(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0042035
(43) 공개일자 2023년03월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/30 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/3069 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2023-7004480
(22) 출원일자(국제) 2021년07월08일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년02월07일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2021/068960
(87) 국제공개번호 WO 2022/008646
국제공개일자 2022년01월13일
(30) 우선권주장
20184800.9 2020년07월08일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
라바 테라퓨틱스 엔.브이.
네덜란드, 3584 씨엠 위트레흐트, 예일란 60
(72) 발명자
루버스, 로버투스 코넬리스
네덜란드, 3584 씨엠 위트레흐트, 예일란 60
반 데르 플릿, 요하네스 엘레
네덜란드, 1081 에이치브이 암스테르담, 드 볼렐란 1117
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 41 항

(54) 발명의 명칭 **PSMA와 감마-델타 T 세포 수용체에 결합할 수 있는 항체**

(57) 요 약

본 발명은 인간 PSMA와 결합할 수 있고 인간 Vγ9Vδ2 T 세포 수용체와 결합할 수 있는 항체에 관한 것이다. 본 발명은 본 발명의 항체를 포함하는 약학적 조성물 및 본 발명의 항체의 의약품으로서의 용도에 관한 것이다.

대 표 도

LV1044	EVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAASRFMISEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGTTDYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCDGYGYRGQGTQVTVSS
LV1050	EVQLVESGGGLVQPGGSL**R**LSCAASRFMISEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGTTDYA**D**SVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSL**RA**EDTAVYYCDGYGYRGQGTQVTVSS
LV1051	EVQLVESGGG**S**VQPGGSL**R**LSCAASRFMISEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGTTDYA**D**SVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSL**RA**EDTAVYYCDGYGYRG**L**GTQVTVSS

(52) CPC특허분류
C07K 16/2809 (2013.01)
C07K 16/468 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/569 (2013.01)
C07K 2319/33 (2013.01)
(72) 발명자
킹, 리사 안나
네덜란드, 1182 디비 암스테르담, 드 볼렐란 1118
파렌, 폴 윌럼 앙리 이다
네덜란드, 3584 씨엠 위트레흐트, 예일란 60
기마라이스 이글레시아스, 빅토리아
네덜란드, 3584 씨엠 위트레흐트, 예일란 60
루체 헐시크, 데이비드
네덜란드, 3584 씨엠 위트레흐트, 예일란 60
마키엘센, 피터 알렉산더 게라르두스 마리아
네덜란드, 3584 씨엠 위트레흐트, 예일란 60

명 세 서

청구범위

청구항 1

인간 PSMA와 결합할 수 있는 제1 항원 결합 영역과 인간 Vγ9Vδ2 T 세포 수용체와 결합할 수 있는 제2 항원 결합 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 다중 특이성 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 다중 특이성 항체는 이중 특이성 항체인 것을 특징으로 하는 다중 특이성 항체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 제1 항원 결합 영역은 단일 도메인(single-domain) 항체인 것을 특징으로 하는 다중 특이성 항체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 항원 결합 영역은 단일 도메인 항체인 것을 특징으로 하는 다중 특이성 항체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 다중 특이성 항체는 인간 PSMA에 대한 결합을 위해 서열번호 2에 제시된 서열을 갖는 항체와 경쟁하는 다중 특이성 항체, 바람직하게는 인간 PSMA에 대해 서열번호 2에 제시된 서열을 갖는 항체와 동일한 항원결정기(epitope)에 결합하는 것을 특징으로 하는 다중 특이성 항체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 항원 결합 영역은 서열번호 14에 제시된 VH CDR1 서열, 서열번호 15에 제시된 VH CDR2 서열 및 서열번호 16에 제시된 VH CDR3 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 다중 특이성 항체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 항원 결합 영역은 인간화되고, 바람직하게는 항원 결합 영역은 서열번호 2에 제시된 서열 또는 서열번호 2에 제시된 서열과 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 96%, 적어도 98% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 다중 특이성 항체.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 다중 특이성 항체는 인간 Vγ9Vδ2 T 세포를 활성화시킬 수 있는 것을 특징으로 하는 다중 특이성 항체.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 다중 특이성 항체는 인간 Vδ2와 결합할 수 있는 것을 특징으로 하는 다중 특이성 항체.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 다중 특이성 항체는 인간 Vδ2와의 결합을 위해 서열번호 5에 제시된 서열을 갖는 항체와 경쟁하거나 서열번호 20에 제시된 서열을 갖는 항체와 경쟁하는 것을 특징으로 하는 다중 특이성 항체.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 다중 특이성 항체는 인간 Vδ2와 결합할 때 서열번호 5에 제시된 서열을 갖는 항체와 동일한 항원결정기와 결합하거나, 서열번호 20에 제시된 서열을 갖는 항체와 동일한 항원결정기와 결합하는 것을 특징으로 하는 다중 특이성 항체.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 항원 결합 영역은 서열번호 17에 제시된 VH CDR1 서열, 서열번호 18에 제시된 VH CDR2 서열 및 서열번호 19에 제시된 VH CDR3 서열, 또는 서열번호 21에 제시된 VH CDR1, 서열번호 22에 제시된 VH CDR2 및 서열번호 23에 제시된 VH CDR3 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 다중 특이성 항체.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 항원 결합 영역은 인간화되고, 바람직하게는 제2 항원 결합 영역은 서열번호 5에 제시된 서열 또는 서열번호 5에 제시된 서열과 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 96%, 적어도 98% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 다중 특이성 항체.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 항원 결합 영역은 서열번호 14에 제시된 VH CDR1, 서열번호 15에 제시된 VH CDR2 및 서열번호 16에 제시된 VH CDR3를 포함하고, 제2 항원 결합 영역은 서열번호 17에 제시된 VH CDR1, 서열번호 18에 제시된 VH CDR2 및 서열번호 19에 제시된 VH CDR3를 포함하는 것을 특징으로 하는 다중 특이성 항체.

청구항 15

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 다중 특이성 항체는 인간 Vγ9에 결합할 수 있는 것을 특징으로 하는 다중 특이성 항체.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 다중 특이성 항체는 Vγ9Vδ2 T 세포를 통해 LNCaP 세포와 같은 PSMA 발현 세포의 사멸을 유도할 수 있는 것을 특징으로 하는 다중 특이성 항체.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 다중 특이성 항체는 전립선암 환자로부터 유래된 인간 PSMA 발현 세포의 사멸을 유도할 수 있는 것을 특징으로 하는 다중 특이성 항체.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 항원 결합 영역 및 제2 항원 결합 영역은 펩타이드 링커를 통해 공유 결합된 것을 특징으로 하는 다중 특이성 항체.

청구항 19

제18항에 있어서, 펩타이드 링커는 서열번호 6에 제시된 서열을 포함하거나 구성된 것을 특징으로 하는 다중 특이성 항체.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 PSMA와 결합할 수 있는 제1 항원 결합 영역은 인간 Vγ9Vδ2 T 세포 수용체와 결합할 수 있는 제2 항원 결합 영역의 N 말단 영역에 위치하는 것을 특징으로 하는 다중 특이성 항체.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 다중 특이성 항체는 반감기 연장 도메인을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 다중 특이성 항체.

청구항 22

제20항에 있어서, 다중 특이성 항체는 인간 피험자에게 투여되었을 때 최종 반감기는 168시간 이상인 것을 특징으로 하는 다중 특이성 항체.

청구항 23

제1항, 제17항, 제21항, 또는 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 다중 특이성 항체는 Fc 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 다중 특이성 항체.

청구항 24

제23항에 있어서, Fc 영역은 두 개의 Fc 폴리펩타이드로 구성된 이형이합체(heterodimer)이고;

여기서 제1 항원 결합 영역은 첫번째 Fc 폴리펩타이드와 융합되어 있고 제2 항원 결합 영역은 두번째 Fc 폴리펩타이드와 융합되어 있으며;

첫번째 및 두번째 Fc 폴리펩타이드는 동형이합체(homodimer)의 형성보다는 이형이합체의 형성을선호하는 비대칭적인 아미노산 돌연변이를 포함하는 것을 특징으로 하는 다중 특이성 항체.

청구항 25

제24항에 있어서, Fc 폴리펩타이드의 CH3 영역은 비대칭적인 아미노산 돌연변이를 포함하고;

바람직하게는, EU 넘버링 시스템에 따른 인간 IgG1 서열에 대응하는 아미노산 위치 기준으로, 첫번째 Fc 폴리펩타이드는 T366W를 포함하고 두번째 Fc 폴리펩타이드는 T366S, L368A 및 Y407V를 포함하거나 그 반대의 경우를 포함하는 것을 특징으로 하는 다중 특이성 항체.

청구항 26

제23항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, EU 넘버링 시스템에 따른 인간 IgG1 서열에 대응하는 아미노산 위치 기준으로, 첫번째 및 두번째 Fc 폴리펩타이드의 220번 위치의 시스테인 잔기는 제거되거나 치환된 것을 특징으로 하는 다중 특이성 항체.

청구항 27

제23항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, EU 넘버링 시스템에 따른 인간 IgG1 서열에 대응하는 아미노산 위치 기준으로, 첫번째와 두번째 Fc 폴리펩타이드는 234번 및/또는 235번 위치에 돌연변이를 포함하고, 바람직하게는 첫번째와 두번째 Fc 폴리펩타이드는 L234F 및 L235E 돌연변이를 포함하는 것을 특징으로 하는 다중 특이성 항체.

청구항 28

제23항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 항원 결합 영역은 서열번호 2에 제시된 서열을 포함하고 제2 항원 결합 영역은 서열번호 5에 제시된 서열을 포함하며;

· 첫번째 Fc 폴리펩타이드는 서열번호 12에 제시된 서열을 포함하고 두번째 Fc 폴리펩타이드는 서열번호 13에 제시된 서열을 포함하거나

· 첫번째 Fc 폴리펩타이드는 서열번호 13에 제시된 서열을 포함하고 두번째 Fc 폴리펩타이드는 서열번호 12에 제시된 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 다중 특이성 항체.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 따른 다중 특이성 항체 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 30

제29항에 있어서, 다중 특이성 항체는 제23항 내지 제28항 중 어느 한 항에 따른 항체이고, 여기서 약학적 조성물은 완충액, 수크로즈, 폴리소르베이트 80 및 메티오닌을 포함하며, 상기 조성물의 pH는 5.4 내지 7.4 사이이

고 특히, 5.4 내지 6.1 사이인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 31

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 다중 특이성 항체는 의약품 용도인 것을 특징으로 하는 다중 특이성 항체.

청구항 32

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 다중 특이성 항체는 암 치료 용도인 것을 특징으로 하는 다중 특이성 항체.

청구항 33

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 다중 특이성 항체는 전립선 암 치료 용도인 것을 특징으로 하는 다중 특이성 항체.

청구항 34

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 다중 특이성 항체는 대장암, 폐암, 유방암, 자궁내막암, 난소암, 위암, 신장세포암, 방광암, 간세포암, 구강편평세포암, 갑상선암 및 교모세포종을 포함하는 원발성 또는 전이성 종양의 신생 혈관 또는 종양 관련 내피 세포에서 PSMA를 발현하는 암의 치료 용도인 것을 특징으로 하는 다중 특이성 항체.

청구항 35

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 다중 특이성 항체는 두경부의 샘낭암종 치료 용도인 것을 특징으로 하는 다중 특이성 항체.

청구항 36

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 따른 다중 특이성 항체를 이를 필요로 하는 인간 피험자에게 투여하는 것을 포함하는 질병 치료 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 질병은 암인 것을 특징으로 하는 치료 방법.

청구항 38

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 따른 다중 특이성 항체를 암호화하는 핵산.

청구항 39

제38항에 따른 핵산을 포함하는 발현 벡터.

청구항 40

제38항에 따른 핵산 또는 제39항에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포, 특히 포유류 숙주 세포, 바람직하게는 CHO 세포.

청구항 41

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 의해 정의된 다중 특이성 항체, 바람직하게는 제23항 내지 제28항 중 어느 한 항에 의해 정의된 다중 특이성 항체를 암호화하는 하나 이상의 핵산을 적합한 숙주 세포, 특히 포유류 세포, 바람직하게는 CHO 세포에 발현시켜 생산된 재조합 항체를 정제하는 것을 특징으로 하는 다중 특이성 항체의 생산 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 인간 PSMA와 결합할 수 있고 인간 Vγ9Vδ2 T 세포 수용체와 결합할 수 있는 새로운 다중 특이적 항체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 상기 항체를 포함하는 약학적 조성물 및 의학적 치료를 위한 상기 항체의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 전립선암은 유럽과 미국에서 가장 흔한 암이다. 국소 병변의 조기 발견을 통해 생존율을 높일 수 있다. 하지만 전이된 종양은 생존율을 극적으로 감소시킨다. 엽산 가수분해효소Ⅰ 또는 글루타메이트 카르복시펩티다아제Ⅱ로도 알려진 전립선 특이 막 항원(PSMA)은 약물 개발을 위한 잠재적 표적이다. PSMA는 정상 조직에서는 발현이 적지만 전립선암 세포에서는 과발현되는 타입Ⅱ 막관통 단백질이다.

[0003] 항체(Chatalic et al. (2015) J Nucl Med 56:1094; WO2018098354 참고)를 포함한 PSMA 표적 물질이 개발되어왔다(Haberkorn et a. (2016) Clin Cancer Res 22:9 참고). 이중 특이성 PSMA+CD3 T 세포 관여 항체 접근법이 밝혀졌다(Hernandez-Hoyos et al. (2016) Mol Cancer Ther 15:2155; WO2016187594). 이중 특이성 T 세포 관여 항체는 종양 표적 결합 특이성 및 T 세포 결합 특이성을 갖고 있어 악성 세포에 대한 T 세포의 세포 독성을 재지시함으로써 효능을 증대시킨다(Huehls et al. (2015) Immunol Cell Biol 93:290; Ellerman (2019) Methods, 154:102; de Bruin et al. (2017) Oncoimmunology 7(1):e1375641 and WO2015156673). 그러나 결과는 크게 달랐다. 예를 들면, 한 연구에서는 CD3 결합 물질이 각기 다른 8개의 B 세포 표적(CD20, CD22, CD24, CD37, CD70, CD79b, CD138 및 HLA-DR) 결합 물질과 조합되었고 각기 다른 종양 표적에 결합할 수 있는 이중 특이성 항체들은 세포 독성을 유발하는 능력에서 큰 편차를 보였고 세포 독성은 항원 발현 수준과 상관 관계가 없다는 것을 밝혔다. 예를 들면, HLA-DR 또는 CD138을 표적으로 하는 CD3 이중 특이성 항체는 보통 내지 높은 수준의 HLA-DR 및 CD138 발현에도 불구하고 세포 독성을 유발하지 못했다(Engelberts et al. (2020) Ebiomedicine 52:102625). 심각한 독성, 제조 과정의 어려움, 면역원성 및 고형종양에 대한 낮은 반응률로 인해 후기 임상 개발 단계에 도달한 T 세포 재지시 요법은 거의 없다. 특히, T 세포 관여 물질에 CD3 결합 영역이 포함될 때, 제어되지 않는 면역 활성화 및 사이토카인 방출의 결과로 세포 독성이 발생할 수 있다.

[0004] 따라서, 상당한 진전이 있었음에도 불구하고 치료제로서 효능이 있으면서 허용할 수 있는 수준의 세포 독성을 갖는 새로운 PSMA 항체에 대한 요구는 여전히 존재한다. 이러한 신규 PSMA 항체는 적절한 약동학적 및 약력학적 특성을 보여야하고, 최적으로는 높은 수율과 순도로 생산 가능해야 한다. 더불어, 분해 및 응집이 최소한으로 발생하는 안정적인 형성물이어야 한다.

[0005] 본 발명에 의해 이러한 필요성들이 해결될 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 인간 PSMA와 결합할 수 있는 제1 항원 결합 영역과 인간 Vγ9Vδ2 T 세포 수용체와 결합할 수 있는 제2항원 결합 영역으로 구성된 다중 특이성 항체를 제공한다.

[0007] 본 발명은 본 발명의 항체를 포함하는 약학적 조성물, 본 발명의 항체의 의학적 치료 용도 및 본 발명의 항체를 생산하기 위한 핵산과 발현 벡터 및 상기 핵산과 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 PSMA 기반 치료를 위한 신규 항체를 제공한다. Vγ9Vδ2 T 세포 수용체와 결합하여 γδ T 세포에 관여할 수 있는 영역 및 PSMA결합 영역이 융합된 이중 특이성 항체를 구성하였다.

[0009] 또한, 포유류 숙주 세포에서 생산할 때 매우 균질하고 순도 높은 생산물을 얻을 수 있는 신규한 이중 특이성 VHH-인간-Fc를 포함하는 항체 형식이 개발되었다.

발명의 효과

[0010] 본 발명은 PSMA 기반 치료를 위한 신규 항체를 제공한다. Vγ9Vδ2 T 세포 수용체와 결합하여 γδ T 세포에 관여할 수 있는 영역 및 PSMA결합 영역이 융합된 이중 특이성 항체를 구성하였다. 놀랍게도 이 이중 특이성 항체

는 종양 침윤 Vγ9Vδ2 T 세포를 포함한 자가 Vγ9Vδ2 T 세포를 활성화시킬 수 있었고 높은 효능을 가진 Vγ9Vδ2 T 세포의 존재 하에 환자 유래의 종양 세포를 사멸시킬 수 있었다. 이러한 활성은 작동 세포(γδ T)와 표적 세포(종양 세포) 간의 비율이 낮은 상황의 종양 세포에서도 관찰되었고, γδ T 세포가 다양한 종류의 인간 T 세포 중 일부라는 사실을 고려하면 상기 결과는 중요하다. 반면에 건강한 정상 조직은 영향을 받지 않았으며, 이는 효과적이지만 안전한 암 치료를 위한 이 항체의 잠재력을 나타낸다. 또한, 인간 전혈을 이용한 연구들에서도 표적 세포에 대한 높은 효능에도 불구하고 항체에 의한 사이토카인 방출은 낮은 수준으로 유도되었고 이는 사이토카인 방출 증후군의 위험이 낮음을 의미한다.

[0011] 또한, 포유류 숙주 세포에서 생산할 때 매우 균질하고 순도 높은 생산물을 얻을 수 있는 신규한 이중 특이성 VHH-인간-Fc를 포함하는 항체 형식이 개발되었다. 또한, 이 형식은 의학적 치료 용도에 적합한 약동학적 특성을 갖고, 이 제품에 적합하고 안정한 제형도 개발되었다. 특정 이론에 얽매이지 않고, 이 형식의 분자 크기와 감소된 유체역학적 반경은 종양 침투에 적합하지만, 신장 여과를 피하고 FcRn과의 결합을 통해 분해가 방지될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1: 항-PSMA VHH JVZ-007의 인간화 변이체의 서열 정렬. LV1044는 라마 유래의 본래 서열이다. 그 외의 서열은 인간화 변이체이다.

도 2: 이중 특이성 VHH의 반감기가 연장된 형식의 개략도. Fc의 면역원성을 감소시키는 돌연변이는 별표(*)로 표시하였다. 변형된 힌지(hinge)의 서열 및 KiH 매개의 이형이합체화를 부여하는 CH3 돌연변이는 도면 옆에 표기하였다.

도 3: T 세포의 탈과립을 유발하는 인간화 변이체의 효력을 확인하기 위한 T 세포 활성화(탈과립) 검증. 상단 패널: PSMA-양성인 LNCaP 세포를 표적 세포로 사용하여 이중 특이성 구성물 적정. 하단 패널: PC-3 세포를 표적 세포로 사용하여 탈과립 검증에 사용된 단일 고농도(10 nM) 이중 특이성 구성물. 5C8은 항-Vγ9Vδ2 TCR-특이적인 VHH를 나타내고 5C8var1은 이의 인간화 변이체이다.

도 4: 항체에 의해 유발된 Vγ9Vδ2 T 세포 매개의 LNCaP 세포의 세포 독성

도 5: FACS를 통해 확인된 각기 다른 세포/세포주에 대한 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc의 결합. 상단 패널: PSMA-양성인 LNCaP 세포주 및 PSMA-음성인 PC-3 세포주와의 결합. 하단 패널: Vγ9Vδ2 T 세포와의 결합.

도 6: 표적 의존적인, LV1050-Fc x 5C8var1-Fc에 의한 Vγ9Vδ2 T 세포 활성화(상단 패널) 및 세포 독성(하단 패널)

도 7: 종양 조직 및 정상 전립선 조직에서의 PSMA 및 CD277의 발현 수준 및 조직 내 (총 CD3+ 집단의 일부로서의) Vγ9Vδ2 T 세포의 빈도.

도 8: Vγ9Vδ2 T 세포 및 LV1044-5C8 ("LAVA 복합체")에 의해 유발된 전립선 종양 세포의 세포 독성(24시간 검증). *** $p<0.05$. 처리하지 않은 종양 세포(상단 패널) 또는 정상 세포(하단 패널)의 수를 100%로 하였다

도 9: PSMA와 LV1050-5C8var1-no-C-tag 간의 교차 결합을 포함한 상호 관계 맵. 숫자는 UniProt ID Q04609를 기반으로 하였지만 다른 신호펩타이드를 포함하는 서열번호 30에 제시된 PSMA 구성물의 아미노산 위치를 나타낸다. PSMA 구성물의 위치 번호는 다음과 같이 UniProt ID Q04609의 넘버링에 대응한다: 구성물에서의 위치 = UniProt ID Q04609 + 41인 위치. 표시된 PSMA 단편들은 서열번호 33 내지 36에 제시되어 있다.

도 10: 확대 배양된 Vγ9Vδ2 T 세포 및 PSMA-양성인 종양 유래 세포주를 이용한 탈과립 검증. 탈과립은 1차 확대 배양된 Vγ9Vδ2 T 세포와 각기 다른 PSMA 발현 세포주(LNCaP, 22Rv1 및 VCaP 세포)를 공동 배양하여 측정하였다. CD3 및Vγ9로 게이팅한 CD107a 양성(탈과립이 진행 중인) 세포의 비율을 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc 농도 기준으로 표기하였다.

도 11: 확대 배양된 Vγ9Vδ2 T 세포와 PSMA양성 또는 PSMA 음성 세포를 이용하여 세포 독성 검증. 세포 독성은 1차, 확대 배양된 Vγ9Vδ2 T 세포와 (A) LNCaP 세포(PSMA 양성 세포) 대 LNCaP.koPSMA 세포(PSMA 음성 세포) 또는 (B) 상이한 PSMA 발현 세포주(LNCaP, 22Rv1 및 VCaP 세포)를 공배양하여 측정하였다. 표적 세포의 세포 사멸은 CytoTox-Glo™ Assay를 이용하여 정의된 세포 내 단백질 분해 효소의 배지 내 활성을 통해 측정하였다.

도 12: 전립선 종양 또는 정상(비악성) 조직 내에 내재적으로 존재하는 Vγ9Vδ2 T 세포의 탈과립화. 전립선 종양(A) 및 정상(비악성) 전립선 조직(B) 세포 현탁액을 50 nM의 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc가 있거나 없이 형광 표

지된 CD107a 단클론 항체와 함께 4시간 동안 정치하였고, CD45+/CD3+/Vγ9+/Vδ2+/CD107a+ 세포의 비율(CD107a 발현(EpCAM-/CD45+/CD3+/Vγ9+/Vδ2+의 %)으로 표시)을 유세포 분석기를 통해 측정하였다. LV1050-Fc x 5C8var1-Fc에 의한 CD107a 발현 유도는 배경(배지 단독)에 대비하여 표현되었다. **P<0.01, 대응표본 T 검정; ns = 통계적 유의성 없음.

도 13: 환자 유래의 전립선 종양 또는 정상(비악성) 전립선 조직과 공배양하였을 때, 자가 PBMC에 존재하는 Vγ9Vδ2 T 세포의 탈과립화. 자가 PBMC의 존재 하에 전립선 종양(A) 및 정상(비악성) 전립선 조직(B) 세포 현탁액을 50 nM의 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc이 있거나 없이 형광 표지된 CD107a 단클론 항체와 4시간 동안 정치하였고, CD45+/CD3+/Vγ9+/Vδ2+/CD107a+ 세포의 비율(CD107a 발현(EpCAM-/CD45+/CD3+/Vγ9+/Vδ2+의 %)으로 표시)을 유세포 분석기를 통해 측정하였다. LV1050-Fc x 5C8var1-Fc에 의한 CD107a 발현 유도는 배경(배지 단독)에 대비하여 표현되었다. *P<0.05, 대응표본 T 검정; ns = 통계적 유의성 없음.

도 14: 자가 PBMC 존재 하에 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc에 매개된 종양 세포 용해. 전립선 종양 조직(A) 또는 정상(비악성) 전립선 조직(B)으로부터 얻은 단일세포 현탁액을 50 nM의 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc이 있거나 없는 조건에서 E:T 비율을 10:1로 하여 자가 PBMC와 24시간 동안 배양하였다. 7-AAD-배제법을 이용하여 유세포 분석기로 세포 독성을 측정하였고 '표적 세포 + PBMC'에 비례한 용해 비율로 표현하였다. 평균과 S.E.M을 표기하였다. n=3, *P <0.05.

