



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년03월04일

(11) 등록번호 10-2776145

(24) 등록일자 2025년02월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 47/64 (2017.01) A61K 47/68 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 16/2878 (2013.01)
A61K 47/6415 (2017.08)

(21) 출원번호 10-2018-7016668

(22) 출원일자(국제) 2016년11월10일

심사청구일자 2021년11월09일

(85) 번역문제출일자 2018년06월12일

(65) 공개번호 10-2019-0008171

(43) 공개일자 2019년01월23일

(86) 국제출원번호 PCT/US2016/061320

(87) 국제공개번호 WO 2017/083511

국제공개일자 2017년05월18일

(30) 우선권주장

62/255,255 2015년11월13일 미국(US)

62/257,493 2015년11월19일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020140036272 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

더 유나이티드 스테이츠 오브 어메리카, 애즈 리
프리젠티드 바이 더 세크리테리, 디파트먼트 오브
헬스 앤드 휴먼 서비스즈

미국, 메릴랜드 20892, 베서스다, 엠에스 7788,
스위트 700, 6701 록리지 드라이브, 내셔널 인스
티튜트 오브 헬스, 오피스 오브 테크놀로지 트랜
스퍼

샌포드 리서치

미국 57104 사우스다코타 수폴스 이스트 60번 스
트리트 노스 2301

(72) 발명자

파스탄 이라 에이치

미국 메릴랜드주 20854 포토맥 비올 마운튼 로드
11710

베라 타펜

미국 메릴랜드주 21703 프레데릭 런닝 스프링스
코트 6816

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

제일특허법인(유)

전체 청구항 수 : 총 39 항

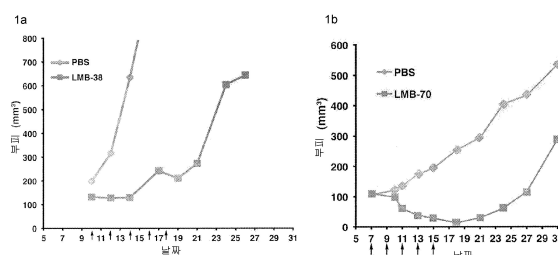
심사관 : 문명순

(54) 발명의 명칭 항-BCMA 폴리펩티드 및 단백질

(57) 요약

본 발명은 B-세포 성숙 항원(BCMA)에 특이적으로 결합하고 이를 면역학적으로 인식하는 폴리펩티드 및 단백질에 관한 것이다. 이러한 폴리펩티드 및 단백질에 관련된 키메라성 항원 수용체(CAR), 항-BCMA 결합 작용부분, 핵산, 재조합 발현 벡터, 숙주 세포, 세포의 집단, 약학 조성물, 및 접합체가 또한 개시된다. 암의 존재를 검출하는 방법 및 암을 치료하거나 예방하는 방법이 또한 개시된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 47/6425 (2017.08)

A61K 47/6803 (2023.08)

A61K 47/6849 (2017.08)

A61P 35/00 (2018.01)

G01N 33/57484 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2319/03 (2013.01)

C07K 2319/03 (2013.01)

(72) 발명자

나가타 사토시

일본 오사카후 미노오 사이토아오미나미 4-1-20 지
오사이토이부키노모리 1010

이세 도모코

일본 오사카후 미노오 사이토아오미나미 4-1-20 지
오사이토이부키노모리 1010

아베 야스히로

일본 도쿄도 세타가야 세타 5-11-15 소레이유
세타2 105

명세서

청구범위

청구항 1

항체의 항원 결합 도메인을 포함하는 폴리펩티드로서,

상기 항원 결합 도메인은 B-세포 성숙 항원(BCMA: B-cell maturation antigen)에 특이적으로 결합하고,

상기 항원 결합 도메인은

(a) 서열번호 1의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR: complementarity determining region)1 아미노산 서열, 서열번호 2의 중쇄 CDR2 아미노산 서열, 서열번호 3의 중쇄 CDR3 아미노산 서열, 서열번호 4의 경쇄 CDR1 아미노산 서열, 서열번호 5의 경쇄 CDR2 아미노산 서열 및 서열번호 6의 경쇄 CDR3 아미노산 서열; 또는

(b) 서열번호 7의 중쇄 CDR1 아미노산 서열, 서열번호 8의 중쇄 CDR2 아미노산 서열, 서열번호 9의 중쇄 CDR3 아미노산 서열, 서열번호 10의 경쇄 CDR1 아미노산 서열, 서열번호 11의 경쇄 CDR2 아미노산 서열 및 서열번호 12의 경쇄 CDR3 아미노산 서열

을 포함하는 폴리펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서,

(a) 서열번호 13 및 14, 또는 (b) 서열번호 15 및 16의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드.

청구항 3

제1항에 있어서,

단일-쇄 가변 영역 단편(scFv)인 폴리펩티드.

청구항 4

항체 또는 상기 항체의 항원 결합 부위로서,

상기 항체 및 상기 항체의 항원 결합 부위는 B-세포 성숙 항원(BCMA)에 특이적으로 결합하고,

상기 항체 및 상기 항체의 항원 결합 부위는

(a) 서열번호 1의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR)1 아미노산 서열, 서열번호 2의 중쇄 CDR2 아미노산 서열 및 서열번호 3의 중쇄 CDR3 아미노산 서열을 포함하는 제1 폴리펩티드, 및 서열번호 4의 경쇄 CDR1 아미노산 서열, 서열번호 5의 경쇄 CDR2 아미노산 서열 및 서열번호 6의 경쇄 CDR3 아미노산 서열을 포함하는 제2 폴리펩티드; 또는

(b) 서열번호 7의 중쇄 CDR1 아미노산 서열, 서열번호 8의 중쇄 CDR2 아미노산 서열 및 서열번호 9의 중쇄 CDR3 아미노산 서열을 포함하는 제1 폴리펩티드, 및 서열번호 10의 경쇄 CDR1 아미노산 서열, 서열번호 11의 경쇄 CDR2 아미노산 서열 및 서열번호 12의 경쇄 CDR3 아미노산 서열을 포함하는 제2 폴리펩티드

를 포함하는, 항체 또는 상기 항체의 항원 결합 부위.

청구항 5

제4항에 있어서,

(a) 제1 폴리펩티드 쇠가 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하고 제2 폴리펩티드 쇠가 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하거나; 또는

(b) 제1 폴리펩티드 쇠가 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하고 제2 폴리펩티드 쇠가 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는,

항체 또는 상기 항체의 항원-결합 부위.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 항체 또는 상기 항체의 항원-결합 부위가 항체, Fab 단편(Fab), F(ab')₂ 단편, 디아바디(diabody), 트리아바디(triobody), 테트라바디(tetrabody), 또는 디설파이드-안정화된 가변 영역 단편(dsFv)인, 항체 또는 상기 항체의 항원-결합 부위.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 항체가 이중특이성 항체인, 항체 또는 상기 항체의 항원-결합 부위.

청구항 8

제1항 내지 제3항중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드를 포함하는 키메라성 항원 수용체(CAR: chimeric antigen receptor).

청구항 9

(a) 효과기 분자에 접합(conjugation)되거나 융합되는, (b) 제1항 내지 제3항중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드를 포함하는 접합체(conjugate).

청구항 10

제9항에 있어서,

효과기 분자가 약물, 독소, 표지, 소 분자 또는 항체인 접합체.

청구항 11

제9항에 있어서,

효과기 분자가 (i) 슈도모나스(*Pseudomonas*) 외독소 A(PE), (ii) PE의 세포독성 단편, 또는 (iii) (i) 또는 (ii)의 세포독성 변형체인 접합체.

청구항 12

제9항에 있어서,

효과기 분자가 PE-LR, PE-LO10R456A, PE-T20, PE-T20-KDEL, PE4E, PE40, PE38, PE25, PE38QQR, PE38KDEL 및 PE35로 구성된 군에서 선택되는 접합체.

청구항 13

제9항에 있어서,

효과기 분자가 폴리펩티드에 연결기를 통해 접합되거나 융합되는 접합체.

청구항 14

제13항에 있어서,

연결기가 서열번호 17 또는 18의 아미노산 서열을 포함하는 접합체.

청구항 15

제1항 내지 제3항중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산.

청구항 16

제4항 내지 제7항중 어느 한 항에 따른 항체 또는 상기 항체의 항원-결합 부위를 인코딩하는 핵산.

청구항 17

제8항에 따른 CAR를 인코딩하는 핵산.

청구항 18

제9항에 따른 집합체를 인코딩하는 핵산.

청구항 19

제15항에 따른 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터.

청구항 20

제16항에 따른 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터.

청구항 21

제17항에 따른 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터.

청구항 22

제18항에 따른 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터.

청구항 23

제19항에 따른 재조합 발현 벡터를 포함하는 단리된 숙주 세포.

청구항 24

제20항에 따른 재조합 발현 벡터를 포함하는 단리된 숙주 세포.

청구항 25

제21항에 따른 재조합 발현 벡터를 포함하는 단리된 숙주 세포.

청구항 26

제22항에 따른 재조합 발현 벡터를 포함하는 단리된 숙주 세포.

청구항 27

2종 이상의 제23항에 따른 숙주 세포를 포함하는 숙주 세포의 단리된 집단.

청구항 28

2종 이상의 제24항에 따른 숙주 세포를 포함하는 숙주 세포의 단리된 집단.

청구항 29

2종 이상의 제25항에 따른 숙주 세포를 포함하는 숙주 세포의 단리된 집단.

청구항 30

2종 이상의 제26항에 따른 숙주 세포를 포함하는 숙주 세포의 단리된 집단.

청구항 31

제8항에 따른 CAR 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, BCMA-양성 암의 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 32

제10항에 따른 접합체를 포함하고, 효과기 분자가 독소인, BCMA-양성 암의 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 33

제8항에 있어서,

포유동물에서 BCMA-양성 암을 치료하거나 예방하기 위한 CAR.

청구항 34

제10항에 있어서,

효과기 분자가 독소인, 포유동물에서 BCMA-양성 암을 치료하거나 예방하기 위한 접합체.

청구항 35

제34항에 있어서,

암이 버킷 림프종, DLBCL, ALL 림프종, 호지킨 림프종 또는 다발성 골수종인, 접합체.

청구항 36

(A) 제8항에 따른 CAR 및 (B) 제2 치료제를 포함하는 약학 조성물로서, 포유동물에서 BCMA-양성 암을 치료하거나 예방하기 위한 약학 조성물.

청구항 37

(A) 제10항에 따른 접합체 및 (B) 제2 치료제를 포함하는 약학 조성물로서,

효과기 분자가 독소인, 포유동물에서 BCMA-양성 암을 치료하거나 예방하기 위한 약학 조성물.

청구항 38

제1항 내지 제3항중 어느 한 항에 있어서,

포유동물에서 BCMA-양성 암을 검출하기 위한 폴리펩티드.

청구항 39

제4항 내지 제7항중 어느 한 항에 있어서,

포유동물에서 BCMA-양성 암을 검출하기 위한, 항체 또는 상기 항체의 항원-결합 부위.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 상호참조

[0002] 본 출원은 2015년 11월 13일자로 출원된 미국 가출원 제62/255,255호 및 2015년 11월 19일자로 출원된 미국 가출원 제62/257,493호(이들의 전체내용은 본원에 참고로 인용됨)를 우선권 주장한다.

[0003] 연방 지원된 연구 개발에 관한 진술

[0004] 본 발명은 국립 보건원, 국립 암 연구소에 의해 ZIA BC 008753의 프로젝트 번호하에서 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명에 일정한 권리를 갖는다.

[0005] 전자적으로 제출된 자료의 참고도입

[0006] 본원과 동시에 제출되고 다음과 같이 식별된 컴퓨터-판독가능한 뉴클레오타이드/아미노산 서열은이 그의 전체가 본원에 참고로 혼입된다: 2016년 10월 7일자의 "726736_ST25.txt"라는 명칭의 7,149 바이트 ASCII(텍스트) 파일.

배경 기술

[0007] 암은 공중 보건학적 관심사이다. 화학요법과 같은 치료에서의 진전에도 불구하고, 다발성 골수종을 비롯한 많은 암들에 대한 예후는 좋지 못할 수 있다. 따라서, 암, 특별히 다발성 골수종을 위한 추가적인 치료에 대하여 충족되지 않은 요구가 남아 있다.

발명의 내용

[0008] 본 발명의 하나의 실시태양은 항체 BM24 또는 BM306의 상보성 결정 영역(CDR: complementarity determining region) 서열을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다.

[0009] 본 발명의 또 다른 실시태양은 (a) 서열번호 1 내지 6, 또는 (b) 서열번호 7 내지 12의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다.

[0010] 본 발명의 추가의 실시태양은 본 발명의 폴리펩티드 및 단백질과 관련된 항-BCMA 결합 작용부분(moiety), 핵산, 제조합 발현 벡터, 숙주 세포, 세포의 집단, 접합체(conjugate), 및 약학 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명의 추가적인 실시태양은 포유동물에서 암의 존재를 검출하는 방법 및 포유동물에서 암을 치료하거나 예방하는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1a는 마우스에 종양 세포가 주사된 이후 다양한 시점(일)에서 PBS(다이아몬드형) 또는 LMB-38(사각형)에 의해 치료된 마우스에서의 종양 부피(mm³)를 도시하는 그래프이다. 화살표는 면역독소가 마우스에 투여된 날짜를 지시한다.

도 1b는 마우스에 종양 세포가 주사된 이후 다양한 시점(일)에서 PBS(다이아몬드형) 또는 LMB-70(사각형)에 의해 치료된 마우스에서의 종양 부피(mm³)를 도시하는 그래프이다. 화살표는 면역독소가 마우스에 투여된 날짜를 지시한다.

도 2는 마우스에 종양 세포가 주사된 이후 다양한 시점(일)에서 대조군(비히클)(다이아몬드형), LMB70 단독(폐쇄 사각형), 아브락산(abraxane) 단독(원형), 또는 아브락산 및 LMB70의 조합물(개방 사각형)에 의해 치료된 마우스에서의 종양 부피(mm³)를 도시하는 그래프이다. 면역독소는 15 일, 16 일, 18 일, 20 일, 23 일, 및 25 일째 마우스에 투여되었다.

도 3a는 대조군(사각형), 2 ng/ml의 LMB70(다이아몬드형), 10 ng/ml의 LMB70(▼), 100 ng/ml의 LMB70(▲), 또는 CHX(원형)에 2 시간 노출된 이후 다양한 시점(일)에서의 생세포의 수/ml를 도시하는 그래프이다.

도 3b는 대조군(사각형), 2 ng/ml의 LMB70(다이아몬드형), 10 ng/ml의 LMB70(▼), 100 ng/ml의 LMB70(▲), 또는 CHX(원형)에 2 시간 노출된 이후 다양한 시점(일)에서의 생세포의 백분율을 도시하는 그래프이다.

도 3c는 대조군(사각형), 2 ng/ml의 LMB70(다이아몬드형), 10 ng/ml의 LMB70(▼), 100 ng/ml의 LMB70(▲), 또는 CHX(원형)에 6 시간 노출된 이후 다양한 시점(일)에서의 생세포의 수/ml를 도시하는 그래프이다.

도 3d는 대조군(사각형), 2 ng/ml의 LMB70(다이아몬드형), 10 ng/ml의 LMB70(▼), 100 ng/ml의 LMB70(▲), 또는 CHX(원형)에 6 시간 노출된 이후 다양한 시점(일)에서의 생세포의 백분율을 도시하는 그래프이다.

도 4a는 0 nM 보르테조미(bortezomib)(BTX)(사각형), 1 nM BTX(다이아몬드형), 3 nM BTX(▼), 또는 6 nM BTX 단독(▲)(독소 없음)에 4 시간 노출된 이후 다양한 시점(일)에서의 생세포의 수/ml를 도시하는 그래프이다.

도 4b는 0 nM 보르테조미(BTX)(사각형), 1 nM BTX(다이아몬드형), 3 nM BTX(▼), 또는 6 nM BTX 단독(▲)(독소 없음)에 4 시간 노출된 이후 다양한 시점(일)에서의 생세포의 백분율을 도시하는 그래프이다.

도 4c는 2 ng/ml의 LMB70과 조합되어 0 nM 보르테조미(BTX)(사각형), 1 nM BTX(다이아몬드형), 3 nM BTX(▼), 또는 6 nM BTX(▲)에 4 시간 노출된 이후 다양한 시점(일)에서의 생세포의 수/ml를 도시하는 그래프이다.

도 4d는 2 ng/ml의 LMB70과 조합되어 0 nM 보르테조미(BTX)(사각형), 1 nM BTX(다이아몬드형), 3 nM BTX(▼), 또는 6 nM BTX(▲)에 4 시간 노출된 이후 다양한 시점(일)에서의 생세포의 백분율을 도시하는 그래프이다.

도 5a는 6 ng/ml의 LMB70과 조합되어 0 nM 보르테조미(BTX)(사각형), 1 nM BTX(다이아몬드형), 3 nM BTX(▼), 또는 6 nM BTX(▲)에 4 시간 노출된 이후 다양한 시점(일)에서의 생세포의 수/ml를 도시하는 그래프이다.

도 5b는 6 ng/ml의 LMB70과 조합되어 0 nM 보르테조미(BTX)(사각형), 1 nM BTX(다이아몬드형), 3 nM BTX(▼),

또는 6 nM BTX(▲)에 4 시간 노출된 이후 다양한 시점(일)에서의 생세포의 백분율을 도시하는 그래프이다.

도 5c는 10 ng/ml의 LMB70과 조합되어 0 nM 보르테조미딘(BTX)(사각형), 1 nM BTX(다이아몬드형), 3 nM BTX(▼), 또는 6 nM BTX(▲)에 4 시간 노출된 이후 다양한 시점(일)에서의 생세포의 수/ml를 도시하는 그래프이다.

