



공개특허 10-2025-0046337

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2025-0046337
(43) 공개일자 2025년04월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2809 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2025-7008876(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2018년09월20일
심사청구일자 2025년03월18일
- (62) 원출원 특허 10-2020-7011016
원출원일자(국제) 2018년09월20일
심사청구일자 2021년09월17일
- (85) 번역문제출일자 2025년03월18일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2018/106618
- (87) 국제공개번호 WO 2019/057099
국제공개일자 2019년03월28일
- (30) 우선권주장
PCT/CN2017/102622 2017년09월21일 중국(CN)

- (71) 출원인
우시 바이올로지스 아일랜드 리미티드
아일랜드 에이91 엑스56에프 코 라우스 던독 물러
할린
- (72) 별명자
리, 징
중국 상하이 푸터 중 로드 299
- (74) 대리인
메이, 친
중국 상하이 푸터 중 로드 299
- 양영준, 이윤기

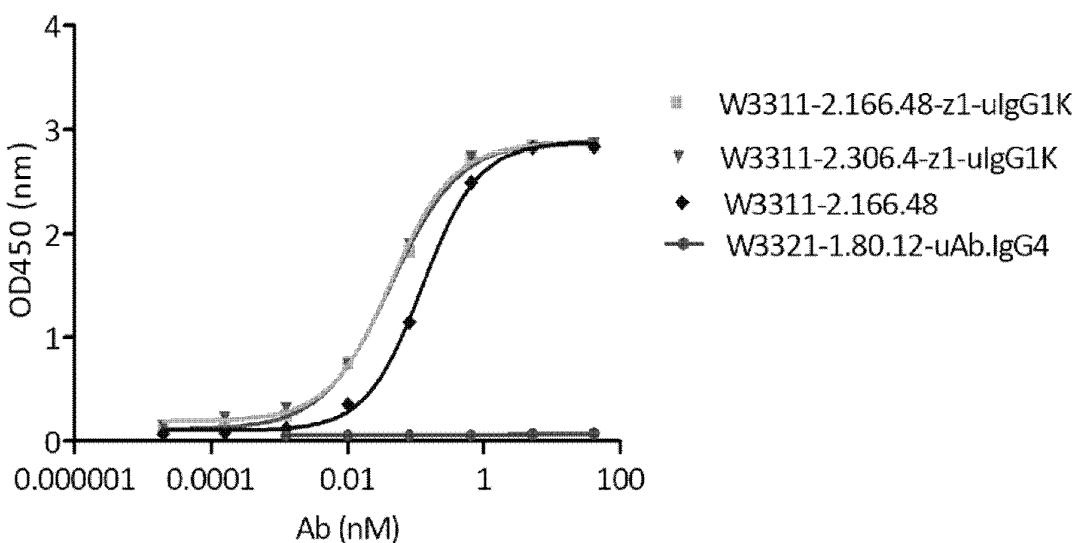
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 신규 항-CD3엡실론 항체

(57) 요 약

서열식별번호: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 및 47로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 중쇄 CDR 서열 및/또는 서열식별번호: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 및 48로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 카파 경쇄 CDR 서열을 포함하는 단리된 모노클로날 항-CD3엡실론 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 제공된다. 추가로, 그를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드, 그를 포함하는 제약 조성물 및 그의 용도가 제공된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/77 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

CD3에 특이적인 제1 항원-결합 도메인, 및 제2 항원-결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체 또는 그의 항원-결합 단편으로서,

여기서 제1 항원-결합 도메인은 각각 서열식별번호: 7, 서열식별번호: 9, 및 서열식별번호: 11의 중쇄 CDR 1 내지 3; 및 서열식별번호: 8, 서열식별번호: 10, 및 서열식별번호: 12의 카파 경쇄 CDR 1 내지 3을 포함하는, 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 제1 항원-결합 도메인이

a) 서열식별번호: 117을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 119를 포함하는 카파 경쇄 가변 영역; 또는

b) 서열식별번호: 85를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 87을 포함하는 카파 경쇄 가변 영역

을 포함하는 것인, 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 3

제1항에 있어서, 제1 항원-결합 도메인이 서열식별번호: 117과 적어도 97% 동일한 중쇄 가변 영역 및 서열식별 번호: 119와 적어도 97% 동일한 카파 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인, 이중특이적 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 4

제1항에 있어서, 제1 항원-결합 도메인이 서열식별번호: 117에 대해 3개 이하의 치환 및/또는 결실을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 119에 대해 3개 이하의 치환 또는 결실을 포함하는 카파 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인, 이중특이적 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 5

제1항에 있어서, 제1 항원-결합 도메인이 하나 이상의 아미노산 잔기 치환을 추가로 포함하지만 CD3에 대한 특이적 결합 친화도를 보유하며, 여기서 치환이 하나 이상의 FR 서열에 있는 것인, 이중특이적 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 6

제1항에 있어서, 이류노글로불린 불변 영역, 임의로 IgG의 불변 영역, 임의로 인간 IgG1의 불변 영역을 추가로 포함하는, 이중특이적 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 7

제1항에 있어서, 제1 항원 결합 도메인이 CD3엡실론에 특이적으로 결합할 수 있고, 임의로 CD3엡실론이 마우스, 래트, 원숭이 또는 인간으로부터 유래되고, 임의로 CD3엡실론이 재조합 CD3엡실론 또는 세포 표면 상에 발현된 CD3엡실론인, 이중특이적 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 8

제1항에 있어서, 제2 항원이 CD3과 상이하고, CD3엡실론-발현 T 세포에 근접한 제2 항원의 존재가 제2 항원이 면역계에 의해 인식되는 데 바람직한 것인, 이중특이적 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 9

제1항에 있어서, 제2 항원이 종양 연관 항원 또는 그의 에피토프인, 이중특이적 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 10

제1항에 있어서, 노브-인투-홀(knob-into-hole) 결합이 형성되어 2개의 상이한 항원-결합 부위의 이중이량체화를 촉진할 수 있도록 계면에서 조작된, 이중특이적 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 11

제1항에 있어서, 1종 이상의 접합체에 연결된 이중특이적 항체 또는 그의 항원-결합 단편으로서, 여기서 접합체가 화학요법제, 독소, 방사성 동위원소, 랜타나이드, 발광 표지, 형광 표지 또는 효소-기질 표지를 포함하는 것인, 이중특이적 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 12

제1항의 이중특이적 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 13

제12항의 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

청구항 14

제13항의 벡터를 포함하는 단리된 숙주 세포.

청구항 15

제1항의 이중특이적 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함하는 단리된 숙주 세포를 상기 벡터가 발현되는 조건 하에 배양하는 것을 포함하는, 제1항의 이중특이적 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 발현시키는 방법.

청구항 16

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 이중특이적 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는, 질환 또는 병태를 치료하기 위한 제약 조성물로서, 여기서 질환 또는 병태는 암, 염증성 질환 또는 감염성 질환인, 제약 조성물.

청구항 17

CD3엡실론-발현 T 세포를 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 이중특이적 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 접촉시키는 것을 포함하는, 시험관내에서 CD3엡실론-발현 T 세포를 활성화시키는 방법.

청구항 18

CD3엡실론을 검출하는데 유용한, 또는 대상체에서 질환 또는 병태를 진단하거나 치료하는데 유용한, 제1항의 이중특이적 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 키트로서,

여기서 질환 또는 병태는 암, 염증성 질환 또는 감염성 질환인, 키트.

청구항 19

제18항에 있어서, 키트가 재조합 CD3엡실론, 세포 표면 상에서 발현된 CD3엡실론 또는 CD3엡실론-발현 세포를 검출하는데 유용한, 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 개시내용은 일반적으로 신규 항-인간 CD3엡실론 항체에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] CD3 (분화 클러스터 3) T-세포 공동-수용체는 단백질 복합체이고, 4개의 별개의 쇄인 CD3감마 쇄, CD3델타 쇄 및 2개의 CD3엡실론 쇄로 구성된다. 이들 쇄는 T-세포 수용체 (TCR) 및 제타-쇄로서 공지된 분자와 결합하여 T 림프구에서 활성화 신호를 생성한다. TCR, 제타-쇄 및 CD3 분자는 함께 TCR 복합체를 구성하며, 여기서 한 서브유닛으로서의 TCR은 항원을 인식하고 이에 결합하고, 한 서브유닛으로서의 CD3은 항원-자극을 신호전달 경로로 전달 및 운반하고, 궁극적으로 T-세포 활성을 조절한다. CD3 단백질은 실질적으로 모든 T 세포에 존재한다.
- [0003] CD3은 TCR과 함께 CD3-TCR 복합체를 형성하고, 이는 선천성 및 입양 면역 반응 둘 다에서의 T 세포의 방대한 기능뿐만 아니라 세포성 및 체액성 면역 기능을 조정하는데 중추적인 역할을 한다. 이들은 병원성 유기체를 제거하고 광범위한 세포독성 효과에 의해 종양 성장을 제어하는 것을 포함한다.
- [0004] 인간 CD3에 특이적인 마우스 모노클로날 항체, 예컨대 OKT3 (Kung et al. (1979) Science 206: 347-9)은 치료를 위한 제1 세대 CD3 항체였다. OKT3은 강한 면역억제 효력을 갖지만, 그의 면역원성 및 유사분열촉진 잠재력과 연관된 심각한 부작용에 의해 그의 임상 용도가 방해되었다 (Chatenoud (2003) Nature Reviews 3:123-132). OKT3은 항-글로불린 반응을 유도하여, 그 자신의 신속한 클리어런스 및 중화를 촉진하였다 (Chatenoud et al. (1982) Eur. J. Immunol. 137:830-8). 추가로, OKT3은 시험관내에서 T-세포 증식 및 시토카인 생산을 유도하였고, 생체내에서 시토카인의 대규모 방출을 일으켰다 (Hirsch et al. (1989) J. Immunol 142: 737-43, 1989). 시토카인 방출 (또한 "시토카인 스톰"으로 지칭됨)은 열, 오한, 두통, 오심, 구토, 설사, 호흡 곤란, 패혈성 수막염 및 저혈압을 특징으로 하는 "독감-유사" 증후군을 유발하였다 (Chatenoud, 2003). 이러한 심각한 부작용은 이식에서의 OKT3의 보다 폭넓은 사용뿐만 아니라 자가면역과 같은 다른 임상 분야에 대한 그의 사용의 확장을 제한하였다 (상기 동일 문헌).
- [0005] 신규 항-CD3 항체에 대한 유의한 필요성이 존재한다.

발명의 내용

- [0006] 본 개시내용 전반에 걸쳐, 단수 표현은 그 표현의 문법적 대상의 하나 또는 하나 초과 (즉, 적어도 하나)를 지칭하는 것으로 본원에 사용된다. 예로서, "항체"는 하나의 항체 또는 하나 초과의 항체를 의미한다.
- [0007] 본 개시내용은 신규 모노클로날 항-CD3엡실론 항체, 그의 아미노산 및 뉴클레오티드 서열, 및 그의 용도를 제공한다.
- [0008] 한 측면에서, 본 개시내용은 서열식별번호(SEQ ID NO): 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 및 47로 이루어진 군으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 중쇄 CDR 서열 및/ 또는 서열식별번호: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 및 48로 이루어진 군으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 카파 경쇄 CDR 서열을 포함하는 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0009] 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 또는 47의 서열에 대해 적어도 80% (예를 들어 적어도 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) 서열 동일성을 갖는 1, 2 또는 3개의 중쇄 CDR 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 또는 48의 서열에 대해 적어도 80% (예를 들어 적어도 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) 서열 동일성을 갖는 1, 2 또는 3개의 경쇄 CDR 서열을 포함한다.
- [0010] 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 가변 영역을 포함한다:
- [0011] a) 서열식별번호: 1, 서열식별번호: 3 및 서열식별번호: 5로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 CDR 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역;
- [0012] b) 서열식별번호: 7, 서열식별번호: 9 및 서열식별번호: 11로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 CDR 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역;
- [0013] c) 서열식별번호: 13, 서열식별번호: 15 및 서열식별번호: 17로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 CDR 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역;
- [0014] d) 서열식별번호: 19, 서열식별번호: 21 및 서열식별번호: 23으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 CDR 서열을 포함

하는 중쇄 가변 영역;

[0015] e) 서열식별번호: 25, 서열식별번호: 27 및 서열식별번호: 29로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 CDR 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역;

[0016] f) 서열식별번호: 31, 서열식별번호: 33 및 서열식별번호: 35로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 CDR 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역;

[0017] g) 서열식별번호: 37, 서열식별번호: 39 및 서열식별번호: 41로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 CDR 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

[0018] h) 서열식별번호: 43, 서열식별번호: 45 및 서열식별번호: 47로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 CDR 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역.

[0019] 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 카파 경쇄 가변 영역을 포함한다:

[0020] a) 서열식별번호: 2, 서열식별번호: 4 및 서열식별번호: 6으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 CDR 서열을 포함하는 카파 경쇄 가변 영역;

[0021] b) 서열식별번호: 8, 서열식별번호: 10 및 서열식별번호: 12로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 CDR 서열을 포함하는 카파 경쇄 가변 영역;

[0022] c) 서열식별번호: 14, 서열식별번호: 16 및/또는 서열식별번호: 18로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 CDR 서열을 포함하는 카파 경쇄 가변 영역;

[0023] d) 서열식별번호: 20, 서열식별번호: 22 및 서열식별번호: 24로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 CDR 서열을 포함하는 카파 경쇄 가변 영역;

[0024] e) 서열식별번호: 26, 서열식별번호: 28 및 서열식별번호: 30으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 CDR 서열을 포함하는 카파 경쇄 가변 영역;

[0025] f) 서열식별번호: 32, 서열식별번호: 34 및 서열식별번호: 36으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 CDR 서열을 포함하는 카파 경쇄 가변 영역;

[0026] g) 서열식별번호: 38, 서열식별번호: 40 및 서열식별번호: 42로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 CDR 서열을 포함하는 카파 경쇄 가변 영역; 및

[0027] h) 서열식별번호: 44, 서열식별번호: 46 및 서열식별번호: 48로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 CDR 서열을 포함하는 카파 경쇄 가변 영역.

[0028] 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 5, 11, 17, 23, 29, 35, 41 및 47로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 CDR3 서열을 포함한다.

[0029] 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 하기를 포함한다:

[0030] a) 서열식별번호: 1, 서열식별번호: 7, 서열식별번호: 13, 서열식별번호: 19, 서열식별번호: 25, 서열식별번호: 31, 서열식별번호: 37 및 서열식별번호: 43으로부터 선택된 중쇄 CDR1 서열;

[0031] b) 서열식별번호: 3, 서열식별번호: 9, 서열식별번호: 15, 서열식별번호: 21, 서열식별번호: 27, 서열식별번호: 33, 서열식별번호: 39 및 서열식별번호: 45로부터 선택된 중쇄 CDR2 서열; 및

[0032] c) 서열식별번호: 5, 서열식별번호: 11, 서열식별번호: 17, 서열식별번호: 23, 서열식별번호: 29, 서열식별번호: 35, 서열식별번호: 41 및 서열식별번호: 47로부터 선택된 중쇄 CDR3 서열.

[0033] 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 하기를 포함한다:

[0034] a) 서열식별번호: 2, 서열식별번호: 8, 서열식별번호: 14, 서열식별번호: 20, 서열식별번호: 26, 서열식별번호: 32, 서열식별번호: 38 및 서열식별번호: 44로부터 선택된 경쇄 CDR1 서열;

[0035] b) 서열식별번호: 4, 서열식별번호: 10, 서열식별번호: 16, 서열식별번호: 22, 서열식별번호: 28, 서열식별번호: 34, 서열식별번호: 40 및 서열식별번호: 46으로부터 선택된 경쇄 CDR2 서열; 및

[0036] c) 서열식별번호: 6, 서열식별번호: 12, 서열식별번호: 18, 서열식별번호: 24, 서열식별번호: 30,

서열식별번호: 36, 서열식별번호: 42 및 서열식별번호: 48로부터 선택된 경쇄 CDR3 서열.

[0037] 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 하기를 포함한다:

a) 서열식별번호: 1, 서열식별번호: 7, 서열식별번호: 13, 서열식별번호: 19, 서열식별번호: 25, 서열식별번호: 31, 서열식별번호: 37 및 서열식별번호: 43으로부터 선택된 중쇄 CDR1 서열;

b) 서열식별번호: 3, 서열식별번호: 9, 서열식별번호: 15, 서열식별번호: 21, 서열식별번호: 27, 서열식별번호: 33, 서열식별번호: 39 및 서열식별번호: 45로부터 선택된 중쇄 CDR2 서열;

c) 서열식별번호: 5, 서열식별번호: 11, 서열식별번호: 17, 서열식별번호: 23, 서열식별번호: 29, 서열식별번호: 35, 서열식별번호: 41 및 서열식별번호: 47로부터 선택된 중쇄 CDR3 서열;

d) 서열식별번호: 2, 서열식별번호: 8, 서열식별번호: 14, 서열식별번호: 20, 서열식별번호: 26, 서열식별번호: 32, 서열식별번호: 38 및 서열식별번호: 44로부터 선택된 경쇄 CDR1 서열;

e) 서열식별번호: 4, 서열식별번호: 10, 서열식별번호: 16, 서열식별번호: 22, 서열식별번호: 28, 서열식별번호: 34, 서열식별번호: 40 및 서열식별번호: 46으로부터 선택된 경쇄 CDR2 서열; 및

f) 서열식별번호: 6, 서열식별번호: 12, 서열식별번호: 18, 서열식별번호: 24, 서열식별번호: 30, 서열식별번호: 36, 서열식별번호: 42 및 서열식별번호: 48로부터 선택된 경쇄 CDR3 서열.

[0044] 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 하기를 포함한다:

a) 서열식별번호: 1, 서열식별번호: 3 및 서열식별번호: 5로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 CDR 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열식별번호: 2, 서열식별번호: 4 및 서열식별번호: 6으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 CDR 서열을 포함하는 카파 경쇄 가변 영역;

b) 서열식별번호: 7, 서열식별번호: 9 및 서열식별번호: 11로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 CDR 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열식별번호: 8, 서열식별번호: 10 및 서열식별번호: 12로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 CDR 서열을 포함하는 카파 경쇄 가변 영역;

c) 서열식별번호: 13, 서열식별번호: 15 및 서열식별번호: 17로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 CDR 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열식별번호: 14, 서열식별번호: 16 및 서열식별번호: 18로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 CDR 서열을 포함하는 카파 경쇄 가변 영역;

d) 서열식별번호: 19, 서열식별번호: 21 및 서열식별번호: 23으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 CDR 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열식별번호: 20, 서열식별번호: 22 및 서열식별번호: 24로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 CDR 서열을 포함하는 카파 경쇄 가변 영역;

e) 서열식별번호: 25, 서열식별번호: 27 및 서열식별번호: 29로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 CDR 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열식별번호: 26, 서열식별번호: 28 및 서열식별번호: 30으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 CDR 서열을 포함하는 카파 경쇄 가변 영역;

f) 서열식별번호: 31, 서열식별번호: 33 및 서열식별번호: 35로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 CDR 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열식별번호: 32, 서열식별번호: 34 및 서열식별번호: 36으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 CDR 서열을 포함하는 카파 경쇄 가변 영역;

g) 서열식별번호: 37, 서열식별번호: 39 및 서열식별번호: 41로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 CDR 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열식별번호: 38, 서열식별번호: 40 및 서열식별번호: 42로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 CDR 서열을 포함하는 카파 경쇄 가변 영역; 또는

h) 서열식별번호: 43, 서열식별번호: 45 및 서열식별번호: 47로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 CDR 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열식별번호: 44, 서열식별번호: 46 및 서열식별번호: 48로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 CDR 서열을 포함하는 카파 경쇄 가변 영역.

[0053] 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 57, 59, 61, 63, 73, 75, 77 및 79로 이루어진 군으로부터 선택된 1, 2, 3 또는 4개의 중쇄 프레임워크 영역 (FR) 서열 및/또는 서열식별번호: 58, 60, 62, 64, 74, 76, 78 및 80으로 이루어진 군으로부터 선택된 1, 2, 3 또는 4개의 경쇄 프레임워크 영역 (FR) 서열을 추가로 포함한다.

- [0054] 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 57 및 73으로부터 선택된 중쇄 FR1 서열; 서열식별번호: 59 및 75로부터 선택된 중쇄 FR2 서열; 서열식별번호: 61 및 77로부터 선택된 중쇄 FR3 서열; 및 서열식별번호: 63 및 79로부터 선택된 중쇄 FR4 서열을 추가로 포함한다.
- [0055] 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 58 및 74로부터 선택된 경쇄 FR1 서열; 서열식별번호: 60 및 76으로부터 선택된 경쇄 FR2 서열; 서열식별번호: 62 및 78로부터 선택된 경쇄 FR3 서열; 및 서열식별번호: 64 및 80으로부터 선택된 경쇄 FR4 서열을 추가로 포함한다.
- [0056] 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 81, 서열식별번호: 85, 서열식별번호: 89, 서열식별번호: 93, 서열식별번호: 97, 서열식별번호: 101, 서열식별번호: 105, 서열식별번호: 109, 서열식별번호: 113, 서열식별번호: 117 및 적어도 80% (예를 들어 적어도 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 서열 동일성을 갖는 그의 상동 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0057] 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 83, 서열식별번호: 87, 서열식별번호: 91, 서열식별번호: 95, 서열식별번호: 99, 서열식별번호: 103, 서열식별번호: 107, 서열식별번호: 111, 서열식별번호: 115, 서열식별번호: 119 및 적어도 80% (예를 들어 적어도 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 서열 동일성을 갖는 그의 상동 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0058] 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 81, 85, 89, 93, 97, 101, 105, 109, 113 및 117로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 가변 영역 서열의 모두 또는 일부분; 및/또는 서열식별번호: 83, 87, 91, 95, 99, 103, 107, 111, 115 및 119로 이루어진 군으로부터 선택된 경쇄 가변 영역 서열의 모두 또는 일부분을 포함한다. 한 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 81, 85, 89, 93, 97, 101, 105, 109, 113 및 117로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 가변 영역의 모두 또는 일부분으로 이루어진 단일 도메인 항체이다.
- [0059] 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 하기를 포함한다:
- [0060] a) 서열식별번호: 81을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 83을 포함하는 카파 경쇄 가변 영역;
 - [0061] b) 서열식별번호: 85를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 87을 포함하는 카파 경쇄 가변 영역;
 - [0062] c) 서열식별번호: 89를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 91을 포함하는 카파 경쇄 가변 영역;
 - [0063] d) 서열식별번호: 93을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 95를 포함하는 카파 경쇄 가변 영역;
 - [0064] e) 서열식별번호: 97을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 99를 포함하는 카파 경쇄 가변 영역;
 - [0065] f) 서열식별번호: 101을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 103을 포함하는 카파 경쇄 가변 영역;
 - [0066] g) 서열식별번호: 105를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 107을 포함하는 카파 경쇄 가변 영역;
 - [0067] h) 서열식별번호: 109를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 111을 포함하는 카파 경쇄 가변 영역;
 - [0068] i) 서열식별번호: 113을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 115를 포함하는 카파 경쇄 가변 영역; 또는
 - [0069] j) 서열식별번호: 117을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 119를 포함하는 카파 경쇄 가변 영역.
- [0070] 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 1개 이상의 아미노산 잔기 치환을 포함하지만 CD3엡실론에 대한 특이적 결합 친화도를 보유한다.
- [0071] 특정 실시양태에서, 치환은 1개 이상의 CDR 서열, 또는 1개 이상의 FR 서열, 또는 하나 또는 둘 다의 가변 영역 서열, 또는 Fc 영역 내의 치환이다. 일부 실시양태에서, CDR 서열, FR 서열, 가변 영역 서열 또는 Fc 영역 내의 치환(들) 중 적어도 1개 (또는 모두)는 보존적 치환을 포함한다.
- [0072] 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 1-48로부터 선택된 1개 이상의 CDR 서열에 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 아미노산 잔기 치환을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 57-80으로부터 선택된 1개 이상의 FR 서열에 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 아미노산 잔기 치환을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 81, 85, 89, 93, 97, 101, 105, 109, 113 및 117로부터 선택된 중쇄 가변 영역 서열의 CDR 서열

및/또는 FR 서열에 총 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 치환을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 83, 87, 91, 95, 99, 103, 107, 111, 115 및 119로부터 선택된 경쇄 가변 영역 서열의 모든 FR에 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 아미노산 잔기 치환을 포함한다.

[0073] 특정 실시양태에서, 치환은 a) CD3엡실론에 대한 결합 친화도의 개선, b) 글리코실화 부위의 도입 또는 제거, c) 유리 시스테인 잔기의 도입, d) ADCC 또는 CDC의 증진 또는 감소, e) 혈청 반감기의 증가; 및 f) FcRn 결합의 증가로부터 선택된 1개 이상의 바람직한 특성을 부여한다.

[0074] 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 이뮤노글로불린 불변 영역을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 IgG의 불변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 인간 IgG1의 불변 영역을 포함한다.

[0075] 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 뮤린 항체 또는 인간화 항체이다.

[0076] 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 낙타화 단일 도메인 항체, 디아바디, scFv, scFv 이랑체, BsFv, dsFv, (dsFv)2, dsFv-dsFv', Fv 단편, Fab, Fab', F(ab')2, 이중특이적 항체, ds 디아바디, 나노바디, 도메인 항체 또는 2가 도메인 항체이다.

[0077] 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 이중특이적이다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 CD3엡실론에 대한 제1 항원 특이성 및 제2 항원 특이성을 갖는다. 특정 실시양태에서, 제2 항원성은 CD3엡실론과 상이한 제2 항원에 대한 것이며, 여기서 CD3엡실론-발현 T 세포에 근접한 제2 항원의 존재는 제2 항원이 면역계에 의해 인식되기에 바람직하다. 특정 실시양태에서, 제1 항원 특이성은 CD3엡실론에 대한 것이고, 제2 항원 특이성은 종양 연관 항원에 대한 것이다.

[0078] 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 1종 이상의 접합체에 연결된다. 특정 실시양태에서, 접합체는 화학요법체, 독소, 방사성 동위원소, 란타나이드, 발광 표지, 형광 표지 또는 효소-기질 표지일 수 있다.

[0079] 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 CD3엡실론에 특이적으로 결합할 수 있다. 특정 실시양태에서, CD3엡실론은 마우스, 래트, 원숭이 또는 인간으로부터 유래된다. 특정 실시양태에서, CD3엡실론은 재조합 CD3엡실론 또는 세포 표면 상에서 발현된 CD3엡실론이다.

[0080] 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 유동 세포측정법 검정에 의해 측정시 5×10^{-9} M 이하, 4×10^{-9} M 이하, 3×10^{-9} M 이하, 2×10^{-9} M 이하, 10^{-9} M 이하, 5×10^{-10} M 이하, 4×10^{-10} M 이하, 3×10^{-10} M 이하, 2×10^{-10} M 이하, 10^{-10} M 이하, 5×10^{-11} M 이하, 4×10^{-11} M 이하, 3×10^{-11} M 이하, 2×10^{-11} M 이하 또는 10^{-11} M 이하의 K_D 값으로 세포 표면 상에서 발현된 인간 CD3엡실론에 특이적으로 결합할 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 유동 세포측정법 검정에 의해 측정시 0.50 nM 이하 또는 1.10 nM 이하의 EC₅₀으로 세포 표면 상에서 발현된 인간 CD3엡실론에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0081] 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 ELISA에 의해 측정시 0.001 nM 이하, 0.005 nM 이하, 0.01 nM 이하, 0.02 nM 이하, 0.03 nM 이하, 0.04 nM 이하 또는 0.05 nM 이하의 EC₅₀으로 재조합 시노몰구스 원숭이 CD3엡실론에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0082] 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 ELISA에 의해 측정시 0.01 nM 이하, 0.02 nM 이하, 0.03 nM 이하, 0.04 nM 이하, 0.05 nM 이하, 0.06 nM 이하, 0.07 nM 이하 또는 0.08 nM 이하의 EC₅₀으로 재조합 인간 CD3엡실론에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0083] 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 유동 세포측정법 검정에 의해 측정시 0.5 nM 이하, 0.6 nM 이하, 0.7 nM 이하, 0.8 nM 이하, 0.9 nM 이하, 1 nM 이하, 2 nM 이하, 3 nM 이하, 4 nM 이하, 5 nM 이하, 6 nM 이하, 7 nM 이하, 8 nM 이하, 9 nM 이하 또는 10 nM 이하의 EC₅₀으로 CD3-발현 세포 표면 상에서 발현된 인간 CD3엡실론에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0084] 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 유동 세포측정법 검정에 의해 측정시 0.50 nM 이하 또는 1.10 nM 이하의 EC₅₀으로 CD4-발현 세포 표면 상에서 발현된 인간 CD3엡실론에 특이적으로 결합할 수 있는 인간

화 항체이다.

[0085] 한 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 동일한 에피토프에 대해 경쟁하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0086] 한 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 추가로 제공한다. 특정 실시양태에서, 제약 조성물은 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 치료 효과를 증진시킬 수 있고/거나 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 부작용을 감소시킬 수 있는 제2 작용제를 추가로 포함한다.