도 15: LV1050-Fc x 5C8var1-Fc와 PBMC의 조합은 22Rv1 전립선암 세포가 접종된 마우스에서 종양 성장을 저해한다. NCG 마우스(그룹 당 4-6 마리)에 22Rv1 전립선암 세포 단독 또는 두 명의 건강한 공여자의 PBMC와의 조합으로 피하 주사하였다. 0일차, 7일차, 14일차 및 21일차에 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc (0.2 또는 2 mg/kg) 또는 PBS를 정맥 주사하였다. 매주 2회 캘리퍼스를 이용하여 종양의 크기를 측정하였다. 그룹의 평균 종양 부피가 2,000 mm^3를 초과하면 마우스를 희생시켰다. 종양의 부피(mm^3; 평균 ± SEM)는 22Rv1 전립선암 세포 접종 후 날짜에 따라 그래프로 기록하였다. 통계학적 분석(ANOVA (변수 분석) 후 Dunnett 사후 검정)은 공여자#1의 PBMC를 사용하여 0.2 또는 2 mg/kg의 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc를 투여한 결과, 종양 성장률이 통계적으로 유의미하게 감소하였고(***P<0.001) 34일차의 종양 성장 억제율(TGI)은 각각 91%와 78%로 나타낸다. 공여자#2의 PBMC를 사용하여 2 mg/kg의 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc를 투여한 결과, 41일차 52%의 TGI 값으로 현저한 항암 효과를 보였다 (*P<0.01).

도 16: 인간 FcRn 형질전환 마우스에 단회 정맥 투여 후 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc의 약동학. LV1050-Fc x 5C8var1-Fc 및 인간화 IgG 대조군 항체를 인간 FcRn 형질전환 마우스(그룹 당 4마리)의 그룹마다 2 mg/kg, 5 mg/kg 또는 10 mg/kg씩 정맥 주사하였다. 상단의 그래프는 각기 다른 농도의 항체가 주사된 세 그룹의 마우스에 대해 시간 경과에 따른 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc의 농도를 나타낸다. 하단의 그래프는 (ELISA 결과 분석을 위해 PK solutions 소프트웨어를 이용하여) 세 그룹에서 얻은 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc의 최종 반감기 계산을 나타낸다. IgG 대조군 항체와 함께 투여한 각 그룹에서 계산된 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc의 반감기는 서로 유사했고 139.9 ± 10.2 hours (2 mg/kg), 160.2 ± 13.4 hours (5 mg/kg) 및 171.7 ± 10.6 hours (10 mg/kg)에 해당했다.

도 17: 비인간 영장류에서 각기 다른 농도의 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc를 단회 정맥 투여 후 약동학. 혈장 내 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc의 농도를 투여 전, 투여 후 0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 72, 120, 168, 336, 504 및 528시간에 측정하였다. 시간에 따른 혈장 내 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc 농도(Y축)를 표기하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 정의

[0014] 본 명세서에서 사용된 용어 "인간 PSMA"는 글루타메이트 카르복시펩티다아제 2(EC:3.4.17.21), 세포 성장 저해 유전자 27 단백질, 엽산 가수분해효소Ⅰ, 폴릴폴리-감마-글루타메이트 카르복시펩티다아제(FGCP), 글루타메이트 카르복시펩티다아제 Ⅱ(GCPⅡ), 막 글루타메이트 카르복시펩티다아제(mGCP), N-아세틸화-알파-결합 산성 디펩티다아제 Ⅰ(NAALADaseⅠ) 또는 프테로일폴리-감마-글루타메이트 카르복시펩티다아제라고도 알려져 있는 인간 전립선 특이성 막 항원(Prostate-Specific Membrane Antigen) 단백질을 의미한다. ((UniProtKB - Q04609 (FOLH1_HUMAN)), 서열번호 24에 제시된 동형단백질Ⅰ.

[0015] 본 명세서에서 사용된 용어 "인간 Vδ2"는 TRDV2 단백질, T 세포 수용체 델타 변이체 2를 의미한다. (UniProtKB - A0JD36 (A0JD36_HUMAN)는 Vδ2 서열의 예시로 제시된다.)

[0016] 본 명세서에서 사용된 용어 "인간 Vγ9"는 TRGV9 단백질, T 세포 수용체 감마 변이체 9를 의미한다. (UniProtKB - Q99603_HUMAN는 Vγ9 서열의 예시로 제시된다.)

[0017] 용어 "항체"는 면역글로불린, 면역글로불린의 단편 또는 이들의 유도체를 의미하고 일반적인 생리적 조건에서 항원과 특이적으로 결합하는 능력이 있고 상당한 기간의 반감기, 특히 적어도 30분, 적어도 45분, 적어도 1시간, 적어도 2시간, 적어도 4시간, 적어도 8시간, 적어도 12시간, 적어도 24시간 또는 그 이상, 48시간 또는 그 이상, 3, 4, 5, 6, 7일 또는 그 이상 등, 또는 그 외의 기능적으로 정의된 적절한 기간 (특히 항원과 결합한 항체가 생리적 반응을 유도하는, 촉진하는, 증진시키는 및/또는 조절하는 시간 및/또는 항체가 유효 효과를 유발할 수 있는 시간)를 갖는 물질을 의미한다. 항원과 상호작용하는 항원 결합 영역(또는 항원 결합 도메인)는 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역으로 구성되어 있거나 중쇄 가변 영역 단독과 같이 단일 도메인 항원 결합 영역일 수 있다. 항체의 불변 영역이 존재한다면 숙주 조직 또는 면역체계의 다양한 세포 및 보체 활성 고전 경로의 첫번째 구성요소인C1q와 같은 보체 체계의 구성요소를 포함하는 요소들에 대한 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다. 그러나 일부 실시예에서는 항체의 Fc 영역이 "불활성화"되도록 변형되었다. "불활성화"는 Fc 영역이 적어도 Fcγ 수용체와 결합할 수 없거나 Fc 매개의 Fc 수용체 교차 결합을 유발할 수 없거나 개별 항체의 2개의 Fc 영역을 통한 Fc 수용체 매개의 표적 항원 교차 결합을 유발할 수 없음을 의미한다. 추가적인 실시예에서 불활성화된 Fc 영역은 C1q와도 결합할 수 없다. 한 실시예에서는 항체에 234번의 류신에서 페닐알라닌으로의 돌연변이 및 235번의 류신에서 글루타메이트로의 돌연변이와 같이, 234번 및 235번 위치에 돌연변이를 포함하고 있다(Canfield and Morrison (1991) J Exp Med 173:1483). 다른 실시예에서는 항체에 234번의 류신에서 알라닌으로의 돌연변이, 235번의 류신에서 알라닌으로의 돌연변이 및 329번의 프롤린에서 글리신으로의 돌연변이를 포함한다. 또 다른 실시예에서는 항체에 234번의 류신에서 페닐알라닌으로의 돌연변이, 235번의 류신을 글루타메이트로의 돌연변이 및 265번의 아스파르트메이트에서 알라닌으로의 돌연변이를 포함한다.

[0018] 면역글로불린의 Fc 영역은 면역글로불린의 2개의 CH2-CH3 영역과 힌지 영역과 같은 연결 부위를 포함하는, 일반적으로 파파인으로 항체를 분해한 후에 생성되는 항체의 단편으로 정의된다. 항체 중쇄의 불변 도메인은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM, IgD, 또는 IgE와 같은 항체 동종형으로 정의된다. Fc 영역은 보체 체계의 단백질과Fc 수용체라고 불리는 세포 표면 수용체를 통해 항체의 유효 기능을 매개한다.

[0019] 본 명세서에서 사용된 용어 "힌지 영역"은 면역글로불린 중쇄의 힌지 영역을 의미한다. 따라서, 예를 들면 인간 IgG1 항체의 힌지 영역은 EU 넘버링을 기준으로 216번 내지 230번 아미노산에 해당한다.

[0020] 본 명세서에서 사용된 용어 "CH2 영역" 또는 "CH2 도메인"은 면역글로불린 중쇄의 CH2 영역을 의미한다. 따라서, 예를 들면 인간 IgG1 항체의 CH2 영역은 EU 넘버링을 기준으로 231번 내지 340번 아미노산에 해당한다. 그러나 CH2 영역은 본 명세서에서 기술된 다른 아류형(subtype) 중 어느 하나일 수 있다.

[0021] 본 명세서에서 사용된 용어 "CH3 영역" 또는 "CH3 도메인"은 면역글로불린 중쇄의 CH3 영역을 의미한다. 따라서, 예를 들면 인간 IgG1 항체의 CH3 영역은 EU 넘버링을 기준으로 341번 내지 447번 아미노산에 해당한다. 그러나 CH3 영역은 본 명세서에서 기술된 다른 아류형 중 어느 하나일 수 있다.

[0022] 본 발명에서 Fc 영역/Fc 도메인 내의 아미노산 위치에 대한 언급은 EU 넘버링에 따른다. (Edelman et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1969 May;63(1):78-85; Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest. 5th Edition - 1991 NIH Publication No. 91-3242)

[0023] 위에서 명시한 바와 같이, 본 명세서에서 사용되는 용어 항체는 달리 언급되거나 문맥상 명백히 모순되지 않는 한, 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 유지하는 항체의 단편을 포함한다. 항체의 항원 결합 기능은 전장(full-length) 항체의 단편에 의해 수행될 수 있음이 밝혀졌다. 용어 "항체"에 포함되는 결합 단편의 예는 (i) Fab' 또는 Fab 단편, 즉, VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 구성된 1가 단편, 또는 WO2007059782에 기재된 바와 같은 1가 항체; (ii) F(ab')2 단편, 즉, 힌지 영역에서 이황화다리에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편; (iii) 기본적으로 VH 및 CH1 도메인으로 구성된 Fd 단편; (iv) 기본적으로 항체의 단일 팔(single arm)의 VL 및 VH 도메인으로 구성된 Fv 단편을 포함한다. 더불어, Fv 단편의 두 도메인인 VL 및 VH는 별도의 유전자에 의해 코딩되지만 재조합 방법을 이용하여 두 도메인이 합성 링커를 통해 연결되어 하나의 단백질 사슬이 될 수 있고, 여기서 VL과 VH 영역이 (단일 사슬 항체 또는 단일 사슬 Fv (scFv)라고 알려진) 1가 분자를 형성하도록 쌍을 이룬다. (예: Bird et al., Science 242, 423-426 (1988) and Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988) 참고). 이러한 단일 사슬 항체는 문맥상 달리 표기하지 않는 한, 용어 항체에 포함된다. 이러한 단편들은 일반적으로 항체의 정의에 포함되지만, 이들은 총체적으로, 그리고 각각 독립적으로 본 발명의 고유한 특징이며, 상이한 생물학적 특성 및 유용성을 나타낸다. 용어 항체는 달리 명시되지 않는 한, 다클론 항체, 단

클론 항체(mAbs), 키메라 항체 및 인간화 항체, 및 효소 절단, 펩타이드 합성 및 재조합 기술과 같이 알려진 기술을 통해 제공되는 항체 단편을 포함한다.

[0024] 본 발명의 항체의 일부 실시예에서, 제1 항원 결합 영역 또는 항원 결합 영역, 또는 둘 모두는 단일 도메인(single domain) 항체이다. 단일 도메인 항체(sdAb, NANOBODY® 또는 VHH)는 당업자에게 널리 알려져 있다(Hamers-Casterman et al. (1993) Nature 363:446, Roovers et al. (2007) Curr Opin Mol Ther 9:327 and Krah et al. (2016) Immunopharmacol Immunotoxicol 38:21 참고). 단일 도메인 항체는 하나의 CDR1, 하나의 CDR2, 및 하나의 CDR3로 구성된다. 단일 도메인 항체의 예는 중쇄 단독 항체의 가변 단편, 자연적으로 경쇄를 포함하지 않는 항체, 통상적인 항체로부터 유래된 단일 도메인 항체 및 조작된 항체이다. 단일 도메인 항체는 마우스, 인간, 낙타, 라마, 상어, 염소, 토끼, 및 소를 포함한 임의의 종에서 유래될 수 있다. 예를 들면, 자연적으로 발생한 VHH 분자는 낙타, 단봉 낙타, 라마, 알파카, 및 과나코와 같은 낙타과 동물에서 생성된 항체에서 유래될 수 있다. 전체 항체와 마찬가지로, 단일 도메인 항체도 특정 항원에 특이적으로 결합할 수 있다. 단일 도메인 항체는 면역글로불린 사슬의 가변 영역, 즉, CDR1, CDR2, CDR3 및 프레임워크 영역만 포함할 수도 있다.

[0025] 본 명세서에서 사용된 용어 "면역글로불린"은 두 쌍의 폴리펩타이드, 한 쌍의 경쇄와 한 쌍의 중쇄로 구성되는 구조적으로 관련된 당 단백질의 분류를 지칭하고, 이러한 4개의 사슬이 이황화 결합을 통해 상호 결합되어 있다. 본 명세서에서 사용된 용어 "면역글로불린 중쇄", "면역글로불린의 중쇄" 또는 "중쇄"는 면역글로불린의 사슬 중 하나를 지칭한다. 중쇄는 일반적으로 면역글로불린의 동종형을 정의하는 중쇄 가변 영역(본 명세서에서는 약어 VH로 표기함) 및 중쇄 불변 영역(본 명세서에서는 약어 CH로 표기함)으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 일반적으로 CH1, CH2 및 CH3, 세 개의 도메인으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 힌지 영역을 더 포함한다. 면역글로불린(예, IgG)의 구조 내에서 두 개의 중쇄는 힌지 영역에서 이황화 결합으로 상호 결합되어 있다. 중쇄와 마찬가지로, 각 경쇄는 일반적으로 경쇄 가변 영역(VL) 및 경쇄 불변 영역(CL)으로 구성된다. 또한, VH 및 VL은 초가변성을 가진 영역(또는 초가변적인 서열 및/또는 구조적으로 정의된 루프 형태일 수 있는 초가변 영역), 항원 인지 영역(CDRs)이라고 불리는 영역, 프레임워크 영역이라고도 불리는 보다 보존적인 영역이 산재한 영역으로 세분화할 수 있다. VH 및 VL 각각은 일반적으로 세 개의 CDR과 네 개의 FR로 구성되어 있고 아미노 말단부터 카르복시 말단까지 다음과 같은 순서로 배열되어 있다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. CDR 서열은 다양한 방법으로 확인 수 있고 그 예를 들면 Choitia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901 또는 Kabat et al. (1991) Sequence of protein of immunological interest, fifth edition. NIH publication에서 제공된 방법일 수 있다. CDR 확인 및 아미노산 넘버링을 위한 다양한 방법은 www.abysis.org (UCL)에서 비교할 수 있다.

[0026] 본 명세서에서 사용된 용어 "동종형"은 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 암호화되는 면역글로불린 (세부)분류(예: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE 또는 IgM) 또는 IgG1m(za) 및 IgG1m(f)와 같은 동종이형(allotype)을 지칭한다. 각 중쇄 동종형은 카파(κ) 또는 람다(λ) 경쇄 중 하나와 결합할 수 있다. 본 발명의 항체는 임의의 동종형을 보유할 수 있다.

[0027] 용어 "모 항체"는 본 발명에 따른 항체와 동일한 항체로 이해되어야 하지만, 여기서 모 항체는 하나 이상의 명시된 돌연변이를 갖지 않는다. 본 발명의 "변이체" 또는 "항체 변이체" 또는 "모 항체의 변이체"는 "모 항체"와 비교하여 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 항체 분자이다. 아미노산 치환은 본래의 아미노산을 다른 자연적으로 발생한 아미노산 또는 비자연적으로 발생시킨 아미노산 유도체로 교체할 수 있다. 아미노산 치환은 보존적이거나 비보존적일 수 있다. 본 발명의 맥락에서는 보존적인 치환은 아래 세 개의 표 중 하나 이상에서 반영된 아미노산 분류 내의 치환에 의해 규정될 수 있다.

[0028] **보존적 치환을 위한 아미노산 잔기 분류**

산성 잔기	Asp (D) 및 Glu (E)
염기성 잔기	Lys (K), Arg (R) 및 His (H)
친수성 비전하 잔기	Ser (S), Thr (T), Asn (N) 및 Gln (Q)
지방족 비전하 잔기	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L) 및 Ile (I)
비극성 비전하 잔기	Cys (C), Met (M) 및 Pro (P)
방향성 잔기	Phe (F), Tyr (Y) 및 Trp (W)

[0029]

[0030] **대안적이고 보존적인 아미노산 잔기 치환 분류**

[0031]

1	A	S	T
2	D	E	
3	N	Q	
4	R	K	
5	I	L	M
6	F	Y	W

[0032] **아미노산 잔기의 대안적인 물리적 및 기능적 분류**

[0033]

알코올기 포함 잔기	S 및 T
지방족 잔기	I, L, V 및 M
시클로알케닐 관련 잔기	F, H, W 및 Y
소수성 잔기	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W 및 Y
음전하 잔기	D 및 E
극성 잔기	C, D, E, H, K, N, Q, R, S 및 T
양전하 잔기	H, K 및 R
크기가 작은 잔기	A, C, D, G, N, P, S, T 및 V
크기가 아주 작은 잔기	A, G 및 S
턴 형성에 관여하는 잔기	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P 및 T
유연한 잔기	Q, T, K, S, G, N, D, E 및 R

[0034] 본 발명의 맥락에서 변이체 내 치환은 아래와 같이 표기하였다:

[0035] 본래의 아미노산 - 위치 - 치환된 아미노산;

[0036] 아미노산을 지칭하는 약어 Xaa 및 X와 같이 세 글자 약어 또는 한 글자 약어로 사용된다. 따라서, 표기법 "T366W"는 모 항체의 366번 위치의 아미노산에 해당하는 트레오닌에서 트립토판으로의 치환을 포함하는 변이체를 의미한다.

[0037] 더불어, 용어 "치환"은 나머지 19개의 천연 아미노산 중 임의의 하나로의 치환 또는 비천연 아미노산과 같은 다른 아미노산으로의 치환을 포함한다. 예를 들면, 366번 아미노산 T의 치환은 아래의 치환 각각을 포함한다: 366A, 366C, 366D, 366G, 366H, 366F, 366I, 366K, 366L, 366M, 366N, 366P, 366Q, 366R, 366S, 366E, 366V, 366W 및 366Y.

[0038] 본 명세서에서 쓰인 용어 "전장 항체"는 동종형의 야생형 항체에서 일반적으로 발견되는 항체에 해당하는 중쇄와 경쇄, 불변 및 가변 도메인 모두를 포함하는 항체를 의미한다.

[0039] 용어 "키메라 항체"는 가변 영역은 비인간종(예, 설치류)에서 유래되고 불변 영역은 인간과 같은 다른 종에서 유래된 항체를 의미한다. 키메라 항체는 유전 공학을 통해 만들 수 있다. 치료적 요법을 위한 키메라 단클론 항체는 항체의 면역원성을 감소시키기 위해 개발되었다.

[0040] 용어 "인간화 항체"는 인간 항체의 불변 도메인 및 인간 가변 도메인과 높은 수준의 서열 상동성을 갖도록 조작된 비인간 가변 도메인을 포함하도록 유전학적으로 조작한 비인간 항체를 의미한다. 이는 항원 결합 부위를 함께 형성하는 6개의 비인간 항원 인식 영역(CDR)을 상동 인간 수용체 프레임워크 영역(FR)에 이식하여 얻을 수 있다. 모 항체의 결합 친화도와 특이성을 온전히 재건하기 위해서는 모 항체(즉, 비인간 항체)의 프레임워크 잔기로부터 인간 프레임워크 영역으로의 치환(복귀 돌연변이)이 필요할 수 있다. 구조적 상동성 모델링이 프레임워크 영역 내에서 항체의 결합 성질에 중요한 아미노산 잔기를 발견하는 것에 도움이 될 수 있다. 따라서, 인간화 항체는 비인간 CDR 서열, 비인간 아미노산 서열에 대한 하나 이상의 아미노산 복귀 돌연변이를 임의로 포함하는 근본적으로는 인간 프레임워크 영역 및 임의의 완전한 인간 불변 영역을 포함할 수 있다. 임의로, 반드시 복귀 돌연변이일 필요는 없는 추가 아미노산 변형을 도입하여 친화도 및 생화학적 특성과 같은 바람직한 특성을

갖는 인간화 항체를 얻을 수 있다. 비인간 치료용 항체의 인간화는 인체 내에서 면역원성을 최소화하고 이러한 인간화 항체는 동시에 비인간화 항체의 특이성과 결합 친화도을 유지하기 위해 수행한다.

[0041] 용어 "다중 특이성 항체"는 적어도 2개, 특히, 적어도 3개의 상이한, 일반적으로 겹치지 않는 항원결정기(epitope)에 대한 특이성을 갖는 항체를 의미한다. 이러한 항원결정기는 같거나 다른 표적 항원일 수 있다. 항원결정기가 다른 표적에 있는 경우, 이러한 표적은 동일한 세포 또는 다른 세포 또는 세포 유형에 있을 수 있다.

[0042] 용어 "이중 특이성 항체"는 2개의 다른, 일반적으로 겹치지 않는 항원결정기에 대한 특이성을 갖는 항체를 의미한다. 이러한 항원결정기는 같거나 다른 표적에 있을 수 있다. 항원결정기가 다른 표적에 있는 경우, 이러한 표적은 동일한 세포 또는 다른 세포 또는 세포 유형에 있을 수 있다.

[0043] 이중 특이성 항체의 상이한 분류의 예는 (i) 이형이합체를 강제하기 위한 상보적 CH3 도메인을 갖는 IgG-유사 분자; (ii) 분자의 양쪽 각각이 적어도 2개의 상이한 항체의 Fab 단편 또는 Fab 단편의 일부를 포함하는 재조합 IgG 유사 이중 표적화 분자; (iii) 전장 IgG 항체가 여분의 Fab 단편 또는 Fab 단편의 일부에 융합된 IgG 융합 분자; (iv) 단일 사슬 Fv 분자 또는 안정화된 이중체(diabodies)가 중쇄 불변 도메인, Fc 영역 또는 이의 일부에 융합된 Fc 융합 분자; (v) 상이한 Fab 단편이 함께 융합되거나 중쇄 불변 도메인, Fc 영역 또는 이의 일부에 융합된 Fab 융합 분자; 및 (vi) 상이한 단일 사슬 Fv 분자 또는 상이한 이중체 또는 상이한 중쇄 항체(예: 도메인 항체, Nanobodies®)가 서로 융합되거나 다른 단백질 또는 중쇄 불변 도메인, Fc 영역 또는 이의 일부에 융합된 운반 분자에 융합된 scFv- 및 이중체-기반 및 중쇄 항체(예: 도메인 항체, Nanobodies®)를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0044] 상보적 CH3 도메인 분자를 갖는 IgG 유사 분자의 예는 Triomab® (Trion Pharma/Fresenius Biotech), Knobs-into-Holes (Genentech), CrossMAbs (Roche) 및 electrostatically-matched (Amgen, Chugai, Oncomed), LUZ-Y (Genentech, Wranik et al. J. Biol. Chem. 2012, 287(52): 43331-9, doi: 10.1074/jbc.M112.397869. Epub 2012 Nov 1), DIG-body and PIG-body (Pharmabcine, WO2010134666, WO2014081202), Strand Exchange Engineered Domain body (SEEDbody)(EMD Serono), Biclonics (Merus, WO2013157953), FcΔAdp (Regeneron), bispecific IgG1 and IgG2 (Pfizer/Rinat), Azymetric scaffold (Zymeworks/Merck,), mAb-Fv (Xencor), bivalent bispecific antibodies (Roche, WO2009080254) 및 DuoBody® molecules (Genmab)를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0045] 재조합 IgG 유사 이중 표적 분자의 예는 Dual Targeting (DT)-Ig (GSK/Domantis, WO2009058383), Two-in-one Antibody (Genentech, Bostrom, et al 2009. Science 323, 1610-1614), Cross-linked Mabs (Karmanos Cancer Center), mAb2 (F-Star), Zybodies™ (Zyngenia, LaFleur et al. MAbs. 2013 Mar-Apr;5(2):208-18), approaches with common light chain, κλBodies (NovImmune, WO2012023053) 및 CovX-body® (CovX/Pfizer, Doppalapudi, V.R., et al 2007. Bioorg. Med. Chem. Lett. 17,501-506)를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0046] IgG 융합 분자의 예는 Dual Variable Domain (DVD)-Ig (Abbott), Dual domain double head antibodies (Unilever; Sanofi Aventis), IgG-like Bispecific (ImClone/Eli Lilly, Lewis et al. Nat Biotechnol. 2014 Feb;32(2):191-8), Ts2Ab (MedImmune/AZ, Dimasi et al. J Mol Biol. 2009 Oct 30;393(3):672-92) 및 BsAb (Zymogenetics, WO2010111625), HERCULES (Biogen Idec), scFv fusion (Novartis), scFv fusion (Changzhou Adam Biotech Inc) 및 TvAb (Roche)를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0047] Fc 융합 분자의 예는 ScFv/Fc Fusions (Academic Institution, Pearce et al Biochem Mol Biol Int. 1997 Sep;42(6):1179), SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Blankenship JW, et al. AACR 100th Annual meeting 2009 (Abstract #5465); Zymogenetics/BMS, WO2010111625), Dual Affinity Retargeting Technology (Fc-DARTTM) (MacroGenics) 및 Dual(ScFv)2-Fab (National Research Center for Antibody Medicine - China)을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0048] Fab 융합 이중 특이성 항체의 예는 F(ab)2 (Medarex/AMGEN), Dual-Action 또는 Bis-Fab (Genentech), Dock-and-Lock® (DNL) (ImmunoMedics), Bivalent Bispecific (Biotecnol) 및 Fab-Fv (UCB-Celltech)를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0049] scFv-, 이중체-기반 및 도메인 항체의 예는 Bispecific T Cell Engager (BiTE®) (Micromet, Tandem Diabody (Tandab) (Affimed), Dual Affinity Retargeting Technology (DARTTM) (MacroGenics), Single-chain Diabody (Academic, Lawrence FEBS Lett. 1998 Apr 3;425(3):479-84), TCR-like Antibodies (AIT, ReceptorLogics),

Human Serum Albumin ScFv Fusion (Merrimack, WO2010059315) 및 COMBODY molecules (Epigen Biotech, Zhu et al. Immunol Cell Biol. 2010 Aug;88(6):667-75), dual targeting nanobodies® (Ablynx, Hmila et al., FASEB J. 2010) 및 이중 표적 중쇄 단독 도메인 항체를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0050] 항원에 대한 항체의 결합의 맥락에서, 용어 "결합하다" 또는 "특이적으로 결합하다"는 본 명세서에서 기재한 바와 같이 유세포 분석기를 이용하여 측정하였을 때, 항체가 미리 결정된 항원 또는 표적(예: 인간 PSMA 또는 Vδ2)에 일반적으로 10^{-6} M 또는 그 이하, 예를 들면 10^{-7} M 또는 그 이하, 특히 10^{-8} M 또는 그 이하, 특히 10^{-9} M 또는 그 이하, 10^{-10} M 또는 그 이하, 특히 10^{-11} M또는 그 이하의 K_D에 해당하는 친화도로 결합하는 것을 의미한다. 대안적으로, 분명한 K_D 값은 항원을 리간드(ligand)로 이용하고 결합하는 물질 또는 결합하는 분자를 피분석물(analyte)로 이용하여 BIAcore T200 기기로 표면 플라스몬 공명(Surface Plasmon Resonance)을 수행하여 측정할 수 있다. 특이적인 결합은 항체가 미리 결정된 항원에 결합하는 친화도가 미리 결정된 항원 또는 그와 유사한 항원이 아닌 비특이적 항원(예: BSA, 카세인)에 결합하는 친화도보다 적어도 10배, 특히 적어도 100배, 예를 들면 적어도 1,000배, 특히 10,000배, 예를 들면 100,000배 낮은 K_D에 해당하는 것을 의미한다. 친화도가 낮아지는 정도는 결합하는 물질 또는 결합하는 분자의 K_D에 따라 달라지므로 결합하는 물질 또는 결합하는 분자의 K_D가 매우 낮을 때(즉, 결합하는 물질 또는 결합하는 분자가 매우 특이적일 때), 항원에 대한 친화도가 비특이적 항원에 대한 친화도보다 낮은 정도가 적어도 10,000배일 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어 "K_D" (M)는 항원과 결합 물질 또는 결합 분자 간의 특정 상호 작용의 평형 해리 상수를 의미한다.

