



공개특허 10-2025-0007058



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0007058
(43) 공개일자 2025년01월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 16/2878 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2024-7043460(분할)

(22) 출원일자(국제) 2016년08월16일
심사청구일자 없음

(62) 원출원 특허 10-2018-7007297
원출원일자(국제) 2016년08월16일
심사청구일자 2021년08월10일

(85) 번역문제출일자 2024년12월30일

(86) 국제출원번호 PCT/US2016/047146

(87) 국제공개번호 WO 2017/031104
국제공개일자 2017년02월23일

(30) 우선권주장
62/206,246 2015년08월17일 미국(US)

(71) 출원인
안센 바이오테크 인코포레이티드
미국 펜실베이니아주 19044 호샴 럿지뷰 드라이브
800/850

(72) 발명자
필라리세티 코단다람
미국 19477 펜실베이니아주 스프링하우스 맥Ken 로드 1400
볼드윈 에릭 토마스
미국 19477 펜실베이니아주 스프링하우스 맥Ken 로드 1400
(뒷면에 계속)

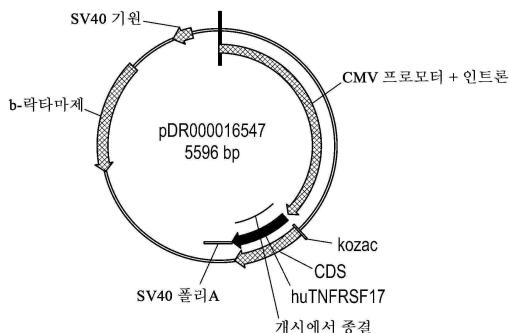
(74) 대리인
특허법인한성

전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 발명의 명칭 BCMA와 CD3에 결합하는 이중특이성 항원 결합 분자인 항-BCMA 항체, 및 이들의 용도

(57) 요약

BCMA에 면역특이적으로 결합하는 항체가 본 명세서에 제공된다. 또한, 제공된 BCMA-특이적 항체 또는 항원-결합 단편을 암호화할 수 있는 관련 폴리뉴클레오티드, 제공된 항체 또는 항원-결합 단편을 발현하는 세포, 및 관련 백터 및 검출가능하게 표지된 항체 또는 항원-결합 단편도 기재되어 있다. 또한, 제공된 항체의 사용 방법이 기재되어 있다. 예를 들어, 제공된 항체는 BCMA-발현 암의 진행, 퇴행 또는 안정성을 진단하거나, 치료하거나, 모니터링하거나; 환자가 암에 대해 치료되어야 하는지 여부를 결정하거나; 대상이 BCMA-발현 암을 앓고 있고 이에 따라 BCMA-특이적 항암 치료제, 예컨대 본 명세서에 기재된 BCMA 및 CD3에 대한 다중특이성 항체를 사용한 치료에 적합할 수 있는지 여부를 결정하기 위해 사용될 수 있다.

대 표 도

(52) CPC특허분류

C07K 16/2809 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

(72) 발명자

파워스 고든 디.

미국 19477 펜실베이니아주 스프링하우스 맥Ken 로

드 1400

카르도소 로사 마리아 폐르난데스

미국 19477 펜실베이니아주 스프링하우스 맥Ken 로

드 1400

아타르 리카도

미국 19477 펜실베이니아주 스프링하우스 맥Ken 로
드 1400

고넷 프랑수아

미국 19477 펜실베이니아주 스프링하우스 맥Ken 로
드 1400

명세서

청구범위

청구항 1

B-세포 성숙 항원(BCMA)에 면역 특이적으로 결합하는 재조합 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 상기 항체는 중쇄 및 경쇄를 가지며,

상기 중쇄는 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 및 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3을 포함하고;

상기 경쇄는 서열 번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열 번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 및 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하는 것인, 재조합 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 2

B-세포 성숙 항원(BCMA)에 면역 특이적으로 결합하는 재조합 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 상기 항체는 중쇄와 경쇄를 가지며, 상기 중쇄가 서열 번호 27의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄가 서열 번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 재조합 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함되는, 2015년 8월 17일자로 출원된 미국 가특허 출원 제 62/206,246호의 이익을 주장한다.

[0002] **서열 목록**

[0003] 본 출원은 ASCII 서식으로 전자 제출된 서열 목록을 포함하며, 이는 본 명세서에 전체적으로 참고로 포함된다. 2016년 8월 15일자로 생성된 상기 ASCII 사본은 파일명이 PRD3383USNP_SL.txt이며, 크기가 87,341 바이트이다.

[0004] 기술분야

[0005] 본 명세서에 제공된 본 발명은 B-세포 성숙 항원 (BCMA)에 면역특이적으로 결합하는 단일클론 항체, BCMA 및 클러스터 결정인자 3 (CD3; cluster determinant 3)에 면역특이적으로 결합하는 다중특이성 항체, 및 기재된 항체를 생성 방법 및 사용 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0006] BCMA, CD269, TNFRSF17 (유니프로트 Q02223)로도 알려진 B-세포 성숙 항원은 분화된 형질 세포에서 우선적으로 발현되는 종양 괴사 수용체 수퍼페밀리의 구성원이다 (문헌[Laabi et al. (1992) EMBO J 11(11):3897-3904]; 문헌[Madry et al. (1998) Int Immunol 10(11):1693-1702]). BCMA는 B 세포 성숙, 성장 및 생존에 관여하는 비글리코실화 I형 막관통 단백질이다. BCMA는 TNF 수퍼페밀리의 두 가지 리간드에 대한 수용체이다: BCMA에 고 친화도 리간드인 APRIL (증식-유도 리간드, CD256, TNFSF13), 및 BCMA에 저친화도 리간드인 B 세포 활성인자 BAFF (THANK, BlyS, B 립프구 자극제, TALL-1 및 zTNF4). APRIL 및 BAFF는 구조적 유사성 및 중복되지만 다른 수용체 결합 특이성을 나타낸다. 음성 조절자 TACI는 또한 BAFF 및 APRIL 모두에 결합한다. BCMA 및/또는 TACI에 대한 APRIL 및 BAFF의 배위 결합은 전사 인자 NF-κB를 활성화시키고, 전생존성(pro-survival) Bcl-2 패밀리 구성원 (예를 들어 Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1)의 발현을 증가시키며, 전세포자멸 인자 (예를 들어 Bid, Bad, Bik, Bim, 등)의 발현을 하향 조절하여, 세포자멸을 억제하고, 생존을 촉진한다. 이러한 작용은 조합하여 B 세포 분화, 증식, 생존 및 항체 생성을 촉진한다 (문헌[Rickert RC et al., Immunol Rev (2011) 244 (1): 115-133]에 검토된 바와 같음). 이러한 발견에 따라, BCMA는 또한 다발성 골수종 (MM) 세포를 포함하는 악성 인간 B 세포의 성장 및 생존을 돋는다. 노박 등은 MM 세포주 및 새로 단리된 MM 세포가 이들의 세포 표면 상에 BCMA 및 TACI 단백질을 발현하고, 이들의 세포 표면 상에 BAFF-R 단백질의 가변적인 발현을 가짐을

발견하였다 (문헌[Novak et al., (2004) Blood 103(2):689-694]).

[0007] 다발성 골수종 (MM)은 두 번째로 흔한 혈액학적 악성종양으로 모든 암 사망의 2%를 차지한다. MM은 이질적 질환으로 염색체 전좌, 그 중에서도 주로 t(11; 14), t(4; 14), t(8;14), del(13), del(17)에 의해 발생한다 (문헌 [Drach et al., (1998) Blood 92(3):802-809]; 문헌[Gertz et al., (2005) Blood 106(8):2837-2840]; 문헌 [Facon et al., (2001) Blood 97(6): 1566-1571]). MM에 감염된 환자는 골수 침윤, 골 파괴, 신부전, 면역결핍 및 암 진단의 사회심리적 부담으로 인한 다양한 질환 관련 증상을 경험할 수 있다. 2006년부로, MM의 경우 5년 상대 생존율은 약 34%이었다는 사실은 MM이 현재 치료 옵션(curative option)이 없는 치료하기 어려운 질환임을 강조한다.

[0008] 림프종 및 다발성 골수종의 치료를 위한 항-BCMA 항체의 사용이 WO2002066516 및 WO2010104949에 언급되어 있다. BCMA에 대한 항체가, 예를 들어, 문헌[Gras M-P. et al. Int Immunol. 7 (1995) 1093-1106], WO200124811 및 WO200124812에 기재되어 있다. 그럼에도 불구하고, BCMA, BAFF-R 및 TACI, 즉, TNF 수용체 수퍼페밀리에 속하는 B 세포 수용체, 및 이들의 리간드 BAFF 및 APRIL이 암에 대항하여 싸우는 요법의 대상이라는 사실에도 불구하고, 이러한 의학적 상태의 치료를 위한 이용가능한 추가의 옵션이 여전히 필요하다.

발명의 내용

[0009] BCMA에 면역특이적으로 결합하는 항체 및 이들의 항원-결합 단편이 본 명세서에 제공된다. 또한, 제공된 BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편을 암호화할 수 있는 관련 폴리뉴클레오티드, 제공된 항체 및 항원-결합 단편을 발현하는 세포, 및 관련 벡터 및 검출가능하게 표지된 항체 및 항원-결합 단편도 기재되어 있다. 게다가, 제공된 항체 및 항원-결합 단편의 사용 방법이 기재되어 있다. 예를 들어, BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편은 BCMA-발현 암을 진단하거나 이의 진행, 퇴행 또는 안정성을 모니터링하기 위해 사용되거나; 환자가 암에 대해 치료되어야 하는지 여부를 결정하기 위해 사용되거나; 대상이 BCMA-발현 암을 앓고 있고 이에 따라 BCMA-특이적 항암 치료제, 예컨대 본 명세서에 기재된 BCMA 및 CD3에 대한 다중특이성 항체를 사용한 치료에 적합할 수 있는지 여부를 결정하기 위해 사용될 수 있다.

[0010] BCMA 및 CD3에 면역특이적으로 결합하는 다중특이성 항체 및 이들의 다중특이성 항원-결합 단편이 본 명세서에 추가로 제공된다. 또한, 제공된 BCMA × CD3 다중특이성 항체를 암호화할 수 있는 관련 폴리뉴클레오티드, 제공된 항체를 발현하는 세포, 및 관련 벡터 및 검출가능하게 표지된 다중특이성 항체도 기재되어 있다. 게다가, 제공된 다중특이성 항체의 사용 방법이 기재되어 있다. 예를 들어, BCMA × CD3-다중특이성 항체는 BCMA-발현 암을 진단하거나 이의 진행, 퇴행 또는 안정성을 모니터링하기 위해 사용되거나; 환자가 암에 대해 치료되어야 하는지 여부를 결정하기 위해 사용되거나; 대상이 BCMA-발현 암을 앓고 있고 이에 따라 BCMA-특이적 항암 치료제, 예컨대 본 명세서에 기재된 BCMA × CD3-다중특이성 항체를 사용한 치료에 적합할 수 있는지 여부를 결정하기 위해 사용될 수 있다.

BCMA-특이적 항체

[0012] BCMA에 특이적인 재조합 항체 및 항원-결합 단편이 본 명세서에 기재되어 있다. 일부 실시 형태에서, BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편은 인간 BCMA에 결합한다. 일부 실시 형태에서, BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편은 인간 BCMA 및 사이노몰거스 원숭이(cynomolgus monkey) BCMA에 결합한다. 일부 실시 형태에서, BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편은 BCMA 세포의 도메인 (ECD)으로부터의 하나 이상의 잔기를 포함하는 에피토프(epitope)에 결합한다. 이러한 BCMA-특이적 항체 또는 항원-결합 단편은 ELISA로 측정시 5.9 nM 이상의 IC₅₀으로 APRIL-결합을 차단할 수 있다.

[0013] 표 1은 본 명세서에 기재된 일부 BCMA-특이적 항체의 예의 요약을 제공한다:

[0014]

[표 1]

인간 BCMA에 대해 생성된 mAb의 CDR 서열
(열거된 서열 각각에 대한 서열 번호가괄호 안에 제공되어 있음)

번호	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
BCMB69	SGSYFWG (4)	SIYYSGITYYYNPSLKS (5)	HDGAVAGLFDY (6)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB117	SGSYFWG (4)	SIYYSGITYYYNPSLKS (5)	HDGAVAGLFDY (6)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB123	SSYYFWG (7)	SIYYSGITYYYNPSLKS (5)	HDGAVAGLFDY (6)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB128	SGSYFWG (4)	SIYYSGITYYYNPSLKS (5)	HDGATAGLFDY (19)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB129	SGSYFWG (4)	SIYYSGSTYYNPSLKS (8)	HDGAVAGLFDY (6)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB176	SSYYFWG (13)	SIYYSGITYYYNPSLKS (5)	HDGATAGLFDY (19)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB177	SSYYFWG (13)	SIYYSGSTYYNPSLKS (8)	HDGATAGLFDY (19)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)

[0015]

[0016] 일부 실시 형태에서는, 표 1에 기재된 항체 중 어느 하나의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 중쇄를 포함하는 BCMA-특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 제공된다. 일부 실시 형태에서는, 표 1에 기재된 항체 중 어느 하나의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 중쇄 및 표 1에 기재된 항체들 중 어느 하나의 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하는 경쇄를 포함하는 BCMA-특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 제공된다.

[0017]

IgG 부류는 인간에서 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 4가지 동종형으로 세분된다. 이들은 Fc 영역의 아미노산 서열에서 95% 초과의 상동성을 공유하지만, 힌지(hinge) 영역의 아미노산 조성 및 구조에서 큰 차이를 보인다. Fc 영역은 효과기 기능, 예컨대 항체-의존성 세포성 세포독성(ADCC) 및 보체-의존성 세포독성(CDC)을 매개한다. ADCC에서는, 항체의 Fc 영역이 자연 살해세포 및 대식세포와 같은 면역 효과기 세포의 표면 상의 Fc 수용체(FcγR)에 결합하여, 표적화된 세포의 죽음세포작용 또는 용해로 이어진다. CDC에서는, 항체가 세포 표면에서 보체 캐스케이드(complement cascade)를 촉발시킴으로써 표적화된 세포를 사멸시킨다. 본 명세서에 기재된 항체는, 상이한 효과기 기능을 탈성하도록 Fc 서열이 변형되어 있는 변형된 버전을 포함하는, IgG 동종형 중 임의의 것과 조합된 가변 도메인의 기재된 특징을 갖는 항체를 포함한다.

[0018]

치료용 항체의 많은 응용에 있어서, Fc-매개 효과기 기능은 작용 기전의 일부가 아니다. 이러한 Fc-매개 효과기 기능은 유해할 수 있으며 탈기전 독성을 야기함으로써 잠재적으로 안전성 위험을 초래할 수 있다. Fc 영역을 유전자조작하여(engineering) FcγR 또는 보체 인자에 대한 이들의 결합을 감소시킴으로써 효과기 기능의 변형을 달성할 수 있다. 활성화 FcγR (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa 및 FcγRIIIb) 및 억제성 FcγR (FcγRIIb) 또는 제1 보체 성분 (C1q)에 대한 IgG의 결합은 힌지 영역 및 CH2 도메인에 위치된 잔기에 의존한다. Fc 기능성을 감소시키거나 침묵시키기(silence) 위해 돌연변이가 IgG1, IgG2 및 IgG4에 도입되어 왔다. 본 명세서에 기재된 항체는 이러한 변형을 포함할 수 있다.

[0019]

일 실시 형태에서, 항체는 하기 특성 중 하나 이상을 갖는 Fc 영역을 포함한다: (a) 모(parent) Fc와 비교하여 감소된 효과기 기능; (b) Fcγ RI, Fcγ RIIa, Fcγ RIIb, Fcγ RIIIb 및/또는 Fcγ RIIIa에 대한 감소된 친화도; (c) FcγRI에 대한 감소된 친화도; (d) FcγRIIa에 대한 감소된 친화도; (e) FcγRIIb에 대한 감소된 친화도; (f) Fcγ RIIb에 대한 감소된 친화도; 또는 (g) FcγRIIIa에 대한 감소된 친화도.

[0020]

일부 실시 형태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 IgG 또는 이들의 유도체, 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 동종형이다. 항체가 IgG4 동종형을 갖는 일부 실시 형태에서, 항체는 이의 Fc 영역 내에 K409R, S228P, L234A 및 L235A 치환을 함유한다. 본 명세서에 기재된 항체는 이러한 변형을 포함할 수 있다.

[0021]

일부 실시 형태에서, 기재된 항체는 ELISA로 측정시 5.9 nM의 IC₅₀으로 APRIL 결합을 억제할 수 있다.

[0022]

일부 실시 형태에서, 기재된 항체는 BCMA-양성 다발성 골수종 세포주에 결합한다.

[0023]

기재된 BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편에 더하여, 기재된 항체 및 항원-결합 단편을 암호화할 수 있는 폴리뉴클레오티드 서열이 또한 제공된다. 기재된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터가 또한 제공되며, 마찬가지로 BCMA-특이적 항체 또는 항원-결합 단편을 발현하는 세포도 본 명세서에 제공된다. 개시된 벡터를 발현할 수 있는 세포가 또한 기재되어 있다. 이러한 세포는 포유류 세포 (예컨대, 293F 세포, CHO 세포), 곤충 세포 (예컨대, Sf7 세포), 효모 세포, 식물 세포 또는 세균 세포 (예컨대, 대장균(*E. coli*))일 수 있다. 기재된 항체는 또한 하이브리도마(hybridoma) 세포에 의해 생성될 수 있다.

[0024]

BCMA-특이적 항체의 사용 방법

[0025]

기재된 BCMA-특이적 항체 또는 항원-결합 단편의 사용 방법이 또한 개시되어 있다. 이러한 섹션에서 논의된 방법에 사용하기 위한 특정 항체에는 표 1의 항체에 대해 기재된 CDR의 세트를 갖는 것들이 포함된다. 예를 들어, 이러한 항체 또는 항원-결합 단편은 BCMA-수용체 상호작용을 방해하거나, 항체를 독소에 접합시켜 독소가 BCMA-발현 암을 표적화함으로써 암을 치료하는 데 유용할 수 있다. 또한, 이러한 항체 또는 항원-결합 단편은 생물학적 샘플, 예컨대 혈액 또는 혈청에서 BCMA의 존재를 검출하거나; 생물학적 샘플, 예컨대 혈액 또는 혈청 중의 BCMA의 양을 정량화하거나; BCMA-발현 암을 진단하거나; 암을 앓고 있는 대상의 치료 방법을 결정하거나; 대상에서 BCMA-발현 암의 진행을 모니터링하는 데 유용할 수 있다. 일부 실시 형태에서, BCMA-발현 암은 펌프 종, 예컨대 다발성 골수종 (MM)일 수 있다. 기재된 방법은 대상이 BCMA-발현 암에 대한 치료, 예컨대 BCMA 및 CD3에 대한 다중특이성 항체에 의한 치료를 받기 전에 수행될 수 있다. 뿐만 아니라, 기재된 방법은 대상이 BCMA-발현 암에 대한 치료, 예컨대 본 명세서에 기재된 BCMA 및 CD3에 대한 다중특이성 항체에 의한 치료를 받은 후에 수행될 수 있다.

[0026]

생물학적 샘플에서 BCMA를 검출하는 기재된 방법은 생물학적 샘플을 본 명세서에 기재된 하나 이상의 BCMA-특이적 항체 또는 항원-결합 단편에 노출시키는 단계를 포함한다.

[0027]

대상에서 BCMA-발현 암의 기재된 진단 방법은 또한 생물학적 샘플을 본 명세서에 기재된 하나 이상의 BCMA-특이적 항체 또는 항원-결합 단편에 노출시키는 단계를 포함하지만; 본 방법은 또한 샘플에 존재하는 BCMA의 양을 정량화하는 단계; 샘플에 존재하는 BCMA의 양을 알려진 표준 또는 기준 샘플과 비교하는 단계; 및 대상의 BCMA 수준이 암과 관련된 BCMA 수준에 속하는지 여부를 결정하는 단계를 포함한다.

[0028]

또한, 대상에서 BCMA-발현 암을 모니터링하는 방법이 본 명세서에 기재되어 있다. 기재된 방법은 생물학적 샘플을 본 명세서에 기재된 하나 이상의 BCMA-특이적 항체 또는 항원-결합 단편에 노출시키는 단계; 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 의해 결합된 샘플에 존재하는 BCMA의 양을 정량화하는 단계; 샘플에 존재하는 BCMA의 양을 알려진 표준 또는 기준 샘플, 또는 대상에서 이전에 획득한 유사한 샘플 중의 BCMA의 양과 비교하는 단계; 및 대상의 BCMA 수준이 비교된 샘플 중 BCMA의 양의 차이에 기초하여 암 진행, 퇴행 또는 안정된 질환을 나타내는지 여부를 결정하는 단계를 포함한다.

[0029]

대상으로부터 획득되거나 유래된 샘플은 소변, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 복수, 순환 세포, 순환 종양 세포, 조직과 관련되지 않은 세포, 조직, 외과적으로 절제된 종양 조직, 생검, 미세 바늘 흡인 샘플 또는 조직학적 자제물과 같은 생물학적 샘플이다.

[0030]

기재된 BCMA-특이적 항체 또는 항원-결합 단편은 기재된 방법 또는 당업자에게 알려진 다른 방법과 함께 사용하기 위해 표지될 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 방사성표지, 형광표지, 에피토프 태그, 비오틴, 발색단 표지, ECL 표지, 효소, 루테늄, ¹¹¹In-DOTA, ¹¹¹In-다이에틸렌트라이아민펜타아세트산(DTPA), 고추냉이 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제 및 베타-갈락토시다제, 또는 폴리-히스티딘 또는 당업계에 알려진 유사한 이러한 표지로 표지될 수 있다.

[0031]

BCMA-특이적 항체 키트

[0032]

개시된 BCMA-특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 키트가 본 명세서에 기재되어 있다. 기재된 키트는 본 명세서에 제공된 BCMA-특이적 항체 또는 항원-결합 단편의 사용 방법 또는 당업자에게 알려진 다른 방법을 수행하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 기재된 키트는 본 명세서에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편 및 생물학적 샘플에서 BCMA의 존재를 검출하는 데 사용하기 위한 시약을 포함할 수 있다. 따라서, 기재된 키트는 본 명세서에 기재된 바와 같이, 본 명세서에 기재된 하나 이상의 항체 또는 이의 항원-결합 단편(들), 및 사용 중이 아닌 경우 항체 또는 단편을 담기 위한 용기, 및/또는 항체 또는 단편, 고체 지지체에 부착된 항체 또는 단편 및/또는 항체 또는 단편의 검출가능하게 표지된 형태를 사용하기 위한 설명서를 포함할 수 있다.

[0033]

BCMA × CD3-다중특이성 항체

[0034]

TCR/CD3 복합체를 통한 BCMA를 발현하는 MM 세포로의 T-림프구의 방향전환(redirection)은 매력적인 대안적 접근법을 제시한다. T-림프구의 TCR/CD3 복합체는 CD3 표지된 감마 (γ), 델타 (δ), 앱실론 (ϵ), 제타 (ζ) 및 에타 (η)의 불변 서브유닛과 함께 세포 표면에서 공발현되는 TCR 알파 (α)/베타 (β) 또는 TCR 감마 (γ)/델타 (δ) 이종이량체로 구성된다. 인간 CD3 ϵ 가 유니프로트 P07766 (CD3E_인간)으로 기재되어 있다. 최신 기술에 기재된 항CD3 ϵ 항체는 SP34이다 (문헌[Yang SJ, The Journal of Immunology (1986) 137; 1097-1100]). SP34는 영장류 및 인간 CD3 모두와 반응한다. SP34는 파밍겐(Pharmingen)으로부터 입수 가능하다. 최신 기술에

기재된 또 다른 항CD3 항체는 UCHT-1이다 (WO2000041474 참조). 최신 기술에 기재된 또 다른 항CD3 항체는 BC-3이다 (문헌[Fred Hutchinson Cancer Research Institute; used in Phase I/II trials of GvHD, Anasetti et al., Transplantation 54: 844 (1992)])]. UCHT-1 및 BC-3이 ϵ 및 γ 사슬 둘 모두에 의해 기여되는 에피토프를 인식하는 반면에 SP34는 CD3의 ϵ 사슬에만 존재하는 에피토프를 인식한다는 점에서 SP-34는 UCHT-1 및 BC-3과 다르다 (문헌[Salmeron et al., (1991) J. Immunol. 147: 3047] 참조). 항체 SP34의 서열과 동일한 서열을 갖는 항체의 서열이 WO2008119565, WO2008119566, WO2008119567, WO2010037836, WO2010037837 및 WO2010037838에 언급되어 있다. 항체 SP34의 중쇄 가변적인 도메인 (VH)과 96% 동일한 서열이 US8236308 (WO2007042261)에 언급되어 있다.

[0035] CD3 및 BCMA에 대한 다양한 이중특이성 항체가 WO2007117600, WO2009132058, WO2012066058, WO2012143498, WO2013072406, WO2013072415 및 WO2014122144에 언급되어 있다. 그러나, 임상으로 발전을 기술하는 데이터는 현재 이용가능하지 않다.

[0036] BCMA 및 CD3 ("BCMA \times CD3 다중특이성 항체") 및 이들의 다중특이성 항원-결합 단편에 결합하는 재조합 다중특이성 항체가 본 명세서에 기재되어 있다. 일부 실시 형태에서, BCMA에 면역특이적으로 결합하는 재조합 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 제공된다.

[0037] 일부 실시 형태에서, 다중특이성 항체의 BCMA-특이적 아암(arm)은 인간 BCMA 및/또는 사이노몰거스 원숭이 BCMA에 결합한다. 일부 실시 형태에서, BCMA \times CD3 다중특이성 항체 또는 항원-결합 단편의 BCMA-특이적 아암은 인간 BCMA의 세포외 도메인에 결합한다. 바람직한 실시 형태에서, BCMA \times CD3 다중특이성 항체 또는 항원-결합 단편은 이중특이성 항체 또는 항원-결합 단편이다. 일부 실시 형태에서, a) 제1 중쇄 (HC1); b) 제2 중쇄 (HC2); c) 제1 경쇄 (LC1); 및 d) 제2 경쇄 (LC2)를 포함하며, HC1과 LC1이 쌍을 이루어 BCMA에 면역특이적으로 결합하는 제1 항원-결합 부위를 형성하고, HC2와 LC2가 쌍을 이루어 CD3에 면역특이적으로 결합하는 제2 항원-결합 부위를 형성하는, 재조합 BCMA \times CD3 이중특이성 항체 또는 이의 BCMA \times CD3-이중특이성 결합 단편이 제공된다. 다른 실시 형태에서, 항체 또는 이중특이성 결합 단편을 발현하는 재조합 세포가 제공된다. 일부 실시 형태에서, BCMA \times CD3 다중특이성 항체의 BCMA-결합 아암 (또는 "BCMA-특이적 아암")은 본 명세서에 기재된 BCMA 항체로부터 (예를 들어, 표 1에 열거된 CDR 서열을 갖는 항체로부터) 유래된다.

[0038] 일부 실시 형태에서, BCMA \times CD3 다중특이성 항체 또는 항원-결합 단편의 BCMA-특이적 아암은 IgG 또는 이의 유도체이다. 일부 실시 형태에서, 기재된 BCMA \times CD3 다중특이성 항체는 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정될 때 0.18 nM 이상의 해리 상수로 BCMA에 결합할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 기재된 BCMA \times CD3-다중특이성 항체는 작용제가 아니다. 일부 실시 형태에서, 기재된 BCMA \times CD3-다중특이성 항체는 10 nM 미만의 농도에서 NF- κ B 활성화를 변경하지 않는다.

[0039] 일부 실시 형태에서, BCMA \times CD3 다중특이성 항체의 CD3-결합 아암 (또는 "CD3-특이적 아암")은 마우스 IgG3/람다 동종형인 마우스 단일클론 항체 SP34로부터 유래된다. (문헌[K.R. Abhinandan and A. C. Martin, 2008. Mol. Immunol. 45, 3832-3839]). 일부 실시 형태에서, BCMA \times CD3 다중특이성 항체의 CD3-결합 아암은 표 2로부터 선택되는 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄를 포함한다.

[0040] [표 2]

CD3-특이적 항체 및 항원-결합 단편의 중쇄 및 경쇄.

중쇄	경쇄
CD3B219 (서열 번호 55): EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAM NWVRQAPGKGLEWVARISKYNNYATYYAASVK GRFTISRDDSNSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHG NFGNSYVSWFAYWGQGTLTVTSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGAL TSGVHTFPVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYT CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPEAAGG PSVFLFPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPVQYTLPPSQEEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLYYSKSLTV KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSSLGLK	CD3B219 (서열 번호 56): QTVVTQEPQLTVSPGGTVTLCRSSTGAV TTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRA PGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEA EYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPK AAPSVTLPSSSEELQANKATLVCLISDFY PGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQS NNKYAASSYSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS
CDR 1: TYAMN (서열 번호 59)	CDR 1: RSSTGAVTTSNYAN (서열 번호 62)
CDR 2: RIRSKYNNYATYYAASVKG (서열 번호 60)	CDR 2: GTNKRAP (서열 번호 63)
CDR 3: HGNFGNSYVSWFAY (서열 번호 61)	CDR 3: ALWYSNLWV (서열 번호 64)

[0041] IgG 부류는 인간에서 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 4가지 동종형으로 세분된다. 이들은 Fc 영역의 아미노산 서열

에서 95% 초과의 상동성을 공유하지만, 헌지 영역의 아미노산 조성 및 구조에서 큰 차이를 보인다. Fc 영역은 효과기 기능, 예컨대 항체-의존성 세포성 세포독성(ADCC) 및 보체-의존성 세포독성(CDC)을 매개한다. ADCC에서는, 항체의 Fc 영역이 자연 살해세포 및 대식세포와 같은 면역 효과기 세포의 표면 상의 Fc 수용체(FcgR)에 결합하여, 표적화된 세포의 식세포작용 또는 용해로 이어진다. CDC에서는, 항체가 세포 표면에서 보체 캐스케이드를 촉발시킴으로써 표적화된 세포를 사멸시킨다.

[0043] 치료용 항체의 많은 응용에 있어서, Fc-매개 효과기 기능은 작용 기전의 일부가 아니다. 이러한 Fc-매개 효과기 기능은 유해할 수 있으며 탈기전 독성을 야기함으로써 잠재적으로 안전성 위험을 초래할 수 있다. Fc 영역을 유전자조작하여 FcgR 또는 보체 인자에 대한 이들의 결합을 감소시킴으로써 효과기 기능의 변형을 달성할 수 있다. 활성화 FcgR (FcgrI, FcgRIIa, FcgRIIIa 및 FcgRIIb) 및 억제성 FcgR (FcgrIIb) 또는 제1 보체 성분 (C1q)에 대한 IgG의 결합은 헌지 영역 및 CH2 도메인에 위치된 잔기에 의존한다. Fc 기능성을 감소시키거나 침묵시키기 위해 돌연변이가 IgG1, IgG2 및 IgG4에 도입되어 왔다.

[0044] 일부 실시 형태에서, 항체는 하기 특성 중 하나 이상을 갖는 Fc 영역을 포함한다: (a) 모 Fc와 비교하여 감소된 효과기 기능; (b) Fcg RI, Fcg RIa, Fcg RIb, Fcg RIIb 및/또는 Fcg RIIa에 대한 감소된 친화도; (c) FcgRI에 대한 감소된 친화도; (d) FcgRIIa에 대한 감소된 친화도; (e) FcgRIIb에 대한 감소된 친화도; (f) Fcg RIIb에 대한 감소된 친화도; 또는 (g) FcgRIIIa에 대한 감소된 친화도.