[0087] 한 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 추가로 제공한다. 특정 실시양태에서, 단리된 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118 및 120으로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0088] 한 측면에서, 본 개시내용은 상기 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 추가로 제공한다.

[0089] 한 측면에서, 본 개시내용은 상기 벡터를 포함하는 숙주 세포를 추가로 제공한다.

[0090] 한 측면에서, 본 개시내용은 상기 폴리뉴클레오티드가 발현되는 조건 하에 상기 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 발현시키는 방법을 추가로 제공한다.

[0091] 한 측면에서, 본 개시내용은 대상체에게 치료 유효량의 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 본원에 제공된 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 CD3엡실론 활성의 조정으로부터 이익을 얻을 질환 또는 병태를 치료하는 방법을 추가로 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 대상체는 인간이다. 특정 실시양태에서, 상기 질환 또는 병태는 CD3 관련 질환 또는 병태이다. 특정 실시양태에서, 상기 질환 또는 병태는 암, 자가면역 질환, 염증성 질환 또는 감염성 질환이다.

[0092] 한 측면에서, 본 개시내용은 CD3엡실론-발현 T 세포를 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 접촉시키는 것을 포함하는, 생체내에서 또는 시험관내에서 CD3엡실론-발현 T 세포를 활성화시키는 방법을 추가로 제공한다.

[0093] 한 측면에서, 본 개시내용은 CD3엡실론-발현 세포를 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 노출시키는 것을 포함하는, CD3엡실론-발현 세포에서 CD3 활성을 조정하는 방법을 추가로 제공한다.

[0094] 한 측면에서, 본 개시내용은 CD3엡실론-발현 T 세포를 본원에 제공된 이중특이적 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 접촉시키는 것을 포함하며, 여기서 이중특이적 항체 또는 항원-결합 단편은 CD3엡실론-발현 T 세포 및 제2 항원 둘 다에 특이적으로 결합하여 이들 둘 다를 매우 근접하게 가져올 수 있는 것인, CD3엡실론-발현 T 세포에 의한 제2 항원의 생체내 또는 시험관내 프로세싱을 촉진하는 방법을 추가로 제공한다.

[0095] 한 측면에서, 본 개시내용은 샘플을 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 접촉시키는 단계 및 샘플에서 CD3엡실론의 존재 또는 양을 결정하는 단계를 포함하는, 샘플에서 CD3엡실론의 존재 또는 양을 검출하는 방법을 추가로 제공한다.

[0096] 한 측면에서, 본 개시내용은 a) 대상체로부터 샘플을 수득하는 단계; b) 샘플을 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 접촉시키는 단계; c) 샘플에서 CD3엡실론의 존재 또는 양을 결정하는 단계; 및 d) CD3엡실론의 존재 또는 양을 대상체에서의 질환 또는 병태와 상호연관시키는 단계를 포함하는, 대상체에서 CD3 관련 질환 또는 병태를 진단하는 방법을 추가로 제공한다.

[0097] 한 측면에서, 본 개시내용은 대상체에서 CD3 관련 질환 또는 병태를 치료하기 위한 의약의 제조에서의 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 용도를 추가로 제공한다.

[0098] 한 측면에서, 본 개시내용은 CD3 관련 질환 또는 병태를 진단하기 위한 진단 시약의 제조에서의 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 용도를 추가로 제공한다.

[0099] 한 측면에서, 본 개시내용은 CD3엡실론을 검출하는데 유용한 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 키트를 추가로 제공한다. 특정 실시양태에서, 키트는 재조합 CD3엡실론, 세포 표면 상에서 발현된 CD3엡실론 또는 CD3엡실론-발현 세포를 검출하는데 유용한 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0100]

도 1은 ELISA 검정에 의해 측정된, 재조합 시노몰구스 원숭이 CD3엡실론 단백질에 대한 모노클로날 항체 WBP3311_2.166.48-uIgG1K, WBP3311_2.306.4 - uIgG1K 및 WBP3311_2.166.48의 결합을 보여준다.

도 2는 유동 세포측정법 검정에 의해 측정된, 인간 CD4 T 세포에 대한 모노클로날 항체 WBP3311_2.166.48-uIgG1K, WBP3311_2.306.4 - uIgG1K, WBP3311_2.166.48 및 WBP3311_2.306.4의 결합을 보여준다.

도 3은 유동 세포측정법 검정에 의해 측정된, 인간 CD3 발현 세포 (Jurkat 세포)에 대한 8종의 마우스 항체 (W3311-2.166.48, W3311-2.306.4, W3311-2.383.47, W3311-2.400.5, W3311-2.482.5, W3311-2.488.33, W3311-2.615.8 및 W3311-2.844.8)의 결합 친화도를 보여준다.

도 4A는 유동 세포측정법 검정에 의해 측정된, 인간 CD3 발현 세포 (Jurkat 세포)에 대한 인간화 항체 WBP3311_2.166.48-z1-uIgG1K의 결합 친화도를 보여준다.

도 4B는 유동 세포측정법 검정에 의해 측정된, 인간 CD3 발현 세포 (Jurkat 세포)에 대한 인간화 항체 WBP3311_2.306.4-z1-uIgG1K의 결합 친화도의 결과를 보여준다.

도 4C는 유동 세포측정법 검정에 의해 측정된, 인간 CD3 발현 세포 (Jurkat 세포)에 대한 양성 대조군 OKT3의 결합 친화도의 결과를 보여준다.

도 5는 유동 세포측정법 검정에 의해 측정된, 인간 CD3 발현 세포 (Jurkat 세포)에 대한 8종의 마우스 항체 (W3311-2.166.48, W3311-2.306.4, W3311-2.383.47, W3311-2.400.5, W3311-2.482.5, W3311-2.488.33, W3311-2.615.8 및 W3311-2.844.8)의 세포 내재화율을 보여준다.

도 6은 세포내 시토카인 TNF알파 및 IFN감마 염색에 의해 측정된, 8종의 마우스 항체 (W3311-2.166.48, W3311-2.306.4, W3311-2.383.47, W3311-2.400.5, W3311-2.482.5, W3311-2.488.33, W3311-2.615.8 및 W3311-2.844.8)에 의한 인간 T 세포 활성화의 결과를 보여준다.

도 7은 세포내 시토카인 TNF알파 및 IFN감마 염색에 의해 측정된, 2종의 인간화 항체 (WBP3311_2.166.48-z1-uIgG1K 및 WBP3311_2.306.4-z1-uIgG1K)에 의한 인간 T 세포 활성화의 결과를 보여준다.

도 8은 클론 WBP3311_2.383.47에 대한 7종의 마우스 항체 (W3311-2.166.48, W3311-2.306.4, W3311-2.400.5, W3311-2.482.5, W3311-2.488.33, W3311-2.615.8 및 W3311-2.844.8)의 에피토프 비닝의 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0101]

본 개시내용의 하기 설명은 단지 본 개시내용의 다양한 실시양태를 예시하기 위해 의도된다. 따라서, 논의된 구체적 변형이 본 개시내용의 범주를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 본 개시내용의 범주를 벗어나지 않고 다양한 등가물, 변화 및 변형이 이루어질 수 있음이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 분명할 것이고, 이러한 등가 실시양태가 본원에 포함되어야 하는 것으로 이해된다. 공개, 특히 및 특허 출원을 포함한 본원에 인용된 모든 참고문헌은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0102]

정의

[0103]

본원에 사용된 용어 "항체"는 특이적 항원에 결합하는 임의의 이谬노글로불린, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 다가 항체, 2가 항체, 1가 항체, 다중특이적 항체 또는 이중특이적 항체를 포함한다. 천연 무손상 항체는 2개의 중쇄 (H) 및 2개의 경쇄 (L)를 포함한다. 포유동물 중쇄는 알파, 델타, 엡실론, 감마 및 뮤로 분류되고, 각각의 중쇄는 가변 영역 (V_H) 및 제1, 제2 및 제3 불변 영역 (각각 C_{H1} , C_{H2} , C_{H3})으로 이루어지고; 포유동물 경쇄는 λ 또는 κ 로 분류되고, 각각의 경쇄는 가변 영역 (각각 λ 경쇄의 경우 V_L 또는 κ 경쇄의 경우 V_K) 및 불변 영역 (각각 λ 경쇄의 경우 C_L 또는 κ 경쇄의 경우 C_K)으로 이루어진다. 항체는 "Y" 형상을 가지며, Y의 줄기는 디슬피드 결합을 통해 함께 결합된 2개의 중쇄의 제2 및 제3 불변 영역으로 이루어진다. Y의 각각의 아암은 단일 경쇄의 가변 및 불변 영역에 결합된 단일 중쇄의 가변 영역 및 제1 불변 영역을 포함한다. 경쇄 및 중쇄의 가변 영역은 항원 결합을 담당한다. 두 쇄 내의 가변 영역은 일반적으로 상보성 결정 영역 (CDR)으로 불리는 3개의 고도로 가변적인 루프를 함유한다 (경쇄 CDR은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하고, 중쇄 CDR은 HCDR1, HCDR2, HCDR3을 포함함). 본원에 개시된 항체 및 항원-결합 단편에 대한 CDR 경계는 카바트(Kabat), IMGT, 코티아(Chothia) 또는 알-라지카니(Al-Lazikani)의 규정에 의해 정의되거나 확인될 수 있다 (Al-

Lazikani, B., Chothia, C., Lesk, A. M., J. Mol. Biol., 273(4), 927 (1997); Chothia, C. et al., J Mol Biol. Dec 5;186(3):651-63 (1985); Chothia, C. and Lesk, A.M., J.Mol.Biol., 196,901 (1987); Chothia, C. et al., Nature. Dec 21-28;342(6252):877-83 (1989); Kabat E.A. et al., National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). 3개의 CDR은 CDR보다 더욱 고도로 보존되고 초가변 루프를 지지하기 위한 스캐폴드를 형성하는 프레임워크 영역 (FR)으로 공지된 플랭킹 스트레치들 사이에 끼여있다. 중쇄 및 경쇄의 불변 영역은 항원-결합에 관여하지 않지만, 다양한 이펙터 기능을 나타낸다. 항체는 그의 중쇄의 불변 영역의 아미노산 서열을 기준으로 하는 부류로 배정된다. 항체의 5가지 주요 부류 또는 이소형은 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이고, 이들은 각각 알파, 델타, 엡실론, 감마 및 뮤 중쇄의 존재를 특징으로 한다. 주요 항체 부류 중 몇몇은 하위부류, 예컨대 IgG1 (감마1 중쇄), IgG2 (감마2 중쇄), IgG3 (감마3 중쇄), IgG4 (감마4 중쇄), IgA1 (알파1 중쇄) 또는 IgA2 (알파2 중쇄)로 분류된다.

- [0104] 본원에 사용된 용어 "2가"는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 항체 또는 항원-결합 단편을 지칭하고; 용어 "1가"는 1개의 단일 항원-결합 부위만을 갖는 항체 또는 항원-결합 단편을 지칭하고; 용어 "다가"는 다중 항원-결합 부위를 갖는 항체 또는 항원-결합 단편을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 2가이다.
- [0105] 본원에 사용된 "이중특이적" 항체는 2개의 상이한 모노클로날 항체로부터 유래된 단편을 갖고 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있는 인공 항체를 지칭한다. 2개의 에피토프는 동일한 항원 상에 존재할 수 있거나 또는 이들은 2개의 상이한 항원 상에 존재할 수 있다.
- [0106] 본원에 사용된 용어 "항원-결합 단편"은 1, 2 또는 3개의 CDR을 포함하는 항체의 한 부분으로부터 형성된 항체 단편, 또는 항원에 결합하지만 무순상의 천연 항체 구조를 포함하지 않는 임의의 다른 항체 단편을 지칭한다. 항원-결합 단편의 예는 비제한적으로 디아바디, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 단편, 디슬피드 안정화된 Fv 단편 (dsFv), (dsFv)₂, 이중특이적 dsFv (dsFv-dsFv'), 디슬피드 안정화된 디아바디 (ds 디아바디), 단일쇄 항체 분자 (scFv), scFv 이량체 (2가 디아바디), 이중특이적 항체, 다중특이적 항체, 낙타화 단일 도메인 항체, 나노바디, 도메인 항체, 및 2가 도메인 항체를 포함한다. 항원-결합 단편은 모 항체가 결합하는 것과 동일한 항원에 결합할 수 있다.
- [0107] 항체와 관련하여 "Fab"는 디슬피드 결합에 의해 단일 중쇄의 가변 영역 및 제1 불변 영역에 결합된 단일 경쇄 (가변 및 불변 영역 둘 다)로 이루어진 항체의 부분을 지칭한다.
- [0108] "Fab'"는 헌지 영역의 한 부분을 포함하는 Fab 단편을 지칭한다.
- [0109] "F(ab')₂"는 Fab'의 이량체를 지칭한다. 항체와 관련하여 "Fv"는 완전한 항원-결합 부위를 보유하는 항체의 가장 작은 단편을 지칭한다. Fv 단편은 단일 중쇄의 가변 영역에 결합된 단일 경쇄의 가변 영역으로 이루어진다.
- [0110] "dsFv"는 단일 경쇄의 가변 영역과 단일 중쇄의 가변 영역 사이의 연결이 디슬피드 결합인 디슬피드-안정화된 Fv 단편을 지칭한다. 일부 실시양태에서, "(dsFv)₂" 또는 "(dsFv-dsFv')"는 3개의 웹티드 쇄: 웹티드 링커 (예를 들어 긴 가요성 링커)에 의해 연결되고, 각각 디슬피드 가교를 통해 2개의 V_L 모이어티에 결합된 2개의 V_H 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, dsFv-dsFv'는 각각의 디슬피드 쌍형성된 중쇄 및 경쇄가 상이한 항원 특이성을 갖는 이중특이적이다.
- [0111] "단일쇄 Fv 항체" 또는 "scFv"는 직접적으로 또는 웹티드 링커 서열을 통해 서로 연결된 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역으로 이루어진 조작된 항체를 지칭한다 (Huston JS et al. Proc Natl Acad Sci USA, 85:5879(1988)).
- [0112] 항체와 관련하여 "Fc"는 디슬피드 결합을 통해 제2 중쇄의 제2 및 제3 불변 영역에 결합된 제1 중쇄의 제2 및 제3 불변 영역으로 이루어진 항체의 부분을 지칭한다. 항체의 Fc 부분은 다양한 이펙터 기능, 예컨대 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC) 및 보체 의존성 세포독성 (CDC)을 담당하지만, 항원 결합에서는 기능하지 않는다.
- [0113] "단일쇄 Fv-Fc 항체" 또는 "scFv-Fc"는 항체의 Fc 영역에 연결된 scFv로 이루어진 조작된 항체를 지칭한다.
- [0114] "낙타화 단일 도메인 항체", "중쇄 항체" 또는 "HCAb"는 2개의 V_H 도메인을 함유하고 경쇄가 없는 항체를 지칭한다 (Riechmann L. and Muylleermans S., J Immunol Methods. Dec 10;231(1-2):25-38 (1999); Muylleermans S., J Biotechnol. Jun;74(4):277-302 (2001); WO94/04678; WO94/25591; 미국 특허 번호 6,005,079). 중쇄

항체는 원래 낙타과 (낙타, 단봉낙타 및 라마)로부터 유래되었다. 경쇄가 결여되어 있지만, 낙타화 항체는 진정한 항원-결합 레퍼토리를 갖는다 (Hamers-Casterman C. et al., *Nature*. Jun 3;363(6428):446-8 (1993); Nguyen VK. et al. "Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation," *Immunogenetics*. Apr;54(1):39-47 (2002); Nguyen VK. et al. *Immunology*. May;109(1):93-101 (2003)). 중쇄 항체의 가변 도메인 (VHH 도메인)은 적응 면역 반응에 의해 생성되는 가장 작은 공지된 항원-결합 단위를 나타낸다 (Koch-Nolte F. et al., *FASEB J.* Nov;21(13):3490-8. Epub 2007 Jun 15 (2007)).

[0115] "나노바디"는 중쇄 항체로부터의 VHH 도메인 및 2개의 불변 도메인 CH2 및 CH3으로 이루어진 항체 단편을 지칭한다.

[0116] "디아바디" 또는 "dAb"는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 포함하며, 여기서 단편은 동일한 폴리펩티드 쇄에서 V_L 도메인에 연결된 V_H 도메인을 포함한다 (V_H-V_L 또는 V_L-V_H) (예를 들어 문헌 [Holliger P. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 15;90(14):6444-8 (1993)]; EP404097; WO93/11161 참조). 너무 짧아서 동일한 쇄 상의 두 도메인 사이에서는 쌍형성을 허용하지 않는 링커를 사용함으로써, 도메인이 또 다른 쇄의 상보적 도메인과 쌍형성되도록 하여, 2개의 항원-결합 부위를 생성한다. 항원-결합 부위는 동일한 또는 상이한 항원 (또는 에피토프)을 표적화할 수 있다. 특정 실시양태에서, "이중특이적 ds 디아바디"는 2개의 상이한 항원 (또는 에피토프)을 표적화하는 디아바디이다. 특정 실시양태에서, "scFv 이량체"는 한 모이어티의 V_H가 다른 모이어티의 V_L과 배위되어 동일한 항원 (또는 에피토프) 또는 상이한 항원 (또는 에피토프)을 표적화할 수 있는 2개의 결합 부위를 형성하도록 또 다른 V_H-V_L 모이어티와 이량체화된 V_H-V_L (펩티드 링커에 의해 연결됨)을 포함하는 2가 디아바디 또는 2가 ScFv (BsFv)이다. 다른 실시양태에서, "scFv 이량체"는 V_{H1}과 V_{L1}이 배위되고 V_{H2}와 V_{L2}가 배위되어 각각의 배위된 쌍이 상이한 항원 특이성을 갖도록 V_{L1}-V_{H2} (또한 폴리펩티드 링커에 의해 연결됨)와 회합된 V_{H1}-V_{L2} (펩티드 링커에 의해 연결됨)를 포함하는 이중특이적 디아바디이다.

[0117] "도메인 항체"는 중쇄의 가변 영역만을 또는 경쇄의 가변 영역만을 함유하는 항체 단편을 지칭한다. 특정 경우에, 2개 이상의 V_H 도메인이 폴리펩티드 링커와 공유 연결되어 2가 또는 다가 도메인 항체를 생성한다. 2가 도메인 항체의 2개의 V_H 도메인은 동일한 또는 상이한 항원을 표적화할 수 있다.

[0118] 본원에 사용된 용어 "키메라"는 중쇄 및/또는 경쇄의 한 부분이 한 종으로부터 유래되고 중쇄 및/또는 경쇄의 나머지가 상이한 종으로부터 유래된 것인 항체 또는 항원-결합 단편을 의미한다. 예시적인 예에서, 키메라 항체는 인간으로부터 유래된 불변 영역 및 비-인간 동물, 예컨대 마우스로부터 유래된 가변 영역을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-인간 동물은 포유동물, 예를 들어 마우스, 래트, 토끼, 염소, 양, 기니 피그 또는 햄스터이다.

[0119] 본원에 사용된 용어 "인간화"는 항체 또는 항원-결합 단편이 비-인간 동물로부터 유래된 CDR, 인간으로부터 유래된 FR 영역, 및 적용가능한 경우 인간으로부터 유래된 불변 영역을 포함하는 것을 의미한다.

[0120] 본원에 사용된 "CD3"은 포유동물, 예컨대 영장류 (예를 들어 인간, 원숭이) 및 설치류 (예를 들어 마우스 및 래트)와 같은 임의의 척추동물 공급원으로부터 유래된 분화 클러스터 3 단백질을 지칭한다. 포유동물에서, CD3 분자는 CD3감마 쇄, CD3델타 쇄, 2개의 CD3엡실론 쇄 및 CD3제타 쇄의 동종이량체를 포함한 6개 쇄의 다중-단백질 복합체이며, 여기서 CD3제타 쇄는 CD3분자의 세포내 꼬리이고, CD3감마, CD3델타 및 CD3엡실론 쇄는 모두 T 세포의 표면 상에서 발현된 세포외 도메인 (ECD)을 함유한다. 인간 CD3의 예시적인 서열은 인간 CD3엡실론 단백질 (NCBI 참조 서열 번호 NP_000724), 인간 CD3델타 단백질 (NCBI 참조 서열 번호 NP_000723), 및 인간 CD3감마 단백질 (NCBI 참조 서열 번호 NP_000064)을 포함한다. 비-인간 CD3의 예시적인 서열은 마카카 파시콜라리스 (*Macaca fascicularis*) (원숭이) CD3엡실론 단백질 (NCBI 참조 서열 번호 NP_001270544), 마카카 파시콜라리스 (원숭이) CD3델타 단백질 (NCBI 참조 서열 번호 NP_001274617), 마카카 파시콜라리스 (원숭이) CD3감마 단백질 (NCBI 참조 서열 번호 NP_001270839); 마우스 CD3엡실론 단백질 (NCBI 참조 서열 번호 NP_031674), 마우스 CD3델타 단백질 (NCBI 참조 서열 번호 NP_038515), 마우스 CD3감마 단백질 (NCBI 참조 서열 번호 AAA37400); 라투스 노르베기쿠스 (*Rattus norvegicus*) (래트) CD3엡실론 단백질 (NCBI 참조 서열 번호 NP_001101610), 라투스 노르베기쿠스 (래트) CD3델타 단백질 (NCBI 참조 서열 번호 NP_037301), 라투스 노르베기쿠스 (래트) CD3감마 단백질 (NCBI 참조 서열 번호 NP_001071114)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 사용된 CD3은 또한 재조합 CD3, 예를 들어 재조합 CD3엡실론 단백질, 재조합 CD3델타 단백질 및 재조합 CD3감마 단백질일 수 있으며, 이는 재조합 CD3 복합체로서 임의로 발현될 수 있다. 재조합 CD3 복합체는 세포 표면 상에서 발현될 수 있거나

또는 대안적으로 세포 표면 상에서 회합되지 않는 임의의 형태로서 발현될 수 있다.

[0121] 본원에 사용된 용어 "CD3엡실론"은 CD3엡실론의 임의의 형태, 예를 들어 1) 천연의 프로세싱되지 않은 CD3엡실론 분자, "전장" CD3엡실론 쇄 또는 CD3엡실론의 자연 발생 변이체, 예를 들어 스플라이스 변이체 또는 대립유전자 변이체; 2) 세포 내의 프로세싱으로부터 생성된 CD3엡실론의 임의의 형태; 또는 3) 전장, 단편 (예를 들어 말단질단된 형태, 세포외/막횡단 도메인) 또는 재조합 방법을 통해 생성된 CD3엡실론 서브유닛의 변형된 형태 (예를 들어 돌연변이된 형태, 글리코실화/PEG화, His-태그/면역형광 융합 형태)를 포함하는 것으로 의도된다.

[0122] 용어 "항-CD3엡실론 항체"는 CD3엡실론 (예를 들어 인간 또는 원숭이 CD3엡실론)에 특이적 결합이 가능한 항체를 지칭한다.

[0123] 본원에 사용된 용어 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합한다"는 두 분자 사이, 예컨대 예를 들어 항체와 항원 사이의 비-무작위 결합 반응을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 또는 항원-결합 단편은 $\leq 10^{-6}$ M (예를 들어 $\leq 5 \times 10^{-7}$ M, $\leq 2 \times 10^{-7}$ M, $\leq 10^{-7}$ M, $\leq 5 \times 10^{-8}$ M, $\leq 2 \times 10^{-8}$ M, $\leq 10^{-8}$ M, $\leq 5 \times 10^{-9}$ M, $\leq 4 \times 10^{-9}$ M, $\leq 3 \times 10^{-9}$ M, $\leq 2 \times 10^{-9}$ M, 또는 $\leq 10^{-9}$ M)의 결합 친화도 (K_D)로 인간 및/또는 CD3엡실론에 특이적으로 결합한다. 본원에 사용된 K_D 는 결합률에 대한 해리율의 비 (k_{off}/k_{on})를 지칭하며, 이는 표면 플라즈몬 공명 방법, 마이크로스케일 열영동 방법, HPLC-MS 방법 및 유동 세포측정법 (예컨대 FACS) 방법을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 관련 기술분야에 공지된 임의의 통상적인 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 특정 실시양태에서, K_D 값은 유동 세포측정법을 사용하여 적절하게 결정될 수 있다.

[0124] 본원에 사용된 용어 "결합을 차단하는" 또는 "동일한 에피토프에 대해 경쟁하는" 능력은 항체 또는 항원-결합 단편이 두 분자 (예를 들어 인간 CD3엡실론 및 항-CD3엡실론 항체) 사이의 결합 상호작용을 임의의 검출가능한 정도로 억제하는 능력을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 두 분자 사이의 결합을 차단하는 항체 또는 항원-결합 단편은 두 분자 사이의 결합 상호작용을 적어도 85% 또는 적어도 90% 억제한다. 특정 실시양태에서, 이러한 억제는 85% 초과 또는 90% 초과일 수 있다.

[0125] 본원에 사용된 용어 "에피토프"는 항체가 결합하는 항원 상의 특이적 원자단 또는 아미노산을 지칭한다. 두 항체가 항원에 대해 경쟁적인 결합을 나타내는 경우 이들은 항원 내의 동일한 또는 밀접하게 관련된 에피토프에 결합할 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 항원-결합 단편이 항원 (예를 들어 재조합 인간/원숭이 CD3엡실론 또는 본 개시내용에서의 세포의 표면 상에서 발현된 CD3엡실론)에 대한 참조 항체의 결합을 적어도 85% 또는 적어도 90% 차단하는 경우에, 항체 또는 항원-결합 단편은 참조 항체와 동일한/밀접하게 관련된 에피토프에 결합하는 것으로 간주될 수 있다.

[0126] 관련 기술분야의 통상의 기술자는, 인간 모노클로날 항체가 본 개시내용의 항체 (예를 들어 마우스 모노클로날 항체 WBP3311_2.166.48, WBP3311_2.306.4, WBP3311_2.383.47, WBP3311_2.400.5, WBP3311_2.482.5, WBP3311_2.488.33, WBP3311_2.615.8, WBP3311_2.844.8, 및 인간화 항체 WBP3311_2.166.48-z1 및 WBP3311_2.306.4-z1)와 동일한 에피토프에 결합하는지를, 전자가 후자의 CD3엡실론 항원 폴리펩티드에 대한 결합을 방지하는지 여부를 확인함으로써 과도한 실험 없이 결정할 수 있음을 인식할 것이다. 본 개시내용의 항체의 CD3엡실론 항원 폴리펩티드에 대한 결합의 감소에 의해 나타난 바와 같이, 시험 항체가 본 개시내용의 항체와 경쟁하는 경우에, 두 항체는 동일한 또는 밀접하게 관련된 에피토프에 결합한다. 또는 시험 항체의 CD3엡실론 항원 폴리펩티드에 대한 결합이 본 개시내용의 항체에 의해 억제된 경우에, 두 항체는 동일한 또는 밀접하게 관련된 에피토프에 결합한다.

[0127] 본원에 제공된 바와 같은 항체 명칭에 사용된 다양한 기호는 상이한 표현을 갖는다: "mIgG2"는 IgG2 이소형의 마우스 불변 영역을 갖는 항체를 지칭하고; "uIgG1"은 IgG1 이소형의 인간 불변 영역을 갖는 항체를 지칭하고; "K" 또는 "L"은 카파 또는 람다 경쇄를 사용하는 항체를 지칭한다.

[0128] 아미노산 서열과 관련하여 "보존적 치환"은 아미노산 잔기를 유사한 생리화학적 성질을 갖는 측쇄를 갖는 상이한 아미노산 잔기로 대체하는 것을 지칭한다. 예를 들어, 보존적 치환은 소수성 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 (예를 들어 Met, Ala, Val, Leu 및 Ile) 중에서, 중성 친수성 측쇄를 갖는 잔기 (예를 들어 Cys, Ser, Thr, Asn 및 Gln) 중에서, 산성 측쇄를 갖는 잔기 (예를 들어 Asp, Glu) 중에서, 염기성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어 His, Lys 및 Arg) 중에서, 또는 방향족 측쇄를 갖는 잔기 (예를 들어 Trp, Tyr 및 Phe) 중에서 이루어질 수 있다. 관련 기술분야에 공지된 바와 같이, 보존적 치환은 보통 단백질 입체형태적 구조에 유의한 변화를 야

기하지 않고, 따라서 단백질의 생물학적 활성을 보유할 수 있다.

[0129] 본원에 사용된 용어 "상동체" 및 "상동"은 상호교환가능하고, 최적으로 정렬될 때 또 다른 서열에 대해 적어도 80% (예를 들어 적어도 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%)의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열 (또는 그의 상보적 가닥) 또는 아미노산 서열을 지칭한다.

