



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0119689
(43) 공개일자 2017년10월27일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
<i>C07K 16/28</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
<i>C07K 16/2803</i> (2013.01)
<i>C07K 16/2851</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2017-7025740</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2016년02월22일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2017년09월13일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2016/018955</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2016/134371
국제공개일자 2016년08월25일</p> <p>(30) 우선권주장
62/118,561 2015년02월20일 미국(US)
62/119,645 2015년02월23일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
오하이오 스테이트 이노베이션 파운데이션
미국 오하이오주 43201 컬럼버스 1524 노스 하이 스트리트 테크놀로지 컴머셜리제이션 앤드 날리지 트랜스퍼 오피스</p> <p>(72) 발명자
칼리지우리, 마이클
미국 43220 오하이오주 콜럼버스 코치 로드 550 찬, 웅, 키웅
미국 43212 오하이오주 콜럼버스 챔버 로드 1220 아파트먼트 414비
유, 지안후아
미국 43235 오하이오주 콜럼버스 돈나헤이 스트리트 1295</p> <p>(74) 대리인
양영준, 김영</p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 29 항

(54) 발명의 명칭 **NKG2D 및 종양 연관 항원에 대해 유도된 이가 항체**

(57) 요약

암 세포의 표면 상의 종양 연관 항원 (TAA) 및 NKG2D 수용체와 결합하는 폴리펩티드가 개시되어 있다. NKG2D 수용체는 자연 살해 세포, T 세포, 자연 살해 T 세포, 및 감마 델타 T 세포와 같은 살해 세포의 표면 상에서 발현된다. 일부 경우, TAA는 CS-1 또는 EGFRvIII이다. 또한, 개시된 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, 개시된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 및 개시된 벡터를 포함하는 숙주 세포가 개시된다. 또한, 개시된 폴리펩티드를 포함하는 2가 항체가 개시된다. 또한, 개시된 항체를 포함하는 약제학적 조성물이 개시된다. 또한, 개시된 이중특이적 항체를 사용하여 대상체에서 암을 치료하는 방법이 개시된다.

(52) CPC특허분류

C07K 16/2863 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2317/73 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

NKG2D 수용체 및 종양 연관 항원 (TAA) 둘 모두와 결합하는 폴리펩티드로서, 상기 TAA는 CS-1 또는 EGFRvIII인, 폴리펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 NKG2D와 결합하는 항체 ("NKG2D 항체") 또는 그의 단편을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 NKG2D 항체는 단일 사슬 가변 단편인, 폴리펩티드.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 NKG2D 항체는 아미노산 서열의 서열 번호 5를 포함하는 가변 중쇄 (V_H) 도메인 및 아미노산 서열의 서열 번호 6을 포함하는 가변 경쇄 (V_L) 도메인을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 CS-1과 결합하는 항체 ("CS-1 항체") 또는 EGFRvIII와 결합하는 항체 ("EGFRvIII 항체"), 또는 그의 단편을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 CS-1 항체는 단일 사슬 가변 단편인, 폴리펩티드.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 CS-1 항체는 아미노산 서열의 서열 번호 13을 포함하는 가변 중쇄 (V_H) 도메인 및 아미노산 서열의 서열 번호 14를 포함하는 가변 경쇄 (V_L) 도메인을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 EGFRvIII 항체는 단일 사슬 가변 단편인, 폴리펩티드.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 EGFRvIII 항체는 아미노산 서열의 서열 번호 19를 포함하는 가변 중쇄 (V_H) 도메인 및 아미노산 서열의 서열 번호 20을 포함하는 가변 경쇄 (V_L) 도메인을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 비면역원성 링커를 추가로 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 11

제10항에 있어서, 비면역원성 링커는 아미노산 서열의 서열 번호 10을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 12

제1항에 있어서, 하기 식을 포함하는 폴리펩티드:



$V_{HN} - V_{LN} -- V_{HT} - V_{LT}$,

$V_{LN} - V_{HN} -- V_{HT} - V_{LT}$, 또는

$V_{HN} - V_{LN} -- V_{LT} - V_{HT}$,

여기서 " V_{HT} "는 CS-1 또는 EGFRvIII에 대해 특이적인 중쇄 가변 도메인이고;

여기서 " V_{LT} "는 CS-1 또는 EGFRvIII에 대해 특이적인 경쇄 가변 도메인이고;

여기서 " V_{LN} "은 NKG2D에 대해 특이적인 경쇄 가변 도메인이고;

여기서 " V_{HN} "은 NKG2D에 대해 특이적인 중쇄 가변 도메인이며;

여기서 "-"는 펩티드 링커 또는 펩티드 결합으로 이루어지고;

여기서 "--"는 펩티드 링커 또는 펩티드 결합으로 이루어짐.

청구항 13

이중특이적 항체로서,

제12항의 폴리펩티드를 포함하고, 상기 V_{LN} 및 상기 V_{HN} 은 이량체화되어 NKG2D에 대한 항원 결합 부위를 형성하고, 상기 V_{HT} 및 상기 V_{LT} 는 이량체화되어 CS-1 또는 EGFRvIII에 대한 항원 결합 부위를 형성하는, 이중특이적 항체.

청구항 14

이중특이적 항체로서,

제1 항원 결합 영역 및 제2 항원 결합 영역을 포함하는 이중특이적 항체를 포함하는 단일 폴리펩티드 사슬을 포함하고;

상기 제1 항원 결합 영역은 인간 면역 효과기 세포 상의 NKG2D에 특이적으로 결합함으로써 상기 인간 면역 효과기 세포의 활성을 동원할 수 있고;

상기 제2 항원 결합 영역은 표적 세포 상의 CS-1 또는 EGFRvIII에 특이적으로 결합할 수 있는, 이중특이적 항체.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 제1 부분은 2개의 항체 가변 도메인을 포함하는, 이중특이적 항체.

청구항 16

제14항 또는 제15항에 있어서, 상기 제2 부분은 2개의 항체 가변 도메인을 포함하는, 이중특이적 항체.

청구항 17

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 부분 및 상기 제2 부분은 인간 항체로부터 유래된, 이중특이적 항체.

청구항 18

제14항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 영역은 아미노산 서열의 서열 번호 5를 갖는 가변 중쇄 (V_H) 도메인 및 아미노산 서열의 서열 번호 6을 갖는 가변 경쇄 (V_L)를 포함하는, 이중특이적 항체.

청구항 19

제14항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 항원 결합 영역은 아미노산 서열의 서열 번호 13을 갖는

가변 중쇄 (V_H) 도메인 및 아미노산 서열의 서열 번호 14를 갖는 가변 경쇄 (V_L)를 포함하는, 이중특이적 항체.

청구항 20

제14항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 항원 결합 영역은 아미노산 서열의 서열 번호 19를 갖는 가변 중쇄 (V_H) 도메인 및 아미노산 서열의 서열 번호 20을 갖는 가변 경쇄 (V_L)를 포함하는, 이중특이적 항체.

청구항 21

제14항에 있어서, 상기 항체는 아미노산 서열의 서열 번호 20을 포함하는, 이중특이적 항체.

청구항 22

약제학적으로 허용가능한 담체 중에 제14항 내지 제21항 중 어느 한 항의 이중특이적 항체를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 23

대상체에서 암을 치료하는 방법으로서,

제22항의 약제학적 조성물의 치료적 유효량을 상기 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 24

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 25

이중성 발현 제어 서열에 작동가능하게 연결된 제24항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 26

제25항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 27

폴리펩티드로서,

NKG2D 수용체 및 종양 연관 항원 (TAA) 둘 모두와 결합하고,

NKG2D와 결합하는 항체 ("NKG2D 항체") 또는 그의 단편; 및

TAA와 결합하는 항체 ("TAA 항체") 또는 그의 단편을 포함하고,

상기 NKG2D 항체는 아미노산 서열의 서열 번호 5를 포함하는 가변 중쇄 (V_H) 도메인, 아미노산 서열의 서열 번호 6을 포함하는 가변 경쇄 (V_L) 도메인, 또는 이들의 조합을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 28

제27항에 있어서, 하기 식을 포함하는 폴리펩티드:

$$V_LN - V_HN \text{ -- } V_LT - V_HT,$$

$$V_HN - V_LN \text{ -- } V_HT - V_LT,$$

$$V_LN - V_HN \text{ -- } V_HT - V_LT, \text{ 또는}$$

$$V_HN - V_LN \text{ -- } V_LT - V_HT,$$

여기서 " V_HT "는 TAA에 대해 특이적인 중쇄 가변 도메인이고;

여기서 " V_LT "는 TAA에 대해 특이적인 경쇄 가변 도메인이고;

여기서 "V_LN"은 NKG2D에 대해 특이적인 경쇄 가변 도메인이고;

여기서 "V_HN"은 NKG2D에 대해 특이적인 중쇄 가변 도메인이며;

여기서 "-"는 펩티드 링커 또는 펩티드 결합으로 이루어지고;

여기서 "--"는 펩티드 링커 또는 펩티드 결합으로 이루어짐.

청구항 29

이중특이적 항체로서,

제28항의 폴리펩티드를 포함하고, 상기 V_LN 및 상기 V_HN은 이량체화되어 NKG2D에 대한 항원 결합 부위를 형성하고, 상기 V_HT 및 상기 V_LT는 이량체화되어 TAA에 대한 항원 결합 부위를 형성하는, 이중특이적 항체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은, 본 명세서에 전체적으로 참고로 포함된, 2015년 2월 20일자로 출원된 미국 가출원 제62/118,561호 및 2015년 2월 23일자로 출원된 미국 가출원 제62/119,645호의 이익을 주장한다.

배경 기술

[0003] 2014년에는 160만 건의 신규 사례가 암으로 진단되었고, 585,720명이 사망한 것으로 보고되었다. 현 치료는 주로 화학요법, 방사선요법, 수술 및 골수 이식에 의존하고 있다. 그러나, 이것들은 심각한 부작용과 연관될 수 있으며, 일부 경우에는 암이 치료에 반응하지 않는다. 따라서, 새로운 치료법이 시급히 필요하다. 암 면역요법은 고도로 특이적이고 림프구로부터 종양 용해 활성을 유도하는 데 효과적이므로 유망하다. 이중특이적 T 세포 결합자(engager) 또는 이중특이적 살해 세포 결합자 (BiTE 및 BiKE)와 같은 융합 단백질은 종양 세포와 T 세포 (또는, 각각 자연 살해 세포) 사이에 연결을 형성하는 암 면역요법이다. BiTE 또는 BiKE 단백질은 상이한 항체의 두 개의 단일 사슬 가변 단편 (scFv)을 가지며, 그 중 하나는 종양 특이적 분자와 결합하고, 다른 하나는 림프구 표면 상의 수용체와 결합한다. BiTE 및 BiKE 치료법은 종래의 항체 치료법과 비교하여 종양 세포 용해에 대해 100 내지 10,000배 더 높은 효능을 가질 것으로 기대된다. 그러나, BiTE 치료법은 T 세포 표면 상의 CD3 수용체를 특이적으로 표적화하는 한편, BiKE 치료법은 자연 살해 세포의 표면 상의 수용체를 표적화한다. 현재, 이중특이적 결합자 단백질은 CD8+ T 세포, NK 세포, NKT 세포 및 γ δ T 세포 등을 포함한 모든 살해 면역 세포를 교차-촉발시키도록 설계되어 있지 않다.

발명의 내용

[0004] 종양-연관 항원 (TAA) 및 NKG2D 수용체와 결합하는 폴리펩티드가 개시되어 있다. 폴리펩티드는 TAA와 결합하는 항체 또는 그의 단편을 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, TAA는 CS-1 또는 EGFRvIII (따라서, "CS-1 항체" 또는 "EGFRvIII 항체"인 항체 또는 단편)일 수 있다. 폴리펩티드는 NKG2D 수용체와 결합하는 항체 ("NKG2D 항체") 또는 그의 단편을 추가로 포함할 수 있다. 따라서, 폴리펩티드는 NKG2D 항체 및 CS-1 항체 또는 EGFRvIII 항체를 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, TAA 항체 및/또는 NKG2D 항체는 단일 사슬 가변 단편 (scFv) 항체이다.

[0005] 일부 실시 형태에서, 폴리펩티드는, TAA 항체 및 NKG2D 항체를 발현하는 핵산에 의해 발현되는 융합 단백질이다. 일부 실시 형태에서, TAA 항체 및 NKG2D 항체는 개시된 폴리펩티드를 형성하도록 함께 화학적으로 접합된 별개의 펩티드이다.

[0006] 폴리펩티드의 일부 실시 형태에서, TAA 항체 및 NKG2D 항체는 비면역원성 링커(linker)에 의해 함께 결합된다. 비면역원성 링커는 인간 근육 알도스 단백질의 아미노산 서열, 그의 단편, 그의 변이체, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0007] NKG2D 수용체는 세포독성 T 세포, 감마-델타 T 세포, 자연 살해 (NK) 세포 및 NKT 세포에 의해 발현되며, 본 명세서에서 이들은 대체적으로 모두 "살해 세포"로 지칭될 수 있다. NKG2D 수용체는 단백질과 결합 시 살해 세포

를 활성화시킬 수 있다. 이러한 활성화는 세포독성이 되는 살해 세포를 포함할 수 있다.

[0008] CS-1은 다발성 골수종 세포에 의해 발현되는 항원이다. EGFR III 형 변이체 (EGFRvIII)는, 유방, 난소, 전립선 및 폐 암종에서만뿐만 아니라 교모세포종에서도 발견되는 새로운 중앙 특이적 표적의 형성을 야기하는, 세포의 도메인의 결실을 갖는다.

[0009] 따라서, 개시된 폴리펩티드는, 특정 암에 의해 발현되는 TAA, 예를 들어 CS-1 또는 EGFRvIII 및 살해 세포에 의해 발현되는 NKG2D 수용체와 결합할 수 있다. 개시된 폴리펩티드는, 암 세포에 의해 발현되는 TAA 및 살해 세포에 의해 발현되는 NKG2D 수용체와 동시에 결합하고, 그에 의해 암 세포와 살해 세포 사이에 가교를 형성할 수 있다. 이러한 가교는 중앙 세포와 살해 세포 사이에 면역 용해 시냅스의 형성을 촉진할 수 있다. 살해 세포는 면역 시냅스 상에서 퍼포린 및/또는 그랜자임을 방출할 수 있으며, 따라서 다발성 골수종 세포의 사멸을 유도할 수 있다. 사멸은 암 세포의 용해를 포함할 수 있다. 이와 같이, 개시된 폴리펩티드는 살해 세포의 동원 및 활성화를 통해 암 세포의 표적화된 사멸을 달성한다.

[0010] 또한, 다발성 골수종, 교모세포종, 유방암, 난소암, 전립선암 및 폐암종과 같은 암을, 이의 치료를 필요로 하는 대상체에서, 치료하는 방법이 개시되어 있다. 본 방법은 전술된 폴리펩티드를 대상체에 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 경우, 폴리펩티드는 치료적 유효량으로 투여된다.

[0011] 본 발명의 하나 이상의 실시 형태의 세부 사항은 첨부 도면 및 하기 설명에서 제시된다. 본 발명의 다른 특징, 목적 및 이점은 상세한 설명 및 도면 및 청구범위로부터 명확해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 항-CS-1 삼중특이적 세포독성 립프구 결합자 (TriCLE) 폴리펩티드 설계의 개략도이다. 항-CS-1 단일 사슬 가변 단편 (scFv) 및 항-NGK2D scFv는 인간 근육 알도스 (HMA) 링커에 의해 함께 결합된다. VH: 중쇄; VL: 경쇄; (G4S)3: 글리신-세린 링커; 6XHis: 히스티딘의 6회 반복.

도 2는 정제된 단백질이 항-CS-1 TriCLE를 함유하는 scFv임을 확인하는 웨스턴 블롯(Western blot)을 도시한다.

도 3은 항-CS-1 TriCLE의 존재 하에 다중 골수종 (MM) 세포주 H929에 대한 NK 세포주 NKL의 세포독성의 그래프이다. Tri-CLE를 50pg/mL 내지 10ug/mL 범위에서 용량을 증가시키면서, 20:1의 효과기 비의 NKL: H929의 공동 배양에 첨가하였다.

도 4a는 CS1⁺ 세포주에 대한 TriCLE의 결합을 도시한다. 0.2×10^6 H929 세포를 TriCLE와 함께 실온에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 세척하고, 2차 항체-결합 단백질 L-바이오틴으로 염색한 후, 유동 세포계측 분석을 위해 항 바이오틴 PE 항체로 염색하였다. 히스토그램은 세 번의 독립적인 실험으로부터의 대표적인 것이었다. 도 4b는 항-CS-1 TriCLE의 평균 형광 강도를 1차 항체로서 비교한 그래프를 나타낸다.

도 5a는 TriCLE에 의한 T, NKT 및 NK 세포의 활성화를 도시한다. 5ug/mL의 TriCLE를 4시간 동안 휴지기 인간 PBMC에 첨가한 후, 세포를 수집하고, CD3, CD56, CD14 및 CD69를 실온에서 20분 동안 염색하였다. 세포를 유동 세포계측법으로 분석하였다. 도 5b는 항-CD3 항체가 TriCLE에 상승작용하며, 살해 세포의 3개의 하위세트 모두의 활성화를 증가시킨 것을 도시한다. 도 5c는 활성화된 인간 PBMC의 세포독성이 3개의 다발성 골수종 세포 MM1.s, H929 및 RPMI-8226에 대한 TriCLE에 의해 강화되었음을 도시한다. EC50은 비선형 회귀 곡선으로부터 계산되었다. 도 5d는 24시간 및 48시간째에 CD56이 결핍된 효과기 세포를 사용하여 항-CS-1 TriCLE이 세포독성을 유도한 것을 도시한다. ***은 $p < 0.001$ 이다.

도 6a는 항-EGFRvIII TriCLE의 그래프 표시를 도시한다. VH: 중쇄; VL: 경쇄; (G4S)3: 글리신-세린 링커; HMA: 인간 근육 알도스. 전체 서열을 pGEX6p1m 벡터 내로 클로닝하였다. 도 6b는 항-EGFRvIII TriCLE에 의한 T, NKT 및 NK 세포의 활성화를 도시한다. 5ug/mL의 TriCLE를 4시간 동안 휴지기 인간 PBMC에 첨가한 후, 세포를 수집하고, CD3, CD56, CD14 및 CD69를 실온에서 20분 동안 염색하였다. 세포를 유동 세포계측법으로 분석하였다. 도 6c는 활성화된 인간 PBMC의 세포독성이 3개의 다발성 골수종 세포 GBM1123에 대한 TriCLE에 의해 강화되었음을 도시한다. EC50은 비선형 회귀 곡선으로부터 계산되었다. 결과는 3명의 독립적인 공여자에 의한 것이었다. ***은 $p < 0.001$ 이고; **는 $p < 0.01$ 이다. 도 6c는 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] TAA 및 NKG2D 수용체와 결합하는 폴리펩티드. 폴리펩티드는 TAA와 결합하는 항체 또는 그의 단편을 포함할 수

있다. 일 실시 형태에서, 도 1a의 개략도에 의해 제시된 것과 같이, TAA는 CS-1 (따라서, "CS-1 항체"인 항체 또는 단편)일 수 있다. 폴리펩티드는 NKG2D 수용체와 결합하는 항체 ("NKG2D 항체") 또는 그의 단편을 추가로 포함할 수 있다. 폴리펩티드는 CS-1 항체 및 NKG2D 항체를 포함할 수 있다. CS-1 항체 및/또는 NKG2D 항체는 단일 사슬 가변 단편일 수 있다.

[0014] 개시된 폴리펩티드는 종양 세포 (또는, 바이러스 감염 세포)를 사멸시키기 위해 모든 강력한 살해 세포의 세포 독성을 동원하여 탈표적(off-target) 부작용 없이 월등한 효능을 야기함으로써, 종래의 항-CD16 BiKE 또는 항-CD3 BiTE와 상이하다. 일부 실시 형태에서, 개시된 폴리펩티드는 NKG2D 촉발자 분자 및 종양-연관 항원 (TAA) 을 표적으로 하는 2개의 단일 사슬 가변 단편 (scFv)의 조작된 융합 단백질을 포함한다. NKG2D 수용체는, 특히 세포독성 T 세포, 감마-델타 T 세포, NK 세포 및 NKT 세포 상에서 고도로 발현되는 활성화 분자이다. 일단 NKG2D 수용체가, 예를 들어, 항-NKG2D scFv, 항체 또는 다른 리간드에 의해 결합되면, 그의 활성화 모터프는 DAP10과 같은 다른 수용자 단백질의 인산화를 촉발시키고, 후속하여, 일련의 세포 활성화 및 세포독성의 실행을 촉발할 것이다. 참고로 포함되는 미국 특허 출원 공개 제2010/0150870호에는 인간 NKG2D에 대한 특이성을 갖는 항체 및 이를 암 치료에 사용하는 방법이 기재되어 있다.

[0015] 개시된 폴리펩티드는 자연 살해 세포, T 세포 및 종양 세포를 표적화할 수 있는 그의 능력으로 인해, 삼중특이 적 세포독성 림프구 결합자 (TriCLE)로 지칭된다.