[0045] 일부 실시 형태에서, 다중특이성 항체의 CD3-특이적 아암의 유래가 되는 CD3-특이적 항체 또는 항원-결합 단편은 IgG 또는 이의 유도체이다. 일부 실시 형태에서, 다중특이성 항체의 CD3-특이적 아암의 유래가 되는 CD3-특이적 항체 또는 항원-결합 단편은 IgG1 또는 이의 유도체이다. 일부 실시 형태에서, 예를 들어, CD3-결합 아암의 유래가 되는 CD3-특이적 IgG1 항체의 Fc 영역은 이의 Fc 영역 내에 L234A, L235A 및 F405L 치환을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 다중특이성 항체의 CD3-특이적 아암의 유래가 되는 CD3-특이적 항체 또는 항원-결합 단편은 IgG4 또는 이의 유도체이다. 일부 실시 형태에서, 예를 들어, CD3-결합 아암의 유래가 되는 CD3-특이적 IgG4 항체의 Fc 영역은 이의 Fc 영역 내에 S228P, L234A, L235A, F405L 및 R409K 치환을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 다중특이성 항체의 CD3-특이적 아암의 유래가 되는 CD3-특이적 항체 또는 항원-결합 단편은 1차 인간 T 세포 및/또는 1차 사이노몰거스 T 세포 상의 CD3 ε에 결합한다. 일부 실시 형태에서, 다중특이성 항체의 CD3-특이적 아암의 유래가 되는 CD3-특이적 항체 또는 항원-결합 단편은 1차 인간 CD4+ T 세포 및/또는 1차 사이노몰거스 CD4+ T 세포를 활성화한다.

[0046] 기재된 BCMA × CD3-다중특이성 항체에 더하여, 기재된 BCMA × CD3 다중특이성 항체를 암호화할 수 있는 폴리뉴클레오티드 서열이 또한 제공된다. 일부 실시 형태에서, BCMA × CD3 이중특이성 항체 또는 이중특이성 결합 단편의 HC1, HC2, LC1 또는 LC2를 암호화하는 단리된 합성 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 기재된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터가 또한 제공되며, 마찬가지로 BCMA × CD3 다중특이성 항체를 발현하는 세포도 본 명세서에 제공된다. 개시된 벡터를 발현할 수 있는 세포가 또한 기재되어 있다. 이러한 세포는 포유류 세포 (예컨대, 293F 세포, CHO 세포), 곤충 세포 (예컨대, Sf7 세포), 효모 세포, 식물 세포 또는 세균 세포 (예컨대, 대장균)일 수 있다. 기재된 항체는 또한 하이브리도마 세포에 의해 생성될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 세포를 배양하여 BCMA × CD3 이중특이성 항체 또는 이중특이성 결합 단편을 생성하는 방법이 제공된다.

[0047] BCMA × CD3 다중특이성 항체 또는 항원-결합 단편 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물이 본 명세서에 추가로 제공된다.

BCMA × CD3-다중특이성 항체의 사용 방법

[0049] 기재된 BCMA × CD3 다중특이성 항체 및 이의 다중특이성 항원-결합 단편의 사용 방법이 또한 개시되어 있다. 예를 들어, BCMA × CD3 다중특이성 항체 및 이의 다중특이성 항원-결합 단편은 BCMA-발현 암의 치료를 필요로 하는 대상에서 BCMA-발현 암의 치료에 유용할 수 있다. 일부 실시 형태에서, BCMA-발현 암은 림프종, 예컨대 다발성 골수종일 수 있다.

[0050] BCMA-발현 암의 치료를 필요로 하는 대상에서 BCMA-발현 암을 치료하는 기재된 방법은 기재된 BCMA × CD3 다중 특이성 항체 또는 이의 다중특이성 항원-결합 단편의 치료적 유효량을 대상에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 대상은 포유동물, 바람직하게는 인간이다. 바람직한 실시 형태에서, BCMA × CD3 이중특이성 항체 또는 이중특이성 항원-결합 단편의 치료적 유효량을 암의 치료를 필요로 하는 환자에게 암을 치료하기에 충분한 시간 동안 투여함으로써 암에 걸린 대상을 치료하는 방법이 제공된다.

[0051] BCMA × CD3 이중특이성 항체 또는 이중특이성 결합 단편의 치료적 유효량을 투여하여 암 세포의 성장 또는 증

식을 억제함으로써 암 세포의 성장 또는 증식을 억제하는 방법이 본 명세서에 추가로 제공된다.

[0052] BCMA × CD3 이중특이성 항체 또는 이중특이성 결합 단편의 치료적 유효성을 투여하여 T 세포를 암으로 방향전환시킴으로써 T 세포를 BCMA-발현 암 세포로 방향전환시키는 방법이 본 명세서에 추가로 제공된다.

BCMA × CD3-특이적 항체 키트

개시된 BCMA × CD3 다중특이성 항체를 포함하는 키트가 본 명세서에 기재되어 있다. 기재된 키트는 본 명세서에 제공된 BCMA × CD3 다중특이성 항체의 사용 방법 또는 당업자에게 알려진 다른 방법을 수행하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 기재된 키트는 본 명세서에 기재된 항체 및 BCMA-발현 암을 치료하는 데 사용하기 위한 시약을 포함할 수 있다. 따라서, 기재된 키트는 본 명세서에 기재된 바와 같이, 본 명세서에 기재된 하나 이상의 다중특이성 항체 또는 이의 다중특이성 항원-결합 단편(들), 사용 중이 아닌 경우 항체 또는 단편을 담기 위한 용기, 및/또는 항체 또는 단편, 고체 지지체에 부착된 항체 또는 단편 및/또는 항체 또는 단편의 검출가능하게 표지된 형태를 사용하기 위한 설명서를 포함할 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1a 및 1b. 인간 BCMA (도 1a) 및 사이노 BCMA (도 1b)를 복제하는 데 사용되는 벡터.

도 2a 내지 도 2d. BCMB69 에피토프 위치 및 인간 BCMA와 BCMB69 사이의 상호작용. (도 2a) 에피토프 위치의 개요. BCMB69는 BCMA의 오목한 표면 (검은색 영역)에 결합한다. (도 2B) BCMA와 BCMB69 사이의 직접 접촉을 보여주는 상호작용 맵. CDR-L1을 제외한 모든 CDR의 잔기가 BCMA에 접촉한다. 반데르발스 상호작용은 과선으로 나타나 있고, H 결합은 실선이며, 화살표는 골격 H 결합을 나타내고 골격 원자를 가리킨다. BCMB69 및 APRIL 모두에 접촉하는 BCMA 잔기는 검은색 프레임을 갖는다. 4 Å의 거리 컷오프(cut-off)를 사용하여 접촉 잔기를 규정하였다 (H 결합의 경우 3.5 Å 거리 임계치(threshold)). (도 2c 및 도 2d) BCMB69 경쇄 (도 2c) 및 중쇄 (도 2d)와의 BCMA 주요 상호작용의 확대도. H 결합을 과선으로 나타내고 거리는 옹스트롬 단위이다.

도 3. BCMB69의 에피토프 및 파라토프(paratope) 잔기. 에피토프 및 파라토프 잔기는 음영처리되고, CDR 영역에는 밀줄이 그어져 있으며 (카밧(Kabat) 정의) 및 인간과 다른 BCMA 잔기는 굵은 글씨로된 이탈릭체이다. BCMB69 Fab 및 세포외 BCMA 서열만을 나타낸다.

도 4a 및 4b. BCMB69 Fab와 APRIL (도 4a) 및 BCMB69 Fab BAFF (도 4b) 사이의 충돌 영역. Fab와 리간드 사이의 충돌 영역을 나타내는 BCMA/APRIL 및 BCMA/BAFF 복합체 상으로의 BCMA/BCMB69 복합체의 구조적 오버레이 (overlay). BCMA의 용매 접근가능한 표면이 도시된다. Fab 및 리간드 분자는 각각 회색 및 검은색 카툰 (cartoon)으로 도시된다. 오버레이는 두 복합체 내의 동등한 BCMA Cα 원자의 중첩에 의해 달성되었다 (APRIL 복합체에 대하여 0.9 Å 및 BAFF에 대하여 1.2 Å의 RMSD).

도 5. BCMB72에 대한 SPR 데이터는 분자가 인간, 사이노 및 마우스 BCMA에 결합하고 있음을 보여준다. 사이노 및 마우스 BCMA의 평균 K_D 는 인간 BCMA에 비교하여 각각 약 36배 및 402배이다.

도 6. BCMA⁺ 세포주에서 BCMB72 결합에 대한 EC₅₀ 측정. BCMB72를 사용하여 BCMA에 대해 세포주 염색하였다. 세포에 결합하는 BCMB72의 기하학적 평균 형광 강도가 도시된다. EC₅₀을 범례에 나타낸다. 약 100 nM의 농도에서 포화가 달성되었다. 평균 형광 강도는 U2932 (EC₅₀ = 7.92 nM), MM1R (EC₅₀ = 8.74 nM), H929 (EC₅₀ = 14.7 nM), EJM (EC₅₀ = 17.5 nM) 및 LP1 (EC₅₀ = 22.3 nM) 세포에 대한 EC₅₀ 값을 유도하는 것으로 간주되었다. 그래프 패드 프리즘 6에서 가변 기울기 (4개의 파라미터) 함수를 갖는 비선형 회귀를 사용하여 데이터의 그래핑 (graphing) 및 피팅(fitting)을 수행하였다.

도 7. 전혈에서의 BCMB72 결합 프로파일. 3명의 정상 인간 공여자로부터의 전혈을 BCMA 또는 BCMB72에 대한 단일클론 또는 다중클론 항체로 염색하였다. 게이팅(Gating) 분석을 수행하여, 표준 세포 특이적 마커를 사용하여 백혈구 집단의 림프구를 동정하였다. 하나의 대표적인 공여자의 염색 강도가 패널에 나타나 있는데, 여기서 검은색 실선은 관심 항체이고, 회색으로 채워진 점선은 대응하는 통종형이다. 3명의 정상적인 공여자에서 림프구, 단핵구, 과립구 또는 형질세포양 DC 상에 BCMA 발현이 관찰되지 않았다. BCMB72는 모든 3명의 공여자에서 공여자 사이에 다양한 강도로 CD3+ T 세포로의 결합을 보여주었다. BCMB72는 이 분석에서 시험한 임의의 다른 세포 유형에는 결합하지 않았다.

도 8a 내지 도 8e. 다양한 MM 세포주의 존재 하에 BCMB72-의존성 T-세포 활성화. 6명의 정상 공여자 (공여자

평균 \pm SEM이 도시됨)로부터의 T 세포 및 Fc 차단제 (2 mg/mL)의 존재 하에 H929 (도 9a), MM.1R (도 9b), RPMI 8226 (도 9c), U266 (도 9d) 및 Mv4-11 (도 9e) 세포에 나타낸 항체를 48시간 동안 처리하였다. EC₅₀ 값을 그래프에 나타내었다. 통계 분석: 모델 수렴(convergence)이라는 간단한 사실에 더하여, LogEC₅₀에 대한 95% 신뢰 구간의 폭을 고려하여 피트(fit)의 적합성을 평가한다. (LogEC₅₀에 대한 신뢰 구간이 대칭인 이유로 사용되고; EC₅₀ 그 자체에 대한 신뢰 구간은 그렇지 않다.) \pm 2 미만의 구간 (또는 총 95% 신뢰 구간의 폭이 4 미만)이 충분하다고 간주된다.

도 9. 다수의 정상 공여자의 T 세포를 사용하는 2개의 독립적인 실험으로부터의 EC₅₀ 및 최대 T 세포 활성화 값의 요약. 각 세포주 및 각 실험에 대한 개별 공여자의 값 및 공여자 평균을 나타낸다. 데이터 없음 = 시험하지 않았음; 피트 없음 = 소프트웨어가 곡선을 생성할 수 없음; ~ 값 = 모델 외삽법에 기초한 근사값.

도 10a 내지 도 10e. 다양한 다발성 골수종 세포주의 T-세포 매개성 BCMB72-의존성 세포독성. 6명의 정상 공여자 (공여자 평균 \pm SEM이 도시됨)로부터의 T 세포 및 Fc 차단제 (2 mg/mL)의 존재 하에 H929 (도 11a), MM.1R (도 11b), RPMI 8226 (도 11c), U266 (도 11d) 및 Mv4-11 (도 11e) 세포에 나타낸 항체 농도를 48시간 동안 처리하였다. EC₅₀ 값을 그래프에 나타낸다. 통계 분석: 모델 수렴이라는 간단한 사실에 더하여, LogEC₅₀에 대한 95% 신뢰 구간의 폭을 고려하여 피트의 적합성을 평가한다. (LogEC₅₀에 대한 신뢰 구간이 대칭인 이유로 사용되고; EC₅₀ 그 자체에 대한 신뢰 구간은 그렇지 않다.) \pm 2 미만의 구간 (또는 총 95% 신뢰 구간의 폭이 4 미만)이 충분하다고 간주된다.

도 11. 다수의 정상 공여자의 T 세포를 사용하는 2개의 독립적인 실험으로부터의 EC₅₀ 및 최대 용해 값의 요약. 각 세포주 및 각 실험에 대한 개별 공여자의 값 및 공여자 평균을 나타낸다. 데이터 없음 = 시험하지 않았음; 피트 없음 = 소프트웨어가 곡선을 생성할 수 없음; ~ 값 = 모델 외삽법에 기초한 근사값.

도 12. H929 세포에서의 세포독성 및 T 세포 활성화. BCMAxCD3 이중특이성 항체 (BCMB72의 돌연변이 분자)를 T-세포 매개성 세포독성 분석에서 시험하였다. 정상 공여자로부터의 외인성 인간 T 세포 (공여자 번호: M5763 및 M6576)의 존재 하에 BCMA-양성 세포주 (H929)를 다양한 농도로 항체와 48시간 동안 인큐베이션하였다. 48시간 동안 인큐베이션한 후, 세포 사멸을 유세포 분석 기반 접근법 (FACS)으로 측정하고, 도 12a에 % 세포독성으로 보고하였다. 도 12b는 T-세포 표면 상의 CD25 상향 조절에 의해 평가한 T-세포 활성화를 나타낸다. 일반적으로, 데이터 점은 생성된 곡선 피트를 따라 꼭 맞게 정렬되고, T 세포 공여자와 반복 연구 사이에는 가변성이 거의 없다.

도 13. BCMB72-매개성 사이토카인 방출에 대한 EC₅₀ 값의 요약. 세포독성 실험으로부터의 RPMI 8226 세포 상청액 (실시예12, 도 8을 참조)을 수집하고, MSD 기반 다중 분석을 사용하여 상이한 사이토카인 수준에 대해 분석하였다. BCMB72 (BCMA \times CD3) 및 대조군 항체 (BCMA \times 널(null) 및 널 \times CD3)을 다양한 농도로 사용하였다.

도 14a 및 도 14b. BCMA 양성 H929 세포주를 사용하여 T-세포 매개성 BCMB72-의존성 세포독성 검정 을 수행하였다. 다수의 정상 공여자 (3명의 공여자 M7197, M5137 및 M6457에 대한 요약을 대표로 나타냄)로부터의 T 세포 (2 mg/mL) 및 Fc 차단제의 존재 하에 세포에 BCMB72를 다양한 농도로 48시간 동안 처리하였다. 효과기 / 표적 (E/T) 비는 5:1이었다. 도 14a는 세포독성 포텐셜(potential)을 나타내고, 우측의 도 14b는 다양한 로트 (lot)의 BCMB72 간에 유사한 T-세포 활성화 곡선을 나타낸다.

도 15. 상기 그래프에서 X축에 표시된 용량으로 BCMB72 (BCMA \times CD3) 및 대조 항체 (BCMA \times 널 및 널 \times CD3)로 H929 세포를 30분 동안 처리하고, 프로틴심플(ProteinSimple) 사용 설명서에 따른 표준 프로토콜에 따라 단순 웨스턴(Simple Western) 분석 방법을 사용하여 전체 단백질을 분석하였다. 하우스키핑 유전자로 액틴을 사용하여 데이터를 정규화하고, 비율을 Y축에 플로팅(plotted)하였다. APRIL 및 BAFF는 예상한 바와 같이 P38의 인산화를 유도하였고, 항체는 시험한 농도에서 자극 효과를 나타내지 않는다.

도 16a 내지 16f. HEK-NF- κ B 세포 발현 BCMA (도 16a, 도 16c 및 도 16e) 또는 모 세포 (도 16b, 도 16d 및 도 16f)를 TNF α 및 다양한 농도의 APRIL 또는 BCMB72로 자극하였다. 16시간. (도 16a 및 도 16b), 24시간. (도 16c 및 도 16d) 및 48시간 (도 16e 및 도 16f)의 3개의 시점을 분석하였다. TNF α 는 HEK- Nf- κ B 모 세포 및 HEK-NF- κ B-BCMA 세포 모두에서 NF- κ B 활성화를 유도하는 반면에, APRIL 유도는 BCMA 특이적 세포 유형에서만

나타났다. BCMB72는 모 세포주에 효과가 없었고, BCMA-발현 세포에서 높은 농도에서만 활성화를 나타냈다.

도 17a 및 17b. T 세포는 sBCMA-매개성 및 BCMB72-의존성 활성화를 나타내지 않았다. BCMB72 (도 17a) 및 널 × CD3 대조 항체 (도 17b)를 다양한 용량의 가용성 BCMA ECD의 존재 하에 2명의 정상 공여자 (M7077 및 M5137)로부터의 T 세포로 적정하였다. 데이터: 평균±SEM.

도 18a 내지 도 18f. H929 세포에서 가용성 인자 sBCMA, APRIL 및 BAFF의 T 세포 활성화 및 BCMB72의 T 세포 매개성 세포독성 포텐셜에 대한 효과 공여자 T 세포 (M7077 & M6521) 및 BCMB72를 사용하여 세포를 48시간 동안 사멸 검정하였다. 표적 세포독성을 그래프 좌측에 도시하고, T 세포 활성화를 그래프 우측에 나타낸다 (n=2). 각 치료에 대한 EC₅₀ 값을 범례에 표시한다. sBCMA (도 18a), APRIL (도 18b) 및 BAFF (도 18c)의 존재 하에 세포 세포독성을 나타낸다. sBCMA (도 18d), APRIL (도 18e) 및 BAFF (도 18f)의 존재 하에 T 세포 활성화를 나타낸다. 데이터: 평균±SEM.

도 19a 및 19b. 2개의 독립적인 실험으로부터의 신호를 경쟁 항체의 부재 하에 APRIL 및 BAFF에 결합하는 BCMA-Fc 결합의 최대 신호에 대해 정규화하였다. APRIL (도 19a) 및 BAFF (도 19b)에 결합하는 BCMA를 BCMB72 및 대조 항체 (널 × CD3) 농도의 함수로서 플로팅하였다.

도 20a 내지 도 20e. 인간 1차 MM 형질 세포에 대한 BCMB72의 세포독성 효능. IgG4 동종형 (CNT0 9412, 좌측 패널) 대조군, 형질 세포 세포독성 (중간) 및 T 세포 활성화 (우측)에 비교하여, 5명의 상이한 환자 (MM240BM (도 20a), MM259BM (도 20b), MM270BM (도 2c), MM276BM (도 20d) 및 MM277BM (도 20e))로부터의 동결 골수-유래 단핵 세포를 사용하여, BCMB72 결합을 평가하였다. 세포독성 분석을 위해, M7077 정상 건강한 공여자로부터의 T 세포를 환자 BMMC 샘플에 첨가하고, BCMB72 (BCMA × CD3), BC3B4 (BCMA × 널) 또는 CNT0 7008 (널 × CD3)과 48시간 동안 인큐베이션하였다. BCMB72는 모든 공여자 샘플에 대해 용량 의존적 방식으로 형질 세포에 결합하고, 평균 형광 강도를 Y축에 기록하였다. BCMB72 치료에 반응하여 생존 형질 세포 (CD138⁺)의 감소 및 수반되는 T 세포 상의 CD25의 상향 조절에 주목한다. T 세포 활성화에 대한 EC₅₀ 값을 그래프에 나타낸다.

도 21. H929 예방적 모델에서 BCMB72의 생체 내 효능.

도 22. H929 이종 이식 마우스에서 혈청 가용성 BCMA 수준. 인간 BCMA ELISA 키트 (R&D 시스템즈(Systems))를 사용하여 혈청 가용성 BCMA 농도를 검출하였다. PBS 대조군에 비해 마우스당 BCMB72 1 μg 및 0.5 μg로 처리한 마우스에서 가용성 BCMA 수준이 현저히 낮았으며, 이는 이러한 동물에서 종양 부담과 잘 상관된다. 낮은 용량의 BCMB72 (0.1 μg/마우스)는 sBCMA 수준 또는 종양 크기에 영향을 주지 않았다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0056]

정의

[0057] 상세한 설명의 양태와 관련된 다양한 용어가 본 명세서 및 청구범위 전체에 걸쳐 사용된다. 이러한 용어는 달리 지시되지 않으면 본 기술 분야에서의 이의 통상적인 의미로 받는다. 다른 구체적으로 정의된 용어는 본 명세서에 제공된 정의와 일치하는 방식으로 해석되어야 한다.

[0058] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용되는 바와 같이, 단수형("a", "an" 및 "the")은 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않으면, 복수의 지시 대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "세포"에 대한 언급은 2개 이상의 세포의 조합 등을 포함한다.

[0059] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 측정가능한 값, 예컨대 양, 시간적 지속 기간 등을 지칭할 때 용어 "약"은 지정된 값으로부터 최대 ±10%의 변동을 포함함을 의미하는데, 이러한 변동이 개시된 방법을 수행하기에 적절하기 때문이다. 달리 지시되지 않는 한, 본 명세서 및 청구범위에 사용되는 성분의 양, 특성, 예컨대 분자량, 반응 조건 등을 표현하는 모든 수는 모든 경우에 용어 "약"에 의해 수식된 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 반대로 나타내지 않는 한, 하기의 명세서 및 첨부된 청구범위에 기재된 수치 파라미터는 근사치로, 본 발명에 의해 얻고자 하는 원하는 특성에 따라 변동될 수 있다. 적어도, 그리고 청구범위의 범주와 동등한 원칙의 적용을 제한하려는 시도로서가 아니라, 각각의 수치 파라미터는 적어도, 보고된 유효 숫자의 개수를 고려하여 그리고 통상적인 반올림 기술을 적용하여 해석되어야 한다.

[0060] 본 발명의 넓은 범주를 나타내는 수치 범위 및 파라미터가 근사치임에도 불구하고, 구체적인 실시예에 기재된

수치는 가능한 한 정확하게 보고된다. 그러나, 임의의 수치는 본질적으로 이들 각자의 시험 측정에서 발견되는 표준 편차로 인해 필연적으로 발생하는 소정의 오차를 포함한다.

[0061]

"단리된"은 생물학적 성분 (예컨대, 핵산, 펩티드 또는 단백질)이 자연적으로 발생하는 유기체의 다른 생물학적 성분, 즉 다른 염색체 및 염색체외 DNA 및 RNA 및 단백질로부터 실질적으로 분리되거나, 따로 생성되거나, 따로 정제되었음을 의미한다. 따라서, "단리된" 핵산, 펩티드 및 단백질은 표준 정제 방법에 의해 정제된 핵산 및 단백질을 포함한다. "단리된" 핵산, 펩티드 및 단백질은 조성물의 일부일 수 있고, 그러한 조성물이 핵산, 펩티드, 또는 단백질의 천연 환경의 일부가 아닌 경우 여전히 단리될 수 있다. 이 용어는 또한 숙주 세포에서의 재조합 발현에 의해 제조된 핵산, 펩티드 및 단백질뿐만 아니라 화학적으로 합성된 핵산도 포함한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "단리된" 항체 또는 항원-결합 단편은 상이한 항원 특이성을 갖는 다른 항체 또는 항원-결합 단편이 실질적으로 없는 항체 또는 항원-결합 단편을 지칭하고자 한다 (예를 들어, BCMA에 특이적으로 결합하는 단리된 항체에는 BCMA 이외의 항원에 특이적으로 결합하는 항체가 실질적으로 없다). 그러나, BCMA의 에피토프, 아이소형(isoform) 또는 변이체에 특이적으로 결합하는 단리된 항체는, 예를 들어 다른 종 유래의 다른 관련 항원 (예컨대, BCMA 종 상동체)에 대한 교차반응성을 가질 수 있다.

[0062]

"폴리뉴클레오티드" - 동의어로 "핵산 분자", "뉴클레오티드" 또는 "핵산"으로 지칭됨 - 는 임의의 폴리리보뉴클레오티드 또는 폴리데옥시리보뉴클레오티드를 지칭하며, 이는 변형되지 않은 RNA 또는 DNA, 또는 변형된 RNA 또는 DNA일 수 있다. "폴리뉴클레오티드"는 단일- 및 이중-가닥 DNA, 단일- 및 이중-가닥 영역의 혼합물인 DNA, 단일- 및 이중-가닥 RNA, 및 단일- 및 이중-가닥 영역의 혼합물인 RNA, 단일-가닥, 또는 더 전형적으로는 이중-가닥일 수 있는 DNA 및 RNA를 포함하거나 단일- 및 이중-가닥 영역의 혼합물을 포함하는 혼성(hybrid) 분자를 제한 없이 포함한다. 게다가, "폴리뉴클레오티드"는 RNA 또는 DNA, 또는 RNA와 DNA 둘 모두를 포함하는 삼중-가닥 영역을 지칭한다. 용어 폴리뉴클레오티드는 또한 하나 이상의 변형된 염기를 함유하는 DNA 또는 RNA, 및 안정성 또는 다른 이유로 골격이 변형된 DNA 또는 RNA를 포함한다. "변형된" 염기는, 예를 들어, 트리틸화(tritylated) 염기 및 통상적이지 않은 염기, 예컨대 이노신을 포함한다. DNA 및 RNA에 대해 다양한 변형이 이루어질 수 있으며; 이에 따라, "폴리뉴클레오티드"는 천연에서 전형적으로 발견되는 바와 같은 화학적으로, 효소적으로 또는 대사적으로 변형된 형태의 폴리뉴클레오티드, 및 바이러스 및 세포에 특징적인 화학 형태인 DNA 및 RNA도 포함한다. "폴리뉴클레오티드"는, 종종 올리고뉴클레오티드로 지칭되는 비교적 짧은 핵산 쇄를 또한 포함한다.

[0063]

"실질적으로 동일한"이라는 의미는 그 용어가 사용되는 문맥에 따라 상이할 수 있다. 종쇄 및 경쇄, 그리고 이들을 암호화하는 유전자 중에서 존재할 가능성이 높은 천연 서열 변이로 인해, 본 명세서에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편을 암호화하는 아미노산 서열 또는 유전자 내에는 약간의 수준의 변이가 발견될 것으로 예측될 것인데, 이때 이러한 변이는 이들의 고유 결합 특성 (예를 들어, 특이성 및 친화도)에 거의 또는 전혀 영향을 주지 않는다. 이러한 예측은 암호화된 단백질의 성질을 인지할 수 있게 변경시키지 않는 보존적 아미노산 서열 변이의 진화적 성공뿐만 아니라 유전자 코드의 축퇴성에도 부분적으로 기인한다. 따라서, 핵산 서열과 관련하여, "실질적으로 동일한"은 2개 이상의 서열 사이의 65% 이상의 동일성을 의미한다. 바람직하게는, 이 용어는 2개 이상의 서열 사이의 70% 이상의 동일성, 더 바람직하게는 75% 이상의 동일성, 더 바람직하게는 80% 이상의 동일성, 더 바람직하게는 85% 이상의 동일성, 더 바람직하게는 90% 이상의 동일성, 더 바람직하게는 91% 이상의 동일성, 더 바람직하게는 92% 이상의 동일성, 더 바람직하게는 93% 동일성, 더 바람직하게는 94% 이상의 동일성, 더 바람직하게는 95% 이상의 동일성, 더 바람직하게는 96% 이상의 동일성, 더 바람직하게는 97% 이상의 동일성, 더 바람직하게는 98% 이상의 동일성, 그리고 더 바람직하게는 적어도 99% 또는 그 이상의 동일성을 지칭한다. 두 서열 사이의 % 동일성은 두 서열의 최적의 정렬을 위해 도입되어야 할 필요가 있는 갭(gap)의 수 및 각 갭의 길이를 고려하여 서열에 의해 공유되는 동일한 위치의 수의 합수 (즉, % 상동성 = 동일한 위치의 수 / 위치의 총수 \times 100)이다. 두 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 사이의 % 동일성을, 예를 들어, PAM120 가중치 잔기(weight residue) 표, 12의 갭 길이 페널티 및 4의 갭 페널티를 사용하여, ALIGN 프로그램 (버전 2.0)에 포함된 문헌[E. Meyers and W. Miller, Comput. Appl. Biosci. 4, 11-17 (1988)]의 알고리즘을 사용하여 측정할 수 있다. 게다가, 두 아미노산 서열 사이의 %동일성은 문헌[Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 444-453 (1970)]의 알고리즘을 사용하여 측정할 수 있다.

[0064]

단백질 기능에 대해 실질적인 영향을 주지 않으면서 단백질의 아미노산 서열 내에서 일어날 수 있는 변이의 정도는 핵산 서열의 변이의 정도보다 훨씬 더 낮은데, 동일한 축퇴성 원리가 아미노산 서열에는 적용되지 않기 때문이다. 따라서, 항체 또는 항원-결합 단편과 관련하여, "실질적으로 동일한"은 기재된 항체 또는 항원-결합 단편과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 항체 또는 항원-결합 단편을

의미한다. 다른 실시 형태는, 프레임워크, 스캐폴드 또는 본 명세서에 기재된 항체 및 항원-결합 단편과 상당한 동일성을 공유하지 않고, 본 명세서에 기재된 이러한 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 결합을 제공하는 데 필요한 하나 이상의 CDR 또는 다른 서열을 포함하는 다른 비결합 영역을 갖는 BCMA-특이적 항체 또는 항원-결합 단편을 포함한다.

[0065] "벡터"는 다른 핵산 절편이 절편의 복제 또는 발현을 일으키도록 작동가능하게 삽입될 수 있는 레플리콘(replicon), 예컨대 플라스미드, 파지, 코스미드(cosmid) 또는 바이러스이다.

[0066] "클론"은 단세포 또는 공통 조상으로부터 유사분열에 의해 유래된 세포의 집단이다. "세포주"는 많은 세대 동안 시험관 내에서 안정하게 성장할 수 있는 1차 세포의 클론이다. 본 명세서에 제공된 일부 예에서, 세포는 세포를 DNA로 형질감염시킴으로써 형질전환된다.

[0067] 용어 "발현하다" 및 "생성하다"는 본 명세서에서 동의어로 사용되며, 유전자 산물의 생합성을 지칭한다. 이러한 용어는 RNA로의 유전자의 전사를 포함한다. 이러한 용어는 또한 하나 이상의 폴리펩티드로의 RNA의 번역을 포함하고, 모든 자연 발생하는 전사후 및 번역후 변형을 추가로 포함한다. 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 발현 또는 생성은 세포의 세포질 내에서 또는 세포 배양의 성장 배지와 같은 세포의 환경 내에서 일어날 수 있다.

[0068] 용어 "치료하는" 또는 "치료"는 손상, 병상 또는 상태의 약화 또는 개선의 임의의 성공 또는 성공 징후를 지칭하는 것으로, 이에는 증상의 감퇴, 관해, 감소와 같은, 또는 상태를 환자가 더 견딜 수 있게 하거나, 퇴화 또는 쇠퇴 속도를 늦추거나, 퇴화의 최종점을 덜 쇠약하게 하거나, 대상의 신체적 또는 정신적 웰빙을 개선하거나, 생존 기간을 연장시키는, 임의의 객관적 또는 주관적 파라미터가 포함된다. 치료는 신체 검사, 신경학적 검사 또는 정신 감정의 결과를 포함한 객관적 또는 주관적 파라미터에 의해 평가될 수 있다.

[0069] "유효량" 또는 "치료적 유효량"은 필요한 투여량에서 그리고 필요한 시간 동안 원하는 치료적 결과를 달성하는데 유효한 양을 지칭한다. BCMA × CD3 항체의 치료적 유효량은 개체의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중, 그리고 항체가 개체에서 원하는 반응을 유도하는 능력과 같은 인자에 따라 달라질 수 있다. 또한, 치료적 유효량은 항체 또는 항체 부분의 임의의 독성 효과 또는 유해 효과보다 치료적으로 유익한 효과가 더 큰 것이다.

