



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2021-0118843  
(43) 공개일자 2021년10월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
A61P 1/14 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류  
C07K 16/2809 (2013.01)  
A61P 1/14 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2021-7023567  
(22) 출원일자(국제) 2019년12월24일  
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2021년07월23일  
(86) 국제출원번호 PCT/RU2019/050257  
(87) 국제공개번호 WO 2020/139171  
국제공개일자 2020년07월02일

(30) 우선권주장  
2018146029 2018년12월25일 러시아(RU)

(71) 출원인  
조인트 스타크 컴퍼니 "바이오펜드"  
러시아 198515 상트페테르부르크 페트로드볼트소  
비이 디스트릭트 스트렐나 스바지 에스티.비엘디  
34 리터 에이

(72) 발명자  
브리타노바 올가 블라디미로브나  
러시아 125362 모스크바 케이브이. 34 디. 42 스  
보보디 에스티알.  
스테라비아로프 드미트리 보리소비치  
러시아 117321 케이브이 247 모스크바 코르프 3  
디. 142 유엘. 프로스유스나이에  
(뒷면에 계속)

(74) 대리인  
유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 **인간 TRBV9에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체**

**(57) 요약**

본 발명은 TRBV9 패밀리의 인간 T 세포 수용체에 특이적으로 결합하는 단일클론 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산, 발현 벡터, 항체의 제조 방법, 및 인간 T 세포 수용체의 상기 패밀리와 관련있는 질환 또는 장애의 치료에 있어 상기한 항체의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 특히 병인이 TRBV9 패밀리의 TCR과 관련있는, 강직성 척추염 (AS 또는 베프테레프 질병), 셀리악 질환 및 혈액 암을 치료하는데 이용할 수 있는 항체 생산에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

*A61P 25/00* (2018.01)

*A61P 35/00* (2018.01)

*A61K 2039/505* (2013.01)

(72) 발명자

**이스트라트바 안나 발렌티노브나**

러시아 186810 지. 피트케란타 케이브이. 43 리에스. 카렐리야 디. 9 유엘. 루다코바

**미소린 알렉세이 콘스탄티노비치**

러시아 194358 상트페테르부르크 피오에스. 파르고로보 케이브이. 307 케이오알피. 2 디.3 유엘. 발레리아 가브릴리나

**네만킨 티모페이 알렉산드로비치**

러시아 198099 상트페테르부르크 케이브이. 160 디. 7 유엘. 털빈나야

**세멜레바 마리아 알렉산드로프나**

러시아 198332 상트페테르부르크 케이브이. 29 케이오알피. 3 디. 74 피알-케이티 레닌스키

**블라디미로바 안나 콘스탄티노브나**

러시아 199004 상트페테르부르크 케이브이. 31 디. 15 리니야 2

**애니키나 이리나 비탈레브나**

러시아 117461 모스크바 케이브이. 242 코르프. 3 디. 10 유엘. 카코프카

**이바노프 로만 알렉세예비치**

러시아 125167 모스크바 케이브이. 176 크롭. 2 29 유엘. 플라네트나야

**모로조프 드미트리 발렌티노비치**

러시아 190000 상트페테르부르크 아드미탈테이스키 알-엔 케이브이. 3 디. 20 유엘. 포치탐트스카야

**야코프레브 파벨 안드리비치**

러시아 196135 상트페테르부르크 케이브이. 17 케이오알피. 3 디.28 피알-케이티. 유리야 가가리나

**루까노프 세르게이 아나톨리에비치**

러시아 117042 모스크바 케이브이. 21 디. 91 유엘. 우즈노부토브스카야

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

인간 T 세포 수용체의 TRBV-9 패밀리의  $\beta$ -쇄 영역에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서,

아미노산 서열이 서열번호 16에 나타낸 서열인 중쇄 가변성 도메인, 및 아미노산 서열이 서열번호 18에 나타낸 서열인 경쇄 가변성 도메인을 포함하는, 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

서열번호 20의 아미노산 서열을 가진 중쇄와 서열번호 22의 아미노산 서열을 가진 경쇄를 포함하는, 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

#### 청구항 3

제2항에 있어서,

전장 IgG 항체인, 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하며, 상기 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 인간 T 세포 수용체의 TRBV9 패밀리의  $\beta$ -쇄 영역에 특이적으로 결합하는, 핵산.

#### 청구항 5

제4항에 따른 핵산을 포함하는 발현 벡터.

#### 청구항 6

세포를 제5항에 따른 벡터로 공동-형질전환하는 것을 포함하는, 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생산하는 숙주 세포를 수득하는 방법.

#### 청구항 7

제4항에 따른 핵산을 포함하는, 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 수득하기 위한 숙주 세포.

#### 청구항 8

제7항에 따른 숙주 세포를 배양 배지에서 항체를 생산할 수 있는 조건 하에 배양한 다음 수득한 항체를 분리 및 정제하는 것을 포함하는, 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 수득하는 방법.

#### 청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 치료학적 유효량으로, 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 부형제와 조합하여 포함하는, 인간 T 세포 수용체의 TRBV9 패밀리의  $\beta$ -쇄 영역에 의해 매개되는 질환 또는 장애를 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물.

#### 청구항 10

제9항에 있어서,

상기 질환 또는 장애가 강직성 척추염, 셀리악 질환, T 세포 백혈병, T 세포 림프종으로 이루어진 군으로부터

선택되는, 약학적 조성물.

**청구항 11**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 치료학적 유효량으로; 및 적어도 하나의 다른 치료학적 활성 화합물을 치료학적 유효량으로 포함하는, TRBV9 패밀리의  $\beta$ -쇄를 가진 인간 T 세포 수용체에 의해 매개되는 질환 또는 장애를 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물.

**청구항 12**

제11항에 있어서,

상기 질환 또는 장애가 강직성 척추염, 셀리악 질환, T 세포 백혈병, T 세포 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약학적 조성물.

**청구항 13**

제11항 또는 제12항에 있어서,

상기 다른 치료학적 활성 화합물이 소분자, 항체 또는 스테로이드 호르몬으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약학적 조성물.

**청구항 14**

개체에 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 유효량으로 투여하는 것을 포함하는, 저해가 필요한 개체에서  $\beta$ -쇄가 TRBV9 패밀리에 속하는 T 세포 수용체의 생물학적 활성을 저해하는 방법.

**청구항 15**

치료가 필요한 개체에 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 제9항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 약학적 조성물을 치료학적 유효량으로 투여하는 것을 포함하는, TRBV9 패밀리의  $\beta$ -쇄를 가진 인간 T 세포 수용체에 의해 매개되는 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

**청구항 16**

제17항에 있어서,

상기 질환 또는 장애가 강직성 척추염, 셀리악 질환, T 세포 백혈병, T 세포 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

**청구항 17**

TRBV9 패밀리의  $\beta$ -쇄를 가진 인간 T 세포 수용체에 의해 매개되는 질환 또는 장애를 치료하기 위한, 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 제9항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 약학적 조성물의 용도.

**청구항 18**

제17항에 있어서,

상기 질환이 강직성 척추염, 셀리악 질환, T 세포 백혈병, T 세포 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 용도.

**발명의 설명**

**기술 분야**

본 발명은 생물공학 및 생의학 분야, 특히 항체 또는 이의 항원 결합 단편뿐 아니라 이의 용도에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 인간 T 세포 수용체 패밀리에 특이적으로 결합하는 단일클론 인간화 항체에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산, 상기한 항체의 제조 방법, 및 인간

[0001]

T 세포 수용체 패밀리와 관련있는 질환 또는 장애의 치료에서의 상기한 항체의 용도에 관한 것이다.

**배경 기술**

- [0002] 자가면역 질환은 자가반응성 T 림프구에 의해 유발된다 (Haroon N et al., *Arthritis Rheum.* 2013 Oct;65(10):2645-54., Duarte J. et al., *PLoS One* 2010 May 10;5(5):e10558; Konig M. et al., *Front Immunol* 2016 Jan 25;7:11). 선행 기술은 T 세포 수용체 (TCR) 서열을 자가면역 질환의 발병에 참여하는 T-림프구를 식별할 수 있는 마커로서 개시하고 있다. T-세포 수용체의 서브유닛은 구조적으로는 면역글로불린 슈퍼패밀리의 구성원이고, 수종의 유전자 세그먼트들로 형성되어 있다. TCR 가변부들은 TCR 항원-결합부를 형성한다. 이는, 이들이 클론-특이적이고, 즉 개별 항원에 반응하는 T 림프구들에서 상이하다는 것을 의미한다.
- [0003] T 세포 수용체는, TCR 가변성 도메인 내 가변성 (V) 유전자 세그먼트들의 아미노산 상동성 측면에서 여러가지 패밀리로 나뉜다.  $\beta$ -쇄는 IMGT 명명법에 따라 26종의 개별 패밀리로 식별되고,  $\alpha$ -쇄는 41종의 패밀리로 구분된다 (Turner SJ et al., *Nature Reviews Immunology* 2006, V.6, 883-894). TCR 쇠의 패밀리를 결정하기 위해, 검사 아미노산 서열을 공지된 TCR 쇠 서열과 다중 정렬하는 방법이 이용되는데, 그 정보는 인터넷 <http://www.imgt.org>에서 이용가능한 IMGT 데이터베이스에 요약 개시된다 ("The international ImmunoGeneTics information system", Lefranc M-P., *Nucl Acids Res* 2001; 29:207-209). 다중 정렬 및 TCR 쇠 패밀리의 결정은 IgBlast 소프트웨어 패키지를 이용해 수행할 수 있다.
- [0004] W09006758에는, 류마티스 관절염을 진단 및 치료하기 위한 수단으로서 제안된, TRBV5-3 및 TRBV8-1 패밀리에 속하는, 인간 T 세포 수용체 가변성 도메인의  $\beta$ -쇄에 대한 단일클론 항체 W112 및 2D1이 개시되어 있다. 이들 단일클론 항체는 TRBV5-3를 가진 말초 T 림프구를 0.3-5%로 인지하고, TRBV8-1을 가진 말초 T 림프구는 0.5-13%로 각각 인지한다. 류마티스 관절염의 발병에서 T 림프구가 관여함을 입증하는 다수의 연구 결과들로, T 수용체의  $\beta$ -쇄 영역에 특이적인 단일클론 항체의 사용이 부상하게 되었다. 특히, Brennan et al., *Clin Exp Immunol.* 1988 Sep; 73(3): 417-423에서는, 류마티스 관절염 환자의 활액 샘플에서 TRBV5 및 TRBV8을 가진 T 림프구가 건강한 개체와 비교해 증가된 것으로, 입증되었다. W09405801에는, TCR V( $\beta$ )3.1 슈퍼패밀리와 상호작용하는, 인간 T-세포 수용체의 VB3.1 가변부의 에피토프와 상호작용하는 류마티스 관절염을 진단 및 치료하기 위한 단일클론 항체가 개시되어 있다.
- [0005] 랫 TRC의 13번째 패밀리의  $\beta$ -쇄를 특이적으로 인지하는 단일클론 항체 역시 개시되어 있다. 동물 모델에서, 이 항체를 이용해, T 수용체에 VB13  $\beta$ -쇄 (VB13+ T 세포)를 포함하는 T 세포의 소 집단을 예방적으로 제거가능한 것으로 입증된 바 있으며, 이러한 과정이 당뇨병-취약 랫에서 1형 당뇨병 발생을 방지하고, 아울러 바이러스-유도된 당뇨병의 발생 위험을 현저하게 낮추는 것으로 입증되어 있다 (Zhiyun Liu et al., *Diabetes.* 2012 May; 61(5): 1160-1168.). 동시에, T 수용체에  $\beta$ -쇄 패밀리의 (VB16)를 포함하는 T 세포의 제거 결과는 대조군과 차이가 없다. 심지어 VB13에 대한 단일클론 항체를 1차 투여한 경우, 랫 비장에서 VB13+ T 세포의 수가 60% 감소되었다는 사실에 주목하는 것이 중요하다.
- [0006] 강직성 척추염 (AS 또는 베흐테레프 질병) 환자에서 자가면역 TCR의 컨센서스 변이체가 언급된 바 있으며, 이는 AS 환자의 활액 및 말초혈에 존재하지만 건강한 공여자에서는 HLA\*B27 대립유전자 상태와 무관하게 동일한 심층 분석에서 관찰되지 않은 것으로, 밝혀졌다 (Faham M. et al., *Arthritis Rheumatol.* 2017;69(4):774-784; Komech E et al. 12th EJI-EFIS Tatra Immunology Conference; 2016 Sep 3-7; Strbske Pleso, Slovakia. Abstract book p. 39). 이러한 TCR들은 (IMGT 명명법에 따르면) TRBV9 패밀리의 구성원이다. TRBV9 패밀리의  $\beta$ -쇄를 가진 T 세포 수용체는 셀리악 질환에서와 같이 자가면역 질환의 발병에도 관여하는 것으로 확인되었다 (Petersen J et al., *J Immunol.* 2015; 194(12): 6112-22). 이는, 또한, 엡스타인-바 바이러스 (EBV)에 의해 유발된 T 세포 림프종 등의 T 세포 림프종 및 T 세포 백혈병에서, 악성화로 이행된 T 세포의 표면에서도 발견된다 (Toyabe S et al., *Clin Exp Immunol.* 2003; 134(1): 92-97).
- [0007] 출원 번호 RU2017145662는 최근, 병인이 TRBV9 패밀리에 속하는 TCR과 관련있는, 자가면역 질환 및 종양 질병, 예를 들어 AS, 셀리악 질환 및 일부 T 세포 림프종 및 T 세포 백혈병을 치료하는데 이용될 수 있는, 인간 T 수용체의 TRBV9 패밀리의  $\beta$ -쇄 영역에 특이적으로 결합할 수 있는 키메라 단일클론 항체를 개시하였다.
- [0008] 이들 항체는 TRBV9 패밀리의 TCR을 가진 T 세포를 제거하는데 이용가능한 현재 유일하게 공지된 항체이다. 이 항체의 주 단점은 인간화 수준이 상대적으로 낮으며, 즉 이는 인간-유사 불변부 및 구조 성분을 포함하지만, 랫-유사 가변성 도메인을 가지고 있다. 이 항체의 중쇄 가변성 단편의 인간화 수준은 72%인 반면, 경쇄 가변성 단편의 인간화 수준은 69%이다.

- [0009] 상기한 모 단일클론 항체는 하기 중쇄 (VH)의 가변성 도메인과 경쇄 (VL)의 가변성 도메인을 포함하며:
- [0010] 1) 중쇄 (VH)의 가변성 도메인은 과가변부 3종 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 포함하되,
- [0011] HCDR1은 (Kabat 번호 지정 체계에 따라) 서열번호 1의 아미노산을 가지고,
- [0012] HCDR2는 서열번호 2의 아미노산을 가지고,
- [0013] HCDR3는 서열번호 3의 아미노산을 가지며;
- [0014] 2) 경쇄 (VL)의 가변성 도메인은 과가변부 3종 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하되,
- [0015] LCDR1은 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지고,
- [0016] LCDR2는 서열번호 5의 아미노산 서열을 가지고,
- [0017] LCDR3는 서열번호 6의 아미노산 서열을 가진다.
- [0018] 상기한 모 단일클론 항체는 서열번호 8 및 10에 나타낸 아미노산 서열을 가진, 중쇄 및 경쇄의 가변성 도메인을 포함한다.
- [0019] 상기한 모 단일클론 항체는 서열번호 12에 나타낸 아미노산 서열을 가진 경쇄, 및 서열번호 14의 아미노산 서열을 가진 항체 중쇄를 포함한다.
- [0020] 상기한 모 항체의 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 대한 예는 서열번호 13 및 11에 나타낸다.
- [0021] 본 발명은 TRBV9 패밀리의 TCR을 가진 T 세포를 제거하는데, 특히 발병 기전이 TRBV9 패밀리의 TCR과 관련있는 AS, 셀리악 질환 및 악성 혈액 질환을 치료하기 위해 이용가능한, 인간화 수준이 높은 것을 특징으로 하는 단일클론 항체의 구축에 관한 것이다. 동시에, 인간화는 항체 친화성 및/또는 용해성의 상당한 감소로 이어진다. 즉, 인간화된 기능성 항체를 구축하는 것이 당면한 과제이다.

### 발명의 내용

- [0022] 본 발명은, 인간 T 수용체의 TRBV9 패밀리의  $\beta$ -쇄 영역에 높은 친화성으로 특이적으로 결합할 수 있는, 인간화된 단일클론 항체 및 이의 항원 결합 단편에 관한 것이다. 본 발명에 따른 항체는 발병 기전이 TRBV9 패밀리에 속하는 TCR과 관련있는, 자가면역 질환 및 종양 질환, 예를 들어, AS, 셀리악 질환 및 일부 T 세포 림프종 및 T 세포 백혈병을 치료하기 위한 약제로 이용할 수 있다.
- [0023] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 항체는 과가변부 3종을 가진 중쇄 (VH)의 가변성 도메인, 및 과가변부 3종, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 가진 경쇄 (VL)의 가변성 도메인을 포함하며,
- [0024] 중쇄의 가변성 도메인에서,
- [0025] 1) HCDR 1 (Kabat 번호 지정 체계에 따라)은 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지고,
- [0026] 2) HCDR 2는 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지고;
- [0027] 3) HCDR 3는 서열번호 3의 아미노산 서열을 가지며;
- [0028] 경쇄의 가변성 도메인에서,
- [0029] LCDR 1은 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지고;
- [0030] LCDR 2는 서열번호 5의 아미노산 서열을 가지고;
- [0031] LCDR 3는 서열번호 6의 아미노산 서열을 가진다.
- [0032] 구체적으로 달리 명시되지 않은 한, 이하 잘 알려진 Kabat 번호 지정 체계에 따라 항체의 CDR을 결정한다.
- [0033] 이에, 항체의 중쇄 및 경쇄 가변성 도메인은, 모 항체와 비교해, 항체의 인간화 수준을 높이는 아미노산 치환을, 중쇄 및 경쇄 가변성 도메인의 FR 단편에 포함한다.
- [0034] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 항체의 중쇄 가변성 도메인은, 서열번호 8에 나타낸 아미노산 서열을 가진 모 항체의 중쇄 가변성 도메인과 비교해, 인간화 아미노산 치환을 10개 이상 포함한다.