[0016] 다른 한편으로, TAA는 암 세포 상에서 발현된다. 특정 TAA는 암 특이적이다. 예를 들어, CS-1은 다발성 골수 종 세포 상에서 발현되는 TAA이다. CS1은 신호전달 림프구 활성화 분자 (SLAM) 계열에 속하는 세포 표면 수용 체이다. 정상 세포가 아닌 MM 세포 상에서의 CS1의 고발현은 CS1을 MM 치료를 위한 매력적인 표적이 되도록 한 다. CS1에 대한 엘로투주마를 사용한 전임상 데이터는, 엘로투주마이, PBMC 또는 정제된 NK 세포와 함께 인큐 베이션된 경우, 인간 MM 세포주의 용해를 유도하는 강력한 능력을 나타냄을 보여주었다. EGFRvIII는, 유방, 난 소, 전립선 및 폐 암종에서만 아니라 교모세포종에서도 발견되는 새로운 종양 특이적 표적의 형성을 야기하는, 세포의 도메인의 결실을 갖는다. scFv의 항원 특이적 특성은, 융합 단백질이 NKG2D 및 TAA 분자와 특이적으로 결합하게 하여, 현 치료법보다 부작용이 더 감소되게 한다.

[0017] 개시된 폴리펩티드는 재조합 DNA 기법을 사용하여 조작될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 폴리펩티드는, TAA 항 체 및 NKG2D 항체를 발현하는 핵산에 의해 발현되는 융합 단백질이다. 조작된 융합 단백질을 코딩하는 DNA 서 열은 박테리아 발현 벡터 내로 혼입될 수 있다. 개시된 폴리펩티드는 용이하게 생성될 수 있고, 다시 접힐 수 있고, 음이온 교환 크로마토그래피 컬럼을 이용하여 정제될 수 있다 일부 실시 형태에서, TAA 항체 및 NKG2D 항 체는 개시된 폴리펩티드를 형성하도록 함께 화학적으로 접합된 별개의 펩티드이다.

[0018] 항-TAA 항체 및 항-NKG2D 항체의 scFv는 비면역원성 링커와 함께 결합 및 연결될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 링커는 인간 근육 알도스 단백질로부터 유래되거나, 그의 변이체일 수 있다.

[0019] 개시된 폴리펩티드가 TAA를 발현하는 암 세포를 갖는 대상체에 투여되는 경우, 항-TAA scFv는 하나의 아암으로 암 세포 표면과 결합하고, 항-NKG2D scFv는 다른 아암 상에서 살해 세포의 NKG2D 수용체와 결합한다. 이러한 결합은 암과 살해 세포를 가교하여, 면역 용해성 시냅스를 형성한다. 살해 세포는, 세포막을 파괴하고 암 세포 의 세포 사멸을 유도하는 시냅스 위에 퍼포린 및 그랜자임을 방출할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 항-TAA scFv는 항-CS-1이다. 다른 특정 실시 형태에서, 항-TAA scFv는 항-EGFLvIII이다. 따라서, 개시된 폴리펩티드 는 살해 세포를 다발성 골수종 세포, 교모세포종, 유방암, 난소암, 전립선암 및 폐암종과 연결시킬 수 있다.

[0020] 일부 실시 형태에서, 개시된 폴리펩티드는 NKG2D에 부착되는 리간드를 (즉, 항체 대신) 포함한다. 이러한 리간 드는 MIC 또는 ULBP 계열로부터의 것일 수 있다. 예를 들어, NKG2D 리간드는 MICA 또는 MICB일 수 있거나, NKG2D 리간드는 ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4, ULBP5, 또는 ULBP6일 수 있다.

[0021] 다른 대안적인 실시 형태에서, 개시된 폴리펩티드는, TAA, 예를 들어, CS-1 또는 EGFRvIII와 결합하는 리간드를 (즉, 항체 대신) 포함한다.

[0022] 또한, 개시된 폴리펩티드에 대해 코딩하는 2개의 핵산 작제물, 예를 들어 pGEX6p1m-TriCLE 및 pET21d-TriCLE가 본 명세서에 개시된다. 이러한 작제물은 박테리아, 포유류 또는 곰팡이 세포를 사용하여, 단백질의 고수율 번 역에 사용될 수 있다. 번역은 강력한 T7 프로모터에 의해 수행될 수 있다. pGEX6p1m 및 pET21d 발현 벡터가 효율적인 단백질 번역을 지원하는 것으로 밝혀졌으나, 본 발명의 범주는 본 명세서에 개시된 융합 단백질을 인 코딩하는 서열과 쌍을 이루는 다른 발현 벡터를 포함한다.

[0023] 본 명세서 및 청구범위에 사용되는 바와 같이, 단수 형태("a", "an", "the")는 그 문맥에 달리 명확히 나타나

있지 않는 한 복수의 지시대상을 포함한다. 예를 들어, 용어 "하나의 세포"는 그의 혼합물을 포함하여, 복수의 세포를 포함한다.

- [0024] 용어 "약" 및 "대략"은 당업자가 이해하는 바와 같이, "근사한" 것으로 정의된다. 비제한적인 일 실시 형태에서, 상기 용어는 10% 이내로 정의된다. 비제한적인 다른 실시 형태에서, 상기 용어는 5% 이내로 정의된다. 비제한적인 또 다른 실시 형태에서, 상기 용어는 1% 이내로 정의된다.
- [0025] 용어 "펩티드", "단백질" 및 "폴리펩티드"는, 하나의 아미노산의 카르복실기에 의해 다른 아미노산의 알파 아미노기에 연결된 2개 이상의 아미노산을 포함하는 천연 또는 합성 분자를 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 용어 "단백질"은 펩티드 결합 또는 변형된 펩티드 결합에 의해 서로 결합된 아미노산, 예를 들어 펩티드 등배전자체 (isostere) 등을 포함하며, 20개의 유전자-인코딩 아미노산 이외의 변형된 아미노산을 함유할 수 있다. 폴리펩티드는 번역 후 처리와 같은 천연 과정 또는 당업계에 잘 알려진 화학적 변형 기법에 의해 변형될 수 있다.
- [0026] 용어 "단백질 도메인"은 단백질의 일 부분, 단백질의 부분들 또는 구조적 완전성을 나타내는 전체 단백질을 지칭하며; 이러한 결정은 단백질의 일 부분, 단백질의 부분들 또는 전체 단백질의 아미노산 조성을 기초로 할 수 있다.
- [0027] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "펩티드모방체 (peptidomimetic)"는 정상 펩티드 화학의 일부 변경을 포함하는 펩티드의 모방체를 의미한다. 펩티드모방체는 전형적으로 안정성의 증가, 효능의 증가, 전달의 강화, 반감기의 증가 등과 같은 본래 펩티드의 일부 특성을 강화시킨다. 공지된 폴리펩티드 서열에 기초한 펩티드모방체의 제조 방법은, 예를 들어, 미국 특허 제5,631,280호; 제5,612,895호; 및 제5,579,250호에 기재되어 있다. 펩티드모방체의 사용은 주어진 위치에서 비-아미드 연결에 의한 비-아미노산 잔기의 혼입을 수반할 수 있다. 본 발명의 일 실시 형태는, 상기 화합물이 적합한 모방체로 대체된 결합, 펩티드 골격 (peptide backbone) 또는 아미노산 성분을 갖는 펩티드모방체이다. 적합한 아미노산 모방체일 수 있는 비천연 아미노산의 일부 비제한 예는 β -알라닌, L- α -아미노 부티르산, L- γ -아미노 부티르산, L- α -아미노 아이소부티르산, L- ϵ -아미노 카프로산, 7-아미노 헵탄산, L-아스파르트산, L-글루탐산, N- ϵ -Boc-N- α -CBZ-L-리신, N- ϵ -Boc-N- α -Fmoc-L 리신, L-메티오닌 설폰, L-노르류신, L-노르발린, N- α -Boc-N- δ -CBZ-L-오르니틴, N- δ -Boc-N- α -CBZ-L-오르니틴, Boc-p-니트로-L-페닐알라닌, Boc-하이드록시프롤린 및 Boc-L-티오프롤린을 포함한다.
- [0028] 용어 "융합 단백질"은 하나의 폴리펩티드의 아미노 말단과 다른 폴리펩티드의 카르복실 말단 사이에 형성된 펩티드 결합을 통한 둘 이상의 폴리펩티드의 결합에 의해 형성된 폴리펩티드를 지칭한다. 융합 단백질은 구성 폴리펩티드의 화학적 커플링 (chemical coupling)에 의해 형성될 수 있거나, 이는 단일 인접 융합 단백질을 인코딩하는 핵산 서열로부터 단일 폴리펩티드로서 발현될 수 있다. 단일 사슬 융합 단백질은 단일 인접 폴리펩티드 골격을 갖는 융합 단백질이다. 융합 단백질은 분자 생물학에서의 종래 기법을 사용하여 두 개의 유전자를 단일 핵산으로 프레임 내에서 결합시킨 후, 융합 단백질이 생성되는 조건 하에 적합한 숙주 세포에서 핵산을 발현시킴으로써 제조될 수 있다.
- [0029] 용어 "항체"는 표적 항원에 선택적으로 결합하는 천연 항체 또는 합성 항체를 지칭한다. 상기 용어는 다클론 항체 및 단일클론 항체를 포함한다. 용어 "항체"에는, 온전한 면역글로불린 분자에 더하여, 이들 면역글로불린 분자의 단편 또는 중합체, 및 표적 항원에 선택적으로 결합하는 면역 글로불린 분자의 인간 또는 인간화된 버전이 또한 포함된다.
- [0030] 용어 "단백질 단편" 또는 "항체 단편"은 전장 단백질 또는 항체의 기능적 부분을 지칭한다. 항체 단편의 지칭시, 단편은 대체적으로 표적 결합 영역 또는 가변 영역이다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편을 포함한다. 항체의 "기능적 단편 또는 유사체"라는 어구는 전장 항체와 공통되는 특질적인 생물학적 활성을 갖는 화합물이다. 예를 들어, 항-CS-1 항체의 기능적 단편 또는 유사체는 암 세포 표면 상에서 CS-1 분자와 결합할 수 있는 것이다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 항체와 관련하여, "기능적 단편"은 Fv, F(ab) 및 F(ab')₂ 단편을 지칭한다. "Fv" 단편은 완전한 표적 인식 및 결합 부위를 포함하는 최소 항체 단편이다. 이러한 영역은 단단한 비공유 결합 (V_H-V_L 이량체)으로 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인의 이량체로 이루어진다. 이러한 구성에서, 각 가변 도메인의 3개의 CDR은 상호작용하여 V_H-V_L 이량체의 표면 상에 표적 결합 부위를 정의한다. 종합하면, 6개의 CDR이 항체에 표적 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 단일 가변 도메인 (scFv, 또는 표적에 대해 특이적인 3개의 CDR만을 포함하는 Fv의 절반)조차도, 전체 결합 부위보다 친화도가 낮더라도, 표적을 인식하여 결합하는 능력을 갖는다.

- [0031] 용어 "CDR" 및 그 복수형인 "CDR들"은, 3개가 경쇄 가변 영역 (CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3)의 결합 특성을 구성하고, 3개가 중쇄 가변 영역 (CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3)의 결합 특성을 구성하는 상보성 결정 영역을 지칭한다. CDR은, 항체와 항원의 특이적 상호작용에 관여하고 따라서 항체 분자의 기능적 활성화에 기여하는 대부분의 잔기를 포함하며; 이들은 항원 특이성의 주 결정인자이다.
- [0032] "단일 사슬 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 V_H 도메인과 V_L 도메인을 포함하며, 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 사슬 내에 존재한다. 대체적으로, Fv 폴리펩티드는, sFv가 표적 결합을 위해 원하는 구조를 형성하는 것을 가능하게 하는, V_H 도메인과 V_L 도메인 사이의 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다.
- [0033] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 폴리펩티드 (항체를 포함) 또는 수용체를 지칭하는 경우, 용어 "특이적으로 결합한다"는 단백질 및 다른 생물학적 물질의 이중 집단에서의 단백질 또는 폴리펩티드 또는 수용체의 존재를 결정하는 결합 반응을 지칭한다. 따라서, 지정된 조건 (예를 들어, 항체의 경우, 면역검정 조건) 하에서, 특정 리간드 또는 항체는, 특정 리간드 또는 항체가 샘플에 존재하는 다른 단백질과 또는 유기체 내에서 상기 리간드 또는 항체가 접촉할 수 있는 다른 단백질과 상당한 양으로 결합하지 않는 경우, 그의 특정 "표적"과 "특이적으로 결합한다" (예를 들어, 항체가 내피 항원과 특이적으로 결합함). 대체적으로, 제2 분자에 "특이적으로 결합하는" 제1 분자는 제2 분자와 약 10^5 M^{-1} (예를 들어, 10^6 M^{-1} , 10^7 M^{-1} , 10^8 M^{-1} , 10^9 M^{-1} , 10^{10} M^{-1} , 10^{11} M^{-1} 및 10^{12} M^{-1} 이상) 초과와 친화도 (K_a)를 갖는다. 일부 실시 형태에서, K_a 는 10^6 M^{-1} 내지 10^9 M^{-1} 일 수 있다. 다른 실시 형태에서, K_a 는 10^9 M^{-1} 내지 10^{12} M^{-1} 일 수 있다.
- [0034] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "리간드"는 대체적으로 표적 세포 상의 수용체와 반응하거나 또는 그렇지 않으면 인식하거나 결합할 수 있는 모든 분자를 지칭한다.
- [0035] 개시된 폴리펩티드 작제물의 공유적 변형이 또한 고려되는데, 이는 항상은 아니지만 대체적으로 변역 후 수행된다. 예를 들어, 선택된 측쇄 또는 N-말단 잔기 또는 C-말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체화제와 폴리펩티드 작제물의 특정 아미노산 잔기를 반응시킴으로써, 개시된 폴리펩티드의 몇몇 유형의 공유적 변형이 분자 내로 도입될 수 있다.
- [0036] 일부 실시 형태에서, 개시된 폴리펩티드의 글리코실화 패턴이 변경된다. 당업계에 공지된 바와 같이, 글리코실화 패턴은 단백질의 서열 (예를 들어, 하기에서 논의되는 특정 글리코실화 아미노산 잔기의 존재 또는 부재) 또는 단백질이 생성되는 숙주 세포 또는 유기체 둘 모두에 의존적일 수 있다. 폴리펩티드의 글리코실화는 전형적으로 N-연결 또는 O-연결된다. N-연결은, 탄수화물 모이어티(moiety)가 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착되는 것을 지칭한다. 트라이펩티드 서열인 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서, X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)은 탄수화물 모이어티를 아스파라긴 측쇄에 효소적으로 부착시키기 위한 인식 서열이다. 따라서, 폴리펩티드 내의 이들 트라이펩티드 서열 중 어느 하나의 존재는 잠재적인 글리코실화 부위를 생성한다. O-연결 글리코실화는, 하이드록시아미노산으로서 5-하이드록시프롤린 또는 5-하이드록시리신이 또한 사용될 수 있으나, 가장 통상적으로는 세린 또는 트레오닌에 대한 당, N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 자일로스 중 하나의 부착을 지칭한다. 탄수화물 모이어티의 수를 증가시키는 다른 수단은 단백질에 글리코사이드를 화학적으로 또는 효소적으로 커플링시키는 것이다. 이러한 과정은 N- 및 O-연결 글리코실화에 대한 글리코실화 능력을 갖는 숙주 세포에서의 단백질의 생성을 요구하지 않는다는 점에서 유리하다.
- [0037] 일부 실시 형태에서, 개시된 폴리펩티드는 하나 이상의 표지(label)를 추가로 포함한다. 표지 그룹은 잠재적인 입체 장애를 줄이기 위해, 다양한 길이의 스페이서 아암을 통해 개시된 폴리펩티드와 커플링될 수 있다. 단백질을 표지하기 위한 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있다. 대체적으로, 표지는, 그가 검출되는 검정에 따라, 다양한 부류로 분류되며, 하기의 예가 포함되지만, 이에 한정되지 않는다: a) 방사성이거나, 중동위원소 (heavy isotope)일 수 있는 동위원소 표지, 예를 들어 방사성동위원소 또는 방사성핵종 (예를 들어, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{89}Zr , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I); b) 자기 표지 (magnetic label) (예를 들어, 자기 입자); c) 산화 환원 활성 모이어티; d) 광학 염료 (발색단, 인광체 및 형광체를 포함하지만, 이에 한정되지 않음), 예를 들어, 형광 기 (예를 들어, FITC, 로다민, 란탄족 인광체), 화학발광 기, 및 "소 분자" 형광물질 또는 단백질 형광물질일 수 있는 형광체; e) 효소 기 (예를 들어, 고추냉이 퍼옥시다제 (horseradish peroxidase), β -갈락토시다제, 루시페라제, 알칼리 포스파타제); f) 바이오닐화 기; g) 2차 리포터에 의해 인식되는 미리결정된 폴리펩티드 에피토프 (예를 들어, 류신 지퍼 쌍 서열, 2차 항체에 대한 결합 부위, 금속 결합 도메인, 에피토프 태그 등), 및 h) 폐길화 (PEGylation).

- [0038] 또한, 개시된 폴리펩티드는, 예를 들어, 분자의 단리에 유용하거나 분자의 조정된 약동학적 프로파일과 연관된 추가 도메인을 포함할 수 있다. 폴리펩티드의 단리에 유용한 도메인은, 단리 방법, 예를 들어, 단리 컬럼에 포획될 수 있는 펩티드 모티프 또는 2차적으로 도입된 모이어티로부터 선택될 수 있다. 이러한 추가 도메인의 비제한 실시 형태는 Myc-태그, HAT-태그, HA-태그, TAP-태그, GST-태그, 키틴 결합 도메인 (CBD-태그), 말토스 결합 단백질 (MBP-태그), 플래그-태그 (Flag-tag), Strep-태그 및 그의 변이체 (예를 들어, StrepII-태그) 및 His-태그로서 알려진 펩티드 모티프를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 개시된 폴리펩티드는, 대체적으로 분자의 아미노산 서열 중의 연속 His 잔기, 바람직하게는 6개의 His 잔기의 반복으로 알려진 His-태그 도메인을 포함한다.
- [0039] 아미노산 서열 변형이 또한 고려된다. 예를 들어, 폴리펩티드의 결합 친화도를 향상시키거나, 생물학적 특성을 변경하거나, 또는 기능 획득 돌연변이 (gain-of-function mutation)를 도입하는 것이 바람직할 수 있다. 아미노산 서열 변이체는 적합한 뉴클레오티드 변화를 폴리펩티드의 핵산 내로 도입하거나, 펩티드 합성에 의해 제조된다.
- [0040] 용어 "아미노산" 또는 "아미노산 잔기"는, 변형 아미노산, 합성 아미노산 또는 희귀 아미노산이 원하는 대로 사용될 수 있으나, 전형적으로는 알라닌 (Ala 또는 A); 아르기닌 (Arg 또는 R); 아스파라긴 (Asn 또는 N); 아스파르트산 (Asp 또는 D); 시스테인 (Cys 또는 C); 글루타민 (Gln 또는 Q); 글루탐산 (Glu 또는 E); 글리신 (Gly 또는 G); 히스티딘 (His 또는 H); 아이소류신 (Ile 또는 I); 류신 (Leu 또는 L); 리신 (Lys 또는 K); 메티오닌 (Met 또는 M); 페닐알라닌 (Phe 또는 F); 프롤린 (Pro 또는 P); 세린 (Ser 또는 S); 트레오닌 (Thr 또는 T); 트립토판 (Trp 또는 W); 티로신 (Tyr 또는 Y); 및 발린 (Val 또는 V)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산과 같은 당업계에 인식된 정의를 갖는 아미노산을 지칭한다. 대체적으로, 아미노산은 비극성 측쇄 (예를 들어, Ala, Cys, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Val); 음으로 하전된 측쇄 (예를 들어, Asp, Glu); 양으로 하전된 측쇄 (예를 들어, Arg, His, Lys); 또는 하전되지 않은 극성 측쇄 (예를 들어, Asn, Cys, Gln, Gly, His, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, 및 Tyr)를 갖는 것으로서 분류될 수 있다.
- [0041] 아미노산 변형은, 예를 들어, 항체 작제물의 아미노산 서열 내 잔기로부터의 결실, 및/또는 그 내로의 삽입, 및/또는 그의 치환을 포함한다. 최종 작제물이 원하는 특성을 보유하는 경우, 최종 작제물에 도달하도록, 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합이 이루어진다. 아미노산 변화는 또한 글리코실화 부위의 수 또는 위치의 변화와 같이, 개시된 폴리펩티드의 번역 후 과정을 변경할 수 있다.
- [0042] 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 아미노산이 (물론, 그의 길이에 따라) 각각의 CDR에 삽입되거나 결실될 수 있다. 개시된 폴리펩티드의 삽입 변이체는 개시된 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단에 대한 효소와의 융합 또는 개시된 폴리펩티드의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드에 대한 융합을 포함한다.
- [0043] 치환 돌연변이유발(mutagenesis) 시에 가장 큰 관심대상 부위는 중쇄 및/또는 경쇄의 CDR, 특히 초가변 영역을 포함한다. 치환은 바람직하게는 본 명세서에 기재된 바와 같은 보존적 치환이다. 바람직하게는, CDR에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산이 치환될 수 있으며, 프레임워크 영역 (FR)에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 또는 25개의 아미노산이 CDR 또는 FR의 길이에 따라 치환될 수 있다. 예를 들어, CDR 서열이 6개의 아미노산을 포괄하는 경우, 이들 아미노산 중 1, 2 또는 3개가 치환된 것으로 예상된다. 유사하게, CDR 서열이 15개의 아미노산을 포괄하는 경우, 이들 아미노산 중 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개가 치환된 것으로 예상된다.
- [0044] 돌연변이유발을 위한 바람직한 위치인 항체 작제물의 특정 잔기 또는 영역의 확인을 위한 유용한 방법은 문헌 [Cunningham and Wells in Science, 244: 1081-1085 (1989)]에 기재된 바와 같은 이른바 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"이다. 여기서, 항체 작제물 내의 잔기 또는 표적 잔기의 그룹이 확인되고 (예를 들어, arg, asp, his, lys, 및 glu와 같은 하전된 잔기), 에피토프와 아미노산의 상호작용에 영향을 주기 위해 중성 또는 음으로 하전된 아미노산 (가장 바람직하게는 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체된다.
- [0045] 이어서, 치환 부위에서 또는 치환 부위에 대해 추가의 또는 다른 변이체를 도입함으로써, 치환에 대해 기능적 민감성을 나타내는 아미노산 위치가 정제된다. 따라서, 아미노산 서열 변이를 도입하기 위한 부위 또는 영역은 미리결정되는 한편, 돌연변이의 특성은 그 자체로 미리결정될 필요가 없다. 예를 들어, 지정된 부위에서 돌연변이의 수행을 분석 또는 최적화하기 위해, 알라닌 스캐닝 또는 무작위 돌연변이유발이 표적 코돈 또는 영역에서 수행될 수 있으며, 발현된 항체 작제물 변이체가 원하는 활성의 최적 조합을 위해 스크리닝된다. 서열을 알고 있는 DNA의 미리결정된 부위에 치환 돌연변이를 생성하는 기법, 예를 들어, M13 프라이머 돌연변이유발 및 PCR 돌연변이유발이 잘 알려져 있다. 표적 항원 결합 활성의 검정을 사용하여 돌연변이체의 스크리닝이 수행된

다.