[0070] 달리 명시되지 않는 한, "항체"는 다양한 단량체 형태, 중합체 형태 및 키메라(chimeric) 형태를 포함하는 면역글로불린의 모든 동종형(IgG, IgA, IgE, IgM, IgD 및 IgY)을 지칭한다. 구체적으로, 용어 "항체"에는 다중클론 항체, 단일클론 항체(mAb) 및 항체-유사 폴리펩티드, 예컨대 키메라 항체 및 인간화 항체가 포함된다.

[0071] "항원-결합 단편"은 특정 항원에 대한 결합 친화도를 나타낼 수 있는 임의의 단백질성 구조물(proteinaceous structure)이다. 항원-결합 단편은 임의의 알려진 기술, 예컨대 효소적 절단, 펩티드 합성 및 재조합 기술에 의해 제공된 것들을 포함한다. 일부 항원-결합 단편은 모 항체 분자의 항원-결합 특이성을 보유하는 온전한 항체의 부분으로 구성된다. 예를 들어, 항원-결합 단편은 특정 항원에 결합하는 것으로 알려진 항체의 적어도 하나의 가변 영역(중쇄 또는 경쇄 가변 영역) 또는 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 적합한 항원-결합 단편의 예에는 이중항체(diabody) 및 단일쇄 분자뿐만 아니라, Fab, F(ab')₂, Fc, Fabc 및 Fv 분자, 단일쇄(Sc) 항체, 개별 항체 경쇄, 개별 항체 중쇄, 항체 쇄 또는 CDR과 다른 단백질, 단백질 스캐폴드 사이의 키메라 융합, 중쇄 단량체 또는 이량체, 경쇄 단량체 또는 이량체, 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄로 이루어진 이량체, VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 1가 단편, 또는 WO2007059782호에 기재된 바와 같은 1가 항체, 헌지 영역에서 이황화물 가교에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편, V_H 및 C_{H1} 도메인으로 본질적으로 이루어진 Fd 단편; 항체의 단일 아암의 VL 및 VH 도메인으로 본질적으로 이루어진 Fv 단편, dAb 단편(문헌[Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)]) - 이는 VH 도메인으로 본질적으로 이루어지고, 도메인 항체로도 불림(문헌[Holt et al; Trends Biotechnol. 2003 Nov.; 21(11):484-90]); 카멜리드(camelid) 또는 나노바디(nanobody)(문헌[Revets et al; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan.; 5(1):111-24]); 단리된 상보성 결정 영역(CDR) 등도 제한 없이 포함한다. 모든 항체 동종형이 항원-결합 단편을 생성하는 데 사용될 수 있다. 추가적으로, 항원-결합 단편은 주어진 관심 항원에 대해 친화도를 부여하는 배향으로 폴리펩티드 절편을 성공적으로 도입시킬 수 있는 비항체 단백질성 프레임워크, 예컨대 단백질 스캐폴드를 포함할 수 있다. 항원-결합 단편은 재조합적으로 생성되거나 온전한 항체의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 생성될 수 있다. 어구 "항체 또는 이의 항원-결합 단편"은 주어진 항원-결합 단편이 이 어구에 언급된 항체의 하나 이상의 아미노산 절편을 포함함을 나타내기 위해 사용될 수 있다.

[0072] 용어 "에피토프"는 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 결정인자를 의미한다. 에피토프는 통상 아미노산

또는 당 측쇄와 같은 문자의 표면 그룹화(grouping)로 이루어지며, 통상 특이적인 3차원 구조 특징뿐만 아니라 특이적인 전하 특징도 갖는다. 입체형태 및 비입체형태 에피토프는 변성 용매의 존재 하에서 전자에 대한 결합은 소실되나 후자는 그렇지 않다는 점에서 구별된다. 에피토프는 결합에 직접 관여하는 아미노산 잔기, 및 결합에 직접 관여하지 않는 다른 아미노산 잔기, 예컨대 특이적 항원 결합 웹티드에 의해 효과적으로 차단되거나 덮이는 아미노산 잔기 (다시 말하면, 이러한 아미노산 잔기는 특이적 항원 결합 웹티드의 풋프린트(footprint) 내에 있음)를 포함할 수 있다.

[0073] 항체 또는 항체 단편과 관련하여 사용될 때, "특이적 결합" 또는 "면역특이적 결합" 또는 이들의 파생어는, 혼합된 문자 집단을 함유하는 샘플 중의 다른 문자에 우선적으로 결합하지 않으면서, 면역글로불린 유전자 또는 면역글로불린 유전자의 단편에 의해 암호화된 도메인을 통한 관심 단백질의 하나 이상의 에피토프에 대한 결합을 나타낸다. 전형적으로, 항체는 표면 플라즈몬 공명 검정 또는 세포 결합 검정에 의해 측정될 때 약 1×10^{-8} M 미만의 K_d 로 동종 항원에 결합한다. "[항원]-특이적" 항체 (예를 들어, BCMA-특이적 항체)와 같은 어구는 언급된 항체가 언급된 항원에 특이적으로 결합함을 나타내고자 한다.

[0074] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 " K_d "는 특정 항체-항원 상호작용의 해리 평형 상수를 지칭한다.

[0075] 용어 "대상"은 인간 및 비인간 동물을 지칭하며, 비인간 동물에는 모든 척추동물, 예를 들어 포유동물 및 비포유동물, 예컨대 비인간 영장류, 마우스, 토끼, 양, 개, 고양이, 말, 소, 닭, 양서류 및 파충류가 포함된다. 기재된 방법의 많은 실시 형태에서, 대상은 인간이다.

[0076] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "샘플"은 대상으로부터 단리된, 유사한 유체, 세포 또는 조직 (예를 들어, 외과적으로 절제된 종양 조직, 미세 바늘 흡인물을 포함하는 생검)의 수집물뿐만 아니라, 대상 내에 존재하는 유체, 세포 또는 조직도 지칭한다. 일부 실시 형태에서, 샘플은 생물학적 유체이다. 생물학적 유체는 전형적으로 생리학적 온도의 액체이고, 대상 또는 생물학적 공급원에 존재하거나, 그로부터 적출되거나, 발현되거나 달리 추출되는 천연 발생 유체를 포함할 수 있다. 소정의 생물학적 유체는 특정 조직, 기관 또는 국부 영역으로부터 유래되고, 소정의 다른 생물학적 유체는 대상 또는 생물학적 공급원 내에 더욱 전체적으로 또는 전신적으로 위치될 수 있다. 생물학적 유체의 예에는 혈액, 혈청 및 장막 유체, 혈장, 럼프, 소변, 타액, 낭액 (cystic fluid), 눈물, 대변, 가래, 분비성 조직 및 기관의 점막 분비물, 질 분비물, 복수, 예컨대 비고형 종양과 관련된 것들, 흉막, 심막, 복막, 복부 및 기타 체강의 유체, 기관지 세척액에 의해 수집된 유체 등이 포함된다. 생물학적 유체는 또한 대상 또는 생물학적 공급원과 접촉된 액체 용액, 예를 들어, 세포 및 세포 또는 기관 컨디셔닝된 배지를 포함하는 기관 배양 배지, 세척액 등을 포함할 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "샘플"은 대상으로부터 적출된 물질 또는 대상에 존재하는 물질을 포함한다.

[0077] "기지 표준물"은 기지량 또는 기지 농도의 BCMA를 갖는 용액일 수 있으며, 여기서 이 용액은 자연 발생 용액, 예컨대 초기, 중기, 말기, 진행성, 또는 정지(static) 암을 갖는 것으로 알려진 환자로부터의 샘플일 수 있거나, 이 용액은 기지량의 BCMA가 희석된 완충수와 같은 합성 용액일 수 있다. 본 명세서에 기재된 기지 표준물은 대상으로부터 단리된 BCMA, 재조합 또는 정제된 BCMA 단백질, 또는 질환 상태와 관련된 BCMA 농도의 값을 포함할 수 있다.

[0078] BCMA, CD269 및 TNFRSF17 (유니프로트 Q02223)로도 알려져 있는, 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "BCMA"는 인간 B 세포 성숙 항원에 관한 것이며, 이는 분화된 형질 세포에서 우선적으로 발현되는 종양 괴사 수용체 수퍼페밀리의 구성원이다. 인간 BCMA의 세포외 도메인은 유니프로트에 따라 아미노산 1 내지 54 (또는 5 내지 51)로 구성된다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "BCMA에 대한 항체, 항 BCMA 항체"는 BCMA에 면역특이적으로 결합하는 항체에 관한 것이다.

[0079] 용어 "CD3"은 인간 CD3 단백질 다중-서브유닛(multi-subunit) 복합체를 지칭한다. CD3 단백질 다중-서브유닛 복합체는 6개의 독특한 폴리펩티드 사슬로 구성된다. 이들은 CD3 γ 사슬(스위스프로트(SwissProt) P09693), CD3 δ 사슬(스위스프로트 P04234), 2개의 CD3 ϵ 사슬(스위스프로트 P07766) 및 하나의 CD3 ζ 사슬 동종이량체 (스위스프로트 20963) - 그리고 이는 T 세포 수용체 α 및 β 쇄와 관련됨 - 를 포함한다. 달리 기재되지 않는 한, 용어 "CD3"은 임의의 CD3 변이체, 아이소형 및 종 상동체를 포함하는데, 이는 세포 (T 세포를 포함함)에 의해 자연 발현되거나 이러한 폴리펩티드를 암호화하는 유전자 또는 cDNA로 형질감염된 세포 상에서 발현될 수 있다.

[0080] "BCMA \times CD3 항체"는 다중특이성 항체, 선택적으로 이중특이성 항체이며, 이중특이성 항체는 2개의 상이한 항원-결합 영역을 포함하는데, 이들 중 하나는 항원 BCMA에 특이적으로 결합하고, 이들 중 하나는 CD3에 특이적으

로 결합한다. 다중특이성 항체는 이중특이성 항체, 이중항체 또는 유사한 분자일 수 있다 (예를 들어, 이중항체에 대한 설명을 위해 문헌[PNAS USA 90(14), 6444-8 (1993)]을 참조한다). 본 명세서에 제공된 이중특이성 항체, 이중항체 등은 BCMA 부분 외에도 임의의 적합한 표적에 결합할 수 있다. 용어 "이중특이성 항체"는 상이한 항체 서열에 의해 한정된 2개의 상이한 항원-결합 영역을 갖는 항체로서 이해되어야 한다. 이는 상이한 표적 결합으로서 이해될 수 있지만, 하나의 표적 내의 상이한 에피토프에 대한 결합도 마찬가지로 포함한다.

[0081] "기준 샘플"은 다른 샘플, 예컨대 시험 샘플과 비교할 수 있는 샘플인데, 이러한 비교는 비교된 샘플의 특성화를 가능하게 한다. 기준 샘플은 시험 샘플과의 비교를 위한 기준으로서의 역할을 하는 일부 특성화된 특성을 가질 것이다. 예를 들어, 기준 샘플은 암에 걸린 대상을 나타내는 BCMA 수준에 대한 기준점으로서 사용될 수 있다. 기준 샘플은 반드시 시험 샘플과 동시에 분석되어야 하는 것은 아니며, 이에 따라 일부 경우에 기준 샘플은 대상에서 암을 나타내는 BCMA 수준과 같은 주어진 조건을 특성화하도록 미리 결정된 수치값 또는 수치 범위일 수 있다. 이 용어는 또한 생리학적 상태 또는 질환 상태, 예컨대 BCMA-발현 암과 관련된 것으로 알려져 있지만 BCMA의 양은 알려지지 않은, 비교 목적으로 사용되는 샘플을 포함한다.

[0082] BCMA-발현 암의 진행과 관련하여 사용되는 바와 같은 용어 "진행"은 덜 심각한 상태로부터 더 심각한 상태로의 암의 변화를 포함한다. 이는 종양의 수 또는 중증도, 전이 정도, 암이 성장하거나 퍼지는 속도 등의 증가를 포함할 수 있다. 예를 들어, "결장암의 진행"은 덜 심각한 상태로부터 더 심각한 상태로의 이러한 암의 진행, 예컨대 I 기로부터 II 기로의 진행, II 기로부터 III 기로의 진행 등을 포함한다.

[0083] BCMA-발현 암의 퇴행과 관련하여 사용되는 바와 같은 용어 "퇴행"은 더 심각한 상태로부터 덜 심각한 상태로의 암의 변화를 포함한다. 이는 종양의 수 또는 중증도, 전이 정도, 암이 성장하거나 퍼지는 속도 등의 감소를 포함할 수 있다. 예를 들어, "결장암의 퇴행"은 더 심각한 상태로부터 덜 심각한 상태로의 그러한 암의 퇴행, 예컨대 III 기로부터 II 기로의 진행, II 기로부터 I 기로의 진행 등을 포함한다.

[0084] 안정된 BCMA-발현 암과 관련하여 사용되는 바와 같은 용어 "안정된"은 진행성 암 또는 퇴행성 암인 것으로 간주되기까지 임상적으로 관련된 기간에 걸쳐 충분히 크게 변화되지 않거나 변화되어 오지 않은 질환 상태를 기술하고자 한다.

[0085] 본 명세서에 기재된 실시 형태는 특정 방법, 시약, 화합물, 조성물 또는 생물학적 시스템으로 제한되지 않으며, 이들은 물론 다양할 수 있다.

BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편

[0087] BCMA에 특이적으로 결합하는 재조합 단일클론 항체 또는 항원-결합 단편이 본 명세서에 기재되어 있다. 항체 분자의 일반 구조는 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항원 결합 도메인, 및 보체 결합(complement fixation) 및 항체 수용체에 대한 결합을 포함하는 다양한 기능을 제공하는 Fc 도메인을 포함한다.

[0088] 기재된 BCMA-특이적 항체 또는 항원-결합 단편은 모든 동종형, IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM 및 4쇄 면역글로불린 구조의 합성 다량체를 포함한다. 기재된 항체 또는 항원-결합 단편은 또한 암탉 또는 터키 혈청 및 암탉 또는 터키 난황에서 대체로 발견되는 IgY 동종형을 포함한다.

[0089] BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편은 재조합 수단에 의해 임의의 종으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 항원-결합 단편은 마우스, 래트, 염소, 말, 돼지, 소, 닭, 토끼, 카멜리드, 당나귀, 인간 또는 이들의 키메라 버전일 수 있다. 인간에게 투여하는 데 사용하기 위하여, 비인간 유래 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 환자에게 투여 시 더 적은 항원성을 나타내도록 유전적으로 또는 구조적으로 변경될 수 있다.

[0090] 일부 실시 형태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 키메라 항체 또는 항원-결합 단편이다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "키메라"는 비인간 포유동물, 설치류 또는 과충류의 항체 아미노산 서열로부터 유래되는 적어도 하나의 가변 도메인의 적어도 일부분을 갖는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 지칭하는 반면, 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 나머지 부분은 인간으로부터 유래된다.

[0091] 일부 실시 형태에서, 항체는 인간화 항체이다. 인간화 항체는 비인간 면역글로불린으로부터 유래되는 최소한의 서열을 함유하는 키메라 면역글로불린, 면역글로불린 사슬 또는 이들의 단편 (예컨대, Fv, Fab, Fab', F(ab')2 또는 항체의 다른 항원-결합 하위서열)일 수 있다. 대부분의 경우, 인간화 항체는 수여자의 상보성 결정 영역 (CDR)으로부터의 잔기가 원하는 특이성, 친화도 및 능력(capacity)을 갖는 비인간 종 (공여 항체), 예컨대 마우스, 래트 또는 토끼의 CDR로부터의 잔기에 의해 대체된 인간 면역글로불린 (수여 항체)이다. 일반적으로, 인간화 항체는 실질적으로 하나 이상의, 전형적으로 2개의 가변 도메인을 모두 포함할 것이며, 여기서 모든 또는 실

질적으로 모든 CDR 영역은 비인간 면역글로불린의 것들에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 프레임워크 영역은 인간 면역글로불린 서열의 것들이다. 인간화 항체는 면역글로불린 불변 영역 (Fc), 전형적으로는 인간 면역글로불린의 것의 적어도 일부분을 포함할 수 있다.

[0092] 본 명세서에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편은 다양한 형태로 존재할 수 있지만, 표 1에 나타낸 항체 CDR들 중 하나 이상을 포함할 것이다.

[0093] BCMA에 면역특이적으로 결합하는 재조합 항체 및 항원-결합 단편이 본 명세서에 기재되어 있다. 일부 실시 형태에서, BCMA-특이적 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 IgG 또는 이의 유도체이다. 본 명세서에 예시된 BCMA-특이적 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 항체 또는 항원-결합 단편이지만, 예시된 항체 또는 항원-결합 단편은 키메라威尔(chimerized) 수 있다.

[0094] 일부 실시 형태에서, 표 1에 기재된 항체 중 어느 하나의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 중쇄를 포함하는 BCMA-특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 제공된다. 일부 실시 형태에서, 표 1에 기재된 항체 중 어느 하나의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 중쇄 및 표 1에 기재된 항체들 중 어느 하나의 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하는 경쇄를 포함하는 BCMA-특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 제공된다.

[0095] 일부 실시 형태에서, BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편은 서열 번호 4를 포함하는 중쇄 CDR1, 서열 번호 5를 포함하는 중쇄 CDR2 및 서열 번호 6을 포함하는 중쇄 CDR3을 포함한다. 일부 실시 형태에서, BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편은 서열 번호 4를 포함하는 중쇄 CDR1, 서열 번호 5를 포함하는 중쇄 CDR2, 서열 번호 6을 포함하는 중쇄 CDR3, 서열 번호 7을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열 번호 8을 포함하는 경쇄 CDR2 및 서열 번호 9를 포함하는 경쇄 CDR3을 포함한다. 이러한 BCMA-특이적 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 프레임워크 서열을 포함할 수 있다. 이러한 BCMA-특이적 항체 또는 항원-결합 단편은 5.9 nM 이상의 IC₅₀으로 APRIL-결합을 차단할 수 있다. 일부 실시 형태에서, BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편은 서열 번호 10과 실질적으로 동일하거나 동일한 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시 형태에서, BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편은 서열 번호 10과 실질적으로 동일하거나 동일한 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호 11과 실질적으로 동일하거나 동일한 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 이 단락에서 논의된 항체의 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인은 하나의 아암이 항-BCMA 아암인 이중특이성 작제물에 포함시키기에 적합하다.

[0096] 일부 실시 형태에서, BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편은 서열 번호 4를 포함하는 중쇄 CDR1, 서열 번호 5를 포함하는 중쇄 CDR2 및 서열 번호 6을 포함하는 중쇄 CDR3을 포함한다. 일부 실시 형태에서, BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편은 서열 번호 7을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열 번호 5를 포함하는 중쇄 CDR2, 서열 번호 6을 포함하는 중쇄 CDR3, 서열 번호 24를 포함하는 경쇄 CDR1, 서열 번호 25를 포함하는 경쇄 CDR2 및 서열 번호 26을 포함하는 경쇄 CDR3을 포함한다. 이러한 BCMA-특이적 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 프레임워크 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편은 서열 번호 57과 실질적으로 동일하거나 동일한 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시 형태에서, BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편은 서열 번호 57과 실질적으로 동일하거나 동일한 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호 28과 실질적으로 동일하거나 동일한 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 이 단락에서 논의된 항체의 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인은 하나의 아암이 항-BCMA 아암인 이중특이성 작제물에 포함시키기에 적합하다.

[0097] 일부 실시 형태에서, BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편은 서열 번호 7을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열 번호 5를 포함하는 중쇄 CDR2 및 서열 번호 6을 포함하는 중쇄 CDR3을 포함한다. 일부 실시 형태에서, BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편은 서열 번호 7을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열 번호 5를 포함하는 중쇄 CDR2, 서열 번호 6을 포함하는 중쇄 CDR3, 서열 번호 24를 포함하는 경쇄 CDR1, 서열 번호 25를 포함하는 경쇄 CDR2 및 서열 번호 26을 포함하는 경쇄 CDR3을 포함한다. 이러한 BCMA-특이적 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 프레임워크 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편은 서열 번호 34와 실질적으로 동일하거나 동일한 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시 형태에서, BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편은 서열 번호 34와 실질적으로 동일하거나 동일한 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호 28과 실질적으로 동일하거나 동일한 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 이 단락에서 논의된 항체의 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인은 하나의 아암이 항-BCMA 아암인 이중특이성 작제물에 포함시키기에 적합하다.

[0098] 일부 실시 형태에서, BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편은 서열 번호 4를 포함하는 중쇄 CDR1, 서열 번호 5를 포함하는 중쇄 CDR2 및 서열 번호 19를 포함하는 중쇄 CDR3을 포함한다. 일부 실시 형태에서, BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편은 서열 번호 4를 포함하는 중쇄 CDR1, 서열 번호 5를 포함하는 중쇄 CDR2, 서열 번호 19를 포함하는 중쇄 CDR3, 서열 번호 24를 포함하는 경쇄 CDR1, 서열 번호 25를 포함하는 경쇄 CDR2 및 서열 번호

26을 포함하는 경쇄 CDR3을 포함한다. 이러한 BCMA-특이적 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 프레임워크 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편은 서열 번호 39와 실질적으로 동일하거나 동일한 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시 형태에서, BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편은 서열 번호 39와 실질적으로 동일하거나 동일한 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호 28과 실질적으로 동일하거나 동일한 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 이 단락에서 논의된 항체의 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인은 하나의 아암이 항-BCMA 아암인 이중특이성 작제물에 포함시키기에 적합하다.

[0099] 일부 실시 형태에서, BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편은 서열 번호 4를 포함하는 중쇄 CDR1, 서열 번호 8을 포함하는 중쇄 CDR2 및 서열 번호 6을 포함하는 중쇄 CDR3을 포함한다. 일부 실시 형태에서, BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편은 서열 번호 4를 포함하는 중쇄 CDR1, 서열 번호 8을 포함하는 중쇄 CDR2, 서열 번호 6을 포함하는 중쇄 CDR3, 서열 번호 24를 포함하는 경쇄 CDR1, 서열 번호 25를 포함하는 경쇄 CDR2 및 서열 번호 26을 포함하는 경쇄 CDR3을 포함한다. 이러한 BCMA-특이적 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 프레임워크 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편은 서열 번호 40과 실질적으로 동일하거나 동일한 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시 형태에서, BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편은 서열 번호 40과 실질적으로 동일하거나 동일한 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호 28과 실질적으로 동일하거나 동일한 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 이 단락에서 논의된 항체의 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인은 하나의 아암이 항-BCMA 아암인 이중특이성 작제물에 포함시키기에 적합하다.

[0100] 일부 실시 형태에서, BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편은 서열 번호 13을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열 번호 5를 포함하는 중쇄 CDR2 및 서열 번호 19를 포함하는 중쇄 CDR3을 포함한다. 일부 실시 형태에서, BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편은 서열 번호 13을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열 번호 5를 포함하는 중쇄 CDR2, 서열 번호 19를 포함하는 중쇄 CDR3, 서열 번호 24를 포함하는 경쇄 CDR1, 서열 번호 25를 포함하는 경쇄 CDR2 및 서열 번호 26을 포함하는 경쇄 CDR3을 포함한다. 이러한 BCMA-특이적 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 프레임워크 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편은 서열 번호 58과 실질적으로 동일하거나 동일한 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시 형태에서, BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편은 서열 번호 58과 실질적으로 동일하거나 동일한 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호 28과 실질적으로 동일하거나 동일한 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 이 단락에서 논의된 항체의 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인은 하나의 아암이 항-BCMA 아암인 이중특이성 작제물에 포함시키기에 적합하다.

[0101] 일부 실시 형태에서, BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편은 서열 번호 13을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열 번호 8을 포함하는 중쇄 CDR2 및 서열 번호 19를 포함하는 중쇄 CDR3을 포함한다. 일부 실시 형태에서, BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편은 서열 번호 13을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열 번호 8을 포함하는 중쇄 CDR2, 서열 번호 19를 포함하는 중쇄 CDR3, 서열 번호 24를 포함하는 경쇄 CDR1, 서열 번호 25를 포함하는 경쇄 CDR2 및 서열 번호 26을 포함하는 경쇄 CDR3을 포함한다. 이러한 BCMA-특이적 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 프레임워크 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편은 서열 번호 43과 실질적으로 동일하거나 동일한 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시 형태에서, BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편은 서열 번호 43과 실질적으로 동일하거나 동일한 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호 28과 실질적으로 동일하거나 동일한 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 이 단락에서 논의된 항체의 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인은 하나의 아암이 항-BCMA 아암인 이중특이성 작제물에 포함시키기에 적합하다.

[0102] 일부 실시 형태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 IgG 또는 이들의 유도체, 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 동종형이다. 항체가 IgG1 동종형을 갖는 일부 실시 형태에서, 항체는 IgG1 Fc 영역 (서열 번호 74)을 포함한다.

[0103] 서열 번호 74

[0104] Astkgpsvfplapsskstsggtaalgc1vkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpav1qssglys1ssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtcppcpapelggpsvflfppkpkdtlmiisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeyckvsnkalpapiektiskakgqprqpvylppssreemtknqvs1tclvkgfypsdiavewesngqpenneyktppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfcscsvmhealhnhytqks1s1spgk

[0105] 항체가 IgG4 동종형을 갖는 일부 실시 형태에서, 항체는 이의 Fc 영역 (서열 번호 73)내에 S228P, L234A 및 L235A 치환을 함유한다.

[0106] 서열 번호 73

- [0107] astkgpsvfplapcsrstsestaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlkssglysllssvvtvpssslgtktytcnvdhkpssntkvdkrvesky gppccppcpapeaaggpsvflfppkpkdtlmistrtpevtcvvvdvsqedpevqfnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkglpssiektskakgqprepqvylppsqeemtknqvslltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflysrltvdkssrwqegnfvfscsvmhealhnhytqkslls1lgk
- [0108] 상기 단락에서 논의된 CDR 및/또는 가변 도메인 서열에 의해 한정된 특이적 항체는 이를 IgG Fc 영역을 포함할 수 있다.
- [0109] BCMA에 면역특이적으로 결합하는 항체 또는 항원-결합 단편을 암호화하는 단리된 합성 폴리뉴클레오티드가 또한 개시되어 있다. 본 명세서에 제공된 가변 도메인 단편을 암호화할 수 있는 단리된 폴리뉴클레오티드는 동일하거나 상이한 벡터 상에 포함되어 항체 또는 항원-결합 단편을 생성할 수 있다.
- [0110] 재조합 항원-결합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 또한 본 발명의 범주 내에 있다. 일부 실시 형태에서, 기재된 폴리뉴클레오티드 (및 이들이 암호화하는 웨티드)는 선도 서열을 포함한다. 당업계에 알려진 임의의 선도 서열을 사용할 수 있다. 선도 서열은 제한 부위 또는 면역 개시 부위를 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다.
- [0111] 본 명세서에 기재된 BCMA-특이적 항체 또는 항원-결합 단편은 기재된 BCMA-특이적 항체 또는 항원-결합 단편의 생물학적 특성 (예를 들어, 결합 친화성 또는 면역 효과기 활성)을 보유하는 단일 또는 다수의 아미노산 치환, 결실 또는 첨가를 갖는 변이체를 포함한다. 달리 지시되지 않는 한, 하기의 표기법을 사용하여 본 발명과 관련하여 돌연변이를 기재한다: i) 주어진 위치에서의 아미노산의 치환은, 예를 들어 K409R로 표기되는데, 이는 위치 409에서의 라이신의 아르기닌으로의 치환을 의미하고; ii) 특정 변이체의 경우, 임의의 아미노산 잔기를 나타내기 위해 코드 Xaa 및 X를 포함한, 특정 3 문자 또는 1 문자 코드가 사용된다. 따라서, 위치 409에서 라이신의 아르기닌으로의 치환은 K409R로 표기되거나, 위치 409에서 라이신의 임의의 아미노산 잔기로의 치환은 K409X로 표시된다. 위치 409에서 라이신이 결실된 경우에, 이것을 K409*로 나타낸다. 당업자는 단일 또는 다수의 아미노산 치환, 결실, 또는 첨가를 갖는 변이체를 생성할 수 있다.
- [0112] 이들 변이체는 하기를 포함할 수 있다: (a) 하나 이상의 아미노산 잔기가 보존적 또는 비보존적 아미노산으로 치환된 변이체, (b) 하나 이상의 아미노산이 폴리펩티드에 첨가되거나 이로부터 결실된 변이체, (c) 하나 이상의 아미노산이 치환기를 포함하는 변이체 및 (d) 폴리펩티드가 그 폴리펩티드에 유용한 특성을 부여할 수 있는 다른 웨티드 또는 폴리펩티드, 예컨대 융합 파트너, 단백질 태그 또는 다른 화학적 모이어티, 예컨대 항체에 대한 에피토프, 폴리히스티딘 서열, 비오틴 모이어티 등과 융합된 변이체. 본 명세서에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편은, 보존되거나 비보존된 위치에서 하나의 종으로부터의 아미노산 잔기가 다른 종에서의 상응하는 잔기 대신 치환된 변이체를 포함할 수 있다. 다른 실시 형태에서, 비보존된 위치에서의 아미노산 잔기가 보존되거나 비보존된 잔기로 치환된다. 유전자적 (결실, 돌연변이 등), 화학적 및 효소적 기술을 포함하는 이들 변이체를 얻기 위한 기술은 당업자에게 알려져 있다.
- [0113] 본 명세서에 기재된 BCMA-특이적 항체 또는 항원-결합 단편은 몇몇 항체 동종형, 예컨대 IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE를 구현할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 항체 동종형은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 동종형, 바람직하게는 IgG1 또는 IgG4 동종형이다. 항체 또는 이의 항원-결합 단편 특이성은 CDR의 아미노산 서열 및 배열에 의해 대체로 결정된다. 따라서, 하나의 동종형의 CDR은 항원 특이성을 변경시키지 않고 다른 동종형으로 전이될 수 있다. 대안적으로, 하이브리도마가 항원 특이성을 변경시키지 않고 하나의 항체 동종형을 생성하는 것으로부터 다른 항체 동종형으로 전환 (동종형 전환)되게 하기 위한 기술이 확립되어 왔다. 따라서, 이러한 항체 동종형들은 기재된 항체 또는 항원-결합 단편의 범주 내에 있다.
- [0114] 본 명세서에 기재된 BCMA-특이적 항체 또는 항원-결합 단편의 APRIL 결합에 대한 IC₅₀ 값은 5.9 nM 이상이다. 기재된 BCMA-특이적 항체 또는 항원-결합 단편의 IC₅₀은 당업계에 알려진 다양한 방법, 예컨대 ELISA-기반 방법 또는 유세포 분석법 (FACS)에 의해 측정될 수 있다. ELISA에 의한 IC₅₀을 측정하기 위한 검정은 BCMA 특이적 항체의 존재 및 부재 하에 플레이트-결합된 BCMA를 가지며, 다양한 농도의 APRIL이 사용된다. BCMA로의 APRIL의 결합을 차단하는 BCMA 항체는 "ELISA로 측정한 APRIL을 차단하는 것"이다.
- [0115] 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터가 또한 제공된다. 벡터는 발현 벡터일 수 있다. 따라서, 관심 폴리펩티드를 암호화하는 서열을 함유하는 재조합 발현 벡터는 본 발명의 범주 내에 있는 것으로 고려된다. 발현 벡터는 조절 서열 (예를 들어, 프로모터, 인핸서), 선택 마커 및 폴리아데닐화 신호와 같은 하나

이상의 추가의 서열을 함유할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 광범위한 숙주 세포를 형질전환시키기 위한 벡터가 잘 알려져 있으며, 플라스미드, 파지미드, 코스미드, 배콜로바이러스, 박미드(bacmid), 박테리아 인공 염색체 (BAC), 효모 인공 염색체 (YAC)뿐만 아니라, 다른 박테리아, 효모 및 바이러스 벡터를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0116] 본 발명의 범주 내의 재조합 발현 벡터는 적합한 조절 요소에 작동가능하게 연결될 수 있는 적어도 하나의 재조합 단백질을 암호화하는 합성, 계놈 또는 cDNA-유래 핵산 단편을 포함한다. 이러한 조절 요소는 전사 프로모터, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 암호화하는 서열, 및 전사 및 번역의 종결을 제어하는 서열을 포함할 수 있다. 발현 벡터, 특히 포유류 발현 벡터는 또한 하나 이상의 비전사 요소, 예컨대 복제 기점, 발현시키고자 하는 유전자에 연결된 적합한 프로모터 및 인핸서, 다른 5' 또는 3' 플랭킹(flanking) 비전사 서열, 5' 또는 3' 비번역 서열 (예컨대, 필요한 리보솜 결합 부위), 폴리아데닐화 부위, 스플라이스 공여 및 수용 부위 또는 전사 종결 서열을 포함할 수 있다. 숙주에서 복제하는 능력을 부여하는 복제 기점이 또한 포함될 수 있다.

