



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0023949
(43) 공개일자 2018년03월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/08 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 16/085 (2013.01)

C07K 16/2809 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-7000659

(22) 출원일자(국제) 2016년06월09일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2018년01월09일

(86) 국제출원번호 PCT/US2016/036735

(87) 국제공개번호 WO 2016/201124

국제공개일자 2016년12월15일

(30) 우선권주장

62/173,330 2015년06월09일 미국(US)

(71) 출원인

메모리얼 슬로안-캐터링 캔서 센터

미국, 뉴욕 10065, 뉴욕, 요크 애비뉴 1275

유레카 씨라퓨틱스, 인코포레이티드

미국 94608 캘리포니아주 에머리빌 스위트 370 호
턴 스트리트 5858

(72) 발명자

체옹, 나이-콩, 브이.

미국 10065 뉴욕주 뉴욕 요크 애비뉴 1275 메모리
얼 슬로안 캐터링 캔서 센터 내

아메드, 마히우딘

미국 10065 뉴욕주 뉴욕 요크 애비뉴 1275 메모리
얼 슬로안 캐터링 캔서 센터 내

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 김영

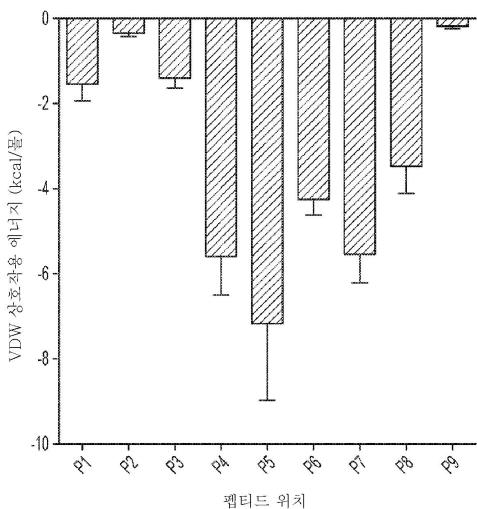
전체 청구항 수 : 총 36 항

(54) 발명의 명칭 인간 HLA에 의해 제시된 EBV 잠복성 막 단백질 2A 웹티드에 특이적인 T 세포 수용체-유사 항체 작용제

(57) 요약

HLA I류 분자, 특히 HLA-A02에 의해 제시된 엡스타인-바 바이러스(EBV) 잠복 막 단백질 2 (LMP2) 웹티드를 결합하는 항체, 그의 단편 및 다중특이적 결합체가 본원에 기재되고 있다. HLA-A02에 의해 제시된 EBV-LMP2 웹티드의 발현을 특징으로 하는 질환, 특히 버켓 림프종, 호지킨 림프종 및 비인두 암종의 검출, 예방 및/또는 치료를 위한 동일물 또는 그 조성물의 사용 방법이 또한 제공된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/21 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/32 (2013.01)

C07K 2317/34 (2013.01)

C07K 2317/56 (2013.01)

C07K 2317/732 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

로페즈-알바이테로, 안드레스

미국 10065 뉴욕주 뉴욕 요크 애비뉴 1275 메모리
얼 슬로안 케터링 캔서 센터 내

리우, 청

미국 94608 캘리포니아주 에머리빌 디344 코모도어
드라이브 4

리우, 흥

미국 94608 캘리포니아주 에머리빌 스위트 370 호
턴 스트리트 5858 유레카 쎄라퓨틱스, 인코포레이
티드 내

시양, 징이

미국 94608 캘리포니아주 에머리빌 스위트 370 호
턴 스트리트 5858 유레카 쎄라퓨틱스, 인코포레이
티드 내

얀, 수

미국 94608 캘리포니아주 에머리빌 스위트 370 호
턴 스트리트 5858 유레카 쎄라퓨틱스, 인코포레이
티드 내

명세서

청구범위

청구항 1

EBV-LMP2/HLA 펩티드 복합체를 결합하는 인간 항체 제제로, 여기서 인간 항체 제제는 EBV-LMP2 펩티드 내의, 1번 위치, 5번 위치, 8번 위치, 및 이들의 조합으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 위치에서 아미노산 잔기와 직접 상호작용하는, 인간 항체 제제.

청구항 2

EBV-LMP2/HLA 펩티드 복합체를 결합하는 인간 항체 제제로, 여기서 인간 항체 제제는 약 2.0 내지 약 170 nM의 K_D 를 갖는, 인간 항체 제제.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, EBV-LMP2 펩티드는 CLGGGLTMV (서열번호 1)이거나 이를 포함하는 아미노산 서열을 갖는, 인간 항체 제제.

청구항 4

제3항에 있어서, 인간 항체 제제는 EBV-LMP2 펩티드 내의, 위치 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 및 이들의 조합으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 위치에서 아미노산 잔기와 직접 상호작용하는, 인간 항체 제제.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 항체 제제는

- (a) 중쇄 서열번호 31의 CDR1, 서열번호 33의 CDR2 및 서열번호 35의 CDR3를 포함하고; 여기서 인간 항체 제제는 경쇄 서열번호 73의 CDR1, 서열번호 75의 CDR2 및 서열번호 77의 CDR3을 포함하고;
- (b) 중쇄 서열번호 37의 CDR1, 서열번호 39의 CDR2 및 서열번호 41의 CDR3를 포함하고; 여기서 인간 항체 제제는 경쇄 서열번호 79의 CDR1, 서열번호 81의 CDR2 및 서열번호 83의 CDR3을 포함하고;
- (c) 중쇄 서열번호 43의 CDR1, 서열번호 45의 CDR2 및 서열번호 47의 CDR3를 포함하고; 여기서 인간 항체 제제는 경쇄 서열번호 85의 CDR1, 서열번호 87의 CDR2 및 서열번호 89의 CDR3을 포함하고;
- (d) 중쇄 서열번호 49의 CDR1, 서열번호 51의 CDR2 및 서열번호 53의 CDR3를 포함하고; 여기서 인간 항체 제제는 경쇄 서열번호 91의 CDR1, 서열번호 93의 CDR2 및 서열번호 95의 CDR3을 포함하고;
- (e) 중쇄 서열번호 55의 CDR1, 서열번호 57의 CDR2 및 서열번호 59의 CDR3를 포함하고; 여기서 인간 항체 제제는 경쇄 서열번호 97의 CDR1, 서열번호 99의 CDR2 및 서열번호 101의 CDR3을 포함하고;
- (f) 중쇄 서열번호 61의 CDR1, 서열번호 63의 CDR2 및 서열번호 65의 CDR3를 포함하고; 여기서 인간 항체 제제는 경쇄 서열번호 103의 CDR1, 서열번호 105의 CDR2 및 서열번호 107의 CDR3을 포함하고; 또는
- (g) 중쇄 서열번호 67의 CDR1, 서열번호 69의 CDR2 및 서열번호 71의 CDR3를 포함하고; 여기서 인간 항체 제제는 경쇄 서열번호 109의 CDR1, 서열번호 111의 CDR2 및 서열번호 113의 CDR3을 포함하는, 인간 항체 제제.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 항체 제제는

- (a) 표 3에 보이는 중쇄 가변 영역 서열과 적어도 95% 동일한 서열을 가지는 중쇄 가변 영역, 및
- (b) 표 3에 보이는 경쇄 가변 영역 서열과 적어도 95% 동일한 서열을 가지는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 인간 항체 제제.

청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 항체 제제는

- (a) 서열번호 3의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 5의 중쇄 가변 영역;
- (b) 서열번호 7의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 9의 중쇄 가변 영역;
- (c) 서열번호 11의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 13의 중쇄 가변 영역;
- (d) 서열번호 15의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 17의 중쇄 가변 영역;
- (e) 서열번호 19의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 21의 중쇄 가변 영역;
- (f) 서열번호 23의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 25의 중쇄 가변 영역; 또는
- (g) 서열번호 27의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 29의 중쇄 가변 영역을 포함하는, 인간 항체 제제.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 항체 제제는 말단 만노오스, N-아세틸글루코오스 또는 글루코오스로 탈푸코실화(defucosylated) 및/또는 글리코실화(glycosylated)되는 인간 단일클론 항체인, 인간 항체 제제.

청구항 9

EBV-LMP2/HLA 웨프티드 복합체를 결합하는 인간 항체 제제로, 인간 항체 제제는 EBV-LMP2/HLA 웨프티드 복합체에 대한 친화도를 증가시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하고, 여기서, 인간 항체 제제는

- (a) 참조 웨프티드/HLA 복합체에 대한 친화도 보다 적어도 약 1.6 KA가 높다는 점, 및/또는
- (b) 참조 웨프티드/HLA 복합체에 대한 교차 반응성이 없다는 점을 특징으로 하는, 인간 항체 제제.

청구항 10

제9항에 있어서, 인간 항체 제제는 아미노산 위치 48, 52, 55, 66, 95 및 이들의 조합 중 어느 하나에서 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 인간 항체 제제.

청구항 11

제10항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 치환은 I48V/S52G, P55H, K66R 또는 N95I인, 인간 항체 제제.

청구항 12

제9항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 항체 제제는 아미노산 위치 5, 10, 26, 51, 78 및 이들의 조합 중 어느 하나에서 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, 인간 항체 제제.

청구항 13

제12항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 치환은 V5E, E10D, G26E/I51V 또는 V78A인, 인간 항체 제제.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 항체 제제는 인간 단일클론 항체 또는 그 단편인, 인간 항체 제제.

청구항 15

제14항에 있어서, 인간 단일클론 항체는 IgG1인, 인간 항체 제제.

청구항 16

제14항에 있어서, 인간 단일클론 항체 단편은 scFv인, 인간 항체 제제.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항의 인간 항체 제제를, 전체적으로 또는 부분적으로, 암호화하는 단리된 핵산 분자.

청구항 18

EBV-LMP2/HLA 웨프티드 복합체를 결합하는 제1 항원-결합 부위 및 제2 항원-결합 부위를 포함하는 이중특이적 항체.

청구항 19

제18항에 있어서, 이중특이적 항체는 EBV-LMP2 웨프티드 CLGGLLTMV (서열번호 1)로 렐스된 T2 세포에서의 약 0.2 내지 약 135 pM의 EC₅₀를 특징으로 하는, 이중특이적 항체.

청구항 20

제18항 또는 제19항에 있어서, 제1 및/또는 제2 항원-결합 부위는 면역글로불린 분자, scFv, scFab, Fab, Fv 또는 이들의 조합으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는, 이중특이적 항체.

청구항 21

제18항 또는 제19항에 있어서, 제1 및 제2 항원-결합 부위는 그들이 단일 폴리웨프티드 사슬을 형성하도록 구성되어 있는, 이중특이적 항체.

청구항 22

제21항에 있어서, 제1 및 제2 항원-결합 부위는 각각 scFv인, 이중특이적 항체.

청구항 23

제18항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 항원-결합 부위는 T 세포, B 세포, NK 세포, 수지상 세포, 단핵구, 대식세포, 호중구, 중간엽 줄기세포 및 신경 줄기세포로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 면역 세포를 결합하는, 이중특이적 항체.

청구항 24

제23항에 있어서, 제2 항원-결합 부위는 T 세포 상의 CD3를 결합하는, 이중특이적 항체.

청구항 25

제18항 내지 제24항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체를, 전체적으로 또는 부분적으로, 암호화하는 단리된 핵산 분자.

청구항 26

EBV-LMP2/HLA 웨프티드 복합체를 발현하는 표적 세포를 사멸시키도록 T 세포를 지시하는 방법으로, 상기 방법은 EBV-LMP2/HLA 웨프티드 복합체를 발현하는 하나 이상의 표적 세포를 이중특이적 항체와 접촉시키는 단계를 포함하며, 이중특이적 항체는 EBV-LMP2/HLA 웨프티드 복합체를 결합하는 제1 항원-결합 부위 및 T 세포 상의 CD3를 결합하는 제2 항원-결합 부위를 포함하고,

상기 접촉은 이중특이적 항체가 결합한 T 세포가 표적 세포의 사멸을 매개하기에 충분한 조건 및 시간 동안 수행되는, 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, EBV-LMP2 웨프티드는 CLGGLLTMV (서열번호 1)이거나 이를 포함하는, 방법.

청구항 28

제26항 또는 제27항에 있어서, 이중특이적 항체의 제1 항원-결합 부위는 EBV-LMP2 웨티드 내의, 위치 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 및 이들의 조합으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 위치에서 아미노산 잔기와 직접 상호작용하는, 방법.

청구항 29

HLA-A02 분자에 의해 제시되는 EBV-LMP2 웨티드 CLGGLTMV (서열번호 1)에 결합하는 제1 scFv, 및

T 세포 상의 CD3를 결합하는 제2 scFv를 포함하는 이중특이적 항체로,

여기서 이중특이적 항체는 EBV-LMP2 웨티드로 필스되는 T2 세포에서 약 0.2 내지 약 135 pM의 EC₅₀를 특징으로 하는, 이중특이적 항체.

청구항 30

제29항에 있어서, 제1 scFv는

- (a) 서열번호 3의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 5의 중쇄 가변 영역;
- (b) 서열번호 7의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 9의 중쇄 가변 영역;
- (c) 서열번호 11의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 13의 중쇄 가변 영역;
- (d) 서열번호 15의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 17의 중쇄 가변 영역;
- (e) 서열번호 19의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 21의 중쇄 가변 영역;
- (f) 서열번호 23의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 25의 중쇄 가변 영역; 또는
- (g) 서열번호 27의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 29의 중쇄 가변 영역을 포함하는, 이중특이적 항체.

청구항 31

제29항 또는 제30항에 있어서, HLA-A02 분자는 HLA-A*02:01, HLA-A*02:02, HLA-A*02:03, HLA-A*02:04, HLA-A*02:05 및 HLA-A*02:06로부터 선택되는, 이중특이적 항체.

청구항 32

제29항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이적 항체의 제1 scFv는 EBV-LMP2 웨티드의 적어도 5번 위치와 직접 상호작용하는, 이중특이적 항체.

청구항 33

EBV-LMP2/HLA 웨티드 복합체를 결합하는 인간 항체 제제의 항원-결합 부위를 포함하는 키메라 항원 수용체.

청구항 34

관심있는 인간 HLA I 류 분자에 의해 제시되는 웨티드의 중심 잔기를 결합하는 항체 제제를 집단에서 선택하는 방법으로, 상기 방법은

- (a) 관심있는 웨티드/HLA I 류 복합체를 결합하는 하나 이상의 항체 제제를 집단에서 선택하는 단계; 및
- (b) 1번 위치, 5번 위치, 8번 위치, 및 이들의 조합으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 잔기에서 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 웨티드를 포함하는 웨티드/HLA I 류 복합체를 결합하기 위해 (a)로부터의 하나 이상의 항체 제제를 스크리닝하는 단계를 포함하고;

여기서 5번 위치에서 치환을 갖는 웨티드를 포함하는 웨티드/HLA I 류 복합체에 대한 항체 제제의 결합의 순서는 인간 HLA I 류 분자에 의해 제공되는 웨티드의 중심 잔기를 결합하는 항체 제제를 나타내는, 방법.

청구항 35

관심있는 인간 HLA I 류 분자에 의해 제시되는 웨티드의 중심 잔기를 결합하는 항체 제제를 집단에서 선택하는 방법으로, 상기 방법은

(a) 제1 펩티드/HLA I 류 복합체를 결합하지 않는 하나 이상의 항체 제제를 집단에서 선택하는 단계로, 이때 제1 펩티드/HLA I 류 복합체는 5번 위치에서 아미노산 치환 및/또는 펩티드의 N- 및/또는 C-말단에서 추가 아미노산을 갖는 펩티드를 포함하는, 단계; 및

(b) 제2 펩티드/HLA I 류 복합체를 결합하기 위해 (a)로부터의 하나 이상의 항체 제제를 스크리닝하는 단계를 포함하고, 여기서 제2 펩티드/HLA I 류 복합체는 관심있는 야생형 서열을 갖는 펩티드를 포함하고;

여기서 제2 펩티드/HLA I 류 복합체에 대한 항체 제제의 결합은 인간 HLA I 류 분자에 의해 제시되는 펩티드의 중심 잔기를 결합하는 항체 제제를 나타내는, 방법.

청구항 36

EBV-LMP2/HLA 펩티드 복합체의 발현을 특징으로 하는 대상 내의 의학적 상태를 치료하는 방법으로, 제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 인간 항체 제제; 제18항 내지 제24항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체, 또는 제33항의 키메라 항원 수용체의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원에 대한 상호 참조

[0002]

본 출원은 2015년 6월 9일자로 출원된, 미국 가출원 번호 62/173,330의 이익을 주장하며, 그 내용은 그 전체가 본 명세서에 통합된다.

[0003]

정부 지원

[0004]

Memorial Sloan Kettering Small-Animal Imaging Core Facility 및 Molecular Cytology Core Facility에서 제공한 기술 서비스는 부분적으로, NIH Cancer Center Support Grant P30 CA008748의 지원을 받았다.

배경 기술

[0005]

T 세포 기반 면역요법은 키메라 항원 수용체, 이중특이적 항체 및 체크포인트 차단제 항체(checkpoint blockade antibodies)에 대한 최근 보고서에 의해 입증되는 바와 같이 암 치료에 매우 효과적이다. 키메라 항원 수용체와 이중특이적 항체 모두 표면 항원의 항체-기반 표적화에 의존해 왔다. 하지만, T 세포 수용체 (TCR)-기반 접근법은 부분적으로는 종양 특이적 T 세포의 클론 빈도 또는 클론 결실이 불충분한 것으로 인해 개발이 느려졌으며 항체 라이브러리 및 플랫폼 기술의 급속한 발전으로 인해 축소되었다. 불행하게도, 임상적으로 승인된 치료용 단일클론 항체는 세포 표면 단백질의 구조를 인식한다. 또한, 항체 기반 표적 가능한 항원의 수는 제한되어 있다. 국립 암연구소(NCI) 암 항원 우선 순위 목록에 있는 후보자 중에서, 대다수는 세포질 구획에서 발견된다. 그러한 후보를 표적으로 하는 항체 제재의 개발은 여전히 어려운 과제이다.

발명의 내용

[0006]

본 발명은, 다른 것들 중에서, 인간 MHC (예를 들어, I 유) 분자와 관련하여 엠스타인-바 바이러스(Epstein-Barr virus, EBV) 잠복 막 단백질 2 (latent membrane protein 2, LMP2) 펩티드를 결합하는 인간 항체 제제 (및 그의 친화도 성숙 버전)를 제공한다. 일부 실시예에서, 제공된 항체 제제는 펩티드-MHC I 유 (예를 들어, HLA-A02) 결합 포켓에서 EBV-LMP2 펩티드의 중심부 (예를 들어, 중심 펩티드 위치)에 대한 높은 특이성을 입증한다. 일부 실시예에서, 제공된 항체 제제는 펩티드-MHC I 유 결합 포켓에서 EBV-LMP2 펩티드의 말단부 (예를 들어, 말단 펩티드 위치)에 대한 높은 특이성을 입증한다. 일부 실시예에서, 제공된 항체 제제는 그들의 표면에서 HLA-A02 분자를 경유하여 EBV-LMP2 펩티드를 운반하는 표적 세포의 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC)을 효과적으로 수행한다. 일부 실시예에서, 제공된 항체 제제는 MHC 분자 (예를 들어, MHC I 유 분자)의 결합 포켓에 제시되는 펩티드의 중심부(들)에 대한 높은 특이성을 갖는 항체와 연관된 최적화되지 않은 친화도를 극복한다.

[0007]

일부 실시예에서, 본 발명은 또한 EBV-LMP2/HLA-A02 복합체를 결합하는 인간 항체 제제를 제공한다. 일부 실시예에서, 제공된 항체 제제는 EBV-LMP2/HLA-A02 복합체 내의 EBV-LMP2 펩티드의 중심부 (예를 들어, 5번 위치)를 결합한다. 일부 실시예에서, 제공된 항체 제제는 EBV-LMP2/HLA-A02 복합체 내의 EBV-LMP2 펩티드의 1번 위치 (P1), 5번 위치 (P5), 8번 위치 (P8), 및/또는 이들의 조합을 결합한다. 일부 실시예에서, 제공된 항체 제제는

EBV-LMP2/HLA-A02 복합체 내의 EBV-LMP2 웨티드의 1-5번 위치 (P1-P5), 4-7번 위치 (P4-P7) 또는 4-8번 위치 (P4-P8)를 결합한다.

[0008] 본 발명은 또한 특정한 표적과 상호작용하는 결합 모이어티를 포함하는 다중특이적 결합체를 제공한다. 많은 실시예에서, 그러한 결합 모이어티는 항체 성분이거나 이를 포함하고 있다. 일부 실시예에서, 다중특이적 결합체는 이중특이적 결합체 (예를 들어, 이중특이적 항체)이다. 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적 결합체는 웨티드-MHC (예를 들어, MHC I 류) 결합 포켓에서 EBV-LMP2 웨티드의 중심부 및/또는 말단부에 대한 높은 특이성을 갖는 항체 성분을 포함하고 있다. 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적 결합체는 웨티드-MHC I 류 결합 포켓 (예를 들어, HLA-A02 결합 포켓)에서 EBV-LMP2 웨티드에 대한 높은 특이성을 갖는 항체 성분에 기반하는 제1 결합 모이어티 및 면역 효과기 세포 (예를 들어, T 세포)와 상호작용하는 제2 결합 모이어티를 포함한다. 일부 실시예에서, 제공된 다중특이적 결합체는 EBV⁺ 및 종양 세포주에 대한 세포독성 분석에서 높은 효능을 갖는다. 일부 실시예에서, 제공된 다중특이적 결합체는 TCR-유사 단일클론 항체와 연관된 낮은 친화도 장벽을 극복한다. 이러한 제공된 제제는 본원에 기재된 성분들이 결합된 모체 결합체에 비해 개선된 기능적 특징을 갖는다.

[0009] 본 발명은 또한 웨티드-MHC 결합 포켓 (예를 들어, MHC I 류 결합 포켓)에서 EBV-LMP2 웨티드를 결합하는 항체 제제 및/또는 다중특이적 결합체를 생성, 선택 및/또는 식별하는 방법을 제공한다. 많은 실시예에서, 본 발명의 방법들은 인간 MHC I 류 분자 (예를 들어, HLA-A02 분자)에 의해 제시되는 EBV-LMP2 웨티드의 중심부 및/또는 말단부를 결합하는 항체 제제 및/또는 다중특이적 결합체를 생성, 선택 및/또는 식별하는 단계를 포함한다.

[0010] 일부 실시예에서, 방법들은 MHC I 류 분자에 의해 제시되는 웨티드의 중심부 및/또는 말단부에서 비-천연 아미노산 치환을 갖는 웨티드의 결합 (또는 결합의 부재)에 기반하여 항체 제제를 선택하는 단계를 포함한다. 일부 실시예에서, 방법들은 MHC I 류 분자에 의해 제시되는 웨티드의 중심부 및/또는 말단부에서 비-천연 아미노산 치환을 가지고 N- 및/또는 C-말단에서 잉여 천연 측부 잔기를 추가로 갖는 웨티드의 결합의 부재에 기반하여 항체 제제를 선택하는 단계를 포함한다. 일부 실시예에서, 방법들은 웨티드의 중심부 외부의 위치(들) (예를 들어, 5번 위치)에서 웨티드의 결합에 기반하여 항체 제제를 음성적으로 선택하는 단계를 포함한다. 일부 실시예에서, 웨티드의 중심부 외부의 웨티드 위치들은 돌연변이된다. 일부 실시예에서, 웨티드는 9량체 또는 10량체 웨티드이다. 많은 실시예에서, MHC I 류 분자는 인간 HLA-A02 분자이다.

[0011] 일부 실시예에서, 본 발명은 EBV-LMP2/HLA 웨티드 복합체를 결합하는 인간 항체 제제를 제공하고, 여기서 인간 항체 제제는 EBV-LMP2 웨티드에서, 1번 위치, 5번 위치, 8번 위치, 및 이들의 조합으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 위치에서 아미노산 잔기와 직접 상호작용한다.

[0012] 일부 실시예에서, 본 발명은 EBV-LMP2/HLA 웨티드 복합체를 결합하는 인간 항체 제제를 제공하고, 여기서 인간 항체 제제는 약 2.0 내지 약 170 nM의 K_D를 갖는다.

[0013] 일부 실시예에서, EBV-LMP2 웨티드는 CLGGLLTMV (서열번호 1)이거나 이를 포함하는 아미노산 서열을 갖는다.

[0014] 일부 실시예에서, 인간 항체 제제는 EBV-LMP2 웨티드에서, 위치 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 및 이들의 조합으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 위치에서 아미노산 잔기와 직접 상호작용한다.

[0015] 일부 실시예에서, 인간 항체 제제는 중쇄 서열번호 31의 CDR1, 서열번호 33의 CDR2 및 서열번호 35의 CDR3를 포함하고; 여기서 인간 항체 제제는 경쇄 서열번호 73의 CDR1, 서열번호 75의 CDR2 및 서열번호 77의 CDR3을 포함한다. 일부 실시예에서, 인간 항체 제제는 중쇄 서열번호 37의 CDR1, 서열번호 39의 CDR2 및 서열번호 41의 CDR3를 포함하고; 여기서 인간 항체 제제는 경쇄 서열번호 79의 CDR1, 서열번호 81의 CDR2 및 서열번호 83의 CDR3을 포함한다. 일부 실시예에서, 인간 항체 제제는 중쇄 서열번호 43의 CDR1, 서열번호 45의 CDR2 및 서열번호 47의 CDR3를 포함하고; 여기서 인간 항체 제제는 경쇄 서열번호 85의 CDR1, 서열번호 87의 CDR2 및 서열번호 89의 CDR3을 포함한다. 일부 실시예에서, 인간 항체 제제는 중쇄 서열번호 49의 CDR1, 서열번호 51의 CDR2 및 서열번호 53의 CDR3를 포함하고; 여기서 인간 항체 제제는 경쇄 서열번호 91의 CDR1, 서열번호 93의 CDR2 및 서열번호 95의 CDR3를 포함한다. 일부 실시예에서, 인간 항체 제제는 중쇄 서열번호 55의 CDR1, 서열번호 57의 CDR2 및 서열번호 59의 CDR3를 포함하고; 여기서 인간 항체 제제는 경쇄 서열번호 97의 CDR1, 서열번호 99의 CDR2 및 서열번호 101의 CDR3를 포함한다. 일부 실시예에서, 인간 항체 제제는 중쇄 서열번호 61의 CDR1, 서열번호 63의 CDR2 및 서열번호 65의 CDR3를 포함하고; 여기서 인간 항체 제제는 경쇄 서열번호 103의 CDR1, 서열번호 105의 CDR2 및 서열번호 107의 CDR3를 포함한다. 일부 실시예에서, 인간 항체 제제는 중쇄 서열번호 67의 CDR1, 서열번호 69의 CDR2 및 서열번호 71의 CDR3를 포함하고; 여기서 인간 항체 제제는 경쇄 서열번호 109의 CDR1, 서열번호 111의 CDR2 및 서열번호 113의 CDR3를 포함한다.

- [0016] 일부 실시예에서, 인간 항체 제제는 중쇄 CDR 및/또는 경쇄 CDR에서 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 소정의 실시예에서, 인간 항체 제제는 중쇄 CDR 및/또는 경쇄 CDR에서 적어도 1개 또는 최대 5개의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 소정의 실시예에서, 인간 항체 제제는 중쇄 CDR 및/또는 경쇄 CDR에서 적어도 1개 또는 최대 3개의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0017] 일부 실시예에서, 인간 항체 제제는 표 3에 보이는 중쇄 가변 영역 서열과 적어도 95% 동일한 서열을 가지는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시예에서, 인간 항체 제제는 표 3에 보이는 경쇄 가변 영역 서열과 적어도 95% 동일한 서열을 가지는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시예에서, 인간 항체 제제는 (a) 표 3에 보이는 중쇄 가변 영역 서열과 적어도 95% 동일한 서열을 가지는 중쇄 가변 영역 및 (b) 표 3에 보이는 경쇄 가변 영역 서열과 적어도 95% 동일한 서열을 가지는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시예에서, 인간 항체 제제는 표 3에서 선택되는 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0018] 일부 실시예에서, 인간 항체 제제는 서열번호 3의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 5의 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시예에서, 인간 항체 제제는 서열번호 7의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 9의 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시예에서, 인간 항체 제제는 서열번호 11의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 13의 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시예에서, 인간 항체 제제는 서열번호 15의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 17의 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시예에서, 인간 항체 제제는 서열번호 19의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 21의 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시예에서, 인간 항체 제제는 서열번호 23의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 25의 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시예에서, 인간 항체 제제는 서열번호 27의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 29의 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0019] 일부 실시예에서, 인간 항체 제제는 말단 만노오스, N-아세틸글루코오스 또는 글루코오스로 탈푸코실화(defucosylated) 및/또는 글리코실화(glycosylated)되는 인간 단일클론 항체이다.
- [0020] 일부 실시예에서, 본 발명은 EBV-LMP2/HLA 웨პ티드 복합체를 결합하는 인간 항체 제제를 제공하고, 인간 항체 제제는 EBV-LMP2/HLA 웨პ티드 복합체에 대한 친화도를 증가시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하고, 여기서, 인간 항체 제제는 (a) 참조 웨პ티드/HLA 복합체에 대한 친화도 보다 적어도 약 1.6 KA 높다는 점, 및/또는 (b) 참조 웨პ티드/HLA 복합체에 대한 교차 반응성이 없다는 점을 특징으로 한다. 일부 실시예에서, 인간 항체 제제는 (a) 참조 웨პ티드/HLA 복합체에 대한 친화도 보다 적어도 약 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 또는 적어도 약 9.0 KA 높다는 점, 및/또는 (b) 참조 웨პ티드/HLA 복합체에 대한 교차 반응성이 없다는 점을 특징으로 한다.
- [0021] 일부 소정의 실시예에서, 인간 항체 제제는 아미노산 위치 48, 52, 55, 66, 95 및 이들의 조합 중 어느 하나에서 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시예에서, 하나 이상의 아미노산 치환은 I48V/S52G, P55H, K66R 또는 N95I이다.
- [0022] 일부 소정의 실시예에서, 인간 항체 제제는 아미노산 위치 5, 10, 26, 51, 78 및 이들의 조합 중 어느 하나에서 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시예에서, 하나 이상의 아미노산 치환은 V5E, E10D, G26E/I51V 또는 V78A이다.
- [0023] 다양한 실시예에서, 인간 항체 제제는 인간 단일클론 항체 또는 그 단편이다. 일부 실시예에서, 인간 단일클론 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 항체이다. 일부 소정의 실시예에서, 인간 단일클론 항체는 IgG1이다. 일부 실시예에서, 인간 단일클론 항체 단편은 scFv이다.
- [0024] 일부 실시예에서, 본 발명은 EBV-LMP2/HLA 웨პ티드 복합체를 결합하는 제1 항원-결합 부위 및 제2 항원-결합 부위를 포함하는 이중특이적 항체를 제공한다.
- [0025] 일부 실시예에서, 이중특이적 항체는 EBV-LMP2 웨პ티드 CLGGLLTMV (서열번호 1)로 펠스된 T2 세포에서의 약 0.2 내지 약 135 pM의 EC₅₀를 특징으로 한다. 일부 실시예에서, 이중특이적 항체는 약 10 내지 약 130 nM의 K_D를 가진다.
- [0026] 일부 실시예에서, 제1 및/또는 제2 항원-결합 부위는 면역글로불린 분자, scFv, scFab, Fab, Fv 또는 이들의 조합으로 이루어지는 그룹으로부터 선택된다. 일부 실시예에서, 제1 및 제2 항원-결합 부위는 그들이 단일 폴리펩

티드 사슬을 형성하도록 구성되어 있다. 일부 실시예에서, 제1 및 제2 항원-결합 부위는 각각 scFv이다. 일부 실시예에서, 제1 및 제2 항원-결합 부위는 웨티드 링커에 의해 연결된다. 일부 실시예에서, 제2 항원-결합 부위는 제1 항원-결합 부위의 C-말단 단부에 연결된다.

- [0027] 일부 실시예에서, 제2 항원-결합 부위는 T 세포, B 세포, NK 세포, 수지상 세포, 단핵구, 대식세포, 호중구, 중간엽 줄기세포 및 신경 줄기세포로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 면역 세포를 결합한다. 일부 소정의 실시예에서, 제2 항원-결합 부위는 T 세포 상의 CD3를 결합한다. 일부 실시예에서, 제2 항원-결합 부위는 서열번호 124이거나 이를 포함한다.
- [0028] 일부 실시예에서, 본 발명은 HLA-A02 분자에 의해 제시되는 EBV-LMP2 웨티드 CLGGLTMV (서열번호 1)에 결합하는 제1 scFv, 및 T 세포 상의 CD3를 결합하는 제2 scFv를 포함하는 이중특이적 항체를 제공하고, 여기서 이중특이적 항체는 EBV-LMP2 웨티드로 펠스되는 T2 세포에서 약 0.2 내지 약 135 pM의 EC₅₀를 특징으로 한다.
- [0029] 일부 실시예에서, 제1 scFv는 (a) 서열번호 3의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 5의 중쇄 가변 영역; (b) 서열번호 7의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 9의 중쇄 가변 영역; (c) 서열번호 11의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 13의 중쇄 가변 영역; (d) 서열번호 15의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 17의 중쇄 가변 영역; (e) 서열번호 19의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 21의 중쇄 가변 영역; (f) 서열번호 23의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 25의 중쇄 가변 영역; 또는 (g) 서열번호 27의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 29의 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0030] 일부 실시예에서, 제2 scFv는 제1 scFv의 C-말단 단부에 연결된다. 일부 소정의 실시예에서, 제2 scFv는 서열번호 124이거나 이를 포함한다.
- [0031] 일부 실시예에서, 이중특이적 항체의 제1 scFv는 EBV-LMP2 웨티드에서, 위치 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 및 이들의 조합으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 위치에서 아미노산 잔기와 직접 상호작용한다. 일부 실시예에서, 이중특이적 항체의 제1 scFv는 EBV-LMP2 웨티드의 적어도 1번 위치, 적어도 5번 위치, 또는 적어도 8번 위치와 직접 상호작용한다.
- [0032] 일부 실시예에서, 본 발명은 EBV-LMP2/HLA 웨티드 복합체를 결합하는 인간 항체 제제의 항원-결합 부위를 포함하는 키메라 항원 수용체를 제공한다.
- [0033] 일부 실시예에서, 항원-결합 부위는 scFv이다. 일부 실시예에서, 항원-결합 부위는 면역 효과기 세포에 의해 발현된다. 일부 실시예에서, 면역 효과기 세포는 T 세포이다.
- [0034] 일부 실시예에서, 본 발명은 본원에 기재된 인간 항체 제제, 이중특이적 항체, 또는 키메라 항원 수용체를, 전체적으로 또는 부분적으로, 암호화하는 단리된 핵산 분자를 제공한다.
- [0035] 일부 실시예에서, 본 발명은 본원에 기재된 핵산 분자를 암호화하는 재조합 백터를 제공한다.
- [0036] 일부 실시예에서, 본 발명은 본원에 기재된 재조합 백터 또는 본원에 기재된 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 일부 실시예에서, 숙주 세포는 박테리아, 효모, 곤충 또는 포유류 세포로부터 선택된다. 일부 실시예에서, 숙주 세포는 *E.coli*, *P.파스토리스*(*P.pastoris*), Sf9, COS, HEK293, CHO 및 포유류 림프구로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일부 소정의 실시예에서, 포유류 림프구는 인간 림프구이다.
- [0037] 일부 실시예에서, 본 발명은 본원에 기재된 인간 항체 제제, 이중특이적 항체, 또는 키메라 항원 수용체를 생산하기 위한 방법을 제공하며, 본원에 기재된 숙주 세포를 인간 항체 제제, 이중특이적 항체, 또는 키메라 항원 수용체의 발현에 적합한 조건 하에 배양 배지에서 배양하는 단계, 및 인간 항체 제제, 이중특이적 항체, 또는 키메라 항원 수용체 (또는 키메라 항원 수용체를 발현하는 숙주 세포)를 상기 배양 배지로부터 회수하는 단계를 포함한다.
- [0038] 일부 실시예에서, 본 발명은 본원에 기재된 인간 항체 제제, 이중특이적 항체, 또는 키메라 항원 수용체를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0039] 일부 실시예에서, 본 발명은 본원에 기재된 인간 항체 제제, 이중특이적 항체, 또는 키메라 항원 수용체, 또는 본원에 기재된 조성물을 포함하고, 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 추가로 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0040] 일부 실시예에서, 본 발명은 본원에 기재된 인간 항체 제제, 이중특이적 항체, 또는 키메라 항원 수용체를 포함하는 키트를 제공한다.

- [0041] 일부 실시예에서, 본 발명은 EBV-LMP2/HLA 웨티드 복합체의 발현을 특징으로 하는 대상 내의 의학적 상태를 치료하는 방법을 제공하며, 본원에 기재된 인간 항체 제제, 이중특이적 항체, 키메라 항원 수용체 (또는 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 효과기 세포), 본원에 기재된 조성물, 또는 본원에 기재된 약제학적 조성물의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0042] 일부 실시예에서, 의학적 상태는 호지킨병(Hodgkin' disease), 비-호지킨병 또는 감염성 단핵구증이다. 일부 실시예에서, 의학적 상태는 버킷 림프종(Burkitt' lymphoma), 면역 억제성 림프종, 미만성 거대 B-세포 림프종 (diffuse large B-cell lymphom), 만성 염증과 연관된 미만성 거대 B-세포 림프종, 림프종양 육아종증 (lymphomatoid granulomatosis), 형질모세포 림프종, 원발성 삼출성 림프종(primary effusion lymphoma), 이식 후 림프 증식성 질환, 비인두 암종, 위 선암종, 림프상피종양-연관 암종 (lymphanepithelioma-associated carcinoma), 및 면역 결핍-관련 평활근 육종으로부터 선택된다.
- [0043] 일부 실시예에서, 본 발명은 EBV 감염과 관련된 상태의 치료 또는 검출을 위한 본원에 기재된 인간 항체 제제, 이중특이적 항체 또는 키메라 항원 수용체 (또는 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 효과기 세포)의 용도를 제공한다.
- [0044] 일부 실시예에서, 본 발명은 EBV-LMP2/HLA 웨티드 복합체를 발현하는 표적 세포를 사멸시키도록 T 세포를 자시하는 방법을 제공하되, 본 방법은 EBV-LMP2/HLA 웨티드 복합체를 발현하는 하나 이상의 표적 세포를 본원에 기재된 이중특이적 항체와 접촉시키는 단계를 포함하며, 상기 접촉은 이중특이적 항체가 결합한 T 세포가 표적 세포의 사멸을 매개하기에 충분한 조건 및 시간 동안 수행된다. 일부 실시예에서, 이중특이적 항체는 EBV-LMP2/HLA 웨티드 복합체를 결합하는 제1 항원-결합 부위 및 T 세포 상의 CD3를 결합하는 제2 항원-결합 부위를 포함한다.
- [0045] 일부 실시예에서, EBV-LMP2 웨티드는 CLGGLTMV (서열번호 1)이거나 이를 포함한다. 일부 실시예에서, 이중특이적 항체의 제1 항원-결합 부위는 EBV-LMP2 웨티드에서, 위치 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 및 이들의 조합으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 위치에서 아미노산 잔기와 직접 상호작용한다.
- [0046] 일부 실시예에서, 본 발명은 관심있는 인간 HLA I 류 분자에 의해 제시되는 웨티드의 중심 잔기를 결합하는 항체 제제를 집단에서 선택하는 방법을 제공하되, 본 방법은 (a) 관심있는 웨티드-HLA I 류 복합체를 결합하는 하나 이상의 항체 제제를 집단에서 선택하는 단계; 및 (b) 1번 위치, 5번 위치, 8번 위치, 및 이들의 조합으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 잔기에서 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 웨티드를 포함하는 웨티드-HLA I 류 복합체를 결합하기 위해 (a)로부터의 하나 이상의 항체 제제를 스크리닝하는 단계를 포함하고; 여기서 5번 위치에서 치환을 갖는 웨티드를 포함하는 웨티드-HLA I 류 복합체에 대한 항체 제제의 결합의 손실은 인간 HLA I 류 분자에 의해 제공되는 웨티드의 중심 잔기를 결합하는 항체 제제를 나타낸다.
- [0047] 일부 실시예에서, 본 발명은 관심있는 인간 HLA I 류 분자에 의해 제시되는 웨티드의 중심 잔기를 결합하는 항체 제제를 집단에서 선택하는 방법을 제공하되, 본 방법은 (a) 제1 웨티드-HLA I 류 복합체를 결합하지 않는 하나 이상의 항체 제제를 집단에서 선택하는 단계로, 이때 제1 웨티드-HLA I 류 복합체는 5번 위치에서 아미노산 치환 및/또는 웨티드의 N- 및/또는 C-말단에서 추가 아미노산을 갖는 웨티드를 포함하는, 단계; 및 (b) 제2 웨티드-HLA I 류 복합체를 결합하기 위해 (a)로부터의 하나 이상의 항체 제제를 스크리닝하는 단계를 포함하고, 여기서 제2 웨티드-HLA I 류 복합체는 관심있는 야생형 서열을 갖는 웨티드를 포함하고; 여기서 제2 웨티드-HLA I 류 복합체에 대한 항체 제제의 결합은 인간 HLA I 류 분자에 의해 제시되는 웨티드의 중심 잔기를 결합하는 항체 제제를 나타낸다.
- [0048] 일부 실시예에서, 웨티드/HLA I 류 복합체의 웨티드는 엡스타인-바 바이러스 (EBV)-관련 웨티드이다. 일부 실시예에서, 웨티드/HLA I 류 복합체는 EBV-LMP2/HLA-A02 복합체이다.
- [0049] 일부 실시예에서, 항체 제제는 인간 단일클론 항체이다. 일부 실시예에서, 항체 제제는 인간 단일클론 항체 단편이다.
- [0050] 일부 실시예에서, 웨티드/HLA 복합체를 결합하는 고 친화도 인간 단일클론 항체를 제공하는 방법에 있어서, 본 발명은 웨티드/HLA 복합체에서 웨티드의 중심에서 하나 이상의 아미노산과 직접 상호작용하거나 이를 선호하는 인간 단일클론 항체를 제공하는 것을 포함하는 개선을 제공한다.
- [0051] 일부 실시예에서, 웨티드/HLA 복합체를 결합하는 고 친화도 인간 단일클론 항체를 제공하는 방법에 있어서, 본 발명은 HLA 결합 포켓에서 웨티드의 중심에서 하나 이상의 아미노산과 직접 상호작용하거나 이를 선호하는 인간

단일클론 항체를 제공하는 것을 포함하는 개선을 제공하고, 여기서 펩티드/HLA 복합체는 *인 실리코(in silico)* 예측 방법을 사용하여 생성되지 않는다.

[0052] 일부 실시예에서, 제1 및 제2 항원-결합 부위를 포함하는 이중특이적 항체를 포함하는 고 친화도 이중특이적 항체 조성물을 제공하며, 제1 항원-결합 부위는 펩티드/HLA 복합체를 결합하는, 방법에 있어서, 본 발명은 펩티드/HLA 복합체에서 펩티드의 중심에서 하나 이상의 아미노산과 직접 상호작용하는 인간 단일클론 항체 또는 그 단편으로서 이러한 제1 항원-결합 부위 중 적어도 하나를 제공하는 것을 포함하는 개선을 제공한다.

[0053] 일부 실시예에서, 하나 이상의 항원-결합 부위를 포함하는 키메라 항원 수용체 조성물을 제공하며, 하나 이상의 항원-결합 부위 중 적어도 하나는 펩티드/HLA 복합체를 결합하는, 방법에 있어서, 본 발명은 HLA 결합 포켓에서 펩티드의 중심에서 하나 이상의 아미노산과 직접 상호작용하는 인간 항체 제제의 항원-결합 부위를 제공하는 것을 포함하는 개선을 제공한다. 일부 소정의 실시예에서, 키메라 항원 수용체 조성물은 면역 효과기 세포에 의해 발현된다. 일부 실시예에서, 면역 효과기 세포는 T 세포이다.

[0054] 다양한 실시예에서, HLA는 I 류 HLA 분자이다.

[0055] 다양한 실시예에서, 펩티드는 9량체 펩티드이다.

[0056] 다양한 실시예에서, 펩티드는 10량체 펩티드이다.

[0057] 다양한 실시예에서, 펩티드는 엠스타인-바 바이러스 (EBV)-관련 펩티드이다.

[0058] 다양한 실시예에서, 펩티드/HLA 복합체는 EBV-LMP2/HLA-A02 복합체이다.

[0059] 다양한 실시예에서, EBV-LMP2/HLA 펩티드 복합체의 HLA는 HLA I 류 분자이다. 다양한 실시예에서, HLA I 류 분자는 HLA-A02이다. 다양한 실시예에서, HLA-A02는 HLA-A*02:01, HLA-A*02:02, HLA-A*02:03, HLA-A*02:04, HLA-A*02:05 및 HLA-A*02:06로부터 선택된다.

[0060] 일부 실시예에서, 본 발명은 의약에 사용하기 위한 약제의 제조에서 본원에 기재된 인간 항체 제제, 이중특이적 항체, 또는 키메라 항원 수용체 (또는 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 효과기 세포)의 용도를 제공한다.

[0061] 일부 실시예에서, 본 발명은 진단 테스트 또는 분석에 사용하기 위한 약제의 제조에서 본원에 기재된 인간 항체 제제, 이중특이적 항체, 또는 키메라 항원 수용체 (또는 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 효과기 세포)의 용도를 제공한다.

[0062] 일부 실시예에서, 본 발명은 암의 진단 또는 치료에 사용하기 위한 약제의 제조에서 본원에 기재된 인간 항체 제제, 이중특이적 항체, 또는 키메라 항원 수용체 (또는 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 효과기 세포)의 용도를 제공한다.

[0063] 일부 실시예에서, 본 발명은 EBV-LMP2/HLA 펩티드 복합체의 발현을 특징으로 하는 의학적 상태의 진단 또는 치료에 사용하기 위한 약제의 제조에서 본원에 기재된 인간 항체 제제, 이중특이적 항체, 또는 키메라 항원 수용체 (또는 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 효과기 세포)의 용도를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0064] 본원에 포함된 도면은, 다음의 도면들로 이루어지며, 단지 예시를 위한 것일 뿐이다.

도 1은 T 세포 수용체:9량체-펩티드/MHC I 류 복합체의 잔기 당 반데르 발스 상호작용 에너지 평균을 나타내는 그래프이다. 펩티드 위치 (P1, P2 등)는 그래프의 x-축에 표시된다.

도 2는 T 세포 수용체:10량체-펩티드/MHC I 류 복합체의 잔기 당 반데르 발스 상호작용 에너지 평균을 나타내는 그래프이다. 펩티드 위치 (P1, P2 등)는 그래프의 x-축에 표시된다.

도 3은 단량체 EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01 펩티드 복합체의 정제 중 관찰된 다양한 종을 도시한 크기 배제 크로마토그램을 보여준다.

도 4는 단량체 EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01 펩티드 복합체의 환원(좌) 및 비환원(우) 조건 하에서 SDS-PAGE 이미지를 보여준다. 단량체 (EBV-LMP2/HLA-A*02:01), MHC 분자 (HLA-A*02:01) 및 β_2 마이크로글로불린 ($\beta 2m$)의 위치 뿐만 아니라 각 캘럼에 대한 각 샘플의 신원이 표시된다. 대조군 A 및 B: 무관한 펩티드/HLA-A02 펩티드 복합체.

도 5는 예 2에 기재된 파지 ELISA 분석에서 가용성 EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01 웨პ티드 복합체에 대한 선택된 인간 scFv 클론의 450nm에서의 광학 밀도 (OD_{450})에 대한 예시적인 그래프이다. EXT005: EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01 복합체; EXT007: 대조군 웨პ티드/HLA-A*02:01 복합체; EXT002 대조군 Ab: 양성 대조군 항-HLA-A*02:01 항체; 68-72: 항-EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01 항체 파지 클론. 대조군 웨პ티드: 무관한 웨პ티드.

도 6은 유세포분석법에 의한 EBV-LMP2 웨პ티드-로딩 및 대조군 웨პ티드-로딩된 T2 세포의 예시적인 파지 결합을 보여준다. 대조군 웨პ티드: 무관한 웨პ티드; EXT005-57: 항-EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01 항체 파지 클론; K07: 헬퍼 파지, 파지 음성 대조군; 세포 단독: 마우스 항-M13 단일클론 항체, 및 R-PE 접합된 말 항-마우스 IgG.

도 7은 환원 조건 하에서 EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01 웨პ티드 복합체에 대해 특이적인 scFv로 만든 선택된 전장 인간 IgG1 항체의 SDS-PAGE의 예시적인 이미지를 보여준다.

도 8은 환원 조건 하에서 선택된 항-EBV-LMP2(CLG)/HLA-A02 이중특이적 분자의 SDS-PAGE의 예시적인 이미지를 보여준다. 이중특이적 항체 분자들이 젤 이미지의 각 레인에 표시된다.

도 9는 T2 세포의 표면 상에 EBV-LMP2 웨პ티드의 HLA-A02 제시에 대한 양성 염색을 설명하는 예시적인 FACS 히스토그램 (각각의 페어링에서 좌측), 및 대조군 (YMLDLQPET; 서열번호 120) 또는 EBV-LMP2 웨პ티드 (CLGGLLTMV; 서열번호 1)로 펄스된 T2 세포의 항체-의존성 세포성 세포독성 (ADCC; 특이적 용해 %, 각각의 페어링에서 우측)을 나타낸다. 대조군 Ab: 인간 IgG1 이소타입 매칭된 대조군; NK92 효과기 세포를 효과기 대 표적 (E:T) 비 20:1에서 $Fc\gamma RIIa$ 176V/V 변이체 대립 유전자 (CD16 176V/V)로 형질감염시킴; mAb: 단일클론 항체.

도 10은 서로 다른 농도의 웨პ티드로 펄스된 T2 세포에서 EBV-LMP2 웨პ티드에 대한 선택된 항-EBV-LMP2(CLG)/HLA-A02 항체의 예시적인 결합을 보여준다.

도 11은 선택된 항-EBV-LMP2(CLG)/HLA-A02 IgG1 항체에 의해 매개되는 EBV-형질전환된 B-림프모구성 세포 (BLCL)의 예시적인 특이적 용해 %를 나타낸다. mAb: 단일클론 항체.

도 12는 EBV-LMP2(CLG)/HLA-A02를 결합하는 제1 항원-결합 부위 및 CD3를 결합하는 제2 항원-결합 부위를 갖는 선택된 이중특이적 항체 (BsAb)를 사용하여 EBV-LMP2 웨პ티드 (실선; CLGGLLTMV, 서열번호 1) 또는 대조군 웨პ티드 (점선; YMLDLQPET, 서열번호 120)로 펄스된 T2 세포에 대한 예시적인 T 세포 세포독성을 보여준다. 대조군 BsAb: 항-HER2xCD3 이중특이적 항체.

도 13은 선택된 LMP2xCD3 이중특이적 항체 (BsAb)를 사용하여 EBV-형질전환된 $HLA-A02^+$ (우측 패널) 및 $HLA-A02^-$ (좌측 패널) 세포의 예시적인 T 세포 세포독성을 보여준다. **도 13a:** LMP2-38xCD3 (상단) 및 LMP2-63xCD3 (하단); **도 13b:** LMP2-40xCD3 (상단) 및 LMP2-61xCD3 (하단); **도 13c:** LMP2-21xCD3 (상단) 및 LMP2-26xCD3 (하단); **도 13d:** LMP2-77xCD3. KBAB: $HLA-A02^+$; 900D: $HLA-A02^-$; AK: $HLA-A02^-$; KS: $HLA-A02^-$; OKO: $HLA-A02^+$; BV: $HLA-A02^+$; 6/28: $HLA-A02^+$.

도 14는 pdb 3REW를 사용하여 생성된 1.9 Å 해상도에서 EBV-LMP2/HLA-A02의 결정 구조를, 실제 축척이 아닌, 개략도로 보여준다. HLA-A02 결합 포켓의 웨პ티드 위치의 배향이 보여진다.

도 15는 선택된 항-EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01 특이적 IgG1 항체 (좌측 패널) 및 상응하는 이중특이적 항체의 BLCL에 대한 세포독성 (우측 패널)의 유세포분석법에 의한 예시적인 웨პ티드 결합을 보여준다. 대조군: 인간 IgG1 이소타입 매칭된 대조군.

도 16는 외인성 EBV-LMP2 웨პ티드 존재 (점선) 및 부재 (실선)하는 $HLA-A*02:01^+$ BLCL OKO 세포에 대해 선택된 EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01 특이적 IgG1 항체의 유세포분석법에 의한 예시적인 결합을 보여준다. 실선은 외인성 웨პ티드가 없는 세포에 대한 IgG1 항체의 결합을 나타내고, 점선은 웨პ티드 100 $\mu g/mL$ 로 밤새 배양한 후 동일한 OKO 세포를 나타낸다.

도 17은 이중특이적 항체의 예시적인 세포독성 (각각의 페어링에서 좌측) 및 상이한 HLA-A02 서브-대립형질을 발현하는 웨პ티드 펄스된 항원 제시 세포에 대한 전장 IgG1 항체의 유세포분석법에 의한 결합 (각각의 페어링에서 우측)을 보여준다. 이중특이적 항체는, 예를 들어, LMP2-38xCD3 이중특이적 항체 등에 대응하는 EXT005-38 BsAb로 표지되고; IgG1 항체는, 예를 들어, LMP2-21 IgG1 항체 등에 대응하는 EXT005-21로 표지된다.

도 18은 상이한 HLA-A02 서브-대립형질을 발현하는 웨პ티드 펄스된 항원 제시 세포에 대한 선택된 전장 IgG1 항

체의 유세포분석법에 의한 예시적인 결합을 보여준다. IgG1 항체는, 예를 들어, LMP2-21 IgG1 항체 등에 대응하는 EXT005-21로 표지된다.

도 19는 웨티드의 1, 5 및 8 위치에서 알라닌 치환을 갖는 9량체 웨티드를 사용하여 II 형 TCR-유사 단일클론 항체를 생성하기 위한 선별 전략에 대한, 실제 축척이 아닌, 예시이다.

도 20은 웨티드의 N- 또는 C-말단에서 천연 잔기를 갖는 5번 위치에서 알라닌 치환을 갖는 9량체 웨티드를 사용하여 II 형 TCR-유사 단일클론 항체를 생성하기 위한 선별 전략에 대한, 실제 축척이 아닌, 예시이다.

도 21은 웨티드의 1, 5 및 8 위치에서 알라닌 치환을 갖는 10량체 웨티드를 사용하여 II 형 TCR-유사 단일클론 항체를 생성하기 위한 선별 전략에 대한, 실제 축척이 아닌, 예시이다.

도 22은 웨티드의 N- 또는 C-말단에서 잉여 본래의 잔기를 갖는 5번 위치에서 알라닌 치환을 갖는 10량체 웨티드를 사용하여 II 형 TCR-유사 단일클론 항체를 생성하기 위한 선별 전략에 대한, 실제 축척이 아닌, 예시이다.

도 23은 유세포분석법에 의해 검출된 HLA-A*02:01에 대해 Ala-치환된 CLG 웨티드의 예시적인 웨팅드 로딩 효율을 보여준다.

도 24는 위치 P3-P8에서 야생형 CLG 웨티드 또는 Ala-치환된 CLG 웨티드로 로딩된 HLA-A*02:01에 대한 항-EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01 IgG 항체 클론의 예시적인 웨티드 결합을 보여준다. **도 24a**는 유세포분석법에 의해 검출된 결합 데이터를 나타낸다. **도 24b**는 도 24a의 결합 데이터를 나타내며, 이때 Ala-치환된 웨티드/HLA-A*02:01 복합체에 대한 결합을 야생형 CLG 웨티드에 대해 정규화하였다.

도 25는 이들 샘플의 순도의 표시로서 LMP2 클론 38 (좌측 상단), 38-2 (우측 상단), 26 (좌측 중간), 61 (우측 중간) 및 40 (좌측 하단)의 이량체 이중특이적 항체의 예시적인 크로마토그램을 보여준다.

도 26은 효과기로서 제대혈 T 세포를 사용하여 (10:1 ET 비), HLA-A*02(+) EBV (+) 종양 세포주에 대한 이량체 이중특이적 항체의 예시적인 세포독성을 나타낸다. 클론 26, 28, 28-2, 40, 61 유래 이량체 이중특이적 항체 및 대조군 각각 테스트했으며 특이적 용해 %가 하기 종양 세포주 각각에 나타나 있다: RPMI-6666 (좌측 상단), DT BLCL (우측 상단), F BLCL (좌측 하단) 및 HONE-1-A2 (우측 하단).

도 27은 면역결핍 마우스가 F BLCL로 이식되고 LMP2 이량체 이중특이적 항체 및 인간 성인 PBMC 효과기 세포로 처리된 마우스 이종이식 연구로부터의 예시적인 종양 정량화 데이터를 나타낸다.

도 28은 면역결핍 마우스가 F BLCL로 이식되고 LMP2 이량체 이중특이적 항체 및 인간 성인 PBMC 효과기 세포로 처리된 마우스 이종이식 연구로부터의 예시적인 생존 데이터를 나타낸다.

도 29는 면역결핍 마우스가 F BLCL로 이식되고 LMP2 이량체 이중특이적 항체 및 인간 제대혈 PBMC 효과기 세포로 처리된 마우스 이종이식 연구로부터의 예시적인 종양 정량화 데이터를 나타낸다.

도 30은 면역결핍 마우스가 F BLCL로 이식되고 LMP2 이량체 이중특이적 항체 및 인간 제대혈 PBMC 효과기 세포로 처리된 마우스 이종이식 연구로부터의 예시적인 생존 데이터를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0065] 정의

본 발명의 범위는 여기에 첨부된 청구범위에 의해 한정되며 본원에 설명된 특정 실시예들에 의해 한정되지는 않는다; 본 개시물을 읽은 당업자라면, 상술한 실시예들과 균등할 수도 있거나, 청구범위의 범주 내에 있을 수도 있는, 다양한 변형예를 인지할 수 있을 것이다.

[0067] 일반적으로, 본원에서 사용되는 용어는 달리 명시되지 않는 한, 당해 분야에서 이해되는 의미에 따른 것이다. 특정 용어의 명시적인 정의가 아래에 제공되며; 본 명세서 전반에 걸친 특정 예시들에서 이를 및 다른 용어의 의미는 문맥으로부터 당업자에게 명백할 것이다.

[0068] 본 명세서, 또는 이의 관련 부분에 인용된 참고문헌들은 본원에 참고로 포함된다.

[0069] 본 발명이 보다 쉽게 이해될 수 있도록 하기 위해, 특정 용어를 먼저 하기에 정의하기로 한다. 다음 용어들과 기타 용어들에 대한 추가 정의는 본 명세서 전반에 걸쳐 개시된다.

[0070] **투여:** 본원에 사용된 용어 "투여"는 조성물을 대상 또는 시스템 (예를 들어, 세포, 기관, 조직, 유기체 또는 관

련 성분 또는 그의 성분 세트)에 투여하는 것을 의미한다. 당업자라면 투여 경로가 예를 들어, 조성물이 투여되고 있는 대상 또는 시스템, 조성물의 성질, 투여 목적 등에 따라 달라질 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들어, 소정의 실시예들에서, 동물 대상 (예, 인간)에 대한 투여는 기관지 (기관지 점적을 포함함), 구강내(buccal), 장내, 피내(interdermal), 동맥 내, 피내, 위내(intragastric), 골수 내, 근육 내, 비강 내, 복강 내, 척수강 내, 정맥 내, 뇌실 내(intraventricular), 점막, 비강, 경구, 직장, 피하, 설하, 국소, 기도 (기도부 내 점적을 포함함), 경피, 질 및/또는 유리체강(vitreal) 투여일 수도 있다. 일부 실시예에서, 투여는 간헐적 투여를 포함할 수도 있다. 일부 실시예에서, 투여는 적어도 선택된 기간 동안 연속 투여 (예, 관류)를 포함할 수도 있다.

[0071] 친화도: 당업계에 공지된 바와 같이, "친화도"는 특정 리간드가 그의 파트너에 결합하는 고정도(tightness)의 척도이다. 친화도는 여러 가지 방법으로 측정할 수 있다. 일부 실시예에서, 친화도는 정량 분석에 의해 측정된다. 이러한 일부 실시예에서, 생리학적 조건을 모방하기 위해 결합 파트너 농도를 리간드 농도를 초과하도록 고정시킬 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 일부 실시예에서, 결합 파트너 농도 및/또는 리간드 농도는 다양할 수도 있다. 이러한 일부 실시예에서, 친화도는 필적 할만한 조건 (예, 농도) 하에서 기준과 비교될 수 있다.