[0051] 본 발명의 맥락에서 "경쟁" 또는 "경쟁할 수 있는" 또는 "경쟁하다"는 특정 결합 분자(예: PSMA 항체)가 특정 결합 파트너(예: PSMA)에 결합하는 경향에서 결합 파트너에 결합하는 다른 분자(예: 상이한 PSMA 항체)의 존재하에 그 경향성이 검출 가능할 정도로 크게 감소하는 것을 의미한다. 일반적으로, 경쟁은 충분한 양의 두 가지 이상의 경쟁하는 분자, 예를 들면 항체를 이용하여 ELISA 분석 또는 유세포 분석과 같은 방법으로 측정하였을 때, 항체와 같은 다른 분자의 존재로 인해 결합이 적어도 25 퍼센트 감소, 특히 적어도 50 퍼센트, 즉, 적어도 75 퍼센트, 특히, 적어도 90 퍼센트 감소하는 것을 의미한다. 경쟁적인 저해에 의해 결합력을 측정하는 추가적인 방법은 예를 들면 Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1988), Colligan et al., eds., Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc, and Wiley InterScience N. Y., (1992, 1993), 및 Muller, Meth. Enzymol. 92, 589-601 (1983)에서 확인할 수 있다. 실시예에서 본 발명의 항체는 LV1050 항체와 같은 PSMA의 항원결정기 및/또는 5C8 또는 6H4 항체와 같은 Vδ2의 항원결정기에 결합한다. 항체와 같은 결합 분자의 항원결정기를 확인하는 방법은 당업계에 알려져 있다.

[0052] 용어 "제1" 및 "제2" 항원 결합 영역은 본 명세서에서 사용되었을 때 항체 내에서 방향/위치를 지칭하지 않는다. 즉, 그것들은 N- 또는 C-말단과 관련된 의미를 갖지 않는다. 용어 "제1" 및 "제2"는 청구 범위 및 설명에서 2개의 상이한 항원 결합 영역을 정확하고 일관되게 지칭하는 역할만 한다.

[0053] "Vγ9Vδ2 T 세포 수용체에 결합할 수 있는"은 Vγ9Vδ2 T 세포 수용체에 결합할 수 있는 결합 분자를 의미하나, 다른 서브유닛의 부재 하에 개별의 서브유닛 중 하나, 즉 Vγ9 사슬 단독 또는 Vδ2 사슬 단독과 결합하는 물질을 배제하지 않는다. 예를 들면, 5C8 항체는 Vγ9Vδ2 T 세포 수용체와 결합하는 항체이지만 Vγ9 사슬이 단독으로 발현하였을 때 Vγ9 사슬과도 결합한다. 이 용어는 항체가 두 사슬의 조합에 특이적인 것 또한 배제하지 않는다.

[0054] 본 명세서에서 사용된 "% 서열 동일성"은 최적의 정렬을 위해 도입해야 하는 갭(gap)의 수 및 각 갭의 길이를 고려하여, 상이한 서열에 의해 공유된 동일한 뉴클레오타이드 또는 아미노산 위치의 수를 의미한다(즉, % 동일성 = 동일한 위치의 개수/위치의 전체 개수 x 100). 두 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열 간의 동일성 비율은 ALIGN 프로그램(버전 2.0)으로 통합된 E. Meyers and W. Miller, Comput. Appl. Biosci 4, 11-17 (1988)의 알고리즘을 사용하거나 PAM120 weight residue table, 12의 갭 페널티, 및 4의 갭 페널티를 이용하여 확인할 수 있다.

[0055] 본 발명의 추가적인 요소 및 구체화

[0056] 위에서 서술한 바와 같이, 첫번째 주요한 측면에서, 본 발명은 인간 PSMA와 결합할 수 있는 제1 항원 결합 영역 및 인간 Vγ9Vδ2 T 세포 수용체와 결합할 수 있는 제2 항원 결합 영역을 포함하는 다중 특이성 항체에 관한 것

이다.

[0057] 한 실시예에서 다중 특이성 항체는 이중 특이성 항체이다. 다른 실시예에서 제1 항원 결합 영역은 단일 도메인 항체이다. 또 다른 실시예에서 제2 항원 결합 영역은 단일 도메인 항체이다. 추가적인 실시예에서 제1 항원 결합 영역 및 제2 항원 결합 영역은 둘다 단일 도메인 항체이다. 추가적인 실시예에서 다중 특이성 항체는 제1 항원 결합 영역이 단일 도메인 항체이고 제2 항원 결합 영역이 단일 도메인 항체인 이중 특이성 항체이다.

[0058] 실시예에서 다중 특이성 항체는 인간 PSMA에 대한 결합에 대해 서열번호 2에 제시된 서열을 갖는 항체와 경쟁한다(즉, 경쟁할 수 있다). 바람직하게는, 다중 특이성 항체는 서열번호 2에 제시된 서열을 갖는 항체와 같은 인간 PSMA 항원결정기에 결합한다. 실시예에서 다중 특이성 항체는 아래의 아미노산 잔기 중 하나 이상 또는 전부를 포함하는 인간 PSMA에 있는 항원결정기와 결합한다: R190, S197, R204, S317, R320, S322, K324, H618, S631, K729, R730 및 Y733, 여기서 아미노산 잔기의 번호는 UniProt 서열 Q04609-1에 해당한다. 추가적인 실시예에서 제1 항원 결합 영역은 서열번호 14에 제시된 VH CDR1 서열, 서열번호 15에 제시된 VH CDR2 서열 및 서열번호 16에 제시된 VH CDR3의 서열을 포함한다.

[0059] 추가적인 실시예에서 제1 항원 결합 영역은 인간화되고, 여기서 바람직하게는 제1 항원 결합 영역이 아래를 포함하거나 이로 구성된다.

[0060] · 서열번호 2에 제시된 서열, 또는

[0061] · 서열번호 2에 제시된 서열과 적어도 90%, 특히, 적어도 92%, 예를 들어, 적어도 94%, 특히, 적어도 96%, 특히, 적어도 98%의 서열 동일성을 갖는 서열.

[0062] 위에서 서술한 바와 같이, 본 발명의 다중 특이성 항체는 Vγ9Vδ2 T 세포 수용체와 결합할 수 있는 제2 항원 결합 영역을 포함한다. 실시예에서 다중 특이성 항체는 인간 Vγ9Vδ2 T 세포를 활성화시킬 수 있다. Vγ9Vδ2 T 세포의 활성화는 유전자 발현 및/또는 (표면) 마커 발현(예: CD25, CD69, 또는 CD107a와 같은 활성화 마커) 및/또는 분비 단백질(예: 사이토카인 또는 케모카인) 프로필을 통해 측정될 수 있다. 바람직한 예로, 다중 특이성 항체는 활성화(예: CD69 및/또는 CD25 발현의 증가)를 유발할 수 있어 CD107a 발현의 증가로 표시되는 탈과립화(예: 실시예 5 참고) 및/또는 Vγ9Vδ2 T 세포를 통한 사이토카인 생산(예: TNFα, IFNγ)을 야기한다. 바람직하게, 본 명세서의 실시예 5에 기재된 바와 같이 시험하였을 때, 본 발명의 다중 특이성 항체는 CD107a-양성 세포의 수를 적어도 2배, 특히, 적어도 5배 증가시킬 수 있다. 다른 바람직한 실시예에서는, 실시예 5에 기재된 바와 같이 Vγ9Vδ2 T 세포 및 LNCaP 표적 세포를 이용하여 시험하였을 때, 본 발명의 다중 특이성 항체는 CD107a-양성 세포의 비율을 증가시키는 것에 있어서 50 pM 이하, 예를 들어 25 pM 이하, 예를 들어 20 pM 이하, 예를 들어 15 pM 이하, 예를 들어 10 pM 이하, 또는 심지어 5pM 이하, 특히 2 pM 이하 또는 1 pM 이하의 EC_{50} 값을 갖고 있다.

[0063] 본 발명의 다중 특이성 항체의 실시예에서, 다중 특이성 항체는 Vδ2와 결합할 수 있다. Vδ2는 Vγ9Vδ2 T 세포 수용체의 델타 사슬의 일부이다. 인간 Vδ2와 결합할 수 있는 항체는 온전히 Vδ2 영역 내에 위치한 항원결정기에 결합할 수 있거나 Vδ2 영역의 잔기와 델타 사슬의 불변 영역의 조합인 항원결정기에 결합할 수도 있다. 다른 실시예에서 다중 특이성 항체는 인간 Vγ9와 결합할 수 있다. Vγ9는 Vγ9Vδ2 T 세포 수용체의 감마 사슬의 일부이다. 인간 Vγ9와 결합할 수 있는 항체는 온전히 Vγ9 영역 내에 위치한 항원결정기와 결합할 수 있거나 Vγ9 영역의 잔기와 감마 사슬의 불변 영역의 조합인 항원결정기에 결합할 수도 있다. Vδ2 또는 Vγ9와 결합하는 항체는 WO2015156673에 기재되어 있고 이의 항원 결합 영역, 적어도 이의 CDR 서열은 본 발명의 다중 특이성 항체에 통합될 수 있다. Vγ9Vδ2 T 세포 수용체 결합 영역이 유래될 수 있는 항체의 다른 예는 T 세포 수용체 Vγ9 항체 7A5(ThermoFisher)(Oberg et al. (2014) Cancer Res 74:1349) 및 Neuman et al. (2016) J Med Prim 45:139에 기재된 항체 B1.1(ThermoFisher) 및 5A6.E9(ATCC HB 9772)이다.

[0064] 실시예에서 다중 특이성 항체는 인간 Vδ2와의 결합에 대해 서열번호 5에서 제시된 서열을 갖는 항체와 경쟁하거나 인간 Vδ2와의 결합에 대해 서열번호 20에서 제시된 서열을 갖는 항체와 경쟁한다. 추가적인 실시예에서 다중 특이성 항체는 서열번호 5에 제시된 서열을 갖는 항체와 같은 인간 Vδ2의 항원결정기에 결합하거나 서열번호 20에 제시된 서열을 갖는 항체와 같은 인간 Vδ2의 항원결정기에 결합한다.

[0065] 본 발명의 다중 특이성 항체의 실시예에서, 제2 항원 결합 영역은 서열번호 17에 제시된 VH CDR1 서열, 서열번호 18에 제시된 VH CDR2 서열 및 서열번호 19에 제시된 VH CDR3의 서열, 또는 서열번호 21에 제시된 VH CDR1, 서열번호 22에 제시된 VH CDR2 및 서열번호 23에 제시된 VH CDR3 서열을 포함한다.

[0066] 본 발명의 다중 특이성 항체의 실시예에서, 제2 항원 결합 영역은 인간화된다.

[0067] 추가 실시예에서, 제2 항원 결합 영역은 아래를 포함하거나 구성된다.

[0068] · 서열번호 5에 제시된 서열, 또는

[0069] · 서열번호 5에 제시된 서열과 적어도 90%, 특히, 적어도 92%, 예를 들어, 적어도 94%, 특히, 적어도 96%, 특히, 적어도 98%의 서열 동일성을 갖는 서열.

[0070] 본 발명의 다중 특이성 항체의 실시예에서는, 제1 항원 결합 영역은 서열번호 14에 제시된 VH CDR1 서열, 서열번호 15에 제시된 VH CDR2 서열 및 서열번호 16에 제시된 VH CDR3 서열을 포함하고, 제2항원 결합 영역은 서열번호 17에 제시된 VH CDR1 서열, 서열번호 18에 제시된 VH CDR2 서열 및 서열번호 19에 제시된 VH CDR3 서열을 포함한다.

[0071] 본 발명의 다중 특이성 항체의 다른 실시예에서는, 제1 항원 결합 영역은 서열번호 14에 제시된 VH CDR1 서열, 서열번호 15에 제시된 VH CDR2 서열 및 서열번호 16에 제시된 VH CDR3 서열을 포함하고, 제2항원 결합 영역은 서열번호 21에 제시된 VH CDR1 서열, 서열번호 22에 제시된 VH CDR2 서열 및 서열번호 23에 제시된 VH CDR3 서열을 포함한다.

[0072] 실시예에서 본 발명의 다중 특이성 항체는 Vγ9Vδ2 T 세포의 활성화를 통해 LNCaP 세포, 22Rv1 세포 또는 VCaP 세포와 같은 PSMA 발현 세포의 사멸을 매개할 수 있다. 바람직하게는, 본 명세서의 실시예 6에 기재된 바와 같이 시험하였을 때, 상기 항체는 EC_{50} 값이 50pM 이하, 예를 들어 25pM 이하, 예를 들어 20pM 이하, 예를 들어 15pM 이하, 예를 들어 10pM 이하, 또는 심지어 5pM 이하, 특히 2 pM 이하 또는 1 pM 이하인 수준으로 Vγ9Vδ2 T 세포의 활성화를 통해 LNCaP 세포의 사멸을 유도할 수 있다.

[0073] 다른 실시예에서는, 본 명세서의 실시예 13에 기재된 바와 같이 24시간 후에 시험하였을 때, 바람직하게는 작동 세포 대 표적 세포 비율이 1:1 및 1:10인 두 조건 모두에서 상기 항체는 EC_{50} 값이 50pM 이하, 예를 들어 25pM 이하, 예를 들어 20pM 이하, 예를 들어 15pM 이하, 예를 들어 10pM 이하, 또는 심지어 5pM 이하, 특히 2 pM 이하 또는 1 pM 이하인 수준으로 Vγ9Vδ2 T 세포의 활성화를 통해 LNCaP 세포, 22Rv1 세포 또는 VCaP 세포의 사멸을 유도할 수 있다.

[0074] 또 다른 실시예에서는, 본 명세서의 실시예 7에 기재한 바와 같이 시험하였을 때, 본 발명의 다중 특이성 항체는 50 nM 이하, 특히, 20 nM 이하, 예를 들면, 10 nM 이하의 EC_{50}으로 PSMA 양성 전립선암 세포주인 LNCaP에 결합할 수 있다. 다른 실시예에서는, 실시예 7에 기재한 바와 같이 시험하였을 때, 본 발명의 다중 특이성 항체는 10 nM 이하, 특히 5 nM 이하, 예를 들면 2 nM 이하의 EC_{50}으로 Vγ9Vδ2 T 세포와 결합할 수 있다. 다른 실시예에서, 실시예 11에 기재한 바와 같이 시험하였을 때, 본 발명의 항체는 100 nM 이하, 특히, 50 nM 이하 수준의 K_D 값으로 재조합 인간 PSMA와 결합할 수 있다. 다른 실시예에서는, 실시예 11에 기재한 바와 같이 시험하였을 때, 본 발명의 항체는 10 nM 이하, 특히, 5 nM 이하, 예를 들면, 2 nM 이하, 특히, 1 nM 이하의 K_D값으로 인간 Vγ9Vδ2-Fc와 결합할 수 있다.

[0075] 추가적인 실시예에서, 전립선암 환자 유래의 인간 PSMA 발현 세포의 사멸을 매개할 수 있다. 전립선암 환자 유래의 인간 PSMA 발현 세포의 사멸은 예를 들면 실시예 10에 기재한 바와 같이 측정할 수 있다. 실시예에서, 본 발명의 다중 특이성 항체는 실시예 10 또는 실시예 14에 기재한 검증법으로 측정하였을 때, 50 nM의 농도로 특정 세포 사멸을 25% 이상, 특히, 50% 이상 매개할 수 있다.

[0076] 추가 실시예에서, 다중 특이성 항체는 PSMA 음성 세포, 특히 PSMA 음성 인간 세포의 사멸을 매개할 수 없다. 다른 실시예에서, 실시예 16에서 기재한 바와 같이 시험하였을 때, 다중 특이성 항체는 280 nM의 농도까지는 건강한 공여자의 전혈에서 IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 또는 TNFα를 유도하지 않는다. 다른 실시예에서는, 실시예 16에서 기재한 바와 같이 시험하였을 때, 건강한 공여자의 전혈에서 Campath®보다 10배 이상 낮은 IL-8 및/또는 50배 이상 낮은 IFNγ를 유도한다.

[0077] 실시예에서, 제1 항원 결합 영역 및 제2 항원 결합 영역은 펩타이드 링커, 예를 들면, 1 내지 20개의 아미노산, 예를 들면 1 내지 10개, 특히 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산 길이를 갖는 링커를 통해 공유결합되어 있다. 실시예에서, 펩타이드 링커는 서열번호 6에 제시된 서열 GGGGS를 포함하거나 구성된다.

[0078] 일부 실시예에서, 인간 PSMA에 결합할 수 있는 제1 항원 결합 영역은 인간 Vγ9Vδ2 T 세포 수용체에 결합할 수

있는 제2 항원 결합 영역의 N-말단에 위치한다.

[0079] 본 발명의 실시예에서, 다중 특이성 항체는 반감기 연장 도메인을 포함한다. 실시예에서, 다중 특이성 항체는 인간 피험자에게 투여되었을 때 168 시간보다 긴 최종 반감기를 갖는다. 더욱 바람직하게는, 최종 반감기가 336 시간 이상이다. 본 명세서에서 사용된 항체의 "최종 반감기"는 생체 내 제거기 최종 단계에서 폴리펩타이드의 혈청 농도가 50%까지 감소하는 데 소요되는 시간을 의미한다.

[0080] 실시예에서는, 다중 특이성 항체는 Fc 영역을 포함한다. 이중 특이성 항체를 제작하는 다양한 방법은 당업계에서 기술되어 왔다. 예를 들면 Brinkmann and Kontermann (2017) MAbs 9:182.에 검토되었다. 본 발명의 실시예에서, Fc 영역은 2개의 Fc 폴리펩타이드를 포함하는 이형이합체이고, 여기서 제1 항원 결합 영역은 첫번째 폴리펩타이드에 융합되고 제2 항원 결합 영역은 두번째 Fc 폴리펩타이드에 융합되어 있으며 첫번째 및 두번째 폴리펩타이드는 동형이합체의 형성보다 이형이합체의 형성을 선호하는 비대칭적인 아미노산 돌연변이를 포함한다(예: Ridgway et al. (1996) 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. Protein Eng 9:617). 본 명세서의 추가 실시예에서, Fc 폴리펩타이드의 CH3 영역은 비대칭적인 아미노산 돌연변이, 바람직하게는 첫번째 Fc 폴리펩타이드는 T366W 치환을 포함하고 두번째 Fc 폴리펩타이드는 T366S, L368A 및 Y407V 치환을 포함하거나 그 반대의 경우를 포함하며, 여기서 아미노산 위치는 EU 넘버링 체계에 따른 인간 IgG에 해당한다. 추가 실시예에서, 첫번째 및 두번째 Fc 폴리펩타이드에 있는 220번의 시스테인이 제거되거나 치환되었고, 여기서 아미노산 위치는 EU 넘버링 체계에 따른 인간 IgG에 해당한다. 추가 실시예에서, 상기 영역은 서열번호 10에 제시된 서열을 포함한다.

[0081] 일부 실시예에서, 첫번째 및/또는 두번째 Fc 폴리펩타이드는 항체를 불활성으로 만드는, 즉, 작동 기능을 매개할 수 없는 돌연변이를 포함한다. 실시예에서는, 첫번째 및 두번째 Fc 폴리펩타이드는 234번 및/또는 235번 위치에 돌연변이, 바람직하게는 첫번째 및 두번째 Fc 폴리펩타이드는 L234F 및 L235E 치환을 포함하고, 여기서 아미노산 위치는 EU 넘버링 체계에 따른 인간 IgG에 해당한다.

[0082] 바람직한 실시예에서, 제1 항원 결합 영역은 서열번호 2에 제시된 서열을 포함하고 제2 항원 결합 영역은 서열번호 5에 제시된 서열을 포함하며

[0083] - 첫번째 Fc 폴리펩타이드는 서열번호 12에 제시된 서열을 포함하고 두번째 Fc 폴리펩타이드는 서열번호 13에 제시된 서열을 포함하거나

[0084] - 첫번째 Fc 폴리펩타이드는 서열번호 13에 제시된 서열을 포함하고 두번째 Fc 폴리펩타이드는 서열번호 12에 제시된 서열을 포함한다.

[0085] 추가적인 실시예에서, 상기 항체는 서열번호 25 및 서열번호 26에 제시된 서열을 포함하거나 구성된다.

[0086] 추가적인 주요 측면에서, 본 발명은 본 명세서에서 기재한 본 발명에 따른 다중 특이성 항체와 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0087] 항체는 (Rowe et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2012 June, ISBN 9780857110275)에서 밝힌 것과 같은 통상적인 기술에 따라 약학적으로 허용되는 부형제와 함께 제형화될 수 있다. 약학적으로 허용되는 부형제뿐만 아니라 임의의 운반체, 희석제, 또는 보조제는 항체 및 선택된 투여 방식에 적합해야 한다. 약학적 조성물의 부형제 및 다른 성분의 적합성은 본 발명의 선택된 항체 또는 약학적 조성물의 원하는 생물학적 특성에 유의미한 부정적 영향이 없는지에 기초하여 결정된다. (예: 항원 결합에 대해 실질적인 영향 미만(10% 이하의 상대적 저해, 5% 이하의 상대적 저해 등))

[0088] 약학적 조성물은 희석제, 필터, 염, 완충액, 계면활성제(예: 트윈20 또는 트윈80과 같은 비이온 계면활성제), 안정제(예: 당 또는 무단백질 아미노산), 보존제, 조직 고정제, 용해제 및/또는 약학적 조성물에 포함되기에 적합한 기타 재료를 포함할 수 있다. 더불어 약학적으로 허용되는 부형제는 임의의 및 모든 적합한 용매, 분산매, 코팅, 항균제 및 항진균제, 등장액, 항산화제 및 흡수지연제 및 본 발명의 항체에 생리학적으로 적합한 기타 물질을 포함할 수 있다.

[0089] 실시예에서, 약학적 조성물은 본 발명의 다중 특이성 항체(바람직하게는 Fc 영역을 포함하는 항체), 완충액 및 항산화제를 포함하고, 여기서 상기 조성물의 pH는 5.4 내지 7.4, 특히 5.4 내지 6.1이다.

[0090] 추가 실시예에서, 약학적 조성물은 본 발명의 다중 특이성 항체, 완충액 및 메티오닌을 포함하고, 여기서 상기 조성물의 pH는 5.4 내지 7.4, 특히 5.4 내지 6.1이다.

[0091] 추가 실시예에서, 약학적 조성물은 본 발명의 다중 특이성 항체, 완충액, 수크로즈, 폴리소르베이트 80 및 메티오닌을 포함하고, 여기서 상기 조성물의 pH는 5.4 내지 7.4, 특히 5.4 내지 6.1이다.