[0117] 척추동물 세포를 형질전환시키는 데 사용되는 발현 벡터에서의 전사 및 번역 제어 서열은 바이러스 공급원에 의해 제공될 수 있다. 예시적인 벡터가 문헌[Okayama and Berg, 3 Mol. Cell. Biol. 280 (1983)]에 의해 기재된 바와 같이 작제될 수 있다.

[0118] 일부 실시 형태에서, 항체- 또는 항원-결합 단편-코딩 서열은 강력한 구성적 프로모터, 예컨대 하기 유전자에 대한 프로모터의 제어 하에 놓여 있다: 하이포잔틴 포스포리보실 트랜스퍼라제(HPRT), 아데노신 테아미나제, 피루베이트 키나제, 베타-액틴, 인간 미오신, 인간 헤모글로빈, 인간 근육 크레아틴 및 기타. 게다가, 많은 바이러스 프로모터는 진핵 세포에서 구성적으로 기능하고, 기재된 실시 형태와 함께 사용하기에 적합하다. 이러한 바이러스 프로모터는 거대세포바이러스(CMV) 극초기 프로모터, SV40의 초기 및 후기 프로모터, 마우스 유선 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, 말로니(Malone) 백혈병 바이러스의 긴 말단 반복부(LTR), 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 앱스티인 바 바이러스(Epstein Barr Virus)(EBV), 라우스 육종 바이러스(Rous Sarcoma Virus)(RSV), 및 다른 레트로바이러스 및 단순 헤르페스 바이러스의 티미딘 키나제 프로모터를 제한 없이 포함한다. 일부 실시 형태에서, BCMA-특이적 항체 또는 그의 항원-결합 단편 코딩 서열은 유도성 프로모터, 예컨대 메틸로티오네인 프로모터, 테트라사이클린-유도성 프로모터, 독시사이클린-유도성 프로모터, 하나 이상의 인터페론-자극 반응 요소(ISRE)를 함유하는 프로모터, 예컨대 단백질 키나제 R 2',5'-올리고아데닐레이트 신태타제, Mx 유전자, ADAR1 등의 제어 하에 놓여 있다.

[0119] 본 명세서에 기재된 벡터는 하나 이상의 내부 리보솜 침입 부위(들)(IRES)를 함유할 수 있다. IRES 서열을 융합 벡터 내에 포함하면 일부 단백질의 발현을 향상시키는 데 유익할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 벡터 시스템은 하나 이상의 폴리아데닐화 부위 (예를 들어, SV40)를 포함할 것이며, 이는 상기 언급된 핵산 서열 중 임의의 것의 상류 또는 하류에 있을 수 있다. 벡터 성분은 (즉, ORF들 사이에의 "스페이서" 뉴클레오티드의 도입에 의해) 유전자 산물을 발현시키기 위한 최적의 간격을 제공하는 방식으로 인접하게 연결되거나 배열될 수 있거나, 다른 방식으로 위치될 수 있다. IRES 모티프와 같은 조절 요소는 또한 발현을 위한 최적의 간격을 제공하도록 배열될 수 있다.

[0120] 벡터는 선택 마커를 포함할 수 있으며, 선택 마커는 당업계에 잘 알려져 있다. 선택 마커는 양성 및 음성 선택 마커, 예를 들어 항생제 저항성 유전자(예를 들어, 네오마이신 저항성 유전자, 하이그로마이신 저항성 유전자, 카나마이신 저항성 유전자, 테트라사이클린 저항성 유전자, 페니실린 저항성 유전자, 퓨로마이신 저항성 유전자, 블라스티시딘 저항성 유전자), 글루타메이트 신태제 유전자, 간시클로비르 선택을 위한 HSV-TK, HSV-TK 유도체, 또는 6-메틸푸린 선택을 위한 세균성 푸린 뉴클레오시드 포스포릴라제 유전자를 포함한다 (문헌[Gadi et al., 7 Gene Ther. 1738-1743 (2000)]). 선택 마커 또는 클로닝 부위를 암호화하는 핵산 서열은 관심 폴리펩티드 또는 클로닝 부위를 암호화하는 핵산 서열의 상류 또는 하류에 있을 수 있다.

[0121] 본 명세서에 기재된 벡터는 다양한 세포를 기재된 항체 또는 항원-결합 단편을 암호화하는 유전자로 형질전환시키는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 벡터는 BCMA-특이적 항체 또는 항원-결합 단편-생성 세포를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 다른 양태는 BCMA에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 예컨대 본 명세서에 기재되고 예시된 항체 또는 항원-결합 단편을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 제공한다.

[0122] 외래 유전자를 세포 내에 도입하기 위한 다수의 기술이 당업계에 알려져 있고, 본 명세서에 기재되고 예시된 다양한 실시 형태에 따라, 기재된 방법을 수행하려는 목적을 위하여 재조합 세포를 작제하는 데 사용될 수 있다. 사용되는 기술은 숙주 세포로의 이종 유전자 서열의 안정한 전달을 제공하여, 이종 유전자 서열이 세포의 자손

에 의해 상속가능하고 발현가능하도록, 그리고 수여 세포의 필요한 발달 및 생리학적 기능이 파괴되지 않도록 해야 한다. 사용될 수 있는 기술은 염색체 전달 (예를 들어, 세포 융합, 염색체 매개 유전자 전달, 마이크로 세포 매개 유전자 전달), 물리적 방법 (예를 들어, 형질감염, 스페로플라스트 융합, 혼미주사(microinjection), 전기천공, 리포솜 담체), 바이러스 벡터 전달 (예를 들어, 재조합 DNA 바이러스, 재조합 RNA 바이러스) 등 (문헌[Cline, 29 *Pharmac. Ther.* 69-92 (1985)]에 기재됨)을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 인산칼슘 침전 및 박테리아 프로토플라스트(bacterial protoplast)와 포유류 세포의 폴리에틸렌 글리콜(PEG)-유도 융합이 또한 세포를 형질전환시키는 데 사용될 수 있다.

[0123] 본 명세서에 기재된 BCMA-특이적 항체 또는 항원-결합 단편의 발현에 사용하기에 적합한 세포는 바람직하게는 진핵 세포, 더 바람직하게는 식물, 설치류 또는 인간 기원의 세포, 예를 들어, 특히 NSO, CHO, CHOK1, perC.6, Tk-ts13, BHK, HEK293 세포, COS-7, T98G, CV-1/EBNA, L 세포, C127, 3T3, HeLa, NS1, Sp2/0 골수종 세포 및 BHK 세포주이나 이에 한정되지 않는다. 게다가, 항체의 발현은 하이브리도마 세포를 사용하여 달성될 수 있다. 하이브리도마를 생성하기 위한 방법이 당업계에 잘 확립되어 있다.

[0124] 본 명세서에 기재된 발현 벡터로 형질전환된 세포는 본 명세서에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편의 재조합 발현을 위해 선택되거나 스크리닝될 수 있다. 재조합-양성 세포는 원하는 표현형, 예컨대 고수준 발현, 향상된 성장 특성, 또는, 예를 들어 단백질 변형 또는 변경된 번역 후 변형으로 인해 원하는 생화학적 특성을 갖는 단백질을 산출하는 능력을 나타내는 하위클론을 위해 증폭되고 스크리닝된다. 이러한 표현형은 주어진 하위클론의 고유 특성에 기인하거나 돌연변이에 기인할 수 있다. 돌연변이는 화학물질, UV-파장 광, 방사선, 바이러스, 삼입 돌연변이원, DNA 불일치 수복의 억제 또는 이러한 방법의 조합의 사용을 통해 달성될 수 있다.

치료를 위해 BCMA-특이적 항체를 사용하는 방법

[0125] 요법에 사용하기 위한 BCMA-특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 본 명세서에 제공된다. 특히, 이러한 항체 또는 항원-결합 단편은 암, 예컨대 BCMA-발현 암을 치료하는 데 유용할 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 항체, 예컨대 BCMA-특이적 항체 또는 항원-결합 단편을 투여하는 것을 포함하는 암의 치료 방법을 제공한다. 예를 들어, 이러한 사용은 BCMA-수용체 상호작용을 방해하거나, 항체를 독소에 접합시켜 독소가 BCMA-발현 암을 표적화함으로써 암을 치료하는 데 유용할 수 있다. 일부 실시 형태에서, BCMA-발현 암에는 럼프종, 예컨대 다발성 골수종 (MM)이 포함된다. 이러한 방법에 사용하는 항체에는 상기 본 명세서에 기재된 것들, 예를 들어, CDR 또는 가변 도메인 서열과 같은 표 1에 기재된 특징부를 갖는 BCMA-특이적 항체 또는 항원-결합 단편, 및 이러한 항체의 추가의 논의에 기재된 항체가 포함된다.

[0126] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, BCMA-특이적 항체의 면역 효과기 특성이 당업자에게 알려진 기술에 의해 Fc 변형을 통해 향상되거나 침묵될 수 있다. 예를 들어, Fc 효과기 기능, 예컨대 C1q 결합, 보체 의존성 세포독성 (CDC), 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC), 항체-의존성 세포-매개 식작용 (ADCP), 세포 표면 수용체 (예를 들어, B 세포 수용체; BCR)의 하향 조절 등이, 이들 활성을 담당하는 Fc 내의 잔기를 변형시킴으로써 제공되고/되거나 제거될 수 있다.

[0127] "항체-의존성 세포-매개 세포독성" 또는 "ADCC"는 Fc 수용체(FcR)를 발현하는 비특이적 세포독성 세포 (예를 들어, 자연 살해(NK) 세포, 호중구 및 대식세포)가 표적 세포 상에 결합된 항체를 인식하고 후속적으로 표적 세포의 용해를 야기하는 세포-매개 반응을 지칭한다.

[0128] ADCC를 유도하는 단일클론 항체의 능력은 이의 올리고당 성분을 유전자조작함으로써 향상될 수 있다. 인간 IgG1 또는 IgG3은 잘 알려진 바이안테나리(biantennary) G0, G0F, G1, G1F, G2 또는 G2F 형태의 글리칸의 대부분에 의해 Asn297에서 N-글리코실화된다. 유전자 조작되지 않은 CHO 세포에 의해 생성된 항체는 전형적으로 약 85% 이상의 글리칸 푸코스 함량을 갖는다. Fc 영역에 부착된 바이안테나리 복합형(complex-type) 올리고당에서 코어(core) 푸코스를 제거하면, 항원 결합 또는 CDC 활성을 변경시키지 않으면서 개선된 Fc γRIIIa 결합을 통해 항체의 ADCC가 향상된다. 이러한 mAb는 바이안테나리 복합형의 Fc 올리고당을 담지하는 비교적 고도로 탈푸코실화된 항체의 성공적인 발현으로 이어지는 것으로 보고된 상이한 방법들을 사용하여 달성될 수 있는데, 이러한 방법에는, 예컨대 다음과 같은 것이 있다: 배양물 오스몰랄 농도(osmolality)의 제어(문헌[Konno *et al.*, Cytotechnology 64:249-65, 2012]), 숙주 세포주로서의 변이체 CHO 세포주 Lec13의 적용(문헌[Shields *et al.*, J Biol Chem 277:26733-26740, 2002]), 숙주 세포주로서의 변이체 CHO 세포주 EB66의 적용(문헌[Olivier *et al.*, mAb; 2(4), 2010; Epub ahead of print; PMID:20562582]), 숙주 세포주로서의 래트 하이브리도마 세포주 YB2/0의 적용(문헌[Shinkawa *et al.*, J Biol Chem 278:3466-3473, 2003]), 특이적으로 알파 1,6-푸코실트랜스페라제(FUT8) 유전자에 대한 짧은 간섭(small interfering) RNA의 도입(문헌[Mori *et al.*, Biotechnol

Bioeng88:901-908, 2004]), 또는 β -1,4-*N*-아세틸글루코사미닐트랜스페라제 III과 골지(Golgi) α -만노시다제 II 또는 강력한 알파-만노시다제 I 억제제인 키푸넨신(kifunensine)의 공발현(문헌[Ferrara *et al.*, J Biol Chem281:5032-5036, 2006], 문헌[Ferrara *et al.*, Biotechnol Bioeng 93:851-861, 2006]; 문헌[Xhou *et al.*, Biotechnol Bioeng 99:652-65, 2008]).

[0130] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, BCMA 항체에 의해 유도되는 ADCC는 또한 항체 Fc 내에서의 소정의 치환에 의해 향상될 수 있다. 예시적인 치환은, 예를 들어, 미국 특허 제6,737,056호에 기재된 바와 같은 아미노산 위치 256, 290, 298, 312, 356, 330, 333, 334, 360, 378 또는 430 (잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따름)에서의 치환이다.

BCMA의 검출 방법

[0131] 샘플을 본 명세서에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 접촉시킴으로써 생물학적 샘플에서 BCMA를 검출하기 위한 방법이 본 명세서에 제공된다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, 샘플은 소변, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 복수, 순환 세포, 순환 종양 세포, 조직과 관련되지 않은 세포 (즉, 유리 세포), 조직 (예를 들어, 외과적으로 절제된 종양 조직, 미세 바늘 흡인물을 포함하는 생검), 조직학적 조직물 등으로부터 유래될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 기재된 방법은 생물학적 샘플을 본 명세서에 기재된 BCMA-특이적 항체 또는 이들의 항원-결합 단편 중 임의의 것과 접촉시킴으로써 샘플에서 BCMA를 검출하는 단계를 포함한다.

[0132] 일부 실시 형태에서, 샘플은 본 명세서에 기재된 하나 초과의 BCMA-특이적 항체 또는 항원-결합 단편과 접촉될 수 있다. 예를 들어, 샘플은 제1 BCMA-특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 접촉된 후, 제2 BCMA-특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 접촉될 수 있는데, 여기서 제1 항체 또는 항원-결합 단편 및 제2 항체 또는 항원-결합 단편은 동일한 항체 또는 항원-결합 단편이 아니다. 일부 실시 형태에서, 제1 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 샘플과 접촉시키기 전에 표면, 예컨대 멀티웰 플레이트, 칩 또는 유사한 기재에 고정될 수 있다. 다른 실시 형태에서, 제1 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 샘플과 접촉시키기 전에 어떠한 것에도 전혀 고정되거나 부착되지 않을 수 있다.

[0133] 기재된 BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편은 검출가능하게 표지될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 표지된 항체 및 항원-결합 단편이 본 명세서에 기재된 방법을 통해 BCMA의 검출을 촉진시킬 수 있다. 많은 이러한 표지가 당업자에게 용이하게 알려져 있다. 예를 들어, 적합한 표지는 방사선 표지, 형광 표지, 에피토프 태그, 비오틴, 발색단 표지, ECL 표지 또는 효소를 포함하지만 이에 한정되는 것으로 여겨져서는 안 된다. 더 구체적으로는, 기재된 표지는 루테늄, ¹¹¹In-DOTA, ¹¹¹In-다이에틸렌트라이아민펜타아세트산(DTPA), 고추냉이 페옥시다제, 알칼리성 포스파타제 및 베타-갈락토시다제, 폴리-히스티딘(HIS 태그), 아크리딘 염료, 시아닌 염료, 플루오론 염료, 옥사진 염료, 페난트리딘 염료, 로다민 염료, 알렉사 플루오르(Alexa Fluor)® 염료 등을 포함한다.

[0134] 기재된 BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편은 생물학적 샘플에서 BCMA를 검출하기 위한 다양한 검정에 사용될 수 있다. 일부 적합한 검정은 웨스턴 블롯(Western blot) 분석, 방사면역검정, 표면 플라즈몬 공명, 면역형광 측정(immunofluorimetry), 면역침전, 평형 투석, 면역화산, 전기화학발광(ECL) 면역검정, 면역조직화학, 형광-활성화 세포 분류(FACS) 또는 ELISA 검정을 포함하지만 이에 한정되는 것으로 여겨져서는 안 된다.

[0135] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, 대상에서의 BCMA-발현 암 세포의 검출을 사용하여 대상이 BCMA에 대한 치료제로 치료될 수 있는지를 결정할 수 있다.

[0136] BCMA는 혈액 및 혈청 샘플 중에 검출가능한 수준으로 존재한다. 따라서, 샘플을 BCMA에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 접촉시킴으로써 혈액으로부터 유래된 샘플, 예컨대 혈청 샘플에서 BCMA를 검출하기 위한 방법이 본 명세서에 제공된다. 혈액 샘플 또는 이의 유도체를 회석하거나, 분획화하거나, 달리 처리하여, 기재된 방법이 수행될 수 있는 샘플을 얻을 수 있다. 일부 실시 형태에서, BCMA는 하기와 같은 그러나 이에 한정되지 않는 당업계에 알려진 다수의 검정에 의해 혈액 샘플 또는 이의 유도체에서 검출될 수 있다: 웨스턴 블롯 분석, 방사면역검정, 표면 플라즈몬 공명, 면역형광측정, 면역침전, 평형 투석, 면역화산, 전기화학발광(ECL) 면역검정, 면역조직화학, 형광-활성화 세포 분류(FACS) 또는 ELISA 검정.

암 진단 방법

[0137] 대상에서 BCMA-발현 암을 진단하기 위한 방법이 본 명세서에 제공된다. 일부 실시 형태에서, BCMA-발현 암에는 림프종, 예컨대 다발성 골수종 (MM)이 포함된다. 일부 실시 형태에서, 전술된 바와 같은 생물학적 샘플, 예컨대 혈액 샘플 또는 혈청 샘플에서 BCMA를 검출하는 것은 샘플이 획득된 대상에서 암을 진단하는 능력을 제공한

다. 대안적으로, 일부 실시 형태에서, 다른 샘플, 예컨대 조직학적 샘플, 미세 바늘 흡인 샘플, 절제된 종양 조직, 순환 세포, 순환 종양 세포 등이 또한 샘플이 획득된 대상이 암을 갖는지 여부를 평가하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 샘플이 획득된 대상이 암을 갖는다는 것이 이미 알려져 있을 수 있지만, 대상이 앓고 있는 암의 유형은 아직 진단되지 않았을 수 있거나, 예비 진단이 불명확할 수 있으며, 이에 따라 대상으로부터 획득된 생물학적 샘플에서 BCMA를 검출하는 것은 암의 진단을 가능하게 하거나 명확하게 할 수 있다. 예를 들어, 대상은 암을 갖는 것으로 알려져 있을 수 있지만, 대상의 암이 BCMA-발현인지 여부가 알려져 있지 않을 수 있거나, 불명확할 수 있다.

[0140] 일부 실시 형태에서, 기재된 방법은 대상으로부터 유래된 생물학적 샘플에 존재하는 BCMA의 양을 측정함으로써 대상이 BCMA-발현 암을 앓고 있는지 여부를 평가하는 단계; 및 관찰된 BCMA의 양을 대조군 샘플 또는 기준 샘플 중의 BCMA의 양과 비교하는 단계를 수반하며, 여기서 대상으로부터 유래되는 샘플 중의 BCMA의 양과 대조군 샘플 또는 기준 샘플 중의 BCMA의 양 사이의 차이는 대상이 BCMA-발현 암을 앓고 있는지를 나타내는 지표이다. 다른 실시 형태에서, 대상으로부터 획득된 생물학적 샘플에서 관찰되는 BCMA의 양을 암의 소정의 형태 또는 단계와 관련된 것으로 알려진 BCMA의 수준과 비교하여, 대상의 암의 형태 또는 병기를 결정할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 대상으로부터 유래된 샘플 중의 BCMA의 양은 샘플을 BCMA에 면역특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 예컨대 본 명세서에 기재된 BCMA-특이적 항체와 접촉시킴으로써 평가된다. BCMA의 존재에 대해 평가되는 샘플은 소변, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 복수, 순환 세포, 순환 종양 세포, 조직과 관련되지 않은 세포 (즉, 유리 세포), 조직 (예를 들어, 외과적으로 절제된 종양 조직, 미세 바늘 흡인물을 포함하는 생검), 조직학적 작제물 등으로부터 유래될 수 있다. 일부 실시 형태에서, BCMA-발현 암에는 혈액 암, 예컨대 다발성 골수종 (MM)이 포함된다. 일부 실시 형태에서, 대상은 인간이다.

[0141] 일부 실시 형태에서, BCMA-발현 암의 진단 방법은 대상의 생물학적 샘플을 BCMA-특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편 (예컨대, 표 1에 제공된 항체 및 단편으로부터 유도가능한 것들)과 접촉시키는 단계, 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 의해 결합된 샘플에 존재하는 BCMA의 양을 정량화하는 단계, 샘플에 존재하는 BCMA의 양을 기지 표준 또는 기준 샘플과 비교하는 단계; 및 대상의 BCMA 수준이 암과 관련된 BCMA의 수준 내에 있는지의 여부를 결정하는 단계를 수반할 것이다. 추가의 실시 형태에서, 진단 방법 이후에는 암-특이적 치료제를 투입하거나 처방하는 추가 단계가 행해질 수 있다. 다른 실시 형태에서, 진단 방법 이후에는 측정 결과를 전송하여 암의 치료를 촉진시키는 추가 단계가 행해질 수 있다. 일부 실시 형태에서, 암-특이적 치료는 본 명세서에 기재된 BCMA × CD3 다중특이성 항체와 같은 BCMA-발현 암에 대해 유도될 수 있다.

[0142] 일부 실시 형태에서, 기재된 방법은 대상으로부터 획득된 혈액 또는 혈청 샘플에 존재하는 BCMA의 양을 측정함으로써 대상이 BCMA-발현 암을 앓고 있는지 여부를 평가하는 단계; 및 관찰된 BCMA의 양을 대조군 샘플 또는 기준 샘플 중의 BCMA의 양과 비교하는 단계를 수반하며, 여기서 대상으로부터 유래되는 샘플 중의 BCMA의 양과 대조군 샘플 또는 기준 샘플 중의 BCMA의 양 사이의 차이는 대상이 BCMA-발현 암을 앓고 있는지를 나타내는 지표이다.

[0143] 일부 실시 형태에서, 대조군 샘플 또는 기준 샘플은 BCMA-발현 암을 앓고 있지 않은 대상으로부터 유래될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 대조군 샘플 또는 기준 샘플은 BCMA-발현 암을 앓고 있지 않은 대상으로부터 유래될 수 있다. 대조군 샘플 또는 기준 샘플이 BCMA-발현 암을 앓고 있지 않은 대상으로부터 유래되는 일부 실시 형태에서, 대조군 샘플 또는 기준 샘플에서 관찰된 양과 비교하여, 시험 샘플에 존재하는 BCMA의 양의 관찰된 증가는 평가되는 대상이 BCMA-발현 암을 앓고 있음을 나타내는 지표이다. 대조군 샘플이 BCMA-발현 암을 앓고 있지 않은 대상으로부터 유래되는 일부 실시 형태에서, 대조군 샘플 또는 기준 샘플에 대해 관찰된 양과 비교하여, 시험 샘플에 존재하는 관찰된 BCMA의 양의 감소 또는 유사성은 평가되는 대상체가 BCMA-발현 암을 앓고 있지 않음을 나타내는 지표이다. 대조군 샘플 또는 기준 샘플이 BCMA-발현 암을 앓고 있는 대상체로부터 유래되는 일부 실시 형태에서, 대조군 샘플 또는 기준 샘플에 대해 관찰된 양과 비교하여, 시험 샘플에 존재하는 관찰된 BCMA의 양의 감소는 평가되는 대상이 BCMA-발현 암을 앓고 있음을 나타내는 지표이다. 대조군 샘플 또는 기준 샘플이 BCMA-발현 암을 앓고 있는 대상으로부터 유래되는 일부 실시 형태에서, 대조군 샘플 또는 기준 샘플에 대해 관찰된 양과 비교하여, 시험 샘플에 존재하는 관찰된 BCMA의 양의 감소는 평가되는 대상이 BCMA-발현 암을 앓지 않음을 나타내는 지표이다.

[0144] 일부 실시 형태에서, 대상체로부터 유래된 샘플 중의 BCMA의 양은 샘플을 BCMA에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 예컨대 본 명세서에 기재된 항체와 접촉시킴으로써 평가된다. BCMA의 존재에 대해 평가되는 샘플은 혈액 샘플, 혈청 샘플, 순환 세포, 순환 종양 세포, 조직과 관련되지 않은 세포 (즉, 유리 세포), 조직 (예를 들어, 외과적으로 절제된 종양 조직, 미세 바늘 흡인물을 포함하는 생검), 조직학적 작제물 등

으로부터 유래될 수 있다.

[0145] 다양한 태양에서, BCMA의 양은 샘플을 BCMA에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 접촉시킴으로써 측정된다. 일부 실시 형태에서, 샘플은 BCMA에 특이적으로 결합하는 하나 초과 유형의 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 접촉될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 샘플은 BCMA에 특이적으로 결합하는 제1 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 의해 접촉된 후, BCMA에 특이적으로 결합하는 제2 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 의해 접촉될 수 있다. BCMA-특이적 항체 또는 항원-결합 단편, 예컨대 본 명세서에 기재된 것들은 이러한 능력에 사용될 수 있다.

[0146] BCMA-특이적 항체 및 항원-결합 단편의 다양한 조합이 기재된 진단 방법을 수행하도록 "제1" 및 "제2" 항체 또는 항원-결합 단편을 제공하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시 형태에서, BCMA-발현 암에는 림프종, 예컨대 다발성 골수종 (MM)이 포함된다.

[0147] 소정 실시 형태에서, BCMA의 양은 웨스턴 블로트 분석, 방사면역검정, 면역형광측정, 면역침전, 평형 투석, 면역 확산, 전기화학발광(ECL) 면역검정, 면역조직화학, 형광-활성화 세포 분류(FACS) 또는 ELISA 검정에 의해 측정된다.

[0148] 기재된 진단 방법의 다양한 실시 형태에서, 대조군 샘플 또는 기준 샘플이 사용된다. 이러한 샘플은 사용되는 검정이 적절하게 수행되고 있음을 보장하는 양성 또는 음성 검정 대조군일 수 있으며; 예를 들어, 이러한 성질의 검정 대조군은 면역조직화학 검정에 일반적으로 사용될 수 있다. 대안적으로, 샘플은 건강한 대상으로부터의 생물학적 샘플 중의 BCMA의 양에 대한 표준화된 참조일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 시험된 대상의 관찰된 BCMA 수준은 BCMA-발현 암을 갖는 것으로 알려진 대상으로부터의 샘플에서 관찰되는 BCMA 수준과 비교될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 대조군 대상은 특정 관심 암을 앓고 있을 수 있다. 일부 실시 형태에서, 대조군 대상은 초기 암을 갖는 것으로 알려져 있는데, 이는 BCMA-발현 암일 수 있거나 그렇지 않을 수 있다. 일부 실시 형태에서, 대조군 대상은 중기 암을 갖는 것으로 알려져 있는데, 이는 BCMA-발현 암일 수 있거나 그렇지 않을 수 있다. 일부 실시 형태에서, 대조군 대상은 말기 암을 갖는 것으로 알려져 있는데, 이는 BCMA-발현 암일 수 있거나 그렇지 않을 수 있다.

암의 모니터링 방법

[0149] 대상에서 BCMA-발현 암을 모니터링하기 위한 방법이 본 명세서에 제공된다. 일부 실시 형태에서, BCMA-발현 암에는 림프종, 예컨대 다발성 골수종 (MM)이 포함된다. 일부 실시 형태에서, 기재된 방법은 대상으로부터 유래된 시험 샘플에 존재하는 BCMA의 양을 측정함으로써 BCMA-발현 암이 진행 중인지, 퇴행 중인지, 또는 안정되게 유지되고 있는지를 평가하는 단계; 및 관찰된 BCMA의 양을, 조기 시점에서 대상으로부터, 유사한 방식으로, 획득된 생물학적 샘플 중의 BCMA의 양과 비교하는 단계를 수반하여, 여기서 시험 샘플과 조기 샘플 중의 BCMA의 양 사이의 차이는 암이 진행 중인지, 퇴행 중인지, 또는 안정되게 유지되고 있는지의 지표를 제공한다. 이에 관하여, 조기 샘플에 대해 관찰된 양과 비교하여 증가된 BCMA의 양을 갖는 시험 샘플은 BCMA-발현 암의 진행을 나타낼 수 있다. 대조적으로, 조기 샘플에 대해 관찰된 양과 비교하여 감소된 BCMA의 양을 갖는 시험 샘플은 BCMA-발현 암의 퇴행을 나타낼 수 있다.

[0150] 따라서, 조기 샘플에 대해 관찰된 양과 비교하여 BCMA의 양에 있어서 유의하지 않은 차이를 갖는 시험 샘플은 BCMA-발현 암에 대한 안정된 질환의 상태를 나타낼 수 있다. 일부 실시 형태에서, 대상으로부터 유래된 생물학적 샘플 중의 BCMA의 양은 샘플을 BCMA에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항체 단편, 예컨대 본 명세서에 기재된 항체와 접촉시킴으로써 평가된다. BCMA의 존재에 대해 평가되는 샘플은 소변, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 복수, 순환 세포, 순환 종양 세포, 조직과 관련되지 않은 세포 (즉, 유리 세포), 조직 (예를 들어, 외과적으로 절제된 종양 조직, 미세 바늘 흡인물을 포함하는 생검), 조직학적 작제물 등으로부터 유래될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 대상은 인간이다.

[0151] 일부 실시 형태에서, BCMA-발현 암의 모니터링 방법은 대상의 생물학적 샘플을 BCMA-특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편 (예컨대, 표 1에 제공된 항체 및 단편으로부터 유도가능한 것들)과 접촉시키는 단계, 샘플에 존재하는 BCMA의 양을 정량화하는 단계, 샘플에 존재하는 BCMA의 양을, 조기 시점에서 동일한 대상으로부터, 유사한 방식으로, 획득된 생물학적 샘플 내에 있는 것으로 확인된 BCMA의 양과 비교하는 단계; 및 대상의 BCMA 수준이 시간 경과에 따라 변화되었는지 여부를 측정하는 단계를 수반할 것이다. 조기 샘플에 대해 관찰된 양과 비교하여 증가된 BCMA의 양을 갖는 시험 샘플은 암의 진행을 나타낼 수 있다. 대조적으로, 조기 샘플에 대해 관찰된 양과 비교하여 감소된 BCMA의 양을 갖는 시험 샘플은 BCMA-발현 암의 퇴행을 나타낼 수 있다. 따라서, 조기 샘

풀에 대해 관찰된 양과 비교하여 BCMA의 양에 있어서 유의하지 않은 차이를 갖는 시험 샘플은 BCMA-발현 암에 대한 안정된 질환의 상태를 나타낼 수 있다. 일부 실시 형태에서, 샘플의 BCMA 수준을 기지 표준 또는 기준 샘플과 비교할 수 있는데, 이는 기지 표준 또는 기준 샘플 단독으로 행해지거나, 조기 시점에서 평가된 샘플에 대해 관찰된 BCMA 수준에 더하여 행해진다. 추가의 실시 형태에서, 진단 방법 이후에는 암-특이적 치료를 실시하는 추가 단계가 행해질 수 있다. 일부 실시 형태에서, 암-특이적 치료는 본 명세서에 기재된 BCMA × CD3 다중 특이성 항체와 같은 BCMA-발현 암에 대해 유도될 수 있다.

[0153] 다양한 태양에서, BCMA의 양은 샘플을 BCMA에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 접촉시킴으로써 측정된다. 일부 실시 형태에서, 샘플은 BCMA에 특이적으로 결합하는 하나 초과 유형의 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 접촉될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 샘플은 BCMA에 특이적으로 결합하는 제1 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 의해 접촉된 후, BCMA에 특이적으로 결합하는 제2 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 의해 접촉될 수 있다. 항체, 예컨대 본 명세서에 기재된 것들은 이러한 능력에 사용될 수 있다.