[0072] 친화도 성숙 (또는 친화도 성숙된 항체): 본원에 사용된 바와 같이, 그러한 변경을 가지고 있지 않은 모체 항체에 비해서, 항원에 대한 항체의 친화도의 개선을 초래하는 그 항체의 하나 이상의 CDR (또는 일부 실시예에서는, 골격 영역)에서의 하나 이상의 변경을 갖는 항체를 지칭한다. 일부 실시예에서, 친화도 성숙된 항체는 표적 항원에 대해 나노 몰 또는 심지어 피코 몰 친화도를 가질 것이다. 친화도 성숙된 항체는 당업계에 공지된 임의의 다양한 절차에 의해 생산될 수 있다. Marks 등, 1992, BioTechnology 10:779-783에서는 V_H 및 V_L 도메인 셔플링에 의한 친화도 성숙을 기술한다. CDR 및/또는 골격 잔기의 무작위 돌연변이 유발이 하기에 의해 기술되어 있다: Barbas 등, 1994, Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 91:3809-3813; Schier 등, 1995, Gene 169: 147-155; Yelton 등, 1995. J. Immunol. 155:1994-2004; Jackson 등, 1995, J. Immunol. 154(7):3310-9; 및 Hawkins 등, 1992, J. Mol. Biol. 226:889-896.

제제: 본원에서 사용된 바와 같이, 예를 들어, 폴리펩티드, 핵산, 사카라이드, 지질, 소형 분자, 금속 또는 그의 조합을 포함하는 임의의 화학적 분류의 화합물 또는 실재물을 지칭할 수 있다. 일부 실시예에서, 제제는 자연에서 발견되고 그리고/또는 얻어진다는 점에서 천연 산물이거나 이를 포함한다. 일부 실시예에서, 제제는 사람의 손을 거쳐서 설계, 조작 및/또는 생산되고 그리고/또는 자연에서 발견되지 않는다는 점에서 사람이 만든 하나 이상의 실재물이거나 이를 포함한다. 일부 실시예에서, 제제는 단리되거나 순수한 형태로 이용될 수도 있으며; 일부 실시예에서, 제제는 조(crude) 형태로 이용될 수 있다. 일부 실시예에서, 잠재적인 제제는 콜렉션이나 라이브러리, 예를 들어, 그 안에 있는 활성 제제를 식별하거나 특징짓기 위해 스크리닝될 수 있는 것으로 제공된다. 본 발명에 따라 사용될 수 있는 제제의 일부 특정 실시예는 소형 분자, 항체, 항체 단편, 앱타머, 핵산 (예를 들어, siRNA, shRNA, DNA/RNA 하이브리드, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 리보자임), 펩티드, 펩티드 모방체 등을 포함한다. 일부 실시예에서, 제제는 중합체이거나 중합체를 포함한다. 일부 실시예에서, 제제는 중합체가 아니고 그리고/또는 어떠한 중합체도 실질적으로 없다. 일부 실시예에서, 제제는 적어도 하나의 중합체 모이어티를 함유한다. 일부 실시예에서, 제제는 임의의 중합체 모이어티가 없거나 실질적으로 없다.

[0074] 개선(amelioration): 본원에 사용된 바와 같이, 대상의 상태의 예방, 감소 또는 완화, 또는 상태 개선을 의미한다. 개선에는 질환, 장애 또는 상태의 완전한 회복 또는 완전한 예방이 포함되지만, 이를 요구하지는 않는다 (예, 방사선 상해).

[0075] 동물: 본원에서 사용된 바와 같이 동물계의 모든 구성원을 지칭한다. 일부 실시예에서, "동물"은 어느 한쪽 성별 및 임의의 발달 단계에서의 인간을 의미한다. 일부 실시예에서, "동물"은 임의의 발달 단계에서의 비인간 동물을 의미한다. 소정의 실시예들에서, 비인간 동물은 포유류이다 (예를 들어, 설치류, 마우스, 쥐, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 양, 소, 영장류, 및/또는 돼지). 일부 실시예에서, 동물은 포유류, 조류, 파충류, 양서류, 어류, 곤충류, 및/또는 벌레류를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 소정의 실시예들에서, 동물은 EBV 감염에 걸리기 쉽다. 일부 실시예에서, 동물은 트랜스제닉 동물, 유전자 조작 동물, 및/또는 클론일 수 있다.

[0076] 항체: 본원에 사용된 바와 같이, 그의 당업계에 이해된 의미를 가지며, 특정 항원에 특이적으로 결합하는 면역 글로불린(Ig)을 지칭한다. 본 기술분야에서 통상의 기술을 가진 자들에 의해 공지된 바와 같이, 자연에서 생산되는 항체는 통상적으로 4개의 폴리펩티드 사슬, 2개의 중쇄 (H) 및 2개의 경쇄 (L)로 구성된다. 각각의 중쇄 및 경쇄는 가변 영역 (본원에서는 HCVR 또는 V_H 및 LCVR 또는 V_L으로 약칭함) 및 불변 영역으로 구성된다. 중쇄의 불변 영역은 C_H1, C_H2 및 C_H3 도메인 (및 선택적으로 IgM 및 IgE의 경우에는 CH4 도메인)을 포함한다. 경쇄의

불변 영역은 하나의 도메인, C_L로 구성된다. V_H 및 V_L 영역은, 보다 보존성이 높고 골격 영역 (FR)이라고 불리는 영역이 산재된, 상보성 결정 영역 (CDR)으로 불리는, 초가변성 영역을 더 포함한다. 각각의 V_H 및 V_L는 아미노 말단에서 카르복시 말단으로 다음과 같은 순서로 배열된, 3개의 CDR과 4개의 FR로 구성된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 면역글로불린 분자들은 임의의 유형 (예를 들어, IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE), 분류 (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 하위분류일 수 있다.

[0077]

항체 제제: 본원에 사용된 용어 "항체 제제"는 특정 항원에 특이적으로 결합하는 제제를 지칭한다. 일부 실시예에서, 상기 용어는 특이적 결합을 부여하기에 충분한 면역글로불린 구조 요소를 갖는 임의의 폴리펩티드를 포함한다. 다양한 실시예에서, 적절한 항체 제제로는 단일클론 항체, 다클론 항체, 인간화 항체, 영장류화 항체, 키메라 항체, 인간 항체, 이중특이적 항체 또는 다중특이적 항체, 단일 도메인 항체 (예, 샤크 단일 도메인 항체 (예, IgNAR 또는 그 단편)), 접합 항체 (즉, 다른 단백질, 방사성 표지, 세포 독소에 접합되거나 융합된 항체), 소형 조절 면역 약제 ("SMIPsTM"), 단일 사슬 항체, 카멜로이드 항체, 항체 단편 등을 포함할 수 있지만, 이에 한정되지는 않는다. 일부 실시예에서, 상기 용어는 스테이플 웹티드를 지칭할 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 용어는 항체-유사 결합 웹티드모방체(peptidomimetic)를 지칭할 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 용어는 항체-유사 결합 스캐폴드 단백질을 지칭할 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 용어는 모노바디(monobody) 또는 애드넥틴(adnectins)을 지칭할 수 있다. 많은 실시예에서, 항체 제제는 그의 아미노산 서열이 상보성 결정 영역 (CDR)으로서 당업자에 의해 인식되는 하나 이상의 구조 요소를 포함하는 폴리펩티드이거나 이를 포함하고; 일부 실시예에서 항체 제제는 그의 아미노산 서열이 참조 항체에서 발견되는 것과 실질적으로 동일한 적어도 하나의 CDR (예, 적어도 하나의 중쇄 CDR 및/또는 적어도 하나의 경쇄 CDR)를 포함하는 폴리펩티드이거나 이를 포함한다. 일부 실시예에서, 포함된 CDR은 서열이 동일하거나 참조 CDR과 비교하여 1 내지 5개의 아미노산 치환을 함유한다는 점에서 참조 CDR과 실질적으로 동일하다. 일부 실시예에서, 포함된 CDR은 그것이 참조 CDR과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 나타낸다는 점에서 참조 CDR과 실질적으로 동일하다. 일부 실시예에서, 포함된 CDR은 그것이 참조 CDR과 적어도 96%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 나타낸다는 점에서 참조 CDR과 실질적으로 동일하다. 일부 실시예에서, 포함된 CDR은 포함된 CDR 내의 적어도 하나의 아미노산이 참조 CDR과 비교하여 결실, 부가 또는 치환된다는 점에서 참조 CDR과 실질적으로 동일하지만, 포함된 CDR은 그렇지 않으면 참조 CDR의 그것과 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 일부 실시예에서, 포함된 CDR은 포함된 CDR 내의 1-5 아미노산이 참조 CDR과 비교하여 결실, 부가 또는 치환된다는 점에서 참조 CDR과 실질적으로 동일하지만, 포함된 CDR은 그렇지 않으면 참조 CDR과 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 일부 실시예에서, 포함된 CDR은 포함된 CDR 내의 적어도 하나의 아미노산이 참조 CDR과 비교하여 치환된다는 점에서 참조 CDR과 실질적으로 동일하지만, 포함된 CDR은 그렇지 않으면 참조 CDR의 그것과 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 일부 실시예에서, 포함된 CDR은 포함된 CDR 내의 1-5 아미노산이 참조 CDR과 비교하여 결실, 부가 또는 치환된다는 점에서 참조 CDR과 실질적으로 동일하지만, 포함된 CDR은 그렇지 않으면 참조 CDR과 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 일부 실시예에서, 항체 제제는 그의 아미노산 서열이 면역글로불린 가변 도메인으로 당업자에 의해 인식되는 구조 요소를 포함하는 폴리펩티드이거나 이를 포함한다. 일부 실시예에서, 항체 제제는 면역글로불린 결합 도메인과 상동성이거나 대체로 상동성인, 결합 도메인을 갖는 폴리펩티드 단백질이다. 일부 실시예에서, 항체 제제는 특정 참조 항체 사슬 또는 사슬들(예를 들어, 중쇄 및/또는 경쇄)에서 발견되는 모든 CDR을 포함하는 폴리펩티드이거나 이를 포함한다.

[0078]

항체 성분: 본원에서 사용된 바와 같이, 에피토프 또는 항원에 특이적으로 결합하고 하나 이상의 면역글로불린 구조 특징부를 포함하는 (완전한 폴리펩티드, 또는 보다 큰 폴리펩티드의 일부, 예를 들어, 본원에 기재된 융합 폴리펩티드일 수도 있는) 폴리펩티드 요소를 지칭한다. 일반적으로 항체 성분은 그의 아미노산 서열이 항체-결합 영역 (예, 선택적으로 하나 이상의 골격 영역의 존재 하에, 그의 항체 경쇄 또는 가변 영역 또는 하나 이상의 상보성 결정 영역 ("CDR"), 또는 그의 항체 중쇄 또는 가변 영역 또는 하나 이상의 CDR)의 특징인 요소들을 포함하는 임의의 폴리펩티드이다. 일부 실시예에서, 항체 성분은 전장 항체이거나 이를 포함한다. 일부 실시예에서, 항체 성분은 전장보다 작지만 적어도 하나의 결합 부위 (알려진 항체 "가변 영역"의 구조를 갖는 적어도 하나, 바람직하게는 적어도 두 개의 서열을 포함 함)를 포함한다. 일부 실시예에서, 용어 "항체 성분"은 면역글로불린-결합 도메인과 상동성이거나 대체로 상동성인, 결합 도메인을 갖는 임의의 단백질을 포함한다. 특정 실시예들에서, 포함된 "항체 성분"은 면역글로불린-결합 도메인과 적어도 99% 동일성을 나타내는 결합 도메인을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, 포함된 "항체 성분"은 면역글로불린-결합 도메인, 예를 들어 참조 면역글로불린-결합 도메인과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98% 동일성을 나타내는 결합 도메인을 갖는 임의의 폴리펩티드를 포함한다. 포함된 "항체 성분"은 자연 공급원에서 발견되는 항체 (또는 그의

일부, 예를 들어, 그의 항원-결합 부분)와 동일한 아미노산 서열을 가질 수 있다. 항체 성분은 단일특이적, 이중특이적 또는 다중특이적일 수 있다. 항체 성분은 인간 부류 중 어느 것을 포함한, 임의의 면역글로불린 부류의 특징적인 구조 요소를 포함할 수 있다: IgG, IgM, IgA, IgD, 및 IgE. 항체의 항원-결합 기능은 전장 항체의 단편에 의해 수행될 수 있다는 것이 밝혀졌다. 그러한 항체의 실시예는 이중특이적, 중복특이적 또는 다중특이적 포맷일 수도 있다; 2개 이상의 상이한 항원에 특이적으로 결합한다. 항체의 "항원 결합 부분"이라는 용어 내에 포함되는 결합 단편의 예로는 (i) V_H , V_L , C_{H1} 및 C_L 도메인으로 구성된 일가 단편인, Fab 단편; (ii) 헌지 영역에서 이황화물 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 이가 단편인, $F(ab')_2$ 단편; (iii) V_H 및 C_{H1} 도메인으로 구성된 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 암의 V_H 및 V_L 도메인으로 구성된 Fv 단편, (v) 단일 가변 도메인을 포함하는, dAb 단편 (Ward 등, 1989, Nature 341:544-546); 및 (vi) 단리된 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함한다. 더욱이, Fv 단편의 2개의 도메인, V_H 및 V_L 이 별도의 유전자들에 의해 코딩되더라도, 그들은 재조합 방법을 사용하여, V_H 및 V_L 영역이 일가 분자를 형성하도록 쌍을 이루는 단일 단백질 사슬로 만들 수 있는 합성 링커에 의해, 연결될 수 있다 (단일 사슬 Fv (scFv)로 알려짐; 예를 들어 Bird 등, 1988, Science 242:423-426; 및 Huston 등, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 참조). 일부 실시예에서, 본원에 기재된 "항체 성분"은 그러한 단일 사슬 항체이거나 이를 포함한다. 일부 실시예에서, "항체 성분"은 디아바디 (diabody)이거나 이를 포함한다. 디아바디는 V_H 및 V_L 도메인이 동일 사슬 상에서 2개의 도메인 사이에 쌍을 형성할 수 있게 하기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 다른 사슬의 상보적 도메인과 쌍을 이루도록 강제하고, 2개의 항원-결합 부위를 생성하여, 단일 폴리펩티드 사슬에서 발현되는 이가, 이중특이적 항체이다 (예를 들어, Holliger; P., 등, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, RJ, 등, 1994, Structure 2:1121-1123 참조). 이러한 항체 결합 부분은 당업계에 공지되어 있다 (Kontermann 및 Dubel eds., Antibody Engineering, 2001, Springer-Verlag. New York. 790 pp. ISBN 3-540-41354-5). 일부 실시예에서, 항체 성분은 상보적인 경쇄 폴리펩티드와 함께, 한 쌍의 항원 결합 영역을 형성하는, 한 쌍의 탠덤 Fv 절편 ($V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}$)을 포함하는 단일 사슬 "선형 항체" 이거나 이를 포함한다 (Zapata 등, 1995, Protein Eng. 8(10):1057-1062; 및 미국 특허 제5,641,870호). 일부 실시예에서, 항체 성분은 키메라, 인간화 또는 인간 항체의 특징인 구조 요소를 가질 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 수혜자의 상보성 결정 영역 (CDR)으로부터의 잔기가, 원하는 특이성, 친화도 및 수용량을 갖는 마우스, 쥐 또는 토끼와 같은 비인간 종 (공여자 항체)의 CDR로부터의 잔기로 대체되는 인간 면역글로불린(수혜자 항체)이다. 일부 실시예에서, 항체 성분은 인간 항체의 특징인 구조 요소를 가질 수 있다.

[0079]

항체 단편: 본원에서 사용된 "항체 단편"은 예를 들어, 항체의 항원 결합 영역 또는 가변 영역과 같은 비손상 (intact) 항체의 부분을 포함한다. 항체 단편의 예로는 Fab, Fab' , $F(ab')$, 및 Fv 단편; 트리아바디 (triabody); 테트라바디; 선형 항체; 단일 사슬 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체에 포함된 CDR 함유 모이어티를 포함한다. 당업자라면 용어 "항체 단편"이 임의의 특정 생성 모드를 의미하지 않으며 이에 한정되지 않음을 이해할 것이다. 항체 단편은 비손상 항체의 절단, 화학 합성, 재조합 생산 등을 포함하지만, 이에 한정되지 않는 임의의 적절한 방법론을 사용하여 생산될 수 있다.

[0080]

생물학적 활성: 본원에 사용된 바와 같이, 관심있는 제제 또는 실재물에 의해 달성된 관찰 가능한 생물학적 효과 또는 결과를 지칭한다. 예를 들면, 일부 실시예에서, 특이적 결합 상호작용은 생물학적 활성이다. 일부 실시예에서, 생물학적 경로 또는 사건의 조절 (예를 들어, 유도, 증진 또는 억제)은 생물학적 활성이다. 일부 실시예에서, 생물학적 활성의 존재 또는 범위는 관심있는 생물학적 경로 또는 사건에 의해 생성된 직접적 또는 간접적 산물의 검출을 통해 평가된다.

[0081]

이중특이적 항체: 본원에서 사용된 바와 같이, 결합 모이어티의 적어도 하나, 및 통상적으로 둘 모두가 항체 성분이거나 이를 포함하는 이중특이적 결합체를 의미한다. 다양한 상이한 이중특이적 항체 구조가 당업계에 공지되어 있다. 일부 실시예에서, 항체 성분이거나 이를 포함하는 이중특이적 항체의 각각의 결합 모이어티는 V_H 및/또는 V_L 영역을 포함하며; 일부 이러한 실시예에서, V_H 및/또는 V_L 영역은 특정 단일클론 항체에서 발견되는 영역이다. 일부 실시예에서, 이중특이적 항체가 두 개의 항체 성분-결합 모이어티를 포함하고 있는 경우, 각각은 다른 단일클론 항체으로부터의 V_H 및/또는 V_L 영역을 포함한다. 일부 실시예에서, 이중특이적 항체는 이량체 이중특이적 항체이다.

[0082]

이중특이적 결합체: 본원에서 사용된 바와 같이, 그 각각이 별도의 표적을 결합하는, 2개의 별도의 결합 모이어

티를 갖는 폴리펩티드 제제를 지칭한다. 일부 실시예에서, 이중특이적 결합체는 단일 폴리펩티드이고; 일부 실시예에서, 이중특이적 결합체는 그러한 일부 실시예에서, 예를 들어 가교 결합에 의해 서로 공유 결합될 수 있는, 복수의 웨პ티드이거나, 이를 포함한다. 일부 실시예에서, 이중특이적 결합체의 2개의 결합 모이어티는 다른 부위 (예를 들어, 에피토프) 동일한 표적 (예를 들어 들어, 항원)을 인식하고; 일부 실시예에서, 그들은 다른 표적을 인식한다. 일부 실시예에서, 이중특이적 결합체는 다른 구조의 두 표적에 동시에 결합할 수 있다.

[0083] 담체: 본원에서 사용된 바와 같이, 조성물과 함께 투여되는 희석제, 어쥬번트(adjuvant), 부형제 또는 비히클을 의미한다. 일부 예시적인 실시예에서, 담체는 예를 들어 물 및 오일과 같은 무균 액체, 땅콩유, 대두유, 광유, 참깨 유 등과 같은 석유, 동물, 식물 또는 합성 유래의 오일을 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 담체는 하나 이상의 고체 성분이거나 이를 포함한다.

[0084] CDR: 본원에 사용된 바와 같이, 항체 가변 영역 내의 상보성 결정 영역을 지칭한다. 각각의 가변 영역의 경우, CDR1, CDR2 및 CDR3으로 지정된, 중쇄 및 경쇄의 가변 영역 각각에 3개의 CDR이 있다. "CDR들의 세트" 또는 "CDR 세트"는 항원을 결합할 수 있는 단일 가변 영역 또는 항원을 결합할 수 있는 동족의 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 CDR에서 발생하는 3개 또는 6개의 CDR 군을 의미한다. CDR의 경계는 시스템에 따라 다르게 정의되었으며, 그 중 몇 개는 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어, Kabat, Chothia 등).

[0085] CDR-이식 항체: 본원에 사용된 바와 같이, 그의 아미노산 서열이 한 종으로부터의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하지만, V_H 및/또는 V_L 의 CDR 영역 중 하나 이상의 서열이 다른 종의 CDR 서열로 대체되는 항체, 예컨대 쥐 CDR (예, CDR3)의 하나 이상이 인간 CDR 서열로 대체된 쥐 V_H 및 V_L 영역을 갖는 항체를 의미한다. 마찬가지로, "CDR-이식 항체"는 또한 인간 CDR (예를 들어, CDR3)의 하나 이상이 마우스 CDR 서열로 대체된, 인간 V_H 및 V_L 영역을 갖는 항체를 의미할 수 있다.

[0086] 키메라 항체: 본원에 사용된 바와 같이, 그의 아미노산 서열이 제1 종에서 발견되는 V_H 및 V_L 영역 서열 및 제1 종과는 다른, 제2 종에서 발견되는 불변 영역 서열을 포함하는 항체를 의미한다. 많은 실시예에서, 키메라 항체는 인간 불변 영역에 연결된 쥐 V_H 및 V_L 영역을 가지고 있다. 일부 실시예에서, 비인간 불변 영역(예를 들어, 마우스 불변 영역)에 연결된 인간 V_H 및 V_L 영역이 있는 항체를 "역 키메라 항체"라고 지칭한다.

[0087] 비교할만한: 본원에 사용된 바와 같이, 서로 동일하지 않을 수도 있지만 그 사이의 비교를 허용하기에 충분히 유사하여, 결론이 판찰된 차이점 또는 유사성에 기초하여 합리적으로 유도될 수 있도록 하는, 두 개 이상의 제제, 실재물, 상황, 조건 세트 등을 의미한다. 당해 기술 분야의 통상의 기술을 가진 자라면, 문맥상, 두 개 이상의 그러한 제제, 실재물, 상황, 조건 세트 등이 비교할만하다고 여겨지도록 임의의 주어진 상황에서 어떤 정도의 동일성이 요구되는지를 이해할 것이다.

[0088] 대조군: 본원에 사용된 바와 같이, 결과가 비교되는 표준인 "대조군"의 당업계에서 이해되는 의미를 지칭한다. 일반적으로, 대조군은 이러한 변수에 대한 결론을 내리기 위해 변수를 격리하여 실험에서 온전함을 향상시키는데 사용된다. 일부 실시예에서, 대조군은 비교자를 제공하기 위해 테스트 반응 또는 분석과 동시에 수행되는 반응 또는 분석이다. 본원에서 사용된 "대조군"은 "대조군 항체"를 의미할 수 있다. "대조군 항체"는 인간, 비인간 (예, 쥐), 키메라, 인간화, CDR-이식, 다중특이적 또는 본원에 기재된 이중특이적 항체, 본원에 기재된 바와 상이한 항체, 항체 단편 또는 항체 성분, 또는 모체 항체일 수 있다. 하나의 실험에서, "테스트"(즉, 테스트중인 변수)가 적용된다. 두 번째 실험에서는 "대조군"은, 테스트중인 변수가 적용되지 않는다. 일부 실시예에서, 대조군은 과거의 대조군 (즉, 이전에 수행된 테스트 또는 분석, 또는 이전에 알려진 양 또는 결과)이다. 일부 실시예에서, 대조군은 인쇄되거나 이와 달리 저장된 기록이거나 이를 포함한다. 대조군은 양성 대조군 또는 음성 대조군일 수 있다.

[0089] ~에 해당하는: 폴리펩티드 서열 내의 아미노산을 참조하여 본원에서 사용된 바와 같이, 관심있는 폴리펩티드의 아미노산 잔기의 위치/동일성을 지정한다. 당업자라면 간략화를 위해, 폴리펩티드의 잔기가 참조 관련 폴리펩티드에 기초한 표준 번호 체계(canonical numbering system)를 사용하여 종종 지정되므로, 190번 위치에서의 잔기에 "해당하는" 아미노산이, 예를 들어, 실제로 특정 아미노산 사슬에서 190번째 아미노산일 필요는 없으며, 오히려 참조 폴리펩티드의 190번에서 발견되는 잔기에 해당한다는 것을 이해할 것이며; 당업자라면 "해당하는" 아미노산을 어떻게 식별하는지 쉽게 이해할 것이다.

[0090] 효과기 기능: 본원에 사용된 바와 같이, 항체 Fc 영역과 Fc 수용체 또는 리간드의 상호작용으로부터 기인하는 생화학적 사건을 의미한다. 효과기 기능에는 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC), 항체-의존성 세포-매개

식균작용 (ADCP) 및 보체-매개 세포독성 (CMC)이 포함되나 이에 한정되지는 않는다. 일부 실시예에서, 효과기 기능은 항원의 결합 후에 작동하는 기능, 항원 결합과 무관하게 작동하는 기능, 또는 둘 다 작동하는 기능이다.

[0091] 효과기 세포: 본원에 사용된 바와 같이, 하나 이상의 Fc 수용체를 발현하고 하나 이상의 효과기 기능을 매개하는 면역계의 세포를 지칭한다. 일부 실시예에서, 효과기 세포는 단핵구, 대식세포, 호중구, 수지상 세포, 호산구, 비만 세포, 혈소판, 큰 과립 림프구, 랑게르한스 세포, 자연 살해(NK) 세포, T-림프구, B-림프구를 포함하지만 이에 한정되지 않을 수도 있으며 인간, 마우스, 랙트, 토끼 및 원숭이를 포함하지만 이에 한정되지 않는 임의의 유기체로부터 유래될 수 있다.

[0092] 조작된: 본원에서 사용된 바와 같이, 일반적으로 사람의 손으로 조작된 양상을 가리킨다. 예를 들면, 일부 실시예에서, 폴리뉴클레오티드는 자연에서는 이 순서로 함께 연결되지 않은 두 개 이상의 서열이 조작된 폴리뉴클레오티드에서 서로에 직접 연결되도록 사람의 손에 의해 조작될 때 "조작된" 것으로 간주될 수 있다. 일부 특정 이러한 실시예에서, 조작된 폴리뉴클레오티드는 제1 코딩 서열과 작동적으로 연관되어 있지만 제2 코딩 서열과 작동적으로 연결되지 않은 자연에서 발견되는 조절 서열을 포함할 수 있으며, 이는 사람의 손에 의해 연결되어 작동적으로 제2 코딩 서열과 관련된다. 대안적으로 또는 추가적으로, 일부 실시예에서, 자연에서는 서로 연결되어 있지 않은 폴리펩티드 요소 또는 도메인을 각각 코딩하는 제1 및 제2 핵산 핵산 서열은 단일의 조작된 폴리뉴클레오티드에서 서로 연결될 수 있다. 비교할 만하게, 일부 실시예에서, 그 유전 정보가 변형되도록 조작된 경우 (예를 들어, 이전에 존재하지 않았던 새로운 유전 물질이 도입되었거나, 이전에 존재한 유전 물질이 변경 또는 제거된 경우) 세포 또는 유기체는 "조작된" 것으로 간주될 수 있다. 통상적인 실무이며 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 조작된 폴리뉴클레오티드 또는 세포의 자손은 실제 조작이 이전 실재물에 대해 수행되었다 하더라도 여전히 "조작된" 것으로 언급된다. 또한, 당업자라면 이해할 수 있는 바와 같이, 본원에 기재된 "조작"이 달성될 수 있는 다양한 방법론이 이용 가능하다. 예를 들면, 일부 실시예에서, "조작"은 분석 또는 비교를 수행하거나, 또는 서열을, 변경 등을 분석, 권고 및/또는 선택하도록 프로그래밍된 컴퓨터 시스템을 사용하여 (예를 들어, 핵산 서열, 폴리펩티드 서열, 세포, 조직 및/또는 유기체의) 선택 또는 설계를 수반할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 일부 실시예에서, "조작"은 시험관 내 화학 합성 방법론 및/또는 재조합 핵산 기술, 예컨대, 예를 들어, (예, 중합 효소 연쇄 반응을 통한) 핵산 증폭 잡종화, 돌연변이, 형질전환, 형질감염 등, 및/또는 다양한 제어된 교배 방법론의 사용을 포함할 수 있다. 당업자라면 이해할 수 있는 바와 같이, 다양한 확립된 이러한 기술 (예, 재조합 DNA, 올리고뉴클레오티드 합성 및 조직 배양 및 형질전환 (예, 전기천공, 리포렉션 등))이 당업계에 주지되어 있으며 본 명세서 전반에 걸쳐 인용되거나 및/또는 논의되는 다양한 일반 및 보다 구체적인 참고문헌에 기술되어 있다. 예를 들어, Sambrook 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)를 참고한다.

[0093] 에피토프: 본원에 사용된 바와 같이, 면역글로불린 (예, 항체 또는 수용체) 결합 성분에 의해 특이적으로 인식되는 임의의 모이어티를 포함한다. 일부 실시예에서, 에피토프는 항원 상의 다수의 화학적 원자 또는 기로 구성된다. 일부 실시예에서, 항원이 관련 삼차원 형태를 채택하는 경우 이러한 화학적 원자 또는 기가 표면에 노출된다. 일부 실시예에서, 항원이 그러한 형태를 취할 때 이러한 화학적 원자 또는 기는 물리적으로 공간에서 서로 가깝다. 일부 실시예에서, 항원이 대체 형태를 취할 때 (예를 들어, 선형화되어 있음) 적어도 일부의 이러한 화학적 원자는 서로 물리적으로 분리되어 있다.

[0094] 부형제: 본원에서 사용된 바와 같이, 예를 들어 원하는 일관성 또는 안정화 효과를 제공하거나 기여하기 위해, 약제학적 조성물에 포함될 수 있는 비-치료제를 의미한다. 적절한 약제학적 부형제로는, 예를 들어 전분, 글루코오스, 락토오스, 수크로오스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카겔, 스테아르산 나트륨, 글리세롤 모노스테아레이트, 탈크, 염화나트륨, 건조 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리세롤, 물, 에탄올 등을 들 수 있다.

[0095] Fc 리간드: 본원에 사용된 바와 같이, 항체의 Fc 영역에 결합하여 Fc-리간드 복합체를 형성하는 임의의 유기체로부터의, 문자, 바람직하게는 폴리펩티드를 지칭한다. Fc 리간드는 Fc v RIIA (CD32A), Fc v RIIB (CD32B), Fc v RIIIA (CD16A), Fc v RIIIB (CD16B), Fc v RI (CD64), Fc ε RII (CD23), FcRn, C1q, C3, 포도상구균 단백질 A, 연쇄상구균 단백질 G 및 바이러스 Fc v R를 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. Fc 리간드는 Fc를 결합하는 발견되지 않은 문자를 포함할 수 있다.

[0096] 골격 또는 골격 영역: 본원에 사용된 바와 같이, 가변 영역 마이너스 CDR의 서열을 지칭한다. CDR 서열은 상이한 시스템들에 의해 결정될 수 있기 때문에, 마찬가지로 골격 서열은 대응해서 상이한 해석의 대상이 된다. 6개의 CDR은 중쇄 및 경쇄의 골격 영역을 각각의 사슬 상에 4개의 하위 영역 (FR1, FR2, FR3 및 FR4)으로

분할하며, CDR1은 FR1과 FR2 사이, CDR2는 FR2와 FR3 사이, 및 CDR3은 FR3 및 FR4 사이에 위치한다. 특정 하위 영역을 FR1, FR2, FR3 또는 FR4로 지정하지 않고, 골격 영역은 다른 것으로 언급되는 바와 같이, 단일의 자연 발생하는 면역글로불린 사슬의 가변 영역 내에서 조합된 FR를 나타낸다. 본원에 사용된 바와 같이, FR은 4개의 하위 영역 중 하나를 나타내며, 예를 들어 FR1은 가변 영역의 아미노 말단에 가장 가까운 제1 골격 영역을 나타내고 CDR1에 대해 5'를 가지고, FR은 골격 영역을 구성하는 하위 영역 중 둘 이상을 나타낸다.

[0097] 숙주 세포: 본원에 사용된 바와 같이, 외인성 DNA (재조합 또는 기타)가 도입된 세포를 지칭한다. 본 개시물을 읽은 숙련자라면 이러한 용어들이 특정한 대상 세포뿐만 아니라, 이러한 세포의 자손을 언급함을 이해할 것이다. 돌연변이 또는 환경적 영향 중 하나로 인해 다음 세대에서 특정 변형이 일어날 수 있기 때문에, 이러한 자손은 사실상, 모체 세포와 동일할 수는 없지만, 본원에 사용된 용어 "숙주 세포"의 범위 내에 포함된다. 일부 실시예에서, 숙주 세포는 외인성 DNA (예, 재조합 핵산 서열)를 발현하는데 적합한 생명 계 중 어느 하나에서 선택된 원핵 세포와 진핵 세포를 포함한다. 대표적인 세포로는 원핵 세포 및 진핵 세포 (단일 세포 또는 다중 세포), 박테리아 세포 (예, *E.coli* 균주, 바실루스 종, 스트렙토미세스 종 등), 미코박테리아 세포, 진균 세포, 효모 세포 (예, *S. 세레비시애*, *S. 품베*, *P. 파스토리스*, *P. 메타놀리카*, 등), 식물 세포, 곤충 세포 (예, SF-9, SF-21, 바클로바이러스-감염 곤충 세포, 트리코플루시아 나, 등), 비인간 동물 세포, 인간 세포, 또는 예를 들면, 하이브리도마 또는 퀘드로마와 같은 세포 융합체를 포함한다. 일부 실시예에서, 숙주 세포는 인간, 원숭이, 유인원, 햄스터, 랫 또는 마우스 세포이다. 일부 실시예에서, 숙주 세포는 진핵 세포이며 다음과 같은 세포에서 선택된다: CHO (예를 들어, CHO K1, DXB-1 1 CHO, Veggie-CHO), COS (예를 들어, COS-7), 망막 세포, Vero, CV1, 신장 (예를 들어, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (예를 들어, BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (상피), CV-1, U937, 3T3, L 세포, C127 세포, SP2/0, NS-0, MMT 060562, 세르톨리 세포, BRL 3 A 세포, HT1080 세포, 골수종 세포, 종양 세포, 및 상기에서 언급한 세포 유래 세포주. 일부 실시예에서, 숙주 세포는 하나 이상의 바이러스 유전자, 예를 들어, 바이러스 유전자를 발현하는 망막 세포 (예, PER.C6™ 세포)를 포함한다.

[0098] 인간 항체: 본원에 사용된 바와 같이, 인간 면역글로불린 서열로부터 생성된 (또는 조립된) 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함하고자 한다. 일부 실시예에서, 항체 (또는 항체 성분)는 비록 그 아미노산 서열이, 예를 들어 하나 이상의 CDR 및 특히 CDR3에서 인간 생식선 면역글로불린 서열에 의해 암호화되지 않은 잔기 또는 요소를 포함하고 있지만 (예를 들어, 시험관 내 무작위 또는 자리 특이적 돌연변이 유발 또는 생체 내 체세포 돌연변이에 의해 본래 도입되었을 수 있는 서열 변이를 포함함) "인간"인 것으로 간주될 수 있다.

[0099] 인간화: 당업계에 공지된 바와 같이, 용어 "인간화"란 그의 아미노산 서열이 비인간 종 (예, 마우스)에서 자란 참조 항체로부터의 V_H 및 V_L 영역 서열을 포함하지만, "인간-유사", 즉, 인간 생식선 가변 서열에 더욱 유사하게 만들기 위한 참조 항체에 대한 해당 서열의 변형도 포함하는 항체 (또는 항체 성분)을 지칭하는 데 통상적으로 사용된다. 일부 실시예에서, "인간화" 항체 (또는 항체 성분)는 관심 항원에 면역 특이적으로 결합하고 실질적으로 인간 항체의 것과 동일한 아미노산 서열을 갖는 골격 (FR) 영역, 및 실질적으로 비인간 항체의 것과 동일한 아미노산 서열을 갖는 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함하는 항체이다. 인간화 항체는 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역이 비인간 면역글로불린(즉, 공여자 면역글로불린)의 그것들에 해당하고, 모든 또는 실질적으로 모든 골격 영역이 인간 면역글로불린 컨센서스 서열의 그것들인, 적어도 하나, 통상적으로 2개의 가변 도메인 (Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv) 중 실질적으로 전부를 포함한다. 일부 실시예에서, 인간화 항체는 또한 면역글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부, 통상적으로 인간 면역글로불린 불변 영역의 그것을 포함한다. 일부 실시예에서, 인간화 항체는 경쇄뿐만 아니라 적어도 중쇄의 가변적인 영역을 포함한다. 항체는 또한 중쇄 불변 영역의 C_{H1} , 헌지, C_{H2} , C_{H3} , 및 선택적으로 C_{H4} 영역을 포함할 수도 있다. 일부 실시예에서, 인간화 항체는 인간화된 V_L 영역만을 포함하고 있다. 일부 실시예에서, 인간화 항체는 인간화된 V_H 영역만을 포함하고 있다. 일부 소정의 실시예에서, 인간화 항체는 인간화된 V_H 및 V_L 영역을 포함하고 있다.

[0100] 개선, 증가 또는 감소: 본원에 사용된 바와 같이, 또는 그 문법적 등가물은, 본원에 기재된 치료의 개시 이전에 동일한 개체에서의 측정, 또는 본원에 기재된 치료의 부재 시에 대조군 개체 (또는 다수의 대조군 개체)에서의 측정과 같은, 기준선 측정에 대해 상대적인 값을 나타낸다. "대조군 개체"는 치료 중인 개체와 동일한 형태의 질병이나 상태를 겪는 개체이다.

[0101] 시험관 내: 본원에 사용된 바와 같이, 다세포성 유기체 내에서보다는 오히려, 인공 환경에서, 예를 들면 시험관 또는 반응 용기에서, 세포 배양 등에서 발생하는 사건을 의미한다.

- [0102] **생체 내:** 본원에 사용된 바와 같이, 인간 및 비인간 동물과 같은, 다세포성 유기체 내에서 발생하는 사건을 지칭한다. 세포 기반 시스템과 관련하여, 이 용어는 (예를 들어, 시험관 내 시스템과 반대로) 살아있는 세포 내에서 발생하는 사건을 지칭하는 데 사용될 수 있다.
- [0103] **단리된:** 본원에 사용된 바와 같이, (1) 초기 생산시 (자연에서 및/또는 실험실 환경에서든지) 그것이 연관된 성분의 적어도 일부로부터 분리되었으며 그리고/또는 (2) 사람의 손으로 설계, 생산, 준비 및/또는 제조된 물질 및/또는 실재물을 의미한다. 단리된 물질 및/또는 실재물은 그것들이 초기에 결합된 다른 성분들의 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 91% 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 99% 초과로부터 분리될 수도 있다. 일부 실시예에서 단리된 제제는 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91% 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 99% 초과의 순도를 갖는다. 본원에 사용된 바와 같이, 물질은 다른 성분이 실질적으로 없는 경우 "순수"하다. 일부 실시예에서, 당업자가 이해할 수 있는 바와 같이, 물질은 예를 들어, 하나 이상의 담체 또는 부형제 (예를 들어, 완충제, 용매, 물 등)와 같은 소정의 다른 성분들과 조합된 후에도 여전히 "단리된" 또는 심지어 "순수한" 것으로 간주될 수 있다; 그러한 실시예들에서, 물질의 단리% 또는 순도%는 이러한 담체 또는 부형제를 포함하지 않고 계산된다. 하나 이외의 예를 제공하기 위해, 일부 실시예에서, 자연에서 발생하는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드와 같은 생물학적 고분자는, a) 그것의 기원 또는 파생 원에 의해 자연에서 본래의 상태로 그것을 수반하는 일부 또는 모든 성분과 연관되지 않으며; b) 자연에서 그것을 생산하는 종으로부터의 동일한 종의 핵산 또는 다른 폴리펩티드가 실질적으로 없으며; c) 자연에서 그것을 생산하는 종의 것이 아닌 세포 또는 다른 발현 시스템으로부터의 성분들에 의해 발현되거나 그렇지 않으면 연관되는 경우, "단리된" 것으로 간주된다. 따라서, 예를 들어, 일부 실시예에서, 화학적으로 합성되거나, 자연에서 그것을 생산하는 것과 다른 세포 시스템에서 합성되는 폴리펩티드를 "단리된" 폴리펩티드인 것으로 간주한다. 대안적으로 또는 추가적으로, 일부 실시예에서, 하나 이상의 정제 기술을 거친 폴리펩티드는 a) 자연에서 그것이 연관되고; 그리고/또는 b) 초기에 생산되었을 때 그것이 연관되어 있는, 다른 성분으로부터 분리된 정도로 "단리된" 폴리펩티드인 것으로 간주될 수 있다.
- [0104] **KA:** 본원에 사용된 바와 같이, 그의 파트너 (예를 들어, 항체 제제 또는 그의 결합 성분이 결합하는 에피토프) 와의 복합체로부터 결합제 (예를 들어, 항체 제제 또는 그의 결합 성분)의 결합 (또는 친화도) 상수를 의미한다.
- [0105] **K_D:** 본원에 사용된 바와 같이, 그의 파트너 (예를 들어, 항체 제제 또는 그의 결합 성분이 결합하는 에피토프) 와의 복합체로부터 결합제 (예를 들어, 항체 제제 또는 그의 결합 성분)의 분리 상수를 의미한다.
- [0106] **k_{off}:** 본원에 사용된 바와 같이, 그의 파트너 (예를 들어, 항체 제제 또는 그의 결합 성분이 결합하는 에피토프) 와의 복합체로부터 결합제 (예를 들어, 항체 제제 또는 그의 결합 성분)의 오프(off)율 상수를 의미한다.
- [0107] **k_{on}:** 본원에 사용된 바와 같이, 그의 파트너 (예를 들어, 항체 제제 또는 그의 결합 성분이 결합하는 에피토프) 와의 복합체로부터 결합제 (예를 들어, 항체 제제 또는 그의 결합 성분)의 온(on)율 상수를 의미한다.
- [0108] **링커:** 본원에 사용된 바와 같이, 다른 요소를 서로 연결시키는 다수 요소 폴리펩티드의 부분을 지칭하는데 사용된다. 예를 들면, 본 기술분야에서 통상의 기술을 가진 자들이라면 그 구조가 두 개 이상의 기능적 또는 조직적 도메인을 포함하는 폴리펩티드가 종종 서로 연결시키는 이들 도메인 간의 아미노산의 스트레치를 포함한다는 것을 이해한다. 일부 실시예에서, 링커 요소를 포함하는 폴리펩티드는 일반 형태인 S1-L-S2의 전체 구조를 가지며, 여기서 S1 및 S2는 동일하거나 상이할 수 있고 링커에 의해 서로 결합된 2개의 도메인을 나타낼 수 있다. 일부 실시예에서, 링커는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 또는 그 이상의 아미노산 길이이다. 일부 실시예에서, 링커는 단단한 삼차원 구조를 채택하지 않는 경향이 있지만, 오히려 폴리펩티드에 유연성을 제공한다는 점에 특징이 있다. 폴리펩티드(예, 융합 폴리펩티드)를 조작할 때 적절하게 사용될 수 있는 다양한 링커 요소가 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어, Holliger, P., 등, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448; Poljak, R. J. 등, 1994, Structure 2:1121-1123 참고).
- [0109] **다가 결합제 (또는 다중특이적 결합제):** 본원에 사용된 바와 같이, 동일한 문자 또는 상이한 문자 상에 존재할 수 있는, 둘 이상의 항원에 결합할 수 있는 결합제를 의미한다. 본원에 기재된 바와 같은 다가 결합제는, 일부 실시예에서, 둘 이상의 항원-결합 부위를 갖도록 조작되고, 통상적으로 자연 발생 단백질이 아니다. 본원에 기재된 바와 같은 다가 결합제는 둘 이상의 관련된 또는 비관련 표적을 결합할 수 있는 결합제를 지칭한다. 다가 결합제는 단일 항체 성분의 다중 사본 또는 상이한 항체 성분의 다중 사본으로 구성될 수 있다. 이러한 결합제

는 둘 이상의 항원에 결합할 수 있고 4가 또는 다가 결합체이다. 다가 결합체는 예를 들어, 면역 조절제, 독소 또는 RNase와 같은 치료제를 추가로 포함할 수 있다. 본원에 기재된 바와 같은 다가 결합체는, 일부 실시예에서, 상이한 구조, 예를 들어, 2개의 상이한 항원, 동일한 항원 상의 2개의 상이한 에피토프, 또는 합텐 및/또는 항원 또는 에피토프를 갖는 적어도 2개의 표적에 동시에 결합할 수 있다. 많은 실시예에서, 본 발명의 다가 결합체는 본원에 기재된 바와 같은 다가 결합체의 특성을 갖도록 조작된 단백질이다. 본 발명의 다가 결합체는 단일특이적 (하나의 항원을 결합할 수 있음) 또는 다중특이적 (둘 이상의 항원을 결합할 수 있음)일 수 있으며, 2개의 중쇄 폴리펩티드 및 2개의 경쇄 폴리펩티드로 구성될 수 있다. 일부 실시예에서, 각각의 결합 부위는 항원-결합 부위 당 항원 결합에 관여하는 총 6개의 CDR을 갖는 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인으로 구성된다.

[0110]

핵산: 본원에 사용된 바와 같이, 최광의에서, 올리고뉴클레오티드 사슬에 혼입되거나 혼입될 수 있는 임의의 화합물 및/또는 물질을 의미한다. 일부 실시예에서, 핵산은 포스포디에스테르 결합을 통해 올리고뉴클레오티드 사슬에 혼입되거나 혼입될 수 있는 화합물 및/또는 물질이다. 문맥에서 분명히 알 수 있듯이, 일부 실시예에서, "핵산"은 개개의 핵산 잔기(예, 뉴클레오티드 및/또는 뉴클레오시드)를 지칭하며; 일부 실시예에서, "핵산"은 RNA이거나 RNA를 포함하며; 일부 실시예에서, "핵산"은 DNA이거나 DNA를 포함한다. 일부 실시예에서, 핵산은 하나 이상의 천연 핵산 잔기이거나, 이를 포함하거나, 이것으로 구성된다. 일부 실시예에서, 핵산은 하나 이상의 핵산 유사체이거나, 이를 포함하거나, 이것으로 구성된다. 일부 실시예에서, 핵산 유사체는 포스포디에스테르 백본을 사용하지 않는다는 점에서 핵산과 다르다. 예를 들면, 일부 실시예에서, 핵산은 당업계에 공지되어 있고 백본에 포스포디에스테르 결합 대신에 웨პ티드 결합을 갖는, 하나 이상의 "펩티드 핵산"이거나, 이를 포함하거나, 이것으로 구성되며, 본 발명의 범위 내로 간주된다. 대안적으로 또는 추가적으로, 일부 실시예에서, 핵산은 포스포디에스테르 결합 보다는 하나 이상의 포스포로티오에이트 및/또는 5'-N-포스포르아미다이트 결합을 갖는다. 일부 실시예에서, 핵산은 하나 이상의 천연 뉴클레오시드(예, 아데노신, 티미딘, 구아노신, 시티딘, 우리딘, 데옥시아데노신, 데옥시티미딘, 데옥시구아노신 및 데옥시시티딘)이거나, 이를 포함하거나, 또는 이들로 구성된다. 일부 실시예에서, 핵산은 하나 이상의 뉴클레오시드 유사체(예, 2-아미노아데노신, 2-티오티미딘, 이노신, 피롤로-피리미딘, 3-메틸 아데노신, 5-메틸시티딘, C-5 프로피닐-시티딘, C-5 프로피닐-우리딘, 2-아미노아데노신, C5-브로모우리딘, C5-플루오로우리딘, C5-요오도우리딘, C5-프로피닐-우리딘, C5-프로피닐-시티딘, C5-메틸시티딘, 2-아미노아데노신, 7-데아자아데노신, 7-데아자구아노신, 8-옥소아데노신, 8-옥소구아노신, 0(6)-메틸구아닌, 2-티오시티딘, 메틸화 염기, 개재 염기(intercalated base) 및 이들의 조합)이거나, 이를 포함하거나, 또는 이들로 구성된다. 일부 실시예에서, 핵산은 천연 핵산과 비교하여 하나 이상의 개질된 당(예, 2'-플루오로리보오스, 리보오스, 2'-데옥시리보오스, 아라비노오스 및 핵소오스)을 포함한다. 일부 실시예에서, 핵산은 RNA 또는 단백질과 같은 기능성 유전자 산물을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 가지고 있다. 일부 실시예에서, 핵산은 하나 이상의 인트론을 포함한다. 일부 실시예에서, 핵산은 천연 공급원으로부터의 하나 이상의 단리, 상보적인 주형에 기초한 중합화에 의한 효소적 합성(생체 내 또는 시험관 내), 재조합 세포 또는 시스템에서의 재생산, 그리고 화학 합성에 의해 제조된다. 일부 실시예에서, 핵산은 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 20, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 또는 그 이상의 잔기 길이이다. 일부 실시예에서, 핵산은 단일 가닥이며; 일부 실시예에서, 핵산은 이중 가닥이다. 일부 실시예에서 핵산은 폴리펩티드를 암호화하는 적어도 하나의 요소를 포함하는 뉴클레오티드 서열을 갖거나, 폴리펩티드를 암호화하는 서열의 상보체이다. 일부 실시예에서 핵산은 효소 활성을 가지고 있다.

[0111]

작동가능하게 연결된: 본원에 사용된 바와 같이, 기재된 성분이 의도된 방식으로 기능할 수 있게 하는 관계에 있는, 병치(juxtaposition)를 말한다. 코딩 서열에 "작동가능하게 연결된" 조절 서열은 조절 서열과 양립 가능한 조건 하에서 코딩 서열의 발현이 달성되는 방식으로 연결(ligate)된다. "작동가능하게 연결된" 서열은 관심 유전자와 인접하는 발현 조절 서열 및 상기 관심 유전자를 조절하도록 트랜스 또는 거리에서 작용하는 발현 조절 서열을 모두 포함한다. 본원에 사용된 용어 "발현 조절 서열"은 그들이 연결되는 코딩 서열의 발현 및 가공을 수행하는데 필요한 폴리뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 발현 조절 서열은 적절한 전사 개시, 종결, 프로모터 및 인핸서 서열; 스플라이싱 및 폴리아데닐화 신호와 같은 효율적인 RNA 가공 신호; 세포질 mRNA를 안정화시키는 서열; 번역 효율을 향상시키는 서열(즉, 코작(Kozak) 컨센서스 서열); 단백질 안정성을 향상시키는 서열; 및 원하는 경우, 단백질 분비를 향상시키는 서열을 포함한다. 이러한 조절 서열의 성질은 숙주 유기체에 따라 상이하다. 예를 들면, 원핵 세포에서, 이러한 조절 서열은 일반적으로 프로모터, 리보솜 결합 부위 및 전사 종

결 서열을 포함하지만, 진핵 세포에서는 통상적으로, 이러한 조절 서열은 프로모터 및 전사 종결 서열을 포함한다. "조절 서열"이라는 용어는 그 존재가 발현 및 가공에 필수적인 성분들을 포함하는 것으로 의도되며, 그 존재가 유리한 추가 성분, 예를 들어 선도 서열 및 융합 파트너 서열을 또한 포함할 수 있다.

[0112] **펩티드:** 본원에 사용된 바와 같이, 펩티드는 통상적으로 비교적 짧고, 예를 들어 약 100 아미노산 미만, 약 50 아미노산 미만, 20 아미노산 미만, 또는 10 아미노산 미만의 길이를 갖는 폴리펩티드를 의미한다. 일부 실시예에서 펩티드는 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15 아미노산 길이이다.

[0113] **생리학적 조건:** 본원에 사용된 바와 같이, 세포 또는 유기체가 살고 및/또는 생식하는 조건을 참조하는 그 분야에서 이해되는 의미를 갖는다. 일부 실시예에서, 이 용어는 유기체나 세포계에서 자연적으로 발생할 수 있는 외부 또는 내부 환경의 상태를 의미한다. 일부 실시예에서, 생리학적 조건은 인간 또는 비인간 동물의 체내에 존재하는 상태, 특히 수술 부위 지점 및/또는 내부에 존재하는 상태이다. 생리학적 조건은 통상적으로 20-40°C의 온도 범위, 1의 대기압, 6-8의 pH, 1-20 mM의 글루코오스 농도, 대기 수준의 산소 농도, 및 지구상에서 접하는 중력을 포함한다. 일부 실시예에서, 실험실에서의 조건은 생리학적 조건에서 조작되고 그리고/또는 유지된다. 일부 실시예에서, 생리학적 조건은 유기체에서 접하게 된다.

[0114] **폴리펩티드:** 본원에 사용된 바와 같이, 임의의 아미노산 고분자 사슬을 의미한다. 일부 실시예에서, 폴리펩티드는 자연에서 발생하는 아미노산 서열을 가지고 있다. 일부 실시예에서, 폴리펩티드는 자연에서 발생하지 않는 아미노산 서열을 가지고 있다. 일부 실시예에서, 폴리펩티드는 사람의 수작업을 통해 설계되고 및/또는 생산된다는 점에서 조작된 아미노산 서열을 가지고 있다. 일부 실시예에서, 폴리펩티드는 천연 아미노산, 비 천연 아미노산, 또는 이들 모두를 포함하거나 이들로 구성될 수 있다. 일부 실시예에서, 폴리펩티드는 오직 천연 아미노산 만 또는 비 천연 아미노산 만을 포함하거나 이들로 구성될 수 있다. 일부 실시예에서, 폴리펩티드는 D-아미노산, L-아미노산 또는 이들 모두를 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 폴리펩티드는 D-아미노산만을 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 폴리펩티드는 L-아미노산만을 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 폴리펩티드는 예를 들면, 폴리펩티드의 N-말단, 폴리펩티드의 C-말단에서 또는 이들의 임의의 조합에서, 하나 이상의 아미노산 측쇄를 변형 또는 이에 부착되는, 하나 이상의 웨던트 기 또는 기타 변형을 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 이러한 웨던트 기 또는 변형은 이들의 조합을 비롯해, 아세틸화, 아미드화, 지질화, 메틸화, 페닐화 등으로 구성되는 그룹으로부터 선택될 수 있다. 일부 실시예에서, 폴리펩티드는 환형일 수 있고, 및/또는 환형 부분을 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 폴리펩티드는 환형이 아니며, 및/또는 임의의 환형 부분을 포함하지 않는다. 일부 실시예에서, 폴리펩티드는 선형이다. 일부 실시예에서, 폴리펩티드는 스테이플 폴리펩티드일 수 있거나 또는 이를 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, "폴리펩티드"라는 용어는 참조 폴리펩티드, 활성 또는 구조의 이름에 첨부될 수 있다; 그러한 예에서, 관련 활성 또는 구조를 공유하는 폴리펩티드를 지칭하기 위해 본원에서 사용되며, 따라서 동일한 폴리펩티드 부류 또는 집단의 구성원으로 간주될 수 있다. 각각의 상기 부류에 대하여, 본 명세서는 제공하며 그리고/또는 당업계의 숙련자라면 그의 아미노산 서열 및/또는 기능이 공지된 부류 내의 예시적인 폴리펩티드들을 알고 있을 것이며; 일부 실시예에서, 이러한 예시적인 폴리펩티드는 폴리펩티드 부류에 대한 참조 폴리펩티드이다. 일부 실시예에서, 폴리펩티드 부류 또는 집단의 구성원은 해당 부류의 참조 폴리펩티드와; 일부 실시예에서, 부류 내의 모든 폴리펩티드와) 상당한 서열 상동성 또는 동일성을 보여주고, 공통 서열 모티프(sequence motif) (예를 들어, 특징적인 서열 요소)를 공유하며, 그리고/또는 (일부 실시예에서 비교 할만한 수준에서 또는 지정된 범위 내에서) 공통 활성을 공유한다. 예를 들면, 일부 실시예에서, 구성원 폴리펩티드는 적어도 약 30 내지 40%이고, 종종 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 보다 큰 참조 폴리펩티드와의 전체 상동성 또는 동일성 정도를 나타내고 및/또는 종종 90% 초과, 심지어 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 보다 큰 매우 높은 서열 동일성을 나타내는 적어도 하나의 영역 (즉, 일부 실시예에서 특징적인 서열 요소이거나 이를 포함할 수 있는 보존 영역)을 포함한다. 그러한 보존 영역은 대개 적어도 3 내지 4개, 종종 최대 20개 또는 그 이상의 아미노산을 포함하며; 일부 실시예에서, 보존 영역은 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 그 이상의 연속적인 아미노산의 적어도 하나의 스트레치를 포함한다. 일부 실시예에서, 유용한 폴리펩티드는 모체 폴리펩티드의 단편을 포함하거나 그 단편으로 이루어질 수 있다. 일부 실시예에서, 유용한 폴리펩티드는 다수의 단편을 포함하거나 이들로 이루어질 수 있는데, 이들 각각은 관심있는 폴리펩티드에서 발견되는 것보다 서로에 대해 다른 공간 배열로 동일한 모체 폴리펩티드에서 발견되어서 (예를 들어, 모체에서 직접 연결된 단편은 관심있는 폴리펩티드에서 공간적으로 분리될 수 있거나 또는 그 반대일 수 있고, 및/또는 단편은 모체에서 보다는 관심있는 폴리펩티드에서 다른 순서로 존재할 수 있음), 따라서 관심있는 폴리펩티드는 그의 모체 폴리펩티드의 유도체이다.

[0115] **예방하다 또는 예방:** 질환, 장애, 및/또는 상태의 발생과 관련하여 사용될 때, 본원에서 사용된 바와 같이, 질

병, 장애 및/또는 상태의 발병 위험을 감소시키고 및/또는 질병, 장애 또는 상태의 하나 이상의 특성 또는 정후의 발생을 지연시키는 것을 지칭한다. 예방은 질병, 장애 또는 상태의 발생이 미리 정의된 기간 동안 지연되었을 때 완성된 것으로 간주될 수 있다.

[0116]

제조합: 본원에서 사용된 바와 같이, 제조합 수단에 의해 설계, 조작, 조제, 발현, 생성 또는 단리되는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 또는 항체 성분, 또는 본원에 기재된 다중특이적 결합체), 예컨대 숙주 세포 내로 형질감염된 제조합 발현 벡터를 사용하여 발현된 폴리펩티드, 제조합 조합형 인간 폴리펩티드 라이브러리로부터 단리된 폴리펩티드(Hoogenboom H.R., 1997, TIB Tech. 15:62-70; Azzazy H., and Highsmith W.E., 2002, Clin. Biochem. 35:425-445; Gavilondo J.V., and Lerrick J.W., 2002, BioTechniques 29:128-145; Hoogenboom H., and Chames P., 2000, Immunol. Today 21:371-378), 인간 면역글로불린 유전자에 대해 트랜스제닉인 동물(예를 들어, 마우스)에서 단리된 항체(예를 들어, Taylor, L.D., 등, 1992, Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Kellermann S-A., and Green L.L., 2002, Curr. Opin. Biotech. 13:593-597; Little, M. 등, 2000, Immunol. Today 21:364-370; Murphy, A.J. 등, 2014, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111(14):5153-5158 참고) 또는 선택된 서열 요소를 서로 스플라이싱하는 것을 포함하는 임의의 다른 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 폴리펩티드를 지칭하고자 한다. 일부 실시예에서, 이러한 선택된 서열 요소들 중 하나 이상이 자연에서 발견된다. 일부 실시예에서, 이러한 선택된 서열 요소들 중 하나 이상이 인 실리코로 설계된다. 일부 실시예에서, 하나 이상의 이러한 선택된 서열 요소는 공지된 서열 요소, 예를 들어, 천연 또는 합성 공급원의 돌연변이 유발(예를 들어, 생체 내 또는 시험관 내)에서 유래한다. 예를 들면, 일부 실시예에서, 제조합 항체 폴리펩티드는 관심있는 공급원 유기체(예를 들어, 인간, 마우스 등)의 생식선에서 발견되는 서열로 구성된다. 일부 실시예에서, 제조합 항체는 돌연변이 유발에 기인한 아미노산 서열을 가져서(예를 들어, 시험관 내 또는 생체 내, 예를 들어 트랜스제닉 동물에서), 제조합 항체의 V_H 및 V_L 영역의 아미노산 서열은, 생식선 V_H 및 V_L 서열에서 기원하고 이와 관련되면서도, 생체 내 생식선 항체 레퍼토리 내에 자연적으로 존재하지 않을 수도 있는 서열이다.