- [0035] 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 항체의 중쇄 가변성 도메인은 서열번호 16에 나타난 서열을 가진다.
- [0036] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 항체의 중쇄 가변성 도메인은 항체 특이성에는 영향을 미치지 않는 아미노산 치환을 더 포함한다.
- [0037] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 항체의 경쇄 가변성 도메인은, 서열번호 10에 나타난 아미노산 서열을 가진 항체의 경쇄 가변성 도메인과 비교해, 인간화 아미노산 치환을 10개 이상 포함한다.
- [0038] 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 항체의 경쇄 가변성 도메인은 서열번호 18에 나타난 서열을 가진다.
- [0039] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 항체의 경쇄 가변성 도메인은 항체 특이성에는 영향을 미치지 않는 아미노산 치환을 더 포함한다.
- [0040] 일부 구현예에서, 본 발명의 단일클론 항체는 전장 인간 IgG 항체, 예를 들어, IgG1 또는 IgG2 또는 IgG3 또는 IgG4이다.
- [0041] 일부 구현예에서, 본 발명의 항체는, 아미노산 서열이 서열번호 20의 아미노산에 대해 적어도 85% 동일한, 또는 적어도 90% 동일한, 또는 적어도 91% 동일한, 또는 적어도 92%, 또는 적어도 93% 동일한, 또는 적어도 94%, 또는 적어도 95%, 또는 적어도 96%, 또는 적어도 97%, 또는 적어도 98% 또는 적어도 99% 또는 100% 동일한, 중쇄를 포함한다.
- [0042] 일부 구현예에서, 본 발명의 항체는, 아미노산 서열이 서열번호 22의 아미노산에 대해 적어도 85% 동일한, 또는 적어도 90% 동일한, 또는 적어도 91% 동일한, 또는 적어도 92%, 또는 적어도 93% 동일한, 또는 적어도 94%, 또는 적어도 95%, 또는 적어도 96%, 또는 적어도 97%, 또는 적어도 98% 또는 적어도 99% 또는 100% 동일한, 경쇄를 포함한다.
- [0043] 일부 구현예에서, 항체는 서열번호 22에 나타난 아미노산 서열의 경쇄, 및 서열번호 20에 나타난 아미노산 서열의 중쇄를 가진다.
- [0044] 또한, 본 발명에 따른 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변성 도메인을 코딩하는 핵산, 본 발명에 따른 항체의 경쇄 및 중쇄 및 이의 기능성 단편을 코딩하는 핵산을 제공한다.
- [0045] 또한, 본 발명의 핵산과 선택 숙주 세포에서 핵산을 발현시키는데 필수적인 조절 인자를 포함하는 발현 카세트 및 발현 벡터를 제공한다. 벡터 또는 발현 카세트는 세포에 이러한 발현 카세트 또는 벡터를 (형질감염에 의해) 도입한 결과로서, 세포 계능에 병합되거나 또는 염색체의 요소로서 숙주 세포에 존재할 수 있다.
- [0046] 아울러, 본 발명의 핵산, 벡터 또는 발현 카세트를 포함하는 세포 및 안정적인 세포주, 및 이의 제조 방법을 제공한다.
- [0047] 또한, 상기한 숙주 세포를 항체를 생산할 수 있는 조건에서 배양 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 이 방법은 제조된 항체를 이후 단리 및 정제하는 것을 포함한다.
- [0048] 또한, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 부형제와 조합하여 포함하는, 인간 T 수용체의 TRBV9 패밀리  $\beta$ -쇄 영역에 의해 매개되는 질환 또는 장애를 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물을 제공한다.
- [0049] 일 구현예에서, 약학적 조성물은 강직성 척추염, 셀리악 질환, T 세포 백혈병, T 세포 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환 또는 장애를 예방 또는 치료하기 위한 것이다.
- [0050] 또한, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 하나 이상의 다른 치료학적 활성 화합물을 포함하는, TRBV9 패밀리의  $\beta$ -쇄를 가진 인간 T 세포 수용체에 의해 매개되는 질환 또는 장애를 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조합 (pharmaceutical combination)을 제공한다.
- [0051] 일 구현예에서, 약학적 조합은 강직성 척추염, 셀리악 질환, T 세포 백혈병, T 세포 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환 또는 장애를 예방 또는 치료하기 위한 것이다.
- [0052] 일 구현예에서, 약학적 조합 또는 조성물은 소분자, 항체 또는 코르티코스테로이드와 같은 스테로이드 호르몬으로부터 선택되는 다른 치료학적 활성 화합물을 포함한다.
- [0053] 또한, 개체에 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 유효량으로 투여하는 것을 포함하는, TRBV9 패밀리에 속하는  $\beta$

-쇄를 가진 T 세포 수용체의 생물학적 활성을 저해하는 방법을 제공한다.

- [0054] 또한, 치료가 필요한 개체에 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 상기한 약학적 조성물을 치료학적 유효량으로 투여하는 것을 포함하는, TRBV9 패밀리의  $\beta$ -쇄를 가진 인간 T 세포 수용체에 의해 매개되는 질환 또는 장애를 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0055] 질환 또는 장애의 치료 방법에 대한 일 구현예에서, 질환 또는 장애는 강직성 척추염, 셀리악 질환, T 세포 백혈병, T 세포 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0056] 또한, 치료가 필요한 개체에서 TRBV9 패밀리의  $\beta$ -쇄를 가진 인간 T 세포 수용체에 의해 매개되는 질환 또는 장애를 치료하기 위한, 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 약학적 조성물의 용도를 제공한다.
- [0057] 용도에 대한 일 구현예에서, 질환은 강직성 척추염, 셀리악 질환, T 세포 백혈병, T 세포 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0058] 본 발명의 기술적인 결과는 TRBV9 패밀리에 속하는  $\beta$ -쇄를 가진 TCR에 대해 고 친화성으로 특이적으로 결합하는 인간화 수준이 높은 항체가 수득되는 것이며, 이를 이용해 발병 기전이 TRBV9 패밀리에 속하는  $\beta$ -쇄를 가진 TCR과 관련있는 자가면역 질환 및 중양 질환을 치료할 수 있다.
- [0059] 바람직한 구현예에서, 항체의 중쇄 가변성 단편은 인간화 수준 87%를 특징으로 한다. 바람직한 구현예에서, 항체의 경쇄 가변성 단편은 인간화 수준 85%를 특징으로 한다.

**도면의 간단한 설명**

- [0060] 도 1은 항체 MA-042를 이용한 T 림프구의 분류 결과를 나타낸 것이다.  
 도 2는 항체 MA-042가 1 ng/ml (우측) 및 1  $\mu$ g/ml (좌측) 농도로 존재하는 조건에서 세포독성 활성 분석에 따른 T 림프구의 유세포 측정 결과를 나타낸 것이다. 사각형은 CD45+ CD3+TRBV9+ 집단을 표시한다.  
 도 3은 세포독성 분석에서 MA-042의 50% 유효 농도 (EC50)를 결정하기 위한 MA-042 농도에 따른 사멸 T 림프구의 수를 나타낸 것이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0061] 본 발명은, 유사체와 비교해 높은 인간화 수준을 가진, 인간 T 수용체의 TRBV9 패밀리의  $\beta$ -쇄 영역에 특이적으로 결합할 수 있는 단리된 단일클론 항체 및 이의 기능성 단편에 관한 것이다. 또한, 본 발명의 항체 및 이의 단편을 코딩하는 핵산, 본 발명의 핵산 및 선택 숙주 세포에서 핵산을 발현하는데 필요한 조절 인자를 포함하는 발현 카세트 및 발현 벡터를 제공한다. 또한, 본 발명의 핵산, 벡터 또는 발현 카세트를 포함하는 세포 및 안정적인 세포주를 제공한다. 또한, 단일클론 항체 또는 이의 기능성 단편의 제조 방법, 본 발명의 항체를 유효량으로 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 부형제, 희석제 또는 담체와 조합하여 포함하는 약학적 조성물 및 약학적 조합, 및 본 발명의 항체를 이용한 AS 및 기타 질환의 진단 및 치료 방법을 제공한다.

**정의**

- [0062] 본 발명은 먼저 몇가지 용어들에 대한 정의를 통해 더 쉽게 이해될 것이다.
- [0063] 본원에 제공된 물질 및 방법들은 변경가능하므로, 특정한 조성물 및 방법 단계로 한정되지 않는 것으로 이해된다. 본원 및 첨부된 청구항에서, 단수 형태는 문맥상 달리 명시되지 않은 한 대응되는 복수의 참조를 포함하는 것임에 유념하여야 한다.
- [0064] 인간 "T 세포 수용체"는 또한 "TCR", "T 수용체"로도 지칭되며, T 림프구의 표면에서 발견되는 헤테로다имер 단백질 복합체이다. T 수용체는 T 림프구 상에서만 존재한다. TCR의 주 기능은 주 조직접합성 복합체 (HLA)의 분자에 결합된 가공된 항원을 특이적으로 인지하는 것이다.
- [0065] 인간 TCR은 이황화 결합을 통해 연결되어 세포 막에 고정된 2종의 서브유닛,  $\alpha$ -쇄와  $\beta$ -쇄, 또는  $\gamma$ -쇄와  $\delta$ -쇄로 구성된다. 각각의 TCR 쇄는 N-말단 가변성 (V) 영역, 연결 도메인 및 T 림프구 원형질막에서 수용체를 고정하는 막관통 도메인에 연결된 불변 (C) 도메인을 가진다.  $\alpha$ -쇄 및  $\beta$ -쇄의 불변 도메인의 길이는 각각 아미노산 잔기 91개 및 129개이다.  $\alpha$ -쇄의 연결 도메인과 막관통 도메인의 길이는 아미노산 잔기 (AAR) 30개 및 17개이고,  $\beta$ -쇄는 AAR 21개 및 22개이다. T 수용체의 가변성 도메인의 길이는 AAR 104에서 125개로 다양하다.

- [0067] T 림프구 중 적은 비율이  $\gamma/\delta$  유형의 T 수용체를 가지고 있다. 이들 수용체는  $\alpha/\beta$  수용체와 유사하게 배열되어 있지만, 일차 구조에 차이가 있으며, 다수의 기능적인 특징을 가진다. 이들 수용체는 가변성이 매우 낮고 (제한된 클론 특이성), "비-고전적인" (non-MHC) 항원-제시 분자와 복합체 형태로 항원을 인지하거나, 또는 심지어 유리 항원을 인지한다.
- [0068] T 수용체는 상보성을 결정하는 (CDR) 영역 6곳:  $\alpha$ -쇄 영역 3개 및  $\beta$ -쇄 영역 3개를 통해 MHC/항원 복합체와 반응한다. 이들 CDR은 과가변부 영역, T 세포 수용체의 가변성 도메인의 루프, V $\alpha$  및 V $\beta$ 이다.
- [0069] 용어 "TRBV9" 또는 "TRBV9 패밀리"는, 이의 가변성 도메인의 아미노산이 CDR1 (아미노산 서열 S-G-D-L-S) 및 CDR2 (아미노산 서열 Y-Y-N-G-E-E)의 독특한 모티프를 포함하는 것을 특징으로 하는, IMGT 명명법에 따라 구분되는, T 세포 수용체의  $\beta$ -쇄의 제9 패밀리를 의미한다. 용어 "TRBV9 패밀리 TCR"은  $\beta$ -쇄가 TRBV9 패밀리에 속하는 T 세포 수용체를 의미한다.
- [0070] 용어 "병리학적"은, T 림프구 또는 TCR과 관련하여, TCR 또는 TCR-보유 T 림프구가 질환 또는 병증과 관련있거나 및/또는 질환을 유발하거나 및/또는 질환 발병에 기여하는 것을 의미한다.
- [0071] 용어 "자가면역"은 TCR과 관련하여 TCR이 자가면역 질환의 발병에 관여하는 것을 의미한다.
- [0072] 본원에서, 용어 "항체"는 폴리펩타이드 쇠 4개 (중 (H) 쇠 2개와 경 (L) 쇠 2개)가 이황화 결합에 의해 연결된 면역글로불린 분자를 지칭하는 것으로 의도된다. 경쇄는  $\kappa$  또는  $\lambda$ 로 분류된다. 중쇄는  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$  또는  $\epsilon$ 으로 분류되며; 이는 각각 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE와 같은 항체 이소형을 결정하며, 이들 중 수종은 서브클래스 (이소형), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2로 더욱 세분될 수 있다. 각각의 중쇄 유형은 특이적인 불변부를 특징으로 한다.
- [0073] 각각의 중쇄는 중쇄 가변부 (이하, HCVR 또는 VH 약칭함)와 중쇄 불변부를 포함한다. 중쇄 불변부는 도메인 3개 CH1, CH2 및 CH3를 포함한다. 각 경쇄는 경쇄 가변부 (이하, LCVR 또는 VL로 약칭함)와 경쇄 불변부를 포함한다. 경쇄 불변부는 도메인 하나 CL을 포함한다. VH 및 VL 영역은 프레임워크 영역 (FR)으로 지칭되는 더 보존적인 영역들로 둘러싸인 상보성 결정부 (CDR)로 지칭되는 과변이 영역들로 추가로 세분될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 CDR 3개와 FR 4개로 구성되며, 아미노 말단에서 카르복시 방향으로 다음과 같은 순서로 배열된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.
- [0074] 본 발명에서, 중쇄 CDR 3개는 "HCDR1, HCDR2 및 HCDR3"를 지칭하는 것이고, 경쇄 CDR 3개는 "LCDR1, LCDR2 및 LCDR3"를 지칭하는 것이다. 이들 CDR은 항원과 특이적으로 상호작용하는 잔기 대부분을 포함한다. 본 발명에 따른 항체의 HCVR 및 LCVR내 CDR-아미노산 잔기는 달리 언급되지 않은 한 잘 알려진 Kabat 번호 지정 체계에 따라 번호가 매겨지고 위치된다. 본 발명은 달리 언급되지 않은 한 아미노산에 대한 통상적인 문자 코드를 포함한다.
- [0075] 용어 "항-TRBV9 항체", "TRBV9에 대한 항체", "TRBV9 패밀리  $\beta$ -쇄에 특이적으로 결합하는 항체" 및 "TRBV9 패밀리  $\beta$ -쇄에 대한 항체"는 본 발명의 내용에서 상호 호환적으로 사용되며, 인간 T 세포 수용체의 TRBV9 패밀리  $\beta$ -쇄의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 지칭한다.
- [0076] 아울러, 본 발명에서 사용되는 "단일클론 항체"는 LCVR- 및 HCVR-코딩 DNA를 링커 서열에 결합시켜 수득할 수 있는 단쇄 Fv-단편일 수 있다 (Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, p. 269-315, 1994). 단편 또는 영역의 언급 여부와 상관없이, 본 발명에서 사용되는 용어 "항체"는 이러한 단편 또는 영역뿐 아니라 단쇄 형태를 포함하는 것으로 간주된다. 단백질이 이의 표적 (예, 에피토프 또는 항원)에 특이적으로 또는 바람직하게 결합하는 능력을 유지하는 한, 용어 "항체"에 포함된다. 항체는 당화되거나 또는 당화되지 않을 수 있으며, 여전히 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0077] 본 발명의 목적에서 용어 "항체" 및 "단일클론 항체"는 TRBV9 패밀리 TCR에 대한 단일클론 항체를 지칭한다. 본원에서, "단일클론 항체"는, 달리 언급되지 않은 한, 설치류, 영장류 또는 낙타과의 항체, 바람직하게는 쥐라인, 원숭이, 카멜 또는 라마 항체, 키메라 항체, 인간화 항체 또는 완전 인간 항체를 지칭한다.
- [0078] "단일클론 항체" 집단은 동질적인 또는 실질적인 동질적인 항체 집단을 지칭한다 (즉, 집단에서 항체들 중 적어도 약 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96%, 더 바람직하게는 적어도 약 97 또는 98%, 또는 심지어 더 바람직하게는 적어도 99%가 ELISA에서 동일한 항원/에피토프에 대해 경쟁할 것이거나, 또는 더 바람직하게는 항체는 아미노산 서열 측면에서 동일함). 항체는 당화되거나 또는 당화되지 않을 수 있지만, 여전히 본 발명의 범위에 포함된다. 단일클론 항체는, 번역 후 수정, 예를 들어 당화 패턴에 차이가 있을 수 있더라도, 동일한 아미노산 서열을 가진다면 동질적인 것일 수 있다.