- [0046] 보존적 아미노산 치환, 비보존적 아미노산 치환 (즉, 축퇴 변이체), 아미노산을 인코딩하는 각 코돈 (즉, DNA 및 RNA)의 워블 위치 (wobble position) 내의 치환, 펩티드의 C-말단에 첨가되는 아미노산들, 또는 기준 서열에 대해 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95% 상동성을 갖는 펩티드를 갖는 개시된 폴리펩티드의 변이체가 또한 개시된다.
- [0047] 용어 "서열 동일성 퍼센트 (%)" 또는 "상동성"은, 필요한 경우, 최대 서열 동일성 퍼센트를 달성하기 위해, 서열을 정렬하고, 갭을 도입한 후, 기준 핵산 서열 내의 뉴클레오티드 또는 아미노산과 동일한 후보 서열 내의 뉴클레오티드 또는 아미노산의 백분율로서 정의된다.
- [0048] 대체적으로, 중쇄 및/또는 경쇄의 하나 이상의 CDR 또는 모든 CDR에서 아미노산이 치환되는 경우, 그 후 얻어진 "치환된" 서열은 "본래의" CDR 서열과 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95% 동일한 것이 바람직하다. 이는 "치환된" 서열과 동일한 CDR의 길이 정도에 의존적임을 의미한다. 예를 들어, 5개의 아미노산을 갖는 CDR은 적어도 하나의 아미노산이 치환되도록 하기 위해 그의 치환된 서열과 80% 동일할 수 있다. 따라서, 항체 작제물의 CDR은 그의 치환된 서열과 상이한 정도의 동일성을 가질 수 있으며, 예를 들어, CDRL1이 80%를 가질 수 있는 한편, CDRL3는 90%를 가질 수 있다.
- [0049] 일부 경우, 치환 (또는 대체)은 보존적 치환이다. 항체 작제물이 제1 결합 도메인을 통해 NKG2D와 그리고 제2 결합 도메인을 통해 CS-1 또는 EGFRvIII와 같은 TAA와 결합할 수 있는 그의 능력을 보유하는 한, 임의의 치환이 예상된다.
- [0050] 아미노산 서열의 경우, 서열 동일성 및/또는 유사성은 문헌 [Smith and Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482]의 국소 서열 동일성 알고리즘, 문헌 [Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443]의 서열 동일성 정렬 알고리즘, 문헌 [Pearson and Lipman, 1988, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444]의 유사성 검색 방법, 이들 알고리즘 (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.)의 컴퓨터 구현, 바람직하게는 디폴트 세팅 (default setting)을 사용하거나 또는 검사에 의해, 문헌 [Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 12:387-395]에 의해 기재된 베스트 피트(Best Fit) 서열 프로그램을 포함하지만, 이에 한정되지 않는, 당업계에 공지된 표준 기법을 사용하여, 바람직하게는 디폴트 세팅 (default setting)을 사용하여, 또는 검사에 의해, 결정될 수 있다. 바람직하게는, 동일성 퍼센트는 하기 매개변수에 기초하여 FastDB에 의해 계산된다: 1의 불일치 페널티; 1의 갭 페널티; 0.33의 갭 크기 페널티; 및 30의 결합 페널티, 문헌 ["Current Methods in Sequence Comparison and Analysis," Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pp 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.]. 유용한 알고리즘의 예는 PILEUP이다. PILEUP은 진행성 쌍별 정렬 (progressive, pairwise alignment)을 사용하여 관련된 서열의 그룹으로부터 다중 서열 정렬을 생성한다. 이는 또한 정렬을 생성하는 데 사용된 클러스터링(clustering) 관계를 나타내는 수형도를 플로팅할 수 있다. PILEUP은 문헌 [Feng & Doolittle, 1987, J. Mol. Evol. 35:351-360]의 진행성 정렬 방법의 단순화를 사용하며; 상기 방법은 문헌 [Higgins and Sharp, 1989, CABIOS 5:151-153]에 기재된 것과 유사하다. 유용한 PILEUP 매개변수는 3.00의 디폴트 갭 가중치, 0.10의 디폴트 갭 길이 가중치, 및 가중 단부 갭을 포함한다.
- [0051] 유용한 알고리즘의 다른 예는 문헌 [Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410]; 문헌 [Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402]; 및 문헌 [Karin et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5787]에 기재된 BLAST 알고리즘이다. 특히 유용한 BLAST 프로그램은 문헌 [Altschul et al., 1996, Methods in Enzymology 266:460-480]으로부터 얻어진 WU-BLAST-2 프로그램이다. WU-BLAST-2는 대부분이 디폴트 값으로 설정된 몇몇 검색 매개변수를 사용한다. 조정가능한 매개변수는 하기 값으로 설정된다: 중첩 범위=1, 중첩 분율=0.125, 단어 임계치 (word threshold) (T)=11. HSP S 및 HSP S2 매개변수는 동적 값이며, 특정 서열의 조성 및 관심대상 서열이 검색된 특정 데이터베이스의 구성에 따라 프로그램 자체에 의해 수립되지만; 민감도를 증가시키기 위해 상기 값을 조정할 수 있다.
- [0052] 추가의 유용한 알고리즘은 문헌 [Altschul et al., 1993, Nucl. Acids Res. 25:3389-3402]에 의해 보고된 바와 같은 갭핑된(gapped) BLAST이다. 갭핑된 BLAST는 BLOSUM-62 치환 스코어; 9로 설정된 임계치 T 매개변수; 갭핑되지 않은 확장을 촉발하기 위한 2-히트 방법 (two-hit method), k의 하전 갭 길이(charge gap length), 10+k의 코스트(cost); 16으로 설정된 Xu, 및 데이터베이스 검색 단계의 경우 40으로 설정되고 알고리즘의 출력 단계의 경우 67로 설정된 Xg를 사용한다. 갭핑된 정렬은 약 22 비트에 상응하는 스코어에 의해 촉발된다.

- [0053] 대체적으로, 개별 변이체 CDR들 사이의 아미노산 상동성, 유사성 또는 동일성은 본 명세서에 기술된 서열에 대해 적어도 60%이며, 더 전형적으로는 적어도 65% 또는 70%, 더 바람직하게는 적어도 75% 또는 80%, 심지어 더 바람직하게는 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 및 거의 100%의 증가된 상동성 또는 동일성이 바람직하다. 유사한 방식으로, 본 명세서에서 확인된 결합 단백질의 핵산 서열에 대한 "핵산 서열 동일성 퍼센트 (%)"는, 항체 자체물의 코딩 서열의 뉴클레오티드 잔기와 동일한 후보 서열의 뉴클레오티드 잔기의 백분율로서 정의된다. 특정 방법은 디폴트 매개변수로 설정된 WU-BLAST-2의 BLASTN 모듈을 사용하는데, 중첩 범위와 중첩 분율은 각각 1과 0.125로 설정된다.
- [0054] 대체적으로, 개별 변이체 CDR을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열과 본 명세서에 기술된 뉴클레오티드 서열 사이의 핵산 서열 상동성, 유사성 또는 동일성은 적어도 60%이며, 더 전형적으로는 적어도 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 및 거의 100%의 증가된 상동성 또는 동일성이 바람직하다. 따라서, "변이체 CDR"은 본 발명의 모 CDR에 대해 특정 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는 것이며, 모 CDR의 특이성 및/또는 활성의 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%를 포함하지만, 이에 한정되지 않는 생물학적 기능을 공유한다.
- [0055] 일부 실시 형태에서, 개시된 폴리펩티드는 하기 식을 갖는 이중특이적 단일 사슬 항체이다:
- [0056] $V_LN - V_HN \text{ -- } V_LT - V_HT,$
- [0057] $V_HN - V_LN \text{ -- } V_HT - V_LT,$
- [0058] $V_LN - V_HN \text{ -- } V_HT - V_LT,$ 또는
- [0059] $V_HN - V_LN \text{ -- } V_LT - V_HT,$
- [0060] 여기서 " V_HN "은 NKG2D에 대해 특이적인 중쇄 가변 도메인이고;
- [0061] 여기서 " V_LN "은 NKG2D에 대해 특이적인 경쇄 가변 도메인이고;
- [0062] 여기서 " V_HT "는 종양 세포 항원에 대해 특이적인 중쇄 가변 도메인이고;
- [0063] 여기서 " V_LT "는 종양 세포 항원에 대해 특이적인 경쇄 가변 도메인이며;
- [0064] 여기서 "-"는 펩티드 링커 또는 펩티드 결합으로 이루어지고;
- [0065] 여기서 "--"는 펩티드 링커 또는 펩티드 결합으로 이루어진다.
- [0066] 상기 식은 방향을 명시하지 않고 있음에 유의해야 하며, 따라서 어느 일 단부가 아미노 말단 또는 카르복시 말단일 수 있다는 것을 염두에 두어야 한다.
- [0067] 일부 실시 형태에서, 종양 세포 항원은 CS-1 또는 EGFRvIII이다.
- [0068] 일부 실시 형태에서, V_HN 은 아미노산 서열의 서열 번호 5를 포함하고, V_LN 은 아미노산 서열의 서열 번호 6을 포함한다. 일부 실시 형태에서, V_HT 는 아미노산 서열의 서열 번호 13을 포함하고, V_LT 는 아미노산 서열의 서열 번호 14를 포함한다. 일부 실시 형태에서, V_HT 는 아미노산 서열의 서열 번호 19를 포함하고, V_LT 는 아미노산 서열의 서열 번호 20을 포함한다. 일부 실시 형태에서, "-" 링커는 아미노산 서열의 서열 번호 8을 포함한다. 일부 실시 형태에서, "--" 링커는 아미노산 서열의 서열 번호 10을 포함한다. 이들 실시 형태 중 임의의 것에서, 특정 서열이 변형되어 폴리펩티드의 결합 친화도를 향상시키거나, 생물학적 특성을 변경하거나, 또는 기능 획득 돌연변이를 도입할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시 형태에서, 상기 서열은, 결합 친화도를 유지하거나 개선시키는, 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환, 예를 들어 보존적 치환을 함유할 수 있다.
- [0069] 일부 실시 형태에서, 폴리펩티드는 아미노산 서열의 서열 번호 21을 포함한다.
- [0070] 이중특이적 항체는 항체 가변 도메인만을 사용하여 작제될 수 있다. 상당히 효율적이면서 비교적 간단한 방법은 V_H 도메인과 V_L 도메인 사이의 링커 서열이 짧아서, 이들이 서로 접하지 않고 결합할 수 없도록 하는 것이다. 3 내지 12개의 잔기로 링커 길이를 감소시키면, scFv 분자의 단량체 구성이 방지되고, 분자간 V_H - V_L 쌍 형성이

촉진되어, 60 kDa의 비공유 결합 scFv 이량체인 "다이아바디"가 형성된다. 다이아바디 형태는 또한, 하나의 항체의 V_H 도메인이 짧은 링커에 의해 다른 항체의 V_L 도메인에 연결된 것으로 이루어진 두 개의 단일 사슬 융합 생성물의 비공유 결합에 의해 얻어지는 재조합 이종특이적 항체의 생성을 위해 사용될 수 있다. 링커 길이를 3 개 미만의 잔기로 추가로 감소시키면, 삼량체 ("트라이아바디", 약 90 kDa) 또는 사량체 ("테트라바디", 약 120 kDa)의 형성이 야기될 수 있다. 조작된 항체, 특히 단일 도메인 단편의 검토를 위해, 문헌 [Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotechnology, 23:1126-1136]을 참조한다. 이러한 조작된 항체 모두는 본 명세서에 제공되는 융합 폴리펩티드에 사용될 수 있다.

- [0071] Tandab® 분자를 제조하는 방법의 교시를 위해 참고로 포함된 국제 특허 공개 WO 1999057150 A3호 또는 미국 특허 출원 공개 제20060233787호에 기재된 바와 같이, 4가 Tandab®가 실질적으로 제조될 수 있다.
- [0072] 조작된 항체의 항원 인식 부위 또는 전체 가변 영역은 임의의 관심대상 항원 (예를 들어, CS-1)에 대한 하나 이상의 모 항체로부터 유래될 수 있다. 모 항체는 자연 발생 항체 또는 항체 단편, 자연 발생 항체로부터 조정된 항체 또는 항체 단편, 관심대상 항원에 특이적인 것으로 알려진 항체 또는 항체 단편의 서열을 사용하여 새롭게 작제된 항체를 포함할 수 있다. 모 항체로부터 유래될 수 있는 서열은 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역 및/또는 CDR, 프레임워크 영역 또는 그의 다른 부분을 포함한다.
- [0073] 일부 실시 형태에서, 이종특이적 항체는 인간에 투여되는 경우 면역원성이 감소되도록 하는 변경에 적용될 수 있다. 이러한 변경은 키메라화, 인간화, CDR-이식, 탈면역화 및/또는 프레임워크 영역 아미노산을 가장 근사한 인간 생식세포계열 서열에 상응하도록 하는 돌연변이 (생식세포계열화 (germlining))로서 통상 알려진 기법 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 따라서, 변경된 이종특이적 항체는, 임의의 이러한 변경(들)을 거치지 않은 상응하는 이종특이적 항체보다 면역 반응 관련 부작용이 감소되거나 이러한 부작용이 없이 더 장기간 동안 투여가능한 채로 남아 있을 것이다. 당업자는, 항체가 원치 않는 숙주 면역 반응을 유도하는 것을 방지하기 위해, 항체가 변경되어야만 하는지 여부 및 그 정도를 결정하는 방법을 이해할 것이다.
- [0074] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "살해 세포"는 세포독성 T 세포, 감마-델타 T 세포, 자연 살해 (NK) 세포, 및 자연 살해 T (NKT) 세포일 수 있다.
- [0075] 대체적으로 링커는 단백질들과 결합하거나 이들 사이에서 어느 정도의 최소 거리 또는 다른 공간적 관계를 유지하는 것 이외에 특정한 생물학적 활성을 갖지 않는다. 그러나, 링커의 구성 아미노산은 분자의 접힘, 순 전하 또는 소수성과 같은 분자의 일부 특성에 영향을 주도록 선택될 수 있다. scFv 항체의 생성에 적합한 펩티드 링커 (-)는, 이들 링커의 교시 및 다양한 링커를 사용하여 상이한 표적에 대한 scFv 항체를 생성하는 방법의 교시를 위해 명세서에 참고로 포함된 문헌 [Kumada Y, et al. Biochemical Engineering Journal. 2007 35(2):158-165]; 문헌 [Albrecht H, et al. J Immunol Methods. 2006 310(1-2):100-16]; 문헌 [Feng J, et al. J Immunol Methods. 2003 282(1-2):33-43]; 문헌 [Griffiths AD, et al. Curr Opin Biotechnol. 1998 9(1):102-8]; 문헌 [Huston JS, et al. Methods Enzymol. 1991 203:46-88]; 문헌 [Bird RE, et al. Science. 1988 242(4877):423-6]; 문헌 [Takkinen K, et al. Protein Eng. 1991 4(7):837-41]; 문헌 [Smallshaw JE, et al. Protein Eng. 1999 12(7):623-30]; 문헌 [Argos P. J Mol Biol. 1990 211(4):943-58]; 및 문헌 [Whitlow M, et al. Protein Eng. 1993 6(8):989-95]에 기재되어 있다.
- [0076] scFv 분자들을 함께 결합시키는 데 사용되는 펩티드 링커의 특정 길이는 반감기, 면역원성 및 전체 작제물의 활성을 결정하는 데 중요하다. 일부 실시 형태에서, 링커 서열은 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25개 이상의 아미노산 길이이다. 일부 실시 형태에서, 링커 서열 (--)은 인간 근육 알도스 단백질 (서열 번호 10)의 단편, 또는 그의 변이체를 포함한다. 링커는 바람직하게는 V_H - V_L 사슬의 적절한 접힘 및 결합을 방해하지 않을 정도로 충분히 길지만, 추가된 면역원성을 야기할 만큼 길지는 않다.
- [0077] 본 명세서에 개시된 단백질 또는 단편은 또한 단일 scFv의 V_H 사슬과 V_L 사슬을 연결하기 위한 적어도 하나의 추가적인 링커를 포함할 수 있다. 예를 들어, 링커는 GGGGS (서열 번호 22)의 3 내지 5회 반복으로부터 크기가 달라질 수 있는 글리신-세린 링커일 수 있다. 예를 들어, 서열 번호 8은 GGGGS (서열 번호 22)의 3회 반복으로, 15개의 아미노산 길이의 링커를 산출한다. 단일 scFv의 V_H 사슬과 V_L 사슬을 연결시키는 다른 잠재적인 서열은 CHI 도메인의 처음 6개의 아미노산 및/또는 친수성 알파-튜블린 펩티드 서열을 함유하는 인공 링커를 포함한다.

- [0078] 본 명세서에 개시된 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드가 또한 개시된다. 개시된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터가 또한 개시된다. 벡터는 (외래의) 유전 물질을 세포로 전달하는 비히클로서 사용되는 핵산 분자이다. 용어 "벡터"는 플라스미드, 바이러스, 코스미드 및 인공 염색체를 포함하지만, 이에 국한되지 않는다. 대체적으로, 조작된 벡터는 복제 기점, 다중클로닝 부위 및 선택가능한 마커를 포함한다. 벡터 자체는 대체적으로, 삽입물 (전이유전자) 및 벡터의 "골격"으로서 기능하는 더 큰 서열을 포함하는, 뉴클레오티드 서열, 통상적으로는 DNA 서열이다. 최근 벡터는 전이유전자 삽입물 및 골격 이외에 프로모터, 유전 마커, 항생물질 저항성, 리포터 유전자, 표적화 서열, 단백질 정제 태그의 추가적인 특징을 포괄할 수 있다. 발현 벡터는 표적 세포에서 전이유전자의 발현을 위한 것이며, 대체적으로 제어 서열을 갖는다. 용어 "제어 서열"은 특정 숙주 유기체에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필요한 DNA 서열을 지칭한다. 원핵생물에 적합한 제어 서열은, 예를 들어, 프로모터, 선택적으로 작동자 서열, 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵 세포는 프로모터, 폴리아데닐화 신호 및 인핸서를 이용하는 것으로 알려져 있다.
- [0079] 또한, 개시된 폴리뉴클레오티드 또는 벡터로 형질전환되거나 형질감염된 숙주 세포가 개시된다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "숙주 세포" 또는 "수용 세포"는 벡터, 외인성 핵산 분자 및 개시된 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드의 수용자; 및/또는 폴리펩티드 자체의 수용자일 수 있거나 또는 그러한 수용자였던 임의의 개별 세포 또는 세포 배양물을 포함하려는 것이다. 각각의 물질의 세포 내로의 도입은 형질전환, 형질감염 등의 방식으로 수행된다. 용어 "숙주 세포"는 또한 단일 세포의 자손 또는 잠재적인 자손을 포함하려는 것이다. 자연적, 우발적 또는 의도적인 돌연변이로 인해 또는 환경적 영향으로 인해, 다음 세대에서 특정 변형이 일어날 수 있으므로, 이러한 자손은 실제로 (형태학 또는 계통 또는 전체 DNA 보체에서) 모세포와 완전히 동일하지 않을 수 있으나, 이는 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어의 범주 내에 여전히 포함된다. 적합한 숙주 세포는 원핵 또는 진핵 세포를 포함하며, 또한, 박테리아, 효모 세포, 곰팡이 세포, 식물 세포 및 동물 세포, 예를 들어 곤충 세포 및 포유류 세포, 예를 들어 쥐와 동물, 랫트, 마카크 또는 인간을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0080] 개시된 폴리펩티드는 박테리아에서 생성될 수 있다. 원핵생물에 더하여, 사상 균류 또는 효모와 같은 진핵 미생물은 개시된 폴리펩티드에 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 사카로마이세스 세레비시아 (*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 통상의 빵 효모는 하등 진핵 숙주 미생물 중 가장 통상적으로 사용되는 것이다. 그러나, 쉬조사카로마이세스 폼비 (*Schizosaccharomyces pombe*), 클루베로마이세스 (*Kluyveromyces*) 숙주, 예를 들어, *K. 락티스* (*K. lactis*), *K. 프라길리스* (*K. fragilis*) (ATCC 12424), *K. 불가리쿠스* (*K. bulgaricus*) (ATCC 16045), *K. 위케라미* (*K. wickerhamii*) (ATCC 24178), *K. 왈티* (*K. waltii*) (ATCC 56500), *K. 드로소필라룸* (*K. drosophilorum*) (ATCC 36906), *K. 테르모톨레란스* (*K. thermotolerans*), 및 *K. 마룩시아누스* (*K. marxianus*); 야로위아 (*yarrowia*) (EP 402 226); 피키아 파스토리스 (*Pichia pastoris*) (EP 183 070); 칸디다 (*Candida*); 트리코데르마 레시아 (*Trichoderma reesia*) (EP 244 234); 뉴로스포라 크라사 (*Neurospora crassa*); 쉬완니오마이세스 (*Schwanniomyces*), 예를 들어 쉬완니오마이세스 오시덴탈리스 (*Schwanniomyces occidentalis*); 및 사상 균류, 예를 들어 뉴로스포라 (*Neurospora*), 페니실리움 (*Penicillium*), 톨리포클라디움 (*Tolypocladium*), 및 아스퍼길루스 (*Aspergillus*) 숙주, 예를 들어 *A. 니둘란스* (*A. nidulans*) 및 *A. 니제르* (*A. niger*)와 같은 다수의 다른 속, 종, 및 균주가 본 명세서에 통상 이용가능하며 유용하다.
- [0081] 글리코실화 폴리펩티드의 발현에 적합한 숙주 세포는 다세포 유기체로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 다수의 바쿠로바이러스 균주 및 변이체 및 스포돗테라 프루기페다 (*Spodoptera frugiperda*) (애벌레), 아에테스 아에집티 (*Aedes aegypti*) (모기), 아에테스 알보픽투스 (*Aedes albopictus*) (모기), 드로소필라 멜라노가스테르 (*Drosophila melanogaster*) (과실 파리), 및 bombyx 모리 (*Bombyx mori*)와 같은 숙주로부터의 상응하는 허용 곤충 숙주 세포가 확인되었다. 형질감염을 위한 다양한 바이러스 균주, 예를 들어 아우토그라파 칼리포니카 (*Autographa californica*) NPV의 L-1 변이체 및 bombyx 모리 (*Bombyx mori*) NPV의 Bm-5 균주가 공개적으로 이용가능하다. 목화, 옥수수, 감자, 대두, 피튜니아, 토마토, 아라비디opsis (*Arabidopsis*) 및 담배의 식물 세포 배양물이 또한 숙주로서 사용될 수 있다. 식물 세포 배양에서 단백질의 생성에 유용한 클로닝 및 발현 벡터는 당업자에게 공지되어 있다.
- [0082] 적합한 숙주 세포는 또한 척추동물 세포를 포함하고, 배양 (조직 배양)에서의 척추동물 세포의 증식은 일상적인 절차가 되었다. 유용한 포유류 숙주 세포주의 예는, SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주 (현탁 배양에서의 성장을 위해 서브클로닝된 293 또는 293 세포, 문헌 [Graham et al., J. Gen Virol. 36 : 59 (1977)]); 새끼 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 중국 햄스터 난소 세포/-DHFR (CHO, 문헌 [Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)]); 마우스 세르톨