도 5d는 10 ng/ml의 LMB70과 조합되어 0 nM 보르테조미딘(BTX)(사각형), 1 nM BTX(다이아몬드형), 3 nM BTX(▼), 또는 6 nM BTX(▲)에 4 시간 노출된 이후 다양한 시점(일)에서의 생세포의 백분율을 도시하는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 본 발명의 하나의 실시태양은 항-B-세포 성숙 항원(BCMA: B-cell Maturation Antigen) 항체의 항원 결합 도메인을 포함하는 폴리펩티드 및 단백질을 제공한다. 폴리펩티드 및 단백질은 유리하게는 특이적으로 BCMA(또한 CD269로서 지칭됨)를 인식하고 높은 친화도로 결합한다. BCMA는 종양 괴사 인자 수용체(TNFR: tumor necrosis factor receptor) 상과(superfamily)의 일원이다. BCMA는 B-세포 활성화 인자(BAFF: B-cell activating factor) 및 증식 유도 리간드(APRIL: a proliferation inducing ligand)에 결합한다. 비악성 세포들중, BCMA는 주로 혈장 세포 및 성숙한 B-세포의 아집합에서 발현되는 것으로 보고되어 있다. BCMA RNA는 다발성 골수종 세포에서 검출되었고, BCMA 단백질은 다발성 골수종 환자로부터의 혈장 세포의 표면 상에서 검출되었다.
- [0014] BCMA는 다양한 인간 암에 의해 발현되거나 과발현된다. BCMA를 발현하거나 과발현하는 암의 예로는, 제한되지 않지만, 버킷(Burkitt) 림프종, 확산 거대 B-세포 림프종(DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma), 급성 림프구성 백혈병(ALL: acute lymphocytic leukemia) 림프종, 호지킨(Hodgkin) 림프종 및 다발성 골수종이 포함된다. 특별한 이론이나 기작에 얽매이는 것은 아니지만, 본 발명의 폴리펩티드 및 단백질은, 유리하게는, 특이적으로 BCMA를 인식하여 이에 결합함으로써 BCMA-발현 암 세포를 표적화하는 것으로 여겨진다. 본 발명의 하나의 실시태양에서, 본 발명의 폴리펩티드 및 단백질은 BCMA에 대한 항원-특이적 반응을 이끌어 낸다. 따라서, 특별한 이론이나 기작에 얽매이는 것은 아니지만, 특이적으로 BCMA를 인식하여 이에 결합함으로써, 본 발명의 단백질 및 폴리펩티드는 다음중 하나 이상의 작용을 제공할 수 있는 것으로 여겨진다: BCMA-발현 암 세포의 검출, BCMA-발현 암 세포의 표적화 및 파괴, 암 세포의 감소 및 제거, 면역 세포 및/또는 효과기 분자의 종양 자리(들)로의 침윤 촉진, 및 항-암 반응의 향상/연장.
- [0015] 용어 "폴리펩티드"는, 본원에 사용될 경우, 올리고펩티드를 포함하고, 하나 이상의 펩티드 결합에 의해 연결되는 아미노산의 단일 쇄를 지칭한다. 폴리펩티드는 항-BCMA 항체의 항원 결합 도메인의 하나 이상의 가변 영역(예를 들어, 2개의 가변 영역)을 포함할 수 있고, 각각의 가변 영역은 상보성 결정 영역(CDR)1, CDR2, 및 CDR3을 포함한다. 본 발명의 하나의 실시태양에서, 폴리펩티드는 항체 BM24 또는 BM306의 CDR 서열을 포함한다. CDR 결합 서열은 당분야에 공지된 방법, 예컨대, 예를 들어, 국제 면역유전학 정보 시스템(IMG: ImMunoGeneTics information system) 또는 카바트(Kabat)[우(Wu) 및 카바트(Kabat)의 문헌 "J. Exp. Med.", 132: 211-250 (1970)]의 방법론에 의해 결정될 수 있다.
- [0016] 바람직하게는, 제1 가변 영역은 서열번호 1 또는 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1(제1 가변 영역의 CDR1), 서열번호 2 또는 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2(제1 가변 영역의 CDR2), 및 서열번호 3 또는 9의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3(제1 가변 영역의 CDR3)을 포함하고, 제2 가변 영역은 서열번호 4 또는 10의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1(제2 가변 영역의 CDR1), 서열번호 5 또는 11의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2(제2 가변 영역의 CDR2), 및 서열번호 6 또는 12의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3(제2 가변 영역의 CDR3)을 포함한다. 이와 관련하여, 본 발명의 폴리펩티드는 (a) 서열번호 1 내지 3, (b) 서열번호 4 내지 6, (c) 서열번호 7 내지 9, (d) 서열번호 10 내지 12, (e) 서열번호 1 내지 6, 또는 (f) 서열번호 7 내지 12의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 하나의 실시태양은 (i) 서열번호 1 내지 6, 또는 (ii) 서열번호 7 내지 12의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다.
- [0017] 하나의 실시태양에서, 폴리펩티드 각각은 항-BCMA 항체의 항원 결합 도메인의 하나 이상의 가변 영역(예를 들어, 제1 및 제2 가변 영역)을 포함하고, 각각은 상기 기재된 바와 같은 CDR을 포함한다. 예를 들어, 폴리펩티드는 항체 BM24 또는 BM306의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 제1 가변 영역은 서열번호 13 또는 15의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 제2 가변 영역은 서열번호 14 또는 16의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명의 하나의 실시태양에서, 폴리펩티드는 (a) 서열번호 13, (b) 서열번호 14, (c) 서열번호 15, (d) 서열번호 16, (e) 서열번호 13 및 14, 또는 (f) 서열번호 15 및 16의 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 폴리펩티드는 (i) 서열번호 13 및 14, 또는 (ii) 서열번호 15 및 16의 아미노산 서열을 포함한다. 본 발명의 하나의 실시태양에서, 제1 가변 영역은 항-BCMA 항체의 중쇄이고 제2 가변 영역은 항-

BCMA 항체의 경쇄이다.

- [0018] 본 발명의 하나의 실시태양에서, 폴리펩티드의 가변 영역은 연결기에 의해 연결될 수 있다. 연결기는 임의의 적합한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 본 발명의 하나의 실시태양에서, 연결기는 약 1 내지 약 100, 약 3 내지 약 20, 약 5 내지 약 30, 약 5 내지 약 18, 또는 약 3 내지 약 8의 아미노산 길이의 Gly/Ser 연결기이고, 글리신 및/또는 세린 잔기로 순서대로 구성된다. 따라서, Gly/Ser 연결기는 글리신 및/또는 세린 잔기로 구성될 수 있다. 몇몇 실시태양에서, Gly/Ser 연결기는 하기 식의 펩티드이다: (Xaal)_n, 여기서 각각의 아미노산 잔기 Xaal은 독립적으로 글리신 및 세린으로부터 선택되고, n은 3 내지 15의 정수이다. 바람직하게는, Gly/Ser 연결기는 서열번호 17 또는 18의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0019] 본 발명은 본원에 기재된 적어도 하나의 폴리펩티드를 포함하는 단백질을 추가로 제공한다. "단백질"은 하나 이상의 폴리펩티드 쇠를 포함하는 분자를 의미한다.
- [0020] 본 발명의 단백질은 (i) 서열번호 1 내지 3, 또는 (ii) 서열번호 7 내지 9의 아미노산 서열을 포함하는 제1 폴리펩티드 쇠, 및 (i) 서열번호 4 내지 6, (ii) 서열번호 10 내지 12의 아미노산 서열을 포함하는 제2 폴리펩티드 쇠를 포함할 수 있다. 이와 관련하여, 단백질은 (i) 서열번호 1 내지 3의 아미노산 서열을 포함하는 제1 폴리펩티드 쇠 및 서열번호 4 내지 6의 아미노산 서열을 포함하는 제2 폴리펩티드 쇠, 또는 (ii) 서열번호 7 내지 9의 아미노산 서열을 포함하는 제1 폴리펩티드 쇠 및 서열번호 10 내지 12의 아미노산 서열을 포함하는 제2 폴리펩티드 쇠를 포함할 수 있다. 본 발명의 단백질, 예를 들어, 서열번호 13 또는 15의 아미노산 서열을 포함하는 제1 폴리펩티드 쇠 및 서열번호 14 또는 16의 아미노산 서열을 포함하는 제2 폴리펩티드 쇠를 포함할 수 있다. 이와 관련하여, 단백질은 (i) 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 제1 폴리펩티드 쇠 및 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 제2 폴리펩티드 쇠, 또는 (ii) 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 제1 폴리펩티드 쇠 및 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 제2 폴리펩티드 쇠를 포함할 수 있다.
- [0021] 단백질은 본 발명의 다른 양태에 관하여 본원에 기재되는 경우 추가로 연결기를 포함할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 단백질은, 예를 들어, 융합 단백질일 수 있다. 예를 들어, 단백질이 (i) 서열번호 13 또는 15, 및 (ii) 서열번호 14 또는 16을 포함하는 단일 폴리펩티드 쇠를 포함한다면, 또는 단백질의 제1 및/또는 제2 폴리펩티드 쇠(들)가 추가로 다른 아미노산 서열, 예를 들어, 면역글로불린을 인코딩하는 아미노산 서열 또는 이의 일부를 포함한다면, 본 발명의 단백질은 융합 단백질일 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명은 또한 본원에 기재된 적어도 하나의 본 발명의 폴리펩티드를 적어도 하나의 다른 폴리펩티드와 함께 포함하는 융합 단백질을 제공한다. 이러한 다른 폴리펩티드는 융합 단백질의 별도의 폴리펩티드로서 존재하거나, 본원에 기재된 본 발명의 폴리펩티드중 하나와 함께(나란히) 발현되는 폴리펩티드로서 존재할 수 있다. 이러한 다른 폴리펩티드는 임의의 펩티드성 또는 단백질성 분자, 또는 이의 일부를 인코딩할 수 있고, 제한되지 않지만, 면역글로불린, CD3, CD4, CD8, MHC 분자, CD1 분자, 예를 들어, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d 등이 포함된다.
- [0023] 융합 단백질은 본 발명의 폴리펩티드의 하나 이상의 복사물 및/또는 나머지 폴리펩티드의 하나 이상의 복사물을 포함할 수 있다. 예를 들어, 융합 단백질은 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 그 이상의, 본 발명의 폴리펩티드 및/또는 나머지 폴리펩티드의 복사물을 포함할 수 있다. 융합 단백질을 제조하기 위한 적합한 방법은 당분야에 공지되어 있고, 예를 들어, 재조합 방법을 포함한다.
- [0024] 본 발명의 폴리펩티드 및 단백질은 항-BCMA 결합 작용부로서 유용할 수 있는 것으로 고려된다. 이와 관련하여, 본 발명의 하나의 실시태양은 본원에 기재된 임의의 폴리펩티드 또는 단백질을 포함하는 항-BCMA 결합 작용부를 제공한다. 본 발명의 하나의 실시태양에서, 항-BCMA 결합 작용부는 본원에 기재된 임의의 폴리펩티드 또는 단백질의 항원 결합 부위를 포함한다. 항원 결합 부위는 적어도 하나의 항원 결합 자리를 갖는 임의의 부위일 수 있다. 하나의 실시태양에서, 항-BCMA 결합 작용부는 항체, Fab 단편(Fab), F(ab')₂ 단편, 디아바디(diabody), 트리아바디(triobody), 테트라바디(tetrabody), 단일-쇄 가변 영역 단편(scFv), 또는 디설파이드-안정화된 가변 영역 단편(dsFv)이다. 바람직하게는, 항-BCMA 결합 작용부는 Fab 단편 또는 dsFv이다.
- [0025] 하나의 실시태양에서, 항-BCMA 결합 작용부는 항체이다. 항체는 단지 BCMA에 대해서만 항원 특이성을 갖는 단일특이성 항체, 또는 BCMA 및 BCMA 이외의 제2 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 이중특이성 항체일 수 있다. 항체는, 예를 들어, 본원에 기재된 적어도 하나의 본 발명의 폴리펩티드를 포함하는 재조합 항체일 수 있다. 본원에 사용될 경우, "재조합 항체"는 본 발명의 적어도 하나의 폴리펩티드 또는 단백질 및 항체의 하나 이상의 폴리펩티드 쇠, 또는 이의 일부를 포함하는 재조합(예를 들어, 유전자 조작된) 단백질을 지칭한다. 항체의 폴리펩티드, 또는 이의 일부는, 예를 들어, 항체의 중쇄 또는 경쇄의 불변성 영역, 또는 Fc 단편 등일 수

있다. 항체의 폴리펩티드 쇄, 또는 이의 일부는, 재조합 항체의 별도의 폴리펩티드로서 존재할 수 있다. 다르게는, 항체의 폴리펩티드 쇄, 또는 이의 일부는, 본 발명의 폴리펩티드 또는 단백질과 함께(나란히) 발현되는 폴리펩티드로서 존재할 수 있다. 항체의 폴리펩티드, 또는 이의 일부는, 임의의 항체 또는 임의의 항체 단편의 폴리펩티드일 수 있다.

[0026] 본 발명의 항체는 당분야에 공지된 임의의 유형의 면역글로불린일 수 있다. 예를 들어, 항-BCMA 결합 작용부분은 임의의 이소타입(isotype)의 항체, 예를 들어, IgA, IgD, IgE, IgG(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4), IgM 등일 수 있다. 항체는 단일클론성 또는 다중클론성일 수 있다. 항체는 천연-발생 항체, 예를 들어, 포유동물, 예를 들어, 마우스, 토끼, 염소, 말, 닭, 햄스터, 인간 등으로부터 단리되고/되거나 정제된 항체일 수 있다. 다르게는, 항체는 유전자-조작된 항체, 예를 들어, 인간화된 항체 또는 키메라성(chimeric) 항체일 수 있다. 항체는 단량체 형태 또는 중합체 형태일 수 있다. 또한, 항체는 BCMA에 대해 임의의 수준의 친화도 또는 결합력을 가질 수 있다.

[0027] BCMA에 결합하는 능력에 대하여 항체를 시험하는 방법은 당분야에 공지되어 있고, 임의의 항체-항원 결합 검정, 예컨대, 예를 들어, 방사면역측정법(RIA: radioimmunoassay), 효소-결합 면역흡착 검사(ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay), 웨스턴 블롯(Western blot), 면역침전, 및 경쟁적 저해 검정이 포함된다.

[0028] 항체를 제조하는 적합한 방법은 당분야에 공지되어 있고, 예를 들어, 표준 하이브리도마(hybridoma) 방법, 엡스타인-바르 바이러스(EBV: Epstein-Barr virus)-하이브리도마 방법, 및 박테리오파지 벡터 발현 시스템이 포함된다. 항체는 비-인간 동물에서 생산될 수 있다.

[0029] 하나의 바람직한 실시태양에서, 항-BCMA 결합 작용부분은 단일-쇄 가변 영역 단편(scFv)이다. 합성 펩티드를 경유하여 항체 경쇄의 V 도메인에 연결된 항체 중쇄의 가변성(V) 도메인을 포함하는 절단된(truncated) Fab 단편인 단일-쇄 가변 영역 단편(scFv) 항체 단편은 일상적인 재조합 DNA 기술 기법을 사용하여 생산될 수 있다. 유사하게, 디설파이드-안정화된 가변 영역 단편(dsFv)은 재조합 DNA 기술에 의해 제조될 수 있다. 본 발명의 항-BCMA 결합 작용부분은 항체 단편의 이들 예시적인 유형에 제한되지 않는다.

[0030] 또한, 항-BCMA 결합 작용부분은, 예컨대, 예를 들어, 방사성동위원소, 형광단[예를 들어, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC: fluorescein isothiocyanate), 파이코에리트린(PE: phycoerythrin)], 효소[예를 들어, 알칼리성 인산가수분해효소, 호스래디시(horseradish) 과산화효소], 및 원소 입자(예를 들어, 금 입자)를 포함하도록 변형될 수 있다.

[0031] 본 발명의 또 다른 실시태양은 (a) 본원에 기재된 임의의 폴리펩티드, 단백질, 또는 항-BCMA 결합 작용부분을 포함하는 항원 결합 도메인, (b) 막관통(TM: transmembrane) 도메인, 및 (c) 세포내 T 세포 신호발송 도메인을 포함하는 키메라성 항원 수용체(CAR)를 제공한다.

[0032] 키메라성 항원 수용체(CAR: chimeric antigen receptor)는 T-세포 신호발송 도메인에 연결된 항체(예를 들어, 단일 쇄 가변성 단편(scFv))의 항원 결합 도메인을 함유하는 인공적으로 작성된 하이브리드 단백질 또는 폴리펩티드이다. CAR의 특징으로는 비-MHC-제한된 방식으로 선택된 표적에 대한 반응성 및 T-세포 특이성을 재유도하여 단일클론성 항체의 항원-결합 특성을 이용하는 이들의 능력이 포함된다. 비-MHC-제한된 항원 인식은 CAR을 발현하는 세포에게 항원 처리와 무관하게 항원을 인식하는 능력을 제공하여, 종양 도피(tumor escape)의 주요 기작을 건너뛰게 한다. 게다가, T-세포에서 발현될 경우, CAR은 유리하게는 내생성 T 세포 수용체(TCR) 알파 및 베타 쇄와 함께 이량체화되지 않는다.

[0033] "항원 특이성을 갖는" 및 "항원-특이적 반응을 이끌어 내는"이라는 구절은, 본원에 사용될 경우, CAR이 항원에 특이적으로 결합하고 면역학적으로 반응함으로써, 항원으로서의 CAR의 결합이 면역 반응을 이끌어낼 수 있음을 의미한다.

[0034] 본 발명의 CAR은 BCMA에 대한 항원 특이성을 갖는다. 특별한 이론이나 기작에 얽매는 것은 아니지만, BCMA에 대한 항원-특이적 반응을 이끌어냄으로써, 본 발명의 CAR은 다음중 하나 이상의 작용을 제공하는 것으로 여겨진다: BCMA-발현 암 세포의 표적화 및 파괴, 암 세포의 감소 및 제거, 종양 자리(들)로의 면역 세포의 침윤 보조, 및 항암 반응의 향상/연장.

[0035] 본 발명의 하나의 실시태양은 항-BCMA 항체의 항원 결합 도메인을 포함하는 CAR을 제공한다. 항-BCMA 항체의 항원 결합 도메인은 BCMA에 특이적으로 결합한다. CAR의 항원 결합 도메인은 본원에 기재된 임의의 폴리펩티드, 단백질, 또는 항-BCMA 결합 작용부분을 포함할 수 있다. 본 발명의 하나의 실시태양에서, CAR은 항-BCMA 단일 쇄 가변성 단편(scFv)을 포함한다. 이와 관련하여, 본 발명의 하나의 바람직한 실시태양은 본원에 기재된 임의

의 폴리펩티드 또는 단백질을 포함하는 단일쇄 가변성 단편(scFv)을 포함하는 항원-결합 도메인을 포함하는 CAR을 제공한다.

- [0036] 본 발명의 하나의 바람직한 실시태양에서, CAR은 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 이들 각각은 상보성 결정 영역(CDR)1, CDR2, 및 CDR3을 포함하는 가변 영역을 포함한다. 바람직하게는, 중쇄는 서열번호 1 또는 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1(중쇄의 CDR1), 서열번호 2 또는 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2(중쇄의 CDR2), 및 서열번호 3 또는 9의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3(중쇄의 CDR3)을 포함하고, 경쇄는 서열번호 4 또는 10의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1(경쇄의 CDR1), 서열번호 5 또는 11의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2(경쇄의 CDR2), 및 서열번호 6 또는 12의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3(경쇄의 CDR3)을 포함한다. 이와 관련하여, 본 발명의 CAR은 (a) 서열번호 1 내지 3, (b) 서열번호 4 내지 6, (c) 서열번호 1 내지 6, (d) 서열번호 7 내지 9, (e) 서열번호 10 내지 12, 또는 (f) 서열번호 7 내지 12의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 바람직하게는 CAR은 서열번호 1 내지 6 또는 서열번호 7 내지 12의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0037] 본 발명의 하나의 실시태양에서, CAR의 항원 결합 도메인은 각각 경쇄 및 중쇄를 포함한다. 경쇄는 서열번호 14 또는 16을 포함할 수 있다. 중쇄는 서열번호 13 또는 15를 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명의 하나의 실시태양에서, 항원 결합 도메인은 (a) 서열번호 13, (b) 서열번호 14, (c) 서열번호 15, (d) 서열번호 16, (e) 서열번호 13 및 14, 또는 (f) 서열번호 15 및 16의 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, CAR은 (i) 서열번호 13 및 14, 또는 (ii) 서열번호 15 및 16의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0038] 하나의 실시태양에서, CAR의 항원 결합 도메인은 리더(leader) 서열을 포함한다. 본 발명의 하나의 실시태양에서, 리더 서열이 세포의 표면상에서 CAR의 발현을 용이하게 할 수 있지만, 발현된 CAR에서의 리더 서열의 존재는 CAR이 작용하기 위해 필수적인 것은 아니다. 본 발명의 하나의 실시태양에서, 세포 표면상에서 CAR의 발현시, 리더 서열은 CAR로부터 분할될 수 있다. 따라서, 본 발명의 하나의 실시태양에서, CAR은 리더 서열이 결핍된다.
- [0039] 하나의 실시태양에서, CAR은 면역글로불린 불변성 도메인을 포함한다. 바람직하게는, 면역글로불린 도메인은 인간 면역글로불린 서열이다. 하나의 실시태양에서, 면역글로불린 불변성 도메인은 면역글로불린 CH2 및 CH3 면역글로불린 G(IgG1) 도메인 서열(CH2CH3)을 포함한다. 특별한 이론에 얽매어는 것은 아니지만, CH2CH3 도메인은 CAR-발현 세포의 막으로부터 멀리 scFv의 결합 모티프(motif)를 연장시키고, 고유의 TCR의 크기 및 도메인 구조를 더욱 정확히 모방할 수 있는 것으로 여겨진다. 몇몇 실시태양에서, CAR은 면역글로불린 불변성 도메인이 결핍될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 하나의 실시태양에서, CAR은 TM 도메인을 포함한다. 본 발명의 하나의 실시태양에서, TM 도메인은 CD8 또는 CD28의 TM 도메인을 포함한다. 하나의 바람직한 실시태양에서, CD8 및 CD28은 인간이다.
- [0041] 본 발명의 하나의 실시태양에서, CAR은 i) CD28, ii) CD137, 및 iii) CD3 제타(ζ)중 하나 이상의 세포내 T 세포 신호발송 도메인을 포함하는 세포내 T 세포 신호발송 도메인을 포함한다. 하나의 바람직한 실시태양에서, CD28, CD137, 및 CD3 제타는 인간이다. CD28은 T 세포 공-자극에서 중요한 T 세포 마커이다. 4-1BB로서도 공지된 CD137은, T 세포에 강력한 공자극 신호를 전달하여, 분화를 촉진시키고 T 림프구의 장-기간의 생존을 향상시킨다. CD3 ζ 는 TCR과 회합하여 신호를 생산하고 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM: immunoreceptor tyrosine-based activation motif)를 함유한다.
- [0042] 본 발명의 하나의 실시태양에서, CAR은 CD28의 TM 도메인을 포함하는 TM 도메인, 및 CD28 및 CD3 제타의 세포내 T 세포 신호발송 도메인을 포함하는 세포내 T 세포 신호발송 도메인을 포함한다.
- [0043] 본 발명의 하나의 실시태양에서, CAR은 CD8의 TM 도메인을 포함하는 TM 도메인, 및 CD28, CD137 및 CD3 제타의 세포내 T 세포 신호발송 도메인을 포함하는 세포내 T 세포 신호발송 도메인을 포함한다.
- [0044] 본 발명의 하나의 실시태양에서, CAR은 CD8의 TM 도메인을 포함하는 TM 도메인, 및 CD137 및 CD3 제타의 세포내 T 세포 신호발송 도메인을 포함하는 세포내 T 세포 신호발송 도메인을 포함한다.
- [0045] 본원에 기재된 본 발명의 폴리펩티드, 단백질, 및 CAR의 작용성 부분은 본 발명의 범주에 속한다. 용어 "작용성 부분"은, 폴리펩티드, 단백질, 또는 CAR에 관하여 사용될 경우, 본 발명의 폴리펩티드, 단백질, 또는 CAR의 임의의 부분 또는 단편을 지칭하고, 이러한 부분 또는 단편은 이것이 유래된 폴리펩티드, 단백질, 또는 CAR(모폴리펩티드, 단백질, 또는 CAR)의 생물학적 활성을 보유한다. 작용성 부분은, 예를 들어, 모폴리펩티드, 단백질, 또는 CAR과 유사한 정도, 동일한 정도, 또는 더 높은 정도로 표적 세포를 인식하거나, 암을 검출하거나, 치료하거나, 예방하는 능력을 보유하는 폴리펩티드, 단백질, 또는 CAR의 이들 부분을 포괄한다. 모폴리펩티드,

단백질, 또는 CAR와 관련하여 작용성 부분은, 예를 들어, 약 10%, 25%, 30%, 50%, 68%, 80%, 90%, 95% 이상의 모 폴리펩티드, 단백질, 또는 CAR을 포함할 수 있다.