[0092] 추가 실시예에서, 약학적 조성물은 본 발명의 다중 특이성 항체, 히스티딘 또는 아세트산나트륨 완충액, 수크로즈, 폴리소르베이트 80 및 메티오닌을 포함하고, 여기서 상기 조성물의 pH는 5.4 내지 7.4, 특히 5.4 내지 6.1이다.

[0093] 바람직하게, 완충액 농도는 5 내지 25 mM, 특히 10 mM이다. 바람직하게, 수크로즈 농도는 100 내지 500 mM, 특히 250 mM 내지 300 mM, 예를 들면 280 mM이다. 바람직하게, 폴리소르베이트 80 농도는 0.005% 내지 0.1%, 특히 0.01% 내지 0.05%, 예를 들면 0.02%이다. 바람직하게 메티오닌 농도는 0.2 mM 내지 5 mM, 특히 0.5 mM 내지 2 mM, 예를 들면 1 mM이다. 바람직하게, 상기 조성물 내 다중 특이성 항체는 Fc 영역을 포함한다.

[0094] 따라서, 바람직한 실시예에서, 약학적 조성물은 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 다중 특이성 항체, 히스티딘 또는 아세트산나트륨 완충액, 수크로즈, 폴리소르베이트 80, 및 메티오닌을 포함하고, 여기서 상기 조성물의 pH는 5.4 내지 7.4, 특히 5.4 내지 6.1이다.

[0095] 따라서, 바람직한 실시예에서, 약학적 조성물은 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 다중 특이성 항체, 10 M의 히스티딘 또는 아세트산나트륨 완충액, 280 mM의 수크로즈, 0.02%의 폴리소르베이트 80 및 1 mM의 메티오닌을 포함하고, 여기서 상기 조성물의 pH는 5.5 또는 6.0이다.

[0096] 바람직하게, Fc 영역은 2개의 Fc 폴리펩타이드를 포함하는 이형이합체이고, 여기서 제1 항원 결합 영역은 첫번째 폴리펩타이드에 융합되고 제2 항원 결합 영역은 두번째 Fc 폴리펩타이드에 융합되어 있으며 첫번째 및 두번째 폴리펩타이드는 동형이합체의 형성보다 이형이합체의 형성을 선호하는 비대칭적인 아미노산 돌연변이를 포함한다. 바람직하게 Fc 폴리펩타이드의 CH3 영역은 비대칭적인 아미노산 돌연변이, 바람직하게는 첫번째 Fc 폴리펩타이드는 T366W 치환을 포함하고 두번째 Fc 폴리펩타이드는 T366S, L368A 및 Y407V 치환을 포함하거나 그 반대의 경우를 포함한다. 또한, 바람직하게, 첫번째 및 두번째 Fc 폴리펩타이드는 220번의 시스테인이 제거되거나 치환되었다. 그리고/또는 첫번째 및 두번째 Fc 폴리펩타이드는 234번 및/또는 235번에 돌연변이를 포함하고, 바람직하게는 여기서 첫번째 및 두번째 Fc 폴리펩타이드는 L234F 및 L235E 치환을 포함한다.

[0097] 또한, 바람직하게, 상기 조성물 내 다중 특이성 항체는 서열번호 2에 제시된 서열을 포함하는 제1 항원 결합 영역 및 서열번호 5에 제시된 서열을 포함하는 제2 항원 결합 영역을 포함하고

[0098] · 첫번째 Fc 폴리펩타이드는 서열번호 12에 제시된 서열을 포함하고 두번째 Fc 폴리펩타이드는 서열번호 13에 제시된 서열을 포함하거나

[0099] · 첫번째 Fc 폴리펩타이드는 서열번호 13에 제시된 서열을 포함하고 두번째 Fc 폴리펩타이드는 서열번호 12에 제시된 서열을 포함하며

[0100] 약학적 조성물은 10 M 히스티딘 또는 아세트산나트륨 완충액, 280 mM 수크로즈, 0.02% 폴리소르베이트 80 및 1 mM 메티오닌을 포함한다. 여기서 상기 조성물의 pH는 5.5 또는 6.0이다.

[0101] 바람직하게, 항체 농도는 0.1 mg/ml 내지 20 mg/ml, 특히 0.1 내지 10 mg/ml, 예를 들면 0.5 mg/ml 내지 2 mg/ml, 특히 1 mg/ml이다.

[0102] 추가적인 주요 측면에서, 본 발명은 의약품 용도로서의 본 명세서에서 기재한 본 발명에 따른 다중 특이성 항체에 관한 것이다.

[0103] 본 발명에 따른 다중 특이성 항체는 Vγ9Vδ2 T 세포에 의해 종양 세포, 특히 PSMA 양성 종양 세포의 사멸에 유익한 미세환경을 조성할 수 있다.

[0104] 따라서, 바람직한 실시예에서, 다중 특이성 항체는 암 치료 용도이다. 추가적인 바람직한 실시예에서, 다중 특이성 항체는 전이성 또는 비전이성 전립선암과 같은 전립선암의 치료 용도이다. 다른 실시예에서, 다중 특이성 항체는 대장암, 폐암, 유방암, 자궁내막암, 난소암, 위암, 신장세포암, 방광암, 간세포암, 구강편평세포암, 갑상선암 및 교모세포종을 포함하는 원발성 또는 전이성 종양의 신생 혈관 또는 종양 관련 내피 세포에서 PSMA를 발현하는 암의 치료 용도이다. 다른 실시예에서, 다중 특이성 항체는 두경부의 샘낭암종 치료 용도이다.

[0105] 이와 유사하게, 본 발명은 본 명세서에서 기술된 바와 같이 본 발명에 따른 다중 특이성 항체를 이를 필요로 하는 인간 피험자에게 투여하는 것을 포함하는 질병 치료 방법에 관한 것이다. 실시예에서 상기 질병은 암, 특히

전립선암, 예를 들면 전이성 또는 비전이성 전립성암이다.

[0106] 일부 실시예에서, 항체는 단일 요법으로 투여된다. 그러나 본 발명의 항체는 병용 요법으로, 즉, 치료할 질환 또는 상태에 관련된 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있다.

[0107] "치료" 또는 "치료하는"은 증상 또는 질병 상태를 완화, 개선, 저지, 근절(치유) 또는 예방할 목적으로 본 발명에 따른 항체의 유효량을 투여하는 것을 의미한다. "유효량"은 원하는 치료적 결과를 얻기 위해 필요한 기간 및 용량 측면에서 유효한 양을 의미한다. 항체와 같은 폴리펩타이드의 유효량은 개개인의 질병 상태, 연령, 성별 및 체중 및 개개인에게 원하는 반응을 일으키는 항체의 효능과 같은 요소에 따라 달라질 수 있다. 또한, 유효량에서는 항체의 치료상 유익한 효과가 독성 또는 유해 효과보다 중요하다. 본 발명의 항체의 유효량의 예시적이지만 비제한적인 범위는 0.1 μg/kg 내지 100 mg/kg, 특히 1 μg/kg 내지 50 mg/kg, 예를 들면 0.01 내지 20 mg/kg, 특히 0.1 내지 10 mg/kg, 예를 들면 0.5, 0.3, 1, 3, 5 또는 8 mg/kg이다. 투여는 임의의 적합한 경로를 통해 수행될 수 있으나 일반적으로 정맥 내, 근육 내 또는 피하와 같은 비경구적 투여일 것이다.

[0108] 본 발명의 다중 특이성 항체는 일반적으로 재조합 방식, 즉, 항체를 암호화하는 핵산을 적합한 숙주 세포에서 발현시키고 생산된 재조합 항체를 세포 배양액으로부터 정제하여 생산된다. 핵산은 당업계에 널리 알려진 일반적인 분자 생물학 기술로 제작된다. 상기 핵산은 일반적으로 발현 벡터를 통해 숙주 세포로 도입된다. 적합한 핵산 및 발현 벡터는 당업계에 알려져 있다. 항체의 재조합 발현에 적합한 숙주 세포는 당업계에 잘 알려져 있고 CHO, HEK293, Expi293F, PER-C6, NS/0 및 Sp2/0 세포를 포함한다.

[0109] 따라서, 추가적인 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 다중 특이성 항체를 암호화하는 핵산에 관한 것이다. 실시예에서, 상기 핵산은 DNA 구성물이다. 다른 실시예에서, 상기 핵산은 RNA 구성물이다.

[0110] 추가적인 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 다중 특이성 항체를 암호화하는 핵산을 포함하는 발현 벡터에 관한 것이다.

[0111] 추가적인 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 다중 특이성 항체를 암호화하는 하나 이상의 핵산 또는 본 발명에 따른 다중 특이성 항체를 암호화하는 핵산을 포함하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포, 즉, 포유류 숙주 세포, 바람직하게는 CHO 세포와 같은 재조합 숙주 세포에 관한 것이다.

[0112] 따라서 추가적인 측면에서, 본 발명은 본 발명의 다중 특이성 항체의 생산, 바람직하게는 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 다중 특이성 항체를 다중 특이성 항체를 암호화하는 하나 이상의 핵산을 포유류 숙주 세포, 예를 들면 CHO 세포와 같은 적합한 숙주 세포에 발현시킨 후, 생산된 재조합 항체를 세포 배양물 또는 세포를 제거한 후의 상층액에서 정제하는 과정을 통해 생산하는 것에 관한 것이다.

표 1

[0113] **표1: 서열 목록**

서열 번호	코드	설명	서열
1	LV1044-JVZ007	VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAASRFMISEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGTTDYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCDGYGYRGQGTQVSS
2	LV1050	VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFMISEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGTTDYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCDGYGYRGQGTQVTVSS
3	LV1051	VHH	EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCAASRFMISEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGTTDYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCDGYGYRGLGTQVTVSS
4	5C8	VHH	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPFSNYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSGGSTSYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSPKPEDTAIYYCAAQFSGADYGFGRLGIRGYEYDYWGQGTQVTVSS
5	5C8var1	VHH	EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRPFSNYAMSWFRQAPGKEREFVSAISWSGGSTSYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAQFSGADYGFGRLGIRGYEYDYWGQGTQVTVSS
6	링커		GGGGS

7	LV1044-5C8	이중특이성 항체	EVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAASRFMISEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINP AGTTDYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCDGYGYRGQGTQ VTVSSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPFSNYAMGWFRQAPGK EREFVAAISWSGGSTSYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSPKPEDTAIYYC AAQFSGADYGFGRLGIRGYEYDYWGQGTQVTVSS
8	LV1050-5C8v ar1	이중특이성 항체	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFMISEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINP AGTTDYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCDGYGYRGQGTQ VTVSSGGGGSEVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRPFSNYAMSWFRQAPGK EREFVSAISWSGGSTSYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AAQFSGADYGFGRLGIRGYEYDYWGQGTQVTVSSAAAEPEA
9	LV1051-5C8v ar1	이중특이성 항체	EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCAASRFMISEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINP AGTTDYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCDGYGYRGLGTQ VTVSSGGGGSEVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRPFSNYAMSWFRQAPGK EREFVSAISWSGGSTSYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AAQFSGADYGFGRLGIRGYEYDYWGQGTQVTVSSAAAEPEA
10		변형된 힌지 영역 서열	AAASDKTHTCPPCP
11	wtIgG1 (G1m17, G1m(z) allotype)	CH2 및 CH3	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
12	IgG1 L234F L235E T366W	중쇄 불변 영역 변이체	AAASDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG
13	IgG1 L234F L235E T366S L368A Y407V	중쇄 불변 영역 변이체	AAASDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG
14	LV1050	CDR1	RFMISEYSMH
15	LV1050	CDR2	TINPAGTTDYADSVKG
16	LV1050	CDR3	DGYGY
17	5C8var1	CDR1	NYAMS
18	5C8var1	CDR2	AISWSGGSTSYADSVKG
19	5C8var1	CDR3	QFSGADYGFGRLGIRGYEYDY
20	6H4	VHH	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPFSNYGMGWFRQAPGKKREFVAGISW SGGSTDYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVFSGAETA YYPSDDYDYWGQGTQVTVSS
21	6H4	CDR1	GRPFSNYGMG
22	6H4	CDR2	GISWSGGSTDYADSVKG
23	6H4	CDR3	VFSGAETAYYPSDDYDY
24	PSMA		MWNLLHETDSAVATARRPRWLCAGALVLAGGFFLLGFLFGWFIKSSNEATNIT PKHNMKAFLDELKAENIKKFLYNFTQIPHLAGTEQNFQLAKQIQSQWKEFGLD SVELAHYDVLLSYPNKTHPNYISIINEDGNEIFNTSLFEPPPPGYENVSDIVP PFSAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLERDMKINCSGKIVIARYGKVFRGN KVKNAQLAGAKGVILYSDPADYFAPGVKSYPDGWNLPGGGVQRGNILNLNGAG DPLTPGYPANEYAYRRGIAEAVGLPSIPVHPIGYYDAQKLLEKMGGSAPPDSS WRGSLKVPYNVGPGFTGNFSTQKVKMHIHSTNEVTRIYNVIGTLRGAVEPDRY VILGGHRDSWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRSFGTLKKEGWRPRRTILFASWDAE EFGLLGSTEWAEENSRLLQERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCTPLMYSLVHNL TKELKSPDEGFEGKSLYESWTKKSPSPEFSGMPRISKLGSGNDFEVFFQRLGI ASGRARYTKNWETNKFSGYPLYHSVYETYELVEKFYDPMFKYHLTVAQVRGGM VFELANSIVLPFDCRDYAVVLRKYADKIYSISMKHPQEMKTYSVSFDSLFSAV KNFTEIASKFSERLQDFDKSNPIVLRMMNDQLMFLERAFIDPLGLPDRPFYRH VIYAPSSHNKYAGESFPGIYDALFDIESKVDPSKAWGEVKRQIYVAAFTVQAA AETLSEVA

25	5C8var1 Fc L234F L235E T366W		EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRPFSNYAMSWFRQAPGKEREFVSAISW SGGSTSYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAQFSGADYG FGRLGIRGYEYDYWGQGTQVTVSSAAASDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
26	LV1050 Fc L234F L235E T366S L368A Y407V		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFMISEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINP AGTTDYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCDGYGYRGQGTQ VTVSSAAASDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
27	5C8var1 FcL234F L235E T366W		EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRPFSNYAMSWFRQAPGKEREFVSAISW SGGSTSYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAQFSGADYG FGRLGIRGYEYDYWGQGTQVTVSSAAASDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
28	LV1050 Fc L234F L235E T366S L368A Y407V		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFMISEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINP AGTTDYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCDGYGYRGQGTQ VTVSSAAASDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
29	LV1050-5C8v ar1-no-c-ta g		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFMISEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINP AGTTDYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCDGYGYRGQGTQ VTVSSGGGGSEVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRPFSNYAMSWFRQAPGK EREFVSAISWSGGSTSYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AAQFSGADYGFGRLGIRGYEYDYWGQGTQVTVSS
30	PSMA var		MARPLCTLLLLMATLAGALAGSHHHHHHGSKSSNEATNITPKHNMKAFLDELK AENIKKFLYNFTQIPHLAGTEQNFQLAKQIQSQWKEFGLDSVELAHYDVLLSY PNKTHPNYISIINEDGNEIFNTSLFEPPPPGYENVSDIVPPFSAFSPQGMPEG DLVYVNYARTEDFFKLERDMKINCSGKIVIARYGKVFRGNKVKNAQLAGAKGV ILYSDPADYFAPGVKSYPDGWNLPGGGVQRGNILNLNGAGDPLTPGYPANEYA YRRGIAEAVGLPSIPVHPIGYYDAQKLLEKMGGSAPPDSSWRGSLKVPYNVGP GFTGNFSTQKVKMHIHSTNEVTRIYNVIGTLRGAVEPDRYVILGGHRDSWVFG GIDPQSGAAVVHEIVRSFGTLKKEGWRPRRTILFASWDAEEFGLLGSTEWAEE NSRLLQERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCTPLMYSLVHNLTKELKSPDEGFEG KSLYESWTKKSPSPEFSGMPRISKLGSGNDFEVFFQRLGIASGRARYTKNWET NKFSGYPLYHSVYETYELVEKFYDPMFKYHLTVAQVRGGMVFELANSIVLPFD CRDYAVVLRKYADKIYSISMKHPQEMKTYSVSFDSLFSAVKNFTEIASKFSER LQDFDKSNPIVLRMMNDQLMFLERAFIDPLGLPDRPFYRHVIYAPSSHNKYAG ESFPGIYDALFDIESKVDPSKAWGEVKRQIYVAAFTVQAAAETLSEVA
31	huVdelta2 ECD-Fc (hole)-His		MQRISSLIHLSLFWAGVMSAIELVPEHQTVPVSIGVPATLRCSMKGEAIGNYY INWYRKTQGNTMTFIYREKDIYGPGFKDNFQGDIDIAKNLAVLKILAPSERDE GSYYCACDTLGMGGEYTDKLIFGKGTRVTVEPRSQPHTKPSVFVMKNGTNVAC LVKEFYPKDIRINLVSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAVKLGKYEDSNSVTCSV QHDNKTVHSTDFEVKTDSTDHVKPKETENTKQPSKSCHKPKAIVHTEKVNMMS LTAAASDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGHHHHHH

32	huVgamma9 ECD-Fc (knob)-C-tag		MLSLLHASTLAVLGALCVYGAGHLEQPQISSTKTLSKTARLECVVSGITISAT SVYWYRERPGEVIQFLVSISYDGTVRKESGIPSGKFEVDRIPETSTSTLTIHN VEKQDIATYYCALWEAQQELGKKIKVFGPGTKLIITDKQLDADVSPKPTIFLP SIAETKLQKAGTYLCLLEKFFPDVIKIHWEEKKSNTILGSQEGNTMKTNDTYM KFSWLTVPEKSLDKEHRCIVRHENNKNGVDQEIIFPPIKTDVITMDPKDNCSK DANDTLLLQLTNTSAAAASDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGAAAEPEA

[0114] 실시예

실 시 예 1

[0115] **실시예 1: PBMC 분리 및 인간 공여자 유래 Vɣ9Vδ2 T 세포 배양물 생성**

[0116] 건강한 자원공여자로부터 전혈을 수집하였다. 대안적으로, 백혈구연층(버피 코트)은 혈액 공급 서비스 Sanquin에서 공급받았고 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)의 분리에 사용되었다. PBMC는 Lymphoprep™ 밀도 구배 원심 분리를 이용하여 분리하였다. FITC-표지 항-TCR Vδ2 마우스 단클론 항체를 염소 항-마우스 IgG 마이크로비드와 조합하여 자석 활성 세포 분류(magnetic-activated cell sorting, MACS)를 통해 Vɣ9Vδ2 T 세포를 건강한 공여자의 PBMC로부터 분리하였다. 분리된 Vɣ9Vδ2 T 세포는 7일에 한 번씩 두 명의 건강한 공여자로부터 얻은 방사선이 조사된 PBMC 및 10 IU/mL의 IL-7, 10 ng/mL의 IL-15 및 50 ng/ml의 PHA가 첨가된 RPMI에 현탁한 엡스타인바 바이러스 변형된 B 세포주(JY)로 구성된 공급 세포 혼합물로 자극되었다. 확대 배양된 Vɣ9Vδ2 T 세포 배양물은 실험에 이용되기 전에 언제나 순도 확인이 되었고 항상 >95% Vɣ9 및 Vδ2 이중 양성인 것으로 밝혀졌다.

실 시 예 2

[0117] **실시예 2: 항-PSMA VHH JVZ-007 및 항- Vɣ9Vδ2 VHH 5C8의 인간화**

[0118] 낙타과 유래의 항-PSMA VHH JVZ-007 (LV1044; 서열번호 1) (J Nucl Med. 2015 Jul; 56(7):1094-9, supplemental data)의 아미노산 서열은 인간 V 유전자 데이터베이스와 정렬되었고 가장 일치율이 높은 인간 생식 세포 유전자는 IGHV3-74*01인 것으로 밝혀졌다. 인간과 라마 유래 서열 간의 프레임워크 영역의 서열 차이를 기반으로, 2개의 인간화 변이체(서열번호 2 및 3)가 고안되었고 서열의 정렬은 도 1에서 보여진다.

[0119] JVZ-007 및 이러한 두 변이체는 항-Vɣ9Vδ2 VHH 5C8 (WO2015156673에 기술된 Vδ2 결합 항체) (서열번호 4) 또는 5C8의 인간화 변이체 5C8var1 (서열번호 5)와 이중 특이성 VHH 형식으로 조합되었다: 항-PSMA VHH-링커-항- Vɣ9Vδ2 VHH. 링커의 서열은 GGGGS이다(서열번호 6). 3개의 알라닌 잔기가 선행하는 C-말단 C-태그(EPEA 서열)는 정제 및 검출 목적으로 일부 구성물에 추가 되었다. 생성된 구성물의 서열은 서열번호 7-9에 제시된다.

실 시 예 3

[0120] **실시예 3: 이중 특이성 VHH 형식의 반감기가 연장된 버전의 디자인**

[0121] 이중 특이성 VHH 형식의 반감기가 연장된 버전이 Fc-포함 형식을 기반으로 디자인되었다. VHH 서열은 약간 변형된 인간 IgG1 힌지 영역에 결합되었다: 아미노산 잔기 216-230(EU 넘버링)은 AAASDKTHTCPPCP (서열번호 10)으로 교체되었다. 보통 다른 중쇄와 가교를 이루는 시스테인을 제거하고 위쪽 힌지 서열 'EPK'를 3개의 알라닌으로 교체하였다. 이 변형 힌지는 IgG1(G1m17, G1m(z) 동종이형 서열)-CH2 및 -CH3 서열(서열번호 11)과 결합하였다. CH2 서열은 Fc의 면역원성을 감소시키는 돌연변이(L234F, L235E)를 포함하도록 변형되었고 CH3 서열은 놉(knob) 돌연변이(T366W)(서열번호 12) 또는 홀(hole)을 생성하는 3개의 돌연변이(T366S, L368A, 및 Y407V)(서열번호 13)를 포함하도록 변형되었다. 이 놉-인투-홀(KiH) 기술은 두 사슬의 우선적인 이형이합체화를 유도한다. 생성된 구성물은 도 2에 개략적으로 묘사된다.

실 시 예 4

[0122] **실시예 4: 이중 특이성 VHH 분자 및 Fc-포함 구성물의 클로닝, 발현 및 정제**

[0123] 이중 특이성 VHH 분자의 아미노산 서열은 cDNA로 역번역되었고 인간 세포에서의 발현을 위해 코돈

최적화되었다. 조절 요소가 추가되었다: (클로닝을 위한 *BamH1* 및 *Not1* 제한 부위를 포함하는) N-말단 코작(Kozak) 서열 및 C-말단 종결 코돈 및 cDNA가 합성유전자로 만들어졌다. 적합한 벡터에 cDNA가 클로닝되었고 서열이 확인되었다. 단백질의 발현은 HEK293_E 세포에 생성된 플라스미드를 일시적 형질 주입하여 수행되었다. 단백질-A 친화성 크로마토그래피 및 크기 배제 크로마토그래피를 통해 배양 상층액으로부터 단백질을 정제하였다.

[0124] Fc-포함 구성물의 두 단백질 사슬의 아미노산 서열은 암호화된 cDNA로 역번역되었고 필수 조절 요소(코작 서열, 종결 코돈 및 클로닝 부위 *BamH1* 및 *Not1*)가 추가되었으며, cDNA는 발현을 위해 코돈 최적화되었다. 합성 유전자 합성을 통해 cDNA를 만들었고 두 단백질 사슬 중 하나를 암호화하는 발현 플라스미드는 cDNA를 각각 적합한 벡터로 클로닝하여 만들었다. 만들어진 플라스미드는 서열을 확인하고 나서 상이한 플라스미드 비율(1:2, 1:1 및 2:1)로 부유 배양된 CHO 세포에 형질 주입하였다. 분비된 단백질은 배양 상층액으로부터 단백질-A 친화성 크로마토그래피를 통해 정제되었고 완충액은 PBS로 교체되었다. 단백질은 추가적으로 크기 배제 크로마토그래피를 통해 정제되었다.

실 시 예 5

[0125] **실시예 5: 항-PSMA VHH JVZ-007의 인간화 변이체의 검증**

[0126] 인간화 변이체를 포함하는 정제된 이중 특이성 VHH는 4시간의 탈과립화 검증에서 표적-의존적인 T 세포 활성화를 유도하는 능력에 대해 검증되었다. Vγ9Vδ2 T 세포는 자석 활성 세포 분류(MACS)를 통해 PBMC에서 분리되었고 실시예 1에 기술한 바와 같이 확대 배양되었다. 실험에서 사용된 확대 배양 Vγ9Vδ2 T 세포는 항상 순도에 대해 확인되었고 FACS의 Vγ9 및 Vδ2 염색에 대해 >95% 이중 양성으로 밝혀졌다. 분리된 확대 배양 Vγ9Vδ2 T 세포는 같은 수의 PSMA 양성 LNCaP (ATCC, cat. Nr. CRL-1740) 표적 세포(1:1의 작동:표적 (E:T) 세포 비율)와 농도 범위의 이중 특이성 구성물과 함께 배양되었다. 4시간 배양 후, CD107a를 발현하는 T 세포의 비율은 FACS 염색을 통해 확인되었다.

