(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년06월17일
(11) 등록번호 10-2410360
(24) 등록일자 2022년06월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 35/17* (2014.01)
A61K 39/00 (2006.01) *C07K 14/705* (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01) *C07K 14/73* (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2878 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7002646(분할)
(22) 출원일자(국제) 2017년06월06일
심사청구일자 2022년01월25일
(85) 번역문제출일자 2022년01월25일
(65) 공개번호 10-2022-0018617
(43) 공개일자 2022년02월15일
(62) 원출원 특허 10-2019-7000160
원출원일자(국제) 2017년06월06일
심사청구일자 2020년02월27일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/036178
(87) 국제공개번호 WO 2017/214167
국제공개일자 2017년12월14일
(30) 우선권주장
62/346,324 2016년06월06일 미국(US)
62/396,767 2016년09월19일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020070107687 A
WO2016009030 A2

(73) 특허권자
시티 오브 호프
미국 91010-3000 캘리포니아주 두아르테 이스트 두아르테 로드 1500
더 보드 오브 리젠츠 오브 더 유니버시티 오브 텍사스 시스템
미국, 텍사스 78701, 오스틴, 210 웨스트 7 스트리트
(72) 발명자
킨 홍
미국 캘리포니아주 91010 두아르테 이스트 두아르테 로드 1500 시티 오브 호프
곽 래리 더블유
미국 캘리포니아주 91010 두아르테 이스트 두아르테 로드 1500 시티 오브 호프
(74) 대리인
제일특허법인(유)

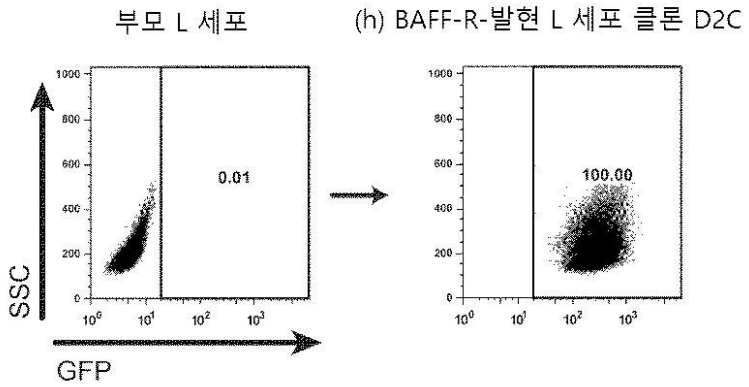
전체 청구항 수 : 총 21 항 심사관 : 김종호

(54) 발명의 명칭 **BAFF-R 표적 키메라 항원 수용체-변형된 T 세포 및 그 용도**

(57) 요 약

본 발명은 B 세포 활성화 인자 수용체(BAFF-R)에 표적화된 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 T 세포에 관한 것이다. 본원에 기술된 BAFF-R에 표적화된 CAR(BAFF-R CAR)은 BAFF-R에 결합하는 도메인을 포함한다. 본 발명은 또한 BAFF-R CAR을 제조하고 사용하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C07K 14/705 (2013.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 14/70514 (2013.01)
C07K 14/70517 (2013.01)
C07K 14/70521 (2013.01)
C07K 14/70578 (2013.01)
C12N 5/0636 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

키메라 항원 수용체로서,

상기 키메라 항원 수용체가 B 세포 활성화 인자 수용체(BAFF-R)에 표적화된 scFv를 포함하고, 상기 scFv가 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역이 CDR L1(서열번호 1), CDR L2(서열번호 2) 및 CDR L3(서열번호 3)을 포함하거나 CDR L1(서열번호 7), CDR L2(서열번호 8) 및 CDR L3(서열번호 9)을 포함하고, 상기 중쇄 가변 영역이 CDR H1(서열번호 4), CDR H2(서열번호 5) 및 CDR H3(서열번호 6)을 포함하거나 CDR H1(서열번호 10), CDR H2(서열번호 11) 및 CDR H3(서열번호 12)을 포함하고,

상기 키메라 항원 수용체가

(i) 1 내지 5개 아미노산 변형을 갖는 CD4 막관통 도메인 또는 그 변이체, 1 내지 5개 아미노산 변형을 갖는 CD8 막관통 도메인 또는 그 변이체, 1 내지 5개 아미노산 변형을 갖는 CD28 막관통 도메인 또는 그 변이체, 및 1 내지 5개 아미노산 변형을 갖는 CD3ζ 막관통 도메인 또는 그 변이체로부터 선택되는 막관통 도메인;

(ii) 보조자극 도메인; 및

(iii) 1 내지 5개 아미노산 변형을 갖는 CD3ζ 신호전달 도메인 또는 그 변이체

를 추가로 포함하는,

키메라 항원 수용체.

청구항 2

제1항에 있어서,

보조자극 도메인이 1 내지 5개 아미노산 변형을 갖는 CD28 보조자극 도메인 또는 그 변이체, 1 내지 5개 아미노산 변형을 갖는 4-1BB 보조자극 도메인 또는 그 변이체, 및 1 내지 5개 아미노산 변형을 갖는 OX40 보조자극 도메인 또는 그 변이체로 구성된 군으로부터 선택되는, 키메라 항원 수용체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 경쇄 가변 영역이 CDR L1(서열번호 1), CDR L2(서열번호 2) 및 CDR L3(서열번호 3)을 포함하고, 상기 중쇄 가변 영역이 CDR H1(서열번호 4), CDR H2(서열번호 5) 및 CDR H3(서열번호 6)을 포함하는, 키메라 항원 수용체.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 경쇄 가변 영역이 CDR L1(서열번호 7), CDR L2(서열번호 8) 및 CDR L3(서열번호 9)을 포함하고, 상기 중쇄 가변 영역이 CDR H1(서열번호 10), CDR H2(서열번호 11) 및 CDR H3(서열번호 12)을 포함하는, 키메라 항원 수용체.

청구항 5

제1항에 있어서,

scFv가 Chi90 HC, Hu90 HC-1, Hu90 HC-2, Hu90 HC-3, Chi55 HC, Hu55 HC-1, Hu55 HC-2 및 Hu55 HC-3으로부터 선택되는 중쇄 가변 도메인, 및 Chi90 LC, Hu90 LC-1, Hu90 LC-2, Hu90 LC-3, Chi55 LC, Hu55 LC-1, Hu55 LC-2 및 Hu55 LC-3으로부터 선택되는 경쇄 가변 도메인을 포함하는, 키메라 항원 수용체.

청구항 6

제3항 또는 제4항에 있어서,

scFv가 중쇄 가변 도메인과 경쇄 가변 도메인 사이에 스페이서를 포함하는, 키메라 항원 수용체.

청구항 7

제1항에 있어서,

scFv 또는 그 변이체와 막관통 도메인 사이에 위치하는 스페이서 영역을 포함하는, 키메라 항원 수용체.

청구항 8

제2항에 있어서,

4-1BB 신호전달 도메인이 서열번호 41의 아미노산 서열을 포함하는, 키메라 항원 수용체.

청구항 9

제1항에 있어서,

CD3ζ 신호전달 도메인이 서열번호 42의 아미노산 서열을 포함하는, 키메라 항원 수용체.

청구항 10

제1항에 있어서,

3 내지 15개 아미노산의 링커가 보조자극 도메인과 CD3ζ 신호전달 도메인 또는 그 변이체 사이에 위치하는, 키메라 항원 수용체.

청구항 11

제1항에 있어서,

scFv가 서열번호 14, 18, 20, 22, 30, 36, 37 및 38로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함하는, 키메라 항원 수용체.

청구항 12

제1항에 있어서,

scFv가 서열번호 16, 23, 24, 26, 28, 33, 34 및 35로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인을 포함하는, 키메라 항원 수용체.

청구항 13

제1항에 있어서,

scFv가 서열번호 43 및 44로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 키메라 항원 수용체.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 키메라 항원 수용체를 포함하는 단리된 인간 T 세포의 개체군.

청구항 15

제14항에 있어서,

T 세포가 CD4+ T_N 세포 및 CD8+ T_N 세포를 포함하는, 단리된 인간 T 세포의 개체군.

청구항 16

제14항에 따른 단리된 인간 T 세포의 개체군을 포함하는 B 세포 악성 종양의 치료에 사용하기 위한 약학 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서,

인간 혈청을 추가로 포함하는, 약학 조성물.

청구항 18

제16항에 있어서,

1% 내지 15%의 인간 혈청 또는 인간 혈청 등가물을 포함하는, 약학 조성물.

청구항 19

제16항에 있어서,

1% 내지 10%의 인간 혈청 또는 인간 혈청 등가물을 포함하는, 약학 조성물.

청구항 20

제16항에 있어서,

1% 내지 5%의 인간 혈청 또는 인간 혈청 등가물을 포함하는, 약학 조성물.

청구항 21

제16항에 있어서,

혈청 대체물을 추가로 포함하는, 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본원은 미국 가출원 제62/346,324호(2016년 6월 6일자 출원됨) 및 미국 가출원 제62/396,767호(2016년 9월 19일자 출원됨)(이들은 그 전체가 본원에 참조로 혼입됨)를 우선권 주장한다.

배 경 기 술

[0002] 조작된 T 세포를 이용하는 치료를 포함하여 종양-특이성 T 세포 기반 면역요법이 항-종양 치료를 위하여 조사되었다. B 세포-활성화 인자 수용체(B cell-activating factor receptor, BAFF-R)는 BAFF, B 및 T 세포 기능의 조절자에 대한 3가지 알려진 수용체 중의 하나이다.

발명의 내용

[0003] B 세포 활성화 인자 수용체(BAFF-R)에 표적화된 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 T 세포가 본원에 제공된다. 본원에 개시된 BAFF-R에 표적화된 CAR(BAFF-R CAR)은 BAFF-R에 결합하는 도메인을 포함한다. BAFF-R CAR을 제조하고 사용하는 방법이 또한 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0004] 도 1a, 1b, 1c, 1d 및 1e는 인간 BAFF-R에 대한 새로운 단일클론 항체의 발생과 특이성을 나타내는 FACS 이미지이다. 도 1a는 마우스 섬유아세포 L 세포에서 hBAFF-R-GFP 융합 단백질의 세포 표면 발현에 대한 FACS 분석이다. GFP-양성 세포에서 게이팅되면, 조작된 L 세포 클론(우측 그림)이 부모 L 세포(좌측 그림)와 비교된다. 클론 D2C가 추가 연구를 위하여 선택되었다. 도 1b, 1c, 1d 및 1e는 항 -BAFF-R 항체 결합 세포주 및 환자 샘플의 형광 카운트의 FACS 추적이다. 도 1b는 0.05 μg mAb/10^6 세포의 농도에서 Mino, JeKo-1, REC-1, JVM-13 및 Z-138을 포함하는, 친화도 정제된 하이브리도마 mAb(C90, C67, C55 및 C53) 결합 BAFF-R-양성, 인간 MCL 라인들을 제시한다. BAFF-R-음성 293T 배아 신장 세포주가 대조군으로 사용되었다. 도 1c는 높은 및 낮은 농도 결합 hBAFF-R-발현 L 세포에서 키메라 항체 C55 및 C90을 제시한다. 부모 L 세포 및 2차 항-hIgG-APC 항체만이 대조군으로 사용되었다. 도 1d는 NHL 세포주의 패널에 결합하는 알렉사 플루오르 488-복합(488-conjugated) 키메

라 항체를 제시한다. 도 1e는 3가지 유형의 NHL 1차 환자 샘플에 결합하는 키메라 항체를 나타낸다. 데이터는 세 가지 독립적인 실험을 나타낸다. 도 1b 내지 1e 모두에 대하여, 도면에 제시된 바와 같이 상단에서 하부까지의 추적은 도면 아래 또는 옆에 제시되는 상단에서 하부까지 사용된 변수(예컨대, 항체 유형 또는 세포 유형)와 관련이 있다.

도 2a, 2b 및 2c는 B 세포 종양 라인에 대해 특이적인 시험관내 세포독성을 나타내는 BAFF-R 단일클론 항체를 나타내는 그래프이다. 항체-유도된 세포독성은 C55, C90, 또는 리툭시맙 및 효과기(NK 세포 또는 보체 함유 혈청)에 의한 배양 이후 크롬-51 방출에 의해 측정되었다. NK 효과기 세포 대 표적 비율(E:T)은 20:1이다. 표적 세포의 세포 특이적 용해의 백분율: 제1 패널은 BAFF-R-발현 L 세포 또는 대조군 부모 L 세포를 나타내며; 제2 및 제3 패널은 투여량 반응 곡선으로 제시되는 다양한 항체 농도와 함께 BAFF-R 양성 JeKo-1 MCL 또는 BAFF-R 음성 U266 다발성 골수종 세포를 나타낸다. 도 2b는 CDC-민감성(Raji) 및 -저항성(Raji-2P)에 대한 활성 보체-함유 인간 혈청과 혼합된 항체(1:3 희석)의 특이적 용해를 나타낸다. 도 2c는 NHL 라인 JeKo-1, SU-DHL-6, Raji, 및 RL에 대한 NK 효과기 세포가 있거나 없는(E:T = 20:1) BAFF-R 키메라 항체의 ADCC 효과를 나타낸다. 데이터는 3배 샘플의 평균 ± s.d.로 제시된다. * 양측 스튜던트 t-검정(two-tailed Student's t-test)에 의해 NK 세포와 비교된 $P < 0.05$.

도 3a 및 3b는 BAFF-R 단일클론 항체가 원발성 B 세포 종양에 대한 시험관 내 항체 의존성 세포-매개 세포독성(Antibody Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity, ADCC)을 유도함을 나타내는 그래프이다. 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC) 효과는 C55, C90, 또는 리툭시맙 및 효과기(NK 세포)에 의한 배양 이후 크롬-51 방출에 의해 측정되었다. 표적 세포의 세포 특이적 용해의 백분율: 도 3a는 NHL 환자 샘플을 나타내며(E:T = 20:1 또는 10:1); 도 3b는 리툭시맙-처리된 난치성 환자의 1차 MCL 및 CLL 샘플을 나타낸다(E:T = 20:1). 데이터는 3배 샘플의 평균 ± s.d.로 제시된다. * 양측 스튜던트 t-검정에 의해 NK 세포와 비교된 $P < 0.05$.

도 4a는 종양의 최소 치사량으로 0 일차 종양 접종 후 치료 계획을 나타내는 개략도이다. 치료는 IV 꼬리 정맥 주사에 의해 이루어졌다. 도 4b 및 4c는 B 세포 종양에 대한 생체 내 치료 효과에서 유도된 인간 BAFF-R을 표적으로 하는 키메라 항체를 나타내는 사진이다. 루시퍼라제-발현 종양을 접종 받은 마우스의 생체발광 이미지: JeKo-1(MCL)(도 4b) 또는 RS4;11(ALL)(도 4c). 실험군은 키메라 BAFF-R mAb(지시된 것과 같이, C55 또는 C90)의 치료를 받았다. 대조군 마우스는 동일한 일정으로 PBS, NK 세포 단독, 또는 리툭시맙을 투여받았다. 데이터는 세 가지 독립적인 실험을 나타낸다.

도 5a, 5b 및 5c는 키메라 BAFF-R 항체가 시험관 내 약물 내성 림프종 모델에서 ADCC를 유도하는 것을 보여주는 이미지 또는 그래프이다. 도 5a는 CD20 유전자의 CRISPR/HDR 노크-아웃(knock-out) 후 JeKo-1 세포에서 CD20 결합을 보여주는 FACS 분석의 산점도이다. 선택된 CD20-/-클론 #25에서 CD20 발현은 WT JeKo-1과 비교된다. ADCC 효과는 C55, C90, 또는 리툭시맙 및 효과기 NK 세포(E:T = 20:1)에 의한 배양 이후 크롬-51 방출에 의해 측정되었다. 표적 세포의 세포 특이적 용해의 백분율: 리툭시맙-내성 JeKo-1-CD20-KO(도 5b) 및 이브루티닙-내성 Z-138 및 SP49-IR(도 5c). 모든 데이터는 둘 이상의 동일한 실험을 나타낸다. 데이터는 3배 샘플의 평균 ± s.d.로 제시된다. * 양측 스튜던트 t-검정에 의해 NK 세포와 비교된 $P < 0.05$.

도 6a 및 6b는 약물-내성 B 세포 종양에 대한 생체 내 치료 효과에서 유도된 인간 BAFF-R을 표적으로 하는 키메라 항체를 나타내는 사진이고 도 6c는 이를 나타내는 그래프이다. 루시퍼라제-발현 종양 JeKo-1-CD20-KO 세포(도 6a) 또는 이브루티닙-내성 Z-138 세포(도 6b)를 접종받고 이어서 도 4와 같이 항체 치료된 마우스의 생체발광 이미지. 대조군 마우스는 동일한 일정으로 PBS, NK 세포 단독, 또는 리툭시맙을 투여받았다. 도 6c는 각각 도 6a 및 도 6b에 나타낸 마우스의 80 일 무-종양 및 전체 생존 곡선을 나타낸다. 실험군과 모든 대조군 간의 무종양 비율과 생존율 차이를 로그-랭크 시험(log-rank test)으로 분석하였다(** $P<0.001$). 데이터는 세 가지 독립적인 실험을 나타낸다.

도 7a 및 7b는 항-인간 BAFF-R 단일클론 항체 생성 및 클론 선별을 나타낸다. 도 7a는 세포내 도메인 상의 C-말단 GFP 태그를 갖는 인간 hBAFF-R을 안정하게 발현하는 L 세포 클론 D2C가 제시된 일정에 따라 BALB/c 마우스를 면역화시키는데 사용된 것을 나타내는 개략도이다. 비장 조직을 20 일차에 채취하여 B 세포 하이브리도마 클론을 확립하였다. 도 7b는 항-마우스 IgG-HRP를 이용한 5가지 하이브리도마 상청액의 ELISA 결과를 나타내는 표이다. 클론 53, 55, 67, 및 90은 BAFF-R-특이적 mAb를 생성한 반면, 클론 37은 생성하지 않았다(또 다른 음성 클론을 나타냄).

도 8은 선택된 하이브리도마 클론이 MCL 세포에 결합한다는 검증을 보여주는 유동 세포계측 결과이다. 하이브리도마 클론 53, 55, 67, 및 90 상청액(1/10, 1/50, 및 1/200 희석액)의 Mino(맨틀 세포 림프종) 및 293T(음성

대조군) 세포주에 대한 결합은 항-마우스 IgG-APC에 의해 수행된 유동 세포계측에 의해 평가되었다.

도 9는 정제된 mAb의 인간 BAFF-R에 대한 투여량-의존성 결합을 나타내는 그래프이다. 하이브리도마 클론 53, 55, 67, 90으로부터의 마우스 mAb는 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 순차적으로 희석된(1 μg/10^6 세포 내지 1.6 ng/10^6 세포) 정제된 마우스 mAb의 Mino 세포에 대한 결합을 항-마우스 IgG-APC 이차 항체에 의한 유동 세포계측으로 평가하였다.

도 10은 시험관내 비-호지킨(non-Hodgkin) 림프종 세포주를 인식하는 hBAFF-R mAb를 보여주는 FACS 분석의 결과이다. 마우스 mAb 클론 55 및 90은 추가 세포주에 높은(2 μg mAb/10^6 세포) 및 낮은(0.05 μg mAb/10^6 세포) 용량으로 결합하였다: JeKo-1(맨틀 세포 림프종), SU-DHL-6(확산형 거대 B 세포 림프종), Raji(버킷 림프종) 및 RL(여포성 림프종). 유동 세포계측 분석은 항-마우스 IgG-APC에 의해 수행되었다. 도면에 제시된 바와 같이 상단에서 하부까지의 추적은 도면 옆에 제시되는 상단에서 하부까지 사용된 변수(예컨대, 항체 유형 또는 세포 유형)와 관련이 있다.

도 11은 림프종 환자 샘플을 인식하는 hBAFF-R mAb를 나타내는 그래프이다. 맨틀 세포 림프종, 확산형 거대 B 세포 림프종, 및 여포성 림프종 환자 샘플을 높은(2 μg/10^6 세포) 및 낮은(0.05 μg/10^6 세포) 용량의 마우스 mAb C55 및 C90으로 염색하였다. 유동 세포계측 분석은 항-마우스 IgG-APC에 의해 수행되었다. 도면에 제시된 바와 같이 상단에서 하부까지의 추적은 도면 아래에 제시되는 좌측에서 우측까지 사용된 변수(예컨대, 항체 유형 또는 세포 유형)와 관련이 있다.

도 12는 BAFF-R 발현 L 세포에 대한 키메라 항체 유도된 ADCC를 나타내는 그래프이다. BAFF-R-발현 D2C L 세포(표적)를 크롬-51로 표지하고 이어서 키메라 mAb + NK 세포(효과 대 표적 비, 20:1)로 밤새 배양하였다. 배양 상청액을 방출된 크롬에 대하여 분석하였다.

도 13은 종양 세포에 대한 세포독성을 위한 키메라 항체 필요 NK 세포를 나타내는 그래프이다. JeKo-1 세포(표적)를 크롬-51로 표지하였다. 세포를 NK 세포(효과기)가 있거나 없이 효과기 대 표적 비율 20:1에서 키메라 mAb(C55, C90, 또는 리툭시맙)로 배양하였다. 키메라 항체를 50 내지 0.005 μg/mL의 농도로 첨가하였다. 배양 상청액을 방출된 크롬에 대하여 분석하였다.

도 14는 hBAFF-R mAb 차단된 BAFF/BAFF-R 상호작용을 나타내는 FACS 결과이다. BAFF-R-발현 D2C L 세포 클론을 C90으로 4 ℃에서 45 분동안 배양하고(0 내지 1,000 ng/10^6 세포) 이어서 재조합 BAFF 리간드(0.5 μg/10^6 세포)로 4 ℃에서 90 분 동안 배양하였다. 유동 세포계측을 수행하고 항-BAFF-PE에 대하여 게이팅되었다. 신호 플롯은 각 mAb 농도의 존재 하에서 BAFF/BAFF-R 결합 신호를 나타낸다. 신호 플롯에 표시된 농도는 각 FACS 결과의 상단에 표시된다.

도 15는 제한된 내재화가 BAFF-R mAb에 의해 관찰됨을 나타내는 FACS 결과이다. Mino 세포를 mAb C90(0.05 μg/10^6 세포)로 4 ℃에서 20 분 동안 배양하고 이어서 37 ℃에서 1 시간 동안 배양하였다. 유동 세포계측 분석은 항-마우스 IgG-APC에 의해 수행되었다. 세포는 표면 국소 항체(OUT) 및 세포 표면 염색의 손실(IN)을 위해 게이팅되었다.

도 16a는 FACS 결과이고 도 16b는 CRISPR로 생성된 CD20 노크 아웃 클론을 나타내는 겔 이미지이다. JeKo-1의 CD20 노크 아웃 클론은 CD20 유전자자리에서 RFP를 대체하는 상용 CRISPR/HDR 시스템에 의해 생성되었다. 도 16a에 있어서, 클론이 CD20-/RFP+ 발현에 대하여 유동 세포계측에 의해 선별되고 분류되었다. 도 16b에 있어서, 항-CD20 항체에 의한 웨스턴 블로팅(Western blotting)을 CD20-/RFP+ 클론으로부터의 전체 세포 용해액에서 수행하였다. β-액틴을 로딩 대조군으로서 블로팅하였다. 도 16c는 BAFF-R 발현이 CD20의 CRISPR/HDR 조작에 의해 영향을 받지 않았음을 확인하기 위해 BAFF-R/RFP+ 발현을 선별한 도 16a에서와 같은 클론에 대한 FACS 결과를 나타낸다.

도 17은 정상 B 세포에 대한 BAFF-R 결합의 특성을 나타내는 FACS 결과이다. 건강한 공여자의 PBMC를 APC-접합 C90 키메라 항체 및 (도 17a) 림프구 마커 패널(항-CD20-PE, 항-CD3-퍼시픽블루, 및 항-CD56-FITC) 또는 (도 17b) 골수 세포 마커 패널(항-CD45-PE, 항-CD15-PerCP-Cy5.5, 및 항-CD14-퍼시픽블루)로 동시-염색하였다. 각각의 특이적 면역 세포 하위-개체군이 게이팅되고 BAFF-R 항체와의 결합에 위해 분석되었다.

도 18은 말초 혈액으로부터의 정상 면역 세포에서 hBAFF-R mAb의 특성화를 나타내는 FACS 결과이다. 마우스 mAb 클론 55 및 90을 분리된 인간 면역 세포 하위-개체군에 대한 결합에 대해 시험하였다. B 세포, T 세포, 및 NK

세포를 상업용 특이적 세포 유형 분리 키트로 분리시키고 C55 및 C90로 염색하였다(0.05 μg mAb/10^6 세포). 유동 세포계측 분석은 항-마우스 IgG에 의해 수행되었다. PBMC로부터의 골수 세포를 CD66b+에 대해 게이팅하고 mAb C55 및 C90 염색을 위하여 분석하였다. 도면에 제시된 바와 같이 상단에서 하부까지의 추적은 도면 옆에 제시되는 상단에서 하부까지 사용된 변수(예컨대, 항체 유형 또는 세포 유형)와 관련이 있다.

도 19a 및 19b는 면역조직화학 이미지이다. 도 19a에 있어서, 면역조직화학을 수행하여 항-BAFF-R 항체의 조직 특이성을 확인하였다. 조직 샘플을 염색하기 위해 1 mg/mL 항체의 1:150 희석액을 사용하였다. 인간 BAFF-R(20x 대물 렌즈)에 대한 C55 mAb의 조직 특이성: 1 mg/mL에서 스톡의 1:150 희석. 도 19b에 있어서, 면역조직화학을 추가 편도선 조직 및 유방 조직에서 수행하여 항-BAFF-R 항체의 조직 특이성을 확인하였다. 조직 샘플을 염색하기 위해 1 mg/mL 항체의 1:150 희석액을 사용하였다. 인간 BAFF-R에 대한 mAb의 조직 특이성(상부 패널: 편도 조직; 하부 패널: 유방 조직; 20x 대물 렌즈).

도 20a 및 20b는 인간화 변이체에 대해 수행된 기능적 시험관내 검정을 나타내는 그래프이다. 도 20a에 있어서, ELISA 검정이 C90의 9가지 인간화 변이체에 대해 수행되었다. 인간 BAFF-R의 재조합 세포외 도메인을 항원으로 사용하였다. 항체를 0.78 내지 100 ng/mL의 농도로 투여하였고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 도 20b에 있어서, 인간화 변이체를 크롬 방출 검정에서 JeKo-1 세포에 대해 시험하였다. 세포에게 크롬을 섭취시킨 다음 인간화 C90 변이체 및 효과기 NK 세포로 처리하였다. 세포를 6시간 동안 배양하고 그들의 상청액을 그들의 크롬 함량을 위해 샘플링하였다.

도 21a 및 도 21b는 각종 림프종 라인의 특이한 세포독성에 대하여 분석된 인간화 항체 C90-4 및 C90-5를 나타내는 그래프이다. 도 21a에 있어서, JeKo-1, Z138, 및 RS4를 인간화 항체 C90-4 및 C90-5를 사용하여 크롬 방출 검정을 실시하였다. 항체를 0 내지 5 μg/mL의 농도로 세포주에 투여하고 20:1의 E:T 비율로 NK 세포와 함께 6 시간 동안 배양하였다. 세포 상청액을 그들의 크롬 함량에 대하여 분석하였다. 도 21b에 있어서, LY-10, MEC-2, RL, 및 Raji 림프종 라인을 인간화 항체 C90-4 및 C90-5를 사용하여 크롬 방출 검정을 실시하였다. 항체를 5 μg/mL로 세포주에 투여하고 20:1의 E:T 비율로 NK 세포와 함께 6 시간 동안 배양하였다. 세포 상청액을 그들의 크롬 함량에 대하여 분석하였다.

도 22a 및 22b는 원발성 MCL 샘플에 대한 결합 및 세포독성에 대해 시험된 인간화 C90 항체 리드 후보군을 나타내는 FACS 결과 및 그래프이다. 도 22a에 대하여, 3개의 원발성 MCL 종양 샘플을 CD20-APC 및 바이오틴화된 인간화 C90으로 동시-염색한 다음 PE-접합 스트렙타비딘을 사용하여 신호를 검출하였다. 도 22b에 대하여, 원발성 종양 샘플에 대한 인간화 C90의 세포독성을 크롬 방출 검정으로 평가하였다. 세포를 크롬-51과 함께 배양한 후 항체 및 효과기 NK 세포로 처리하였다. 하룻밤 배양 후, 상청액을 샘플링하고 크롬 함량을 측정하였다.

도 23은 바이오틴화된 인간화 C90-4 및 C90-5의 유동 세포계측 분석을 보여주는 FACS 결과이다. 항체를 사용하여 PBMC를 염색한 후 형광 PE 스트렙타비딘 프로브로 검출하였다. PBMC는 또한 과립구 마커 CD66b-PerCP-Cy5.5, 단핵구 마커 CD14-PE-Cy7, B 세포 마커 CD20-APC, T 세포 마커 CD3-PE-Cy5, 및 NK 세포 마커 CD56-FITC로 표지되었다. PBMC를 유동 세포계측으로 분석하였다.

도 24는 생체 내 종양 치료에서 BAFF-R 키메라 항원 수용체(CAR) T 세포를 나타내는 이미지이다. 공여자 T 세포는 4-1BB 모티프로 T 세포 수용체 신호전달 도메인에서 키메라 C55 항-BAFF-R 단일 쇄(sFv)를 발현하도록 조작되었다. NSG 마우스에게 NHL JeKo-1-Luci 세포(1 x 10^6 세포)의 최소 치사 투여량을 투여하였다. 종양 세포를 종양이 생물발광 이미징(9일차)에 의해 검출가능할 때까지 이식(engraft)시켰다. 마우스에게 종양 유발 후 9 일차 및 15 일차에 T 세포 요법(5 x 10^6 CAR-T 세포) 또는 대조군을 투여하였다. 마우스를 면밀히 관찰하고 종양 발달을 추적하기 위해 매 3 일마다 영상을 찍었다.

도 25a는 전형적인 CAR 구조의 개략도이고, 도 25b는 전형적인 CAR-T 세포주 생산 일정의 개략도이다.

도 26은 BAFF-R CAR을 발현하는 다양한 T 세포 하위개체군을 사용하여 시험관 내 검정 결과를 보여주는 그래프이다. 이러한 4-시간 51Cr 방출 검정에서 BAFF-R CAR T 세포를 다양한 효과기 대 표적 비율에서 51Cr-표지된 BAFF-R 양성 표적 세포, JeKo-1, 또는 PBMC 음성 대조군으로 함께-배양하였다. 그래프 옆에 표시된 범례는 그래프에서 왼쪽에서 오른쪽으로 있는 막대와 위에서 아래로 상관된다.

도 27은 세포 증식 검정의 결과를 나타내는 신호 플롯이다. BAF-R CAR 발현 T 세포(CD8+ T_{CM} 발현 H90 BAFF-R CAR)를 U266 세포(음성 대조군), CD3 비드(양성 대조군), 또는 JeKo-1 세포에 노출시켰다.

도 28a는 종양 자극에 반응하는 세포 증식을 보여주는 FACS 결과이다. 도 28b는 지시된 바와 같은 표적 세포/비드와 24 시간 동안 배양한 후 사이토카인 IFN-γ, TNF-α, 및 그란자임(Granzyme) B 상청액 농도의 ELISA 측정을 나타내는 그래프이다.

도 29는 시험관 내에서 BAFF-R 발현 B 세포 악성 종양에 대한 세포독성을 나타내는 BAFF-R CAR-T 세포를 나타내는 그래프이다. 세포독성 T 림프구 검정은 크롬-51 방출에 의한 표적 세포의 특이적 용해를 측정한다. 크롬-51 표지된 표적 세포(악성 B 세포주 또는 대조군, BAFF-R+ L 세포; BAFF-R- 부모 L 세포)를 제시된 효과기-대-표적 비율에서 T 세포와 함께 배양하였다. BAFF-R CAR-T 세포가 CD4+ T_N 또는 CD8+ T_{CM} 분리된 T 세포로부터 유래되었다. 방출된 크롬-51을 상청액에서 배양 4 시간 후 측정하였다. 모든 데이터는 둘 이상의 동일한 실험을 나타낸다. 데이터는 3배 샘플의 평균 ± s.d.로 제시된다. 그래프 아래에 표시된 범례는 그래프에서 왼쪽에서 오른쪽으로 막대를 왼쪽에서 오른쪽으로 연관시킨다.

도 30a 및 30b는, 생체 내에서, BAFF-R CAR-T 세포가 확립된 종양을 제거하고 재접종된 종양에 대해서 내성임을 나타내는 이미지 및 그래프이다. 루시퍼라제-발현 JeKo-1로 0 일차에 정맥내(IV) 종양 접종(1×10^6 세포/마우스) 후의 NSG 마우스 군(n=5)의 생체발광 이미지. 활성화된 CAR T 세포 치료는 10 일차 및 17 일차에 IV에 의해 주입되었다. 치료는 2.5×10^6 CD4+ T_N + 2.5×10^6 CD8+ T_{CM} CAR-T 세포 또는 5×10^6 비분류된(Pan) CAR-T 세포로 구성되었다. PBS를 종양 대조군으로 사용하였다. 생존 쥐(군당 n=4)를 추가 치료 없이 100 일차에 1×10^6 JeKo-1 세포로 재접종하였다. 사전 치료되지 않은 NSG 마우스(n = 3)를 종양 대조군과 동일한 수의 JeKo-1 세포를 접종하였다. 이미지가 도 30a에 도시된다. 도 30b는 100 일 동안 전체 생존의 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 플롯이다.

도 31은 JeKo-1 모델에서 H55 BAFF-R CAR T 세포 및 CD19 표적화된 CAR T 세포의 활성의 생체 내 검정 결과를 보여주는 이미지이다. 루시퍼라제(ffluc) 및 녹색 형광 단백질(GFP) 세포를 발현하도록 조작된 2×10^6 ffluc GFP JeKo-1 세포를 NOD/Scid IL2Rγ Cnull(NSG) 마우스에 정맥 내 주사하였다. 종양 접종 후 9 일차에, 마우스에게 1×10^6 H55 BAFF-R CAR T 세포, PBS, 1×10^6 CD19 표적화된 CAR T 세포 또는 모조 형질도입된 (대조군) T 세포를 정맥 내 주사하였다. 종양 신호는 지시된 바와 같이 제노젠 영상(Xenogen imaging)으로 모니터링하였다.

도 32a, 32b 및 32c는, 생체 내에서, BAFF-R CAR T 세포 치료적 지속성에 대해 최적화된 T 세포 시작 물질을 보여주는 이미지 및 그래프이다. 루시퍼라제-발현 JeKo-1로 0 일차에 정맥내(IV) 종양 접종(1×10^6 세포/마우스) 후의 NSG 마우스 군(n=5)의 생체발광 이미지. 활성화된 CAR T 세포 치료는 IV에 의해 주입되었다. 치료는 10 일차 및 17 일차에(도 32a) 그리고 10 일차에(도 32b 및 32c) 제공되었다. 치료는 시작 물질 및 CD8+ T_{CM}, T_N, 또는 T_{SCM} CAR-T 세포와 조합된 CD4+ T_N CAR-T 세포의 치료 용량을 최적화하였다. 제시된 치료는 표시된 T 세포 서브세트로부터 유래된(도 32a) 2.5×10^6 CD4+ T_N + 2.5×10^6 CD8+ T 세포(도 32b) 2.5×10^6 CD4+ T_N + 1×10^6 CD8+ T 세포(도 32c) 1×10^6 CD4+ T_N + 1×10^6 CD8+ T 세포로 구성된 CAR-T 세포이다. 동일한 공여자 샘플의 비-형질도입된 CD4+/CD8+ T 세포를 동종이계 대조군으로 사용하였고 PBS를 종양 대조군으로 사용하였다. 도 32b 및 32c는 또한 100 일 동안 전체 생존의 카플란-마이어 플롯을 나타낸다.

도 33a, 33b 및 33c는 종양 재접종에 대한 지속적인 CAR-T 세포를 나타내는 BAFF-R CAR-T 치료된 마우스를 나타내는 이미지 및 그래프이다. 도 33a에 대하여, CD8+ T_N 및 CD8+ T_{CM} 실험군(군당 n=4)에서 도 32b의 생존하는, 종양 없는 마우스를 추가 치료 없이 최초 접종 후 100 일차에 1×10^6의 JeKo-1 세포로 재접종하였다. 사전 치료되지 않은 NSG 마우스(n = 5)를 종양 대조군과 동일한 수의 JeKo-1 세포를 접종하였다. 각 실험 마우스의 혈액을 종양 재접종의 0 일차 및 5 일차에 샘플링하였다. 백혈구를 RBC 용해에 의해 혈액으로부터 분리하고 유동세포계측에 의해 검사하였다. 도 33b는 각 실험군에서의 대표적인 FACS 플롯 및 GFP+BAFF-R CAR-T 세포에 대하여 게이팅된 백혈구의 날짜, 이어서 CD4 및 CD8 T 세포 게이팅을 나타낸다. 도 33c는 백혈구 전체에서 BAFF-R+ CAR-T 세포의 백분율이 각 마우스에 대해 계산되고 플롯된 것을 나타낸다. CD4 및 CD8 T 세포 개체군의 백분율은 각각의 누적된 막대에 표시된다.

도 34는 최적화된 BAFF-R CAR T 세포 요법이, 생체 내에서, CD19 내성 종양을 제거하는 것을 나타내는 이미지

및 그래프이다. 루시퍼라제-발현 Raji로 0 일차에 정맥내(IV) 종양 접종(0.5×10^6 세포/마우스) 후의 NSG 마우스 군(n=5)의 생체발광 이미지. 단일 활성화된 CAR T 세포 치료가 7 일차 IV에 의해 주입되었다. 표준 작업 처리 용량은 CD4+ T_N 2.5×10^6 + CD8+ T_N 1×10^6 BAFF-R CAR T 세포 또는 CD19 CAR-T 세포로 구성되었다. 단지 scFv-항-BAFF-R 또는 항-CD19에서만 서로 다른 동등한 2세대 CAR 플랫폼을 사용하였다. 동일한 공여자 샘플의 비-형질도입된 CD4+/CD8+ T 세포를 동종이계 대조군으로 사용하였고 PBS를 종양 대조군으로 사용하였다. 80 일 동안 전체 생존율의 카플란-마이어 플롯이 오른쪽에 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0005] 특히, 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하는 BAFF-R 항체가 본원에 제공된다. 항체의 기능성 단편이 또한 제공된다. 본원에 제공된 BAFF-R 항체 및 이의 기능성 단편은 인간 BAFF-R 단백질에 결합할 수 있고 BAFF-R-발현 세포(예를 들어, B 세포)에 항체-의존성 세포성 세포독성(ADCC)을 유도할 수 있다. 임의적으로, 본원에 제공된 항체의 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역은 키메라 항원 수용체(CAR)의 일부를 형성한다. 따라서, 본원에 제공된 조성물 및 방법은 특히 암(예를 들어, B 세포 악성 종양) 또는 자가면역 질환의 치료에 사용될 수 있다.

[0006] 본원에 언급된 BAFF-R 단백질의 BAFF-R, 즉 BAFF 수용체는 BAFF-R 활성(예컨대, BAFF-R과 비교하여 적어도 50%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 활성)을 유지하며 또한 종양 괴사 인자 수용체 수퍼패밀리 멤버 13C(TNFRSF13C) 또는 그 변이체 또는 동족체로 알려진 B 세포 활성화 인자 수용체(BAFF-R)의 재조합 또는 자연-발생적 형태 중 임의의 것을 포함한다. 임의적으로, 변이체 또는 동족체는 자연-발생적 BAFF-R과 비교하여, 전체 서열 또는 서열의 일부분(예컨대, 50, 100, 150 또는 200 연속 아미노산 일부분)에 걸쳐서 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 아미노산 서열 동일성을 갖는다. 임의적으로, BAFF-R은 UniProt 참조 번호 Q96RJ3에 의해 확인된 단백질 또는 이에 대해 실질적인 동일성을 갖는 변이체 또는 동족체와 실질적으로 동일하다. 임의적으로, BAFF-R은 UniProt 참조 번호 Q9D8D0에 의해 확인된 단백질 또는 이에 대해 실질적인 동일성을 갖는 변이체 또는 동족체와 실질적으로 동일하다. 임의적으로, BAFF-R은 NCBI 참조 번호 GI:16445027에 의해 확인된 단백질 또는 이에 대해 실질적인 동일성을 갖는 변이체 또는 동족체와 실질적으로 동일하다. 임의적으로, BAFF-R은 NCBI 참조 번호 GI:16306481에 의해 확인된 단백질 또는 이에 대해 실질적인 동일성을 갖는 변이체 또는 동족체와 실질적으로 동일하다.

[0007] 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하는 B 세포 활성화 인자 수용체(BAFF-R) 항체가 제공된다. 경쇄 가변 영역은 서열번호 1에 제시된 CDR L1, 서열번호 2에 제시된 CDR L2 및 서열번호 3에 제시된 CDR L3을 포함한다. 그리고, 중쇄 가변 영역은 서열번호 4에 제시된 CDR H1, 서열번호 5에 제시된 CDR H2 및 서열번호 6에 제시된 CDR H3을 포함한다. 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 서열번호 7에 제시된 CDR L1, 서열번호 8에 제시된 CDR L2 및 서열번호 9에 제시된 CDR L3을 포함한다. 그리고, 중쇄 가변 영역은 서열번호 10에 제시된 CDR H1, 서열번호 11에 제시된 CDR H2 및 서열번호 12에 제시된 CDR H3을 포함한다. 임의적으로, 항체는 인간화 항체이다. 개시된 항체의 기능성 단편이 또한 제공된다.

[0008] 본원에 제공된 인간화 항체는 BAFF-R 단백질에 결합할 수 있고, 본원에 제공된 BAFF-R 항체의 적어도 하나의 마우스 CDR 또는 그의 기능성 단편 또는 변이체를 포함할 수 있다(예를 들어, 서열번호 1 또는 7의 CDR L1, 서열번호 2 또는 8의 CDR L2, 서열번호 3 또는 9의 CDR L3, 서열번호 4 또는 10의 CDR H1, 서열번호 5 또는 11의 CDR H2, 서열번호 7 또는 13의 CDR H3). CDR의 기능성 단편은 완전한 CDR 아미노산 서열의 일부분이지만 기능성 단편을 함유하는 항체 또는 그 단편은 여전히 항원(예컨대, BAFF-R)에 결합할 수 있다. CDR의 기능성 변이체는 CDR 서열에 하나 이상의 변형이 있는 CDR이지만 기능성 변이체를 함유하는 항체 또는 그 기능성 단편은 여전히 항원(예컨대, BAFF-R)에 결합할 수 있다. 예를 들어, CDR을 인코딩하는 핵산 서열의 기능성 변이체는 하나 이상의 변형을 포함할 수 있지만 여전히 CDR의 동일한 아미노산 서열을 인코딩한다. 또한, CDR의 폴리펩티드 서열의 기능성 변이체는 항체 또는 그 기능성 단편이 항원에 결합하는 한, 하나 이상의 아미노산 변형을 포함할 수 있다. 따라서, CDR의 기능성 단편 또는 변이체는 전형적으로 항원(예를 들어, BAFF-R)에 대한 항체 결합에 필요한 아미노산 잔기를 포함한다. 인간화 항체가 적어도 하나의 CDR을 포함하는 경우, 적어도 하나의 CDR 또는 그 기능성 단편이 공여자 항체로부터 유래된다. 임의적으로, 공여자 항체는 마우스 항체이다. 해당 분야의 통상의 기술자는 적어도 하나의 마우스 CDR을 포함하는 인간화 항체가 공여자 항체로부터 유래된 적어도 하나의 마우스 CDR을 갖는 인간화 항체이고 추가 CDR이 수용체 항체로부터 유래된다는 것을 즉시 인식할 것이다(예컨대, 경쇄가 총 3 개의 CDR을 포함하고 중쇄가 총 3 개의 CDR을 포함하는 경우).

[0009] 본원에 제공된 BAFF-R 항체가 인간화 항체인 경우, 항체는 인간화 중쇄 가변 영역 및/또는 인간화 경쇄 가변 영

역을 포함할 수 있다. 임의적으로, 인간화 경쇄 가변 영역 및 인간화 중쇄 가변 영역은 결합된 하나의 마우스 CDR 또는 마우스 CDR의 기능성 단편 또는 변이체를 포함한다. 따라서, 인간화 경쇄 가변 영역 및 인간화 중쇄 가변 영역은 결합된 6개의 CDR을 포함할 수 있으며, 이때 6개의 CDR 중 적어도 하나는 마우스 CDR이다. 인간화 경쇄 가변 영역 및 인간화 중쇄 가변 영역이 결합된 하나의 마우스 CDR을 포함하는 경우, 인간화 경쇄 가변 영역 또는 인간화 중쇄 가변 영역은 하나의 마우스 CDR을 포함한다. 예를 들어, 인간화 항체는 공여자 항체로부터 유래된 CDR L3(예를 들어, 마우스, 또한 본원에서 마우스 CDR L3으로 지칭됨) 및 수용체 항체(즉, 인간)로부터 유래된 CDR L1, CDR L2, CDR H1, CDR H2, 및 CDR H3을 포함할 수도 있다.

[0010] 임의적으로, 인간화 경쇄 가변 영역 및 인간화 중쇄 가변 영역은 결합된 2개의 마우스 CDR을 포함한다. 인간화 경쇄 가변 영역 및 인간화 중쇄 가변 영역이 결합된 2개의 마우스 CDR을 포함하는 경우, 인간화 경쇄 가변 영역 및 인간화 중쇄 가변 영역이 각각 하나의 마우스 CDR을 포함하거나(i), 인간화 경쇄 가변 영역이 2개의 마우스 CDR을 포함하거나(ii), 인간화 중쇄 가변 영역이 2개의 마우스 CDR을 포함한다(iii). 예를 들어, 인간화 항체는 공여자 항체로부터 유래된 CDR L3 및 CDR H3(또한, 본원에서 각각 마우스 CDR L3 및 마우스 CDR H3으로 지칭됨) 및 수용체 항체(즉, 인간)로부터 유래된 CDR L1, CDR L2, CDR H1, 및 CDR H2를 포함할 수도 있다.

[0011] 임의적으로, 인간화 경쇄 가변 영역 및 인간화 중쇄 가변 영역은 결합된 3개의 마우스 CDR을 포함한다. 인간화 경쇄 가변 영역 및 인간화 중쇄 가변 영역이 결합된 3개의 마우스 CDR을 포함하는 경우, 인간화 경쇄 가변 영역이 하나의 마우스 CDR을 포함하고 인간화 중쇄 가변 영역이 2개의 마우스 CDR을 포함할 수 있거나(i), 인간화 경쇄 가변 영역이 2개의 마우스 CDR을 포함하고 인간화 중쇄 가변 영역이 하나의 마우스 CDR을 포함하거나(ii), 인간화 경쇄 가변 영역이 3개의 마우스 CDR을 포함하거나(iii), 인간화 중쇄 가변 영역이 3개의 마우스 CDR을 포함한다(iv). 예를 들어, 인간화 항체는 공여자 항체로부터 유래된 CDR L3, CDR H3 및 CDR L2(예컨대, 마우스, 또한 이때 각각 CDR L3, 마우스 CDR H3, 및 마우스 CDR L2로 지칭됨) 및 수용체 항체(즉, 인간)로부터 유래된 CDR L1, CDR H1, 및 CDR H2를 포함할 수도 있다.

[0012] 인간화 경쇄 가변 영역 및 인간화 중쇄 가변 영역은 결합된 4개의 마우스 CDR을 포함할 수 있다. 인간화 경쇄 가변 영역 및 인간화 중쇄 가변 영역이 결합된 4개의 마우스 CDR을 포함하는 경우, 인간화 경쇄 가변 영역이 하나의 마우스 CDR을 포함하고 인간화 중쇄 가변 영역이 3개의 마우스 CDR을 포함하거나(i), 인간화 경쇄 가변 영역이 3개의 마우스 CDR을 포함하고 인간화 중쇄 가변 영역이 하나의 마우스 CDR을 포함하거나(ii), 인간화 경쇄 가변 영역이 2개의 마우스 CDR을 포함하고 인간화 중쇄 가변 영역이 2개의 마우스 CDR을 포함한다(iii). 예를 들어, 인간화 항체는 공여자 항체로부터 유래된 CDR L3, CDR H3, CDR L2 및 CDR L1(예컨대, 마우스, 또한 이때 각각 마우스 CDR L3, 마우스 CDR H3, 마우스 CDR L2 및 마우스 CDR L1로 지칭됨) 및 수용체 항체(즉, 인간)로부터 유래된 CDR H1 및 CDR H2를 포함할 수도 있다.

[0013] 인간화 경쇄 가변 영역 및 인간화 중쇄 가변 영역은 각각 적어도 하나의 마우스 CDR을 포함할 수 있다. 인간화 경쇄 가변 영역 및 인간화 중쇄 가변 영역이 각각 적어도 하나의 마우스 CDR을 포함하는 경우, 인간화 경쇄 가변 영역이 적어도 하나의 마우스 CDR을 포함하고 인간화 중쇄 가변 영역이 적어도 하나의 CDR을 포함한다. 따라서, 인간화 경쇄 가변 영역이 마우스 CDR L1을 포함할 수 있고 인간화 중쇄가 마우스 CDR H1을 포함한다. 임의적으로, 마우스 CDR L1은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하고 마우스 CDR H1은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함한다. 임의적으로, 마우스 CDR L1은 서열번호 1의 아미노산 서열이고 마우스 CDR H1은 서열번호 4의 아미노산 서열이다. 임의적으로, 인간화 경쇄 가변 영역은 마우스 CDR L2를 포함하고 인간화 중쇄 가변 영역은 마우스 CDR H2를 포함한다. 임의적으로, 마우스 CDR L2는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하고 마우스 CDR H2는 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함한다. 임의적으로, 마우스 CDR L2는 서열번호 2의 아미노산 서열이고 마우스 CDR H2는 서열번호 5의 아미노산 서열이다. 임의적으로, 인간화 경쇄 가변 영역은 마우스 CDR L3을 포함하고 인간화 중쇄 가변 영역은 마우스 CDR H3을 포함한다. 임의적으로, 마우스 CDR L3은 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하고 마우스 CDR H3은 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함한다. 임의적으로, CDR L3은 서열번호 3의 아미노산 서열이고 마우스 CDR H3은 서열번호 6의 아미노산 서열이다.

[0014] 임의적으로, 마우스 CDR L1은 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하고 마우스 CDR H1은 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함한다. 임의적으로, 마우스 CDR L1은 서열번호 7의 아미노산 서열이고 마우스 CDR H1은 서열번호 10의 아미노산 서열이다. 임의적으로, 인간화 경쇄 가변 영역은 마우스 CDR L2를 포함하고 인간화 중쇄 가변 영역은 마우스 CDR H2를 포함한다. 임의적으로, 마우스 CDR L2는 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하고 마우스 CDR H2는 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함한다. 임의적으로, 마우스 CDR L2는 서열번호 8의 아미노산 서열이고 마우스 CDR H2는 서열번호 11의 아미노산 서열이다. 임의적으로, 인간화 경쇄 가변 영역은 마우스 CDR L3을 포함하고 인간화 중쇄 가변 영역은 마우스 CDR H3을 포함한다. 임의적으로, 마우스 CDR L3은 서열번호 9의

아미노산 서열을 포함하고 마우스 CDR H3은 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함한다. 임의적으로, CDR L3은 서열번호 9의 아미노산 서열이고 마우스 CDR H3은 서열번호 12의 아미노산 서열이다.

[0015] 마우스 CDR L3 및 마우스 CDR H3의 존재는 인간화 항체의 BAFF-R에 대한 결합에 충분할 수 있다. 따라서, 인간화 항체는 마우스 CDR L1, 마우스 CDR L2, CDR H1 또는 마우스 CDR H2를 포함하지 않을 수도 있다. 인간화 항체가 마우스 CDR L1, 마우스 CDR L2, 마우스 CDR H1 또는 마우스 CDR H2를 포함하지 않는 경우, 인간화 항체는 수용체 항체(즉, 인간)로부터 유래된 CDR L1, CDR L2, CDR H1 또는 CDR H2를 포함한다. 따라서, 마우스 CDR L1, 마우스 CDR L2, 마우스 CDR H1 또는 마우스 CDR H2를 포함하지 않는 인간화 항체는 공여자 항체(예컨대, 마우스(mouse), 래트(rat), 토끼(rabbit))로부터의 CDR L1, CDR L2, CDR H1 또는 CDR H2를 포함하지 않으나, 수용체 항체(즉, 인간)로부터의 CDR L1, CDR L2, CDR H1 또는 CDR H2를 포함한다. 따라서, 인간화 경쇄 가변 영역이 마우스 CDR L1 또는 마우스 CDR L2를 포함하지 않을 수도 있고 인간화 중쇄 가변 영역이 마우스 CDR H1 또는 마우스 CDR H2를 포함하지 않는다. 임의적으로, 인간화 경쇄 가변 영역이 마우스 CDR L1 및 마우스 CDR L2를 포함하지 않고 인간화 중쇄 가변 영역이 마우스 CDR H1 및 마우스 CDR H2를 포함하지 않는다.

[0016] 임의적으로, 인간화 경쇄 가변 영역은 마우스 CDR L2 및 마우스 CDR L3을 포함하고 인간화 중쇄 가변 영역은 마우스 CDR H2 및 마우스 CDR H3을 포함한다. 임의적으로, 인간화 경쇄 가변 영역은 마우스 CDR L1, 마우스 CDR L2 및 마우스 CDR L3을 포함하고 인간화 중쇄 가변 영역은 마우스 CDR H1, 마우스 CDR H2 및 마우스 CDR H3을 포함한다. 임의적으로, 인간화 경쇄 가변 영역은 서열번호 1에 제시된 마우스 CDR L1, 서열번호 2에 제시된 마우스 CDR L2 및 서열번호 3에 제시된 마우스 CDR L3을 포함하고, 인간화 중쇄 가변 영역은 서열번호 4에 제시된 마우스 CDR H1, 서열번호 5에 제시된 마우스 CDR H2, 및 서열번호 6에 제시된 마우스 CDR H3을 포함한다. 임의적으로, 인간화 경쇄 가변 영역은 서열번호 7에 제시된 마우스 CDR L1, 서열번호 8에 제시된 마우스 CDR L2 및 서열번호 9에 제시된 마우스 CDR L3을 포함하고, 인간화 중쇄 가변 영역은 서열번호 10에 제시된 마우스 CDR H1, 서열번호 11에 제시된 마우스 CDR H2, 및 서열번호 12에 제시된 마우스 CDR H3을 포함한다.

