



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0087441
(43) 공개일자 2022년06월24일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/54 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/283 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7012588
- (22) 출원일자(국제) 2020년09월15일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년04월15일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2020/050851
- (87) 국제공개번호 WO 2021/055342
국제공개일자 2021년03월25일
- (30) 우선권주장
62/901,198 2019년09월16일 미국(US)

- (71) 출원인
리젠츠 오브 더 유니버시티 오브 미네소타
미국 55455 미네소타주 미니애폴리스 스위트 600
오크 스트리트 에스이 200 맥나마라 알럼니 센터
지티 바이오파마, 인크.
미국 94005 캘리포니아주 브리즈번 스위트 100 마
리나 블러바드 8000
- (72) 발명자
발레라, 다니엘, 에이.
미국 55455 미네소타주 미니애폴리스 오크 스트리
트 에스이 200 맥나마라 알럼니 센터 280
밀러, 제프리, 에스.
미국 55455 미네소타주 미니애폴리스 오크 스트리
트 에스이 200 맥나마라 알럼니 센터 280
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 김영

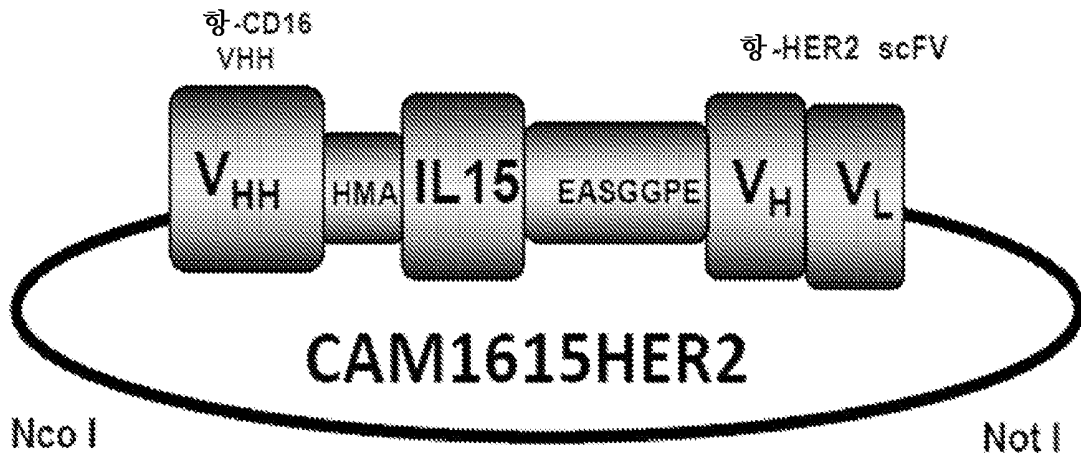
전체 청구항 수 : 총 32 항

(54) 발명의 명칭 면역요법 화합물 및 방법

(57) 요약

면역요법 화합물은 NK 세포 결속화 도메인, NK 활성화 도메인 및 표적화 도메인을 포함한다. 표적화 도메인은 HER2, HER3 또는 HER2/HER3 이중이량체 복합체에 선택적으로 결합하고, NK 활성화 도메인 및 NK 세포 결속화 도메인에 작동 가능하게 연결된다. 화합물은 대상체에게 암 세포의 NK-매개 사멸 유도, 대상체에서 NK 세포의 확장 자극 및/또는 암 치료를 위해 투여될 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

C07K 14/5443 (2013.01)
C07K 16/32 (2013.01)
C07K 2317/22 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/569 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)

(72) 발명자

펠리세스, 마틴

미국 55455 미네소타주 미니애폴리스 오크 스트리트
트 에스이 200 맥나마라 알럼니 센터 280

슈뢰더, 마틴

미국 94005 캘리포니아주 브리즈번 스위트 100 마
리나 블러바드 8000

명세서

청구범위

청구항 1

CD16에 선택적으로 결합하는 모이어티를 포함하는 NK 세포 결속화 도메인;

IL-15 또는 그의 기능적 단편을 포함하는 NK 세포 결속화 도메인에 작동 가능하게 연결된 NK 활성화 도메인; 및
HER2, HER3 또는 HER2/HER3 이중이량체 복합체에 선택적으로 결합하고 NK 활성화 도메인 및 NK 세포 결속화 도메인에 작동 가능하게 연결된 표적화 도메인을 포함하는, 화합물.

청구항 2

제1항에 있어서, CD16은 CD16a를 포함하는 것인, 화합물.

청구항 3

제1항에 있어서, NK 세포 결속화 도메인은 서열식별번호: 2의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 화합물.

청구항 4

제1항에 있어서, NK 세포 결속화 도메인 모이어티는 항체 또는 그의 결합 단편을 포함하는 것인, 화합물.

청구항 5

제4항에 있어서, 항체 또는 그의 결합 단편은 인간, 인간화 또는 낙타류인, 화합물.

청구항 6

제1항에 있어서, IL-15는 서열식별번호: 4의 아미노산 서열 또는 그의 기능적 변이체를 포함하는 것인, 화합물.

청구항 7

제6항에 있어서, IL-15의 기능적 변이체는 서열식별번호: 4와 비교하여 N72D 또는 N72A 아미노산 치환을 포함하는 것인, 화합물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 표적화 도메인은 항체 또는 그의 결합 단편을 포함하는 것인, 화합물.

청구항 9

제8항에 있어서, 항체 결합 단편은 scFv, F(ab)2, Fab 또는 단일-도메인 항체 단편을 포함하는 것인, 화합물.

청구항 10

제8항에 있어서, 표적화 도메인은 트라스투주맵, e23, 롬레투주맵, 세리반투맵, KTN3379/CDX-3379, 파트리투맵, 엘렘투맵, U3-1402, AV-203, GSK2849330, MM-111, MCLA-128, 이스티라투맵, 돌리고투맵, 페르투주맵 또는 그의 기능적 변이체를 포함하는 것인, 화합물.

청구항 11

제8항에 있어서, 표적화 도메인은 서열식별번호: 6, 서열식별번호: 15, 서열식별번호: 16, 서열식별번호: 17, 서열식별번호: 18, 서열식별번호: 19, 서열식별번호: 20, 서열식별번호: 21, 서열식별번호: 22, 서열식별번호: 23, 서열식별번호: 24, 서열식별번호: 25, 서열식별번호: 26, 서열식별번호: 27의 아미노산 서열을 포함하는 것

인, 화합물.

청구항 12

제1항에 있어서, 도메인 중 2개를 연결하는 적어도 1종의 플랭킹 서열을 추가로 포함하는, 화합물.

청구항 13

제12항에 있어서, 2개의 연결된 도메인을 제3 도메인과 연결하는 제2 플랭킹 서열을 추가로 포함하는, 화합물.

청구항 14

제13항에 있어서, 플랭킹 서열은 NK 활성화 도메인을 플랭킹하는 것인, 화합물.

청구항 15

제13항에 있어서, 제1 플랭킹 서열은 NK 세포 결속화 도메인에 대해 C-말단이고, 제2 플랭킹 서열은 항-종양 표적화 도메인에 대해 N-말단인, 화합물.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 표적화 도메인을 추가로 포함하는, 화합물.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 NK 세포 결속화 도메인을 추가로 포함하는, 화합물.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 NK 활성화 도메인을 추가로 포함하는, 화합물.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항의 화합물; 및

제약상 허용되는 담체

를 포함하는, 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 추가의 치료제를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 추가의 치료제는 HER2, HER3 또는 HER2/HER3 이중이량체 복합체를 표적화하는 치료제를 포함하는 것인, 조성물.

청구항 22

대상체에게 암 세포의 NK-매개 사멸을 유도하기 위한 제1항 내지 제18항 중 어느 한 항의 화합물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 23

대상체에게 대상체에서 NK 세포의 확장을 자극하기 위한 제1항 내지 제18항 중 어느 한 항의 화합물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 생체내 NK 세포의 확장을 자극하는 방법.

청구항 24

대상체에게 암을 치료하기 위한 제1항 내지 제18항 중 어느 한 항의 화합물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 화학요법, 종양의 외과적 절제 또는 방사선 요법 전에, 그와 동시에 또는 그 후에 화합물을 투여하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 26

제23항에 있어서, 화학요법은 알트레타민, 암사크린, L-아스파라기나제, 콜라스파제, 블레오마이신, 부술판, 카페시타빈, 카르보플라틴, 카르무스틴, 클로람부실, 시스플라틴, 클라드리빈, 시클로포스파미드, 시토포스판, 시타라빈, 다카르바진, 닥티노마이신, 다우노루비신, 도세탁셀, 독소루비신, 에피루비신, 에토포시드, 플루오로우라실, 플루다라빈, 포테무스틴, 간시클로비르, 겐시타빈, 히드록시우레아, 이다루비신, 이포스파미드, 이리노테칸, 로무스틴, 멜팔란, 메르캅토피린, 메토티렉세이트, 미톡산트론, 미토마이신 C, 니무스틴, 옥살리플라틴, 파클리탁셀, 페메트렉세드, 프로카르바진, 랄티트렉세드, 테모졸로미드, 테니포시드, 티오구아닌, 티오테파, 토포테칸, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신 또는 비노렐빈을 포함하는 것인, 방법.

청구항 27

대상체에게 암 세포의 NK-매개 사멸을 유도하기 위한 제19항 내지 제21항 중 어느 한 항의 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 28

대상체에게 대상체에서 NK 세포의 확장을 자극하기 위한 제19항 내지 제21항 중 어느 한 항의 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 생체내 NK 세포의 확장을 자극하는 방법.

청구항 29

대상체에게 암을 치료하기 위한 제19항 내지 제21항 중 어느 한 항의 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 화학요법, 면역요법, 종양의 외과적 절제 또는 방사선 요법 전에, 그와 동시에 또는 그 후에 조성물을 투여하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 화학요법은 알트레타민, 암사크린, L-아스파라기나제, 콜라스파제, 블레오마이신, 부술판, 카페시타빈, 카르보플라틴, 카르무스틴, 클로람부실, 시스플라틴, 클라드리빈, 시클로포스파미드, 시토포스판, 시타라빈, 다카르바진, 닥티노마이신, 다우노루비신, 도세탁셀, 독소루비신, 에피루비신, 에토포시드, 플루오로우라실, 플루다라빈, 포테무스틴, 간시클로비르, 겐시타빈, 히드록시우레아, 이다루비신, 이포스파미드, 이리노테칸, 로무스틴, 멜팔란, 메르캅토피린, 메토티렉세이트, 미톡산트론, 미토마이신 C, 니무스틴, 옥살리플라틴, 파클리탁셀, 페메트렉세드, 프로카르바진, 랄티트렉세드, 테모졸로미드, 테니포시드, 티오구아닌, 티오테파, 토포테칸, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신 또는 비노렐빈을 포함하는 것인, 방법.

청구항 32

제30항에 있어서, 면역요법은 HER2, HER3 또는 HER2/HER3 이중이량체를 표적화하는 것인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호-참조

[0002] 본 출원은 그 전문이 본원에 참조로써 포함된, 2019년 9월 16일에 출원된 미국 특허 가출원 번호 62/901,198을 우선권 주장한다.

[0003] 정부 지원

[0004] 본 발명은 미국 국립 보건원(National Institutes of Health)에 의해 수여된 CA197292 하의 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명에 특정 권리를 갖는다.

[0005] 서열 목록

[0006] 본 출원은 2020년 9월 15일에 생성되고, 70 킬로바이트의 크기를 가지며, "Seq_Listing-0110-000632_ST25.txt"라는 제목의 ASCII 텍스트 파일로서 미국 특허 상표청에 EFS-웹을 통해 전자적으로 제출된 서열 목록을 함유한다. 서열 목록에 함유된 정보는 본원에 참조로 포함된다.

발명의 내용

[0007] 개요

[0008] 본 개시내용은, 한 측면에서, NK 세포 결속화 도메인, NK 활성화 도메인 및 표적화 도메인을 포함하는 다중특이적 면역요법 화합물을 기재한다. 표적화 도메인은 HER2, HER3 또는 HER2/HER3 이종이량체 복합체에 선택적으로 결합하고, NK 활성화 도메인 및 NK 세포 결속화 도메인에 작동 가능하게 연결된다.

[0009] 일부 실시양태에서, NK 세포 결속화 도메인은 CD16에 특이적으로 결합한다. 이들 실시양태에서, CD16은 CD16a 또는 CD16b일 수 있다. 이들 실시양태 중 일부에서, NK 세포 결속화 도메인은 서열식별번호(SEQ ID NO): 2의 아미노산 서열을 포함한다.

[0010] 일부 실시양태에서, NK 세포 결속화 도메인 모이어티는 항체 또는 그의 결합 단편을 포함할 수 있다. 이들 실시양태 중 일부에서, 항체 또는 그의 결합 단편은 인간, 인간화 또는 낙타류일 수 있다.

[0011] 일부 실시양태에서, NK 활성화 도메인은 IL-15 성분을 포함한다. 이들 실시양태 중 일부에서, IL-15 성분은 서열식별번호: 4의 아미노산 서열 또는 그의 기능적 변이체를 포함한다. 이들 실시양태 중 일부에서, IL-15의 기능적 변이체는 서열식별번호: 4와 비교하여 N72D 또는 N72A 아미노산 치환을 포함한다.

[0012] 일부 실시양태에서, 표적화 도메인은 항체 또는 그의 결합 단편을 포함한다. 이들 실시양태 중 일부에서, 항체 결합 단편은 scFv, F(ab)2, Fab 또는 단일-도메인 항체 단편을 포함할 수 있다. 이들 실시양태 중 일부에서, 표적화 도메인은 서열식별번호: 6, 서열식별번호: 15, 서열식별번호: 16, 서열식별번호: 17, 서열식별번호: 18, 서열식별번호: 19, 서열식별번호: 20, 서열식별번호: 21, 서열식별번호: 22, 서열식별번호: 23, 서열식별번호: 24, 서열식별번호: 25, 서열식별번호: 26 또는 서열식별번호: 27의 아미노산 서열을 포함한다.

[0013] 일부 실시양태에서, 면역요법 화합물은 제2 표적화 도메인을 포함할 수 있다.

[0014] 일부 실시양태에서, 면역요법 화합물은 제2 NK 세포 결속화 도메인을 포함할 수 있다.

[0015] 일부 실시양태에서, 면역요법 화합물은 제2 NK 활성화 도메인을 포함할 수 있다.

[0016] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 상기 요약된 치료 화합물의 임의의 실시양태 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 기재한다.

[0017] 일부 실시양태에서, 조성물은 추가의 치료제를 추가로 포함할 수 있다. 이들 실시양태 중 일부에서, 추가의 치료제는 화학요법제를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 추가의 치료제는 HER2, HER3 또는 HER2/HER3 이종이량체 복합체를 표적화하는 치료제를 포함할 수 있다.

[0018] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에게 암 세포의 NK-매개 사멸을 유도하기 위한 상기 요약된 조성물 또는 화합물의 임의의 실시양태의 유효량을 투여하는 것을 포함하는 방법을 기재한다.

[0019] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 생체 내 NK 세포의 확장을 자극하는 방법을 기재한다. 일반적으로, 방법은 대상체에게 대상체에서 NK 세포의 확장을 자극하기 위한 상기 요약된 조성물 또는 화합물의 임의의 실시양태의 유효량을 투여하는 것을 포함한다.

[0020] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에서 암을 치료하는 방법을 기재한다. 일반적으로, 방법은 대상체에게 암을 치료하기 위한 상기 요약된 조성물 또는 화합물의 임의의 실시양태의 유효량을 투여하는 것을 포함한다.

[0021] 일부 실시양태에서, 조성물 또는 화합물은 화학요법, 종양의 외과적 절제 또는 방사선 요법 전에, 그와 동시에 또는 그 후에 투여된다. 이들 실시양태 중 일부에서, 화학요법은 알트레타민, 암사크린, L-아스파라기나제, 콜라스파제, 블레오마이신, 부술판, 카페시타빈, 카르보플라틴, 카르무스틴, 클로람부실, 시스플라틴, 클라드리빈, 시클로포스파미드, 시토포스판, 시타라빈, 다카르바진, 닥티노마이신, 다우노루비신, 도세탁셀, 독

소루비신, 에피루비신, 에토포시드, 플루오로우라실, 플루다라빈, 포테무스틴, 간시클로비르, 겐시타빈, 히드록시우레아, 이다루비신, 이포스파미드, 이리노테칸, 로무스틴, 멜팔란, 메르캅토피린, 메토티렉세이트, 미톡산트론, 미토마이신 C, 니무스틴, 옥살리플라틴, 파클리탁셀, 페메트렉세드, 프로카르바진, 랄티트렉세드, 테모졸로미드, 테니포시드, 티오구아닌, 티오테파, 토포테칸, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신 또는 비노렐빈을 포함할 수 있다.

[0022] 상기 개요는 본 발명의 모든 구현 또는 각각의 개시된 실시양태를 기재하도록 의도되지 않는다. 하기 설명은 예시적 실시양태를 보다 특히 예시한다. 본 출원 전반에 걸쳐 여러 곳에서, 다양한 조합으로 사용될 수 있는 예의 목록을 통해 지침이 제공된다. 각각의 경우에, 언급된 목록은 단지 대표적인 군으로서의 역할을 하고, 배타적 목록으로서 해석되어서는 안된다.

도면의 간단한 설명

[0023] 특허 또는 출원 파일은 컬러로 작성된 적어도 1개의 도면을 함유한다. 컬러 도면을 갖는 본 특허 또는 특허 출원 공보의 사본은 요청 및 필요한 수수료의 지불 시 특허청에 의해 제공될 것이다.

도 1. cam1615HER2의 설계, 생산 및 정제. (A) cam1615HER2의 성분을 코딩하는 코딩 영역의 배열을 갖는 예시적인 발현 벡터의 개략도(좌측에서 우측으로): 낙타류 항-CD16 VHH, 인간 IL-15, 항-HER2 scFV. (B) pET28c 벡터 상의 표적 유전자 위치 및 제한 부위를 포함하는, cam1615HER2를 코딩하는 예시적인 발현 벡터의 유전자 지도.

도 2. cam1615HER2의 생산 및 정제. (A) 2개의 직교 칼럼 단계 후의 최종 생성물의 크기 및 순도를 나타내는, 쿠마시 블루 염료로 염색된 SDS-PAGE 겔. MWS: 분자량 표준물; NR: 비환원됨; R: 환원됨. 농도 계측을 수행하여 최종 순도를 도출하였다. (B) 이온 교환(FFQ) 칼럼 상에서의 cam1615HER2의 제1-단계 정제로부터 생성된 크로마토그래피 트레이스. 수집 피크는 양측 화살표로 표시된다. (C) 크기 배제 칼럼 상에서의 cam1615HER2의 제2-단계 정제로부터 생성된 크로마토그래피 트레이스. 수집 피크는 양측 화살표로 표시된다.

도 3. NK 세포 확장에 대한 cam1615HER2 효과 및 유동 세포계측법에 의해 측정된 증식을 겪고 있는 CD56⁺CD3⁻ NK 세포의 백분율에 대한 TriKE 처리의 효과를 보여주는 절대 수. 6명의 상이한 정상 공여자로부터의 PBMC를 개별적으로 분석하였다. cam1615HER2에 추가로, IL-15를 대조군으로서 사용하였다. (A) cam1615HER2 처리는 대조군과 비교하는 경우 고도로 증식하는 NK 세포의 백분율이 유의하게 상이하였음을 보여준다. (B) cam1615HER2 처리는 대조군과 비교하는 경우 총 NK 세포의 백분율이 유의하게 상이하였음을 보여준다. (C) cam1615HER2 처리는 NT 대조군과 비교하는 경우 원 NK 계측의 수가 유의하게 상이하였음을 보여준다. (D) cam1615HER2 처리는 고도로 증식하는 CD3⁺CD56⁻ T 세포의 백분율을 증가시키지 않았다. (E) cam1615HER2 처리는 총 CD3⁺CD56⁻ T 세포의 백분율을 증가시키지 않았다. (F) cam1615HER2 처리는 원 CD3⁺CD56⁻ T 세포의 수를 증가시키지 않았다.

도 4. 표적 세포주에 대한 cam1615HER2 TriKE 결합. (A) SKOV-3 세포주에 결합하는 FITC로 직접 표지된 cam1615HER2. (B) SK-BR-3 세포주에 결합하는 FITC로 직접 표지된 cam1615HER2. (C) UMSSC-11B 세포주에 결합하는 FITC로 직접 표지된 cam1615HER2. BAC3은 CD3 결합 분자이고, 결합에 대해 음성 대조군으로서 기능한다.

도 5. cam1615HER2 TriKE의 결합 활성과 상관관계가 있는 기능적 활성. (A) CD107a 기능적 활성은 IL-15 및 비처리 대조군과 비교하여 cam1615HER2 처리된 PBMC 플러스 SKOV3 세포의 배양물에서 상승되었다. 10명의 상이한 정상 공여자로부터의 PBMC를 개별적으로 분석하였다. (B) 동일한 PBMC/SKOV3 배양물에서의 증진된 IFN- γ 활성. (C) CD107a 기능적 활성은 PBMC 플러스 유방암 세포주 SK-BR-3의 배양물에서 상승되었다(7명의 상이한 공여자를 분석하였다). (D) 동일한 PBMC/SK-BR-3 배양물에서의 증진된 IFN- γ 활성. (E) CD107a는 UMSSC-11B 두경부암 세포주를 동일한 분석에서 시험한 경우 상승되지 않았다(4명의 상이한 공여자를 분석하였다).

도 6. 약물(타목시펜) 저항성 MCF-7L-TamR 유방 암종 세포의 사멸을 증대시키는 TriKE의 능력의 시험. (A) 암 세포가 없는 CD56⁺CD3⁻ NK 세포의 백그라운드 세포독성 활성을 CD107a 유동 세포계측법을 사용하여 시험하였다. (B) 모 MCF-7L 세포주와 함께 인큐베이션된 PBMC를 사용한 CD107a 활성. (C) 타목시펜 저항성 MCF-7L-TamR 세포와 함께 인큐베이션된 PBMC를 사용한 CD107a 활성. (D) SKBR-3 유방암 세포와 함께 인큐베이션된 PBMC를 사용한 CD107a 활성. (E) 암 세포가 없는 CD56⁺CD3⁻ NK 세포의 백그라운드 세포내 IFN- γ 활성. (F) 모 MCF-7L

세포주와 함께 인큐베이션된 PBMC를 사용한 세포내 IFN- γ 활성. (G) 타목시펜 저항성 MCF-7L-TamR 세포와 함께 인큐베이션된 PBMC를 사용한 세포내 IFN- γ 활성. (H) SKBR-3 유방암 세포와 함께 인큐베이션된 PBMC를 사용한 세포내 IFN- γ 활성. 세포내 IFN- γ 활성은 CD107a 활성과 상관관계가 있었다.

도 7. CD107a 세포독성 데이터를 입증하는, PBMC의 존재 하에 SKOV3 난소암 세포의 실시간 사멸을 측정하는 인큐사이트(INCUCYTE)(에센 바이오사이언스, 인크.(Essen Bioscience, Inc.), 미시간주 앤 아버) 데이터. (A) 구상체 크기; (B) 구상체 강도. cam1615HER2는 비처리, 항-cam16 단독(CAM16) 및 IL-15 단독(IL-15) 대조군에서의 보다 적은 활성과 비교하여 120-시간 기간에 걸쳐 측정된 표적 세포에서의 급격한 감소를 유발한다. N=7 공여자/군.

도 8. cam1615HER2가 비처리(좌측 칼럼), 항-cam16 단독 및 IL-15 단독 대조군에서의 보다 적은 활성과 비교하여 72-시간 기간에 걸쳐 측정된 표적 세포에서의 급격한 시간-의존성 감소(우측 칼럼)를 유발한다는 시각적 증거. N=7 공여자/군.

도 9. 이펙터 세포의 공급원으로서 난소암 환자로부터의 복수 시험. (A) 환자 복수액으로부터의 세포를 MA-148 난소암 세포 없이 인큐베이션한 경우의 CD107a 백그라운드 활성. (B) 복수 세포를 MA-148 난소암 세포와 함께 인큐베이션한 경우의 CD107a 활성. (C) 정상 공여자로부터의 세포를 MA-148 난소암 세포 없이 인큐베이션한 경우의 CD107a 백그라운드 활성. (D) 정상 공여자 세포를 MA-148 난소암 세포와 함께 인큐베이션한 경우의 CD107a 활성. (E) 환자 복수액으로부터의 세포를 MA-148 난소암 세포 없이 인큐베이션한 경우의 IFN- γ 백그라운드 활성. (F) 복수 세포를 MA-148 난소암 세포와 함께 인큐베이션한 경우의 IFN- γ 활성. (G) 정상 공여자로부터의 세포를 MA-148 난소암 세포 없이 인큐베이션한 경우의 IFN- γ 백그라운드 활성. (H) 정상 공여자 세포를 MA-148 난소암 세포와 함께 인큐베이션한 경우의 IFN- γ 활성. 대조군은 IL-15 및 비처리였다. 각각의 경우에, 9-13명의 상이한 공여자를 독립적으로 분석하고, 데이터를 평균하였다.

도 10. 이중이식편 모델에서의 cam1615HER2의 생체내 효능. 세포를 실시간 생체발광 영상화의 목적을 위해 반딧불이 루시페라제로 안정하게 형질감염시켰다. (A) 복강내로 SKOV3 및 NK 세포를 제공받은 6마리 NSG 마우스의 군의 생체발광 영상화. 영상은 각각의 동물에 대한 총 플럭스를 보여주고, 비처리군의 6마리의 동물 중 5마리가 진행성 종양을 가졌음을 나타낸다. 최소 활성을 나타낸 비처리군의 단일 동물에서 종양이 발생하기 시작하였다. (B) SKOV3 및 NK 세포를 또한 제공받았지만, cam1615HER2 TriKE로 처리된 6마리 마우스의 군의 제38일 영상화.