- [0079] 각 경쇄/중쇄 쌍의 가변성 영역들이 항체의 항원-결합부를 형성한다. 본원에 사용된 바와 같이, "항원 결합 부위" 또는 "항원 결합 영역" 또는 "항원 결합 도메인" 또는 "항원-결합부"는 상호 호환적으로 항원과 상호작용하는 아미노산 잔기를 포함하는 항체의 부분으로서, 항원과 관련하여 항체 특이성 및 친화성을 제공한다. 항체의 이러한 부분은 항원-결합 잔기들의 적절한 구조를 유지하는데 필요한 "프레임워크" 아미노산 잔기를 포함한다.
- [0080] 본원에서, 용어 "인간 항체"는 가변 도메인과 불변 도메인의 서열이 인간 서열로부터 유래된 항체를 지칭한다. 본 발명에 따른 인간 항체는, 예를 들어 CDR, 특히 CDR3에 인간에 전형적이지 않은 (예, 시험관내 비-특이적 또는 부위-특이적인 돌연변이 유발에 의해 도입된 돌연변이 또는 생체내 체세포 돌연변이) 아미노산 잔기를 포함할 수 있다.
- [0081] 항체 언급시 사용되는, 용어 "인간화된"은 인간-유사 불변부 및 구조 성분들을 포함하나, 다른 기원의 면역글로불린의 또는 변형된 항체의 대응되는 단편의 전형적인 상보성 결정부 (CDR)을 가지는, 항체를 지칭한다.
- [0082] 본원에서 사용되는, "모" 항체는 변이체를 획득하기 위해 사용되는 아미노산 서열에 의해 코딩되는 항체이다. 모 항체는 설치류, 라마, 키메라, 인간화된 또는 인간 항체로부터 기원할 수 있다.
- [0083] 항체와 관련하여 용어 "인간화 수준"은 인간화 항체를 구축하는데 이용되고 인간 라이브러리로부터 입수가 가능한, 오리지널 인간 어셉터 프레임워크 영역을 가진 인간화 항체의 프레임워크 영역 서열의 동일성 %를 나타내는 것으로 사용된다. 바람직하게는, 본 발명의 항체는 인간 라이브러리로부터 획득된 프레임워크 영역에 대해 적어도 80% 동일한, 전형적으로 적어도 82%, 보다 빈번하게는 적어도 83%, 예를 들어, 적어도 84%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 86%, 또는 적어도 87% 동일한 프레임워크 영역을 포함한다.
- [0084] 용어 "인간화 치환 (humanizing substitution)"은 항체 또는 이의 단편의 인간화 수준을 높이는 아미노산 치환을 의미한다.
- [0085] 본 발명의 항체 언급시 용어 "키메라"는 인간-유사 불변부 특징을 가지지만 다른 기원의 가변부를 가진 항체를 의미한다. 이러한 항체에서, 비-인간 기원 (예, 랫 기원)의 경쇄 및/또는 중쇄의 가변성 도메인은 인간 기원의 대응되는 쇠의 불변 도메인에 작동가능하게 연결된다.
- [0086] 항체 설명에 사용되는, 용어 "작동가능하게 연결된" 또는 유사 표현은 폴리펩타이드 서열들이 서로 물리적 (달리 언급되지 않은 한, 공유 결합) 및 기능적인 연관성으로 배치되는 것을 의미다. 가장 바람직한 구현예에서, 키메라 분자의 폴리펩타이드 성분들의 기능은 단리된 폴리펩타이드 성분들의 기능적인 특성과 비교해 변경되지 않는다. 용어 "작동가능하게 연결된" 또는 유사 표현은, 핵산을 설명하는데 사용되는 경우, 핵산들이 이들이 연결된 지점에 리딩 프레임 시프트 또는 정지 코돈이 존재하지 않도록 공유적으로 연결되는 것을 의미한다. 당해 기술 분야의 당업자에게 자명한 바와 같이, "작동가능하게 연결된" 성분들 (단백질, 폴리펩타이드, 링커 서열, 단백질 도메인 등)을 포함하는 키메라 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 이들 성분을 코딩하는 단편들로 구성되며, 이러한 단편들은 전장 키메라 단백질, 예를 들어 본 발명에 따른 키메라 항체가 뉴클레오티드 서열의 번역 및 전사 중에 만들어지 되도록 공유적으로 연결된다.
- [0087] 본원에서, 용어 "단리된"은 분자 또는 세포가 생체내에 존재하는 환경과는 다른 환경에 분자 또는 세포가 존재하는 것을 의미한다.
- [0088] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 항체는 재조합 항체이고, 즉 재조합 DNA 기법을 이용해 제조된다. 본원에서, 용어 "재조합 항체"는 숙주 세포에 도입된 재조합 발현 벡터를 이용하여 발현된 항체, 재조합 조합 인간 항체 라이브러리 세트로부터 단리된 항체, 인간 면역글로불린 유전자에 대해 형질전환성 동물로부터 단리된 항체와 같이, 재조합 수단에 의해 획득, 발현, 구축 또는 단리된 모든 항체를 포함한다 (예, Taylor L.D. et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295). 일부 구현예에서, 재조합 인간 항체는 시험관내 돌연변이 유발 (또는 인간 Ig 서열에 대해 형질전환성 동물을 사용하는 경우에는, 생체내 체세포 돌연변이 유발)을 거치며, 따라서 재조합 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열들은, 인간 생식계열 VH 및 VL 서열로부터 유래되고 이와 관련 있지만 생체내 인간 항체 생식계열 레퍼토리 범위에 본래 존재하지 않을 수 있는, 서열이다.
- [0089] 본원에서, 용어 "특이적으로 결합한다"는 특이적인 결합 쌍의 하나의 구성원이 이의 특이적인 결합 파트너(들) 이외의 다른 분자에는 특이적으로 결합하지 않는 상황을 나타내기 위한 것이다. 이 용어는 또한, 예를 들어, 본 발명의 항체의 항원-결합 도메인이 다수의 항원들이 보유한 특정 에피토프에 특이적인 경우에도 적용가능하며; 이 경우, 항원-결합 도메인을 포함하는 특이적인 항체는 에피토프를 보유한 다양한 항원들에 특이적으로 결합할 것이다. 즉, 본 발명의 단일클론 항체는 인간 T 세포 수용체의 TRBV9 패밀리  $\beta$  쇠의 에피토프에 특이적으로 결합

합하지만, 다른 패밀리의 TCR  $\beta$  체인 및 TCR  $\alpha$  체에는 특이적으로 결합하지 않는다.

- [0090] 용어 "에피토프"는 항체의 항원-결합 영역 하나 이상에서 항체에 의해 인지되어 항체에 의해 결합될 수 있는 분자의 부분을 지칭한다. 에피토프는 흔히 아미노산 또는 당 측쇄와 같은 분자의 화학적으로 활성인 표면 기들로 구성되며, 3차원 구조 특징뿐 아니라 특이적인 전하 특징을 가진다.
- [0091] 본원에서, 용어 "에피토프"는 특히 동물, 바람직하게는 포유류, 예를 들어, 마우스, 랫 또는 인간에서 항원성 및/또는 면역원성 활성을 가진 폴리펩타이드 단편을 지칭한다. 본 출원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "항원성 에피토프"는 항체에 특이적으로 결합할 수 있으며 당해 기술 분야에서 잘 알려진 임의의 기법에 의해, 예를 들어 표준 면역분석에 의해 검출될 수 있는, 폴리펩타이드 단편이다. 항원 에피토프가 반드시 면역원성인 것은 아니나, 면역원성일 수 있다. 본원에서, "면역원성 에피토프"는 선행 기술 분야에서 공지된 임의의 방법에 의해 확인되는, 동물에서 항체 반응을 일으키는 폴리펩타이드 단편으로서 정의된다. "비-선형 에피토프" 또는 "입체 구조 에피토프 (conformational epitope)"는 에피토프-특이 항체에 결합하는 항원 단백질 내부의 비-인접 폴리펩타이드 (또는 아미노산)를 포함한다.
- [0092] 본 발명의 항체 또는 이의 기능성 단편을 언급하는 경우, 표현 "생물학적 특성" 또는 "생물학적 특징", 또는 용어 "활성" 또는 "생활성"은 본원에서 상호 호환적으로 사용되며, 비-제한적으로 에피토프/항원 친화성 및 특이성, TRBV9 패밀리에 속하는  $\beta$  체인을 포함하는 TCR의 활성을 증화 또는 길항하는 능력을 포함한다.
- [0093] 항체의 기타 식별가능한 생물학적 특성은, 예를 들어 (즉, 통상적으로, 표적 펩타이드의 비-인간 상동체, 또는 다른 단백질 또는 조직과의) 교차 반응성, 및 포유류 세포에서 높은 수준의 단백질 발현을 유지하는 능력을 포함한다. 진술한 특성 또는 특징은, 비-제한적인 예로, ELISA, 경쟁적인 ELISA, BIACORE 또는 KINEXA 표면 플라즈몬 공명 분석, 시험관내 또는 생체내 저해 분석, 비-제한적으로 수용체 결합 분석, 사이토카인 또는 성장인자 생산 및/또는 분비 분석, 및 인간, 영장류 또는 임의의 기타 소스 등의 다양한 소스로부터 수득되는 조직 단편의 면역조직화학 및 신호 전이 등의, 당해 기술 분야에서 인정되는 기법을 이용해, 관찰, 측정 및/또는 분석할 수 있다.
- [0094] 본 출원에서 사용되는 바와 같이, 본 발명의 항체의 활성과 관련하여, 용어 "저해한다" 또는 "증화한다"는, 비-제한적으로, 진술한 항체의 생물학적 활성, 또는 특성, 질환 또는 상태 등의, 저해 중인 진행 또는 중증도를 실질적으로 길항하거나, 금하거나, 방지하거나, 저지하거나, 서행시키거나, 교란하거나, 소거하거나, 정지시키거나, 감소시키는 능력을 지칭한다.
- [0095] 본원에서, 용어 "돌연변이" 또는 "변이체"는 하나 이상의 아미노산이 본 발명의 항체 또는 이의 단편의 천연 아미노산 서열의 N-말단 및/또는 C-말단 및/또는 내부에서 부가 및/또는 치환 및/또는 결손 및/또는 삽입된, 본 발명에 개시된 항체를 지칭한다. 본원에서, 용어 "돌연변이"는 또한 돌연변이 단백질을 코딩하는 핵산 분자를 지칭한다. 또한, 용어 "돌연변이"는 단백질 또는 핵산보다 더 짧거나 또는 긴 임의의 변이체를 지칭한다.
- [0096] 용어 "상동성"은, 비교되는 서열들 간의 동일성 정도 및/또는 유사성 정도에 의해 결정되는, 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열과 다른 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 간의 연관성을 나타내기 위해 사용된다.
- [0097] 본원에서, 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열은, 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열이 비교용으로 선택된 영역내 명시된 서열과의 동일성이 85% 이상이라면, 기준 서열과 "실질적으로 유사" 또는 "실질적으로 동일"한 것이다. 즉, 실질적으로 유사한 서열들은, 예를 들어 적어도 90% 동일한, 또는 적어도 91% 동일한, 또는 적어도 92% 동일한, 또는 적어도 93% 동일한, 또는 적어도 94% 동일한, 또는 적어도 95% 동일한, 또는 적어도 96% 동일한, 또는 적어도 97% 동일한, 또는 적어도 98% 동일한, 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함한다. 서로 동일한 서열 2종은 또한 실질적으로 유사하다.
- [0098] 서열 동일성은 기준 서열에 기초하여 결정된다. 서열 분석 알고리즘은 Ye et al. Nucleic Acids Res. 2013, W34-40에 기술된 IgBLAST와 같이 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 본 발명의 목적에서, 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열들 간의 동일성 및 유사성 정도를 결정하기 위해, 국립 생물공학정보센터 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>)에서 제공하는 IgBLAST 소프트웨어 패키지를 사용해, 표준 파라미터를 적용한 깎 정렬을 이용해, 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열들을 비교할 수 있다. 동일성 %를 계산하기 위해, 기준 서열, 예를 들어 가변부의 전장을 이용한다.
- [0099] 폴리펩타이드를 "코딩하는" 뉴클레오티드 서열은, 폴리펩타이드가 뉴클레오티드 서열로부터 mRNA 번역 및 전사에 의해 생성되는 것을 의미한다. 이로써, mRNA가 동일하고 전사용 주형으로서 사용되는 상보적인 체인 및 서열의 리스트에서 전형적으로 사용되는, 코딩 체인을 지칭할 수 있다. 당해 기술 분야의 당업자에게 자명한 바와

같이, 이 용어는 또한 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 임의의 축중 (degenerate) 뉴클레오티드 서열들을 포함한다. 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 인트론을 포함하는 서열을 포함한다.

- [0100]           **항체**
- [0101]           전술한 바와 같이, 본 발명은 인간 T 수용체의 TRBV9 패밀리 β-쇄 영역에 특이적으로 결합하는 능력을 가진 단리된 단일클론 항체 및 이의 기능성 단편에 관한 것이다.
- [0102]           본 발명에 따른 항체는 키메라, 인간화된 또는 인간 항체, 또는 이들의 항원-결합 단편일 수 있으며, TRBV9 패밀리에 속하는 TCR이 병인에 관여하는 AS, 기타 질환, 예를 들어 셀리악 질환 또는 T 세포 림프종을 치료하기 위한 약제로서 사용될 수 있다.
- [0103]           본 발명의 항체는 단일클론 항체이다. 본 발명의 단일클론 항체는, 예를 들어, 당해 기술 분야에 잘 알려진 하이브리도마 기법뿐 아니라 재조합 기법, 파지 디스플레이 기법, 합성 기법 또는 이들 기법들의 조합 또는 그외 당해 기술 분야에 잘 알려진 기법을 이용해 수득할 수 있다. 본 출원에서 사용되는 용어 "단일클론 항체"는, 이의 제조 방법보다는, 예를 들어 임의의 진핵생물, 원핵생물 또는 파지 클론 등의, 싱글 카피 또는 클론으로부터 수득되는 항체를 지칭하는 것이다.
- [0104]           인간화된 및 키메라 항체는 펩타이드 합성에 의해 또는 하기 "핵산" 섹션에 기술된 재조합 DNA 기법에 의해 수득할 수 있다.
- [0105]           일부 구현예에서, 본 발명의 항체는 키메라 항체이며, 이들이 비-인간 기원 (예, 랫 또는 무라인 기원)의 경쇄 및 중쇄의 가변성 도메인, 및 인간 기원 불변 도메인을 가지는 것을 특징으로 한다.
- [0106]           본 발명의 항체는 하기 과가변부 3개, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 가진 중쇄 (VH)의 가변성 도메인과, 과가변부 3개, 즉 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 가진 경쇄 (VL)의 가변성 도메인을 포함하며,
- [0107]           1) HCDR1 (Kabat 번호 지정 체계에 따라)은 서열번호 1의 서열을 가지고,
- [0108]           2) HCDR2는 서열번호 2의 서열을 가지고;
- [0109]           3) HCDR3는 서열번호 3의 서열을 가지며,;
- [0110]           경쇄 (VL)의 가변성 도메인에서,
- [0111]           LCDR 1은 서열번호 4의 서열을 가지고,
- [0112]           LCDR 2는 서열번호 5의 서열을 가지고,
- [0113]           LCDR 3는 서열번호 6의 서열을 가진다.
- [0114]           구체적으로 달리 언급되지 않은 한, 항체의 CDR 결정에는 잘 알려진 Kabat 번호 지정 체계를 이용한다.
- [0115]           전체 구현예들에서, 본 발명에 따른 항체의 경쇄 및 중쇄의 가변성 도메인은 인간화된 것이며, 모 항체의 가변성 도메인과는 인간화 아미노산 치환 측면에서 상이하되, 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변성 도메인은 중쇄 및 경쇄의 가변성 도메인의 FR 단편에 모 항체와 비교해 항체의 인간화 수준을 증가시키는 아미노산 치환을 포함한다.
- [0116]           일부 구현예에서, 본 발명에 따른 항체의 중쇄 가변성 도메인은, 서열번호 8에 나타난 아미노산 서열을 가진 모 항체의 중쇄 가변성 도메인과 비교해, 인간화 아미노산 치환을 10개 이상 포함한다.
- [0117]           바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 항체의 중쇄 가변성 도메인은 서열번호 16에 나타난 아미노산 서열을 가진다.
- [0118]           일부 구현예에서, 본 발명에 따른 항체의 중쇄 가변성 도메인은 항체 특이성을 변형시키지 않는 아미노산 치환을 더 포함한다.
- [0119]           일부 구현예에서, 본 발명에 따른 항체의 경쇄 가변성 도메인은, 서열번호 10에 나타난 아미노산 서열을 가진 모 항체의 경쇄 가변성 도메인과 비교해, 인간화 아미노산 치환을 10개 이상 포함한다.
- [0120]           바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 항체의 경쇄 가변성 도메인은 아미노산 치환을 포함하며, 서열번호 18에 나타난 서열을 가진다.
- [0121]           일부 구현예에서, 본 발명에 따른 항체의 경쇄 가변성 도메인은 항체 특이성을 변형시키지 않는 아미노산 치환

을 더 포함한다.

- [0122] 일부 구현예에서, 본 발명의 단일클론 항체는 전장 인간 IgG 항체, 예를 들어, IgG1 또는 IgG2 또는 IgG3 또는 IgG4이다.
- [0123] 일부 구현예에서, 본 발명의 항체는, 아미노산 서열이 서열번호 20의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일한, 또는 적어도 90% 동일한, 또는 적어도 91% 동일한, 또는 적어도 92%, 또는 적어도 93% 동일한, 또는 적어도 94%, 또는 적어도 95%, 또는 적어도 96%, 또는 적어도 97%, 또는 적어도 98% 또는 적어도 99% 또는 100% 동일한, 중쇄를 포함한다.
- [0124] 일부 구현예에서, 본 발명의 항체는, 아미노산 서열이 서열번호 22의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일한, 또는 적어도 90% 동일한, 또는 적어도 91% 동일한, 또는 적어도 92%, 또는 적어도 93% 동일한, 또는 적어도 94%, 또는 적어도 95%, 또는 적어도 96%, 또는 적어도 97%, 또는 적어도 98% 또는 적어도 99% 또는 100% 동일한, 경쇄를 포함한다.
- [0125] 일부 구현예에서, 항체는 서열번호 22에 나타난 아미노산 서열의 경쇄, 및 서열번호 20에 나타난 아미노산 서열의 중쇄를 가진다.
- [0126] 선행 기술 분야에서 공지된 바와 같이, 돌연변이는 가변성 도메인 등의 항체 서열에 도입될 수 있으며, 이는 항원에 결합하는 항체의 결합력을 실질적으로 변형시키지 않는다. 본 발명의 항체는 TCR의 TRBV9 패밀리의  $\beta$ -쇄에 결합하는 항체의 결합력의 감소를 유발하진 않지만, 항체-의존적인 세포-매개 세포독성의 감소 또는 항체의 친화성 또는 다른 생물학적 특성 증가를 유발할 수 있는, 추가적인 돌연변이를 또한 포함할 수 있다. 특히, 선행 기술 분야에서 잘 알려진 바와 같이, 항체 서열에 보존적인 아미노산 치환이 행해질 수 있다. 본 출원의 맥락에서 "보존적인 치환"은 아미노산 잔기가 비슷한 측쇄를 가진 다른 아미노산 잔기로 치환되는 치환을 의미한다. 염기성 측쇄 (예, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄 (예, 아스파르트산, 글루탐산), 비-하전된 극성 측쇄 (예, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비-극성 측쇄 (예, 알라닌, 발린, 루신, 이소루신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판),  $\beta$ -분지형 측쇄 (예, 트레오닌, 발린, 이소루신), 및 방향족 측쇄 (예, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 포함하여, 비슷한 측쇄를 가진 아미노산 잔기 패밀리는 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다. 바람직하게는, VL 및/또는 VH 도메인에서 CDR3 영역들은 5개 이하의 보존적인 아미노산 치환, 보다 일반적으로 3개 이하의 보존적인 치환을 포함한다. 전형적으로, 보존적인 치환은 TRBV9 패밀리의  $\beta$ -쇄의 에피토프에 결합하는데 중요한 아미노산 위치에서는 이루어지지 않는다.
- [0127] 본 발명의 항체에 대한 상기한 변이체 (돌연변이)는 아래 "핵산" 섹션에 기술된 제조법 DNA 기법을 이용하거나 또는 펩타이드 합성에 의해 구축할 수 있다.
- [0128] 바람직한 구현예에서, 항체는 중쇄의 불변부, 예를 들어 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM, IgD의 불변부를 포함한다. 바람직하게는, 중쇄 불변부는 인간 IgG1 중쇄 불변부이다. 아울러, 항체는 경쇄 불변부 또는 경쇄  $\kappa$  불변부 또는 경쇄  $\lambda$  불변부를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 항체는 경쇄  $\kappa$  불변부를 포함한다.
- [0129] 바람직한 구현예에서, 항체의 중쇄 가변성 단편은 인간화 수준 87%를 특징으로 한다. 바람직한 구현예에서, 항체의 경쇄 가변성 단편은 인간화 수준 85%를 특징으로 한다.
- [0130] 또한, 본 발명의 항체의 항원-결합 단편을 제공한다. 본원에서, 항체의 "항원-결합 단편" (또는 "항체의 기능성 단편" 또는 "항체의 활성 단편")이라는 용어는, 항체에 특이적으로 결합하는 능력을 보유한 하나 이상의 항체 단편을 지칭한다. 항체의 항원-결합 기능은 전장 항체의 단편들에 의해 달성될 수 있는 것으로 입증된 바 있다. 항체의 "항원-결합 영역"이라는 용어에 포함되는 결합 단편의 예로는, (a) Fab 단편, 즉 VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 1가 단편; (b) F(ab)<sub>2</sub> 단편, 즉 힌지부에서 2개의 Fab 단편이 이황화 결합에 의해 연결된 2가 단편; (c) VH 및 CH1 도메인으로 구성된 Fd 단편; (d) 항체의 싱글 암의 VL 및 VH 도메인으로 구성된 Fv 단편; (e) VH 도메인으로 구성된 dAb 단편 (Ward et al. (1989) Nature 341:544-546), 및 (f) 단리된 상보성 결정부 (CDR) 등이 있다. 아울러, Fv 단편의 2개의 도메인, 즉 VL 및 VH는 개별 유전자에 의해 코딩되지만, 이들은, 제조법 방법을 이용해, VL과 VH 영역이 쌍을 형성하여 1가 분자 (단쇄 Fv (scFv)라함; 예, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)를 형성하는 단일한 단백질 쇄로 만들 수 있는 합성 링커에 의해 연결될 수 있다. 이러한 단쇄 항체는 또한 항체의 "항원-결합 단편"이라는 용어에 포함되는 것으로 간주된다. 이는 또한 다이아바디 (diabody)와 같은 단쇄 항체의 또다른 형태도 포함한다. 다이아바디는, VH 도메인과 VL 도메인이 단일 폴리펩타이드 체인 상에 발현되며 동일 체인 상에서 2개의 도메인 간의 쌍 형성을 허용하기엔 매우 짧은 링커를 이용해 도메인이 다른 체인의 상보적인 도메인

과 쌍을 형성해 2개의 항원 결합부가 구축된, 2가의 2중 특이성 항체이다 (예, Holliger P. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak R. J. et al. (1994) Structure 2:1121-1123).