[0017] CDR 및 FR의 위치는 카밧(Kabat) 번호 체계(Kabat numbering system)에 의해 정의될 수 있다(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)). 유사하게, 항체의 경쇄 또는 중쇄 내의 개별 잔기가 차지하는 위치가 카밧 번호 체계에 의해 정의될 수 있다. 따라서, 인간화 항체의 인간화 경쇄 및 인간화 중쇄 내 결합에 필요한 잔기의 위치는 당해 분야에 공지된 카밧 번호 체계에 따른 잔기의 위치에 의해 정의될 수 있다. 전술한 바와 같이, 인간화 항체는 공여자 항체(예컨대, 마우스)의 CDR 및 인간 항체의 가변 영역 프레임워크(FR)를 갖는 항체일 수 있다. 프레임워크 영역(FR)은 CDR을 인간화 항체에서 제 위치에 유지한다고 한다. 아미노-말단으로부터 진행하여, 이들 영역은 각각 경쇄에 대해 FR L1, FR L2, FR L3, 및 FR L4로 표시되고, 중쇄에 대해 FR H1, FR H2, FR H3, 및 FR H4로 표시된다. 본원에서 프레임워크 영역 내에 하나 이상의 잔기를 포함하는 인간화 항체가 제공된다. 임의적으로, 이러한 잔기는 인간화 항체의 에피토프 결합에 중요하다. 에피토프 결합(예컨대, BAFF-R 결합)에 관여하는(또는 중요한) 프레임워크 영역 잔기는 본원에서 결합 프레임워크 영역 잔기로 지칭된다. 결합 프레임워크 영역 잔기는 인간화 경쇄 가변 영역(즉, FR L1, FR L2, FR L3, FR L4)의 프레임워크 영역에 잔류하거나 이들은 인간화 중쇄 가변 영역(즉, FR H1, FR H2, FR H3, FR H4)의 프레임워크에 잔류할 수 있다. 인간화 경쇄의 FR L3 영역에 잔류하는 결합 프레임워크 잔기는 본원에서 FR L3 결합 프레임워크 영역 잔기로 지칭된다. 따라서, 인간화 중쇄의 FR H3 영역에 잔류하는 결합 프레임워크 영역 잔기는 본원에서 FR H3 결합 프레임워크 영역 잔기로 지칭된다.

[0018] 임의적으로, 인간화 항체는 적어도 하나의 결합 프레임워크 영역 잔기를 포함한다. 임의적으로, 인간화 경쇄 가변 영역은 적어도 하나의 결합 프레임워크 영역 잔기를 포함한다. 임의적으로, 인간화 경쇄 가변 영역은 하나 이상의 FR L1, FR L2, FR L3 또는 FR L4 결합 프레임워크 영역 잔기를 포함한다. 임의적으로, 인간화 경쇄 가변 영역은 하나 이상의 FR L1 결합 프레임워크 영역 잔기를 포함한다. 임의적으로, 인간화 경쇄 가변 영역은 하나 이상의 FR L2 결합 프레임워크 영역 잔기를 포함한다. 임의적으로, 인간화 경쇄 가변 영역은 하나 이상의 FR L3 결합 프레임워크 영역 잔기를 포함한다. 임의적으로, 인간화 경쇄 가변 영역은 하나 이상의 FR L4 결합 프레임워크 영역 잔기를 포함한다. 임의적으로, 인간화 중쇄 가변 영역은 하나 이상의 FR H1, FR H2, FR H3 또는 FR H4 결합 프레임워크 영역 잔기를 포함한다. 임의적으로, 인간화 중쇄 가변 영역은 하나 이상의 FR H1 결합 프레임워크 영역 잔기를 포함한다. 임의적으로, 인간화 중쇄 가변 영역은 하나 이상의 FR H2 결합 프레임워크 영역 잔기를 포함한다. 임의적으로, 인간화 중쇄 가변 영역은 하나 이상의 FR H3 결합 프레임워크 영역 잔기를 포함한다. 임의적으로, 인간화 중쇄 가변 영역은 하나 이상의 FR H4 결합 프레임워크 영역 잔기를 포함한다.

[0019] 인간화 경쇄 가변 영역은 적어도 하나의 결합 프레임워크 영역 잔기(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,

11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 또는 그 이상의 잔기)를 포함할 수 있고 인간화 중쇄 가변 영역은 적어도 하나의 결합 프레임워크 영역 잔기(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 또는 그 이상의 잔기)를 포함한다. 인간화 항체 내의 결합 프레임워크 영역 잔기의 위치는 CDR 잔기의 위치와 유사하게 카밧 번호 체계에 의해 정의될 수 있다.

[0020] 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 카바트 위치 7에 대응하는 위치에서 세린을 포함한다. 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 카바트 위치 8에 대응하는 위치에서 프롤린을 포함한다. 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 카바트 위치 15에 대응하는 위치에서 발린을 포함한다. 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 카바트 위치 22에 대응하는 위치에서 트레오닌을 포함한다. 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 카바트 위치 24에 대응하는 위치에서 글루타민을 포함한다. 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 카바트 위치 41에 대응하는 위치에서 글리신을 포함한다. 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 카바트 위치 42에 대응하는 위치에서 리신을 포함한다. 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 카바트 위치 43에 대응하는 위치에서 알라닌을 포함한다. 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 카바트 위치 44에 대응하는 위치에서 프롤린을 포함한다. 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 카바트 위치 56에 대응하는 위치에서 트레오닌을 포함한다. 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 카바트 위치 72에 대응하는 위치에서 트레오닌을 포함한다. 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 카바트 위치 73에 대응하는 위치에서 페닐알라닌을 포함한다. 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 카바트 위치 79에 대응하는 위치에서 글루타민을 포함한다. 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 카바트 위치 104에 대응하는 위치에서 발린을 포함한다.

[0021] 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 카밧 위치 7에 대응하는 위치에서 세린, 카밧 위치 8에 대응하는 위치에서 프롤린, 카밧 위치 15에 대응하는 위치에서 발린, 카밧 위치 22에 대응하는 위치에서 트레오닌, 카밧 위치 24에 대응하는 위치에서 글루타민 또는 세린, 카밧 위치 41에 대응하는 위치에서 글리신, 카밧 위치 42에 대응하는 위치에서 리신, 카밧 위치 43에 대응하는 위치에서 알라닌 또는 트레오닌, 카밧 위치 44에 대응하는 위치에서 프롤린, 카밧 위치 56에 대응하는 위치에서 트레오닌, 카밧 위치 72에 대응하는 위치에서 트레오닌, 카밧 위치 73에 대응하는 위치에서 페닐알라닌 또는 리신, 카밧 위치 79에 대응하는 위치에서 글루타민 또는 카밧 위치 104에 대응하는 위치에서 발린을 포함한다.

[0022] 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 카밧 위치 7에 대응하는 위치에서 세린, 카밧 위치 8에 대응하는 위치에서 프롤린, 카밧 위치 15에 대응하는 위치에서 발린, 카밧 위치 22에 대응하는 위치에서 트레오닌, 카밧 위치 24에 대응하는 위치에서 글루타민 또는 세린, 카밧 위치 41에 대응하는 위치에서 글리신, 카밧 위치 42에 대응하는 위치에서 리신, 카밧 위치 43에 대응하는 위치에서 알라닌 또는 트레오닌, 카밧 위치 44에 대응하는 위치에서 프롤린, 카밧 위치 56에 대응하는 위치에서 트레오닌, 카밧 위치 72에 대응하는 위치에서 트레오닌, 카밧 위치 73에 대응하는 위치에서 페닐알라닌 또는 리신, 카밧 위치 79에 대응하는 위치에서 글루타민 및 카밧 위치 104에 대응하는 위치에서 발린을 포함한다.

[0023] 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 카밧 위치 7에 대응하는 위치에서 세린, 카밧 위치 8에 대응하는 위치에서 프롤린, 카밧 위치 15에 대응하는 위치에서 발린, 카밧 위치 22에 대응하는 위치에서 트레오닌, 카밧 위치 24에 대응하는 위치에서 글루타민 또는 세린, 카밧 위치 41에 대응하는 위치에서 글리신, 카밧 위치 42에 대응하는 위치에서 리신, 카밧 위치 43에 대응하는 위치에서 알라닌 또는 트레오닌, 카밧 위치 44에 대응하는 위치에서 프롤린, 카밧 위치 56에 대응하는 위치에서 트레오닌, 카밧 위치 72에 대응하는 위치에서 트레오닌, 카밧 위치 73에 대응하는 위치에서 페닐알라닌 또는 리신, 카밧 위치 79에 대응하는 위치에서 글루타민 또는 카밧 위치 104에 대응하는 위치에서 발린인 결합 프레임워크 영역 잔기를 포함한다.

[0024] 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 10에 대응하는 위치에서 트레오닌 또는 알라닌을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 11에 대응하는 위치에서 리신을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 12에 대응하는 위치에서 발린을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 15에 대응하는 위치에서 트레오닌을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 19에 대응하는 위치에서 트레오닌을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 23에 대응하는 위치에서 트레오닌을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 41에 대응하는 위치에서 프롤린을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 44에 대응하는 위치에서 알라닌을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 61에 대응하는 위치에서 프롤린 또는 트레오닌을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 66에 대응하는 위치에서 아르기닌을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 70에 대응하는 위치에서 트레오닌을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 75에 대응하는 위치에서 리신을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧

위치 79에 대응하는 위치에서 발린을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 81에 대응하는 위치에서 트레오닌을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 82에 대응하는 위치에서 메티오닌을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 82B에 대응하는 위치에서 아스파라긴을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 82C에 대응하는 위치에서 메티오닌을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 84에 대응하는 위치에서 프롤린을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 85에 대응하는 위치에서 발린을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 108에 대응하는 위치에서 리신을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 109에 대응하는 위치에서 발린을 포함한다.

[0025] 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 10에 대응하는 위치에서 트레오닌 또는 알라닌, 카밧 위치 11에 대응하는 위치에서 리신, 카밧 위치 12에 대응하는 위치에서 발린, 카밧 위치 15에 대응하는 위치에서 트레오닌, 카밧 위치 19에 대응하는 위치에서 트레오닌, 카밧 위치 23에 대응하는 위치에서 트레오닌, 카밧 위치 41에 대응하는 위치에서 프롤린, 카밧 위치 44에 대응하는 위치에서 알라닌, 카밧 위치 61에 대응하는 위치에서 프롤린, 세린 또는 트레오닌, 카밧 위치 66에 대응하는 위치에서 아르기닌, 카밧 위치 70에 대응하는 위치에서 트레오닌, 카밧 위치 75에 대응하는 위치에서 리신, 카밧 위치 79에 대응하는 위치에서 발린, 카밧 위치 81에 대응하는 위치에서 트레오닌 또는 리신, 카밧 위치 82에 대응하는 위치에서 메티오닌, 카밧 위치 82B에 대응하는 위치에서 아스파라긴, 카밧 위치 82C에 대응하는 위치에서 메티오닌, 카밧 위치 84에 대응하는 위치에서 프롤린, 카밧 위치 85에 대응하는 위치에서 발린, 카밧 위치 108에 대응하는 위치에서 리신 또는 카밧 위치 109에 대응하는 위치에서 발린을 포함한다.

[0026] 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 10에 대응하는 위치에서 트레오닌 또는 알라닌, 카밧 위치 11에 대응하는 위치에서 리신, 카밧 위치 12에 대응하는 위치에서 발린, 카밧 위치 15에 대응하는 위치에서 트레오닌, 카밧 위치 19에 대응하는 위치에서 트레오닌, 카밧 위치 23에 대응하는 위치에서 트레오닌, 카밧 위치 41에 대응하는 위치에서 프롤린, 카밧 위치 44에 대응하는 위치에서 알라닌, 카밧 위치 61에 대응하는 위치에서 프롤린, 세린 또는 트레오닌, 카밧 위치 66에 대응하는 위치에서 아르기닌, 카밧 위치 70에 대응하는 위치에서 트레오닌, 카밧 위치 75에 대응하는 위치에서 리신, 카밧 위치 79에 대응하는 위치에서 발린, 카밧 위치 81에 대응하는 위치에서 트레오닌 또는 리신, 카밧 위치 82에 대응하는 위치에서 메티오닌, 카밧 위치 82B에 대응하는 위치에서 아스파라긴, 카밧 위치 82C에 대응하는 위치에서 메티오닌, 카밧 위치 84에 대응하는 위치에서 프롤린, 카밧 위치 85에 대응하는 위치에서 발린, 카밧 위치 108에 대응하는 위치에서 리신 및 카밧 위치 109에 대응하는 위치에서 발린을 포함한다.

[0027] 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 10에 대응하는 위치에서 트레오닌 또는 알라닌, 카밧 위치 11에 대응하는 위치에서 리신, 카밧 위치 12에 대응하는 위치에서 발린, 카밧 위치 15에 대응하는 위치에서 트레오닌, 카밧 위치 19에 대응하는 위치에서 트레오닌, 카밧 위치 23에 대응하는 위치에서 트레오닌, 카밧 위치 41에 대응하는 위치에서 프롤린, 카밧 위치 44에 대응하는 위치에서 알라닌, 카밧 위치 61에 대응하는 위치에서 프롤린, 세린 또는 트레오닌, 카밧 위치 66에 대응하는 위치에서 아르기닌, 카밧 위치 70에 대응하는 위치에서 트레오닌, 카밧 위치 75에 대응하는 위치에서 리신, 카밧 위치 79에 대응하는 위치에서 발린, 카밧 위치 81에 대응하는 위치에서 트레오닌 또는 리신, 카밧 위치 82에 대응하는 위치에서 메티오닌, 카밧 위치 82B에 대응하는 위치에서 아스파라긴, 카밧 위치 82C에 대응하는 위치에서 메티오닌, 카밧 위치 84에 대응하는 위치에서 프롤린, 카밧 위치 85에 대응하는 위치에서 발린, 카밧 위치 108에 대응하는 위치에서 리신 또는 카밧 위치 109에 대응하는 위치에서 발린인 결합 프레임워크 영역 잔기를 포함한다.

[0028] 마우스 CDR L1, 마우스 CDR L2, 또는 마우스 CDR L3을 포함하는 인간화 경쇄 가변 영역과 마우스 CDR H1, 마우스 CDR H2, 또는 마우스 CDR H3을 포함하는 인간화 중쇄 가변 영역을 포함하는 인간화 BAFF-R 항체가 제공된다. 인간화 경쇄 가변 영역은 서열번호 1에 제시된 마우스 CDR L1, 서열번호 2에 제시된 마우스 CDR L2, 또는 서열번호 3에 제시된 마우스 CDR L3을 포함할 수 있다. 인간화 경쇄 가변 영역은 서열번호 1에 제시된 마우스 CDR L1, 서열번호 2에 제시된 마우스 CDR L2, 및 서열번호 3에 제시된 마우스 CDR L3을 포함할 수 있다. 인간화 중쇄 가변 영역은 서열번호 4에 제시된 마우스 CDR H1, 서열번호 5에 제시된 마우스 CDR H2, 또는 서열번호 6에 제시된 마우스 CDR H3을 포함할 수 있다. 인간화 중쇄 가변 영역은 서열번호 4에 제시된 마우스 CDR H1, 서열번호 5에 제시된 마우스 CDR H2, 및 서열번호 6에 제시된 마우스 CDR H3을 포함할 수 있다. 임의적으로, 인간화 경쇄 가변 영역은 서열번호 1에 제시된 마우스 CDR L1을 포함한다. 임의적으로, 인간화 경쇄 가변 영역은 서열번호 2에 제시된 마우스 CDR L2를 포함한다. 임의적으로, 인간화 경쇄 가변 영역은 서열번호 3에 제시된 마우스 CDR L3을 포함한다. 임의적으로, 인간화 중쇄 가변 영역은 서열번호 4에 제시된 마우스 CDR H1을 포함한다. 임의적으로, 인간화 중쇄 가변 영역은 서열번호 5에 제시된 마우스 CDR H2를 포함한다. 임의적으로, 인간화 경쇄

가변 영역은 서열번호 6에 제시된 마우스 CDR H3을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 인간화 경쇄 가변 영역은 적어도 하나의 결합 프레임워크 영역 잔기를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 인간화 중쇄 가변 영역은 적어도 하나의 결합 프레임워크 영역 잔기를 포함한다.

[0029] 마우스 CDR L1, 마우스 CDR L2, 또는 마우스 CDR L3을 포함하는 인간화 경쇄 가변 영역과 마우스 CDR H1, 마우스 CDR H2, 또는 마우스 CDR H3을 포함하는 인간화 중쇄 가변 영역을 포함하는 인간화 BAFF-R 항체가 제공된다. 인간화 경쇄 가변 영역은 서열번호 7에 제시된 마우스 CDR L1, 서열번호 8에 제시된 마우스 CDR L2, 또는 서열번호 9에 제시된 마우스 CDR L3을 포함할 수 있다. 인간화 경쇄 가변 영역은 서열번호 7에 제시된 마우스 CDR L1, 서열번호 8에 제시된 마우스 CDR L2, 및 서열번호 9에 제시된 마우스 CDR L3을 포함할 수 있다. 인간화 중쇄 가변 영역은 서열번호 10에 제시된 마우스 CDR H1, 서열번호 11에 제시된 마우스 CDR H2, 또는 서열번호 12에 제시된 마우스 CDR H3을 포함할 수 있다. 인간화 중쇄 가변 영역은 서열번호 10에 제시된 마우스 CDR H1, 서열번호 11에 제시된 마우스 CDR H2, 및 서열번호 12에 제시된 마우스 CDR H3을 포함할 수 있다. 임의적으로, 인간화 경쇄 가변 영역은 서열번호 7에 제시된 마우스 CDR L1을 포함한다. 임의적으로, 인간화 경쇄 가변 영역은 서열번호 8에 제시된 마우스 CDR L2를 포함한다. 임의적으로, 인간화 경쇄 가변 영역은 서열번호 9에 제시된 마우스 CDR L3을 포함한다. 임의적으로, 인간화 중쇄 가변 영역은 서열번호 10에 제시된 마우스 CDR H1을 포함한다. 임의적으로, 인간화 중쇄 가변 영역은 서열번호 11에 제시된 마우스 CDR H2를 포함한다. 임의적으로, 인간화 경쇄 가변 영역은 서열번호 12에 제시된 마우스 CDR H3을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 인간화 경쇄 가변 영역은 적어도 하나의 결합 프레임워크 영역 잔기를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 인간화 중쇄 가변 영역은 적어도 하나의 결합 프레임워크 영역 잔기를 포함한다.

[0030] 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 서열번호 18, 서열번호 20 또는 서열번호 22의 서열을 포함한다. 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 서열번호 18의 서열을 포함한다. 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 서열번호 20의 서열을 포함한다. 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 서열번호 22의 서열을 포함한다. 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 서열번호 18의 서열이다. 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 서열번호 20의 서열이다. 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 서열번호 22의 서열이다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 서열번호 24, 서열번호 26 또는 서열번호 28의 서열을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 서열번호 24의 서열을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 서열번호 26의 서열을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 서열번호 28의 서열을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 서열번호 24의 서열이다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 서열번호 26의 서열이다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 서열번호 28의 서열이다. 따라서, 또 다른 양상에 있어서, 인간화 경쇄 가변 영역 및 인간화 중쇄 가변 영역을 포함하는 인간화 BAFF-R 항체가 제공되며, 이때 인간화 경쇄 가변 영역은 서열번호 18의 서열을 포함하며 중쇄 가변 영역은 서열번호 24의 서열을 포함한다. 또 다른 양상에 있어서, 인간화 경쇄 가변 영역 및 인간화 중쇄 가변 영역을 포함하는 인간화 BAFF-R 항체가 제공되며, 이때 인간화 경쇄 가변 영역은 서열번호 20의 서열을 포함하며 중쇄 가변 영역은 서열번호 26의 서열을 포함한다. 또 다른 양상에 있어서, 인간화 경쇄 가변 영역 및 인간화 중쇄 가변 영역을 포함하는 인간화 BAFF-R 항체가 제공되며, 이때 인간화 경쇄 가변 영역은 서열번호 22의 서열을 포함하며 중쇄 가변 영역은 서열번호 28의 서열을 포함한다.

[0031] 임의적으로, 항체는 키메라 항체이다. 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 서열번호 14의 서열을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 서열번호 16의 서열을 포함한다. 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 서열번호 14의 서열이다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 서열번호 16의 서열이다. 따라서, 또 다른 양상에 있어서, 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하는 키메라 BAFF-R 항체가 제공되며, 이때 경쇄 가변 영역은 서열번호 14의 서열을 포함하며 중쇄 가변 영역은 서열번호 16의 서열을 포함한다.

[0032] 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 서열번호 30의 서열을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 서열번호 32의 서열을 포함한다. 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 서열번호 30의 서열이다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 서열번호 32의 서열이다. 따라서, 또 다른 양상에 있어서, 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하는 키메라 BAFF-R 항체가 제공되며, 이때 경쇄 가변 영역은 서열번호 30의 서열을 포함하며 중쇄 가변 영역은 서열번호 32의 서열을 포함한다.

[0033] 본원에서 항체가 인용되는 각각의 경우에, 기능성 단편이 사용될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 중쇄(예컨대, 불변 및 가변 영역을 포함) 및 경쇄(예컨대, 불변 및 가변 영역을 포함)를 포함할 수 있는 Fab' 단편이 제공된다. 임의적으로, Fab' 단편은 인간화 중쇄(예컨대, 불변 및 가변 영역을 포함) 및 인간화 경쇄(예컨대, 불변 및 가변 영역을 포함)를 포함한다.

[0034] 임의적으로, BAFF-R 항체 또는 그 단편은 인간 불변 영역을 포함한다. 임의적으로, BAFF-R 항체 또는 그 단편은

IgG이다. 임의적으로, BAFF-R 항체 또는 그 단편은 IgG1이다. 임의적으로, BAFF-R 항체 또는 그 단편은 IgG2이다. 임의적으로, BAFF-R 항체 또는 그 단편은 IgG3이다. 임의적으로, BAFF-R 항체 또는 그 단편은 IgG4이다. 임의적으로, BAFF-R 항체 또는 그 단편은 IgA이다. 임의적으로, BAFF-R 항체 또는 그 단편은 IgM이다.

[0035] 임의적으로, BAFF-R 항체 또는 그 단편은 단일 쇄 항체이다. 단일 쇄 항체는 가변 경쇄 및 가변 중쇄를 포함한다. 해당 기술 분야의 통상의 기술자는 단일 쇄 항체가 단일 경쇄 및 단일 중쇄를 포함하며, 면역글로불린 항체와 대조적으로, 두 쌍의 동일한 폴리펩티드 쇄를 포함하며, 각 쌍은 하나의 경쇄 및 하나의 중쇄를 갖는다는 것을 즉시 인식할 것이다. 각 경쇄 및 중쇄는 순서대로 2개의 영역[표적 항원과의 결합에 관여하는 가변("V") 영역(즉, 가변 경쇄 및 가변 중쇄) 및 면역계의 다른 성분과 상호작용하는 불변("C") 영역]으로 구성된다. 단일 쇄 항체의 가변 경쇄와 가변 중쇄는 링커 펩티드를 통하여 연결될 수도 있다. 단일 쇄 항체의 링커 펩티드의 예는 문헌[Bird, R. E., et al., Science. 242(4877):423-6 (1988)]에 개시되어 있다. scFv 항체 제조 방법에 개시되어 있(문헌[Huse *et al., Science* 246:1275-1281 (1989); Ward *et al., Nature* 341:544-546 (1989)]; 및 문헌[Vaughan *et al., Nature Biotech.* 14:309-314 (1996)] 참조). 간략하게, 면역화된 동물로부터의 B 세포로부터의 mRNA를 분리하고 cDNA를 제조한다. cDNA는 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역에 특이적인 프라이머를 사용하여 증폭된다. PCR 산물을 정제하고 핵산 서열을 결합시킨다. 링커 펩티드가 요구되면, 펩티드를 인코딩하는 핵산 서열을 중쇄 핵산 서열과 경쇄 핵산 서열 사이에 삽입시킨다. scFv를 인코딩하는 핵산은 벡터에 삽입되어 적절한 hosT 세포에서 발현된다.

[0036] 특정 에피토프(예컨대, BAFF-R)에 결합하는 항체 또는 그 기능성 단편의 능력은 평형 해리 상수(K_D)에 의해 기술될 수 있다. 본원에 정의된 평형 해리 상수(K_D)는 BAFF-R 단백질에 대한 BAFF-R 항체의 해리 속도(K-off)와 결합 속도(K-on)의 비율이다. 이는 다음 공식으로 기술된다: K_D = K-off/K-on. 임의적으로, BAFF-R 항체는 약 5 nM 미만의 평형 해리 상수(K_D)로 BAFF-R 단백질에 결합할 수 있다. 임의적으로, BAFF-R 항체는 약 4.5 nM 미만의 평형 해리 상수(K_D)로 BAFF-R 단백질에 결합할 수 있다. 임의적으로, BAFF-R 항체는 약 4 nM 미만의 평형 해리 상수(K_D)로 BAFF-R 단백질에 결합할 수 있다. 임의적으로, BAFF-R 항체는 약 3.5 nM 미만의 평형 해리 상수(K_D)로 BAFF-R 단백질에 결합할 수 있다. 임의적으로, BAFF-R 항체는 약 3 nM 미만의 평형 해리 상수(K_D)로 BAFF-R 단백질에 결합할 수 있다. 임의적으로, BAFF-R 항체는 약 2.5 nM 미만의 평형 해리 상수(K_D)로 BAFF-R 단백질에 결합할 수 있다. 임의적으로, BAFF-R 항체는 약 2 nM 미만의 평형 해리 상수(K_D)로 BAFF-R 단백질에 결합할 수 있다. 임의적으로, BAFF-R 항체는 약 1.5 nM 미만의 평형 해리 상수(K_D)로 BAFF-R 단백질에 결합할 수 있다. 임의적으로, BAFF-R 항체는 약 1 nM 미만의 평형 해리 상수(K_D)로 BAFF-R 단백질에 결합할 수 있다. 임의적으로, BAFF-R 항체는 약 0.5 nM 미만의 평형 해리 상수(K_D)로 BAFF-R 단백질에 결합할 수 있다.

[0037] 임의적으로, BAFF-R 항체 또는 그 기능성 단편은 약 0.5 nM의 평형 해리 상수(K_D)로 BAFF-R 단백질에 결합할 수 있다. 임의적으로, BAFF-R 항체 또는 그 기능성 단편은 약 1 nM의 평형 해리 상수(K_D)로 BAFF-R 단백질에 결합할 수 있다. 임의적으로, BAFF-R 항체 또는 그 기능성 단편은 약 1.5 nM의 평형 해리 상수(K_D)로 BAFF-R 단백질에 결합할 수 있다. 임의적으로, BAFF-R 항체 또는 그 기능성 단편은 약 2 nM의 평형 해리 상수(K_D)로 BAFF-R 단백질에 결합할 수 있다. 임의적으로, BAFF-R 항체 또는 그 기능성 단편은 약 2.5 nM의 평형 해리 상수(K_D)로 BAFF-R 단백질에 결합할 수 있다. 임의적으로, BAFF-R 항체 또는 그 기능성 단편은 약 3 nM의 평형 해리 상수(K_D)로 BAFF-R 단백질에 결합할 수 있다. 임의적으로, BAFF-R 항체 또는 그 기능성 단편은 약 3.5 nM의 평형 해리 상수(K_D)로 BAFF-R 단백질에 결합할 수 있다. 임의적으로, BAFF-R 항체 또는 그 기능성 단편은 약 4 nM의 평형 해리 상수(K_D)로 BAFF-R 단백질에 결합할 수 있다. 임의적으로, BAFF-R 항체 또는 그 기능성 단편은 약 4.5 nM의 평형 해리 상수(K_D)로 BAFF-R 단백질에 결합할 수 있다. 임의적으로, BAFF-R 항체 또는 그 기능성 단편은 약 5 nM의 평형 해리 상수(K_D)로 BAFF-R 단백질에 결합할 수 있다. 임의적으로, BAFF-R 항체 또는 그 기능성 단편은 약 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 또는 5 nM의 평형 해리 상수(K_D)로 BAFF-R 단백질에 결합할 수 있다.

[0038] 임의적으로, 약 4 nM 미만의 K_D로 BAFF-R에 결합할 수 있는 인간화 B 세포 활성화 인자 수용체(BAFF-R) 항체가

제공된다. 임의적으로, 약 4 nM 미만의 K_D에서 BAFF-R에 결합된 인간화 B 세포 활성화 인자 수용체(BAFF-R) 항체가 제공된다. 임의적으로, 항체는 BAFF-R 활성을 유발하지 않는다.

[0039] 임의적으로, BAFF-R 항체는 BAFF-R 단백질에 결합된다. 임의적으로, BAFF-R 단백질은 인간 BAFF-R 단백질이다. 임의적으로, BAFF-R 단백질은 NCBI 유전자 ID 번호 115650에 의해 확인된 핵산 서열에 의해 인코딩된다. 임의적으로, BAFF-R 단백질은 세포의 일부를 형성한다. 임의적으로, BAFF-R 단백질은 상기 세포의 표면에서 발현된다. 임의적으로, 세포는 림프성 세포이다. 임의적으로, 세포는 B 세포이다. 임의적으로, 세포는 암 세포이다. 임의적으로, 암 세포는 림프종 세포이다.

[0040] 매우 다양한 진단적 및 치료적 원자단 및 이들의 조합은 그의 구체예를 포함하여 본원에 제공된 BAFF-R 항체 또는 그 기능성 단편에 접합될 수 있고, 이에 의해 매우 안정하고/거나 다용도의 약물 전달 및/또는 진단 조성물을 제공할 수 있다. 임의적으로, BAFF-R 항체 또는 그 기능성 단편은 치료적 원자단 또는 진단적 원자단을 포함한다. 임의적으로, 치료적 원자단 또는 진단적 원자단은 화학적 링커를 통하여 BAFF-R 항체 또는 그 기능성 단편에 결합된다. 임의적으로, 화학적 링커는 공유결합 링커 또는 비-공유결합 링커이다. 치료적 원자단을 항체에 접합(conjugating)시키는 기술은 공지되어 있다(예컨대, 문헌[Arnon et al., Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy, in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985)]; 문헌[Hellstrom et al., Antibodies For Drug Delivery in Controlled Drug Delivery (2^{nd} Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987)]; 문헌[Thorpe, Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985)]; 및 문헌[Thorpe et al., The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates, Immunol. Rev., 62:119-58 (1982)] 참고). 본원에 사용된 용어 "항체-약물 접합체(conjugate)" 또는 "ADC"는 항원 또는 그 기능성 단편에 접합되거나 그렇지 않으면 공유 결합된 치료적 원자단을 의미한다.

[0041] 용어 "치료적 원자단"은 본원에 제공된 바와 같이 평범한 통상적인 의미에 따라 사용되며 필요한 대상체에 제공될 때 치료 효과(예컨대, 치료되는 근본적인 질환의 예방, 박멸, 개선)를 갖는 1가 화합물을 의미한다. 치료적 원자단은 본원에 제공된 바와 같이 비제한적으로 펩티드, 단백질, 핵산, 핵산 유사체, 소분자(small molecule), 항체, 효소, 전구약물, 세포독성제(예컨대, 독신)[예컨대, 비제한적으로 리친(ricin), 독소루비신, 다우노루비신, 탁솔, 에티듐 브로마이드, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 디하이드록시 안트라신 디온, 액티노마이신 D, 디프테리아 독신, 슈도모나스 엑소톡신(PE) A, PE40, 아브린, 및 글루코코르티코이드]를 포함할 수도 있다. 임의적으로, 치료적 원자단은 본원에 개시된 바와 같은 항암제 또는 화학요법제이다. 임의적으로, 치료적 원자단은 핵산 원자단, 펩티드 원자단 또는 소분자 약물 원자단이다. 임의적으로, 치료적 원자단은 핵산 원자단이다. 임의적으로, 치료적 원자단은 항체 원자단이다. 임의적으로, 치료적 원자단은 펩티드 원자단이다. 임의적으로, 치료적 원자단은 소분자 약물 원자단이다. 임의적으로, 치료적 원자단은 뉴클레아제이다. 임의적으로, 치료적 원자단은 면역자극제이다. 임의적으로, 치료적 원자단은 독신이다. 임의적으로, 치료적 원자단은 뉴클레아제이다.

[0042] 그 구체예를 포함하여 본원에 제공된 BAFF-R 항체 또는 그 기능성 단편을 인코딩하는 단리된 핵산이 제공된다. 단리된 핵산에 의해 인코딩된 BAFF-R 항체 또는 그 기능성 단편은 본원(전술한 설명 및 실시예 부분)에서 상세하게 개시된다. 예를 들어, 핵산은 적어도 하나의 CDR, 에피토프의 결합에 관여하는 특정 잔기, 또는 결합 프레임워크 잔기를 인코딩할 수 있다. 예를 들어, 핵산은 서열번호 1의 서열을 포함하는 경쇄를 인코딩할 수 있다.

[0043] 임의적으로, 단리된 핵산은 서열번호 13, 서열번호 15, 서열번호 29 또는 서열번호 31의 서열을 포함한다. 임의적으로, 단리된 핵산은 서열번호 13의 서열 및 서열번호 15의 서열을 포함한다. 임의적으로, 단리된 핵산은 서열번호 29의 서열 및 서열번호 31의 서열을 포함한다.

[0044] 임의적으로, 단리된 핵산은 서열번호 17, 서열번호 19, 서열번호 21, 서열번호 23, 서열번호 25, 또는 서열번호 27의 서열을 포함한다. 임의적으로, 단리된 핵산은 서열번호 17의 서열 및 서열번호 23의 서열을 포함한다. 임의적으로, 단리된 핵산은 서열번호 19의 서열 및 서열번호 25의 서열을 포함한다. 임의적으로, 단리된 핵산은 서열번호 21의 서열 및 서열번호 27의 서열을 포함한다.

[0045] 본원에 제공된 BAFF-R 항체 또는 그 기능성 단편의 치료적 유효량 및 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약학 조성물이 제공된다.

[0046] 치료적 유효량은 본원에 제공되듯이 그 의도된 목적을 달성하는데 효과적인 양을 의미한다. 특히 특정 용도에

효과적인 실제 양은 치료되는 상태에 따라 달라질 수 있다. 질병을 치료하는 방법에서 투여될 때, 본원에 개시된 약학 조성물은 원하는 결과, 예컨대, 표적 분자(예컨대, BAFF-R)의 활성을 조절하고/거나, 질병 증상(예컨대, 암, 자가면역 질환)의 진행을 감소시키거나, 없애거나, 늦추는 것을 달성하기에 효과적인 양의 활성 인간화 항체를 함유할 것이다. 본원에 제공되는 BAFF-R 항체의 치료적 유효량의 결정은, 특히 본원의 상세한 설명에 비추어 볼 때, 해당 분야의 통상의 기술자의 능력범위 내에 있다.

[0047] 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정제는 사용된 용량과 농도에서 수혜자에게 무독성이며, 전형적으로 5.0 내지 8.0, 임의적으로 6.0 내지 7.0의 pH에서, 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 또는 아세테이트와 같은 완충제; 등장성을 만들기 위한, 예컨대 나트륨 클로라이드, 칼륨 클로라이드 등과 같은 염; 항산화제; 방부제; 저분자량 폴리펩티드; 단백질; 친수성 중합체, 예컨대 폴리소르베이트 80; 아미노산, 예컨대 글리신; 탄수화물; 킬레이트제; 당(sugar); 및 해당 분야의 통상의 기술자에게 공지된 기타 표준 성분들을 포함한다(*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, *22nd Edition*, Loyd V. Allen et al., editors, Pharmaceutical Press (2012)). mAb는 0.1 내지 100 mg/mL, 예컨대, 1 내지 10 mg/mL 또는 10 내지 50 mg/mL, 예를 들어 5, 10, 20, 30, 40, 50 또는 60 mg/mL의 농도로 존재할 수 있다.

[0048] 본원에 개시된 바와 같이 항체, 예컨대, 인간화 항체, 또는 그 기능성 단편을 포함하는 약학 조성물은 해당 분야에 공지된 다양한 방법에 의해 투여될 수 있다. 투여 경로 및/또는 방식은 원하는 결과에 따라 다양하다. 임의적으로, 투여는 정맥 내, 근육 내, 복강 내, 또는 피하로 이루어지거나, 표적 위치 근방에 투여된다. 약학적으로 허용가능한 부형제는 정맥 내, 근육 내, 피하, 비경구, 척추 또는 표피 투여(예컨대, 주사 또는 주입에 의함)에 적합할 수 있다.

[0049] 항체 또는 그 기능성 단편의 약학 조성물은 해당 분야에 공지되고 통상적으로 실시되는 방법에 따라 제조될 수 있다(예컨대, 문헌[*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, *22nd Edition*, Loyd V. Allen et al., editors, Pharmaceutical Press (2012)]; 및 문헌[*Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978] 참고). 약학 조성물은 바람직하게는 GMP 조건 하에서 제조된다. 전형적으로, 인간화 항체의 치료적 유효 투여량 또는 효과적 투여량이 약학 조성물에 사용된다. 제공된 인간화 항체는 해당 분야의 통상의 기술자에게 공지된 통상적인 방법에 의해 약학적으로 허용되는 제형으로 제제화될 수 있다. 용량 요법은 최적의 원하는 반응(예를 들어, 치료 반응)을 제공하도록 조정된다. 예를 들어, 단일 볼러스(bolus)가 투여될 수 있고, 여러번 분할된 용량이 시간이 지남에 따라 투여될 수 있거나, 용량이 치료 상황의 긴급성에 의해 지시된 바와 같이 비례적으로 감소되거나 증가될 수 있다. 또 다른 치료제 또는 약제와 조합하여 인간화 항체를 제형화하는 것이 유리할 수 있다. 비경구 조성물을 투여의 용이함 및 투여량의 균일성을 위해 투여량 단위 형태로 제형화하는 것이 유리할 수 있다. 투여량 단위 형태는 본원에 사용된 바와 같이 투여량 단위 형태는 본원에 사용된 바와 같이 치료될 대상체를 위한 단일 투여량으로 적합한 물리적으로 별개의 단위를 의미하며; 각 단위는 요구된 약학 부형제와 관련하여 원하는 치료 효과를 생성하도록 계산된 소정의 양의 인간화 항체를 함유한다.

[0050] 약학 조성물에서 활성 성분의 실제 투여량 수준은, 환자에게 유독하지 않으면서, 특정 환자, 조성물, 및 투여 방식에 대해 원하는 치료 반응을 달성하는데 효과적인 양의 활성 성분을 얻도록 다양할 수 있다. 선택된 투여량 수준은 사용된 특정 조성물의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용되는 특정 항체의 배설 속도, 치료 기간, 사용되는 특정 조성물과 결합되어 사용되는 또 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 나이, 성별, 체중, 상태, 치료되는 환자의 전반적인 건강 및 이전의 병력, 및 유사한 인자를 포함하는 다양한 약동학적 요인에 따라 달라질 수 있다.

[0051] 의사 또는 수의사는 원하는 치료 효과를 얻기 위해 요구되는 것보다 낮은 수준에서 약학 조성물에 사용되는 항체 또는 그의 기능성 단편의 투여를 시작할 수 있고, 원하는 효과가 달성될 때까지 점차적으로 투여량을 증가시킬 수 있다. 일반적으로, 조성물의 유효 투여량은 치료할 특정 질병 또는 질환, 투여 수단, 표적 부위, 환자의 생리학적 상태, 환자가 사람인지 동물인지 여부, 투여되는 또 다른 의약품, 및 처리가 예방적인지 또는 치료적인지 여부를 포함하여, 많은 상이한 요인에 따라 달라질 수 있다. 치료 투여량은 안전성과 효능을 최적화하기 위해 적정되어야 한다. 항체 투여를 위해, 투여량은 숙주 체중의 약 0.0001 내지 100 mg/kg, 더욱 일반적으로는 0.01 내지 5 mg/kg 범위이다. 예를 들어 투여량은 1 mg/kg 체중 또는 10 mg/kg 체중이거나 1 내지 10 mg/kg 범위 이내일 수 있다. 예시적인 치료 요법은 2 주 또는 3 주마다 1회 또는 1 개월에 1회 또는 3 내지 6 개월마다 1회 투여를 수반한다.

[0052] 본원에 제공되는 BAFF-R 항원 또는 그 기능성 단편은 여러 차례 투여될 수 있다. 단회 투여 사이의 간격은

매주, 매월 또는 매년 일 수 있다. 간격은 또한 환자의 인간화 항체의 혈중 농도를 측정하여 지시되는 바에 따라 불규칙적일 수 있다. 일부 방법에서, 투여량은 1 내지 1,000 mg/mL 및 일부 방법에서 25 내지 300 mg/mL의 혈장 항체 농도를 달성하도록 조정된다. 대안으로, 항체는 서방형 제형으로 투여될 수 있으며, 이 경우 투여 빈도가 적다. 투여량과 빈도는 환자의 항체의 반감기에 따라 달라진다. 일반적으로, 인간화 항체는 키메라 항체 및 비인간 항체의 반감기보다 더 긴 반감기를 나타낸다. 투여량 및 투여 빈도는 처리가 예방적인지 또는 치료적인지 여부에 따라 달라질 수 있다. 예방적 적용에서, 상대적으로 낮은 투여량이 장기간에 걸쳐 비교적 드문 간격으로 투여된다. 일부 환자는 나머지 평생 동안 치료를 계속 받는다. 치료적 적용에서, 질병의 진행이 감소되거나 종결될 때까지, 그리고 바람직하게는 환자가 질병 증상의 부분적인 또는 완전한 개선을 나타낼 때까지, 비교적 짧은 간격으로 상대적으로 높은 투여량이 때때로 요구된다. 그 후, 환자는 예방적 요법을 투여받을 수 있다.

[0053] 인간 BAFF-R 단백질 또는 그 단편을 발현하는 마우스 섬유아세포 세포가 제공되고 인간 BAFF-R 단백질 또는 그 단편이 상기 세포의 세포 표면에서 발현된다. 임의적으로, 인간 BAFF-R 단백질 또는 그 단편은 검출가능한 원자단을 포함한다. 임의적으로, 검출가능한 원자단은 형광 원자단이다. 임의적으로, 검출가능한 원자단은 향상된 녹색 형광 단백질(enhanced green fluorescent protein, eGFP)이다.

[0054] 이를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 본원에 제공된 키메라 항원 수용체의 치료적 유효량을 대상체에 투여하여 이에 의해 대상체의 암을 치료하는 단계를 포함한다.

[0055] 또 다른 양상에서, 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법이 제공되며, 이는 본원에 제공된 항체 또는 그 기능성 단편의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하여 이에 의해 대상체의 암을 치료하는 단계를 포함한다. 임의적으로, 암은 림프종, 백혈병 또는 골수종이다. 임의적으로, 암은 림프종이다. 임의적으로, 림프종은 맨틀 세포 림프종, 여포성 림프종, 확산성 거대 B 세포 림프종, 변연부 림프종 또는 버킷 림프종이다. 임의적으로, 림프종은 맨틀 세포 림프종이다. 임의적으로, 림프종은 여포성 림프종이다. 임의적으로, 림프종은 확산성 거대 B 세포 림프종이다. 임의적으로, 림프종은 변연부 림프종이다. 임의적으로, 림프종은 버킷 림프종이다.

[0056] 임의적으로, 암은 백혈병이다. 임의적으로, 백혈병은 림프모구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병 또는 다모 세포 백혈병이다. 임의적으로, 백혈병은 림프구성 백혈병이다. 임의적으로, 백혈병은 만성 림프구성 백혈병이다. 임의적으로, 백혈병은 다모 세포 백혈병이다.

[0057] 임의적으로, 암은 골수종이다. 임의적으로, 골수종은 다발성 골수종이다.

[0058] 임의적으로, 상기 방법은 제2 치료제를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 임의적으로, 상기 치료제는 CD 20 항원과 결합할 수 있는 키메라 단일클론 항체이다. 임의적으로, 치료제는 리툭시맙(rituximab)이다. 용어 "리툭시맙"은 통상적인 의미에서 ATC 코드 L01XC02에 의해 식별되는 단백질 CD20에 대한 단일클론 항체를 지칭한다.

[0059] 또한, 이를 필요로 하는 대상체에서 자가면역 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 본원에 제공되는 바와 같은 항체 또는 그 기능성 단편의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하여, 이에 의해 대상체의 자가면역 질환을 치료하는 단계를 포함한다. 임의적으로, 자가면역 질환은 류마티스 관절염, 전신성 홍반성 루프스, 다발성 경화증, 사구체신염, 쇼그렌 증후군 또는 자가면역 용혈성 빈혈이다. 임의적으로, 자가면역 질환은 류마티스 관절염이다. 임의적으로, 자가면역 질환은 전신성 홍반성 루프스이다. 임의적으로, 자가면역 질환은 다발성 경화증이다. 임의적으로, 자가면역 질환은 사구체신염이다. 임의적으로, 자가면역 질환은 쇼그렌 증후군이다. 임의적으로, 자가면역 질환은 자가면역 용혈성 빈혈이다. 임의적으로, 상기 방법은 제2 치료제를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0060] 또 다른 양상에서, 세포의 증식을 억제하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 세포를 그 구체예를 포함하여 본원에 제공되는 바와 같은 BAFF-R 항체 또는 그 기능성 단편과 접촉시켜, 이에 의해 접촉된 세포를 형성시키는 단계를 포함한다. BAFF-R 항체 또는 그 기능성 단편을 접촉된 세포 상의 BAFF-R 단백질에 결합시켜, 이에 의해 세포의 증식을 억제한다. 임의적으로, 세포는 림프성 세포이다. 임의적으로, 세포는 B 세포이다. 임의적으로, 세포는 암 세포이다. 임의적으로, 세포는 림프종 세포이다.

[0061] 또 다른 양상에서, 항-인간 BAFF-R 항체를 생성하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 본원에 제공된 마우스 섬유아세포 세포를 마우스에 투여하여, 이에 의해 면역화된 BAFF-R 마우스를 형성하는 단계를 포함한다. 면역화된 BAFF-R 마우스의 비장 세포를 인간 골수종 세포와 융합시켜, 이에 의해 BAFF-R 하이브리도마 세포를 형성한다. BAFF-R 하이브리도마 세포는 그 후 BAFF-R 항체를 발현하여, 이에 의해 항-BAFF-R 항체를 생성한다. 항-BAFF-R

항체는 본원에 제공되는 항체이다.

[0062] 본원에 제공되는 항체 또는 그 기능성 단편을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)뿐만 아니라 BAFF-R CAR의 제조 및 사용 방법이 또한 제공된다. 이하 실시예에서 더욱 상세하게 기술하듯이, BAFF-R CAR-T 세포는 체외에서 종양 세포를 발현하는 항원(BAFF-R)에 잘 반응한다. BAFF-R CAR-T 세포 요법은 확립된 종양을 박멸함으로써 명백한 생체 내 항종양 효과를 유도했다. 미접촉 T 세포(naïve T cell) 개체군으로부터 제조된 CAR-T 세포는 최적의 항종양 효능과 치료 지속성을 입증하였다. 항종양 효과는 CD4와 CD8 CAR-T 세포의 협력 활동으로 달성된다. 또한, BAFF-R CAR-T 세포 요법은 CD19 CAR-T 세포 치료제 내성 모델에서 항종양 효과를 입증하였다.

[0063] 본원에 개시된 BAFF-R CAR에 존재하는 BAFF-R scFv 서열은 2개의 단일클론 항체, 클론 90 및 클론 55로부터 유래되며 전체에 걸쳐 더욱 상세하게 개시된다. 2개의 단일클론 항체는 아래 CDR 서열을 갖는다:

[0064] C90 CDR L1: ESVDNYGISF(서열번호 1)

[0065] C90 CDR L2: AAS(서열번호 2)

[0066] C90 CDR L3: QQSKEVPWT(서열번호 3)

[0067] C90 CDR H1: GDSITSGY(서열번호 4)

[0068] C90 CDR H2: ISYSGST(서열번호 5)

[0069] C90 CDR H3: ASPNYPFYAMDY(서열번호 6)

[0070] C55 CDR L1: QDISNY(서열번호 7)

[0071] C55 CDR L2: YTS(서열번호 8)

[0072] C55 CDR L3: FSELPWT(서열번호 9)

[0073] C55 CDR H1: GFSLSTSGMG(서열번호 10)

[0074] C55 CDR H2: IWWDDDK(서열번호 11)

[0075] C55 CDR H3: ARSFGYGLDY(서열번호 12)

[0076] BAFF-R CAR의 scFv 부분에서 사용하기에 적합한 중쇄 가변 도멘인 중에는 단일클론 항체 클론 90(전체에서 설명됨)으로부터 유래된 아래 중쇄 가변 도메인이 있다. 이들 중에서, Hu90 HC-1, HC-2 및 HC-3은 인간화되어있다.

[0077] Chi90 HC:
MYRMQLLSCIALSLALVTNSEVQLQESGPSLVKPSQTLSLTCSVTGDSITSGYWNWIRKFPGNKLEYMGYISYSGSTYYNPSLKSRISITRDTSKNQYYLQLNSVTPEDTATYYCASPNYPFYAMDYWGQGTSVTVSSDI(서열번호 16)

[0078] Hu90 HC-1:
MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGDSITSGYWNWIRQHPGKGLEYIGYISYSGSTYYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCASPNYPFYAMDYWGQGTLVTVSS(서열번호 24)

[0079] Hu90 HC-2:
MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGEVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGDSITSGYWNWIRQHPGKGLEYIGYISYSGSTYYNPSLKSRVTISRDTSKNQYSLKLSSVTAADTAVYYCASPNYPFYAMDYWGQGTLVTVSS(서열번호 26)

[0080] Hu90 HC-3:
MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGEVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGDSITSGYWNWIRQPPGKGLEYIGYISYSGSTYYNPSLKSRVTISRDTSKNQYSLRLSSVTAADTALYYCASPNYPFYAMDYWGQGTRVTVSS(서열번호 28)

[0081] BAFF-R CAR의 scFv 부분에서 사용하기에 적합한 경쇄 가변 도멘인 중에는 단일클론 항체 클론 90(전체에서 설명됨)으로부터 유래된 아래 경쇄 가변 도메인이 있다. 이들 중에서, Hu90 LC-1, LC-2 및 LC-3은 인간화되어있다.

[0082] Chi90 LC:
MYRMQLLSCIALSLALVTNSDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGSGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQQSKEVPWTFGGGTKLEIKTMEIKR(서열번호 14)

[0083] HuC90 LC-1:

METDTLLLWVLLLWVPGSTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDNYGISFLNWFQQKPGQAPRLLIYAASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSL
EPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGGGTKVEIKRTV(서열번호 18)

[0084] Hu90 LC-2:
METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGQAPRLLIYAASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSL
EPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGGGTKVEIKRTV(서열번호 20)

[0085] HuC90 LC-3:
METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAASNLGSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL
QPEDFATYYCQQSKEVPWTFGQGTKVEIKRTV(서열번호 22)

[0086] BAFF-R CAR의 scFv 부분에서 사용하기에 적합한 중쇄 가변 도멘인 중에는 단일클론 항체 클론 55(전체에서 설명됨)로부터 유래된 아래 중쇄 가변 도메인이 있다. 이들 중에서, Hu55 HC-1, HC-2 및 HC-3은 인간화되어있다.

[0087] Chi55 HC:
MYRMQLLSCIALSLALVTNSQVTLKESGPGILKPSQTLSLTCSFSGFSLSTSGMGVGWIRQPSGKGLEWLAHIWWDDDKYYNSSLKSHLTISKDTSRNQVFL
KITSVDTADTATYYCARSFGYGLDYWGQGTTLTVSSAS(서열번호 23)

[0088] Hu55 HC-1:
MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGQVTLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVGWIRQPPGKALEWLAHIWWDDDKYYNPSLKSRLTITKDTSKN
QVVLTMTNMDPVDTATYYCARSFGYGLDYWGQGTLVTVSS(서열번호 33)

[0089] Hu55 HC-2:
MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGQVTLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVGWIRQPPGKALEWLAHIWWDDDKYYNSSLKSRLTITKDTSKN
QVVLTMTNMDPVDTATYYCARSFGYGLDYWGQGTLVTVSS(서열번호 34)

[0090] Hu55 HC-3:
MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGQVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVGWIRQPPGKALEWLAHIWWDDDKYYNTSLKSRLTITKDTSKN
QVVLKMTNMDPVDTATYYCARSFGYGLDYWGQGTLVTVSS(서열번호 35)

[0091] BAFF-R CAR의 scFv 부분에서 사용하기에 적합한 경쇄 가변 도멘인 중에는 단일클론 항체 클론 55(전체에서 설명됨)로부터 유래된 아래 경쇄 가변 도메인이 있다. 이들 중에서,Hu55 LC-1, LC-2 및 HC-3은 인간화되어있다.

[0092] Chi55 LC:
MYRMQLLSCIALSLALVTNSDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCSASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISSLEPED
IATYYCHQFSELPWTFGGGTKLEIKRT(서열번호 30)

[0093] Hu55 LC-1:
METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSSLHTGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPED
IATYYCHQFSELPWTFGGGTKVEIKRTV(서열번호 36)

[0094] Hu55 LC-2:
METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSSLHTGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPED
IATYYCHQFSELPWTFGGGTKVEIKRTV(서열번호 37)

[0095] Hu55 LC-3:
METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKTPKLLIYYTSSLHTGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPED
IATYYCHQFSELPWTFGGGTKVEIKRTV(서열번호 38)

[0096] 본원에 개시된 CAR은 BAFF-R에 대한 특이성을 여전히 유지하면서 CAR의 scFv 부분에서 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산을 치환함으로써 변형될 수 있다. 따라서, CAR의 scFv 부분에서 Hu90 LC-1, Hu90 LC-2, Hu90 LC-3, Hu90 HC-1, Hu90 HC-2 및 Hu90 HC-3, Hu55 LC-1, Hu55 LC-2, Hu55 LC-3, Hu55 HC-1, Hu55 HC-2 및 Hu90 HC-3은 각각 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 임의적으로, 치환은 CDR보다는 프레임워크 영역(FR)에 국한된다. 임의적으로, 치환은 보존적 치환이다.