도 11. (A) 다중 TriKE 주사에도 불구하고, 동물 체중에서 최소의 변화가 있었으며, 이는 비처리 대조군과 비교하여 처리가 독성이 아니었음을 나타낸다. (B) 종양-후 접종 제46일에 동일한 실험으로부터의 데이터의 산점도. 데이터는 총 플럭스 방사휘도(p/s)로서 표현된다. 처리된 마우스를 비처리 마우스와 비교하였다. 차이는 스투던트 T 검정에 의해 결정된 바와 같이 유의하였다(p=0.0216). (C) 처리군이 재발하기 시작하였음을 나타내는 시간(일)의 선 플롯. (D) 연장된 시간 간격에 대한 데이터의 생존 플롯. 처리군 대 비처리군의 차이는 유의하다.

도 12. 다른 HER2 발현 난소암 세포주의 사멸을 증대시키는 cam1615HER2 TriKE의 능력의 시험. (A) PBMC NK 세포를 OVCAR3 난소암 세포와 함께 인큐베이션한 경우의 CD107a 활성. (B) PBMC NK 세포를 OVCAR5 난소암 세포와 함께 인큐베이션한 경우의 CD107a 활성. (C) PBMC NK 세포를 SKOV3 난소암 세포와 함께 인큐베이션한 경우의 CD107a 활성. (D) PBMC NK 세포를 OVCAR3 난소암 세포와 함께 인큐베이션한 경우의 IFN- γ 활성. (E) PBMC NK 세포를 OVCAR5 난소암 세포와 함께 인큐베이션한 경우의 IFN- γ 활성. (F) PBMC NK 세포를 SKOV3 난소암 세포와 함께 인큐베이션한 경우의 IFN- γ 활성. SKOV3 데이터를 하기 음성 대조군과 함께 수행하였다: 비처리(NT), 항-cam16 단독(CAM16), IL-15(IL15) 및 항-HER2 항체 단독(e23).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 예시적인 실시양태의 상세한 설명

[0025] 본 개시내용은 일반적으로 막횡단 수용체 티로신 키나제의 표피 성장 인자 수용체(EGFR) 족의 구성원인 인간 표피 성장 인자 수용체-2(HER-2) 및/또는 인간 표피 성장 인자 수용체-3(HER-3)을 발현하는 종양 세포를 표적화하는 치료 화합물을 기재한다. HER2는 그의 과다발현이 유방암에서의 불량한 예후와 연관되고, 세포 증식, 분화 및 생존과 관련된 세포내 신호전달 경로를 촉발하기 때문에 암과 직접적인 연관성을 갖는다. HER2 및 HER3는 이중이량체 복합체를 형성할 수 있다.

- [0026] 많은 실시양태에서, 면역요법 화합물은 삼중특이적 킬러 결속체 화합물(TriKE)일 수 있다. TriKE는 3개의 별개의 결합 영역을 갖는다: NK 세포(예를 들어, CD16)에 결합하는 NK 세포 결속화 도메인, 시토카인 또는 그 시토카인에 대한 수용체에 결합하는 그의 기능적 단편을 포함하는 NK 활성화 도메인 및 표적 세포(예를 들어, 암 세포)상에 존재하는 마커에 결합하는 표적화 도메인. TriKE의 설계 및 제조는, 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 US 2018/0282386 A1에 광범위하게 기재되어 있다. TriKE는 동일한 분자 상에서 항체-의존성 세포독성(ADCC)-촉진 모이어티 및 확장-관련 모이어티(IL-15)를 조합하는 이점을 제공한다.
- [0027] 면역요법 화합물 내의 1개 이상의 결합 영역 또는 도메인은 항체를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 용어 "항체"는 일반적으로 이류노글로불린 또는 그의 단편을 지칭하고, 따라서 모노클로날 항체, 그의 단편을 포괄한다. 예시적인 항체 단편은 scFv, Fab, F(ab')₂, Fv, 단일-도메인 Ab(sdAb) 또는 다른 변형된 형태(예를 들어, 인간화) 및/또는 모노클로날 항체 및/또는 그의 단편의 조합을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 예를 들어, 낙타류는 경쇄가 없는 기능적 항체를 생산한다. 이러한 단일-도메인 항체 단편(VHH 또는 나노바디스(NANOBODIES)(아블링스 엔. 브이.(Ablynx N. V.)), 벨기에 젠트)은 생명공학적 적용에 대해 여러 이점을 갖는다. 이들은 미생물에서 잘 발현되고, 높은 안정성 및 용해도를 갖는다. 본원에 기재된 TriKE 화합물의 특정 실시양태에서, NK 세포 결속화 도메인은 낙타류 단일-도메인 항체 단편이다.
- [0028] 면역요법 화합물이 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 갖는 HER2-표적화 scFv를 포함하는 표적화 도메인을 갖는 예시적인 실시형태의 문맥에서 본원에 기재되지만, 본원에 기재된 면역요법 화합물은 임의의 다른 적합한 HER2-표적화 및/또는 HER3-표적화 모이어티를 포함할 수 있다. 따라서, 다양한 실시양태에서, 표적화 도메인은 HER2, HER3 및/또는 HER2/HER3 이중이량체를 인식할 수 있다. HER2/HER3 이중이량체는 많은 유방암 및 많은 HER2⁺ 종양에서 검출된다. HER2/HER3 이량체는 증식, 원격 전이 및/또는 불량한 환자 치료 결과와 연관된다.
- [0029] 예시적인 대안적 표적화 모이어티는, HER2, HER3 및/또는 HER2/HER3 이중이량체에 특이적으로 결합하는 항체 및 항체 단편을 포함한다. 예시적인 항체 단편은, e23 또는 그의 기능적 단편(예를 들어, 서열식별번호: 15), 트라스투주맵 또는 그의 기능적 단편(예를 들어, 서열식별번호: 16 및 유럽 특허 번호 EP 3457139 A1), 서열식별번호: 17, 서열식별번호: 18, 롬레투주맵 또는 그의 기능적 단편(RG7116; (Liu et al., 2019, *Biol Proced Online* 21:5); 예를 들어, 서열식별번호: 19, 서열식별번호: 20), 세리반투맵 또는 그의 기능적 단편(MM-121; (Liu et al., 2019, *Biol Proced Online* 21:5); 예를 들어, 서열식별번호: 21 또는 서열식별번호: 22), KTN3379/CDX-3379 또는 그의 기능적 단편((Liu et al., 2019, *Biol Proced Online* 21:5); 예를 들어, 서열식별번호: 23), 파트리투맵 또는 그의 기능적 단편(U3-1287; (Liu et al., 2019, *Biol Proced Online* 21:5); 예를 들어, 서열식별번호: 24, 서열식별번호: 25, 서열식별번호: 26 또는 서열식별번호: 27), 엘렘투맵(LJM716, (Liu et al., 2019, *Biol Proced Online* 21:5)) 또는 그의 기능적 단편, U3-1402(Liu et al., 2019, *Biol Proced Online* 21:5) 또는 그의 기능적 단편, AV-203(Liu et al., 2019, *Biol Proced Online* 21:5) 또는 그의 기능적 단편, GSK2849330(Liu et al., 2019, *Biol Proced Online* 21:5) 또는 그의 기능적 단편, MM-111(Liu et al., 2019, *Biol Proced Online* 21:5) 또는 그의 기능적 단편, MCLA-128(Liu et al., 2019, *Biol Proced Online* 21:5) 또는 그의 기능적 단편, 이스티라투맵(MM-141; (Liu et al., 2019, *Biol Proced Online* 21:5)) 또는 그의 기능적 단편, 돌리고투맵(MEHD7945A; (Liu et al., 2019, *Biol Proced Online* 21:5)) 또는 그의 기능적 단편 또는 페르투주맵 또는 그의 기능적 변이체를 포함하나, 그에 제한되지는 않는다.
- [0030] NK 세포 결속화 도메인이 CD16에 결합하는 단일-도메인 항체(sdAb)를 포함하는 예시적인 실시양태의 문맥에서 본원에 기재되었지만, 면역요법 화합물은 임의의 다른 적합한 NK 결속화 모이어티를 포함할 수 있다. 예시적인 대안적 NK 결속화 모이어티는 NK 세포의 표면에 적어도 부분적으로 위치하는 수용체에 선택적으로 결합할 수 있는 임의의 아미노산 서열을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 따라서, NK 세포 결속화 도메인은 NK 세포에 결합하는 기능을 수행함으로써 NK를 표적화 도메인이 선택적으로 결합하는 표적에 공간적으로 근접하게 가져오도록 할 수 있다. 특정 실시양태에서, NK 세포 결속화 도메인은 NK 세포를 활성화시키는 수용체에 선택적으로 결합할 수 있고, 따라서, 또한 활성화 기능을 보유한다. 예를 들어, CD16 수용체의 활성화는 항체-의존성 세포-매개 세포독성을 유발할 수 있다. 따라서, 예시적인 cam1615HER2 화합물의 NK 세포 결속화 도메인은 NK 활성화 활성을 보유한다. 다른 실시양태에서, NK 세포 결속화 도메인은 NK 세포를 억제하는 메커니즘을 방해할 수 있다. 이러한 실시양태에서, NK 세포 결속화 도메인은, 예를 들어, 항-PD-1/PD-L1, 항-NKG2A, 항-TIGIT, 항-킬러-이류노글로불린 수용체(KIR) 및/또는 임의의 다른 억제 차단 도메인을 포함할 수 있다.
- [0031] NK 세포 결속화 도메인은 임의의 NK 세포 수용체, 예컨대, 예를 들어, 세포독성 수용체 2B4, 저친화도 Fc 수용체 CD16, 킬러 이류노글로불린 유사 수용체(KIR), CD2, NKG2A, TIGIT, NKG2C, LIR-1 및/또는 DNAM-1에 선택적

으로 결합하는 리간드 또는 항체를 포함할 수 있다.

[0032] NK 세포 결속화 도메인을 목적하는 정도의 NK 선택성 및, 따라서, 목적하는 면역 결속화 특징을 보유하도록 설계할 수 있다. 예를 들어, CD16은 Fc 수용체 Fc γ RIIIa(CD16a) 및 Fc γ RIIIb(CD16b)로서 확인된다. 이들 수용체는 IgG 항체의 Fc 부분에 결합하며, 이어서 항체-의존성 세포-매개 세포독성에 대해 NK 세포를 활성화시킨다. 항-CD16 항체는 NK 세포에 선택적으로 결합하지만, 또한 호중구에 결합할 수 있다. 항-CD16a 항체는 NK 세포에 선택적으로 결합하지만, 호중구에는 결합하지 않는다. 항-CD16a 항체를 갖는 NK 세포 결속화 도메인을 포함하는 면역요법 화합물은 NK 세포에 결합할 수 있지만 호중구에는 결합할 수 없다. 따라서, NK 세포는 결속시키지만 호중구는 결속시키지 않기를 원할 수 있는 상황에서, 항-CD16a 항체를 포함하도록 면역요법 화합물의 NK 세포 결속화 도메인을 설계할 수 있다.

[0033] NK 활성화 도메인이 인간 IL-15의 단편을 포함하는 예시적인 실시양태의 문맥에서 본원에 기재되었지만, NK 활성화 도메인은 NK 세포를 활성화시키거나, NK 세포의 지속을 촉진하거나 또는 달리 NK 세포 활성을 촉진하는 임의의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. NK 활성화 도메인은 NK 세포를 활성화 및/또는 지속시킬 수 있는 1종 이상의 시토카인일 수 있거나 또는 그로부터 유래될 수 있다. 본원에 사용된 용어, "로부터 유래된"은 참조된 시토카인의 기능적 변이체, 즉, NK 세포 활성화 및/또는 지속 활성을 제공하기에 충분한 참조된 시토카인과의 서열 유사성 또는 서열 동일성을 갖는 시토카인(예를 들어, IL-15)의 아미노산 단편을 지칭한다. NK 활성화 도메인이 기반할 수 있는 예시적인 시토카인은, 예를 들어, IL-15, IL-18, IL-12 및 IL-21을 포함한다. 따라서, 예시적인 cam1615HER2 화합물은 IL-15로부터 유래된 NK 활성화 도메인을 포함하지만, HER2-표적화 화합물은 임의의 적합한 시토카인이거나 또는 그로부터 유래된 NK 활성화 도메인을 갖도록 설계될 수 있다.

[0034] 본 설명에서의 간결성을 위해, 기반이 되는 시토카인을 확인함으로써 NK 활성화 도메인에 대한 언급은 시토카인의 기능적 변이체 또는 시토카인의 전체 아미노산 서열을 지칭할 수 있다. 시토카인의 기능적 변이체는 1개 이상의 아미노산 결실, 부가 및/또는 치환을 포함하는 시토카인의 변형된 버전 및/또는 시토카인의 임의의 적합한 아미노산 단편을 포함할 수 있다. 따라서, "IL-15" NK 활성화 도메인에 대한 언급은 IL-15의 전체 아미노산 서열을 포함하는 NK 활성화 도메인, IL-15의 단편을 포함하는 NK 활성화 도메인 또는 야생형 IL-15 아미노산 서열과 비교하여 아미노산 치환을 포함하는 NK 활성화 도메인, 예컨대, 예를 들어, IL-15N72D 또는 IL-15N72A를 포함한다.

[0035] 면역요법 화합물이 삼중특이적 킬러 결속제 화합물(즉, TriKE)인 예시적인 실시양태의 문맥에서 상기 기재되었지만, 본원에 기재된 조성물 및 방법은 추가의 도메인을 포함하도록 변형된 면역요법 화합물의 사용을 수반할 수 있다. 예를 들어, 면역요법 화합물은 1개 초과와 표적화 도메인, 1개 초과와 NK 세포 결속화 도메인 및/또는 1개 초과와 NK 활성화 도메인을 갖는 보다 큰 분자이도록 설계될 수 있다. 1개 초과와 NK 활성화 도메인을 포함하는 실시양태에서, NK 활성화 도메인은 직렬로 또는 임의의 다른 조합으로 제공될 수 있다. 임의의 시토카인-기반 NK 활성화 도메인은 면역요법 화합물에 포함된 다른 NK 활성화 도메인의 성질과 독립적으로, 시토카인의 전체 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 아미노산 단편일 수 있거나 또는 시토카인의 변형된 버전일 수 있다.

[0036] 예시적인 추가의 표적화 도메인은 의도된 표적, 예컨대, 예를 들어, 종양 세포, 암 기질에서의 표적, 억제 세포, 예컨대 CD33+인 골수 유래 억제 세포 상의 표적 또는 바이러스-감염된 세포 상의 표적에 선택적으로 결합하는 임의의 모이어티를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 따라서, 표적화 도메인은, 예를 들어, 항-종양 항체, 예컨대 리톡시맙(항-CD20), 아푸투주맙(항-CD20), 페르투주맙(항-HER2/neu), 라베투주맙(항-CEA), 아데카투무맙(항-EpCAM), 시타투주맙 보가톡스(항-EpCAM), 에드레콜로맙(항-EpCAM), 아르시투모맙(항-CEA), 베바시주맙(항-VEGF-A), 세톡시맙(항-EGFR), 니모투주맙(항-EGFR), 파니투무맙(항-EGFR), 잘루투무맙(항-EGFR), 깬투주맙 오조가미신(항-CD33), 린투주맙(항-CD33), 에타라시주맙(항-인테그린 $\alpha_v\beta_3$), 인테투무맙(항-CD51), 이필리무맙(항-CD152), 오레고보맙(항-CA-125), 보투무맙(항-종양 항원 CTAA16.88) 또는 켈투무맙(항-MUC1), 항-CD19, 항-CD20, 항-CD22, 항-CD23, 항-CD30, 항-CD38, 항-CD45, 항-CD52, 항-CD70, 항-CD74, 항-CD133, 항-메소텔린, 항-ROR1, 항-CSPG4, 항-SS1 또는 항-HSPG2, 항-IGF-1, 항-ROR-1, 항-uPAR, 항-VEGFR, 항-LIV-1, 항-SGN-CD70A, 항-IL-3, 항-IL-4R, 항-상피-중간엽 전이(EMT), 항-TRAIL, 항-PD-L1, 유럽 특허 번호 EP 3457139 A1의 서열목록번호: 1-119 중 임의의 1개 이상 또는 상기 중 임의의 것의 기능적 변이체를 포함할 수 있다.

[0037] "기능적 변이체" 아미노산 서열이 참조 아미노산 서열과 비교하여 명시된 양의 서열 동일성 또는 서열 특이성을 보유하는 경우에 아미노산 서열은 참조 아미노산 서열의 "기능적 변이체"이다. "기능적 단편" 아미노산 서열이 참조 아미노산 서열의 전장 미만의 아미노산 서열을 함유하는 경우에 아미노산 서열은 참조 아미노산 서열

의 "기능적 단편"이다. "기능적 단편"은 참조 아미노산 서열과 비교하여 명시된 양의 서열 동일성 또는 서열 특이성을 추가로 보유할 수 있다.

- [0038] 2개의 아미노산 서열의 서열 유사성 및/또는 서열 동일성은 그들의 서열의 길이를 따라 동일한 아미노산의 수를 최적화하기 위해 아미노산 서열의 잔기를 정렬함으로써 결정될 수 있고; 동일한 아미노산의 수를 최적화하기 위해 정렬을 만드는데 어느 1개 또는 둘 다의 서열 내의 갭이 허용되지만, 그럼에도 불구하고 각각의 서열 내의 아미노산은 그의 적절한 순서로 유지되어야 한다.
- [0039] 아미노산 서열의 쌍-별 비교 분석은 GCG 패키지(버전 10.2, 위스콘신주 매디슨)에서 베스트핏(BESTFIT) 알고리즘을 사용하여 수행될 수 있다. 대안적으로, 폴리펩티드는 문헌[Tatiana et al., (*FEMS Microbiol Lett*, 174, 247-250 (1999))]에 기재된 바와 같이 블라스트(BLAST) 2 검색 알고리즘의 Blastp 프로그램을 사용하여 비교될 수 있고, 미국 국립 생물공학 정보 센터(National Center for Biotechnology Information(NCBI)) 웹사이트 상에서 입수 가능하다. 행렬 = BLOSUM62; 개방 갭 페널티 = 11, 연장 갭 페널티 = 1, 갭 x_드롭오프 = 50, 기대치 = 10, 워드크기 = 3 및 필터 온을 포함한 모든 블라스트 2 검색 파라미터에 대한 디폴트 값이 사용될 수 있다.
- [0040] 2개의 아미노산 서열의 비교에서, 구조적 유사성은 퍼센트 "동일성"으로 지칭될 수 있거나 또는 퍼센트 "유사성"으로 지칭될 수 있다. "동일성"은 동일한 아미노산의 존재를 지칭한다. "유사성"은 동일한 아미노산의 존재를 지칭할 뿐만 아니라 보존적 치환의 존재를 허용한다. 아미노산 서열 내의 아미노산 잔기에 대한 보존적 치환은 아미노산 잔기가 속하는 부류의 다른 구성원으로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 비극성(소수성) 아미노산은 알라닌, 류신, 이소류신, 발린, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판 및 티로신을 포함한다. 극성 중성 아미노산은 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민을 포함한다. 양이온으로 하전된(염기성) 아미노산은 아르기닌, 리신 및 히스티딘을 포함한다. 음이온으로 하전된(산성) 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함한다. 따라서, 보존적 치환은, 예를 들어, 양전하를 유지하기 위해 Arg에 대해 Lys 및 그 반대; 음전하를 유지하기 위해 Asp에 대해 Glu 및 그 반대; 자유 -OH가 유지되도록 Thr에 대해 Ser; 및 자유 -NH₂를 유지하기 위해 Asn에 대해 Gln을 포함한다.
- [0041] 따라서, 특정한 크기 또는 특징(예를 들어, 전하, 소수성 또는 친수성)을 갖는 아미노산의 군에 속하는 아미노산은 단백질의 활성을 변경시키지 않으면서, 특히 생물학적 활성과 직접적으로 연관되지 않은 단백질의 영역에서 또 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 생물학적 활성과 직접적으로 연관되지 않은 아미노산 서열 내의 영역은 관련 아미노산 서열을 비교하는 경우 가변성(예를 들어, 부가, 결실 또는 비-보존적 치환)이 존재하는 영역을 확인하는 정렬 분석으로부터 추론될 수 있다. 본원에 제공된 아미노산 서열 및/또는 데이터베이스에서 용이하게 입수 가능한 아미노산 서열을 사용하여 정렬 분석을 수행할 수 있다.
- [0042] NK 결속화 도메인, NK 활성화 도메인 또는 표적화 도메인은 참조 아미노산 서열(예를 들어, 참조 항체 단편, 시토키인 또는 시토키인 단편)과 적어도 85 %, 적어도 86 %, 적어도 87 %, 적어도 88 %, 적어도 89 %, 적어도 90 %, 적어도 91 %, 적어도 92 %, 적어도 93 %, 적어도 94 %, 적어도 95 %, 적어도 96 %, 적어도 97 %, 적어도 98 % 또는 적어도 99 % 서열 유사성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0043] NK 결속화 도메인, NK 활성화 도메인 또는 표적화 도메인은 참조 아미노산 서열과 적어도 85 %, 적어도 86 %, 적어도 87 %, 적어도 88 %, 적어도 89 %, 적어도 90 %, 적어도 91 %, 적어도 92 %, 적어도 93 %, 적어도 94 %, 적어도 95 %, 적어도 96 %, 적어도 97 %, 적어도 98 % 또는 적어도 99 % 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0044] 본원에 기재된 바와 같은 면역요법 화합물은 또한, 예를 들어, 칼립 상의 포획 또는 항체의 사용에 의해 정제를 용이하게 할 수 있는, 예를 들어, 부가된 C-말단 또는 N-말단 아미노산의 부가와 같은 추가의 서열을 제공하도록 설계될 수 있다. 이러한 태그는, 예를 들어, 니켈 칼립 상에서 폴리펩티드의 정제를 가능하게 하는 히스티딘-풍부 태그를 포함한다. 이러한 유전자 변형 기술 및 적합한 추가의 서열은 분자 생물학 분야에 널리 공지되어 있다.
- [0045] 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 임의의 면역요법 화합물을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 이러한 폴리뉴클레오티드 서열의 상보체를 제공한다. 본원에 기재된 면역요법 화합물 폴리펩티드 중 임의의 1종(또는 면역요법 화합물의 1종 이상의 성분 단편)의 아미노산 서열이 제시되면, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 통상적인, 일상적인 방법을 사용하여 그 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 전체 범위를 결정할 수 있다.
- [0046] 도 1A는 항체-의존성 세포독성(ADCC) 및 NK 세포 확장 둘 다가 가능한, 본원에서 cam1615HER2(서열식별번호:

1)로 지칭되는 제2 세대 TriKE의 예시적인 실시양태의 예시적인 구축을 보여준다. cam1615HER2 TriKE는 NK 세포 결속화 도메인으로서 항-CD16 VHH를 포함한다. 항-CD16 VHH는 낙타류 항체의 중쇄의 가변 영역이다. 도 1B는 pET 발현 벡터에서의 TriKE 코딩 서열의 배치를 보여주는 플라스미드 맵이다. 도 2B는 봉입체로부터의 정제의 제1 단계로서 FFQ 이온 교환 칼럼을 통과할 때의 표적 단백질 및 박테리아의 분획의 흡광도 추적을 보여준다. 용리액을 8 ml 분취액으로 수집하였다. 도 2C는 제2 정제 단계, 크기 배제 크로마토그래피(SEC)로부터의 흡광도 추적을 보여준다. 양측 화살표는 cam1615HER2가 칼럼을 나갈 때 수집된 표적 피크를 보여준다. 도 2A는 균일한 생성물의 증거를 제공하는 쿠마시 블루 염색과 함께 SDS-PAGE를 사용하여 분석한 경우의 최종 생성물(분획 C2-D4)을 대부분 단일 밴드로서 보여준다. 최종 생성물은 90 % 초과로 순수하였고 분자량은 약 55 kDa이었다.

[0047] 그러나, cam1615HER2 TriKE는 다른 방식으로 구축될 수 있다. 각각 완전한 면역요법 화합물의 일부의 합성을 코딩하고 지시하는 다중 구축물을 설계하는 것이 가능하다. 예를 들어, 항-HER2 경쇄(예를 들어, 서열식별번호: 17)는 1개의 플라스미드 상에서 코딩될 수 있고, 항-HER2 중쇄(예를 들어, 서열식별번호: 18)는 제2 플라스미드 상에서 코딩될 수 있다. 둘 다의 플라스미드가 숙주 세포 내로 도입되고 발현되는 경우, 항-HER2 경쇄 및 항-HER2 중쇄는 이량체화되어 면역요법 화합물의 표적화 모이어티로서 항-HER2 Fab을 형성할 수 있다. cam1615HER2 TriKE는 이러한 방식으로 구축될 수 있다. 예를 들어, 서열식별번호: 31은 신호 펩티드, 항-HER2 경쇄, 링커, IL-15 아미노산 서열, 제2 링커 및 낙타류 항-CD16 단일 도메인 항체 단편을 함유하는 아미노산 서열인, 예시적인 제1 플라스미드로부터 발현된 아미노산 서열을 제공한다. 서열식별번호: 32는 신호 펩티드 및 항-HER2 중쇄를 함유하는 아미노산 서열인, 예시적인 제2 플라스미드로부터 발현된 아미노산 서열을 제공한다.

[0048] 또 다른 예로서, 단일 플라스미드 구축물은 완전한 면역요법 화합물의 모든 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 서열식별번호: 33은 신호 서열, 항-HER2 중쇄 단편, T2A 자기-절단 펩티드, 제2 신호 서열, 항-HER2 경쇄 단편, 링커, IL-15 아미노산 서열, 제2 링커 및 낙타류 항-CD16 단일 도메인 항체 단편을 포함하는 아미노산 서열인, 예시적인 단일-플라스미드 구축물로부터 발현된 아미노산 서열을 제공한다. 발현되는 경우, T2A 펩티드는 자기-절단하여, 항-HER2 중쇄 단편을 면역요법 화합물의 나머지에서 분리하여 항-HER2 경쇄 단편과 이량체화할 수 있다.