[0130] 아미노산 서열 (또는 핵산 서열)과 관련하여 "퍼센트 (%) 서열 동일성"은, 동일한 아미노산 (또는 핵산)의 최대 개수를 달성하도록 서열을 정렬하고, 필요에 따라 캡을 도입한 후에, 참조 서열에서의 아미노산 (또는 핵산) 잔기와 동일한 후보 서열에서의 아미노산 (또는 핵산) 잔기의 백분율로서 정의된다. 아미노산 잔기의 보존적 치환은 동일한 잔기로서 고려될 수 있거나 고려되지 않을 수 있다. 퍼센트 아미노산 (또는 핵산) 서열 동일성을 결정하려는 목적을 위한 정렬은, 예를 들어 공중 이용가능한 도구, 예컨대 BLASTN, BLASTp (미국 국립 생물 정보 센터 (NCBI)의 웹사이트 상에서 이용가능함, 또한 문헌 [Altschul S.F. et al., J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990); Stephen F. et al., Nucleic Acids Res., 25:3389-3402 (1997)] 참조), ClustalW2 (유럽 생물정보학 연구소의 웹사이트 상에서 이용가능함, 또한 문헌 [Higgins D.G. et al., Methods in Enzymology, 266:383-402 (1996); Larkin M.A. et al., Bioinformatics (Oxford, England), 23(21): 2947-8 (2007)] 참조), 및 ALIGN 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 달성될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 상기 도구에 의해 제공되는 디폴트 파라미터를 사용할 수 있거나, 또는 예를 들어 적합한 알고리즘을 선택하는 것과 같이 정렬에 적절한 파라미터를 맞춤화할 수 있다.

[0131] 본원에 사용된 "이펙터 기능"은 항체의 Fc 영역이 그의 이펙터, 예컨대 C1 복합체 및 Fc 수용체에 결합하는데 기여할 수 있는 생물학적 활성을 지칭한다. 예시적인 이펙터 기능은 항체와 C1 복합체 상의 C1q 사이의 상호작용에 의해 유도되는 보체 의존성 세포독성 (CDC); 항체의 Fc 영역이 이펙터 세포 상의 Fc 수용체에 결합함으로써 유도되는 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC); 및 식세포작용을 포함한다.

[0132] 본원에 사용된 병태를 "치료하는" 또는 "치료"는 병태를 예방 또는 완화시키는 것, 병태의 발병 또는 발달 속도를 늦추는 것, 병태의 발달 위험을 감소시키는 것, 병태와 연관된 증상의 발달을 예방 또는 자연시키는 것, 병태와 연관된 증상을 감소 또는 종료시키는 것, 병태의 완전한 또는 부분적인 퇴행을 생성시키는 것, 병태를 치유하는 것, 또는 그의 일부 조합을 포함한다.

[0133] "단리된" 물질은 인간의 손에 의해 천연 상태로부터 변경된 것이다. "단리된" 조성물 또는 물질이 자연에서 발생하는 경우, 이는 그의 원래 환경으로부터 변화 또는 제거되었거나 또는 이들 둘 다이다. 예를 들어, 살아있는 동물에 자연적으로 존재하는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 "단리된" 것이 아니지만, 동일한 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드가 실질적으로 순수한 상태로 존재하도록 그의 천연 상태의 공존 물질로부터 충분히 분리된 경우 이는 "단리된" 것이다. "단리된 핵산 서열"은 단리된 핵산 분자의 서열을 지칭한다. 특정 실시양태에서, "단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편"은 전기영동 방법 (예컨대 SDS-PAGE, 등전 포커싱, 모세관 전기영동), 또는 크로마토그래피 방법 (예컨대 이온 교환 크로마토그래피 또는 역상 HPLC)에 의해 결정시 적어도 60%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 순도를 갖는 항체 또는 항원-결합 단편을 지칭한다.

[0134] 본원에 사용된 용어 "벡터"는 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 그 단백질을 발현시키도록 작동가능하게 삽입될 수 있는 비히클을 지칭한다. 벡터는 그것이 숙주 세포 내에 운반하는 유전 요소를 발현시키도록 숙주 세포를 형질전환, 형질도입 또는 형질감염시키기 위해 사용될 수 있다. 벡터의 예는 플라스미드, 파지미드, 코스미드, 인공 염색체, 예컨대 효모 인공 염색체 (YAC), 박테리아 인공 염색체 (BAC) 또는 P1-유래된 인공 염색체 (PAC), 박테리오파지, 예컨대 람다 파지 또는 M13 파지, 및 동물 바이러스를 포함한다. 벡터로서 사용되는 동물 바이러스의 카테고리는 레트로바이러스 (렌티바이러스 포함), 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 헤르페스바이러스 (예를 들어 단순 포진 바이러스), 폭스바이러스, 바콜로바이러스, 유두종바이러스, 및 파포바이러스 (예를 들어 SV40)를 포함한다. 벡터는 발현을 제어하는 다양한 요소, 예컨대 프로모터 서열, 전사 개시 서열, 인핸서 서열, 선택 요소 및 리포터 유전자를 함유할 수 있다. 추가로, 벡터는 복제 기점을 함유할 수 있다. 벡터는 또한 그의 세포 내로의 진입을 보조하는 물질, 예컨대 이에 제한되는 것은 아니지만, 바이러스 입자, 리포솜 또는 단백질 코팅을 포함할 수 있다. 벡터는 발현 벡터 또는 클로닝 벡터일 수 있다. 본 개시내용은 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩하는 본원에 제공된 핵산 서열, 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 1종의 프로모터 (예를 들어 SV40, CMV, EF-1 α), 및 적어도 1종의 선택 마커를 함유하는 벡터 (예를 들어 발현 벡터)를 제공한다. 벡터의 예는 레트로바이러스 (렌티바이러스 포함), 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 헤르페스바이러스 (예를 들어 단순 포진 바이러스), 폭스바이러스, 바콜로바이러스, 유두종바이러스, 파

포바바이러스 (예를 들어 SV40), 람다 파지 및 M13 파지, 플라스미드 pcDNA3.3, pMD18-T, pOptiVec, pCMV, pEGFP, pIRES, pQD-Hyg-GS, pALTER, pBAD, pcDNA, pCal, pL, pET, pGEMEX, pGEX, pCI, pEGFT, pSV2, pFUSE, pVITRO, pVIVO, pMAL, pMONO, pSELECT, pUNO, pDUO, Psg5L, pBABE, pWPXL, pBI, p15TV-L, pPro18, pTD, pRS10, pLexA, pACT2.2, pCMV-SCRIPT.RTM., pCDM8, pCDNA1.1/amp, pcDNA3.1, pRc/RSV, PCR 2.1, pEF-1, pFB, pSG5, pXT1, pCDEF3, pSVSPORT, pEF-Bos 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0135] 본원에 사용된 어구 "숙주 세포"는 외인성 폴리뉴클레오티드 및/또는 벡터가 도입된 세포를 지칭한다.

[0136] 본원에 사용된 "CD3 관련 질환 또는 병태"는 CD3의 증가 또는 감소된 발현 또는 활성에 의해 야기되거나, 악화되거나, 또는 달리 연관된 임의의 질환 또는 병태를 지칭한다. 일부 실시양태에서, CD3 관련 병태는 면역-관련 장애, 예컨대, 예를 들어 암, 자가면역 질환, 염증성 질환 또는 감염성 질환이다.

[0137] 본원에 사용된 "암"은 악성 세포 성장 또는 신생물, 비정상적 종식, 침윤 또는 전이를 특징으로 하는 임의의 의학적 병태를 지칭하고, 고형 종양 및 백혈병과 같은 비-고형 암 (혈액 악성종양) 둘 다를 포함한다. 본원에 사용된 "고형 종양"은 신생물성 및/또는 악성 세포의 고형 종괴를 지칭한다.

[0138] 용어 "제약상 허용되는"은 지정된 담체, 비히클, 희석제, 부형제(들) 및/또는 염이 일반적으로 제제를 구성하는 다른 성분들과 화학적으로 및/또는 물리적으로 상용성이고, 그의 수용자와 생리학적으로 상용성인 것을 나타낸다.

[0139] 항-CD3엡실론 항체

[0140] 본 개시내용은 항-CD3엡실론 항체 WBP3311_2.166.48, WBP3311_2.306.4, WBP3311_2.383.47, WBP3311_2.400.5, WBP3311_2.482.5, WBP3311_2.488.33, WBP3311_2.615.8 또는 WBP3311_2.844.8의 1개 이상 (예를 들어 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개)의 CDR 서열을 포함하는 항-CD3엡실론 항체 및 그의 항원-결합 단편을 제공한다. 본 개시내용 전반에 걸쳐, 항체 명칭과 관련하여 용어 "WBP3311"은 "W3311"과 상호교환가능하게 사용된다. 예를 들어, 항체 WBP3311_2.166.48은 또한 W3311_2.166.48로 지칭되고, 이러한 명칭은 동일한 항체를 지칭한다.

[0141] 본원에 사용된 "WBP3311_2.166.48"은 서열식별번호: 81의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 83의 카파 경쇄 가변 영역을 갖는 마우스 모노클로날 항체를 지칭한다.

[0142] 본원에 사용된 "WBP3311_2.306.4"는 서열식별번호: 85의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 87의 카파 경쇄 가변 영역을 갖는 마우스 모노클로날 항체를 지칭한다.

[0143] 본원에 사용된 "WBP3311_2.383.47"은 서열식별번호: 89의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 91의 카파 경쇄 가변 영역을 갖는 마우스 모노클로날 항체를 지칭한다.

[0144] 본원에 사용된 "WBP3311_2.400.5"는 서열식별번호: 93의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 95의 카파 경쇄 가변 영역을 갖는 마우스 모노클로날 항체를 지칭한다.

[0145] 본원에 사용된 "WBP3311_2.482.5"는 서열식별번호: 97의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 99의 카파 경쇄 가변 영역을 갖는 마우스 모노클로날 항체를 지칭한다.

[0146] 본원에 사용된 "WBP3311_2.488.33"은 서열식별번호: 101의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 103의 카파 경쇄 가변 영역을 갖는 마우스 모노클로날 항체를 지칭한다.

[0147] 본원에 사용된 "WBP3311_2.615.8"은 서열식별번호: 105의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 107의 카파 경쇄 가변 영역을 갖는 마우스 모노클로날 항체를 지칭한다.

[0148] 본원에 사용된 "WBP3311_2.844.8"은 서열식별번호: 109의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 111의 카파 경쇄 가변 영역을 갖는 마우스 모노클로날 항체를 지칭한다.

[0149] 표 1은 이들 8종의 항-CD3엡실론 항체의 CDR 서열을 제시한다. 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열이 또한 하기에 제공된다.

[0150]

표 1.

항체 ID:		CDR1	CDR2	CDR3
WBP3311_2.166.48	VH	SEQ ID NO: 1 GYSFTYYIHKFG	SEQ ID NO: 3 WIFPGNDNIKYSE KFKG	SEQ ID NO: 5 DSVSIYYFDY
		SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 6
WBP3311_2.166.48	VK	KSSQSLNSRTRKN YLA	WASTRKS	TQSFLRT
		SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 11
WBP3311_2.306.4	VH	GFAFTDYYIHKFG	WISPGNVNTKYN ENFKG	DGYSLYYFDY
		SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 12
WBP3311_2.306.4	VK	KSSQSLNSRTRKN YLA	WASTRQS	TQSHTLRT
		SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 17
WBP3311_2.383.47	VH	GFTFTNYYIHKFG	WISPENGNTKYNE NFQD	DGYSLYYFDY
		SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 18
WBP3311_2.383.47	VK	KSSQSLNSRTRKN YLA	WASIRVS	TQSHTLRT
		SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 23
WBP3311_2.400.5	VH	GYSFTNYYLH	WIFPESDNTKYNE KLKG	DSVGNYFFDF
		SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 24
WBP3311_2.400.5	VK	KSSQSLVNNRTRKN YLA	WASTRES	AQSFLRT
		SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 29
WBP3311_2.482.5	VH	GYTFTTYIHKFG	WIFPGSDNIKYNE NFKD	DSVSRYYFDY
		SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 30
WBP3311_2.482.5	VK	KSSQSLVNDRTRKN YLA	WASTRES	AQSFLRT
		SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 35
WBP331_2.488.33	VH	GFSFTNYYLH	WIFPGTVNTKYNE KFKG	DSVGIVYYFDF
		SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 36
WBP331_2.488.33	VK	KSSQSLNNRTRKN YLA	WASTRES	TQSFLRT
		SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 41
WBP3311_2.615.8	VH	GYSFTDFYTH	WIFPGSDNIKYNE KFKG	DSVSVYYFDY
		SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 40	SEQ ID NO: 42
WBP3311_2.615.8	VK	KSSQSLLNIRTRKNY LA	WASTRDS	TQSFLRT
		SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 47
WBP3311_2.844.8	VH	GFAFTDYYIHKFG	WISPGNVNTKYN ENFKG	DGYSLYYFDY
		SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 48
WBP3311_2.844.8	VK	KSSQSLNSRTRKN YLA	WASTRES	TQSHTLRT

[0151]

WBP3311_2.166.48, WBP3311_2.306.4, WBP3311_2.383.47, WBP3311_2.400.5, WBP3311_2.482.5, WBP331_2.488.33, WBP3311_2.615.8 및 WBP3311_2.844.8, 및 인간화 WBP3311_2.166.48 및 WBP3311_2.306.4 항체의 중쇄 또는 카파 경쇄 가변 영역 서열이 하기에 제공한다.

WBP3311_2.166.48-VH

아미노산 서열 (서열식별번호: 81):

QVQLQQSGPELVKPGASVKIACKASGYSF~~TYYIHWV~~KQRPGQGLEWIGWIFPGND
NIKYSEKFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSA~~VYFC~~AIDSVIYYFDYWGQGTT
 LTVSS

핵산 서열 (서열식별번호: 82):

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAACACCTGGGGCTTCAGTG
 AAGATTGCC~~TGCA~~AGGCTTCTGGCTACAGCTTACAACACTATATACTGGG
 TGAAGCAGAGGC~~CTGG~~ACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTCTGGAA
 ATGATAATATTAAGTACAGTGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACGGCAG
 ACAC~~TTCC~~AGTACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTC
 TGCTGTCTATTCTGTGCTATAGACTCCGTTAGTATCTACTACTTTGACTATTGGG
 GCCAAGGCACCAC~~T~~CACAGTCTCCTCA

WBP3311_2.166.48-VK

아미노산 서열 (서열식별번호: 83):

DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNSRTRKNYLA~~WYQQKPGQSPKLLIY~~W
ASTRKSGVPDRFTGSGSGTDFTLTINSVQAEDLAVYYCTQSFILRTFGGGTKLEIK

핵산 서열 (서열식별번호: 84):

GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAGCAGGAGAGAAGG
 TCACTATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAACAGTAGAACCGAAAGA
 ACTACTTGGCTTGGTAC~~ACC~~AGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATCTA
 CTGGGCATCCACTAGGAAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCT
 GGGACAGATTTC~~ACT~~CTCACCATCAACAGTGTGCAGGCTGAAGAC~~TGG~~CAGTT
 ATTACTGCACGCAATCTTATTCTCGGACGTT~~CGG~~AGG~~AC~~CCAAGCTGGA
 AATCAAA

WBP3311_2.306.4-VH

아미노산 서열 (서열식별번호: 85):

QVQLQQSGPELVKPGASVRISCKASGF~~AFTDYYIHWV~~KQRPGQGLEWIGWISPGNVN
TKYNENFKGRATLTADLSSSTAYMQLSSLTSEDSA~~VYFC~~ARDGYSL~~YYFDYWGQGT~~
 TLT~~VSS~~

핵산 서열 (서열식별번호: 86):

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAATTGGTGAAGCCTGGGGCTTCGTGA
 GGATATCCTGCAAGGCTTCTGGCTCGC~~CTTC~~CACAGACTACTATATACTGGGT
 GAAGCAGAGGC~~CTGG~~ACAGGGCTTGAGTGGATTGGATGGATTCTCCTGGAAA
 TGTAA~~T~~ACTAA~~T~~ACA~~T~~GAAA~~ACT~~TC~~A~~AGGGCAGGCCACACTGACTGCAGA

CCTATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCT
GCGGTCTATTCTGTGCAAGAGATGGATATTCCCTGTATTACTTGACTACTGGG
GCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

WBP3311_2.306.4-VK

아미노산 서열 (서열식별번호: 87):

DIVMSQSPSSLTVSAGEKVTM**SCKSSQSLLNSRTRKNYLA**WYQQKPGQSPKLLIYWA
STRQSGVPDRFTGSGSGTAFTLTISGVQAEDLAVYFCTOSHTLRTFGGGTKLEIK

핵산 서열 (서열식별번호: 88):

GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTGACTGTGTCAGCAGGAGAGAAGG
TCACTATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGCTAACAGTAGAACCGAAAGA
ACTACTGGCTTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCTAAACTACTAATCTA
CTGGGCATCCACTAGGCAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCT
GGGACAGCTTCACTCTCACCATCAGCGGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTT
ATTCTGCACGCAATCTCATACTCTCGGACGTTGGAGGCACCAAGCTGGA
AATCAAA

WBP3311_2.383.47-VH

아미노산 서열 (서열식별번호: 89):

QVQLQQSGPELVKPGASVRISCKTSGFTFTNYYIHWWVIQRPGQGLEWIGWISPENGNT
KYNENFQDKATLTADISSSTAYMHLSLTSEDSAVFCARDGYSLYYFDYWGQGTT
LTVSS

핵산 서열 (서열식별번호: 90):

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAATTGGTGAAAGCCTGGGGCTTCAGTG
AGGATATCCTGCAAGAGACTTCTGGCTTCACCTTCACAAACTACTATATACTGGG
TGATACAGAGGCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGTTGGATTCTCCTGAAAA
TGGTAATACTAAATACAATGAAAACCTCCAGGACAAGGCCACACTGACTGCAGA
CATATCGTCCAGCACAGCCTACATGCACCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCT
GCGGTCTATTCTGTGCAAGAGATGGGTATTCCCTTACTACTTTGACTACTGGGG
CCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

WBP3311_2.383.47-VK

아미노산 서열 (서열식별번호: 91):

DIVMSQSPSSLTVSAGEKVTM**SCKSSQSLLNSRTRKNYLA**WYQQKPGQSPKLLIYWA
SIRVSGVPDRFTGSGSTTFTLTISGVQAEDLAVYYCTQSHTLRTFGGGTKLEIK

핵산 서열 (서열식별번호: 92):

GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTGACTGTGTCAGCAGGAGAGAAGG
 TCACTATGAGCTGCAAATCCAGTCAGACTGCTCAACAGTAGAACCGAAAGA
 ACTACTTGGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAGCTACTGATCTA
 CTGGGCATCCATTAGGGTATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCT
 GGGACAACTTCACTCTCACCATCAGCGGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTT
 ATTATTGCACGCAATCTCATACTCTCGGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGA
 AATCAA

WBP3311_2.400.5-VH

아미노산 서열 (서열식별번호: 93):

QVQLQQSGPELVNPGASVKISCKASGYSFTNYYLHWVKQRPGQGLEWIGWIFPESD
NTKYNEKLKGKATLTADTSSDTAYMHLSSLTFEDSAVYFCARDSVGNYFFDFWGQG
 TTLTVSS

핵산 서열 (서열식별번호: 94):

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAATCCTGGGGCTTCAGTGA
 AGATATCCTGCAAGGCTCTGGCTACAGTTACAAACTACTATTACACTGGGT
 GAAACAGAGGCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTCCTGAAAG
 TGATAATACCAAGTACAATGAGAAATTGAAGGGCAAGGCCACACTGACGGCAGA
 CACATCCTCCGATACAGCCTACATGCACCTCAGCAGCCTGACATTGAGGACTCT
 GCAGTCTATTCTGTGCAAGAGACTCCGTTGGAAACTACTTCTTGACTTCTGGG
 GCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

WBP3311_2.400.5-VK

아미노산 서열 (서열식별번호: 95):

DIVMSQSPSSLAVSAGEKVMRCKSSQSLVNRRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYW
ASTRESGPDRFTGSGSTDFLTISSVQAEDLAVYYCAQSFILRTFGGGTKLEIK

핵산 서열 (서열식별번호: 96):

GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAGCAGGAGAGAAGG
 TCACTATGAGGTGCAAATCCAGTCAGACTGCTGGTCAACAATAGAACCGAAAGA
 ACTACTTGGCATGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCTAAACTATTGATCTA
 CTGGGCATCCACTAGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCT
 GGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTT
 ATTACTGCGCGCAATCTTATTCTCGGACGTTGGAGGCACCAACTGGA
 AATCAA

WBP3311_2.482.5-VH

아미노산 서열 (서열식별번호: 97):

[0155]

QVQLQQSGPELVKPGSSVKISCKPSGYTFTYYIHWVKQRPGQGLEWIGWIFPGSDNI
KYNENFKDKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARDSVSRYYFDYWQGQGTI
 LTVSS

핵산 서열 (서열식별번호: 98):

CAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAACCTGGTCTTCAGTGA
 AGATATCCTGCAAACCTTCTGGCTACACCTCACAAACTTACTATATACATTGGGT
 GAAGCAGAGGCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTCTGGAAAG
 TGATAATATTAAATACAATGAGAATTCAAGGACAAGGCCACACTGACGGCAGA
 CACATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAAGACTCT
 GCAGTCTATTCTGTGCAAGAGACTCCGTCACTAGGTACTACTTGACTACTGGG
 GCCAAGGCACCATTCTCACAGTTCTCA

WBP331_2.482.5-VK

아미노산 서열 (서열식별번호: 99):

DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQLVNDRTRKNYLAWYQQKPGLSPKLLIYW
ASTRESGPDRFTGSGSGTDFTLISSVQAEDLAVYYCAQSFILRTFGGGTKLEIK

핵산 서열 (서열식별번호: 100):

GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAGCAGGAGAGAAGG
 TCACTATGAGCTGCAAATCCAGTCAGACTGGTCAATGATAGAACCGAAAAAA
 ACTACTGGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCTGTCCTAAACTGCTGATCTA
 CTGGGCTTCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCT
 GGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCTGTTT
 ATTACTGCGCGCAATCTTTATTCTGGACGTTGGAGGCACCAAGCTGGAA
 AATCAAA

WBP331_2.488.33-VH

아미노산 서열 (서열식별번호: 101):

QVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKASGFSFTNYYIHWVKQRPGQGPEWIGWIFPGTVN
TKYNEKFKGKATLTADTSSNTAFMQLSSLTADSAVYFCARDSVGIYYFDFWGLGTT
 LTVSS

핵산 서열 (서열식별번호: 102):

CAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAACCTGGTGAAACCTGGACTTCAGTG
 AAGATATCCTGCAAGGCTCTGGCTCAGCTCACAAACTACTATATACACTGGG
 TGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGACCTGAGTGGATTGGATGGATTTCTGGAA
 CTGTTAATACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAGGGTAAGGCCACACTGACGGCAG
 ACACATCCTCCAATACAGCCTCATGCAGCTCAGCAGCCTGACTCTGCGGACTC

TGCAGTCTATTCTGTGCAAGAGACTCCGTTGGTATCTACTACTTGACTTCTGG
GCCTAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

WBP331_2.488.33-VK

아미노산 서열 (서열식별번호: 103):

DIVMSQSPSSLAVSAGEKTVSCKSSQSLLNNRTRKNYLA~~WYQQKPGQSPKLLIYW~~
ASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCTQSFI~~LRTFGGGTKLEIK~~

핵산 서열 (서열식별번호: 104):

GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAGCAGGAGAGAAGG
TCACTGTGAGTTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAACAATAGAACCGAAAAAA
ACTACTGGCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTACTAATCTA
CTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCT
GGTACAGATTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTT
ATTACTGCACGCAATCTTATTCTCGGACGTTGGAGGCACCAAGCTGGA
GATCAAA

WBP3311_2.615.8-VH

아미노산 서열 (서열식별번호: 105):

QVQLQQSGPELVKPGTSMKISCKASGYSFTDFYTHWVRQRPGQGLEWIGWIFPGSDN
IKYNEKFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARDSVSYYFDYWGQGT
TLTVSS

핵산 서열 (서열식별번호: 106):

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGAAAACCTGGGACTTCAATG
AAAATATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGTTCACAGACTTCTATAACACACTGGG
TGAGGCAGAGGCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTTCTGGAA
GTGATAATATTAATACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACGGCAG
ACACATCCTCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTC
TGCAGTCTATTCTGTGCAAGAGACTCCGTTAGTGTCTACTACTTGACTATTGGG
GCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

WBP3311_2.615.8-VK

아미노산 서열 (서열식별번호: 107):

DIVMSQSPSSLAVTAGEKVTMSCKSSQSLLNIRTRKNYLA~~WYQQKPGQSPKLLIWA~~
STRDSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCTQSFI~~LRTFGGGTKLEIK~~

[0157] 핵산 서열 (서열식별번호: 108):

GACATCGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGACAGCAGGAGAGAAG
 GTCACTATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGCTAACATTAGAACCCGAAAG
 AACTACTTGGCTTGGTACCAACAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATCT
 ACTGGGCATCCACTAGGGACTCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATC
 TGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTT
 TATTACTGCACGCAATCTTATTCTCGGACGTTCGTGGAGGCACCAAGCTGG
 AAATCAA

WBP3311_2.844.8-VH

아미노산 서열 (서열식별번호: 109):

QVQLQQSGPELVKPGASVRISCKASGFAFTDYYIHWVKQRPGQGLEWIGWISPGNVN
TKYNENFKGRATLTADLSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARDGYSLYYFDYWGQGT
 TLTVSS

핵산 서열 (서열식별번호: 110):

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAATTGGTGAAGCCTGGGGCTTCCGTGA
 GGATATCCTGCAAGGCCTCTGGCTTCGCCTCACAGACTACTATACACTGGGT
 GAAGCAGAGGCCCTGGACAGGGTCTGAGTGGATTGGATGGATTCTCCTGGAAA
 TGTAAATACTAAATACAATGAAAACITCAAGGGCAGGCCACACTGACTGCAGA
 CCTATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCAGCCTGACCTCTGAGGA~~CT~~
 GCGGTCTATTCTGTGCAAGAGATGGATATTCCCTGTATTACTTTGACTACTGGG
 GCCAAGGCACCACTTCACAGTCTC

WBP3311_2.844.8-VK

아미노산 서열 (서열식별번호: 111):

DIVMSQSPSSLTVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWA
STRESGPDRFTGSGSGTAFTLTISGVQAEDLAVYFCTQSHTLRTFGGGTKLEIK

핵산 서열 (서열식별번호: 112):

GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTGACTGTGTCAGCAGCAGGAGAGAAGG
 TCACTATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGCTAACAGTAGAACCCGAAAGA
 ACTACTTGGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAACGACTAACTCTA
 CTGGGCATCCACTAGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCT
 GGGACAGCTTCACTCTCACCATCAGCGGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTT
 ATTCTGCACGCAATCTCATACTCTCGGACGTTCGTGGAGGCACCAAGCTGGA
 AATCAA

[0158]

CDR은 항원 결합을 담당하는 것으로 공지되어 있지만, 6개의 CDR 모두가 필수적이거나 불변하는 것은 아니라는 것이 밝혀졌다. 다시 말해서, 항-CD3엡실론 항체 WBP3311_2.166.48, WBP3311_2.306.4, WBP3311_2.383.47, WBP3311_2.400.5, WBP3311_2.482.5, WBP3311_2.488.33, WBP3311_2.615.8 또는 WBP3311_2.844.8에서 1개 이상의 CDR을 대체 또는 변화 또는 변형시키지만 CD3엡실론에 대한 특이적 결합 친화도를 실질적으로 보유하는 것이 가능하다.

[0159]

특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD3엡실론 항체 및 항원-결합 단편은 항-CD3엡실론 항체 WBP3311_2.166.48, WBP3311_2.306.4, WBP3311_2.383.47, WBP3311_2.400.5, WBP3311_2.482.5, WBP3311_2.488.33, WBP3311_2.615.8 및 WBP3311_2.844.8 중 하나의 중쇄 CDR3 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD3엡실론 항체 및 항원-결합 단편은 서열식별번호: 5, 11, 17, 23, 29, 35, 41 및 47로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 CDR3 서열을 포함한다. 중쇄 CDR3 영역은 항원-결합 부위의 중앙에 위치하고, 따라서 항원과 가장 많이 접촉하여 항원에 대한 항체의 친화도에 가장 많은 자유 에너지를 제공하는 것으로 여겨진다. 또한, 중쇄 CDR3은 다수의 다양화 메카니즘에 의해 길이, 아미노산 조성 및 입체형태의 면에서 항원-결합 부위의 단연코 가장 다양한 CDR인 것으로 여겨진다 (Tonegawa S. Nature. 302:575-81). 중쇄 CDR3 내의 다양성은 대부분의 항체 특이성 (Xu JL, Davis MM. Immunity. 13:37-45) 뿐만 아니라 바람직한 항원-결합 친화도 (Schier R, etc. J Mol Biol. 263:551-67)를 생성하기에 충분하다.