[0154] 표 1에 기재된 항체 및 항원-결합 단편의 다양한 조합이 기재된 모니터링 방법을 수행하도록 "제1" 및 "제2" 항체 또는 항원-결합 단편을 제공하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시 형태에서, BCMA-발현 암에는 혈액암, 예컨대 급성 골수성 백혈병 (AML)이 포함된다.

[0155] 소정 실시 형태에서, BCMA의 양은 웨스턴 블로트 분석, 방사면역검정, 면역형광측정, 면역침전, 평형 투석, 면역 확산, 전기화학발광(ECL) 면역검정, 면역조직화학, 형광-활성화 세포 분류(FACS) 또는 ELISA 검정에 의해 측정된다.

BCMA를 검출하기 위한 키트

[0157] 생물학적 샘플에서 BCMA를 검출하기 위한 키트가 본 명세서에 제공된다. 이러한 키트는 본 명세서에 기재된 하나 이상의 BCMA-특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 및 키트의 사용 설명서를 포함한다.

[0158] 제공된 BCMA-특이적 항체 또는 항원-결합 단편은 용액 상태일 수 있거나; 동결건조될 수 있거나; 기재, 담체 또는 플레이트에 고정될 수 있거나, 검출가능하게 표지될 수 있다.

[0159] 기재된 키트는 또한 본 명세서에 기재된 방법을 수행하기에 유용한 추가 성분을 포함할 수 있다. 예로서, 키트는 대상으로부터 샘플을 획득하기 위한 수단, 대조군 샘플 또는 기준 샘플, 예를 들어 느리게 진행되는 암을 갖는 대상 및/또는 암을 갖지 않는 대상으로부터의 샘플, 하나 이상의 샘플 구획, 및/또는 본 발명의 방법의 성능 및 조직 특이적 대조물 또는 표준물을 설명한 교육용 자료를 포함할 수 있다.

[0160] BCMA의 수준을 측정하기 위한 수단은, 예를 들어 완충액 또는 BCMA의 수준을 측정하기 위한 검정에 사용하기 위한 다른 시약을 추가로 포함할 수 있다. 설명서는, 예를 들어, 검정을 수행하는 것에 대한 인쇄된 설명서 및/또는 BCMA의 발현의 수준을 평가하는 것에 대한 설명서일 수 있다.

[0161] 기재된 키트는 또한 대상으로부터 샘플을 단리하기 위한 수단을 포함할 수 있다. 이러한 수단은 대상으로부터 유체 또는 조직을 획득하기 위해 사용될 수 있는 시약 또는 장비 중 하나 이상의 아이템을 포함할 수 있다. 대상으로부터 샘플을 획득하기 위한 수단은 또한 혈액 샘플로부터 혈액 성분, 예컨대 혈청을 단리하기 위한 수단을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 키트는 인간 대상과 함께 사용하도록 설계된다.

다중특이성 항체

[0163] 본 명세서에 기재된 항-BCMA 항체의 결합 도메인은 표면 상에 BCMA를 발현하는 세포를 인식한다. 상기에 기재된 바와 같이, BCMA 발현은 암성 세포를 나타낼 수 있다. 특정 하위세트의 세포에 더 특이적인 표적화가 BCMA 및 CD3과 같은 다른 표적에 결합하는 이중특이성 분자, 예컨대 항체 또는 항체 단편을 제조함으로써 달성될 수 있다. 이는 BCMA에 결합하는 제1 영역 및 다른 표적 항원에 결합하는 제2 결합 영역을 포함하는 분자를 제조함으로써 달성된다. 항원-결합 영역은 표적의 특이적 인식을 가능하게 하는 임의의 형태를 취할 수 있으며, 예를 들어 결합 영역은 중쇄 가변 도메인, Fv (중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인의 조합), 파이브로넥틴 타입 III 도메인을 기반으로 하는 결합 도메인 (예컨대, 파이브로넥틴 유래, 파이브로넥틴으로부터의 타입 III 도메인의 공통 서열에 기반, 테나신 유래 또는 테나신으로부터의 타입 III 도메인의 공통 서열에 기반, 예컨대 얀센 바이오테크(Janssen Biotech) 인코포레이티드로부터의 센티린(Centyrin) 분자, 예를 들어, WO2010/051274 및 WO2010/093627 참조)일 수 있거나 이를 포함할 수 있다. 따라서, BCMA 및 다른 항원에 각각 결합하는 2개의 상이한 항원-결합 영역을 포함하는 이중특이성 분자가 제공된다.

[0164] 본 명세서에 기재된 다중특이성 항체 중 일부는 BCMA 및 CD3에 각각 결합하는 2개의 상이한 항원-결합 영역을

포함한다. 바람직한 실시 형태에서, BCMA 및 CD3에 결합하는 다중특이성 항체 (BCMA × CD3 다중특이성 항체) 및 이의 다중특이성 항원-결합 단편이 제공된다. 일부 실시 형태에서, BCMA x CD3 다중특이성 항체는, 쌍을 이루어 BCMA에 면역특이적으로 결합하는 제1 항원-결합 부위를 형성하는 제1 중쇄 (HC1) 및 제1 경쇄 (LC1), 및 쌍을 이루어 CD3에 면역특이적으로 결합하는 제2 항원-결합 부위를 형성하는 제2 중쇄 (HC2) 및 제2 경쇄 (LC2)를 포함한다. 바람직한 실시 형태에서, BCMA x CD3 다중특이성 항체는, 쌍을 이루어 CD3에 면역특이적으로 결합하는 제1 항원-결합 부위를 형성하는 제1 중쇄 (HC1) 및 제1 경쇄 (LC1)를 포함하는 BCMA-특이적 아암, 및 쌍을 이루어 BCMA에 면역특이적으로 결합하는 제2 항원-결합 부위를 형성하는 제2 중쇄 (HC2) 및 제2 경쇄 (LC2)를 포함하는 CD3-특이적 아암을 포함하는 이중특이성 항체이다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 이중특이성 항체는 전장 항체 구조를 갖는 항체를 포함한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "전장 항체"는 2개의 전장 항체 중쇄 및 2개의 전장 항체 경쇄를 갖는 항체를 지칭한다. 전장 항체 중쇄 (HC)는 중쇄 가변 및 불변 도메인 VH, CH1, CH2 및 CH3을 포함한다. 전장 항체 경쇄 (LC)는 경쇄 가변 및 불변 도메인 VL 및 CL을 포함한다. 전장 항체는 어느 하나 또는 둘 모두의 중쇄에 C-말단 라이신(K)이 결여되어 있을 수 있다. 용어 "Fab-아암(Fab-arm)" 또는 "하프 분자(half molecule)"는 항원에 특이적으로 결합하는 하나의 중쇄-경쇄 쌍을 지칭한다. 일부 실시 형태에서, 항원-결합 도메인 중 하나는 비-항체(non-antibody) 기반 결합 도메인, 예를 들어, 파이브로넥틴 타입 3 도메인, 예를 들어, 센티린에 기초한 결합 도메인이다.

[0165]

본 명세서에 제공된 다중특이성 항체의 BCMA-결합 아암은 전술된 BCMA-특이적 항체 중 임의의 것으로부터 유래될 수 있다. 이러한 BCMA-결합 아암의 일부 예시적인 실시 형태에서, BCMA에 결합하는 제1 항원-결합 영역은 표 1에 기재된 바와 같은 항체 클론으로부터 유래되는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다. 이러한 BCMA-결합 아암의 일부 예시적인 실시 형태에서, BCMA에 결합하는 제1 항원-결합 영역은 표 1에 기재된 바와 같은 항체 클론으로부터 유래되는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 및 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다. 이러한 BCMA-결합 아암의 일부 예시적인 실시 형태에서, BCMA에 결합하는 제1 항원-결합 영역은 클론 BCMB69, BCMB117, BCMB123, BCMB128, BCMB129, BCMB176 또는 BCMB177의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다. 이러한 BCMA-결합 아암의 일부 예시적인 실시 형태에서, BCMA에 결합하는 제1 항원-결합 영역은 클론 BCMB69, BCMB117, BCMB123, BCMB128, BCMB129, BCMB176 또는 BCMB177의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 및 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다. 이러한 BCMA-결합 아암의 일부 예시적인 실시 형태에서, BCMA에 결합하는 제1 항원-결합 영역은 표 1에 기재된 바와 같은 항체 클론으로부터 유래되는 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 이러한 BCMA-결합 아암의 일부 예시적인 실시 형태에서, BCMA에 결합하는 제1 항원-결합 영역은 표 1에 기재된 바와 같은 항체 클론으로부터 유래되는 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 이러한 BCMA-결합 아암의 일부 예시적인 실시 형태에서, BCMA에 결합하는 제1 항원-결합 영역은 클론 BCMB69, BCMB117, BCMB123, BCMB128, BCMB129, BCMB176 또는 BCMB177의 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 이러한 BCMA-결합 아암의 일부 예시적인 실시 형태에서, BCMA에 결합하는 제1 항원-결합 영역은 클론 BCMB69, BCMB117, BCMB123, BCMB128, BCMB129, BCMB176 또는 BCMB177의 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0166]

표 3은 BCMA에 특이적인 하나의 중쇄 및 경쇄 쌍 및 CD3에 특이적인 다른 중쇄 및 경쇄 쌍을 갖는 BCMA × CD3 이중특이성 항체의 목록을 제공하는데, 여기서 특정 항체 ID는 기재된 실시 형태를 생성하는 데 사용되는 항원-특이적 항체 아암을 기재하기 위해 열거된다.

[0167]

[표 3]

BCMA-특이적 아암 = Ab ID	CD3-특이적 아암 = Ab ID
BCMB69	CD3B219
BCMB117	CD3B219
BCMB123	CD3B219
BCMB128	CD3B219
BCMB129	CD3B219
BCMB176	CD3B219
BCMB177	CD3B219

[0168]

[0169] 이중특이성 항체의 일부 실시 형태에서, BCMA-결합 아암은 또한 사이노몰거스 BCMA, 바람직하게는 이의 세포외 도메인에 결합한다.

[0170]

일부 실시 형태에서, 다중특이성 항체의 BCMA-결합 아암은 IgG 또는 이의 유도체, 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 동종형이다. BCMA-결합 아암이 IgG4 동종형을 갖는 일부 실시 형태에서, 이는 이의 Fc 영역 내에 S228P, L234A, 및 L235A 치환(들)을 함유한다.

[0171]

[0171] 이중특이성 항체의 일부 실시 형태에서, 제2 항원-결합 아암은 인간 CD3에 결합한다. 일부 바람직한 실시 형태

에서, BCMA × CD3 이중특이성 항체의 CD3-특이적 아암은 인간 1차 T 세포 및/또는 사이노몰거스 원숭이 1차 T 세포에 결합하고 이를 활성화하는 CD3-특이적 항체로부터 유래된다. 일부 실시 형태에서, CD3-결합 아암은 CD3 ε의 N-말단에 있는 에피토프에 결합한다. 일부 실시 형태에서, CD3-결합 아암은 CD3 ε의 6개의 N-말단 아미노산을 포함하는 에피토프와 접촉한다. 일부 실시 형태에서, 이중특이성 항체의 CD3-특이적 결합 아암은 마우스 IgG3/람다 동종형인 마우스 단일클론 항체 SP34로부터 유래된다. 일부 실시 형태에서, CD3-결합 아암은 항체 SP34의 CDR을 포함한다. 그러한 CD3-결합 아암은 5×10^{-7} M 이하, 예컨대 1×10^{-7} M 이하, 5×10^{-8} M 이하, 1×10^{-8} M 이하, 5×10^{-9} M 이하, 또는 1×10^{-9} M 이하의 친화도로 CD3에 결합할 수 있다. CD3-특이적 결합 아암은 마우스 단일클론 항체 SP34의 아암의 인간화 버전일 수 있다. CD3-특이적 아암의 유래가 되는 항-CD3 항체를 인간화하기 위해 인간 프레임워크 적응화(HFA)가 사용될 수 있다. 이중특이성 항체의 일부 실시 형태에서, CD3-결합 아암은 표 2로부터 선택되는 중쇄와 경쇄 쌍을 포함한다. 이중특이성 항체의 다른 실시 형태에서, CD3-결합 아암은 표 2에 기재된 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 및 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함한다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 이중특이성 항체의 CD3-결합 아암의 일부 실시 형태의 중쇄 및 경쇄 CDR 서열은 하기 아미노산 서열을 포함할 수 있다: Hc CDR1, 서열 번호 59; Hc CDR2: 서열 번호 60; Hc CDR3, 서열 번호 61; Lc CDR1, 서열 번호 62; Lc CDR2: 서열 번호 63; 및 Lc CDR3, 서열 번호 64.

[0172]

일부 실시 형태에서, CD3-결합 아암은 IgG 또는 이의 유도체이다. 일부 실시 형태에서, CD3-결합 아암은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4이다. CD3-결합 아암이 IgG4 동종형을 갖는 일부 실시 형태에서, 이는 이의 Fc 영역 내에 S228P, L234A, L235A, F405L 및 R409K 치환(들)을 함유한다. 일부 실시 형태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 1차 인간 T 세포 상의 CD3 ε에 결합한다. 일부 실시 형태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 1차 사이노몰거스 T 세포 상의 CD3 ε에 결합한다. 일부 실시 형태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 1차 인간 및 사이노몰거스 T 세포 상의 CD3 ε에 결합한다. 일부 실시 형태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 1차 인간 CD4+ T 세포를 활성화한다. 일부 실시 형태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 1차 사이노몰거스 CD4+ T 세포를 활성화한다.

[0173]

일부 실시 형태에서, 항체 클론 BCMB69, BCMB117, BCMB123, BCMB128, BCMB129, BCMB176 또는 BCMB177의 중쇄를 포함하는 BCMA-결합 아암을 갖는 BCMA × CD3 이중특이성 항체가 제공된다. 일부 실시 형태에서, 항체 클론 BCMB69, BCMB117, BCMB123, BCMB128, BCMB129, BCMB176 또는 BCMB177의 중쇄 및 경쇄를 포함하는 BCMA-결합 아암을 갖는 BCMA × CD3 이중특이성 항체가 제공된다. 일부 실시 형태에서, 항체 클론 CD3B219의 중쇄를 포함하는 CD3-결합 아암을 갖는 BCMA × CD3 이중특이성 항체가 제공된다. 일부 실시 형태에서, 항체 클론 CD3B219의 중쇄 및 경쇄를 포함하는 CD3-결합 아암을 갖는 BCMA × CD3 이중특이성 항체가 제공된다. 일부 실시 형태에서, 항체 클론 BCMB69, BCMB117, BCMB123, BCMB128, BCMB129, BCMB176 또는 BCMB177의 중쇄를 포함하는 BCMA-결합 아암 및 항체 클론 CD3B219의 중쇄를 포함하는 CD3-결합 아암을 갖는 BCMA × CD3 이중특이성 항체가 제공된다. 일부 실시 형태에서, 항체 클론 BCMB69, BCMB117, BCMB123, BCMB128, BCMB129, BCMB176 또는 BCMB177의 중쇄 및 경쇄를 포함하는 BCMA-결합 아암 및 항체 클론 CD3B219의 중쇄 및 경쇄를 포함하는 CD3-결합 아암을 갖는 BCMA × CD3 이중특이성 항체가 제공된다.

[0174]

예시적인 BCMA × CD3 이중특이성 항체가 표 9에 제공된다.

[0175]

상이한 포맷의 이중특이성 항체가 기재되어 왔고, 최근에는 문헌[Chames and Baty (2009) Curr Opin Drug Disc Dev 12: 276]에 의해 검토되었다.

[0176]

일부 실시 형태에서, 본 발명의 이중특이성 항체는 이중항체, 크로스-바디(cross-body), 또는 본 발명에 기재된 것들로서의 제어된 Fab 아암 교환을 통해 얻은 이중특이성 항체이다.

[0177]

일부 실시 형태에서, 이중특이성 항체는, 이중이량체화를 강제로 일으키는 상보적 CH3 도메인을 갖는 IgG-유사 분자; 재조합 IgG-유사 이중 표적화 분자 (여기서는, 분자의 2개의 측 각각이 적어도 2개의 상이한 항체의 Fab 단편 또는 Fab 단편의 일부를 함유함); IgG 융합 분자 (여기서는, 전장 IgG 항체가 추가 Fab 단편 또는 Fab 단편의 일부에 융합됨); Fc 융합 분자 (여기서는, 단일쇄 Fv 분자 또는 안정화된 이중항체가 중쇄 불변-도메인, Fc-영역 또는 이들의 일부에 융합됨); Fab 융합 분자 (여기서는, 상이한 Fab-단편들이 함께 융합됨); ScFv- 및 이중항체-기반 및 중쇄 항체 (예를 들어, 도메인 항체, 나노바디) (여기서는, 상이한 단일쇄 Fv 분자들 또는 상이한 이중항체 또는 상이한 중쇄 항체(예를 들어, 도메인 항체, 나노바디)가 서로 또는 다른 단백질 또는 담체 분자에 융합됨)를 포함한다.

[0178]

일부 실시 형태에서, 상보적 CH3 도메인 분자를 갖는 IgG-유사 분자는 트리오맵(Triomab)/쿼드로마(Quadroma) (트리온파마(Trion Pharma)/프레제니우스 밥이오토크(Fresenius Biotech)), 농-인투-홀(Knob-into-Hole) (제넨

테크(Genentech)), 크로스MAb(CrossMAb) (라로슈(Roche)) 및 정전기적으로 일치된 항체(electrostatically-matched) (암젠(Amgen)), LUZ-Y (제넨테크), 가닥 교환 조작된 도메인 바디(Strand Exchange Engineered Domain body)(시드바디(SEEDbody)) (EMD 세로노(Serono)), 비클로닉(Biclonic)(메루스(Merus)) 및 듀오바디(DuoBody)® (젠팝(Genmab) A/S)를 포함한다.

[0179] 일부 실시 형태에서, 재조합 IgG-유사 이중 표적화 분자는 이중 표적화(Dual Targeting)(DT)-Ig (GSK/도만티스(Domantis)), 투-인-원 항체(Two-in-one Antibody) (제넨테크), 가교결합된(Cross-linked) Mab (카르마노스(Karmanos) 암센터), mAb2 (F-스타(Star)) 및 코브(Cov)X-바디 (CovX/화이자(Pfizer))를 포함한다.

[0180] 일부 실시 형태에서, IgG 융합 분자는 이중 가변 도메인(Dual Variable Domain)(DVD)-Ig (애보트(Abbott)), IgG-유사 이중특이성 항체(IgG-like Bispecific)(인클론(InnClone)/일라이 릴리(Eli Lilly)), Ts2Ab (메들뮨(MedImmune)/AZ) 및 BsAb (자이모제네틱스(Zymogenetics)), 헤라클레스(HERCULES) (바이오젠 아이텍(Biogen Idec)) 및 TvAb (라로슈)를 포함한다.

[0181] 일부 실시 형태에서, Fc 융합 분자는 ScFv/Fc 융합물 (아카데믹 인스티튜션(Academic Institution)), 스콜피온(SCORPION) (이머진트 바이오솔루션스(Emergent BioSolutions)/트루비온, 자이모제네틱스/BMS), 이중 친화성 재표적화 기술(Dual Affinity Retargeting Technology)(Fc-DART) (마크로제닉스(MacroGenics)) 및 이중(Dual)(ScFv)₂-Fab (항체 약품 국립 연구 센터(National Research Center for Antibody Medicine)--중국)를 포함한다.

[0182] 일부 실시 형태에서, Fab 융합 이중특이성 항체는 F(ab)2 (메다렉스(Medarex)/암젠), 이중-작용(Dual-Action) 또는 Bis-Fab (제넨테크), 독-앤드-록(Dock-and-Lock)(DNL) (이뮤노메딕스(ImmunoMedics)), 2가 이중특이성 항체(Bivalent Bispecific) (바이오테크놀(Biotecnol)) 및 Fab-Fv (UCB-셀테크(Celitech))를 포함한다. ScFv-, 이중항체-기반 및 도메인 항체는 이중특이성 T 세포 인게이저 (Bispecific T Cell Engager; BITE) (Micromet), 텐덤 이중항체(Tandem Diabody)(Tandab) (아피메드(Affimed)), 이중 친화성 재표적화 기술(DART) (마크로제닉스), 단일쇄 이중항체(Single-chain Diabody) (아카데믹), TCR-유사(TCR-like) 항체 (AIT, 리셉터로직스(ReceptorLogics)), 인간 혈청 일부분 ScFv 융합물 (메리맥(Merrimack)) 및 콤바디(COMBODY) (에피젠 바이오테크(Epigen Biotech)), 이중 표적화 나노바디(dual targeting nanobody) (아블링스(Ablynx)), 이중 표적화 중쇄 단독 도메인 항체를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0183] 본 발명의 전장 이중특이성 항체는, 예를 들어 2개의 단일특이성 2가 항체들 사이에서의 Fab 아암 교환(또는 하프 분자 교환)을 사용하여 생성될 수 있는데, 이는 공발현을 사용하거나 또는 무세포 환경에서의 시험관내에서, 각각의 하프 분자 내의 중쇄 CH3 계면에 치환을 도입하여 별개의 특이성을 갖는 2개의 항체 하프 분자의 이종이량체 형성을 유리하게 함으로써 행해진다. Fab 아암 교환 반응은 이황화물-결합 이성질화 반응 및 CH3 도메인의 해리-회합의 결과이다. 모 단일특이성 항체의 헌지 영역 내의 중쇄 이황화물 결합은 환원된다. 모 단일특이성 항체들 중 하나의, 생성된 유리 시스테인은, 제2 모 단일특이성 항체 분자의 시스테인 잔기와 중쇄간 이황화물 결합을 형성하고, 동시에 모 항체의 CH3 도메인이 해리-회합에 의해 방출 및 재형성된다. Fab 아암의 CH3 도메인은 동종이량체화에 비하여 이종이량체화에 유리하도록 조작될 수 있다. 생성된 산물은, 각각이 별개의 에피토프, 즉 BCMA 상의 에피토프 및 CD3 상의 에피토프에 결합되는 2개의 Fab 아암 또는 하프 분자를 갖는 이중특이성 항체이다.

[0184] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "동종이량체화"는 동일한 CH3 아미노산 서열을 갖는 2개의 중쇄의 상호작용을 지칭한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "동종이량체"는 동일한 CH3 아미노산 서열을 갖는 2개의 중쇄를 갖는 항체를 지칭한다.

[0185] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "이종이량체화"는 동일하지 않은 CH3 아미노산 서열을 갖는 2개의 중쇄의 상호작용을 지칭한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "이종이량체"는 동일하지 않은 CH3 아미노산 서열을 갖는 2개의 중쇄를 갖는 항체를 지칭한다.

[0186] "눕-인-홀(knob-in-hole)" 전략 (예를 들어, 국제 특허 출원 공개 WO 2006/028936호 참조)이 전장 이중특이성 항체를 생성하는 데 사용될 수 있다. 간략하게 말해서, 인간 IgG 내의 CH3 도메인의 계면을 형성하는 선택된 아미노산이 CH3 도메인 상호작용에 영향을 주는 위치에서 돌연변이되어 이종이량체 형성을 촉진할 수 있다. 작은 측쇄(홀)를 갖는 아미노산이 제1 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 내로 도입되고, 큰 측쇄(노브)를 갖는 아미노산이 제2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 내로 도입된다. 2개의 항체의 공발현 후에, "홀"을 갖는 중쇄와 "노브"를 갖는 중쇄의 우선적인 상호작용의 결과로서 이종이량체가 형성된다. 노브와 홀을

형성하는 예시적인 CH3 치환 쌍은 하기와 같다(제1 중쇄의 제1 CH3 도메인 내의 변형된 위치/제2 중쇄의 제2 CH3 도메인 내의 변형된 위치로서 표현됨): T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S 및 T366W/T366S_L368A_Y407V.

[0187] 하나의 CH3 표면에서 양으로 하전된 잔기를, 그리고 제2 CH3 표면에서 음으로 하전된 잔기를 치환함으로써 정전기 상호작용을 사용하여 중쇄 이종이량체화를 촉진하는 것과 같은 다른 전략이 사용될 수 있으며, 이는 미국 특허 출원 공개 제2010/0015133호; 미국 특허 출원 공개 제2009/0182127호; 미국 특허 출원 공개 제2010/028637호 또는 미국 특허 출원 공개 제2011/0123532호에 기재된 바와 같다. 다른 전략에서는, 미국 특허 출원 공개 제2012/0149876호 또는 미국 특허 출원 공개 제2013/0195849호에 기재된 바와 같이 하기의 치환(제1 중쇄의 제1 CH3 도메인 내의 변형된 위치/제2 중쇄의 제2 CH3 도메인 내의 변형된 위치로서 표현됨)에 의해 이종이량체화가 촉진될 수 있다: L351Y_F405AY407V/T394W, T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V K409F Y407A/T366A_K409F, 또는 T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W.

[0188] 전술된 방법에 더하여, 본 발명의 이중특이성 항체는, 2개의 단일특이성 동종이량체성 항체의 CH3 영역 내에 비대칭 돌연변이를 도입시키고, 이황화물 결합 이성질화를 가능하게 하는 환원성 조건에서 2개의 모 단일특이성 동종이량체성 항체로부터 이중특이성 이종이량체성 항체를 형성함으로써 무세포 환경에서 시험관내에서 생성될 수 있는데, 이는 국제 특허 출원 공개 WO2011/131746호에 기재된 방법에 따른 것이다. 이들 방법에서, 제1 단일특이성 2가 항체(예를 들어, 항-BCMA 항체) 및 제2 단일특이성 2가 항체(예를 들어, 항-CD3 항체)는 CH3 도메인에서 헤테로이량체 안정성을 촉진하는 소정의 치환을 갖도록 조작되며; 이들 항체는 헌지 영역 내의 시스테인이 이황화물 결합 이성화를 거칠 수 있게 하기에 충분한 환원성 조건 하에서 함께 인큐베이팅되고; 그럼으로써 Fab 아암 교환에 의해 이중특이성 항체를 생성한다. 인큐베이션 조건은 비환원성 상태로 최적으로 회복될 수 있다. 사용될 수 있는 예시적인 환원제는 2-메르캅토에틸아민(2-MEA), 디이티오프레이톨(DTT), 디이티오에리트리톨(DTE), 글루타타온, 트리스(2-카르복시에틸)포스핀(TCEP), L-시스테인 및 베타-메르캅토에탄올이며, 바람직하게는 환원제는 2-메르캅토에틸아민, 디이티오프레이톨 및 트리스(2-카르복시에틸)포스핀으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 예를 들어, pH 5 내지 8에서, 예를 들어 pH 7.0 또는 pH 7.4에서 적어도 0.5 mM의 디이티오프레이톨의 존재 하에서 또는 적어도 25 mM의 2-MEA의 존재 하에서 20°C 이상의 온도에서 90분 이상 동안의 인큐베이션이 사용될 수 있다.

[0189] 기재된 BCMA × CD3-다중특이성 항체에 더하여, 기재된 BCMA × CD3 다중특이성 항체를 암호화할 수 있는 폴리뉴클레오티드 서열이 또한 제공된다. 기재된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터가 또한 제공되며, 마찬가지로 BCMA × CD3 다중특이성 항체를 발현하는 세포도 본 명세서에 제공된다. 개시된 벡터를 발현할 수 있는 세포가 또한 기재되어 있다. 이들 세포는 포유류 세포(예컨대, 293F 세포, CHO 세포), 곤충 세포(예컨대, Sf7 세포), 효모 세포, 식물 세포, 또는 세균 세포(예컨대, 대장균)일 수 있다. 기재된 항체는 또한 하이브리도마 세포에 의해 생성될 수 있다.

다중특이성 항체 및 이의 다중특이성 항원-결합 단편을 사용하는 치료적 조성물 및 치료 방법

[0191] 상기에 논의된 BCMA 이중특이성 항체, 예를 들어 상기 논의된 BCMA × CD3 이중특이성 항체는 요법에 유용하다. 특히, BCMA 이중특이성 항체는 암을 치료하는 데 유용하다. 또한, 포유동물에서 과다증식성 장애의 치료를 위한 치료적 조성물이 본 명세서에 제공되며, 본 치료적 조성물은 본 명세서에 기재된 다중특이성 항체 또는 다중특이성 항원-결합 단편의 치료적 유효량 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 바람직한 실시 형태에서, 다중특이성 항체는 본 명세서에 기재된 바와 같은 BCMA × CD3 다중특이성 항체 또는 이의 다중특이성 항원-결합 단편, 그리고 더 바람직하게는 본 명세서에 기재된 바와 같은 BCMA × CD3 이중특이성 항체 또는 이의 BCMA × CD3 이중특이성 항원-결합 단편이다. 일 실시 형태에서, 상기 약제학적 조성물은 하기를 포함하는(그러나 이에 한정되지 않는) BCMA-발현 암의 치료를 위한 것이다: BCMA-발현 B 세포 암, 예컨대 다발성 골수종 (MM); 및 BCMA이 발현되는 아직 확인되지 않은 다른 암. 상기에 논의된 특정 암을 포함하는 암, 예컨대 혈액암을 치료하기 위해 사용될 수 있는 특정 이중특이성 항체는 항체 BCMB69, BCMB117, BCMB123, BCMB128, BCMB129, BCMB176, 또는 BCMB177 또는 CD3B219를 포함한다. 이러한 특정 암을 포함하는 암, 예컨대 혈액암을 치료하기에 유용한 이중특이성 항체의 하나의 예는 BCMB72이다.

[0192] 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물은 a) 본 발명의 다중특이성 항체 또는 항체 단편의 유효량, 및 b) 약제학적으로 허용되는 담체 - 이는 불활성이거나 생리학적으로 활성일 수 있음 - 를 포함한다. 바람직한 실시 형태에서, 다중특이성 항체는 본 명세서에 기재된 바와 같은 BCMA × CD3 다중특이성 항체 또는 이의 다중특이성 항

원-결합 단편, 그리고 더 바람직하게는 본 명세서에 기재된 바와 같은 BCMA × CD3 이중특이성 항체 또는 이의 BCMA × CD3 이중특이성 항원-결합 단편이다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "약제학적으로 허용되는 담체"는 생리학적으로 적합한 임의의 그리고 모든 용매, 분산 매체, 코팅, 항세균제 및 항진균제 등을 포함한다. 적합한 담체, 희석제 및/또는 부형제의 예에는 물, 식염수, 인산염 완충 식염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등뿐만 아니라, 이들의 임의의 조합 중 하나 이상을 포함한다. 많은 경우에, 조성물 중에 등장화제, 예컨대 당류, 폴리알코올, 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다. 특히, 적합한 담체의 관련 예에는 (1) 약 1 mg/mL 내지 25 mg/mL의 인간 혈청 일부민을 함유하거나 함유하지 않는 둘베코(Dulbecco) 인산염 완충 식염수, pH 약 7.4, (2) 0.9% 식염수(0.9% w/v 염화나트륨(NaCl)), 및 (3) 5% (w/v) 텍스트로스가 포함되고; 또한 산화방지제, 예컨대 트립타민 및 안정제, 예컨대 트윈(Tween) 20®을 함유한다.

[0193] 본 발명에서의 조성물은 또한, 필요하다면 치료되는 특정 장애를 위하여, 추가의 치료제를 함유할 수 있다. 바람직하게는, 다중특이성 항체 또는 항체 단편과 보충적 활성 화합물은 서로에게 불리한 영향을 주지 않는 상보적 활성을 가질 것이다. 바람직한 실시 형태에서, 추가의 치료제는 시타라빈, 안트라사이클린, 히스타민 다이하이드로클로라이드 또는 인터류킨 2이다. 바람직한 실시 형태에서, 추가의 치료제는 화학치료제이다.

[0194] 본 발명의 조성물은 다양한 형태일 수 있다. 이들은, 예를 들어 액체, 반고체, 및 고체 투여형을 포함하지만, 바람직한 형태는 의도된 투여 방식 및 치료적 응용에 좌우된다. 전형적인 바람직한 조성물은 주사가능 또는 주입가능 용액의 형태이다. 바람직한 투여 방식은 비경구(예를 들어, 정맥내, 근육내, 복막내, 피하) 투여이다. 바람직한 실시 형태에서, 본 발명의 조성물은 일정 시간에 걸쳐 연속 주입에 의해 또는 볼루스(bolus)로서 정맥내 투여된다. 다른 바람직한 실시 형태에서, 이들은 국부뿐만 아니라 전신 치료적 효과를 발휘하도록 근육내, 피하, 관절내, 골액낭내, 종양내, 종양 주변, 병변내, 또는 병변 주변 경로에 의해 주사된다.