[0049] 예시적인 cam1615HER2 TriKE에서, 인간 IL-15 TriKE 모이어티는 분자의 확장 능력을 보유한다. 따라서, NK 확장에 영향을 미치는 cam1615HER2 중 IL-15 모이어티의 능력을 측정하였다. 도 3A 및 도 3B는 비처리 대조군(NT) 및 IL-15 대조군과 비교하여 50 nM cam1615HER2 TriKE와의 7일의 인큐베이션 후의 고도로 증식된 CD56⁺CD3⁻ NK 세포의 백분율 및 NK 세포의 총 백분율을 보여준다. 둘 다는 cam1615HER2와의 인큐베이션 후에 유의하게 상승하였다. 마찬가지로, cam1615HER2에 대한 노출은 또한 NT 대조군과 비교하여 총 NK 계수를 유의하게 향상시켰다(도 3C). 도 3D-F는 비처리 대조군과 비교하여 CD3⁺CD56⁻ T 세포 백분율 및 원 수가 상승되지 않았음을 보여준다. 종합하면, 이들 연구는 HER2 TriKE가 NK 세포의 확장은 자극하지만 T 세포는 그렇지 않다는 것을 나타낸다. 데이터는 또한 TriKE 내의 IL-15 모이어티가 기능적이고, 생존 가능한 형태적 정렬에 있다는 것을 보여준다.

[0050] 세포독성은 NK 면역요법의 특징이다. 항체-의존성 세포독성(ADCC) 효력을 확립하기 위해, 다양한 세포주를 NK 세포 세포독성의 허용된 척도인 CD107a 발현에 대해 분석하였다. cam1615HER2 TriKE를 SKOV3 및 SK-BR-3에 대해 시험하였는데, 이는 유방암 및 일부 난소암 사례가 ERBB2를 과발현하는 것으로 공지되어 있어, 이를 항체-지정 표적화를 위한 바람직한 표적이 되게 하기 때문이다. UMSCC-11B 세포주는 그것이 HER2의 최소 발현을 갖기 때문에 음성 대조군으로서 시험하였다. 먼저, 다양한 작용제를 FITC 표지한 다음 그들의 표적에 대한 직접 결합을 유동 세포측정법에 의해 시험함으로써 결합을 측정하였다. SKOV3(도 4A) 및 SK-BR-3(도 4B)은 최고 수준의 HER2 TriKE 결합을 보여주었다. UMSCC-11B는 보다 낮은 수준의 결합을 보여주었다(도 4C).

[0051] ADCC 활성을 측정하였을 때, cam1615HER2 TriKE는 IL-15 및 비처리 대조군과 비교하여 SKOV3 및 SK-BR-3 세포주에 대해 고도로 상승된 CD107a 활성을 보여주었다(도 5A, 5C). ADCC를 UMSCC-11B 세포주 상에서 시험하였을 때, cam1615HER2 TriKE는 거의 효과를 갖지 않았다(도 5E). 또한, SKOV-3(도 5B) 및 SK-BR-3(도 5D) cam1615HER2는 cam1615HER2 TriKE로 처리한 경우에 상승된 IFN- γ 활성화를 보여주었다.

[0052] cam1615HER2 TriKE를 유방암 세포주 MCF-7L에 대해 추가로 시험하였다. 도 6A는 첨가된 표적 세포가 없는 CD107a 이펙터 세포 백그라운드를 보여준다. 도 6B는 표적이 첨가된 경우의 CD107a 활성을 보여준다. 대조군과 비교하여 cam1615HER2 TriKE에서 가장 높은 수준의 사멸이 관찰되었다. cam16 자체는 활성을 갖지만, 높지

는 않았다. MCF-7L의 하위주(MCF-7L-TamR)는 타목시펜 저항성이고, cam1615HER2 TriKE로 처리된 경우에 CD107a 활성의 유사한 패턴을 보여주었다(도 6C). NK 세포는, 사멸시키도록 활성화되는 경우, 또한 항암 시도 카인, 예컨대 IFN- γ 을 분비하는 것에 대해 공지되어 있다. 도 6E는 세포내 염색에 의해 동일한 샘플에서 정량화된 IFN- γ 수준이 cam1615HER2 TriKE로 상승되었고, 대조군에서 최소로 영향을 받았음을 보여주며, 이는 NK 세포 활성화를 나타낸다. 이는 MCF-7L-TamR에 대해서도 동일하였다(도 6F). 도 6D는 SK-BR-3 세포의 cam1615HER2 TriKE 사멸을 입증하고, 그가 트라스투주맵과 마찬가지로 사멸시킨다는 것을 나타낸다. 도 6H는 cam1615HER2 TriKE가 트라스투주맵보다 훨씬 더 큰 IFN- γ 증진 활성을 갖는다는 것을 보여준다. 종합하면, 이들 데이터는 HER2가 인간 유방암 세포 상의 면역 결속체에 대한 유효한 표적이고, 선천적 면역요법이 약물 저항성 유방암 세포주에 대해 시험관내에서 고도로 효과적이라는 것을 보여준다.

[0053] 도 12는 HER2를 발현하는 2종의 추가의 세포주인 OVCAR-3 및 OVCAR-5에 대한 cam1615HER2 TriKE의 활성을 보여주는 데이터를 제공한다. 다시, cam1615HER2 TriKE는 대조군과 비교하여 상승된 CD107a 활성(도 12A, 12B) 및 IFN- γ 활성(도 12D, 12E)을 보여준다. SKOV3을 평가하는 반복 실험은 항-HER2 scFv 단독(e23), cam16 VHH 단독, IL-15 단독 및 비처리 대조군을 포함하는 보다 광범위한 수의 음성 대조군과 함께 포함된다. 다시, 약물은 대조군과 비교하여 상승된 CD107a 활성(도 12C) 및 상승된 IFN- γ 활성(도 12F)을 보여준다.

[0054] 사멸을 2일에 걸쳐 인큐사이트 줌(INCUCYTE ZOOM) 플랫폼(에센 바이오사이언스, 인크., 미시간주 앤 아버)을 사용하여 실시간으로 추가로 평가하였다. 구상체로서 배양물 중에서 성장시킨 SKOV3을 연구하였다. 누클라이트 레드(NUCLIGHT RED)(에센 바이오사이언스, 인크., 미시간주 앤 아버)로 안정하게 형질도입된 SKOV3을 풍부화된 NK 세포 및 cam1615HER2 TriKE, 유리 IL-15, cam16 VHH 단독 또는 비처리와 함께 인큐베이션하였다. 세포 사멸을 검출하기 위해 카스파제 3/7 녹색 시약을 첨가하였다. 죽어가는 세포는 녹색이 되고, 죽어가는 누클라이트 레드 라지(Raji) 세포는 황색이 되어, 남아있는 살아있는 세포의 추적을 허용한다. 데이터를 컴파일링하였을 때, cam1615HER2 TriKE는 IL-15, cam16 VHH 단독 및 비처리 대조군과 비교하여 72시간의 연속 측정에 걸쳐 SKOV3 구상체 크기(도 7A) 및 구상체 강도(도 7B)에서의 인상적인 하락을 유도하였다. 도 8은 cam1615HER2가 72-시간 기간에 걸쳐 측정된 표적 세포의 급격한 시간-의존성 감소를 유발함을 보여주는 영상을 제공한다. 이 직접-사멸 분석에서의 발견은 CD107a 분석에서의 발견과 상관관계가 있었다.

[0055] 동의한 암 환자로부터의 NK 세포가 분석에서 작용할 것인지 여부를 결정하기 위해 정상 지원자 대신 6명의 동의한 난소암 환자로부터 NK 세포를 수득하였고, MA-148 난소암 세포에 대해 시험하였다. 도 9A는 cam1615HER2 TriKE 또는 대조군에 의한 것보다 암 세포 없이 이펙터의 처리 시 보다 낮은 CD107a 백그라운드를 보여준다. 도 9B는 비처리 대조군과 비교하여 cam1615HER2 TriKE로의 처리 시 이펙터 플러스 종양 표적에서의 CD107a 발현의 유의한 상승을 보여준다. IFN- γ 활성에 관하여, 도 9E는 cam1615HER2 TriKE로 처리한 경우에 표적이 없는 이펙터에서의 낮은 활성을 보여준다. 이펙터 세포를 첨가한 경우, cam1615HER2 TriKE는 증진된 IFN- γ 활성을 보였다(도 9F). 비교를 위해, 도 9C는 정상 공여자 이펙터 세포의 CD107a 백그라운드를 보여주고, 도 9D는 MA148 암 세포를 갖는 정상 공여자 세포의 CD107a 활성을 보여준다. 도 9G는 정상 공여자 이펙터 세포의 IFN- γ 백그라운드를 보여주고, 도 9H는 MA148 암 세포를 갖는 정상 공여자 세포의 IFN- γ 활성을 보여준다. 정상 또는 환자 NK 세포를 암 세포와 혼합하였을 때 경향이 유사했지만, 정상 세포의 활성이 다소 더 높았다. 그럼에도, 환자로부터의 이펙터 세포는 TriKE 자극을 할 수 있다.

[0056] 도 10은 SCID/hu/NK 이중이식편 모델을 사용한 cam1615HER2 TriKE의 생체내 효능을 입증하는 데이터를 보여준다. 도 10A 및 10B는 SKOV3 종양 세포를 복강내 접종한지 약 6주 후에 마우스의 비처리군(도 10A) 및 처리군(도 10B)의 시각적 영상화 데이터를 보여준다. 진행성 종양 진행은 비처리 마우스 군에서 명백하였고(도 10A), 처리 마우스 군에서 명백하게 감소하였다(도 10B).

[0057] 도 11A는 46-일 기간에 걸친 동물 체중의 최소 변화를 보여주며, cam1615HER2 TriKE가 매일 투여에도 불구하고 독성이 아님을 나타낸다. 도 11B는 2회의 독립적인 실험으로부터의 총 종양 생체발광(총 플럭스)의 비교 스냅샷이고, 심지어 종양 투여 후 제46일에, 종양 성장이 치료군 대 비처리군에서 유의하게 억제된다는 것을 보여준다. 도 11C는 시간에 따른 종양 성장(생체발광)의 전반적인 진행을 보여준다. 46-일 기간에 걸쳐, 종양 성장은 처리군에서 유의하게 억제되었으나, 종양 성장은 제39일에 재발하기 시작하였다. 도 11D는 생존 플롯에서 보다 장기간의 결과를 보여준다. 제52일까지 비처리군에서 6마리의 동물 중 5마리가 사망하였고, 제60일까지 모든 비처리군 동물이 사망하였다. 대조적으로, cam1615HER2-처리군에서는 제72일까지 여전히 50%가 생존하였다. cam1615HER2-TriKE-처리군의 나머지 동물은 여전히 종양 부하를 나타내었고, 따라서 처리는 억제성이었으며, 치유성이지 않았다. 종합하면, 이들 데이터는 cam1615HER2 TriKE가 생체내 인간 난소 암종의 성장을 억제

하는데 효과적이라는 것을 입증한다.

- [0058] 따라서, 본원에 제시된 데이터는 HER2가 면역요법 화합물, 예컨대 삼중특이적 킬러 결속제(TriKE) 화합물에 의해 표적화되는 경우 난소암 및 유방암에 대한 면역요법 표적으로서 작용한다는 것을 입증한다. 예시적인 면역요법 화합물은 타목시펜 불응성 세포에 대해 효과적이고, 따라서 타목시펜 또는 다른 화학요법제에 저항성인 암 세포를 용이하게 사멸시킬 수 있다. 본 개시내용은 추가로 예시적인 면역요법 화합물인, HER2-표적화 NK 결속화 TriKE가 인간 NK 세포 및 암 세포 둘 다를 이중 마우스에 생착시키는 것을 수반하는 모델인 복강내 난소암 이종이식편 모델에서 생체내 암을 억제할 수 있다는 것을 입증한다. 본원에 제시된 데이터는 HER3 및/또는 HER2/HER3 이중이량체를 표적화하는 면역요법 화합물에 대한 기초를 추가로 제공한다.
- [0059] 본원에 기재된 면역요법 화합물은 제약상 허용되는 담체와 함께 제제화될 수 있다. 본원에 사용된 "담체"는 임의의 용매, 분산 매질, 비히클, 코팅, 희석제, 항박테리아제 및/또는 항진균제, 등장화제, 흡수 지연제, 완충제, 담체 용액, 현탁액, 콜로이드 등을 포함한다. 제약 활성 물질을 위한 이러한 매질 및/또는 작용제의 사용은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 작용제가 활성 성분과 비상용성인 경우를 제외하고는, 치료 조성물에서의 그의 사용이 고려된다. 보조 활성 성분이 또한 조성물에 혼입될 수 있다. 본원에 사용된 "제약상 허용되는"은 생물학적으로 또는 달리 바람직하지 않은 것이 아닌 물질을 지칭하며, 즉, 물질은 그것이 함유되어 있는 제약 조성물의 임의의 다른 성분과 유해한 방식으로 상호작용하거나 임의의 바람직하지 않은 생물학적 효과를 유발하지 않으면서 면역요법 화합물과 함께 개체에 투여될 수 있다.
- [0060] 따라서, 면역요법 화합물은 제약 조성물로 제제화될 수 있다. 제약 조성물은 바람직한 투여 경로에 적합화된 다양한 형태로 제제화될 수 있다. 따라서, 조성물은, 예를 들어, 경구, 비경구(예를 들어, 피내, 경피, 피하, 근육내, 정맥내, 복강내 등) 또는 국소(예를 들어, 비측, 폐내, 유방내, 질내, 자궁내, 피내, 경피, 직장 등)를 포함하는 공지된 경로를 통해 투여될 수 있다. 제약 조성물은, 예컨대, 예를 들어, 비측 또는 호흡 점막으로의 투여에 의해(예를 들어, 스프레이 또는 에어로졸에 의해) 점막 표면에 투여될 수 있다. 조성물은 또한 지속 또는 지연 방출을 통해 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 조성물은 복강내로, 정맥내로 또는 피하로 투여된다.
- [0061] 따라서, 면역요법 화합물은 용액, 현탁액, 에멀전, 스프레이, 에어로졸 또는 임의의 형태의 혼합물을 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 적합한 형태로 제공될 수 있다. 조성물은 임의의 제약상 허용되는 부형제, 담체 또는 비히클과 함께 제제로 전달될 수 있다. 예를 들어, 제제는 통상적인 국소 투여 형태, 예컨대, 예를 들어, 크림, 연고, 에어로졸 제제, 비-에어로졸 스프레이, 젤, 로션 등으로 전달될 수 있다. 제제는 예컨대, 예를 들어, 보조제, 피부 침투 증진제, 착색제, 향료, 향미제, 보습제, 증점제 등을 포함하는 1종 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 조성물은 용액 또는 현탁액으로 제제화될 수 있다.
- [0062] 제제는 편리하게는 단위 투여 형태로 제공될 수 있고, 제약 기술분야에 널리 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. 제약상 허용되는 담체를 갖는 조성물을 제조하는 방법은 면역요법 화합물을 1종 이상의 보조적인 성분을 구성하는 담체와 결합시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 제제는 활성 분자를 액체 담체, 미분된 고체 담체 또는 둘 다와 균일하게 및/또는 치밀하게 결합시킨 다음, 필요한 경우에, 생성물을 목적하는 제제로 성형시킴으로써 제조될 수 있다.
- [0063] 따라서, 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에서 암을 치료하는 방법을 기재한다. 일반적으로, 방법은 대상체에게 암을 치료하기 위한 면역요법 화합물의 유효량을 투여하는 것을 포함한다. "치료하다" 또는 그의 변형은 상태와 관련된 증상 또는 징후를 임의의 정도로 감소, 진행 제한, 완화 또는 해결하는 것을 지칭한다. 본원에 사용된 "완화하다"는 특정한 상태의 특징적인 임상 징후 또는 증상의 정도, 중증도, 빈도 및/또는 가능성의 임의의 감소를 지칭하고; "증상"은 질병의 또는 환자 상태의 임의의 주관적 증거를 지칭하고; "징후" 또는 "임상 징후"는 환자 이외의 다른 것에 의해 발견될 수 있는 특정 상태와 관련된 객관적 신체 소견을 지칭한다.
- [0064] "치료"는 치료적 또는 예방적일 수 있다. "치료적" 및 그의 변형은 상태와 연관된 1개 이상의 기존 증상 또는 임상 징후를 완화하는 치료를 지칭한다. "예방적" 및 그의 변형은 상태의 증상 또는 임상 징후의 발생 및/또는 출현을 임의의 정도로 제한하는 치료를 지칭한다. 일반적으로, "치료적" 치료는 대상체에서 상태가 나타난 후에 개시되는 반면, "예방적" 치료는 대상체에서 상태가 나타나기 전에 개시된다. 따라서, 특정 실시양태에서, 방법은 상태가 발생할 위험이 있는 대상체의 예방적 치료를 수반할 수 있다. "위험이 있는"은 기재된 위험을 실제로 보유할 수 있거나 보유하지 않을 수 있는 대상체를 지칭한다. 따라서, 예를 들어, 특정 상태가 발생할 "위험이 있는" 대상체는, 대상체가 상태를 갖거나 발생하는 임의의 증상 또는 임상 징후를 나타내는지 여부에 관계없이, 1개 이상의 징후가 결여된 개체와 비교하여 특정 상태를 갖거나 발생할 증가된 위험의 1개 이상의 징

후를 보유하는 대상체이다. 상태의 예시적인 징후는, 예를 들어, 유전적 소인, 혈통, 연령, 성별, 지리적 위치, 생활방식 또는 병력을 포함할 수 있다. 치료는 또한 증상이 해결된 후에, 예를 들어 그의 재발을 방지하거나 지연시키기 위해 계속될 수 있다.

- [0065] 따라서, 면역요법 화합물은 대상체가 처음으로 상태의 증상 또는 임상 징후를 나타내기 전에, 그 동안에 또는 그 후에 대상체에게 투여될 수 있다. 대상체가 처음으로 상태와 연관된 증상 또는 임상 징후를 나타내기 전에 개시된 치료는 면역요법 화합물이 투여되지 않은 대상체와 비교하여 대상체가 상태의 임상 증거를 경험할 가능성을 감소시키고, 상태의 증상 및/또는 임상 징후의 중증도를 감소시키고 및/또한 상태를 완전히 해결할 수 있다. 대상체가 처음으로 상태와 연관된 증상 또는 임상 징후를 나타낸 후에 개시된 치료는 면역요법 화합물이 투여되지 않은 대상체와 비교하여 상태의 증상 및/또는 임상 징후의 중증도를 감소시키고 및/또한 상태를 완전히 해결할 수 있다.
- [0066] 투여되는 면역요법 화합물의 양은 투여되는 특정 면역요법 화합물, 대상체의 체중, 신체 상태 및/또는 연령 및/또는 투여 경로를 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 인자에 의해 달라질 수 있다. 따라서, 주어진 단위 투여 형태에 포함되는 면역요법 화합물의 절대 중량은 광범위하게 달라질 수 있고, 인자, 예컨대 대상체의 중, 연령, 체중 및 신체 상태 및/또는 투여 방법에 따라 달라진다. 따라서, 모든 가능한 적용에 효과적인 면역요법 화합물의 양을 구성하는 양을 일반적으로 제시하는 것은 실용적이지 않다. 그러나, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 이러한 인자를 적절히 고려하여 적절한 양을 용이하게 결정할 수 있다.
- [0067] 일부 실시양태에서, 방법은 대상체에게, 예를 들어, 약 100 ng/kg/일 내지 약 10 mg/kg/일의 용량을 제공하기에 충분한 면역요법 화합물을 투여하는 것을 포함할 수 있지만, 일부 실시양태에서 방법은 면역요법 화합물을 이 범위 밖의 용량으로 투여함으로써 수행될 수 있다.
- [0068] 일부 실시양태에서, 방법은 적어도 100 ng/kg/일, 예컨대, 예를 들어, 적어도 1 μg/kg/일, 적어도 5 μg/kg/일, 적어도 10 μg/kg/일, 적어도 25 μg/kg/일, 적어도 50 μg/kg/일, 적어도 100 μg/kg/일, 적어도 200 μg/kg/일, 적어도 300 μg/kg/일, 적어도 400 μg/kg/일, 적어도 500 μg/kg/일, 적어도 600 μg/kg/일, 적어도 700 μg/kg/일, 적어도 800 μg/kg/일, 적어도 900 μg/kg/일 또는 적어도 1 mg/kg/일의 최소 용량을 제공하기에 충분한 면역요법 화합물을 투여하는 것을 포함할 수 있다.
- [0069] 일부 실시양태에서, 방법은 10 mg/kg/일 이하, 예컨대, 예를 들어, 5 mg/kg/일 이하, 4 mg/kg/일 이하, 3 mg/kg/일 이하, 2 mg/kg/일 이하, 1 mg/kg/일 이하, 900 μg/kg/일 이하, 800 μg/kg/일 이하, 700 μg/kg/일 이하, 600 μg/kg/일 이하, 500 μg/kg/일 이하, 400 μg/kg/일 이하, 300 μg/kg/일 이하, 200 μg/kg/일 이하, 100 μg/kg/일 이하, 90 μg/kg/일 이하, 80 μg/kg/일 이하, 70 μg/kg/일 이하, 60 μg/kg/일 이하, 50 μg/kg/일 이하, 40 μg/kg/일 이하, 30 μg/kg/일 이하, 20 μg/kg/일 이하 또는 10 μg/kg/일 이하의 최대 용량을 제공하기에 충분한 면역요법 화합물을 투여하는 것을 포함한다. 면역요법 화합물이 부재하지 않지만 명시된 양 포함 및 명시된 양까지의 양으로 존재하는 경우에, 면역요법 화합물은 명시된 양의 "이하"의 용량을 제공한다.
- [0070] 일부 실시양태에서, 방법은 상기 확인된 임의의 최소 용량 및 선택된 최소 용량보다 더 큰 임의의 최대 용량에 의해 정의된 끝점을 갖는 범위를 특징으로 하는 용량을 제공하기에 충분한 면역요법 화합물을 투여하는 것을 포함한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 방법은 대상체에게 약 10 μg/kg/일 내지 약 10 mg/kg/일의 용량, 약 100 μg/kg/일 내지 약 1 mg/kg/일의 용량, 5 μg/kg/일 내지 100 μg/kg/일의 용량 등을 제공하기에 충분한 면역요법 화합물을 투여하는 것을 포함할 수 있다.
- [0071] 특정 실시양태에서, 방법은 상기 열거된 임의의 최소 용량 또는 임의의 최대 용량과 동일한 용량을 제공하기에 충분한 면역요법 화합물을 투여하는 것을 포함한다. 따라서, 예를 들어, 특정 실시양태에서, 방법은 1 μg/kg/일, 5 μg/kg/일, 10 μg/kg/일, 25 μg/kg/일, 50 μg/kg/일, 100 μg/kg/일, 200 μg/kg/일, 500 μg/kg/일, 1 mg/kg/일, 5 mg/kg/일 등의 용량을 제공하기에 충분한 면역요법 화합물을 투여하는 것을 포함할 수 있다.
- [0072] 일부 실시양태에서, 면역요법 화합물은, 예를 들어, 1주 당 단일 용량 내지 다중 용량으로 투여될 수 있지만, 일부 실시양태에서 방법은 면역요법 화합물을 이 범위 밖의 빈도로 투여함으로써 수행될 수 있다. 특정 실시양태에서, 면역요법 화합물은 1개월에 약 1회 내지 1주에 약 5회 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 24-시간 기간에 걸쳐 투여되는 면역요법 화합물의 양의 관점에서 기재된 상기 나타내어진 용량은, 4일의 치료 및 3일의 휴지의 7-일 주기로 투여된다.
- [0073] 일부 실시양태에서, 면역요법 화합물은, 예를 들어, 단일 용량 내지 치료의 다중 주기로 투여될 수 있지만, 일

부 실시양태에서 방법은 면역요법 화합물을 이러한 범위 밖의 기간 동안 투여함으로써 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 면역요법 화합물은 3주 동안 투여될 수 있다. 이러한 실시양태에서, 각각의 주는 치료 주기, 예컨대 상기 단락에 기재된 예시적인 치료 주기일 수 있다. 다른 실시양태에서, 면역요법 화합물은 치료 주기의 1 세트와 치료 주기의 후속 세트 사이에 겹 없이 보다 많은 수의 치료 주기 동안 투여될 수 있다. 치료 주기의 1 세트와 치료 주기의 후속 세트 사이의 겹은 1주 이상, 1개월 이상 또는 1년 이상의 겹일 수 있다.

[0074] 일부 실시양태에서, 방법은 1종 이상의 추가의 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 1종 이상의 추가의 치료제(예를 들어, 화학요법제)는 면역요법 화합물의 투여 전에, 그 후에 및/또는 그와 동시에 투여될 수 있다. 면역요법 화합물 및 추가의 치료제는 공동 투여될 수 있다. 본원에 사용된 "공동 투여된"은 조합물의 치료적 또는 예방적 효과가 단독으로 투여된 어느 한 성분의 치료적 또는 예방적 효과보다 더 클 수 있도록 투여된 조합물의 2종 이상의 성분을 지칭한다. 2종의 성분은 동시에 또는 순차적으로 공동 투여될 수 있다. 동시에 공동 투여되는 성분은 1종 이상의 제약 조성물로 제공될 수 있다. 2종 이상의 성분의 순차적 공동 투여는 각각의 성분이 동시에 치료 부위에 존재할 수 있도록 성분이 투여되는 경우를 포함한다. 대안적으로, 2종의 성분의 순차적 공동 투여는 적어도 1종의 성분이 치료 부위로부터 제거되었지만, 성분 투여의 적어도 1종의 세포 효과(예를 들어, 시토키인 생산, 특정 세포 집단의 활성화 등)가 1종 이상의 추가의 성분이 치료 부위에 투여될 때까지 치료 부위에서 지속되는 경우를 포함할 수 있다. 따라서, 공동 투여되는 조합물은, 특정 상황에서, 서로와의 화학적 혼합물로 결코 존재하지 않는 성분을 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 면역요법 화합물 및 추가의 치료제는 혼합물 또는 콕테일의 일부로서 투여될 수 있다. 일부 측면에서, 면역요법 화합물의 투여는 다른 치료제 또는 치료제들 단독의 투여와 비교하는 경우 더 낮은 투여량의 다른 치료 양식의 유효성을 허용할 수 있고, 그에 따라 더 높은 용량의 다른 치료제 또는 치료제들이 투여될 때 관찰되는 가능성, 중증도 및/또는 독성의 정도를 감소시킬 수 있다.