[0161]

특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 및 그의 항원-결합 단편은 항체 및 그의 항원-결합 단편이 CD3엡실론에

특이적으로 결합할 수 있는 한 적합한 프레임워크 영역 (FR) 서열을 포함한다. 표 1에 제공된 CDR 서열은 마우스 항체로부터 수득되지만, 이들은 관련 기술분야에 공지된 적합한 방법, 예컨대 재조합 기술을 사용하여 임의의 적합한 종, 예컨대 특히 마우스, 인간, 래트, 토끼의 임의의 적합한 FR 서열에 그라프팅될 수 있다.

[0162] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 및 그의 항원-결합 단편은 인간화된 것이다. 인간화 항체 또는 항원-결합 단편은 인간에서의 그의 감소된 면역원성을 있어서 바람직하다. 인간화 항체는 비-인간 CDR 서열이 인간 또는 실질적으로 인간 FR 서열에 그라프팅되기 때문에 그의 가변 영역에 있어서 키메라이다. 항체 또는 항원-결합 단편의 인간화는 비-인간 (예컨대 뮤린) CDR 유전자를 인간 이뮤노글로불린 유전자에서의 상응하는 인간 CDR 유전자로 치환시킴으로써 본질적으로 수행될 수 있다 (예를 들어 문헌 [Jones et al. (1986) Nature 321:522-525; Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-327; Verhoeyen et al. (1988) Science 239:1534-1536] 참조).

[0163] 이러한 목적을 달성하기 위해 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 적합한 인간 중쇄 및 경쇄 가변 도메인이 선택될 수 있다. 예시적인 예에서, "최적-피트" 접근법이 사용될 수 있으며, 여기서 비-인간 (예를 들어 설치류) 항체 가변 도메인 서열이 공지된 인간 가변 도메인 서열의 데이터베이스에 대해 스크리닝되거나 BLAST 검색되고, 비-인간 질의 서열에 가장 가까운 인간 서열이 비-인간 CDR 서열을 그라프팅하기 위한 인간 스캐폴드로서 확인되고 사용된다 (예를 들어 문헌 [Sims et al., (1993) J. Immunol. 151:2296; Chothia et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901] 참조). 대안적으로, 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 프레임워크가 비-인간 CDR의 그라프팅을 위해 사용될 수 있다 (예를 들어 문헌 [Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285; Presta et al. (1993) J. Immunol., 151:2623] 참조).

[0164] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 인간화 항체 또는 항원-결합 단편은 비-인간인 CDR 서열을 제외하고는 실질적으로 모든 인간 서열로 구성된다. 일부 실시양태에서, 가변 영역 FR 및 불변 영역은 존재하는 경우 완전히 또는 실질적으로 인간 이뮤노글로불린 서열로부터의 것이다. 인간 FR 서열 및 인간 불변 영역 서열은 상이한 인간 이뮤노글로불린 유전자로부터 유래될 수 있고, 예를 들어 FR 서열은 하나의 인간 항체로부터 유래되고 불변 영역은 또 다른 인간 항체로부터 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 인간화 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 FR1-4 및 인간 JH 및 J_K를 포함한다.

[0165] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 인간화 항체 및 그의 항원-결합 단편은 WBP3311_2.166.48-z1 또는 WBP3311_2.306.4-z1의 1개 이상의 FR 서열을 포함한다. 하기 표 2는 WBP3311_2.166.48-z1 또는 WBP3311_2.306.4-z1의 FR 서열을 제시한다. 천연 마우스 FR 서열이 또한 표 2에 열거된다. 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열이 또한 하기에 제공된다.

[0166] 본원에 사용된 "WBP3311_2.166.48-z1"은 서열식별번호: 113의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 115의 카파 경쇄 가변 영역을 포함하는 WBP3311_2.166.48을 기재로 하는 인간화 항체를 지칭한다. WBP3311_2.166.48-z1은 그의 모 항체 WBP3311_2.166.48과 비교하여 항원에 대한 대등한 친화도를 갖는다.

[0167] 본원에 사용된 "WBP3311_2.306.4-z1"은 서열식별번호: 117의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 119의 카파 경쇄 가변 영역을 포함하는 WBP3311_2.306.4를 기재로 하는 인간화 항체를 지칭한다. WBP3311_2.306.4-z1은 그의 모 항체 WBP3311_2.306.4와 비교하여 항원에 대한 대등한 친화도를 갖는다.

[0168]

표 2.

	FR1	FR2	FR3	FR4
WBP3311 _2.166.48- VH	SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 55
	QVQLQQSGPEL VKPGASV рIAC KAS	WVKQRPGQG LEWIG	KATLTADTSSSTA YMQLSSLSEDS AVYFCAI	WGQGTTLV SS
WBP3311 _2.166.48- z1-VH	SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 59	SEQ ID NO: 61	SEQ ID NO: 63
	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKVS CKAS	WVRQAPGQG LEWMG	RVTITADKSTST AYMELSSLRSED TAVYYCAI	WGQGTLTV SS
WBP3311 _2.166.48- VK	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 56
	DIVMSQSPSSL AVSAGEKVTM SC	WYQQKPGQS PKLLIY	GVPDRFTGSGSG TDFTLTINSVQA EDLAVYYC	FGGGTKLEIK
WBP3311 _2.166.48- z1-VK	SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 60	SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 64
	DIVMTQSPDSL AVSLGERATIN C	WYQQKPGQP PKLLIY	GVPDRFSGSGSG TDFTLTISSLQAE DVAVYYC	FGGGTKVEIK
WBP3311 _2.306.4- VH	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 67	SEQ ID NO: 69	SEQ ID NO: 71
	QVQLQQSGPEL VKPGASV рLSC KAS	WMKQRPGQG LEWIG	RATVTADLSSST AYMQLSSLSEDS SAVYFCAR	WGQGTTLV SS
WBP3311 _2.306.4- z1-VH	SEQ ID NO: 73	SEQ ID NO: 75	SEQ ID NO: 77	SEQ ID NO: 79
	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKAS	WVRQAPGQG LEWMG	RVTITADKSTST AYMELSSLRSED TAVYYCAR	WGQGTLTV SS
WBP3311 _2.306.4- VK	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 72
	DIVMSQSPSSLT VSAGEKVTMS C	WYQQKPGQS PKLLIY	GVPDRFTGSGSG TAFTLTISGVQAE DLAVYFC	FGGGTKLEIK
WBP3311 _2.306.4- z1-VK	SEQ ID NO: 74	SEQ ID NO: 76	SEQ ID NO: 78	SEQ ID NO: 80
	DIVMTQSPDSL AVSLGERATIN C	WYQQKPGQP PKLLIY	GVPDRFSGSGSG TDFTLTISSLQAE DVAVYYC	FGGGTKVEIK

[0169]

WBP3311_2.166.48-z1-VH

아미노산 서열 (서열식별번호: 113):

QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGYSFTTYIHWVRQAPGQGLEWMGWIFPGN
DNIKYSEFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAIDSVIYYFDYWGQG
TLTVSS

핵산 서열 (서열식별번호: 114):

CAGGTGCAACTCGTCAGTCTGGAGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGGTCTTCAGTC
AAGGTCAAGTCAGTGCAGGCCAGTGGGTATTCCCTCACTACCTACTACATCCACTGGG
TGGCAGGCACCAGGACAGGGCTTGAGTGGATGGCTGGATCTTCCGGCA
ACGATAATTAAGTACAGCGAGAAGTCAAAGGGAGGGTACCCATTACCGCCG
ACAAATCCACTCCACAGCCTACATGGAGTTGAGCAGCCTGAGATCCGAGGATA
CAGCCGTGTACTACTGTGCCATTGACAGCGTGTCCATCTACTACTTGACTACTG
GGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTGAGCAGC

WBP3311_2.166.48-z1-VK

아미노산 서열 (서열식별번호: 115):

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWA
STRKSGVPDRFSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCTQSFILTFGGGTKEIK

핵산 서열 (서열식별번호: 116):

GACATCGTCATGACCCAGTCCCCAGACTCTTGGCAGTGTCTCTGGGGAAAGAG
CTACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGTCCCTCTGAACAGCAGGACCAGGAAGA
ATTACCTCGCCTGGTACCAACAGAACAGCCGGACAGCCTCTTAAGCTCCTGATCTA
CTGGGCCTCAACCCGGAAGAGTGGAGTGCCCAGTCCTTAGCAGGGAGCGGCTC
CGGGACAGATTTCACACTGACAATTCCCTGCAGGCCAGGGACGTCGCCGTG
TATTACTGTACTCAGAGCTCATTCTGGACATTGGCGCGGGACTAAAGTGG
AGATTAAG

WBP3311_2.306.4-z1-VH

아미노산 서열 (서열식별번호: 117):

QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGFAFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWISPGN
VNTKYNENFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWGQ
GTLTVSS

핵산 서열 (서열식별번호: 118):

[0170]

CAGGTGCAGCTTGTGCAGTCGGGAGAAGTGAAGAAGCCTGGGTCTAGTGTC
 AAGGTGTCATGCAAGGCTAGCGGGTCGCCCTTAUTGACTACATCCACTGGG
 TGCGCAGGCTCCGGACAAGGGTTGGAGTGGATGGATGGATCTCCCCAGGCA
 ATGTCAACACAAAGTACAACGAGAACTTCAAAGGCCCGTCACCATTACCGCCG
 ACAAGAGCACCTCACAGCCTACATGGAGCTGTCCAGCCTCAGAAGCGAGGACA
 CTGCCGTCTACTACTGTGCCAGGGATGGGTACTCCCTGTATTACTTTGATTACTGG
 GGCCAGGGCACACTGGTACAGTGAGCTCC

WBP3311_2.306.4-z1-VK

아미노산 서열 (서열식별번호: 119):

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWA
STRQSGVPDRFSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCTQSHTLRTFGGGTKVEIK

핵산 서열 (서열식별번호: 120):

GATATCGTGATGACCCAGAGCCCAGACTCCCTGCTGTCTCCCTCGGCAGAAAGAG
 CAACCATCAACTGCAAGAGCTCCAAAGCCTGCTGAUTCCAGGACCAGGAAGA
 ATTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAACGCCGGCAGCCTCTAAGCTGCTCATCTA
 CTGGGCCTCCACCCGGCAGTCTGGGTGCCGATCGTTAGTGGATCTGGGAGC
 GGGACAGACTTCACATTGACAATTAGCTACTGCAGGCCAGGACGTGGCGTC
 TACTACTGTACTCAGAGCCACACTCTCCGCACATTGGCGGAGGGACTAAAGTGG
 AGATTAAG

[0171]

2종의 예시적인 인간화 항-CD3엡실론 항체 WBP3311_2.166.48-z1 또는 WBP3311_2.306.4-z1은 둘 다 CD3-발현 세포 (예를 들어 CD4 T 세포)에 대한 특이적 결합 친화도를 보유하였으며, 그 측면에서 모 마우스 항체에 적어도 대등하거나 또는 그보다 훨씬 더 우수하다. 2종의 예시적인 인간화 항체는 둘 다 인간 T 세포를 활성화시키고 TNF알파 및 IFN감마의 시토카인 방출을 촉발할 수 있다는 점에서 둘 다 CD3-발현 세포와의 그의 기능적 상호작용을 보유하였다.

[0172]

일부 실시양태에서, 인간으로부터 유래된 FR 영역은 그것이 유래된 인간 이谬노글로불린과 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 인간 FR의 1개 이상의 아미노산 잔기는 모 비-인간 항체로부터의 상응하는 잔기로 치환된다. 이는 특정 실시양태에서 인간화 항체 또는 그의 단편을 비-인간 모 항체 구조에 밀접하게 근사화하기 위해 바람직할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 인간화 항체 또는 항원-결합 단편은 각각의 인간 FR 서열에 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 아미노산 잔기 치환, 또는 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인의 모든 FR에 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 아미노산 잔기 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 아미노산 잔기의 이러한 변화는 중쇄 FR 영역에서만, 경쇄 FR 영역에서만, 또는 둘 다의 쇄에서 존재할 수 있다.

[0173]

특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 및 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 81, 서열식별번호: 85, 서열식별번호: 89, 서열식별번호: 93, 서열식별번호: 97, 서열식별번호: 101, 서열식별번호: 105, 서열식별번호: 109, 서열식별번호: 113, 서열식별번호: 117로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 가변 도메인 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 및 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 83, 서열식별번호: 87, 서열식별번호: 91, 서열식별번호: 95, 서열식별번호: 99, 서열식별번호: 103, 서열식별번호: 107, 서열식별번호: 111, 서열식별번호: 115, 서열식별번호: 119로 이루어진 군으로부터 선택된 경쇄 가변 도메인 서열을 포함한다.

[0175]

일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD3엡실론 항체 및 항원-결합 단편은 중쇄 가변 도메인의 모두 또는 일부분 및/또는 경쇄 가변 도메인의 모두 또는 일부분을 포함한다. 한 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD3엡실론 항체 및 항원-결합 단편은 본원에 제공된 중쇄 가변 도메인의 모두 또는 일부분으로 이루어진 단일 도메인 항체이다. 이러한 단일 도메인 항체의 보다 많은 정보가 관련 기술분야에서 이용가능하다 (예를 들어 미국 특히 번호 6,248,516 참조).

[0176]

특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD3엡실론 항체 및 그의 단편은 이谬노글로불린 불변 영역을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 이谬노글로불린 불변 영역은 중쇄 및/또는 경쇄 불변 영역을 포함한다. 중쇄 불변 영역은 CH1, 힌지 및/또는 CH2-CH3 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 중쇄 불변 영역은 Fc 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 경쇄 불변 영역은 C_k를 포함한다.

[0177]

일부 실시양태에서, 항-CD3엡실론 항체 및 그의 항원-결합 단편은 IgG1 또는 IgG2a 이소형의 불변 영역을 갖고,

이는 감소된 또는 고갈된 이펙터 기능, 예컨대 ADCC 또는 CDC를 가지며, 이는 Fc 수용체 결합 검정, C1q 결합 검정 및 세포 용해 검정과 같은 다양한 검정을 사용하여 평가될 수 있다.

[0178] 본원에 제공된 항체 및 항원-결합 단편의 결합 친화도는 항원과 항원-결합 분자 사이의 결합이 평형에 도달할 때의 회합률에 대한 해리율의 비 (k_{off}/k_{on})를 나타내는 K_D 값으로 표시될 수 있다. 항원-결합 친화도 (예를 들어 K_D)는, 예를 들어 유동 세포측정법 검정을 포함한 관련 기술분야에 공지된 적합한 방법을 사용하여 적절하게 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상이한 농도에서의 항원에 대한 항체의 결합은 유동 세포측정법에 의해 결정될 수 있고, 결정된 평균 형광 강도 (MFI)가 먼저 항체 농도에 대해 플로팅될 수 있고, 이어서 K_D 값이 프리즘 버전 5 (그래프패드 소프트웨어(GraphPad Software), 캘리포니아주 샌디에고)를 사용하여 특이적 결합 형광 강도 (Y) 및 항체의 농도 (X)의 상관성을 한 부위 포화 방정식: $Y=B_{max} \cdot X / (K_D + X)$ 에 피팅함으로써 계산될 수 있으며, 여기서 B_{max} 는 항원에 대한 시험 항체의 최대 특이적 결합을 지칭한다.

[0179] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD3엡실론 항체 및 그의 항원-결합 단편은 세포 표면 상에서 발현된 인간 CD3엡실론 또는 재조합 인간 CD3엡실론에 특이적으로 결합할 수 있다. CD3엡실론은 세포 상에서 발현되는 수용체이다. 재조합 CD3엡실론은 재조합적으로 발현되고 세포 막과 회합되지 않는 가용성 CD3엡실론이다. 재조합 CD3엡실론은 다양한 재조합 기술에 의해 제조될 수 있다. 한 예에서, 인간 CD3엡실론 (NP_000724.1)의 세포외 도메인 (Met1-Asp126)을 코딩하는 CD3엡실론 DNA 서열은 발현 벡터 내의 C-말단에서 폴리히스티딘 태그와 융합된 다음, 293E 세포에 형질감염되어 발현되고, Ni-친화도 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다.

[0180] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD3엡실론 항체 및 그의 항원-결합 단편은 유동 세포측정법 검정에 의해 측정시 5×10^{-9} M 이하, 4×10^{-9} M 이하, 3×10^{-9} M 이하, 2×10^{-9} M 이하, 10^{-9} M 이하, 5×10^{-10} M 이하, 4×10^{-10} M 이하, 3×10^{-10} M 이하, 2×10^{-10} M 이하, 10^{-10} M 이하, 5×10^{-11} M 이하, 4×10^{-11} M 이하, 3×10^{-11} M 이하, 2×10^{-11} M 이하 또는 10^{-11} M 이하의 결합 친화도 (K_D)로 세포의 표면 상에서 발현된 인간 CD3엡실론에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0181] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD3엡실론 항체 및 그의 항원-결합 단편은 시노몰구스 원숭이 CD3엡실론, 예를 들어 세포 표면 상에서 발현된 시노몰구스 원숭이 CD3엡실론 또는 가용성 재조합 시노몰구스 원숭이 CD3엡실론과 교차-반응한다.

[0182] 재조합 CD3엡실론 또는 세포의 표면 상에서 발현된 CD3엡실론에 대한 항체의 결합은 또한 그의 최대 효과 (예를 들어 결합 또는 억제 등)의 50%가 관찰되는 항체의 농도를 지칭하는 "반수 최대 유효 농도" (EC_{50}) 값으로 표시될 수 있다. EC_{50} 값은 관련 기술분야에 공지된 방법, 예를 들어 샌드위치 검정, 예컨대 ELISA, 웨스턴 블로트, 유동 세포측정법 검정 및 다른 결합 검정에 의해 측정될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 및 그의 단편은 ELISA에 의해 0.01 nM 이하, 0.02 nM 이하, 0.03 nM 이하, 0.04 nM 이하, 0.05 nM 이하, 0.06 nM 이하, 0.07 nM 이하 또는 0.08 nM 이하의 EC_{50} (즉 50% 결합 농도)으로 재조합 인간 CD3엡실론에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 및 그의 단편은 유동 세포측정법 검정에 의해 0.5 nM 이하, 0.6 nM 이하, 0.7 nM 이하, 0.8 nM 이하, 0.9 nM 이하, 1 nM 이하, 2 nM 이하, 3 nM 이하, 4 nM 이하, 5 nM 이하, 6 nM 이하, 7 nM 이하, 8 nM 이하, 9 nM 이하 또는 10 nM 이하의 EC_{50} 으로 세포 표면 상에서 발현된 인간 CD3엡실론에 특이적으로 결합한다.

[0183] 특정 실시양태에서, 항체 및 그의 항원-결합 단편은 인간 CD3엡실론의 것과 유사한 결합 친화도로 시노몰구스 원숭이 CD3엡실론에 결합한다. 예를 들어, 예시적인 항체 WBP3311_2.166.48, WBP3311_2.306.4, WBP3311_2.383.47, WBP3311_2.400.5, WBP3311_2.482.5, WBP3311_2.488.33, WBP3311_2.615.8, WBP3311_2.844.8의 시노몰구스 원숭이 CD3엡실론에 대한 결합은 인간 CD3엡실론의 것과 유사한 친화도 또는 EC_{50} 값으로의 결합이다.

[0184] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 및 그의 단편은 ELISA에 의해 0.001 nM 이하, 0.005 nM 이하, 0.01 nM 이하, 0.02 nM 이하, 0.03 nM 이하, 0.04 nM 이하 또는 0.05 nM 이하의 EC_{50} 으로 재조합 시노몰구스 원숭이 CD3엡실론에 특이적으로 결합한다.

[0185] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 및 그의 단편은 진단 및/또는 치료 용도를 제공하기에 충분한 인간 CD3엡실론에 대한 특이적 결합 친화도를 갖는다. 다수의 치료 전략은, 특히 임상적으로 사용되는 항-인간 CD3 모

노클로날 항체에 의한 TCR 신호전달을 표적화함으로써 T 세포 면역을 조정한다.

[0186] 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 재조합 항체, 이중특이적 항체, 표지된 항체, 2가 항체 또는 항-이디오타입 항체일 수 있다. 재조합 항체는 재조합 방법을 사용하여 동물에서가 아니라 시험관내에서 제조된 항체이다.

[0187] 항체 변이체

[0188] 본 개시내용은 또한 본원에 제공된 항체 및 그의 항원-결합 단편의 다양한 변이체를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 예시적인 항체의 다양한 유형의 변이체, 즉, WBP3311_2.166.48, WBP3311_2.306.4, WBP3311_2.383.47, WBP3311_2.400.5, WBP3311_2.482.5, WBP3311_2.488.33, WBP3311_2.615.8 및 WBP3311_2.844.8을 포함한다.

[0189] 특정 실시양태에서, 항체 변이체는 표 1에 제공된 바와 같은 1개 이상의 CDR 서열, 표 2에 제공된 1개 이상의 FR 서열, 본원에 제공된 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 서열, 및/또는 불변 영역 (예를 들어 Fc 영역)에 1개 이상의 변형 또는 치환을 포함한다. 이러한 변이체는 그의 모 항체의 CD3엡실론에 대한 특이적 결합 친화도를 보유하지만, 변형(들) 또는 치환(들)에 의해 부여되는 1개 이상의 바람직한 특성을 갖는다. 예를 들어, 항체 변이체는 개선된 항원-결합 친화도, 개선된 글리코실화 패턴, 감소된 글리코실화 위험, 감소된 탈아미노화, 감소된 또는 고갈된 이펙터 기능(들), 개선된 FcRn 수용체 결합, 증가된 약동학적 반감기, pH 감수성, 및/또는 접합에 대한 상용성 (예를 들어 1개 이상의 도입된 시스테인 잔기)을 가질 수 있다.

[0190] 모 항체 서열은 변형 또는 치환될 적합한 또는 바람직한 잔기를 확인하기 위해, 관련 기술분야에 공지된 방법, 예를 들어 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"을 사용하여 스크리닝될 수 있다 (예를 들어 문헌 [Cunningham and Wells (1989) Science, 244: 1081-1085] 참조). 간략하게, 표적 잔기 (예를 들어 하전된 잔기, 예컨대 Arg, Asp, His, Lys 및 Glu)가 확인되고 중성 또는 음으로 하전된 아미노산 (예를 들어 알라닌 또는 폴리알라닌)에 의해 대체될 수 있으며, 변형된 항체가 생산되고 관심 특성에 대해 스크리닝될 수 있다. 특정한 아미노산 위치에서의 치환이 관심 기능적 변화를 나타내는 경우에, 위치는 변형 또는 치환을 위한 잠재적 잔기로서 확인될 수 있다. 잠재적 잔기는 상이한 유형의 잔기 (예를 들어 시스테인 잔기, 양으로 하전된 잔기 등)로 치환시킴으로써 추가로 평가될 수 있다.

[0191] 친화성 변이체

[0192] 친화성 변이체는 표 1에 제공된 바와 같은 1개 이상의 CDR 서열, 표 2에 제공된 1개 이상의 FR 서열, 또는 본원에 제공된 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 서열에 변형 또는 치환을 함유할 수 있다. 친화성 변이체는 모 항체의 CD3엡실론에 대한 특이적 결합 친화도를 보유하거나 또는 심지어 모 항체에 비해 개선된 CD3엡실론 특이적 결합 친화도를 갖는다. 특정 실시양태에서, CDR 서열, FR 서열 또는 가변 영역 서열 내의 치환(들) 중 적어도 하나 (또는 모두)는 보존적 치환을 포함한다.

[0193] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 표 1 및 표 2에 제공된 CDR 서열 및 FR 서열에서, 1개 이상의 아미노산 잔기가 치환될 수 있지만, 생성된 항체 또는 항원-결합 단편은 여전히 CD3엡실론에 대한 결합 친화도를 보유하거나 또는 심지어 개선된 결합 친화도를 갖는다는 것을 이해할 것이다. 관련 기술분야에 공지된 다양한 방법을 사용하여 이러한 목적을 달성할 수 있다. 예를 들어, 항체 변이체 (예컨대 Fab 또는 scFv 변이체)의 라이브러리를 생성하고, 파지 디스플레이 기술에 의해 발현시킨 다음, 인간 CD3엡실론에 대한 결합 친화도에 대해 스크리닝할 수 있다. 또 다른 예로, 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 인간 CD3엡실론에 대한 항체의 결합을 실질적으로 시뮬레이션하고, 결합 계면을 형성하는 항체 상의 아미노산 잔기를 확인할 수 있다. 이러한 잔기는 결합 친화도의 감소를 방지하도록 치환시에 피할 수 있거나 또는 더 강한 결합을 제공하기 위해 치환의 표적으로 할 수 있다.

[0194] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 인간화 항체 또는 항원-결합 단편은 1개 이상의 CDR 서열 및/또는 1개 이상의 FR 서열에 1개 이상의 아미노산 잔기 치환을 포함한다. 특정 실시양태에서, 친화성 변이체는 CDR 서열 및/또는 FR 서열에 총 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 치환을 포함한다.

[0195] 특정 실시양태에서, 항-CD3엡실론 항체 및 그의 항원-결합 단편은 표 1에 열거된 것 (또는 것들)에 대해 적어도 80% (예를 들어 적어도 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) 서열 동일성을 갖는 1, 2 또는 3개의 CDR 서열을 포함하고, 한편 그의 모 항체와 유사하거나 그보다 훨씬 더 높은 수준의 CD3엡실론에 대한 결합 친화도를 보유한다.

[0196] 특정 실시양태에서, 항-CD3엡실론 항체 및 그의 항원-결합 단편은 표 2에 열거된 것 (또는 것들)에 대해 적어도

80% (예를 들어 적어도 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) 서열 동일성을 갖는 1개 이상의 FR 서열을 포함하고, 한편 그의 모 항체와 유사하거나 그보다 훨씬 더 높은 수준의 CD3엡실론에 대한 결합 친화도를 보유한다.

[0197] 특정 실시양태에서, 항-CD3엡실론 항체 및 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 81, 서열식별번호: 85, 서열식별번호: 89, 서열식별번호: 93, 서열식별번호: 97, 서열식별번호: 101, 서열식별번호: 105, 서열식별번호: 109, 서열식별번호: 113, 서열식별번호: 117, 서열식별번호: 83, 서열식별번호: 87, 서열식별번호: 91, 서열식별번호: 95, 서열식별번호: 99, 서열식별번호: 103, 서열식별번호: 107, 서열식별번호: 111, 서열식별번호: 115, 서열식별번호: 119에 열거된 것 (또는 것들)에 대해 적어도 80% (예를 들어 적어도 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) 서열 동일성을 갖는 1개 이상의 가변 영역 서열을 포함하고, 한편 그의 모 항체와 유사하거나 그보다 훨씬 더 높은 수준의 CD3엡실론에 대한 결합 친화도를 보유한다. 일부 실시양태에서, 서열식별번호: 81, 서열식별번호: 85, 서열식별번호: 89, 서열식별번호: 93, 서열식별번호: 97, 서열식별번호: 101, 서열식별번호: 105, 서열식별번호: 109, 서열식별번호: 113, 서열식별번호: 117, 서열식별번호: 83, 서열식별번호: 87, 서열식별번호: 91, 서열식별번호: 95, 서열식별번호: 99, 서열식별번호: 103, 서열식별번호: 107, 서열식별번호: 111, 서열식별번호: 115 및 서열식별번호: 119로부터 선택된 서열에서 총 1 내지 10개의 아미노산이 치환, 삽입 또는 결실되었다. 일부 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 CDR 외부 영역에서 (즉, FR에서) 일어난다.

[0198] 글리코실화 변이체

[0199] 본원에 제공된 항-CD3엡실론 항체 및 항원-결합 단편은 또한 항체 또는 항원 결합 단편의 글리코실화 정도를 증가 또는 감소시키기 위해 수득될 수 있는 글리코실화 변이체를 포괄한다.

[0200] 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 탄수화물 모이어티 (예를 들어 올리고사카라이드 구조)가 부착될 수 있는 측쇄를 갖는 1개 이상의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 항체의 글리코실화는 전형적으로 N-연결 또는 O-연결된다. N-연결된 탄수화물 모이어티가 아스파라긴 잔기, 예를 들어 트리펩티드 서열, 예컨대 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)에서의 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착된 것을 지칭한다. O-연결된 글리코실화는 당 N-아세틸갈اكتозamin, 갈اكتوس 또는 크릴로스 중 하나가 헤드록시아미노산, 가장 통상적으로는 세린 또는 트레오닌에 부착된 것을 지칭한다. 천연 글리코실화 부위의 제거는, 예를 들어 서열 중에 존재하는 상기 기재된 트리펩티드 서열 (N-연결된 글리코실화 부위의 경우) 또는 세린 또는 트레오닌 잔기 (O-연결된 글리코실화 부위의 경우) 중 하나가 치환되도록 아미노산 서열을 변경시킴으로써 편리하게 달성될 수 있다. 새로운 글리코실화 부위는 이러한 트리펩티드 서열 또는 세린 또는 트레오닌 잔기를 도입함으로써 유사한 방식으로 생성될 수 있다.

[0201] 시스테인-조작된 변이체

[0202] 본원에 제공된 항-CD3엡실론 항체 및 항원-결합 단편은 또한 1개 이상의 도입된 유리 시스테인 아미노산 잔기를 포함하는 시스테인-조작된 변이체를 포괄한다.

