



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0021074
(43) 공개일자 2020년02월27일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C07K 16/28</i> (2006.01) <i>A61K 31/225</i> (2006.01)
 <i>A61K 31/41</i> (2006.01) <i>A61K 31/4178</i> (2006.01)
 <i>A61K 31/4184</i> (2006.01) <i>A61K 31/4188</i>
 (2006.01)
 <i>A61K 31/4245</i> (2006.01) <i>A61K 31/513</i> (2006.01)
 <i>A61K 45/06</i> (2006.01) <i>A61P 9/00</i> (2006.01)
 (52) CPC특허분류
 <i>C07K 16/2833</i> (2013.01)
 <i>A61K 31/225</i> (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2020-7001150
 (22) 출원일자(국제) 2017년06월14일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2020년01월14일
 (86) 국제출원번호 PCT/IB2017/053539
 (87) 국제공개번호 WO 2018/229530
 국제공개일자 2018년12월20일</p> | <p>(71) 출원인
 아디셋 바이오, 인크.
 미국 94025 캘리포니아주 덴로 파크 컨스티튜션
 드라이브 200
 (72) 발명자
 자코보비츠, 아야
 미국 캘리포니아 90210 비벌리 힐스 휴튼 드라이브 3135
 폴드, 오렛
 미국 캘리포니아 64404 포스터 씨티 케이맨 레인 712
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 특허법인다나</p> |
|--|---|

전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 HLA 제한된 방식으로 HLA-A2/TYRD를 결합할 수 있는 항체 및 이의 용도

(57) 요약

HLA 제한된 방식에서 HLA-A2/티로시나제(TyrD)에 결합할 수 있는 항체가 제공된다. 구체적으로, 상기 항체는 HLA 제한된 방식에서 HLA-A2/TyrD369-377에 결합할 수 있다. 항체의 중쇄 및 경쇄의 상보적 결정 영역(CDR) 서열, 및 암의 치료용 항체를 사용하는 방법이 또한 제공된다.

(52) CPC특허분류

A61K 31/41 (2013.01)
A61K 31/4178 (2013.01)
A61K 31/4184 (2013.01)
A61K 31/4188 (2013.01)
A61K 31/4245 (2013.01)
A61K 31/513 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
C07K 16/2809 (2013.01)
C07K 16/283 (2013.01)

(72) 발명자

사트파예브, 다우렛 캐딜

미국 캘리포니아 64061 레드우드 씨티 팜 힐 불리
 마드 3573 아파트 20

펠레드 카마, 미라

이스라엘 헤르츨리야 4676707 살론스키 스트리트 7

헝크베르크, 갈리트

이스라엘 노피트 3600100 길보아 스트리트 63

라이터, 요람

이스라엘 하이파 3498784 에스더 라빈 스트리트 23

비어, 일란

이스라엘 하이파 3455614 페텔 스트리트 3

시니크, 케렌

이스라엘 라마트-이샤이 3009500 하트자빔 스트리
 트 60

테블 (엘바즈), 야엘

이스라엘 하이파 3298523 하시디 우모트 하울람 스
 트리트 10

슈페르베 (세리), 야엘

이스라엘 가버-브라딤 2514700 스니르 스트리트 87

에텔 시걸, 레우트

이스라엘 하이파 2650316 솔로모 고렌 스트리트
 5/16

오렌, 라비트

이스라엘 하이파 2622153 베이트 알파 스트리트 37

알리쉐케비츠, 드로어 사무엘

이스라엘 키르야트-티본 3653405 타마르 스트리트
 77

명세서

청구범위

청구항 1

N-C로 정렬된 CDR 서열을 포함하는 항원 결합 도메인을 포함하는 항체:

CDR1 중쇄 (HC)	서열번호: 8		TSGMGVS
CDR2 HC	서열번호: 9		HIYWDDDKRYNPSLKS
CDR3 HC	서열번호: 10		KDYGSSFYAMHY
CDR1 경쇄 (LC)	서열번호: 5		KASQDIHNYIA
CDR2 LC	서열번호: 6		YTSTLQP
CDR3 LC	서열번호: 7		LQYDNLWT

상기 항체의 상기 중쇄의 가변 영역은 하기로 서열번호: 4로 제시되고, 그리고 상기 항체는 HLA 제한된 방식에서 HLA-A2/Tyr_{D369-377}을 결합할 수 있음.

청구항 2

N-C로 정렬된 CDR 서열을 포함하는 항원 결합 도메인을 포함하는 항체:

CDR1 중쇄 (HC)	서열번호: 8		TSGMGVS
CDR2 HC	서열번호: 9		HIYWDDDKRYNPSLKS
CDR3 HC	서열번호: 10		KDYGSSFYAMHY
CDR1 경쇄 (LC)	서열번호: 5		KASQDIHNYIA
CDR2 LC	서열번호: 6		YTSTLQP
CDR3 LC	서열번호: 7		LQYDNLWT

상기 항체의 상기 중쇄의 가변 영역은 서열번호: 4로 제시됨, 항체의 상기 경쇄의 가변 영역은 서열번호: 2로 제시됨 그리고 상기 항체는 HLA 제한된 방식에서 HLA-A2/Tyr_{D369-377}을 결합할 수 있음.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, IgG인 항체.

청구항 4

키메라 항체인 청구항 1 및 3 중 어느 한 항의 항체.

청구항 5

청구항 1, 2 및 4 중 어느 한 항에 있어서, 항체 단편인, 항체.

청구항 6

청구항 5에 있어서, Fab, F(ab')₂, Fv, scFv, dsFv 및 단일 도메인 분자로 구성된 군으로부터 선택된 항체.

청구항 7

청구항 1 또는 3에 있어서, 상기 항체의 중쇄는 서열번호: 21 또는 27로 제시되는, 항체.

청구항 8

청구항 1, 3 내지 7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체의 경쇄는 서열번호: 2, 19 또는 25로 제시되는, 항체.

청구항 9

청구항 1 내지 8 중 어느 한 항에 있어서, 치료적 모이어티를 포함하는 항체.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 치료적 모이어티는 세포독성 모이어티, 독성 모이어티, 사이토카인 모이어티 및 약물로 구성된 군으로부터 선택되는, 항체.

청구항 11

청구항 9에 있어서, 상기 치료적 모이어티는 세포를 포함하는, 항체.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 세포는 $\alpha\beta$ T-세포, $\gamma\delta$ T-세포, NK, CIK, NKT, 대식세포 및 B 세포로 구성된 군으로부터 선택되는, 항체.

청구항 13

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이적 항체인 항체.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 항-CD3 또는 항-CD16을 포함하는, 항체.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 상기 항-CD3은 scFv를 포함하는, 항체.

청구항 16

청구항 13 내지 15 중 어느 한 항에 있어서, HLA 제한된 방식에서 HLA-A2/Tyr_{D369-377}을 결합할 수 있는 항체의 경쇄는 서열번호: 2를 포함하는, 항체.

청구항 17

청구항 1 내지 16 중 어느 한 항의 항체를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 18

시스-작용 조절 인자에 작동가능하게 연결된 청구항 17의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 19

바이러스 벡터인 청구항 18의 발현 벡터.

청구항 20

청구항 17의 폴리뉴클레오타이드 또는 청구항 18의 발현 벡터를 포함하는 세포.

청구항 21

청구항 1 내지 16 중 어느 한 항의 항체, 청구항 18의 벡터 또는 청구항 20의 세포를 포함하는 억제학적 조성물.

청구항 22

흑색종 또는 교모세포종을 치료하는 방법으로서, 치료 유효량의 청구항 1 내지 16 중 어느 한 항의 항체, 청구항 18의 벡터 또는 청구항 20의 세포를 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여함으로써, 흑색종 또는 교모세포종

을 치료하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 23

흑색종 또는 교모세포종의 치료에서의, 청구항 1 내지 16 중 어느 한 항의 항체, 청구항 18의 벡터 또는 청구항 20의 세포.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 이들의 일부 구현예에서, HLA 제한된 방식에서 HLA-A2/TyrD를 결합할 수 있는 항체 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 종양 및 바이러스-감염된 세포는 $CD8^+$ 세포독성 T 세포에 의해 인식되며, 이에 반응하여 이들 세포를 제거하기 위해 활성화된다. 활성화되도록 하기 위해, 클론형 T-세포 수용체 (TCR)는 막 표면 구조적 적합성 복합체 (MHC) 분자에 의해 제시된 특이적 펩타이드 항원을 조우할 필요가 있다. 악성 형질전환 또는 바이러스성 감염을 겪은 세포는 그것의 MHC 부류 I 분자 상에 종양-연관된 항원 또는 바이러스 단백질로부터 유래된 펩타이드를 제시한다. 따라서, 질환-특이적 MHC-펩타이드 복합체는 면역치료적 접근법에 대한 바람직한 표적이다. 하나의 이러한 접근법은 MHC-펩타이드 복합체에 대한 TCR의 독특한 미세 특이성이지만 낮은 고유 친화도를 종양 또는 바이러스 에피토프에 대한 TCR-유사 특이성이 부여된 고-친화도 가용성 항체 분자로 변형시킨다. 이들 항체, 일명 TCR-유사 항체는 종양 및 바이러스-감염된 세포를 표적화하고 그것의 특이적 사멸을 매개할 수 있는 신규한 부류의 면역치료제로서 개발되고 있다. 그것의 치료적 능력에 부가하여, TCR-유사 항체는 암 및 감염성 질환의 진단 시약으로 개발되고 있으며, MHC 부류 I 항원 전달을 연구하기 위한 유용한 연구 도구로 작용한다.

[0003] 흑색종은 멜라닌세포 또는 멜라닌세포 관련된 모반 세포 중 어느 하나로부터 유래된 공격적인, 빈번한 전이성 종양이다. 흑색종이 피부에 명백하게 국소화된 경우에도, 환자의 최대 30 %는 전신 전이를 전개한다. 흑색종의 고전적 치료 양식은 수술, 방사선 및 화학요법을 포함한다. 지난 10년 동안 면역요법 및 유전자 요법이 흑색종을 치료하기 위한 신규하고 유망한 방법으로 부각되었다.

[0004] WO03/068201은 티로시나제를 포함하는 종양 항원에 대한 TCR-유사 항체를 생성하는 방법을 개시한다.

[0005] WO2008/120202는 HLA-티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ 복합체에 대한 TCR-유사 항체를 개시한다.

[0006] 추가의 배경 기술은 하기를 포함한다:

[0007] WO2016/199141

[0008] WO2016/199140

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 일부 구현예의 일 양태에 따르면 N-C로 정렬된 CDR 서열을 포함하는 항원 결합 도메인을 포함하는 항체가 제공된다.

CDR1 중쇄 (HC)	서열번호: 8		TSGMGVS
CDR2 HC	서열번호: 9		HIYWDDDKRYNPSLKS
CDR3 HC	서열번호: 10		KDYGSSFYAMHY
CDR1 경쇄 (LC)	서열번호: 5		KASQDIHNYIA
CDR2 LC	서열번호: 6		YTSTLQP
CDR3 LC	서열번호: 7		LQYDNLWT

[0010]

[0011]

상기 항체의 중쇄의 가변 영역은 서열번호: 4로 제시되고 그리고 항체는 HLA 제한된 방식에서 HLA-A2/Tyr_{D369-377}을 결합할 수 있다. 본 발명의 일부 구현예의 일 양태에 따르면 N-C로 정렬된 CDR 서열을 포함하는 항원 결합 도메인을 포함하는 항체가 제공된다.

CDR1 중쇄 (HC)	서열번호: 8		TSGMGVS
CDR2 HC	서열번호: 9		HIYWDDDKRYNPSLKS
CDR3 HC	서열번호: 10		KDYGSSFYAMHY
CDR1 경쇄 (LC)	서열번호: 5		KASQDIHNYIA
CDR2 LC	서열번호: 6		YTSTLQP
CDR3 LC	서열번호: 7		LQYDNLWT

[0012]

[0013]

상기 항체의 중쇄의 가변 영역은 서열번호: 4로 제시되고, 항체의 경쇄의 가변 영역은 서열번호: 2로 제시되고, 그리고 항체는 HLA 제한된 방식에서 HLA-A2/Tyr_{D369-377}을 결합할 수 있다.

[0014]

본 발명의 일부 구현예에 따르면, 항체는 IgG이다.

[0015]

본 발명의 일부 구현예에 따르면, 항체는 키메라 항체이다.

[0016]

본 발명의 일부 구현예에 따르면, 항체는 항체 단편이다.

[0017]

본 발명의 일부 구현예에 따르면, 항체는 하기로 구성된 군으로부터 선택된다: Fab, F(ab')₂, Fv, scFv, dsFv 및 단일 도메인 분자.

[0018]

본 발명의 일부 구현예에 따르면, 항체의 중쇄는 서열번호: 21 또는 27로 제시된 바와 같다.

[0019]

본 발명의 일부 구현예에 따르면, 항체의 경쇄는 서열번호: 2, 19 또는 25로 제시된 바와 같다.

[0020]

본 발명의 일부 구현예에 따르면, 항체는 치료적 모이어티를 포함한다.

[0021]

본 발명의 일부 구현예에 따르면, 상기 치료적 모이어티는 하기로 구성된 군으로부터 선택된다: 세포독성 모이어티, 독성 모이어티, 사이토카인 모이어티 및 약물.

[0022]

본 발명의 일부 구현예에 따르면, 상기 치료적 모이어티는 세포를 포함한다.

[0023]

본 발명의 일부 구현예에 따르면, 상기 세포는 하기로 구성된 군으로부터 선택된다: α β T-세포, γ δ T-세포, NK, CIK, NKT, 대식세포 및 B 세포.

[0024]

본 발명의 일부 구현예에 따르면, 항체는 이중특이적 항체이다.

[0025]

본 발명의 일부 구현예에 따르면, 상기 이중특이적 항체는 항-CD3 또는 항-CD16을 포함한다.

[0026]

본 발명의 일부 구현예에 따르면, 상기 항-CD3은 scFv를 포함한다.

[0027]

본 발명의 일부 구현예에 따르면, HLA 제한된 방식에서 HLA-A2/Tyr_{D369-377}을 결합할 수 있는 항체의 경쇄는 서열번호: 2를 포함한다.

[0028]

본 발명의 일부 구현예의 일 양태에 따르면 하기가 제공된다: 항체를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오타이드.

- [0029] 본 발명의 일부 구현예의 일 양태에 따르면 하기가 제공된다: 시스-작용 조절 인자에 작동가능하게 연결된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터.
- [0030] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 발현 벡터는 바이러스 벡터이다.
- [0031] 본 발명의 일부 구현예의 일 양태에 따르면 하기가 제공된다: 폴리뉴클레오타이드 또는 발현 벡터를 포함하는 세포.
- [0032] 본 발명의 일부 구현예의 일 양태에 따르면 하기가 제공된다: 청구항의 항체, 벡터 또는 세포를 포함하는 약제학적 조성물.
- [0033] 본 발명의 일부 구현예의 일 양태에 따르면 하기가 제공된다: 치료 유효량의 항체, 벡터 또는 세포를 그것을 필요로 하는 대상체에게 투여하고, 그것에 의해 흑색종 또는 교모세포종을 치료하는 것을 포함하는, 흑색종 또는 교모세포종을 치료하는 방법.
- [0034] 본 발명의 일부 구현예의 일 양태에 따르면 하기가 제공된다: 항체, 벡터 또는 세포로 흑색종 또는 교모세포종의 치료에 사용.
- [0035] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술 및/또는 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 당해 분야의 숙련가에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에서 기재된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 물질이 본 발명의 구현예의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 예시적인 방법 및/또는 물질이 아래에 기재되어 있다. 상충하는 경우에, 정의를 포함한 특허 명세서가 우선한다. 또한, 물질, 방법, 및 그 예는 단지 설명적이고 반드시 제한하려는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

- [0036] 본 발명의 일부 구현예들은 수반되는 도면들과 관련하여 단지 예로써 본 명세서에 기재된다. 이제 도면을 상세히 특이적 참조로 하여, 도시된 세부사항들은 예로써 그리고 본 발명의 구현예들의 예시적 논의를 목적으로 한다는 것이 강조된다. 이와 관련하여, 도면과 함께 이루어진 설명은 본 발명의 구현예들이 어떻게 실시될 수 있는지를 당해 분야의 숙련가에게 명백하게 한다.

도면에 있어서:

도 1은 인간화된 D11 (hD11-5) TCRL 항체 중쇄 및 경쇄의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열을 도시한다 (서열번호: 1-4 및 24-27를 포함함).

도 2는 SPR에 의해 결정된 HLA-A2/TyrD 369-377 복합체에 대한 D11 및 hD11-5 TCRL 항체의 명백한 결합 친화도 결정을 도시한다.

도 3은 HLA-A2+/Tyr 항원 양성 또는 음성 세포에 대한 바이오티닐화된 D11 및 hD11-5 TCRL 항체의 결합 특이성을 도시한다.

도 4는 HLA-A2+ 일차 정상 세포에 대한 바이오티닐화된 D11 및 hD11-5 TCRL 항체의 결합을 도시한다.

도 5A-B는 CD3-ChD11-5 이중특이적 (BS) TCRL에 의한 HLA-A2+/Tyr+ 및 HLA-A2+/Tyr- 세포주의 사멸을 도시한다 (서열번호: 16-21).

도 6은 CD3-ChD11-5 BS TCRL에 의한 HLA-A2+ 정상 일차 세포 및 정상 망막 색소 상피 세포주 (ARPE-19)의 사멸을 도시한다.

도 7은 확립된 인간 흑색종 이중이식 모델 Me1526에서 CD3-D11 및 CD3-ChD11-5 BS TCRL의 항종양 활성을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0037] 본 발명의 특이적 구현예들의 설명
- [0038] 본 발명은, 이들의 일부 구현예에서, 하기에 관한 것이다: HLA 제한된 방식에서 HLA-A2/TyrD를 결합할 수 있는 항체 및 이의 용도. 본 발명의 적어도 하나의 구현예를 상세히 설명하기 전에, 본 발명은 하기 설명에서 제시되거나 실시예에 의해 예시된 세부사항으로 본 발명의 적용에 반드시 제한되는 것은 아니라는 것을 이해해야 한다. 본 발명은 다른 구현예가 가능하거나 또는 다양한 방식으로 실시 또는 수행될 수 있다.

[0039] T 세포 수용체 (TCR)-유사 (TCRL) 항체에는 중앙 에피토프에 대한 TCR-유사 특이성이 부여된다. HLA-펩타이드 항원 복합체에 대해 저친화도를 나타내는 TCR과 달리, TCRL은 그것의 가용성 형태에서도 친화도를 특징으로 한다. TCRL은 중앙 세포를 표적으로 하고 그것의 특이적 사멸을 매개하기 위한 신규한 치료제 부류로 개발되고 있다.

[0040] 본 발명자들은 이전에 힘든 스크린 및 실험과정을 통해 TyrD-HLA-A2 (WO2016/199141)에 대해 전례없는 정밀한 특이성을 나타내는 TCRL 동정하였다. 본 항체는 일명 D11이다.

[0041] 본 발명자들은 이제 D11을 성공적으로 인간화하였고, 항 CD3 아암을 갖는 이들의 이중특이적 배치형태를 생성하였다. 중요한 경쇄 가변 영역 (Y49H) 내 프레임워크 변형을 포함한 다루기 힘든 인간화 과정에 이어, hD11-5로 명명된 완전한 인간화된 항체를 수득하였다. 인간화된 형태는 명백한 결합 친화도 및 결합 특이성을 포함한 D11의 모든 기능적 특징을 유지한다 (도 2-4). 항-CD3 아암 (일명 CD3-ChD11-5)을 포함하는 항체의 이중특이적 배치형태는 시험관내 및 생체내에서 결정될 때 흑색종 세포 사멸에서 강력한 활성을 나타냈다 (도 5-7 참고).

[0042] 전적으로, 본 발견은 hD11-5를 암의 치료에 강력한 도구로 제시한다.

[0043] 따라서, 본 발명의 일 양태에 따르면 N-C로 정렬된 CDR 서열을 포함하는 항원 결합 도메인을 포함하는 항체가 제공된다:

CDR1 중쇄 (HC)	서열번호: 8		TSGMGVS
CDR2 HC	서열번호: 9		HIYWDDDKRYNPSLKS
CDR3 HC	서열번호: 10		KDYGSSFYAMHY
CDR1 경쇄 (LC)	서열번호: 5		KASQDIHNYIA
CDR2 LC	서열번호: 6		YTSTLQP
CDR3 LC	서열번호: 7		LQYDNLWT

[0044]

[0045] 상기 항체의 중쇄의 가변 영역은 서열번호: 4로 제시되고, 그리고 항체는 HLA 제한된 방식에서 HLA-A2/Tyr_{D369-377}을 결합할 수 있다.