[0097] CDR 및 FR의 위치는 카밧 번호 체계에 의해 정의될 수 있다(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)). 유사하게, 항체의 경쇄 또는 중쇄 내의 개별 잔기가 차지하는 위치가 카밧 번호 체계에 의해 정의될 수 있다. 따라서, 인간화 항체의 인간화 경쇄 및 인간화 중쇄 내 결합에 필요한 잔기의 위치는

당해 분야에 공지된 카밧 번호 체계에 따른 잔기의 위치에 의해 정의될 수 있다. 본원에 개시된 바와 같이, 인간화 항체는 공여자 항체(예컨대, 마우스)의 CDR 및 인간 항체의 가변 영역 프레임워크(FR)를 갖는 항체일 수 있다. 프레임워크 영역(FR)은 CDR을 인간화 항체에서 제 위치에 유지한다고 한다. 아미노-말단으로부터 진행하여, 이들 영역은 각각 경쇄에 대해 FR L1, FR L2, FR L3, 및 FR L4로 표시되고, 중쇄에 대해 FR H1, FR H2, FR H3, 및 FR H4로 표시된다.

[0098] 따라서, CAR의 scFv 부분은 본원에 개시된 임의의 BAFF-R 표적화된 scFv 서열로 구성될 수 있다. scFv에 추가하여, 세포외 도메인은, 예를 들어 인간 Fc 도메인의 일부분을 포함하는 스페이서를 포함할 수 있다. 막관통 도메인은 CD4 막관통 도메인, CD8 막관통 도메인, CD28 막관통 도메인, CD3 막관통 도메인 또는 4-1BB 막관통 도메인을 포함할 수 있다. 세포내 신호전달 도메인은 인간 CD3 복합물(human CD3 complex)의 제타 쇄(CD3ζ)로부터의 신호전달 도메인 및 하나 이상의 보조 자극 도메인, 예를 들어, 4-1BB 보조자극 도메인을 포함한다. 세포외 도메인은, T 세포의 표면에서 발현될 때, CAR이 T 세포 활성을 BAFF-R을 발현하는 세포, 즉 맨틀 세포 림프종 세포 및 특정의 또 다른 종양 세포의 표면에서 발현되는 수용체로 유도할 수 있게 한다. 세포내 영역에서 CD3ζ와 직렬로 4-1BB(CD137) 보조자극 도메인과 같은 보조자극 도메인의 포함은 T 세포가 보조자극 신호를 수신할 수 있게 한다. T 세포, 예를 들어, 환자-특이적, 자가유래 T 세포는 본원에 개시된 CAR을 발현하도록 조작될 수 있으며 조작된 세포는 확장되고 항체에 대하여 본원에 일반적으로 개시된 바와 같이 다양한 B 세포 림프종 및 자가-면역 장애의 치료를 위한 요법에서 사용될 수 있다. 다양한 T 세포 서브세트가 사용될 수 있다. 또한, CAR은 NK 세포와 같은 또 다른 면역 세포에서 발현될 수 있다. 환자가 본원에 기재된 CAR을 발현하는 면역 세포로 치료되는 경우 상기 세포는 자가유래 또는 동종이계 T 세포일 수 있다. 임의적으로, 사용된 세포는 CD4+ 미접촉 T 세포(CD4+ T_N)와 CD8+ 중심 기억 T 세포(CD8+ T_{CM})의 혼합물이다. 임의적으로, 사용된 세포는 CD4+ 미접촉 T 세포(CD4+ T_N)와 CD8+ 미접촉 T 세포(CD8+ T_N)의 혼합물이다.

[0099] 1 내지 5개(예컨대, 1 또는 2개) 아미노산 변형을 갖는 BAFF-R scFv 또는 그 변이체; 1 내지 5개(예컨대, 1 또는 2개) 아미노산 변형을 갖는 CD4 막관통 도메인 또는 그 변이체, 1 내지 5개(예컨대, 1 또는 2개) 아미노산 변형을 갖는 CD8 막관통 도메인 또는 그 변이체, 1 내지 5개(예컨대, 1 또는 2개) 아미노산 변형을 갖는 CD28 막관통 도메인 또는 그 변이체, 또는 1 내지 5개(예컨대, 1 또는 2개) 아미노산 변형을 갖는 CD3ζ 막관통 도메인 또는 그 변이체로부터 선택되는 막관통 도메인; 보조자극 도메인; 및 1 내지 5개(예컨대, 1 또는 2개) 아미노산 변형을 갖는 CD3ζ 신호전달 도메인 또는 그 변이체를 포함하는 CAR이 또한 기술된다.

[0100] 임의적으로, BAFF-R-표적화된 CAR의 scFv 부분은 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하며, 이때 경쇄 가변 영역은 서열번호 1에 제시된 CDR L1, 서열번호 2에 제시된 CDR L2 및 서열번호 3에 제시된 CDR L3을 포함하고; 중쇄 가변 영역은 서열번호 4에 제시된 CDR H1, 서열번호 5에 제시된 CDR H2 및 서열번호 6에 제시된 CDR H3을 포함한다.

[0101] 임의적으로, BAFF-R-표적화된 CAR의 scFv 부분은 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하며, 이때 경쇄 가변 영역은 서열번호 7에 제시된 CDR L1, 서열번호 8에 제시된 CDR L2 및 서열번호 9에 제시된 CDR L3을 포함하고; 중쇄 가변 영역은 서열번호 10에 제시된 CDR H1, 서열번호 11에 제시된 CDR H2 및 서열번호 12에 제시된 CDR H3을 포함한다. 임의적으로, 항체는 인간화 항체이다.

[0102] 임의적으로, BAFF-R-표적화된 CAR의 scFv 부분은 서열번호 1 또는 7의 CDR L1, 서열번호 2 또는 8의 CDR L2, 서열번호 3 또는 9의 CDR L3, 서열번호 4 또는 10의 CDR H1, 서열번호 5 또는 11의 CDR H2, 및 서열번호 6 또는 12의 CDR H3을 포함한다.

[0103] 임의적으로, BAFF-R-표적화된 CAR의 scFv 부분은 단일클론 항체 H90의 경쇄 가변 도메인 및 단일클론 항체 H90의 중쇄 가변 도메인 또는 단일클론 항체 H55의 경쇄 가변 도메인 및 단일클론 항체 H55의 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 중쇄 및 경쇄 가변 도메인은 5 내지 100개, 10 내지 50개 또는 10 내지 20개 아미노산의 링커(예컨대, GGGGSGGGGSGGGGS(서열번호 45))에 의해 연결될 수 있다.

[0104] 임의적으로, BAFF-R-표적화된 CAR의 scFv 부분은 a) 단일클론 항체 H90의 경쇄 가변 도메인의 인간화 변이체 및 단일클론 항체 H90의 중쇄 가변 도메인의 인간화 변이체; 또는 b) 단일클론 항체 H55의 경쇄 가변 도메인의 인간화 변이체 및 단일클론 항체 H55의 중쇄 가변 도메인의 인간화 변이체를 포함한다. 중쇄 및 경쇄 가변 도메인은 10 내지 20개 아미노산의 링커(예컨대, GGGGSGGGGSGGGGS(서열번호 45))에 의해 연결될 수 있다. 임의적으로, H90 경쇄 가변 도메인의 인간화 변이체는 Hu90 LC-1, Hu90 LC-2 및 Hu90 LC-3으로부터 선택되며 H90 중쇄 가변 도메인의 인간화 변이체는 Hu90 HC-1, Hu90 HC-2 및 Hu90 HC-3으로부터 선택된다. 임의적으로, H55 경쇄 가변

도메인의 인간화 변이체는 Hu55 LC-1, Hu55 LC-2 및 Hu55 LC-3으로부터 선택되며 H55 중쇄 가변 도메인의 인간화 변이체는 Hu55 HC-1, Hu55 HC-2 및 Hu90 HC-3으로부터 선택된다.

[0105] 임의적으로, scFv의 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 부분 각각은 1, 2, 3, 4 또는 5개 단일 아미노산 치환을 갖는다. 따라서, CAR의 scFv 부분에서 Hu90 LC-1, Hu90 LC-2, Hu90 LC-3, Hu90 HC-1, Hu90 HC-2 및 Hu90 HC-3, Hu55 LC-1, Hu55 LC-2, Hu55 LC-3, Hu55 HC-1, Hu55 HC-2 및 Hu90 HC-3 각각은 1, 2, 3, 4 또는 5개 단일 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 임의적으로, 치환은 프레임워크 영역에 한정된다. 일부 경우에, 치환은 보존적 치환이다.

[0106] 본원에 기술된 CAR의 scFv 부분은 에피토프 결합에 중요한 프레임워크 영역 내에 하나 이상의 잔기를 포함할 수 있다. 에피토프 결합(예컨대, BAFF-R 결합)에 관여하는(또는 중요한) 프레임워크 영역 잔기는 본원에서 결합 프레임워크 영역 잔기로 지칭된다. 결합 프레임워크 영역 잔기는 인간화 경쇄 가변 영역(즉, FR L1, FR L2, FR L3, FR L4)의 프레임워크 영역에 잔류하거나 이들은 인간화 중쇄 가변 영역(즉, FR H1, FR H2, FR H3, FR H4)의 프레임워크에 잔류할 수 있다. 인간화 경쇄의 FR L3 영역에 잔류하는 결합 프레임워크 잔기는 본원에서 FR L3 결합 프레임워크 영역 잔기로 지칭된다. 따라서, 인간화 중쇄의 FR H3 영역에 잔류하는 결합 프레임워크 영역 잔기는 본원에서 FR H3 결합 프레임워크 영역 잔기로 지칭된다.

[0107] 임의적으로, scFv는 적어도 하나의 결합 프레임워크 영역 잔기를 포함한다. 임의적으로, 인간화 경쇄 가변 영역은 적어도 하나의 결합 프레임워크 영역 잔기를 포함한다. 임의적으로, 인간화 경쇄 가변 영역은 하나 이상의 FR L1, FR L2, FR L3 또는 FR L4 결합 프레임워크 영역 잔기를 포함한다. 임의적으로, 인간화 경쇄 가변 영역은 하나 이상의 FR L1 결합 프레임워크 영역 잔기를 포함한다. 임의적으로, 인간화 경쇄 가변 영역은 하나 이상의 FR L2 결합 프레임워크 영역 잔기를 포함한다. 임의적으로, 인간화 경쇄 가변 영역은 하나 이상의 FR L3 결합 프레임워크 영역 잔기를 포함한다. 임의적으로, 인간화 경쇄 가변 영역은 하나 이상의 FR L4 결합 프레임워크 영역 잔기를 포함한다. 임의적으로, 인간화 중쇄 가변 영역은 하나 이상의 FR H1, FR H2, FR H3 또는 FR H4 결합 프레임워크 영역 잔기를 포함한다. 임의적으로, 인간화 중쇄 가변 영역은 하나 이상의 FR H1 결합 프레임워크 영역 잔기를 포함한다. 임의적으로, 인간화 중쇄 가변 영역은 하나 이상의 FR H2 결합 프레임워크 영역 잔기를 포함한다. 임의적으로, 인간화 중쇄 가변 영역은 하나 이상의 FR H3 결합 프레임워크 영역 잔기를 포함한다. 임의적으로, 인간화 중쇄 가변 영역은 하나 이상의 FR H4 결합 프레임워크 영역 잔기를 포함한다.

[0108] 임의적으로, 인간화 경쇄 가변 영역은 적어도 하나의 결합 프레임워크 영역 잔기(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 또는 그 이상의 잔기)를 포함하고 인간화 중쇄 가변 영역은 적어도 하나의 결합 프레임워크 영역 잔기(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 또는 그 이상의 잔기)를 포함한다. 인간화 항체 내의 결합 프레임워크 영역 잔기의 위치는 전술한 바와 같이 CDR 잔기의 위치와 유사하게 카밧 번호 체계에 의해 정의될 수 있다.

[0109] 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 카바트 위치 7에 대응하는 위치에서 세린을 포함한다. 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 카바트 위치 8에 대응하는 위치에서 프롤린을 포함한다. 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 카바트 위치 15에 대응하는 위치에서 발린을 포함한다. 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 카바트 위치 22에 대응하는 위치에서 트레오닌을 포함한다. 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 카바트 위치 24에 대응하는 위치에서 글루타민을 포함한다. 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 카바트 위치 41에 대응하는 위치에서 글리신을 포함한다. 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 카바트 위치 42에 대응하는 위치에서 리신을 포함한다. 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 카바트 위치 43에 대응하는 위치에서 알라닌을 포함한다. 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 카바트 위치 44에 대응하는 위치에서 프롤린을 포함한다. 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 카바트 위치 56에 대응하는 위치에서 트레오닌을 포함한다. 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 카바트 위치 72에 대응하는 위치에서 트레오닌을 포함한다. 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 카바트 위치 73에 대응하는 위치에서 페닐알라닌을 포함한다. 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 카바트 위치 79에 대응하는 위치에서 글루타민을 포함한다. 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 카바트 위치 104에 대응하는 위치에서 발린을 포함한다.

[0110] 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 카밧 위치 7에 대응하는 위치에서 세린, 카밧 위치 8에 대응하는 위치에서 프롤린, 카밧 위치 15에 대응하는 위치에서 발린, 카밧 위치 22에 대응하는 위치에서 트레오닌, 카밧 위치 24에 대응하는 위치에서 글루타민 또는 세린, 카밧 위치 41에 대응하는 위치에서 글리신, 카밧 위치 42에 대응하는 위

치에서 리신, 카밧 위치 43에 대응하는 위치에서 알라닌 또는 트레오닌, 카밧 위치 44에 대응하는 위치에서 프롤린, 카밧 위치 56에 대응하는 위치에서 트레오닌, 카밧 위치 72에 대응하는 위치에서 트레오닌, 카밧 위치 73에 대응하는 위치에서 페닐알라닌 또는 리신, 카밧 위치 79에 대응하는 위치에서 글루타민 또는 카밧 위치 104에 대응하는 위치에서 발린을 포함한다.

[0111] 임의적으로, 경쇄 가변 영역은 카밧 위치 7에 대응하는 위치에서 세린, 카밧 위치 8에 대응하는 위치에서 프롤린, 카밧 위치 15에 대응하는 위치에서 발린, 카밧 위치 22에 대응하는 위치에서 트레오닌, 카밧 위치 24에 대응하는 위치에서 글루타민 또는 세린, 카밧 위치 41에 대응하는 위치에서 글리신, 카밧 위치 42에 대응하는 위치에서 리신, 카밧 위치 43에 대응하는 위치에서 알라닌 또는 트레오닌, 카밧 위치 44에 대응하는 위치에서 프롤린, 카밧 위치 56에 대응하는 위치에서 트레오닌, 카밧 위치 72에 대응하는 위치에서 트레오닌, 카밧 위치 73에 대응하는 위치에서 페닐알라닌 또는 리신, 카밧 위치 79에 대응하는 위치에서 글루타민 또는 카밧 위치 104에 대응하는 위치에서 발린인 결합 프레임워크 영역 잔기를 포함한다.

[0112] 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 10에 대응하는 위치에서 트레오닌 또는 알라닌을 포함한다. 구체예에서, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 11에 대응하는 위치에서 리신을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 12에 대응하는 위치에서 발린을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 15에 대응하는 위치에서 트레오닌을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 19에 대응하는 위치에서 트레오닌을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 23에 대응하는 위치에서 트레오닌을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 41에 대응하는 위치에서 프롤린을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 44에 대응하는 위치에서 알라닌을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 61에 대응하는 위치에서 프롤린 또는 트레오닌을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 66에 대응하는 위치에서 아르기닌을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 70에 대응하는 위치에서 트레오닌을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 75에 대응하는 위치에서 리신을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 79에 대응하는 위치에서 발린을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 81에 대응하는 위치에서 트레오닌을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 82에 대응하는 위치에서 메티오닌을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 82B에 대응하는 위치에서 아스파라긴을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 82C에 대응하는 위치에서 메티오닌을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 84에 대응하는 위치에서 프롤린을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 85에 대응하는 위치에서 발린을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 108에 대응하는 위치에서 리신을 포함한다. 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 109에 대응하는 위치에서 발린을 포함한다.

[0113] 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 10에 대응하는 위치에서 트레오닌 또는 알라닌, 카밧 위치 11에 대응하는 위치에서 리신, 카밧 위치 12에 대응하는 위치에서 발린, 카밧 위치 15에 대응하는 위치에서 트레오닌, 카밧 위치 19에 대응하는 위치에서 트레오닌, 카밧 위치 23에 대응하는 위치에서 트레오닌, 카밧 위치 41에 대응하는 위치에서 프롤린, 카밧 위치 44에 대응하는 위치에서 알라닌, 카밧 위치 61에 대응하는 위치에서 프롤린, 세린 또는 트레오닌, 카밧 위치 66에 대응하는 위치에서 아르기닌, 카밧 위치 70에 대응하는 위치에서 트레오닌, 카밧 위치 75에 대응하는 위치에서 리신, 카밧 위치 79에 대응하는 위치에서 발린, 카밧 위치 81에 대응하는 위치에서 트레오닌 또는 리신, 카밧 위치 82에 대응하는 위치에서 메티오닌, 카밧 위치 82B에 대응하는 위치에서 아스파라긴, 카밧 위치 82C에 대응하는 위치에서 메티오닌, 카밧 위치 84에 대응하는 위치에서 프롤린, 카밧 위치 85에 대응하는 위치에서 발린, 카밧 위치 108에 대응하는 위치에서 리신 또는 카밧 위치 109에 대응하는 위치에서 발린을 포함한다.

[0114] 임의적으로, 중쇄 가변 영역은 카밧 위치 10에 대응하는 위치에서 트레오닌 또는 알라닌, 카밧 위치 11에 대응하는 위치에서 리신, 카밧 위치 12에 대응하는 위치에서 발린, 카밧 위치 15에 대응하는 위치에서 트레오닌, 카밧 위치 19에 대응하는 위치에서 트레오닌, 카밧 위치 23에 대응하는 위치에서 트레오닌, 카밧 위치 41에 대응하는 위치에서 프롤린, 카밧 위치 44에 대응하는 위치에서 알라닌, 카밧 위치 61에 대응하는 위치에서 프롤린, 세린 또는 트레오닌, 카밧 위치 66에 대응하는 위치에서 아르기닌, 카밧 위치 70에 대응하는 위치에서 트레오닌, 카밧 위치 75에 대응하는 위치에서 리신, 카밧 위치 79에 대응하는 위치에서 발린, 카밧 위치 81에 대응하는 위치에서 트레오닌 또는 리신, 카밧 위치 82에 대응하는 위치에서 메티오닌, 카밧 위치 82B에 대응하는 위치에서 아스파라긴, 카밧 위치 82C에 대응하는 위치에서 메티오닌, 카밧 위치 84에 대응하는 위치에서 프롤린, 카밧 위치 85에 대응하는 위치에서 발린, 카밧 위치 108에 대응하는 위치에서 리신 또는 카밧 위치 109에 대응하는 위치에서 발린인 결합 프레임워크 영역 잔기를 포함한다.

[0115] 키메라 항원 수용체를 인코딩하는 핵산 분자가 또한 제공되며, 이때 키메라 항원 수용체는 (i) BAFF-R에 표적화

된 scFv; (ii) 1 내지 5개 아미노산 변형을 갖는 CD4 막관통 도메인 또는 그 변이체, 1 내지 5개 아미노산 변형을 갖는 CD8 막관통 도메인 또는 그 변이체, 1 내지 5개 아미노산 변형을 갖는 CD28 막관통 도메인 또는 그 변이체, 및 1 내지 5개 아미노산 변형을 갖는 CD3ζ 막관통 도메인 또는 그 변이체로부터 선택되는 막관통 도메인; (iii) 보조자극 도메인; 및 (iv) 1 내지 5개 아미노산 변형을 갖는 CD3ζ 신호전달 도메인 또는 그 변이체를 포함한다.

[0116] 임의적으로, 보조자극 도메인은 1 내지 5개 아미노산 변형을 갖는 CD28 보조자극 도메인 또는 그 변이체, 1 내지 5개 아미노산 변형을 갖는 4-1BB 보조자극 도메인 또는 그 변이체, 및 1 내지 5개 아미노산 변형을 갖는 OX40 보조자극 도메인 또는 그 변이체로 구성된 군으로부터 선택된다. 임의적으로, scFv는 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하며, 이때 경쇄 가변 영역은 CDR L1(서열번호 1), CDR L2(서열번호 2) 및 CDR L3(서열번호 3)을 포함하며; 중쇄 가변 영역은 CDR H1(서열번호 4), CDR H2(서열번호 5) 및 CDR H3(서열번호 6)을 포함한다. 임의적으로, scFv는 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하며, 이때 경쇄 가변 영역은 CDR L1(서열번호 7), CDR L2(서열번호 8) 및 CDR L3(서열번호 9)을 포함하며; 중쇄 가변 영역은 CDR H1(서열번호 10), CDR H2(서열번호 11) 및 CDR H3(서열번호 12)을 포함한다. 임의적으로, scFv는 Chi90 HC, Hu90 HC-1, Hu90 HC-2, Hu90 HC-3, Chi55 HC, Hu55 HC-1, Hu55 HC-2 및 Hu55 HC-3으로부터 선택되는 중쇄 가변 도메인, 및 Chi90 LC, Hu90 LC-1, Hu90 LC-2, Hu90 LC-3, Chi55 LC, Hu55 LC-1, Hu55 LC-2, 및 Hu55 LC-3으로부터 선택되는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 임의적으로, scFv는 중쇄 가변 도메인과 경쇄 가변 도메인 사이에 스페이서를 포함한다. 임의적으로, 키메라 항원 수용체는 scFv 또는 그 변이체와 막관통 도메인 사이에 위치하는 스페이서 영역을 포함한다. 임의적으로, 4-1BB 신호전달 도메인은 서열번호 41의 아미노산 서열을 포함한다. 임의적으로, CD3ζ 신호전달 도메인은 서열번호 42의 아미노산 서열을 포함한다. 임의적으로, 3 내지 15개 아미노산의 링커는 보조자극 도메인과 CD3ζ 신호전달 도메인 또는 그 변이체 사이에 위치한다. 임의적으로, scFv는 서열번호 14, 18, 20, 22, 30, 36, 37, 및 38로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 임의적으로, scFv는 서열번호 16, 24, 26, 28, 23, 33, 34, 및 35로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 임의적으로, scFv는 서열번호 43 및 44로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0117] 또한, 본원에 개시된 핵산 분자를 포함하는 발현 카세트를 포함하는 벡터에 의해 형질도입된 인간 T 세포의 개체군이 본원에 기술된다. 인간 T 세포의 개체군은 T 세포를 포함하며, 이때 scFv는 Chi90 HC, Hu90 HC-1, Hu90 HC-2, Hu90 HC-3, Chi55 HC, Hu55 HC-1, Hu55 HC-2, 및 Hu55 HC-3으로부터 선택되는 중쇄 가변 도메인 및 Chi90 LC, Hu90 LC-1, Hu90 LC-2, Hu90 LC-3, Chi55 LC, Hu55 LC-1, Hu55 LC-2, 및 Hu55 LC-3으로부터 선택되는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 임의적으로, T 세포는 CD4+ T_N 세포 및 CD8+ T_{CM} 세포를 포함한다. 임의적으로, T 세포는 CD4+ TN 세포 및 CD8+ TN 세포를 포함한다.

[0118] B 세포 활성화 인자 수용체(BAFF-R)에 표적화된 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 T 세포를 사용하는 B 세포 악성 종양 치료 방법이 본원에 개시된다. 본원에 개시된 BAFF-R에 표적화된 CAR(BAFF-R CAR)은 BAFF-R, 막관통 도메인(예컨대, CD8 막관통 도메인), 보조자극 도메인(예컨대, 4-1BB 보조자극 도메인), CD3 제타 신호전달 도메인 또는 이들의 조합에 결합하는 scFv 도메인(예컨대, 인간화 scFv)을 포함할 수 있다. CAR은 또한 예를 들어, scFv 도메인과 막관통 도메인 사이, 막관통 도메인과 보조자극 도메인 사이, 및/또는 보조자극 도메인과 CD3 제타 신호전달 도메인 사이에 스페이서 서열을 포함할 수 있다.

[0119] 또한, 본원에 개시된 인간 T 세포의 개체군을 포함하는 조성물의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하여, 이에 의해 대상체에서 암을 치료하는 단계를 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법이 본원에 개시된다.

[0120] 임의적으로, 암은 림프종, 백혈병 또는 골수종이다. 임의적으로, 림프종은 맨틀 세포 림프종, 여포성 림프종, 확산성 거대 B 세포 림프종, 변연부 림프종 또는 버킷 림프종이다. 임의적으로, 백혈병은 림프모구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병 또는 다모 세포 백혈병이다. 임의적으로, 골수종은 다발성 골수종이다. 임의적으로, 상기 방법은 제2 치료제를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 임의적으로, T 세포의 개체군은 자가유래 또는 환자에 대하여 동종이계이다. 임의적으로, 인간 T 세포의 개체군은 CD4+ T_N 세포 및 CD8+ T_{CM} 세포를 포함하는 세포를 포함한다.

[0121] 본원에 개시된 인간 T 세포의 개체군을 포함하는 조성물의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하여, 이에 의해 대상체에서 암을 치료하는 단계를 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서 자가면역 질환을 치료하는 방법이 본원에 개시된다. 임의적으로, 자가면역 질환은 류마티스 관절염, 전신성 홍반성 루프스, 다발성 경화증, 사구체신염, 쇼그렌 증후군 또는 자가면역 용혈성 빈혈이다. 따라서, 본원에 개시된 CAR T 세포는 다양한 자가면역 질

환을 치료하는데 사용될 수 있다. 자가면역 질환은, 예컨대 대상체의 몸에 정상적으로 존재하는 물질 조직 및/또는 세포에 대한 대상체의 면역 체계에 의한 변화된 면역 반응으로부터 발생하는 질병 또는 장애이다. 자가면역 질환은 비제한적으로 관절염, 류마티스 관절염, 건선성 관절염, 소아기 특발성 관절염, 경피증, 전신성 경피증, 다발성 경화증, 전신성 홍반성 루프스(SLE), 중증 근무력증, 소아기 발병 당뇨증, 제1형 당뇨병, 길랑-발레 증후군, 하시모토 뇌염, 하시모토 갑상선염, 강직성 척추염, 건선, 쇼그렌 증후군, 혈관염, 사구체신염, 자가-면역성 갑상선염, 베체트 병, 크론 병, 궤양성 대장염, 수포성 천포창, 유육종증, 건선, 소양증, 그레이브스 안병증, 염증성 장 질환, 애디슨 병, 백반, 천식, 및 알러지성 천식을 포함한다.

[0122] 전반적으로 기술된 바와 같이, 약학 조성물은 해당 분야에 공지되고 통상적으로 실시되는 방법에 따라 제조될 수 있다(예컨대, 문헌[*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, *22nd Edition*, Loyd V. Allen et al., editors, Pharmaceutical Press (2012)]; 및 문헌[*Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978] 참고). 이러한 조성물은 제공된 인간 T 세포 또는 BAFF-R CAR T 세포의 개체군을 포함할 수 있다. 약학 조성물은 바람직하게는 GMP 조건 하에서 제조된다. 전형적으로, 세포의 치료적 유효 투여량 또는 효과적 투여량이 약학 조성물에 사용된다. 제공된 세포는 해당 분야의 통상의 기술자에게 공지된 통상적인 방법에 의해 약학적으로 허용되는 제형으로 제제화될 수 있다. 용량 요법은 최적의 원하는 반응(예를 들어, 치료 반응)을 제공하도록 조정된다. 예를 들어, 단일 볼러스(bolus)가 투여될 수 있고, 여러번 분할된 용량이 시간이 지남에 따라 투여될 수 있거나, 용량이 치료 상황의 긴급성에 의해 지시된 바와 같이 비례적으로 감소되거나 증가될 수 있다. 또 다른 치료제 또는 약제와 조합하여 세포를 제형화하는 것이 유리할 수 있다. 비경구 조성물을 투여의 용이함 및 투여량의 균일성을 위해 투여량 단위 형태로 제형화하는 것이 유리할 수 있다. 투여량 단위 형태는 본원에 사용된 바와 같이 치료될 대상체를 위한 단일 투여량으로 적합한 물리적으로 별개의 단위를 의미하며; 각 단위는 요구된 약학 부형제와 관련하여 원하는 치료 효과를 생성하도록 계산된 소정의 양의 인간화 항체를 함유한다.

[0123] 예를 들어, 세포는 세포의 절대 수에 의해 대상체에게 투여될 수 있으며, 상기 대상체는 약 1,000 세포/주사 내지 최대 약 10 십억(billion) 세포/주사, 예를 들어 약, 적어도 약, 또는 많아야 약, $1X10^8$, $1X10^7$, $5X10^7$, $1X10^6$, $5X10^6$, $1X10^5$, $5X10^5$, $1X10^4$, $5X10^4$, $1X10^3$, $5X10^3$(기타 등등) BAFF-R CAR T 세포/주사, 또는 종점을 포함하여 임의의 두 수 사이의 임의의 범위로 투여받을 수 있다. 임의적으로, $1X10^6$ 내지 $1X10^8$ 세포가 대상체에 투여된다. 임의적으로, 세포는 1 주 이상 동안 1 주일에 1회 이상 투여된다. 임의적으로, 세포는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 이상의 주 동안 1 주일에 1회 또는 2회 투여된다.

[0124] 임의적으로, 대상체는 약 1,000 세포/주사/m^2 내지 최대 약 10 십억(billion) 세포/주사/m^2, 예를 들어 약, 적어도 약, 또는 많아야 약, $1X10^8/m^2$, $1X10^7/m^2$, $5X10^7/m^2$, $1X10^6/m^2$, $5X10^6/m^2$, $1X10^5/m^2$, $5X10^5/m^2$, $1X10^4/m^2$, $5X10^4/m^2$, $1X10^3/m^2$, $5X10^3/m^2$(기타 등등) BAFF-R CAR T 세포/주사, 또는 종점을 포함하여 임의의 두 수 사이의 임의의 범위로 투여받을 수 있다.

[0125] 임의적으로, BAFF-R CAR T 세포는 세포의 상대 수에 의해 이러한 개체군에 투여될 수 있으며, 상기 개체군은 약 1,000 세포 내지 최대 약 10 십억(billion) 세포/개체군 킬로그램, 예를 들어 약, 적어도 약, 또는 많아야 약, $1X10^8$, $1X10^7$, $5X10^7$, $1X10^6$, $5X10^6$, $1X10^5$, $5X10^5$, $1X10^4$, $5X10^4$, $1X10^3$, $5X10^3$(기타 등등) BAFF-R CAR T 세포/개체군 킬로그램, 또는 종점을 포함하여 임의의 두 수 사이의 임의의 범위로 투여받을 수 있다.

[0126] 임의적으로, 전체 투여량은 몸체 표면적의 m^2에 의해 계산될 수 있으며, 1 m^2 당, 약 $1X10^{11}$, $1X10^{10}$, $1X10^9$, $1X10^8$, $1X10^7$, 또는 종점을 포함하여 임의의 두 수 사이의 임의의 범위를 포함한다. 임의적으로, 약 1 십억(billion) 내지 약 3 십억(billion) BAFF-R CAR T 세포 가 환자에 투여된다. 임의적으로, 투여 당 주사되는 BAFF-R CAR T 세포의 양은 몸체 표면적의 m^2에 의해 계산될 수 있으며, 1 m^2 당, 약 $1X10^{11}$, $1X10^{10}$, $1X10^9$, $1X10^8$, $1X10^7$을 포함한다.

[0127] 임의적으로, BAFF-R CAR T 세포는 BAFF-R CAR T 세포 및 배지, 예컨대 인간 혈청 또는 그 등가물을 포함하는 조성물로 투여된다. 임의적으로, 배지는 인간 혈청 알부민을 포함한다. 임의적으로, 배지는 인간 혈장을 포함한다. 임의적으로, 배지는 약 1% 내지 약 15% 인간 혈청 또는 인간 혈청 등가물을 포함한다. 임의적으로, 배지는 약 1% 내지 약 10% 인간 혈청 또는 인간 혈청 등가물을 포함한다. 임의적으로, 배지는 약 1% 내지 약 5%

인간 혈청 또는 인간 혈청 등가물을 포함한다. 임의적으로, 배지는 약 2.5% 인간 혈청 또는 인간 혈청 등가물을 포함한다. 임의적으로, 혈청은 인간 AB 혈청이다. 임의적으로, 인간 치료제로 사용하기에 적합한 혈청 대체물이 인간 혈청 대신에 사용된다. 이러한 혈청 대체물은 해당 분야에 공지되어 있다. 임의적으로, BAFF-R CAR T 세포는 BAFF-R CAR T 세포 및 세포 생존력을 지원하는 등장액 용액을 포함하는 조성물로 투여된다. 임의적으로, BAFF-R CAR T 세포는 저온보존된 샘플로부터 재구성된 조성물로 투여된다.

[0128] 다양한 구체예 및 양상들이 여기에 도시되고 설명되지만, 통상의 기술자에게는 그러한 구체예 및 양상들이 단지 예시로서 제공된다는 것이 명백할 것이다. 많은 변형, 변경, 및 대체가 이제 통상의 기술자에게 발생할 것이다. 본원에 설명된 구체예에 대한 다양한 대안이 채용될 수 있음을 이해해야 한다.

[0129] 항체는 복잡한 내부 구조를 갖는 크고 복잡한 분자(약 150,000 Da의 분자량 또는 약 1,320개 아미노산)이다. 천연 항체 분자는 2개의 동일한 쌍의 폴리펩티드 쇄을 포함하며, 각 쌍은 하나의 경쇄와 하나의 중쇄를 갖는다. 각 경쇄 및 중쇄는 순서대로 2개의 영역: 표적 항원과의 결합에 관여하는 가변("V") 영역 및 면역계의 다른 성분과 상호작용하는 불변("C") 영역으로 구성된다. 경쇄 및 중쇄 가변 영역은 3-차원 공간에서 함께 모여 항원(예를 들어, 세포 표면의 수용체)에 결합하는 가변 영역을 형성한다. 각각의 경쇄 또는 중쇄 가변 영역에는, 상보성 결정 영역("CDR")이라고 불리는 세 개의 짧은 세그먼트(길이가 평균 10개 아미노산)가 있다. 항체 가변 도메인에 있는 6개 CDR(경쇄에서 3개 그리고 중쇄에서 3개)은 3-차원 공간에서 함께 접혀서 표적 항원(에피토프)에 도킹하는 실제 항체 결합 부위(파라토프)를 형성한다. CDR의 위치 및 길이는 문헌[Kabat, E. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1983, 1987]에 상세하게 정의되어 있다. CDR에 포함되지 않은 가변 영역의 부분은 프레임워크("FR")라 불리며, 이는 CDR을 위한 환경을 형성한다.

[0130] 용어 "항체"는 해당 분야에서 통상적으로 알려진 의미에 따라 사용된다. 항체는, 예를 들어 미손상(intact) 면역글로불린으로서 존재한다. 그러나, 기능성 항체 단편 또는 단편들이 용어 "항체"가 본원에 인용될 때마다 사용될 수 있다. 예를 들어, 많은 잘-특징지어진 기능성 항체 단편이 다양한 펩티다아제에 의한 분해에 의해 생성될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 펩신은 힌지 부위의 디설파이드 결합 아래에 있는 항체를 분해시켜 $F(ab)'_2$, 즉 Fab의 이량체(dimer)를 생성하는데, 그 자체가 디설파이드 결합에 의해 V_H-C_{H1}에 결합된 경쇄이다. $F(ab)'_2$는 힌지(hinge) 영역에서 디설파이드 결합을 파괴하기 위해 온화한 조건 하에서 환원될 수 있으며, 이에 의해 $F(ab)'_2$ 이량체를 Fab' 단량체로 전환시킨다. Fab' 단량체는 본질적으로 힌지 영역의 일부를 갖는 Fab이다(문헌[Fundamental Immunology (Paul ed., 3d ed. (1993)] 참고). 다양한 항체 단편이 미손상 항체의 분해의 관점에서 정의되지만, 통상의 기술자는 이러한 단편이 화학적으로 또는 재조합 DNA 방법론을 사용하여 새롭게 합성될 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 용어 "항체"는, 본원에 사용되듯이, 예시적이며 전체 항체의 변형에 의해 생성된 항체 단편이거나, 재조합 DNA 방법론(예컨대, 단일 쇄 Fv)을 사용하여 새롭게 합성된 것 또는 파지 디스플레이 라이브러리(phage display library)를 식별한 것(예컨대, 문헌[McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990)])이 항체에 대해 기재된 바와 같이 사용될 수 있다.

[0131] 단일클론 또는 다클론 항체의 제조를 위해, 해당 업계에 공지된 임의의 기술이 사용될 수 있다(예컨대, 문헌[Kohler & Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975)]; 문헌[Kozbor *et al.*, *Immunology Today* 4:72 (1983)]; 문헌[Cole *et al.*, pp. 77-96 in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy* (1985)] 참고). 단일클론 항체(mAb)는 단일 클론으로부터 유래된 항체를 말한다. 단일 쇄 항체 제조 기술(미국 특허공보 제4,946,778호)이 본원에 기술된 폴리펩티드에 대한 항체를 생산하도록 적용될 수 있다. 또한, 형질전환 마우스, 또는 또 다른 포유동물과 같은 또 다른 생물체가 인간화 항체를 발현하는데 사용될 수 있다. 대안으로, 파지 디스플레이 기술이 선택된 항원에 특이적으로 결합하는 항체 및 이종 Fab 단편을 확인하는데 사용될 수 있다(예컨대, 문헌[McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554 (1990); Marks *et al.*, *Biotechnology* 10:779-783 (1992)] 참고).

[0132] mAb의 에피토프는 mAb가 결합하는 그 항원의 영역이다. 2개의 항체는, 각각이 항원에 대한 다른 하나의 결합을 경쟁적으로 억제(차단)하는 경우, 동일하거나 중첩된 에피토프에 결합한다. 즉, 하나의 항체의 1x, 5x, 10x, 20x 또는 100x 과량은 경쟁적 결합 분석법에서 측정시 적어도 30% 그러나 바람직하게는 50%, 75%, 90% 또는 심지어 99%만큼 다른 하나의 결합을 억제한다(예컨대, 문헌[Junghans *et al.*, Cancer Res. 50:1495, 1990] 참고). 대안으로, 본질적으로 모든 아미노산 돌연변이가 하나의 항체의 결합을 감소시키거나 제거하는 항원에서 다른 하나의 결합을 감소시키거나 제거한다면, 2개의 항체는 동일한 에피토프를 갖는다. 하나의 항체의 결합을 감소시키거나 제거하는 일부 아미노산 돌연변이가 다른 하나의 결합을 감소시키거나 제거한다면, 2개의 항체는 중첩된 에피토프를 갖는다.

[0133] 리간드는 수용체 분자(예컨대, 항체)에 결합할 수 있는 작용제, 예컨대, 폴리펩티드 또는 또 다른 분자를 의미한다.

[0134] 표지 또는 검출가능한 원자단은 분광학적, 광화학적, 생화학적, 면역화학적, 화학적, 또는 기타 물리적 수단에 의해 검출가능한 조성물이다. 예를 들어, 유용한 표지는 ^{32}P, 형광 염료, 전자-고밀도 시약(electron-dense reagent), 효소(예컨대, ELISA에서 일반적으로 사용되는 것과 같은), 비오틴, 디곡시제닌, 또는 합텐 및 단백질 또는 예컨대, 방사성표지를 표적 펩티드와 특이적으로 반응하는 펩티드 또는 항체에 혼입시킴으로써 검출가능하게 될 수 있는 기타 개체를 포함한다. 문헌[Hermanson, Bioconjugate Techniques 1996, Academic Press, Inc., San Diego]에 개시된 방법을 사용하여 항체를 표지에 접합시키는 해당 분야에 공지된 임의의 적절한 방법이 사용될 수 있다.

[0135] 접촉은 평범한 의미에 따라 사용되며 적어도 2개의 별개의 화학종(예컨대, 생물분자 또는 세포를 비롯한 화학적 화합물)이 반응하거나 상호작용하거나 물리적으로 접촉하기 위해 충분히 근접하도록 허용하는 과정을 의미한다. 그러나, 생성된 반응 생성물이 첨가된 시약들 사이의 반응으로부터 또는 반응 혼합물에서 생성될 수 있는 하나 이상의 첨가된 시약들로부터의 중간체로부터 직접 생성될 수 있음을 인정하여야 한다.

[0136] 용어 "접촉"은 2개 화학종(species)이 반응하거나 상호작용하거나 물리적으로 접촉하도록 하는 것을 포함할 수 있으며, 이때 2개 화학종은 본원에 기재된 항체 또는 BAFF-R 단백질일 수 있다. 접촉은, 예를 들어 본원에 기술된 바와 같은 인간화 항체가 BAFF-R과 상호작용하도록 하는 것을 포함한다.

[0137] 본원에 사용된 바와 같이, 질환, 질병 또는 장애 또는 질환, 질병 또는 장애와 관련된 증상을 "치료하는" 또는 이의 "치료"는 임상 결과를 비롯하여 유익한 또는 바람직한 결과를 얻는 접근법을 말한다. 유익하거나 바람직한 임상 결과는, 비제한적으로, 부분적으로 또는 완전하게, 하나 이상의 증상 또는 질환의 완화 또는 개선, 질환, 장애 또는 질병의 정도 감소, 질환, 장애 또는 질병의 상태 안정화, 질환, 장애 또는 질병의 발병 예방, 질환, 장애 또는 질병의 확산 방지, 질환, 장애 또는 질병 진행의 지연 또는 감속, 질환, 장애 또는 질병 개시의 지연 또는 감속, 질환, 장애 또는 질병 상태의 개선 또는 일시적 완화, 및 차도(remission)를 포함할 수 있다. 치료는 또한 치료가 없을 때 기대했던 것 이상으로 대상체의 생존기간을 연장시키는 것을 의미한다. "치료"는 또한 질환, 장애 또는 질병의 진행을 억제하는 것, 질환, 장애 또는 질병의 진행을 일시적으로 늦추는 것을 의미할 수도 있지만, 일부 경우에는, 질환, 장애 또는 질병의 진행을 영구적으로 정지시키는 것을 포함한다. 본원에 사용된 용어 "치료", "치료하다" 또는 "치료하는"은 프로테아제의 발현을 특징으로 하는 질병 또는 질환의 하나 이상의 증상들 또는 프로테아제의 발현을 특징으로 하는 질병 또는 질환의 증상의 효과를 감소시키는 방법을 의미한다. 따라서, 기술된 방법에서, "치료"는 확립된 질병, 질환, 또는 질병 또는 질환의 증상의 심각성의 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 감소를 의미할 수 있다. 질병을 치료하기 위한 방법은 대조군과 비교하여 대상체에서 질병의 하나 이상의 증상이 10% 감소한 경우 치료로 간주된다. 따라서, 감소는 원 수준 또는 대조군 수준과 비교하여 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 또는 10% 내지 100% 사이의 임의의 퍼센트 감소일 수 있다. 치료가 반드시 질병, 질환, 또는 질병 또는 질환의 증상의 완치 또는 완전한 절제를 지칭하는 것은 아니라는 것이 이해된다. 또한, 여기에 사용되듯이, 절감, 감소, 또는 억제에 대한 언급은 대조군 수준과 비교하여 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 그 이상의 변화를 포함하며 그러한 용어는 완전한 제거를 포함할 수 있지만 반드시 포함하는 것은 아니다.

[0138] 용어 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 의미하는 것으로 여기서 상호교환적으로 사용되며, 이때 중합체는 아미노산으로 구성되지 않은 원자단에 접합될 수 있다. 상기 용어는 하나 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 자연-발생 아미노산의 인공 화학적 모방물인 아미노산 중합체, 뿐만 아니라 자연-발생 아미노산 중합체 및 비-자연-발생 아미노산 중합체에 적용된다. 융합 단백질은 단일 원자단으로서 재조합적으로 발현되는 2개 이상의 개별적인 단백질 서열을 인코딩하는 키메라 단백질을 지칭한다. 용어 "펩티딜" 및 "펩티딜 원자단"은 1가 펩티드를 의미한다.

[0139] 용어 "아미노산"은 자연-발생 및 합성 아미노산, 뿐만 아니라 자연-발생 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 아미노산 유사체 및 아미노산 모방물을 지칭한다. 자연-발생 아미노산은 유전 암호에 의해 인코딩되는 것들, 뿐만 아니라 추후 변형되는 이들 아미노산, 예컨대, 하이드록시프롤린, γ-카르복시글루타메이트, 및 O-포스포세린이다. 아미노산 유사체는 자연-발생 아미노산과 동일한 기본적 화학 구조, 즉 수소, 카르복실기, 아미노기, 및 R기와 결합된 α 탄소를 갖는 화합물, 예컨대, 호모세린, 노르류신, 메티오닌 설폭사이드, 메티오닌 메틸 설포늄을 지칭한다. 이러한 유사체는 변형된 R기(예컨대, 노르류신) 또는 변형된 펩티드 백본을 갖지만, 자연-발생 아미노산과 동일한 기본적 화학 구조를 유지한다. 아미노산 모방물은 아미노산의 일반적 화학 구조와 상이한

구조를 갖지만, 자연-발생 아미노산과 유사한 방식으로 기능을 하는 화학적 화합물을 지칭한다. 용어 "비-자연-발생 아미노산" 및 "비천연 아미노산"은 자연에서 발견되지 않는 아미노산 유사체, 합성 아미노산, 및 아미노산 모방물을 지칭한다.

[0140] 아미노산은 본원에서 일반적으로 알려진 세 글자 기호에 의해 또는 IUPAC-IUB 생화학 명명 위원회(IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission)에 의해 권장되는 한 글자 기호에 의해 언급될 수 있다. 마찬가지로, 뉴클레오티드는 일반적으로 인정되는 단일 문자 코드에 의해 언급될 수 있다.

[0141] 보존적으로 변형된 변이체가 아미노산 서열 및 핵산 서열 모두에 적용된다. 특정 핵산 서열과 관련하여, 보존적으로 변형된 변이체는 동일하거나 본질적으로 동일한 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산을 의미한다. 유전 암호의 퇴화 때문에, 수많은 핵산 서열이 임의의 주어진 단백질을 인코딩할 것이다. 예를 들어, 코돈 GCA, GCC, GCG 및 GCU는 모두 아미노산 알라닌을 인코딩한다. 따라서, 알라닌이 코돈에 의해 특정되는 모든 위치에서, 코돈은 인코딩된 폴리펩티드를 변경하지 않으면서 개시된 상응하는 코돈의 임의의 것으로 변경될 수 있다. 이러한 핵산 변이는, 보존적으로 변형된 변이의 하나의 화학종인, 침묵 변이(silent variation)이다. 폴리펩티드를 인코딩하는 모든 핵산 서열은 본원에서 또한 핵산의 모든 가능한 침묵 변이를 기술한다. 핵산(통상 메티오닌에 대한 유일한 코돈인 AUG, 및 트립토판에 대한 유일한 코돈인 TGG 제외)의 각 코돈이 기능적으로 동일한 분자를 생성하도록 변형될 수 있음을 통상의 기술자는 인식할 것이다. 따라서, 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산의 각각의 침묵 변이는 각각의 기재된 서열에 암시적이다.

[0142] 아미노산 서열에 관해서, 인코딩된 서열에서 단일 아미노산 또는 아미노산의 작은 백분율을 변경, 추가 또는 결실시키는 핵산, 펩티드, 폴리펩티드, 또는 단백질 서열에 대한 개별적인 치환체, 결실제 또는 첨가제는 보존적으로 변형된 변이체이며, 이때 변경은 아미노산을 화학적으로 유사한 아미노산으로 치환시키는 결과를 유발한다는 것을 통상의 기술자는 인식할 것이다. 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환 표는 해당 분야에 공지되어 있다. 이러한 보존적으로 변형된 변이체는 다형성 변이체, 종간 동족체, 및 대립유전자에 추가되며 이를 배제하지 않는다.

[0143] 아래 8개 군은 각각 서로에 대하여 보존적 치환체인 아미노산을 함유한다:

[0144] 1) 알라닌(A), 글리신(G);

[0145] 2) 아스파라긴산(D), 글루탐산(E);

[0146] 3) 아스파라긴(N), 글루타민(Q);

[0147] 4) 아르기닌(R), 리신(K);

[0148] 5) 이소류신(I), 류신(L), 메티오닌(M), 발린(V);

[0149] 6) 페닐알라닌(F), 티로신(Y), 트립토판(W);

[0150] 7) 세린(S), 트레오닌(T); 및

[0151] 8) 시스테인(C), 메티오닌(M)

[0152] (예컨대, 문헌[Creighton, *Proteins* (1984)] 참고).

[0153] 서열 동일성의 백분율은 비교 창에서 두 개의 최적으로 정렬된 서열을 비교함으로써 결정되며, 이때 비교 창 내의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열의 일부는, 두 서열의 최적 정렬을 위한 기준 서열(추가 또는 결실을 포함하지 않음)과 비교하여, 추가 또는 결실(즉, 갭)을 포함할 수 있다. 백분율은 두 서열 모두에서 동일한 핵산 염기 또는 아미노산 잔기가 일어나는 위치의 수를 결정하여 일치된 위치(matched position)의 수를 산출하고, 일치된 위치의 수를 비교 창의 위치의 총 수로 나누고, 그 결과에 100을 곱하여 서열 동일성의 백분율을 산출한다.

[0154] 둘 이상의 핵산 또는 폴리펩티드 서열과 관련하여 "동일한" 또는 "퍼센트 동일성"이란 용어는, 아래 서열 비교 알고리즘 중 하나를 사용하거나 수동 정렬 및 육안 검사에 의해 측정되면서 비교 창 또는 지정된 영역에서 최대 일치를 위해 비교되고 정렬될 때, 동일하거나 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드의 특정 백분율을 갖는 둘 이상의 서열 또는 서브서열을 의미한다(즉, 예컨대, 전체 폴리펩티드 서열 또는 폴리펩티드의 개별 도메인의 특정 영역에 걸쳐서 60% 동일성, 임의적으로 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일성). 이러한 서열은 따라서 실질적으로 동일하다고 한다. 이 정의는 또한 시험 서열의 보체로 지칭된다. 임의적으로,

동일성은 길이가 적어도 약 50개 뉴클레오티드인 영역, 또는 더욱 바람직하게는 길이가 100개 내지 500개 또는 1,000개 이상 뉴클레오티드인 영역에 존재한다.

[0155] 서열 비교를 위해, 전형적으로 하나의 서열은 시험 서열이 비교되는 기준 서열로서 작용한다. 서열 비교 알고리즘을 사용할 때, 시험 및 기준 서열을 컴퓨터에 입력하고, 필요하다면 서열 좌표를 지정하고, 서열 알고리즘 프로그램 파라미터를 지정한다. 디폴트 프로그램 파라미터를 사용할 수도 있고, 다른 파라미터를 지정할 수도 있다. 서열 비교 알고리즘은 그 후 프로그램 파라미터에 기초하여, 기준 서열과 비교하여 시험 서열의 퍼센트 서열 동일성을 계산한다.

[0156] 비교 창은, 본원에 사용되듯이, 예컨대, 전장 서열 또는 20개 내지 600개, 약 50개 내지 약 200개, 또는 약 100개 내지 약 150개 아미노산 또는 뉴클레오티드로 구성된 군으로부터 선택되는 인접 위치의 수 중 임의의 것의 단편에 대한 기준을 포함하며, 이때 서열은 두 서열이 최적으로 정렬된 후에 인접 위치의 동일한 수의 기준 서열과 비교될 수 있다. 비교를 위한 서열의 정렬 방법은 해당 분야에 공지되어 있다. 비교를 위한 서열의 최적의 정렬은 예컨대, 문헌[Smith and Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482c]의 국부 상동성 알고리즘에 의하거나, 문헌[Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443]의 상동성 정렬 알고리즘에 의하거나, 문헌[Pearson and Lipman (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444]의 유사도 탐색법에 의하거나, 이러한 알고리즘의 컴퓨터화된 구현(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI의 GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA)에 의하거나, 수동 정렬 및 육안 검사(예컨대, 문헌[Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* (1995 supplement)] 참고)에 의해 수행될 수 있다.

[0157] 퍼센트 서열 동일성 및 서열 유사성을 결정하기에 적합한 알고리즘의 예는 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘이며, 이들은 문헌[Altschul *et al.* (1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402], 및 문헌[Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410]에 각각 개시되어 있다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 미국 국립 생명 공학 정보 센터(National Center for Biotechnology Information)(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)을 통하여 공개적으로 입수가능하다. 이 알고리즘은 먼저, 데이터베이스 서열에서 동일한 길이의 단어와 정렬될 때 일부 양수-값 임계값 T와 일치하거나 이를 만족하는 쿼리 서열에서 길이 W의 짧은 단어를 식별하여 고득점 서열 쌍(high scoring sequence pairs, HSP)을 식별하는 단계를 포함한다. T는 인접 단어 점수 임계값으로 지칭된다(문헌[Altschul *et al.*, *supra*]). 이러한 초기 인접 단어 히트(word hit)는 검색을 시작하는 시드로 사용되어 이들을 함유하는 더 긴 HSP를 찾는다. 단어 히트는 누적 정렬 점수가 증가될 수 있는 한 각 서열을 따라 양방향으로 연장된다. 누적 점수는, 뉴클레오티드 서열에 대해, 파라미터 M(일치 잔기의 쌍에 대한 보상 점수, 항상 > 0) 및 N(일치하지 않는 잔기에 대한 패널티 점수, 항상 < 0)을 사용하여 계산된다. 아미노산 서열의 경우, 득점 매트릭스는 누적 점수를 계산하는데 사용된다. 누적 정렬 점수가 최대 달성 값에서 양 X만큼 떨어지면 각 방향으로 단어 히트의 연장이 중단되고; 누적 점수는, 하나 이상의 음-득점 잔기 정렬의 누적으로 인해, 0 이하로 되거나; 두 시퀀스 중 하나의 종점에 도달한다. BLAST 알고리즘 파라미터 W, T, 및 X는 정렬의 민감도와 속도를 결정한다. BLASTN 프로그램(뉴클레오티드 서열용)은 기본값으로 11의 단어 길이(W), 10의 기대치(E), M=5, N=-4 및 두 가닥의 비교를 사용한다. 아미노산 서열에 대해, BLASTP 프로그램은 기본값으로 3의 단어 길이, 10의 기대치(E), 및 BLOSUM62 득점 매트릭스(문헌[Henikoff and Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915] 참고) 50의 정렬(B), 10의 기대치(E), M=5, N=-4, 및 두 가닥의 비교를 사용한다.