[0075] 예시적인 추가의 치료제는 알트레타민, 암사크린, L-아스파라기나제, 콜라스파제, 블레오마이신, 부술판, 카페시타빈, 카르보플라틴, 카르무스틴, 클로람부실, 시스플라틴, 클라드리빈, 시클로포스파미드, 시토포스판, 시타라빈, 다카르바진, 닥티노마이신, 다우노루비신, 도세탁셀, 독소루비신, 에피루비신, 에토포시드, 플루오로우라실, 플루다라빈, 포테무스틴, 간시클로비르, 겐시타빈, 히드록시우레아, 이다루비신, 이포스파미드, 이리노테칸, 로무스틴, 멜팔란, 메르캅토포린, 메토티렉세이트, 미톡산트론, 미토마이신 C, 니무스틴, 옥살리플라틴, 파클리탁셀, 페메트렉세드, 프로카르바진, 라티트렉세드, 테모졸로미드, 테니포시드, 티오구아닌, 티오테파, 토포테칸, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신 및 비노렐빈, 항-HER2 항체 요법, 항-HER3 항체 요법(예를 들어, (Liu et al., 2019, *Biol Proced Online* 21:5) 참조) 또는 항-HER2/HER3 이중이량체 복합체 항체 요법(예를 들어, (Liu et al., 2019, *Biol Proced Online* 21:5) 참조)을 포함한다.

[0076] 일부 실시양태에서, 방법은 본원에 기재된 바와 같은 충분한 면역요법 화합물을 투여하는 것 및 치료적 상승작용을 입증하는 적어도 1종의 추가의 치료제를 투여하는 것을 포함할 수 있다. 본 발명의 방법의 일부 측면에서, 본원에 기재된 바와 같은 면역요법 화합물 및 추가의 치료제 둘 다를 투여한 후에 관찰된 치료에 대한 반응의 측정치는 면역요법 화합물 또는 추가의 치료제를 단독으로 투여한 후에 관찰된 치료에 대한 반응의 동일한 측정치에 비해 개선된다. 일부 실시양태에서, 추가의 치료제는, 예를 들어, EpCAM 특이적 모노클로날 항체, 예컨대, 예를 들어, EpCAM 및 CD3을 표적화하는 모노클로날 하이브리드 항체인 카툼악소맴을 포함하는, EpCAM을 표적화하는 추가의 작용제를 포함할 수 있다.

[0077] 일부 실시양태에서, 대상체에게 면역요법 화합물을 투여하는 것은 생체내 내인성 NK 세포를 자극할 수 있다. 생체내 방법의 일부로서 면역요법 화합물을 사용하는 것은 동시 공동-자극, 생존의 증진 및 확장과 함께 NK 세포를 항원 특이적으로 만들 수 있다. 다른 경우에, 면역요법 화합물은 NK 세포 입양 전달 요법에 대한 보조제로서 시험관내에서 사용될 수 있다.

[0078] 상기 설명 및 하기 청구항에서, 용어 "및/또는"은 열거된 요소 중 1종 또는 모두 또는 열거된 요소 중 임의의 2종 이상의 조합을 의미하고; 용어 "포함한다", "포함하는" 및 그의 변형은 개방형으로 해석되어야 하며-즉, 추가의 요소 또는 단계는 임의적이고, 존재할 수 있거나 존재하지 않을 수 있고; 달리 명시되지 않는 한, 단수 형태의 표현 및 "적어도 1종"은 상호교환 가능하게 사용되고 1개 또는 1개 초과를 의미하고; 끝점에 의한 수치 범위의 언급은 그 범위 내에 포함된 모든 수를 포함한다(예를 들어, 1 내지 5는 1, 1.5, 2, 2.75, 3, 3.80, 4, 5 등을 포함한다).

[0079] 상기 설명에서, 특정한 실시양태는 명확성을 위해 별개로 기재될 수 있다. 특정한 실시양태의 특색이 또 다른 실시양태의 특색과 비상용성인 것으로 달리 명백하게 명시되지 않는 한, 특정 실시양태는 1종 이상의 실시양태

와 관련하여 본원에 기재된 상용성 특색의 조합을 포함할 수 있다.

- [0080] 별개의 단계를 포함하는 본원에 개시된 임의의 방법에 대해, 단계는 임의의 실현 가능한 순서로 수행될 수 있다. 또한, 적절한 경우에, 2개 이상의 단계의 임의의 조합이 동시에 수행될 수 있다.
- [0081] 본 발명은 하기 실시예에 의해 예시된다. 특정한 실시예, 물질, 양 및 절차는 본원에 제시된 바와 같은 본 발명의 범주 및 취지에 따라 광범위하게 해석되어야 하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0082] 실시예
- [0083] cam1615HER TriKE의 구축
- [0084] 낙타화 항-CD16으로부터의 CDR 영역을 코딩하는 DNA 단편(Vincke et al., 2009, *J. Biol. Chem.* 284(5):3273-3284)을 항원 특이성 및 친화도의 전달을 갖는 항원-결합 루프의 이식편을 허용하는 것으로 이전에 보여진 보편적인 인간화 나노바디 스캐폴드로 스플라이싱하였다(Behar et al., 2008, *Protein Engineering, Design & Selection* 21(1):1-10). 이 새로운 서열을 사용하여 cam1615HER2(서열식별번호: 1)를 제조하였다. cam1615HER2 TriKE를 코딩하는 완전히 조립된 하이브리드 유전자 *cam1615HER2*는 NcoI 제한 부위; ATG 개시 코돈; 항-인간 CD16 VHH; PSGQAGAAASESLFVSNHAY의 20-아미노산(aa) 절편(서열식별번호: 3); 인간 IL-15; EASGGPE의 7개 아미노산 링커(서열식별번호: 5); 항-HER2 scFv(Batra et al., 1992, *Proc Natl Acad Sci USA* 89(13):5867-5871) 및 XhoI 제한 부위를 코딩한다(5' 말단에서 3' 말단으로). 생성된 하이브리드 유전자(서열식별번호: 7)를 이소프로필-D-티오갈락토피라노시드(IPTG) 유도성 T7 프로모터의 제어 하에서 pET28c 발현 벡터 내로 스플라이싱하였다. cam1615HER2를 코딩하는 DNA 표적 유전자는 1517개 염기쌍이었다. 야생형 인간 IL-15를 사용하였고, 시토키인의 돌연변이된 형태는 사용하지 않았다. 미국 미네소타주 세인트폴의 미네소타 대학교의 바이오메디칼 게노믹스 센터(Biomedical Genomics Center)는 유전자 서열 및 표적 유전자의 프레임 내 정확도를 검증하였다.
- [0085] 봉입체로부터의 단백질 정제
- [0086] 플라즈미드 형질감염 후 단백질 발현을 위해 *에스케리키아 콜라이* 균주.BL21(DE3)(노바젠(Novagen), 위스콘신주 매디슨)을 사용하였다. 박테리아를 50 µg/ml 카나마이신을 함유하는 800-ml 루리아(Luria) 브로쓰에서 밤새 배양하였다. 배지가 600 nm에서 0.65의 흡광도에 도달하였을 때 IPTG(써모 피셔 사이언티픽, 인크(Thermo Fisher Scientific, Inc.), 뉴저지주 페어 론)를 첨가함으로써 발현을 유도하였다. 박테리아 발현은 봉입체 내로의 표적 단백질의 패키징을 초래하였다. 발현 후, 박테리아를 수확하고, 이어서 완충제(50 mM 트리스, 50 mM NaCl 및 5 mM EDTA pH 8.0) 중에서 균질화하고, 펠릿을 초음파 처리하고, 원심분리하였다. 펠릿으로부터 단백질을 추출하기 위해, 0.3 % 나트륨 데옥시소르베이트, 5 % 트리톤 X-100, 10 % 글리세린, 50 mmol/L 트리스, 50 mmol/L NaCl 및 5 mmol/L EDTA(pH 8.0)의 용액을 사용하고, 추출물을 3회 세척하였다.
- [0087] 봉입체로부터의 단백질은 재폴딩을 필요로 한다. 따라서, 이전에 기재된 방법으로부터 변형된 나트륨 N-라우로실-사르코신(SLS) 공기 산화 방법을 사용하였다(Vallera et al., 2005, *Leuk Res* 29(3):331-341). 간략하게, 봉입체를 100 mM 트리스, 2.5 % SLS(시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), 미주리주 세인트 루이스) 중에 용해시켰다. 펠릿을 원심분리에 의해 제거하였다. 50 µM의 CuSO₄를 용액에 첨가하고, 이어서 -SH 기의 공기-산화물 위해 20시간 동안 신속하게 교반하면서 실온에서 인큐베이션하였다. SLS의 제거는 계면활성제-가용화된 단백질 용액에 6 M 우레아 및 10 % AG 1-X8 수지(200-400 메쉬, 클로라이드 형태)(바이오-라드 래보러토리즈, 인크(Bio-Rad Laboratories, Inc.), 캘리포니아주 허클레스)를 첨가함으로써 수행하였다. 다음 단계는 13.3 M 구아니딘-HCl을 단백질 용액에 첨가한 후, 37 °C에서 2 내지 3시간 동안 인큐베이션하였다. 용액을 재폴딩 완충제(50 mM 트리스, 0.5 M L-아르기닌, 1 M 우레아, 20 % 글리세롤, 5 mM EDTA, pH 8.0)로 20배 희석하였다. 혼합물을 4 °C에서 2일 동안 인큐베이션하였다. 완충제를 제거하기 위해, 샘플을 4 °C에서 48시간 동안 pH 8.0에서 5 부피의 20 mM 트리스-HCl에 대해 투석하고, 이어서 추가 18시간 동안 8 부피에 대해 투석하였다. 이어서, 생성물을 먼저 고속 유동 Q 이온 교환 크로마토그래피에 의해, 이어서 크기 배제 칼럼(슈퍼덱스(SUPERDEX) 200, 시티바(Cytiva), 매사추세츠주 말보로)에 통과시키는 것에 의해 정제하였다. 소듐 도데실 술페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)을 심플리 블루 라이프 스테인(Simply Blue life Stain)(인비트로젠(Invitrogen), 캘리포니아주 칼스바드)을 사용해 수행하여 단백질 크기 및 순도를 평가하였다.
- [0088] 암 세포주
- [0089] 하기 세포주를 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection)(버지니아주, 마나사스)으로부터

입수하였다: MCF-7L(관상 유방 암종), MCF-7L-TamR(MCF-7L의 타목시펜-저항성 하위주), SKOV3(난소 복수), SK-BR-3(전이 부위로부터 유래된 유방 암종), 후두 종양으로부터 유래된 UMSSC-11B 편평 세포 암종(Worsham et al., 2006, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 132:668-677), HL-60(급성 전골수구성 백혈병), MA-148(난소 암종) 및 SKOV3-luc. 생체내 실험을 위해, 리포펙타민(LIPOFECTAMINE)(인비트로젠, 캘리포니아주 칼스배드)을 사용하여 루시페라제 리포터 구축물로 SKOV3을 형질감염시키고, 10 µg/ml의 블라스토시딘으로 선택압을 적용함으로써 SKOV3-luc를 제조하였다. UMSSC-11B는 존 홉킨스 대학의 프래그먼트 어널리시스 퍼실리티(Fragment Analysis Facility)에 의해 수행된 STR 시험에 의해 입증되었다. MA148(미네소타 대학교에서 지역적으로 확립된다)은 인간 상피 난소 암종 세포주이다. 세포주를 10-20 % 소 태아 혈청(FBS) 및 2 mmol/L L-글루타민으로 보충된 RPMI 1640 RPMI에서 유지하였다. 세포주를 일정한 37 °C에서 5 % CO₂를 함유하는 가슴 분위기에서 인큐베이션하였다. 부착성 세포가 90 % 초과로 전면성장한 때, 이들을 분리를 위해 트립신-EDTA를 사용하여 계대배양하였다. 세포 계수를 위해 표준 혈구계를 사용하였다. 트립판 블루 배제에 의해 결정된 바와 같이, 생존율 > 95 %를 갖는 세포만을 실험에 사용하였다.

[0090] 세포독성 및 NK 세포 활성화의 평가

[0091] 항체-의존성 세포독성(ADCC)을 CD107a(리소솜-연관 막 단백질 LAMP-1) 유동 세포측정법 분석을 사용하여 측정하였다. 이펙터 세포의 경우, PBMC는 기증자 동의 및 기관 검토 위원회(Institutional Review Board)의 허가를 획득한 후 정상 지원자로부터 획득하였다. 암 표적 세포를 상기 기재된 바와 같이 세포주로부터 성장시켰다. 환자 이펙터 세포를 사용한 실험을 위해, 미네소타 대학교 암 센터 조직 조달 시설(University of Minnesota Cancer Center Tissue Procurement Facility)은 기관 검토 위원회로부터의 승인 후에 난소암으로 진단된 환자로부터 고-등급 장액성 복수 샘플을 획득하였다. 모든 시편을 원발성 용적축소 수술 시에 진행-단계 난소 또는 원발성 복막 암종으로 진단된 여성으로부터 수집하였다. 세포를 펠릿화하고, 용해시켜 적혈구를 제거하고, 10 % DMSO/90 % FBS 중에 동결보존하고, 액체 질소 중에 저장하였다.

[0092] PBMC를 10 % 소 태아 혈청(RPMI-10)으로 보충된 RPMI 1640 배지에서 밤새 인큐베이션하고(37 °C, 5 % CO₂), RPMI-10으로 3회 세척한 후 배지 또는 종양 표적 세포로 현탁시켰다. 이어서, 세포를 TriKE 또는 대조군과 함께 37 °C에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC)-접합된 항-인간 CD107a 모노클로날 항체(BD 바이오사이언시스(BD Biosciences), 캘리포니아주 산호세)를 첨가하고 1시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 골지스톱(GolgiStop)(1:1,500, BD 바이오사이언시스, 캘리포니아주 산호세) 및 골지플러그(GolgiPlug)(1:1,000, BD 바이오사이언시스, 캘리포니아주 산호세)를 3시간 동안 첨가하였다(37 °C, 5 % CO₂). 포스페이트 완충 염수로 세척한 후, 세포를 PE/Cy7-접합된 항-CD56 mAb, APC/Cy7-접합된 항-CD16 mAb 및 PE-CF594-접합된 항-CD3 mAb(바이올레전드(BioLegend), 캘리포니아주 샌디에고)로 염색하였다. 세포를 4 °C에서 15분 동안 인큐베이션하고, 세척하고, 2 % 파라포름알데히드로 고정시켰다.

[0093] 세포내 IFN- γ 를 NK 세포 활성화의 지표로서 측정하였다. 간략하게, 세포를 투과화 완충제(BD 바이오사이언시스, 캘리포니아주 산호세)에 노출시키고, 퍼시픽 블루(Pacific Blue)-접합된 항인간 IFN- γ (바이올레전드, 캘리포니아주 샌디에고)와 함께 20분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 최종적으로 세척하고 CD56⁺CD3⁻ 세포 상에서 LSRII 유동 세포측정기(BD 바이오사이언시스, 캘리포니아주 산호세) 게이팅을 사용하여 형광-활성화 세포 분류 분석에 의해 평가하였다.

[0094] 세포독성 효력을 추가로 실시간으로 측정하였다. 자기 비드 풍부화된 CD56⁺CD3⁻ NK 이펙터 세포를 적색 표지된 종양 세포와 함께 96-웰 편평 투명 바닥 폴리스티렌 조직-배양 처리된 마이크로플레이트(코닝(Corning), 영국 플린트셔)에 플레이팅하고, 플레이트를 37 °C/5 % CO₂에서 세포 인큐베이터 내부에 하우스징된 인큐사이트 줌 플랫폼(에센 바이오사이언스, 인크., 미시간주 앤 아버)으로 옮겼다. 4× 대물 렌즈를 사용하여 48시간 동안 15분마다 3회의 기술적 반복실험으로부터의 영상을 찍은 다음 인큐사이트 베이직 소프트웨어(INCUCYTE Basic Software)(에센 바이오사이언스, 인크., 미시간주 앤 아버)를 사용해 분석하였다.

[0095] IL-15 자극을 통한 NK 세포 확장

[0096] 그의 기능적 IL-15 모이어티에 의존하는 TriKE 효력을 측정하기 위해, 건강한 공여자로부터의 PBMC 또는 풍부화된 NK 세포를 키트 설명서에 따라 셀트레이스(CELLTRACE) 바이올렛 증식 염료(인비트로젠, 캘리포니아주 칼스배드)로 표지하였다. 염색 후에, 이펙터 세포를 50 nM의 TriKE 또는 대조군과 함께 배양하고, 5 % CO₂를 함유하는 가슴 분위기 하에 37 °C에서 7일 동안 인큐베이션하였다. 세포를 수확하고, 생존율에 대해 라이브/데드

(Live/Dead) 시약(인비트로젠, 미국 캘리포니아주 칼스배드)으로 염색하고, 항-CD56 PE/Cy7(바이오레전드, 캘리포니아주 샌디에고) 및 항-CD3 PE-CF594(BD 바이오사이언시스, 뉴저지주 프랭클린 레이크스)에 대해 표면 염색하여 생존 가능한 CD3⁻CD56⁺ NK 세포 집단에 대해 게이팅하였다. 데이터 분석은 플로우조(FlowJo) 소프트웨어(플로우조 엔터프라이즈 LCC(Flowjo enterprise LCC), 버전 7.6.5, 오레곤주 앳슈랜드)를 사용하여 수행하였다.

[0097]

생체내 마우스 연구 및 영상화

[0098]

HER2 TriKE의 효능을 이전에 보고되었지만(Vallera et al., 2016, *Clin Cancer Res* 22(14):3440-3450), 인간 난소암 세포주 SCOV3의 성장에 대해 변형된 scid/hu 마우스 모델에서 시험하였다. 세포주를 루시페라제 리포터 유전자로 형질감염시켜, 실시간으로 생체발광 영상화를 통한 중앙 진행의 모니터링을 허용하였다. NSG 마우스(NOD.Cg-Prkdc^{scid} I12rg^{tm1Wjl}/SzJ, n = 5/군)에게 2×10^5 개의 SCOV3 세포를 복강내 주사하고, 이어서 3-5일 후에 저-용량 전신 방사선(275 cGy)을 조사하였다. 다음날, 모든 군에게 고도로 풍부화된 NK 세포(자기적으로 CD3 및 CD19 고갈된 PBMC)를 제공하고 cam1615HER2 TriKE로의 처리를 시작하였다. 처리의 단일 과정은 2주 동안 1주에 5회(MTWF) 복강내로 제공된 약물 50 µg 및 이어서 제60일까지 1주에 3회(MWF) 유지 요법으로 이루어졌다. 살아있는 마우스를 매주 영상화하였다. 각각의 영상화 세션에서, 마우스에게 100 µl의 30 mg/ml 루시페린 기질을 10분 동안 주사하고, 이어서 이소플루란 기체 진정 하에 영상화하였다. 리빙 이미지(Living Image) 2.5 소프트웨어(제노겐 코퍼레이션(Xenogen Corporation), 매사추세츠주 홉킨턴)를 갖는 제노겐 이비스(Xenogen Ivis) 100 영상화 시스템을 사용하여 영상화 데이터를 수집하였다. 마우스를 가능한 경우 매주 칭량하였다.

[0099]

본원에 인용된 모든 특허, 특허 출원 및 간행물 및 전자적으로 이용 가능한 자료(예를 들어, 예를 들어 진뱅크(GenBank) 및 RefSeq에서의 뉴클레오티드 서열 제출 및 예를 들어 스위스프로트(SwissProt), PIR, PRF, PDB에서의 아미노산 서열 제출 및 진뱅크 및 RefSeq에서의 주석 달린 코딩 영역으로부터의 번역 포함)의 완전한 개시내용은 그 전문이 참조로 포함된다. 본 출원의 개시내용과 본원에 참조로 포함된 임의의 문헌의 개시내용(들) 사이에 임의의 불일치가 존재하는 경우에, 본 출원의 개시내용이 지배할 것이다. 상기 상세한 설명 및 실시예는 단지 명확한 이해를 위해 제공되었다. 그로부터 불필요한 제한은 없는 것으로 이해된다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백한 변형이 청구범위에 의해 정의된 본 발명 내에 포함될 것이기 때문에, 본 발명은 보여지고 기재된 정확한 세부사항으로 제한되지 않는다.

[0100]

달리 나타내지 않는 한, 명세서 및 청구범위에 사용된 성분의 양, 분자량 등을 표현하는 모든 수치는 모든 경우에 용어 "약"에 의해 수식되는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 달리 반대로 나타내지 않는 한, 명세서 및 청구범위에 제시된 수치 파라미터는 본 발명에 의해 수득하고자 하는 목적하는 특성에 따라 달라질 수 있는 근사치이다. 적어도 및 균등론을 청구범위의 범위로 제한하려는 시도가 아닌 것으로서, 각각의 수치 파라미터는 적어도 보고된 유효 숫자의 수에 비추어 및 통상의 반올림 기술을 적용함으로써 해석되어야 한다.

[0101]

본 발명의 넓은 범위를 제시하는 수치 범위 및 파라미터는 근사치이지만, 특정 실시예에 제시된 수치 값은 가능한 한 정확하게 보고된다. 그러나, 모든 수치 값은 본질적으로 그의 각각의 시험 측정에서 발견되는 표준 편차로부터 필연적으로 생성되는 범위를 함유한다.

[0102]

모든 표제는 독자의 편의를 위한 것이고, 달리 명시되지 않는 한, 표제에 이어지는 본문의 의미를 제한하는데 사용되지 않아야 한다.

서열 목록 자유 텍스트

서열식별번호: 1 - cam1615HER2 아미노산 서열:

MEQVQLVESG GGLVQPGGSL RLSCAASGLT FSSYNMGWFR QAPQGGLAV ASITWGRDT
 FYADSVKGRF TISRDNKNT LYLQMNLSRA EDTAVYYCAA NPWPVAAPRS GTYWGQGLV
 TVSSPSGQAG AAASESLFVS NHAYNWNVI SDLKKIEDLI QSMHIDATLY TESDVHPCK
 VTAMKCFLE LQVISLESGD ASIHDTVENL IILANNSLSS NGNVTEGCK ECEELEEKNI
 KEFLQSFVHI VQMFINTSEA SGGPEDVQLT QSPAILSASP GEKVTMTCRA TPSVSYMHWY
 QQKPGSSPKP WIYTSTNLAS GVPARFSGGG SGTSYSLTVS RVEAEDAATY YCQQWSRSP
 TFGGGSKLEI KGSTSGSGKS SEGKGVQLQE SGPEVVKPGG SMKISCKTSG YSFTGHTMNW
 VKQSHGKNLE WIGLINPYNG DTNYNQKFKG KATFTVDKSS STAYMELLSL TSEDSAVYYC
 ARRVDWYFD VWGAGTTTV S

서열식별번호: 2 - cam16(서열식별번호: 1 의 아미노산 3-124)

QVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLTFS SYNMGWFRQA PGQGLEAVAS ITWGRDIFY
 ADSVKGRFTI SRDNKNTLY LQMNLSRAED TAVYYCAANP WPVAAPRSGT YWGQGLVTV
 SS

서열식별번호: 3 - hma 링커(서열식별번호: 1 의 아미노산 125-144)

PSGQAGAAAS ESLFVSNHAY

서열식별번호: 4 - 인간 IL-15(서열식별번호: 1 의 아미노산 145-258)

NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD VHPCKVTAM KCFLLELQVI SLESGDASIH
 DTVENLIILA NNSLSSNGNV TEGCKECEE LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

서열식별번호: 5 - 링커(서열식별번호: 1 의 아미노산 259-265)

EASGGPE

서열식별번호: 6 - 항-HER2(서열식별번호: 1 의 아미노산 266-501)

DVQLTQSPAI LSASPGEKVT MTCRATPSVS YMHWYQQKPG SSPKPWIYTT SNLASGVPAR
 FSGGSGTSY SLTVSRVEAE DAATYYCQW SRSPPTFGG SKLEIKGSTS GSGKSSEGK
 VQLQESGPEV VKPGGSMKIS CKTSGYSFTG HTMNWVKQSH GKNLEWIGLI NPYNGDTNYN
 QKFKGKATFT VDKSSSTAYM ELLSLTSEDS AVYYCARRVT DWYFDVWGAG TTVTVS

서열식별번호: 7 - cam1615HER2 DNA 서열

CCATGAGca ggtgcagctg gtggagtctg ggggagcctt ggtgcagcct gggggctctc
 tgagactctc ctgtgcagcc tctggcctca ccttcagtag ctataacatg ggctggttcc