[0046] 대안적으로, N-C로 정렬된 CDR 서열을 포함하는 항원 결합 도메인을 포함하는 항체가 제공된다:

CDR1 중쇄 (HC)	서열번호: 8		TSGMGVS
CDR2 HC	서열번호: 9		HIYWDDDKRYNPSLKS
CDR3 HC	서열번호: 10		KDYGSSFYAMHY
CDR1 경쇄 (LC)	서열번호: 5		KASQDIHNYIA
CDR2 LC	서열번호: 6		YTSTLQP
CDR3 LC	서열번호: 7		LQYDNLWT

[0047]

[0048] 상기 항체의 중쇄의 가변 영역은 서열번호: 4로 제시되고, 항체의 경쇄의 가변 영역은 서열번호: 2로 제시되고, 그리고 항체는 HLA 제한된 방식에서 HLA-A2/Tyr_{D369-377}을 결합할 수 있다.

[0049] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "결합하는" 또는 "결합한다"는 일반적으로 임상적으로 관련된 TCRL의 경우에서, 그리고 이 경우에, 표면 플라즈몬 공명 감정 (SPR)에 의해 결정될 때, 5 nM 아래 (예를 들어, 3.5-4.9 nM) K_D의 범위에서, 결합하는 항체-항원 방식을 지칭한다.

[0050] 그것의 항원에 대한 항체의 친화도는 결합능의 기여를 최소화하기 위해 포착된 또는 고정된 단클론성 항체 (MAb) 형식을 사용하여 표면 플라즈몬 공명 (SPR)에 의해 결정된다. 친화도 평가에 대해, 항원은 그것의 가용성 형태 즉, 하기 본 명세서에서 기재된 바와 같은 단일 사슬 (sc)HLA-A2/Tyr_{D369-377} 복합체에서 사용된다.

[0051] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "K_D"는 항원 결합 도메인과 그것의 각각의 항원 사이의 평형 해리 상수를

지칭한다.

- [0052] 본 발명에서 사용된 바와 같이 용어 "항체"는 온전한 분자 예를 들어, IgG 뿐만 아니라 그것의 단편을 포함하며 이것은 인간화된 중쇄의 가변 영역 즉, 서열번호: 4를 포함한다.
- [0053] 특정 구현예에 따르면, 항체 단편은, 비제한적으로, HLA 제한된 방식에서 항원의 에피토프에 결합할 수 있는 단일 사슬, F_{ab} , $F_{ab'}$ 및 $F_{(ab')_2}$ 단편, Fv, dsFv, scFvs, 디아바디, 미니바디, 나노바디, F_{ab} 발현 라이브러리 또는 단일 도메인 분자 예컨대 VH 및 VL을 포함한다.
- [0054] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "가변 영역" 및 "CDR"은 접근법의 조합을 포함하여, 임의의 당업계에서 알려진 접근법에 의해 정의된 가변 영역 및 CDR을 지칭할 수 있다. 특정 구현예에 따르면, CDR은 Kabat 등 (상동)에 따라 결정된다.
- [0055] 특정 구현예에 따르면, 항체는 인간화된 항체이다.
- [0056] 특정 구현예에 따르면, 항체는 키메라 항체이다.
- [0057] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "키메라 항체"는 적어도 하나의 사슬이 비-인간 (예를 들어, 쥐과) 동물의 것이고 불변 영역 [예를 들어, 불변 영역 예를 들어, CL (카파 또는 람다)]은 인간인 항체를 지칭한다. 따라서, 예를 들어, 항체는 양 사슬이 비-인간 가변 영역 및 인간 불변 영역을 포함하는 완전 항체 또는 이의 단편일 수 있다. 또 다른 예에 따르면, 하나의 사슬은 인간화되고 또 다른 사슬은 비-인간 가변 영역 및 인간 불변 영역을 포함한다. 키메라 항체의 이중특이적 배치형태는 하기 본 명세서에서 기재된다.
- [0058] 비-인간 (예를 들어, 쥐과) 항체의 인간화된 형태는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 면역글로불린, 면역글로불린 사슬의 키메라 분자이다. 인간화된 항체는 수령체의 상보적 결정 영역 (CDR)으로부터의 잔기가 원하는 특이성, 친화도 및 효력 (세포 사멸)을 갖는, 이 경우에 마우스와 같은 비-인간 종 (공여체 항체)의 CDR로부터의 잔기에 의해 대체된 인간 면역글로불린 (수령체 항체)을 포함한다. 일부 사례에서, 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 잔기는 상응하는 비-인간 잔기에 의해 대체된다. 인간화된 항체는 또한 수령체 항체에서도 또는 유입된 CDR 또는 프레임워크 서열에서도 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 인간화된 항체는 비-인간 면역글로불린의 것들에 상응하는 모든 CDR 영역 및 인간 면역글로불린 공통 서열의 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역을 포함한다. 인간화된 항체는 최적으로 또한 면역글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부분, 전형적으로 인간 면역글로불린의 것을 포함할 것이다 [Jones 등, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann 등, Nature, 332:323-329 (1988); 및 Presta, Curr.Op.Struct.Biol., 2:593-596 (1992)].
- [0059] 특정 구현예에 따르면, 항체는 서열번호: 2 또는 25에 제시된 바와 같은 경쇄의 가변 영역을 포함하고 그리고 따라서 인간화된 항체이다.
- [0060] 특정 구현예에 따르면, 항체는 서열번호: 19에 제시된 바와 같은 경쇄의 가변 영역을 포함한다.
- [0061] 일부 구현예에서, 면역글로불린 아이소타입은 IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4, 더 상세하게는, IgG1 또는 IgG4로부터 선택된다. 특정 구현예에 따르면, 아이소타입은 IgG1이다.
- [0062] 특정 구현예에 따르면 항체는 치료적 모이어티를 포함한다.
- [0063] 특정 구현예에 따르면, 항체는 이중특이적 항체이다. 따라서, 하기와 같은 hD11-5 항체의 이중특이적 배치형태가 또한 본 명세서에서 고려된다: 인간화된 형태 (서열번호: 2 및 서열번호: 4 각각에 제시된 바와 같은 경쇄 및 중쇄의 가변 영역을 갖는 것) 또는 키메라 형태 (예를 들어, 서열번호: 19에 제시된 바와 같은 경쇄의 가변 도메인을 갖는 것 및 서열번호: 21에 제시된 바와 같은 중쇄의 가변 도메인을 갖는 것). 이중특이적 항체 (BsAb)는 2개의 상이한 단클론성 항체의 단편으로 구성되고 결과적으로 2개의 상이한 유형의 항원 이 경우에 HLA-A2/TyrD₃₆₉₋₃₇₇ 및 또 다른 에피토프로 뚜렷하게 다른 것의 상기 TyrD₃₆₉₋₃₇₇에 결합하는 인공 단백질이다. 특정 구현예에 따르면 BsAb는 CD3을 통해 세포독성 세포 예컨대 T 세포 및 TyrD HLA-A2-제한된 펩타이드를 통해 표적 흑색종 세포에 동시에 결합하도록 조작된다. 다른 예시적인 배치형태가 하기 본 명세서에 기재되어 있다.
- [0064] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 어구 "MHC (또는 HLA)-제한된 펩타이드"는 HLA 분자 상에 제시된 펩타이드를 지칭하고, 이 경우에 TyrD₃₆₉₋₃₇₇ (여기서 다음과 같이 단축됨: "TyrD" 서열번호: 15)로 HLA-A2 분자 상에 제시된다.
- [0065] 특정 구현예에 따르면, 항-CD3의 scFv는 서열번호: 16, 17, 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드에서 제시된

바와 같다).

- [0066] 본 발명의 일 양태에 따르면 본 명세서에서 기재된 바와 같은 항체를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오타이드가 또한 제공된다.
- [0067] 특정 구현예에 따르면, HLA-A2 제한된 방식에서 TyrD₃₆₉₋₃₇₇을 결합할 수 있는 인간화된 항체를 인코딩하는 핵산 서열은 서열번호: 1, 3, 24, 26에 제시된 바와 같다.
- [0068] 특정 구현예에 따르면, HLA 제한된 방식에서 TyrD₃₆₉₋₃₇₇을 결합할 수 있는 키메라 항체를 인코딩하는 핵산 서열은 서열번호: 3, 20 또는 26 및 18에 제시된 바와 같다.
- [0069] 특정 구현예에 따르면, 항-CD3 scFv를 인코딩하는 핵산 서열은 서열번호: 17에 제시된 바와 같다.
- [0070] 시스-작용 조절 인자에 작동가능하게 연결된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터가 또한 제공된다.
- [0071] 본 발명의 일부 구현예들의 핵산 작제물 (또한 본 명세서에서 일명 "발현 벡터")은 이 벡터를 원핵생물, 진핵생물, 또는 바람직하게는 둘 모두 (예를 들어, 서틀 벡터)에서 복제 및 통합에 적합하게 하는 추가의 서열을 포함한다. 부가하여, 전형적인 클로닝 벡터는 또한 전사 및 번역 개시 서열, 전사 및 번역 종결자 및 폴리아데닐화 신호를 함유할 수 있다. 예로써, 이러한 작제물은 전형적으로 5' LTR, tRNA 결합 부위, 패키징 신호, 제2-가닥 DNA 합성의 기원, 및 3' LTR 또는 이들의 부분을 포함할 것이다.
- [0072] 본 발명의 일부 구현예들의 핵산 작제물은 전형적으로 이것이 배치된 숙주세포로부터 항체의 분비 또는 제시를 위한 신호 서열을 포함한다. 바람직하게는 이러한 목적을 위한 신호 서열은 포유동물 신호 서열이다.
- [0073] 진핵 프로모터는 전형적으로 두 유형의 인식 서열인, TATA 박스 및 업스트림 프로모터 요소를 함유한다. 전사 시작 부위의 25-30개 염기쌍 업스트림에 위치한 TATA 박스는 RNA 중합효소가 RNA 합성을 개시하도록 지시하는데 관여된다고 생각된다. 다른 업스트림 프로모터 요소는 전사가 개시되는 속도를 결정한다.
- [0074] 바람직하게는, 본 발명의 일부 구현예들의 핵산 작제물에 의해 이용된 프로모터는 형질전환된 특이적 세포 모집단에서 활성이다. 세포 유형-특이적 및/또는 조직-특이적 프로모터의 예는 하기를 포함한다: 간 특이적인 프로모터 예컨대 알부민 [Pinkert 등, (1987) Genes Dev. 1:268-277], 림프양 특이적 프로모터 [Calame 등, (1988) Adv.Immunol. 43:235-275]; 특히 T-세포 수용체의 프로모터 [Winoto 등, (1989) EMBO J. 8:729-733] 및 면역글로불린; [Banerji 등 (1983) Cell 33729-740], 뉴런-특이적 프로모터 예컨대 신경필라멘트 프로모터 [Byrne 등 (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477], 췌장-특이적 프로모터 [Edlunch 등 (1985) Science 230:912-916] 또는 유선-특이적 프로모터 예컨대 밀크 유장 프로모터 (미국특허 번호 4,873,316 및 유럽 출원 공개 번호 264,166).
- [0075] 향상제 요소는 연결된 상동성 또는 이중성 프로모터로부터 최대 1,000배 전사를 자극할 수 있다. 향상제는 전사 시작 부위로부터 다운스트림 또는 업스트림에 배치될 때 활성적이다. 바이러스로부터 유래된 많은 향상제 요소는 넓은 숙주 범위를 가지며 다양한 조직에서 활성적이다. 예를 들어, SV40 초기 유전자 향상제는 많은 세포 유형에 적합하다. 본 발명의 일부 구현예들에 적합한 다른 향상제/프로모터 조합은 폴리오마 바이러스, 인간 또는 쥘과 사이토메갈로바이러스 (CMV), 다양한 레트로바이러스 예컨대 쥘과 백혈병 바이러스, 쥘과 또는 루 육종 바이러스 및 HIV로부터 장기간 반복으로부터 유래된 것들을 포함한다. 본 명세서에 참고로 편입된, Enhancers and Eukaryotic Expression, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1983 참고.
- [0076] 발현 벡터의 구축에 있어서, 프로모터는 바람직하게는 그것의 천연 환경에서 전사 개시 부위로부터 있는 그대로의 이중성 전사 개시 부위로부터 대략 동일한 거리에 배치된다. 그러나, 당업계에서 알려진 바와 같이, 프로모터 기능의 손실 없이 이 거리에서 일부 변동은 수용될 수 있다.
- [0077] 폴리아데닐화 서열은 또한 TCRL mRNA 번역의 효율을 증가시키기 위해 발현 벡터에 첨가될 수 있다. 정확하고 효율적인 폴리아데닐화를 위해 2개의 뚜렷한 서열 요소가 필요하다: 폴리아데닐화 부위로부터 다운스트림으로 위치한 GU 또는 U 풍부 서열 및 11-30개 뉴클레오타이드 업스트림으로 위치한 6개 뉴클레오타이드, AAUAAA의 고도로 보존 서열.본 발명의 일부 구현예들에 대해 적합한 종결 및 폴리아데닐화 신호는 SV40으로부터 유래된 것들을 포함한다.
- [0078] 이미 기재된 요소에 부가하여, 본 발명의 일부 구현예들의 발현 벡터는 클로닝된 핵산의 발현 수준을 증가시키거나 또는 재조합 DNA를 수반하는 세포의 확인을 촉진하기 위해 의도된 다른 특화된 요소를 전형적으로 함유할 수 있다. 예를 들어, 수많은 동물 바이러스는 허용된 세포 유형에서 바이러스 게놈의 추가의 염색체 복제를 증

진하는 DNA 서열을 함유한다. 이들 바이러스 레플리콘을 담지하는 플라스미드는 플라스미드 상에 수반되거나 숙주세포의 계놈과 함께 수반되는 유전자에 의해 적절한 인자가 제공되는 한 에피솜 상태로 복제된다.

- [0079] 벡터는 진핵 레플리콘을 포함하거나 하지 않을 수 있다. 진핵 레플리콘이 존재하는 경우, 벡터는 적절한 선별 마커를 사용하여 진핵 세포에서 증폭가능하다. 벡터가 진핵 레플리콘을 포함하지 않는 경우, 에피솜 증폭은 가능하지 않다. 대신에, 재조합 DNA는 조작된 세포의 계놈으로 통합되며, 여기서 프로모터는 원하는 핵산의 발현을 지시한다.
- [0080] 포유동물 세포에서 재조합 폴리펩타이드 발현의 개선은 형질감염된 숙주세포에서 유전자 용량을 효과적으로 증가시킴에 의해 달성될 수 있다. 유전자 복제수의 증가는 효소 예컨대 디하이드로폴레이트 환원효소 (DHFR) 또는 글루타민 합성효소 (GS)에서 결핍된 세포주를, DHFR을 억제하는 메토틱세이트 (MTX) 및 GS를 억제하는 메티오닌 설펍사민 (MSX)과 같은 이들 효소 및 체제를 인코딩하는 유전자를 함유하는 발현 벡터와 공조하여 사용한 유전자 증폭에 의해 가장 통상적으로 달성된다. 따라서, 예시적인 구현예에서, DHFR 또는 GS, DHFR⁺ 또는 GS.sup⁺ 감염체를 각각 인코딩하는 강한 프로모터 및 유전자의 제어 하에서 재조합 유전자를 함유하는 발현 벡터가 수득될 수 있고 유전자 증폭은 그 다음 점진적으로 증가하는 농도의 MTX 또는 MSX에서 감염체를 성장시킴에 의해 달성된다.
- [0081] 발현에 대한 예시적인 시스템은 EP2861741, US20120178126, 및 US20080145895에 기재되어 있고, 이들 각각은 본 명세서에 전체적으로 참고로 편입된다.
- [0082] 본 명세서에서 기재된 바와 같은 폴리뉴클레오타이드/발현 벡터를 포함하는 세포가 또한 제공된다.
- [0083] 항체-인코딩하는 벡터의 클로닝 또는 발현을 위한 적합한 숙주세포는 본 명세서에 기재된 원핵 또는 진핵 세포를 포함한다. 예를 들어, 특히 당화 및 Fc 효과기 기능이 필요하지 않은 경우, 항체는 박테리아에서 생산될 수 있다. 또한 하기를 참조한다: Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pp. 245-254, 이것은 E. 콜리에서 항체 단편의 발현을 기술한다. 발현 후, 항체는 가용성 분획 내 박테리아 세포 페이스트로부터 분리될 수 있고 추가로 정제될 수 있다.
- [0084] 원핵생물에 부가하여, 그의 당화 경로가 "인간화되어", 부분적으로 또는 완전 인간 당화 패턴을 갖는 항체의 생산을 초래하는 진균 및 효모 균주를 포함하는, 진핵 미생물 예컨대 사상균 또는 효모가 항체-인코딩하는 벡터에 대한 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 하기 참고: Gerngross, Nat. Biotech.22:1409-1414 (2004), 및 Li 등, Nat. Biotech.24:210-215 (2006).
- [0085] 당화된 항체의 발현을 위한 적합한 숙주세포는 또한 다중세포 유기체 (무척추동물 및 척추동물)로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 특히 스포도프테라 프루지페라 세포의 형질감염을 위해 곤충 세포와 공조하여 사용될 수 있는, 수많은 바콜로바이러스 균주가 확인되었다.
- [0086] 식물 세포 배양물이 또한 숙주로 이용될 수 있다. 하기 참고, 예를 들어, 미국특허 번호 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978, 및 6,417,429 (형질전환 식물에서 항체를 생산하기 위한 PLANTIBODIES.TM. 기술을 기재함).
- [0087] 척추동물 세포가 또한 숙주로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 현탁액에서 성장하도록 적응된 포유동물 세포주가 유용할 수 있다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 다른 예는 하기와 같다: SV40 (COS-7)에 의해 전환된 원숭이 신장 CV1 라인; 인간 배아 신장 라인 (예를 들어, 하기에 기재된 바와 같은 293 또는 293 세포; Graham 등, J. Gen Virol.36:59 (1977)); 어린 햄스터 신장 세포 (BHK); 마우스 세르틀리 세포 (예를 들어, 하기에 기재된 바와 같은 TM4 세포; Mather, Biol. Reprod.23:243-251 (1980)); 원숭이 신장 세포 (CV1); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76); 인간 자궁경부 암종 세포 (HELA); 갯과 신장 세포 (MDCK; 버팔로 랫트 간 세포 (BRL 3A); 인간 폐 세포 (W138); 인간 간 세포 (Hep G2); 마우스 유선 종양 (MMT 060562); 예를 들어, 하기에 기재된 바와 같은 TRI 세포; Mather 등, Annals N.Y.Acad. Sci. 383:44-68 (1982); MRC 5 세포; 및 FS4 세포. 다른 유용한 포유동물 숙주 세포주는 DHFR.sup.- CHO 세포 (Urlaub 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980))를 포함한 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포; 및 골수종 세포주 예컨대 Y0, NS0 및 Sp2/0를 포함한다. 항체 생산에 적합한 특정 포유동물 숙주 세포주의 검토에 대해서는, 예를 들어, 하기를 참고한다: Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J.), pp. 255-268 (2003).
- [0088] 항체의 고특이성은 이것을 진단 (특히 항체의 인간화된 특성이 중요한 생체내에서의 진단) 및 치료적 적용에 특

히 적합하게 한다.