[0195] 본 발명의 항체, 항체 단편 또는 항체 접합체를 적절한 용매 중에 필요한 양으로 혼입시킨 후, 미세여과에 의해 멸균함으로써 비경구 투여를 위한 멸균 조성물이 제조될 수 있다. 용매 또는 비허클로서, 물, 식염수, 인산염 완충 식염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등뿐만 아니라 이들의 조합도 사용될 수 있다. 많은 경우에, 조성물 중에 등장화제, 예컨대 당류, 폴리알코올, 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다. 이들 조성물은 또한 애쥬번트(adjuvant), 특히 습윤제, 등장화제, 유화제, 분산제 및 안정제를 함유할 수 있다. 비경구 투여를 위한 멸균 조성물은 또한 멸균 고체 조성물 형태로 제조될 수 있는데, 이것은 멸균수 또는 임의의 다른 주사가능 멸균 매체 중에서 사용 시에 용해될 수 있다.

[0196] 다중특이성 항체 또는 항체 단편은 또한 경구 투여될 수 있다. 경구 투여를 위한 고체 조성물로서, 정제, 환제, 분말(젤라틴 캡슐, 샤ퟜ(sachet)) 또는 과립이 사용될 수 있다. 이들 조성물에서, 본 발명에 따른 활성 성분은 아르곤 스트림 하에서 하나 이상의 불활성 희석제, 예컨대 전분, 셀룰로스, 수크로스, 락토스 또는 실리카와 혼합된다. 이들 조성물은 또한 희석제 이외의 물질, 예를 들어 하나 이상의 유행제, 예컨대 마그네슘 스테아레이트 또는 활석, 착색제, 코팅(당-코팅 정제) 또는 글레이즈를 포함할 수 있다.

[0197] 경구 투여를 위한 액체 조성물로서, 불활성 희석제, 예컨대 물, 에탄올, 글리세롤, 식물성 오일 또는 파라핀유를 함유하는 약제학적으로 허용되는 용액, 혼탁액, 애멀전, 시럽 및 엘리서(elixir)가 사용될 수 있다. 이들 조성물은 희석제 이외의 물질, 예를 들어 습윤, 감미, 증점, 향미 또는 안정화 제품을 포함할 수 있다.

[0198] 용량은 원하는 효과, 치료 지속시간 및 사용되는 투여 경로에 좌우되며; 이는 대체로 성인의 경우 경구로 일일 5 mg 내지 1000 mg이며, 이때 단위 용량은 1 mg 내지 250 mg 활성 물질의 범위이다. 일반적으로, 의사는 치료되는 대상의 연령, 체중 및 이에 특이적인 임의의 다른 인자에 따라 적절한 투여량을 결정할 것이다.

[0199] 또한, BCMA + 세포를 사멸을 필요로 하는 환자에게, 상기 BCMA에 결합하고 T 세포를 동원하여 BCMA + 세포를 사멸할 수 있는 (즉, T 세포 방향전환) 다중특이성 항체를 투여함으로써 상기 BCMA + 세포를 사멸하기 위한 방법이 본 명세서에 제공된다. 본 발명의 다중특이성 항체 또는 항체 단편 중 임의의 것이 치료적으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 일 실시 형태에서, BCMA × CD3-다중특이성 항체 BCMB72를 치료적으로 사용하여 대상에서 암을 치료할 수 있다.

[0200] 바람직한 실시 형태에서, 본 발명의 다중특이성 항체 또는 항체 단편은 포유동물에서의 과다증식성 장애의 치료에 사용된다. 더 바람직한 실시 형태에서, 상기에 개시되고 본 발명의 다중특이성 항체 또는 항체 단편을 함유하는 약제학적 조성물들 중 하나가 포유동물에서의 과다증식성 장애의 치료에 사용된다. 일 실시 형태에서, 장애는 암이다. 특히, 암은 하기를 포함하는(그러나 이로 한정되지 않는) BCMA-발현 암이다: BCMA-발현 B-세포 암, 예컨대 다발성 골수종 (MM); 및 BCMA이 발현되는 아직 확인되지 않은 다른 암. 바람직한 실시 형태에서,

다중특이성 항체는 본 명세서에 기재된 바와 같은 BCMA × CD3 다중특이성 항체 또는 이의 다중특이성 항원-결합 단편, 그리고 더 바람직하게는 본 명세서에 기재된 바와 같은 BCMA × CD3 이중특이성 항체 또는 이의 BCMA × CD3 이중특이성 항원-결합 단편이다.

[0201] 따라서, 본 발명의 약제학적 조성물은 BCMA-발현 암을 포함하는(그러나 이로 한정되지 않는) 다양한 암의 치료 또는 예방에 유용하며, BCMA-발현 암은 하기를 포함한다(그러나 이로 한정되지 않는다): BCMA-발현 B-세포 암, 예컨대 급성 다발성 골수종 (MM); 및 BCMA이 발현되는 아직 확인되지 않은 다른 암.

[0202] 유사하게, 선택된 세포 집단의 성장을 억제하기 위한 방법이 본 명세서에 추가로 제공되며, 본 방법은 BCMA-발현 표적 세포, 또는 이러한 표적 세포를 함유하는 조직을, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)의 존재 하에서, 단독으로 의 또는 다른 세포독성제 또는 치료제와 병용된 본 발명의 다중특이성 항체 또는 항체 단편의 유효량과 접촉시키는 단계를 포함한다. 바람직한 실시 형태에서, 다중특이성 항체는 본 명세서에 기재된 바와 같은 BCMA × CD3 다중특이성 항체 또는 이의 다중특이성 항원-결합 단편, 그리고 더 바람직하게는 본 명세서에 기재된 바와 같은 BCMA × CD3 이중특이성 항체 또는 이의 BCMA × CD3 이중특이성 항원-결합 단편이다. 바람직한 실시 형태에서, 추가의 치료제는 시타라빈, 안트라사이클린, 히스타민 다이하이드로클로라이드 또는 인터류킨 2이다. 바람직한 실시 형태에서, 추가의 치료제는 화학치료제이다. 선택된 세포 집단의 성장을 억제하기 위한 방법은 시험관내, 생체내 또는 생체외에서 실시될 수 있다.

[0203] 시험관내 사용의 예에는, 이환된 또는 악성 세포를 사멸하기 위한, 동일한 환자 내로의 이식 전에의 자가 골수의 치료; 컴페턴트(competent) T 세포를 사멸하여 이식편-대-숙주-질환(GVHD)을 예방하기 위한, 이식 전에의 골수의 치료; 표적 항원을 발현하지 않는 원하는 변이체를 제외한 모든 세포를 사멸하기 위한 또는 원치 않는 항원을 발현하는 변이체를 사멸하기 위한, 세포 배양물의 치료가 포함된다. 비임상적 시험관내 사용의 조건은 당업자에 의해 용이하게 결정된다.

[0204] 임상적 생체외 사용의 예는 암 치료에서 자가 이식 전에 골수로부터 종양 세포를 제거하기 위한 것이다. 치료는 하기와 같이 수행될 수 있다. 골수가 환자 또는 다른 개체로부터 수거되고, 이어서 본 발명의 세포독성제가 첨가된 혈청을 함유하는 배지 중에서 인큐베이션된다. 농도는 약 37°C에서 약 30분 내지 약 48시간 동안 약 10 uM 내지 1 uM의 범위이다. 인큐베이션의 시간 및 농도의 정확한 조건, 즉 용량은 당업자에 의해 용이하게 결정된다. 인큐베이션 후에, 골수 세포를 혈청을 함유하는 배지로 세척하고, 알려진 방법에 따라 i.v. 주입에 의해 환자에게 반환시킨다. 환자가 골수의 수거와 치료된 세포의 재주입의 시간 사이에 다른 치료, 예컨대 일련의 절제 화학요법 또는 전신 방사선 조사를 받는 상황에서, 치료된 골수 세포는 표준 의료 장비를 사용하여 액체 질소 중에 동결 상태로 저장된다.

[0205] 임상적 생체내 사용을 위하여, 다중특이성 항체 또는 항원-결합 단편의 치료적 유효량이 이를 필요로 하는 대상에게 투여된다. 예를 들어, BCMA × CD3 다중특이성 항체 및 이의 다중특이성 항원-결합 단편은 BCMA-발현 암의 치료를 필요로 하는 대상에서 BCMA-발현 암의 치료에 유용할 수 있다. 일부 실시 형태에서, BCMA-발현 암은 B-세포 암, 예컨대 다발성 골수종 (MM)이다. 바람직한 실시 형태에서, 다중특이성 항체는 본 명세서에 기재된 바와 같은 BCMA × CD3 다중특이성 항체 또는 이의 다중특이성 항원-결합 단편, 그리고 더 바람직하게는 본 명세서에 기재된 바와 같은 BCMA × CD3 이중특이성 항체 또는 이의 BCMA × CD3 이중특이성 항원-결합 단편이다. 일부 실시 형태에서, 대상은 포유동물, 바람직하게는 인간이다. 일부 실시 형태에서, 다중특이성 항체 또는 항원-결합 단편은 멸균성에 대해 시험된 용액으로서 투여될 것이다.

[0206] 상기의 치료 및 사용 방법에서의 투여 계획은 최적의 원하는 반응(예를 들어, 치료적 반응)을 제공하도록 조정된다. 예를 들어, 단일 볼루스가 투여될 수 있거나, 수회 분할 용량이 시간 경과에 따라 투여될 수 있거나, 또는 치료적 상황의 위급 상황에 의해 지시되는 바와 같이 용량이 비례해서 감소 또는 증가될 수 있다. 비경구 조성물은 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위하여 투여 단위형으로 제형화될 수 있다.

[0207] 다중특이성 항체 및 단편에 대한 효율적인 투여량 및 투여 계획은 치료하고자 하는 질환 또는 상태에 좌우되고, 당업자에 의해 결정될 수 있다. 본 발명의 화합물의 치료적 유효량에 대한 예시적인 비제한적인 범위는 약 0.001 내지 10 mg/kg, 예컨대 약 0.001 내지 5 mg/kg, 예를 들어 약 0.001 내지 2 mg/kg, 예컨대 약 0.001 내지 1 mg/kg, 예를 들어 약 0.001, 약 0.01, 약 0.1, 약 1 또는 약 10 mg/kg이다.

[0208] 본 기술분야에서 통상의 기술을 가진 의사 또는 수의사는 필요한 약제학적 조성물의 유효량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다. 예를 들어, 의사 또는 수의사는 약제학적 조성물에 사용되는 다중특이성 항체 또는 단편의 용량을 원하는 치료적 효과를 달성하기 위해 필요한 수준보다 더 낮은 수준에서 시작해서 원하는 효과가 달성될

때까지 투여량을 점차적으로 증가시킬 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 이중특이성 항체의 적합한 일일 용량은 치료적 효과를 생성하기에 유효한 최저 용량인 화합물의 그러한 양일 것이다. 투여는, 예를 들어 비경구, 예컨대 정맥내, 근육내 또는 피하 투여일 수 있다. 일 실시 형태에서, 다중특이성 항체 또는 단편은 mg/m^2 로 계산된 매주 투여량으로 주입에 의해 투여될 수 있다. 그러한 투여량은, 예를 들어, 하기에 따라 상기에 제공된 mg/kg 투여량을 기준으로 할 수 있다: 용량(mg/kg) $\times 70: 1.8$. 그러한 투여는, 예를 들어 1 내지 8회, 예컨대 3 내지 5회 반복될 수 있다. 투여는 2 내지 24시간, 예컨대 2 내지 12시간의 기간에 걸쳐 연속 주입에 의해 수행될 수 있다. 일 실시 형태에서, 다중특이성 항체 또는 단편은 독성 부작용을 감소시키기 위해 장기간, 예컨대 24시간 초과에 걸쳐 느린 연속 주입에 의해 투여될 수 있다.

[0209] 일 실시 형태에서, 다중특이성 항체 또는 단편은 주 1회 제공될 때 최대 8회, 예컨대 4 내지 6회 동안 고정 용량으로서 계산된 매주 투여량으로 투여될 수 있다. 그러한 계획은, 예를 들어 6개월 또는 12개월 후에, 필요하다면 1회 이상 반복될 수 있다. 그러한 고정 투여량은, 예를 들어, 70 kg의 체중 추산치로, 상기에 제공된 mg/kg 투여량을 기준으로 할 수 있다. 투여량은, 투여 시에 혈액 중의 본 발명의 이중특이성 항체의 양을 측정함으로써 결정 또는 조정될 수 있는데, 이는, 예를 들어 생물학적 샘플을 취하고, 본 발명의 다중특이성 항체의 BCMA 항원 결합 영역을 표적으로 하는 항-이디오타입(anti-idiotypic) 항체를 사용함으로써 행해진다.

[0210] 일 실시 형태에서, 다중특이성 항체 또는 단편은 유지 요법(maintenance therapy)에 의해, 예를 들어 6개월 이상의 기간 동안 주 1회 투여될 수 있다.

[0211] 다중특이성 항체 또는 단편은 또한 암 발생 위험을 감소시키고/시키거나, 암 진행에서의 사건의 발생의 개시를 지연시키고/시키거나, 암이 관해기에 있을 때 재발 위험을 감소시키기 위하여 예방적으로 투여될 수 있다.

[0212] 본 명세서에 기재된 바와 같은 다중특이성 항체 및 이의 단편은 또한 병용 요법으로 투여될 수 있는데, 즉 치료하고자 하는 질환 또는 상태에 대해 관련된 다른 치료제와 병용되어 투여될 수 있다. 따라서, 일 실시 형태에서, 본 항체-함유 약제는 하나 이상의 추가의 치료제, 예컨대 화학치료제와의 병용을 위한 것이다. 일부 실시 형태에서, 다른 치료제는 시타라빈, 안트라사이클린, 히스타민 다이하이드로클로라이드 또는 인터류킨 2이다. 그러한 병용 투여는 동시적, 개별적 또는 순차적 - 임의의 순서임 - 일 수 있다. 동시 투여의 경우, 작용제는, 필요에 따라, 하나의 조성물로서 또는 개별 조성물로서 투여될 수 있다.

[0213] 일 실시 형태에서, 대상에서 BCMA를 발현하는 세포를 수반하는 장애를 치료하기 위한 방법이 제공되며, 본 방법은 다중특이성 항체 또는 단편, 예컨대 본 명세서에 기재된 BCMA \times CD3 이중특이성 항체의 치료적 유효량의 투여를 포함하고, 이를 필요로 하는 대상에 대한 방사선요법이 제공된다. 일 실시 형태에서, 암을 치료 또는 예방하기 위한 방법이 제공되며, 본 방법은 다중특이성 항체 또는 단편, 예컨대 본 명세서에 기재된 BCMA \times CD3 항체의 치료적 유효량의 투여를 포함하고, 이를 필요로 하는 대상체에 대한 방사선요법이 제공된다. 방사선요법은 방사선을 포함할 수 있거나, 환자에 대한 방사성 의약품의 관련 투여가 제공된다. 방사선의 공급원은 치료되는 환자에 대해 외부 또는 내부에 있을 수 있다(방사선 치료는, 예를 들어 외부 빔 방사선 요법(EBRT) 또는 근접방사선요법(brachytherapy)(BT)의 형태일 수 있다). 그러한 방법을 실시하는 데 사용될 수 있는 방사성 원소는, 예를 들어 라듐, 세슘-137, 이리듐-192, 아메리슘-241, 금-198, 코발트-57, 구리-67, 테크네튬-99, 요오다이드-123, 요오다이드-131, 및 이리듐-111을 포함한다.

키트

[0214] 본 명세서에는 키트가 또한 제공되며, 본 키트는, 예를 들어 기재된 다중특이성 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 및 특정 세포 유형의 사멸을 위한 항체 또는 단편의 사용에 대한 설명서를 포함한다. 바람직한 실시 형태에서, 다중특이성 항체는 본 명세서에 기재된 바와 같은 BCMA \times CD3 다중특이성 항체 또는 이의 다중특이성 항원-결합 단편, 그리고 더 바람직하게는 본 명세서에 기재된 바와 같은 BCMA \times CD3 이중특이성 항체 또는 이의 BCMA \times CD3 이중특이성 항원-결합 단편이다. 설명서는 시험관내, 생체내 또는 생체외에서 다중특이성 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 사용하는 것에 대한 지시사항을 포함할 수 있다.

[0215] 전형적으로, 키트는 다중특이성 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 담긴 구획을 가질 것이다. 다중특이성 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 동결건조된 형태, 액체 형태, 또는 키트에 포함되기에 적합한 다른 형태일 수 있다. 키트는 또한 키트 내의 설명서에 기재된 방법을 실시하는 데 필요한 추가 요소들, 예컨대 동결건조된 분말을 재구성하기 위한 멸균 용액, 환자에게 투여하기 전에 다중특이성 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 병용하기 위한 추가 작용제, 및 다중특이성 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 환자에게 투여하는 데 도움이 되는 도구를 수용할 수 있다.

[0217] **진단적 용도**

본 명세서에 기재된 다중특이성 항체 및 단편은 또한 진단 목적으로 사용될 수 있다. 따라서, 또한, 본 명세서에 정의된 바와 같은 다중특이성 항체 또는 단편을 포함하는 진단용 조성물이 제공되고, 이의 용도에 대해 제공된다. 바람직한 실시 형태에서, 다중특이성 항체는 본 명세서에 기재된 바와 같은 BCMA × CD3 다중특이성 항체 또는 이의 다중특이성 항원-결합 단편, 그리고 더 바람직하게는 본 명세서에 기재된 바와 같은 BCMA × CD3 이중특이성 항체 또는 이의 BCMA × CD3 이중특이성 항원-결합 단편이다. 일 실시 형태에서, 본 발명은 암 진단용 키트를 제공하며, 본 키트는 이중특이성 BCMA × CD3 항체, 및 BCMA에 대한 항체의 결합을 검출하기 위한 하나 이상의 시약을 포함하는 용기를 포함한다. 시약은, 예를 들어 형광 태그, 효소 태그, 또는 다른 검출 가능한 태그를 포함할 수 있다. 시약은 또한 효소적 반응을 위한 2차 또는 3차 항체 또는 시약을 포함할 수 있으며, 여기서 효소적 반응은 시각화될 수 있는 생성물을 생성한다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 다중특이성 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 방사성표지, 형광 표지, 에피토프 태그, 비오틴, 발색단 표지, ECL 표지, 효소, 루테늄, ¹¹¹In-DOTA, ¹¹¹In-다이에틸렌트라이아민펜타아세트산(DTPA), 고추냉이 페옥시다제, 알칼리성 포스파타제 및 베타-갈락토시다제, 또는 폴리-히스티딘 또는 당업계에 알려진 유사한 그러한 표지로 표지화될 수 있다.

[0219] **기재된 발명 요지의 예시적인 실시 형태**

본 명세서의 주제를 더 잘 그리고 더 완전히 설명하기 위해, 이 섹션은 제시된 주제의 열거된 예시적인 실시 형태를 제공한다.

[0221] **열거된 실시 형태:**

[0222] 1. BCMA에 면역특이적으로 결합하는 재조합 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 상기 항체는 중쇄 및 경쇄를 갖고, 상기 중쇄는 하기를 포함하는, 재조합 항체 또는 이의 항원-결합 단편:

[0223] a. 서열 번호 4의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1 (상보성 결정 영역 1), 서열 번호 5의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2 및 서열 번호 6의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3;

[0224] b. 서열 번호 4의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1, 서열 번호 5의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2 및 서열 번호 6의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3;

[0225] c. 서열 번호 7의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1, 서열 번호 5의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2 및 서열 번호 6의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3;

[0226] d. 서열 번호 4의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1, 서열 번호 5의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2 및 서열 번호 19의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3;

[0227] e. 서열 번호 4의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1, 서열 번호 8의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2 및 서열 번호 6의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3;

[0228] f. 서열 번호 13의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1, 서열 번호 5의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2 및 서열 번호 19의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3;

[0229] g. 서열 번호 13의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1, 서열 번호 8의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2 및 서열 번호 19의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3.

[0230] 2. 상기 항체가 서열 번호 24의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR1, 서열 번호 25의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR2 및 서열 번호 26의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR3을 추가로 포함하는, 실시 형태 1의 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

[0231] 3. 상기 (a)의 항체의 중쇄가 서열 번호 27의 아미노산 서열을 포함하거나; 상기 (b)의 항체의 중쇄가 서열 번호 57의 아미노산 서열을 포함하거나; 상기 (f)의 항체의 중쇄가 서열 번호 34의 아미노산 서열을 포함하거나; 상기 (k)의 항체의 중쇄가 서열 번호 39의 아미노산 서열을 포함하거나; 상기 (l)의 항체의 중쇄가 서열 번호 40의 아미노산 서열을 포함하거나; 상기 (m)의 항체의 중쇄가 서열 번호 58의 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 (n)의 항체의 중쇄가 서열 번호 43의 아미노산 서열을 포함하는, 실시 형태 1의 항체 또는 항원-결합 단편.

[0232] 4. 항체의 경쇄가 서열 번호 28의 아미노산 서열을 포함하는, 실시 형태 2 또는 실시 형태 3의 항체 또는 항원-결합 단편.

- [0233] 5. 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 인간 BCMA의 세포와 도메인에 결합하는, 실시 형태 1 내지 실시 형태 4 중 어느 하나의 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0234] 6. 인간 항체 또는 항원-결합 단편인, 실시 형태 1 내지 실시 형태 5 중 어느 하나의 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0235] 7. Fab 단편, Fab2 단편 또는 단일쇄 항체인, 실시 형태 1 내지 실시 형태 6 중 어느 하나의 항원 결합 단편.
- [0236] 8. 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 BCMA와 APRIL의 상호작용을 억제하는, 실시 형태 1 내지 실시 형태 7 중 어느 하나의 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0237] 9. ELISA로 측정시 BCMA와 APRIL의 상호작용에 대한 항체 또는 항원-결합 단편의 IC_{50} 이 약 5.9 nM인, 실시 형태 8의 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0238] 10. 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 IgG인, 실시 형태 1 내지 실시 형태 9 중 어느 하나의 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0239] 11. 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 IgG4 동종형인, 실시 형태 1 내지 실시 형태 10 중 어느 하나의 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0240] 12. IgG4가 Fc 영역 내에 S228P 치환, L234A 치환 및 L235A 치환을 갖는, 실시 형태 11의 항체.
- [0241] 13. 인간 BCMA에 면역특이적으로 결합하고, 사이노몰거스 원숭이 BCMA와 교차 반응하는, 실시 형태 1 내지 실시 형태 12 중 어느 하나의 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0242] 14. 인간 골수종 세포의 표면 상의 BCMA에 결합하는, 실시 형태 1 내지 실시 형태 13 중 어느 하나의 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0243] 15. 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 인간 다발성 골수종 세포의 표면 상의 BCMA에 결합하는, 실시 형태 1 내지 실시 형태 14 중 어느 하나의 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0244] 16. 실시 형태 1 내지 실시 형태 15 중 어느 하나의 항체 또는 항원-결합 단편을 발현하는 재조합 세포.
- [0245] 17. 상기 세포가 하이브리도마인, 실시 형태 16의 세포.
- [0246] 18. 상기 항체가 재조합적으로 생성되는, 실시 형태 16의 세포.
- [0247] 19. 재조합 BCMA \times CD3 이중특이성 항체 또는 이의 BCMA \times CD3 이중특이성 결합 단편으로서,
- [0248] a) 제1 중쇄 (HC1);
- [0249] b) 제2 중쇄 (HC2);
- [0250] c) 제1 경쇄 (LC1); 및
- [0251] d) 제2 경쇄(LC2)를 포함하며,
- [0252] HC1은 LC1과 결합하고, HC2는 LC2와 결합하며, HC1은 서열 번호 59, 서열 번호 60 및 서열 번호 61을 포함하고, LC1은 서열 번호 62, 서열 번호 63 및 서열 번호 64를 포함하여 CD3에 면역특이적으로 결합하는 제1 항원-결합 부위를 형성하며, HC2는 서열 번호 4, 서열 번호 5 및 서열 번호 6을 포함하고, LC2는 서열 번호 24, 서열 번호 25 및 서열 번호 26을 포함하여 BCMA에 면역특이적으로 결합하는 제2 항원-결합 부위를 형성하는, 재조합 BCMA \times CD3 이중특이성 항체 또는 이의 BCMA \times CD3 이중특이성 결합 단편.
- [0253] 20. 서열 번호 55를 포함하는 HC1, 서열 번호 56을 포함하는 LC1, 서열 번호 65를 포함하는 HC2, 및 a) 서열 번호 66 또는 b) 서열 번호 76을 포함하는 LC2를 포함하는, 실시 형태 19의 재조합 BCMA \times CD3 이중특이성 항체 또는 이의 단편.
- [0254] 21. 항체 또는 이중특이성 결합 단편이 IgG인, 실시 형태 20의 BCMA \times CD3 이중특이성 항체 또는 이중특이성 결합 단편.
- [0255] 22. 항체 또는 이중특이성 결합 단편이 IgG4 동종형인, 실시 형태 19 내지 실시 형태 21 중 어느 하나의 BCMA \times CD3 이중특이성 항체 또는 이중특이성 결합 단편.
- [0256] 23. 항체 또는 이중특이성 결합 단편이 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정시 0.22 nM 이상의 친화도로 인간 BCMA

에 면역특이적으로 결합하는, 실시 형태 19 내지 실시 형태 22 중 어느 하나의 BCMA × CD3 이중특이성 항체 또는 이중특이성 결합 단편.

[0257] 24. 항체 또는 이의 이중특이성 결합 단편이 인간 골수종 세포의 표면 상의 BCMA에 결합하는, 실시 형태 19 내지 실시 형태 23 중 어느 하나의 BCMA × CD3 이중특이성 항체 또는 이중특이성 결합 단편.

[0258] 25. 항체 또는 이의 이중특이성 결합 단편이 인간 다발성 골수종 세포의 표면 상의 BCMA에 결합하는, 실시 형태 19 내지 실시 형태 24 중 어느 하나의 BCMA × CD3 이중특이성 항체 또는 이중특이성 결합 단편.

[0259] 26. 항체 또는 이중특이성 결합 단편이 약 0.37 nM 미만의 EC₅₀으로 시험관 내에서 인간 T-세포 활성화를 유도하는, 실시 형태 19 내지 실시 형태 25 중 어느 하나의 BCMA × CD3 이중특이성 항체 또는 이중특이성 결합 단편.

[0260] 27. 항체 또는 이중특이성 결합 단편이 약 0.45 nM 미만의 EC₅₀으로 시험관 내에서 BCMA-발현 세포의 T-세포의 존성 세포독성을 유도하는, 실시 형태 19 내지 실시 형태 26 중 어느 하나의 BCMA × CD3 이중특이성 항체 또는 이중특이성 결합 단편.

[0261] 28. 항체 또는 이중특이성 결합 단편이 BCMA 작용제가 아닌, 실시 형태 19 내지 실시 형태 27 중 어느 하나의 BCMA × CD3 이중특이성 항체 또는 이중특이성 결합 단편.

[0262] 29. 항체 또는 이중특이성 결합 단편이 10 nM 미만의 농도에서 NF- κ B 활성화를 변경하지 않는, 실시 형태 19 내지 실시 형태 28 중 어느 하나의 BCMA × CD3 이중특이성 항체 또는 이중특이성 결합 단편.

[0263] 30. 실시 형태 19 내지 실시 형태 29 중 어느 하나의 항체 또는 이중특이성 결합 단편을 발현하는 재조합 세포.

[0264] 31. 상기 세포가 하이브리도마인, 실시 형태 30의 세포.

[0265] 32. 암에 걸린 대상을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 실시 형태 19 내지 실시 형태 29 중 어느 하나의 BCMA × CD3 이중특이성 항체 또는 이중특이성 결합 단편의 치료적 유효량을 암의 치료를 필요로 하는 대상에게 암을 치료하기에 충분한 시간 동안 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

[0266] 33. 암세포의 성장 또는 증식을 억제하는 방법으로서, 상기 방법은 실시 형태 19 내지 실시 형태 29 중 어느 하나의 BCMA × CD3 이중특이성 항체 또는 이중특이성 결합 단편의 치료적 유효량을 투여하여 암 세포의 성장 또는 증식을 억제하는 단계를 포함하는, 방법.

[0267] 34. T 세포를 BCMA-발현 암 세포로 방향전환시키는 방법으로서, 상기 방법은 실시 형태 19 내지 실시 형태 29 중 어느 하나의 BCMA × CD3 이중특이성 항체 또는 이중특이성 결합 단편의 치료적 유효량을 투여하여 T 세포를 암으로 방향전환시키는 단계를 포함하는, 방법.

[0268] 35. 상기 암이 혈액암인, 실시 형태 32 내지 실시 형태 34 중 어느 하나의 방법.

[0269] 36. 상기 혈액암이 BCMA-발현 B 세포 암인, 실시 형태 35의 방법.

[0270] 37. 상기 BCMA-발현 B 세포 암이 다발성 골수종인, 실시 형태 36의 방법.

[0271] 38. 제2 치료제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 실시 형태 32의 방법.

[0272] 39. 상기 제2 치료제가 화학치료제 또는 표적화된 항암 요법인, 실시 형태 38의 방법.

[0273] 40. 상기 화학치료제가 시타라빈, 안트라사이클린, 히스타민 다이하이드로클로라이드 또는 인터류킨 2인, 실시 형태 39의 방법.

[0274] 41. 실시 형태 19 내지 실시 형태 29 중 어느 하나의 BCMA × CD3 이중특이성 항체 또는 이중특이성 결합 단편 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

[0275] 42. 실시 형태 30 또는 실시 형태 31의 세포를 배양함으로써 실시 형태 19 내지 실시 형태 29 중 어느 하나의 BCMA × CD3 이중특이성 항체 또는 이중특이성 결합 단편을 생성하는 방법.

[0276] 43. 실시 형태 19 내지 실시 형태 29 중 어느 하나의 BCMA × CD3 이중특이성 항체 또는 이중특이성 결합 단편의 HC1, HC2, LC1 또는 LC2를 암호화하는, 단리된 합성 폴리뉴클레오티드.

[0277] 44. 실시 형태 19 내지 실시 형태 29 중 어느 하나에서 정의된 바와 같은 BCMA × CD3 이중특이성 항체 또는 이중특이성 결합 단편 및/또는 제44항에 정의된 바와 같은 폴리뉴클레오티드, 및 이를 위한 패키징을 포함하는 키

트.

[0278] **실시예**

[0279] 하기의 실시예는 앞서의 개시내용을 보충하기 위해 그리고 본 명세서에 기재된 발명 요지에 대한 더 우수한 이해를 주기 위해 제공된다. 이를 실시예는 기재된 발명 요지를 한정하는 것으로 여겨져서는 안 된다. 본 명세서에 기재된 실시예 및 실시 형태는 단지 예시적인 목적을 위한 것이고, 이를 고려하여 다양한 변형 또는 변화가 당업자에게 명백할 것이고, 이는 본 발명의 진정한 범주 내에 포함되어야 하며 이로부터 벗어나지 않고서 이루어질 수 있음이 이해된다.

[0280] **실시예1: 물질**

[0281] **BCMA ECD 분자**

[0282] hBCMA (서열 번호1)의 아미노산 1 내지 54에 해당하는 재조합 인간 (h) BCMA-Fc 융합 단백질 (카탈로그 번호 193-BC-050) 및 mBCMA (서열 번호2)의 아미노산 1 내지 49에 해당하는 재조합 마우스 (m) BCMA-Fc 융합 단백질 (카탈로그 번호 593-BC-050)을 R&D 시스템즈로부터 입수하였다. 재조합 사이노 BCMA 단백질을 유전자 합성 기술 (미국 특허 제6,670,127호; 미국 특허 제6,521,427호)로 얻은 cDNA로부터 제조하였다. 모든 단백질을 사용 전에 내독소에 대해 시험하고, 과거 패닝 연구를 위하여 비오티닐화하였다. 이러한 물질을 또한 결합 및 친화도 측정에 사용하였다.