[0103]

```

gccaggtcc agggcaaggc ctgaggctg tagcatctat tacctggagt ggtcgggaca
cattctatgc agactccgtg aagggccgat tcacatctc cagagacaac tccaagaaca
ctctctatct gcaaatgaac agcctgcgcg cggaggacac ggccgtttat tattgtgctg
caaaccctct gccagtggcg gccccacgta gtggcaccta ctggggccaa gggaccctgg
tcaccgtctc ctaccgtct ggtcaggctg gtgctgctgc tagcgaatct ctgttcgttt
ctaaccacgc ttacAACTGG GTGAATGTAA TAAGTGATTT GAAAAAATTT GAAGATCTTA
TTCAATCTAT GCATATTGAT GCTACTTTAT ATACGGAAAG TGATGTTTAC CCCAGTTGCA
AAGTAACAGC AATGAAGTGC TTTCTCTTGG AGTTACAAGT TATTTCACTT GAGTCCGGAG
ATGCAAGTAT TCATGATACA GTAGAAAATC TGATCATCCT AGCAAACAAC AGTTTGTCTT
CTAATGGGAA TGTAACAGAA TCTGGATGCA AAGAATGTGA GGAAGTGGAG GAAAAAATA
TTAAGAATT TTTGCAGAGT TTTGTACATA TTGTCCAAAT GTTCATCAAC ACTTCTgaag
cttccggagg tcccagagGAC GTCCAGCTGA CCCAGTCTCC AGCAATCCTG TCTGCATCTC
CAGGGGAGAA GGTCACAATG ACTTGCAGGG CCACCCCAAG TGTAAGTTAC ATGCACTGGT
ATCAGCAGAA GCCAGGATCC TCCCCAAAC CTGGATTTA TACCACATCC AACCTGGCTT
CTGGAGTCCC TGCTCGCTTC AGTGGCGGTG GGTCTGGGAC CTCTTACTCT CTCACAGTCA
GCAGAGTGGG GGCTGAAGAT GCTGCCACTT ATTACTGCCA GCAGTGGAGT CGTAGCCAC
CCAGGTTCGG AGGGGGTCC AAGCTGGAAA TAAAAGGTTT TACCTCTGGT TCTGGTAAAT
CTTCTGAAGG TAAAGGTGTG CAGCTGCAGG AGTCAGGACC TGAGGTGGTG AAGCCTGGAG
GTTCAATGAA GATATCCTGC AAGACTTCTG GTTACTCATT CACTGGCCAC ACCATGAACT
GGGTGAAGCA GAGCCATGGA AAGAACCCTG AGTGGATTGG ACTTATTAAT CCTTACAATG
GTGATACTAA CTACAACCAG AAGTTCAAGG GCAAGGCCAC ATTTACTGTA GACAAGTCGT
CCAGCACAGC CTACATGGAG CTCCTCAGTC TGACATCTGA GGACTCTGCA GTCTATTACT
GTGCAAGGAG GGTTACGGAC TGTTACTTCG ATGTCTGGGG CGCAGGGACC ACGGTCACCG
TCTCCTaata gctcgag
    
```

서열식별번호: 8 - NcoI 제한부위 및 개시 코돈(서열식별번호: 7 의 1-8)

CCATGGAG

서열식별번호: 9 - cam16(서열식별번호: 7 의 9-374)

```

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttgggtgcagc ctgggggctc tctgagactc
tcctgtgcag cctctggcct caccttcagt agctataaca tgggtctggtt ccgccaggct
ccagggcaag gccttgagcg tgtagcatct attacctgga gtggtcggga cacattctat
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca actccaagaa cactctctat
ctgcaaatga acagcctgcg cgcggaggac acggccgttt attattgtgc tgcaaacccc
tggccagtgg cggcgccacg tagtggcacc tactggggcc aagggaccct ggtcaccgtc
tcctca
    
```

서열식별번호: 10 - hma 링커(서열식별번호: 7 의 375-434)

ccgtctggtc aggtctggtc tgctgctagc gaatctctgt tcgtttctaa ccacgcttac

서열식별번호: 11 - 인간 IL-15(서열식별번호: 7 의 435-776)

```

AACTGGGTGA ATGTAATAAG TGATTTGAAA AAAATTGAAG ATCTTATTCA ATCTATGCAT
ATTGATGCTA CTTTATATAC GGAAAGTGAT GTTCACCCCA GTTGCAAAGT AACAGCAATG
AAGTGCTTTC TCTTGGAGTT ACAAGTTATT TCACTTGAGT CCGGAGATGC AAGTATTTCAT
GATACAGTAG AAAATCTGAT CATCCTAGCA AACAACAGTT TGTCTTCTAA TGGGAATGTA
    
```

[0104]

ACAGAATCTG GATGCAAAGA ATGTGAGGAA CTGGAGGAAA AAAATATTAA AGAATTTTGG
CAGAGTTTTG TACATATTGT CCAAATGTTC ATCAACACTT CT

서열식별번호: 12 - 링커(서열식별번호: 7 의 777-797)

gaagcttccg gaggtcccga g

서열식별번호: 13 - 항-HER2(서열식별번호: 7 의 798-1505)

GACGTCCAGC TGACCCAGTC TCCAGCAATC CTGTCTGCAT CTCCAGGGGA GAAGGTCACA
ATGACTTGCA GGGCCACCCC AAGTGTAACT TACATGCACT GGTATCAGCA GAAGCCAGGA
TCCTCCCCCA AACCTTGGAT TTATACCACA TCCAACCTGG CTCTGGAGT CCCTGCTCGC
TTCAGTGGCG GTGGGTCTGG GACCTCTTAC TCTCTCACAG TCAGCAGAGT GGAGGCTGAA
GATGCTGCCA CTTATFACTG CCAGCAGTGG AGTCGTAGCC CACCCACGTT CGGAGGGGGG
TCCAAGCTGG AAATAAAAGG TTCTACCTCT GGTCTGGTA AATCTTCTGA AGGTAAAGGT
GTGCAGCTGC AGGAGTCAGG ACCTGAGGTG GTGAAGCCTG GAGGTTCAAT GAAGATATCC
TGCAAGACTT CTGGTTACTC ATTCACTGGC CACACCATGA ACTGGGTGAA GCAGAGCCAT
GGAAAGAACC TTGAGTGGAT TGGACTTATT AATCCTTACA ATGGTGATAC TAACTACAAC
CAGAAGTTCA AGGGCAAGGC CACATTTACT GTAGACAAGT CGTCCAGCAC AGCCTACATG
GAGCTCCTCA GTCTGACATC TGAGGACTCT GCAGTCTATT ACTGTGCAAG GAGGGTTACG
GACTGGTACT TCGATGTCTG GGGCGCAGGG ACCACGGTCA CCGTCTCC

서열식별번호: 14 - 2 개의 종결 코돈 및 XhoI 제한 부위(서열식별번호: 7 의 1506-1517)

taatagctcg aga

서열식별번호: 15 - e23 항-HER2 아미노산 서열

DVQLTQSPA I LSASPGKVT MTCRATPSVS YMHWYQKPG SSPKPWIYTT SNLASGVPAR
FSGGGSGTSY SLTVSRVEAE DAATYYCQQW SRSPPFTFGG SKLEIKGSTS GSGKSSEKKG
VQLQESGPEV VKPGGSMKIS CKTSGYSFTG HTMNWVKQSH GKNLEWIGLI NPYNGDTNYN
QKFKGKATFT VDKSSSTAYM ELLSLTSEDS AVYYCARRVT DWYFDVWGAG TTVTVS

서열식별번호: 16 - 트라스투주맵-기반 scFv

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWRQA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY
ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYV GQGLVTVVSS
GSTSGSGKPG SGEKSTKEDI QMTQSPSSLS ASVGDRVTIT CRASQDVNTA VAWYQKPKGK
APKLLIYSAS FLYSGVPSRF SGRSGTDFT LTISLQPED FATYYCQHY TTPPTFGQGT
KVEIKRTV

서열식별번호: 17 - 항-HER2 경쇄

DIQMTQSPSS LSASVDRVT ITCRASQDVN TAVAWYQKPK GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS
RFSGRSGTD FTLTISLQEP EDFATYYCQQ HYTTPPTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP

[0105]

SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGE C

서열식별번호: 18 - 항-HER2 중쇄

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWRQA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY
ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNLSRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGTLVTVSS
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHNKPS NTKVDKKEVEP KSCDK

서열식별번호: 19 - 룬레투주맵 중쇄

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFR SSYISWVRQA PGQGLEWMGW IYAGTGSPSY
NQKLGGRVTM TDDTSTSTAY MELRSLRSD TAVYYCARHR DYYSNSLTYW GQGTLVTVSS
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHNKPS NTKVDKKEVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG
PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVDVVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFPYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG

서열식별번호: 20 - 룬레투주맵 경쇄

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSVL NSGNQKNYLT WYQQKPGQPP KLLIYWASTR
ESGVPDRFSG SGSSTDFDTL ISSLQAEDVA VYQCQSDYSY PYTFGQGTKL EIKRTVAAPS
VFI FPPSDEQ LKSGTASVVC LLNNFYPREA KVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKSTYS
LSSTLTLSKA DYEKHKVYAC EVTHQGLSSP VTKSFNRGEC

서열식별번호: 21 - 세리반투맵 중쇄

EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIF HYVMAWVRQA PGKGLEWVSS ISSSGGWTLY
ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNLSRAED TAVYYCTRGL KMATIFDYWG GQGTLVTVSSA
STKGPSVFP APCSRSTSES TAALGCLVKD YFPEPVTVSW NSGALTSKV HTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTV PSSNFGTQTY TCNVDHKPSN TKVDKTKVERK CCVECPCCPA PPVAGPSVFL
FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTFRV
VSVLTVVHQD WLGNGKEYKCK VSNKGLPAPI EKTISKTKGQ PREPQVYTL PPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFPYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
FSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG

서열식별번호: 22 - 세리반투맵 경쇄

QSALTQPASV SGSPQSITI SCTGTSSDVG SYNVSWSYQQ HPGKAPKLLI YEVSQRPSGV
SNRFGSKSG NTASLTISGL QTEDEADYIC CSYAGSSIFV IFGGGTKVTV LGQPKAAPSV
TLFPPSSEEL QANKATLVCLVSDFYPGA VAWKADGSPV KGVGVTTKPS KQSNNKYAAS
SYLSLTPEQW KSHRSYSCRV THEGSTVEKT VAPAEC

서열식별번호: 23 - KTN3379 경쇄

[0106]

QSVLTQPPSA SGTPEGQRTI SCSGSLSNIG LNYVSWYQQL PGTAPKLLIS RNNQRPSGVP
 DRFSGSKSGT SASLAISGLR SEDEADYYCA AWDDSPGGEA FGGGTCLTVL GQPKAAPSVT
 LFPPSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAFTV AWKADSSPVK AGVETTKPSK QSNKYAASS
 YLSLTPEQWK SHRSYSCQVT HEGSTVEKTV APTECS

서열식별번호: 24 - 파트리투맵 서브유닛 1

QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGGFS GYYWSWIRQP PGKGLEWIGE INHSGSTNYN
 PSLKSRVTIS VETSKNQFSL KLSVTAADT AVYYCARDKW TWYFDLWGRG TLVTVSSAST
 KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY
 SLSSVVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKHTCPCPCP APELLGGPSV
 FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK
 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
 NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK

서열식별번호: 25 - 파트리투맵 서브유닛 2

QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGGFS GYYWSWIRQP PGKGLEWIGE INHSGSTNYN
 PSLKSRVTIS VETSKNQFSL KLSVTAADT AVYYCARDKW TWYFDLWGRG TLVTVSSAST
 KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY
 SLSSVVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKHTCPCPCP APELLGGPSV
 FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK
 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
 NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK

서열식별번호: 26 - 파트리투맵 서브유닛 3

DIEMTQSPDS LAVSLGERAT INCRSSQSVL YSSSNRNYLA WYQQNPGQPP KLLIYWASTR
 ESGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCQQYYST PRTFGQGTKV EIKRTVAAPS
 VFIFPPSDEQ LKSGTASVVC LLNMFYPREA KVQWKVDNAL QSGNSQESVT EQDSKDYSTYS
 LSSTLTLSKA DYEKHKVYAC EVTHQGLSSP VTKSFNRGEC

서열식별번호: 27 - 파트리투맵 서브유닛 4

DIEMTQSPDS LAVSLGERAT INCRSSQSVL YSSSNRNYLA WYQQNPGQPP KLLIYWASTR
 ESGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCQQYYST PRTFGQGTKV EIKRTVAAPS
 VFIFPPSDEQ LKSGTASVVC LLNMFYPREA KVQWKVDNAL QSGNSQESVT EQDSKDYSTYS
 LSSTLTLSKA DYEKHKVYAC EVTHQGLSSP VTKSFNRGEC

서열식별번호: 28 - 트라스투주맵-기반 TriKE 아미노산 서열

QVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLTFS SYNMGWFRQA PGQGLEAVAS ITWSGRDTFY
 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAANP WPVAAPRSGT YWGQGLTVTV
 SSSGGGSGG GSGGGGSGG GSGSNWVNI SDLKKIEDLI QSMHIDATLY TESDVHPSCK
 VTAMKCFLE LQVISLESGL ASIHDVTENL IILANNSLSS NGNVTEGCK ECEELEEKNI

[0107]

KEFLQSFVHI VQMFINTSGS TSGSGKPGSG EGSTKGEVQL VESGGGLVQP GGSRLRSCAA
 SGNFKDITYI HWVRQAPGKG LEWVARIYPT NGYTRYADSV KGRFTISADT SKNTAYLQMN
 SLRAEDTAVY YCSRWGGDGF YAMDYWGQGT LVTVSSGSTS GSGKPGSGEG STKGDIQMTQ
 SPSSLSASVG DRVTTICRAS QDVNTAVAWY QQKPGKAPKL LIYSASFLYS GVPSRFSGSR
 SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQHYTTPP TFGQGTKVEI KRTV

서열식별번호: 29 - 트라스투주맵-기반 TriKE DNA 서열 - 인간 코돈 최적화

CAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTGCAGC CTGGGGGCTC TCTGAGACTC
 TCCTGTGCAG CCTCTGGCCT CACCTTCAGT AGCTATAACA TGGGCTGGTT CCGCCAGGCT
 CCAGGGCAAG GCCTTGAGGC TGTAGCATCT ATTACCTGGA GTGGTCGGGA CACATCTAT
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG ATTCACCATC TCCAGAGACA ACTCCAAGAA CACTCTCTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG CGCGGAGGAC ACGGCCGTTT ATTATGTGTC TGCAAACCCC
 TGGCCAGTGG CCGCGCCACG TAGTGGCACC TACTGGGGCC AAGGGACCCT GGTACCCTGC
 TCCTCATCTG GCGGCGGCGG TTCTGGTGGA GGAGGTAGTG GGGGGGGAGG AAGCGGAGGG
 GGTGGCTCAG GGAAC TGGGT GAATGTAATA AGTGATTTGA AAAAAATTGA AGATCTTATT
 CAATCTATGC ATATTGATGC TACTTTATAT ACGGAAAGTG ATGTTACACC CAGTTGCAAA
 GTAACAGCAA TGAAGTGCTT TCTCTTGGAG TTACAAGTTA TTTCACCTGA GTCGGGAGAT
 GCAAGTATTC ATGATACAGT AGAAAATCTG ATCATCCTAG CAAACAACAG TTTGTCTTCT
 AATGGGAATG TAACAGAATC TGGATGCAAA GAATGTGAGG AACTGGAGGA AAAAAATATT
 AAAGAATTTT TGCAGAGTTT TGTACATATT GTCCAATGT TCATCAACAC TTCTGCGAGT
 ACCAGCGGGT CAGGGAAACC TGGCAGTGGG GAAGGTTC CAAGAGGTGA GGTTCAGCTC
 GTGGAAATCCG GCGGCGGGCT GGTCCAACCA GGTGGGAGTC TCCGCCTGTC ATGTGCCGCA
 AGCGGATTCA ATATAAAAAGA TACATATATA CATTGGGTAA GACAGGCCCC CGGTAAGGGT
 CTGGAGTGGG TTGCCAGAAT TTATCCCACT AATGGATACA CTCGTTACGC CGATTCTGTG
 AAAGGCCGGT TTACCATCTC TGCTGACACC TCAAAGAACA CCGCGTACCT CCAGATGAAC
 TCCCTGAGGG CAGAGGACAC GGCTGTCTAT TATTGCTCTC GCTGGGGCGG CGACGGGTTT
 TATGCCATGG ATTACTGGGG TCAGGGGACC CTAGTTACAG TGAGCAGCGG TAGTACTTCT
 GGGAGCGGCA AGCCTGGCTC CGGAGAAGGA TCCACCAAAG GGGATATCCA GATGACGCAG
 AGCCATCAT CATTGAGTGC CAGTGTGGGC GACCGGGTCA CGATCACCTG TAGGGCATCT
 CAGGACGTAA ACACAGCGGT GGCATGGTAC CAGCAAAAAC CTGGAAAGGC CCCAAAATTT
 TTGATCTACA GCGCTAGCTT CTTATACTCC GGCGTCCCCT CACGATCTCT CGGCTCCAGA
 AGTGGAACAG ACTTTACTCT GACAATTTCT TCGCTTCAGC CCGAGGATTT TGCTACCTAT
 TATTGCCAGC AACACTACAC AACCCCTCCG ACTTTCGGAC AAGGGACAAA GGTGGAATTT
 AAGAGGACTG TG

서열식별번호: 30 - 트라스투주맵-기반 TriKE DNA 서열 - *이. 콜라이* 코돈 최적화

CAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGTGGCGGC TTGGTGCAGC CTGGTGGCTC TCTGCGCCTG
 TCCTGTGCGG CCTCTGGCCT CACCTTCAGC AGCTATAACA TGGGCTGGTT CCGCCAGGCT
 CCAGGACAAG GCCTTGAGGC TGTGGCGTCT ATTACCTGGA GTGGTCGGGA CACCTTCTAT
 GCGGACTCCG TGAAGGGCCG TTTCCACCATC TCGCGTGACA ATTCGAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG CGCGGAGGAC ACGGCCGTTT ATTATGTGTC GGCAAACCCC
 TGGCCGGTTG CCGCGCCCGG TAGTGGCACC TACTGGGGCC AAGGGACCCT GGTACCCTGC
 TCCTCATCTG GCGGCGGCGG TAGCGGTGGC GGAGGTAGCG GGGGGGGTGG AAGCGGTGGT
 GGTGGCTCAG GGAAC TGGGT GAATGTAATA AGTGATTTGA AAAAAATTGA AGATCTGATT
 CAGAGCATGC ATATTGATGC GACGTTATAT ACGGAATCGG ATGTTACACC AAGTTGCAAA
 GTTACAGCAA TGAATGCTT TTTGTTAGAG TTACAAGTTA TTTCACCTGA GTCGGGAGAT
 GCAAGTATTC ATGATACTGT AGAAAATCTG ATCATCCTGG CAAACAACAG CTTGTGCTCG
 AATGGGAATG TAACAGAATC TGGATGCAAA GAATGTGAAG AACTGGAAGA AAAAAATATT

[0108]

AAAGAATTTT TGCAGAGTTT TGTCACATT GTCCAAATGT TCATCAACAC TTCTGGCAGT
 ACCAGCGGTT CAGGTA AAC GGGCAGCGGG GAAGGTCCA CAAAAGGTGA AGTTCAGCTC
 GTGGAAAGCG GCGCGGTTCT GGTCCAGCCA GGTGGGAGTC TCCGCCTGTC ATGTGCCGCG
 AGCGGTTTTA ATATCAAAGA TACATATATA CATTGGGTAA GACAGGCCCC GGGTAAGGGT
 CTGGAGTGGG TTGCGCGTAT TTATCCGACG AATGGATACA CTCGTTACGC CGATTCTGTG
 AAAGGCCGCT TTACCATCTC AGCCGACACC TCAAAGAACA CCGCGTACTT ACAGATGAAC
 TCCCTGCGCG CAGAAGACAC GGCTGTCTAT TATGCTCGC GCTGGGGCGG CGACGGTTTT
 TATGCCATGG ATTACTGGGG TCAGGGGACC CTAGTTACTG TGAGCAGCGG TAGTACTTCT
 GGGAGCGGCA AACCTGGCTC CGGAGAAGGT TCGACCAAAG GGGATATCCA GATGACGCAG
 AGCCCGTCAT CACTGTCCGC CAGTGTGGGC GATCGGGTCA CGATCACCTG CCGTGCATCG
 CAGGATGTAA ATACAGCGGT GGCATGGTAC CAGCAAAAAC CTGGAAGGC CCCAAAACCT
 CTGATCTACA GCGCTAGCTT CTTATACTCC GCGTCCCGT CACGATTTTC CGGCTCCCGT
 AGTGAACGG ACTTTACTCT GACAATTTCT TCGCTTCAGC CCGAGGATTT TGCTACCTAT
 TATTGCCAGC AACACTACAC CACCCCGCCG ACTTTCGGCC AAGGGACGAA AGTGAAATT
 AAGAGGACGG TG

서열식별번호: 31 - 신호 펩티드/항-HER2 중쇄/링커/wtIL15/링커/cam16

MGWSCIILFL VATATGVHSD IQMTQSPSSL SASVGDRVTI TCRASQDVNT AVAWYQQKPG
 KAPKLLIYSA SFLYSGVPSR FSGRSRGTDF TLTISLQPE DFATYYCQQH YTPPTFGQG
 TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE
 SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GECGGGGSGG
 GGSNWNVNIS DLKKIEDLIQ SMHIDATLYT ESDVHPSCVK TAMKCFLELEL QVISLESQDA
 SIHDTVENLI ILANNSLSSN GNVTEGCKE CEELEEKNIK EFLQSFVHIV QMFINTSGST
 SSGKPGSGE GSTKGQVQLV EGGGLVQPG GSLRLSCAAS GLTFSSYNMG WFRQAPGQGL
 EAVASITWSG RDTFYADSVK GRFTISRDNK NNTLYLQMNK LRAEDTAVYY CAANPWPVAA
 PRSGTYWQG TLVTVSS

서열식별번호: 32 - 신호 펩티드/항-HER2 중쇄

MGWSCIILFL VATATGVHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFNIKD TYIHWVRQAP
 GKLEWVARI YPTNGYTRYA DSVKGRFTIS ADTSKNTAYL QMNSLRAEDT AVYCSRWGG
 DGFYAMDYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD YFPEPVTVSW
 NSGALTSQVH TFPVAVLQSSG LYSLSVTV PSSLGQTQY ICNVNHKPSN TKVDKKEPK
 SCDK

서열식별번호: 33 - 신호 펩티드/항-HER2 중쇄 Fab/T2A/신호 펩티드/항-HER2
 중쇄/링커/wtIL15/링커/cam16

MGWSCIILFL VATATGVHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFNIKD TYIHWVRQAP
 GKLEWVARI YPTNGYTRYA DSVKGRFTIS ADTSKNTAYL QMNSLRAEDT AVYCSRWGG
 DGFYAMDYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD YFPEPVTVSW
 NSGALTSQVH TFPVAVLQSSG LYSLSVTV PSSLGQTQY ICNVNHKPSN TKVDKKEPK
 SCDKEGRGSL LTCGDVEENP GPMGWSCIIL FLVATATGVH SDIQMTQSPS SLSASVGDV
 TITCRASQDV NTAVAWYQQK PGKAPKLLIY SASFLYSGVP SRFSGRSRGT DFTLTISLQ
 PEDFATYYCQ QHYTTPPTFG QGTVKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF
 YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSSTL TLSKADYEKH KVYACEVTHQ
 GLSSPVTKSF NRGECGGGS GGGGSNWNV ISDLKKIEDL IQSMHIDATL YTESDVHPSC
 KVTAMKCFLL ELQVISLESG DASIHDTVEN LIIILANNSLS SNGNVTEGCKE CEELEEKNI
 I KEFLQSFVH IVQMFINTSG STSGSGKPGS GEGSTKGQVQ LVESGGGLVQ PGGSLRLSCA

[0109]

ASGLTFSSYN MGWFRQAPGQ GLEAVASITW SGRDTFYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQM
NSLRAEDTAV YYCAANPWPV AAPRSGTYWG QGTLVTVSS

서열식별번호: 34 - 링커

SGGGGSGGGG SGGGGSGGGG SG

서열식별번호: 35 - 링커

GSTSGSGKPG SGEESTKG

서열식별번호: 36 - 신호 펩티드

MGWSCIIILFL VATATGVHS

서열식별번호: 37 - T2A 자가-절단 펩티드

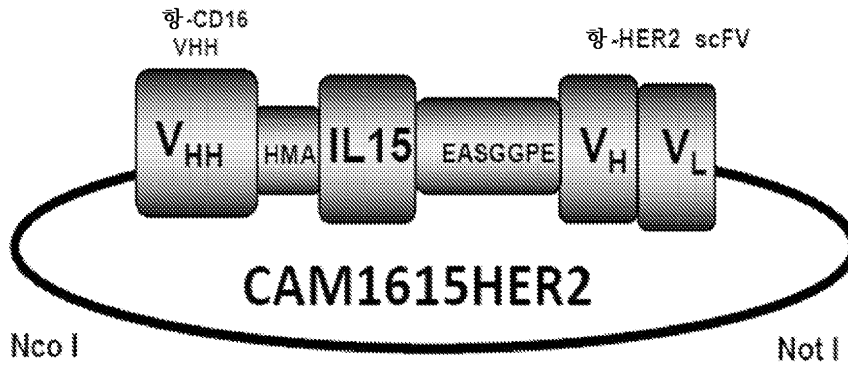
EGRSLLTCG DVEENPGP

[0110]

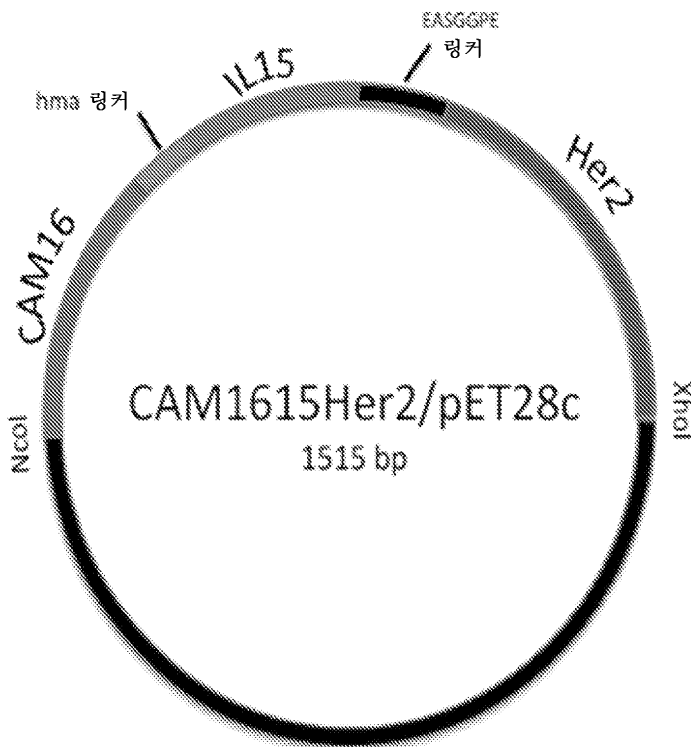
도면

도면1

(A)