- [0089] 따라서, 본 발명 의일 양태에 따르면, HLA 제한된 방식으로 TyrD₃₆₉₋₃₇₇을 제시하는 세포를 검출하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 HLA-A2-제한된 TyrD 펩타이드 항원에 대해 특이성을 갖는 본 발명의 항체와 세포를 접촉시키는 것을 포함한다. 접촉은, 면역복합체의 존재 또는 이들의 수준이 관심 있는 HLA-제한된 펩타이드 항원을 제시하는 세포를 나타내는, 면역복합체 형성을 허용하는 조건 하에서 영향을 받는다.
- [0090] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "검출하는"은 세포를 검출, 인지, 폭로, 노출, 시각화 또는 식별하는 행위를 지칭한다. 정확한 검출 방법은 하기 본 명세서에 추가로 기재된 바와 같이 항체가 부착된 검출가능 모이어티 (또한 본 명세서에서 일명 확인가능한 모이어티)에 의존적이다.
- [0091] 상기-언급된 검출 방법은 HLA 제한된 방식에서 TyrD₃₆₉₋₃₇₇의 제시를 특징으로 하는 암 예를 들어, 흑색종 및 교모세포종의 진단에 활용될 수 있다.
- [0092] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "진단하는"은 하기를 지칭한다: 질환을 분류하는 것, 질환의 중증도 (등급 또는 단계)를 결정하는 것, 진행을 모니터링하는 것, 질환의 결과 및/또는 회복의 전망을 예측하는 것.
- [0093] 대상체는 일상적인 건강 검진을 받는 건강한 대상체 (예를 들어, 인간)일 수 있다. 대안적으로, 상기 대상체는 질환의 위험에 있을 수 있다. 여전히 대안적으로, 본 방법은 치료 효능을 모니터링하기 위해 사용될 수 있다.
- [0094] TCRL은 예를 들어 확인가능한 모이어티에 부착된 것을 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, TCRL (또는 이를 포함하는 복합체)은 예컨대 이차 항체를 사용함에 의해 간접적으로 확인될 수 있다.
- [0095] 언급된 바와 같이, 본 발명의 방법은 면역복합체 (예를 들어, 전형적으로 세포가 용해되지 않을 때, 본 발명의 항체와 HLA에 복합체화된 펩타이드 사이의 복합체)를 형성하기에 충분한 조건 하에서 영향을 받고; 이러한 조건 (예를 들어, 적절한 농도, 완충제, 온도, 반응 시간)뿐만 아니라 이러한 조건을 최적화하는 방법은 당해 분야의 숙련가에게 공지되어 있고, 그 예는 본 명세서에서 개시되어 있다.
- [0096] 본 발명의 항체는 암의 치료에 특히 유용하다.
- [0097] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "암"은 비정상적인 세포의 신속하고 조절되지 않는 성장을 특징으로 하는 질환으로 정의된다. 암 세포는 국소적으로 또는 혈류 및 림프계를 통해 신체의 다른 부분으로 퍼질 수 있다.
- [0098] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 병리학은 고형 종양이다.
- [0099] 특정 구현예에 따르면, 병리학은 흑색종이다.
- [0100] 특정 구현예에 따르면, 병리학은 교모세포종이다.
- [0101] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 본 발명의 항체는 항종양 효과를 갖는다.
- [0102] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "항종양 효과"는 종양 부피의 감소, 종양 세포 수의 감소, 전이 횟수의 감소, 기대 수명의 증가 또는 암성 상태와 연관된 다양한 생리적 증상의 개선에 의해 명시될 수 있는 생물학적 효과를 지칭한다. "항종양 효과"는 또한 처음 장소에서 종양 발생의 예방에 있어서 본 발명의 약제의 능력에 의해 명시될 수 있다.
- [0103] 특정 구현예에 따르면, 항체는 티로시나제 (TyrD) 양성 암에 대한 것이다.
- [0104] 용어 "TyrD₃₆₉₋₃₇₇-양성 암"은 HLA-제한된 방식에서 TyrD를 나타내는 세포를 포함하는 암을 지칭한다. 특정 구현예에 따르면, TyrD₃₆₉₋₃₇₇-양성 암은 흑색종 또는 교모세포종이다.
- [0105] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "흑색종"은 멜라닌세포로 알려진 안료-함유 세포로부터 발생하는 암을 지칭한다. 흑색종은 전형적으로 피부에서 발생하지만 입, 갈, 또는 눈에서는 거의 발생하지 않을 수 있다.
- [0106] 본 발명의 구현예들은 하기 유형의 흑색종 지칭한다:
- [0107] 악성 흑자
- [0108] 악성 흑자 흑색종
- [0109] 표재 확장성 흑색종

- [0110] 선단 흑자성 흑색종
- [0111] 점막 흑색종
- [0112] 결절성 흑색종
- [0113] 폴립형 흑색종
- [0114] 결합조직형성 흑색종
- [0115] 작은 모반-유사 세포를 갖는 흑색종
- [0116] 스피즈 모반의 특징을 갖는 흑색종
- [0117] 포도막 흑색종
- [0118] 흑색종 암 병기결정은 TNM에서 이용가능하다. 또한 중요한 것은 "Clark 수준" 및 "Breslow의 깊이"로, 이것은 종양 침습의 현미경적 깊이를 지칭한다.
- [0119] 흑색종 단계로, 이들 각각은 본 명세서에서 고려된다.
- [0120] 단계 0: 원위치 흑색종 (Clark 수준 I), 99.9% 생존
- [0121] 단계 I / II: 침습성 흑색종, 89-95% 생존
- [0122] T1a: 1.0 mm 미만의 원발성 종양 두께, 궤양화 없음, 및 유사분열 $< 1/\text{mm}^2$
- [0123] T1b: 1.0 mm 미만의 원발성 종양 두께, 궤양화 없음 또는 유사분열 $\geq 1/\text{mm}^2$
- [0124] T2a: 1.01-2.0 mm 원발성 종양 두께, 궤양화 없음
- [0125] 단계 II: 고위험 흑색종, 45-79% 생존
- [0126] T2b: 1.01-2.0 mm 원발성 종양 두께, 궤양화 있음
- [0127] T3a: 2.01-4.0 mm 원발성 종양 두께, 궤양화 없음
- [0128] T3b: 2.01-4.0 mm 원발성 종양 두께, 궤양화 있음
- [0129] T4a: 4.0 mm 초과 원발성 종양 두께, 궤양화 없음
- [0130] T4b: 4.0 mm 초과 원발성 종양 두께, 궤양화 있음
- [0131] 단계 III: 영역 전이, 24-70% 생존
- [0132] N1: 단일 양성 림프절
- [0133] N2: 2 내지 3개 양성 림프절 또는 영역 피부/전이 중인 전이
- [0134] N3: 4개 양성 림프절 또는 1개 림프절 및 영역 피부/전이 중인 전이
- [0135] 단계 IV: 원격 전이, 7-19% 생존
- [0136] M1a: 원격 피부 전이, 정상 LDH
- [0137] M1b: 폐 전이, 정상 LDH
- [0138] M1c: 다른 원격 전이 또는 상승된 LDH를 갖는 임의의 원격 전이
- [0139] AJCC에 기반하여 적절한 치료로 초기 흑색종 진단으로부터 5-년 생존.
- [0140] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "교모세포종" 또는 "다형성 교모세포종 (GBM)"은 뇌 내에서 개시하는 가장 공격적인 암을 지칭한다.
- [0141] 특정 구현예에 따르면, 교모세포종은 아래와 같이 분류될 수 있다:
- [0142] 고전적: '고전적' 아형에서 종양 중 96 퍼센트는 표피 성장 인자 수용체 (EGFR) 유전자의 추가의 복제를 담지하고, 대부분은 표피 성장 인자 수용체 (EGFR)의 정상 발현보다 더 높고, 반면에 교모세포종에서 종종 돌연변이되는 유전자 TP53 (p53)은 이 아형에서 거의 돌연변이되지 않는다.

- [0143] 전신경 아형은 종종 TP53 (p53), 및 a-유형 혈소판-유래된 성장 인자 수용체를 인코딩하는 유전자인, PDGFRA, 및 이소시트레이트 탈수소효소-1을 인코딩하는 유전자인, IDH1에서 고속의 변형을 갖는다.
- [0144] 간엽 아형은 뉴로피브로민 1을 인코딩하는 유전자인, NF1에서 고속의 돌연변이 또는 다른 변형 및 다른 유형보다 EGFR 유전자에서 적은 변형과 EGFR의 낮은 발현을 특징으로 한다.
- [0145] 신경 아형은 뉴런 마커 예컨대 NEFL, GABRA1, SYT1 및 SLC12A5의 발현에 의해 대표된다.
- [0146] 많은 다른 유전적 변이가 교모세포종에 기재되어 있고, 이들 중 다수는 RB 및 PI3K/AKT인, 2개 경로로 클러스터링된다. 교모세포종은 각각 이들 경로의 68-78% 및 88%에서 변형이 있다.
- [0147] 또 다른 중요한 변형은 "자살" DNA 회복 효소인 MGMT의 메틸화이다. 메틸화는 DNA 전사 및 따라서 MGMT 효소의 발현을 손상시키는 것으로 기재되어 있다. MGMT 효소는 그것의 자살 회복 기전으로 인해 하나의 DNA 알킬화만을 회복할 수 있기 때문에, 역 수용력이 낮고 MGMT 유전자 프로모터의 메틸화는 DNA-회복 수용력에 크게 영향을 준다. ^{[35][36]} 사실상, MGMT 메틸화는 DNA-손상 화학치료제, 예컨대 테모졸로마이드로의 치료에 대한 개선된 반응과 관련이 있다.
- [0148] 어느 경우에도, 일부 구현예에 따르면, 상기 암은 (예를 들어, 당해 분야에서 잘 알려진 방법 예컨대 RT-PCR 또는 면역조직화학을 사용하여 결정될 때) 티로시나제 mRNA 또는 단백질의 발현을 특징으로 한다.
- [0149] 진술한 분류는 진단 및 치료 둘 모두와 관련이 있다.
- [0150] 본 발명의 면역복합체의 존재 또는 수준을 결정하는 것은 항체가 부착된 검출가능 모이어티에 의존적이다.
- [0151] 본 발명에 사용될 수 있는 검출가능 모이어티의 예는 비제한적으로 방사성 동위원소, 인광 화학물질, 화학발광 화학물질, 형광 화학물질, 효소, 형광 폴리펩타이드 및 에피토프 태그를 포함한다. 검출가능 모이어티는 결합 쌍의 구성원일 수 있고, 이는 결합 쌍의 추가 구성원과의 그것의 상호작용 및 직접적으로 시각화된 표지를 통해 확인가능하다. 일 예에서, 결합 쌍의 구성원은 상응하는 라벨링된 항체에 의해 확인되는 항원이다. 일 예에서, 표지는 형광 단백질 또는 비색계 반응을 생성하는 효소이다.
- [0152] 검출가능한 모이어티의 추가의 예는 양전자 방출 단층촬영 (PET) 및 자기 공명 영상 (MRI)에 의해 검출가능한 것들을 포함하고, 이들 모두는 당해 분야의 숙련자에게 잘 알려져 있다.
- [0153] 검출가능한 모이어티가 폴리펩타이드인 경우, 면역표지 (즉, 검출가능한 모이어티에 접합된 항체)는 재조합 수단에 의해 생성될 수 있거나 또는, 예를 들어, 고상 펩타이드 합성 기술을 사용하여 정의된 순서대로 하나 이상의 아미노산 잔기의 단계적인 첨가에 의해 화학적으로 합성될 수 있다. 재조합 DNA 기술 (여기서 TCRL을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 검출가능한 모이어티에 번역적으로 융합됨)을 사용하여 본 발명의 항체에 연결될 수 있는 폴리펩타이드 검출가능한 모이어티의 예는 형광 폴리펩타이드, 인광 폴리펩타이드, 효소 및 에피토프 태그를 포함하는.
- [0154] 대안적으로, 본 발명의 항체에 대한 검출가능한 모이어티의 화학적 부착은 펩타이드 결합을 통해 (검출가능한 모이어티가 폴리펩타이드인 경우) 또는 개재하는 링커 요소, 예컨대 링커 펩타이드 또는 다른 화학적 모이어티, 예컨대 유기 폴리머에 대한 공유결합을 통해서와 같이, 직접적이든 간접적이든 임의의 적합한 화학적 연결을 사용하여 영향을 받을 수 있다. 이러한 키메라 펩타이드는 펩타이드의 카복시 (C) 또는 아미노 (N) 말단에서의 결합을 통해, 또는 내부 화학기 예컨대 직쇄형, 분지형 또는 환형 측쇄, 내부 탄소 또는 질소 원자, 및 기타 동종의 것에 결합을 통해 연결될 수 있다. 이러한 변형된 펩타이드는 펩타이드 합성 및/또는 펩타이드의 공유결합의 잘 알려진 방법을 사용하여 당해 분야의 숙련자에 의해 용이하게 확인되고 제조될 수 있다. 항체의 형광 라벨링의 설명은 하기에서 상세히 제공되어 있다: 미국특허 번호 3,940,475, 4,289,747, 및 4,376,110.
- [0155] 따라서, 본 명세서에 기재된 콘주게이트는 항체를 지질, 탄수화물, 단백질, 독소, 약물 또는 다른 원자 및 분자와 연결하는 알려진 방법에 의해 제조될 수 있다. 일부 구현예에서, 콘주게이트는 적합한 연결 또는 결합을 사용하여 부위-특이적인 콘주게이션에 의해 형성된다. 부위-특이적인 콘주게이션은 항체의 결합 활성을 보존할 가능성이 높다. 서브스텐스는 티오에테르 결합 형성을 통해 환원된 항원 결합 작제물의 힌지 영역에 접합되거나 부착될 수 있다. 일부 구현예에서, 티로신 콘주게이션이 이용될 수 있다. 콘주게이트를 형성하기 위해 사용된 다른 연결기 또는 결합은, 비제한적으로, 공유결합, 비-공유결합, 디설파이드 연결, 하이드라존 연결, 에스테르 결합, 아미도 연결, 및 아미노 연결, 이미노 연결, 티오세미카바존 연결, 세미카바존 연결, 옥심 결합 및 탄소-탄소 연결을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 시스테인 또는 다른 연결 양태는 항체에 포함될 필요가 없다

(바이오콘주게이트 기술 (제3 판) 저자(들):Greg T.Hermanson ISBN:978-0-12-382239-0).

- [0156] 모이어티를 접합하기 위한 예시적인 방법은 W02017/027325 또는 U.S. 9,078,931에 기재되어 있고, 이들 각각은 전체적으로 본 명세서에 참고로 통합된다.
- [0157] 언급된 바와 같이, 본 발명의 항체는 또한 치료제에 사용될 수 있다.
- [0158] 전체의 항체에서, Fc 도메인이 항체-의존적 세포-매개된 세포독성 (ADCC)을 활성화시키기 때문에 치료적 활성은 분자에 고유하다. ADCC는 세포-매개된 면역 방어의 기전으로 그것에 의하여 면역계의 효과기 세포는 막-표면 항원이 특이적 항체에 의해 결합된 표적 세포를 활동적으로 용해한다. 이것은 체액 면역 반응의 일부로서 항체가 감염을 제한하고 억제하도록 작용할 수 있는 기전 중 하나이다. 고전적 ADCC는 자연 살해 (NK) 세포에 의해 매개되고; 대식세포, 중성구 및 호산구가 또한 ADCC를 매개할 수 있다. 예를 들어, 호산구는 IgE에 의해 매개된 ADCC를 통해 연충으로 알려진 특정 기생충 벌레를 사멸할 수 있다. ADCC는 이전의 항체 반응에 대한 그것의 의존성에 기인하여 적응성 면역 반응의 일부이다.
- [0159] 대안적으로 또는 추가로 그리고 언급된 바와 같이, 항체는 치료적 모이어티가 예를 들어 항 CD3 항체 또는 항 CD16a와 같은 T 세포 연관체인 이중특이적 항체 일 수 있거나, 대안적으로 치료적 모이어티는 항 면역 관문 분자일 수 있다 (예를 들어 항 PD-1, 항-PD-L1, 항-CTLA4). 특정 구현예에 따르면, 치료적 모이어티는 항 CD3이다.
- [0160] 대안적으로 또는 추가로 항체는 이중성 치료적 모이어티에 부착될 수 있다 (콘주게이션의 방법은 상기 본 명세서에 기재되어 있다). 치료적 모이어티는, 예를 들어, 세포독성 모이어티, 독성 모이어티, 사이토카인 모이어티, 약물일 수 있다. 그 예는, 비제한적으로, BRAF 억제제 예컨대 베무라페닙 및 다브라페닙뿐만 아니라 방사성 동위원소 또는 독소 예를 들어, 퓨로티오닌, 슈도모나스 외독소 A, 메토크렉세이트를 포함한다.
- [0161] 항체는 가용성 또는 불용성 형태일 수 있다.
- [0162] 불용성 형태는 인간화 항체의 가변 영역을 포함하는 분자가 세포에 의해 발현되는 형태일 수 있다 (즉, 또한 본 명세서에서 일명 치료적 모이어티).
- [0163] 이러한 세포의 예는 면역 세포, T 세포, B 세포, 수지상 세포, CIK, NKT, NK 세포 (자가, 동종이계, 이종발생)를 포함한다.
- [0164] 특정 구현예에 따르면, 항체 (또는 그것의 가변 영역)는 CAR 또는 인공 T 세포 수용체를 형성한다.
- [0165] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "키메라 항원 수용체 (CAR)"는 인공 T-세포 수용체, T-바디, 단일-사슬 면역수용체, 키메라 T-세포 수용체, 또는 키메라 면역수용체를 지칭할 수 있고, 예를 들어, 특정 면역 효과기 세포 상에 인공 특이성을 이식하는 조작된 수용체를 포괄할 수 있다. CAR은 단클론성 항체의 특이성을 T 세포에 부여하기 위해 이용될 수 있으며, 그것에 의해 예를 들어 입양 세포 요법에 사용하기 위해 다수의 특이적 T 세포가 생성되도록 할 수 있다. 특정 구현예에서, CAR은 세포의 특이성을 예를 들어 종양 관련 항원으로 향하게 한다. 일부 구현예에서, CAR은 세포내 활성화 도메인 (T 세포가 표적 세포, 예컨대 표적 종양 세포와 표적화 모이어티의 결합에 의해 활성화하는 것을 허용함), 막관통 도메인, 및 길이가 변할 수 있고 질환- 또는 장애-연관된, 예를 들어, 종양-항원 결합 영역을 포함하는 세포의 도메인을 포함한다. 특정 양태에서, CAR은 CD3-제타에 막관통 도메인 및 엔도도메인을 융합한 단클론성 항체로부터 유래된 단일-사슬 가변성 단편 (scFv)의 융합을 포함한다. 다른 CAR 디자인의 특이성은 수용체의 리간드 (예를 들어, 펩타이드) 또는 패턴-인식 수용체, 예컨대 렉틴으로부터 유래될 수 있다. 특정 경우에, 항원-인식 도메인의 간격은 활성화-유도된 세포사를 감소시키기 위해 변형될 수 있다. 특정 경우에, CAR은 추가의 공통자극 신호전달, 예컨대 CD3-제타, FcR, CD27, CD28, CD137, DAP 10/12, 및/또는 OX40, ICOS, TLR, 등에 대한 도메인을 포함한다. 일부 경우에, 분자는 공통자극 분자, 이미징형성 (예를 들어, 양전자 방출 단층촬영)을 위한 리포터 유전자, 전구약물의 첨가에 의해 T 세포를 조건적으로 제거하는 유전자 산물, 귀소 수용체, 케모카인, 케모카인 수용체, 사이토카인, 및 사이토카인 수용체를 포함하여, CAR과 공-발현될 수 있다.
- [0166] 특정 구현예에서, 본 발명의 일부 구현예들의 $\alpha\beta$ T-세포, $\gamma\delta$ T-세포, NK, 대식세포, 또는 B 세포, 또는 세포 모집단(들)은 발현 카세트에 의해 인코딩된 하나 이상의 구조적으로 뚜렷한 항체를 안정적으로 발현하도록 조작된다. 항체는 키메라 항원 수용체 (CAR), 전체의 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 단일-사슬 가변성 단편 (scFv), 중쇄 또는 경쇄 단일 도메인 항체 (sdAb), Fab, F(ab)₂, 또는 이들의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있고 이것은 하기에 결합한다: (i) 세포 표면 종양 항원 또는 (ii) MHC와 복합체로 세포 표면 상

에 발현된 종양 항원으로부터 유래된 펩타이드 (펩타이드-MHC 복합체).