[0127] 도3은 PSMA VHH JVZ-007의 인간화 변이체가 항원-양성 세포주 LNCaP에 의존적으로 Vγ9Vδ2 T 세포의 탈과립화를 유도하는 강한 능력이 있음을 나타낸다. 그러나 항원-음성 세포주 PC-3이 이용되었을 때 이중 특이성 구성물의 단일 고농도는 T 세포의 유의미한 활성화를 유발하지 않았다.

실 시 예 6

[0128] **실시예 6: 이중 특이성 VHH 및 Fc-포함 대응물에 의해 매개되는 세포 독성**

[0129] 이중 특이성 VHH LV1050-5C8var1의 2개의 VHH 서열은 상기 기재된 바와 같이 인간 IgG1 Fc를 포함하는 반감기가 연장된 분자로 재형식화하여 서열번호 25 및 서열번호 26(5C8var1-Fc 및 LV1050-Fc)에 제시된 구성물을 만들었다.

[0130] 이중 특이성 VHH 구성물 LV1050-5C8var1 및 Fc-포함 대응물 5C8var1-Fc x LV1050-Fc(본 명세서에서 LV1050-Fc x 5C8var1로도 기재됨) 둘다 Vγ9Vδ2 T 세포 활성화를 통해 LNCaP 세포의 세포 독성을 유발하는 능력에 대해 검증되었다.

[0131] 도4는 이중 특이성 VHH뿐만 아니라 같은 VHH 서열을 포함하는 Fc-포함 대응물 둘다 1:1의 E:T 비율에서 24시간 후 100%의 종양 세포 용해를 유발할 수 있음을 보여준다. 본래의 항-PSMA VHH JVZ-007를 포함하는 이중 특이성 VHH LV1044-5C8는 인간화 버전인 LV1050-5C8var1만큼 효력이 있었고 둘다 Fc-포함 대응물인 5C8var1-Fc x LV1050-Fc보다 조금 더 효력이 있었다. 확인된 EC_{50} 값은 LV1050-5C8var1 및 LV1044-5C8에 대해서 각각 2.2 pM 및 1.6 pM이었고 5C8var1-Fc x LV1050-Fc에 대해서는 10.5 pM이었다. 다음 실험에서는 발현 목적으로 C-말단 라이신이 Fc-포함 사슬을 암호화하는 두 구성물에 추가되어 서열번호 27 및 서열번호 28에 제시된 코딩 서열이 되었다. 생산된 폴리펩타이드의 분석은 C-말단 라이신이 잘려 나갔고(데이터는 나타내지 않음), 이에 따라 C-말단의 라이신을 암호화하지 않는 구성물로부터 생산된 폴리펩타이드와 동일한 폴리펩타이드가 됨을 밝혔다.

실 시 예 7

[0132] **실시예 7: FACS에서 표적 양성 세포에 대한 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc의 결합**

[0133] 이중 특이성 Fc-포함 구성물 5C8var1-Fc x LV1050-Fc은 상기 기재된 바와 같이 클로닝되었고 발현되어 정제되었다. PSMA에 대한 이 분자의 결합을 확인하기 위해, 농도 범위의 항체가 PSMA 양성 전립선암 세포주 LNCaP 및 항원 음성 세포주 PC-3에 대한 결합을 검증하였다. 검출은 다클론 항-인간 IgG 항체로 수행되었다.

[0134] Vγ9Vδ2 T 세포에 대한 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc의 결합을 검증하기 위해, 농도 범위의 복합체(100nM 및 이의 절반 로그 희석(희석배수: $10^{0.5}$))를 VHH에 대한 상이한 2개의 단클론 항체(45H8 및 96A3F5; Genscript, 카탈로그 Nrs CP001/18L001614 및 A01994)를 검출에 이용하여 FACS 염색에서 결합에 대해 검증하였다.

[0135] 도5는 이 분자가 PSMA 음성 세포주 PC-3을 눈에 띄게 염색하지 않지만 LNCaP 세포에 강한 결합을 보임으로써, 이 분자가 PSMA에 특이적으로 결합함을 보여준다(도 5B). 이 결합의 EC_{50}은 7.3 nM로 측정되었다. FACS로 확인한 Vγ9Vδ2 T 세포 수용체에 대한 친화도는 1.7 nM로 측정되었다(도 5B).

실 시 예 8

[0136] **실시예 8: 선도물질 이중 특이성 항체 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc는 잠재적인 표적-의존적인 T 세포 활성화 및 표적 세포 용해를 유발한다.**

[0137] 이중 특이성 T 세포 관여 물질의 효능을 측정하기 위해, 표적 양성 LNCap 세포는 농도 범위의 이 분자 및 고정된 수의 Vγ9Vδ2 T 세포와 함께 배양되었다(작동:표적 비율 1:1). 배양 4시간 후, T 세포 활성화는 T 세포 표면에 발현된 CD107a에 대한 FACS 염색으로 측정하였다. 세포 독성은 24시간 후 FACS(7AAD 염색)에서 측정된 생존 세포 수로 측정하였다. 도6은 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc가 CD107a 발현으로 입증된 바와 같이 강한 T 세포 활성화를 유발한다는 것을 보여준다. 더불어, 이는 LNCaP 표적 세포에 대한 강한 세포 독성 효과를 야기한다. 밝혀진 세포 독성의 EC_{50} 값은 검증된 두 이중 특이성 VHH 분자(LV1044-5C8 (이 실험에서는AAAEPEA 태그없이 제작됨.) 및 LV1050-5C8var1에 대해 1.9 pM)에 대해서는 사실상 동일하고 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc (9.4 pM)에 대해서는 약간 높았다.

실 시 예 9

[0138] **실시예 9: 환자 유래 종양 및 정상 조직에서 Vγ9Vδ2 T 세포의 빈도 및 리간드의 발현**

[0139] 전립선 종양 조직은 비전이성 전립선암 환자로부터 근치전립선절제술 후에 확보하였다. 정상 조직 및 종양 조직 둘다 육안 상으로 분석하였다. 조직을 메스날을 이용하여 작은 조각으로 잘랐고 0.1% DNA분해효소 I (Roche), 0.14% 콜라겐분해효소 A, 100 IU/mL의 소듐페니실린, 100 μg/mL의 스트렙토마이신 설페이트, 2.0 mM의 L 글루타민 및 5% FCS가 첨가된 IMDM으로 구성된 분리 배양액에 현탁시켰다. 조직 조각은 멸균된 플라스크로 옮겨져 37도에서 45분간 자석교반기 위에서 정치되었다. 정치 후, 세포 현탁액은 100 μm 셀 스트레이너에 통과시켰다. 종양 조직은 총 3회, 정상 조직은 총 2회 분리한 후, 세포를 세척하고 트리판 블루 배제를 이용하여 생존 세포 수를 준비하였다. 분리된 종양 및 정상 조직은 AF700 표지된 항-CD45 단클론 항체, PerCP-Cy5.5 표지된 항-CD3 단클론 항체, APC 표지된 항-TCR Vγ9 단클론 항체 및 BV711 표지된 TCR Vδ2 단클론 항체를 이용한 FACS 염색을 이용하여 Vγ9Vδ2 T 세포의 존재를 분석하였다. 종양 및 정상 세포에서의 표적 EpCAM, PSMA 및 CD277의 발현은 BV421 표지된 항-EpCAM 단클론 항체, FITC 표지된 항-PSMA 단클론 항체 및 PE 표지된 항-CD277 단클론 항체를 이용하여 확인되었다.

[0140] 도7은 종양 및 정상 조직 간에 PSMA 및 CD277 발현 모두 유의미한 차이가 있음을 보여준다. 절제된 조직은 육안으로 검사하여 종양 또는 정상 조직으로 규정하였다. 이는 PSMA 발현과 상관 관계가 있는 종양에 대한 FACS의 EpCAM 양성 염색을 통해 추가로 확증되었다. PSMA는 정상 조직에서는 거의 부재하지만 분리된 종양 세포에서는 유의미한 수준으로 발현되었다. CD277(BTN3A)의 발현은 그 차이가 통계적 유의미성은 없었지만 종양에서 더 높게 발현되었다. 대조적으로 종양 및 정상 조직에서의 Vγ9Vδ2 T 세포의 빈도는 정상 조직에서 약간 높은 비율로 대체로 비슷했다.

실 시 예 10

[0141] 이중 특이성 구성물이 Vγ9Vδ2 T 세포의 환자 유래 표적 세포에 대한 세포 독성을 매개하는 가능성을 확인하기 위해서, 분리된 종양 및 정상 세포 현탁액을 Vγ9Vδ2 T 세포와 작동:표적(E:T) 비율 1:1로 50 nM의 복합체가 있거나 없는 조건에서 37도, 24시간 동안 배양하였다. 살아있는 표적 세포의 수는 생존-사멸 마커 7AAD 및 123count eBeads를 이용하여 확인하였다.

[0142] 도8은 Vγ9Vδ2 T 세포는 환자 유래 종양 세포의 사멸을 표적 및 Vγ9Vδ2 T 세포 의존적인 경향으로 유도할 수 있음을 보여준다. 50 nM의 이중 특이성 항체의 존재 하에도 PSMA 발현이 거의 없는 정상 조직은 Vγ9Vδ2 T 세포에 의한 영향을 받지 않는다. 하지만 PSMA 양성 종양 세포는 작동 세포와 이중 특이성 항체가 둘다 존재하는

조건에서만 24시간 후 유의미한 수준으로 사멸된다.

실 시 예 11

[0143] **실시예 11: 생물층 간섭계(biolayer interferometry, BLI)를 이용하여 인간 PSMA 및 Vγ9Vδ2 TCR에 대한 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc의 친화도 확인**

[0144] 재조합 인간 PSMA 및 인간 Vγ9Vδ2 TCR에 대한 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc의 친화도는 생물층 간섭계를 이용하여 확인되었다. 리간드로 12.5 μg/mL의 바이오틴화된 hPSMA 또는 5 μg/mL의 hVγ9Vδ2-Fc(서열번호 31 및 32로 구성됨)를 스트렙타아비틴 바이오센서에 결합시켰다. 피분석물로는 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc 의 2배 연속 희석물을 이용하였다: 리간드 hPSMA와 조합하여 3.125 내지 200 nM 범위; 리간드 hVγ9Vδ2-Fc와 조합하여 0.03125 내지 20 nM 범위. 표2에서 보여지듯이, LV1050-Fc x 5C8var1-Fc는 32 ± 1.2 nM의 K_D 값으로 인간 PSMA와 결합하고 0.64 ± 0.16 nM의 K_D 값으로 인간 Vγ9Vδ2 TCR과 결합한다.

표 2

[0145] 표2: 생물층 간섭계를 이용하여 인간 PSMA 및 Vγ9Vδ2 TCR에 대한 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc의 친화도 확인

리간드	K_D (M)		k_{on} (1/Ms)		k_{dis} (1/s)	
	평균	SD	k_{on} (1/Ms)	SD	k_{dis} (1/s)	SD
PSMA (n=3)	3.16E-08	1.24E-09	3.07E+05	7.41E+03	9.69E-03	4.73E-04
Vγ9Vδ2 TCR (n=4)	6.35E-10	1.60E-10	2.40E+05	8.64E+03	1.51E-04	3.40E-05

실 시 예 12

[0146] **실시예 12: 항원결정기 맵핑**

[0147] LV1050-Fc x 5C8var1-Fc에 통합된 VHH가 결합하는 PSMA에 있는 항원결정기를 확인하기 위해, (LV1050-Fc x 5C8var1-Fc와 동일한 PSMA 결합 VHH 도메인을 포함하는) LV1050-5C8var1-no-c-tag (서열번호 29)가 CovalX AG(Pimenova et al. (2008) J Mass Spectrom 43:185)에 의해 개발된 항원결정기 맵핑 기술에 이용되었다. 요약하자면, 재조합 PSMA 단백질(서열번호 30)은 교차 결합되고 상이한 단백질 분해 효소에 노출된 LV1050-5C8var1-no-c-tag에 결합할 수 있고 그로 인해 생긴 교차 결합되거나 되지 않은 펩타이드가 고분해능 질량 분석기로 분석되었다.

[0148] 도9에서 보여지듯이, 결과는 VHH가 구조적 항원결정기에 결합하는 것을 입증하였다. 다음 잔기가 항체와 직접적인 상호작용을 갖는 것을 밝혔다: R149, S156, R163, S276, R279, S281, K283, H577, S590, K688, R689 및 Y692. 이러한 잔기는 UniProt 서열 Q04609-1의 R190, S197, R204, S317, R320, S322, K324, H618, S631, K729, R730 및 Y733에 해당한다. FOLH1 유전자에서 확인된 희귀 단일 염기 다형성(SNP) 중 어느 것도 항원결정기에 존재하지 않았고, 이는 LV1050-5C8var1-no-c-tag 및 따라서, LV1050-Fc x 5C8var1-Fc는 표적의 모든 관련된 SNP 변이체와 결합할 수 있음을 의미한다.

실 시 예 13

[0149] **실시예 13: 종양 유래 세포주를 이용한 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc의 추가적인 기능 분석**

[0150] LV1050-Fc x 5C8var1-Fc가 PSMA 의존적인 Vγ9Vδ2 T 세포 활성화를 유도하는 능력은 탈과립화 마커 CD107a(LAMP-1)을 판독값으로 이용하여 4시간 동안의 시험관 내 검증을 통해 확인하였다. 건강한 공여자의 PBMC로부터 분리하여 확대 배양된 Vγ9Vδ2 T 세포는 PSMA를 발현하는 전립선 유래의 암 세포주 LNCaP, VCaP 또는 22Rv1과 함께 작동:표적 세포 비율을 1:1로 하여 상이한 농도의 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc (10 fM 내지 3.16 nM의 범위)의 존재 또는 부재 하에 배양하였다. 세포를 수득하여 CD107a의 세포 표면 발현을 유세포 분석기를 통해 확인하였다. 모든 PSMA 발현 종양 세포주의 존재 하에 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc는 EC_{50}값이 pM 수준의 굉장히 강한 Vγ9Vδ2 T 세포 활성화(도 10)를 유발하였다 (표3).

표 3

[0151] **표 3: Vγ9Vδ2 T 세포와 PSMA 양성 종양 세포주를 이용한 시험관 내 검증에서 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc에 의한 Vγ9Vδ2 T 세포의 탈과립화 및 Vγ9Vδ2 T 세포 매개 종양 세포 독성의 EC_{50} 값.**

작동 세포	표적 세포주	시험 범위 (nM)	E:T 비율	평균 EC_{50} (nM) (±SD)	공여자(n)의 수 및 시험 횟수
4시간 후 탈과립화					
Vγ9Vδ2-T 세포	LNCaP	3.2-0.000010	1:1	0.016 (0.0049)	n=10 (5회 실험에서 공여자 10명)
Vγ9Vδ2-T 세포	22Rv1	3.2-0.000032	1:1	0.029(0.0049)	n=4 (2회 실험에서 공여자 4명)
Vγ9Vδ2-T 세포	VCaP	3.2-0.000032	1:1	0.028(0.0064)	n=4 (2회 실험에서 공여자 4명)
24시간 후 세포 독성					
Vγ9Vδ2-T 세포	LNCaP	3.2-0.000010	1:1	0.017 (0.013)	n=10 (7회 실험에서 공여자 10명, 2회 실험에서 공여자 4명)
Vγ9Vδ2-T 세포	22Rv1	3.2-0.000032	1:1	0.013 (0.0069)	n=4 (2회 실험에서 공여자 4명)
Vγ9Vδ2-T 세포	VCaP	3.2-0.000032	1:1	0.015 (0.011)	n=3 (2회 실험에서 공여자 3명)

[0152] 다음으로, 표적 의존적인, Vγ9Vδ2 T 세포 매개의 종양 세포 사멸을 유도할 수 있는 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc의 능력을 죽어가는/죽은 종양 세포로부터의 세포 내 단백질 분해 효소의 방출량을 측정하는 발광 검증법(CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay, Promega)을 이용하여 24시간 동안의 동일한 공배양 조건에서 측정하였다. LV1050-Fc x 5C8var1-Fc는 탈과립화와 유사한 범위의 EC_{50} 값으로 LNCaP, VCaP 및 22Rv1 세포에 대해 표적 의존적이고 Vγ9Vδ2 T 세포 매개인 강한 세포 독성(도 11B)을 유도하였다(표 3).

[0153] 또한, Vγ9Vδ2 T 세포는 (종양 세포 없이) LV1050-Fc x 5C8var1-Fc 단독에 의해서는 활성화되지 않고, PSMA 발현이 제거된 종양 세포(LNCaP.koPSMA)의 용해는 확인되지 않았다(도 11A).

[0154] LV1050-Fc x 5C8var1-Fc (시험 농도 범위: 10 fM 내지 3.2 nM)의 능력에 대해 상이한 E:T 비율이 미치는 영향을 확인하기 위해서, 24시간 세포 독성 검증에서 표적 LNCaP 세포의 수(즉, 50,000개)를 일정하게 유지하되, 작동 Vγ9Vδ2 T 세포의 수를 다르게 하여 상이한 E:T 비율을 얻었다(1:1, 1:10 및 1:100). 표 4에 제시된 바와 같이, LV1050-Fc x 5C8var1-Fc 에 의해 유도되는 Vγ9Vδ2 T 세포 매개 세포 독성의 평균 EC_{50} 값은 E:T 비율 1:1과 1:10 간에 유사했지만(각각 17 ± 13 pM 및 9.9 ± 6.5 pM), 1:100의 E:T 비율에서는 관찰되는 세포 독성의 수준이 EC_{50} 값을 정확하게 계산하기에는 너무 낮았다. 이 검증법에서의 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc의 능력(EC_{50})은 영향을 받지 않았지만, 관찰된 용해의 최대 비율은 E:T 비율이 1:1일 때에 비해서 E:T 비율이 1:10일 때 유의미하게 낮았다(데이터는 나타내지 않음). 그러므로 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc의 능력(즉, 이 검증법에서 측정된 EC_{50})은 다양한 E:T 비율에 의해 강한 영향을 받지는 않는다.

표 4

[0155] **표 4: 상이한 E:T 비율을 이용하여 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc에 의해 매개된 Vγ9Vδ2 T 세포 세포 독성의 EC_{20}, EC_{50} 및 EC_{90} 값**

E:T 비율	평균 EC_{20} ± SD (pM)	평균 EC_{50} ± SD (pM)	평균 EC_{90} ± SD (pM)	공여자의 수(n) 및 시험 횟수
1:1	4.3 ± 3.0	17 ± 13	79 ± 48	n = 10 (7회 실험에서 공여자 10명, 2회 실험에서 공여자 4명)
1:10	3.6 ± 1.3	9.9 ± 6.5	60 ± 59	n = 4(2회 실험에서 공여자 4명)

실 시 예 14

[0156] **실시예 14: 환자 유래의 표적 세포를 이용한 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc의 기능적 분석**

[0157] 환자 유래의 비전이성 전립선암 조직을 확보하였고 실시예 9에 기재한 바와 같이 정상(비악성) 및 종양 조직을 처리하였다.

[0158] Vγ9Vδ2 T 세포의 활성화의 척도로서, 분리된 전립선 샘플(정상(비악성) 또는 원발성 종양 조직에서 분리된 세포 0.5-1X10^5개) 내에 존재하는 Vγ9Vδ2 T 세포에서의 탈과립화 마커 CD107a(LAMP-1; Thermofisher의 PE 표지된 항-인간 CD107a를 이용하여 검출됨.)의 증가를 50 nM의 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc가 있거나 없는 조건에서 측정하였다. 4시간 후, Vγ9Vδ2 T 세포의 탈과립화는 CD107a 발현에 의해 측정되었고 유세포 분석기를 이용하여 분석하였다(EpCAM-/CD45+/CD3+/Vγ9+/Vδ2+/CD107a+ 세포의 비율 확인).

[0159] 전립선 종양 또는 정상(비악성) 조직이 있는 조건에서 배양된 환자의 자가 PBMC 내의 Vγ9Vδ2 T 세포의 탈과립화를 유발하는 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc의 능력을 측정하였다. 이러한 목적으로, 자가 PBMC가 10:1의 작동 대 표적(E:T; PBMC:전립선 세포) 비율로 24시간 동안 배양되었다는 차이를 제외하고 상기와 같은 방법이 이용되었다.

[0160] 분리된 전립선암 조직에서 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc는 조직에 침투한 Vγ9Vδ2 T 세포의 탈과립화의 통계적으로 유의미한 증가를 유발하였으나 비악성 전립선 조직에서는 그렇지 않았다. 이중 특이성 항체없이 배양된 조직 세포에 비해 훨씬 높은 비율의 CD107a 발현 Vγ9Vδ2 T 세포가 관찰되었다(도 12A). 정상 조직에서 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc는 조직에 침투한 Vγ9Vδ2 T 세포의 탈과립화를 유발하지 않았다(도 12B).

[0161] 게다가 환자의 전립선 종양 또는 정상(비악성) 조직과 공배양된 자가 PBMC 내 Vγ9Vδ2 T 세포를 활성화시키는 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc의 능력이 확인되었다. 종양 조직 세포와 자가 PBMC만 배양한 조건과 비교하여, LV1050-Fc x 5C8var1-Fc이 있는 조건에서의 공배양은 훨씬 높은 비율의 CD107a 발현 Vγ9Vδ2 T 세포를 야기하였다(도 13A). 자가 PBMC와 정상(비악성) 전립선 조직의 배양에 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc을 추가하였을 때, 자가 PBMC 내 Vγ9Vδ2 T 세포의 활성화는 관찰되지 않았다(도 13B).

[0162] LV1050-Fc x 5C8var1-Fc에 의해 유도되는 특이적인 세포 독성은 E:T 비율이 10:1로 사용하였다는 차이를 제외하고 실시예 10에 기재한 바와 같이 전립선 종양 세포 또는 정상(비악성) 전립선 세포와 자가 PBMC의 공배양 조건에서 검증되었다. LV1050-Fc x 5C8var1-Fc은 자가 PBMC의 존재 하에 통계적으로 유의미한 수준의 종양 세포 용해를 유발하였으나, 정상(비악성) 전립선 세포는 용해되지 않았다(도 14).

실 시 예 15

[0163] **실시예 15: LV1050-Fc x 5C8var1-Fc의 생체 내 치료적 효능**

[0164] 면역 결핍 NCG 마우스는 인간 PBMC와 2:1의 비율(22Rv1:PBMC)로 혼합한 5x10^6개의 22Rv1 세포를 피하 접종하였다. 상이한 CD3+ T 세포 내 Vγ9Vδ2 T 세포 빈도를 보이는 2명의 공여자, 공여자#1(Vγ9Vδ2 T 세포 21.9%) 및 공여자#2(Vγ9Vδ2 T 세포 8.8%)로부터 얻은 PBMC를 이용하였다. LV1050-Fc x 5C8var1-Fc (0.2 mg/kg 또는 2 mg/kg) 또는 인산염 완충 식염수(PBS)를 종양 세포 및 PBMC를 접종한 날로부터 매주 한 번(0일, 7일, 14일 및 21일) 정맥 주사로 투여하였다. 종양의 크기는 캘리퍼스를 이용하여 주 2회, 2차원으로 측정하였다. 그룹의 평균 종양 부피가 2,000 mm^3가 넘으면 마우스를 희생시켰다.

[0165] 공여자#1의 PBMC가 주사된 마우스에서는, 34일차(대조군(PBS 투여군)의 마우스가 희생된 날) 에 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc의 0.2 또는 2 mg/kg 투여가 각각 91% 및 78% 수준으로 통계적으로 유의미한 수준의 종양 성장 억제(TGI) 값을 보였다(도 15A). 공여자#2의 PBMC가 투여된 마우스에서는, 41일차(이에 해당하는 대조군(PBS 투여군)의 마우스가 희생된 날) 에 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc의 0.2 및 2 mg/kg 투여 마우스의 TGI 값이 23% 및 52%였다(도 15B). 공여자#2의 PBMC를 사용한 경우에는 TGI의 통계적 유의미성은 복합체의 투여 농도가 가장 높은 경우에서만 확인되었다.

실 시 예 16

[0166] **실시예 16: 전혈 사이토카인 방출 평가**

[0167] 30명의 건강한 공여자로부터 얻은 신선한 전혈로 용액상 검증을 이용하여 시험관 내 사이토카인 방출 검증을 수행하였다. 상이한 농도의 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc (280 내지 8.75 nM 범위)를 전혈과 24시간 동안 정치하였고

혈장 내 7가지 사이토카인(IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN-γ 및 종양 괴사 인자(TNF)α)의 수준을 면역분석법을 이용하여 측정하였다. Erbitux® (cetuximab) 및 Campath® (alemtuzumab)는 각각 임상에서 낮고 높은 사이토카인 방출을 유도하는 대조군으로 검증에 추가하였다. 포도구균 장독소 B(SEB)는 측정하는 모든 사이토카인의 방출에 대한 양성 대조군으로 사용되었다.

[0168] 결과의 요약은 표 5에 나타난다. LV1050-Fc x 5C8var1-Fc는 IL-8 및 IFN-γ의 방출만을 유도하였다. LV1050-Fc x 5C8var1-Fc에 의한 IL-8 방출은 환자에서 사이토카인 방출 증후군(CRS)를 유발하지 않는다고 알려진 (또는 낮은 수준의 사이토카인을 유도한다고 알려진) Erbitux®에 의한 방출과 유사했다. LV1050-Fc x 5C8var1-Fc은 Erbitux®와 비교하여 약간 높은 수준의 IFN-γ 방출을 유도했지만 관찰된 가장 높은 IFN-γ 방출은 임상적으로 CRS와 관련이 있는 항체인 Campath®에 의한 방출보다 훨씬 낮았다. 중요한 것은 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc는 CRS에서 가장 두드러지는 사이토카인인 IL-6(Tanaka et al (2016) Immunotherapy 8: 959)의 방출을 유도하지 않았다.