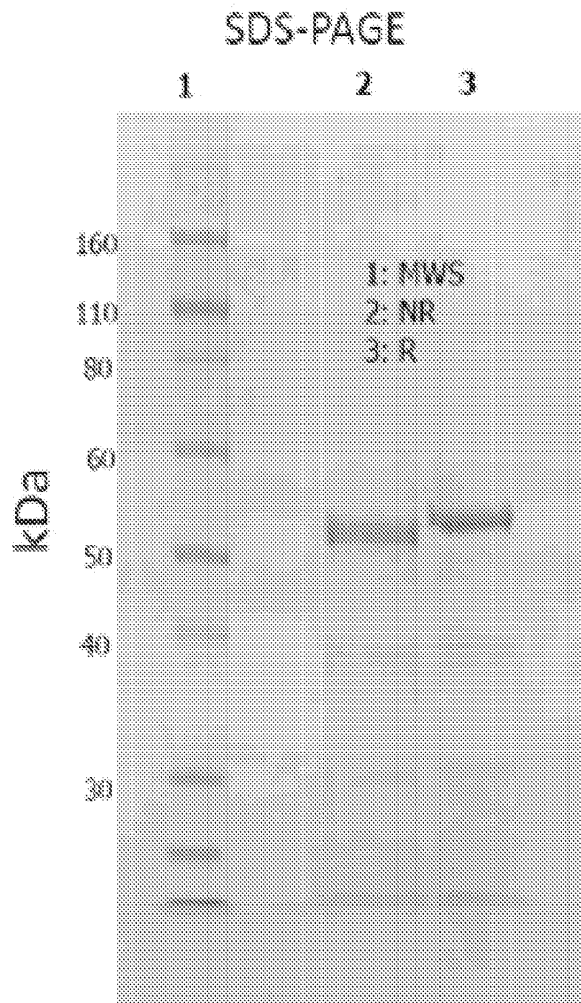


(B)

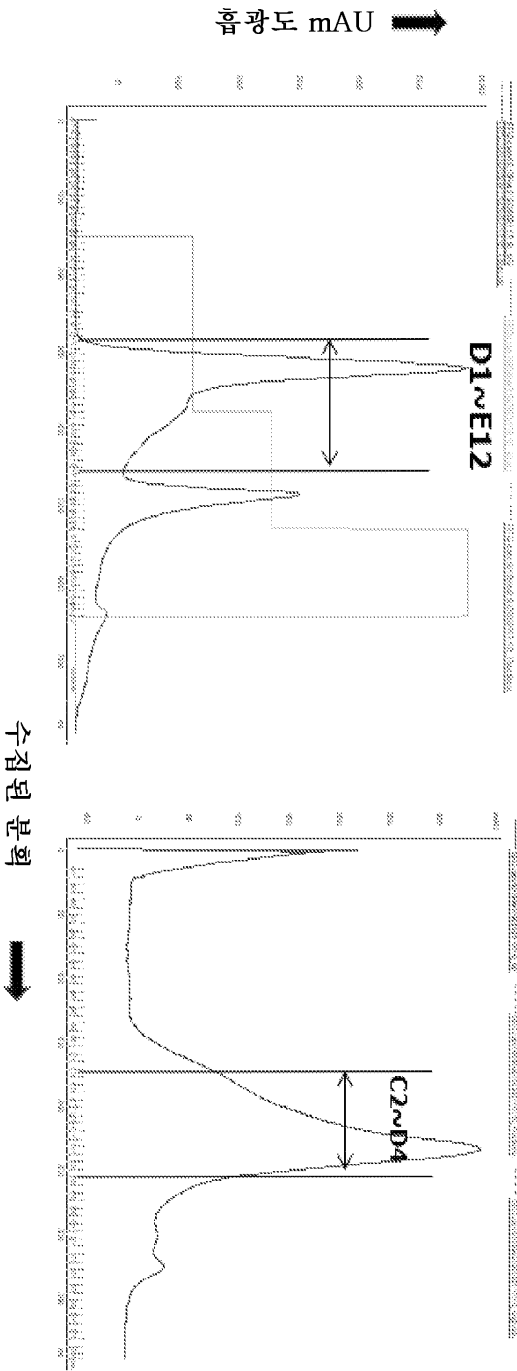


도면2i

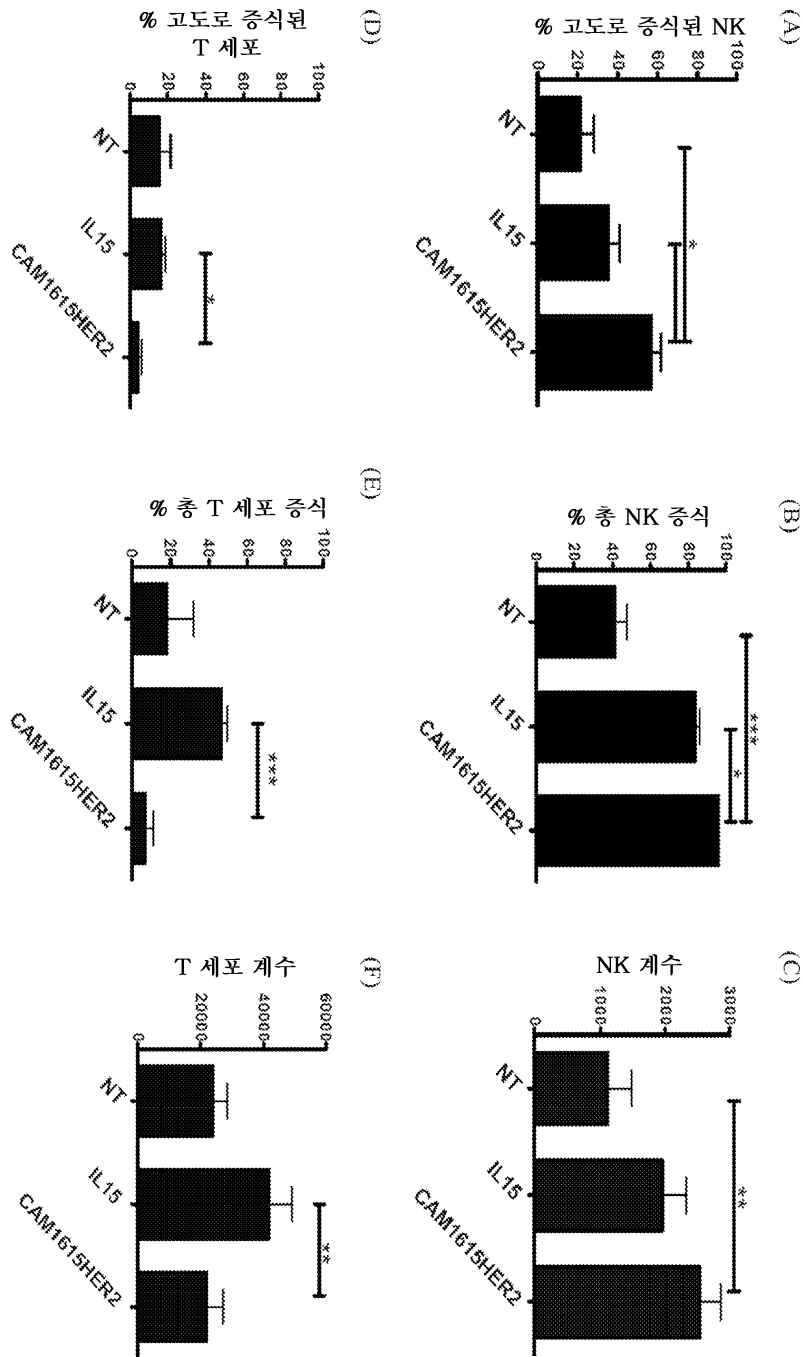
(A)



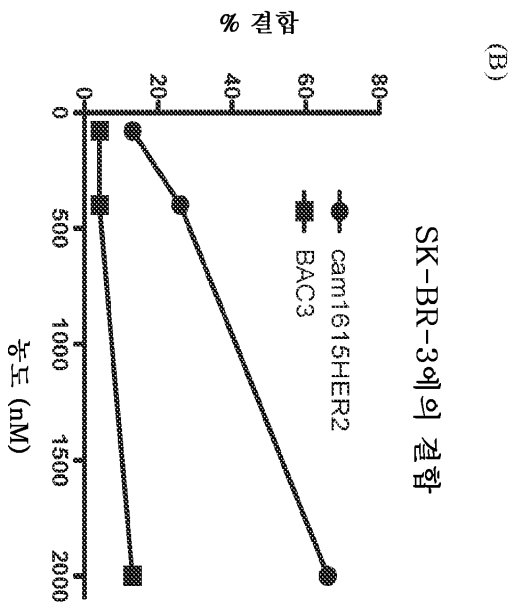
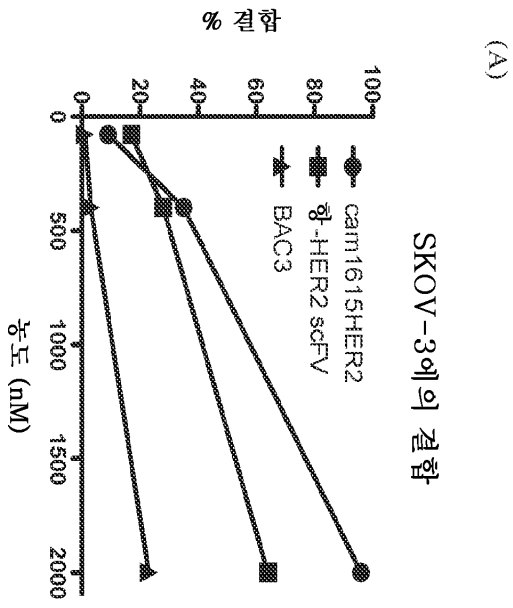
도면2ii



도면3

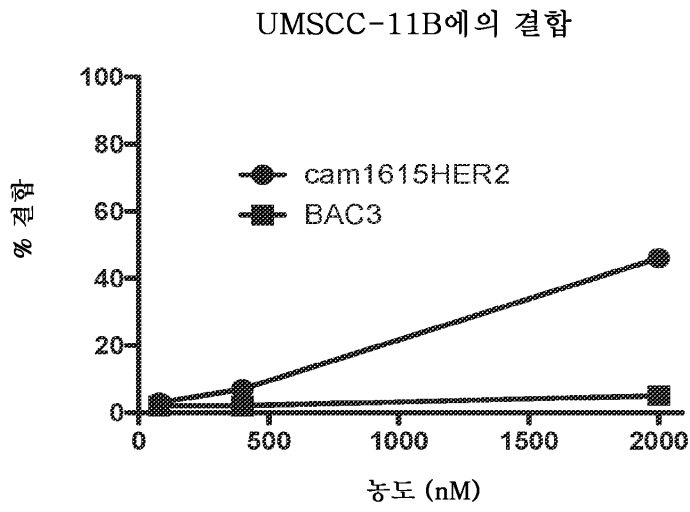


도면4i



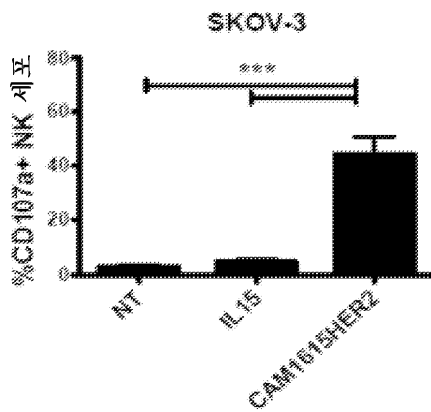
도면4ii

(C)

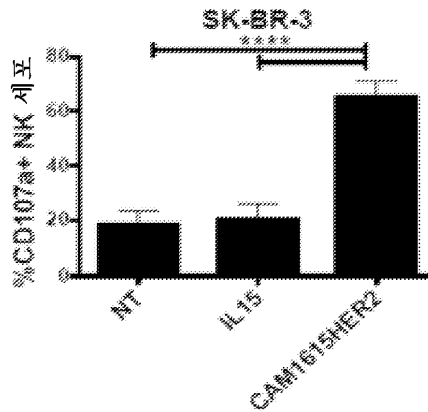


도면5i

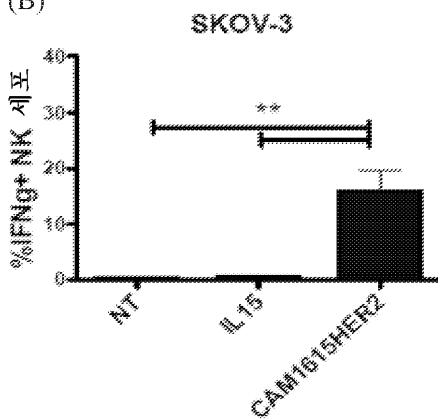
(A)



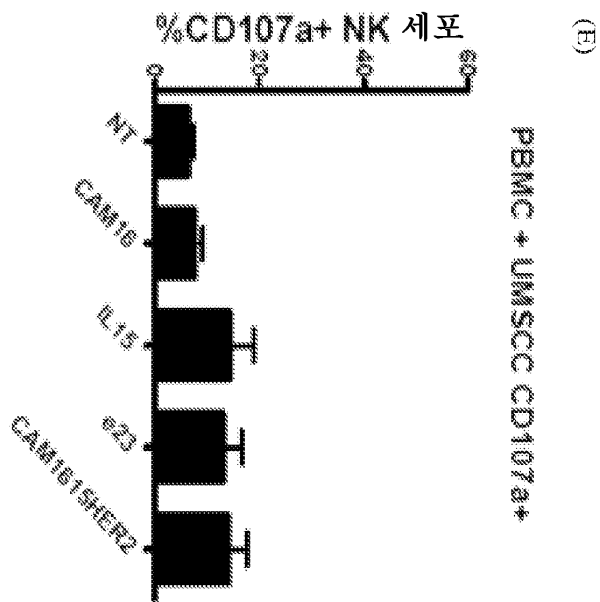
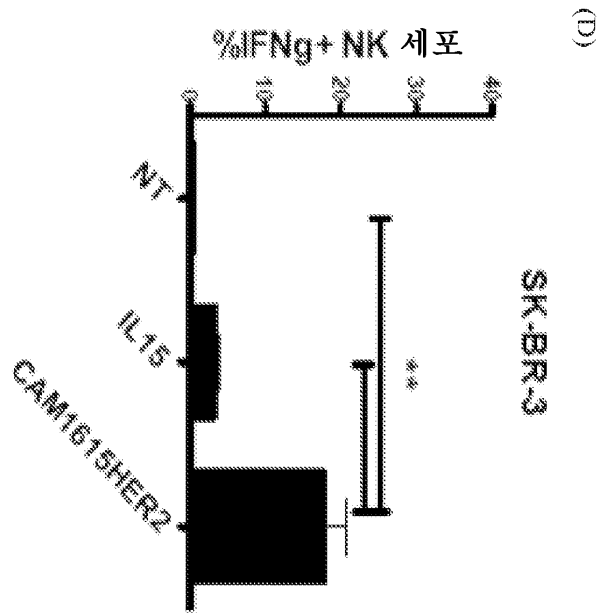
(C)



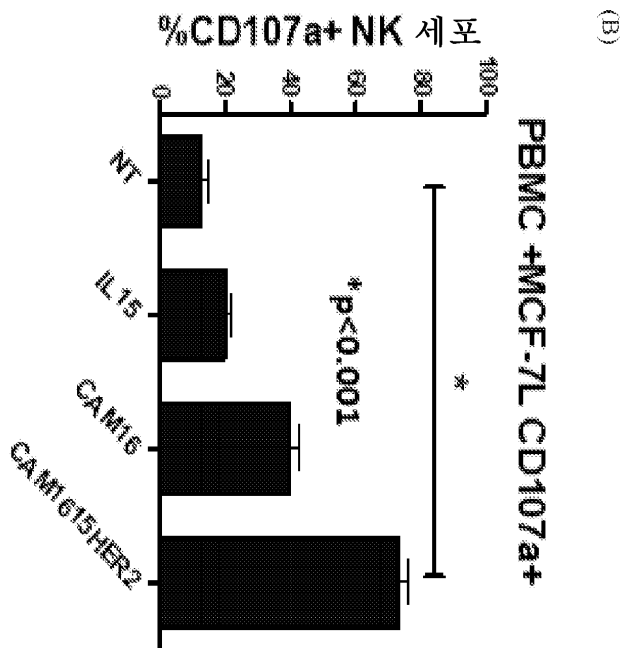
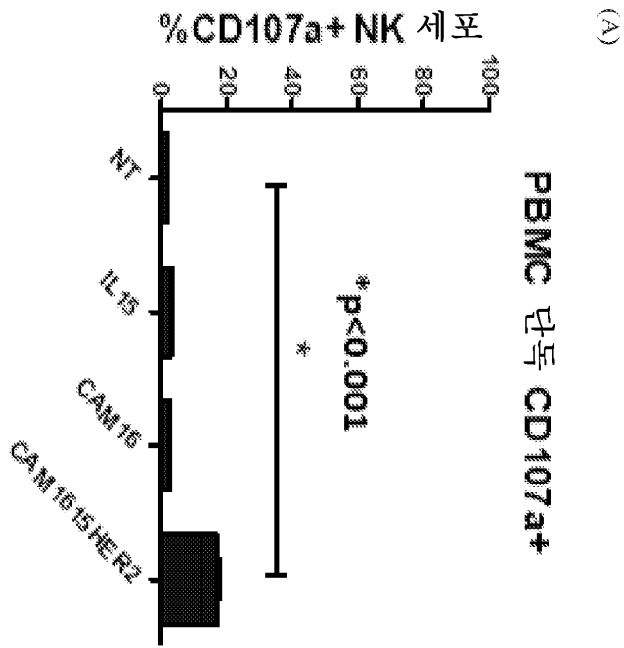
(B)



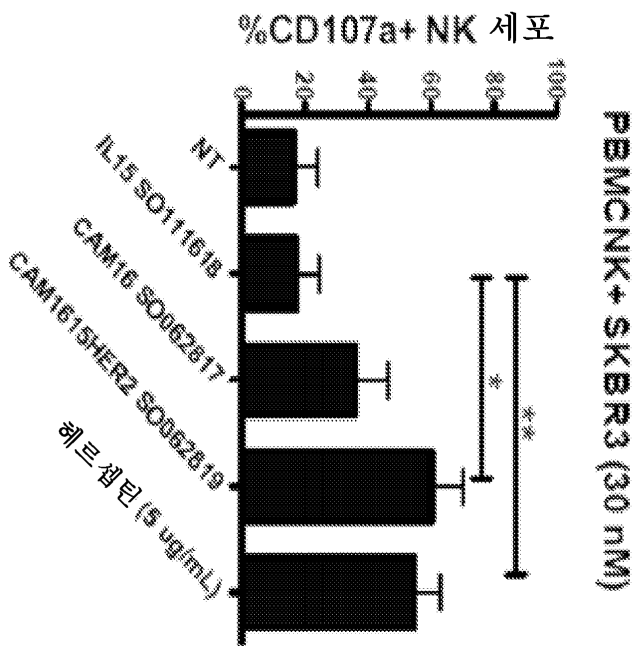
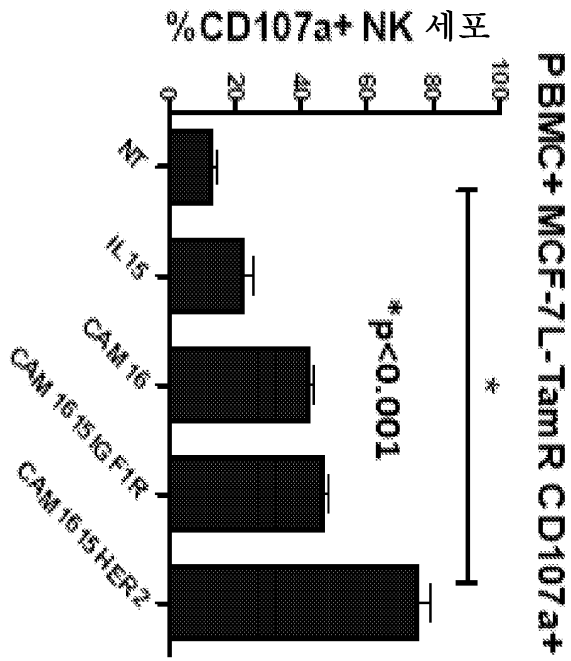
도면5i



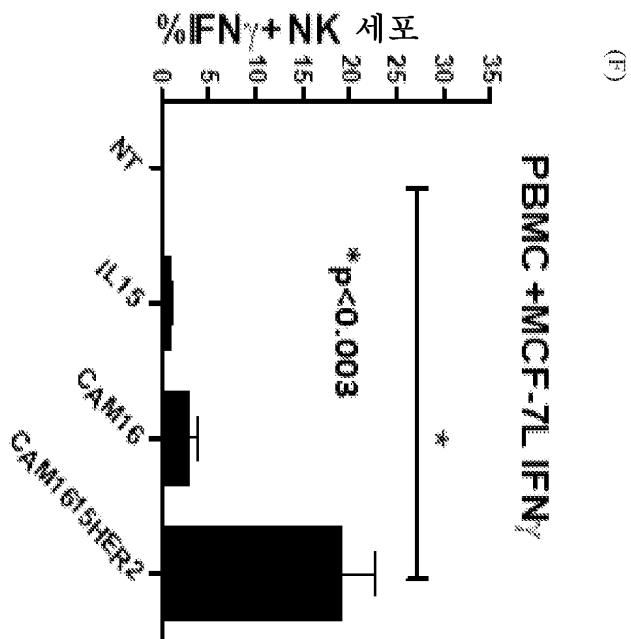
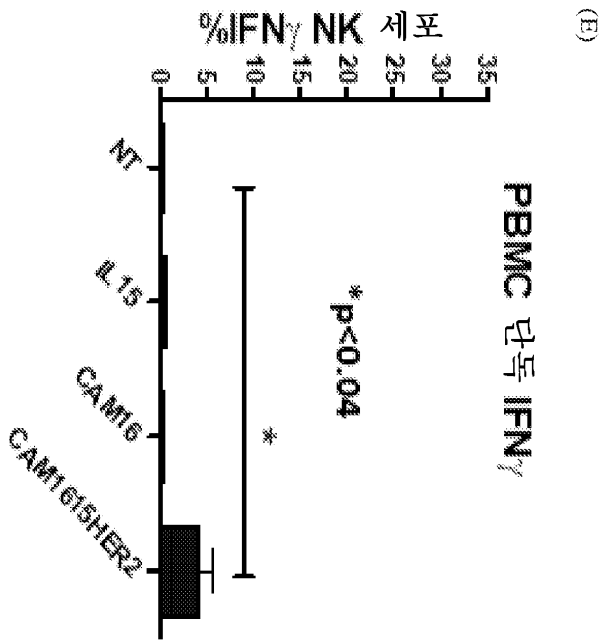
도면6i



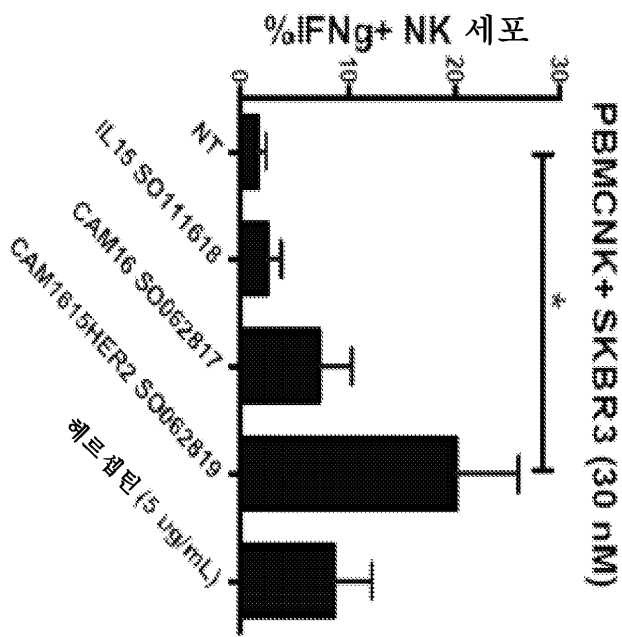
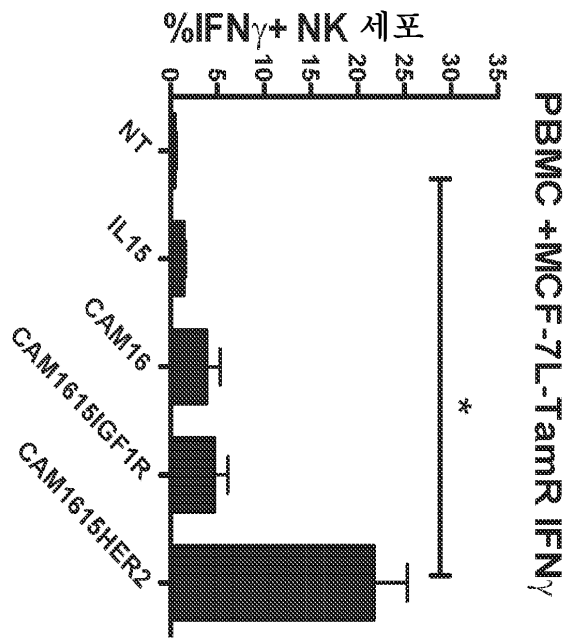
도면6ii