- [0167] 따라서 이러한 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 관심 있는 세포에 형질도입된다 (예를 들어, 서열번호: 1, 3 또는 서열번호: 2, 4를 인코딩하는 임의의 폴리뉴클레오타이드).
- [0168] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 세포는 다음과 같다: T 세포, 천연 살해 세포, 표적 세포에 대해 효과기 사멸 기능을 발휘하는 세포, 효과기 T 세포에 대해 억제성 효과를 발휘하는 세포, 효과기 사멸 기능으로 조작된 세포 또는 억제성 기능으로 조작된 세포.
- [0169] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 세포는 T 세포, 또는 $\alpha\beta$ T 세포, 또는 $\gamma\delta$ T 세포이다.
- [0170] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 세포는 자연 살해 (NK) 세포이다.
- [0171] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 천연 살해 세포는 암을 표적화하기 위해 사용된다.
- [0172] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, T 세포는 세포독성 T 세포 (효과기 T 세포)이다.
- [0173] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 세포독성 T 세포 (효과기 T 세포)는 이 경우에 TyrD인 암 항원을 표적화하기 위해 사용된다.
- [0174] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, T 세포는 Treg (T 조절 세포)를 포함한다.
- [0175] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, T 세포는 CD3 T 세포를 포함한다.
- [0176] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, T 세포는 CD4 T 세포를 포함한다.
- [0177] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, T 세포는 CD8 T 세포를 포함한다.
- [0178] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 항체는 단일 사슬 Fv (scFv) 분자이다.
- [0179] 본 발명의 CAR 분자의 세포질 도메인 (또한 일명 "세포내 신호전달 도메인")은 CAR이 배치된 면역 세포의 정상 효과기 기능 중 적어도 하나의 활성화를 담당한다.
- [0180] 용어 "효과기 기능"은 세포의 특화된 기능을 지칭한다. T 세포의 효과기 기능은, 예를 들어, 사이토카인의 분비를 포함하는 세포용해 활성 또는 헬퍼 활성일 수 있다. 따라서 용어 "세포내 신호전달 도메인"은 효과기 기능 신호를 형질도입하고 세포가 특화된 기능을 수행하도록 지시하는 단백질의 일부를 지칭한다. 일반적으로 전체 세포내 신호전달 도메인이 사용될 수 있지만, 많은 경우에서 전체 사슬을 사용할 필요는 없다. 세포내 신호전달 도메인의 절단된 부분이 사용되는 한, 그러한 절단된 부분은 효과기 기능 신호를 형질도입하는 한 온전한 사슬 대신에 사용될 수 있다. 용어 세포내 신호전달 도메인은 따라서 효과기 기능 신호를 형질도입하기에 충분한 세포내 신호전달 도메인의 임의의 절단된 부분을 포함하는 것으로 의미된다.
- [0181] 본 발명의 CAR 분자에 사용하기 위한 세포내 신호전달 도메인의 예는 항원 수용체 결합 후 신호 형질도입을 개시하기 위해 협력하여 작용하는 T 세포 수용체 (TCR) 및 공동-수용체의 세포질 서열, 뿐만 아니라 동일한 기능적 능력을 갖는 이들 서열 및 임의의 합성 서열의 임의의 유도체 또는 변이체를 포함한다.
- [0182] TCR 단독을 통해 생성된 신호는 T 세포의 완전한 활성화에 불충분하며 이차 또는 공동-자극 신호도 요구된다는 것이 알려져 있다. 따라서, T 세포 활성화는 2개의 상이한 부류의 세포질 신호전달 서열: TCR을 통해 항원-의존적 일차 활성화를 개시하는 것 (일차 세포질 신호전달 서열) 및 이차 또는 공동-자극 신호를 제공하기 위해 항원-독립적인 방식으로 작용하는 것 (이차 세포질 신호전달 서열)에 의해 매개될 수 있다.
- [0183] 일차 세포질 신호전달 서열은 자극 방식 또는 억제성 방식으로 TCR 복합체의 일차 활성화를 조절한다. 자극 방식으로 작용하는 일차 세포질 신호전달 서열은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 (ITAM)로 알려진 신호전달 모티프를 함유할 수 있다.
- [0184] 본 발명에서 특히 사용되는 일차 세포질 신호전달 서열을 함유하는 ITAM의 예는 TCR 제타, FcR 감마, FcR 베타, CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD5, CD22, CD79a, CD79b, 및 CD66d로부터 유래된 것들을 포함한다. 본 발명의 CAR에서 세포질 신호전달 분자는 CD3 제타로부터 유래된 세포질 신호전달 서열을 포함하는 것이 특히 바람직하다.
- [0185] 바람직한 구현예에서, CAR의 세포질 도메인은 그 자체로 CD3-제타 신호전달 도메인을 포함하거나 본 발명의 CAR의 맥락에서 임의의 다른 원하는 세포질 도메인(들)과 조합되도록 설계될 수 있다. 예를 들어, CAR의 세포질 도메인은 CD3 제타 사슬 부분 및 공동자극 신호전달 영역을 포함할 수 있다. 공동자극 신호전달 영역은 공동자극

분자의 세포내 도메인을 포함하는 CAR의 일부를 지칭한다. 공통자극 분자는 항원에 대한 림프구의 효율적인 반응에 필요한 항원 수용체 또는 그것의 리간드 이외의 세포 표면 분자이다. 이러한 분자의 예는 CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능-연관된 항원-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 및 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드, 및 기타 동종의 것을 포함한다. 따라서, 본 발명에 공동-자극 신호전달 요소로서 4-1BB가 주로 예시되지만, 다른 공동자극 요소도 본 발명의 범위 내에 있다.

[0186] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 세포내 도메인은 공통자극 신호전달 영역 및 제타 사슬 부분을 포함한다. 공통자극 신호전달 영역은 공통자극 분자의 세포내 도메인을 포함하는 CAR 분자의 일부를 지칭한다. 공통자극 분자는 항원에 대한 림프구의 효율적인 반응에 필요한 항원 수용체 또는 그것의 리간드 이외의 세포 표면 분자이다.

[0187] 본 명세서에서 사용된 용어로서, "공통-자극 리간드"는 T 세포 상에서 동족 공통자극 분자에 특이적으로 결합하고, 그것에 의해, 예를 들어, 펩타이드로 장입된 MHC 분자와 TCR/CD3 복합체의 결합에 의해 제공된 일차 신호에 부가하여, 비제한적으로, 증식, 활성화, 분화, 및 기타 동종의 것을 포함한, T 세포 반응을 매개하는 신호를 제공하는, 항원 제시 세포 [예를 들어, aAPC (인공 항원 제시 세포), 수지상 세포, B 세포, 및 기타 동종의 것] 상의 분자를 포함한다. 공통자극 리간드는, 비제한적으로, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, 유도성 공동자극 리간드 (ICOS-L), 세포간 접착 분자 (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, 림프독소 베타 수용체, 3/TR6, ILT3, ILT4, HVEM, Toll 리간드 수용체에 결합하는 효능제 또는 항체 및 B7-H3과 특이적으로 결합하는 리간드를 포함할 수 있다. 공통자극 리간드는 또한, 특히, T 세포 상에 존재하는 공통자극 분자와 특이적으로 결합하는 항체, 예컨대, 비제한적으로, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능-연관된 항원-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 및 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드를 포괄한다.

[0188] "공통자극 분자"는 공통자극 리간드와 특이적으로 결합하고, 그것에 의해 T 세포에 의한 공통자극 반응, 예컨대, 비제한적으로, 증식을 매개하는 T 세포 상의 동족 결합 파트너를 지칭한다. 공통자극 분자는, 비제한적으로 MHC 부류 1 분자, BTLA 및 Toll 리간드 수용체를 포함한다.

[0189] 본 명세서에서 사용된 바와 같은, "공통자극 신호"는 일차 신호, 예컨대 TCR/CD3 결합과 조합하여 T 세포 증식 및/또는 핵심 분자의 상향조절 또는 하향조절을 야기하는 신호를 지칭한다.

[0190] 용어 "자극"으로는 자극 분자 (예를 들어, TCR/CD3 복합체)와 그것의 동족 리간드의 결합에 의해 유도된 일차 반응을 의미하며, 그것에 의해 신호 형질도입 이벤트, 예컨대, 비제한적으로, TCR/CD3 복합체를 통한 신호 형질도입을 매개한다. 자극은 특정 분자의 변경된 발현, 예컨대 TGF- β 의 하향조절, 및/또는 세포골격 구조의 재구성, 및 기타 동종의 것을 매개할 수 있다.

[0191] 본 명세서에서 사용된 용어로서 "자극 분자"는 항원 제시 세포 상에 존재하는 동족 자극 리간드와 특이적으로 결합하는 T 세포 상의 분자를 의미한다.

[0192] 본 명세서에서 사용된 바와 같은, "자극 리간드"는 항원 제시 세포 (예를 들어, aAPC, 수지상 세포, B-세포, 및 기타 동종의 것) 상에 존재할 때, T 세포 상에서 동족 결합 파트너 (본 명세서에서 일명 "자극 분자")와 특이적으로 결합할 수 있고, 그것에 의해, 비제한적으로, 활성화, 면역 반응의 개시, 증식, 및 기타 동종의 것을 포함한, T 세포에 의한 일차 반응을 매개하는 리간드를 의미한다. 자극 리간드는 당업계에서 잘 알려져 있으며, 섬모 사이에, 펩타이드, 항-CD3 항체, 초효능제 항-CD28 항체, 및 초효능제 항-CD2 항체가 장입된 MHC 부류 I 분자를 포괄한다.

[0193] 세포질 도메인과 관련하여, 본 발명의 일부 구현예들의 CAR 분자는 그 자체로 CD28 및/또는 4-1BB 신호전달 도메인을 포함하거나 또는 본 발명의 일부 구현예들의 CAR 분자의 맥락에서 유용한 임의의 다른 원하는 세포질 도메인(들)과 조합되도록 설계될 수 있다. 일 구현예에서, CAR의 세포질 도메인은 CD3-제타의 신호전달 도메인을 추가로 포함하도록 설계될 수 있다. 예를 들어, CAR의 세포질 도메인은 비제한적으로 CD3-제타, 4-1BB 및 CD28 신호전달 모듈 및 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0194] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 세포내 도메인은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 1, 예를 들어, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 예를 들어, 적어도 6개의 폴리펩타이드를 포함한다: CD3 ζ (CD247, CD3z), CD28, 41BB, ICOS, OX40, 및 CD137.

[0195] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 세포내 도메인은 하기를 포함한다: CD3 ζ -사슬 ["CD3-ZETA" 및 "CD3z"로도 알려져 있는, CD247 분자; 유전자은행 기탁 번호NP_000725.1 및 NP_932170.1], 이것은 내인성 TCR로부터 신호의

일차 전달물질이다.

- [0196] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 세포내 도메인은 CAR의 세포질 꼬리에 다양한 공통자극 단백질 수용체를 포함하여 T 세포 (제2 세대 CAR)에 추가의 신호를 제공한다. 그 예는, 비제한적으로, CD28 [예를 들어, 유전자은행 기탁 번호 NP_001230006.1, NP_001230007.1, NP_006130.1], 4-1BB ["CD137"로도 알려져 있는, 종양 괴사 인자 수용체 상과, 구성원 9 (TNFRSF9), 예를 들어, 유전자은행 기탁 No. NP_001552.2], 및 ICOS [유도성 T-세포 공동자극인자, 예를 들어, 유전자은행 기탁 No. NP_036224.1]를 포함한다. 전임상 연구는 CAR 디자인의 제2 세대는 T 세포의 항종양 활성을 개선한다는 것을 나타냈다.
- [0197] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 세포내 도메인은 다중 신호전달 도메인, 예컨대 CD3z-CD28-41BB 또는 CD3z-CD28-OX40을 포함하여, 효력을 더 확대한다. 용어 "OX40"은 종양 괴사 인자 수용체 상과, 구성원 4 (TNFRSF4), 예를 들어, 유전자은행 기탁 No. NP_003318.1 ("제3 세대" CAR)을 지칭한다.
- [0198] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 세포내 도메인은 CD28-CD3z, CD3z, CD28-CD137-CD3z을 포함한다. 용어 "CD137"은 종양 괴사 인자 수용체 상과, 구성원 9 (TNFRSF9), 예를 들어, 유전자은행 기탁 No. NP_001552.2를 지칭한다.
- [0199] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, CAR 분자가 천연 살해 세포를 위해 설계될 때, 신호전달 도메인은 CD28 및/또는 CD3ζ 일 수 있다. 막관통 도메인은 천연 또는 합성 원천으로부터 유래될 수 있다. 원천이 천연인 경우, 도메인은 임의의 막-결합 또는 막관통 단백질로부터 유래될 수 있다. 본 발명에서 특히 사용되는 막관통 영역은 T-세포 수용체, CD28, CD3 엠실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154의 알파, 베타 또는 제타 사슬로부터 유래될 수 있다 (즉 적어도 이들의 막관통 영역(들)을 포함한다). 대안적으로 막관통 도메인은 합성일 수 있고, 이 경우에 이것은 우세하게 소수성 잔기 예컨대 류신 및 발린을 포함할 것이다. 바람직하게는 페닐알라닌, 트립토판 및 발린의 삼중항은 합성 막관통 도메인의 각각의 말단에서 발견될 것이다. 선택적으로, 짧은 올리고- 또는 폴리펩타이드 링커, 바람직하게는 2 내지 10개 길이의 아미노산은 CAR의 막관통 도메인과 세포질 신호전달 도메인 사이의 연결을 형성할 수 있다. 글리신-세린 이중항이 특히 적합한 링커를 제공한다.
- [0200] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 본 발명의 일부 구현예들의 CAR 분자에 포함된 막관통 도메인은 CAR에서 도메인 중 하나와 자연적으로 연관된 막관통 도메인이다. 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 막관통 도메인은 수용체 복합체의 다른 구성원과의 상호작용을 최소화하기 위해 동일 또는 상이한 표면 막 단백질의 막관통 도메인에 이러한 도메인의 결합을 피하기 위해 아미노산 치환에 의해 선택되거나 변형될 수 있다.
- [0201] 일부 구현예에 따르면, CAR 분자의 세포외 도메인과 막관통 도메인 사이, 또는 CAR 분자의 세포질 도메인과 막관통 도메인 사이에 스페이서 도메인이 편입될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "스페이서 도메인"은 일반적으로 막관통 도메인을 폴리펩타이드 사슬에서의 세포외 도메인 또는 세포질 도메인에 연결시키는 기능을 하는 임의의 올리고- 또는 폴리펩타이드를 의미한다. 스페이서 도메인은 최대 300개 아미노산, 바람직하게는 10 내지 100개 아미노산 및 가장 바람직하게는 25 내지 50개 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0202] 상기 배치형태 중 임의의 것이 요법에 사용될 수 있다.
- [0203] 본 발명의 일부 구현예들의 일 양태에 따르면, 본 명세서에서 기재된 바와 같은 항체를 대상체에게 투여하고, 그것에 의해 대상체에서 암을 치료하는 것을 포함하는, 그것을 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법이 제공된다.
- [0204] 병리학, 예를 들어 암을 치료하기위한 약제의 제조에서 본 명세서에서 정의된 바와 같은 항체의 용도가 또한 제공된다.
- [0205] 용어 "치료하는"은 병리 (질환, 장애 또는 병태)의 발달을 억제, 예방 또는 정지시키고 및/또는 병리의 감소, 차도 또는 퇴행을 야기하는 것을 지칭한다. 당해 분야의 숙련가는 다양한 방법론 및 검정을 사용하여 병리의 발달을 평가할 수 있고, 유사하게, 다양한 방법론 및 검정을 사용하여 병리의 감소, 차도 또는 퇴행을 평가할 수 있다는 것을 이해할 것이다.
- [0206] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "대상체"는 병리로 고통받는 임의의 연령의 포유동물, 바람직하게는 인간을 포함한다.
- [0207] 본 발명의 일부 구현예들의 항체는 유기체 자체 또는 적합한 캐리어 또는 부형제와 혼합되는 약제학적 조성물로

투여될 수 있다.

- [0208] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "약제학적 조성물"은 생리적으로 적합한 캐리어 및 부형제와 같은 다른 화학적 성분과 함께 본 명세서에 기재된 하나 이상의 활성 성분의 제제를 지칭한다. 약제학적 조성물의 목적은 유기체에 화합물의 투여를 용이하게 하는 것이다.
- [0209] 본 명세서에서 용어 "활성 성분"은 생물학적 효과에 대해 책임이 있는 항체를 지칭한다.
- [0210] 이하에서, 교환가능하게 사용될 수 있는 어구 "생리적으로 허용가능한 담체" 및 "약제학적으로 허용가능한 담체"는 유기체에 대한 상당한 자극을 유발하지 않고 투여된 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 폐지하지 않는 담체 또는 희석제를 지칭할 수 있다. 아췌반트가 이들 어구 하에 포함된다.
- [0211] 본 명세서에서 용어 "부형제"는 활성 성분의 투여를 더욱 용이하게 하기 위해 약제학적 조성물에 첨가되는 불활성 물질을 지칭한다. 비제한적으로, 부형제의 예는 탈산칼슘, 인산칼슘, 다양한 당류 및 전분의 유형, 셀룰로스 유도체, 젤라틴, 식물성 오일 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다.
- [0212] 약물의 제형화 및 투여에 대한 기술은 아래에 발견될 수 있다: 본 명세서에 참고로 편입되는, "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, 최종판.
- [0213] 적합한 투여 경로는, 예를 들어, 경구, 직장, 경점막, 특히 경비, 장내 또는 근육내, 피하 및 수질내 주사를 포함한 비경구 전달뿐만 아니라 척추강내, 직접적인 심실내, 심장내, 예를 들어, 우심실 또는 좌심실 공동 내, 공통 관상동맥 내, 정맥내, 복강내, 비강내, 또는 안구내 주사를 포함할 수 있다.
- [0214] 특정 구현예에 따르면, 투여는 정맥내 투여를 포함한다.
- [0215] 중추신경계 (CNS)에 약물 전달을 위한 통상적인 접근법은 하기를 포함한다: 신경외과적 전략 (예를 들어, 뇌내 주사 또는 뇌심실내 주입); BBB의 내인성 전달 경로 중 하나를 개척하기 위한 시도로 제제의 분자 조작 (예를 들어, 그 자체로 BBB를 관통할 수 있는 제제와 조합하여 내피성 세포 표면 분자에 대해 친화도를 갖는 수송 펩타이드를 포함하는 키메라 융합 단백질의 생산); 제제의 지질 용해도를 증가시키도록 설계된 약리적 전략 (예를 들어, 수용성 제제 대 지질 또는 콜레스테롤 캐리어의 콘주게이션); 및 (생물학적 활성 제제 예컨대 안지오텐신 펩타이드의 사용 또는 목동맥 안으로 만니톨 용액의 주입으로 인한) 고삼투 파괴에 의한 BBB의 완전성의 일시적 파괴. 그러나, 각각의 이들 전략은 침습성 수술 절차와 관련된 고유한 위험, 내인성 운반체에 고유한 제한에 의해 부과되는 크기 제한, CNS 외부에서 활성화될 수 있는 담체 모티프로 구성된 키메라 분자의 전신 투여와 관련된 잠재적으로 바람직하지 않은 생물학적 부작용 및 BBB가 파괴된 뇌의 영역 내에서 뇌 손상의 가능한 위험과 같은 제한을 가지며, 이 제한은 이것을 최적이하 전달 방법으로 한다.
- [0216] 대안적으로, 약제학적 조성물을 전신 방식이 아닌 국소 방식으로, 예를 들어 약제학적 조성물을 환자의 조직 영역으로 직접적으로 주사를 통해 투여할 수 있다.
- [0217] 용어 "조직"은 기능 또는 기능들을 수행하도록 설계된 세포로 구성된 유기체의 일부를 지칭한다. 그 예는, 비제한적으로, 뇌 조직, 망막, 피부 조직, 간 조직, 체장 조직, 뼈, 연골, 결합 조직, 혈액 조직, 근육 조직, 심장 조직 뇌 조직, 혈관 조직, 신장 조직, 폐 조직, 생식샘 조직, 조혈 조직을 포함한다.
- [0218] 본 발명의 일부 구현예들의 약제학적 조성물은 당해 분야에서 잘 알려진 공정, 예를 들어, 통상적인 혼합, 용해, 과립화, 당의정-제조, 분말화, 에멀션화, 캡슐화, 포획하는 또는 동결건조 공정에 의해 제조될 수 있다.
- [0219] 본 발명의 일부 구현예들에 따라 사용하기 위한 약제학적 조성물은 따라서 활성 성분을 약제학적으로 사용될 수 있는 제제로 가공하는 것을 용이하게 하는 부형제 및 보조제를 포함하는 하나 이상의 생리적으로 허용가능한 캐리어를 사용하여 통상적인 방식으로 제형화될 수 있다. 적절한 제형은 선택된 투여 경로 의존적이다.
- [0220] 주사를 위해, 약제학적 조성물의 활성 성분은 수용액, 바람직하게는 생리적으로 양립가능한 완충액 예컨대 한스 용액, 링거액, 또는 생리적 염 완충액으로 제형화될 수 있다. 경점막 투여를 위해, 침투될 장벽에 적절한 침투제가 제형에 사용된다. 이러한 침투제는 일반적으로 당업계에서 알려져 있다.
- [0221] 경구 투여를 위해, 약제학적 조성물은 당해 분야에서 잘 알려진 약제학적으로 허용가능한 캐리어와 활성 화합물을 배합시킴에 의해 쉽게 제형화될 수 있다. 이러한 캐리어는 약제학적 조성물이 환자에 의한 경구 섭취를 위해 정제, 알약, 당의정, 캡슐, 액체, 젤, 시럽, 슬러리, 현탁액, 및 동종의 것으로 제형화될 수 있게 한다. 경구용 약리적 제제는 고체 부형제를 사용하여, 선택적으로 수득한 혼합물을 분쇄하고, 필요한 경우 적합한 보조제를 첨가한 후 과립의 혼합물을 가공하여 제조하여 정제 또는 당의정 코어를 수득할 수 있다. 적합한 부형제는, 특

히, 충전제 예컨대, 락토스, 수크로스, 만니톨, 또는 소르비톨을 포함한 당; 셀룰로스 제제 예컨대, 예를 들어, 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 감자 전분, 젤라틴, 트라가칸쓰검, 메틸 셀룰로스, 하이드록시프로필메틸-셀룰로스, 나트륨 카보메틸셀룰로스; 및/또는 생리적으로 허용가능한 폴리머 예컨대 폴리비닐피롤리돈 (PVP)이다. 요망하는 경우, 봉쇄제에는, 예컨대 가교결합된 폴리비닐 피롤리돈, 한천, 또는 알긴산 또는 이의 염 예컨대 나트륨 알기네이트가 첨가될 수 있다.