- [0131] Fab 및 F(ab')<sub>2</sub>와 같은 항체 단편은, 각각 완전 항체 (whole antibody)에 대한 파파인 또는 펩신 소화와 같은 통상적인 기법을 이용해 완전 항체로부터 수득할 수 있다. 또한, 항체, 항체 단편 및 면역부착 (immunoadhesion) 분자도 표준적인 재조합 DNA 기법으로 수득할 수 있다.
- [0132] 항체 또는 이의 항원-결합 영역은 항체 또는 항체 단편과 하나 이상의 단백질 또는 펩타이드의 공유 또는 비-공유 결합에 의해 형성된 더 큰 면역부착 분자의 일부일 수 있다. 이러한 면역부착 분자의 예로는 스트렙타비딘 코어 영역을 사용해 테트라머 scFv 분자를 형성한 경우 (Kipriyanov S.M. et al. (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101), 및 시스테인 잔기, 마커 펩타이드 및 C-말단 폴리히스티딘 태그를 사용해 2가의 크기 축소된 scFv 생체분자를 형성하는 경우 (Kipriyanov S.M. et al. (1994) Mol. Immunol., 31:1047-1058) 등이 있다. 항체 단편들 간의 다른 화학 결합들도 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다.
- [0133] 본 발명에 따른 항체 및 이의 기능성 단편은 단리된 형태로 존재하며, 즉 이는 이러한 단백질에는 올리고당, 핵산 및 이의 단편 등과 같이 자연적으로 생성된 다른 생물학적 분자 또는 기타 단백질이 실질적으로 존재하지 않는 것을 의미하며, 이 경우에 용어 "실질적으로 존재하지 않는다"는 것은, 자연적으로 생성된 다른 생물학적 분자가 단리된 단백질을 포함하는 조성물의 70% 미만, 전형적으로 60% 미만, 흔히 50% 미만이라는 것을 의미한다. 일부 구현예에서, 단백질은 실질적으로 정제된 형태로 존재하며, 여기서 용어 "실질적으로 정제된 형태"는 순도가 95% 이상, 전형적으로 97% 이상, 보다 일반적으로 99% 이상이라는 것을 의미한다.
- [0134] 재조합 또는 하이브리도마 기법에 의해 수득된 항체에 대한 정제 방법들은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 크로마토그래피 (예, 이온 교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 특히 특정 항원 단백질 A 또는 단백질 G에 대한 친화성, 및 크기 분류 컬럼 크로마토그래피), 원심분리, 차별적인 용해성, 또는 그의 임의의 표준적인 단백질 정제 기법에 의해 수행될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 기법에 의해 수득된 항체 또는 이의 단편은 정제 용이성을 위해 이중의 폴리펩타이드 서열 (예, 히스티딘 태그)과 융합시킬 수 있다.
- [0135] 항체 친화성은 해리 상수 (KD)를 결정함으로써 표준 분석으로 정할 수 있다. KD는 식  $KD = kd/kon$ 으로 계산하며, 여기서 kd는 실험적으로 계산된 해리 속도 상수이고, kon은 항원-항체 복합체의 실험적으로 계산된 결합 속도 상수이다.
- [0136] 바람직한 항체는, 약  $1 \times 10^{-7}$  M 이하; 바람직하게는 약  $1 \times 10^{-8}$  M 이하; 보다 일반적으로 약  $1 \times 10^{-9}$  M 이하; 더 바람직하게는 약  $1 \times 10^{-10}$  M 이하, 가장 바람직하게는 약  $1 \times 10^{-11}$  M 이하, 예를 들어, 약  $1 \times 10^{-12}$  M 이하의 KD로 인간 항체에 결합하는 것이다.
- [0137] 바람직한 항체로는 아래 실험 섹션에 상세히 기술된 항체 MA-042를 포함한다.
- [0138] 본 발명의 조성물 및 방법에 사용될 수 있는 항체 및 이의 단편은 생물학적 활성 항체 및 단편이며, 즉, 이는 바람직한 항원 에피토프에 결합하여 직접 또는 간접적으로 생물학적 효과를 발휘할 수 있다.
- [0139] 본 발명에 따른 항체 및 이의 기능성 단편은 TRBV9 패밀리의 β-쇄의 에피토프 (영역)에 특이적으로 결합할 수 있다. 바람직한 구현예에서, TRBV9 패밀리의 β-쇄에 특이적으로 결합함으로써, 상기 β-쇄를 포함하는 TCR의 활성을 저해한다. 전형적으로, 저해는 바람직하게는 적어도 약 20%, 또는 30%, 또는 40%, 또는 50%, 또는 60%, 또는 70%, 또는 80%, 또는 90%, 또는 95% 또는 그 이상이다.
- [0140] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 TRBV9 패밀리의 β-쇄에 대한 항체 또는 이의 단편은 TRBV9 패밀리의 β-쇄를 포함하는 TCR을 가진 T 세포를 제거할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 단편은 T 림프구를 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 약 100%로 제거할 수 있다.
- [0141] 본 발명의 바람직한 구현예에서, 항체는 항체 MA-042이다.
- [0142] 항체 MA-042는 서열번호 16 및 18에 나타낸 아미노산 서열을 가진 중쇄 및 경쇄의 가변성 도메인을 포함한다.
- [0143] 항체 MA-042는 각각 서열번호 20 및 22에 나타낸 아미노산 서열을 가진 중쇄 및 경쇄를 포함한다.
- [0144] **핵산**
- [0145] 본 발명은 본 발명의 항체의 중쇄 및 경쇄, 이의 기능성 단편 및 가변성 도메인을 코딩하는 핵산 분자를 제공하

며, 이를 이용해 인간 항체의 공지된 불변 도메인과 작동가능하게 융합된 본 발명의 가변성 도메인을 함유한 키메라 항체를 획득할 수 있다.

- [0146] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 핵산은, 가변성 도메인이 하기로 특정되는 과가변부 3개, 즉, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 포함하는, 항체 중쇄를 코딩한다:
- [0147] HCDR1 (Kabat 번호 지정 체계에 따름)은 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지며;
- [0148] HCDR2는 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지며;
- [0149] HCDR3는 서열번호 3의 아미노산 서열을 가진다.
- [0150] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 핵산은, 가변성 도메인이 하기로 특정되는 과가변부 3개, 즉, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는, 항체 경쇄를 코딩한다:
- [0151] LCDR1은 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지며;
- [0152] LCDR2는 서열번호 5의 아미노산 서열을 가지며;
- [0153] LCDR3는 서열번호 6의 아미노산 서열을 가진다.
- [0154] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 핵산은, 모 항체와 비교해, 항체의 인간화 수준을 높이는 아미노산 치환을 중쇄 및 경쇄의 가변성 도메인의 FR 단편에 가진, 항체의 중쇄 및 경쇄 가변성 도메인을 코딩한다.
- [0155] 항체 쇄, 기능성 단편 및 이의 도메인에 대한 상동체 및 돌연변이를 코딩하는 핵산 분자 역시 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0156] 일부 구현예에서, 핵산은, 서열번호 8에 나타난 아미노산 서열을 가진 모 항체의 중쇄 가변성 도메인과 비교해, 인간화 아미노산 치환 10개 이상을 함유한, 본 발명에 따른 항체의 중쇄 가변성 도메인을 코딩한다.
- [0157] 일부 구현예에서, 핵산은, 가변성 도메인이 서열번호 16의 아미노산 서열을 가진, 항체 중쇄를 코딩한다.
- [0158] 일부 구현예에서, 핵산은, 가변성 도메인이, 서열번호 10에 나타난 아미노산 서열을 가진 모 항체의 경쇄 가변성 도메인과 비교해, 인간화 아미노산 치환 10개 이상을 포함하는, 항체 경쇄를 코딩한다.
- [0159] 일부 구현예에서, 핵산은, 가변성 도메인이 서열번호 18의 아미노산 서열을 가진, 항체 경쇄를 코딩한다.
- [0160] 일부 구현예에서, 핵산은, 아미노산 서열이 서열번호 20의 아미노산에 대해 적어도 85% 동일한, 또는 적어도 90% 동일한, 또는 적어도 91% 동일한, 또는 적어도 92%, 또는 적어도 93% 동일한, 또는 적어도 94%, 또는 적어도 95%, 또는 적어도 96%, 또는 적어도 97%, 또는 적어도 98% 또는 적어도 99% 또는 100% 동일한, 항체 중쇄를 코딩한다.
- [0161] 일부 구현예에서, 핵산은, 아미노산 서열이 서열번호 22의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일한, 또는 적어도 90% 동일한, 또는 적어도 91% 동일한, 또는 적어도 92%, 또는 적어도 93% 동일한, 또는 적어도 94%, 또는 적어도 95%, 또는 적어도 96%, 또는 적어도 97%, 또는 적어도 98% 또는 적어도 99% 또는 100% 동일한, 항체 경쇄를 코딩한다.
- [0162] 본 발명의 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 핵산의 예는 서열번호 19 및 21에 나타난다.
- [0163] 항체의 경쇄 및 중쇄의 가변성 도메인을 코딩하는 핵산 역시 본 발명의 내용이다. 항체의 경쇄 및 중쇄의 가변성 도메인을 코딩하는 핵산은 항체의 대응되는 불변 도메인을 코딩하는 핵산과 작동가능하게 융합하여 사용할 수 있다.
- [0164] 일부 구현예에서, 핵산은, 아미노산 서열이 서열번호 16에 나타난, 항체의 중쇄의 가변성 도메인을 코딩한다.
- [0165] 일부 구현예에서, 핵산은, 아미노산 서열이 서열번호 18에 나타난, 항체의 경쇄의 가변성 도메인을 코딩한다.
- [0166] 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변성 도메인을 코딩하는 핵산에 대한 예는 서열번호 15 및 17에 나타난다.
- [0167] 본원에서, "핵산 분자" 또는 "핵산"은 DNA 분자, 예를 들어, 게놈 DNA 분자 또는 cDNA 분자, 또는 RNA 분자, 예를 들어 mRNA 분자이다. 일부 구현예에서, 본 발명의 핵산 분자는, 본 발명의 항체 또는 항체 단편을 코딩하며; 이중의 발현 시스템에서 적절한 조건 (예, 생리학적 세포내 조건) 하에 발현시킬 수 있는, 오픈 리딩 프레임을 포함하는 DNA (또는 cDNA) 분자이다.

- [0168] 일부 구현예에서, 본 발명의 핵산 분자는 유전자 조작 방법에 의해 제조된다. 핵산 제조 방법은 당해 기술 분야에 잘 공지되어 있다. 예를 들어, 이용가능한 아미노산 서열 정보 또는 뉴클레오티드 서열 정보를 이용해 올리고뉴클레오티드 합성에 의해 본 발명의 단리된 핵산 분자를 제조할 수 있다. 아미노산 서열 정보의 경우, 축중 코드로 인해 서로 다른 여러가지 핵산이 합성될 수 있다. 바람직한 숙주에 대한 코돈 변이체를 선택하는 방법들은 당해 기술 분야에 잘 공지되어 있다.
- [0169] 합성 올리고뉴클레오티드는 포스포르아미디트 방법에 의해 제조할 수 있으며, 구축된 구조체는 당해 기술 분야에 잘 알려진 방법에 따라, 예를 들어 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC) 또는 예를 들어 Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., (1989) Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY에 기술된 기타 방법에 따라, 예를 들어 United States Dept. of HHS, National Institute of Health (NIH) Guidelines for Recombinant DNA Research에 기술된 지침에 따라 정제할 수 있다. 본 발명의 긴 이중 가닥 DNA 분자는 다음과 같은 방식으로, 즉 인접한 단편과 결합될 수 있는 적절한 말단을 포함하는 적절한 상보성을 가진 수개의 작은 단편들을 합성함으로써, 합성할 수 있다. 인접 단편들은 DNA 리가제 또는 PCR-기반의 방법으로 연결시킬 수 있다.
- [0170] 본 발명의 핵산 분자는 생물학적 소스로부터 또한 클로닝할 수 있다.
- [0171] 또한, 본 발명은 본 발명의 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산과 상동적인, 실질적으로 동일한, 동일한 또는 이로부터 유래된 핵산을 포함한다.
- [0172] 본 발명의 핵산은 본래 존재하는 환경이 아닌 다른 환경에 존재하며, 예를 들어 이는 단리되거나, 증가된 함량으로 존재하거나, 천연 조건에 존재하는 것 이외의 다른 세포 또는 유기체 또는 시험관내 시스템에서 존재 또는 발현된다.
- [0173] 매우 밀접한 핵산 서열들 간의 뉴클레오티드 서열의 변화 또는 차이는 정상적인 복제 또는 증폭 과정 중에 생기는 서열의 뉴클레오티드 변동일 수 있다. 다른 변화도 특수 설계하여, 특정한 목적으로, 예를 들어 조절 영역내 특이적인 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열의 코돈을 바꾸기 위해 서열에 도입할 수 있다. 이러한 특이적인 변화는 다양한 돌연변이 유발 기법을 이용해 시험관내에서 형성시키거나 또는 변화에 대해 유도 또는 선별하는 특정 선택 조건 하에 숙주 유기체를 두어 달성할 수 있다. 이러한 특이적으로 구축된 서열 변이체는 오리지널 서열의 "돌연변이" 또는 "유도체"로 언급될 수 있다.
- [0174] 돌연변이 또는 유도체 핵산은, 주형 핵산의 변이체를 제조하기 위해, 상기한 핵산들로부터 선택되는 주형 핵산을 기반으로, 주형 서열에 하나 이상의 뉴클레오티드 수정, 결손 또는 부가, 또는 이들의 조합에 의해, 수행할 수 있다. 수정, 부가 또는 결손은, 에러-유발 (error-prone) PCR, 셔플링 (shuffling), 올리고뉴클레오티드-특이적인 돌연변이 유발, 어셈블리 PCR, 유성 PCR 돌연변이 유발 (sexual PCR mutagenesis), 생체내 돌연변이 유발, 카세트 돌연변이 유발, 반복 앙상블 돌연변이 유발 (recursive ensemble mutagenesis), 엑스포넨셜 앙상블 돌연변이 유발 (exponential ensemble mutagenesis), 부위-특이적인 돌연변이 유발, 랜덤 돌연변이 유발, 유전자 어셈블리, 유전자 부위 포화 돌연변이 (gene site saturated mutagenesis, GSSM), 합성 라이게이션 리어셈블리 (synthetic ligation reassembly, SLR), 또는 이들의 조합 등의, 당해 기술 분야에 공지된 임의의 방법으로 수행할 수 있다 (예, Gustin et al., *Biotechniques* (1993) 14: 22; Barany, *Gene* (1985) 37: 111-123; 및 Colicelli et al., *Mol. Gen. Genet.* (1985) 199:537-539, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (1989), CSH Press, pp. 15.3-15.108). 수정, 부가 또는 결손은 또한 재조합, 반복적인 서열 재조합, 포스포티오에이트-변형된 DNA 돌연변이 유발, 우라실-함유 주형 돌연변이 유발, 갭 삽입형 두플렉스 돌연변이 유발 (gapped duplex mutagenesis), 포인트 미스매치 복구 돌연변이 유발, 복구-결합 숙주 스트레인에 의한 돌연변이 유발 (repair-deficient host strain mutagenesis), 화학적인 돌연변이 유발, 방사성 돌연변이 유발, 결손 돌연변이 유발, 제한-선별 돌연변이 유발 (restriction-selection mutagenesis), 제한-정제 돌연변이 유발, 인공 유전자 합성, 앙상블 돌연변이 유발, 키메라 핵산 멀티머 구축 (chimeric nucleic acid multimer creation) 및 이들의 조합을 포함하는 방법에 의해 수행할 수 있다.
- [0175] 또한, 본 발명의 단백질을 코딩하는 핵산의 축중 변이체를 제공한다. 핵산의 축중 변이체는 핵산 코돈을 동일한 아미노산을 코딩하는 다른 코돈으로 치환한 것을 포함한다. 특히, 핵산의 축중 변이체는 숙주 세포에서 발현을 증가시키기 위해 제조된다. 이러한 구현예에서, 숙주 세포에서 유전자에 바람직하지 않은 또는 덜 바람직한 핵산의 코돈을 숙주 세포에서 유전자 코딩 서열에서 많이 존재하는 코돈으로 치환하며, 이러한 치환된 코돈은 동일한 아미노산을 코딩한다.