[0158] BLAST 알고리즘은 또한 두 서열 간의 유사성에 대한 통계 분석을 수행한다(문헌[Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787] 참고). BLAST 알고리즘에 의해 제공되는 유사성의 하나의 척도는 최소 합계 확률(P(N))이며, 이는 두 개의 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 사이의 일치가 우연히 일어날 확률의 지표를 제공한다. 예를 들어, 시험 핵산과 기준 핵산의 비교에서 최소 합계 확률이 약 0.2 미만, 더욱 바람직하게는 약 0.01 미만, 가장 바람직하게는 약 0.001 미만인 경우, 핵산은 기준 서열과 유사하다고 간주된다.

[0159] 두 개의 핵산 서열 또는 폴리펩티드가 실질적으로 동일하다는 표시는 제1 핵산에 의해 인코딩된 폴리펩티드가 후술하는 바와 같이 제2 핵산에 의해 인코딩된 폴리펩티드에 대해 생성된 항체와 면역학적으로 교차 반응한다는 것이다. 따라서, 폴리펩티드는 전형적으로, 예를 들어, 두 개의 펩티드가 보존적 치환에 의해서만 상이한 경우, 제2 폴리펩티드와 실질적으로 동일하다. 두 개의 핵산 서열이 실질적으로 동일하다는 또 다른 표시는 아래에 기술된 바와 같이 엄격한 조건 하에서 두 분자 또는 그 보체가 서로 혼성화된다는 것이다. 두 개의 핵산 서열이 실질적으로 동일하다는 또 다른 표시는 동일한 프라이머가 서열을 증폭시키는데 사용될 수 있다는 것이다.

[0160] 항체 내의 아미노산 잔기는, 항체 내에서 주어진 잔기와 동일한 본질적인 구조적 위치를 차지하는 경우, 주어진 잔기에 상응한다. 예를 들어, 비교 항체 내의 선택된 잔기는, 선택된 잔기가 해당 분야에서 적용가능한 방법을

사용하여 평가되는 바와 같이 카밧 위치 48에 대한 동일한 본질적인 공간적 또는 구조적 상관관계를 차지할 때, 본원에 제공된 항체 내의 위치 48(본원에 기재된 카밧 번호 체계에 따름)에 대응한다. 예를 들어, 비교 항체는 본원에 제공된 항체와 최대 서열 상동성을 갖도록 정렬될 수 있고, 카밧 위치 48에 정렬되는 정렬된 비교 항체 내의 위치는 그에 상응하도록 결정될 수 있다. 대안으로, 전술한 바와 같은 일차 서열 정렬 대신에(또는 이에 부가하여), 예컨대, 비교 항체의 구조가 본원에 제공되는 항체와 최대 일치를 갖도록 정렬되고 전체 구조가 비교되는 경우, 3차원 구조 정렬이 사용될 수 있다. 이 경우, 구조 모델에서 카밧 위치 48과 동일한 본질적 위치를 차지하는 아미노산은 대응한다고 말할 수 있다.

[0161] 용어 "단리된(isolated)"은, 단백질에 대하여 적용될 때, 단백질에 자연 상태에서 결합된 또 다른 세포 성분이 본질적으로 존재하지 않는다는 것을 의미한다. 건조 또는 수용액일 수 있지만 바람직하게는 균질한 상태이다. 순도 및 균질성은 전형적으로 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동 또는 고성능 액체 크로마토그래피와 같은 분석 화학 기술을 사용하여 결정된다. 조제물에 존재하는 주류인 단백질은 실질적으로 정제된다. 용어 "정제된"은 단백질이 전기영동 겔에서 본질적으로 하나의 밴드를 발생시킨다는 것을 의미한다. 특히, 단백질이 적어도 85%, 더욱 바람직하게는 적어도 95%, 가장 바람직하게는 적어도 99% 순수하다는 것을 의미한다.

[0162] 단백질 또는 펩티드를 언급할 때, 항체에 "특이적으로(또는 선택적으로) 결합하는" 또는 "특이적으로(또는 선택적으로) 면역반응하는"이라는 어구는 단백질 및 또 다른 생물체의 이종 개체군에서 단백질의 존재를 결정짓는 결합 반응을 지칭한다. 따라서, 지정된 면역검정 조건 하에서, 특정 항체는 백그라운드의 적어도 2배로 특정 단백질에 결합하고 샘플에 존재하는 또 다른 현저한 양의 단백질에는 실질적으로 결합하지 않는다. 전형적으로 특이적 또는 선택적 반응은 백그라운드 신호 또는 잡음의 적어도 2배, 더욱 전형적으로는 백그라운드의 10배 내지 100배 이상일 것이다.

[0163] 본원에 사용되는 세포는 그의 게놈 DNA를 보존하거나 복제하기에 충분한 대사작용 또는 다른 기능을 수행하는 세포를 의미한다. 세포는, 예를 들어, 미손상 막의 존재, 특정 염료에 의한 염색, 자손을 생성하는 능력 또는, 배우자의 경우, 제2 배우자와 결합하여 생존가능한 자손을 생산하는 능력을 포함하여, 해당 업계에 공지된 방법에 의해 식별될 수 있다. 세포는 원핵 세포 및 진핵 세포를 포함할 수 있다. 원핵 세포는 비제한적으로 박테리아를 포함한다. 진핵 세포는 비제한적으로 효모 세포, 및 식물 및 동물, 예를 들어 포유동물, 곤충(예컨대, 스포도프테라) 및 인간 세포로부터 유래된 세포를 포함한다.

[0164] 본원에 정의된 용어 "억제", "억제하다", "억제하는" 등은 단백질-억제제(예컨대, 본원에 제시된 BAFF-R 항체) 상호작용과 관련하여, 억제제(예컨대, BAFF-R 항체)의 부재 하에서 단백질의 활성 또는 기능과 비교하여, 단백질의 활성 또는 기능에 부정적으로 영향(예컨대, 감소)을 미치는 것(예컨대, BAFF-R의 활성을 감소시킴)을 의미한다. 억제는 질병 또는 질병의 증상(예컨대, 암 또는 자가면역 질환)의 감소를 포함한다. 따라서, 억제는, 적어도 부분적으로, 부분적으로, 또는 전체적으로 자극 차단, 활성화 감소, 예방, 지연, 신호 전달 또는 효소 활성 또는 단백질의 양의 감도저하, 또는 하향-조절을 포함한다. 유사하게 억제제는 예를 들어, 결합, 부분적 또는 전체적 차단, 감소, 예방, 지연, 불활성화, 감도저하, 또는 하향-조절 활성(예컨대, BAFF-R 신호전달 활성)에 의해, BAFF-R 활성을 억제하는 화합물 또는 단백질이다.

[0165] 본원에 제공되는 시약, 예컨대, 항체 또는 세포는 종종 활성 치료제 및 다양한 기타 약학적으로 허용가능한 성분을 포함하는 약학 조성물로서 투여된다(문헌[*Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd Edition*, Loyd V. Allen et al., editors, Pharmaceutical Press (2012)] 참고). 바람직한 형태는 의도된 투여 방식 및 치료적 용도에 의존한다. 조성물은 또한, 원하는 제제에 따라, 동물 또는 인간 투여를 위한 약학 조성물을 제형화하기 위해 일반적으로 사용되는 비히클로서 정의되는, 약학적으로-허용되는, 무독성 담체 또는 희석제를 포함할 수 있다. 희석제는 조합물의 생물학적 활성에 영향을 미치지 않도록 선택된다. 이러한 희석제의 예로는 증류수, 생리학적 인산염-완충 식염수, 링거액, 덱스트로스 용액, 및 행크 용액이 있다. 또한, 약학 조성물 또는 제형은 또한 기타 담체, 보조제, 또는 무독성, 비치료적, 비면역원성 안정제 등을 포함할 수 있다.

[0166] 조성물은 치료 또는 예방 치료를 위해 투여될 수 있다. 치료 용도에서, 조성물은 치료적 유효량으로 질환(예컨대, 암)을 앓고 있는 환자에게 투여된다. 이 사용에 효과적인 양은 질병의 중증도와 환자의 건강 상태에 따라 다를 것이다. 조성물의 단일 또는 다중 투여는 환자에 의해 요구되고 허용되는 투여량 및 빈도에 따라 투여될 수 있다. 환자 또는 대상체는 인간 및 또 다른 동물, 특히 포유류를 포함한다. 따라서, 이 방법은 인간 치료 및 수의학 용도 모두에 적용가능하다. 임의적으로, 환자는 포유류, 영장류 또는 인간이다.

[0167] 경구 투여에 적합한 제형은 (a) 물, 식염수 또는 PEG 400과 같은 희석제에 현탁된 본원에 제공되는 유효량의 항체와 같은 액체 용액; (b) 액체, 고체, 과립 또는 젤라틴으로서 각각 소정의 양의 유효 성분을 함유하는 캡슐,

사쉐(sachet) 또는 정제; (c) 적합한 액체 중의 현탁액; 및 (d) 적합한 에멀젼으로 구성될 수 있다. 정제 형태(Tablet form)는 락토오스, 수크로오스, 만니톨, 소르비톨, 칼슘 포스페이트, 옥수수 전분, 감자 전분, 미정질 셀룰로오스, 젤라틴, 콜로이드성 이산화 규소, 활석(talc), 마그네슘 스테아레이트, 스테아린산, 및 기타 부형제, 착색제, 충전제, 결합제, 희석제, 완충제, 습윤제, 방부제, 풍미제, 염료, 붕해제, 및 약학적으로 호환가능한 담체 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 로렌지 형태(Lozenge form)는 풍미제, 예컨대, 수크로오스 중의 유효 성분, 뿐만 아니라 유효 성분에 부가하여 해당 분야에 공지된 담체를 함유하는 젤라틴 및 글리세린 또는 수크로오스 및 아카시아 에멀젼, 겔, 등과 같은 비활성 기재 중에 유효 성분을 포함하는 패스틸(pastille)을 포함할 수 있다.

[0168] 약학 조성물은 또한 크고, 천천히 대사되는 거대분자, 예컨대 단백질, 다당류, 예컨대 키토산, 폴리락트산, 폴리글리콜산 및 공중합체(예컨대, 라텍스 기능화 세파로오스(TM), 아가로오스, 셀룰로오스 등), 고분자성 아미노산, 아미노산 공중합체, 및 지질 집합체(예컨대, 오일 방울 또는 리포좀)를 포함할 수 있다. 또한, 이들 담체는 면역자극제(즉, 보조제)로서 기능할 수 있다.

[0169] 직장 투여를 위한 적합한 제형은, 예를 들어 좌약 기재를 갖는 포장된 핵산으로 구성된 좌약을 포함한다. 적합한 좌약 기제는 천연 또는 합성 트리글리세리드 또는 파라핀 탄화수소를 포함한다. 또한, 예를 들어, 액체 트리글리세라이드, 폴리에틸렌 글리콜, 및 파라핀 탄화수소를 포함하는 염기와 선택 화합물의 조합으로 구성된 젤라틴 직장 캡슐을 사용하는 것도 가능하다.

[0170] 예를 들어, 관절 내(관절 내에), 정맥 내, 근육 내, 종양 내, 피내, 복강 내, 및 피하 경로에 의한 것과 같은 비경구 투여에 적합한 제형은 항산화제, 완충액, 세균억제제, 제형을 의도된 수혜자의 혈액과 등장성으로 만드는 용질을 함유할 수 있는, 수용성 및 비-수용성, 등장 멸균 주사 용액, 및 현탁제, 용해제, 증점제, 안정제, 및 방부제를 포함할 수 있는 수용성 및 비-수용성 멸균 현탁액을 포함한다. 조성물은, 예를 들어, 정맥 내 주입에 의하거나, 경구적으로, 국소적으로, 복강내로, 방광내로 또는 척수강내로 투여될 수 있다. 비경구 투여, 경구 투여, 및 정맥 내 투여는 바람직한 투여 방법이다. 화합물의 제형은 앰플 및 바이알과 같은 단위-용량 또는 다중-용량 밀폐 용기로 제공될 수 있다.

[0171] 주사 용액 및 현탁액은 앞서 설명한 종류의 멸균 분말, 과립 및 태블릿으로부터 제조될 수 있다. 생체 외 치료를 위한 핵산에 의한 세포 형질도입은 전술한 바와 같이 정맥내로 또는 비경구적으로 투여될 수 있다.

[0172] 약학 제제는 단위 투약 형태일 수 있다. 이러한 형태에서, 제제는 적절한 양의 유효 성분을 함유하는 단위 투여량으로 세분된다. 단위 투약 형태는 포장된 제제일 수 있으며, 포장은 포장된 정제, 캡슐, 및 분말과 같은 별도 분량의 제제를 바이알 또는 앰풀에 함유한다. 또한, 단일 투약 형태는 캡슐, 정제, 카쉐(cachet), 또는 로젠지 자체일 수 있거나, 이들 중 적절한 수의 포장된 형태일 수 있다. 상기 조성물은 원한다면 다른 상용 치료제를 또한 함유할 수 있다.

[0173] 조합된 투여는 별도의 제형 또는 단일 약학 제형을 사용하는 동시-투여, 및 임의 순서의 연속 투여를 고려하며, 바람직하게는 양쪽(또는 모든) 활성제가 동시에 그의 생물학적 활성을 발휘하는 기간이 있다.

[0174] 본원에 제공된 조성물의 유효 투여량은 투여 수단, 표적 부위, 환자의 생리학적 상태, 환자가 사람인지 동물인지 여부, 투여되는 또 다른 의약품, 및 처리가 예방적인지 또는 치료적인지 여부를 포함하여, 많은 상이한 요인에 따라 달라질 수 있다. 그러나, 해당 분야의 통상의 기술자는 안내를 위하여 암을 치료 및 예방하기 위한 승인된 조성물의 투여량을 바라보는 적절한 및/또는 등가 투여량을 즉시 인식할 것이다.

[0175] 용어 "질병" 또는 "질환"은 본원에 제공된 화합물, 약학 조성물, 또는 방법으로 치료될 수 있는 환자 또는 대상체의 상태 또는 건강 상태를 의미한다. 임의적으로, 질병은 암(예컨대, 폐암, 난소암, 골육종, 방광암, 자궁경부암, 간암, 신장암, 피부암(예컨대, 메셀 세포 암종), 고환암, 백혈병, 림프종, 두경부암, 대장암, 전립선암, 췌장암, 흑색종, 유방암, 신경모세포종)이다. 질병은 자가면역, 염증성, 암, 전염성, 대사성, 발달성, 심장혈관성, 간장성, 내분비선성, 신경학적, 또는 기타 질병일 수 있다.

[0176] 본원에 사용된 용어 "암"은 포유류에서 발견되는 모든 유형의 암, 신생물 또는 악성 종양을 말하며, 백혈병, 림프종, 흑색종, 신경내분비 종양, 암종 및 육종을 포함한다. 본원에 제공된 화합물, 약학 조성물, 또는 방법에 의해 치료될 수 있는 예시적인 암은 림프종, 육종, 방광암, 골암, 뇌종양, 자궁경부암, 결장암, 식도암, 위암, 두경부암, 신장암, 골수종, 갑상선암, 백혈병, 전립선암, 유방암(예컨대, 삼중 음성, ER 양성, ER 음성, 화학요법 내성, 허셉틴 내성, HER2 양성, 독소루비신 내성, 타목시펜 내성, 관 암종, 소엽암, 원발성, 전이성), 난소암, 췌장암, 간암(예컨대, 간세포 암종), 폐암(예컨대, 비-소세포 폐 암종, 편평 세포 폐 암종, 선암, 대세포

폐 암종, 소세포 폐 암종, 카르시노이드, 육종), 다형성아교모세포종, 신경교종, 흑색종, 전립선암, 거세-저항성 전립선암, 유방암, 삼중 음성 유방암, 아교모세포종, 난소암, 폐암, 편평 세포 암종(예컨대, 머리, 목, 또는 식도), 대장암, 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 림프종, B 세포 림프종, 또는 다발성 골수종을 포함한다. 추가적인 예는 갑상선, 내분비계, 두뇌, 유방, 자궁경관, 결장, 머리 및 목, 식도, 간, 신장, 폐, 비-소세포 폐, 흑색종, 중피종, 난소, 육종, 위, 자궁의 암, 또는 수모세포종, 호지킨 병, 비-호지킨 림프종, 다발성 골수종, 신경모세포종, 신경교종, 다형성아교모세포종, 난소암, 횡문근육종, 원발성 혈소판증가증, 원발성 마크로글로불린혈증, 원발성 뇌종양, 암, 악성 췌장 인슐린종, 악성 카르시노이드, 방광암, 전암 피부 병변, 고환암, 림프종, 갑상선암, 신경모세포종, 식도암, 비뇨생식관 암, 악성 고칼슘혈증, 자궁내막 암, 부신피질 암, 내분비 또는 외분비 췌장의 신생물, 수질 갑상선암, 수질 갑상선 암종, 흑색종, 대장암, 유두 갑상선암, 간세포 암종, 유방의 파제트 병, 엽상 종양, 소엽암, 관 암종, 췌장 성상 세포의 암, 간 성상 세포의 암, 또는 전립선암을 포함한다.

[0177] 용어 "백혈병"은 광범위하게 혈액-생성 기관의 진행성, 악성 질환을 말하며 일반적으로 혈액 및 골수에서 백혈구 및 이들의 전구체의 왜곡된 증식 및 발생을 특징으로 한다. 백혈병은 일반적으로 (1) 질환의 지속기간 및 특성(급성 또는 만성); (2) 관련된 세포의 유형; 골수(골수성), 림프(림프성), 또는 단핵세포성; 및 (3) 혈액에서 세포 수의 증가 또는 비증가[백혈병성 또는 비백혈병성(아백혈병성)]에 기초하여 임상적으로 분류된다. 본원에 제공된 화합물, 약학 조성물, 또는 방법으로 치료될 수 있는 예시적인 백혈병은 예를 들어, 급성 비림프구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 급성 과립구성 백혈병, 만성 과립구성 백혈병, 급성 전골수성 백혈병, 성체 T 세포 백혈병, 무백혈병성 백혈병, 백혈구병성 백혈병, 호염기성 백혈병, 모세포 백혈병, 소(bovine) 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 백혈병 창상, 배아 백혈병, 호산구성 백혈병, 그로스 백혈병(Gross' leukemia), 다모 세포 백혈병(hairy-cell leukemia), 성혈세포성 백혈병(hemoblastic leukemia), 혈구아세포성 백혈병(hemocytoblastic leukemia), 조직구성 백혈병(histiocytic leukemia), 줄기세포 백혈병, 급성 단핵구성 백혈병, 백혈구 감소성 백혈병(leukopenic leukemia), 림프계 백혈병(lymphatic leukemia), 림프모구성 백혈병(lymphoblastic leukemia), 림프구성 백혈병(lymphocytic leukemia), 림프형성 백혈병(lymphogenous leukemia), 림프구 백혈병(lymphoid leukemia), 림프육종 세포 백혈병(lymphosarcoma cell leukemia), 비만세포 백혈병, 거대핵세포 백혈병(megakaryocytic leukemia), 미세골수아구성 백혈병(micromyeloblastic leukemia), 단구성 백혈병, 골수엽 백혈병(myeloblastic leukemia), 골수성 백혈병(myelocytic leukemia), 골수 과립구성 백혈병(myeloid granulocytic leukemia), 골수단구성 백혈병(myelomonocytic leukemia), 네겔리 백혈병(Naegeli leukemia), 혈장 세포 백혈병, 다발성 골수종, 형질구성 백혈병(plasmacytic leukemia), 전골수구성 백혈병(promyelocytic leukemia), 리이더 세포 백혈병(Rieder cell leukemia), 실링 백혈병(Schilling's leukemia), 줄기 세포 백혈병, 아백혈성 백혈병(subleukemic leukemia), 및 미분화 세포 백혈병을 포함한다.

[0178] 본원에 사용된 용어 "전이성" 및 "전이성 암"은 상호교환적으로 사용될 수 있으며 하나의 기관 또는 또 다른 인접하지 않은 기관 또는 신체 부위로부터의 증식성 질환 또는 장애, 즉 암의 확산을 지칭한다. 암은 기원 부위, 예컨대, 유방에서 발생하며, 이 부위는 원발성 종양, 예컨대 원발성 유방암으로 지칭된다. 원발성 종양 또는 기원 부위의 일부 암 세포는 국소적 영역에서 주변 정상 조직에 침투하고 침윤하는 능력 및/또는 계를 통하여 신체의 다른 부위 또는 조직으로 순환하는 림프계 또는 혈관계의 벽을 침투하는 능력을 획득한다. 원발성 종양의 암 세포로부터 형성된 두 번째 임상적으로 검출가능한 종양은 전이성 종양 또는 이차 종양으로 지칭된다. 암 세포가 전이될 때, 전이성 종양과 그 세포는 원래의 종양과 유사하다고 추정된다. 따라서, 폐암이 유방으로 전이되면, 유방 부위의 이차 종양은 비정상 폐 세포로 이루어지며 비정상 유방 세포가 아니다. 유방에 있는 이차 종양은 전이성 폐암이라고 한다. 따라서, 전이성 암이란 어구는 대상체가 원발성 종양을 갖거나 가지고 있었고 하나 이상의 이차 종양을 갖는 질환을 말한다. 비-전이성 암 또는 전이성이 아닌 암을 갖는 대상체는 대상체가 원발성 종양을 갖지만 하나 이상의 이차 종양은 갖지 않는 질환을 지칭한다. 전이성 폐암은 원발성 폐 종양이 있거나 그 병력이 있고, 예컨대 유방의 두 번째 위치 또는 여러 위치에서 하나 이상의 이종 종양이 있는 대상체의 질병을 지칭한다.

[0179] 질병(예컨대, 암(예컨대, 백혈병, 림프종, B 세포 림프종, 또는 다발성 골수종))과 관련된 물질 또는 물질 활성 또는 기능의 맥락에서 용어 "관련된" 또는 "관련되어 있는"은 질병(예컨대, 암, 예컨대, 백혈병, 림프종, B 세포 림프종, 또는 다발성 골수종)이 상기 물질 또는 물질 활성 또는 기능에 의해 (전체적으로 또는 부분적으로) 발생되거나, 질병의 증상이 상기 물질 또는 물질 활성 또는 기능에 의해 (전체적으로 또는 부분적으로) 발생되는 것을 의미한다.

[0180] 본원에 사용되듯이, 자가면역 질환은, 예컨대 대상체의 몸에 정상적으로 존재하는 물질 조직 및/또는 세포에 대한 대상체의 면역 체계에 의해 변화된 면역 반응으로부터 발생하는 질병 또는 장애를 지칭한다. 자가면역 질환

은 비제한적으로 관절염, 류마티스 관절염, 건선성 관절염, 소아기 특발성 관절염, 경피증, 전신성 경피증, 다발성 경화증, 전신성 홍반성 루프스(SLE), 중증 근무력증, 소아기 발병 당뇨증, 제1형 당뇨병, 길랑-발레 증후군, 하시모토 뇌염, 하시모토 갑상선염, 강직성 척추염, 건선, 쇼그렌 증후군, 혈관염, 사구체신염, 자가-면역성 갑상선염, 베체트 병, 크론 병, 궤양성 대장염, 수포성 천포창, 유육종증, 건선, 소양증, 그레이브스 안병증, 염증성 장 질환, 애디슨 병, 백반, 천식, 및 알러지성 천식을 포함한다.

[0181] 본원에 사용되는 바와 같이, 염증성 질환은 비정상적이거나 변형된 염증과 관련된 질환 또는 장애를 지칭한다. 염증은 병원균, 손상된 세포 또는 조직 또는 자극에 대한 치유 과정의 일부로 면역계에 의해 시작된 생물학적 반응이다. 만성 염증은 다양한 질병을 일으킬 수 있다. 염증성 질환은 비제한적으로 죽상경화증, 알러지, 천식, 류마티스 관절염, 이식 거부, 체강 질병, 만성 전립선염, 염증성 장 질환, 골반 염증성 질환, 및 염증성 근병증을 포함한다.

[0182] 인간화 항체는 마우스 항체("공여자 항체", 이는 또한 랫, 햄스터 또는 기타 비-인간 종일 수 있음)로부터의 적어도 하나의 CDR(또는 그 기능성 단편 또는 변이체)이 인간 항체 프레임워크("억셉터 항체")에 이식되는, 유전자 조작된 항체이다. 임의적으로, 하나 이상의 마우스 CDR이 이식된다(예컨대, 6개 마우스 CDR 모두가 이식된다). 억셉터 항체의 서열은, 예를 들어 성숙한 인간 항체 서열(또는 그 단편), 인간 항체 서열(또는 그 단편)의 컨센서스 서열, 또는 생식세포 영역 서열(또는 그 단편)일 수 있다. 따라서, 인간화 항체는 공여자 항체 및 가변 영역 프레임워크(FR)로부터 하나 이상의 CDR을 갖는 항체일 수 있다. FR은 인간 항체 내의 불변 영역 및/또는 가변 영역의 일부를 형성할 수 있다. 또한, 높은 결합 친화성을 유지하기 위해, 인간 억셉터 서열 내의 아미노산은, 예를 들어, (1) 아미노산이 CDR에 있거나 (2) 아미노산이 인간 프레임워크 영역에 있는 경우(예컨대, 아미노산이 CDR 중 하나와 바로 인접해 있음), 공여자 서열의 상응하는 아미노산에 의해 대체될 수 있다. 미국 특허공보 제5,530,101호 및 제5,585,089호를 참조하고, 이는 여기에 참조로 수록되며, 이는 인간화 항체의 구성에 대한 상세한 설명을 제공한다. 비록 인간화 항체가 종종 마우스 항체로부터의 모든 6개의 CDR을 통합하지만(예컨대, 카밧에 의해 정의된 바와 같이, 그러나 종종 코티아(Chothia)에 의해 정의된 초가변 루프 H1을 포함), 이들은 또한 적은 수의 마우스 CDR 및/또는 완전한 마우스 CDR 서열보다 더 적게 만들어질 수 있다(예컨대, CDR의 기능성 단편)(예컨대, 문헌[Pascalis *et al.*, J. Immunol. 169:3076, 2002]; 문헌[Vajdos et al., Journal of Molecular Biology, 320: 415-428, 2002]; 문헌[Iwahashi et al., Mol. Immunol. 36:1079-1091, 1999]; 문헌[Tamura et al, Journal of Immunology, 164:1432-1441, 2000)] 참고).

[0183] 전형적으로 본원에 제공된 인간화 항체는 (i) 마우스 항체의 적어도 하나의 CDR(종종 3개의 CDR)(본원에서 마우스 CDR이라 칭함) 및 인간 가변 영역 프레임워크를 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 (ii) 마우스 항체의 적어도 하나의 CDR(종종 3개의 CDR) 및 인간 가변 영역 프레임워크(FR)를 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 경쇄 및 중쇄 가변 영역 프레임워크(FR)는 각각 성숙한 인간 항체 가변 영역 프레임워크 서열(또는 그 단편), 생식세포 가변 영역 프레임워크 서열(J 영역 서열과 결합됨)(또는 그 단편) 또는 인간 항체 가변 영역 프레임워크 서열(또는 그 단편)의 컨센서스 서열을 포함할 수 있다. 임의적으로, 인간화 항체는 본원에 개시된 경쇄 가변 영역(i), 경쇄 인간 불변 영역 및 중쇄 인간 불변 영역과 함께 본원에 개시된 중쇄 가변 영역(ii)을 포함한다.

[0184] 키메라 항체는 마우스(또는 다른 설치류) 항체의 가변 영역이 인간 항체의 불변 영역과 결합된 항체이고; 유전자 조작에 의한 키메라 항체의 제작은 잘 알려져 있다. 이러한 항체는 마우스 항체의 결합 특이성을 유지하고, 약 2/3 인간이다. 마우스, 키메라 및 인간화 항체에 존재하는 비인간 서열의 비율은 키메라 항체의 면역원성이 마우스와 인간화 항체 사이의 중간임을 시사한다. 마우스 항체에 비해 면역원성을 감소시킬 수 있는 유전적으로 조작된 항체의 또 다른 유형은 파지 디스플레이 방법을 사용하거나(다워(Dower) 등의 WO91/17271; 맥카퍼티(McCafferty) 등의 WO92/001047; 윈터(Winter)의 WO92/20791; 및 문헌[Winter, FEBS Lett. 23:92, 1998], 이들 각각은 본원에 참조로 혼입됨) 형질전환 동물을 사용하여(론버그(Lonberg) 등의 WO93/12227; 쿠커라파티(Kucherlapati)의 WO91/10741, 이들 각각은 본원에 참조로 혼입됨) 제조된 인간 항체를 포함한다.

[0185] 인간화 항체를 설계하기 위한 또 다른 접근법이 또한 미국 특허공보 제5,530,101호 및 제5,585,089호의 방법과 같은 동일한 결과를 달성하기 위해 사용될 수도 있다(예를 들어, 문헌[Tan et al. J. Immunol. 169: 1119, 2002], 및 미국 특허공보 제6,881,557호에 개시된 초인간화 또는 문헌[Studnicak et al., Protein Eng. 7:805, 1994]의 방법). 더욱이, 유전적으로 조작되고, 감소된-면역원성 mAb를 생산하는 또 다른 접근법은 문헌[Vaswami et al., Annals of Allergy, Asthma and Immunology 81:105, 1998]; 문헌[Roguska et al. Protein Eng. 9:895, 1996]; 및 미국 특허공보 제6,072,035호 및 제5,639,641호에 개시된 바와 같이, 재형성(reshaping), 과키메라화(hyperchimerization) 및 축성(veneering)/표면처리(resurfacing)를 포함한다.

[0186] 개시된 방법 및 조성물에 대해 사용될 수 있거나, 함께 사용될 수 있거나, 제조에 사용될 수 있거나, 생성물일 수 있는 물질, 조성물, 및 성분이 개시되어 있다. 이들 및 기타 물질이 본원에 개시되어 있으며, 이들 물질의 조합, 서브세트, 상호작용, 군 등이 개시될 때, 이들 화합물의 다양한 개별 및 집단 조합 및 치환의 특정 참조가 명시적으로 개시되지 않더라도, 각각은 구체적으로 고려되고 본원에 설명된다. 예를 들어, 방법이 개시되고 논의되며 그 방법을 포함하여 다수의 분자에 대해 행해질 수 있는 다수의 변형이 논의된다면, 특별히 반대하지 않는 한, 상기 방법의 각각의 그리고 모든 조합 및 치환, 그리고 가능할 수 있는 변형이 구체적으로 논의된다. 마찬가지로, 이들의 임의의 서브세트 또는 조합이 또한 구체적으로 고려되고 개시된다. 이러한 개념은 개시된 조성물을 사용하는 방법의 단계를 비제한적으로 포함하여 본 개시의 모든 양상에 적용된다. 따라서, 수행될 수 있는 다양한 추가 단계가 있는 경우, 이들 추가 단계 각각은 임의의 특정 방법 단계 또는 개시된 방법의 방법 단계들의 조합으로 수행될 수 있으며, 이러한 각각의 조합 또는 조합의 서브세트가 구체적으로 고려되어야 하며 개시된 것으로 간주되어야 한다.

[0187] 하기 실시예는 본원에 기재된 방법 및 조성물의 특정 측면을 추가로 예시하기 위한 것이며, 청구범위를 제한하려는 것은 아니다.

[0188] 실시예

[0189] **실시예 1. 본래 접힌 재조합 단백질에 대한 새로운 BAFF-수용체 항체는 생체 내에서 약물 내성인 인간 B 세포 악성 종양을 제거한다.**

[0190] mAb를 개발하기 위해 박테리아에서 생성된 종래 재조합 면역원 단백질은 번역-후 변형이 없으며 진핵생물, 원핵생물과 비교하여 샤페론 단백질과 산화 환경이 없기 때문에 단순하게 접혀있다. 결과적으로, 이러한 단백질은 상응하는 원형질막-고정된 천연 단백질과 입체 구조가 상이할 수 있다. 또한, 항체는 표적 단백질의 막관통 또는 세포내 도메인과 같은 표적-밖 도메인에 대해 증가될 수 있다. 본원에 개시된 바와 같이, 진핵 세포 상에 발현된 음성으로 접힌, 글리코실화된 면역원에 대한 mAb를 생성시키는 전략이 적용되었다. 구체적으로, 인간 BAFF-R은 마우스 섬유아세포 세포의 천연 단백질로서, 조작된 세포 클론을 마우스의 면역원으로 사용하였다. 생체 외에서 인간 악성 B 세포주 및 원발성 림프종을 특이적으로 결합하고 용해시키고, 생체 내에서 이종 종양 모델에서의 약물-내성 림프종 세포주의 성장을 억제하는 신규 mAb의 생성이 본원에 개시된다.

[0191] 재료 및 방법

[0192] 동물, 세포주 및 원발성 인간 종양 샘플. 항체 개발을 위한 BALB/c 마우스 및 NOD scid 감마(NSG) 번식 쌍을 더 잭슨 래보러토리(The Jackson Laboratory: 미국 메인주 브라 하버)로부터 구입하였다. NSG 번식 군집을 시티 오브 호프(City of Hope)의 애니몰 리소스 센터(Animal Resource Center)에서 관리했다. 마우스를 기관 지침에 따라 병원균이 없는 동물 시설에 수용시켰다. 모든 동물 연구는 기관 동물 관리 및 사용 위원회(IACUC: 15020)의 승인을 받았다. JeKo-1, SU-DHL-6, Raji, U266 및 RL을 ATCC(미국 버지니아주 매나사스)로부터 구입하였다. Z-138 라인은 마이클 왕(Michael Wang) 박사(엠디 앤더슨 캔서 센터(MD Anderson Cancer Center))에 의해 제공되었다. 이브루티닙-내성 SP49-IR 라인은 지안구오 타오(Jianguo Tao) 박사(유니버시티 오브 사우스 플로리다(University of South Florida))에 의해 개발되고 제공되었다. 이브루티닙-내성 SP49 세포주(SP49-IR)는 증가량의 이브루티닙으로 세포를 치료함으로써 확립되었다. IC50은 SP49-IR에 대한 >100 nM과 비교하여 부모 SP49에 대해서 5 nM이었다. 100 nM 이브루티닙에서 >90%의 SP49-IR 세포와 비교하여 약 5%의 SP49 세포가 가능하였다. 인간 NK-92 176V 세포를 콘크웨스트 인코포레이티드(Chonkwest Inc.: 미국 캘리포니아주 샌디에고)에서 입수했다. 인간 혈액 및 종양 샘플의 경우, 배양되지 않은 원발성 인간 림프종을 기관 검토 위원회 승인 프로코톨 하에서 엠디 앤더슨 캔서 센터의 림포마 새틀라이트 티슈 뱅크(Lymphoma Satellite Tissue Bank)로부터 10% DMSO 중의 동결보존된, 가용한 단일 세포 현탁액으로 입수였다(IRB: 2005-0656). 1차 환자 샘플은 맨틀 세포 림프종(MCL) 또는 만성 림프구성 백혈병(CLL)이 있는 환자의 백혈구 및 혈액, 그리고 확산성 거대 B 세포 림프종(DLBCL) 또는 여포성 림프종(FL)이 있는 환자의 절제된 림프절을 포함하였다. 각 샘플의 종양 세포는 백혈구 또는 혈액에 대하여 80% 내지 98%, 림프절 생검에 대하여 50% 내지 60%의 범위였다. 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)는 시티 오브 호프에 있는 마이클 아미니 트랜스퓨젼 메디슨 센터(Michael Amini Transfusion Medicine Center)에 의해 제공되었다(IRB: 15283).

[0193] 인간 BAFF-R 발현 마우스 섬유아세포 세포의 생성. 인간 BAFF-R(hBAFF-R) cDNA는 인간 B 세포로부터 유래되었고 pEGFP-N1 벡터(타카라/클로텍(Takara/Clotech), 미국 캘리포니아주 마운틴 뷰) 상의 GFP 유전자로 인-프레임(in-frame)으로 클로닝되었다. hBAFF-R cDNA 서열은 NCBI 유전자 서열 데이터베이스에 대하여 확인되었다(유전자 ID: 115650). hBAFF-R-GFP 융합을 인코딩하는 cDNA는 그 후, 마우스 섬유아세포(L) 세포로 형질도입될 때,

렌티바이러스 유전자 전달 시스템(pLenti6/V5-DEST 게이트웨이 벡터 키트(Gateway Vector kit), 라이프 테크놀로지스(Life Technologies), 미국 뉴욕주 그랜드 아일랜드)으로 클로닝되어 hBAFF-R-GFP 융합 단백질을 생성한다. 단일 세포 클론이 분류된 GFP-양성 L 세포로부터 확립되었고, (h)BAFF-R-GFP-발현 L 세포 클론 D2C를 추가 연구에서 사용하였다.

[0194] 항체-생성 하이브리도마. 2마리의 6-주령 BALB/c 마우스를 3 일에 1회 발바닥에서 5회 피하 주입하여 D2C 세포로 면역화시켰다. ELISA에 의해 D2C에 대한 혈청 항체를 측정하기 위해 두 마우스 모두에서 혈액 샘플을 얻었다. 비장 조직을 20 일차에 채취하였다. 채취된 비장 세포를 Sp2/0 골수종과 융합시켜 하이브리도마를 만들고 ELISA로 D2C 또는 부모 L 세포-코팅된 플레이트를 사용하여 항체를 선별하였다. 면역화 및 하이브리도마 과정은 엠디 앤더슨 캔서 센터의 안티바디 코어 프퍼실러티(Antibody Core Facility)에서 수행되었다.

[0195] 키메라 항체 생산. 항체 경쇄 및 중쇄의 가변 영역을 인코딩하는 선택된 하이브리도마의 cDNA를 각각의 인간 IgG1 불변 영역을 포함하는 발현 벡터에서 조작하였다. 벡터를 제조사의 지시에 따라 FreeStyle 293 Expression System(라이프 테크놀로지스: 미국 캘리포니아주 칼스배드)으로 공동-형질감염시켰다. 배양 상청액 중의 항체를 하이트랩 단백질 A(HiTrap Protein A) 친화성 크로마토그래피 칼럼(지이 헬스케어(GE Healthcare), 미국 매사추세츠주 말보로)으로 제조사의 지시에 따라 정제하였다.

[0196] 세포독성 검정. 51Cr 방출 검정을 위해 표적 세포(L 세포, 인간 종양 라인, 1차 환자 샘플)를 크롬-51(51Cr, 퍼킨 엘머(Perkin Elmer), 미국 매사추세츠주 왈탐)로 표지하였다. 간단히 말하면, 항체 및 효과기(NK 세포 또는 보체 혈청 표준[시그마 알드리치(Sigma Aldrich), 미국 미주리주 세인트루이스])을 표지된 표적 세포에 첨가하고 최대 18 시간 동안 배양하였다. NK 세포는 PBMC에서 농축되었다(NK 세포 농축 키트, 스템셀 테크놀로지스(Stemcell Technologies), 캐나다 밴쿠버). 상청액으로 방출된 51Cr은 위자드 오토매틱 감마 카운터(Wizard Automatic Gamma Counter)(퍼킨 엘머)로 검출되었다.

[0197] JeKo-1-CD20-KO의 생성. CD20-CRISPR/Cas9 및 HDR Plasmid Systems(산타 크루즈 바이오테크놀로지: 미국 캘리포니아주 산타 크루즈)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 FACS-정렬된, 안정한 JeKo-1-CD20-KO를 생성하였다. CD20 노크-아웃을 유동 세포계측 및 웨스턴 블롯으로 확인하였다.

[0198] 생체 내 연구. 종양 모델의 경우, 안정한 루시퍼라제-발현 종양 라인을 마우스 모델에서 생체발광 이미징에 대하여 확립시켰다. 간단히 말해서, 루시퍼라제 유전자를 렌티바이러스 유전자 전달 시스템(pLenti7.3/V5-DEST Gateway Vector Kit, 라이프 테크놀로지스, 미국 캘리포니아주 칼스배드)에 의해 종양 라인에 도입시켰다. 마우스 당 최소 치사 투여량을 투여량 적정에 의해 각 종양 세포주에 대해 결정하였다. 종양 세포에 정맥 내(IV) 주입하고 마우스를 생존을 보장하기 위한 최소 종양 투여량에 대하여 생체발광 이미징에 의해 생체 내에서 모니터링하였다. 최소 치사 종양 투여량은 1 x 10^6 JeKo-1, 5 x 10^5 RS4;11, 5 x 10^5 JeKo-1-CD20-KO, 또는 2.5 x 10^4 Z-138 세포이었다.

[0199] 생물발광 이미징: 마우스를 이소플루란으로 마취시키고 영상진단 10 분 전에 복강 내(IP) 주입을 통하여 150 mg/kg D-루시페린(라이프 테크놀로지스, 미국 캘리포니아주 칼스배드)을 투여하였다. 영상처리를 아믹스 이미징 시스템(AmiX imaging system)(스펙트랄 인스트루먼츠 이미징(Spectral Instruments Imaging): 미국 애리조나주 투스칸)에서 수행하였다.

[0200] 항체 연구: 마우스(군당 n=5)를 5 일에 1회로 4번의 치료 3 일 전에 IV 종양 접종하였다. 치료는 300 μL IV 주사이었다: 200 μg 치료 항체, 10 x 10^6 효과기 인간 NK-92-176V 세포, 및 5 x 10^4 IU IL-2(프로메투스 래보러토리스(Prometheus Laboratories), 미국 캘리포니아주 샌디에고). 대조군은 대조군 항체가 있거나 항체 및/또는 NK 세포 없이 동일한 용량의 주사를 받았다. 생체발광 이미징을 최대 80 일 동안 매주 수행하였다. 생존을 종양 접종 후 최대 100 일까지 추적하였다.

[0201] 결과

[0202] 인간 BAFF-R에 대한 단일클론 항체의 생성. BAFF-R의 생물학적으로 관련된 에피토프에 대한 치료 항체를 생성하기 위해, 내인성 세포-표면 단백질이 적절한 번역-후 변형을 갖는 본래의 형태로 제공되는 진핵 세포-표면 발현 시스템이 사용되었다. 마우스 섬유아세포(L) 세포 클론을 세포 표면 GFP-표지된 인간 BAFF-R을 발현하도록 조작하였다. BAFF-R-발현 L 세포 클론을 생성하고 GFP 발현을 위하여 특성화되었다(도 1a). 클론 D2C를 확장하여 도 7a의 방법 및 면역화 계획에 따라 BALB/c 마우스를 면역화하는데 성공적으로 사용하였다.

[0203] 하이브리도마 클론를 생성하고 선별한 후, 4개의 클론(53, 55, 67 및 90)이, BAFF-R-발현이나 부모가 아닌, L

세포에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하는 것으로 확인되었다(도 7b). 4개 클론의 상청액은 모두 BAFF-R-발현 Mino 세포주(MCL)에 투여량-의존적으로 결합하는 항체를 포함하였다. BAFF-R-음성 대조군 세포주, 293T에서는 항체 결합이 검출되지 않았다(도 8).

[0204] 4개 하이브리도마 상청액으로부터의 항체를 단백질 A 친화성 크로마토그래피로 정제하였다. 정제된 항체는 JeKo-1, REC-1, 및 이브루티닙-내성 JVM-13 및 Z-138을 포함하여 또 다른 인간 MCL 라인(도 1b)뿐만 아니라, Mino 세포에 투여량-의존적 방식으로 결합하였다(도 9).

[0205] 4개의 항체에 대한 상보성 결정 영역(CDR)의 분석 결과, 클론 53, 55 및 67은 거의 동일한 서열을 갖는 반면, 클론 90은 독특한 것으로 밝혀졌다. 따라서, 클론 55 및 90을 추가 조사를 위해 선정하였다. 클론 55 및 90은 모두 높은 농도(2 μg/10^6 세포) 및 낮은 농도(0.05 μg/10^6 세포) 모두에서 JeKo-1(MCL), SU-DHL-6(DLBCL), Raji(버킷 림프종), 및 RL(FL)에 효과적으로 결합하였다(도 10).

[0206] 인간 BAFF-R에 대한 키메라 mAb는 생체 외 및 생체 내에서 항-종양 효과를 유발하였다. 클론 55 및 90은 인간 IgG1 불변 영역을 함유하는 각각의 키메라 mAb로 더욱 전개되었다(C55 및 C90으로 명명됨). 키메라 항체는 BAFF-R-발현 L 세포에 특이적인 투여량-의존성 결합을 유지했다(도 1c). C55 및 C90은 알렉사 플루오르 488에 접합되었으며, 비-호지킨 림프종(NHL) 라인 JeKo-1, SU-DHL-6, Raji, 및 RL에 대한 직접적인 결합을 나타냈다(도 1d). 중요하게는, 키메라 mAb는 MCL, DLBCL, 및 FL 부모 원발성 종양 샘플을 쉽게 결합시켰다(도 1e 및 도 11).

[0207] C55 및 C90은 BAFF-R-발현 L 세포 및 JeKo-1에 대하여 특이적으로 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC)을 유도하였으나, BAFF-R 음성 L 세포 및 BAFF-R 음성 인간 다발성 골수종 라인, U266에는 그러하지 않았다(도 2a, 도 12). 대조적으로, 항체는 시험관 내에서 보체 의존성 세포독성(complement dependent cytotoxicity, CDC)을 유도하지 않았다(도 2b). 세포독성은 SU-DHL-6, Raji, 및 RL 림프종 세포주(도 2c 및 도 13)에 대해 나타낸 바와 같이 NK 세포의 첨가를 필요로 하며, 이는 ADCC를 항체-매개 세포독성의 주요 메카니즘으로 제시한다. 중요하게, 키메라 항체는 1차 환자 종양 샘플에 대해 ADCC를 유도하였다(도 3a).

[0208] 항체는 BAFF/BAFF-R 결합을 투여량-의존적 방식으로 억제하였으며(도 14), 이는 종양 세포에서 BAFF/BAFF-R 생존 신호전달의 잠재적 붕괴를 시사한다. 또한, C55 및 C90은 BAFF-R 결합시 제한된 내재화를 나타내었다(도 15).

[0209] 생체 내에서, NSG 마우스에게 루시퍼라제 노크-인 JeKo-1 MCL 세포주를 접종한 후 항체 처리하였다. 처리는 도 4a의 일정을 따랐다. C55 또는 C90을 투여받은 마우스는 PBS 또는 NK 세포 단독의 대조군과 비교하여 종양 성장의 유의미한 지연을 보였다(도 4b). 유사하게, C55 및 C90은 또한, 리툭시맙 또는 대조군에 의한 비억제와 비교하여, RS4; 11마리(급성 림프모구성 백혈병, ALL) 접종된 NSG 마우스에서 종양 성장을 현저히 지연시켰다(도 4c).

[0210] 키메라 mAb는 생체 외 및 생체 내에서 약물-내성 림프종에 대한 강력한 항종양 효과를 유도하였다. 항체는 이전에 리툭시맙으로 처리된 환자의 원발성 CLL(n=3) 및 MCL(n=2) 샘플에 대해 추가로 시험되었다. 5개의 1차 샘플 모두 C55 및 C90이 있는 ADCC에 의한 살생에 민감하였으며, 이는 리툭시맙에 노출된 후 임상적으로 진행된 종양에 대한 효과를 시사하였다(도 3b).

[0211] 약물-내성 림프종의 모델을 만들기 위해, CRISPR/HDR 시스템을 사용하여 JeKo-1의 안정적인 CD20 노크-아웃(KO) 클론을 생성했다. CD20-KO 클론은 유동 세포계측 및 웨스턴 블로팅에 의한 CD20 표면 발현의 부재(도 5a 및 도 16a 및 16b) 및 유동 세포계측에 의한 BAFF-R 표면 발현의 존재(도 16c)에 대해 확인되었다. 추가 연구를 위해 선택된 JeKo-1-CD20-KO 클론 25는 C55- 및 C90- 매개 ADCC에 대한 민감성을 유지하였지만, 항-CD20 리툭시맙에 의해 매개되는 세포독성에는 민감하지 않았다(도 5b).

[0212] 약물-내성 림프종의 두 번째 모델로서, 키메라 BAFF-R mAb를 천연 이브루티닙 내성 인간 MCL 라인, Z-138 및 유도된 이브루티닙 내성 MCL 라인, SP49-IR에 대하여 ADCC에 대해 시험하였고, 이는 이브루티닙에 대한 내성을 위해 생체 외에서 유도된 것이었다(방법 참조). 현저한 생체 외 ADCC는 이브루티닙 내성 라인 모두에 대한 항체로 관찰되었다(도 5c).

[0213] 마지막으로, 생체 내에서 JeKo-1-CD20-KO 종양 세포를 IV 접종한지 3 일 후에, NSG 마우스(군당 n=5)는 방법에서 기술된 바와 같이 도 4a의 일정에 따라 BAFF-R 항체 처리(C55 또는 C90) 또는 리툭시맙을 받았다. 20 일차에서의 생체발광 이미징은 대조군 및 리툭시맙 처리 마우스에서 상당한 종양 부하를 나타냈지만, BAFF-R 항체 치

료 군에서는 육안으로 보이는 종양이 나타나지 않았다(도 6a). 종양이 없는 장기적인 전체 생존을 모니터링하면 BAFF-R 항체 모두의 상당한 항종양 효과는 확인되었지만, 리툭시맙은 그렇지 않았다(도 6c). 유사하게, 대조군(PBS 또는 NK 단독)과 비교하여, 이브루티닙-내성 Z-138 종양-보유 마우스를 어느 하나의 BAFF-R 항체로 처리한 이후에 유의미한 효과가 관찰되었다(도 6b 및 6c).

[0214] BAFF-R mAb는 또한 정상 B 세포에 결합한다. 정상 PBMC에 대해 시험하였을 때, 항-BAFF-R 항체 C90은 예상대로, T 세포, NK 세포, 과립구, 또는 단핵구를 염색하지 않고, B 세포에 특이적인 결합을 나타냈다(도 17). 양성 염색 결과는 정제된 B 세포에서 확인되었다(도 18). 다시 말하면, 정제된 T 세포, NK 세포, 및 게이팅된 골수 세포는 결합을 나타내지 않았다.

[0215] 본 발명자들의 범위를 확장시키면서, 면역조직화학 연구는 편도선과 비장 샘플에 대한 본 발명자들의 항체의 양성 염색을 보여주었으며, 심장, 폐, 신장, 및 뇌를 포함한 다른 모든 중요한 장기는 그대로 유지했다(도 19a 및 19b).

[0216] 토의

[0217] 제공된 BAFF-R mAb는 NHL, CLL, 및 ALL을 포함한 여러 가지 B 세포 종양 유형에 대한 단일 약제로서 강력한 생체 내 항종양 효과를 이끌어 냈다. 또한, 항체는 확립된 종양을 박멸하여, 생체 내에서 장기간 종양-없는 생존을 유도하였다.

[0218] BAFF-R mAb의 구별되는 특징은 이들을 생성하는데 사용된 접근법 때문일 수 있다. 제공된 접근법은 면역화를 위하여 마우스 섬유아세포 세포 상에서 천연 표면 단백질로서 인간 BAFFF-R을 발현하여, 본래 접힌 글리코실화된 면역원을 제공하는 가능성을 높였다. 그러므로, 항체가 개시된 또 다른 항체와 구별되는 접근가능한 인간 BAFF-R 에피토프를 결합할 가능성이 매우 높다. 따라서, 생체 내에서 B 세포 종양을 특이적으로 결합하고, 용해하고, 억제할 수 있는 본래 접힌, 진핵세포로 글리코실화된 인간 BAFF-R에 대한 단일클론 항체 생성을 위한 기술적 전략이 입증되었다. 결과는 생체 외 활성을 위한 mAb 이외에 NK 세포가 필요했기 때문에 우리 mAb의 주요 항-종양 메카니즘이 ADCC임을 시사하며(도 2); CDC의 증거는 관찰되지 않았다. 두 항체 모두 BAFF-R에 결합하는 BAFF 리간드를 경쟁적으로 억제할 수 있었다(도 14).

[0219] 리툭시맙에 대한 임상적으로 관련된 내성 메커니즘은 CD20의 하향-조절이다. 약물 내성 현상은 CD20이 결핍된 CRISPR 편집 MCL 라인, JeKo-1로 모델링되었다. 이러한 라인 및 유사하게 천연적 이브루티닙 내성 Z-138 MCL에 대한, 리툭시맙 처리 없는, C55 또는 C90의 상당한 생체 내 항종양 효과는 약물-내성 림프종에 대한 효능을 시사한다(도 5). 리툭시맙으로 이전에 치료받았고 리툭시맙에 반응하여 진행된 림프종 환자의 원발성 종양에 대한 이러한 항체의 생체 외 세포독성과 함께, 이러한 데이터는 C55 및 C90이 약물 내성을 극복하기 위한 잠재적 치료 전략임을 시사한다(도 3).

[0220] **실시예 2. BAFF-R mAb의 인간화.**

[0221] 키메라 항체, 클론 90을 결합 특이성 및 세포독성 효과를 유지하면서 인간화하였다. CDR 및 예상된 구조의 전산 분석을 통해, 중쇄의 3가지 변이체 및 경쇄의 3가지 변이체를 인간화 항체와 비슷한 정도의 가변적인 유사성으로 생산하였다. 전체 9가지 조합 변이체가 인간화 중쇄 및 경쇄로부터 구성되었다. 이들 변이체는 모두 2.6 내지 5.0 nM 범위의 K_D 값을 갖는 부모 키메라 항체에 대한 결합 친화도가 비교가능하다는 것을 증명하였다(표 1).