[0222] 당의정 코어에는 적합한 코팅물이 제공된다. 이러한 목적을 위해, 선택적으로 아라비아검, 탈크, 폴리비닐 피롤리돈, 카보폴 겔, 폴리에틸렌 글리콜, 이산화티타늄, 래커 용액 및 적합한 유기 용매 또는 용매 혼합물을 함유할 수 있는 농축된 당 용액이 사용될 수 있다. 염료 또는 안료는 활성 화합물 용량의 상이한 조합을 확인 또는 특징화 하기 위해 정제 또는 당의정 코팅물에 첨가될 수 있다.

[0223] 경구로 사용될 수 있는 약제학적 조성물은 젤라틴으로 만들어진 압입형 캡슐뿐만 아니라 젤라틴 및 가소제, 예컨대 글리세롤 또는 소르비톨로 만들어진 연질 밀봉 캡슐을 포함한다. 압입형 캡슐은 충전제 예컨대 락토스, 결합제 예컨대 전분, 윤활제 예컨대 탈크 또는 스테아르산 마그네슘 및, 선택적으로, 안정화제와 혼합물로 활성 성분을 함유할 수 있다. 연질 캡슐에서, 활성 성분은 적합한 액체, 예컨대 지방 오일, 유동 파라핀, 또는 액체 폴리에틸렌 글리콜에 용해 또는 현탁될 수 있다. 또한, 안정화제가 첨가될 수 있다. 경구 투여를 위한 모든 제형은 선택된 투여 경로에 적합한 투약량이어야 한다.

[0224] 볼 투여를 위해, 조성물은 통상적인 방식으로 제형화된 정제 또는 로젠지의 형태를 취할 수 있다.

[0225] 비강 흡입에 의한 투여를 위해, 본 발명의 일부 구현예에 따라 사용하기 위한 활성 성분은 적합한 추진제, 예를 들어, 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로-테트라플루오로에탄 또는 이산화탄소의 사용으로 가압된 팩 또는 분무기로부터 에어로졸 분무 제제의 형태로 편리하게 전달된다. 가압된 에어로졸의 경우, 투약량 단위는 계량된 양을 전달하기 위한 밸브를 제공함으로써 결정될 수 있다. 예를 들어, 분배기에 사용하기 위한 젤라틴의 캡슐 및 카트리지는 화합물 및 적합한 분말 베이스 예컨대 락토스 또는 전분의 분말 혼합물을 함유하여 제형화될 수 있다.

[0226] 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물은 예를 들어, 볼러스 주사 또는 연속적 주입에 의해, 비경구 투여를 위해 제형화될 수 있다. 주사용 제형은 단위 투여 형태, 예를 들어 앰플 또는 임의로 첨가된 보존제를 함유한 다회용량 용기로 제공될 수 있다. 조성물은 유성 또는 수성 비히클 중에 현탁액, 용액 또는 에멀션일 수 있고, 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 제형화제를 함유할 수 있다.

[0227] 비경구 투여를 위한 약제학적 조성물은 수용성 형태의 활성 제제의 수용액을 포함한다. 추가로, 활성 성분 현탁액은 적절한 유성 또는 수성계 주사 현탁액으로 제조될 수 있다. 적합한 친유성 용매 또는 비히클은 지방 오일 예컨대 참깨 오일, 또는 합성 지방산 에스테르 예컨대 에틸 올레레이트, 트리글리세라이드 또는 리포솜을 포함한다. 수성 주사 현탁액은 현탁액, 예컨대 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 소르비톨 또는 텍스트란의 점도를 증가시키는 물질을 함유할 수 있다. 선택적으로, 현탁액은 또한 고농축 용액의 제조를 가능하게 하기 위해 활성 성분의 용해도를 증가시키는 적합한 안정화제 또는 제제를 함유할 수 있다.

[0228] 대안적으로, 활성 성분은 사용 전에 적합한 비히클, 예를 들어 멸균된 무발열원 수성 기반 용액으로 구성하기 위한 분말 형태일 수 있다.

[0229] 본 발명의 일부 구현예들의 약제학적 조성물은 또한, 예를 들어, 통상적인 좌약 베이스 예컨대 코코아 버터 또는 다른 글리세라이드를 사용하여, 직장 조성물 예컨대 좌약 또는 체류 관장제로 제형화될 수 있다.

[0230] 본 발명의 일부 구현예들과 관련하여 사용하기에 적합한 약제학적 조성물은 활성 성분이 의도된 목적을 달성하기에 효과적인 양으로 함유된 조성물을 포함한다. 더 구체적으로, 치료 유효량은 장애 (예를 들어, 암)의 증상을 예방, 완화 또는 개선시키거나 치료되고 있는 대상체의 생존을 연장시키는데 효과적인 양의 활성 성분 (TCRL-항체)을 의미한다.

[0231] 치료 유효량의 결정은 특히 본 명세서에 제공된 상세한 개시내용에 비추어 당해 분야의 숙련가의 능력 내에 있다.

[0232] 본 발명의 방법에 사용된 임의의 제제의 경우, 치료 유효량 또는 용량은 시험관내 및 세포 배양 검정으로부터 초기에 추정될 수 있다. 예를 들어, 용량은 원하는 농도 또는 역가를 달성하기 위해 동물 모델에서 제형화될 수 있다. 이러한 정보는 인간에서 유용한 용량을 보다 정확하게 결정하는데 사용될 수 있다.

[0233] 본 명세서에 기재된 활성 성분의 독성 및 치료적 효능은 시험관내, 세포 배양물 또는 실험 동물에서 표준 약제

학적 절차에 의해 결정될 수 있다. 이들 시험관내 및 세포 배양 검정과 동물 연구로부터 수득된 데이터는 인간에서 사용하기 위한 투약량의 범위를 제형화하는데 사용될 수 있다. 투약량은 사용된 투여 형태 및 사용된 투여 경로에 따라 달라질 수 있다. 정확한 제형, 투여 경로 및 투약량은 환자의 상태를 고려하여 개별 의사에 의해 선택될 수 있다. (하기 참고; 예를 들어, Fingl, 등, 1975, "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch.1 p.1).

- [0234] 투약량 및 간격은 생물학적 효과 (최소 효과 농도, MEC)를 유도 또는 억제하기에 충분한 활성 성분의 세포 (TCRL 조직) 수준과 같은 TCRL 또는 TCRL 함유 개체를 제공하도록 개별적으로 조정될 수 있다. MEC는 각각의 제조에 따라 다를 것이지만 시험관내 데이터에서 추정될 수 있다. MEC를 달성하기 위해 필요한 투약량은 개별 특성 및 투여 경로에 따라 달라질 것이다. 검출 검정은 혈장 농도를 결정하는데 사용될 수 있다.
- [0235] 치료될 병태의 중증도 및 반응성에 따라, 투여는 며칠에서 몇 주까지 또는 치료가 수행되거나 질환 상태의 감소가 달성될 때까지 지속되는 치료 과정으로, 단일 또는 복수의 투여일 수 있다.
- [0236] 투여되는 조성물의 양은 물론 치료되고 있는 대상체, 고통의 중증도, 투여의 방식, 처방 의사의사의 판단 등에 따라 달라질 것이다.
- [0237] 본 발명의 일부 구현예들의 조성물은 활성 성분을 함유하는 하나 이상의 단위 투여 형태를 함유할 수 있는 FDA 승인된 키트 (진단 또는 치료)와 같은 팩 또는 분배기 장치에 제시될 수 있다. 팩은, 예를 들어, 금속 또는 플라스틱 포일, 예컨대 블리스터 팩을 포함할 수 있다. 팩 또는 분배기 장치에는 투여에 대한 지침서가 첨부될 수 있다. 팩 또는 분배기는 또한 의약품의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 기관에 의해 규정된 형태의 용기와 관련된 통지에 의해 수용될 수 있으며, 이 통지는 조성물 또는 인간 또는 수의과 투여의 형태의 기관에 의한 승인을 반영한다. 예를 들어, 이러한 통지는 미국에 의해 승인된 라벨링일 수 있다. 처방 약물에 대한 또는 승인된 제품내 삽입물의 것에 대한 식품 의약품국. 상용성 약제학적 담체에 제형화된 본 발명의 제제를 포함하는 조성물은 또한 상기에서 더욱 상세히 기술된 바와 같이 제조되고, 적절한 용기에 배치되고, 지시된 상태의 치료를 위해 표지될 수 있다.
- [0238] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "약"은 $\pm 10\%$ 를 지칭한다.
- [0239] 용어들 "포함하다", "포함하는", "함유하다", "함유하는", "갖는" 및 그것의 용합은 "비제한적으로 포함하는"을 의미한다.
- [0240] 용어 "구성되는"은 "포함하고 이에 제한되는"을 의미한다.
- [0241] 용어 "본질적으로 구성되는"은 조성물, 방법 또는 구조가 추가 성분, 단계 및/또는 부분을 포함할 수 있지만, 추가 성분, 단계 및/또는 부분이 청구된 조성물, 방법 또는 구조의 기본적 및 신규한 특성을 물질적으로 변경시키지 않는 경우에만 포함할 수 있음을 의미한다.
- [0242] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 문맥에서 달리 명확히 명시되지 않는 한 복수의 참조를 포함한다. 예를 들어, 용어 "화합물" 또는 "적어도 하나의 화합물"은 이들의 혼합물을 포함한 복수의 화합물들을 포함할 수 있다.
- [0243] 본원 전체에서, 본 발명의 다양한 구현예는 범위 형식으로 제시될 수 있다. 범위 형식에서의 설명은 단지 편의상 및 간결성을 위한 것이며 본 발명의 범위에 대한 융통성 없는 제한으로 해석되어서는 안된다는 것을 이해해야 한다. 따라서, 범위의 설명은 구체적으로 그 범위 내에서 모든 가능한 하위범위 뿐만 아니라 개별 수치가 개시된 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어, 예컨대 1 내지 6의 범위의 설명은 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 6, 3 내지 6과 같은 하위범위 뿐만 아니라 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 및 6의, 그 범위 내의 개별 숫자를 구체적으로 개시한 것으로 간주되어야 한다. 이것은 범위의 폭에 무관하게 적용한다.
- [0244] 수치 범위가 본 명세서에 지시될 때마다, 지시된 범위 내에 임의의 인용된 숫자 (분수 또는 정수)를 포함하는 것으로 의도된다. 어구 제1 표시 수와 제2 표시 수 "사이의 범위로 되는/범위" 및 제1 표시 수 내지 제2 표시 수의 "범위로 되는/범위"는 본 명세서에서 교환가능하게 사용되며 제1 및 제2 표시 수와 그 사이의 모든 분수 및 정수를 포함하도록 의도된다.
- [0245] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "방법"은 비제한적으로 화학, 약리학, 생물학, 생화학 및 의학의 실무자들에 의한 알려진 방식, 수단, 기술 및 절차로부터 알려져 있거나 또는 쉽게 개발되는 이들 방식, 수단, 기술 및 절차를 포함한, 주어진 과제를 수행하기 위한 방식, 수단, 기술 및 절차를 지칭한다.

- [0246] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "치료하는"은 상태의 진행을 폐지, 실질적으로 억제, 둔화 또는 역전하거나, 상태의 임상 또는 심미적 증상을 실질적으로 개선하거나 또는 상태의 임상 또는 심미적 증상의 출현을 실질적으로 예방하는 것을 포함한다.
- [0247] 특정 서열목록을 언급할 때, 이러한 언급은, 예를 들어, 서열분석 오류, 클로닝 오류로부터 초래되는 사소한 서열 변동, 또는 염기 치환, 염기 결실 또는 염기 부가로부터 초래되는 다른 변형을 포함하여 그것의 상보적 서열에 실질적으로 상응하는 서열을 또한 포괄하는 것으로 이해되어야 하고, 단, 이러한 변동의 빈도는 50개 뉴클레오타이드 중 1개 미만, 대안적으로, 100개 뉴클레오타이드 중 1개 미만, 대안적으로, 200개 뉴클레오타이드 중 1개 미만, 대안적으로, 500개 뉴클레오타이드 중 1개 미만, 대안적으로, 1000개 뉴클레오타이드 중 1개 미만, 대안적으로, 5,000개 뉴클레오타이드 중 1개 미만, 대안적으로, 10,000개 뉴클레오타이드 중 1개 미만이다.
- [0248] 본원에 개시된 임의의 서열 식별 번호 (서열번호)는 서열번호가 DNA 서열 형식 또는 RNA 서열 형식으로만 표현되더라도, 서열번호가 언급된 상황에 따라 DNA 서열 또는 RNA 서열을 지칭할 수 있는 것으로 이해된다.
- [0249] 명백하게 하기 위해, 별도의 구현예와 관련하여 기재된 본 발명의 특정 특징들은 또한 단일 구현예에서 조합하여 제공될 수 있다는 것이 인정된다. 반대로, 간결하게 하기 위해, 단일 구현예와 관련하여 기재된 본 발명의 다양한 특징들은 별도로 또는 임의의 적합한 하위조합으로 또는 본 발명의 임의의 다른 기재된 구현예에서 적합한 것으로 제공될 수 있다. 다양한 구현예와 관련하여 기재된 특정 특징들은 구현예들이 이들 요소들 없이 동작하지 않는 한, 이들 구현예들의 필수적인 특징으로 간주되지 않아야 한다.
- [0250] 상기에 기술되고 하기 청구범위 부문에 청구된 바와 같은 본 발명의 다양한 구현예 및 양태는 하기 실시예에서 실험적 지지를 찾는다.
- [0251] 실시예
- [0252] 상기 설명과 함께 본 발명의 일부 구현예들을 비제한적인 방식으로 설명하는 하기 실시예를 이제 참조한다.
- [0253] 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법 및 본 발명에 이용된 실험실 절차는 분자, 생화학, 미생물학 및 재조합 DNA 기술을 포함한다. 이러한 기술은 문헌에 철저히 설명되어 있다. 하기 참고; 예를 들어, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook 등, (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R.M., ed. (1994); Ausubel 등, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson 등, "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren 등 (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); methodologies as set forth in U.S. Pat. Nos. 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 and 5,272,057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N.Y.(1994), Third Edition; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites 등 (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W.H. Freeman and Co., New York (1980); 이용가능한 면역검정은 특허 및 과학적 문헌에 광범위하게 기재되어 있고, 예를 들어, 하기를 참고한다; 미국특허 번호 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219; 5,011,771 및 5,281,521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M.J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B.D., and Higgins S.J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B.D., and Higgins S.J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R.I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) and "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak 등, "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); 이들 모두는 본 명세서에서 완전하게 제시된 것처럼 참고로 편입된다. 다른 일반적인 참조가 이 문서 전체에서 제공된다. 그 안에 있는 절차는 당해 분야에서 잘 알려져 있으며 독자의 편의를 위해 제공되는 것으로 여겨진다. 그 안에 함유된 모든 정보는 본 명세서에 참고로 편입된다.
- [0254] 실시예 1
- [0255] CDR 이식을 사용한 D11 TCRL 항체의 인간화

- [0256] D11 (서열번호: 11-14로 **서열번호: 5-10**에 제시된 CDR을 가짐, Kabat에 따라 결정됨), 찢과 단클론성 항체 대 HLA-A2/TyrD 369-377 (서열번호: 15) 펩타이드-HLA 복합체를 인간 Ig 프레임워크 영역 상에 그래프팅한 상보성 결정 영역 (CDR)을 사용하여 인간화하였다. 중쇄 및 경쇄에 대한 인간 프레임워크는 기능적 인간 생식계열 유전자에 대한 서열 및 구조 유사성에 기초하여 선택되었다. 이와 관련하여, 구조 유사성은 동일한 정식 구조를 갖는 인간 후보에 마우스 정식 CDR 구조를 비교함에 의해 평가되었다.
- [0257] D11은 컴퓨터-보조 CDR-그래프팅 방법 (Abysis Database, UCL Business Plc.) 및 분자 공학 기술을 사용하여 인간화되어 hD11-5를 제공하였다. 분자공학 절차는 기술적으로 인정된 기술을 사용하여 수행되었다. 그 목적을 위해 RT-PCR에 의해 증폭된, 찢과 항체 가변 영역 DNA 서열의 정확한 결정 및 그것의 중쇄 및 경쇄 단백질 번역의 상동성 모델링이 개시점이었다.
- [0258] 단일 프레임워크 변화는 D11의 결합의 양호한 특성을 유지하기 위해 필요하였다. 이런 점에서, 중쇄 가변 영역에서 이루어진 프레임워크 변화 또는 복귀 돌연변이가 없었고 경쇄 가변 영역에서 단일 프레임워크 변형 만이 착수되었다 (hD11-5 내 Y49H). Y49H 복귀 돌연변이는 HLA-A2/TyrD₃₆₉₋₃₇₇ 복합체에 인간화된 항체의 전체 결합을 회복하는데 중요하였다. 인간화된 D11 항체 (hD11-5)의 아미노산 및 뉴클레오타이드 서열은 도 1에 도시되어 있다 (서열번호: 24-27).
- [0259] CDR 이식에 의해 선택된 모든 항체의 인간화에 따라, 수득한 경쇄 및 중쇄 가변 영역 아미노산 서열은 찢과 공여체 및 인간 수용체 경쇄 및 중쇄 가변 영역에 관하여 그것의 상동성을 결정하기 위해 분석되었다.
- [0260] 실시예 2
- [0261] 인간 IgG1 발현 벡터 안으로 hD11-5 TCRL 항체의 클로닝에 이어서 Expi293 시스템에서 발현 및 정제.
- [0262] hD11-5의 인간화된 무거운 및 가벼운 가변성 사슬의 합성 DNA 단편을 도 1에서 나타낸 바와 같이 hIgG1 불변 중쇄 및 경쇄 영역을 함유하는 pCI 발현 벡터 안으로 클로닝하였다. hD11-5 항체는 그 다음 Expi293 세포 (ThermoFisher A14635) 안으로 유래된 중쇄 및 경쇄 작제물의 공-형질감염에 의해 발현되었다. 신호 서열은 분비를 매개하기 위해 포함되었다 (서열번호: 36, 37 경쇄 경우 및 서열번호: 38, 39 중쇄 경우).
- [0263] 간단히, 선택된 인간 면역글로불린 발현 벡터 안으로 인간화된 가변 영역 유전자의 지향성 클로닝이 수행되었다. Ig 유전자-특이적 PCR에 사용된 모든 프라이머는 인간 IgG1 중쇄 및 경쇄 불변 영역을 함유하는 발현 벡터 안으로 직접적인 클로닝을 허용하는 제한 부위를 포함했다. AgeI 및 XhoI (중쇄 경우) 및 XmaI 및 DraIII (경쇄 경우)로 소화된 합성 유전자를 발현 벡터 안으로 결합하기 전에 정제하였다. 결합 반응은 200 U T4-DNA 리가제 (New England Biolabs), 7.5 μ L의 소화 및 정제된 유전자-특이적 PCR 생성물 및 25 ng 선형화된 벡터 DNA와 함께 총 용적 10 μ L에서 수행되었다. 전기-능숙한 E. 콜리 DH10B 박테리아 (Life Technologies)를 암피실린 플레이트 (100 μ g/mL) 상에 플레이팅된 1 μ L 결합 생성물로 전기천공 (BioRad)을 통해 형질전환시켰다. VH 영역의 AgeI-XhoI 단편은 pCI-HuIgG1 발현 벡터의 동일한 부위 안으로 클로닝되었고 반면에 합성 XmaI-DraIII VK 삽입물은 각각의 pCI-Hu-Kappa 발현 벡터의 XmaI-DraIII 부위 안으로 클로닝되었다.
- [0264] 플라스미드 DNA는 QIAprep 스핀 칼럼 (Qiagen)으로 정제되었다. Expi293 세포는 2 % FBS가 보충된 DMEM 배지에서 배양되었다.
- [0265] 일시적 형질감염을 위해, Expi293 세포는 250만개의 세포/mL로 성장시켰다. 동등량의 IgH 및 상응하는 IgL 사슬 벡터 DNA (각각 15 μ g)는 1.5 mL Opti-MEM 배지 (ThermoFisher 31985062) 내 80 μ L ExpiFectamine 293 시약과 혼합된 1.5 mL Opti-MEM 배지에 첨가되었다. 혼합물을 실온에서 30분 동안 인큐베이션하고 10-cm 조직 배양판 (Corning)에 균등하게 분배하였다. 상청액은 형질감염 3일 후에 수확하고, 10 % FBS가 보충된 20mL의 새로운 DMEM으로 대체하고 형질감염 후 6일에 다시 수확하였다. 배양 상청액을 800 X g에서 10분 동안 원심분리에 의해 세포 잔해를 제거하였다. 재조합 인간화된 항체 hD11-5를 단백질 A 친화성 크로마토그래피 (GE Healthcare)를 사용하여 정제하거나 상청액으로 사용하였다.
- [0266] 실시예 3
- [0267] Expi293 시스템에서 D11 TCRL 항체의 클로닝 및 발현
- [0268] 마우스 친계 D11 (IgG1 아이소타입) 중쇄 및 경쇄 (서열번호: 11-14)를 Life Technologies, GeneArt에 의한 pCDNA3.4 발현 벡터 안으로 개별적으로 클로닝하였다. 선도 서열 (서열번호: 34, 35)은 분비를 매개하도록 프레

임 안에 포함되었다.