[0169] LV1050-Fc x 5C8var1-Fc 을 고결합 96웰 플레이트에 코팅하고 10명의 건강한 공여자로부터 얻은 신선한 전혈을 정치시킨 시험관 내 사이토카인 방출 검증에서 유사한 결과를 얻었다. 여기서 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc은 굉장히 낮은(중간값) 수준의 IL-6 및 IL-8을 유도하였고, 이는 반응성이 낮은 비교군인 Erbitux®와 유사한 수준이었으며, TNFα 방출은 관찰되지 않았다. LV1050-Fc x 5C8var1-Fc는 실험에 사용된 복합체의 각 농도에서 Erbitux®와 비교하여 높은(중간값) 수준의 IFNγ를 유도하였으나 중간값 수준은 Campath®에 의해 유도된 것에 비해 상당히 낮았다.

표 5

[0170] **표 5: 건강한 공여자의 전혈 샘플에서 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc 에 의해 유도된 사이토카인 방출 프로필(pg/mL)**

시험 항목		IL-2	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	IFN-	TNFα
PBS (음성 대조군)		0	0	0	0	0	0	0
SEB (양성 대조군)		24,470.9	53.3	5,613.2	8,936.3	1,010.3	61,792.2	4,302.2
Erbitux®	280 nM	0	0	0	15.1	0	0	0
	140 nM	0	0	0	24.8	0	1.1	0
	70 nM	0	0	4.7	15.6	0	0.5	0
	35 nM	0	0	17.4	20.0	0	0	0
	17.5 nM	0	0	46.0	16.6	0	0	0
	8.75 nM	0	0	6.2	15.4	0	3.6	0
Campath®	280 nM	0	0	1,732.1	578.2	0.2	3,409.9	18.1
	140 nM	0	0	1,360.3	392.7	0	4,029.0	12.9
	70 nM	0	0	896.5	326.5	0	4,732.9	8.3
	35 nM	0	0	714.9	255.5	0	5,313.4	14.5
	17.5 nM	0	0	422.4	195.1	0	4,353.3	16.9
	8.75 nM	0	0	400.9	180.5	0	4,932.2	20.6
LV1050-Fc x 5C8var1-Fc	280 nM	0	0	0	35.4	0	9.4	0
	140 nM	0	0	0	25.4	0	24.4	0
	70 nM	0	0	0	24.2	0	37.9	0
	35 nM	0	0	0	20.3	0	49.6	0
	17.5 nM	0	0	0	28.2	0	50.0	0
	8.75 nM*	0	0	0	19.2	0	81.4	0

[0171] 시험관 내 사이토카인 방출 검증을 통해 30명의 건강한 공여자의 전혈 샘플에서 측정된 각 약물/투여용량 조합에서 중간값의 사이토카인 수준(pg/mL)

실 시 예 17

[0172] **실시예 17: 약동학**

[0173] LV1050-Fc x 5C8var1-Fc는 인간 FcRn 수용체와의 결합을 통해 복합체의 생체 내 반감기를 연장시킬 것으로 기대

되는 인간 Fc 도메인을 포함한다. 이를 확인하기 위해서, LV1050-Fc x 5C8var1-Fc를 인간 IgG 대조군과 함께 2 mg/kg, 5 mg/kg 및 10 mg/kg로 인간 FcRn Tg32 SCID 마우스(Jackson labs: JAX)에 각각 단회 정맥 투여하였다. 투여 후 상이한 시점(5분, 8시간, 1일, 3일, 7일, 10일, 14일, 17일, 21일 및 28일)에 전혈을 수집하였고, LV1050-Fc x 5C8var1-Fc의 농도는 항원 포획 ELISA를 이용하여 평가하였다. 이 모델에서 얻은 결과는 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc는 이 형질 전환 마우스에서 140과 172 시간 사이의 범위(5.8-7.2일, 도 16)의 반감기를 갖고, 이는 이러한 체계에서 IgG 기반 항체가 갖는 반감기와 유사하다.

[0174] LV1050-Fc x 5C8var1-Fc의 약동학은 비인간 영장류(NHP)에서도 평가되었다. 세 마리의 암컷 긴꼬리 원숭이에게 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc(0.14, 0.77 및 2.27 mg/kg (1 마리당 투여 용량))를 30분-정맥 주사를 통해 단회 정맥 투여하였다. LV1050-Fc x 5C8var1-Fc의 반감기는 150 내지 166시간(6.3일-6.9일)(도 17)이고, 이는 긴꼬리 원숭이의 동원체 표적에 결합하지 않은 IgG 기반 인간화 항체의 반감기와 일치한다(Walker et al. (2019) PLOS ONE 14: e0217061). 용량 비례 노출 증가가 관찰되었다. 약동학 매개변수는 표 6에 제공되었다.

표 6

[0175] **표 6: 단회 정맥 투여 후 긴꼬리 원숭이에서의 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc의 약동학 매개변수**

동물 ID	투여 용량 (mg/kg)	T_{max} (시간)	C_{max} (mg/mL)	nC_{max} (mg/mL)/ (mg/kg)	$T_{1/2}$ (시간)	$AUC_{0-\Delta}$ (mg · h/mL)	$nAUC_{0-\Delta}$ (mg · h/mL)/ (mg/kg)	Cl (mL/h/kg)	Vz (mL/kg)
61	0.14	1	3.17	22.6	162.1	297.9	2127.9	0.47	109.9
62	0.77	1	17.1	22.2	150.0	1513.2	1965.2	0.51	110.1
63	2.27	1	53.6	23.6	165.9	5548.7	2444.4	0.41	97.9

[0176] CL=청소율; (n)Cmax=(정규화된) 투여 후 최고 농도; (n)AUC_{Δ}=(정규화된) 시점 t=0 h부터 무한까지의 농도 대 시간 곡선하 면적; T_{max}=투여 후 최고 농도에 도달하는 시간; $T_{1/2}$=제거 반감기; V_z= 겉보기 분포 용적

실 시 예 18

[0177] **실시예 18: 형질 주입 비율에 관계없는 균질한 생산물**

[0178] LV1050-Fc x 5C8var1-Fc에 관련된 2개의 항체 중쇄를 암호화하는 cDNA는 각각 제조에 적합한 발현 벡터에 클로닝되었다. 1:1, 1:1.25, 1:1.5, 1.25:1 및 1.5:1의 상이한 LV1050-Fc 또는 5C8var1-Fc를 포함하는 발현 벡터의 비율로 제조에 적합한 세포의 형질 주입에 이용되었다. 세포는 2개의 상이한 항생제에 저항성이 있는 것으로 선택되었고 항체는 선택된 세포풀(cell pool)에서 유가배양 방식으로 생산되었다. 생산된 항체의 크기 배제 고성능액체크로마토그래피(SE-HPLC) 분석은 생산물의 높은 순도(이합체 함량)를 밝혔다: 형질 주입 비율에 관계없이 분비된 단백질의 93.2% 내지 96.4%는 예상 분자 크기였다(표 7의 메인 피크 면적). 역상 HPLC(RP-HPLC) 분석은 단량체(LV1050-Fc 및 5C8var1-Fc)와 동형이합체(LV1050-Fc x LV1050-Fc 및 5C8var1-Fc x 5C8var1-Fc)를 의도한 LAVA 이형이합체(LV1050-Fc x 5C8var1-Fc)로부터 구분하기 위해 구축되었다. 모든 클론 풀(clone pool) 샘플에서 의도한 이형이합체 LAVA LV1050-Fc x 5C8var1-Fc가 86.1% 내지 94.9%로 높은 함량을 보였다. 클론 풀 DGC8-T1P, -T3P 및 -T5P에서는 증가한 비율의 5C8var1-Fcx5C8var1-Fc 이합체를 확인하였다.

표 7

[0179] **표 7: LV1050-Fc 또는 5C8var1-Fc를 포함하는 발현 벡터를 상이한 비율로 형질 주입하여 얻은 클론 풀의 SE-HPLC의 결과.**

풀 ID	LV1050-Fc : 5c8var1-Fc 비율	상대적 피크 면적 [%]		
		고분자량 종	메인	저분자량 종
DGC8-T1P	1 : 1	4.1	95.8	0.0
DGC8-T3P	1 : 1.25	4.5	94.1	1.4
DGC8-T5P	1 : 1.5	4.3	93.2	2.5
DGC8-T7P	1.25 : 1	3.6	96.4	0.1
DGC8-T9P	1.5 : 1	3.6	96.3	0.0

실 시 예 19

[0180] **실시예 19: LV1050-Fc x 5C8var1-Fc의 제형**

[0181] 선택된 세포 클론으로부터 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc 생산물을 생물반응기 시스템에서의 생산으로 수득하였고 수득 및 정제 후 4가지 종류의 제형 완충액을 이용하여 0.5 mg/mL 및 10 mg/mL의 단백질 농도로 조제되었다.

[0182]

완충액	조제
완충액 1	10 mM 히스티딘 + 280 mM 수크로즈 + 0.02% 폴리소르베이트 80, pH 6.0
완충액 2	10 mM 히스티딘 + 280 mM 수크로즈 + 0.02% 폴리소르베이트 80, pH 6.0 + 1 mM 메티오닌
완충액 3	10 mM 아세트산 나트륨 + 280 mM 수크로즈 + 0.02% 폴리소르베이트 80, pH 5.5
완충액 4	10 mM 아세트산 나트륨 + 280 mM 수크로즈 + 0.02% 폴리소르베이트 80, pH 5.5 + 1 mM 메티오닌

[0183] 조제된 샘플은 최대 12주 동안 여러 보관 조건(아래에 규정됨)에 적용되었다. 추가로 여러 가혹 시험이 적용되었다:

[0184] · 5° C ± 3° C에서 보관

[0185] · -80° C ± 10° C에서 보관

[0186] · 25° C ± 2° C/ 60% 상대 습도(RH)± 5%에서 가속 보관 조건

[0187] · 40° C ± 2° C/ 75% RH ± 5%에서 열 가혹

[0188] · 동결/해동 주기: 샘플을 -80 ± 10° C에서 완전히 냉동하였다. 이어서 샘플을 실온(15 - 25° C)에서 완전히 해동한 후, 5회의 동결/해동 주기를 수행하였다.

[0189] · 교반 가혹: 샘플을 실온(15° C - 25° C)에서 7일 동안 240 rpm으로 교반하였다.

[0190] · 산화: 샘플에 0.01% (v/v)의 과산화수소(H2O2)와 섞어 25° C ± 2° C/ 60% RH ± 5% 조건에서 7일 동안 정치하였다.

[0191] · 광안정성: 25° C ± 2° C/ 60% RH ± 5% 조건에서 시간당 > 120만 룩스 및 시간당 > 200 와트/m^2 의 근자외선 에너지를 적용하였다.

[0192] 초기 샘플(t=0; 5° C ± 3° C)은 참고용으로 제공되었다. 샘플은 아래의 분석 방법을 이용하여 분석되었다.

방법	평가
투명도	성상
색상	성상
pH	pH
A_{280} (UV/VIS)	함량
미광	완전성
SE-HPLC	완전성
양이온 교환(CIEX)-HPLC	완전성
모세관 전기영동 소듐 도데실 설페이트(CE-SDS_ (비환원))	완전성
CE-SDS (환원)	완전성
활성 검증- PSMA 결합 ELISA	역가
펩타이드 맵핑	특성
시차 주사	완전성
액체 크로마토그래피 질량분석기 (LC-MS) (산화)	완전성

[0193]

[0194] 시간에 따른 안정성 연구 결과는 -80° C ± 10° C, 5° C ± 3° C 및 25° C ± 2° C / 60% RH ± 5%의 보관 온도에서 투명성, 색상, pH, A280 (UV-VIS), 미광, SE-HPLC, CIEX-HPLC, CE-SDS 및 PSMA 결합, 시차 주사 열량 측정법 및 펩타이드 핑거프린트가 굉장히 유사했다. 이러한 측정 결과는 이 생산물이 선택된 완충액 조건에서 상당히 안정적이고 시간의 흐름에 따라 아주 약간의 영향만 관찰되었음을 나타낸다.

[0195] 뚜렷한 영향은 특히 5주째에 40° C ± 2° C / 75% RH ± 5%의 열 가혹 조건에서 발견되어서 시험 완충액과 농도 간의 구별을 할 수 있었다. 40° C ± 2° C / 75% RH ± 5%에서 5주간 보관된 샘플의 CIEX-HPLC 분석은 이 시점에서 모든 시험 완충액 및 생산물 농도에 대해 메인 변이체의 함량이 60% 이하로 떨어지는 것을 보여준다. 아세트산 기반 제형과 비교하여 히스티딘 기반의 제형에서는 메인 변이체의 비율이 약간 덜 감소하는 것이 관찰되었다.

[0196] CE-SDS 결과는 40° C에서의 보관은 생산물의 저분자량 종의 최대 5% 정도의 미세한 증가가 야기될 수 있음을 보여주었다. 이 영향은 완충액 1 및 3의 10 mg/mL 샘플에서 약간 더 두드러진다. 그럼에도 불구하고 항체는 5주간 40° C ± 2° C / 75% RH ± 5%와 같이 강한 가혹 조건에서도 매우 안정함을 확인하였다.

[0197] 40° C ± 2° C / 75% RH ± 5% 에서 5주차 시점의 PSMA 결합 데이터는 완충액 1 및 3의 10 mg/mL 샘플에 대해 EC_{50}이 크게 증가함을 보여준다. PSMA 결합 검증에서 측정된 EC_{50}의 증가는 SE-HPLC 분석에서 상대적인 고분자량 종의 양의 미세한 증가(0.3%에서 0.6%로, 0.2%에서 0.7%로 증가함)와 상관 관계가 있다.

[0198] 가혹 시험(동결/해동(5회의 동결/해동 주기), 광-, 교반- 및 산화 가혹) 결과는 온도 안정성 연구와는 다른 순위를 보여주었다. 온도 안정성 연구에서 완충액 3의 10 mg/mL 샘플은 사전에 규정된 분석 임계값을 벗어난 결과가 가장 많았으나, 가혹 안정성 연구는 다른 조건과 비교하여 완충액 1의 0.5 mg/mL 샘플에 대해 사전에 규정된 분석 임계값을 벗어난 결과가 증가함을 밝혔다.

[0199] LC-MS 분석은 메티오닌의 첨가(완충액 2 및 완충액 4에 존재함)가 생산물의 산화 방지에 효과적을 밝혔다.

[0200] 결과적으로 LV1050-Fc x 5C8var1-Fc는 완충액 2 및 완충액 4에서 조제되었을 때 가장 안정했다. 온도 안정성, 가혹 안정성 및 종합 안정성(온도+가혹)에 대해 사전에 규정된 분석 임계값을 벗어나는 결과의 합계의 개요는 표 8에서 보여진다.

[0201] 최종 제형으로는 0.5 내지 10 mg/mL의 단백질 농도에서 10 mM 히스티딘 + 280 mM 수크로즈 + 0.02% 폴리소르베이트 80, pH 6.0 + 1 mM 메티오닌을 선택하였다.

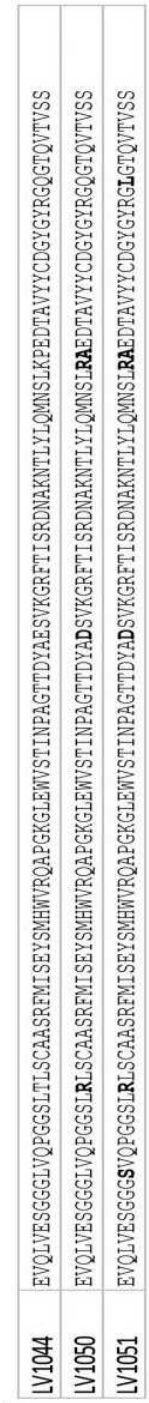
표 8

[0202] **표 8: 온도 안정성, 가혹 안정성 및 종합 안정성(온도+가혹)에 대해 사전에 규정된 분석 임계값을 벗어난 결과의 합계**

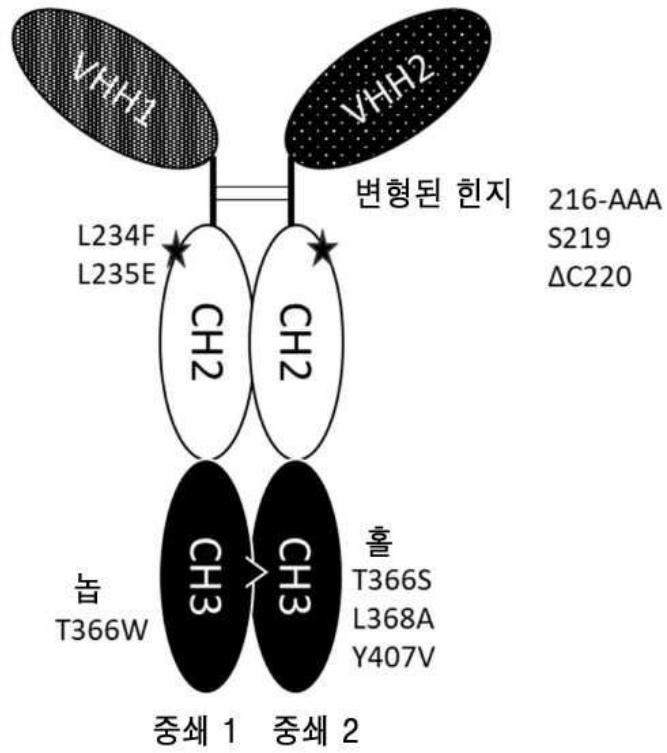
완충액	완충액 1		완충액 2		완충액 3		완충액 4	
단백질 농도 (mg/mL)	0.5	10	0.5	10	0.5	10	0.5	10
온도 안정성	0	2	0	0	1	6	0	0
가혹 안정성	11	5	5	4	5	5	5	4
종합 안정성	11	7	5	4	6	11	5	4

도면

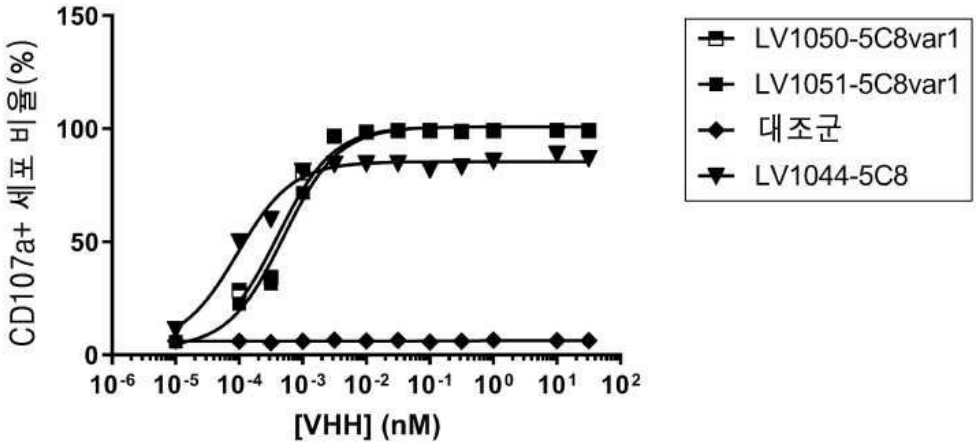
도면1



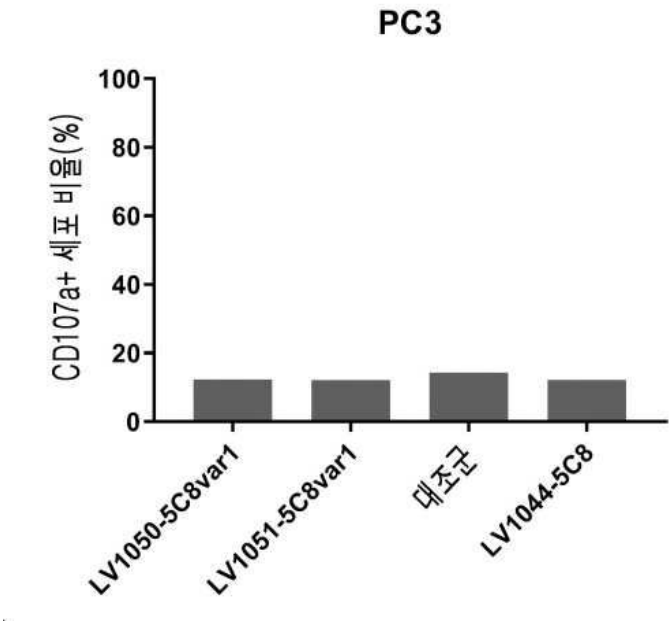
도면2


VHH1
VHH2
변형된 힌지
216-AAA
S219
ΔC220
L234F
L235E
CH2
CH2
CH3
CH3
홀
T366S
L368A
Y407V
놉
T366W
중쇄 1
중쇄 2

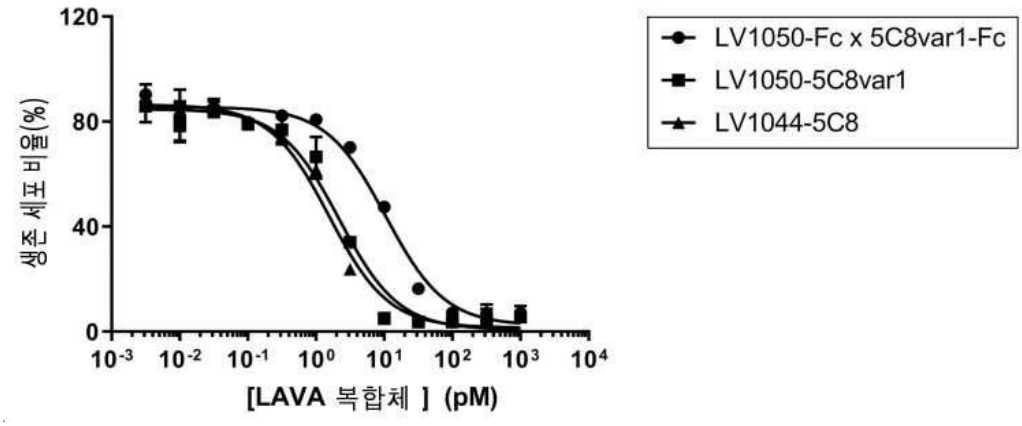
도면3a


CD107a+ 세포 비율(%)
150
100
50
0
10-6 10-5 10-4 10-3 10-2 10-1 100 101 102
[VHH] (nM)
LV1050-5C8var1
LV1051-5C8var1
대조군
LV1044-5C8