[0046] 작용성 부분은 이러한 부분의 아미노 말단 또는 카복시 말단, 또는 양쪽 말단에서 추가적인 아미노산을 포함할 수 있고, 이러한 추가적인 아미노산은 모 폴리펩티드, 단백질, 또는 CAR의 아미노산 서열에서 발견되지 않는다. 바람직하게, 추가적인 아미노산은 작용성 부분의 생물학적 기능을 방해하지 않고, 예를 들어, 표적 세포를 인식 하거나, 암을 검출, 치료 또는 예방한다. 더욱 바람직하게, 추가적인 아미노산은, 모 폴리펩티드, 단백질, 또는 CAR의 생물학적 활성과 비교하여, 생물학적 활성을 향상시킨다.

[0047] 본원에 기재된 본 발명의 폴리펩티드, 단백질, 또는 CAR의 작용성 변형체는 본 발명의 범주에 포함된다. "작용성 변형체"라는 용어는, 본원에 사용될 경우, 모 폴리펩티드, 단백질, 또는 CAR에 실질적이거나 유의적인 서열 동일성 또는 유사성을 갖는 폴리펩티드, 단백질, 또는 CAR을 지칭하고, 이러한 작용성 변형체는 모 폴리펩티드, 단백질, 또는 CAR의 생물 활성을 보유한다. 작용성 변형체는, 예를 들어, 모 폴리펩티드, 단백질, 또는 CAR과 유사한 정도, 동일한 정도 또는 더 높은 정도로 표적 세포를 인식하는 능력을 보유하는 본원에 기재된 폴리펩티드, 단백질, 또는 CAR(모 폴리펩티드, 단백질, 또는 CAR)의 변형체를 포괄한다. 모 폴리펩티드, 단백질, 또는 CAR과 관련하여, 작용성 변형체는 아미노산 서열에 있어서, 모 폴리펩티드, 단백질, 또는 CAR에, 예를 들어, 적어도 약 30%, 약 50%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 그 이상 동일할 수 있다.

[0048] 작용성 변형체는, 예를 들어, 적어도 1개의 보존적 아미노산 치환을 갖는 모 폴리펩티드, 단백질, 또는 CAR의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 다르게는 또는 추가적으로, 작용성 변형체는 적어도 1개의 비-보존적 아미노산 치환을 갖는 모 폴리펩티드, 단백질, 또는 CAR의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 이러한 경우, 비-보존적 아미노산 치환은 작용성 변형체의 생물 활성을 간섭하거나 저해하지 않는 것이 바람직하다. 비-보존적 아미노산 치환은 작용성 변형체의 생물 활성이 모 폴리펩티드, 단백질, 또는 CAR과 비교하여 증가하도록 작용성 변형체의 생물 활성을 향상시킬 수 있다.

[0049] 본 발명의 폴리펩티드, 단백질, 또는 CAR의 아미노산 치환은 바람직하게는 보존적 아미노산 치환이다. 보존적 아미노산 치환은 당분야에 공지되어 있고, 특정한 물리적 및/또는 화학적 특성을 갖는 하나의 아미노산이 동일 하거나 유사한 화학적 또는 물리적 특성을 갖는 또 다른 아미노산으로 교환되는 아미노산 치환을 포함한다. 예를 들어, 보존적 아미노산 치환은 산성/음성으로 하전된 또 다른 극성 아미노산으로 치환되는 산성/음성으로 하전된 극성 아미노산(예를 들어, Asp 또는 Glu), 비극성 측쇄를 갖는 또 다른 아미노산으로 치환되는 비극성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, Ala, Gly, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Cys, Val 등), 염기성/양성으로 하전된 또 다른 극성 아미노산으로 치환되는 염기성/양성으로 하전된 극성 아미노산(예를 들어, Lys, His, Arg 등), 극성 측쇄를 갖는 또 다른 비하전된 아미노산으로 치환되는 극성 측쇄를 갖는 비하전된 아미노산(예를 들어, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr 등), 베타-분지형 측쇄를 갖는 또 다른 아미노산으로 치환되는 베타-분지형 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, Ile, Thr, 및 Val), 방향족 측쇄를 갖는 또 다른 아미노산으로 치환되는 방향족 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, His, Phe, Trp, 및 Tyr) 등일 수 있다.

[0050] 폴리펩티드, 단백질, 또는 CAR은, 다른 성분, 예를 들어, 다른 아미노산이 폴리펩티드, 단백질, CAR, 작용성 부분 또는 작용성 변형체의 생물 활성을 현저히 변화시키지 않도록, 본원에 기재된 특정화된 아미노산 서열 또는 서열들로 본질적으로 구성될 수 있다.

[0051] 본 발명의 실시태양의 폴리펩티드, 단백질, 또는 CAR(작용성 부분 및 작용성 변형체 포함)은 임의의 길이일 수 있고, 즉 임의의 수의 아미노산을 포함할 수 있지만, 폴리펩티드, 단백질, 또는 CAR(또는 이의 작용성 부분 및 작용성 변형체)은 이들의 생물 활성, 예를 들어, 항원에 특이적으로 결합하거나, 포유동물에서 병에 걸린 세포를 검출하거나, 포유동물에서 질병을 치료하거나 예방하는 능력 등을 보유해야 한다. 예를 들어, 폴리펩티드, 단백질, 또는 CAR은 약 50 내지 약 5000개 아미노산 길이, 예컨대 50, 70, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000개 또는 그 이상의 아미노산 길이일 수 있다.

[0052] 본 발명의 실시태양의 폴리펩티드, 단백질, 또는 CAR(본 발명의 작용성 부분 및 작용성 변형체 포함)은 하나 이상의 천연-발생 아미노산 대신에 합성 아미노산을 포함할 수 있다. 이러한 합성 아미노산은 당분야에 공지되어 있고, 예를 들어, 아미노사이클로헥산 카복실산, 노르로이신, α -아미노 n-테칸산, 호모세린(homoserine), S-아세틸아미노메틸-시스테인, 트랜스-3- 및 트랜스-4-하이드록시프롤린, 4-아미노페닐알라닌, 4-니트로페닐알라닌, 4-클로로페닐알라닌, 4-카복시페닐알라닌, β -페닐세린 β -하이드록시페닐알라닌, 페닐글리신, α -나프틸알라닌, 사이클로헥실알라닌, 사이클로헥실글리신, 인돌린-2-카복실산, 1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴

놀린-3-카복실산, 아미노말론산, 아미노말론산 모노아미드, N'-벤질-N'-메틸-라이신, N',N'-디벤질-라이신, 6-하이드록시라이신, 오르니틴, α-아미노사이클로펜탄 카복실산, α-아미노사이클로헥산 카복실산, α-아미노사이클로헵탄 카복실산, α-(2-아미노-2-노르보르난)-카복실산, α, γ-디아미노부티르산, α, β-디아미노프로피온산, 호모페닐알라닌, 및 α-3급-부틸글리신이 포함된다.

[0053] 본 발명의 실시태양의 폴리펩티드, 단백질, 또는 CAR(작용성 부분 및 작용성 변형체 포함)은 글리코실화되거나, 아미드화되거나, 카복실화되거나, 인산화되거나, 에스테르화되거나, N-아실화되거나, 예를 들어 디설파이드 가교를 통해 환화되거나, 산 부가 염으로 전환되고/되거나, 임의적으로 이량체화 또는 중합체화될 수 있다.

[0054] 본 발명의 실시태양의 폴리펩티드, 단백질, 또는 CAR(이의 작용성 부분 및 작용성 변형체 포함)은 당분야에 공지된 방법에 의해 수득될 수 있다. 폴리펩티드, 단백질, 또는 CAR은 폴리펩티드 또는 단백질을 제조하는 임의의 적합한 방법에 의해 제조될 수 있다. 폴리펩티드 및 단백질을 드 노보(de novo) 합성하는 적합한 방법은 당분야에 공지되어 있다. 또한, 폴리펩티드 및 단백질은 핵산 및 표준 재조합 방법을 사용하여 재조합적으로 생산될 수 있다. 추가로, 본 발명의 폴리펩티드, 단백질, 또는 CAR(이의 작용성 부분 및 작용성 변형체 포함)중 몇몇은 공급원, 예컨대 식물, 박테리아, 곤충, 포유동물, 예를 들어, 래트, 인간 등으로부터 단리되고/되거나 정제될 수 있다. 단리 및 정제 방법은 당분야에 잘 공지되어 있다. 다르게는, 본원에 기재된 폴리펩티드, 단백질, 또는 CAR(이의 작용성 부분 및 작용성 변형체 포함)은 회사, 예컨대, 예를 들어, 신페프(Synpep)(미국 캘리포니아주 두블린), 펩티드 테크놀로지스 코퍼레이션(Peptide Technologies Corp.)(미국 메릴랜드주 가이터스버그), 및 멀티펩 펩티드 시스템즈(Multiple Peptide Systems)(미국 캘리포니아주 샌 디에고)에 의해 상업적으로 합성될 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명의 폴리펩티드, 단백질, 또는 CAR은 합성적이거나, 재조합적이거나, 단리 및/또는 정제될 수 있다.

[0055] 본 발명의 임의의 폴리펩티드, 단백질, CAR, 항-BCMA 결합 작용부분, 또는 이의 작용성 부분 및 작용성 변형체를 포함하는 접합체, 예를 들어, 바이오접합체가 본 발명의 범주에 포함된다. 이와 관련하여, 본 발명의 하나의 실시태양은 (b) 효과기 분자에 접합(conjugation)되거나 융합된 (a) 본원에 기재된 임의의 폴리펩티드, 단백질, CAR, 또는 항-BCMA 결합 작용부분을 포함하는 접합체를 제공한다. 효과기 분자는 임의의 치료 분자 또는 접합체의 검출을 용이하게 하는 분자일 수 있다. 효과기 분자는 제한되지 않고 임의의 적합한 효과기 분자일 수 있다. 예를 들어, 효과기 분자는 임의의 하나 이상의 약물, 독소, 표지(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 검출가능한 표지), 소 분자, 또는 또 다른 항체일 수 있다. 예를 들어, 독소는 (i) 슈도모나스(*Pseudomonas*) 외독소 A("PE"), (ii) PE의 세포독성 단편(예를 들어, PE의 도메인 III), 또는 (iii) (i) 또는 (ii)의 세포독성 변형체, 예컨대, 예를 들어, 임의의 PE-LR, PE-L010R456A, PE-T20, PE-T20-KDEL, PE4E, PE40, PE38, PE24, PE25, PE38QQR, PE38KDEL, 및 PE35이고, 예를 들어, 미국 특허 제4,892,827호; 제5,512,658호; 제5,602,095호; 제5,608,039호; 제5,821,238호; 제5,854,044호; 제8,871,906호; 제8,907,060호; 제8,936,792호; 제9,346,859호; 제9,206,240호; 및 제9,388,222호에 기재된 바와 같으며, 이들 각각은 본원에 참고로 혼입된다. 본 발명의 접합체에서 적합할 수 있는 약물의 예로는, 제한되지 않지만, 피롤로벤조디아제핀(PBD) 이량체, 튜블린-결합체, 예컨대, 예를 들어, 돌라스타틴(dolastatin) 10, 모노메틸 돌라스타틴 10, 아우리스타틴(auristatin) E, 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE), 아우리스타틴 F, 모노메틸 아우리스타틴 F, HTI-286, 튜블리신(tubulysin) M, 메이탄시노이드(maytansinoid) AP-3, 크립토피신(cryptophycin), Boc-Val-Dil-Dap-OH, 튜블리신 IM-1, Boc-Val-Dil-Dap-Phe-OMe, 튜블리신 IM-2, Boc-Nme-Val-Val-Dil-Dap-OH, 튜블리신 IM-3, 및 콜키신(colchicine) DA; DNA-알킬화제[듀오카마이신(duocarmycin) 유사체], 예컨대, 예를 들어, 듀오카마이신 SA, 듀오카마이신 CN, 듀오카마이신 DMG, 듀오카마이신 DMA, 듀오카마이신 MA, 듀오카마이신 TM, 듀오카마이신 MB, 듀오카마이신 GA; 토메이마이신(tomaymycin) DM; SJG-136; 일루딘(illudin) S; 이로폴벤(irofulven); 아파지쿠온(apaziquone); 트립톨라이드(triptolide); 스타우로스포르린(staurosporine); 캄프토테신(camptothecin); 메토크세이트(methotrexate); 및 기타 항-암 약물, 예컨대, 예를 들어, 키나아제(kinase) 저해제, 히스톤 데아세틸라아제(HDAC: histone deacetylase) 저해제, 프로테아솜(proteasome) 저해제, 및 기질 금속단백분해효소(MMP: matrix metalloproteinase) 저해제가 포함된다.

[0056] 본원에 기재된 폴리펩티드, 단백질, CAR, 또는 항-BCMA 결합 작용부분은 (a) 효과기 분자에 직접적으로 또는 간접적으로, 예를 들어, 연결기를 통해 접합되거나 융합될 수 있다. 연결기는 당분야에 공지되어 있는 임의의 적합한 연결기일 수 있다. 하나의 실시태양에서, 연결기는 포유동물에게 접합체를 투여할 경우 분할될 수 있는 분할가능한 연결기이다. 본 발명의 접합체에 사용하기에 적합한 연결기의 예로는, 제한되지 않지만, 본 발명의 다른 양태에 관하여 본원에 기재된 임의의 연결기가 포함된다.

[0057] 임의의 폴리펩티드, 단백질, CAR, 항-BCMA 결합 작용부분, 접합체, 또는 이의 작용성 부분 및 작용성 변형체를

인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산이 본 발명의 하나의 실시태양에 의해 제공된다. 본 발명의 핵산은 본원에 기재된 임의의 연결기, 항원 결합 도메인, 면역글로불린 도메인, TM 도메인, 및/또는 세포내 T 세포 신호발송 도메인을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다.

[0058] 본 발명의 하나의 실시태양은 본원에 기재된 임의의 폴리펩티드, 단백질, 또는 항-BCMA 결합 작용부분을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산을 제공한다. 이와 관련하여, 핵산은 (i) 서열번호 13 및 14의 제1 및 제2 가변 영역 각각, 또는 (ii) 서열번호 15 및 16의 제1 및 제2 가변 영역 각각을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 본 발명의 또 다른 실시태양은 본원에 기재된 임의의 CDR 영역을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산을 제공한다. 이와 관련하여, 핵산은 (a) 서열번호 1 내지 3, (b) 서열번호 4 내지 6, (c) 서열번호 7 내지 9, (d) 서열번호 10 내지 12, (e) 서열번호 1 내지 6, 또는 (f) 서열번호 7 내지 12의 아미노산 서열을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 본 발명의 또 다른 실시태양은 본원에 기재된 임의의 CAR을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산을 제공한다.

[0059] "핵산"은, 본원에 사용될 경우, "폴리뉴클레오타이드", "올리고뉴클레오타이드", 및 "핵산 분자"를 포함하고, 일반적으로 DNA 또는 RNA의 중합체를 의미하고, 이는 단일-가닥 또는 2중-가닥이고, 합성되거나 천연 공급원으로부터 수득될 수 있으며(예를 들어, 단리되고/되거나 정제됨), 이는 천연, 비-천연 또는 변경된 뉴클레오타이드를 함유할 수 있고, 이는 변형되지 않은 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 사이에서 발견되는 포스포디에스테르 대신에, 천연, 비-천연 또는 변경된 인터뉴클레오타이드 연결기, 예컨대 포스포로아미데이트 연결기 또는 포스포로티오에이트 연결기를 함유할 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 핵산은 삽입, 결실, 역위(inversion), 및/또는 치환을 전혀 포함하지 않는다. 그러나, 본원에 논의되는 바와 같이, 몇몇 경우에, 핵산이 하나 이상의 삽입, 결실, 역위 및/또는 치환을 포함하는 것이 적합할 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 핵산은, 폴리펩티드, 단백질, 또는 CAR의 기능에 영향을 주지 않고 숙주 세포(예를 들어, AAA)에 의한 핵산의 발현시 번역되거나 번역되지 않는 추가의 아미노산을 인코딩할 수 있다. 본 발명의 하나의 실시태양에서, 핵산은 상보성 DNA(cDNA)이다. 본 발명의 하나의 실시태양에서, 핵산은 코돈-최적화된 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0060] 본 발명의 하나의 실시태양의 핵산은 재조합적일 수 있다. 본원에 사용될 경우, "재조합"이라는 용어는 (i) 천연 또는 합성 핵산 분절을 살아있는 세포에서 복제가능한 핵산 분자에 연결시킴으로써 살아있는 세포 밖에서 작성되는 분자, 또는 (ii) 상기 (i)에 기재된 것의 복제로부터 생성되는 분자를 지칭한다. 본원에서 목적을 위해, 복제는 시험관내 복제 또는 생체내 복제일 수 있다.

[0061] 핵산은, 다른 성분, 예를 들어, 다른 뉴클레오타이드가 인코딩된 CAR, 폴리펩티드, 단백질, 항 BCMA-결합 작용부분, 작용성 부분, 또는 작용성 변형체의 생물 활성을 현저히 변화시키지 않도록, 본원에 기재된 특정화된 뉴클레오타이드 서열 또는 서열들로 본질적으로 구성될 수 있다.

[0062] 재조합 핵산은 천연적으로 발생하지 않는 서열을 갖는 핵산 또는 서열의 2개의 다른 별도의 분절의 인공적 조합에 의해 제조된 서열을 갖는 핵산일 수 있다. 이러한 인공적 조합은 종종 화학적 합성에 의해, 또는 더욱 흔히는 핵산의 단리된 분절의 인공적 조작에 의해, 예를 들어, 유전자 조작 기법, 예컨대 문헌[그린(Green) 및 샘브룩(Sambrook)의 문헌 "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 4th Ed. (2012)"]에 기재된 기법에 의해 달성된다. 핵산은 당분야에 공지된 절차를 사용하여 화학적 합성 및/또는 효소적 결합 반응에 기반하여 작성될 수 있다. 예를 들어, 그린(Green) 등의 상기 문헌을 참조한다. 예를 들어, 핵산은 천연 발생 뉴클레오타이드, 또는 분자의 생물학적 안정성을 증가시키거나 하이브리드화시 형성되는 이중물(duplex)의 물리적 안정성을 증가시키도록 고안된 다양하게 변형된 뉴클레오타이드[예를 들어, 포스포로티오에이트 유도체 및 아크리딘(acridine) 치환된 뉴클레오타이드]를 사용하여 화학적으로 합성될 수 있다. 핵산을 생성하기 위해 사용될 수 있는 변형된 뉴클레오타이드의 예로는, 제한되지 않지만, 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 5-클로로우라실, 5-요오도우라실, 하이포잔틴, 잔틴, 4-아세틸시토신, 5-(카복시하이드록시메틸)우라실, 5-카복시메틸아미노메틸-2-티오우리딘, 5-카복시메틸아미노메틸우라실, 디하이드로우라실, 베타-D-갈락토실케오신(galactosylqueosine), 이노신, N⁶-이소펜테닐아데닌, 1-메틸구아닌, 1-메틸이노신, 2,2-디메틸구아닌, 2-메틸아데닌, 2-메틸구아닌, 3-메틸시토신, 5-메틸시토신, N⁶-치환된 아데닌, 7-메틸구아닌, 5-메틸아미노메틸우라실, 5-메톡시아미노메틸-2-티오우라실, 베타-D-만노실케오신, 5'-메톡시카복시메틸우라실, 5-메톡시우라실, 2-메틸티오-N⁶-이소펜테닐아데닌, 우라실-5-옥시아세트산(v), 와이부톡소신(wybutoxosine), 슈도우라실, 퀘오신, 2-티오시토신, 5-메틸-2-티오우라실, 2-티오우라실, 4-티오우라실, 5-메틸우라실, 우라실-5-옥시아세트산 메틸에스테르, 3-(3-아미노-3-N-2-카복시프로필)우라실, 및 2,6-디아미노퓨린이 포함된다. 다르게는, 하나 이상의

본 발명의 핵산은 회사, 예컨대, 매크로몰레큘라 리소시스(Macromolecular Resources)(미국 콜로라도주 포트 콜린스) 및 신테겐(Synthegen)(미국 텍사스주 휴스턴)으로부터 구입될 수 있다.