리 세포 (mouse Sertoli cell) (TM4, 문헌 [Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)]); 원숭이 신장 세포 (CVI ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL1587); 인간 자궁 경부암 세포 (HELA, ATCC CCL 2); 갯과 동물 신장 세포 (MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 래트 간 세포 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포 (W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포 (Hep G2, 1413 8065); 마우스 유방 종양 (MMT 060562, ATCC CCL5 1); TRI 세포 (문헌 [Mather et al., Annals N. Y Acad. Sci. (1982) 383: 44-68]); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간암 세포주 (Hep G2)이다.

[0083] 또한, 본 명세서에 개시된 폴리펩티드의 생성 방법으로서, 개시된 폴리펩티드의 발현을 허용하는 조건 하에서 본 명세서에 개시된 숙주 세포를 배양하는 단계 및 배양물로부터 폴리펩티드를 회수하는 단계를 포함하는 방법이 개시된다.

[0084] 재조합 기법을 사용하는 경우, 개시된 폴리펩티드는, 주변세포질 공간에서, 세포내에서 생성될 수 있거나, 또는 배지 내로 직접 분비될 수 있다. 폴리펩티드가 세포내에서 생성되는 경우, 제1 단계로서, 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해, 숙주 세포 또는 용해된 단편의 미립자 파편이 제거된다. 폴리펩티드는 또한 *E. coli*의 주변세포질 공간으로 분비될 수 있다. 요약하면, 세포 페이스트를 약 30분에 걸쳐 아세트산나트륨 (pH 3.5), EDTA 및 페닐메틸설포닐플루오라이드 (PMSF)의 존재 하에서 해동시킨다. 세포 파편은 원심분리에 의해 제거될 수 있다. 폴리펩티드가 배지로 분비되는 경우, 대체적으로 먼저, 이러한 발현 시스템으로부터의 상청액이 구매가능한 단백질 농축 필터, 예를 들어, Amicon 또는 Millipore Pellicon 한외여과 유닛을 사용하여 농축된다. 단백질분해를 저해하기 위해 PMSF와 같은 프로테아제 억제제가 전술한 단계들 중 임의의 단계에 포함될 수 있으며, 우발적인 오염물의 성장을 방지하기 위해 항생제가 포함될 수 있다.

[0085] 숙주 세포로부터 제조된 개시된 폴리펩티드는, 예를 들어 하이드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 및 친화성 크로마토그래피를 사용하여, 회수 또는 정제될 수 있다. 회수될 폴리펩티드에 따라, 단백질 정제를 위한 기타 기법, 예를 들어 이온 교환 컬럼, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상 크로마토그래피, 헤파린 SEPHAROSE™에서의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지 (예를 들어, 폴리아스파르트산 컬럼)에서의 크로마토그래피, 크로마토-포커싱 (chromato-focusing), SDS-PAGE 및 황산암모늄 침전에서의 분별법이 또한 사용될 수 있다. 개시된 폴리펩티드가 CH3 도메인을 포함하는 경우, 베이커 본드 ABX 수지 (Bakerbond ABX resin) (미국 뉴저지주 필립스버그 소재의 J.T. Baker)가 정제에 유용하다.

[0086] 친화성 크로마토그래피가 사용될 수 있다. 친화성 리간드가 부착된 매트릭스가 가장 흔한 아가로스이지만, 다른 매트릭스가 이용가능하다. 제어된 다공성 유리 또는 폴리(스티렌다이비닐) 벤젠과 같은 기계적으로 안정한 매트릭스는, 아가로스에 의해 탈성될 수 있는 것보다 빠른 유속 및 짧은 처리 시간을 가능하게 한다.

[0087] 약제학적으로 허용가능한 담체 중에 본 명세서에 개시된 폴리펩티드를 포함하는 약제학적 조성물이 또한 개시된다. "약제학적으로 허용가능한"은 생물학적으로 또는 다르게는 바람직하지 않은 물질을 의미하는 것으로, 즉, 그가 함유된 약제학적 조성물의 임의의 다른 성분과 유해한 방식으로 상호작용하거나 임의의 바람직하지 않은 생물학적 효과를 야기함이 없이, 상기 물질은 핵산 또는 벡터와 함께 대상체에 투여될 수 있다. 당연히 담체는, 당업자에게 잘 알려져 있는 바와 같이, 활성 성분의 어떠한 분해도 최소화하고 대상체에 어떠한 부작용도 최소화하기 위해, 선택될 것이다.

[0088] 본 명세서에 기재된 화합물은 비경구 투여용으로 제형화될 수 있다. 비경구 제형은 당업계에 공지된 기법을 사용하여 수성 조성물로서 제조될 수 있다. 전형적으로, 이러한 조성물은 주사가능 제형, 예를 들어, 용액 또는 현탁액; 주사 전 재구성 매질의 첨가 시에 용액 또는 현탁액을 제조하는데 사용하기에 적합한 고체 형태; 에멀전, 예를 들어 유중수 (w/o) 에멀전, 수중유 (o/w) 에멀전 및 이들의 마이크로에멀전, 리포솜 또는 에멀솜 (emulsome)으로서 제조될 수 있다.

[0089] 담체는, 예를 들어 물, 에탄올, 하나 이상의 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜), 오일, 예를 들어 식물성 오일 (예를 들어, 땅콩 유, 옥수수 유, 참깨 유 등) 및 이들의 조합을 함유하는 용매 또는 분산매일 수 있다.

[0090] 적절한 유동성은, 예를 들어, 코팅, 예컨대 레시틴의 사용에 의해, 분산물의 경우에는 필요 입자 크기의 유지에 의해, 그리고 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 많은 경우에, 당 또는 염화나트륨과 같은 등장화제를 포함하는 것이 바람직할 것이다.

[0091] 유리 산 또는 염기 또는 그의 약리학적으로 허용가능한 염으로서의 활성 화합물의 용액 및 분산물은, 계면활성제, 분산제, 유화제, pH 조절제 및 이들의 조합을 포함하지만, 이에 한정되지 않는, 하나 이상의 약제학적으로

허용가능한 부형제와 적절히 혼합된 물 또는 다른 용매 또는 분산매 중에서 제조될 수 있다.

- [0092] 적합한 계면활성제는 음이온성, 양이온성, 양쪽성 또는 비이온성 계면활성제일 수 있다. 적합한 음이온성 계면활성제는 카르복실레이트, 설포네이트 및 설페이트 이온을 함유하는 것들을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 음이온성 계면활성제의 예는 장쇄 알킬 설포네이트 및 알킬 아릴 설포네이트의 나트륨, 칼륨, 암모늄, 예를 들어 소듐 도데실벤젠 설포네이트; 다이알킬 소듐 설포석시네이트, 예를 들어 소듐 도데실벤젠 설포네이트; 다이알킬 소듐 설포석시네이트, 예를 들어 소듐 비스-(2-에틸티옥실)-설포석시네이트; 및 알킬 설페이트, 예를 들어 소듐 라우릴 설페이트를 포함한다. 양이온성 계면활성제는 4차 암모늄 화합물, 예를 들어 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드, 브롬화세트리모늄, 스테아릴 다이메틸벤질 암모늄 클로라이드, 폴리옥시에틸렌 및 코코넛 아민을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 비이온성 계면활성제의 예는 에틸렌 글리콜 모노스테아레이트, 프로필렌 글리콜 미리스테이트, 글리세릴 모노스테아레이트, 글리세릴 스테아레이트, 폴리글리세릴-4-올레이트, 소르비탄 아크릴레이트, 수크로스 아크릴레이트, PEG-150 라우레이트, PEG-400 모노라우레이트, 폴리옥시에틸렌 모노라우레이트, 폴리소르베이트, 폴리옥시에틸렌 옥틸페닐에테르, PEG-1000 세틸 에테르, 폴리옥시에틸렌 트라이데실 에테르, 폴리프로필렌 글리콜 부틸 에테르, Poloxamer® 401, 스테아로일 모노아이스프로판올아미드 및 폴리옥시에틸렌 수소화 탈로우(tallow) 아미드를 포함한다. 양쪽성 계면활성제의 예는 소듐 N-도데실-β-알라닌, 소듐 N-라우릴-β-이미노다이프로피오네이트, 미리스토암포아세테이트, 라우릴 베타인 및 라우릴 설포베타인을 포함한다.
- [0093] 제형은 미생물의 성장을 방지하기 위한 보존제를 함유할 수 있다. 적합한 보존제는 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산 및 티메로살을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 제형은 또한 활성제(들)의 분해를 방지하기 위한 항산화제를 함유할 수 있다.
- [0094] 제형은 전형적으로 재구성 시에 비경구 투여를 위해 pH 3 내지 8로 완충된다. 적합한 완충제는 인산염 완충제, 아세테이트 완충제 및 시트레이트 완충제를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0095] 수용성 중합체는 종종 비경구 투여용 제형에 사용된다. 적합한 수용성 중합체는 폴리비닐피롤리돈, 텍스트란, 카르복시메틸셀룰로스 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0096] 멸균 주사가 가능 용액은 필요한 양의 활성 화합물을 적합한 용매 또는 분산매 중에서 상기 열거된 부형제들 중 하나 이상과 함께 혼합시킨 후, 필요에 따라, 여과 멸균함으로써 제조될 수 있다. 대체적으로, 분산물은 다양한 멸균된 활성 성분들, 기본 분산매 및 상기 열거된 것 이외의 다른 필요한 성분을 함유하는 멸균 비히클 내로 혼합입시킴으로써 제조한다. 멸균 주사가 가능 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 그의 사전에 멸균 여과된 용액으로부터 입자의 추가의 원하는 성분을 더한 활성 성분의 분말을 산출하는 진공 건조 및 동결 건조 기법이다. 분말은 입자가 본질적으로 다공성인 방식으로 제조할 수 있으며, 이는 입자의 용해를 증가시킬 수 있다. 다공성 입자의 제조 방법은 당업계에 잘 알려져 있다.
- [0097] 펩티드는 유도체의 경구 전달이 효과적하도록 화학적으로 변형될 수 있다. 대체적으로, 고려되는 화학적 변형은 성분 분자 자체에 적어도 하나의 모이어티를 부착하는 것으로, 상기 모이어티는 (a) 단백질 분해의 저해; 및 (b) 위 또는 장으로부터 혈류로의 흡수를 가능하게 한다. 또한, 성분 또는 성분들의 전체 안정성이 증가하고 체내 순환 시간이 증가하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 폐길화는 약제학적 용도로 바람직한 화학적 변형이다. 사용될 수 있는 다른 모이어티는 프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸 셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리프롤린, 폴리-1,3-다이옥솔란 및 폴리-1,3,6-티옥소칸을 포함한다.
- [0098] 경구 제형의 경우, 방출 위치는 위, 소장 (십이지장, 공장 (jejunum) 또는 회장) 또는 대장일 수 있다. 당업자는, 위에서 용해되지 않지만, 십이지장 또는 장 내의 다른 위치에서 물질을 방출하는 입수가능한 제형을 갖는다. 바람직하게는, 방출은 장에서와 같이 위 환경 이외에서의 펩티드 (또는, 유도체)의 보호에 의해 또는 펩티드 (또는, 유도체)의 방출에 의해 위 환경의 유해한 영향을 회피할 것이다.
- [0099] 완전한 위 저항성을 보장하기 위해, 코팅이 적어도 pH 5.0에서 불투과성일 수 있다. 장용 코팅제로서 사용되는 더 통상적인 불활성 성분의 예는 셀룰로스 아세테이트 트라이멜리테이트 (CAT), 하이드록시프로필메틸셀룰로스 프탈레이트 (HPMCP), HPMCP 50, HPMCP 55, 폴리비닐 아세테이트 프탈레이트 (PVAP), 유드라지트 L30D (Eudragit L30D), 아쿠아테리릭 (Aquateric), 셀룰로스 아세테이트 프탈레이트 (CAP), 유드라지트 L, 유드라지트 S 및 셸락 (Shellac)이다. 이러한 코팅은 혼합 필름으로서 사용할 수 있다.
- [0100] 코팅 또는 코팅들의 혼합물은 또한, 위에 대해 보호하도록 의도되지 않은 정제에 사용될 수 있다. 이는 당 코

팅, 또는 정제를 삼키기 쉽게 하는 코팅을 포함할 수 있다. 캡슐은 건조 치료제 (즉, 분말)의 전달을 위한 경질 셸(shell) (예를 들어, 젤라틴)로 이루어질 수 있고, 액체 형태에 대해서는 연질 젤라틴 셸이 사용될 수 있다. 카세제 (cachet)의 셸 물질은 진한 전분 또는 다른 식용 종이일 수 있다. 알약, 로젠지 (lozenge), 성형된 정제 또는 습제 정제 (tablet triturate)의 경우, 습식 대량 기법 (moist massing technique)이 사용될 수 있다.

- [0101] 수성 환경으로의 펩티드의 용해를 돕기 위해, 계면활성제가 습윤제로서 첨가될 수 있다. 계면활성제는 소듐 라우릴 설페이트, 다이옥틸 소듐 설포석시네이트 및 다이옥틸 소듐 설포네이트와 같은 음이온성 표면활성제 (anionic detergent)를 포함할 수 있다. 양이온성 표면활성제가 사용될 수 있으며, 염화벤잘코늄 또는 염화벤제토륨을 포함할 수 있다. 계면활성제로서 제형에 포함될 수 있는 잠재적인 비이온성 표면활성제의 목록은 라우로마크로골 400, 폴리옥실 40 스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 수소첨가 피마자 유 10, 50 및 60, 글리세롤 모노스테아레이트, 폴리소르베이트 20, 40, 60, 65 및 80, 수크로스 지방산 에스테르, 메틸 셀룰로스 및 카르복시메틸 셀룰로스이다. 이러한 계면활성제는 단독으로 또는 상이한 비들의 혼합물로서 단백질 또는 유도체의 제형에 존재할 수 있다.
- [0102] 펩티드의 흡수를 잠재적으로 강화하는 첨가제에는, 예를 들어 지방산 올레산, 리놀레산 및 리놀렌산이 있다.
- [0103] 제어된 방출 경구 제형이 바람직할 수 있다. 펩티드는 확산 또는 침출 메커니즘에 의한 방출을 가능하게 하는 불활성 매트릭스, 예를 들어 검 (gum) 내로 혼입될 수 있다. 서서히 축퇴되는 매트릭스가 또한 상기 제형 내로 혼입될 수 있다. 일부 장용 코팅이 또한 지연 방출 효과를 갖는다. 제어된 방출의 다른 형태는 오로스 (Oros) 치료 시스템 (Alza Corp.)에 기초한 방법에 의한 것으로, 즉, 삼투압 효과로 인해 작은 단일 개구부를 통해 물이 유입되어, 약물을 밀어낼 수 있게 하는 반투막 내에 약물이 둘러싸여 있다.
- [0104] 다른 코팅이 상기 제형을 위해 사용될 수 있다. 이는 코팅 팬에 적용될 수 있는 다양한 당을 포함한다. 펩티드는 또한 필름 코팅된 정제로 제공될 수 있으며, 이 경우에 사용되는 물질은 2개의 군으로 나누어진다. 제1 군은 비장용 물질이며, 메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스, 하이드록시에틸 셀룰로스, 메틸하이드록시-에틸 셀룰로스, 하이드록시프로필 셀룰로스, 하이드록시프로필-메틸 셀룰로스, 소듐 카르복시-메틸 셀룰로스, 프로비돈 (providone) 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다. 제2 군은 통상 프탈산의 에스테르인 장용 물질로 이루어진다.
- [0105] 최적의 필름 코팅을 제공하기 위해 물질들의 혼합물이 사용될 수 있다. 필름 코팅은 팬 코팅기 또는 유동층에서 또는 압축 코팅에 의해 수행될 수 있다.
- [0106] 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서, 암을 치료하는 방법으로서, 본 명세서에 개시된 폴리펩티드를 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 방법이 또한 개시된다. 일부 경우, 폴리펩티드는 치료적 유효량으로 투여된다.
- [0107] 약제학적 조성물을 포함하는 본 명세서에 개시된 조성물은, 국소 치료가 바람직한지 또는 전신 치료가 바람직한지에 따라 그리고 치료될 부위에 따라, 많은 방식으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 개시된 조성물은 정맥내, 복강내, 근육내, 피하, 공동내 (intracavity) 또는 경피로 투여될 수 있다. 조성물은 경구, 비경구 (예를 들어, 정맥내), 근육내 주사, 복강내 주사, 경피, 체외, 안구, 질내, 직장내, 비강내, 국소 비강내 투여 또는 흡입제에 의한 투여를 포함하는 국소 등으로 투여될 수 있다.
- [0108] 조성물의 비경구 투여는, 사용되는 경우, 대체적으로 주사에 의해 특징지어진다. 주사가 가능 물질은 액체 용액 또는 현탁액, 액체 중 현탁액의 용액에 적합한 주사 전 고체 형태, 또는 에멀전으로서 통상적인 형태로 제조될 수 있다. 비경구 투여를 위한 보완된 접근법은 일정한 투여량이 유지되도록 저속 방출 또는 서방형 시스템의 사용을 수반한다.
- [0109] 본 명세서에 개시된 조성물은 암에 걸릴 위험이 있는 환자 또는 대상체에 예방적으로 투여될 수 있다. 따라서, 상기 방법은 본 명세서에 개시된 조성물의 투여 전에 암에 걸릴 위험이 있는 환자를 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0110] 필요한 조성물의 정확한 양은 대상체의 종, 연령, 중량 및 일반적인 상태, 치료되는 알레르기 장애의 중증도, 사용된 특정 핵산 또는 벡터, 그의 투여 방식 등에 따라 대상체마다 다를 것이다. 따라서, 모든 조성물에 대해 정확한 양을 지정하는 것은 불가능하다. 그러나, 적정 양은 본 명세서에서 교시된 일상적인 실험만을 사용하여, 당업자에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 조성물을 투여하기 위한 유효한 투여량 및 일정은 경험적으로 결정될 수 있으며, 이러한 결정을 내리는 것은 당업계의 기술 범위 내에 있다. 조성물의 투여를 위한 투여량 범위는 증상 장애에 미치는 원하는 효과를 생성하기에 충분히 큰 양의 범위이다. 투여량은 원하지 않는 교차 반응, 과민성 반응 등과 같은 부정적인 부작용을 야기할 만큼의 다량이 아니어야 한다. 대체적으로, 투여

량은 환자의 연령, 상태, 성별 및 질병의 정도, 투여 경로, 또는 다른 약제가 요법에 포함되는지 여부에 따라 달라질 것이며, 이는 당업자에 의해 결정될 수 있다. 투여량은 어떠한 사용금지사유가 있는 경우에는 개별의 사에 의해 조정될 수 있다. 투여량은 다양할 수 있으며, 1일 또는 수 일 동안 매일 1회 이상의 용량 투여로 투여될 수 있다. 지정된 분류의 의약품의 적정 투여량에 대한 지침은 문헌에서 찾아 볼 수 있다. 예를 들어, 항체의 적정 용량 선택에 대한 지침은 항체의 치료적 사용에 관한 문헌, 예를 들어 문헌 [Handbook of Monoclonal Antibodies, Ferrone et al., eds., Nokes Publications, Park Ridge, N.J., (1985) ch. 22 and pp. 303-357]; 문헌 [Smith et al., Antibodies in Human Diagnosis and Therapy, Haber et al., eds., Raven Press, New York (1977) pp. 365-389]에서 찾아 볼 수 있다. 단독으로 사용되는 항체의 전형적인 1일 투여량은 전술된 인자에 따라 약 1 µg/kg체중/일 내지 최대 100 mg/kg체중/일 이상의 범위일 수 있다.