[0117]

회수: 본원에 사용된 바와 같이, 예를 들어 당업계에 공지된 정제 기술을 사용하여, 단리에 의해 이전에 연관되었던 다른 성분이 실질적으로 없는 제제 또는 실재물을 만드는 공정을 의미한다. 일부 실시예에서, 제제 또는 실재물은 천연 공급원 및/또는 세포를 포함하는 공급원으로부터 회수된다.

[0118]

참조: 본원에 사용된 바와 같이, 본원에 기재된 바와 같이 비교가 이루어지는 표준, 대조군 또는 다른 적절한 참조를 기술한다. 예를 들면, 일부 실시예에서, 참조란 표준 또는 대조 제제, 동물, 개체, 집단, 샘플, 서열, 단계 시리즈, 상태 세트, 또는 관심있는 제제, 동물, 개체, 집단, 샘플, 서열, 단계 시리즈, 상태 세트, 또는 값이 비교되는 값이다. 일부 실시예에서, 참조는 관심있는 시험이나 결정과 사실상 동시에 시험되고 그리고/또는 결정된다. 일부 실시예에서, 참조는 선택적으로 유형의 매체로 구현된, 역사적인 참조이다. 통상적으로, 당업자가 이해할 수 있는 바와 같이, 참조는 관심있는 평가에서 이용되는 것과 비교할 만한 조건 하에서 결정되거나 특징화된다.

[0119]

위험: 문맥상 이해되는 바와 같이, 질병, 장애, 및/또는 상태의 "위험"은 특정 개인이 질병, 장애, 및/또는 상태(예를 들어, 방사선 상해)가 발달하게 될 가능성을 포함한다. 일부 실시예에서, 위험은 백분율로 표시된다. 일부 실시예에서, 위험은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 및 최대 100%이다. 일부 실시예에서 위험은 참조 샘플 또는 참조 샘플 그룹과 연관된 위험에 대해 상대적인 위험으로 표시된다. 일부 실시예에서, 참조 샘플 또는 참조 샘플 그룹은 질병, 장애, 상태 및/또는 사건(방사선 상해)의 알려진 위험을 가지고 있다. 일부 실시예에서 참조 샘플 또는 참조 샘플 그룹은 특정 개체에 비교할 만한 개체 으로부터 나온 것이다. 일부 실시예에서, 상대 위험도는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 이상이다.

[0120]

특이적 결합: 본원에 사용된 바와 같이, 결합이 일어날 환경에서 가능한 파트너를 구별하는 결합체의 능력을 의미한다. 다른 잠재 표적이 존재할 때 하나의 특정한 표적과 상호작용하는 결합체는 그것이 상호작용하는 표적과 "특이적으로 결합한다"고 한다. 일부 실시예에서, 특이적 결합은 결합체와 그 파트너 사이의 연관 정도를 검출하거나 결정함으로써 평가되며; 일부 실시예에서, 특이적 결합은 결합체-파트너 복합체의 해리 정도를 검출하거나 결정함으로써 평가되며; 일부 실시예에서, 특이적 결합은 결합체가 파트너와 다른 실재물 사이의 대안적인 상호작용과 경쟁하는 능력을 검출하거나 결정함으로써 평가된다. 일부 실시예에서, 특이적 결합은 다양한 농도 범위에서 그러한 검출 또는 결정을 수행함으로써 평가된다.

[0121]

대상: 본원에 사용된 바와 같이, 인간을 비롯한 임의의 포유류를 의미한다. 본 발명의 소정의 실시예들에서 대상은 성인, 청소년 또는 유아이다. 일부 실시예에서, "개체" 또는 "환자"라는 용어가 "대상"과 상호교환 가능하도록 사용되며 의도된다. 또한, 본 발명에 의해 약제학적 조성물의 투여 및/또는 자궁 내 치료 방법의 수행이

고려된다.

[0122]

실질적으로: 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "실질적으로"는 관심있는 특징 또는 특성의 전체 또는 거의 전체 범위 또는 정도를 나타내는 정성적 상태를 의미한다. 생물학 기술 분야의 숙련자라면 생물학적 및 화학적 현상이 거의 완성으로 가고 그리고/또는 완성으로 진행하거나 또는 절대적 결과를 달성하지 않거나 희미한다는 것을 이해할 것이다. 그러므로 "실질적으로"라는 용어는 많은 생물학적 및 화학적 현상에 내재된 완성의 잠재적인 부족을 포착하기 위해 여기에서 사용된다.

[0123]

실질적인 서열 상동성: 본원에 사용된 바와 같이, 어구 "실질적인 상동성"은 아미노산 또는 핵산 서열 간의 비교를 의미한다. 본 기술 분야에서 숙련자가 알 수 있는 바와 같이, 2개의 서열은 상응하는 위치에 상동성 잔기를 함유하는 경우 일반적으로 "실질적으로 상동성"인 것으로 간주된다. 상동성 잔기는 동일한 잔기일 수 있다. 대안적으로, 상동성 잔기는 적절하게 유사한 구조적 및/또는 기능적 특성인 동일하지 않은 잔기일 수 있다. 예를 들면, 본 기술 분야에서 숙련자가 알 수 있는 바와 같이, 소정의 아미노산은 통상적으로 "소수성" 또는 "친수성" 아미노산으로, 그리고/또는 "극성" 또는 "비극성" 측쇄를 갖는 것으로 분류된다. 동일한 유형의 다른 것에 대한 하나의 아미노산의 치환은 종종 "동종" 치환으로 간주될 수 있다. 통상적인 아미노산 분류체계는 다음과 같이 요약된다:

알라닌	Ala	A	비극성	중성	1.8
아르기닌	Arg	R	극성	양성	-4.5
아스파라긴	Asn	N	극성	중성	-3.5
아스파르트산	Asp	D	극성	음성	-3.5
시스테인	Cys	C	비극성	중성	2.5
글루탐산	Glu	E	극성	음성	-3.5
글루타민	Gln	Q	극성	중성	-3.5
글리신	Gly	G	비극성	중성	-0.4
히스티딘	His	H	극성	양성	-3.2
이소류신	Ile	I	비극성	중성	4.5
류신	Leu	L	비극성	중성	3.8
라이신	Lys	K	극성	양성	-3.9
메티오닌	Met	M	비극성	중성	1.9
페닐알라닌	Phe	F	비극성	중성	2.8
프롤린	Pro	P	비극성	중성	-1.6
세린	Ser	S	극성	중성	-0.8
쓰레오닌	Thr	T	극성	중성	-0.7
트립토판	Trp	W	비극성	중성	-0.9
티로신	Tyr	Y	극성	중성	-1.3
발린	Val	V	비극성	중성	4.2
불분명한 아미노산				3자	1자
아스파라긴 또는 아스파르트산				Asx	B
글루타민 또는 글루탐산				Glx	Z
루신 또는 이소류신				Xle	J
불특정 또는 미지의 아미노산				Xaa	X

[0124]

당업계에 널리 공지된 바와 같이, 아미노산 서열 또는 핵산 서열은 뉴클레오티드 서열에 대한 BLASTN 및 아미노산 서열에 대한 BLASTP, gapped BLAST 및 PSI-BLAST와 같은 상업적 컴퓨터 프로그램에서 이용가능한 것들을 포함하는, 다양한 알고리즘 중 임의의 것을 사용하여 비교될 수 있다. 예시적인 이러한 프로그램은 Altschul 등, 1990, J. Mol. Biol., 215(3):403-410; Altschul 등, 1996, Meth. Enzymology 266:460-480; Altschul 등, 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Baxevanis 등, Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; 및 Misener, 등, (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999에 기술되어 있다. 상동성 서열의 확인 이외에, 상기 언급된 프로그램은 통상적으로 상동성의 정도의 지표를 제공한다. 일부 실시예에서, 2개의 서열은, 이들의 상응하는 잔기 중 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 그 이상이 잔기들 중 관련 스트레치에 대해 상동성인 경우 실질적으로 상동성인 것으로 간주된다. 일부 실시예에서, 상기 관련 스트레치는 완전한 서열이다. 일부 실시예에서, 상기 관련 스트레치는 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 40, 적어도 45, 적어도 50, 적어도 55, 적어도 60, 적어도 65, 적어도 70, 적어도 75, 적어도 80, 적어도 85, 적어도 90, 적어도 95, 적어도 100, 적어도 125, 적어도 150, 적어도 175, 적어도 200, 적어도 225, 적어도 250, 적어도 275, 적어도 300, 적어도 325, 적어도 350, 적어도 375, 적어도 400, 적어도 425, 적어도 450, 적어도 475, 적어도 500 또는 그 이상의 잔기이다.

[0126]

실질적인 동일성: 본원에 사용된 바와 같이, 어구 "실질적인 동일성"은 아미노산 또는 핵산 서열 간의 비교를 의미한다. 본 기술 분야에서 숙련자가 알 수 있는 바와 같이, 2개의 서열은 상응하는 위치에 동일한 잔기를 함유하는 경우 일반적으로 "실질적으로 동일한" 것으로 간주된다. 당업계에 널리 공지된 바와 같이, 아미노산 서열 또는 핵산 서열은 뉴클레오티드 서열에 대한 BLASTN 및 아미노산 서열에 대한 BLASTP, gapped BLAST 및 PSI-BLAST와 같은 상업적 컴퓨터 프로그램에서 이용가능한 것들을 포함하는, 다양한 알고리즘 중 임의의 것을 사용하여 비교될 수 있다. 예시적인 이러한 프로그램은 Altschul 등, 1990, J. Mol. Biol., 215(3):403-410, 1990; Altschul 등, 1996, Methods in Enzymology 266:460-480; Altschul 등, 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Baxevanis 등, Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; 및 Misener, 등, (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999에 기술되어 있다. 동일성 서열의 확인 이외에, 상기 언급된 프로그램은 통상적으로 동일성의 정도의 지표를 제공한다. 일부 실시예에서, 2개의 서열은, 이들의 상응하는 잔기 중 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상이 잔기들 중 관련 스트레치에 대해 동일성인 경우 실질적으로 동일성인 것으로 간주된다. 일부 실시예에서, 상기 관련 스트레치는 완전한 서열이다. 일부 실시예에서, 상기 관련 스트레치는 적어도 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 또는 그 이상의 잔기이다. CDR의 문맥에서, "실질적인 동일성"에 대한 참조는 통상적으로 참조 CDR와 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR을 의미한다.

[0127]

표면 플라스몬 공명: 본원에서 사용된 바와 같이, 예를 들어, BIACore 시스템(Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.)을 사용하는 것과 같이, 바이오센서 매트릭스 내의 단백질 농도의 변경의 검출을 통해, 실시간으로 특이적 결합 상호작용의 분석을 가능하게 하는 광학 현상을 의미한다. 자세한 설명은, Jonsson, U. 등, 1993, Ann. Biol. Clin. 51:19-26; Jonsson, U. 등, 1991, Biotechniques 11:620-627; Johnsson, B. 등, 1995, J. Mol. Recognit. 8:125-131; 및 Johnnson, B. 등, 1991, Anal. Biochem. 198:268-277을 참고한다.

[0128]

치료 유효량: 본원에 사용된 바와 같이, 투여에 대해 바람직한 효과를 생성하는 양을 의미한다. 일부 실시예에서, 상기 용어는 치료학적 투여 요법에 따라 질환, 장애 및/또는 상태를 앓고 있거나 감염되기 쉬운 집단에 투여될 때, 질환, 장애 및/또는 상태를 치료하기에 충분한 양을 지칭한다. 일부 실시예에서, 치료 유효량은 질병, 장애, 및/또는 상태의 하나 이상의 징후의, 발생률 및/또는 증증도를 낮추고 발병을 저연시키는 것이다. 당업자라면 용어 "치료 유효량"이 사실상 특정 개체에서 달성될 성공적인 치료가 요구되지 않는다는 것을 이해할 것이다. 오히려, 치료 유효량은 그러한 치료를 필요로 하는 환자에게 투여될 때 상당한 수의 대상에서 특정의 바람직한 약리학적 반응을 제공하는 양일 수 있다. 일부 실시예에서, 치료 유효량에 대한 언급은 하나 이상의 특이적 조직 (예를 들어, 질병, 장애 또는 상태에 의해 영향을 받은 조직) 또는 체액 (예를 들어, 혈액, 타액, 혈청, 땀, 눈물, 소변 등)에서 측정된 양에 대한 참조일 수 있다. 당업자라면 일부 실시예에서, 치료 유효성의 특정 제제 또는 치료가 단일 투여량으로 제형화될 수 있고 그리고/또는 투여될 수 있음을 인식할 것이다. 일부 실시예에서, 치료 유효성 제제는 예를 들어, 투여 요법의 일부로서, 복수의 투여량으로 제형화 및/또는 투여될 수 있다.

[0129]

형질전환: 본원에 사용된 바와 같이, 외인성 DNA가 숙주 세포 내로 도입되는 임의의 과정을 의미한다. 형질전환은 당업계에 널리 공지된 다양한 방법을 사용하여 자연 조건 또는 인공 조건 하에서 발생할 수 있다. 형질전환은 외래 핵산 서열을 원핵 또는 진핵 숙주 세포 내로 삽입하기 위한 임의의 공지된 방법에 의존할 수 있다. 일부 실시예에서, 특정 형질전환 방법론은 형질전환되는 숙주 세포를 기반으로 선택되며, 바이러스 감염, 전기천공(electroporation), 교배(mating), 리포펙션(lipofection)을 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다. 일부 실시예에서, "형질전환" 된 세포는 삽입된 DNA가 자율적으로 복제하는 플라스미드로서 또는 숙주 염색체의 일부로서 복제할 수 있다는 점에서 안정적으로 형질전환된다. 일부 실시예에서, 형질전환된 세포는 제한된 기간 동안 도입된 핵산을 일시적으로 발현한다.

[0130]

벡터: 본원에 사용된 바와 같이, 연결된 다른 핵산을 운반할 수 있는 핵산 분자를 의미한다. 한 유형의 벡터는 "플라스미드"이며, 추가 DNA 절편이 연결될 수 있는 원형의 이중 가닥 DNA 루프를 의미한다. 또 다른 유형의 벡터는 바이러스 벡터이며, 추가 DNA 절편이 바이러스 게놈에 연결될 수 있다. 특정 벡터는 그들이 도입되는 숙주 세포에서 자율 복제가 가능하다 (예를 들어, 박테리아의 복제 기원을 갖는 박테리아 벡터 및 에피솜 포유류 벡터). 다른 벡터 (예를 들어, 비-에피솜 포유류 벡터)는 숙주 세포 내로 도입되면 숙주 세포의 게놈에 통합될 수

있으며, 따라서 숙주 세포와 함께 복제된다. 또한, 특정 벡터는 작동 가능하게 연결되는 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터를 본원에서 "발현 벡터"라고 부른다.

[0131] 소정의 실시예에 대한 상세한 설명

본 발명은 부분적으로, MHC 결합 포켓 내 펩티드의 말단 부분 (즉, 항원 펩티드의 N-말단 또는 C-말단 단부; 예를 들면, 1번 위치 및 8번 위치)에 대한 우선적인 결합을 갖는, MHC 분자 (예를 들어, I 류 분자)에 의해 제시되는 펩티드와의 TCR 상호작용을 모방하는 고 친화도 인간 항체 제제 (예를 들어, 인간 단일클론 항체)가 생성될 수 있다는 인식에 기초한다 (본원에서 I 형 항체라고 함). 또한, MHC 결합 포켓 내 펩티드의 중간 또는 중앙 부분 (예를 들어, 5번 위치)에 대한 우선적인 결합을 갖는 항체 제제는 일반적으로 더욱 낮은 친화도를 나타내며, 쉽게 친화도 성숙되지 않는다 (본원에서 II 형 항체라고 함). 본 발명은 또한 종양 세포주 상에서 자연 가공된 펩티드가 인 실리코 예측과 다를 수 있고, 이러한 자연 가공된 펩티드가 I 형 항체에 의해서가 아닌, II 형 항체에 의해 인지된다는 인식에 기초한다. 한 가지 예를 들자면, 본 발명은 인간 항체 제제가, (1) 인간 MHC I 류 분자 (예를 들어, HLA-A02)에 의해 제시된 EBV 잠복 막 2 펩티드 및 (2) 비특이적 면역 효과기 세포 (예를 들어, T 세포)를 결합하는 다중특이적 결합제(예를 들어, 이중특이적 항체)와 관련하여 사용되는 경우, 앱스타인-바 바이러스 (EBV)-감염 세포주가 I 형 항체에 의해서가 아닌, II 형 항체에 의해 우선적으로 살해된다는 것을 입증한다.

본 발명은 다른 것들 보다도, 인간 MHC 분자-결합 포켓에 제시되는 앱스타인-바 바이러스 (EBV)-연관 항원의 중심 부분을 결합하는 II 형 인간 단일클론 항체의 성공적인 생산 및 선별을 입증한다. 본 발명은 부분적으로, EBV-연관 항원에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)가 HLA-A02(예, HLA-A*02:01)와 관련하여 항원성 펩티드의 5번 위치와 우선적으로 상호작용한다는 인식에 기초한다. 따라서, 본 발명은 다른 것들 보다도, 여기에 기재된 인간 항체 제제가 HLA-A02 결합 포켓에 제시된 EBV 잠복 막 단백질 2 (LMP2) 펩티드의 중앙 부분 (예, 5번 위치)에 결합한다는 점에서 EBV-연관 항원과의 TCR 상호작용을 모방하는 인간 항체 제제를 제공한다. 본 발명은 인간 HLA-A02 (예, HLA-A*02:01) 분자와 관련하여 EBV-LMP2 (CLGGLTMV; 서열 번호 1)에서 유래한 펩티드를 표적으로 하는 인간 항체 제제를 제공한다. LMP2는 EBV 감염 B-세포와 비인두 및 위 상피 세포 모두에서 발현되므로, 상기 인간 항체 제제는 EBV-연관 질환 및 악성 종양의 치료 및 진단에 유용하다.

다른 것들 보다도, 본 발명은 또한 인간 MHC 분자-결합 포켓에 제시된 EBV-LMP2 펩티드를 결합하는 다중특이적 결합제(예를 들어, 이중특이적 항체)의 성공적인 생산을 입증한다. 특히, 본 발명은 HLA-A02 결합 포켓에 제시된 EBV-LMP2 펩티드의 중심 부분 (예를 들어, 5번 위치)에 결합하는 다중특이적 결합제를 구체적으로 제공한다. 이러한 다중특이적 결합제는 EBV^+ B-림프모구성 세포주 (B-lymphoblastoid cell line, BLCL) 및 종양 세포주를 포함한 세포독성 검정에서 높은 특이성 및 효능을 특징으로 한다.

특정 이론에 구속되기를 바라지는 않지만, 세포질 항원에 도달하는 유일한 알려진 방법론은 TCR과의 상호작용을 통해 처음 발견되는, 세포 표면에 제시된 펩티드-HLA 복합체를 이용하는 것임을 유의하기로 한다. TCR 모방체라고 불리는, 특이적 항체가 보고되었지만, 임상 잠재력을 실현한 경우는 (있다 하더라도) 거의 없다. 알려진 TCR-펩티드-HLA 구조의 결정학상 구조에 대한 상세한 메타 분석과 EBV-LMP2 펩티드를 이용한 실험 데이터에 기초하여, 본 발명은, 다른 것들 보다도, (1) TCR이 HLA 포켓에서 펩티드의 말단 위치가 아니라 중심부 (4-7번 위치)의 우선적 결합을 일관되게 나타내고, (2) 펩티드-HLA 복합체의 4-7번 위치 (P4-P7)에 특이성을 갖는 항체 제제(즉, II 형 TCR 모방체)가 매우 특이적이지만, 일반적으로 천연 TCR과 유사한 낮은 친화도와 연관되고, (3) HLA 포켓에서 펩티드의 말단 위치에 우선적으로 결합하는 항체(즉, I 형 TCR 모방체)는 높은 친화도와 연관되지만, 펩티드 말단이 천연 아미노산(들)에 의해 차단되는 경우 친화도를 상실하고, (4) 그러한 세포에 제시된 펩티드가 자유 단부를 가지고 있는 9량체를 제시할 가능성이 없지만, 오히려 10량체, 11량체, 또는 12량체 펩티드를 제시하기 때문에, 형질전환된 세포에서 자연적으로 제시된 펩티드-HLA 복합체를 I 형 TCR 모방체가 인식하지 못하고, 그리고 (5) 펩티드-HLA 복합체에서 펩티드의 말단 부분에 대한 특이성을 갖는 TCR 모방체는 HLA-A02 대립 유전자를 포함하는 무관한 펩티드-HLA 복합체와 교차-반응할 가능성이 더 높다는 점을 입증한다. 또한, 천연 TCR 및 II 형 TCR 모방체 모두의 낮은 친화도 특성은 잔기가 고정되는 말단 위치에 의해 펩티드의 중간 (또는 중심) 위치의 엔트로피 자유의 결과이다. 이렇게 낮은 친화도는 T 세포가 표적에서 해리되어 연쇄 살해를 계속 할 수 있도록 하며, 세포 표면에서 자유롭게 이동하는 TCR의 다중 사본의 존재에 의해 균형을 이루게 된다. 따라서, 적어도 일부 실시예에서, 본 발명은 이러한 제제가 천연 TCR에 보다 특이적이고 유사하고 그러한 제제의 2가 및 4가 형태가 교차 반응을 겪지 않으면서 효능 및 임상 유용성을 향상시켜야 한다는 인식에 기초하여 암 진단 및 치료를 위한 II 형 TCR 모방체의 개발을 포함한다.

[0136] **엡스타인-바 바이러스 감염과 암**

[0137] 엡스타인-바 바이러스 (EBV)와 악성 종양의 연관성이 보고되었다 (예를 들어, Coghill, A.E. 및 A. Hildesheim, 2014, Am. J. Epidemiol. 180:687-95에 보고되었음). EBV는 발암 유전자로 확인된 최초의 바이러스 중 하나였다. EBV는 CD21과 MHC II 류와의 상호작용을 통해 B 세포를 감염시키는데 극히 효과적이다 (Hislop, A.D., G.S. Taylor, 및 D. Sauce 등, 2007, Ann. Rev. Immunol. 25:587-617). 그러나 EBV는 또한 덜 효율적이며 잘 이해되지 않는 과정을 상피 세포에서 감염시키고 유지될 수 있다.

[0138] 거의 세계의 모든 성인이 EBV에 노출되었다. 면역 결핍이 없는 경우, 어떤 시절의 초기 노출은 세포성 면역 반응에 의해 조절되는 자가-치유 병(self-limited illness)을 초래한다 (Hislop, A.D., G.S. Taylor, 및 D. Sauce 등, 2007, Ann. Rev. Immunol. 25:587-617). 엡스타인-바 바이러스 (EBV) 및 EBV-연관 질환에 대한 면역 방어의 존재는 잘 알려져 있다 (Hislop, A.D. 등, 2007, Ann. Rev. Immunol. 25:587-617; Long, H.M. 등, 2011, J. Immunol. 187:92-101). 바이러스 단백질에 대해 숙주가 항원 특이적 T-세포를 생성하는 것은 바이러스에 대해 매우 효과적이다. 그러나, EBV는 완전히 제거되지 않고 상피 세포 또는 B 세포에서 지속될 수 있다 (Long, H.M. 등, 2011, J. Immunol. 187:92-101). 숙주의 면역 상태의 임의의 변화는 재활성화로 이어질 수 있으며 면역 결핍의 정도에 따라, 이러한 재활성화는 악성 종양을 유발할 수 있다.

[0139] 바이러스 복제는 용균 복제 또는 잠복기를 통한 복제와 같은 두 가지 메커니즘에 의해 일어날 수 있다. 전자는 선형 바이러스 게놈을 필요로 하며, 활성 비리온을 생산하고 숙주 세포를 파괴한다. 반대로, 잠복기를 통한 복제는 바이러스 게놈이 숙주의 세포 DNA 중합효소에 의해 복제되는 에피솜을 생성할 때 일어난다. 그것은 세포의 복제를 영속시키며 그것과 함께 EBV 감염을 영속시킨다. 잠복기를 통한 복제는 발현되는 EBV 유전자 래퍼토리가 각각 다양한, 3가지 다른 잠복기 프로그램을 생성할 수 있다.

[0140] EBV는 고령 기관 및 조혈모세포 이식 (HSCT)의 세팅에서 가장 잘 연구되어 왔으며, 이 경우 T-세포의 수가 감소하거나 없어서 EBV를 포함하는 B-세포의 제한없는 증식을 유발할 수 있다 (Rasche, L. 등, 2014, Bone Marrow Transplant 49:163-7). 이러한 조절되지 않는 확장은 가장 흔한 이식 후 악성 종양인, 이식 후 림프증식성 질환 (PTLD)으로 이어질 수 있다. 이 중후군의 빈도와 강도는 각 환자마다 다르며 면역 억제가 T 세포 집단에 미치는 영향도 다양하다 (Bollard, C.M. 등, 2012, Nat. Rev. Clin. Oncol. 9:510-9).

[0141] 그러나, EBV는 또한 다른 악성 종양에 연관된다. 다양한 연구가 EBV가 다양한 상피 세포 및 림프계 악성 종양의 발병 기전에 관여함을 의미한다. 예를 들면, 호지킨 (Glaser, S.L. 등, 1997, Int. J. Cancer 70:375-82)과 비호지킨 림프종은 EBV와 관련이 있지만 이 질병의 발달에 있어서 그 역할은 잘 알려져 있지 않다는 것이 잘 알려져 있다. 마찬가지로, EBV와 비인두암 사이에 명확한 인과 관계가 있지만(NPC; Shanmugaratnam, K., 1978, IARC Sci. Publ 1:3-12), 이 신생물의 발병 기전에 대한 EBV의 역할은 완전히 이해되지 않았다. 호지킨 림프종 및 NPC 환자의 종양 샘플은 잠복 막 단백질 2 (LMP2)을 포함한 EBV 유래 단백질을 발현한다. LMP-2는 또한 EBV 관련 위암의 40%에서 발견되었다. 이들은 비-차립적이며 EBV에 대한 세포성 면역 반응의 주요 표적이기도 하기 때문에, 면역요법에 대한 이상적인 표적이 된다.

[0142] EBV와 연관된 LMP2(+) 인간 악성 종양의 목록에는 버킷 림프종, 면역억제성 림프종, 미만성 거대 B세포 림프종 (diffuse large B-cell lymphom), 만성 염증과 연관된 미만성 거대 B세포 림프종, 림프종양 육아종증 (lymphomatoid granulomatosis), 형질모세포 림프종, 원발성 삼출성 림프종(primary effusion lymphoma), 이식 후 림프 증식성 질환, 비인두 암종, 위 선암종, 림프상피종양-연관 암종 (lymphanepithelioma-associated carcinoma), 및 면역 결핍-관련 평활근 육종을 포함한다 (Ok, CY 등, 2015, Exp. Mol. Med. 47:e132; Grywalska, E. and J. Rolinski, 2015, Semin. Oncol. 42:291-303; Petersson, F., 2015, Semin. Diagn. Pathol. 32:54-73; Tsao, S.W. 등, 2015, J. Pathol. 235(2):323-33).

[0143] **EBV 잠복 단백질의 발현**

[0144] 휴지중인 B-세포의 EBV 감염/형질전환은 잠복 림프모구성 세포주 (LCL)를 생산한다. 이 과정은 마모셋 (marmoset) B-림프모구성 세포주 B95-8에 존재하는 EBV의 B95-8 균주를 사용하여 시험관 내에서 정확하게 복제되었다 (Menezes, J. 등, 1975, Biomedicine 22:276-84). 실험실에서의 BLCL 생산은 EBV 감염의 이해와 특성 규명 및 EBV 감염에 대한 면역 반응에서 매우 중요했다. 대조적으로, 상피 세포의 시험관 내 감염은 효과적이지 않으며, 이 상호작용을 이해할 수 있는 현재의 모델은 없다.

[0145] LCL은 잠복 복제에 존재하고 바이러스 게놈의 다종 사본을 에피솜으로 소지하고 있다. 그들은 잠복기 단계에 따라 달라지는 잠복 단백질이라는 수많은 바이러스 유전자 산물을 발현한다.

- [0146] 총 10개의 잠복기 단백질이 기술되었다: 6개의 엡스타인 바이러스 핵 항원 (EBNA 1, 2, 3A, 3B, 3C 및 LP), 3개의 잠복 막 단백질 (LMP 1, 2A 및 2B) 및 BARF1. 초기 EBV 감염은 B-세포를 활성화시키고 EBNA1, EBNA2, EBNA3, LMP1, LMP2 및 BARF1이 발현될 때 잠복기 III를 유도한다 (Bollard 등, Nat. Rev. Clin. Oncol. 9:510, 2012). 그 다음에는 EBNA1, LMP1 및 LMP2가 발현되는, 잠복기 II라고 불리는, 바이러스 산물의 보다 제한된 발현 및 감염된 B-세포의 메모리 B-세포로의 변환이 뒤따른다. 이들 항원의 발현에 대한 추가 제한은 EBNA-1, LMP2 및 BARF1 만 발현되는 잠복기 I을 초래한다.
- [0147] B-세포는 I 내지 III의 잠복기 프로그램을 가질 수 있다. 그러나 상피 세포는 잠복기 I과 II 만 제시한다. LMP-2A는 잠복기 I, II 및 III에서 발현되며 (Bollard, C.M. 등, 2012, Nat. Rev. Clin. Oncol. 9(9):510-9), 따라서 다수의 고형 및 비-고형 악성 종양에 대한 매력적인 표적이다.
- [0148] **EBV 및 적응 T 세포 치료에 대한 면역 반응**
- [0149] 체내의 거의 모든 유핵 세포(nucleated cell)는 인간 백혈구 항원 - I 류 (HLA I 류) 분자를 발현한다. 이들 분자는 단백질이 세포 표면에 존재하는지 또는 세포질 내에 존재하는지에 관계없이 세포에 의해 발현된 임의의 단백질에서 유래된 웨티드를 제시할 수 있는 능력을 가지고 있다. 본 발명은 이러한 웨티드-HLA 복합체에 대해 탐색된 면역 반응이 자기(self)를 비-자기(non-self)와 구별할 수 있는 성공적인 세포성 면역성에 대한 기반을 형성한다는 인식에 기초한다. 예를 들어, 호지킨 림프종 (HL)과 비인두 암종 (NPC) 세포는 EBV 유래 단백질을 구성적으로 발현하며, HLA 분자와 관련하여 제시된 이들 단백질 유래의 면역원성 웨티드는 이 EBV 연관 악성 종양에 대한 치료 전략에서 세포성 면역을 활용할 수 있는 독특한 기회를 제공한다.
- [0150] T 세포는 클론 T 세포 수용체를 통해 이러한 웨티드-HLA 복합체를 인식한다(TCR; Haigh, T.A. 등, 2008, J. Immunol. 180:1643-54.). 실제로, 동종이식 골수 또는 줄기세포 이식 (HSCT) 또는 고형 기관 이식의 수혜자에서 EBV-재발에 대한 매우 효과적인 치료는 적응성 T-세포 치료이다. 더 중요한 것은, 특히 T-결핍 이식편을 가진 이식 후 림프 증식성 질환 (PTLD)은, EBV 감염된 B 세포의 T 세포 조절이 손실되는 결과이고, 이제는 70% 사례에서 공여자 T 세포 주입, 또는 EBV-특이적 동종이식 T 세포 주입에 의해 성공적으로 치료될 수 있다 (Bollard, C.M. 등, 2012, Nat. Rev. Clin. Oncol. 9:510-9).
- [0151] 엡스타인-바 바이러스 (EBV) 및 EBV-연관 질환에 대한 면역 방어는 잘 알려져 있다 (Hislop, A.D. 등, 2007, Ann. Rev. Immunol. 25:587-617; Long, H.M. 등, 2011, Curr. Opin. Immunol. 23:258-64, 2011. EBV 담체는 EBV 단백질의 면역 우성 계급을 나타내는, EBV-특이적 CD4⁺ 및 CD8⁺ 다기능 T-세포 반응을 생성한다: (CD4+ T 세포 경우, EBNA1 > EBNA3/LMP2 및 CD8+ T 세포 경우, EBNA3 > LMP2 > EBNA1; Ning, R.J. 등, 2011, Immunology 134:161-71.). EBV-잠복 막 단백질 (LMP) 1 및 2는 EBV1과 함께, EBV-연관 호지킨 림프종 (HL) 및 비인두 암종 (NPC)에서 발현되는 세 가지 바이러스 단백질이다. 이 종양들은 HLA I 류 및 II 류-양성이므로, LMP 및 EBNA1은 CD8 및 CD4 T 세포 표적으로서 작용할 수 있다 (Haigh, T.A. 등, 2008, J. Immunol. 180:1643-54). 이들 잠복 유전자 산물 (0.05%-1%)에서 유래한 에피토프에 대해 특이적인 CTL의 우세한 빈도에도 불구하고, 생체 내 EBV 감염의 조절에 관여한다 (Hislop, A.D. 등, 2007, Ann. Rev. Immunol. 25:587-617). 이 세 가지 항원을 표적으로 하는 DNA 백신이 NPC 환자에서 테스트되었다 (Lutzky, V.P. 등, 2010, J. Virol. 84:407-17). A11에 대한 LMP2 SSC 웨티드 (SSCSSCPLSK; 서열번호 121)는 대부분의 NPC 환자에서 반응을 유도했다. B55(아시아 인구에서 고빈도 대립형질)에 대한 웨티드 APYL (APYLFWLAA; 서열번호 122)도 관심의 대상이다. NPC를 위한 적응성 T 세포 치료 또한 안전하고 임상적 가능성이 있음이 입증되었다 (Louis, C.U. 등, 2010, J. Immunother. 33:983-90). LMP2 및 EBNA3 특이적 T 세포는 EBNA1 또는 LMP1 특이적 T 세포보다 일반적이었다. HLA-A02에 대한 LMP-2 웨티드 CLGGLLTMV (340-349; 서열번호 1) 및 HLA-A11에 대한 SSCSSCPLSK (426-434; 서열 번호 121)는 관련성이 매우 높은 T 세포 에피토프(TCE)이다.
- [0152] EBV 유래 단백질에 대해 특이적인 T 세포의 생성 및 활성화를 개선하기 위한 노력으로, LMP2를 표적으로 하는 백신이 NPC 환자에서 테스트되었다. Lutzky 등 (2010, 상기)은 정상 공여자와 NPC 환자에서 LMP2 특이적 반응을 생성하는, 아데노바이러스를 가진 EBNA1, LMP1 및 LMP2에 대한 서열을 포함하는 스크램블된 웨티드를 사용하였다 (Lutzky, V.P. 등, 2010, J. Virol. 84:407-17). Cheung 등은 LMP2 유래 웨티드 (SSCSSCPLSK; 서열번호 121)가 금 나노입자를 사용하여 구축물에 사용했을 때 EBV 형질전환 세포에 대한 반응을 입증했다(Cheung, W.H. 등, 2009, Bioconjug. Chem. 20:24-31). 마찬가지로, EBNA1, LMP1 및 LMP2로부터의 서열을 함유하는, APYL 웨티드 (서열번호 122)의 사용은 또한 몇가지 반응을 나타냈다. 또한, NPC에 대한 적응성 T 세포 치료는 안전하다고 입증되었으며 임상 활성에 대한 제안을 가졌다 (Louis, C.U. 등, 2010, J. Immunother. 33:983-90). HLA-A*02:01에 특이적인 LMP-2 웨티드 CLGGLLTMV (340-349; 서열번호 1)는 II 기 잠복기를 갖는 EBV 관련 고형 및

비-고형 악성 종양에 대해 효과적인 것으로 보고되었다. 실제로, 이 웨티드는 HLA-A*02:01 공여자를 위한 LMP2A의 전체 서열 내에서 가장 면역원성이 있다.

[0153] 이러한 전임상 및 임상적 성공에도 불구하고, EBV-연관 악성 종양에서의 EBV 감복기 에피토프의 발현에 관한 불확실성이 있다. 질량 분석기가 집단 수준에서 이러한 에피토프의 존재 또는 부재를 평가할 수 있지만 (Weidanz, JA 등, 2011, Int. Rev. Immunol. 30:328-40), 종양 내 및 종양 사이의 세포에서 세포로의 이질성을 평가하기 어려웠다. 웨티드-HLA 복합체에 특이적인 항체 (TCR 모방체라고 함)의 발견은 그러한 문제를 재검토할 수 있는 새로운 기회를 제공한다 (Sim, A.C. 등, 2013, Sci. Rep. 3:3232). HLA-A*02:01과 연관된 감복 에피토프 LMP1(125-133), LMP2A(340-349) 또는 EBNA1(562-570)을 표적으로 하는 세 가지 TCR-유사 쥐 단일클론 항체가 내인성으로 생성된 EBV 에피토프의 발현 계층구조를 맵핑하도록 최근에 기술되었다. HLA-A*02:01과 연관된 EBNA(1562-570)의 우세가 세포주 및 EBV-연관 종양 생검에서 일관되게 관찰되었다.

T 세포 수용체-유사 단일클론 항체

[0155] 대부분의 세포질 단백질의 표면 발현이 없으면 일반 항체로 표적화하는 것이 거의 불가능해진다. 그러나, 이러한 단백질에서 유래한 항원성 웨티드는 MHC I 류 분자 내의 세포 표면에 제시되며, TCR 결합과 닮았거나 이를 복제하는 항체로 표적화될 수 있다 (Dahan, R. 및 Y. Reiter, 2012, Expert Rev. Mol. Med. 14:e6; Denkberg, G. 등, 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:9421-6; Sergeeva, A. 등, 2011, Blood 117:4262-72; Tashev, D.V. 등, 2012, Cancer Gene Ther. 19:84-100; Dao, T. 등, 2013, Sci. Transl. Med. 5:176ra33). 이 웨티드-HLA 복합체는 길이가 다양할 수 있지만 I 류 대립형질에 대해 보통 9개 아미노산인, 짧은 웨티드 서열을 포함한다 (Townsend, A. 및 H. Bodmer, 1989, Ann. Rev. Immunol. 7:601-24; Rudolph, M.G. 등, 2005, Ann. Rev. Immunol. 24:419-466). 이 9량체 내에는 보통 HLA-A*02:01 대립형질에 대해 2 및 9번 위치 (P2와 P9)에 있는 2개의 고정 잔기가 있다 (Parker, K.C. 등, 1992, J. Immunol. 149:3580-7). 여러 TCR-웨티드-HLA 복합체의 공동-결정화 구조는 면역 시냅스에서 복합체 (웨티드, HLA, TCR)의 세 구성원의 상호작용에 대한 더 나은 이해를 가능하게 했다.

[0156] 예를 들면, CD8⁺ T 세포의 TCR은 이 복합체의 3가지 구성원에 의해 운반되는 여러 상호작용 부위를 가지고 웨티드-HLA 복합체에 대각선으로 평균 35 도의 각도로 결합한다. 그러나, T 세포 활성화 자체는 성공적인 면역 반응을 일으키기 위해 없어서는 안되는 몇 가지 접촉 아미노산에만 의존한다. 이러한 일차 및 이차 접촉 부위는 항원성 웨티드의 중간 부분에 위치하는 2개 내지 5개의 아미노산 잔기의 측쇄에 의해 결정된다 (Rudolph, MG 및 Wilson IA, Curr. Opin. Immunol. 14(1):52-65, 2002), 이른바 기능성 핫스팟 (Massimo, D. 등, 2000, Immunity 12:251-261). I 류 대립형질에 제시된 가장 빈번한 웨티드 길이인, 9량체 웨티드의 경우에, TCR 상호작용에 대한 가장 중요한 잔기는 P6, P7 및 P8이 보조 역할을 하면서, 항원성 웨티드의 5번 위치(P5)에 위치한다 (Rudolph, M.G. 등, 2005, Ann. Rev. Immunol. 24:419-466; Rudolph, MG 및 Wilson IA, Curr. Opin. Immunol. 14(1):52-65, 2002; Massimo, D. 등, 2000, Immunity 12:251-261). 8량체 웨티드에서, 가장 관련이 있는 잔기는 P4, P6 및 P7이다 (Rudolph, M.G. 등, 2005, Ann. Rev. Immunol. 24:419-466; Rudolph, MG 및 Wilson IA, Curr. Opin. Immunol. 14(1):52-65, 2002; Massimo, D. 등, 2000, Immunity 12:251-261). 구조적 증거 외에도, 항원성 웨티드 내에서 이러한 영역들의 기능적 중요성이 일관되게 입증되었다. 예를 들면, EBV-특이적 메모리 T-세포 활성화는 이 잔기가 일차 접촉 부위 중 하나인 한, 한 개의 아미노산 만큼 적게 일어날 수 있다 (Reali, E. 등, 1999, J. Immunol. 162:106-113).

[0157] 웨티드-MHC 복합체를 표적으로 하는 항체는 웨티드-MHC 복합체에 결합하기 때문에 적당히 "TCR 모방체"라고 불리며, TCR 결합을 복제하는 것으로 생각된다. 처음에는 생성하기가 어려웠지만, 가용성 웨티드-MHC 단량체와 과지 디스플레이 기술의 이용가능성이 그 생성을 크게 촉진시켰다 (Dahan, R. 및 Y. Reiter Y, 2011, Expert Rev. Mol. Med. 14). 가용성 TCR은 성공적으로 생성되었고 친화도 성숙되었다 (Liddy, N. 등, 2012, Nat. Med. 18:980-987). 그러나, TCR 모방체 항체 시약은 다음과 같은 이유로 이들보다 뚜렷한 장점을 가지고 있다: (1) 스크리닝하기에 TCR 라이브러리보다 큰 라이브러리, (2) 천연 및 인공 라이브러리 모두 사용할 수 있으며, 이들 중 후자는 면역계의 성숙 과정에서 삭제된 클론을 찾는데 이상적이다, (3) 웨티드의 아미노산 위치 각각에서 지시된 항체를 선택함에 의한 에피토프 선호도의 미세 조정, (4) 표준 과자 또는 효모 디스플레이 기술을 이용한 친화도 성숙, (5) Fab, scFv 또는 IgG, 또는 심지어 다중체 포맷을 사용한 원자가 제어, 및 (6) 항체-기반 대 TCR-기반 플랫폼에 대한 제조 및 유전자 조작의 용이성. 조작을 통해, 진단 및 치료 모두의 약물 후보물질은 T 세포 반응을 인공적으로 생성하기 위해 항체-약물 접합체, 방사능-접합체, 독소 접합체 및 이중특이적 항체를 포함하지만, 이에 한정되지 않는, 이러한 TCR 모방체로부터 유래할 수 있다.

[0158]

Andersen 등이 TCR 특이성을 가진 단일클론 항체를 처음으로 생산한 이래 (Andersen, P.S. 등, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:1820-4), 60개가 넘는 TCR 모방체 단일클론 항체가 인간 펩티드-HLA I 류 복합체에 대해 생성되었다. 이러한 단일클론 항체는 전임상 모델에서 항원 제시 및 치료제로서의 특성을 나타내기 위해 성공적으로 사용되어 왔다. 그러나, 항원성 펩티드의 특이적 부분에 대한 이들 시약의 특이성에 대한 정보가 부족하며, 이들 중 어느 것도 일차 및 이차 접촉 잔기를 특이적으로 표적화하도록 생성되지 못했다 (Townsend, A. 및 H. Bodmer, 1989, Ann. Rev. Immunol. 7:601-24; Willemse, RA 등, 2001, Gene Ther. 8(21):1601-8, 2001; Low, JL 등, 2012, PLOS ONE 7(12):e51397; Miller, KR 등, 2012, PLOS ONE 7(8):e43746; Biddison, WE 등, 2003, J. Immunol. 171(6):3064-74; Cohen, CJ 등, 2002, Cancer Res. 62(20):5835-44; Cohen, CJ 등 2003, J. Immunol. 170(8):4349-61; Dao, T 등, 2013, Sci. Transl. Med. 5(176):176ra33; Denkberg, G 등, 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99(14):9421-6; Epel, M 등, 2008, Eur. J. Immunol. 38:1706-20; Zhang, G 등, 2014, Scientific Reports 4:3571; Klechevsky, E 등, 2008, Cancer Res. 68(15):6360-7; Oren, R 등, 2014, J. Immunol. 193(11):5733-43; Sergeeva, A 등, 2011, Blood 117(16):4262-72; Stewart-Jones, G 등, 2009, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106(14):5784-8; Verma, B 등, 2011, J. Immunol. 186(5):3265-76; Weidanz, JA 등, 2006, J. Immunol. 177(8):5088-97; Ziegler, A 등, 2007, Recent Results Cancer Res. 176:229-41). 따라서, 비록 이러한 단일클론 항체가 펩티드-HLA 복합체에 결합하더라도, TCR이 펩티드-HLA에 결합하는 것을 반드시 복제하지는 않는다.

[0159]

항원 인식을 위한 가장 중요한 잔기를 표적으로 하지 않는 것은 TCR 모방체를 치료제로 개발할 때 특히 중요한 의미를 지닌다. 가능성 핫스팟을 표적으로 하지 않음으로써, 그러한 시약은 특히 다가 체결 (예, 키메라 항원 수용체)이 도입될 때, 비특이적인 상호작용이나 에피토프 스프레드가 일어나기 쉽다 (Oren, R. 등, 2014, J. Immunol. 193:5733-43). 또한, TCR 단일클론 항체 모방체의 생성은 대개 관련성을 순상시킬 수 있는 선별 편견을 만들어내면서 생체 내에서 제시된 항원성 펩티드와 다를 수 있는, 인 실리코에서 생성되는 펩티드 서열을 사용한다 (Scott, R.B. 등, 2006, Trends Immunol. 27:11-16).

[0160]

진정한 2세대 T 세포 수용체 단일클론 항체 모방체의 생성

[0161]

진정한 TCR-유사 단일클론 항체를 생성하기 위해, 본 발명자들은 먼저 TCR이 펩티드-HLA 복합체에 본래 어떻게 결합하는지를 결정하였다. 본 발명자들은 단백질 데이터 뱅크로부터 14가지의 독특한 TCR:9량체-펩티드/HLA I 류 공-결정 구조를 확인하였다 (표 1; Stewart-Jones, G.B. 등, 2003; Nat. Immunol. 4:657-63; Garboczi, D.N. 등, 1996, Nature 384:134-41; Ding, Y.H. 등, 1998, Immunity 8:403-11; Chen, J.L. 등, 2005, J. Exp. Med. 201:1243-55; Borbulevych, O.Y. 등, 2009, Immunity 31:885-96; Borbulevych, O.Y. 등, 2011, J. Immunol. 186:2950-8; Gras, S. 등 2009, J. Immunol. 183:430-7). 천연 인간 TCR:HLA 상호작용만 고려한 반면, 비인간 TCR, 비천연 펩티드 변형체 및 인공적으로 친화도 증진된 TCR은 제외하였다. 본 발명자들은 또한 단백질 데이터 뱅크 (표 2)로부터 5개의 독특한 TCR:10량체-펩티드/HLA I 류 공-결정 구조를 확인하였다. 10량체-데이터 세트의 크기가 더 작기 때문에, 본 발명자들은 불규칙변화성(heteroclitic) 펩티드를 갖는 2가지 구조를 포함하였다. 이러한 구조 전부는 TCR이 HLA 결합 포켓 (또는 갈라진 틈)에서 펩티드와 대각선으로 결합하는 경우, 일반적인 결합 기하구조를 공유한다는 것을 보여주었다. 그런 다음 본 발명자들은 CHARMM 힘 필드 시뮬레이션을 사용하여 결합된 TCR과 펩티드의 잔기 당 상호작용 에너지를 계산함으로써 이 상호작용에 대한 보다 상세한 분자 분석을 수행하였다.

[0162]

Discovery Studio 4.1 (Accelrys, 미국 캘리포니아 샌디에고)을 사용하여 분자 모델링 및 상호작용 에너지 계산을 수행했다. TCR-펩티드-HLA 복합체의 결정 구조는 CHARMM (Chemistry at Harvard Molecular mechanics) 힘 필드 시뮬레이션을 사용하여 에너지-최소화되었고, 이어서 원자 상호작용 에너지를 반데르 발스와 정전기 에너지의 합으로 계산하였다.

표 1

[0163]

PDB	MHC	TCR	펩티드	출처	참조
1OGA	HLA-A2	JM22	GILGFVFTL	바이러스 MP (58-66)	(1)
1AO7	HLA-A2	A6	LLFGYPVYV	Tax 바이러스 펩티드	(2)
1BD2	HLA-A2	B7	LLFGYPVYV	Tax 바이러스 펩티드	(3)
2BNQ	HLA-A2	1G4	SLLMWITQV	NY-ESO-1	(4)
3H9S	HLA-A2	A6	MLWGYLQYV	Tellp	(5)
3PWP	HLA-A2	A6	LGYGFVNVI	Hud	(6)
3GSN	HLA-A2	RA14	NLVPMVATV	CMV-pp65	(7)

3QEQQ	HLA-A2	DMF4	AAGIGILTV	MART-1	(8)
3QDJ	HLA-A2	DMF5	AAGIGILTV	MART-1	(8)
1MI5	HLA-B8	LC13	FLRGRAYGL	EBV/EBNA-3	(9)
3SJV	HLA-B8	RL42	FLRGRAYGL	EBV/EBNA-3	(10)
4QRP	HLA-B8	DD31	HSKKKCDEL	HCV/NS3-4A	(11)
3FFC	HLA-B8	CF34	FLRGRAYGL	EBV/EBNA-3	(12)
3KPS	HLA-B44	LC13	EEYLQAFY	ABCD3	(13)

표 2

PDB	MHC	TCR	펩티드	출처	참조
3QDM	HLA-A2	DMF4	ELAGIGILTV	MART-1 (A2L)	(8)
3QDG	HLA-A2	DMF5	ELAGIGILTV	MART-1 (A2L)	(8)
3DXA	HLA-B44	DM1	EENLLDFVRF	EBV	(14)
3UTT	HLA-A2	1E6	ALWGPDPAAA	인슐린	(15)
3VXR	HLA-A24	H27-14	RYPLTFGWC	HIV-1 Nef	(16)

[0164] TCR-펩티드-HLA 계면에서의 단거리 문자 접촉을 이해하기 위해, 반데르 발스 상호작용 에너지를 9량체 및 10량체 펩티드의 각각의 잔기에 대해 분석하였다. 잔기 당 반데르 발스 상호작용 에너지는 TCR:9량체-펩티드/HLA 구조의 경우 도 1에, TCR:10량체-펩티드/HLA 구조의 경우 도 2에 제시되어 있다 (보다 음의 값일수록 보다 유리한 상호작용을 나타낸다). 9량체 구조에 대한 반데르 발스 상호작용 에너지는 잔기 P5에서 가장 높은 상호작용이 일어나면서, 잔기 P4-P7와 연관되는 우세한 상호작용 클러스터를 보여준다. 본 발명자들이 예상한 바와 같이, TCR과의 최소 상호작용은 펩티드 앵커 잔기 P2 및 P9에서 일어난다. 10량체 구조의 경우, 유사한 패턴이 관찰되었으며, P5에서 가장 높은 상호작용을 하면서, 잔기 P4-P7에서 일어나는 가장 큰 TCR과의 상호작용의 클러스터가 일어난다. 마지막 앵커 잔기가 P9 대신에 P10인 10량체의 경우, 9량체 구조와 비교하여, 여분의 잔기가 존재하기 때문에 P5와 P6 위치에서 높은 상호작용 에너지의 더 넓은 분포가 있었다. 많은 수의 천연 인간 TCR-펩티드-HLA 복합체에 대한 이 독특한 구조 분석에 기초하여, 본 발명자들은 TCR의 정밀한 펩티드-MHC 결합 모드를 모방하는 인간 항체 제제(예, 인간 단일클론 항체)를 생성하였다.

[0165] 본 발명의 인간 항체 제제는 B 세포 수용체 및 항체에 의한 항원 인식과 비교하여 TCR에 의한 항원 인식이 다르다는 인식에 기초한다. 특히, B 세포 수용체와 항체는 항원의 표면을 인식하며, 접힌 단백질 구조에서 함께 모인 불연속의 아미노산을 종종 접촉한다. 통상적으로 항체는 종종 최고 친화도를 갖는 결합체를 "최상의" 치료제로 선택하면서, 특정 항원에 대한 친화도에 기초하여 선택된다. 대조적으로, TCR은 접힌 단백질의 구조 내에 종종 묻혀있는 짧은 연속적인 아미노산 (펩티드)을 인식하며, 이와 달리 MHC 문자를 통해 세포 표면에 그러한 펩티드를 제시하지 않으면 인식가능하지 않을 것이다. TCR은 상대적으로 낮은 친화도를 가지고 MHC 결합 포켓에 제시된 펩티드에 결합한다 (보통 마이크로몰 범위로; 예를 들어, Donermeyer, DL 등, 2006, J. Immunol. 177(10):6911-9 참고). 또한 TCR의 다양성의 대부분은 펩티드와 직접 상호작용하는, CDR3에 존재하는 반면, 다른 CDR (예, CDR1, CDR2)은 덜 가변적이며 MHC 아미노산과 직접 상호작용한다. 이러한 낮은 친화도는 다른 것들 중에서도, 펩티드-MHC 복합체와의 결합 해제해서 이러한 펩티드를 제시하는 세포 및 다른 T 세포 기능의 연속적인 살해를 재개하기 위해 중요하다. 따라서, 본 발명의 인간 항체 제제는 MHC 문자에 의해 제시된 펩티드에 특이적인 항체 제제를 생성할 때 중심 이론으로서 친화도에 대해 과도한 의존과 인 실리코 예측이 결함이 있고 잘못된 방법론을 나타낸다는 인식을 포함한다. 이러한 방법론은 높은 친화도를 가지지만 MHC 문자에 의해 제시된 펩티드의 말단 부분과 우세하게 상호작용하고 무관한 펩티드-MHC 복합체와의 교차 반응성을 겪는 몇몇 항체의 생산을 유도한다.

[0166] 다른 것들 중에서, 본 발명은 구체적으로 MHC 문자에 의해 제시된 펩티드를 인식하는 인간 항체 제제를 개발하기 위한 개선된 방법론을 제공한다. 특히, 본 발명은 생체 내에서 MHC 문자에 의해 제시된 펩티드의 중심 위치에서 아미노산과의 상호작용에 초점을 맞추는 방법론을 사용하여 생성된 인간 항체 제제를 제공하며, 또한 펩티드-MHC 복합체를 발현하는 세포에 대한 세포독성에서 높은 특이성 및 효능을 특징으로 하는 인간 항체 제제를 제공한다. 따라서, 적어도 일부 실시예에서, 본 개시는 원하지 않는 교차 반응 없이 자연적인 TCR-유사 상호작용을 달성하기 위한 중심 이론으로서 생체 내 항체 제제-펩티드 상호작용 위치를 사용하여 인간 항체 제제의 개발을 위한 개선된 방법론의 개발을 포함한다.

[0168]

본원에 기재된 바와 같이, 파지 디스플레이 기술은 본 발명자들에 의해 사용되어, HLA-A*02:01 대립형질과 관련하여 LMP2 유래 항원성 펩티드 (CLGGLTMV, 340-349; 서열번호 1)에 특이적인 높은 친화도 인간 항체 제제 (예, 인간 단일클론 항체)를 생성하였다. 본 발명은 다른 HLA 대립형질 및 항원에 대한 일반화를 허용하는 뚜렷한 장점을 제공한다: (1) 구조적 증거는 EBV-LMP2-HLA-A*02:01 복합체가 항원성 펩티드 내에서 중심에 위치하는 중요 영역에 대한 프로토타입 거동을 갖는다는 것을 입증함 (Simpson, AA 등, 2011, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108(52):21176-81) 및 (2) HLA에 대해 완전히 유전자형이 결정되고 EBV 양성으로 시험관 내 형질전환된 여러 세포주의 이용 가능성. 본원에 기재된 인간 단일클론 항체는 그들의 친화도 및 펩티드-HLA 복합체에 대한 특이성에 대해 선택되었을 뿐만 아니라, 이러한 복합체에 존재하는 펩티드 내의 특이적 아미노산 잔기를 결합하는 그들의 능력에 대해서도 특징지어졌다. 본 개시물에 제시된 데이터는 상이한 아미노산 위치를 표적으로 하는 것이 TCR 모방체의 특이성 및 친화도에 대한 중요한 함의를 가지며, 이는 EBV-연관 악성 종양의 진단 및 치료에서 유용성을 확인할 뿐만 아니라 이들이 접근이 어떻게 다른 펩티드-HLA I 류 복합체에 적용될 수 있는지에 대한 중요한 통찰을 제공한다는 것을 입증한다.

[0169]

항-EBV-LMP2/HLA I 류 항체 제제

[0170]

본 발명은 항-EBV-LMP2/HLA-A02 항체 제제(예, 단일클론 항체)의 투여에 기초하여, EBV-연관 질환, 장애 및 상태 및 관련 악성 종양을 치료하기 위한 방법 및 조성물, 및 일부 실시예에서는, EBV-LMP2/HLA-A02 복합체에 결합하는 제1 항원-결합 부위와 면역 효과기 세포(예, T 세포)에 결합하는 제2 항원-결합 부위를 갖는 다중특이적 결합체 (예를 들어, 이중특이적 항체)를 제공한다.

[0171]

EBV-LMP2/HLA-A02 복합체에 결합하는 예시적인 인간 항체 제제(예, 인간 단일클론 항체)가 표 3에 제시되어 있다 (LCVR: 경쇄 가변 영역; HCVR: 중쇄 가변 영역; scFv: 단일 사슬 가변 단편).