[0063] 핵산은 임의의 폴리펩티드, 단백질, CAR, 항-BCMA 결합 작용부분, 접합체, 또는 이의 작용성 부분 및 작용성 변형체를 인코딩하는 임의의 단리되거나 정제된 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 다르게는, 뉴클레오티드 서열은 임의의 서열에 대해 변성된 뉴클레오티드 서열 또는 변성된 서열의 조합을 포함할 수 있다.

[0064] 본 발명의 하나의 실시태양은 또한 본원에 기재된 임의의 핵산의 뉴클레오티드 서열에 상보성인 뉴클레오티드 서열, 또는 엄격한 조건하에 본원에 기재된 임의의 핵산의 뉴클레오티드 서열에 하이브리드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리되거나 정제된 핵산을 제공한다.

[0065] 엄격한 조건하에 하이브리드화하는 뉴클레오티드 서열은 매우 엄격한 조건하에 하이브리드화할 수 있다. "매우 엄격한 조건"은 뉴클레오티드 서열이 비-특이적 하이브리드화에 비해 검출가능하게 더 강한 양으로 표적 서열(본원에 기재된 임의의 핵산의 뉴클레오티드 서열)에 특이적으로 하이브리드화함을 의미한다. 매우 엄격한 조건은, 뉴클레오티드 서열에 부합하는 소수의 작은 영역(예를 들어, 3 내지 10개 염기)을 갖게된 무작위 서열로부터, 정확한 상보성 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드 또는 단지 소수의 산란된 부정합을 함유하는 폴리뉴클레오티드를 구별하는 조건을 포함한다. 상보성의 이러한 작은 영역은 14 내지 17개 이상의 염기의 전장 보체에 비해 더욱 쉽게 용융되고, 매우 엄격한 하이브리드화는 이들이 쉽게 구별될 수 있도록 만든다. 상대적으로 매우 엄격한 조건은, 예를 들어, 낮은 염 및/또는 높은 온도 조건, 예컨대 약 50 내지 70℃의 온도에서 약 0.02 내지 0.1 M NaCl 또는 등가물에 의해 제공되는 조건을 포함한다. 이러한 매우 엄격한 조건은 뉴클레오티드 서열 및 주형 또는 표적 가닥 사이의, 존재하더라도 극히 적은 부정합을 용인하고, 임의의 본 발명의 폴리펩티드, 단백질, CAR, 항-BCMA 결합 작용부분, 접합체, 또는 이의 작용성 부분 또는 작용성 변형체의 발현을 검출하는데 특히 적합하다. 일반적으로 조건은 포름아미드의 양을 증가시키면서 첨가함으로써 더욱 엄격하게 될 수 있는 것으로 인식된다.

[0066] 본 발명은 또한 본원에 기재된 임의의 핵산에 적어도 약 70% 이상, 예를 들어, 약 80%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 또는 약 99% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을 제공한다.

[0067] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 핵산은 재조합 발현 벡터내로 혼입될 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명의 하나의 실시태양은 본 발명의 임의의 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공한다. 본원에서 목적을 위해, "재조합 발현 벡터"라는 용어는, 작성물이 mRNA, 단백질, 폴리펩티드, 또는 펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고 벡터가 세포내에서 발현된 mRNA, 단백질, 폴리펩티드, 또는 펩티드를 갖기에 충분한 조건하에 세포와 접촉되는 경우, 숙주 세포에 의한 mRNA, 단백질, 폴리펩티드, 또는 펩티드의 발현을 허용하는 유전자-변형된 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드 작성물을 의미한다. 본 발명의 벡터는 전반적으로 천연-발생성이 아니다. 그러나, 벡터의 일부는 천연-발생성일 수 있다. 본 발명의 재조합 발현 벡터는 임의의 유형의 뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 제한되지 않지만 DNA 및 RNA가 포함되며, 이는 단일-가닥 또는 2중-가닥이고, 합성되거나 천연 공급원으로부터 부분적으로 수득되며, 이는 천연, 비-천연 또는 변형된 뉴클레오티드를 함유할 수 있다. 재조합 발현 벡터는 천연-발생 또는 비-천연-발생의 인터뉴클레오티드 연결기, 또는 이들 유형의 연결기 둘 다를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 비-천연 발생 또는 변형된 뉴클레오티드 또는 인터뉴클레오티드 연결기는 벡터의 전사 또는 복제를 방해하지 않는다.

[0068] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 재조합 발현 벡터는 임의의 적합한 재조합 발현 벡터일 수 있고, 임의의 적합한 숙주 세포를 형질전환하거나 형질감염시키기 위해 사용될 수 있다. 적합한 벡터로는 번식 및 확장을 위해 또는 발현을 위해, 또는 이들 둘 다를 위해 고안된 벡터, 예컨대 플라스미드 및 바이러스가 포함된다. 벡터는 pUC 시리즈[페르멘타스 라이프 사이언시즈(Fermentas Life Sciences), 미국 메릴랜드주 글렌 버니], 피블루스크립트(pBluescript) 시리즈[스트라타젠(Stratagene), 미국 캘리포니아주 라호야], pET 시리즈[노바겐(Novagen), 미국 위스콘신주 매디슨], pGEX 시리즈[파마시아 바이오텍(Pharmacia Biotech), 스웨덴 웁살라], 및 pEX 시리즈[클론테크(Clontech), 미국 캘리포니아주 팔로 알토]로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 박테리오파지(bacteriophage) 벡터, 예컨대 λGT10, λGT11, λZapII(스트라타젠), λEMBL4, 및 λMN1149가 또한 사용될 수 있다. 식물 발현 벡터의 예로는 pBI01, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 및 pBIN19(클론테크)가 포함된다. 동물 발현 벡터의 예로는 pEUK-C1, pMAM, 및 pMAMneo(클론테크)가 포함된다. 재조합 발현 벡터는 바이러스 벡터, 예를 들어, 레트로바이러스 벡터일 수 있다.

[0069] 다수의 형질감염 기법은 일반적으로 당분야에 공지되어 있다. 형질감염 방법은 인산 칼슘 공-침전, 배양 세포

내로의 직접적인 마이크로주사, 전기천공, 리포솜 중재된 유전자 전달, 지질 중재된 형질도입, 및 고 속력 미립자가속장치(microprojectile)를 사용하는 핵산 전달을 포함한다.

[0070] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 재조합 발현 벡터는, 예를 들어, 그린(Green) 등의 상기 문헌에 기재된 표준 재조합 DNA 기법을 사용하여 제조될 수 있다. 환형 또는 선형인 발현 벡터의 작성물은, 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 작용성인 복제 시스템을 함유하도록 제조될 수 있다. 복제 시스템은, 예를 들어, ColE1, 2 μ 플라스미드, λ , SV40, 소 유두종 바이러스 등으로부터 유래될 수 있다.

[0071] 재조합 발현 벡터는, 적절한 경우, 및 벡터가 DNA-기반인지 또는 RNA-기반인지의 여부를 고려하여, 벡터가 도입되는 숙주의 유형(예를 들어, 세균, 곰팡이, 식물 또는 동물)에 특이적인 조절 서열, 예컨대 전사 및 번역 개시 및 종결 코돈을 포함할 수 있다. 재조합 발현 벡터는 클로닝을 용이하게 하는 제한 자리를 포함할 수 있다.

[0072] 재조합 발현 벡터는 형질전환되거나 형질감염된 숙주 세포의 선택을 허용하는 하나 이상의 표지 유전자를 포함할 수 있다. 표지 유전자는 살생물제 내성, 예를 들어, 항생제, 중금속 등에 대한 내성, 원양양체 조건(protothrophy)을 제공하기 위한 영양요구성 숙주에서의 상보성 등을 포함한다. 본 발명의 발현 벡터에 적합한 표지 유전자로는, 예를 들어, 네오마이신(neomycin)/G418 내성 유전자, 하이그로마이신(hygromycin) 내성 유전자, 히스티딘올(histidinol) 내성 유전자, 테트라사이클린(tetracycline) 내성 유전자, 및 암피실린(ampicillin) 내성 유전자가 포함된다.

[0073] 재조합 발현 벡터는 본 발명의 폴리펩티드, 단백질, CAR, 항-BCMA 결합 작용부분, 접합체, 또는 이의 작용성 부분 및 작용성 변형체를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에, 또는 본 발명의 폴리펩티드, 단백질, CAR, 항-BCMA 결합 작용부분, 접합체, 또는 이의 작용성 부분 및 작용성 변형체를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 상보성이거나 이에 하이브리드화하는 뉴클레오티드 서열에 작동적으로 연결되는 고유의 또는 비-고유의 프로모터를 포함할 수 있다. 예를 들어, 강하거나, 약하거나, 유도가능하거나, 조직-특이적이거나 발달-특이적인 프로모터의 선택은 당분야의 통상적인 기술내에 속한다. 유사하게, 프로모터와 뉴클레오티드 서열의 조합은 또한 당분야의 통상적인 기술내에 속한다. 프로모터는 비-바이러스성 프로모터 또는 바이러스성 프로모터일 수 있고, 예를 들어, 사이토메갈로바이러스(CMV: cytomegalovirus) 프로모터, SV40 프로모터, RSV 프로모터, 또는 뮌헨 줄기 세포 바이러스의 긴-말단 반복부(long-terminal repeat)에서 발견되는 프로모터이다.

[0074] 본 발명의 재조합 발현 벡터는 일시적 발현, 안정한 발현, 또는 이들 둘 다에 대해 고안될 수 있다. 또한, 재조합 발현 벡터는 구성요소적 발현 또는 유도성 발현을 위해 제조될 수 있다.

[0075] 추가로, 재조합 발현 벡터는 자살 유전자를 포함하도록 만들어질 수 있다. 본원에 사용될 경우, "자살 유전자"라는 용어는 자살 유전자를 발현하는 세포가 사멸되도록 하는 유전자를 지칭한다. 자살 유전자는, 유전자가 발현되는 세포상에서 제제, 예를 들어, 약물에 대한 감수성을 부여하고, 세포가 제제와 접촉되거나 이에 노출될 때 세포를 사멸시키는 유전자일 수 있다. 자살 유전자는 당분야에 공지되어 있고, 예를 들어, 단순포진 바이러스(HSV: Herpes Simplex Virus) 티미딘 키나아제(TK: thymidine kinase) 유전자, 시토신 다미나아제(daminase), 푸린 뉴클레오시드 포스포릴라아제(phosphorylase), 및 니트로환원효소(nitroreductase)가 포함된다.

[0076] 본 발명의 하나의 실시태양은 본원에 기재된 임의의 재조합 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 추가로 제공한다. 본원에 사용될 경우, "숙주 세포"라는 용어는 본 발명의 재조합 발현 벡터를 함유할 수 있는 임의의 유형의 세포를 지칭한다. 숙주 세포는 진핵 세포, 예를 들어, 식물, 동물, 곰팡이, 또는 조류(algae)이거나, 원핵 세포, 예를 들어, 세균 또는 원생동물일 수 있다. 숙주 세포는 배양된 세포 또는 1차 세포, 즉 유기체, 예를 들어, 인간으로부터 직접 단리된 세포일 수 있다. 숙주 세포는 접착 세포 또는 현탁된 세포, 즉, 현탁액에서 성장하는 세포일 수 있다. 적합한 숙주 세포는 당분야에 공지되어 있고, 예를 들어, DH5 α 에스켈리치아 콜라이(*Escherichia coli*) 세포, 중국 햄스터 난소 세포, 원숭이 VERO 세포, COS 세포, HEK293 세포 등이 포함된다. 재조합 발현 벡터를 증폭시키고 복제하기 위해, 숙주 세포는 원핵 세포, 예를 들어, DH5 α 세포일 수 있다. 재조합 폴리펩티드, 단백질, CAR, 항-BCMA 결합 잔기, 접합체, 또는 이의 작용성 부분 또는 작용성 변형체를 생산하기 위해, 숙주 세포는 포유동물 세포일 수 있다. 숙주 세포는 인간 세포일 수 있다. 숙주 세포가 임의의 세포 유형이고, 임의의 유형의 조직으로부터 기원되며, 임의의 발달 단계일 수 있지만, 숙주 세포는 말초 혈액 림프구(PBL: peripheral blood lymphocyte) 또는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC: peripheral blood mononuclear cell)일 수 있다. 숙주 세포는 B 세포, 또는 T 세포일 수 있다.

[0077] 본원에서 목적을 위해, T 세포는 임의의 T 세포, 예컨대 배양된 T 세포, 예를 들어, 1차 T 세포, 또는 배양된 T

세포주로부터의 T 세포, 예를 들어, 주르캣(Jurkat), SupT1 등, 또는 포유동물로부터 수득된 T 세포일 수 있다. 포유동물로부터 수득된다면, T 세포는 다수의 공급원, 예컨대 제한되지 않지만 혈액, 골수, 림프질, 흉선, 또는 기타 조직 또는 체액으로부터 수득될 수 있다. T 세포는 또한 강화되거나 정제될 수 있다. T 세포는 인간 T 세포일 수 있다. T 세포는 인간으로부터 단리된 T 세포일 수 있다. T 세포는 임의의 유형의 T 세포일 수 있고, 임의의 발달 단계, 예컨대 제한되지 않지만, $CD4^{+}/CD8^{+}$ 2중 양성 T 세포, $CD4^{+}$ 헬퍼 T 세포, 예를 들어, Th_1 및 Th_2 세포, $CD8^{+}$ T 세포(예를 들어, 세포독성 T 세포), 종양 침투 세포, 기억 T 세포, 나이브(naive) T 세포 등일 수 있다. T 세포는 $CD8^{+}$ T 세포 또는 $CD4^{+}$ T 세포일 수 있다.

[0078] 또한, 본 발명의 하나의 실시태양에 의해 본원에 기재된 적어도 하나의 숙주 세포를 포함하는 세포의 집단이 제공된다. 세포의 집단은 기재된 임의의 재조합 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를, 재조합 발현 벡터를 전혀 포함하지 않는 적어도 하나의 다른 세포, 예를 들어, 숙주 세포(예를 들어, T 세포), 또는 T 세포 이외의 세포, 예를 들어, B 세포, 대식세포, 호중구, 적혈구, 간세포, 내피 세포, 상피 세포, 근육 세포, 뇌 세포 등에 더하여 포함하는 이종성 집단일 수 있다. 다르게는, 세포의 집단은 실질적으로 동종성 집단일 수 있고, 여기서 집단은 재조합 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 주로 포함한다(예를 들어, 이로 실질적으로 구성된다). 집단은 또한 세포의 클론성 집단일 수 있고, 여기서 집단의 모든 세포는 재조합 발현 벡터를 포함하는 단일 숙주 세포의 클론이어서, 집단의 모든 세포가 재조합 발현 벡터를 포함하게 된다. 본 발명의 하나의 실시태양에서, 세포의 집단은 본원에 기재된 바와 같은 재조합 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 포함하는 클론 집단이다.

[0079] 폴리펩티드, 단백질, CAR(이의 작용성 부분 및 변형체 포함), 핵산, 재조합 발현 벡터, 숙주 세포(이의 집단 포함), 항-BCMA 결합 작용부분, 및 접합체(이후 이들 모두는 집합적으로 "본 발명의 항-BCMA 물질"로서 지칭됨)는, 단리되고/되거나 정제될 수 있다. 용어 "단리된"은, 본원에 사용될 경우, 그의 천연 환경으로부터 제거됨을 의미한다. 용어 "정제된" 또는 "단리된"은 완전한 정제 또는 단리를 필요로 하는 것은 아니고; 오히려 이는 상대적 용어로서 의도된다. 이에 따라, 예를 들어, 정제된(또는 단리된) 숙주 세포 제조물은, 숙주 세포가 신체내의 이들의 천연 환경에서의 세포에 비해 더욱 순수한 것이다. 이러한 숙주 세포는, 예를 들어, 표준 정제 기법에 의해 생산될 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 숙주 세포의 제조물은 숙주 세포가 제조물의 총 세포 함량의 적어도 약 50%, 예를 들어, 적어도 약 70%를 나타내도록 정제된다. 예를 들어, 순도는 적어도 약 50%일 수 있고, 약 60%, 약 70% 또는 약 80%를 초과할 수 있거나, 약 100%일 수 있다.

[0080] 본 발명의 항-BCMA 물질은 조성물, 예컨대 약학 조성물로 제형화될 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명의 하나의 실시태양은 본원에 기재된 임의의 본 발명의 항-BCMA 물질 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 임의의 본 발명의 항-BCMA 물질을 함유한 본 발명의 약학 조성물은 하나 보다 많은 본 발명의 항-BCMA 물질, 예를 들어, 하나의 접합체 및 하나의 핵산, 또는 둘 이상의 상이한 접합체를 포함할 수 있다. 다르게는, 약학 조성물은 본 발명의 항-BCMA 물질을, 다른 약학적으로 활성인 제제 또는 약물, 예컨대 화학요법제, 예를 들어, 아스파라기나아제(asparaginase), 보르테조미(예를 들어, VELCADE 보르테조미), 부설판(busulfan), 카보플라틴(carboplatin), 시스플라틴(cisplatin), 다우노루비신(daunorubicin), 텍사메타손(dexamethasone), 독소루비신(doxorubicin), 플루오로우라실(fluorouracil), 겐시타빈(gemcitabine), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 레날리도미드(lenalidomide), 멜팔란(melphalan), 메토트렉세이트(methotrexate), 파클리탁셀(paclitaxel)(예를 들어, 아브락산 파클리탁셀), 리툭시맷(rituximab), 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine) 등과 함께 포함할 수 있다. 하나의 바람직한 실시태양에서, 약학 조성물은 본 발명의 접합체를 포함한다. 바람직하게는, 나머지 약학적으로 활성인 제제 또는 약물은 멜팔란, 보르테조미, 레날리도미드, 텍사메타손, 또는 파클리탁셀이다.

[0081] 본 발명의 항-BCMA 물질은 염, 예를 들어, 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 제공될 수 있다. 적합한 약학적으로 허용가능한 산 부가염은 무기산, 예컨대 염산, 브롬화수소산, 인산, 메타인산, 질산, 및 황산, 및 유기산, 예컨대 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 말산, 락트산, 푸마르산, 벤조산, 글리콜산, 글루콘산, 석신산, 및 아릴설폰산, 예를 들어, *p*-톨루엔설폰산으로부터 유래된 산 부가염이 포함된다.

[0082] 약학 조성물에 관하여, 약학적으로 허용가능한 담체는 관례적으로 사용되는 임의의 담체일 수 있고, 단지 물리화학적 고려사항, 예컨대 용해도 및 활성제(들)와의 반응성의 결여에 의해, 및 투여 경로에 의해 제한된다. 본원에 기재된 약학적으로 허용가능한 담체, 예를 들어, 비히클, 보조제, 부형제, 및 희석제는 당분야의 숙련자에게 잘-공지되어 있고, 일반인들이 쉽게 이용할 수 있다. 약학적으로 허용가능한 담체는 사용 조건하에 활성제(들)에 화학적으로 불활성이고 해로운 부작용 또는 독성을 갖지 않는 것이 바람직하다.