[0111] 일부 실시 형태에서, 개시된 폴리펩티드는 약 0.1 ng/kg체중 내지 약 100 g/kg체중, 약 10 ng/kg체중 내지 약 50 g/kg체중, 약 100 ng/kg체중 내지 약 1 g/kg체중, 약 1 µg/kg체중 내지 약 100 mg/kg체중, 약 1 µg/kg체중 내지 약 50 mg/kg체중, 약 1 mg/kg체중 내지 약 500 mg/kg체중; 및 약 1 mg/kg체중 내지 약 50 mg/kg체중의 비경구 투여와 등가인 용량으로 투여된다. 대안적으로, 치료적 유효한 용량을 달성하기 위해 투여되는 폴리펩티드의 양은 약 0.1 ng/kg체중, 1 ng/kg체중, 10 ng/kg체중, 100 ng/kg체중, 1 µg/kg체중, 10 µg/kg체중, 100 µg/kg체중, 1 mg/kg체중, 2 mg/kg체중, 3 mg/kg체중, 4 mg/kg체중, 5 mg/kg체중, 6 mg/kg체중, 7 mg/kg체중, 8 mg/kg체중, 9 mg/kg체중, 10 mg/kg체중, 11 mg/kg체중, 12 mg/kg체중, 13 mg/kg체중, 14 mg/kg체중, 15 mg/kg체중, 16 mg/kg체중, 17 mg/kg체중, 18 mg/kg체중, 19 mg/kg체중, 20 mg/kg체중, 30 mg/kg체중, 40 mg/kg체중, 50 mg/kg체중, 60 mg/kg체중, 70 mg/kg체중, 80 mg/kg체중, 90 mg/kg체중, 100 mg/kg체중, 500 mg/kg체중 이상이다.

[0112] 용어 "대상체"는 투여 또는 치료의 표적이 되는 임의의 개체를 지칭한다. 대상체는 척추동물, 예를 들어 포유류일 수 있다. 따라서, 대상체는 인간 또는 수의과 환자일 수 있다. 용어 "환자"는 임상적, 예를 들어, 의사의 치료 하에 있는 대상체를 지칭한다.

[0113] 개시된 방법의 암은 비조절 성장, 침윤 또는 전이를 겪고 있는 대상체의 임의의 세포일 수 있다. 일부 태양에서, 암은, 현재 방사선요법이 사용되는 임의의 신생물 또는 종양일 수 있다. 대안적으로, 암은 표준 방법을 사용하여 방사선요법에 충분히 민감하지 않은 신생물 또는 종양일 수 있다. 따라서, 암은 육종, 림프종, 백혈병, 암종, 아세포종 또는 생식 세포 종양일 수 있다. 개시된 조성물이 치료에 사용될 수 있는 대표적이나 비제한적인 암의 목록은 림프종, B 세포 림프종, T 세포 림프종, 근상 식육종, 호지킨병, 골수성 백혈병, 방광암, 뇌암, 신경계 암, 두경부암, 두부 및 경부의 편평세포암종, 신장암, 폐암 (lung cancer), 예를 들어 소세포 폐암 (small cell lung cancer) 및 비소세포 폐암 (non-small cell lung cancer), 신경아세포종/교모세포종, 난소암, 췌장암, 전립선암, 피부암, 간암, 흑색종, 구강, 인후, 후두 및 폐의 편평 세포 암종, 결장암, 자궁경부암, 자궁경부암종, 유방암, 상피암, 신장암, 비뇨생식기암, 폐암 (pulmonary cancer), 식도암종, 두부 및 경부 암종, 대장암, 조혈암; 고환암; 결장 및 직장 암, 전립선암 및 췌장암을 포함한다.

[0114] 본 발명의 다수의 실시 형태가 기재되었다. 그럼에도 불구하고, 본 발명의 사상 및 범주를 벗어나지 않으면서 다양한 변형이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 다른 실시 형태들은 하기 청구범위의 범주 내에 있다.

[0115] **실시예**

[0116] **실시예 1: 항-CS-1 TriCLE의 생성 및 그의 특성**

[0117] **물질 및 방법**

[0118] **항-CS1 및 항-EGFRvIII TriCLE의 클로닝.** TriCLE를 인실리코로 설계하였으며, 유전자 단편 (인비트로젠)으로서 합성하였다. 유전자 단편을 발현 벡터 (예를 들어, pGEX6p-1 및 pET21d) 내로 클로닝하였다. 서열 번호 1 및 서열 번호 2는 각각 pET21d-TriCLE 및 pGEX6p-1-TriCLE의 뉴클레오티드 서열을 제공한다.

[0119] **단백질 생성.** 30°C에서 하룻밤 동안 100 µM IPTG를 첨가하여, 단백질의 발현을 유도하였다. 이어서, 박테리아 세포를 수집하고, Tris pH7.4 및 프로테아제 억제제를 함유하는 용해 완충제에서 초음파 처리하여 용해시켰다. TriCLE 단백질을 HisTRAP 컬럼 (GE Health Science)에서 정제하고, 다시 집고, 원심분리 필터 유닛을 사용하여 PBS/글리세린에 의해 투석하였다. TriCLE의 농도를 측정하고 실험을 위해 희석하였다.

[0120] **유동 세포계측법.** TriCLE의 결합 친화도를 유동 세포계측법을 사용하여 시험하였다. 2×10^{-5} 의 다발성 골수

중 세포주 (예를 들어, MM1.s) 또는 교모세포종 (GBM) 세포주를 사용하여 1차 염색 시약으로서 TriCLE로 염색하고, 이어서 scFv의 존재의 검출을 위해 바이오틴 표지 단백질 L을 사용하고 유동 세포계측법에 의해 PE 접합 항-바이오틴 항체에 의해 검출하였다. 인간 말초 혈액 단핵구 세포 상의 다른 표현형결정에 대해, 이들 항체를 사용하였다: CD56-APC (Beckman Coulter), CD3-APCH7 (BD Bioscience), CD14-FITC (BD Bioscience), CD69-PE (Beckman Coulter).

[0121] 세포독성 검정. TriCLE에 대한 세포독성 검정을 24시간 및 48시간 동안 수행하였다. 따라서, 유동-기반 세포 독성 검정을 사용하였다. 요약하면, NK 세포주 NKL을 다중 골수종 세포주 H929 세포와 20:1의 효과기 대 표적 비로 혼합하였다. TriCLE을 50pg/mL로부터 10ug/mL까지 지시된 용량을 증가시키면서 공동배양물에 첨가하고, 2 시간 동안 인큐베이션하였다 TriCLE과 함께 또는 그 없이 NKL을 단독으로 그리고 H929를 단독으로 대조군으로서 사용하여 TriCLE의 독성을 결정하였다. 세포를 수집하고 유동 세포계측법으로 분석하여, 각각의 조건에 대해 생존 세포와 사멸 세포의 백분율을 결정하였다.

[0122] 서열:

[0123] *pET21d- 항-CS-1-TriCLE의 DNA 서열*

ATCCGGATATAGTTTCCTCTTTCAGCAAAAAACCCCTCAAGACCCGTTTAGA
 GGCCCCAAGGGGTTATGCTAGTTATTGCTCAGCGGTGGCAGCAGCCAACCTCAGCTTC
 CTTTCGGGCTTTGTTAGCAGCCGGATCTCAGCGGCCGCGTGGTGATGATGGTGATGG
 CTCTGTACCTGCAGCTGCTGCGGACCCGCCTCAAGAACGCGCGGGCCGGCTGATAC
 CTTCAGGGAACATTTGGCCGAACCATAGCTGAAGGTGGTGTACCACATGTTCCACAC
 TTTCTGGCGGGGGCCCTGGCCAGTTCCCAGATGCCCATGATATGTGGGCTATCGCT
 TTCGGTGCAGATTCTGTTAAATTTGTCTTTCGCAGTCAGAGTCACGICTTTTGAA
 GAGGAGGTGGCATAACATTTGCAGAGAGGAAGGGGTGACTCATCGCTGGCCACGTA
 ATAGCACGCCCGCATGTCATAATCGCGGTCCGTGCCATATCGTACCATCCTTGGCC
 CGTCGACACCGTCACGGAGCCCCCTCCCCGCTGCCCCACCGCCACTACCACCGCC
 GCCAGAGTCAATCACCATGGTTTGGGACTGCTTGCTCATGGAGGTGCTAACTCCGTC
 GCGAACTGAAATTGTACATTTGGCAGACTGGTCCACGATCGTTCACCGCCAGTA
 CTGCTGTTTCGGACCCTGAGAAGGTTTCAGAAGGATATAGCTTGCACTATAACCGGTA
 CGTACCTACCGGATCACGGAACGTACCGCTGCCTGATCCTGTATCAAAGGTAAGG
 TAATAGAGTTACCTGCGCTTCGTCGAAGCGCCACGTAATAGCACTGCTGGTGATAGC
 TCGTAGGGAGGGTAAATCCCGCACCCGCTTTGAGTTCAGTTTGTAGGCGTGATTTG
 ACACAAAACAGGGACTCCGATGCCGCCGCGCCCGCTGGCCGCTCGGCAGCACGGTC
 AGTTTAGTACCGCCGCCAAAAACTGGGCCATTTAAGCTATCATCCCATGCGGCGCAA
 TAATAATCAGCTTCATCCTCGCTCTGGAGACCCGAAATAGCCAGAAAAGCCGAGGT
 ACCCGATTTACTGCCGAAAAGCGGTACTAACTCCACTTGGCAGCAAATCATCATA
 GTAATCAGCAGTTTCGGCGCTTTTCCCGCAGTTGCTGATACCAGTTCACTGCGTT
 GTTACCGATGTTGGAGCTGCTCCCACTACAGCTGATCGTGATCGACTGACCCGGGGA
 ACCCGACACCGACGCCGGCTGCGTAAGCGCTGACTGACTGCCACCTCCGCCGCTGC
 CACCGCCACCAGAGCCGCCCCACCTGAACTAACGGTAACGGTGGTGCCCTGACCC
 CAGTAATCGAAGTACGTACCATCACCCAGGCCACGATCTTTAGCGCAATAGTAAAC

[0124]

GGCGGTATCTTCGGCGCGCAGGCTATTCATTTGCAGGTACAGGGTATTTTTGCTATT
 GTCGCGGCTAATAGTGAAGCGTCCTTTTACTGAGTCGGCATAATATTTGTTAGACCC
 ATCGTAGCGGATGAACGCAACCCACTCCAGACCTTTGCCAGGGCGCTGACGCACCC
 AATGCATAACCATAAGAGCTGAAGGTAAAACCCGACGCGGCACAGCTCAGACGCAA
 AGAGCCGCCCGGCTTGACCAGACCGCCACCGGATTCAACCAGCTGCACTTGCATGA
 ATTCATATATCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTAGAGGGGAATTGTTATCC
 GCTCACAATTCCTTATAGTGAGTCGTATTAATTTGCGGGGATCGAGATCTCGATCC
 TCTACGCCGGACGCATCGTGGCCGGCATCACCGGCGCCACAGGTGCGGTTGCTGGC
 GCCTATATCGCCGACATCACCGATGGGGAAGATCGGGCTCGCCACTTCGGGCTCAT
 GAGCGCTTGTTCGGCGTGGGTATGGTGGCAGGCCCCGTGGCCGGGGGACTGTTGG
 GCGCCATCTCCTTGCAATGCACCATTCCTTGGCGGCGCGGTGCTCAACGGCCTCAACC
 TACTACTGGGCTGCTTCTAATGCAGGAGTCGCATAAGGGAGAGCGTCGAGATCCC
 GGACACCATCGAATGGCGCAAAACCTTTGCGGGTATGGCATGATAGCGCCCGGAAG
 AGAGTCAATTCAGGGTGGTGAATGTGAAACCAGTAAACGTTATACGATGTCGCAGAG
 TATGCCGGTGTCTCTTATCAGACCGTTTCCCGCGTGGTGAACCAGGCCAGCCACGTT
 TCTGCGAAAACGCGGGAAAAAGTGAAGCGGCGATGGCGGAGCTGAATTACATTCC
 CAACCGCGTGGCACAACAACCTGGCGGGCAAACAGTCGTTGCTGATTGGCGTTGCCA
 CCTCCAGTCTGGCCCTGCACGCGCCGTCGCAAAATTGTCGCGGCGATTAAATCTCGCG
 CCGATCAACTGGGTGCCAGCGTGGTGGTGTGATGGTAGAACGAAGCGGCGTCGAA
 GCCTGTAAAGCGGCGGTGCACAATCTTCTCGCGCAACGCGTCAGTGGGCTGATCATT
 AACTATCCGCTGGATGACCAGGATGCCATTGCTGTGGAAGCTGCCTGCACTAATGTT
 CCGGCGTTATTTCTTGATGTCTCTGACCAGACACCCATCAACAGTATTATTTTCTCCC
 ATGAAGACGGTACGCGACTGGGCGTGGAGCATCTGGTTCGATGGGTCACCAGCAA
 ATCGCGCTGTTAGCGGGCCATTAAGTTCTGTCTCGGCGCGTCTGCGTCTGGCTGGC
 TGGCATAAATATCTCACTCGCAATCAAATTCAGCCGATAGCGGAACGGGAAGGCGA
 CTGGAGTGCCATGTCCGGTTTTCAACAAACCATGCAAAATGCTGAATGAGGGCATCGT
 TCCCCTGCGATGCTGGTTGCCAACGATCAGATGGCGCTGGGCGCAATGCGCGCCA
 TTACCGAGTCCGGGCTGCGCGTTGGTGGGATATCTCGGTAGTGGGATACGACGAT
 ACCGAAGACAGCTCATGTTATATCCC GCCGTTAACACCATCAAACAGGATTTTCGC
 CTGCTGGGGCAAACCAGCGTGGACCGCTTGTCTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGT
 GAAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTGAAGAAAAACCACCCTGGCGC
 CCAATACGCAAAACCGCTTCCCCGCGGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCAC
 GACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTAAGTTA
 GCTCACTCATTAGGCACCGGGATCTCGACCGATGCCCTTGAGAGCCTTCAACCCAGT
 CAGCTCCTTCCGGTGGGCGCGGGGCATGACTATCGTTCGCCGCACTTATGACTGTCTT
 CTTTATCATGCAACTCGTAGGACAGGTGCCGGCAGCGCTCTGGGTCAATTTTCGGCGA
 GGACCGCTTTTCGCTGGAGCGCGACGATGATCGGCCTGTCGCTTGGGATTCGGAAT
 CTTGCACGCCCTCGCTCAAGCCTTCGTCACTGGTCCC GCCACCAAACGTTTCGGCGA
 GAAGCAGGCCATTATCGCCGGCATGGCGGGCCCCACGGGTGCGCATGATCGTGCTCC
 TGTCGTTGAGGACCCGGCTAGGCTGGCGGGGTTGCCCTACTGGTTAGCAGAATGAAT
 CACCGATACGCGAGCGAACGTGAAGCGACTGCTGCTGCAAAACGCTGCGACCTGA
 GCAACAACATGAATGGTCTTCGGTTTCCGTGTTTCGTAAAGTCTGGAAACGCGGAAG
 TCAGCGCCCTGCACCATATGTTCCGGATCTGCATCGCAGGATGCTGCTGGCTACCC
 TGTGGAACACCTACATCTGTATTAACGAAGCGCTGGCATTGACCCCTGAGTGATTTTT

[0125]

CTCTGGTCCCGCCGCATCCATAACCGCCAGTTGTTTACCCTCACAAACGTTCCAGTAAC
 CGGGCATGTTTCATCATCAGTAACCCGTATCGTGAGCATCCTCTCTCGTTTCATCGGT
 ATCATTACCCCATGAACAGAAATCCCCCTTACACGGAGGCATCAGTGACCAACA
 GGAAAAAACCGCCTTAACATGGCCCGCTTATCAGAAAGCCAGACATTAACGTTCT
 GGAGAAACTCAACGAGCTGGACGCGGATGAACAGGCAGACATCTGTGAATCGCTTC
 ACGACCACGCTGATGAGCTTTACCGCAGCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTG
 AAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGAT
 GCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTCCGGG
 CGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTATACTGGCTTAACTATGC
 GGCATCAGAGCAGATTGTAAGTGCACCATATATGCGGTGTGAAATACCGCA
 CAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTACTGA
 CTCGCTGCGCTCGGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGT
 AATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAATGTGAGCAAAA
 GGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGTGGCGTTTTTCCATAG
 GCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAA
 ACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCT
 CTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCCTTCTCCCTTCGGGAAG
 CGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCG
 CTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATC
 CGGTAACATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGC
 AGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCT
 TGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTC
 TGCTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACA
 ACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAA
 AAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAC
 GAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCAATGAGATTATCAAAAAAGGATCTTACCTAG
 ATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACT
 TGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTA
 TTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAG
 GGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCAGGCT
 CCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCC
 TGCAACTTTATCCGCCCTCCACTCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAG
 TAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCACAAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGT
 GTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCAATCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCG
 AGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGAT
 CGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCA
 TAATCTCTTACTGTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAAGTACTCA
 ACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCGGCGTCA
 ATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAA
 ACGTTCCTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGAT
 GTAACCCACTCGTGCACCCAACCTGATCTTCAGCATTTTTACTTTCACCAGCGTTTCT
 GGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACAC
 GGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGG
 TTATTGTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGG

[0126]

GGTTCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGAAATTGTAAACGTTAATATTTT
 GTTAAAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGA
 AATCGGCAAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTG
 TTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTTGACTCCAACGTCAAAAGGG
 CGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAG
 TTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAGCACTAAATCGGAACCTAAAAGGGAGCCCC
 GATTTAGAGCTTGACGGGAAAGCCGGCAACGTGGCGAGAAAAGGAAGGAAGAA
 AGCGAAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTA
 ACCACCACACCCGCCGCTTAATGCGCCGCTACAGGCGCTCCCATTCGCCA (서열
 번호 1)

[0127]

[0128] *pGEX6p1m-항-CS-1-TriCLE의 DNA 서열*

ACGTTATCGACTGCACGGTGCACCAATGCTTCTGGCGTCAGGCAGCCATCGG
AAGCTGTGGTATGGCTGTGCAGGTCGTAATCACTGCATAATTCGTGTGCTCAAG
GCGCACTCCCGTTCTGGATAATGTTTTTGGCGCCGACATCATAACGGTTCTGGCAA
ATATTTCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATT
GTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGTATTCGGATCCCCGGAATTCATGC
AAGTGCAGCTGGTTGAATCCGGTGGCGGTCTGGTCAAGCCGGGCGGCTCTTTGCGT
CTGAGCTGTGCCGCGTCGGGTTTTACCTTCAGCTCTTATGGTATGCATTGGGTGCGT
CAGGCGCCTGGCAAAGGTCTGGAGTGGGTTGCGTTTCATCCGCTACGATGGGTCTAA
CAAATATTATGCCGACTCAGTAAAAGGACGCTTCACTATTAGCCGCGACAATAGCA
AAAATACCCTGTACCTGCAAATGAATAGCCTGCGCGCCGAAGATACCGCGTTTAC
TATTGCGCTAAAAGATCGTGGCCTGGGTGATGGTACGTAATTCGATTACTGGGGTCA
GGGCACCACCGTTACCGTTAGTTTCAGGTGGGGGCGGCTCTGGTGGCGGTGGCAGC
GGCGGAGGTGGCAGTCAGTCAGCGCTTACGCAGCCGGCGTCGGTTCGGGTTCCCC
GGGTCAGTCGATCAGATCAGCTGTAGTGGGAGCAGCTCCAACATCGGTAACAAC
GCAGTGAAGTGGTATCAGCAACTGCCGGGAAAAGCGCCGAAACTGCTGATTTACT
ATGATGATTTGCTGCCAAGTGGAGTTAGTGACCGCTTTTCCGGCAGTAAATCGGGT
ACCTCGGCTTTTCTGGCTATTTCCGGTCTCCAGAGCGAGGATGAAGCTGATTATTAT
TGCGCCGATGGGATGATAGCTTAAATGGCCAGTTTTTGGCGGCGGTACTAAACT
GACCGTGCTGCCGAGCGGCCAGGCGGGCGGCGGCATCGGAGTCCCTGTTTGTGT
CAAATCACGCCTACAAACTGGAAGTCAAGACGGGTGCGGGATTTACCCTCCCTACG
AGCTATCACCAGCAGTGCTATTACGTGGCGCTTGACGAAGCGCAGGTGAAGTCTAT
TACCTTTACCTTTGATACAGGATCAGGCAGCGGTACGTTCCGTGATCCGGTAGGTA
CGTACCGGTATAGTGAAGCTATATCCTTCTGAAACCTTCTCAGGGTCCGAAACAG
CAGTACTGGGCGGTGGGAACGATCGTGGACCAGTCTGCCAAATGTACAATTTAGT
TCGCGACGGAGTTAGCACCTCCATGAGCAAGCAGTCCCAAACCATGGTGATTGACT
CTGGCGGCGGTGGTAGTGCCGTTGGGGGAGCGGGGGAGGGGGTCCGTGACGGT
GTCGACGGGCCAAGGATGGTACGATATGGCACGGACCGCGATTATGACATCGCGG
GCGTGCTATTACGTGGCCAGCGATGAGTCGACCCCTTCTCTGCAAAATGTATGC
CACCTCCTTTCAAAAAGACGTGACTCTGACTGCGAAAAGACAAATTTAAACAGAATC
TGCCACCCGAAAGCGATAGCCACATATCATGGGCATCTGGGAACTGGGCCAGGG
CCCCCGCCAGAAAGTGTGGAACATGTGGTACACCACCTTCAGCTATGGTTCGGCCA
AATGTTCCCTGAAGGTATCAGCCGGCCCGCGCTTCTTGAGGCGGGTCCGCAGCAG
CTGCAGGTACAGAGCCATCACCATCATCACCACGCGGCCGCATCGTACTGACTGA