- [0269] 일시적 형질감염을 위해, Expi293 세포는 다음과 같이 성장되었다: Expi293 발현 배지 내 (Gibco, Cat. A14351-01) mL 당 250만개의 세포로 Erlenmeyer 플라스크 내 (Thermo scientific, Cat. 4115-1000), 회전식 진탕기 (125rpm), 37°C 인큐베이터, 8% CO₂. 동등량의 IgH 및 상응하는 IgL 사슬 벡터 DNA (각각 375 µg)를 37.5 mL Opti-MEM 배지에 첨가하였다 (Gibco, Cat. 31985-047). 2.0ml ExpiFectamine 293 시약 (Gibco, Cat. 100014994) 을 최종 용적 37.5 mL로 Opti-MEM 배지에 첨가하였다. 두 용액을 혼합하고 30분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 25ml의 혼합물을 1 리터 삼각 플라스크 당 212.5ml 세포 배양액, 총 3개 플라스크에 첨가하였다. 형질감염 16-18 시간 후, ExpiFectamine 293 형질감염 향상제 1 (Gibco, Cat. 100013863) 및 향상제 2 (Gibco, Cat. A14350-01)를 첨가하였다 (각각, 플라스크 당 1.25ml 및 12.5ml). 형질감염 6일 후 세포를 700 X g에서 5분 동안 원심분리에 의해 수확하였고 상청액을 수집하고, 여과하고 4°C에서 저장하였다. 재조합 마우스 항체를 단백질 A Mabselect Hitrap 추가 컬럼 (GE Healthcare)으로 정제하고 적절한 조건하에 저장하였다.
- [0270] 실시예 4
- [0271] SPR에 의해 결정될 때 hD11-5 TCRL 항체 결합의 친화도
- [0272] 단일-사슬 HLA-펩타이드 복합체의 생산
- [0273] 단일-사슬 HLA-A2 (scHLA-A2)/TyrD 369-377 펩타이드 복합체는 하기 문헌에 상세히 기재된 바와 같이 이소프로필 β-D-티오갈락토시드 (IPTG) 유도에 의해 에스케리치아 콜라이에서 생산된 봉입체의 시험관내 재폴딩에 의해 생산되었다: Denkberg, 등 (2000) Eur.J. Immunol. 30, 3522-3532. 간단히, 가요성 링커에 의해 서로에 대해서 연결된 β₂-마이크로글로불린 및 HLA-A2 유전자의 세포의 도메인을 함유하는 scHLA가 조작되었다. 시험관내 재폴딩은 하기의 존재에서 수행되었다: TyrD 369-377 (서열번호: 15) 펩타이드. 정확하게 접혀진 HLA-펩타이드 복합체는 음이온 교환 Q-세파로스 크로마토그래피 (GE Healthcare Life Sciences)에 의해 분리 및 정제되었다.
- [0274] 친제 D11 TCRL 항체에 비교하여 hD11-5의 명백한 친화도를 결정하기 위해, IgG TCRL 항체가 칩 표면 상에 고정된 항-마우스 또는 항-인간 항체에 의해 포착된 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 결합 분석을 수행하였다. 정제된 단일-사슬 재조합 HLA-A2/TyrD 369-377 펩타이드 복합체를 피분석물로 사용하였다. 간단히, 6개 채널의 ProteOn GLM 센서 칩 (BioRad laboratories)을 0.04 M N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필) 카보디이미드 (EDC) 및 0.01 M 설폰-N-하이드록시석신이미드 (설폰-NHS)의 혼합물 50 µl로 30 µl/분의 유량으로 활성화시켰다. 항-마우스 또는 항-인간 다클론성 항체 (Jackson ImmunoResearch)를 10 mM 아세트산나트륨 완충액 pH 4.5에서 최종 농도 25 µg/ml로 희석하고 150 µl를 주입하고 이어서 150 µl의 1 M 에탄올아민-HCl pH 8.5를 주사하였다. IgG TCRL 항체는 30 µl/분의 유량으로 수직 배향으로 주입되었다. 정제된 단일-사슬 재조합 HLA-A2/TyrD 369-377 펩타이드 복합체는 5개 상이한 농도 (250, 125, 62.5, 31.2 및 16 nM)를 사용하여 ProteOn의 수평 배향으로 주입되었다. 작동 완충제 (PBST)은 실험 동안 칩 센서 표면으로부터 포착된 항체의 손실을 교정하기 위해 이중 참조를 위해 6번째 채널에 동시에 주입하였다. 모든 결합 센서그램은 통합된 ProteOn 매니저 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) 소프트웨어를 사용하여 수집, 가공 및 분석되었다. 결합 곡선은 1:1 결합 화학양론을 기술하는 랭뮤어 모델을 사용하거나, 또는 랭뮤어 및 물질 전달 제한 모델로 적합화되었다. 도 2에서 나타난 바와 같이, hD11-5 및 D11 TCRL 항체 둘 모두는 각각 3.9 및 4.6 nM의 HLA-A2/TyrD 369-377 펩타이드 복합체에 대한 유사한 친화도를 실증했다.
- [0275] 실시예 5
- [0276] hD11-5 TCRL 항체의 선택성 및 특이성
- [0277] HLA-A2/TyrD 369-377 복합체에 대한 hD11-5 결합의 선택성 및 특이성은 HLA-A2+ 세포주 및 일차 세포의 패널에서 유세포측정에 의해 실증되었다. WM266.4 세포주 (CRL-1676, ATCC)는 10 % FBS (모두 GIBCO에 의해 공급됨)가 보충된 완전한 DMEM에서 배양하였다. C33A 세포주 (HTB-31, ATCC)는 10 % FBS (모두 GIBCO에 의해 공급됨)가 보충된 완전한 EMEM에서 배양하였다. 501A, Me1526, SKMe15 (HTB-70, ATCC), Mewo (HTB-65, ATCC) 및 1938 (흑색종), Saos2 (HTB-85, ATCC로부터 골육종), Panc1 (CRL-1469, ATCC로부터 췌장 암종), J82 (HTB-1, ATCC), JVM2 (CRL-3002, ATCC로부터 외투 세포 림프종), 및 SW620 (CCL-227, ATCC로부터 결장직장 선암종) 세포주는 10 % FBS (모두 GIBCO에 의해 공급됨)가 보충된 완전한 RPMI에서 배양하였다. Malme3M (HTB-64, ATCC로부터 흑색종) 및 Y79 (HTB-18, ATCC로부터 망막모세포종) 세포주는 20 % FBS (모두 GIBCO에 의해 공급됨)가 보충된 완전한 RPMI에서 배양하였다. 세포주는 7.5 % CO₂의 가습된 분위기에서 37 °C로 유지하였다.

- [0278] 정상 일차 각질형성세포, 간세포, 심장 근세포, 골모세포, 별아교세포, 기관지 상피 세포, 결장 평활근 세포, 요상피 세포 및 신장 상피 세포는 Sciencell로부터 수득하였다. 망막 상피 (ARPE-19) 세포는 ATCC (CRL-2302)로부터 수득하였다. 세포는 제조자의 지침에 따라 배양하고 7.5 % CO₂의 가습된 분위기에서 37 °C로 유지하였다.
- [0279] 간단히, Tyr+ (501A, SKMEL5, WM266.4, 526) 및 Tyr- (1938, PANC1, C33A, SAOS2, SW620, JVM2) 세포주는 1시간 동안 4 °C에서 10 µg/ml의 바이오틴화된 hD11-5 및 D11 TCRL 항체로 인큐베이션하고, 이어서 45분 동안 4 °C에서 PE-라벨링된 스트렙타비딘 콘주게이트로 인큐베이션하였다. BB7.2 항체 (10 µg/ml)를 사용하여 이차 PE-라벨링된 항-마우스 IgG를 사용한 HLA-A2의 발현을 모니터링하였다.
- [0280] 도 3에서 나타낸 바와 같이 바이오틴화된 hD11-5 및 D11 TCRL 항체는 구체적으로 HLA-A2+/Tyr 양성 세포를 염색하였다. 다중 HLA-A2+/Tyr 음성 세포주에 대한 반응성은 검출되지 않았다. BB7.2 항체 염색은 이 패널에서 세포주의 HLA-A2+ 상태를 확인했다.
- [0281] 바이오틴화된 hD11-5 및 D11 TCRL 항체 반응성이 또한 별아교세포, 간세포, 신장 세포, 심장 근세포, 결장 근육, 기관지 상피성, 골모세포, 기관지, 각질형성세포 및 정상 망막 색소 상피 세포주 ARPE19를 포함한 정상 일차 세포의 패널 상에서 시험되었다 (도 4). 이들 HLA-A2+ 세포에 대한 결합은 관측되지 않았다. BB7.2 항체 염색은 이 패널에서 세포의 HLA-A2+ 상태를 확인했다.
- [0282] 실시예 6
- [0283] 세포독성 검정에서 키메라 이중특이적 TCRL CD3-ChD11-5의 생성 및 기능적 특성규명
- [0284] 인간화된 중쇄의 가변 영역 및 인간 불변 영역 1 (VH-CH1)과 찢과 경쇄 (VL)의 가변 영역 및 인간 불변 카파 사슬 (CL) D11 (서열번호 20 및 서열번호 18)을 하기와 같이 조립하였다: 항-CD3 scFv 단편 (서열번호: 16)을 HLA-A2+/Tyr369-377+ 표적 세포에 대해 효과기 T 세포를 재-표적화할 수 있는 이중특이적 작제물 안으로 조립함. 간단히, 항-CD3 scFv를 키메라 경쇄 (마우스-VL 인간-CL 카파)의 N-말단에 하기를 통해 융합하였다: 커넥터 (서열번호: 32, 33) 그리고 6xHis-태그를 하기의 C-말단에 첨가하였다: VH-CH1 (서열번호: 20, 21) 도메인으로 hD11-5의 것. 선도 서열 (서열번호: 34, 35)을 인프레임에 포함시켰다. 두 작제물을 포유동물 세포에서의 발현을 위해 pcDNA3.4 벡터 안으로 클로닝하여 CD3-ChD11-5 BS로 명명된 이중특이적 항체를 수득하였다.
- [0285] CD3-ChD11-5 BS TCRL을 실시예 3에서 기재된 바와 같은 Expi293F 인간 세포 안으로 두 작제물의 동시 형질감염에 의해 발현시켰다. 배양에서 6일 후 세포를 700 X g에서 5분 동안 원심분리하고, CD3-ChD11-5 BS TCRL 항체를 함유하는 상청액을 수거, 여과 및 투석하였다. CD3-ChD11-5 BS TCRL 재조합 단백질은 금속 친화도 (Talon) 및 크기 배제 크로마토그래피 (Superdex 200 10/300 GL GE)로 정제하였다.
- [0286] 세포독성은 CytoTox96® (Promega)을 사용하여 비-방사성 검정에서 측정하였다. 이 검정은 세포 용해에 의해 방출된 효소인 락테이트 탈수소효소 (LDH)를 정량적으로 측정한다. 배양 상청액에서 방출된 LDH는 10분 커플링된 효소적 검정으로 측정되며, 이는 테트라졸륨 염 (INT)을 적색 포르마잔 생성물로의 전환을 초래한다. 생성되는 색상의 양은 용해된 세포의 수에 비례한다.
- [0287] 구체적으로, 표적 세포 및 효과기 세포는 페놀 레드 없이 cRPMI 배지 (1% FBS)에 세정, 계수 및 재현탁시켰다. 표적 세포는 2.5×10^5 세포/mL의 세포 밀도 및 2.5×10^6 세포/mL의 세포 밀도에서의 효과기 세포로 조정되었다. 40 µl (1×10^4 세포)의 표적 세포가 96-웰 V-형상화된 플레이트에서 배양되었다. CD3-ChD11-5 BS TCRL 시험 시약의 5 x 스톱을 최고 시험 농도로 제조하고, 그 다음 별도의 플레이트에 페놀 레드 없는 배지에서 1:10으로 연속으로 희석하여 다른 시험 농도를 수득하였다. CD3-ChD11-5 및 CD3-D11 BS TCRL을 그런 다음 20 µl/웰로 검정 플레이트에서의 표적 세포에 첨가하여 최종 지시된 적정된 양을 수득하였다. BS TCRL과 혼합된 표적 세포를 함유하는 검정 플레이트를 그 다음 37 °C/5 % CO₂에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 40 µl 효과기 세포 (1×10^5 세포)를 각 웰에 첨가하여 10:1의 효과기 대 표적 (E:T) 비를 생성하였다. 효과기 자발적인 방출을 계산하기 위해 효과기 세포 단독, 표적 자발적인 방출을 계산하기 위해 표적 세포 단독, 및 최대 방출을 계산하기 위해 80 µg/ml 디기토닌 최종을 갖는 표적 세포로 대조군 웰을 설정하였다. 각각의 조건을 최종 용적 100 µl로 3회 반복으로 분석하였다. 플레이트는 37 °C/5 % CO₂에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 기간 후, 플레이트를 700 x g에서 5분 동안 원심분리하고, 50 µl는 96-웰 편평한 바닥 Maxisorb 플레이트 (Nunc)에서 각각의 웰로부터 상응하는 웰로 이동되었다. CytoTox96® 기질 혼합물은 제조자

의 지침에 따라 CytoTox96® 검정 완충액을 사용하여 재구성되었고, 플레이트의 각 웰에 50 μ l가 첨가되었다. 플레이트를 알루미늄 포일로 덮고 실온에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 그 다음 흡광도는 플레이트 리더 상에 490 nm에서 기록되었다. 세포독성 백분율은 그 다음 하기 방정식을 사용하여 계산되었다: 특이적 용해 = [(실험 - 효과기 자발적 - 표적 자발적)/(표적 최대 - 표적 자발적)] x 100. 사멸 검정을 위한 PBMC는 건강한 지원자로부터 그리고 모든 규제 IRB 승인 및 서면 동의로 단리된다. 효과기 PBMC는 Lymphoprep 절차를 사용하여 단리된다.

[0288] 도 5A-B 및 6에서 나타난 바와 같이, CD3-ChD11-5 BS TCRL은 인간 PBMC의 존재에서 시험관내 흑색종 WM266.4 세포에 대한 세포독성을 실증했다. Panc-1, HLA-A2+/Tyr- 세포주는 음성 대조군으로 작용했고 세포독성을 나타내지 않았다. 세포독성은 또한 HLA-A2+/Tyr+ 흑색종 세포주의 패널에 대해 검출되었다 (도 5A). 그것의 선택성을 확인하는 CD-ChD11-5 BS TCRL로 HLA-A2+/Tyr- 세포주 (도 5B) 및 정상 인간 일차 세포 (도 6)의 패널에 대해 세포독성은 검출되지 않았다.

[0289] 실시예 7

[0290] 확립된 흑색종 이중이식 마우스 모델에서 CD3-ChD11-5 BS TCRL 및 CD3-D11 BS TCRL의 항종양 활성

[0291] Mel526 흑색종 세포주는 10% 우태 혈청 (GIBCO, 미국 매사추세츠주 월샘 소재)이 보충된 RPMI1640 성장 배지 (GIBCO, 미국 매사추세츠주 월샘 소재)에서 배양되었다. 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)는 건강한 공여체로부터 제조되고 CD3 양성 세포는 생체의 팽창되고, 하기에 기재된 바와 같이 효과기 세포로 사용되었다: WO 2016/199141, 이것은 전체적으로 본 명세서에 참고로 통합된다.

[0292] 0일째에서, 6 내지 8 주령 암컷 NOD/SCID 마우스 (Envigo, 이스라엘 소재)에 최종 용적 0.1ml의 50 % Matrigel® (Corning)에서 15×10^6 생체의 팽창된 효과기 PBMC (효과기:종양 세포 비율 3:1)가 있거나 없는 5×10^6 Mel526 흑색종 세포로 단일 옆구리에 피하로 (s.c.) 접종하였다. 일단 측지가능한 종양이 5일차에서 확립되면, 마우스를 15 μ g/마우스 투약량에서의 CD3-D11, CD3-ChD11-5 또는 CD3-대조군 BS TCRL로 또는 총 6 용량 동안 24시간마다 투여된 5개 추가의 용량과 함께, 최종 용적 0.1 ml에서 비히클 대조군 (PBS)으로 i.v. 처리하였다.

[0293] 도 7은 CD3-ChD11-5 및 CD3-D11 BS TCRL이 이 모델에서 29일의 기간에 걸쳐 종양 퇴화를 유도하였음을 보여준다.

[0294] 본 발명이 그것의 특정 구현예와 관련하여 기재되었지만, 많은 대안, 변형 및 변동이 당해 분야의 숙련자에게 명백할 것이라는 것이 분명하다. 따라서, 첨부된 청구항들의 사상 및 넓은 범위에 속하는 모든 그러한 대안, 변형 및 변동을 포함하도록 의도된다.

[0295] 본 명세서에서 언급된 모든 공보, 특허 및 특허 출원은 각각의 개별 공보, 특허 또는 특허 출원이 본 명세서에 참고로 포함된 것으로 구체적이고 개별적으로 지시된 것과 동일한 정도로 본 명세서에 참고로 전체적으로 편입된다. 또한, 본원에서 임의의 참조의 인용 또는 식별은 이러한 참조가 본 발명의 선행기술로서 이용가능하다는 인정으로 해석되어서는 안된다. 섹션 제목이 사용되는 정도로 제목을 반드시 제한하는 것으로 해석해서는 안된다.