- [0083] 담체의 선택은 부분적으로 특별한 본 발명의 항-BCMA 물질에 의해, 뿐만 아니라 본 발명의 항-BCMA 물질을 투여하기 위해 사용되는 특별한 방법에 의해 결정될 수 있다. 따라서, 본 발명의 약학 조성물의 다양한 적합한 제형이 존재한다. 보존제가 사용될 수 있다. 적합한 보존제로는, 예를 들어, 메틸파라벤, 프로필파라벤, 벤조산나트륨, 및 염화 벤즈알코늄이 포함될 수 있다. 2종 이상의 보존제의 혼합물이 임의적으로 사용될 수 있다. 보존제 또는 이의 혼합물은 전형적으로 총 조성물의 약 0.0001% 내지 약 2%(중량)의 양으로 존재한다.
- [0084] 적합한 완충제로는, 예를 들어, 시트르산, 시트르산 나트륨, 인산, 인산 칼륨, 및 다양한 기타 산 및 염이 포함될 수 있다. 2종 이상의 완충제의 혼합물이 임의적으로 사용될 수 있다. 완충제 또는 이의 혼합물은 전형적으로 총 조성물의 약 0.001% 내지 약 4%(중량)의 양으로 존재한다.
- [0085] 약학 제형중 본 발명의 항-BCMA 물질의 농도는 다양할 수 있고, 예를 들어, 약 1% 미만, 대체적으로 약 10% 또는 적어도 약 10%로부터, 예를 들어, 약 20% 내지 약 50% 또는 그 이상(중량) 만큼이고, 선택된 특별한 투여 방식에 따라, 유체 부피, 및 점도에 의해 1차적으로 선택될 수 있다.
- [0086] 투여가능한(예를 들어, 비경구적으로 투여가능한) 조성물을 제조하는 방법은 당분야에 공지되거나 숙련가에게 명백하고, 더욱 상세히, 예를 들어, 문헌[*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Pharmaceutical Press; 22nd Ed. (2012)]에 기재되어 있다.
- [0087] 경구, 에어로졸, 비경구(예를 들어, 피하, 정맥내, 동맥내, 근육내, 피내, 복강내, 및 척추강내), 및 국소 투여를 위한 하기 제형은 단지 예시적이고, 어떠한 방식으로든 제한되지 않는다. 하나 보다 많은 경로가 본 발명의 항-BCMA 물질을 투여하기 위해 사용될 수 있고, 특정한 경우, 특별한 경로는 또 다른 경로에 비해 더욱 즉각적이고 더욱 효과적인 반응을 제공할 수 있다.
- [0088] 경구 투여에 적합한 제형은 (a) 액체 용액, 예컨대 희석액, 예컨대 물, 염수, 또는 오렌지 주스에 용해된 효과량의 본 발명의 항-BCMA 물질; (b) 각각 고체 또는 과립으로서의 예정된 양의 활성 구성성분을 함유하는 캡슐, 사체(sachet), 정제, 로젠지(lozenge), 및 트로키제(troche); (c) 분말; (d) 적절한 액체중의 현탁액; 및 (e) 적합한 유화액을 포함하거나 이로 구성될 수 있다. 액체 제형은 희석제, 예컨대 물 및 알코올, 예를 들어, 에탄올, 벤질 알코올, 및 폴리에틸렌 알코올을 약학적으로 허용가능한 계면활성제의 존재 또는 부재하에 포함할 수 있다. 캡슐 형태는, 예를 들어, 계면활성제, 윤활제, 및 불활성 충전제, 예컨대 락토즈, 수크로즈, 인산 칼슘, 및 옥수수 전분을 함유하는 일반적인 경질- 또는 연질-외피의 젤라틴 유형일 수 있다. 정제 형태는 하나 이상의 락토즈, 수크로즈, 만니톨, 옥수수 전분, 감자 전분, 알긴산, 거정질(macrocrySTALLINE) 셀룰로즈, 아카시아, 젤라틴, 구아 고무, 콜로이드성 이산화규소, 크로스카멜로스 나트륨(croscarmellose sodium), 활석, 마그네슘 스테아레이트, 칼슘 스테아레이트, 아연 스테아레이트, 스테아르산, 및 기타 부형제, 착색제, 희석제, 완충제, 붕해제, 습윤제, 보존제, 풍미제, 및 기타 약리학적으로 상용가능한 부형제를 포함할 수 있다. 로젠지 형태는 풍미제, 대체적으로 수크로즈 및 아카시아 또는 트라카칸트중의 본 발명의 항-BCMA 물질을 포함할 뿐만 아니라, 불활성 기재, 예컨대 젤라틴 및 글리세린, 또는 수크로즈 및 아카시아, 유화액, 겔, 및 당분야에 공지되어 있는 이러한 부형제를 추가로 함유하는 유사물중 본 발명의 항-BCMA 물질을 포함하는 캔디류(pastille)를 포함할 수 있다.
- [0089] 비경구 투여에 적합한 제형으로는, 항산화제, 완충액, 정균제, 및 제형을 의도된 수여자의 혈액과 등장성으로 만드는 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비수성 등장성 멸균 주사 용액, 및 현탁제, 가용화제, 증점제, 안정화제 및 보존제를 포함할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 현탁액이 포함된다. 본 발명의 항-BCMA 물질은 약학 담체, 예컨대 멸균 액체, 또는 액체, 예컨대 물, 염수, 수성 텍스트로즈 및 관련된 당 용액, 알코올, 예컨대 에탄올 또는 헥사데실 알코올, 글리콜, 예컨대 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜, 디메틸설폭사이드, 글리세롤, 케탈(ketal), 예컨대 2,2-디메틸-1,3-디옥솔란-4-메탄올, 에테르, 폴리(에틸렌글리콜) 400, 오일, 지방산, 지방산 에스테르 또는 글리세라이드, 또는 아세틸화된 지방산 글리세라이드의 혼합물중의 생리학적으로 허용가능한 희석액에서, 약학적으로 허용가능한 계면활성제, 예컨대 비누 또는 세정제, 현탁제, 예컨대 펙틴, 카보머, 메틸셀룰로즈, 하이드록시프로필메틸셀룰로즈, 또는 카복시메틸셀룰로즈, 또는 유화제 및 기타 약학 보조제를 첨가하거나 첨가하지 않으면서 투여될 수 있다.
- [0090] 비경구적 제형에서 사용될 수 있는 오일은, 석유, 동물성, 식물성, 또는 합성 오일을 포함한다. 오일의 구체적 인 예로는 땅콩유, 대두유, 참깨유, 목화씨유, 옥수수유, 올리브유, 바세린(petrolatum), 및 광유(mineral oil)를 포함한다. 비경구 제형에 사용하기에 적합한 지방산으로는 올레산, 스테아르산, 및 이소스테아르산이 포함된다. 에틸 올리에이트 및 이소프로필 미리스테이트는 적합한 지방산 에스테르의 예이다.

- [0091] 비경구 제형에 사용하기 위해 적합한 비누로는 지방 알칼리 금속, 암모늄, 및 트리에탄올아민 염이 포함되고, 적합한 세정제로는 (a) 양이온성 세정제, 예컨대, 예를 들어, 할로젠화 디메틸 디알킬 암모늄, 및 할로젠화 알킬 피리디늄, (b) 음이온성 세정제, 예컨대, 예를 들어, 알킬, 아릴, 및 올레핀 설포네이트, 알킬, 올레핀, 에테르, 및 모노글리세라이드 설페이트, 및 설포석시네이트, (c) 비이온성 세정제, 예컨대, 예를 들어, 지방 아민 옥사이드, 지방산 알카놀아미드, 및 폴리옥시에틸렌폴리프로필렌 공중합체, (d) 양쪽성 세정제, 예컨대, 예를 들어, 알킬-P-아미노프로피오네이트, 및 2-알킬-이미다졸린 4급 암모늄 염, 및 (e) 이들의 혼합물을 포함한다.
- [0092] 비경구적 제형은 전형적으로, 예를 들어, 용액중 본 발명의 항-BCMA 물질을 약 0.5% 내지 약 25%(중량)로 함유할 것이다. 보존제 및 완충액이 사용될 수 있다. 주사 자리에서의 자극을 최소화하거나 제거하기 위해, 이러한 조성물은, 예를 들어, 약 12 내지 약 17의 친수성-친유성 평형(HLB: hydrophile-lipophile balance)을 갖는 하나 이상의 비이온성 계면활성제를 함유할 수 있다. 이러한 제형중 계면활성제의 양은 전형적으로, 예를 들어, 약 5% 내지 약 15%(중량)의 범위일 것이다. 적합한 계면활성제로는 폴리에틸렌 글리콜 소르비탄 지방산 에스테르, 예컨대 소르비탄 모노올리에이트, 및 산화 에틸렌과 소수성 염기의 고분자량 부가물(산화 프로필렌과 프로필렌 글리콜의 축합에 의해 형성됨)이 포함된다. 비경구적 제형은 단일-용량 또는 다중-용량 밀봉된 용기, 예컨대 앰플(ampoule) 및 바이알(vial)에 제시될 수 있고, 주사를 위해 사용 직전에 멸균 액체 부형제, 예를 들어 물의 첨가만을 필요로 하는 냉동-건조된(동결건조된) 조건하에 저장될 수 있다. 즉석 주사 용액 및 현탁액은 이전에 기재된 종류의 멸균 분말, 과립 및 정제로부터 제조될 수 있다.
- [0093] 주사용 제형은 본 발명의 하나의 실시태양에 따른다. 주사용 조성물을 위한 효과적인 약학 담체를 위한 요건은 당분야의 숙련가에게 잘 공지되어 있다[예를 들어, 문헌 "*A Practical Guide to Contemporary Pharmacy Practice*, 3rd Edition, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, Thompson and Davidow, eds., (2009)", 및 문헌 "*Handbook on Injectable Drugs*, Trissel, 16th ed., (2010)"].
- [0094] 경피 약물 방출을 위해 유용한 제형을 비롯한 국소 제형은 당분야의 숙련가에게 공지되어 있고, 피부에 적용하기 위한 본 발명의 실시태양과 관련하여 적합하다. 본 발명의 항-BCMA 물질은, 단독으로 또는 다른 적합한 성분들과 조합하여, 흡입을 통해 투여되는 에어로졸 제형으로 제조될 수 있다. 이들 에어로졸 제형은 가압된 허용가능한 추진제, 예컨대 디클로로디플루오로메탄, 프로판, 질소 등에 위치될 수 있다. 이들은 또한 가압되지 않은 제제를 위한 약제로서, 예컨대 네블라이저(nebulizer) 또는 애토마이저(atomizer)에서 제형화될 수 있다. 이러한 스프레이 제형은 또한 점막에 분무하기 위해 사용될 수 있다.
- [0095] "효과량" 또는 "치료하기에 효과적인 양"은 개별체에서 암을 예방하거나 치료하기에 적절한 용량을 지칭한다. 치료 용도 또는 예방 용도에 효과적인 양은, 예를 들어, 치료되는 질병 또는 질환의 단계 및 위중성, 환자의 연령, 체중, 및 일반적 건강 상태, 및 처방한 의사의 판단에 좌우될 것이다. 용량의 크기는 또한 선택된 활성화제, 투여 방법, 투여 시간 및 빈도, 특정한 활성화제의 투여와 동반될 수 있는 임의의 부작용의 존재, 성질 및 정도, 및 원하는 생리학적 효과에 의해 결정될 것이다. 당분야의 숙련가라면, 다양한 질병 또는 질환은 아마도 각각 또는 다양한 회차의 투여에서 본 발명의 항-BCMA 물질을 사용하는 다중 투여를 비롯하여 연장된 치료를 필요로 할 수 있음을 이해할 것이다. 본 발명을 제한하려는 것은 아니지만 예로서, 본 발명의 항-BCMA 물질의 용량은 1 일 당 치료되는 피험체의 체중 1kg 당 약 0.001 내지 약 1000 mg, 약 0.01 내지 약 10 mg/kg 체중/일, 약 0.01 mg 내지 약 1 mg/kg 체중/일일 수 있다.
- [0096] 본 발명의 목적을 위해, 투여되는 본 발명의 항-BCMA 물질의 양 또는 용량은 피험체 또는 동물에서 합리적인 시간 구간안에 치료학적 또는 예방학적 반응에 영향을 주기에 충분해야 한다. 예를 들어, 본 발명의 항-BCMA 물질의 용량은 투여 시간으로부터 약 2 시간 이상, 예를 들어, 약 12 내지 약 24 시간 이상의 기간내에 항원에 결합하거나, 질병을 검출, 치료 또는 예방하기에 충분해야 한다. 특정 실시태양에서, 시간 기간이 더욱 더 길어질 수 있다. 용량은 특별한 본 발명의 항-BCMA 물질의 효능 및 동물(예를 들어, 인간)의 증상, 뿐만 아니라 치료되는 동물(예를 들어, 인간)의 체중에 의해 결정될 것이다.
- [0097] 본 발명의 목적을 위해, 예를 들어, 소정의 용량의 본 발명의 항-BCMA 물질을 포유동물(포유동물들의 집합에게 각각 상이한 용량의 소정의 본 발명의 항-BCMA 물질이 제공됨)에게 투여할 경우 표적 세포가 사멸되는 정도를 비교함을 포함하는 검정은, 포유동물에게 투여되는 출발 용량을 결정하기 위해 사용될 수 있다. 특정 용량의 투여시 표적 세포가 사멸되는 정도는 당분야에 공지된 방법에 의해 검사될 수 있다.
- [0098] 전술된 약학 조성물에 더하여, 본 발명의 항-BCMA 물질은 포접 화합물, 예컨대 사이클로덱스트린 포접 화합물, 또는 리포솜으로서 제형화될 수 있다. 리포솜은 본 발명의 항-BCMA 물질을 특별한 조직에 표적화시키는 작용을 할 수 있다. 리포솜은 또한 본 발명의 항-BCMA 물질의 반감기를 증가시키기 위해 사용될 수 있다. 많은 방법

들이 리포솜을 제조하기 위해 이용가능하다.

- [0099] 본 발명의 실시태양과 관련하여 유용한 전달 시스템으로는, 본 발명의 조성물의 전달이 치료되는 자리의 감각화 이전에, 및 이를 일으키기 충분한 시간을 갖고 초래되도록 지속성, 지연성, 및 지효성 전달 시스템이 포함될 수 있다. 본 발명의 조성물은 기타 치료제 또는 치료법과 함께 사용될 수 있다. 이러한 시스템은 본 발명의 조성물의 반복된 투여를 방지할 수 있으므로, 피험체 및 담당 의사에게 편리함을 증가시키고, 본 발명의 특정한 조성물 실시태양을 위해 특히 적합할 수 있다.
- [0100] 많은 유형의 방출 전달 시스템이 이용가능하고 당분야의 숙련가에게 공지되어 있다. 이들은 중합체 기체 시스템, 예컨대 폴리(락티드-글리콜라이드), 코폴리옥살레이트, 폴리카프로락톤, 폴리에스테르아미드, 폴리오르토에스테르, 폴리하이드록시부티르산, 및 폴리산무수물을 포함한다. 전달 시스템은 또한 지질, 예를 들어 스테롤, 예컨대 콜레스테롤, 콜레스테롤 에스테르, 및 지방산 또는 중성 지방, 예컨대 모노-, 디- 및 트리-글리세라이드; 하이드로겔 방출 시스템; 실라스틱(sylastic) 시스템; 펩티드 기체 시스템; 왁스 코팅물; 통상적인 결합제 및 부형제를 사용하는 압착된 정제; 부분적으로 융합된 이식물 등의 비-중합체 시스템을 포함한다. 구체적인 예로는, 제한되지 않지만: (a) 활성 조성물이 기질내에 일정 형태로 함유되는 침식형(erosional) 시스템, 및 (b) 활성 성분이 중합체로부터 제어된 속도로 침투하는 확산형 시스템이 포함된다. 추가로, 펌프-기반의 하드웨어 전달 시스템이 사용될 수 있고, 이중 일부는 이식에 적합하다.
- [0101] 당분야의 숙련가라면 본 발명의 항-BCMA 물질의 치료학적 또는 예방학적 효능이 변형을 통해 증가되도록 본 발명의 항-BCMA 물질이 다수의 방식으로 변형될 수 있음을 쉽게 인식할 것이다. 예를 들어, 본 발명의 항-BCMA 물질은, 본 발명의 항-BCMA 물질이 투여된 신체내로 방출되는 방식이 시간 및 신체내의 위치에 대하여 제어되도록 데포(depot) 형태로 변형될 수 있다. 본 발명의 항-BCMA 물질의 데포 형태는, 예를 들어, 본 발명의 항-BCMA 물질 및 다공질 또는 비-다공질 물질, 예컨대 중합체를 포함하는 이식가능한 조성물일 수 있고, 여기서 본 발명의 항-BCMA 물질은 이러한 물질에 의해 캡슐화되거나 이들 전체를 통해 확산되고/되거나 비다공질 물질의 분해에 의해 확산된다. 이어서, 데포는 신체내의 원하는 위치내로 이식되고, 본 발명의 항-BCMA 물질은 예정된 속도로 이식물로부터 방출된다.
- [0102] 본 발명의 항-BCMA 물질이 하나 이상의 추가적인 치료제와 함께 투여되는 경우, 하나 이상의 추가적인 치료제는 포유동물에게 공투여될 수 있다. "공투여"는, 본 발명의 항-BCMA 물질이 하나 이상의 추가적인 치료제의 효과를 향상시키거나 이의 반대이도록, 충분히 가까운 시간내에 하나 이상의 추가적인 치료제 및 본 발명의 항-BCMA 물질을 투여함을 의미한다. 이와 관련하여, 본 발명의 항-BCMA 물질은 우선적으로 투여될 수 있고 하나 이상의 추가적인 치료제는 두 번째로 투여될 수 있으며, 또는 그 반대이다. 다르게는, 본 발명의 항-BCMA 물질 및 하나 이상의 추가적인 치료제는 동시적으로 투여될 수 있다. 항-BCMA 물질과 함께 공투여될 수 있는 예시적인 치료제는 본 발명의 다른 양태에 관하여 본원에 기재된 화학요법제가 포함된다. 숙주 세포 또는 세포의 집단을 포유동물에게 투여하는 본 발명의 방법의 목적을 위해, 세포는 포유동물에 대해 동종이형성 또는 자가유래성 세포일 수 있다.
- [0103] 본 발명의 항-BCMA 물질 및 약학 조성물은 포유동물에서 암을 치료하거나 예방하는 방법에 사용될 수 있는 것으로 고려된다. 특별한 이론이나 기작에 얽매지는 것은 아니지만, 본 발명의 항-BCMA 물질은 생물학적 활성, 예를 들어, 항-BCMA 물질이 표적 세포 또는 표적 조직으로 효과기 분자를 유도할 수 있도록 항원, 예를 들어, BCMA를 인식하는 능력을 갖는다. 이와 관련하여, 본 발명의 하나의 실시태양은 포유동물에서 암을 치료하거나 예방하는데 효과적인 양으로 본 발명의 임의의 폴리펩티드, 단백질, CAR, 작용성 부분, 작용성 변형체, 핵산, 재조합 발현 벡터, 숙주 세포, 세포의 집단, 항-BCMA 결합 작용부분, 접합체, 및/또는 약학 조성물을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물에서 암을 치료하거나 예방하는 방법을 제공한다.
- [0104] 본 발명의 하나의 실시태양은 본 발명의 항-BCMA 물질(들)을 투여하기 이전에 포유동물을 림프구고갈(lymphodepletion)시키는 추가로 포함한다. 림프구고갈의 예로는, 제한되지 않지만, 비-골수절제성(nonmyeloablative) 림프구고갈 화학요법, 골수절제성 림프구고갈 화학요법, 전신 방사선 치료 등이 포함된다.
- [0105] 숙주 세포 또는 세포의 집단을 투여하는 본 발명의 방법의 목적을 위해, 세포는 포유동물에 대해 동종이형성 또는 자가유래성 세포일 수 있다. 바람직하게는, 세포는 포유동물에 대해 자가유래성이다.
- [0106] 본원에 지칭된 포유동물은 임의의 포유동물일 수 있다. 본원에 사용될 경우, 용어 "포유동물"은 임의의 포유동물을 지칭하고, 제한되지 않지만, 설치목(Rodentia)의 포유동물, 예컨대 마우스 및 햄스터, 및 중치목(Logomorpha)의 포유동물, 예컨대 토끼가 포함된다. 포유동물은 식육목(Carnivora)으로부터일 수 있고, 예컨대

고양이과(고양이) 및 개과(개)가 포함된다. 포유동물은 소과(소) 및 돼지과(돼지)를 비롯한 우제목(Artiodactyla), 또는 말과(말)를 비롯한 기제목(Perissodactyla)으로부터일 수 있다. 포유동물은 영장목(Primate), 세보이드(Ceboid), 또는 시모이드(Simoid) 목(원숭이), 또는 유인원목(Anthropoid)(인간 및 유인원)으로부터일 수 있다. 바람직하게는, 포유동물은 인간이다.