[0129]

CGATCTGCCTCGCGGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTC
 CCGGAGACGGTCACAGCTTGCTGTAAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTC
 AGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACG
 TAGCGATAGCGGAGTGTATAATCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTAT
 TTTTATAGGTTAATGTATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTC
 GGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGT
 ATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAA
 GAGTATGAGTATCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGGCGCATTTTG
 CCTTCTGTTTTTGGTCAACCCAGAAAACGCTGGTGAAAAGTAAAAGATGCTGAAGATC
 AGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTT
 GAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCT
 ATGTGGCGCGGTAATTATCCCGTGTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCA
 TACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCATCTT
 ACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATA
 ACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACC GC
 TTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGC
 TGAATGAAGCCATAACAAACGACGAGCGTGACACCAGATGCCTGCAGCAATGGC
 AACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTTAGCTTCCCGCAAC
 AATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGC
 CCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTC
 GCGGTATCATTCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATC
 TACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGA
 TAGGTGCCTCACTGATTAAGCATGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATA
 CTTTAGATTGATTTAAAACCTTATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTT
 TTTGATAATCTCATGACCAAAAATCCCTAACGTTAGATTTTTCTGTTCCACTGAGCGTCA
 GACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAAT
 CTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACCCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATC
 AAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCA
 AATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGC
 ACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCG
 ATAAGTCTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAAGCGCAG
 CGGTCCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCT
 ACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGA
 AGGGAGAAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGGAACAGGAGAGCG
 CACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTC
 GCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAAGGGGGGGCGGAGCCTA
 TGGA AAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTACGGTTCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTT
 GCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCC
 TTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAG
 TGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCTGTGC
 GGTATTTACACCGCATAAATTCGACACCATCGAATGGTGCAAAACCTTTTCGCGG
 TATGGCATGATAGCGCCCGAAGAGAGTCAATTCAGGGTGGTGAATGTGAAACCA
 GTAACGTTATACGATGTCGACAGATATGCCGGTGTCTTATCAGACCGTTTCCCG
 CGTGGTGAACCAGGCCAGCCACGTTTCTGCGAAAACGCGGGAAAAAGTGGAAAGCG

[0130]

CGCATGGCGGAGCTGAATTACATTCCCAACCGCGTGGCACAACAACCTGGCGGGCA
AACAGTCGTTGCTGATTGGCGTTGCCACCTCCAGTCTGGCCCTGCACGCGCCGTCG
CAAATTGTCGCGGCGATTAATCTCGCGCCGATCAACTGGGTGCCAGCGTGGTGGT
GTTCGATGGTAGAACGAAGCGGCGTCGAAGCCTGTAAAGCGGCGGTGCACAATCTT
CTCGCGCAACGCGTCACTGGGCTGATCATTAACTATCCGCTGGATGACCAGGATGC
CATTGCTGTGGAAGCTGCCTGCCTAATGTTCCGGCGTTATTTCTTGATGTCTCTGA
CCAGACACCCATCAACAGTATTATTTTCTCCCATGAAGACGGTACGCGACTGGGCG
TGGAGCATCTGGTGCATTGGGTCACCAGCAAATCGCGCTGTTAGCGGGCCCATTA
AGTTCTGTCTCGGCGCGTCTGCGTCTGGCTGGCTGGCATAAATATCTCACTCGCAAT
CAAATTCAGCCGATAGCGGAACGGGAAGGCGACTGGAGTGCCATGTCCGGTTTTTC
AACAAACCATGCAAATGCTGAATGAGGGCATCGTTCCCACTGCGATGCTGGTTGCC
AACGATCAGATGGCGCTGGGCGCAATGCGCGCCATTACCGAGTCCGGGCTGCGCG
TTGGTGGGATATCTCGGTAGTGGGATACGACGATACCGAAGACAGCTCATGTTAT
ATCCCGCCGTC AACACCATCAAACAGGATTTTCGCTGCTGGGGCAAACCAGCGT
GGACCGCTTGTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGC
CCGTCCTACTGGTGA AAAAGAAAAACCACCCTGGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCT
CCCCGCGCTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGA
AAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACC
CCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATA
ACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGGATTCCTGGCCGTCGTT
TTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCAACTTAATCGCCTTGCAGC
ACATCCCCCTTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTT
CCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTTTCCTGGTTTTCCGGCACCA
GAAGCGGTGCCGAAAGCTGGCTGGAGTGCATCTTCTGAGGCCGATACTGTCTGT
CGTCCCCCTCAAACCTGGCAGATGCACGGTTACGATGCGCCATCTACCAACGTAA
CCTATCCCATTACGGTCAATCCGCCGTTTGTTCACGGAGAATCCGACGGGTTGTT
ACTCGCTCACATTAATGTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATT
ATTTTTGATGGCGTTGGAATT (서열 번호 2)

[0131]

항-NKG2D 중쇄 DNA 서열

CAAGTGCAGC TGGTTGAATC CGGTGGCGGT CTGGTCAAGC CGGGCGGCTC
TTTTGCGTCTG AGCTGTGCCG CGTCGGGTTT TACCTCAGC TCTTATGGTA
TGCATTGGGT GCGTCAGGCG CCTGGCAAAG GTCTGGAGTG GGTGCGTTC
ATCCGCTACG ATGGGTCTAA CAAATATTAT GCCGACTCAG TAAAAGGACG
CTTCACTATT AGCCGCGACA ATAGCAAAAA TACCCTGTAC CTGCAAATGA
ATAGCCTGCG CGCCGAAGAT ACCGCCGTTT ACTATTGCGC TAAAGATCGT
GGCCTGGGTG ATGGTACGTA CTTCGATTAC TGGGGTCAGG GCACCACCGT
TACCGTTAGT TCA (서열 번호 3)

[0133]

항-NKG2D 경쇄 DNA 서열

CAGTCAGCGC TTACGCAGCC GGCCTCGGTG TCGGGTCCC CGGGTCAGTC
GATCACGATC AGCTGTAGTG GGAGCAGCTC CAACATCGGT AACACGCAG
TGAACCTGGTA TCAGCAACTG CCGGAAAAG CGCCGAAACT GCTGATTTAC
TATGATGATT TGCTGCCAAG TGGAGTTAGT GACCGCTTTT CCGGCAGTAA
ATCGGGTACC TCGGCTTTTC TGGCTATTTT GGGTCTCCAG AGCGAGGATG
AAGCTGATTA TTATTGCGCC GCATGGGATG ATAGCTTAAA TGGCCCAGTT
TTTTGGCGGCG GACTAAACT GACCGTGCTG (서열 번호 4)

[0135]

항-NKG2D 중쇄 단백질 서열

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS SYGMH WVRQAPGKGLEWVA
FIRYDGSNKYYADSVKG RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAK
DRGLGDGTYFDY WQGTTVTVSS (서열 번호 5)

[0137]

항-NKG2D 경쇄 단백질 서열

QSALTQPASVSGSPGQSITISC SGSSSNIGNNAVN WYQQLPGKAPKLLIY
YDDL LPS GVSDRFSGSKSGTSAFLAISGLQSEDEADYYCAA WDDSLNGPV
FGGGTKLTVL (서열 번호 6)

[0139]

- [0140] *ScFv 링커(G4S)3 DNA 서열*
- [0141] GGTGGGGGCG GCTCTGGTGG CGGTGGCAGC GGCGGAGGTG GCAGT (서열 번호 7)
- [0142] *ScFv 링커(G4S)3 단백질 서열*
- [0143] GGGGSGGGGS GGGGS (서열 번호 8)
- [0144] *HMA의 DNA 서열*
- [0145] CCGAGCGGCC AGGCGGGCGC GGCGGCATCG GAGTCCCTGT TTGTGTCAAA
TCACGCCTAC (서열 번호 9)
- [0146] *HMA의 단백질 서열*
- [0147] PSGQAGAAASESLFVSNHAY (서열 번호 10)
- [0148] *3' → 5' CS-1 scFv 중쇄 DNA 서열*
- [0149] AGCGTTACCG TGAGTACAGG CCAGGGCTGG TATGACATGG CACGTACAGC
CATCATGACC TCGCGCGCAT GTTACTACGT CGCGTCAGAT GAATCGACGC
CTTCCTCGCT GCAAATGTAT GCAACCTCCA GCAGCAAAGA TGTTACCCTG
ACCGCAAAGG ACAAGTTTAA ACAGAATTTG CGTACGGAGA GTGACTCCCC
GCACATCATG GGAATCTGGG AGTTGGGTCA GGGGCCTCGT CAGAAGGTAT
GGAACATGTG GTATACAAC TTTTCGTACG GCTCAGCAAA ATGCAGCTTG
AAAGTGTCGG CAGGTCCGCG CGTGCTGGAG GCCGGTCCGC AGCAGCTGCA
AGTCCAGTCT (서열 번호 11)
- [0150] *3' → 5' CS-1 scFv 경쇄 DNA 서열*
- [0151] AAACCTGAGT TGAAGACCGG TGCCGGCTTC ACCTTACCGA CCAGTTATCA
TCAACAATGC TATTACGTGG CCCTGGACGA AGCACAGGTG AATTCAATTA
CGTTTACGTT TGATACCGGC TCTGGCAGCG GTACATTTTCG TGATCCCGTG
GGCACTTACC GCTATTCGGC GAGTTATATC TTGCTGAAAC CTTCCEAAGG
TCCGAAACAG CAGTACTGGG CGGTTGGCAC CATTGTAGAC CAATCAGCCA
AATGTACAAT CTCGGTTCGC GATGGTGTCA GTACGTCGAT GTCTAAGCAG
TCACAGACAA TGGTTATCGA T (서열 번호 12)
- [0152] *3' → 5' CS-1 scFv 중쇄 단백질 서열*
- [0153] SVTVSTGQGWDYDMARTAIMTSRACYVVASDESTPSSLQMYATSSSKDVTLTAK
DKFKQNLRTESDSPHIMGIWELGQGPRQKVWNMWYTTFSYGS AKCSLKV SAGPRVLE
AGPQQLQVQS (서열 번호 13)
- [0154] *3' → 5' CS-1 scFv 경쇄 단백질 서열*
- [0155] KLELKTGAGFTLPTS YHQCYVVALDEAQVNSITFTFDTGSGSGTFRDPVGTYR
YSASYILLKPSQGPQQYWA VGTIVDQSAKCTISVRDGVSTSM SKQSQT MVID (서열
번호 14)
- [0156] *히스티딘 태그 DNA 서열*
- [0157] CATCACCATC ATCACCAC (서열 번호 15)
- [0158] *히스티딘 태그 단백질 서열*
- [0159] HHHHHH (서열 번호 16)

[0160] 3' → 5' EGFRvIII scFv 중쇄 DNA 서열
 AGTAGCGTGA CTGTTCTGAC GGGACAGGGT TGGTATGAGT CTTGGGGTTC
 CTCCGGCGCG TGTTACTATG TTGCGACCGA TGAAGCGCGC TTGAGCAATA
 TGCAACTGTA CCTTACTAAC AAGAGTAATG ACCGTTCCAT CACGTTTCGG
 GGCAAAGTTA GCGACGCATA TAATACCTCA GGTGGCAGCG GGTCTATCGC
 AAGCGTCTGG GAGCTCGGTA AAGGCCCCGC ACAACGTGTG TGGAGTATGG
 CTTACAGTAG CTTTACTTTC GGATCTGCTG CATGCTCCCT GCGCCTGTCC
 GGAGGGCCAC AGGTTCTGGG TGGTGGCAGT GAACTGGTCC AGGTGGAG (서열
 번호 17)

[0161] 3' → 5' EGFRvIII scFv 경쇄 DNA 서열
 TCAAATCACG CCTACAAAAT TGAAGTGAAA ACGGGGGGCG GTAGTACGTT
 GCCGTATTCC CACCATCAGC TGTGTTATTA TACAGCATTC GACGAGCCTC
 AATTATCATC TGTTATCCTG ACCTTCGAAA CCGGATCTGG CTCTGGGACG
 TTCCGGTCTC CGGTGGGCTC CCAGCTGAAC TCAGCCGCGT ATATTCTGCG
 CAAACCAGCG AAAGGGCCGA AACAACAGTA CTGGGCCCTG AACAATCGCA
 TTGGACAGTC GGCCCGTTGC ACGATCACCG TCCGGGACGG AGTCAGTGCG
 AGCCTGAGTT CCCCCTCGCA GACCATGCAG ATTGAT (서열 번호 18)

[0162] 3' → 5' EGFRvIII scFv 중쇄 단백질 서열
 SSVTVLTGQGWYESWGSSGACYVATDEARLSNMQLYLTNKSNDRSITFRGKV
 SDAYNTSGGSGSIASVWELGKQPAQRVWSMAYSSFTFGSAACSLRLSGGPQVLGGGSE
 LVQVE (서열 번호 19)

[0163] 3' → 5' EGFRvIII scFv 경쇄 단백질 서열
 SNHAYKIEVKTGGGSTLPYSHHQLCYTAFDEPQLSSVILTFETGSGSGTFRSPVG
 SQLNSAAYILRPAKGPQYQYWALNNRIGQSARCTITVRDGVSAASLSSPSQTMQID
 (서열 번호 20)

[0168] *TriCLE*

GTGGTGATGATGGTGATGGCTCTGTACCTGCAGCTGCTGCGGACCCGCCTCA
 AGAACGCGCGGGCCGGCTGATACCTTCAGGGAACATTTGGCCGAACCATAGCTGA
 AGGTGGTGTACCACATGTTCCACACTTTCTGGCGGGGGCCCTGGCCCAGTTCCCAG
 ATGCCCATGATATGTGGGCTATCGCTTTTCGGTGCAGATTCTGTTTAAATTTGTCT
 TTCGCAGTCAGAGTCACGTCCTTTGAAGAGGAGGTGGCATAACATTTGCAGAGAGGA
 AGGGGTCGACTCATCGCTGGCCACGTAATAGCACGCCCCGCGATGTCATAATCGCGG
 TCCGTGCCATATCGTACCATCCTTGGCCCGTCGACACCGTCACGGAGCCCCCTCCC
 CCGCTGCCCCACCGCCACTACCACCGCCGCCAGAGTCAATCACCATGGTTTGGGA
 CTGCTTGCTCATGGAGGTGCTAACTCCGTCGCGAACTGAAATTGTACATTTGGCAG
 ACTGGTCCACGATCGTTCACCGCCAGTACTGCTGTTTCGGACCCTGAGAAGGT
 TTCAGAAGGATATAGCTTGCCTATACCGGTACGTACCTACCGGATCACGGAACGT
 ACCGCTGCCTGATCCTGTATCAAAGGTAAGGTAATAGAGTTCACCTGCGCTTCGT
 CAAGCGCCACGTAATAGCACTGCTGGTGATAGCTCGTAGGGAGGGTAAATCCCGC
 ACCCGTCTTGAGTTCAGTTTGTAGGCGTGATTTGACACAAACAGGGACTCCGATG
 CCGCCGCGCCCGCTGGCCGCTCGGCAGCACGGTCAGTTTAGTACCGCCGCCAAAA
 ACTGGGCCATTTAAGCTATCATCCCATGCGGCGCAATAATAATCAGCTTCATCCTC
 GCTCTGGAGACCCGAAATAGCCAGAAAAGCCGAGGTACCCGATTTACTGCCGGAA
 AAGCGGTCACAACTCCACTTGGCAGCAAAATCATCATAGTAAATCAGCAGTTTCGG
 CGCTTTTCCCGGCAGTTGCTGATACCAGTTCACTGCGTTGTTACCGATGTTGGAGCT
 GCTCCCACTACAGCTGATCGTATCGACTGACCCGGGGAACCCGACACCGACGCC
 GGCTGCGTAAGCGCTGACTGACTGCCACCTCCGCGCTGCCACCGCCACCAGAGCC
 GCCCCACCTGAACTAACGGTAACGGTGGTGCCTGACCCAGTAATCGAAGTACG
 TACCATCACCCAGGCCACGATCTTTAGCGCAATAGTAAACGGCGGTATCTTCGGCG
 CGCAGGCTATTCATTTGCAGGTACAGGGTATTTTTGCTATTGTGCGGGCTAATAGTG
 AAGCGTCTTTTACTGAGTCGGCATAATATTTGTTAGACCCATCGTAGCGGATGAA
 CGCAACCCACTCCAGACCTTTGCCAGGCGCCTGACGCACCCAATGCATACCATAAG
 AGCTGAAGGTA AAAACCCGACGCGGCACAGCTCAGACGCAAAGAGCCGCCCGGCTT
 GACCAGACCGCCACCGGATTCAACCAGCTG CACTTGCAT (서열 번호 21)

[0169] *클리신-세린 링커*

[0170] GGGGS (서열 번호 22)

[0171] scFv (G4S)₄ 링커인 20개의 아미노산 링커 인간 근육 알도스에 의해, 항-NKG2D 항체의 중쇄 및 경쇄와 항-CS1 항체의 중쇄 및 경쇄를 결합시킴으로써 TriCLE를 인실리코로 설계하였다 (문헌 [Chu et al., Leukemia 28 (2014), 917-27] 및 문헌 [Chu et al. Clin Cancer Res 20 (2014), 3989-4000]). 설계는 도 1에 도시되어 있다. 항-NKG2D scFv의 DNA 및 단백질 서열은 상기에 열거되어 있다 (서열 번호 3 내지 서열 번호 6). 항-NKG2D scFv 및 항-CS1 scFv에서 중쇄와 경쇄를 결합시키기 위해, 글리신과 세린의 반복으로 구성된 링커를 사용하였다 (서열 번호 7 및 8). HMA의 DNA 및 단백질 서열은 서열 번호 9 및 서열 번호 10으로서 열거되어 있다. 항-CS-1 scFv의 DNA 서열 (서열 번호 11 및 서열 번호 12) 및 단백질 서열 (서열 번호 13 및 서열 번호 14)은 3'에서 5' 방향으로 나타냈다. 전체 서열에 이어서 6개의 히스티딘 카피가 존재한다 (서열 번호 15 및 서열 번호 16).

[0172] 항-CS-1 TriCLE의 생화학적 분석은 그가 56.6kDa의 분자량을 갖고 7.99의 pI를 갖는 것을 보여주었다. 완전한 아미노산 조성이 표 1에 열거되어 있다. 단백질 L에 의해 검출된 바와 같이, 웨스턴 블롯 및 쿠마시 블루 염색 (Commassie Blue staining)을 사용한 표준 SDS-PAGE에 의해, TriCLE의 크기를 확인하였다 (도 2). TriCLE에 대한 흡광 계수는 물에서 102720M⁻¹cm⁻¹이다. 박테리아의 예상 반감기는 10시간 초과이다.

TriCLE의 아미노산 조성

Ala (A)	345	21.6%
Arg (R)	0	0.0%
Asn (N)	0	0.0%
Asp (D)	0	0.0%
Cys (C)	409	25.6%
Gln (Q)	0	0.0%
Glu (E)	0	0.0%
Gly (G)	484	30.3%
His (H)	0	0.0%
Ile (I)	0	0.0%
Leu (L)	0	0.0%
Lys (K)	0	0.0%
Met (M)	0	0.0%
Phe (F)	0	0.0%
Pro (P)	0	0.0%
Ser (S)	0	0.0%
Thr (T)	361	22.6%
Trp (W)	0	0.0%
Tyr (Y)	0	0.0%
Val (V)	0	0.0%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%
(B)	0	0.0%
(Z)	0	0.0%
(X)	0	0.0%

[0174]

[0175] 실시예 2: 다발성 골수종 (MM) 세포에 대한 항-CS-1 Tri-CLE 활성화 NK 세포의 세포독성

[0176] 도 3은 항-CS-1 Tri-CLE의 존재 하에 다중 골수종 (MM) 세포주 H929에 대한 NK 세포주 NKL의 세포독성의 그래프이다. Tri-CLE를 50pg/mL 내지 10ug/mL 범위에서 용량을 증가시키면서, 20:1의 효과기 비의 NKL: H929의 공동 배양에 첨가하였다.

[0177] 실시예 3: 항-CS-1 TriCLE은 다발성 골수종 세포를 효율적으로 염색할 수 있다.