[0222] [표 1]

[0223] 인간화 BAFF-R 항체 변이체의 결합 친화도

로딩 샘플 ID	샘플 ID	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	전체(Full) R^2	전체(Full) X^2
키메라 부모(Chimeric Parental)	BAFF-R	3.0E-09	9.9E+05	2.0E-03	0.0049	0.9809
인간화 HC1 + LC1	BAFF-R	4.0E-09	6.1E+05	2.4E-03	0.0114	0.9619
인간화 HC1 + LC2	BAFF-R	3.7E-09	6.2E+05	2.3E-03	0.005	0.9800
인간화 HC1 + LC3	BAFF-R	5.0E-09	4.1E+05	2.1E-03	0.0125	0.9565
인간화 HC2 + LC1	BAFF-R	2.6E-09	7.7E+05	2.0E-03	0.0051	0.9790
인간화 HC2 + LC2	BAFF-R	3.6E-09	6.1E+05	2.2E-03	0.0047	0.9799
인간화 HC2 + LC2	BAFF-R	3.2E-09	8.2E+05	3.1E-03	0.0045	0.9821
인간화 HC3 + LC1	BAFF-R	3.8E-09	8.2E+05	3.1E-03	0.0045	0.9821
인간화 HC3 + LC2	BAFF-R	3.1E-09	1.2E+06	3.7E-03	0.0074	0.9793
인간화 HC3 + LC3	BAFF-R	3.4E-09	6.8E+05	2.3E-03	0.0025	0.9900

[0224]

[0225] 9개 후보 항체가 추가로 평가되고 우선 후보자가 결정되었다. 인간화 항체의 결합은 BAFF-R에 특이성이 있는 것으로 관찰되었고 모두는 투여량 의존적 방식으로 유사한 상대적 결합을 가졌다(도 20a). 또한, 인간화 항체는 그들의 ADCC 효과에 대해 평가되었다. 다시 말하지만, 인간화된 후보자는 이들의 특이적 세포독성을 유지하고, 키메라 대조군 및 리툭시맙과 비교하여 똑같이 잘 수행되었음이 밝혀졌다(도 20b).

[0226] 인간화 클론 90 변이체 4 및 5를 추가적인 생체 외 시험을 위해 선택하였다. 인간화 항체 변이체는 형광 스트렙타비딘 프로브로 비오틴화되고 시각화되었다. JeKo-1, Ly-10, MEC-2, RL, RS4, Raji, Z138 및 U266을 포함하여, 다양한 비-호지킨 림프종, 림프모구성 백혈병, 및 다발성 골수종 라인에 대한 이들의 결합이 평가되었다(도 22a). 유동 세포계측 결과는 이들 각 세포주에 대한 상당한 결합을 나타낸다. 정상 PBMC에 대한 인간화 변이체를 이용한 추가 유동 분석이 결합의 특이성을 나타낸다. 정상적인 건강한 PBMC에서 과립구, 단핵구, B 세포, T 세포, 및 NK 세포의 결합을 평가할 때, 항체는 단지 B 세포 개체군에만 결합한다(도 22b).

[0227] 2가지 변이체는 ADCC를 개시할 수 있는 이들의 능력에 대해 더욱 평가되었다. 항체는 일정 기간 동안 크롬 섭취 후 JeKo-1, Z138, 및 RS4 라인에 다양한 농도로 투여되었다. 세포와 항체를 효과기 NK 세포와 함께 배양하였다. 상청액을 처리 6 시간 후 분석하였다(도 21a). 항체는 종양 라인에 대한 명확한 세포독성 효과를 가지며 각 10배 희석액으로 투여량 의존성을 입증한다. 그 결과는 리툭시맙의 결과와 비슷하지만 리툭시맙이 활성화되지 않은 RS4 급성 림프모구성 림프종에서도 볼 수 있다. LY-10, MEC-2, RL, 및 Raji에 대한 추가 검정(도 21b)은 인간화 항체 치료의 효능을 계속해서 입증한다. 발견된 모든 결과는 리툭시맙에 의한 현재의 기존 치료의 결과와

비교할만하다.

[0228] **실시예 3. 키메라 항원 수용체 T 세포.**

[0229] 높은 결합 친화도 및 생체활성을 갖는 항체를 사용하여 생체 내 연구를 위한키메라 항원 수용체(CAR) T 세포를 제조하였다. 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 위한 DNA 서열은 단일 쇄(sFv) 포맷으로 배열되고 4-1BB 모티프와 함께 T 세포 신호전달 도메인(δ 쇄)으로 조작되었다. 조작된 CAR 유전자는 렌티바이러스를 통해 공동-발현하는 GFP와 함께, 정제된 건강한 공여자 유래 CD8+ T 세포에 도입되었다. CAR-T 세포를 이들의 GFP 발현을 위해 세포 분류하였고 동물 연구를 위해 CD3 및 CD28 비드로 생체 외에서 확대시켰다. NSG 마우스에게 JeKo-1 MCL 라인(JeKo-1-luci)을 발현하는 루시퍼라제를 접종시켰다. 종양을 종양 세포의 가시적 개채군이 관찰될 때까지; 종양 접종 후 약 9 일까지 발달시키고 생체발광 이미징으로 모니터링하였다. 마우스에게 종양 접종 후 9 일차 및 15 일차에 5 x 10^6 CAR-T 세포(항-BAFF-R 및 항-CD19)를 2회 투여하였다. 대조군은 처리되지 않은 T 세포 또는 식염수(PBS)를 투여받았다. 마우스를 면밀히 모니터링하고 CAR-T 요법의 치료적 항-종양 효과를 평가하기 위해 종양 발달을 추적하도록 매 3 일마다 영상을 찍었다.

[0230] 인간화 항-BAFF-R mAb는 그들의 결합 및 세포독성에 대해 1차 환자 종양 샘플에 대해 추가로 평가되었다. 3가지 맨틀 세포 림프종 환자 샘플은 BAFF-R을 발현하는 대부분의 종양 세포를 특징으로 한다. 유동 세포계측 결과는 우리 인간화 항체에 의해 결합된 이러한 원발성 종양 세포의 뚜렷한 개체군을 나타냈다(도 22a). 또한, 동일한 원발성 종양 샘플에 대한 크롬 방출 세포독성 검정은 대조군에 비해 높은 특이적 사멸을 나타냈다. 결과는 리툭시맙의 효과에 상응하고 이전에 개발된 키메라 항체와 일치한다(도 22b). 인간화 항체의 세포 유형 특이성은 정상 PBMC에 대한 그들의 결합을 평가함으로써 결정되었다. 과립구, 단핵구, T 세포 및 NK 세포를 포함하는 PBMC의 주요 군에 대해서는 주목할만한 결합이 발견되지 않았다. B 세포 개체군은 항체에 의해 결합된 유일하게 검출가능한 개체군이었다(도 23). 검정 결과는 또한 이전에 특성화된 키메라 항체와도 일치한다.

[0231] 항-BAFF-R mAb를 더욱 사용하여 키메라 항원 수용체(CAR) T 세포를 생성시켰다. 실험은 단일 쇄(sFv) 포맷으로 조작된 키메라 C55 가변 영역을 활용했다. 항-BAFF-R C55 sFv는 4-1BB 모티프를 함유하는 T 세포 수용체 신호전달 도메인에 부착되어 건강한 정상 인간 공여자 CD8+ T 세포의 분리된 PBMC로 성공적으로 도입되었다. CAR-T 세포는 상당한 양의 종양 부하를 갖는 종양 보유 마우스에 투여되었다(도 24). 항-BAFF-R CAR-T 세포로 처리한 마우스는 식염수 또는 조작되지 않은 T 세포 대조군과 비교할 때 유의미한 종양 제거를 보였다. 또한, 우리의 CAR-T 세포의 항-종양 효과는 항-CD-19 CAR-T 치료군의 그것과 유사하였다.

[0232] 키메라 항-BAFF-R 항체 C90은 여러 변이체로 인간화되었다. 인간화 과정은 가변 영역 및 특히 키메라 항체의 CDR을 고려하고 분석하였다. 이로부터, 각 중쇄 및 경쇄에 대한 3가지 변이체가 1(가장 인간적) 내지 3(키메라에 가장 보존적)의 범위에서 인간-유사성의 다양한 등급으로 개발되었다. 변이체를 결합하여 9가지 변이체를 생성하였다. 비아코어(Biacore) 분석을 각 변이체뿐만 아니라 키메라 부모(Chimeric Parental) C90에서 수행하여 이들의 평형 해리 상수 K_D를 결정하였다. 항원은 인간 BAFF-R의 상업용, 재조합 세포 외 도메인이었다.

[0233] **실시예 4. BAFF-R CAR의 발현을 위한 T 세포 개체군의 제조.**

[0234] 아래 T 세포 개체군을 BAFF-R CAR의 발현을 위하여 제조하였다: CD4+ 미접촉 T 세포(CD4+ T_N), CD8+ 미접촉 T 세포(CD8+ T_N), CD8+ 중심 기억 T 세포(CD8+ T_{CM}), CD8+ 기억 줄기 세포(CD8+ MSC) 및 Pan T 세포(Pan T). 간단히 말하면, 5 mL의 혈액 샘플을 5 mL의 히스토패이크(Histopaque)-1077(시그마 알드리치)에 첨가하였다. 혼합물을 20 분 동안 2,500 RPM(실온, 브레이크 없음)으로 원심분리하였다. 중간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 층을 수집하고, 50 mL PBS(코닝(Corning))로 세척하고, 5 분 동안 1,500 RPM(RT)에서 원심분리하였다. 수집된 세포를 10 mL RBC 용해 완충액(Qiagen)과 혼합하고 7 분 동안 배양하였다. 이어서 세포를 PBS로 세척하고 5 분 동안 원심분리하였다(1,500 RPM, RT).

[0235] 스템셀 테크놀로지스 인코포레이티드에서 입수가능한 아래 키트를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 다양한 T 세포 개체군을 제조하였다: 이지셉(EasySep)™ 인간 미접촉 CD4+ T 세포 농축 키트(CD4+ T_N), 이지셉™ 인간 미접촉 CD8+ T 세포 농축 키트(CD8+ T_N), 및 이지셉™ 인간 T 세포 농축 키트(Pan T). CD8+ T_{CM}은 스템셀 테크놀로지스 인코포레이티드(캐나다 밴쿠버)의 이지셉™ 인간 CD8+ T 세포 농축 키트를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 CD8+ T 세포를 분리하고 그 후 CD8-PerCP-Cy5.5, CD45 RO-APC, 및 CD62L-PE로 염색하였다. 염색된 세포를 그 후 분류하여 CD8+/CD45+/CD62L+ 삼중 양성 세포를 분리하였다. CD8+ 기억 줄기 세포(CD8+ MSC)를 표 2에 제

시된 배양 조건을 사용하여 CD8+ T_N으로부터 생성시켰다. 또 다른 T 세포 개체군을 표 2에 제시된 바와 같이 배양하였다.

[0236] [표 2]

개체군	*배지*	*혈청*	*사이토카인*	*추가 보충제*
CD4+ T_N, CD8+ T_N, CD8+ T_{CM} Pan T	X-VIVO 15 (론자(Lonza))	10% 인간 AB 혈청 (밸리 바이오메티칼 (Valley Biomedical))	100 U/mL hIL-2	100 U/mL 페니실린 100 μg/mL 스트렙토마이신
CD8+ MSC	AIM-V (써모 피셔(Thermo Fisher))	5% 인간 AB 혈청 (밸리 바이오메티칼)	5 ng/mL IL-7 30 ng/mL IL-21 (셀제닉스(Cellgenix))	2 mM 글루타맥스 (써모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific)) 5 mM TWS119 (케이만 케미칼(Cayman Chemical))

[0237]

[0238] **실시예 5. BAFF-R을 발현하는 렌티바이러스 벡터의 제조.**

[0239] 두 개의 상이한 BAFF-R CAR이 구성되었다. 각각은 CD3 신호 서열 이어서 BAFF-R scFv, CD8a 막관통 도메인(추가적인 세포 외 아미노산 및 세포질 아미노산을 가짐), 4-1BB 보조자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하였다. 여러 영역은 아래 아미노산 서열을 갖는다:

[0240] CD3 신호: MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP(서열번호 39)

[0241] 추가적인 세포 외 및 세포질 아미노산 서열을 포함하는 CD8a 막관통(밑줄 부분): TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC(서열번호 40)

[0242] 4-1BB 보조자극: KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL(서열번호 41)

[0243] CD3 제타 신호전달: RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR(서열번호 42)

[0244] H90 CAR은 아래 scFv 서열을 가진다: VQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGDSITSGYWNWIRQHPGKGLEYIGYISYSGSTYYNPSLKSRVTISRDTSKNQYSLKLSSVTAADTAVYYCASPNYPFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGQAPRLLIYAASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGGGTKVEIKR(서열번호 43)

[0245] H55 CAR은 아래 scFv 서열을 가진다: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSTSGMGVGWVRQSPGKGLEWVAHIWWDDDKYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAIYYCSRSFGYGLDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPILLSASVGDRVTITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQRTNGSPRLLIYLVSNLESGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDEADYYCHQFSELPWTFGAGTKVEIKR(서열번호 44)

[0246] H90 CAR 및 H55 CAR을 인코딩하는 서열을 제조업체의 지침에 따라 pLenti7.3/V5-TOPO 발현 벡터(인비트로겐(Invitrogen), 미국 캘리포니아주 칼스배드)에 클로닝하였다. 도 25a는 BAFF-R CAR-T 세포 생산에 사용되는 키메라 항원 수용체(CAR) 구성의 개략적인 구조이다. 서열 모티프는 CAR-T 생산을 위해 T 세포를 감염시키는데 사용되는 렌티바이러스 벡터 상에 인코딩된다. BAFF-R 단일 쇄 가변 단편(scFv)은 인간화 항-BAFF-R 항체로부터 유래되었다. 다운스트림 GFP 모티프는 분류 및 CAR-T 세포 식별 목적을 위하여 사용되며 CAR 신호전달을 방해하지 않는다.

[0247] **실시예 6. CAR 발현 세포의 제조.**

[0248] 세포를 1:1 비드 대 세포 비로 CD3/CD28 자석 비드(써모 피셔: 미국 매사추세츠주 왈탐)와 결합시키고 하룻밤 동안 배양함으로써(가습됨, 5% CO_2, 37 ℃), BAFF-R CAR을 발현하는 렌티바이러스 벡터에 의한 형질도입을 대비

하여 세포를 활성화시켰다. 배양 후, 세포를 계수하고 48-웰 플레이트에서 1 x 10^6 세포/웰로 분배하였다. 세포를 1의 MOI에서 감염시켰다. 각각의 경우에 총 배양 배지를 250 μL로 보충하고, 30 분 동안 원심분리하였다(800 g, RT). 세포를 밤새 배양하고(가습화됨, 5% CO_2, 37 ℃) 그 후 표 1에 제시된 배지에서 10 일 동안 배양한다. CD4+ T_N, CD8+ T_N, CD8+ T_{CM}, 및 Pan T 세포의 배양물은 CD3/CD28 자석 비드를 1:1 세포 대 비드 비율로 포함하였다. CD8+ T MSC의 배양물에는 CD3/CD28 자석 비드가 포함되지 않았다. BAFF-R CAR의 발현은 유동 세포 계측을 이용하여 GFP 양성 세포의 백분율에 의해 평가되었다.

[0249] 도 25b는 BAFF-R CAR-T 세포 생산에 관여하는 주요 활성을 보여주는 개략적인 시간 선이다. 이 일정에는 CD4+ 및 CD8+ 미접촉 T 세포(날짜 -14) 또는 GFP+ CAR-T 세포(날짜 -7)를 선택하는 두 개의 세포 분리 단계가 포함된다. 첫 번째 분리 단계 후에, 2개의 T 세포 하위개체군을 시뮬레이션하고, BAFF-R CAR 렌티바이러스를 감염시키고, 확장시켰다(CD4+ 및 CD8+ 미접촉 T 세포). 두 번째 분리 단계 후에 GFP+ CAR-T 세포는 7 일 동안 더 확장된다. 채취 단계에서(0 일차), 2가지 미접촉 T 세포 유래 CAR-T 세포 개체군을 주입에 적절한 비율로 혼합한다. 이 연구에서 모든 CAR-T 세포는 원하는 T 세포 개체군과 관련하여, 이 일정에 따라 생산되었다(분리 단계, 날짜 -14).

[0250] **실시예 7. BAFF-R 표적화된 CAR T 세포에 의한 생체 외 세포 사멸.**

[0251] H90 BAFF-R CAR을 발현하는 다양한 T 세포 개체군을 사용하는 생체 외 검정을 사용하여 JeKo-1 세포에 대한 세포독성을 평가하였고(문헌[Jeon et al. 1998 British Journal of Haematology 102:1323]), 이는 맨틀 세포 림프종 세포이다. 이러한 4-시간 ^{51}Cr 방출 검정에서, H90 BAFF-R CAR T 세포를 다양한 효과기 대 표적 비율에서 ^{51}Cr-표지된 BAFF-R 양성 표적 세포(JeKo-1 세포) 또는 PBMC 음성 대조군으로 함께-배양하였다. H90 BAFF-R CAR이 Pan T 세포, CD4+ T_N 세포, CD8+ T_{CM} 세포 또는 CD4+ T_N 세포와 CD8+ T_{CM} 세포의 혼합물에서 발현되었다. 이 분석 결과를 도 26에 제시한다. 각 효과기 대 표적 비율(E/T)에 걸친 T 세포 서브세트는 투여량-의존적 세포독성을 나타냈다. 분리된 CD4+ 미접촉 CAR T 세포(T_N)는 가장 적은 세포독성을 나타냈다. 생체 외 세포독성 효과는, Pan T 세포에서부터, T_N + T_{CM}(1:1 혼합물)까지, 그리고 최종적으로 T_{CM} 단독까지, CD8+ 중심 기억 CAR-T 세포(T_{CM})의 농도가 증가할수록 더 커졌다.

[0252] H90 BAFF-R CAR 발현 CD8+ T_{CM} 세포를 U266 세포(BAFF-R 발현이 없는 다발성 골수종; 음성 대조군), CD3/CD28 비드(양성 대조군) 또는 JeKo-1 세포에 노출하여 세포 증식을 평가하였다. 이 분석의 결과를 도 27에 제시하며 여기서 H90 BAFF-R CAR 발현 CD8+ T_{CM} 세포는 JeKo-1 세포에 강한 증식 반응을 보였다.

[0253] H90 BAFF-R CAR 발현 CD4+ T_N 세포 또는 CD8+ T_N 세포를 U266 세포(BAFF-R 발현이 없는 다발성 골수종; 음성 대조군), CD3/CD28 비드(양성 대조군) 또는 JeKo-1 세포에 노출하여 세포 증식을 평가하였다. 도 28a는 세포 증식 염료 eFluor 670 표지된 CAR-T 세포의 FACS 히스토그램을 도시한다. 세포를 지시된 바와 같이 표적 세포/비드와 72 시간 동안 배양한 후 FACS를 분석하였다. 염색 강도는 세포 증식에 반비례한다. BAFF-R CAR-T 세포는 BAFF-R 발현 조양 세포주의 존재 하에서 증식할 수 있었다. 도 28b는 지시된 바와 같은 표적 세포/비드와 24 시간 동안 배양한 후 사이토카인 IFN-γ, TNF-α, 및 그란자임 B 상청액 농도의 ELISA 측정을 나타내는 그래프이다. 동종이계 대조군은 동일한 공여자 샘플로부터의 비-형질도입 CD4+ 또는 CD8+ T 세포를 사용하여 병행하여 수행되었다. 모든 데이터는 둘 이상의 동일한 실험을 나타낸다. 데이터는 3배 샘플의 평균 ± s.d.로 제시된다. BAFF-R CAR-T 세포는 BAFF-R 발현 조양 세포주의 존재 하에서 사이토카인을 방출할 수 있었다.

[0254] 도 29는 크롬-51 방출에 의한 표적 세포의 특이적 용해를 측정하는 세포독성 T 림프구 검정을 나타내는 그래프이다. 크롬-51 표지된 표적 세포(악성 B 세포주 또는 대조군, BAFF-R+ L 세포; BAFF-R- 부모 L 세포)를 제시된 효과기-대-표적 비율에서 T 세포와 함께 배양하였다. BAFF-R CAR-T 세포가 CD4+ T_N 또는 CD8+ T_{CM} 분리된 T 세포로부터 유래되었다. 방출된 크롬-51을 상청액에서 배양 4 시간 후 측정하였다. 모든 데이터는 둘 이상의 동일한 실험을 나타낸다. 데이터는 3배 샘플의 평균 ± s.d.로 제시된다.

[0255] 도 29에 나타낸 바와 같이, BAFF-R CAR-T 세포는 광범위한 B 세포 림프종 패널에 대해 세포독성을 유도하였다. BAFF-R CAR-T의 적응증은 또한 급성 림프모구성 및 만성 림프구성 백혈병을 포함할 수 있다. BAFF-R CAR-유도 세포독성의 특이성은 부모 L 세포가 아니라 인간 BAFF-R을 발현하기 위해 조작된 마우스 섬유아세포(L) 세포에 대한 세포독성에 의해 명확하였다.

[0256] **실시예 8. 생체 내에서 BAFF-R 표적화된 CAR의 평가.**

[0257] 맨틀 세포 림프종의 JeKo-1 이종이식 마우스 모델(문헌[Klanova et al. 2014 Laboratory Investigation 94:806]; 문헌[Verner et al. 2015 Leukemia & lymphoma 56:3198])을 사용하여 H90 BAFF-R CAR의 생체 내 활성을 평가하였다.

[0258] 루시퍼라제(ffluc) 및 녹색 형광 단백질(GFP) 세포를 발현하도록 조작된 JeKo-1세포를 NOD/Scid IL2Rγ Cnull(NSG) 마우스에 정맥 내 주사하였다(마우스 당 2 x 10^6 세포). 종양 세포 접종 후 10 일차 및 17 일차에, 마우스에게 1 x 10^6 H90 BAFF-R CAR 발현 CD4+ T_N 및 CD8+ T_{CM} 세포(왼쪽 패널) 또는 1 x 10^6 H90 BAFF-R CAR 발현 Pan T 세포(중간 패널) 또는 PBS(오른쪽 패널)를 정맥 내 주사하였다. 종양 세포 접종 후 10 일, 18 일, 22 일, 25 일, 43 일 및 100 일에 제노젠 영상으로 종양 신호를 모니터링하였다. 이미징 결과를 각 군의 생존율을 그래프로 나타낸 생존 곡선(도 30b)과 함께 도 30a에 제시한다. 로그-순위 테스트로 생존 곡선을 분석한 결과, BAFF-R CAR T 세포 치료로 PBS 대조군에 비해 생존율이 유의미하게 높았다($P < 0.005$).

[0259] 생존한 마우스를 JeKo-1 세포로 다시 접종하여 수여된 기억 면역성과 CAR-T 세포의 지속성을 시험하였다. 따라서, 생존한 마우스(군당 n=4)를 100 일차에 2 x 10^6 fflucGFP JeKo-1 세포를 추가로 정맥 내 주사로 재접종하였다. 재접종 후 11 일, 15 일 및 22 일에 제노젠 영상으로 종양 신호를 모니터링하였다. 이미징 결과는 도 30a에 제시되어있다.

[0260] 이미징 결과는 확립된 종양의 제거를 나타낸다. 치료 코호트에서 대다수의 마우스는 종양 접종 후 100 일 동안 장기간 종양이 없는 생존을 보였다(도 30a). 종양 이미징은 또한 CD4+ T_N + CD8+ T_{CM} 치료 코호트가 Pan T CAR-T 치료와 비교하여 더욱 즉각적인 항-종양 반응을 보였으며, 이는 침강하기 전에 더 큰 종양 부하를 나타냈다.

[0261] 종양 재접종에서, 종양 대조군 마우스에 비해 항-종양 효과가 아주 명확하게 나타났으며, 모두 접종 후 22 일차에 상당한 종양 부하를 나타냈다(도 30a). 거의 모든 종양 재접종 마우스는 종양 발달을 막을 수 있었고, 마우스 #10 만이 22 일차까지 작은 종양을 발달시켰다. 마우스 9마리는 비-종양 관련 원인으로 죽었다.

[0262] 따라서, BAFF-R CAR-T 치료군 둘 모두는 종양 퇴행 및 무-종양 생존을 입증하였다. 종양 재접종은 계속된 항종양 효과를 부여할 수 있는 생체 내 CAR-T 지속성을 나타냈다.

[0263] 전술한 실험에서 사용된 맨틀 세포 림프종의 동일한 마우스 모델을 사용하여 두 번째 BAFF-R CAR(H55 BAFF-R CAR)의 활성을 CD19 표적화된 CAR과 비교하였다. 종양 세포 접종 후 9 일차에, 마우스에게 5 x 10^6 H55 BAFF-R CAR 발현 CD8+ T 세포, 또는 5 x 10^6 CD19-표적화된 CAR 발현 CD8+ T 세포, 또는 PBS(오른쪽 패널)를 정맥 내 주사하였다. 종양 세포 접종 후 9 일, 11 일, 14 일, 및 20 일에 제노젠 영상으로 종양 신호를 모니터링하였다. 이미징 결과는 도 31에 제시되어있다. CD19 CAR-T와 비교할 때, H55 CAR-T는 더욱 즉각적인 대응과 더 나은 관리된 종양 부하를 나타냈다.

[0264] **실시예 9. T 세포 시작 물질을 생체 내에서 BAFF-R CAR T 세포 치료적 지속성에 대해 최적화하였다.**

[0265] 루시퍼라제-발현 JeKo-1로 0 일차에 정맥내(IV) 종양 접종(1 x 10^6 세포/마우스) 후의 NSG 마우스 군(n=5)의 생체발광 이미지. 활성화된 CAR T 세포 치료는 IV에 의해 주입되었다. 치료는 10 일차 및 17 일차에(도 32a) 그리고 10 일차에(도 32b 및 32c) 제공되었다. 치료는 시작 물질 및 CD8+ T_{CM}, T_N, 또는 T_{SCM} CAR-T 세포와 조합된 CD4+ T_N CAR-T 세포의 치료 용량을 최적화하였다. 제시된 치료는 표시된 T 세포 서브세트로부터 유래된(도 32a) 2.5 x 10^6 CD4+ T_N + 2.5 x 10^6 CD8+ T 세포(도 32b) 2.5 x 10^6 CD4+ T_N + 1 x 10^6 CD8+ T 세포(도 32c) 1 x 10^6 CD4+ T_N + 1 x 10^6 CD8+ T 세포로 구성된 CAR-T 세포이다. 동일한 공여자 샘플의 비-형질도입된 CD4+/CD8+ T 세포를 동종이계 대조군으로 사용하였고 PBS를 종양 대조군으로 사용하였다. 비-종양 관련 사망이 염증을 나타내는 마우스에서 관찰되었고; 특히 군 (도 32a) CD4 T_N + CD8 T_N(4/5 사망) 및 (도 32b) CD4 T_N + CD8 T_{SCM}(2/4 사망)에서 관찰되었다. 도 3bB 및 32c의 이미지의 경우, 100 일 동안의 전반적인 생존율의 카플란-마이어 플롯이 또한 표시된다.

[0266] CAR-T 세포 생산은 시작 물질: 미접촉 T 세포(T_N), 중심 기억 T 세포(T_{CM}), 및 기억 줄기 T 세포(T_{SCM})에 대해 최

적화되었다. 다양한 치료 투여량(주입된 세포의 수 및 CD4 대 CD8의 비율)은 세포 주입 수를 줄이면서 시작 물질의 다른 효과를 명확하게 할 수 있었다. 가장 큰 차이는 도 32c에서 1 x 10^6 CD4+ T_N + 1 x 10^6 CD8+ T 세포 투여에서 관찰되었고; CD8+ T_N 군은 T_{CM} 및 T_{SCM}에 비해 더 큰 생존율을 보였다. 낮은 CAR-T 세포 투여량에서, 부작용(사이토카인 방출 또는 이식편 대 숙주 질환, GVHD로 인한 염증 가능성)이 현저히 감소되었다. 총체적으로, T_N으로부터 제조된 CAR-T 세포는 T_{CM} 및 T_{SCM}으로부터 제조된 CAR-T 세포와 비교하여 더 우수한 지속성을 부여할 수 있다고 결론지었다.

[0267] **실시예 9. 사전 BAFF-R CAR-T 처리된 마우스는 종양 재접종에 대한 지속적인 CAR-T 세포를 나타냈다.**

[0268] CD8+ T_N 및 CD8+ T_{CM} 실험군(군당 n=4)에서 도 32b의 생존하는, 종양 없는 마우스를 추가 치료 없이 최초 접종 후 100 일차에 1 x 10^6의 JeKo-1 세포로 재접종하였다. 사전 치료되지 않은 NSG 마우스(n = 5)에 종양 대조군과 동일한 수의 JeKo-1 세포를 접종하였다. 생체발광 이미지가 도 33a에 도시된다. 각 실험 마우스의 혈액을 종양 재접종의 0 일차 및 5 일차에 샘플링하였다. 백혈구를 RBC 용해에 의해 혈액으로부터 분리하고 유동 세포계측에 의해 검사하였다. 도 33b는 각 실험군에서의 대표적인 FACS 플롯 및 GFP+BAFF-R CAR-T 세포에 대하여 게이팅된 백혈구의 날짜, 이어서 CD4 및 CD8 T 세포 게이팅을 나타낸다. 도 33c는 백혈구 전체에서 BAFF-R+ CAR-T 세포의 백분율이 각 마우스에 대해 계산되고 플롯된 것을 나타내는 그래프이다. CD4 및 CD8 T 세포 개체군의 백분율은 각각의 누적된 막대에 표시된다.

[0269] 종양 재접종은 계속된 항종양 효과를 부여할 수 있는 생체 내 CAR-T 지속성을 나타냈다. 특히 CD8+ T_N 치료군에서, 4마리 마우스 모두에서 CD8+ TCM 치료군의 2마리 마우스와 비교하여, 무-종양 생존이 관찰되었다. 혈액 샘플을 분석할 때, CD8+ TCM 치료군과 비교하여 CD8+ T_N에서 종양 재접종 후에 더 높은 기준선 CAR-T 개체군 및 더 큰 CAR-T 세포 확장이 관찰되었다. 또한, 측정가능한 CD8+ CAR-T 세포 개체군이 CD8+ T_N 치료군에서 발견되었다. 생체 내에서 종양 자극에 대한 계속된 지속성과 잠재성은 CAR-T 세포 생산을 위한 시작 물질로서 T_N을 사용하는 것을 더욱 뒷받침하는 증거이다.

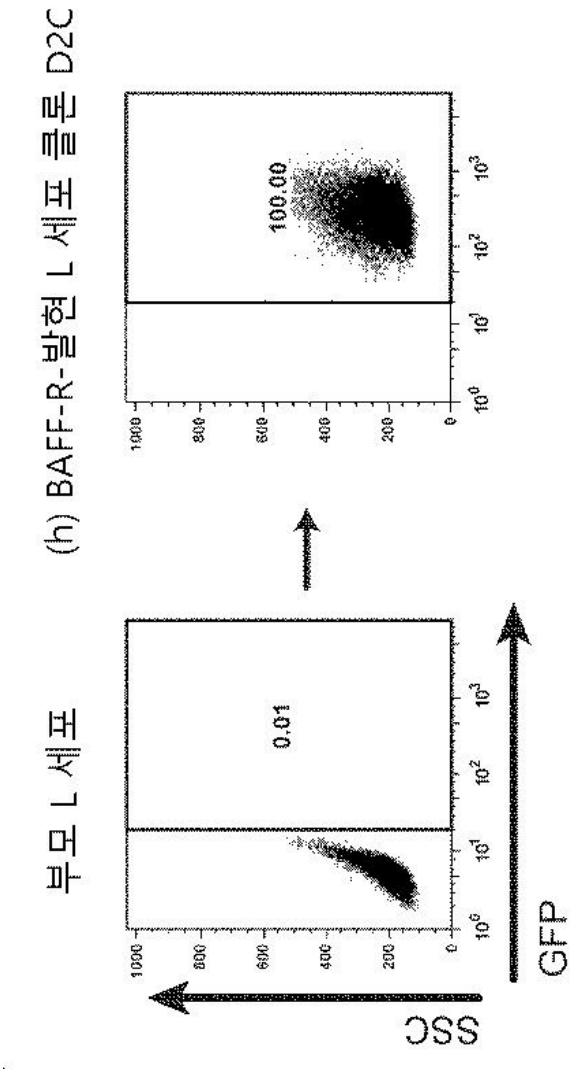
[0270] **실시예 10. 최적화된 BAFF-R CAR T 세포 치료법은 생체 내에서 CD19 내성 종양을 제거한다.**

[0271] 루시퍼라제-발현 Raji로 0 일차에 정맥내(IV) 종양 접종(0.5 x 10^6 세포/마우스) 후의 NSG 마우스 군(n=5)의 생체발광 이미지. 단일 활성화된 CAR T 세포 치료가 7 일차 IV에 의해 주입되었다. 표준 작업 처리 용량은 CD4+ T_N 2.5 x 10^6 + CD8+ T_N 1 x 10^6 BAFF-R CAR T 세포 또는 CD19 CAR-T 세포로 구성되었다. 단지 scFv-항-BAFF-R 또는 항-CD19에서만 서로 다른 동등한 CAR 플랫폼을 사용하였다. 동일한 공여자 샘플의 비-형질도입된 CD4+/CD8+ T 세포를 동종이계 대조군으로 사용하였고 PBS를 종양 대조군으로 사용하였다. 이미지가 도 34에서 80 일 동안 전체 생존의 카플란-마이어 플롯 옆에 도시된다.

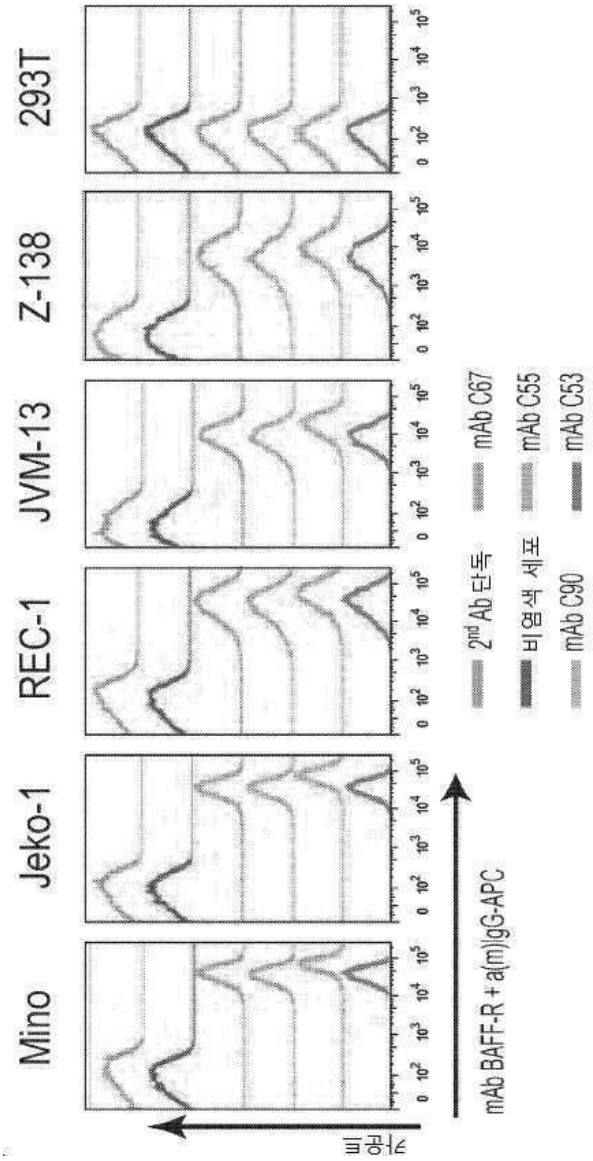
[0272] 사전에 최적화된 CAR-T 세포 시작 물질을 사용하고 항-CD19 scFv를 도 25a의 벡터 상에서 조작하여, CD19 CAR-T 세포를 제조하여 BAFF-R CAR-T 세포 치료와 비교하였다. CD19 CAR-T 세포 치료에 내성에 있는 것으로 관찰된 이전에 연구되고 공격적인 Raji(버킷 림프종) 세포주가 사용되었다. 일대일 비교에서, CAR-T 세포 치료는 모두 종양 접종으로부터 약 2 주 후에 효과적이었다. 그러나, BAFF-R CAR-T 세포 치료는 모든 종양을 완전히 제거할 수 있었지만 반면 CD19 CAR-T 세포 치료는 치료한 지 21 일 후에 실패하기 시작하여 점차 가시화되는 종양이 있었다. 이 자료는 BAFF-R CAR-T 세포 치료가 현재의 CD19 표적 치료법보다 우월한 치료법일 수 있음을 시사한다. 비록 CAR-T 치료 둘 모두가 항종양 반응을 유도하고 잠시 동안 종양 부담을 줄일 수 있었지만, BAFF-R CAR-T 세포는 종양이 완전히 제거될 때까지 지속될 수 있었다.

도면

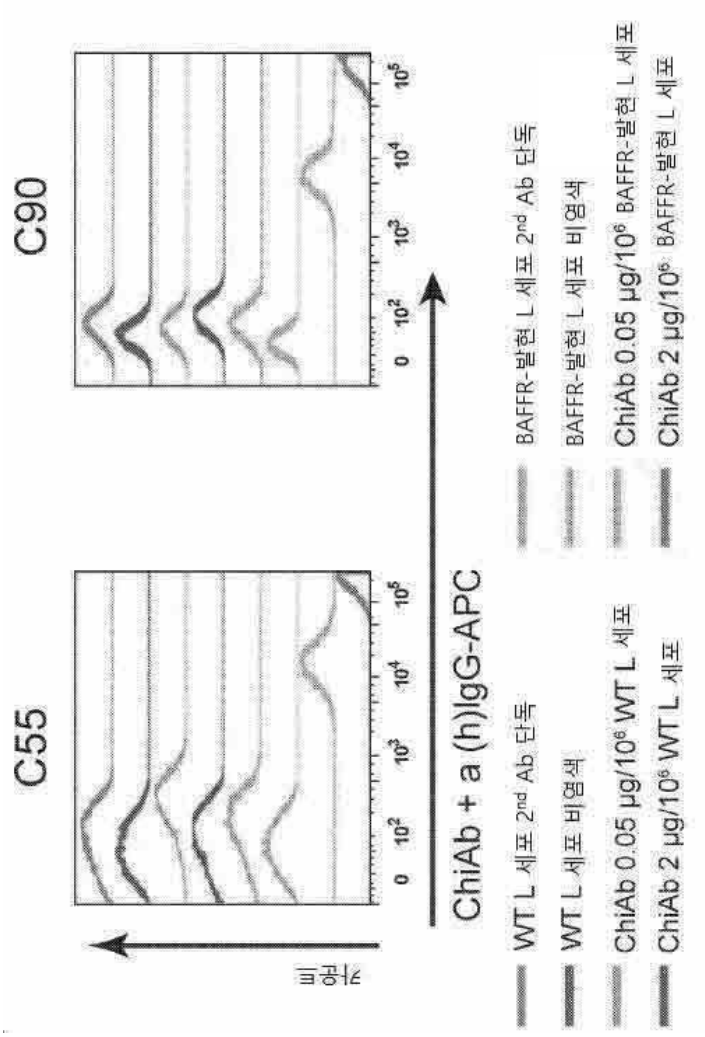
도면1a



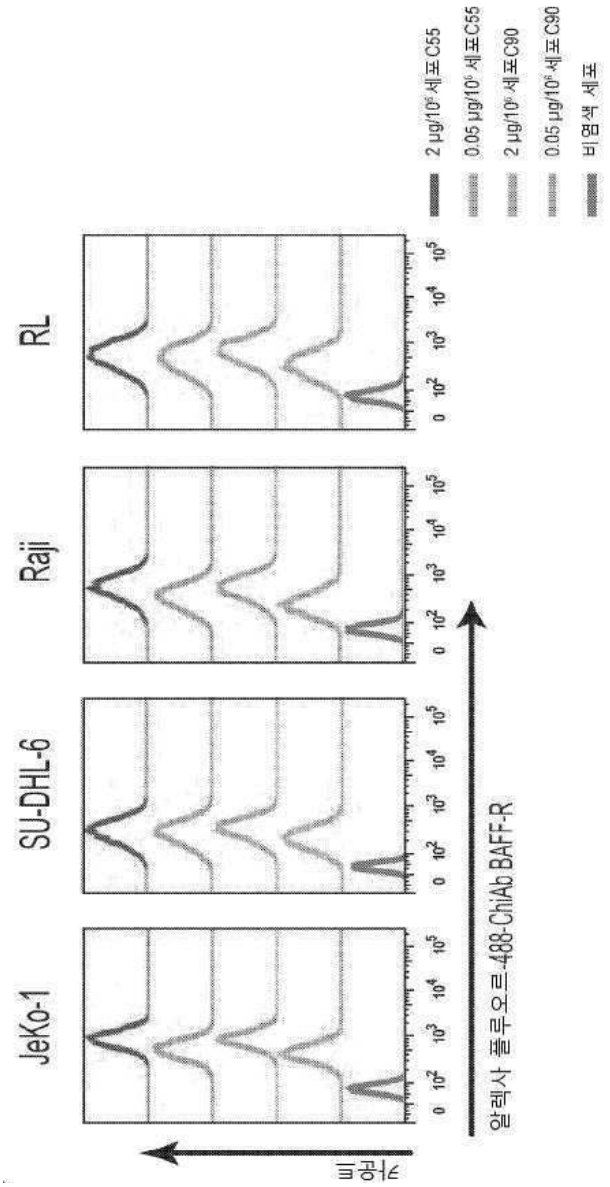
도면1b


Mino
Jeko-1
REC-1
JVM-13
Z-138
293T
세포수
mAb BAFF-R + a(m)IgG-APC
2nd Ab 단독
비 염색 세포
mAb C90
mAb C67
mAb C55
mAb C53

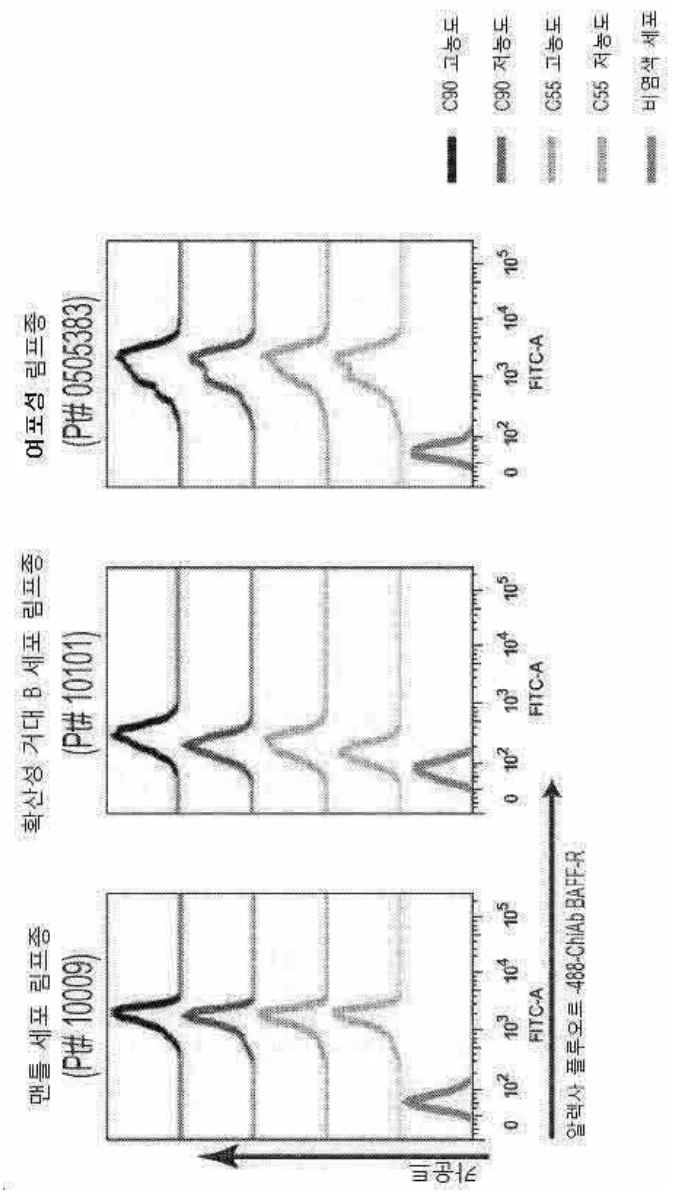
도면1c


C55
C90
카운트
0
10^2
10^3
10^4
10^5
ChiAb + a (h)IgG-APC
WT L 세포 2nd Ab 단독
WT L 세포 비염색
ChiAb 0.05 μg/10^6 WT L 세포
ChiAb 2 μg/10^6 WT L 세포
BAFFR-발현 L 세포 2nd Ab 단독
BAFFR-발현 L 세포 비염색
ChiAb 0.05 μg/10^6 BAFFR-발현 L 세포
ChiAb 2 μg/10^6 BAFFR-발현 L 세포

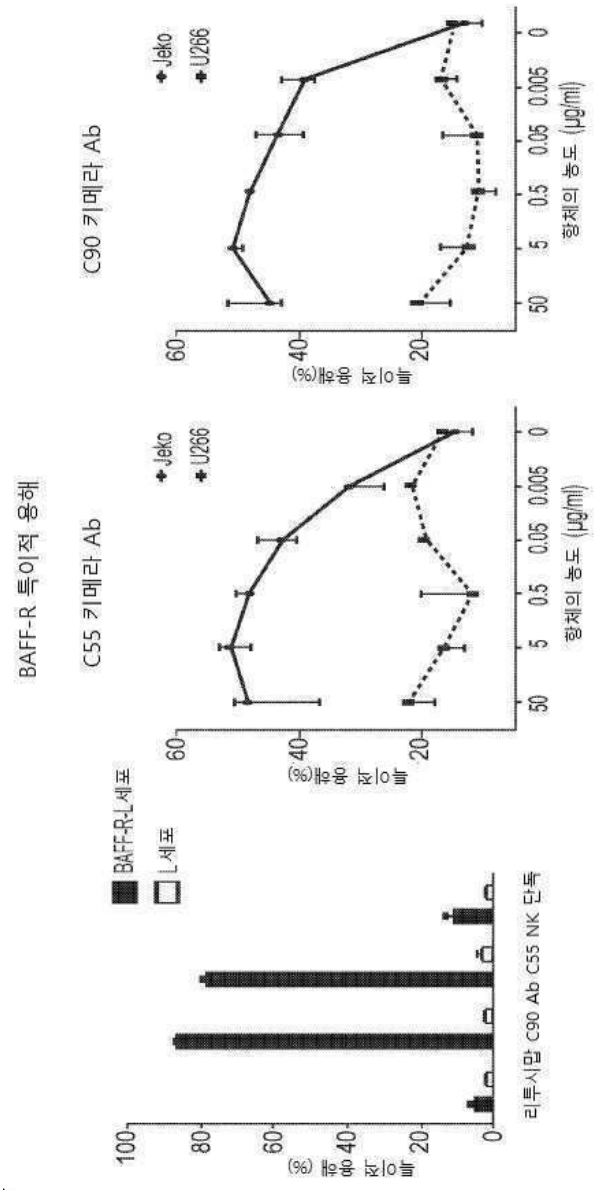
도면1d


JeKo-1
SU-DHL-6
Raji
RL
카운트
알렉사 플루오르-488-ChiAb BAFF-R
2 μg/10⁶ 세포C55
0.05 μg/10⁶ 세포C55
2 μg/10⁶ 세포C90
0.05 μg/10⁶ 세포C90
비염색 세포

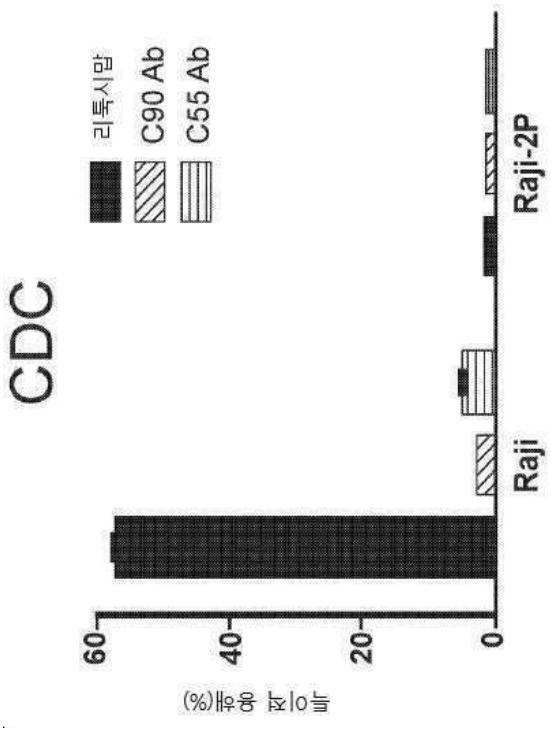
도면1e


C90 고농도
C90 저농도
C55 고농도
C55 저농도
비염색 세포
여포성 림프종
(P# 0505383)
확산성 거대 B 세포 림프종
(P# 10101)
맨틀 세포 림프종
(P# 10009)
FITC-A
0
10^2
10^3
10^4
10^5
카운트
알렉사 플루오르 488-ChiAb BAFF-R

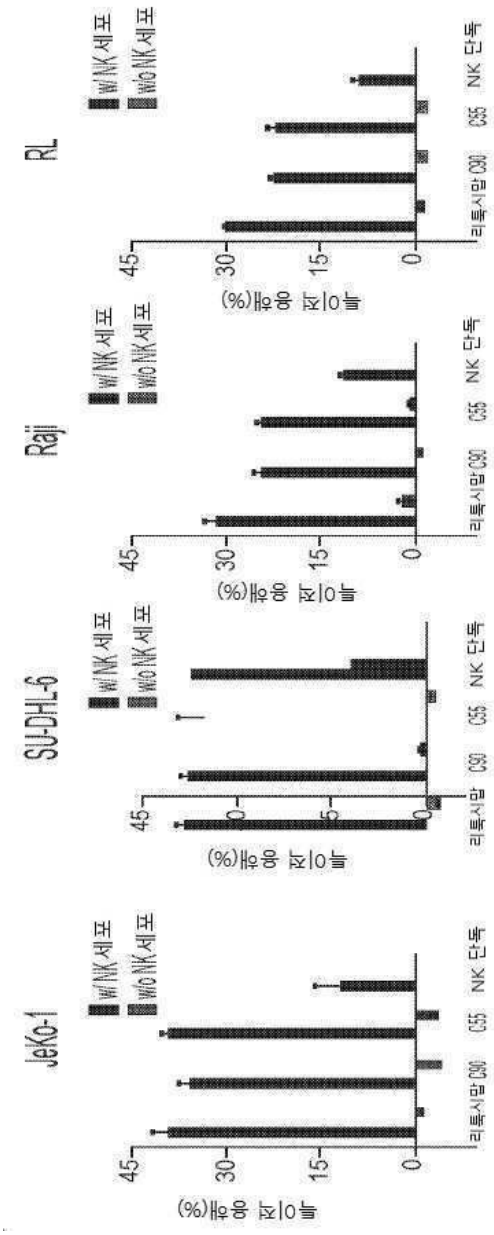
도면2a


BAFF-R 특이적 용해
C55 키메라 Ab
C90 키메라 Ab
BAFF-R-L세포
L세포
Jeko
U266
특이적 용해 (%)
항체의 농도 (μg/ml)
리투시맙 C90 Ab C55 NK 단독

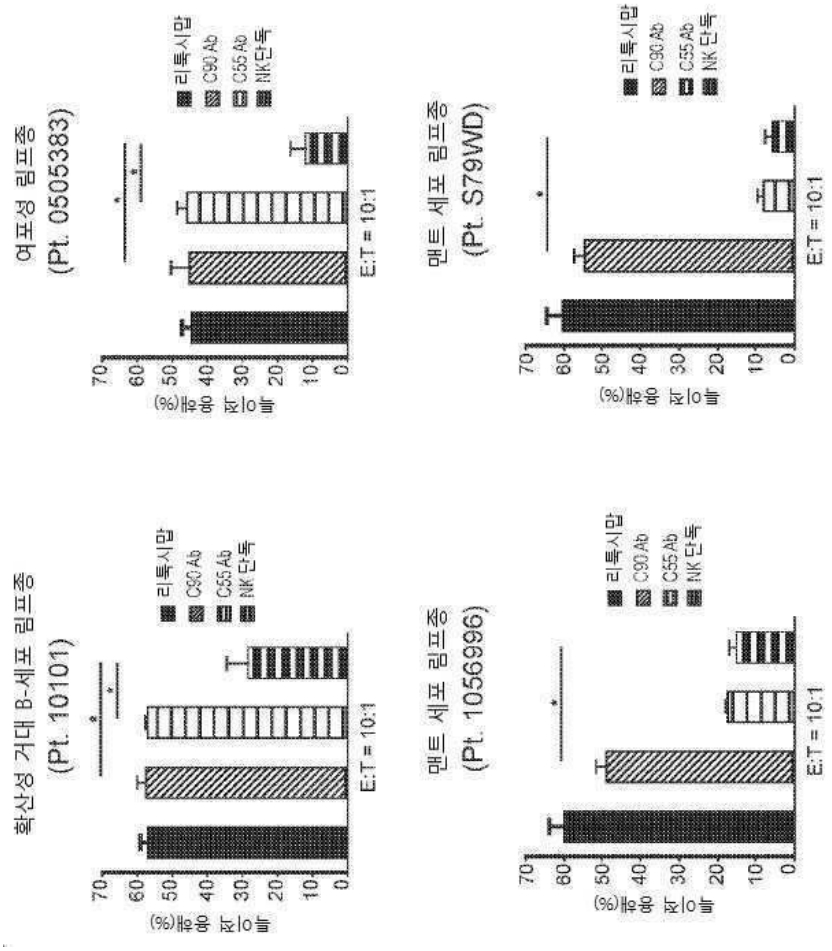
도면2b



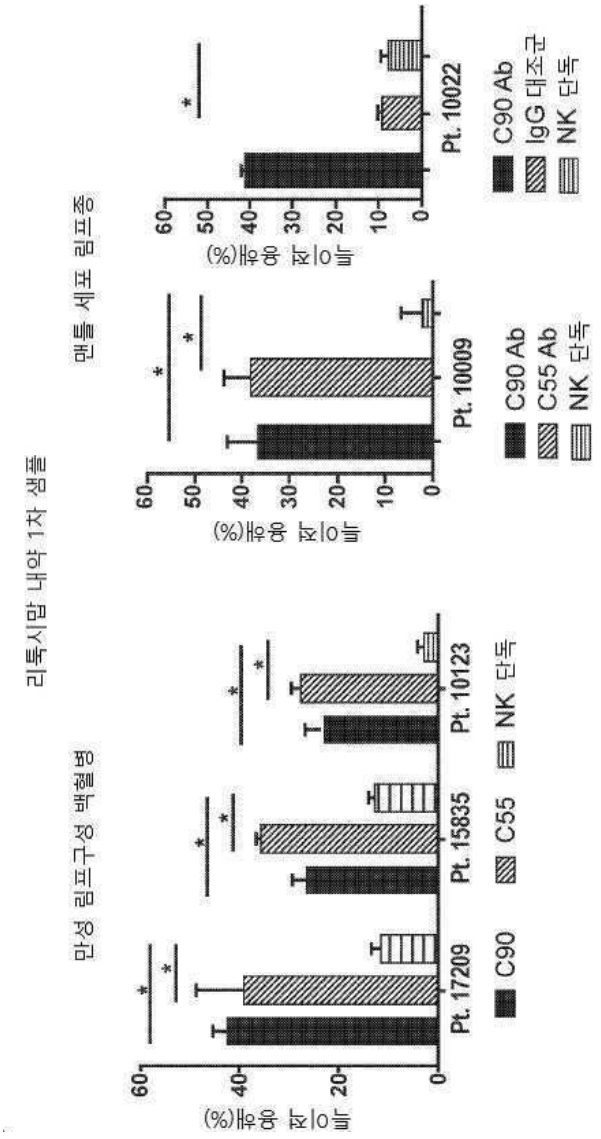
도면2c


RL
Raji
SU-DHL-6
Jeko-1
w/ NK 세포
w/o NK 세포
특이적 용해(%)
45
30
15
0
리툭시맙
C90
C55
NK 단독