표 3

[0172]

LMP2-21 LCVR DNA (서열번호 2)
ACCTATGAGCTGACTCAGGCCACCCTCAGTGTCAAGTGGCCCCAGGAGAGACGGCCAGGATTACCTGTGGGGAAACAACATTGGAGGCAGAACAGTGTGACTGGTACCAAGCAGGCCAGGCCAGGGCCCTGTACTGGTCATCTCTTATGATAGCGACCCGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGAATCTCGGCTCAAACCTCTGGGAACACGGCCACCCCTGACCATCAGCAGGGTCGAAGCCGGGATGAGGCCGACTATTACTGTCAGGTGTGGGATAGTAGTAGTGTGATCATGGTGTTCCGGCGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT
LMP2-21 LCVR 아미노산 (서열번호 3)
SYELTQPPSVSVPGETARITCGGNINGGKSVHWYQQKPGQAPVLVISYSDSDRPSGIPERISGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHWVFGGGTKLTVLG
LMP2-21 HCVR DNA (서열번호 4)
TAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGCTGAGGTGAAGAACGCTGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAGGATCATCCCTATCCTGGTATAGCAAACACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGCGCGTTCTTACCATCAGCATTCTACTCTGATGTTGGGTCAAGGTACTCTGGTGACCGTCTCCTCA
LMP2-21 HCVR 아미노산 (서열번호 5)
QVQLVQSGAEVKKPGRSSVKVSKASGGTFSSYAIWVVRQAPGQGLEWMGRILPILGIANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGSYHQHSYSDVWGQGTLTVLG
LMP2-26 LCVR DNA (서열번호 6)
ACCTATGCTGACTCAGGCCACCCTCAGTCTCAAGTGGCCCCAGGAAAGACGGCCAGAGTTACCTGTGGGGAAATAAGATTGGAAGCAAACATGTGCACTGGTACCAACACAAGGCAGGCCAGGCCCTGTGTTGGTCATCTTATAATACTGACCCGCCCTGGGGATCCCTGAGCGAATCTCGGCTCAAACCTCTGGGACACGGCCACCCCTGACCATCACCGGGGTCGAGGCCGGATGAGGCCGACTATTACTGTCAGGTGTGGGATAGTAGTTATGATCATGTGATATTCCGGCGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT
LMP2-26 LCVR 아미노산 (서열번호 7)
SYVLTQPPSVSVPGKTARVTCGGNKIGSKHVVHWYQHKAGQAPVLVIYYNTDRPSGIPERISGSNSGDTATLTITGVEAGDEADYYCQVWDSSYDHVIFGGGTKLTVLG
LMP2-26 HCVR DNA (서열번호 8)

AAGGTGCAGCTGGTGCAGTCGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGTCCTCGTGAGGTCTCTGCAAGGCTCTGGAGGCACCTCAGCAG TATGCTATCAACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGCTTGAGTGATGGAAAGGATCATCCCTACCTTGATAGCAAACACGCACAG AAGTTCCAGGCCAGAGTCACGATTACCGCGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCTGAGATCTGAGGACACGCCGTA TATTACTGTGCGCCTTACCGCTGACTCTGGTTGGATTACTGGGTCAAGGTACTCTGGTGACCGTCTCCTCA
LMP2-26 HCVR 아미노산 (서열번호 9) QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAINWVRQAPGQGLEWMGRIPILGIANYAQKFQARVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTV YYCARSYPLYSGWWDYWGQGTLTVSS
LMP2-38 LCVR DNA (서열번호 10) AAATCTGCCCTGACTCAGCCTGCCCTGGTCTGGGCTCCAGGACAGTCGATCACCATCTCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTAGT TATAACGATGTCCTCTGGTACCAACAACACCCAGGCAAAGCCCCAAACTCATGTTATGATGTCAGTAATCGGCCCTCAGGGTTCTAAT CGCTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACACGGCCTCCCTGACCATCTGGGCTCAGACTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAACTCATAT ACAAGCAGCAACACTTATGTCCTCGGAACCTGGGACCAAGGTACCGTCTCCTAGGT
LMP2-38 LCVR 아미노산 (서열번호 11) QSALTQPASVSGSPGQSTITISCTGTSSDVGSYNDVSWYQQHPGKAPKLMIVDVSNRPSGVSNRSGSKSGNTASLTISGLQTEDEADYYCNSY TSSNTYVFGTGTKVTVLG
LMP2-38 HCVR DNA (서열번호 12) TAGGTGCAGCTGGTGCAGTCGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGCTCAGTGAGGTTCTGCAGGGATCTGGATACACAATCACCTCC TACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGATGGAGTAATCAACCTTAATGTCAGCAGCACAGTCTGACGACACTGCCGT AAATTCCAGGGCAGAGTCACCATGAGCACTGACACGTCACAGTCTGAGTCTGAGATCTGACGACACTGCCGT TATTACTGTGCGCCTGGTATGACCGTATGACGATTGGGTCAAGGTACTCTGGTGACCGTCTCCTCA
LMP2-38 HCVR 아미노산 (서열번호 13) QVQLVQSGAEVKPGASVQVSCRASGYITSYYMHWRQAPGQGLEWMGVINPNAGSTRYAQKFQGRVTMSTDSTSTVYMALOSSRSDDAV YYCARGMYRMYDWGQGTLTVSS
LMP2-40 LCVR DNA (서열번호 14) AAGTCGTGTTGACTCAGCCACCTCAGTCAGTGAGGCCCAGGAGAGACGGCCAGAATTACCTGTGGGAAACAAACATTGGAAGTAGAAGT GTGCACTGGTACCAAGCAGAAGGCAGGCCAGGCCCTTCTGGTACATCTCTTATAAACGACGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGAATCTCT GGCTCCAACCTCTGGAACACGGCACCCCTGACCATCAGCAGGGTCGAAGGCCGGATGAGGCCGACTTTACTGTCAGGTGTTGGATAGTATT AGTGACCATATGTCCTCGGAACCTGGGACCAAGGTACCGTCTCCTAGGT
LMP2-40 LCVR 아미노산 (서열번호 15) QSVLTQPPSVAPGETARITCGGNIGSRSHWYQQKAGQAPVLVISYNNDRPSGIPERISGSNSGNTATLTISRVEAGDEADFYCQVWDSI SDHYVFGTGTKVTVLG
LMP2-40 HCVR DNA (서열번호 16) TAGGTGCAGCTGGTGGAGTCGGGCTGAGGTGAAGAACCTGGTCCTCGTGAGGTGCGCTGCAAGGGTTCTGGAGGCACCTCAGCAAC TATCATATCAGCTGGTGCAGACGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGATGGGGATCATCCCTCCTGGCACACCAAACACGCACCG AAATTCTGGACAGAGTCACGATTCCCGCGACGATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTCACAGTGCACGACACGCCGTA TATTACTGTGCGCCTGGTCTGGTACTCTGGATTCTGGGTCAAGGTACTCTGGTGACCGTCTCCTCA
LMP2-40 HCVR 아미노산 (서열번호 17) QVQLVESGAEVKPGSSVKVACKGSGGTFSNYHISWVRQAPGQGLEWMGGIIPILGTPNYAPKFLDRVITSADDSTSTAYMELSLTADDTAV YYCARGRTWWSGTLDSWGQGTLTVSS
LMP2-61 LCVR DNA (서열번호 18) GCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCCTGCTGTGTCAGGCCCTGGGACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGCTATTAT GCAAGCTGGTACCAAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCTGACTCTGTCATCTATGGTAAAACAACGGCCCTCAGGGATCCAGACCGATTCTCT GGCTCCAGCTCAGGAAACACAGCTCCCTGACCATCAGTGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAACCTGGGACAGCAGT GGTAACCATCTGGTATTGGCGAGGGACCAAGCTGACCGTCTCCTAGGT
LMP2-61 LCVR 아미노산 (서열번호 19) SSEL TQDPAVSVALGQTVRITCQGDLSRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDADEYYCNSRDSS GNHLVFGGGTKLTVLG
LMP2-61 HCVR DNA (서열번호 20)

TAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCTGAGGTGAAGAGGCCCTGGGCCTCAGTGAGGTCTCTGCAAGGCATCTGGATACACCTCACCAAC TATTATATCCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGCTTGAGTGATGGAAAGAATCAACCTAGTGGTGGAGCACAAATTACGCACCG AAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGGACACGTCCACGAACACAGTCTACATGGAACAGTGAGCAGCTGAGATCTGAGGACACTGCCGTG TATTACTGTGCGCGCTTACTACCGTTCTATGGATGCTGGGGCAAGGTAAGGTAACCTGGTACCGTCTCCCTCA
LMP2-61 HCVR 아미노산 (서열번호 21) QVQLVQSGAEVKRP GAS VKS CKAS GY TFT NYY IHW VRQAP QGLEWMGR INPS GG ST NY APK F QGR VT MTR DT ST NT VY MEL S L RSE D TAV YY CAR SY Y GSMD A W G Q GTL VTVSS
LMP2-63 LCVR DNA (서열번호 22) TCCTATGTGCTGACTCAGGCCACCCCTCGGTGTCAGTGCCCCAGGAAAGACGGCCAGACTTACCTGTGGGGAAACAAACATTGGAAGTGAAGT GTACATTGGTACCGAGCAGAACGCCAGGCCAGGCCCTTACTGGTCGCTATGATGATGACGACCCGCCCTCGGGATCCCTGAGCGATTCT GGCTCCA ACT CTGGG AAC AC GGC CAC CCT GAC CAT CAG CAGGGT CGAGG CCGG AT GAG CC GACT ATT ACT GT CAG GT TGGG AT CGA AGT AGT GAT CA TTGG TTT CCG CG AGGG ACCA AGGT ACCG TCT TAGGT
LMP2-63 LCVR 아미노산 (서열번호 23) SYVL TQPP SVS VAPG K TAR L TCG NN IGSE SVH WY Q QPG QAP LL VVY DDD DRPS G I PER FSG NSG NTAT L TIS RVE AGD EAD YYC QVWDRS SDHWFFGGG TKV TVLG
LMP2-63 HCVR DNA (서열번호 24) AAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGCTGAGGTGAAGAACGCTGGGCCTCAGTGAGGTTCTGCAGGGCATCTGGATACACAATCACCTCC TACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGCTTGAGTGATGGAGTAATCAACCTAATGCTGGCAGCACAGATCGCACAG AAATTCCAGGGCAGAGTCACCATGAGCACTGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGCGCTGAGTAGTCTGAGATCTGACGACACGGCCGTG TATTACTGTGCGCGCGT GAC GTT ACA CAG GT TGGG AT GA TGGG TCA AGG TACT CTGGT GACC GT CT CTC TA
LMP2-63 HCVR 아미노산 (서열번호 25) EVQLVQSGAEVKKP GAS VQ VSCR ASGY IT SYY MH W VRQAP QGLEWMGV INPNAG STR Y AQKF QGR VT MSTD TST VY MAL S L RSD D TAV YY CAR GD VY NGW DEW G Q GTL VTVSS
LMP2-77 LCVR DNA (서열번호 26) GCTTCTGAGCTGACTCAGGAC CCTG TG TG CTG TG GC CT TGGG ACAG ACAGT CAGG TT CAC ATGCCA AGG AG ACAGC CT CAGA CCG CATT GCAAGTTGGTACCGAGCAGAACGCCAGGCCCTCACTTGATCTATGGTAAAACAGGCCCTCAGGGATCCAGACCATTCT GGCTCACCTCAGAAACACCGCTTCTTGACCATCACTGGGCTCAGCGGAAGATGAGGGTACTATTACTGTAACCTCCGGCACAGCAGT GGTAATCATGTGTTGGCGAGGGACCAAGCTGACCGTCTAGGT
LMP2-77 LCVR 아미노산 (서열번호 27) SSEL TQDP AVS VAL QTV RFT CQGD SLR THY ASW Y Q QPG QAP QLV I Y GKN RR P SG I PDR FSG ST SG NT AS LT IT GQA QAE D EG D YYC NSR HSS GN HCV FGGG TKL VTVLG
LMP2-77 HCVR DNA (서열번호 28) TAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAACACCTTACAGACCCCTGCCCTACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCACCAAGT GGTAATTACTACTGGAGCTGGATCCGTGAGCCCGGAGGGACTGGAGTGAGTTGGGAGATCAATCATAGCGGAAGGCCAAGTACAAT CCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCGAAGACAGTCCCGAACAGTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGGACACGCC GTG TATTACTGTGCGGCCAGTCTTACGGTGGTACATAGATCAGTGGGTCAAGGTAAGGTAACCTGGTACCGTCTCCCTCA
LMP2-77 HCVR 아미노산 (서열번호 29) EVQL VES GPL V KPS QTL S L TCT VSGG S IT SG N Y W SW I R Q PPG K GLE W IGE I NH GSP K YN PSL K SRV T I S E D T S R N Q F S L K L S V T A A D T A VYY CAR QSS YGGY ID QW G Q GTL VTVSS
항-CD3 scFv DNA (서열번호 123) GACGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCTGAAGTGAAAGAACCTGGCCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAAGCTAGCGGTATACTTACCC TACACCATGCACTGGTGCGCCAGGACACCTGGACAGGGACTGGATGGATCGGCTACATCACCCCTCCGGGCTACACCAACTACGCC TCTGTGAAGGGCCGTTACCATCACACCGATAAGTCACCGACCGCTTACATGGACTGTCCCTCCCTGAGATCGAGGGACACCGCTACC TACTATTGCGCCCGTACTACGACGACCAACTACGCTGGACTACTGGGAGCAGGGAACACAGTGACCGTGTCTCTGGCGAGGGACCC ACTGGATCTGGGGAGTGGTGGTCTGGCGCGTACGACATCGTGTGACCCAGTCTCCAGCCACCCCTGTCTGTGAGCCAGCGAGAGA GCTACCCCTGCTCGAGAGCCTCCAGCGTGTCTACATGAATTGGTATCAGCAGAAGCCTGCAAGGCCCTAAGCGGTGGATCTACGAC ACCTCCAAGGTGGCTCTGGCGTCCAGCCGGTTTCCGGATCTGGCTCTGGCACCGACTACTCCCTGACCATCAACAGCCTGGAAGCC GACGCTGCCACCTATTACTGCCAGCAGTGGTCTCCAACCCCTGACCTTGGAGGCGGCACCAAGGTGGAAATCAAG
항-CD3 scFv 아미노산 (서열번호 124)

DVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSRGYTNYADSVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSLRSEDTATYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTVTSSGEQTSTGSGGGSGGADDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDYQQKPGKAPKRWIYDTSKVASGVPARFSGSGSGTDLTINSLEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGGGTKEIK

- [0173] 다양한 실시예에서, 본 발명에 따른 인간 항-EBV-LMP2/HLA-A02 단일클론 항체는 중쇄 및 경쇄 가변 영역으로 구성되고, 여기서 중쇄 가변 영역은 표 3에 나타난 중쇄 가변 영역에서 발견되는 CDR 중 적어도 하나를 포함하고 경쇄 가변 영역은 표 3에 나타난 경쇄 가변 영역에서 발견되는 CDR 중 적어도 하나를 포함한다.
- [0174] 다양한 실시예에서, 본 발명에 따른 인간 항-EBV-LMP2/HLA-A02 단일클론 항체는 중쇄 및 경쇄 가변 영역으로 구성되고, 여기서 중쇄 가변 영역은 표 3에 나타난 중쇄 가변 영역에서 발견되는 CDR 중 적어도 두 개를 포함하고 경쇄 가변 영역은 표 3에 나타난 경쇄 가변 영역에서 발견되는 CDR 중 적어도 두 개를 포함한다.
- [0175] 다양한 실시예에서, 본 발명에 따른 인간 항-EBV-LMP2/HLA-A02 단일클론 항체는 중쇄 및 경쇄 가변 영역으로 구성되고, 여기서 중쇄 가변 영역은 표 3에 나타난 중쇄 가변 영역에서 발견되는 3개의 CDR을 포함하고 경쇄 가변 영역은 표 3에 나타난 경쇄 가변 영역에서 발견되는 3개의 CDR을 포함한다.
- [0176] 다양한 실시예에서, 본 발명에 따른 인간 항-EBV-LMP2/HLA-A02 단일클론 항체는 중쇄 및 경쇄 가변 영역으로 구성되고, 여기서 중쇄 가변 영역은 세 개의 CDR를 포함하는데, CDR은 각각 표 5에 나타난 중쇄 CDR과 적어도 약 50% (예를 들어, 적어도 약 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 동일한 서열을 갖는다.
- [0177] 다양한 실시예에서, 본 발명에 따른 인간 항-EBV-LMP2/HLA-A02 단일클론 항체는 중쇄 및 경쇄 가변 영역으로 구성되고, 여기서 중쇄 가변 영역은 세 개의 CDR를 포함하는데, CDR은 각각 표 5에 나타난 중쇄 CDR과 실질적으로 동일하거나 동일한 서열을 갖는다.
- [0178] 다양한 실시예에서, 본 발명에 따른 인간 항-EBV-LMP2/HLA-A02 단일클론 항체는 중쇄 및 경쇄 가변 영역으로 구성되고, 여기서 경쇄 가변 영역은 세 개의 CDR를 포함하는데, CDR은 각각 표 6에 나타난 경쇄 CDR과 적어도 약 50% (예를 들어, 적어도 약 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 동일한 서열을 갖는다.
- [0179] 다양한 실시예에서, 본 발명에 따른 인간 항-EBV-LMP2/HLA-A02 단일클론 항체는 중쇄 및 경쇄 가변 영역으로 구성되고, 여기서 경쇄 가변 영역은 세 개의 CDR를 포함하는데, CDR은 각각 표 6에 나타난 경쇄 CDR과 실질적으로 동일하거나 동일한 서열을 갖는다.
- [0180] 다양한 실시예에서, 본 발명에 따른 인간 항-EBV-LMP2/HLA-A02 단일클론 항체는 중쇄 및 경쇄 가변 영역으로 구성되고, 여기서 중쇄 가변 영역은 표 5에 나타난 세 개의 CDR를 포함하고, 경쇄 가변 영역은 표 6에 나타난 세 개의 CDR를 포함한다.
- [0181] 다양한 실시예에서, 본 발명에 따른 인간 항-EBV-LMP2/HLA-A02 단일클론 항체는 중쇄 및 경쇄 가변 영역으로 구성되고, 여기서 중쇄 가변 영역은 표 3에 나타난 중쇄 가변 영역과 적어도 약 50% (예를 들어, 적어도 약 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 동일한 서열을 갖는다.
- [0182] 다양한 실시예에서, 본 발명에 따른 인간 항-EBV-LMP2/HLA-A02 단일클론 항체는 중쇄 및 경쇄 가변 영역으로 구성되고, 여기서 중쇄 가변 영역은 표 3에 나타난 중쇄 가변 영역과 실질적으로 동일하거나 동일한 서열을 갖는다.
- [0183] 다양한 실시예에서, 본 발명에 따른 인간 항-EBV-LMP2/HLA-A02 단일클론 항체는 중쇄 및 경쇄 가변 영역으로 구성되고, 여기서 경쇄 가변 영역은 표 3에 나타난 경쇄 가변 영역과 적어도 약 50% (예를 들어, 적어도 약 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 동일한 서열을 갖는다.
- [0184] 다양한 실시예에서, 본 발명에 따른 인간 항-EBV-LMP2/HLA-A02 단일클론 항체는 중쇄 및 경쇄 가변 영역으로 구성되고, 여기서 경쇄 가변 영역은 표 3에 나타난 경쇄 가변 영역과 실질적으로 동일하거나 동일한 서열을 갖는다.
- [0185] 다양한 실시예에서, 본 발명에 따른 인간 항-EBV-LMP2/HLA-A02 단일클론 항체는 중쇄 및 경쇄 가변 영역으로 구성되는데, 중쇄 가변 영역은 표 3에 나타난 중쇄 가변 영역과 적어도 약 50% (예를 들어, 적어도 약 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 동일한 서열을 가지며, 경쇄 가변 영역은 표 3에 나타난 경쇄 가변 영역과 적어도 약 50% (예를 들어, 적어도 약 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%,

95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 동일한 서열을 갖는다.

[0186] 다양한 실시예에서 본 발명에 따른 인간 항-EBV-LMP2/HLA-A02 단일클론 항체는 중쇄 및 경쇄 가변 영역으로 구성되는데, 중쇄 가변 영역은 표 3에 나타난 중쇄 가변 영역과 실질적으로 동일하거나 동일한 서열을 가지며, 경쇄 가변 영역은 표 3에 나타난 경쇄 가변 영역과 실질적으로 동일하거나 동일한 서열을 갖는다.

[0187] 다양한 실시예에서, 본 발명에 따른 인간 항-EBV-LMP2/HLA-A02 단일클론 항체는 표 3에 나타난 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열로부터 선택되는 중쇄 및 경쇄 가변 영역으로 구성된다.

[0188] 본원에 기재된 EBV-LMP2 웨티드, 또는 이의 단편은 당업자에게 공지된 방법에 의해 항체를 생성하는데 사용될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 항-EGV-LMP2/HLA-A02 항체는 HLA-A02와 관련하여 EBV-LMP2 웨티드 CLGGLLTMV (서열번호 1)의 임의의 잔기에 특이적으로 결합하는 임의의 항체 또는 항체의 단편을 포함한다.

[0189] 본원에 사용된 바와 같이, "항-EBV-LMP2/HLA-A02 항체", "항-EBV-LMP2/HLA-A02 항체 부분," 또는 "항-EBV-LMP2/HLA-A02 항체 단편" 및/또는 "항-EBV-LMP2/HLA-A02 항체 변이체" 등등은 본 발명의 항체에 포함될 수 있는, 비-쥐 기원, 바람직하게는 인간 기원의, 중쇄 또는 경쇄 가변 영역, 중쇄 또는 경쇄 불변 영역, 골격 영역 또는 그의 임의의 부분과 함께, 본원에 기재된 임의의 단일클론 항체로부터 유래한 중쇄 또는 경쇄 또는 그의 리간드 결합 부분의 적어도 하나의 상보성 결정 영역 (CDR)을 함유하는, 면역글로불린 분자의 적어도 일부분을 포함하는 임의의 단백질 또는 웨티드 함유 분자를 포함한다. 대안적으로, "항-EBV-LMP2/HLA-A02 항체"는 집합적으로 또는 개별적으로 LMP2-21, LMP2-21 IgG1, LMP2-26, LMP2-26 IgG1, LMP2-38, LMP2-38 IgG1, LMP2-40, LMP2-40 IgG1, LMP2-61, LMP2-61 IgG1, LMP2-63, LMP2-63 IgG1, LMP2-77, LMP2-77 IgG1, 및 이들의 조합, 그리고 LMP2-21 scFv, LMP2-26 scFv, LMP2-38 scFv, LMP2-40 scFv, LMP2-61 scFv, LMP2-63 scFv, LMP2-77 scFv, 및 이들의 조합을 포함한 본 발명의 단일 사슬 가변 단편과 같은 이들의 단편 및 영역을 지칭하게 될 것이다. 이러한 인간 단일클론 항체는 적어도 하나의 세포 기능을 시험관 내, 계 내 및/또는 생체 내 조절, 감소, 길항, 완화, 경감, 차단, 억제, 폐색 및/또는 간섭할 수 있으며, 여기서 상기 세포는 EBV-LMP2/HLA-A02 복합체를 발현한다. 비-제한적인 예로서, 본 발명의 적합한 항-EBV-LMP2/HLA-A02 항체, 특정 부분 또는 변이체는 인간 HLA I 유전자에 의해 제시된 EBV-LMP2 웨티드의 에피토프, 특히 웨티드 에피토프에 높은 친화도를 가지고 결합할 수 있다.

[0190] 항-EBV-LMP2/HLA-A02 항체는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 예를 들면, 항체 생산을 위한 프로토콜은 Harlow 및 Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (1988)에 의해 기술되어 있다. 일반적으로 항체는 마우스, 쥐, 기니아 퍼그, 햄스터, 낙타, 라마, 상어 또는 다른 적절한 숙주에서 생성될 수 있다. 대안적으로, 항체는 IgY 분자를 생산하는, 닭에서 생성될 수도 있다 (Schade 등, 1996, ALTEX 13(5):80-85). 일부 실시예에서, 본 발명에 적합한 항체는 인간이 아닌 영장류 항체이다. 예를 들면, 비비(baboon)에서 치료학적으로 유용한 항체를 기르는 일반적인 기술은, 예를 들어 WO 91/11465 및 Losman 등, 1990, Int. J. Cancer 46:310에서 발견될 수도 있다. 일부 실시예에서, 단일클론 항체는 하이브리도마 방법을 사용하여 제조될 수 있다 (Milstein 및 Cuello, 1983, Nature 305(5934):537-40). 일부 실시예에서, 또한 단일클론 항체는 재조합 방법을 사용하여 제조될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허번호 제4,166,452호 참고).

[0191] B-세포 불멸화에 의한 단일클론 항체 생성과 관련된 많은 어려움은 파지 디스플레이를 사용하여, *E. coli*에서 항체 단편을 조작하고 발현함으로써 극복될 수 있다. 고 친화도 단일클론 항체의 회수를 보장하기 위해, 조합적인 면역글로불린 라이브러리는 통상적으로 큰 레퍼토리 크기를 포함해야 한다. 통상적인 전략은 역전사 효소를 사용하여 cDNA를 합성하기 위해 면역화된 마우스의 립프구 또는 비장 세포로부터 수득된 mRNA를 이용한다. 중쇄 및 경쇄 유전자는 PCR에 의해 개별적으로 증폭되고 파지 클로닝 벡터에 연결된다. 하나는 중쇄 유전자를 포함하고 하나는 경쇄 유전자를 포함하는 두 개의 다른 라이브러리가 생산된다. 파지 DNA가 각각의 라이브러리로부터 단리되고, 중쇄 및 경쇄 서열이 함께 연결되고 패키징되어 조합적인 라이브러리를 형성한다. 각각의 파지는 중쇄 및 경쇄 cDNA의 무작위 쌍을 포함하고 있으며, *E. coli* 감염시 감염된 세포에서 항체 사슬의 발현을 지시한다. 관심있는 항원을 인식하는 항체를 식별하기 위해, 파지 라이브러리를 플레이팅하고 플라크에 있는 항체 분자를 필터로 옮긴다. 필터를 방사능으로 표지된 항원과 함께 인큐베이팅한 다음 세척하여 과량의 비결합 리간드를 제거한다. 자가방사사진(autoradiogram) 상의 방사능 지점은 항원에 결합하는 항체가 들어있는 플라크를 식별해낸다. 인간 면역글로불린 파지 라이브러리를 생산하는데 유용한 클로닝 및 발현 벡터는 예를 들어, Stratagene Cloning Systems (캘리포니아 라 졸라)로부터 수득할 수 있다.

[0192] 비슷한 전략을 사용하여 고 친화도 scFv를 얻을 수 있다 (Vaughn 등, 1996, Nat. Biotechnol., 14:309-314 참고). 모든 알려진 V_H, V_L 및 V_V 유전자 군에 상응하는 PCR 프라이머를 사용하여 면역화되지 않은 인간 공여체

로부터 V-유전자를 단리함으로써 큰 레퍼토리를 갖는 scFv 라이브러리를 구축할 수 있다. 증폭 후, Vk 및 Vv 풀을 하나의 풀을 형성하도록 합친다. 이들 단편을 파지미드(phagemid) 벡터에 연결시킨다. 그런 다음 scFv 링커 (예, [G₄S]₃)를 V_L 단편의 상류에 있는 파지미드에 연결한다. V_H 와 링커-V_L 단편은 J_H 영역에 증폭되고 조립된다. 생성 된 V_H-링커-V_L 단편을 파지미드 벡터에 연결시킨다. 파지미드 라이브러리는 위에서 설명한대로 필터를 사용하거나 면역튜브 (Nunc; Maxisorp)를 사용하여 패닝할 수 있다. 면역화된 토키의 림프구 또는 비장 세포로부터 조합적 면역글로불린 라이브러리를 구축하고 P. 파스토리스에서 scFv 구축물을 발현함으로써 유사한 결과를 얻을 수 있다 (예를 들어 Ridder 등, 1995, Biotechnology, 13:255-260 참고). 또한, 적절한 scFv의 단리 후에, 보다 높은 결합 친화도 및 보다 느린 해리 속도를 갖는 항체 단편은 CDR3 돌연변이 유발 및 사슬-셔플링과 같은 친화도 성숙 공정을 통해 수득될 수 있다 (예를 들어, Jackson 등, 1998, Br. J. Cancer, 78:181-188); Osbourn 등, 1996, Immunotechnology, 2:181-196 참고).

[0193]

항체 단편의 또 다른 형태는 단일 CDR을 코딩하는 웨პ티드이다. 관심있는 항체의 CDR을 암호화하는 유전자를 구축함으로써 CDR 웨პ티드 ("최소 인식 단위")를 얻을 수 있다. 이러한 유전자는, 예를 들어, 항체 생산 세포의 RNA로부터 가변 영역을 합성하기 위해 중합효소 연쇄 반응을 사용하여 제조된다 (예를 들어, Larrick 등, 1991, Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:106; Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies," in Monoclonal Antibodies: Production, Engineering And Clinical Application, Ritter 등, eds., p. 166-179, Cambridge University Press 1995; 및 Ward 등, "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies," in Monoclonal 항체: Principles And Applications, Birch 등, eds., p. 137-185, Wiley-Liss, Inc. 1995 참고).

[0194]

일부 실시예에서, 본 발명에 적합한 항체는 인간화된 항체 또는 인간 항체를 포함할 수 있다. 비인간 항체의 인간화된 형태는 비인간 Ig로부터 유래한 최소 서열을 함유하고 있는, 키메라 면역글로불린 (Ig), Ig 사슬 또는 단편 (예컨대 항체의 Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 다른 항원 결합 하위서열)이다. 일반적으로, 인간화된 항체는 비-인간 기원으로부터 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 이러한 비인간 아미노산 잔기는흔히 "도입(import)" 잔기라고 불리는데, 이는 일반적으로 "도입" 가변 도메인에서 취해진다. 인간화는 인간 항체의 상응하는 서열을 위한 설치류 상보성 결정 영역 (CDR) 또는 CDR 서열을 대체함으로써 달성된다 (Riechmann 등, 1988, Nature 332(6162):323-7; Verhoeyen 등, 1988, Science 239(4847):1534-6). 이러한 "인간화" 항체는 키메라 항체 (예를 들어, 미국 특허번호 4,816,567; 5,693,762; 및 5,225,539)이며, 여기서 무손상인 인간 가변 도메인 보다 실질적으로 적게 비인간 종으로부터의 상응하는 서열에 의해 치환되었다. 일부 실시예에서, 인간화 항체는 통상적으로 일부 CDR 잔기 및 가능하게는 일부 골격 (FR) 잔기가 설치류 항체의 유사 부위의 잔기로 치환되는 인간 항체이다. 인간화 항체는 수혜자의 CDR로부터의 잔기가 원하는 특이성, 친화도 및 용량을 갖는, 마우스, 랙트 또는 토키와 같은 비인간 종 (공여자 항체)의 CDR로부터의 잔기로 대체되는 인간 Ig (수혜자 항체)를 포함한다. 일부 경우에는, 상응하는 비인간 잔기가 인간 Ig의 Fv 골격 잔기를 대체한다. 인간화 항체는 수혜자 항체 또는 도입된 CDR 또는 골격 서열에서도 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 하나, 통상적으로는 2개의, 가변 도메인 중 실질적으로 전부를 포함하며, CDR 영역의 전부는 아니라도 대부분이 비인간 Ig의 영역에 상응하고, FR 영역의 전부는 아니라도 대부분이 인간 Ig 컨센서스 서열의 영역이다. 인간화 항체는 또한 Ig 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부분, 통상적으로는 인간 Ig의 그것을 포함하고 있다 (Riechmann 등, 1988, Nature 332(6162):323-7; Verhoeyen 등, 1988, Science 239(4847): 1534-6).

[0195]

인간 항체는 파지 디스플레이 라이브러리 (Hoogenboom 등, 1991, Mol. Immunol. 28(9):1027-37; Marks 등, 1991, J. Mol. Biol. 222(3):581-97) 및 인간 단일클론 항체의 제조 (Reisfeld 및 Sell, 1985, Cancer Surv. 4(1):271-90)를 포함한, 다양한 기술을 이용하여 생산될 수 있다. 마찬가지로, 내인성 Ig 유전자가 부분적으로 또는 완전히 불활성화된 트랜스제닉 동물에 인간 Ig 유전자를 도입하는 것을 사용하여 인간 항체를 합성할 수 있다 (예를 들어, Fishwild 등, 1996, Nat. Biotechnol. 14(7):845-51; Lonberg 등, 1994, Nature 368(6474):856-9; Lonberg and Huszar, 1995, Int. Rev. Immunol. 13:65-93; Taylor, L.D., 등, 1992, Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Kellermann S-A., 및 Green L.L., 2002, Curr. Opin. Biotechnol. 13:593-597; Little, M. 등, 2000, Immunol. Today 21:364-370; Murphy, A.J. 등, 2014, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111(14):5153-5158 참고). 공격(challenge) 시, 인간 항체 생산이 관찰된다. 일부 실시예에서, 항-EBV-LMP2/HLA-A02 인간 항체는 CLGGLTMV (서열번호 1)이거나 이를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 EBV-LMP2 웨პ티드로 항원 공격에 응답하여 인간 항체를 제조하도록 조작된 비인간 동물의 면역화에 의해 제조된다.

[0196]

일부 실시예에서, 본 발명에 따라 사용하기 위한 항-EBV-LMP2/HLA-A02 인간 단일클론 항체는 변이체 Fc 영역을

포함하고, 여기서 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 Fc 영역(또는 모체 Fc 영역)에 비해 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함함으로써, 상기 변이체 Fc 영역이 Sondermann 등, 2000, Nature, 406:267-273에 개시된 것과 같은 Fc-Fc 수용체 상호작용의 결정학적 및 구조적 분석에 기초하여 Fc 수용체와 직접 접촉하게 하는 위치에서 치환체를 갖지 않는다는 가정 하에, 상기 분자는 Fc 수용체(예, Fc γ R)에 대해 변경된 친화도를 가지게 된다. Fc γ R과 같은 Fc 수용체와 직접 접촉하게 하는 Fc 영역 내의 위치의 예로는 아미노산 234-239(한지 영역), 아미노산 265-269(B/C 루프), 아미노산 297-299(C'/E 루프), 및 아미노산, 그리고 327-332(F/G) 루프가 있다. 일부 실시예에서, 변이체 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 항-EBV-LMP2/HLA-A02 인간 단일클론 항체는 구조적 및 결정학적 분석에 기초하여 Fc γ R와 직접 접촉하게 하는 적어도 하나의 잔기의 변형을 포함한다.

[0197] 일부 실시예에서, 본 발명에 따라 사용하기 위한 항-EBV-LMP2/HLA-A02 인간 단일클론 항체는 하나 이상의 아미노산 변형을 갖는 변이체 Fc 영역을 갖는, 억제 작용 및/또는 억제성 수용체에 대해 변경된 친화도를 갖는 항-EBV-LMP2/HLA-A02 인간 단일클론 항체이며, 여기서 상기 하나 이상의 아미노산 변형은 297 위치에서 알라닌에 의한 치환이고; 일부 실시예에서, FcR 친화도를 강화하기 위한 239D, 330L, 332E에서의 치환; 일부 실시예에서, FcR 결합을 줄이거나 없애기 위한 322K에서의 치환이다. 일부 실시예에서, 본 발명에 따라 사용하기 위한 항-EBV-LMP2/HLA-A02 인간 단일클론 항체는 모체 Fc 영역에 비해 변이체 글리코실화를 갖는 Fc 영역을 가지며; 일부 실시예에서, 변이체 글리코실화는 푸코오스의 부재를 포함하고; 일부 실시예에서, 변이체 글리코실화는 GnT1-결핍 CHO 세포에서의 발현으로부터 초래된다. 일부 실시예에서, 본 발명은 K322A 치환을 특징으로 하는 변이체 Fc 영역을 포함하는 인간 항-EBV-LMP2/HLA-A02 항체 성분을 갖는 다중특이적 결합제를 제공한다. 일부 실시예에서 제공된 다중특이적 결합제는 성분이 유도될 수 있는 모체 항체와 비교하여 변이체 글리코실화를 보여주는(예를 들어, 비글리코실화됨(aglycosylate)) 항체 성분을 포함하며; 일부 이러한 실시예에서, 이러한 변이체는 K322A 치환을 특징으로 하는 변이체 Fc 영역이거나 이를 포함할 수도 있다.

[0198] 일부 실시예에서, 본 발명은 변경 효과기 기능 및/또는 FcR에 대한 친화도가 참조 Fc에 비해 증진되거나 감소된다는 점에 특징이 있는 변이체 Fc 영역(즉, Fc 영역은 적정한 참조 Fc에 비해 하나 이상의 첨가, 결실 및/또는 치환을 포함함)을 포함하는 항체 또는 항체 제제를 제공 및/또는 활용한다. 이러한 변이들은 당업자의 기술 범위 내에 있다.

[0199] 따라서, 다른 것들 중에서, 본 발명은 하나 이상의 Fc γ R에 대해 보다 큰 친화도로 결합하는 변이체 Fc 영역을 포함하는 항체 제제 및 다중특이적 결합제(예를 들어, 항체 제제)를 제공한다. 이러한 제제는 바람직하게 상기에서 논의된 바와 같이 효과기 기능을 보다 효과적으로 매개한다. 일부 실시예에서, 본 발명은 하나 이상의 Fc γ R에 대해 보다 약한 친화도로 결합하는 변이체 Fc 영역을 포함하는 항체 제제 및 다중특이적 결합제(예를 들어, 이중특이적 항체)를 제공한다. 효과기 기능의 감소 또는 제거는 소정의 경우, 예를 들어 작용 기전이 표적 항원의 차단 또는 길항 작용을 포함하나 표적 항원을 갖는 세포의 살해를 포함하지 않는 항체의 경우에 바람직하다. 또한, 일부 실시예에서, 상기에서 논의된 바와 같이 이중특이적 항체를 만들 때, 효과기 기능의 제거가 바람직하다. 효과기 세포의 Fc γ R 활성화 수용체를 차단하는 자가면역 질환의 경우에 효과기 기능의 감소 또는 제거가 바람직할 것이다(이 유형의 기능은 숙주 세포에서 나타남). 일반적으로, 증가된 효과기 기능은 종양 및 외래 세포에 유도될 수 있다; 일부 실시예에서, 효과기 기능은 종양 세포에서 멀리 유도될 수 있다.

[0200] 본 발명에 따라 사용하기 위한 Fc 변이체는 효과기 기능을 변경시키는 변형을 포함하지만 이에 한정되지 않는, 다른 Fc 변형과 조합될 수 있다. 본 발명은 항체 또는 Fc 융합체에서 첨가제, 상승작용 또는 신규한 성질을 제공하기 위해 본원에 기재된 바와 같은 Fc 변이체를 다른 Fc 변형체와 조합하는 것을 포함한다. 일부 이러한 실시예에서, Fc 변이체는 이들이 조합되는 변형의 표현형을 강화시킬 수 있다. 예를 들면, Fc 변이체가 야생형 Fc 영역을 포함하는 비교가능한 분자보다 높은 친화도를 가지고 Fc γ RIIIA와 결합하는 것으로 알려진 돌연변이체와 조합되는 경우, 돌연변이체와의 조합은 Fc γ RIIIA 친화도의 보다 큰 배수 증가를 초래한다.

[0201] 일부 실시예에서, 본 발명에 따르면 본원에 기재된 Fc 변이체는 항체 또는 Fc 융합체에 혼입되어 Fc 영역을 포함하는 분자에 대한 하나 이상의 Fc 글리코 형태(즉, 하나 이상의 탄수화물이 공유 결합되는 하나 이상의 Fc 폴리펩티드)를 포함하는 조작된 제제를 생성시키고, 여기서 글리코 형태의 탄수화물 조성물은 Fc 영역을 포함하는 모체 분자의 화학적 조성과 화학적으로 상이하다.

[0202] 일부 실시예에서, 본원에 기재된 다중특이적 결합제(예를 들어, 항체 제제)는 변이체 글리코실화를 나타내는 Fc 변이체를 포함할 수 있고 및/또는 글리코실화 결핍 세포주(예를 들어, GnT1-결핍 CHO 세포)에서 발현될 수 있으며, 적정한 참조 Fc 영역(예, 야생형), 또는 글리코실화가 결핍되지 않은 세포주에서 발현된 Fc 영역과 비교하여 글리코실화가 결여된 채로 제제의 그러한 Fc 영역이 생산된다.

[0203]

일부 실시예에서, 본 발명에 따라 사용되는 항체는, 바람직하게는 항체의 기능성, 예를 들면 항원에 대한 결합 활성을 변경시키지 않고, 관심있는 항원 (예를 들어, EBV-LMP2 웨티드)에 결합하는 적정 참조 항체에 비해 변형된 글리코실화 부위를 가질 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "글리코실화 부위"는 올리고사카라이드 (즉, 함께 연결된 2개 이상의 단순 당을 함유하는 탄수화물)이 특이적으로 그리고 공유적으로 결합할 항체 중의 임의의 특이적 아미노산 서열을 포함한다. 올리고사카라이드 측쇄는 통상적으로 N- 또는 O-결합을 통해 항체의 백분에 연결된다. N-결합된 글리코실화는 올리고사카라이드 모이어티를 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착시키는 것을 말한다. O-결합된 글리코실화는 올리고사카라이드 모이어티를 하이드록시아미노산, 예를 들어, 세린, 트레오닌에 부착시키는 것을 말한다. 예를 들면, 푸코오스 및 말단 N-아세틸글루코사민을 비롯한 소정의 올리고사카라이드가 결여된 Fc-글리코 형은 특별한 CHO 세포에서 생산될 수 있고, 증진된 ADCC 효과가 기능을 나타낼 수 있다.

[0204]

일부 실시예에서, 본 발명은 글리코실화 부위를 첨가 또는 결실시킴으로써 본원에 기재된 바와 같은 항체의 탄수화물 함량을 변형시키는 방법을 포함한다. 항체의 탄수화물 함량을 변형시키는 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며 본 발명에 포함된다 (예를 들어, 미국 특허 번호 6,218,149; EP 0359096B1; 미국 특허출원 번호 US 2002/0028486; 국제 특허출원 공개 번호 WO 03/035835; 미국 특허공개 번호 2003/0115614; 미국 특허 번호 6,218,149; 미국 특허 번호 6,472,511 참고). 일부 실시예에서, 본 발명은 항체의 하나 이상의 내인성 탄수화물 모이어티를 제거함으로써 항체 (또는 그의 관련 부분 또는 성분)의 탄수화물 함량을 변형시키는 방법을 포함한다. 일부 소정의 실시예에서, 본 발명은 아스파라긴으로부터 알라닌으로 위치 297을 변형시킴으로써, 항체의 Fc 영역의 글리코실화 부위를 결실시키는 것을 포함한다.

[0205]

조작된 글리코형은 효과기 기능의 강화 또는 감소를 포함하지만 이에 한정되지 않는, 다양한 목적에 유용할 수 있다. 조작된 글리코형은 당업자에게 공지된 임의의 방법, 예를 들어, 조작된 또는 변이체 발현 균주를 사용하거나, 하나 이상의 효소, 예를 들어 DI N-아세틸글루코사민전이효소 III (GnTIII)와의 공동-발현에 의하거나, 다양한 유기체 또는 다양한 유기체로부터의 세포주에서 Fc 영역을 포함하는 분자를 발현시키거나, 또는 Fc 영역을 포함하는 분자가 발현된 후에 탄수화물(들)을 변형시킴으로써 생성될 수 있다. 조작된 글리코형을 생성하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, Umana 등, 1999, Nat. Biotechnol. 17:176-180; Davies 등, 2001, Biotechnol. Bioeng. 74:288-294; Shields 등, 2002, J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Shinkawa 등, 2003, J. Biol. Chem. 278:3466-3473; 미국 특허 번호 6,602,684; 미국 특허 출원 번호 10/277,370; 미국 특허 출원 번호 10/113,929; 국제 특허 출원 공개 번호 WO 00/61739A1; WO 01/292246A1; WO 02/311140A1; WO 02/30954A1; POTILLEGENT™ 기술 (Biowa, Inc. Princeton, N.J.); GLYCOMAB™ 글리코실화 조작 기술 (GLYCART biotechnology AG, 스위스 취리히)에 기재된 방법들을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 국제 특허 출원 공개 번호 WO 00/061739; EA01229125; 미국 특허 출원 공개 번호 2003/0115614; Okazaki 등, 2004, JMB, 336:1239-49를 참고한다.

[0206]

다가 결합제

[0207]

당업자가 알고 있는 바와 같이, 다가 결합제는 둘 이상의 표적 (예를 들어, 에피토프)에 특이적으로 결합하는 결합 성분을 포함하는 분자 실체물 또는 복합체이다. 이러한 다가 결합제는 치료 용도를 포함하여, 당업계에서 다양한 용도를 발견한다. 하나의 예를 들자면, 당업자가 알고 있는 바와 같이, 다가 결합제는 세포독성 T 세포를 종양 부위로 유도 (또는 모집)함으로써 종양 세포의 살해를 용이하게 하도록 조작되었다. 종양 항원의 예로는 알파 테아단백질 (AFP), CA15-3, CA27-29, CA19-9, CA-125, 칼레티닌(calretinin), 암 배아 항원 (carcinoembryonic antigen), CD34, CD99, CD117, 크로모그라닌(chromogranin), 시토케라틴(cytokeratin), 데스민(desmin), 상피 막 단백질 (EMA), 인자 VIII, CD31 FL1, 신경 아교 섬유 산성 단백질 (glial fibrillary acidic protein, GFAP), 총 낭포증 유체 단백질 (gross cystic disease fluid protein, GCDFP-15), HMB-45, 인간 용모성 성선자극 호르몬 (human chorionic gonadotropin, hCG), 인히빈(inhibin), 케라틴, CD45, 립프구 마커, MART-1 (Melan-A), Myo D1, 근육 특이적 액틴 (MSA), 신경섬유, 뉴런 특이적 엔올라제 (NSE), 태반 알칼리성 포스포파타제 (placental alkaline phosphatase, PLAP), 전립선 특이적 항원, S100 단백질, 평활근 액틴 (SMA), 시냅토파이신(synaptophysin), 티로글로불린(thyroglobulin), 갑상선 전사 인자-1, 종양 M2-PK 및 비멘틴(vimentin)을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0208]

일부 실시예에서, 본 발명에 따라 사용하기 위한 다가 결합제는 이중특이적 결합제이다. 많은 실시예에서, 이러한 이중특이적 결합제는 종양 세포에 결합할 수 있다. 많은 실시예에서, 이러한 이중특이적 결합제는 엡스타인-바 바이러스 (EBV)-감염된, EBV^+ 세포, 또는 MHC 분자 (예를 들어, HLA I 류 분자)를 통해 종양 세포 표면에 EBV-관련 웨티드를 발현하는 세포에 결합할 수 있다.

- [0209] 일부 실시예에서, 본 발명에 의해 제공되는 다가 결합체(예를 들어, 이중특이적 결합체)는 항체 성분이거나 항체 성분을 포함한다. 항체 성분을 포함하는 다중특이적 결합체를 설계, 구축 및/또는 생산하기 위한 다양한 기술이 당업계에 공지되어 있다.
- [0210] 예를 들면, 완전한 면역글로불린 골격 (예, IgG), 단일 사슬 가변 단편 (scFv), 또는 이들의 조합을 사용하는 다가 결합체가 구축되었다. 일렬로 된 2개의 scFv 유닛으로 구성된 이중특이적 결합체는 임상적으로 성공적인 이중특이적 항체 형태인 것으로 나타났다. 항 종양 면역 요법의 경우, 일렬로 된 2개의 단일 사슬 가변 단편 (scFv)을 포함하는 이중특이적 결합체는 종양 항원에 결합하는 scFv가, CD3를 결합하여 T 세포와 체결하는 scFv와 연결되도록 설계되었다. 이런 식으로, T 세포는 소정의 T 세포가 가지고 있는 세포독성 성질에 의해 종양 세포의 살해를 매개할 수 있다는 희망으로 종양 부위에 모집된다. 림프종에 대해 CD19와 CD3를 표적으로 하는 이러한 이중특이적 결합체의 예가 만들어졌으며 (이중특이적 T 세포 체결, 또는 BiTE로 불림; 예를 들어, Dreier 등, 2003, J. Immunol. 170:4397-4402; Bargou 등, 2008, Science 321:974-977 참고), 이는 동물 이종이식 연구에서 종양 성장을 예방하는데 성공적이었다. 인간 연구에서, 이 이중특이적 결합체는 5가지 부분적 및 2가지 완전 관해를 포함하여, 객관적인 종양 반응을 입증했다.
- [0211] 예시적인 이중특이적 결합체는 종양 항원 (예, MHC 분자의 결합 포켓 내의 EBV-관련 웹티드)에 특이적인 제1 항체 성분 및 면역 효과기 세포 (예, T 세포, NK 세포 등)에 특이적인 제2 항체 성분을 가진 것을 포함한다. 이중 특이적 결합체는 예를 들어, 동일하거나 상이한 항원의 상이한 에피토프를 인식하는 중쇄 및/또는 경쇄를 조합함으로써 만들어 질 수 있다. 일부 실시예에서, 분자 기능에 의해, 이중특이적 결합체는 두 개의 결합 암(arm) 중 하나 (하나의 V_H/V_L 쌍)에 하나의 항원 (또는 에피토프)을 결합하고, 두 번째 암 (다른 V_H/V_L 쌍)에 다른 항원 (또는 에피토프)을 결합한다. 이 정의에 의해, 이중특이적 결합체는 두 개의 별개의 항원 결합 암 (특이성 및 CDR 서열 모두에)을 가지며, 그것이 결합하는 각 항원에 대해 1가이다.
- [0212] 일부 실시예에서, 본 발명의 이중특이적 결합체는 상이한 구조의 2개의 표적에 동시에 결합하는 능력을 특징으로 한다. 일부 실시예에서, 본 발명의 이중특이적 결합체는 예를 들어, B-세포, T-세포, 골수, 혈장 또는 비만 세포 항원 또는 에피토프에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 성분, 및 웹티드-HLA 복합체에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 다른 성분을 가지며, 상기 웹티드-HLA 복합체의 웹티드는 EBV 단백질로부터 유래된 것이다.
- [0213] 본 발명의 이중특이적 결합체(예를 들어, 이중특이적 항체)는 소정의 포맷이 EBV-관련 질환 및 악성 종양의 진단 및/또는 치료를 위해 사용될 때 소정의 표적 (예를 들어, 종양 항원)에 보다 유익할 수 있다는 특별한 통찰력에 기초한다. 예를 들면, 본원에서 제공되는 이중특이적 항체는 별개의 결합 특성을 갖는 scFv의 조합을 이용한다. 이러한 이중특이적 항체는 제1 scFv를 통한 EBV-웹티드-HLA 복합체에 대한 특이성 및 제2 (예를 들어, 항-CD3)을 통한 T 세포에 대한 특이성을 입증한다. 본원에 기재된 바와 같이, 이 포맷을 갖는 이중특이적 항체는 먼저 제1 scFv(예, 항-EBV-LMP2/HLA-A02)를 통해 EBV-LMP2 웹티드/HLA 복합체를 발현하고 제2 scFv를 통해 T 세포 상의 CD3를 발현하는 세포에 결합한다. 이러한 이중특이적 결합체는 EBV-LMP2 웹티드/HLA 복합체와 CD3의 동시 결합을 통해 T 세포를 통해 EBV⁺ 세포의 세포독성을 촉진시킨다. 또한, 본 발명의 이중특이적 항체는 진단적 및 치료적 종양 표적화 특징을 제공한다.
- [0214] 다양한 실시예에서, 본 발명에 따른 이중특이적 결합체(예를 들어, 이중특이적 항체)는 제1 결합 성분 및 제2 결합 성분으로 구성된다. 많은 실시예에서, 본원에 기재된 이중특이적 결합체의 제1 결합 성분 및 제2 결합 성분은 각각 상이한 특이성을 특징으로 하는 항체 성분으로 구성된다. 많은 실시예에서, 항체 성분은 표 3에서 선택된다.
- [0215] 다양한 실시예에서, 본 발명에 따른 이중특이적 결합체는 제1 결합 성분 및 제2 결합 성분을 포함한다. 다양한 실시예에서, 본 발명에 따른 이중특이적 결합체는 제1 결합 성분, 제2 결합 성분 및 제1 결합 성분 및 제2 결합 성분 모두에 연결되는 (예를 들어, 제1 결합 성분 및 제2 결합 성분 사이에 위치하는) 링커를 포함한다.
- [0216] 다양한 실시예에서, 본원에 기재된 제1 결합 성분 및/또는 제2 결합 성분은 항체 성분을 포함하거나 항체 성분이다. 다양한 실시예에서, 본원에 기재된 제1 결합 성분 및/또는 제2 결합 성분은 링커 서열을 포함한다.
- [0217] 일부 실시예에서, 링커는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 또는 그 이상의 아미노산 길이이다. 일부 실시예에서, 링커는 단단한 삼차원 구조를 채택하지 않는 경향이 있지만, 오히려 폴리웹티드 (예를 들어, 제1 결합 성분 및/또는 제2 결합 성분)에 유연성을 제공한다는 점에서 특징이 있다. 일부 실시예에서, 링커는 이중특이적 결합체에 부여된 특이적 성질, 예컨대 응집 감소 및/또는 안정성 증가에 기

초하여 본원에 기재된 이중특이적 결합체에 사용된다. 일부 실시예에서, 본 발명의 이중특이적 결합체는 G₄S 링커를 포함한다. 일부 소정의 실시예에서, 본 발명의 이중특이적 결합체는 (G₄S)_n 링커를 포함하며, 여기서 n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 그 이상이다.

[0218] 일부 실시예에서, 본원에 기재된 제1 결합 성분 및/또는 제2 결합 성분은 면역글로불린(예, IgG)을 포함하거나 또는 면역글로불린이다. 일부 실시예에서, 본원에 기재된 제1 결합 성분 및/또는 제2 결합 성분은 항체 단편(예, scFv)을 포함하거나 또는 항체 단편이다. 일부 실시예에서, 본원에 기재된 제1 결합 성분은 면역글로불린을 포함하거나 면역글로불린이고, 제2 결합 성분은 항체 단편을 포함하거나 또는 항체 단편이다. 일부 소정의 실시예에서, 제1 결합 성분은 면역글로불린이고 제2 결합 성분은 항체 단편이다. 일부 소정의 실시예에서, 제1 결합 성분은 IgG이고 제2 결합 성분은 scFv이다.

[0219] 일부 소정의 실시예에서, 본 발명에 따른 이중특이적 결합체는 제1 및 제2 scFv를 포함한다. 일부 소정의 실시예에서, 제1 scFv는 제2 scFv의 C-말단 단부에 연결되어 있다. 일부 소정의 실시예에서, 제2 scFv는 제1 scFv의 C-말단 단부에 연결되어 있다. 일부 소정의 실시예에서, scFv는 링커 서열을 통해 서로 연결되어 있다.

[0220] 일부 실시예에서, 본 발명의 이중특이적 결합체는 표 3에 나타난 하나 이상의 서열과 적어도 약 50% (예를 들어, 적어도 약 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 동일한 하나 이상의 서열을 포함한다.

[0221] 일부 실시예에서, 본 발명의 이중특이적 결합체는 표 3에 나타난 하나 이상의 서열과 실질적으로 동일하거나 동일한 하나 이상의 서열을 포함한다.

[0222] 일부 실시예에서, 본 발명의 이중특이적 결합체는 표 3에 나타난 하나 이상의 서열로부터 선택된다. 일부 소정의 실시예에서, 본 발명의 이중특이적 결합체는 표 3에 나타난 2개의 서열, 예를 들어, 중쇄 서열 및 경쇄 서열로부터 선택된다. 일부 소정의 실시예에서, 본 발명의 이중특이적 결합체는 표 3에 나타난 3개의 서열, 예를 들어, 중쇄 서열, 경쇄 서열 및 scFv 서열로부터 선택된다.

[0223] 다양한 실시예에서, 본원에 기재된 이중특이적 결합체의 제1 결합 성분은 표 3에 나타난 항체 성분과 적어도 약 50% (예를 들어, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상) 동일한 서열을 갖는 항체 성분을 포함한다.

[0224] 다양한 실시예에서, 본원에 기재된 이중특이적 결합체의 제1 결합 성분은 표 3에 나타난 항체 성분과 실질적으로 동일하거나 동일한 서열을 갖는 항체 성분을 포함한다.

[0225] 다양한 실시예에서, 본원에 기재된 이중특이적 결합체의 제2 결합 성분은 T 세포를 결합하는 항체 성분을 포함한다. 본원에 기재된 이중특이적 결합체의 제2 결합 성분에 대한 표적으로 사용될 수 있는 예시적인 T 세포 마커는 CD3, CD4, CD8, CD28 등을 포함한다. 일부 실시예에서, 본원에 기재된 이중특이적 결합체의 제2 결합 성분은 CD3를 결합하는 항체 성분을 포함한다. 일부 소정의 실시예에서, 본원에 기재된 이중특이적 결합체의 제2 결합 성분은 CD3 ε를 결합하는 항체 성분을 포함한다.

[0226] 다양한 실시예에서, 본원에 기재된 이중특이적 결합체의 제2 결합 성분은 표 3에 나타난 항체 성분과 적어도 약 50% (예를 들어, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상) 동일한 서열을 갖는 항체 성분을 포함한다.

[0227] 다양한 실시예에서, 본원에 기재된 이중특이적 결합체의 제2 결합 성분은 표 3에 나타난 항체 성분과 실질적으로 동일하거나 동일한 서열을 갖는 항체 성분을 포함한다. 일부 소정의 실시예에서, 본원에 기재된 이중특이적 결합체의 제2 결합 성분은 서열번호 124이거나 이를 포함한다.

[0228] 본원에 기재된 바와 같이, 본 발명자들은 HLA I 류 결합 포켓에 제시된 EBV-관련 웨티드를 표적으로 하는 개선된 단일특이적 및 다중특이적 결합체(예를 들어, 이중특이적 항체)를 제공한다. 그러한 다중특이적 결합체는 일부 실시예에서, HLA I 류 결합 포켓에 제시된 웨티드와 TCR 상호작용을 모방하는, 결합 성분을 포함한다. 따라서, 본 발명의 다중특이적 결합체의 결합 성분은 HLA I 류 결합 포켓에 제시된 EBV-관련 웨티드에 특이적인 천연 TCR에 더욱 특이적이고 유사하다고 설명될 수 있다. 본원에 기재된 바와 같이, 그러한 다중특이적 결합체는 그러한 결합 성분을 함유하지 않는 다중특이적 결합체와 비교하여 교차 반응성을 겪지 않으면서 증진된 결합력 및 임상적 유용성을 나타낸다. 따라서, 본 발명은 이가 및 다가 LMP2 (CLG)/HLA-A02 특이적 II 형 항체의 합성을 구체적으로 입증하며, 항체는 시험관 내 및 생체 내에서 증진된 효능으로 특징지어진다. 또한, 본 발명은, 일부 실시예에서, 다른 HLA 대립형질 및 항원에 대한 일반화를 허용하는 별개의 이점을 제공하는, EBV-관련 웨

티드의 표적 웨티드 4-7 위치에 대한 특이성으로 특징지어지는, II 형 TCR 항체 모방체를 개발하기 위한 선별 방법론을 특이적으로 입증한다.

[0229] 키메라 항원 수용체 (*Chimeric Antigen Receptor, CAR*)

본 발명은 또한 본원에 기재된 인간 항체 제제 및/또는 다중특이적 결합체를 포함하는 키메라 항원 수용체를 제공한다. CAR은 당업계에 공지된 방법들에 의해 구축될 수 있다 (예를 들어, WO 2012/079000, 미국 특허 출원 공개 번호 2012/0213783, WO 2013/126726, WO 2015/177789 및 WO 2015/080981 참고; 이들 모두는 본원에 참고 문헌으로 포함된다). 면역 효과기 세포 (예를 들어, T 세포, NK 세포 등)는 본원에 기재된 항체 성분을 함유하는 키메라 항원 수용체를 발현하도록 조작되어서, 검출을 피하기 위해 암세포가 사용하는 면역계의 감시 메커니즘을 극복하는 항-종양 면역 효과기 세포를 생성할 수 있다. 일부 실시예에서, 본 발명은 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 효과기 세포를 제공하는데, 키메라 항원 수용체는 본원에 기재된 인간 항체 제제 또는 다중특이적 결합체의 하나 이상의 항원-결합 부위를 포함한다. 일부 실시예에서, 면역 효과기 세포는 본원에 기재된 항체 성분의 항원-결합 부위를 발현하도록 조작된 T 세포를 포함한다. 일부 실시예에서, 항원-결합 부위는 본원에 기재된 항체 성분이거나 항체 성분을 포함한다.

일부 실시예에서, 면역 효과기 세포는 키메라, 인간화된, 인간 및/또는 사람의 손에 의해 조작된 키메라 항원 수용체를 포함한다. 일부 실시예에서, 키메라 항원 수용체는 하나, 둘, 셋, 넷, 다섯 개 또는 그 이상의 성분 (예를 들어, 항체 성분, 결합 성분, 신호전달 성분 등)을 포함한다. 일부 실시예에서, 본원에 기재된 키메라 항원 수용체의 성분들은 EBV⁺ 또는 EBV-감염된 세포에 대한 면역 효과기 세포의 결합을 용이하게 한다. 일부 실시예에서, 본원에 기재된 키메라 항원 수용체는 EBV-LMP2/HLA-A 복합체 (예를 들어, EBV-LMP2(CLG)/HLA-A02 복합체)에 결합하는 항체 성분을 포함하고, 전체적으로 또는 부분적으로, 하나 이상의 세포질 신호전달 도메인, 및 전체적으로 또는 부분적으로, 하나 이상의 공동-자극성 분자를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 본원에 기재된 키메라 항원 수용체의 항체 성분은 scFv이거나 이를 포함하고; 일부 소정의 실시예에서, scFv는 표 3에서 선택된다.

[0232] 표적

다른 것들 중에서, 본 발명은 다중특이적 결합체 (및/또는 키메라 항원 수용체), 특히 이중특이적 항체와 같은 이중특이적 결합체가, 세포 살해를 용이하게 하는데 유용하고 및/또는 효과적이라는 인식을 포함한다. 특히, 본 발명은 표적-세포-연관 에피토프 (예를 들어, EBV-연관 웨티드 항원) 및 림프구-연관 에피토프 (예를 들어, T 세포 표면 단백질) 모두에 특이적으로 결합하는 다가 결합체의 활성이 EBV-연관 질환 및 악성 종양에 대한 효과적인 면역 요법이 될 수 있음을 나타낸다.

예를 들면, 본 발명의 일부 실시예에서, 다가 결합체는 종양-세포-연관 에피토프 및 T 세포 에피토프에 특이적으로 결합한다. 이러한 실시예들에 따라, 다가 결합체는 그의 표적 에피토프 중 하나 또는 둘 모두에 대한 제제의 결합을 용이하게 할 수 있고 및/또는 표적 T 세포에 의해 매개되는 표적 종양 세포의 살해를 증진시킬 수 있다. 다른 예시를 제공하기 위해, 본 발명의 일부 실시예에서, 키메라 항원 수용체는 EBV⁺ 또는 EBV-감염된 세포 상의 EBV-연관 에피토프를 결합한다. 이러한 실시예들에 따라, 면역 효과기 세포는 키메라 항원 수용체와 그의 표적 에피토프의 체결 후에 EBV⁺ 또는 EBV-감염된 세포의 살해를 용이하게 할 수 있다.