도면6iii

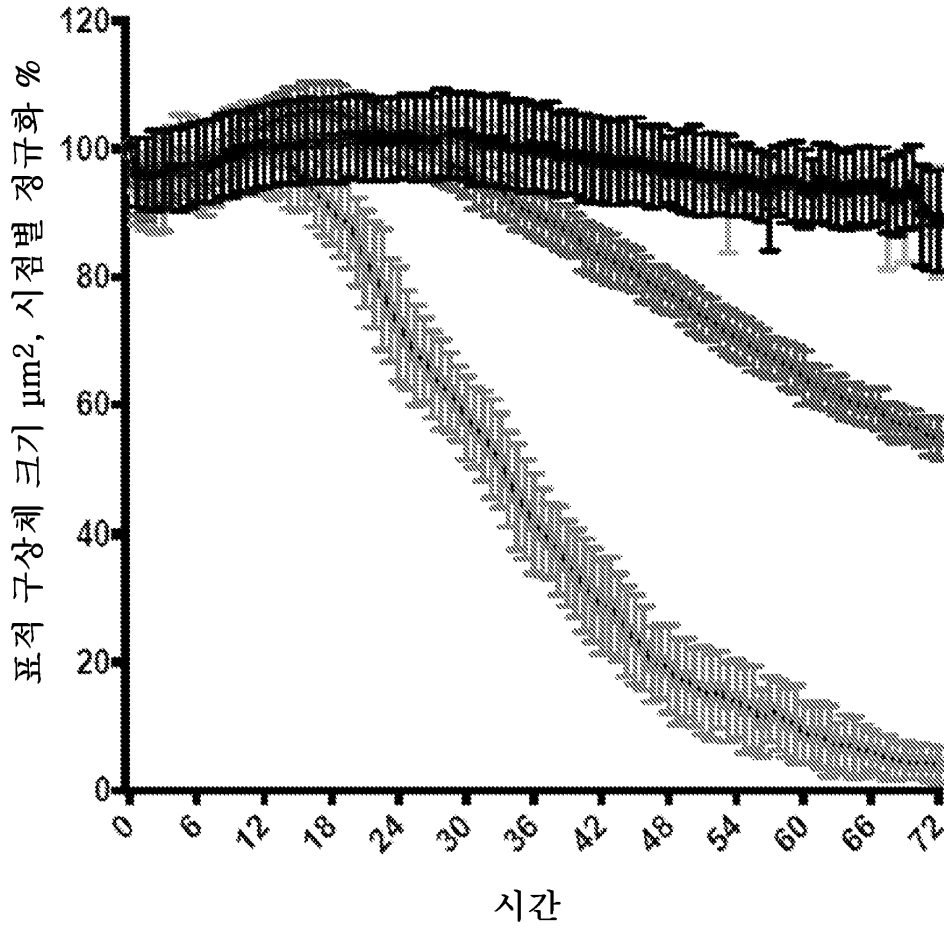


도면6iv



도면 7i

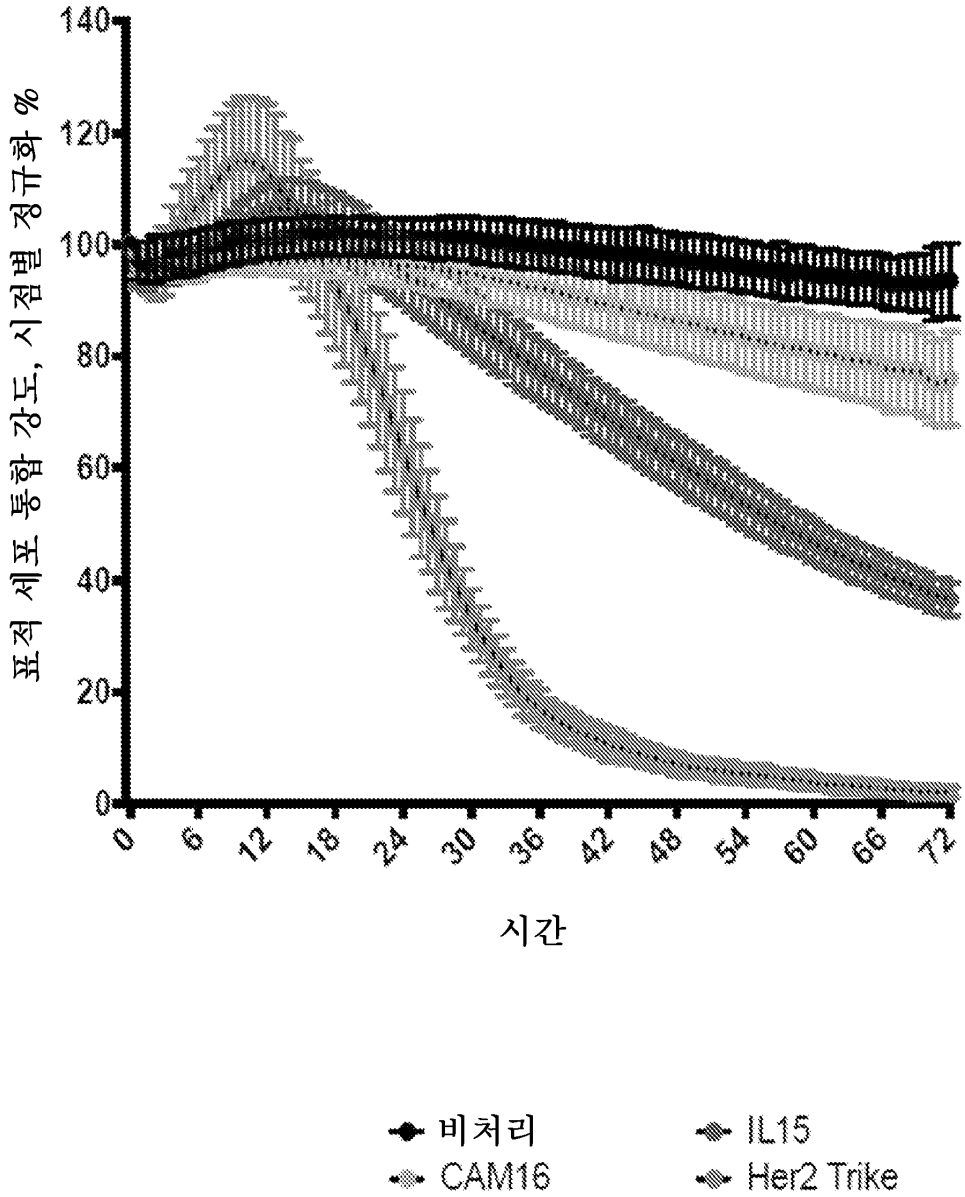
(A) 구상체 크기



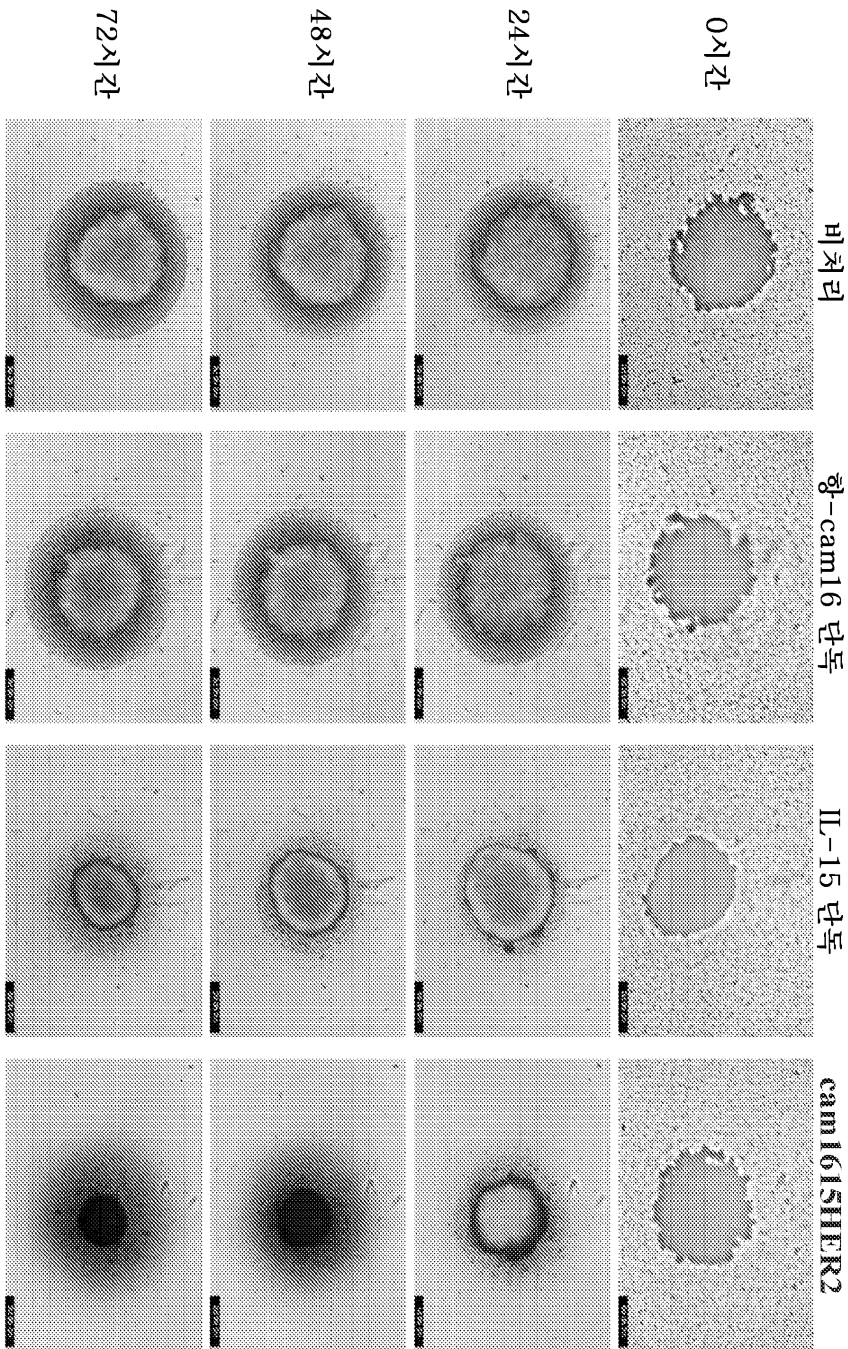
◆ 비처리 ◆ IL15
 ◆ CAM16 ◆ Her2 Trike

도면7ii

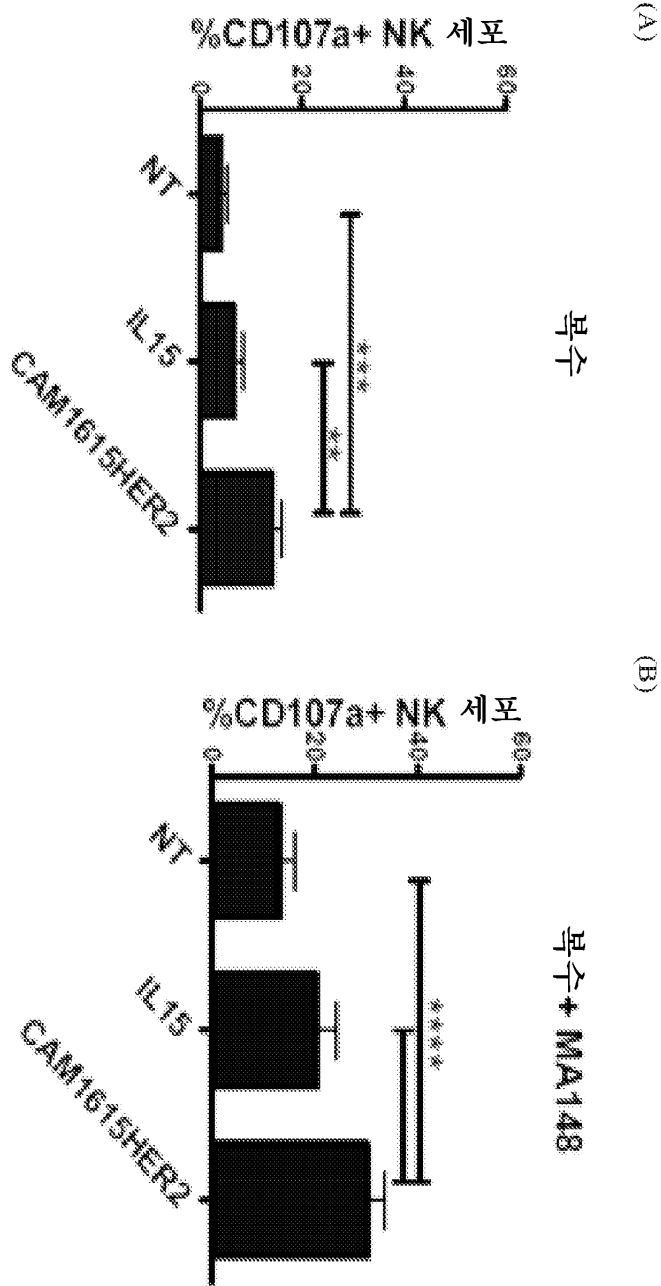
(B) 구상체 강도



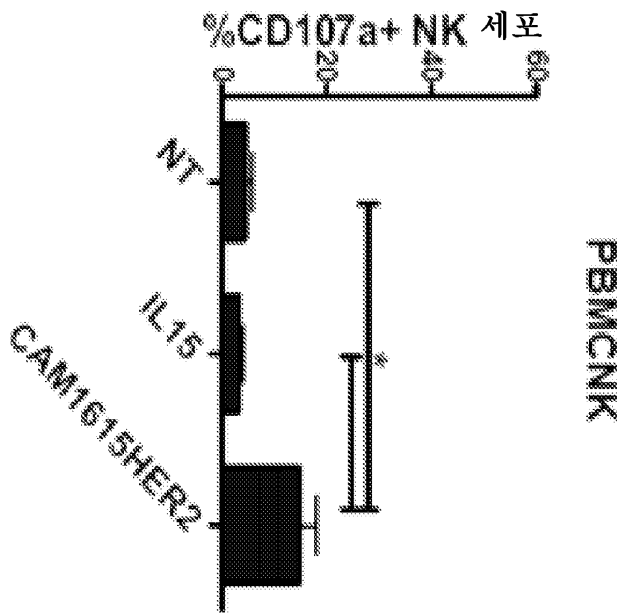
도면8



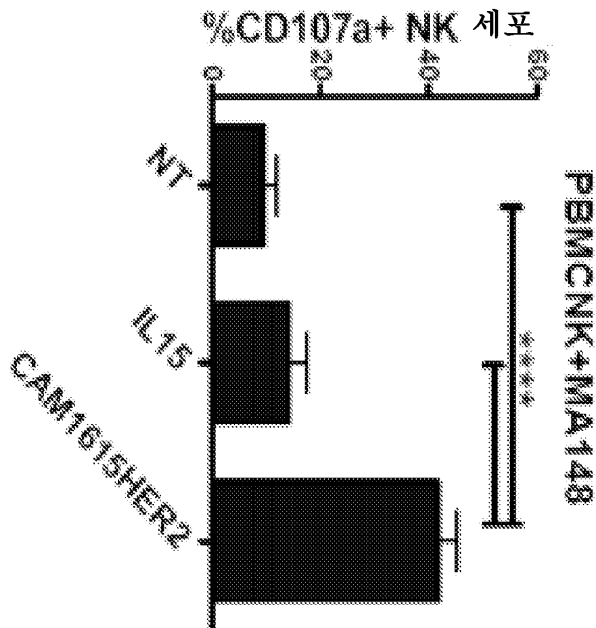
도면9i



도면9i

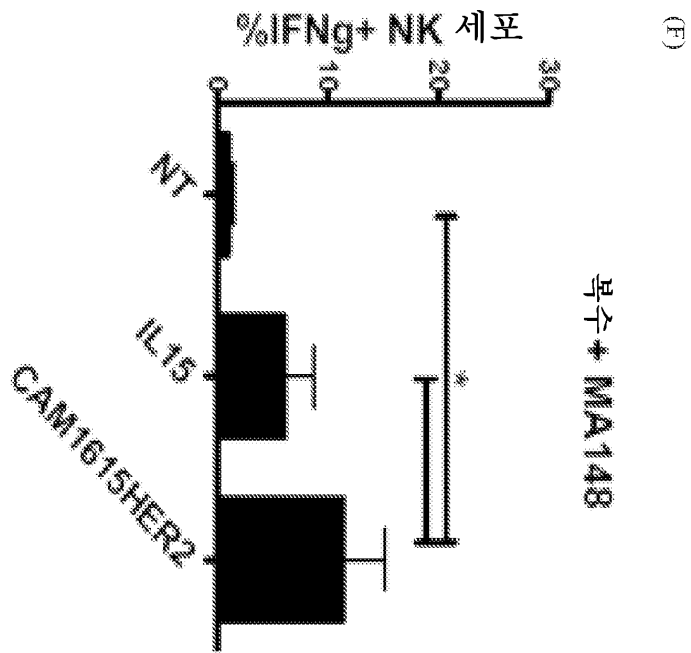
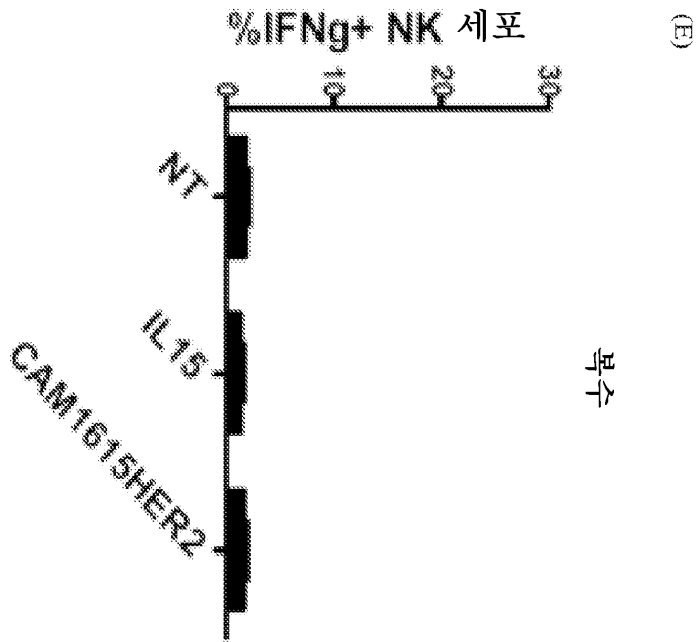


(a)

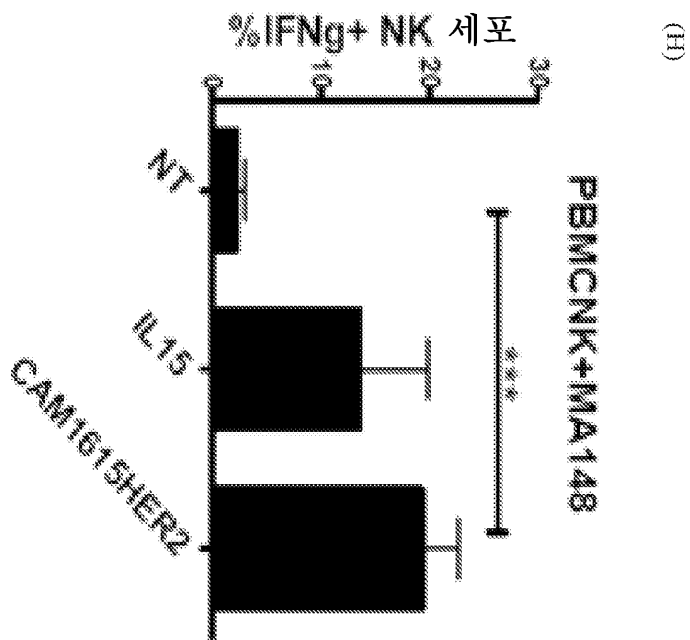
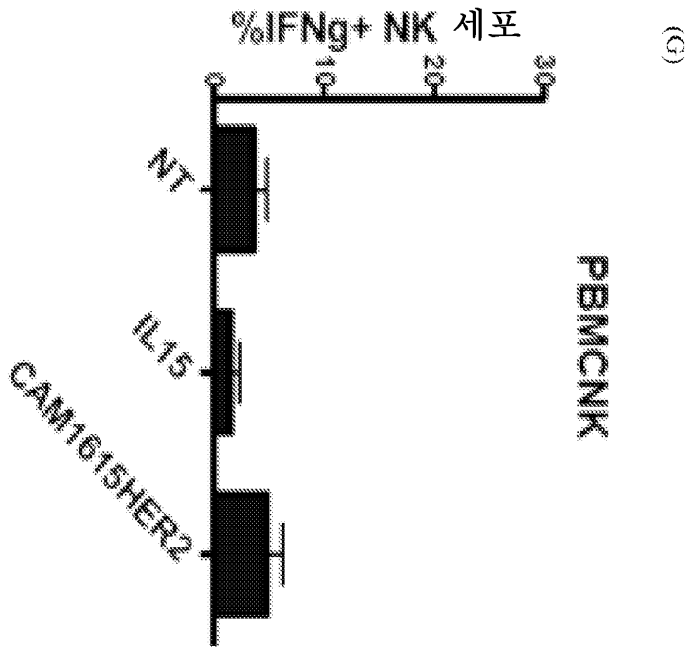


(b)

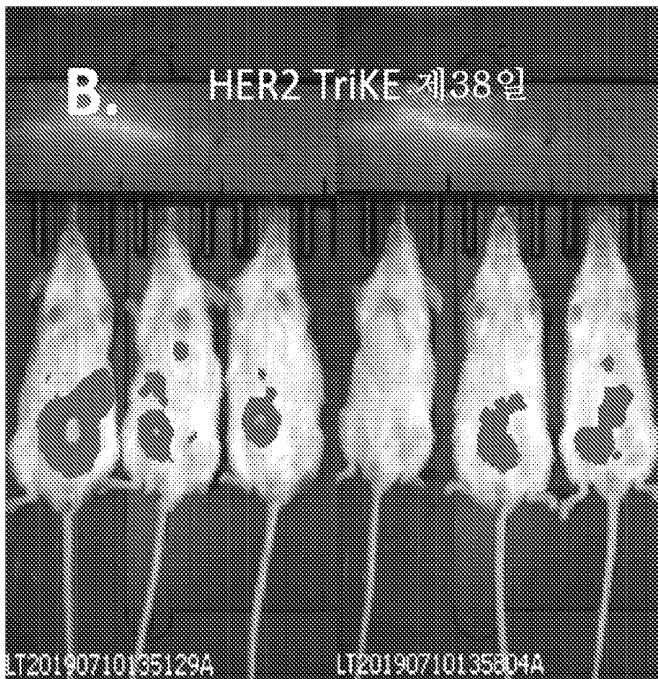
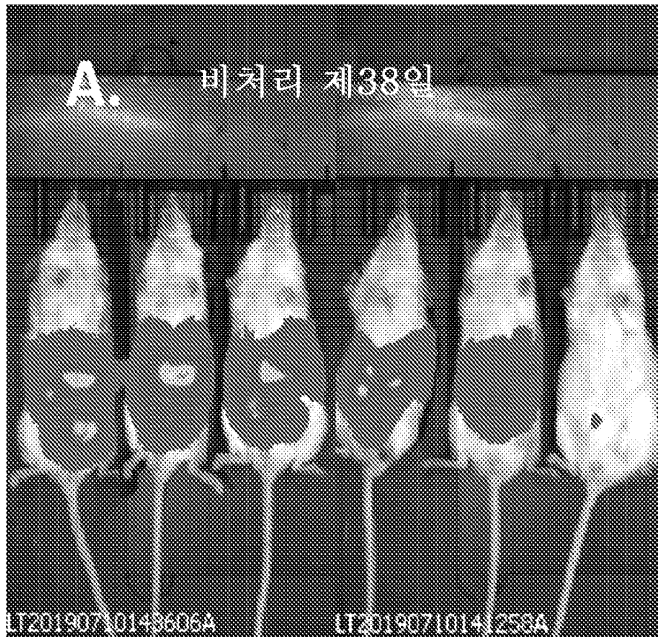
도면9iii



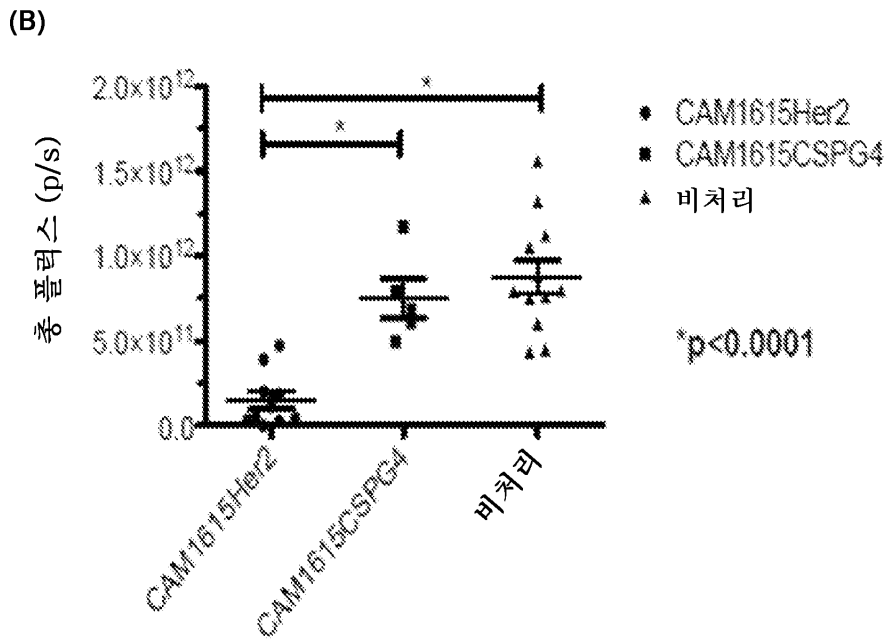
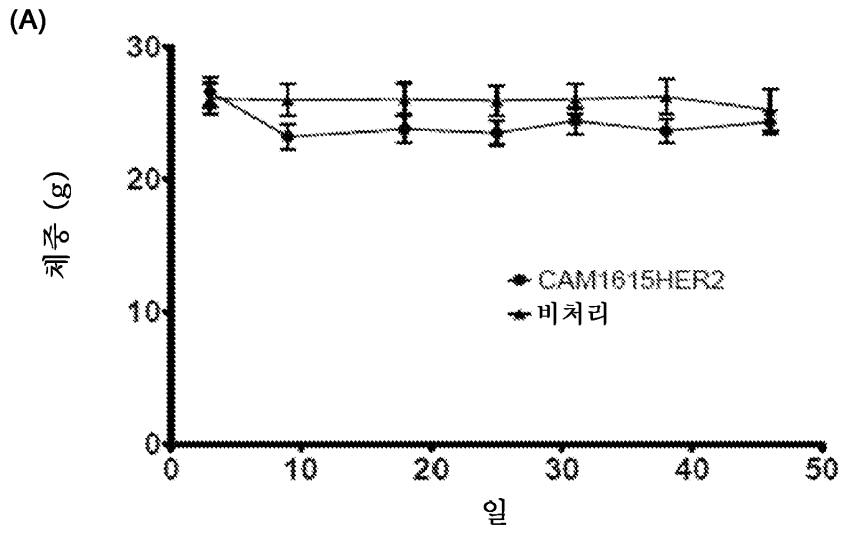
도면9iv