[0203] 유리 시스테인 잔기는 디슬피드 가교의 일부가 아닌 것이다. 시스테인 조작된 변이체는 조작된 시스테인의 부위에서, 예를 들어 말레이미드 또는 할로아세틸을 통해, 예를 들어 특히 세포독성 및/또는 영상화 화합물, 표지 또는 방사성동위원소와의 접합에 유용하다. 유리 시스테인 잔기를 도입하기 위해 항체 또는 항원-결합 단편을 조작하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 예를 들어 WO2006/034488을 참조한다.

[0204] Fc 변이체

[0205] 본원에 제공된 항-CD3엡실론 항체 및 항원-결합 단편은 또한 그의 Fc 영역 및/또는 힌지 영역에서 1개 이상의 아미노산 잔기 변형 또는 치환을 포함하는 Fc 변이체를 포괄한다.

[0206] 특정 실시양태에서, 항-CD3엡실론 항체 또는 항원-결합 단편은 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 pH-의존성 결합을 개선시키는 1개 이상의 아미노산 치환(들)을 포함한다. 이러한 변이체는 연장된 약동학적 반감기를 가질 수 있는데, 이는 그것이 리소솜에서의 분해를 피한 다음 전위되어 세포 밖으로 방출되도록 하는 산성 pH에서 FcRn에 결합하기 때문이다. FcRn과의 결합 친화도를 개선시키기 위해 항체 및 그의 항원-결합 단편을 조작하는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌 [Vaughn, D. et al., Structure, 6(1): 63-73, 1998; Kontermann, R. et al., Antibody Engineering, Volume 1, Chapter 27: Engineering of the Fc region for improved PK, published by Springer, 2010; Yeung, Y. et al., Cancer Research, 70: 3269-3277 (2010);

및 Hinton, P. et al., J. Immunology, 176:346-356 (2006)]을 참조한다.

[0207] 특정 실시양태에서, 항-CD3엡실론 항체 또는 항원-결합 단편은 항체-의존성 세포성 세포독성 (ADCC)을 변경시키는 1개 이상의 아미노산 치환(들)을 포함한다. Fc 영역의 CH2 도메인에서의 특정 아미노산 잔기는 치환되어 증진된 ADCC 활성을 제공할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 항체 상의 탄수화물 구조가 변화되어 ADCC 활성을 증진시킬 수 있다. 항체 조작에 의해 ADCC 활성을 변경시키는 방법은 관련 기술분야에 기재되었으며, 예를 들어 문헌 [Shields RL. et al., J Biol Chem. 2001. 276(9): 6591-604; Idusogie EE. et al., J Immunol. 2000. 164(8):4178-84; Steurer W. et al., J Immunol. 1995, 155(3): 1165- 74; Idusogie EE. et al., J Immunol. 2001, 166(4): 2571-5; Lazar GA. et al., PNAS, 2006, 103(11): 4005-4010; Ryan MC. et al., Mol. Cancer Ther., 2007, 6: 3009-3018; Richards JO., et al., Mol Cancer Ther. 2008, 7(8): 2517-27; Shields R. L. et al., J. Biol. Chem, 2002, 277: 26733-26740; Shinkawa T. et al., J. Biol. Chem, 2003, 278: 3466-3473]을 참조한다.

[0208] 특정 실시양태에서, 항-CD3엡실론 항체 또는 항원-결합 단편은, 예를 들어 C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC)을 개선 또는 감소시킴으로써 CDC를 변경시키는 1개 이상의 아미노산 치환(들)을 포함한다 (예를 들어 Fc 영역 변이체의 다른 예에 관하여 WO99/51642; 문헌 [Duncan & Winter Nature 322:738-40 (1988)]; 미국 특허 번호 5,648,260; 미국 특허 번호 5,624,821; 및 WO94/29351 참조).

[0209] 특정 실시양태에서, 항-CD3엡실론 항체 또는 항원-결합 단편은 이종이량체화를 용이하게 하고/거나 촉진하기 위해 Fc 영역의 계면 내에 1개 이상의 아미노산 치환(들)을 포함한다. 이들 변형은 제1 Fc 폴리펩티드 내로의 돌출부 및 제2 Fc 폴리펩티드 내로의 공동의 도입을 포함하며, 여기서 돌출부는 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드의 상호 작용을 촉진하여 이종이량체 또는 복합체를 형성하도록 공동 내에 위치될 수 있다. 이들 변형을 갖는 항체를 생성시키는 방법은, 예를 들어 미국 특허 번호 5,731,168에 기재된 바와 같이 관련 기술분야에 공지되어 있다.

항원-결합 단편

[0211] 또한 항-CD3엡실론 항원-결합 단편이 본원에 제공된다. 다양한 유형의 항원-결합 단편이 관련 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들어 CDR 및 FR 서열이 표 1 및 2에 제시된 것인 예시적인 항체 및 그의 상이한 변이체 (예컨대 친화성 변이체, 글리코실화 변이체, Fc 변이체, 시스테인-조작 변이체 등)를 포함한 본원에 제공된 항-CD3엡실론 항체에 기초하여 개발될 수 있다.

[0212] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD3엡실론 항원-결합 단편은 낙타화 단일 도메인 항체, 디아바디, 단일쇄 Fv 단편 (scFv), scFv 이량체, BsFv, dsFv, (dsFv)₂, dsFv-dsFv', Fv 단편, Fab, Fab', F(ab')₂, 이중특이적 항체, ds 디아바디, 나노바디, 도메인 항체, 단일 도메인 항체 또는 2가 도메인 항체이다.

[0213] 다양한 기술이 이러한 항원-결합 단편의 생산을 위해 사용될 수 있다. 예시적인 방법은 무순상 항체의 효소적 소화 (예를 들어 문헌 [Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); 및 Brennan et al., Science, 229:81 (1985)] 참조), 숙주 세포, 예컨대 이. 콜라이(E. Coli)에 의한 재조합 발현 (예를 들어 Fab, Fv 및 ScFv 항체 단편의 경우), 상기 논의된 바와 같은 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 스크리닝 (예를 들어 ScFv의 경우), 및 F(ab')₂ 단편을 형성하기 위한 2개의 Fab'-SH 단편의 화학적 커플링 (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992))을 포함한다. 항체 단편의 생산을 위한 다른 기술은 숙련된 기술자에게 분명할 것이다.

[0214] 특정 실시양태에서, 항원-결합 단편은 scFv이다. scFv의 생성은, 예를 들어 WO 93/16185; 미국 특허 번호 5,571,894; 및 5,587,458에 기재되어 있다. scFv는 이렉터 단백질에 아미노 또는 카르복시 말단 중 어느 하나에서 융합되어 융합 단백질을 제공할 수 있다 (예를 들어 문헌 [Antibody Engineering, ed. Borrebaeck] 참조).

이중특이적 항체, 다가 항체

[0216] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 및 그의 항원-결합 단편은 2가, 4가, 6가 또는 다가이다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 및 그의 항원-결합 단편은 단일특이적 또는 이중특이적이다.

[0217] 본원에 사용된 용어 "가"는 주어진 문자 내 명시된 개수의 항원 결합 부위의 존재를 지칭한다. 따라서, 용어 "2가", "4가" 및 "6가"는 항원-결합 문자 내 각각 2개의 결합 부위, 4개의 결합 부위 및 6개의 결합 부위의 존재를 나타낸다. 2가 문자는 2개의 결합 부위가 둘 다 동일한 항원 또는 동일한 에피토프의 특이적 결합에 대한 것인 경우 단일특이적일 수 있다. 유사하게, 3가 문자는, 예를 들어 2개의 결합 부위가 제1 항원 (또는 에피토

프)에 대해 단일특이적이고 제3 결합 부위가 제2 항원 (또는 에피토프)에 특이적인 경우 이중특이적일 수 있다.

[0218] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 및 그의 항원-결합 단편은 동일한 항원 또는 에피토프에 대해 특이적인 적어도 2개의 결합 부위를 갖는, 단일특이적이지만 2가, 3가 또는 4가일 수 있다. 이는 특정 실시양태에서 1가 대응물보다 항원 또는 에피토프에 대한 더 강한 결합을 제공한다. 특정 실시양태에서, 2가 항원-결합 모이어티에서, 제1가의 결합 부위 및 제2가의 결합 부위는 구조적으로 동일하거나 (즉 동일한 서열을 가짐) 또는 구조적으로 상이하다 (즉 동일한 특이성을 갖긴 하지만 상이한 서열을 가짐).

[0219] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 및 그의 항원-결합 단편은 이중특이적이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 이중특이적 항체 및 그의 항원-결합 단편은 CD3엡실론에 대한 제1 특이성 및 제2 특이성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 제2 특이성은 CD3엡실론에 대한 것이지만 상이한 에피토프에 대한 것이다. 일부 실시양태에서, 제2 특이성은 CD3엡실론과 상이한 제2 항원에 대한 것이고, 이것이 CD3엡실론-발현 T 세포에 근접하게 존재하는 것은 제2 항원이 면역계에 의해 인식되기에 바람직하다. 예를 들어, CD3엡실론-발현 T 세포를 종양 항원 또는 병원체 항원에 매우 근접하게 가져가고 따라서 면역계에 의한 이러한 항원의 인식 또는 제거를 촉진한다.

[0220] 특정 실시양태에서, 제2 특이성은 종양 연관 항원 또는 그의 에피토프에 대한 것이다. 용어 "종양 연관 항원"은 종양 세포 표면 상에 존재하거나 존재할 수 있고 종양 세포 상에 또는 그 내에 위치하는 항원을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 종양 연관 항원은 종양 세포에 의해서만 제시되고 정상, 즉 비-종양 세포에 의해서는 제시될 수 없다. 일부 다른 실시양태에서, 종양 연관 항원은 종양 세포 상에서 독점적으로 발현될 수 있거나 또는 비-종양 세포와 비교하여 종양 특이적 돌연변이를 나타낼 수 있다. 일부 다른 실시양태에서, 종양 연관 항원은 종양 세포 및 비-종양 세포 둘 다에서 발견될 수 있지만, 비-종양 세포와 비교하였을 때 종양 세포 상에서 과다 발현되거나 또는 비-종양 조직과 비교하여 종양 조직의 덜 치밀한 구조로 인해 종양 세포에서의 항체 결합을 위해 접근가능하다. 일부 실시양태에서, 종양 연관 항원은 종양의 혈관계 상에 위치한다.

[0221] 종양 연관 항원의 예시적인 예는 CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD30, CD33, CD34, CD37, CD44v6, CD45, CD133, Fms-유사 티로신 키나제 3 (FLT-3, CD135), 콘드로이틴 슬레이트 프로테오글리칸 4 (CSPG4, 흑색 종-연관 콘드로이틴 슬레이트 프로테오글리칸), 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), Her2, Her3, IGFR, IL3R, 섬유모세포 활성화 단백질 (FAP), CDCP1, 데클린1, 테나신, 프리즐드 1-10, 혈관 항원 VEGFR2 (KDR/FLK1), VEGFR3 (FLT4, CD309), PDGFR-알파 (CD140a), PDGFR-베타 (CD140b), 엔도글린, CLEC14, Tem1-8, 및 Tie2이다. 추가의 예는 A33, 카르보안히드라제 IX (MN/CA IX), de2-7, EGFR, EGFRvIII, EpCAM, Ep-CAM, 폴레이트-결합 단백질, G250, Fms-유사 티로신 키나제 3 (FLT-3, CD135), c-Kit (CD117), CSF1R (CD115), HLA-DR, IGFR, IL-2 수용체, IL3R, MCSF (흑색종-연관 세포 표면 콘드로이틴 슬레이트 프로테오글리칸), Muc-1, 전립선-특이적 막 항원 (PSMA), 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA), 전립선 특이적 항원 (PSA), 및 TAG-72를 포함할 수 있다.

[0222] 본원에 제공된 이중특이적 항체 및 항원-결합 단편은 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 방법으로 제조될 수 있다. 통상적인 접근법에서, 상이한 항원 특이성을 갖는 2개의 이뮤노글로불린 종쇄-경쇄 쌍을 재조합 방식으로 숙주 세포에서 공동-발현시켜 이중특이적 항체를 생산할 수 있고 (예를 들어 문헌 [Milstein and Cuello, Nature, 305: 537 (1983)] 참조), 이어서 친화도 크로마토그래피에 의해 정제할 수 있다.

[0223] 2가지 특이성에 대한 항체 중쇄 가변 도메인을 코딩하는 서열을 각각 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열에 융합시키고, 이어서 발현 벡터에 삽입하고, 이를 경쇄 서열에 대한 발현 벡터와 함께 이중특이적 항체의 재조합 발현을 위한 적합한 숙주 세포에 공동-형질감염시키는 재조합 접근법이 또한 사용될 수 있다 (예를 들어 WO94/04690; 문헌 [Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986)] 참조). 유사하게, scFv 이량체는 또한 숙주 세포로부터 재조합적으로 구축 및 발현될 수 있다 (예를 들어 문헌 [Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)] 참조.)

[0224] 또 다른 방법에서, Fos 및 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 펩티드는 유전자 융합에 의해 2개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 연결될 수 있다. 연결된 항체는 한지 영역에서 4개의 절반 항체 (즉 단량체)로 환원된 다음 재-산화되어 이중이량체를 형성한다 (Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)).

[0225] 2개의 항원-결합 도메인은 또한 접합 또는 가교되어 이중특이적 항체 또는 항원-결합 단편을 형성할 수 있다. 예를 들어, 하나의 항체는 비오틴에 커플링될 수 있고 한편 다른 항체는 아비딘에 커플링될 수 있으며, 비오틴과 아비딘 사이의 강한 회합은 2개의 항체를 함께 복합체화하여 이중특이적 항체를 형성한다 (예를 들어 미국

특허 번호 4,676,980; WO 91/00360, WO 92/00373 및 EP 03089 참조). 또 다른 예로, 2개의 항체 또는 항원-결합 단편은, 예를 들어 미국 특허 번호 4,676,980에 개시된 바와 같은 관련 기술분야에 공지된 통상적인 방법에 의해 가교될 수 있다.

[0226] 이중특이적 항원-결합 단편은 이중특이적 항체로부터, 예를 들어 단백질분해적 절단에 의해 또는 화학적 연결에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 항체의 항원-결합 단편 (예를 들어 Fab')을 제조하고, Fab'-티올 유도체로 전환시킨 다음, 상이한 항원 특이성을 갖는 또 다른 전환된 Fab' 유도체와 혼합 및 반응시켜 이중특이적 항원-결합 단편을 형성할 수 있다 (예를 들어 문헌 [Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)] 참조).

[0227] 특정 실시양태에서, 이중특이적 항체 또는 항원-결합 단편은 2개의 상이한 항원-결합 부위의 이종이량체화를 촉진하기 위해 노브-인투-홀 회합이 형성될 수 있도록 계면에서 조작될 수 있다. 본원에 사용된 "노브-인투-홀"은, 하나의 폴리펩티드는 벌기 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 (예를 들어 티로신 또는 트립토판)의 존재로 인해 돌출부 (즉 "노브")를 갖고, 다른 폴리펩티드는 작은 측쇄 아미노산 잔기 (예를 들어 알라닌 또는 트레오닌)가 존재하는 공동 (즉 "홀")을 갖고, 돌출부는 2개의 폴리펩티드의 상호작용을 촉진하여 이종이량체 또는 복합체를 형성하도록 공동 내에 위치가능한 것인, 2개의 폴리펩티드 (예컨대 CH3 도메인) 사이의 상호작용을 지칭한다. 노브-인투-홀을 갖는 폴리펩티드를 생성하는 방법은, 예를 들어 미국 특허 번호 5,731,168에 기재된 바와 같이 관련 기술분야에 공지되어 있다.

[0228] 접합체

[0229] 일부 실시양태에서, 항-CD3엡실론 항체 및 그의 항원-결합 단편은 접합체를 추가로 포함한다. 접합체는 항체 및 그의 항원-결합 단편에 연결될 수 있다. 접합체는 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 부착될 수 있는 비-단백질성 모이어티이다. 다양한 접합체가 본원에 제공된 항체 또는 항원-결합 단편에 연결될 수 있는 것으로 고려된다 (예를 들어 문헌 ["Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr. (eds.), Carger Press, New York, (1989)] 참조). 이를 접합체는 다른 방법들 중에서 공유 결합, 친화성 결합, 삽입, 배위 결합, 복합체화, 회합, 블렌딩 또는 부가에 의해 항체 또는 항원-결합 단편에 연결될 수 있다.

[0230] 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 항체 및 항원-결합 단편은 1종 이상의 접합체에 대한 결합에 이용될 수 있는, 에피토프 결합 부분 외부의 특정 부위를 함유하도록 조작될 수 있다. 예를 들어, 이러한 부위는 1개 이상의 반응성 아미노산 잔기, 예컨대 예를 들어 시스테인 또는 히스티딘 잔기를 포함하여, 접합체와의 공유 연결을 용이하게 할 수 있다.

[0231] 특정 실시양태에서, 항체는 접합체에 간접적으로 또는 또 다른 접합체를 통해 연결될 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 항원-결합 단편은 비오틴에 접합된 다음, 아비딘에 접합된 제2 접합체에 간접적으로 접합될 수 있다. 접합체는 독소 (예를 들어 화학요법제), 검출가능한 표지 (예를 들어 방사성 동위원소, 란타나이드, 발광 표지, 형광 표지 또는 효소-기질 표지)일 수 있다.

[0232] "독소"는 세포에 유해하거나 세포를 손상 또는 사멸시킬 수 있는 임의의 작용제일 수 있다. 독소의 예는 비체한적으로 탁솔, 시토칼라신 B, 그라미시딘 D, 브로민화에티듐, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빙크리스틴, 빈블라스틴, 콜키신, 독소루비신, 다우노루비신, 디히드록시 안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-데히드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 퓨로마이신 및 그의 유사체, 항대사물 (예를 들어 메토트렉세이트, 6-메르캅토퓨린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실 데카르바진), 알킬화제 (예를 들어 메클로레타민, 티오에파 클로람부실, 멜팔란, 카르무스틴 (BSNU) 및 로무스틴 (CCNU), 시클로포스파미드, 부술판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C, 및 시스-디클로로디아민 백금 (II) (DDP) 시스플라틴), 안트라시클린 (예를 들어 다우노루비신 (이전에 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제 (예를 들어 닥티노마이신 (이전에 악티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신, 및 안트라마이신 (AMC)), 및 항유사분열제 (예를 들어 빙크리스틴 및 빈블라스틴)를 포함한다.

[0233] 검출가능한 표지의 예는 형광 표지 (예를 들어 플루오레세인, 로다민, 단실, 피코에리트린, 또는 텍사스 레드), 효소-기질 표지 (예를 들어 양고추냉이 페옥시다제, 알칼리성 포스파타제, 루시페라제, 글루코아밀라제, 리소자임, 사카라이드 옥시다제 또는 β -D-갈اكت오시다제), 방사성동위원소 (예를 들어 123 I, 124 I, 125 I, 131 I, 35 S, 3 H, 111 In, 112 In, 14 C, 64 Cu, 67 Cu, 86 Y, 88 Y, 90 Y, 177 Lu, 211 At, 186 Re, 188 Re, 153 Sm, 212 Bi, 및 32 P, 다른 란타나이드, 발광 표지), 발색단 모이어티, 디곡시게닌, 비오틴/아비딘, DNA 분자 또는 검출용 금을 포함할 수 있다.

- [0234] 특정 실시양태에서, 접합체는 항체의 반감기를 증가시키는데 도움이 되는 약동학 조절 모이어티일 수 있다. 예시적인 예는 수용성 중합체, 예컨대 PEG, 카르복시메틸셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈, 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체 등을 포함한다. 중합체는 임의의 분자량을 가질 수 있고, 분지형 또는 비분지형일 수 있다. 항체에 부착되는 중합체의 수는 달라질 수 있고, 1개 초과의 중합체가 부착되는 경우에, 이들은 동일한 또는 상이한 분자일 수 있다.
- [0235] 특정 실시양태에서, 접합체는 정제 모이어티, 예컨대 자기 비드일 수 있다.
- [0236] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 및 그의 항원-결합 단편은 접합체를 위한 베이스에 사용된다.
- [0237] 폴리뉴클레오티드 및 재조합 방법
- [0238] 본 개시내용은 항-CD3엡실론 항체 및 그의 항원-결합 단편을 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 특정 실시양태에서, 단리된 폴리뉴클레오티드는 본원에 제공된 예시적인 항체의 가변 영역을 코딩하는 서열식별 번호: 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118 및/또는 120에 제시된 바와 같은 1개 이상의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 사용하여 (예를 들어 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하여) 용이하게 단리되고 서열분석된다. 코딩 DNA는 또한 합성 방법에 의해 수득될 수 있다.
- [0239] 항-CD3엡실론 항체 및 그의 항원-결합 단편을 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드 (예를 들어 서열식별번호: 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118 및/또는 120에 제시된 바와 같은 서열 포함)는 관련 기술분야에 공지된 재조합 기술을 사용하여 추가의 클로닝 (DNA의 증폭) 또는 발현을 위해 백터 내로 삽입될 수 있다. 많은 백터들이 이용가능하다. 백터 성분은 일반적으로 신호 서열, 복제 기점, 1종 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터 (예를 들어 SV40, CMV, EF-1 α) 및 전사 종결 서열 중 하나 이상을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0240] 일부 실시양태에서, 백터 시스템은 포유동물, 박테리아, 효모 시스템 등을 포함하며, 플라스미드, 예컨대 이에 제한되지는 않지만, pALTER, pBAD, pcDNA, pCa1, pL, pET, pGEMEX, pGEX, pCI, pCMV, pEGFP, pEGFT, pSV2, pFUSE, pVITRO, pVIVO, pMAL, pMD18-T, pMONO, pSELECT, pUNO, pDUO, Psg5L, pBABE, pWPXL, pBI, p15TV-L, pPro18, pTD, pRS420, pLexA, pACT2.2 등 및 다른 실험실용 및 상업적으로 입수가능한 백터를 포함한다. 적합한 백터는 플라스미드 또는 바이러스 백터 (예를 들어 복제 결손 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-연관 바이러스)를 포함할 수 있다.
- [0241] 항체 또는 항원-결합 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 백터는 클로닝 또는 유전자 발현을 위해 숙주 세포에 도입될 수 있다. 본원에서 백터 내의 DNA를 클로닝 또는 발현시키는데 적합한 숙주 세포는 상기 기재된 원핵생물, 효모 또는 고등 진핵 세포이다. 이러한 목적에 적합한 원핵생물은 유박테리아, 예컨대 그람-음성 또는 그람-양성 유기체, 예를 들어 엔테로박테리아세아(Enterobacteriaceae), 예컨대 에스케리키아(Escherichia), 예를 들어 이. 콜라(E. coli), 엔테로박터(Enterobacter), 에르위니아(Erwinia), 클레브시엘라(Klebsiella), 프로테우스(Proteus), 살모넬라(Salmonella), 예를 들어 살모넬라 티피무리움(Salmonella typhimurium), 세라티아(Serratia), 예를 들어 세라티아 마르세스칸스(Serratia marcescans), 및 시겔라(Shigella), 뿐만 아니라 바실루스(Bacilli), 예컨대 비. 서브틸리스(B. subtilis) 및 비. 리케니포르미스(B. licheniformis), 슈도모나스(Pseudomonas), 예컨대 피. 아에루기노사(P. aeruginosa), 및 스트렙토미세스(Streptomyces)를 포함한다.
- [0242] 원핵생물 이외에도, 진핵 미생물, 예컨대 사상 진균 또는 효모가 항-CD3엡실론 항체-코딩 백터에 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 사카로미세스 세레비지아(Saccharomyces cerevisiae) 또는 통상의 뺑 효모가 하등 진핵 숙주 미생물 중에서 가장 흔히 사용된다. 그러나, 다수의 다른 속, 종 및 균주, 예컨대 쉬조사카로미세스 품베(Schizosaccharomyces pombe); 클루이베로미세스(Kluyveromyces) 숙주, 예컨대, 예를 들어 케이. 락티스(K. lactis), 케이. 프라길리스(K. fragilis) (ATCC 12,424), 케이. 불가리쿠스(K. bulgaricus) (ATCC 16,045), 케이. 위케라미이(K. wickeramii) (ATCC 24,178), 케이. 왈티이(K. waltii) (ATCC 56,500), 케이. 드로소필라룸(K. drosophilum) (ATCC 36,906), 케이. 씨모톨레란스(K. thermotolerans), 및 케이. 마르시아누스(K. marxianus); 야로위아(yarrowia) (EP 402,226); 피키아 파스토리스(Pichia pastoris) (EP 183,070); 칸디다(Candida); 트리코더마 레에시아(Trichoderma reesia) (EP 244,234); 뉴로스포라 크라사(Neurospora crassa); 슈완니오미세스(Schwanniomyces), 예컨대 슈완니오미세스 옥시덴탈리스(Schwanniomyces occidentalis); 및 사

상 진균, 예컨대, 예를 들어 뉴로스포라(Neurospora), 페니실륨(Penicillium), 톨리포클라디움(Tolypocladium), 및 아스페르길루스(Aspergillus) 속주, 예컨대 에이. 니둘란스(*A. nidulans*) 및 에이. 니거(*A. niger*)가 흔히 이용가능하고 본원에 유용하다.

[0243] 본원에 제공된 글리코실화 항체 또는 항원-단편의 발현에 적합한 속주 세포는 다세포 유기체로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 수많은 바큘로바이러스 균주 및 변이체, 및 속주로부터의 상응하는 허용되는 곤충 속주 세포, 예컨대 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) (모충), 아에데스 아에깁티(*Aedes aegypti*) (모기), 아에데스 알보피ктус(*Aedes albopictus*) (모기), 드로소필라 멜라노가스터(*Drosophila melanogaster*) (과실파리), 및 봄비克斯 모리(*Bombyx mori*)가 확인되었다. 형질감염을 위한 다양한 바이러스 균주, 예를 들어 아우토그라파 칼리포르니카(*Autographa californica*) NPV의 L-1 변이체 및 봄비克斯 모리(*Bombyx mori*) NPV의 Bm-5 균주가 공중 이용가능하고, 이러한 바이러스는 특히 스포도프테라 프루기페르다 세포의 형질감염을 위해 본 발명에 따라 본원에서의 바이러스로서 사용될 수 있다. 목화, 옥수수, 감자, 대두, 페튜니아, 토마토 및 담배의 식물 세포 배양물이 또한 속주로서 이용될 수 있다.

[0244] 그러나, 척추동물 세포에 가장 큰 관심이 있었고, 배양물 (조직 배양물) 중에서의 척추동물 세포의 증식은 상용 절차가 되었다. 유용한 포유동물 속주 세포주의 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주 (현탁 배양에서의 성장을 위해 서브클로닝된 293 또는 293 세포, [Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)]); 새끼 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 차이니즈 햄스터 난소 세포/-DHFR (CHO, [Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)]); 마우스 세르톨리 세포 (TM4, [Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)]); 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부 암종 세포 (HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포 (MDCK, ATCC CCL 34); 베팔로 래트 간 세포 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포 (W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포 (Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포 (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간세포암 세포주 (Hep G2)이다. 일부 바람직한 실시양태에서, 속주 세포는 293F 세포이다.

[0245] 속주 세포는 항-CD3엡실론 항체 생산을 위해 상기 기재된 발현 또는 클로닝 백터로 형질전환되고, 프로모터의 유도, 형질전환체의 선택 또는 목적하는 서열을 코딩하는 유전자의 증폭에 적절하도록 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양된다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 관련 기술분야에 공지된 상동 재조합에 의해 생산될 수 있다.

[0246] 본원에 제공된 항체 또는 항원-결합 단편을 생산하기 위해 사용되는 속주 세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 상업적으로 입수가능한 배지, 예컨대 햄 F10 (시그마(Sigma)), 최소 필수 배지 (MEM) (시그마), RPMI-1640 (시그마) 및 둘베코 변형 이글 배지 (DMEM) (시그마)가 속주 세포의 배양에 적합하다. 추가로, 문헌 [Ham et al., *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes et al., *Anal. Biochem.* 102:255 (1980)], 미국 특허 번호 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 또는 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; 또는 미국 특허 Re. 30,985에 기재된 임의의 배지가 속주 세포를 위한 배양 배지로서 사용될 수 있다. 임의의 이들 배지는 필요에 따라 호르몬 및/또는 다른 성장 인자 (예컨대 인슐린, 트랜스페린 또는 표피 성장 인자), 염 (예컨대 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 포스페이트), 완충제 (예컨대 HEPES), 뉴클레오티드 (예컨대 아데노신 및 티미딘), 항생제 (예컨대 젠타마이신(GENTAMYCIN)TM 약물), 미량 원소 (마이크로몰 범위의 최종 농도로 통상적으로 존재하는 무기 화합물로서 정의됨), 및 글루코스 또는 등가 에너지원으로 보충될 수 있다. 임의의 다른 필수 보충물이 또한 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있을 적절한 농도로 포함될 수 있다. 배양 조건, 예컨대 온도, pH 등은 발현을 위해 선택된 속주 세포와 함께 이전에 사용된 것이고, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 분명할 것이다.