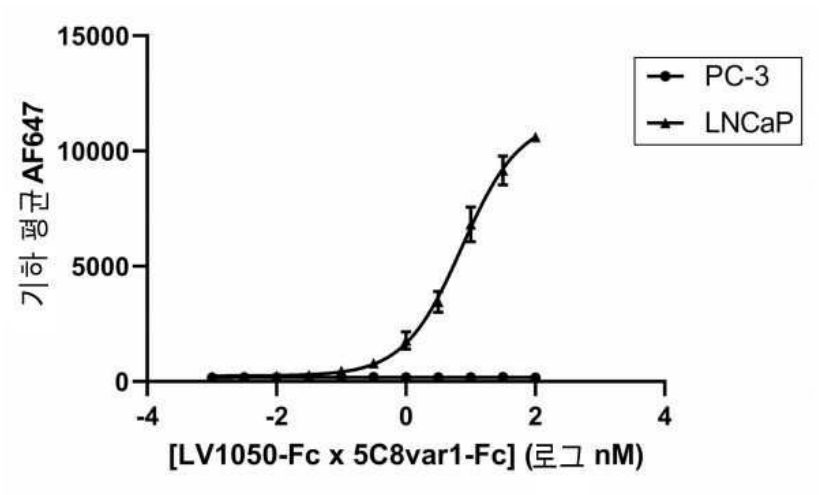
도면3b



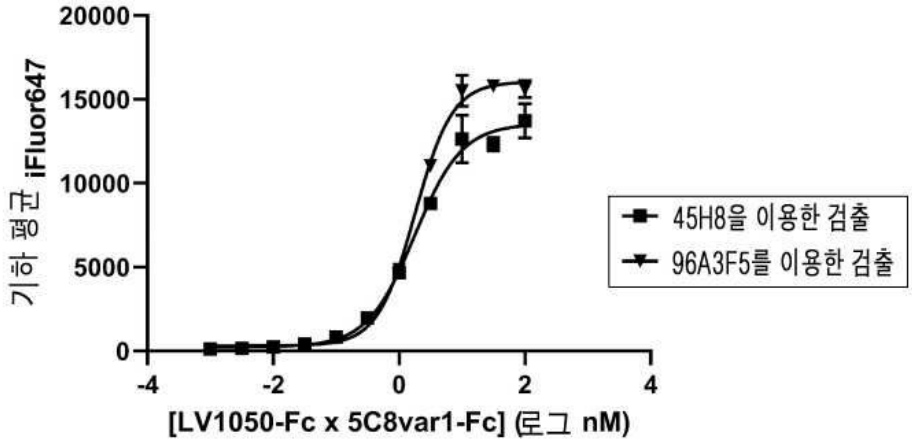
도면4



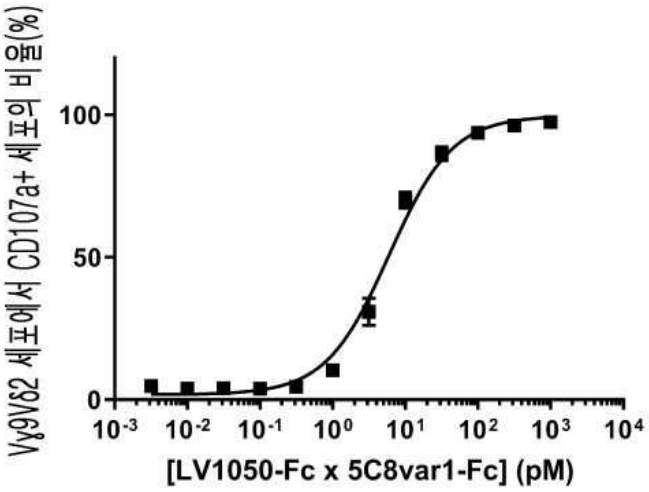
도면5a



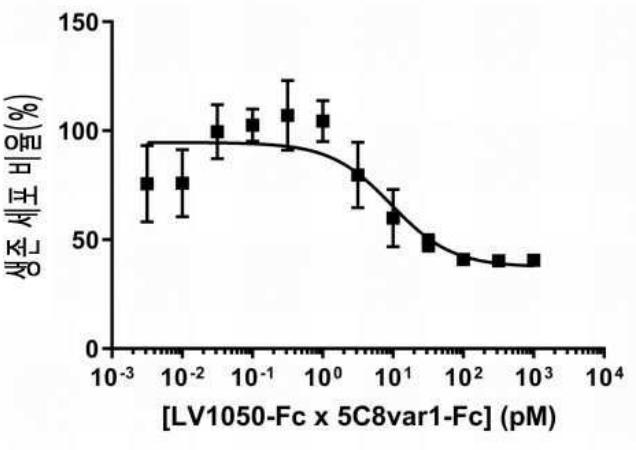
도면5b



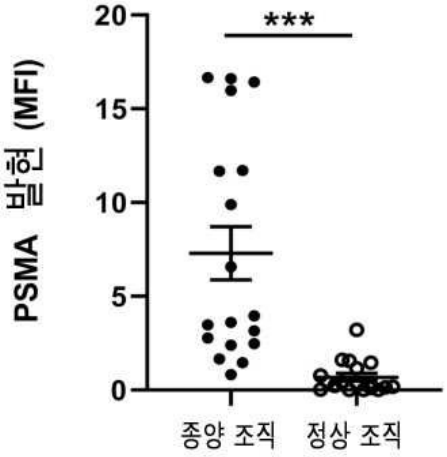
도면6a



도면6b

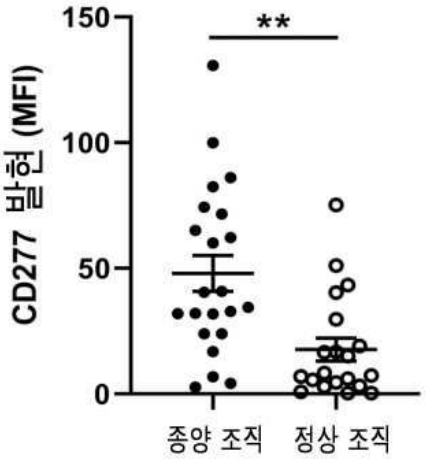


도면7a



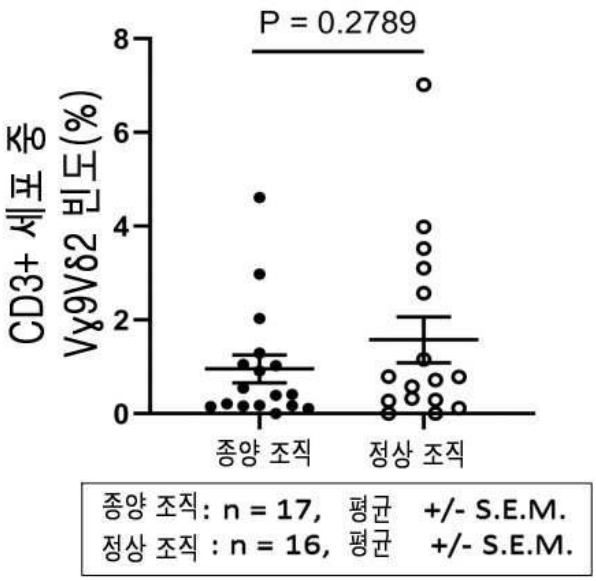
종양 조직: n = 18, 평균 +/- S.E.M.
정상 조직 : n = 17, 평균 +/- S.E.M.
*** p <0.001

도면7b

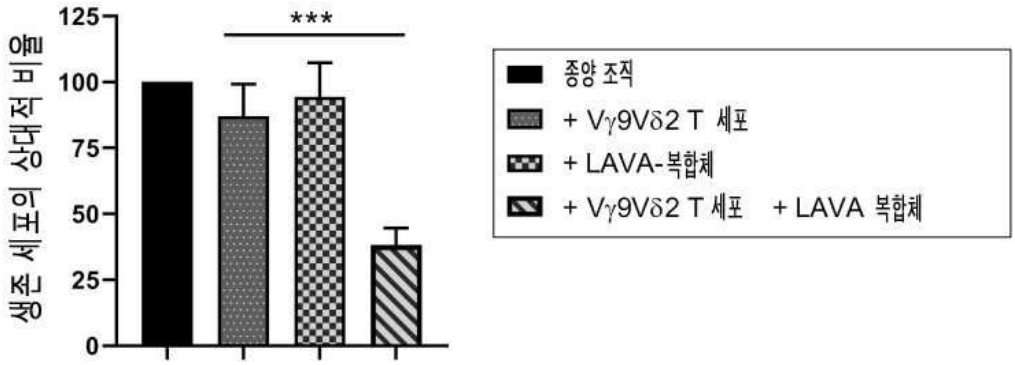


종양 조직: n = 22, 평균 +/- S.E.M.
정상 조직 : n = 20, 평균 +/- S.E.M.
**p <0.01

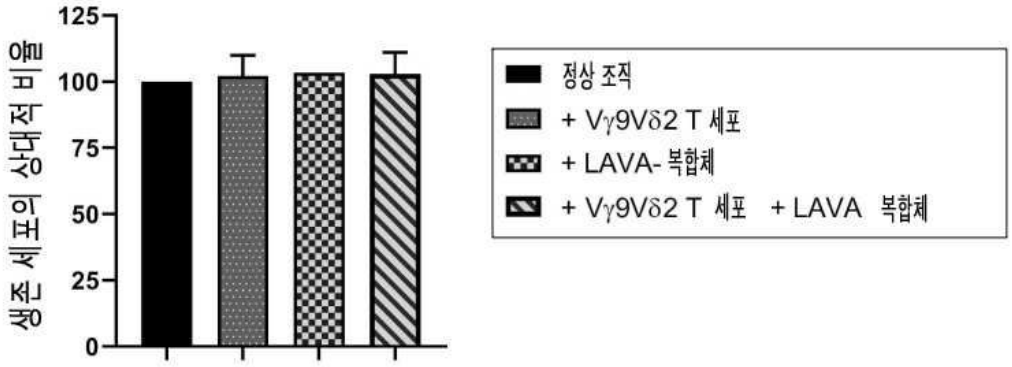
도면7c



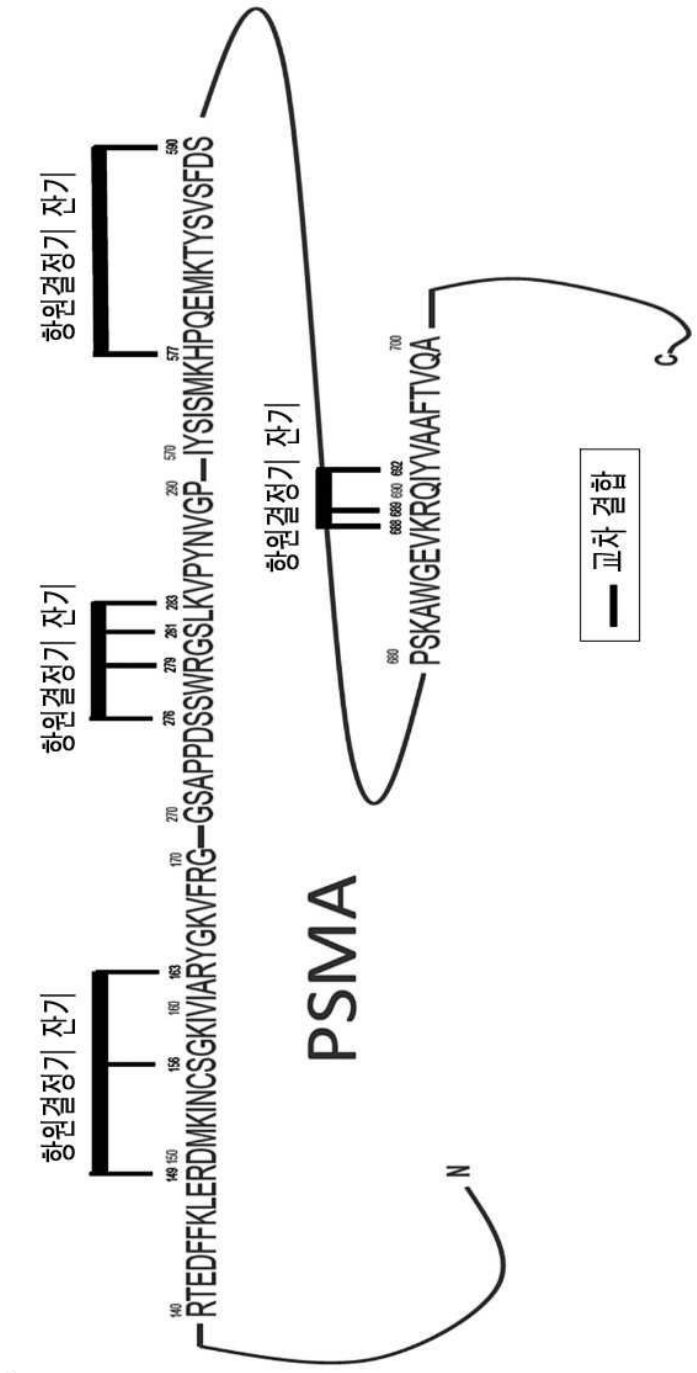
도면8a



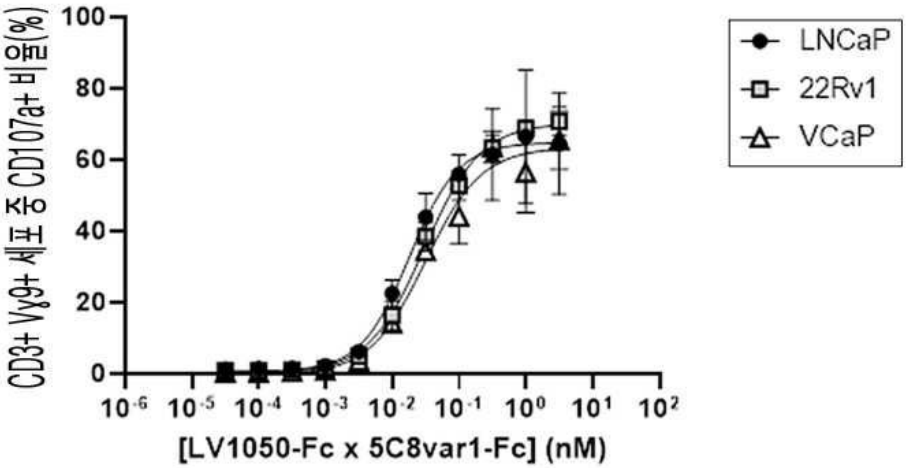
도면8b



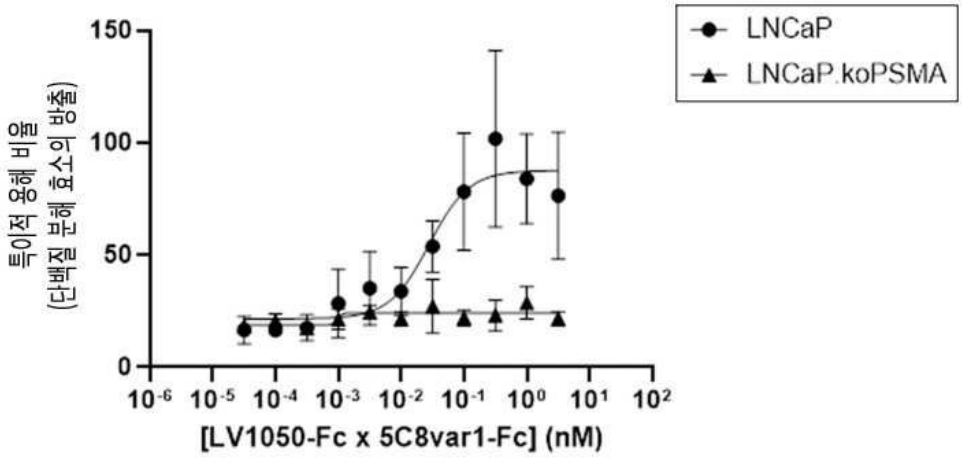
도면9


N
RTEDFFKLERDMKINCSGKIVIARYGKVFRG
GSAPPDSSWRGSLKVPYNVGP
IYSISMKHPQEMKTYSVSFDS
PSKAWGEVKRQIYVAAFTVQA
C
PSMA
항원결정기 잔기
항원결정기 잔기
항원결정기 잔기
항원결정기 잔기
교차 결합

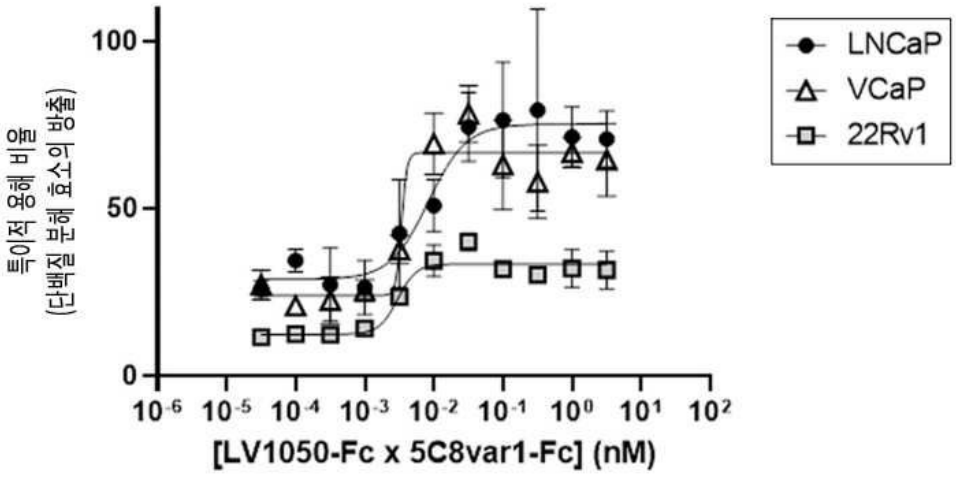
도면10



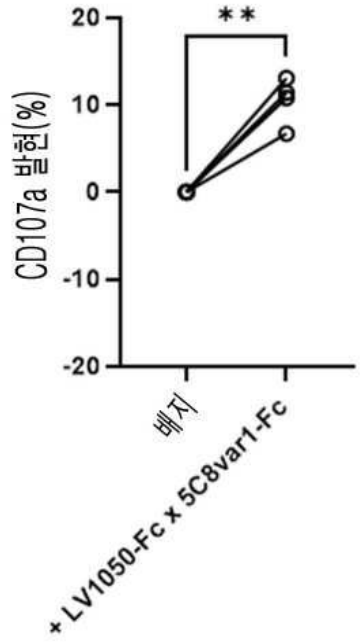
도면11a



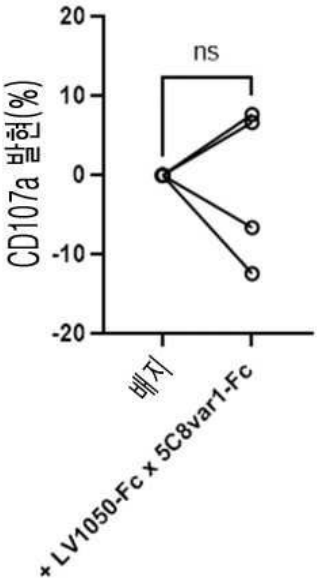
도면11b



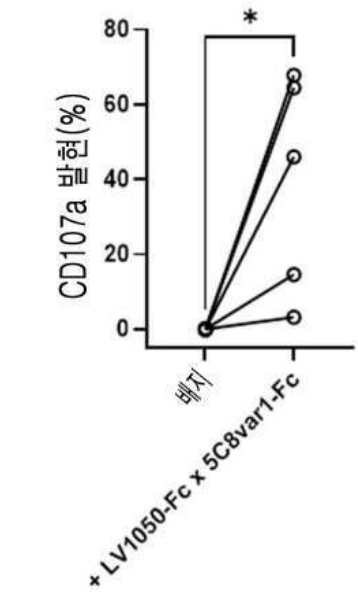
도면12a


**
20
10
0
-10
-20
CD107a 발현(%)
배지
+ LV1050-Fc x 5C8var1-Fc

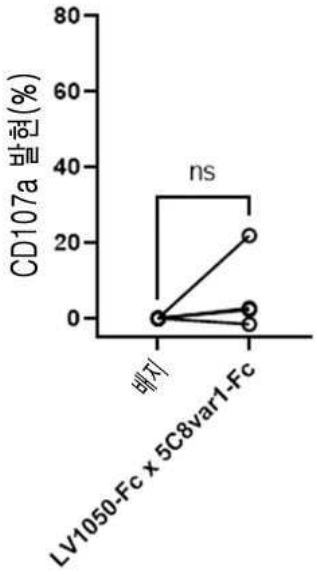
도면12b


ns
20
10
0
-10
-20
CD107a 발현(%)
배지
+ LV1050-Fc x 5C8var1-Fc

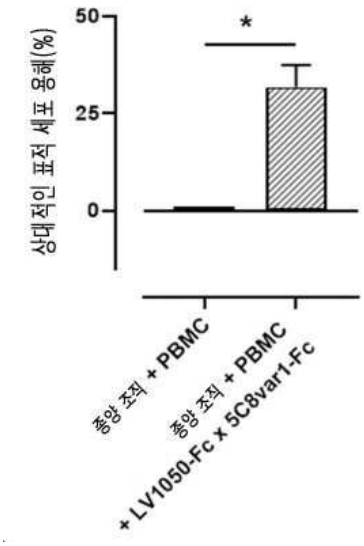
도면13a


*
80
60
40
20
0
CD107a 발현(%)
배지
+ LV1050-Fc x 5C8var1-Fc

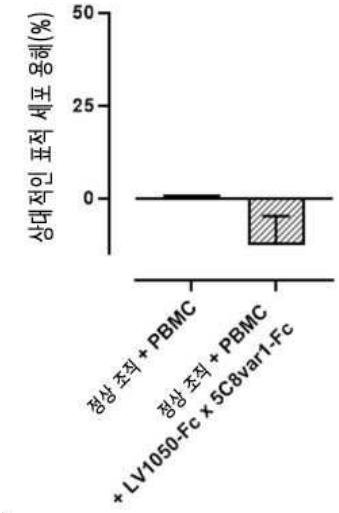
도면13b


80
60
40
20
0
CD107a 발현(%)
ns
배지
LV1050-Fc x 5C8var1-Fc

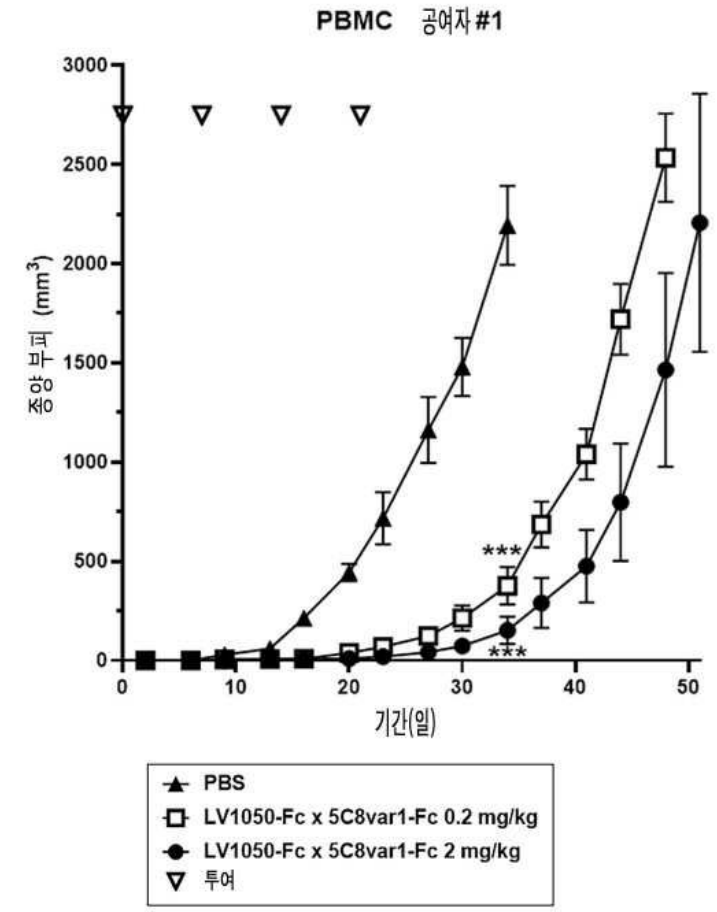
도면14a


50
25
0
*
상대적인 표적 세포 용해(%)
종양 조직 + PBMC
종양 조직 + PBMC
+ LV1050-Fc x 5C8var1-Fc

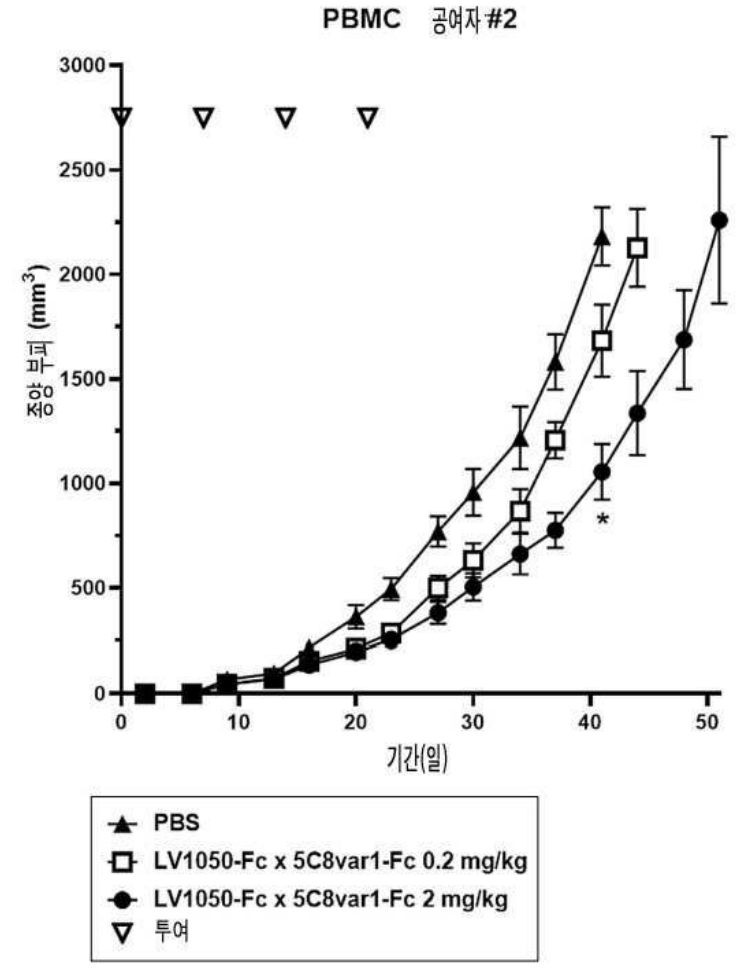
도면14b


50
25
0
상대적인 표적 세포 용해(%)
정상 조직 + PBMC
정상 조직 + PBMC
+ LV1050-Fc x 5C8var1-Fc

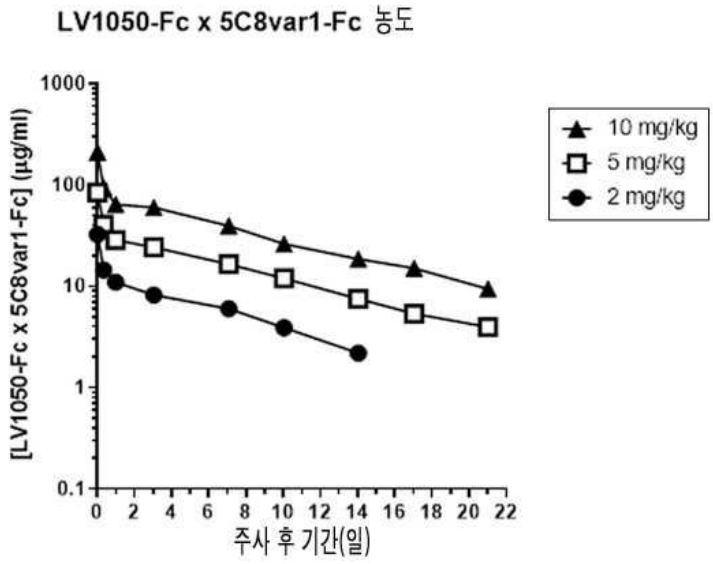
도면15a


PBMC 공여자#1
종양부피 (mm3)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
기간(일)
***
***
PBS
LV1050-Fc x 5C8var1-Fc 0.2 mg/kg
LV1050-Fc x 5C8var1-Fc 2 mg/kg
투여