[0178] 유동 세포계측법을 위한 염색 시약으로서 항-CS-1 TriCLE를 사용한 경우, 다발성 골수종 환자로부터 분리된 전형적인 세포주인 MM1.s의 80%를 염색할 수 있었다 (도 4a). 아이소타입(isotype) 대조군과 비교하는 경우, 평균 형광 강도가 유의하게 증가했다. 이는 CS1 scFv가 기능적이었음을 시사한다 (도 4b).

[0179] 실시예 4: 항-CS-1 TriCLE은 인간 살해 세포를 활성화시켰고 특이적 세포독성을 촉발하였다.

[0180] CD69의 상향조절에 의해 지시된 바와 같이, 5 µg/mL의 TriCLE은 PBMC 중의 1차 T, NKT 및 NK 세포를 4시간 후에 활성화시켰다 (도 5a). 이는 항-NKG2D scFv가 고정화되었고 세포 활성화를 촉발하는데 기능적이었음을 시사한다. 항-CD3 항체가 동시에 투여된 경우, CD69의 상향조절을 관찰하였다 (도 5b). MM1.s, H929 및 RPMI-8226과 같은 다발성 골수종 세포주의 공동배양에 TriCLE를 사용한 경우, TriCLE-활성화된 PBMC로부터의 세포독성은 증가되었다 (도 5c). MM1.s에 대한 EC₅₀은 3 × 10⁻¹² M이었다. CS1 발현이 낮은 세포주의 경우, H929 세포에 대한 EC₅₀은 1.2 × 10⁻⁹ M이었고, RPMI-8226에 대한 EC₅₀은 1.8 × 10⁻⁹ M이었다. TriCLE은 24시간 및 48시간째에 CD56 결핍 효과기 세포를 사용하여 세포독성을 유도하였다 (도 5d).

[0181] 실시예 5: 항-EGFRvIII TriCLE은 인간 살해 세포를 활성화시켰고 특이적 세포독성을 촉발하였다.

[0182] 도 1a는 항-EGFLvIII Tri-CLE의 그래픽 표시를 도시한다. EGFRvIII scFv의 중쇄 및 경쇄에 대한 DNA 및 단백질 서열은 서열 번호 17 내지 서열 번호 20으로 나타나 있다. 도 6a는 항-EGFRvIII TriCLE에 의한 T, NKT 및 NK 세포의 활성화를 도시한다. 5 µg/mL의 TriCLE를 4시간 동안 휴지기 인간 PBMC에 첨가한 후, 세포를 수집하고, CD3, CD56, CD14 및 CD69를 실온에서 20분 동안 염색하였다. 세포를 유동 세포계측법으로 분석하였다. 도 6b는 활성화된 인간 PBMC의 세포독성이 3개의 다발성 골수종 세포 GBM1123에 대한 항-EGFRvIII TriCLE에 의해 강화되었음을 도시한다. EC50은 비선형 회귀 곡선으로부터 계산되었다. 결과는 3명의 독립적인 공여자에 의한 것이었다. ***는 p<0.001이고; **는 p<0.01이다.

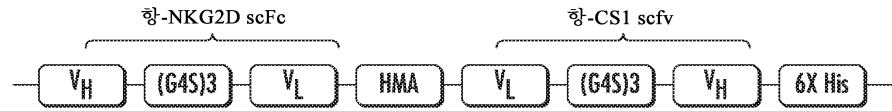
[0183] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 개시된 발명이 속하는 기술분야의 당업자에 의해 통상 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 인용된 공보 및 이들이 인용된 자료는 참고로 구체적으로 포함된다.

[0184]

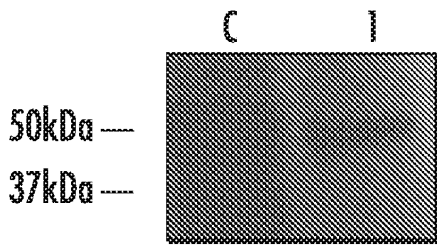
당업자는 일상적인 실험만을 사용하여, 본 명세서에 기재된 본 발명의 특정 실시 형태에 대한 다수의 균등물을 인식할 것이고, 또는 확인할 수 있을 것이다. 이러한 균등물은 하기 청구범위에 포괄되려는 것이다.

도면

도면1

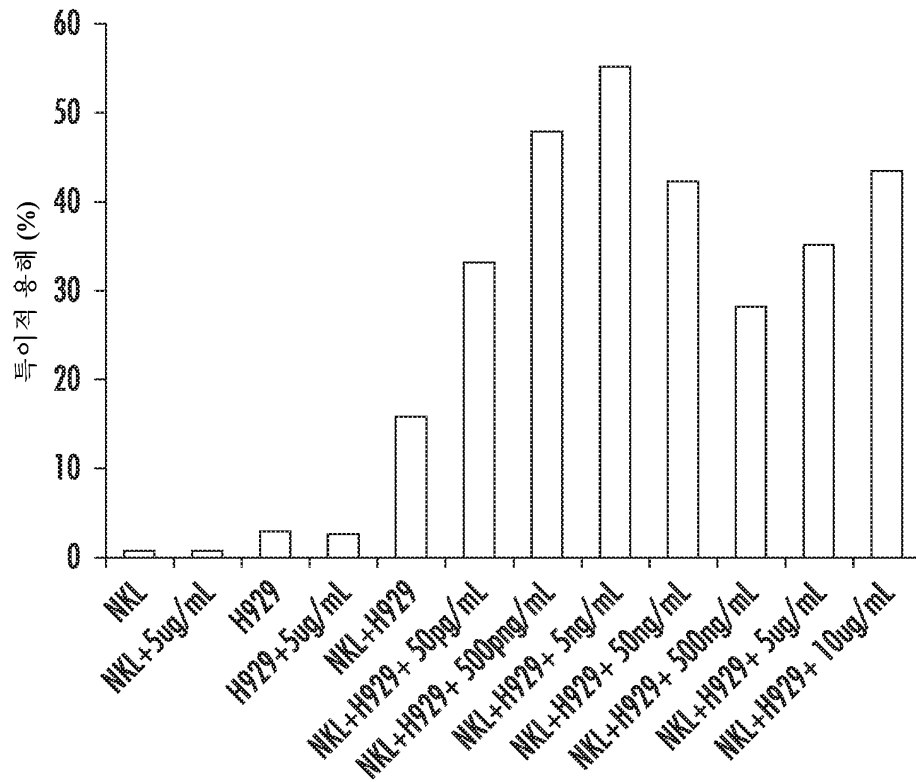


도면2

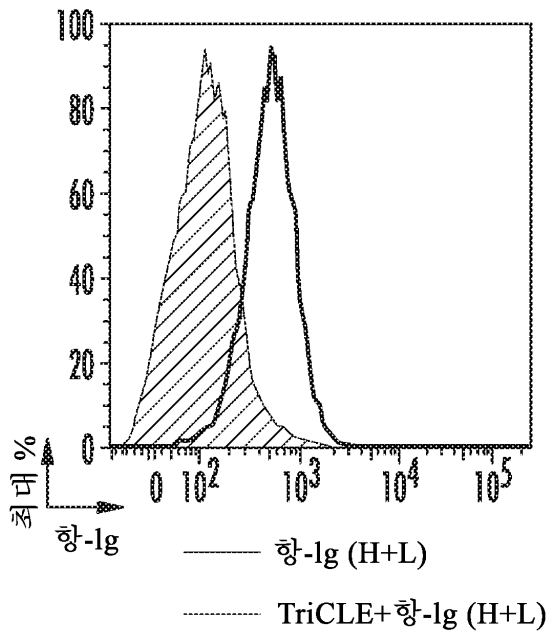


C: 미정제된 단백질 추출물
I: 정제된 항-CS1 TrICLE

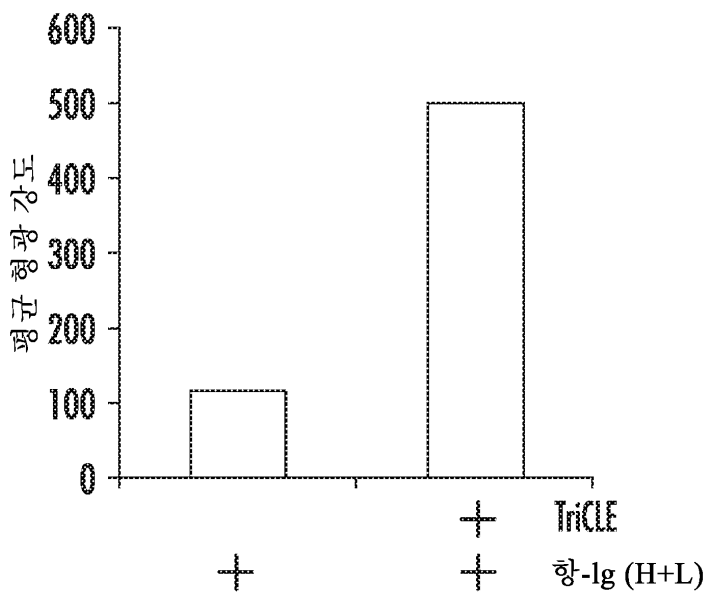
도면3



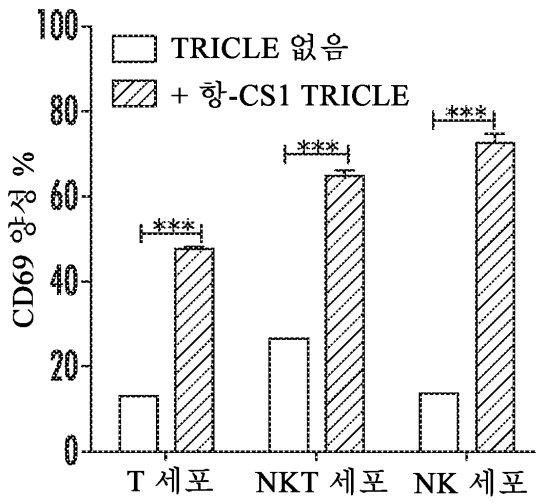
도면4a



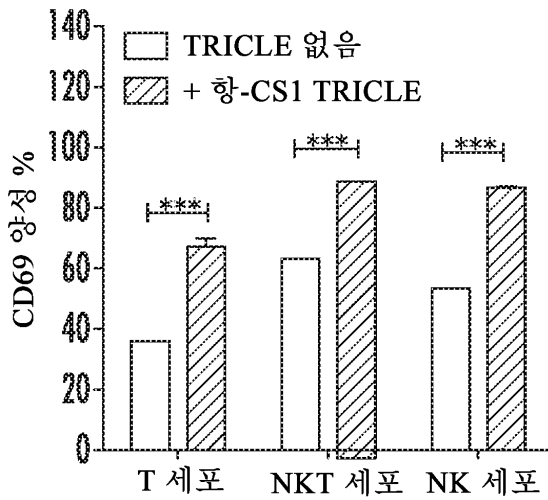
도면4b



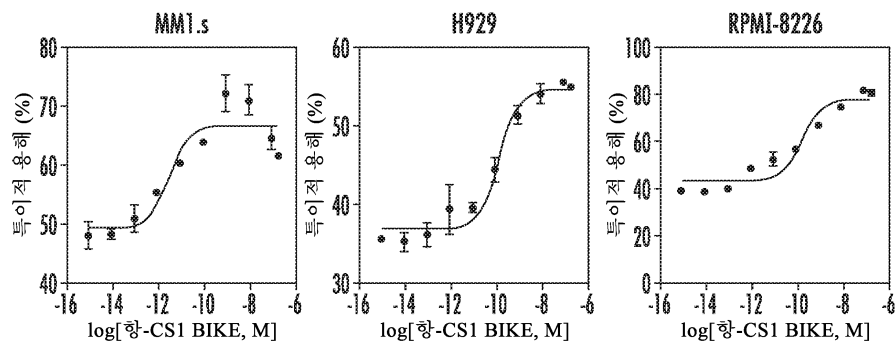
도면5a



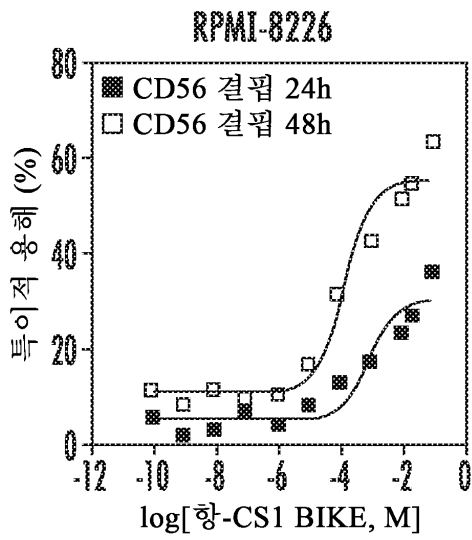
도면5b



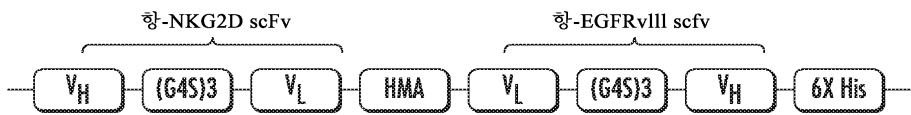
도면5c



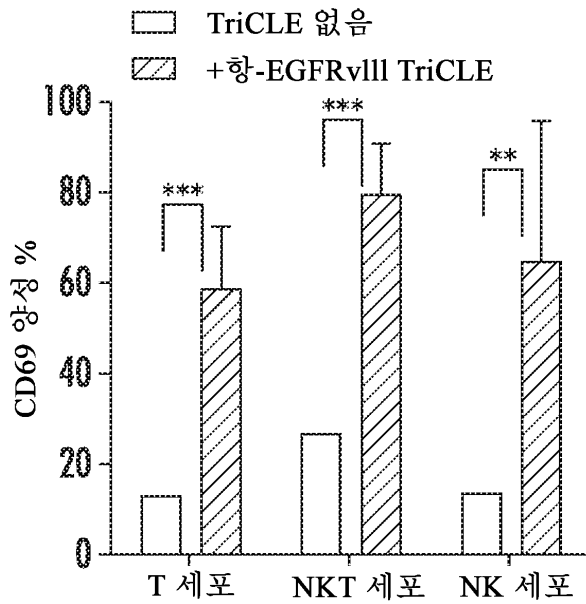
도면5d



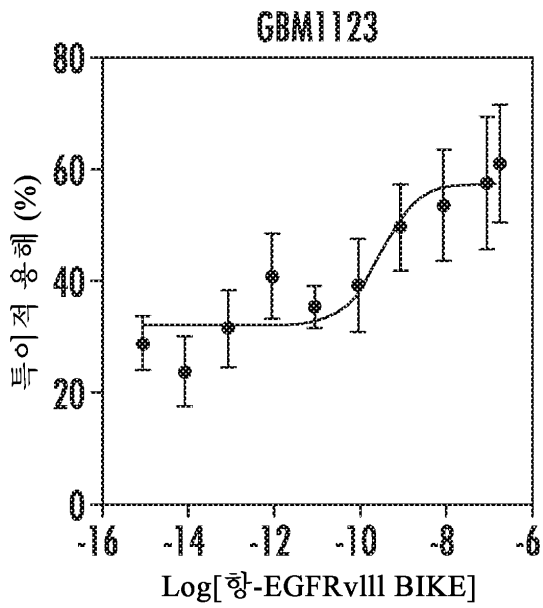
도면6a



도면6b



도면6c



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Ohio State Innovation Foundation
 - <120> BIVALENT ANTIBODY DIRECTED AGAINST NKG2D and TUMOR ASSOCIATED ANTIGENS
 - <130> 10336-214W01
 - <160> 22
 - <170> PatentIn version 3.5
 - <210> 1
 - <211> 6898
 - <212> DNA
 - <213> Artificial Sequence
 - <220><223> Synthetic Construct
 - <400> 1
- ```

atccggatat agttctctct ttcagcaaaa aaccctcaa gaccgttta gaggcccaa 60
ggggttatgc tagttattgc tcagcgggtg cagcagcaa ctacagttcc ttcgggctt 120

tgttagcagc cggatctcag cggcccggtg gtgatgatgg tgatggctct gtacctgcag 180
ctgctgcgga cccgcctcaa gaacgcgctg gccggctgat accttcaggg aacattggc 240
cgaaccatag ctgaagggtg tgtaccacat gtccacact ttctggcggg ggcctggcc 300
cagttccag atgcccata tatgtgggct atcgctttcg gtgcgcagat tctgtttaa 360

```

ttgtctttc gcagtcagag tcacgtcttt tgaagaggag gtggcataca ttgacagaga 420  
 ggaaggggtc gactcatcgc tggccacgta atagcacgcc cgcgatgtca taatcgcggt 480  
 ccgtgccata tcgtaccatc cttggccccg cgacaccgtc acggagcccc ctcccccgct 540  
  
 gccccaccg ccaactaccac cgccgccaga gtcaatcacc atggtttggg actgcttgct 600  
 catggagggtg ctaactccgt cgcgaaactga aattgtacat ttggcagact ggtccacgat 660  
 cgttcccacc gccagctact gctgtttcgg acctgagaa ggtttcagaa ggatatagct 720  
 tgcactatac cggtagctac ctaccggatc acggaacgta ccgctgcctg atcctgtatc 780  
 aaaggtaaag gtaatagagt tcacctgcgc ttcgtcaagc gccacgtaat agcactgctg 840  
 gtgatagctc gtagggaggg taaatcccgc acccgtcttg agttccagtt ttaggcgctg 900  
 atttgacaca aacagggact ccgatgccgc cgcgccgcc tggccgctcg gcagcacggt 960  
  
 cagtttagta ccgccccaa aaactgggcc atttaagcta tcatccatg cggcgcaata 1020  
 ataatcagct tcatcctcgc tctggagacc cgaaatagcc agaaaagccg aggtaccga 1080  
 ttactgccg gaaaagcggg cactaactcc acttggcagc aaatcatcat agtaaatcag 1140  
 cagtttcgge gcttttcccg gcagttgctg ataccagttc actgcgttgt taccgatgtt 1200  
 ggagctgctc ccaactacgc tgatcgtgat cgactgacc ggggaaccg acaccgacgc 1260  
 cggctgcgta agcgtgact gactgccacc tccgccctg ccaccgccac cagagccgcc 1320  
 cccacctgaa ctaacggtaa cggtggtgcc ctgaccccag taatcgaagt acgtaccatc 1380  
  
 acccaggcca cgatctttag cgcaatagta aacggcggtg tcttcggcgc gcaggctatt 1440  
 catttgcagg tacagggtat ttttctatt gtcgcggtg atagtgaagc gtccttttac 1500  
 tgagtcggca taatattgt tagacccatc gtgagcgatg aacgcaacc actccagacc 1560  
 ttgcccagc gcctgacgca cccaatgcat accataagag ctgaaggtaa aaccgacgc 1620  
 ggcacagctc agacgcaaag agcccccgg cttgaccaga ccgccaccg attcaaccag 1680  
 ctgcacttgc atgaattcta tatctcttc ttaaagttaa acaaaattat ttctagaggg 1740  
 gaattgttat ccgctcaca ttcccctata gtgagtcgta ttaatttcgc gggatcgaga 1800  
  
 tctcgatcct ctacgccga cgcatcgtg ccggcatcac cggcgcaca ggtgcggtt 1860  
 ctggcgcta tatcggcgc atcaccgatg gggaagatc ggctcgcac ttcgggctca 1920  
 tgagcgttg tttcggcgtg ggtatggtg caggccccgt ggccggggga ctgttggcg 1980  
 ccatctcctt gcatgacca ttccttgcgg cggcgggtct caacggcctc aacctactac 2040  
 tgggtgctt cctaagcag gactgcata agggagagc tcgagatccc ggacaccatc 2100  
 gaatggcgca aaaccttctg cggtatggca tgatagcgc cgggaagagag tcaattcagg 2160

gtggtgaatg tgaaacccagt aacgttatac gatgtcgag agtatgccg tgtctcttat 2220

cagaccgttt cccgcgtggt gaaccaggcc agccacgttt ctgcgaaaac gcgggaaaaa 2280

gtggaagcgg cgatggcggg gctgaattac attcccaacc gcgtggcaca acaactggcg 2340

ggcaaacagt cgttgctgat tggcgttgcc acctccagtc tggccctgca cgcgccctcg 2400

caaatgtcg cggcgattaa atctcgcgcc gatcaactgg gtgccagcgt ggtggtgtcg 2460

atggtagaac gaagcggcgt cgaagcctgt aaagcggcgg tgcacaatct tctcgcgcaa 2520

cgcgtcagtg ggctgatcat taactatccg ctggatgacc aggatgccat tgctgtggaa 2580

gctgcctgca ctaatgttcc ggcgttattt ctgatgtct ctgaccagac acctatcaac 2640

agtattattt tctccatga agacggtacg cgactgggcg tggagcatct ggtcgcattg 2700

ggtcaccagc aaatcgcgct gttagcgggc ccattaagtt ctgtctcggc gcgtctgcgt 2760

ctggctggct ggcataaata tctcactcgc aatcaaattc agccgatagc ggaacgggaa 2820

ggcgactgga gtgcatgct cggttttcaa caaacatgc aaatgctgaa tgagggcatc 2880

gttcccactg cgatgctggt tgccaacgat cagatggcgc tgggcgcaat gcgcccatt 2940

accgagtccg ggctgcgctg ttggtcggat atctcggtag tgggatacga cgataccgaa 3000

gacagctcat gttatatccc gccgtaacc acctcaaac aggattttcg cctgctgggg 3060

caaaccagcg tggaccgctt gctgcaactc tctcagggcc aggcggtgaa gggcaatcag 3120

ctggtgcccc tctcactggt gaaaagaaaa accaccctgg cgccaatac gcaaaccgcc 3180

tctccccgcg cgttggccga ttcatatag cagctggcac gacaggttc ccgactggaa 3240

agcgggcagt gagcgaacg caattaatgt aagttagctc actcattagg caccgggatc 3300

tcgaccgatg cccttgagag cttcaacc agtcagctcc ttccggtggg cgcggggcat 3360

gactatgctc gccgactta tgaactgtct ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc 3420