[0247] 재조합 기술을 사용하는 경우, 항체는 세포내에서, 주변세포질 공간에서 생산될 수 있거나, 또는 배지 내로 직접 분비될 수 있다. 항체가 세포내에서 생산되는 경우에, 제1 단계로서 미립자 파편인 속주 세포 또는 용해된 단편을, 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거한다. 문헌 [Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)]은 이. 콜라이의 주변세포질 공간에 분비되는 항체를 단리하는 절차를 기재한다. 간략하게, 세포 페이스트를 아세트산나트륨 (pH 3.5), EDTA 및 페닐메틸су포닐플루오라이드 (PMSF)의 존재 하에 약 30분에 걸쳐 해동시킨다. 세포 파편을 원심분리에 의해 제거할 수 있다. 항체가 배지 내로 분비되는 경우에, 이러한 발현 시스템으로부터의 상청액을 일반적으로 먼저 상업적으로 이용가능한 단백질 농축 필터, 예를 들어 아미콘(Amicon) 또는 밀리포어 펠리콘(Millipore Pellicon) 한외여과 유닛을 사용하여 농축시킨다. 프로테아제 억제제, 예컨대 PMSF를 상기 단계들 중 임의의 단계에 포함시켜 단백질 가수분해를 억제할 수 있고, 항생제를 포함

시켜 우발적인 오염물의 성장을 방지할 수 있다.

[0248] 세포로부터 제조된 항-CD3엡실론 항체 및 그의 항원-결합 단편은, 예를 들어 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, DEAE-셀룰로스 이온 교환 크로마토그래피, 황산암모늄 침전, 염석 및 친화도 크로마토그래피를 사용하여 정제될 수 있으며, 친화도 크로마토그래피가 바람직한 정제 기술이다.

[0249] 특정 실시양태에서, 고체 상에 고정화된 단백질 A가 항체 및 그의 항원-결합 단편의 면역친화도 정제에 사용된다. 친화도 리간드로서의 단백질 A의 적합성은 항체 내에 존재하는 임의의 이뮤노글로불린 Fc 도메인의 종 및 이소형에 좌우된다. 단백질 A는 인간 감마1, 감마2 또는 감마4 중쇄에 기초하는 항체를 정제하는데 사용될 수 있다 (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). 단백질 G는 모든 마우스 이소형 및 인간 감마3에 권장된다 (Guss et al., EMBO J. 5:1567 1575 (1986)). 친화성 리간드가 부착되는 매트릭스는 가장 흔하게는 아가로스이지만, 다른 매트릭스도 이용가능하다. 기계적으로 안정한 매트릭스, 예컨대 제어 세공 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠은 아가로스 사용시에 달성될 수 있는 것보다 더 빠른 유속 및 더 짧은 처리 시간을 가능하게 한다. 항체가 CH3 도메인을 포함하는 경우에, 베이커본드 ABX.TM. 수지 (제이. 티. 베이커(J. T. Baker), 뉴저지주 필립스버그)가 정제에 유용하다. 또한 회수될 항체에 따라 다른 단백질 정제 기술, 예컨대 이온-교환 칼럼 상의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상의 크로마토그래피, 해파린 세파로스 (SEPHAROSE)™ 상의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지 (예컨대 폴리아스파르트산 칼럼) 상의 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE 및 황산암모늄 침전이 이용가능하다.

[0250] 임의의 예비 정제 단계(들) 후에, 관심 항체 및 오염물을 포함하는 혼합물은 바람직하게는 낮은 염 농도 (예를 들어 약 0-0.25M 염)에서 수행되는, pH 약 2.5-4.5의 용리 완충제를 사용하는 낮은 pH 소수성 상호작용 크로마토그래피에 적용될 수 있다.

제약 조성물

[0252] 본 개시내용은 항-CD3엡실론 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 1종 이상의 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 추가로 제공한다.

[0253] 본원에 개시된 제약 조성물에 사용하기 위한 제약상 허용되는 담체는, 예를 들어 제약상 허용되는 액체, 겔, 또는 고체 담체, 수성 비히클, 비수성 비히클, 항균제, 등장화제, 완충제, 항산화제, 마취제, 혼탁화제/분산제, 격리제 또는 퀸레이트화제, 희석제, 아주반트, 부형제, 또는 비-독성 보조 물질, 관련 기술분야에 공지된 다른 성분, 또는 그의 다양한 조합을 포함할 수 있다.

[0254] 적합한 성분은, 예를 들어 항산화제, 충전제, 결합제, 붕해제, 완충제, 보존제, 윤활제, 향미제, 중점제, 착색제, 유화제 또는 안정화제, 예컨대 당 및 시클로덱스트린을 포함할 수 있다. 적합한 항산화제는, 예를 들어 메티오닌, 아스코르브산, EDTA, 티오황산나트륨, 백금, 카탈라제, 시트르산, 시스테인, 티오클리세롤, 티오클리콜산, 티오소르비톨, 부틸화 히드록시아니솔, 부틸화 히드록시톨루엔 및/또는 프로필 갈레이트를 포함할 수 있다. 본원에 개시된 바와 같이, 본원에 개시된 항체 또는 항원-결합 단편 및 접합체를 포함하는 조성물 중에 1종 이상의 항산화제, 예컨대 메티오닌을 포함시키는 것은 항체 또는 항원-결합 단편의 산화를 감소시킨다. 이러한 산화의 감소는 결합 친화도의 손실을 방지하거나 감소시켜, 항체 안정성을 개선시키고 보관-수명을 최대화시킨다. 따라서, 특정 실시양태에서 본원에 개시된 바와 같은 1종 이상의 항체 또는 항원-결합 단편 및 1종 이상의 항산화제, 예컨대 메티오닌을 포함하는 조성물이 제공된다. 항체 또는 항원-결합 단편을 1종 이상의 항산화제, 예컨대 메티오닌과 혼합함으로써, 본원에 제공된 바와 같은 항체 또는 항원-결합 단편의 산화를 방지하고/거나, 보관-수명을 연장시키고/거나, 효능을 개선시키는 방법이 추가로 제공된다.

[0255] 추가로 예시하기 위해, 제약상 허용되는 담체는, 예를 들어 수성 비히클, 예컨대 염화나트륨 주사, 링거 주사, 등장성 텍스트로스 주사, 멸균수 주사, 또는 텍스트로스 및 락테이트화 링거 주사, 비수성 비히클, 예컨대 식물성 기원의 고정 오일, 목화씨 오일, 옥수수 오일, 참깨 오일, 또는 땅콩 오일, 정박테리아 또는 정진균 농도의 향미생물제, 등장화제, 예컨대 염화나트륨 또는 텍스트로스, 완충제, 예컨대 포스페이트 또는 시트레이트 완충제, 항산화제, 예컨대 중황산나트륨, 국부 마취제, 예컨대 프로카인 히드로클로라이드, 혼탁화제 및 분산제, 예컨대 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스 또는 폴리비닐피롤리돈, 유화제, 예컨대 폴리소르베이트 80 (TWEEN-80), 격리제 또는 퀸레이트화제, 예컨대 EDTA (에틸렌디아민테트라아세트산) 또는 EGTA (에틸렌 글리콜 테트라아세트산), 에틸 알콜, 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 수산화나트륨, 염산, 시트르산, 또는 락트산을 포함할 수 있다. 담체로서 이용되는 향미생물제는 페놀 또는 크레졸, 수은, 벤질 알콜, 클로로부탄올, 메틸 및 프로필 p-히드록시벤조산 에스테르, 티메로살, 벤즈알코늄 클로라이드 및 벤즈에토

늄 클로라이드를 포함하는 다중-용량 용기 내의 제약 조성물에 첨가될 수 있다. 적합한 부형제는, 예를 들어 물, 염수, 텍스트로스, 글리세롤 또는 에탄올을 포함할 수 있다. 적합한 비-독성 보조 물질은, 예를 들어 습윤제 또는 유화제, pH 완충제, 안정화제, 용해도 증진제, 또는 작용제, 예컨대 아세트산나트륨, 소르비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민 올레이트, 또는 시클로덱스트린을 포함할 수 있다.

[0256] 제약 조성물은 액체 용액, 혼탁액, 에멀젼, 환제, 캡슐, 정제, 지속 방출 제제 또는 분말일 수 있다. 경구 제제는 표준 담체, 예컨대 제약 등급의 만니톨, 락토스, 전분, 스테아르산마그네슘, 폴리비닐 피롤리돈, 사카린나트륨, 셀룰로스, 탄산마그네슘 등을 포함할 수 있다.

[0257] 특정 실시양태에서, 제약 조성물을 주사가능한 조성물로 제제화될 수 있다. 주사가능한 제약 조성물은 임의의 통상적인 형태, 예컨대 예를 들어 액체 용액, 혼탁액, 에멀젼, 또는 액체 용액, 혼탁액 또는 에멀젼을 생성하는데 적합한 고체 형태로 제조될 수 있다. 주사용 제제는 즉시 주사용 멸균 및/또는 비-발열성 용액, 멸균 건조 가용성 생성물, 예컨대 사용 직전에 용매와 즉시 조합되는 동결건조 분말, 예컨대 피하 정제, 즉시 주사용 멸균 혼탁액, 사용 직전에 비히클과 즉시 조합되는 멸균 건조 불용성 생성물, 및 멸균 및/또는 비-발열성 에멀젼을 포함할 수 있다. 용액은 수성 또는 비수성일 수 있다.

[0258] 특정 실시양태에서, 단위-용량 비경구 제제는 앰플, 바이알 또는 바늘을 갖는 시린지에 포장된다. 비경구 투여를 위한 모든 제제는 관련 기술분야에 공지되고 실시되는 바와 같이 멸균 및 비발열성이어야 한다.

[0259] 특정 실시양태에서, 멸균 동결건조 분말은 적합한 용매 중에 본원에 개시된 바와 같은 항체 또는 항원-결합 단편을 용해시킴으로써 제조된다. 용매는 분말 또는 분말로부터 제조된 재구성된 용액의 안정성 또는 다른 약리학적 요소를 개선시키는 부형제를 함유할 수 있다. 사용될 수 있는 부형제는 물, 텍스트로스, 소르비탈, 프룩토스, 옥수수 시럽, 크실리톨, 글리세린, 글루코스, 수크로스 또는 다른 적합한 작용제를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 용매는 완충제, 예컨대 시트레이트, 인산나트륨 또는 인산칼륨, 또는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 다른 이러한 완충제, 한 실시양태에서는 거의 중성 pH의 완충제를 함유할 수 있다. 후속하여 용액의 멸균 여파, 이어서 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 표준 조건 하에서의 동결건조가 바람직한 제제를 제공한다. 한 실시양태에서, 생성된 용액은 동결건조를 위해 바이알 내로 배분될 것이다. 각각의 바이알은 단일 투여량 또는 다중 투여량의 항-CD3엡실론 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 그의 조성물을 함유할 수 있다. 정확한 샘플 채취 및 정확한 투여를 용이하게 하기 위해 용량 또는 용량 세트에 필요한 것보다 조금 더 많은 양으로 (예를 들어 약 10%) 바이알을 과충전하는 것이 허용가능하다. 동결건조 분말은 적절한 조건, 예컨대 약 4°C 내지 실온 하에 저장될 수 있다.

[0260] 동결건조 분말을 주사용수로 재구성하여 비경구 투여에 사용하기 위한 제제를 제공한다. 한 실시양태에서, 멸균 및/또는 비-발열성 물 또는 다른 액체로 재구성하기 위해 적합한 담체가 동결건조 분말에 첨가된다. 정확한 양은 주어지는 선택 요법에 좌우되고, 실험적으로 결정될 수 있다.

0261] 사용 방법

[0262] 본 개시내용은 또한 치료 유효량의 본원에 제공된 바와 같은 항체 또는 항원-결합 단편을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하여 CD3-관련 병태 또는 장애를 치료 또는 예방하는 것을 포함하는 치료 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, CD3-관련 병태 또는 장애는 암, 자가면역 질환, 염증성 질환 또는 감염성 질환이다.

[0263] 암의 예는 비소세포 폐암 (편평/비편평), 소세포 폐암, 신세포암, 결장직장암, 결장암, 난소암, 유방암 (기저 유방 암종, 관 암종 및 소엽성 유방 암종 포함), 췌장암, 위 암종, 방광암, 식도암, 중피종, 흑색종, 두경부암, 갑상선암, 육종, 전립선암, 교모세포종, 자궁경부암, 흉선 암종, 흑색종, 골수종, 균상 식육종, 메르켈 세포암, 간세포성 암종 (HCC), 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골원성 육종, 및 다른 육종, 활막종, 중피종, 유잉 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 텁프성 악성종양, 기저 세포 암종, 선암종, 한선 암종, 수질성 갑상선 암종, 유두상 갑상선 암종, 크롬친화세포종 피지선 암종, 유두상 암종, 유두상 선암종, 수질성 암종, 기관지원성 암종, 간세포암, 담즙 관 암종, 융모막암종, 월름스 종양, 자궁경부암, 고환 종양, 정상피종, 전형적 호지킨 텁프종 (CHL), 원발성 종격 대 B-세포 텁프종, T-세포/조직구-풍부 B-세포 텁프종, 급성 텁프구성 백혈병, 급성 골수구성 백혈병, 급성 골수 백혈병, 만성 골수구성 (과립구성) 백혈병, 만성 골수 백혈병, 만성 텁프구성 백혈병, 진성 다혈구혈증, 비만 세포 유래 종양, EBV-양성 및 -음성 PTLD, 및 미만성 대 B-세포 텁프종 (DLBCL), 형질모구성 텁프종, 결절외 NK/T-세포 텁프종, 비인두 암종, HHV8-연관 원발성 삼출 텁프종, 비-호지킨 텁프종, 다발성 골수종, 발렌스트롬 마크로불린혈증, 중쇄 질환, 골수이형성 증후군, 모발상 세포 백혈병 및 골수이형성 증, 원발성 CNS 텁프종, 척수축 종양, 뇌간 신경교종, 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 상의세포종, 송과

체종, 혈관모세포종, 청신경종, 펩지교종, 수막종, 흑색종, 신경모세포종 및 망막모세포종을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0264] 자가면역 질환은 후천성 면역결핍 증후군 (자가면역 요인을 갖는 바이러스성 질환인 AIDS), 원형 탈모증, 강직성 척추염, 항인지질 증후군, 자가면역 애디슨병, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 간염, 자가면역 내이 질환 (AIED), 자가면역 림프증식성 증후군 (ALPS), 자가면역 혈소판감소성 자반증 (ATP), 베제트병, 심근병증, 복강스프루-포진성 피부염; 만성 피로 면역 기능장애 증후군 (CFIDS), 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증 (CIPD), 반흔성 유천포창, 저온 응집소 질환, crest 증후군, 크론병, 데고스병, 소아-피부근염, 원관상 루푸스, 본태성 혼합 한랭글로불린혈증, 섬유근육통-섬유근염, 그레이브스병, 길랑-바레 증후군, 하시모토 갑상선염, 특발성 폐섬유증, 특발성 혈소판감소증 자반증 (ITP), IgA 신병증, 인슐린-의존성 당뇨병, 소아 만성 관절염 (스틸병), 소아 류마티스 관절염, 메니에르병, 혼합 결합 조직 질환, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 악성 빈혈, 결절성 다발동맥염, 다발연골염, 다선성 증후군, 류마티스성 다발근육통, 다발근염 및 피부근염, 원발성 무감마글로불린혈증, 원발성 담즙성 간경변증, 건선, 건선성 관절염, 레이노 현상, 라이터 증후군, 류마티스성 열, 류마티스 관절염, 사르코이드증, 경피증 (진행성 전신 경화증 (PSS), 또한 전신 경화증 (SS)으로도 공지됨), 쇼그렌 증후군, 강직-사람 증후군, 전신 홍반성 루푸스, 다카야스 동맥염, 측두 동맥염/거대 세포 동맥염, 궤양성 결장염, 포도막염, 백반증 및 베게너 육아종증을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 염증성 장애는, 예를 들어 만성 및 급성 염증성 장애를 포함한다. 염증성 장애의 예는 알츠하이머병, 친식, 아토피성 알레르기, 알레르기, 아데롬 성동맥경화증, 기관지 친식, 습진, 사구체신염, 이식편 대 숙주 질환, 용혈성 빈혈, 골관절염, 폐혈증, 콜중, 조직 및 기관 이식, 혈관염, 당뇨병성 망막병증 및 인공호흡기 유발 폐 손상을 포함한다. 일부 실시양태에서, CD3 연관 병태는 염증성 질환, 예컨대 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 장 점막 염증, 결장염과 연관된 소모성 질환, 다발성 경화증, 바이러스 감염, 류마티스 관절염, 골관절염, 크론병, 및 염증성 장 질환, 건선, 전신 경피증, 자가면역 당뇨병 등이다.

[0265] 감염성 질환은 진균 감염, 기생충/원충 감염 또는 만성 바이러스 감염, 예를 들어 말라리아, 콕시디오이데스진균증 임미티스, 히스토플라스마증, 조갑진균증, 아스페르길루스증, 블라스토미세스증, 칸디다증 알비칸스, 파라콕시디오이데스진균증, 미포자충증, 아칸트아메바 각막염, 아메바증, 회충증, 바베시아증, 발란티디움증, 바일리사스카리스증, 샤크스병, 간흡충증, 코클리오미아아, 크립토스포리디움증, 열두조충증, 메디나충증, 에키노코쿠스증, 상피증, 요충증, 간질증, 비대흡충증, 사상충증, 편모충증, 악구충증, 왜소조충증, 포자충증, 카타야마열, 리슈마니아증, 라임병, 요코가와흡충증, 구더기증, 회선사상충증, 이감염증, 움, 주혈흡충증, 수면병, 분선충증, 조충증, 특소카라증, 특소플라스마증, 선모충증, 편충증, 트리파노소마증, 연충 감염, B형 간염 (HBV), C형 간염 (HCV), 포진 바이러스, 앱스타인-바르 바이러스, HIV, 시토메갈로바이러스, 단순 포진 바이러스 유형 I, 단순 포진 바이러스 유형 II, 인간 유두종 바이러스, 아데노바이러스, 인간 면역결핍 바이러스 I, 인간 면역결핍 바이러스 II, 유행성 카포시 웨스트 육종 연관 포진 바이러스, 맑은 고리 바이러스 (토르크테노바이러스), 인간 T 림프향성 바이러스 I, 인간 T 림프향성 바이러스 II, 수두 조스터, JC 바이러스 또는 BK 바이러스의 감염을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0266] 또 다른 측면에서, 면역 반응의 상향조절로부터 이익을 얻을 병태의 치료를 필요로 하는 대상체에게 치료 유효량의 본원에 제공된 바와 같은 항체 또는 항원-결합 단편을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 면역 반응의 상향조절로부터 이익을 얻을 병태를 치료하는 방법이 제공된다.

[0267] 본원에 제공된 바와 같은 항체 또는 항원-결합 단편의 치료 유효량은 관련 기술분야에 공지된 다양한 인자, 예컨대 예를 들어 대상체의 체중, 연령, 과거 병력, 현재 의약, 건강 상태 및 교차-반응, 알레르기, 과민증 및 유해 부작용의 가능성, 뿐만 아니라 투여 경로 및 질환 별달 정도에 좌우될 것이다. 투여량은 이들 및 다른 상황 또는 요건에 의해 나타난 바와 같이 관련 기술분야의 통상의 기술자 (예를 들어 의사 또는 수의사)에 의해 비례적으로 감소 또는 증가될 수 있다.

[0268] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 바와 같은 항체 또는 항원-결합 단편은 약 0.01 mg/kg 내지 약 100 mg/kg (예를 들어 약 0.01 mg/kg, 약 0.5 mg/kg, 약 1 mg/kg, 약 2 mg/kg, 약 3 mg/kg, 약 5 mg/kg, 약 10 mg/kg, 약 15 mg/kg, 약 20 mg/kg, 약 25 mg/kg, 약 30 mg/kg, 약 35 mg/kg, 약 40 mg/kg, 약 45 mg/kg, 약 50 mg/kg, 약 55 mg/kg, 약 60 mg/kg, 약 65 mg/kg, 약 70 mg/kg, 약 75 mg/kg, 약 80 mg/kg, 약 85 mg/kg, 약 90 mg/kg, 약 95 mg/kg, 또는 약 100 mg/kg)의 치료 유효 용량으로 투여될 수 있다. 이들 중 특정 실시양태에서 항체 또는 항원-결합 단편은 약 50 mg/kg 이하의 투여량으로 투여되고, 이들 중 특정 실시양태에서 투여량은 10 mg/kg 이하, 5 mg/kg 이하, 3 mg/kg 이하, 1 mg/kg 이하, 0.5 mg/kg 이하 또는 0.1 mg/kg 이하이다. 특정 실시양태에서, 투여 투여량은 치료 과정에 걸쳐 변화될 수 있다. 예를 들어, 특정 실시양태에서 초기 투여 투여

량은 후속 투여 투여량보다 더 많을 수 있다. 특정 실시양태에서, 투여 투여량은 대상체의 반응에 따라 치료 과정에 걸쳐 달라질 수 있다.

[0269] 투여 요법은 최적의 목적하는 반응 (예를 들어 치료 반응)을 제공하기 위해 조정될 수 있다. 예를 들어, 단일 용량이 투여될 수 있거나 또는 여러 분할 용량이 시간에 걸쳐 투여될 수 있다.

[0270] 본원에 개시된 항체 및 항원-결합 단편은 관련 기술분야에 공지된 임의의 경로, 예컨대 예를 들어 비경구 (예를 들어 피하, 복강내, 정맥내, 예컨대 정맥내 주입, 근육내 또는 피내 주사) 또는 비-비경구 (예를 들어 경구, 비강내, 안내, 설하, 직장 또는 국소) 경로에 의해 투여될 수 있다.

[0271] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체 또는 항원-결합 단편은 단독으로 또는 1종 이상의 추가의 치료 수단 또는 작용제와 조합되어 투여될 수 있다. 예를 들어, 본원에 개시된 항체 또는 항원-결합 단편은 또 다른 치료제, 예를 들어 화학요법제 또는 항암 약물과 조합되어 투여될 수 있다.

[0272] 이들 중 특정 실시양태에서, 1종 이상의 추가의 치료제와 조합되어 투여되는 본원에 개시된 바와 같은 항체 또는 항원-결합 단편은 1종 이상의 추가의 치료제와 동시에 투여될 수 있고, 이들 중 특정 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편 및 추가의 치료제(들)는 동일한 제약 조성물의 일부로서 투여될 수 있다. 그러나, 또 다른 치료제와 "조합되어" 투여되는 항체 또는 항원-결합 단편은 상기 치료제와 동시에 투여되거나 동일한 조성물 중에서 투여될 필요는 없다. 또 다른 작용제 전에 또는 후에 투여되는 항체 또는 항원-결합 단편은, 심지어 상기 항체 또는 항원-결합 단편 및 제2 작용제가 상이한 경로로 투여되더라도, 상기 어구가 본원에 사용된 바와 같이 상기 작용제와 "조합되어" 투여되는 것으로 고려된다. 가능한 경우, 본원에 개시된 항체 또는 항원-결합 단편과 조합되어 투여되는 추가의 치료제는 추가의 치료제의 제품 정보 시트에 열거된 스케줄에 따라 또는 문헌 [Physicians' Desk Reference 2003 (Physicians' Desk Reference, 57th Ed; Medical Economics Company; ISBN: 1563634457; 57th edition (November 2002))] 또는 관련 기술분야에 공지된 프로토콜에 따라 투여된다.

[0273] 본 개시내용은 항-CD3엡실론 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 사용하는 방법을 추가로 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 CD3엡실론-발현 T 세포를 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 접촉시키는 것을 포함하는, 생체내에서 또는 시험관내에서 CD3엡실론-발현 T 세포를 활성화시키는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 CD3엡실론-발현 세포를 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 노출시키는 것을 포함하는, CD3엡실론-발현 세포에서 CD3 활성을 조정하는 방법을 제공한다.

[0274] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 CD3엡실론-발현 T 세포를 본원에 제공된 이중특이적 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 접촉시키는 것을 포함하며, 여기서 이중특이적 항체 또는 항원-결합 단편은 CD3엡실론-발현 T 세포 및 제2 항원 둘 다에 특이적으로 결합하여 이들 둘 다를 매우 근접하게 가져올 수 있는 것인, CD3엡실론-발현 T 세포에 의한 제2 항원의 생체내 또는 시험관내 프로세싱을 촉진하는 방법을 추가로 제공한다.

[0275] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 샘플을 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 접촉시키는 단계 및 샘플에서 CD3엡실론의 존재 또는 양을 결정하는 단계를 포함하는, 샘플에서 CD3엡실론의 존재 또는 양을 검출하는 방법을 제공한다.

[0276] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 a) 대상체로부터 샘플을 수득하는 단계; b) 대상체로부터 수득된 샘플을 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 접촉시키는 단계; c) 샘플에서 CD3엡실론의 존재 또는 양을 결정하는 단계; 및 d) CD3엡실론의 존재를 대상체에서의 CD3 관련 질환 또는 병태와 상호연관시키는 단계를 포함하는, 대상체에서 CD3 관련 질환 또는 병태를 진단하는 방법을 제공한다.

[0277] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 또한 대상체에서 CD3 관련 질환 또는 병태를 치료하기 위한 의약의 제조에서의, CD3 관련 질환 또는 병태를 진단하기 위한 진단 시약의 제조에서의 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 용도를 제공한다.

[0278] 하기 실시예는 청구된 발명을 더 잘 예시하기 위해 제공되고, 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 해석되지는 않는다. 하기 기재된 모든 특정 조성물, 물질 및 방법은 전체적으로 또는 부분적으로 본 발명의 범주 내에 속한다. 이들 특정 조성물, 물질 및 방법은 본 발명을 제한하는 것으로 의도되는 것이 아니라, 단지 본 발명의 범주 내에 속하는 특정 실시양태를 예시하기 위한 것으로 의도된다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 발명적 능력을 행사하지 않고 본 발명의 범주를 벗어나지 않으면서 등가의 조성물, 물질 및 방법을 개발할 수 있다. 본원에 기재된 절차는 본 발명의 한계 내에 여전히 유지되면서 많은 변화가 이루어질 수 있다는 것이 이해될 것이다. 이러한 변화가 본 발명의 범주 내에 포함되는 것이 본 발명자들의 의도이다.

[0279] 실시예 1: 하이브리도마 항체의 생성

[0280] 1.1 동물 면역화:

[0281] 동물 면역화를 위한 면역원으로서 His 태그를 갖는 인간 CD3 앱실론 (CD3앱실론) (카탈로그 번호: 10977-H08H; 시노 바이올로지칼 인크.(Sino Biological Inc., 중국 베이징), 인간 CD3 감마 (CD3감마) (카탈로그 번호: ab140563; 압캠 상하이 차이나(Abcam Shanghai China)) 및 His 태그를 갖는 인간 CD3 텔타 (CD3텔타) (카탈로그 번호: 10977-H08H; 시노 바이올로지칼 인크., 중국 베이징)를 포함한 인간 CD3의 재조합 세포와 도메인 (ECD) 단백질을 사용하였다. Balb/c 마우스를 상하이 SLAC 래보러토리 앤니멀 캄파니, 리미티드(Shanghai SLAC laboratory animal Co, Ltd.)로부터 구입하였고, IACUC 승인된 동물 시설에 수용하였다. 마우스를 격주로 피하 및 발바닥 주사에 의해, CD3앱실론, CD3감마 및 CD3텔타의 ECD 단백질 혼합물로 면역화시키거나 또는 타이터액스 아주반트와 함께 혼합된, 각각의 마우스에 대한 7×10^6 개의 새로 단리된 인간 T-세포로 면역화시켰다.

[0282] 면역화 전 및 후 마우스로부터 혈액을 수집하고, 표적 단백질에 대한 혈청 역가를 ELISA에 의해 모니터링하였다.

[0283] 1.2 하이브리도마 생성

[0284] 세포 융합을 위해 가장 높은 혈청 역가를 갖는 마우스를 선택하였다. 마우스 비장 및 림프절로부터의 B 세포를 일반적인 전기-융합 절차에 따른 전기-융합에 의해 SP2/0 골수종 세포와 융합시켰다. 세포 융합 후, 세포를 20% FBS 및 1% HAT 선택적 시약이 보충된 DMEM 배지를 갖는 96-웰 플레이트에 플레이팅하였다.

[0285] 하이브리도마 배지의 상청액에 존재하는 항체를 유동 세포측정법 검정 (FACS)에 의해 CD3-발현 Jurkat 세포를 사용하여 스크리닝하고, FACS에 의해 CD3-음성 MOLT-4 T 세포를 사용하여 카운터-스크리닝하였다. Jurkat 세포에 대한 결합 활성을 갖지만 MOLT-4 세포에 교차 결합하지 않는 하이브리도마 세포를 양성 하이브리도마 세포주로서 수집한 다음, 반-고체 배지 접근법을 사용하여 서브클로닝 단계로 진행하였다.