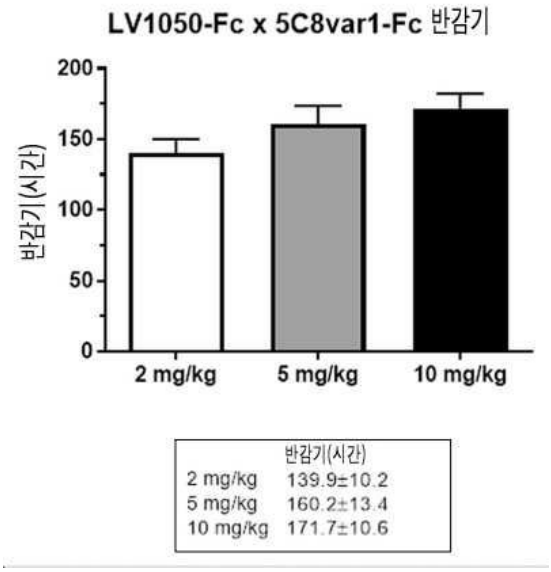
도면15b


PBMC 공여자#2
종양 부피 (mm3)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
기간(일)
*
PBS
LV1050-Fc x 5C8var1-Fc 0.2 mg/kg
LV1050-Fc x 5C8var1-Fc 2 mg/kg
투여

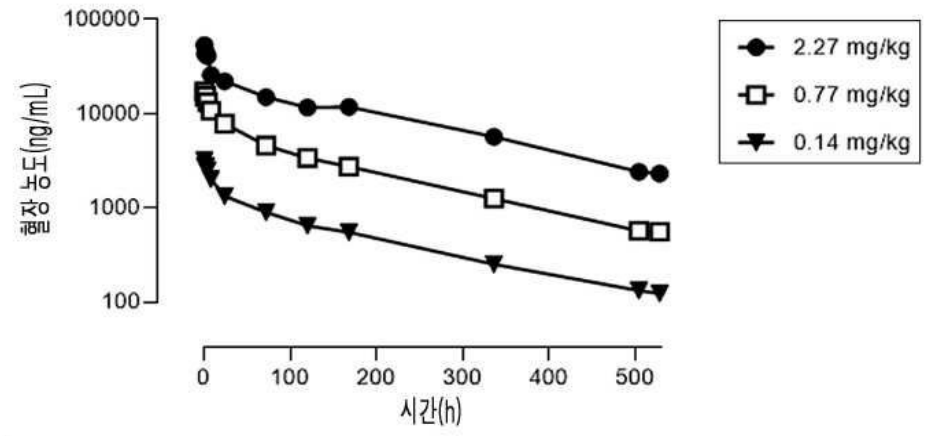
도면16a


LV1050-Fc x 5C8var1-Fc 농도
[LV1050-Fc x 5C8var1-Fc] (μg/ml)
1000
100
10
1
0.1
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
주사 후 기간(일)
10 mg/kg
5 mg/kg
2 mg/kg

도면16b



도면17



서 열 목 록

<110> LAVA Therapeutics

<120> Antibodies that bind PSMA and gamma-delta T cell receptors

<130> P007

<160> 36

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody sequence

<400> 1

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

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

100 105

<210> 2
<211> 111
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antibody sequence
<400> 2

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

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

Gly Tyr Gly Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

100 105 110

<210> 3

<211

> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody sequence

<400> 3

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Phe Met Ile Ser Glu Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Gly Tyr Gly Tyr Arg Gly Leu Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

100 105 110

<210> 4

<211> 130

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> Antibody sequence

<400> 4

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Pro Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

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

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

130

<210> 5
<211> 130
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antibody sequence
<400> 5
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Pro Phe Ser Asn Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val

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

Ala Ala Gln Phe Ser Gly Ala Asp Tyr Gly Phe Gly Arg Leu Gly Ile
100 105 110
Arg Gly Tyr Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
115 120 125

Ser Ser
130

<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> linker sequence
<400> 6
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 7
<211> 246
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antibody sequence
<400> 7
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Phe Met Ile Ser Glu Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Gly Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly

100 105 110

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

115 120 125

Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Pro

130 135 140

Phe Ser Asn Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu

145 150 155 160

Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr

165 170 175

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

180 185 190

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Pro Lys Pro Glu Asp Thr Ala

195 200 205

Ile Tyr Tyr Cys Ala Ala Gln Phe Ser Gly Ala Asp Tyr Gly Phe Gly

210 215 220

Arg Leu Gly Ile Arg Gly Tyr Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

225 230 235 240

Gln Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 8

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody sequence

<400> 8

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Phe Met Ile Ser Glu Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

115 120 125
Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Pro
130 135 140
Phe Ser Asn Tyr Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu
145 150 155 160
Arg Glu Phe Val Ser Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr
165 170 175
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
180 185 190

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

<210> 9

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody sequence

<400> 9

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Phe Met Ile Ser Glu Tyr
20 25 30

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

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

50 55 60

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

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

Gly Tyr Gly Tyr Arg Gly Leu Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val
115 120 125

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Pro
130 135 140

Phe Ser Asn Tyr Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu
145 150 155 160

Arg Glu Phe Val Ser Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr
165 170 175

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
180 185 190

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

195 200 205

Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gln Phe Ser Gly Ala Asp Tyr Gly Phe Gly
210 215 220

Arg Leu Gly Ile Arg Gly Tyr Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
225 230 235 240

Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Glu Pro Glu Ala

245 250

<210> 10

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody sequence

<400> 10

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

1 5 10

<210> 11

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody sequence

<400> 11

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

180 185 190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
210 215

<210> 12
<211> 230
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antibody sequence
<400> 12

Ala Ala Ala Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
1 5 10 15
Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

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

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
100 105 110

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

165 170 175
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
180 185 190
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
195 200 205
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
210 215 220
Leu Ser Leu Ser Pro Gly
225 230

<210> 13
<211> 230
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220><223> Antibody sequence
<400> 13

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

50 55 60
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
65 70 75 80

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
85 90 95
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
100 105 110
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
115 120 125

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

195 200 205
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
210 215 220
Leu Ser Leu Ser Pro Gly
225 230
<210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antibody sequence
<400> 14
Arg Phe Met Ile Ser Glu Tyr Ser Met His
1 5 10
<210> 15
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody sequence

<400> 15

Thr Ile Asn Pro Ala Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody sequence

<400> 16

Asp Gly Tyr Gly Tyr
1 5

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody sequence

<400> 17

Asn Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody sequence

<400> 18

Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 19

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody sequence

<400> 19

Gln Phe Ser Gly Ala Asp Tyr Gly Phe Gly Arg Leu Gly Ile Arg Gly
1 5 10 15

Tyr Glu Tyr Asp Tyr
20

<210> 20

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody sequence

<400> 20

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Pro Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Ala Gly Ile Ser Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ala Val Phe Ser Gly Ala Glu Thr Ala Tyr Tyr Pro Ser Asp Asp
100 105 110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody sequence

<400> 21

Gly Arg Pro Phe Ser Asn Tyr Gly Met Gly

1 5 10

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody sequence

<400> 22

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

1 5 10 15

Gly

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> Antibody sequence

<400> 23

Val Phe Ser Gly Ala Glu Thr Ala Tyr Tyr Pro Ser Asp Asp Tyr Asp

1 5 10 15

Tyr

<210> 24

<211> 750

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Met Trp Asn Leu Leu His Glu Thr Asp Ser Ala Val Ala Thr Ala Arg

1 5 10 15

Arg Pro Arg Trp Leu Cys Ala Gly Ala Leu Val Leu Ala Gly Gly Phe

20 25 30

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

100 105 110
Tyr Asp Val Leu Leu Ser Tyr Pro Asn Lys Thr His Pro Asn Tyr Ile
115 120 125
Ser Ile Ile Asn Glu Asp Gly Asn Glu Ile Phe Asn Thr Ser Leu Phe
130 135 140
Glu Pro Pro Pro Pro Gly Tyr Glu Asn Val Ser Asp Ile Val Pro Pro
145 150 155 160
Phe Ser Ala Phe Ser Pro Gln Gly Met Pro Glu Gly Asp Leu Val Tyr
165 170 175

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

245 250 255
Asn Ile Leu Asn Leu Asn Gly Ala Gly Asp Pro Leu Thr Pro Gly Tyr
260 265 270

Pro Ala Asn Glu Tyr Ala Tyr Arg Arg Gly Ile Ala Glu Ala Val Gly
275 280 285

Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro Ile Gly Tyr Tyr Asp Ala Gln Lys
290 295 300

Leu Leu Glu Lys Met Gly Gly Ser Ala Pro Pro Asp Ser Ser Trp Arg
305 310 315 320

Gly Ser Leu Lys Val Pro Tyr Asn Val Gly Pro Gly Phe Thr Gly Asn
325 330 335

Phe Ser Thr Gln Lys Val Lys Met His Ile His Ser Thr Asn Glu Val
340 345 350

Thr Arg Ile Tyr Asn Val Ile Gly Thr Leu Arg Gly Ala Val Glu Pro
355 360 365

Asp Arg Tyr Val Ile Leu Gly Gly His Arg Asp Ser Trp Val Phe Gly
370 375 380

Gly Ile Asp Pro Gln Ser Gly Ala Ala Val Val His Glu Ile Val Arg

385 390 395 400

Ser Phe Gly Thr Leu Lys Lys Glu Gly Trp Arg Pro Arg Arg Thr Ile
405 410 415

Leu Phe Ala Ser Trp Asp Ala Glu Glu Phe Gly Leu Leu Gly Ser Thr
420 425 430

Glu Trp Ala Glu Glu Asn Ser Arg Leu Leu Gln Glu Arg Gly Val Ala
435 440 445

Tyr Ile Asn Ala Asp Ser Ser Ile Glu Gly Asn Tyr Thr Leu Arg Val
450 455 460

Asp Cys Thr Pro Leu Met Tyr Ser Leu Val His Asn Leu Thr Lys Glu
465 470 475 480

Leu Lys Ser Pro Asp Glu Gly Phe Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Glu Ser
485 490 495

Trp Thr Lys Lys Ser Pro Ser Pro Glu Phe Ser Gly Met Pro Arg Ile
500 505 510

Ser Lys Leu Gly Ser Gly Asn Asp Phe Glu Val Phe Phe Gln Arg Leu
515 520 525

Gly Ile Ala Ser Gly Arg Ala Arg Tyr Thr Lys Asn Trp Glu Thr Asn

530 535 540

Lys Phe Ser Gly Tyr Pro Leu Tyr His Ser Val Tyr Glu Thr Tyr Glu
545 550 555 560

Leu Val Glu Lys Phe Tyr Asp Pro Met Phe Lys Tyr His Leu Thr Val
565 570 575

Ala Gln Val Arg Gly Gly Met Val Phe Glu Leu Ala Asn Ser Ile Val
580 585 590

Leu Pro Phe Asp Cys Arg Asp Tyr Ala Val Val Leu Arg Lys Tyr Ala
595 600 605

Asp Lys Ile Tyr Ser Ile Ser Met Lys His Pro Gln Glu Met Lys Thr
610 615 620

Tyr Ser Val Ser Phe Asp Ser Leu Phe Ser Ala Val Lys Asn Phe Thr
625 630 635 640

Glu Ile Ala Ser Lys Phe Ser Glu Arg Leu Gln Asp Phe Asp Lys Ser
645 650 655

Asn Pro Ile Val Leu Arg Met Met Asn Asp Gln Leu Met Phe Leu Glu
660 665 670

Arg Ala Phe Ile Asp Pro Leu Gly Leu Pro Asp Arg Pro Phe Tyr Arg

675 680 685

His Val Ile Tyr Ala Pro Ser Ser His Asn Lys Tyr Ala Gly Glu Ser
690 695 700

Phe Pro Gly Ile Tyr Asp Ala Leu Phe Asp Ile Glu Ser Lys Val Asp
705 710 715 720

Pro Ser Lys Ala Trp Gly Glu Val Lys Arg Gln Ile Tyr Val Ala Ala
725 730 735

Phe Thr Val Gln Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ser Glu Val Ala
740 745 750

<210> 25

<211> 360

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody sequence

<400> 25

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Pro Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

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

Ala Ala Gln Phe Ser Gly Ala Asp Tyr Gly Phe Gly Arg Leu Gly Ile
100 105 110

Arg Gly Tyr Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
115 120 125

Ser Ser Ala Ala Ala Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
130 135 140

Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
145 150 155 160

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
165 170 175

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
180 185 190

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

195 200 205

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

355 360

<210> 26

<211> 341

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody sequence

<400> 26

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Phe Met Ile Ser Glu Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

Ser Leu Ser Pro Gly

340

<210> 27

<211> 361

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody sequence

<400> 27

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Pro Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

355 360

<210> 28

<211> 342

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody sequence

<400> 28

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

1 5 10 15

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

85 90 95
Gly Tyr Gly Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala
100 105 110
Ala Ala Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
115 120 125
Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
130 135 140
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
145 150 155 160

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

225 230 235 240
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
245 250 255

Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
260 265 270
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
275 280 285
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys
290 295 300

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
305 310 315 320
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
325 330 335
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
340

<210> 29
<211> 246
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> antibody sequence
<400> 29

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

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

85 90 95
Gly Tyr Gly Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly
100 105 110

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

115 120 125

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Pro

130 135 140

Phe Ser Asn Tyr Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu

145 150 155 160

Arg Glu Phe Val Ser Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Arg Leu Gly Ile Arg Gly Tyr Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

225 230 235 240

Gln Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 30

<211> 737

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 30

Met Ala Arg Pro Leu Cys Thr Leu Leu Leu Leu Met Ala Thr Leu Ala

1 5 10 15

Gly Ala Leu Ala Gly Ser His His His His His His Gly Ser Lys Ser

20 25 30

Ser Asn Glu Ala Thr Asn Ile Thr Pro Lys His Asn Met Lys Ala Phe

35 40 45

Leu Asp Glu Leu Lys Ala Glu Asn Ile Lys Lys Phe Leu Tyr Asn Phe

50 55 60

Thr Gln Ile Pro His Leu Ala Gly Thr Glu Gln Asn Phe Gln Leu Ala

65 70 75 80

Lys Gln Ile Gln Ser Gln Trp Lys Glu Phe Gly Leu Asp Ser Val Glu

85 90 95

Leu Ala His Tyr Asp Val Leu Leu Ser Tyr Pro Asn Lys Thr His Pro

100 105 110

Asn Tyr Ile Ser Ile Ile Asn Glu Asp Gly Asn Glu Ile Phe Asn Thr

115 120 125

Ser Leu Phe Glu Pro Pro Pro Pro Gly Tyr Glu Asn Val Ser Asp Ile

130 135 140

Val Pro Pro Phe Ser Ala Phe Ser Pro Gln Gly Met Pro Glu Gly Asp

145 150 155 160

Leu Val Tyr Val Asn Tyr Ala Arg Thr Glu Asp Phe Phe Lys Leu Glu

165 170 175

Arg Asp Met Lys Ile Asn Cys Ser Gly Lys Ile Val Ile Ala Arg Tyr

180 185 190

Gly Lys Val Phe Arg Gly Asn Lys Val Lys Asn Ala Gln Leu Ala Gly

195 200 205

Ala Lys Gly Val Ile Leu Tyr Ser Asp Pro Ala Asp Tyr Phe Ala Pro

210 215 220

Gly Val Lys Ser Tyr Pro Asp Gly Trp Asn Leu Pro Gly Gly Gly Val

225 230 235 240

Gln Arg Gly Asn Ile Leu Asn Leu Asn Gly Ala Gly Asp Pro Leu Thr

245 250 255

Pro Gly Tyr Pro Ala Asn Glu Tyr Ala Tyr Arg Arg Gly Ile Ala Glu

260 265 270

Ala Val Gly Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro Ile Gly Tyr Tyr Asp

275 280 285

Ala Gln Lys Leu Leu Glu Lys Met Gly Gly Ser Ala Pro Pro Asp Ser

290 295 300

Ser Trp Arg Gly Ser Leu Lys Val Pro Tyr Asn Val Gly Pro Gly Phe

305 310 315 320

Thr Gly Asn Phe Ser Thr Gln Lys Val Lys Met His Ile His Ser Thr

325 330 335

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

340 345 350

Val Glu Pro Asp Arg Tyr Val Ile Leu Gly Gly His Arg Asp Ser Trp

355 360 365

Val Phe Gly Gly Ile Asp Pro Gln Ser Gly Ala Ala Val Val His Glu

370 375 380

Ile Val Arg Ser Phe Gly Thr Leu Lys Lys Glu Gly Trp Arg Pro Arg

385 390 395 400

Arg Thr Ile Leu Phe Ala Ser Trp Asp Ala Glu Glu Phe Gly Leu Leu

405 410 415

Gly Ser Thr Glu Trp Ala Glu Glu Asn Ser Arg Leu Leu Gln Glu Arg

420 425 430

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

435 440 445

Leu Arg Val Asp Cys Thr Pro Leu Met Tyr Ser Leu Val His Asn Leu

450 455 460

Thr Lys Glu Leu Lys Ser Pro Asp Glu Gly Phe Glu Gly Lys Ser Leu

465 470 475 480

Tyr Glu Ser Trp Thr Lys Lys Ser Pro Ser Pro Glu Phe Ser Gly Met

485 490 495

Pro Arg Ile Ser Lys Leu Gly Ser Gly Asn Asp Phe Glu Val Phe Phe

500 505 510

Gln Arg Leu Gly Ile Ala Ser Gly Arg Ala Arg Tyr Thr Lys Asn Trp

515 520 525

Glu Thr Asn Lys Phe Ser Gly Tyr Pro Leu Tyr His Ser Val Tyr Glu

530 535 540

Thr Tyr Glu Leu Val Glu Lys Phe Tyr Asp Pro Met Phe Lys Tyr His

545 550 555 560

Leu Thr Val Ala Gln Val Arg Gly Gly Met Val Phe Glu Leu Ala Asn

565 570 575

Ser Ile Val Leu Pro Phe Asp Cys Arg Asp Tyr Ala Val Val Leu Arg

580 585 590

Lys Tyr Ala Asp Lys Ile Tyr Ser Ile Ser Met Lys His Pro Gln Glu

595 600 605

Met Lys Thr Tyr Ser Val Ser Phe Asp Ser Leu Phe Ser Ala Val Lys

610 615 620

Asn Phe Thr Glu Ile Ala Ser Lys Phe Ser Glu Arg Leu Gln Asp Phe

625 630 635 640

Asp Lys Ser Asn Pro Ile Val Leu Arg Met Met Asn Asp Gln Leu Met

645 650 655

Phe Leu Glu Arg Ala Phe Ile Asp Pro Leu Gly Leu Pro Asp Arg Pro

660 665 670

Phe Tyr Arg His Val Ile Tyr Ala Pro Ser Ser His Asn Lys Tyr Ala

675 680 685

Gly Glu Ser Phe Pro Gly Ile Tyr Asp Ala Leu Phe Asp Ile Glu Ser

690 695 700

Lys Val Asp Pro Ser Lys Ala Trp Gly Glu Val Lys Arg Gln Ile Tyr

705 710 715 720

Val Ala Ala Phe Thr Val Gln Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ser Glu Val

725 730 735

Ala

<210> 31

<211> 503

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> gammadelta TCR construct

<400> 31

Met Gln Arg Ile Ser Ser Leu Ile His Leu Ser Leu Phe Trp Ala Gly

1 5 10 15

Val Met Ser Ala Ile Glu Leu Val Pro Glu His Gln Thr Val Pro Val

20 25 30

Ser Ile Gly Val Pro Ala Thr Leu Arg Cys Ser Met Lys Gly Glu Ala

35 40 45

Ile Gly Asn Tyr Tyr Ile Asn Trp Tyr Arg Lys Thr Gln Gly Asn Thr

50 55 60

Met Thr Phe Ile Tyr Arg Glu Lys Asp Ile Tyr Gly Pro Gly Phe Lys

65 70 75 80

Asp Asn Phe Gln Gly Asp Ile Asp Ile Ala Lys Asn Leu Ala Val Leu

85 90 95

Lys Ile Leu Ala Pro Ser Glu Arg Asp Glu Gly Ser Tyr Tyr Cys Ala

100 105 110

Cys Asp Thr Leu Gly Met Gly Gly Glu Tyr Thr Asp Lys Leu Ile Phe

115 120 125

Gly Lys Gly Thr Arg Val Thr Val Glu Pro Arg Ser Gln Pro His Thr

130 135 140

Lys Pro Ser Val Phe Val Met Lys Asn Gly Thr Asn Val Ala Cys Leu

145 150 155 160

Val Lys Glu Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Arg Ile Asn Leu Val Ser Ser

165 170 175

Lys Lys Ile Thr Glu Phe Asp Pro Ala Ile Val Ile Ser Pro Ser Gly

180 185 190

Lys Tyr Asn Ala Val Lys Leu Gly Lys Tyr Glu Asp Ser Asn Ser Val

195 200 205

Thr Cys Ser Val Gln His Asp Asn Lys Thr Val His Ser Thr Asp Phe

210 215 220

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

225 230 235 240

Asn Thr Lys Gln Pro Ser Lys Ser Cys His Lys Pro Lys Ala Ile Val

245 250 255

His Thr Glu Lys Val Asn Met Met Ser Leu Thr Ala Ala Ala Ser Asp

260 265 270

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

275 280 285

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
290 295 300
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
305 310 315 320
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
325 330 335
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
340 345 350
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

355 360 365
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
370 375 380
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
385 390 395 400
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
405 410 415
Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
420 425 430

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
435 440 445
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
450 455 460
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
465 470 475 480
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
485 490 495
Gly His His His His His His

500

<210> 32
<211> 517

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> gammadelta TCR construct

<400> 32

Met Leu Ser Leu Leu His Ala Ser Thr Leu Ala Val Leu Gly Ala Leu
1 5 10 15

Cys Val Tyr Gly Ala Gly His Leu Glu Gln Pro Gln Ile Ser Ser Thr
20 25 30

Lys Thr Leu Ser Lys Thr Ala Arg Leu Glu Cys Val Val Ser Gly Ile
35 40 45

Thr Ile Ser Ala Thr Ser Val Tyr Trp Tyr Arg Glu Arg Pro Gly Glu
50 55 60

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

Glu Ser Gly Ile Pro Ser Gly Lys Phe Glu Val Asp Arg Ile Pro Glu
85 90 95

Thr Ser Thr Ser Thr Leu Thr Ile His Asn Val Glu Lys Gln Asp Ile
100 105 110

Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Glu Ala Gln Gln Glu Leu Gly Lys

115 120 125

Lys Ile Lys Val Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Ile Ile Thr Asp Lys
130 135 140

Gln Leu Asp Ala Asp Val Ser Pro Lys Pro Thr Ile Phe Leu Pro Ser
145 150 155 160

Ile Ala Glu Thr Lys Leu Gln Lys Ala Gly Thr Tyr Leu Cys Leu Leu
165 170 175

Glu Lys Phe Phe Pro Asp Val Ile Lys Ile His Trp Glu Glu Lys Lys
180 185 190

Ser Asn Thr Ile Leu Gly Ser Gln Glu Gly Asn Thr Met Lys Thr Asn
195 200 205

Asp Thr Tyr Met Lys Phe Ser Trp Leu Thr Val Pro Glu Lys Ser Leu
210 215 220

Asp Lys Glu His Arg Cys Ile Val Arg His Glu Asn Asn Lys Asn Gly
225 230 235 240
Val Asp Gln Glu Ile Ile Phe Pro Pro Ile Lys Thr Asp Val Ile Thr
245 250 255
Met Asp Pro Lys Asp Asn Cys Ser Lys Asp Ala Asn Asp Thr Leu Leu

260 265 270
Leu Gln Leu Thr Asn Thr Ser Ala Ala Ala Ala Ser Asp Lys Thr His
275 280 285
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
290 295 300
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
305 310 315 320
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
325 330 335

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
340 345 350
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
355 360 365
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
370 375 380
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
385 390 395 400
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

405 410 415
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
420 425 430
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
435 440 445
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
450 455 460
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

465 470 475 480

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
485 490 495
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala Ala
500 505 510
Ala Glu Pro Glu Ala
515

<210> 33
<211> 31
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 33
Arg Thr Glu Asp Phe Phe Lys Leu Glu Arg Asp Met Lys Ile Asn Cys
1 5 10 15
Ser Gly Lys Ile Val Ile Ala Arg Tyr Gly Lys Val Phe Arg Gly
20 25 30

<210> 34
<211> 21
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 34
Gly Ser Ala Pro Pro Asp Ser Ser Trp Arg Gly Ser Leu Lys Val Pro
1 5 10 15
Tyr Asn Val Gly Pro
20

<210> 35
<211> 21
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 35
Ile Tyr Ser Ile Ser Met Lys His Pro Gln Glu Met Lys Thr Tyr Ser
1 5 10 15

Val Ser Phe Asp Ser

20

<210> 36

<211> 21

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 36

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

1 5 10 15

Phe Thr Val Gln Ala

20