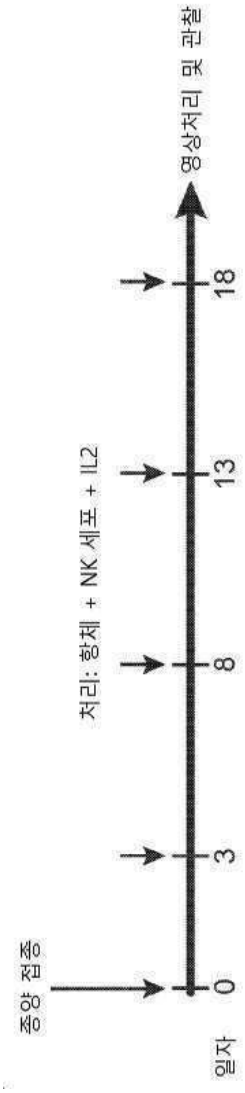
도면3a


여포성 림프종
(Pt. 0505383)
리툭시맙
C90 Ab
C55 Ab
NK단독
특이적 용해(%)
E:T = 10:1
맨트 세포 림프종
(Pt. S79WD)
확산성 거대 B-세포 림프종
(Pt. 10101)
맨트 세포 림프종
(Pt. 1056996)

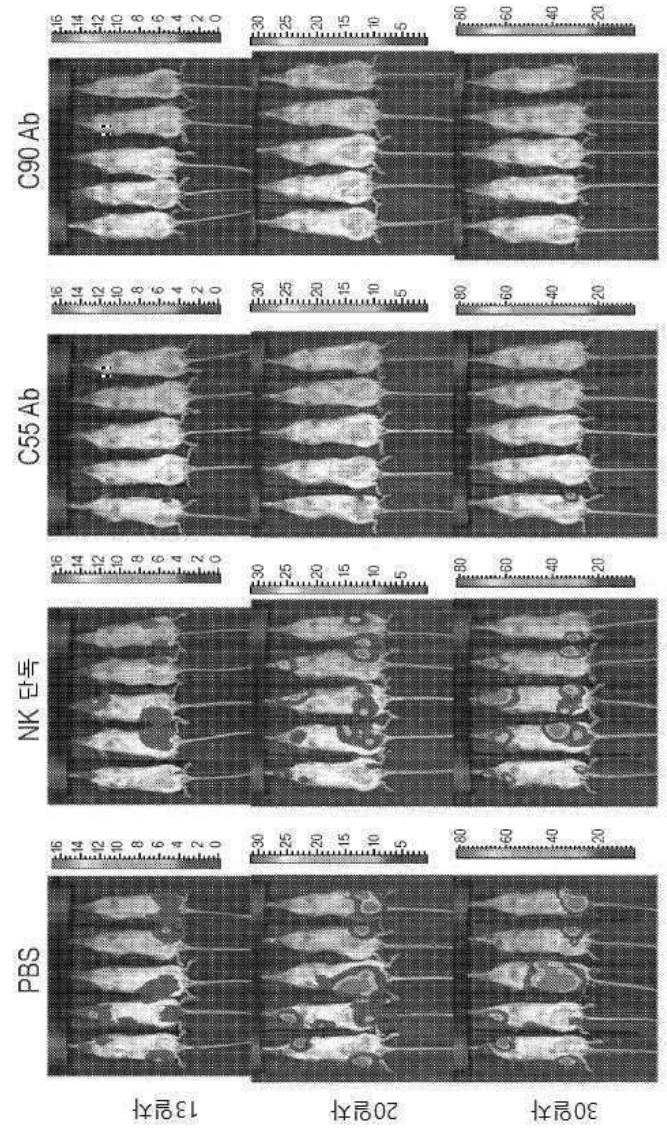
도면3b


리툭시맙 내약 1차 샘플
만성 림프구성 백혈병
맨틀 세포 림프종
특이적 용해(%)
Pt. 17209
Pt. 15835
Pt. 10123
Pt. 10009
Pt. 10022
C90
C55
NK 단독
C90 Ab
C55 Ab
IgG 대조군

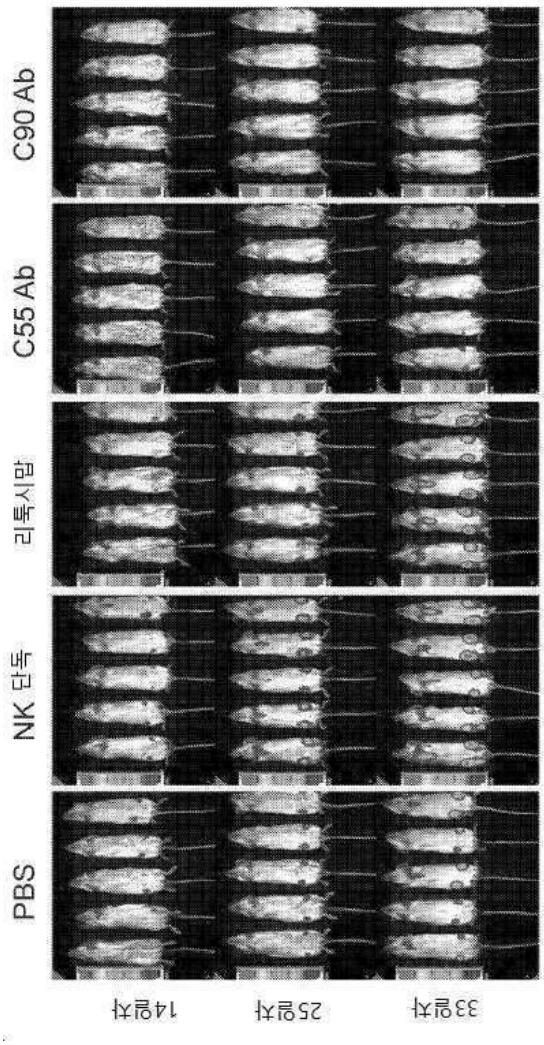
도면4a



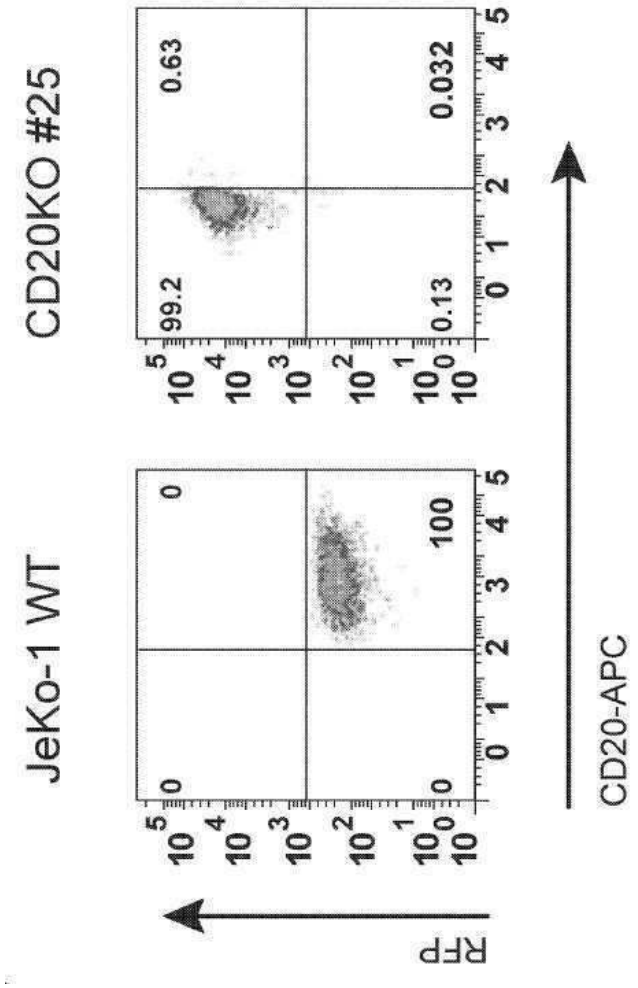
도면4b



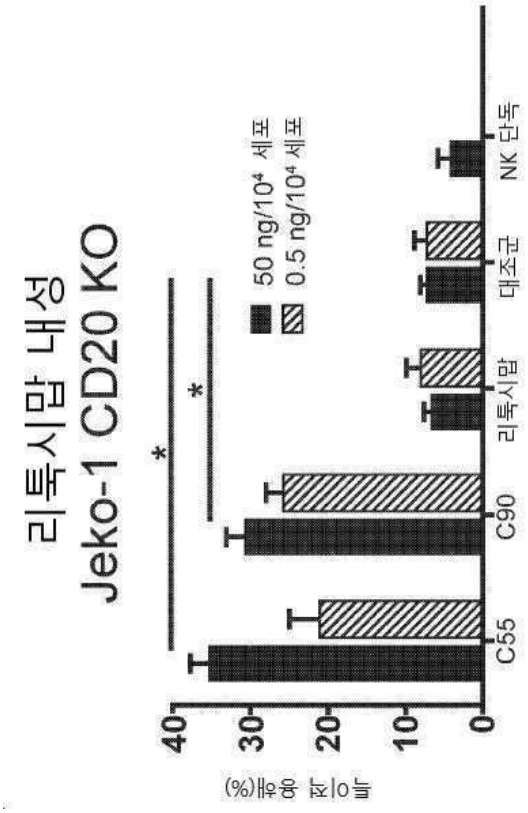
도면4c



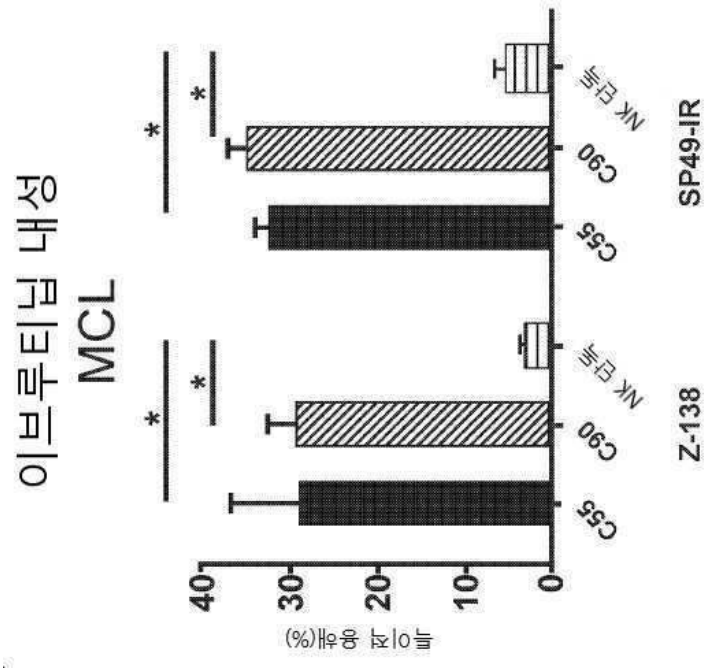
도면5a



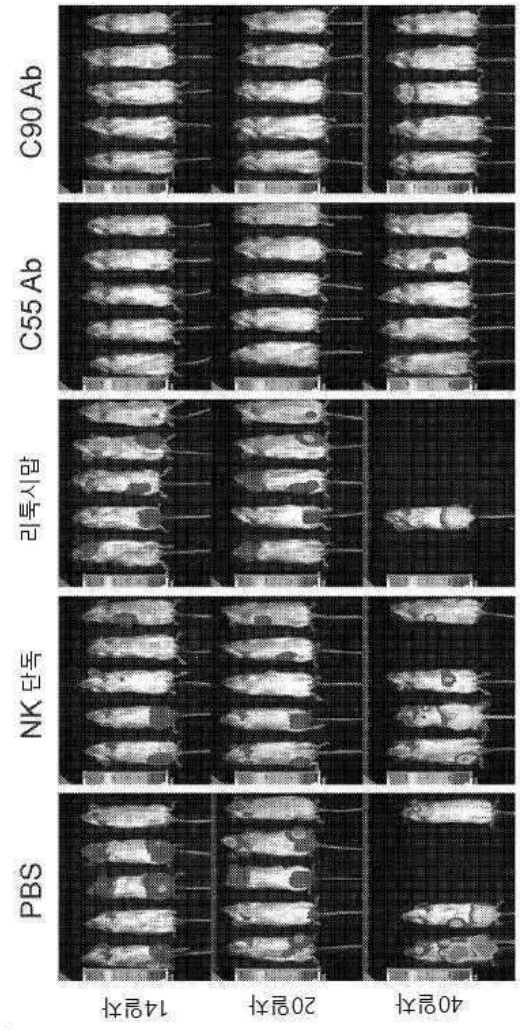
도면5b


리툭시맙 내성
Jeko-1 CD20 KO
50 ng/10⁴ 세포
0.5 ng/10⁴ 세포
특이적 용해(%)
0
10
20
30
40
C55
C90
리툭시맙
대조군
NK 단독
*
*

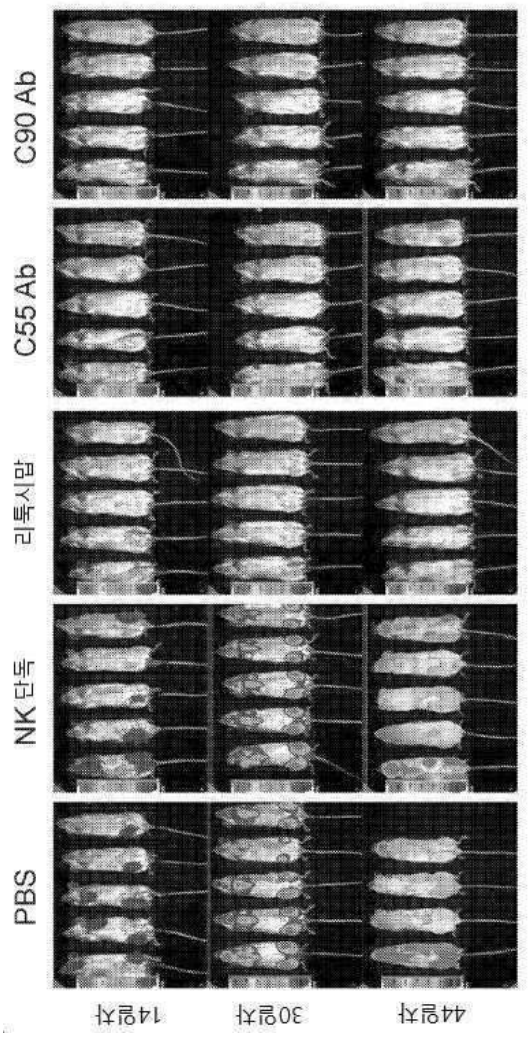
도면5c


이브루티닙 내성
MCL
특이적 용해(%)
0
10
20
30
40
C55
C90
NK 단독
C55
C90
NK 단독
Z-138
SP49-IR
*
*
*
*

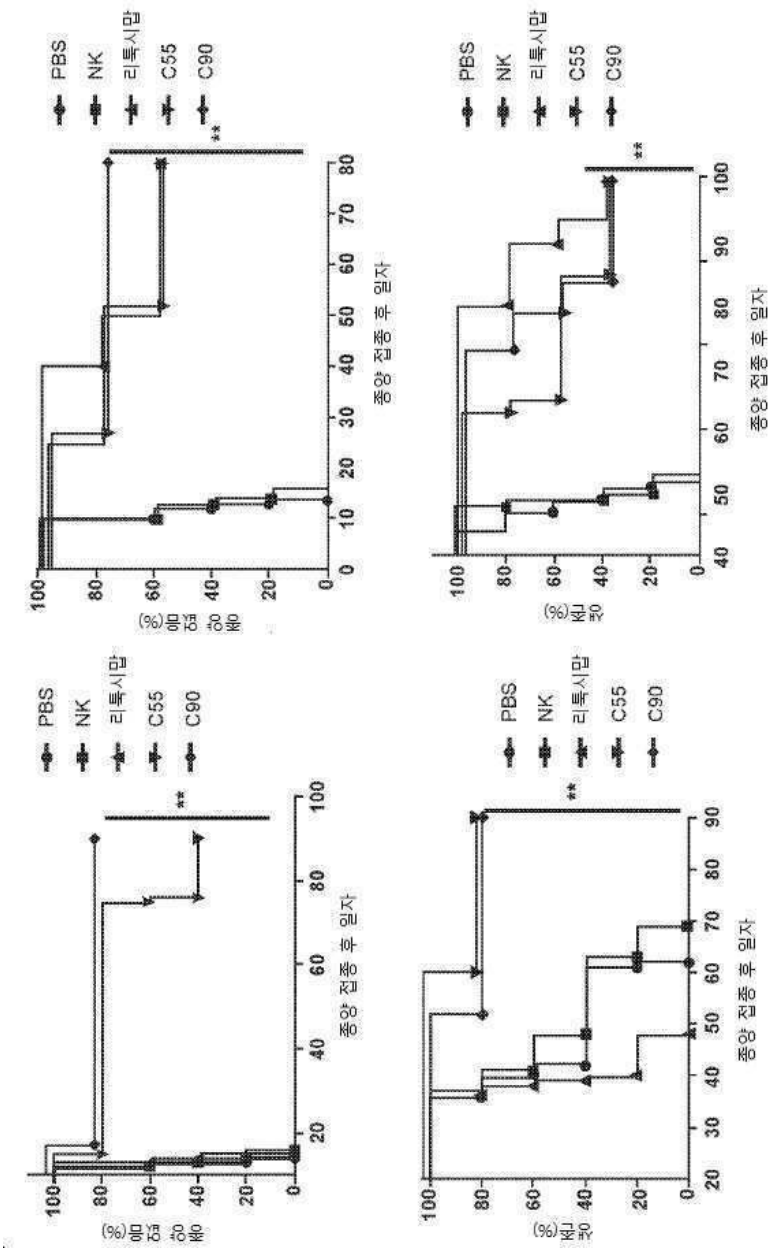
도면6a



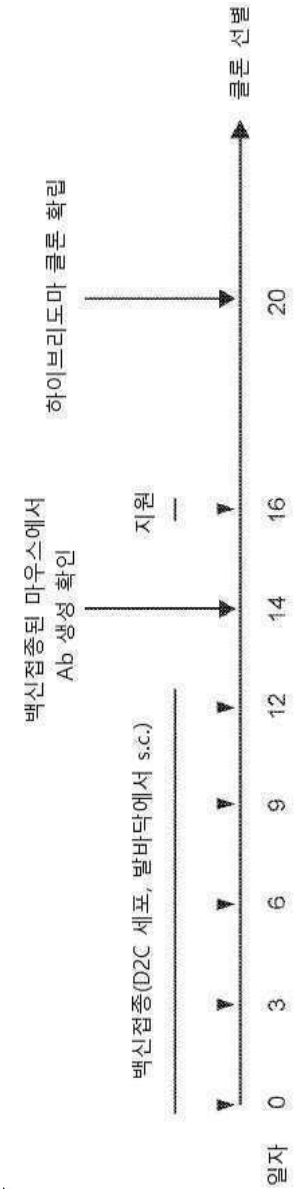
도면6b



도면6c



도면7a

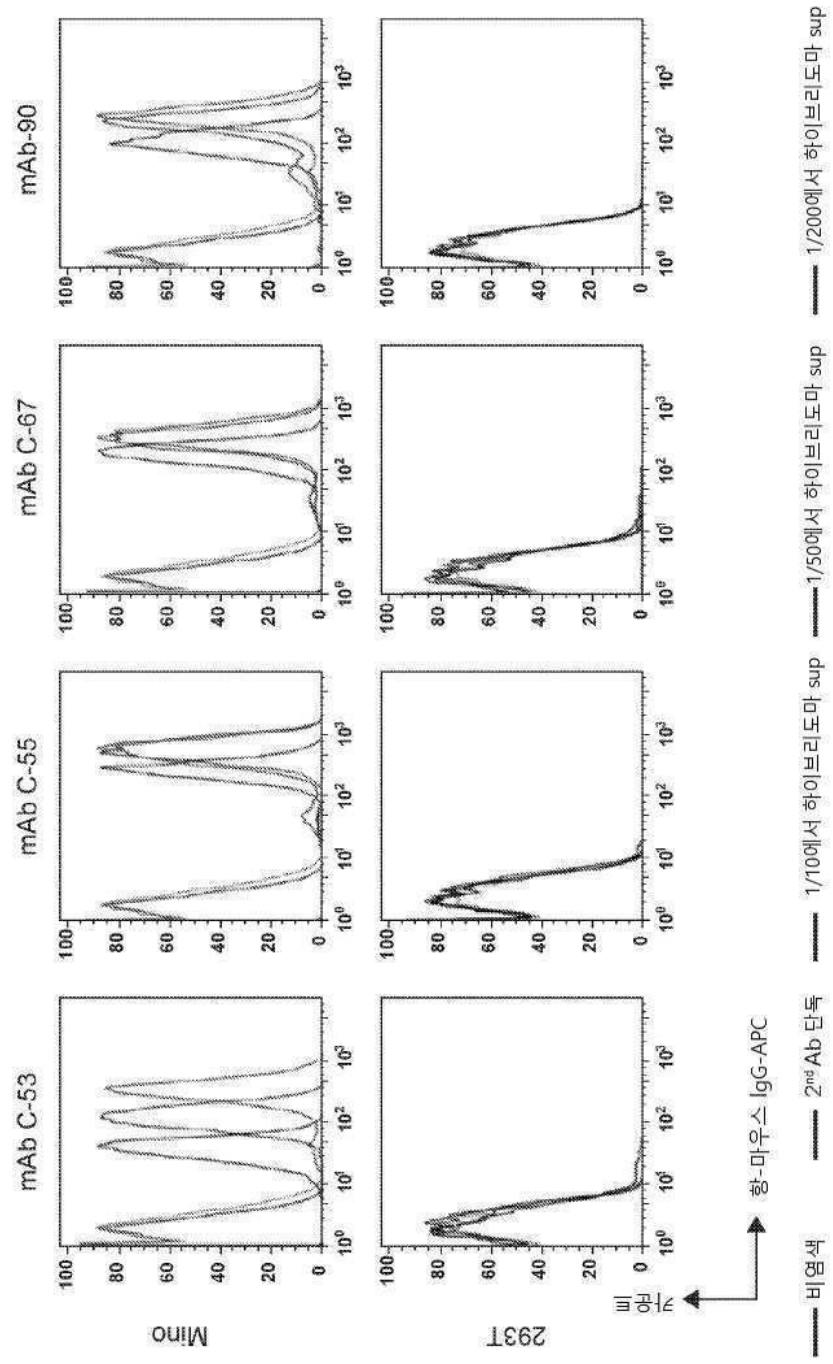

일자
0
3
6
9
12
14
16
20
백신접종(D2C 세포, 발바닥에서 s.c.)
백신접종된 마우스에서
Ab 생성 확인
지원
—
하이브리도마 클론 확립
클론 선별

도면7b

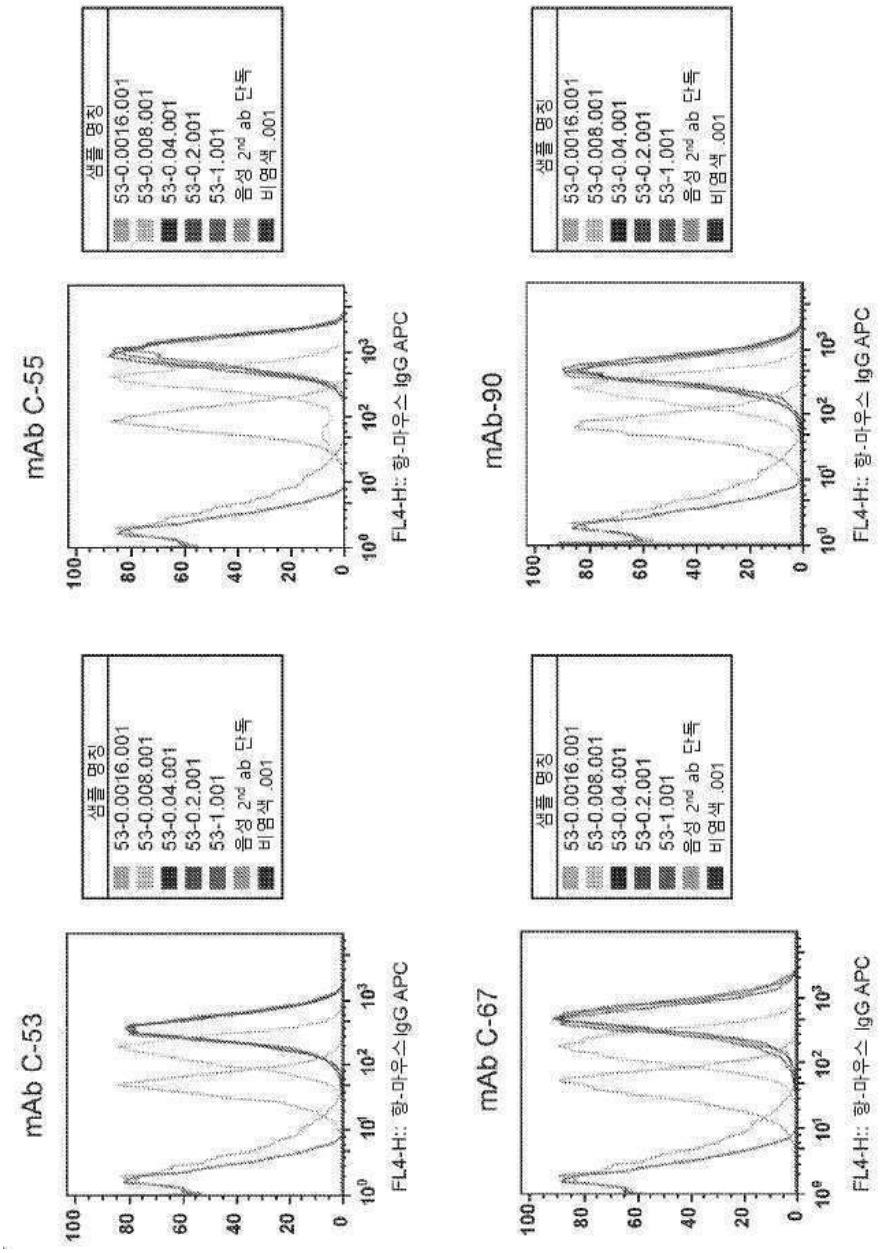
항체 생산을 위하여 ELISA에 의해 선별된 하이브리도마 클론

클론	(h)BAFF-R-발현 세포 (OD 450 nm)	부모 L 세포 (OD 450 nm)
C53	0.552	0.095
C55	1.067	0.102
C67	0.615	0.093
C90	0.645	0.116
C39	0.137	0.091

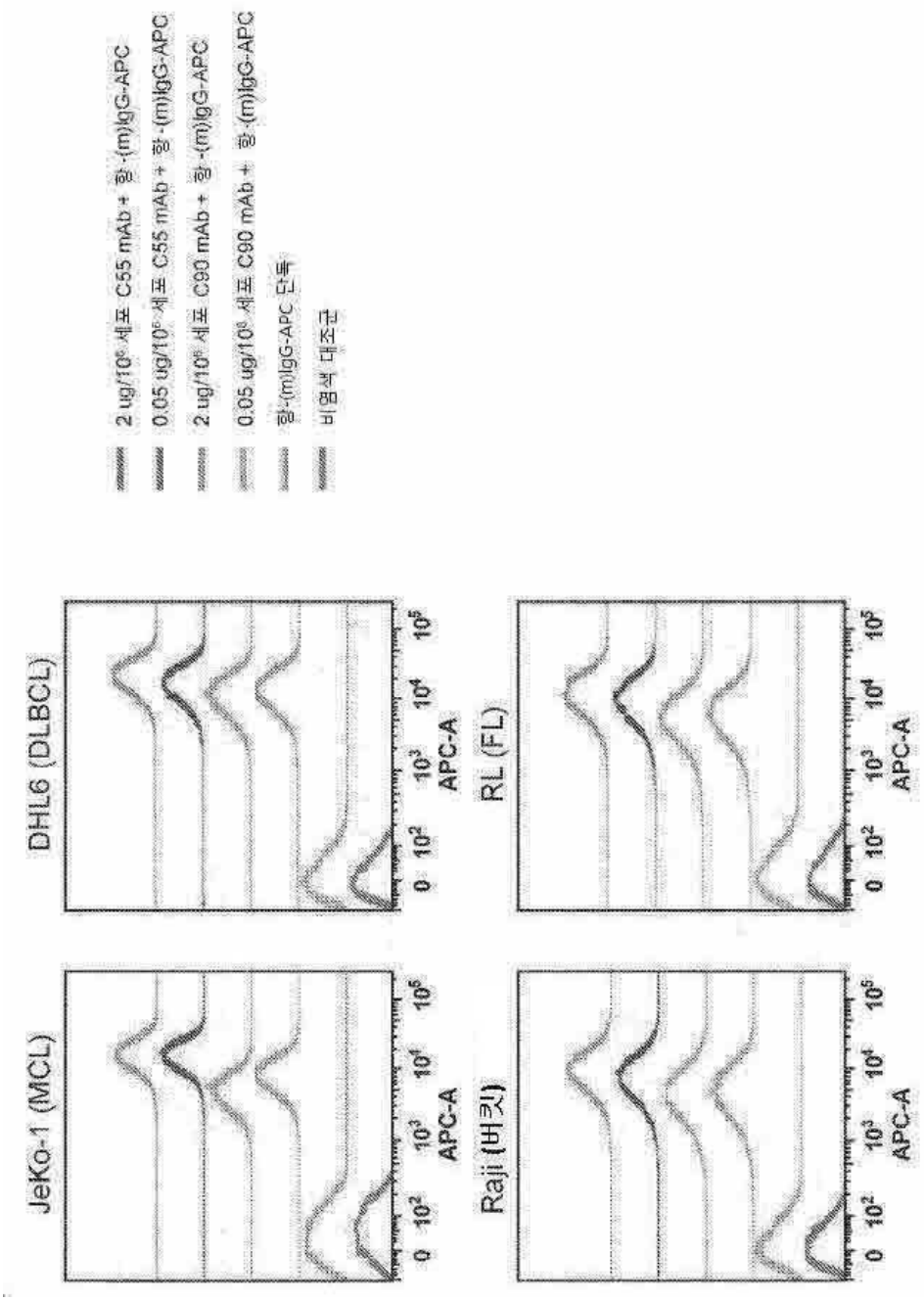
도면8


mAb C-53
mAb C-55
mAb C-67
mAb-90
Mino
293T
카운트
항-마우스 IgG-APC
비염색
2nd Ab 단독
1/10에서 하이브리도마 sup
1/50에서 하이브리도마 sup
1/200에서 하이브리도마 sup

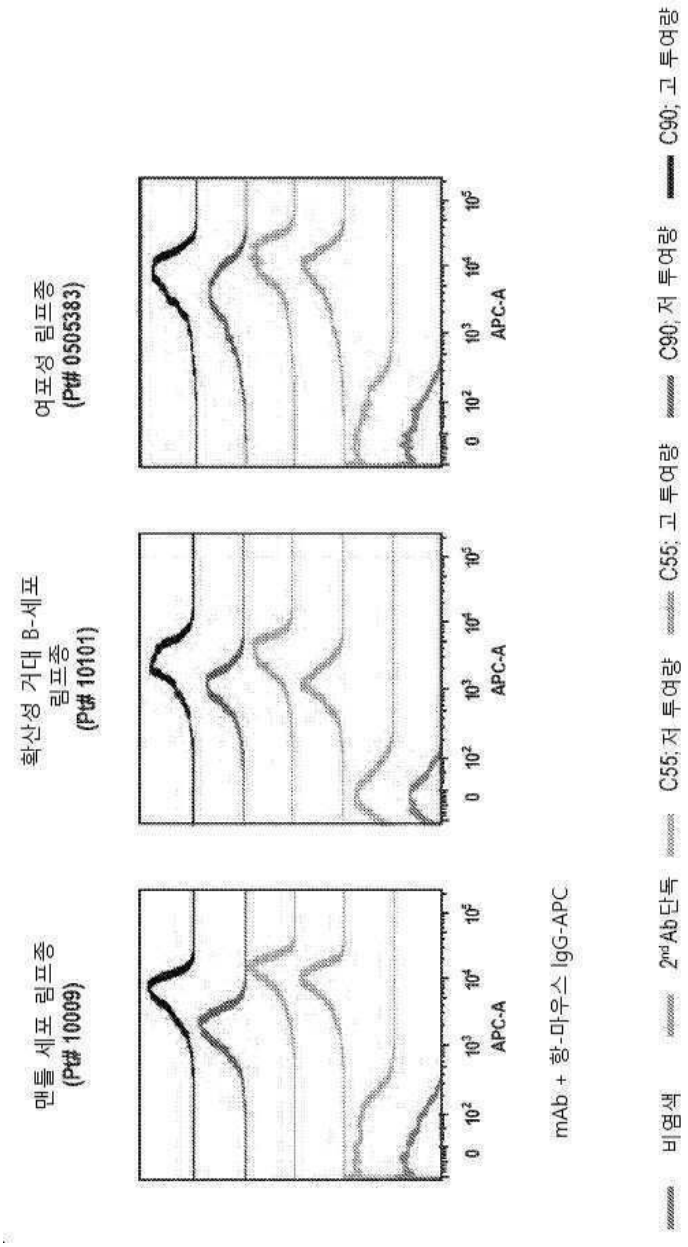
도면9


mAb C-55
mAb-90
mAb C-53
mAb C-67
샘플 명칭
53-0.0016.001
53-0.008.001
53-0.04.001
53-0.2.001
53-1.001
음성 2nd ab 단독
비염색 .001
FL4-H:: 항-마우스 IgG APC

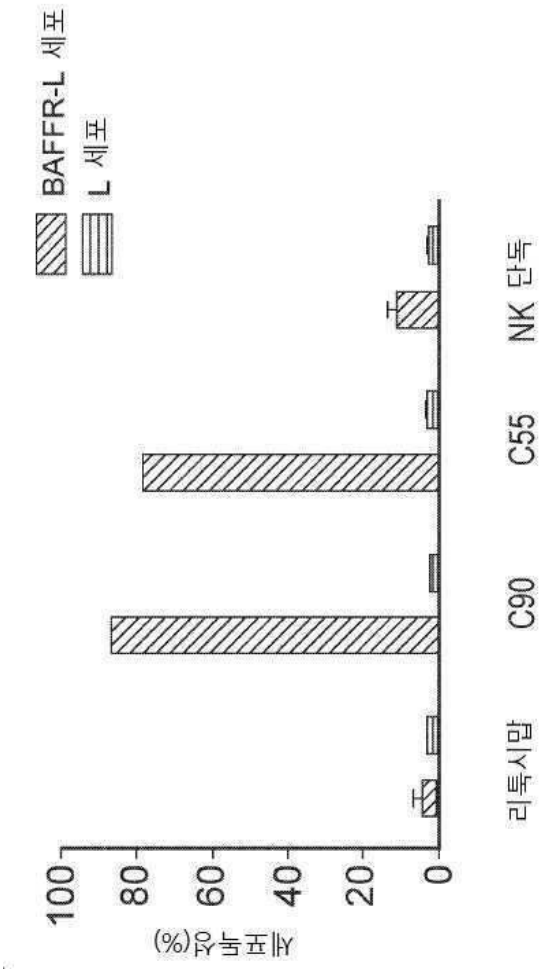
도면10


2 ug/10⁶ 세포 C55 mAb + 항-(m)IgG-APC
0.05 ug/10⁶ 세포 C55 mAb + 항-(m)IgG-APC
2 ug/10⁶ 세포 C90 mAb + 항-(m)IgG-APC
0.05 ug/10⁶ 세포 C90 mAb + 항-(m)IgG-APC
항-(m)IgG-APC 단독
비염색 대조군
DHL6 (DLBCL)
RL (FL)
JeKo-1 (MCL)
Raji (버킷)
APC-A
0
10²
10³
10⁴
10⁵

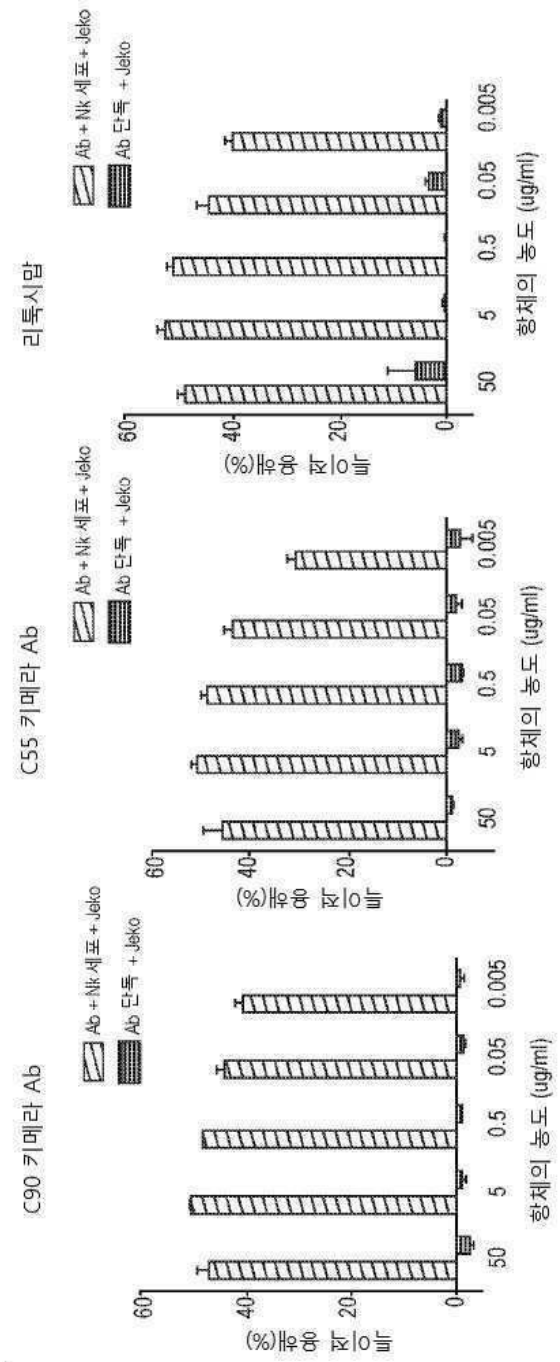
도면11


맨틀 세포 림프종
(P# 10009)
확산성 거대 B-세포
림프종
(P# 10101)
여포성 림프종
(P# 0505383)
0 10² 10³ 10⁴ 10⁵
APC-A
mAb + 항-마우스 IgG-APC
비염색
2nd Ab단독
C55; 저 투여량
C55; 고 투여량
C90; 저 투여량
C90; 고 투여량

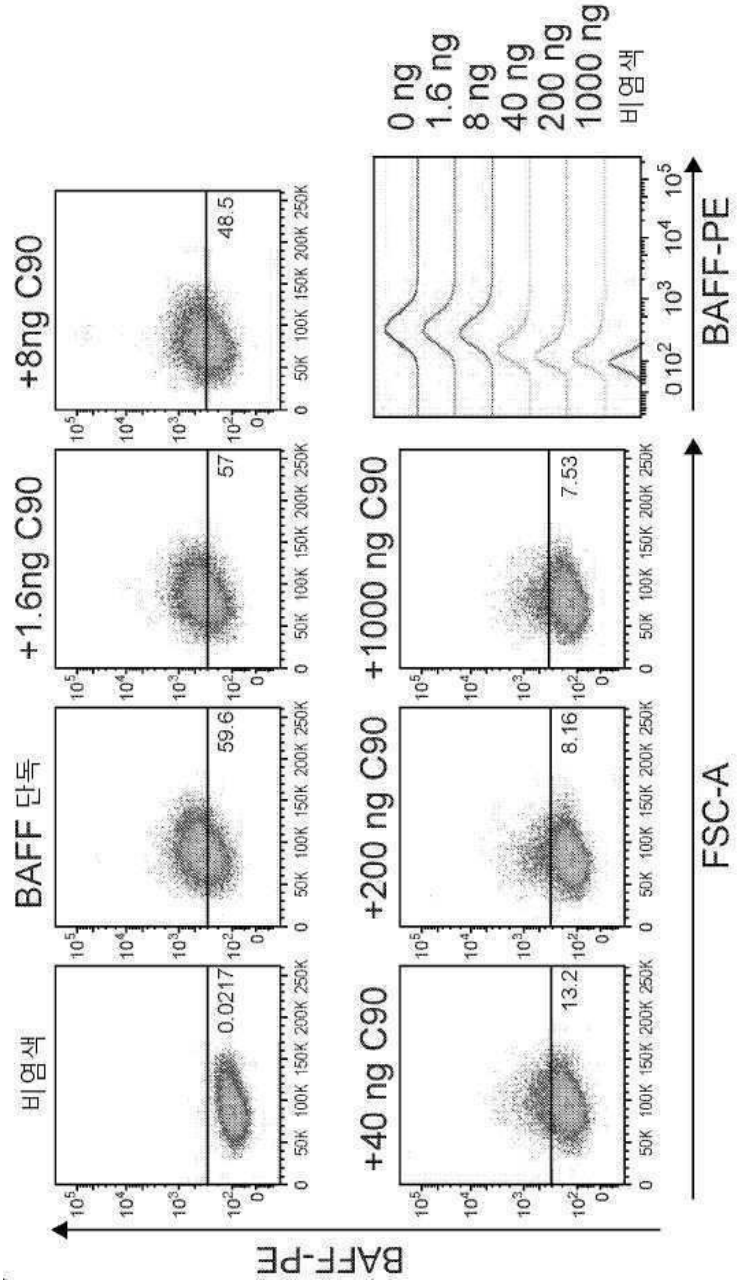
도면12



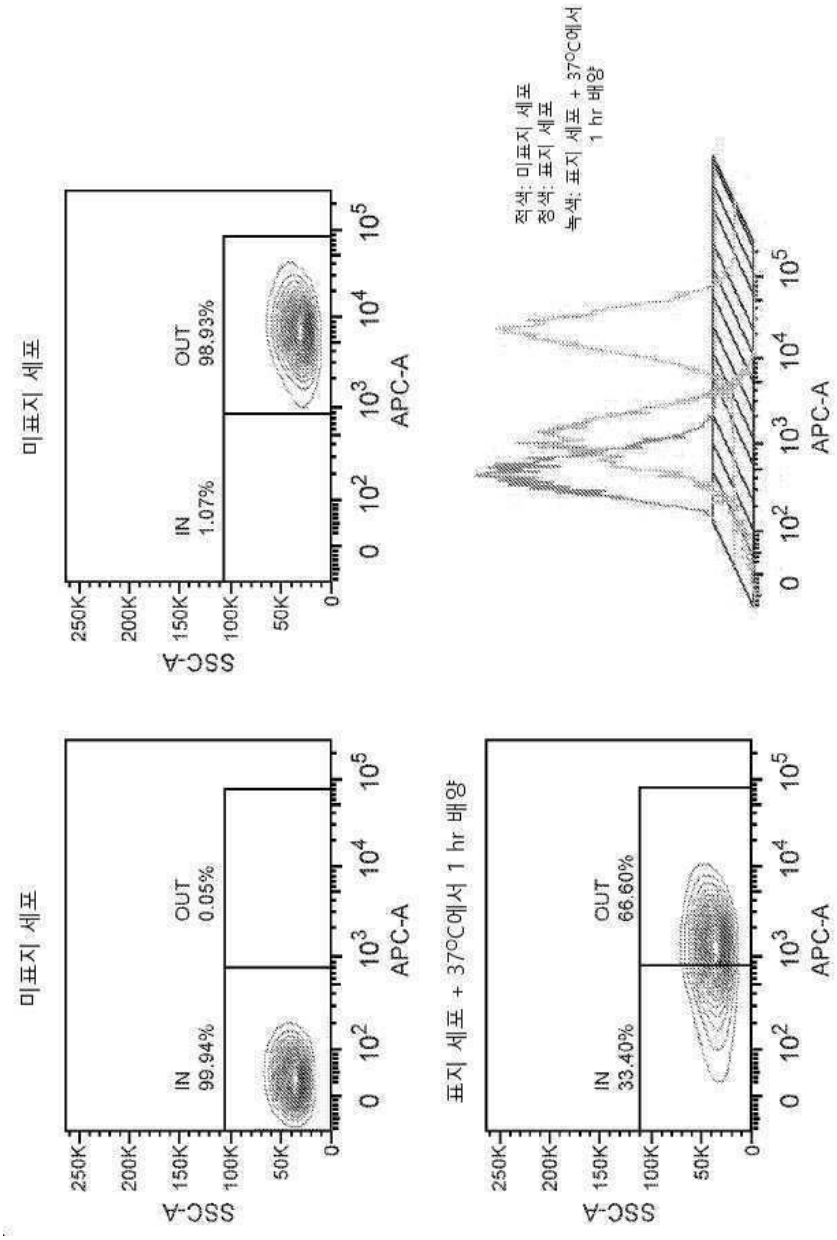
도면13


리툭시맙
C55 키메라 Ab
C90 키메라 Ab
Ab + Nk 세포 + Jeko
Ab 단독 + Jeko
세포 용해(%)
항체의 농도 (ug/ml)
0
20
40
60
50
5
0.5
0.05
0.005

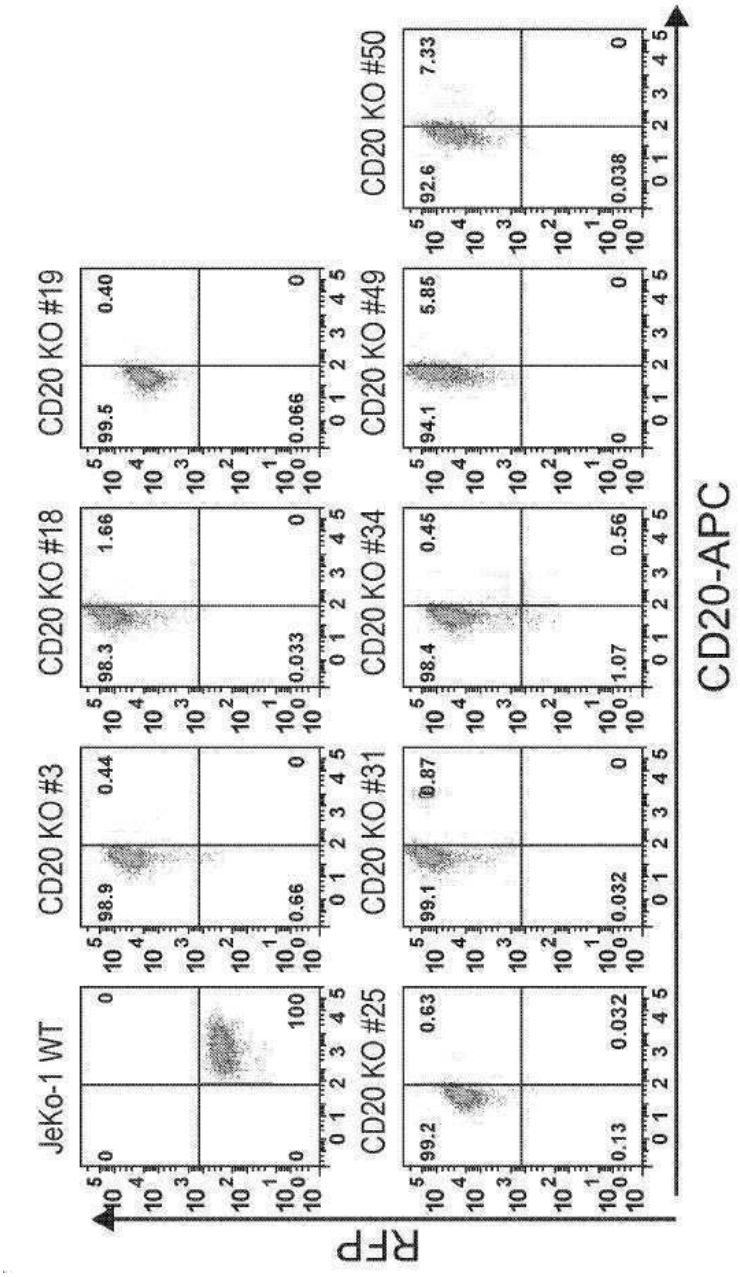
도면14


비염색
BAFF 단독
+1.6ng C90
+8ng C90
+40 ng C90
+200 ng C90
+1000 ng C90
0.0217
59.6
57
48.5
13.2
8.16
7.53
BAFF-PE
FSC-A
0 ng
1.6 ng
8 ng
40 ng
200 ng
1000 ng
비염색
BAFF-PE

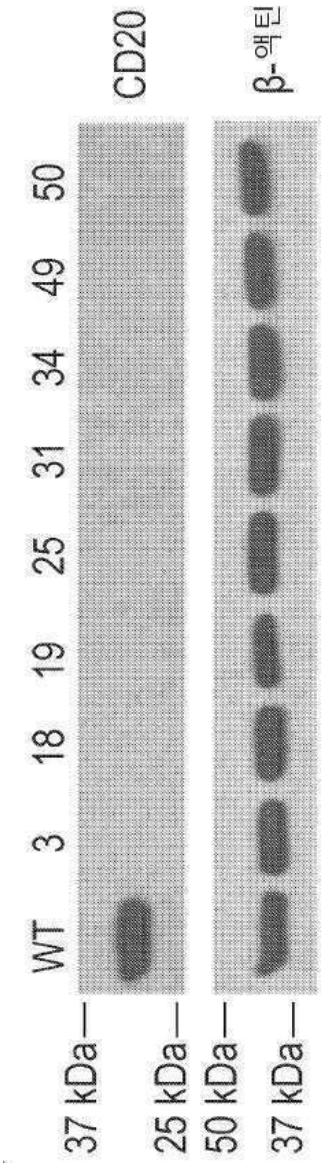
도면15


미표지 세포
IN
99.94%
OUT
0.05%
SSC-A
APC-A
표지 세포 + 37°C에서 1 hr 배양
IN
33.40%
OUT
66.60%
미표지 세포
IN
1.07%
OUT
98.93%
검색: 미표지 세포
청색: 표지 세포
녹색: 표지 세포 + 37°C에서
1 hr 배양