[0107] 본 발명의 방법에 관하여, 암은 임의의 암일 수 있고, 임의의 급성 림프구성 암, 급성 골수성 백혈병, 횡문근육종, 방광암(예를 들어, 방광 암종), 골암, 뇌암(예를 들어, 수모세포종, 신경아세포종, 및 교모세포종), 유방암, 항문, 또는 항문관, 항문직장의 암, 눈의 암, 간내담관암, 관절의 암, 목 암, 담낭암, 흉막암, 코, 비강 또는 중이암, 구강암, 음문암, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수암, 결장암, DLBCL 림프종, 유잉(Ewing)의 육종, 식도암, 자궁경부암, 섬유육종, 위장 카르시노이드(carcinoid) 종양, 두경부암(예를 들어, 두경부 편평상피 세포 암종), 호지킨 림프종, 하인두암, 신장암, 후두암, 백혈병, 액체 종양, 간암, 폐암(예를 들어, 비-소세포 폐 암종), 림프종, 악성 중피종, 비만세포종, 흑색종, 다발성 골수종, 비인두암, 신경아세포종, 비-호지킨 림프종, B-만성 림프구성 백혈병, 모양 세포 백혈병, 급성 림프구성 백혈병(ALL) 림프종, 및 버킷 림프종, 난소암, 췌장암, 복막암, 장막암, 장간막암, 인두암, 전립선암, 직장암, 신세포암, 피부암, 소장암, 연조직암, 고체 종양, 위암, 고환암, 갑상선암, 및 자궁암이 포함된다. 바람직하게는, 암은 버킷 림프종, DLBCL 림프종, ALL 림프종, 호지킨 림프종 또는 다발성 골수종이다. 하나의 실시태양에서, 암은 BCMA의 발현 또는 과발현을 특징으로 한다.

[0108] 용어 "치료" 및 "예방" 뿐만 아니라 이로부터 유래된 단어는, 본원에 사용될 경우, 필수적으로 100% 또는 완전한 치료 또는 예방을 포괄하는 것은 아니다. 오히려, 당분야의 숙련가가 잠재적 이점 또는 치료학적 효과를 갖는 것으로 인식하는 치료 또는 예방의 다양한 정도가 존재한다. 이와 관련하여, 본 발명의 방법은 포유동물에서 암을 치료 또는 예방하는 임의의 수준의 임의의 양을 제공할 수 있다. 더욱이, 본 발명의 방법에 의해 제공되는 치료 또는 예방은, 치료되거나 예방되는 하나 이상 증상, 예를 들어, 암 또는 이러한 증상의 증후를 치료 또는 예방함을 포함할 수 있다. 또한, 본원에서 목적을 위해, "예방"은 암의 개시, 또는 이의 증후 또는 증상을 지연시킴, 또는 암의 재발을 지연 또는 예방함을 포괄할 수 있다.

[0109] 본 발명의 또 다른 실시태양은 포유동물에서 암을 치료하거나 예방하는데 있어서의, 본 발명의 임의의 폴리펩티드, 단백질, CAR, 작용성 부분, 작용성 변형체, 핵산, 재조합 발현 벡터, 숙주 세포, 세포의 집단, 항-BCMA 결합 작용부분, 접합체, 또는 약학 조성물의 용도를 제공한다.

[0110] 본 발명의 또 다른 실시태양은 (a) 포유동물로부터의 하나 이상의 세포를 포함하는 샘플을 본 발명의 임의의 폴리펩티드, 단백질, CAR, 작용성 부분, 작용성 변형체, 핵산, 재조합 발현 벡터, 숙주 세포, 세포의 집단, 항-BCMA 결합 작용부분, 또는 접합체와 접촉시킴으로써 복합체를 형성하는 단계, 및 (b) 복합체를 검출하는 단계(여기서, 복합체의 검출은 포유동물에서 암의 존재를 지시함)를 포함하는, 포유동물에서 암의 존재를 검출하는 방법을 제공한다.

[0111] 샘플은 임의의 적합한 방법, 예를 들어, 생검 또는 부검에 의해 취득될 수 있다. 생검은 개별체로부터의 조직 및/또는 세포의 제거이다. 이러한 제거는 개별체로부터의 조직 및/또는 세포를 수집하여 제거된 조직 및/또는 세포 상에서 실험을 수행하는 것이다. 이러한 실험은, 개별체가 특정한 증상 또는 질병-상태를 갖고/갖거나 이로부터 고통받는지를 결정하는 실험을 포함할 수 있다. 증상 또는 질병은, 예를 들어, 암일 수 있다.

[0112] 포유동물에서 암의 존재를 검출하는 본 발명의 방법에 대한 하나의 실시태양에 있어서, 포유동물의 세포를 포함하는 샘플은 전체 세포, 이의 용해물, 또는 전체 세포 용해물의 분별물, 예를 들어, 핵 또는 세포질 분별물, 전체 단백질 분별물, 또는 핵산 분별물을 포함하는 샘플일 수 있다. 샘플이 전체 세포를 포함한다면, 세포는 포유동물의 임의의 세포, 예를 들어, 임의의 기관 또는 조직의 세포일 수 있고, 혈액 세포 또는 내피 세포가 포함된다.

[0113] 본 발명의 검출 방법의 목적을 위해, 접촉 단계는 포유동물과 관련하여 시험관내 또는 생체내에서 실행될 수 있다. 바람직하게는, 접촉 단계는 시험관내에서 실행된다.

[0114] 또한, 복합체의 검출은 당분야에 공지된 다수의 방식을 통해 일어날 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 본 발명의 CAR, 폴리펩티드, 단백질, 작용성 부분, 작용성 변형체, 핵산, 재조합 발현 벡터, 숙주 세포, 세포의 집단, 항-BCMA 결합 작용부분, 또는 접합체는, 검출가능한 표지, 예컨대, 예를 들어, 방사성동위원소, 형광단[예를 들어, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 파이코에리트린(PE)], 효소(예를 들어, 알칼리성 인산가수분해효소, 호스래디시 과산화효소), 및 원소 입자(예를 들어, 금 입자)에 의해 표지화될 수 있다.

- [0115] 하기 실시예에는 본 발명을 추가로 예시하지만, 물론 그의 범주를 어떠한 방식으로든 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.
- [0116] **실시예**
- [0117] 하기 물질 및 방법을 실시예 1 내지 11에 기재된 실험에서 이용하였다.
- [0118] *플라스미드*
- [0119] BCMA(TNFRSF17) cDNA를 클로닝하고 한 쌍의 발현 벡터를 작성하였다. 하나의 벡터는 전장 인간 BCMA를 인코딩하고 나머지는 토끼 IgG 중쇄의 Fc 영역(CH2 및 CH3 도메인) 및 힌지 영역에 융합된 인간 BCMA(잔기 1-54)의 세포외 도메인을 인코딩하였다. 우선, 인간 BCMA의 전장 cDNA를 사이토메갈로바이러스 프로모터의 제어하에 포유동물의 발현 벡터인 pcDNA6[인비트로젠(Invitrogen), 미국 캘리포니아주 칼스바드]내로 클로닝하여, pcDNA6/BCMA를 생성하였다. Fc-융합 단백질의 경우, 인간 BCMA의 세포외 도메인을 인코딩하는 DNA 단편을 PCR에 의해 증폭시키고 EcoRI 및 BgIII에 의해 소화시키고, pFUSE-rFcI 발현 벡터[인비보젠(InvivoGen), 미국 캘리포니아주 샌디에고]내로 클로닝하여, pFUSE/BCMA-rFc를 생성하였다.
- [0120] *세포*
- [0121] 293T 세포를 10% 소 태아 혈청(FBS: fetal bovine serum)이 보충된 DMEM에서 성장시켰다. 하이브리도마 형성을 위해 P3U1 골수종 세포를 융합 단백질로서 사용하였고, 15% 소 태아 혈청(FBS)이 보충된 이스코베의 변형된 돌베코 배지(IMDM: Iscove's Modified Dulbecco's Medium)(인비트로젠)에서 유지시켰다.
- [0122] *제조합 BCMA-rFc 융합 단백질의 생산*
- [0123] BCMA-rFc 융합 단백질을 발현하는 안정한 세포주를 확립하기 위하여, PLUS 시약(인비트로젠)을 갖는 리포펙타민(LIPOFECTAMINE) LTX에 의해 제조업체의 지시에 따라 293T 세포를 pFUSE/BCMA-rFc로 형질감염시켰다. 형질감염된 세포를 200 mg/ml의 제오신(ZEOCIN) 항생제(인비트로젠)가 함유된 배양 배지에서 수 회차의 한계 희석에 의해 선택하였다. 가장 높은 BCMA-rFc 발현을 갖는 안정한 세포주를, 높은 세포 밀도를 용이하게 하는 2-구획 생물반응기인 셀라인(CELLINE) AD 1000[휘튼(Wheaton), 미국 뉴저지주 밀빌]에서 대규모 생산을 위해 사용하였다. BCMA-rFc 융합 단백질을 단백질 G-세파로즈(SEPAHROSE) 칼럼[지이 헬스케어(GE healthcare), 미국 펜실바니아주 피츠버그]에 의해 정제하였다.
- [0124] *면역화*
- [0125] 암컷 BALB/c 마우스(6 주령)를, 제 1 면역화를 위해 타이터맥스 골드 보조제(TITERMAX Gold Adjuvant) 액체[시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), 미국 미주리주 세인트 루이스]중 25 μ g의 제조합 BCMA-rFc 융합 단백질에 의해 복강내로 면역화시키고, 후속적으로 보조제 없이 BCMA-rFc에 의해 5 회 면역화시켰다. 마우스 혈청으로부터의 항체의 역가를 세포 융합 이전에 시험하였다. BCMA-면역화된 마우스를 추가접종하기 위해, 보조제와 함께 100 μ g의 BCMA-rFc를 마우스에게 복강내로 주사하였다. 세포 융합을 위해 최종 추가접종 이후 72 시간(h)째 비장을 수거하였다. 모든 동물을 보호기관의 지침에 따라 유지시켰다.
- [0126] *세포 융합 및 하이브리도마 배양*
- [0127] 비장세포 및 P3U1 세포를 무혈청 IMDM에 의해 각각 3회 및 2회 세척하였다. 비장세포를 계수하고 P3U1과 4:1의 비로 혼합하였다. 혼합된 세포를 원심분리하고, 교반하에 1 분의 기간에 걸쳐 적하에 의해 적가된 1 ml의 40% 폴리에틸렌 글리콜[PEG4000, EMD 밀리포어(EMD Millipore), 미국 매사추세츠주 빌레리카]에 세포 펠렛(pellet)을 재현탁시켰다. 추가적으로 1 분 동안 교반한 후, 현탁액을 예온된(37℃) IMDM에 의해 천천히 희석시켰다. 생성된 현탁액을 원심분리하고 세포 펠렛을 20%의 FBS, 1 mM 피루브산 나트륨, 2 mM L-글루타민, 50 μ M 2-머캅토에탄올, 10 μ g/ml의 겐타마이신(gentamycin), 8 μ g/ml의 소 인슐린, 1 μ g/ml의 소 트랜스페린(transferrin), 1 U/ml의 인간 IL-6이 보충된 IMDM에 2.5×10^6 /ml로 재현탁시켰다. 세포 현탁액을 96-웰 플레이트에 2.5×10^5 세포/웰로 접종하고 CO₂ 항온기에서 배양하였다. 융합 후 그날에, 100 μ l의 신선한 HAT 배지를 첨가하였다. 4 일 및 7 일째, 소비된 배지의 절반을 신선한 HAT 배지로 대체하였다. 10 일 또는 11 일째 배양 상청액중 항체 생산을 이후 기재된 바와 같이 형광 활성화 세포 분류기(FACS: fluorescence activated cell sorter)에 의해 검사하였다.
- [0128] *FACS 선별*

- [0129] 형질감염 실험을 위해, 293T 세포를 100 mm 디쉬(dish)[비디 바이오사이언시즈(BD Biosciences), 미국 매사추세츠주 베드포드]에 접종하고 반융합적(subconfluent) 밀도로 성장시켰다. pcDNA6/BCMA, pcDNA/TACI, 또는 pcDNA6/BAFFR(6 μ g)을 디쉬마다 리포펙타민 LX 및 PLUS 시약에 의해 제조업체의 지시에 따라 형질감염시켰다. 24 시간 후, 일시적으로 형질감염된 세포를 수거하고 FACS 선별을 위해 사용하였다. 세포(1×10^5)를 FACS 완충액(5% FBS 및 0.1% 아지드화 나트륨이 함유된 PBS)중 하이브리도마 상청액의 일련의 희석물과 함께 1 시간 동안 얼음 위에서 항온처리하였다. FACS 완충액으로 2회 세척한 후, 세포를 R-파이크코리트린(PE)-표지화된 염소 항-마우스 IgG F(ab')₂[잭슨 이뮤노 리서치 레보레이토리즈(Jackson Immuno Research Laboratories), 미국 펜실바니아주 웨스트 그로브]의 1:200 희석물과 함께 30 분 동안 항온처리하였다. 2회 세척한 후, 세포를 10 nM TO-PRO-3 염료(인비트로젠)가 함유된 180 μ l의 FACS 완충액에 재현탁시키고, 살아있는 세포와 회합된 형광물질을 비디 애큐리(ACCURI) C6 유세포분석기(비디 바이오사이언시즈)에 의해 측정하였다. 양성 하이브리도마 클론을 24-웰 플레이트에 전달시켰다. 제1 선별에서의 긍정 오류를 배제하기 위해, 24-웰 배양 상청액을 전달 이후 2 일째 재-검사하였다. 특정 하이브리도마를 수 회차의 한계 희석에 의해 클로닝하고 셀라인(CELLINE) 플라스크에서 성장시켜 배양 상청액에서 MAb를 수거하였다. 확립된 단일클론성 항체(MAb)의 이소타입(isotype)을 마우스 MAb 이소타입결정 시약(시그마-알드리치)에 의해 결정하였다. 배양 상청액중 면역글로불린 농도를 샌드위치형 ELISA에 의해 결정하였다.
- [0130] *ELISA*
- [0131] 맥시소프(MAXISORP) 96-웰 ELISA 플레이트[날제 눈크(Nalge Nunc), 미국 뉴욕주 로체스터]를 PBS중 100 ng/웰의 염소 항-토끼 IgG(잭슨 이뮤노 리서치 레보레이토리즈)에 의해 하룻밤 4℃에서 코팅시켰다. 차단 후, 5 ng/웰의 BCMA-rFc, TACI-rFc, 또는 BAFFR-rFc를 플레이트에 첨가하고 2 시간 동안 실온에서 항온처리하였다. 세척 후, 4 μ g/ml의 하이브리도마 상청액을 플레이트에 첨가하고 2 시간 동안 실온에서 항온처리하였다. 세척 후, 결합된 MAb를 1 시간 동안 알칼리성 인산가수분해효소(ALP)-표지화된 염소 항-마우스 IgG(잭슨 이뮤노 리서치 레보레이토리즈)와 함께, 이어서 p-니트로페닐 포스페이트[pNPP, 피셔 사이언티픽(Fisher Scientific), 미국 펜실바니아주 피츠버그]와 함께 항온처리함으로써 검출하였다.
- [0132] *친화도 결정*
- [0133] BCMA에 대한 MAb의 결합 반응속도(binding kinetics)를, BLITZ[포르테바이오(ForteBio), 미국 캘리포니아주 멘로 파크] 기기를 사용하여 생물막 간섭계법(bio-layer interferometry)에 의해 측정하였다. 제조업체의 지시에 따라서, BCMA-rFc를 아민-반응성의 제2 세대 바이오센서 상에 아민 커플링에 의해 고정화시키고, 이후 센서 표면을 N-하이드록시석신아미드(NHS) 및 N-에틸-N-(3-디메틸아미노프로필) 카보디이미드 하이드로클로라이드(EDC)로 활성화시켰다. PBS(pH 7.4)중 5가지 상이한 농도로 MAb의 일련의 희석물을 센서 표면을 가로질러 이동시켰다. 센서그램(sensorgram) 데이터 세트를 빌트-인(built-in) BLITZ 소프트웨어에 의해 전체적으로 정합시켜 회합 속도 상수(K_a), 해리 속도 상수(K_d), 및 친화도 상수(K_D)를 결정하였다.
- [0134] **실시예 1**
- [0135] 본 실시예는 항-BCMA mAb를 분리하는 하이브리도마의 생산을 보여준다.
- [0136] 마우스를, 제1 면역화를 위해 보조제중의 BCMA-rFc 융합 단백질에 의해 복강내로 면역화시키고, 후속적으로 보조제 없이 BCMA-rFc에 의해 5회 면역화시켰다. BCMA-발현 293T 세포에 대한 높은 항체 역가(1:10,000)가 BCMA-rFc에 의해 면역화된 마우스로부터의 혈청에서 검출되었다. 높은 역가를 갖는 마우스에게 보조제와 함께 BCMA-rFc를 복강내로 주사함으로써 최종 추가접종을 제공하고, 3 일 후, 비장을 P3U1 골수종과 융합시켰다. 하이브리도마의 배양 상청액을 특이적 mAb의 생산에 대해 FACS 분석에 의해 선별하였다. FACS 선별 후, 11개의 양성 클론을 선택하였다. 11개의 클론중, BM303은 BCMA의 고유의 형태에 대해 가장 높은 친화도를 나타내었다. 이소타입결정 시험 결과, 선택된 mAb는 모두 κ 경쇄를 갖는 IgG1이었다.
- [0137] **실시예 2**
- [0138] 본 실시예는 BM24 및 BM306이 BCMA에 특이적으로 결합함을 보여준다.
- [0139] 다른 TNFR 상과 구성원과 항-BCMA mAb의 교차-반응성을 검사하기 위해, 형질감염된 293T 세포에 의해 발현된 고유의 TNFR(BCMA, TACI 또는 BAFFR)에 대한 포화 농도(4 μ g/ml)에서의 각각의 mAb의 반응성을 FACS에 의해 시험하였다. TNFR-rFc 융합 단백질에 대한 각각의 mAb의 반응성을 ELISA에 의해 시험하였다. 이들 결과로부터, 5종의 mAb(BM101, BM226, BM303, BM309 및 BM313)가 TACI와 다양한 정도로 교차-반응성을 나타낸 반면, 각각의

BM14, BM24, BM201, BM219, BM222 및 BM306의 결합이 양쪽 검정에서 BCMA에 특이적임을 알 수 있었다.

실시예 3

본 실시예는 BM24 및 BM306의 결합 반응속도를 보여준다.

BM24 및 BM306은 높은 친화도 및 특이성을 갖고 세포 표면 상에서 BCMA 항원에 선택적으로 결합한다. BCMA-rFc 단백질에 대한 이들 2종의 항-BCMA mAb의 결합 반응속도를 생물막 간섭계법에 의해 측정하였다. 항-BCMA MAb의 일련의 희석물(20, 10, 5, 2.5, 1.25 $\mu\text{g/ml}$)을 BCMA-rFc 고정화 센서에 적용하고 검출하였다. 실시간 생물분자 상호작용 분석을 BLITZ 소프트웨어에 의해 수행하였다. 결과는 표 1에 제시된다. BM306은 BM24와 비교하여 높은 회합 속도 상수(K_a)를 나타내었다. mAb 둘 다의 해리 상수(K_d)는 1×10^{-12} 미만이었다(검출 한계를 초과함).

[표 1]

샘플	$K_d(\text{M})$	$k_a(1/\text{Ms})$	$k_d(1/\text{s})$
BM24	$< 1 \times 10^{-12}$	2.97×10^5	$< 1 \times 10^{-7}$
BM306	$< 1 \times 10^{-12}$	4.15×10^5	$< 1 \times 10^{-7}$

실시예 4

본 실시예는 BM24 및 BM306 하이브리도마로부터의 Fv 단편의 클로닝을 보여준다.

BM24 및 BM306 mAb 둘 다는 IgG1 이소타입이다. 중쇄 및 경쇄를 IgG1 이소타입-특이적 올리고 프라이머에 의해 BM24 및 BM306-발현 하이브리도마로부터 클로닝하였다. 아미노산 서열에 대한 서열번호는 표 2에 제시된다.

[표 2]

BM24 VH	서열번호 13
BM24 VL	서열번호 14
BM306 VH	서열번호 15
BM306 VL	서열번호 16

실시예 5

본 실시예는 BM24 및 BM306으로부터의 Fv를 사용하는 PE-기체 면역독소의 개발을 보여준다.