일부 실시예에서, 살해될 표적 세포는 예를 들어, 바이러스 웨티드 항원 (예, EBV-연관 바이러스 웨티드 항원)을 발현하는 세포를 포함한다. 당업자는 본원에 기재된 다가 결합체가 바람직하게 결합하는 그러한 세포 상의 적절한 표적 에피토프를 인식할 것이다.

일부 실시예에서, 본원에 기재된 표적 세포의 살해를 매개할 수 있는 림프구 세포는 T 세포 (예, CD8⁺ T 세포), 자연 살해 세포 (NK 세포), 대식세포, 과립구 및 항체-의존성 세포독성 세포가 있다. 당업자는 본원에 기재된 다가 결합체가 바람직하게 결합하는 그러한 림프구 상의 적절한 표적 에피토프를 인식할 것이다. 그러한 에피토프의 대표적인 것들은 항원, 예컨대, 예를 들면, IgG의 Fc 수용체 (예를 들어, Fc vRIIB), CD1d, CD3, CD4, CD7, CD8, CD13, CD14, CD16, CD31, CD38, CD56, CD68, MAC-1/MAC-3, IL-2Ra, OX40, Ly49, 및 CD94에서 발견될 수 있다.

[0237] 혁신 구축 및 발현

본원에 기재된 인간 단일클론 항체, 다중특이적 결합체 (예를 들어, 이중특이적 항체) 및 키메라 항원 수용체는

당업계에 공지된 분자 생물학적 방법들을 사용하여 핵산 분자로부터 생산될 수 있다. 핵산 분자는 적절한 숙주 세포 내로 도입될 때 융합 단백질을 발현할 수 있는 벡터 내로 삽입된다. 적절한 숙주 세포는 박테리아, 효모, 곤충 및 포유류 세포를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. DNA 단편을 벡터에 삽입하는 당업자에게 공지된 임의의 방법을 사용하여 전사/번역 제어 신호의 조절 하에 본 발명의 융합 단백질을 암호화하는 발현 벡터를 구축 할 수 있다. 이 방법들은 시험관 내 재조합 DNA 및 합성 기술 및 생체 내 재조합을 포함할 수 있다 (Sambrook 등, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory; Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Ausubel, 등, Greene Publ. Assoc., Wiley-Interscience, NY 참고).

[0239]

본 발명에 따른 핵산 분자의 발현은 재조합 DNA 분자로 형질전환된 숙주에서 분자가 발현되도록 제2 핵산 서열에 의해 조절될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 핵산 분자의 발현은 당업계에 공지된, 프로모터 및/또는 인핸서 요소에 의해 조절될 수 있다.

[0240]

핵산 구축물은 항체 및/또는 항체 성분으로부터 생성된 다중특이적 결합 단백질 (또는 키메라 항원 수용체)을 암호화하는 영역을 포함한다. 통상적으로, 그러한 다중특이적 결합 단백질 (또는 키메라 항원 수용체)은 V_H 및/ 또는 V_L 영역으로부터 생성될 것이다. 원하는 결합 및/또는 기능적 성질을 나타내는 항체의 식별 및 선별 후에, 각 항체의 가변 영역은 단리, 중폭, 클로닝 및 서열 결정된다. 아미노산을 암호화하고 및/또는 제한 부위를 운반하는 뉴클레오티드 서열의 첨가, 아미노산을 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 결실, 또는 아미노산을 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 치환을 포함하여, V_H 및 V_L 뉴클레오티드 서열에 변형이 이루어질 수 있다. 항체 및/ 또는 항체 성분은 인간, 비인간 (예, 설치류), 인간화 또는 키메라 항체로부터 생성될 수 있다.

[0241]

본 발명의 핵산 구축물은 당업계에 공지된 방법들에 의해 발현 벡터 또는 바이러스 벡터 내로 삽입되며, 핵산 분자는 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결된다.

[0242]

적절한 경우, 본원에 기재된 인간 단일클론 항체, 다중특이적 결합제 및 키메라 항원 수용체를 암호화하는 핵산 서열은 특정 세포 유형 또는 유기체에서의 발현에 최적화된 코돈을 포함하도록 변형될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,670,356 및 5,874,304 참고). 코돈 최적화 서열은 합성 서열이며, 바람직하게는 비-코돈 최적화 모체 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화된 동일한 폴리펩티드(또는 전장 폴리펩티드와 실질적으로 동일한 활성을 갖는 전장 폴리펩티드의 생물학적 활성 단편)를 암호화한다. 일부 실시예에서, 전체적으로 또는 부분적으로, 항체 성분을 암호화하는 유전 물질의 코딩 영역은 특정 세포 유형 (예, 진핵 세포 또는 원핵 세포)에 대한 코돈 사용을 최적화하기 위해 변경된 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 본원에 기재된 인간 또는 인간화된 중쇄 (또는 경쇄) 가변 영역에 대한 코딩 서열은 박테리아 세포에서의 발현을 위해 최적화될 수 있다. 대안적으로, 코딩 서열은 포유류 세포(예를 들어, CHO)에서의 발현을 위해 최적화될 수 있다. 이러한 서열은 코돈-최적화 서열로 설명될 수 있다.

[0243]

핵산 분자를 함유하는 발현 벡터는 핵산 구축물에 의해 암호화된 단백질의 생산을 허용하기 위해 적합한 숙주 세포로 형질전환된다. 예시적인 숙주 세포는 원핵 세포 (예를 들어, E. coli) 및 진핵 세포 (예를 들어, COS 또는 CHO 세포)를 포함한다. 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 본 발명의 인간 단일클론 항체, 다중특이적 결합제 및 키메라 항원 수용체의 생산을 허용하는 조건 하에서 생장시킨 다음, 인간 단일클론 항체, 다중특이적 결합제 및 키메라 항원 수용체의 회수가 뒤따른다.

[0244]

본 발명의 인간 단일클론 항체 및/또는 다중특이적 결합제는 안정적인 항체 또는 결합제 분자의 후속 형성을 가능하게 하는, 임의의 기술에 의해 정제될 수 있다. 예를 들면, 이론에 구속되기를 바라지 않고, 인간 단일클론 항체 및/또는 다중특이적 결합제는 수용성 폴리펩티드로서 또는 봉입체로서 세포로부터 회수될 수 있으며, 이들로부터 8M 염산 구아니디늄에 의해 정량적으로 추출 및 투석될 수 있다. 본 발명의 인간 단일클론 항체 및/또는 다중특이적 결합제를 추가로 정제하기 위해, 종래의 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 역상 크로마토그래피 또는 겔 여과가 사용될 수 있다. 본 발명의 인간 단일클론 항체 및/또는 다중특이적 결합제는 또한 진핵 세포 또는 원핵 세포로부터 분비 후 조건화된 배지로부터 회수될 수 있다.

[0245]

면역 효과기 세포 표면 상에 발현되는 키메라 항원 수용체는 당업계에 공지된 방법들에 의해 달성될 수 있다. 통상적으로, 키메라 항원 수용체 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 운반하는 발현 벡터는 발현을 위해 미생물로 형질전환된다. 상술한 바와 같이, 이러한 미생물은 원핵 생물 (박테리아) 또는 진핵 생물 (예를 들어, 효모)일 수 있다. 발현 벡터는 키메라 항원 수용체의 발현이 원하는 결과물에 따라 달라지는 세포막 또는 세포 이하 위치로 표적화되도록 신호 펩티드를 암호화하는 서열을 또한 포함할 수 있다. 이러한 신호 펩티드는 당업자에게 공지되어 있다. 키메라 항원 수용체 폴리펩티드를 암호화하는 발현 벡터는 당업계에 공지된 방법들에 의해

숙주 세포 내로 도입되며, 이 방법들은 예를 들어, DNA 형질감염, 전기천공, 형질감염 및 감염 (예를 들어, 아데노바이러스 또는 레트로 바이러스와 같은 바이러스에 의함)을 포함한다.

[0246] 일부 실시예에서, 본원에 기재된 키메라 항원 수용체를 암호화하는 핵산 분자는 T 세포에서의 발현을 제공하여 키메라 항원 수용체 T 세포를 생성한다. 키메라 항원 수용체를 암호화하는 핵산 분자는 T 세포와 같은 숙주 면역 효과기 세포에서의 발현을 위한 벡터 (예를 들어, 렌티바이러스 또는 레트로바이러스 벡터)에 포함될 수 있다. 예시적인 면역 효과기 세포는 T 세포, 자연 살해 (NK) 세포, 세포독성 T 럼프구 (CTL) 및 조절성 T 세포가 포함된다. 키메라 항원 수용체 및 이러한 키메라 항원 수용체를 포함하는 T 세포를 암호화하는 핵산 분자를 생성하는 방법은 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어, Tilly, B.G. 등, 2008, Blood 112(6):2261-71; Brentjens, R. 등, 2010, Molecular Therapy 18(4):666-8; Morgan, R.A. 등, 2010, Molecular Therapy 18(4):843-51; Park, T.S. 등, 2011, Trends Biotechnol. 29(11):550-7; Grupp, S.A. 등, 2013, N. Engl. J. Med. 368(16):1509-18; Han, E.Q. 등, 2013, J. Hematol. Oncol. 6:47; WO 2012/079000, WO 2013/126726; 및 미국 특허 출원 공개 번호 2012/0213783 참고, 이들 모두는 본원에 참고 문헌으로 포함된다).

스크리닝 및 검출 방법

[0247] [0248] 본 발명의 인간 단일클론 항체, 다중특이적 결합체 및/또는 키메라 항원 수용체는 또한 시험관 내 또는 생체 내 스크리닝 방법에서 사용될 수 있으며, 이때 세포 또는 세포들 (예를 들어, 세포사멸 또는 세포 성장)의 하나 이상의 활성을 검출 및/또는 측정하는 것이 바람직하다. 스크리닝 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며 세포-무, 세포-기반 및 동물 분석을 포함한다. 시험관 내 분석은 고체 상태 또는 가용성 표적 분자 검출일 수 있으며 표적 분자(예를 들어, 세포 표면 항원)에 결합되는 인간 단일클론 항체 또는 다중특이적 결합체를 식별할 수 있는 표지 또는 검출가능한 군의 사용을 포함하여, 당업계에 공지된 다수의 방법으로 달성될 수 있다. 검출가능한 표지는 본 발명의 인간 단일클론 항체, 다중특이적 결합체 또는 키메라 항원 수용체를 사용하는 분석과 함께 사용될 수 있다.

치료 방법

[0249] [0250] 표적 항원 중 하나에 대한 높은 친화도 결합을 나타낼 수 있는 본 발명의 인간 단일클론 항체, 다중특이적 결합체 및/또는 키메라 항원 수용체의 능력은 그것들이 표적 항원(예를 들어, EBV-연관 웨티드)을 발현하는 세포를 효율적으로 표적화하는 데 치료학적으로 유용하게 한다. 따라서, 일부 실시예에서, 다중특이적 결합체 (또는 인간 단일클론 항체의 경우 Fc 수용체)에 의해 또한 결합되는 다른 표적 항원이 아니라, 하나의 표적 항원에 대한 인간 단일클론 항체 또는 다중특이적 결합체의 친화도를 증가시키는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들면, 종양 살해와 관련하여, 소정의 조건은 종양 살해를 매개할 수 있는 세포의 표면에 있는 항원이 아니라 (예, T 세포), 종양 항원에 대한 친화도의 증가로 인해 이득을 얻을 수 있다. 따라서, 본원에 기재된 인간 단일클론 항체, 다중특이적 결합체 또는 키메라 항원 수용체의 사용을 통해 종양 항원을 발현하는 종양을 갖는 환자에서 종양 항원에 대한 인간 단일클론 항체, 다중특이적 결합체 또는 키메라 항원 수용체의 결합 친화도를 증가시키는 것이 유익할 수 있다.

[0251] 본 발명은 이러한 다중특이적 결합체에 의해 결합될 수 있는 항원을 발현하는 종양을 갖는 환자의 치료를 위한 치료제로서 본원에 기재된 인간 단일클론 항체, 다중특이적 결합체 및/또는 키메라 항원 수용체를 제공한다. 이러한 인간 단일클론 항체, 다중특이적 결합체 및/또는 키메라 항원 수용체는 인간 또는 동물 신체의 치료 방법, 또는 진단 방법에 사용될 수 있다.

[0252] 일부 실시예에서, 제공된 인간 단일클론 항체, 다중특이적 결합체 또는 키메라 항원 수용체는 의학에 유용하다. 일부 실시예에서, 제공된 인간 단일클론 항체, 다중특이적 결합체 또는 키메라 항원 수용체는 EBV-연관 질환 또는 악성 종양 또는 EBV-연관 질환 또는 악성 종양과 연관되거나 상관 관계가 있는 음성 과급의 치료 또는 예방에서의 예방제로서 유용하다. 일부 실시예에서, 제공된 인간 단일클론 항체, 다중특이적 결합체 또는 키메라 항원 수용체는, 치료학적 응용분야, 예를 들어 EBV-연관 질환 또는 악성 종양을 앓고 있거나 결리기 쉬운 개체에서 유용하다.

투여

[0253] [0254] 본 발명은 치료를 필요로 하는 대상에게 유효량의 본원에 기재된 치료 활성제 (예를 들어, 인간 단일클론 항체, 다중특이적 결합체, 또는 키메라 항원 수용체)를 투여하는 방법을 제공한다.

[0255] 본원에 기재된 인간 단일클론 항체, 다중특이적 결합체, 또는 키메라 항원 수용체는 제제의 치료학적 전달을 위해 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 투여될 수 있는데, 예컨대 단백질 또는 핵산은 인간 단일클론 항체, 다

중특이적 결합제, 또는 키메라 항원 수용체의 치료학적 전달에 사용될 수 있거나, 대상에서 표적 세포의 살해 또는 성장 저해를 위한 본 발명의 인간 단일클론 항체, 다중특이적 결합제, 또는 키메라 항원 수용체를 암호화하는 핵산, 예를 들어, 세포성 형질감염, 유전자 치료, 전달 비히클 또는 약제학적으로 허용가능한 담체와 함께 직접 투여, 본 발명의 다중특이적 결합제를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 세포를 제공함에 의한 간접 전달이 있다.

[0256] 다양한 전달 시스템이 공지되어 있고, 본 발명의 인간 단일클론 항체, 다중특이적 결합제, 또는 키메라 항원 수용체를 투여하는데 사용될 수 있는데, 예를 들어, 리포솜, 미세입자, 미세캡슐, 화합물을 발현할 수 있는 재조합 세포에의 캡슐화, 수용체-매개 엔도시토시스 (예를 들어, Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 참고), 레트로바이러스 또는 기타 벡터의 일부로서 핵산 구축 등이다. 투여 경로는 장내 또는 비경구일 수 있으며, 정맥 내, 피하, 근육 내, 비경구, 경피 또는 경점막 (예를 들어, 경구 또는 비강)을 포함하지만 이에 한정 되지는 않는다. 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적 결합제는 정맥 내 투여된다. 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적 결합제는 피하 투여된다. 일부 실시예에서, 다중특이적 결합제는 다른 생물학적 활성제와 함께 투여된다.

약제학적 조성물

[0258] 본 발명은 본 발명의 인간 단일클론 항체, 다중특이적 결합제, 또는 키메라 항원 수용체를 포함하는 약제학적 조성물 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 추가로 제공한다. 조성물은, 원하는 경우, 하나 이상의 추가의 치료 활성 물질을 또한 함유할 수 있다.

[0259] 일부 실시예에서, 키메라 항원 수용체를 포함하는 약제학적 조성물은 대상으로부터 단리된 자가 T 세포를 감염시키는데 사용되는 바이러스 (예를 들어, 레트로바이러스)로서 제공될 수 있다. 이러한 실시예에서, 자가 T 세포는 본원에 기재된 키메라 항원 수용체를 발현하도록 조작된 바이러스로 감염되어, 대상(예를 들어, 인간 환자) 내로의 재관류를 위한 키메라 항원 수용체 T 세포를 생성한다.

[0260] 본원에 제공되는 약제학적 조성물의 설명은 원칙적으로 인간에 대한 윤리적 투여에 적합한 약제학적 조성물에 관한 것이지만, 당업계의 숙련자는 이러한 조성물이 일반적으로 모든 종류의 동물에게 투여하기에 적절하다는 것을 이해할 것이다. 다양한 동물에 투여하기에 적합한 조성물을 부여하기 위해 인간에 투여하기에 적합한 약제학적 조성물의 변형이 잘 이해되어 있으며, 통상적인 숙련된 약리학자는 단지 통상적인 실험을 통해 그러한 변형을 설계 및/또는 수행할 수 있다.

[0261] 예를 들면, 본원에 제공되는 약제학적 조성물은 멸균 주사 형태 (예를 들어, 피하 주사 또는 정맥 내 주입에 적합한 형태)로 제공될 수 있다. 예를 들면, 일부 실시예에서, 약제학적 조성물은 주사에 적합한 액상 투약 형태로 제공된다. 일부 실시예에서, 약제학적 조성물은 (예를 들면, 동결 건조 및/또는 멸균된) 분말로서, 선택적으로 진공 상태에서 제공되며, 주사 전에 수성 희석제 (예, 물, 완충액, 염 용액 등)로 재구성된다. 일부 실시예에서, 약제학적 조성물은 물, 염화나트륨 용액, 초산 나트륨 용액, 벤질 알코올 용액, 인산염 완충 염수 등으로 희석 및/또는 재구성된다. 일부 실시예에서, 분말이 수성 희석제와 부드럽게 혼합되어야 한다 (예를 들어, 진탕되지 않음).

[0262] 본원에 기재된 약제학적 조성물의 제형은 약리학 분야에서 공지되었거나 이후 개발된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 그러한 제조 방법은 활성 성분을 희석제 또는 다른 부형제 및/또는 하나 이상의 다른 보조 성분과 결합되게 하는 단계, 및 이어서, 필요하고 및/또는 바람직하다면, 생성물을 원하는 단일 또는 다중 투여량 단위로 성형 및/또는 포장하는 단계를 포함한다.

[0263] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 대량으로, 단일 단위 투여량으로서, 및/또는 복수의 단일 단위 투여량으로서, 제조, 포장 및/또는 판매될 수 있다. 본원에 사용된, "단위 투여량"은 소정 양의 활성 성분을 포함하는 약제학적 조성물의 개별적인 양이다. 활성 성분의 양은 일반적으로 대상에게 투여될 활성 성분의 투여량 및/또는 그러한 투여량의 간편한 분획, 예를 들어 그러한 투여량의 1/2 또는 1/3과 동일하다.

[0264] 본 발명에 따른 약제학적 조성물에서 활성 성분, 약제학적으로 허용가능한 부형제 및/또는 임의의 추가 성분의 상대적인 양은 치료되는 대상의 정체, 크기 및/또는 상태에 따라 달라질 것이며, 추가로 조성물이 투여되는 경로에 따라 달라질 것이다. 예로서, 조성물은 0.1% 내지 100% (w/w) 활성 성분을 포함할 수 있다.

[0265] 약제학적 제형은 본원에서 사용된 바와 같이, 임의의 모든 용매, 분산 매질, 희석제 또는 다른 액체 비히클, 분산제 또는 혼탁 보조제, 계면 활성제, 등장화제, 중점제 또는 유화제, 방부제, 고형 결합제, 윤활제 등을 포함하는, 약제학적으로 허용가능한 부형제를, 원하는 특정 투여량 형태에 적합한 것으로서, 추가적으로 포함할 수

있다. Remington의 The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, A. R. Gennaro (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006)는 약제학적 조성물을 제형화하는 데 사용되는 다양한 부형제 및 그의 제조를 위한 공지된 기술을 개시한다. 임의의 종래의 부형제 매질이 임의의 바람직하지 않은 생물학적 효과를 생성시키거나 그렇지 않으면 약제학적 조성물의 임의의 다른 성분(들)과 유해한 방식으로 상호작용하는 것과 같이, 물질 또는 그의 유도체와 양립할 수 없는 한을 제외하고, 그의 용도는 본 발명의 범위 내인 것으로 고려된다.

[0266] 일부 실시예에서, 약제학적으로 허용가능한 부형제는 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 순도하다. 일부 실시예에서, 부형제는 인간에서 사용하고 수의학 용도를 위해 승인되었다. 일부 실시예에서, 부형제는 미국 식품의약국(the United States Food and Drug Administration)의 승인을 받았다. 일부 실시예에서, 부형제는 제약학적 등급이다. 일부 실시예에서, 부형제는 미국 약전 (USP), 유럽 약전 (EP), 영국 약전 (the British Pharmacopoeia) 및/또는 국제 약전 (the International Pharmacopoeia)의 기준을 충족 한다.

[0267] 약제학적 조성물의 제조에 사용되는 약제학적으로 허용가능한 부형제는, 불활성 희석제, 분산제 및/또는 과립화제, 계면 활성제 및/또는 유화제, 봉해제, 결합제, 방부제, 완충제, 윤활제, 및/또는 오일을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 이러한 부형제는 선택적으로 약제학적 제형에 포함될 수 있다. 코코아 버터 및 콥제 왁스와 같은 부형제, 착색제, 코팅제, 감미료, 향료 및/또는 방향제가 형성기의 판단에 따라, 조성물 중에 존재할 수 있다.

[0268] 일부 실시예에서, 제공된 약제학적 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 부형제(예를 들어, 방부제, 불활성 희석제, 분산제, 계면 활성제 및/또는 유화제, 완충제 등)을 포함한다. 일부 실시예에서, 약제학적 조성물은 하나 이상의 방부제를 포함한다. 일부 실시예에서, 약제학적 조성물은 방부제를 포함하지 않는다.

[0269] 일부 실시예에서, 약제학적 조성물은 냉장 및/또는 냉동될 수 있는 형태로 제공된다. 일부 실시예에서, 약제학적 조성물은 냉장 및/또는 냉동될 수 없는 형태로 제공된다. 일부 실시예에서, 재구성된 용액 및/또는 액체 투여량 형태는 재구성후 소정의 기간 동안 저장될 수 있다(예, 2 시간, 12 시간, 24 시간, 2 일, 5 일, 7 일, 10 일, 2 주, 한 달, 두 달 또는 그 이상). 일부 실시예에서, 특정된 시간보다 오랫 동안 항체 조성물을 저장하면 항체가 분해된다.

[0270] 액체 투여량 형태 및/또는 재구성된 용액은 투여 전에 미립자 물질 및/또는 변색을 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 변색되거나 흐려지는 경우 및/또는 여과 후에 미립자 물질이 남아 있는 경우 용액을 사용해서는 안된다.

[0271] 약제학적 제제의 제형 및/또는 제조에 대한 일반적인 고려사항은 예를 들어, Remington에서 찾을 수 있다: The Science and Practice of Pharmacy 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

키트

[0273] 본 발명은 본원에 기재된 적어도 하나의 인간 단일클론 항체, 다중특이적 결합제 (예를 들어, 이중특이적 항체), 또는 키메라 항원 수용체 (또는 키메라 항원 면역 효과기 세포)가 채워진 하나 이상의 용기를 포함하는 약제학적 팩 또는 키트를 추가로 제공한다. 키트는 예를 들어, 진단학적으로와 같은, 임의의 적용가능한 방법으로 사용될 수 있다. 선택적으로 그러한 용기(들)와 관련이 있는 것은 의약품 또는 생물학적 제품의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 기관이 규정한 형태의 통지일 수 있으며, 통지는 (a) 인간 투여를 위한 제조, 사용 또는 판매에 대한 기관에 의한 승인, (b) 사용 지침, 또는 둘 다를 반영한다.

[0274] 본 발명의 다른 특징은 본 발명의 설명을 위해 제공된, 예시적인 실시예의 하기 설명의 과정에서 명백해질 것이고, 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니다.

예시적인 실시예

[0276] 1. EBV-LMP2/HLA 웨პ티드 복합체를 결합하는 인간 항체 제제로, 여기서 인간 항체 제제는 EBV-LMP2 웨პ티드 내의, 1번 위치, 5번 위치, 8번 위치, 및 이들의 조합으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 위치에서 아미노산 잔기와 직접 상호작용하는, 인간 항체 제제.

[0277] 2. EBV-LMP2/HLA 웨პ티드 복합체를 결합하는 인간 항체 제제로, 여기서 인간 항체 제제는 약 2.0 내지 약 170 nM의 K_D 를 갖는, 인간 항체 제제.

- [0278] 3. 예시적인 실시예 1 또는 2의 인간 항체 제제로, EBV-LMP2 웨티드는 CLGGLLTMV (서열번호 1)이거나 이를 포함하는 아미노산 서열을 갖는다.
- [0279] 4. 예시적인 실시예 3의 인간 항체 제제로, 인간 항체 제제는 EBV-LMP2 웨티드에서, 위치 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 및 이들의 조합으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 위치에서 아미노산 잔기와 직접 상호 작용한다.
- [0280] 5. 예시적인 실시예들 1-4 중 어느 하나의 인간 항체 제제로, 인간 항체 제제는 중쇄 서열번호 31의 CDR1, 서열 번호 33의 CDR2 및 서열번호 35의 CDR3를 포함하고; 여기서 인간 항체 제제는 경쇄 서열번호 73의 CDR1, 서열번호 75의 CDR2 및 서열번호 77의 CDR3을 포함한다.
- [0281] 6. 예시적인 실시예들 1-4 중 어느 하나의 인간 항체 제제로, 인간 항체 제제는 중쇄 서열번호 37의 CDR1, 서열 번호 39의 CDR2 및 서열번호 41의 CDR3를 포함하고; 여기서 인간 항체 제제는 경쇄 서열번호 79의 CDR1, 서열번호 81의 CDR2 및 서열번호 83의 CDR3을 포함한다.
- [0282] 7. 예시적인 실시예들 1-4 중 어느 하나의 인간 항체 제제로, 인간 항체 제제는 중쇄 서열번호 43의 CDR1, 서열 번호 45의 CDR2 및 서열번호 47의 CDR3를 포함하고; 여기서 인간 항체 제제는 경쇄 서열번호 85의 CDR1, 서열번호 87의 CDR2 및 서열번호 89의 CDR3을 포함한다.
- [0283] 8. 예시적인 실시예들 1-4 중 어느 하나의 인간 항체 제제로, 인간 항체 제제는 중쇄 서열번호 49의 CDR1, 서열 번호 51의 CDR2 및 서열번호 53의 CDR3를 포함하고; 여기서 인간 항체 제제는 경쇄 서열번호 91의 CDR1, 서열번호 93의 CDR2 및 서열번호 95의 CDR3을 포함한다.
- [0284] 9. 예시적인 실시예들 1-4 중 어느 하나의 인간 항체 제제로, 인간 항체 제제는 중쇄 서열번호 55의 CDR1, 서열 번호 57의 CDR2 및 서열번호 59의 CDR3를 포함하고; 여기서 인간 항체 제제는 경쇄 서열번호 97의 CDR1, 서열번호 99의 CDR2 및 서열번호 101의 CDR3을 포함한다.
- [0285] 10. 예시적인 실시예들 1-4 중 어느 하나의 인간 항체 제제로, 인간 항체 제제는 중쇄 서열번호 61의 CDR1, 서열 번호 63의 CDR2 및 서열번호 65의 CDR3를 포함하고; 여기서 인간 항체 제제는 경쇄 서열번호 103의 CDR1, 서열번호 105의 CDR2 및 서열번호 107의 CDR3을 포함한다.
- [0286] 11. 예시적인 실시예들 1-4 중 어느 하나의 인간 항체 제제로, 인간 항체 제제는 중쇄 서열번호 67의 CDR1, 서열 번호 69의 CDR2 및 서열번호 71의 CDR3를 포함하고; 여기서 인간 항체 제제는 경쇄 서열번호 109의 CDR1, 서열번호 111의 CDR2 및 서열번호 113의 CDR3을 포함한다.
- [0287] 12. 예시적인 실시예들 5-11 중 어느 하나의 인간 항체 제제로, 인간 항체 제제는 중쇄 CDR 및/또는 경쇄 CDR에서 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0288] 13. 예시적인 실시예 12의 인간 항체 제제로, 인간 항체 제제는 중쇄 CDR 및/또는 경쇄 CDR에서 적어도 1개 또는 최대 5개의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0289] 14. 예시적인 실시예 12의 인간 항체 제제로, 인간 항체 제제는 중쇄 CDR 및/또는 경쇄 CDR에서 적어도 1개 또는 최대 3개의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0290] 15. 예시적인 실시예들 1-4 중 어느 하나의 인간 항체 제제로, 인간 항체 제제는 표 3에 보이는 중쇄 가변 영역 서열과 적어도 95% 동일한 서열을 가지는 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0291] 16. 예시적인 실시예들 1-4 중 어느 하나의 인간 항체 제제로, 인간 항체 제제는 표 3에 보이는 경쇄 가변 영역 서열과 적어도 95% 동일한 서열을 가지는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0292] 17. 예시적인 실시예들 1-4 중 어느 하나의 인간 항체 제제로, 인간 항체 제제는
- [0293] (a) 표 3에 보이는 중쇄 가변 영역 서열과 적어도 95% 동일한 서열을 가지는 중쇄 가변 영역, 및
- [0294] (b) 표 3에 보이는 경쇄 가변 영역 서열과 적어도 95% 동일한 서열을 가지는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0295] 18. 예시적인 실시예들 1-4 중 어느 하나의 인간 항체 제제로, 인간 항체 제제는 표 3에서 선택되는 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0296] 19. 예시적인 실시예들 1-4 중 어느 하나의 인간 항체 제제로, 인간 항체 제제는 표 3에서 선택되는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

- [0297] 20. 예시적인 실시예들 1-4 중 어느 하나의 인간 항체 제제로, 인간 항체 제제는 서열번호 3의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 5의 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0298] 21. 예시적인 실시예들 1-4 중 어느 하나의 인간 항체 제제로, 인간 항체 제제는 서열번호 7의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 9의 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0299] 22. 예시적인 실시예들 1-4 중 어느 하나의 인간 항체 제제로, 인간 항체 제제는 서열번호 11의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 13의 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0300] 23. 예시적인 실시예들 1-4 중 어느 하나의 인간 항체 제제로, 인간 항체 제제는 서열번호 15의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 17의 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0301] 24. 예시적인 실시예들 1-4 중 어느 하나의 인간 항체 제제로, 인간 항체 제제는 서열번호 19의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 21의 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0302] 25. 예시적인 실시예들 1-4 중 어느 하나의 인간 항체 제제로, 인간 항체 제제는 서열번호 23의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 25의 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0303] 26. 예시적인 실시예들 1-4 중 어느 하나의 인간 항체 제제로, 인간 항체 제제는 서열번호 27의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 29의 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0304] 27. 전술한 예시적인 실시예들 중 어느 하나의 인간 항체 제제로, 인간 항체 제제는 말단 만노오스, N-아세틸글루코오스 또는 글루코오스로 탈푸코실화(defucosylated) 및/또는 글리코실화(glycosylated)되는 인간 단일클론 항체이다.
- [0305] 28. EBV-LMP2/HLA 웨პ티드 복합체를 결합하는 인간 항체 제제로, 인간 항체 제제는 EBV-LMP2/HLA 웨პ티드 복합체에 대한 친화도를 증가시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하고, 여기서, 인간 항체 제제는
- [0306] (a) 참조 웨პ티드/HLA 복합체에 대한 친화도 보다 적어도 약 1.6 KA가 높다는 점, 및/또는
- [0307] (b) 참조 웨პ티드/HLA 복합체에 대한 교차 반응성이 없다는 점을 특징으로 한다.
- [0308] 29. 예시적인 실시예 28의 인간 항체 제제로, 인간 항체 제제는 아미노산 위치 48, 52, 55, 66, 95 및 이들의 조합 중 어느 하나에서 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0309] 30. 예시적인 실시예 29의 인간 항체 제제로, 하나 이상의 아미노산 치환은 I48V/S52G, P55H, K66R 또는 N95I이다.
- [0310] 31. 예시적인 실시예들 28-30 중 어느 하나의 인간 항체 제제로, 인간 항체 제제는 아미노산 위치 5, 10, 26, 51, 78 및 이들의 조합 중 어느 하나에서 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0311] 32. 예시적인 실시예 31의 인간 항체 제제로, 하나 이상의 아미노산 치환은 V5E, E10D, G26E/I51V 또는 V78A이다.
- [0312] 33. 전술한 예시적인 실시예들 중 어느 하나의 인간 항체 제제로, 인간 항체 제제는 인간 단일클론 항체 또는 그 단편이다.
- [0313] 34. 예시적인 실시예 33의 인간 항체 제제로, 인간 단일클론 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 항체이다.
- [0314] 35. 예시적인 실시예 34의 인간 항체 제제로, 인간 단일클론 항체는 IgG1이다.
- [0315] 36. 예시적인 실시예 33의 인간 항체 제제로, 인간 단일클론 항체 단편은 scFv이다.
- [0316] 37. 전술한 예시적인 실시예들 중 어느 하나의 인간 항체 제제로, EBV-LMP2/HLA 웨პ티드 복합체의 HLA는 HLA I 유형 분자이다.
- [0317] 38. 예시적인 실시예 37의 인간 항체 제제로, HLA I 유형 분자는 HLA-A02이다.
- [0318] 39. 예시적인 실시예 38의 인간 항체 제제로, HLA-A02는 HLA-A*02:01, HLA-A*02:02, HLA-A*02:03, HLA-A*02:04, HLA-A*02:05 및 HLA-A*02:06로부터 선택된다.
- [0319] 40. 예시적인 실시예들 1-39 중 어느 하나의 인간 항체 제제를, 전체적으로 또는 부분적으로, 암호화하는 단위된 핵산 분자.

- [0320] 41. 예시적인 실시예 40의 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터.
- [0321] 42. 제41항의 재조합 벡터 또는 예시적인 실시예 40의 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포.
- [0322] 43. 예시적인 실시예 42의 숙주 세포로, 숙주 세포는 박테리아, 효모, 곤충 또는 포유류 세포로부터 선택된다.
- [0323] 44. 예시적인 실시예 43의 숙주 세포로, 숙주 세포는 *E.coli*, *P.파스토리스(P.pastoris)*, Sf9, COS, HEK293, CHO 및 포유류 램프구로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0324] 45. 예시적인 실시예 44의 숙주 세포로, 포유류 램프구는 인간 램프구이다.
- [0325] 46. 예시적인 실시예들 1-39 중 어느 하나에 따른 인간 항체 제제를 생산하기 위한 방법으로,
- [0326] 예시적인 실시예들 42-45 중 어느 하나에 따른 숙주 세포를 인간 항체 제제의 발현에 적합한 조건 하에 배양 배지에서 배양하는 단계, 및
- [0327] 인간 항체 제제를 상기 배양 배지로부터 회수하는 단계를 포함한다.
- [0328] 47. 예시적인 실시예들 1-39 중 어느 하나에 따른 인간 항체 제제를 포함하는 조성물.
- [0329] 48. 예시적인 실시예들 1-39 중 어느 하나에 따른 인간 항체 제제 또는 예시적인 실시예 47에 따른 조성물을 포함하고, 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제를 추가로 포함하는 약제학적 조성물.
- [0330] 49. 예시적인 실시예들 1-39 중 어느 하나에 따른 인간 항체 제제를 포함하는 키트.
- [0331] 50. EBV-LMP2/HLA 웨티드 복합체의 발현을 특징으로 하는 대상 내의 의학적 상태를 치료하는 방법으로,
- [0332] 예시적인 실시예들 1-39 중 어느 하나에 따른 인간 항체 제제, 예시적인 실시예 47의 조성물, 또는 예시적인 실시예 48의 약제학적 조성물의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0333] 51. 예시적인 실시예 50의 방법으로, 의학적 상태는 호지킨병(Hodgkin's disease), 비-호지킨병 또는 감염성 단핵구증이다.
- [0334] 52. 예시적인 실시예 50의 방법으로, 의학적 상태는 버킷 램프종(Burkitt's lymphoma), 면역 억제성 램프종, 미만성 거대 B-세포 램프종(diffuse large B-cell lymphoma), 만성 염증과 연관된 미만성 거대 B-세포 램프종, 램프종양 육아종증(lymphomatoid granulomatosis), 형질모세포 램프종, 원발성 삼출성 램프종(primary effusion lymphoma), 이식 후 램프 종식성 질환, 비인두암종, 위 선암종, 램프상피종양-연관 암종(lymphanepithelioma-associated carcinoma), 및 면역 결핍-관련 평활근 육종으로부터 선택된다.
- [0335] 53. 예시적인 실시예들 50-52 중 어느 하나의 방법으로, EBV-LMP2/HLA 웨티드 복합체의 HLA는 HLA I 유형이다.
- [0336] 54. 예시적인 실시예 53의 방법으로, HLA I 유형 분자는 HLA-A02이다.
- [0337] 55. 예시적인 실시예 54의 방법으로, HLA-A02는 HLA-A*02:01, HLA-A*02:02, HLA-A*02:03, HLA-A*02:04, HLA-A*02:05 및 HLA-A*02:06로부터 선택된다.
- [0338] 56. EBV 감염과 관련된 상태의 치료 또는 검출을 위한 예시적인 실시예들 1-39 중 어느 하나에 따른 인간 항체 제제의 용도.
- [0339] 57. EBV-LMP2/HLA 웨티드 복합체를 결합하는 제1 항원-결합 부위 및 제2 항원-결합 부위를 포함하는 이중특이적 항체.
- [0340] 58. 예시적인 실시예 57의 이중특이적 항체로, 이중특이적 항체는 EBV-LMP2 웨티드 CLGGLTMV (서열번호 1)로 펠스된 T2 세포에서의 약 0.2 내지 약 135 pM의 EC₅₀를 특징으로 한다.
- [0341] 59. 예시적인 실시예 57 또는 58의 이중특이적 항체로, 제1 및/또는 제2 항원-결합 부위는 면역글로불린 분자, scFv, scFab, Fab, Fv 또는 이들의 조합으로 이루어지는 그룹으로부터 선택된다.
- [0342] 60. 예시적인 실시예 57 또는 58의 이중특이적 항체로, 제1 및 제2 항원-결합 부위는 그들이 단일 폴리웨티드 사슬을 형성하도록 구성되어 있다.
- [0343] 61. 예시적인 실시예 60의 이중특이적 항체로, 제1 및 제2 항원-결합 부위는 각각 scFv이다.

- [0344] 62. 예시적인 실시예 60의 이중특이적 항체로, 제1 및 제2 항원-결합 부위는 웨티드 링커에 의해 연결된다.
- [0345] 63. 예시적인 실시예 61 또는 62의 이중특이적 항체로, 제2 항원-결합 부위는 제1 항원-결합 부위의 C-말단 단부에 연결된다.
- [0346] 64. 예시적인 실시예들 57-63 중 어느 하나의 이중특이적 항체로, 제2 항원-결합 부위는 T 세포, B 세포, NK 세포, 수지상 세포, 단핵구, 대식세포, 호중구, 중간엽 줄기세포 및 신경 줄기세포로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 면역 세포를 결합한다.
- [0347] 65. 예시적인 실시예 64의 이중특이적 항체로, 제2 항원-결합 부위는 T 세포 상의 CD3를 결합한다.
- [0348] 66. 예시적인 실시예들 57-65 중 어느 하나의 이중특이적 항체로, EBV-LMP2/HLA 웨티드 복합체의 HLA는 HLA I 류 분자이다.
- [0349] 67. 예시적인 실시예 66의 이중특이적 항체로, HLA I 류 분자는 HLA-A02이다.
- [0350] 68. 예시적인 실시예 67의 이중특이적 항체로, HLA-A02는 HLA-A*02:01, HLA-A*02:02, HLA-A*02:03, HLA-A*02:04, HLA-A*02:05 및 HLA-A*02:06로부터 선택된다.
- [0351] 69. 예시적인 실시예들 57-68 중 어느 하나에 따른 이중특이적 항체를, 전체적으로 또는 부분적으로, 암호화하는 단리된 핵산 분자.
- [0352] 70. 예시적인 실시예 69의 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터.
- [0353] 71. 예시적인 실시예 70의 재조합 벡터 또는 예시적인 실시예 69의 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포.
- [0354] 72. 예시적인 실시예 71의 숙주 세포로, 숙주 세포는 박테리아, 효모, 곤충 또는 포유류 세포로부터 선택된다.
- [0355] 73. 예시적인 실시예 72의 숙주 세포로, 숙주 세포는 *E.coli*, *P.파스토리스(P.pastoris)*, Sf9, COS, HEK293, CHO 및 포유류 림프구로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0356] 74. 예시적인 실시예 73의 숙주 세포로, 포유류 림프구는 인간 림프구이다.
- [0357] 75. 예시적인 실시예들 57-68 중 어느 하나에 따른 이중특이적 항체를 포함하는 조성물.
- [0358] 76. 예시적인 실시예들 57-68 중 어느 하나에 따른 이중특이적 항체 또는 예시적인 실시예 75에 따른 조성물을 포함하고, 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 추가로 포함하는 약제학적 조성물.
- [0359] 77. 예시적인 실시예들 57-68 중 어느 하나에 따른 이중특이적 항체를 포함하는 키트.
- [0360] 78. EBV-LMP2/HLA 웨티드 복합체의 발현을 특징으로 하는 대상 내의 의학적 상태를 치료하는 방법으로, 예시적인 실시예들 57-68 중 어느 하나에 따른 이중특이적 항체, 예시적인 실시예 75의 조성물, 또는 예시적인 실시예 76의 약제학적 조성물의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0361] 79. 예시적인 실시예 78의 방법으로, 의학적 상태는 호지킨병(Hodgkin's disease), 비-호지킨병 또는 감염성 단핵구증이다.
- [0362] 80. 예시적인 실시예 78의 방법으로, 의학적 상태는 버킷 림프종(Burkitt's lymphoma), 면역 억제성 림프종, 미만성 거대 B-세포 림프종(diffuse large B-cell lymphoma), 만성 염증과 연관된 미만성 거대 B-세포 림프종, 림프종양 육아종증(lymphomatoid granulomatosis), 형질모세포 림프종, 원발성 삼출성 림프종(primary effusion lymphoma), 이식 후 림프 증식성 질환, 비인두 암종, 위 선암종, 림프상피종양-연관 암종(lymphanepithelioma-associated carcinoma), 및 면역 결핍-관련 평활근 육종으로부터 선택된다.
- [0363] 81. 예시적인 실시예들 78-80 중 어느 하나의 방법으로, EBV-LMP2/HLA 웨티드 복합체의 HLA는 HLA I 류 분자이다.
- [0364] 82. 예시적인 실시예 81의 방법으로, HLA I 류 분자는 HLA-A02이다.
- [0365] 83. 예시적인 실시예 82의 방법으로, HLA-A02는 HLA-A*02:01, HLA-A*02:02, HLA-A*02:03, HLA-A*02:04, HLA-A*02:05 및 HLA-A*02:06로부터 선택된다.
- [0366] 84. EBV 감염과 관련된 상태의 치료 또는 검출을 위한 예시적인 실시예들 57-68 중 어느 하나에 따른 이중특이적 항체의 용도.

- [0367] 85. EBV-LMP2/HLA 웨티드 복합체를 발현하는 표적 세포를 사멸시키도록 T 세포를 지시하는 방법으로, 상기 방법은
EBV-LMP2/HLA 웨티드 복합체를 발현하는 하나 이상의 표적 세포를 이중특이적 항체와 접촉시키는 단계를 포함하며, 이중특이적 항체는 EBV-LMP2/HLA 웨티드 복합체를 결합하는 제1 항원-결합 부위 및 T 세포 상의 CD3를 결합하는 제2 항원-결합 부위를 포함하고,
- [0369] 상기 접촉은 이중특이적 항체가 결합한 T 세포가 표적 세포의 사멸을 매개하기에 충분한 조건 및 시간 동안 수행된다.
- [0370] 86. 예시적인 실시예 85의 방법으로, EBV-LMP2 웨티드는 CLGGLTMV (서열번호 1)이거나 이를 포함한다.
- [0371] 87. 예시적인 실시예 85 또는 86의 방법으로, 이중특이적 항체의 제1 항원-결합 부위는 EBV-LMP2 웨티드 내의, 위치 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 및 이들의 조합으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 위치에서 아미노산 잔기와 직접 상호작용한다.
- [0372] 88. 예시적인 실시예들 85-87 중 어느 하나의 방법으로, EBV-LMP2/HLA 웨티드 복합체의 HLA는 HLA I 류 분자이다.
- [0373] 89. 예시적인 실시예 88의 방법으로, HLA I 류 분자는 HLA-A02^o]다.
- [0374] 90. 예시적인 실시예 89의 방법으로, HLA-A02는 HLA-A*02:01, HLA-A*02:02, HLA-A*02:03, HLA-A*02:04, HLA-A*02:05 및 HLA-A*02:06로부터 선택된다.
- [0375] 91. HLA-A02 분자에 의해 제시되는 EBV-LMP2 웨티드 CLGGLTMV (서열번호 1)에 결합하는 제1 scFv, 및
- [0376] T 세포 상의 CD3를 결합하는 제2 scFv를 포함하는 이중특이적 항체로,
- [0377] 여기서 이중특이적 항체는 EBV-LMP2 웨티드로 펄스되는 T2 세포에서 약 0.2 내지 약 135 pM의 EC₅₀를 특징으로 한다.
- [0378] 92. 예시적인 실시예 91의 이중특이적 항체로, 제1 scFv는
- [0379] (a) 서열번호 3의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 5의 중쇄 가변 영역;
- [0380] (b) 서열번호 7의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 9의 중쇄 가변 영역;
- [0381] (c) 서열번호 11의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 13의 중쇄 가변 영역;
- [0382] (d) 서열번호 15의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 17의 중쇄 가변 영역;
- [0383] (e) 서열번호 19의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 21의 중쇄 가변 영역;
- [0384] (f) 서열번호 23의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 25의 중쇄 가변 영역; 또는
- [0385] (g) 서열번호 27의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 29의 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0386] 93. 예시적인 실시예 91 또는 92의 이중특이적 항체로, 제2 scFv는 제1 scFv의 C-말단 단부에 연결된다.
- [0387] 94. 예시적인 실시예들 91-93 중 어느 하나에 따른 이중특이적 항체로, HLA-A02 분자는 HLA-A*02:01, HLA-A*02:02, HLA-A*02:03, HLA-A*02:04, HLA-A*02:05 및 HLA-A*02:06로부터 선택된다.
- [0388] 95. 예시적인 실시예들 91-94 중 어느 하나에 따른 이중특이적 항체로, 이중특이적 항체의 제1 scFv는 EBV-LMP2 웨티드 내의, 위치 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 및 이들의 조합으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 위치에서 아미노산 잔기와 직접 상호작용한다.
- [0389] 96. 예시적인 실시예들 91-94 중 어느 하나에 따른 이중특이적 항체로, 이중특이적 항체의 제1 scFv는 EBV-LMP2 웨티드의 적어도 5번 위치와 직접 상호작용한다.
- [0390] 97. 예시적인 실시예들 91-94 중 어느 하나에 따른 이중특이적 항체로, 이중특이적 항체의 제1 scFv는 EBV-LMP2 웨티드의 적어도 1번 위치와 직접 상호작용한다.
- [0391] 98. 예시적인 실시예들 91-94 중 어느 하나에 따른 이중특이적 항체로, 이중특이적 항체의 제1 scFv는 EBV-LMP2 웨티드의 적어도 8번 위치와 직접 상호작용한다.

- [0392] 99. EBV-LMP2/HLA 웨티드 복합체를 결합하는 인간 항체 제제의 항원-결합 부위를 포함하는 키메라 항원 수용체.
- [0393] 100. 예시적인 실시예 99의 키메라 항원 수용체로, 항원-결합 부위는 scFv이다.
- [0394] 101. 예시적인 실시예 99 또는 100의 키메라 항원 수용체로, 항원-결합 부위는 면역 효과기 세포에 의해 발현된다.
- [0395] 102. 예시적인 실시예 101의 키메라 항원 수용체로, 면역 효과기 세포는 T 세포이다.
- [0396] 103. 예시적인 실시예들 99-102 중 어느 하나에 따른 키메라 항원 수용체로, EBV-LMP2/HLA 웨티드 복합체의 HLA는 HLA I 류 분자이다.
- [0397] 104. 예시적인 실시예 103의 키메라 항원 수용체로, HLA I 류 분자는 HLA-A*02이다.
- [0398] 105. 예시적인 실시예 104의 키메라 항원 수용체로, HLA-A02는 HLA-A*02:01, HLA-A*02:02, HLA-A*02:03, HLA-A*02:04, HLA-A*02:05 및 HLA-A*02:06로부터 선택된다.
- [0399] 106. 예시적인 실시예들 99-105 중 어느 하나에 따른 키메라 항원 수용체를, 전체적으로 또는 부분적으로, 암호화하는 단리된 핵산 분자.
- [0400] 107. 예시적인 실시예 106의 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터.
- [0401] 108. 예시적인 실시예 107의 재조합 벡터 또는 예시적인 실시예 106의 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포.
- [0402] 109. 예시적인 실시예 108의 숙주 세포로, 숙주 세포는 박테리아, 효모, 곤충 또는 포유류 세포로부터 선택된다.
- [0403] 110. 예시적인 실시예 109의 숙주 세포로, 숙주 세포는 *E.coli*, *P.파스토리스*(*P.pastoris*), Sf9, COS, HEK293, CHO 및 포유류 림프구로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0404] 111. 예시적인 실시예 110의 숙주 세포로, 포유류 림프구는 인간 림프구이다.
- [0405] 112. 예시적인 실시예들 99-105 중 어느 하나에 따른 키메라 항원 수용체를 포함하는 조성물.
- [0406] 113. 예시적인 실시예들 99-105 중 어느 하나에 따른 키메라 항원 수용체 또는 예시적인 실시예 112에 따른 조성물을 포함하고, 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 추가로 포함하는 약제학적 조성물.
- [0407] 114. 예시적인 실시예들 99-105 중 어느 하나에 따른 키메라 항원 수용체를 포함하는 키트.
- [0408] 115. EBV-LMP2/HLA 웨티드 복합체의 발현을 특징으로 하는 대상 내의 의학적 상태를 치료하는 방법으로,
- [0409] 예시적인 실시예들 99-105 중 어느 하나에 따른 키메라 항원 수용체, 예시적인 실시예 112의 조성물, 또는 예시적인 실시예 113의 약제학적 조성물의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0410] 116. 예시적인 실시예 115의 방법으로, 의학적 상태는 호지킨병(Hodgkin' disease), 비-호지킨병 또는 감염성 단핵구증이다.
- [0411] 117. 예시적인 실시예 115의 방법으로, 의학적 상태는 버킷 림프종(Burkitt' lymphoma), 면역 억제성 림프종, 미만성 거대 B-세포 림프종(diffuse large B-cell lymphom), 만성 염증과 연관된 미만성 거대 B-세포 림프종, 림프종양 육아종증(lymphomatoid granulomatosis), 형질모세포 림프종, 원발성 삼출성 림프종(primary effusion lymphoma), 이식 후 림프 증식성 질환, 비인두 암종, 위 선암종, 림프상피종양-연관 암종(lymphanepithelioma-associated carcinoma), 및 면역 결핍-관련 평활근 육종으로부터 선택된다.
- [0412] 118. 예시적인 실시예들 115-117 중 어느 하나의 방법으로, EBV-LMP2/HLA 웨티드 복합체의 HLA는 HLA I 류 분자이다.
- [0413] 119. 예시적인 실시예 118의 방법으로, HLA I 류 분자는 HLA-A02이다.
- [0414] 120. 예시적인 실시예 119의 방법으로, HLA-A02는 HLA-A*02:01, HLA-A*02:02, HLA-A*02:03, HLA-A*02:04, HLA-A*02:05 및 HLA-A*02:06로부터 선택된다.
- [0415] 121. EBV 감염과 관련된 상태의 치료 또는 검출을 위한 예시적인 실시예들 99-105 중 어느 하나에 따른 키메라 항원 수용체의 용도.
- [0416] 122. 관심있는 인간 HLA I 류 분자에 의해 제시되는 웨티드의 중심 잔기를 결합하는 항체 제제를 집단에서 선택

하는 방법으로, 상기 방법은

[0417] (a) 관심있는 펩티드/HLA I 류 복합체를 결합하는 하나 이상의 항체 제제를 집단에서 선택하는 단계; 및

[0418] (b) 1번 위치, 5번 위치, 8번 위치, 및 이들의 조합으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 잔기에서 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 펩티드를 포함하는 펩티드/HLA I 류 복합체를 결합하기 위해 (a)로부터의 하나 이상의 항체 제제를 스크리닝하는 단계를 포함하고;

[0419] 여기서 5번 위치에서 치환을 갖는 펩티드를 포함하는 펩티드/HLA I 류 복합체에 대한 항체 제제의 결합의 손실은 인간 HLA I 류 분자에 의해 제공되는 펩티드의 중심 잔기를 결합하는 항체 제제를 나타낸다.

[0420] 123. 관심있는 인간 HLA I 류 분자에 의해 제시되는 펩티드의 중심 잔기를 결합하는 항체 제제를 집단에서 선택하는 방법으로, 상기 방법은

[0421] (a) 제1 펩티드-HLA I 류 복합체를 결합하지 않는 하나 이상의 항체 제제를 집단에서 선택하는 단계로, 이때 제1 펩티드/HLA I 류 복합체는 5번 위치에서 아미노산 치환 및/또는 펩티드의 N- 및/또는 C-말단에서 추가 아미노산을 갖는 펩티드를 포함하는, 단계; 및

[0422] (b) 제2 펩티드/HLA I 류 복합체를 결합하기 위해 (a)로부터의 하나 이상의 항체 제제를 스크리닝하는 단계를 포함하고, 여기서 제2 펩티드/HLA I 류 복합체는 관심있는 야생형 서열을 갖는 펩티드를 포함하고;

[0423] 여기서 제2 펩티드/HLA I 류 복합체에 대한 항체 제제의 결합은 인간 HLA I 류 분자에 의해 제시되는 펩티드의 중심 잔기를 결합하는 항체 제제를 나타낸다.

[0424] 124. 예시적인 실시예 122 또는 123의 방법으로, 펩티드/HLA I 류 복합체의 펩티드는 엡스타인-바 바이러스 (EBV)-관련 펩티드이다.

[0425] 125. 예시적인 실시예 122 또는 123의 방법으로, 펩티드/HLA I 류 복합체는 EBV-LMP2/HLA-A02 복합체이다.

[0426] 126. 예시적인 실시예 125의 방법으로, HLA-A02는 HLA-A*02:01, HLA-A*02:02, HLA-A*02:03, HLA-A*02:04, HLA-A*02:05 및 HLA-A*02:06로 이루어지는 그룹으로부터 선택된다.

[0427] 127. 예시적인 실시예 125 또는 126의 방법으로, EBV-LMP2 펩티드는 CLGGLTMV (서열번호 1)이거나 이를 포함한다.

[0428] 128. 예시적인 실시예 122 또는 123의 방법으로, 펩티드는 9량체 펩티드이다.

[0429] 129. 예시적인 실시예 122 또는 123의 방법으로, 펩티드는 10량체 펩티드이다.

[0430] 130. 예시적인 실시예들 122-129 중 어느 하나의 방법으로, 항체 제제는 인간 단일클론 항체이다.

[0431] 131. 예시적인 실시예들 122-129 중 어느 하나의 방법으로, 항체 제제는 인간 단일클론 항체 단편이다.

[0432] 132. 펩티드/HLA 복합체를 결합하는 고 친화도 인간 단일클론 항체를 제공하는 방법에 있어서, 개선은

[0433] 펩티드/HLA 복합체에서 펩티드의 중심에서 하나 이상의 아미노산과 직접 상호작용하거나 이를 선호하는 인간 단일클론 항체를 제공하는 것을 포함하고, 여기서 펩티드/HLA 복합체는 인 실리코(*in silico*) 예측 방법을 사용하여 생성되지 않는다.

[0434] 133. 펩티드/HLA 복합체를 결합하는 고 친화도 인간 단일클론 항체를 제공하는 방법에 있어서, 개선은

[0435] HLA 결합 포켓에서 펩티드의 중심에서 하나 이상의 아미노산과 직접 상호작용하거나 이를 선호하는 인간 단일클론 항체를 제공하는 것을 포함하고, 여기서 펩티드/HLA 복합체는 인 실리코(*in silico*) 예측 방법을 사용하여 생성되지 않는다.

[0436] 134. 제1 및 제2 항원-결합 부위를 포함하는 이중특이적 항체를 포함하는 고 친화도 이중특이적 항체 조성물을 제공하며, 제1 항원-결합 부위는 펩티드/HLA 복합체를 결합하는, 방법에 있어서, 개선은

[0437] 펩티드/HLA 복합체에서 펩티드의 중심에서 하나 이상의 아미노산과 직접 상호작용하는 인간 단일클론 항체 또는 그 단편으로서 이러한 제1 항원-결합 부위 중 적어도 하나를 제공하는 것을 포함한다.

[0438] 135. 하나 이상의 항원-결합 부위를 포함하는 키메라 항원 수용체 조성물을 제공하며, 하나 이상의 항원-결합 부위 중 적어도 하나는 펩티드/HLA 복합체를 결합하는, 방법에 있어서, 개선은

[0439] HLA 결합 포켓에서 펩티드의 중심에서 하나 이상의 아미노산과 직접 상호작용하는 인간 항체 제제의 항원-결합

부위를 제공하는 것을 포함한다.

[0440] 136. 예시적인 실시예 135의 방법으로, 키메라 항원 수용체 조성물을 면역 효과기 세포에 의해 발현된다.

[0441] 137. 예시적인 실시예 136의 방법으로, 면역 효과기 세포는 T 세포이다.

[0442] 138. 예시적인 실시예들 132-137 중 어느 하나의 방법으로, HLA는 I 류 HLA 분자이다.

[0443] 139. 예시적인 실시예들 132-137 중 어느 하나의 방법으로, 웨티드는 9량체 웨티드이다.

[0444] 140. 예시적인 실시예들 132-137 중 어느 하나의 방법으로, 웨티드는 10량체 웨티드이다.

[0445] 141. 예시적인 실시예들 132-137 중 어느 하나의 방법으로, 웨티드는 엡스타인-바 바이러스 (EBV)-관련 웨티드이다.

[0446] 142. 예시적인 실시예들 132-137 중 어느 하나의 방법으로, 웨티드/HLA 복합체는 EBV-LMP2/HLA-A02 복합체이다.

예

[0448] 하기 예시들은 당업계의 통상의 기술을 가진 자들에게 본 발명의 방법 및 조성물을 제조하고 사용하는 방법을 기술하기 위해 제공되며, 본 발명자들이 그들의 발명으로 간주하는 것의 범위를 제한하고자 하는 것은 아니다. 달리 명시되어 있지 않는 한, 온도는 섭씨로 표시되고 압력은 대기 또는 대기 근처에 있다.

예 1. 비오티닐화된 웨티드/HLA-A*02:01 복합체 단량체의 생산

[0450] 본 예는 I류 인간 MHC 분자에 의해 제시된 EBV-관련 웨티드를 인식하는 항체 및 다중 특이적 결합체 (예컨대, 이중 특이적 항체)의 개발 및 식별에서의 MHC-웨티드 복합체의 생산을 보여준다. 특히, 본 예는 단량체 EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01 복합체의 생산을 구체적으로 기술하며, 이는 인간 HLA-A02에 의해 제시된 EBV-LMP2 웨티드를 인식하는 항체 (즉, 항체 제제 및 전장 IgG) 및 이중 특이적 항체를 생산하기 위해 따르는 예에서 사용된다.

[0451] 예컨대, 당업계에 공지된 방법 (예컨대, Altman, J.D. and M.M. Davis, 2003, MHC-peptide tetramers to visualize antigen-specific T cells. Curr. Protoc. Immunol. Chapter 17:Unit 173 참조)을 사용하여 비오티닐화된 웨티드/HLA-A*02:01 복합체 단량체를 제조하였다. Genewiz에 의해 전장 인간 베타-2 마이크로글로불린 ($\beta 2m$)을 코딩하는 DNA를 합성하고 pET-27b 백터에 클로닝하였다. BirA 기질 웨티드 (BSP)를 HLA-A*02:01 세포 외 도메인 (ECD)의 C-말단에 첨가하였다. Genewiz에 의해 HLA-A*02:01 ECD-BSP를 코딩하는 DNA를 합성하고 pET-27b 백터에 클로닝하였다. 인간 $\beta 2m$ 및 HLA-A*02:01 ECD-BSP를 발현하는 백터를 *E. coli* BL21에 각각 형질전환하고, 박테리아 배양물로부터 봉입체로서 분리하였다. 웨티드 리간드 EBV-LMP2A(CLG) (전체 9량체 서열 CLGGLLTMV; 서열번호 1)를 인간 $\beta 2m$ 및 HLA-A*02:01 ECD-BSP와 함께 재접힘(refolding)되어 단량체 EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01 웨티드 복합체를 형성하였다. 접힌 웨티드/HLA-A*02:01 단량체를 한외여과로 농축하고 크기 배제 크로마토그래피를 통해 추가로 정제하였다 (도 3). 정제된 웨티드/HLA-A*02:01 단량체를 또한 SDS-PAGE를 통해 시각화하고 (도 4) BirA-매개 효소 반응을 통해 비오티닐화하고 후속하여 고 해상도 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 비오티닐화된 웨티드/HLA-A*02:01 단량체를 -80°C에서 PBS 중에 저장하였다.