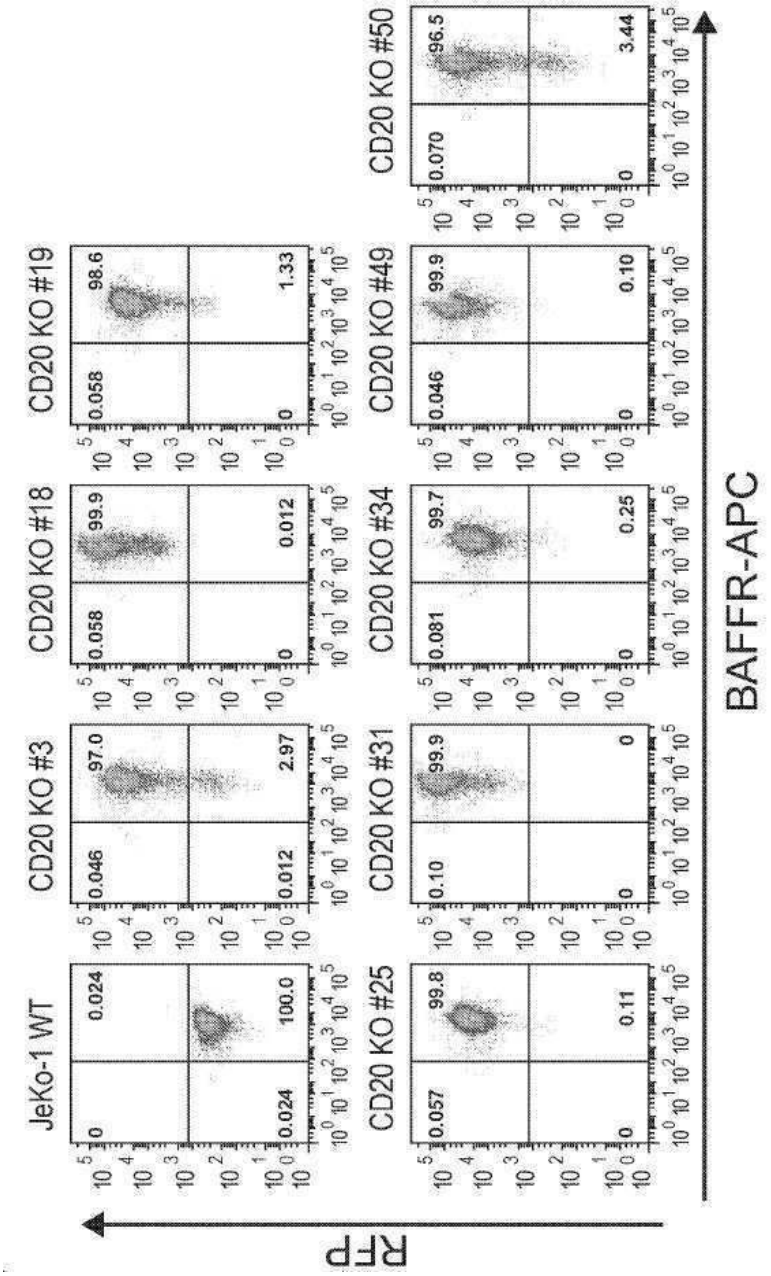
도면16a


JeKo-1 WT
CD20 KO #3
CD20 KO #18
CD20 KO #19
CD20 KO #25
CD20 KO #31
CD20 KO #34
CD20 KO #49
CD20 KO #50
RFP
CD20-APC

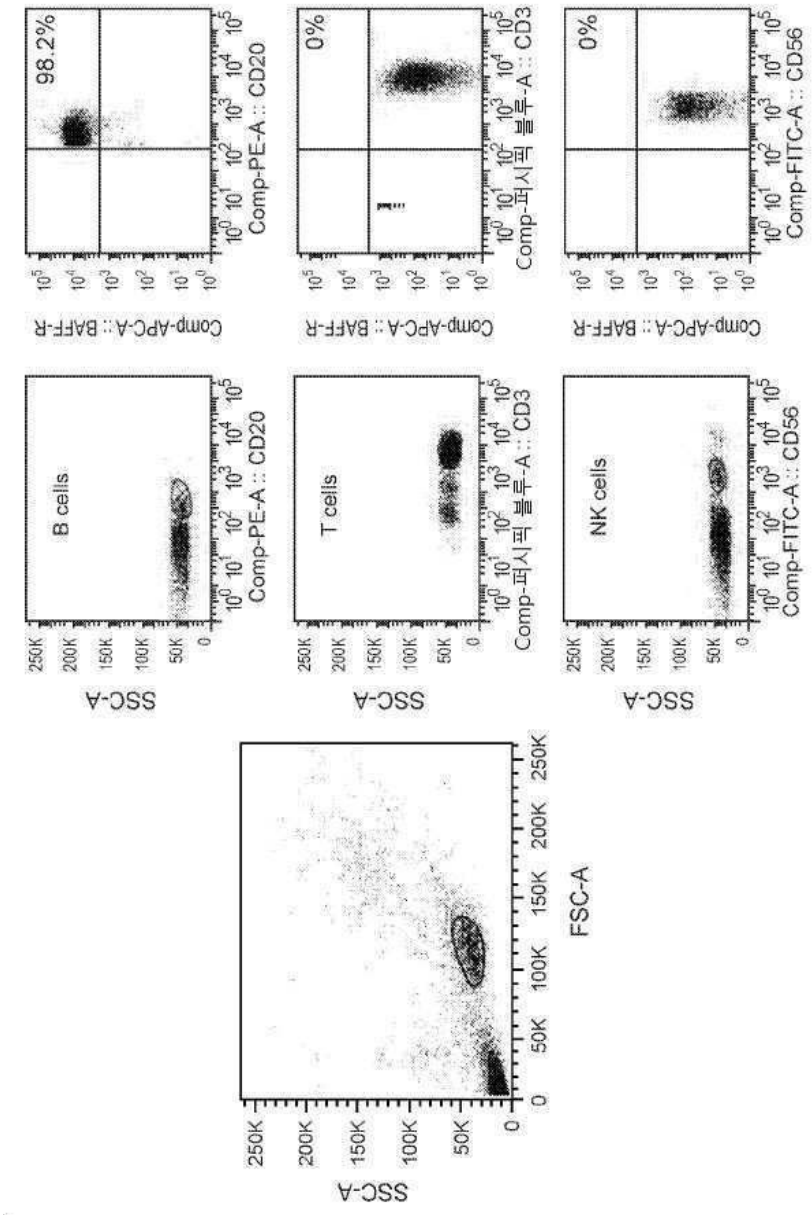
도면16b



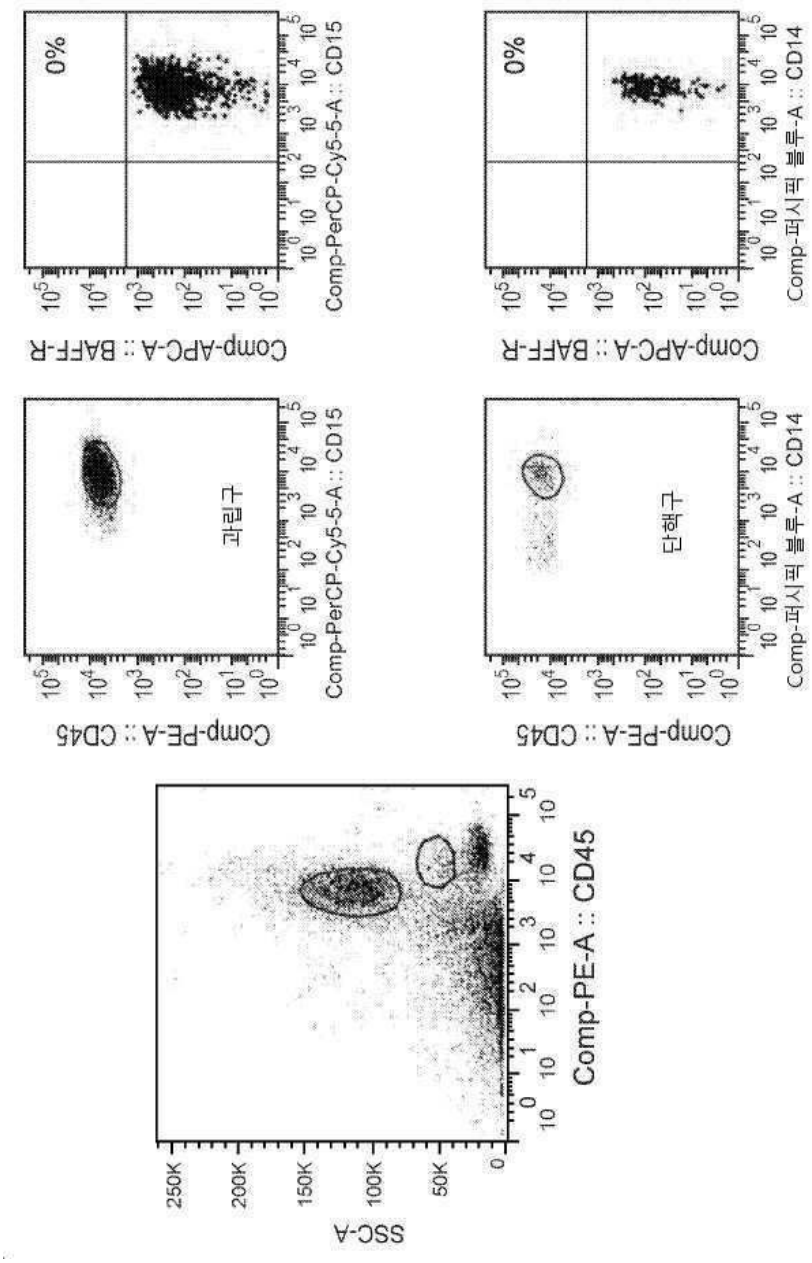
도면16c


JeKo-1 WT
CD20 KO #3
CD20 KO #18
CD20 KO #19
CD20 KO #25
CD20 KO #31
CD20 KO #34
CD20 KO #49
CD20 KO #50
RFP
BAFFR-APC

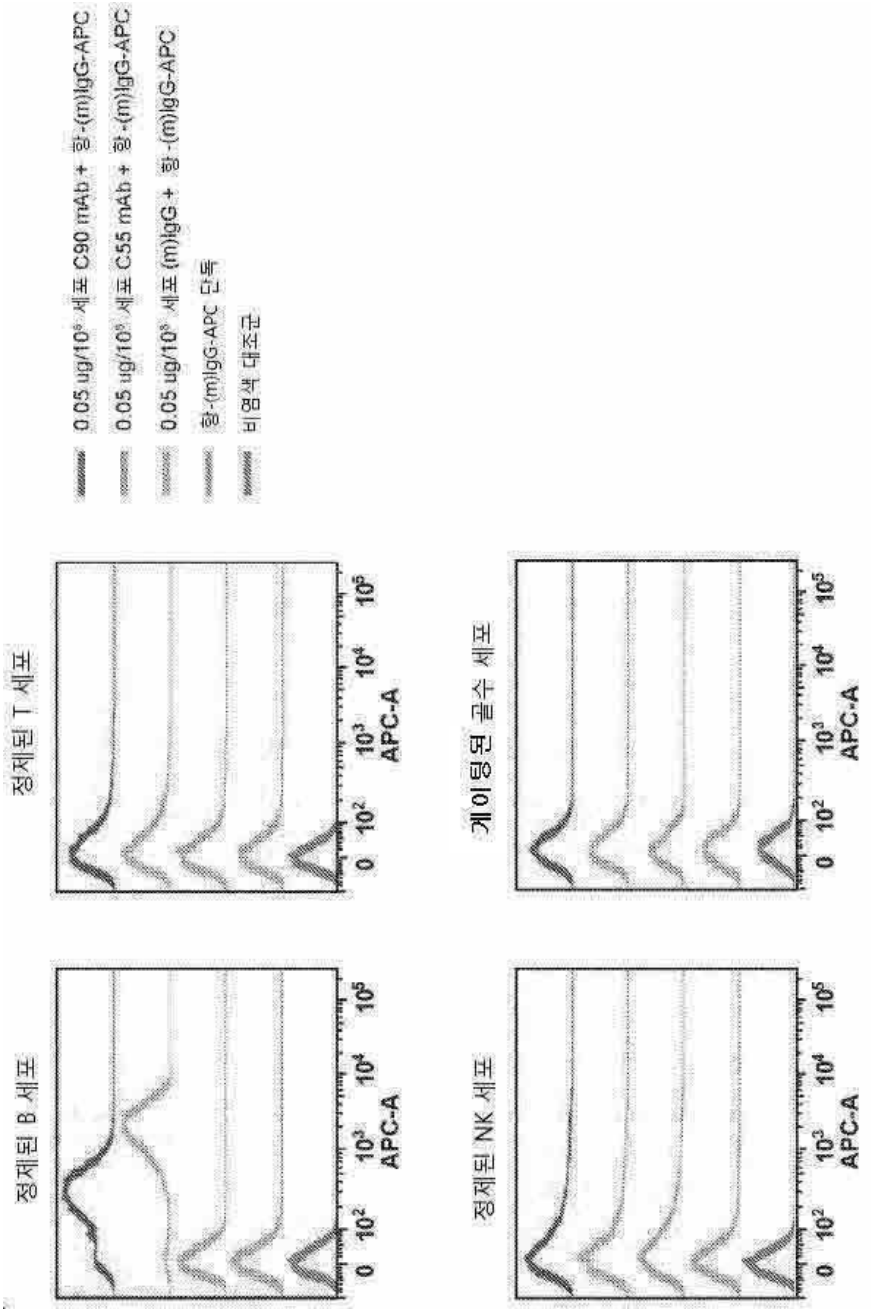
도면17a


98.2%
0%
0%
B cells
T cells
NK cells
Comp-PE-A :: CD20
Comp-퍼시픽 블루-A :: CD3
Comp-FITC-A :: CD56
Comp-APC-A :: BAFF-R
SSC-A
FSC-A
0
50K
100K
150K
200K
250K

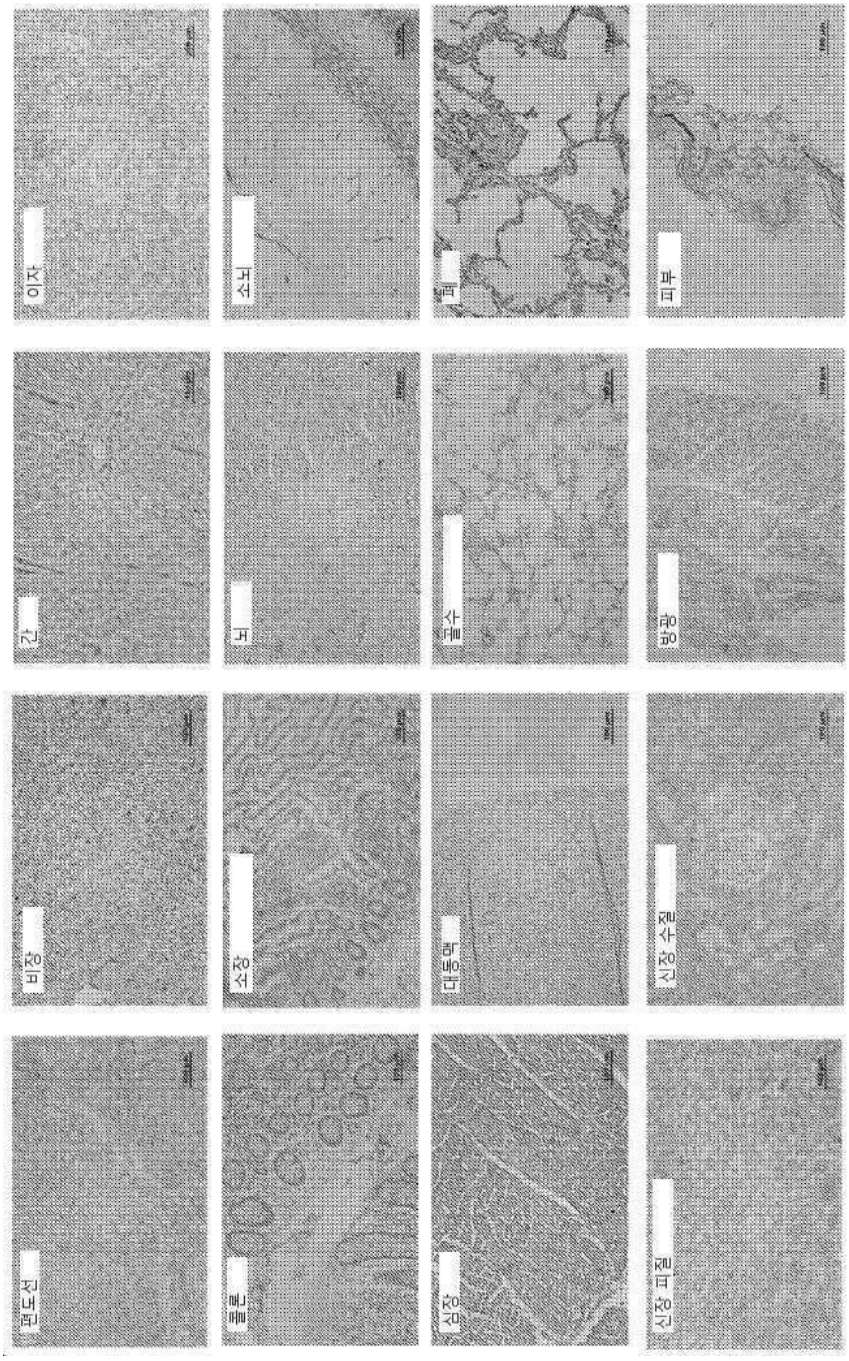
도면17b


0%
Comp-APC-A :: BAFF-R
Comp-PerCP-Cy5-5-A :: CD15
과립구
Comp-PE-A :: CD45
0%
Comp-APC-A :: BAFF-R
Comp-퍼시픽 블루-A :: CD14
단핵구
Comp-PE-A :: CD45
SSC-A
250K
200K
150K
100K
50K
0
Comp-PE-A :: CD45

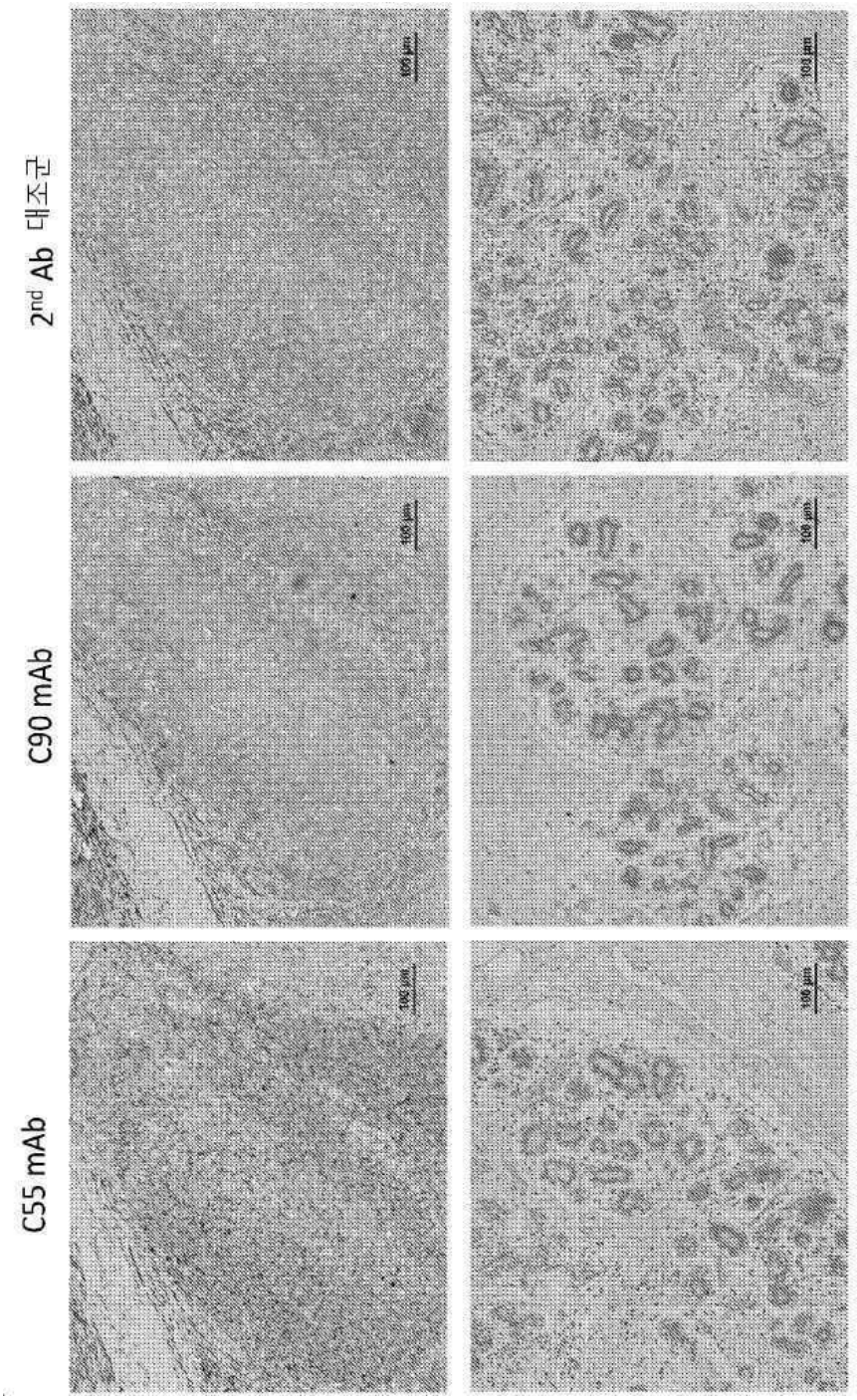
도면18


0.05 ug/10⁵ 세포 C90 mAb + 항-(m)IgG-APC
0.05 ug/10⁵ 세포 C55 mAb + 항-(m)IgG-APC
0.05 ug/10⁵ 세포 (m)IgG + 항-(m)IgG-APC
항-(m)IgG-APC 단독
비염색 대조군
정제된 T 세포
정제된 B 세포
정제된 NK 세포
게이팅된 골수 세포
0
10²
10³
10⁴
10⁵
APC-A

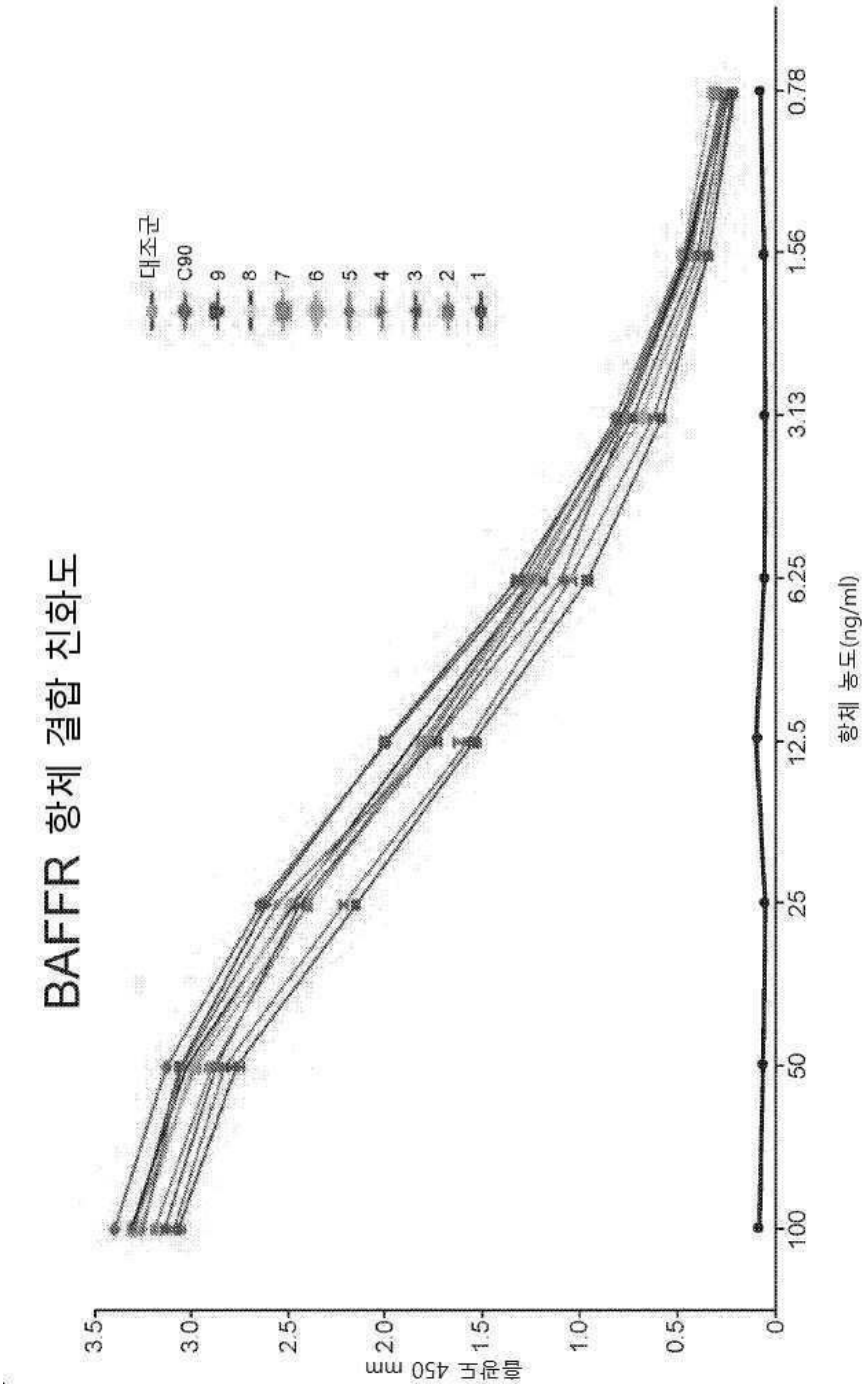
도면19a



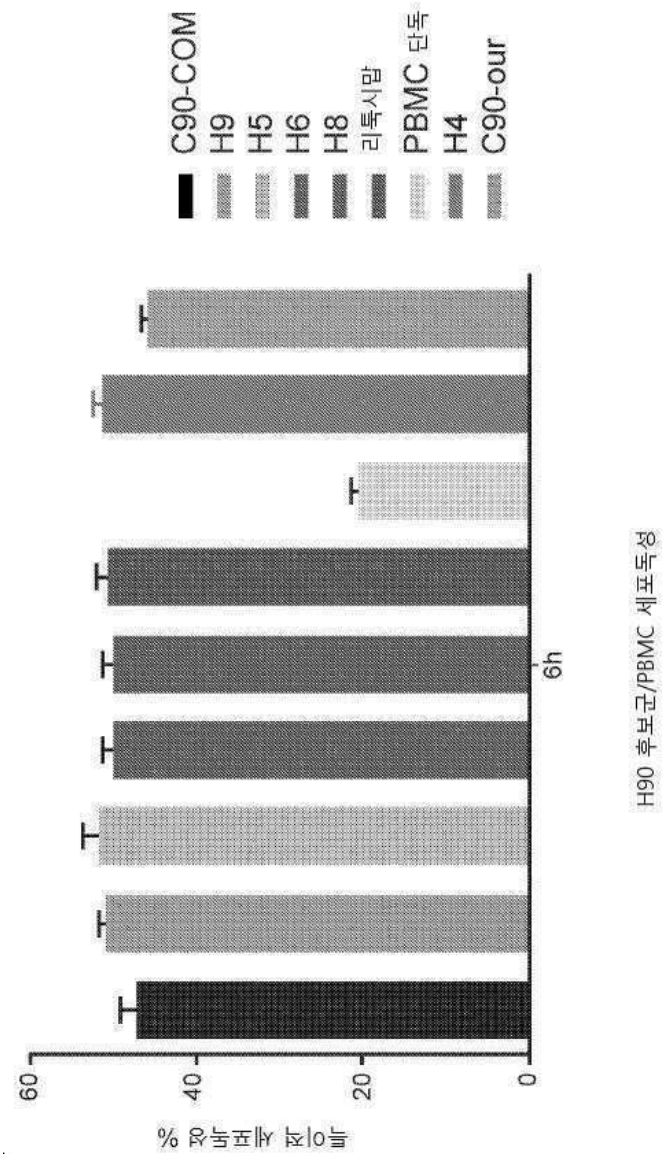
도면19b



도면20a

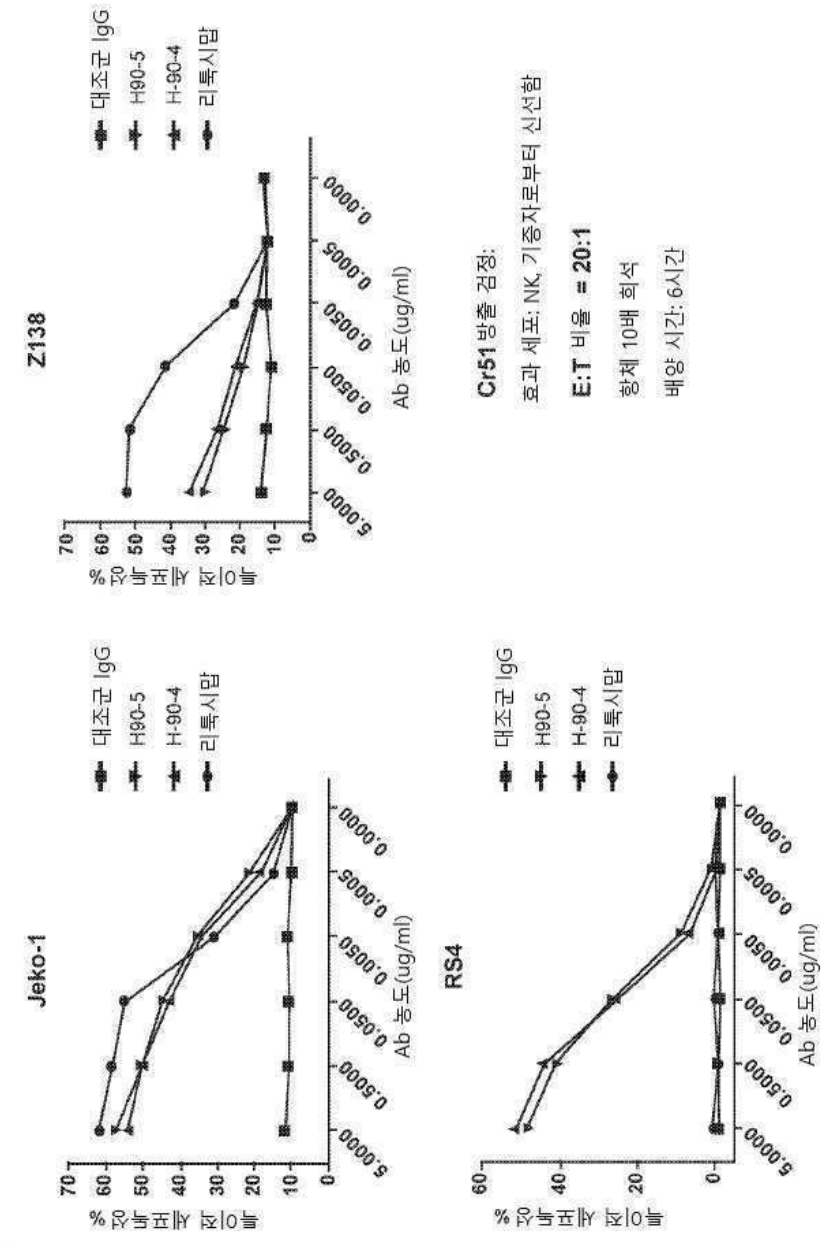

BAFFR 항체 결합 친화도
흡광도 450 nm
항체 농도(ng/ml)
대조군
C90
9
8
7
6
5
4
3
2
1
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0
100
50
25
12.5
6.25
3.13
1.56
0.78

도면20b

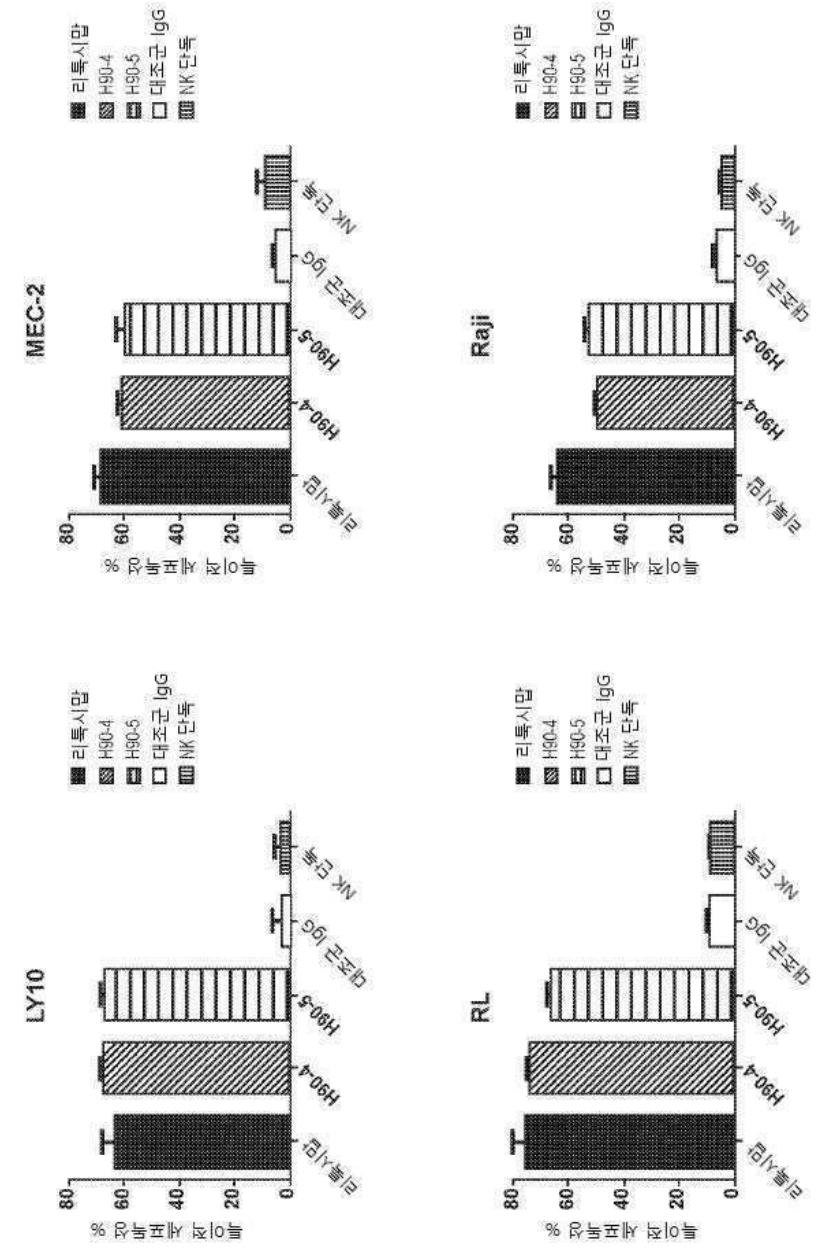


H90 후보군/PBMC 세포독성

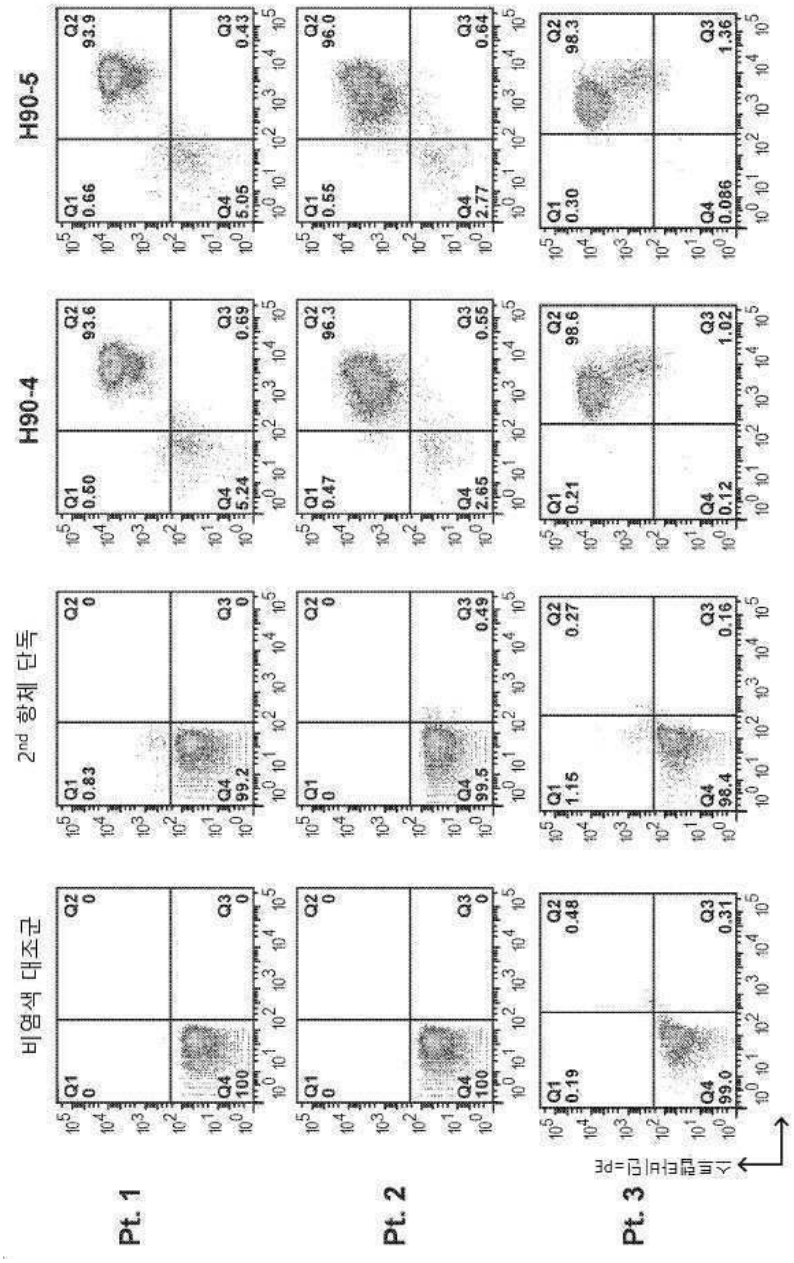
도면21a


Z138
Jeko-1
RS4
대조군 IgG
H90-5
H-90-4
리툭시맙
특이적 세포독성 %
Ab 농도(ug/ml)
0
10
20
30
40
50
60
70
5.0000
0.5000
0.0500
0.0050
0.0005
0.0000
Cr51 방출 검정:
효과 세포: NK, 기증자로부터 신선함
E:T 비율 = 20:1
항체 10배 희석
배양 시간: 6시간

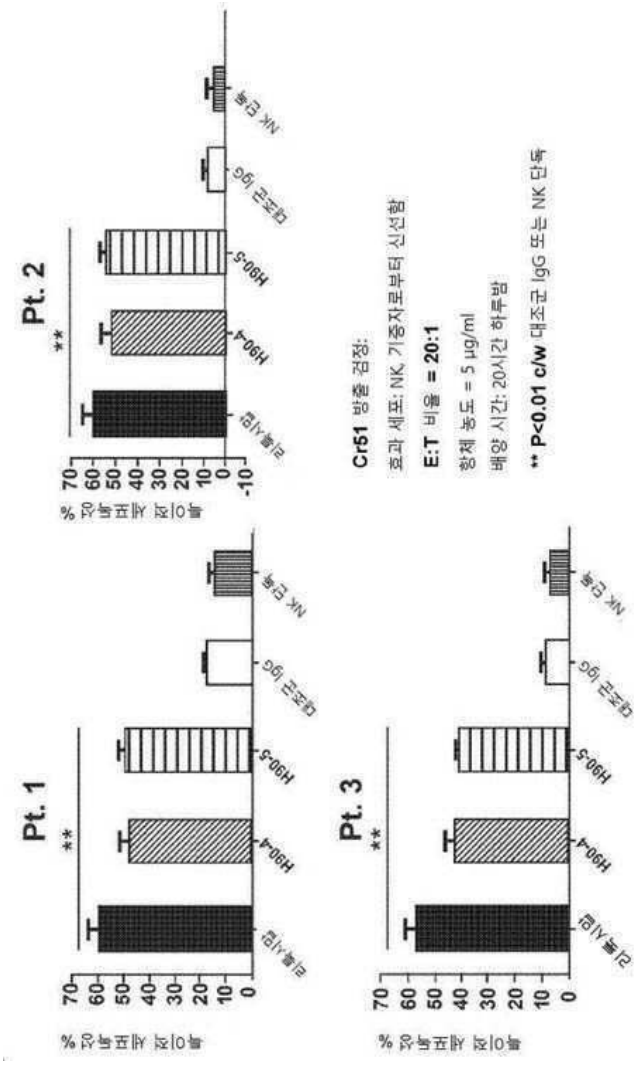
도면21b


MEC-2
Raji
LY10
RL
리툭시맙
H90-4
H90-5
대조군 IgG
NK 단독
특이적 세포독성 %
0
20
40
60
80

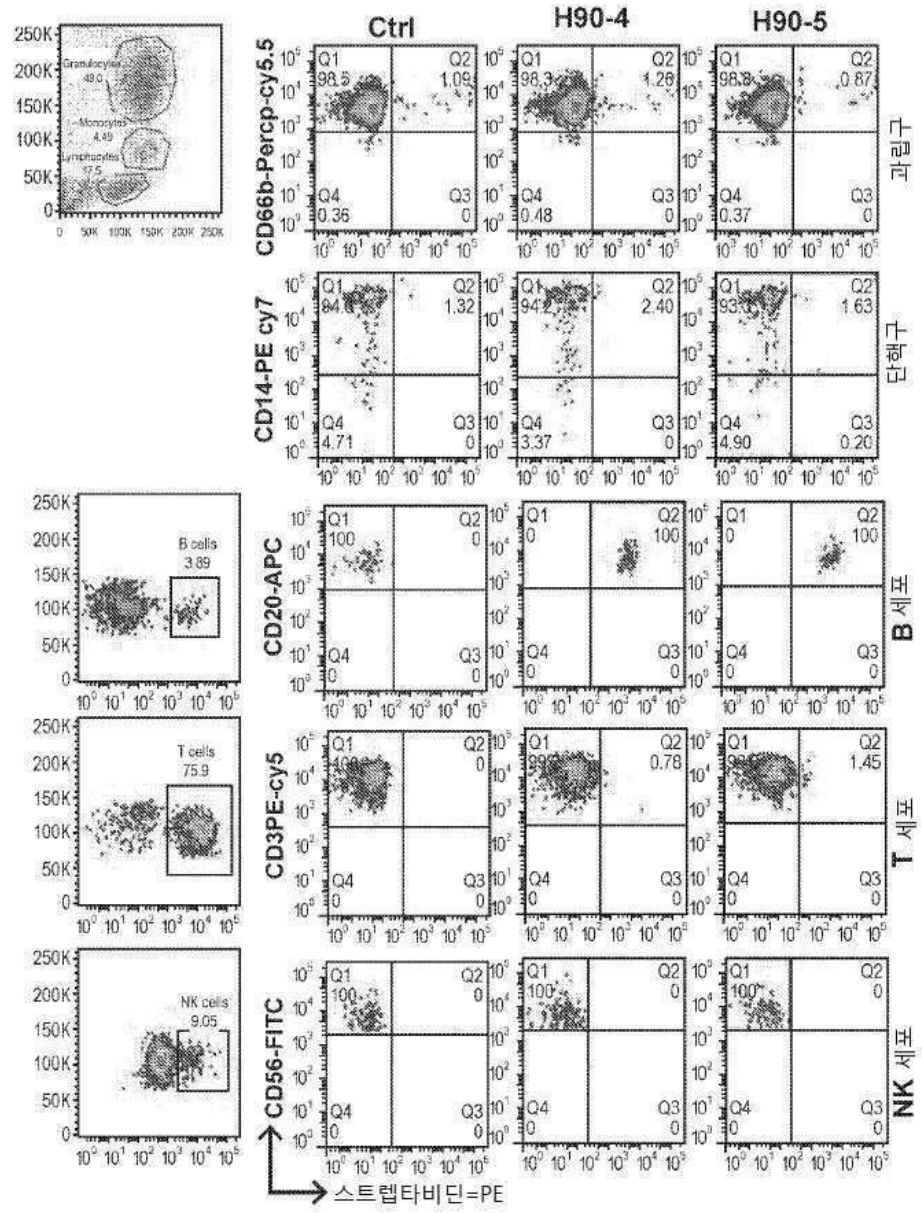
도면22a



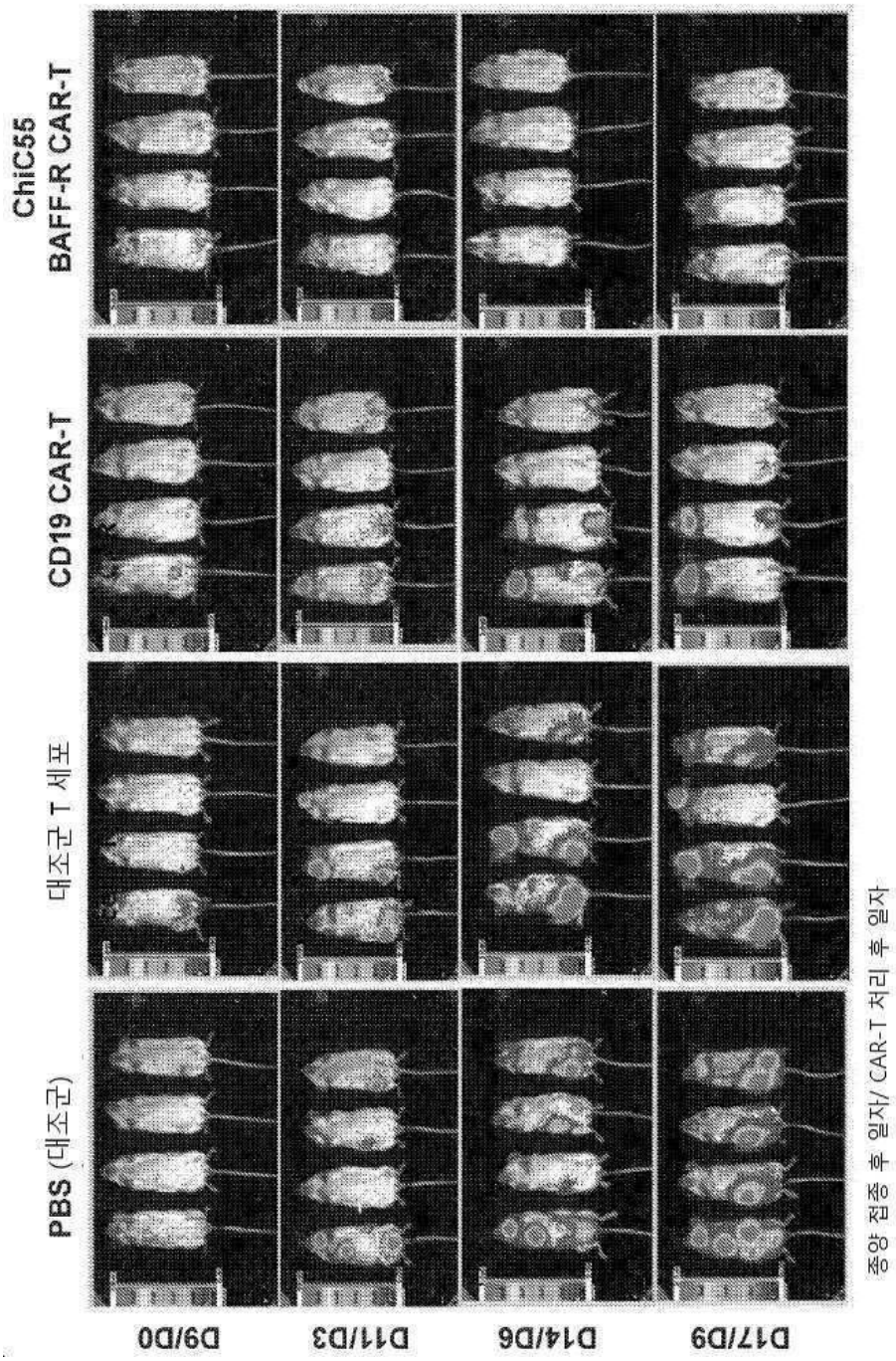
도면22b


Pt. 1
Pt. 2
Pt. 3
**
특이적 세포독성 %
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
림사놀리
H90-4
H90-5
대조군 IgG
NK 단독
Cr51 방출 검정:
효과 세포: NK, 기증자로부터 신선함
E:T 비율 = 20:1
항체 농도 = 5 μg/ml
배양 시간: 20시간 하루밤
** P<0.01 c/w 대조군 IgG 또는 NK 단독

도면23


Ctrl
H90-4
H90-5
Granulocytes 48.0
Monocytes 4.49
Lymphocytes 47.5
CD66b-Percp-cy5.5
과립구
CD14-PE cy7
단핵구
B cells 3.89
CD20-APC
B 세포
T cells 75.9
CD3PE-cy5
T 세포
NK cells 9.05
CD56-FITC
NK 세포
스트렙타비딘=PE

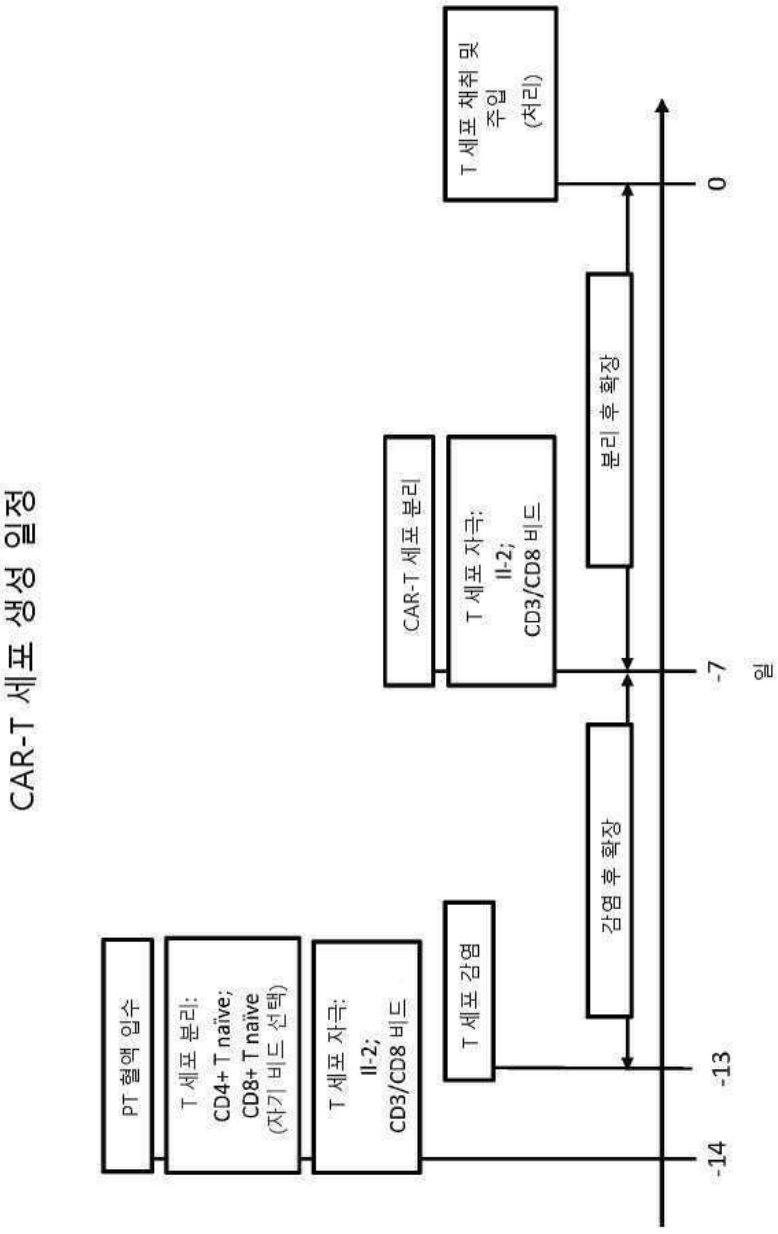
도면24


ChiC55 BAFF-R CAR-T
CD19 CAR-T
대조군 T 세포
PBS (대조군)
D9/D0
D11/D3
D14/D6
D17/D9
종양 접종 후 일자/ CAR-T 처리 후 일자

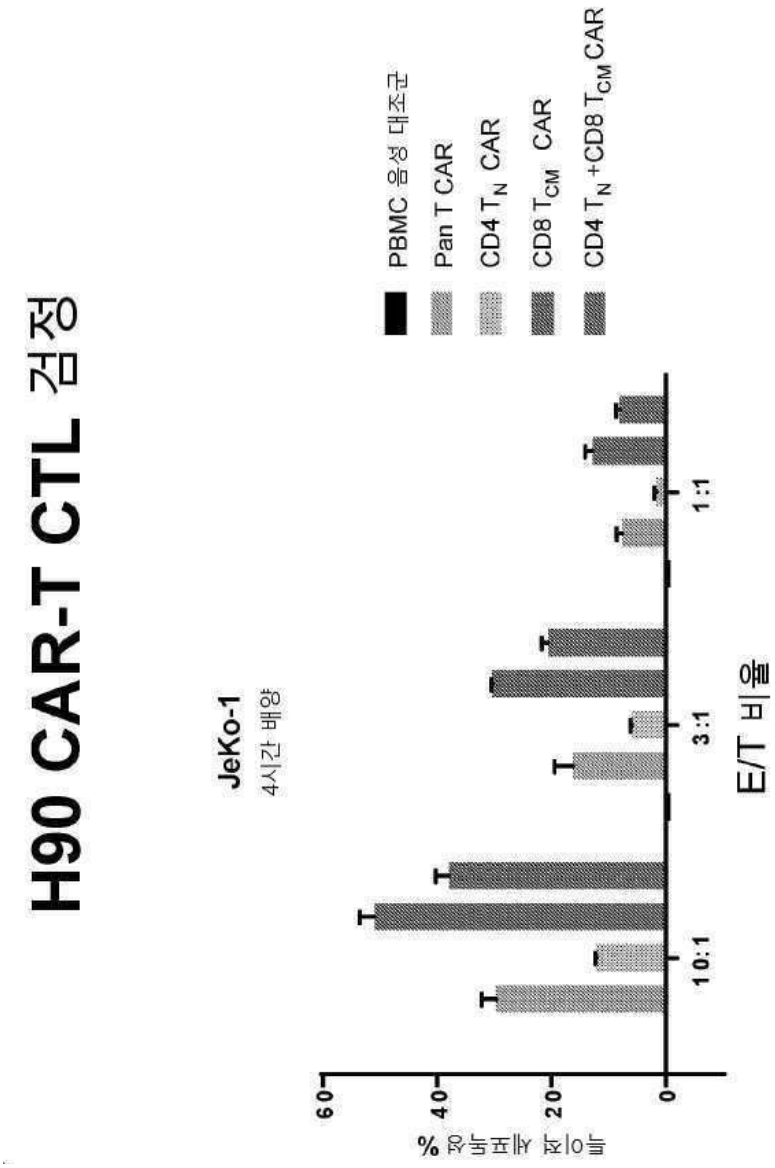
도면25a

CAR 구성 개략적 구조

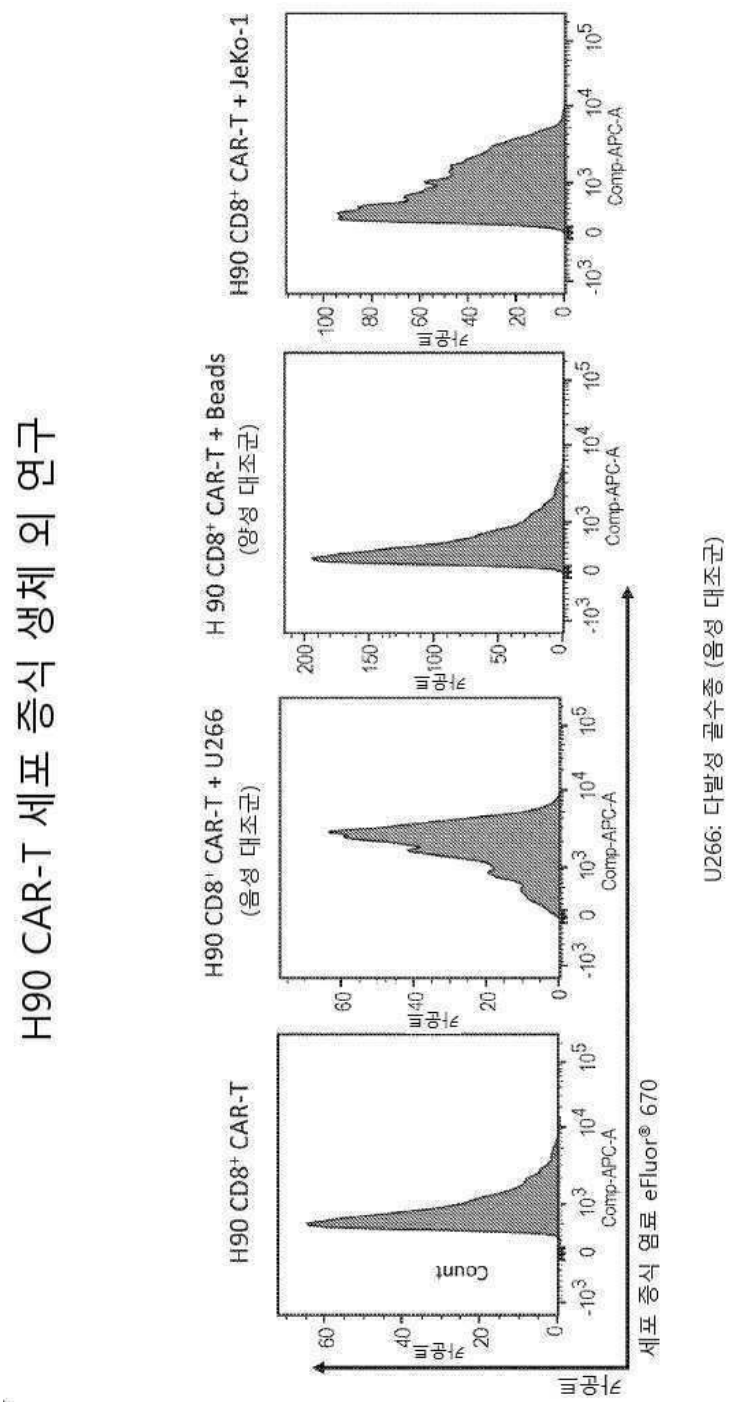
도면25b


CAR-T 세포 생성 일정
PT 혈액 입수
T 세포 분리:
CD4+ T naïve;
CD8+ T naïve
(자기 비드 선택)
T 세포 자극:
Il-2;
CD3/CD8 비드
T 세포 감염
감염 후 확장
CAR-T 세포 분리
T 세포 자극:
Il-2;
CD3/CD8 비드
분리 후 확장
T 세포 채취 및
주입
(처리)
-14
-13
-7
0
일