Fab 또는 dsFv 단편이 PE의 도메인 III의 변형체에 연결된 면역독소를 제조하였다. 생성된 항-BCMA 면역독소는 아래에 열거된다:

● **LMB34**: BM24-Fab-LO10R456A;

● **LMB38**: BM24-Fab-LR-GGS;

● **LMB63**: BM24-Fab-LR-GGS-T20;

● **LMB64**: BM24-Fab-LR-GGS-T20-KDEL;

● **LMB70**: BM306-Fab-LR-GGS;

● **LMB75**: BM306-dsFv-LR-GGS;

● **LMB92**: BM306-Fab-LO10R456A;

● **LMB94**: BM306-dsFv-GGSx4-PE24(퓨린 자리 없음);

● **LMB103**: BM306-Fab-LR-GGS-T20; 및

● **LMB107**: BM306-dsFv-PE38.

실시예 6

[0164] 본 실시예는 세포주에 대한 항-BCMA 면역독소(IT)의 활성을 보여준다.

[0165] 4명의 다발성 골수종 환자로부터의 BCMA-발현 세포주 및 세포에 대한 항-BCMA 면역독소의 활성을 WST 검정에 의해 시험하였다. 각각의 면역독소에 대한 IC₅₀ 값은 표 3에 요약된다. 야생형 PE24-GGS를 갖는 LMB38 및 LMB70은 BCMA-발현 H929 세포주에 대하여 가장 활성인 IT였고, 1.0 내지 1.5 ng/mL의 IC₅₀을 가졌다.

[0166] [표 3]

					IC ₅₀ (ng/mL)						
세포주	LMB3 4	LMB3 8	LMB6 3	LMB6 4	LMB7 0	LMB7 5	LMB9 2	LMB9 4	LMB1 03	LMB1 07	BM30 6
U266B	8.0	1.9	NT	NT	5.0	NT	16.0	NT	NT	NT	>1000
H929	3.6	1.2	7.0	8.0	1.1	1.3	3.1	50.0	6.0	1.1	>1000
RPMI-8226	20.0	6.9	NT	NT	5.1	NT	18.0	NT	NT	NT	>1000
LP-1	40.0	25.0	NT	NT	20.0	NT	36.0	NT	NT	NT	NT
JJN-3	9.0	2.5	NT	NT	4.0	NT	10.0	NT	NT	NT	>1000
KMS-18	52.0	55.0	NT	NT	65.0	NT	59.0	NT	NT	NT	NT
Jeko-1	>100	>100	NT	NT	>100	NT	>100	NT	NT	NT	NT
HUT-102	>100	>100	NT	NT	>100	NT	>100	NT	NT	NT	NT
환자로부터의 세포											
MM-1	NT	NT	NT	NT	0.4	NT	NT	NT	NT	NT	NT
MM-2	NT	NT	NT	NT	17.0	NT	NT	NT	NT	NT	NT
MM-3	NT	NT	NT	NT	2.3	NT	NT	NT	NT	NT	NT
MM-4	NT	NT	NT	NT	17.9	NT	NT	NT	NT	NT	NT
NT = 시험되지 않음											

[0167]

[0168] 실시예 7

[0169] 본 실시예는 고정된 용량에서의 항-BCMA 면역독소의 세포독성을 보여준다.

[0170] LMB38 및 LMB70이 단지 성장을 저해하기 보다는 세포를 실제로 사멸시키는지의 여부를 시험하기 위해, BCMA-양성 H929 세포를 독소의 부재하에(대조군(Ctrl)) 또는 100 ng/mL의 LMB38 또는 LMB70과 함께 2 시간, 4 시간, 6 시간 또는 24 시간 동안 항온처리한 후 세척하고 신선한 배지 상에서 항온처리하였다. 면역독소에 노출된 후 다양한 시점(일)에 취해진 세포의 트립판 블루(trypsin blue) 염색에 의해 세포 사멸 활성을 측정하였다. 표 4A 및 4B에 제시된 바와 같이, 세포는 100 ng/mL의 LMB38에 노출된지 2 시간 이후에 모두 사멸되었다(트립판 블루 양성). 세포는 21 일 이후 다시 생존하지 않았고, 이는 세포가 100 ng/mL의 LMB38에 노출되었을 때 모두 사멸하였음을 지시한다.

[0171] [표 4A]

세포	사멸률			
LMB38	날짜(D)-1	D-2	D-5	D-7
H929-Cntrl	6	10	25	27
H929-2 시간	46	84	98	100
H929-4 시간	44	85	100	100
H929-6 시간	48	87	100	100
H929-24 시간	50	94	100	100

[0172]

[0173] [표 4B]

세포	사멸률			
LMB70	D-1	D-2	D-5	D-7
H929-Cntrl	3	4	29	35
H929-2 시간	43	88	100	100
H929-4 시간	44	89	100	100
H929-6 시간	42	88	100	100
H929-24 시간	51	95	100	100

[0174]

[0175] BCMA-양성 H929, U266, 및 RPMI 세포주를 3 ml의 부피에 ml 당 10^6 으로 접종하였다. LMB38(BM24-Fab-LRggs)을 100 ng/ml의 양으로 0 일(D-0)째 첨가하였다. 세포($10 \mu\text{l}$)를 상이한 날짜에 취하고, 트립판 블루 염색 이후 계수하였다. D-3 후, 세포를 세척하고 독소가 함유되지 않은 배지에 플레이팅하였다. 6개의 그룹에 대해, 6 시간 이후 세포를 세척하고 무독소의 일반 배지에 플레이팅하였다. 사이클로헥사미드(cyclohexamide)(Chxm) 및 205를 양성 대조군으로서 사용하였고; 메소텔린(mesothelin)을 표적화하는 SS1-Fab-면역독소를 음성 대조군(Ctrl)으로서 사용하였다.

[0176] 표 5에 제시된 바와 같이, 3가지 모든 세포주는 높은 용량의 LMB38에 의해 사멸되었다.

[0177] [표 5]

세포	사멸률						
	D-0	D-1	D-2	D-3	D-6	D-8	D-21
H929-Cntrl	12	19	24	23	25	NT	NT
H929-LMB38	10	62	97	100	100	100	100
H929-6 시간	13	87	100	100	100	100	100
H929-Chxm	9	70	92	100	100	NT	NT
H929-205	14	NT	NT	27	NT	NT	NT
U266B-Cntrl	2	3	4	12	14	NT	NT
U266-LMB38	5	23	59	90	100	100	100
U266B-6 시간	4	25	74	95	100	100	100
U266B-Chxm	7	25	50	80	100	NT	NT
U266B-205	10	NT	NT	18	NT	NT	NT
RPMI-Ctrl	10	15	20	25	30	NT	NT
RPMI-LMB38	12	60	100	100	100	100	100
RPMI-6 시간	9	75	90	98	100	100	100
RPMI-Chmx	15	75	100	100	100	NT	NT
RPMI-205	18	NT	NT	28	NT	NT	NT
NT = 시험되지 않음							

[0178]

[0179] **실시예 8**

[0180] 본 실시예는 H929 이중이식 종양을 갖는 마우스에서의 LMB38의 항종양 활성을 보여준다.

[0181] LMB38 및 LMB70의 생체내 효능을 시험하기 위해, 가장 감수성인 세포주 H929를 사용하여 SCID 마우스에서 종양을 성장시켰다. 이전의 독성 데이터에 근거하여, 1.5 mg/kg의 QODX5 용량을 각각의 그룹에서 5 마리의 마우스에 사용하였다. 도 1a 및 1b에 도시된 바와 같이, 면역독소-치료된 그룹에서 종양 성장은 대조군 인산염 완충된 염수(PBS)-치료된 마우스에 비해 지연되었다. 그러나, 종양은 일단 치료가 종료되자 다시 성장하였다.

[0182] **실시예 9**

[0183] 본 실시예는 H929 이중이식 종양을 갖는 마우스에서의 LMB70 및 아브락산 조합의 항종양 활성을 나타낸다.

[0184] 아브락산 및 보르테조밐(BTZ)에 대한 H929 및 U266B 세포의 감수성을 시험관내에서 측정하였다. 결과는 표 6에 제시된다.

[0185] [표 6]

	아브락산 IC ₅₀	BTZ IC ₅₀
H929	0.5 ng/mL	4 nM
U266B	1.0 ng/mL	NT
NT = 시험되지 않음		

[0186]

[0187] 세포주 H929를 사용하여 마우스에서 종양을 성장시켰다. 종양이 약 100 mm³의 부피에 도달될 경우, 마우스에 대조군(비히클), LMB70 단독, 아브락산 단독, 또는 아브락산(Abrx) 및 LMB70의 조합물을 투여하였다. 투여량은 다음과 같았다: LMB70(BM306-Fab-LR-ggs): 1 mg/kg, QODX5; Abrx: 40 mg/kg X1.

[0188] 종양 부피를 측정하였다. 결과는 도 2에 도시된다. 도 2에 도시된 바와 같이, 종양 성장은 아브락산 및 LMB70의 조합물에 의해 치료된 마우스에서 저해되었다.

[0189] 실시예 10

[0190] 본 실시예는 H929 세포를 사멸시키기 위해 필요한 LMB70으로의 노출 기간을 보여준다. 본 실시예는 또한 LMB70에 노출시킨 이후 H929 세포가 얼마나 신속히 사멸하는지를 보여준다.

[0191] 생체내에서의 섭취를 측정하기 위해 LMB70을 AF647에 의해 표지화하였다. AF647 표지화 키트[라이프 테크놀로지스(Life Technologies)]를 사용하여 LMB70을 AF647에 의해 2회 표지화하였다. 표지화 효능 및 활성을 WST-8 검정 및 친화도 측정에 의해 측정하였다. 제1 표지화 이후 WST-8 분석에 의하여, IC₅₀은 표지화되지 않은 LMB70의 경우 1.532이고, 표지화된 LMB70의 경우 6.082임이 밝혀졌다. 제2 표지화 이후 WST-8 분석에 의하여, IC₅₀은 표지화되지 않은 LMB70의 경우 2.758이고, 표지화된 LMB70의 경우 10.69임이 밝혀졌다. 제1 표지화 이후 친화도 분석에 의하여, B_{최대값}은 표지화되지 않은 LMB70의 경우 2220이고, 표지화된 LMB70의 경우 1131이며, K_d는 표지화되지 않은 LMB70의 경우 4078이고, 표지화된 LMB70의 경우 3673임이 밝혀졌다. 표지화된 독소가 표지화되지 않은 독소에 비해 약 4 배 덜 활성인 것으로 결정되었다.

[0192] H929 세포의 표면 상에서 BCMA 분자를 정량화하기 위해, H929 세포를 FLOW 완충액에서 얼음 상에서 1 시간 동안 다양한 농도의 표지화된 LMB70과 함께 항온처리하였다. 세포를 세척하고 AF647 정량화 비이드(bead)와 함께 유세포분석에 의해 분석하였다. 결과로부터, 제1 표지화 이후, B_{최대값}은 세포 당 150,000 분자이고, K_d는 710 ng/mL(9.5 nM)임을 알 수 있었다. 제2 표지화 이후, B_{최대값}은 세포 당 230,000 분자이고, K_d는 1600 ng/mL(21 nM)임을 알 수 있었다.

[0193] H929 세포를 다양한 기간 동안 LMB70에 노출시켰다. 세포 생존력을 유세포분석에 의해 3 일 후 분석하였다[어넥신(Annexin) V/7AAD 염색]. 결과로부터, 높은 용량의 LMB70(100 ng/mL)에 의해, 매우 짧은 노출 시간(예를 들어, 10 분 만큼 짧은 시간)이 세포를 사멸시키기에 충분함을 알 수 있었다.

[0194] H929 세포를 100 ng/mL의 LMB70에 20 분 동안 노출시켰다. 세포 생존력을 트립판 블루 염색에 의해 분석하였다. 결과로부터, H929 세포가 노출 후 24 시간째 사멸하기 시작하였고, 모든 세포가 3 일 후에 사멸하였음을 알 수 있었다.

[0195] H929 세포를 2 ng/mL의 LMB70에 10 분 내지 72 시간의 다양한 시간 기간 동안 노출시켰다. 3 일 후, 세포 생존력을 유세포분석에 의해 분석하였다(어넥신 V/7AAD 염색). 결과로부터, 2 ng/mL의 LMB70에 의해, 세포가 노출 24 시간 이후에도 사멸되지 않았음을 알 수 있었다.

[0196] 실시예 11

[0197] 본 실시예는 H929 세포 생존력 및 성장에 대한 다양한 농도의 LMB70의 영향을 보여준다.

[0198] H929 세포를 2, 10, 및 100 ng/mL의 LMB70에 2 시간 또는 6 시간 동안 노출시켰다. 세포 생존력 및 세포 밀도를 분석하였다. 결과는 도 3a 내지 3d에 제시된다. 결과로부터, 단지 2 ng/mL의 LMB70이 약한 성장 저해를 제공하였지만 세포를 사멸시키지는 않았음을 알 수 있었다. 10 ng/mL의 LMB70은 모든 세포를 사멸시키기에 충분하지 않았고; 생존한 세포가 일정 시간 이후 성장하였다.

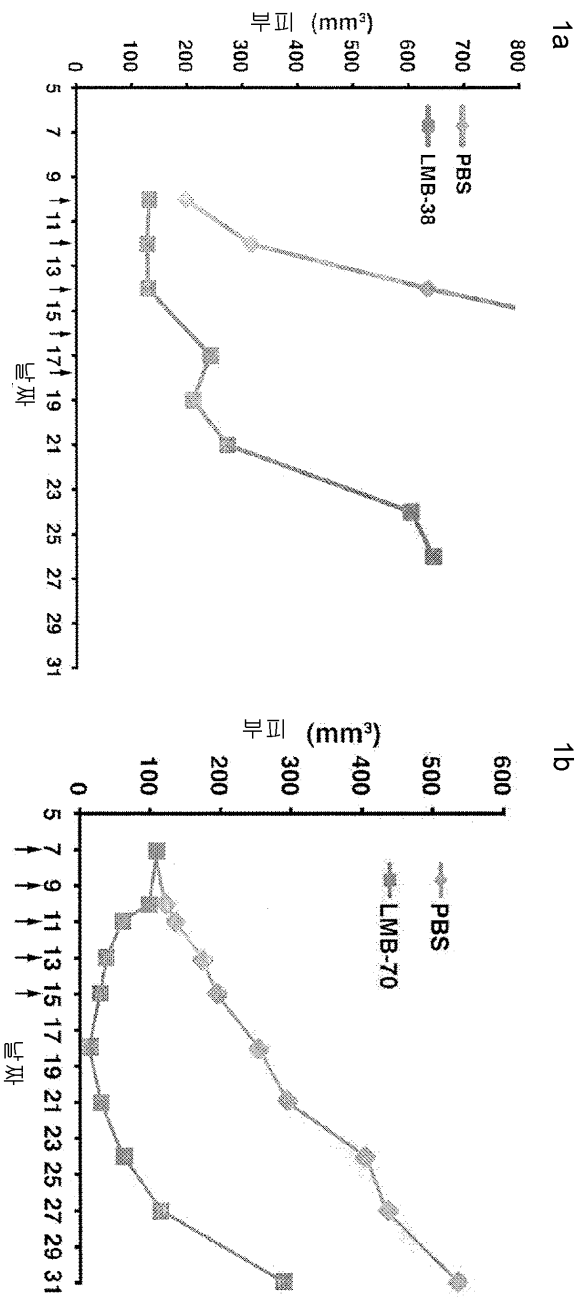
[0199] H929 세포를 0, 1, 3 또는 6 nM 보르테오미과 조합하여 0, 2, 6 또는 10 ng/mL의 LMB70에 4 시간 동안 노출시켰다. 세포 생존력 및 세포 밀도를 트립판 블루 염색에 의해 분석하였다. 결과는 도 4a 내지 4d 및 5a 내지

5d에 제시된다.

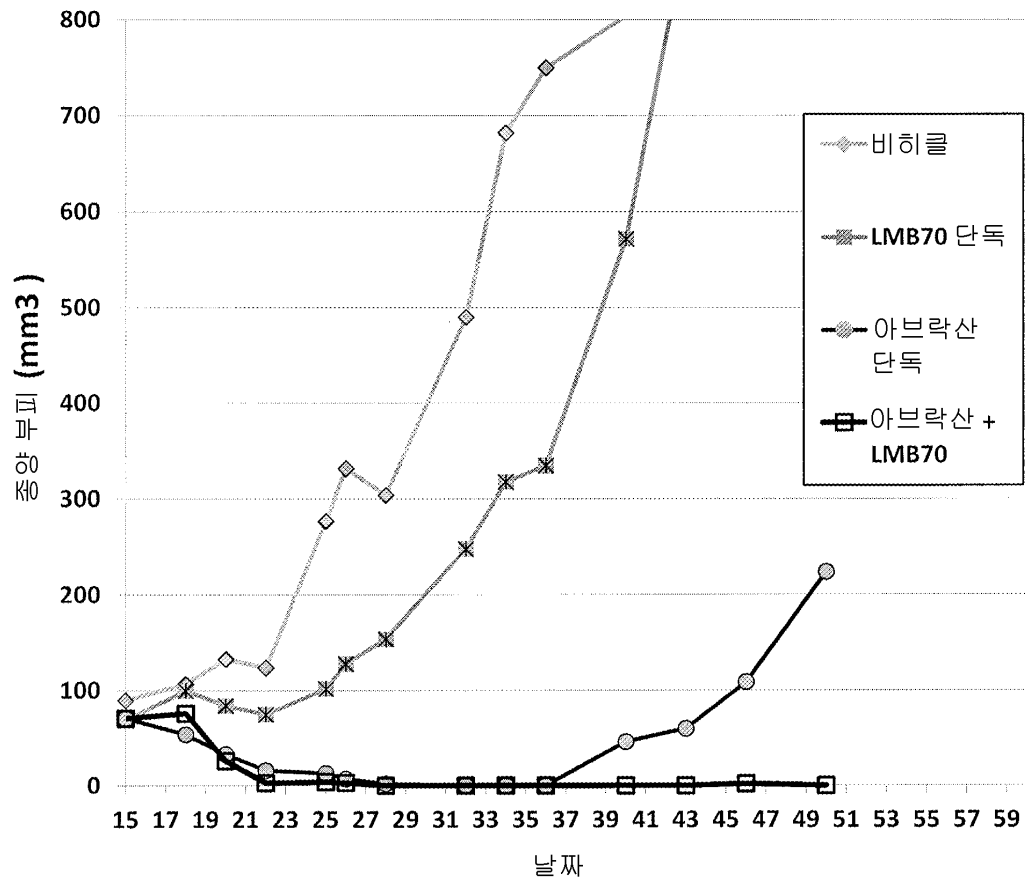
- [0200] 본원에 인용된 출판물, 특허 출원, 및 특허를 비롯한 모든 참고문헌은, 각각의 참고문헌이 개별적으로 및 구체적으로 참고로 혼입되고 그의 전체가 본원에 제시되는 것과 동일한 정도로, 본원에 참고로 혼입된다.
- [0201] 본 발명을 기재함에 있어서(특히 하기 특허청구범위와 관련하여) 단수형 용어 및 유사한 언급은, 달리 본원에 지시되거나 문맥상 명확히 모순되지 않는 한, 단수형 및 복수형 둘 다를 포함하는 것으로 이해되어야 한다. "포함하는", "갖는", "포함되는" 및 "함유하는"이라는 용어는, 달리 주지되지 않는 한, 확장가능한 용어(즉, "제한되지 않고 포함함"을 의미함)인 것으로 이해되어야 한다. 본원에서 값들의 범위에 대한 언급은, 달리 본원에 지시되지 않는 한, 단지 그 범위내에 속하는 각각의 별도의 값을 개별적으로 지칭하는 속기 방법으로서 작용하고자 할 뿐이고, 각각의 별도의 값은 이것이 개별적으로 본원에 언급되는 것과 마찬가지로 본 명세서에 혼입된다. 본원에 기재된 모든 방법은, 달리 본원에 지시되거나 문맥상 명확히 모순되지 않는 한, 임의의 적합한 순서로 수행될 수 있다. 본원에 제공된 임의의 및 모든 예, 또는 예시적인 표현(예를 들어, "예컨대")의 사용은, 단지 본 발명을 좀 더 잘 설명하려는 것이고, 달리 청구되지 않는 한, 본 발명의 범주에 제한을 두는 것이 아니다. 본 명세서에서 어떠한 표현도 임의의 청구되지 않은 요소가 본 발명의 실행에 필수적임을 지시하는 것으로 이해되어서는 안된다.
- [0202] 본 발명의 바람직한 실시태양, 예컨대 본 발명을 실행하기 위해 발명자들에게 공지된 최적의 방식이 본원에 기재되어 있다. 이들 바람직한 실시태양의 변경은 전술된 기재내용을 살펴볼 경우 당분야의 숙련가에게 분명해질 수 있다. 본 발명자들은 숙련가라면 이러한 변경을 적절히 이용할 것으로 기대하고, 본 발명자들은 본 발명이 본원에 구체적으로 기재된 것과 다르게 실행될 수 있음을 의도한다. 따라서, 본 발명은 적용가능한 법률에 의해 허용될 경우 본원에 첨부된 특허청구범위에 인용된 주제 내용의 모든 변형 및 대등물을 포함한다. 게다가, 이의 모든 가능한 변경에서 상기 기재된 요소들의 임의의 조합은, 달리 본원에 지시되거나 문맥상 명확히 모순되지 않는 한, 본 발명에 의해 포괄된다.