[0452] HiPrep 26/60 Sephadryl S-300 HR을 Hyclone Dulbecco의 인산 완충된 식염수 (Thermo Scientific, Cat No. SH3002802)로 1.5 컬럼 부피로 평형화하였다. 비정제된 샘플을 로딩하고 1 컬럼 부피로 용리하였다. 도 3에 나타난 바와 같이, 잘못접힌 응집체로 이루어진 첫 번째 피크를 로딩 후 약 102.24 mL로 용리하였다. 적절하게 접힌 MHC 복합체에 해당하는 피크가 201.24 mL에서 관찰되었다. 마지막으로, 유리 $\beta 2m$ 으로 이루어진 피크가 254.85 mL에서 관찰되었다.

[0453] 전술된 정제된 EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01 복합체를 HLA-A02와 관련하여 LMP2 웨티드를 인식하는 인간 항체 구성성분을 생산하기 위한 다음의 예에서 사용하였다.

예 2. EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01 복합체에 특이적인 파지 scFv의 스크리닝

[0455] 본 예는 인간 MHC I류 분자와 관련하여 EBV-LMP2 웨티드에 특이적인 인간 항체 제제의 구축을 보여준다. 특히, 본 예는, 인간 HLA-A02 분자에 의해 제시되는 서열 CLGGLLTMV (서열번호 1)을 갖는 EBV-LMP2 9량체 웨티드에 결합하는, 인간 scFv의 생산, 및 전장 인간 IgG의 후속 생산을 보여준다. LMP2는 EBV 감염된 B-세포 및 비인두 및 위 상피 세포 둘 모두에서 발현된다. 따라서, 이러한 인간 항체 제제는 EBV-관련 질환 및 악성 종양의 치료 및

진단에서 사용될 수 있다.

[0456] 요컨대, EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01에 특이적인 인간 단일클론 항체를 선별하기 위해 Eureka Therapeutics (ALPHA™ 파지 디스플레이)에 의해 구축된 인간 scFv 항체 파지 디스플레이 라이브러리 (10×10^{10} 클론)를 사용하였다. 단백질 복합체를 플라스틱 표면 상에 고정시킴으로써 도입된 MHC I 복합체의 임의의 구조적 변화를 감소시키기 위해, 종래의 플레이트 패닝 대신 용액 패닝을 사용하였다. 용액 패닝에서, 비오티닐화된 항원을 PBS 완충액으로 장기간 세척한 후에 인간 scFv 파지 라이브러리와 먼저 혼합한 다음, 항원-scFv 항체 파지 복합체를 자성 랙을 통해 스트렙타비딘-접합된 Dynabeads M-280에 의해 풀 다운(pull down) 하였다. 결합된 클론을 용리한 다음 *E.coli* XL1-Blue를 감염시키기 위해 사용하였다. 파지 클론을 박테리아에서 발현시킨 다음 정제하였다. 패닝을 3 내지 4회 수행하여 EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01에 특이적으로 결합하는 scFv 파지 클론을 풍부하게 하였다. 표 4는 EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01에 대한 파지 패닝의 요약을 나타낸다. 양성 클론을 비오티닐화된 EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01 복합체를 사용하여 ELISA 분석에 의해 결정하였다 (예컨대, 도 5 참조).

표 4

패닝 방법	단리된 클론	ELISA 양성 클론	특이 클론
용액 중 패닝	281	125	80

[0458] 양성 클론을 TAP-결핍 HLA-A*02:01⁺ 세포주인 T2를 사용하여 유세포분석법에 의해 살아있는 세포의 표면 상에 웹티드/HLA-A02 복합체의 결합에 대해 추가로 시험하였다. T2 세포는 단지 외인성 웹티드만을 제시하며, HLA-A02 분자 상의 웹티드의 제시에 일상적으로 사용된다. 요컨대, T2 세포를 20 $\mu\text{g/mL}$ 의 β 2m을 함유하는 무혈청 RPMI-1640 배지에서 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 LMP2 웹티드 (CLGGLLTMV; 서열번호 1)로 밤새 펄스(pulse) 하였다. 이어서 세포를 정제된 scFv 파지 클론으로 염색하고, 이어서 마우스 항-M13 단일클론 항체, 및 R-PE 접합된 말 항-마우스 IgG (Vector Labs)로 염색하였다. 염색의 각 단계를 약 30 내지 60분 인큐베이션으로 얼음 상에서 수행하였다. 세포를 염색의 각 단계 사이에서 2회 세척하였다. 도 6은 EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01가 로딩된 T2 세포로의 파지 클론의 예시적인 결합을 나타낸다.

[0459] ELISA 분석을 사용하여 스크리닝된 281개의 클론 중, 125개의 ELISA 양성 클론을 동정하였다. 125개의 동정된 양성 클론 중에, 80개의 특이적 클론을 단리하고 특성 분석 하였다. 80개의 특이적 클론 중에, 54개가 ELISA 및 FACS에 의해 단백질 수준 및 세포 표면 수준 모두에서 표적 복합체에 특이적으로 결합하는 것으로 확인되었다. EBV-LMP2 웹티드의 위치에 대한 클론의 특이성은 알라닌 워킹을 사용하여 확인하였다 (예컨대 Liu, Z 외, 1999, J. Mol. Recognit. 12(2):103-11; Weiss, GA 외, 2000, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 97(16):8950-4; Morrison, KL 및 GA Weiss, 2001, Curr. Opin. Chem. Biol. 5(3):302-7 참조). 요컨대, LMP2 웹티드 (CLGGLLTMV; 서열번호 1)를 1, 5 또는 8번 위치에서 알라닌 잔기로 치환하였다. T2 세포를 50 $\mu\text{g/mL}$ 으로 알라닌 돌연변이 웹티드로 펄스하였다. 결합을 유세포분석법으로 측정하였다. 선택된 클론의 중쇄 및 경쇄 CDR의 DNA 및 아미노산 서열을 각각 표 5 및 표 6에 나타냈다.

표 5

항체	HCDR	DNA/아미노산 서열 (5' -3')	
LMP2-21	1	GGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCT GGTFSSYA	서열번호 30 서열번호 31
	2	ATCATCCCTATCCTTGGTATAGCA IIPILGIA	서열번호 32 서열번호 33
	3	GCGCGCGTTCTTACCATCAGCATTCTACTCTGATGTT ARGSYHQHSYSVDV	서열번호 34 서열번호 35
LMP2-26	1	GGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCT GGTFSSYA	서열번호 36 서열번호 37
	2	ATCATCCCTATCCTTGGTATAGCA IIPILGIA	서열번호 38 서열번호 39
	3	GCGCGCTCTTACCCGCTGTACTCTGGTTGGGATTAC ARSYPLYSGWDY	서열번호 40 서열번호 41

LMP2-38	1	GGATACACAATCACCTCCTACTAT GYTITSYY	서열번호 42 서열번호 43
	2	ATCAACCCTAACGCTGGCAGCACA INPNAGST	서열번호 44 서열번호 45
	3	GCGCGCGGTATGTACCGTATGTACGAT ARGMYRMYD	서열번호 46 서열번호 47
LMP2-40	1	GGAGGCACCTTCAGCAACTATCAT GGTFSNYH	서열번호 48 서열번호 49
	2	ATCATCCCCATCCTTGGCACACCA IIPILGTP	서열번호 50 서열번호 51
	3	GCGCGCGGTGTAACGGTGGCTGGTACTCTGGATTCT ARGRTWWSGTLDS	서열번호 52 서열번호 53
LMP2-61	1	GGATACACCTCACCAACTATTAT GYTFTNYY	서열번호 54 서열번호 55
	2	ATCAACCCTAGTGGTGGGAGCACA INPSGGST	서열번호 56 서열번호 57
	3	GCGCGCTTACTACGGTTATGGATGCT ARSYYGSMDA	서열번호 58 서열번호 59
LMP2-63	1	GGATACACAATCACCTCCTACTAT GYTITSYY	서열번호 60 서열번호 61
	2	ATCAACCCTAACGCTGGCAGCACA INPNAGST	서열번호 62 서열번호 63
	3	GCGCGCGGTGACGTTACAACGGTTGGGATGAA ARDVYNGWDE	서열번호 64 서열번호 65
LMP2-77	1	GGTGGCTCCATACCAGTGTAATTACTAC GGSITSGNYY	서열번호 66 서열번호 67
	2	ATCAATCATAGCGGAAGCCCC INHSGSP	서열번호 68 서열번호 69
	3	GCGCGCCAGTCTTCTACGGTGGTTACATAGATCAG ARQSSYGGYIDQ	서열번호 70 서열번호 71

표 6

[0461]	항체	LCDR	DNA/아미노산 서열 (5' -3')	
LMP2-21		1	AACATTGGAGGCAGGAAAGT NIGGKS	서열번호 72 서열번호 73
		2	TATGATAGC YDS	서열번호 74 서열번호 75
		3	CAGGTGTGGATAGTAGTTAGTGATCATGGTG QWWDSSSDHWV	서열번호 76 서열번호 77
LMP2-26		1	AAGATTGGAAGCAAACAT KIGSKH	서열번호 78 서열번호 79
		2	TATAATACT YNT	서열번호 80 서열번호 81
		3	CAGGTGTGGATAGTAGTTATGATCATGTGATA QWWDSSYDHVI	서열번호 82 서열번호 83
LMP2-38		1	AGCAGTGACGTTGGTAGTTATAACGAT SSDVGSYND	서열번호 84 서열번호 85
		2	GATGTCAGT DVS	서열번호 86 서열번호 87
		3	AACTCATATACAAGCAGCAACACTTATGTC NSYTSSNTYV	서열번호 88 서열번호 89

LMP2-40	1	AACATTGGAAGTAGAAGT NIGSRS	서열번호 90 서열번호 91
	2	TATAATAAC YNN	서열번호 92 서열번호 93
	3	CAGGTGTGGATAGTATTAGTGACCATTATGTC QVWDSISDHYV	서열번호 94 서열번호 95
LMP2-61	1	AGCCTCAGAACGCTATTAT SLRSYY	서열번호 96 서열번호 97
	2	GGTAAAAAC GKN	서열번호 98 서열번호 99
	3	AACTCCCAGGACAGCAGTGGTAACCCTGGTA NSRDSSGNHLV	서열번호 100 서열번호 101
LMP2-63	1	AACATTGGAAGTGAAAGT NIGSES	서열번호 102 서열번호 103
	2	GATGATGAC DDD	서열번호 104 서열번호 105
	3	CAGGTGTGGATCGAAGTAGTGATCATTGGTT QVWDRSSDHWF	서열번호 106 서열번호 107
LMP2-77	1	AGCCTCAGAACGCATTAT SLRTHY	서열번호 108 서열번호 109
	2	GGTAAAAAC GKN	서열번호 110 서열번호 111
	3	AACTCCCAGGACAGCAGTGGTAATCATTGTGTG NSRHSSGNHCV	서열번호 112 서열번호 113

[0462] 항체 클론 38 및 63번은 웨프티드 위치 8을 통해 웨프티드 위치 5에 대한 선택적인 결합을 나타냈고 (P5-P8), 거의 동일한 중쇄를 가졌다 (약 75% 아미노산 동일성). 또한, 항체 클론 38 및 63번은 동일한 중쇄 CDR 1 및 CDR 2 서열 및 유사한 CDR3 서열을 보여주며; 경쇄 CDR 내에 일부 공통 잔기를 공유하였다. 항체 클론 21 및 26번은 웨프티드 위치 8 (P8)에 대해 선택적인 결합을 나타냈고 유사한 중쇄(약 88% 아미노산 동일성)를 가지는 반면, CDR1 및 CDR2는 동일하고 CDR3은 유사하였다. 항체 클론 21 및 26번에 대한 경쇄는 역시 유사하였다. 항체 클론 40 및 61번은 웨프티드 위치 1 (P1)에 대해 선택적인 결합을 나타냈고 약 67%의 동일성을 가지며 전체적으로 유사한 CDR을 가졌다. 항체 클론 77번은 웨프티드 위치 5를 통해 웨프티드 위치 1에 대해 (P1-P5) 선택적인 결합을 나타내고 항체 클론 63번의 경쇄와 서열 유사성을 가졌다 (약 40% 동일성). 항체 클론 21, 26, 40 및 61번은 I형 TCR 모방체로 명명한 반면, 클론 38 및 63번은 II형 TCR 모방체로 명명하였다.

[0463] 종합하면, 본 예는 인간 MHC I류 분자와 관련하여 제시된 EBV-관련 웨프티드에 결합하는 I형 및 II형 TCR 유사 단일클론 항체 모두의 성공적인 생산을 보여준다. 특히, 본 예는 인간 HLA-A02 분자에 의해 제시된 웨프티드의 중앙 영역 (예컨대, 웨프티드 위치 5)을 선택적으로 표적화하는 항체의 생산을 기술한다. 하기와 같이, 이러한 항체는 EBV⁺ 세포주에 대해 세포독성에서 높은 특이성 및 효능을 가지며, 다중 특이적 결합체 (예컨대, 이중 특이적 항체)의 구축에 사용될 수 있다.

예 3. scFv 단편을 사용하는 전장 단일클론 항체의 구축

[0465] 본 예는 예 2에 기술된 선택된 인간 scFv를 사용하는 전장 항체의 구축을 보여준다. 특히, 본 예는 표 5 및 표 6에 나타난 인간 scFv 클론을 사용하는 전장 인간 IgG(예컨대, IgG1)의 구축을 구체적으로 기술한다.

[0466] 예컨대, 선택된 파지 클론의 전장 인간 IgG1을 이전에 기술된 바와 같이 HEK293 및 중국 햄스터 난소 (CHO)에서 생산하였다 (Tomimatsu, K. 외, 2009, Biosci. Biotechnol. Biochem. 73:1465-9). 항체 가변 영역을 동족 인간 람다 (λ) 또는 카파 (κ) 경쇄 불변 영역 및 인간 IgG1 불변 영역 서열을 갖는 포유류 밸현 벡터 내에 서브클로닝하였다.

인간 C λ DNA (서열번호 114)

[0468] AAGCCTAAGGCCAACCTACCGTGACCTGTTCCCCCATCCTCCGAGGAACTGCAGGCCAACAGGCCACCTCGTGTGCCTGATCTCCGACTTCTACCCCTGGCGCGTGACCGTGGCCTGGAAGGCTGATGGATCTCCTGTGAAGGCCGGCTGGAAACCAAGCCCTCCAAGCAGTCCAACAACAAATACGCCCTCC
TCCTACCTGTCCCTGACCCCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACCGGTCTACAGCTGCCAAGTGACCCACGAGGGCTCCACCGTGGAAAAGACCGTGGCTCCTACC

GAGTGCTCCTAG

[0469] 인간 C λ 아미노산 (서열번호 115)

QPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVLCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0471] 인간 C κ DNA (서열번호 116)

ACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTCATCTTCCCACCTTCGACGAGCAGCTGAAGTCGGCACCGCTCTGCGTGTGCCGTGCTGAACAACCTCTACCCCCGC
GAGGCCAAGGTGCACTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACTCCCAGGAATCCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCT
TCCACCCCTGACCCCTGTCAGGCGACTACGAGAACAGGTGTACGCCGTGCAAGTGACCCACCAGGGCTGTCTAGCCCCGTGACCAAGTCTTCACACGGGGCGAGTAGCTAG

[0473] 인간 C κ 아미노산 (서열번호 117)

TVAAPSFIGFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0475] 인간 IgG1 DNA (서열번호 118)

GTCTCCTCAGCTTCCACCAAGGGCCATCGCTTCCCCCTGGCACCCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGCACAGGGCCCTGGCTGCTGGTCAAGGACTACTCCCT
TACTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGGAACACTCAGGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGCGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACCCCT
AGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTTGAG
CCCAAATCTGTGACAAAATCACACATGCCAACCGTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTCCTTCCCCCCTTACCCCAAGGACACC
CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG
CATATGCCAAGACAAGCCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGTGAATGGCAAGGAG
TACAAGTCAAGGTCTCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACACCACAGGTGTACCCCTGCC
CCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTACAGCTGACCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGGACATCGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGCG
CCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCTTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG
AACGTCTCTCATGCTCGTATGCATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACGCAGAACAGGCTCTCCGTCTCCGGTAAATGA

[0477] 인간 IgG1 아미노산 (서열번호 119)

ASTKGPSVFPLAPSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0479] 정제된 전장 IgG1 항체의 분자량을 전기영동에 의해 환원 및 비환원 조건 둘 모두에서 측정하였다 (도 7). 종합하면, 본 예는 EBV-LMP2(CLG)/HLA-A02에 대해 특이적인 선택된 scFv의 가변 영역을 사용하여 전장 인간 IgG1의 성공적인 구축 및 발현을 보여준다.

[0480] 예 4. 단일 사슬 항체 구성성분을 사용하는 다중 특이적 결합제의 구축

[0481] 본 예는 인간 MHC I류 분자에 의해 제시되는 EBV-LMP2 웨프티드에 특이적인 scFv 단편을 사용하는 다중 특이적 결합제의 구축을 보여준다. 특히, 본 예는 인간 HLA-A02 분자와 관련하여 EBV-LMP2 웨프티드 (CLGGLLTMV; 서열번호 1)에 결합하는 제1 항원-결합 부위 및 T 세포 상의 CD3에 결합하는 제2 항원-결합 부위를 갖는 이중 특이적 항체의 구축을 구체적으로 보여준다. 따라서, 본 예는 일부 예에서, 본원에 기술된 바와 같은 항체 구성성분을 함유하는 다중 특이적 결합제를 사용하여, T 세포가 인간 MHC I류 분자 (예컨대, HLA-A02; 예컨대, Brischwein, K. 외, 2006, Mol. Immunol. 43:1129-43 참조)를 통해 그 표면 상에 웨프티드 (예컨대, EBV-LMP2)를 제시하는 표적 세포를 사멸시키도록 지시될 수 있음을 설명한다.

[0482] 예컨대, EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01에 특이적인 scFv가 이의 C-말단에서 인간 CD3 (즉, CD3 ϵ ; DNA: 서열번호 123; 아미노산: 서열번호 124)에 특이적인 scFv와 연결되도록 단일 사슬 형태를 사용하여 이중 특이적 항체 구축물을 구축하였다. EBV-LMP2(CLG)-특이적 scFv 및 인간 CD3-특이적 scFv를 코딩하는 DNA 단편을 Genewiz에 의해 합성하고 포유류 발현 벡터 pGSN-Hyg (Eureka Therapeutics, Inc.)에 서브클로닝 하였다. 정제 및 검출을 위해 이중 특이적 구축물의 C-말단에 헥스-히스타민 태그를 삽입하였다. HEK293 세포를 일시적인 발현을 위한 이중 특이적 항체 발현 벡터로 형질감염하고 분비된 이중 특이적 항체 분자를 함유하는 상등액을 수집하였다.

이중 특이적 항체 발현 벡터로 형질감염된 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포를 사용하여 이중 특이적 항체 분자의 안정한 발현을 달성하였고 글루타민 합성효소 (GS)-기반 시스템을 사용하여 메티오닌 설폐시민 (MSX)으로 약물 선택 중에 성장시켰다. 분비된 항-EBV-LMP2(CLG) 이중 특이적 항체 분자를 함유하는 CHO 세포 상등액을 회수하고 FPLC AKTA 시스템을 사용하여 HisTrap HP 컬럼 (GE healthcare)을 사용하여 정제하였다. CHO 세포 배양물을 정화하고 낮은 이미다졸 농도 (20 mM)를 갖는 컬럼 상에 로딩하고, 컬럼에 부착된 항-EBV-LMP2(CLG) 이중 특이적 항체 분자를 등용매 고 이미다졸 농도 용리 완충액(500 mM)을 사용하여 용리하였다. 정제된 항-EBV-LMP2(CLG) 이중 특이적 항체 분자의 분자량을 전기영동에 의해 비활원 조건 하에 측정하였다 (도 8).

[0483] 종합하면, 본 예는 HLA-A02 분자에 의해 제시된 EBV-LMP2 웨티드에 대해 특이적인 제1 항원-결합 부위 및 CD3에 특이적인 제2 항원-결합 부위를 갖는 이중 특이적 분자의 성공적인 구축을 보여준다. 이러한 이중 특이적 분자의 추가의 특성분석이 다음의 예에 기술되어 있다.

[0484] 예 5. TCR-유사 항-EBV-LMP2(CLG) IgG1 항체에 의해 매개되는 T2 세포의 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC)

[0485] 본 예는 항-EBV-LMP2(CLG) 특이적 scFv로부터 제조된 전장 IgG1 항체가 표적 세포의 표면 상에 제시된 EBV-LMP2 웨티드를 특이적으로 인식하고 인간 HLA-A02 분자를 통해 EBV-LMP2 웨티드를 제시하는 표적 세포의 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC)을 매개할 수 있음을 보여준다. 림프모구성 T2 세포주는 T1 세포주 (ATCC CRL-1991) 및 HLA-A*02:01⁺ TAP1⁻의 변이형이다. T2 세포는 내인성 웨티드를 제시할 수 없지만 이와 함께 인큐베이션 되는 경우 외인성 웨티드를 제시할 수 있다. T2 세포는 이를 자연적으로 생산하지 않기 때문에, β2m은 외인성 웨티드와 함께 인큐베이션 되는 경우 첨가될 수 있다. 따라서, T2 세포는 형질 감염에 적절하고 항원 처리 및 MHC I 류 항원의 T 세포 인식에 일상적으로 사용된다 (예컨대, Salter, R.D. 외, 1985, Immunogenetics 21: 235-246 참조).

[0486] 예컨대, T2 세포를 HLA-A*02:01에 의해 제시되는 대조군 웨티드 (YMLDLQPET, IC₅₀=7.5; 서열번호 120) 또는 EBV-LMP2 웨티드 (CLGGLLTMV, IC₅₀=95.6; 서열번호 1) 및 무혈청 IMDM 배지 중의 외인성 β2m의 100 μg으로 밤새 펄스하였다. 이어서 세포를 선택된 전장 IgG1 항-EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01 항체와 함께 1시간 동안 4°C에서 5 μg/mL으로 인큐베이션 하였다. PE-표지된 2차 항체 항-인간 Fc 항체를 사용하였고 세포를 유세포분석법에 의해 분석하였다.

[0487] 유세포분석법을 위해, T2 세포를 한번 세척하여 과량의 웨티드를 제거하고 5 μg/mL의 주어진 항체 (또는 이소타입 매칭된 대조군)와 함께 4°C에서 인큐베이션 하였다. 항-Fc PE-표지된 2차 항체를 사용하고 세포를 5의 MFI에서 이소타입 대조군을 설정하는 FACS 칼리버 유동 세포 계측기에서 수행하였다. 데이터 및 오버레이를 Flowjo 소프트웨어 버전 6을 사용하여 준비하였다. 예시적인 결과를 도 9에 나타냈다.

[0488] 세포독성 분석을 위해, T2 세포를 전술된 바와 같이 인큐베이션 하고, 아침에 회수한 후 100 μCi의 ⁵¹Cr로 1시간 동안 표지한 후 각각의 단일클론 항체의 특정 농도를 갖는 동근 바닥 96웰 플레이트 내에 웰 당 5x10³의 밀도로 플레이팅 하였다. CD16 (Fc v RIIIa)의 158V/V 동형접합체 변이체로 형질감염된 NK92 세포를 20:1의 E:T 비율을 갖는 효과기 세포로서 사용하였다. 플레이트를 37°C에서 4시간 동안 인큐베이션 하고, 상등액을 수집하고 이어서 섬광계수기를 사용하여 분석하였다. 결과를 PRISM-Graphpad 소프트웨어를 사용하여 플롯팅하였다. 세포독성은 특이적 용해(lysis) % = ((실험 용해 - 자연적인 방출)/(최대 용해 - 자연적인 방출)) 공식을 사용하여 계산하였다. 최대 용해를 SDS 상에 표적 세포를 인큐베이션 함으로써 수득하였고; 자연적인 방출은 배지 단독으로 인큐베이션한 표적 세포를 나타낸다. 예시적인 결과를 도 9에 나타냈다.

[0489] 도 9에 나타낸 바와 같이, 선택된 전장 IgG1 항-EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01 항체 각각은 T2 세포의 표면 상에서 HLA-A02 분자에 의해 제시된 EBV-LMP2 웨티드에 대한 결합을 나타낸 반면 (히스토그램, 각각의 페어링에서 좌측면), 대조군 웨티드에 대한 결합은 어떠한 항체에 대해서도 관찰되지 않았다. 또한, ADCC는 각각의 항체에 대해 동등한 수준으로 나타났으며 (특이적 용해 %, 각각의 페어링에서 우측면), 각 항체에서 관찰된 웨티드 결합과 관련있다.

[0490] 종합하면, 이러한 데이터는 예 3에 기술된 전장 IgG1 항체가 모든 항체 구성성분 (즉 scFv)의 EBV-LMP2 웨티드에 대한 특이성을 유지함을 보여준다. 또한, 이러한 전장 항체는 이들의 표면 상에 HLA-A02 분자를 통해 EBV-LMP2 웨티드를 제시하는 표적 세포 (예컨대, T2 세포)의 ADCC를 효율적으로 매개할 수 있다.

[0491] 예 6. TCR-유사 항-EBV-LMP2(CLG) IgG1 항체의 친화도 측정

[0492] 본 예는 예 3에 기술된 전장 IgG1 항체가 T2 세포 표면 상의 HLA-A02 분자에 의해 제시된 다양한 농도의 EBV-LMP2 웨티드에 결합하는 것을 보여준다.

[0493] 요컨대, 1×10^6 T2 세포를 1 mL 무혈청 IMDM 배지에 재현탁하고 상이한 농도의 EBV-LMP2 웨티드 (0.0001 내지 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 범위) 및 외인성 β 2m (25 mg/mL)과 함께 로딩하고 37°C에서 밤새 인큐베이션 하였다. 이어서 세포를 5 $\mu\text{g/mL}$ 의 선택된 항-EBV-LMP2(CLG)/HLA-A02 IgG1 항체와 함께 인큐베이션 하고 유세포분석법을 사용하여 분석하였다. 각각의 항체로 수득된 MFI를 웨티드 농도에 대해 플로팅 하였다. 예시적인 결과를 도 10에 나타낸다.

[0494] 도 10에 나타난 바와 같이, 각각의 항체는 T2 세포 표면 상의 HLA-A02를 통해 제시된 EBV-LMP2 웨티드에 대해 상이한 친화도로 결합하였다. 항체 결합에서의 편차를 결정하기 위해 결과를 정규화하였으며, 이는 일관적인 결합을 나타냈다. 각각의 항체의 친화도를 또한 BIACORE를 사용하여 측정하였다 (표 7; nb: 결합 없음).

표 7

항체	K_{on} ($\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$)	K_{off} (s^{-1})	K_D (nM)
LMP2-21 IgG1	2.244106	1.85310-2	8.3
LMP2-26 IgG1	1.030107	2.10310-2	2.04
LMP2-38 IgG1	1.144104	5.97510-4	52.2
LMP2-40 IgG1	2.793107	1.46710-0	52.3
LMP2-61 IgG1	6.876106	1.81710-1	26.4
LMP2-63 IgG1	6.185104	7.77010-3	125.6
LMP2-77 IgG1	6.010105	1.01610-1	169.0
IgG1-대조군	nb		

[0495] 예 7. 항-EBV-LMP2(CLG)/HLA-A02 IgG 항체에 의해 매개되는 EBV-형질전환된 세포의 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC)

[0497] 본 예는 EpsteinBarr 바이러스 (EBV)로 형질전환된 표적 세포의 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC)을 매개하는 항-EBV-LMP2(CLG) 특이적 scFv로부터 제조된 전장 IgG1 항체에 대한 가능성을 기술한다. 특히, 본 예는 예 3에 기술된 선택된 항-EBV-LMP2(CLG)/HLA-A02 IgG1 항체가 EBV-형질전환된 세포의 ADCC를 매개하지 않음을 구체적으로 기술한다.

[0498] 요컨대, HLA-A*02:01⁺/EBV⁺ B 림프모구성 세포주 (BLCL), BV-를 건강한 공여자의 PBMC를 B95-8 마모셋 세포의 바이러스 상등액으로 형질전환함으로써 생성하였다. 이러한 조작된 BLCL 세포주를 상이한 농도의 항-EBV-LMP2(CLG)/HLA-A02 IgG1 항체 및 효과기로서 NK92 세포 (전술됨)와 함께 크롬-기반 세포독성 분석에서 표적으로 사용하였다. EBV-형질전환된 BLCL이 CD20⁺이기 때문에, 리툭시맙 (항-CD20 항체; 예컨대, Maloney, D.G. 외, 1997, Blood 90 (6): 2188-95 참조)을 양성 대조군으로 사용하였다. 이소타입 매칭된 음성 대조군이 또한 상기 분석에 포함되어 있다. 예시적인 결과가 도 11에 나타나 있다.

[0499] 도 11에 나타난 바와 같이, ADCC가 리툭시맙® (항-CD20)에 존재하였다. 그러나, 이러한 IgG1 항체가 고농도(30 $\mu\text{g/mL}$)로 사용되더라도 항-EBV-LMP2 IgG1 항체에 대해서는 어떠한 ADCC도 관찰되지 않았다.

[0500] 예 8. 웨티드-필스된 T2 세포를 이용한 T 세포 세포독성 분석

[0501] 본 예는 EBV-LMP2/HLA-A02 웨티드 복합체에 결합하는 제1 항원-결합 부위 및 T 세포에 결합하는 제2 항원-결합 부위를 갖는 다중 특이적 결합제에 의해 매개되는 T 세포 세포독성에 대한 웨티드 로딩된 T2 세포의 민감성을 측정하기 위해 수행된 실험을 보여준다. 특히, 본 예는 EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01 웨티드 복합체에 결합하는 제1 항원-결합 부위 및 CD3에 효과적으로 결합하는 제2 항원-결합 부위를 갖는 이중 특이적 항체가 웨토볼 범위로 웨티드 로딩된 T2 세포의 T세포 세포독성을 매개한다는 것을 구체적으로 보여준다.

[0502] 요컨대, 웨티드 로딩된 T2 세포 (전술됨)를 상이한 농도의 예 4에 기술된 EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01 이중 특이적 항체 구축물을 사용하여 T 세포 세포독성에 대한 이의 민감도에 대해 시험하였다. 표적 T2 세포를 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 LMP2 (CLGGLLTMV; 서열번호 1) 또는 대조군 (YMLDLQPET; 서열번호 120) 웨티드 및 20 $\mu\text{g/mL}$ 의 인간 β

2m으로 밤새 펄스 하였다. 이중 특이적 항체 각각을 LMP2 웨티드에 대한 특이성 및 친화도에 대해 시험하였다 (표 8). BIACORE 기술을 사용하여 EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01에 대한 이중 특이적 항체 각각의 예시적인 친화도 측정치를 표 9에 나타냈다. EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01 이중 특이적 항체를 사용하여 EBV-LMP2 웨티드로 펄스된 T2 세포의 예시적인 T세포 세포독성을 도 12에 나타냈다.

표 8

[0503]

이중 특이적 항체	EC ₅₀ (ng/mL)	EC ₅₀ (pM)
LMP2-21xCD3	0.02059	0.4
LMP2-26xCD3	0.0109	0.2
LMP2-38xCD3	0.655	12.1
LMP2-40xCD3	0.02361	0.4
LMP2-61xCD3	0.4021	7.4
LMP2-63xCD3	7.222	133.6
LMP2-77xCD3	3.613	66.8

표 9

[0504]

이중 특이적 항체	K _{on} (s ⁻¹ M ⁻¹)	K _{off} (s ⁻¹)	K _D (nM)
LMP2-21xCD3	1.929x10 ⁵	2.595x10 ⁻³	20
LMP2-26xCD3	1.399x10 ⁵	2.818x10 ⁻³	13
LMP2-38xCD3	3.864x10 ⁴	2.145x10 ⁻³	117
LMP2-40xCD3	1.358x10 ⁴	1.587x10 ⁻³	31
LMP2-61xCD3	5.457x10 ⁴	2.736x10 ⁻³	128
LMP2-63xCD3	4.987x10 ⁴	6.389x10 ⁻³	56
LMP2-77xCD3	8.538x10 ⁴	2.642x10 ⁻³	50

[0505]

표 8에 나타난 바와 같이, 이중 특이적 항체 각각은 LMP2 웨티드에 특이적이며 0.4 내지 약 133 pM 범위의 EC₅₀을 갖는다. 또한, 이중 특이적 항체 각각은 유사한 친화도를 가지며 (표 9), 웨티드 특이적 방식으로 T2 세포의 T 세포 사멸을 효과적으로 매개한다 (도 12).

[0506]

예 9. EBV-형질전환된 BLCL을 사용하는 T 세포 세포독성 분석

[0507]

본 예는 본 발명의 다중 특이적 결합제가 다수의 상이한 EBV-형질전환된 세포를 사용하여 EBV 웨티드를 제시하는 EBV-형질전환된 표적 세포의 T 세포 세포독성을 매개할 수 있음을 보여준다. 특히, 본 예는 선택된 EBV-LMP2(CLG)/HLA-A02xCD3 이중 특이적 항체가 HLA-A02⁺ EBV-형질전환된 BLCL 패널에 대해 T 세포 세포독성을 매개한다는 것을 구체적으로 기술한다.

[0508]

B95-8 마모셋 라인에 의해 시험관 내에서 생성되고 이전에 유세포분석법 및 시퀀싱 둘 모두에 의해 이의 HLA-A*02:01 상태에 대해 유전형질 분석된 7개의 상이한 BLCL 패널을 상이한 농도의 EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01 이중 특이적 항체를 사용하여 세포독성 분석에서 제대혈 기증자로부터 생성된 활성화된 T-세포 (ATC)를 사용하여 시험하였다. 제대혈 세포가 EBV에 대해 천연이기 때문에 제대혈 세포를 사용하였고 따라서 배양물에 존재하는 항원 특이적 T 세포로부터 교차 반응의 잠재성을 제거하였다.

[0509]

요컨대, BLCL을 건강한 기증자로부터 생성하였고 (전술됨) 이어서 10% FBS에서 배양하였다. 세포독성 분석을 위해, 다른 곳에 기술된 바와 같이 1x10⁶ BLCL을 100 μCi ⁵¹Cr로 37°C에서 60분 동안 인큐베이션 하였다 (Xu, H. 외, 2015, Cancer Immunol. Res. 3(3):266-77). 이어서 BLCL을 2회 세척하고 등근 바닥 96웰 플레이트에 웰 당 5x10³의 밀도로 플레이팅 하였다. 각각의 이중 특이적 항체를 10:1의 E:T 비율로 특정 농도로 첨가하고 37°C에

서 4시간 동안 인큐베이션 하였다. 상층액을 수확하고 감마 계수기를 사용하여 판독하였다. 특이적 용해는 전술한 바와 같이 계산하였다. 이팩터 세포를 생성하기 위해, NY 혈액 은행에서 제대혈 세포를 수득하여 피콜 구배를 사용하여 처리하였다. 생성된 림프구가 풍부한 개체군은 CD3 마이크로비드 (Miltenyi Biotech)를 사용하여 자성 컬럼을 통해 CD3 발현을 풍부하게 하였다. 이어서 세포를 7일 동안 (x2) CD3/CD28 자성 비드 (Life Technologies)로 도금하여 ATC를 생성하였다. 예시적인 결과를 도 13a 내지 13d 및 표 10에 나타냈다(EBV-LMP2 웨티드의 아미노산에 대한 이의 특이성에 따라 분류된 이중 특이적 항체).

표 10

이중 특이적 항체	표적 웨티드 위치(들)
LMP2-21xCD3	8
LMP2-26xCD3	8
LMP2-38xCD3	5-8
LMP2-40xCD3	1
LMP2-61xCD3	1
LMP2-63xCD3	5-8
LMP2-77xCD3	1-5

[0510] 도 13a 내지 13d에 나타난 바와 같이, 이중 특이적 항체 각각에 의한 EBV-형질전환된 세포에 대한 세포독성은 가장 높은 세포독성을 나타내는 LMP2-38xCD3에 따라 다양하였다. LMP2-38xCD3 및 LMP2-63xCD3 이중 특이적 항체는 HLA-A*02:01⁺ 세포에서 가장 높은 특이성을 보였지만 몇몇 다른 이중 특이적 항체 (LMP2-21xCD3, LMP2-26xCD3, LMP2-40xCD3 및 LMP2-77xCD3)는 HLA-A*02:01 음성 세포 중 적어도 하나와 교차 반응을 나타냈다. 또한, EBV-LMP2 웨티드의 잔기 5 내지 8 (표 10)을 표적으로 하는 이중 특이적 항체는 HLA-A*02:01⁺ EBV⁺ 세포에 대해 가장 높은 특이성을 나타냈다.

[0511] [0512] 종합하면, 본 예는 EBV-LMP2(CLG)/HLA-A02xCD3 이중 특이적 항체가 HLA-A02⁺ EBV-형질전환된 BLCL 패널에 대해 T 세포 세포독성을 효과적으로 매개한다는 것을 확인한다.

예 10. BLCL에서 HLA-A02에 의해 제시된 LMP-2 웨티드의 특성분석

[0513] [0514] 본 예는 EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01 이중 특이적 항체를 사용하여 BLCL에서 HLA-A*02:01에 의해 제시된 LMP2 웨티드 (CLGGLLTMV; 서열번호 1)의 특성분석을 보여준다. 예시적인 결과가 도 15 및 도 16에 나타나 있다.

[0515] 도 15에 나타난 바와 같이, EBV-LMP2 웨티드 (예컨대, LMP2-21, LMP2-26)의 위치 8을 표적으로 하는 EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01 IgG1 항체는 LMP2⁺ HLA-A*02:01⁺ 세포에 대해 최소 세포독성을 나타냈다. 흥미롭게도, 이러한 동일한 구축물은 T2-웨티드 펄스된 세포 (전술됨)에 대해 시험했을 때 가장 낮은 EC₅₀ (가장 높은 친화도)을 나타냈다. 이러한 관계의 잠재적인 이유를 확인하기 위해, HLA-A*02:01⁺/EBV⁺ BLCL OKO 세포를 HLA-A*02:01⁺ BLCL에 대한 이의 결합을 결정하기 위해 상이한 웨티드 위치를 표적으로 하는 선택된 항체로 염색하였다. EBV-LMP2 웨티드의 위치 1을 표적으로 하는 항체는 세포독성 분석에서 관찰된 결과와 상호 관련이 있는 BLCL에 대한 유세포분석법에 의한 최소 결합 내지 전혀 결합을 나타내지 않았다. HLA-A*02:01⁻ 세포주 KBAB-1을 음성 대조군으로 사용하였다 (도 15, 하단 패널).

[0516] 도 16에 나타난 바와 같이, BLCL OKO 세포를 100 μg/mL의 EBV-LMP2 웨티드로 밤새 펄스하고 동일한 EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01 특이적 IgG1 항체로 염색하였을 때, EBV-LMP2 웨티드의 위치 8을 표적으로 하는 구축물의 결합이 재구성 되었다. 본 발명자들은 이러한 차이가 BLCL에서 CLGGLLTMV 웨티드의 제시에 의한 차이에 기인한다고 추론하였다.

예 11. 상이한 HLA-A02 하위-대립형질에 의해 제시된 EBV-LMP2 웨티드의 인식

[0517] [0518] 본 예는 EBV-LMP2 웨티드의 특이성 치 5 내지 8을 갖는 EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01 이중 특이적 항체가 다수의 상이한 HLA-A02 문자의 하위-대립형질에 의해 제시될 때 EBV-LMP2 웨티드에 결합할 수 있음을 보여준다. 본 예는 인공 항원 제시 세포 (aAPC)를 사용하는데, 이는 공동-자극 문자와 함께 특이적 HLA I류 대립형질을 안정적

으로 발현하도록 조작된 3TC 마우스 섬유아세포 세포이다.

[0519] 요컨대, HLA-A02 (HLA-A*02:01, HLA-A*02:02, HLA-A*02:03, HLA-A*02:04, HLA-A*02:05 및 HLA-A*02:06)의 하위-대립형질을 발현하는 6개의 상이한 aAPC를 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 EBV-LMP2 웨티드로 37°C에서 밤새 펄스하고 EBV-LMP2 웨티드의 위치 5 내지 8의 아미노산을 표적으로 하는 EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01 이중 특이적 항체를 이용하는 세포독성 분석(전술됨)에서 사용하였다. 이러한 동일한 세포를 전장 IgG1 항체로서 동일한 EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01 이중 특이적 항체로 염색한 후 유세포분석법으로 분석하였다. 세포독성의 임의의 차이가 HLA-I 유분자의 발현 차이 때문이 아니라는 것을 확인하기 위해, aAPC를 판(pan)-HLA 항체(W6/32)를 사용하여 유세포분석법으로 HLA 분자의 발현을 특성화하였다. 예시적인 결과를 도 17에 나타냈다.

[0520] 도 17에 나타난 바와 같이, 몇몇 이중 특이적 및 IgG1 항체가 상이한 HLA-A02 대립형질에 의해 제시된 웨티드에 결합하였다. 특히, 본 예는 EBV-LMP2 웨티드의 위치 5 내지 8에 결합하는 EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01 이중 특이적 항체가 또한 HLA-A*02:02 및 HLA-A*02:06에 대해 반응성임을 보여준다.

[0521] 이러한 세포가 외인성 웨티드가 로딩되지 않은 aAPC와 교차 반응하지 않는다는 것을 보여주기 위해, HLA-A*02:01 세포 aAPC는 저농도로 ($0.0001 \mu\text{g/mL}$) 또는 외인성 웨티드 없이 인큐베이션한 후 세포독성 분석(전술됨)에서 표적 세포로서 사용하였으며, EBV-LMP2 웨티드의 상이한 위치에 결합하는 선택된 LMP2(CLG)/HLA-A*02:01 이중 특이적 항체를 사용하여 ATC로 시험하였다. 이들을 또한 선택된 항-EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01 IgG1 항체를 사용하여 염색하고 유세포분석법으로 분석하였다. 예시적인 결과를 도 18에 나타냈다.

[0522] 도 18에 나타난 바와 같이, aAPC는 이중 특이적 또는 전장 IgG1 항체에 의해 인식될 수 있도록 웨티드 펄스된 T2 세포보다 높은 웨티드 농도를 필요로 한다. 또한, 본 예는 시험된 이중 특이적 및 IgG1 항체간에 유사한 세포독성이 관찰되었음을 보여준다.

예 12. I형 TCR 유사 항체의 친화도 성숙

[0524] 본 예는 항-EBV-LMP2(CLG)/HLA-A02 항체의 친화도 성숙을 보여준다. 특히, 본 예는 선택된 항-EBV-LMP2(CLG)/HLA-A02 항체(LMP2-38)에 무작위 돌연변이를 도입하고 스크리닝하고 단량체 EBV-LMP2(CLG)/HLA-A02를 사용하여 항체 변이체를 특성분석하는 일련의 항체 변이체 생산을 구체적으로 보여준다.

[0525] ALPHA™ 파지 디스플레이(전술됨)를 사용하여, LMP2-38 IgG1 항체를 무작위로 돌연변이시키고 단량체 EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01로 선택하였다. 스크리닝된 총 581개의 클론 중에, 111개가 웨티드-HLA 복합체에 대해 특이적이었다. 웨티드-HLA 복합체에 대해 특이적인 111개에 중에, 34개가 독특한 결합제로 결정되었다. 11개는 웨티드로딩된 T2 세포에 대한 강한 결합을 나타냈다, 즉, [P19 웨티드로딩된 T2 세포 파지 항체 FACS 신호] / [음성 대조군 FACS 신호] < 5; 17개가 T2 세포 교차 결합을 나타냈다: [P19 웨티드로딩된 T2 세포 파지 항체 FACS 신호] / [음성 대조군 FACS 신호] > 5. 종합하면, 9개의 클론은 모두 항체보다 개선을 나타냈고, 즉, [LMP2-38 모 IC₅₀] / [돌연변이된 독특한 파지 항체 IC₅₀] > 2, 24개는 개선을 나타내지 않았다, 즉, [EXT005-38 모 IC₅₀] / [돌연변이된 독특한 파지 항체 IC₅₀] < 2. 예시적인 결과를 표 11에 나타냈다(세포 표면 결합: [특이적 파지 항체 FACS 신호] / [음성 대조군 FACS 신호] < 2; +: [특이적 파지 항체 FACS 신호] / [음성 대조군 FACS 신호] = 2-10; ++: [특이적 파지 항체 FACS 신호] / [음성 대조군 FACS 신호] > 10; nd: 측정되지 않음; 친화도 개선: [LMP2-38 모 IC₅₀] / [돌연변이된 독특한 파지 항체 IC₅₀]; P19 웨티드: 19개의 내인성 대조군 웨티드 혼합물) 및 12(BIACORE; nd: 측정되지 않음).

표 11

항체 클론	세포 표면 결합		친화도 개선
	LMP2 웨티드로딩된 T2 세포	P19 웨티드로딩된 T2 세포	
LMP2-38 모	++	-	1.00
1	++	-	0.79
2	++	-	1.67
3	++	-	1.58
4	++	+	ND
5	++	-	1.37
6	++	-	1.29
7	nd	nd	0.91

8	++	+	1.16
9	++	++	2.19
10	++	++	0.95
11	++	+	2.65
12	++	++	2.51
13	++	-	0.55
14	nd	nd	0.89
15	nd	nd	0.78
16	++	++	1.72
17	++	++	1.39
18	nd	nd	0.88
19	++	++	1.12
20	nd	nd	0.78
21	++	-	0.74
22	++	+	1.04
23	++	++	2.85
24	++	++	1.89
25	++	+	1.44
26	++	++	4.25
27	++	+	1.37
28	++	+	1.49
29	++	+	1.46
30	++	+	2.22
31	++	++	2.36
32	++	++	3.55
33	++	++	6.20
34	++	+	1.66

표 12

[0527]	친화도 성숙된 클론	유지된 특이성	ELISA 향상	배수 개선		
				$k_{\text{온}}$	$k_{\text{오프}}$	KA
LMP2-38-1	있음	0.79	1.12	1.66	1.86	
LMP2-38-2	있음	1.67	2.36	2.07	4.90	
LMP2-38-3	있음	1.58	3.44	1.79	6.18	
LMP2-38-5	있음	1.37	2.44	1.36	3.31	
LMP2-38-6	있음	1.29	1.05	1.53	1.62	
LMP2-38-11	없음	2.65	6.15	1.38	8.46	
LMP2-38-13	nd	0.55	2.35	1.23	2.89	
LMP2-38-21	있음	0.74	1.44	1.68	2.42	
LMP2-38 모	-	1	1	1	1	

[0528] LMP2-38의 친화도 향상은 특이성을 희생시켰으며, 즉, 친화도 향상이 1.0 초과인 경우, 다수의 항체 클론에 대해 P19 펩티드와 교차반응이 관찰되었다. 4개의 항체 클론은 특이성을 유지하면서 ELISA에 의한 LMP2-38 모 항체보다 결합에서 한계 개선을 나타냈다 (1.29, 1.37, 1.58, 1.67). 이러한 클론의 결합 동력학을 SPR (BIACORE)로 상세하게 분석하였을 때, 친화도의 증가는 강력하지 못했다: $k_{\text{온}}$ 의 경우 1.05-배 내지 3.44-배, 및 $k_{\text{오프}}$ 의 경우 1.36 내지 2.07, 1.62-배 내지 6.2-배의 KA 개선을 가져옴 (표 12). 선택된 친화도 성숙된 항-EBV-LMP2(CLG)/HLA-A02 IgG1 항체 클론의 V_H 및 V_L 영역에서의 예시적인 돌연변이를 표 13에 나타냈다 (카밧 (Kabat)에서와 같이 아미노산 번호매김; 예컨대 E.A. Kabat 외, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, 1991, NIH 참조).

표 13

클론	V _L							V _H						
	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
38-1					K66R									
38-2				P55H										
38-3						N95I								
38-5												V78A		
38-6			I48V	S52G										
38-11							G26E			I51V				
38-13							V5E							
38-21							E10D							

[0530] 본 예에 제시된 데이터는 KA의 친화도 성숙 및 특히 II형 TCR 모방체에 대한 k_{off} 가 어려울 수 있음을 보여준다.

이는 웨티드의 중앙 위치 (즉, 위치 5 주위)에 대한 특이성 및 전형적으로 시험관 내 또는 생체 내 반복적인 도전에 의한 낮은 친화도 (μM)를 갖는 TCR과 유사하다. 웨티드-HLA-A02 복합체의 결정 구조에 기초하여, 웨티드 P4-6의 중앙 (P2 및 P9에서 고정된 경우)은 MHC I류 단백질과의 접촉 수가 가장 적다 (Madden, D.R. 외, 1993, Cell 75:693-708). 이는 위치 P5 주위의 웨티드 중dkd에서 높은 수준의 구조 유연성을 허용할 것이고, 이는 종종 가장 덜 고정된 잔기이다. 웨티드 위치 P5 영역의 TCR 또는 항체 인식은 이러한 영역에 대한 엔트로피의 상당한 손실을 초래할 것이다. 구조 연구 보고서는 높은 엔트로피 결합 비용이 단백질-리간드 상호작용의 낮은 친화도와 관련되어 있음을 보여주었다 (Thorpe, I.F. and Brooks, C.L., 2007, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104:8821-6). 본 발명의 발명자들은 일부 실시양태에서, 본원에 제시된 데이터에 기초하여, II형 TCR-유사 단일클론 항체를 생성하기 위한 고유의 친화도 장벽이 있음을 인식하였다.

예 13. TCR 유사 단일클론 항체의 생성을 위한 선택 전략

[0531] 본 예는 TCR-유사 단일클론 항체, 특히 II형 TCR 모방체의 개발을 위한 다수의 선택 전략을 보여준다.

[0532] [0533] 두 가지 선택 전략을 사용하여 중앙 에피토프 (P2 및 P9에 고정되었을 경우 위치 P5 웨티드; 예컨대 도 19 및 도 20 참조)에 특이적인 II형 TCR-유사 단일클론 항체를 효율적으로 생산할 수 있다.

[0534] 첫 번째 전략에서 (도 19), 후보 항체의 라이브러리는 부적절한 웨티드-MHC 복합체에 대한 결합에 대해 우선 음성적으로 선택하였다. 남아있는 라이브러리는 이어서 관심의 표적-웨티드/MHC 복합체에 대한 결합에 대해 양성적으로 선택하였다. 이어서, 위치 P1, P5, 또는 P8에서 Ala-치환된 웨티드를 사용하여 I형 (웨티드의 말단에 결합하는 항체), 대 II형 (위치 P5에서 웨티드의 중앙 근처에 결합하는 항체)를 구별하기 위해 두 번째 스크리닝 단계를 이용하였다. P1-Ala 또는 P8-Ala 치환된 웨티드와만 결합을 잃는 항체는 I형으로 분류된다. P5-Ala 웨티드와의 결합을 주로 잃는 항체는 II형으로 분류된다.

[0535] 두 번째 전략에서(도 20), P5-Ala 치환을 갖는 웨티드 및 웨티드의 N- 또는 C-말단에 부가적인 천연 플랭킹 잔기를 포함하는 웨티드의 결합에 대해 항체 라이브러리가 우선 음성적으로 선택된다. 이어서, 항체 후보의 나머지 라이브러리는 야생형 표적-웨티드/MHC 복합체에 대한 결합에 대해 양성적으로 선택된다. 확장된 웨티드의 사용은 최종 항체 후보에 의해 결합될 천연의 중앙 에피토프 (위치 P5를 중심으로 함)만이 보장된다.

[0536] 전술된 전략의 조합이 또한 사용될 수 있다. 동일한 전략은 또한 Ala 이외의 다른 비-천연 아미노산 치환을 이용할 수 있다. P1, P5, 또는 P8의 천연 서열이 알라닌인 경우, 상이한 아미노산이 사용될 수 있다. 고정된 부위가 P1 및 P8인 경우, 중앙 위치는 P(1+3)=P4가 될 것이고, 병치터미널 위치는 P(8-1)=P7이 될 것이다. 데카웨티드에 사용될 수 있는 전략이 도 21 및 도 22에 요약되어 있다.

예 14. 항-EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01 클론의 에피토프 맵핑

[0537] [0538] 본 예는 EBV-LMP2/HLA 웨티드 복합체를 결합하는 본원에 기술된 바와 같은 특정 항체 제제의 상세한 결합 특성을 기술한다. 특히, 본 예에서 제공된 데이터는 웨티드-MHC I류 (예컨대, HLA-A02) 결합 포켓 내의 EBV-LMP2 웨티드의 중앙 부분 내의 위치에 대한 결합의 중요성을 확인한다. 본원에 제공된 데이터는 또한 TCR 결합의 하나 이상의 속성을 모방한 특정 제제에 대한 결합 특성을 기술한다. 임의의 특정 이론에 구속되기를 바라지 않고, 본 발명은 잔기 P3-P8에 걸친 Ala-치환 위치에 대한 결합 손실의 역종형 분포를 특징으로 하는 결합을 나타내는

항체 제제가 특히 관심이 있을 수 있음을 제안한다.

[0539] 특히, 본 예는 EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01 웨티드 복합체에 결합하는 본원에 기술된 바와 같은 전장 IgG1 항체로 수행된 상세한 에피토프 맵핑 연구를 기술한다. 먼저, HLA-A*02:01에 대해 위치 P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8 또는 P9 각각에서 알라닌 치환을 갖는 EBV-LMP2(CLG) 웨티드의 로딩 효율을 시험하였다 (도 23). T2 세포를 CLG 야생형 웨티드 (서열번호 1) 또는 P1 내지 P9 Ala-치환된 웨티드로 각각 펠스한 다음, 항체 BB7.2와의 결합에 대해 염색하였고, 이는 웨티드 로딩된 상태에서 HLA-A*02:01에 대한 향상된 결합을 나타냈다. BB7.2의 결합을 유세포분석법으로 탐지하였다 (도 23). 도 23에 제시된 유동 세포 계측 데이터는 위치 P3 내지 P9에서의 Ala-치환이 내약성이 우수하고 야생형 CLG 웨티드와 비교가능한 BB7.2 결합을 나타내지만, 위치 P1 또는 P2에서의 Ala-치환은 HLA-A*02:01 상의 로딩을 불가능하게 한다.

[0540] CLG 웨티드 위치 P1 및 P2에서의 Ala 치환은 HLA-A*02:01에 대한 로딩 손실을 초래하고, 위치 P2 및 P9는 T 세포 수용체 또는 항체로부터 멀리 떨어져 있는 고정된 잔기이기 때문에 (결정 구조 pdb 3REW에 예시된 바와 같이), 클론 21, 26, 38, 61, 63 및 77의 IgG 항체의 상세한 에피토프 맵핑을 위치 P3, P4, P5, P6, P7, 및 P8에서 Ala-치환된 웨티드를 사용하여 수행하였다 (도 24). 도 24a는 유세포분석법에 의해 검출된 바와 같이, 위치 P3-P8에서 야생형 CLG 웨티드 또는 Ala-치환된 CLG 웨티드로 로딩된 HLA-A*02:01에 대한 항-EBV-LMP2(CLG)/HLA-A*02:01 IgG 구축물의 결합을 나타낸다. 도 24b에서, IgG 구축물의 Ala-치환된 웨티드/HLA-A*02:01 복합체에 대한 결합을 각각의 IgG 클론의 야생형 CLG/HLA-A*02:01 복합체에 대한 결합에 대해 정규화하였다. 도 24a 및 도 24b에 제시된 데이터는 예 2 및 표 10에서 시험되지 않은 위치에서 알라닌 치환을 갖는 웨티드에 대한 결합을 평가하는 것을 포함하여 상세한 에피토프 분석을 제공하며, 여기서, 초기 에피토프 맵핑은 CLG 웨티드 위치 P1, P5 및 P8에서만 알리닌 치환이 수행되었다.

[0541] 도 23의 데이터는 웨티드 위치 P1에서의 Ala-치환이 HLA-A*02:01로의 로딩을 금지한다는 것을 보여주고 도 24a 및 24b에 제시된 데이터는 시험된 LMP2 클론의 결합 특성에 대한 상세한 통찰을 제공한다. 따라서, 본원에 제공된 데이터는 고 친화도 LMP2-21 및 LMP2-26 (이는 강한 서열 상동성을 공유함)이 CLG 웨티드의 C-말단에 우세하게 결합하고, LMP2-38 및 LMP2-63 (이는 강한 서열 상동성을 공유함)이 CLG 웨티드의 중앙에 우세하게 결합함을 보여주고/주거나 확인한다.

[0542] 중요하게는, LMP2-38 및 LMP2-63에 대한 모든 잔기 P3 내지 P8에 걸쳐 Ala 치환된 위치에 대한 결합 손실의 역종형 분포는 HLA I류 분자에 대한 천연 TCR의 접촉 에너지 (반 데르 발스)의 역종형 분포와 매우 유사하다 (도 1에 나타나 있음). 따라서, 본 발명은 LMP2-38 및 LMP2-63의 다양한 결합 특성이 TCR을 밀접하게 모방함을 나타낸다. 임의의 특정 이론에 구속되기를 바라지 않고, 본 발명은 LMP2-38 및 LMP2-63이 천연 TCR의 MHC I류 포켓을 가로지르는 유사한 교차 각도로 결합하는 경향이 있음을 제시한다. 본원에 제공된 에피토프 맵핑 데이터는 LMP2-40이 또한 CLG 웨티드의 중앙에 우세하게 결합하지만, P4 내지 P8 잔기를 중심으로 LMP2-38 및 LMP2-63에 대해 관찰된 것보다 더 좁은 분포를 갖는다는 것을 나타낸다. LMP2-61 및 LMP2-77은 또한 CLG 웨티드의 중앙 근처에 에피토프를 나타내지만, 평평한 분포 (역종형이 아님)와 전반적으로 약한 결합을 갖는다.

예 15. 이량체 이중 특이적 항체 제제의 생성

[0544] 본 예는 본 발명에 의해 제공된 교시에 따라 인간 MHC I류 분자 및 CD3에 의해 제시된 EBV-LMP2 웨티드에 특이적인 이량체 이중 특이적 항체의 구축을 보여준다.

[0545] 이론에 구속되지 않고, 적어도 일부 실시양태에서, 이량체화 형태는 이중 특이적 (또는 다른 다중 특이적) 항체 제제 형태에 안정하고/하거나 다른 유용한 특성을 제공할 수 있다고 생각된다. 몇 가지 예를 언급하면 되겠지만, 일부 실시양태에서, 이량체 이중 특이적 형태는 잠재적으로 적어도 부분적으로 이의 보다큰 크기로 인해 하나 이상의 결합 및/또는 약물동력학 특성의 분석을 개선 및/또는 단순화할 수 있다.

[0546] 다섯 개의 리드 항체인 LMP2 클론 (26, 38, 38-2, 40, 및 61)을 결합 특이성 및 전반적인 친화도에 기초하여 이량체 이중 특이적 형태에서의 분석을 위해 선택하였다. 상기 다섯 개의 리드 항체인 LMP2 클론을 Ahmed 외 (2015) *Oncimmunology* 4, e989776에 기술된 형태에 기초하여 이량체 이중 특이적 항체 (DiBsAb) 구축물로 재구성하였다. LMP2 클론 26, 38, 38-2, 40 및 61의 이량체 BsAb를 생성하기 위해, 예 4에 기술된 LMP2xCD3 BsAb에 두 가지 변화를 가하였다. 먼저, 항-CD3 scFv의 유리 시스테인(서열번호 124)을 세린(서열번호 125)으로 돌연변이시키고, 전사 인자 HNF1 α 를 기초로 하는 이량체화 태그를 항-CD3 scFv의 C-말단에 첨가하고 이어서 6x-His 태그 (서열번호 126)를 첨가하였다.