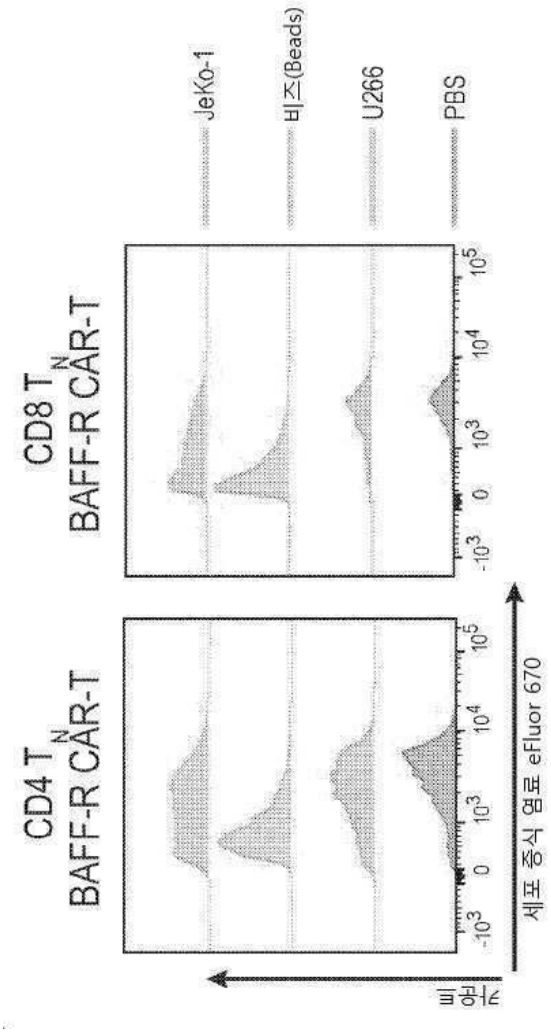
도면26


H90 CAR-T CTL 검정
PBMC 음성 대조군
Pan T CAR
CD4 T_N CAR
CD8 T_{CM} CAR
CD4 T_N +CD8 T_{CM} CAR
JeKo-1
4시간 배양
특이적 세포독성 %
0
20
40
60
10:1
3:1
1:1
E/T 비율

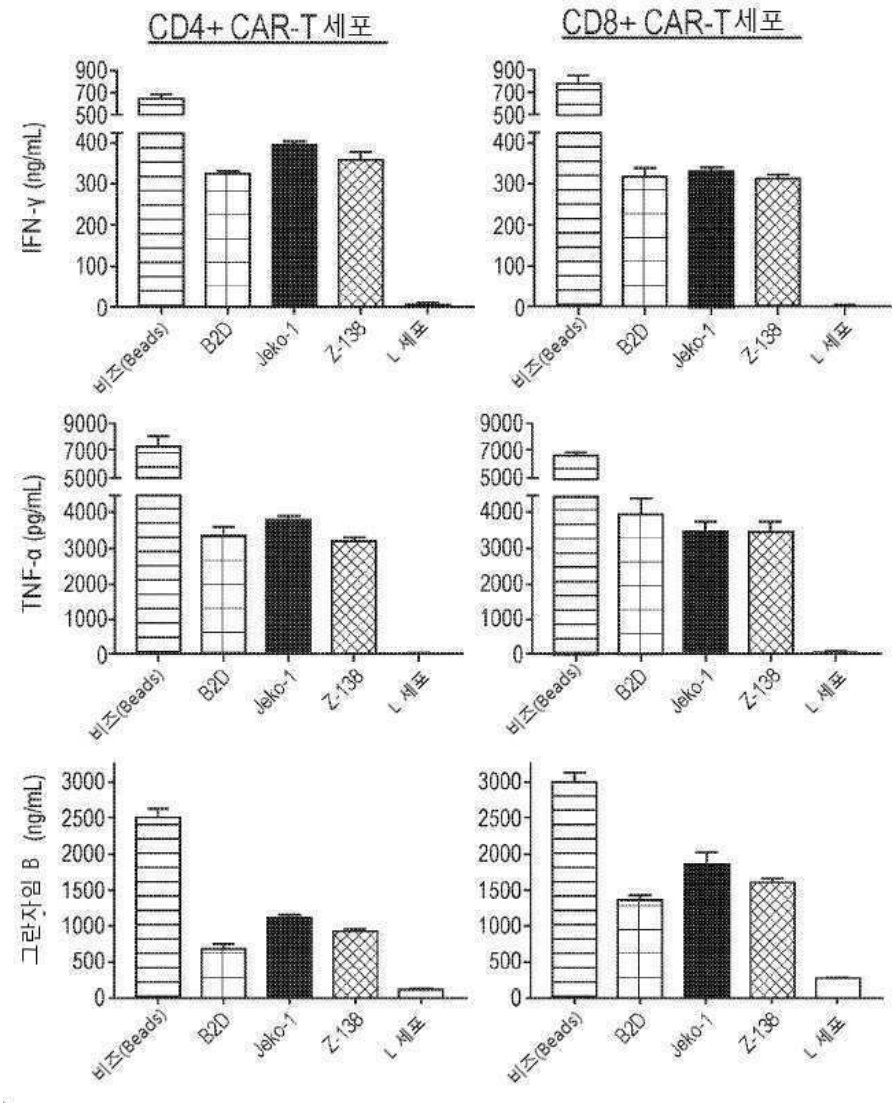
도면27


H90 CAR-T 세포 증식 생체 외 연구
H90 CD8+ CAR-T
H90 CD8+ CAR-T + U266
(음성 대조군)
H 90 CD8+ CAR-T + Beads
(양성 대조군)
H90 CD8+ CAR-T + JeKo-1
Count
Comp-APC-A
세포 증식 염료 eFluor® 670
U266: 다발성 골수종 (음성 대조군)

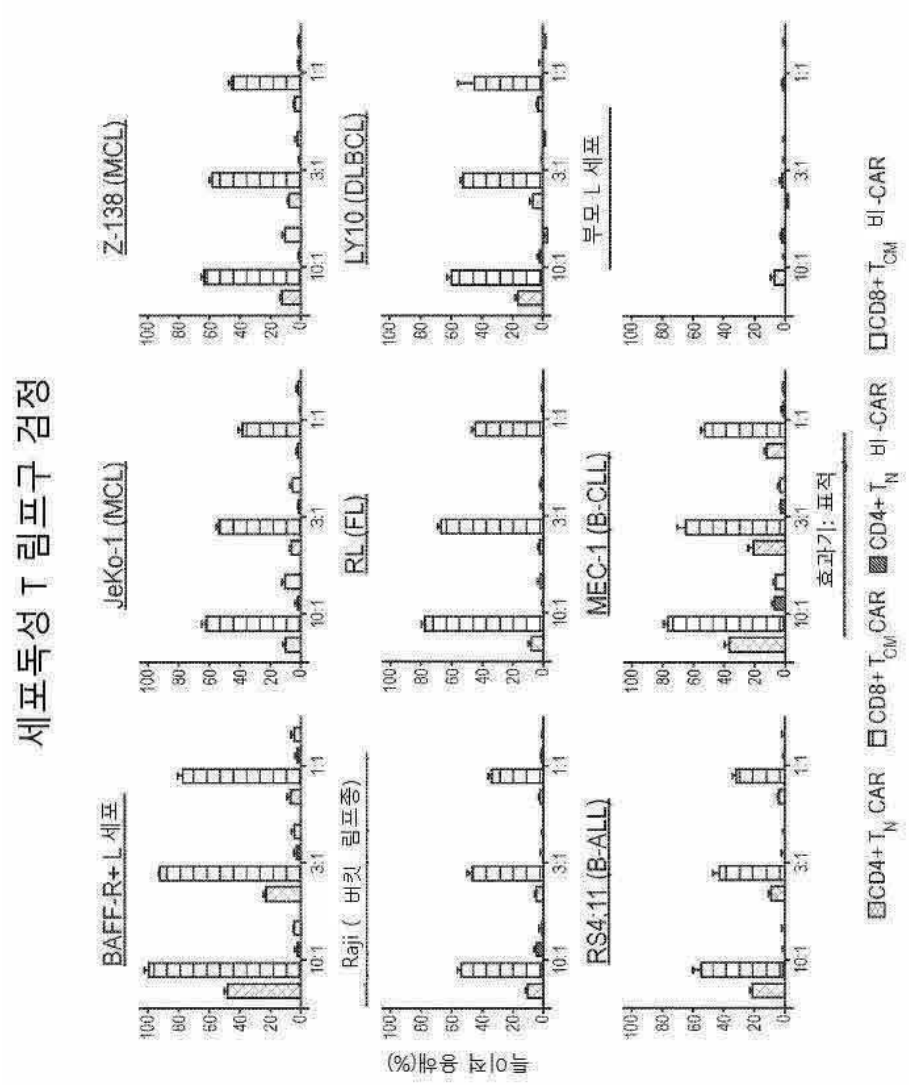
도면28a


CD4 T
BAFF-R CAR-T
CD8 T
BAFF-R CAR-T
JeKo-1
비즈(Beads)
U266
PBS
카운트
세포 증식 염료 eFluor 670
-10^3
0
10^3
10^4
10^5

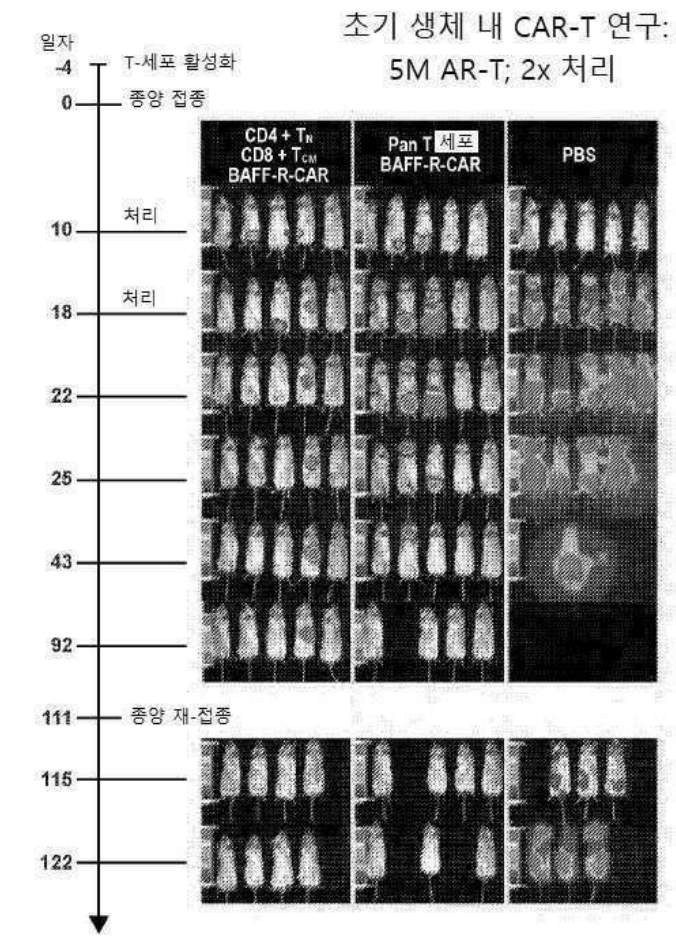
도면28b


CD4+ CAR-T세포
CD8+ CAR-T세포
IFN-γ (ng/mL)
TNF-α (pg/mL)
그란자임 B (ng/mL)
비즈(Beads)
B2D
Jeko-1
Z-138
L 세포

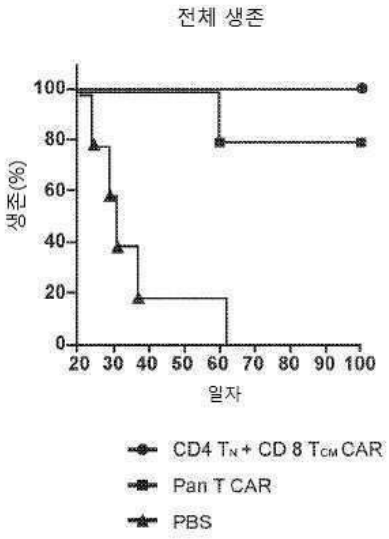
도면29


세포독성 T 림프구 검정
BAFF-R+L 세포
JeKo-1 (MCL)
Z-138 (MCL)
Raji (버킷 림프종)
RL (FL)
LY10 (DLBCL)
RS4;11 (B-ALL)
MEC-1 (B-CLL)
부모 L 세포
특이적 용해(%)
100
80
60
40
20
0
10:1
3:1
1:1
효과기 : 표적
CD4+ T_N CAR
CD8+ T_{CM} CAR
CD4+ T_N BI-CAR
CD8+ T_{CM} BI-CAR

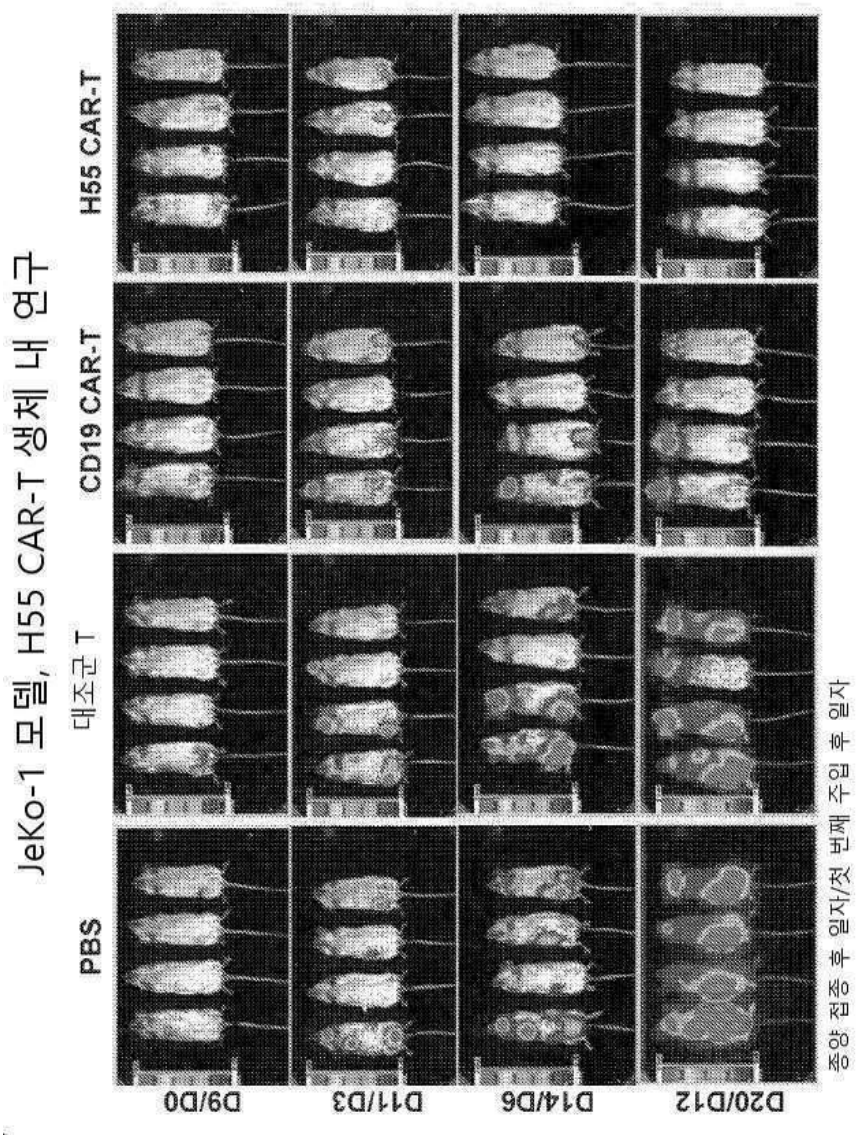
도면30a


초기 생체 내 CAR-T 연구:
5M AR-T; 2x 처리
일자
-4
T-세포 활성화
0
종양 접종
CD4 + TN
CD8 + TCM
BAFF-R-CAR
Pan T 세포
BAFF-R-CAR
PBS
10
처리
18
처리
22
25
43
92
111
종양 재-접종
115
122

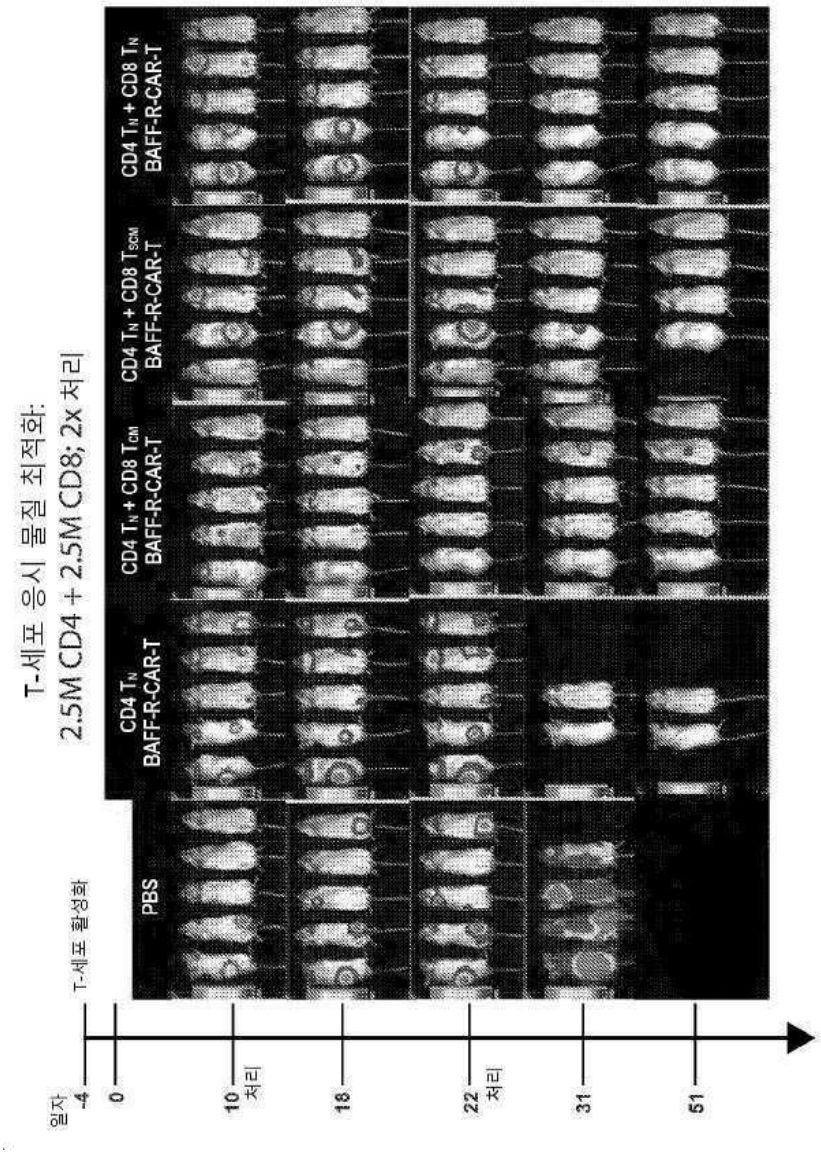
도면30b


전체 생존
생존(%)
100
80
60
40
20
0
20 30 40 50 60 70 80 90 100
일자
CD4 TN + CD 8 TCM CAR
Pan T CAR
PBS

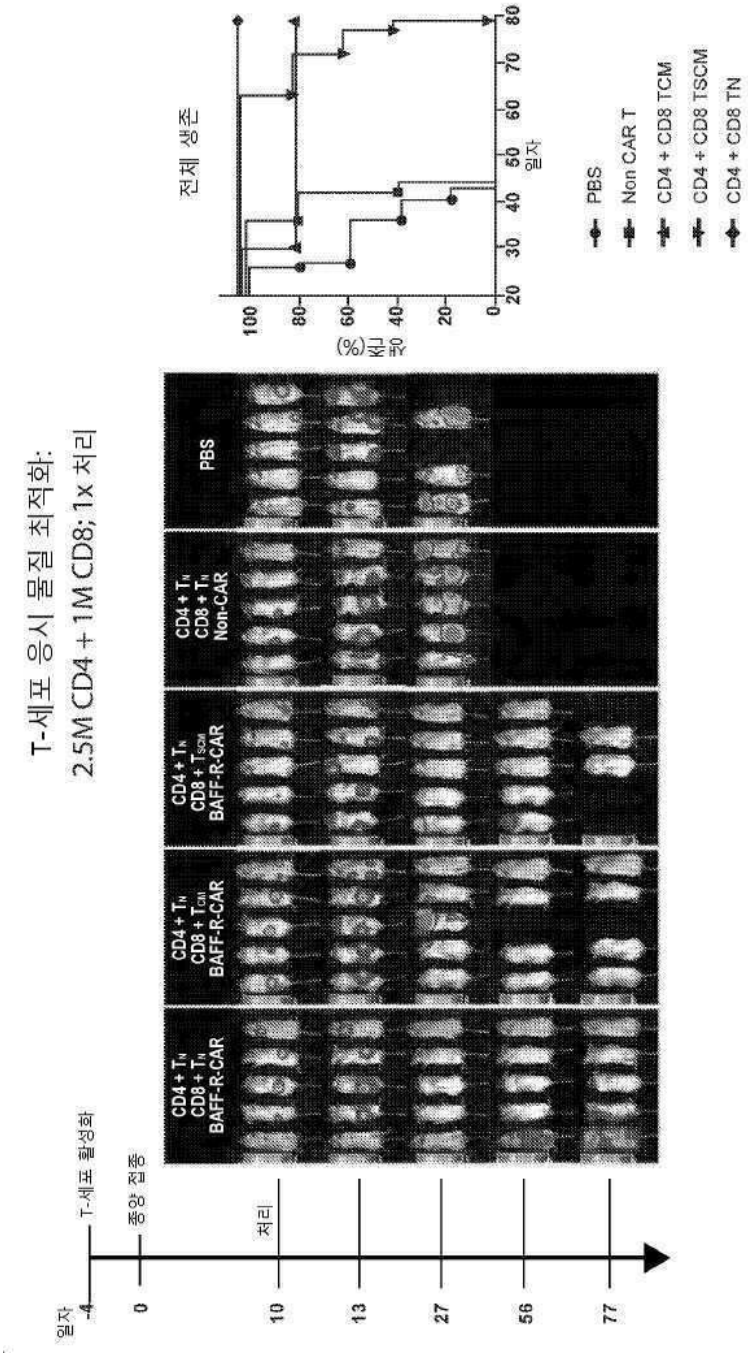
도면31


JeKo-1 모델, H55 CAR-T 생체 내 연구
PBS
대조군 T
CD19 CAR-T
H55 CAR-T
D9/D0
D11/D3
D14/D6
D20/D12
종양 접종 후 일자/첫 번째 주입 후 일자

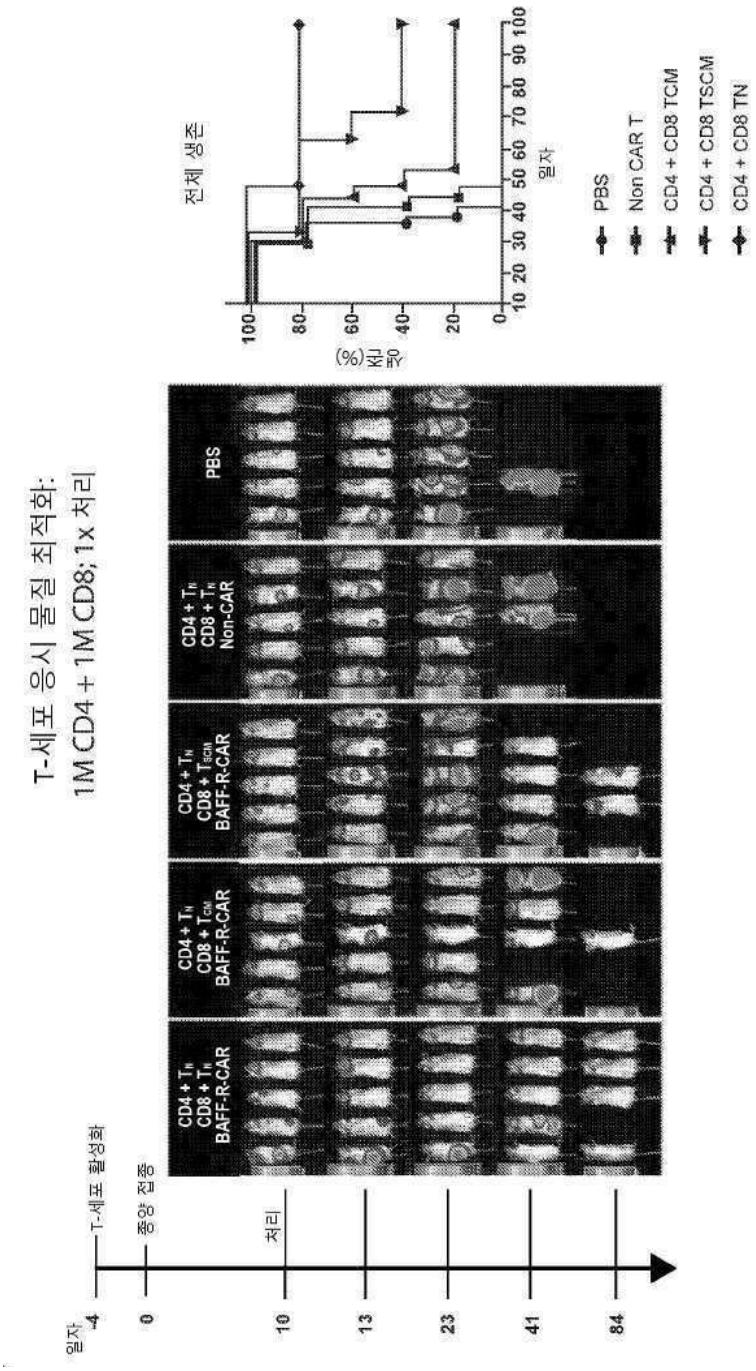
도면32a


T-세포 응시 물질 최적화:
2.5M CD4 + 2.5M CD8; 2x 처리
PBS
CD4 T_N BAFF-R-CAR-T
CD4 T_N + CD8 T_{CM} BAFF-R-CAR-T
CD4 T_N + CD8 T_{SCM} BAFF-R-CAR-T
CD4 T_N + CD8 T_N BAFF-R-CAR-T
일자
-4
T-세포 활성화
0
10
처리
18
22
처리
31
51

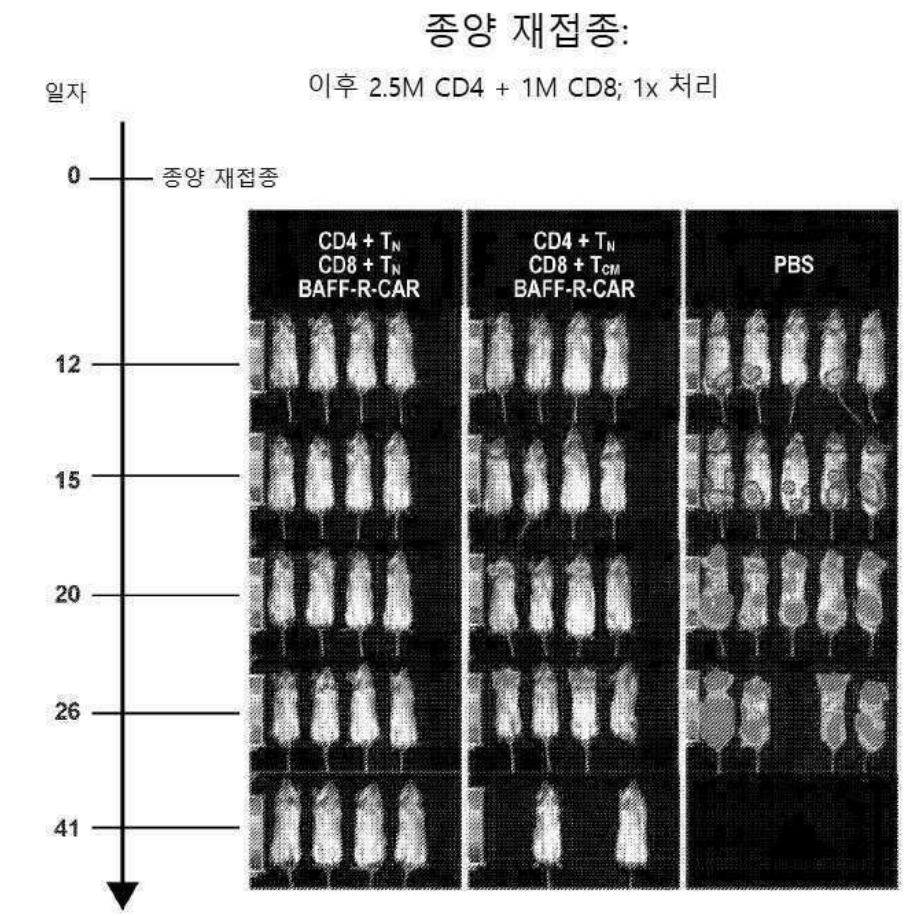
도면32b


T-세포 응시 물질 최적화:
2.5M CD4 + 1M CD8; 1x 처리
일자
-4
T-세포 활성화
0
종양 접종
처리
10
13
27
56
77
CD4 + TN
CD8 + TN
BAFF-R-CAR
CD4 + TN
CD8 + TCM
BAFF-R-CAR
CD4 + TN
CD8 + TSCM
BAFF-R-CAR
CD4 + TN
CD8 + TN
Non-CAR
PBS
전체 생존
생존율 (%)
일자
PBS
Non CAR T
CD4 + CD8 TCM
CD4 + CD8 TSCM
CD4 + CD8 TN

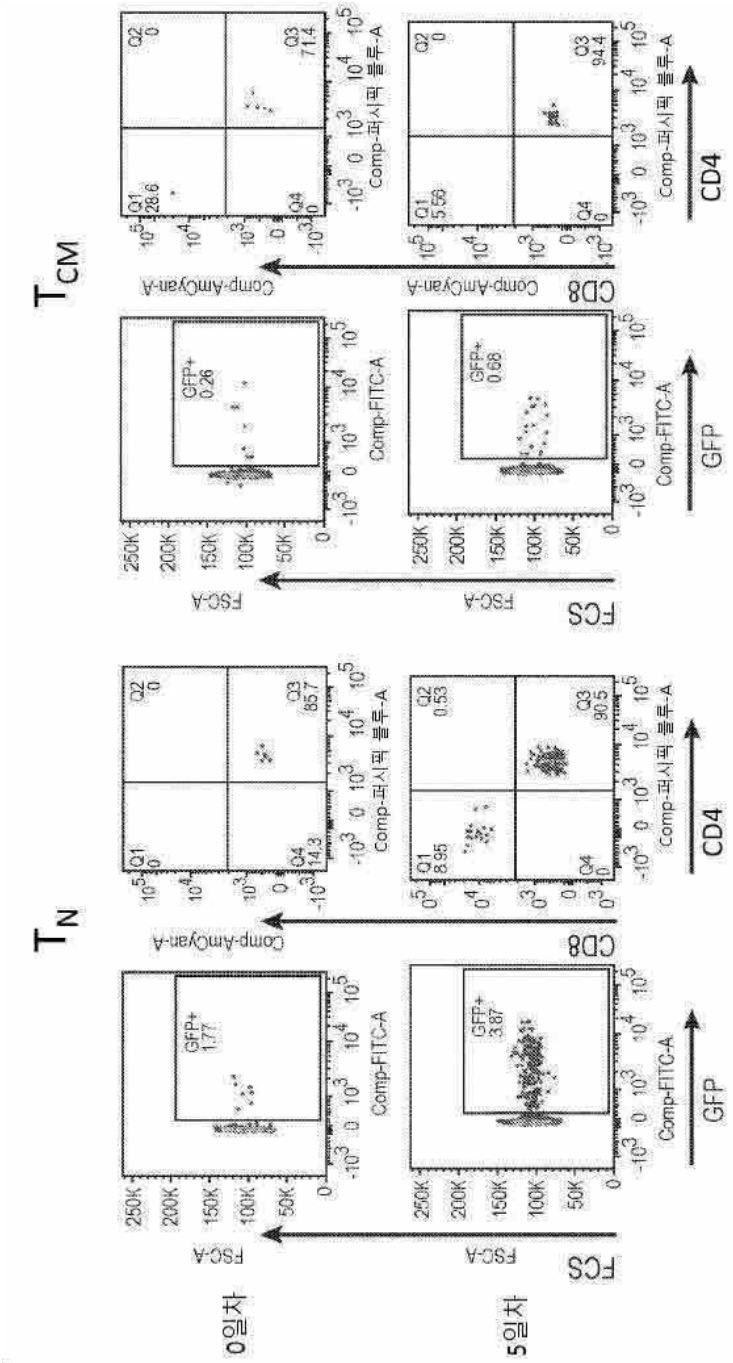
도면32c


T-세포 응시 물질 최적화:
1M CD4 + 1M CD8; 1x 처리
일자
-4
T-세포 활성화
0
종양 접종
처리
10
13
23
41
84
CD4 + TN
CD8 + TN
BAFF-R-CAR
CD4 + TN
CD8 + TSCM
BAFF-R-CAR
CD4 + TN
CD8 + TN
Non-CAR
PBS
전체 생존
생존(%)
일자
PBS
Non CAR T
CD4 + CD8 TCM
CD4 + CD8 TSCM
CD4 + CD8 TN

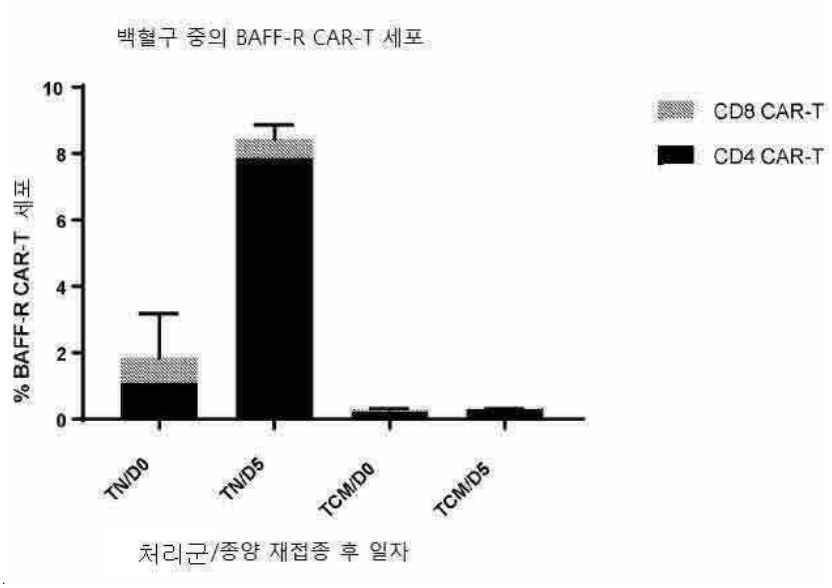
도면33a


종양 재접종:
이후 2.5M CD4 + 1M CD8; 1x 처리
일자
0
종양 재접종
12
15
20
26
41
CD4 + TN
CD8 + TN
BAFF-R-CAR
CD4 + TN
CD8 + TCM
BAFF-R-CAR
PBS

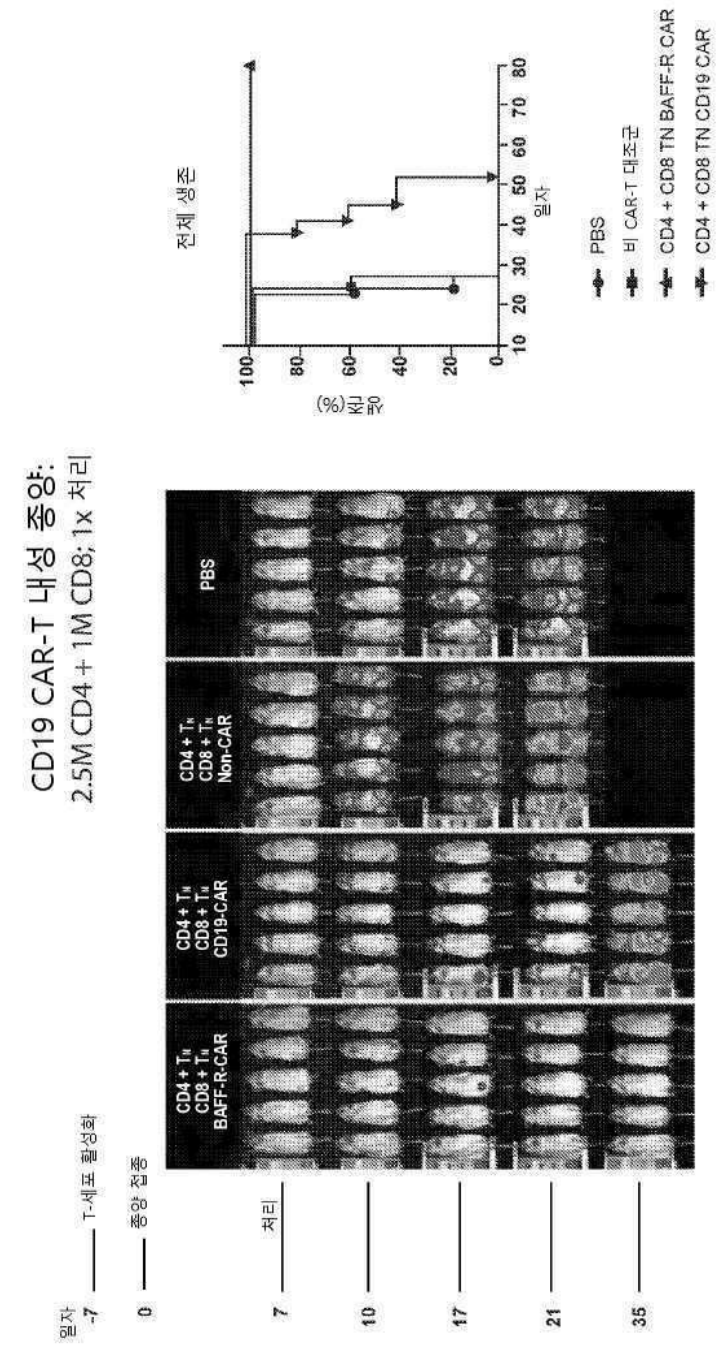
도면33b


TCM
TN
0일차
5일차
FCS
FSC-A
CD8
Comp-AmCyan-A
CD4
Comp-퍼시픽 블루-A
GFP
Comp-FITC-A
GFP+ 0.26
GFP+ 0.68
GFP+ 1.77
GFP+ 3.87
Q1 28.6
Q2 0
Q3 71.4
Q4 0
Q1 5.56
Q2 0
Q3 94.4
Q4 0
Q1 0
Q2 0
Q3 85.7
Q4 14.3
Q1 8.95
Q2 0.53
Q3 90.5
Q4 0

도면33c


백혈구 중의 BAFF-R CAR-T 세포
% BAFF-R CAR-T 세포
10
8
6
4
2
0
TN/D0
TN/D5
TCM/D0
TCM/D5
CD8 CAR-T
CD4 CAR-T
처리군/종양 재접종 후 일자

도면34



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> City of Hope;

Board of Regents, the University of Texas System

<120> BAFF-R TARGETED CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR-MODIFIED T-CELLS AND USES THEREOF

<130> 095058-1051328 (003WO1)

<140> PCT/US2017/036178

<141> 2017-06-06

<150> US 62/346,324

<151> 2016-06-06

<150> US 62/396,767

<151> 2016-09-19

<160> 45

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 1

Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe

1 5 10

<210> 2

<211> 3

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 2

Ala Ala Ser

1

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 3

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 4

Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly Tyr

1 5

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> mus muculus

<400> 5

Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr

1 5

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> mus muculus

<400> 6

Ala Ser Pro Asn Tyr Pro Phe Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> mus muculus

<400> 7

Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

1 5

<210> 8

<211> 3

<212> PRT

<213> mus muculus

<400> 8

Tyr Thr Ser

1

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> mus muculus

<400> 9

Phe Ser Glu Leu Pro Trp Thr

1 5

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> mus muculus

<400> 10

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly

1 5 10

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> mus muculus

<400> 11

Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> mus muculus

<400> 12

Ala Arg Ser Phe Gly Tyr Gly Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 13

<211> 411

<212> DNA

<213

> artificial sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 13

atgtacagga tgcaactcct gtcttgcatt gcactaagtc ttgcacttgt cacgaattca 60

gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 120

atctcctgca gagccagcga aagtgttgat aattatggca ttagttttat gaactggttc 180

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccaa ccaaggatcc 240

ggggtccctg ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcagcct caacatccat 300

cctatggagg aggatgatac tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgtgg 360

acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaaaccatgg aaatcaaacg t 411

<210> 14

<211> 137

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 14

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15

Val Thr Asn Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
35 40 45

Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser
85 90 95

Leu Asn Ile His Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys
100 105 110

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Ile Lys Thr Met Glu Ile Lys Arg
130 135

<210> 15

<211> 420

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 15

atgtacagga tgcaactcct gtcttgcatt gcactaagtc ttgcacttgt cacgaattcg 60

gaggtgcagc tgcaggagtc tggacctagc ctcgtgaaac cttctcagac tctgtccctc 120

acctgttctg tcactggcga ctccatcacc agtggttact ggaactggat ccggaaattc 180

ccagggaata aacttgagta catggggtac ataagctaca gtggtagcac ttactacaat 240

ccatctctca aaagtcgaat ctccatcact cgagacacat ccaagaacca gtactacctg 300

cagttaaatt ctgtgacacc tgaggacaca gccacatatt actgtgcaag ccccaattac 360

cccttctatg ctatggacta ctggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctcagatatc 420

<210> 16

<211> 140

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 16

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ile Thr Ser Gly Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys

50 55 60

Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn

65 70 75 80

Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn

85 90 95

Gln Tyr Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Thr

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Ser Pro Asn Tyr Pro Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp

115 120 125

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Asp Ile

130 135 140

<210> 17

<211> 403

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 17

atggagaccg acaccctgct gctctgggtg ctgctgctct gggtgcccgg ctccaccgga 60

gagatcgtgc tgacccagag ccctgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagctacc 120

ctgtcctgca gagcctccga gtccgtggac aactacggca tctccttcct gaactggttc 180

cagcagaagc ccggccaggc ccccagactg ctgatctacg ccgcctctaa tcgggccacc 240

ggcatccctg ccagattctc cggatctggc tccggcaccg actttaccct gaccatctcc 300

agcctggaac ccgaggactt cgccgtgtac tactgccagc agtccaaaga ggtgccctgg 360

acctttggcg gaggcaccaa ggtggaaatc aagcggaccg tgg 403

<210> 18

<211> 134

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 18

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
35 40 45

Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Arg Ala Thr
65 70 75 80

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

100 105 110

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val

115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val

130

<210> 19

<211> 403

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 19

atggagaccg acaccctgct gctctgggtg ctgctgctct gggtgcccgg ctccaccgga 60

gacatcgtgc tgacccagag ccctgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagctacc 120

ctgtcctgca gagcctccga gtccgtggac aactacggca tctccttcat gaactggttc 180

cagcagaagc ccggccaggc ccccagactg ctgatctacg ccgcctctaa tcgggccacc 240

ggcatccctg ccagattctc cggatctggc tccggcaccg actttaccct gaccatctcc 300

agcctggaac ccgaggactt cgccgtgtac tactgccagc agtccaaaga ggtgccctgg 360

acctttggcg gaggcaccaa ggtggaaatc aagcggaccg tgg 403

<210> 20

<211> 134

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 20

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser

35 40 45

Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro

50 55 60

Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Arg Ala Thr

65 70 75 80

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

85 90 95

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

100 105 110

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val

115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val

130

<210> 21

<211> 403

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 21

atggagaccg acaccctgct gctctgggtg ctgctgctct gggtgcccgg ctccaccgga 60

gacatcgtga tgacccagag cccctccagc ctgtctgcct ctgtgggcga cagagtgacc 120

atcacctgtc gggcctccga gtccgtggac aactacggca tctccttcat gaactggttc 180

cagcagaagc ccggcaaggc ccccaagctg ctgatctacg ccgcctctaa tctgggctct 240

ggcgtgccct ctagattctc cggatctggc tccggcaccg actttaccct gaccatctcc 300

agcctgcagc ccgaggactt cgccacctac tactgccagc agtccaaaga ggtgccctgg 360

acctttggcc agggcaccaa ggtggaaatc aagcggaccg tgg 403

<210> 22

<211> 134

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 22

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser

35 40 45

Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val

115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val

130

<210> 23

<211> 426

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 23

atggacccca agggcagcct gagctggaga atcctgctgt tcctgagcct ggccttcgag 60

ctgagctacg gccaggtgca gctgcaggaa tctggccctg gcctcgtgaa gccttcccag 120

accctgtccc tgacctgcac cgtgtccggc gactctatca cctccggcta ctggaactgg 180

atccggcagc atcctggcaa gggcctggag tatatcggct acatctccta ctccggctcc 240

acctactaca accccagcct gaagtccaga gtgaccatct cccgggacac ctccaagaac 300

cagttctccc tgaagctgtc ctccgtgacc gctgctgata ccgccgtgta ctactgcgcc 360

tcccccaact acccttctta cgccatggac tactggggcc agggcaccct cgtgaccgtg 420

tcctct 426

<210> 24

<211> 142

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 24

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

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

Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 25

<211> 426

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 25

atggacccca agggcagcct gagctggaga atcctgctgt tcctgagcct ggccttcgag 60

ctgagctacg gcgaagtgca gctgcaggaa tctggccctg gcctcgtgaa gccttcccag 120

accctgtccc tgacctgcac cgtgtccggc gactctatca cctccggcta ctggaactgg 180

atccggcagc atcctggcaa gggcctggag tatatcggct acatctccta ctccggctcc 240

acctactaca accccagcct gaagtccaga gtgaccatct cccgggacac ctccaagaac 300

cagtactccc tgaagctgtc ctccgtgacc gctgctgata ccgccgtgta ctactgcgcc 360

tcccccaact acccttctca cgccatggac tactggggcc agggcaccct cgtgaccgtg 420

tcctct 426

<210> 26

<211> 142

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 26

Met Asp Pro Lys Gly Ser Leu Ser Trp Arg Ile Leu Leu Phe Leu Ser
1 5 10 15

Leu Ala Phe Glu Leu Ser Tyr Gly Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly
20 25 30

Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val
35 40 45

Ser Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His
50 55 60

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser
65 70 75 80

Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp
85 90 95

Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala
100 105 110

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Pro Asn Tyr Pro Phe Tyr Ala
115 120 125

Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 27

<211> 426

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 27

atggacccca agggcagcct gagctggaga atcctgctgt tcctgagcct ggccttcgag 60

ctgagctacg gcgaagtgca gctgcaggaa tctggccctg gcctcgtgaa gccttccgag 120

accctgtccc tgacctgctc cgtgtccggc gactctatca cctccggcta ctggaactgg 180

atccggcagc ctcctggcaa gggcctggag tatatcggct acatctccta ctccggctcc 240

acctactaca accccagcct gaagtccaga gtgaccatct cccgggacac ctccaagaac 300

cagtactccc tgcggctgtc ctccgtgacc gctgctgata ccgccctgta ctactgcgcc 360

tcccccaact acccttctta cgccatggac tactggggcc agggcacaag agtgaccgtg 420

tcctct 426

<210> 28

<211> 142

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 28

Met Asp Pro Lys Gly Ser Leu Ser Trp Arg Ile Leu Leu Phe Leu Ser
1 5 10 15

Leu Ala Phe Glu Leu Ser Tyr Gly Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly
20 25 30

Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val
35 40 45

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

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser
65 70 75 80

Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp
85 90 95

Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala
100 105 110

Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Ser Pro Asn Tyr Pro Phe Tyr Ala
115 120 125

Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Arg Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 29

<211> 387

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 29

atgtacagga tgcaactcct gtcttgcatt gcactaagtc ttgcacttgt cacgaattca 60

gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 120

atcagttgca gtgcaagtca ggacattagc aattatttaa actggtatca gcagaaacca 180

gatggaactg ttaaactcct gatctattac acatcaagtt tacactcagg agtcccatca 240

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagat tattctctca ccatcagcag cctggaacct 300

gaagatattg ccacttacta ttgtcatcag tttagtgagc ttccgtggac gttcggtgga 360

ggcaccaagc tggaaataaa acgtacg 387

<210> 30

<211> 129

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 30

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15

Val Thr Asn Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Asp
35 40 45

Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

115 120 125

Thr

<210> 31

<211> 420

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 31

atgtacagga tgcaactcct gtcttgcatt gcactaagtc ttgcacttgt cacgaattcg 60

caggttactc tgaaagagtc tggccctggg atattgaagc cctcacagac cctcagtctg 120

acttgttctt tctctgggtt ttcactgagc acttctggta tgggtgtagg ctggattcgt 180

cagccttcag ggaagggtct ggagtggctg gcacacattt ggtgggatga tgataaatac 240

tataactcat ccctgaagag tcacctcaca atctccaagg atacctccag aaaccaggta 300

ttcctcaaga tcaccagtgt ggacactgca gatactgcca cttactactg tgctcgaagc 360

tttggttacg gtcttgacta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctcagctagc 420

<210> 32

<211> 140

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 32

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser

35 40 45

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

100 105 110
Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Phe Gly Tyr Gly Leu Asp Tyr Trp
115 120 125
Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser
130 135 140

<210> 33
<211> 142
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220><223> synthetic construct
<400> 33

Met Asp Pro Lys Gly Ser Leu Ser Trp Arg Ile Leu Leu Phe Leu Ser
1 5 10 15

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

Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr
85 90 95
Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp
100 105 110

Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Phe Gly Tyr Gly
115 120 125
Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 34
<211> 142
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220><223> synthetic construct
<400> 34
Met Asp Pro Lys Gly Ser Leu Ser Trp Arg Ile Leu Leu Phe Leu Ser
1 5 10 15
Leu Ala Phe Glu Leu Ser Tyr Gly Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly
20 25 30
Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe
35 40 45
Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg

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

115 120 125
Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140
<210> 35
<211> 142
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 35

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

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

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

<210> 36

<211> 130

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 36

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

1 5 10 15
Gly Ser Thr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp
35 40 45

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

50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Thr Gly Val Pro Ser

65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Thr Val

130

<210> 37

<211> 130

<212

> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 37

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Thr Gly Val Pro Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Thr Val

130

<210> 38

<211> 130

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 38

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Thr Gly Val Pro Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Thr Val

130

<210> 39

<211> 22

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 39

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro
20

<210> 40

<211> 69

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 40

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
1 5 10 15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
20 25 30

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile
35 40 45

Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val

50 55 60

Ile Thr Leu Tyr Cys
65

<210> 41

<211> 42

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 41

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

35 40

<210> 42

<211> 113

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 42

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly

1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr

20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys

35 40 45

Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln

50 55 60

Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu

65 70 75 80

Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr

85 90 95

Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro

100 105 110

Arg

<210> 43

<211> 244

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 43

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

1 5 10 15

Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly Tyr
20 25 30
Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
35 40 45

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

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

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

Glu Ile Lys Arg

<210> 44

<211> 245

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 44

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser
50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ser Arg Ser Phe Gly Tyr Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ile Leu Leu
130 135 140

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys
145 150 155 160

Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Arg
165 170 175

Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu
180 185 190

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe
195 200 205

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

210 215 220

Cys His Gln Phe Ser Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys

225 230 235 240

Val Glu Ile Lys Arg

245

<210> 45

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 45

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

1 5 10 15