도면

도면1

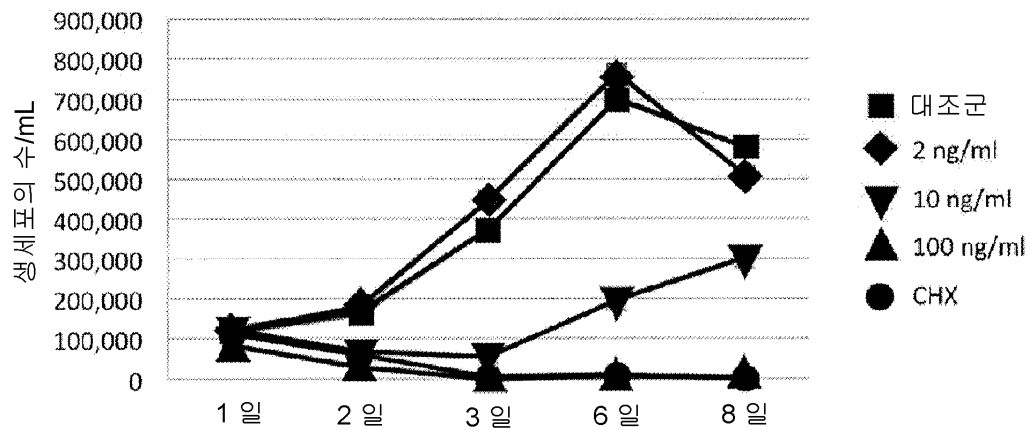


도면2

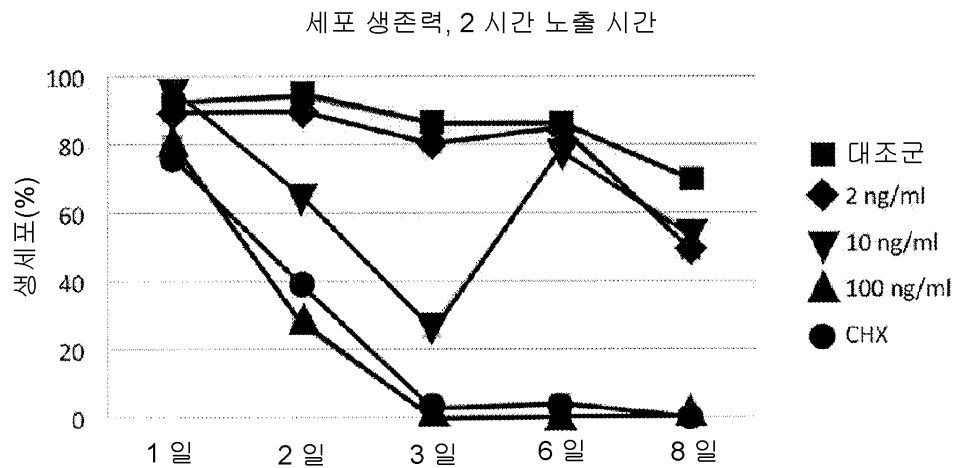


도면3a

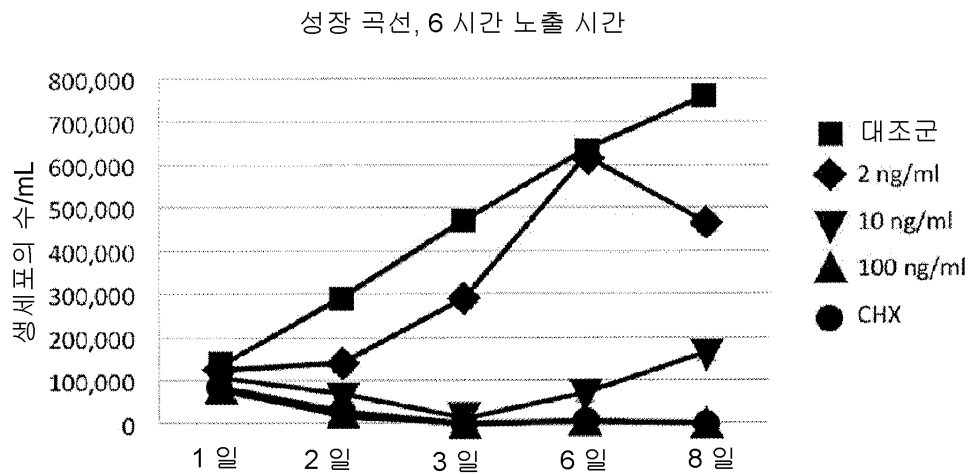
성장 곡선, 2 시간 노출 시간



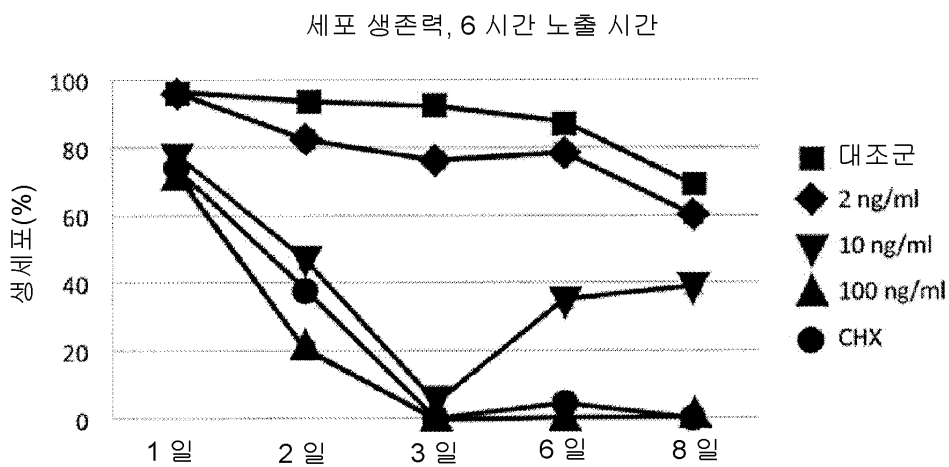
도면3b



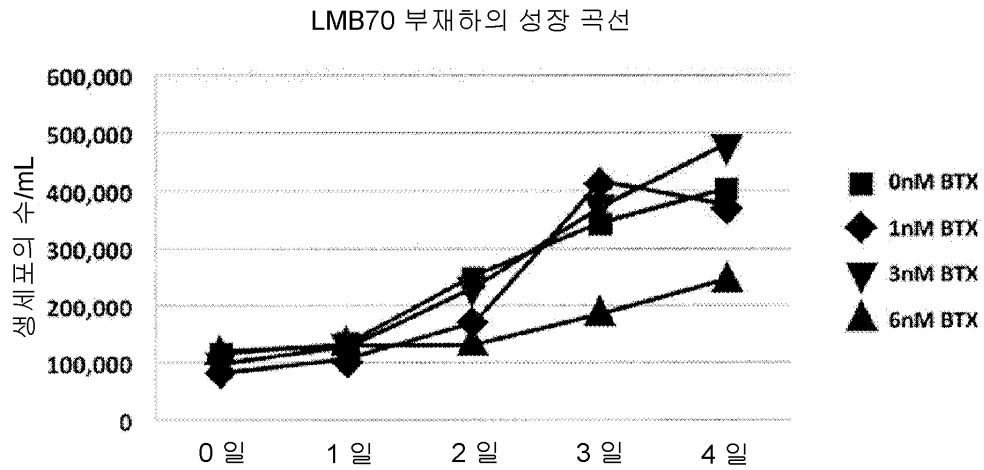
도면3c



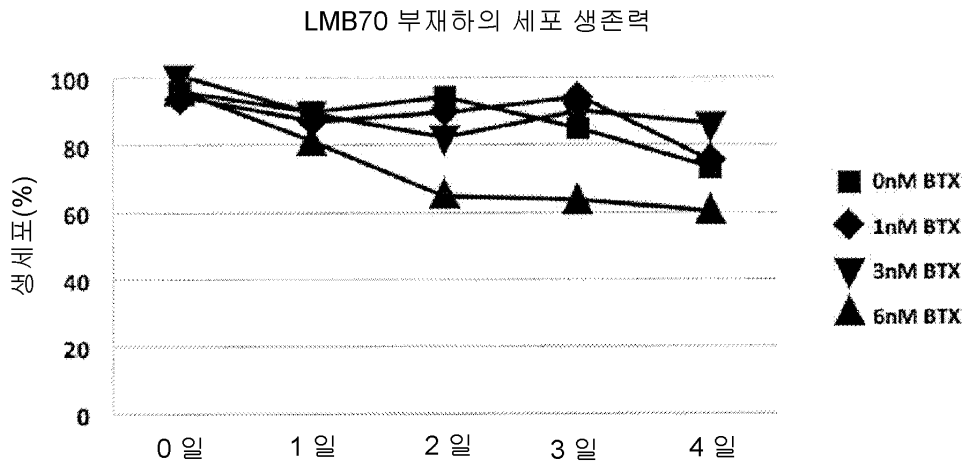
도면3d



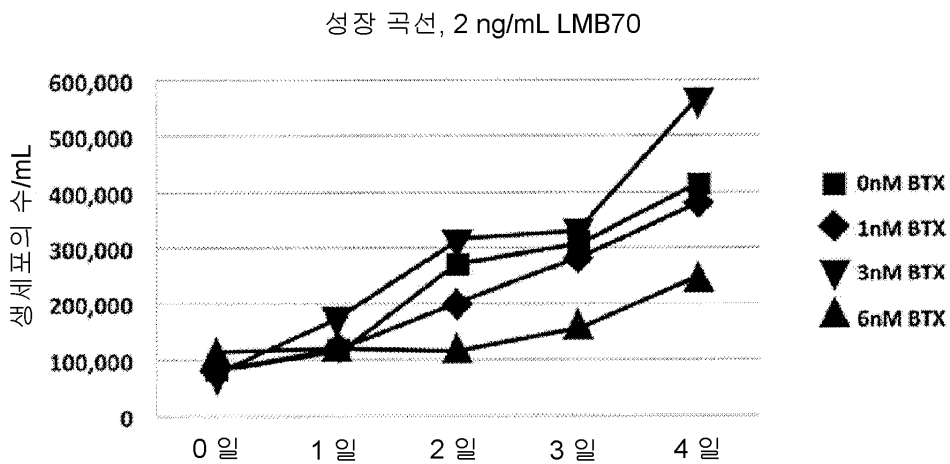
도면4a



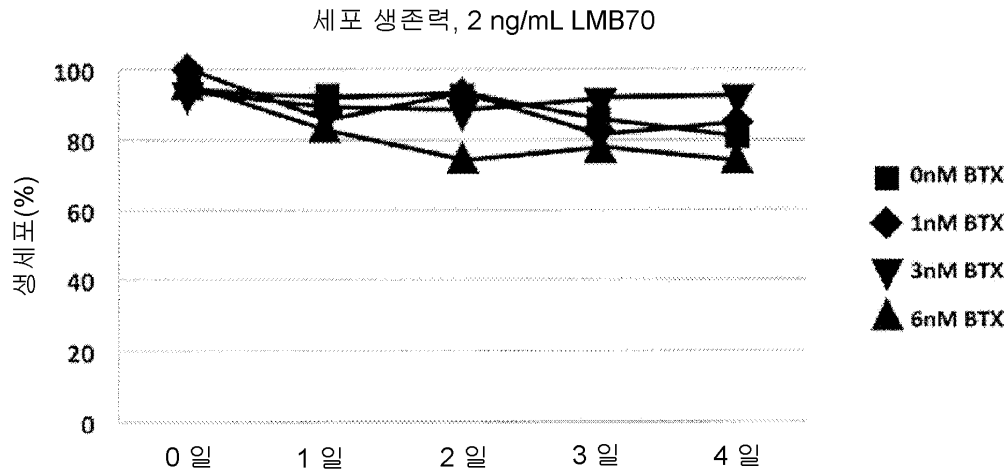
도면4b



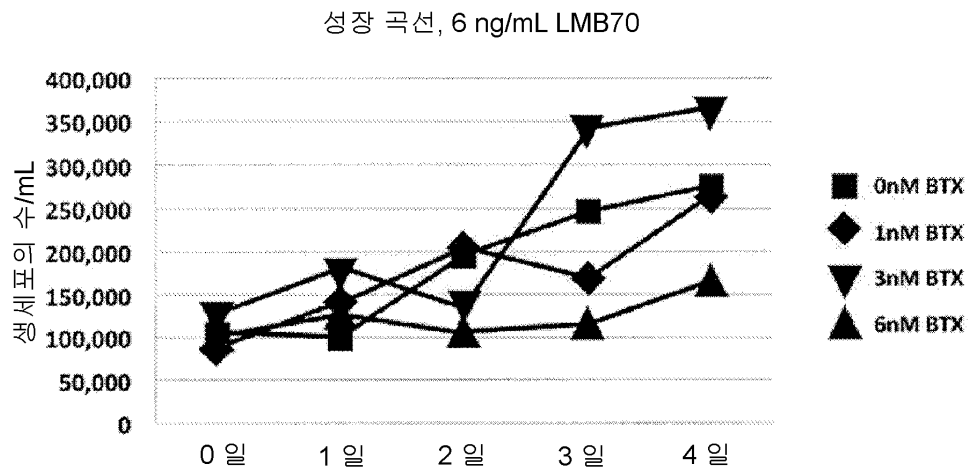
도면4c



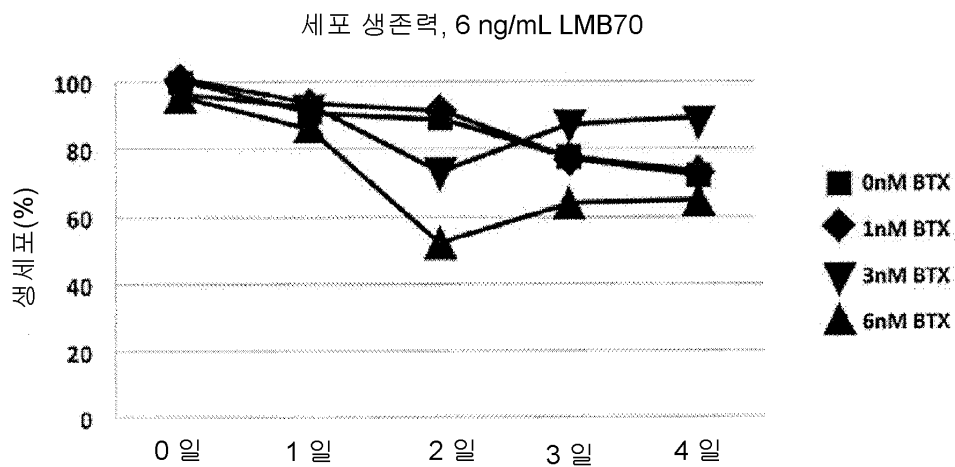
도면4d



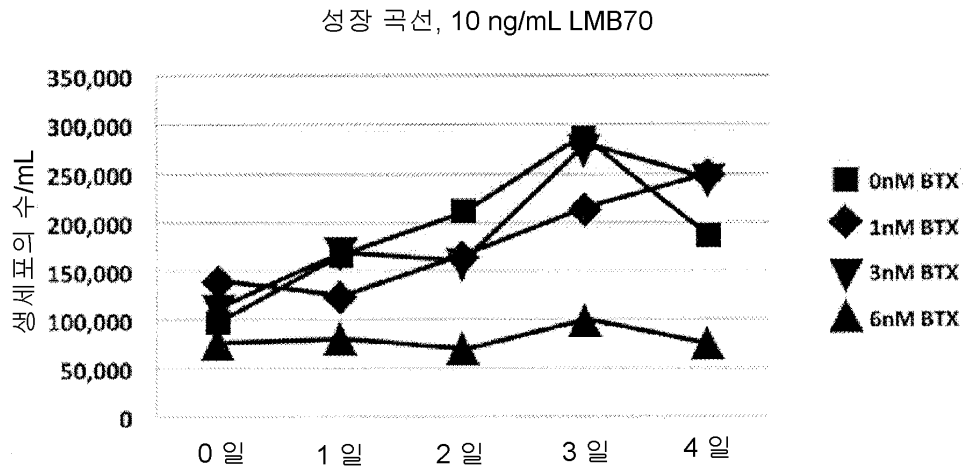
도면5a



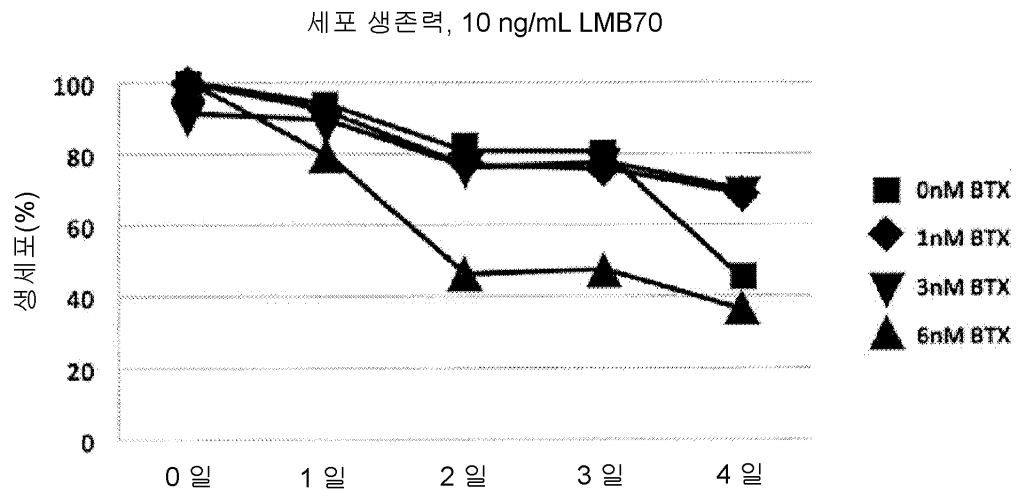
도면5b



도면5c



도면5d



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE
SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES;
SANFORD RESEARCH

<120> ANTI-BCMA POLYPEPTIDES AND PROTEINS

<130> 726736

<140> PCT/US2016/061320

<141> 2016-11-10

<150> US 62/255,255

<151> 2015-11-13

<150> US 62/257,493
 <151> 2015-11-19
 <160> 18
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 1
 Gly Asn Thr Leu Thr Asn Tyr Val

1 5
 <210> 2
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 2
 Ile Leu Pro Tyr Asn Asp Leu Thr

1 5
 <210> 3
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 3
 Thr Arg Trp Asp Trp Asp Gly Phe Phe Asp Pro

1 5 10
 <210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 4

Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr His

1 5 10

<210> 5

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 5

Ser Val Ser

1

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 6

Ser Gln Thr Ser His Ile Pro Tyr Thr

1 5

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 7

Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr

1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 8

Ile Tyr Pro Asp Asn Tyr Asn Ile

1 5
 <210> 9
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 9
 Ala Asn His Asp Phe Phe Val Phe

1 5
 <210> 10
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 10
 Gln Asp Ile Ser Asn His

1 5
 <210> 11
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 11

Tyr Thr Ser
 1
 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 12

His Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro Thr
 1 5
 <210> 13

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 13

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Val Ile His Trp Met Lys Gln Met Pro Gly Gln Gly Leu Asp Trp

35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Leu Pro Tyr Asn Asp Leu Thr Lys Tyr Asn Glu Lys

50 55 60

Phe Thr Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Ser Ala

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Thr Arg Trp Asp Trp Asp Gly Phe Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser

115 120

<210> 14

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 14

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Asn Gly Asn Thr His Leu His Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln

35 40 45
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Val Ser Asn Arg Phe Ser Glu Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80

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

<210> 15

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 15

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

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

Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Ser Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Asn His Asp Phe Phe Val Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ala Ala Lys

115

<210> 16

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 16

Met Asp Ile Gln Met Thr Gln Ala Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105

<210> 17

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 17

Gly Gly Ser

1

<210> 18

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 18

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

1

5

10