[0286] 단일 콜로니를 10% FBS가 보충된 DMEM 배지를 갖는 96-웰 플레이트 내로 2~3일 동안 골라내고, 유동 세포측정법 검정 (FACS)에 의해 CD3-발현 Jurkat 세포를 사용하여 CD3의 표적에 대해 재-스크리닝하고, FACS 검정에 의해 CD3-음성 MOLT-4 T 세포를 사용하여 카운터-스크리닝하였다.

[0287] 1.3 하이브리도마 서열분석

[0288] 하이브리도마 세포로부터 RNA를 추출하고, 5'-RACE 키트를 사용하여 cDNA를 증폭시키고, 이어서 3'-축중성 프라이머를 사용하여 PCR 증폭시켰다. 이어서 PCR 생성물을 pMD18-T 벡터 내로 클로닝하고, 형질전환시키고, 증폭시키고, 서열분석하였다.

[0289] 8종의 마우스 모노클로날 항체를 생성하였으며, 이의 CDR 서열은 상기 표 1에 제시된다.

[0290] 실시예 2: 인간화 항체의 생성

[0291] 2.1 IgG 전환 및 인간화

[0292] 뮤린-유래 mAb로부터의 키메라 항체의 생성: WBP3311_2.166.48 및 WBP3311_2.306.4 및 WBP3312_3.179.16 VH 및 VL 유전자를 적절한 제한 부위를 함유하는 클로닝 프라이머로 재-증폭시키고, 옥시 바이올로직스(WuXi Biologics) 소유의 발현 벡터 내로 클로닝하여 인간 IgG1의 불변 영역을 갖는 키메라 항체의 상응하는 클론을 생성하였다.

[0293] 인간화 및 인간화 V-유전자의 합성: "최적 피트" 접근법을 사용하여 WBP3311_2.166.48 및 WBP3311_2.306.4 경쇄 및 중쇄를 인간화하였다. 경쇄의 경우, 상응하는 V-유전자의 아미노산 서열을 사내 인간 배선 V-유전자 데이터베이스에 대해 블라스트 검색하였다. 카바트 CDR 정의를 사용하여 상위 히트의 인간 CDR 서열을 마우스 CDR 서열로 대체함으로써 인간화 VL-유전자의 서열을 유도하였다. 카바트 CDR1을 N-말단에서 5개의 아미노산만큼 연장시킨 연장된 CDR을 사용하여 프레임워크를 정의하였다. 마우스 프레임워크를 인간 배선 이谬노글로불린 데이터베이스에 대해 블라스트 검색함으로써 각각의 중쇄 및 경쇄에 대해 다중 인간화 서열을 생성하였다. 상이한 FR 조합물을 생성하고, 결합 친화도에 대해 분석하고, 상위 3개의 히트를 사용하여 인간화 VH-유전자의 서열을 유도하였다. 인간화 유전자를 역-번역하고, 포유동물 발현을 위해 코돈-최적화하고, 진아트 맞춤 유전자 합성(GeneArt Costum Gene Synthesis) (라이프 테크놀로지스(Life Technologies))에 의해 합성하였다. 합성 유전자를 IgG 발현 벡터 내로 재-클로닝하고, 발현시키고, 정제하였다. 2종의 인간화 항체 및 그의 모 마우스

항체의 FR을 상기 표 2에 제시하였다.

[0294] 키메라 및 인간화 항체의 일시적 발현 및 정제: 상기 기재된 키메라 및 인간화 항체를 옥시 바이올로직스 소유의 발현 벡터 내로 구축하고, 293F 세포로부터 발현시켰다. 상응하는 항체를 함유하는 배양 상청액을 수거하고, 단백질 A 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다.

[0295] 실시예 3: 시험판내 특징화

[0296] 3.1 ELISA 및 FACS에 의한 항체 결합

[0297] 하기 기재된 ELISA 및 FACS에 사용된 항원, 항체 및 세포가 표 3에 열거된다.

[0298] 표 3. ELISA 및 FACS에서 사용된 항원, 항체 및 세포

물질	회사	카탈로그 번호
인간 CD3 앱실론 (CD3앱실론) 단백질 (His 태그)	시노 바이올로지칼 인크.	10977-H08H
인간 CD3 엘타 (CD3엘타) 단백질 (His 태그)	시노 바이올로지칼 인크.	10981-H08H
인간 CD3 감마 (CD3감마) 단백질	압캡	ab140563
시노몰구스 원송이 CD3앱실론 단백질	아크로	CDE-C5226
시노 PBMC	파마레거시 래보리토리즈 (상하이) 캄파니	
마우스 항 인간 CD3앱실론 모노클로날 항체	시노 바이올로지칼 인크. (클론 번호: 1A7E5G5)	10977-MM03
마우스 항-인간 CD3엘타 모노클로날 항체	시노 바이올로지칼 인크.	10981-MM08
마우스 항-인간 CD3감마 모노클로날 항체	산타 크루즈 바이오테크놀로지, 인크	sc-55563
벤치마크 항체 OKT3	압캡	ab86883
Jurkat 세포	ATCC	TIB-152
HUT78 세포	ATCC	ECACC-880401901
MOLT-4 세포	ATCC	CRL-1582
반-고체 배지	스템셀즈	03814

[0299]

[0300] ELISA 및 EC₅₀에 의한 단백질에 대한 항체의 결합: 인간 CD3앱실론, CD3엘타 및 CD3감마 단백질을 각각 96-웰 플레이트에 사전-코팅하였다. 이를 3종의 상이한 CD3 단백질 세포와 도메인에 대한 다양한 농도의 mAb의 결합 친화도를 상응하는 HRP 표지된 2차 항체에 의해 검출하였다. 결합 EC₅₀ (반수 최대 결합에 도달할 때의 시험 항체의 농도)을 그래프패드 프리즘 소프트웨어 방정식: 비선형 회귀 (곡선 피트)-log (효능제) vs. 반응-가변 기울기를 사용하여 분석하였다.

[0301] ELISA에 의한 인간 CD3앱실론 단백질에 대한 항체의 특이적 결합: 8종의 마우스 mAb는 CD3감마 및 CD3엘타에 대한 결합 없이 인간 CD3앱실론에 대한 고도로 특이적인 결합 활성을 나타냈으며, 데이터를 표 5에 제시하였다.

[0302] 표 5. 인간 CD3엡실론 서브-유닛 단백질에 대한 특이적 결합

mAb	ELISA (A450)		
	인간 CD3엡실론 (PC: 1.6; NC: 0.05)	인간 CD3감마 (PC: 1.21; NC: 0.05)	인간 CD3델타 (PC: 1.9; NC: 0.05)
W3311-2.166.48	1.64	0.05	0.05
W3311-2.306.4	1.46	0.06	0.05
W3311-2.383.47	1.61	0.05	0.05
W3311-2.400.5	1.57	0.05	0.05
W3311-2.482.5	1.33	0.06	0.05
W3311-2.488.33	1.70	0.06	0.05
W3311-2.615.8	1.55	0.05	0.05
W3311-2.844.8	1.54	0.07	0.06

[0303]

[0304] FACS 및 EC₅₀에 의한 항체의 세포 결합: 다양한 농도의 시험 mAb를 Jurkat 세포에 첨가한 다음, 세포 표면에 대한 mAb의 결합 활성을 2차 항체-FITC에 의해 검출하였다. OKT3을 양성 대조군으로서 사용하였다. 염색된 세포를 비디 바이오사이언시스(BD Biosciences) FACS칸토 II 기기 및 플로우 조 버전 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 결합 EC₅₀을 그래프패드 프리즘 소프트웨어 방정식: 비선형 회귀 (곡선 피트)-log (효능제) vs. 반응-가변 기울기를 사용하여 계산하였다.

[0305]

T 세포 표면 상의 인간 CD3 수용체에 대한 특이적 결합: 8종의 mAb는 표 6에서 CD3-음성 세포 (MOTL-4 세포 및 293F 세포)에 대한 결합 없이 인간 CD3 발현 세포 (Jurkat 세포)에 대한 고도로 특이적인 결합 활성을 나타냈다.

[0306]

표 6. FACS에 의한 인간 CD3 수용체 교차 다중 세포주에 대한 특이적 결합

mAb	MFI (FACS) (JurkatB10: 3145~4045)	MFI (FACS) (MOLT-4: 22.7~27.3)	MFI (FACS) (293F: 22.6~24.6)
W3311-2.166.48	2139	42.5	24.9
W3311-2.306.4	3365	53.5	29.1
W3311-2.383.47	2132	44.5	29.8
W3311-2.400.5	2741	54.5	25.1
W3311-2.482.5	2390	54.8	25.0
W3311-2.488.33	2266	58.4	30.2
W3311-2.615.8	2215	57.2	25.7
W3311-2.844.8	984	42.5	22.7

[0307]

3.2 ELISA 및 FACS에 의한 항체의 교차 종 표적 단백질 결합

[0308]

상이한 종으로부터의 CD3에 대한 시험 항체의 결합 친화도를 분석하였다. 인간, 원숭이, 래트 및 마우스 CD3 참조 서열의 상동성이 하기 제시된다.

[0310] 표 4. 인간, 원숭이, 래트 및 마우스 CD3 도메인 서열 상동성

종	CD3엡실론 (%)	CD3델타 (%)	CD3감마 (%)
인간	100 (NP_000724)	100 (NP_000723)	100 (NP_000064)
마카카 파시콜라리스 (원숭이)	83 (NP_001270544)	94 (NP_001274617)	81 (NP_001270839)
마카카 물라타 (원숭이)	84 (XP_001097204)	94 (NP_001097302)	82 (NP_001253854)
마우스	59 (NP_031674)	64 (NP_038515)	70 (AAA37400)
라투스 노르베기쿠스 (래트)	57 (NP_001101610)	69 (NP_037301)	71 (NP_001071114)

[0311]

[0312] ELISA에 의한 시노몰구스 원숭이 CD3엡실론 및 마우스 CD3엡실론에 대한 항체의 교차-결합: 다양한 농도의 시험 항체, 양성 및 음성 대조군을 시노몰구스 원숭이 CD3엡실론 단백질 및 마우스 CD3엡실론으로 사전-코팅된 96-웰 플레이트에 첨가하였다. 시노몰구스 원숭이 CD3엡실론 단백질 및 마우스 CD3엡실론 단백질에 대한 항체의 결합을 상응하는 HRP 표지된 2차 항체 (BETHYL, A90-231P)에 의해 검출하였다. 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 EC₅₀을 계산하였다.

[0313]

데이터는 모든 8종의 mAb가 시노몰구스 원숭이 CD3엡실론에 대한 강력한 교차-결합 활성을 나타냈지만 마우스 CD3엡실론에 대한 결합은 나타내지 않았다는 것을 제시하였다. 양성 대조군 OKT3은 시노몰구스 원숭이 CD3엡실론이나 마우스 CD3엡실론 모두에 대해 교차-결합 활성을 나타내지 않았다 (표 7).

[0314]

표 7. 시노몰구스 원숭이 CD3엡실론 및 마우스 CD3엡실론에 대한 교차-결합

mAb	ELISA A450		
	인간 CD3엡실론	시노-원숭이 CD3엡실론	마우스 CD3엡실론
음성 대조군	0.046	0.046	0.179
OKT3	0.048	0.052	0.24
W3311-2.166.48	2.761	2.808	0.446
W3311-2.306.4	2.909	2.822	0.711
W3311-2.383.47	2.786	2.756	0.666
W3311-2.400.5	2.828	2.794	0.709
W3311-2.482.5	2.953	2.874	0.61
W3311-2.488.33	2.914	2.831	0.607
W3311-2.615.8	2.824	2.713	0.471
W3311-2.844.8	2.923	2.75	0.6

[0315]

[0316] FACS에 의한 시노몰구스 원숭이 CD3엡실론에 대한 항체의 교차-결합: 피콜-파크 플러스 구배 원심분리 및 100g 원심분리 단계를 사용하여 혈소판을 제거함으로써 건강한 시노 전혈로부터 시노 PBMC를 단리하였다. PBMC를 즉시 사용할 때까지 완전 RPMI-1640 배지에서 배양하였다. 다양한 농도의 시험 항체를 시노 PBMC에 첨가한 다음, 세포 표면에 대한 항체의 결합 활성을 2차 항체-FITC (잭슨(Jackson), 115-095-008)에 의해 검출하였다. 염색된 세포를 비디 바이오사이언시스 FACS칸토 II 및 플로우조 버전 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 그래프패드 프리즘 소프트웨어 방정식: 비선형 회귀 (곡선 피트)를 사용하여 결합 EC₅₀을 계산하였다.

[0317] FACS에 의한 항체의 에피토프 비닝: 다양한 농도의 시험 항체를 각각 특정 양의 W3311-2.383.47의 비오티닐화 항체와 혼합하였다. 이어서 혼합물을 96-웰 플레이트 내의 CD3-발현 세포에 첨가하고, 4°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. CD3을 발현하는 세포에 대한 표적 항체의 결합을 PE-접합된 항-비오틴 Ab를 사용하여 검출하였다. 샘플을 유동 세포측정법에 의해 시험하고, 데이터를 플로우조에 의해 분석하였다.

[0318] ELISA에 의한 인간 CD3엡실론 및 시노몰구스 원숭이 CD3엡실론 단백질에 대한 결합 및 EC₅₀ 계산: 8종의 mAb는 인간 CD3엡실론에 대한 강한 결합 활성 및 시노몰구스 원숭이 CD3엡실론 단백질에 대한 교차 결합을 나타냈고, 표 8에서 인간 CD3엡실론과 시노몰구스 원숭이 CD3엡실론 사이에 낮은 nM 범위의 대등한 EC₅₀을 나타냈다.

표 8. 인간 CD3엡실론 및 시노몰구스 원숭이 CD3엡실론에 대한 8종의 mAb EC₅₀

mAb	인간 CD3엡실론 EC ₅₀ (nM)	시노몰구스 원숭이 CD3엡실론 EC ₅₀ (nM)
W3311-2.166.48	0.049	0.033
W3311-2.306.4	0.012	0.011
W3311-2.383.47	0.074	0.028
W3311-2.400.5	0.053	0.024
W3311-2.482.5	0.069	0.028
W3311-2.488.33	0.026	0.019
W3311-2.615.8	0.033	0.025
W3311-2.844.8	0.011	0.009
WBP331-BMK1 (UCHT1)	0.186	NA
이소형 대조군	NA	NA

[0320]

4.3 인간화 항체의 교차-종 결합의 검출

[0321] 2종의 인간화 mAb의 시노몰구스 원숭이 CD3엡실론 단백질 결합 및 EC₅₀ 값: 모든 데이터는 두 인간화 mAb가 표 9에서의 두 인간화 항체에 대한 0.043 nM의 EC₅₀ 값으로 시노몰구스 원숭이 CD3엡실론 단백질에 대한 그의 높은 결합 활성을 보유하였다는 것 (도 1 참조)을 나타냈다.

[0323]

표 9. 시노몰구스 원숭이 CD3엡실론에 대한 2종의 인간화 mAb EC₅₀

mAb	EC ₅₀ (nM)
W3311-2.166.48-z1-uIgG1K	0.043
W3311-2.306.4-z1-uIgG1K	0.043
W3311-2.166.48	0.125
이소형 대조군	N/A

[0324]

[0325] FACS에 의한 항체의 친화도: 5x10⁴개의 Jurkat 세포/웰을 96-웰 플레이트에 시팅하고, 이어서 1차 항체로서 다양한 농도의 정제된 시험 리드 항체를 4°C에서 1시간 동안 첨가하였다. 염소 항-마우스 IgG Fc-FITC의 2차 항체를 4°C에서 30분 동안 첨가한 다음, FITC에 의해 염색된 세포를 FACS에 의해 검출하였다. K_D 값을 상기 기재된 방법에 따라 계산하였다.

[0326]

2종의 인간화 mAb를 인간 CD4 T 세포에 대한 결합 활성에 대해 시험하였다: 데이터는 두 인간화 항체가 각각 WBP331-2.166.48-z1-uIgG1k 및 WBP331-2.306.4-z1-uIgG1k에 대해 표 10에서의 각각의 모 항체의 것보다 0.5-1배 더 낮은 1.01 및 0.46 nM의 낮은 EC₅₀ 값으로 CD4 T 세포에 대한 높은 결합 활성을 보유하였다는 것 (도 2

참조)을 나타냈다.

[0327] 표 10. FACS 및 EC₅₀에 의한 2종의 인간화 mAb의 hCD4 T 세포 결합

mAb	EC ₅₀ (nM)
W3311-2.166.48-z1-ulG1K	1.01
W3311-2.166.48-mIgG2aK	3.514
W3311-2.306.4-z1-ulG1K	0.253
W3311-2.306.4-mIgG2bK	0.461
OKT3	0.202
이소형 대조군	N/A

[0328]

[0329] 4.5 FACS에 의한 항체의 친화도 및 EC₅₀

[0330]

8종의 mAb를 FACS에 의해 그의 EC₅₀에 대해 시험하고, 인간 CD3 발현 세포 (Jurkat 세포)에 대한 친화도를 시험하였다. 8종의 mAb의 EC₅₀은 0.57 nM 내지 6.91 nM 범위였고 (표 11 참조), 친화도는 표 12에서 1.3×10^9 내지 9.3×10^{-10} M 범위였다.

[0331]

표 11. FACS에 의한 Jurkat 세포에 대한 EC₅₀ 측정

mAb	EC ₅₀ (nM)
W3311-2.166.48	6.91
W3311-2.306.4	0.57
W3311-2.383.47	0.91
W3311-2.400.5	2.5
W3311-2.482.5	3.71
W3311-2.488.33	2.97
W3311-2.615.8	4.65
W3311-2.844.8	0.77
OKT3	0.2

[0332]

[0333] 표 12. FACS에 의한 Jurkat 세포에 대한 8종의 mAb K_D 값

샘플	W3311-2.166.48	W3311-2.306.4	W3311-2.383.47	W3311-2.400.5	W3311-2.482.5	W3311-2.488.33	W3311-2.615.8	W3311-2.844.8	WBP3311.OKT3-평균
최적 피트-Bmax	1.26E-10	1.17E-10	1.12E-10	1.13E-10	1.30E-10	1.30E-10	1.20E-10	1.19E-10	9.41E-11
최적 피트-K _D	1.67E-09	1.91E-10	4.03E-10	9.34E-10	2.29E-09	1.32E-09	2.23E-09	2.52E-10	1.29E-10
표준 오차-Bmax	1.66E-12	1.19E-12	1.62E-12	1.76E-12	2.35E-12	2.51E-12	2.18E-12	1.00E-12	1.95E-12
표준 오차-K _D	5.62E-11	8.32E-12	2.15E-11	4.38E-11	9.63E-11	6.98E-11	9.47E-11	8.64E-12	1.27E-11

[0334]

[0335] 4.6 FACS에 의한 2종의 인간화 mAb의 친화도 및 동역학적 K_D 측정

[0336]

2종의 인간화 mAb를 FACS에 의해 Jurkat 세포에 대한 친화도 측정에 대해 시험하였다. 데이터는 두 인간화 mAb가 도 4 및 표 13에서의 그의 각각의 모 mAb와 유사한 K_D 값으로 Jurkat 세포에 대한 그의 높은 친화도 활성을 보유하였다는 것을 나타냈다.

[0337]

표 13. FACS에 의한 Jurkat 세포에 대한 2종의 인간화 mAb의 동역학적 K_D 측정

샘플	WBP3311-2.166.48-z1-ulG1k	WBP3311-2.306.4-z1-ulG1k	OKT3
최적 피트-Bmax	7.32E-12	6.83E-12	6.06E-12
최적 피트-KD	2.01E-10	5.30E-11	2.77E-11
표준 오차-Bmax	3.82E-13	3.49E-13	2.19E-13
표준 오차-KD	4.38E-11	1.14E-11	5.13E-12

[0338]

[0339] 3.3 세포 기반 기능적 검정

[0340]

FACS에 의한 항체의 세포 내재화: Jurkat 세포를 96-웰 플레이트에 1×10^5 개/웰로 시딩하였다. 시험 항체 ($1 \mu \text{g/mL}$)를 세포에 첨가하고, 4°C 에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 미결합 항체를 세척 제거한 다음, 세포를 4°C 또는 37°C 에서 5% CO_2 하에 3시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 세포 표면상의 항체의 존재를 2차 항체 (암캡, ab98742)에 의해 검출하였다. 염색된 세포를 비디 바이오사이언시스 FACS 칸토 II 및 플로우조 버전 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 내재화율을 하기와 같이 계산하였다: $[(\text{MFI}_{0\text{시간}} - \text{MFI}_{3\text{시간}}) / \text{MFI}_{0\text{시간}}] * 100\%$.

[0341]

4.7 세포 내재화율 측정

[0342]

내재화율을 FACS에 의해 Jurkat 세포를 사용하여 시험하였다. 데이터는 도 5에서 모든 8종의 mAb가 3시간 연구기간 후에 86-94% 범위의 항체가 내재화되는 높은 내재화율을 보인 반면 OKT3은 약 72% 내재화율을 보였다는 것을 나타냈다.

[0343]

세포내 시토카인 염색 검정을 사용한 항체의 T 세포 활성화: 세포내 시토카인 염색은 면역 세포를 세포 표면 마커와 조합하여 시토카인 생산을 검출할 수 있는 유동 세포측정법-기반 검정이다. 인간 PBMC를 건강한 공여자로부터 단리하였다. 간략하게, 피콜-파크 플러스 구배 원심분리와 후속 100g 원심분리 단계를 사용하여 혈소판을 제거하였다. PBMC를 완전 RPMI-1640 배지에서 배양하였다. PBMC를 골지 스톱이 보충된 세포 배지 중에 재현탁시키고, 96-웰 플레이트에 2×10^5 개/웰로 분배하였다. 다양한 농도의 시험 항체, 양성 및 음성 대조군을 첨가한 다음, 세포와 함께 37°C 에서 4.5시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 세포를 1% BSA로 2회 세척한 다음, 항-인간 CD4-FITC 항체 (비디, 550628) 및 항-인간 CD8-PE 항체 (비디, 560959)를 사용하여 그의 표면 마커에 대해 염색하고, 이어서 인간 조절 T 세포 염색 키트 (이바이오사이언스(eBioscience), 88-8999)를

사용하여 고정 및 투과화하였다. 고정/투과화 후, 항-인간 TNF-APC 항체 (비디, 554514) 및 항-인간 IFN-PerCP-Cy5.5 항체 (이바이오사이언스, 45-7319-42)를 사용하여 세포를 시토카인 생산에 대해 검출하였다. 염색된 세포를 비디 바이오사이언시스 FACS칸토 II 및 플로우조 버전 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0344] T 세포 활성화: T 세포 활성화를 세포내 시토카인 염색 방법에 의해 인간 PBMC를 사용하여 평가하고, TNF알파 및 INF감마의 시토카인을 모니터링하였다. 데이터는, 8종의 시험 mAb 중에서 2.306.4 및 2.844.8이 어떠한 유의한 TNF알파 및 INF감마 시토카인 방출도 모니터링되지 않았으므로 유의한 T 세포 활성화 사건을 보여주지 않았고, 반면에 모든 다른 6종의 시험 mAb는 OKT3의 것과 유사한 정도로 T 세포 활성화를 보여주되, 예외로 클론 2.383.47은 OKT3과 비교하여 더 약한 T 세포 활성화를 보여주었다는 것을 나타냈다 (데이터는 도 6에 제시됨).

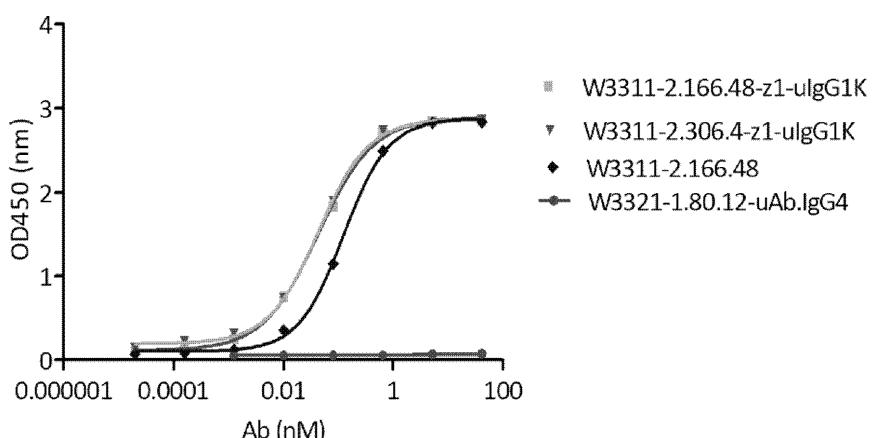
[0345] 2종의 인간화 mAb의 인간 T 세포 활성화: 2종의 인간화 mAb를 세포내 시토카인 염색 방법에 의해 인간 PBMC에 대한 T 세포 활성화 활성에 대해 시험하였고, TNF알파 및 INF감마의 시토카인을 모니터링하였다. 데이터는 두 인간화 항체가 OKT3 양성 대조군과 유사한 정도의 CD8+ T 세포에 대한 T 세포 활성화를 보여주었고, 반면에 두 인간화 mAb는 OKT3과 비교하여 더 낮은 정도의 CD4+ T 세포에 대한 활성화를 보여주었다는 것을 나타냈다. 또한, 클론 2.306.4의 모 마우스 항체는 반복적으로 T 세포 활성화를 전혀 디스플레이하지 않았다는 것을 주목한다. 데이터를 도 7에 제시하였다.

[0346] 3.4 FACS에 의한 항체의 에피토프 비닝

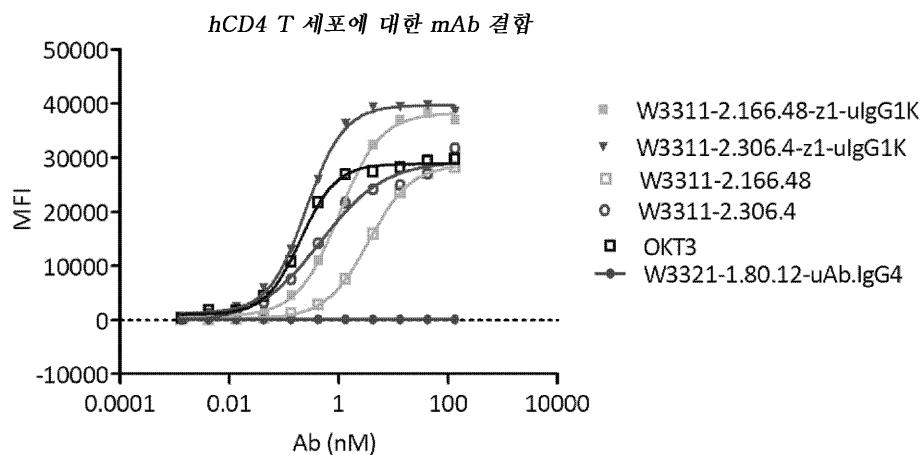
[0347] 에피토프 비닝: 8종의 mAb 중 7종이 클론 2.383.47에 대해 비닝되며, 결과는 도 8에서 모든 8종의 mAb가 동일한 에피토프 빈을 공유함을 제시하였다.