[0547] 유리 시스테인 대 세린 돌연변이를 갖는 항-CD3 scFv 아미노산 서열 (서열번호 125)

[0548] DVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSRGYTNYADSVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSLRSEDTATYYCARYYDD HYSLDYWGQGTTVSSGEGTSTGGSGGGADDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIDTSKVASGVPARFSGSGSG TDYSLTINSLEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGGGTKEIK

[0549] HNF1a에 기초한 동종이량체화 태그 서열 (서열번호 126)

[0550] RTPLGDTTHTSGMVKLSQLQTELLAALLESGLSKEALIQALGEKGSGGAPHHHHHHH

[0551] 생성된 DiBsAb는 도 25에 제시된 크기 배제 크로마토그래피 데이터에서 볼 수 있는 바와 같이 매우 순도가 높았다 (97 내지 100%).

예 16. 종양 세포주를 사용한 특정 항체 제제의 T 세포 세포독성 분석

[0553] 본 예는 본원에 제공된 특정 항체 제제가 종양 세포의 T 세포 세포독성을 매개할 수 있음을 보여준다. 특히, 본 예는 예 15에 기술된 바와 같이 이량체 형태로 사용되는 선택된 EBV-LMP2(CLG)/HLA-A02xCD3 이량체 이중 특이적 항체가 HLA-A*02(+) EBV (+) 종양 세포주의 패널에 대해 T 세포 세포독성을 매개한다는 것을 구체적으로 기술한다.

[0554] RPMI-6666 (호지킨 림프종), DT BLCL, F BLCL, HONE-1-A2 (HLA-A*02:01로 형질감염된 비인두 암종)를 포함하여, HLA-A*02:01(+) EBV (+) 종양 세포주에 대한 LMP2 DiBsAb의 T 세포 의존성 세포독성 분석을 완료하였다. 활성화된 제대혈 T 세포를 10:1효과기 대 표적 비율의 효과기 세포로서 사용하였고, 4시간 치료 후에 ⁵¹Cr 방출에 의해 세포독성을 측정하였다 (도 26). LMP2-38 및 LMP2-38-2 DiBsAb는 4종의 종양 세포주 모두에 대해 가장 높은 수준의 세포독성을 나타냈다. LMP2-26 및 LMP2-61은 대조군 BsAb에 비해 세포독성이 거의 나타나지 않았다. LMP2-40 DiBsAb는 DT BLCL에 유의한 사멸을 보였지만 F BLCL, RPMI-6666 또는 HONE-1-A2에는 유의하지 않았다. EC₅₀ 및 비선형 4개 변수 가변 사면 회귀 분석(GraphPad Prism)에 기초한 최대 사멸 데이리를 표 14에 나타냈다. LMP2-38-2 DiBsAb는 0.003 내지 0.07 μg/mL의 EC₅₀ 값과 37 내지 55%의 최대 사멸을 가졌고 LMP2-38 DiBsAb는 0.02 내지 0.04 μg/mL의 EC₅₀ 값과 17 내지 40%의 최대 사멸을 가졌다. 표 14는 LMP2 이량체 BsAb로 수득된 시험관 내 세포독성 결과를 나타낸다. “nd”는 불량한 곡선 적합성으로 인한 비선형 회귀 분석에서 “측정되지 않음”을 나타낸다.

표 14

		LMP2-26 이 량체 BsAb	LMP2-38 이 량체 BsAb	LMP2-38-2 이량체 BsAb	LMP2-40 이 량체 BsAb	LMP2-61 이 량체 BsAb	대조군 BsAb
RPMI-6666	최대 사멸 %	12.6	26.5	53.5	10.6	3.9	4.1
	EC ₅₀ (μg/mL)	nd	3.7E-02	3.0E-03	nd	nd	nd
DT BLCL	최대 사멸 %	24.7	39.9	55.1	67.3	6.5	9.2
	EC ₅₀ (μg/mL)	nd	2.5E-02	4.7E-03	nd	nd	nd
F BLCL	최대 사멸 %	8.8	25.8	48.7	8.9	nd	3.5
	EC ₅₀ (μg/mL)	nd	3.3E-02	7.2E-03	nd	nd	nd
HONE-1-A2	최대 사멸 %	nd	16.8	36.5	6.3	4.9	nd
	EC ₅₀ (μg/mL)	nd	2.4E-02	7.4E-02	1.4E-02	1.2E+00	nd

[0556] 제대혈 T 세포를 효과기로 사용하여, HLA-A*02(-) EBV (+) 종양 세포주 KS BLCL 및 HLA-A*02(+) EBV(-) 종양 세포주 COLO205 (대장암), MCF-7 (유방암), 및 HepG2 (간세포암)를 포함하여, LMP2 이량체 BsAb의 T 세포 의존성 세포독성 분석을 또한 항원 음성 종양 세포주에 대해 수행하였다. 대조군 BsAb와 비교하여 실질적인 사멸이 관찰되지 않았다.

예 17. 본원에 기술된 바와 같은 특정 항체 제제의 마우스 이종이식 연구

[0558] 본 예는 본원에 기술된 2개의 예시적인 이중 특이적 항체 제제의 생체 내 효능을 보여준다. 특히, 본 예는 선택된 EBV-LMP2(CLG)/HLA-A02xCD3 이중 특이적 항체 (이량체 형태로 평가됨) 가 마우스 이종이식 모델에서 종양 성장 및 생존을 감소시키는데 매우 효과적임을 구체적으로 보여준다.

[0559] 본원에 기술된 바와 같이 강력한 시험관 내 활성을 나타내는 LMP-38 및 LMP2-38-2 후보를 마우스 이종이식 연구에서 본원에 기술된 바와 같은 이량체 이중 특이적 형태로 시험하였다. 첫 번째 연구에서, 면역결핍성 DKO 마우스 (군 당 5마리)에 1×10^6 F BLCL (루시퍼라제 리포터 유전자가 포함됨)을 정맥 내로 주입한 후 7일차 (50% T 세포) 및 14일차 (50% T 세포)에 정맥 주사 2회 투여로 10×10^6 백만 개의 인간 성인 PBMC로 처리하였다. 7, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 17, 19, 22, 25, 28, 32, 및 39일차에 대조군 DiBsAb, LMP2-38 DiBsAb 또는 LMP2-38-2 DiBsAb의 20 μg 주사하였다. 종양 성장을 생물발광에 의해 모니터링하였으며 결과를 도 27에 나타냈다. 알 수 있는 바와 같이, 28일차 후에 비처리군의 발광 신호가 포화되었다. 28일차의 생물발광을 표 15에 나타냈다. LMP2-38 및 LMP2-38-2 DiBsAb는 종양 성장을 감소시키는데 매우 효과적이었다 (대조군 DiBsAb에 비해 각각 98.8% 및 99.8% 감소). 표 15는 BLCL이 이식되고 인간 성인 PBMC 및 LMP2 DiBsAb로 처리한 면역결핍성 마우스의 28일차에의 생물발광 정량의 결과를 포함한다.

표 15

군	28일차에서의 평균 생물발광 (광자/초)	표준 편차	3군과 비교한 변화 %	3군과 비교한 p 값
1. 종양 단독	3.44E+09	2.73E+09	-	-
2. 종양 + 성인 PBMC	2.28E+09	3.73E+09	-	-
3. 종양 + 성인 PBMC + 대조군 BsAb	8.24E+09	5.83E+09	-	-
4. 종양 + 성인 PBMC + LMP2-38 DiBsAb	1.02E+08	5.73E+07	-98.8%	0.03
5. 종양 + 성인 PBMC + LMP2-38-2 DiBsAb	1.79E+07	2.77E+07	-99.8%	0.01

[0561] 생존 데이터를 도 28에 나타냈다. LMP2-38 DiBsAb 군 ($p=0.04$) 및 LMP2-38-2 DiBsAb 군 ($p=0.03$) 둘 모두에 대해 생존에 있어 유의한 개선이 관찰되었다.

[0562] 2차 연구에서, 면역결핍성 DKO 마우스 (군 당 5마리)에게 1×10^6 F BLCL (루시퍼라제 리포터 유전자가 포함됨)을 정맥내로 주입한 후 7일차 (20% T 세포) 및 14일차 (50% T 세포)에 10×10^6 백만 개의 인간 제대혈 PBMC를 정맥 주사로 2회 투여량으로 처리하였다. 대조군 DiBsAb, LMP2-38 DiBsAb, 또는 LMP2-38-2 DiBsAb의 20 μg 주사를 7, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 17, 19, 22, 25, 28, 32, 및 39일차에 주었다. 종양의 성장을 생물발광에 의해 모니터링한 후 도 29에 나타냈다. 28일차 후에 포화된 비처리 군의 발광 신호 및 28일차의 생물발광을 표 16에 나타냈다. LMP2-38 및 LMP2-38-2 DiBsAb는 종양 성장을 감소시키는데 매우 효과적이었다 (대조군 DiBsAb에 비해 각각 91.2% 및 98.1% 감소). 표 16은 F BLCL로 이식되고 인간 제대혈 PBMC 및 LMP2 DiBsAb로 처리된 면역결핍성 마우스의 28일차의 생물발광 정량을 기술한다.

표 16

군	28일차에서의 평균 생물발광 (광자/초)	표준 편차	3군과 비교한 변화 %	3군과 비교한 P 값
1. 종양 단독	3.44E+09	2.73E+09		
2. 종양 + 제대혈 PBMC	5.97E+09	1.41E+09		
3. 종양 + 제대혈 PBMC + 대조군 BsAb	6.52E+09	2.22E+09		
4. 종양 + 제대혈 PBMC + LMP2-38 DiBsAb	5.75E+08	2.59E+08	-91.2%	<0.001
5. 종양 + 제대혈 PBMC + LMP2-38-2 DiBsAb	1.27E+08	7.40E+07	-98.1%	<0.001

[0564] 생존 데이터를 도 30에 나타냈다. 나타난 바와 같이, LMP2-38 DiBsAb 군 ($p=0.003$) 및 LMP2-38-2 DiBsAb 군

($p=0.003$) 둘 모두에서 생존에 있어 유의한 개선이 관찰되었다.

[0565] 참고문헌

- [0566] Coghill AE, Hildesheim A: Epstein-Barr virus antibodies and the risk of associated malignancies: review of the literature, *Am. J. Epidemiol.* 180:687-95, 2014
- [0567] Hislop AD, Taylor GS, Sauce D, et al.: Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus, *Annu. Rev. Immunol.* 25:587-617, 2007
- [0568] Long HM, Leese AM, Chagoury OL, et al.: Cytotoxic CD4+ T cell responses to EBV contrast with CD8 responses in breadth of lytic cycle antigen choice and in lytic cycle recognition, *J. Immunol.* 187:92-101, 2011
- [0569] Tsao SW, Tsang CM, To KF, et al.: The role of Epstein-Barr virus in epithelial malignancies, *J. Pathol.* 235:323-33, 2015
- [0570] Rasche L, Kapp M, Einsele H, et al.: EBV-induced post transplant lymphoproliferative disorders: a persisting challenge in allogeneic hematopoietic SCT, *Bone Marrow Transplant* 49:163-7, 2014
- [0571] Bolland CM, Rooney CM, Heslop HE: T-cell therapy in the treatment of post-transplant lymphoproliferative disease, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 9:510-9, 2012
- [0572] Glaser SL, Lin RJ, Stewart SL, et al.: Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease: epidemiologic characteristics in international data, *Int. J. Cancer* 70:375-82, 1997
- [0573] Shanmugaratnam K: Histological typing of nasopharyngeal carcinoma, *IARC Sci Publ*:3-12, 1978
- [0574] Menezes J, Leibold W, Klein G, et al.: Establishment and characterization of an Epstein-Barr virus (EBV)-negative lymphoblastoid B cell line (BJA-B) from an exceptional, EBV-genome-negative African Burkitt's lymphoma, *Biomedicine* 22:276-84, 1975
- [0575] Haigh TA, Lin X, Jia H, et al.: EBV latent membrane proteins (LMPs) 1 and 2 as immunotherapeutic targets: LMP-specific CD4+ cytotoxic T cell recognition of EBV-transformed B cell lines, *J. Immunol.* 180:1643-54, 2008
- [0576] Long HM, Taylor GS, Rickinson AB: Immune defense against EBV and EBV-associated disease, *Curr. Opin. Immunol.* 23:258-64, 2011
- [0577] Ning RJ, Xu XQ, Chan KH, et al.: Long-term carriers generate Epstein-Barr virus (EBV)-specific CD4(+) and CD8(+) polyfunctional T-cell responses which show immunodominance hierarchies of EBV proteins, *Immunology* 134:161-71, 2011
- [0578] Lutzky VP, Corban M, Heslop L, et al.: Novel approach to the formulation of an Epstein-Barr virus antigen-based nasopharyngeal carcinoma vaccine, *J. Virol.* 84:407-17, 2010
- [0579] Louis CU, Straathof K, Bolland CM, et al.: Adoptive transfer of EBV-specific T cells results in sustained clinical responses in patients with locoregional nasopharyngeal carcinoma, *J. Immunother.* 33:983-90, 2010
- [0580] Cheung WH, Chan VS, Pang HW, et al.: Conjugation of latent membrane protein (LMP)-2 epitope to gold nanoparticles as highly immunogenic multiple antigenic peptides for induction of Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses *in vitro*, *Bioconjug. Chem.* 20:24-31, 2009
- [0581] Weidanz JA, Hawkins O, Verma B, et al.: TCR-like biomolecules target peptide/MHC Class I complexes on the surface of infected and cancerous cells, *Int. Rev. Immunol.* 30:328-40, 2011
- [0582] Sim AC, Too CT, Oo MZ, et al.: Defining the expression hierarchy of latent T-cell epitopes in Epstein-Barr virus infection with TCR-like antibodies, *Sci. Rep.* 3:3232, 2013
- [0583] Dahan R, Reiter Y: T-cell-receptor-like antibodies - generation, function and applications, *Expert Rev. Mol. Med.* 14:e6, 2012

- [0584] Denkberg G, Cohen CJ, Lev A, et al.: Direct visualization of distinct T cell epitopes derived from a melanoma tumor-associated antigen by using human recombinant antibodies with MHC-restricted T cell receptor-like specificity, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:9421-6, 2002
- [0585] Sergeeva A, Alat rash G, He H, et al.: An anti-PR1/HLA-A2 T-cell receptor-like antibody mediates complement-dependent cytotoxicity against acute myeloid leukemia progenitor cells, Blood 117:4262-72, 2011
- [0586] Tashev DV, Cheng M, Cheung NK: Retargeting NK92 cells using an HLA-A2-restricted, EBNA3C-specific chimeric antigen receptor, Cancer Gene Ther. 19:84-100, 2012
- [0587] Dao T, Yan S, Veomett N, et al.: Targeting the Intracellular WT1 Oncogene Product with a Therapeutic Human Antibody, Sci. Transl. Med. 5:176ra33, 2013
- [0588] Townsend A, Bodmer H: Antigen Recognition by Class I-Restricted T Lymphocytes, Ann. Rev. Immunol. 7:601-24, 1989
- [0589] Rudolph MG, Stanfield RL, Wilson IA: How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors, Ann. Rev. Immunol. 24:419-466, 2005
- [0590] Parker KC, Bednarek MA, Hull LK, et al.: Sequence motifs important for peptide binding to the human MHC class I molecule, HLA-A2, J. Immunol. 149:3580-7, 1992
- [0591] Rudolph MG, Wilson IA: The specificity of TCR/pMHC interaction, Curr. Opin. Immunol. 14(1):52-65, 2002
- [0592] Massimo D, Garcia KC, Vasso A, et al.: A Functional Hot Spot for Antigen Recognition in a Superagonist TCR/MHC Complex, Immunity 12:251-261, 2000
- [0593] Reali E, Guerrini R, Marastoni M, et al.: A single specific amino acid residue in peptide antigens is sufficient to activate memory CTL: potential role of cross-reactive peptides in memory T cell maintenance, J. Immunol. 162:106-113, 1999
- [0594] Liddy N, Bossi G, Adams KJ, et al.: Monoclonal TCR-redirected tumor cell killing, Nat. Med. 18:980-987, 2012
- [0595] Andersen PS, Stryhn A, Hansen BE, et al.: A recombinant antibody with the antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted specificity of T cells, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:1820-4, 1996
- [0596] Willemsen RA, Debets R, Hart E, Hoogenboom HR, Bolhuis RL, Chames P: A phage display selected Fab fragment with MHC class I-restricted specificity for MAGE-A1 allows for retargeting of primary human T lymphocytes, Gene Ther. 8(21):1601-8, 2001
- [0597] Low JL, Naidoo A, Yeo G, Gehring AJ, Ho ZZ, Yau YH, Shochat SG, Kranz DM, Bertoletti A, Grotenhuis GM: Binding of TCR Multimers and a TCR-Like Antibody with Distinct Fine-Specificities Is Dependent on the Surface Density of HLA Complexes, PLOS ONE 7(12):e51397, 2012
- [0598] Miller KR, Koide A, Leung B, Fitzsimmons J, Yoder B, Yuan H, Jay M, Sidhu SS, Koide S, Collins EJ: T Cell Receptor-Like Recognition of Tumor In Vivo by Synthetic Antibody Fragment, PLOS ONE 7(8):e43746, 2012
- [0599] Biddison WE, Turner RV, Gagnon SJ, et al.: Tax and M1 Peptide/HLA-A2-Specific Fabs and T Cell Receptors Recognize Nonidentical Structural Features on Peptide/HLA-A2 Complexes, J. Immunol. 171(6):3064-74, 2003
- [0600] Cohen CJ, Hoffmann N, Farago M, et al.: Direct Detection and Quantitation of a Distinct T-Cell Epitope Derived from Tumor-specific Epithelial Cell-associated Mucin Using Human Recombinant Antibodies Endowed with the Antigen-specific, Major Histocompatibility Complex-restricted Specificity of T Cells, Cancer Res. 62(20):5835-44, 2002

- [0601] Cohen CJ, Sarig O, Yamano Y, et al.: Direct Phenotypic Analysis of Human MHC Class I Antigen Presentation: Visualization, Quantitation, and In Situ Detection of Human Viral Epitopes Using Peptide-Specific, MHC-Restricted Human Recombinant Antibodies, *J. Immunol.* 170(8):4349-61, 2003
- [0602] Dao T, Yan S, Veomett N, et al.: Targeting the Intracellular WT1 Oncogene Product with a Therapeutic Human Antibody, *Sci. Transl. Med.* 5(176):176ra33, 2013
- [0603] Denkberg G, Cohen CJ, Lev A, et al.: Direct visualization of distinct T cell epitopes derived from a melanoma tumor-associated antigen by using human recombinant antibodies with MHC-restricted T cell receptor-like specificity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(14):9421-6, 2002
- [0604] Epel M, Carmi I, Soueid-Baumgarten S, et al.: Targeting TARP, a novel breast and prostate tumor-associated antigen, with T-cell receptor-like human recombinant antibodies, *Eur. J. Immunol.* 38:1706-20, 2008
- [0605] Zhang G, Wang L1, Cui H, Wang X, Zhang G, Ma J, Han H, He W, Wang W, Zhao Y, Liu C, Sun M, Gao B: Anti-melanoma activity of T cells redirected with a TCR-like chimeric antigen receptor, *Scientific Reports* 4:3571, 2014
- [0606] Klechovsky E, Gallegos M, Denkberg G, et al.: Antitumor activity of immunotoxins with T-cell receptor-like specificity against human melanoma xenografts, *Cancer Res.* 68(15):6360-7, 2008
- [0607] Oren R, Hod-Marco M, Haus-Cohen M, et al.: Functional comparison of engineered T cells carrying a native TCR versus TCR-like antibody-based chimeric antigen receptors indicates affinity/avidity thresholds, *J. Immunol.* 193(11):5733-43, 2014
- [0608] Sergeeva A, Alat rash G, He H, et al.: An antiPR1/HLA-A2 T-cell receptorlike antibody mediates complement-dependent cytotoxicity against acute myeloid leukemia progenitor cells, *Blood* 117(16):4262-72, 2011
- [0609] Stewart-Jones G, Wadle A, Hombach A, et al.: Rational development of high-affinity T-cell receptor-like antibodies, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106(14):5784-8, 2009
- [0610] Verma B, Jain R, Caseltine S, et al.: TCR Mimic Monoclonal Antibodies Induce Apoptosis of Tumor Cells via Immune Effector-Independent Mechanisms, *J. Immunol.* 186(5):3265-76, 2011
- [0611] Weidanz JA, Nguyen T, Woodburn T, et al.: Levels of Specific Peptide-HLA Class I Complex Predicts Tumor Cell Susceptibility to CTL Killing, *J. Immunol.* 177(8):5088-97, 2006
- [0612] Ziegler A, Coulie PG, Uchanska-Ziegler B: Monoclonal and recombinant antibodies with T cell receptor-like reactivity, *Recent Results Cancer Res.* 176:229-41, 2007
- [0613] Oren R, Hod-Marco M, Haus-Cohen M, et al.: Functional comparison of engineered T cells carrying a native TCR versus TCR-like antibody-based chimeric antigen receptors indicates affinity/avidity thresholds, *J. Immunol.* 193:5733-43, 2014
- [0614] Scott RB, Jamie R, James M: Have we cut ourselves too short in mapping CTL epitopes? *Trends in Immunology* 27:11-16, 2006
- [0615] Stewart-Jones GB, McMichael AJ, Bell JI, et al.: A structural basis for immunodominant human T cell receptor recognition, *Nat. Immunol.* 4:657-63, 2003
- [0616] Garboczi DN, Ghosh P, Utz U, et al.: Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2, *Nature* 384:134-41, 1996
- [0617] Ding YH, Smith KJ, Garboczi DN, et al.: Two human T cell receptors bind in a similar diagonal mode to the HLA-A2/Tax peptide complex using different TCR amino acids, *Immunity* 8:403-11, 1998
- [0618] Chen JL, Stewart-Jones G, Bossi G, et al.: Structural and kinetic basis for heightened immunogenicity of T cell vaccines, *J. Exp. Med.* 201:1243-55, 2005

- [0619] Borbulevych OY, Piepenbrink KH, Gloor BE, et al.: T cell receptor cross-reactivity directed by antigen-dependent tuning of peptide-MHC molecular flexibility, *Immunity* 31:885-96, 2009
- [0620] Borbulevych OY, Piepenbrink KH, Baker BM: Conformational melding permits a conserved binding geometry in TCR recognition of foreign and self-molecular mimics, *J. Immunol.* 186:2950-8, 2011
- [0621] Gras S, Saulquin X, Reiser JB, et al.: Structural bases for the affinity-driven selection of a public TCR against a dominant human cytomegalovirus epitope, *J. Immunol.* 183:430-7, 2009
- [0622] Simpson AA, Mohammed F, Salim M et al.: Structural and energetic evidence for highly peptide-specific tumor antigen targeting via allo-MHC restriction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108(52):21176-81, 2011
- [0623] Altman JD, Davis MM: MHC-peptide tetramers to visualize antigen-specific T cells, *Curr. Protoc. Immunol.* Chapter 17:Unit 17 3, 2003
- [0624] Tomimatsu K, Matsumoto SE, Yamashita M, et al.: Production of human monoclonal antibodies against Fc(epsilon)RI(alpha) by a method combining in vitro immunization with phage display, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73:1465-9, 2009
- [0625] Brischwein K, Schlereth B, Guller B, et al.: MT110: a novel bispecific single-chain antibody construct with high efficacy in eradicating established tumors, *Mol. Immunol.* 43:1129-43, 2006
- [0626] Madden DR, Garboczi DN, Wiley DC: The antigenic identity of peptide-MHC complexes: a comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2, *Cell* 75:693-708, 1993
- [0627] Thorpe IF, Brooks CL, 3rd: Molecular evolution of affinity and flexibility in the immune system, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 104:8821-6, 2007
- [0628] Maloney DG, Grillo-LoAJ, White CA et al.: IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma, *Blood* 90(6):2188-95, 1997
- [0629] Donermeyer DL, Weber KS, Kranz DM, Allen PM, 2006, The study of high-affinity TCRs reveals duality in T cell recognition of antigen: specificity and degeneracy, *J. Immunol.* 177(10):6911-9
- [0630] Xu, H, Cheng M, Guo H, Chen Y, Huse M, and Cheung NK, 2015, Retargeting T cells to GD2 pentasaccharide on human tumors using Bispecific humanized antibody, *Cancer Immunol. Res.* 3(3):266-77.

균등률

- [0632] 청구항 요소를 변형하기 위해 청구범위에서 "제1", "제2", "제3" 등과 같은 서수 용어를 사용하는 것은 그 자체로 다른 것에 비해 하나의 청구항 요소의 임의의 우선권, 우선 순위 또는 방법의 동작들이 수행되는 시간 순서를 암시하지 않지만, 특정 명칭을 갖는 하나의 청구항 요소를 단지 동일한 명칭을 갖는 (그러나 상기 서수 용어를 사용하는 경우) 다른 요소와 구별하기 위한 표지로서 사용되어서 청구항 요소들과 구별한다.
- [0633] 본 명세서 및 청구범위에 사용된 바와 같이, "a" 및 "an"이라는 문구는 반대로 명백히 지시되지 않는 한 복수의 대상을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 그룹의 하나 이상의 구성원 사이에 "또는"을 포함하는 청구범위 또는 설명은 달리 문맥상 그 반대로 지시되거나 명백하지 않는 한, 그룹 구성원 중 하나, 둘 이상, 또는 전부가 주어진 제품 또는 공정에 존재하거나, 사용되거나, 또는 관련이 있는 경우 만족되는 것으로 간주된다. 본 발명은 그룹의 정확히 하나의 구성원이 주어진 제품 또는 공정에 존재하거나, 사용되거나, 관련이 있는 실시예를 포함한다. 본 발명은 또한 하나 이상의 그룹 구성원 또는 전체 그룹 구성원이 주어진 제품 또는 공정에 존재하거나, 사용되거나, 관련이 있는 실시예를 포함한다. 또한, 달리 명시되지 않는 한 또는 모순 또는 불일치가 발생한다는 것이 당업자에게 명백하지 않는 한, 본 발명은 열거된 청구항들 중 하나 이상으로부터, 하나 이상의 제한들, 요소들, 절들, 설명적인 용어들 등이 동일한 기본 청구항에 종속하는 다른 청구항들 (또는 관련이 있는, 임의의 다른 청구항)에 도입되는 모든 변형, 조합 및 순열을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 요소들이 목록으로 제시되는 경우 (예, 마크쉬 그룹 또는 유사한 형식), 요소들의 각각의 하위 그룹도 개시되며, 그룹에서 모든 요소(들이)이 제거될 수 있음을 이해해야 한다. 일반적으로, 본 발명, 또는 본 발명의 측면들이, 특정 요소들, 특징들을 포함하는 것으로 언급되는 경우, 본 발명의 소정의 실시예들 또는 본 발명의 측면들은, 그러한 요소들, 특징들 등으로 구성되거나, 필수적으로 구성되는 것으로 이해해야 한다. 단순화를 위해, 이들 실시예들은 모든 경우에 본원에 그렇게 많은 단어로 구체적으로 설명되지는 않았다. 또한, 본 발명의 임의의 실시예 또는 측면은

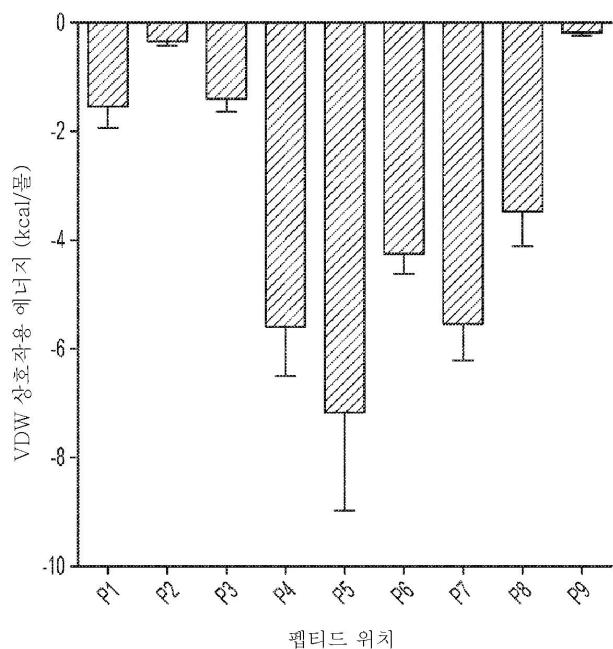
특이한 배제가 본 명세서에 인용되는지 여부에 관계없이, 청구범위로부터 명시적으로 배제될 수 있음을 이해해야 한다. 본 발명의 배경을 설명하고 그 실시에 관한 추가 세부 사항을 제공하기 위해 본원에서 언급된 공개문현들, 웹사이트들 및 기타 참고 자료들은 본원에 참고로 포함된다.

[0634]

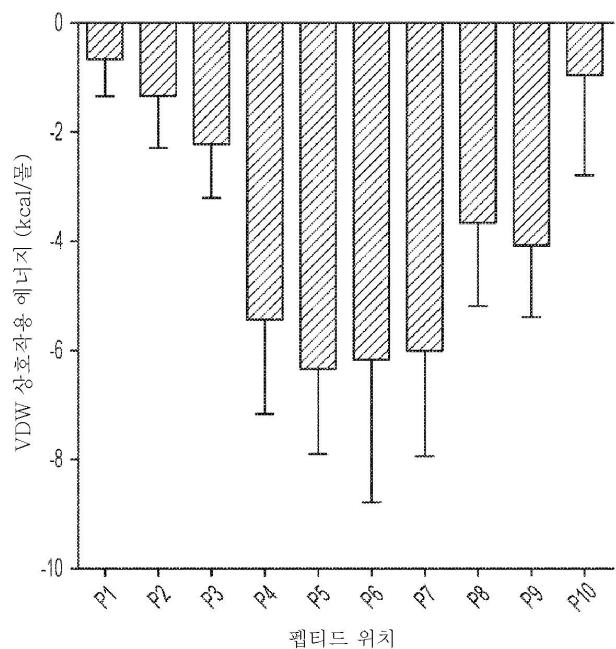
따라서, 본 발명의 적어도 하나의 실시예의 여러 측면을 설명하였으므로, 당업자라면 다양한 변경, 변형 및 개선이 용이하다는 것을 알 수 있을 것이다. 이러한 변경, 변형 및 개선은 이 개시물의 일부로서 의도되며, 본 발명의 사상 및 범위 내에 있는 것으로 의도된다. 따라서, 전술한 설명 및 도면들은 단지 예시하기 위한 것이며, 본 발명은 하기 청구범위에 의해 상세하게 설명된다.

도면

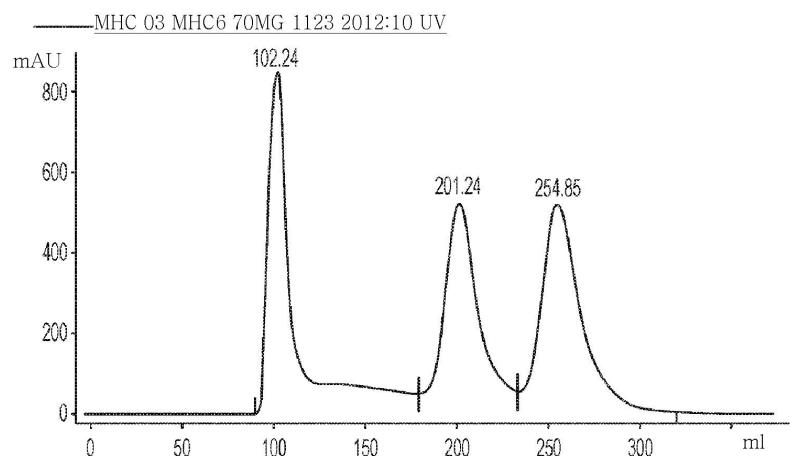
도면1



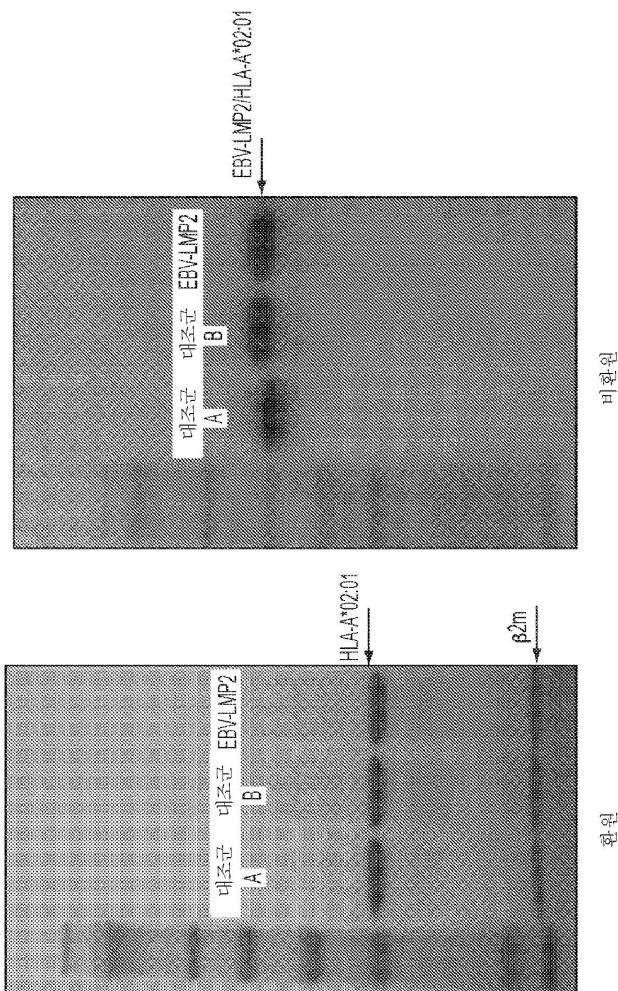
도면2



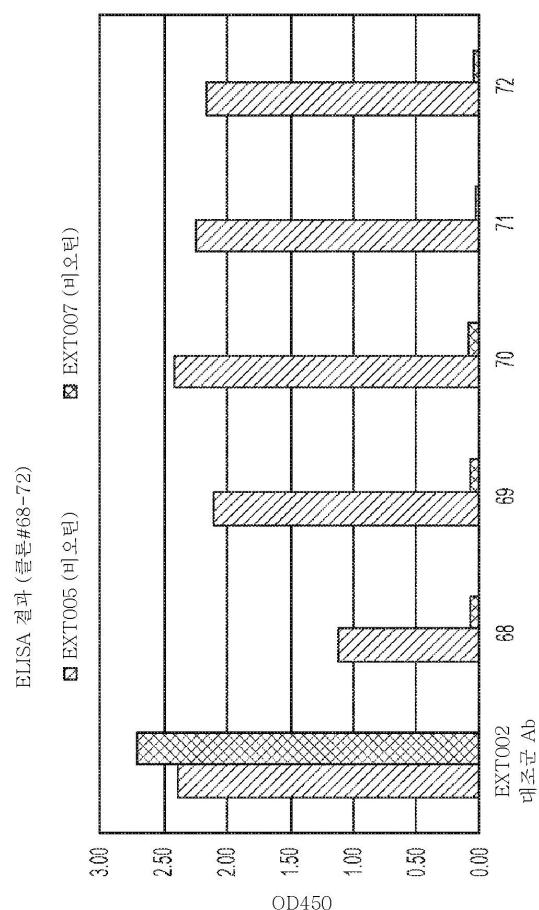
도면3



도면4



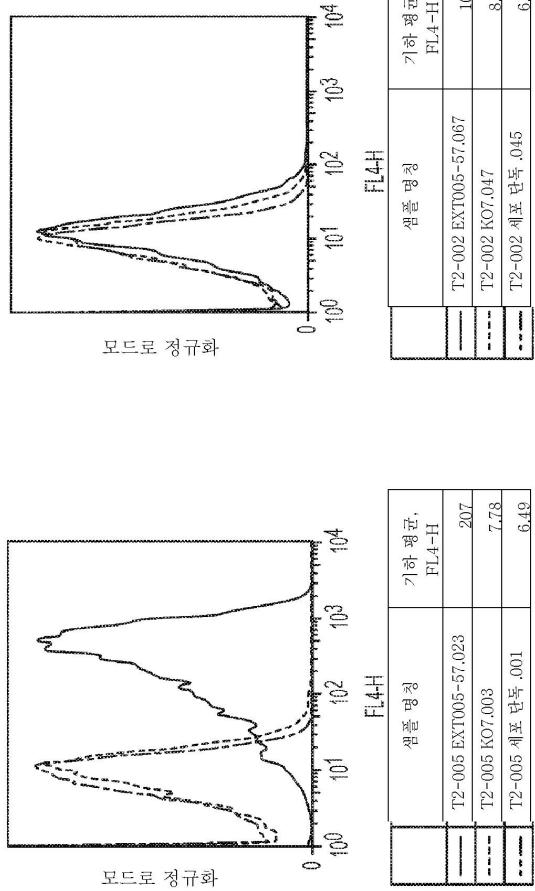
도면5



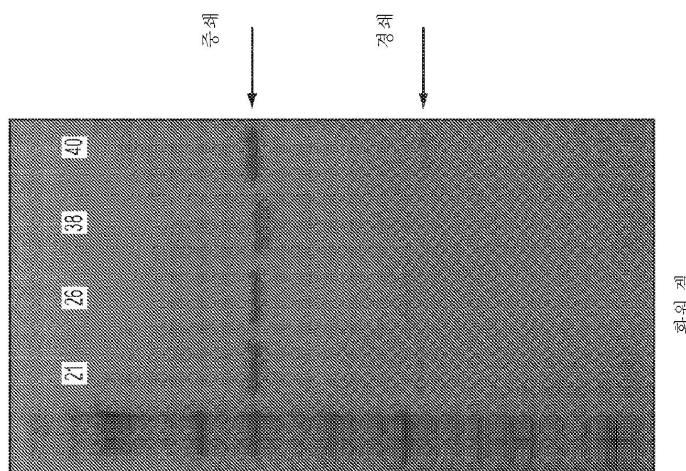
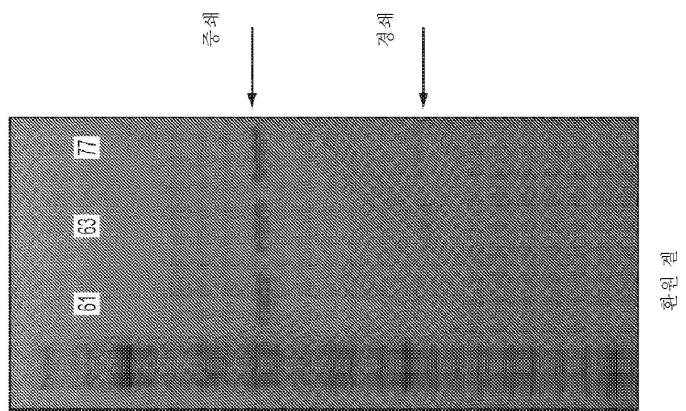
도면6