도면

도면1a

hD11-5

경쇄 VK 핵산 (서열번호: 1):

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4- 불변 영역-중지 코돈

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCAAGGCGA
GTCAGGACATTCACTATATAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCCACTATAC
ATCCACTTTGCAACCAGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTTTCACCATCAGC
AGCTGCAGCCTGAAGATATTGCAACATATTACTGTCTACAGTATGATAATCTCTGGACGTTCCGGTCAAGGCACCA
AGGTGGAAATCAAACGGACCGTGGCCGCACCTAGTGTGTTTCATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCTG
GCACCGCTCCGTGGTCTGCCTGCTGAACAACCTTACCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAACG
CCCTGCAGTCCGGCACTCCAGGAATCCGTACCGAGCAGGACTCCAAGGACTTACCTACTCCTGTCTCCAC
CCTGACCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTATACGCTGCGAGGTCAACCAAGGGCCTGTCTCT
TCCCGTCACCAAGTCTTCAACCGGGGCGAGTGCTGA

경쇄 VK 아미노산 서열 (서열번호: 2):

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDIHNYIAWYQKPGKAPKLLIHYTSLQPGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPE
DIATYYCLQYDNLWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

중쇄 VH-5 핵산 (서열번호: 3):

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4- 불변 영역-중지 코돈

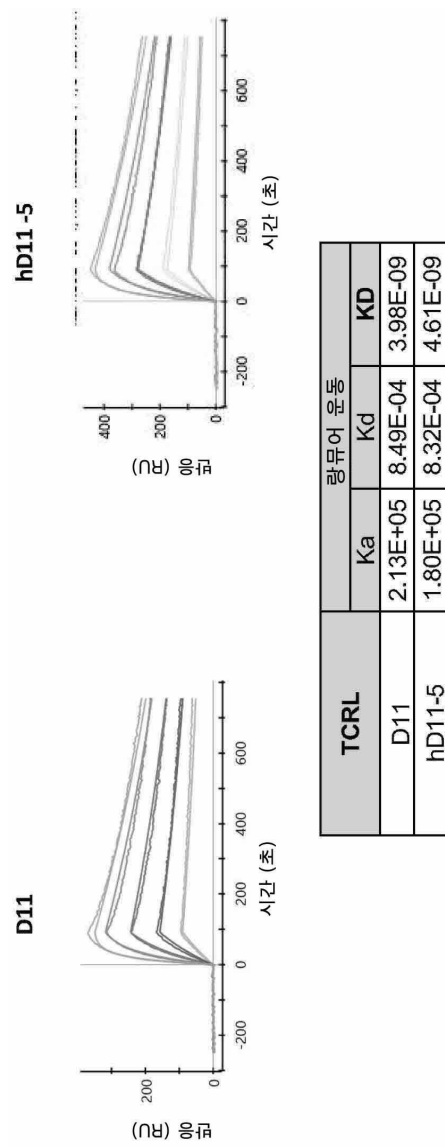
CAGATCACCTTGAAGGAGTCTGGTCTACGCTGGTGAAACCCACACAGACCCTCACGCTGACCTGCACCTTCTCTG
GGTTCTCACTCAGCACTAGTGAATGGGTGTGCTCTGGATCCGTGAGCCCCAGGAAAGGCCCTGGAGTGGCTTG
CACACATTTATTGGGATGATGATAAGCGCTACAACCCATCTCTGAAGAGCAGGCTACCATCACCAAGGACACCTC
CAAAAACAGGTGGTCTTACAATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCACATATTACTGTGCACGAAAGGA
CTACGGTAGTAGCTTCTATGCTATGCACTACTGGGGTCAAGGAACCTAGTCACCGTCTCGAGTGCCTCTACCAAG
GGCCCTTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCAGCTCGAAGTCCACCTCCGGCGGCACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCA
AGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTGGAACCTCTGGCGCTCTGACCTCTGGCGTGCATACCTTCCCTGCC
GTGCTGCAGTCTCCGGCTGTACTCCCTGTCTGTGGTCAAGTGCCTTCTCTCCCTGGGCACCCAGACCTA
CATCTGCAACGTGAACCAAGCCTTCCAACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCTAAGTCTGCGACAAGAC
CCACACCTGTCTCCCTGCCCTGCTCCTGAGCTGCTGGGCGGACCCTCCGTGTTCTCTCCCTCCTAAGCCTAAGG
ACACCTGATGATCTCCGGACCCCTGAGGTCACTGTGTGGTGGTGGATGTGTCCACGAGGATCCTGAGGTCA
AGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACAAAGCCAGCGAGGAACAGTACAACCTC
ACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGACCAAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGT
CTCAACAAGGCCCTGCCTGCCCATCGAGAAAACCATCTCAAGGCCAAGGGACAGCCTCGCGAGCCTCAGGT
GTACACCTGCCTCCCTCTCGGGATGAAGTGAACAAGATCAGGTGTCCCTGACATGTCTGGTCAAGGGCTTCTAC
CCTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAATAAGACCAACCCCTCCTGTGCTG
GACTCCGACGGCTCTTCTCTCTGACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCT
CCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTGTCCCTCTCTCCCGGCTGA

도면1b

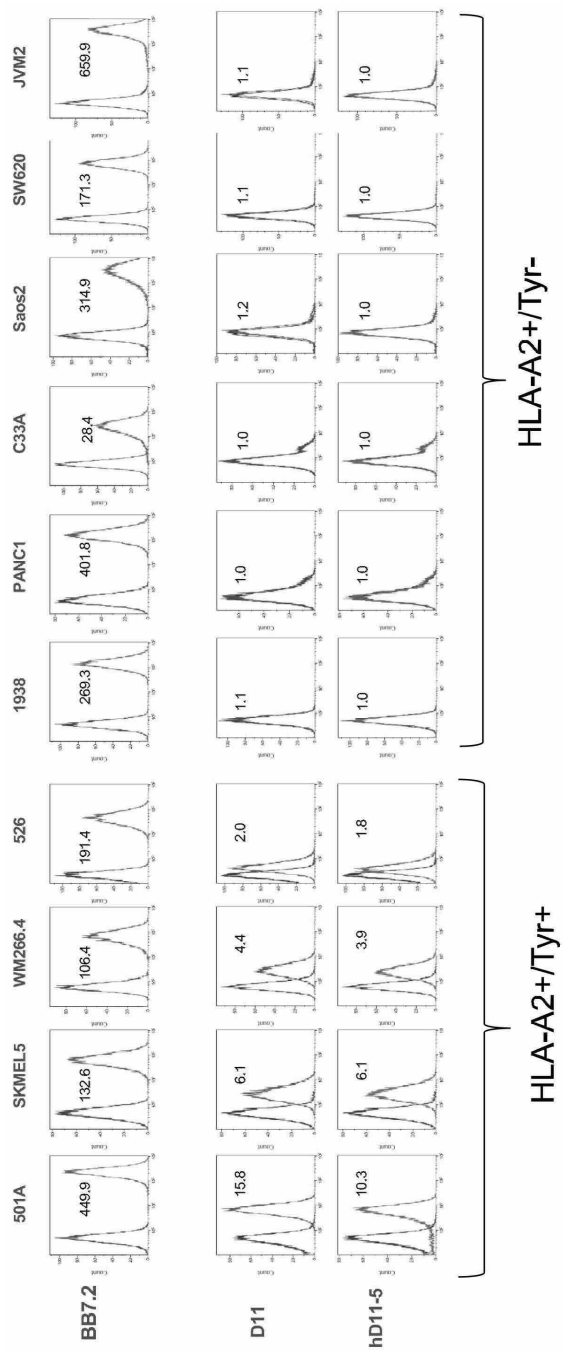
중쇄 VH-5 아미노산 서열 (서열번호: 4):

QITLKESGPTLVKPTQLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQV
VLTMTNMDPVDATYYCARKDYGSSFYAMHYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

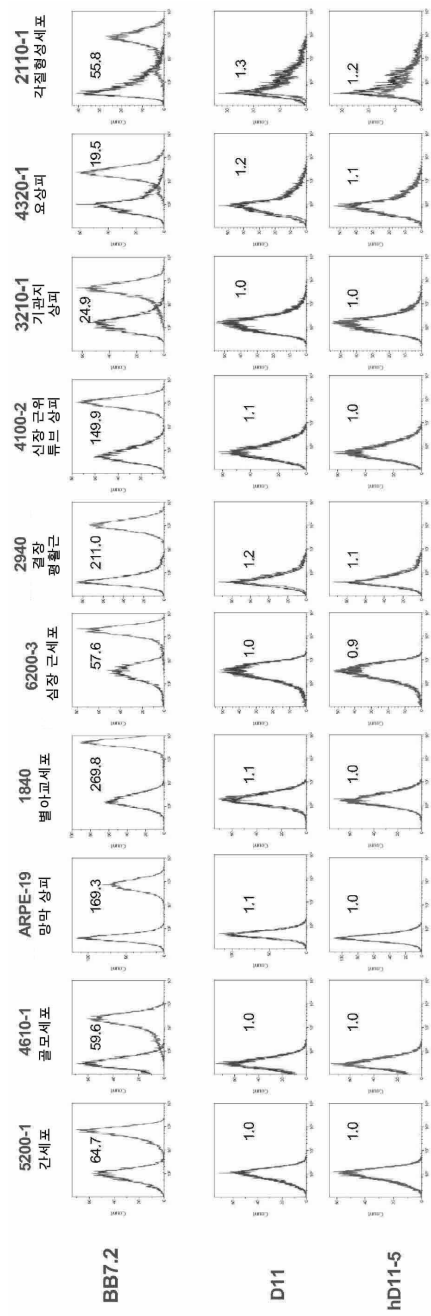
도면2



도면3

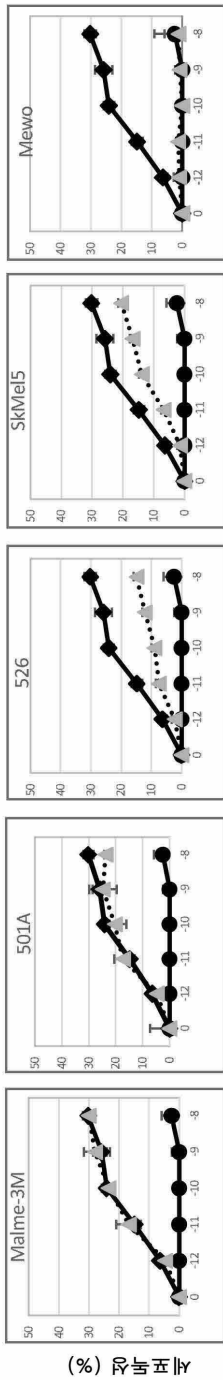


도면4



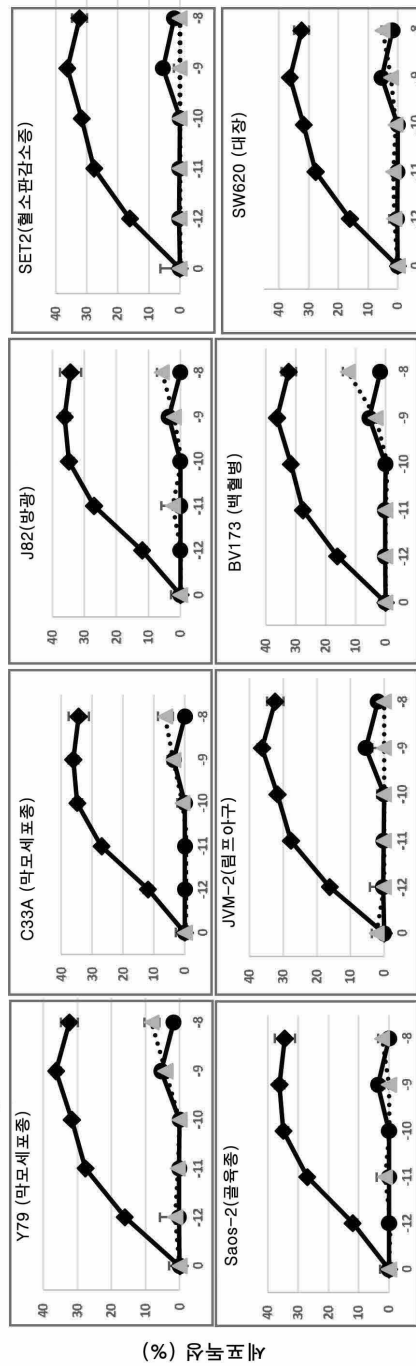
도면5

A. HLA-A2+/Tyr+ 흑색종 세포주



Log10 CD3-Chd11-5 BS [M]

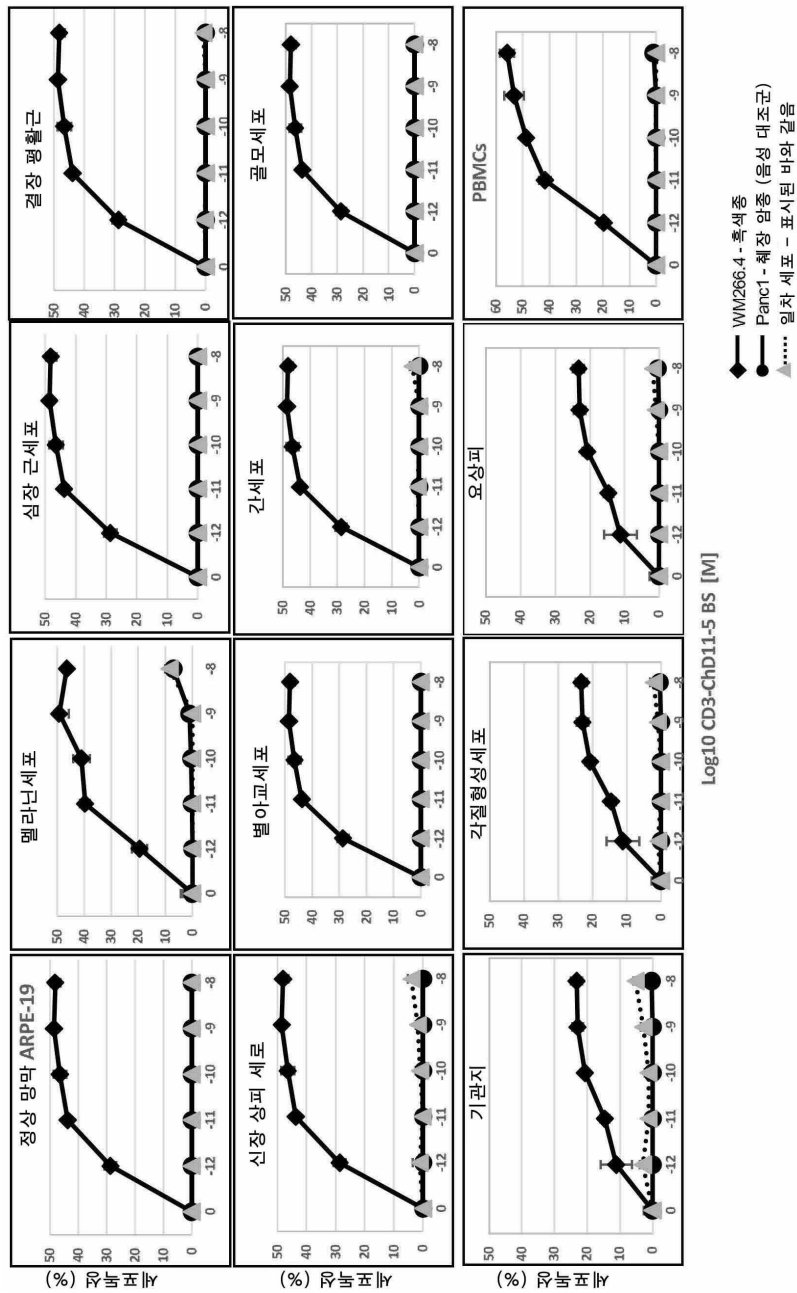
B. HLA-A2+/Tyr-



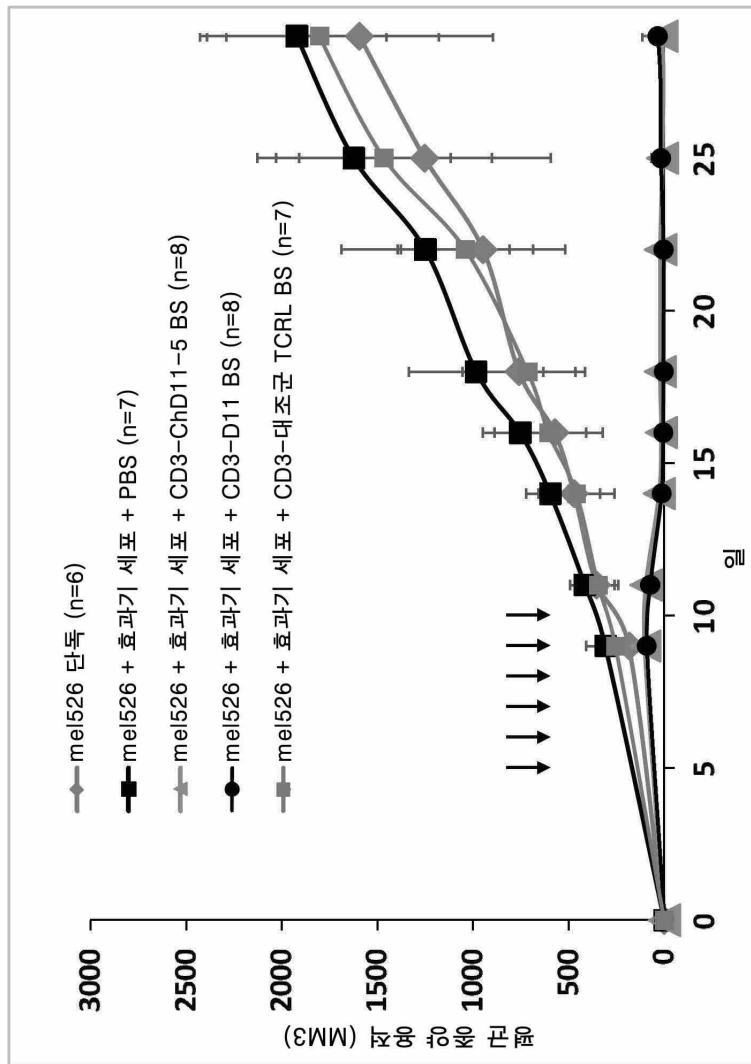
Log10 CD3-Chd11-5 BS [M]

◆ WM266.4- 흑색종
● Panc1- 췌장암종 (음성 대조군)
▲ 표시된 바와 같은 세포주

도면6



도면7



서열 목록

<110> Adicet Bio Inc.
 JAKOBOVITS, Aya
 FOORD, Orit
 SATPAYEV, Daulet Kadyr
 PELED KAMAR, Mira
 DENKBERG, Galit
 REITER, Yoram
 BEER, Ilan
 SINIK, Keren
 TEBOUL (ELBAZ), Yael
 SHPERBER (SERY), Yael
 EREL SEGAL, Reut

OREN, Ravit
 ALISHEKEVITZ, Dror Shmuel
 <120> ANTIBODIES CAPABLE OF BINDING HLA-A2/TYRD IN AN HLA RESTRICTED
 MANNER AND USES THEREOF
 <130> 70151
 <160> 39
 <170> KoPatentIn version 3.0
 <210> 1
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Variable light chain
 <400> 1
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgca aggcgagtca ggacattcac aactatatag cttggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagtcctt gatccactat acatccactt tgcaaccagg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gaagtggatc tgggacagat ttactttca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagatattg caacatatta ctgtctacag tatgataatc tctggacgtt cggccaaggc 300
 accaaggtgg aaatcaaacg g 321
 <210> 2
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Variable light chain
 <400> 2
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Asn Tyr
 20 25 30
 Ile Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

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

<210> 3

<211> 366

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain

<400> 3

cagatcacct tgaaggagtc tggctctacg ctggtgaaac ccacacagac cctcacgctg 60
 acctgcacct tctctggggtt ctactcagc actagtggaa tgggtgtgtc ctggatccgt 120
 cagcccccag gaaaggcctt ggagtggctt gcacacattt attgggatga tgataagcgc 180
 tacaacccat ctctgaagag caggtcacc atcaccaagg acacctcaa aaaccaggtg 240
 gtccttaca tgaccaacat ggaccctgtg gacacagcca catattactg tgcacgaaag 300

gactacggta gtagcttcta tgctatgcac tactggggtc aaggaaccct agtcaccgtc 360
 tcgagt 366

<210> 4

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain

<400> 4

Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

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

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

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

115 120

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1 light chain

<400> 5

Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Asn Tyr Ile Ala

1 5 10

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2 light chain

<400> 6

Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro

1 5

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3 light chain

<400> 7

Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Trp Thr

1 5
 <210> 8
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDR1 Heavy chain
 <400> 8