[0283] 가용성 인간 BCMA 를 AB 바이오사이언시스(Biosciences) (카탈로그 번호 P011Xp, 로트 번호 033-013)로부터 입수하여, 특성화 연구에 사용하였다.

[0284] **APRIL, BAFF, BAFF-R 및 TACI 분자**

[0285] 가용성 hAPRIL (카탈로그 #DY884), hBAFF (카탈로그 #2149-BF), hBAFF-R의 아미노산 7 내지 71에 해당하는 hBAFF-R (카탈로그 #1162-BR) 및 TACI의 아미노산 2 내지 166에 해당하는 hTAC1을 R&D 시스템즈로부터 입수하였다. BAFF-R 및 TAC1을 SPR 연구에 대해 비오틸화하였다.

[0286] **BCMA 세포주의 생성**

[0287] 표준 방법을 사용하여 인간 BCMA (도 1a) 및 사이노 BCMA (도 1b)를 제공하는 벡터를 HEK293 엑스피(expi) 세포로 일시적으로 형질감염시켰다. 형질감염된 293F 부착성 세포를 안정한 플라스미드 혼입을 위해 선택한 후, 단 세포를 분류하고, BCMA 표면 수용체 발현을 항-인간 BCMA-PE 표지된 항체 (R&D 시스템즈 FAB193P)를 사용하여 FACS에 의해 정량화하였다.

[0288] **실시예2: 인간 BCMA 단일클론 항체 발현 하이브리도마의 단리**

[0289] 인간 면역글로불린 트랜스제닉(transgenic) 래트 균주 (옴니래트(OmniRat) ®; OMT, 인코포레이티드)를 사용하여 인간 BCMA 단일클론 항체 발현 하이브리도마 세포를 개발하였다. 옴니래트®는 완전한 인간 IgL 유전자좌 (J_K-C_K에 결합된 12개의 V_Ks 및 J_λ-C_λ에 연결된 16개의 V_λs)와 함께 키메라 인간/래트 IgH 유전자좌 (22개의 인간 V_Hs, 래트 C_H 유전자좌에 연결된 자연 형태의 모든 인간 D 및 J_H 세그먼트를 포함함)를 함유한다. (예를 들어, 문헌[Osborn, et al. (2013) J Immunol 190(4): 1481-1490]을 참조한다). 따라서, 래트는 면역에 반응하여 래트 IgM 또는 κ의 감소된 발현을 나타내며, 도입된 인간 중쇄 및 경쇄 도입 유전자는 종류전환 (class switching) 및 체세포 돌연변이를 거쳐, 고 친화도 인간 IgG 단일클론 항체를 생성한다. 옴니래트®의 제조 및 사용, 및 이러한 래트에 의해 수행된 개놈 변형이 브루게만(Brugemann) 등의 PCT 공개 WO 14/093908 기재되어 있다.

[0290] 재조합 인간BCMA (rhBCMA)로 면역화한 경우, 이러한 트랜스제닉 래트는 인간 BCMA에 특이적인 인간 IgG 항체를 생성한다.

[0291] 면역 계획을 다음과 같이 수행하였다: 6마리의 래트를 hBCMA-Fc 융합으로 면역화시켰다. 21일 간의 면역 요법 후, 면역화된 래트로부터의 비장 및 립프절을 수확하고, 이를 사용하여 4개의 총 하이브리도마 라이브러리를 생성하였다. 라이브러리를 적정하고, ELISA로 분석하여, 비오티닐화 hBCMA에 대한 결합을 나타내는 mAb를 동정하였다. MSD 스트렙타비딘 플레이트 상에 mAb를 포획하였다. 추가의 확인 스크리닝 후, 인간 BCMA 및 사이노 BCMA에 특이적 결합을 나타내는 하이브리도마 상청액을 시퀀싱하고, 클론닝하여, 발현시키고, 인간 IgG1 및 IgG4 모두로 전환시켰다.

[0292] **실시예3: BCMA 항체의 정제**

정화된 배양물 상청액 중의 BCMA 항체를 mAb셀렉트 슈어(MabSelect SuRe) 단백질 A 수지로 포획하고, 100 mM 아세트산나트륨 (pH 3.5)으로 용리시켰다. 항체를 함유하는 분획을 풀링(pooled)하고 즉시 2.5 M 트리스 HC1 (pH 7.2)로 중화시킨 후, 1xD-PBS 또는 명시된 경우 다른 원하는 완충액으로 완충액 교환하였다. 나노드롭(NanoDrop) 분광 광도계에서 OD280을 측정하여 단백질 농도를 측정하고, 이것의 흡광 계수를 사용하여 계산하였다. 항체의 순도 및 균질성을 SDS-PAGE 및 SE-HPLC로 평가하였다. SE-HPLC 당 95% 미만으로 떨어지는 단량체의 경우 수퍼덱스(Superdex) 200을 사용하여 SEC 폴리싱(polishing) 단계를 수행하였다.

[0294] **실시예4: BCMA에 결합하는 BCMA 항체 세포의 특성화**

세포 및 암 세포주 U2392, EJM, MMR, U266, OPM2 및 RPMI-18226을 발현하는 유전자 조작된 BCMA으로의 BCMA 항체의 결합을 MSD (메조스케일(Mesoscale)) 세포 결합 분석 및 유세포 분석법을 사용하여 평가하였다. 스크리닝 검정의 목적은 BCMA를 발현하는 세포에 결합된 항체를 동정하는 것뿐만 아니라 사이노 BCMA를 발현하는 세포와의 교차 반응성도 확인하는 것이었다.

MSD 세포 결합 검정을 위해, 세포를 고정시키고, BCMA 항체 샘플을 3회 반복하여 검정하였다. 간단히 말하면, 발현 상층액 또는 정제된 BCMA 항체를 10 μ g/mL로 정규화하였다. 웨당 5000개의 세포를 384웰 플레이트(MA6000, 카탈로그 L21XB, MSD)로 플레이팅하고, 2시간 동안 접착시켰다. 이어서, 세포를 15분 동안 PBS 중 20% FBS (깁코(Gibco))로 블로킹(blocked)하였다. 이어서, 항체 상층액을 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 그대로 두었다. 세포를 PBS로 3회 세척하고, 루테늄 표지된 2차 항체(잭슨 이뮤노-리서치(Jackson Immuno Research))를 1 μ g/mL로 첨가한 다음, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 추가의 세척 단계를 적용하고, 이어서 웨당 35 μ L의 MSD 판독 완충액(Read buffer) T(계면활성제 무함유)를 첨가하고, 검출을 위하여 30분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, MSD 섹터(Sector) 6000을 사용하여 플레이트를 판독하였다. 데이터를 대조군에 대해 정규화하고, 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 버전 5를 사용하여 그래프로 나타내었다. 백그라운드보다 3배 큰 신호를 갖는 양성 결합제를 히트(hit)인 것으로 측정되었다. 데이터 일관성을 위해 검정을 반복하였으며, 최고의 결합제를 추가의 개발을 위해 선택하였다.

유세포 분석법을 위해, 세포를 생존력 염색제(viability stain)로 인큐베이션하여, 100,000개의 세포를 U형 바닥 플레이트에 첨가하고, 원심분리하여 세포를 펠렛화(pellet)하였다. 적정된 BCMA 항체를 세포에 첨가하였다. 인큐베이션 기간 후, 세포를 펠렛화하여 세정하였다. 알렉사플루오르(AlexaFluor) 647 표지된 종 특이적 2차 항체를 세포에 첨가하고, 인큐베이션시켰다. 세포를 펠렛화하고 수회 세정하였다. 세포를 적정량의 전개 완충액에서 재현탁하고, FACS 칸토(Canto) II를 사용하여 분석하였다. 세포를 크기에 대해 FSC-A 대 SSC-A, 싱글릿(singlet) 및 생존력 염색에 대해 SSC-A 대 SSC-H에 의해 게이팅(gated)하였다. 살아있는 세포 집단의 geoMFI 값을 그래프화하고, 가능한 경우, 즉 곡선이 완전히 S자형인 경우 이를 사용하여 EC₅₀ 값을 계산하였다.

[0298] **APRIL 리간드-결합의 억제**

APRIL 결합 경쟁 ELISA에서 BCMA 항체 패널을 스크리닝하였다. 가용성 인간 April을 R&D 시스템즈 카탈로그 # DY884)로부터 구입하고, BCMA를 고정시키기 위해 April의 결합을 차단하는 항-BCMA 항체의 능력을 평가하였다.

간단히 말하면, 96-웰 투명 맥시소르브 플레이트를 PBS에서 제조된 BCMA-ECD의 0.5 μ g/mL의 100 μ L로 처리하고, 실온에서 하룻밤 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 플레이트를 0.05% 트윈-20 n PBS (R&D 시스템즈 카탈로그 # WA126)를 함유하는 ELISA 세정 완충액으로 3회 세정한 후, PBS 중의 1% BSA5를 함유하는 300 μ L/웰의 시약 희석제(Reagent Diluent) (R&D 시스템즈 카탈로그 # DY995)로 블로킹하였다. 경쟁적 결합의 경우, BCMA 항체를 100 μ L 부피로 플레이트에 첨가하고, APRIL 첨가 전에 30분 동안 인큐베이션하였다. 30분 후에, 웨당 1 ng의 APRIL를 첨가하고, 플레이트를 하룻밤 동안 4°C에서 인큐베이션하였다. 결합하지 않은 APRIL을 ELISA 세척 완충액으로 세정하고, 결합된 비오티닐화 APRIL을 450 nm의 광학 밀도로 SA-HRP 접합체를 사용하여 검출하였다.

[0301] **실시예5: 히트 평가 및 선택**

특성화 실험을 완료한 후, M2 하이브리도마- BCMB69로 명명됨- 유래 항체가 다음과 같은 특성을 갖는 것으로 확인되었다:

• 재조합 인간 BCMA에 결합한다

- [0304] • 재조합 사이노 BCMA에 결합한다
- [0305] • 마우스 BCMA에 약한 결합을 나타낸다
- [0306] • 유세포 분석법으로 측정시 HEK-발현 인간 BCMA 및 HEK-발현 사이노 BCMA 모두에 결합한다
- [0307] • BCMA를 발현하는 인간 암 세포주에 결합한다 (U2392, EJM, MMIR, U266, OPM2 및 RPMI-18226)
- [0308] • $IC_{50} = 5.9 \text{ nM}$ 로 APRIL 결합을 차단한다

[0309] 결과적으로, BCMB69 (표 4 및 표 5)를 발현시키고 정제하여, BCMA \times CD3 이중특이성 항체를 제조한다.

[0310] [표 4]

BCMB69 의 CDR 서열 (관련 서열 번호가 판호에 제공됨)

식별 번호	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
BCMB69	SGSYFWG (4)	SIYYSGITYYYNPSLKS (5)	HDGAVAGLFDY (6)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)

[0311]

[표 5]

BCMB69의 V_H 및 V_L 서열

mAb AA ID	VH 아미노산 서열	서열 번호	VL 아미노산 서열	서열 번호
BCMB69	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GGSISSGSYFWGIRQPPGKGLEWI GSIYYSGITYYYNPSLKSRTVTSVDT KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARH DGAVAGLFDYWGQQGTLVTVSSA	27	SYVLTQPPSVAPGQTARITC GGNNIGSKSVHWWYQQPPGQAP VVVVYDDSDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRVEAGDEAVYYC QVWDSSSDHVVFGGGTKLTVL	28

[0313]

실시예6: 항-BCMA Fab의 결정 구조

[0314]

원자적 세부사항에서 항체/항원 상호작용을 특성화하고, 항체의 작용 메커니즘에 대한 이해를 높이며, 임의의 필요한 항체 유전자 조작 작업을 지원하기 위해 유리 Fab 형태뿐만 아니라, 인간 BCMA에 결합된 경우의 하나의 항-BCMA 항체 (BCMB69)의 결정 구조를 확인하였다.

[0315]

재료

[0316]

His-태그된(tagged) BCMA Fab (서열 번호 75 및 76; 이하 간단히 BCMB69 Fab)가 HEK293 세포에서 발현되고 친화도 및 크기-배체 크로마토그래피를 사용하여 정제되었다. Fab에 pH 7.4의 20 mM의 MES, 130 mM의 NaCl을 넣었다.

[0317]

C-말단 His 태그를 갖는 인간 BCMA 세포의 영역 (서열 번호 1의 잔기 5 내지 51; 이하 간단히 BCMA)을 배클로바 이러스 시스템을 사용하여 발현시키고 친화도 및 크기-배체 크로마토그래피 정제하였다. 단백질에 50 mM NaCl, 20 mM 트리스 pH 8을 넣었다.

[0318]

결정화

[0319]

BCMA/BCMB69 Fab 복합체

[0320]

완충액을 20 mM 헤페스 pH 7.5로 교환하는 동안 Fab/항원 복합체를 BCMA와 BCMB69 Fab를 16시간 동안 4°C에서 3.8 : 1 (BCMA 과량)의 몰비로 혼합하여 제조하였다. 이어서, 복합체를 20 mM의 헤페스 (pH 7.5)에서 51 내지 63 mM의 NaCl의 구배로 모노S 5/50 컬럼으로부터 용리시키고, 17 mg/mL로 농축시켰다. 20°C에서 시팅 드롭 (sitting drop) 증기-확산법을 사용하여 25% PEG 3 kDa, 0.2 M MgCl₂, 0.1M Mes pH 6.5로부터 X-선 회절에 적합한 결정을 얻었다.

[0321]

BCMB69 Fab

[0322]

BCMB69 Fab를 추가의 정제 없이 9 mg/mL로 농축시켰다. 20°C에서 시팅 드롭 증기-확산법을 사용하여 2M (NH₄)₂SO₄, 5% MPD, 0.1M Mes pH 6.5로부터 X-선 회절에 적합한 결정을 얻었다.

[0323]

X-선 데이터 수집 및 구조 결정

[0324]

X-선 데이터 수집을 위하여, 결정을 20% 글리세롤이 보충된 해당 모액을 함유하는 동결보호 용액 중에 수초 동안 액침한 후, 액체 질소 중에서 급속 동결시켰다. BCMA/BCMB69 복합체의 X-선 회절 데이터를 캐나다 광원

(CLS; Canadian Light Source)의 빔라인(beamline) CMCF-08ID에서 라이오닉스(Rayonix) 300HS CCD 검출기로 수집하는 반면에, 유리 BCMB69 Fab의 X-선 데이터를 빔라인 17-ID에서 Dectris Pilatus 6M Pixel Array 검출기로 아르곤 국립 연구소(Argonne National Laboratory)의 고등 광자 소스(Advanced Photon Source)에서 수집하였다. 회절 데이터를 프로그램 HKL(문헌[Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods in Enzymology* 276: 307-326])를 사용하여 처리하였다.

[0326] 이 구조를 폐이저((문헌[Read, R. J. (2001). Pushing the boundaries of molecular replacement with maximum likelihood. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57: 1373-82])를 사용하여 분자 대체(molecular replacement)(MR)에 의해 해석하였다. 유리 Fab 구조의 경우, MR에 대한 검색 모델은 항-인플루엔자 혈구응집 소 5j8 Fab (PDB 코드: 4M5Y)이었다. BCMA/Fab 복합체의 경우, MR의 서치 모델은 BCMA (PDB 코드: 1XU2) 및 BCMB69 유리 Fab 구조 결정 구조이었다. 폐닉스(PHENIX)를 사용하여 구조를 정밀화(refined)하고 (문헌[Adams, P. D., Gopal, K., Grosse-Kunstleve, R. W., Hung, L. W., Ioerger, T. R., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Pai, R. K., Read, R. J., Romo, T. D., Sacchettini, J. C., Sauter, N. K., Storoni, L. C. & Terwilliger, T. C. (2004). Recent developments in the PHENIX software for automated crystallographic 구조 determination. *J Synchrotron Radiat* 11: 53-5]), 쿠트(COOT) (문헌[Emsley P. & Cowtan, K. (2004). Coot: Model building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D60*: 2126-2132])을 사용하여 모델 조정을 수행하였다. 모든 다른 결정학적 계산은 CCP4 프로그램 제품군(suite)(문헌[Collaborative Computational Project Number 4, 1994])을 사용하여 수행하였다. 모든 분자 그래픽은 파이몰(PyMol)을 사용하여 생성하였다(문헌[DeLano, W. (2002). The PyMOL molecular graphics system. *Palo Alto, CA, USA: DeLano Scientific*]).

[0327] BCMB69 유리 Fab 구조 및 복합체 모두에 대한 데이터 통계가 표 6에 나타나있다.

[0328]

[표 6]

BCMA/BCMB69 Fab 복합체 및 유리 BCMB69 Fab의 결정학적 데이터.

	복합체	유리 Fab
CBIS에서의 화학식 식별 번호	PS41	PS40
결정 데이터		
결정화 용액		
0.1 M 완충액	Mes pH 6.5	Mes pH 6.5
침전제	25% PEG 3 kDa	2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
첨가제	0.2 M MgCl_2	5% MPD
공간군	P2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
분자/비대칭 단위	2	1
단위 셀		
a, b, c (Å)	62.9, 87.1, 88.7	64.3, 71.1, 123.0
α, β, γ (°)	90.0, 94.8, 90.0	90.0, 90.0, 90.0
용매 함량 (%)	47	56
X-선 티이타늄*		
분해능 (Å)	50.00-2.00	50.00-2.70
가장 높은 분해능 셀 (Å)	(2.07-2.00)	(2.75-2.70)
측정된 반사의 수	235,905	91,256
완전성 (%)	99.9 (99.8)	99.9 (99.9)
중복성	3.7 (3.6)	5.7 (4.8)
R_{sym} (%)	10.0 (52.7)	14.8 (51.9)
$\langle I/\sigma \rangle$	13.3 (2.9)	13.5 (3.1)
정밀화		
분해능 (Å)	45.4-2.0	34.2-2.7
반사의 수	64,157	15,890
모든 원자의 수	7,001	3,149
물의 수	89	10
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$ (%)	19.0 / 23.7	18.5 / 24.0
결합 길이 RMSD (Å)	0.009	0.004
결합각 RMSD (°)	1.190	0.869
평균 B-인자 (Å ²)	31.0	51.1
몰프로비티(MolProbity)		
선후되는 라마찬드란(Ramachandran) (%)	97.32	96.86
허용되는 라마찬드란 (%)	2.68	2.90
라마찬드란 이상치 (%)	0.00	0.24
회전이성질체 이상치 (%)	0.39	0.59
총돌 점수	3.20	1.96

[0329]

에피토프, 파라토프 및 상호작용

[0330]

BCMB69는 BCMA의 β -헤어핀 (잔기 Y13-H19) 및 헬릭스-루프-헬릭스(helix-loop-helix) (잔기 L26, R27 및 N31-L35) 영역에 있는 잔기로 이루어진 입체구조 에피토프를 인식한다 (도 3 및 도 4). BCMB69 에피토프는 BCMA에서 약 830 Å²를 차지하고, 리간드-결합 DXL 모티프 (β -헤어핀의 타입 I 회전(turn)에서 잔기 D15-L18)를 함유하는데, 이는 항체 상보성 결정 영역 (CDR)에 의해 형성된(lined) 얇은 공동으로 돌출된다. DXL의 팀(tip)에 있는 회전의 류신 17은 항체 공동에 완전히 묻혀, BCMB69와 광범위한 상호작용을 갖는다. 다른 널리 쓰이는 에피토프 잔기는 Arg27이며, 이는 3₁₀-나선 h1 상에 있고, 중쇄 CDR와 접촉하는 여러 개의 수소 결합을 형성한다.

[0331]

BCMB69 파라토프는 CDR-L1을 제외한 모든 CDR로부터의 잔기로 이루어진다 (도 2 및 도 3). 중쇄는 경쇄와 비교하여 2배의 BCMA와 접촉을 갖는다. CDR-H3 루프 팀 (102-GAVAG-106) (서열 번호 77)의 작은 측쇄는 BCMA로의 CDR-H3의 삽입 및 광범위한 항체/항원 접촉 (총 접촉의 40%가 CDR-H3에 의해 생김)의 확립을 촉진한다. BCMB69 CDR은 h1 헬릭스 및 h1h2 루프에 의해 형성된 "시트(seat)"와 접촉하는 CDR-L2 (잔기 Y48, D52, P54, S55), CDR-H1 (잔기 G32-Y34) 및 CDR-H3 (D101, A103, V104)을 갖는 BCMA 의자형 구조의 오목한 표면 상에 담겨지는 (pack) 반면에, CDR-L3 (잔기 W90, S92, D95), CDR-H1 (F35), CDR-H2 (Y54, Y60) 및 CDR-H3 (H100, G102, A103, A105)은 BCMA β -헤어핀에 의해 형성된 "뒷면"과 상호작용한다. "의자 다리(chair leg)" (h2 나선)에서의 유일한 에피토프 잔기인 Leu35는 CDR-L2 잔기 D52와 반테르 밸스 접촉을 갖는다.

[0332]

BCMA는 작고 (약 50개의 잔기) 콤팩트한 세포외 도메인이다. BCMA에 대한 비경쟁 항체 또는 리간드의 결합을 위해 이용가능한 표면이 제한된다. 대부분의 BCMB69 에피토프 잔기가 또한 APRIL (14개 중 12개의 에피토프 잔기) 및 BAFF (14개 중 9개의 잔기)에 대한 결합 잔기이다. BCMA 최고 친화도 리간드인 APRIL의 경우, 유일한

에피토프 잔기는 F14 및 S16 (도 2b)를 공유하지 않는 반면에, BAFF의 경우 공유하지 않은 잔기는 F14, L26, T32, P33 및 L35이다. DXL 루프는 리간드 및 BCMB69에 의해 묻힌다.

[0334] BCMB69의 제안된 작용 메커니즘

[0335] BCMB69는 T-세포의 MM 암 세포로의 방향전환을 위한 후보이다. BCMB69 × 항-CD3 이중특이성 항체에 의해 매개되는 암 세포의 사멸은 BCMB69 에피토프의 구조 및 위치에 의해 손상될 것으로 예상되지 않는다. 에피토프의 접근 가능한 위치는 BCMB69 Fab 아암과 막-결합 BCMA의 결합시키는 반면에, 다른 Fab 아암은 여전히 T-세포 막의 CD3에 결합되어 있다.

[0336] BCMB69는 또한 입체 맞물림(steric occlusion) 및 BCMA 결합 부위에 대한 직접 경쟁을 통해 형질 세포에서 APRIL 및 BAFF 신호전달 경로를 방해할 수 있다. BCMA/BCMB69 구조의 BCMA/APRIL 및 BCMA/BAFF 구조로의 오버레이 (문헌[Liu, Y., Hong, X., Kappler, J., Jiang, L., Zhang, R., Xu, L., Pan, C.H., Martin, W.E., Murphy, R.C., Shu, H.B., Dai, S. & Zhang, G. (2003). *Nature* 423: 49-56]; 문헌[Hymowitz, S.G., Patel, D.R., Wallweber, H.J.A., Runyon, S., Yan, M., Yin, J., Shriner, S.K., Gordon, N.C., Pan, B., Skelton, N.J., Kelley, R.F. & Starovasnik, M.A. (2005). *J. Biol. Chem.* 280: 7218-7227])는 BCMB69와 APRIL, BAFF (도 2b 및 도 4a 및 도 4b) 사이의 충돌 영역을 나타내며, 이는 BCMA가 항체 및 천연 리간드에 동시에 결합하는 것을 불가능하게 만든다. APRIL 및 BAFF는 다른 수용체, 예컨대 TACI 및 BAFF-R을 사용하여 신호를 보낼 수 있고, BCMA 뉴아웃(knock-out) 마우스는 여전히 생존 가능하다. 따라서, BCMA 맞물림을 통해 APRIL 및 BAFF 활성을 차단하는 것은 MM 환자에게 치명적이지 않을 수 있다.

[0337] 실시예7: BCMB69 돌연변이의 구조-기반 설계

[0338] 결합되지 않은 BCMB69 가변 도메인의 변역 후 변형 모티프 및 응집 위험에 대한 전산 평가는 응집 위험을 야기할 수 있는 CDR 영역의 D101-G102 잔기 (CDR-H3) 및 486 \AA^2 소수성 패치의 이성질체화의 중간 정도의 위험을 나타낸다. 패치에서 가장 많이 노출된 소수성 잔기는 I58 (CDR-H2), F35 (CDR-H1) 및 V104 (CDR-H3; V104는 Fv 상동성 모델에서 관련이 있지만 Fab 결정 구조에서는 관련되지 않음)이다. BCMB69 가변 도메인에서 이성질체화 및 응집 위험을 제거하기 위해, 다양한 돌연변이가 합리적으로 설계되었다 (표 7).

[0339]

[표 7]

BCMB69 돌연변이의 패널

세트	클론 ID	돌연변이	목표
1	BCMB117	G152A ^L	이성질체화 제거 및 소수성 감소
1	BCMB118	G102A ^H , F35Y ^H , V104T ^H	이성질체화 제거 및 소수성 감소
1	BCMB119	D101E ^H , F35Y ^H , V104T ^H	이성질체화 제거 및 소수성 감소
1	BCMB120	D101S ^H , F35Y ^H , V104T ^H	이성질체화 제거 및 소수성 감소
1	BCMB121	G32S ^H , F35Y ^H , I58S ^H , P37K ^L , V44L ^L , V83D ^L	소수성을 감소시키기 위한 VH 및 VL 생식계열 돌연변이
1	BCMB122	G32S ^H , F35Y ^H , I58S ^H	소수성을 감소시키기 위한 VH 생식계열 돌연변이
1	BCMB123	G32S ^H	단일 돌연변이의 효과 평가, 소수성 감소
1	BCMB124	F35Y ^H	단일 돌연변이의 효과 평가, 소수성 감소
1	BCMB125	D101E ^H	단일 돌연변이의 효과 평가, 이성질체화 제거
1	BCMB126	D101S ^H	단일 돌연변이의 효과 평가, 이성질체화 제거
1	BCMB127	G102A ^H	단일 돌연변이의 효과 평가, 이성질체화 제거
1	BCMB128	V104T ^H	단일 돌연변이의 효과 평가, 소수성 감소
1	BCMB129	I58S ^H	단일 돌연변이의 효과 평가, 소수성 감소
1	BCMB130	G102A ^H , F35Y ^H , I58S ^H	이성질체화 제거 및 소수성 감소
1	BCMB131	D101E ^H , F35Y ^H , I58S ^H	이성질체화 제거 및 소수성 감소
2	BCMB176	G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	소수성을 감소시키기 위한 VH 및 VL 생식계열 돌연변이
2	BCMB177	I58R ^H , G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	소수성을 감소시키기 위한 VH 및 VL 생식계열 돌연변이
2	BCMB178	I58W ^H , G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	소수성을 감소시키기 위한 VH 및 VL 생식계열 돌연변이
2	BCMB179	D101Q ^H , G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	이성질체화 및 소수성 파괴,
2	BCMB180	D101H ^H , G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	이성질체화 및 소수성 파괴
2	BCMB181	D101W ^H , G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	소수성을 제거하기 위한 VH 및 VL 생식계열 돌연변이 및 이성질체화 제거
2	BCMB182	D101Y ^H , G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	소수성을 제거하기 위한 VH 및 VL 생식계열 돌연변이 및 이성질체화 제거
2	BCMB183	I58R ^H , D101Q ^H , G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	소수성을 제거하기 위한 VH 및 VL 생식계열 돌연변이 및 이성질체화 제거
2	BCMB184	I58R ^H , D101H ^H , G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	소수성을 제거하기 위한 VH 및 VL 생식계열 돌연변이 및 이성질체화 제거
2	BCMB185	I58R ^H , D101Y ^H , G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	소수성을 제거하기 위한 VH 및 VL 생식계열 돌연변이 및 이성질체화 제거
2	BCMB186	I58W ^H , D101Q ^H , G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	소수성을 제거하기 위한 VH 및 VL 생식계열 돌연변이 및 이성질체화 제거
2	BCMB187	I58W ^H , D101H ^H , G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	소수성을 제거하기 위한 VH 및 VL 생식계열 돌연변이 및 이성질체화 제거
2	BCMB188	I58W ^H , D101Y ^H , G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	소수성을 제거하기 위한 VH 및 VL 생식계열 돌연변이 및 이성질체화 제거

[0340]

[0341]

구조-기반 BCMB69 돌연변이의 CDR 서열 및 VH 및 VL 서열이 각각 표 8 및 9에 도시된다.