대조군 펩티드 로딩된 T2 세포주

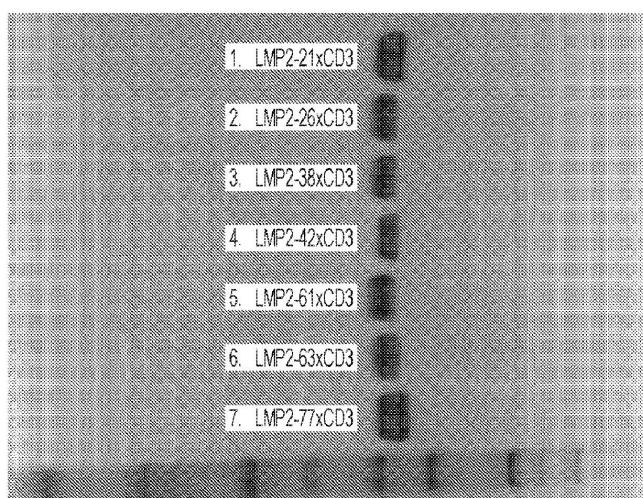
EBV-LMP2(CLG) 펩티드 로딩된 T2 세포주



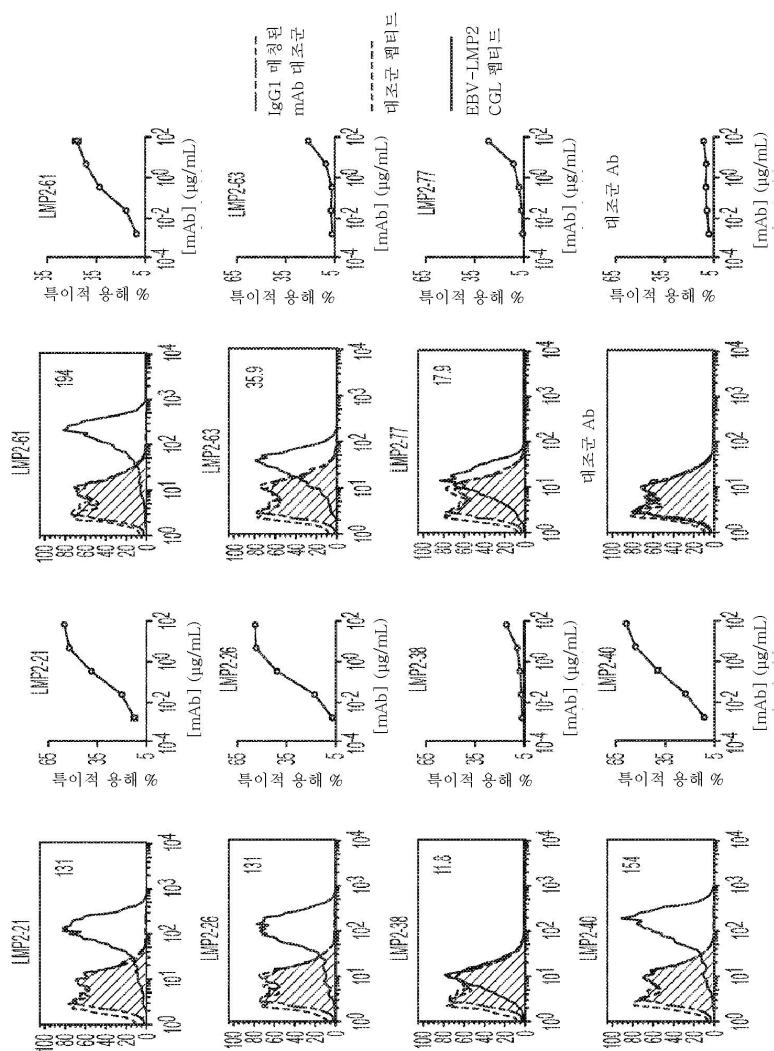
도면7



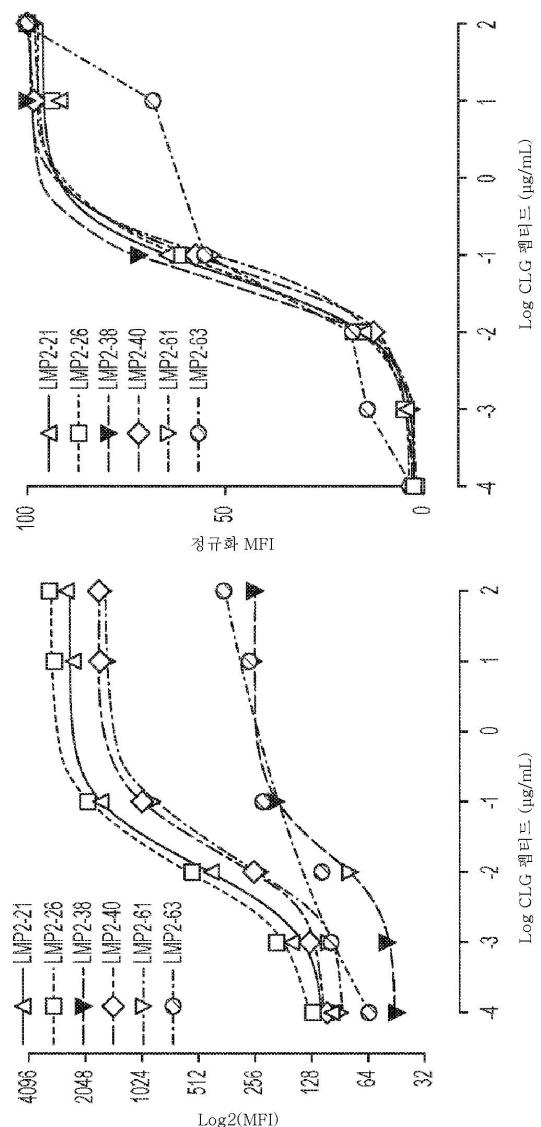
도면8



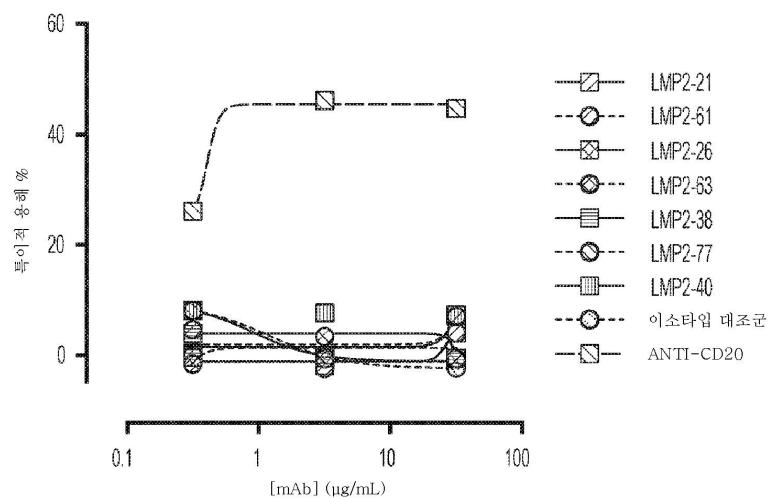
도면9



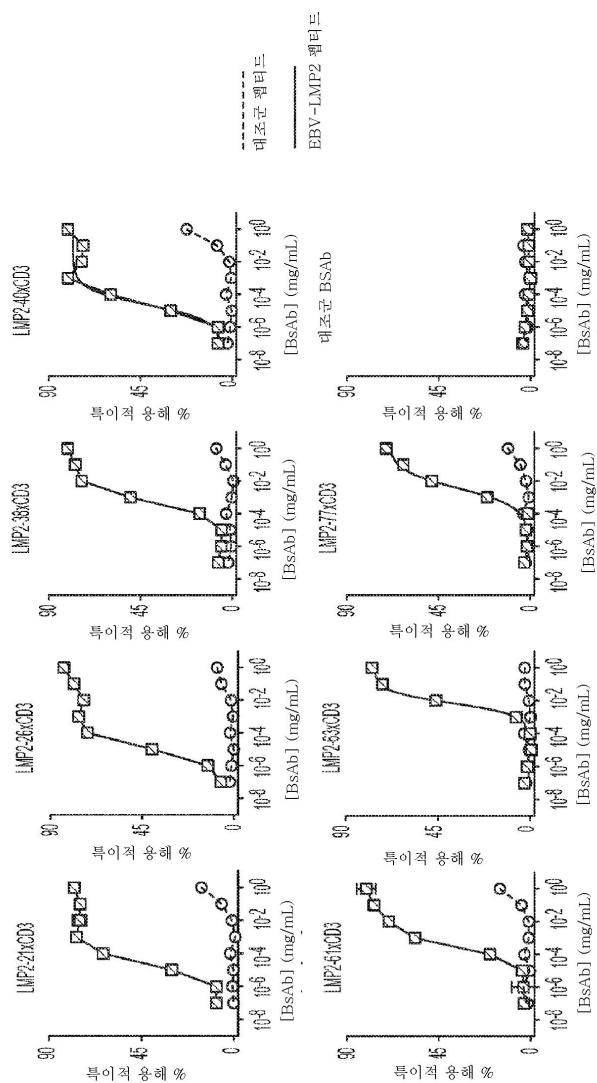
도면10



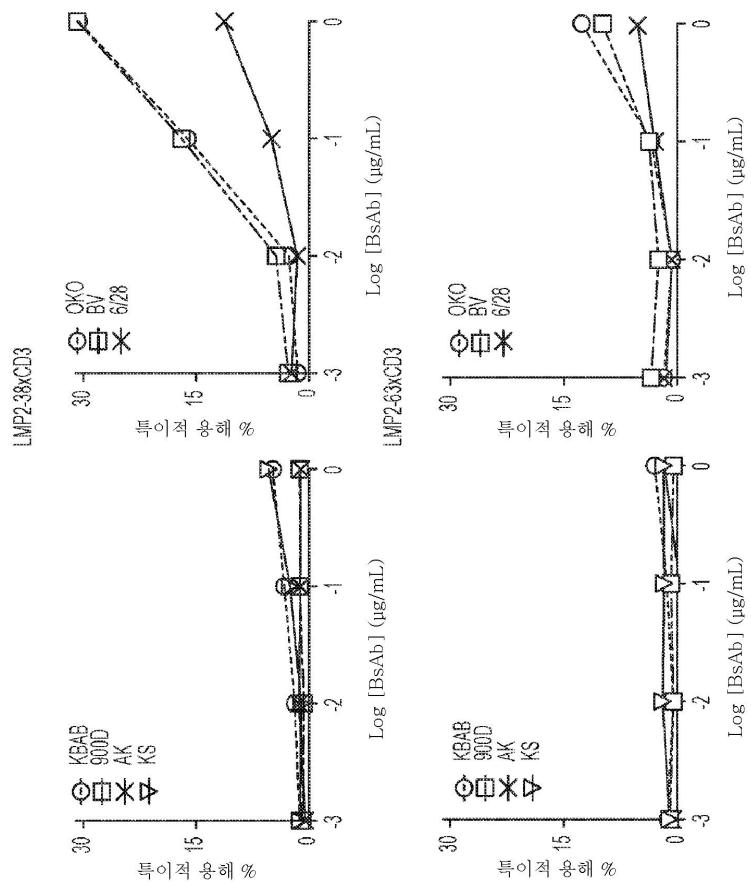
도면11



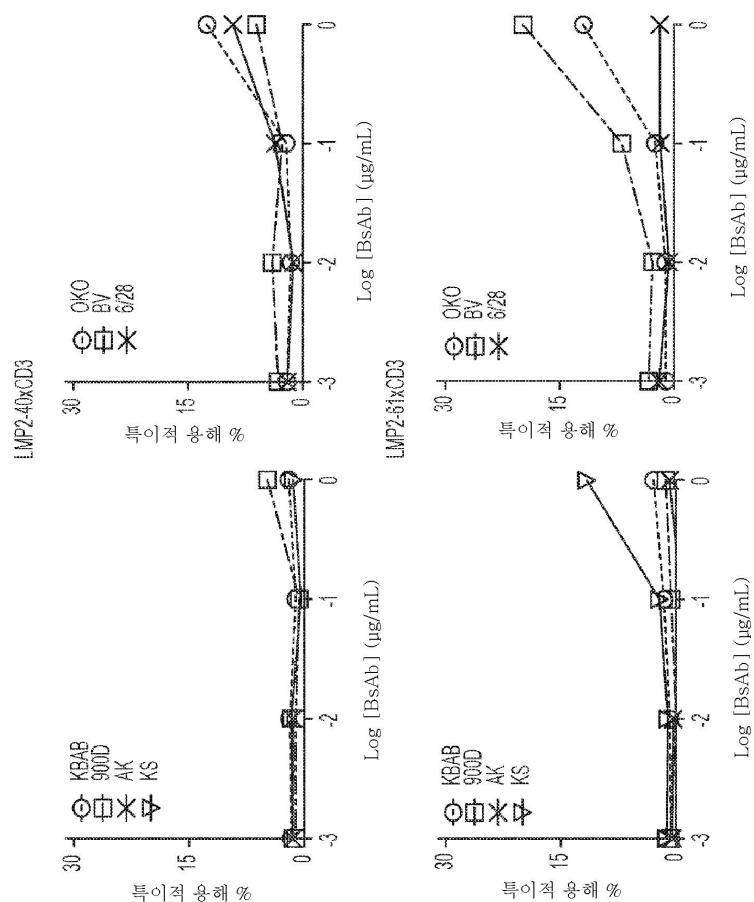
도면12



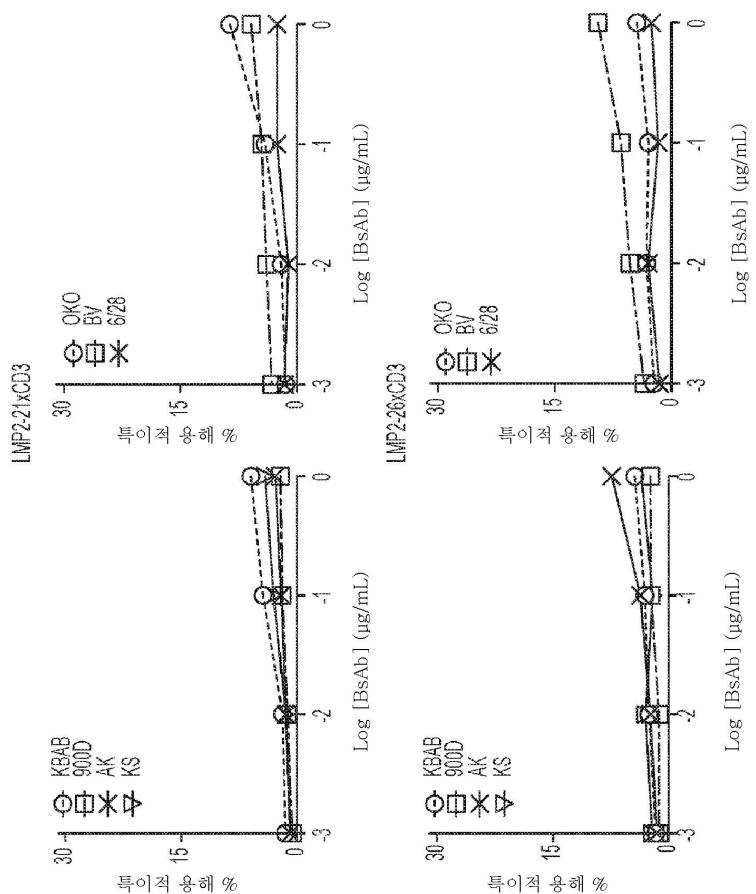
도면13a



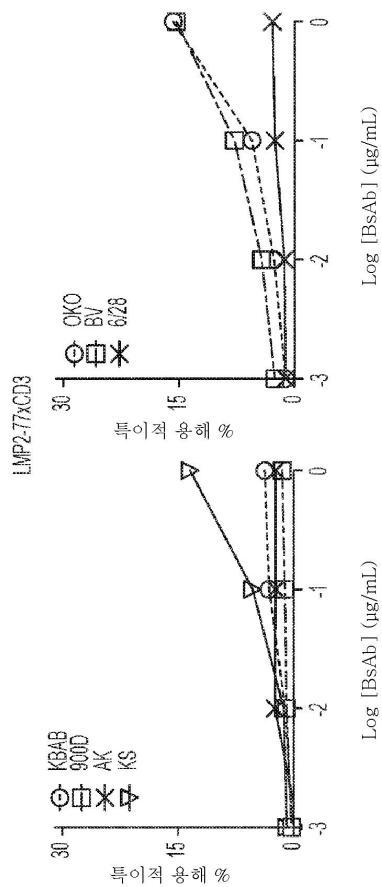
도면13b



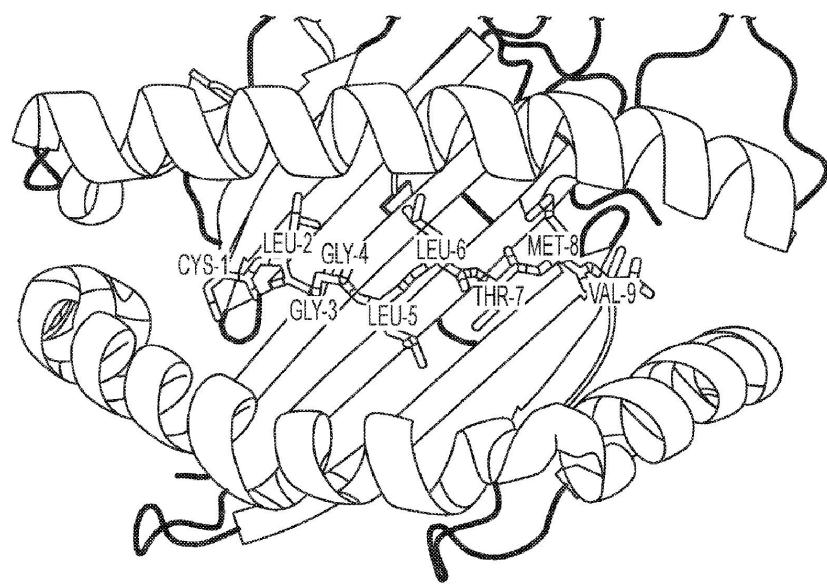
도면13c



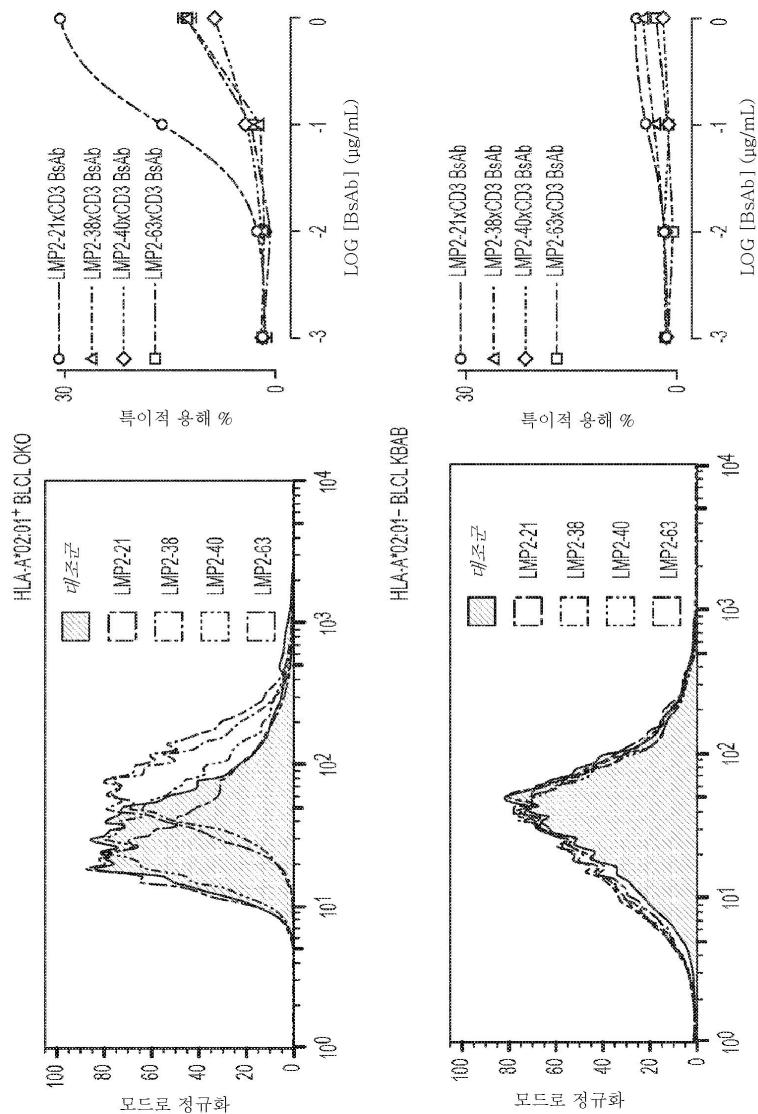
도면13d



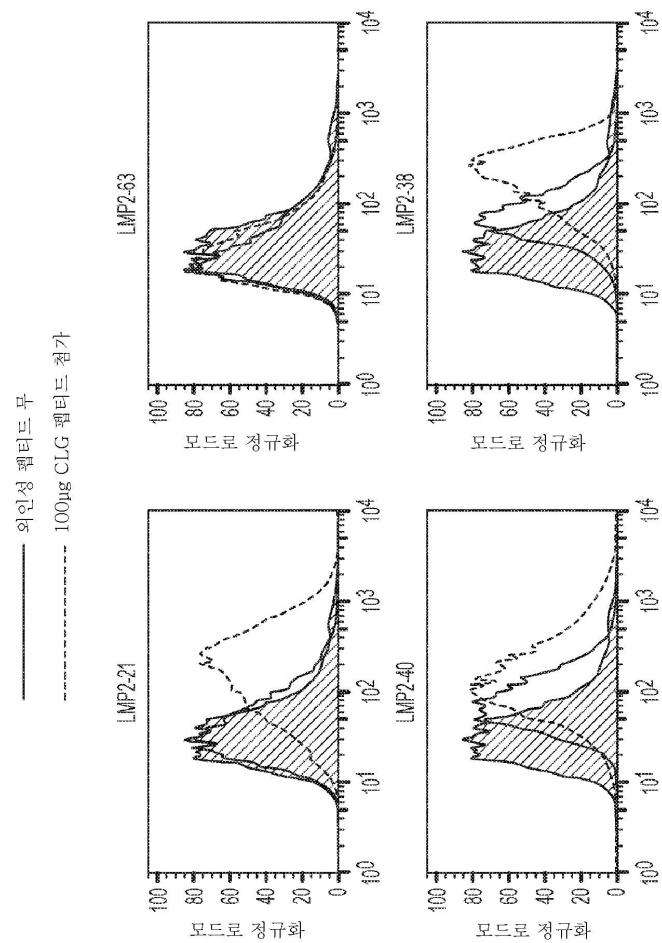
도면14



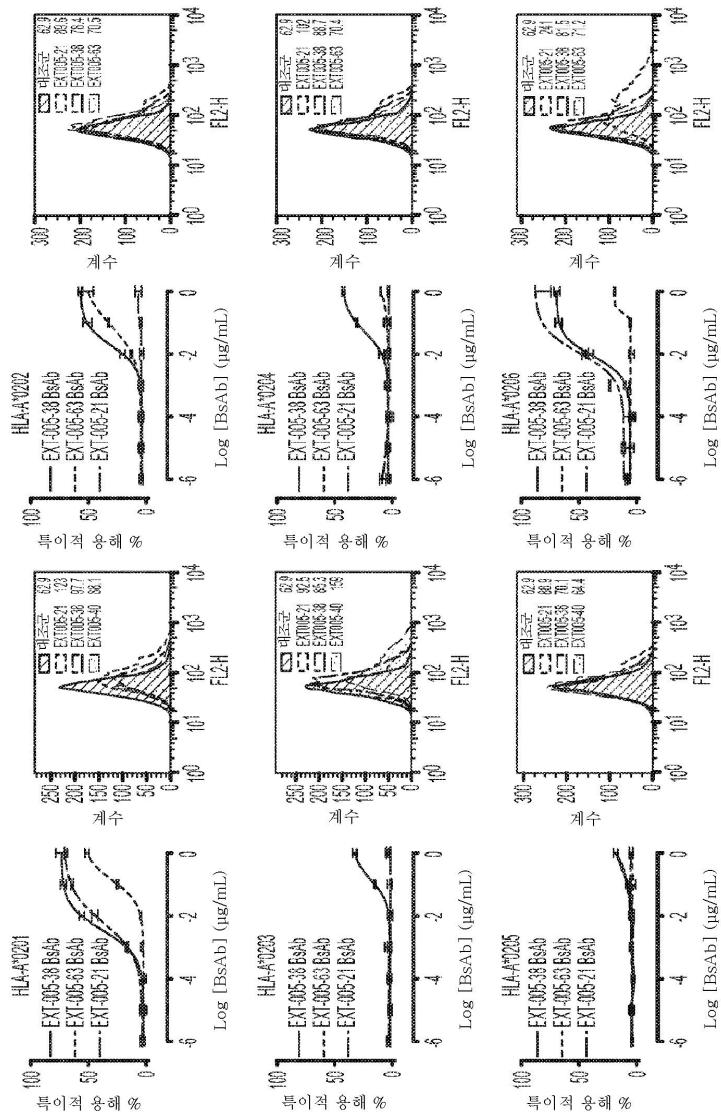
도면15



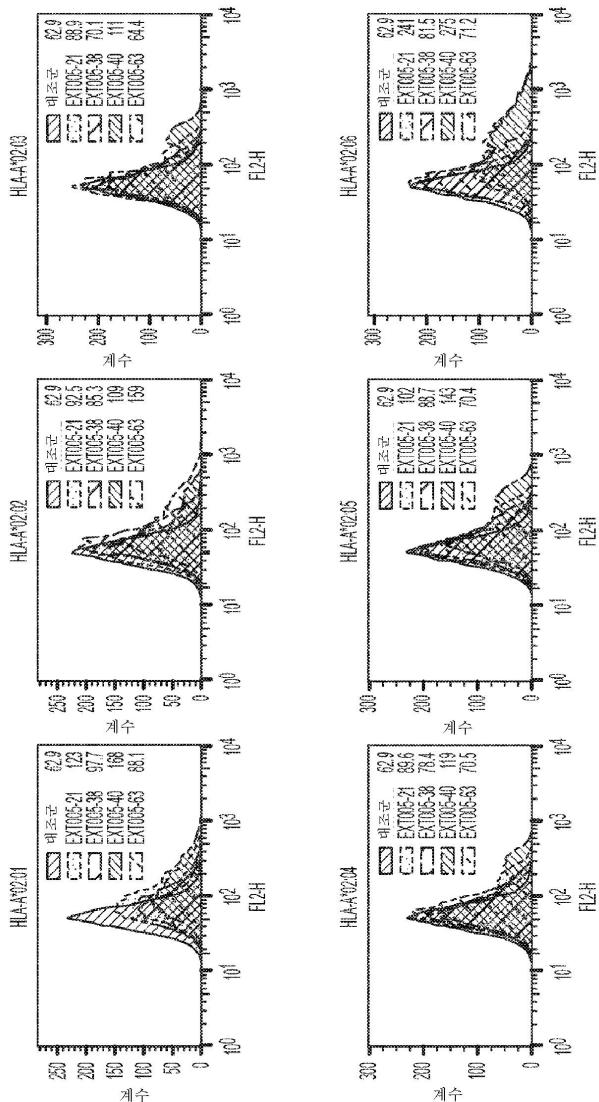
도면16



도면17



도면18

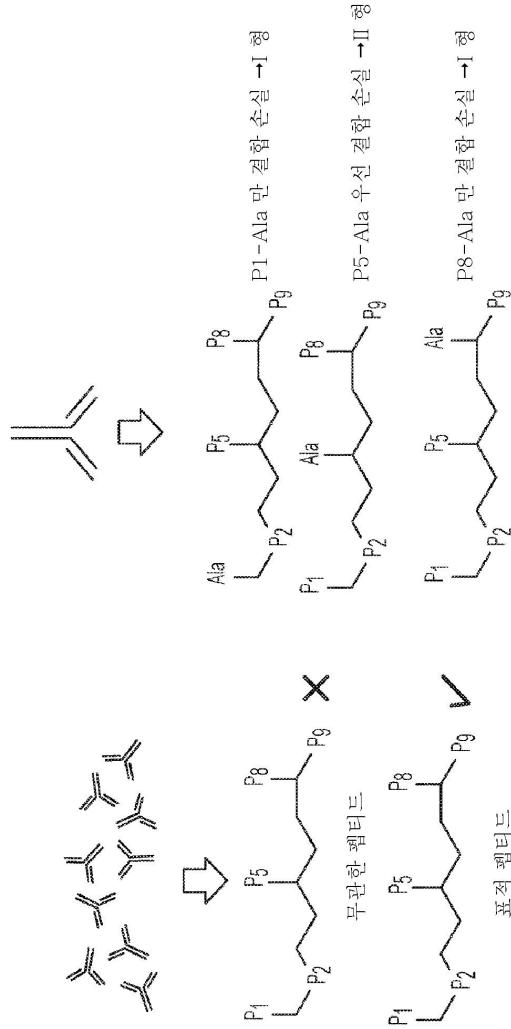


도면19

전략 1. 위치 P1, P5, 및 P8에서 Ala-치환된 펩티드를 사용하여 스크리닝

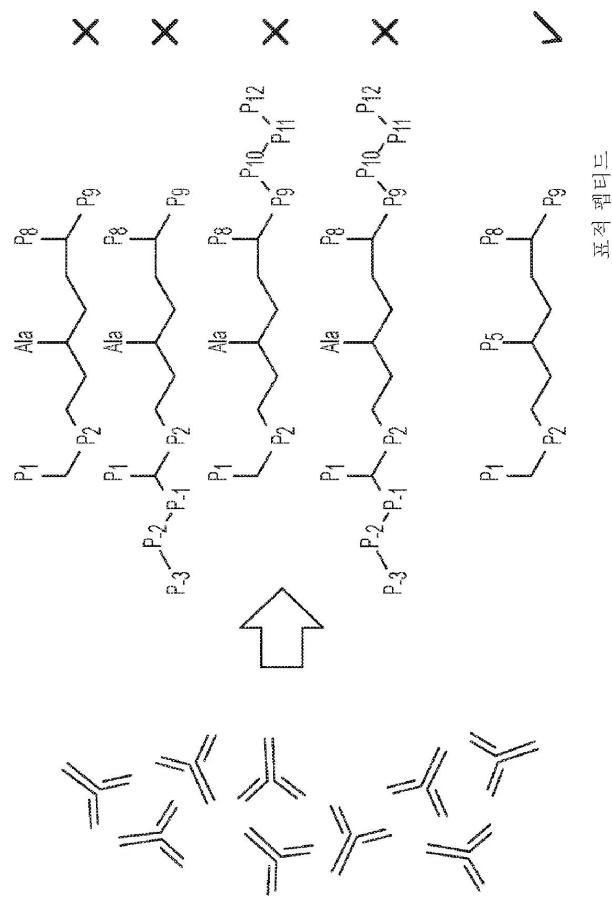
1 단계. 판상의 표적-펩티드/MHC 복합체에
결합하지만, 무관한-펩티드/MHC 복합체에
결합하지 않는 항체 선별

2 단계. 위치 P1, P5, 또는 P8에서 Ala-치환된
펩티드를 사용하여 I 형 또는 II 형 특이성 결정하기
위해 특이성 스크리닝



도면20

전략 2. 펩티드의 N- 또는 C-말단에 이ing 천연 잔기를 갖는 P5에서 Ala-치환된 펩티드를 사용하여 음성선택



표적 페터드

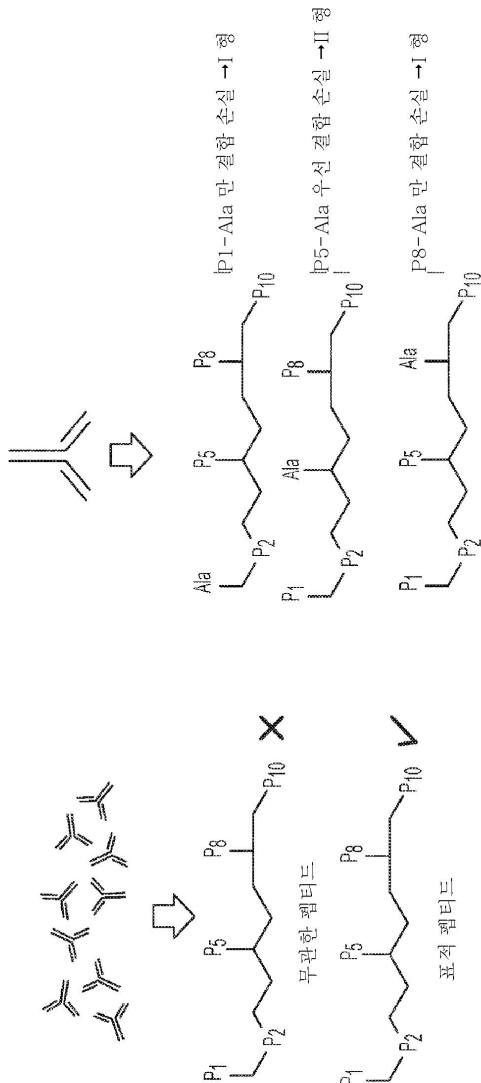
- 92 -

도면21

전략 3. 10 락체의 위치 P1, P5, 및 P8에서 Ala-치환된 펩티드를 사용하여 스크리닝

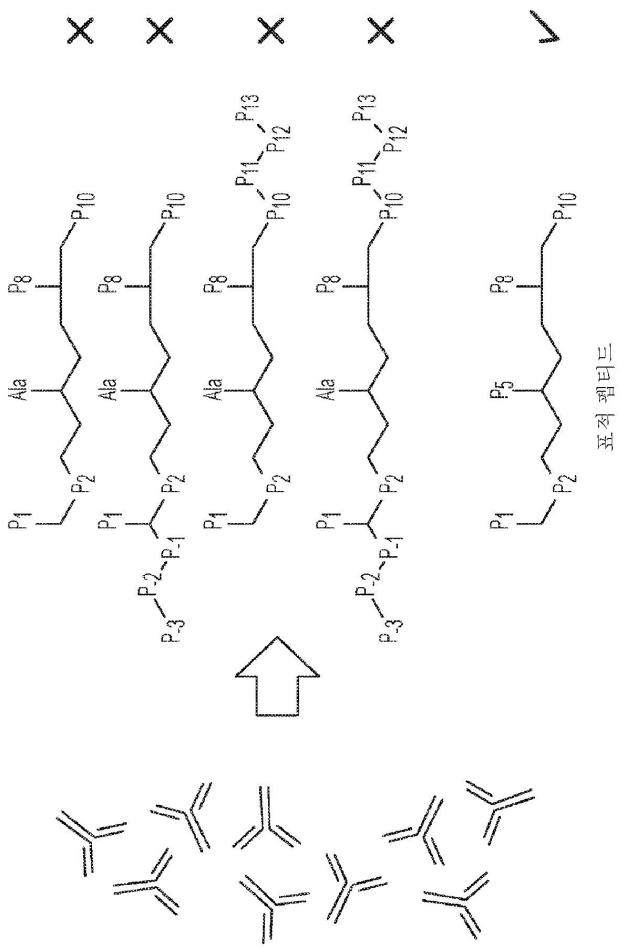
1 단계. 관상의 표적-펩티드/MHC 복합체에 결합하지만, 무관한-펩티드/MHC 복합체에 결합하지 않는 항체 선별

2 단계. 위치 P1, P5, 또는 P8에서 Ala-치환된 펩티드를 사용하여 I 형 또는 II 형 특이성 결정하기 위해 특이성 스크리닝

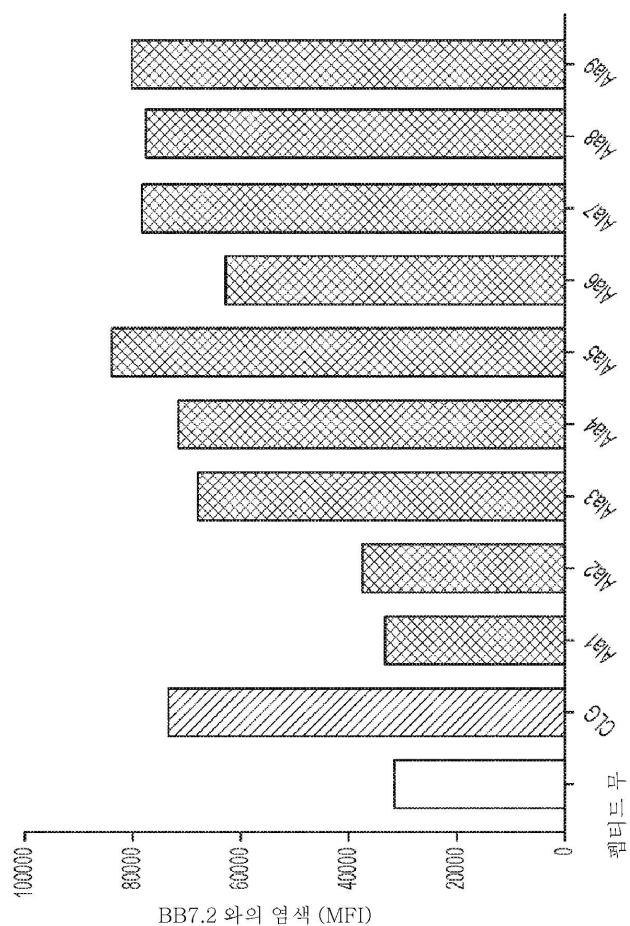


도면22

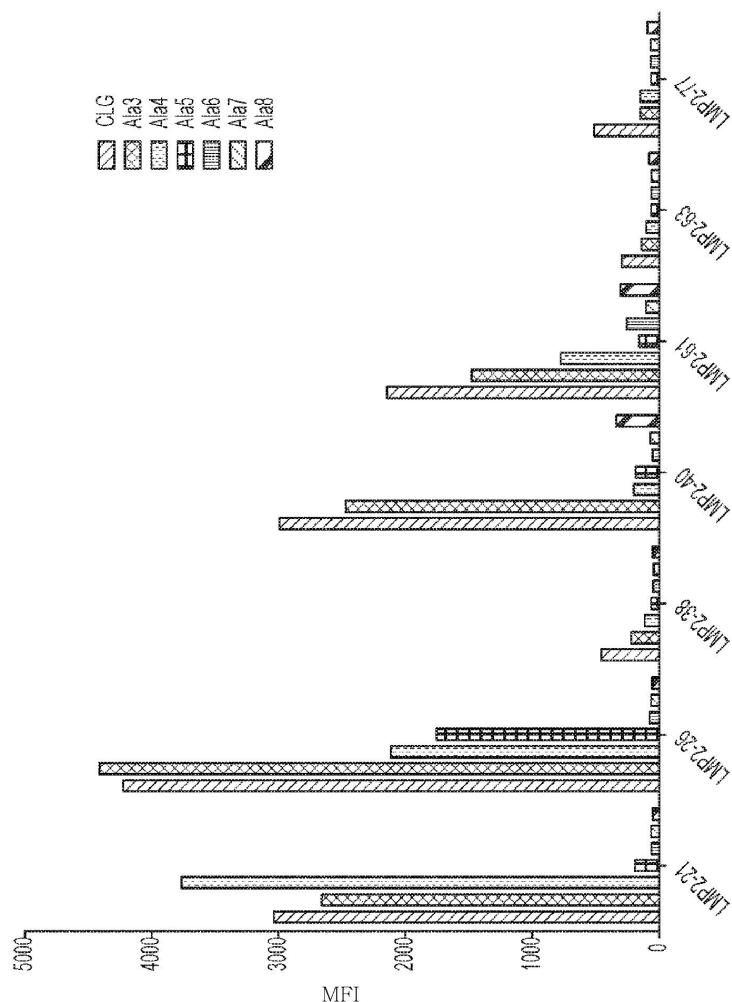
전략 4. 펩티드 10 랑체의 N- 또는 C-말단에 있는 천연 잔기(+)를 갖는 P5에 서 Ala-치환된 펩티드를 사용하여 음성적 선박



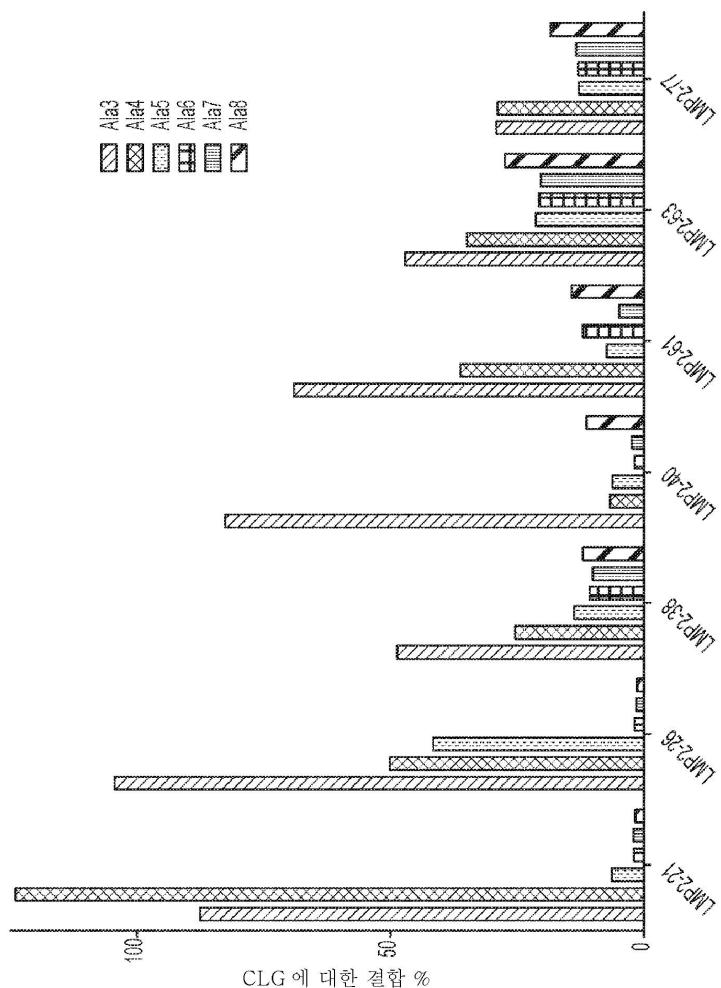
도면23



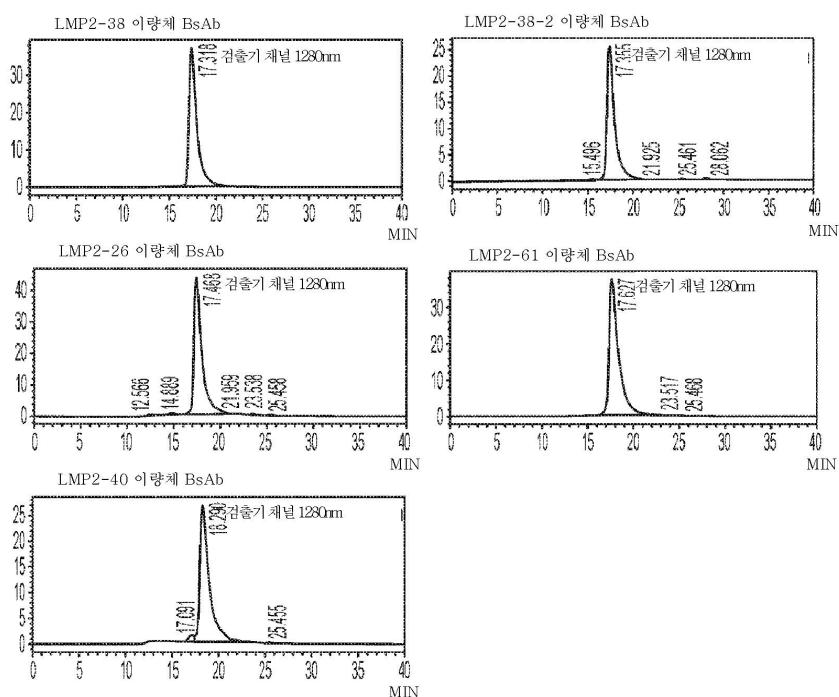
도면24a



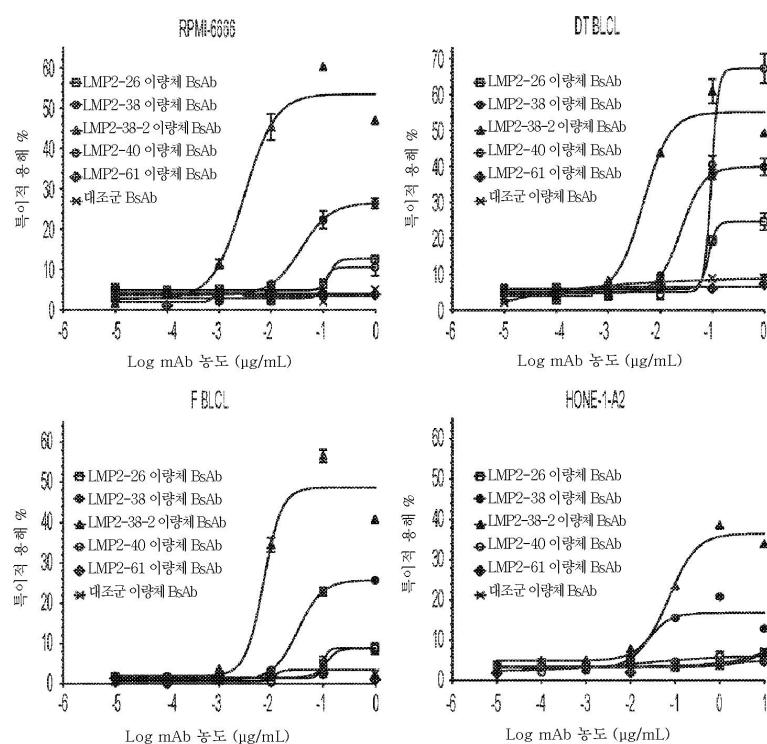
도면24b



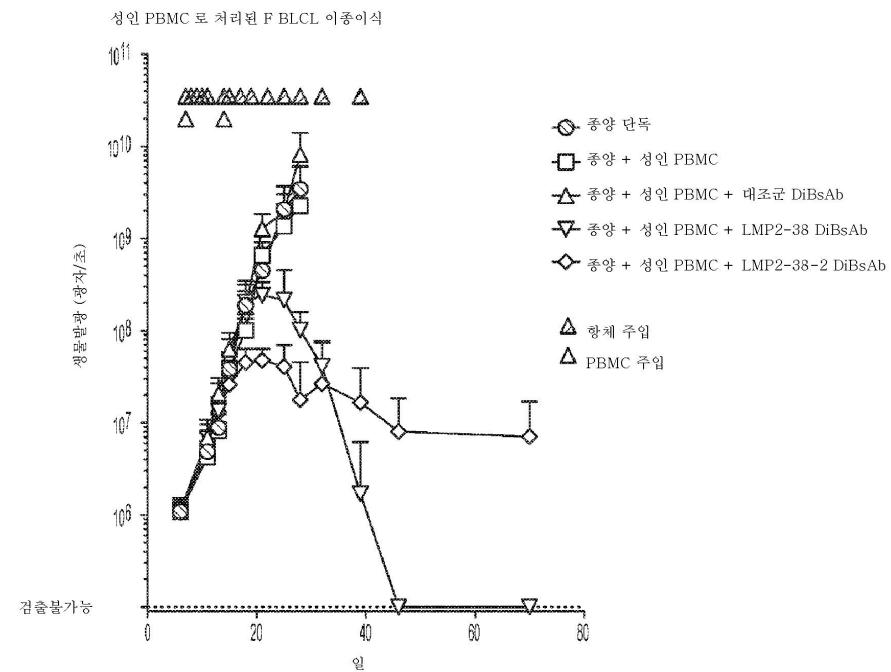
도면25



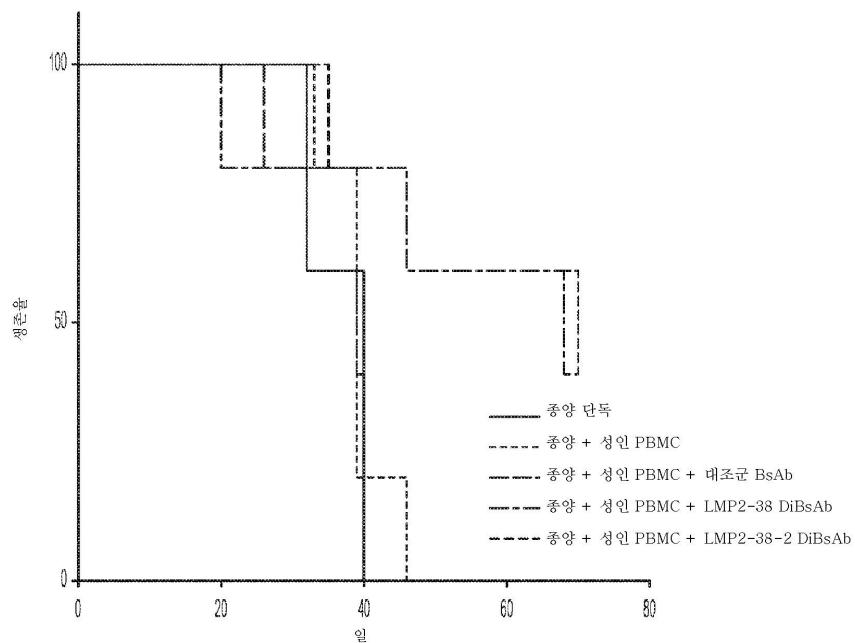
도면26

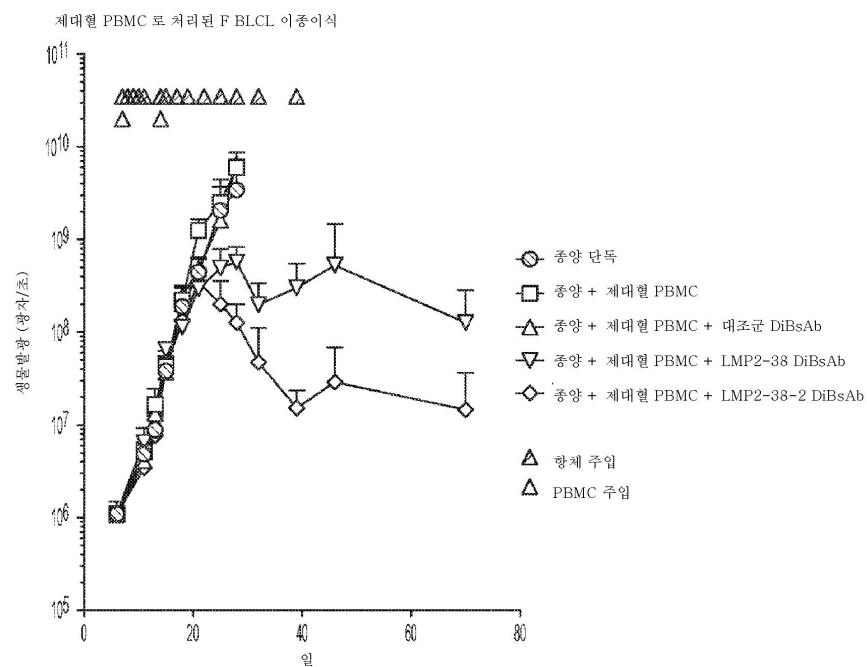
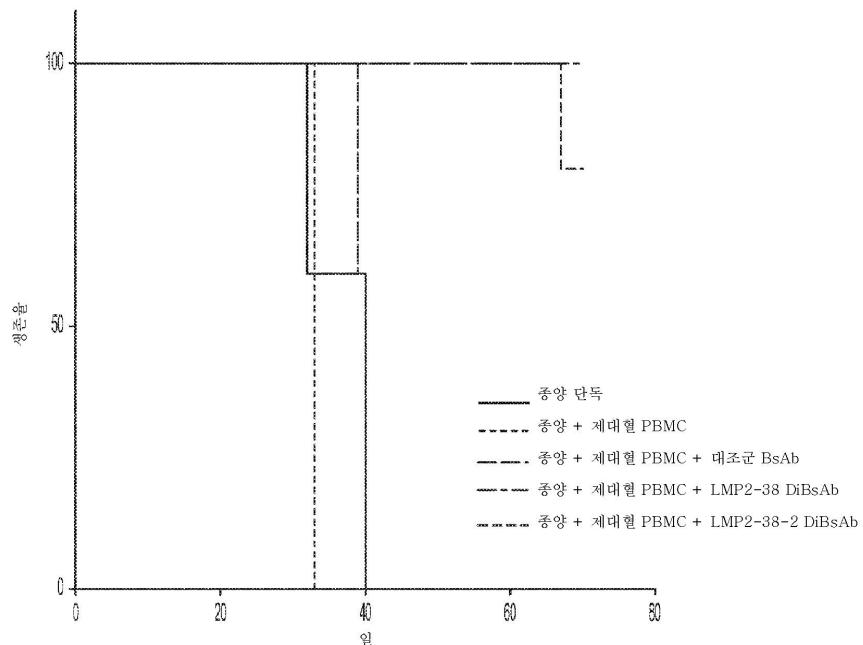


도면27



도면28



도면29**도면30****서 열 목 록**

SEQUENCE LISTING

<110> MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER CENTER

EUREKA THERAPEUTICS, INC.

<120> T CELL RECEPTOR-LIKE ANTIBODY AGENTS SPECIFIC FOR EBV LATENT

MEMBRANE PROTEIN 2A PEPTIDE PRESENTED BY HUMAN HLA

<130> 2003080-1132

<140> PCT/US2016/036735

<141> 2016-06-09

<150> 62/173,330

<151> 2015-06-09

<160> 144

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

EBV LMP2 peptide

<400> 1

Cys Leu Gly Gly Leu Leu Thr Met Val

1 5

<210> 2

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-21 LCVR polynucleotide

<400> 2

acctatgagc tgactcagcc accctcagtg tcagtggccc caggagagac ggccaggatt 60

acctgtgggg gaaaacaacat tggaggcaaa agtgtgcact ggtaccagca gaagccaggc 120

caggccccctg tactggtcat ctcttatgt agcgaccggc ctcaggat ccctgagcga 180

atctccggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaagccgg 240

gatgaggccg actattactg tcaggtgtgg gatagtagta gtgatcattg ggtttcgcc 300

ggagggacca agctgaccgt cctaggt 327

<210> 3

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-21 LCVR polypeptide

<400> 3

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

1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Gly Lys Ser Val

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Ser

35 40 45

Tyr Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Ile Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His

85 90 95

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

100 105

<210> 4

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-21 HCVR polynucleotide

<400> 4

taggtccagc tggtgcaagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggta 60

tcctgcagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgcacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatggaaagg atcatcccta tccttggtat agcaaactac 180

gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggaca aatccacgag cacagctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgcccattt attactgtgc gcgcgggtct 300

taccatcagc attcttactc tgatgtttgg ggtcaaggta ctctggtgac cgtctcccta 360

<210> 5

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-21 HCVR polypeptide

<400> 5

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Ser Tyr His Gln His Ser Tyr Ser Asp Val Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 6

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-26 LCVR polynucleotide

<400> 6

acctatgtgc tgactcagcc accctcagtc tcagtggccc cagaaagac ggccagagt 60

acctgtgggg gaaataagat tggaagcaaa catgtgcact ggtaccaaca caaggcaggc 120

caggccctg ttttgtcat ctattataat actgaccggc cctcgggat ccctgagcga 180

atctctggct ccaactctgg ggacacggcc accctgacca tcaccgggt cgaggccgc
 gatgaggccg actattactg tcaggtgtgg gatagtagtt atgatcatgt gatattcgcc
 ggagggacca agctgaccgt cctaggt

<210> 7

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-26 LCVR polypeptide

<400> 7

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

1 5 10 15

Thr Ala Arg Val Thr Cys Gly Gly Asn Lys Ile Gly Ser Lys His Val

20 25 30

His Trp Tyr Gln His Lys Ala Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Tyr Asn Thr Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Ile Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Glu Ala Gly

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Tyr Asp His

85 90 95

Val Ile Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

100 105

<210> 8

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-26 HCVR polynucleotide

<400> 8

aagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag gtcttgagtg gatgggaagg atcatcccta tccttggtat agcaaactac 180
 gcacagaagt tccaggccag agtacgatt accgcggaca aatccacgag cacagctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtat attactgtgc gcgctttac 300
 ccgcgttact ctggttggga ttactgggtt caaggtactc tggtaccgt ctcctca 357
 <210> 9
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-26 HCVR polypeptide

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Ala Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Tyr Pro Leu Tyr Ser Gly Trp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 10

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-38 LCVR polynucleotide

<400> 10

aaatctggcc	tgactcagcc	tgcctccgtg	tctgggtctc	caggacagtgc	gatcaccatc	60
tcctgcactg	gaaccagcag	tgacgttgg	agtataacg	atgtctcctg	gtaccaaca	120
caccaggca	aagccccaa	actcatgatt	tatgatgtca	gtaatcgcc	ctcagggtt	180
tctaattcgct	tctctggctc	caagtctggc	aacacggcct	ccctgaccat	ctctggctc	240
caactgagg	acgaggctga	ttattactgc	aactcatata	caagcagcaa	cacttatgtc	300

ttcggaaactg	ggaccaaggt	caccgtccta	ggt	333
-------------	------------	------------	-----	-----

<210> 11

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-38 LCVR polypeptide

<400> 11

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

1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr

20 25 30

Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu

65 70 75 80

Gln Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Tyr Thr Ser Ser

85 90 95

Asn Thr Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly

100 105 110

<210> 12

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-38 HCVR polynucleotide

<400> 12

taggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgcaggtt	60
tcctgcaggc catctggata cacaatcacc tcctactata tgcactgggt gcgacaggcc	120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggagta atcaacccta atgctggcag cacaagatac	180
gcacagaaat tccagggcag agtaccatg agcactgaca cgtccacgag cacagtctac	240

atggcgctga gtagtctgag atctgacgac actgccgtgt attactgtgc gcgcggtatg	300
taccgtatgt acgattgggg tcaaggtact ctggtgaccg tctcctca	348

<210> 13

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-38 HCVR polypeptide

<400> 13

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

1 5 10 15

Ser Val Gln Val Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Thr Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Asn Pro Asn Ala Gly Ser Thr Arg Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Ser Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Met Tyr Arg Met Tyr Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 14

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-40 LCVR polynucleotide

<400> 14

aagctgtgt tgactcagcc accctcagtg tcagtggccc caggagagac ggccagaatt	60
acctgtgggg gaaacaacat tggaagtaga agtgtgcact ggtaccagca gaaggcaggc	120

caggccctg ttctggcat ctcttataat aacgaccggc cctcaggat ccctgagcga	180
atctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaagccggg	240
gatgaggccg actttactg tcaggtgtgg gatagtattt gtgaccatta tgtttcgga	300
actgggacca aggtcacccgt ccttaggt	327

<210> 15

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-40 LCVR polypeptide

<400> 15

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Arg Ser Val

20	25	30
----	----	----

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Ser

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly

65	70	75	80
----	----	----	----

Asp Glu Ala Asp Phe Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ile Ser Asp His

85 90 95

Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly

100 105

<210> 16

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-40 HCVR polynucleotide

<400> 16

taggtgcagc tggggctgag gtgaagaaac ctgggtccctc ggtgaaggtc	60
---	----

gcctgcaagg gttctggagg caccttcagc aactatcata tcagctgggt gcgacaggcc	120
---	-----

cctggacaag ggcttgagtg gatgggtggg atcatccccca tccttggcac accaaactac	180
--	-----

gcaccgaaat tcctggacag agtacgatt tccggggacg attccacgag cacagcctac	240
--	-----

atggagctga gcagcctcac agctgacgac acggccgtat attactgtgc ggcgggtcg	300
--	-----

acttggtgtt ctggtaactct ggattcttgg ggtcaaggta ctctggtgac cgtctcccta	360
--	-----

<210> 17

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-40 HCVR polypeptide

<400> 17

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Leu Asp Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Asp Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Arg Thr Trp Trp Ser Gly Thr Leu Asp Ser Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 18
 <211> 327
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-61 LCVR polynucleotide

<400> 18
 gcttctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60
 acatgccaag gagacagcct cagaagctat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120
 caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc ctcaggatcccagaccga 180
 ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactgggc tcaggcgaa 240
 gatgaggctg actattactg taactcccg gacagcagt gtaaccatct ggtattcgcc 300
 ggagggacca agctgaccgt cctaggt 327

<210> 19

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-61 LCVR polypeptide

<400> 19
 Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr

35

40

45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser

50

55

60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His

85

90

95

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

100

105

<210>

20

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-61 HCVR polynucleotide

<400> 20

taggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaggc ctggggcctc agtgaaggc	60
tcctgcaagg catctggata caccttacc aactattata tccactgggt gcgacaggcc	120
cctggacaag ggcttgagtg gatggaaaga atcaacccta gtggtgggag cacaattac	180
gcaccgaagt tccaggccag agtaccatcg accaggacaca cgtccacgaa cacagtctac	240
atggaactga gcagcctgag atctgaggac actgccgtgt attactgtgc gcgccttac	300

tacggttcta tggatgcttg gggtaaggt actctggta ccgtctcctc a	351
--	-----

<210> 21

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-61 HCVR polypeptide

<400> 21

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

1 5 10 15

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

20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45
Gly Arg Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Asn 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 Ser Tyr Tyr Gly Ser Met Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 22
<211> 327
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-63 LCVR polynucleotide

<400> 22

tcctatgtgc tgactcagcc accctcggtg tcagtggccc caggaagac ggccagactt	60
acctgtgggg gaaaacaacat tggaaagtgaa agtgtacatt ggtaccagca gaagccaggc	120
caggcccctt tactggtcgt ctatgatgat gacgaccggc cctccggat ccctgagcga	180
ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaggccggc	240
gatgaggccg actattactg tcaggtgtgg gatcgaagta gtgatcattt gttttcggc	300
ggagggacca aggtcacccgt cctaggt	327

<210> 23
<211> 109
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-63 LCVR polypeptide

<400> 23

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

1 5 10 15

Thr Ala Arg Leu Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Glu Ser Val

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Leu Leu Val Val Tyr

35 40 45

Asp Asp Asp Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Arg Ser Ser Asp His

85 90 95

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

100 105

<210> 24

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-63 HCVR polynucleotide

<400> 24

aagggtccagc tggtagtc tggtggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgcaggtt 60

tcctgcaggg catctggata cacaatcacc tcctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggagta atcaacccta atgctggcag cacaagatac 180

gcacagaaat tccagggcag agtcaccatg agcactgaca cgtccacgag cacagtctac 240

atggcgctga gtatgtctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc ggcgcgtgac 300

gtttacaacg gttggatga atgggtcaa ggtactctgg tgaccgtctc ctca 354

<210> 25

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-63 HCVR polypeptide

<400> 25

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

1 5 10 15

Ser Val Gln Val Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Thr Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Asn Pro Asn Ala Gly Ser Thr Arg Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Ser Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Asp Val Tyr Asn Gly Trp Asp Glu Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 26

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-77 LCVR polynucleotide

<400> 26

gcttctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggttc 60

acatgccaag gagacagcct cagaacgcatt tatgcaagg tt ggtaccagca gaagccagga 120

caggccccctc aacttgtcat ctatggtaaa aacaggcgcc cctcaggat cccagacgga 180

ttctctggct ccacctcagg aaacaccgt tccttgacca tcactgggc tcaggcgaa 240

gatgagggtg actattactg taactcccgg cacagcagt gtaatcattg tgtgtttggc 300

ggagggacca agctgaccgt ccttaggt 327

<210> 27

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-77 LCVR polypeptide

<400> 27

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

1 5 10 15

Thr Val Arg Phe Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Thr His Tyr Ala

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Gln Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Gly Lys Asn Arg Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Thr Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu

65 70 75 80

Asp Glu Gly Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg His Ser Ser Gly Asn His

85 90 95

Cys Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

100 105

<210> 28

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-77 HCVR polynucleotide

<400> 28

taggtgcagc tggtgaggc tggccagga ctggtaaac cttcacagac cctgtccctc	60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcacc agtgtaatt actactggag ctggatccgt	120
cagccccag ggaaggggct ggagtgatt ggggagatca atcatagcgg aagcccaag	180
tacaatccgt ccctcaagag tcgagtacc atatcagaag acacgtcccg gaaccagttc	240

tccctgaagc tgagcttgt gaccggcg gacacggccg tgtattactg tgcgcgccag 300
 tc ttcttacg gtggttacat agatcagtgg ggtcaaggta ctctggtgac cgttcctca 360
 <210> 29
 <211> 120
 <212> PRT
 <213>

Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-77 HCVR polypeptide

<400> 29

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln
1															
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Thr	Ser	Gly
Asn	Tyr	Tyr	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Leu	Glu	
35															

Trp	Ile	Gly	Glu	Ile	Asn	His	Ser	Gly	Ser	Pro	Lys	Tyr	Asn	Pro	Ser
50															
Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Glu	Asp	Thr	Ser	Arg	Asn	Gln	Phe
65															
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
85															
Cys	Ala	Arg	Gln	Ser	Ser	Tyr	Gly	Gly	Tyr	Ile	Asp	Gln	Trp	Gly	Gln
100															

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 30

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-21 HCDR1 polynucleotide

<400> 30

ggaggcacct tcagcagcta tgct
<210> 31
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
LMP2-21 HCDR1 polypeptide
<400> 31
Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala

1 5
<210> 32
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
LMP2-21 HCDR2 polynucleotide
<400> 32

atcatcccta tccttggtat agca 24
<210> 33
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
LMP2-21 HCDR2 polypeptide
<400> 33
Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala

1 5
<210> 34
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
LMP2-21 HCDR3 polynucleotide

<400> 34

gcgcgcgtt cttaccatca gcattttac tctgatgtt 39

<210> 35

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-21 HCDR3 polypeptide

<400> 35

Ala Arg Gly Ser Tyr His Gln His Ser Tyr Ser Asp Val

1 5 10

<210> 36

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-26 HCDR1 polynucleotide

<400> 36

ggaggcacct tcagcagcta tgct 24

<210> 37

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-26 HCDR1 polypeptide

<400> 37

Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala

1 5

<210> 38

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-26 HCDR2 polynucleotide

<400> 38

atcatcccta tccttggtat agca 24

<210> 39

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-26 HCDR2 polypeptide

<400> 39

Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala

1 5

<210> 40

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-26 HCDR3 polynucleotide

<400> 40

gcgcgcttt acccgctgta ctctgggg gattac 36

<210> 41

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-26 HCDR3 polypeptide

<400> 41

Ala Arg Ser Tyr Pro Leu Tyr Ser Gly Trp Asp Tyr

1 5 10

<210> 42

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-38 HCDR1 polynucleotide

<400> 42

ggatacacaa tcaccccta ctat

24

<210> 43

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-38 HCDR1 polypeptide

<400> 43

Gly Tyr Thr Ile Thr Ser Tyr Tyr

1 5

<210> 44

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-38 HCDR2 polynucleotide

<400> 44

atcaacccta atgctggcag caca

24

<210> 45

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-38 HCDR2 polypeptide

<400> 45

Ile Asn Pro Asn Ala Gly Ser Thr

1 5

<210> 46

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
LMP2-38 HCDR3 polynucleotide

<400> 46

gcgcgccgtatgtaccgtatgtacgat	27
-----------------------------	----

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-38 HCDR3 polypeptide

<400> 47

Ala Arg Gly Met Tyr Arg Met Tyr Asp

1	5
---	---

<210> 48

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-40 HCDR1 polynucleotide

<400> 48

ggaggcaccttcagcaactatcat	24
--------------------------	----

<210> 49

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-40 HCDR1 polypeptide

<400> 49

Gly Gly Thr Phe Ser Asn Tyr His

1	5
---	---

<210> 50

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-40 HCDR2 polynucleotide

<400> 50

atcatccccca tccttggcac acca

24

<210> 51

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-40 HCDR2 polypeptide

<400> 51

Ile Ile Pro Ile Leu Gly Thr Pro

1 5

<210> 52

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-40 HCDR3 polynucleotide

<400> 52

gcgcgcggtc gtacttggtg gtctggtaact ctggattct

39

<210> 53

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-40 HCDR3 polypeptide

<400> 53

Ala Arg Gly Arg Thr Trp Trp Ser Gly Thr Leu Asp Ser

1 5 10

<210> 54

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-61 HCDR1 polynucleotide

<400> 54

ggatacacct tcaccaacta ttat

24

<210> 55

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-61 HCDR1 polypeptide

<400> 55

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Tyr

1 5

<210> 56

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-61 HCDR2 polynucleotide

<400> 56

atcaacccta gtgggtggag caca

24

<210> 57

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-61 HCDR2 polypeptide

<400> 57

Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr

1 5

<210> 58

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-61 HCDR3 polynucleotide

<400> 58

gcgcgcttt	actacggttc	tatggatgt	30
-----------	------------	-----------	----

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-61 HCDR3 polypeptide

<400> 59

Ala Arg Ser Tyr Tyr Gly Ser Met Asp Ala

1	5	10
---	---	----

<210> 60

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-63 HCDR1 polynucleotide

<400> 60

ggatacacaa	tcacctccata	ctat	24
------------	-------------	------	----

<210> 61

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-63 HCDR1 polypeptide

<400> 61

Gly Tyr Thr Ile Thr Ser Tyr Tyr

1	5
---	---

<210> 62

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-63 HCDR2 polynucleotide

<400> 62

atcaacccta atgctggcag caca

24

<210> 63

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-63 HCDR2 polypeptide

<400> 63

Ile Asn Pro Asn Ala Gly Ser Thr

1 5

<210> 64

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-63 HCDR3 polynucleotide

<400> 64

gcgcgcgtg acgttacaa cggttggat gaa

33

<210> 65

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-63 HCDR3 polypeptide

<400> 65

Ala Arg Gly Asp Val Tyr Asn Gly Trp Asp Glu

1 5 10

1 5

<210> 70

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-77 HCDR3 polynucleotide

<400> 70

gcgcgccagt ctcttacgg tggttacata gatcag	36
--	----

<210> 71

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-77 HCDR3 polypeptide

<400> 71

Ala Arg Gln Ser Ser Tyr Gly Gly Tyr Ile Asp Gln

1	5	10
---	---	----

<210> 72

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-21 LCDR1 polynucleotide

<400> 72

aacattggag gcaaaagt	18
---------------------	----

<210> 73

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-21 LCDR1 polypeptide

<400> 73

Asn Ile Gly Gly Lys Ser

1 5

<210> 74

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-21 LCDR2 polynucleotide

<400> 74

tatgatagc	9
-----------	---

<210> 75

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-21 LCDR2 polypeptide

<400> 75

Tyr Asp Ser

1

<210> 76

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-21 LCDR3 polynucleotide

<400> 76

cagggtgtggg atagtagtag tgatcattgg gtg	33
---------------------------------------	----

<210> 77

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-21 LCDR3 polypeptide

<400> 77

Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Trp Val

1 5 10

<210> 78

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-26 LCDR1 polynucleotide

<400> 78

aagattggaa gcaaacat 18

<210> 79

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-26 LCDR1 polypeptide

<400> 79

Lys Ile Gly Ser Lys His

1 5

<210> 80

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-26 LCDR2 polynucleotide

<400> 80

tataatact 9

<210> 81

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-26 LCDR2 polypeptide

<400> 81

Tyr Asn Thr

1

<210> 82

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-26 LCDR3 polynucleotide

<400> 82

caggtgtggg atagtagtta tgatcatgtg ata 33

<210> 83

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-26 LCDR3 polypeptide

<400> 83

Gln Val Trp Asp Ser Ser Tyr Asp His Val Ile

1 5 10

<210> 84

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-38 LCDR1 polynucleotide

<400> 84

agcagtgacg ttggtagtta taacgat 27

<210> 85

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-38 LCDR1 polypeptide

<400> 85

Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Asp

1 5

<210> 86

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-38 LCDR2 polynucleotide

<400> 86

gatgtcagt 9

<210> 87

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-38 LCDR2 polypeptide

<400> 87

Asp Val Ser

1

<210> 88

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-38 LCDR3 polynucleotide

<400> 88

aactcatata caagcagcaa cacttatgtc 30

<210> 89

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-38 LCDR3 polypeptide

<400> 89

Asn Ser Tyr Thr Ser Ser Asn Thr Tyr Val

1 5 10

<210> 90

<211>

18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-40 LCDR1 polynucleotide

<400> 90

aacattggaa gtagaagt 18

<210> 91

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-40 LCDR1 polypeptide

<400> 91

Asn Ile Gly Ser Arg Ser

1 5

<210> 92

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-40 LCDR2 polynucleotide

<400> 92

tataataaac 9

<210> 93

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-40 LCDR2 polypeptide

<400> 93

Tyr Asn Asn

1

<210> 94

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-40 LCDR3 polynucleotide

<400> 94

cagggtgtggg atagtattag tgaccattat gtc 33

<210> 95

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-40 LCDR3 polypeptide

<400> 95

Gln Val Trp Asp Ser Ile Ser Asp His Tyr Val

1 5 10

<210> 96

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-61 LCDR1 polynucleotide

<400> 96

agcctcagaa gctattat 18

<210> 97

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-61 LCDR1 polypeptide

<400> 97

Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr

1 5

<210> 98

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-61 LCDR2 polynucleotide

<400> 98

ggtaaaaac 9

<210> 99

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-61 LCDR2 polypeptide

<400> 99

Gly Lys Asn

1

<210> 100

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-61 LCDR3 polynucleotide

<400> 100

aactccggg acagcagtgg taaccatctg gta 33

<210> 101

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-61 LCDR3 polypeptide

<400> 101

Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His Leu Val

1 5 10

<210> 102

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-63 LCDR1 polynucleotide

<400> 102

aacattggaa gtgaaagt 18

<210> 103

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-63 LCDR1 polypeptide

<400> 103

Asn Ile Gly Ser Glu Ser

1 5

<210> 104

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-63 LCDR2 polynucleotide

<400> 104

gatgatgac

9

<210> 105

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-63 LCDR2 polypeptide

<400> 105

Asp Asp Asp

1

<210> 106

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-63 LCDR3 polynucleotide

<400> 106

caggtgtggg atcgaagtat tgatcatgg ttt

33

<210> 107

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-63 LCDR3 polypeptide

<400> 107

Gln Val Trp Asp Arg Ser Ser Asp His Trp Phe

1

5

10

<210> 108

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-77 LCDR1 polynucleotide

<400> 108

agcctcagaa cgcattat

18

<210> 109

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-77 LCDR1 polypeptide

<400> 109

Ser Leu Arg Thr His Tyr

1 5

<210> 110

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-77 LCDR2 polynucleotide

<400> 110

ggtaaaaac

9

<210> 111

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-77 LCDR2 polypeptide

<400> 111

Gly Lys Asn

1

<210> 112

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

LMP2-77 LCDR3 polynucleotide

<400> 112

aactccggc acagcagtgg taatcattgt gtg 33
<210> 113
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
LMP2-77 LCDR3 polypeptide
<400> 113
Asn Ser Arg His Ser Ser Gly Asn His Cys Val
1 5 10
<210> 114
<211> 318
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 114
aaggctaagg ccaaccctac cgtgaccctg ttcccccat cctccgagga actgcaggcc 60
aacaaggcca ccctcggttg cctgatctcc gacttctacc ctggcgccgt gaccgtggcc 120

tggaggctg atggatctcc tgtgaaggcc ggcgtggaaa ccaccaagcc ctccaaggcag 180
tccaacaaca aatacgccgc ctcctctac ctgtccctga cccctgagca gtggaaagtcc 240
caccggctct acagctgccca agtgacccac gagggctcca ccgtggaaaa gaccgtggct 300
cctaccgagt gctcttag 318
<210> 115
<211> 105
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 115
Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr 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 Gly Ser Pro Val
35 40 45
Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys 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> 116

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 116

accgtggccg ctccctccgt gttcatcttc ccacacctcg acgagcagct gaagtccggc	60
accgcttctg tcgtgtgcct gctgaacaac ttctaccccc gcgaggccaa ggtgcagtgg	120
aagggtggaca acgccctgca gagcggcaac tcccaggaat ccgtgaccga gcaggactcc	180
aaggacagca cctactccct gtcctccacc ctgaccctgt ccaaggccga ctacgagaag	240

cacaaggtgt acgcctgcga agtgacccac cagggcctgt ctagcccggt gaccaagtct	300
ttcaaccggg gcgagtgcta g	321

<210> 117

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 117

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys

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

<210> 118

<211> 1002

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 118

gtctcctcag ctccaccaa gggccatcg gtctcccc tggcacccctc ctccaaggac	60
acctctgggg gcacagcggc cctggctgc ctggtaagg actactccc cgaaccggtg	120
acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acacctccc ggccgtccta	180
cagtcctcag gactctactc ctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttggc	240
acccagacct acatctgcaa cgtaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag	300
gtttagccca aatcttgtga caaaactcac acatgccac cgtgccagc acctgaactc	360

ctgggggac cgtcagtctt cctttcccc caaaaaccca aggacacct catgatctcc	420
cggacccctg aggtcacatg cgtgggttg gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtaag	480
ttcaactgtt acgtggacgg cgtggagggt cataatgcca agacaagcc gcgggaggag	540
cagtacaaca gcacgttaccg tgtggtcagc gtcctcaccc tcctgcacca ggactggctg	600
aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccaagcc catcgagaaa	660
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacctt gccccatcc	720
cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaagg ctttatccc	780

agcgacatcg ccgtggagtggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg	840
cctccgtgc tggactccga cggctccttc ttccctata gcaagctcac cgtggacaag	900
agcaggtggc agcagggaa cgtttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac	960
cactacacgc agaagaccccttccctgtct ccggtaaat ga	1002

<210> 119

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 119

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 Glu Glu

225 230 235 240

Met 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 Gly Lys
 325 330

<210> 120

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 120

Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr

1 5

<210> 121

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 121

Ser Ser Cys Ser Ser Cys Pro Leu Ser Lys

1 5 10

<210> 122

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 122

Ala Pro Tyr Leu Phe Trp Leu Ala Ala

1 5

<210> 123

<211> 729

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Anti-CD3 scFv polynucleotide

<400> 123

gacgtgcagc tgggtgcagag cggagctgaa gtgaagaaaac ctggcgccctc cgtgaagggtg	60
tcctgcaaag cttagcggtta taccttacc cggtacacca tgcaactgggt ggcgcaggca	120
cctggacagg gactggaatg gatcggtac atcaacccct cccggggcta caccaactac	180
gccgactctg tgaaggcccg gttcaccatc accaccgata agtccaccag caccgcttac	240

atggaactgt cctccctgag atccgaggac accgctacct actattgcgc ccggtaatcac	300
gacgaccact actgcctgga ctactggga caggaaacca cagtgaccgt gtcctctggc	360
gagggcacct ctactggatc tggggaaatg ggtgggtctg gcccgcgtga cgacatcg	420
ctgacccatg ctccagccac cctgtctcg agcccgaggcg agagagctac cctgtctgc	480
agagcctccc agtccgtgtc ctacatgaat tggtatcagc agaagcctgg caaggccc	540
aagcggtgga tctacgacac ctccaagggtg gcctctggcg tgccagccccg gtttccg	600
tctggctctg gcaccgacta ctccctgacc atcaacagcc tggaagccga ggacgctgc	660

acatttact gccaggcgtg gtcctccaac cccctgaccc ttggaggcgg caccaagg	720
gaaatcaag	729

<210> 124

<211> 243

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Anti-CD3 scFv polypeptide

<400> 124

Asp 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 Arg Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Thr Thr Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser
 130 135 140
 Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 145 150 155 160
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 165 170 175
 Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser
 180 185 190
 Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser
 195 200 205
 Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 210 215 220
 Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val
 225 230 235 240
 Glu Ile Lys

<210> 125

<211> 243

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Anti-CD3 scFv amino acid sequence with free cysteine to
 serine mutation polypeptide

<400> 125

Asp 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 Arg Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Thr Thr Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly Ser Gly

115 120 125

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser

130 135 140

Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

145 150 155 160

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

165 170 175

Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser

180 185 190
 Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser

195 200 205
 Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 210 215 220
 Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
 225 230 235 240
 Glu Ile Lys

<210> 126
<211> 56
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Homodimerization tag sequence based on HNF1-alpha

polypeptide

<400> 126
 Arg Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Ser Gly Met Val Ser Lys
 1 5 10 15
 Leu Ser Gln Leu Gln Thr Glu Leu Leu Ala Ala Leu Leu Glu Ser Gly
 20 25 30
 Leu Ser Lys Glu Ala Leu Ile Gln Ala Leu Gly Glu Gly Ser Gly Gly
 35 40 45
 Ala Pro His His His His His

50 55
<210> 127
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 127

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu

1 5

<210> 128

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 128

Leu Leu Phe Gly Tyr Pro Val Tyr Val

1 5

<210> 129

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 129

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Val

1 5

<210> 130

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 130

Met Leu Trp Gly Tyr Leu Gln Tyr Val

1 5

<210> 131

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 131

Leu Gly Tyr Gly Phe Val Asn Tyr Ile

1 5

<210> 132

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 132

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val

1 5

<210> 133

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 133

Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5

<210> 134

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 134

Phe Leu Arg Gly Arg Ala Tyr Gly Leu

1 5

<210> 135

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 135

His Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu

1 5

<210> 136

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 136

Glu Glu Tyr Leu Gln Ala Phe Thr Tyr

1 5

<210> 137

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 137

Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5 10

<210> 138

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 138

Glu Glu Asn Leu Leu Asp Phe Val Arg Phe

1 5 10

<210> 139

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 139

Ala Leu Trp Gly Pro Asp Pro Ala Ala Ala

1 5 10

<210> 140

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 140

Arg Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Trp Cys Phe

1 5 10

<210> 141

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

3xGS linker

<400> 141

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 142

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

6xHis tag

<400> 142

His His His His His His

1 5

<210> 143

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

1xGS linker

<400> 143

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 144

<211> 75

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(75)

<223> This sequence may encompass 1-15 "Gly Gly Gly Gly Ser"

repeating units

<220>

<223> See specification as filed for detailed description of

substitutions and preferred embodiments

<400> 144

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly

20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

35 40 45

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

50

55

60

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

65

70

75