[0176] 진술한 수정은 항체 또는 이의 기능성 단편의 특성을 실질적으로 변형시키지 않지만, 숙주 세포에서 단백질 폴딩을 용이하게 할 수 있거나, 응집력을 감소시킬 수 있거나, 또는 단백질의 기타 생화학적 특성, 예를 들어 반감기를 조절할 수 있다. 일부 구현예에서, 이러한 수정은 단백질의 생화학적 특성을 변형시키지 않는다. 일부 구현예에서, 이러한 수정은 항체 면역원성을 감소시킨다. 진술한 모든 타입의 수정 및 돌연변이는 핵산 수준에서 이루어진다.

[0177] 본원에 개시된 핵산은 실질적으로 정제된 형태로 단리 및 제조될 수 있다. 실질적으로 정제된 형태는, 핵산의 순도가 약 50% 이상, 전형적으로 약 90% 이상이고, 전형적으로 "제조함"인, 즉 전형적으로 천연 숙주 유기체에서 본래 생성된 염색체에서는 조합되어 있지 않은 하나 이상의 뉴클레오티드 서열이 측면에 위치하는 것을 의미한다.

[0178] 또한, 아래에서 보다 상세히 기술되는, 본 발명의 단백질 또는 이의 단편을 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 제공한다. 본 발명의 가변성 도메인을 코딩하는 핵산은 항체의 경쇄 및 중쇄의 대응되는 불변 도메인을 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결될 수 있다. 항체의 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 핵산은 숙주 세포로부터 발현 산물의 이동을 용이하게 하는 리더 펩타이드를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결될 수 있다. 리더 펩타이드는 폴리펩타이드의 성숙화 후 제거된다.

[0179] **백터**

[0180] 또한, 본원에 개시된 핵산을 포함하는 백터 및 기타 핵산 구조체를 제공한다. 용어 "백터"는 작동가능하게 연결된 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 어떤 백터는 이것이 도입된 숙주 세포에서 자율적으로 복제할 수 있지만, 기타 백터는 숙주 세포의 게놈에 병합되어, 숙주 게놈과 함께 복제될 수 있다. 또한, 일부 백터는 작동가능하게 연결된 유전자들의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 백터를 본 발명에서 "제조함 발현 백터" (또는 간단히 "발현 백터")라 지칭하며; 이러한 백터의 예들은 선행 기술 분야에 잘 알려져 있다. 적절한 백터로는 바이러스 백터, 비-바이러스 백터, 플라스미드, 코스미드, 파지 등이 있으며, 바람직하게는 플라스미드이며, 이는 본 발명의 핵산 서열을 적절한 숙주에서 클로닝, 증폭, 발현, 전달하기 위해 사용된다. 적절한 백터를 선택하는 것은 당해 기술 분야의 당업자들에게 자명하다. 진장 핵산 또는 이의 일부는 전형적으로 백터의 절단된 제한효소 부위에 DNA 리가제 부착을 이용함으로써 백터에 삽입된다. 대안적으로, 바람직한 뉴클레오티드 서열은 생체내 상동적인 제조함에 의해, 전형적으로 바람직한 뉴클레오티드 서열의 측면으로 백터에 상동적인 영역을 삽입함으로써, 삽입할 수 있다. 상동성 영역은, 올리고뉴클레오티드의 라이게이션에 의해, 또는 예를 들어 상동성 영역과 바람직한 뉴클레오티드 서열의 일부 둘다를 포함하는 프라이머를 이용한 중합효소 연쇄 반응에 의해, 부가된다. 전형적으로, 백터는 세포내 도입 결과로서 염색체의 요소로서 숙주 세포에서 증폭을 보장하는 복제 기원을 가진다. 백터는 숙주 세포에서 핵산의 발현과 표적 폴리펩타이드 생성을 보장하는 조절 인자를 또한 포함할 수 있다. 발현 백터에서, 이러한 핵산은 프로모터, 인핸서, 종결인자, 오퍼레이터, 억제인자 및 유발인자뿐 아니라 폴리펩타이드의 개시 코돈을 포함할 수 있는 조절 서열에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 본 발명의 핵산은 숙주 세포로부터 세포외 공간으로 발현 산물의 분리를 보장하는 리더 펩타이드에 작동가능하게 추가적으로 연결된다.

[0181] 또한, 특히, 발현 카세트 또는 시스템에 기반하여 기술된 폴리펩타이드 (예, 본 발명의 항체의 경쇄 및 중쇄, 또는 본 발명의 항체의 경쇄 및 중쇄의 가변성 도메인)를 수득하거나 또는 개시된 핵산 분자를 복제하기 위해 사용되는 발현 카세트 또는 시스템을 제공한다. 발현 카세트는 염색체외 요소로서 존재할 수 있거나, 또는 세포내 발현 카세트의 도입 결과로서 세포 게놈에 삽입될 수 있다. 발현하는 경우, 본 발명의 핵산에 의해 코딩된 단백질 산물은, 예를 들어 박테리아 시스템, 효모, 곤충, 양서류 또는 포유류 세포 등의 임의의 편리한 발현 시스템에서 발현된다. 발현 카세트에서, 타겟 핵산은 프로모터, 인핸서, 종결 서열, 오퍼레이터, 억제인자 및 유발인자뿐 아니라 폴리펩타이드의 개시 코돈을 포함할 수 있는 조절 서열에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 본 발명의 핵산은 숙주 세포로부터 세포외 공간으로 발현 산물의 분리를 보장하는 리더 펩타이드에 또한 작동가능하게 연결된다. 원하는 산물을 발현할 수 있는 발현 카세트 또는 시스템을 수득하는 제조 방법은 당해 기술 분야의 당업자들에게 공지되어 있다.

[0182] **숙주 세포**

[0183] 상기한 발현 시스템은 원핵생물 숙주 또는 진핵생물 숙주에서 이용될 수 있다. 숙주 세포, 예를 들어 E. coli, 바실러스 썩틸리스 (B. subtilis), 사카로마이세스 세레비시아 (S. cerevisiae), 베를로바이러스 백터를 조합 사용하는 곤충 세포, 또는 인간 배아 세포가 아닌, 효모, 식물, 척추동물과 같은 고등 유기체의 세포, 예를 들어 CHO 세포 (예, ATCC CRL-9096), NS0 세포, SP2/0 세포, HEK293 세포, COS 세포 (예, ATCC CRL-1650, CRL-

1651) 및 HeLa (ATCC CCL-2)가 단백질을 수득하기 위해 이용될 수 있다.

- [0184] 본 발명의 항체를 생산하기 위해, 숙주 세포는 항체 경쇄를 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 벡터, 및 항체 중쇄를 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 벡터로 공동-형질전환된다. 일부 구현예에서, 항체의 경쇄 및 중쇄 둘다 코딩하는 핵산들이 도입된, 단일 발현 벡터를 이용한다.
- [0185] 경쇄 및 중쇄를 발현하기 위해, 경쇄 및 중쇄가 숙주 세포에서 발현되고, 바람직하게는 숙주 세포를 배양하는 배지로 분비되어 배지로부터 항체를 분리할 수 있도록, 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 발현 벡터(들)를 숙주 세포에 형질전환 (공동-형질전환)한다. 용어 "형질전환"에 대한 다양한 해석들은, Sambrook, Fritsch and Maniatis (eds) Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989; Ausubel F.M. et al. (eds.) Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates (1989)에 기술된 바와 같이, 외인성 DNA를 원핵생물 또는 진핵생물 숙주 세포에 도입하기 위해 통상적으로 사용되는 매우 다양한 방법, 예를 들어 전기천공, 칼슘 포스페이트 석출, DEAE-텍스트란 형질전환 등을 포함하는 것으로 의도된다.
- [0186] 항체의 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터가 숙주 세포에 도입되는 경우, 숙주 세포에서 항체를 발현시키기에, 또는 (더 바람직하게는) 숙주 세포를 배양하는 배양 배지로 항체를 분비하기에 충분한 기간 동안 숙주 세포를 배양함으로써, 항체를 수득한다. 항체는 표준적인 단백질 정제 기법으로 배양 배지로부터 분리할 수 있다. 세포 배양 조건은 당해 기술 분야의 당업자들에게 잘 공지되어 있으며, John Wiley & Sons, Inc., 2000에서 공개된 Current Protocols in Cell Biology, Bonifacino J.S., Dasso M., Harford J.B., Lippincott-Schwartz J. and Yamada K.M. (eds.)에 기술되어 있다.
- [0187] 상기한 숙주 세포 또는 본 발명의 핵산을 복제 및/또는 발현시키기에 적합한 기타 숙주 세포 또는 유기체들 중 임의의 것을 사용할 경우, 제조되는 복제된 핵산, 발현된 단백질 또는 폴리펩타이드는 숙주 세포 또는 유기체의 산물로서 본 발명의 범위에 포함된다. 이들 산물은 당해 기술 분야에 공지된 적절한 기법에 의해 분리할 수 있다.
- [0188] 본 발명의 단백질을 안정적으로 발현하는 세포주는 당해 기술 분야에 공지된 방법 (예, 게놈에 삽입된 유전자를 포함하는 형질전환된 세포를 식별 및 분리할 수 있는, dhfr, gpt, 네오마이신, 히그로마이신과 같은 선별 마커와의 공동-형질전환)에 의해 선별할 수 있다.
- [0189] 본 발명의 핵산 분자를 또한 이용해, 생물학적 샘플에서 유전자 발현을 확인할 수 있다. 게놈 DNA 또는 RNA와 같은 특이적인 뉴클레오티드 서열의 존재에 대해 세포를 검사하는 방법들은 당해 기술 분야에 잘 확립되어 있다. 간략하게는, DNA 또는 mRNA를 세포 샘플에서 분리한다. mRNA를 역전사효소를 이용한 RT-PCR에 의해 증폭시켜 상보적인 DNA 가닥을 형성한 다음, 대상 DNA 서열에 특이적인 프라이머를 이용한 중합효소 연쇄 반응 증폭에 의해 증폭시킬 수 있다. 대안적으로, mRNA 샘플은 겔 전기영동에 의해 분리하고, 이를 적정 담체, 예를 들어 니트로셀룰로스, 나일론 등으로 옮긴 후 프로브로서 대상 DNA의 단편으로 탐침한다. 올리고뉴클레오티드 라이게이션 분석, 인 시추 혼성화 및 고체 칩에 고정된 DNA 프로브에 대한 혼성화와 같은 다른 기법들도 이용할 수 있다. 대상 서열에의 mRNA 혼성화는 샘플에서의 유전자 발현을 나타내는 지표이다.
- [0190] **본 발명의 항체의 치료학적 용도**
- [0191] 일 측면에서, 본 발명의 항체 또는 이의 활성 단편은 표면에 TRBV9 패밀리의 TCR을 가진 병리학적인 T 림프구의 활성화와 관련된, 예를 들어 AS, 셀리악 질환, T 세포 림프종에서 자가면역 T 림프구의 활성을 나타내는 병리학적인 T 림프구의 활성화와 관련된 장애를 치료하는데 이용된다.
- [0192] 본 출원에서 사용되는 용어 "환자"는 비-제한적으로, 마우스, 원숭이, 인간, 가축 포유류, 스포츠 포유류 및 애완동물 포유류 등의 포유류를 지칭하며; 바람직하게는, 이 용어는 인간에 적용된다. 특정 구현예에서, 환자는 TRBV9 패밀리에 속하는 β-쇄를 가진 TCR의 체내 존재에 의해 매개되는 질환 또는 장애 또는 병태로 추가적으로 특정된다. 선행 기술 분야에서 공지된 바와 같이, TRBV9 패밀리에 속하는 β-쇄를 가진 TCR은 AS 및 셀리악 질환과 관련있다. 아울러, TRBV9 패밀리에 속하는 β-쇄를 가진 TCR은 엡스타인 바 바이러스에 의해 유발되는 T 세포 림프종과 같은 다수의 혈액 질환의 발병과 관련있을 수 있다.
- [0193] 본원에서, 항체를 하나 이상의 다른 치료학적 물질과 함께 언급하는, 용어 "공동-투여 (co-administration)", "공동-투여된다" 및 "와 조합하여 (in combination with)"는,
- [0194] 1) 환자에게 구성 성분들을 실질적으로 동시에 방출하는 단일한 투약 형태로 구성 성분들이 제형화되는, 본 발명의 항체 및 치료학적 물질의 조합을 치료가 필요한 환자에게 동시 투여하는 방식,

- [0195] 2) 구성 성분들이 서로 다른 투약 형태로 분리되어 제형화되고, 환자에게 실질적으로 동시에 섭취되어 이들 구성 성분들이 환자에서 실질적으로 동시에 방출되는 경우에, 본 발명에 따른 항체 및 치료학적 물질의 조합을 치료가 필요한 환자에게 동시에 투여하는 방식,
- [0196] 3) 구성 성분들이 별개의 투약 형태로 서로 분리되어 제형화되고, 투약 형태들이 충분한 투여 간격으로 환자에게 연속적인 횟수로 섭취되어, 구성 성분들이 환자에서 실질적으로 다른 시기에 방출되는, 본 발명에 따른 항체 및 치료학적 물질의 조합을 치료가 필요한 환자에게 순차적으로 투여하는 방식; 및
- [0197] 4) 환자에게 동시에, 연속적으로 또는 동일 시점에 및/또는 서로 다른 시점에 중첩하여 방출되는 조절된 방식으로 구성 성분들을 방출하는 단일한 투약 형태로 구성 성분들이 함께 제형화되고, 각각의 부분이 동일 경로에 의해 또는 서로 다른 경로에 의해 투여될 수 있는, 본 발명에 따른 항체 및 치료학적 물질의 조합을 치료가 필요한 환자에게 순차적으로 투여하는 방식을 의미, 언급 또는 포함하는 것으로 간주된다.
- [0198] 본 발명의 항체는 추가적인 치료학적 처치없이, 즉 독립적인 테라피 (independent therapy)로서 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체에 의한 치료는 하나 이상의 부가적인 치료학적 처치를 포함할 수 있다 (병용 요법). 본 발명의 일부 구현예에서, 항체는, 병인이 TRBV9  $\beta$ -쇄를 포함하는 TCR을 수반하는, 자가면역 질환 또는 종양 질환, 예를 들어 AC, 셀리악 질환, T 세포 림프종, T 세포 백혈병에 대한 다른 약제/약물과 공동-투여되거나 또는 제형화될 수 있다.
- [0199] **용량 및 투여 경로**
- [0200] 본 발명의 항체는 대상 병태를 치료하는데 효과적인 양으로, 즉 요망하는 결과를 달성하는데 필요한 용량 및 시간 동안 투여될 것이다. 치료학적 유효량은 치료할 구체적인 병태, 환자의 나이, 성별 및 체중뿐 아니라 항체가 단독으로 또는 하나 이상의 부가적인 면역억제 또는 항-염증성 치료 기법과 조합하여 투여되는 지의 여부와 같은 인자들에 따라 달라질 수 있다.
- [0201] 투약 용법은 최적 반응을 제공하도록 조정될 수 있다. 예를 들어, 단일 볼루스를 투여하거나, 분할된 수회의 용량을 일정 기간 동안 투여하거나, 또는 용량을 치료학적 상황의 긴급성에 의해 지정되는 바와 같이 비례적으로 줄이거나 높일 수 있다. 투여 용이성 및 투여량 균일성을 위해 단위 투약 형태로 비경구 조성물을 제형화하는 것이 특히 유익하다. 본원에서 표준적인 투약 형태는 치료할 환자/개체에게 단일한 투여량 (unitary dosages)으로서 적합한 물리적으로 분리된 단위를 지칭하는 것으로 의도되며; 각 단위는 요망하는 약제학적 담체와 조합하여 원하는 치료학적 효과를 발휘하도록 계산된 기-결정된 함량으로 활성 화합물을 포함한다. 전형적으로, 본 발명의 표준적인 투약 형태에 대한 사양 (specification)은, (a) 화학치료제의 고유한 특징 및 달성할 구체적인 치료학적 또는 예방학적 효과, 및 (b) 개체에서 민감성을 치료하기 위한 활성 화합물의 컴파운드 기술 분야에서 고유한 한계에 의해 기술되며, 이에 의해 직접적으로 좌우된다.
- [0202] 따라서, 당해 기술 분야의 당업자라면, 본원에 제공된 내용을 기초로, 용량 및 투여 용법이 치료 분야에서 잘 공지된 방법에 따라 조정됨을 알 것이다. 즉, 최대 허용량은 쉽게 확립할 수 있으며, 환자에게 검출가능한 치료학적 이점을 제공하는 유효량 역시 환자에게 검출가능한 치료학적 효과를 제공하기 위해 각 물질을 투여하는 시간적 요건처럼 결정할 수 있다. 따라서, 일부 용량 및 용법 계획들이 본원에 예시되지만, 이들 예는 본 발명을 실시함에 있어 환자에게 필수적일 수 있는 용량 및 투여 용법을 어떠한 방식으로든 제한하는 것은 아니다.
- [0203] 투여량 값은 완화형 병태의 유형과 중증도에 따라 달라질 수 있으며, 1회 투여 또는 다회 투여를 포함할 수 있음에 유념하여야 한다. 또한, 임의의 특정 개체의 경우, 구체적인 투약 용법은 개체 필요성에 따라, 그리고 조성물의 투여를 수행 또는 감독하는 의료 전문가의 판단에 따라 경시적으로 조정되어야 하며, 본원에 기술된 투여량 범위는 단순 예이며 청구된 조성물의 범위 또는 실시를 제한하고자 하는 것이 아닌 것으로 이해되어야 한다. 또한, 본 발명의 조성물을 이용한 투약 용법은 질환의 유형, 나이, 체중, 성별, 환자의 건강 상태, 병태의 중증도, 투여 경로 및 사용되는 구체적인 항체 등의, 다양한 인자들에 기초할 수 있다. 즉, 투약 용법은 광범위하게 달라질 수 있지만, 표준적인 방법을 이용해 일상적으로 결정할 수 있다. 예를 들어, 용량은 독성 효과 또는 실험 값과 같은 임상적인 효과를 포함할 수 있는 약동학 및 약리학 파라미터를 기반으로 조정될 수 있다. 이에, 본 발명은 당해 기술 분야의 당업자에 의해 결정되는 환자별 용량-증가 (dose-escalation)를 포함한다. 적절한 투여량 및 용법을 결정하는 방법은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있으며, 본원에 기술된 아이디어가 제공된다면 당해 기술 분야의 당업자라면 이해할 것이다.
- [0204] 적합한 투여 방법의 예는 상기에 제공된다.

- [0205] 본 발명의 항체의 적정 용량은 0.1-200 mg/kg, 바람직하게는 0.1-100 mg/kg, 예로, 약 0.5-50 mg/kg, 예를 들어, 약 1-20 mg/kg의 범위일 것으로 간주된다. 항체는, 예를 들어, 적어도 0.25 mg/kg, 예를 들어, 적어도 0.5 mg/kg, 예로, 적어도 1 mg/kg, 예를 들어, 적어도 1.5 mg/kg, 예를 들어, 적어도 2 mg/kg, 예를 들어, 적어도 3 mg/kg, 예로, 적어도 4 mg/kg, 예를 들어 적어도 5 mg/kg; 예를 들어, 최대 50 mg/kg, 예로, 최대 30 mg/kg, 예를 들어, 20 mg/kg, 예로, 최대 15 mg/kg의 용량으로 투여할 수 있다. 투여는 전형적으로 적절한 시간 간격으로, 예를 들어 주당 1회, 2주당 1회, 3주당 1회 또는 4주당 1회로, 그리고 주치의가 적절하다고 생각하는 동안 반복될 것이며, 일부 경우에 필요에 따라 용량을 늘리거나 또는 줄일 수 있다.
- [0206] **약학적 조성물**
- [0207] 본 발명의 항체는 환자에게 투여하기 적합한 약학적 조성물에 병합될 수 있다. 본 발명의 항체는 단독으로 또는 약제학적으로 허용가능한 담체, 희석제 및/또는 부형제와 조합하여 1회 또는 다회 투여로 투여할 수 있다. 투여용 약학적 조성물은 선택한 투여 방식에 적합하게 설계되며, 분산화제, 완충제, 계면활성제, 보존제, 가용화제, 등장화제 (isotonicity agents), 안정제 등과 같은 약제학적으로 허용가능한 희석제, 담체 및/또는 부형제가 적절한 경우에 사용된다. 이러한 조성물은, 실무자들에게 일반적으로 공지된 바와 같이 조성물을 수득하기 위한 다양한 기법을 제공하는, 예를 들어, Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1995에서와 같이, 통상적인 방법에 따라 설계된다.
- [0208] "약제 (약물)"는 인간 및 동물에서 생리학적 기능을 복구, 개선 또는 수정하고; 질환을 치료 및 예방하고; 진단, 마취, 피임, 미용 (cosmetology) 및 기타 용도로 의도된, 정제, 캡슐제, 산제, 동결건조물, 주사제, 주입제, 연고 및 기타 레디 형태 (ready form)의 약학적 조성물로서 화합물 또는 화합물들의 혼합물이다. 당해 기술 분야에서 용인되는 펩타이드, 단백질 또는 항체를 투여하는 임의의 방법들이 본 발명의 항체에 대해서도 적절하게 적용될 수 있다.
- [0209] 용어 "약제학적으로 허용가능한"은 포유류, 바람직하게는 인간에게 투여하는데 적합한 하나 이상의 혼용가능한 (compatible) 액체 또는 고체 성분들을 의미한다.
- [0210] 본원에서, 용어 "부형제"는 본 발명의 진술한 구성성분들 이외의 임의의 구성성분을 나타내기 위해 사용된다. 이는, 필요한 물리화학적 특성을 약물 제품에 부여하기 위해 약제 제조시 사용되는 무기 또는 유기 특성을 가진 물질이다.
- [0211] 용어 "완충제", "완충제 조성물", "완충화제"는 산-염기 컨주게이트 (acid-base conjugate) 성분들의 작용에 의해 pH 변화를 견딜 수 있으며, 항체 약물이 pH 변화를 견딜 수 있게 하는, 용액을 지칭한다. 일반적으로, 약학적 조성물은, 바람직하게는 pH 4.0 내지 8.0 범위를 가진다. 사용되는 완충제의 예로는, 비-제한적으로, 아세트이트, 포스페이트, 사이트레이트, 히스티딘, 숙시네이트 등, 완충제 용액이 있다.
- [0212] 본원에서, 용어 "간장성 물질", "삼투용질 (osmolyte)" 또는 "삼투압제 (osmotic agent)"는 액체 항체 제형의 삼투압을 높일 수 있는 부형제를 지칭한다. "등장성 (isotonic)" 약물은 인간 혈액과 동일한 삼투압을 가진 약물이다. 등장성 약물은 전형적으로 약 250 내지 350 mOsm/kg의 삼투압을 가진다. 사용되는 등장제 (isotonic agent)로는, 비-제한적으로, 폴리올, 사카라이드 및 슈크로스, 아미노산, 금속염, 예를 들어, 소듐 클로라이드 등이 있다.
- [0213] "안정제"는 활성 물질의 물리적 및/또는 화학적 안정성을 제공하는 부형제 또는 부형제 2종 이상의 혼합물을 의미한다. 안정제로는, 아미노산, 비-제한적인 예로, 아르기닌, 히스티딘, 글리신, 라이신, 글루타민, 프롤린; 계면활성제, 비-제한적인 예로, 폴리소르베이트 20 (상품명 Tween 20), 폴리소르베이트 80 (상품명 Tween 80), 폴리에틸렌-폴리프로필렌 글리콜 및 이의 코폴리머 (상품명 Poloxamer), Pluronic, 소듐 도데실 설페이트 (SDS); 항산화제, 비-제한적인 예로, 메티오닌, 아세틸시스테인, 아스코르브산, 모노티오글리세롤, 아황산 염 등; 킬레이트제, 비-제한적인 예로, 에틸렌다이아민테트라아세트산 (EDTA), 다이에틸렌트리아민펜타아세트산 (DTPA), 소듐 사이트레이트 등이 있다.
- [0214] 약학적 조성물은, 활성 물질이 보관 온도, 예를 들어 2-8°C의 보관 온도에서 지정된 유통 기한 (shelf life) 동안 물리적인 안정성 및/또는 화학적 안정성 및/또는 생물학적 활성을 유지한다면, "안정적"인 것이다. 바람직하게는, 활성 물질은 물리적 및 화학적 안정성뿐 아니라 생물학적 활성을 유지한다. 보관 기간은 가속 또는 자연 노화 조건에서의 안정성 검사 결과를 토대로 정해진다.
- [0215] 본 발명의 단일클론 항체를 포함하는 약학적 조성물은 비경구, 정맥내, 복막내, 피하, 폐, 경피, 근육내, 비강

내, 볼, 설하 또는 좌제 투여 등의 표준적인 투여 방법을 이용해 본원에 기술된 병태를 나타내는 환자에게 투여할 수 있다.

[0216] 본 발명의 약학적 조성물은, 바람직하게는, 본 발명의 항체의 "치료학적 유효량"이거나 또는 이를 포함한다. 용어 "치료학적 유효량"은 원하는 치료학적 결과를 달성하는데 필요한 기간 동안 투여량에서 유효한 양을 지칭하는 것으로 의도된다. 항체의 치료학적 유효량은 개체의 질환 상태, 나이, 성별 및 체중, 개체에서 원하는 반응을 유발하는 항체 또는 그 일부의 능력 등의 인자들에 따라 달라질 수 있다. 또한, 치료학적 유효량은 임의의 독성 또는 유해한 효과가 항체의 치료학적으로 유의한 효과를 넘어서지 않는 양이다. "예방학적 유효량"은 원하는 예방학적 결과를 달성하는데 필요한 기간 동안 투여량에서 유효한 양을 지칭하는 것으로 의도된다. 예방학적 용량은 질환 발병 전 또는 초기 단계에 개체에 처방되므로, 전형적으로 예방학적 유효량은 치료학적 유효량보다 소량일 수 있다.

[0217] 치료학적 유효량 또는 예방학적 유효량은 활성 물질의 독성 용량보다는 낮은, 적어도 치료학적으로 유의한 최소 용량이다. 한편, 본 발명의 항체의 치료학적 유효량은, 포유류, 바람직하게는 인간에서, 자가면역 클론의 존재가 부적절한 병리학적 효과를 유발하거나 또는 기여하는, 자가면역 클론의 생물학적 활성을, 예를 들어, TRBV9 패밀리에 속하는  $\beta$ -쇄를 가진 TCR에의 결합을 통해 감소시키거나, 또는 TRBV9 패밀리에 속하는  $\beta$ -쇄를 가진 TCR을 감소시켜 포유류, 바람직하게는 인간에서 유의한 치료학적 효과를 유발하는, 양이다.

[0218] 본 발명의 항체의 투여 경로는 경구, 비경구, 흡입 또는 국소일 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 항체는 비경구 투여용으로 허용되는 약학적 조성물에 포함될 수 있다. 본 출원에서 사용되는, 용어 "비경구"는 정맥내, 근육내, 피하, 직장, 질 또는 복막내 투여를 포함한다. 정맥내, 복막내 또는 피하 주사가 바람직한 투여 경로이다. 이러한 주사에 허용가능한 약제학적 담체들은 선행 기술 분야에 잘 알려져 있다.

[0219] 적절한 가이드라인에 기술된 바와 같이, 약학적 조성물은 제조 조건 및 용기내 보관 조건 하에 무균성 (sterile) 및 안정적이어야 하며, 이는 기밀 밀봉된 (hermetically sealed) 바이얼 (앰플) 또는 시린지에 의해 제공된다. 즉, 약학적 조성물은 조성물 제조 후 여과 멸균 (filtration sterilization)을 거치거나, 또는 임의의 다른 기법에 의해 적절하게 미생물 측면에서 처리될 수 있다. 전형적인 정맥내 주입용 조성물은 멸균 링거액, 생리 식염수, 텍스트로스 용액 또는 헵크 염 용액 (Hank's salt solution)과 같은 유체 250-1000 ml과, 치료학적 유효량의 항체 농축물 (예, 1-100 mg/ml 이상)을 포함할 수 있다. 용량은 질환의 타입과 중증도에 따라 달라질 수 있다. 임의의 환자에 대한 용량이 환자의 신체 크기, 체표면적, 나이, 투여할 구체적인 화합물, 성별, 투여 기간 및 투여 경로, 전반적인 건강 상태 및 그의 동시 투여되는 약제 등의 다수 인자들에 따라 결정된다는 것은, 최신 의학 분야에서 잘 알려져 있다. 전형적인 용량은, 예를 들어, 0.001-1000  $\mu\text{g}$ 의 범위일 수 있지만, 이러한 예시적인 범위보다 낮거나 또는 높은 용량도, 특히 전술한 파라미터를 고려하여 예상된다. 일일 비경구 투약 요법 (daily parenteral dosing regimen)은 총 체중의 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  내지 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 바람직하게는 0.3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  내지 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 더 바람직하게는 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  내지 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 더욱 더 바람직하게는 0.5 내지 10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{일}$  (day)일 수 있다. 치료 프로세스는 환자의 건강 상태를 주기적으로 평가함으로써 모니터링할 수 있다. 환자의 상태에 따라 수일 또는 그 이상의 기간 동안 반복 투여하는 경우, 질환의 증상에 대해 원하는 반응 또는 역제가 달성될 때까지 치료를 반복한다. 그러나, 본원에 기술되지 않은 다른 투약 용법도 적용할 수 있다. 바람직한 용량은, 실무자가 달성하고자 하는 약동학적 분해에 따라, 1회 볼루스 투여, 다회 볼루스 투여에 의해, 또는 항체의 연속 주입에 의해 투여할 수 있다.

[0220] 이러한 항체의 추정되는 특성은 의사의 결정에 따라 크게 좌우된다. 의도한 효과가 적절한 용량과 용법을 선정하는 주 인자이다. 본원에서 고려되는 인자는 치료할 특정 질환, 치료받을 특정 포유류, 특정 환자의 임상적인 상태, 장애 요인, 항체 투여 부위, 구체적인 항체 타입, 투여 경로, 투약 용법 및 의학 분야에 잘 알려진 기타 인자를 포함한다.

[0221] 본 발명의 치료학적 물질은 냉동 또는 동결건조하고, 투여하기 전 적절한 무균 담체에서 재구성할 수 있다. 냉동-건조 및 재구성은 항체 활성의 일부 감소를 유발할 수 있다. 용량은 이러한 감소를 감안하여 조정할 수 있다. 통상적으로, 약학적 조성물은 pH 6 내지 8이 바람직하다.

[0222] **제조 물품 (생산물) 및 키트**

[0223] 본 발명의 추가적인 구현에는, 병인이 TRBV9 패밀리의  $\beta$ -쇄를 가진 TCR을 수반하는, 자가면역 질환 및 관련 병태 및 악성 혈액 질환을 치료하기 위해 사용되는 생산물을 포함하는 제조 물품이다. 이러한 질환으로는, 예를 들어, AS, 셀리악 질환, T 세포 백혈병, T 세포 림프종 등이 있다.

[0224] 제조 물품은 라벨 및 패키지 인서트가 구비된 용기이며, 이는 블리스터 및/또는 패키지 안에 있을 수 있다. 적절한 용기로는, 예를 들어, 바이얼, 앰플, 주사기 등이 있다. 용기는 유리 또는 폴리머 물질과 같은 다양한 물질들로 제조될 수 있다. 용기는 특정 병태를 치료하는데 효과적인 조성물을 수용하며, 무균 접근 포트 (sterile access port)가 구비될 수 있다. 조성물내 하나 이상의 활성 성분이 본 발명에 따른 항체이다. 라벨 및 패키지 인서트는, 약물이 특정 병태를 치료하기 위해 사용되는 용도를 표시한다. 라벨 및/또는 패키지 인서트는 적응증, 투여 빈도, 투여 용량, 투여 경로, 금기사항 및/또는 이러한 치료학적 생산물에 대한 주의 사항 등의 환자에 항체 조성물을 투여하기 위한 설명을 부가적으로 포함한다. 일 구현예에서, 패키지 인서트는 조성물이 치료에 사용되는 것임을 표시한다.

[0225] 아울러, 제조 물품은, 비-제한적으로, 용매, 희석제, 필터, 바늘 및 주사기와 같이 소비자에게 필수적이거나 또는 상업적인 목적으로 필수적인 기타 제품을 포함할 수 있다.

[0226] 또한, 본 발명은 다양한 목적으로, 예를 들어 TRBV9 패밀리의 TCR을 가진 T 세포를 사멸시키는 능력을 평가하기 위해, 세포로부터 TRBV9 수용체를 정제 또는 면역침강시키기 위해 이용가능한 키트에 관한 것이다. 키트는, 단리 및 정제 목적에서는, 비드 (예, 세파로스 비드)에 커플링된 항체를 포함할 수 있다. 키트는 용기, 라벨 및 패키지 인서트를 포함한다.

[0227] **진단 용도**

[0228] 본 발명의 항체는 또한 진단 목적으로 (예, 시험관내, 생체외) 사용된다. 예를 들어, 항체는 환자로부터 수득한 샘플 (예, 조직 샘플 또는 체액 샘플, 예를 들어 염증 삼출물, 혈액, 장액, 타액 또는 뇨)에서 TRBV9 패밀리의 TCR을 포함하는 T 림프구의 수준을 검출 또는 측정하기 위해 이용할 수 있다. 적절한 검출 및 측정 방법으로는 면역분석, 예를 들어 유세포 측정, 효소-연계된 면역흡착 분석 (ELISA), 화학발광 분석, 방사성면역분석 및 면역조직학 등이 있다. 본 발명은 본원에 기술된 항체를 포함하는 키트, 예를 들어 진단 키트를 더 포함한다.

[0229] 본 발명을 더 잘 이해하기 위해, 하기 실시예들을 기술한다. 이들 실시예는 단지 예를 들기 위한 것일 뿐 어떠한 방식으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0230] 본 명세서에 인용된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 인용에 의해 본 명세서에 포함된다. 전술한 본 발명이 애매하게 해석되는 것을 방지하기 위해 예시 및 실시예를 들어 일부 상세히 기술되었지만, 본 기술 분야의 전문가라면 본 발명에 기술된 내용에 기초하여, 본 발명에 포함된 구현예들의 범위 또는 본질로부터 이탈하지 않는 한에서 일부 변경 및 수정을 행할 수 있음은 매우 자명할 것이다.

[0231] **실험 섹션**

[0232] **실시예 1. 항체 가변성 도메인 서열의 인 실리코 인간화**

[0233] 모 (기준) 서열로서 항-TRBV9-2 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변성 도메인의 서열을 이용하였으며, 이의 아미노산 서열은 서열번호 8 및 10에 나타난다.

[0234] 중쇄 및 경쇄의 가변성 도메인의 아미노산 서열을, 공개된 소스와 Biocad (Russia)에서 제공한 도너 라이브러리로부터 수득한 인간 면역글로불린의 가변성 도메인의 생식계열 서열, 랫 면역글로불린의 가변성 도메인의 생식계열 서열, 성숙한 인간 및 랫 항체의 서열로 된 풀과 비교하였다. Ylab 소프트웨어 패키지를 분석에 사용하였다 (Biocad, Russia).

[0235] 분석에서는, 검사 항체의 가변성 도메인의 서열에서 동물과 가장 유사하고 인간과 유사하지 않은 위치 및 이들의 조합을 결정하였다. 동시에, 이들 위치들에서 인간 항체에서 가장 빈번하게 관찰되는 아미노산 조합을 결정하였다. 수득한 데이터를 기반으로, 항체의 인간화 수준을 높이는 치환을 가진 가변성 도메인의 인공 서열을 설계하였다.

[0236] 또한, CHO 세포주에서 인간화 항체를 발현시키기 위해 대상 아미노산 변이체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 코돈 최적화하였다. 중쇄 및 경쇄의 가변성 도메인의 인간화된 뉴클레오티드 서열 (서열번호 15 및 17)을 테노보 합성하고, pEE-HC, pEE-CK 벡터, IgG1 포맷 (Xu et al. Front. Chem. Sci. Eng. 2015, 9(3): 376-380)에 SalI/NheI 및 SalI/BsiWI 제한효소 부위에서 각각 클로닝하였다.

[0237] 수득한 경쇄 및 중쇄의 핵산 서열을 생거 서열분석을 통해 검증하였다. 항체 MA-042를 추가로 조사하기 위해 선택하였으며, 이의 경쇄 및 중쇄의 아미노산 서열과 뉴클레오티드 서열을 서열번호 19-22에 나타낸다.

- [0238] 항체 MA-042는 서열번호 16 및 18에 나타난 아미노산 서열을 가진 중쇄 및 경쇄의 가변성 도메인을 함유한다.
- [0239] 항체 MA-042의 중쇄의 가변성 도메인의 인간화 수준은 87%이고, 경쇄 가변성 도메인의 인간화 수준은 85%이었다 (표 1). 중쇄 불변 도메인은 IgG1 포맷, Gm3 알로타입으로 표시된다.

[0240] 표 1. 모 항체 및 항체 MA-042의 가변성 도메인들 간의 인간화 수준 비교

표 1

항체	중쇄 가변성 도메인의 인간화 수준, %	경쇄 가변성 도메인의 인간화 수준, %
TRBV9-2	72	69
MA-042	87	85

[0242] 실시예 2. 재조합 항체의 제조 및 이의 친화성 결정

[0243] 실시예 1에 기술된 바와 같이 수득한, 항체 MA-042 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터를, E. coli 세포에서 증폭시키고, Qiagen (Germany) 사의 플라스미드 DNA 정제 키트를 사용해 정제하였으며, 선형 폴리에틸렌아민 (PEI "MAX", "Polysciences", USA)을 제조사의 지침에 따라 이용해 CHO-Fut8 세포주에 형질감염시켰다. 수득되는 반응 혼합물을 교반기 상에서 37°C에서 인큐베이션하였다. 형질감염한지 9일 후, 0.5/0.22 μm 필터를 통해 여과하여 세포로부터 배양액을 분리하였다. 여과 후, 배양액을 이용해, 포스페이트-완충화된 염수 (PBS, pH 7.4)로 평형화한 0.2 ml PreDictor RoboColumn MabSelect SuRe 컬럼 (GE Healthcare, USA)에서 친화성 크로마토그래피에 의해 항체를 분리하였다. 그런 후, 컬럼을 5배 부피의 PBS로 행구었다. 담체-결합된 단백질을 0.1 M 글리신 완충제 pH 3으로 용출시켰다. 단백질을 함유된 주 피크를 수집하고, 1 M Tris 완충제 (pH 7.5)를 사용해 pH를 중화하였다. 모든 단계는 유속 110 cm/h로 수행하였다. 그런 후, 단백질을 투석을 통해 PBS (pH 7.4)로 옮기고, 0.22 μm 필터로 여과한 다음 새로운 멸균 관으로 옮겼다.

[0244] 분리 품질을 12% PAGE로 변성 조건 하에 평가하였다. 정량 평가는 NanoDrop2000 마이크로분광광도계에서 280Å에서 측정하여 수행하였다. 분리한 단백질은 -70°C에서 보관하였다.

[0245] 항체 친화성을 OctetRed 96 시스템 (ForteBio, USA)에서 확인하였다. 항체를 20 μg/ml 농도로 AR2G 센서 (ForteBio) 표면에 표준 프로토콜 및 제조사의 지침에 따라 고정하였다. 분석은 30°C에서, 작동 완충제로서 0.1% Tween 20 및 0.1% BSA가 첨가된 PBS를 사용해 수행하였다. 베이스라인을 기록한 후, 센서를 항체 용액이 든 웰에 300초간 침지하였으며, 여기서 복합체가 결합되었다. 이후, 완충액에서 복합체 해리를 600초간 검출하였다.

[0246] 결합 곡선을, 참조 신호를 제한 후, Octet 데이터 분석 (Version 9.0) 소프트웨어에서 표준 절차에 따라, 그리고 1:1 글로벌 상호작용 모델을 적용해 분석하였다. 수득한 데이터 (표 2)에 따르면, 항체는 인간 항원에 특이적이고 고 친화성으로 결합하였다.

[0247] 표 2. 항체 MA-042 친화성 특징

표 2

항체	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	전체 R <sup>2</sup>
MA-042	<1.0E-12	3.19E+05	<1.0E-07	0.9758

[0249] 실시예 3. IgG1 포맷 항체를 안정적으로 생산하는 세포주 구축 및 항체 생산

[0250] 항체 MA-042의 중쇄 및 경쇄의 서열을 실시예 1에 기술된 바와 같이 준비한 다음, pSX 벡터에 HindIII, XbaI 제한효소 부위에서 클로닝하였다. 제조한 플라스미드는 E. coli 세포에서 배양하고, BenchPro (Life Technology, CLLA)를 제조사의 지침에 따라 사용해 600-700 μg으로 분리하였다. 플라스미드를 밤새 PvuI 엔도뉴클레아제 처리하여 선형화하고, 에탄올을 첨가해 석출한 다음, 석출물을 물에 용해하였으며, 최종 부피에서의 농도는 900-1100 ng/μl이었다.

[0251] CHO-K1-S 세포주를 Ham's F12 Gibco 배지 (Thermo, USA)에서 배양하였다. MA-042 쇄들의 코딩 서열을 포함하는 유전자 구조체를 Nucleofector™ (Lonza, Switzerland)을 사용해 제조사의 프로토콜에 따라 형질감염시켰다.

- [0252] 형질감염 후 다음날, 형질감염된 세포는 배지에 푸로마이신 (최종 농도 7.2  $\mu\text{g/ml}$ ) 및 히그로마이신 B (최종 농도 640  $\mu\text{g/ml}$ )를 첨가하여 24일간 항생제 선별을 수행하였다. 그런 후, MA-042를 높은 수준으로 발현하는 구조에서 동질적인 항생제-내성 세포 클론을 선별하였다.
- [0253] MA-042를 발현하는 CHO-K1-S를 배양하기 위해, 25-100  $\mu\text{M}$  2-데옥시-2-플루오로-L-푸코스 (CarboSynth, UK)가 첨가된 무혈청 배지 Ham's F12 Gibco (Thermo, USA)를 사용하였다. 전입상 실험용 단일클론 항체 MA-042를 50 L HyClone 1회용 생물반응기 발효조 (Thermo Fisher Scientific)에서 생산하였다. 생산자 세포를 배양물로부터 Millistak COHC 심층 필터 (Merck-Millipore, USA)를 사용해 제거하였다. 단백질 A 친화성 흡착제에서 청정처리된 배양물로부터 항체를 1차 정제하였다. 표적 단백질을 산성 조건 하에 글리신 완충제 pH 3.3-3.8을 사용해 특이적으로 용출시켰다. 수집한 용출물은 바이러스 불활화를 위해 산성 pH에 30-60분간 노출시킨 다음 1M Tris-HCl 용액을 사용해 pH 6.5-7.0으로 중화하였다. 가능한 불순물 (DNA, 생산자 세포, 단백질, 방출된 친화성 흡착제 리간드, 응집물 및 항체 단편)을 제거하기 위한 최종 크로마토그래피 정제를 CaptoAdhere sorbent (GE HealthCare LifeSciences)에서 플로우-스루 방식으로 수행하였다. 이에, 저 전도성 ( $< 3\text{msec/cm}^2$ ) 하에 Tris 완충제로 pH 6.5-7.0으로 평형화한 준비된 흡착제를 통해 단백질 용액을 통과시켰다. 이후, 정제된 단백질을 Viresolve PRO 필터 키트 (Millipore, USA)를 사용해 바이러스-제거 여과한 다음, 농축하고, 아세테이트 완충제 (pH 5.0-5.5) 및 트레할로스가 함유된 최종 완충제에서 정용여과를 수행하였다.
- [0254] **실시예 4. TRBV9 패밀리의 TCR에 특이적으로 결합하기 위한 항체의 사용.**
- [0255] 실시예 3에 기술된 바와 같이 수득한 단일클론 항체 MA-042를 이용해 림프구 아집단을 분류하였다. 항체는 플루오레세인 이소티오시아네이트 시약 (Sigma, USA)을 제조사의 프로토콜에 따라 사용해 플루오레세인으로 표지하였다. 항체 분자와 반응하는 형광단의 개수를 파장 495/280 nm에서 흡광 스펙트럼 비율에 의해 조절하였다.
- [0256] 건강한 공여자의 말초혈에서 T 림프구를 입수하였다. 혈액은 EDTA Vacuette 관 (각각 2x9 ml)에서 채혈하고, (Kovalchuk L. V. et al. Immunology: Workshop - 2010. - 176 p.)에 기술된 표준 공정에 따라 단핵 분획을 단리하였다. 세포는 단리한 후 0.5% 소 혈청 알부민 (BSA) 및 2 mM EDTA에 첨가된 포스페이트 완충화된 염수 (PBS)로 옮겼다. 총 세포수 및 이의 생존성을 Lang N.R. (Stimulation of lymphocytes M.: Medicine, 1976.-288 p.)에 기술된 바와 같이 트리판 블루 염색 방법에 의해 측정하였다. 0.1% 트리판 블루 용액을 동일 부피로 세포 현탁물에 첨가한 다음, 염색된 (사멸) 및 염색되지 않은 세포를 Goryaev 챔버에서 계수하였다. 이들 데이터를 기반으로, 검사 샘플내 사멸 세포 %를 결정하였다.
- [0257] TRBV9 패밀리에 속하는 막 TCR을 가진 T-림프구의 표적 집단에 대한 MA-042의 결합 선택성을 검증하기 위해, 단핵 분획 중 일부 세포 500,000개를 0.5% 소 혈청 알부민 (BSA), 2 mM EDTA pH8, FITC로 표지된 항체 MA-042, CD3-eFluor405 (T 림프구 마커) (eBioscience, USA) 및 CD45-PC5 (eBioscience, USA) (전체 백혈구 마커)를 포함하는 PBS 완충제에 100 ng/ml 농도로 첨가하였다. 반응 혼합물 50  $\mu\text{l}$ 를 실온에서 30분간 인큐베이션하였으며, 이후 세포를 0.5% BSA, 2mM EDTA가 첨가된 PBS 완충제로 행구었다. 염색 공정 후, 세포는 유세포 측정 (FACSARIA III, USA, 도 1)을 이용한 분류에 이용하였다. 염색시 이들 마커의 사용으로, 표면 TRBV9+, CD3+, CD45+를 가진 표적-집단 세포뿐 아니라 음성-집단 세포, 즉 면역표현형 "TRBV9-, CD3+, CD45+"에 해당하는 세포를 단리하는 것이 가능하였다. 2번의 레플리케이션으로부터 수득한 TRBV9+ 및 TRBV9- 집단 세포를 이용해, 전체 RNA 분리 및 TCR  $\beta$ -쇄 서열분석을 수행하였다. 수득한 세포 분획을 RLT 완충제 (Quagen, Germany)에 넣고, Quiagen RNeasy mini kit #217004 시약 키트 (Quagen)를 제조사의 프로토콜에 따라 사용해 이로부터 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA 주형에 대해 cDNA를 합성하고, T 수용체  $\beta$ -쇄의 단편을 Britanova et al (J Immunol, 2016, 196(12) 5005-5013)에 기술된 프로토콜에 따라 Mint cDNA 합성 키트 (Eurogen, Russia)를 사용해 증폭시켰다. 생성된 증폭산물에 Illumina 어댑터 (USA)를 라이게이션하고, MiSeq Illumina 플랫폼에서 서열분석기 제조사의 프로토콜에 따라 서열을 분석하였다. 서열분석 데이터는 인터넷 <https://milaboratory.com>에서 이용가능한 MiGEC, MiXCR 및 VDJtools 소프트웨어를 이용해 분석하였다. 수득한 TCR  $\beta$ -쇄 레퍼토리를 분석한 결과, 항체 MA-042를 이용한 분류를 통해 수득한 라이브러리는 TRBV9 유전자 세그먼트에 의해 코딩된 서열을 93%까지 농축한 반면, "TRBV9-" 음성 분획  $\beta$ -쇄의 레퍼토리에서는 TRBV9를 포함하는 서열이 검출되지 않았다.
- [0258] **실시예 5. 항체 MA-042의 시험관내 기능 활성**
- [0259] 단일클론 항체 MA-042를 실시예 3에 기술된 바와 같이 수득하였다. 인간 혈액의 단핵 분획을 실시예 4에 기술된 바와 같이 수득하였다. MA-042의 세포독성 활성을 사이토플루오로메트리 방법으로 측정하였다. 단핵 분획의 세포 분율을 이용해 세포 총 수를 계산하였으며, 생존성은 트리판 블루 염색 능력을 통해 측정하였다. 세포독성

효과를 평가하기 위해, 세포 3-4 x 10<sup>6</sup> 개를 PBS 완충제에서 1시간 동안 20 ng/ml, 40 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 500 ng/ml 및 1 µg/ml 농도의 항체 MA-042와 인큐베이션하였으며, "제로 대조군"의 경우에는 세포를 항체 첨가없이 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 세포를 PBS로 2회 행군 다음 10% 인간 혈청을 포함하는 RPMI 배지로 옮겨 CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 72시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 세포를 원심분리하고, 항체 CD4-PE, CD3-eFluor405 (eBioscience, USA) 및 MA-042-FITC로 염색하였다. 세포의 염색된 샘플은 FACS Aria III 세포 분류기 (BD, USA)에서 세포측정 분석에 사용하였다. 세포독성 효과는 CD3+ 림프구 집단에서 TRBV9-양성 세포의 비율을 계속적으로 감소시키면서 평가하였으며, 표적 세포수 감소는 표적 집단이 완전히 없어질 때까지 항체 MA-042 농도 증가와 상관관계를 나타내었다. MA-042 염색 후 표적 집단의 완전한 제거는 항체 농도 500 ng/ml에서 검출되었다. "제로 대조군"의 경우, TRBV9 T 림프구의 %는 변동없이 유지되었다. 도 2는 유세포 측정의 전형적인 결과를 도시한다. EC50 값이 수득되었으며 (50% 최고 유효 농도는 지정된 기간 경과 후 소정의 항체의 최대 효과를 절반 수준으로 유도하는 항체의 농도임), 항체 MA-042의 경우 100 ng/ml에 달하였다 (도 3).

[0260] 실시예 6. 항체 MA-042의 시험관내 기능 활성

[0261] 단일클론 항체 MA-042를 실시예 3에 기술된 바와 같이 수득하였다. 비활성 및 기본적인 약동학 파라미터들을 분석하기 위해 붉은 털 원숭이 (마카카 몰라타 (*Macaca mulatta*))에 MA-042를 1회 정맥내 투여하였다. 실험은 Federal State Budget Scientific Institution "Scientific Research Institute of Medical Primatology"로부터 제공받은, 체중이 4-10 kg인 성적으로 성숙한 수컷 붉은 털 원숭이를 이용해 수행하였다. 동물은 이송 후 30 일간 격리하였다.

[0262] 실험 동물 및 대조군 동물의 코호트를 구성하기 위해, 말초혈에서 TRBV9+ 림프구의 분획 함량을 예비 추정하였다. 동물의 정맥혈을 EDTA 진공관 (Vacurette, Greiner Bio-One, Austria)에서 4 ml/관으로 채혈하였다. 그런 후, 피콜 구배에 의해 단핵 세포 분획 (1.077 g/cm<sup>3</sup> PanEco, Russia)을 분리하였다. 면역표현형을 확인하기 위해, 세포 100,000개를 사용하였으며, 시판 항-CD8 PE/Cy5 (clone RPA-T8) 항체 (BioLegend, USA), 항-CD4-Alexa Fluor 488 (clone S3.5) 항체 (Thermo Fisher, USA) 및 항-CD2-PerCP Cy 5.5 (clone RPA-2.10) 항체 (BioLegend, USA), 항-TcRVβ1 (TRBV9)-PE 항체 (Beckman Coulter, USA) 1 µl를 첨가하여, 실온에서 20분간 인큐베이션한 다음 동일 부피의 헵크 용액으로 2회 행구었다. FACS Aria III 세포 분류기 (USA)를 사용해 샘플을 분석하였다.

[0263] 실험 기간 동안, 선택 동물을 사료 통, 라벨 홀더가 장착된 개별 금속 케이지에서 케이지 당 동물 1마리씩 사육하였다. 식단은 평균 급식 기준에 따라 올인원 사료 (all-in-one feed), 과일, 채소로 구성하였다. 동물은 중앙 급수관으로부터 물을 제공받았다.

[0264] 주요 림프구 표면 결정기 (CD4, CD8, CD2)에 대한 항체를 이용한 세포측정 분석 결과에 기반하여, 동물을 대조군을 포함하여 군 당 4마리씩 3개의 군으로 나누었다. 대조군 동물에는 인간 면역글로불린 ("Immunovenin", Microgen, Russia)을 정맥내 투여하였다.

[0265] 제품 용량에 대한 함수로서, 붉은 털 원숭이 (마카카 몰라타)의 말초혈에서 TRBV9+ T 세포의 퍼센트 (%)를 비교 실험하기 위해, MA-042를 동물 당 각각 1 및 10 mg의 용량으로 2개의 실험군에 투여하였다. "이뮤노베닌 (Immunovenin)"을 지침에 따라 멸균수에 희석하여, 동물 당 10 mg의 농도로 투여하였다. MA-042 생산물을 칼슘 및 마그네슘 첨가없이 둘베코의 포스페이트-완충화된 염수 (DPBS)로 희석하였다. 생산물을 우측 앞다리의 척골 정맥에 주사 당 5 ml을 넘지 않는 부피로 투여하였다.

[0266] 관찰 기간은 42일간 지속하였다. 혈액 샘플을 표 3에 나타낸 바와 같이 선택하였다. 면역표현형 평가 및 샘플 분석을 전술한 바와 같이 수행하였다.

[0267] 표 3. T 세포 중 TRBV9+ 퍼센트 (%)를 결정하기 위한 전혈 샘플 채혈 계획.

표 3

주	일	시간	유의
1	1	0	백그라운드 (1차 투여 전)
1	4	72	투여 후 72시간
1	7	144	투여 후 144시간
3	15	336	투여 후 336시간
4	25	576	투여 후 576시간
6	42	984	투여 후 984시간

[0269] 그 결과, MA-042를 투여한 후 72시간 경과시, 동물은 2가지 용량에서 말초혈내 TRBV9+가 거의 완전히 제거된 것으로 관찰되었다. 생산물을 동물 당 1 mg 농도로 투여한 후 336시간 경과시 TRBV9+ 림프구가 일부 검출되었다. 생산물이 10 mg 용량으로 투여된 동물에서는 TRBV9+ 림프구가 검출되지 않았다. 투여 후 42일째에, 실험군들에 서 TRBV9+ 림프구는 검출되지 않았으며; 대조군에서는 TRBV9+ 림프구의 수준이 실험 전에서와 동일하였다.

[0270] **실시예 8. 본 발명의 항체를 포함하는 약학적 조성물의 제조**

[0271] 약학적 조성물을 당해 기술 분야에 공지된 표준 방법에 의해 수득하였다.

[0272] 약학적 조성물의 구성성분을 표 4에 나타낸다.

[0273] **표 4. 약학적 조성물의 구성성분들의 농도**

**표 4**

구성성분	농도
항체 MA-042	10-50 mg/ml
10 mM 사이트레이트 완충제	pH 6.0-7.0이 되도록 첨가
소듐 클로라이드	50-150 mM
슈크로스, 트레할로스	0.3-0.5%
주사용수	최종 1 ml이 되게 첨가

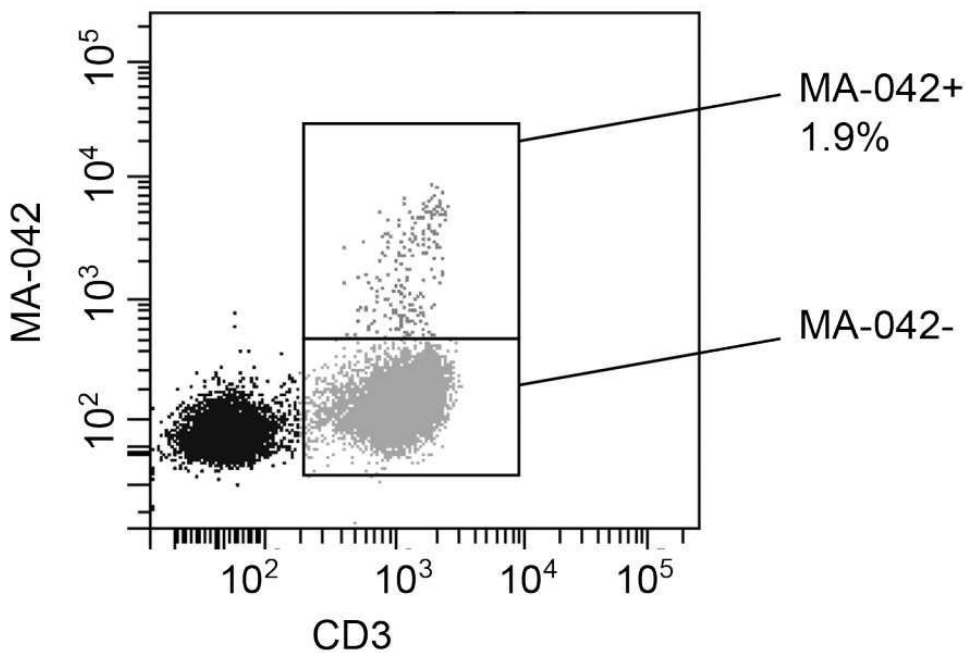
[0275] **실시예 9. 항체가 첨가된 약학적 조성물을 포함하는 키트**

[0276] 항체 MA-042 조성물을 포함하는 투약 형태가 함유된 키트를 제조하기 위해, 실시예 5에 따라 준비한 약학적 조성물을 무균 조건 하에 1 ml 앰플 또는 시린지에 넣어 밀봉하고, 라벨을 붙인 다음 플라스틱 또는 판지 용기에 넣어 포장하였다.

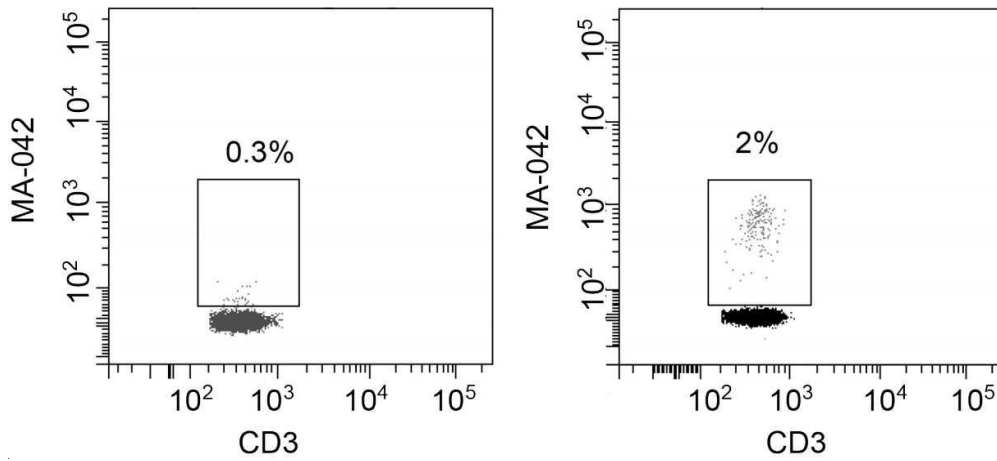
[0277] 또한, 인서트를 앰플 용기 안에 넣었다.

**도면**

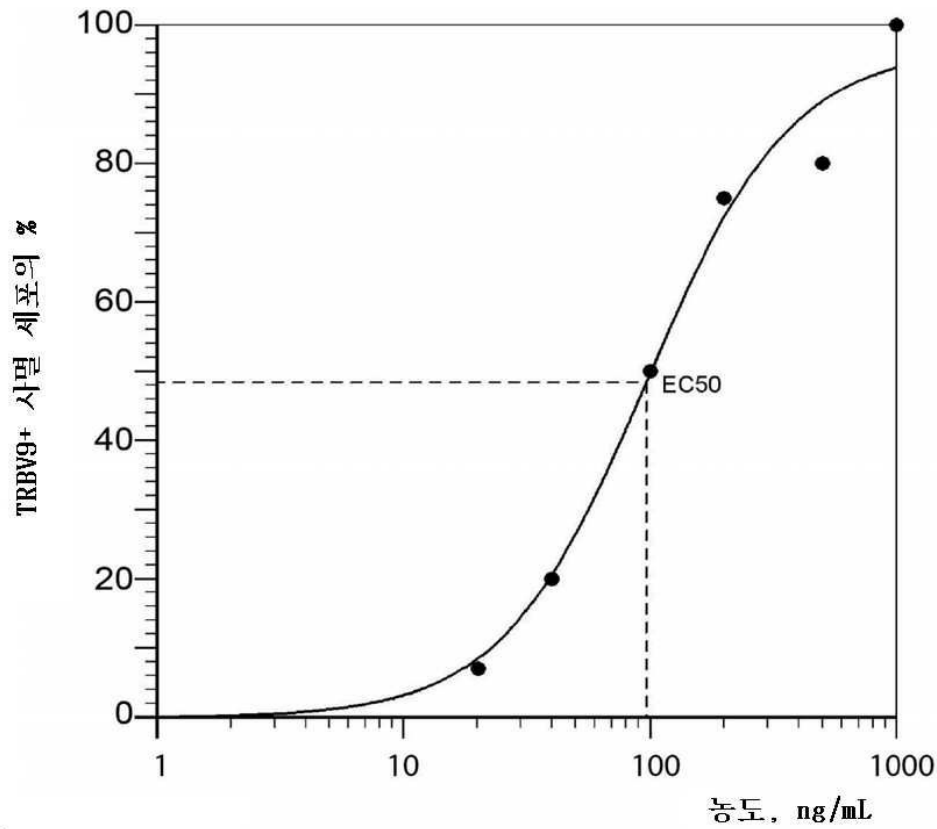
**도면1**



도면2



도면3



서열 목록

- <110> JSC "BIOCAD"
- <120> MONOCLONAL ANTIBODIES THAT BIND SPECIFICALLY TO HUMAN TRBV9
- <130> MA042.docx
- <150> RU 2018146029
- <151> 2019-12-24
- <160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> The HCDR1 sequence of the parental antibody TRBV9-2

<400> 1

Asp Tyr Leu Val His

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> The HCDR2 sequence of the parental antibody TRBV9-2

<400> 2

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Thr Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Glu

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> The HCDR3 sequence of the parental antibody TRBV9-2

<400> 3

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

1 5 10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> The LCDR1 sequence of the parental antibody TRBV9-2

<400> 4

Lys Ala Ser Lys Ser Ile Asn Lys Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> The LCDR2 sequence of the parental antibody TRBV9-2

<400> 5

Asp Gly Ser Thr Leu Gln Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> The LCDR3 sequence of the parental antibody TRBV9-2

<400> 6

Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Pro Thr

1 5

<210> 7

<211> 366

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> The nucleotide sequence of the variable domain of the heavy chain  
of the parental antibody TRBV9-2

<400> 7

caaatacaac tggatgcagag cgggccagaa ttgagagaac ccggagaatc tgtgaagctg 60

agttgtaagg ccagcggata cactttcact gactatctcg tgcactgggt gaacaggct 120

cccggtaagg gattgaaatg gatgggatgg atcaatactt ataccggcac acctacatat 180

gcagacgatt tcgaggggcg atttgtgttc agtttgagg cctctgccag cacggcgaac 240

ctgcagatat cgaatctcaa gaatgaggac accgccactg atttctgcgc tagatcttgg 300

agacgcggat tgagaggtat cggattcgac tactggggac aaggcgtctt cgtgactgta 360

tcatcc 366

<210> 8

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> The amino acid sequence of the variable domain of the heavy chain  
of the parental antibody TRBV9-2

<400> 8

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Arg Glu Pro Gly Glu

1	5	10	15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr			
	20	25	30
Leu Val His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met			
	35	40	45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Thr Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe			
	50	55	60
Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Glu Ala Ser Ala Ser Thr Ala Asn			
	65	70	75
			80
Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys			
	85	90	95
Ala Arg Ser Trp Arg Arg Gly Leu Arg Gly Ile Gly Phe Asp Tyr Trp			
	100	105	110
Gly Gln Gly Val Phe Val Thr Val Ser Ser			
	115	120	

<210> 9

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> The nucleotide sequence of the light chain variable domain of the  
parental antibody TRBV9-2

<400> 9

gatgtacaga tgacacaatc accctacaac cttgctgctt ccctgggga aagtgtcagt	60
atcaattgca aggcacgaa gtcgatcaac aagtatcttg cgtggtatca gcagaagcca	120
ggaaagccca acaagctcct gatctatgac ggctctacac tgcaatctgg cataccttcg	180

cggttttctg gctcggggtc cgggactgac ttactctta caatagagg acttgaaccc 240  
 gaagacttcg gcctgtatta ctgccagcag cacaatgagt atccacctac cttcggggct 300  
 ggccaagaat tggagcttaa g 321

<210> 10  
 <211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> The amino acid sequence of the light chain variable domain of the  
 parent antibody TRBV9-2

<400> 10

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

1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Asn Cys Lys Ala Ser Lys Ser Ile Asn Lys Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Asp Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105

<210> 11

<211> 639

<212> DNA

<

213> Artificial Sequence

<220><223> The nucleotide sequence of the light chain of the parental  
 antibody TRBV9-2

<400> 11

gacgtgcaga tgaccagtc ccctacaac ctggccgct cccccggcga gtccgtgtcc 60

atcaactgca aggcctccaa gtccatcaac aagtacctgg cctggtacca gcagaagccc 120  
 ggcaagccca acaagctgct gatctacgac ggctccaccc tgcagtccgg catcccctcc 180  
 aggttctccg gctccggctc cggcaccgac ttcacctga ccatcagggg cctggagccc 240  
 gaggacttcg gcctgtacta ctgccagcag cacaacgagt accccccac cttcggcgcc 300

ggcaccaagc tggagctgaa gcgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360  
 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgtcgtgt gcctgctgaa taacttctat 420  
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgcc tccaatcggg taactcccag 480  
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540  
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtac ccatcagggc 600  
 ctgtcctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagag 639

<210> 12  
 <211> 213  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> The amino acid sequence of the light chain of the parental antibody TRBV9-2

<400> 12

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

1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Asn Cys Lys Ala Ser Lys Ser Ile Asn Lys Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Asp Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Pro

85 90 95

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

100 105 110

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

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

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205  
 Phe Asn Arg Gly Glu  
 210

<210> 13  
 <211> 1365  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> The nucleotide sequence of the heavy chain of the parental  
 antibody TRBV9-2  
 <400> 13

cagatccagc tggatgcagtc cggccccgag ctgagggagc cggcgcagtc cgtgaagctg 60  
 tcttgcaagg cctccggcta caccttcacc gactacctgg tgcactgggt gaagcaggcc 120  
  
 cccggcaagg gcctgaagtg gatgggctgg atcaacacct acaccggcac ccccacctac 180  
 gccgacgact tegagggcag gttcgtgttc tcctggagg cctcgcctc caccgccaac 240  
 ctgcagatct ccaacctgaa gaacaggac accgccacct acttctgcgc caggtcctgg 300  
 aggaggggcc tgaggggat cggcttcgac tactggggcc agggcgtgtt cgtgaccgtg 360  
 tctcgcct ccaccaagg cccatcggtc tccccctgg caccctctc caagagcacc 420  
 tctggggca cagcggcct gggctgcctg gtcaaggact actccccga accggtgacg 480  
 gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttccggc tgtcctacag 540  
  
 tctcaggac tctactcct cagcagcgtg gtgactgtgc cctctagcag cttgggcacc 600

cagacctaca tctgcaactg gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagt 660  
gagccccga aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc 720  
ctggggggac cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaacca aggacaccct catgatctcc 780  
cggaccctg aggtcacatg cgtgggtgtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggicaag 840  
ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 900  
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtctcaccg tctgcacca ggactggctg 960

aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 1020  
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc 1080  
cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaagg cttctatccc 1140  
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1200  
cctccctgtc tggactccga cggctcttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1260  
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgetccgtga tgcatgaggc tctgcacaac 1320  
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct cgggtaaat gataa 1365

<210> 14

<211> 453

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> The amino acid sequence of heavy chain of the parental antibody  
TRBV9-2

<400> 14

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Arg Glu Pro Gly Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Thr Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys

85 90 95

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

Gly Gln Gly Val Phe 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 Pro Lys  
 210 215 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 15

<211> 366

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> The nucleotide sequence of the variable heavy chain of the antibody MA-042

<400> 15

caggtgcaac ttgttcagtc ggggagcga cctaagaagc caggggaaag tgtaaaagtg 60  
 agctgcaaag ctcaggcta cagtttacc gattatcttg tgcattgggt tagacaggct 120  
 ccaggccaag gactggaatg gatgggatgg atcaatacct atacaggac accacatat 180  
 gccgatgact ttgagggacg gtttgccttc tctttgata ccagtgttcc cactgctaac 240  
 ctccagataa gcagcctgaa ggcagaggac accgccgttt atttctgcgc ccgatcatgg 300  
 aggagaggct tgcgaggaat tggattcgat tactggggtc agggcacttt agtcactgtc 360  
 tctagc 366

<210> 16

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> The amino acid sequence of the variable domain of the heavy chain of the parental antibody MA-042

<400> 16

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Thr Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

50 55 60

Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Asn

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 17

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> The nucleotide sequence of the variable light chain of the antibody MA-042

<400> 17

gacatacaga tgactcaaag cccttattcg ctcagtgcgt cggtcgggga cagagtaacc 60

atcacctgca aggcgtcaaa gtcaatcaat aagtatctgg cgtggttcca gcagaagcca 120

ggaaagccta acaagctatt aatatcagat gggtctacc tccaatccgg ggtcccttca 180

cgattttctg gaagcggctc aggaaccgat ttcacgetga ccatcagtag cttggagcct 240

gaggactttg ccacttatta ttgccagcag cacaacgagt atcctcccac cttcggacag 300

ggtacaaaac tggagatcaa g

321

<210> 18

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> The amino acid sequence of variable light chain of the antibody  
MA-042

<400> 18

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Lys Ser Ile Asn Lys Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Asn Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 19

<211> 1356

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> The nucleotide sequence of the heavy chain of the antibody MA-042

<400> 19

caggtgcaac ttgttcagtc ggggagcgaa cctaagaagc caggggaaag tgtaaaagtg 60

agctgcaaag cctcaggcta cagtttacc gattatcttg tgcattgggt tagacaggct 120

ccaggccaag gactggaatg gatgggatgg atcaatacct atacagggac acccacatat 180

gccgatgact ttgagggacg gtttcttc tcaactgata ccagtgttc cactgctaac 240

ctccagataa gcagcctgaa ggcagaggac accgccgttt atttctgcmc ccatcatgg 300  
 aggagaggcc tacgaggaat cggattcgat tactggggtc agggcacttt agtcactgtc 360  
 tctagcgcta gcaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctctc caagagcacc 420  
 tctgggggca cagcggcctt gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accgggtgacg 480  
 gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ctttccccgc tgtcctacag 540  
 tctcaggac tctactcct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag ctgggcacc 600  
 cagacctaca tctgcaactg gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt 660

gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg 720  
 gggggaccgt cagtcttctt ctcccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccgg 780  
 acccctgagg tcacatgctt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 840  
 aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 900  
 tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 960  
 ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc 1020  
 atctccaag ccaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 1080

gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1140  
 gacatgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactaca gaccacgctt 1200  
 cccgtgctgg actccgacgg ctctctcttc ctctatagca agtcaccgt ggacaagagc 1260  
 aggtggcagc aggggaactt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1320  
 tacacgcaga aaagcctctc cctgtccccg ggtaaa 1356

<210> 20

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> The amino acid sequence of the heavy chain of the antibody MA-042

<400> 20

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Thr Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe



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 Glu Glu Met 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 Lys  
 450

<210> 21

<211> 642

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> The nucleotide sequence of the light chain of the antibody MA-042

<400> 21

gacatacaga tgactcaaag cccttattcg ctcaagtgcgt cggtcgggga cagagtaacc            60  
 atcacctgca aggcgtcaaa gtcaatcaat aagtatctgg cgtggttcca gcagaagcca            120  
 ggaaagccta acaagctatt aatatagat gggctctacc tccaatccgg ggtcccttca            180  
  
 cgattttctg gaagcggctc aggaaccgat ttcacgctga ccatcagtag cttggagcct            240  
 gaggactttg ccaattatta ttgccagcag cacaacgagt atcctcccac cttcggacag            300  
 ggtacaaaac tggagatcaa gcgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca            360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420  
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480  
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540  
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

<210> 22

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> The amino acid sequence of a light chain of the antibody MA-042

<400> 22

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Lys Ser Ile Asn Lys Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Asn Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Pro

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