ggcagcgtc tgggtcattt tcggcgagga ccgctttcgc tggagcgcga cgatgatcgg 3480

cctgtcgtt gcggtattcg gaatcttga cgcctcgt caagccttcg tcaactgtcc 3540

cgccacaaa cgtttcggcg agaagcagc cattatcgcc ggcatggcgg ccccacgggt 3600

gcgatgatc gtgctcctgt cgttgaggac ccggctaggc tggcggggtt gccttactgg 3660

ttagcagaat gaatcaccga tacgcgagcg aacgtgaagc gactgctgct gcaaacgctc 3720

tgcgacctga gcaacaacat gaatggtctt cggtttcctg gtttcgtaaa gcttggaac 3780

gcggaagtca gcgccctgca ccattatgtt ccggatctgc atcgcaggat gctgctggct 3840

acctgtgga acacctacat ctgtattaac gaagcgtgg cattgacct gactgatttt 3900

tctctgggcc cgccgcatcc ataccgccag ttgtttacc tcacaacgtt ccagtaaccg 3960  
 ggcattgtca tcatcagtaa cccgtatcgt gagcatcctc tctcgtttca tcggtatcat 4020  
 tacccecatg aacagaaatc ccccttacac ggaggcatca gtgaccaaac aggaaaaaac 4080  
 cgccctaac atggcccgtt ttatcagaag ccagacatta acgcttctgg agaaactcaa 4140  
 cgagctggac gcggatgaac aggcagacat ctgtgaatcg cttcagacc acgctgatga 4200  
 gctttaccgc agctgcctcg cgcgtttcgg tgatgacggt gaaaacctct gacacatgca 4260  
 gctcccggag acggtcacag cttgtctgia agcggatgcc gggagcagac aagcccgtca 4320  
  
 gggcgcgtca gcgggtgttg gcgggtgtcg gggcgcagcc atgaccagc cacgtagcga 4380  
 tagcggagtg tatactggct taactatgcg gcatcagagc agattgtact gagagtgcac 4440  
 cataatgctg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgtt 4500  
 cttccgttc ctcgctcact gactcgtcgc gctcggctgt tcggctgcgg cgagcggtat 4560  
 cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga 4620  
 acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt 4680  
 ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgtca agtcagaggt 4740  
  
 ggcgaaacc gacaggacta taaagatac agcgtttcc ccctggaagc tcctcgtgc 4800  
 gctctcctgt tccgacctg ccgcttaccg gatacctgc cgcctttctc ctttcgggaa 4860  
 gcgtggcgtt ttctcatagc tcacgtgia ggtatctcag ttcgggtgtag gtcgttcgct 4920  
 ccaagctggg ctgtgtgac gaacccccg ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggt 4980  
 actatcgtct tgagtccaac ccgtaagac acgacttacc gccactggca gcagccactg 5040  
 gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagtcttg aagtgtggc 5100  
 ctaactacgg ctacactaga aggacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta 5160  
  
 ctttcggaaa aagagtgggt agctcttgat ccggcaaaa aaccaccgt ggtagcgggtg 5220  
 gttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaa aggatctcaa gaagatcctt 5280  
 tgatctttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttg 5340  
 tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaa tgaagtttta 5400  
 aatcaatcta aagtatatat gagtaactt ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg 5460  
 aggcacatat ctcagcgtc tgtctatttc gttcatccat agttgctga ctccccgtc 5520  
 tgtagataac tacgatacgg gagggcttac catctggccc cagtctgca atgataccgc 5580  
  
 gagaccacg ctcaccggt ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaaggccg 5640  
 agcgcagaag tggctctgca actttatecg cctccatcca gtctattaat tgttccggg 5700  
 aagctagagt aagtagttcg ccagtaata gtttgcgcaa cgttgttgcc attgctgac 5760

gcatcgtggt gtcacgctcg tcgtttggta tggcttcatt cagctccggt tcccaacgat 5820  
 caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc ggtagctcc ttcggtcctc 5880  
 cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag tgttatcact catggttatg gcagcactgc 5940  
 ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggt gactactcaa 6000  
  
 ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgccgc gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac 6060  
 gggataatac cgcgccacat agcagaactt taaaagtgt catcattgga aaacgttctt 6120  
 cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg taaccactc 6180  
 gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa 6240  
 caggaaggca aaatgccga aaaaaggga taaggcgac acggaatgt tgaatactca 6300  
 tactcttct tttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat 6360  
 acatattga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa 6420  
  
 aagtgcacc tgaattgta aacgtaata tttgtttaa attcgcgta aatttttgtt 6480  
 aaatcagctc atttttaac caataggccg aaatcgcaa aatcccttat aaatcaaaag 6540  
 aatagaccga gatagggtg agtgtgttc cagtttgaa caagagtcca ctattaaaga 6600  
 acgtggactc caacgtcaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc cactacgtg 6660  
 aaccatcacc ctaatcaagt tttttgggt cgaggtgccg taaagcacta aatcggaacc 6720  
 ctaaaggag cccccattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaaactg gcgagaaagg 6780  
 aaggaagaa agcgaagga gcggcgctc gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc 6840  
  
 gcgtaaccac cacaccgcc gcgcttaatg cgcgctaca ggcgctccc attcgcca 6898  
 <210> 2  
 <211> 5828  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Construct  
 <400> 2  
 acgttatcga ctgcacggtg caccaatgct tctggcgtca ggcagccatc ggaagctgtg 60  
 gtatggctgt gcaggtcgta aatcactgca taattcgtgt cgctcaagc gactcccgt 120  
 tctggataat gtttttgcg ccgacatcat aacggttctg gcaaatattc tgaatgagc 180  
 tgttgacaat taatcatcgg ctctgataat gtgtggaatt gtgagcggat aacaatttca 240  
 cacaggaaac agtattcga tccccggaat tcatgcaagt gcagctggtt gaatccggtg 300  
  
 gcggtctggt caagccgggc ggctctttgc gtctgagctg tgcccgctcg ggttttacct 360

tcagctctta tggatgcat tgggtgctc aggcgcctgg caaaggctctg gagggggtt 420  
 cgttcatccg ctacgatggg tctaacaat attatgccga ctcagtaaaa ggacgcttca 480  
 ctattagccg cgacaatagc aaaaataacc tgtacctgca aatgaatagc ctgcgcgccg 540  
 aagataccgc cgtttactat tgcgctaaag atcgtggcct gggatgatgt acgtacttcg 600  
 attactgggg tcagggcacc accgttaccg ttagttcagg tggggcgccg tctggtggcg 660  
 gtggcagcgg cggagggtgg agtcagtcag cgttacgca gccggcgtcg gtgtcgggtt 720  
  
 ccccggtca gtcgatcacg atcagctgta gtgggagcag ctccaacatc ggtaacaacg 780  
 cagtgaactg gtatcagcaa ctgccgggaa aagcggcga actgctgatt tactatgatg 840  
 atttgctgcc aagtggagt agtgaccgct tttccggcag taaatcgggt acctcggctt 900  
 ttctggctat ttcgggtctc cagagcgagg atgaagctga ttattattgc gccgcatggg 960  
 atgatagctt aaatggccca gtttttggcg gcggtactaa actgaccgtg ctgccgagcg 1020  
 gccagggcgg cgcgggcgca tcggagtccc tgtttgtgc aaatcacgcc tacaactgg 1080  
 aactcaagac ggggtcggga tttaccctcc ctacgagcta tcaccagcag tgctattacg 1140  
  
 tggccttga cgaagcgcag gtgaactcta ttacctttac ctttgataca ggatcagcga 1200  
 gcggtacgtt ccgtgatccg gtaggtacgt accggtatag tgcaagctat atccttctga 1260  
 aaccttctca ggggtccgaaa cagcagctact gggcgggtggg aacgatcgtg gaccagtctg 1320  
 ccaaatgtac aatttcagtt cgcgacggag ttagcacctc catgagcaag cagteccaaa 1380  
 ccatggtgat tgactctggc ggcggtggtg gtggcgggtgg ggcgagcggg ggagggggct 1440  
 ccgtgacggt gtcgacgggc caaggatggt acgatatggc acggaccgcg attatgacat 1500  
 cgcgggcgtg ctattacgtg gccagcgtat agtcgacccc ttcctctctg caaatgtatg 1560  
  
 ccacctctc ttcaaaagac gtgactctga ctgcgaaaga caaatttaa cagaatctgc 1620  
 gcaccgaaag cgatagccca catatcatgg gcatctggga actgggccag ggccccgcc 1680  
 agaaagtgtg gaacatgtgg tacaccacct tcagctatgg ttcggccaaa tgttcctga 1740  
 aggtatcagc cgccccgcg gttcttgagg cgggtccgca gcagctgcag gtacagagcc 1800  
 atcaccatca tcaccacgcg gccgcategt gactgactga cgatctgcct cgcgcttcc 1860  
 ggtgatgacg gtgaaaacct ctgacacatg cagctcccgg agacggtcac agcttgtctg 1920  
 taagcggatg ccgggagcag acaagcccgt cagggcgcgt cagcgggtgt tggcgggtgt 1980  
  
 cggggcgcag ccatgacca gtcacgtagc gatagcggag tgtataattc ttgaagacga 2040  
 aaggcctcg tgatagcct atttttatag gttaatgtca tgataataat ggtttcttag 2100  
 acgtcaggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaacce ctatttgttt atttttctaa 2160  
 atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct tcaataatat 2220

tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc cttttttgcg 2280  
 gcattttgcc ttctgtttt tgctcacca gaaacgctgg tgaaagtaa agatgctgaa 2340  
 gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt 2400  
  
 gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaagt tctgctatgt 2460  
 ggcgcggtat tatcccgtgt tgacgccggg caagagcaac tcggtcgcgg catacactat 2520  
 tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg 2580  
 acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc ggccaactta 2640  
 cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgacaa catgggggat 2700  
 catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag 2760  
 cgtgacacca cgatgcctgc agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt aactggcgaa 2820  
  
 ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga taaagttgca 2880  
 ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa atctggagcc 2940  
 ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca gactggggc cagatggtaa gccctccgt 3000  
 atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc 3060  
 gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tgtaactgt cagaccaagt ttactcatat 3120  
 atactttaga ttgatttaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt 3180  
 tttgataate teatgaccaa aateccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac 3240  
  
 cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgct aatctgctgc 3300  
 ttgcaaaaaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttggt tgccggatca agagctacca 3360  
 actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta 3420  
 gigttagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctgct 3480  
 ctgctaatec tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg 3540  
 gactcaagac galagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc 3600  
 acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatactaca gcgtgagcta 3660  
  
 tgagaaaagc ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg 3720  
 gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggtat tctttatagt 3780  
 cctgtcgggt ttcgccact ctgacttgag cgtcgatfff tgtgatgctc gtcagggggg 3840  
 cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttccctggc cttttgctgg 3900  
 ccttttgctc acatgttctt tcttgcgtta tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc 3960  
 gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag cgagtcaagt 4020

agcgaggaag cggaagagcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt 4080  
  
 tcacaccgca taaattccga caccatcgaa tggtgcaaaa ctttcgagg tatggcatga 4140  
 tagcggccgg aagagagtca attcaggggtg gtgaatgtga aaccagtaac gttatacgat 4200  
 gtgcgagagt atgccggtgt ctcttatcag accgtttccc gcgtggtgaa ccaggccagc 4260  
 cacgtttctg cgaaaacgcg ggaaaaagtg gaagcggcga tggcggagct gaattacatt 4320  
 cccaaccgcg tggcacaaca actggcgggc aaacagtcgt tgctgattgg cgttgccacc 4380  
 tccagtctgg ccctgcacgc gccgtcgaa attgtcggg cgattaaatc tcgcccgat 4440  
 caactgggtg ccagcgtggt ggtgtcgatg gtagaacgaa gcggcgtcga agcctgtaaa 4500  
  
 gcggcgggtgc acaatcttct cgcgcaacgc gtcagtgggc tgatcattaa ctatccgctg 4560  
 gatgaccagg atgccattgc tgtggaagct gcctgacta atgttccggc gttatttctt 4620  
 gatgtctctg accagacacc catcaacagt attattttct cccatgaaga cggtagcga 4680  
 ctgggcgtgg agcatctggt cgcattgggt caccagcaaa tcgcgctgtt agcgggcca 4740  
 ttaagttctg tctcggcgcg tctgcgtctg gctggctggc ataaatatct cactcgcaat 4800  
 caaattcage cgatagcga acgggaaggc gactggagtg ccatgtccgg tttcaacaa 4860  
 accatgcaaa tgctgaatga gggcatcgtt cccactgca tgctggttgc caacgatcag 4920  
  
 atggcgtg ggcgaatgcg cgccattacc gagtccgggc tgcgcgttgg tgcggatc 4980  
 tcggtagtgg gatcgcgca taccgaagac agctcatgtt atatcccgc gccaaccacc 5040  
 atcaaacagg attttcgct gctggggcaa accagcgtgg accgcttgct gcaactctct 5100  
 cagggccagg cggatgaagg caatcagctg ttccccgtct cactggtgaa aagaaaaacc 5160  
 accctggcgc ccaatacga aaccgctct ccccgcgct tggccgattc attaatgcag 5220  
 ctggcagc aggtttccg actgaaagc gggcagtgag cgcaacgcaa ttaatgtgag 5280  
 ttagctcact cattagcac cccaggcttt acactttatg cttccgctc gtatgtgtg 5340  
  
 tggattgtg agcggataac aatttcacac aggaaacagc tatgacctg attacggatt 5400  
 cactggccgt cgttttaca cgctgtgact gggaaaaacc tggcgttacc caacttaac 5460  
 gccttgacg acatcccct ttcgccagct ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc 5520  
 gcccttcca acagtgcgc agcctgaatg gcgaatggcg ctttgcttg tttccggcac 5580  
 cagaagcggg gccgaaagc tggctggagt gcatcttcc tgaggccgat actgtcgtcg 5640  
 tcccctcaa ctggcagatg cacggttacg atgcgccat ctacaccaac gtaacctatc 5700  
 ccattacggt caatccgcg tttgttcca cggagaatcc gacgggttgt tactcgtca 5760

catttaatgt tgatgaaagc tggctacagg aaggccagac gcgaattatt ttgatggcg 5820  
 ttggaatt 5828  
 <210> 3  
 <211> 363  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Construct  
 <400> 3  
 caagtgcagc tggttgaatc cggtggcggc ctggtcaagc cgggcggctc ttgctctg 60  
 agctgtgccg cgtcgggttt taccttcagc tcttatggta tgcatgggt gcgtcaggcg 120  
 cctggcaaag gtctggagtg ggttcgcttc atccgctacg atgggtctaa caaatattat 180  
 gccgactcag taaaaggacg ctccactatt agccgcgaca atagcaaaaa taccctgtac 240  
  
 ctgcaaatga atagcctcgc cgccgaagat accgccgttt actattgcgc taaagatcgt 300  
 ggctgggtg atggtacgta ctccgattac tggggtcagg gcaccaccgt taccgttagt 360  
 tca 363  
 <210> 4  
 <211> 330  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Construct  
 <400> 4  
 cagtcagcgc ttacgcagcc ggcgtcggtg tgggttccc cgggtcagtc gatcagatc 60  
 agctgtagtg ggagcagctc caacatcggc aacaacgcag tgaactggta tcagcaactg 120  
 ccgggaaaag cgccgaaact gctgatttac tatgatgatt tgctccaag tggagttagt 180  
  
 gaccgctttt ccggcagtaa atcgggtacc tggcttttc tggtatttc gggctctccag 240  
 agcgaggatg aagctgatta ttattgcgcc gcatgggatg atagcttaaa tggcccagtt 300  
 ttggcggcg gtactaaact gaccgtgctg 330  
 <210> 5  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Construct  
 <400> 5

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
                   20                    25                    30  
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                   35                    40                    45  
 Ala Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr 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  
 Ala Lys Asp Arg Gly Leu Gly Asp Gly Thr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly  
                   100                    105                    110  
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
                   115                    120

<210> 6  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Construct  
 <400> 6

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



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> 11

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 11

agcgttaccg tgagtacagg ccagggtgg tatgacatgg cacgtacagc catcatgacc            60  
 tcgcgcgcat gttactacgt cgcgicagat gaatcgacgc cttcctcgct gcaaattgat            120  
 gcaacctcca gcagcaaaga tgttaccctg accgcaaagg acaagtttaa acagaatttg            180  
 cgtacggaga gtgactcccc gcacatcatg ggaatctggg agttgggtca ggggcctcgt            240  
 cagaaggat ggaacatgtg gtatacaact ttttcgtacg gctcagcaaa atgcagcttg            300

aaagtgtcgg caggtccgcg cgtgctggag gccgggccgc agcagctgca agtccagtct            360

<210> 12

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 12

aaacttgagt tgaagaccgg tgccggcttc accttaccga ccagttatca tcaacaatgc            60  
 tattactggt ccctggacga agcacaggtg aattcaatta cgtttacgtt tgataccggc            120  
 tctggcagcg gtacatttcg tgatcccgtg ggcacttacc gctattcggc gagttatc            180  
 ttgtgaaac cticcgaagg tccgaaacag cagtactggg cggttggcac cattgtagac            240  
 caatcagcca aatgtacaat ctcggttcgc gatggtgtca gtacgtgat gtctaagcag            300

tcacagacaa tggttatcga t            321

<210> 13

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 13

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

<210> 14

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 14

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



<210>

18

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 18

```
tcaaatcacg cctacaaaat tgaagtgaaa acggggggcg gtagtacgtt gccgtattcc 60
caccatcagc tgtgttatta tacagcattc gacgagcctc aattatcadc tgttatcctg 120
accttcgaaa ccggatctgg ctctgggacg ttccggctctc cggtaggctc ccagctgaac 180
tcagcccgct atattctgcg caaaccagcg aaagggccga aacaacagta ctgggcctg 240
aacaatcgca ttggacagtc ggcccgttgc acgatcaccg tccgggacgg agtcagtgcg 300
agcctgagtt ccccgctgca gaccatgcag attgat 336
```

<210> 19

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 19

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

Val Gln Val Glu

115

<210> 20

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 20

Ser Asn His Ala Tyr Lys Ile Glu Val Lys Thr Gly Gly Gly Ser Thr

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

Gly Thr Phe Arg Ser Pro Val Gly Ser Gln Leu Asn Ser Ala Ala Tyr

                  50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

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

                  100                    105                    110

<210> 21

<211> 1545

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 21

gtggtgatga tggatgatggc tctgtacctg cagctgctgc ggacccgcct caagaacgcg                    60

cgggccggct gataacctca gggaacattt ggccgaacca tagctgaagg tgggttacca                    120

catgttccac actttctggc gggggccctg gcccagttcc cagatgccca tgatatgtgg                    180

gctatcgctt tcggtgcgca gattctgttt aaatttgtct ttcgcagtca gagtcacgtc                    240

ttttgaagag gaggtggcat acatttgcag agaggaaggg gtcgactcat cgctggccac 300  
 gtaatagcac gcccgcatg tcataatcgc ggtccgtgcc atatcgtacc atccttggcc 360  
 cgtcgacacc gtcacggagc cccctcccc gctgccccca ccgccactac caccgccgcc 420

agagtcaatc accatggttt gggactgctt gctcatggag gtgctaactc gtcgcgaac 480  
 tgaaattgta catttggcag actggtccac gatcgttccc accgcccagt actgctgttt 540  
 cggaccctga gaaggtttca gaaggatata gcttgcacta taccggtacg tacctaccgg 600  
 atcacggaac gtaccgctgc ctgatcctgt atcaaaggta aaggtaatag agttcacctg 660  
 cgcttcgta agcggccagt aatagcactg ctggtgatag ctcgtaggga gggtaaatcc 720  
 cgcaccgctc ttgagttcca gttttaggc gtgatttgac acaaacaggg actccgatgc 780  
 gcccgcccc gcctggccgc tcggcagcac ggtcagtta gtaccgccgc caaaaactgg 840

gccatttaag ctatcatccc atgcccgcga ataataatca gtttcatcct cgctctggag 900  
 acccgaata gccagaaaag ccgaggtacc cgatttactg ccgaaaagc ggtcactaac 960  
 tccacttggc agcaaatcat catagtaaat cagcagtttc ggcgcttttc ccggcagttg 1020  
 ctgataccag ttacttgcgt tgttaccgat gttggagctg ctcccactac agctgatcgt 1080  
 gatcgactga cccggggaac ccgacaccga cgcggctgc gtaagcgtg actgactgcc 1140  
 acctccgcc ctgccaccgc caccagagcc gccccacct gaactaacgg taacggtggt 1200  
 gccctgacce cagtaatcga agtacgtacc atcaccagg ccacgatctt tagcgcaata 1260

gtaaaccggc gtatcttcgg cgcgcaggct attcatttgc aggtacaggg tatttttgc 1320  
 attgtcgcg ctaatagtga agcgtccttt tactgagtcg gcataatatt tgtagacc 1380  
 atcgtagcgg atgaacgcaa cccactccag acctttgcca ggcgctgac gcaccaatg 1440  
 catacataa gagctgaagg taaaaccga cgcggcacag ctcagacgca aagagccgcc 1500  
 cggcttgacc agaccgccac cggattcaac cagctgcact tgeat 1545

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 22

Gly Gly Gly Gly Ser