도면

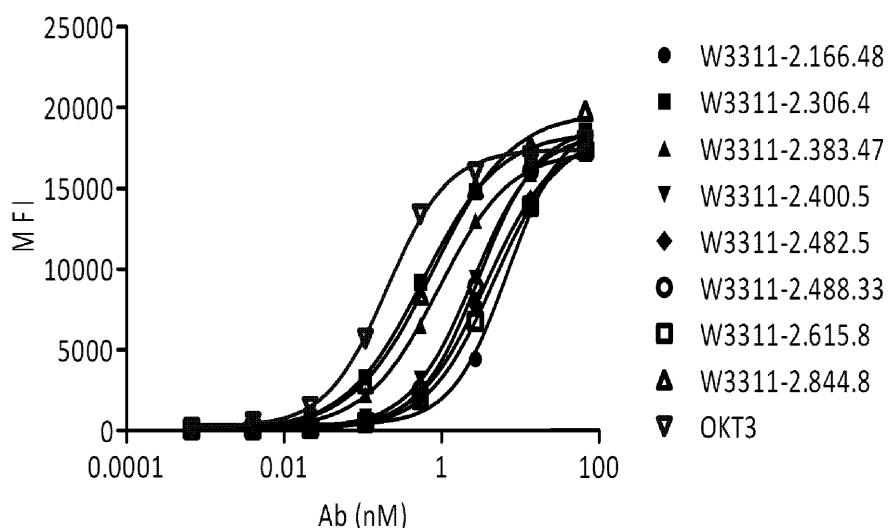
도면1



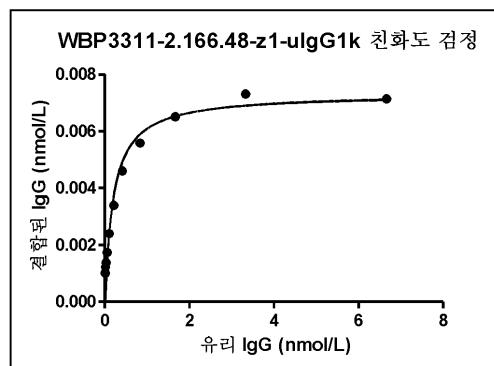
도면2



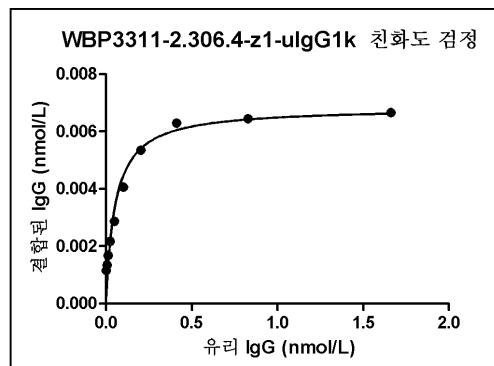
도면3



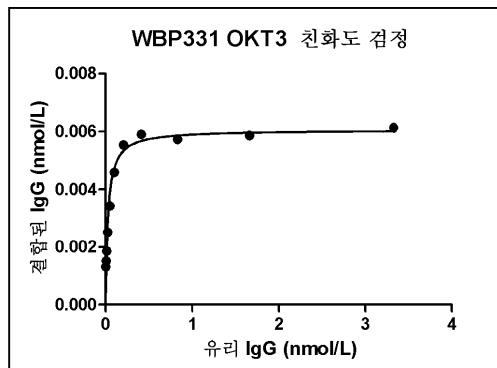
도면4



도 4A

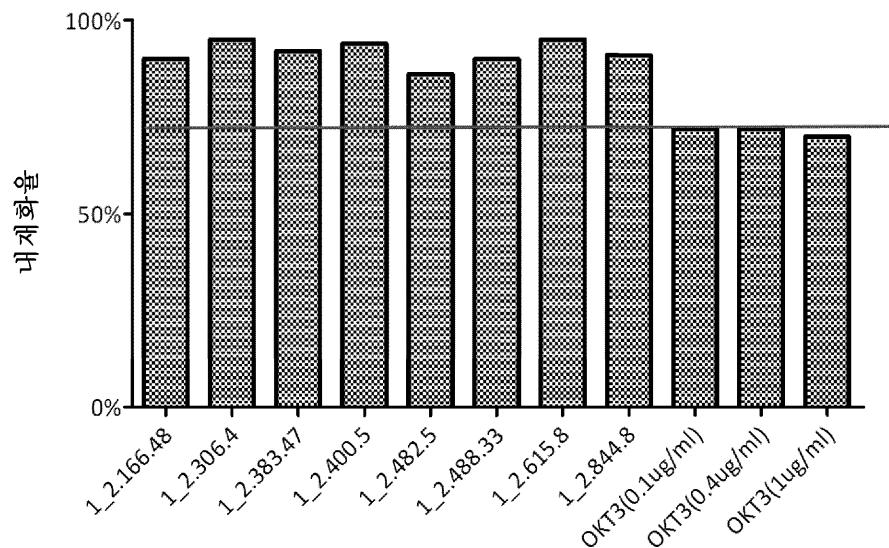


도 4B

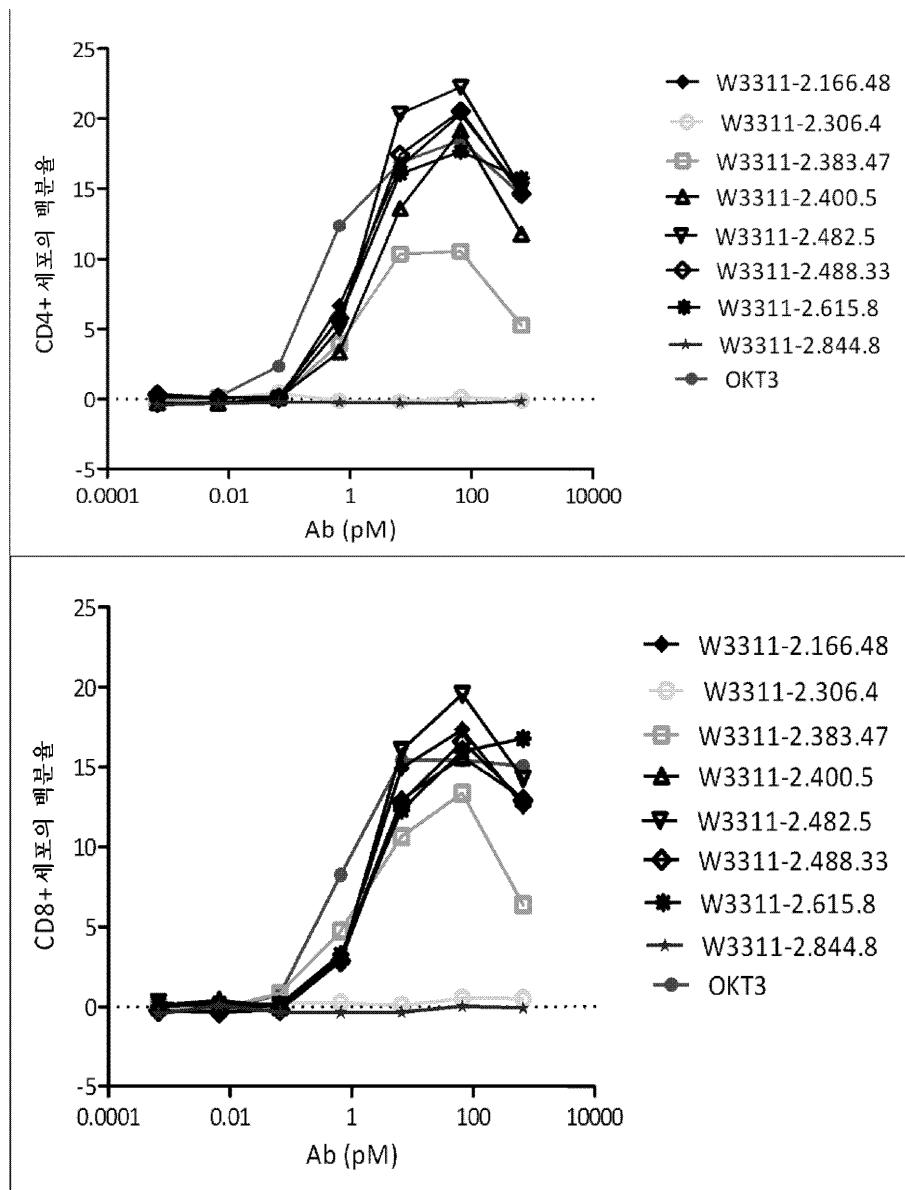


도 4C

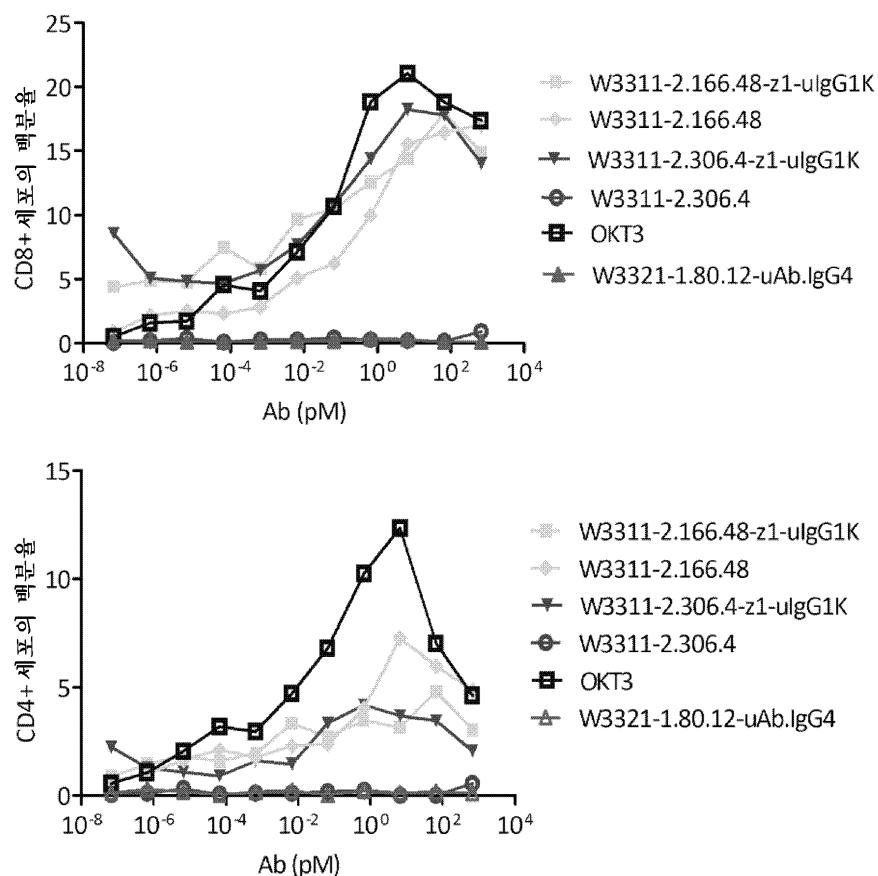
도면5



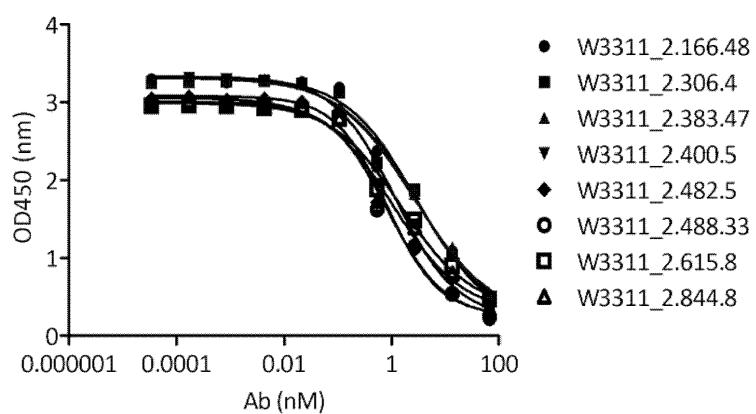
도면6



도면7



도면8



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> WUXI BIOLOGICS (SHANGHAI) CO. LTD.

WUXI BIOLOGICS (CAYMAN) INC.

<120> NOVEL ANTI-CD3EPSILON ANTIBODIES

<130> 053674-8012W002

<160> 120

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Gly Tyr Ser Phe Thr Thr Tyr Tyr Ile His

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

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu

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

Ala

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Trp Ile Phe Pro Gly Asn Asp Asn Ile Lys Tyr Ser Glu Lys Phe Lys

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

Gly

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Trp Ala Ser Thr Arg Lys Ser

1	5
---	---

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 5
Asp Ser Val Ser Ile Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210
> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 6
Thr Gln Ser Phe Ile Leu Arg Thr
1 5

<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 7

Gly Phe Ala Phe Thr Asp Tyr Tyr Ile His

1 5 10
<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 8

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15
Ala

<210> 9

<211> 17
<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

Trp Ile Ser Pro Gly Asn Val Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe Lys

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

Gly

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Trp Ala Ser Thr Arg Gln Ser

1	5
---	---

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

Asp Gly Tyr Ser Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr

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

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Thr Gln Ser His Thr Leu Arg Thr

1	5
---	---

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

Gly Phe Thr Phe Thr Asn Tyr Tyr Ile His

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

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

Trp Ile Ser Pro Glu Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe Gln

1 5 10 15

Asp

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

Trp Ala Ser Ile Arg Val Ser

1 5

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

Asp Gly Tyr Ser Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

Thr Gln Ser His Thr Leu Arg Thr

1 5

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr Tyr Leu His

1 5 10

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

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

1 5 10 15

Ala

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

Trp Ile Phe Pro Glu Ser Asp Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Leu Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 23

Asp Ser Val Gly Asn Tyr Phe Phe Asp Phe

1 5 10

<210> 24

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

Ala Gln Ser Phe Ile Leu Arg Thr

1 5

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 25

Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Tyr Ile His

1 5 10

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 26

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

1 5 10 15

Ala

<210> 27

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 27

Trp Ile Phe Pro Gly Ser Asp Asn Ile Lys Tyr Asn Glu Asn Phe Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 28

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 29

Asp Ser Val Ser Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 30

Ala Gln Ser Phe Ile Leu Arg Thr

1 5

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 31

Gly Phe Ser Phe Thr Asn Tyr Tyr Ile His

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

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 32

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Asn Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu

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

Ala

<210> 33

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 33

Trp Ile Phe Pro Gly Thr Val Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

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

Gly

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 34

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1	5
---	---

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 35

Asp Ser Val Gly Ile Tyr Tyr Phe Asp Phe

1 5 10

<210> 36

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 36

Thr Gln Ser Phe Ile Leu Arg Thr

1 5

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 37

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Phe Tyr Thr His

1 5 10

<210> 38

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 38

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ile Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 39

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 39

Trp Ile Phe Pro Gly Ser Asp Asn Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 40
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 40
Trp Ala Ser Thr Arg Asp Ser
1 5
<210> 41
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 41
Asp Ser Val Ser Val Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10
<210> 42
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 42
Thr Gln Ser Phe Ile Leu Arg Thr
1 5
<210> 43

<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 43
Gly Phe Ala Phe Thr Asp Tyr Tyr Ile His
1 5 10
<210> 44
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 44

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 45

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 45

Trp Ile Ser Pro Gly Asn Val Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 46

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 47

Asp Gly Tyr Ser Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 48

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 48

Thr Gln Ser His Thr Leu Arg Thr

1 5

<210> 49

<211> 25

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 49

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ala Cys Lys Ala Ser

20 25

<210> 50

<211> 23

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 50

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys

20

<210> 51

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 51

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

1 5 10

<210> 52

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 52

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

1 5 10 15

<210> 53

<211> 32

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 53

Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln

1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ile

20 25 30

<210> 54

<211> 32

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 54

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Asn Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 55

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 55

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 56

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 56

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 57

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser

20 25

<210> 58

<211> 23

<212>

PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys

20

<210> 59

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

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

1 5 10

<210> 60

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 61

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

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

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

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

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

<210> 62

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

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

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys

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

<210> 63

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

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

<210> 64

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

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

<210> 65

<211> 25

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 65

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

1 5 10 15

Ser Val Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser

20 25

<210> 66

<211> 23

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 66

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys

20

<210> 67

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 67

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

1 5 10

<210> 68

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 68

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

1 5 10 15

<210> 69

<211> 32

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 69

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 70

<211> 32

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 70

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 71

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 71

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 72

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 72

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 73

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser

20 25

<210> 74

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys

20

<210> 75

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

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

1 5 10

<210> 76

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 77

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

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

1 5 10 15

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

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

<210> 78

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

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

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys

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

<210> 79

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

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

<210> 80

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

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

<210> 81

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 81

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

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

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

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

100	105	110
Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser		
115		
<210>	82	
<211>	357	
<212>	DNA	
<213>	Mus musculus	
<400>	82	
caggccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtaaaac ctggggcttc agtgaagatt 60		
gcctgcagg ctctggcta cagttcaca acctactata tacactgggt gaagcagagg 120		
cctggacagg gacttgatgt gattggatgg attttcctg gaaatgataa tattaagtac 180		
agtggagaat tcaaggccaa ggccacactg acggcagaca cttccctccag tacagcctac 240		
atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgctgtct atttctgtgc tatagactcc 300		

gttagtatct actacttga ctattggggc caaggcacca ctctcacagt ctcctca 357		
<210>	83	
<211>	112	
<212>	PRT	
<213>	Mus musculus	
<400>	83	

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

1	5	10	15
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser			

20	25	30
Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln		
35	40	45
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Lys Ser Gly Val		
50	55	60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr		
65	70	75
Ile Asn Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Gln		
85	90	95
Ser Phe Ile Leu Arg Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
100	105	110

<210> 84

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 84

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtaact	60
atgagctgca aatccagtca gagtctgctc aacagttagaa cccgaaagaa ctacttgct	120
tggtaaccagg agaaaccagg gcagtcctct aaactgctga tctactggc atccactagg	180
aaatctgggg tccctgatcg cttcacaggg agtggatctg ggacagattt cacttcacc	240
atcaacagtg tgccaggctga agacctggca gtttattact gcacgcaatc ttttattctt	300
cggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaa	336

<210> 85

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 85

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Gly Asn Val Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 86

<211> 357

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 86

cagggtccagc tgacgcagtc tggacactgaa ttgggtgaagc ctggggcttc cgtgaggata	60
tcctcgcaagg ctctcggtt cgccttcaca gactactata tacactgggt gaagcagagg	120
cctggacagg gtcttgagtg gattggatgg atttctccctg gaaatgttaa tactaaatac	180
aatgaaaact tcaaggccag ggccacactg actgcagacc tatcctccag cacagctac	240
atgcagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggctt atttctgtgc aagagatgga	300
tattccctgt attacttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctccctca	357

<210> 87

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 87

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser

20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35

40

45

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

50

55

60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

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

85

90

95

Ser His Thr Leu Arg Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

110

<210> 88

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 88

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctgactgtgt cagcaggaga gaaggtcact 60

at gagactgca aatccagtca gagtctgctc aacagttagaa cccgaaagaa ctacttgct 120

tgttaccagc agaagccagg gcagtctctt aaactactaa tctactggc atccactagg 180

caatctgggg tccctgatcg cttcacagggc agtggatctg ggacagcttt cactctcacc 240

atcagcggtg tgcaggctga agacctggca gtttatttct gcacgcaatc tcatacttt 300

cggaacgttcg gtggggggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 89

<211> 119

<212> PRT

<

213> Mus musculus

<400> 89

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

1 5 10 15

Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Tyr

20

25

30

Tyr Ile His Trp Val Ile Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Trp Ile Ser Pro Glu Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe

50	55	60
Gln Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Ile Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys		
85	90	95
Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
100	105	110
Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser		
115		
<210> 90		
<211> 357		
<212> DNA		
<213> Mus musculus		
<400> 90		
caggtccagc tgcagcagtc tggacctgaa ttggtaaagg ctggggcttc agtgaggata 60		
tcctgcaaga cttctggctt caccttcaca aactactata tacactgggt gatacagagg 120		
cctggacagg gacttgatgt gattgggtgg atttctctg aaaatggtaa tactaaatac 180		
aatgaaaact tccaggacaa ggccacactg actgcagaca tatcgccag cacagcctac 240		
atgcacctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggctt atttctgtgc aagagatggg 300		
tattcccttt actacttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctcctca 357		
<210> 91		
<211> 112		
<212> PRT		
<		
213> Mus musculus		
<400> 91		
Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Ser Ala Gly		
1	5	10
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser		
20	25	30
Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln		
35	40	45
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ile Arg Val Ser Gly Val		

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

<210> 92

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 92

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctgactgtgt cagcaggaga gaaggtcact 60

atgagctgca aatccagtca gagtctgctc aacagttagaa cccgaaagaa ctacttgct	120
tggtaccagg agaaaccagg gcagtcctct aagctactga tctactggc atccattagg	180
gtatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacaacttt cactctcacc	240
atcagcggtg tgcaggctga agacctggca gtttattatt gcacgcaatc tcatacttt	300
cggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa	336

<210> 93

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 93

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

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

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Val Gly Asn Tyr Phe Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 94

<211> 357

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 94

caggccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtaatc ctggggcttc agtgaagata 60

tcctgcaagg cttctggcta cagttcaca aactactatt tacactgggt gaaacagagg 120

cctggacagg gacttgagtg gattggatgg attttcctg aaagtgataa taccagaatc 180

aatgagaaat tgaaggcua ggccacactg acggcagaca catcctccga tacagcctac 240

atgcaccta gcagcctgac atttggggac tctgcagtc atttctgtgc aagagactcc 300

gttggaaact acttcttga cttctgggc caaggccca ctctcacagt ctcctca 357

<210> 95

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 95

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Arg Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val Asn Asn

20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Gln

85 90 95

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

100 105 110

<210> 96

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 96

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcgggaga gaaggtaact 60

attaggtgca aatccagtca gagtctggtc aacaatagaa cccgaaagaa ctacttgca 120

tggtaccagg agaaaccagg gcagcctct aaactattga tctactggc atccactagg 180

gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctacc 240

atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcgcgcaatc ttttattctt 300

cggacgttcg gtggaggcac caaactggaa atcaaa 336

<210> 97

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 97

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Pro Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Phe Pro Gly Ser Asp Asn Ile Lys Tyr Asn Glu Asn Phe

50 55 60

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

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

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

85	90	95	
----	----	----	--

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

100	105	110	
-----	-----	-----	--

Thr Ile Leu Thr Val Ser Ser

115			
-----	--	--	--

<210> 98

<211> 357

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 98

cagggtcagc tgacgacatc tggacactgag ctgggtgaaac ctgggtcttc agtgaagata 60

tcctgcacaaac cttctggcta caccttcaca acttactata tacattgggt gaagcagagg 120

cctggacagg gacttgatgt gattggatgg attttcctg gaagtgtataa tattaaatac 180

aatgagaatt tcaaggacaa ggccacactg acggcagaca catcctccag cacagcctac 240

atgcagctca gcagcctgac atctgaagac tctgcagttt atttctgtgc aagagactcc 300

gtcagtaggt actacttta ctactgggc caaggcacca ttctcacagt ttcttca 357

<210> 99

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 99

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

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val Asn Asp

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

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Leu

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

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

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

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Gln

85 90 95

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

100 105 110

<210> 100

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 100

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaagggtcact 60

at gagctgca aatccagtca gagtctggtc aatgatagaa cccgaaaaaa ctacttggt 120

tggtaccaggc agaaaccagg gctgtctctt aaactgctga tctactggc ttccactagg 180

gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctacc 240

atcagcagtgc tgcaaggctga agacctggct gttttattact gcgcgcatac ttttattctt 300

cggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 101

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 101

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Pro Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Trp Ile Phe Pro Gly Thr Val Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Phe

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Ala Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Val Gly Ile Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Leu Gly

100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 102

<211> 357

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 102

caggccagc tgeaacagtc tggacctgaa ctggtgaaac ctgggacttc agtgaagata	60
tcctgcaagg cttctggctt cagttcaca aactactata tacactgggt gaagcagagg	120
cctggacagg gacctgagtg gattggatgg attttcctg gaactgttaa tactaagtac	180
aatgagaagt tcaaggtaa ggccacactg acggcagaca catcctcaa tacagccttc	240

atgcagctca gcagcctgac ttctgcccac tctgcagtc atttctgtgc aagagactcc	300
gttgttatct actacttga cttctggggc ctaggcacca ctctcacagt ctcctca	357

<210> 103

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 103

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Val Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Asn

20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Gln

85 90 95
 Ser Phe Ile Leu Arg Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100	105	110	
<210> 104			
<211> 336			
<212> DNA			
<213> Mus musculus			
<400> 104			
gacattgtga tgtcacagtc tccatccccc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtaact	60		
gtgagttgca aatccagtca gagtctgctc aacaatagaa cccgaaaaaa ctacttgct	120		
tggtaccaggc agaaaccagg gcagtcctct aaactactaa tctactggc atccactagg	180		
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gtacagattt cactctcacc	240		
atcagcagtgc tgccaggctga agacctggca gtttattact gcacgcaatc ttttattctt	300		

cgacgttcg gtggaggcac caagctggag atcaaa	336		
<210> 105			
<211> 119			
<212> PRT			
<213> Mus musculus			
<400> 105			

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

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

100	105	110	
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser			
115			
<210>	106		
<211>	357		
<212>	DNA		
<213>	Mus musculus		
<400>	106		
caggccagg tgcagcagtc tggaccttag ctggtaaaac ctgggacttc aatggaaaata			60
tcctgcagg cttctggcta cagtttaca gacttctata cacactgggt gaggcagagg			120
cctggacagg gacttgatgt gattggatgg attttccctg gaagtgtataa tattaaatac			180
aatgagaagt tcaaggccaa ggccacactg acggcagaca catcctccag cacagcctac			240
atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcagtc atttctgtgc aagagactcc			300
 gttagtgtct actacttga ctattggggc caaggcacca ctctcacagt ctcctca			
			357
<210>	107		
<211>	112		
<212>	PRT		
<213>	Mus musculus		
<400>	107		
Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Thr Ala Gly			
1	5	10	15
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ile			
20	25	30	
Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln			
35	40	45	
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Asp Ser Gly Val			
50	55	60	
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr			
65	70	75	80
Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Gln			
85	90	95	
Ser Phe Ile Leu Arg Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			

100 105 110

<210> 108

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 108

gacatcgta tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtga cagcaggaga gaaggtaact	60
atgagctgca aatccagtca gagtctgctc aacattagaa cccgaaagaa ctacttgct	120
tggtaccaac agaaaccagg gcagtcctt aaactgctga tctactgggc atccactagg	180
gactctgggg tccctgatcg cttcacaggg agtggatctg ggacagattt cacttcacc	240
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcacgcaatc ttttatttt	300
cggaacctcg gtggaggcac caagctggaa atcaa	336

<210> 109

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 109

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

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

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

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

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

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

Gly Trp Ile Ser Pro Gly Asn Val Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe

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

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

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

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

85	90	95
----	----	----

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

100	105	110
-----	-----	-----

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 110

<211> 357

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 110

caggtccagc tgcagcagtc tggacctgaa ttggtaagc ctgggcttc cgtgaggata	60
tcctgcaagg ctctggctt cgccttcaca gactactata tacactgggt gaagcagagg	120
cctggacagg gcttgagtg gattggatgg atttctctg gaaatgtta tactaaatac	180
aatgaaaact tcaagggcag ggccacactg actgcagacc tatcctccag cacagctac	240
atgcagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgeggctt atttctgtgc aagagatgga	300
tattccctgt attacttga ctactgggc caaggcacca ctctcacagt ctcctca	357

<210> 111

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 111

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser

20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser His Thr Leu Arg Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 112

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 112

gacattgtga tgcacagtc tccatcctcc ctgactgtgt cagcaggaga gaaggtaact	60
atgagctgca aatccagtca gagtctgctc aacagttagaa cccgaaagaa ctactggct	120
tggtaaccagc agaaaccagg gcagtcctt aagctactaa tctactggc atccactagg	180
gaatctgggg tccctgatcg cttcacagcc agtggatctg ggacagctt cactctacc	240
atcagcggtg tgcaggctga agacctggca gtttatttct gcacgcaatc tcatacttt	300
cggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa	336

<210> 113

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 113

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asn Asp Asn Ile Lys Tyr Ser Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Ile Asp Ser Val Ser Ile Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

<210> 114
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 114

caggtgcaac tcgtgcagtc tggagctgaa gtgaagaagc ctgggtttc agtcaaggc	60
agtgcagg ccagtggta ttccttact acctactaca tccactgggt gcggcaggca	120
ccagcacagg ggcttgatgt gatggctgg atcttcccg gcaacgataa tattaagtac	180
agcgagaagt tcaaaggaggg ggtcaccatt accgecgaca aatccacttc cacagectac	240
atggagttga gcagccttag atccgaggat acagccgtgt actactgtgc cattgacagc	300
gtgtccatct actacttga ctactgggc cagggcacac tggcacagt gagcagc	357

<210> 115
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 115

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

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

100 105 110

<210> 116

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 116

gacatcgta	tgaccagtc	cccagactct	ttggcagtgt	ctctcgaaa	aagagctacc	60
atcaactgca	agagcagcca	gtcccttctg	aacagcaggaa	ccaggaagaa	ttaccccgcc	120
tggtaaccaac	agaagcccg	acagcctct	aagctctga	tctactggc	ctcaaccgg	180
aagagtggag	tgcggatcg	cttagcgaa	agcggctcg	ggacagattt	cacactgaca	240
atttcctccc	tgcaggccga	ggacgtcgcc	gtgttattact	gtactcagag	tttcattctg	300
cgacatgg	gccccggac	taaagtggag	at			336

<210> 117

<

211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 117

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

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

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

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

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

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

Gly Trp Ile Ser Pro Gly Asn Val Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe

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

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

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

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

85	90	95
----	----	----

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

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 118

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 118

caggtgcagc ttgtgcagtc tggggcagaa gtgaagaagc ctgggtctag tgtcaaggtg	60
tcatgcaagg ctagcgggtt cgcccttaact gactactaca tccactgggt gggcaggct	120
cccgacaag gtttgagtg gatggatgg atctccccag gcaatgtcaa cacaaagtac	180
aacgagaact tcaaaggccg cgtcaccatt accgcccaca agagcacctc cacagctac	240
atggagctgt ccagccttag aagcgaggac actgccgtct actactgtgc cagggatgg	300
tactccctgt attacttga ttactgggc cagggcacac tggtgacagt gagctcc	357

<210> 119

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 119

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser

20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

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

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Gln

85

90

95

Ser His Thr Leu Arg Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

110

<210> 120

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 120

gatatcgtga tgaccaggag cccagactcc cttgctgtct ccctcgccga aagagcaacc	60
atcaactgca agagctccca aagcctgtcg aactccagga ccaggaagaa ttacctggcc	120
tggtatcagc agaagcccg ccagcctctt aagctgctca tctactggc ctccacccgg	180
cagtcgtggg tgcccgtatcg gtttagtgga tctggagcg ggacagactt cacattgaca	240
attagctcac tgcaggccga ggacgtggcc gtctactact gtactcagag ccacactctc	300
cgcacattcg gccccgggac taaagtggag attaag	336