Thr Ser Gly Met Gly Val Ser

1 5
 <210> 9
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDR2 Heavy chain
 <400> 9

His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15
 <210> 10
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDR3 Heavy chain
 <400> 10

Lys Asp Tyr Gly Ser Ser Phe Tyr Ala Met His Tyr

1 5 10
 <210> 11
 <211> 639
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 11

gacatccaga tgacccagag cccagcagc ctgagcgcca gcctgggagg caaagtgacc 60

atcacatgca aggccagcca ggacatccac aactatatcg cctgggtatca gcacaagccc 120

gtgaaggggc ccagactgct gatccactac accagcacc tgcagcccg caccctctcc 180

agattttctg gcagcggtc cggcagagac tacagcttca gcatcagcaa cctggaaccc 240
gaggatatac ccacctacta ctgcctgcag tacgacaacc tgtggacctt cggcggaggc 300
accaagctgg aaatcaagcg ggccgatgcc gccctaccg tgtccatctt cccaccacgc 360
tccgagcagc tgaccagcgg cggagccagc gtcgtgtgct tccgaacaa cttctacccc 420
aaggacatca acgtgaagtg gaagatcgac ggcagcgagc ggcagaacgg cgtgctgaac 480
agctggaccg accaggacag caaggactcc acctacagca tgtccagcac actgaccctg 540

accaaggacg agtacgagag acacaactcc tatacctgcg aggccaccca caagacctcc 600
accagcccca tcgtgaagtc cttcaaccgg aacgagtgc 639

<210> 12

<211> 213

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

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

1 5 10 15

Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Thr Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Trp Thr

85 90 95

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

100 105 110

Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly

115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn

130 135 140

Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn

145 150 155 160
 Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr

 180 185 190
 Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Asn Glu Cys

210
 <210> 13
 <211> 1341
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 13

caagtcacac tgaagagag cggccctggc atcctgcagc ccagccagac cctgagcctg	60
acctgcagct tcagcggctt ctccctgacc acctccggca tgggcgtgtc ctggatcaga	120
cagcctagcg gcaagggcct ggaatggctg gcccacatct actgggacga cgacaagcgg	180
tacaacccca gcctgaagtc ccggctgacc atcagcaagg acaccagccg gaaccaggtg	240
ttcctgaaga tcaccagcgt ggacgccgcc gacaccgcca cctactactg cgccagaaag	300
gactacggca gcagcttcta cgccatgcac tactggggcc agggcacctc cgtgaccgtg	360
tccagcgcca agaccacccc cccagcgtg taccctctgg cccctggaag cgccgctcag	420
accaacagca tggtcaccct gggctgcctg gtcaagggtt acttccccga gcccgtgaca	480
gtgacctgga acagcggcag cctgagcagc ggcgctgcaca ctttccagc cgtgctgcag	540
agcgacctgt acaccctgtc cagcagcgtc accgtgcccc gcagcacctg gcccagcgaa	600
accgtgacct gtaacgtggc ccaccccgcc agctccacca aggtggacaa gaaaatcgtg	660
ccccgggact gcggctgcaa gccctgcatc tgcacagtgc ccgaggtgtc ctccgtgttc	720
atcttccca ccaagcccaa ggacgtgctg acaatcacc tgaccccaa agtgacatgc	780
gtggtggtgg acatctccaa ggatgaccca gaggtgcagt tcagttggtt cgtggacgac	840
gtggaagtgc acacagccca gaccagcct agagaggaac agttcaacag caccttcaga	900
agcgtgtccg agctgcccat catgcaccag gactggctga acggcaaaga attcaagtgc	960
agagtgaaca gcgccgcctt ccctgcccc atcgagaaaa ccatctctaa gaccaagggc	1020

agaccaagg cccctcaggt ctacaccatc cccccaccta aagaacagat ggccaaggac 1080
aaggtgtccc tcacctgtat gatcaccgat ttcttcccag aggacatcac cgtcgagtgg 1140
cagtggaacg gccagcccgc cgagaactac aagaacaccc agccaatcat ggacaccgac 1200
ggcagctact tcgtgtacag caagctgaac gtgcagaagt ccaactggga ggccggcaac 1260
accttcacct gttctgtgct gcacgagggc ctgcacaacc accacaccga gaagtcctg 1320
tcccacagcc ccggcaagta a 1341

<210> 14

<211> 446

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Ser

20 25 30

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

35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Ala Arg Lys Asp Tyr Gly Ser Ser Phe Tyr Ala Met His Tyr Trp

100 105 110

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

115 120 125

Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met

130 135 140

Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

145 150 155 160

Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro

165	170	175	
Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val			
180	185	190	
Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His			
195	200	205	
Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys			
210	215	220	
Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe			
225	230	235	240
Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro			
245	250	255	
Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val			
260	265	270	
Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr			
275	280	285	
Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu			
290	295	300	
Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys			
305	310	315	320
Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser			
325	330	335	
Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro			
340	345	350	
Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile			
355	360	365	
Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly			
370	375	380	
Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp			
385	390	395	400
Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp			
405	410	415	

Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His

420 425 430

Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TyrD 369-377 amino acid sequence

<400> 15

Tyr Met Asp Gly Thr Met Ser Gln Val

1 5

<210> 16

<211> 759

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ScFv CD3 nucleic acid sequence

<400> 16

Gly Ala Cys Ala Thr Cys Cys Ala Gly Ala Thr Gly Ala Cys Cys Cys

1 5 10 15

Ala Gly Ala Gly Cys Cys Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr

20 25 30

Gly Ala Gly Cys Gly Cys Cys Ala Gly Cys Gly Thr Gly Gly Gly Cys

35 40 45

Gly Ala Cys Ala Gly Ala Gly Thr Gly Ala Cys Cys Ala Thr Cys Ala

50 55 60

Cys Cys Thr Gly Thr Cys Gly Gly Gly Cys Cys Ala Gly Cys Cys Ala

65 70 75 80

Gly Gly Ala Cys Ala Thr Cys Cys Gly Gly Ala Ala Cys Thr Ala Cys

85 90 95

Cys Thr Gly Ala Ala Cys Thr Gly Gly Thr Ala Thr Cys Ala Gly Cys

100 105 110

Ala Gly Ala Ala Gly Cys Cys Cys Gly Gly Cys Ala Ala Gly Gly Cys
115 120 125
Cys Cys Cys Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Cys Thr Gly Ala Thr Cys
130 135 140

Thr Ala Cys Thr Ala Cys Ala Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly Ala Cys
145 150 155 160
Thr Gly Gly Ala Ala Ala Gly Cys Gly Gly Cys Gly Thr Gly Cys Cys
165 170 175
Cys Ala Gly Cys Ala Gly Ala Thr Thr Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys
180 185 190
Ala Gly Cys Gly Gly Cys Thr Cys Cys Gly Gly Cys Ala Cys Cys Gly
195 200 205
Ala Cys Thr Ala Cys Ala Cys Cys Cys Thr Gly Ala Cys Cys Ala Thr

210 215 220
Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly Cys Cys Cys
225 230 235 240
Gly Ala Gly Gly Ala Cys Thr Thr Cys Gly Cys Cys Ala Cys Cys Thr
245 250 255
Ala Cys Thr Ala Cys Thr Gly Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly Gly Gly
260 265 270
Cys Ala Ala Cys Ala Cys Cys Cys Thr Gly Cys Cys Cys Thr Gly Gly
275 280 285

Ala Cys Cys Thr Thr Cys Gly Gly Cys Cys Ala Ala Gly Gly Cys Ala
290 295 300
Cys Cys Ala Ala Gly Gly Thr Gly Gly Ala Ala Ala Thr Cys Ala Ala
305 310 315 320
Gly Gly Gly Cys Gly Gly Ala Gly Gly Cys Gly Gly Cys Thr Cys Thr
325 330 335
Gly Gly Ala Gly Gly Cys Gly Gly Ala Gly Gly Ala Ala Gly Cys Gly
340 345 350
Gly Ala Gly Gly Cys Gly Gly Ala Gly Gly Ala Thr Cys Thr Gly Gly

355 360 365
 Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ala Thr Cys Thr Gly Gly Cys
 370 375 380
 Gly Gly Ala Gly Gly Cys Thr Cys Thr Gly Ala Gly Gly Thr Gly Cys
 385 390 395 400
 Ala Gly Cys Thr Gly Gly Thr Gly Gly Ala Ala Thr Cys Cys Gly Gly
 405 410 415
 Cys Gly Gly Ala Gly Gly Cys Cys Thr Gly Gly Thr Gly Cys Ala Gly
 420 425 430

 Cys Cys Thr Gly Gly Cys Gly Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Ala
 435 440 445
 Gly Ala Cys Thr Gly Thr Cys Thr Thr Gly Thr Gly Cys Cys Gly Cys
 450 455 460
 Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys Thr Ala Cys Ala Gly Cys Thr Thr Cys
 465 470 475 480
 Ala Cys Cys Gly Gly Cys Thr Ala Cys Ala Cys Cys Ala Thr Gly Ala
 485 490 495
 Ala Cys Thr Gly Gly Gly Thr Cys Cys Gly Ala Cys Ala Ala Gly Cys

 500 505 510
 Cys Cys Cys Thr Gly Gly Cys Ala Ala Gly Gly Gly Cys Cys Thr Gly
 515 520 525
 Gly Ala Ala Thr Gly Gly Gly Thr Gly Gly Cys Cys Cys Thr Gly Ala
 530 535 540
 Thr Cys Ala Ala Cys Cys Cys Cys Thr Ala Cys Ala Ala Gly Gly Gly
 545 550 555 560
 Cys Gly Thr Gly Thr Cys Cys Ala Cys Cys Thr Ala Cys Ala Ala Cys
 565 570 575

 Cys Ala Gly Ala Ala Gly Thr Thr Cys Ala Ala Gly Gly Ala Cys Cys
 580 585 590
 Gly Gly Thr Thr Cys Ala Cys Cys Ala Thr Cys Ala Gly Cys Gly Thr
 595 600 605
 Gly Gly Ala Cys Ala Ala Gly Ala Gly Cys Ala Ala Gly Ala Ala Cys

610 615 620
 Ala Cys Cys Gly Cys Cys Thr Ala Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly Ala
 625 630 635 640
 Thr Gly Ala Ala Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Ala Gly Ala Gly Cys

645 650 655
 Cys Gly Ala Gly Gly Ala Cys Ala Cys Cys Gly Cys Cys Gly Thr Gly
 660 665 670
 Thr Ala Cys Thr Ala Cys Thr Gly Cys Gly Cys Cys Ala Gly Ala Ala
 675 680 685
 Gly Cys Gly Gly Cys Thr Ala Cys Thr Ala Cys Gly Gly Cys Gly Ala
 690 695 700
 Cys Ala Gly Cys Gly Ala Cys Thr Gly Gly Thr Ala Cys Thr Thr Cys
 705 710 715 720

Gly Ala Cys Gly Thr Gly Thr Gly Gly Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly
 725 730 735
 Gly Ala Ala Cys Cys Cys Thr Gly Gly Thr Cys Ala Cys Cys Gly Thr
 740 745 750
 Gly Thr Cys Thr Ala Gly Cys

755

<210> 17

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ScFv CD3 amino acid sequence

<400> 17

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp

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

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

225 230 235 240
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

245 250

<210> 18

<211> 639

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain D11 in BS nucleic acid sequence

<400> 18

gatattcaga tgaccacgtc tctagctct ctgtctgccg gcctcggcgg caaagtgaca

60

atcacatgca aggcctctca ggatatccac aactatatcg cctggatatca acacaaaccc 120
gtgaaggac ccagactgct gattcactat acaagcacc tgcagccagg cacacctagc 180

agattcagcg gaagcggcag cggaagagac tactccttca gcatcagcaa cctggaacca 240
gaggacattg ccacatatta ctgcctgcag tacgacaacc tgtggacctt cggaggcggga 300
acaaagctcg agatcaagag aacagtggcc gctcctagcg tgttcattctt cccaccaagc 360
gacgagcagc tgaagtctgg cacagcctct gtcgtgtgcc tgcgaacaa cttctacccc 420
agagaagcca aggtgcagtg gaaggtggac aatgccctgc agagcggcaa tagccaagag 480
agcgtgaccg agcaggacag caaggatagc acctatagcc tgagcagcac actgaccctg 540
agcaaggccg actacgagaa gcacaaagtg tacgcctgcg aagtgcacac ccagggactg 600

agcagccctg tgaccaagag cttcaacaga ggcgagtgc 639

<210> 19

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain D11 in BS amino acid sequence

<400> 19

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

1 5 10 15

Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Thr Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Trp Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro

100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr

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

180 185 190
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205
Asn Arg Gly Glu Cys

210
<210> 20
<211> 675
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> VHCH1 in BS nucleic acids sequence
<400> 20

cagatcaccc tgaagaatc tggcctaca ctggtcaagc ccacacagac cctgacactg 60

acctgcacct ttagcggctt tagcctgagc acaagcggca tgggagtgtc ctggattaga 120

cagcctcttg gaaaggccct cgaatggctg gccacatct actgggacga cgacaagaga 180

tacaacccca gcctgaagtc ccggctgaca atcaccaagg acaccagcaa gaaccaggtg 240

gtgctgacca tgaccaaat ggacctgtg gacaccgcta cctactattg cgcccgaag 300

gattacggca gcagcttcta cgccatgcac tactggggac agggcacact cgtgacagtg 360

tctagcgct ctacaaaggg ccctagcgtt ttccactgg ctctagcag caagtctaca 420

agcggaggaa cagccgctct gggctgcctg gtcaaggatt actttcctga gcctgtgacc 480

gtgtcttggga actctggcgc tctgacctcc ggcgtgcaca catttcagc cgtgctgcag 540

tctagcggcc tgiactctct gagcagcgtt gtgacagtgc caagctctag cctgggcacc 600

cagacctaca tctgcaactg gaaccacaag cctagcaaca ccaaggtcga caagaaggtg 660

gaaccaaga gctgc 675

<210> 21

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VHCH1 in BS amino acid sequence

<400> 21

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

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser

20 25 30

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

35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Lys Asp Tyr Gly Ser Ser Phe Tyr Ala Met His Tyr Trp

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro

165 170 175

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

180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn

195 200 205

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

210	215	220
Cys		
225		
<210>	22	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	CDR1 light chain nucleic acid sequence	
<400>	22	
aaggcgagtc aggacattca caactatata gct		33
<210>	23	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CDR2 light chain nucleic acid sequence	
<400>	23	
tatacatcca ctttgaacc a		21
<210>	24	
<211>	639	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	hD11-5 Full length light chain nucleic acid sequence	
<400>		
>	24	
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc		60
atcacttgca aggcgagtc ggacattcac aactatatag cttggtatca gcagaaacca		120
gggaaagccc ctaagctcct gatccactat acatccactt tgcaaccagg ggtcccatca		180
aggttcagt gaagtggatc tgggacagat ttactttca ccatcagcag cctgcagcct		240
gaagatattg caacatatta ctgtctacag tatgataatc tctggacgtt cggteaaggc		300
accaaggtgg aaatcaaacg gaccgtggcc gcacctagtg tgttcattct ccctccctcc		360
gacgagcagc tgaagtctgg caccgcctcc gtggtctgcc tgctgaacaa cttctaccct		420
cgaggaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agtccggcaa ctcccaggaa		480
tccgtcaccg agcaggactc caaggactct acctactccc tgtcctccac cctgaccctg		540

tccaaggccg actacgagaa gcacaaggta tacgcctgcg aggtcaccca ccagggcctg 600
tcctctcccg tcaccaagtc cttcaaccgg ggcgagtg 639

<210> 25

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hD11-5 Full length light chain amino acid sequence

<400> 25

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Trp Thr
85 90 95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu

145 150 155 160
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe

195

200

205

Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 26

<211> 1353

<

212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hD11-5 Full length heavy chain nucleic acid sequence

<400> 26

cagatcacct tgaaggagtc tggctctacg ctggtgaaac ccacacagac cctcacgctg 60

acctgcacct tctctgggtt ctactcagc actagtggaa tgggtgtgtc ctggatccgt 120

cagccccag gaaaggccct ggagtggctt gcacacattt attgggatga tgataagcgc 180

tacaacctat ctctgaagag caggctcacc atcaccaagg acacctcaa aaaccaggtg 240

gtccttataa tgaccaacat ggacctgtg gacacagcca catattactg tgcacgaaag 300

gactacggta gtagcttcta tgctatgcac tactggggtc aaggaaacct agtcaccgtc 360

tcgagtgcct ctaccaaggg ccttccgtg ttccctctgg ccccagctc gaagtccacc 420

tccggcggca ccgccgtctt gggctgcctg gtcaaggact acttccctga gcctgtgaca 480

gtgtcctgga actctggcgc tctgacctct ggctgtcata ccttccctgc cgtgtgtcag 540

tcctccggcc tgiactccct gtcctctgtg gtcacagtgc cttctctct cctgggcacc 600

cagacctaca tctgcaacgt gaaccacaag ccttccaaca ccaagggtga caagaagggtg 660

gagcctaagt cctgcgacaa gaccacacc tgcctccct gcctgtctcc tgagctgctg 720

ggcggaccct ccgtgttctt gttccctcct aagcctaagg acacctgat gatctccgg 780

acctctgagg tcacctgtgt ggtggtggat gtgtcccacg aggatcctga ggtcaagttc 840

aattggtacg tggacggcgt ggaggtgcac aacgccaaga caaagccacg cgaggaacag 900

tacaactcca cctaccgggt ggtgtccgtg ctgacctgac tgcaccagga ctggctgaac 960

ggcaaagagt acaagtgcaa ggtctccaac aaggccctgc ctgccccat cgagaaaacc 1020

atctccaagg ccaagggaca gcctcgcgag cctcaggtgt acacctgcc tccctctcgg 1080

gatgaactga ccaagaatca ggtgtccctg acatgtctgg tcaagggtct ctacccttcc 1140

gatatcgccg tggagtggga gtccaacggc cagcctgaga acaactacaa gaccaccct 1200

cctgtgctgg actccgacgg ctttttcttc ctgtactcca agctgacctg ggacaagtcc 1260

cgggtggcagc agggcaacgt gttctcctgc tccgtgatgc acgaggcct gcacaaccac 1320
tacaccaga agtctctgtc cctctctccc ggc 1353

<210> 27

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hD11-5 Full length heavy chain amino acid sequence

<400> 27

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

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

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

145	150	155	160
Val	Ser	Trp	Asn
Ser	Gly	Ala	Leu
Thr	Ser	Gly	Val
His	Thr	Phe	Pro
165	170	175	
Ala	Val	Leu	Gln
Ser	Ser	Gly	Leu
Tyr	Ser	Leu	Ser
Ser	Val	Val	Thr
180	185	190	

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

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

435	440	445
Ser Pro Gly		
450		
<210> 28		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> CDR3 light chain nucleic acid sequence		
<400> 28		
ctacagtatg ataatctctg gacg		24
<210> 29		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> CDR1 Heavy chain nucleic acid sequence		
<400> 29		
actagtgga tgggtgtgtc c		21
<210> 30		
<211> 48		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> CDR2 Heavy chain nucleic acid sequence		
<400> 30		
cacatttatt gggatgatga taagcgctac aacccatctc tgaagagc		48
<210> 31		
<211> 36		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> CDR3 Heavy chain nucleic acid sequence		
<400> 31		
aaggactacg gtagtagctt ctatgctatg cactac		36
<210> 32		
<211> 15		
<212> DNA		

<213> Artificial Sequence

<220><223> Connector between anti CD3 to D11 VL nucleic acid sequence

<400> 32

ggcgggtggcg gaagc

15

<210> 33

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Connector between anti CD3 to D11 VL amino acid sequence

<400> 33

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 34

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse IgH signal sequence - leader sequence for expression in

pCDNA3.4

<400> 34

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt acactcc

57

<210> 35

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse IgH signal sequence - leader sequence for expression in

pCDNA3.4

<400> 35

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser

<210> 36

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Leader sequence for expression in pCI Light chain

<400> 36

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct ggggtcccggg atccactggt 60

60

<210> 37

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Leader sequence for expression in pCI Light chain

<400> 37

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly

20

<210> 38

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Leader sequence for expression in pCI Heavy chain

<400> 38

atggaatggt cctgggtgtt cctgttcttc ctgtccgtga ccaccggtgt gcactcc 57

<210> 39

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Leader sequence for expression in pCI Heavy chain

<400> 39

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser