



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년10월23일

(11) 등록번호 10-2721595

(24) 등록일자 2024년10월21일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/18 (2013.01)
A61K 39/00 (2023.05)
- (21) 출원번호 10-2017-7029950
- (22) 출원일자(국제) 2016년04월01일
 심사청구일자 2021년03월31일
- (85) 번역문제출일자 2017년10월18일
- (65) 공개번호 10-2017-0132793
- (43) 공개일자 2017년12월04일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2016/025755
- (87) 국제공개번호 WO 2016/161390
 국제공개일자 2016년10월06일
- (30) 우선권주장
 62/244,653 2015년10월21일 미국(US)
 (뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌
 CN104087592 A*
 W02014093855 A1*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
 유레카 세라퓨틱스, 인코포레이티드
 미국 94608 캘리포니아주 에머리빌 스위트 170 호
 턴 스트리트 5858
- (72) 발명자
 리우, 청
 미국 94608 캘리포니아주 에머리빌 #디334 코모도
 어 드라이브 4
 리우, 홍
 미국 94803 캘리포니아주 엘 소브란테 우드뷰 드
 라이브 5573
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 양영준, 이상남

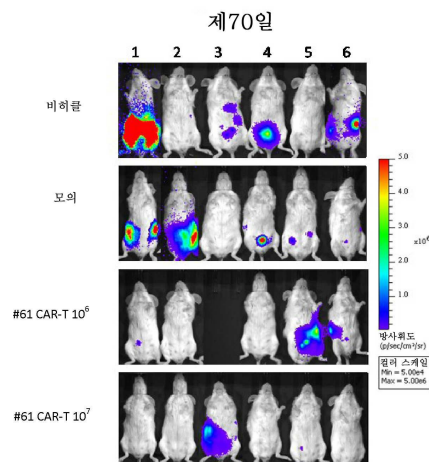
전체 청구항 수 : 총 18 항

심사관 : 이미경

(54) 발명의 명칭 AFP 펩티드/MHC 복합체를 표적화하는 구축물 및 그의 용도

(57) 요약

본 출원은 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 모이어티를 포함하는 구축물을 제공한다. 또한, 이들 구축물을 제조 및 사용하는 방법이 제공된다.

대표도 - 도16b

(52) CPC특허분류

C07K 16/2809 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/21 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/33 (2013.01)
C07K 2317/34 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)

(72) 발명자

수, 이양

미국 94588 캘리포니아주 플레젠튼 체스트넛 웨이
 7652

시양, 정이

미국 94597 캘리포니아주 월넛 크릭 샌 루이스 로
 드 2170

룡, 리

미국 캘리포니아주 라파예트 그린힐스 드라이브
 3209

(30) 우선권주장

62/304,915 2016년03월07일 미국(US)
 62/142,958 2015년04월03일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

알파-태아단백질 (AFP) 펩티드 및 주요 조직적합성 (MHC) 부류 I 단백질을 포함하는 복합체 (AFP/MHC 부류 I 복합체, 또는 AMC)에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 단리된 항-AMC 구축물이며, 여기서 AFP 펩티드는 서열식별번호: 4의 아미노산 서열로 이루어지고, 항-AMC 항체 모이어티는 하기를 포함하는 것인 단리된 항-AMC 구축물:

(1) 서열식별번호: 62의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 상보성 결정 영역 (HC-CDR) 1, 서열식별번호: 72의 아미노산 서열로 이루어진 HC-CDR2, 및 서열식별번호: 82의 아미노산 서열로 이루어진 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인 (V_H), 및 서열식별번호: 95의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 상보성 결정 영역 (LC-CDR) 1, 서열식별번호: 105의 아미노산 서열로 이루어진 LC-CDR2, 및 서열식별번호: 115의 아미노산 서열로 이루어진 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인 (V_L); 또는

(2) 서열식별번호: 63의 아미노산 서열로 이루어진 HC-CDR1, 서열식별번호: 73의 아미노산 서열로 이루어진 HC-CDR2, 및 서열식별번호: 83의 아미노산 서열로 이루어진 HC-CDR3을 포함하는 V_H , 및 서열식별번호: 96의 아미노산 서열로 이루어진 LC-CDR1, 서열식별번호: 106의 아미노산 서열로 이루어진 LC-CDR2, 및 서열식별번호: 116의 아미노산 서열로 이루어진 LC-CDR3을 포함하는 V_L ; 또는

(3) 서열식별번호: 64의 아미노산 서열로 이루어진 HC-CDR1, 서열식별번호: 74의 아미노산 서열로 이루어진 HC-CDR2, 및 서열식별번호: 84의 아미노산 서열로 이루어진 HC-CDR3을 포함하는 V_H , 및 서열식별번호: 97의 아미노산 서열로 이루어진 LC-CDR1, 서열식별번호: 107의 아미노산 서열로 이루어진 LC-CDR2, 및 서열식별번호: 117의 아미노산 서열로 이루어진 LC-CDR3을 포함하는 V_L ; 또는

(4) 서열식별번호: 65의 아미노산 서열로 이루어진 HC-CDR1, 서열식별번호: 75의 아미노산 서열로 이루어진 HC-CDR2, 및 서열식별번호: 85의 아미노산 서열로 이루어진 HC-CDR3을 포함하는 V_H , 및 서열식별번호: 98의 아미노산 서열로 이루어진 LC-CDR1, 서열식별번호: 108의 아미노산 서열로 이루어진 LC-CDR2, 및 서열식별번호: 118의 아미노산 서열로 이루어진 LC-CDR3을 포함하는 V_L ; 또는

(5) 서열식별번호: 66의 아미노산 서열로 이루어진 HC-CDR1, 서열식별번호: 76의 아미노산 서열로 이루어진 HC-CDR2, 및 서열식별번호: 86의 아미노산 서열로 이루어진 HC-CDR3을 포함하는 V_H , 및 서열식별번호: 99의 아미노산 서열로 이루어진 LC-CDR1, 서열식별번호: 109의 아미노산 서열로 이루어진 LC-CDR2, 및 서열식별번호: 119의 아미노산 서열로 이루어진 LC-CDR3을 포함하는 V_L .

청구항 2

제1항에 있어서, 항-AMC 항체 모이어티가 하기를 포함하는 것인 단리된 항-AMC 구축물:

(1) 서열식별번호: 22의 아미노산 서열을 포함하는 V_H , 또는 서열식별번호: 22와 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 32의 아미노산 서열을 포함하는 V_L , 또는 서열식별번호: 32와 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 그의 변이체; 또는

(2) 서열식별번호: 23의 아미노산 서열을 포함하는 V_H , 또는 서열식별번호: 23과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 V_L , 또는 서열식별번호: 33과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 그의 변이체; 또는

(3) 서열식별번호: 24의 아미노산 서열을 포함하는 V_H , 또는 서열식별번호: 24와 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 34의 아미노산 서열을 포함하는 V_L , 또는 서열식별번호: 34와 적어도 95%

서열 동일성을 갖는 그의 변이체; 또는

(4) 서열식별번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 V_H , 또는 서열식별번호: 25와 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 35의 아미노산 서열을 포함하는 V_L , 또는 서열식별번호: 35와 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 그의 변이체; 또는

(5) 서열식별번호: 26의 아미노산 서열을 포함하는 V_H , 또는 서열식별번호: 26과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 36의 아미노산 서열을 포함하는 V_L , 또는 서열식별번호: 36과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 그의 변이체.

청구항 3

제1항에 있어서, 항-AMC 항체 모이어티가 하기를 포함하는 것인 단리된 항-AMC 구축물:

i) 서열식별번호: 63의 아미노산 서열로 이루어진 HC-CDR1, 서열식별번호: 73의 아미노산 서열로 이루어진 HC-CDR2, 및 서열식별번호: 83의 아미노산 서열로 이루어진 HC-CDR3을 포함하는 V_H , 및 서열식별번호: 96의 아미노산 서열로 이루어진 LC-CDR1, 서열식별번호: 106의 아미노산 서열로 이루어진 LC-CDR2, 및 서열식별번호: 116의 아미노산 서열로 이루어진 LC-CDR3을 포함하는 V_L ; 및/또는

ii) 서열식별번호: 23의 아미노산 서열을 포함하는 V_H , 또는 서열식별번호: 23과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 V_L , 또는 서열식별번호: 33과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 그의 변이체.

청구항 4

제1항에 있어서, MHC 부류 I 단백질이 HLA-A*02:01 하위유형의 HLA-A02인 단리된 항-AMC 구축물.

청구항 5

제1항에 있어서, 단리된 항-AMC 구축물이 AMC에 0.1 pM 내지 500 nM의 K_d 로 결합하는 것인 단리된 항-AMC 구축물.

청구항 6

제1항에 있어서,

i) 항-AMC 항체 모이어티가 전장 항체, Fab, Fab', (Fab')₂, Fv, 또는 단일쇄 Fv (scFv)이거나;

ii) 단리된 항-AMC 구축물이 탠덤 scFv, 디아바디 (Db), 단일쇄 디아바디 (scDb), 이중-친화도 재표적화 (DART) 항체, 이중 가변 도메인 (DVD) 항체, 노브-인투-홀 (KiH) 항체, 독 앤 록 (DNL) 항체, 화학적으로 가교된 항체, 이중다량체 항체, 또는 이중접합체 항체인

단리된 항-AMC 구축물.

청구항 7

제1항에 있어서, 단리된 항-AMC 구축물이 제2 항원에 특이적으로 결합하는 제2 항체 모이어티를 추가로 포함하는 것인 단리된 항-AMC 구축물.

청구항 8

제1항에 있어서, 단리된 항-AMC 구축물이 항-AMC 항체 모이어티 및 하기:

i) 이펙터 분자, 여기서 이펙터 분자는 약물, 독소, 방사성동위원소, 단백질, 펩티드, 및 핵산으로 이루어진 군으로부터 선택된 치료제임; 또는

ii) 표지

를 포함하는 면역접합체인, 단리된 항-AMC 구축물.

청구항 9

제1항에 있어서, 항-AMC 구축물이 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 세포외 도메인, 막횡단 도메인, 및 T 세포를 활성화시킬 수 있는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)인 단리된 항-AMC 구축물.

청구항 10

제1항에 있어서, 항-AMC 구축물이 AMC에 특이적인 scFv 및 CD3에 특이적인 scFv를 포함하는 탠덤 scFv인 단리된 항-AMC 구축물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 항-AMC 구축물을 발현하는 숙주 세포.

청구항 12

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 단리된 항-AMC 구축물의 폴리펩티드 성분을 코딩하는 핵산.

청구항 13

제10항의 항-AMC 구축물을 발현하는 T 세포.

청구항 14

AMC를 그의 표면 상에 제시하는 세포를 제8항에 따른 항-AMC 구축물과 시험관내(*in vitro*) 접촉시키고 세포 상의 표지의 존재를 검출하는 것을 포함하는, AMC를 그의 표면 상에 제시하는 세포를 검출하는 시험관내 방법.

청구항 15

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 항-AMC 구축물 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는, AFP-양성 암을 가진 개체를 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 16

AFP-양성 암을 가진 개체를 진단하기 위한, 제8항에 따른 항-AMC 구축물을 포함하는 조성물이며,

- a) 유효량의 조성물이 개체에게 투여되고;
- b) 개체에서 표지의 수준이 결정되며, 여기서 표지의 수준이 역치 수준을 초과하는 경우는 개체가 AFP-양성 암을 갖고 있음을 나타내는 것인

조성물.

청구항 17

AFP-양성 암을 가진 개체를 진단하기 위한, 제8항에 따른 항-AMC 구축물을 포함하는 조성물이며,

- a) 유효량의 조성물이 개체로부터 유래된 샘플과 접촉되고;
- b) 샘플에서 항-AMC 구축물과 결합된 세포의 수가 결정되며, 여기서 항-AMC 구축물과 결합된 세포의 수에 대한 값이 역치 수준을 초과하는 경우는 개체가 AFP-양성 암을 갖고 있음을 나타내는 것인

조성물.

청구항 18

제15항에 있어서, AFP-양성 암이 간세포성 암종, 배세포 종양, 또는 유방암인 제약 조성물.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 참조

[0002] 본 출원은 2015년 4월 3일에 출원된 미국 가출원 번호 62/142,958, 2015년 10월 21일에 출원된 미국 가출원 번호 62/244,653, 및 2016년 3월 7일에 출원된 미국 가출원 번호 62/304,915를 우선권 주장하며, 이들 모두는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 AFP 펩티드와 복합체화된 MHC 분자에 특이적으로 결합하는 항체 구축물, 및 질환의 치료 및 진단을 포함한 그의 용도에 관한 것이다.

[0005] ASCII 텍스트 파일의 서열 목록 제출

[0006] ASCII 텍스트 파일의 하기 제출의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다: 서열 목록의 컴퓨터 판독가능 형태 (CRF) (파일명: 750042000140SEQLIST.txt, 기록된 날짜: 2016년 4월 1일, 크기: 65 KB).

배경 기술

[0007] 세포 표면 단백질은 세포성 단백질의 단지 적은 부분만을 구성하고, 이들 단백질은 종종 종양-특이적이지 않다. 시판되는 치료 모노클로날 항체 (mAb)는 세포에 용이하게 침투할 수 없기 때문에, 대부분이 계통 또는 분화 항원인 이들 세포 표면 단백질을 인식한다 (Milenic, E.D., Curr. Pharm. Des. 8:1794-1764, 2002; Grillo-Lopez, A.J., Expert Rev. Anticancer Ther. 2(3):323-329, 2002; Jones, K.L. & Buzdat, A.U., Lancet Oncol. 10(12):1179-1187, 2009). 대조적으로, 돌연변이된 또는 종양원성 종양-연관 단백질은 전형적으로 핵, 세포질 또는 분비 단백질이며, 이들은 현재 소분자 약물에 의해 가장 잘 다뤄지고 있으나 분비 단백질의 경우에는 항암 약물 표적으로서 거의 다뤄지지 않는다 (Reddy et al., Expert Opin. Ther. Targets 3:313-324, 2012; Takeuchi, K. & Ito, F., Biol. Pharm. Bull. 34(12):1774-1780; Roychowdhury, S. & Talpaz, M., Blood Rev. 6:279-290, 2011). 그러나, 대부분의 세포내 단백질은 프로테오솜으로 분해되고, 프로세싱되어, T 세포 수용체 (TCR)에 의해 인식되는 MHC 분자와 관련하여 T 세포 펩티드 에피토프로서 세포 표면 상에 MHC 분자에 의해 제시된다 (Morris et al., Blood Rev. 20:61-69, 2006; Konnig, R., Curr. Opin. Immunol. 14(1):75-83, 2002). 따라서, 세포 표면 상의 분비 또는 세포내 종양 항원-유래 펩티드/MHC 복합체를 인식하는 치료 mAb를 생성하는 것은 mAb에 의해 제공되는 증진된 특이성 및 치료 효력을 이용할 것이다. mAb를 생성하기 위해 파지 디스플레이를 사용하는데 있어서의 최근 진보는 거대 항체 레퍼토리오로부터 정의된 에피토프에 대한 정교한 특이성을 갖는 작용제를 선택하는 것을 가능하게 하였다. 고품 종양 항원에 특이적인 다수의 이러한 mAb는 HLA-A01 및 HLA-A02와 관련하여 파지 디스플레이 라이브러리로부터 성공적으로 선택되었다 (Noy et al., Expert Rev. Anticancer Ther. 5(3):523-536, 2005; Chames et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:7969-7974, 2000; Held et al., Eur. J. Immunol. 34:2919-2929, 2004; Lev et al., Cancer Res. 62:3184-3194, 2002; Klechevsky et al., Cancer Res. 68(15):6360-6367, 2008). 보다 최근에는, 널리 기재되어 있는 T 세포 에피토프인 인간 WT1/HLA-A02 복합체에 특이적인 인간 mAb가 세포 검정 및 생체내 모델에서 Fc-매개 이펙터 세포 기능을 통해 다중 암 세포주 및 원발성 암 세포를 억제하는 것으로 제시되었다 (Dao et al., Sci. Transl. Med. 5:176ra33, 2013; Veomett et al., Clin. Cancer Res. doi: 10.1158/1078-0432, 2014).

[0008] 알파-태아단백질 (AFP)은 난황낭 및 태아 간에서 생산되고 순환 내로 분비되는 69 kD 당단백질이다. AFP의 합성은 출생 후 극적으로 감소하고, 단지 미량만이 성인 간에 존재한다. 정상 성인 인간 혈청에서, AFP 농도는 통상적으로 5-7 ng/ml만큼 낮다 (Terentiev, A.A. & Moldogazieva, N.T., Tumour Biol. 34(4):2075-2091, 2013). 그러나, AFP 유전자의 발현은 성인에서 간 재생 동안, 간암발생, 배세포 종양 또는 바이러스 감염 (HBV/HCV)의 일부 경우에서 재활성화된다. 따라서, 혈청 AFP의 측정은 AFP-양성 암의 진단 및 그의 치료에 대한 반응을 모니터링하는데 있어서 중요한 역할을 한다. 현재, AFP는 종양-특이적 분자 바이오마커 중에서 "황금 표준"으로 간주된다. 그러나, AFP는 세포-표면 단백질이 아니기 때문에, AFP를 표적화하는 것은 항암 항체 약물 개발을 위한 매우 활발한 분야는 아니었다.

[0009] 원발성 간암은 전세계에서 암의 5번째로 가장 흔한 형태이며 암-관련 사망의 2번째로 가장 흔한 원인이다. 2012년에, 세계적으로 약 782,000건의 새로운 암 사례 및 약 746,000건의 간암 관련 사망이 존재하였다 (http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx). 간암의 90-95%는 간세포성 암종 (HCC)이다. 만성 간 손상, 예컨대 만성 간염, 간 경변증 및 지방간 질환에 의해 야기된 것은 HCC의 발생과 밀접하게 연관된다. 간염 바이러스 감염 (예를 들어 HBV, HCV), 아플라톡신 B 노출, 알콜 섭취 및 다른 대사 질환 (예를 들어 비만 및 당뇨병)은 HCC에 대한 널리 공지된 위험 인자이다. HCC의 발생률은 동아시아 및 아프리카 국가에서 HBV 및 HCV의 유행률로 인해 이들 지역에서 높다 (Shibata, T. & Aburatani, H., Nat. Rev.

Gastroenterol. Hepatol. 11(6):340-349, 2014). 그러나, HCV에 감염된 환자의 수는 서부 국가, 특히 바이러 스성 간염 감염이 약물 남용을 통해 부분적으로 매개되고 있는 미국에서 급속하게 증가하였다. 한편, 비알콜성 지방간염 (NASH) 및 비만으로 인한 간경변증의 발생률이 또한 서부 국가에서 증가하였다. 미국에서, HCC는 9번 째로 가장 흔한 암이다 (Vallanueva et al., Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 10(1):34-42).

[0010] HCC를 갖는 환자의 평균 생존은 진단으로부터 3개월이다. 그러나 이는 종양의 병기 및 기저 간 질환의 정도와 밀접하게 관련된다. HCC 환자의 단지 소수만이 진단 시기에 절제 및 이식에 적합한 것으로 여겨지기 때문에, HCC를 갖는 환자의 다수에 대한 치료는 주로 완화적이다. 비-수술적 치료, 예컨대 경동맥 화학색전술 (TACE/TAE), 고주파 절제 및 소라페닙과 같은 전신 표적화제는 종양 부담을 감소시키고 생존율을 개선시키는 것 으로 제시되었지만, 이들 치료는 암 세포를 근절하지 못하고 환자는 빈번하게 재발한다. 따라서, 보다 효과적인 요법의 개발이 긴급한 연구 분야로 남아있다 (Behboudi et al., Liver Int. 30(4):521-526, 2010).

[0011] AFP 발현은 HCC의 대략 80%에서 재활성화된다. MHC 부류 I 단백질에 의해 HCC 암 세포 표면 상에 제시된 펩티 드를 인식하는 AFP-특이적 세포독성 CD8 T 세포 반응을 생성하는 것을 목표로 하는 면역요법 연구는 T-세포 에 피토프로서 많은 인간 AFP 펩티드를 보고하였다 (Butterfield et al., J. Immunol. 166:5300-5308, 2001; Pardee, A.D. & Butterfield, L.H., OncoImmunol. 1:48-55, 2012; Butterfield et al., J. Trans. Med. 12:86, 2014; Liu et al., J. Immunol. 177(1):712-721, 2006; Mizukoshi et al., Int. J. Cancer 118(5):1194-1204, 2006). 이들 펩티드 중에서, FMNKFIYEI (AFP158)는 HLA-A*02:01에 의해 제한되는 면역우성 T-세포 에피토프이다. AFP/HLA-A*02:01 복합체는 시험관내에서 정상 HLA-A*02:01 공여자로부터 펩티드-특이적 T 세포를 유도하였다. 이들 AFP158 특이적 T 세포는 세포독성 검정 및 IFN γ ELISPOT 검정 둘 다에서 HLA-A*02:01 양성 및 AFP 양성 종양 세포를 인식하였다. AFP158은 HLA-A*02:01 양성 HCC 세포주인 HepG2로부터의 표면 펩티드의 질량 분광측정 분석에 의해 확인되었지만, HLA-A*02:01 음성 암 세포주인 Hep3B로부터는 확인되 지 않았다 (Butterfield et al., J. Immunol. 166:5300-5308, 2001). 이들 데이터는 AFP158이 사실상 AFP-양 성 암 세포에서 프로세싱되어 HLA-A*02:01 분자에 의해 제시된다는 것을 지지한다. 따라서, AFP158/HLA-A*02:01은 mAb 암 약물 개발을 위한 우수한 표적 후보이다.

[0012] AFP를 과다발현하는 암을 치료하기 위한 치료 표적으로서 AFP를 사용하는 것에 대한 전통적인 접근법은 AFP 단 백질을 표적화하는 항체 또는 다양한 AFP 펩티드에 의한 백신접종을 사용하는 것에 의존하였다. AFP 단백질에 대해 지시된 항체는, AFP가 세포-표면 단백질이 아니고 높은 순환 수준으로 존재할 수 있어 AFP를 발현하는 세 포에 대한 항체의 임의의 특이적 표적화가 감소될 수 있기 때문에, 치료 효능을 거의 갖지 않는다. 다양한 MHC-제한 AFP 펩티드 및 그의 변이체에 의한 백신접종은 시험관내에서 AFP-특이적 T 세포의 활성화 및 AFP-제시 세포의 증가된 세포독성을 유발하는 것으로 관찰되었지만, 임상적으로 유의한 치료 이익은 아직 관찰되지 않았 다.

[0013] 본원에 언급된 모든 공개, 특허, 특허 출원 및 공개 특허 출원의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

발명의 내용

[0014] 본 출원은 한 측면에서 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체 (본원에서 "AFP/MHC 부류 I 복합체" 또는 "AMC"로 지칭됨)에 결합하는 구축물 (예컨대 단리된 구축물)을 제공한다. 일부 실시양태에서, 구 축물 ("항-AMC 구축물")은 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 모 이어티 (본원에서 "항-AMC 항체 모이어티"로 지칭됨)를 포함한다.

[0015] 따라서, 일부 실시양태에서, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 모이어티를 포함하는 항-AMC 구축물 (예컨대 단리된 항-AMC 구축물)이 제공된다. 일부 실시양태에서, AFP/MHC 부류 I 복합체는 세포 표면 상에 제시된다. 일부 실시양태에서, AFP/MHC 부류 I 복합체는 암 세포의 표면 상에 제시된다.

[0016] 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하 는 항체 모이어티를 포함하고, 여기서 MHC 부류 I 단백질은 HLA-A이다. 일부 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질 은 HLA-A02이다. 일부 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질은 HLA-A02 대립유전자의 HLA-A*02:01 하위유형이다.

[0017] 일부 실시양태에서, 상기 기재된 임의의 항-AMC 구축물 (예컨대 단리된 항-AMC 구축물)에 따르면, 항-AMC 구축 물은 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 모이어티를 포함하고, 여기서 항체 모이어티는 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질과 상이한 HLA 대립유전자를 갖는 제2 MHC 부류 I 단

백질을 포함하는 복합체와 교차-반응한다. 일부 실시양태에서, 항체 모이어티는 AFP 펩티드의 중간 변이체 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체와 교차-반응한다. 일부 실시양태에서, 항체 모이어티는 1개의 아미노산 치환 (예컨대 보존적 아미노산 치환)을 포함하는 AFP 펩티드의 변이체 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체와 교차-반응한다.

[0018] 일부 실시양태에서, 상기 기재된 임의의 항-AMC 구축물 (예컨대 단리된 항-AMC 구축물)에 따르면, 항-AMC 구축물은 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 모이어티를 포함하고, 여기서 AFP 펩티드는 약 8 내지 약 12개 (예컨대 약 8, 9, 10, 11, 또는 12개 중 어느 것)의 아미노산 길이이다. 일부 실시양태에서, AFP 펩티드는 인간 AFP로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, AFP 펩티드는 서열식별번호(SEQ ID NO): 3-13 및 16으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, AFP 펩티드는 아미노산 서열 FMNFIYEI (서열식별번호: 4)를 갖는다.

[0019] 일부 실시양태에서, 상기 기재된 임의의 항-AMC 구축물 (예컨대 단리된 항-AMC 구축물)에 따르면, 항-AMC 구축물은 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 모이어티를 포함하고, 여기서 항체 모이어티는 전장 항체, Fab, Fab', (Fab')₂, Fv 또는 단일쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 항체 모이어티는 완전 인간, 인간 항체 프레임워크 영역을 갖는 반합성, 또는 인간화이다.

[0020] 일부 실시양태에서, 상기 기재된 임의의 항-AMC 구축물 (예컨대 단리된 항-AMC 구축물)에 따르면, 항-AMC 구축물은 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 모이어티를 포함하고, 여기서 항체 모이어티는 AFP/MHC 부류 I 복합체에 약 0.1 pM 내지 약 500 nM (예컨대 약 0.1 pM, 1.0 pM, 10 pM, 50 pM, 100 pM, 500 pM, 1 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 또는 500 nM 중 어느 것 (이들 값 사이의 임의의 범위 포함))의 평형 해리 상수 (K_d)로 결합한다. 일부 실시양태에서, 단리된 항-AMC 구축물은 AFP/MHC 부류 I 복합체에 약 0.1 pM 내지 약 500 nM (예컨대 약 0.1 pM, 1.0 pM, 10 pM, 50 pM, 100 pM, 500 pM, 1 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 또는 500 nM 중 어느 것 (이들 값 사이의 임의의 범위 포함))의 K_d 로 결합한다.

[0021] 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 모이어티를 포함하고, 여기서 항체 모이어티는 i) G-F/Y-S/T-F-D/S/T-D/N/S-Y/A-A/G/W의 아미노산 서열 (서열식별번호: 87)을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 (HC-CDR) 1, 또는 최대 약 3개 (예컨대 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, I/S-K/S-X-H/Y-X-G-X-T의 아미노산 서열 (서열식별번호: 88)을 포함하는 HC-CDR2, 또는 최대 약 3개 (예컨대 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 A/G-X-W/Y-Y-X-X-X-F/Y-D의 아미노산 서열 (서열식별번호: 89)을 포함하는 HC-CDR3, 또는 최대 약 3개 (예컨대 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및 ii) S/T-G/S-D/N-I/V-A/G-A/S/V-X-H/Y의 아미노산 서열 (서열식별번호: 120)을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 (LC-CDR) 1, 또는 최대 약 3개 (예컨대 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 Q-S/T-Y/W-D/T-S/T-A/S의 아미노산 서열 (서열식별번호: 121)을 포함하는 LC-CDR3, 또는 최대 약 3개 (예컨대 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 여기서 X는 임의의 아미노산일 수 있다.

[0022] 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 모이어티를 포함하고, 여기서 항체 모이어티는 i) 서열식별번호: 57-66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진) HC-CDR1, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 서열식별번호: 67-76 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진) HC-CDR2, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진) HC-CDR3, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및 ii) 서열식별번호: 90-99 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진) LC-CDR1, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 서열식별번호: 100-109 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진) LC-CDR2, 또는 최대 약 3개 (예컨대 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진) LC-CDR3, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

- [0023] 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 모이어티를 포함하고, 여기서 항체 모이어티는 i) 서열식별번호: 57-66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진) HC-CDR1, 서열식별번호: 67-76 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진) HC-CDR2, 및 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진) HC-CDR3을 포함하는 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진) 중쇄 가변 도메인; 또는 HC-CDR 영역에서 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체; 및 ii) 서열식별번호: 90-99 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진) LC-CDR1, 서열식별번호: 100-109 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진) LC-CDR2, 및 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진) LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인; 또는 LC-CDR 영역에서 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함한다.
- [0024] 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 모이어티를 포함하고, 여기서 항체 모이어티는 a) 서열식별번호: 17-26 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진) 중쇄 가변 도메인 또는 서열식별번호: 17-26 중 어느 하나와 적어도 약 95% (예컨대 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 중 어느 것) 서열 동일성을 갖는 그의 변이체; 및 b) 서열식별번호: 27-36 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진) 경쇄 가변 도메인 또는 서열식별번호: 27-36 중 어느 하나와 적어도 약 95% (예컨대 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 중 어느 것) 서열 동일성을 갖는 그의 변이체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 모이어티는 서열식별번호: 17-26 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진) 중쇄 가변 도메인 및 서열식별번호: 27-36 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진) 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0025] 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 표적 AFP/MHC 부류 I 복합체와의 결합에 대해 상기 기재된 임의의 항체 모이어티에 따른 제2 항체 모이어티와 경쟁하는 제1 항체 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 항체 모이어티는 제2 항체 모이어티와 동일한 또는 실질적으로 동일한 에피토프에 결합한다. 일부 실시양태에서, 표적 AFP/MHC 부류 I 복합체와의 제1 항체 모이어티의 결합은 표적 AFP/MHC 부류 I 복합체와의 제2 항체 모이어티의 결합을 적어도 약 70% (예컨대 적어도 약 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 중 어느 것) 억제하거나, 또는 그 반대의 경우도 마찬가지이다. 일부 실시양태에서, 제1 항체 모이어티 및 제2 항체 모이어티는 표적 AFP/MHC 부류 I 복합체와의 결합에 대해 교차-경쟁하고, 즉 각각의 제1 및 제2 항체 모이어티는 표적 AFP/MHC 부류 I 복합체와의 결합에 대해 다른 것과 경쟁한다.
- [0026] 일부 실시양태에서, 상기 기재된 임의의 항-AMC 구축물 (예컨대 단리된 항-AMC 구축물)에 따르면, 단리된 항-AMC 구축물은 전장 항체이다. 일부 실시양태에서, 단리된 항-AMC 구축물은 단일특이적이다. 일부 실시양태에서, 단리된 항-AMC 구축물은 다중-특이적이다. 일부 실시양태에서, 단리된 항-AMC 구축물은 이중특이적이다. 일부 실시양태에서, 단리된 항-AMC 분자는 탠덤 scFv, 디아바디 (Db), 단일 체 디아바디 (scDb), 이중-친화도 재표적화 (DART) 항체, 이중 가변 도메인 (DVD) 항체, 노브-인투-홀 (KiH) 항체, 독 앤 록 (DNL) 항체, 화학적으로 가교된 항체, 이중다량체 항체, 또는 이중접합체 항체이다. 일부 실시양태에서, 단리된 항-AMC 구축물은 펩티드 링커에 의해 연결된 2개의 scFv를 포함하는 탠덤 scFv이다. 일부 실시양태에서, 펩티드 링커는 아미노산 서열 GGGGS를 포함한다 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진다).
- [0027] 일부 실시양태에서, 상기 기재된 임의의 항-AMC 구축물 (예컨대 단리된 항-AMC 구축물)에 따르면, 항-AMC 구축물은 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 모이어티를 포함하고, 여기서 단리된 항-AMC 구축물은 제2 항원에 특이적으로 결합하는 제2 항원-결합 모이어티를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 항원-결합 모이어티는 항체 모이어티이다. 일부 실시양태에서, 제2 항원은 T 세포의 표면 상의 항원이다. 일부 실시양태에서, T 세포는 세포독성 T 세포, 헬퍼 T 세포, 및 자연 킬러 T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 제2 항원은 CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD28, OX40, GITR, CD137, CD27, CD40L, 및 HVEM으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 제2 항원은 CD3 ϵ 이고, 단리된 항-AMC 구축물은 AFP/MHC 부류 I 복합체에 특이적인 N-말단 scFv 및 CD3 ϵ 에 특이적인 C-말단 scFv를 포함하는 탠덤 scFv이다. 일부 실시양태에서, 제2 항원은 자연 킬러 세포, 호중구, 단핵구, 대식세포, 또는 수지상 세포의 표면 상의 항원이다.
- [0028] 일부 실시양태에서, 상기 기재된 임의의 항-AMC 구축물 (예컨대 단리된 항-AMC 구축물)에 따르면, 항-AMC 구축

물은 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 모이어티를 포함하고, 여기서 단리된 항-AMC 구축물은 키메라 항원 수용체이다. 일부 실시양태에서, 키메라 항원 수용체는 항체 모이어티를 포함하는 세포외 도메인, 막횡단 도메인, 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3ζ 세포내 신호전달 서열 및 공동-자극 신호전달 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 공동-자극 신호전달 서열은 CD28 세포내 신호전달 서열이다.

[0029] 일부 실시양태에서, 상기 기재된 임의의 항-AMC 구축물 (예컨대 단리된 항-AMC 구축물)에 따르면, 항-AMC 구축물은 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 모이어티를 포함하고, 여기서 단리된 항-AMC 구축물은 항체 모이어티 및 이펙터 분자를 포함하는 면역접합체이다. 일부 실시양태에서, 이펙터 분자는 약물, 독소, 방사성동위원소, 단백질, 펩티드, 및 핵산으로 이루어진 군으로부터 선택된 치료제이다. 일부 실시양태에서, 치료제는 약물 또는 독소이다. 일부 실시양태에서, 이펙터 분자는 표지이다.

[0030] 또 다른 실시양태에서, 상기 기재된 임의의 실시양태에 따른 항-AMC 구축물 (예컨대 단리된 항-AMC 구축물)을 포함하는 제약 조성물이 제공된다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 항-AMC 구축물과 연관된 세포 (예컨대 이펙터 세포)를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물 또는 그의 폴리펩티드 성분을 발현하거나 그와 연관된 숙주 세포가 제공된다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물 또는 그의 폴리펩티드 성분을 코딩하는 핵산이 제공된다. 일부 실시양태에서, 핵산을 포함하는 벡터가 제공된다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물을 발현하거나 그와 연관된 이펙터 세포가 제공된다. 일부 실시양태에서, 이펙터 세포는 T 세포이다.

[0031] 일부 실시양태에서, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체를 그의 표면 상에 제시하는 세포를 a) AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 모이어티 및 b) 표지를 포함하는 상기 기재된 임의의 실시양태에 따른 항-AMC 구축물 (예컨대 단리된 항-AMC 구축물)과 접촉시키고 세포 상의 표지의 존재를 검출하는 것을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체를 그의 표면 상에 제시하는 세포를 검출하는 방법이 제공된다.

[0032] 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환을 갖는 개체에게 상기 기재된 임의의 실시양태에 따른 항-AMC 구축물 (예컨대 단리된 항-AMC 구축물)을 포함하는 제약 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, AFP-양성 질환을 갖는 개체를 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 단리된 항-AMC 구축물과 연관된 세포 (예컨대 이펙터 세포)를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환을 갖는 개체에게 상기 기재된 임의의 항-AMC CAR을 발현하는 이펙터 세포의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, AFP-양성 질환을 갖는 개체를 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 이펙터 세포는 T 세포이다. 일부 실시양태에서, 투여는 개체에서 제1 질환 부위에 원위인 주사 부위에서 이루어진다. 일부 실시양태에서, 주사 부위는 제1 질환 부위에 원위인 제1 종양이다. 일부 실시양태에서, 제1 질환 부위는 AFP-양성 종양이다. 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환은 암이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종 또는 배세포 종양이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이고, 전이는 억제된다. 일부 실시양태에서, 암은 전이성 간세포성 암종이다.

[0033] 일부 실시양태에서, a) AFP-양성 질환을 갖는 개체에게 유효량의 상기 기재된 임의의 실시양태에 따른 단리된 항-AMC 구축물을 투여하는 단계; 및 b) 개체에서 표지의 수준을 결정하는 단계이며, 여기서 역치 수준을 초과하는 표지의 수준은 개체가 AFP-양성 질환을 갖는다는 것을 나타내는 것인 단계를 포함하는, AFP-양성 질환을 갖는 개체를 진단하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, a) AFP-양성 질환을 갖는 개체로부터 유래된 샘플을 상기 기재된 임의의 실시양태에 따른 단리된 항-AMC 구축물과 접촉시키는 단계; 및 b) 샘플에서 단리된 항-AMC 구축물과 결합된 세포의 수를 결정하는 단계이며, 여기서 역치 수준을 초과하는 단리된 항-AMC 구축물과 결합된 세포의 수에 대한 값은 개체가 AFP-양성 질환을 갖는다는 것을 나타내는 것인 단계를 포함하는, AFP-양성 질환을 갖는 개체를 진단하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환은 암이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종 또는 배세포 종양이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이고, 전이는 억제된다. 일부 실시양태에서, 암은 전이성 간세포성 암종이다.

[0034] 또한 본원에 기재된 임의의 구축물을 제조하는 방법, 본원에 기재된 방법에 적합한 제조 물품 및 키트가 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은 한외여과에 의한 농축 후 AFP158 펩티드/HLA-A*02:01 복합체의 크기 배제 크로마토그래피 (SEC) 크로마

토그램을 보여준다. 적절히 폴딩된 펩티드/MHC 복합체 단량체: 212.49 mL; 미스폴딩된 응집체: 111.27 mL; 유리 β 2M: 267.21 mL.

도 2는 SEC 후 분리된 AFP158/HLA-A*02:01 복합체의 순도를 결정하기 위한 환원 SDS-PAGE 분석을 보여준다. 주요 밴드는 HLA-A*02:01 및 β 2M 서브유닛에 상응한다.

도 3은 비오틴화 대조군 펩티드/HLA-A*02:01 (Bio-대조군)에 비해 비오틴화 AFP158 펩티드/HLA-A*02:01 (Bio-AFP158)의 특이적 결합에 대한 파지 클론 ELISA의 결과를 보여준다.

도 4는 β 2M-로딩된, β 2M/AFP158 펩티드-로딩된 및 β 2M/hTERT 펩티드-로딩된 T2 세포의 결합에 대한 파지 클론 FACS 결합 검정의 결과를 보여준다.

도 5는 β 2M-로딩된 T2 세포에 비해 β 2M/인간 AFP158 펩티드-로딩된 T2 세포 및 β 2M/마우스 AFP158 펩티드-로딩된 T2 세포와의 교차-반응성에 대한 파지 클론 FACS 결합 검정의 결과를 보여준다.

도 6은 다양한 위치에 단일 알라닌 치환을 갖는 AFP158 펩티드가 로딩된 T2 세포에 대한 파지 클론 #52 FACS 결합 검정의 결과를 보여준다.

도 7은 β 2M AFP158 펩티드-로딩된 T2 세포, β 2M 및 정상적으로 발현된 내인성 단백질로부터 유래된 펩티드의 혼합물이 로딩된 T2 세포 또는 β 2M-로딩된 T2 세포의 결합에 대한 파지 클론 FACS 결합 검정의 결과를 보여준다.

도 8은 정제된 항-AFP158/MHC 이중특이적 항체의 분자량 결정을 위한 SDS-PAGE 분석을 보여준다.

도 9는 응집의 수준을 평가하기 위한 예시적인 정제된 AFP158 이중특이적 항체의 SEC 크로마토그램을 보여준다. 항-AFP158/MHC 이중특이적 항체 단량체: ~15.8 mL.

도 10은 다양한 농도에서의 항-AFP158/MHC 이중특이적 항체 (BsAb)에 의해 매개되는 다중 암 세포주의 T-세포 사멸을 보여준다. 각각의 농도에 대해, 막대는 좌측에서 우측으로 HEPG2, SK-HEP1, Hela, HEP3B, Raji, Jurkat, Daudi, 및 K562 세포주를 나타낸다.

도 11은 키메라 항원 수용체 구축물의 개략적 표현을 보여준다.

도 12는 한 패널의 항-AFP158/MHC CAR을 발현하는 T 세포에 의해 매개되는 HEPG2, SK-HEP1, 및 SK-HEP1-MiniG 세포주의 사멸을 보여준다.

도 13은 예시적인 항-AFP158/MHC CAR을 발현하는 T 세포에 의해 매개되는, AFP158 및 HLA-A*02:01에 대해 양성 또는 음성인 한 패널의 암 세포주의 사멸을 보여준다. 각각의 세포주의 기원 조직, AFP/AFP158 펩티드 발현 및 세포가 HLA-A02 대립유전자를 발현하는지 여부가 표에 나타나 있다.

도 14a는 AFP158 CAR 형질도입된 T 세포 또는 모의-형질도입된 T 세포와 AFP158 및 HLA-A*02:01에 대해 양성 또는 음성인 암 세포주와의 공동-인큐베이션 후 IL-2, IL-4, IL-6, 및 IL-8의 방출을 보여준다.

도 14b는 AFP158 CAR 형질도입된 T 세포 또는 모의-형질도입된 T 세포와 AFP158 및 HLA-A*02:01에 대해 양성 또는 음성인 암 세포주와의 공동-인큐베이션 후 IL-10, GM-CSF, IFN- γ , 및 TNF- α 의 방출을 보여준다.

도 15a는 모의-형질도입된 T 세포 또는 AFP158 CAR-형질도입된 T 세포의 정맥내 주사로 처리되거나 또는 비처리된 채로 남아있는 HepG2 피하 이종이식 마우스에서의 종양 성장을 보여준다.

도 15b는 모의-형질도입된 T 세포 또는 AFP158 CAR-형질도입된 T 세포의 종양내 주사로 처리되거나 또는 비처리된 채로 남아있는 HepG2 피하 이종이식 마우스에서의 종양 성장을 보여준다.

도 16a는 모의-형질도입된 T 세포 또는 AFP158 CAR-형질도입된 T 세포의 복강내 주사를 사용한 처리 또는 비처리 후 제70일에 루시페라제-태그부착된 HepG2 (HepG2-Luc2) 복강내 이종이식 마우스로부터의 광자 방출에서의 변화를 보여준다.

도 16b는 제70일에 HepG2-Luc2 종양-보유 마우스의 광자 방출 영상을 보여준다.

도 17은 AFP158 CAR-형질도입된 T 세포의 정맥내 또는 종양내 주사 또는 모의-형질도입된 T 세포의 정맥내 주사로 처리된 SK-Hep1-MiniG 피하 이종이식 마우스에서의 종양 성장을 보여준다.

도 18은 전장 항-AFP158/MHC 마우스 키메라 IgG1 항체의 순도를 결정하기 위한 SDS-PAGE 분석을 보여준다.

도 19는 AFP158/HLA-A*02:01을 제시하는 SK-HEP1-miniG 세포에 결합하는 전장 항-AFP158/MHC 마우스 키메라 IgG1 (흑색 선) 또는 음성 대조군 (2차 항체 단독, 회색 선)의 FACS 분석을 보여준다.

도 20은 AFP158/HLA-A*02:01 복합체, 재조합 AFP 단백질 또는 유리 AFP158 펩티드에 결합하는 전장 항-AFP158/MHC 마우스 키메라 IgG1에 대한 ELISA의 결과를 보여준다. 좌측 패널: 전장 항-AFP158/MHC 마우스 키메라 IgG1의 용량 의존성 곡선; 우측: AFP158 펩티드/MHC (MHC), AFP 단백질 (AFP) 및 AFP158 펩티드 (펩티드)에 대한 100 ng/mL에서의 항체 결합의 OD450.

도 21은 AFP158 CAR-T 세포 또는 대조군이 종양내로 주사된 마우스에 대한 시간 경과에 따른 (제1 투여 후 35일 까지) 체중 측정을 보여준다.

도 22는 AFP158 CAR-형질도입된 T 세포의 정맥내 또는 종양내 주사, AFP158 CAR-형질도입된 T 세포와 APC의 조합의 종양내 주사, 또는 모의-형질도입된 T 세포의 종양내 주사로 처리된 양측 SK-Hep1-MiniG 피하 이종이식 마우스에서의 종양 성장 동역학을 보여준다. 종양내 주사를 우측 측복부 종양 내로 주사하였다.

도 23은 AFP158 CAR-형질도입된 T 세포와 APC의 조합의 우측 측복부 종양 내로의 종양내 주사로 처리된 양측 SK-Hep1-MiniG 피하 이종이식 마우스로부터의 종양 절편에서의 인간 CD3의 면역조직화학적 염색을 보여준다. L, 좌측 종양; R, 우측 종양.

도 24는 AFP158 CAR-형질도입된 말초 혈액 림프구의 유동 세포측정법 분석을 보여주며; 세포를 AFP158/HLA-A*02:01 사량체로 염색하고, 항-CD3 항체, 항-CD4 항체, 또는 항-CD8 항체로 공동-염색하였다. 모의-형질도입된 세포 및 염색이 없는 세포를 대조군으로서 포함시켰다.

도 25는 표적 세포 (HepG2, SK-HEP-1 또는 SK-Hep1-MiniG)와의 공동-배양 후 AFP158 CAR-형질도입된 T 세포의 탈과립화의 유동 세포측정법 분석을 보여주며; 형질도입된 T-세포를 CAR 및 CD8 발현을 위해 게이팅하고, 항-CD107a에 대해 염색하였다.

도 26은 대표적인 AFP158 CAR을 발현하도록 형질도입된 세포에서의 CAR 세포 표면 분포를 보여주며; 세포를 AFP158/HLA-A*02:01 사량체-PE로 염색하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 본 출원은 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체 (본원에서 "AFP/MHC 부류 I 복합체" 또는 "AMC"로 지칭됨)에 특이적으로 결합하는 항체 모이어티 (본원에서 "항-AMC 항체 모이어티"로 지칭됨)를 포함하는 단리된 구축물 (본원에서 "항-AMC 구축물"로 지칭됨)을 제공한다. 항-AMC 구축물은 순환 AFP 단백질 또는 유리 AFP 펩티드와는 대조적으로, AFP/MHC 부류 I 복합체 (예컨대 AFP를 발현하는 세포의 표면 상의 MHC-제시된 AFP 펩티드)를 특이적으로 인식한다. 항-CD3 이중특이적 항체로서 무장되거나 또는 T 세포에 의해 발현된 키메라 항원 수용체 (CAR)에 제시되는 경우에, 항-AMC 항체 모이어티는 인간 T 세포에 특이적으로 재지시되어 AMC-제시 표적 세포, 예컨대 AMC-제시 암 세포를 사멸시킨다. 이 전략은 AMC-제시 세포 (즉, MHC 부류 I 분자에 결합된 AFP 펩티드를 그의 표면 상에 제시하는 세포)를 특이적으로 표적화할 수 없는, AFP 단백질에 대해 지시된 항체를 사용하는 것에 비해 유의한 기술적 이점을 제공한다. 게다가, 검출가능한 모이어티에 융합되는 경우에, 항-AMC 항체 모이어티는 순환 AFP 수준보다 잠재적으로 더 관련된 질환 진행의 척도인 AMC-제시 세포의 수 및 분포에서의 변화에 대해 높은 감수성을 갖는 AFP-양성 질환 또는 장애의 진단 및 예후를 가능하게 한다.

[0037] 파지 디스플레이 기술을 사용하여, 본 발명자들은 인간 AFP158 펩티드/HLA-A*02:01 복합체, 뿐만 아니라 HLA-A02 대립유전자의 다른 하위유형과 관련하여 형성된 AFP158/MHC 복합체에 대해 특이적이고 고친화도를 갖는 다중 모노클로날 항체를 생성하였다. 유동 세포측정법 및 T-세포 매개 세포독성 검정은 항체가 AFP 펩티드-펄싱 T2 세포 및 AMC-제시 암 세포주를 AFP- 및 HLA-A*02:01-제한 방식으로 인식하였다는 것을 입증하였다. 항-CD3 이중특이적 항체 또는 CAR T 세포로서 무장되는 경우에, 항체는 인간 T 세포에 재지시되어 AFP-양성 및 HLA-A*02:01-양성 표적 암 세포를 사멸시킨다. 본원에 제시된 데이터는 HLA 복합체와 관련하여 분비 암 항원에 대한 항체가 암 적응증, 예컨대 고형 종양 적응증을 위한 효과적인 치료제일 수 있다는 것을 입증한다.

[0038] 따라서 본 출원은 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 모이어티를 포함하는 구축물 (예컨대 단리된 구축물)을 제공한다. 구축물은, 예를 들어 전장 항-AMC 항체, 다중-특이적 항-AMC 분자 (예컨대 이중특이적 항-AMC 항체), 항-AMC 키메라 항원 수용체 ("CAR"), 또는 항-AMC 면역접합체일 수 있다.

- [0039] 또 다른 측면에서, 항-AMC 구축물 또는 구축물의 항-AMC 항체 모이어티 부분을 코딩하는 핵산이 제공된다.
- [0040] 또 다른 측면에서, AFP-펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 모이어티를 포함하는 항-AMC 구축물을 포함하는 조성물이 제공된다. 조성물은 항-AMC 구축물, 또는 항-AMC 구축물을 발현하거나 그와 연관된 이펙터 세포 (예를 들어 항-AMC CAR을 발현하는 T 세포)를 포함하는 제약 조성물일 수 있다.
- [0041] 또한, 치료 또는 진단 목적을 위한 항-AMC 구축물 (또는 항-AMC 구축물을 발현하거나 그와 연관된 세포)의 제조 및 사용 방법, 뿐만 아니라 이러한 방법에 유용한 키트 및 제조 물품이 제공된다.
- [0042] 정의
- [0043] 본원에 사용된 "치료" 또는 "치료하는"은 임상 결과를 포함한 유익한 또는 목적하는 결과를 얻기 위한 접근법이다. 본 발명의 목적상, 유익한 또는 목적하는 임상 결과는 하기 중 1개 이상을 포함하나 이에 제한되지는 않는다: 질환으로부터 유발되는 1종 이상의 증상의 완화, 질환 정도의 감소, 질환의 안정화 (예를 들어, 질환 악화의 예방 또는 지연), 질환 확산 (예를 들어, 전이)의 예방 또는 지연, 질환 재발생의 예방 또는 지연, 질환 진행의 지연 또는 둔화, 질환 상태의 호전, 질환 완화 (부분 또는 총)의 제공, 질환 치료에 요구되는 1종 이상의 다른 의약의 용량의 감소, 질환 진행의 지연, 삶의 질의 증가 또는 개선, 체중 증가의 증가, 및/또는 생존 연장. 또한, "치료"에는 암의 병리학적 결과 (예컨대, 예를 들어, 종양 부피)의 감소가 포괄된다. 본 발명의 방법은 치료의 이들 측면 중 어느 1개 이상을 고려한다.
- [0044] 용어 "재발생", "재발" 또는 "재발성"은 질환 소멸의 임상 평가 후 암 또는 질환의 복귀를 지칭한다. 원격 전이 또는 국부 재발생의 진단은 재발로 간주될 수 있다.
- [0045] 용어 "불응성" 또는 "저항성"은 암 또는 질환이 치료에 반응하지 않은 것을 지칭한다.
- [0046] T 세포와 관련하여 본원에 사용된 "활성화"는 검출가능한 세포 증식을 유도하기 위해 충분히 자극된 T 세포의 상태를 지칭한다. 활성화는 또한 유도된 시토카인 생산 및 검출가능한 이펙터 기능과 연관될 수 있다.
- [0047] 용어 "항체 모이어티"는 전장 항체 및 그의 항원-결합 단편을 포함한다. 전장 항체는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함한다. 경쇄 및 중쇄의 가변 영역은 항원 결합을 담당한다. 두 쇄 내의 가변 영역은 일반적으로 상보성 결정 영역 (CDR)으로 불리는 3개의 고도 가변성 루프를 함유한다 (LC-CDR1, LC-CDR2 및 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 (LC) CDR, HC-CDR1, HC-CDR2 및 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 (HC) CDR). 본원에 개시된 항체 및 항원-결합 단편에 대한 CDR 경계는 카바트(Kabat), 코티아(Chothia) 또는 알-라지카니(Al-Lazikani)의 규정에 의해 정의 또는 확인될 수 있다 (Al-Lazikani 1997; Chothia 1985; Chothia 1987; Chothia 1989; Kabat 1987; Kabat 1991). 중쇄 또는 경쇄의 3개의 CDR은, CDR보다 더 고도로 보존되며 초가변 루프를 지지하기 위해 스캐폴드를 형성하는 프레임워크 영역 (FR)으로 공지된 플랭킹 스트레치 사이에 놓여있다. 중쇄 및 경쇄의 불변 영역은 항원 결합에 수반되지는 않지만, 다양한 이펙터 기능을 나타낸다. 항체는 그의 중쇄의 불변 영역의 아미노산 서열에 기초하여 부류로 할당된다. 항체의 5개의 주요 부류 또는 이소형은 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이며, 이들은 각각 α , δ , ϵ , γ 및 μ 중쇄의 존재를 특징으로 한다. 주요 항체 부류 중 몇몇은 하위부류, 예컨대 IgG1 ($\gamma 1$ 중쇄), IgG2 ($\gamma 2$ 중쇄), IgG3 ($\gamma 3$ 중쇄), IgG4 ($\gamma 4$ 중쇄), IgA1 ($\alpha 1$ 중쇄) 또는 IgA2 ($\alpha 2$ 중쇄)로 분류된다.
- [0048] 본원에 사용된 용어 "항원-결합 단편"은, 예를 들어 디아바디, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 단편, 디술피드 안정화된 Fv 단편 (dsFv), (dsFv)₂, 이중특이적 dsFv (dsFv-dsFv'), 디술피드 안정화된 디아바디 (ds 디아바디), 단일-쇄 항체 분자 (scFv), scFv 이량체 (2가 디아바디), 1개 이상의 CDR을 포함하는 항체의 일부분으로부터 형성된 다중특이적 항체, 낙타화 단일 도메인 항체, 나노바디, 도메인 항체, 2가 도메인 항체, 또는 항원에 결합하지만 완전한 항체 구조를 포함하지는 않는 임의의 다른 항체 단편을 포함한 항체 단편을 지칭한다. 항원-결합 단편은 모 항체 또는 모 항체 단편 (예를 들어, 모 scFv)이 결합하는 동일한 항원에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항원-결합 단편은 1개 이상의 상이한 인간 항체로부터의 프레임워크 영역에 그래프트된, 특정한 인간 항체로부터의 1개 이상의 CDR을 포함할 수 있다.
- [0049] 본원에 사용된 용어 "에피토프"는 항체 또는 항체 모이어티가 결합하는 항원 상의 특정 원자단 또는 아미노산을 지칭한다. 2개의 항체 또는 항체 모이어티는 이들이 항원에 대한 경쟁적 결합을 나타내는 경우에 항원 내의 동일한 에피토프에 결합할 수 있다.
- [0050] 본원에 사용된 바와 같이, 제1 항체 모이어티는, 제1 항체 모이어티가 제2 항체 모이어티의 표적 AMC 결합을 등

몰 농도의 제1 항체 모이어티의 존재 하에서 적어도 약 50% (예컨대 적어도 약 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 중 어느 것) 억제하는 경우에, 표적 AMC에의 결합에 대해 제2 항체 모이어티와 "경쟁"하며, 또는 그 반대의 경우도 마찬가지이다. 그의 교차-경쟁에 기초하여 항체를 "비닝"하는 고처리량 방법이 PCT 공개 번호 WO 03/48731에 기재되어 있다.

[0051] 본원에 사용된 용어 "특이적으로 결합하다" 또는 "에 특이적인"은 생물학적 분자를 포함한 이중 분자 집단의 존재 하에서 표적의 존재를 결정하게 해주는 측정가능하고 재현가능한 상호작용, 예컨대 표적과 항체 또는 항체 모이어티 사이의 결합을 지칭한다. 예를 들어, 표적 (에피토프일 수 있음)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체 모이어티는 다른 표적에 결합하는 경우보다 더 큰 친화도, 결합력으로, 더 용이하게 맞/또는 더 긴 지속기간 동안 상기 표적에 결합하는 항체 또는 항체 모이어티이다. 일부 실시양태에서, 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체 모이어티는 다른 표적에 대한 그의 결합 친화도의 적어도 약 10배인 결합 친화도로 항원 (예를 들어 AFP 펩티드/MHC 부류 I 단백질 복합체)의 1개 이상의 항원 결정기와 반응한다.

[0052] 본원에 사용된 "단리된" 항-AMC 구축물은 (1) 자연에서 발견된 단백질과 연관되지 않거나, (2) 동일한 공급원로부터의 다른 단백질이 없거나, (3) 상이한 종으로부터의 세포에 의해 발현되거나, 또는 (4) 자연에서 발생하지 않는 항-AMC 구축물을 지칭한다.

[0053] 본원에 사용된 용어 "단리된 핵산"은 게놈, cDNA 또는 합성 기원의 핵산, 또는 그의 일부 조합을 의미하는 것으로 의도되며, 그의 기원에 의해 "단리된 핵산"은 (1) "단리된 핵산"이 자연에서 발견되는 폴리뉴클레오타이드의 모두 또는 일부분과 연관되지 않거나, (2) 자연에서 연결되지 않는 폴리뉴클레오타이드에 작동가능하게 연결되거나, 또는 (3) 보다 큰 서열의 일부로서 자연에서 발생하지 않는다.

[0054] 본원에 사용된 용어 "CDR" 또는 "상보성 결정 영역"은 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드 둘 다의 가변 영역 내에서 발견되는 비-인접 항원 결합 부위를 의미하는 것으로 의도된다. 이들 특정한 영역은 문헌 [Kabat et al., J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977); Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of proteins of immunological interest" (1991); Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); 및 MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996)]에 기재되었으며, 여기서 정의는 서로에 대해 비교하였을 때 아미노산 잔기의 중첩 또는 하위세트를 포함한다. 그럼에도 불구하고, 항체 또는 그라프트된 항체 또는 그의 변이체의 CDR을 지칭하기 위한 정의의 적용은 본원에 정의 및 사용된 바와 같은 용어의 범주 내인 것으로 의도된다. 각각의 상기 인용된 참고문헌에 의해 정의된 바와 같은 CDR을 포괄하는 아미노산 잔기가 비교로서 하기 표 1에 제시되어 있다.

[0055] 표 1: CDR 정의

	카바트 ¹	코티아 ²	맥칼럼 ³
V _H CDR1	31-35	26-32	30-35
V _H CDR2	50-65	53-55	47-58
V _H CDR3	95-102	96-101	93-101
V _L CDR1	24-34	26-32	30-36
V _L CDR2	50-56	50-52	46-55
V _L CDR3	89-97	91-96	89-96

[0056] ¹잔기 넘버링은 문헌 [Kabat et al., 상기문헌]의 명명법을 따른다.

[0057] ²잔기 넘버링은 문헌 [Chothia et al., 상기문헌]의 명명법을 따른다.

[0058] ³잔기 넘버링은 문헌 [MacCallum et al., 상기문헌]의 명명법을 따른다.

[0060] 용어 "키메라 항체"는, 중쇄 및/또는 경쇄의 일부분이 특정한 종으로부터 유래되거나 특정한 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 그에 상동하면서 쇠(들)의 나머지는 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 그에 상동인 항체, 뿐만 아니라 본 발명의 생물학적 활성을 나타내는 한 이러한 항체의 단편을 포함한다 (미국 특허 번호 4,816,567; 및 문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)] 참조).

[0061] 항체 또는 항체 모이어티와 관련하여 용어 "반합성"은 항체 또는 항체 모이어티가 1개 이상의 자연 발생 서열 및 1개 이상의 비-자연 발생 (즉, 합성) 서열을 갖는다는 것을 의미한다.

- [0062] "Fv"는 완전한 항원-인식 및 -결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 이 단편은 1개의 중쇄 및 1개의 경쇄 가변 영역 도메인이 단단하게 비-공유 회합된 이량체로 이루어진다. 이들 2개의 도메인의 폴딩으로부터 6개의 초가변 루프 (중쇄 및 경쇄로부터 각각 3개의 루프)가 발생하며, 이는 항원 결합을 위한 아미노산 잔기를 제공하고 항체에게 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 심지어 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 단지 3개의 CDR만을 포함하는 Fv의 절반)도 전체 결합 부위보다 친화도가 낮은 하지만 항원을 인식하고 결합하는 능력을 갖는다.
- [0063] "sFv" 또는 "scFv"로도 약칭되는 "단일-쇄 Fv"는 단일 폴리펩티드 쇠로 연결된 V_H 및 V_L 항체 도메인을 포함하는 항체 단편이다. 일부 실시양태에서, scFv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합을 위한 목적하는 구조를 형성할 수 있게 하는, V_H 및 V_L 도메인 사이의 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. scFv의 검토를 위해, 문헌 [Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조한다.
- [0064] 용어 "디아바디"는 전형적으로 V_H 및 V_L 도메인 사이의 짧은 링커 (예컨대 약 5 내지 약 10개의 잔기)로 scFv 단편 (상기 단락 참조)을 구축하여 V 도메인의 쇠내 쌍형성이 아닌 쇠간 쌍형성을 달성하여 2가 단편, 즉 2개의 항원-결합 부위를 갖는 단편을 생성함으로써 제조된 작은 항체 단편을 지칭한다. 이중특이적 디아바디는 2개의 항체의 V_H 및 V_L 도메인이 상이한 폴리펩티드 쇠 상에 존재하는 2개의 "가교" scFv 단편의 이중이량체이다. 디아바디는, 예를 들어 EP 404,097; WO 93/11161; 및 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)]에 보다 상세하게 기재되어 있다.
- [0065] 비-인간 (예를 들어, 설치류) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 항체로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우에, 인간화 항체는 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)이며, 여기서 수용자의 초가변 영역 (HVR)으로부터의 잔기가 목적하는 항체 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 마우스, 래트, 토끼 또는 비-인간 영장류와 같은 비-인간 종 (공여자 항체)의 초가변 영역으로부터의 잔기에 의해 대체된 것이다. 일부 경우에, 인간 이뮤노글로불린의 프레임워크 영역 (FR) 잔기는 상응하는 비-인간 잔기에 의해 대체된다. 게다가, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 항체 성능을 추가로 정밀화하기 위해 이루어진다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 1개 및 전형적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프는 비-인간 이뮤노글로불린의 것에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 이뮤노글로불린 서열의 것이다. 인간화 항체는 또한 임의로 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부분, 전형적으로 인간 이뮤노글로불린의 것을 포함할 것이다. 추가의 세부사항에 대해서는, 문헌 [Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); 및 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)]을 참조한다.
- [0066] 본원에서 확인된 폴리펩티드 및 항체 서열에 관한 "퍼센트 (%) 아미노산 서열 동일성" 또는 "상동성"은 서열 동일성의 일부로서의 임의의 보존적 치환을 고려하여 서열을 정렬시킨 후, 비교되는 폴리펩티드 내의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 중의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 퍼센트 아미노산 서열 동일성을 결정하기 위한 목적의 정렬은, 예를 들어 공중 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN, 메갈라인 (DNASTAR) 또는 MUSCLE 소프트웨어를 사용하여, 관련 기술분야의 기술 내인 다양한 방식으로 달성될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 비교되는 서열의 전장에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여, 정렬을 측정하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 그러나, 본원의 목적상, % 아미노산 서열 동일성 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 MUSCLE를 사용하여 생성된다 (Edgar, R.C., Nucleic Acids Research 32(5):1792-1797, 2004; Edgar, R.C., BMC Bioinformatics 5(1):113, 2004).
- [0067] 용어 "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 기재하기 위해 사용된다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 FcR은 IgG 항체 (γ 수용체)에 결합하는 것이고, Fc γ RI, Fc γ RRI 및 Fc γ RIII 하위부류의 수용체를 포함하며, 이는 이들 수용체의 대립유전자 변이체 및 교대로 스플라이싱된 형태를 포함한다. Fc γ RRI 수용체는 Fc γ RIIA ("활성화 수용체") 및 Fc γ RIIB ("억제 수용체")를 포함하며, 이는 주로 그의 세포질 도메인에서 상이한 유사한 아미노산 서열을 갖는다. 활성화 수용체 Fc γ RIIA는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기재 활성화 모티프 (ITAM)를 함유한다. 억제 수용체 Fc γ RIIB는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기재 억제 모티프 (ITIM)를 함유한다 (문헌 [M. in Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)]의 검토 참조). 용어는 동종이형, 예컨대 Fc γ RIIIA 동종이형: Fc γ RIIIA-Phe158, Fc γ RIIIA-Val158, Fc γ RIIA-R131 및/또는 Fc γ RIIA-H131을 포함한다. FcR은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92

(1991); Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994); 및 de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)]에서 검토된다. 향후 확인될 것을 포함한 다른 FcR이 본원의 용어 "FcR"에 포괄된다. 용어는 또한, 모체 IgG를 태아로 전달하는 것을 담당하는 신생아 수용체인 FcRn을 포함한다 (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) 및 Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)).

[0068] 용어 "FcRn"은 신생아 Fc 수용체 (FcRn)를 지칭한다. FcRn은 주요 조직적합성 복합체 (MHC)와 구조적으로 유사하고 $\beta 2$ -마이크로글로불린에 비공유 결합된 α -쇄로 이루어진다. 신생아 Fc 수용체 FcRn의 다중 기능은 문헌 [Ghetie and Ward (2000) Annu. Rev. Immunol. 18, 739-766]에서 검토된다. FcRn은 모체로부터 태아로의 이뮤노글로불린 IgG의 수동 전달 및 혈청 IgG 수준의 조절에서 소정의 역할을 한다. FcRn은 세포 내에서 및 세포를 가로질러 둘 다에서 무손상 형태의 음세포작용된 IgG에 결합하여 수송하고 이를 디폴트 분해 경로로부터 구제하는 샬비지 수용체로서 작용할 수 있다.

[0069] 인간 IgG Fc 영역의 "CH1 도메인" ("H1" 도메인의 "C1"로도 지칭됨)은 통상적으로 약 아미노산 118로부터 약 아미노산 215 (EU 넘버링 시스템)에 이른다.

[0070] "힌지 영역"은 일반적으로 인간 IgG1의 Glu216으로부터 Pro230에 이르는 것으로 정의된다 (Burton, Molec. Immunol. 22:161-206 (1985)). 다른 IgG 이소형의 힌지 영역은 중쇄간 S-S 결합을 형성하는 첫번째 및 마지막 시스테인 잔기를 동일한 위치에 배치하여 IgG1 서열과 정렬될 수 있다.

[0071] 인간 IgG Fc 영역의 "CH2 도메인" ("H2" 도메인의 "C2"로도 지칭됨)은 통상적으로 약 아미노산 231로부터 약 아미노산 340에 이른다. CH2 도메인은 또 다른 도메인과 밀접하게 쌍형성되지 않는다는 점에서 고유하다. 오히려, 2개의 N-연결된 분지형 탄수화물 쇄가 무손상 천연 IgG 분자의 2개의 CH2 도메인 사이에 놓여있다. 탄수화물이 도메인-도메인 쌍형성에 대한 대안을 제공하고 CH2 도메인의 안정화를 도울 수 있는 것으로 추측되었다. 문헌 [Burton, Molec Immunol. 22:161-206 (1985)].

[0072] "CH3 도메인" ("C2" 또는 "H3" 도메인으로도 지칭됨)은 Fc 영역에서 CH2 도메인에 대해 C-말단인 잔기의 스트레치 (즉, 항체 서열의 약 아미노산 잔기 341에서 C-말단 단부, 전형적으로 IgG의 아미노산 잔기 446 또는 447)를 포함한다.

[0073] "기능적 Fc 단편"은 천연 서열 Fc 영역의 "이펙터 기능"을 지닌다. 예시적인 "이펙터 기능"은 C1q 결합; 보체의존성 세포독성 (CDC); Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC); 식세포작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어 B 세포 수용체; BCR)의 하향 조절 등을 포함한다. 이러한 이펙터 기능은 일반적으로 Fc 영역이 결합 도메인 (예를 들어 항체 가변 도메인)과 조합될 것을 요구하고, 관련 기술분야에 공지된 다양한 검정을 사용하여 평가될 수 있다.

[0074] FcR 결합 친화도 또는 ADCC 활성이 "변경된" 변이체 IgG Fc를 갖는 항체는 모 폴리펩티드 또는 천연 서열 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드와 비교하여 증진 또는 감소된 FcR 결합 활성 (예를 들어, Fc γ R 또는 FcRn) 및/또는 ADCC 활성을 갖는 것이다. FcR에 대한 "증가된 결합을 나타내는" 변이체 Fc는 모 폴리펩티드 또는 천연 서열 IgG Fc보다 더 높은 친화도 (예를 들어, 더 낮은 겉보기 K_d 또는 IC_{50} 값)로 적어도 1개의 FcR에 결합한다. 일부 실시양태에 따르면, 모 폴리펩티드와 비교하여 결합 개선은 약 3배, 예컨대 약 5, 10, 25, 50, 60, 100, 150, 200 또는 최대 500배 중 어느 것, 또는 약 25% 내지 1000%의 결합 개선이다. FcR에 대한 "감소된 결합을 나타내는" 폴리펩티드 변이체는 모 폴리펩티드보다 더 낮은 친화도 (예를 들어, 더 높은 겉보기 K_d 또는 더 높은 IC_{50} 값)로 적어도 1개의 FcR에 결합한다. 모 폴리펩티드와 비교하여 결합 감소는 약 40% 또는 그 초과에 결합 감소될 수 있다.

[0075] "항체-의존성 세포-매개 세포독성" 또는 "ADCC"는 특정 세포독성 세포 (예를 들어, 자연 킬러 (NK) 세포, 호중구 및 대식세포) 상에 존재하는 Fc 수용체 (FcR)에 결합된 분비 Ig가 이들 세포독성 이펙터 세포로 하여금 항원-보유 표적 세포에 특이적으로 결합한 후에 표적 세포를 세포독성으로 사멸시킬 수 있게 하는 세포독성 형태를 지칭한다. 항체는 세포독성 세포를 "무장"하고 이러한 사멸에 절대적으로 요구된다. ADCC를 매개하기 위한 1차 세포인 NK 세포는 단지 Fc γ RIII만을 발현하는 반면, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII를 발현한다. 조혈 세포 상에서의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991)]의 464페이지의 표 3에 요약되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해, 미국 특허 번호 5,500,362 또는 5,821,337에 기재된 것과 같은 시험관내 ADCC 검정이 수행될 수 있다. 이러한 검정에 유용한 이펙터 세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및 자연 킬러 (NK) 세포를 포함한다. 대안적으로 또는 추가적으로, 관심 분자의 ADCC 활성은 생체 내에서, 예를 들어 문헌 [Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998)]에 기재된 것과 같은 동물 모델에서 평

가될 수 있다.

- [0076] 야생형 IgG Fc를 갖는 폴리펩티드 또는 모 폴리펩티드보다 더 효과적으로 인간 이펙터 세포의 존재 하에서 항체-의존성 세포-매개 세포 독성 (ADCC)을 매개하거나 "증가된 ADCC를 나타내는" 변이체 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드는, 검정에서 변이체 Fc 영역을 갖는 폴리펩티드 및 야생형 Fc 영역을 갖는 폴리펩티드 (또는 모 폴리펩티드)의 양이 본질적으로 동일한 경우에, 시험관내 또는 생체내에서 ADCC를 실질적으로 보다 효과적으로 매개하는 것이다. 일반적으로, 이러한 변이체는 관련 기술분야에 공지된 임의의 시험관내 ADCC 검정, 예컨대, 예를 들어 동물 모델 등에서 ADCC 활성을 결정하기 위한 검정 또는 방법을 사용하여 확인될 것이다. 일부 실시양태에서, 변이체는 야생형 Fc (또는 모 폴리펩티드)보다 약 5배 내지 약 100배, 예를 들어 약 25 내지 약 50배 더 효과적으로 ADCC를 매개한다.
- [0077] "보체 의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 보체의 존재 하에서의 표적 세포의 용해를 지칭한다. 전형적 보체 경로의 활성화는 보체 시스템의 제1 성분 (C1q)이 동족 항원에 결합된 (적절한 하위부류의) 항체에 결합하는 것에 의해 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)]에 기재된 바와 같은 CDC 검정이 수행될 수 있다. Fc 영역 아미노산 서열이 변경되고 C1q 결합 능력이 증가 또는 감소된 폴리펩티드 변이체가 미국 특허 번호 6,194,551B1 및 W099/51642에 기재되어 있다. 이들 특허 공개의 내용은 본원에 참조로 구체적으로 포함된다. 또한, 문헌 [Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)]을 참조한다.
- [0078] 달리 명시되지 않는 한, "아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열"은, 서로 축중성 버전이고 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 모든 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 어구 단백질 또는 RNA를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 또한 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 일부 버전에서 인트론(들)을 함유할 수 있는 정도로 인트론을 포함할 수 있다.
- [0079] 용어 "작동가능하게 연결된"은 조절 서열과 이중 핵산 서열 사이의 기능적 연결로 후자의 발현을 유발하는 것을 지칭한다. 예를 들어, 제1 핵산 서열은 제1 핵산 서열이 제2 핵산 서열과 기능적 관계로 배치되는 경우에 제2 핵산 서열과 작동가능하게 연결된 것이다. 예를 들어, 프로모터는 프로모터가 코딩 서열의 전사 또는 발현에 영향을 미치는 경우에 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 것이다. 일반적으로, 작동가능하게 연결된 DNA 서열은 인접하고, 2개의 단백질 코딩 영역을 연결하기 위해 필요한 경우에, 동일한 리딩 프레임 내에 있다.
- [0080] "상동"은 2개의 폴리펩티드 사이 또는 2개의 핵산 분자 사이의 서열 유사성 또는 서열 동일성을 지칭한다. 2개의 비교된 서열 둘 다에서의 한 위치가 동일한 염기 또는 아미노산 단량체 서브유닛에 의해 점유된 경우에, 예를 들어 2개의 DNA 분자 각각에서의 한 위치가 아데닌에 의해 점유된다면, 분자들은 그 위치에서 상동이다. 2개의 서열 사이의 상동성 퍼센트는 2개의 서열에 의해 공유되는 매칭 또는 상동 위치의 수를 비교된 위치의 수로 나눈 것에 100을 곱한 함수이다. 예를 들어, 2개의 서열 내의 위치 10개 중 6개가 매칭 또는 상동이라면, 2개의 서열은 60% 상동이다. 예를 들어, DNA 서열 ATTGCC 및 TATGGC는 50% 상동성을 공유한다. 일반적으로, 비교는 2개의 서열이 최대 상동성을 제공하도록 정렬되는 경우에 이루어진다.
- [0081] 본원에 개시된 바와 같은 항-AMC 구축물 또는 조성물의 "유효량"은 구체적으로 언급된 목적을 수행하기에 충분한 양이다. "유효량"은 실험적으로 및 언급된 목적과 관련된 공지된 방법에 의해 결정될 수 있다.
- [0082] 용어 "치료 유효량"은 개체에서 질환 또는 장애를 "치료"하는데 효과적인, 본원에 개시된 바와 같은 항-AMC 구축물 또는 조성물의 양을 지칭한다. 암의 경우에, 본원에 개시된 바와 같은 항-AMC 구축물 또는 조성물의 치료 유효량은 암 세포 수를 감소시키고/거나; 종양 크기 또는 중량을 감소시키고/거나; 암 세포가 말초 기관 내로 침윤되는 것을 억제하고/거나 (즉, 어느 정도 둔화 및 바람직하게는 정지시킴); 종양 전이를 억제하고/거나 (즉, 어느 정도 둔화 및 바람직하게는 정지시킴); 종양 성장을 어느 정도 억제하고/거나; 암과 연관된 증상 중 1종 이상을 어느 정도 경감시킬 수 있다. 본원에 개시된 바와 같은 항-AMC 구축물 또는 조성물이 기존 암 세포의 성장을 방지하고/거나 사멸시킬 수 있는 정도까지, 이는 세포증식억제성 및/또는 세포독성일 수 있다. 일부 실시양태에서, 치료 유효량은 성장 억제량이다. 일부 실시양태에서, 치료 유효량은 환자의 생존을 연장하는 양이다. 일부 실시양태에서, 치료 유효량은 환자의 무진행 생존을 개선시키는 양이다.
- [0083] 본원에 사용된 "제약상 허용되는" 또는 "약리학상 상용성인"은 생물학적으로 또는 달리 바람직하지 않은 것이 아닌 물질을 의미하며, 예를 들어 물질은 어떠한 유의한 바람직하지 않은 생물학적 효과도 야기하지 않으면서 또는 물질이 함유된 조성물의 다른 성분 중 어느 것과도 유해한 방식으로 상호작용하지 않으면서 환자에게 투여되는 제약 조성물 내로 혼입될 수 있다. 제약상 허용되는 담체 또는 부형제는 바람직하게는 독성학적 및 제조

시험의 요구 표준을 충족시키고/거나 미국 식품 의약품국에 의해 작성된 불활성 성분 지침에 포함된다.

- [0084] 본원에 사용된 경우의 용어 "표지"는 항-AMC 항체 모이어티에 직접적으로 또는 간접적으로 접합될 수 있는 검출 가능한 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 표지는 그 자체가 검출가능할 수 있거나 (예를 들어, 방사성동위원소 표지 또는 형광 표지), 또는 효소적 표지의 경우에, 검출가능한 기질 화합물 또는 조성물의 화학적 변형을 촉매할 수 있다.
- [0085] 본원에 기재된 본 발명의 실시양태는 실시양태로 "이루어진" 및/또는 "본질적으로 이루어진" 것을 포함한다는 것이 이해된다.
- [0086] 본원에서 값 또는 파라미터에 대해 언급되는 "약"은 그 값 또는 파라미터 자체에 대해 지시된 변동을 포함 (및 기재)한다. 예를 들어, "약 X"를 언급하는 기재는 "X"의 기재를 포함한다.
- [0087] 본원에 사용된 값 또는 파라미터에 대해 언급되는 "아닌"은 일반적으로 값 또는 파라미터 "이외의 다른"을 의미 및 기재한다. 예를 들어, 방법이 유형 X의 암을 치료하는데 사용되지 않는다는 것은 방법이 X 이외의 다른 유형의 암을 치료하는데 사용된다는 것을 의미한다.
- [0088] 본원 및 첨부된 청구범위에서 사용된 단수 형태는 문맥이 달리 명백하게 지시하지 않는 한 복수 지시대상을 포함한다.
- [0089] 항-AMC 구축물
- [0090] 한 측면에서, 본 발명은 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체 ("AFP/MHC 부류 I 복합체" 또는 "AMC")에 특이적으로 결합하는 항체 모이어티를 포함하는 AFP/MHC 부류 I 복합체-특이적 구축물 (항-AMC 구축물)을 제공한다. 항-AMC 구축물의 특이성은 AMC에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티, 예컨대 전장 항체 또는 그의 항원-결합 단편으로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 모이어티 (예컨대 항체 모이어티)에 대한 언급은 모이어티가 AMC에 a) 전장 AFP, 유리 AFP 펩티드, 펩티드에 결합되지 않은 MHC 부류 I 단백질, 및 비-AFP 펩티드에 결합된 MHC 부류 I 단백질 각각에 대한 그의 결합 친화도의 적어도 약 10배 (예를 들어 적어도 약 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000배 또는 그 초과 중 어느 것 포함)인 친화도로; 또는 b) 전장 AFP, 유리 AFP 펩티드, 펩티드에 결합되지 않은 MHC 부류 I 단백질, 및 비-AFP 펩티드에 결합된 MHC 부류 I 단백질 각각에의 결합에 대한 그의 K_d 의 약 1/10배 이하 (예컨대 약 1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/50, 1/75, 1/100, 1/200, 1/300, 1/400, 1/500, 1/750, 1/1000배 또는 그 미만 중 어느 것 이하)인 K_d 로 결합한다는 것을 의미한다. 결합 친화도는 관련 기술분야에 공지된 방법, 예컨대 ELISA, 형광 활성화 세포 분류 (FACS) 분석, 또는 방사선면역침전 검정 (RIA)에 의해 결정될 수 있다. K_d 는 관련 기술분야에 공지된 방법, 예컨대, 예를 들어 비아코어 (Biacore) 기기를 이용하는 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 검정, 또는 예를 들어 사피딘(Sapidyne) 기기를 이용하는 동역학적 배제 검정 (KinExA)에 의해 결정될 수 있다.
- [0091] 고려되는 항-AMC 구축물은, 예를 들어 전장 항-AMC 항체, 다중-특이적 (예컨대 이중특이적) 항-AMC 분자, 항-AMC 키메라 항원 수용체 (CAR), 및 항-AMC 면역접합체를 포함한다.
- [0092] 예를 들어, 일부 실시양태에서, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 항-AMC 구축물 (예컨대 단리된 항-AMC 구축물)이 제공된다. 일부 실시양태에서, AFP 펩티드는 AFP158 (서열식별번호: 4)이다. 일부 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질은 HLA-A*02이다. 일부 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질은 HLA-A*02:01 (진뱅크(GenBank) 수탁 번호: AA020853)이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 비-자연 발생이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 전장 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 다중-특이적 (예컨대 이중특이적) 분자이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 키메라 항원 수용체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 면역접합체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 AMC에 약 0.1 pM 내지 약 500 nM (예컨대 약 0.1 pM, 1.0 pM, 10 pM, 50 pM, 100 pM, 500 pM, 1 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 또는 500 nM 중 어느 것 (이들 값 사이의 임의의 범위 포함))의 K_d 로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 MHC 부류 I 단백질 및 1개의 아미노산 치환 (예컨대 보존적 아미노산 치환)을 갖는 AFP 펩티드의 변이체를 포함하는 적어도 1개 (예컨대 적어도 2, 3, 4, 5, 또는 6개 중 어느 것)의 복합체와 교차-반응한다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질의 상이한 하위유형을 포함하는 적어도 1개 (예컨대 적어도 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 복합체와 교차-반응한다.
- [0093] 일부 실시양태에서, AFP158 펩티드 (서열식별번호: 4) 및 HLA-A*02:01을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하

는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 항-AMC 구축물이 제공된다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 비-자연 발생이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 전장 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 다중-특이적 (예컨대 이중특이적) 분자이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 키메라 항원 수용체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 면역접합체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 AMC에 약 0.1 pM 내지 약 500 nM (예컨대 약 0.1 pM, 1.0 pM, 10 pM, 50 pM, 100 pM, 500 pM, 1 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 또는 500 nM 중 어느 것 (이들 값 사이의 임의의 범위 포함))의 K_d 로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 MHC 부류 I 단백질 및 1개의 아미노산 치환 (예컨대 보존적 아미노산 치환)을 갖는 AFP 펩티드의 변이체를 포함하는 적어도 1개 (예컨대 적어도 2, 3, 4, 5, 또는 6개 중 어느 것)의 복합체와 교차-반응한다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질의 상이한 하위유형을 포함하는 적어도 1개 (예컨대 적어도 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 복합체와 교차-반응한다.

[0094]

일부 실시양태에서, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 항-AMC 구축물이 제공되고, 여기서 항-AMC 항체 모이어티는 i) G-F/Y-S/T-F-D/S/T-D/N-S-Y/A-A/G/W의 아미노산 서열 (서열식별번호: 87)을 포함하는 HC-CDR1, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, I/S-K/S-X-H/Y-X-G-X-T의 아미노산 서열 (서열식별번호: 88)을 포함하는 HC-CDR2, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 A/G-X-W/Y-Y-X-X-X-F/Y-D의 아미노산 서열 (서열식별번호: 89)을 포함하는 HC-CDR3; 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 및 ii) S/T-G/S-D/N-I/V-A/G-A/S/V-X-H/Y의 아미노산 서열 (서열식별번호: 120)을 포함하는 LC-CDR1, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 Q-S/T-Y/W-D/T-S/T-A/S의 아미노산 서열 (서열식별번호: 121)을 포함하는 LC-CDR3, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하며; 여기서 X는 임의의 아미노산일 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 비-자연 발생이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 전장 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 다중-특이적 (예컨대 이중특이적) 분자이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 키메라 항원 수용체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 면역접합체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 AMC에 약 0.1 pM 내지 약 500 nM (예컨대 약 0.1 pM, 1.0 pM, 10 pM, 50 pM, 100 pM, 500 pM, 1 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 또는 500 nM 중 어느 것 (이들 값 사이의 임의의 범위 포함))의 K_d 로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 MHC 부류 I 단백질 및 1개의 아미노산 치환 (예컨대 보존적 아미노산 치환)을 갖는 AFP 펩티드의 변이체를 포함하는 적어도 1개 (예컨대 적어도 2, 3, 4, 5, 또는 6개 중 어느 것)의 복합체와 교차-반응한다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질의 상이한 하위유형을 포함하는 적어도 1개 (예컨대 적어도 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 복합체와 교차-반응한다.

[0095]

일부 실시양태에서, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 항-AMC 구축물이 제공되고, 여기서 항-AMC 항체 모이어티는 i) 서열식별번호: 57-66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진) HC-CDR1; 또는 최대 약 5개 (예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체; 서열식별번호: 67-76 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진) HC-CDR2; 또는 최대 약 5개 (예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체; 및 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진) HC-CDR3; 또는 최대 약 5개 (예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 및 ii) 서열식별번호: 90-99 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진) LC-CDR1; 또는 최대 약 5개 (예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체; 서열식별번호: 100-109 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진) LC-CDR2; 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체; 및 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진) LC-CDR3; 또는 최대 약 5개 (예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 경쇄 가변 도메인 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 비-자연 발생이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 전장 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 다중-특이적 (예컨대 이중특이적) 분자이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 키메라 항원 수용체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 면역접합체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 AMC에 약

0.1 pM 내지 약 500 nM (예컨대 약 0.1 pM, 1.0 pM, 10 pM, 50 pM, 100 pM, 500 pM, 1 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 또는 500 nM 중 어느 것 (이들 값 사이의 임의의 범위 포함))의 K_d 로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 MHC 부류 I 단백질 및 1개의 아미노산 치환 (예컨대 보존적 아미노산 치환)을 갖는 AFP 펩티드의 변이체를 포함하는 적어도 1개 (예컨대 적어도 2, 3, 4, 5, 또는 6개 중 어느 것)의 복합체와 교차-반응한다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질의 상이한 하위유형을 포함하는 적어도 1개 (예컨대 적어도 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 복합체와 교차-반응한다.

[0096]

일부 실시양태에서, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 항-AMC 구축물이 제공되고, 여기서 항-AMC 항체 모이어티는 i) 서열식별번호: 57-66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진) HC-CDR1; 서열식별번호: 67-76 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진) HC-CDR2; 및 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진) HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 또는 HC-CDR 서열에서 최대 약 5개 (예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체; 및 ii) 서열식별번호: 90-99 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진) LC-CDR1; 서열식별번호: 100-109 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진) LC-CDR2; 및 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진) LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인 서열; 또는 LC-CDR 서열에서 최대 약 5개 (예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 비-자연 발생이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 전장 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 다중-특이적 (예컨대 이중특이적) 분자이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 키메라 항원 수용체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 면역접합체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 AMC에 약 0.1 pM 내지 약 500 nM (예컨대 약 0.1 pM, 1.0 pM, 10 pM, 50 pM, 100 pM, 500 pM, 1 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 또는 500 nM 중 어느 것 (이들 값 사이의 임의의 범위 포함))의 K_d 로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 MHC 부류 I 단백질 및 1개의 아미노산 치환 (예컨대 보존적 아미노산 치환)을 갖는 AFP 펩티드의 변이체를 포함하는 적어도 1개 (예컨대 적어도 2, 3, 4, 5, 또는 6개 중 어느 것)의 복합체와 교차-반응한다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질의 상이한 하위유형을 포함하는 적어도 1개 (예컨대 적어도 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 복합체와 교차-반응한다.

[0097]

일부 실시양태에서, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 항-AMC 구축물이 제공되고, 여기서 항-AMC 항체 모이어티는 서열식별번호: 17-26 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진) 중쇄 가변 도메인, 또는 적어도 약 95% (예를 들어 적어도 약 96%, 97%, 98%, 또는 99% 중 어느 것) 서열 동일성을 갖는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 27-36 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진) 경쇄 가변 도메인, 또는 적어도 약 95% (예를 들어 적어도 약 96%, 97%, 98%, 또는 99% 중 어느 것) 서열 동일성을 갖는 그의 변이체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 비-자연 발생이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 전장 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 다중-특이적 (예컨대 이중특이적) 분자이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 키메라 항원 수용체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 면역접합체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 AMC에 약 0.1 pM 내지 약 500 nM (예컨대 약 0.1 pM, 1.0 pM, 10 pM, 50 pM, 100 pM, 500 pM, 1 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 또는 500 nM 중 어느 것 (이들 값 사이의 임의의 범위 포함))의 K_d 로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 MHC 부류 I 단백질 및 1개의 아미노산 치환 (예컨대 보존적 아미노산 치환)을 갖는 AFP 펩티드의 변이체를 포함하는 적어도 1개 (예컨대 적어도 2, 3, 4, 5, 또는 6개 중 어느 것)의 복합체와 교차-반응한다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질의 상이한 하위유형을 포함하는 적어도 1개 (예컨대 적어도 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 복합체와 교차-반응한다.

[0098]

일부 실시양태에서, 표적 AFP/MHC 부류 I 복합체와의 결합에 대해 본원에 기재된 임의의 항-AMC 항체 모이어티에 따른 제2 항-AMC 항체 모이어티와 경쟁하는 제1 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 항-AMC 구축물이 제공된다. 일부 실시양태에서, 제1 항-AMC 항체 모이어티는 제2 항-AMC 항체 모이어티와 동일한 또는 실질적으로 동일한 에피토프에 결합한다. 일부 실시양태에서, 표적 AFP/MHC 부류 I 복합체와의 제1 항-AMC 항체 모이어티의 결합은 표적 AFP/MHC 부류 I 복합체와의 제2 항-AMC 항체 모이어티의 결합을 적어도 약 70% (예컨대 적어도 약 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 중 어느 것) 억제하거나, 또는 그 반대의 경우도 마찬가지이다.

일부 실시양태에서, 제1 항-AMC 항체 모이어티 및 제2 항-AMC 항체 모이어티는 표적 AFP/MHC 부류 I 복합체의 결합에 대해 교차-경쟁하고, 즉 각각의 제1 및 제2 항체 모이어티는 표적 AFP/MHC 부류 I 복합체의 결합에 대해 다른 것과 경쟁한다.

[0099] 다른 측면은 하기 다양한 섹션에서 추가로 상세하게 논의된다.

[0100] 항-AMC 항체 모이어티

[0101] 항-AMC 구축물은 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함한다.

[0102] 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 세포의 표면 상에 제시된 AMC에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 세포는 그의 표면 상에 비정상적으로 높은 수준의 AFP를 제시한다. 일부 실시양태에서, 세포는 암 세포이다. 일부 실시양태에서, 암 세포는 고형 종양 내의 것이다. 일부 실시양태에서, 암 세포는 전이성 암 세포이다.

[0103] 일부 실시양태에서, AFP 펩티드는 MHC 부류 I-제한 펩티드이다. 일부 실시양태에서, AFP 펩티드는 약 8 내지 약 12개 (예컨대 약 8, 9, 10, 11, 또는 12개 중 어느 것)의 아미노산 길이이다. 일부 실시양태에서, AFP 펩티드는 인간 AFP (hAFP), 마우스 AFP (mAFP) 또는 래트 AFP (rAFP)로부터 유래된다.

[0104] 일부 실시양태에서, AFP 펩티드는 hAFP로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, AFP 펩티드는 hAFP의 아미노산 137-145 (PLFQVPEPV, 서열식별번호: 3), hAFP의 아미노산 158-166 (FMNKFIYEI, 서열식별번호: 4, 또한 본원에서 "AFP158"로 지칭됨), hAFP의 아미노산 325-334 (GLSPNLNRFL, 서열식별번호: 5), 또는 hAFP의 아미노산 542-550 (GVALQTMKQ, 서열식별번호: 6)의 서열을 포함한다 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진다).

[0105] 일부 실시양태에서, AFP 펩티드는 mAFP로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, AFP 펩티드는 mAFP의 아미노산 154-162의 서열 (FMNRFIYEV, 서열식별번호: 16)을 포함한다.

[0106] 일부 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질은 HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F 또는 HLA-G이다. 일부 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질은 HLA-A이다. 일부 실시양태에서, HLA-A는 HLA-A02이다. 일부 실시양태에서, HLA-A02는 HLA-A*02:01이다.

[0107] 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 전장 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 항원-결합 단편, 예를 들어 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 단편, 디설피드 안정화된 Fv 단편 (dsFv) 및 단일-쇄 항체 분자 (scFv)로 이루어진 군으로부터 선택된 항원-결합 단편이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 scFv이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 인간, 인간화 또는 반합성이다.

[0108] 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 복합체 중 AFP 펩티드의 N-말단 부분에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 복합체 중 AFP 펩티드의 C-말단 부분에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 복합체 중 AFP 펩티드의 중간 부분에 특이적으로 결합한다.

[0109] 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하고, 여기서 항-AMC 항체 모이어티는 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질의 대립유전자 변이체를 포함하는 적어도 1개의 복합체와 교차-반응한다. 일부 실시양태에서, 대립유전자 변이체는 MHC 부류 I 단백질과 비교하였을 때 최대 약 10개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 갖는다. 일부 실시양태에서, 대립유전자 변이체는 MHC 부류 I 단백질과 동일한 혈청형이다. 일부 실시양태에서, 대립유전자 변이체는 MHC 부류 I 단백질과 상이한 혈청형이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질의 임의의 대립유전자 변이체를 포함하는 복합체와 교차-반응하지 않는다.

[0110] 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하고, 여기서 항-AMC 항체 모이어티는 MHC 부류 I 단백질 및 1개의 아미노산 치환 (예컨대 보존적 치환)을 갖는 AFP 펩티드의 변이체를 포함하는 적어도 1개의 복합체와 교차-반응한다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 MHC 부류 I 단백질 및 AFP 펩티드의 임의의 변이체를 포함하는 복합체와 교차-반응하지 않는다.

[0111] 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하고, 여기서 항-AMC 항체 모이어티는 MHC 부류 I 단백질 및 AFP 펩티드의 중간 변이체를 포함하는 적어도 1개의 복합체와 교차-반응한다. 일부 실시양태에서, 예를 들어, AFP 펩티드는 인간 AFP 펩티드이고, AFP 펩티드의 중간 변이체는 그의 마우스 또는 래트 변이체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 MHC 부류

I 단백질 및 AFP 펩티드의 임의의 중간 변이체를 포함하는 복합체와 교차-반응하지 않는다.

- [0112] 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티 (또는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 항-AMC 구축물)는 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 전장 AFP, 유리 AFP 펩티드, 펩티드에 결합되지 않은 MHC 부류 I 단백질, 및 비-AFP 펩티드에 결합된 MHC 부류 I 단백질 각각에 대한 그의 결합 친화도의 적어도 약 10배 (예를 들어 적어도 약 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000배 또는 그 초과 중 어느 것 포함)인 친화도로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티 (또는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 항-AMC 구축물)는 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 전장 AFP, 유리 AFP 펩티드, 펩티드에 결합되지 않은 MHC 부류 I 단백질, 및 비-AFP 펩티드에 결합된 MHC 부류 I 단백질 각각에 대한 그의 K_d 의 약 1/10배 이하 (예컨대 약 1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/50, 1/75, 1/100, 1/200, 1/300, 1/400, 1/500, 1/750, 1/1000배 또는 그 미만 중 어느 것 이하)인 K_d 로 결합한다.

[0113] 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티 (또는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 항-AMC 구축물)는 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 약 0.1 pM 내지 약 500 nM (예컨대 약 0.1 pM, 1.0 pM, 10 pM, 50 pM, 100 pM, 500 pM, 1 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 또는 500 nM 중 어느 것 (이들 값 사이의 임의의 범위 포함))의 K_d 로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티 (또는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 항-AMC 구축물)는 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 약 1 pM 내지 약 250 pM (예컨대 약 1, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 또는 250 pM 중 어느 것 (이들 값 사이의 임의의 범위 포함))의 K_d 로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티 (또는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 항-AMC 구축물)는 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 약 1 nM 내지 약 500 nM (예컨대 약 1, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 또는 500 nM 중 어느 것 (이들 값 사이의 임의의 범위 포함))의 K_d 로 결합한다.

[0114] 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 AFP158 (서열식별번호: 4) 및 MHC 부류 I 단백질 (예컨대 HLA-A02, 예를 들어 HLA-A*02:01)을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 서열식별번호: 7의 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질 (예컨대 HLA-A02, 예를 들어 HLA-A*02:01)을 포함하는 복합체; 서열식별번호: 8의 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질 (예컨대 HLA-A02, 예를 들어 HLA-A*02:01)을 포함하는 복합체; 서열식별번호: 9의 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질 (예컨대 HLA-A02, 예를 들어 HLA-A*02:01)을 포함하는 복합체; 서열식별번호: 10의 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질 (예컨대 HLA-A02, 예를 들어 HLA-A*02:01)을 포함하는 복합체; 서열식별번호: 11의 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질 (예컨대 HLA-A02, 예를 들어 HLA-A*02:01)을 포함하는 복합체; 서열식별번호: 12의 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질 (예컨대 HLA-A02, 예를 들어 HLA-A*02:01)을 포함하는 복합체; 및 서열식별번호: 13의 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질 (예컨대 HLA-A02, 예를 들어 HLA-A*02:01)을 포함하는 복합체 중 적어도 1개 (적어도 약 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7개 중 어느 것 포함)에 추가로 결합한다.

[0115] 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 서열식별번호: 4의 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질 (예컨대 HLA-A02, 예를 들어 HLA-A*02:01)을 포함하는 복합체; 서열식별번호: 10의 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질 (예컨대 HLA-A02, 예를 들어 HLA-A*02:01)을 포함하는 복합체; 서열식별번호: 11의 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질 (예컨대 HLA-A02, 예를 들어 HLA-A*02:01)을 포함하는 복합체; 서열식별번호: 12의 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질 (예컨대 HLA-A02, 예를 들어 HLA-A*02:01)을 포함하는 복합체; 및 서열식별번호: 13의 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질 (예컨대 HLA-A02, 예를 들어 HLA-A*02:01)을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합한다.

[0116] 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 서열식별번호: 4의 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질 (예컨대 HLA-A02, 예를 들어 HLA-A*02:01)을 포함하는 복합체; 서열식별번호: 7의 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질 (예컨대 HLA-A02, 예를 들어 HLA-A*02:01)을 포함하는 복합체; 및 서열식별번호: 8의 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질 (예컨대 HLA-A02, 예를 들어 HLA-A*02:01)을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합한다.

[0117] 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 서열식별번호: 4의 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질 (예컨대 HLA-A02, 예를 들어 HLA-A*02:01)을 포함하는 복합체; 서열식별번호: 8의 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질 (예컨대 HLA-A02, 예를 들어 HLA-A*02:01)을 포함하는 복합체; 서열식별번호: 10의 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질 (예컨대 HLA-A02, 예를 들어 HLA-A*02:01)을 포함하는 복합체; 서열식별번호: 11의 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질 (예컨대 HLA-A02, 예를 들어 HLA-A*02:01)을 포함하는 복합체; 서열식별번호: 12의 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질 (예컨대 HLA-A02, 예를 들어 HLA-A*02:01)을 포함하는 복합체; 및 서열식별번호: 13의 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질 (예컨대 HLA-A02, 예를 들어 HLA-A*02:01)을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합한다.

드 및 MHC 부류 I 단백질 (예컨대 HLA-A02, 예를 들어 HLA-A*02:01)을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합한다.

[0118] 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 서열식별번호: 4의 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질 (예컨대 HLA-A02, 예를 들어 HLA-A*02:01)을 포함하는 복합체; 서열식별번호: 7의 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질 (예컨대 HLA-A02, 예를 들어 HLA-A*02:01)을 포함하는 복합체; 및 서열식별번호: 13의 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질 (예컨대 HLA-A02, 예를 들어 HLA-A*02:01)을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합한다.

[0119] 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 서열식별번호: 4의 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질 (예컨대 HLA-A02, 예를 들어 HLA-A*02:01)을 포함하는 복합체; 서열식별번호: 7의 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질 (예컨대 HLA-A02, 예를 들어 HLA-A*02:01)을 포함하는 복합체; 서열식별번호: 9의 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질 (예컨대 HLA-A02, 예를 들어 HLA-A*02:01)을 포함하는 복합체; 서열식별번호: 11의 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질 (예컨대 HLA-A02, 예를 들어 HLA-A*02:01)을 포함하는 복합체; 및 서열식별번호: 13의 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질 (예컨대 HLA-A02, 예를 들어 HLA-A*02:01)을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합한다.

[0120] 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 AFP158 (서열식별번호: 4) 및 HLA-A*02:01을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-항체 모이어티는 AFP158 (서열식별번호: 4) 및 HLA-A*02:02 (진뱅크 수탁 번호: AFL91480)를 포함하는 복합체, AFP158 (서열식별번호: 4) 및 HLA-A*02:03 (진뱅크 수탁 번호: AAA03604)을 포함하는 복합체, AFP158 (서열식별번호: 4) 및 HLA-A*02:05 (진뱅크 수탁 번호: AAA03603)를 포함하는 복합체, AFP158 (서열식별번호: 4) 및 HLA-A*02:06 (진뱅크 수탁 번호: CCB78868)을 포함하는 복합체, AFP158 (서열식별번호: 4) 및 HLA-A*02:07 (진뱅크 수탁 번호: ACR55712)을 포함하는 복합체, 및 AFP158 (서열식별번호: 4) 및 HLA-A*02:11 (진뱅크 수탁 번호: CAB56609)을 포함하는 복합체 중 적어도 1개 (적어도 약 2, 3, 4, 5, 또는 6개 중 어느 것 포함)와 교차-반응한다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 AFP158 (서열식별번호: 4) 및 HLA-A*02:02를 포함하는 복합체, AFP158 (서열식별번호: 4) 및 HLA-A*02:03을 포함하는 복합체, 및 AFP158 (서열식별번호: 4) 및 HLA-A*02:11을 포함하는 복합체 각각과 교차-반응한다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 AFP158 (서열식별번호: 4) 및 HLA-A*02:02를 포함하는 복합체, AFP158 (서열식별번호: 4) 및 HLA-A*02:05를 포함하는 복합체, AFP158 (서열식별번호: 4) 및 HLA-A*02:06을 포함하는 복합체, AFP158 (서열식별번호: 4) 및 HLA-A*02:07을 포함하는 복합체, 및 AFP158 (서열식별번호: 4) 및 HLA-A*02:11을 포함하는 복합체 각각과 교차-반응한다.

[0121] 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 완전 인간 서열 및 1개 이상의 합성 영역을 포함하는 반합성 항체 모이어티이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 완전 인간 경쇄 가변 도메인 및 완전 인간 FR1, HC-CDR1, FR2, HC-CDR2, FR3 및 FR4 영역 및 합성 HC-CDR3을 포함하는 반합성 중쇄 가변 도메인을 포함하는 반합성 항체 모이어티이다. 일부 실시양태에서, 반합성 중쇄 가변 도메인은 약 5 내지 약 25개 (예컨대 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25개 중 어느 것)의 아미노산 길이의 서열을 갖는 완전 합성 HC-CDR3을 포함한다. 일부 실시양태에서, 반합성 중쇄 가변 도메인 또는 합성 HC-CDR3은 약 5 내지 약 25개 (예컨대 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25개 중 어느 것)의 아미노산 길이의 서열을 갖는 완전 합성 HC-CDR3을 포함하는 반합성 라이브리 (예컨대 반합성 인간 라이브리)로부터 수득되고, 여기서 서열 내 각각의 아미노산은 표준 인간 아미노산, 마이너스 시스테인으로부터 무작위로 선택된다. 일부 실시양태에서, 합성 HC-CDR3은 약 10 내지 약 19개 (예컨대 약 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 또는 19개 중 어느 것)의 아미노산 길이이다.

[0122] 항-AMC 항체 모이어티는 일부 실시양태에서 특정 서열 또는 이러한 서열의 특정 변이체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변이체 서열 내 아미노산 치환은 AMC에 결합하는 항-AMC 항체 모이어티의 능력을 실질적으로 감소시키지 않는다. 예를 들어, AMC 결합 친화도를 실질적으로 감소시키지 않는 변경이 이루어질 수 있다. AMC 결합 친화도를 실질적으로 개선시키거나 또는 일부 다른 특성, 예컨대 특이성 및/또는 AMC의 관련 변이체와의 교차-반응성에 영향을 미치는 변경이 또한 고려된다.

[0123] 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 i) A/G-X-W/Y-Y-X-X-X-F/Y-D의 아미노산 서열 (서열식별번호: 89)을 포함하는 HC-CDR3, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및 ii) Q-S/T-Y/W-D/T-S/T-A/S의 아미노산 서열 (서열식별번호: 121)을 포함하는 LC-CDR3, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하고; 여기서 X는 임의의 아미노산일 수 있다.

[0124] 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 i) A/G-X-W/Y-Y-X-X-X-F/Y-D의 아미노산 서열 (서열식별번호: 8

9)을 포함하는 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및 ii) Q-S/T-Y/W-D/T-S/T-A/S의 아미노산 서열 (서열식별번호: 121)을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하고; 여기서 X는 임의의 아미노산일 수 있다.

[0125] 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 i) G-F/Y-S/T-F-D/S/T-D/N/S-Y/A-A/G/W의 아미노산 서열 (서열식별번호: 87)을 포함하는 HC-CDR1, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, I/S-K/S-X-H/Y-X-G-X-T의 아미노산 서열 (서열식별번호: 88)을 포함하는 HC-CDR2, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 A/G-X-W/Y-Y-X-X-X-F/Y-D의 아미노산 서열 (서열식별번호: 89)을 포함하는 HC-CDR3, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및 ii) S/T-G/S-D/N-I/V-A/G-A/S/V-X-H/Y의 아미노산 서열 (서열식별번호: 120)을 포함하는 LC-CDR1, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 Q-S/T-Y/W-D/T-S/T-A/S의 아미노산 서열 (서열식별번호: 121)을 포함하는 LC-CDR3, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하고; 여기서 X는 임의의 아미노산일 수 있다.

[0126] 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 i) G-F/Y-S/T-F-D/S/T-D/N/S-Y/A-A/G/W의 아미노산 서열 (서열식별번호: 87)을 포함하는 HC-CDR1, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, I/S-K/S-X-H/Y-X-G-X-T의 아미노산 서열 (서열식별번호: 88)을 포함하는 HC-CDR2, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 A/G-X-W/Y-Y-X-X-X-F/Y-D의 아미노산 서열 (서열식별번호: 89)을 포함하는 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및 ii) S/T-G/S-D/N-I/V-A/G-A/S/V-X-H/Y의 아미노산 서열 (서열식별번호: 120)을 포함하는 LC-CDR1, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 Q-S/T-Y/W-D/T-S/T-A/S의 아미노산 서열 (서열식별번호: 121)을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하고; 여기서 X는 임의의 아미노산일 수 있다.

[0127] 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 i) G-F/Y-S/T-F-D/S/T-D/N/S-Y/A-A/G/W의 아미노산 서열 (서열식별번호: 87)을 포함하는 HC-CDR1, I/S-K/S-X-H/Y-X-G-X-T의 아미노산 서열 (서열식별번호: 88)을 포함하는 HC-CDR2, 및 A/G-X-W/Y-Y-X-X-X-F/Y-D의 아미노산 서열 (서열식별번호: 89)을 포함하는 HC-CDR3을 중쇄 가변 도메인; 또는 HC-CDR 서열에서 최대 약 3개 (예컨대 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체; 및 ii) S/T-G/S-D/N-I/V-A/G-A/S/V-X-H/Y의 아미노산 서열 (서열식별번호: 120)을 포함하는 LC-CDR1, 및 Q-S/T-Y/W-D/T-S/T-A/S의 아미노산 서열 (서열식별번호: 121)을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인; 또는 LC-CDR 서열에서 최대 약 3개 (예컨대 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하고; 여기서 X는 임의의 아미노산일 수 있다.

[0128] 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 i) G-F/Y-S/T-F-D/S/T-D/N/S-Y/A-A/G/W의 아미노산 서열 (서열식별번호: 87)을 포함하는 HC-CDR1, I/S-K/S-X-H/Y-X-G-X-T의 아미노산 서열 (서열식별번호: 88)을 포함하는 HC-CDR2, 및 A/G-X-W/Y-Y-X-X-X-F/Y-D의 아미노산 서열 (서열식별번호: 89)을 포함하는 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및 ii) S/T-G/S-D/N-I/V-A/G-A/S/V-X-H/Y의 아미노산 서열 (서열식별번호: 120)을 포함하는 LC-CDR1, 및 Q-S/T-Y/W-D/T-S/T-A/S의 아미노산 서열 (서열식별번호: 121)을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하고; 여기서 X는 임의의 아미노산일 수 있다. 본원에 제시된 CDR의 서열은 하기 표 2에 제공된다.

[0129] 표 2

HC-CDR1 컨센서스	SEQ ID NO: 87	G-F/Y-S/T-F-D/S/T-D/N/S-Y/A-A/G/W
HC-CDR2 컨센서스	SEQ ID NO: 88	I/S-K/S-X-H/Y-X-G-X-T
HC-CDR3 컨센서스	SEQ ID NO: 89	A/G-X-W/Y-Y-X-X-X-F/Y-D
LC-CDR1 컨센서스	SEQ ID NO: 120	S/T-G/S-D/N-I/V-A/G-A/S/V-X-H/Y
LC-CDR3 컨센서스	SEQ ID NO: 121	Q-S/T-Y/W-D/T-S/T-A/S

[0130]

[0131] 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 i) 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및 ii) 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변

이체를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

- [illegible]

쇄 가변 도메인 서열을 포함한다. 본원에 제시된 HC-CDR의 서열은 하기 표 3에 제공되고, 본원에 제시된 LC-CDR의 서열은 하기 표 4에 제공된다.

표 3

SEQ ID NO: 57 17 HC-CDR1	GYTFTSYG	SEQ ID NO: 67 17 HC-CDR2	ISAYNGNT	SEQ ID NO: 77 17 HC-CDR3	ARYQDWWYLGQFDQ
SEQ ID NO: 58 33 HC-CDR1	VSSNSAAWN	SEQ ID NO: 68 33 HC-CDR2	YRSKWYN	SEQ ID NO: 78 33 HC-CDR3	ARGSYYSGRYDA
SEQ ID NO: 59 44 HC-CDR1	GGTFSSYA	SEQ ID NO: 69 44 HC-CDR2	IIPFGTA	SEQ ID NO: 79 44 HC-CDR3	AREIRGYYYYYGMDV
SEQ ID NO: 60 48 HC-CDR1	GFTFDDYA	SEQ ID NO: 70 48 HC-CDR2	ISWNSGRI	SEQ ID NO: 80 48 HC-CDR3	ARADDYGAPYYYYGMDV
SEQ ID NO: 61 50 HC-CDR1	GGSISSSNW	SEQ ID NO: 71 50 HC-CDR2	IYHSGST	SEQ ID NO: 81 50 HC-CDR3	ATGYGGYFDY
SEQ ID NO: 62 52 HC-CDR1	GYTFTSYG	SEQ ID NO: 72 52 HC-CDR2	ISAYNGNT	SEQ ID NO: 82 52 HC-CDR3	ARDSYYYYYGMVDV
SEQ ID NO: 63 61 HC-CDR1	GYSFPNYW	SEQ ID NO: 73 61 HC-CDR2	IDPGDSYT	SEQ ID NO: 83 61 HC-CDR3	ARYYVSLVDI
SEQ ID NO: 64 76 HC-CDR1	GFTFSNAW	SEQ ID NO: 74 76 HC-CDR2	IRSKAYGGTT	SEQ ID NO: 84 76 HC-CDR3	ARDGLYSSSWYDSY
SEQ ID NO: 65 79 HC-CDR1	GFTFDDYA	SEQ ID NO: 75 79 HC-CDR2	ISWNSGSI	SEQ ID NO: 85 79 HC-CDR3	AKDIHSGSYGLLYAMDV
SEQ ID NO: 66 17-13 HC-CDR1	GYTFTSYG	SEQ ID NO: 76 17-13 HC-CDR2	ISAYNGNT	SEQ ID NO: 86 17-13 HC-CDR3	ARFQDWWYLGQFDQ

표 4

SEQ ID NO: 90 17 LC-CDR1	GSDVGYYYY	SEQ ID NO: 100 17 LC-CDR2	DVG	SEQ ID NO: 110 17 LC-CDR3	ASYTNRNSLGYV
SEQ ID NO: 91 33 LC-CDR1	SGSIASNY	SEQ ID NO: 101 33 LC-CDR2	EDN	SEQ ID NO: 111 33 LC-CDR3	QSYDSSTVV
SEQ ID NO: 92 44 LC-CDR1	NIGTKS	SEQ ID NO: 102 44 LC-CDR2	YDT	SEQ ID NO: 112 44 LC-CDR3	QVWDSSSDHPV
SEQ ID NO: 93 48 LC-CDR1	SSNIGAGYD	SEQ ID NO: 103 48 LC-CDR2	GNS	SEQ ID NO: 113 48 LC-CDR3	QSYDSSLGSGV
SEQ ID NO: 94 50 LC-CDR1	NIGSKS	SEQ ID NO: 104 50 LC-CDR2	YDS	SEQ ID NO: 114 50 LC-CDR3	QVWDSSSDHVV
SEQ ID NO: 95 52 LC-CDR1	TGAVTSGHY	SEQ ID NO: 105 52 LC-CDR2	DAS	SEQ ID NO: 115 52 LC-CDR3	LLSYSDALV
SEQ ID NO: 96 61 LC-CDR1	SSDVGGINNY	SEQ ID NO: 106 61 LC-CDR2	DVN	SEQ ID NO: 116 61 LC-CDR3	SSYTTGSRV
SEQ ID NO: 97 76 LC-CDR1	SSNIGNNY	SEQ ID NO: 107 76 LC-CDR2	DNN	SEQ ID NO: 117 76 LC-CDR3	GTWDGSLYTML
SEQ ID NO: 98 79 LC-CDR1	SSNIGAGYD	SEQ ID NO: 108 79 LC-CDR2	GNS	SEQ ID NO: 118 79 LC-CDR3	QSYDSSLGSGV
SEQ ID NO: 99 17-13 LC-CDR1	GSDVGYYYY	SEQ ID NO: 109 17-13 LC-CDR2	DVD	SEQ ID NO: 119 17-13 LC-CDR3	ASYTNRNSLGYV

일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 서열식별번호: 17-26 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 또는 적어도 약 95% (예를 들어 적어도 약 96%, 97%, 98%, 또는 99% 중 어느 것 포함) 서열 동일성을 갖는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 27-36 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인, 또는 적어도 약 95% (예를 들어 적어도 약 96%, 97%, 98%, 또는 99% 중 어느 것 포함) 서열 동일성을 갖는 그의 변이체를 포함한다.

일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 서열식별번호: 17-26 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열식별번호: 27-36 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

중쇄 및 경쇄 가변 도메인은 다양한 쌍별 조합으로 조합되어 다수의 항-AMC 항체 모이어티를 생성할 수 있다.

예를 들어, 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 서열식별번호: 57의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1, 또는 최대 약 5개 (예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체; 서열식별번호: 67의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2, 또는 최대 약 5개 (예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체; 및 서열식별번호: 77의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의

서열을 포함하는 LC-CDR2, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체; 및 서열식별번호: 112의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

- [illegible]

- [illegible]

함하는 중쇄 가변 도메인, 또는 HC-CDR 서열에서 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체; 및 서열식별번호: 98의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1, 서열식별번호: 108의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2, 및 서열식별번호: 118의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인, 또는 LC-CDR 서열에서 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함한다.

[0171] 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 서열식별번호: 65의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1, 서열식별번호: 75의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2, 및 서열식별번호: 85의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및 서열식별번호: 98의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1, 서열식별번호: 108의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2, 및 서열식별번호: 118의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0172] 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 서열식별번호: 66의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1, 또는 최대 약 5개 (예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체; 서열식별번호: 76의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2, 또는 최대 약 5개 (예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체; 및 서열식별번호: 86의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및 서열식별번호: 99의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1, 또는 최대 약 5개 (예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체; 서열식별번호: 109의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체; 및 서열식별번호: 119의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0173] 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 서열식별번호: 66의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1, 서열식별번호: 76의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2, 및 서열식별번호: 86의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 또는 HC-CDR 서열에서 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체; 및 서열식별번호: 99의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1, 서열식별번호: 109의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2, 및 서열식별번호: 119의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인, 또는 LC-CDR 서열에서 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함한다.

[0174] 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 서열식별번호: 66의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1, 서열식별번호: 76의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2, 및 서열식별번호: 86의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및 서열식별번호: 99의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1, 서열식별번호: 109의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2, 및 서열식별번호: 119의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0175] 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 서열식별번호: 17에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 또는 적어도 약 95% (예를 들어 적어도 약 96%, 97%, 98%, 또는 99% 중 어느 것) 서열 동일성을 갖는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 27에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인, 또는 적어도 약 95% (예를 들어 적어도 약 96%, 97%, 98%, 또는 99% 중 어느 것 포함) 서열 동일성을 갖는 그의 변이체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 서열식별번호: 17에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열식별번호: 27에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0176] 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 서열식별번호: 18에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 또는 적어도 약 95% (예를 들어 적어도 약 96%, 97%, 98%, 또는 99% 중 어느 것 포함) 서열 동일성을 갖는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 28에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인, 또는 적어도 약 95% (예를 들어 적어도 약 96%, 97%, 98%, 또는 99% 중 어느 것 포함) 서열 동일성을 갖는 그의 변이체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 서열식별번호: 18에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열식별번호: 28에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0177] 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 서열식별번호: 19에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 또는 적어도 약 95% (예를 들어 적어도 약 96%, 97%, 98%, 또는 99% 중 어느 것) 서열 동일성을 갖는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 29에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인, 또는 적어도 약 95%

어티는 제2 항-AMC 항체 모이어티와 동일한 또는 실질적으로 동일한 에피토프에 결합한다. 일부 실시양태에서, 표적 AFP/MHC 부류 I 복합체와의 항-AMC 항체 모이어티의 결합은 표적 AFP/MHC 부류 I 복합체와의 제2 항-AMC 항체 모이어티의 결합을 적어도 약 70% (예컨대 적어도 약 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 중 어느 것) 억제하거나, 또는 그 반대의 경우도 마찬가지이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티 및 제2 항-AMC 항체 모이어티는 표적 AFP/MHC 부류 I 복합체와의 결합에 대해 교차-경쟁하고, 즉 각각의 항체 모이어티는 표적 AFP/MHC 부류 I 복합체와의 결합에 대해 다른 것과 경쟁한다.

[0186] 전장 항-AMC 항체

[0187] 일부 실시양태에서 항-AMC 구축물은 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 전장 항체 (본원에서 "전장 항-AMC 항체"로 또한 지칭됨)이다. 일부 실시양태에서, 전장 항체는 모노클로날 항체이다.

[0188] 일부 실시양태에서, 전장 항-AMC 항체는 이뮤노글로불린, 예컨대 IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM으로부터의 Fc 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 전장 항-AMC 항체는 IgG, 예컨대 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 중 어느 것의 Fc 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 전장 항-AMC 항체는 인간 이뮤노글로불린의 Fc 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 전장 항-AMC 항체는 마우스 이뮤노글로불린의 Fc 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 전장 항-AMC 항체는 항체 의존성 세포성 세포독성 (ADCC) 또는 보체 의존성 세포독성 (CDC) 이펙터 기능이 증진되도록 변경되거나 또는 달리 변화된 Fc 서열을 포함한다.

[0189] 따라서, 예를 들어, 일부 실시양태에서, a) AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티, 및 b) Fc 영역을 포함하는 전장 항-AMC 항체가 제공된다. 일부 실시양태에서, AFP 펩티드는 AFP158 (서열식별번호: 4)이다. 일부 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질은 HLA-A02이다. 일부 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질은 HLA-A*02:01이다. 일부 실시양태에서, a) AFP158 펩티드 (서열식별번호: 4) 및 HLA-A*02:01을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티, 및 b) Fc 영역을 포함하는 전장 항-AMC 항체가 제공된다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 IgG1 Fc 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 인간 IgG1 Fc 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 마우스 IgG1 Fc 서열을 포함한다.

[0190] 일부 실시양태에서, a) i) G-F/Y-S/T-F-D/S/T-D/N/S-Y/A-A/G/W의 아미노산 서열 (서열식별번호: 87)을 포함하는 HC-CDR1, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, I/S-K/S-X-H/Y-X-G-X-T의 아미노산 서열 (서열식별번호: 88)을 포함하는 HC-CDR2, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 A/G-X-W/Y-Y-X-X-X-F/Y-D의 아미노산 서열 (서열식별번호: 89)을 포함하는 HC-CDR3; 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 및 ii) S/T-G/S-D/N-I/V-A/G-A/S/V-X-H/Y의 아미노산 서열 (서열식별번호: 120)을 포함하는 LC-CDR1, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 Q-S/T-Y/W-D/T-S/T-A/S의 아미노산 서열 (서열식별번호: 121)을 포함하는 LC-CDR3, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 경쇄 가변 도메인 (여기서 X는 임의의 아미노산일 수 있음)을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티, 및 b) Fc 영역을 포함하는 전장 항-AMC 항체가 제공된다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 IgG1 Fc 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 인간 IgG1 Fc 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 마우스 IgG1 Fc 서열을 포함한다.

[0191] 일부 실시양태에서, a) i) G-F/Y-S/T-F-D/S/T-D/N/S-Y/A-A/G/W의 아미노산 서열 (서열식별번호: 87)을 포함하는 HC-CDR1, I/S-K/S-X-H/Y-X-G-X-T의 아미노산 서열 (서열식별번호: 88)을 포함하는 HC-CDR2, 및 A/G-X-W/Y-Y-X-X-X-F/Y-D의 아미노산 서열 (서열식별번호: 89)을 포함하는 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 및 ii) S/T-G/S-D/N-I/V-A/G-A/S/V-X-H/Y의 아미노산 서열 (서열식별번호: 120)을 포함하는 LC-CDR1, 및 Q-S/T-Y/W-D/T-S/T-A/S의 아미노산 서열 (서열식별번호: 121)을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인 (여기서 X는 임의의 아미노산일 수 있음)을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티, 및 b) Fc 영역을 포함하는 전장 항-AMC 항체가 제공된다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 IgG1 Fc 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 인간 IgG1 Fc 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 마우스 IgG1 Fc 서열을 포함한다.

[0192] 일부 실시양태에서, a) i) 서열식별번호: 57-66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 서열식별번호: 67-76 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개

중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및 ii) 서열식별번호: 90-99 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 서열식별번호: 100-109 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2, 또는 최대 약 3개 (예컨대 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3, 또는 최대 약 5개 (예컨대 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 전장 항-AMC 항체가 제공된다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 IgG1 Fc 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 인간 IgG1 Fc 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 마우스 IgG1 Fc 서열을 포함한다.

[0193] 일부 실시양태에서, a) i) 서열식별번호: 57-66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1; 서열식별번호: 67-76 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2; 및 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 또는 HC-CDR 서열에서 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체; 및 ii) 서열식별번호: 90-99 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1; 서열식별번호: 100-109 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2; 및 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인 서열; 또는 LC-CDR 서열에서 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티; 및 b) Fc 영역을 포함하는 전장 항-AMC 항체가 제공된다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 IgG1 Fc 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 인간 IgG1 Fc 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 마우스 IgG1 Fc 서열을 포함한다.

[0194] 일부 실시양태에서, a) i) 서열식별번호: 57-66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1; 서열식별번호: 67-76 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2; 및 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 및 ii) 서열식별번호: 90-99 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1; 서열식별번호: 100-109 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2; 및 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인 서열을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티; 및 b) Fc 영역을 포함하는 전장 항-AMC 항체가 제공된다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 IgG1 Fc 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 인간 IgG1 Fc 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 마우스 IgG1 Fc 서열을 포함한다.

[0195] 일부 실시양태에서, a) 서열식별번호: 17-26 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 또는 적어도 약 95% (예를 들어 적어도 약 96%, 97%, 98%, 또는 99% 중 어느 것) 서열 동일성을 갖는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 27-36 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인, 또는 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 그의 변이체를 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티; 및 b) Fc 영역을 포함하는 전장 항-AMC 항체가 제공된다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 IgG1 Fc 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 인간 IgG1 Fc 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 마우스 IgG1 Fc 서열을 포함한다.

[0196] 일부 실시양태에서, a) 서열식별번호: 17-26 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열식별번호: 27-36 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티; 및 b) Fc 영역을 포함하는 전장 항-AMC 항체가 제공된다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 IgG1 Fc 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 인간 IgG1 Fc 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 마우스 IgG1 Fc 서열을 포함한다.

[0197] 일부 실시양태에서, 전장 항-AMC 항체는 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 약 0.1 pM 내지 약 500 nM (예컨대 약 0.1 pM, 1.0 pM, 10 pM, 50 pM, 100 pM, 500 pM, 1 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 또는 500 nM 중 어느 것 (이들 값 사이의 임의의 범위 포함))의 K_d 로 결합한다. 일부 실시양태에서, 전장 항-AMC 항체는 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 약 1 pM 내지 약 250 pM (예컨대 약 1, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 또는 250 pM 중 어느 것 (이들 값 사이의 임의의 범위 포함))의 K_d 로 결합한다.

- [0198] 다중-특이적 항-AMC 분자
- [0199] 일부 실시양태에서 항-AMC 구축물은 항-AMC 항체 모이어티 및 제2 결합 모이어티 (예컨대 제2 항원-결합 모이어티)를 포함하는 다중-특이적 항-AMC 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 다중-특이적 항-AMC 분자는 항-AMC 항체 모이어티 및 제2 항원-결합 모이어티를 포함한다.
- [0200] 다중-특이적 분자는 적어도 2개의 상이한 항원 또는 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 분자이다 (예를 들어, 이중특이적 항체는 2개의 항원 또는 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는다). 2가 초과와 원자가 및/또는 특이성을 갖는 다중-특이적 분자가 또한 고려된다. 예를 들어, 삼중특이적 항체가 제조될 수 있다. 문헌 [Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991)]. 관련 기술분야의 통상의 기술자가 본원에 기재된 개별 다중-특이적 분자의 적절한 특색을 선택하여 본 발명의 다중-특이적 항-AMC 분자가 형성되도록 서로 조합할 수 있다는 점이 인지되어야 한다.
- [0201] 따라서, 예를 들어, 일부 실시양태에서, a) AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티, 및 b) 제2 결합 모이어티 (예컨대 항원-결합 모이어티)를 포함하는 다중-특이적 (예를 들어, 이중특이적) 항-AMC 분자가 제공된다. 일부 실시양태에서, 제2 결합 모이어티는 MHC 부류 I 단백질에 결합된 상이한 AFP 펩티드를 포함하는 복합체에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 제2 scFv는 상이한 MHC 부류 I 단백질에 결합된 AFP 펩티드를 포함하는 복합체에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 제2 결합 모이어티는 MHC 부류 I 단백질에 결합된 AFP 펩티드를 포함하는 복합체 상의 상이한 에피토프에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 제2 결합 모이어티는 상이한 항원에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 제2 결합 모이어티는 세포, 예컨대 세포독성 세포의 표면 상의 항원에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 제2 결합 모이어티는 림프구, 예컨대 T 세포, NK 세포, 호중구, 단핵구, 대식세포, 또는 수지상 세포의 표면 상의 항원에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 제2 결합 모이어티는 이펙터 T 세포, 예컨대 세포독성 T 세포 (세포독성 T 림프구 (CTL) 또는 T 킬러 세포로 또한 공지됨)에 특이적으로 결합한다.
- [0202] 일부 실시양태에서, a) AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티, 및 b) CD3에 특이적으로 결합하는 제2 항원-결합 모이어티를 포함하는 다중-특이적 항-AMC 분자가 제공된다. 일부 실시양태에서, 제2 항원-결합 모이어티는 CD3 ϵ 에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 제2 항원-결합 모이어티는 CD3 ϵ 의 효능작용 에피토프에 특이적으로 결합한다. 본원에 사용된 용어 "효능작용 에피토프"는 (a) 다중-특이적 분자의 결합 시, 임의로 동일한 세포 상의 여러 다중-특이적 분자의 결합 시, 상기 다중-특이적 분자가 TCR 신호전달을 활성화시키고 T 세포 활성화를 유도하는 것을 가능하게 하는 에피토프, 및/또는 (b) 단지 CD3의 엡실론 쇄의 아미노산 잔기만으로 구성되고 T 세포 상에 그의 자연적 상황으로 제시되는 (즉 TCR, CD3 γ 쇄 등에 의해 둘러싸인) 경우에, 다중-특이적 분자에 의한 결합에 접근가능한 에피토프, 및/또는 (c) 다중-특이적 분자의 결합 시, CD3 γ 에 비해 CD3 ϵ 의 공간 위치의 안정화를 유발하지 않는 에피토프를 의미한다.
- [0203] 일부 실시양태에서, a) AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티, 및 b) 예를 들어 CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD28, CD16a, CD56, CD68, 및 GDS2D를 포함하는, 이펙터 세포의 표면 상의 항원에 특이적으로 결합하는 제2 항원-결합 모이어티를 포함하는 다중-특이적 항-AMC 분자가 제공된다.
- [0204] 일부 실시양태에서, a) AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티, 및 b) 보체계의 성분, 예컨대 C1q에 특이적으로 결합하는 제2 항원-결합 모이어티를 포함하는 다중-특이적 항-AMC 분자가 제공된다. C1q는 혈청 보체계를 활성화시키는 C1 효소 복합체의 서브유닛이다.
- [0205] 일부 실시양태에서, 제2 항원-결합 모이어티는 Fc 수용체에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 제2 항원-결합 모이어티는 Fc γ 수용체 (Fc γ R)에 특이적으로 결합한다. Fc γ R은 자연 킬러 (NK) 세포의 표면 상에 제시되는 Fc γ RIII 또는 대식세포, 단핵구, 호중구 및/또는 수지상 세포의 표면 상에 제시되는 Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB1, Fc γ RIIB2, 및 Fc γ RIIB 중 하나일 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 항원-결합 모이어티는 Fc 영역 또는 그의 기능적 단편이다. 이 문맥에서 사용된 "기능적 단편"은 FcR에, 특히 Fc γ R에, Fc γ R 보유 이펙터 세포, 특히 대식세포, 단핵구, 호중구 및/또는 수지상 세포가 세포독성 용해 또는 식세포작용에 의해 표적 세포를 사멸시키는 것을 가능하도록 하기에 충분한 특이성 및 친화도로, 여전히 결합할 수 있는 항체 Fc 영역의 단편을 지칭한다. 기능적 Fc 단편은 원래 전장 Fc 부분의 FcR 예컨대 활성화 Fc γ RI에의 결합을 경쟁적으로 억제할 수 있다. 일부 실시양태에서, 기능적 Fc 단편은 활성화 Fc γ R에 대한 그의 친화도의 적어도 30%,

40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 95%를 보유한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역 또는 그의 기능적 단편은 증진된 Fc 영역 또는 그의 기능적 단편이다. 본원에 사용된 용어 "증진된 Fc 영역"은 Fc 수용체-매개 이펙터-기능, 특히 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC), 보체-의존성 세포독성 (CDC), 및 항체-매개 식세포작용을 증진시키도록 변형된 Fc 영역을 지칭한다. 이는 관련 기술분야에 공지된 바와 같이, 예를 들어 활성화 수용체 (예를 들어 자연 킬러 (NK) 세포 상에 발현된 Fc γ RIIA (CD16A))에 대한 증가된 친화도 및/또는 억제 수용체 (예를 들어 Fc γ RIIB1/B2 (CD32B))에의 감소된 결합을 유발하는 방식으로 Fc 영역을 변경함으로써 달성될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 제2 항원-결합 모이어티는 FcR, 특히 Fc γ R에, Fc γ R 보유 이펙터 세포, 특히 대식 세포, 단핵구, 호중구 및/또는 수지상 세포가 세포독성 용해 또는 식세포작용에 의해 표적 세포를 사멸시키는 것을 가능하도록 하기에 충분한 특이성 및 친화도로, 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편이다.

[0206] 일부 실시양태에서, 다중-특이적 항-AMC 분자는 AMC-제시 표적 세포의 사멸을 가능하게 하고/거나 AMC-제시 표적 세포를 용해시키도록 CTL을 효과적으로 재지시할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 다중-특이적 (예를 들어, 이중특이적) 항-AMC 분자는 10 내지 500 ng/ml의 범위의 시험관내 EC₅₀을 나타내고, CTL을 통해 약 1:1 내지 약 50:1 (예컨대 약 1:1 내지 약 15:1, 또는 약 2:1 내지 약 10:1)의 CTL 대 표적 세포의 비에서 표적 세포의 약 50%의 재지시된 용해를 유도할 수 있다.

[0207] 일부 실시양태에서, 다중-특이적 (예를 들어, 이중특이적) 항-AMC 분자는 표적 세포가 용해되는 방식으로 자극 또는 비자극 CTL 및 표적 세포를 가교할 수 있다. 이는 표적-특이적 T 세포 클론의 생성 또는 수지상 세포에 의한 공통 항원 제시가 다중-특이적 항-AMC 분자가 그의 목적 활성을 발휘하는데 요구되지 않는다는 이점을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 다중-특이적 항-AMC 분자는 다른 활성화 신호의 부재 하에 표적 세포를 용해시키도록 CTL을 재지시할 수 있다. 일부 실시양태에서, 다중-특이적 항-AMC 분자의 제2 항원-결합 모이어티는 CD3에 특이적으로 결합하고 (예를 들어, CD3 ϵ 에 특이적으로 결합함), CD28 및/또는 IL-2를 통한 신호전달은 표적 세포를 용해시키도록 CTL을 재지시하는데 요구되지 않는다.

[0208] 동시에 2개의 항원 (예를 들어, 2개의 상이한 세포 상의 항원)에 결합하는 다중-특이적 항-AMC 분자의 선택을 측정하는 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자의 정상 능력 내에 있다. 예를 들어, 제2 결합 모이어티가 CD3에 특이적으로 결합하는 경우에, 다중-특이적 항-AMC 분자는 CD3⁺/AFP⁻ 세포 및 CD3⁻/AFP⁺ 세포의 혼합물과 접촉될 수 있다. 다중-특이적 항-AMC 분자-양성 단세포의 수 및 다중-특이적 항-AMC 분자에 의해 가교된 세포의 수는 이어서 관련 기술분야에 공지된 바와 같이 현미경검사 또는 형광-활성화 세포 분류 (FACS)에 의해 평가될 수 있다.

[0209] 예를 들어, 일부 실시양태에서, a) AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티, 및 b) 제2 항원-결합 모이어티를 포함하는 다중-특이적 항-AMC 분자가 제공된다. 일부 실시양태에서, AFP 펩티드는 AFP158 (서열식별번호: 4)이다. 일부 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질은 HLA-A*02이다. 일부 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질은 HLA-A*02:01이다. 일부 실시양태에서, 제2 항원-결합 모이어티는 MHC 부류 I 단백질에 결합된 상이한 AFP 펩티드를 포함하는 복합체에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 제2 항원-결합 모이어티는 상이한 MHC 부류 I 단백질에 결합된 AFP 펩티드를 포함하는 복합체에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 제2 항원-결합 모이어티는 MHC 부류 I 단백질에 결합된 AFP 펩티드를 포함하는 복합체 상의 상이한 에피토프에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 제2 항원-결합 모이어티는 또 다른 항원에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 제2 항원-결합 모이어티는 세포, 예컨대 AMC-제시 세포의 표면 상의 항원에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 제2 항원-결합 모이어티는 세포, 예컨대 T 세포, NK 세포, 호중구, 단핵구, 대식세포, 또는 수지상 세포의 표면 상의 항원에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 제2 항원-결합 모이어티는 예를 들어 CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD28, CD16a, CD56, CD68, 및 GDS2D를 포함하는 이펙터 세포의 표면 상의 항원에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 인간, 인간화, 또는 반합성이다. 일부 실시양태에서, 제2 항원-결합 모이어티는 항체 모이어티이다. 일부 실시양태에서, 제2 항원-결합 모이어티는 인간, 인간화, 또는 반합성 항체 모이어티이다. 일부 실시양태에서, 다중-특이적 항-AMC 분자는 적어도 1개 (예컨대 적어도 약 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과 중 어느 것)의 추가의 항원-결합 모이어티를 추가로 포함한다.

[0210] 일부 실시양태에서, a) AFP158 펩티드 (서열식별번호: 4) 및 HLA-A*02:01을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합

하는 항-AMC 항체 모이어티, 및 b) 제2 항원-결합 모이어티를 포함하는 다중-특이적 항-AMC 분자가 제공된다.

[0211] 일부 실시양태에서, a) i) G-F/Y-S/T-F-D/S/T-D/N/S-Y/A-A/G/W의 아미노산 서열 (서열식별번호: 87)을 포함하는 HC-CDR1, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, I/S-K/S-X-H/Y-X-G-X-T의 아미노산 서열 (서열식별번호: 88)을 포함하는 HC-CDR2, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 A/G-X-W/Y-Y-X-X-X-F/Y-D의 아미노산 서열 (서열식별번호: 89)을 포함하는 HC-CDR3, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 및 ii) S/T-G/S-D/N-I/V-A/G-A/S/V-X-H/Y의 아미노산 서열 (서열식별번호: 120)을 포함하는 LC-CDR1, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 Q-S/T-Y/W-D/T-S/T-A/S의 아미노산 서열 (서열식별번호: 121)을 포함하는 LC-CDR3, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 경쇄 가변 도메인 (여기서 X는 임의의 아미노산일 수 있음)을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티, 및 b) 제2 항원-결합 모이어티를 포함하는 다중-특이적 항-AMC 분자가 제공된다.

[0212] 일부 실시양태에서, a) i) G-F/Y-S/T-F-D/S/T-D/N/S-Y/A-A/G/W의 아미노산 서열 (서열식별번호: 87)을 포함하는 HC-CDR1, I/S-K/S-X-H/Y-X-G-X-T의 아미노산 서열 (서열식별번호: 88)을 포함하는 HC-CDR2, 및 A/G-X-W/Y-Y-X-X-X-F/Y-D의 아미노산 서열 (서열식별번호: 89)을 포함하는 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 및 ii) S/T-G/S-D/N-I/V-A/G-A/S/V-X-H/Y의 아미노산 서열 (서열식별번호: 120)을 포함하는 LC-CDR1, 및 Q-S/T-Y/W-D/T-S/T-A/S의 아미노산 서열 (서열식별번호: 121)을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인 (여기서 X는 임의의 아미노산일 수 있음)을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티, 및 b) 제2 항원-결합 모이어티를 포함하는 다중-특이적 항-AMC 분자가 제공된다.

[0213] 일부 실시양태에서, a) i) 서열식별번호: 57-66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 서열식별번호: 67-76 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및 ii) 서열식별번호: 90-99 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 서열식별번호: 100-109 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2, 또는 최대 약 3개 (예컨대 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티; 및 b) 제2 항원-결합 모이어티를 포함하는 다중-특이적 항-AMC 분자가 제공된다.

[0214] 일부 실시양태에서, a) i) 서열식별번호: 57-66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1; 서열식별번호: 67-76 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2; 및 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 또는 HC-CDR 서열에서 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체; 및 ii) 서열식별번호: 90-99 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1; 서열식별번호: 100-109 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2; 및 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인 서열; 또는 LC-CDR 서열에서 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티; 및 b) 제2 항원-결합 모이어티를 포함하는 다중-특이적 항-AMC 분자가 제공된다.

[0215] 일부 실시양태에서, a) i) 서열식별번호: 57-66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1; 서열식별번호: 67-76 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2; 및 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 및 ii) 서열식별번호: 90-99 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1; 서열식별번호: 100-109 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2; 및 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인 서

열을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티; 및 b) 제2 항원-결합 모이어티를 포함하는 다중-특이적 항-AMC 분자가 제공된다.

- [0216] 일부 실시양태에서, a) 서열식별번호: 17-26 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 또는 적어도 약 95% (예를 들어 적어도 약 96%, 97%, 98%, 또는 99% 중 어느 것) 서열 동일성을 갖는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 27-36 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인, 또는 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 그의 변이체를 포함하는 항-AMC 항체 모이어티; 및 b) 제2 scFv를 포함하는 다중-특이적 항-AMC 분자가 제공된다.
- [0217] 일부 실시양태에서, a) 서열식별번호: 17-26 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열식별번호: 27-36 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항-AMC 항체 모이어티; 및 b) 제2 항원-결합 모이어티를 포함하는 다중-특이적 항-AMC 분자가 제공된다.
- [0218] 일부 실시양태에서, 다중-특이적 항-AMC 분자는, 예를 들어, 디아바디 (Db), 단일쇄 디아바디 (scDb), 탠덤 scDb (Tandab), 선형 이량체 scDb (LD-scDb), 원형 이량체 scDb (CD-scDb), 디-디아바디, 탠덤 scFv, 탠덤 디-scFv (예를 들어, 이중특이적 T 세포 연관체), 탠덤 트리-scFv, 트리(아)바디, 이중특이적 Fab2, 디-미니항체, 테트라바디, scFv-Fc-scFv 융합체, 이중-친화도 재표적화 (DART) 항체, 이중 가변 도메인 (DVD) 항체, IgG-scFab, scFab-ds-scFv, Fv2-Fc, IgG-scFv 융합체, 독 앤 록 (DNL) 항체, 노브-인투-홀 (KiH) 항체 (KiH 기술에 의해 제조된 이중특이적 IgG), 듀오바디 (듀오바디 기술에 의해 제조된 이중특이적 IgG), 이중다량체 항체 또는 이중접합체 항체이다. 일부 실시양태에서, 다중-특이적 항-AMC 분자는 탠덤 scFv (예를 들어, 탠덤 디-scFv, 예컨대 이중특이적 T 세포 연관체)이다.
- [0219] 탠덤 scFv
- [0220] 일부 실시양태에서 다중-특이적 항-AMC 분자는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 제1 scFv 및 제2 scFv를 포함하는 탠덤 scFv (본원에서 "탠덤 scFv 다중-특이적 항-AMC 항체"로 또한 지칭됨)이다. 일부 실시양태에서, 탠덤 scFv 다중-특이적 항-AMC 항체는 적어도 1개 (예컨대 적어도 약 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과 중 어느 것)의 추가의 scFv를 추가로 포함한다.
- [0221] 일부 실시양태에서, a) AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 제1 scFv, 및 b) 제2 scFv를 포함하는 탠덤 scFv 다중-특이적 (예를 들어, 이중특이적) 항-AMC 항체가 제공된다. 일부 실시양태에서, AFP 펩티드는 AFP158 (서열식별번호: 4)이다. 일부 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질은 HLA-A*02:01이다. 일부 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질은 HLA-A*02:01이다. 일부 실시양태에서, 제2 scFv는 MHC 부류 I 단백질에 결합된 상이한 AFP 펩티드를 포함하는 복합체에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 제2 scFv는 상이한 MHC 부류 I 단백질에 결합된 AFP 펩티드를 포함하는 복합체에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 제2 scFv는 MHC 부류 I 단백질에 결합된 AFP 펩티드를 포함하는 복합체 상의 상이한 에피토프에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 제2 scFv는 또 다른 항원에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 제2 scFv는 세포, 예컨대 AMC-제시 세포의 표면 상의 항원에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 제2 scFv는 AFP를 발현하지 않는 세포의 표면 상의 항원에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 제2 scFv는 세포독성 세포의 표면 상의 항원에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 제2 scFv는 림프구, 예컨대 T 세포, NK 세포, 호중구, 단핵구, 대식세포, 또는 수지상 세포의 표면 상의 항원에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 제2 scFv는 이펙터 T 세포, 예컨대 세포독성 T 세포의 표면 상의 항원에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 제2 scFv는 예를 들어 CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD28, CD16a, CD56, CD68, 및 GDS2D를 포함하는 이펙터 세포의 표면 상의 항원에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 제1 scFv는 인간, 인간화, 또는 반합성이다. 일부 실시양태에서, 제2 scFv는 인간, 인간화, 또는 반합성이다. 일부 실시양태에서, 제1 scFv 및 제2 scFv는 둘 다 인간, 인간화, 또는 반합성이다. 일부 실시양태에서, 탠덤 scFv 다중-특이적 항-AMC 항체는 적어도 1개 (예컨대 적어도 약 2, 3, 4, 5개, 또는 그 초과 중 어느 것)의 추가의 scFv를 추가로 포함한다.
- [0222] 일부 실시양태에서, a) AFP158 펩티드 (서열식별번호: 4) 및 HLA-A*02:01을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 제1 scFv, 및 b) 제2 scFv를 포함하는 탠덤 scFv 다중-특이적 (예를 들어, 이중특이적) 항-AMC 항체가 제공된다.
- [0223] 일부 실시양태에서, a) i) G-F/Y-S/T-F-D/S/T-D/N/S-Y/A-A/G/W의 아미노산 서열 (서열식별번호: 87)을 포함하는 HC-CDR1, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, I/S-K/S-X-H/Y-X-G-X-T의 아미노산 서열 (서열식별번호: 88)을 포함하는 HC-CDR2, 또는 최대 약 3개 (예

를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 A/G-X-W/Y-Y-X-X-X-F/Y-D의 아미노산 서열 (서열식별번호: 89)을 포함하는 HC-CDR3, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 및 ii) S/T-G/S-D/N-I/V-A/G-A/S/V-X-H/Y의 아미노산 서열 (서열식별번호: 120)을 포함하는 LC-CDR1, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 Q-S/T-Y/W-D/T-S/T-A/S의 아미노산 서열 (서열식별번호: 121)을 포함하는 LC-CDR3, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 경쇄 가변 도메인 (여기서 X는 임의의 아미노산일 수 있음)을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 제1 scFv, 및 b) 제2 scFv를 포함하는 탠덤 scFv 다중-특이적 (예를 들어, 이중특이적) 항-AMC 항체가 제공된다.

[0224] 일부 실시양태에서, a) i) G-F/Y-S/T-F-D/S/T-D/N/S-Y/A-A/G/W의 아미노산 서열 (서열식별번호: 87)을 포함하는 HC-CDR1, I/S-K/S-X-H/Y-X-G-X-T의 아미노산 서열 (서열식별번호: 88)을 포함하는 HC-CDR2, 및 A/G-X-W/Y-Y-X-X-X-F/Y-D의 아미노산 서열 (서열식별번호: 89)을 포함하는 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 및 ii) S/T-G/S-D/N-I/V-A/G-A/S/V-X-H/Y의 아미노산 서열 (서열식별번호: 120)을 포함하는 LC-CDR1, 및 Q-S/T-Y/W-D/T-S/T-A/S의 아미노산 서열 (서열식별번호: 121)을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인 (여기서 X는 임의의 아미노산일 수 있음)을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 제1 scFv, 및 b) 제2 scFv를 포함하는 탠덤 scFv 다중-특이적 (예를 들어, 이중특이적) 항-AMC 항체가 제공된다.

[0225] 일부 실시양태에서, a) i) 서열식별번호: 57-66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 서열식별번호: 67-76 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및 ii) 서열식별번호: 90-99 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 서열식별번호: 100-109 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2, 또는 최대 약 3개 (예컨대 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 제1 scFv; 및 b) 제2 scFv를 포함하는 탠덤 scFv 다중-특이적 (예를 들어, 이중특이적) 항-AMC 항체가 제공된다.

[0226] 일부 실시양태에서, a) i) 서열식별번호: 57-66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1; 서열식별번호: 67-76 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2; 및 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 또는 HC-CDR 서열에서 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체; 및 ii) 서열식별번호: 90-99 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1; 서열식별번호: 100-109 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2; 및 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인 서열; 또는 LC-CDR 서열에서 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 제1 scFv; 및 b) 제2 scFv를 포함하는 탠덤 scFv 다중-특이적 (예를 들어, 이중특이적) 항-AMC 항체가 제공된다.

[0227] 일부 실시양태에서, a) i) 서열식별번호: 57-66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1; 서열식별번호: 67-76 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2; 및 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 및 ii) 서열식별번호: 90-99 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1; 서열식별번호: 100-109 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2; 및 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인 서열을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 제1 scFv; 및 b) 제2 scFv를 포함하는 탠덤 scFv 다중-특이적 (예를 들어, 이중특이적) 항-AMC 항체가 제공된다.

[0228] 일부 실시양태에서, a) 서열식별번호: 17-26 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 또는 적어도 약 95% (예를 들어 적어도 약 96%, 97%, 98%, 또는 99% 중 어느 것) 서열 동일성을 갖는 그의 변이체,

및 서열식별번호: 27-36 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인, 또는 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 그의 변이체를 포함하는 제1 scFv; 및 b) 제2 scFv를 포함하는 탠덤 scFv 다중-특이적 (예를 들어, 이중특이적) 항-AMC 항체가 제공된다.

[0229] 일부 실시양태에서, a) 서열식별번호: 17-26 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열식별번호: 27-36 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 제1 scFv; 및 b) 제2 scFv를 포함하는 탠덤 scFv 다중-특이적 (예를 들어, 이중특이적) 항-AMC 항체가 제공된다.

[0230] 일부 실시양태에서, a) AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 제1 scFv, 및 b) 제2 scFv를 포함하는 탠덤 scFv 다중-특이적 (예를 들어, 이중특이적) 항-AMC 항체가 제공되고, 여기서 탠덤 scFv 다중-특이적 항-AMC 항체는 탠덤 디-scFv 또는 탠덤 트리-scFv이다. 일부 실시양태에서, 탠덤 scFv 다중-특이적 항-AMC 항체는 탠덤 디-scFv이다. 일부 실시양태에서, 탠덤 scFv 다중-특이적 항-AMC 항체는 이중특이적 T-세포 연관체이다.

[0231] 예를 들어, 일부 실시양태에서, a) AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 제1 scFv, 및 b) T 세포의 표면 상의 항원에 특이적으로 결합하는 제2 scFv를 포함하는 탠덤 디-scFv 이중특이적 항-AMC 항체가 제공된다. 일부 실시양태에서, AFP 펩티드는 AFP158 (서열식별번호: 4)이다. 일부 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질은 HLA-A02이다. 일부 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질은 HLA-A*02:01이다. 일부 실시양태에서, 제2 scFv는 이펙터 T 세포, 예컨대 세포독성 T 세포의 표면 상의 항원에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 제2 scFv는 예를 들어, CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD28, OX40, GITR, CD137, CD27, CD40L, 및 HVEM으로 이루어진 군으로부터 선택된 항원에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 제2 scFv는 T 세포의 표면 상의 항원 상의 효능작용 에피토프에 특이적으로 결합하며, 여기서 제2 scFv의 항원과의 결합은 T 세포 활성화를 증진시킨다. 일부 실시양태에서, 제1 scFv는 인간, 인간화, 또는 반합성이다. 일부 실시양태에서, 제2 scFv는 인간, 인간화, 또는 반합성이다. 일부 실시양태에서, 제1 scFv 및 제2 scFv는 둘 다 인간, 인간화, 또는 반합성이다.

[0232] 일부 실시양태에서, a) AFP158 펩티드 (서열식별번호: 4) 및 HLA-A*02:01을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 제1 scFv, 및 b) T 세포의 표면 상의 항원에 특이적으로 결합하는 제2 scFv를 포함하는 탠덤 디-scFv 이중특이적 항-AMC 항체가 제공된다.

[0233] 일부 실시양태에서, a) i) G-F/Y-S/T-F-D/S/T-D/N/S-Y/A-A/G/W의 아미노산 서열 (서열식별번호: 87)을 포함하는 HC-CDR1, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, I/S-K/S-X-H/Y-X-G-X-T의 아미노산 서열 (서열식별번호: 88)을 포함하는 HC-CDR2, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 A/G-X-W/Y-Y-X-X-X-F/Y-D의 아미노산 서열 (서열식별번호: 89)을 포함하는 HC-CDR3, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 및 ii) S/T-G/S-D/N-I/V-A/G-A/S/V-X-H/Y의 아미노산 서열 (서열식별번호: 120)을 포함하는 LC-CDR1, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 Q-S/T-Y/W-D/T-S/T-A/S의 아미노산 서열 (서열식별번호: 121)을 포함하는 LC-CDR3, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 경쇄 가변 도메인 (여기서 X는 임의의 아미노산일 수 있음)을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 제1 scFv, 및 b) T 세포의 표면 상의 항원에 특이적으로 결합하는 제2 scFv를 포함하는 탠덤 디-scFv 이중특이적 항-AMC 항체가 제공된다.

[0234] 일부 실시양태에서, a) i) G-F/Y-S/T-F-D/S/T-D/N/S-Y/A-A/G/W의 아미노산 서열 (서열식별번호: 87)을 포함하는 HC-CDR1, I/S-K/S-X-H/Y-X-G-X-T의 아미노산 서열 (서열식별번호: 88)을 포함하는 HC-CDR2, 및 A/G-X-W/Y-Y-X-X-X-F/Y-D의 아미노산 서열 (서열식별번호: 89)을 포함하는 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 및 ii) S/T-G/S-D/N-I/V-A/G-A/S/V-X-H/Y의 아미노산 서열 (서열식별번호: 120)을 포함하는 LC-CDR1, 및 Q-S/T-Y/W-D/T-S/T-A/S의 아미노산 서열 (서열식별번호: 121)을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인 (여기서 X는 임의의 아미노산일 수 있음)을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 제1 scFv, 및 b) T 세포의 표면 상의 항원에 특이적으로 결합하는 제2 scFv를 포함하는 탠덤 디-scFv 이중특이적 항-AMC 항체가 제공된다.

[0235] 일부 실시양태에서, a) i) 서열식별번호: 57-66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 서열식별번호:

67-76 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및 ii) 서열식별번호: 90-99 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 서열식별번호: 100-109 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2, 또는 최대 약 3개 (예컨대 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 제1 scFv; 및 b) T 세포의 표면 상의 항원에 특이적으로 결합하는 제2 scFv를 포함하는 탠덤 디-scFv 이중특이적 항-AMC 항체가 제공된다.

[0236] 일부 실시양태에서, a) i) 서열식별번호: 57-66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1; 서열식별번호: 67-76 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2; 및 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 또는 HC-CDR 서열에서 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체; 및 ii) 서열식별번호: 90-99 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1; 서열식별번호: 100-109 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2; 및 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인 서열; 또는 LC-CDR 서열에서 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 제1 scFv, 및 b) T 세포의 표면 상의 항원에 특이적으로 결합하는 제2 scFv를 포함하는 탠덤 디-scFv 이중특이적 항-AMC 항체가 제공된다.

[0237] 일부 실시양태에서, a) i) 서열식별번호: 57-66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1; 서열식별번호: 67-76 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2; 및 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 및 ii) 서열식별번호: 90-99 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1; 서열식별번호: 100-109 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2; 및 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인 서열을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 제1 scFv; 및 b) T 세포의 표면 상의 항원에 특이적으로 결합하는 제2 scFv를 포함하는 탠덤 디-scFv 이중특이적 항-AMC 항체가 제공된다.

[0238] 일부 실시양태에서, a) 서열식별번호: 17-26 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 또는 적어도 약 95% (예를 들어 적어도 약 96%, 97%, 98%, 또는 99% 중 어느 것) 서열 동일성을 갖는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 27-36 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인, 또는 적어도 약 95% (예를 들어 적어도 약 96%, 97%, 98%, 또는 99% 중 어느 것) 서열 동일성을 갖는 그의 변이체를 포함하는 제1 scFv, 및 b) T 세포의 표면 상의 항원에 특이적으로 결합하는 제2 scFv를 포함하는 탠덤 디-scFv 이중특이적 항-AMC 항체가 제공된다.

[0239] 일부 실시양태에서, a) 서열식별번호: 17-26 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열식별번호: 27-36 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 제1 scFv, 및 b) T 세포의 표면 상의 항원에 특이적으로 결합하는 제2 scFv를 포함하는 탠덤 디-scFv 이중특이적 항-AMC 항체가 제공된다.

[0240] 일부 실시양태에서, a) AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 제1 scFv, 및 b) CD3 ϵ 에 특이적으로 결합하는 제2 scFv를 포함하는 탠덤 디-scFv 이중특이적 항-AMC 항체가 제공된다. 일부 실시양태에서, AFP 펩티드는 AFP158 (서열식별번호: 4)이다. 일부 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질은 HLA-A02이다. 일부 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질은 HLA-A*02:01이다. 일부 실시양태에서, 제1 scFv는 펩티드 링커를 사용하는 연결을 통해 제2 scFv에 융합된다. 일부 실시양태에서, 펩티드 링커는 약 5 내지 약 20개 (예컨대 약 5, 10, 15, 또는 20개 중 어느 것 (이들 값 사이의 임의의 범위 포함))의 아미노산 길이이다. 일부 실시양태에서, 펩티드 링커는 아미노산 서열 GGGGS를 포함한다 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진다). 일부 실시양태에서, 제1 scFv는 인간, 인간화, 또는 반합성이다. 일부 실시양태에서, 제2 scFv는 인간, 인간화, 또는 반합성이다. 일부 실시양태에서, 제1 scFv 및 제2 scFv는 둘 다 인간, 인간화, 또는 반합성이다.

- [0241] 일부 실시양태에서, a) AFP158 펩티드 (서열식별번호: 4) 및 HLA-A*02:01을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 제1 scFv, 및 b) CD3 ϵ 에 특이적으로 결합하는 제2 scFv를 포함하는 탠덤 디-scFv 이중특이적 항-AMC 항체가 제공된다. 일부 실시양태에서, 제1 scFv는 펩티드 링커를 사용하는 연결을 통해 제2 scFv에 융합된다. 일부 실시양태에서, 펩티드 링커는 약 5 내지 약 20개 (예컨대 약 5, 10, 15, 또는 20개 중 어느 것 (이들 값 사이의 임의의 범위 포함))의 아미노산 길이이다. 일부 실시양태에서, 펩티드 링커는 아미노산 서열 GGGGS를 포함한다 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진다). 일부 실시양태에서, 제1 scFv는 인간, 인간화, 또는 반합성이다. 일부 실시양태에서, 제2 scFv는 인간, 인간화, 또는 반합성이다. 일부 실시양태에서, 제1 scFv 및 제2 scFv는 둘 다 인간, 인간화, 또는 반합성이다.
- [0242] 일부 실시양태에서, a) i) G-F/Y-S/T-F-D/S/T-D/N/S-Y/A-A/G/W의 아미노산 서열 (서열식별번호: 87)을 포함하는 HC-CDR1, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, I/S-K/S-X-H/Y-X-G-X-T의 아미노산 서열 (서열식별번호: 88)을 포함하는 HC-CDR2, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 A/G-X-W/Y-Y-X-X-X-F/Y-D의 아미노산 서열 (서열식별번호: 89)을 포함하는 HC-CDR3, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 및 ii) S/T-G/S-D/N-I/V-A/G-A/S/V-X-H/Y의 아미노산 서열 (서열식별번호: 120)을 포함하는 LC-CDR1, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 Q-S/T-Y/W-D/T-S/T-A/S의 아미노산 서열 (서열식별번호: 121)을 포함하는 LC-CDR3, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 경쇄 가변 도메인 (여기서 X는 임의의 아미노산일 수 있음)을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 제1 scFv, 및 b) CD3 ϵ 에 특이적으로 결합하는 제2 scFv를 포함하는 탠덤 디-scFv 이중특이적 항-AMC 항체가 제공된다. 일부 실시양태에서, 제1 scFv는 펩티드 링커를 사용하는 연결을 통해 제2 scFv에 융합된다. 일부 실시양태에서, 펩티드 링커는 약 5 내지 약 20개 (예컨대 약 5, 10, 15, 또는 20개 중 어느 것 (이들 값 사이의 임의의 범위 포함))의 아미노산 길이이다. 일부 실시양태에서, 펩티드 링커는 아미노산 서열 GGGGS를 포함한다 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진다). 일부 실시양태에서, 제1 scFv는 인간, 인간화, 또는 반합성이다. 일부 실시양태에서, 제2 scFv는 인간, 인간화, 또는 반합성이다. 일부 실시양태에서, 제1 scFv 및 제2 scFv는 둘 다 인간, 인간화, 또는 반합성이다.
- [0243] 일부 실시양태에서, a) i) G-F/Y-S/T-F-D/S/T-D/N/S-Y/A-A/G/W의 아미노산 서열 (서열식별번호: 87)을 포함하는 HC-CDR1, I/S-K/S-X-H/Y-X-G-X-T의 아미노산 서열 (서열식별번호: 88)을 포함하는 HC-CDR2, 및 A/G-X-W/Y-Y-X-X-X-F/Y-D의 아미노산 서열 (서열식별번호: 89)을 포함하는 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 및 ii) S/T-G/S-D/N-I/V-A/G-A/S/V-X-H/Y의 아미노산 서열 (서열식별번호: 120)을 포함하는 LC-CDR1, 및 Q-S/T-Y/W-D/T-S/T-A/S의 아미노산 서열 (서열식별번호: 121)을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인 (여기서 X는 임의의 아미노산일 수 있음)을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 제1 scFv, 및 b) CD3 ϵ 에 특이적으로 결합하는 제2 scFv를 포함하는 탠덤 디-scFv 이중특이적 항-AMC 항체가 제공된다. 일부 실시양태에서, 제1 scFv는 펩티드 링커를 사용하는 연결을 통해 제2 scFv에 융합된다. 일부 실시양태에서, 펩티드 링커는 약 5 내지 약 20개 (예컨대 약 5, 10, 15, 또는 20개 중 어느 것 (이들 값 사이의 임의의 범위 포함))의 아미노산 길이이다. 일부 실시양태에서, 펩티드 링커는 아미노산 서열 GGGGS를 포함한다 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진다). 일부 실시양태에서, 제1 scFv는 인간, 인간화, 또는 반합성이다. 일부 실시양태에서, 제2 scFv는 인간, 인간화, 또는 반합성이다. 일부 실시양태에서, 제1 scFv 및 제2 scFv는 둘 다 인간, 인간화, 또는 반합성이다.
- [0244] 일부 실시양태에서, a) i) 서열식별번호: 57-66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 서열식별번호: 67-76 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및 ii) 서열식별번호: 90-99 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 서열식별번호: 100-109 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2, 또는 최대 약 3개 (예컨대 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어

는 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 제1 scFv, 및 b) CD3 ε에 특이적으로 결합하는 제2 scFv를 포함하는 탠덤 디-scFv 이중특이적 항-AMC 항체가 제공된다. 일부 실시양태에서, 제1 scFv는 펩티드 링커를 사용하는 연결을 통해 제2 scFv에 융합된다. 일부 실시양태에서, 펩티드 링커는 약 5 내지 약 20개 (예컨대 약 5, 10, 15, 또는 20개 중 어느 것 (이들 값 사이의 임의의 범위 포함))의 아미노산 길이이다. 일부 실시양태에서, 펩티드 링커는 아미노산 서열 GGGGS를 포함한다 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진다). 일부 실시양태에서, 제1 scFv는 인간, 인간화, 또는 반합성이다. 일부 실시양태에서, 제2 scFv는 인간, 인간화, 또는 반합성이다. 일부 실시양태에서, 제1 scFv 및 제2 scFv는 둘 다 인간, 인간화, 또는 반합성이다.

[0245] 일부 실시양태에서, a) i) 서열식별번호: 57-66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1; 서열식별번호: 67-76 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2; 및 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 또는 HC-CDR 서열에서 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체; 및 ii) 서열식별번호: 90-99 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1; 서열식별번호: 100-109 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2; 및 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인 서열; 또는 LC-CDR 서열에서 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 제1 scFv, 및 b) CD3 ε에 특이적으로 결합하는 제2 scFv를 포함하는 탠덤 디-scFv 이중특이적 항-AMC 항체가 제공된다. 일부 실시양태에서, 제1 scFv는 펩티드 링커를 사용하는 연결을 통해 제2 scFv에 융합된다. 일부 실시양태에서, 펩티드 링커는 약 5 내지 약 20개 (예컨대 약 5, 10, 15, 또는 20개 중 어느 것 (이들 값 사이의 임의의 범위 포함))의 아미노산 길이이다. 일부 실시양태에서, 펩티드 링커는 아미노산 서열 GGGGS를 포함한다 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진다). 일부 실시양태에서, 제1 scFv는 인간, 인간화, 또는 반합성이다. 일부 실시양태에서, 제2 scFv는 인간, 인간화, 또는 반합성이다. 일부 실시양태에서, 제1 scFv 및 제2 scFv는 둘 다 인간, 인간화, 또는 반합성이다.

[0246] 일부 실시양태에서, a) i) 서열식별번호: 57-66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1; 서열식별번호: 67-76 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2; 및 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 및 ii) 서열식별번호: 90-99 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1; 서열식별번호: 100-109 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2; 및 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인 서열을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 제1 scFv; 및 b) CD3 ε에 특이적으로 결합하는 제2 scFv를 포함하는 탠덤 디-scFv 이중특이적 항-AMC 항체가 제공된다. 일부 실시양태에서, 제1 scFv는 펩티드 링커를 사용하는 연결을 통해 제2 scFv에 융합된다. 일부 실시양태에서, 펩티드 링커는 약 5 내지 약 20개 (예컨대 약 5, 10, 15, 또는 20개 중 어느 것 (이들 값 사이의 임의의 범위 포함))의 아미노산 길이이다. 일부 실시양태에서, 펩티드 링커는 아미노산 서열 GGGGS를 포함한다 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진다). 일부 실시양태에서, 제1 scFv는 인간, 인간화, 또는 반합성이다. 일부 실시양태에서, 제2 scFv는 인간, 인간화, 또는 반합성이다. 일부 실시양태에서, 제1 scFv 및 제2 scFv는 둘 다 인간, 인간화, 또는 반합성이다.

[0247] 일부 실시양태에서, a) 서열식별번호: 17-26 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 또는 적어도 약 95% (예를 들어 적어도 약 96%, 97%, 98%, 또는 99% 중 어느 것) 서열 동일성을 갖는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 27-36 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인, 또는 적어도 약 95% (예를 들어 적어도 약 96%, 97%, 98%, 또는 99% 중 어느 것) 서열 동일성을 갖는 그의 변이체를 포함하는 제1 scFv, 및 b) CD3 ε에 특이적으로 결합하는 제2 scFv를 포함하는 탠덤 디-scFv 이중특이적 항-AMC 항체가 제공된다. 일부 실시양태에서, 제1 scFv는 펩티드 링커를 사용하는 연결을 통해 제2 scFv에 융합된다. 일부 실시양태에서, 펩티드 링커는 약 5 내지 약 20개 (예컨대 약 5, 10, 15, 또는 20개 중 어느 것 (이들 값 사이의 임의의 범위 포함))의 아미노산 길이이다. 일부 실시양태에서, 펩티드 링커는 아미노산 서열 GGGGS를 포함한다 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진다). 일부 실시양태에서, 제1 scFv는 인간, 인간화, 또는 반합성이다. 일부 실시양태에서, 제2 scFv는 인간, 인간화, 또는 반합성이다. 일부 실시양태에서, 제1 scFv 및 제2 scFv는 둘 다 인간, 인간화, 또는 반합성이다.

[0248] 일부 실시양태에서, a) 서열식별번호: 17-26 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열식별번호: 27-36 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 제1 scFv, 및 b)

CD3 ϵ 에 특이적으로 결합하는 제2 scFv를 포함하는 탠덤 디-scFv 이중특이적 항-AMC 항체가 제공된다. 일부 실시양태에서, 제1 scFv는 펩티드 링커를 사용하는 연결을 통해 제2 scFv에 융합된다. 일부 실시양태에서, 펩티드 링커는 약 5 내지 약 20개 (예컨대 약 5, 10, 15, 또는 20개 중 어느 것 (이들 값 사이의 임의의 범위 포함))의 아미노산 길이이다. 일부 실시양태에서, 펩티드 링커는 아미노산 서열 GGGGS를 포함한다 (및 일부 실시양태에서 이로 이루어진다). 일부 실시양태에서, 제1 scFv는 인간, 인간화, 또는 반합성이다. 일부 실시양태에서, 제2 scFv는 인간, 인간화, 또는 반합성이다. 일부 실시양태에서, 제1 scFv 및 제2 scFv는 둘 다 인간, 인간화, 또는 반합성이다.

[0249] 일부 실시양태에서, 탠덤 디-scFv 이중특이적 항-AMC 항체는 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 약 0.1 pM 내지 약 500 nM (예컨대 약 0.1 pM, 1.0 pM, 10 pM, 50 pM, 100 pM, 500 pM, 1 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 또는 500 nM 중 어느 것 (이들 값 사이의 임의의 범위 포함))의 K_d 로 결합한다. 일부 실시양태에서, 탠덤 디-scFv 이중특이적 항-AMC 항체는 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 약 1 nM 내지 약 500 nM (예컨대 약 1, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 또는 500 nM 중 어느 것 (이들 값 사이의 임의의 범위 포함))의 K_d 로 결합한다.

[0250] 키메라 항원 수용체 (CAR) 및 CAR 이펙터 세포

[0251] 일부 실시양태에서 항-AMC 구축물은 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR) (본원에서 "항-AMC CAR"로 또한 지칭됨)이다. 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 CAR을 포함하는 CAR 이펙터 세포 (예를 들어, T 세포) (본원에서 "항-AMC CAR 이펙터 세포", 예를 들어, "항-AMC CAR T 세포"로 또한 지칭됨)가 또한 제공된다.

[0252] 항-AMC CAR은 a) AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 세포의 도메인 및 b) 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 막횡단 도메인은 세포의 도메인과 세포내 도메인 사이에 존재할 수 있다.

[0253] 항-AMC CAR의 세포의 도메인과 막횡단 도메인 사이에, 또는 항-AMC CAR의 세포내 도메인과 막횡단 도메인 사이에, 스페이서 도메인이 있을 수 있다. 스페이서 도메인은 막횡단 도메인을 세포의 도메인 또는 세포내 도메인에 폴리펩티드 채로 연결시키도록 기능하는 임의의 올리고- 또는 폴리펩티드일 수 있다. 스페이서 도메인은 예를 들어 약 10 내지 약 100개, 또는 약 25 내지 약 50개의 아미노산을 포함하는 최대 약 300개의 아미노산을 포함할 수 있다.

[0254] 막횡단 도메인은 천연 또는 합성 공급원으로부터 유래될 수 있다. 공급원이 천연인 경우에, 도메인은 임의의 막-결합 또는 막횡단 단백질로부터 유래될 수 있다. 본 발명에 특히 유용한 막횡단 영역은 T-세포 수용체의 α , β , δ , 또는 γ 채, CD28, CD3 ϵ , CD3 ζ , CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, 또는 CD154로부터 유래될 수 있다 (즉 적어도 그의 막횡단 영역(들)을 포함할 수 있다). 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 합성일 수 있고, 이 경우에 이는 소수성 잔기 예컨대 류신 및 발린을 우세하게 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 페닐알라닌, 트립토판 및 발린의 삼중체는 합성 막횡단 도메인의 각 말단에서 발견될 수 있다. 일부 실시양태에서, 예를 들어, 약 2 내지 약 10개 (예컨대 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 중 어느 것)의 아미노산 길이의 길이를 갖는 짧은 올리고- 또는 폴리펩티드 링커는 항-AMC CAR의 막횡단 도메인과 세포내 신호전달 도메인 사이에 연결을 형성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는 글리신-세린 이중체이다.

[0255] 일부 실시양태에서, 천연적으로 항-AMC CAR의 세포내 도메인 내의 서열 중 하나와 연관된 막횡단 도메인이 사용된다 (예를 들어, 항-AMC CAR 세포내 도메인이 CD28 공동-자극 서열을 포함하는 경우에, 항-AMC CAR의 막횡단 도메인은 CD28 막횡단 도메인으로부터 유래된다). 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 이러한 도메인의 동일하거나 상이한 표면 막 단백질의 막횡단 도메인에의 결합을 회피하여 수용체 복합체의 다른 구성원과의 상호작용을 최소화하도록 선택되거나 또는 아미노산 치환에 의해 변형될 수 있다.

[0256] 항-AMC CAR의 세포내 신호전달 도메인은 항-AMC CAR이 도입된 면역 세포의 정상 이펙터 기능 중 적어도 하나의 활성화를 담당한다. T 세포의 이펙터 기능은, 예를 들어, 시토키인의 분비를 포함하는 세포용해 활성 또는 헬퍼 활성일 수 있다. 따라서 용어 "세포내 신호전달 도메인"은 이펙터 기능 신호를 전달하고 특수한 기능을 수행하도록 세포를 지시하는 단백질의 부분을 지칭한다. 통상적으로 전체 세포내 신호전달 도메인이 사용될 수 있지만, 많은 경우에서 전체 채를 사용할 필요는 없다. 세포내 신호전달 도메인의 말단절단된 부분이 사용되는 정도로, 이러한 말단절단된 부분은 이펙터 기능 신호를 전달하는 한 무손상 채 대신 사용될 수 있다. 용어 "세

세포내 신호전달 서열"은 따라서 이펙터 기능 신호를 전달하기에 충분한 세포내 신호전달 도메인의 임의의 말단절단된 부분을 포함하도록 의도된다.

- [0257] 본 발명의 항-AMC CAR에 사용하기 위한 세포내 신호전달 도메인의 예는 T 세포 수용체 (TCR) 및 항원 수용체 연관 후에 신호 전달을 개시하기 위해 함께 작용하는 보조-수용체의 세포질 서열 뿐만 아니라, 이들 서열의 임의의 유도체 또는 변이체 및 동일한 기능적 능력을 갖는 임의의 합성 서열을 포함한다.
- [0258] TCR을 통해 생성된 신호는 단독으로 T 세포의 완전한 활성화에 불충분하고 2차 또는 공동-자극 신호가 또한 요구된다는 것이 공지되어 있다. 따라서, T 세포 활성화는 세포내 신호전달 서열의 2개의 별개의 부류: TCR을 통해 항원-의존성 1차 활성화를 개시하는 것 (1차 신호전달 서열) 및 항원-비의존성 방식으로 작용하여 2차 또는 공동-자극 신호를 제공하는 것 (공동-자극 신호전달 서열)에 의해 매개되는 것으로 언급될 수 있다.
- [0259] 1차 신호전달 서열은 TCR 복합체의 1차 활성화를 자극 방식으로 또는 억제 방식으로 조절한다. 자극 방식으로 작용하는 1차 신호전달 서열은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로 공지된 신호전달 모티프를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서 항-AMC CAR 구축물은 하나 이상의 ITAM을 포함한다.
- [0260] 본 발명에 특히 유용한 1차 신호전달 서열을 함유하는 ITAM의 예는 TCR ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD5, CD22, CD79a, CD79b, 및 CD66d로부터 유래된 것을 포함한다.
- [0261] 일부 실시양태에서, 항-AMC CAR은 CD3 ζ 로부터 유래된 1차 신호전달 서열을 포함한다. 예를 들어, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 CD3 ζ 세포내 신호전달 서열 그 자체를 포함할 수 있거나 또는 본 발명의 항-AMC CAR의 문맥에 유용한 임의의 다른 목적하는 세포내 신호전달 도메인(들)과 조합될 수 있다. 예를 들어, 항-AMC CAR의 세포내 도메인은 CD3 ζ 세포내 신호전달 서열 및 공동자극 신호전달 서열을 포함할 수 있다. 공동자극 신호전달 서열은 예를 들어, CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능-연관 항원-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, CD83과 특이적으로 결합하는 리간드 등을 포함하는 공동자극 분자의 세포내 도메인의 부분일 수 있다.
- [0262] 일부 실시양태에서, 항-AMC CAR의 세포내 신호전달 도메인은 CD3 ζ 의 세포내 신호전달 서열 및 CD28의 세포내 신호전달 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-AMC CAR의 세포내 신호전달 도메인은 CD3 ζ 의 세포내 신호전달 서열 및 4-1BB의 세포내 신호전달 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-AMC CAR의 세포내 신호전달 도메인은 CD3 ζ 의 세포내 신호전달 서열 및 CD28 및 4-1BB의 세포내 신호전달 서열을 포함한다.
- [0263] 따라서, 예를 들어, 일부 실시양태에서, a) AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 세포의 도메인, b) 막횡단 도메인, 및 c) 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 항-AMC CAR이 제공된다. 일부 실시양태에서, AFP 펩티드는 AFP158 (서열식별번호: 4)이다. 일부 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질은 HLA-A*02이다. 일부 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질은 HLA-A*02:01이다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 면역 세포를 활성화시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 1차 신호전달 서열 및 공동-자극 신호전달 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 1차 신호전달 서열은 CD3 ζ 세포내 신호전달 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 공동-자극 신호전달 서열은 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 CD3 ζ 세포내 신호전달 서열 및 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함한다.
- [0264] 일부 실시양태에서, a) AFP158 펩티드 (서열식별번호: 4) 및 HLA-A*02:01을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 세포의 도메인, b) 막횡단 도메인, 및 c) 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 항-AMC CAR이 제공된다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 면역 세포를 활성화시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 1차 신호전달 서열 및 공동-자극 신호전달 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 1차 신호전달 서열은 CD3 ζ 세포내 신호전달 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 공동-자극 신호전달 서열은 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 CD3 ζ 세포내 신호전달 서열 및 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함한다.
- [0265] 일부 실시양태에서, a) i) G-F/Y-S/T-F-D/S/T-D/N/S-Y/A-A/G/W의 아미노산 서열 (서열식별번호: 87)을 포함하는 HC-CDR1, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, I/S-K/S-X-H/Y-X-G-X-T의 아미노산 서열 (서열식별번호: 88)을 포함하는 HC-CDR2, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 A/G-X-W/Y-Y-X-X-X-F/Y-D의 아미노산 서열 (서열식별번호: 89)을 포함하는 HC-CDR3, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 및 ii) S/T-G/S-D/N-

I/V-A/G-A/S/V-X-H/Y의 아미노산 서열 (서열식별번호: 120)을 포함하는 LC-CDR1, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 Q-S/T-Y/W-D/T-S/T-A/S의 아미노산 서열 (서열식별번호: 121)을 포함하는 LC-CDR3, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 경쇄 가변 도메인 (여기서 X는 임의의 아미노산일 수 있음)을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 세포의 도메인, b) 막횡단 도메인, 및 c) 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 항-AMC CAR이 제공된다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 면역 세포를 활성화시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 1차 신호전달 서열 및 공동-자극 신호전달 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 1차 신호전달 서열은 CD3ζ 세포내 신호전달 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 공동-자극 신호전달 서열은 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 CD3ζ 세포내 신호전달 서열 및 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함한다.

[0266] 일부 실시양태에서, a) i) G-F/Y-S/T-F-D/S/T-D/N/S-Y/A-A/G/W의 아미노산 서열 (서열식별번호: 87)을 포함하는 HC-CDR1, I/S-K/S-X-H/Y-X-G-X-T의 아미노산 서열 (서열식별번호: 88)을 포함하는 HC-CDR2, 및 A/G-X-W/Y-Y-X-X-X-F/Y-D의 아미노산 서열 (서열식별번호: 89)을 포함하는 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 및 ii) S/T-G/S-D/N-I/V-A/G-A/S/V-X-H/Y의 아미노산 서열 (서열식별번호: 120)을 포함하는 LC-CDR1, 및 Q-S/T-Y/W-D/T-S/T-A/S의 아미노산 서열 (서열식별번호: 121)을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 세포의 도메인; b) 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 항-AMC CAR이 제공된다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 면역 세포를 활성화시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 1차 신호전달 서열 및 공동-자극 신호전달 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 1차 신호전달 서열은 CD3ζ 세포내 신호전달 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 공동-자극 신호전달 서열은 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 CD3ζ 세포내 신호전달 서열 및 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함한다.

[0267] 일부 실시양태에서, a) i) 서열식별번호: 57-66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 서열식별번호: 67-76 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및 ii) 서열식별번호: 90-99 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 서열식별번호: 100-109 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2, 또는 최대 약 3개 (예컨대 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 세포의 도메인; b) 막횡단 도메인, 및 c) 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 항-AMC CAR이 제공된다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 면역 세포를 활성화시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 1차 신호전달 서열 및 공동-자극 신호전달 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 1차 신호전달 서열은 CD3ζ 세포내 신호전달 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 공동-자극 신호전달 서열은 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 CD3ζ 세포내 신호전달 서열 및 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함한다.

[0268] 일부 실시양태에서, a) i) 서열식별번호: 57-66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1; 서열식별번호: 67-76 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2; 및 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 또는 HC-CDR 서열에서 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체; 및 ii) 서열식별번호: 90-99 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1; 서열식별번호: 100-109 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2; 및 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인 서열; 또는 LC-CDR 서열에서 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 세포의 도메인; b) 막횡단 도메인, 및 c) 세포내 신호전달 도메

인을 포함하는 항-AMC CAR이 제공된다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 면역 세포를 활성화시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 1차 신호전달 서열 및 공동-자극 신호전달 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 1차 신호전달 서열은 CD3 ζ 세포내 신호전달 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 공동-자극 신호전달 서열은 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 CD3 ζ 세포내 신호전달 서열 및 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함한다.

[0269] 일부 실시양태에서, a) i) 서열식별번호: 57-66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1; 서열식별번호: 67-76 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2; 및 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 및 ii) 서열식별번호: 90-99 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1; 서열식별번호: 100-109 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2; 및 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인 서열을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 세포외 도메인; b) 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 항-AMC CAR이 제공된다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 면역 세포를 활성화시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 1차 신호전달 서열 및 공동-자극 신호전달 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 1차 신호전달 서열은 CD3 ζ 세포내 신호전달 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 공동-자극 신호전달 서열은 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 CD3 ζ 세포내 신호전달 서열 및 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함한다.

[0270] 일부 실시양태에서, a) 서열식별번호: 17-26 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 또는 적어도 약 95% (예를 들어 적어도 약 96%, 97%, 98%, 또는 99% 중 어느 것) 서열 동일성을 갖는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 27-36 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인, 또는 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 그의 변이체를 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 세포외 도메인; b) 막횡단 도메인, 및 c) 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 항-AMC CAR이 제공된다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 면역 세포를 활성화시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 1차 신호전달 서열 및 공동-자극 신호전달 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 1차 신호전달 서열은 CD3 ζ 세포내 신호전달 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 공동-자극 신호전달 서열은 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 CD3 ζ 세포내 신호전달 서열 및 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함한다.

[0271] 일부 실시양태에서, a) 서열식별번호: 17-26 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열식별번호: 27-36 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 세포외 도메인; b) 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 항-AMC CAR이 제공된다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 면역 세포를 활성화시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 1차 신호전달 서열 및 공동-자극 신호전달 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 1차 신호전달 서열은 CD3 ζ 세포내 신호전달 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 공동-자극 신호전달 서열은 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 CD3 ζ 세포내 신호전달 서열 및 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함한다.

[0272] 일부 실시양태에서, a) AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 세포외 도메인, b) 막횡단 도메인, 및 c) CD3 ζ 세포내 신호전달 서열 및 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 항-AMC CAR이 제공된다. 일부 실시양태에서, AFP 펩티드는 AFP158 (서열식별번호: 4)이다. 일부 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질은 HLA-A02이다. 일부 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질은 HLA-A*02:01이다.

[0273] 일부 실시양태에서, a) AFP158 펩티드 (서열식별번호: 4) 및 HLA-A*02:01을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 세포외 도메인, b) 막횡단 도메인, 및 c) CD3 ζ 세포내 신호전달 서열 및 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 항-AMC CAR이 제공된다.

[0274] 일부 실시양태에서, a) i) G-F/Y-S/T-F-D/S/T-D/N/S-Y/A-A/G/W의 아미노산 서열 (서열식별번호: 87)을 포함하는 HC-CDR1, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, I/S-K/S-X-H/Y-X-G-X-T의 아미노산 서열 (서열식별번호: 88)을 포함하는 HC-CDR2, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 A/G-X-W/Y-Y-X-X-F/Y-D의 아미노산 서열 (서열식별번호: 89)을 포함하는 HC-CDR3, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개

중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 및 ii) S/T-G/S-D/N-I/V-A/G-A/S/V-X-H/Y의 아미노산 서열 (서열식별번호: 120)을 포함하는 LC-CDR1, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 Q-S/T-Y/W-D/T-S/T-A/S의 아미노산 서열 (서열식별번호: 121)을 포함하는 LC-CDR3, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 경쇄 가변 도메인 (여기서 X는 임의의 아미노산일 수 있음)을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 세포외 도메인, b) 막횡단 도메인, 및 c) CD3 ζ 세포내 신호전달 서열 및 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 항-AMC CAR이 제공된다.

[0275] 일부 실시양태에서, a) i) G-F/Y-S/T-F-D/S/T-D/N/S-Y/A-A/G/W의 아미노산 서열 (서열식별번호: 87)을 포함하는 HC-CDR1, I/S-K/S-X-H/Y-X-G-X-T의 아미노산 서열 (서열식별번호: 88)을 포함하는 HC-CDR2, 및 A/G-X-W/Y-Y-X-X-X-F/Y-D의 아미노산 서열 (서열식별번호: 89)을 포함하는 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 및 ii) S/T-G/S-D/N-I/V-A/G-A/S/V-X-H/Y의 아미노산 서열 (서열식별번호: 120)을 포함하는 LC-CDR1, 및 Q-S/T-Y/W-D/T-S/T-A/S의 아미노산 서열 (서열식별번호: 121)을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인 (여기서 X는 임의의 아미노산일 수 있음)을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 세포외 도메인, b) 막횡단 도메인, 및 c) CD3 ζ 세포내 신호전달 서열 및 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 항-AMC CAR이 제공된다.

[0276] 일부 실시양태에서, a) i) 서열식별번호: 57-66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 서열식별번호: 67-76 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및 ii) 서열식별번호: 90-99 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 서열식별번호: 100-109 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2, 또는 최대 약 3개 (예컨대 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 세포외 도메인; b) 막횡단 도메인, 및 c) CD3 ζ 세포내 신호전달 서열 및 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 항-AMC CAR이 제공된다.

[0277] 일부 실시양태에서, a) i) 서열식별번호: 57-66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1; 서열식별번호: 67-76 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2; 및 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 또는 HC-CDR 서열에서 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체; 및 ii) 서열식별번호: 90-99 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1; 서열식별번호: 100-109 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2; 및 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인 서열; 또는 LC-CDR 서열에서 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 세포외 도메인; b) 막횡단 도메인, 및 c) CD3 ζ 세포내 신호전달 서열 및 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 항-AMC CAR이 제공된다.

[0278] 일부 실시양태에서, a) i) 서열식별번호: 57-66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1; 서열식별번호: 67-76 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2; 및 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 및 ii) 서열식별번호: 90-99 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1; 서열식별번호: 100-109 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2; 및 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인 서열을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 세포외 도메인; b) 막횡단 도메인, 및 c) CD3 ζ 세포내 신호전달 서열 및 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 항-AMC CAR이 제공된다.

[0279] 일부 실시양태에서, a) i) 서열식별번호: 17-26 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인,

또는 적어도 약 95% (예를 들어 적어도 약 96%, 97%, 98%, 또는 99% 중 어느 것) 서열 동일성을 갖는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 27-36 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인, 또는 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 그의 변이체를 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 세포의 도메인; b) 막형단 도메인, 및 c) CD3 ζ 세포내 신호전달 서열 및 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 항-AMC CAR이 제공된다.

[0280] 일부 실시양태에서, a) 서열식별번호: 17-26 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열식별번호: 27-36 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 세포의 도메인; b) 막형단 도메인, 및 c) CD3 ζ 세포내 신호전달 서열 및 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 항-AMC CAR이 제공된다.

[0281] 항-AMC CAR을 발현하는 이펙터 세포 (예컨대 림프구, 예를 들어, T 세포)가 본원에서 또한 제공된다.

[0282] 항-AMC CAR을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터를 이펙터 세포 내로 도입하는 것을 포함하는, 항-AMC CAR을 발현하는 이펙터 세포를 생산하는 방법이 또한 제공된다. 일부 실시양태에서, 벡터를 이펙터 세포 내로 도입하는 것은 이펙터 세포를 벡터로 형질도입하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 벡터를 이펙터 세포 내로 도입하는 것은 이펙터 세포를 벡터로 형질감염시키는 것을 포함한다. 벡터의 이펙터 세포로의 형질도입 또는 형질감염은 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법을 사용하여 수행될 수 있다.

[0283] 면역접합체

[0284] 일부 실시양태에서 항-AMC 구축물은 이펙터 분자에 부착된 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 면역접합체 (본원에서 "항-AMC 면역접합체"로 또한 지칭됨)를 포함한다. 일부 실시양태에서 이펙터 분자는 세포독성, 세포증식 억제성이거나 또는 달리 일부 치료 이익을 제공하는 치료제, 예컨대 암 치료제이다. 일부 실시양태에서, 이펙터 분자는 직접적으로 또는 간접적으로 검출가능한 신호를 생성할 수 있는 표지이다.

[0285] 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티 및 치료제를 포함하는 항-AMC 면역접합체 (본원에서 "항체-약물 접합체", 또는 "ADC"로 또한 지칭됨)가 제공된다. 일부 실시양태에서, 치료제는 세포독성, 세포증식억제성이거나 또는 달리 분열하는 표적 세포의 능력을 방지하거나 감소시키는 독소이다. 세포독성제 또는 세포증식억제제, 즉, 암의 치료에서 종양 세포를 사멸시키거나 억제하는 약물의 국부 전달을 위한 ADC의 사용 (Syrigos and Epenetos, *Anticancer Research* 19:605-614 (1999); Niculescu-Duvaz and Springer, *Adv. Drg. Del. Rev.* 26:151-172 (1997); 미국 특허 번호 4,975,278)은 약물 모이어티의 표적 세포로의 표적화 전달, 및 그 내부에서의 세포내 축적을 가능하게 하고, 여기서 이들 비접합된 치료제의 전신 투여는 제거하고자 하는 표적 세포 뿐만 아니라 정상 세포에서 허용되지 않는 수준의 독성을 일으킬 수 있다 (Baldwin et al., *Lancet* (Mar. 15, 1986):603-605 (1986); Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506). 이에 의해 최소 독성을 갖는 최대 효능이 모색된다. 중요하게, 대부분의 정상 세포는 그의 표면 상에 AMC를 제시하지 않기 때문에, 이는 항-AMC 면역접합체에 결합할 수 없고, 독소 또는 다른 치료제의 사멸 효과로부터 보호된다.

[0286] 항-AMC 면역접합체에 사용된 치료제는, 예를 들어, 다우노마이신, 독소루비신, 메토트렉세이트, 및 빈데신을 포함한다 (Rowland et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 21:183-187 (1986)). 항-AMC 면역접합체에 사용된 독소는 박테리아 독소 예컨대 디프테리아 독소, 식물 독소 예컨대 리신, 소분자 독소 예컨대 겔다나마이신 (Mandler et al., *J.Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581 (2000); Mandler et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028 (2000); Mandler et al., *Bioconjugate Chem.* 13:786-791 (2002)), 메이탄시노이드 (EP 1391213; Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623 (1996)), 및 칼리케아미신 (Lode et al., *Cancer Res.* 58:2928 (1998); Hinman et al., *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993))을 포함한다. 독소는 튜불린 결합, DNA 결합, 또는 토포이소머라제 억제를 포함하는 메카니즘에 의해 그의 세포독성 및 세포증식억제성 효과를 발휘할 수 있다. 일부 세포독성 약물은 큰 항체 또는 단백질 수용체 리간드에 접합될 때 불활성이거나 보다 적은 활성인 경향이 있다.

[0287] 사용될 수 있는 효소적 활성 독소 및 그의 단편은, 예를 들어, 디프테리아 A쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A쇄 (슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)로부터), 리신 A쇄, 아브린 A쇄, 모데신 A쇄, α -사르신, 알레우리테스 포르디이(*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피토라카 아메리카

나(*Phytolaca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(*momordica charantia*) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스(*sapaonaria officinalis*) 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신, 및 트리코테센을 포함한다. 예를 들어, 1993년 10월 28일자로 공개된 WO 93/21232를 참조한다.

- [0288] 항-AMC 항체 모이어티 및 하나 이상의 소분자 독소, 예컨대 칼리케아미신, 메이탄시노이드, 돌라스타틴, 아우로스타틴, 트리코테센, 및 CC1065, 및 독소 활성을 갖는 이들 독소의 유도체의 항-AMC 면역접합체가 본원에서 또한 고려된다.
- [0289] 일부 실시양태에서, 세포내 활성을 갖는 치료제를 포함하는 항-AMC 면역접합체가 제공된다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 면역접합체는 내재화되고 치료제는 세포의 단백질 합성을 차단하고, 그 내부에서 세포 사멸을 유발하는 세포독소이다. 일부 실시양태에서, 치료제는 예를 들어 겔로닌, 보우가닌, 사포린, 리신, 리신 A 쇠, 브리오딘, 디프테리아 독소, 레스트릭토신, 슈도모나스 외독소 A 및 그의 변이체를 포함하는 리보솜-불활성화 활성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 세포독소이다. 일부 실시양태에서, 치료제가 리보솜-불활성화 활성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 세포독소인 경우에, 항-AMC 면역접합체는 단백질이 세포에 세포독성하도록 하기 위해 표적 세포에 결합 시 내재화되어야 한다.
- [0290] 일부 실시양태에서, DNA를 파괴하는 작용을 하는 치료제를 포함하는 항-AMC 면역접합체가 제공된다. 일부 실시양태에서, DNA를 파괴하는 작용을 하는 치료제는, 예를 들어, 에네딘 (예를 들어, 칼리케아미신 및 에스페라미신) 및 비-에네딘 소분자 작용제 (예를 들어, 블레오마이신, 메티뮴프로필-EDTA-Fe(II))로 이루어진 군으로부터 선택된다. 본 출원에 따라 유용한 다른 암 치료제는 비제한적으로, 다우노루비신, 독소루비신, 디스타마이신 A, 시스플라틴, 미토마이신 C, 액테이나시딘, 두오카르마이신/CC-1065, 및 블레오마이신/페플레오마이신을 포함한다.
- [0291] 본 발명은 항-AMC 항체 모이어티와 핵산분해 활성을 갖는 화합물 (예를 들어, 리보뉴클레아제 또는 DNA 엔도뉴클레아제 예컨대 데옥시리보뉴클레아제; DNase) 사이에 형성된 항-AMC 면역접합체를 추가로 고려한다.
- [0292] 일부 실시양태에서, 항-AMC 면역접합체는 튜블린을 파괴하는 작용을 하는 작용제를 포함한다. 이러한 작용제는, 예를 들어, 리족신/메이탄신, 파클리탁셀, 빈크리스틴 및 빈블라스틴, 콜키신, 아우리스타틴 돌라스타틴 10 MMAE, 및 펠로루시드 A를 포함할 수 있다.
- [0293] 일부 실시양태에서, 항-AMC 면역접합체는 예를 들어 아살레이 NSC 167780, AZQ NSC 182986, BCNU NSC 409962, 부술판 NSC 750, 카르복시프탈레이토폴라티늄 NSC 271674, CBDCA NSC 241240, CCNU NSC 79037, CHIP NSC 256927, 클로람부실 NSC 3088, 클로로조토신 NSC 178248, 시스-폴라티늄 NSC 119875, 클로메손 NSC 338947, 시아노모르폴리노독소루비신 NSC 357704, 시클로디손 NSC 348948, 디안히드로갈락티톨 NSC 132313, 플루오로도판 NSC 73754, 헵술판 NSC 329680, 하이칸톤 NSC 142982, 멜팔란 NSC 8806, 메틸 CCNU NSC 95441, 미토마이신 C NSC 26980, 미토줄아미드 NSC 353451, 질소 머스타드 NSC 762, PCNU NSC 95466, 피페라진 NSC 344007, 피페라진디온 NSC 135758, 피포브로만 NSC 25154, 포르피로마이신 NSC 56410, 스피로히단토인 머스타드 NSC 172112, 테록시론 NSC 296934, 테트라플라틴 NSC 363812, 티오-테파 NSC 6396, 트리에틸렌멜라민 NSC 9706, 우라실 질소 머스타드 NSC 34462 및 요시-864 NSC 102627을 포함하는 알킬화제를 포함한다.
- [0294] 일부 실시양태에서, 본 출원의 항-AMC 면역접합체의 암 치료제 부분은, 비제한적으로, 알로콜키신 NSC 406042, 할리콘드린 B NSC 609395, 콜키신 NSC 757, 콜키신 유도체 NSC 33410, 돌라스타틴 10 NSC 376128 (NG - 아우리스타틴 유래), 메이탄신 NSC 153858, 리족신 NSC 332598, 탁솔 NSC 125973, 탁솔 유도체 NSC 608832, 티오콜키신 NSC 361792, 트리틸 시스테인 NSC 83265, 빈블라스틴 술페이트 NSC 49842, 및 빈크리스틴 술페이트 NSC 67574를 포함하는 항유사분열제를 포함할 수 있다.
- [0295] 일부 실시양태에서, 항-AMC 면역접합체는, 비제한적으로, 캄프토테신 NSC 94600, 캄프토테신, Na 염 NSC 100880, 아미노캄프토테신 NSC 603071, 캄프토테신 유도체 NSC 95382, 캄프토테신 유도체 NSC 107124, 캄프토테신 유도체 NSC 643833, 캄프토테신 유도체 NSC 629971, 캄프토테신 유도체 NSC 295500, 캄프토테신 유도체 NSC 249910, 캄프토테신 유도체 NSC 606985, 캄프토테신 유도체 NSC 374028, 캄프토테신 유도체 NSC 176323, 캄프토테신 유도체 NSC 295501, 캄프토테신 유도체 NSC 606172, 캄프토테신 유도체 NSC 606173, 캄프토테신 유도체 NSC 610458, 캄프토테신 유도체 NSC 618939, 캄프토테신 유도체 NSC 610457, 캄프토테신 유도체 NSC 610459, 캄프토테신 유도체 NSC 606499, 캄프토테신 유도체 NSC 610456, 캄프토테신 유도체 NSC 364830, 캄프토테신 유도체 NSC 606497, 및 모르폴리노독소루비신 NSC 354646을 포함하는 토포이소머라제 I 억제제를 포함한다.

다.

- [0296] 일부 실시양태에서, 항-AMC 면역접합체는, 비제한적으로, 독소루비신 NSC 123127, 아모나피드 NSC 308847, m-AMSA NSC 249992, 안트라피라졸 유도체 NSC 355644, 피라졸로아크리딘 NSC 366140, 비산트렌 HCL NSC 337766, 다우노루비신 NSC 82151, 데옥시독소루비신 NSC 267469, 미톡산트론 NSC 301739, 메노가릴 NSC 269148, N,N-디벤질 다우노마이신 NSC 268242, 옥산트라졸 NSC 349174, 루비다존 NSC 164011, VM-26 NSC 122819, 및 VP-16 NSC 141540을 포함하는 토포이소머라제 II 억제제를 포함한다.
- [0297] 일부 실시양태에서, 항-AMC 면역접합체는, 비제한적으로, L-알라노신 NSC 153353, 5-아자시티딘 NSC 102816, 5-플루오로우라실 NSC 19893, 아시비신 NSC 163501, 아미노프테린 유도체 NSC 132483, 아미노프테린 유도체 NSC 184692, 아미노프테린 유도체 NSC 134033, 안티폴 NSC 633713, 안티폴 NSC 623017, 베이커의 가용성 안티폴 NSC 139105, 디클로르알릴 로손 NSC 126771, 브레퀴나르 NSC 368390, 프토라푸르 (전구약물) NSC 148958, 5,6-디히드로-5-아자시티딘 NSC 264880, 메토티렉세이트 NSC 740, 메토티렉세이트 유도체 NSC 174121, N-(포스포노아세틸)-L-아스파르테이트 (PALA) NSC 224131, 피라조푸린 NSC 143095, 트리메트렉세이트 NSC 352122, 3-HP NSC 95678, 2'-데옥시-5-플루오로우리딘 NSC 27640, 5-HP NSC 107392, α-TGDR NSC 71851, 아피디콜린 글리시네이트 NSC 303812, ara-C NSC 63878, 5-아자-2'-데옥시시티딘 NSC 127716, β-TGDR NSC 71261, 시클로시티딘 NSC 145668, 구아나졸 NSC 1895, 히드록시우레아 NSC 32065, 이노신 글리코디알데히드 NSC 118994, 맥베신 II NSC 330500, 피라졸로이미다졸 NSC 51143, 티오구아닌 NSC 752, 및 티오피린 NSC 755를 포함하는 RNA 또는 DNA 항대사물을 포함한다.
- [0298] 일부 실시양태에서, 항-AMC 면역접합체는 고도의 방사성 원자를 포함한다. 다양한 방사성 동위원소가 방사성접합된 항체의 생산에 이용가능하다. 예는 ²¹¹At, ¹³¹I, ¹²⁵I, ⁹⁰Y, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁵³Sm, ²¹²Bi, ³²P, ²¹²Pb 및 Lu의 방사성 동위원소를 포함한다.
- [0299] 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 종양 사전-표적화에 이용하기 위한 "수용체" (예컨대, 스트렙타비딘)에 접합될 수 있고, 여기서 항체-수용체 접합체를 환자에게 투여한 후에, 제거제를 사용하여 순환으로부터 결합되지 않은 접합체를 제거하고 이어서 세포독성제 (예를 들어, 방사성뉴클레오타이드)에 접합된 "리간드" (예를 들어, 아비딘)를 투여한다.
- [0300] 일부 실시양태에서, 항-AMC 면역접합체는 전구약물-활성화 효소에 접합된 항-AMC 항체 모이어티를 포함할 수 있다. 일부 이러한 실시양태에서, 전구약물-활성화 효소는 전구약물 (예를 들어, 펩티딜 화학요법제, WO 81/01145 참조)을 활성 약물, 예컨대 항암 약물로 전환시킨다. 일부 실시양태에서, 이러한 항-AMC 면역접합체는 항체-의존성 효소-매개 전구약물 요법 ("ADEPT")에 유용하다. 항체에 접합될 수 있는 효소는 포스페이트-함유 전구약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 알칼리성 포스파타제; 술페이트-함유 전구약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 아릴술포타제; 비-독성 5-플루오로시토신을 항암 약물인 5-플루오로우라실로 전환시키는데 유용한 시토신 데아미나제; 펩티드-함유 전구약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 프로테아제, 예컨대 세라티아 프로테아제, 썬모리신, 서브틸리신, 카르복시펩타제 및 카텝신 (예컨대 카텝신 B 및 L); D-아미노산 치환기를 함유하는 전구약물을 전환시키는데 유용한 D-알라닐카르복시펩타제; 글리코실화 전구약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 탄수화물-절단 효소 예컨대 β-갈락토시다제 및 뉴라미니다제; β-락탐으로 유도체화된 약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 β-락타마제; 및 약물의 아민 질소에서 각각 페녹시아세틸 또는 페닐아세틸 기로 유도체화된 약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 페닐실린 아미다제, 예컨대 페닐실린 V 아미다제 및 페닐실린 G 아미다제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 효소는 관련 기술분야에 널리 공지된 재조합 DNA 기술에 의해 항체 모이어티에 공유 결합될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Neuberger et al., Nature 312:604-608 (1984)]을 참조한다.
- [0301] 일부 실시양태에서, 항-AMC 면역접합체의 치료 부분은 핵산일 수 있다. 사용될 수 있는 핵산은 안티센스 RNA, 유전자 또는 다른 폴리뉴클레오타이드 (핵산 유사체 예컨대 티오구아닌 및 티오피린을 포함함)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0302] 본 출원은 이펙터 분자에 부착된 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 항-AMC 면역접합체를 추가로 제공하며, 여기서 이펙터 분자는 검출가능한 신호를 간접적으로 또는 직접적으로 생성할 수 있는 표지이다. 이들 항-AMC 면역접합체는 연구 또는 진단 적용, 예컨대 암의 생체내 검출을 위해 사용될 수 있다. 표지는 바람직하게는 직접적으로 또는 간접적으로 검출가능한 신호를 생산할 수 있다. 예를 들어, 표지는 방사선-비투과성 또는 방사성동위원소, 예컨대 ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, ¹²³I, ¹²⁵I, ¹³¹I; 형광 (형광단) 또는 화학발광 (발색단) 화합물, 예컨대 플루

오레세인 이소티오시아네이트, 로다민 또는 루시페린; 효소, 예컨대 알칼리성 포스파타제, β -갈락토시다제 또는 양고추냉이 퍼옥시다제; 영상화제; 또는 금속 이온일 수 있다. 일부 실시양태에서, 표지는 신티그래피 연구를 위한 방사성 원자, 예를 들어 ^{99}Tc 또는 ^{123}I , 또는 핵 자기 공명 (NMR) 영상화 (자기 공명 영상화, MRI로 또한 공지됨)를 위한 스핀 표지, 예컨대 지르코늄-89, 아이오딘-123, 아이오딘-131, 인듐-111, 플루오린-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망가니즈 또는 철이다. 지르코늄-89는, 예를 들어, PET 영상화를 위해 다양한 금속 킬레이트화제에 착물화되고 항체에 접합될 수 있다 (WO 2011/056983).

[0303] 일부 실시양태에서, 항-AMC 면역접합체는 간접적으로 검출가능하다. 예를 들어, 항-AMC 면역접합체에 특이적이고 검출가능한 표지를 함유한 2차 항체는 항-AMC 면역접합체를 검출하는데 사용될 수 있다.

[0304] 따라서, 예를 들어, 일부 실시양태에서, a) AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티, 및 b) 이펙터 분자를 포함하는 항-AMC 면역접합체가 제공된다. 일부 실시양태에서, AFP 펩티드는 AFP158 (서열식별번호: 4)이다. 일부 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질은 HLA-A*02:01이다. 일부 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질은 HLA-A*02:01이다. 일부 실시양태에서, 이펙터 분자는 항-AMC 항체 모이어티에 공유 부착된다. 일부 실시양태에서, 이펙터 분자는, 예를 들어, 약물, 독소, 방사성동위원소, 단백질, 펩티드, 및 핵산으로 이루어진 군으로부터 선택된 치료제이다. 일부 실시양태에서, 이펙터 분자는 암 치료제이다. 일부 실시양태에서, 암 치료제는 화학요법제이다. 일부 실시양태에서, 암 치료제는, 예를 들어, ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , 및 ^{212}Pb 로 이루어진 군으로부터 선택된 고도의 방사성 원자이다. 일부 실시양태에서, 이펙터 분자는 직접적으로 또는 간접적으로 검출가능한 신호를 생성할 수 있는 표지이다. 일부 실시양태에서, 표지는 예를 들어, ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{123}I , ^{125}I , 및 ^{131}I 로 이루어진 군으로부터 선택된 방사성동위원소이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 scFv이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 인간, 인간화, 또는 반합성이다.

[0305] 일부 실시양태에서, a) AFP158 펩티드 (서열식별번호: 4) 및 HLA-A*02:01을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티, 및 b) 이펙터 분자를 포함하는 항-AMC 면역접합체가 제공된다. 일부 실시양태에서, 이펙터 분자는 항-AMC 항체 모이어티에 공유 부착된다. 일부 실시양태에서, 이펙터 분자는, 예를 들어, 약물, 독소, 방사성동위원소, 단백질, 펩티드, 및 핵산으로 이루어진 군으로부터 선택된 치료제이다. 일부 실시양태에서, 이펙터 분자는 암 치료제이다. 일부 실시양태에서, 암 치료제는 화학요법제이다. 일부 실시양태에서, 암 치료제는, 예를 들어, ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , 및 ^{212}Pb 로 이루어진 군으로부터 선택된 고도의 방사성 원자이다. 일부 실시양태에서, 이펙터 분자는 직접적으로 또는 간접적으로 검출가능한 신호를 생성할 수 있는 표지이다. 일부 실시양태에서, 표지는, 예를 들어, ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{123}I , ^{125}I , 및 ^{131}I 로 이루어진 군으로부터 선택된 방사성동위원소이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 scFv이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 인간, 인간화, 또는 반합성이다.

[0306] 일부 실시양태에서, a) i) G-F/Y-S/T-F-D/S/T-D/N/S-Y/A-A/G/W의 아미노산 서열 (서열식별번호: 87)을 포함하는 HC-CDR1, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, I/S-K/S-X-H/Y-X-G-X-T의 아미노산 서열 (서열식별번호: 88)을 포함하는 HC-CDR2, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 A/G-X-W/Y-Y-X-X-X-F/Y-D의 아미노산 서열 (서열식별번호: 89)을 포함하는 HC-CDR3, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 및 ii) S/T-G/S-D/N-I/V-A/G-A/S/V-X-H/Y의 아미노산 서열 (서열식별번호: 120)을 포함하는 LC-CDR1, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 Q-S/T-Y/W-D/T-S/T-A/S의 아미노산 서열 (서열식별번호: 121)을 포함하는 LC-CDR3, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 경쇄 가변 도메인 (여기서 X는 임의의 아미노산일 수 있음)을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티, 및 b) 이펙터 분자를 포함하는 항-AMC 면역접합체가 제공된다.

[0307] 일부 실시양태에서, a) i) G-F/Y-S/T-F-D/S/T-D/N/S-Y/A-A/G/W의 아미노산 서열 (서열식별번호: 87)을 포함하는 HC-CDR1, I/S-K/S-X-H/Y-X-G-X-T의 아미노산 서열 (서열식별번호: 88)을 포함하는 HC-CDR2, 및 A/G-X-W/Y-Y-X-X-X-F/Y-D의 아미노산 서열 (서열식별번호: 89)을 포함하는 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 및 ii) S/T-G/S-D/N-I/V-A/G-A/S/V-X-H/Y의 아미노산 서열 (서열식별번호: 120)을 포함하는 LC-CDR1, 및 Q-S/T-Y/W-D/T-S/T-A/S의 아미노산 서열 (서열식별번호: 121)을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인 (여기

서 X는 임의의 아미노산일 수 있음)을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티, 및 b) 이펙터 분자를 포함하는 항-AMC 면역접합체가 제공된다.

[0308] 일부 실시양태에서, a) i) 서열식별번호: 57-66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 서열식별번호: 67-76 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및 ii) 서열식별번호: 90-99 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 서열식별번호: 100-109 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2, 또는 최대 약 3개 (예컨대 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티, 및 b) 이펙터 분자를 포함하는 항-AMC 면역접합체가 제공된다.

[0309] 일부 실시양태에서, a) i) 서열식별번호: 57-66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1; 서열식별번호: 67-76 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2; 및 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 또는 HC-CDR 서열에서 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체; 및 ii) 서열식별번호: 90-99 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1; 서열식별번호: 100-109 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2; 및 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인 서열; 또는 LC-CDR 서열에서 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티, 및 b) 이펙터 분자를 포함하는 항-AMC 면역접합체가 제공된다.

[0310] 일부 실시양태에서, a) i) 서열식별번호: 57-66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1; 서열식별번호: 67-76 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2; 및 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 및 ii) 서열식별번호: 90-99 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1; 서열식별번호: 100-109 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2; 및 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인 서열을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티, 및 b) 이펙터 분자를 포함하는 항-AMC 면역접합체가 제공된다.

[0311] 일부 실시양태에서, a) 서열식별번호: 17-26 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 또는 적어도 약 95% (예를 들어 적어도 약 96%, 97%, 98%, 또는 99% 중 어느 것) 서열 동일성을 갖는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 27-36 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인, 또는 적어도 약 95% (예를 들어 적어도 약 96%, 97%, 98%, 또는 99% 중 어느 것) 서열 동일성을 갖는 그의 변이체를 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티, 및 b) 이펙터 분자를 포함하는 항-AMC 면역접합체가 제공된다.

[0312] 일부 실시양태에서, a) 서열식별번호: 17-26 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열식별번호: 27-36 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티, b) 이펙터 분자를 포함하는 항-AMC 면역접합체가 제공된다.

[0313] 핵산

[0314] 항-AMC 구축물 또는 항-AMC 항체 모이어티를 코딩하는 핵산 분자가 또한 고려된다. 일부 실시양태에서, 전장 항-AMC 항체를 코딩하는 핵산 (또는 핵산 세트)이 제공된다. 일부 실시양태에서, 다중-특이적 항-AMC 분자 (예를 들어, 다중-특이적 항-AMC 항체, 이중특이적 항-AMC 항체, 또는 이중특이적 T-세포 연관체 항-AMC 항체), 또는 그의 폴리펩티드 부분을 코딩하는 핵산 (또는 핵산 세트)이 제공된다. 일부 실시양태에서, 항-AMC CAR을 코딩하는 핵산 (또는 핵산 세트)이 제공된다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 면역접합체, 또는 그의 폴리펩티드 부분을 코딩하는 핵산 (또는 핵산 세트)이 제공된다.

- [0315] 본 출원은 이들 핵산 서열에 대한 변이체를 또한 포함한다. 예를 들어, 변이체는 적어도 중간 정도의 엄격한 혼성화 조건 하에 본 출원의 항-AMC 구축물 또는 항-AMC 항체 모이어티를 코딩하는 핵산 서열에 혼성화한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0316] 본 발명은 또한 본 발명의 핵산이 삽입된 벡터를 제공한다.
- [0317] 간단한 개요에서, 항-AMC 구축물 또는 그의 폴리펩티드 부분을 코딩하는 천연 또는 합성 핵산에 의한 항-AMC 구축물 (예를 들어, 항-AMC CAR) 또는 그의 폴리펩티드 부분의 발현은, 핵산이 예를 들어 프로모터 (예를 들어, 림프구-특이적 프로모터) 및 3' 비번역 영역 (UTR)을 포함하는 5' 및 3' 조절 요소에 작동가능하게 연결되도록, 핵산을 적절한 발현 벡터 내로 삽입함으로써 달성될 수 있다. 벡터는 진핵 숙주 세포에서 복제 및 통합에 적합할 수 있다. 전형적인 클로닝 및 발현 벡터는 목적하는 핵산 서열의 발현의 조절에 유용한 전사 및 번역 종결 인자, 개시 서열, 및 프로모터를 함유한다.
- [0318] 본 발명의 핵산은 또한 표준 유전자 전달 프로토콜을 사용하여, 핵산 번역화 및 유전자 요법에 사용될 수 있다. 유전자 전달을 위한 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 그의 전문이 본원에 참조로 포함된, 미국 특허 번호 5,399,346, 5,580,859, 5,589,466을 참조한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 유전자 요법 벡터를 제공한다.
- [0319] 핵산은 수많은 유형의 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 예를 들어, 핵산은 플라스미드, 파지미드, 파지 유도체, 동물 바이러스, 및 코스미드를 포함하나 이에 제한되지는 않는 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 특정한 관심 벡터는 발현 벡터, 복제 벡터, 프로브 생성 벡터, 및 서열분석 벡터를 포함한다.
- [0320] 추가로, 발현 벡터는 바이러스 벡터의 형태로 세포에 제공될 수 있다. 바이러스 벡터 기술은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 예를 들어, 문헌 [Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)], 및 다른 바이러스학 및 분자 생물학 매뉴얼에 기재되어 있다. 벡터로서 유용한 바이러스는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 포진 바이러스, 및 렌티바이러스를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일반적으로, 적합한 벡터는 적어도 하나의 유기체에서 기능적인 복제 기점, 프로모터 서열, 편리한 제한 엔도뉴클레아제 부위, 및 하나 이상의 선택 마커를 함유한다 (예를 들어, WO 01/96584; WO 01/29058; 및 미국 특허 번호 6,326,193 참조).
- [0321] 수많은 바이러스 기반 시스템이 포유동물 세포 내로의 유전자 전달을 위해 개발되었다. 예를 들어, 레트로바이러스는 유전자 전달 시스템을 위한 편리한 플랫폼을 제공한다. 선택된 유전자는 관련 기술분야에 공지된 기술을 사용하여 벡터 내로 삽입되고 레트로바이러스 입자 내에 패키징될 수 있다. 이어서 재조합 바이러스는 단리되고 생체내 또는 생체외에서 대상체의 세포로 전달될 수 있다. 수많은 레트로바이러스 시스템이 관련 기술분야에 공지되어 있다. 일부 실시양태에서, 아데노바이러스 벡터가 사용된다. 수많은 아데노바이러스 벡터가 관련 기술분야에 공지되어 있다. 일부 실시양태에서, 렌티바이러스 벡터가 사용된다. 레트로바이러스 예컨대 렌티바이러스로부터 유래된 벡터는 딸 세포에서 트랜스진의 장기간의 안정한 통합 및 그의 증식을 가능하게 하기 때문에 장기간의 유전자 전달을 달성하기에 적합한 도구이다. 렌티바이러스 벡터는 비-중식 세포, 예컨대 간세포를 형질도입할 수 있다는 점에서 중앙-레트로바이러스 예컨대 무린 백혈병 바이러스로부터 유래된 벡터에 비해 추가의 이점을 갖는다. 이는 또한 낮은 면역원성의 추가의 이점을 갖는다.
- [0322] 추가의 프로모터 요소, 예를 들어, 인헨서는 전사 개시의 빈도를 조절한다. 전형적으로, 이들은 개시 부위의 30-110 bp 상류의 영역에 위치하지만, 수많은 프로모터가 기능적 요소를 또한 개시 부위의 하류에 함유하는 것으로 최근에 밝혀졌다. 프로모터 요소 사이의 간격은 빈번하게 탄력적이어서, 프로모터 기능은 요소가 역전되거나 서로에 대해 이동될 경우에 보존된다. 티미딘 키나제 (tk) 프로모터에서, 프로모터 요소 사이의 간격은 활성이 감소하기 시작하기 전 50 bp까지 증가할 수 있다.
- [0323] 적합한 프로모터의 한 예는 극초기 시토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터 서열이다. 이 프로모터 서열은 그에 작동가능하게 연결된 임의의 폴리뉴클레오타이드 서열의 높은 수준의 발현을 구동할 수 있는 강력한 구성적 프로모터 서열이다. 적합한 프로모터의 또 다른 예는 신장 성장 인자-1 α (EF-1 α)이다. 그러나, 원숭이 바이러스 40 (SV40) 초기 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스 (MMTV), 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 긴 말단 반복부 (LTR) 프로모터, MoMuLV 프로모터, 조류 백혈병 바이러스 프로모터, 엠스타인-바르 바이러스 극초기 프로모터, 라우스 육종 바이러스 프로모터, 뿐만 아니라 인간 유전자 프로모터 예컨대, 비제한적으로, 액틴 프로모터, 미오신 프로모터, 헤모글로빈 프로모터, 및 크레아틴 키나제 프로모터를 포함하나 이에 제한되지는 않는 다른 구성적 프로모터 서열이 또한 사용될 수 있다. 추가로, 본 발명은 구성적 프로모터의 사용으로 제한되지 않아야

한다. 유도성 프로모터가 본 발명의 일부로서 또한 고려된다. 유도성 프로모터의 사용은 작동가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 이러한 발현을 목적으로 하는 경우에 턴 온할 수 있거나, 또는 발현을 목적으로 하지 않는 경우에 발현을 턴 오프할 수 있는 분자 스위치를 제공한다. 유도성 프로모터의 예는 메탈로티오닌 프로모터, 글루코코르티코이드 프로모터, 프로게스테론 프로모터, 및 테트라시클린 프로모터를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0324] 폴리펩티드 또는 그의 부분의 발현을 평가하기 위해, 세포 내로 도입될 발현 벡터는 또한 바이러스 벡터를 통해 형질감염되거나 감염될 것이 모색되는 세포의 집단으로부터 발현 세포의 확인 및 선택을 용이하게 하는 선택 마커 유전자 또는 리포터 유전자 또는 둘 다를 함유할 수 있다. 다른 측면에서, 선택 마커는 DNA의 개별 조각 상에 보유되고 공동-형질감염 절차에 사용될 수 있다. 선택 마커 및 리포터 유전자는 둘 다 숙주 세포에서 발현을 가능하게 하는 적절한 조절 서열과 플랜킹될 수 있다. 유용한 선택 마커는, 예를 들어, 항생제-내성 유전자, 예컨대 neo 등을 포함한다.

[0325] 리포터 유전자는 잠재적으로 형질감염된 세포를 확인하고 조절 서열의 기능성을 평가하는데 사용된다. 일반적으로, 리포터 유전자는 수용자 유기체 또는 조직에 존재하지 않거나 이에 의해 발현되지 않고 폴리펩티드의 발현이 일부 용이하게 검출가능한 특성, 예를 들어, 효소적 활성에 의해 나타나는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자이다. 리포터 유전자의 발현은 DNA가 수용자 세포 내로 도입된 후 적합한 시간에 검정된다. 적합한 리포터 유전자는 루시페라제, β -갈락토시다제, 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제, 분비된 알칼리성 포스포타제를 코딩하는 유전자, 또는 녹색 형광 단백질을 유전자를 포함할 수 있다 (예를 들어, Ui-Tel et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82). 적합한 발현 시스템은 널리 공지되어 있고 공지된 기술을 사용하여 제조되거나 상업적으로 입수될 수 있다. 일반적으로, 리포터 유전자의 최고 수준의 발현을 나타내는, 최소 5' 플랜킹 영역을 갖는 구축물은 프로모터로서 확인된다. 이러한 프로모터 영역은 리포터 유전자에 연결되고 프로모터-구동 전사를 조정하는 능력에 대해 작용제를 평가하는데 사용될 수 있다.

[0326] 유전자를 세포 내로 도입하고 발현하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 발현 벡터와 관련하여, 벡터는 관련 기술분야의 임의의 방법에 의해 숙주 세포, 예를 들어, 포유동물, 박테리아, 효모, 또는 곤충 세포 내로 용이하게 도입될 수 있다. 예를 들어, 발현 벡터는 물리적, 화학적, 또는 생물학적 수단에 의해 숙주 세포 내로 전달될 수 있다.

[0327] 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 도입하는 물리적 방법은 인산칼슘 침전, 리포펙션, 입자 충격, 미세주사, 전기천공 등을 포함한다. 벡터 및/또는 외인성 핵산을 포함하는 세포를 생산하는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)]을 참조한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드의 숙주 세포로의 도입은 인산칼슘 형질감염에 의해 수행된다.

[0328] 관심 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 도입하는 생물학적 방법은 DNA 및 RNA 벡터의 사용을 포함한다. 바이러스 벡터, 및 특히 레트로바이러스 벡터는 가장 널리 사용되는, 유전자를 포유동물, 예를 들어, 인간 세포 내로 삽입하는 방법이 되었다. 다른 바이러스 벡터는 렌티바이러스, 폭스바이러스, 단순 포진 바이러스 1, 아데노바이러스 및 아데노-연관 바이러스 등으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,350,674 및 5,585,362를 참조한다.

[0329] 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 도입하는 화학적 수단은 콜로이드성 분산액 시스템, 예컨대 거대분자 복합체, 나노캡슐, 마이크로구체, 비드, 및 수중유 에멀전, 미셀, 혼합된 미셀, 및 리포솜을 포함하는 지질-기반 시스템을 포함한다. 시험관내 및 생체내에서 전달 비히클로서 사용하기 위한 예시적인 콜로이드성 시스템은 리포솜 (예를 들어, 인공 막 소포)이다.

[0330] 비-바이러스 전달 시스템이 이용되는 경우에, 예시적인 전달 비히클은 리포솜이다. 지질 제제의 사용이 핵산의 숙주 세포 내로의 도입 (시험관내, 생체외 또는 생체내)을 위해 고려된다. 또 다른 측면에서, 핵산은 지질과 회합될 수 있다. 지질과 회합된 핵산은 리포솜의 수성 내부에 캡슐화되거나, 리포솜의 지질 이중층 내에 점재되거나, 리포솜 및 올리고뉴클레오티드 둘 다와 회합된 연결 분자를 통해 리포솜에 부착되거나, 리포솜 내에 포획되거나, 리포솜과 복합체화되거나, 지질을 함유하는 용액 중에 분산되거나, 지질과 혼합되거나, 지질과 조합되거나, 현탁액으로서 지질에 함유되거나, 미셀과 함께 함유 또는 복합체화되거나, 또는 달리 지질과 회합될 수 있다. 지질, 지질/DNA 또는 지질/발현 벡터 회합 조성물은 용액 중 임의의 특정한 구조로 제한되지 않는다. 예를 들어, 이들은 이중층 구조로, 미셀로서, 또는 "붕괴된" 구조로 존재할 수 있다. 이들은 또한 단순히 용액 중에서 점재되고, 가능하게는 크기 또는 형상에서 균일하지 않은 응집체를 형성할 수 있다. 지질은 자연 발생

또는 합성 지질일 수 있는 지방 물질이다. 예를 들어, 지질은 세포질에서 자연 발생하는 지방 액적 뿐만 아니라 장쇄 지방족 탄화수소 및 그의 유도체, 예컨대 지방산, 알콜, 아민, 아미노 알콜, 및 알데히드를 함유하는 화합물의 부류를 포함한다.

[0331] 외인성 핵산을 숙주 세포 내로 도입하거나 또는 달리 세포를 본 발명의 억제제에 노출시키는데 사용된 방법과 상관없이, 숙주 세포에서 재조합 DNA 서열의 존재를 확인하기 위해, 다양한 검정이 수행될 수 있다. 이러한 검정은, 예를 들어, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 "분자 생물학적" 검정, 예컨대 서던 및 노던 블롯팅, RT-PCR 및 PCR; 예를 들어, 면역학적 수단 (ELISA 및 웨스턴 블롯)에 의해 또는 본 발명의 범주 내에 있는 작용제를 확인하기 위해 본원에 기재된 검정에 의해, 특정한 펩티드의 존재 또는 부재를 검출하는 것과 같은 "생화학적" 검정을 포함한다.

[0332] AFP 및 MHC 부류 I 단백질

[0333] 알파-태아단백질 (AFP, α -태아단백질; 알파-1-태아단백질, 알파-태아글로불린, 또는 알파 태아 단백질로 또한 지칭됨)은 인간에서 AFP 유전자에 의해 코딩되는 591개의 아미노산 당단백질이다. AFP 유전자는 염색체 4의 q 아암 (4q25) 상에 위치한다. AFP는 태아 발생 동안 난황낭 및 간에 의해 생산되는 주요 혈장 단백질이다. 혈청 알부민의 태아 형태인 것으로 생각된다. AFP는 구리, 니켈, 지방산 및 빌리루빈에 결합하고, 단량체, 이량체 및 삼량체 형태로 발견된다. AFP는 인간 태아에서 발견되는 가장 풍부한 혈장 단백질이다. 혈장 수준은 출생 후에 급속하게 감소하지만 임신 전기 말기에서 시작하여 태아기에 감소하기 시작한다. 정상 성인 수준은 통상적으로 8 내지 12개월령까지 달성된다. 성인 인간에서의 AFP의 기능은 알려지지 않았으나; 설치류에서 이는 에스트라디올에 결합하여 이 호르몬의 태반을 가로지르는 태아로의 수송을 방지한다. 그의 주요 기능은 여성 태아의 남성화를 방지하는 것이다. 인간 AFP는 에스트로겐에 결합하지 않기 때문에, 인간에서의 그의 기능은 덜 명백하다.

[0334] 인간에서 AFP가 상승될 질환 중 일부는, 예를 들어, 간세포성 암종/간세포암, 배세포 종양, 전이성 간암, 배꼽 탈장, 신경관 결손, 난황낭 종양, 및 모세혈관확장성 운동실조를 포함한다.

[0335] MHC 부류 I 단백질은 주요 조직적합성 복합체 (MHC) 분자의 2개의 주요 부류 중 하나이고 (다른 하나는 MHC 부류 II임) 신체의 거의 모든 유핵 세포 상에서 발견된다. 그의 기능은 세포 내로부터의 단백질의 단편을 T 세포에 디스플레이하는 것이고; 건강한 세포는 무시될 것인 반면에, 외래 단백질을 함유하는 세포는 면역계에 의해 공격될 것이다. MHC 부류 I 단백질은 시토솔 단백질로부터 유래된 펩티드를 제시하기 때문에, MHC 부류 I 제시의 경로는 종종 시토솔 또는 내인성 경로로 불린다. 부류 I MHC 분자는 주로 프로테아솜에 의한 시토솔 단백질의 분해로부터 생성된 펩티드에 결합한다. 이어서 MHC I:펩티드 복합체는 세포의 형질 막 내로 삽입된다. 펩티드는 부류 I MHC 분자의 세포외 부분에 결합된다. 따라서, 부류 I MHC의 기능은 세포내 단백질을 세포독성 T 세포 (CTL)에 디스플레이하는 것이다. 그러나, 부류 I MHC는 또한 교차-제시로 공지된 과정에서, 외인성 단백질로부터 생성된 펩티드를 제시할 수 있다.

[0336] MHC 부류 I 단백질은 2개의 폴리펩티드 쇠, α 및 β 2-마이크로글로불린 (β 2M)으로 이루어진다. 2개의 쇠는 b2m 및 α 3 도메인의 상호작용을 통해 비공유 연결된다. 단지 α 쇠만 다형성이고 HLA 유전자에 의해 코딩되는 반면에, b2m 서브유닛은 다형성이 아니고 β -2 마이크로글로불린 유전자에 의해 코딩된다. α 3 도메인은 형질 막-관통이고 T 세포의 CD8 보조-수용체와 상호작용한다. α 3-CD8 상호작용은 세포독성 T 세포의 표면 상의 T 세포 수용체 (TCR)가 그의 α 1- α 2 이중이량체 리간드에 결합하고, 커플링된 펩티드를 항원성에 대해 조사하는 동안에 MHC I 분자를 제자리에 유지한다. α 1 및 α 2 도메인은 폴딩되어 결합하는 펩티드를 위한 홈을 구성한다. MHC 부류 I 단백질은 8-10개의 아미노산 길이인 펩티드에 결합한다.

[0337] 인간 백혈구 항원 (HLA) 유전자는 MHC 유전자의 인간 버전이다. 인간에서의 3개의 주요 MHC 부류 I 단백질은 HLA-A, HLA-B, 및 HLA-C인 한편, 3개의 부차적인 것은 HLA-E, HLA-F, 및 HLA-G이다. HLA-A는 인간의 유전자 중에 가장 빠르게 진화하는 코딩 서열로 랭킹된다. 2013년 12월 현재, 1740개의 활성 단백질 및 117개의 널 단백질을 코딩하는 2432개의 공지된 HLA-A 대립유전자가 있었다. HLA-A 유전자는 염색체 6의 짧은 아암 상에 위치하고 HLA-A의 보다 큰, α -쇄 구성성분을 코딩한다. HLA-A α -쇄의 변이는 HLA 기능의 핵심이다. 이 변이는 집단에서의 유전적 다양성을 촉진한다. 각 HLA는 특정 구조의 펩티드에 대해 상이한 친화도를 갖기 때문에, 더욱 다양한 HLA는 세포 표면 상에 '제시될' 더욱 다양한 항원을 의미하며, 집단의 하위세트가 임의의 주어진 외래 침입자에 저항성일 가능성을 증진시킨다. 이는 단일 병원체가 전체 인간 집단을 일소하는 능력을 가질 가능성을 감소시킨다. 각 개체는 그의 각각의 부모로부터의 것인 최대 2개의 유형의 HLA-A를 발현할 수 있다. 일부 개체는 부모 둘 다를로부터 동일한 HLA-A가 유전되어 그의 개별 HLA 다양성이 감소할 것이나; 대다수의 개체는

2개의 상이한 HLA-A의 카피를 받을 것이다. 이 동일한 패턴이 모든 HLA 군에 따른다. 다시 말해서, 사람은 2432개의 공지된 HLA-A 대립유전자 중 단지 1 또는 2개를 발현할 수 있다.

[0338] 모든 대립유전자는 적어도 4자리 숫자의 분류, 예를 들어, HLA-A*02:12를 받는다. A는 대립유전자가 어느 HLA 유전자에 속하는 지를 의미한다. 많은 HLA-A 대립유전자가 있어서, 혈청형에 의한 분류는 카테고리화를 단순화한다. 다음 쌍의 숫자는 할당을 나타낸다. 예를 들어, HLA-A*02:02, HLA-A*02:04, 및 HLA-A*02:324는 모두 A2 혈청형의 구성원이다 (접두어 *02에 의해 지정됨). 이 군은 HLA 적합성을 담당하는 주요 인자이다. 이 뒤의 모든 숫자는 혈청형결정에 의해 결정될 수 없고 유전자 서열분석을 통해 지정된다. 제2 숫자 세트는 어떤 HLA 단백질이 생산되는 지를 나타낸다. 이들은 발견 순서대로 할당되고 2013년 12월 현재 456개의 공지된 상이한 HLA-A02 단백질이 있다 (명칭 HLA-A*02:01 내지 HLA-A*02:456로 할당됨). 가장 짧은 가능한 HLA 명칭은 이들 세부사항 모두를 포함한다. 그 초과각각의 연장은 단백질을 변화시킬 수 있거나 또는 그렇지 않을 수 있는 뉴클레오타이드 변화를 의미한다.

[0339] 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 모이어티는 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하고, 여기서 MHC 부류 I 단백질은 HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, 또는 HLA-G이다. 일부 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질은 HLA-A, HLA-B, 또는 HLA-C이다. 일부 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질은 HLA-A이다. 일부 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질은 HLA-B이다. 일부 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질은 HLA-C이다. 일부 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질은 HLA-A01, HLA-A02, HLA-A03, HLA-A09, HLA-A10, HLA-A11, HLA-A19, HLA-A23, HLA-A24, HLA-A25, HLA-A26, HLA-A28, HLA-A29, HLA-A30, HLA-A31, HLA-A32, HLA-A33, HLA-A34, HLA-A36, HLA-A43, HLA-A66, HLA-A68, HLA-A69, HLA-A74, 또는 HLA-A80이다. 일부 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질은 HLA-A02이다. 일부 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질은 HLA-A*02:01-555 중 어느 하나, 예컨대 HLA-A*02:01, HLA-A*02:02, HLA-A*02:03, HLA-A*02:04, HLA-A*02:05, HLA-A*02:06, HLA-A*02:07, HLA-A*02:08, HLA-A*02:09, HLA-A*02:10, HLA-A*02:11, HLA-A*02:12, HLA-A*02:13, HLA-A*02:14, HLA-A*02:15, HLA-A*02:16, HLA-A*02:17, HLA-A*02:18, HLA-A*02:19, HLA-A*02:20, HLA-A*02:21, HLA-A*02:22, 또는 HLA-A*02:24이다. 일부 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질은 HLA-A*02:01이다. HLA-A*02:01은 모든 백인의 39-46%에서 발현되고, 따라서 본 발명에 사용하기 위한 MHC 부류 I 단백질의 적합한 선택을 나타낸다.

[0340] 항-AMC 항체 모이어티를 생성하는데 사용하기에 적합한 AFP 펩티드는, 예를 들어, HLA-A*02:01-결합 모티프 및 프로테아솜 및 면역-프로테아솜에 대한 절단 부위의 존재에 기초하여 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 컴퓨터 예측 모델을 사용하여 결정될 수 있다. MHC 결합 부위를 예측하기 위한, 이러한 모델은 IEDB (Vita et al., The immune epitope database (IEDB) 3.0. Nucleic Acids Res. 2014 Oct 9. pii: gku938), ProPred1 (문헌 [Singh and Raghava, ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. BIOINFORMATICS 17(12):1236-1237, 2001]에 보다 상세히 기재됨), 및 SYFPEITHI (문헌 [Schuler et al. SYFPEITHI, Database for Searching and T-Cell Epitope Prediction. in Immunoinformatics Methods in Molecular Biology, vol 409(1): 75-93, 2007] 참조)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0341] 적절한 펩티드가 확인되었다면, 펩티드 합성은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 프로토콜에 따라 수행될 수 있다. 그의 상대적으로 작은 크기 때문에, 본 발명의 펩티드는 통상적인 펩티드 합성 기술에 따라 용액 중에서 또는 고체 지지체 상에서 직접적으로 합성될 수 있다. 다양한 자동 합성기는 상업적으로 입수 가능하고 공지된 프로토콜에 따라 사용될 수 있다. 용액 상 중 펩티드의 합성은 합성 펩티드의 대규모 생산에 대한 잘 확립된 절차가 되었고 이에 따라 본 발명의 펩티드를 제조하는데 적합한 대안적 방법이다 (예를 들어, 문헌 [Solid Phase Peptide Synthesis by John Morrow Stewart and Martin et al. Application of Almez-mediated Amidation Reactions to Solution Phase Peptide Synthesis, Tetrahedron Letters Vol. 39, pages 1517-1520, 1998] 참조).

[0342] 후보 AFP 펩티드의 결합 활성은 항원-제시 홈에서 펩티드에 의해 안정화되는 경우에 HLA-A의 발현을 증가시키는 항원-프로세싱-결합 T2 세포주를 사용하여 시험될 수 있다. T2 세포는 후보 펩티드로 세포 표면 상의 HLA-A 발현을 안정화시키기 위해 충분한 시간 동안 펄성되며, 이는 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법, 예컨대 HLA-A (예를 들어, BB7.2)에 특이적인 형광 표지된 모노클로날 항체로의 면역염색에 이어 형광-활성화 세포-분류 (FACS) 분석을 사용하여 측정될 수 있다.

[0343] 항-AMC 항체 및 항-AMC 항체 모이어티의 제조

[0344] 일부 실시양태에서, 항-AMC 항체 또는 항-AMC 항체 모이어티는 모노클로날 항체이다. 모노클로날 항체는, 예를

들어, 하이브리도마 방법, 예컨대 문헌 [Kohler and Milstein, Nature, 256:495 (1975) 및 Sergeeva et al., Blood, 117(16):4262-4272]에 의해 기재된 것을 사용하여, 본원 및 아래 실시예에 기재된 파지 디스플레이 방법을 사용하여, 또는 재조합 DNA 방법 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567 참조)을 사용하여 제조될 수 있다.

[0345] 하이브리도마 방법에서, 햄스터, 마우스, 또는 다른 적절한 숙주 동물은 전형적으로 면역화제로 면역화되어 면역화제에 특이적으로 결합할 항체를 생산하거나 또는 생산할 수 있는 림프구를 도출한다. 대안적으로, 림프구는 시험관내에서 면역화될 수 있다. 면역화제는 관심 단백질, 또는 적어도 2개의 분자를 포함하는 복합체, 예컨대 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체의 폴리펩티드 또는 융합 단백질을 포함할 수 있다. 일반적으로, 인간 기원의 세포가 요망되는 경우에 말초 혈액 림프구 ("PBL")가 사용되거나, 또는 비-인간 포유동물 공급원이 요망되는 경우에 비장 세포 또는 림프절 세포가 사용된다. 이어서 림프구는 적합한 융합제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 불멸화 세포주와 융합되어, 하이브리도마 세포를 형성한다. 예를 들어, 문헌 [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (New York: Academic Press, 1986), pp. 59-103]을 참조한다. 불멸화 세포주는 통상적으로 형질전환된 포유동물 세포, 특히 설치류, 소, 및 인간 기원의 골수종 세포이다. 통상적으로, 래트 또는 마우스 골수종 세포주가 사용된다. 하이브리도마 세포는 바람직하게는 비융합된, 불멸화 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 1종 이상의 물질을 함유하는 적합한 배양 배지에서 배양될 수 있다. 예를 들어, 모 세포에 효소 하이포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPR T)가 결합된 경우에, 하이브리도마를 위한 배양 배지는 전형적으로 HGPRT-결핍 세포의 성장을 방지하는 하이포크산틴, 아미노프테린, 및 티미딘 ("HAT 배지")을 포함할 것이다.

[0346] 일부 실시양태에서, 불멸화 세포주는 효율적으로 융합하고, 선택된 항체-생산 세포에 의한 항체의 안정한 높은-수준의 발현을 지지하고, 배지 예컨대 HAT 배지에 감수성이다. 일부 실시양태에서, 불멸화 세포주는, 예를 들어, 미국 캘리포니아주, 샌 디에고 소재의 솔크 인스티튜트 셀 디스트리뷰션 센터(Salk Institute Cell Distribution Center) 및 버지니아주, 매너시스 소재의 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection)으로부터 입수할 수 있는 뮌헨 골수종 세포주이다. 인간 모노클로날 항체의 생산을 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이중골수종 세포주가 또한 기재되었다. 문헌 [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al. Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications (Marcel Dekker, Inc.: New York, 1987) pp. 51-63].

[0347] 이어서 하이브리도마 세포가 배양되는 배양 배지는 폴리펩티드에 대해 지시된 모노클로날 항체의 존재에 대해 검정될 수 있다. 하이브리도마 세포에 의해 생산된 모노클로날 항체의 결합 특이성은 면역침전에 의해 또는 시험관내 결합 검정, 예컨대 방사선면역검정 (RIA) 또는 효소-연결 면역흡착 검정 (ELISA)에 의해 결정될 수 있다. 이러한 기술 및 검정은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 모노클로날 항체의 결합 친화도는, 예를 들어, 문헌 [Munson and Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980)]의 스캐차드(Scatchard) 분석에 의해 결정될 수 있다.

[0348] 목적하는 하이브리도마 세포가 확인된 후에, 클론은 한계 희석 절차에 의해 서브클로닝될 수 있고 표준 방법에 의해 성장될 수 있다. [Goding, 상기문헌]. 이 목적에 적합한 배양 배지는, 예를 들어, 돌베코 변형 이글 배지 및 RPMI-1640 배지를 포함한다. 대안적으로, 하이브리도마 세포는 포유동물에서 복수로서 생체내에서 성장될 수 있다.

[0349] 서브클론에 의해 분리되는 모노클로날 항체는 배양 배지 또는 복수액으로부터 통상적인 이뮤노글로불린 정제 절차 예컨대, 예를 들어, 단백질 A-세파로스, 히드록시아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 또는 친화성 크로마토그래피에 의해 분리되거나 또는 정제될 수 있다.

[0350] 항-AMC 항체 또는 항체 모이어티는 또한 조합 라이브러리를 목적 활성 또는 활성들을 갖는 항체에 대해 스크리닝함으로써 확인될 수 있다. 예를 들어, 파지 디스플레이 라이브러리를 생성하고 이러한 라이브러리를 목적하는 결합 특징을 보유하는 항체에 대해 스크리닝하는 다양한 방법이 관련 기술분야에 공지되어 있다. 이러한 방법이, 예를 들어, 문헌 [Hoogenboom et al., Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, N.J., 2001)]에서 검토되고, 예를 들어, 문헌 [McCafferty et al., Nature 348:552-554; Clackson et al., Nature 352: 624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, Methods in Molecular Biology 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, N.J., 2003); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004); 및 Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132(2004)]에 추가로 기재되어 있다.

- [0351] 특정 파지 디스플레이 방법에서, VH 및 VL 유전자의 레퍼토리는 개별적으로 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)에 의해 클로닝되고 파지 라이브러리에 무작위적으로 재조합되며, 이는 이어서 항원-결합 파지에 대해 스크리닝된다 (문헌 [Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)]에 기재된 바와 같음). 파지는 전형적으로 항체 단편을, 단일쇄 Fv (scFv) 단편 또는 Fab 단편으로 디스플레이한다. 면역화된 공급원으로부터의 라이브러리는 하이브리도마를 구축할 필요없이 면역원에 대한 고친화도 항체를 제공한다. 대안적으로, 나이트 레퍼토리는 (예를 들어, 인간으로부터) 클로닝되어 임의의 면역화없이 광범위한 비-자기 및 또한 자기 항원에 대한 항체의 단일 공급원을 제공할 수 있다 (문헌 [Griffiths et al., EMBO J., 12: 725-734 (1993)]에 기재된 바와 같음). 최종적으로, 나이트 라이브러리는 또한 줄기 세포로부터의 재배열되지 않은 V-유전자 절편을 클로닝하고, 고도로 가변성인 CDR3 영역을 코딩하고 시험관내 재배열을 달성하는 무작위 서열을 함유하는 PCR 프라이머를 사용함으로써 합성적으로 제조될 수 있다 (문헌 [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)]에 의해 기재된 바와 같음). 인간 항체 파지 라이브러리를 기재하는 특허 공개는, 예를 들어: 미국 특허 번호 5,750,373, 및 미국 특허 공개 번호 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936, 및 2009/0002360을 포함한다.
- [0352] 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적인 항체에 대해 라이브러리를 스크리닝하는 파지 디스플레이를 사용하여 제조될 수 있다. 라이브러리는 적어도 1×10^9 (예컨대 적어도 약 1×10^9 , 2.5×10^9 , 5×10^9 , 7.5×10^9 , 1×10^{10} , 2.5×10^{10} , 5×10^{10} , 7.5×10^{10} , 또는 1×10^{11} 중 어느 것)의 특유한 인간 항체 단편의 다양성을 갖는 인간 scFv 파지 디스플레이 라이브러리일 수 있다. 일부 실시양태에서, 라이브러리는 건강한 공여자로부터의 인간 PMBC 및 비장으로부터 추출된 DNA로부터 구축된 나이트 인간 라이브러리이며, 모든 인간 중쇄 및 경쇄 서브패밀리를 포괄한다. 일부 실시양태에서, 라이브러리는 다양한 질환을 갖는 환자, 예컨대 자가면역질환을 갖는 환자, 암 환자, 및 감염성 질환을 갖는 환자로부터 단리된 PBMC로부터 추출된 DNA로부터 구축된 나이트 인간 라이브러리이다. 일부 실시양태에서, 라이브러리는 반합성 인간 라이브러리이며, 여기서 중쇄 CDR3은 동등하게 임의의 주어진 위치에 존재할 가능성이 있는 모든 아미노산 (시스테인 제외)으로 완전히 무작위화된다 (예를 들어, 문헌 [Hoet, R.M. et al., Nat. Biotechnol. 23(3):344-348, 2005] 참조). 일부 실시양태에서, 반합성 인간 라이브러리의 중쇄 CDR3은 약 5 내지 약 24개 (예컨대 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 또는 24개 중 어느 것)의 아미노산의 길이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 라이브러리는 비-인간 파지 디스플레이 라이브러리이다.
- [0353] AMC에 고친화도로 결합하는 파지 클론은 고체 지지체 (예컨대, 예를 들어, 용액 패닝을 위한 비드 또는 세포 패닝을 위한 포유동물 세포)에 결합된 파지의 AMC에의 반복 결합에 이어, 비-결합 파지의 제거 및 특이적으로 결합된 파지의 용리에 의해 선택될 수 있다. 용액 패닝의 예에서, AMC는 고체 지지체에 대한 고정화를 위해 비오틴화될 수 있다. 비오틴화 AMC는 파지 라이브러리 및 고체 지지체, 예컨대 스트렙타비딘-접합된 디나비즈 (Dynabeads) M-280와 혼합되고, 이어서 AMC-파지-비드 복합체가 단리된다. 이어서 결합된 파지 클론은 용리되고 발현 및 정제를 위해 적절한 숙주 세포, 예컨대 이. 콜라이(E. coli) XL1-블루를 감염시키는데 사용된다. 세포 패닝의 예에서, AMC의 AFP 펩티드로 로딩된 T2 세포 (TAP-결핍, HLA-A*02:01⁺ 림프모구 세포주)가 파지 라이브러리와 혼합되고, 그 후에 세포가 수집되고 결합된 클론이 용리되고, 발현 및 정제를 위해 적절한 숙주 세포를 감염시키는데 사용된다. 패닝은 다중 (예컨대 약 2, 3, 4, 5, 6회 또는 그 초과 중 어느 것) 라운드 동안 용액 패닝, 세포 패닝, 또는 둘의 조합으로 수행되어, AMC에 특이적으로 결합하는 파지 클론을 풍부화할 수 있다. 풍부화된 파지 클론은 AMC에의 특이적 결합에 대해 예를 들어 ELISA 및 FACS를 포함하는 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해 시험될 수 있다.
- [0354] 모노클로날 항체는 또한 재조합 DNA 방법, 예컨대 미국 특허 번호 4,816,567에 기재된 것에 의해 제조될 수 있다. 본 발명의 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 사용하여 (예를 들어, 무린 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써) 용이하게 단리되고 서열분석될 수 있다. 상기 기재된 바와 같은 하이브리도마 세포 또는 본 발명의 AMC-특이적 파지 클론은 이러한 DNA의 공급원으로서 역할을 할 수 있다. 단리되면, DNA는 발현 벡터 내에 도입될 수 있고, 이는 이어서 다른 이뮤노글로불린 단백질을 생산하지 않는 숙주 세포 예컨대 원숭이 COS 세포, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포, 또는 골수종 세포 내로 형질감염되어, 재조합 숙주 세포에서 모노클로날 항체의 합성을 획득한다. DNA는 또한, 예를 들어, 상동 비-인간 서열 대신 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인 및/또는 프레임워크 영역에 대한 코딩 서열로 치환하거나 (미국 특허 번호 4,816,567; [Morrison et al., 상기문헌]) 또는 이뮤노글로불린 코딩 서열에 비이뮤노글로불린 폴리펩티드에 대한 코딩 서열의 모두 또는 일부를 공유 연결함으로써 변형될 수 있

다. 이러한 비-이뮤노글로불린 폴리펩티드로 본 발명의 항체의 불변 도메인이 치환될 수 있거나, 또는 본 발명의 항체의 하나의 항원-결합 부위 가변 도메인이 치환되어 키메라 2가 항체를 생성할 수 있다.

[0355] 항체는 1가 항체일 수 있다. 1가 항체를 제조하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 한 방법은 이뮤노글로불린 경쇄 및 변형된 중쇄의 재조합 발현을 수반한다. 중쇄는 일반적으로 중쇄 가교가 방지되도록 Fc 영역에서의 임의의 위치에서 말단절단된다. 대안적으로, 관련 시스테인 잔기는 가교가 방지되도록 또 다른 아미노산 잔기로 치환되거나 결실된다.

[0356] 시험관내 방법이 1가 항체를 제조하는데 또한 적합하다. 그의 단편, 특히 Fab 단편을 생산하는 항체의 소화는 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법을 사용하여 달성될 수 있다.

[0357] 목적하는 결합 특이성을 갖는 항체 가변 도메인 (항체-항원 결합 부위)이 이뮤노글로불린 불변-도메인 서열에 융합될 수 있다. 융합은 바람직하게는 힌지, CH2, 및 CH3 영역의 적어도 부분을 포함하는 이뮤노글로불린 중쇄 불변 도메인에 의해 이루어진다. 일부 실시양태에서, 경쇄 결합에 필요한 부위를 함유하는 제1 중쇄 불변 영역 (CH1)이 융합체 중 적어도 하나에 존재한다. 이뮤노글로불린 중쇄 융합체 및, 원하는 경우에, 이뮤노글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA가 개별 발현 벡터 내로 삽입되고, 적합한 숙주 유기체 내로 공동-형질감염된다. 이중특이적 항체를 생성하는 추가의 세부사항에 대해, 예를 들어, 문헌 [Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986)]을 참조한다.

[0358] 인간 및 인간화 항체

[0359] 항-AMC 항체 또는 항체 모이어티는 인간화 항체 또는 인간 항체일 수 있다. 인간화 형태의 비-인간 (예를 들어, 뮤린)항체는 전형적으로 비-인간 이뮤노글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 이뮤노글로불린, 이뮤노글로불린 쇄, 또는 그의 단편 (예컨대 Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, 또는 항체의 다른 항원-결합 하위서열)이다. 인간화 항체는 수용자의 CDR로부터의 잔기가 목적하는 특이성, 친화도, 및 능력을 갖는, 비-인간 종 예컨대 마우스, 래트, 또는 토끼의 CDR로부터의 잔기 (공여자 항체)에 의해 대체된 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)을 포함한다. 일부 경우에, 인간 이뮤노글로불린의 Fv 프레임워크 잔기는 상응하는 비-인간 잔기에 의해 대체된다. 인간화 항체는 또한 수용자 항체에서도 또한 유입된 CDR 또는 프레임워크 서열에서도 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 1개, 및 전형적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 수 있으며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역은 비-인간 이뮤노글로불린의 것에 상응하고 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 이뮤노글로불린 컨센서스 서열의 것이다. 일부 실시양태에서, 인간화 항체는 전형적으로 인간 이뮤노글로불린의 것인 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부를 포함할 것이다. 예를 들어, 문헌 [Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-329 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)]을 참조한다.

[0360] 일반적으로, 인간화 항체는 비-인간인 공급원으로부터의 그 내로 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 이들 비-인간 아미노산 잔기는 전형적으로 "유입" 가변 도메인으로부터 취해지는 "유입" 잔기로 종종 지칭된다. 일부 실시양태에 따르면, 인간화는 본질적으로 윈터(Winter) 및 동료의 방법 (Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988))에 따라, 인간 항체의 상응하는 서열을 설치류 CDR 또는 CDR 서열로 치환함으로써 수행될 수 있다. 따라서, 이러한 "인간화" 항체는 실질적으로 보다 적은 무손상 인간 가변 도메인이 비-인간 종으로부터의 상응하는 서열에 의해 치환된 항체 (미국 특허 번호 4,816,567)이다. 실제로, 인간화 항체는 전형적으로 일부 CDR 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기가 설치류 항체에서 유사한 부위로부터의 잔기에 의해 치환된 인간 항체이다.

[0361] 인간화에 대한 대안으로서, 인간 항체가 생성될 수 있다. 예를 들어, 면역화 시, 내인성 이뮤노글로불린 생산의 부재 하에 인간 항체의 전체 레퍼토리를 생산할 수 있는 트랜스제닉 동물 (예를 들어, 마우스)을 생산하는 것이 현재 가능하다. 예를 들어, 키메라 및 배선 돌연변이체 마우스에서 항체 중쇄 연결 영역 (JH) 유전자의 동형접합 결실이 내인성 항체 생산의 완전한 억제를 일으킨다는 것이 기재된 바 있다. 인간 배선 이뮤노글로불린 유전자 어레이의 이러한 배선 돌연변이체 마우스 내로의 전달은 항원 챌린지 시 인간 항체의 생산을 일으킬 것이다. 예를 들어, 문헌 [Jakobovits et al., *PNAS USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.*, 7:33 (1993)]; 미국 특허 번호 5,545,806, 5,569,825, 5,591,669; 5,545,807; 및 WO 97/17852를 참조한다. 대안적으로, 인간 항체는 인간 이뮤노글로불린 유전자좌를 트랜스제닉 동물, 예를 들어, 내인성 이뮤노글로불린 유전자가 부분적으로 또는 완전히 불활성화된 마우스 내로 도입함으로써 제조될 수 있다. 챌린지 시, 유전자 재배열, 조립, 및 항체 레퍼토리를 포함하는 모든 관점에서 인간에서 관찰되는 것과 밀접하게 유사한 인간 항체 생산이 관찰된다. 이 접근법은, 예를 들어,

미국 특허 번호 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 및 5,661,016, 및 문헌 [Marks et al., Bio/Technology, 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature, 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature, 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology, 14: 845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology, 14: 826 (1996); Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol., 13: 65-93 (1995)]에 기재되어 있다.

[0362] 인간 항체는 또한 시험관내 활성화 B 세포에 의해 (미국 특허 5,567,610 및 5,229,275 참조) 또는 파지 디스플레이 라이브러리를 포함하는 관련 기술분야에 공지된 다양한 기술을 사용함으로써 생성될 수 있다. 문헌 [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)]. 콜(Cole) 등 및 보르너(Boerner) 등의 기술이 인간 모노클로날 항체의 제조에 또한 이용가능하다. 문헌 [Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) 및 Boerner et al., J. Immunol., 147(1): 86-95 (1991)].

[0363] 다중-특이적 항체

[0364] 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 다중-특이적 항체이다. 다중-특이적 (예를 들어, 이중특이적) 항체를 제조하는 적합한 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 이중특이적 항체의 생산은 2개의 이뮤노글로불린 중쇄/경쇄 쌍의 공동-발현에 기초할 수 있고, 여기서 2쌍은 각각 상이한 특이성을 갖고, 회합 시 이중이량체 항체를 생성한다 (예를 들어, 문헌 [Milstein and Cuello, Nature, 305: 537-539 (1983); WO 93/08829, 및 Traunecker et al., EMBO J. 10: 3655 (1991)] 참조). 이뮤노글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 편성 때문에, 이들 하이브리도마 (퀴드로마)는 10개의 상이한 항체 분자의 잠재적 혼합물을 생산하며, 이 중 단지 하나만 정확한 이중특이적 구조를 갖는다. 정확한 분자의 정제는 통상적으로 친화성 크로마토그래피 단계에 의해 달성된다. 유사한 절차가 WO 93/08829 및 문헌 [Traunecker et al., EMBO, 10: 3655-3659 (1991)]에 기재되어 있다. 대안적으로, 중쇄 및 경쇄의 조합은 중-제한 쌍형성을 이용함으로써 지시될 수 있고 (예를 들어, 문헌 [Lindhofer et al., J. Immunol., 155:219-225 (1995)] 참조) 중쇄의 쌍형성은 CH3 도메인을 조작하는 "노브-인트루 홀"의 사용에 의해 지시될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,731,168; 문헌 [Ridgway et al., Protein Eng., 9(7):617-621 (1996)] 참조). 다중-특이적 항체는 또한 항체 Fc-이중이량체 분자를 제조하기 위한 정전기적 스테어링 효과를 조작함으로써 제조될 수 있다 (예를 들어, WO 2009/089004A1 참조). 또 다른 방법에서, 안정한 이중특이적 항체는 제어된 Fab-아암 교환에 의해 생성될 수 있고, 여기서 별개의 항원 특이성을 갖는 2개의 모 항체 및 CH3 도메인에서의 매칭된 점 돌연변이가 환원 조건에서 혼합되어 고도로 순수한 이중특이적 항체를 형성하는 분리, 재조합, 및 재산화를 가능하게 한다. 문헌 [Labrigin et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 110(13):5145-5150 (2013)]. 중쇄/경쇄 쌍의 혼합물을 포함하는 이러한 항체는 본원에서 "이중다량체 항체"로 또한 지칭된다.

[0365] 상이한 특이성을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 또한 화학적으로 가교되어 다중-특이적 이중접합체 항체를 생성할 수 있다. 예를 들어, 각각 상이한 항원에 대한 특이성을 갖는 2개의 F(ab')₂ 분자는 화학적으로 연결될 수 있다. 문헌 [Pullarkat et al., Trends Biotechnol., 48:9-21 (1999)]. 이러한 항체가, 예를 들어, 면역계 세포를 원치않는 세포로 표적화시키기 위해 (미국 특허 번호 4,676,980), 및 HIV 감염의 치료를 위해 제안되었다. WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089. 항체가 가교제를 수반하는 것을 포함하는 합성 단백질 화학에서 공지된 방법을 사용하여 시험관내에서 제조될 수 있다는 것이 고려된다. 예를 들어, 면역독소는 디설피드-교환 반응을 사용하여 또는 티오에테르 결합을 형성함으로써 구축될 수 있다. 이 목적을 위한 적합한 시약의 예는 이미노티올레이트 및 메틸-4-메르캅토부티르이미데이트, 및 예를 들어, 미국 특허 번호 4,676,980에 개시된 것을 포함한다.

[0366] 일부 실시양태에서, 다중-특이적 항체는 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 이중특이적 항체는 2개의 scFv를 융합시켜, 예컨대 그들을 펩티드 링커를 통해 융합시켜, 탠덤 scFv를 생성함으로써 조작될 수 있다. 탠덤 scFv의 한 예는 이중특이적 T 세포 연관체이다. 이중특이적 T 세포 연관체는 항-CD3 scFv를 표적 세포의 표면 항원, 예컨대 종양-연관 항원 (TAA)에 특이적인 scFv에 연결시킴으로써 제조되며, T 세포의 표적 세포로의 재지시를 일으킨다. 문헌 [Mack et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 92:7021-7025 (1995); Brischwein et al., Mol. Immunol., 43(8):1129-1143 (2006)]. 2개의 가변 도메인 사이의 펩티드 링커의 길이를 단축시킴으로써, 이들은 자기-어셈블리로부터 방지되고 제2 폴리펩티드 상의 도메인과 쌍형성하도록 되어, 디아바디 (Db)로 불리는 컴팩트 이중특이적 항체를 생성할 수 있다. 문헌 [Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 90:6444-6448 (1993)]. Db의 2개의 폴리펩티드는 각각 동일한 채 상의 2개의 도메인 사이에서 쌍형성을 가능하게 하기에는 너무 짧은 링커에 의해 VL에 연결된 VH를 포함한다. 따라서, 하나의 폴리펩티드의

VH 및 VL 도메인은 또 다른 폴리펩티드의 상보적 VL 및 VH 도메인과 쌍형성하도록 되어, 그에 의해 2개의 항원-결합 부위를 형성한다. 이 포맷의 변형에서, 2개의 폴리펩티드는 또 다른 펩티드 링커에 의해 연결되어, 단일쇄 디아바디 (scDb)를 생성한다. Db 포맷의 또 다른 변형에서, 이중-친화도 재표적화 (DART) 이중특이적 항체는 각 폴리펩티드의 C-말단에서 시스테인 잔기 사이에 디설피드 연결을 도입하고, 임의로 목적하는 이중이량체 구조의 어셈블리가 구동되도록, C-말단 시스테인 잔기 앞에 도메인을 포함시킴으로써 생성될 수 있다. 문헌 [Veri et al., Arthritis Rheum., 62(7):1933-1943 (2010)]. 2개의 모노클로날 항체의 표적-결합 가변 도메인이 자연 발생 링커를 통해 조합되어 4가, 이중특이적 항체를 생성하는 이중-가변-도메인 이뮤노글로불린 (DVD-Ig™)이 또한 관련 기술분야에 공지되어 있다. 문헌 [Gu and Ghayur, Methods Enzymol., 502:25-41 (2012)]. 또 다른 포맷에서, 이중특이적 항체인 독 앤 록 (DNL)은 인간 A 키나제 앵커 단백질 (AKAP)의 앵커링 도메인으로부터 유래된 펩티드 (AD2)를 갖는 인간 cAMP-의존성 단백질 키나제 (PKA)의 조절 서브유닛으로부터 유래된 펩티드 (DDD2)의 이량체화를 이용함으로써 제조된다. 문헌 [Rossi et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 103:6841-6846 (2006)].

[0367] 재조합 세포 배양물로부터 직접적으로 이중특이적 항체 단편을 제조 및 분리하는 다양한 기술이 또한 기재되었다. 예를 들어, 류신 지퍼를 사용하여 이중특이적 항체가 생산되었다. 문헌 [Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)]. 이 방법은 또한 항체 동종이량체의 생산에 이용될 수 있다.

[0368] 항-AMC 변이체

[0369] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체의 아미노산 서열 변이체가 고려된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선시키는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체가 항체를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 내로 적절한 변형을 도입함으로써, 또는 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다. 이러한 변형, 예를 들어, 항체의 아미노산 서열 내 잔기의 결실, 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 결실, 삽입, 및 치환의 임의의 조합이 이루어져 최종 구축물에 도달할 수 있고, 단 최종 구축물은 목적하는 특징, 예를 들어, 항원-결합을 보유한다.

[0370] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 항체 변이체가 제공된다. 치환 돌연변이유발에 대한 관심 부위는 HVR 및 FR을 포함한다. 아미노산 치환은 관심 항체 내로 도입될 수 있고 생성물은 목적 활성, 예를 들어, 보유/개선된 항원 결합, 감소된 면역원성, 또는 개선된 ADCC 또는 CDC에 대해 스크리닝될 수 있다.

[0371] 보존적 치환이 아래 표 5에 제시된다.

[0372] 표 5: 보존적 치환

원래 잔기	예시적인 치환	바람직한 치환
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 노르류신	Leu
Leu (L)	노르류신; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 노르류신	Leu

[0373]

[0374] 아미노산은 공통 측쇄 특성에 따라 상이한 부류로 그룹화될 수 있다:

[0375] a. 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0376] b. 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0377] c. 산성: Asp, Glu;

[0378] d. 염기성: His, Lys, Arg;

[0379] e. 쇠 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro;

[0380] f. 방향족: Trp, Tyr, Phe.

[0381] 비-보존적 치환은 이들 부류 중 하나의 구성원을 또 다른 부류로 교환하는 것을 수반할 것이다.

[0382] 예시적 치환 변이체는, 예를 들어, 파지 디스플레이-기반 친화도 성숙 기술을 사용하여 편리하게 생성된 친화도 성숙 항체이다. 간략하게, 하나 이상의 CDR 잔기가 돌연변이되고 변이체 항체가 파지 상에 디스플레이되고, 특정한 생물학적 활성 (예를 들어, 결합 친화도)에 대해 스크리닝된다. 변경 (예를 들어, 치환)은 HVR에서 이루어져, 예를 들어, 항체 친화도를 개선시킬 수 있다. 이러한 변경은 HVR "핫스팟"에서, 즉, 체세포 성숙 과정 동안 고빈도로 돌연변이를 겪는 코돈에 의해 코딩된 잔기 (예를 들어, 문헌 [Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008)] 참조), 및/또는 특이성 결정 잔기 (SDR)에서 이루어질 수 있으며, 생성 변이체 VH 또는 VL은 결합 친화도에 대해 시험된다. 2차 라이브러리로부터 구축 및 재선택하는 것에 의한 친화도 성숙은, 예를 들어, 문헌 [Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001))]에 기재되었다.

[0383] 친화도 성숙의 일부 실시양태에서, 다양성은 임의의 다양한 방법 (예를 들어, 오류-유발 PCR, 쇠 서플링, 또는 올리고뉴클레오타이드-지시된 돌연변이유발)에 의한 성숙을 위해 선택된 가변 유전자 내로 도입된다. 이어서 2차

라이브러리가 생성된다. 이어서 라이브러리는 스크리닝되어 목적 친화도를 갖는 임의의 항체 변이체를 확인한다. 다양성을 도입하는 또 다른 방법은 여러 HVR 잔기 (예를 들어, 한 번에 4-6개의 잔기)가 무작위화된 HVR-지시된 접근법을 수반한다. 항원 결합에 수반되는 HVR 잔기는, 예를 들어, 알려진 스캐닝 돌연변이유발 또는 모델링을 사용하여 구체적으로 확인될 수 있다. 특히 CDR-H3 및 CDR-L3이 종종 표적화된다.

[0384] 일부 실시양태에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 이러한 변경이 항원에 결합하는 항체의 능력을 실질적으로 감소시키지 않는 한 하나 이상의 HVR 내에서 발생할 수 있다. 예를 들어, 결합 친화도를 실질적으로 감소시키지 않는 보존적 변경 (예를 들어, 본원에 제공된 바와 같은 보존적 치환)이 HVR에서 이루어질 수 있다. 이러한 변경은 HVR "핫스팟" 또는 SDR의 외부일 수 있다. 상기 제공된 변이체 VH 및 VL 서열의 일부 실시양태에서, 각 HVR은 변경되지 않거나, 또는 1, 2 또는 3개 이하의 아미노산 치환을 함유한다.

[0385] 문헌 [Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085]에 기재된 바와 같이 돌연변이유발을 위해 표적화될 수 있는 항체의 잔기 또는 영역의 확인에 유용한 방법은 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"로 불린다. 이 방법에서, 잔기 또는 표적 잔기의 군 (예를 들어, 하전된 잔기 예컨대 arg, asp, his, lys, 및 glu)이 확인되고 중성 또는 음으로 하전된 아미노산 (예를 들어, 알라닌 또는 폴리알라닌)에 의해 대체되어 항체의 항원과의 상호작용에 영향을 미치는 지 여부를 결정한다. 추가의 치환은 초기 치환에 대한 기능적 감수성을 입증하는 아미노산 위치에 도입될 수 있다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 항원-항체 복합체의 결정 구조가 결정되어 항체와 항원 사이의 접촉점을 확인할 수 있다. 이러한 접촉 잔기 및 이웃 잔기는 치환을 위한 후보로 표적화되거나 제거될 수 있다. 변이체는 스크리닝되어 이들이 목적하는 특성을 함유하는 지 여부를 결정할 수 있다.

[0386] 아미노산 서열 삽입은 1개의 잔기 내지 100개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드의 길이의 범위의 아미노- 및/또는 카르복실-말단 융합, 뿐만 아니라 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체를 포함한다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체는 항체의 N- 또는 C-말단에 대한 효소 (예를 들어 ADEPT의 경우) 또는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드의 융합을 포함한다.

[0387] Fc 영역 변이체

[0388] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 변형이 본원에 제공된 전장 항-AMC 항체의 Fc 영역 내로 도입되고, 그에 의해 Fc 영역 변이체가 생성될 수 있다. 일부 실시양태에서, Fc 영역 변이체는 종종 Fc 수용체 (FcR)에의 결합과 관련된 항체 의존성 세포성 세포독성 (ADCC) 이펙터 기능을 증진시켰다. 일부 실시양태에서, Fc 영역 변이체는 ADCC 이펙터 기능을 감소시켰다. 이펙터 기능을 변경할 수 있는 Fc 서열에 대한 변화 또는 돌연변이의 다수의 예가 있다. 예를 들어, WO 00/42072 및 문헌 [Shields et al. J Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)]은 개선된 또는 감소된 FcR에의 결합을 갖는 항체 변이체를 기재한다. 이들 공개의 내용이 구체적으로 본원에 참조로 포함된다.

[0389] 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC)은 종양 세포에 대한 치료 항체의 작용 메커니즘이다. ADCC는 면역계의 이펙터 세포가 능동적으로 막-표면 항원이 특이적 항체 (예를 들어, 항-AMC 항체)에 의해 결합된 표적 세포 (예를 들어, 암 세포)를 용해시키는 세포-매개 면역 방어이다. 전형적인 ADCC는 NK 세포의 항체에 의한 활성화를 수반한다. NK 세포는 Fc 수용체인 CD16을 발현한다. 이 수용체는 표적 세포의 표면에 결합된 항체의 Fc 부분을 인식하고 이에 결합한다. NK 세포의 표면 상의 가장 통상적인 Fc 수용체는 CD16 또는 Fc γ RIII으로 불린다. Fc 수용체의 항체의 Fc 영역에의 결합은 NK 세포 활성화, 세포용해 과립의 방출 및 결과적 표적 세포 아포토시스를 일으킨다. ADCC의 종양 세포 사멸에 대한 기여는 고친화도 FcR로 형질감염된 NK-92 세포를 사용하는 특정 시험으로 측정될 수 있다. 결과는 FcR을 발현하지 않는 야생형 NK-92 세포와 비교된다.

[0390] 일부 실시양태에서, 본 발명은 생체내 항-AMC 구축물의 반감기가 중요하지만 특정 이펙터 기능 (예컨대 CDC 및 ADCC)은 불필요하거나 또는 유해한 적용에 대해 목적하는 후보가 되게 하는, 전부가 아닌 일부 이펙터 기능을 보유한 FC 영역을 포함하는 항-AMC 구축물 변이체를 고려한다. 시험관내 및/또는 생체내 세포독성 검정이 CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 입증하는데 수행될 수 있다. 예를 들어, Fc 수용체 (FcR) 결합 검정이 항체가 Fc γ R 결합은 결여되어 있지만 (따라서 ADCC 활성이 결여될 가능성이 있음), FcRn 결합 능력을 보유한다는 것을 보장하기 위해 수행될 수 있다. ADCC를 매개하는 1차 세포인 NK 세포는, 단지 Fc γ RIII을 발현하는 반면에, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ R II 및 Fc γ RIII을 발현한다. 조혈 세포 상에서의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991)]의 페이지 464의 표 3에 요약된다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하는 시험관내 검정의 비-제한적 예는 미국 특허 번호 5,500,362 (예를 들어 문헌 [Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)] 참조) 및 문헌 [Hellstrom, I et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985)]; 미국 특허 번호 5,821,337 (문헌 [Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med.

166:1351-1361 (1987)] 참조)에 기재되어 있다. 대안적으로, 비-방사성 검정 방법이 사용될 수 있다 (예를 들어, 유동 세포측정법을 위한 악티(ACTI)TM 비-방사성 세포독성 검정 (캘리포니아주, 마운틴 뷰 소재의 셀테크놀로지, 인크.(CellTechnology, Inc.)); 및 사이토독스(CytoTox) 96TM 비-방사성 세포독성 검정 (위스콘신주, 매디슨 소재의 프로메가(Promega)) 참조). 이러한 검정에 유용한 이펙터 세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및 자연 킬러 (NK) 세포를 포함한다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 관심 분자의 ADCC 활성은 생체 내, 예를 들어, 동물 모델 예컨대 문헌 [Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998)]에 기재된 것에서 평가될 수 있다. C1q 결합 검정이 또한 수행되어 항체가 C1q에 결합할 수 없고 따라서 CDC 활성이 결여되어 있음을 확인할 수 있다. 예를 들어, WO 2006/029879 및 WO 2005/100402에서의 C1q 및 C3c 결합 ELISA를 참조한다. 보체 활성화를 평가하기 위해, CDC 검정이 수행될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M. S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003); 및 Cragg, M. S. and M. J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)] 참조). FcRn 결합 및 생체내 클리어런스/반감기 결정은 또한 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 수행될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Petkova, S. B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)] 참조).

- [0391] 감소된 이펙터 기능을 갖는 항체는 Fc 영역 잔기 238, 265, 269, 270, 297, 327 및 329 중 1개 이상의 치환을 갖는 것을 포함한다 (미국 특허 번호 6,737,056). 이러한 Fc 돌연변이체는 잔기 265 및 297의 알라닌으로의 치환을 갖는 소위 "DANA" Fc 돌연변이체를 포함하는, 아미노산 위치 265, 269, 270, 297 및 327 중 2개 이상에서 치환을 갖는 Fc 돌연변이체를 포함한다 (미국 특허 번호 7,332,581).
- [0392] 개선된 또는 감소된 FcR에의 결합을 갖는 특정 항체 변이체가 기재되어 있다. (예를 들어, 미국 특허 번호 6,737,056; WO 2004/056312, 및 문헌 [Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)] 참조.)
- [0393] 일부 실시양태에서, ADCC를 개선시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 변이체 Fc 영역을 포함하는 항-AMC 구축물 (예를 들어, 전장 항-AMC 항체) 변이체가 제공된다. 일부 실시양태에서, 변이체 Fc 영역은 ADCC를 개선시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하며, 여기서 치환은 변이체 Fc 영역의 위치 298, 333, 및/또는 334 (잔기의 EU 넘버링)에서이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물 (예를 들어, 전장 항-AMC 항체) 변이체는 그의 변이체 Fc 영역에서 하기 아미노산 치환을 포함한다: S298A, E333A, 및 K334A.
- [0394] 일부 실시양태에서, 변경은, 예를 들어, 미국 특허 번호 6,194,551, WO 99/51642, 및 문헌 [Idusogie et al., J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)]에 기재된 바와 같이 변경된 (즉, 개선된 또는 감소된) C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC)을 일으키는 Fc 영역에서 이루어진다.
- [0395] 일부 실시양태에서, 반감기를 증가시키고/거나 신생 Fc 수용체 (FcRn)에의 결합을 개선시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 변이체 Fc 영역을 포함하는 항-AMC 구축물 (예를 들어, 전장 항-AMC 항체) 변이체가 제공된다. 증가된 반감기 및 개선된 FcRn에의 결합을 갖는 항체는 US2005/0014934A1 (Hinton et al.)에 기재되어 있다. 이들 항체는 Fc 영역의 FcRn에의 결합을 개선시키는 하나 이상의 치환을 그 내부에 갖는 Fc 영역을 포함한다. 이러한 Fc 변이체는 Fc 영역 잔기: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 또는 434 중 1개 이상에서의 치환, 예를 들어, Fc 영역 잔기 434의 치환을 갖는 것을 포함한다 (미국 특허 번호 7,371,826).
- [0396] 또한 Fc 영역 변이체의 다른 예에 관하여 문헌 [Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988)]; 미국 특허 번호 5,648,260; 미국 특허 번호 5,624,821; 및 WO 94/29351을 참조한다.
- [0397] 본원에 기재된 임의의 Fc 변이체, 또는 그의 조합물을 포함하는 항-AMC 구축물 (예컨대 전장 항-AMC 항체)이 고려된다.
- [0398] 글리코실화 변이체
- [0399] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항-AMC 구축물은 항-AMC 구축물이 글리코실화되는 정도를 증가시키거나 감소시키도록 변경된다. 항-AMC 구축물에 대한 글리코실화 부위의 부가 또는 결실은 1개 이상의 글리코실화 부위가 생성되거나 제거되도록 항-AMC 구축물의 아미노산 서열 또는 그의 폴리펩티드 부분을 변경함으로써 편리하게 달성될 수 있다.
- [0400] 항-AMC 구축물이 Fc 영역을 포함하는 경우, 이에 부착된 탄수화물이 변경될 수 있다. 포유동물 세포에 의해 생산된 천연 항체는 전형적으로 Fc 영역의 CH2 도메인의 Asn297에의 N-연결에 의해 일반적으로 부착되는 분지형, 이중안테나 올리고사카라이드를 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Wright et al., TIBTECH 15:26-32 (1997)]을 참조한다. 올리고사카라이드는 다양한 탄수화물, 예를 들어 만노스, N-아세틸 글루코사민 (GlcNAc), 갈락토스 및

시알산 뿐만 아니라 이중안테나 올리고사카라이드 구조의 "줄기" 내의 GlcNAc에 부착된 푸코스를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-AMC 구축물 내의 올리고사카라이드의 변형은 특정 개선된 특성을 갖는 항-AMC 구축물 변이체를 생성하기 위해 이루어질 수 있다.

[0401] 일부 실시양태에서, Fc 영역에 부착된 탄수화물 구조에서 푸코스가 감소되거나 푸코스가 결여되어 있는 Fc 영역을 포함하는 항-AMC 구축물 (예컨대 전장 항-AMC 항체) 변이체가 제공되며, 이는 ADCC 기능을 개선시킬 수 있다. 구체적으로, 야생형 CHO 세포에서 생산된 동일한 항-AMC 구축물 상의 푸코스의 양에 비해 푸코스가 감소된 항-AMC 구축물이 본원에서 고려된다. 즉, 이들은 천연 CHO 세포 (예를 들어, 천연 글리코실화 패턴을 생산하는 CHO 세포, 예컨대 천연 FUT8 유전자를 함유하는 CHO 세포)에 의해 생산된 경우 이들이 달리 갖게 될 것보다 더 적은 양의 푸코스를 갖는 것을 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 그 상의 N-연결 글리칸의 약 50%, 40%, 30%, 20%, 10% 또는 5% 미만이 푸코스를 포함하는 것이다. 예를 들어, 이러한 항-AMC 구축물 중의 푸코스의 양은 1% 내지 80%, 1% 내지 65%, 5% 내지 65% 또는 20% 내지 40%일 수 있다. 특정 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 그 상의 N-연결 글리칸 중 어느 것도 푸코스를 포함하지 않는 것이며, 즉 여기서 항-AMC 구축물은 푸코스가 완전히 없거나, 또는 푸코스를 전혀 갖지 않거나, 또는 비-푸코실화된다. 푸코스의 양은 예를 들어 WO 2008/077546에 기재된 바와 같이 MALDI-TOF 질량 분광측정법에 의해 측정 시, Asn 297에 부착된 모든 당구조물 (예를 들어, 복합체, 하이브리드 및 고만노스 구조물)의 합과 비교하여 Asn297에서 당 쇄 내의 푸코스의 평균 양을 계산하는 것에 의해 결정된다. Asn297은 Fc 영역 내의 약 위치 297 (Fc 영역 잔기의 Eu 넘버링)에 위치한 아스파라긴 잔기를 지칭하지만; Asn297은 또한 항체에서의 부차적 서열 변이로 인해 위치 297의 약 ± 3개 아미노산 상류 또는 하류, 즉 위치 294 내지 300에 위치할 수 있다. 이러한 푸코실화 변이체는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 공개 번호 US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (교와 핫코 고교 캄파니, 리미티드(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd))을 참조한다. "탈푸코실화" 또는 "푸코스-결핍" 항체 변이체에 대한 문헌의 예는 하기를 포함한다: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; 문헌 [Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)]. 탈푸코실화 항체를 생산할 수 있는 세포주의 예는 단백질 푸코실화가 결핍된 Lec13 CHO 세포 (문헌 [Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)]; 미국 특허 출원 번호 US2003/0157108 A1 (Presta, L); 및 WO2004/056312 A1 (Adams et al.), 특히 실시예 11), 및 녹아웃 세포주, 예컨대 α-1,6-푸코실트랜스퍼라제 유전자, FUT8, 녹아웃 CHO 세포 (예를 들어, 문헌 [Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006)]; 및 WO2003/085107 참조)를 포함한다.

[0402] 이등분된 올리고사카라이드를 갖는 항-AMC 구축물 (예컨대 전장 항-AMC 항체) 변이체가 추가로 제공되며, 예를 들어 여기서 항-AMC 구축물의 Fc 영역에 부착된 이중안테나 올리고사카라이드는 GlcNAc에 의해 이등분된다. 이러한 항-AMC 구축물 (예컨대 전장 항-AMC 항체) 변이체는 감소된 푸코실화 및/또는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 이러한 항체 변이체의 예는, 예를 들어 WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); 미국 특허 번호 6,602,684 (Umana et al.); US 2005/0123546 (Umana et al.), 및 문헌 [Ferrara et al., Biotechnology and Bioengineering, 93(5): 851-861 (2006)]에 기재되어 있다. Fc 영역에 부착된 올리고사카라이드 내에 적어도 1개의 갈락토스 잔기를 갖는 항-AMC 구축물 (예컨대 전장 항-AMC 항체) 변이체가 또한 제공된다. 이러한 항-AMC 구축물 변이체는 개선된 CDC 기능을 가질 수 있다. 이러한 항체 변이체는 예를 들어, WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); 및 WO 1999/22764 (Raju, S.)에 기재되어 있다.

[0403] 일부 실시양태에서, Fc 영역을 포함하는 항-AMC 구축물 (예컨대 전장 항-AMC 항체) 변이체는 FcγRIII에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, Fc 영역을 포함하는 항-AMC 구축물 (예컨대 전장 항-AMC 항체) 변이체는 인간 이펙터 세포의 존재 하에 ADCC 활성을 갖거나, 또는 인간 야생형 IgG1Fc 영역을 포함하는 달리 동일한 항-AMC 구축물 (예컨대 전장 항-AMC 항체)과 비교하여 인간 이펙터 세포의 존재 하에 증가된 ADCC 활성을 갖는다.

[0404] 시스템인 조작된 변이체

[0405] 일부 실시양태에서, 1개 이상의 아미노산 잔기가 시스템인 잔기로 치환된 시스템인 조작된 항-AMC 구축물 (예컨대 전장 항-AMC 항체)을 생성하는 것이 바람직할 수 있다. 일부 실시양태에서, 치환된 잔기는 항-AMC 구축물의 접근가능한 부위에서 발생한다. 본원에 추가로 기재된 바와 같이, 이들 잔기를 시스템인으로 치환함으로써 그에 의해 반응성 티올기가 항-AMC 구축물의 접근가능한 부위에 위치하게 되고, 이는 항-AMC 구축물을 다른 모이어티, 예컨대 약물 모이어티 또는 링커-약물 모이어티에 접합시키는데 사용되어 항-AMC 면역접합체를 생성할 수

있다. 시스템인 조작된 항-AMC 구축물 (예컨대 전장 항-AMC 항체)은, 예를 들어, 미국 특허 번호 7,521,541에 기재된 바와 같이 생성될 수 있다.

[0406] 유도체

[0407] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항-AMC 구축물은 관련 기술분야에 공지되고 용이하게 입수가능한 추가의 비단백질성 모이어티를 함유하도록 추가로 변형될 수 있다. 항-AMC 구축물의 유도체화에 적합한 모이어티는 수용성 중합체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 수용성 중합체의 비제한적 예는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산 (단독중합체 또는 랜덤 공중합체), 및 텍스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 단독중합체, 폴리프로필렌 옥시드/에틸렌 옥시드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올 (예를 들어, 글리세롤), 폴리비닐 알콜, 및 그의 혼합물을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드는 물에서의 안정성으로 인해 제조에 이점을 가질 수 있다. 중합체는 임의의 분자량의 것일 수 있고, 분지형 또는 비분지형일 수 있다. 항-AMC 구축물에 부착되는 중합체의 수는 달라질 수 있고, 1개 초과 중합체가 부착되는 경우, 이들은 동일하거나 또는 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화를 위해 사용되는 중합체의 수 및/또는 유형은 개선될 항-AMC 구축물의 특정한 특성 또는 기능, 항-AMC 구축물 유도체가 규정된 조건 하에서 요법에 사용될 것인지 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 고려사항에 기초하여 결정될 수 있다.

[0408] 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물 및 방사선 노출에 의해 선택적으로 가열될 수 있는 비단백질성 모이어티의 접합체가 제공된다. 일부 실시양태에서, 비단백질성 모이어티는 탄소 나노튜브이다 (Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005)). 방사선은 임의의 파장의 것일 수 있고, 통상적인 세포에는 유해하지 않지만, 항-AMC 구축물-비단백질성 모이어티에 근접한 세포가 사멸되는 온도로 비단백질성 모이어티를 가열하는 파장을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0409] CAR 이펙터 세포 제조

[0410] 한 측면에서 본 발명은 항-AMC CAR을 발현하는 이펙터 세포 (예컨대 림프구, 예를 들어 T 세포)를 제공한다. 항-AMC CAR을 발현하는 이펙터 세포 (예컨대 T 세포) (항-AMC CAR 이펙터 세포, 예컨대 항-AMC CAR T 세포)를 제조하는 예시적인 방법이 본원에 제공된다.

[0411] 일부 실시양태에서, 항-AMC CAR 이펙터 세포 (예컨대 T 세포)는 이펙터 세포 (예컨대 T 세포) 내에 항-AMC CAR (예를 들어 항-AMC 항체 모이어티 및 CD28 및 CD3ζ 세포내 신호전달 서열을 포함하는 CAR)을 포함하는 벡터 (예를 들어 렌티바이러스 벡터 포함)를 도입함으로써 생성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-AMC CAR 이펙터 세포 (예컨대 T 세포)는 생체내에서 복제될 수 있어서 장기간 존속하고, 이는 AFP-양성 질환 (예컨대 암, 예를 들어, HCC)의 지속된 제어에 이어질 수 있다.

[0412] 일부 실시양태에서, 본 발명은 AFP-양성 질환을 갖고 있거나 또는 AFP-양성 질환을 가질 위험이 있는 환자의 치료를 위해 림프구 주입을 사용하여 항-AMC CAR을 발현하는 유전자 변형된 T 세포를 투여하는 것에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 자가 림프구 주입이 치료에 사용된다. 자가 PBMC는 치료를 필요로 하는 환자로부터 수집되고 T 세포는 본원에 기재되고 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 활성화 및 확장되고 이어서 환자 내로 다시 주입된다.

[0413] 일부 실시양태에서, 항-AMC CAR T 세포는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 항-AMC CAR을 발현한다 (또한 본원에서 "항-AMC CAR T 세포"로 지칭됨). 일부 실시양태에서, 항-AMC CAR T 세포는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 세포의 도메인 및 CD3ζ 및 CD28의 세포내 신호전달 서열을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 항-AMC CAR을 발현한다. 본 발명의 항-AMC CAR T 세포는 강건한 생체내 T 세포 확장을 겪을 수 있고, 혈액 및 골수에서 연장된 양의 시간 동안 높은 수준으로 지속되는 AMC-특이적 기억 세포를 확립할 수 있다. 일부 실시양태에서, 환자 내에 주입된 본 발명의 항-AMC CAR T 세포는 AMC-제시 세포, 예컨대 AMC-제시 암 세포를 AFP-양성 질환을 갖는 환자에서 생체내에서 제거할 수 있다. 일부 실시양태에서, 환자 내에 주입된 본 발명의 항-AMC CAR T 세포는 AMC-제시 세포, 예컨대 AMC-제시 암 세포를 적어도 하나의 통상적인 치료에 불응성인 AFP-양성 질환을 갖는 환자에서 생체내에서 제거할 수 있다.

[0414] 일부 실시양태에서, 항-AMC CAR T 세포는 항-AMC CAR을 균등 세포 표면 분포로 발현한다. 균등 세포 표면 분포는, 예를 들어, 연속적 출현 및 균등 두께 또는 신호 강도를 갖는 염색 패턴을 특징으로 할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 항-AMC CAR T 세포를 포함하는 조성물, 예컨대 제약 조성물은 세포 표면 상의 항-AMC

CAR의 응집을 갖는 세포를 약 10% 미만 (예컨대 약 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1% 미만)으로 포함한다. 응집은, 예를 들어, 불균등 두께 또는 신호 강도를 갖는 염색 패턴 또는 불연속인, 덩어리진, 점상의, 및/또는 불균등 분포 패턴을 특징으로 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-AMC CAR T 세포는 항-AMC CAR을 세포 표면 상에서 항-AMC CAR의 약 10% 미만 (예컨대 약 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1% 미만)의 응집으로 발현한다. 일부 실시양태에서, 항-AMC CAR T 세포는 낮은 수준의 항원-비의존성 항-AMC CAR 활성화를 갖는다. 일부 실시양태에서, 항-AMC CAR T 세포는 낮은 수준의 T 세포 소진을 갖는다. T 세포 소진은, T 세포가 기능장애가 되는 암 또는 만성 감염과 같은 연장된 면역 활성화의 상태 동안 자연적으로 발생한다. T 세포 소진은 기능적 이펙터 또는 기억 T 세포와 비교하여 손상된 이펙터 기능, 지속된 억제 수용체의 발현, 및/또는 변경된 전사 상태를 특징으로 할 수 있다. 종양 세포 및 감염의 최적의 클리어런스는 T 세포 소진에 의해 방해된다. 항-AMC CAR T 세포의 T 세포 소진은 관련 기술분야에 공지된 임의의 수단에 의해, 예를 들어, 그의 기능적 및/또는 표현형 프로파일을 결정함으로써 특징화될 수 있다 (Wherry, E. J., *Nature immunology* 12(6): 492-499, 2011; Jiang, Y., *et al.*, *Cell death & disease* 6(6): e1792, 2015). 예를 들어, 일부 실시양태에서, 항-AMC CAR T 세포는, 예를 들어, PD-1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, BTLA, 및 TIGIT를 포함하는 T 세포 소진의 하나 이상의 마커를 낮은 수준으로 발현한다. 일부 실시양태에서, 항-AMC CAR T 세포는 IL-2 생산, TNF- α 생산, IFN- γ 생산 및 그랜자임 B 생산을 위한 비-소진 T 세포의 특징적인 수준을 유지시키고/거나, 표적 세포의 존재 하에 생체의 사멸 능력을 유지시키며, 이는 항-AMC CAR T 세포가 자기-활성화 및 조기 소진을 겪지 않는다는 것을 시사한다.

[0415] T 세포의 확장 및 유전적 변형 전에, T 세포의 공급원이 대상체로부터 획득된다. T 세포는 말초 혈액 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직, 감염 부위로부터의 조직, 복수, 흉막 삼출, 비장 조직, 및 종양을 포함한 다수의 공급원으로부터 획득될 수 있다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 관련 기술분야에서 입수가능한 임의의 수의 T 세포주가 사용될 수 있다. 본 발명의 일부 실시양태에서, T 세포는 통상의 기술자에게 공지된 임의의 수의 기술, 예컨대 퍼콜(Ficoll)TM 분리를 사용하여 대상체로부터 수집된 혈액 단위로부터 획득될 수 있다. 일부 실시양태에서, 개체의 순환 혈액으로부터의 세포는 분리반출술에 의해 획득된다. 분리반출술 생성물은 전형적으로 T 세포, 단핵구, 과립구, B 세포를 포함하는 림프구, 다른 유핵 백혈구, 적혈구, 및 혈소판을 함유한다. 일부 실시양태에서, 분리반출술에 의해 수집된 세포를 세척하여 혈장 분획을 제거하고 세포를 후속 처리 단계를 위해 적절한 완충제 또는 배지에 위치시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포는 포스페이트 완충 염수 (PBS)로 세척된다. 일부 실시양태에서, 세척 용액은 칼슘이 결여되고, 마그네슘이 결여될 수 있거나 또는 모두는 아니지만 많은 2가 양이온이 결여될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 용이하게 명백한 바와 같이, 세척 단계는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법에 의해, 예컨대 반-자동화 "관통형" 원심분리기 (예를 들어, 코브(Cobe) 2991 셀 프로세서, 박스터 시토메이트(Baxter CytoMate), 또는 해모네틱스 셀 세이버 5(Haemonetics Cell Saver 5))를 제조업체의 지침에 따라 사용하여 달성될 수 있다. 세척 후에, 세포는 다양한 생체적합성 완충제, 예컨대 Ca^{2+} -무함유, Mg^{2+} -무함유 PBS, 플라스마라이트 A(PlasmaLyte A), 또는 완충제 존재 또는 부재 하의 다른 염수 용액 중에 재현탁될 수 있다. 대안적으로, 분리반출술 샘플의 바람직하지 않은 성분은 제거되고, 세포는 배양 배지 내에 직접 재현탁될 수 있다.

[0416] 일부 실시양태에서, T 세포는 적혈구를 용해시키고, 예를 들어 퍼콜(PERCOLL)TM 구배를 통한 원심분리에 의해 또는 역류 원심 분리에 의해 단핵구를 고갈시킴으로써 말초 혈액 림프구로부터 분리된다. T 세포의 특정 하위 집단, 예컨대 CD3^+ , CD28^+ , CD4^+ , CD8^+ , CD45RA^+ , 및 CD45RO^+ T 세포는 양성 또는 음성 선택 기술에 의해 추가로 분리될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, T 세포는 항-CD3/항-CD28 (즉, 3x28)-접합된 비드, 예컨대 디나비즈® M-450 CD3/CD28 T와 목적하는 T 세포의 양성 선택을 위한 충분한 시간 동안 인큐베이션함으로써 분리된다. 일부 실시양태에서, 시간은 약 30분이다. 일부 실시양태에서, 시간은 30분 내지 36시간 또는 그 초과 및 그 사이의 모든 정수 값의 범위이다. 일부 실시양태에서, 시간은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6시간이다. 일부 실시양태에서, 시간은 10 내지 24시간이다. 일부 실시양태에서, 인큐베이션 시간은 24시간이다. 백혈병에 걸린 환자로부터 T 세포를 분리하기 위해, 보다 긴 인큐베이션 시간, 예컨대 24시간을 사용하여 세포 수율을 증가시킬 수 있다. 다른 세포 유형과 비교 시 T 세포가 거의 없는 임의의 상황에서, 예컨대 종양 조직으로부터 또는 면역손상된 개체로부터 종양 침윤 림프구 (TIL)를 분리하는데 있어서, T 세포를 분리하기 위해 보다 긴 인큐베이션 시간이 사용될 수 있다. 또한, 보다 긴 인큐베이션 시간의 사용은 CD8^+ T 세포의 포획 효율을 증가시킬 수 있다. 따라서, 단순히 시간을 단축시키거나 연장시킴으로써 T 세포가 CD3/CD28 비드에 결합하도록 하고/거나, 비드 대 T 세포의 비를 증가시키거나 감소시킴으로써 배양 개시 시 또는 과정 동안의 다른 시점에 T 세포의 하위집단이 우선적으로 선택되도록 할 수 있다. 추가로, 비드 또는 다른 표면 상의 항-CD3 및/또는 항-CD28

항체의 비를 증가시키거나 감소시킴으로써 배양 개시 시 또는 다른 목적하는 시점에 T 세포의 하위집단이 우선적으로 선택되도록 할 수 있다. 통상의 기술자는 다중 라운드의 선택이 또한 본 발명과 관련하여 사용될 수 있음을 인식할 것이다. 일부 실시양태에서, 활성화 및 확장 과정에서 선택 절차를 수행하고 "비선택된" 세포를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. "비선택된" 세포는 또한 추가 라운드의 선택에 적용될 수 있다.

[0417] 음성 선택에 의한 T 세포 집단의 풍부화는 음성 선택된 세포에 고유한 표면 마커에 대해 지시된 항체의 조합을 사용하여 달성될 수 있다. 1가지 방법은 음성 선택된 세포의 표면 상에 존재하는 세포 표면 마커에 대해 지시된 모노클로날 항체의 카테일을 사용하는 음성 자기 면역부착 또는 유동 세포측정법을 통한 세포 분류 및/또는 선택이다. 예를 들어, 음성 선택에 의해 CD4⁺ 세포를 풍부화하기 위해, 모노클로날 항체 카테일은 전형적으로 CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR, 및 CD8에 대한 항체를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 전형적으로 CD4⁺, CD25⁺, CD62Lhi, GITR⁺, 및 FoxP3⁺를 발현하는 조절 T 세포를 풍부화하거나 또는 양성 선택하는 것이 바람직할 수 있다. 대안적으로, 일부 실시양태에서, T 조절 세포는 항-CD25 접합된 비드 또는 다른 유사한 선택 방법에 의해 고갈된다.

[0418] 양성 또는 음성 선택에 의한 세포의 목적하는 집단의 단리를 위해, 세포의 농도 및 표면 (예를 들어, 입자, 예컨대 비드)은 달라질 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 및 비드의 최대 접촉을 보장하기 위해 비드 및 세포가 함께 혼합되는 부피를 유의하게 감소시키는 (즉, 세포의 농도를 증가시키는) 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 약 20억개 세포/ml의 농도가 사용된다. 일부 실시양태에서, 약 10억개 세포/ml의 농도가 사용된다. 일부 실시양태에서, 약 1억개 초과 세포/ml가 사용된다. 일부 실시양태에서, 약 1천만, 1천5백만, 2천만, 2천5백만, 3천만, 3천5백만, 4천만, 4천5백만, 또는 5천만개 세포/ml 중 어느 것의 세포 농도가 사용된다. 일부 실시양태에서 약 7천5백만, 8천만, 8천5백만, 9천만, 9천5백만, 또는 1억개 세포/ml 중 어느 것의 세포 농도가 사용된다. 일부 실시양태에서, 약 1억2천5백만 또는 약 1억5천만개 세포/ml의 농도가 사용된다. 높은 농도의 사용은 증가된 세포 수율, 세포 활성화, 및 세포 확장을 발생시킬 수 있다. 또한, 높은 세포 농도의 사용은 관심 표적 항원을 약하게 발현할 수 있는 세포, 예컨대 CD28-음성 T 세포의, 또는 많은 종양 세포가 존재하는 샘플 (즉, 백혈병성 혈액, 종양 조직 등)로부터의 보다 효율적인 포획을 가능하게 한다. 이러한 세포의 집단은 치료 가치를 가질 수 있고, 수득하는 것이 바람직할 것이다. 예를 들어, 높은 농도의 세포를 사용하면, 정상적으로는 보다 약한 CD28 발현을 갖는 CD8⁺ T 세포를 보다 효율적으로 선택하는 것이 가능하다.

[0419] 본 발명의 일부 실시양태에서, T 세포는 치료 후에 환자로부터 직접적으로 수득된다. 이와 관련하여, 특정 암 치료, 특히 면역계를 손상시키는 약물을 사용한 치료 후, 환자가 치료로부터 정상적으로 회복되는 기간 동안 치료 직후에, 수득된 T 세포의 품질은 생체외에서 확장되는 그의 능력이 최적화되거나 또는 개선될 수 있는 것으로 관찰되었다. 마찬가지로, 본원에 기재된 방법을 사용한 생체외 조작 후에, 이들 세포는 증진된 생착 및 생체내 확장에 바람직한 상태로 존재할 수 있다. 따라서, 이러한 회복기 동안 T 세포, 수지상 세포, 또는 조절 계열의 다른 세포를 포함하는 혈액 세포를 수집하는 것이 본 발명의 문맥 내에서 고려된다. 추가로, 일부 실시양태에서, 특히 요법 후의 규정된 시간 윈도우 동안 특정한 세포 유형의 재증식, 재순환, 재생, 및/또는 확장이 유리한 조건을 대상체에서 생성하기 위해 가동화 (예를 들어, GM-CSF를 사용한 가동화) 및 조건화 요법이 사용될 수 있다. 예시적인 세포 유형은 T 세포, B 세포, 수지상 세포, 및 면역계의 다른 세포를 포함한다.

[0420] 바람직한 항-AMC CAR을 발현하기 위한 T 세포의 유전자 변형 전인지 또는 후인지에 상관없이, T 세포는 일반적으로, 예를 들어, 미국 특허 번호 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041; 및 미국 특허 출원 공개 번호 20060121005에 기재된 바와 같은 방법을 사용하여 활성화 및 확장될 수 있다.

[0421] 일반적으로, 본 발명의 T 세포는 CD3/TCR 복합체 연관 신호를 자극하는 작용제 및 T 세포의 표면 상의 공동-자극 분자를 자극하는 리간드가 부착된 표면과의 접촉에 의해 확장된다. 특히, T 세포 집단은, 예컨대 표면 상에 고정된 항-CD3 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 또는 항-CD2 항체와의 접촉에 의해, 또는 칼슘 이오노포어와 함께 단백질 키나제 C 활성화제 (예를 들어, 브리오스타틴)와의 접촉에 의해 자극될 수 있다. T 세포의 표면 상의 보조 분자의 공동자극을 위해, 보조 분자에 결합하는 리간드가 사용된다. 예를 들어, T 세포의 집단은 T 세포의 증식을 자극하기에 적절한 조건 하에 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체와 접촉될 수 있다. CD4⁺ T 세포 또는 CD8⁺ T 세포의 증식을 자극하기 위해, 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체. 항-CD28 항체의 예는 9.3, B-T3, XR-CD28

(디아클론(Diaclone), 프랑스 브장송)을 포함하고, 관련 기술분야에 통상적으로 공지된 다른 방법이 사용될 수 있다 (Berg *et al.*, *Transplant Proc.* 30(8):3975-3977, 1998; Haanen *et al.*, *J. Exp. Med.* 190(9):13191328, 1999; Garland *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 227(1-2):53-63, 1999).

[0422] 면역접합체 제조

[0423] 항-AMC 면역접합체는 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 WO 2009/067800, WO 2011/133886 및 미국 특허 출원 공개 번호 2014322129를 참조한다.

[0424] 항-AMC 면역접합체의 항-AMC 항체 모이어티는 항-AMC 항체 모이어티가 이펙터 분자에 회합되거나 또는 결합될 수 있는 임의의 수단에 의해 이펙터 분자에 "부착될" 수 있다. 예를 들어, 항-AMC 면역접합체의 항-AMC 항체 모이어티는 화학적 또는 재조합 수단에 의해 이펙터 분자에 부착될 수 있다. 융합체 또는 접합체를 제조하기 위한 화학적 수단은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 항-AMC 면역접합체를 제조하는데 사용될 수 있다. 항-AMC 항체 모이어티와 이펙터 분자를 접합시키기 위해 사용되는 방법은 표적 세포 상에서 항원에 결합하는 결합 단백질의 능력을 방해하지 않고 결합 단백질을 이펙터 분자와 연결시킬 수 있어야 한다.

[0425] 항-AMC 면역접합체의 항-AMC 항체 모이어티는 이펙터 분자에 간접적으로 연결될 수 있다. 예를 들어, 항-AMC 면역접합체의 항-AMC 항체 모이어티는 여러 유형 중 하나의 이펙터 분자를 함유하는 리포솜에 직접적으로 연결될 수 있다. 이펙터 분자(들) 및/또는 항-AMC 항체 모이어티는 또한 고체 표면에 결합될 수 있다.

[0426] 일부 실시양태에서, 항-AMC 면역접합체의 항-AMC 항체 모이어티 및 이펙터 분자는 둘 다 단백질이고, 관련 기술 분야에 널리 공지된 기술을 사용하여 접합될 수 있다. 2개의 단백질을 접합시킬 수 있는 입수가 가능한 수백개의 가교제가 있다. (예를 들어 문헌 ["Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking". 1991, Shans Wong, CRC Press, Ann Arbor] 참조). 가교제는 일반적으로 항-AMC 항체 모이어티 및/또는 이펙터 분자에 이용 가능한 또는 삽입된 반응성 관능기에 기초하여 선택된다. 게다가, 반응성 기가 없는 경우, 광활성화가능한 가교제가 사용될 수 있다. 특정 경우에, 항-AMC 항체 모이어티 및 이펙터 분자 사이에 스페이서를 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 관련 기술분야에 공지된 가교제는 동종이관능성 작용제: 글루타르알데히드, 디메틸아디프미데이트 및 비스(디아조벤지딘) 및 이종이관능성 작용제: m 말레이미도벤조일-N-히드록시숙신이미드 및 술포-m 말레이미도벤조일-N-히드록시숙신이미드를 포함한다.

[0427] 일부 실시양태에서, 항-AMC 면역접합체의 항-AMC 항체 모이어티는 이펙터 분자의 화학적 부착을 위해 특정한 잔기로 조작될 수 있다. 관련 기술분야에 공지된 분자의 화학적 부착에 사용되는 특정한 잔기는 리신 및 시스테인을 포함한다. 가교제는 항-AMC 항체 모이어티에 삽입되고, 이펙터 분자에 이용가능한 반응성 관능기에 기초하여 선택된다.

[0428] 항-AMC 면역접합체는 또한 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 이러한 경우에 항-AMC 항체 모이어티를 코딩하는 DNA 서열은 이펙터 분자를 코딩하는 DNA 서열에 융합되어, 키메라 DNA 분자를 생성한다. 키메라 DNA 서열은 융합 단백질을 발현하는 숙주 세포 내로 형질감염된다. 융합 단백질은 세포 배양물로부터 회수되고, 관련 기술분야에 공지된 기술을 사용하여 정제될 수 있다.

[0429] 표지인 이펙터 분자를 결합 단백질에 부착시키는 것의 예는 문헌 [Hunter, *et al.*, *Nature* 144:945 (1962); David, *et al.*, *Biochemistry* 13:1014 (1974); Pain, *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 40:219 (1981); Nygren, J. *Histochem. and Cytochem.* 30:407 (1982); Wensel and Meares, *Radioimmunoimaging And Radioimmunotherapy*, Elsevier, N.Y. (1983); 및 Colcher *et al.*, "Use Of Monoclonal Antibodies As Radiopharmaceuticals For The Localization Of Human Carcinoma Xenografts In Athymic Mice", *Meth. Enzymol.*, 121:802-16 (1986)]에 기재된 방법을 포함한다.

[0430] 방사성- 또는 다른 표지는 공지된 방식으로 면역접합체에 혼입될 수 있다. 예를 들어, 펩티드는 생합성될 수 있거나, 또는 예를 들어 수소 대신 플루오린-19를 수반하는 적합한 아미노산 전구체를 사용하는 화학적 아미노산 합성에 의해 합성될 수 있다. 표지, 예컨대 ⁹⁹Tc 또는 ¹²³I, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re 및 ¹¹¹In이 펩티드 내의 시스테인 잔기를 통해 부착될 수 있다. 이트륨-90은 리신 잔기를 통해 부착될 수 있다. 아이오도젠 (IODOGEN) 방법 (Fraker *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80:49-57 (1978))을 사용하여 아이오딘-123을 혼입시킬 수 있다. 문헌 ["Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989)]은 다른 방법을 상세히 기재한다.

- [0431] 항체 모이어티 및 세포독성제의 면역접합체는 다양한 이관능성 단백질 커플링제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예컨대 디메틸 아디프이미데이트 HCl), 활성 에스테르 (예컨대 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예컨대 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대 비스(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대 톨루엔 2,6-디이소시아네이트) 및 비스-활성 플루오린 화합물 (예컨대 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al., Science 238:1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이트벤질-3-메틸티에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 항체에 대한 방사성뉴클레오타이드의 접합을 위한 예시적인 킬레이트화제이다. 예를 들어, W094/11026을 참조한다. 링커는 세포 내에서 세포독성 약물의 방출을 용이하게 하는 "절단 가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산-불안정성 링커, 펩티다제-감수성 링커, 광불안정성 링커, 디메틸 링커 또는 디술피드-함유 링커 (문헌 [Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)]; 미국 특허 번호 5,208,020)가 사용될 수 있다.
- [0432] 본 발명의 항-AMC 면역접합체는 상업적으로 입수가능한 (예를 들어, 피어스 바이오테크놀로지, 인크.(Pierce Biotechnology, Inc.) (미국 일리노이주 록포드)로부터의) 가교 시약: BMPs, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 술폰-EMCS, 술폰-GMBS, 술폰-KMUS, 술폰-MBS, 술폰-SIAB, 술폰-SMCC, 및 술폰-SMPB, 및 SVSB (숙신이미딜-(4-비닐술폰)벤조에이트)를 사용하여 제조된 ADC를 명백하게 고려하나, 이에 제한되지는 않는다. 문헌 [2003-2004 Applications Handbook and Catalog]의 467-498 페이지를 참조한다.
- [0433] 제약 조성물
- [0434] 항-AMC 구축물을 포함하는 조성물 (예컨대 제약 조성물, 또한 본원에서 제제로 지칭됨)이 또한 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 항-AMC 구축물과 회합된 세포 (예컨대 이펙터 세포, 예를 들어, T 세포)를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물이 제공된다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 항-AMC 구축물과 회합된 세포 (예컨대 이펙터 세포, 예를 들어, T 세포)를 추가로 포함한다.
- [0435] 항-AMC 구축물의 적합한 제제는 목적하는 정도의 순도를 갖는 항-AMC 구축물을 임의적인 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))와 혼합함으로써 동결건조 제제 또는 수용액의 형태로 수득된다. 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 이는 완충제 예컨대 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기 산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 보존제 (예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤 예컨대 메틸 또는 프로필파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드 및 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 포함하는 다른 탄수화물; 킬레이트화제 예컨대 EDTA; 당 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 반대-이온 예컨대 나트륨; 금속 착물 (예를 들어 Zn-단백질 착물); 및/또는 비-이온성 계면활성제 예컨대 트윈(TWEEN)TM, 플루로닉스(PLURONICS)TM 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함한다. 예시적인 제제는, 명백하게 본원에 참조로 포함된 W098/56418에 기재되어 있다. 피하 투여에 적합한 동결건조된 제제는 W097/04801에 기재되어 있다. 이러한 동결건조 제제는 적합한 희석제를 사용하여 높은 단백질 농도로 재구성될 수 있고, 재구성된 제제는 본원에서 치료될 개체에게 피하로 투여될 수 있다. 리포펙틴 또는 리포솜은 세포 내로 본 발명의 항-AMC 구축물을 전달하는데 사용될 수 있다.
- [0436] 본원에서 제제는 또한 치료될 특정한 적응증을 위해 필요에 따라 항-AMC 구축물 뿐만 아니라 1종 이상의 활성 화합물, 바람직하게는 서로에게 유해하게 영향을 미치지 않는 보완적 활성을 갖는 것을 함유할 수 있다. 예를 들어, 항-AMC 구축물 뿐만 아니라 항-신생물제, 성장 억제제, 세포독성제 또는 화학요법제를 추가로 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 분자는 의도된 목적에 효과적인 양으로 조합물에 적합하게 존재한다. 이러한 다른 작용제의 유효량은 제제에 존재하는 항-AMC 구축물의 양, 질환 또는 장애 또는 치료의 유형, 및 상기 논의된 다른 요인에 따라 달라진다. 이들은 일반적으로 본원에 기재된 바와 동일한 투여량 및 투여 경로 또는 이전에 사용된 투여량의 약 1% 내지 99%로 사용된다.

- [0437] 항-AMC 구축물은 또한, 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로구체, 마이크로에멀전, 나노-입자 및 나노-캡슐) 또는 마크로에멀전 내의, 예를 들어 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에 각각 포획될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다. 지속-방출 제제가 제조될 수 있다.
- [0438] 항-AMC 구축물의 지속-방출 제제가 제조될 수 있다. 지속-방출 제제의 적합한 예는 항체 (또는 그의 단편)를 함유하는 고휘 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하고, 이러한 매트릭스는 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다. 지속-방출 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드 (미국 특허 번호 3,773,919), L-글루탐산 및 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체 예컨대 루프론 데포(LUPRON DEPOT)TM (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 구성된 주사가능한 마이크로구체), 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산을 포함한다. 중합체 예컨대 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산은 100일을 초과하여 분자를 방출할 수 있는 반면에, 특정 히드로겔은 보다 짧은 기간 동안 단백질을 방출한다. 포획된 항체가 장기간 동안 신체 내에 유지되는 경우, 이것은 37°C에서의 습기 노출의 결과로서 변성 또는 응집되어, 생물학적 활성의 손실, 및 면역원성의 가능한 변화를 일으킬 수 있다. 수반된 메카니즘에 따라 항-AMC 구축물의 안정화를 위한 합리적인 전략이 고안될 수 있다. 예를 들어, 응집 메카니즘이 티오-디설피드 상호교환을 통한 분자간 S-S 결합 형성인 것으로 발견되는 경우, 안정화는 술폰히드릴 잔기의 변형, 산성 용액으로부터의 동결건조, 습기 함량의 조절, 적절한 첨가제의 사용 및 특이적 중합체 매트릭스 조성물의 개발에 의해 달성될 수 있다.
- [0439] 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 시트레이트, NaCl, 아세테이트, 숙시네이트, 글리신, 폴리소르베이트 80 (트윈 80) 또는 상기의 것의 임의의 조합을 포함하는 완충제에서 제제화된다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 약 100 mM 내지 약 150 mM 글리신을 포함하는 완충제에서 제제화된다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 약 50 mM 내지 약 100 mM NaCl을 포함하는 완충제에서 제제화된다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 약 10 mM 내지 약 50 mM 아세테이트를 포함하는 완충제에서 제제화된다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 약 10 mM 내지 약 50 mM 숙시네이트를 포함하는 완충제에서 제제화된다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 약 0.005% 내지 약 0.02% 폴리소르베이트 80을 포함하는 완충제에서 제제화된다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 pH 약 5.1 내지 5.6을 갖는 완충제에서 제제화된다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 10 mM 시트레이트, 100 mM NaCl, 100mM 글리신 및 0.01% 폴리소르베이트 80을 포함하는 완충제에서 제제화되고, 여기서 제제는 pH 5.5이다.
- [0440] 생체내 투여에 사용될 제제는 멸균되어야 한다. 이는 예를 들어, 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성된다.
- [0441] 항-AMC 구축물을 사용하는 치료 방법
- [0442] 본 발명의 항-AMC 구축물 및/또는 조성물은 개체 (예를 들어, 포유동물 예컨대 인간)에게 투여되어, 예를 들어, 암 (예컨대 간세포성 암종, 배세포 종양, 및 유방암)을 포함하는 비정상적으로 높은 AFP 발현을 수반하는 질환 및/또는 장애 (또한 본원에서 "AFP-양성" 질환 또는 장애로 지칭됨)를 치료할 수 있다. 본 출원은 따라서 일부 실시양태에서 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 항-AMC 구축물, 예컨대 본원에 기재된 항-AMC 구축물 중 어느 하나를 포함하는 조성물 (예컨대 제약 조성물)의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 AFP-양성 질환 (예컨대 암)을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 항-AMC 구축물과 회합된 세포 (예컨대 이펙터 세포)를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은, 예를 들어, 간세포성 암종, 배세포 종양, 및 유방암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이고 치료는 암의 확산을 방지하는 것, 예를 들어, 암의 전이를 억제 (예컨대 방지)하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 전이성 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.
- [0443] 예를 들어, 일부 실시양태에서, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 항-AMC 구축물을 포함하는 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 AFP-양성 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, AFP 펩티드는 AFP158 (서열식별번호: 4)이다. 일부 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질은 HLA-A02이다. 일부 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질은 HLA-A*02:01이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 비-자연 발생이다. 일부 실시양태에서, 항-

AMC 구축물은 전장 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 다중-특이적 (예컨대 이중특이적) 분자이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 키메라 항원 수용체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 면역접합체이다. 일부 실시양태에서, 조성물은 항-AMC 구축물과 회합된 세포 (예컨대 이펙터 세포)를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환은 암이다. 일부 실시양태에서, 암은, 예를 들어, 간세포성 암종, 배세포 종양, 또는 유방암이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이고 치료는 암의 확산을 방지하는 것, 예를 들어, 암의 전이를 억제 (예컨대 방지)하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 전이성 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0444] 일부 실시양태에서, AFP158 펩티드 (서열식별번호: 4) 및 HLA-A*02:01을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 항-AMC 구축물을 포함하는 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 AFP-양성 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 비-자연 발생이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 전장 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 다중-특이적 (예컨대 이중특이적) 분자이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 키메라 항원 수용체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 면역접합체이다. 일부 실시양태에서, 조성물은 항-AMC 구축물과 회합된 세포 (예컨대 이펙터 세포)를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환은 암이다. 일부 실시양태에서, 암은, 예를 들어, 간세포성 암종, 배세포 종양, 또는 유방암이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이고 치료는 암의 확산을 방지하는 것, 예를 들어, 암의 전이를 억제 (예컨대 방지)하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 전이성 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0445] 일부 실시양태에서, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 항-AMC 구축물을 포함하는 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 항-AMC 항체 모이어티는 i) G-F/Y-S/T-F-D/S/T-D/N/S-Y/A-A/G/W의 아미노산 서열 (서열식별번호: 87)을 포함하는 HC-CDR1, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, I/S-K/S-X-H/Y-X-G-X-T의 아미노산 서열 (서열식별번호: 88)을 포함하는 HC-CDR2, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 A/G-X-W/Y-Y-X-X-X-F/Y-D의 아미노산 서열 (서열식별번호: 89)을 포함하는 HC-CDR3, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 및 ii) S/T-G/S-D/N-I/V-A/G-A/S/V-X-H/Y의 아미노산 서열 (서열식별번호: 120)을 포함하는 LC-CDR1, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 Q-S/T-Y/W-D/T-S/T-A/S의 아미노산 서열 (서열식별번호: 121)을 포함하는 LC-CDR3, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 경쇄 가변 도메인 (여기서 X는 임의의 아미노산일 수 있음)을 포함하는 것인, 개체에서 AFP-양성 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 비-자연 발생이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 전장 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 다중-특이적 (예컨대 이중특이적) 분자이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 키메라 항원 수용체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 면역접합체이다. 일부 실시양태에서, 조성물은 항-AMC 구축물과 회합된 세포 (예컨대 이펙터 세포)를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환은 암이다. 일부 실시양태에서, 암은, 예를 들어, 간세포성 암종, 배세포 종양, 또는 유방암이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이고 치료는 암의 확산을 방지하는 것, 예를 들어, 암의 전이를 억제 (예컨대 방지)하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 전이성 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0446] 일부 실시양태에서, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 항-AMC 구축물을 포함하는 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 항-AMC 항체 모이어티는 i) G-F/Y-S/T-F-D/S/T-D/N/S-Y/A-A/G/W의 아미노산 서열 (서열식별번호: 87)을 포함하는 HC-CDR1, I/S-K/S-X-H/Y-X-G-X-T의 아미노산 서열 (서열식별번호: 88)을 포함하는 HC-CDR2, 및 A/G-X-W/Y-Y-X-X-X-F/Y-D의 아미노산 서열 (서열식별번호: 89)을 포함하는 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 및 ii) S/T-G/S-D/N-I/V-A/G-A/S/V-X-H/Y의 아미노산 서열 (서열식별번호: 120)을 포함하는 LC-CDR1, 및 Q-S/T-Y/W-D/T-S/T-A/S의 아미노산 서열 (서열식별번호: 121)을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인 (여기서 X는 임의의 아미노산일 수 있음)을 포함하는 것인, 개체에서 AFP-양성 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 비-자연 발생이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 전장 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 다중-특이적 (예컨대 이중특이적) 분자이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 키메라 항원 수용체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 면역접합체이다. 일부 실시양태에서,

조성물은 항-AMC 구축물과 회합된 세포 (예컨대 이펙터 세포)를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환은 암이다. 일부 실시양태에서, 암은, 예를 들어, 간세포성 암종, 배세포 종양, 또는 유방암이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이고 치료는 암의 확산을 방지하는 것, 예를 들어, 암의 전이를 억제 (예컨대 방지)하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 전이성 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0447]

일부 실시양태에서, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 항-AMC 구축물을 포함하는 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 항-AMC 항체 모이어티는 i) 서열식별번호: 57-66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1, 또는 최대 약 5개 (예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체; 서열식별번호: 67-76 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2, 또는 최대 약 5개 (예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체; 및 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3; 또는 최대 약 5개 (예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 및 ii) 서열식별번호: 90-99 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1, 또는 최대 약 5개 (예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체; 서열식별번호: 100-109 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2, 또는 최대 약 5개 (예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체; 및 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3; 또는 최대 약 5개 (예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 경쇄 가변 도메인 서열을 포함하는 것인, 개체에서 AFP-양성 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 비-자연 발생이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 전장 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 다중-특이적 (예컨대 이중특이적) 분자이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 키메라 항원 수용체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 면역접합체이다. 일부 실시양태에서, 조성물은 항-AMC 구축물과 회합된 세포 (예컨대 이펙터 세포)를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환은 암이다. 일부 실시양태에서, 암은, 예를 들어, 간세포성 암종, 배세포 종양, 또는 유방암이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이고 치료는 암의 확산을 방지하는 것, 예를 들어, 암의 전이를 억제 (예컨대 방지)하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 전이성 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0448]

일부 실시양태에서, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 항-AMC 구축물을 포함하는 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 항-AMC 항체 모이어티는 i) 서열식별번호: 57-66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1; 서열식별번호: 67-76 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2; 및 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 또는 HC-CDR 서열에서 최대 약 5개 (예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체; 및 ii) 서열식별번호: 90-99 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1; 서열식별번호: 100-109 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2; 및 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인 서열; 또는 LC-CDR 서열에서 최대 약 5개 (예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 것인, 개체에서 AFP-양성 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 비-자연 발생이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 전장 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 다중-특이적 (예컨대 이중특이적) 분자이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 키메라 항원 수용체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 면역접합체이다. 일부 실시양태에서, 조성물은 항-AMC 구축물과 회합된 세포 (예컨대 이펙터 세포)를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환은 암이다. 일부 실시양태에서, 암은, 예를 들어, 간세포성 암종, 배세포 종양, 또는 유방암이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이고 치료는 암의 확산을 방지하는 것, 예를 들어, 암의 전이를 억제 (예컨대 방지)하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 전이성 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0449]

일부 실시양태에서, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 항-AMC 구축물을 포함하는 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 항-AMC 항체 모이어티는 i) 서열식별번호: 57-66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1; 서열식별번호: 67-76 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2; 및 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 및 ii) 서열식별번호: 90-99 중 어느 하나의

아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1; 서열식별번호: 100-109 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2; 및 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인 서열을 포함하는 것인, 개체에서 AFP-양성 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 비-자연 발생이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 전장 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 다중-특이적 (예컨대 이중특이적) 분자이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 키메라 항원 수용체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 면역접합체이다. 일부 실시양태에서, 조성물은 항-AMC 구축물과 회합된 세포 (예컨대 이펙터 세포)를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환은 암이다. 일부 실시양태에서, 암은, 예를 들어, 간세포성 암종, 배세포 종양, 또는 유방암이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이고 치료는 암의 확산을 방지하는 것, 예를 들어, 암의 전이를 억제 (예컨대 방지)하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 전이성 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0450] 일부 실시양태에서, AFP 펩티드 및 MCH 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 항-AMC 구축물을 포함하는 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 항-AMC 항체 모이어티는 서열식별번호: 17-26 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 또는 적어도 약 95% (예를 들어 적어도 약 96%, 97%, 98%, 또는 99% 중 어느 것) 서열 동일성을 갖는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 27-36 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인, 또는 적어도 약 95% (예를 들어 적어도 약 96%, 97%, 98%, 또는 99% 중 어느 것) 서열 동일성을 갖는 그의 변이체를 포함하는 것인, 개체에서 AFP-양성 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 비-자연 발생이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 전장 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 다중-특이적 (예컨대 이중특이적) 분자이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 키메라 항원 수용체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 면역접합체이다. 일부 실시양태에서, 조성물은 항-AMC 구축물과 회합된 세포 (예컨대 이펙터 세포)를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환은 암이다. 일부 실시양태에서, 암은, 예를 들어, 간세포성 암종, 배세포 종양, 또는 유방암이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이고 치료는 암의 확산을 방지하는 것, 예를 들어, 암의 전이를 억제 (예컨대 방지)하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 전이성 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0451] 일부 실시양태에서, AFP 펩티드 및 MCH 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 항-AMC 구축물을 포함하는 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 항-AMC 항체 모이어티는 서열식별번호: 17-26 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열식별번호: 27-36 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 것인, 개체에서 AFP-양성 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 비-자연 발생이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 전장 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 다중-특이적 (예컨대 이중특이적) 분자이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 키메라 항원 수용체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 면역접합체이다. 일부 실시양태에서, 조성물은 항-AMC 구축물과 회합된 세포 (예컨대 이펙터 세포)를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환은 암이다. 일부 실시양태에서, 암은, 예를 들어, 간세포성 암종, 배세포 종양, 또는 유방암이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이고 치료는 암의 확산을 방지하는 것, 예를 들어, 암의 전이를 억제 (예컨대 방지)하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 전이성 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0452] 일부 실시양태에서, 상기 기재된 임의의 실시양태에 따른 항-AMC 구축물을 포함하는 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 전이성 간세포성 암종을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0453] 일부 실시양태에서, 상기 기재된 임의의 실시양태에 따른 항-AMC 구축물을 포함하는 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 간세포성 암종의 전이를 억제 (예컨대 방지)하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0454] 상기 기재된 AFP-양성 질환을 치료하기 위한 임의의 방법의 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 개체에게 투여되기 전에 세포 (예컨대 면역 세포, 예를 들어, T 세포)에 접합된다. 따라서, 예를 들어, a) 본원에 기재된 항-AMC 구축물 중 어느 하나를 세포 (예컨대 면역 세포, 예를 들어, T 세포)에 접합시켜, 항-AMC 구축물/세포 접합체를 형성시키는 것, 및 b) 항-AMC 구축물/세포 접합체를 포함하는 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 AFP-양성 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 세포는 개체로부터 유

래된다. 일부 실시양태에서, 세포는 개체로부터 유래되지 않는다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 세포의 표면 상의 분자에게 공유 연결에 의해 세포에 접합된다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 세포의 표면 상의 분자에게 비-공유 연결에 의해 세포에 접합된다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 세포의 외막 내로의 항-AMC 구축물의 부분의 삽입에 의해 세포에 접합된다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 비-자연 발생이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 전장 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 다중-특이적 (예컨대 이중특이적) 분자이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 키메라 항원 수용체이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 면역접합체이다. 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환은 암이다. 일부 실시양태에서, 암은, 예를 들어, 간세포성 암종, 배세포 종양, 또는 유방암이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이고 치료는 암의 확산을 방지하는 것, 예를 들어, 암의 전이를 억제 (예컨대 방지)하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 전이성 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0455] 일부 실시양태에서, 개체는 포유동물 (예를 들어, 인간, 비-인간 영장류, 래트, 마우스, 소, 말, 돼지, 양, 염소, 개, 고양이 등)이다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 개체는 임상 환자, 임상 시험 지원자, 실험 동물 등이다. 일부 실시양태에서, 개체는 약 60세 미만이다 (예를 들어 약 50, 40, 30, 25, 20, 15 또는 10세 중 어느 것 미만 포함). 일부 실시양태에서, 개체는 약 60세 초과이다 (예를 들어 약 70, 80, 90 또는 100세 중 어느 것 초과 포함). 일부 실시양태에서, 개체는 본원에 기재된 하나 이상의 질환 또는 장애 (예컨대 간세포성 암종, 배세포 종양, 및 유방암)로 진단되거나 또는 유전적으로 걸리기 쉽다. 일부 실시양태에서, 개체는 본원에 기재된 하나 이상의 질환 또는 장애와 연관된 하나 이상의 위험 인자를 갖는다.

[0456] 본 출원은 일부 실시양태에서 개체에서 항-AMC 구축물 (예컨대 본원에 기재된 항-AMC 구축물 중 어느 하나)을 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체를 그의 표면 상에 제시하는 세포에 전달하는 방법을 제공하며, 방법은 항-AMC 구축물을 포함하는 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 전달될 항-AMC 구축물은 세포 (예컨대 이펙터 세포, 예를 들어, T 세포)와 회합된다.

[0457] 암 (예컨대 간세포성 암종, 배세포 종양 및 유방암) 또는 비정상적 AFP 발현을 나타내는 임의의 다른 질환을 위한 많은 진단 방법 및 이들 질환의 임상적 서술은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 이러한 방법은, 예를 들어, 면역조직화학, PCR, 및 형광 계내 혼성화 (FISH)를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0458] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-AMC 구축물 및/또는 조성물은 비정상적 AFP 발현을 수반하는 질환 또는 장애를 치료하기 위해 제2, 제3 또는 제4 작용제 (예를 들어 항신생물제, 성장 억제제, 세포독성제 또는 화학요법제 포함)와 조합하여 투여된다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물은 MHC 부류 I 단백질의 발현을 증가시키고/거나, MHC 부류 I 단백질에 의한 AFP 펩티드의 표면 제시를 증진시키는 작용제와 조합하여 투여된다. 일부 실시양태에서, 작용제는, 예를 들어, IFN 수용체 효능제, Hsp90 억제제, p53 발현의 인핸서 및 화학요법제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 작용제는, 예를 들어, IFN γ , IFN β 및 IFN α 를 포함하는 IFN 수용체 효능제이다. 일부 실시양태에서, 작용제는, 예를 들어, 타네스피마이신 (17-AAG), 알베스피마이신 (17-DMAG), 레타스피마이신 (IPI-504), IPI-493, CNF2024/BIIB021, MPC-3100, 데비오 0932 (CUDC-305), PU-H71, 가네테스픽 (STA-9090), NVP-AUY922 (VER-52269), HSP990, KW-2478, AT13387, SNX-5422, DS-2248 및 XL888을 포함하는 Hsp90 억제제이다. 일부 실시양태에서, 작용제는, 예를 들어, 5-플루오로우라실 및 누틀린-3을 포함하는 p53 발현의 인핸서이다. 일부 실시양태에서, 작용제는, 예를 들어, 토포테칸, 에토포시드, 시스플라틴, 파클리탁셀, 및 빈블라스틴을 포함하는 화학요법제이다.

[0459] 일부 실시양태에서, 개체에서 AFP-양성 질환을 치료하는 방법이 제공되고, 여기서 AFP를 발현하는 세포는 AFP 단백질 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체를 그의 표면 상에 정상적으로 제시하지 않거나 (예컨대 배세포 종양 세포), 또는 상대적으로 낮은 수준으로 제시하고, 방법은 항-AMC 구축물을 포함하는 조성물을 MHC 부류 I 단백질의 발현을 증가시키고/거나 MHC 부류 I 단백질에 의한 AFP 펩티드의 표면 제시를 증진시키는 작용제와 조합하여 개체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 작용제는, 예를 들어, IFN 수용체 효능제, Hsp90 억제제, p53 발현의 인핸서 및 화학요법제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 작용제는, 예를 들어, IFN γ , IFN β 및 IFN α 를 포함하는 IFN 수용체 효능제이다. 일부 실시양태에서, 작용제는, 예를 들어, 타네스피마이신 (17-AAG), 알베스피마이신 (17-DMAG), 레타스피마이신 (IPI-504), IPI-493, CNF2024/BIIB021, MPC-3100, 데비오 0932 (CUDC-305), PU-H71, 가네테스픽 (STA-9090), NVP-AUY922 (VER-52269), HSP990, KW-2478, AT13387, SNX-5422, DS-2248 및 XL888을 포함하는 Hsp90 억제제이다. 일부 실시양태에서, 작용제는, 예를 들어, 5-플루오로우라실 및 누틀린-3을 포함하는 p53 발현의 인핸서이다. 일부 실시양태에서, 작용제는, 예를 들어

어, 토포테칸, 에토포시드, 시스플라틴, 파클리탁셀 및 빈블라스틴을 포함하는 화학요법제이다.

- [0460] 암 치료는, 예를 들어, 종양 퇴행, 종양 중량 또는 크기 수축, 진행까지의 시간, 생존 기간, 무진행 생존, 전체 반응률, 반응 지속기간, 삶의 질, 단백질 발현 및/또는 활성에 의해 평가될 수 있다. 요법의 효능을 결정하기 위한 접근법이 사용될 수 있고, 이는 예를 들어 방사선 영상화를 통하여 반응을 측정하는 것을 포함한다.
- [0461] 일부 실시양태에서, 치료 효능은 방정식 $100 - (T/C \times 100)$ 을 사용하여 계산된 종양 성장 억제 백분율 (% TGI)로서 측정되고, 여기서 T는 치료된 종양의 평균 상대 종양 부피이고, C는 치료되지 않은 종양의 평균 상대 종양 부피이다. 일부 실시양태에서, %TGI는 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 또는 95% 초과이다.
- [0462] 항-AMC 구축물 조성물의 투약 및 투여 방법
- [0463] 개체 (예컨대 인간)에게 투여되는 항-AMC 구축물 조성물의 용량은 특정한 조성물, 투여 방식, 및 치료되는 질환의 유형에 따라 달라질 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물의 양은 객관적 반응 (예컨대 부분 반응 또는 완전 반응)을 일으키는데 효과적이다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물 조성물의 양은 개체에서 완전 반응을 일으키는데 충분하다. 일부 실시양태에서, 항-AMC 구축물 조성물의 양은 개체에서 부분 반응을 일으키는데 충분하다. 일부 실시양태에서, 투여되는 항-AMC 구축물 조성물의 양 (예를 들어, 단독으로 투여되는 경우)은 항-AMC 구축물 조성물로 치료된 개체의 집단에서 약 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 64%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 또는 90% 중 어느 것 초과 전체 반응률을 생성시키는데 충분하다. 본원에 기재된 치료 방법에 대한 개체의 반응은, 예를 들어, RECIST 수준에 기초하여 결정될 수 있다.
- [0464] 일부 실시양태에서, 조성물의 양은 개체의 무진행 생존을 연장하는데 충분하다. 일부 실시양태에서, 조성물의 양은 개체의 전체 생존을 연장하는데 충분하다. 일부 실시양태에서, 조성물의 양 (예를 들어, 단독으로 투여되는 경우)은 항-AMC 구축물 조성물로 치료된 개체들의 집단에서 약 50%, 60%, 70%, 또는 77% 중 어느 것 초과 임상 이익을 생성시키는데 충분하다.
- [0465] 일부 실시양태에서, 단독으로 또는 제2, 제3 및/또는 제4 작용제와 조합된 조성물의 양은, 치료 전의 동일한 대상체에서의 상응하는 종양 크기, 암 세포 수, 또는 종양 성장률과 비교하여 또는 치료를 받지 않은 다른 대상체에서의 상응하는 활성과 비교하여 적어도 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100% 중 어느 것만큼 종양 크기를 감소시키는 데, 암 세포 개수를 감소시키는 데, 또는 종양의 성장률을 감소시키는 데 충분한 양이다. 표준 방법, 예컨대 정제된 효소를 사용한 시험관내 검정, 세포-기반 검정, 동물 모델, 또는 인간 시험을 사용하여, 이러한 효과의 크기를 측정할 수 있다.
- [0466] 일부 실시양태에서, 조성물 중의 항-AMC 구축물 (예를 들어, 전장 항-AMC 항체, 다중-특이적 항-AMC 분자, 항-AMC CAR, 또는 항-AMC 면역접합체)의 양은 조성물이 개체에게 투여되는 경우 독성학적 효과 (즉, 임상적으로 허용되는 수준의 독성을 초과하는 효과)를 유도하는 수준 미만 이거나, 또는 잠재적 부작용이 제어 또는 허용될 수 있는 수준이다.
- [0467] 일부 실시양태에서, 조성물의 양은 동일한 투여 요법에 따른 조성물의 최대 허용 용량 (MTD)에 근접한다. 일부 실시양태에서, 조성물의 양은 MTD의 약 80%, 90%, 95%, 또는 98% 중 어느 것 초과이다.
- [0468] 일부 실시양태에서, 조성물 중의 항-AMC 구축물 (예를 들어, 전장 항-AMC 항체, 다중-특이적 항-AMC 분자, 항-AMC CAR, 또는 항-AMC 면역접합체)의 양은 약 0.001 μg 내지 약 1000 μg 의 범위에 포함된다.
- [0469] 임의의 상기 측면의 일부 실시양태에서, 조성물 중의 항-AMC 구축물 (예를 들어, 전장 항-AMC 항체, 다중-특이적 항-AMC 분자, 항-AMC CAR, 또는 항-AMC 면역접합체)의 유효량은 총 체중의 약 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 약 100 mg/kg 의 범위이다.
- [0470] 항-AMC 구축물 조성물은 개체 (예컨대 인간)에게, 예를 들어, 정맥내, 동맥내, 복강내, 폐내, 경구, 흡입, 소포내, 근육내, 기관내, 피하, 안내, 척수강내, 경점막, 및 경피를 포함하는 다양한 경로를 통해 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물의 지속 연속 방출 제제가 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물은 정맥내로 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 문맥내로 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 동맥내로 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 복강내로 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 간내로 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 간 동맥 주입에 의해 투여된다.
- [0471] 항-AMC CAR 이펙터 세포 요법

- [0472] 본 출원은 또한 이펙터 세포 (예컨대 1차 T 세포)의 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 대한 특이성을 재지시하기 위해 항-AMC CAR을 사용하는 방법을 제공한다. 따라서, 본 발명은 또한 항-AMC CAR을 발현하는 이펙터 세포 (예컨대 T 세포)를 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물에서 AMC-제시 세포를 포함하는 표적 세포 집단 또는 조직에 대한 이펙터 세포-매개 반응 (예컨대 T 세포-매개 면역 반응)을 자극하는 방법을 제공한다.
- [0473] 항-AMC CAR을 발현하는 항-AMC CAR 이펙터 세포 (예컨대 T 세포)는 그를 필요로 하는 수용자에 주입될 수 있다. 주입된 세포는 수용자에서 AMC-제시 세포를 사멸시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 요법과는 달리, 항-AMC CAR 이펙터 세포 (예컨대 T 세포)는 생체내에서 복제가능하고, 이는 지속된 종양 제어에 이어질 수 있는 장기간 지속성을 일으킨다.
- [0474] 일부 실시양태에서, 항-AMC CAR 이펙터 세포는 강건한 생체내 T 세포 확장을 겪을 수 있고, 연장된 양의 시간 동안 지속될 수 있는 항-AMC CAR T 세포이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-AMC CAR T 세포는 재활성화되어 임의의 추가의 종양 형성 또는 성장을 억제할 수 있는 특정한 기억 T 세포로 발달한다.
- [0475] 본 발명의 항-AMC CAR T 세포는 또한 포유동물에서 생체외 면역화 및/또는 생체내 요법을 위한 백신의 유형으로서 역할을 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 포유동물은 인간이다.
- [0476] 생체외 면역화에 관하여, 하기 중 적어도 하나가 포유동물 내로 세포를 투여하기 전에 시험관내에서 발생한다: i) 세포의 확장, ii) 항-AMC CAR을 코딩하는 핵산을 세포에 도입하는 것, 및/또는 iii) 세포의 동결보존.
- [0477] 생체외 절차는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 하기에서 보다 자세히 논의된다. 간략하게, 세포는 포유동물 (바람직하게는 인간)로부터 단리되고, 본원에 개시된 항-AMC CAR을 발현하는 벡터에 의해 유전자 변형된다 (즉, 시험관내 형질도입 또는 형질감염됨). 항-AMC CAR 세포는 포유동물 수용자에게 투여되어 치료 이익을 제공할 수 있다. 포유동물 수용자는 인간일 수 있고, 항-AMC CAR 세포는 수용자에 관하여 자가일 수 있다. 대안적으로, 세포는 수용자에 관하여 동종, 동계 또는 이종일 수 있다.
- [0478] 조혈 줄기 및 전구 세포의 생체외 확장을 위한 절차는 본원에 참조로 포함된 미국 특허 번호 5,199,942에 기재되어 있고, 본 발명의 세포에 적용될 수 있다. 다른 적합한 방법이 관련 기술분야에 공지되어 있고, 따라서 본 발명은 세포의 생체외 확장의 임의의 특정한 방법으로 제한되지 않는다. 간략하게, T 세포의 생체외 배양 및 확장은: (1) 포유동물로부터 말초 혈액 수거 또는 골수 외식편으로부터 CD34⁺ 조혈 줄기 및 전구 세포를 수집하는 것; 및 (2) 이러한 세포를 생체외 확장시키는 것을 포함한다. 미국 특허 번호 5,199,942에 기재된 세포 성장 인자에 추가로, 다른 인자, 예컨대 flt3-L, IL-1, IL-3 및 c-kit 리간드가 세포의 배양 및 확장을 위해 사용될 수 있다.
- [0479] 생체외 면역화와 관련하여 세포-기반 백신을 사용하는 것에 추가로, 본 발명은 또한 환자에서 항원에 대해 지시된 면역 반응을 도출하는 생체내 면역화를 위한 조성물 및 방법을 제공한다.
- [0480] 본 발명의 항-AMC CAR 이펙터 세포 (예컨대 T 세포)는 또한 단독으로 투여되거나, 또는 희석제와의 및/또는 다른 성분 예컨대 IL-2 또는 다른 시토카인 또는 세포 집단과 조합하여 제약 조성물로서 투여될 수 있다. 간략하게, 본 발명의 제약 조성물은, 하나 이상의 제약상 또는 생리학상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 조합하여, 항-AMC CAR 이펙터 세포 (예컨대 T 세포)를 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 완충제 예컨대 중성 완충 염수, 포스페이트 완충 염수 등; 탄수화물 예컨대 글루코스, 만노스, 수크로스 또는 텍스트란, 만니톨; 단백질; 폴리펩티드 또는 아미노산 예컨대 글리신; 항산화제; 킬레이트화제 예컨대 EDTA 또는 글루타티온; 아주반트 (예를 들어, 수산화알루미늄); 및 보존제를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-AMC CAR 이펙터 세포 (예컨대 T 세포) 조성물은 정맥내 투여를 위해 제제화된다.
- [0481] 투여될 본 발명의 항-AMC CAR 이펙터 세포 (예컨대 T 세포) 조성물의 정확한 양은 연령, 체중, 종양 크기, 감염 또는 전이의 정도, 및 환자 (대상체)의 상태의 개별 차이를 고려하여 의사에 의해 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-AMC CAR 이펙터 세포 (예컨대 T 세포)를 포함하는 제약 조성물은 약 10⁴ 내지 약 10⁹개 세포/kg 체중, 예컨대 약 10⁴ 내지 약 10⁵, 약 10⁵ 내지 약 10⁶, 약 10⁶ 내지 약 10⁷, 약 10⁷ 내지 약 10⁸, 또는 약 10⁸ 내지 약 10⁹개 세포/kg 체중 중 어느 것 (이 범위 내의 모든 정수 값을 포함함)의 투여량으로 투여된다. 항-AMC CAR 이펙터 세포 (예컨대 T 세포) 조성물은 또한 이들 투여량으로 다수회 투여될 수 있다. 세포는 면역요법에 통상적으로 공지된 주입 기술을 사용함으로써 투여될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Rosenberg et al., New Eng.

J. of Med. 319:1676, 1988] 참조). 특정한 환자를 위한 최적의 투여량 및 치료 요법은 질환의 징후에 대해 환자를 모니터링하고 이에 따라 치료를 조정함으로써 의학 기술분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0482] 일부 실시양태에서, 활성화된 항-AMC CAR T 세포를 대상체에게 투여한 후, 후속적으로 혈액을 채취하고 (또는 분리반출술 수행), 본 발명에 따른 그로부터의 T 세포를 활성화시키고, 환자에게 활성화 및 확장된 이들 T 세포를 재주입하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 과정은 수주마다 다수회로 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, T 세포는 10 cc 내지 400 cc의 혈액 채취물로부터 활성화될 수 있다. 일부 실시양태에서, T 세포는 20 cc, 30 cc, 40 cc, 50 cc, 60 cc, 70 cc, 80 cc, 90 cc 또는 100 cc의 혈액 채취물로부터 활성화된다.

[0483] 항-AMC CAR 이펙터 세포 (예컨대 T 세포)의 투여는, 에어로졸 흡입, 주사, 삽취, 수혈, 이식(implantation) 또는 이식(transplantation)에 의한 것을 포함하는 임의의 편리한 방식으로 수행될 수 있다. 본원에 기재된 조성물은 피하로, 피내로, 종양내로, 결절내로, 수질내로, 근육내로, 정맥내 (i.v.) 주사에 의해, 또는 복강내로 환자에게 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-AMC CAR 이펙터 세포 (예컨대 T 세포) 조성물은 피내 또는 피하 주사에 의해 환자에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-AMC CAR 이펙터 세포 (예컨대 T 세포) 조성물은 i.v. 주사에 의해 투여된다. 항-AMC CAR 이펙터 세포 (예컨대 T 세포)의 조성물은 종양, 림프절 또는 감염의 부위 내로 직접 주사될 수 있다.

[0484] 따라서, 예를 들어, 일부 실시양태에서, a) AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 세포의 도메인, b) 막횡단 도메인, 및 c) CD3ζ 세포내 신호전달 서열 및 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 항-AMC CAR을 발현하는 이펙터 세포 (예컨대 T 세포)를 포함하는 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 AFP-양성 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, AFP 펩티드는 AFP158 (서열식별번호: 4)이다. 일부 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질은 HLA-A*02:01이다. 일부 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질은 HLA-A*02:01이다. 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환은 암이다. 일부 실시양태에서, 암은, 예를 들어, 간세포성 암종, 배세포 종양, 또는 유방암이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이고 치료는 암의 확산을 방지하는 것, 예를 들어, 암의 전이를 억제 (예컨대 방지)하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 전이성 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 투여는 정맥내, 복강내 또는 종양내 경로를 통한다. 일부 실시양태에서, 투여는 정맥내 경로를 통한다. 일부 실시양태에서, 투여는 종양내 경로를 통한다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0485] 일부 실시양태에서, a) AFP158 펩티드 (서열식별번호: 4) 및 HLA-A*02:01을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 세포의 도메인, b) 막횡단 도메인, 및 c) CD3ζ 세포내 신호전달 서열 및 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 항-AMC CAR을 발현하는 이펙터 세포 (예컨대 T 세포)를 포함하는 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 AFP-양성 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환은 암이다. 일부 실시양태에서, 암은, 예를 들어, 간세포성 암종, 배세포 종양, 또는 유방암이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이고 치료는 암의 확산을 방지하는 것, 예를 들어, 암의 전이를 억제 (예컨대 방지)하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 전이성 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 투여는 정맥내, 복강내 또는 종양내 경로를 통한다. 일부 실시양태에서, 투여는 정맥내 경로를 통한다. 일부 실시양태에서, 투여는 종양내 경로를 통한다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0486] 일부 실시양태에서, a) i) G-F/Y-S/T-F-D/S/T-D/N/S-Y/A-A/G/W의 아미노산 서열 (서열식별번호: 87)을 포함하는 HC-CDR1, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, I/S-K/S-X-H/Y-X-G-X-T의 아미노산 서열 (서열식별번호: 88)을 포함하는 HC-CDR2, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 A/G-X-W/Y-Y-X-X-X-F/Y-D의 아미노산 서열 (서열식별번호: 89)을 포함하는 HC-CDR3, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 및 ii) S/T-G/S-D/N-I/V-A/G-A/S/V-X-H/Y의 아미노산 서열 (서열식별번호: 120)을 포함하는 LC-CDR1, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 Q-S/T-Y/W-D/T-S/T-A/S의 아미노산 서열 (서열식별번호: 121)을 포함하는 LC-CDR3, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 경쇄 가변 도메인 (여기서 X는 임의의 아미노산일 수 있음)을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 세포의 도메인, b) 막횡단 도메인, 및 c) CD3ζ 세포내 신호전달 서열 및 CD28 세포내 신호

전달 서열을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 항-AMC CAR을 발현하는 이펙터 세포 (예컨대 T 세포)를 포함하는 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 AFP-양성 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환은 암이다. 일부 실시양태에서, 암은, 예를 들어, 간세포성 암종, 배세포 종양, 또는 유방암이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이고 치료는 암의 확산을 방지하는 것, 예를 들어, 암의 전이를 억제 (예컨대 방지)하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 전이성 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 투여는 정맥내, 복강내 또는 종양내 경로를 통한다. 일부 실시양태에서, 투여는 정맥내 경로를 통한다. 일부 실시양태에서, 투여는 종양내 경로를 통한다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0487] 일부 실시양태에서, a) i) G-F/Y-S/T-F-D/S/T-D/N/S-Y/A-A/G/W의 아미노산 서열 (서열식별번호: 87)을 포함하는 HC-CDR1, I/S-K/S-X-H/Y-X-G-X-T의 아미노산 서열 (서열식별번호: 88)을 포함하는 HC-CDR2, 및 A/G-X-W/Y-Y-X-X-X-F/Y-D의 아미노산 서열 (서열식별번호: 89)을 포함하는 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 및 ii) S/T-G/S-D/N-I/V-A/G-A/S/V-X-H/Y의 아미노산 서열 (서열식별번호: 120)을 포함하는 LC-CDR1, 및 Q/S/T-Y/W-D/T-S/T-A/S의 아미노산 서열 (서열식별번호: 121)을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인 (여기서 X는 임의의 아미노산일 수 있음)을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 세포의 도메인, b) 막횡단 도메인, 및 c) CD3ζ 세포내 신호전달 서열 및 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 항-AMC CAR을 발현하는 이펙터 세포 (예컨대 T 세포)를 포함하는 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 AFP-양성 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환은 암이다. 일부 실시양태에서, 암은, 예를 들어, 간세포성 암종, 배세포 종양, 또는 유방암이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이고 치료는 암의 확산을 방지하는 것, 예를 들어, 암의 전이를 억제 (예컨대 방지)하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 전이성 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 투여는 정맥내, 복강내 또는 종양내 경로를 통한다. 일부 실시양태에서, 투여는 정맥내 경로를 통한다. 일부 실시양태에서, 투여는 종양내 경로를 통한다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0488] 일부 실시양태에서, a) i) 서열식별번호: 57-66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 서열식별번호: 67-76 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및 ii) 서열식별번호: 90-99 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 서열식별번호: 100-109 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2, 또는 최대 약 3개 (예컨대 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 세포의 도메인; b) 막횡단 도메인, 및 c) CD3ζ 세포내 신호전달 서열 및 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 항-AMC CAR을 발현하는 이펙터 세포 (예컨대 T 세포)를 포함하는 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 AFP-양성 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환은 암이다. 일부 실시양태에서, 암은, 예를 들어, 간세포성 암종, 배세포 종양, 또는 유방암이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이고 치료는 암의 확산을 방지하는 것, 예를 들어, 암의 전이를 억제 (예컨대 방지)하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 전이성 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 투여는 정맥내, 복강내 또는 종양내 경로를 통한다. 일부 실시양태에서, 투여는 정맥내 경로를 통한다. 일부 실시양태에서, 투여는 종양내 경로를 통한다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0489] 일부 실시양태에서, a) i) 서열식별번호: 57-66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1; 서열식별번호: 67-76 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2; 및 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 또는 HC-CDR 서열에서 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체; 및 ii) 서열식별번호: 90-99 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1; 서열식별번호: 100-109 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2; 및 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄

실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0493] 일부 실시양태에서, a) AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 세포외 도메인, b) 막횡단 도메인, 및 c) CD3 ζ 세포내 신호전달 서열 및 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 항-AMC CAR을 발현하는 이펙터 세포 (예컨대 T 세포)를 포함하는 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 투여는 AFP-양성 질환 (예컨대 AFP-양성 종양)의 부위에 원위인 주사 부위로의 조성물의 국부 주사를 포함하는 것인, 개체에서 AFP-양성 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 주사 부위는 제1 AFP-양성 종양이다 (즉, 투여는 종양내 경로를 통한). 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환의 부위는 제2 AFP-양성 종양이다. 일부 실시양태에서, 주사 부위는 제1 AFP-양성 종양이고 AFP-양성 질환의 부위는 제2 AFP-양성 종양이다. 일부 실시양태에서, AFP 펩티드는 AFP158 (서열식별번호: 4)이다. 일부 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질은 HLA-A02이다. 일부 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질은 HLA-A*02:01이다. 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환은 암이다. 일부 실시양태에서, 암은, 예를 들어, 간세포성 암종, 배세포 종양, 또는 유방암이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이고 치료는 암의 확산을 방지하는 것, 예를 들어, 암의 전이를 억제 (예컨대 방지)하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 전이성 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0494] 일부 실시양태에서, a) AFP158 펩티드 (서열식별번호: 4) 및 HLA-A*02:01을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 세포외 도메인, b) 막횡단 도메인, 및 c) CD3 ζ 세포내 신호전달 서열 및 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 항-AMC CAR을 발현하는 이펙터 세포 (예컨대 T 세포)를 포함하는 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 투여는 AFP-양성 질환 (예컨대 AFP-양성 종양)의 부위에 원위인 주사 부위로의 조성물의 국부 주사를 포함하는 것인, 개체에서 AFP-양성 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 주사 부위는 제1 AFP-양성 종양이다 (즉, 투여는 종양내 경로를 통한). 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환의 부위는 제2 AFP-양성 종양이다. 일부 실시양태에서, 주사 부위는 제1 AFP-양성 종양이고 AFP-양성 질환의 부위는 제2 AFP-양성 종양이다. 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환은 암이다. 일부 실시양태에서, 암은, 예를 들어, 간세포성 암종, 배세포 종양, 또는 유방암이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이고 치료는 암의 확산을 방지하는 것, 예를 들어, 암의 전이를 억제 (예컨대 방지)하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 전이성 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0495] 일부 실시양태에서, a) i) G-F/Y-S/T-F-D/S/T-D/N/S-Y/A-A/G/W의 아미노산 서열 (서열식별번호: 87)을 포함하는 HC-CDR1, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, I/S-K/S-X-H/Y-X-G-X-T의 아미노산 서열 (서열식별번호: 88)을 포함하는 HC-CDR2, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 A/G-X-W/Y-Y-X-X-X-F/Y-D의 아미노산 서열 (서열식별번호: 89)을 포함하는 HC-CDR3, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 및 ii) S/T-G/S-D/N-I/V-A/G-A/S/V-X-H/Y의 아미노산 서열 (서열식별번호: 120)을 포함하는 LC-CDR1, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 Q-S/T-Y/W-D/T-S/T-A/S의 아미노산 서열 (서열식별번호: 121)을 포함하는 LC-CDR3, 또는 최대 약 3개 (예를 들어 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 경쇄 가변 도메인 (여기서 X는 임의의 아미노산일 수 있음)을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 세포외 도메인, b) 막횡단 도메인, 및 c) CD3 ζ 세포내 신호전달 서열 및 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 항-AMC CAR을 발현하는 이펙터 세포 (예컨대 T 세포)를 포함하는 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 투여는 AFP-양성 질환 (예컨대 AFP-양성 종양)의 부위에 원위인 주사 부위로의 조성물의 국부 주사를 포함하는 것인, 개체에서 AFP-양성 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 주사 부위는 제1 AFP-양성 종양이다 (즉, 투여는 종양내 경로를 통한). 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환의 부위는 제2 AFP-양성 종양이다. 일부 실시양태에서, 주사 부위는 제1 AFP-양성 종양이고 AFP-양성 질환의 부위는 제2 AFP-양성 종양이다. 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환은 암이다. 일부 실시양태에서, 암은, 예를 들어, 간세포성 암종, 배세포 종양, 또는 유방암이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이고 치료는 암의 확산을 방지하는 것, 예를 들어, 암의 전이를 억제 (예컨대 방지)하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 전이성 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0496] 일부 실시양태에서, a) i) G-F/Y-S/T-F-D/S/T-D/N/S-Y/A-A/G/W의 아미노산 서열 (서열식별번호: 87)을 포함하는 HC-CDR1, I/S-K/S-X-H/Y-X-G-X-T의 아미노산 서열 (서열식별번호: 88)을 포함하는 HC-CDR2, 및 A/G-X-W/Y-Y-X-X-X-F/Y-D의 아미노산 서열 (서열식별번호: 89)을 포함하는 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 및 ii) S/T-G/S-D/N-I/V-A/G-A/S/V-X-H/Y의 아미노산 서열 (서열식별번호: 120)을 포함하는 LC-CDR1, 및 Q-S/T-Y/W-D/T-S/T-A/S의 아미노산 서열 (서열식별번호: 121)을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인 (여기서 X는 임의의 아미노산일 수 있음)을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 세포외 도메인, b) 막횡단 도메인, 및 c) CD3 ζ 세포내 신호전달 서열 및 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 항-AMC CAR을 발현하는 이펙터 세포 (예컨대 T 세포)를 포함하는 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 투여는 AFP-양성 질환 (예컨대 AFP-양성 종양)의 부위에 원위인 주사 부위로의 조성물의 국부 주사를 포함하는 것인, 개체에서 AFP-양성 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 주사 부위는 제1 AFP-양성 종양이다 (즉, 투여는 종양내 경로를 통한). 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환의 부위는 제2 AFP-양성 종양이다. 일부 실시양태에서, 주사 부위는 제1 AFP-양성 종양이고 AFP-양성 질환의 부위는 제2 AFP-양성 종양이다. 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환은 암이다. 일부 실시양태에서, 암은, 예를 들어, 간세포성 암종, 배세포 종양, 또는 유방암이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이고 치료는 암의 확산을 방지하는 것, 예를 들어, 암의 전이를 억제 (예컨대 방지)하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 전이성 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0497] 일부 실시양태에서, a) i) 서열식별번호: 57-66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 서열식별번호: 67-76 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및 ii) 서열식별번호: 90-99 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 서열식별번호: 100-109 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2, 또는 최대 약 3개 (예컨대 약 1, 2, 또는 3개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3, 또는 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 세포외 도메인; b) 막횡단 도메인, 및 c) CD3 ζ 세포내 신호전달 서열 및 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 항-AMC CAR을 발현하는 이펙터 세포 (예컨대 T 세포)를 포함하는 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 투여는 AFP-양성 질환 (예컨대 AFP-양성 종양)의 부위에 원위인 주사 부위로의 조성물의 국부 주사를 포함하는 것인, 개체에서 AFP-양성 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 주사 부위는 제1 AFP-양성 종양이다 (즉, 투여는 종양내 경로를 통한). 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환의 부위는 제2 AFP-양성 종양이다. 일부 실시양태에서, 주사 부위는 제1 AFP-양성 종양이고 AFP-양성 질환의 부위는 제2 AFP-양성 종양이다. 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환은 암이다. 일부 실시양태에서, 암은, 예를 들어, 간세포성 암종, 배세포 종양, 또는 유방암이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이고 치료는 암의 확산을 방지하는 것, 예를 들어, 암의 전이를 억제 (예컨대 방지)하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 전이성 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0498] 일부 실시양태에서, a) i) 서열식별번호: 57-66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1; 서열식별번호: 67-76 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2; 및 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 또는 HC-CDR 서열에서 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체; 및 ii) 서열식별번호: 90-99 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1; 서열식별번호: 100-109 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2; 및 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인 서열; 또는 LC-CDR 서열에서 최대 약 5개 (예컨대 약 1, 2, 3, 4, 또는 5개 중 어느 것)의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 세포외 도메인; b) 막횡단 도메인, 및 c) CD3 ζ 세포내 신호전달 서열 및 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 항-AMC CAR을 발현하는 이

펙터 세포 (예컨대 T 세포)를 포함하는 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 투여는 AFP-양성 질환 (예컨대 AFP-양성 종양)의 부위에 원위인 주사 부위로의 조성물의 국부 주사를 포함하는 것인, 개체에서 AFP-양성 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 주사 부위는 제1 AFP-양성 종양이다 (즉, 투여는 종양내 경로를 통한). 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환의 부위는 제2 AFP-양성 종양이다. 일부 실시양태에서, 주사 부위는 제1 AFP-양성 종양이고 AFP-양성 질환의 부위는 제2 AFP-양성 종양이다. 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환은 암이다. 일부 실시양태에서, 암은, 예를 들어, 간세포성 암종, 배세포 종양, 또는 유방암이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이고 치료는 암의 확산을 방지하는 것, 예를 들어, 암의 전이를 억제 (예컨대 방지)하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 전이성 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0499] 일부 실시양태에서, a) i) 서열식별번호: 57-66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1; 서열식별번호: 67-76 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2; 및 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열; 및 ii) 서열식별번호: 90-99 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1; 서열식별번호: 100-109 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2; 및 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인 서열을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 세포외 도메인; b) 막횡단 도메인, 및 c) CD3 ζ 세포내 신호전달 서열 및 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 항-AMC CAR을 발현하는 이펙터 세포 (예컨대 T 세포)를 포함하는 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 투여는 AFP-양성 질환 (예컨대 AFP-양성 종양)의 부위에 원위인 주사 부위로의 조성물의 국부 주사를 포함하는 것인, 개체에서 AFP-양성 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 주사 부위는 제1 AFP-양성 종양이다 (즉, 투여는 종양내 경로를 통한). 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환의 부위는 제2 AFP-양성 종양이다. 일부 실시양태에서, 주사 부위는 제1 AFP-양성 종양이고 AFP-양성 질환의 부위는 제2 AFP-양성 종양이다. 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환은 암이다. 일부 실시양태에서, 암은, 예를 들어, 간세포성 암종, 배세포 종양, 또는 유방암이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이고 치료는 암의 확산을 방지하는 것, 예를 들어, 암의 전이를 억제 (예컨대 방지)하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 전이성 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0500] 일부 실시양태에서, a) i) 서열식별번호: 17-26 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 또는 적어도 약 95% (예를 들어 적어도 약 96%, 97%, 98%, 또는 99% 중 어느 것) 서열 동일성을 갖는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 27-36 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인, 또는 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 그의 변이체를 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 세포외 도메인; b) 막횡단 도메인, 및 c) CD3 ζ 세포내 신호전달 서열 및 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 항-AMC CAR을 발현하는 이펙터 세포 (예컨대 T 세포)를 포함하는 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 투여는 AFP-양성 질환 (예컨대 AFP-양성 종양)의 부위에 원위인 주사 부위로의 조성물의 국부 주사를 포함하는 것인, 개체에서 AFP-양성 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 주사 부위는 제1 AFP-양성 종양이다 (즉, 투여는 종양내 경로를 통한). 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환의 부위는 제2 AFP-양성 종양이다. 일부 실시양태에서, 주사 부위는 제1 AFP-양성 종양이고 AFP-양성 질환의 부위는 제2 AFP-양성 종양이다. 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환은 암이다. 일부 실시양태에서, 암은, 예를 들어, 간세포성 암종, 배세포 종양, 또는 유방암이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이고 치료는 암의 확산을 방지하는 것, 예를 들어, 암의 전이를 억제 (예컨대 방지)하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 전이성 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0501] 일부 실시양태에서, a) 서열식별번호: 17-26 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열식별번호: 27-36 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체에 특이적으로 결합하는 항-AMC 항체 모이어티를 포함하는 세포외 도메인; b) 막횡단 도메인, 및 c) CD3 ζ 세포내 신호전달 서열 및 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 항-AMC CAR을 발현하는 이펙터 세포 (예컨대 T 세포)를 포함하는 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 투여는 AFP-양성 질환 (예컨대 AFP-양성 종양)의 부위에 원위인 주사 부위로의 조성물의 국부 주사를 포함하는 것인, 개체에서 AFP-양성 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 주사 부위는 제1 AFP-양성 종양이다 (즉, 투여는 종양내 경로를 통한). 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환의 부위는 제2 AFP-양성 종양이다. 일부 실시양태에서, 주사 부위는 제1 AFP-양성 종양이고 AFP-양성 질환

의 부위는 제2 AFP-양성 종양이다. 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환은 암이다. 일부 실시양태에서, 암은, 예를 들어, 간세포성 암종, 배세포 종양, 또는 유방암이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이고 치료는 암의 확산을 방지하는 것, 예를 들어, 암의 전이를 억제 (예컨대 방지)하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 전이성 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0502] 일부 실시양태에서, 상기 기재된 임의의 실시양태에 따른 항-AMC CAR을 발현하는 이펙터 세포 (예컨대 T 세포)를 포함하는 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 전이성 간세포성 암종을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0503] 일부 실시양태에서, 상기 기재된 임의의 실시양태에 따른 항-AMC CAR을 발현하는 이펙터 세포 (예컨대 T 세포)를 포함하는 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 간세포성 암종의 전이를 억제 (예컨대 방지)하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0504] 일부 실시양태에서, 상기 기재된 임의의 항-AMC CAR에 따른 항-AMC CAR을 발현하는 이펙터 세포 (예컨대 T 세포)를 포함하는 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 T 세포를 프라임하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 개체는 AFP-양성 질환을 갖는다. 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환은 암이다. 일부 실시양태에서, 암은, 예를 들어, 간세포성 암종, 배세포 종양, 또는 유방암이다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 투여는 정맥내, 복강내 또는 종양내 경로를 통한다. 일부 실시양태에서, 투여는 정맥내 경로를 통한다. 일부 실시양태에서, 투여는 종양내 경로를 통한다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0505] 일부 실시양태에서, 상기 기재된 임의의 방법에 따르면, 방법은 항원 제시 세포, 또는 APC (예컨대 단핵구 또는 단핵구-분화 수지상 세포)를 개체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 수지상 세포는 단핵구를 특정한 시토카인과 배양하여 생체외에서 생성될 수 있다 (Palucka and Banchereau, Nature Reviews Cancer 12:265-277, 2012). 일부 실시양태에서, APC는 이펙터 세포 조성물과 동시에 투여된다. 일부 실시양태에서, APC는 이펙터 세포 조성물과 공동으로 투여된다. 일부 실시양태에서, APC는 이펙터 세포 조성물과 순차적으로 투여된다. 일부 실시양태에서, APC는 이펙터 세포 조성물과 동일한 경로를 통해 투여된다. 일부 실시양태에서, APC는 이펙터 세포 조성물과 동일한 부위에 투여된다. 일부 실시양태에서, 이펙터 세포 조성물은 APC를 포함한다.

[0506] 암

[0507] 일부 실시양태에서 항-AMC 구축물 및 항-AMC CAR 세포는 암을 치료하는데 유용할 수 있다. 본원에 기재된 임의의 방법을 사용하여 치료될 수 있는 암은 혈관화되지 않았거나, 또는 아직 실질적으로 혈관화되지 않은 종양, 뿐만 아니라 혈관화된 종양을 포함한다. 암은 비-고형 종양 (예컨대 혈액 종양, 예를 들어, 백혈병 및 림프종)을 포함할 수 있거나, 또는 고형 종양을 포함할 수 있다. 본 발명의 항-AMC 구축물 및 항-AMC CAR 세포로 치료될 암의 유형은 암종, 모세포종, 및 육종, 및 특정 백혈병 또는 림프성 악성종양, 양성 및 악성 종양, 및 악성종양 예를 들어, 육종, 암종, 및 흑색종을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 성인 종양/암 및 소아 종양/암이 또한 포함된다.

[0508] 혈액암은 혈액 또는 골수의 암이다. 혈액 (또는 혈형성) 암의 예는 급성 백혈병 (예컨대 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수구성 백혈병, 급성 골수 백혈병 및 골수모구성, 전골수구성, 골수단핵구성, 단핵구성 및 적백혈병), 만성 백혈병 (예컨대 만성 골수구성 (과립구성) 백혈병, 만성 골수 백혈병 및 만성 림프구성 백혈병)을 포함한 백혈병, 진성 다혈구혈증, 림프종, 호지킨병, 비-호지킨 림프종 (무통성 및 고등급 형태), 다발성 골수종, 발덴스트롬 마크로글로블린혈증, 중쇄 질환, 골수이형성 증후군, 모발상 세포 백혈병 및 골수이형성증을 포함한다.

[0509] 고형 종양은 통상적으로 낭 또는 액체 구역을 함유하지 않는 조직의 비정상적 덩어리이다. 고형 종양은 양성 또는 악성일 수 있다. 상이한 유형의 고형 종양은 그를 형성하는 세포의 유형에 대해 명명된다 (예컨대 육종, 암종 및 림프종). 고형 종양, 예컨대 육종 및 암종의 예는 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 및 다른 육종, 활막종, 증피종, 유잉 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 결장 암종, 림프성 악성종양, 췌장암, 유방암, 폐암, 난소암, 전립선암, 간세포성 암종, 편평 세포 암종, 기저 세포 암종, 선암종, 한선 암종, 수질성 갑상선 암종, 유두상 갑상선 암종, 크롬친화세포종 피지선 암종, 유두상 암종, 유두상 선암종, 수질성 암종, 기관지원성 암종, 신세포 암종, 간세포암, 담관 암종, 융모막암종, 윌름스 종양, 자궁경부암, 고환 종양, 정상피종, 방광 암종, 흑색종, 및 CNS 종양 (예컨대 신경교종 (예컨대 뇌간 신경교종 및 혼합 신경교종), 교모세포종

(다형성 교모세포종으로도 공지됨) 성상세포종, CNS 림프종, 배세포종, 수모세포종, 슈반세포종 두개인두종, 상의세포종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경종, 편지교종, 수막종, 신경모세포종, 망막모세포종 및 뇌 전이)을 포함한다.

[0510] 일부 실시양태에서, 암은 HCC이다. 일부 실시양태에서, HCC는 초기 HCC, 비-전이성 HCC, 원발성 HCC, 진행성 HCC, 국부 진행성 HCC, 전이성 HCC, 완화 상태의 HCC, 또는 재발성 HCC이다. 일부 실시양태에서, HCC는 국부 절제가능한 것 (즉, 완전한 외과적 제거를 허용하는 간의 일부에 국한된 종양), 국부 절제불가능한 것 (즉, 중요한 혈관 구조가 수반되기 때문에 또는 간이 손상되기 때문에, 국부 종양이 절제불가능할 수 있음), 또는 절제 불가능한 것 (즉, 종양이 모든 간엽을 수반하고/거나 다른 기관 (예를 들어, 폐, 림프절, 골)으로 확산되었음)이다. 일부 실시양태에서, HCC는, TNM 분류에 따르면, I기 종양 (혈관 침습이 없는 단일 종양), II기 종양 (혈관 침습이 있는 단일 종양, 또는 5cm 초과하지 않는 다발 종양), III기 종양 (임의의 5cm 초과하는 다발 종양, 또는 문맥 또는 간정맥의 주요 분지에 수반된 종양), IV기 종양 (담낭 이외의 인접한 기관으로의 직접적 침습이 있거나 또는 내장측 복막의 천공이 있는 종양), N1 종양 (국한성 림프절 전이), 또는 M1 종양 (원격 전이)이다. 일부 실시양태에서, HCC는, AJCC (미국 암 공동 위원회(American Joint Commission on Cancer)) 병기결정 기준에 따르면, T1기, T2기, T3기, 또는 T4기 HCC이다. 일부 실시양태에서, HCC는 간 세포 암종, HCC의 섬유유관성 변이체, 및 혼합 간세포성 담관암종 중 어느 하나이다.

[0511] 일부 실시양태에서, 암은 배세포 종양이다.

[0512] 암 치료는 예를 들어 종양 퇴행, 종양 중량 또는 크기 수축, 진행까지의 시간, 생존 기간, 무진행 생존, 전체 반응률, 반응 지속기간, 삶의 질, 단백질 발현 및/또는 활성에 의해 평가될 수 있다. 요법의 효능을 결정하기 위한 접근법이 사용될 수 있고, 이는 예를 들어, 방사선 영상화를 통하여 반응을 측정하는 것을 포함한다.

[0513] 항-AMC 구축물을 사용한 진단 및 영상화 방법

[0514] 세포의 표면 상의 AMC에 특이적으로 결합하는 표지된 항-AMC 항체 모이어티 및 그의 유도체 및 유사체는, 상기 기재된 임의의 질환 및 장애, 예컨대 암 (예를 들어, 간세포성 암종, 배세포 종양, 또는 유방암)을 포함하는, AFP의 발현, 이상 발현 및/또는 활성과 연관된 질환 및/또는 장애를 검출, 진단, 또는 모니터링하기 위한 진단 목적으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항-AMC 항체 모이어티는 계내, 생체내, 생체외, 및 시험관내 진단 검정 또는 영상화 검정에 사용될 수 있다.

[0515] 본 발명의 추가의 실시양태는 개체 (예를 들어, 포유동물, 예컨대 인간)에서 AFP의 발현 또는 이상 발현과 연관된 질환 또는 장애를 진단하는 방법을 포함한다. 방법은 개체에서 AMC-제시 세포를 검출하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 개체 (예를 들어, 포유동물, 예컨대 인간)에서 AFP의 발현 또는 이상 발현과 연관된 질환 또는 장애를 진단하는 방법이 제공되며, 방법은 (a) 상기 기재된 임의의 실시양태에 따른 표지된 항-AMC 항체 모이어티의 유효량을 개체에게 투여하는 단계; 및 (b) 개체에서 표지의 수준을 결정하는 단계이며, 여기서 역치 수준을 초과하는 표지의 수준은 개체가 질환 또는 장애를 갖는다는 것을 나타내는 것인 단계를 포함한다. 역치 수준은, 예를 들어, 질환 또는 장애를 갖는 개체의 제1 세트 및 질환 또는 장애를 갖지 않는 개체의 제2 세트에서 상기 기재된 진단 방법에 따라 표지를 검출하고, 제1 및 제2 세트 사이의 구별을 가능하게 하는 수준으로 역치를 설정하는 것을 포함하는, 다양한 방법에 의해 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 역치 수준은 0이고, 방법은 개체에서 표지의 존재 또는 부재를 결정하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 단계 (a)의 투여 후에 시간 간격 동안 대기하여 표지된 항-AMC 항체 모이어티가 AMC가 발현된 개체의 부위에 우선적으로 집중되도록 (및 미결합된 표지된 항-AMC 항체 모이어티가 클리어런스되도록) 허용하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 표지의 배경 수준을 차감하는 것을 추가로 포함한다. 배경 수준은, 예를 들어, 표지된 항-AMC 항체 모이어티의 투여 전에 개체에서 표지를 검출하는 것, 또는 질환 또는 장애를 갖지 않는 개체에서 상기 기재된 진단 방법에 따른 표지를 검출하는 것을 포함하는, 다양한 방법에 의해 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 암이다. 일부 실시양태에서, 암은, 예를 들어, 간세포성 암종, 배세포 종양 및 유방암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 전이성 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 전이성 간세포성 암종이고 방법은 개체의 혈액에서 표지의 수준을 결정하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0516] 일부 실시양태에서, 개체 (예를 들어, 포유동물, 예컨대 인간)에서 전이성 간세포성 암종을 진단하는 방법이 제공되며, 방법은 (a) 상기 기재된 임의의 실시양태에 따른 표지된 항-AMC 항체 모이어티의 유효량을 개체에게 투여하는 단계; 및 (b) 개체의 혈액에서 표지의 수준을 결정하는 단계이며, 여기서 역치 수준을 초과하는 표지의 수준은 개체가 전이성 간세포성 암종을 갖는다는 것을 나타내는 것인 단계를 포함한다. 역치 수준은, 예를 들어

어, 전이성 간세포암종을 갖는 개체의 제1 세트 및 전이성 간세포암종을 갖지 않는 개체의 제2 세트에서 상기 기재된 진단 방법에 따라 표지를 검출하고, 제1 및 제2 세트 사이의 구별을 가능하게 하는 수준으로 역치를 설정하는 것을 포함하는, 다양한 방법에 의해 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 역치 수준은 0이고, 방법은 개체의 혈액에서 표지의 존재 또는 부재를 결정하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 단계 (a)의 투여 후에 시간 간격 동안 대기하여 표지된 항-AMC 항체 모이어티가 AMC가 발현된 개체의 부위에 우선적으로 집중되도록 (및 미결합된 표지된 항-AMC 항체 모이어티가 클리어된다고) 허용하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 표지의 배경 수준을 차감하는 것을 추가로 포함한다. 배경 수준은, 예를 들어, 표지된 항-AMC 항체 모이어티의 투여 전에 개체에서 표지를 검출하는 것, 또는 전이성 간세포암종을 갖지 않는 개체에서 상기 기재된 진단 방법에 따라 표지를 검출하는 것을 포함하는, 다양한 방법에 의해 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0517] 일부 실시양태에서, 개체 (예를 들어, 포유동물, 예컨대 인간)에서 AFP의 발현 또는 이상 발현과 연관된 질환 또는 장애를 진단하는 방법이 제공되며, 방법은 a) 상기 기재된 임의의 실시양태에 따른 표지된 항-AMC 항체 모이어티를 개체로부터 유래된 샘플 (예컨대 전혈 또는 균질화된 조직)과 접촉시키는 단계; 및 (b) 샘플에서 표지된 항-AMC 항체 모이어티와 결합된 세포의 수를 결정하는 단계이며, 여기서 역치 수준을 초과하는 표지된 항-AMC 항체 모이어티와 결합된 세포의 수에 대한 값은 개체가 질환 또는 장애를 갖는다는 것을 나타내는 것인 단계를 포함한다. 역치 수준은, 예를 들어, 질환 또는 장애를 갖는 개체의 제1 세트 및 질환 또는 장애를 갖지 않는 개체의 제2 세트에서 상기 기재된 진단 방법에 따라 표지된 항-AMC 항체 모이어티와 결합된 세포의 수를 검출하고, 제1 및 제2 세트 사이의 구별을 가능하게 하는 수준으로 역치를 설정하는 것을 포함하는, 다양한 방법에 의해 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 역치 수준은 0이고 방법은 샘플에서 표지된 항-AMC 항체 모이어티와 결합된 세포의 존재 또는 부재를 결정하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 표지된 항-AMC 항체 모이어티와 결합된 세포의 수의 배경 수준을 차감하는 것을 추가로 포함한다. 배경 수준은, 예를 들어, 표지된 항-AMC 항체 모이어티의 투여 전에 개체에서 표지된 항-AMC 항체 모이어티와 결합된 세포의 수를 결정하는 것, 또는 질환 또는 장애를 갖지 않는 개체에서 상기 기재된 진단 방법에 따라 항-AMC 항체 모이어티와 결합된 세포의 수를 결정하는 것을 포함하는, 다양한 방법에 의해 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 암이다. 일부 실시양태에서, 암은, 예를 들어, 간세포암종, 배세포 종양 및 유방암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 암은 간세포암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 전이성 간세포암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 전이성 간세포암종이고, 샘플은 혈액 샘플 (예컨대 전혈)이다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0518] 일부 실시양태에서, 개체 (예를 들어, 포유동물, 예컨대 인간)에서 전이성 간세포암종을 진단하는 방법이 제공되며, 방법은 a) 상기 기재된 임의의 실시양태에 따른 표지된 항-AMC 항체 모이어티를 개체로부터 유래된 샘플 (예컨대 전혈)과 접촉시키는 단계; 및 (b) 샘플에서 표지된 항-AMC 항체 모이어티와 결합된 세포의 수를 결정하는 단계이며, 여기서 역치 수준을 초과하는 표지된 항-AMC 항체 모이어티와 결합된 세포의 수에 대한 값은 개체가 전이성 간세포암종을 갖는다는 것을 나타내는 것인 단계를 포함한다. 역치 수준은, 예를 들어, 전이성 간세포암종을 갖는 개체의 제1 세트 및 전이성 간세포암종을 갖지 않는 개체의 제2 세트에서 상기 기재된 진단 방법에 따라 표지된 항-AMC 항체 모이어티와 결합된 세포의 수를 검출하고, 제1 및 제2 세트 사이의 구별을 가능하게 하는 수준으로 역치를 설정하는 것을 포함하는, 다양한 방법에 의해 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 역치 수준은 0이고 방법은 샘플에서 표지된 항-AMC 항체 모이어티와 결합된 세포의 존재 또는 부재를 결정하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 표지된 항-AMC 항체 모이어티와 결합된 세포의 수의 배경 수준을 차감하는 것을 추가로 포함한다. 배경 수준은, 예를 들어, 표지된 항-AMC 항체 모이어티의 투여 전에 개체에서 표지된 항-AMC 항체 모이어티와 결합된 세포의 수를 결정하는 것, 또는 전이성 간세포암종을 갖지 않는 개체에서 상기 기재된 진단 방법에 따라 항-AMC 항체 모이어티와 결합된 세포의 수를 결정하는 것을 포함하는, 다양한 방법에 의해 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 샘플은 혈액 (예컨대 전혈)이다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0519] 본 발명의 항-AMC 항체 모이어티는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법을 사용하여 생물학적 샘플 중의 AMC-제시 세포의 수준을 검정하는데 사용될 수 있다. 적합한 항체 표지는 관련 기술분야에 공지되어 있고, 효소 표지, 예컨대, 글루코스 옥시다제; 방사성동위원소, 예컨대 아이오딘 (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), 탄소 (^{14}C), 황 (^{35}S), 삼중수소 (^3H), 인듐 ($^{115\text{m}}\text{In}$, $^{113\text{m}}\text{In}$, ^{112}In , ^{111}In), 테크네튬 (^{99}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$), 티타늄 (^{201}Ti), 갈륨 (^{68}Ga , ^{67}Ga), 팔라듐 (^{103}Pd), 몰리브데넘 (^{99}Mo), 크세논 (^{133}Xe), 플루오린 (^{18}F), 사마륨 (^{153}Sm), 루테튬

(¹⁷⁷Lu), 가돌리늄 (¹⁵⁹Gd), 프로메튬 (¹⁴⁹Pm), 란타넘 (¹⁴⁰La), 이테르븀 (¹⁷⁵Yb), 홀름 (¹⁶⁶Ho), 이트륨 (⁹⁰Y), 스칸듐 (⁴⁷Sc), 레늄 (¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re), 프라세오디뮴 (¹⁴²Pr), 로듐 (¹⁰⁵Rh), 및 루테튬 (⁹⁷Ru); 루미놀; 형광 표지, 예컨대 플루오레세인 및 로다민; 및 비오틴을 포함한다.

[0520] 관련 기술분야에 공지된 기술을 본 발명의 표지된 항-AMC 항체 모이어티에 적용될 수 있다. 이러한 기술은 2관능성 접합체의 사용을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,756,065; 5,714,631; 5,696,239; 5,652,361; 5,505,931; 5,489,425; 5,435,990; 5,428,139; 5,342,604; 5,274,119; 4,994,560; 및 5,808,003 참조). 상기 검정 이외에, 다양한 생체내 및 생체의 검정이 숙련된 진료의에게 이용가능하다. 예를 들어, 대상체의 신체 내의 세포를 검출가능한 표지, 예를 들어, 방사성 동위원소로 임의로 표지된 항-AMC 항체 모이어티에 노출시킬 수 있고, 항-AMC 항체 모이어티의 세포에 대한 결합은 예를 들어, 방사능에 대한 외부 스캐닝에 의해 또는 항-AMC 항체 모이어티에 이전에 노출된 대상체로부터 유래된 샘플 (예를 들어, 생검 또는 다른 생물학적 샘플)의 분석에 의해 평가될 수 있다.

[0521] 제조 물품 및 키트

[0522] 본 발명의 일부 실시양태에서, AFP-양성 질환 예컨대 암 (예를 들어 간세포성 암종, 배세포 종양, 또는 유방암)의 치료에, 항-AMC 구축물을 AMC를 그의 표면 상에 제시하는 세포에 전달하는 것에, 또는 개체에서 AMC-제시 세포의 단리 또는 검출에 유용한 물질을 함유하는 제조 물품이 제공된다. 제조 물품은 용기 및 용기 상의 또는 용기와 연관된 라벨 또는 패키지 삽입물을 포함할 수 있다. 적합한 용기는, 예를 들어, 병, 바이알, 시린지 등을 포함한다. 용기는 다양한 물질 예컨대 유리 또는 플라스틱으로 형성될 수 있다. 일반적으로, 용기는 본원에 기재된 질환 또는 장애를 치료하는데 효과적인 조성물을 보유하고, 멸균 접근 포트를 가질 수 있다 (예를 들어 용기는 피하 주사 바늘에 의해 관통가능한 마개를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있음). 조성물 중의 적어도 하나의 활성제는 본 발명의 항-AMC 구축물이다. 라벨 또는 패키지 삽입물은 조성물이 특정한 상태를 치료하기 위해 사용된다는 것을 나타낸다. 라벨 또는 패키지 삽입물은 항-AMC 구축물 조성물을 환자에게 투여하기 위한 지침서를 추가로 포함할 것이다. 본원에 기재된 조합 요법을 포함하는 제조 물품 및 키트가 또한 고려된다.

[0523] 패키지 삽입물은 치료 제품의 사용에 관한 적응증, 용법, 투여량, 투여, 금기 및/또는 경고에 대한 정보를 함유하는 이러한 치료 제품의 상업용 패키지에 통상적으로 포함된 지침서를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 패키지 삽입물은 조성물이 암 (예컨대 간세포성 암종, 배세포 종양, 또는 유방암)을 치료하기 위해 사용된다는 것을 나타낸다.

[0524] 추가적으로, 제조 물품은 제약상-허용되는 완충제, 예컨대 정박테리아 주사용수 (BWFI), 포스페이트-완충 염수, 링거액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2 용기를 추가로 포함할 수 있다. 이는 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘 및 시린지를 포함하는, 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질을 추가로 포함할 수 있다.

[0525] 다양한 목적에, 예를 들어, 본원에 기재된 AFP-양성 질환 또는 장애의 치료에, 항-AMC 구축물을 그의 표면 상에 AMC를 제시하는 세포에 전달하는 데에, 또는 개체에서 AMC-제시 세포의 단리 또는 검출에 유용한 키트가, 임의로는 제조 물품과 조합되어 또한 제공된다. 본 발명의 키트는 항-AMC 구축물 조성물 (또는 단위 투여 형태 및/또는 제조 물품)을 포함하는 1개 이상의 용기를 포함하고, 일부 실시양태에서, 또 다른 작용제 (예컨대 본원에 기재된 작용제) 및/또는 본원에 기재된 임의의 방법에 따른 사용을 위한 지침서를 추가로 포함한다. 키트는 치료에 적합한 개체의 선택에 대한 설명을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 키트에 공급된 지침서는 전형적으로 라벨 또는 패키지 삽입물 (예를 들어, 키트에 포함된 종이 시트) 상의 서면 지침서이지만, 기계-판독가능한 지침서 (예를 들어, 자기 또는 광학 저장 디스크 상에 운반되는 지침서)가 또한 허용된다.

[0526] 예를 들어, 일부 실시양태에서, 키트는 항-AMC 구축물 (예를 들어, 전장 항-AMC 항체, 다중-특이적 항-AMC 분자 (예컨대 이중특이적 항-AMC 항체), 또는 항-AMC 면역접합체)을 포함하는 조성물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 a) 항-AMC 구축물을 포함하는 조성물, 및 b) MHC 부류 I 단백질의 발현을 증가시키고/거나 MHC 부류 I 단백질에 의한 AFP 펩티드의 표면 제시를 증진시키는 적어도 하나의 다른 작용제 (예를 들어, IFN γ , IFN β , IFN α , 또는 Hsp90 억제제)의 유효량을 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 a) 항-AMC 구축물을 포함하는 조성물, 및 b) AFP-양성 질환, 예컨대 HCC의 치료를 위해 항-AMC 구축물의 조성물을 개체에게 투여하기 위한 지침서를 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 a) 항-AMC 구축물을 포함하는 조성물, b) MHC 부류 I 단백질의 발현을 증가시키고/거나 MHC 부류 I 단백질에 의한 AFP 펩티드의 표면 제시를 증진시키는 적어도 하나의 다른 작용제 (예를 들어, IFN γ , IFN β , IFN α , 또는 Hsp90 억제제)의 유효량, 및 c) AFP-양성 질환, 예컨대 HCC의 치

료를 위해 개체에게 항-AMC 구축물 조성물 및 다른 작용제(들)를 투여하기 위한 지침서를 포함한다. 항-AMC 구축물 및 다른 작용제(들)는 분리된 용기 또는 단일 용기에 존재할 수 있다. 예를 들어, 키트는 1종의 특징적 조성물 또는 2종 이상의 조성물을 포함할 수 있고, 여기서 하나의 조성물은 항-AMC 구축물을 포함하고 또 다른 조성물은 또 다른 작용제를 포함한다.

[0527] 일부 실시양태에서, 키트는 a) 항-AMC 구축물 (예를 들어, 전장 항-AMC 항체, 다중-특이적 항-AMC 분자 (예컨대 이중특이적 항-AMC 항체), 또는 항-AMC 면역접합체)을 포함하는 조성물, 및 b) 항-AMC 구축물을 세포 (예컨대 세포, 예를 들어, 개체로부터 유래된 면역 세포)와 조합하여 항-AMC 구축물/세포 접합체를 포함하는 조성물을 형성하고, AFP-양성 질환 (예컨대 HCC)의 치료를 위해 항-AMC 구축물/세포 접합체 조성물을 개체에게 투여하기 위한 지침서를 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 a) 항-AMC 구축물을 포함하는 조성물, 및 b) 세포 (예컨대 세포독성 세포)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 a) 항-AMC 구축물을 포함하는 조성물, b) 세포 (예컨대 세포독성 세포), 및 c) 항-AMC 구축물을 세포와 조합하여 항-AMC 구축물/세포 접합체를 포함하는 조성물을 형성하고, AFP-양성 질환 (예컨대 HCC)의 치료를 위해 항-AMC 구축물/세포 접합체 조성물을 개체에게 투여하기 위한 지침서를 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 세포 (예컨대 세포독성 세포)와 회합된 항-AMC 구축물을 포함하는 조성물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 a) 세포 (예컨대 세포독성 세포)와 회합된 항-AMC 구축물을 포함하는 조성물, b) AFP-양성 질환, 예컨대 HCC의 치료를 위해 조성물을 개체에게 투여하기 위한 지침서를 포함한다. 일부 실시양태에서, 회합은 세포의 표면 상의 분자에 대한 항-AMC 구축물의 접합에 의한 것이다. 일부 실시양태에서, 회합은 세포의 외막 내로의 항-AMC 구축물의 부분의 삼입에 의한 것이다.

[0528] 일부 실시양태에서, 키트는 항-AMC 구축물 (예를 들어, 전장 항-AMC 항체, 다중-특이적 항-AMC 분자 (예컨대 이중특이적 항-AMC 항체), 항-AMC CAR, 또는 항-AMC 면역접합체) 또는 그의 폴리펩티드 부분을 코딩하는 핵산 (또는 핵산 세트)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 a) 항-AMC 구축물 또는 그의 폴리펩티드 부분을 코딩하는 핵산 (또는 핵산 세트), 및 b) 핵산 (또는 핵산 세트)을 발현시키기 위한 숙주 세포 (예컨대 이펙터 세포)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 a) 항-AMC 구축물 또는 그의 폴리펩티드 부분을 코딩하는 핵산 (또는 핵산 세트), 및 b) i) 숙주 세포 (예컨대 이펙터 세포, 예를 들어, T 세포)에서 항-AMC 구축물을 발현시키고, ii) 항-AMC 구축물 또는 항-AMC 구축물을 발현하는 숙주 세포를 포함하는 조성물을 제조하고, iii) AFP-양성 질환, 예컨대 HCC의 치료를 위해 항-AMC 구축물 또는 항-AMC 구축물을 발현하는 숙주 세포를 포함하는 조성물을 개체에게 투여하기 위한 지침서를 포함한다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 개체로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 키트는 a) 항-AMC 구축물 또는 그의 폴리펩티드 부분을 코딩하는 핵산 (또는 핵산 세트), b) 핵산 (또는 핵산 세트)을 발현시키기 위한 숙주 세포 (예컨대 이펙터 세포), 및 c) i) 숙주 세포에서 항-AMC 구축물을 발현시키고, ii) 항-AMC 구축물 또는 항-AMC 구축물을 발현하는 숙주 세포를 포함하는 조성물을 제조하고, iii) AFP-양성 질환, 예컨대 HCC의 치료를 위해 항-AMC 구축물 또는 항-AMC 구축물을 발현하는 숙주 세포를 포함하는 조성물을 개체에게 투여하기 위한 지침서를 포함한다.

[0529] 일부 실시양태에서, 키트는 항-AMC CAR을 코딩하는 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 항-AMC CAR을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 a) 항-AMC CAR을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터, 및 b) i) 개체로부터 유래된 이펙터 세포, 예컨대 T 세포 내로 벡터를 도입하고, ii) 항-AMC CAR 이펙터 세포를 포함하는 조성물을 제조하고, iii) AFP-양성 질환, 예컨대 HCC의 치료를 위해 항-AMC CAR 이펙터 세포 조성물을 개체에게 투여하기 위한 지침서를 포함한다.

[0530] 본 발명의 키트는 적합한 포장 내에 있다. 적합한 포장은 바이알, 병, 단지, 가요성 포장 (예를 들어, 실링된 마일라(Mylar) 또는 플라스틱 백) 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 키트는 임의로 추가의 성분, 예컨대 완충제 및 해석적 정보를 제공할 수 있다. 따라서, 본 출원은 또한 바이알 (예컨대, 실링된 바이알), 병, 단지, 가요성 포장 등을 포함하는 제조 물품을 제공한다.

[0531] 항-AMC 구축물 조성물의 사용에 관한 지침서는 일반적으로 의도된 치료를 위한 투여량, 투여 스케줄 및 투여 경로와 같은 정보를 포함한다. 용기는 단위 용량, 벌크 패키지 (예를 들어, 다중-용량 패키지) 또는 서브유닛 용량일 수 있다. 예를 들어, 개체의 효과적인 치료를 연장된 기간, 예컨대 1주, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 2주, 3주, 4주, 6주, 8주, 3개월, 4개월, 5개월, 7개월, 8개월, 9개월, 또는 그 초과 중 어느 것 동안 제공하기에 충분한 투여량의 본원에 개시된 바와 같은 항-AMC 구축물 (예를 들어, 전장 항-AMC 항체, 다중-특이적 항-AMC 분자 (예컨대 이중특이적 항-AMC 항체), 항-AMC CAR, 또는 항-AMC 면역접합체)을 함유하는 키트가 제공될 수 있다. 키트는 또한 항-AMC 구축물 및 제약 조성물의 다중 단위 용량 및 사용 지침서를 포함할 수 있으며, 약국, 예를 들어 병원 약국 및 조제 약국에서 저장 및 사용하기에 충분한 양으로 포장될 수 있다.

- [0532] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 여러 실시양태가 본 발명의 범주 및 취지 내에서 가능하다는 것을 인식할 것이다. 본 발명은 이제 하기 비제한적 예를 참조하여 보다 상세하게 기재될 것이다. 하기 실시예는 본 발명을 추가로 예시하지만, 물론 어떠한 방식으로든 그의 범주를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.
- [0533] 예시적 실시양태
- [0534] 실시양태 1. 일부 실시양태에서, 알파-태아단백질 (AFP) 펩티드 및 주요 조직적합성 (MHC) 부류 I 단백질을 포함하는 복합체 (AFP/MHC 부류 I 복합체, 또는 AMC)에 특이적으로 결합하는 항체 모이어티를 포함하는 단리된 항-AMC 구축물이 제공된다.
- [0535] 실시양태 2. 실시양태 1의 일부 추가 실시양태에서, AFP/MHC 부류 I 복합체는 세포 표면 상에 제시된다.
- [0536] 실시양태 3. 실시양태 1의 일부 추가 실시양태에서, AFP/MHC 부류 I 복합체는 암 세포의 표면 상에 제시된다.
- [0537] 실시양태 4. 실시양태 1-3 중 어느 하나의 일부 추가 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질은 인간 백혈구 항원 (HLA)-A이다.
- [0538] 실시양태 5. 실시양태 4의 일부 추가 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질은 HLA-A02이다.
- [0539] 실시양태 6. 실시양태 5의 일부 추가 실시양태에서, MHC 부류 I 단백질은 HLA-A02 대립유전자의 HLA-A*02:01 하위유형이다.
- [0540] 실시양태 7. 실시양태 1-6 중 어느 하나의 일부 추가 실시양태에서, 항체 모이어티는 AFP 펩티드, 및 MHC 부류 I 단백질과 상이한 HLA 대립유전자를 갖는 제2 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체와 교차-반응한다.
- [0541] 실시양태 8. 실시양태 1-7 중 어느 하나의 일부 추가 실시양태에서, AFP 펩티드는 8 내지 12개 아미노산 길이이다.
- [0542] 실시양태 9. 실시양태 1-8 중 어느 하나의 일부 추가 실시양태에서, AFP 펩티드는 인간 AFP로부터 유래된다.
- [0543] 실시양태 10. 실시양태 1-9 중 어느 하나의 일부 추가 실시양태에서, AFP 펩티드는 서열식별번호: 3-13 및 16으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는다.
- [0544] 실시양태 11. 실시양태 9의 일부 추가 실시양태에서, AFP 펩티드는 FMNKFIIYEI의 아미노산 서열 (서열식별번호: 4)을 갖는다.
- [0545] 실시양태 12. 실시양태 1-11 중 어느 하나의 일부 추가 실시양태에서, 단리된 항-AMC 구축물은 AFP 펩티드의 중간 변이체 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체와 교차-반응한다.
- [0546] 실시양태 13. 실시양태 1-12 중 어느 하나의 일부 추가 실시양태에서, 항체 모이어티는 인간, 인간화 또는 반합성이다.
- [0547] 실시양태 14. 실시양태 1-13 중 어느 하나의 일부 추가 실시양태에서, 항체 모이어티는 전장 항체, Fab, Fab', (Fab')₂, Fv, 또는 단일쇄 Fv (scFv)이다.
- [0548] 실시양태 15. 실시양태 1-14 중 어느 하나의 일부 추가 실시양태에서, 항체 모이어티는 AFP/MHC 부류 I 복합체에 약 0.1 pM 내지 약 500 nM의 평형 해리 상수 (K_d)로 결합한다.
- [0549] 실시양태 16. 실시양태 1-15 중 어느 하나의 일부 추가 실시양태에서, 단리된 항-AMC 구축물은 AFP/MHC 부류 I 복합체에 약 0.1 pM 내지 약 500 nM의 K_d로 결합한다.
- [0550] 실시양태 17. 실시양태 1-16 중 어느 하나의 일부 추가 실시양태에서, 항체 모이어티는
- [0551] i) G-F/Y-S/T-F-D/S/T-D/N/S-Y/A-A/G/W의 아미노산 서열 (서열식별번호: 87)을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 (HC-CDR) 1, 또는 최대 약 3개의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, I/S-K/S-X-H/Y-X-G-X-T의 아미노산 서열 (서열식별번호: 88)을 포함하는 HC-CDR2, 또는 최대 약 3개의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 A/G-X-W/Y-Y-X-X-F/Y-D의 아미노산 서열 (서열식별번호: 89)을 포함하는 HC-CDR3; 또는 최대 약 3개의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및
- [0552] ii) S/T-G/S-D/N-I/V-A/G-A/S/V-X-H/Y의 아미노산 서열 (서열식별번호: 120)을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 (LC-CDR) 1, 또는 최대 약 3개의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 Q-S/T-Y/W-D/T-S/T-A/S의 아미노산 서열 (서열식별번호: 121)을 포함하는 LC-CDR3; 또는 최대 3개의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를

포함하는 경쇄 가변 도메인

- [0553] 을 포함하며, 여기서
- [0554] X는 임의의 아미노산일 수 있다.
- [0555] 실시양태 18. 실시양태 1-16 중 어느 하나의 일부 추가 실시양태에서, 항체 모이어티는
- [0556] i) 서열식별번호: 57-66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1, 또는 최대 약 5개의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 서열식별번호: 67-76 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2, 또는 최대 약 5개의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3, 또는 최대 약 5개의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및
- [0557] ii) 서열식별번호: 90-99 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1, 또는 최대 약 5개의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 서열식별번호: 100-109 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2, 또는 최대 약 3개의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체, 및 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3, 또는 최대 약 5개의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 경쇄 가변 도메인
- [0558] 을 포함한다.
- [0559] 실시양태 19. 실시양태 1-16 중 어느 하나의 일부 추가 실시양태에서, 항체 모이어티는
- [0560] i) 서열식별번호: 57-66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR1, 서열식별번호: 67-76 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR2, 및 서열식별번호: 77-86 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HC-CDR3을 포함하는 중쇄 (HC) 가변 도메인; 또는 HC-CDR 영역에서 최대 약 5개의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체; 및
- [0561] ii) 서열식별번호: 90-99 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR1, 서열식별번호: 100-109 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR2, 및 서열식별번호: 110-119 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LC-CDR3을 포함하는 경쇄 (LC) 가변 도메인; 또는 LC-CDR 영역에서 최대 약 5개의 아미노산 치환을 포함하는 그의 변이체
- [0562] 를 포함한다.
- [0563] 실시양태 20. 실시양태 18 또는 19의 일부 추가 실시양태에서, 항체 모이어티는 a) 서열식별번호: 17-26 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 또는 서열식별번호: 17-26 중 어느 하나와 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 그의 변이체; 및 b) 서열식별번호: 27-36 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인, 또는 서열식별번호: 27-36 중 어느 하나와 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 그의 변이체를 포함한다.
- [0564] 실시양태 21. 실시양태 20의 일부 추가 실시양태에서, 항체 모이어티는 서열식별번호: 17-26 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열식별번호: 27-36 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0565] 실시양태 22. 실시양태 1-21 중 어느 하나의 일부 추가 실시양태에서, 단리된 항-AMC 구축물은 전장 항체이다.
- [0566] 실시양태 23. 실시양태 1-22 중 어느 하나의 일부 추가 실시양태에서, 단리된 항-AMC 구축물은 단일특이적이다.
- [0567] 실시양태 24. 실시양태 1-22 중 어느 하나의 일부 추가 실시양태에서, 단리된 항-AMC 구축물은 다중특이적이다.
- [0568] 실시양태 25. 실시양태 24의 일부 추가 실시양태에서, 단리된 항-AMC 구축물은 이중특이적이다.
- [0569] 실시양태 26. 실시양태 24 또는 25의 일부 추가 실시양태에서, 단리된 항-AMC 구축물은 탠덤 scFv, 디아바디 (Db), 단일 쇠 디아바디 (scDb), 이중-친화도 재표적화 (DART) 항체, 이중 가변 도메인 (DVD) 항체, 노브-인트루홀 (KIH) 항체, 독 앤 록 (DNL) 항체, 화학적으로 가교된 항체, 이중다량체 항체, 또는 이중접합체 항체이다.
- [0570] 실시양태 27. 실시양태 26의 일부 추가 실시양태에서, 단리된 항-AMC 구축물은 펩티드 링커에 의해 연결된 2개의 scFv를 포함하는 탠덤 scFv이다.

- [0571] 실시양태 28. 실시양태 27의 일부 추가 실시양태에서, 펩티드 링커는 아미노산 서열 GGGGS를 포함한다.
- [0572] 실시양태 29. 실시양태 24-28 중 어느 하나의 일부 추가 실시양태에서, 단리된 항-AMC 구축물은 제2 항원에 특이적으로 결합하는 제2 항체 모이어티를 추가로 포함한다.
- [0573] 실시양태 30. 실시양태 29의 일부 추가 실시양태에서, 제2 항원은 T 세포의 표면 상의 항원이다.
- [0574] 실시양태 31. 실시양태 30의 일부 추가 실시양태에서, 제2 항원은 CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD28, OX40, GITR, CD137, CD27, CD40L, 및 HVEM으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0575] 실시양태 32. 실시양태 30의 일부 추가 실시양태에서, 제2 항원은 CD3 ϵ 이고, 단리된 항-AMC 구축물은 AFP/MHC 부류 I 복합체에 특이적인 N-말단 scFv 및 CD3 ϵ 에 특이적인 C-말단 scFv를 포함하는 텐덤 scFv이다.
- [0576] 실시양태 33. 실시양태 30의 일부 추가 실시양태에서, T 세포는 세포독성 T 세포, 헬퍼 T 세포, 및 자연 킬러 T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0577] 실시양태 34. 실시양태 29의 일부 추가 실시양태에서, 제2 항원은 자연 킬러 세포, 호중구, 단핵구, 대식세포 또는 수지상 세포의 표면 상의 항원이다.
- [0578] 실시양태 35. 실시양태 1-21 중 어느 하나의 일부 추가 실시양태에서, 단리된 항-AMC 구축물은 키메라 항원 수용체이다.
- [0579] 실시양태 36. 실시양태 35의 일부 추가 실시양태에서, 키메라 항원 수용체는 항체 모이어티를 포함하는 세포외 도메인, 막횡단 도메인, 및 CD3 ζ 세포내 신호전달 서열 및 CD28 세포내 신호전달 서열을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0580] 실시양태 37. 실시양태 1-21 중 어느 하나의 일부 추가 실시양태에서, 단리된 항-AMC 구축물은 항체 모이어티 및 이펙터 분자를 포함하는 면역접합체이다.
- [0581] 실시양태 38. 실시양태 36의 일부 추가 실시양태에서, 이펙터 분자는 약물, 독소, 방사성동위원소, 단백질, 펩티드, 및 핵산으로 이루어진 군으로부터 선택된 치료제이다.
- [0582] 실시양태 39. 실시양태 38의 일부 추가 실시양태에서, 치료제는 약물 또는 독소이다.
- [0583] 실시양태 40. 실시양태 37의 일부 추가 실시양태에서, 이펙터 분자는 표지이다.
- [0584] 실시양태 41. 일부 실시양태에서 실시양태 1-39 중 어느 하나의 단리된 항-AMC 구축물을 포함하는 제약 조성물이 제공된다.
- [0585] 실시양태 42. 일부 실시양태에서 실시양태 1-40 중 어느 하나의 단리된 항-AMC 구축물을 발현하는 숙주 세포가 제공된다.
- [0586] 실시양태 43. 일부 실시양태에서 실시양태 1-40 중 어느 하나의 단리된 항-AMC 구축물의 폴리펩티드 성분을 코딩하는 핵산이 제공된다.
- [0587] 실시양태 44. 일부 실시양태에서 실시양태 43의 핵산을 포함하는 벡터가 제공된다.
- [0588] 실시양태 45. 일부 실시양태에서 실시양태 35 또는 36의 단리된 항-AMC 구축물을 발현하는 이펙터 세포가 제공된다.
- [0589] 실시양태 46. 실시양태 45의 일부 추가 실시양태에서, 이펙터 세포는 T 세포이다.
- [0590] 실시양태 47. 일부 실시양태에서 AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체를 그의 표면 상에 제시하는 세포를 실시양태 40의 단리된 항-AMC 구축물과 접촉시키고 세포 상의 표지의 존재를 검출하는 것을 포함하는, AFP 펩티드 및 MHC 부류 I 단백질을 포함하는 복합체를 그의 표면 상에 제시하는 세포를 검출하는 방법이 제공된다.
- [0591] 실시양태 48. 일부 실시양태에서 AFP-양성 질환을 갖는 개체에게 유효량의 실시양태 41의 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, AFP-양성 질환을 갖는 개체를 치료하는 방법이 제공된다.
- [0592] 실시양태 49. 일부 실시양태에서 AFP-양성 질환을 갖는 개체에게 유효량의 실시양태 45 또는 46의 이펙터 세포를 투여하는 것을 포함하는, AFP-양성 질환을 갖는 개체를 치료하는 방법이 제공된다.

- [0593] 실시양태 50. 실시양태 48 또는 49의 일부 추가 실시양태에서, 투여는 정맥내 경로를 통한다.
- [0594] 실시양태 51. 실시양태 48 또는 49의 일부 추가 실시양태에서, 투여는 종양내 경로를 통한다.
- [0595] 실시양태 52. 실시양태 48 또는 49의 일부 추가 실시양태에서, 투여는 제1 질환 부위에 원위인 주사 부위에서 이루어진다.
- [0596] 실시양태 53. 실시양태 52의 일부 추가 실시양태에서, 주사 부위는 제1 질환 부위에 원위인 제1 종양이다.
- [0597] 실시양태 54. 실시양태 52 또는 53의 일부 추가 실시양태에서, 제1 질환 부위는 AFP-양성 종양이다.
- [0598] 실시양태 55. 일부 실시양태에서
- [0599] a) AFP-양성 질환을 갖는 개체에게 유효량의 실시양태 40의 단리된 항-AMC 구축물을 투여하는 단계; 및
- [0600] b) 개체에서 표지의 수준을 결정하는 단계이며, 여기서 역치 수준을 초과하는 표지의 수준은 개체가 AFP-양성 질환을 갖는다는 것을 나타내는 것인 단계
- [0601] 를 포함하는, AFP-양성 질환을 갖는 개체를 진단하는 방법이 제공된다.
- [0602] 실시양태 56. 일부 실시양태에서
- [0603] a) AFP-양성 질환을 갖는 개체로부터 유래된 샘플을 실시양태 40의 단리된 항-AMC 구축물과 접촉시키는 단계; 및
- [0604] b) 샘플에서 단리된 항-AMC 구축물과 결합된 세포의 수를 결정하는 단계이며, 여기서 역치 수준을 초과하는 단리된 항-AMC 구축물과 결합된 세포의 수에 대한 값은 개체가 AFP-양성 질환을 갖는다는 것을 나타내는 것인 단계
- [0605] 를 포함하는, AFP-양성 질환을 갖는 개체를 진단하는 방법이 제공된다.
- [0606] 실시양태 57. 실시양태 48-56 중 어느 하나의 일부 추가 실시양태에서, AFP-양성 질환은 암이다.
- [0607] 실시양태 58. 실시양태 57의 일부 추가 실시양태에서, 암은 간세포성 암종, 배세포 종양, 또는 유방암이다.
- [0608] 실시양태 59. 실시양태 58의 일부 추가 실시양태에서, 암은 간세포성 암종이다.
- [0609] 실시양태 60. 실시양태 59의 일부 추가 실시양태에서, 암은 전이성 간세포성 암종이다.
- [0610] 실시양태 61. 실시양태 48-54 중 어느 하나의 일부 추가 실시양태에서, AFP-양성 질환은 간세포성 암종이고 전이는 억제된다.
- [0611] 실시예
- [0612] 물질
- [0613] 세포 샘플, 세포주, 및 항체
- [0614] 세포주 HepG2, SK-Hep1, MCF7, Malme-3M, CA46, THP-1, Colo205, ASPC1, OVCAR3, LnCAP, A498 및 HeLa를 아메리칸 타입 컬처 콜렉션으로부터 입수하였다. 각각의 모 세포주를 AFP158 펩티드 발현 미니진 카세트에 형질도입하여 SK-Hep1-MiniG (또는 SK-Hep1 AFP MG), MCF7-MiniG 및 HeLa-MiniG (또는 HeLa-MG)를 생성하였고, 이는 SK-Hep1 및 MCF7 세포에서 AFP158/HLA-A*02:01 복합체의 높은 수준의 세포 표면 발현을 발생시켰다. HeLa는 HLA-A03- 및 HLA-A68-양성 및 HLA*A02:01-음성이므로, 따라서 HeLa-MiniG는 AFP158 미니진은 발현하지만 AFP158/HLA*A02:01 음성인 대조군 세포주로서 기능하였다. 세포주를 10% FBS, 2 mM 글루타민이 보충된 RPMI 1640에서 37°C/5% CO₂에서 배양하였다.
- [0615] 하기 항체를 구입하였다: FITC 또는 APC에 접합된 인간 HLA-A02에 대한 모노클로날 Ab (클론 BB7.2), 및 인간 또는 마우스 CD3, CD 19, CD56, CD33, CD34에 대한 그의 이소형 대조군 마우스 IgG2b/FITC 또는 APC (비디 바이오사이언시스(BD Biosciences), 샌디에고), PE 또는 FITC에 접합된 염소 F(ab)₂ 항-인간 IgG 및 염소 F(ab)₂ 항-마우스 IgG (인비트로젠(Invitrogen)).
- [0616] 모든 펩티드는 진메드 신테시스, 인크.(Genemed Synthesis, Inc.) (텍사스주 샌안토니오)에 의해 합성되었다. 펩티드는 >90% 순수하였다. 펩티드를 DMSO에 용해시키고, 염수 중 5 mg/mL로 희석하고, -180°C에서

동결시켰다. 펩티드가 재조합 HLA-A*02:01 및 β -2 마이크로글로불린 (β 2M)과 재폴딩하여 비오틴화된 단일쇄 AFP 펩티드/HLA-A*02:01 및 대조군 펩티드/HLA-A*02:01 복합체가 합성되었다. 하기 15종의 유전자로부터 HLA-A*02:01에 결합하는 19종의 대조군 펩티드 (서열식별번호: 122-140)를 생성하였다: BCR, BTG2, CALR, CD247, CSF2RA, CTSG, DDX5, DMTN, HLA-E, IFI30, IL7, PIM1, PPP2R1B, RPS6KB1, 및 SSR1.

[0617] 실시예 1. 비오틴화된 AFP158/HLA-A*02:01 복합체 단량체의 생산

[0618] 비오틴화된 AFP158/HLA-A*02:01 복합체 단량체를 표준 프로토콜에 따라 제조하였다 (Altman, J.D. & Davis, M.M., Current Protocols in Immunology 17.3.1-17.3.33, 2003). 간략하게, 전장 인간 β -2 마이크로글로불린 (β 2M)을 코딩하는 DNA를 진와이즈(Genewiz)로 합성하고, 벡터 pET-27b 내로 클로닝하였다. BirA 기질 펩티드 (BSP)를 HLA-A*02:01 세포외 도메인 (ECD)의 C-말단에 부가하였다. HLA-A*02:01 ECD-BSP를 코딩하는 DNA를 또한 진와이즈로 합성하고, 벡터 pET-27b 내로 클로닝하였다. 인간 β 2M 및 HLA-A*02:01 ECD-BSP를 발현하는 벡터로 이. 콜라이 BL21 세포를 개별적으로 형질전환시키고, 박테리아 배양물로부터 봉입체로서 분리하였다. 펩티드 리간드 AFP158은 인간 β 2M 및 HLA-A*02:01 ECD-BSP와 재폴딩하여 AFP158/HLA-A*02:01 복합체 단량체를 형성하였다. 폴딩된 펩티드/HLA-A*02:01 단량체를 한외여과에 의해 농축시키고 추가로 크기-배제 크로마토그래피를 통해 정제하였다. HiPrep 26/60 세파크릴 S-300 HR을 1.5 칼럼 부피의 하이클론 둘베코의 포스페이트 완충 염수 용액 (썬모 사이언티픽(Thermo Scientific), Cat No. SH3002802)으로 평형화하였다. 비정제된 샘플을 로딩하고, 1 칼럼 부피로 용리시켰다. 미스폴딩된 응집체에 상응하는 제1 피크는 대략 111.3 mL에서 용리되었고, 적절하게 폴딩된 MHC 복합체에 상응하는 피크는 212.5 mL에서 관찰되었고, 유리 β 2M에 상응하는 피크는 267.2 mL에서 관찰되었다 (도 1). 정제된 AFP158/MHC 복합체의 SDS-PAGE를 수행하여 단백질 순도를 결정하였다. 간략하게, 단백질 복합체 1 μ g을 NuPAGE LDS 샘플 완충제 (라이프 테크놀로지스(Life Technologies), NP0008) 2.5 μ L와 혼합하고, 탈이온수로 10 μ L가 되게 하였다. 샘플을 70°C에서 10분 동안 가열한 다음, 겔 상에 로딩하였다. 겔 전기영동을 180V에서 1시간 동안 수행하였다. HLA-A*02:01 및 β 2M 서브유닛이 겔 상에서 주요 밴드로서 관찰되었다 (도 2). 펩티드/HLA-A*02:01 단량체를 BirA-매개 효소적 반응을 통해 비오틴화하고, 후속해서 고해상도 음이온-교환 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 비오틴화된 펩티드/HLA-A*02:01 단량체를 PBS 중 -80°C에서 저장하였다.

[0619] 실시예 2. AFP158/HLA-A*02:01 복합체에 특이적인 scFv의 선택 및 특징화.

[0620] 유레카 테라퓨틱스(Eureka Therapeutics)에 의해 구축된 인간 scFv 항체 파지 디스플레이 라이브러리의 집단 (다양성 = 10×10^{10})을 AFP158/HLA-A*02:01에 특이적인 인간 mAb의 선택에 사용하였다. 15종의 완전 인간 파지 scFv 라이브러리를 사용하여 AFP158/HLA-A*02:01 복합체에 대해 패닝시켰다. 단백질 복합체를 플라스틱 표면 상에 고정시킴으로써 도입되는 MHC1 복합체의 입체형태적 변화를 감소시키기 위해, 통상적인 플레이트 패닝 대신 용액 패닝 및 세포 패닝을 사용하였다. 용액 패닝에서, 비오틴화된 항원을 먼저 PBS 완충제에 의한 연장된 세척 후 인간 scFv 파지 라이브러리와 혼합하고, 이어서 항원-scFv 항체 파지 복합체를 자기 락을 통해 스트렙타비딘-접합된 디나비즈 M-280으로 끌어당겼다. 이어서 결합된 클론을 용리시키고, 이. 콜라이 XL1-블루 세포를 감염시키는데 사용하였다. 세포 패닝에서, AFP158 펩티드가 로딩된 T2 세포를 먼저 인간 scFv 파지 라이브러리와 혼합하였다. T2 세포는 TAP-결핍, HLA-A*02:01⁺ 림프모구 세포주이다. 펩티드 로딩을 위해, T2 세포를 무혈청 RPMI1640 배지 중 20 μ g/ml β 2M의 존재 하에 밤새 펩티드 (50ug/ml)로 펄싱하였다. PBS에 의한 연장된 세척 후, 결합된 scFv 항체 파지를 갖는 펩티드-로딩된 T2 세포를 스펀 다운시켰다. 이어서 결합된 클론을 용리시키고, 이. 콜라이 XL1-블루 세포를 감염시키는데 사용하였다. 이어서 박테리아에서 발현된 파지 클론을 정제하였다. 용액 패닝, 세포 패닝, 또는 용액 및 세포 패닝의 조합 중 어느 하나로 패닝을 3-4 라운드 동안 수행하여 AFP158/HLA-A*02:01에 특이적으로 결합된 scFv 파지 클론을 풍부화하였다.

[0621] 스트렙타비딘 ELISA 플레이트를 각각 비오틴화된 AFP158/HLA-A*02:01 복합체 단량체 (Bio-AFP158) 또는 비오틴화된 대조군 펩티드/HLA-A*02:01 단량체 (Bio-대조군)로 코팅하였다. AFP158/HLA-A*02:01 복합체에 대한 풍부화된 파지 디스플레이 패닝 풀로부터의 개별 파지 클론을 코팅된 플레이트에서 인큐베이션하였다. 파지 클론의 결합을 HRP-접합된 항-M13 항체에 의해 검출하고, HRP 기질을 사용하여 발색시켰다. 흡광도를 450nm에서 판독하였다. 파지 패닝으로부터 풍부화된 1260개의 파지 클론의 ELISA 스크리닝을 통해 605개의 양성 클론을 확인하였다. 도 3은 ELISA 검정에서의 비오틴화된 AFP158/HLA-A*02:01 단량체에 결합한 파지 클론의 예를 제공한다. 605개의 ELISA 양성 파지 클론의 DNA 서열분석에 의해 82개의 고유한 클론을 확인하였다. 비오틴화된 AFP158/HLA-A*02:01 복합체 단량체에 대한 표준 ELISA에 의해 양성 클론을 결정하였다. 이어서, ELISA-양성 클론의 DNA 서열분석을 통해 고유한 항체 클론을 확인하였다. 특이적 및 고유한 클론을, AFP158-로딩된 살아있

는 T2 세포를 사용하여 유동 세포측정법 (FACS 분석)에 의해 살아있는 세포 표면 상의 HLA-A2/펩티드 복합체에 대한 그의 결합에 대해 추가로 시험하였다. 상이한 펩티드 및 β 2M이 로딩된 T2 세포를 먼저 정제된 scFv 파지 클론으로 염색한 다음, 마우스 항-M13 mAb로 염색하고, 마지막으로 벡터 랩스(Vector Labs)로부터의 R-PE 접합 된 말 항-마우스 IgG로 염색하였다. 염색의 각 단계는 병상에서 30-60분 수행하였고, 염색 사이에 세포를 2회 세척하였다. 82개의 클론 중, 44개는 AFP158-로딩된 T2 세포를 특이적으로 인식하였다. 도 4는 FACS를 통한, 펩티드-로딩된 T2 세포에 결합한 AFP158/HLA-A*02:01 특이적 파지 클론의 예를 제공한다. 파지 클론은 AFP158-로딩된 T2 세포에 특이적으로 결합하였고, HLA-A*02:01과 관련하여 hTERT-유래 펩티드 ILAKFLHWL (hTERT540, 서열식별번호: 141)이 로딩된 T2 세포, 또는 β 2M는 로딩되었지만 펩티드는 로딩되지 않은 T2 세포는 인식하지 않았다.

[0622] 실시예 3. FACS-양성 AFP158-특이적 파지 클론의 특징화

[0623] 마우스 AFP158 펩티드에 대한 교차-반응성

[0624] AFP158-로딩된 T2 세포에 대한 FACS 결합 분석으로부터 선택된 클론을, 마우스 AFP158-로딩된 살아있는 T2 세포를 사용하여 FACS 분석에 의해 살아있는 세포 표면 상의 마우스 AFP158 펩티드/HLA-A*02:01 복합체에 대한 교차-반응성에 대해 추가로 특징화하였다. 마우스 AFP158 펩티드는 위치 4 및 위치 9에서의 2개의 아미노산이 인간 AFP158 펩티드와 상이하다. 마우스 AFP158 펩티드 서열은 FMNRFIYEV (서열식별번호: 16)이고, 한편 인간 AFP158 펩티드 서열은 FMNKFIEI (서열식별번호: 4)이다. 인간 및 마우스 AFP158 펩티드/MHC 복합체 둘 다와 교차-반응하는 항체는 HLA-A*02:01 트랜스제닉 마우스에서 항체 약물 독성을 평가하는데 유용하다. 시험된 파지 클론 중, 4개의 클론 (#17, #33, #48 및 #76)이 인간 AFP158- 및 마우스 AFP158-로딩된 T2 세포 둘 다를 인식하였다 (도 5). 클론 #52 및 #79도 또한 마우스 AFP158-로딩된 T2 세포에 결합하였지만, 더 낮은 정도로 결합하였다.

[0625] 알라닌 위킹에 의한 에피토프 맵핑

[0626] mAb 인식을 위해 에피토프를 정확하게 조사하기 위해, 위치 1, 3, 4, 5, 6, 7 및 8에서 알라닌 치환을 갖는 인간 AFP158 펩티드 (서열식별번호: 7-13)를 T2 세포 상에 펄싱하였다. 이어서 FACS 분석에 의해 이들 펩티드-로딩된 T2 세포에 대한 결합에 대해 항체 파지 클론을 시험하였다. 모든 항체가 AFP158 펩티드 및 그의 주위 MHC α 쇄 잔기에 의해 형성된 작은 입체형태적 에피토프를 인식하였지만, 상이한 항체와 상호작용하는 주요 펩티드 잔기는 매우 상이하였다. 예를 들어, 위치 1 또는 3에서의 알라닌 치환이 펩티드-로딩된 T2 세포에 대한 결합을 현저하게 감소시키고, 위치 4에서의 알라닌 치환이 클론 #52의 결합을 완전히 제거하였기 때문에, 클론 #52는 AFP158 펩티드의 N-말단 절반에 결합할 것으로 예측되었다. 대조적으로, 위치 5, 6, 7 또는 8에서의 알라닌 치환은 클론 #52의 결합을 변화시키지 않았다. 다른 한편으로 클론 #17-13은 위치 4에서의 알라닌 치환에 비감수성이었지만, 위치 3, 5 및 7에서의 변화에 감수성이었다. 도 6은 FACS 분석의 예를 제공하며, 이는 다양한 AFP 펩티드가 로딩된 T2 세포에 대한 파지 클론 #52의 결합을 제시한다. 표 6은 알라닌-치환된 인간 AFP158 펩티드-로딩된 T2 세포에 대한 여러 AFP158/HLA-A*02:01-특이적 항체 클론의 결합을 요약한다.

[0627] 표 6

펩티드	Ala 위치	ET1402-52	ET1402-61	ET1402-76	ET1402-79	AM1402-17-13
FMNKFIEI		37900	30400	14400	30100	83300
AMNKFIEI	1	468	12300	5458	21000	55600
FMAKFIEI	3	4470	38600	38200	786	2914
FMNAFIEI	4	20.9	15.1	38.3	79.2	50800
FMNKAFIEI	5	21800	3719	49300	34.4	1500
FMNKFAYEI	6	18800	169	40300	27.7	28800
FMNKFIAEI	7	42500	1110	29300	907	572
FMNKFIIAI	8	38500	1748	53300	16100	43200
감수성 위치		4, 1, 3	4, 6, 7, 8, 5	4, 1	5, 6, 4, 3, 7	7, 5, 6

[0628]

[0629] 내인성 펩티드에 대한 항체 결합 특이성 평가

[0630] 평균적으로, 인간 신체 내의 각각의 유핵 세포는 약 50만 종의 상이한 펩티드/MHC 부류 I 복합체를 발현한다.

항-펩티드/MHCI-복합체 항체를 높은 특이성 및 치료 지수를 갖는 항암 약물로 발전시키기 위해, 항체는 MHCI 분자 그 자체 또는 세포 표면 상에 제시된 다른 펩티드에 결합된 MHCI 분자가 아닌 표적 펩티드/MHCI 복합체를 특이적으로 인식하는 것이 필수적이다. 현행 연구의 경우에, 관련 MHCI 분자는 HLA-A*02:01이다. 본 발명자들의 파지 패닝 및 스크리닝의 초기 단계 동안, 본 발명자들은 HLA-A*02:01 분자에만 결합하는 항체를 제거하였다 (예를 들어, 도 3 및 4 참조). 상부 파지 클론을 또한, 다중 유형의 유핵 인간 세포에서 정상적으로 발현되는 단백질로부터 유래된 19종의 내인성 HLA-A*02:01 펩티드, 예컨대 글로빈 α 쇄, β 쇄, 핵 단백질 p68 등에 대해 스크리닝하였다. 내인성 펩티드의 풀 (P19, 서열식별번호: 122-140)을 T2 세포 내로 로딩하고, 항체 결합을 FACS 분석을 통해 결정하였다. 도 7에 제시된 바와 같이, AFP158/HLA-A*02:01-특이적 항체 파지 클론은 AFP158 펩티드-로딩된 T2 세포에 결합하였지만, 내인성 펩티드가 로딩된 T2 세포에는 결합하지 않았다. 본 발명자들은 확인된 항체가 AFP158 펩티드/HLA-A*02:01 복합체에 특이적이고, 시험된 다른 HLA-A*02:01 펩티드에 결합된 HLA-A*02:01 분자는 인식하지 않는 것으로 결론지었다.

[0631] 실시예 4. 이중특이적 항체 조작

[0632] AFP158/HLA-A*02:01-특이적 파지 클론의 scFv 서열을 사용하여 이중특이적 항체 (BsAb)를 생성하였다. BsAb는 N-말단 단부에 AFP158/HLA-A*02:01-특이적 파지 클론의 scFv 서열 및 C-말단 단부에 항-인간 CD3 ϵ 마우스 모노클로날 scFv를 포함하는 단일-쇄 이중특이적 항체이다 (Brischwein, K. et al., Mol. Immunol. 43:1129-1143, 2006). AFP158 scFv 및 항-인간 CD3 ϵ scFv를 코딩하는 DNA 단편은 진와이즈에 의해 합성되었고, 이를 표준 DNA 기술을 사용하여 유레카의 포유동물 발현 벡터 pGSN-Hyg 내로 서브클로닝하였다. 항체 정제 및 검출을 위해 헥스히스타민 태그를 C-말단 단부에 삽입하였다. 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포를 BsAb 발현 벡터로 형질감염시키고, 이어서 BsAb 항체 생산을 위해 7일 동안 배양하였다. 분비된 AFP158 BsAb 분자를 함유하는 CHO 세포 상청액을 수집하였다. BsAb 항체를 FPLC AKTA 시스템에 의해 HisTrap HP 칼럼 (지이 헬스케어)을 사용하여 정제하였다. 간략하게, CHO 세포 배양물을 정화하고, 낮은 이미다졸 농도 (20 mM)를 갖는 칼럼 상에 로딩한 다음, 등용매 높은 이미다졸 농도의 용리 완충제 (500 mM)를 사용하여 결합된 BsAb 단백질을 용리시켰다. 정제된 AFP158 BsAb 항체의 분자량을 겔 전기영동에 의해 비-환원 조건 하에 측정하였다. 단백질 4 μ g를 NuPAGE LDS 샘플 완충제 (라이프 테크놀로지스, NP0008) 2.5 μ L와 혼합하고, 탈이온수로 10 μ L가 되게 하였다. 샘플을 70°C에서 10분 동안 가열한 다음, 겔 상에 로딩하였다. 겔 전기영동을 180V에서 1시간 동안 수행하였다. 겔 상에서 ~50 KD 밴드가 주요 밴드로서 관찰되었다 (도 8). 크기-배제 크로마토그래피 (SEC)에 의해 항체 응집을 평가하였다. 샘플 50 μ L를 SEC 칼럼 (애질런트, BioSEC-3,300A, 4.6x300mm)에 주입하는 한편, pH 7.0으로 조정된 둘베코의 포스페이트 완충 염수 (피셔 사이언티픽, SH30028.FS) 및 0.2M 아르기닌으로 이루어진 완충제를 유동시켰다. BsAb는 체류 시간 ~15.8 mL에 주요 피크로서 관찰되었다 (도 9). 10% 미만의 고분자량 응집을 갖는 BsAb를 추가의 특징화를 위해 사용하였다.

[0633] 실시예 5. AFP158 BsAb 항체의 특징화

[0634] AFP158 BsAb 항체의 결합 친화도

[0635] 재조합 AFP158/HLA-A*02:01 복합체에 대한 AFP158 BsAb 항체의 결합 친화도를 표면 플라즈마 공명 (비아코어 (BiaCore))에 의해 측정하였다. AFP158 BsAb와 AFP158/HLA-A*02:01 복합체 사이의 결합 파라미터는 비아코어 X100 (지이 헬스케어) 상에서 His 포획 키트 (지이 헬스케어, Cat# 28995056)를 사용하여 다중-사이클 동역학적 측정에 대한 제조업체의 프로토콜에 따라 측정하였다. 검정에 사용된 모든 단백질은 HBS-E 완충제를 사용하여 희석하였다. 간략하게, 용액을 유동 셀 2를 통해 2분 동안 2 μ L/분으로 유동시켜 항-히스티딘 항체로 사전-능화된 센서 칩 상에 AFP158 BsAb 1 μ g/mL를 고정시켰다. AFP158/A*02:01 복합체에 대한 결합을 0.19, 0.38, 7.5, 15, 및 30 μ g/mL에서 분석하였고, 각각의 실험은 30 μ L/분으로의 3분 회합 및 3분 해리로 이루어졌다. 사이클 말미에, His 포획 키트로부터의 재생 완충제를 사용하여 표면을 재생시켰다. 동역학적 측정 후, 키트로부터의 재생 용액을 사용하여 표면을 재생시켰다. 비아코어 X-100 평가 소프트웨어에 의해 1:1 결합 부위 모델을 사용하여 데이터를 분석하였다. 결합 파라미터 (회합 속도 상수 k_a , 해리 상수 k_d , 및 평형 해리 상수 K_d)를 계산하였다. 1가 scFv 포맷의 AFP158 항체의 결합 친화도는 10-500nM의 범위에 속하였다. (예가 표 7에 제공됨).

[0636] 표 7

클론 #	k_a [1/Ms]	k_d [1/s]	K_d [nM]
#52	2.63E+05	1.71E-2	65
#61	8.92E+04	3.08E-3	34
#76	9.94E+04	1.42E-2	143
#79	7.88E+04	2.51E-2	318
#17-13	7.36E+04	3.45E-3	47

[0637]

[0638] T-세포 사멸 검정

[0639] LDH 세포독성 검정 (프로메가)에 의해 종양 세포독성을 검정하였다. 올셀즈(AllCells)로부터 구입한 인간 T 세포를 CD3/CD28 디나비즈 (인비트로젠)를 사용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 활성화 및 확장시켰다. 활성화된 T 세포 (ATC)를 10% FBS 플러스 100 U/ml IL-2를 함유하는 RPMI1640 배지에서 배양 및 유지시키고, 제7일-제14일에 사용하였다. FACS 분석에 의하면 T 세포는 > 99% CD3⁺였다. 활성화된 T 세포 (이펙터 세포) 및 표적 세포를 5:1 비로 상이한 농도의 BsAb 항체와 함께 16시간 동안 공동-배양하였다. 이어서 배양물 상청액에서 LDH 활성을 측정함으로써 세포독성을 결정하였다.

[0640] AFP158 BsAb 항체는 AFP 및 HLA-A*02:01-의존성 방식으로 암 세포를 사멸시켰다. 시험된 모든 세포주 중, HEPG2 (AFP 및 HLA-A*02:01 양성)가 AFP158 BsAb를 통해 재지시된 T 세포에 의해 가장 효과적으로 사멸되었다. AFP 음성 또는 HLA-A02 음성, 또는 둘 다에 대해 음성인 시험된 다른 세포주는 동일한 실험 설정 하에서 효과적으로 사멸되지 않았다 (도 10).

[0641] 다중 HLA-A02 대립유전자에 대한 AFP158 BsAb 항체의 교차-반응성

[0642] 인간 MHC I 분자는 6개의 부류의 이소형, HLA-A, -B, -C, -E, -F 및 G로 이루어진다. HLA-A, -B 및 -C 중쇄 유전자는 고도로 다형성이다. 각각의 이소형의 경우에, HLA 유전자는 중쇄 서열의 유사성에 따라 추가로 그룹화된다. 예를 들어, HLA-A는 상이한 대립유전자 예컨대 HLA-A*01, -A*02, -A*03 등으로 나뉘어진다. HLA-A*02 대립유전자의 경우에, 다중 하위유형, 예컨대 HLA-A*02:01, A*02:02 등이 존재한다. HLA-A*02 그룹의 상이한 하위유형 사이에서, 서열 차이는 단지 여러 개의 아미노산으로 제한된다. 따라서 다수의 경우에서, HLA-A*02:01 분자에 결합하는 펩티드는 또한 HLA-A*02 대립유전자의 다중 하위유형과 복합체를 형성할 수 있다. 표 8에 제시된 바와 같이 (<http://www.allelefrequencies.net/>), HLA-A*02:01은 백인 인구 중 우성 HLA-A*02 하위유형일지라도, 아시아 및 아프리카에서는 A*02:03, A*02:05, A*02:06, A*02:07 및 A*02:11이 또한 흔한 HLA-A*02 하위유형이다. AFP158 항체가 HLA-A*02:01과 관련하여 AFP158 펩티드, 뿐만 아니라 HLA-A*02의 다른 하위유형을 인식하는 능력은, AFP158 항체 약물 치료로부터 이익을 얻을 수 있는 환자 집단을 확장시킬 것이다. 본 발명자들은 따라서 HLA-A*02 대립유전자의 다른 하위유형과의 재조합 AFP158/MHCI 복합체를 생성하여, 이들 다른 복합체에 대한 AFP158/HLA-A*02:01-특이적 항체의 결합 친화도를 시험하였다. 결합 친화도는 포르테바이오 옥텟 QK를 사용하여 결정하였다. 5 µg/mL의 다양한 하위유형의 비오틴화된 HLA-A*02 MHC 복합체를 스트렙타비딘 바이오센서 상에 로딩하였다. 과량의 항원을 세척한 후, BsAb 항체를 10 µg/mL에서 회합 및 해리에 대해 시험하였다. 1:1 결합 부위, 부분 피트 모델을 사용하여 결합 파라미터를 계산하였다. 표 9는 상이한 하위유형과의 다중 AFP158/HLA-A*02 복합체에 대한 여러 AFP158 BsAb의 결합 친화도를 제시한다. 시험된 모든 항체는 HLA-A*02 대립유전자의 다중 하위유형에 결합된 AFP158을 인식하는 것으로 발견되었다.

[0643] 표 8

	오스트레 일리아	중국	유럽	인도	북 아프리카	사하라- 이남 아프리카	타이완	미국
A*02:01	97.8%	39.5%	94.0%	53.9%	73.3%	56.3%	35.1%	79.4%
A*02:02	0.0%	0.1%	0.3%	0.9%	9.7%	24.1%	0.0%	3.6%
A*02:03	0.0%	15.3%	0.2%	4.9%	0.0%	0.4%	19.3%	2.2%
A*02:04	0.0%	0.1%	0.0%	0.3%	2.6%	0.4%	0.0%	0.2%
A*02:05	1.1%	0.9%	3.2%	5.8%	13.8%	15.9%	0.1%	4.5%
A*02:06	0.0%	16.0%	0.9%	10.6%	0.0%	0.7%	12.8%	5.5%
A*02:07	1.1%	26.1%	0.4%	0.4%	0.0%	0.0%	32.7%	2.4%
A*02:08	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
A*02:09	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
A*02:10	0.0%	1.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.1%
A*02:11	0.0%	0.1%	0.1%	22.3%	0.0%	1.5%	0.0%	1.7%
다른 A02 하위유형 (A*02:12 - A*02:93)	0.0%	0.7%	0.8%	0.9%	0.5%	0.5%	0.0%	0.6%
	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

[0644]

[0645] 표 9

HLA-A02 하위유형	#17-13 K _d (nM)	#52 K _d (nM)	#61 K _d (nM)	#76 K _d (nM)	#79 K _d (nM)
A*02:02	233	16.8	394	16.8	115
A*02:03	212	25.7	204*	25.7*	--
A*02:05	183	18.6	2000	18.6	686
A*02:06	26.4	9.4	2200*	9.4*	63.8
A*02:07	373	6.9	3200*	6.9*	387
A*02:11	11.3	10.4	433	10.4	68.5

[0646]

[0647] * 낮은 피팅 신뢰

[0648] 실시예 6. AFP158/HLA-A*02:01 특이적 키메라 항원 수용체-제시 T 세포 (CAR-T)의 생성

[0649] 키메라 항원 수용체 요법 (CAR-T 요법)은 표적화된 면역요법의 신규 형태이다. 이는 모노클로날 항체의 정교한 표적화 특이성을 세포독성 T 세포에 의해 제공되는 강력한 세포독성 및 장기간 지속성과 병합한 것이다. 이러한 기술은 T 세포가 내인성 TCR과 독립적인 장기간 신규 항원 특이성을 획득할 수 있게 한다. 임상 시험은 신경모세포종 (Louis, C.U. et al., Blood 118(23):6050-6, 2011), B-ALL (Maude, S.L. et al., N Engl J Med. 371(16):1507-1517, 2014), CLL (Brentjens, R.J. et al., Blood. 118(18):4817-4828, 2011), 및 B 세포 림프종 (Kochenderfer, J.N. et al., Blood. 116(20):4099-4102, 2010)에서의 CAR-T 요법의 임상적으로 유의한 항종양 활성을 제시한 바 있다. 한 연구에서, CD19-CAR T 요법으로 치료받은 B-ALL을 갖는 30명의 환자에서 90% 완전 완화율이 보고되었다 (Maude et al., 상기문헌).

[0650] AFP158/HLA-A*02:01 특이적 항체의 효력을 추가로 연구하기 위해, 본 발명자들은 항-AFP158/HLA-A*02:01 scFv 발현 CAR을 구축하여, T 세포를 이들 CAR로 형질도입시켰다. AFP158/HLA-A*02:01 특이적 CAR은 렌티바이러스 CAR 발현 벡터를 사용하여 구축하였다. 세포내 T 세포 자극 신호를 제공하고 T 세포를 활성화하기 위해 시스로 조작된 CD28 신호전달 도메인 및 TCR ζ 를 갖는 제2 세대 CAR (Mackall, C.L. et al., Nat. Rev. Clin. Oncol. 11(12):693-703, 2014) 상에 항-AFP158/HLA-A*02:01 scFv를 그래프팅하였다. 도 11은 항-AFP158/HLA-A*02:01 CAR 구축물의 개략도를 제공한다.

[0651] 실시예 7. AFP158 CAR-T 세포의 특징화

[0652] CD4⁺ 및 CD8⁺ 1차 T 세포에서 발현된 AFP158 CAR

[0653] 건강한 공여자로부터 말초 혈액 림프구를 분리하여 항-AFP158/HLA-A*02:01 결합 모이어티를 코딩하는 AFP158 CAR 구축물로 형질도입시켰다. 형질도입 5일 후에, AFP158 CAR-T 세포 및 모의-형질도입된 세포를 AFP158 사량체, 및 CD3, CD4 또는 CD8 항체 중 하나로 공동-염색하고, 유동 세포측정법에 의해 분석하였다. 도 24는 AFP158 CAR이 CD4⁺ 및 CD8⁺ 1차 T 세포 둘 다에서 발현될 수 있다는 것을 보여주는, AFP158 CAR- 및 모의-형질

감염된 세포에 대한 유동 세포측정법 결과를 제시한다.

- [0654] T 세포 표면 상의 AFP158 CAR의 균등 분포
- [0655] CAR의 균등 세포 표면 분포를 갖는 CAR-T 세포가 CAR의 불균등 세포 표면 분포를 갖는 CAR-T 세포보다 시험관내 및 생체내에서 종양 세포를 더 효율적으로 사멸시키고, 사멸 후에 훨씬 덜 용이하게 고갈되는 것으로 입증된 바 있다. CAR의 불균등 분포, 예컨대 응집은 생체내 항원-비의존성 CAR 활성화, 조기 T 세포 소진, 및 항종양 활성 부재로 이어질 수 있다. 따라서, T 세포 표면 상에서의 CAR의 균등 분포가 바람직하다. T 세포 막 상에서의 항-AFP158/HLA-A*02:01 scFv 발현 CAR의 분포를 결정하기 위해, 본 발명자들은 접합체 AFP158 펩티드-HLA-A2 사량체-PE를 사용하여 상기 기재된 바와 같이 AFP158 CAR-형질도입된 T 세포를 염색하였다. 1차 인간 CD3+ T 세포를 먼저 항-CD3 및 CD28 비드로 활성화시킨 다음, AFP158 CAR 렌티바이러스로 형질도입시켰다. 바이러스 형질도입 후 제8일에, AFP158 CAR-형질도입된 T 세포를 AFP158 펩티드-HLA-A2 사량체-PE 2 ng/ml로, 단백질 수송 억제제의 존재 하에 실온에서 30분 동안 염색하였다. 영상을 올림푸스 형광 현미경을 사용하여 획득하였다. 본 발명자들은 T 세포 막 상의 AFP158 CAR의 분포가 균등하고 평활하다는 것을 발견하였다. 어떠한 점상 CAR 분포도 관찰되지 않았다. 대표적인 영상을 도 26에 제시한다.
- [0656] AFP158 CAR-T 세포의 시험관내 세포독성 연구
- [0657] 293T 세포를 CAR 벡터로 형질감염시켜 AFP158/HLA-A*02:01-특이적 키메라 항원 수용체를 함유하는 렌티바이러스를 생산하였다. 인간 T-세포를 인터류킨-2의 존재 하에서의 100 U/ml로의 CD3/CD28 비드 (디나비즈®, 인비트로젠)에 의한 1-일 자극 후 형질도입을 위해 사용하였다. 농축된 렌티바이러스를 레트로넥틴(Retronectin) (다카라(Takara)) 코팅된 6-웰 플레이트에서 T-세포에 72시간 동안 적용하였다. 형질도입된 T 세포 (AFP158 CAR-T 세포)의 기능성 평가를 LDH 세포독성 검정을 사용하여 수행하였다. 사용된 이펙터-대-표적 비는 5:1이었다.
- [0658] T 세포 내로 형질도입된 한 패널의 AFP158 CAR 클론을 표적 세포주 HEPG2, SK-HEP1, 및 SK-HEP1-MiniG에 대해 시험하였다. AFP158 CAR 클론으로 형질도입된 T 세포는 AFP158/HLA-A*02:01 양성 세포주 HEPG2 및 SK-HEP1-MiniG를 특이적으로 사멸시켰다 (도 12). AFP158 CAR 발현 T 세포는 시험된 대부분의 항체 클론의 경우에 표적-양성 암 세포를 특이적이고 고도로 효율적인 방식으로 사멸시켰다. 그러나, 표적-음성, 야생형 SK-HEP1 세포는, 야생형 SK-HEP1 세포의 일부 비-특이적 사멸을 제시한 클론 #44로 형질도입된 것을 제외하고, 동일한 T 세포에 의해 불량하게 인식되었다.
- [0659] AFP158 및 HLA-A*02:01에 대해 양성 또는 음성인 암 세포주의 대규모 패널을 AFP158 CAR-T 세포에 의한 사멸에 대해 시험하였다. 모의-형질도입된 또는 AFP158 CAR (예시적인 항-AFP158/HLA-A*02:01 항체를 코딩하는 CAR 구축물)로 형질도입된 1차 T 세포를 AFP158/HLA-A*02:01 양성 암 세포를 특이적으로 사멸하는 그의 능력에 대해, 이펙터-대-표적 비 5:1로 시험하였다. 도 13에 제시된 바와 같이, AFP158 CAR-T 세포는 AFP158/HLA-A*02:01 양성 세포주 HepG2 및 SK-Hep1-MiniG를 특이적으로 사멸시켰지만, AFP 음성 또는 HLA-A*02:01 음성인 다른 세포주는 어떠한 것도 사멸시키지 않았다. 중요하게는, 이러한 데이터는 본 발명자들의 항체가 AFP-발현 세포에 대해 고도로 특이적이고, AFP를 발현하지 않는 다중 조직 유형에 걸친 HLA-A02 세포주의 대규모 패널의 비-특이적인 사멸은 매개하지 않는다는 것을 입증한다.
- [0660] AFP158 CAR-형질도입된 T 세포는 항원 자극 시 탈과립화된다
- [0661] AFP158 CAR-형질도입된 T 세포에서의 생물학적 활성을 추가로 특징화하기 위해, 본 발명자들은 유동 세포측정법 검정을 사용하여 탈과립화 활성의 측정으로서 CD107a 표면 발현을 검출하였다. AFP158 CAR-형질도입된 T 세포를 HepG2, SK-HEP-1 및 SK-Hep1-MiniG 세포와 4시간 동안, 1:200 희석된 항-CD107a 항체 및 단백질 수송 억제제 콕테일 (이바이오사이언스(eBioscience))의 존재 하에 공동-인큐베이션하였다. 표적 세포와의 공동-인큐베이션 후에, 형질도입된 T 세포를 AFP158/HLA 사량체 및 항-CD8로 염색하였다. 사량체-양성, CD8-양성 T 세포에서의 탈과립화를 도 25에 제시한다. CD107a 발현에 의해 측정된 바와 같은 탈과립화의 최고 수준은 SK-Hep1-MiniG와, 그 다음은 HepG2와의 공동-인큐베이션 시에 관찰되었고, 모 항원-음성 SK-HEP-1에 의해서는 어떠한 탈과립화도 관찰되지 않았다. 이는 상기 T-세포 매개 세포 용해 데이터와 일치한다.
- [0662] 시토카인 방출
- [0663] 활성화된 AFP158 CAR-T 세포에 의한 처리 시 시토카인 방출 프로파일을 또한 검사하였다. T 세포를 모의-형질도입시키거나 또는 예시적인 AFP158 CAR로 형질도입시키고, 표시된 바와 같은 표적 세포와 공동-인큐베이션하였다. 배지로의 IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN- γ 및 TNF- α 의 방출을 16시간 후에 맵덱스 멀티플렉스 시스템 (루미넥스(Luminex))을 사용하여 바이오-플렉스 프로 인간 시토카인 8-플렉스 검정 (바이오라드

(BioRad))에 의해 측정하였다. 시토카인 농도는 표준 곡선으로부터, 배지, 표적 세포 단독 및 AFP158 CAR 형질 도입된 T 세포 단독으로부터 값을 차감한 후에 결정하였다. 도 14a 및 14b에 제시된 바와 같이, 시토카인 방출은 AFP158 CAR-T 세포를 AFP158/HLA*A02:01 양성 세포: SK-Hep1-MiniG, MCF7-MiniG 및 HepG2와 공동-인큐베이션한 경우에만 검출되었고, AFP158/HLA*A02:01 음성 세포: SK-Hep1 및 MCF7과 공동-인큐베이션한 경우에는 그렇지 않았다. AFP158 CAR-T 세포는 SK-Hep1-MiniG 및 MCF7-MiniG에 노출된 경우에 훨씬 더 높은 수준의 시토카인을 방출하였다. 이는 HepG2보다 세포 표면 상에서 훨씬 더 높은 수준의 AFP158/HLA*A02:01을 발현하는 AFP158 미니진-형질도입된 암 세포와 일치한다. 모의-형질도입된 T 세포는 AFP158/HLA*A02:01 양성 암 세포의 존재 하에, 존재하는 경우에, 단지 미량의 시토카인만을 방출하였다. 모의-형질도입된 (AFP 음성) SK-Hep1와의 공동-인큐베이션 후의 IL-6 방출은 이들 세포에서의 내인성 IL-6 발현으로 인한 것이다 (제시되지 않은 데이터에 기초함).

[0664] 인간 HCC 이종이식 모델에서의 AFP158 CAR T 세포의 생체내 효능 연구

[0665] AFP158 CAR-T 세포의 생체내 항종양 활성을 SCID-베이지 면역손상 마우스의 여러 확립된 인간 HCC 이종이식 모델에서 시험하였다. HepG2를 마우스당 2.5×10^6 개 세포로 우측 측복부 위에 피하로 (s.c.) 이식하였다. 종양 부피가 평균 100 mm^3 에 도달하였을 때, 마우스를 종양 부피에 기초하여 4개의 군으로 무작위화하였다: 1) 처리하지 않음, 2) 모의-형질도입된, 공여자-매칭 T 세포에 의한 정맥내 (i.v.) 처리 (모의), 3) 예시적인 AFP158 CAR 형질도입된 T 세포에 의한 정맥내 (i.v.) 처리, 및 4) AFP158 CAR 형질도입된 T 세포의 종양내 (i.t.) 주사. 모든 처리는 마우스당 10^7 개 세포의 용량으로 투여하고, 총 3회 용량 동안 2주마다 반복하였다.

[0666] 대조군 및 AFP158 CAR-T 세포 둘 다는 주어진 용량 및 스케줄에서 잘-용인되었고; 연구 동안 어떠한 처리-관련 유해 반응도 관찰되지 않았다. 미처리된 마우스, 뿐만 아니라 대조군 T 세포-처리된 마우스에서의 종양은, 안락사가 요구되는 크기에 도달할 때까지 계속해서 성장하였다. 도 15a에 제시된 바와 같이, HepG2 종양-보유 마우스에서 AFP158 CAR-T 세포의 정맥내 투여는 제1 용량 후 28일에 시작되는 지연된 종양 성장을 발생시켰다. 제1 용량 후 제35일 후에 대략 25% 종양 성장 억제가 관찰되었다 (도 15a). i.v. 투여의 지연된 효과와 대조적으로, AFP158 CAR-T 세포의 i.t. 주사는 모든 마우스에서 신속하고, 지대하고, 지속적인 종양 퇴행을 유발하였고, 80% (6/8)가 완전 퇴행을 제시하였다 (도 15b).

[0667] HCC의 복막 파종은 매우 제한된 치료 옵션을 갖는 환자의 하위세트에서 결과로서 발생한다. 따라서 AFP158 CAR-T 세포의 항종양 활성을 확립된 복강내 HCC 이종이식 모델에서 추가로 시험하였다. 이러한 연구에서, 루시페라제-태그부착된 HepG2 세포 (HepG2-luc2)를 마우스당 2.5×10^6 개 세포로 복강내로 (i.p.) 이식하였다. 종양-유래 생물발광을 측정함으로써 종양 부담을 매주 평가하였다. 종양 이식 1주 후, 동물을 총 생물발광 플럭스에 기초하여 4개의 군으로 무작위화하였다: 1) 처리하지 않음, 2) 10^7 개 대조군 T 세포의 i.p. 주사에 의한 처리, 3) 10^6 개 AFP158 CAR-T 세포의 i.p. 주사에 의한 처리, 및 4) 10^7 개 AFP158 CAR-T 세포의 i.p. 주사에 의한 처리 (군당 n=6 마우스). T 세포의 2회 용량을 각각의 군에 2주 간격으로 투여하였다.

[0668] i.v. 및 i.t. 투여 경로에 의해 관찰되는 바와 같이, 대조군 또는 AFP158 CAR-T 세포의 i.p. 주사의 결과로서 유해 반응의 어떠한 임상 징후도 관찰되지 않았다. 도 16a (처리 후 제70일의 종양-보유 마우스로부터의 광자 방출의 변화) 및 16b (제70일의 HepG2-Luc2 종양-보유 마우스의 광자 방출 영상)에 제시된 바와 같이, 대조군 T 세포-처리된 동물에서의 종양 부담은 비처리된 대조군에서 관찰된 것과 어떠한 차이도 제시하지 않았다. 대조적으로, 마우스당 10^6 또는 10^7 개의 세포의 AFP158 CAR-T 세포로 처리된 마우스는 강건한 종양 퇴행을 제시하였다. 어떠한 용량-의존성 항종양 활성도 관찰되지 않았고, 이는 둘 다의 용량이 이러한 모델에서 최대의 효과적인 용량을 초과한다는 것을 나타낸다. 따라서 복막 HCC 모델에서의 AFP158 CAR T 세포에 의한 i.p. 처리는 안전하고, 강력하고, 종양을 효과적으로 근절시킨다.

[0669] AFP158 CAR-T 세포의 생체내 활성을 또한 SK-Hep1-MiniG s.c. 이종이식 모델에서 평가하였다. SK-Hep1-MiniG를 마우스당 2.5×10^6 개 세포로 우측 측복부 위에 피하로 (s.c.) 이식하였다. 종양 부피가 평균 100 mm^3 에 도달하였을 때, 마우스를 종양 부피에 기초하여 3개의 군으로 무작위화하였다: 1) 모의-형질도입된, 공여자-매칭 T 세포에 의한 정맥내 (i.v.) 처리 (모의), 2) 예시적인 AFP158 CAR 형질도입된 T 세포에 의한 정맥내 (i.v.) 처리, 및 3) 동일한 AFP158 CAR 형질도입된 T 세포의 종양내 (i.t.) 주사. 모든 처리는 마우스당 10^7 개 세포의 용량으로 투여하고, 제1 처리 2주 후에 1회 반복하였다. 이러한 종양 모델에서, AFP158 CAR-T 세포의

i.v. 투여는 즉각적인 종양 성장 억제를 발생시켰고, 제1 용량 후 제31일에 종양 성장을 대략 28% 늦추었다 (도 17). 이는 HepG2 종양에서 i.v. AFP158 CAR-T 세포 투여의 지연된 종양 성장 억제 활성이 모델-특이적 현상이라는 것을 시사한다. HepG2 종양에서 수득된 결과와 유사하게, SK-Hep1-MiniG 마우스 모델에서 AFP158 CAR-T 세포의 i.t. 주사는 제1 용량 직후에 강건하고 지속적인 종양 퇴행을 발생시켰다 (도 17).

[0670] 실시예 8. 전장 IgG1 AFP158 항체의 생성 및 특징화

[0671] 선택된 파지 클론의 전장 인간 IgG1을 HEK293 및 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포주에서 기재된 바와 같이 생산하였다 (Tomimatsu, K. et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 73(7):1465-1469, 2009) (데이터는 제시되지 않음). 간략하게, 항체 가변 영역을 매칭되는 인간 램다 또는 카파 경쇄 불변 영역 및 인간 IgG1 불변 영역 서열을 갖는 포유동물 발현 벡터 내로 서브클로닝하였다. 동일한 클로닝 전략을 적용하여, 본 발명자들은 또한 마우스 IgG1 중쇄 및 경쇄 불변 영역을 갖는 키메라 AFP158 전장 항체를 생성하였다. 정제된 전장 IgG 항체의 분자량을 전기영동에 의해 환원 및 비-환원 조건 둘 다 하에서 측정하였다. 정제된 AFP158 마우스 키메라 IgG1 항체의 SDS-PAGE를 수행하여 단백질 순도를 결정하였다. 간략하게, 단백질을 2 µg를 NuPAGE LDS 샘플 완충제 (라이프 테크놀로지스, NP0008) 2.5 µL와 혼합하고, 탈이온수로 10 µL가 되게 하였다. 샘플을 70°C에서 10분 동안 가열한 다음, 겔 상에 로딩하였다. 겔 전기영동을 180V에서 1시간 동안 수행하였다. SDS-PAGE의 예를 도 18에 제시한다.

[0672] AFP158 키메라 IgG1 항체를 유동 세포측정법에 의해 AFP158 제시 SK-HEP1 세포에 대한 결합에 대해 시험하였다. SK-HEP1은 HLA-A*02:01 양성 및 AFP 음성 세포주이다. AFP158 미니진 카세트로 SK-HEP1 세포를 형질감염시켜 AFP158-제시 SK-HEP1-miniG 세포를 생성하였다. 항체 10 µg/mL를 세포에 병상에서 1시간 동안 첨가하였다. 세척 후, R-PE 접합된 항-마우스 IgG(H+L) (벡터 랩스#EI-2007)를 첨가하여 항체 결합을 검출하였다. AFP158 항체는 미니진-형질감염된 SK-HEP1-miniG 세포에 결합하는 것으로 발견되었고, 반면에 2차 대조군 항체 단독은 동일한 세포에 결합하지 않았다 (도 19). 마우스 키메라 IgG1 AFP158 항체의 결합 친화도를 포르테바이오에 의해 결정하였다. 항체를 1가 BsAb로부터 2가 IgG 항체로 전환시키는 것은 표적 항원에 대한 AFP158 항체의 결합 친화도를 현저하게 증가시켰다. 전장 항체의 K_d 는 BsAb 포맷과 비교하여 100- 내지 1000-배 증가된 피코몰 범위인 것으로 결정되었다. 표 10은 K_d 데이터의 예를 제시한다.

[0673] 표 10

클론 #	k_a [1/Ms]	k_d [1/s]	K_d [nM]
1402-52	1.17E+06	2.35E-04	0.201
1402-61	5.13E+05	1.31E-05	0.0255
1402-76	6.32E+05	1.10E-04	0.173
1402-79	4.60E+05	5.33E-05	0.116

[0674]

[0675] AFP158-특이적 및 음성 대조군 (ET901) 마우스 키메라 IgG1을 ELISA 검정에서 AFP158/HLA-A*02:01, AFP 재조합 단백질 및 유리 AFP158 펩티드에 대한 결합에 대해 시험하였다. 항체를 100 ng/mL에서 시작하여 3X 연속 희석 물로, 총 8종의 농도에 대해 시험하였다. 비오티닐화된 AFP158/A*02:01 MHC를 스트렙타비딘 플레이트 상에 2 µg/mL로 코팅하고, AFP 단백질은 2 µg/mL로 코팅하고, AFP158 펩티드는 40 ng/mL로 코팅하였다. 전장 AFP158 항체는 HLA-A02와 관련하여 단지 AFP158 펩티드만을 인식하였고, 재조합 AFP 단백질 또는 유리 AFP158 펩티드에는 결합하지 않는다는 것이 확인되었다 (도 20).

[0676] 실시예 9. 원위 SK-Hep1-MiniG s.c. 이종이식 모델에서의 AFP158-CART의 효능

[0677] 실시예 7은 피하 (s.c.) 간 종양 모델로의 AFP158 CAR T 세포의 종양내 투여가 다중 이종이식 모델에서 처리된 종양의 성장을 유의하게 억제한다는 것을 제시하였다. 본 실시예에 기재된 연구의 목적은 종양내 처리가 또한 원위 s.c. 종양의 성장에 영향을 미칠 것인지 여부를 평가하기 위한 것이었다.

[0678] 하나의 대표적인 연구에서, 하기 물질 및 절차를 사용하였다:

[0679] 1. 표적 종양 세포주 SK-Hep1-MiniG (일명 SK-Hep1-MG): HLA-A*02:01 및 AFP158 펩티드 미니진을 발현하는 인간 HCC 세포주 SK-Hep1.

[0680] 2. 동물: 어떠한 T- 및 B-세포도 보유하지 않는 SCID-베이지. 기능적 NK, 단핵구/대식세포, 과립구 및 수지상

세포를 가짐.

- [0681] 3. 동물 연구는 연구 계약 실험실에서 수행하였다.
- [0682] 4. CART 세포: 인간 T 세포를 제0일에 활성화시켰다; b) 활성화된 T 세포를 제1일에 렌티바이러스로 형질도입시켰다; c) 렌티바이러스 및 비드를 제5일에 제거하였다; d) CAR T 세포를 배양하고, IL-2로 100 유닛/ml로 확장시켰다; e) PBMC로부터 CD3⁺ T 세포를 고갈시켜 APC 세포를 분리하였다. 세포는 주로 단핵구 및 B-세포이다.
- [0683] 5. 동물 연구. 6-8주령의 암컷 SCID 베이지 마우스를 이 연구에 사용하였다. SK-Hep1-MiniG 세포주를 5% CO₂를 함유하는 가슴 분위기에서 37℃에서 DMEM 배지+10% FBS 및 1% L-글루타민 중에서 배양하였다. SK-Hep1-MiniG 세포를 50% PBS 플러스 50% 매트릭셀 중에 재현탁시키고, 40마리의 마우스의 우측 및 좌측 측복부 둘 다에 피하로 5 x 10⁶ 개 세포/100ul/주사 부위로 이식하였다.
- [0684] 종양이 평균 100mm³에 도달하였을 때, 마우스를 우측 측복부의 종양 크기에 기초하여 하기 기재된 6개의 군으로, 군당 6마리의 마우스로 무작위화하고, 샘플을 각각의 마우스의 우측 측복부의 종양 내로 주사하였다. AFP158-CART 군 (군 4-6)의 경우에, 상기 기재된 바와 같은 다양한 항체 클론을 다양한 실험에 사용하였다. 대표적인 클론을 사용한 실험으로부터의 결과를 하기 제시한다. 다른 클론이 유사한 결과를 생성하였다 (데이터는 제시되지 않음).
- [0685] 군 1: 비히클 (PBS), 100 μL/ 마우스, 우측 부위 s.c. 종양 내로의 i.t., 단일 용량.
- [0686] 군 2: 모의* T-세포 7백만개/100 μL/마우스, 우측 부위 s.c. 종양 내로의 i.t., 단일 용량. (모의 T-세포는 CART 형질도입이 없는 T-세포임)
- [0687] 군 3: 모의, APC 세포 포함, 7백만개 (70% 모의 + 30% APC) /100 μL/ 마우스, 우측 부위 s.c. 종양 내로의 i.t., 단일 용량.
- [0688] 군 4: AFP158 CAR T 세포 7백만개 /100 μL/ 마우스, 꼬리 정맥을 통해 i.v., 단일 용량.
- [0689] 군 5: AFP158 CAR T 세포 7백만개 /100 μL/ 마우스, 우측 부위 s.c. 종양 내로의 i.t., 단일 용량.
- [0690] 군 6: AFP158 CAR T 세포, APC 포함, 7백만개 (70% CART + 30% APC) / 100 μL/ 마우스, 우측 부위 s.c. 종양 내로의 i.t., 단일 용량.
- [0691] AFP158-CART는 현행 용량/스케줄에서 안전하다
- [0692] 투여 후, 체중 및 다른 임상 행동을 밀접하게 모니터링하였다. 도 21에 제시된 바와 같이, 체중 감소는 어떠한 군에서도 관찰되지 않았다. 약물 관련 독성의 어떠한 다른 임상 징후도 관찰되지 않았다.
- [0693] 단일 i.t. 용량은 국부 종양의 퇴행 및 원위 종양의 억제를 발생시켰다
- [0694] 도 22에 제시된 바와 같이, 우측 측복부에만 주사된 AFP158-CART의 단일 i.t. 용량은 우측 측복부 및 좌측 측복부 (AFP158-CAR T 세포가 직접 주사되지 않은 측) 둘 다에 이식된 종양의 유의한 억제를 발생시켰다. 종양의 전반적 성장 동역학을 반영한 곡선하 면적에 의한 분석은 AFP158-CART 단독의 i.t. 주사가 우측 측복부에서 42% 종양 성장 억제 (던넛 검정 p<0.01) 및 좌측 측복부에서 33% 종양 성장 억제 (p>0.05)를 발생시켰다는 것을 제시하였다.
- [0695] AFP158-CART + APC는 양 측에서 항종양 활성을 증진시켰다
- [0696] 도 22에 제시된 바와 같이, AFP158-CART 플러스 APC의 i.t. 주사는 비히클-처리된 군과 비교 시 68%의 전반적인 종양 억제와 함께 우측 측복부 종양의 퇴행을 유발하였다 (p<0.001). 각각의 비히클-처리된 군과 비교하여 원위 좌측 측복부 종양의 보다 강력한 억제가 또한 관찰되었다 (47%, p<0.01). 이는 우측 및 좌측 종양 둘 다의 추가의 억제에서의 T-세포 교차-프라이밍의 가능한 수반을 시사한다.
- [0697] CD3 양성 세포는 AFP158-CART + APC 처리된 동물에서 우측 및 좌측 종양 둘 다에서 관찰되었다
- [0698] 연구 말미에 (투여 34일 후), 종양을 수거하고 CD3 (T-세포 마커)의 조직학적 염색을 수행하였다. 도 23에 제시된 바와 같이, CD3 양성 세포가 AFP158-CART 플러스 APC 세포의 i.t. 주사로부터 우측 및 좌측 종양 둘 다에서 발견되었다. 이는 종양 성장 억제에서 인간 T-세포의 수반을 시사한다.

[0699] 서열 목록

hAFP 단백질 (SEQ ID NO: 1)

MKWVESIFLIFLLNFTESRTLHRNEYGIASILDSYQCTAEISLADLATIFFAQFVQEATY
KEYSKMVKDALTAIEKPTGDEQSSGCLENQLPAFLEELCHEKEILEKYGHSDCCSQSE
EGRHNCFLAHKKPTPASIPLFQVPEPVTSCAEYEDRETFMNKFIYEIARRHPFLYAPT
ILLWAARYDKIIPSCCKAENAVECFQTKAATVTKELRESSLLNQHACAVMKNFGTRT
FQAITVTKLSQKFTKVNFTIEIQLVLVDVAHVHEHCCRGDVLDCLODGEKIMSYICSQ
QDTLNKNITECKLTTLERGGCIIHAENDEKPEGLSPNLNRFLGDRDFNQFSSGKNI
LASFVHEYSRRHPQLAVSVILRVAKGYQELLEKCFQNTENPLECQDKGEEELQKYIQES
QALAKRSCGLFQKLGEYYLQNAFLVAYTKKAPQLTSSSELMATRKMATAATCCQL
SEDKLLACGEGAADIIIGHLCIRHEMTPVNPVGVGQCTSSYANRRPCFSSLVVDETYV
PPAFSDDKFIFHKDLCAQGVALQTMKQEFNLINLVKQKPOITEEQLEAVIADFSGLLE
KCCQGQEQEVCFEEGQKLISKTRAALGV

[0700]

hAFP CDS (SEQ ID NO: 2)

ATGAAGTGGGTGGAATCAATTTTTTAAATTTTCTACTAAATTTTACTGAATCCAG
AACACTGCATAGAAATGAATATGGAATAGCTTCCATATTGGATTCTTACCAATGT
ACTGCAGAGATAAGTTTAGCTGACCTGGCTACCATATTTTTTGCCAGTTTGTTC
AGAAAGCCACTTACAAGGAAGTAAAGCAAAATGGTGAAAGATGCATTGACTGCAAT
TGAGAAACCCACTGGAGATGAACAGTCTTCAGGGTGTTTAGAAAACAGCTACC
TGCCCTTTCTGGAAGAAGTTTGCCATGAGAAAGAAATTTTGGAGAAGTACGGACAT
TCAGACTGCTGCAGCCAAAGTGAAGAGGGAAGACATAACTGTTTTCTTGCACAC
AAAAAGCCCACTCCAGCATCGATCCCACTTTTCCAAGTTCCAGAACCTGTCAAA
GCTGTGAAGCATATGAAGAAGACAGGGAGACATTTCATGAACAAATTCATTTATG
AGATAGCAAGAAGGCATCCCTTCTGTATGCACCTACAATTCTTTTGGGCTGC
TCGCTATGACAAAATAATTCCATCTTGTGTGCAAAAGCTGAAAATGCAGTTGAATGC
TTCCAAACAAAGGCAGCAACAGTTTACAAAAGAAATTAAGAGAAAAGCAGCTTGTTA
AATCAACATGCATGTGCAGTAATGAAAAATTTTGGGACCCGAACCTTTCCAAGCCA
TAACTGTTACTAACTGAGTCAGAAAGTTTACCAAAGTTAATTTTACTGAAATCCA
GAAACTAGTCCTGGATGTGGCCCATGTACATGAGCACTGTTGCAGAGGAGATGT
GCTGGATTGTCTGCAGGATGGGGAAAAATCATGTCCTACATATGTTCTCAACAA
GACACTCTGTCAAAACAAAATAACAGAATGCTGCAAACTGACCACGCTGGAACGT
GGTCAATGTATAATTCATGCAGAAAATGATGAAAAACCTGAAGGTCTATCTCCA
AATCTAAACAGTTTTTAGGAGATAGAGATTTTAACCAATTTTCTTCAGGGGAAA
AAAATATCTTCTTGGCAAGTTTTGTTTCATGAATATTCAAGAAGACATCCTCAGCT
TGCTGTCTCAGTAATTCTAAGAGTTGCTAAAGGATACCAGGAGTTATTGGAGAAG
TGTTTCCAGACTGAAAACCTCTTGAATGCCAAGATAAAGGAGAAGAAGAATTA
CAGAAATACATCCAGGAGAGCCAAGCATTGGCAAGCGAAGCTGCGGCCCTCTTC
CAGAAACTAGGAGAATATTACTTACAAAATGCGTTTCTCGTTGCTTACACAAAAGA
AAGCCCCCAGCTGACCTCGTCGGAGCTGATGGCCATCACCAGAAAAATGGCAG
CCACAGCAGCCACTTGTGGCCAACTCAGTGAGGACAAACTATTGGCCTGTGGCGA
GGGAGCGGCTGACATTATTATCGGACACTTATGTATCAGACATGAAATGACTCCA
GTAAACCTGGTGTGGCCAGTGCTGCACTTCTTCATATGCCAACAGGAGGCCAT
GCTTCAGCAGCTTGGTGGTGGATGAAACATATGTCCCTCTGCATTCTCTGATGA
CAAGTTCAATTTCCATAAGGATCTGTGCCAAGCTCAGGGTGTAAGCGCTGCAAA
ATGAAGCAAGAGTTTCTCATTAACCTTGTGAAGCAAAAGCCACAAATAACAGAG
GAACAACTTGAGGCTGTCAATTGCAGATTTCTCAGGCCCTGTTGGAGAAAATGCTGCC
AAGGCCAGGAACAGGAAGTCTGCTTTGCTGAAGAGGGACAAAACCTGATTTCAA
AAACTCGTGCTGCTTTGGGAGTTTAA

hAFP137-145 (SEQ ID NO: 3)

PLFQVPEPV

hAFP158-166 (SEQ ID NO: 4)

FMNKFIYEI

hAFP325-334 (SEQ ID NO: 5)

GLSPNLNRFL

hAFP542-550 (SEQ ID NO: 6)

GVALQTMKQ

[0701]

hAFP158 A1 (SEQ ID NO: 7)
AMNKFIYEI

hAFP158 A3 (SEQ ID NO: 8)
FMAKFIYEI

hAFP158 A4 (SEQ ID NO: 9)
FMNAFIYEI

hAFP158 A5 (SEQ ID NO: 10)
FMNKAIYEI

hAFP158 A6 (SEQ ID NO: 11)
FMNKFAYEI

hAFP158 A7 (SEQ ID NO: 12)
FMNKFIAEI

hAFP158 A8 (SEQ ID NO: 13)
FMNKFIYAI

mAFP 단백질 (SEQ ID NO: 14)
MKWITPASLILLHFAASKALHENEFGIASTLDSSQCVTEKNVLSIATITFTQFVPEATE
EEVNKMTSDVLAAMKKNSGDGCLESQLSVFLDEICHETELSNKYGLSGCCSQSGVE
RHQCLLARKKTAPASVPPFQFPEPAESCKAHEENRAVFMNRFIYEVSRNPFFMYAPA
ILSLAAQYDKVVLACCKADNKEECFQTKRASIAKELREGSMLNEHVCVIRKFGSRN
LQATTIHKLSQKLTEANFTEIQKLALDVAHIHEECCQGSLECLQDGEKVMYICISQQ
NILSSKIAECCKLPMIQLGFCIIHAENGVKPEGLSLNPSQFLGDRNFAQFSSEEKIMFM
ASFLHEYSRTHPNLPVSILRIAKTYQEILEKCSQSGNLPGCQDNLEELQKHIESQA
LSKQSCALYQTLGDYKLNFLIGYTRKAPQLTSAELIDLTGKMVSIASSTCCQLSEEK
WSGCGEGMADIFIGHLCIRNEASPVNSGISHCCNSSYSNRRLCITSFLRDETYAPPPFS
EDKFIFHKDLCAQGKALQTMKQELLINLVKQKPELTEEQLAAVTADFSGLLEKCKK
AQDQEVCFTEEGPKLISKTRDALGV

[0702]

mAFP CDS (SEQ ID NO: 15)

ATGAAGTGGATCACACCCGCTTCCTCATCCTCCTGCTACATTTTCGCTGCGTCCA
AAGCATTGCACGAAAATGAGTTTGGGATAGCTTCCACGTTAGATTCCCTCCAGTG
CGTGACGGAGAAGAATGTGCTTAGCATAGCTACCATCACCTTTACCCAGTTTGT
CCGGAAGCCACCGAGGAGGAAGTGAACAAAATGACTAGCGATGTGTTGGCTGCA
ATGAAGAAAACTCTGGCGATGGGTGTTTAGAAAAGCCAGCTATCTGTGTTTCTGG
ATGAAATTTGTCATGAGACGGAACCTCTAACAAGTATGGACTCTCAGGCTGCTG
CAGCCAAAGTGGAGTGGAAAAGACATCAGTGTCTGCTGGCACGCAAGAAGACTGC
TCCGCGCTCTGTCCCACCCTTCCAGTTTCCAGAACCTGCCGAGAGTTGCAAAGCA
CATGAAGAAAACAGGGCAGTGTTTCATGAACAGGTTTCATCTATGAAGTGTCAAGG
AGGAACCCCTTCATGTATGCCCCAGCCATTCTGTCTTGGCTGCTCAGTACGACA
AGGTCGTTCTGGCATGCTGCAAAGCTGACAACAAGGAGGAGTGCTTCCAGACAA
AGAGAGCATCCATTGCAAAAGGAATTAAGAGAAGGAAGCATGTAAATGAGCATG
TATGTTTCAGTGATAAGAAAATTTGGATCCCGAAACCTCCAGGCAACAACCATTAT
TAAGCTAAGTCAAAAAGTTAACTGAAGCAAAATTTACTGAGATTCAGAAGCTGGC
CCTGGATGTGGCTCACATCCACGAGGAGTGTGCAAGGAACTCGCTGGAGTG
TCTGCAGGATGGGGAAAAAGTCATGACATATATATGTTCTCAACAAAATATTCTG
TCAAGCAAAATAGCAGAGTGCTGCAAAATACCCATGATCCAACTAGGCTTCTGCA
TAATTCACGCAGAGAAATGGCGTCAAAACCTGAAGGCTTATCTCTAAATCCAAGCCA
GTTTTTGGGAGACAGAAATTTGCCCAATTTCTTCAGAGGAAAAAATCATGTTT
ATGGCAAGCTTCTTCATGAATACTCAAGAACTACCCCAACCTTCTGTCTCAG
TCATTCTAAGAATTGCTAAAACGTACCAGGAAATATTGGAGAAGTGTTCCAGTC
TGGAATCTACCTGGATGTCTAGGACAATCTGGAAGAAGAATTGCAGAAACACAT
CGAGGAGAGCCAGGCATGTCCAAGCAAAGCTGCGCTCTCTACCAGACCTTAGG
AGACTACAAATTACAAAATCTGTTCTTATTGGTTACACGAGGAAAAGCCCTCAG
CTGACCTCAGCAGAGCTGATCGACCTCACCGGAAGATGGTGAGCATTGCCTCC
ACGTGCTGCCAGCTCAGCGAGGAGAAATGGTCCGGCTGTGGTGAGGGAATGGCC
GACATTTTCATTGGACATTTGTGTATAAGGAATGAAGCAAGCCCTGTGAACTCTG
GTATCAGCCACTGCTGCAACTCTTCGTATTCCAACAGGAGGCTATGCATCACCAG
TTTTCTGAGGGATGAAACCTATGCCCCCTCCCCATTCTCTGAGGATAAATTCATCT
TCCACAAGGATCTGTGCCAAGCTCAGGGCAAAGCCCTACAGACCATGAAACAAG
AGCTTCTCATTAACCTGGTGAAGCAAAAGCCTGAAGTACAGAGGAGCAGCTGG
CGGCTGTCACTGCAGATTTCTCGGGCCTTTTGGAGAAAGTGCTGCAAAAGCCAGGA
CCAGGAAGTCTGTTTCACAGAAGAGGGTCCAAAGTTGATTTCCAAAACCTCGTGAT
GCTTTGGGCGTTTAA

mAFP154-162 (SEQ ID NO: 16)

FMNRFIYEV

클론 17 중쇄 가변 도메인, 단백질 (SEQ ID NO: 17)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYN
GNTNYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARYQDWWYLGQFD
QWGQGLVTVSS

클론 33 중쇄 가변 도메인, 단백질 (SEQ ID NO: 18)

QVQLQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRS
KWNNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARGSYYSGRYDAWG
QGTLVTVSS

[0703]

클론 44 중쇄 가변 도메인, 단백질 (SEQ ID NO: 19)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGT
ANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREIRGYYYYYYGMVDW
GQGTTVTVSS

클론 48 중쇄 가변 도메인, 단백질 (SEQ ID NO: 20)

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNS
GRIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARADDYGAPYYYYG
MDVWGQGTITVTSS

클론 50 중쇄 가변 도메인, 단백질 (SEQ ID NO: 21)

QVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGGSISSSNWWSWVRQPPGKGLEWIGEIIHSGS
TNYNPSLKSRTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYGGYFDYWQGGLV
TVSS

클론 52 중쇄 가변 도메인, 단백질 (SEQ ID NO: 22)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYN
GNTNYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDSSYYYYYGMVDV
WGQGTITVTSS

클론 61 중쇄 가변 도메인, 단백질 (SEQ ID NO: 23)

EVQLVQSGAEVKKPGESLTISCKASGYSPNYWITWVRQMSGGGLEWMGRIDPGDS
YTTYNPSFQGHVTISIDKSTNTAYLHWNSLKASDTAMYYCARYYVSLVDIWQGGLV
TVSS

클론 76 중쇄 가변 도메인, 단백질 (SEQ ID NO: 24)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGFIRSKA
YGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQMNNLKTEDTAVYYCARDGLYSSSWYDS
DYWGQGLVTVSS

클론 79 중쇄 가변 도메인, 단백질 (SEQ ID NO: 25)

QMQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNS
GSIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIHSGSYYGLLYYA
MDVWGQGTITVTSS

클론 17-13 중쇄 가변 도메인, 단백질 (SEQ ID NO: 26)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYN
GNTNYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARFQDWWYLGQFD
QWGQGLVTVSS

클론 17 경쇄 가변 도메인, 단백질 (SEQ ID NO: 27)

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTATGSDVGYYVSWYQQHPGKAPKVMIDVGNRP
PGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDADYYCASYTNRNSLGYVFGTGKVTVLG

클론 33 경쇄 가변 도메인, 단백질 (SEQ ID NO: 28)

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNQRP
SGVPDRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSTVVFGGGKLTVLG

[0704]

클론 44 경쇄 가변 도메인, 단백질 (SEQ ID NO: 29)

SYELTQPPSVSVAPGKTARITCGGDNIGTKSVTWYQQRPGQAPMMVIYYDTPRPSGI
PERLSGNSNGNTATLTITRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHPVFVGGGKLTVLG

클론 48 경쇄 가변 도메인, 단백질 (SEQ ID NO: 30)

QSVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPS
GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLGSGVFGTGTKVTVLG

클론 50 경쇄 가변 도메인, 단백질 (SEQ ID NO: 31)

QSVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQKPGQAPVLVIYYDSRPSGIP
ERFSGNSNGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFVGGGKLTVLG

클론 52 경쇄 가변 도메인, 단백질 (SEQ ID NO: 32)

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGHYPYWFQKPGQAPRTLIYDASDKH
SWTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCLLSYSDALVFVGGGKLTVLG

클론 61 경쇄 가변 도메인, 단백질 (SEQ ID NO: 33)

QSVLTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVNNRP
SEVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCQSYTTGSRVFGGKLTVLG

클론 76 경쇄 가변 도메인, 단백질 (SEQ ID NO: 34)

QSVVTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSG
IPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDGSLYTMLFVGGGKLTVLG

클론 79 경쇄 가변 도메인, 단백질 (SEQ ID NO: 35)

QSVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIFGNSNRPS
GVPDRFSGFKSGTSASLAITGLQAEDEADYFCQSYDSSLGSGVFGTGTKVTVLG

클론 17-13 경쇄 가변 도메인, 단백질 (SEQ ID NO: 36)

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTATGSDVGYYYVSWYQQHPGKAPKVMYDNDNR
PGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCASYTNRNSLGYYVFGTGTKVTVLG

클론 17 중쇄 가변 도메인, 핵산 (SEQ ID NO: 37)

GAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTG
AAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGG
TGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACA
ATGGTAACACAACTATGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAG
ACACATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACA
CGGCCGTGTATTACTGTGCGCGCTACCAGGACTGGTGGTACCTGGGTCAGTTCGA
TCAGTGGGGTCAAGGTACTCTGGTGACCGTCTCTCTCA

클론 33 중쇄 가변 도메인, 핵산 (SEQ ID NO: 38)

[0705]

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTC
TCACTCACCTGTGCCATTTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGCTGCTTGGG
ACTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACT
ACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCAT
CAACCCAGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAACCTGTGACTCCC
GAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGCGCGGTTCTTACTACTCTGGTCGTTACG
ATGCTTGGGGTCAAGGTACTCTGGTGACCGTCTCCTCA

클론 44 중쇄 가변 도메인, 핵산 (SEQ ID NO: 39)

CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTG
AAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGG
TGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCT
TTGGTACAGCAAACTACGCACAGAAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGG
ACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACA
CGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAAATTAGGGGCTACTACTACTACTACGGTAT
GGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

클론 48 중쇄 가변 도메인, 핵산 (SEQ ID NO: 40)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTATGCCATGCACTGGGT
CCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAACAG
TGGTAGAATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGA
CAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACAC
GGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGCCGATGACTACGGCGCCCCCTACTACTACTAC
GGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

클론 50 중쇄 가변 도메인, 핵산 (SEQ ID NO: 41)

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGGGACCCCTG
TCCCTCACCTGCGCTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTAACTGGTGGAGTT
GGGTCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCTATCATA
GTGGGAGCACCAACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAG
ACAAGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACA
CGGCCGTGTATTACTGTGCGACCGGTTATGGGGGGTACTTTGACTACTGGGGCCA
GGGAACCCCTGGNACCGTCTCCTCA

클론 52 중쇄 가변 도메인, 핵산 (SEQ ID NO: 42)

GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTG
AAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGG
TGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACA
ATGGTAACACAACTATGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAG
ACACATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACA
CGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATTCTACTACTACTACTACGGTATGGACGT
CTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

클론 61 중쇄 가변 도메인, 핵산 (SEQ ID NO: 43)

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAGCCTGGCGAGAGCCTG
ACCATCTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACAGCTTCCCCAACTACTGGATCACCTGGG
TGCGCCAGATGTCCGGCGGAGGCCTGGAATGGATGGGCAGAAATCGACCCCGGCG
ACAGCTACACAACCTACAACCCAGCTTCCAGGGCCACGTGACCATCAGCATCG
ACAAGAGCACCAATACCGCTACCTGCACTGGAACAGCCTGAAGGCCTCCGACA
CCGCCATGTACTACTGCGCCCCGTACTATGTGTCCCTGGTGGATATCTGGGGCCA
GGGCACACTCGTGACCGTGTCTAGC

[0706]

클론 76 중쇄 가변 도메인, 핵산 (SEQ ID NO: 44)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGCCTGGGGGGTCCCTT
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAACGCCTGGATGAGCTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTAGGTTTCATTAGAAGCAAAG
CTTATGGTGGGACAACAGAATACGCCGCCTCTGTGAAAGGCAGATTACCATCTC
AAGAGATGATTCCAAAAGCATCGCCTATCTGCAAATGAACAACCTGAAAACCGA
GGACACAGCCGTGTATTACTGTGCTAGAGATGGGCTGTATAGCAGCAGCTGGTA
CGATTCTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA

클론 79 중쇄 가변 도메인, 핵산 (SEQ ID NO: 45)

CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTATGCCATGCACTGGGT
CCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAG
TGGTAGCATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGAC
AACGCCAAGAAGTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACG
GCCTTGTATTACTGTGCAAAAGATATCCATAGTGGGAGCTACTACGGCCTACTCT
ACTACGCTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACACGGTCACCGTCTCCTCA

클론 17-13 중쇄 가변 도메인, 핵산 (SEQ ID NO: 46)

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTG
AAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACCAGCTACGGCATCAGCTGG
GTGCGCCAGGCTCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCTGGATCAGCGCCTAC
AACGGCAATACCAACTACGCCAGAACTGCAGGGCAGAGTGACCATGACCACC
GACACCAGCACCTCCACCGCTACATGGAAGTGGGAGCCTGAGAAGCGACGAC
ACCGCCGTGTACTATTGCGCCCGGTTCCAGGACTGGTGGTATCTGGGCCAGTTCC
ACCAGTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCTAGC

클론 17 경쇄 가변 도메인, 핵산 (SEQ ID NO: 47)

CAATCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCA
CCATCTCCTGCACTGCAACCGGCAGTGACGTTGGTGTATTACTATGTCTCCTGG
TACCAACAACACCCAGGCAAGCCCCAAAGTGATGATTTATGATGTCGGTAAT
CGGCCCCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCT
CCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCGCCTC
ATATACAAACAGGAACAGTCTCGGCTATGTCTTCGGAACCGGGACCAAGGTCAC
CGTCCTAGG

클론 33 경쇄 가변 도메인, 핵산 (SEQ ID NO: 48)

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGGAAGACGGTAA
CCATCTCCTGCACCCGAGCAGTGGCAGCATTGCCAGCAACTATGTGCAGTGGTA
CCAGCAGCGCCCGGGCAGTTCACCCCACTGTGATCTATGAGGATAACCAAAG
ACCTCTGGGGTCCCTGATCGGTTCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAACCTCTG
CCTCCCTCACCATCTCTGGACTGAAGACTGAGGACGAGGCTGACTACTACTGTCA
GTCTTATGATAGCAGCACCGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA
GGT

[0707]

클론 44 경쇄 가변 도메인, 핵산 (SEQ ID NO: 49)

TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCACTGGCCCCCTGGCAAGACGGCCA
GGATTACCTGTGGGGGTGACAACATTGGAACATAAAGTGTGACCTGGTACCAAC
AGAGGCCAGGCCAGGCCCTATGATGGTCATCTATTATGATACCGTCCGGCCCTC
AGGGATCCCTGAGCGACTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACGGCCACCCTGACC
ATCACCAGGGTCGAAGCCGGGGATGAGGCCGACTATTACTGTCAGGTGTGGGAT
AGTAGTAGTGATCATCCGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT

클론 48 경쇄 가변 도메인, 핵산 (SEQ ID NO: 50)

CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCGGGGCAGAGGGTC
ACCATCTCCTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATGATGTACACT
GGTACCAGCAGCTTCCAGGAACAGCCCCAACTCCTCATCTATGGTAACAGCA
ATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGC
CTCCCTGGCCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGCCAG
TCCTATGACAGCAGCCTGAGTGGTTCAGTCTTCGGAACCTGGGACCAAGGTCACCG
TCCTAGGT

클론 50 경쇄 가변 도메인, 핵산 (SEQ ID NO: 51)

CAGTCTGTGTTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCACTGGCCCCAGGAAAGACGGCC
AGGATTACCTGTGGGGGAAACAACATTGGAAGTAAAGTGTGCACTGGTACCAG
CAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCATCTATTATGATAGCGACCGGCCCT
CAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACGGCCACCCTGAC
CATCAGCAGGGTTCGAAGCCGGGGATGAGGCCGACTATTACTGTCAGGTGTGGGA
TAGTAGTAGTGATCATGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT

클론 52 경쇄 가변 도메인, 핵산 (SEQ ID NO: 52)

CAGGCTGTGGTGACTCAGGAGCCCTCACTGACTGTGTCCCCAGGAGGGACAGTC
ACTCTCACCTGTGGCTCCAGCACTGGAGCTGTACCAAGTGGTCATTATCCCTACT
GGTTCCAGCAGAAGCCTGGCCAAGCCCCCAGGACACTGATTTATGATGCAAGCG
ACAAACACTCCTGGACACCTGCCCCGTTTCTCAGGCTCCCTCCTTGGGGGCAAAGC
TGCCCTGACCCTTTCGGGTGCGCAGCCTGAGGATGAGGCTGAGTATTACTGCTTG
CTCTCCTATAGTGATGCTCTGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAG
GT

클론 61 경쇄 가변 도메인, 핵산 (SEQ ID NO: 53)

CAGAGCGTGCTGACACAGCCTGCCTCCGTGTCTGGCTCTCCTGGCCAGTCCATCA
CCATCAGCTGTACCGGCACCAGCTCCGACGTGGGCGGCTACAATTACGTGTCCTG
GTATCAGCAGCATCCCGGCAAGGCCCAAGCTGATGATCTACGACGTGAACAA
CCGGCCCAGCGAGGTGTCCAACAGATTTCAGCGGCAGCAAGAGCGGCAACACCGC
CAGCCTGACAATCAGCGGACTGCAGGCCGAGGACGAGGCCGACTACTACTGCAG
CAGCTACACCACCGGCAGCAGAGCCGTGTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGACAGT
GCTGGGC

[0708]

클론 76 경쇄 가변 도메인, 핵산 (SEQ ID NO: 54)

CAGTCTGTCTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACAGAAGGTC
ACCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATAATTATGTATCCTGGT
ACCAGCAGCTCCCAGGAACAGCCCCAACTCCTCATTATGACAATAATAAGC
GACCTCTAGGGATTCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACGTCAGCCAC
CCTGGGCATCACCGGACTCCAGACTGGGGACGAGGCCGATTACTACTGCGGAAC
ATGGGATGGCAGCCTCTATACTATGTTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTC
CTAGGT

클론 79 경쇄 가변 도메인, 핵산 (SEQ ID NO: 55)

CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCAGAGGGTC
ACCATCTCCTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATGATGTACACT
GGTACCAGCAGCTTCCAGGAACAGCCCCAACTCCTCATCTTTGGTAACAGCAA
TCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTTCAAGTCTGGCACCTCAGCC
TCCCTGGCCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGATGAGGCTGACTATTTCTGCCAGT
CGTATGACAGTAGCCTGAGTGGTTCGGGGGTCTTCGGAAGTGGGACCAAGGTCA
CCGTCCTAGGT

클론 17-13 경쇄 가변 도메인, 핵산 (SEQ ID NO: 56)

CAGAGCGCCCTGACACAGCCTGCCTCCGTGTCTGGATCTCCCGGCCAGAGCATCA
CCATCAGCTGCACAGCCACCGGCTCCGACGTGGGCGTGTACTACTACGTGTCCTG
GTATCAGCAGCATCCCGGCAAGGCCCCCAAAGTGATGATCTACGACGTGGACAA
CCGGCCTCCCGGCGTGTCCAATAGATTACGCGGCAGCAAGAGCGGCAACACCGC
CAGCCTGACAATCAGCGGACTGCAGGCCGAGGACGAGGCCGATTACTACTGCGC
CAGCTACACCAACCGGAACAGCCTGGGCTACGTGTTTCGGCACCGGCACCAAAGT
GACAGTGCTGGGC

클론 17 HCDR1 (SEQ ID NO: 57)

GYTFTSYG

클론 33 HCDR1 (SEQ ID NO: 58)

VSSNSAAWN

클론 44 HCDR1 (SEQ ID NO: 59)

GGTFSSYA

클론 48 HCDR1 (SEQ ID NO: 60)

GFTFDDYA

클론 50 HCDR1 (SEQ ID NO: 61)

GGSISSSNW

클론 52 HCDR1 (SEQ ID NO: 62)

GYTFTSYG

클론 61 HCDR1 (SEQ ID NO: 63)

GYSEPNYW

[0709]

클론 76 HCDR1 (SEQ ID NO: 64)
GFTFSNAW

클론 79 HCDR1 (SEQ ID NO: 65)
GFTFDDYA

클론 17-13 HCDR1 (SEQ ID NO: 66)
GYTFTSYG

클론 17 HCDR2 (SEQ ID NO: 67)
ISAYNGNT

클론 33 HCDR2 (SEQ ID NO: 68)
YRSKWYN

클론 44 HCDR2 (SEQ ID NO: 69)
IIPFGTA

클론 48 HCDR2 (SEQ ID NO: 70)
ISWNSGRI

클론 50 HCDR2 (SEQ ID NO: 71)
IYHSGST

클론 52 HCDR2 (SEQ ID NO: 72)
ISAYNGNT

클론 61 HCDR2 (SEQ ID NO: 73)
IDPGDSYT

클론 76 HCDR2 (SEQ ID NO: 74)
IRSKAYGGTT

클론 79 HCDR2 (SEQ ID NO: 75)
ISWNSGSI

클론 17-13 HCDR2 (SEQ ID NO: 76)
ISAYNGNT

클론 17 HCDR3 (SEQ ID NO: 77)
ARYQDWWYLGQFDQ

클론 33 HCDR3 (SEQ ID NO: 78)
ARGSYYSGRYDA

클론 44 HCDR3 (SEQ ID NO: 79)
AREIRGYYYYYGMDV

[0710]

클론 48 HCDR3 (SEQ ID NO: 80)
ARADDYGAPYYYYGMDV

클론 50 HCDR3 (SEQ ID NO: 81)
ATGYGGYFDY

클론 52 HCDR3 (SEQ ID NO: 82)
ARDSYYYYYGMDV

클론 61 HCDR3 (SEQ ID NO: 83)
ARYYVSLVDI

클론 76 HCDR3 (SEQ ID NO: 84)
ARDGLYSSSWYDSDY

클론 79 HCDR3 (SEQ ID NO: 85)
AKDIHSGSYYGLLYYAMDV

클론 17-13 HCDR3 (SEQ ID NO: 86)
ARFQDWWYLGQFDQ

HCCDR1 컨센서스 (SEQ ID NO: 87)
G-F/Y-S/T-F-D/S/T-D/N/S-Y/A-A/G/W

HCCDR2 컨센서스 (SEQ ID NO: 88)
I/S-K/S-X-H/Y-X-G-X-T

HCCDR3 컨센서스 (SEQ ID NO: 89)
A/G-X-W/Y-Y-X-X-X-F/Y-D

클론 17 LCDR1 (SEQ ID NO: 90)
GSDVGVYYY

클론 33 LCDR1 (SEQ ID NO: 91)
SGSIASNY

클론 44 LCDR1 (SEQ ID NO: 92)
NIGTKS

클론 48 LCDR1 (SEQ ID NO: 93)
SSNIGAGYD

클론 50 LCDR1 (SEQ ID NO: 94)
NIGSKS

클론 52 LCDR1 (SEQ ID NO: 95)
TGAVTSGHY

[0711]

클론 61 LCDR1 (SEQ ID NO: 96)
SSDVGGYNY

클론 76 LCDR1 (SEQ ID NO: 97)
SSNIGNNY

클론 79 LCDR1 (SEQ ID NO: 98)
SSNIGAGYD

클론 17-13 LCDR1 (SEQ ID NO: 99)
GSDVGVYYY

클론 17 LCDR2 (SEQ ID NO: 100)
DVG

클론 33 LCDR2 (SEQ ID NO: 101)
EDN

클론 44 LCDR2 (SEQ ID NO: 102)
YDT

클론 48 LCDR2 (SEQ ID NO: 103)
GNS

클론 50 LCDR2 (SEQ ID NO: 104)
YDS

클론 52 LCDR2 (SEQ ID NO: 105)
DAS

클론 61 LCDR2 (SEQ ID NO: 106)
DVN

클론 76 LCDR2 (SEQ ID NO: 107)
DNN

클론 79 LCDR2 (SEQ ID NO: 108)
GNS

클론 17-13 LCDR2 (SEQ ID NO: 109)
DVD

클론 17 LCDR3 (SEQ ID NO: 110)
ASYTNRNSLGYV

클론 33 LCDR3 (SEQ ID NO: 111)
QSYDSSTVV

[0712]

클론 44 LCDR3 (SEQ ID NO: 112)
QVWDSSSDHPV

클론 48 LCDR3 (SEQ ID NO: 113)
QSYDSSLGSGV

클론 50 LCDR3 (SEQ ID NO: 114)
QVWDSSSDHVV

클론 52 LCDR3 (SEQ ID NO: 115)
LLSYSDALV

클론 61 LCDR3 (SEQ ID NO: 116)
SSYTTGSRV

클론 76 LCDR3 (SEQ ID NO: 117)
GTWDGSLYTML

클론 79 LCDR3 (SEQ ID NO: 118)
QSYDSSLGSGV

클론 17-13 LCDR3 (SEQ ID NO: 119)
ASYTNRNSLGYV

LCCDR1 컨센서스 (SEQ ID NO: 120)
S/T-G/S-D/N-I/V-A/G-A/S/V-X-H/Y

LCCDR3 컨센서스 (SEQ ID NO: 121)
Q-S/T-Y/W-D/T-S/T-A/S

IF130 대조군 (SEQ ID NO: 122)
LLDVPTAAV

BTG2 대조군 (SEQ ID NO: 123)
TLWVDPYEV

BCR 대조군 (SEQ ID NO: 124)
FLLDHLKRV

IF130 대조군 (SEQ ID NO: 125)
LLLDVPTAAV

SSR1 대조군 (SEQ ID NO: 126)
VLFRGGPRGLLAV

PPP2R1B 대조군 (SEQ ID NO: 127)
SLLPAIVEL

[0713]

DDX5 대조군 (SEQ ID NO: 128)
YLLPAIVHI

CTSG 대조군 (SEQ ID NO: 129)
FLLPTGAEA

CD247 대조군 (SEQ ID NO: 130)
LLDPKLCYLL

DMTN 대조군 (SEQ ID NO: 131)
SLPHFHHPET

CALR 대조군 (SEQ ID NO: 132)
MLLSVPLLLG

PIM1 대조군 (SEQ ID NO: 133)
LLYDMVCGDIP

IFI30 대조군 (SEQ ID NO: 134)
LLLDVPTAAVQ

IFI30 대조군 (SEQ ID NO: 135)
LLLDVPTAAVQA

SSR1 대조군 (SEQ ID NO: 136)
VLFRGGPRGLLAVA

HLA-E 대조군 (SEQ ID NO: 137)
MVDGTLLLL

RPS6KB1 대조군 (SEQ ID NO: 138)
YMAPEILMRS

CSF2RA 대조군 (SEQ ID NO: 139)
FIYNADLMNC

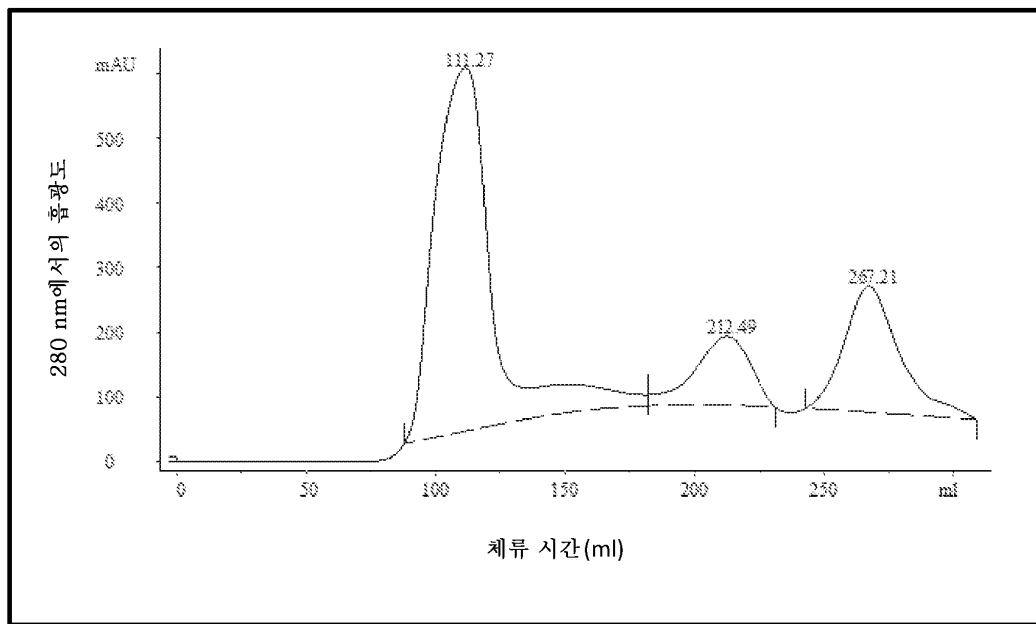
IL7 대조군 (SEQ ID NO: 140)
KQYESVLMVSI

hTERT540 대조군 (SEQ ID NO: 141)
ILAKFLHWL

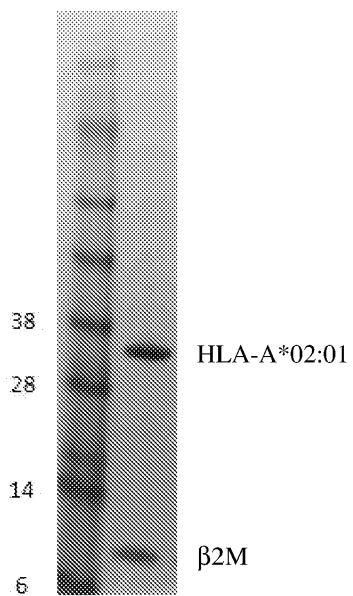
[0714]

도면

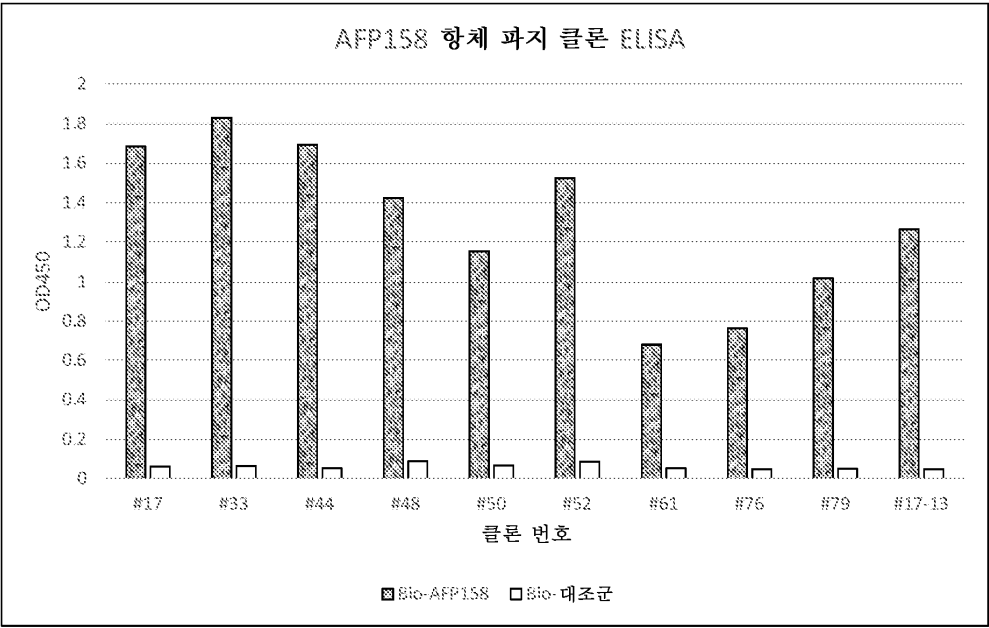
도면1



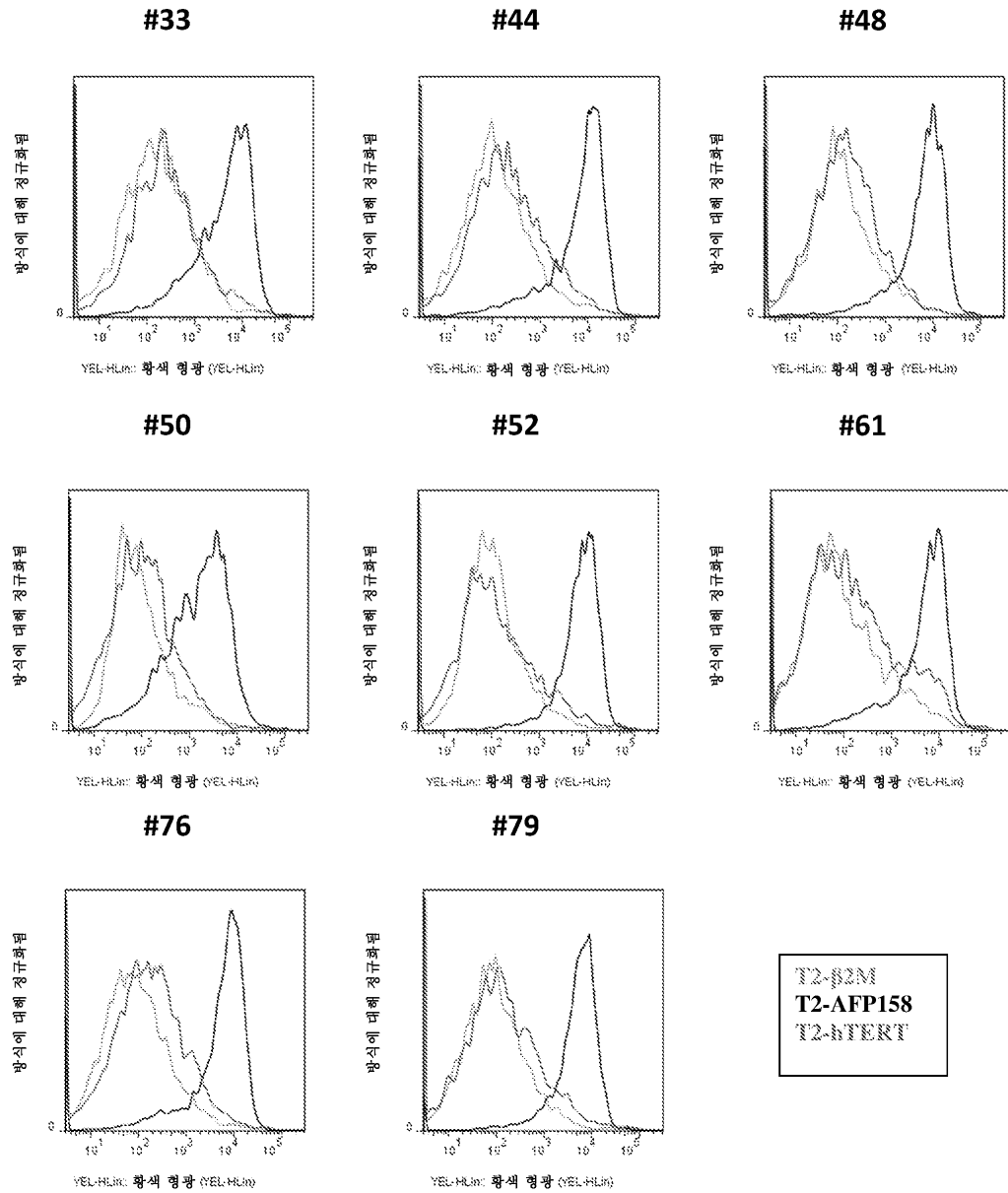
도면2



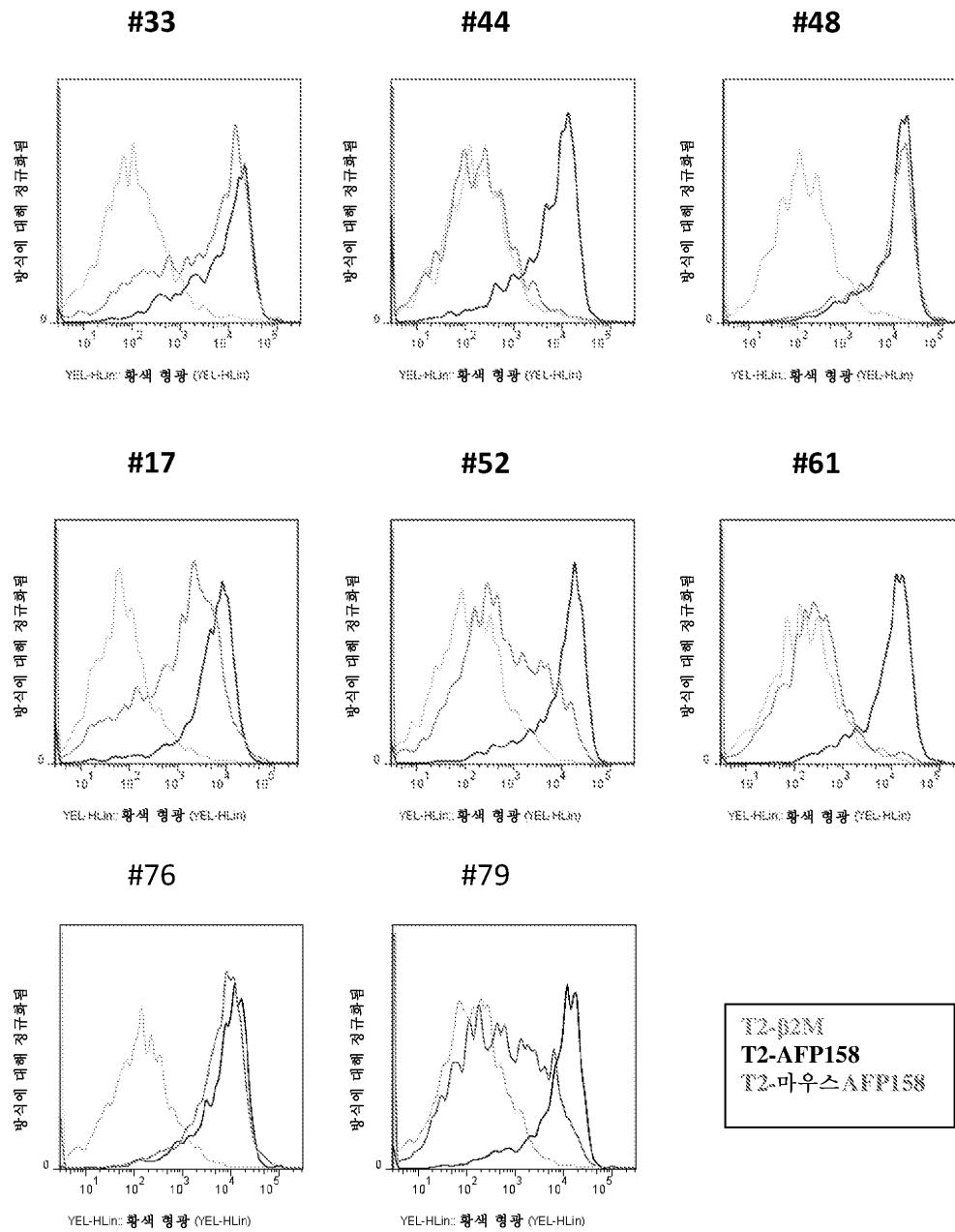
도면3



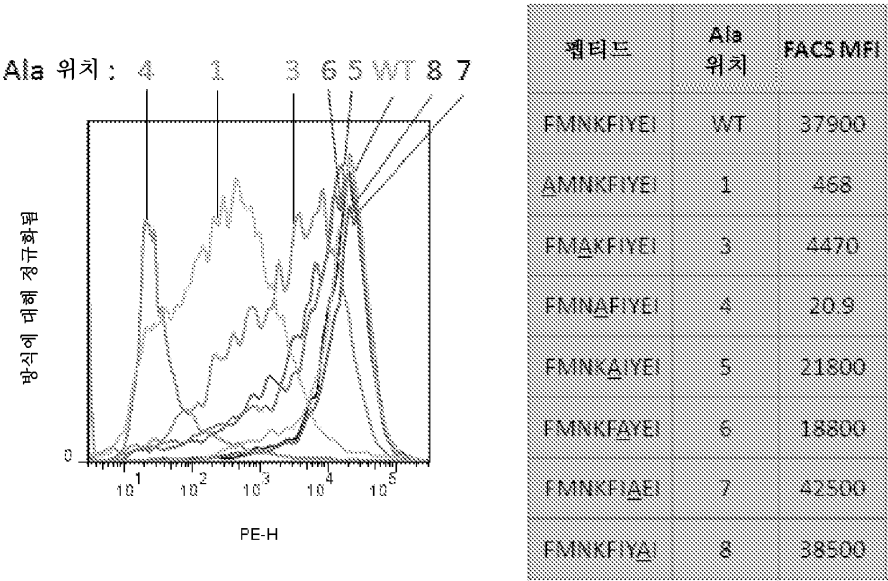
도면4



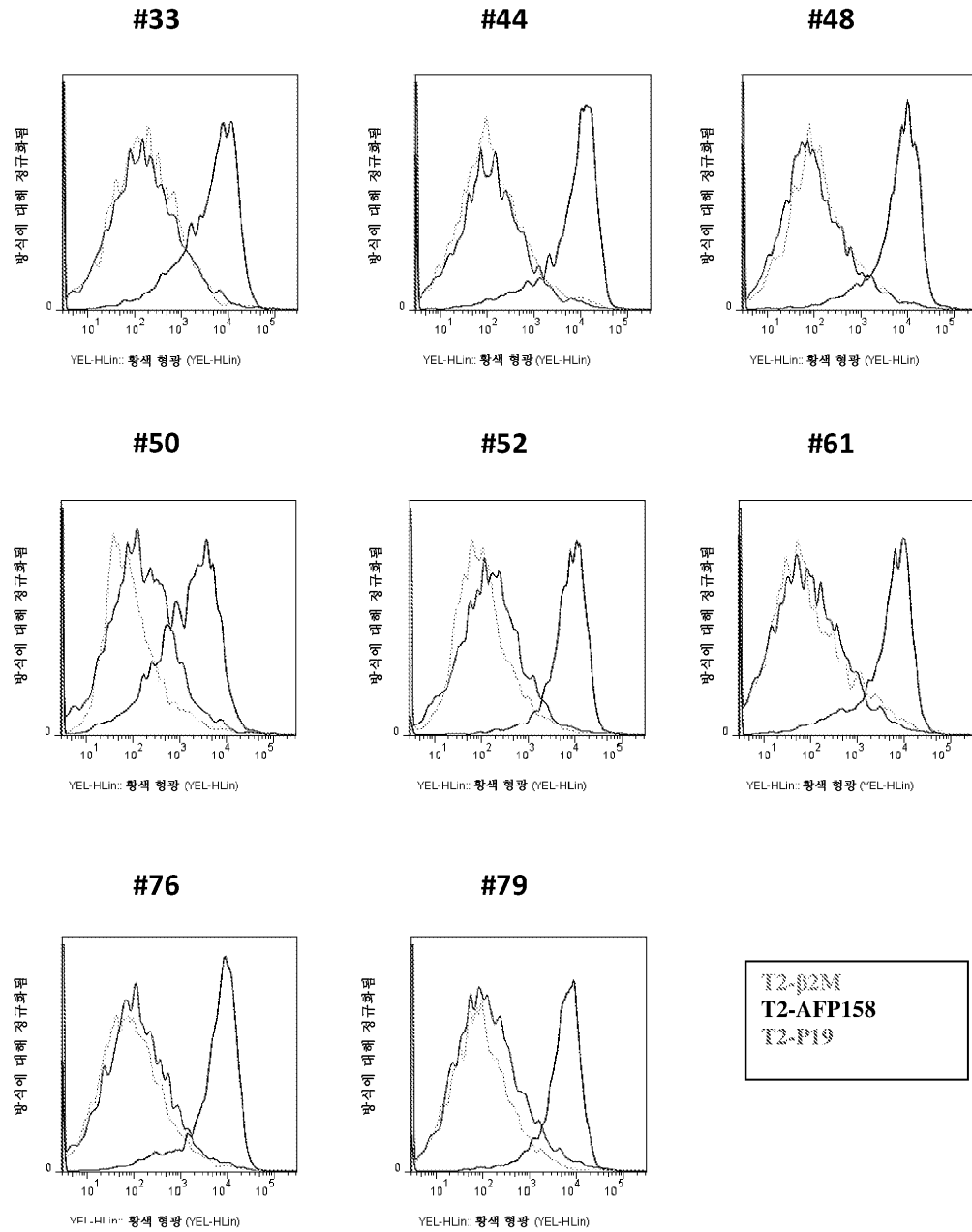
도면5



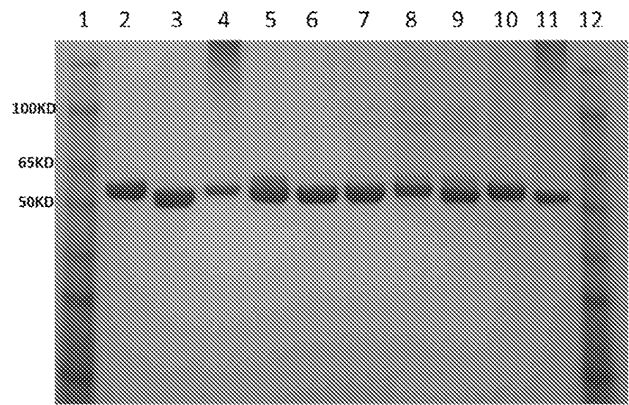
도면6



도면7

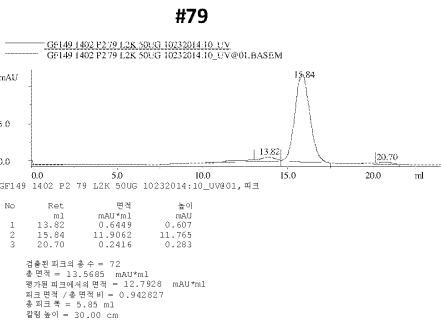
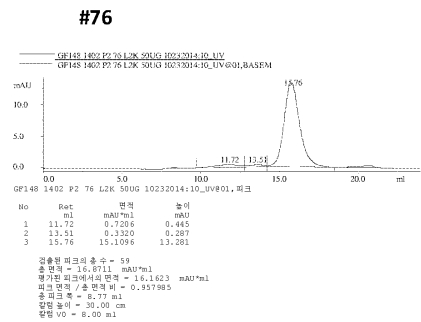
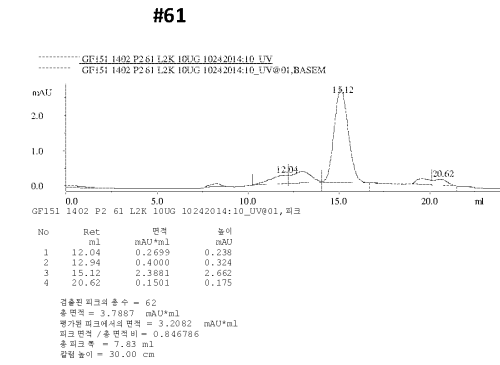
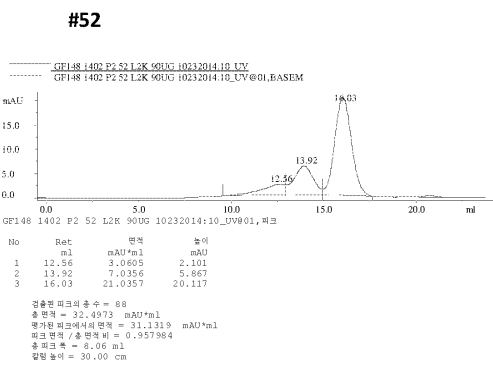


도면8

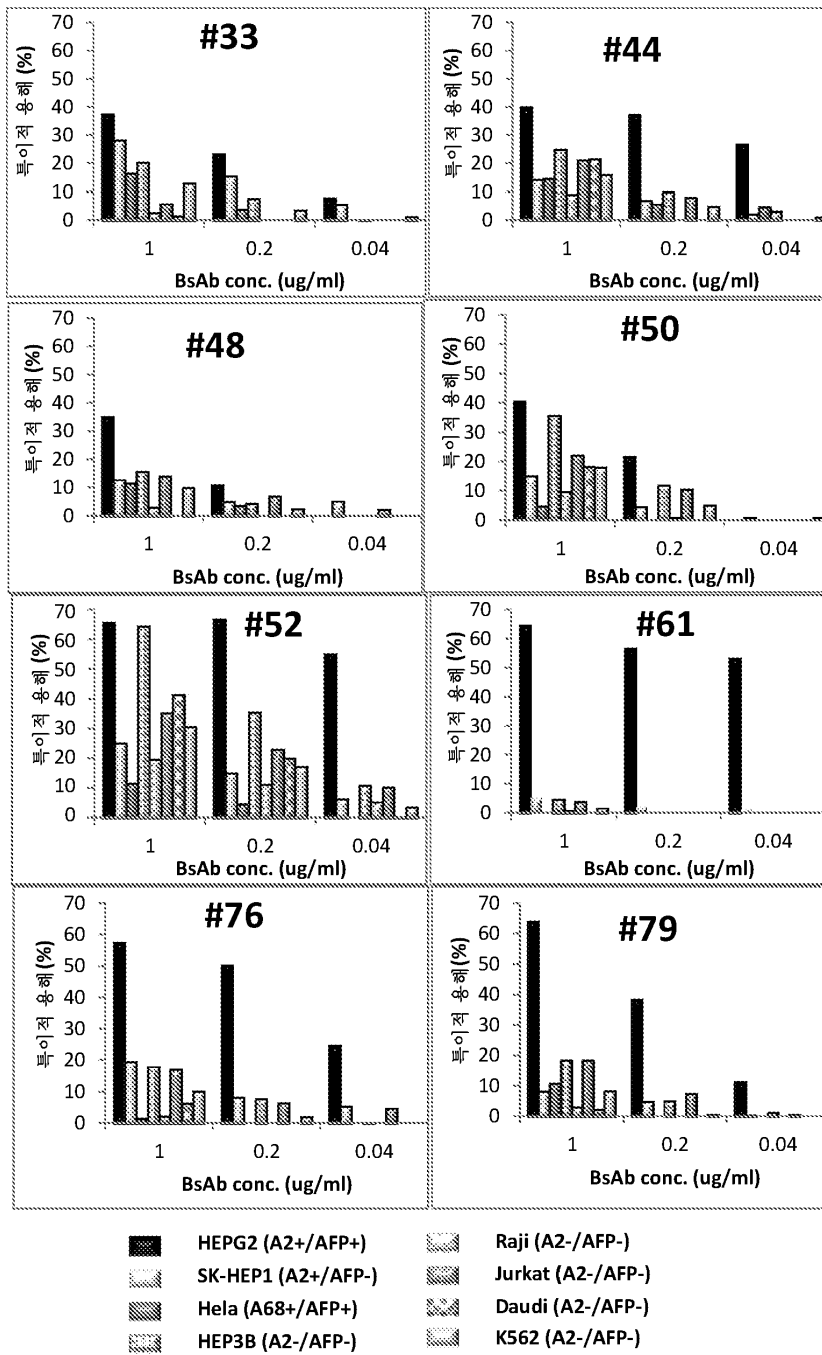


- 레인: {L2K BiTE에 대해 각각 4ug}
1. 씨발루 플러스 사전-염색된 표준물
 2. 1402-48 (환원됨)
 3. 1402-50 (환원됨)
 4. 1402-52 (환원됨)
 5. 1402-54 (환원됨)
 6. 1402-62 (환원됨)
 7. 1402-67 (환원됨)
 8. 1402-68 (환원됨)
 9. 1402-69 (환원됨)
 10. 1402-73 (환원됨)
 11. 1402-74 (환원됨)
 12. 씨발루 플러스 사전-염색된 표준물

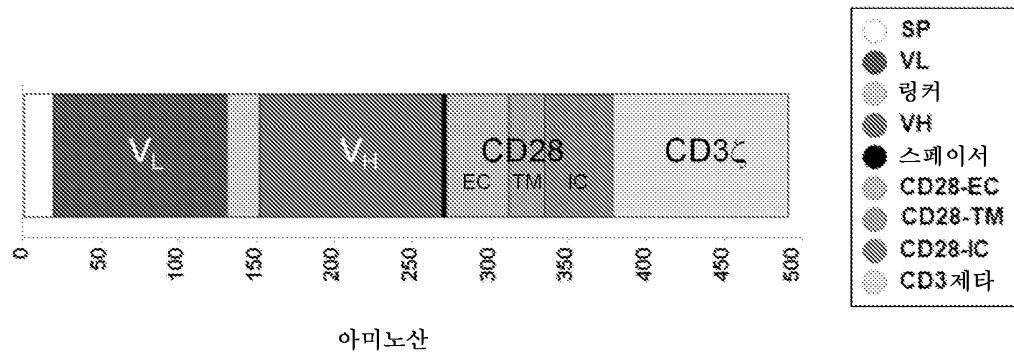
도면9



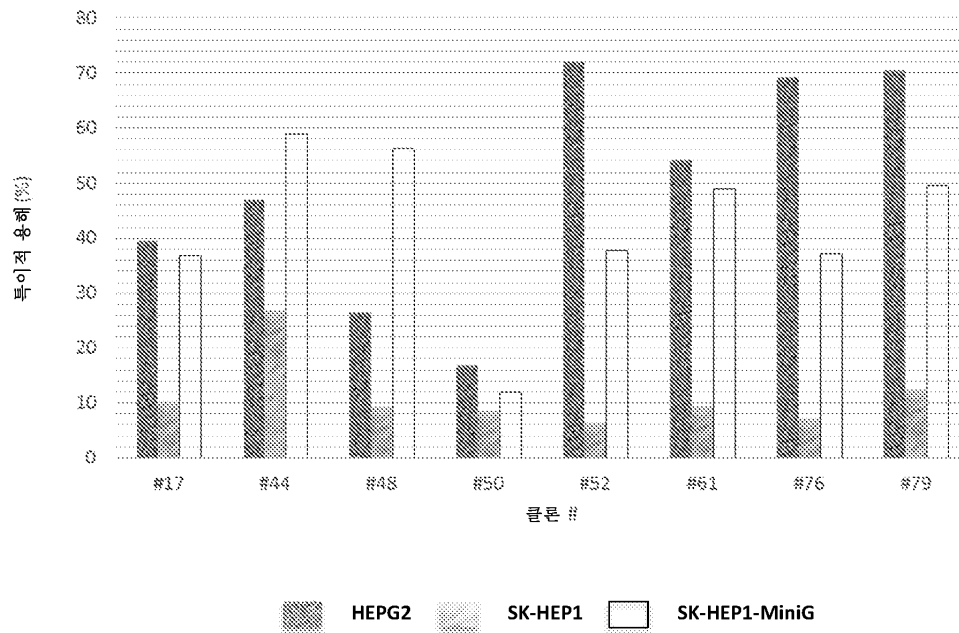
도면10



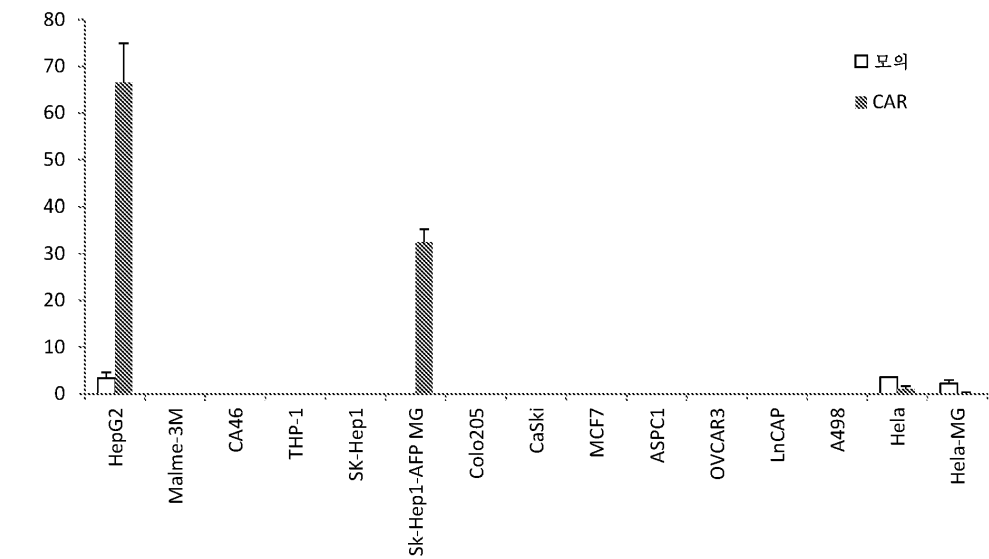
도면11



도면12

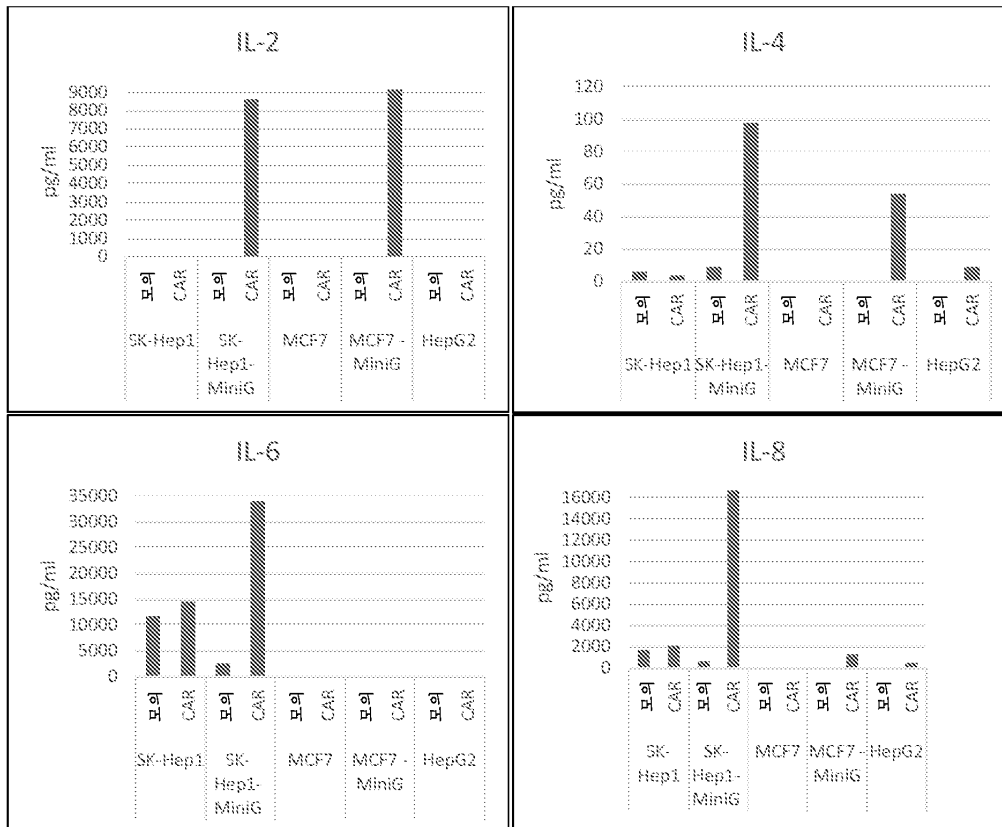


도면13

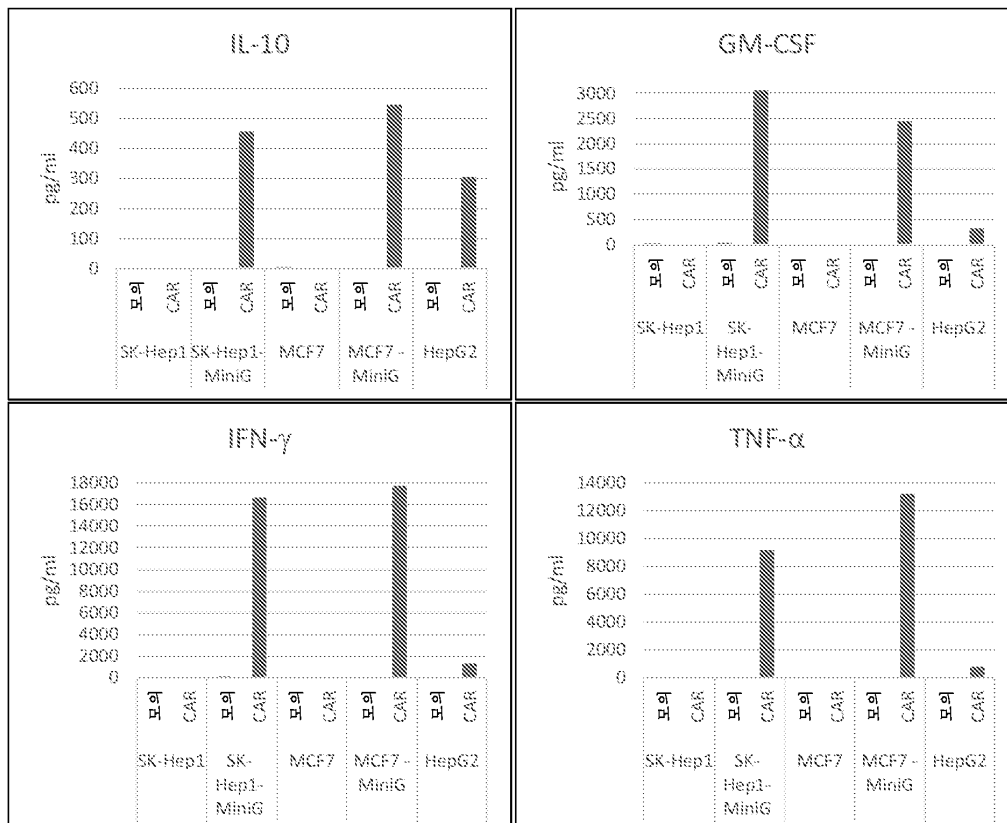


세포주	HepG2	Malme-3M	CA46	THP-1	SK-Hep1	SK-Hep1-MiniG	Colo205	CaSki	MCF7	ASPC1	OVCAR3	LnCAP	A498	HeLa	HeLa-MiniG
조직	간	피부	혈	혈	간	간	결장	자궁경부	유방	췌장	난소	전립선	신장	자궁경부	자궁경부
AFP	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
HLA-A02	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-

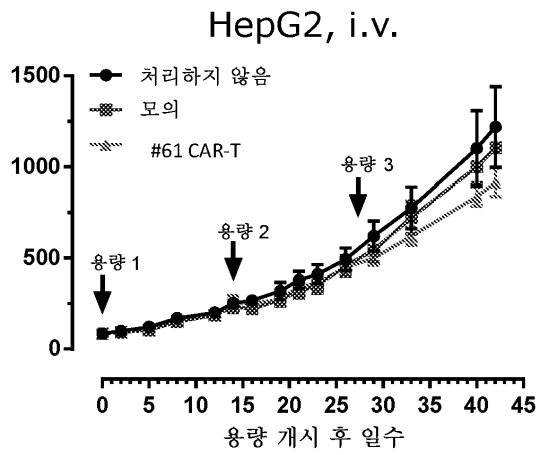
도면14a



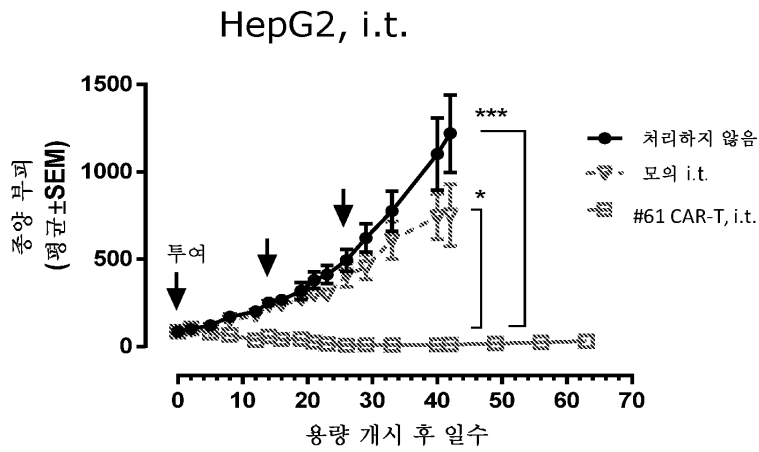
도면14b



도면15a



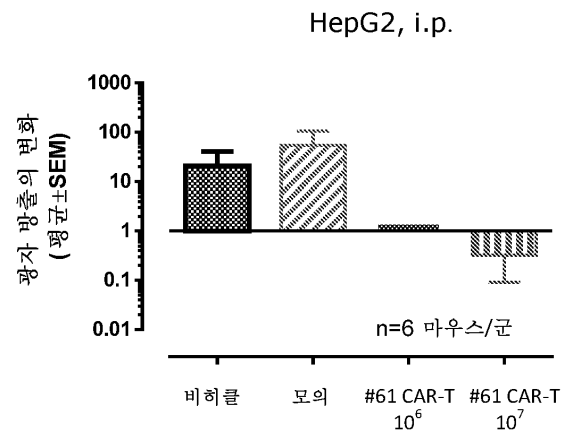
도면15b



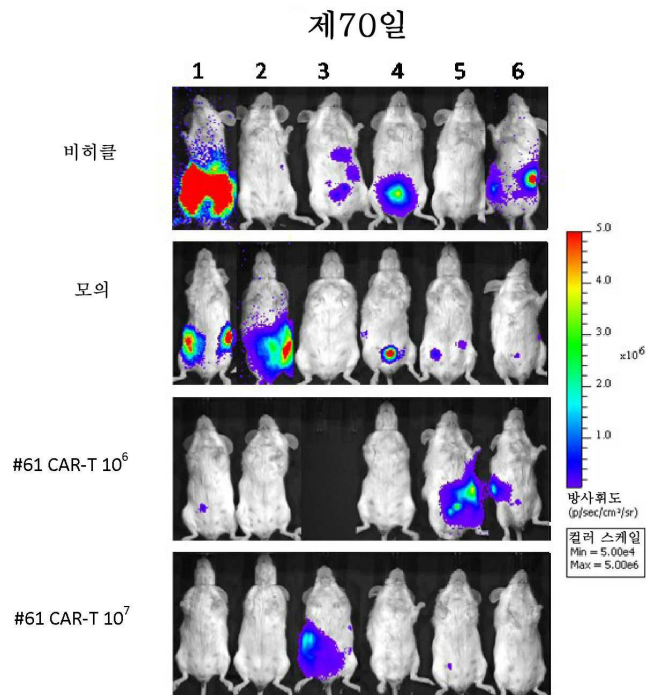
* 던넛 검정, $P<0.05$

*** 던넛 검정, $P<0.001$

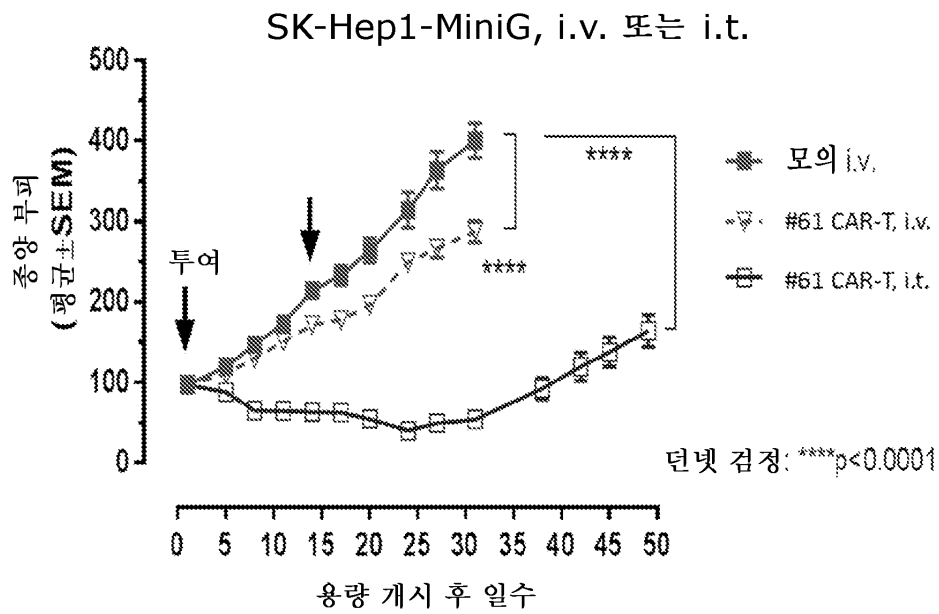
도면16a



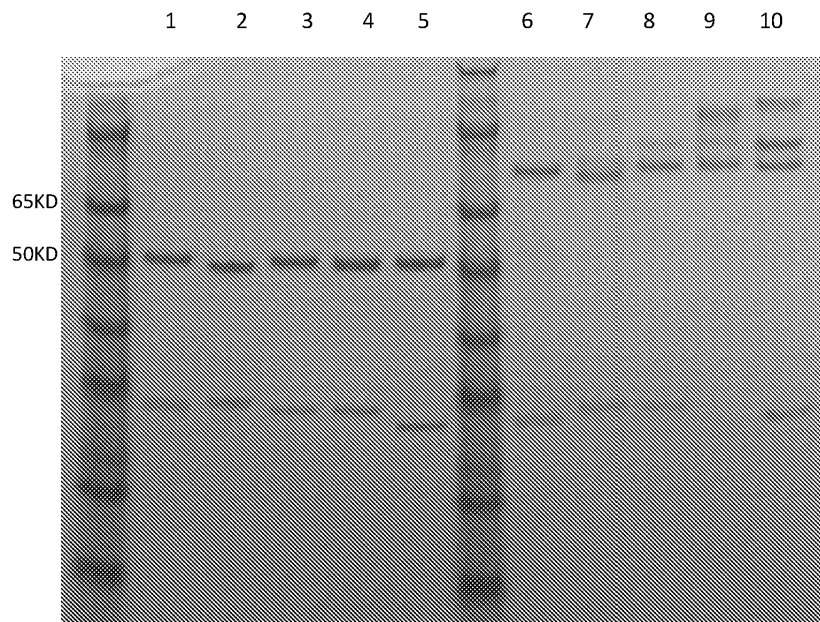
도면16b



도면17

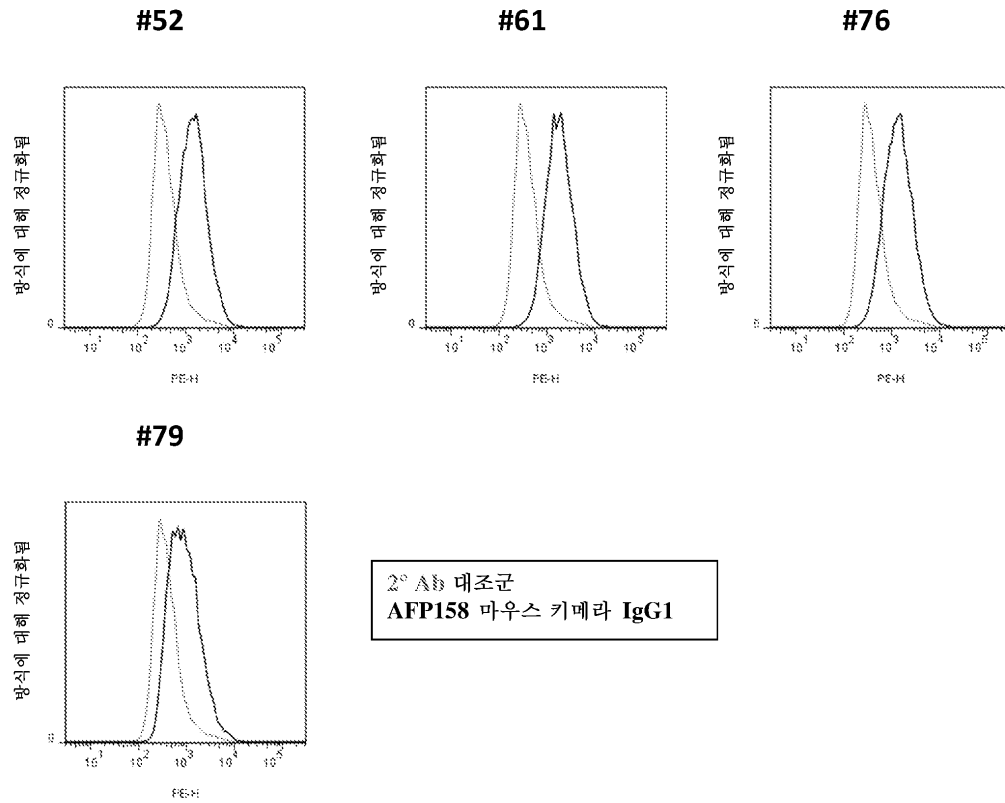


도면18

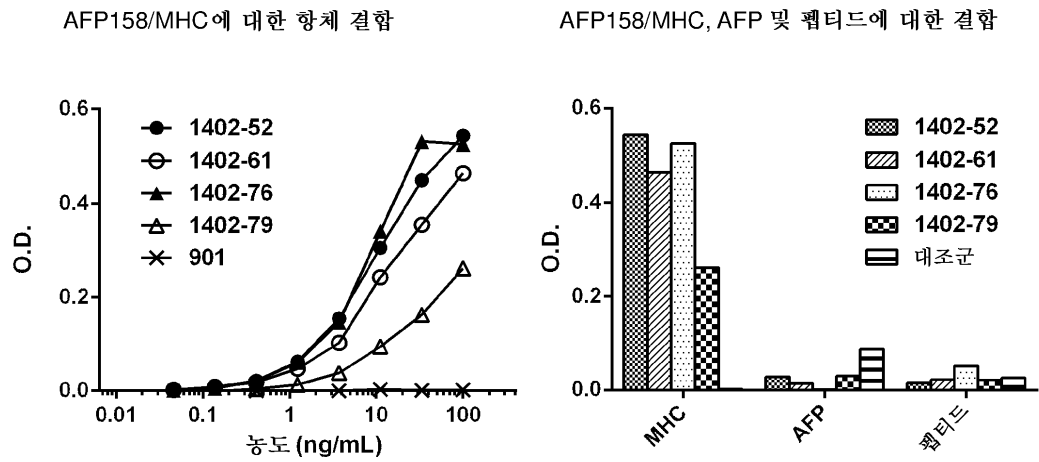


1. ET1402 mlgG1 52, 환원됨.
2. ET1402 mlgG1 61, 환원됨.
3. ET1402 mlgG1 76, 환원됨.
4. ET1402 mlgG1 79, 환원됨.
5. ET1402 mlgG1 대조군 항체, 환원됨.
6. ET1402 mlgG1 52, 비-환원됨, 가열하지 않음.
7. ET1402 mlgG1 61, 비-환원됨, 가열하지 않음.
8. ET1402 mlgG1 76, 비-환원됨, 가열하지 않음.
9. ET1402 mlgG1 79, 비-환원됨, 가열하지 않음.
10. ET1402 mlgG1 대조군 항체, 비-환원됨, 가열하지 않음.

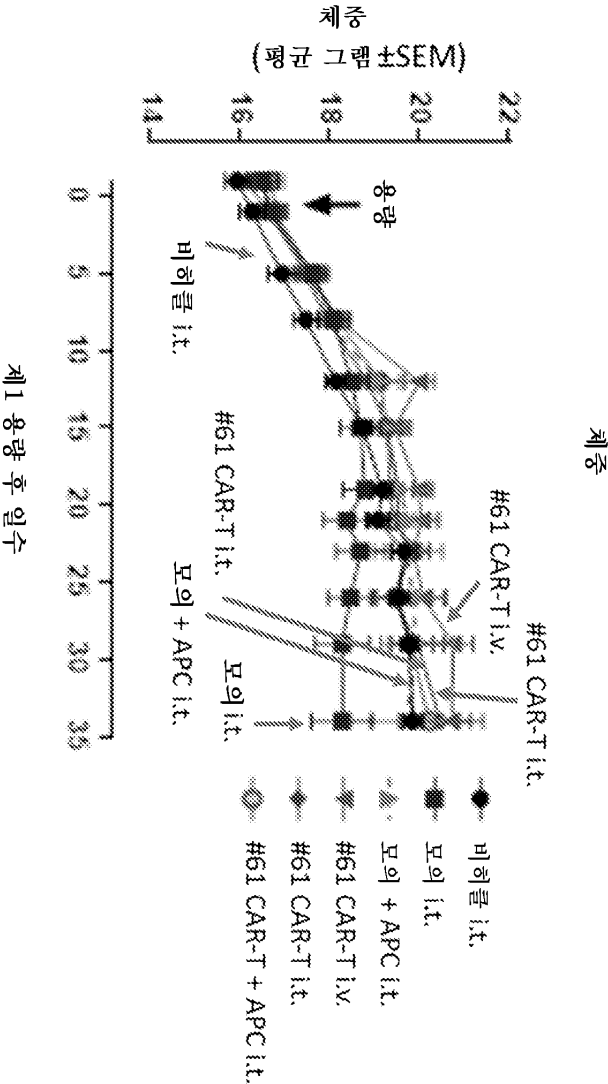
도면19



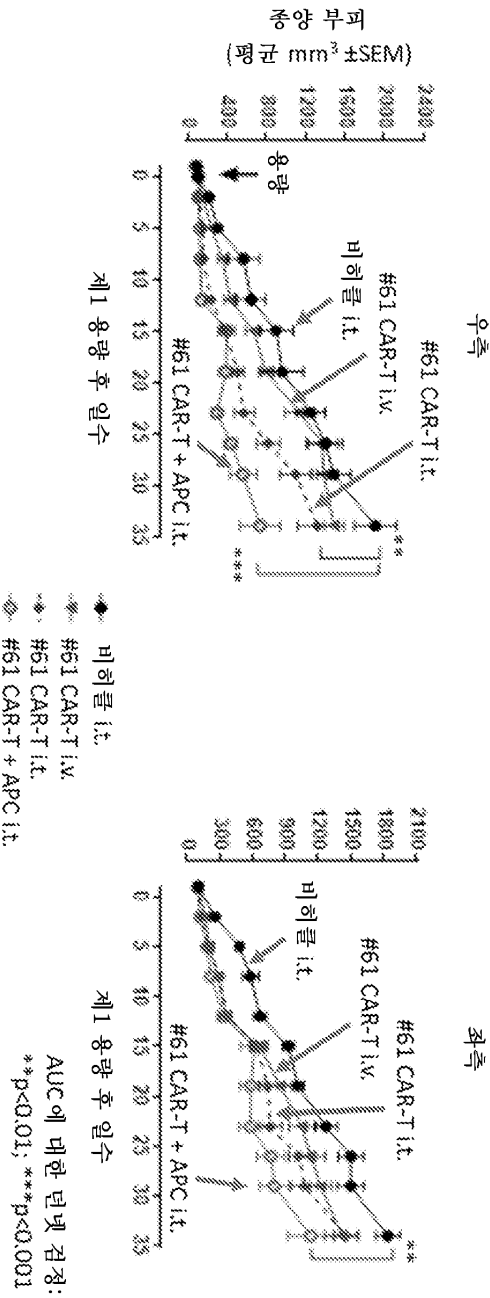
도면20



도면21

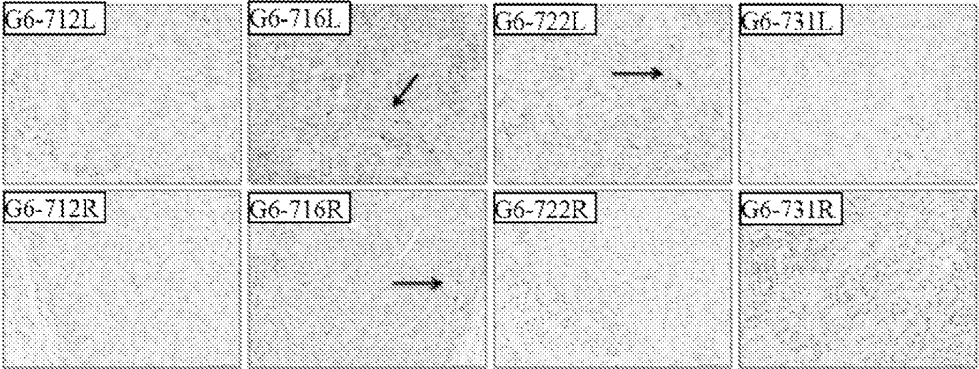


도면22



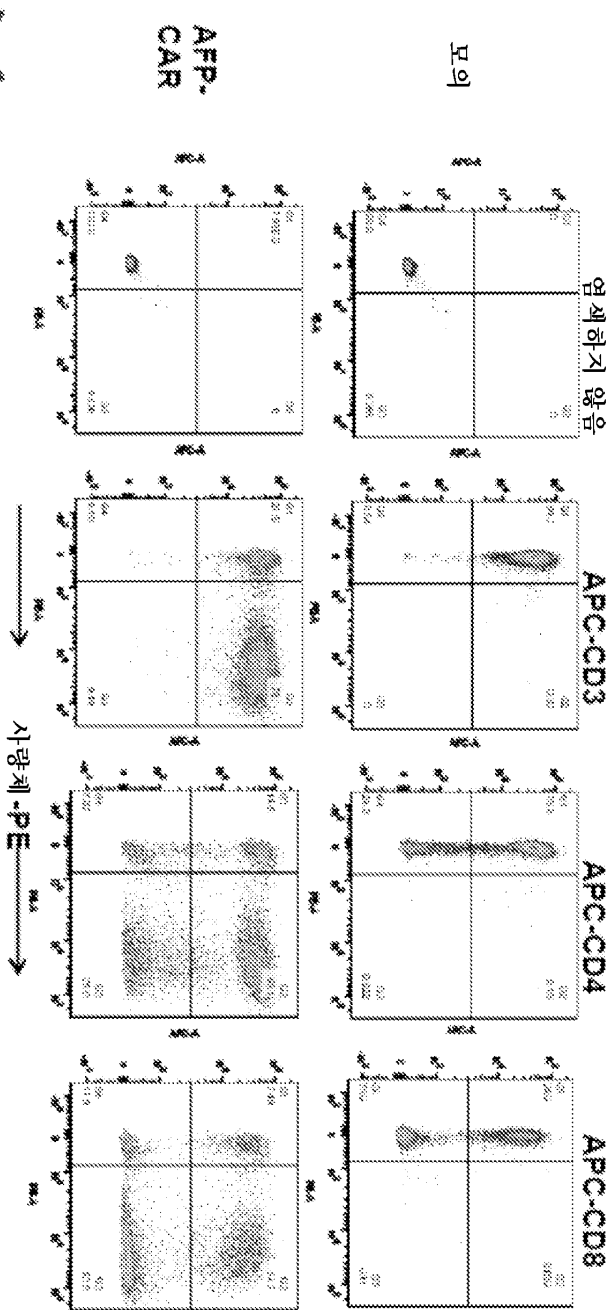
도면23

SK-Hep1-MG 종양: 군 6

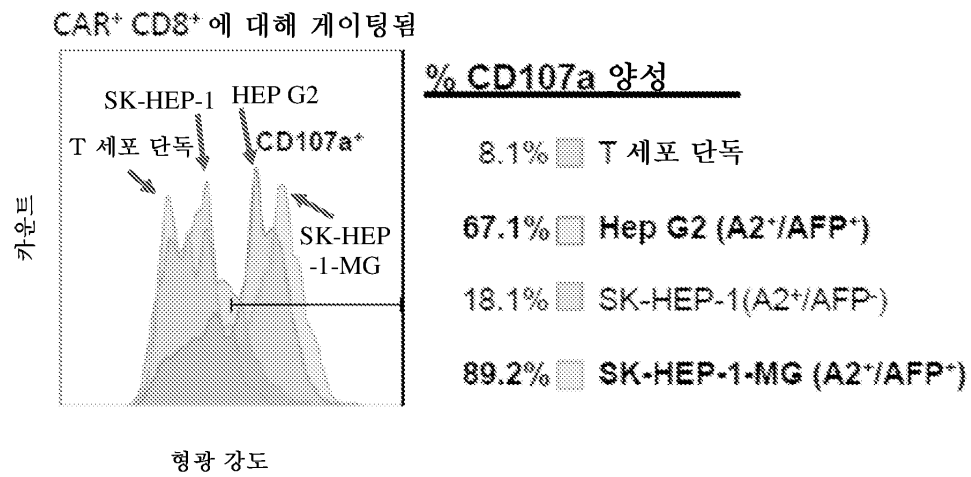


바이오케어 항-인간 CD3 (1:50), pH 6.2 Ag 회수, 바이오케어 유니버설 디텍션, 20X

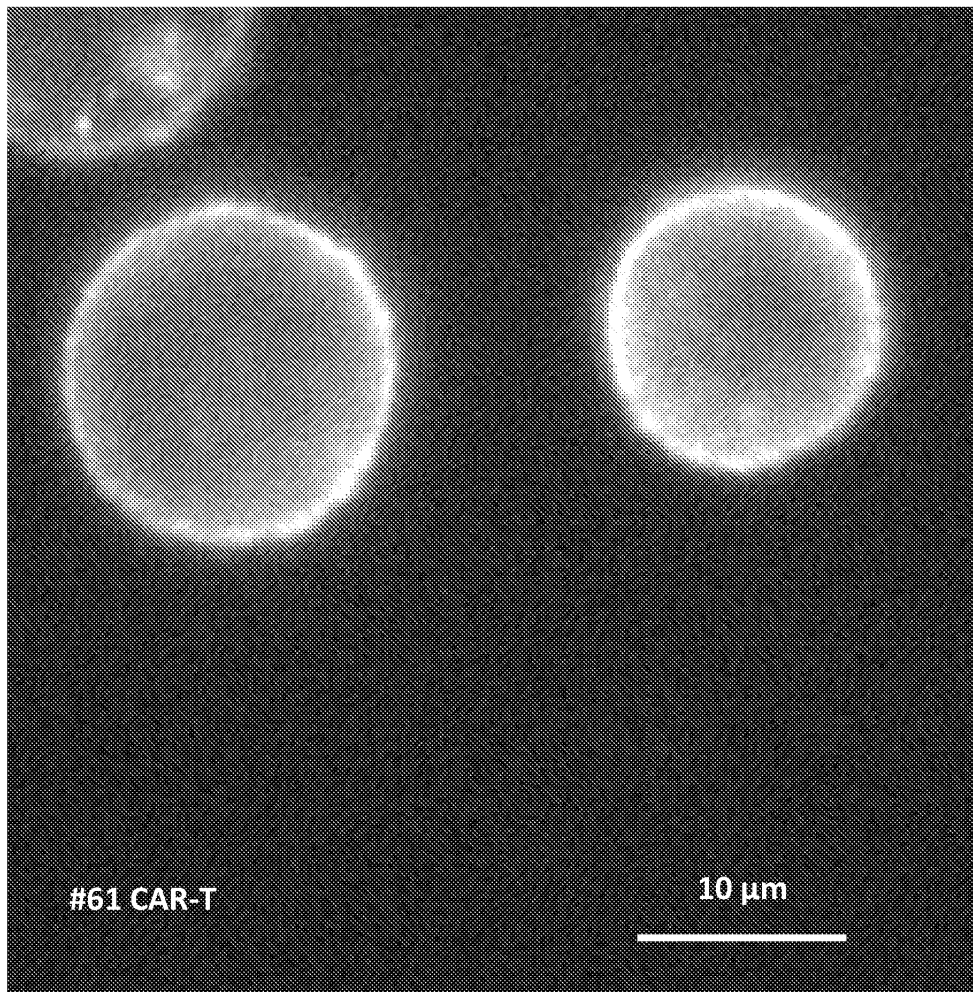
도면24



도면25



도면26



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Liu, Cheng

Liu, Hong
 Xu, Yiyang
 Xiang, Jingyi
 Long, Li

<120> CONSTRUCTS TARGETING AFP PEPTIDE/MHC
 COMPLEXES AND USES THEREOF

<130> 750042000140

<140> Not Yet Assigned

<141> Concurrently Herewith

<150> US 62/142,958

<151> 2015-04-03

<150> US 62/244,653

<151> 2015-10-21

<150> US 62/304,915

<151> 2016-03-07

<160> 141

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211>

609

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Lys Trp Val Glu Ser Ile Phe Leu Ile Phe Leu Leu Asn Phe Thr

1 5 10 15

Glu Ser Arg Thr Leu His Arg Asn Glu Tyr Gly Ile Ala Ser Ile Leu

20 25 30

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

35 40 45

Ile Phe Phe Ala Gln Phe Val Gln Glu Ala Thr Tyr Lys Glu Val Ser

50 55 60

Lys Met Val Lys Asp Ala Leu Thr Ala Ile Glu Lys Pro Thr Gly Asp

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

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

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

 245 250 255
 Lys Leu Val Leu Asp Val Ala His Val His Glu His Cys Cys Arg Gly
 260 265 270
 Asp Val Leu Asp Cys Leu Gln Asp Gly Glu Lys Ile Met Ser Tyr Ile
 275 280 285
 Cys Ser Gln Gln Asp Thr Leu Ser Asn Lys Ile Thr Glu Cys Cys Lys
 290 295 300
 Leu Thr Thr Leu Glu Arg Gly Gln Cys Ile Ile His Ala Glu Asn Asp

 305 310 315 320

Glu Lys Pro Glu Gly Leu Ser Pro Asn Leu Asn Arg Phe Leu Gly Asp
 325 330 335
 Arg Asp Phe Asn Gln Phe Ser Ser Gly Glu Lys Asn Ile Phe Leu Ala
 340 345 350
 Ser Phe Val His Glu Tyr Ser Arg Arg His Pro Gln Leu Ala Val Ser
 355 360 365
 Val Ile Leu Arg Val Ala Lys Gly Tyr Gln Glu Leu Leu Glu Lys Cys
 370 375 380
 Phe Gln Thr Glu Asn Pro Leu Glu Cys Gln Asp Lys Gly Glu Glu Glu
 385 390 395 400
 Leu Gln Lys Tyr Ile Gln Glu Ser Gln Ala Leu Ala Lys Arg Ser Cys
 405 410 415
 Gly Leu Phe Gln Lys Leu Gly Glu Tyr Tyr Leu Gln Asn Ala Phe Leu
 420 425 430
 Val Ala Tyr Thr Lys Lys Ala Pro Gln Leu Thr Ser Ser Glu Leu Met
 435 440 445
 Ala Ile Thr Arg Lys Met Ala Ala Thr Ala Ala Thr Cys Cys Gln Leu
 450 455 460
 Ser Glu Asp Lys Leu Leu Ala Cys Gly Glu Gly Ala Ala Asp Ile Ile
 465 470 475 480
 Ile Gly His Leu Cys Ile Arg His Glu Met Thr Pro Val Asn Pro Gly
 485 490 495
 Val Gly Gln Cys Cys Thr Ser Ser Tyr Ala Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510
 Ser Ser Leu Val Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Pro Ala Phe Ser Asp
 515 520 525
 Asp Lys Phe Ile Phe His Lys Asp Leu Cys Gln Ala Gln Gly Val Ala
 530 535 540
 Leu Gln Thr Met Lys Gln Glu Phe Leu Ile Asn Leu Val Lys Gln Lys
 545 550 555 560
 Pro Gln Ile Thr Glu Glu Gln Leu Glu Ala Val Ile Ala Asp Phe Ser

565 570 575
Gly Leu Leu Glu Lys Cys Cys Gln Gly Gln Glu Gln Glu Val Cys Phe

580 585 590
Ala Glu Glu Gly Gln Lys Leu Ile Ser Lys Thr Arg Ala Ala Leu Gly

595 600 605
Val

<210> 2

<211> 1830

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atgaagtggg tggaatcaat tttttaatt ttctactaa attttactga atccagaaca 60
ctgcatagaa atgaatatgg aatagcttcc atattggatt cttaccaatg tactgcagag 120

ataagtttag ctgacctggc taccatatit ttgcccagt ttgttcaaga agccacttac 180
aaggaagtaa gcaaatggt gaaagatgca ttgactgcaa ttgagaaacc cactggagat 240
gaacagtctt cagggtgttt agaaaaccag ctacctgcct ttctggaaga actttgccat 300
gagaaagaaa ttttgagaa gtacggacat tcagactgct gcagccaaag tgaagaggga 360
agacataact gttttcttgc acacaaaaag ccactccag catcgatccc acttttcaa 420
gttcagaac ctgtcacaag ctgtgaagca tatgaagaag acagggagac attcatgaac 480
aaattcattt atgagatagc aagaaggcat cccttctgt atgcacctac aattcttctt 540
tggtctgctc gctatgaca aataattcca tcttgctgca aagctgaaaa tgcagttgaa 600

tgcttccaaa caaaggcagc aacagttaca aaagaattaa gagaaagcag ctgtttaaat 660
caacatgcat gtgcagtaat gaaaaattt gggacccgaa ctttccaagc cataactgtt 720
actaaactga gtcagaagtt taccaaagtt aattttactg aaatccagaa actagtcctg 780
gatgtggccc atgtacatga gcactgttgc agaggagatg tgctggattg tctgcaggat 840
ggggaaaaaa tcatgtccta catatgttct caacaagaca ctctgtcaaa caaaataaca 900
gaatgctgca aactgaccac gctggaacgt ggtcaatgta taattcatgc agaaaatgat 960
gaaaaacctg aaggtctatc tccaaatcta aacaggtttt taggagatag agattttaac 1020
caattttctt caggggaaaa aaatatcttc ttggcaagtt ttgttcatga atattcaaga 1080

agacatctc agcttgctgt ctcagtaatt ctaagattg ctaaaggata ccaggagtta 1140
ttggagaagt gttccagac tgaaaacct cttgaatgcc aagataaagg agaagaaga 1200

ttacagaaat acatccagga gagccaagca ttggcaaagc gaagctgcgg cctcttccag 1260
 aaactaggag aatattactt acaaaatgcg tttctcgttg cttacacaaa gaaagccccc 1320
 cagctgacct cgtcggagct gatggccatc accagaaaaa tggcagccac agcagccact 1380
 tgttgccaac tcagtgagga caaactattg gcctgtggcg agggagcggc tgacattatt 1440
 atcggacact tatgtatcag acatgaaatg actccagtaa accctgggtg tggccagtgc 1500
 tgcacttctt catatgccaa caggaggcca tgcttcagca gcttggtggt ggatgaaaca 1560

tatgtccctc ctgcattctc tgatgacaag ttcatittcc ataaggatct gtgccaagct 1620
 cagggtgtag cgtcgcaaac aatgaagcaa gagtttctca ttaaccttgt gaagcaaaag 1680
 ccacaaataa cagaggaaca acttgaggct gtcattgcag atttctcagg cctgttggag 1740
 aaatgctgcc aaggccagga acaggaagtc tgctttgctg aagagggaca aaaactgatt 1800
 tcaaaaactc gtgctgcttt gggagtttaa 1830

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Pro Leu Phe Gln Val Pro Glu Pro Val

1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Phe Met Asn Lys Phe Ile Tyr Glu Ile

1 5

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Gly Leu Ser Pro Asn Leu Asn Arg Phe Leu

1 5 10

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Gly Val Ala Leu Gln Thr Met Lys Gln

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 7

Ala Met Asn Lys Phe Ile Tyr Glu Ile

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 8

Phe Met Ala Lys Phe Ile Tyr Glu Ile

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 9

Phe Met Asn Ala Phe Ile Tyr Glu Ile

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 10

Phe Met Asn Lys Ala Ile Tyr Glu Ile

1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 11

Phe Met Asn Lys Phe Ala Tyr Glu Ile

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 12

Phe Met Asn Lys Phe Ile Ala Glu Ile

1 5

<210> 13

<211>

9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 13

Phe Met Asn Lys Phe Ile Tyr Ala Ile

1 5

<210> 14

<211> 605

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Met Lys Trp Ile Thr Pro Ala Ser Leu Ile Leu Leu Leu His Phe Ala

1 5 10 15

Ala Ser Lys Ala Leu His Glu Asn Glu Phe Gly Ile Ala Ser Thr Leu

20 25 30

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

35 40 45

Ile Thr Phe Thr Gln Phe Val Pro Glu Ala Thr Glu Glu Glu Val Asn

50 55 60

Lys Met Thr Ser Asp Val Leu Ala Ala Met Lys Lys Asn Ser Gly Asp

65 70 75 80

Gly Cys Leu Glu Ser Gln Leu Ser Val Phe Leu Asp Glu Ile Cys His

85 90 95

Glu Thr Glu Leu Ser Asn Lys Tyr Gly Leu Ser Gly Cys Cys Ser Gln

100 105 110

Ser Gly Val Glu Arg His Gln Cys Leu Leu Ala Arg Lys Lys Thr Ala

115 120 125

Pro Ala Ser Val Pro Pro Phe Gln Phe Pro Glu Pro Ala Glu Ser Cys

130 135 140

Lys Ala His Glu Glu Asn Arg Ala Val Phe Met Asn Arg Phe Ile Tyr

145 150 155 160

Glu Val Ser Arg Arg Asn Pro Phe Met Tyr Ala Pro Ala Ile Leu Ser

165 170 175

Leu Ala Ala Gln Tyr Asp Lys Val Val Leu Ala Cys Cys Lys Ala Asp

180 185 190

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

195 200 205
 Leu Arg Glu Gly Ser Met Leu Asn Glu His Val Cys Ser Val Ile Arg
 210 215 220
 Lys Phe Gly Ser Arg Asn Leu Gln Ala Thr Thr Ile Ile Lys Leu Ser

 225 230 235 240
 Gln Lys Leu Thr Glu Ala Asn Phe Thr Glu Ile Gln Lys Leu Ala Leu
 245 250 255
 Asp Val Ala His Ile His Glu Glu Cys Cys Gln Gly Asn Ser Leu Glu
 260 265 270
 Cys Leu Gln Asp Gly Glu Lys Val Met Thr Tyr Ile Cys Ser Gln Gln
 275 280 285
 Asn Ile Leu Ser Ser Lys Ile Ala Glu Cys Cys Lys Leu Pro Met Ile

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

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

 420 425 430
 Arg Lys Ala Pro Gln Leu Thr Ser Ala Glu Leu Ile Asp Leu Thr Gly
 435 440 445

Lys Met Val Ser Ile Ala Ser Thr Cys Cys Gln Leu Ser Glu Glu Lys
450 455 460

Trp Ser Gly Cys Gly Glu Gly Met Ala Asp Ile Phe Ile Gly His Leu
465 470 475 480

Cys Ile Arg Asn Glu Ala Ser Pro Val Asn Ser Gly Ile Ser His Cys

485 490 495
Cys Asn Ser Ser Tyr Ser Asn Arg Arg Leu Cys Ile Thr Ser Phe Leu
500 505 510

Arg Asp Glu Thr Tyr Ala Pro Pro Pro Phe Ser Glu Asp Lys Phe Ile
515 520 525

Phe His Lys Asp Leu Cys Gln Ala Gln Gly Lys Ala Leu Gln Thr Met
530 535 540

Lys Gln Glu Leu Leu Ile Asn Leu Val Lys Gln Lys Pro Glu Leu Thr

545 550 555 560
Glu Glu Gln Leu Ala Ala Val Thr Ala Asp Phe Ser Gly Leu Leu Glu
565 570 575

Lys Cys Cys Lys Ala Gln Asp Gln Glu Val Cys Phe Thr Glu Glu Gly
580 585 590

Pro Lys Leu Ile Ser Lys Thr Arg Asp Ala Leu Gly Val
595 600 605

<210> 15

<211> 1818

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 15

atgaagtgga tcacaccgc ttcctcacc ctctgtctac atttcgtgc gtccaaagca 60

ttgcacgaaa atgagtttgg gatagcttcc acgttagatt cctcccagtg cgtgacggag 120
aagaatgtgc ttagcatagc taccatcacc ttaccagcgt ttgttccgga agccaccgag 180
gaggaagtga acaaaatgac tagcgatgtg ttggctgcaa tgaagaaaa ctctggcgat 240
gggtgttttag aaagccagct atctgtgttt ctggatgaaa tttgtcatga gacggaactc 300
tctaacaagt atggactctc aggctgctgc agccaaagtg gagtggaaag acatcagtg 360
ctgctggcac gcaagaagac tgctccggcc tctgtccac ccttcagtt tccagaacct 420

gccgagagtt gcaaagcaca tgaagaaaac agggcagtg tcatgaacag gttcatctat 480
gaagtgtcaa ggaggaaccc cttcatgtat gccccagcca ttctgtcctt ggctgctcag 540

tagcacaagg tcgttctggc atgctgcaaa gctgacaaca aggaggagtg cttccagaca 600
aagagagcat ccattgcaaa ggaattaaga gaaggaagca tgttaaatga gcatgtatgt 660
tcagtataaa gaaaatttgg atcccgaac ctccaggcaa caaccattat taagctaagt 720
caaaagttaa ctgaagcaaa ttttactgag attcagaagc tggccctgga tgtggctcac 780
atccacgagg agtgttgcca aggaaactcg ctggagtgtc tgcaggatgg ggaaaaagtc 840
atgacatata tatgtttctc acaaaatatt ctgtcaagca aaatagcaga gtgctgcaaa 900
ttacccatga tccaactagg cttctgcata attcacgcag agaatggcgt caaacctgaa 960
ggcttatctc taaatccaag ccagtttttg ggagacagaa attttgcca attttcttca 1020

gaggaaaaaa tcatgttcat ggcaagcttt cttcatgaat actcaagaac tcacccaac 1080
cttcctgtct cagtcattct aagaattgct aaacgtacc aggaaatatt ggagaagtgt 1140
tcccagtctg gaaatctacc tggatgtcag gacaatctgg aagaagaatt gcagaaacac 1200
atcgaggaga gccaggcact gtccaagcaa agctgcgctc tctaccagac cttaggagac 1260
tacaattac aaaaatctgtt ctttatttgg tacacagga aagccctca gctgacctca 1320
gcagagctga tcgacctcac cgggaagatg gtgagcattg cctccacgtg ctgccagctc 1380
agcgaggaga aatgggtccg ctgtggtgag ggaatggccg acattttcat tggacatttg 1440
tgtataagga atgaagcaag ccctgtgaac tctggtatca gccactgctg caactcttcg 1500

tattccaaca ggaggtatg catcaccagt tttctgaggg atgaaaceta tgccctccc 1560
ccattctctg aggataaatt catcttccac aaggatctgt gccaaactca gggcaaagcc 1620
ctacagacca tgaacaaga gtttctcatt aacctggtga agcaaaagcc tgaactgaca 1680
gaggagcagc tggcggtgtg cactgcagat ttctcgggcc ttttgagaa gtgctgcaaa 1740
gcccaggacc aggaagtctg ttccacagaa gaggttcaa agttgatttc caaaactcgt 1800
gatgcttttg gcgtttaa 1818

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

Phe Met Asn Arg Phe Ile Tyr Glu Val

<210> 17

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 17

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 18

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 18

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

1 5 10 15

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

20 25 30
Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu

35 40 45
Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala

50 55 60
Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn

65 70 75 80
Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val

85 90 95
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Ser Gly Arg Tyr Asp Ala Trp

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

115 120

<210> 19

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 19

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Ile Arg Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 20

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 20

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Arg Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ala Asp Asp Tyr Gly Ala Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp

100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 21

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 21

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser

20 25 30

Asn Trp Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Ile Gly Glu Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Thr Gly Tyr Gly Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 22

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 22

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 23

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 23

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

Ser Leu Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Pro Asn Tyr
20 25 30

Trp Ile Thr Trp Val Arg Gln Met Ser Gly Gly Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ile Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu His Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Val Ser Leu Val Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 24

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 24

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 25

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 25

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg

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

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

<210> 26

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 26

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

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Phe Gln Asp Trp Trp Tyr Leu Gly Gln Phe Asp Gln Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 27

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 27

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

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

<210> 28

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 28

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val

35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 29

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 29

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Met Met Val Ile Tyr

35 40 45

Tyr Asp Thr Val Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Leu Ser Gly Ser

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

<210> 30

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

 $\langle 220 \rangle$

<223> Synthetic Construct

<400> 30

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

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

<210> 31

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

 $\langle 220 \rangle$

<223> Synthetic Construct

<400> 31

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

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

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

<210> 32

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 32

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

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

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

<210> 33

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

 $\langle 220 \rangle$

<223> Synthetic Construct

<400> 33

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

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 34

 $\langle 211 \rangle$ 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

 $\langle 220 \rangle$

<223> Synthetic Construct

<400> 34

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Gly Ser Leu

85 90 95

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

100 105 110

<210> 35

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 35

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Phe Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu

65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
85 90 95
Leu Ser Gly Ser Gly Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110
Gly

<210> 36

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 36

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

<210> 37

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 37

gaggtccagc tggtagcagc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcttgcgaagg cttctgggta cacctttacc agctatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatggtaa cacaaactat 180
gcacagaagc tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gcgctaccag 300

gactggtggt acctgggtca gttcgatcag tggggtcaag gtactctggt gaccgtctcc 360
tca 363

<210> 38

<211> 366

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 38

caggtacagc tgcagcagtc aggtccagga ctggtgaagc cctcgcagac cctctcactc 60
acctgtgcc a tttccgggga cagtgtctct agcaacagtg ctgcttggaa ctggatcagg 120
cagtccecat cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actacaggtc caagtggat 180
aatgattatg cagtatctgt gaaaagtcga ataaccatca acccagacac atccaagaac 240

cagttctccc tgcagctgaa ctctgtgact cccgaggaca cggtgtgtga ttactgtgcg 300
cgcggttctt actactctgg tcgttacgat gcttggggtc aaggtactct ggtgaccgtc 360
tcctca 366

<210> 39

<211> 366

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 39

caggtccagc tggtagcagc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagg ctcttgagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagt gatgggaggg atcatcccta tctttgttac agcaaactac 180

gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagaaatt 300
aggggctact actactacta cggtatggac gtctggggcc aagggaccac ggtcacctgc 360
tcctca 366

<210> 40

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 40

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag ccctcggatt cacctttgat gattatgcca tgcactgggt cgggcaagct 120

ccaggggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagttgga acagtggtag aataggctat 180
gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagccgat 300
gactacggcg cccctacta ctactacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
accgtctcct ca 372

<210> 41

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> misc_feature

<222> 338

<223> n = A,T,C or G

<400> 41

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggggac cctgtccctc 60

acctgcgctg tcctctgggtg ctccatcagc agtagtaact ggtggagtgt ggtccgccag 120
 cccccaggga aggggctgga gtggattggg gaaatctatc atagtgggag caccaactac 180
 aaccgcgtcc tcaagagtcg agtcaccata tcagtagaca agtccaagaa ccagttctcc 240
 ctgaagctga gcctctgtac cgccgcggac acggccgtgt attactgtgc gaccggttat 300
 ggggggtact ttgactactg gggccaggga accctggnca ccgtctctc a 351

<210> 42

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 42

gaagtgcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggtta cacctttacc agctatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatggtaa cacaaactat 180
 gcacagaagc tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240
 atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagattcc 300
 tactactact actacggtat ggacgtcttg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 360

<210> 43

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 43

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaagc ctggcgagag cctgaccatc 60
 tcctgcaagg ccagcggtta cagcttcccc aactactgga tcacctgggt gcgccagatg 120
 tccggcggag gcctggaatg gatgggcaga atcgaccccg gcgacagcta cacaacctac 180
 aacccagct tccagggcca cgtgaccatc agcatcgaca agagcaccaa taccgcctac 240
 ctgcactgga acagcctgaa ggcctccgac accgccatgt actactgcgc ccggtactat 300
 gtgtccctgg tggatatctg gggccagggc aactcgtga ccgtgtctag c 351

<210> 44

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 44

```
gaggtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctgggggggtc ccttagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagc aacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtaggtttc attagaagca aagcttatgg tgggacaaca 180
gaatacgccg cctctgtgaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc caaaagcatc 240
gcctatctgc aaatgaacaa cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtgctaga 300
gatgggctgt atagcagcag ctggtacgat tctgactact ggggccaggg aaccctggtc 360
accgtctcct ca 372
```

<210> 45

<211> 378

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 45

```
cagatgcagc tggtagcagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggcagggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttgat gattatgcca tgcactgggt ccggcaagct 120
ccagggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagtggga atagtggtag cataggctat 180
gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac acggccttgt attactgtgc aaaagatata 300
catagtggga gctactacgg cctactctac tacgctatgg acgtctgggg ccaagggacc 360
acggtcaccg tctctca 378
```

<210> 46

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 46

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaaggtg 60
 tcctgcaagg ccagcggcta cacctttacc agctacggca tcagctgggt gcgccaggct 120
 cctggacagg gcctggaatg gatgggctgg atcagcgctt acaacggcaa taccaactac 180
 gcccagaaac tgcagggcag agtgaccatg accaccgaca ccagcacctc caccgcctac 240
 atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actattgcgc ccggttccag 300

 gactggtggt atctgggcca gttcgaccag tggggccagg gcacactcgt gaccgtgtct 360
 agc 363

<210> 47

<211> 338

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 47

caatctgcc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60
 tcctgcactg caaccggcag tgacgttggg gtttattact atgtctcttg gtaccaacaa 120
 caccaggca aagccccaa agtgatgatt tatgatgtcg gtaatcgcc cccaggggtt 180
 tctaatecgt tctctggctc caagcttggc aacacggcct ccctgaccat ctctgggctc 240

 caggctgagg acgaggctga ttattactgc gcctcatata caaacaggaa cagtctcgcc 300
 tatgtcttcg gaaccgggac caaggtcacc gtcctagg 338

<210> 48

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 48

aattttatgc tgactcagcc ccactctgtg tcggagtctc cggggaagac ggtaaccatc 60
 tcctgcaccc gcagcagtg cagcattgcc agcaactatg tgcagtggta ccagcagcgc 120
 ccgggcagtt cccccaccac tgtgatctat gaggataacc aaagaccctc tggggtcctt 180
 gatcggttct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctctgga 240

ctgaagactg aggacgaggc tgactactac tgcagtcctt atgatagcag caccgtggta 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggt 333

<210> 49

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 49

tcctatgagc tgactcagcc accctcgggtg tcagtggccc ctggcaagac ggccaggatt 60
acctgtgggg gtgacaacat tggaactaaa agtgtgacct ggtaccaaca gaggccaggc 120
caggccccta tgatggatcat ctattatgat accgtccggc cctcagggat ccctgagcga 180
ctctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcaccagggt cgaagccggg 240

gatgaggccg actattactg tcagggtgtgg gatagtagta gtgatcatcc ggtgttcggc 300
ggagggacca agctgaccgt cctaggt 327

<210> 50

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 50

cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctggggccc cggggcagag ggtcaccatc 60
tcctgcactg ggagcagctc caacatcggg gcaggttatg atgtacactg gtaccagcag 120
cttcaggaa cagcccccaa actcctcatc tatggtaaca gcaatcggcc ctcaggggtc 180
cctgaccgat tccttggtc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggtc 240

caggctgagg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtgggtca 300
gtcttcggaa ctgggaccaa ggteaccgtc ctaggt 336

<210> 51

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 51

cagtctgtgt tgactcagcc accctcagtg tcagtggccc caggaaagac ggccaggatt 60
 acctgtgggg gaaacaacat tggaagtaaa agtgtgcact ggtaccagca gaagccaggc 120
 caggcccttg tgctggatcat ctattatgat agcgaccggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaagccggg 240

 gatgaggccg actattactg tcaggtgtgg gatagtagta gtgatcatgt ggtattcggc 300
 ggagggacca agctgaccgt cctaggt 327

<210> 52

<211> 330

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 52

caggctgtgg tgactcagga gccctcactg actgtgtccc caggaggagc agtcactctc 60
 acctgtggct ccagcactgg agctgtcacc agtggtcatt atccctactg gtccagcag 120
 aagcctggcc aagccccag gacactgatt tatgatgcaa gcgacaaaca ctccctggaca 180
 cctgcccggg tctcaggctc cctccttggg ggcaaagctg ccctgaccct ttcgggtgcg 240

 cagcctgagg atgaggctga gtattactgc ttgctctcct atagtgatgc tctgggtgtc 300
 ggcggaggga ccaagctgac cgtcctaggt 330

<210> 53

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 53

cagagcgtgc tgacacagcc tgcctccgtg tctggctctc ctggccagtc catcaccatc 60
 agctgtaccg gcaccagctc cgacgtgggc ggctacaatt acgtgtcctg gtatcagcag 120
 catcccgga agcccccaa gctgatgac tacgacgtga acaaccggcc cagcgagggtg 180
 tccaacagat tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgacaat cagcggactg 240

caggccgagg acgaggccga ctactactgc agcagctaca ccaccggcag cagagccgtg 300
tttggcggag gcaccaagct gacagtgcctg ggc 333

<210> 54

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 54

cagtctgtcg tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60
tcctgtctcg gaagcagctc caacattggg aataattatg tatcctggta ccagcagctc 120
ccaggaacag cccccaaact cctcatTTat gacaataata agcgaccctc agggattcct 180
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag 240

actggggacg aggccgatta ctactgcgga acatgggatg gcagcctcta tactatgtta 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggt 333

<210> 55

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 55

cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
tcctgcactg ggagcagctc caacatcggg gcaggttatg atgtacactg gtaccagcag 120
cttcaggaa cagccccaa actcctcatc tttggtaaca gcaatcggcc ctcaggggtc 180
cctgaccgat tccttggett caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240

caggctgagg atgaggctga ctatttctgc cagtcgtatg acagtagcct gagtggttcg 300
ggggtcttcg gaactgggac caaggtcacc gtccatggt 339

<210> 56

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 56

cagagcgccc tgacacagcc tgcctccgtg tctggatctc ccggccagag catcaccatc 60
agctgcacag ccaccggctc cgacgtgggc gtgtactact acgtgtcctg gtatcagcag 120
catcccgga aggcccccaa agtgatgac tacgacgtgg acaaccggcc tcccggcgtg 180
tccaatagat tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgacaat cagcggactg 240

caggccgagg acgaggccga ttactactgc gccagctaca ccaaccggaa cagcctgggc 300
tacgtgttcg gcaccggcac caaagtgaca gtgctgggc 339

<210> 57

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 57

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly

1 5

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 58

Val Ser Ser Asn Ser Ala Ala Trp Asn

1 5

<210>

59

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 59

Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala

1 5

<210> 60

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 60

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala

1 5

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 61

Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser Asn Trp

1 5

<210> 62

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 62

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly

1 5

<210> 63

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 63

Gly Tyr Ser Phe Pro Asn Tyr Trp

1 5

<210> 64

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 64

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala Trp

1 5

<210> 65

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 65

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala

1 5

<210> 66

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 66

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly

1 5

<210> 67

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 67

Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr

1 5

<210> 68

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 68

Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn

1 5

<210> 69

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 69

Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala

1 5

<210> 70

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 70

Ile Ser Trp Asn Ser Gly Arg Ile

1 5

<210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 71

Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr

1 5

<210> 72

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 72

Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr

1 5

<210> 73

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 73

Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Thr

1 5

<210> 74

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 74

Ile Arg Ser Lys Ala Tyr Gly Gly Thr Thr

1 5 10

<210> 75

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 75

Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile

1 5

<210> 76

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 76

Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr

1 5

<210> 77

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 77

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

1 5 10

<210> 78

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 78

Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Ser Gly Arg Tyr Asp Ala

1 5 10

<210> 79

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 79

Ala Arg Glu Ile Arg Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10 15

<210> 80

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 80

Ala Arg Ala Asp Asp Tyr Gly Ala Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp

1 5 10 15

Val

<210> 81

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 81

Ala Thr Gly Tyr Gly Gly Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 82

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 82

Ala Arg Asp Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 83

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 83

Ala Arg Tyr Tyr Val Ser Leu Val Asp Ile

1 5 10

<210>

> 84

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 84

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

1 5 10 15

<210> 85

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 85

Ala Lys Asp Ile His Ser Gly Ser Tyr Tyr Gly Leu Leu Tyr Tyr Ala

1 5 10 15

Met Asp Val

<210> 86

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 86

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

1 5 10

<210> 87

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa = F or Y

<220>

<221> VARIANT

<222> 3

<223> Xaa = S or T

<220>

<221> VARIANT

<222> 5

<223> Xaa = D or S or T

<220>

>

<221> VARIANT

<222> 6

<223> Xaa = D or N or S

<220>

<221> VARIANT

<222> 7

<223> Xaa = Y or A

<220>

<221> VARIANT

<222> 8

<223> Xaa = A or G or W

<400> 87

Gly Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 88

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = I or S

<220>

<221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa = K or S

<220>

<221> VARIANT

<222> 3

<223> Xaa = Any Amino Acid

<220>

<221> VARIANT

<222> 4

<223> Xaa = H or Y

<220>

<221> VARIANT

<222> 5

<223> Xaa = Any Amino Acid

<220>

<221> VARIANT

<222> 7

<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 88

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Thr

1 5

<210> 89

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = A or G

<220>

<221> VARIANT

<222> 2, 5, 6, 7

<223> Xaa = Any Amino Acid

<220>

<221> VARIANT

<222> 3

<223> Xaa = W or Y

<220>

<221> VARIANT

<222> 8

<223> Xaa = F or Y

<400> 89

Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Asp

1 5

<210> 90

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 90

Gly Ser Asp Val Gly Val Tyr Tyr Tyr

1 5

<210> 91

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 91

Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn Tyr

1 5

<210> 92

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 92

Asn Ile Gly Thr Lys Ser

1 5

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 93

Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp

1 5

<210> 94

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 94

Asn Ile Gly Ser Lys Ser

1 5

<210> 95

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 95

Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly His Tyr

1 5

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 96

Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr

1 5

<210> 97

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 97

Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr

1 5

<210> 98

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 98

Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp

1 5

<210> 99

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 99

Gly Ser Asp Val Gly Val Tyr Tyr Tyr

1 5

<210> 100

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 100

Asp Val Gly

1
 <210> 101
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Construct
 <400> 101
 Glu Asp Asn

1
 <210> 102
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Construct
 <400> 102
 Tyr Asp Thr

1
 <210> 103
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Construct

 <400> 103

Gly Asn Ser
 1
 <210> 104
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 104

Tyr Asp Ser

1

<210> 105

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 105

Asp Ala Ser

1

<210> 106

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 106

Asp Val Asn

1

<210> 107

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 107

Asp Asn Asn

1

<210> 108

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 108

Gly Asn Ser

1

<210> 109

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 109

Asp Val Asp

1

<210> 110

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 110

Ala Ser Tyr Thr Asn Arg Asn Ser Leu Gly Tyr Val

1

5

10

<210> 111

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 111

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Thr Val Val

1

5

<210> 112

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 112

Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Pro Val

1 5 10

<210> 113

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 113

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val

1 5 10

<210> 114

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 114

Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Val Val

1 5 10

<210> 115

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 115

Leu Leu Ser Tyr Ser Asp Ala Leu Val

1 5

<210> 116

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 116

Ser Ser Tyr Thr Thr Gly Ser Arg Ala Val

1 5 10

<210> 117

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 117

Gly Thr Trp Asp Gly Ser Leu Tyr Thr Met Leu

1 5 10

<210> 118

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 118

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Gly Val

1 5 10

<210> 119

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 119

Ala Ser Tyr Thr Asn Arg Asn Ser Leu Gly Tyr Val

1 5 10

<210> 120

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = S or T

<220>

<221> VARIANT

<222>

> 2

<223> Xaa = G or S

<220>

<221> VARIANT

<222> 3

<223> Xaa = D or N

<220>

<221> VARIANT

<222> 4

<223> Xaa = I or V

<220>

<221> VARIANT

<222> 5

<223> Xaa = A or G

<220>

<221> VARIANT

<222> 6

<223> Xaa = A or S or V

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 7
 <223> Xaa = Any Amino Acid
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> 8
 <223> Xaa = H or Y
 <400> 120
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5
 <210> 121

 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Construct
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> 2
 <223> Xaa = S or T
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> 3
 <223> Xaa = Y or W
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> 4
 <223> Xaa = D or T
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> 5
 <223> Xaa = S or T
 <220>

<221> VARIANT

<222> 6

<223> Xaa = A or S

<400> 121

Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 122

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 122

Leu Leu Asp Val Pro Thr Ala Ala Val

1 5

<210> 123

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 123

Thr Leu Trp Val Asp Pro Tyr Glu Val

1 5

<210> 124

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 124

Phe Leu Leu Asp His Leu Lys Arg Val

1 5

<210> 125

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 125

Leu Leu Leu Asp Val Pro Thr Ala Ala Val

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

<210> 126

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 126

Val Leu Phe Arg Gly Gly Pro Arg Gly Leu Leu Ala Val

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

<210> 127

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 127

Ser Leu Leu Pro Ala Ile Val Glu Leu

1	5
---	---

<210> 128

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 128

Tyr Leu Leu Pro Ala Ile Val His Ile

1	5
---	---

<210> 129

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 129

Phe Leu Leu Pro Thr Gly Ala Glu Ala

1	5
---	---

<210> 130

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 130

Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys Tyr Leu Leu

1 5 10

<210> 131

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 131

Ser Leu Pro His Phe His His Pro Glu Thr

1 5 10

<210> 132

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 132

Met Leu Leu Ser Val Pro Leu Leu Leu Gly

1 5 10

<210> 133

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 133

Leu Leu Tyr Asp Met Val Cys Gly Asp Ile Pro

1 5 10

<210> 134

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 134

Leu Leu Leu Asp Val Pro Thr Ala Ala Val Gln

1 5 10

<210> 135

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 135

Leu Leu Leu Asp Val Pro Thr Ala Ala Val Gln Ala

1 5 10

<210> 136

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 136

Val Leu Phe Arg Gly Gly Pro Arg Gly Leu Leu Ala Val Ala

1 5 10

<210> 137

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 137

Met Val Asp Gly Thr Leu Leu Leu Leu

1 5

<210> 138

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 138

Tyr Met Ala Pro Glu Ile Leu Met Arg Ser

1 5 10

<210> 139

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 139

Phe Ile Tyr Asn Ala Asp Leu Met Asn Cys

1 5 10

<210> 140

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 140

Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile

1 5 10

<210> 141

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 141

Ile Leu Ala Lys Phe Leu His Trp Leu

1 5