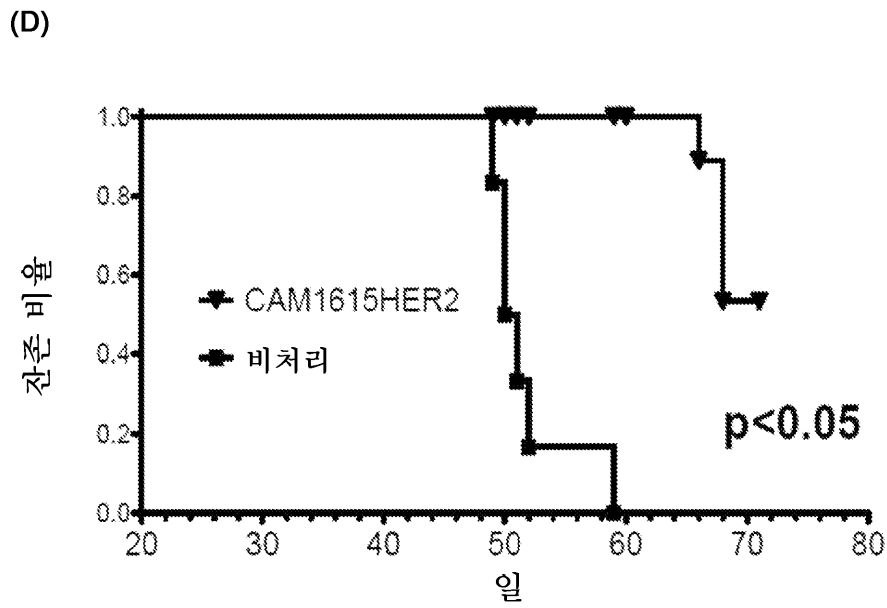
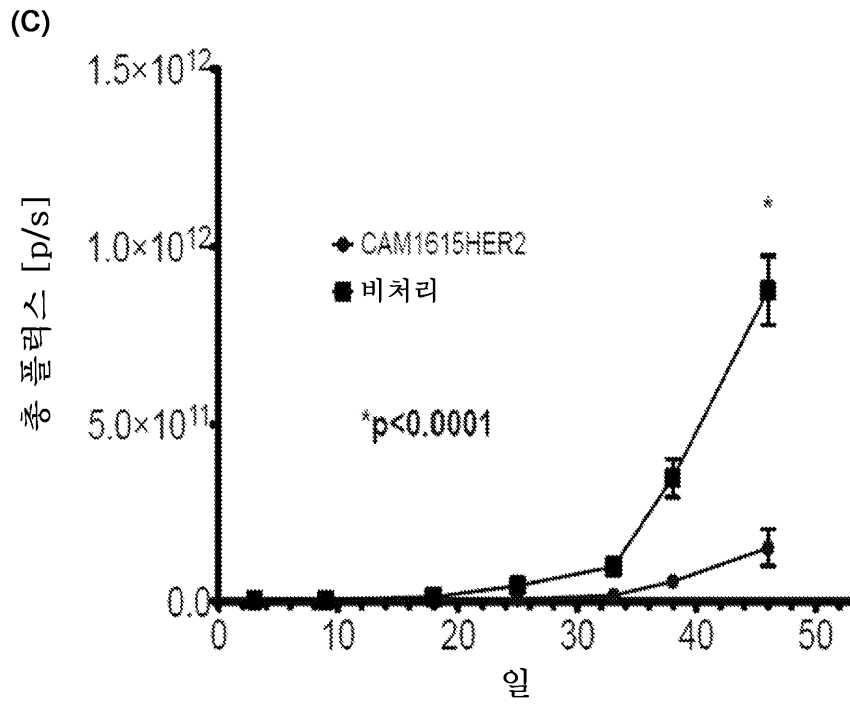
도면10



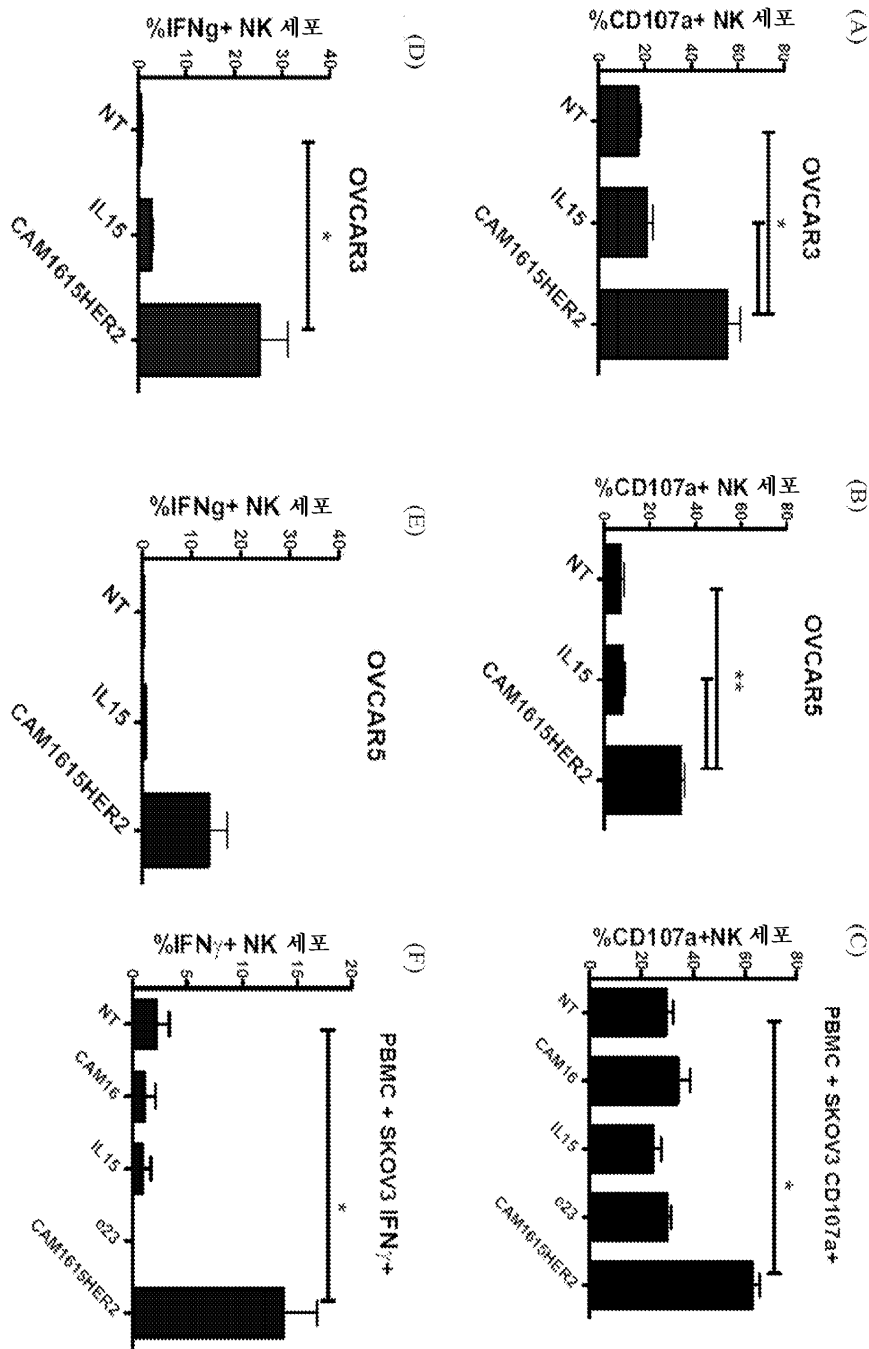
도면11i



도면11ii



도면12



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA

GT BIOPHARMA, INC.

Vallera, Daniel A.

Miller, Jeffrey S.

Felices, Martin

Schroeder, Martin

<120> IMMUNOTHERAPY COMPOUNDS AND METHODS

<130> 0110.000632W001

<150> US 62/901,198

<151> 2019-09-16

<160> 37

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 501

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> cam1615HER2

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Cys Ala Ala Asn Pro Trp Pro Val Ala Ala Pro Arg Ser Gly Thr

100 105 110

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

115 120 125

Ala Gly Ala Ala Ala Ser Glu Ser Leu Phe Val Ser Asn His Ala Tyr

130 135 140

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile
 145 150 155 160
 Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His
 165 170 175
 Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
 180 185 190
 Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
 195 200 205
 Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val
 210 215 220
 Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
 225 230 235 240
 Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
 245 250 255
 Thr Ser Glu Ala Ser Gly Gly Pro Glu Asp Val Gln Leu Thr Gln Ser
 260 265 270
 Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys
 275 280 285
 Arg Ala Thr Pro Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 290 295 300
 Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 305 310 315 320
 Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
 325 330 335
 Leu Thr Val Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 340 345 350
 Gln Gln Trp Ser Arg Ser Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Ser Lys Leu
 355 360 365
 Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys
 370 375 380
 Gly Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Val Val Lys Pro Gly Gly

85 90 95
 Ala Ala Asn Pro Trp Pro Val Ala Ala Pro Arg Ser Gly Thr Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 3
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> linker
 <400> 3

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

1 5 10 15

Asn His Ala Tyr
 20

<210> 4
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile

1 5 10 15

Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His
 20 25 30

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
 35 40 45

Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
 50 55 60

Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val
 65 70 75 80

Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
 85 90 95

Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn

115 120 125
 Glu Val Val Lys Pro Gly Gly Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser
 130 135 140
 Gly Tyr Ser Phe Thr Gly His Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His
 145 150 155 160
 Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp
 165 170 175
 Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Val Asp
 180 185 190
 Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu
 195 200 205
 Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Val Thr Asp Trp Tyr Phe
 210 215 220

Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 225 230 235

<210> 7

<211> 1517

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> cam1615HER2 DNA sequence

<400> 7

ccatggagca ggtgcagctg gtggagtctg ggggaggctt ggtgcagcct ggggctctc 60
 tgagactctc ctgtgcagcc tctggcctca ccttcagtag ctataacatg ggctggttcc 120
 gccaggctcc agggcaaggc cttgaggctg tagcatctat tacctggagt ggtcgggaca 180
 cattctatgc agactccgtg aagggccgat tcaccatctc cagagacaac tccaagaaca 240
 ctctctatct gcaaatgaac agcctgcgcg cggaggacac ggccgtttat tattgtgctg 300
 caaacacctg gccagtggcg gcgccagta gtggcaccta ctggggccaa gggaccctgg 360
 tcaccgtctc ctcaccgtct ggtcaggctg gtgctgctgc tagcgaatct ctgttcgttt 420
 ctaaccacgc ttacaactgg gtgaatgtaa taagtgattt gaaaaaatt gaagatctta 480
 ttcaatctat gcatattgat gctactttat atacggaaag tgatgttcac cccagttgca 540
 aagtaacagc aatgaagtgc tttctcttgg agttacaagt tatttcactt gagtccggag 600

atgcaagtat tcatgatata gtagaaaatc tgatcatcct agcaaacaac agtttgcctt 660

ctaattgggaa tgtaacagaa tctggatgca aagaatgtga ggaactggag gaaaaaata 720

ttaaagaatt ttgcagagt ttgtacata ttgtccaaat gttcatcaac acttctgaag 780

cttccggagg tcccaggagc gtccagctga cccagtctcc agcaatcctg tctgcatctc 840

caggggagaa ggtcacaatg acttgcaagg ccacccaag tgtaagttac atgcactggt 900

atcagcagaa gccaggatcc tccccaaac cttggattta taccacatcc aacctggctt 960

ctggagtccc tgctcgcttc agtggcggtg ggtctgggac ctcttactct ctcacagtca 1020

gcagagtgga ggctgaagat gctgccactt attactgcca gcagtggagt cgtageccac 1080

ccacgttcgg aggggggtcc aagctgaaa taaaaggttc tacctctggt tctggtaaat 1140

cttctgaagg taaagggtg cagctgcagg agtcaggacc tgagggtgtg aagcctggag 1200

gttcaatgaa gatatcctgc aagacttctg gttactcatt cactggccac accatgaact 1260

gggtgaagca gagccatgga aagaaccttg agtggattgg acttattaat cttacaatg 1320

gtgatactaa ctacaaccag aagttcaagg gcaaggccac atttactgta gacaagtcgt 1380

ccagcacage ctacatggag ctctctcagtc tgacatctga ggactctgca gtctattact 1440

gtgcaaggag ggttacggac tggctacttcg atgtctgggg cgcagggacc acggtcaccg 1500

tctcctaata gctcgag 1517

<210> 8

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> NcoI restriction site and start codon

<400> 8

ccatggag 8

<210> 9

<211> 366

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> cam16

<400> 9

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggagc ttggtgcagc ctgggggctc tctgagactc 60

tctctgagcag cctctggcct caccttcagt agctataaca tgggctggtt cgcaggct 120

ccagggaag gccttgaggc tgtagcatct attacctgga gtggtcggga cacattctat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca actccaagaa cactctctat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg cgcgaggagac acggccgttt attattgtgc tgcaaacccc 300
 tggccagtgg cggcggccag tagtggcacc tactggggcc aagggaccct ggtcacctgc 360
 tcctca 366

<210> 10

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> linker

<400> 10

ccgtctggtc aggtctgtgc tgctctagc gaatctctgt tcgtttctaa ccacgttac 60

<210> 11

<211> 342

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

aactgggtga atgtaataag tgatttgaaa aaaattgaag atcttattca atctatgcat 60
 attgatgcta cttatatac ggaaagtgat gttcaccca gttgcaaagt aacagcaatg 120
 aagtgtttc tcttggagtt acaagttatt tcacttgagt ccggagatgc aagtattcat 180
 gatacagtag aaaatctgat catcctagca aacaacagtt tgtcttctaa tgggaatgta 240
 acagaatctg gatgcaaaga atgtgaggaa ctggaggaaa aaaatattaa agaattttg 300
 cagagttttg tacatattgt ccaaagtgc atcaacactt ct 342

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> linker

<400> 12

gaagcttccg gagtcccga g 21

<210> 13

<211> 708

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> anti-HER2

<400> 13

gacgtccagc tgaccagtc tccagcaatc ctgtctgcat ctccagggga gaaggtcaca 60
 atgacttgca gggccacccc aagtgtaagt tacatgcaact ggtatcagca gaagccagga 120
 tcctccccc aaccttgat ttataccaca tccaacctgg cttctggagt cctgtctgc 180
 ttcagtggcg gtgggtctgg gacctcttac tctctcacag tcagcagagt ggaggctgaa 240

gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg agtcgtagcc caccacgtt cggagggggg 300
 tccaagctgg aaataaaagg ttctacctt ggttctggta aatcttctga aggtaaaggt 360
 gtgcagctgc aggagtcagg acctgaggtg gtgaagcctg gaggttcaat gaagatatcc 420
 tgcaagactt ctggttactc attcactggc cacacatga actgggtgaa gcagagccat 480
 ggaaagaacc ttgagtggat tggacttatt aatccttaca atggtgatac taactacaac 540
 cagaagtta agggcaaggc cacatttact gtagacaagt cgtccagcac agcctacatg 600
 gagctctca gtctgacatc tgaggactct gcagtctatt actgtgcaag gagggttacg 660

gactgtact tcgatgtctg gggcgcagg accacgtca ccgtctcc 708

<210> 14

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> two stop codons and XhoI restriction site

<400> 14

taatagctcg aga 13

<210> 15

<211> 236

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> e23

<400> 15

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Thr Pro Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Gly
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Val Ser Arg Val Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Arg Ser Pro Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Ser Lys Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser
 100 105 110
 Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro
 115 120 125
 Glu Val Val Lys Pro Gly Gly Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser
 130 135 140
 Gly Tyr Ser Phe Thr Gly His Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His
 145 150 155 160
 Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp
 165 170 175
 Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Val Asp
 180 185 190
 Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu
 195 200 205
 Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Val Thr Asp Trp Tyr Phe
 210 215 220
 Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 225 230 235
 <210> 16
 <211> 248
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> trastuzumab-based scFv
 <400> 16

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

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

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

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

 Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 225 230 235 240
 Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val

245

<210> 17

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> anti-HER2 light chain

<400> 17

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala

 20 25 30

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

 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

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

 100 105 110

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

 115 120 125

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

 130 135 140

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

145 150 155 160

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

 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

 180 185 190

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

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

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

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

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

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

<210> 21

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> seribantumab heavy chain

<400> 21

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr

20 25 30

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

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

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

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

85 90 95

Thr Arg Gly Leu Lys Met Ala Thr Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys

115 120 125
 Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Val Ser Asp Phe
 130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val
 145 150 155 160

Lys Val Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Arg Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser
 210 215

<210> 23

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> KTN3379 light chain

<400> 23

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Leu Asn
 20 25 30

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

35 40 45
 Ile Ser Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg

65 70 75 80
 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Pro

85 90 95

Pro Gly Glu Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys

145 150 155 160

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

165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His

180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys

195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210 215

<210> 24

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> patritumab subunit 1

<400> 24

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Glu Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 25

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> patritumab subunit 2

<400> 25

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Glu Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 26

<211> 220

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> patritumab subunit 3

<400> 26

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

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn
 290 295 300
 Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 305 310 315 320
 Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr
 325 330 335
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
 340 345 350
 Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 355 360 365
 Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp
 370 375 380
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser
 385 390 395 400
 Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Asp Ile
 405 410 415
 Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
 420 425 430
 Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala
 435 440 445
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser
 450 455 460
 Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg
 465 470 475 480
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
 485 490 495
 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe
 500 505 510
 Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
 515 520

<210> 29

<211> 1572

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> trastuzumab-based TriKE, H. sapiens codon optimized

<400> 29

```

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctgggggctc tctgagactc      60

tctctgtcag ccctctggcct caccttcagt agctataaca tgggctggtt ccgccaggct      120
ccagggcaag gccttgaggc tgtagcatct attacctgga gtggtcggga cacattctat      180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca actccaagaa cactctctat      240
ctgcaaatga acagcctcgc gcgggaggac acggccgttt attattgtgc tgcaaacccc      300
tggccagtgg cggcggccag tagtggcacc tactggggcc aagggacct ggtcacctc      360
tcctcatctg gcggcggcgg ttctggtgga ggaggtagtg gggggggagg aagcggaggg      420
ggtggctcag ggaactgggt gaatgtaata agtgattga aaaaaattga agatcttatt      480

caatctatgc atattgatgc tactttatat acggaaagtg atgttcacce cagttgcaaa      540
gtaacagcaa tgaagtgctt tctcttggag ttacaagtta tttcacttga gtccggagat      600
gcaagtattc atgatacagt agaaaaatcg atcatcctag caaacaacag tttgtcttct      660
aatgggaatg taacagaatc tggatgcaaa gaatgtgagg aactggagga aaaaaatatt      720
aaagaatfff tgcagagttt tgtacatatt gtccaaatgt tcatcaacac ttctggcagt      780
accagcgggt cagggaaacc tggcagtggg gaaggttcca caaaaggtga ggttcagctc      840
gtggaatccg gcggcgggct ggtccaacca ggtgggagtc tccgcctgtc atgtgccgca      900

agcggattca atataaaaga tacatatata cattgggtaa gacaggcccc cggttaagggt      960
ctggagtggg ttgccagaat ttateccact aatggataca ctcgttacgc cgattctgtg      1020
aaaggccggt ttaccatctc tgctgacacc tcaaagaaca ccgcgtacct ccagatgaac      1080
tcctgagggg cagaggacac ggctgtctat tattgtcttc gctggggcgg cgacgggttt      1140
tatgccatgg attactgggg tcaggggacc ctagttacag tgagcagcgg tagtacttct      1200
gggagcggca agcctggctc cggagaagga tccaccaaag gggatatcca gatgacgcag      1260
agcccatcat cattgagtgc cagtgtgggc gaccgggtca cgatcacctg tagggcatct      1320

caggacgtaa acacagcggg ggcatggtac cagcaaaaac ctggaaggc cccaaaactt      1380
ttgatctaca gcctagctt cttatactcc ggcgtccctc cacgattctc cggctccaga      1440
agtggaacag actttaactc gacaatttct tcgcttcagc ccgaggattt tgctacctat      1500
tattgccagc aactactac aaccctccg actttcggac aagggacaaa ggtggaatt      1560

```

aagaggactg tg 1572
 <210> 30
 <211> 1572
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> trastuzumab-based TriKE, E. coli codon optimized
 <400> 30

caggtgcagc tggtagtc tggtagcgc ttgtagcagc ctgtagcgc tctgcgctg 60
 tcctgtgagg ccctgagc cacctcagc agctataaca tggtagcgc cgcagcgc 120
 ccaggacaag gcctgagc tggtagcgc attacctgga tggtagcgc cacctcctat 180
 gcgtagcgc tgaagcgc ttccaccatc tgcgtagcagc attccaagaa cagcgtgat 240
 ctgcaaatga acagcctgagc cgcgtagcagc acggcgcctt attattgtgc ggcaaaccc 300
 tggcgcgctt cgcgtagcgc tagtggcacc tactgggagc aaggcgcct ggtcagcgc 360
 tcctcctctg gcgtagcgc tagcgcgtagc ggaggttagc ggggggtagc aagcgcgtagc 420

 ggttagcgcag ggaactgtagc gaatgtaata agttagctga aaaaattga agatctgatt 480
 cagagcagc atattgagc gacgttatat acggaatcgc atgttcacc aagttgcaaa 540
 gttacagcaa tgaatgctt ttgttagag ttacaagtta ttccactga gtcgtagcagc 600
 gcaagtattc atgatactg agaaaatctg atcctcctg caaacacag cttgtcgtcgc 660
 aatgggaatg taacagaatc tggtagcgc gaatgtgaag aactggaaga aaaaatatt 720
 aaagaatttt tgcagagctt tgttcacatt gtccaaatgt tcatcaacac ttctgtagc 780
 accagcgcct cagtaaac ggcgtagcgc gaaggttcca caaaggtga agttcagcgc 840

 gtggaagcgc gcgtagcgc ggttagcgc ggttagcgc tccgctgctc atgtgtagcgc 900
 agcgcgtttta atatacaaga tacatataa cattggtagc gacagcgcgc ggtagcgcgc 960
 ctgtagcgcgc ttgcgtagc ttatccgagc aatggataga ctcgtagcgc cgattctgtagc 1020
 aaagcgcgcct ttaccatctc agcgcagcgc tcaagaaca ccgtagcgcct acagatgaac 1080
 tcctcgcgcgc cagaagacac ggctgtctat tattgctcgc gctggtagcgc gcagcgcctt 1140
 tatgcatagc attactgtagc tcagtagcgc ctgtagcgc ttagcgcgcgc tagtagcgcgc 1200
 ggcgtagcgc aacctgtagc cggagaagc tgcacaaag ggcgatagc gatgtagcgc 1260

 agccgcctcact cactgtagcgc cagtagcgcgc gatcgcgcgc cagtagcgcgc ccgtagcgcgc 1320
 cagtagcgcgc atacagcgcgc ggcagtagcgc cagcaaaaac ctggaagcgc ccaaaaactt 1380
 ctgtagcgcgc gcgtagcgcct cttatagcgc ggcgtagcgcgc cagtagcgcgc gcgtagcgcgc 1440

agtggaacgg actttactct gacaatttct tcgcttcagc cggaggattt tgctacctat 1500
 tattgccagc aactactacac caccocgccg actttcggcc aaggacgaa agtggaaatt 1560
 aagaggacgg tg 1572

- <210> 31
- <211> 497
- <212> PRT
- <213> Artificial

<220><223> partial trastuzumab-based TriKE

<400> 31

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
 20 25 30
 Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val
 35 40 45
 Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 50 55 60
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg
 65 70 75 80
 Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 85 90 95
 Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr
 100 105 110
 Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 115 120 125
 Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 130 135 140
 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 145 150 155 160
 Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 165 170 175

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

420 425 430
 Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp

435 440 445
 Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu

450 455 460
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Asn Pro Trp Pro Val Ala Ala

465 470 475 480
 Pro Arg Ser Gly Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

485 490 495
 Ser

<210> 32

<211> 244

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> partial trastuzumab-based TriKE

<400> 32

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile
 35 40 45

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

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

65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn
 85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Ser Cys Asp Lys

<210> 33

<211> 759

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> trastuzumab-based TriKE

<400> 33

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys

305 310 315 320

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

 325 330 335

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

 340 345 350

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr

 355 360 365

Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys

 370 375 380

Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro

385 390 395 400

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu

 405 410 415

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp

 420 425 430

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp

 435 440 445

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

 450 455 460

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln

465 470 475 480

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly

 485 490 495

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asn Trp Val Asn Val Ile Ser

 500 505 510

Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala

 515 520 525

Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala

 530 535 540

Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly

545 550 555 560
 Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn

 565 570 575
 Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu

 580 585 590
 Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe

 595 600 605
 Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser Gly Ser Thr Ser Gly

 610 615 620
 Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Val Gln

625 630 635 640
 Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg

 645 650 655
 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Ser Tyr Asn Met Gly

 660 665 670
 Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Ala Val Ala Ser Ile

 675 680 685
 Thr Trp Ser Gly Arg Asp Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg

 690 695 700
 Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met

705 710 715 720
 Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Asn

 725 730 735
 Pro Trp Pro Val Ala Ala Pro Arg Ser Gly Thr Tyr Trp Gly Gln Gly

 740 745 750
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

755

<210> 34

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> linker

<400> 34

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly

20

<210> 35

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> linker

<400> 35

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 36

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> signal peptide

<400> 36

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

1 5 10 15

Val His Ser

<210> 37

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> T2A self-cleaving peptide

<400> 37

Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro

1 5 10 15

Gly Pro