[0342]

[표 8]

BCMB69 돌연변이의 CDR 서열(관련 서열 번호가 관호에 제공됨)

ID	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
BCMB117	SGSYFWG (4)	SIYSGITYYNPSLKS (5)	HDGAVAGLFDY (6)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSDHVV (26)
BCMB118	SGSYFWG (4)	SIYSGITYYNPSLKS (5)	HDAATAGLFDY (9)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSDHVV (26)
BCMB119	SGSYFWG (4)	SIYSGITYYNPSLKS (5)	HEGATAGLFDY (12)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSDHVV (26)
BCMB120	SGSYFWG (4)	SIYSGITYYNPSLKS (5)	HSGATAGLFDY (15)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSDHVV (26)
BCMB121	SSYYWG (7)	SIYSGSTYYNPSLKS (8)	HDGAVAGLFDY (6)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSDHVV (26)
BCMB122	SSYYWG (7)	SIYSGSTYYNPSLKS (8)	HDGAVAGLFDY (6)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSDHVV (26)
BCMB123	SSYYWG (7)	SIYSGITYYNPSLKS (5)	HDGAVAGLFDY (6)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSDHVV (26)
BCMB124	SGSYYWG (10)	SIYSGITYYNPSLKS (5)	HDGAVAGLFDY (6)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSDHVV (26)
BCMB125	SGSYFWG (4)	SIYSGITYYNPSLKS (5)	HEGAVAGLFDY (16)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSDHVV (26)
BCMB126	SGSYFWG (4)	SIYSGITYYNPSLKS (5)	HSGAVAGLFDY (17)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSDHVV (26)
BCMB127	SGSYFWG (4)	SIYSGITYYNPSLKS (5)	HDAAVAGLFDY (18)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSDHVV (26)
BCMB128	SGSYFWG (4)	SIYSGITYYNPSLKS (5)	HDGATAGLFDY (19)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSDHVV (26)
BCMB129	SGSYFWG (4)	SIYSGSTYYNPSLKS (8)	HDGAVAGLFDY (6)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSDHVV (26)
BCMB130	SGSYYWG (10)	SIYSGSTYYNPSLKS (8)	HDAAVAGLFDY (18)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSDHVV (26)
BCMB131	SGSYYWG (10)	SIYSGSTYYNPSLKS (8)	HEGAVAGLFDY (16)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSDHVV (26)
BCMB176	SSSYFWG (13)	SIYSGITYYNPSLKS (5)	HDGATAGLFDY (19)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSDHVV (26)
BCMB177	SSSYFWG (13)	SIYSGSTYYNPSLKS (8)	HDGATAGLFDY (19)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSDHVV (26)
BCMB178	SSSYFWG (13)	SIYSGWTYYNPSLKS (11)	HDGATAGLFDY (19)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSDHVV (26)
BCMB179	SSSYFWG (13)	SIYSGITYYNPSLKS (5)	HQGATAGLFDY (20)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSDHVV (26)
BCMB180	SSSYFWG (13)	SIYSGITYYNPSLKS (5)	HHGATAGLFDY (21)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSDHVV (26)
BCMB181	SSSYFWG (13)	SIYSGITYYNPSLKS (5)	HWGATAGLFDY (22)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSDHVV (26)
BCMB182	SSSYFWG (13)	SIYSGITYYNPSLKS (5)	HYGATAGLFDY (23)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSDHVV (26)
BCMB183	SSSYFWG (13)	SIYSGRTYYNPSLKS (14)	HQGATAGLFDY (20)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSDHVV (26)
BCMB184	SSSYFWG (13)	SIYSGRTYYNPSLKS (14)	HHGATAGLFDY (21)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSDHVV (26)
BCMB185	SSSYFWG (13)	SIYSGRTYYNPSLKS (14)	HYGATAGLFDY (23)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSDHVV (26)
BCMB186	SSSYFWG (13)	SIYSGWTYYNPSLKS (11)	HQGATAGLFDY (20)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSDHVV (26)
BCMB187	SSSYFWG (13)	SIYSGWTYYNPSLKS (11)	HHGATAGLFDY (21)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSDHVV (26)
BCMB188	SSSYFWG (13)	SIYSGWTYYNPSLKS (11)	HYGATAGLFDY (23)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSDHVV (26)

[0343]

[0344]

[표 9]

BCMB69 돌연변이의 VH 및 VL 서열

mAb AA ID	VH 아미노산 서열	서열 번호	VL 아미노산 서열	서열 번호
BCMB117	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GGSISSGSYFWGWRQPPGKGLEWI GSIYYSGITYYNPSLKSRSVTISVDT KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARH DGAAGLFDYWGQGTLVTVSSA	57	SYVLTQPPSVVAPGQTARITC GGNNIGSKSVHWYQQPPGQAP VVVYDDSDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRVEAGDEAVYYC QVWDSSDHVVFGGGTKLTVL	28
BCMB118	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GGSISSGSYFWGWRQPPGKGLEWI GSIYYSGITYYNPSLKSRSVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR HDAATAGLFDYWGQGTLVTVSSA	29	SYVLTQPPSVVAPGQTARITC GGNNIGSKSVHWYQQPPGQAP VVVYDDSDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRVEAGDEAVYYC QVWDSSDHVVFGGGTKLTVL	28
BCMB119	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GGSISSGSYFWGWRQPPGKGLEWI GSIYYSGITYYNPSLKSRSVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR HEGATAGLFDYWGQGTLVTVSSA	31	SYVLTQPPSVVAPGQTARITC GGNNIGSKSVHWYQQPPGQAP VVVYDDSDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRVEAGDEAVYYC QVWDSSDHVVFGGGTKLTVL	28
BCMB120	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GGSISSGSYFWGWRQPPGKGLEWI GSIYYSGITYYNPSLKSRSVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR HSGATAGLFDYWGQGTLVTVSSA	32	SYVLTQPPSVVAPGQTARITC GGNNIGSKSVHWYQQPPGQAP VVVYDDSDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRVEAGDEAVYYC QVWDSSDHVVFGGGTKLTVL	28
BCMB121	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GGSISSSSYFWGWRQPPGKGLEWI GSIYYSGTYNPSLKSRSVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR HDGAVAGLFDYWGQGTLVTVSSA	33	SYVLTQPPSVVAPGQTARITC GGNNIGSKSVHWYQQPPGQAP VLVYDDSDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRVEAGDEADYYC QVWDSSDHVVFGGGTKLTVL	30
BCMB122	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GGSISSSSYFWGWRQPPGKGLEWI GSIYYSGTYNPSLKSRSVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR HDGAVAGLFDYWGQGTLVTVSSA	33	SYVLTQPPSVVAPGQTARITC GGNNIGSKSVHWYQQPPGQAP VVVYDDSDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRVEAGDEAVYYC QVWDSSDHVVFGGGTKLTVL	28
BCMB123	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GGSISSSSYFWGWRQPPGKGLEWI GSIYYSGTYNPSLKSRSVTISVDT KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARH DGAAGLFDYWGQGTLVTVSSA	34	SYVLTQPPSVVAPGQTARITC GGNNIGSKSVHWYQQPPGQAP VVVYDDSDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRVEAGDEAVYYC QVWDSSDHVVFGGGTKLTVL	28
BCMB124	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GGSISSGSYFWGWRQPPGKGLEWI GSIYYSGITYYNPSLKSRSVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR HDGAVAGLFDYWGQGTLVTVSSA	35	SYVLTQPPSVVAPGQTARITC GGNNIGSKSVHWYQQPPGQAP VVVYDDSDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRVEAGDEAVYYC QVWDSSDHVVFGGGTKLTVL	28
BCMB125	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GGSISSGSYFWGWRQPPGKGLEWI GSIYYSGITYYNPSLKSRSVTISVDT KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARH EGAVAGLFDYWGQGTLVTVSSA	36	SYVLTQPPSVVAPGQTARITC GGNNIGSKSVHWYQQPPGQAP VVVYDDSDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRVEAGDEAVYYC QVWDSSDHVVFGGGTKLTVL	28
BCMB126	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GGSISSGSYFWGWRQPPGKGLEWI GSIYYSGITYYNPSLKSRSVTISVDT KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARH SGAVAGLFDYWGQGTLVTVSSA	37	SYVLTQPPSVVAPGQTARITC GGNNIGSKSVHWYQQPPGQAP VVVYDDSDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRVEAGDEAVYYC QVWDSSDHVVFGGGTKLTVL	28

[0345]

BCMB127	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVS GGSISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWI GSIYYSGITYYNPSLKSRTVISVDT KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARH DAAVAGLFDYWGQGTLVTVSSA	38	SYVLTQPPSVSVA PGQTARITC GGNNIGSKSVHWYQQPPGQAP VVVYDDSDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRVEAGDEAVYYC QVWDSSDHVVFGGGTKLTVL	28
BCMB128	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVS GGSISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWI GSIYYSGITYYNPSLKSRTVISVDT KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARH DGATAGLFDYWGQGTLVTVSSA	39	SYVLTQPPSVSVA PGQTARITC GGNNIGSKSVHWYQQPPGQAP VVVYDDSDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRVEAGDEAVYYC QVWDSSDHVVFGGGTKLTVL	28
BCMB129	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVS GGSISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWI GSIYYSGITYYNPSLKSRTVISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR HDGAVAGLFDYWGQGTLVTVSSA	40	SYVLTQPPSVSVA PGQTARITC GGNNIGSKSVHWYQQPPGQAP VVVYDDSDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRVEAGDEAVYYC QVWDSSDHVVFGGGTKLTVL	28
BCMB130	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVS GGSISSGSYYFWGWIRQPPGKGLEW IGSIYYSGITYYNPSLKSRTVISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR HDAAVAGLFDYWGQGTLVTVSSA	41	SYVLTQPPSVSVA PGQTARITC GGNNIGSKSVHWYQQPPGQAP VVVYDDSDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRVEAGDEAVYYC QVWDSSDHVVFGGGTKLTVL	28
BCMB131	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVS GGSISSGSYYFWGWIRQPPGKGLEW IGSIYYSGITYYNPSLKSRTVISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR HEGAVAGLFDYWGQGTLVTVSSA	42	SYVLTQPPSVSVA PGQTARITC GGNNIGSKSVHWYQQPPGQAP VVVYDDSDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRVEAGDEAVYYC QVWDSSDHVVFGGGTKLTVL	28
BCMB176	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVS GGSISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWI GSIYYSGRTYYNPSLKSRTVISVDT KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARH DGATAGLFDYWGQGTLVTVSSA	58	SYVLTQPPSVSVA PGQTARITC GGNNIGSKSVHWYQQPPGQAP VVVYDDSDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRVEAGDEAVYYC QVWDSSDHVVFGGGTKLTVL	28
BCMB177	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVS GGSISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWI GSIYYSGRTYYNPSLKSRTVISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR HDGATAGLFDYWGQGTLVTVSSA	43	SYVLTQPPSVSVA PGQTARITC GGNNIGSKSVHWYQQPPGQAP VVVYDDSDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRVEAGDEAVYYC QVWDSSDHVVFGGGTKLTVL	28
BCMB178	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVS GGSISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWI GSIYYSGWTYYNPSLKSRTVISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR HDGATAGLFDYWGQGTLVTVSSA	44	SYVLTQPPSVSVA PGQTARITC GGNNIGSKSVHWYQQPPGQAP VVVYDDSDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRVEAGDEAVYYC QVWDSSDHVVFGGGTKLTVL	28
BCMB179	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVS GGSISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWI GSIYYSGITYYNPSLKSRTVISVDT KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARH QGATAGLFDYWGQGTLVTVSSA	45	SYVLTQPPSVSVA PGQTARITC GGNNIGSKSVHWYQQPPGQAP VVVYDDSDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRVEAGDEAVYYC QVWDSSDHVVFGGGTKLTVL	28
BCMB180	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVS GGSISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWI GSIYYSGITYYNPSLKSRTVISVDT KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARH HGATAGLFDYWGQGTLVTVSSA	46	SYVLTQPPSVSVA PGQTARITC GGNNIGSKSVHWYQQPPGQAP VVVYDDSDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRVEAGDEAVYYC QVWDSSDHVVFGGGTKLTVL	28
BCMB181	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVS GGSISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWI GSIYYSGITYYNPSLKSRTVISVDT KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARH WGATAGLFDYWGQGTLVTVSSA	47	SYVLTQPPSVSVA PGQTARITC GGNNIGSKSVHWYQQPPGQAP VVVYDDSDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRVEAGDEAVYYC QVWDSSDHVVFGGGTKLTVL	28

BCMB182	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GGSISSSSYFWGWRQPPGKGLEWI GSIYYSGTYYNPSLKSRTVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARH YGATAGLFDFYWGQGTLTVSSA	48	SYVLTQPPSVSVA GGNNIGSKSVH VVVYDDSDRPSGIPERFSGSN SGNTATLT QVWDSSDHV 28
BCMB183	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GGSISSSSYFWGWRQPPGKGLEWI GSIYYSGRTYYNPSLKSRTVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR HQGATAGLFDFYWGQGTLTVSSA	49	SYVLTQPPSVSVA GGNNIGSKSVH VVVYDDSDRPSGIPERFSGSN SGNTATLT QVWDSSDHV 28
BCMB184	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GGSISSSSYFWGWRQPPGKGLEWI GSIYYSGRTYYNPSLKSRTVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR HHGATAGLFDFYWGQGTLTVSSA	50	SYVLTQPPSVSVA GGNNIGSKSVH VVVYDDSDRPSGIPERFSGSN SGNTATLT QVWDSSDHV 28
BCMB185	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GGSISSSSYFWGWRQPPGKGLEWI GSIYYSGRTYYNPSLKSRTVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR HYGATAGLFDFYWGQGTLTVSSA	51	SYVLTQPPSVSVA GGNNIGSKSVH VVVYDDSDRPSGIPERFSGSN SGNTATLT QVWDSSDHV 28
BCMB186	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GGSISSSSYFWGWRQPPGKGLEWI GSIYYSGWTYYNPSLKSRTVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR HQGATAGLFDFYWGQGTLTVSSA	52	SYVLTQPPSVSVA GGNNIGSKSVH VVVYDDSDRPSGIPERFSGSN SGNTATLT QVWDSSDHV 28
BCMB187	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GGSISSSSYFWGWRQPPGKGLEWI GSIYYSGWTYYNPSLKSRTVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR HHGATAGLFDFYWGQGTLTVSSA	53	SYVLTQPPSVSVA GGNNIGSKSVH VVVYDDSDRPSGIPERFSGSN SGNTATLT QVWDSSDHV 28
BCMB188	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GGSISSSSYFWGWRQPPGKGLEWI GSIYYSGWTYYNPSLKSRTVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR HYGATAGLFDFYWGQGTLTVSSA	54	SYVLTQPPSVSVA GGNNIGSKSVH VVVYDDSDRPSGIPERFSGSN SGNTATLT QVWDSSDHV 28

[0347]

[0348] 따라서, BCMB69 이외도, 실시예 3에 기재된 바와 같이 28개의 돌연변이는 발현되고 정제되며, 실시예 4에 기재된 바와 같이 유세포 분석법에 의해 BCMA-발현 세포에 결합하는 것을 특징으로 하였다. 28개 중 7개의 돌연변이는 BCMA를 발현하는 세포에 결합하고, BCMA × CD3 이중특이성 패널을 제조할 목적으로 이동시켰다.

[0349]

실시예8: IgG4 S228P, L234A, L235A에서 이중특이성 포맷으로의 BCMA 및 CD3 항체의 제조

[0350]

Fc 치환 S228P, L234A 및 L235A를 갖는 BCMA 항체가 IgG4로서 발현되었다 (EU 인덱스에 따른 넘버링). 각각 서열 번호 55 및 서열 번호 56의 서열을 포함하는 중쇄 및 경쇄를 포함하는 단일특이적 항-CD3 항체 CD3B19를 또한 생성하였다.

[0351]

이러한 단일특이성 항체를 단백질 A 컬럼(HiTrap mAbSelect SuRe column)을 사용하여 표준 방법을 사용하여 정제하였다. 용리 후, 풀(pool)을 D-PBS, pH 7.2 내로 투석하였다.

[0352]

(WO2011/131746호에 기재된 바와 같이) 시험관내 Fab 아암 교환으로 단일특이성 CD3 mAb와 단일특이성 BCMA mAb를 조합함으로써 이중특이성 BCMA × CD3 항체를 생성하였다. 간략하게 말하면, PBS (pH 7 내지 7.4) 및 75 mM의 2-메르캅토에탄올아민(2-MEA) 중의 1:1 몰비의 항-BCMA/항-CD3 항체 (또는 일부 실시 형태에서는 다른 것을 고갈시키기 위해 6% 여분의 하나의 모 항체) 약 1 내지 20 mg/mL를 함께 혼합하고, 31°C에서 5시간 동안 인큐베이션한 후, 표준 방법을 사용하여 투석, 투석여과, 접선 유동 여과 및/또는 스픈 세포 여과(spinned cell filtration)를 통해 2-MEA를 제거하였다. 이중특이성 BCMA × CD3 항체의 형성을 양이온 교환 (CEX) HPLC 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC) HPLC에 의해 분석하였다. 원하는 경우, 이중특이성 BCMA × CD3 항체를 분취용 CEX 또는 HIC에 의해 풀리싱하여, 잔류 모(들)를 제거하였다

[0353]

대표적인 BCMA × CD3 이중특이성 항체의 중쇄 및 경쇄가 하기 표 10에 나타나 있다. CD3 아암과 병용했을 경우 BCMB178은 발현이 좋지 않아, 결과적으로 추가의 특성을 나타내지 않았다.

[0354]

[표 10]

이중특이성 항체에 대한 중쇄 및 경쇄 서열

Ab	아미노산 서열
BCMB72	중쇄 1 CD3B219 (서열 번호 55) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYA ASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNLSKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLTVSSAS TKGPSVFLAPCRSRTSESTAALGCLVKDVFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPVSSSLGTKTCTNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEAAGGSPVFLPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVQSQEDPEVQFNWYVVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSLGK
	경쇄 1 CD3B219 (서열 번호 56) QTVTQEPSTVSPGGTVLTCRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFS GSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQ ANKATLVCILISDFYPGAVTVAWKADSPVKAQGETTTPSKQSNKKYAASSYSLTPEQWKSRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
	중쇄 2 BCMB69 (서열 번호 65) QLQLQESGPGGLVKPSETLSLCTVSGGSISSGSYFWGIRQPPGKGLEWIGSIYYSGITYNNPSLK RVTISVDTSKNQFLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAAGLFDYWGQGTLTVTSSASTKGPSVFL APCSRSTSESTAALGCLVKDVFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPVSSSLGT KTTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEAAGGSPVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVV DVSQEDPEVQFNWYVVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPVLDSDGSFLYSRLLTVDKSRWQEGNVFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSLGK
BC3B7	중쇄 1 CD3B219 (서열 번호 55) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYA ASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNLSKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLTVSSAS TKGPSVFLAPCRSRTSESTAALGCLVKDVFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPVSSSLGTKTCTNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEAAGGSPVFLPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVQSQEDPEVQFNWYVVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSLGK
	경쇄 1 CD3B219 (서열 번호 56) QTVTQEPSTVSPGGTVLTCRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFS GSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQ ANKATLVCILISDFYPGAVTVAWKADSPVKAQGETTTPSKQSNKKYAASSYSLTPEQWKSRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
	중쇄 2 BCMB117 (서열 번호 67) QLQLQESGPGGLVKPSETLSLCTVSGGSISSGSYFWGIRQPPGKGLEWIGSIYYSGITYNNPSLK RVTISVDTSKNQFLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAAGLFDYWGQGTLTVTSSASTKGPSVFL APCSRSTSESTAALGCLVKDVFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPVSSSLGT KTTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEAAGGSPVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVV DVSQEDPEVQFNWYVVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPVLDSDGSFLYSRLLTVDKSRWQEGNVFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSLGK
BC3B8	경쇄 2 BCMB117 (서열 번호 66) SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGNNIGKSVHNVYQQPPGQAPVVVYDDSDRPGSFIGERFGSNS GNTATLTISRVEAGDEAVYYCQVWDDSSDHVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANK ATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSPVKAQGETTTPSKQSNKKYAASSYSLTPEQWKSRSYSQC VTHEGSTVEKTVAPTECS
	중쇄 1 CD3B219 (서열 번호 55) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYA ASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNLSKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLTVSSAS TKGPSVFLAPCRSRTSESTAALGCLVKDVFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPVSSSLGTKTCTNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEAAGGSPVFLPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVQSQEDPEVQFNWYVVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0355]

	경체 1 CD3B219 (서열 번호 56)	QTVVVTQEPSTVSPGGTVLTCRSSTGAVITSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGNTKRAPGTPARFS GSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTAKLTVLGQPKAAPSVTLFPSSSEELQ ANKATLVCLISDFYPCAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSRSR YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
	중체 2 BCMB123 (서열 번호 68)	QQLQESGPGLVKPSETSLSTCTVSGGSISSSSYFWGWRQPPGKGLEWIGSIYSGITYYNNPSLKS RVTISVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVAGLFDYWGQGTLTVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRTSESTAALGCLVKDYPFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEAAGGSPVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVV DVSQEDPEVQFNWYVVGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSIEKTISAKGQPREPVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFLYSLRTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
	경체 2 BCMB123 (서열 번호 66)	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVVYDDSDRPSGIPERFSGNS GSNTATLTLISRVEAGDEAVYYCQVWDDSDDHVVFGGGTAKLTVLGQPKAAPSVTLFPSSSEELQANK ATLVLCLISDFYPCAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS
BC3B9	중체 1 CD3B219 (서열 번호 55)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVVARIRSKYNNATYYA ASVKGRFTISRDDSNSLNLQMSLKLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLTVSSAS TKGPSPVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYPFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VTVTPSSSLGTTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEAAGGSPVFLFPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVVGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN EYKCKVSNKGLPSIEKTISAKGQPREPVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFLYSLRTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
	경체 1 CD3B219 (서열 번호 56)	QTVVVTQEPSTVSPGGTVLTCRSSTGAVITSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGNTKRAPGTPARFS GSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTAKLTVLGQPKAAPSVTLFPSSSEELQ ANKATLVCLISDFYPCAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSRSR YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
	중체 2 BCMB128 (서열 번호 69)	QQLQESGPGLVKPSETSLSTCTVSGGSISSSSYFWGWRQPPGKGLEWIGSIYSGITYYNNPSLKS RVTISVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARHDGATAGLFDYWGQGTLTVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYPFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEAAGGSPVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVV DVSQEDPEVQFNWYVVGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSIEKTISAKGQPREPVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFLYSLRTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
	경체 2 BCMB128 (서열 번호 66)	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVVYDDSDRPSGIPERFSGNS GSNTATLTLISRVEAGDEAVYYCQVWDDSDDHVVFGGGTAKLTVLGQPKAAPSVTLFPSSSEELQANK ATLVLCLISDFYPCAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS
BC3B10	중체 1 CD3B219 (서열 번호 55)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVVARIRSKYNNATYYA ASVKGRFTISRDDSNSLNLQMSLKLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLTVSSAS TKGPSPVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYPFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VTVTPSSSLGTTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEAAGGSPVFLFPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVVGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN EYKCKVSNKGLPSIEKTISAKGQPREPVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFLYSLRTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
	경체 1 CD3B219 (서열 번호 56)	QTVVVTQEPSTVSPGGTVLTCRSSTGAVITSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGNTKRAPGTPARFS GSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTAKLTVLGQPKAAPSVTLFPSSSEELQ ANKATLVCLISDFYPCAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSRSR YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
	중체 2 BCMB129 (서열 번호 70)	QQLQESGPGLVKPSETSLSTCTVSGGSISSSSYFWGWRQPPGKGLEWIGSIYSGSTYYNNPSLKS RVTISVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVAGLFDYWGQGTLTVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYPFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEAAGGSPVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVV DVSQEDPEVQFNWYVVGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSIEKTISAKGQPREPVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLYSLRTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

	경체 2 BCMB129 (서열 번호 66)	SYVLTQPPSVSVPQQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVVYDDSDRPSGIPERFGSNS GNTATLTLISRVEAGDEAVYYCQVWDSSDHVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANK ATLVCCLISDFYFPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS
BC3B11	중체 1 CD3B219 (서열 번호 55)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYA ASVKGRFTISRDDSNSKNSLYQMQNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLTVSSAS TKGKPSVFLAPCSRSTSESTAAALGCLVKDYFPEPVTSWSNGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTTCTCNDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCCPAPEAAGGSPVFLFPKPKDLMIS RTPEVTCVVVDVQDPEVQFNWYVVDGVEVHNAKTKPREFQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLYSLRSLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK
	경체 1 CD3B219 (서열 번호 56)	QTVTQEPLSTVSPGGTVLTCRSTGAVTTNSYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFS GSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTAKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQ ANKATLVLCLISDFYFPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
	중체 2 BCMB176 (서열 번호 71)	QLQLQESGPGLVKPSETLSLCTVSGGSISSSSYFWGWIROPPGKGLEWIGSIYSGITYNNPLSKR VTISVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARHDGATAGLFDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFL APCSRSTSESTAAALGCLVKDYFPEPVTSWSNGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG KTYYTCNDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCCPAPEAAGGSPVFLFPKPKDLMISRTPEVTCVV DVSQEDPEVQFNWYVVDGVEVHNAKTKPREFQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN GLPSSIEKTISAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ TTPPVLDSDGSFLYSLRSLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK
	경체 2 BCMB176 (서열 번호 66)	SYVLTQPPSVSVPQQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVVYDDSDRPSGIPERFGSNS GNTATLTLISRVEAGDEAVYYCQVWDSSDHVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANK ATLVCCLISDFYFPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS
BC3B12	중체 1 CD3B219 (서열 번호 55)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYA ASVKGRFTISRDDSNSKNSLYQMQNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLTVSSAS TKGKPSVFLAPCSRSTSESTAAALGCLVKDYFPEPVTSWSNGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTTCTCNDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCCPAPEAAGGSPVFLFPKPKDLMIS RTPEVTCVVVDVQDPEVQFNWYVVDGVEVHNAKTKPREFQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLYSLRSLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK
	경체 1 CD3B219 (서열 번호 56)	QTVTQEPLSTVSPGGTVLTCRSTGAVTTNSYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFS GSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTAKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQ ANKATLVLCLISDFYFPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
	중체 2 BCMB177 (서열 번호 72)	QLQLQESGPGLVKPSETLSLCTVSGGSISSSSYFWGWIROPPGKGLEWIGSIYSGRTYYNPLSK RVTISVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARHDGATAGLFDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFL APCSRSTSESTAAALGCLVKDYFPEPVTSWSNGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG KTYYTCNDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCCPAPEAAGGSPVFLFPKPKDLMISRTPEVTCVV DVSQEDPEVQFNWYVVDGVEVHNAKTKPREFQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ TTTPVLDSDGSFLYSLRSLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK
	경체 2 BCMB177 (서열 번호 66)	SYVLTQPPSVSVPQQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVVYDDSDRPSGIPERFGSNS GNTATLTLISRVEAGDEAVYYCQVWDSSDHVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANK ATLVCCLISDFYFPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS

[0357]

실시예9: BCMA 항체 및 BCMA × CD3 이중특이성에 대한 BCMA 친화도 측정

[0359]

표면 플라즈몬 공명 (SPR)을 사용하여 CD3 이중특이성의 생성에 사용되는 BCMA 항체의 인간 BCMA 친화도 값을 측정하였다. SPR에 이어지는 프로토콜은 실시예4에 기재된 것과 유사하다. 표 11에 나타낸 결과는 다양한 친화도를 갖는 단량체 BCMA 항원에 결합된 모든 샘플을 나타낸다. 모 mAb (BCMB69)의 결합 친화도는 약 1.4 nM이었다. BCMB117 및 BCMB128은 BCMB69의 범위에 친화도를 가는 반면에, BCMB123, BCMB129, BCMB176 및 BCMB177은 더 빠른 해리 속도(off-rate)로 인해 상대적으로 더 약한 친화도 (3 내지 15배)를 가졌다. 데이터 재현성을 평가하기 위해, 모든 샘플을 적어도 3회 반복하여 수행하고, 표준 편차를 보고한다.

[0360]

[표 11]

SPR에 의한 항-BCMA mAb 와 단량체성 인간 BCMA의 결합 친화도			
mAb	$k_{on} (\times 10^6 1/Ms)$	$k_{off} (\times 10^{-3} 1/s)$	$K_D (nM)$
BCMB69	2.74 ± 0.02	3.95 ± 0.19	1.44 ± 0.05
BCMB117	2.57 ± 0.21	3.42 ± 0.25	1.34 ± 0.20
BCMB123	2.14 ± 0.04	11.0 ± 1.33	5.12 ± 0.69
BCMB128	4.20 ± 0.13	8.70 ± 0.61	2.07 ± 0.21
BCMB129	1.54 ± 0.06	8.43 ± 0.44	5.47 ± 0.13
BCMB176	4.00 ± 0.05	28.8 ± 1.25	7.18 ± 0.22
BCMB177	2.80 ± 0.22	56.6 ± 5.54	20.2 ± 1.57

[0361]

SPR을 또한 사용하여 인간 및 사이노 BCMA에 대한 BCMA × CD3 이중특이성 항체의 친화도 값을 측정하였다. 표 12의 결과는 다양한 친화도를 갖는 Fc-BCMA 항원에 결합된 모든 샘플을 나타낸다. BC3B7 및 BC3B9는 인간 BCMA에 대해 BCMB72의 범위의 친화도를 갖는 반면에, 남아있는 이중특이성은 BCMB72에 비교하여 2 내지 3배 더 약한 친화도를 가졌다. 사이노 Fc-BCMA의 경우, BC3B7 및 BC3B9는 BCMB72보다 2 내지 3배 (각각 K_D 0.65 내지 0.37

nM) 더 단단한 친화도를 가지는 반면에, 남아있는 mAb는 BCMB72 (K_D ~0.8-1.2 nM)와 유사한 결합을 유지하였다. 데이터 재현성을 평가하기 위해, 모든 샘플을 적어도 3회 반복하여 수행하고, 표준 편차를 보고한다.

[0363] [표 12]

SPR에 의한 Fc-BCMA에 대한 BCMA × CD3 항체의 결합 친화도

BCMA × CD3	Fc-BCMA	k_{on1} ($\times 10^6$ 1/Ms)	k_{off1} ($\times 10^{-3}$ 1/s)	K_D (nM)	k_{on2} ($\times 10^{-3}$ 1/s)	k_{off2} ($\times 10^{-4}$ 1/s)	최종 K_D (nM)
BCMB72 (B69 × B219)	Hu	1.35±0.11	2.08±0.80	1.51±0.45	6.56±1.27	2.79±0.55	0.06±0.01
	Cy	1.26±0.12	4.83±0.28	3.87±0.57	1.06±0.10	7.85±1.04	1.65±0.26
BC3B7 (B117 × B219)	Hu	1.48±0.09	1.58±0.30	1.07±0.20	4.97±0.67	2.94±0.54	0.06±0.01
	Cy	1.38±0.07	4.17±0.19	3.04±0.25	1.50±0.06	4.15±0.53	0.65±0.04
BC3B8 (B123 × B219)	Hu	1.35±0.08	1.23±0.24	0.91±0.16	3.13±0.48	5.94±0.82	0.14±0.01
	Cy	1.09±0.05	7.34±0.21	6.77±0.48	1.94±0.08	3.26±0.43	0.97±0.09
BC3B9 (B128 × B219)	Hu	2.58±0.14	2.05±0.75	0.794±0.25	5.06±1.12	3.64±0.36	0.05±0.01
	Cy	2.18±0.06	4.23±0.23	1.94±0.14	1.60±0.09	3.76±0.52	0.37±0.04
BC3B10 (B129 × B219)	Hu	1.02±0.07	1.55±0.31	1.50±0.22	4.53±0.64	5.31±1.20	0.16±0.03
	Cy	0.93±0.04	6.36±0.28	6.84±0.48	1.65±0.07	3.59±0.50	1.22±0.17
BC3B11 (B176 × B219)	Hu	2.26±0.16	1.32±0.15	0.584±0.07	2.52±0.32	6.89±1.17	0.12±0.02
	Cy	1.93±0.10	6.83±0.11	3.56±0.23	1.47±0.04	3.95±0.76	0.75±0.11
BC3B12 (B177 × B219)	Hu	1.78±0.09	1.29±0.05	0.72±0.05	1.29±0.15	5.57±0.38	0.22±0.03
	Cy	1.48±0.10	8.31±0.30	5.65±0.46	1.46±0.07	3.37±0.43	1.06±0.15

[0364]

[0365] 바이아코어(Biacore) T200 시스템 (뉴저지 소재의 GE 헬스케어(Healthcare)) 사용하여 항-BCMA × CD3 이중특이성 항체 (BCMB72)와 Fc-융합 BCMA 단백질 (인간, 사이노 및 마우스)의 결합 친화도를 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 측정하였다.

[0366] 스트렙타비딘-유도체화된 센서 칩 (GE 헬스케어, 제품# BR-1005-31)의 유세포 2, 3 및 4를 각각 비오티닐화 Fc-융합 인간, 사이노 또는 마우스 BCMA와 고정시키고 (BCMA는 12 내지 16 반응 단위 (RU) 수준으로 고정됨; Fc-BCMA 단백질: 인간 (R&D 시스템즈; 제품# 193-FC), 사이노 (사내; 카탈로그# BCMW6.001) 및 마우스 (R&D 시스템즈; 제품# 593-BC)를 사내에서 비오티닐화하였다). 유세포 1 상에는 단백질이 고정되지 않았으며, 기준 표면으로 사용하였다. 결합 속도 실험을 전개 완충액(PBS pH 7.4, 0.005% P20, 3 mM EDTA) 중에서 25°C에서 수행하였다. BCMB72를 100 nM에서 시작하여 0.16 nM로 5배 회석하여 전개 완충액 중에 제조하였다. 이러한 용액을 5분 동안 (회합 단계) 50 μ L/min으로 주사하고, 전개 완충액으로 15분 동안 유동시켜 해리를 모니터링하였다. 글리신 (pH 1.5) 및 전개 완충액을 100 μ L/min으로 잠시 주사하여 칩 표면을 재생시켰다. Fc-BCMA와 BCMB72 상호작용의 결합 속도 분석을, 분석물 주사에 대한 참조물질-감산된 완충액 곡선으로부터 완충액 주사에 의해 생성된 곡선을 감산함으로써, 데이터의 이중 참조 감산하여 수행하였다. 바이아코어 T200 평가 소프트웨어 (GE 헬스케어, NJ)를 사용하여 2상태(Two-State) 결합 모델을 사용하여 센서그램(sensogram)의 전체적인 속도 피팅(Global kinetics fitting)을 수행하였다. 상이한 BCMA 종의 2상태 결합 모델에서 얻은 결합 친화도를 제1 복합체 (K_D) 및 최종 복합체 (K_b) (도 5)로 보고한다.

[0367] 실시예10: 다발성 골수종 백그라운드의 불멸화 세포주의 존재 하에 BCMA × CD3 항체의 표적-특이적 T-세포 활성화 및 세포독성 효능

[0368] BCMA × CD3 항체에 의해 매개된 T-세포의 활성화를 평가하였다. 간단히 말하면, BCMB72 (BCMA × CD3) 및 대조 항체 (BCMA × 널 및 널 × CD3)를 PBS 중에 800 μ g/ml로 회석하였다. 적정을 96-웰 U형 바닥 플레이트에서 PBS 중의 4배 연속 회석으로 준비하였다. 마지막 컬럼을 PBS 단독으로 두었다 (비허클 대조군).

[0369] 표적 세포을 글루타맥스(GlutaMAX), 10% FBS 및 25mM 헤페스가 보충된 항생제 무함유 RPMI 1640 배지 (배양 배지)에서 배양하였다. 셋업하는 날 (1일), 표적 세포를 계수하고, 1000만개의 세포를 1350 rpm으로 3분 동안 원심분리한 후, 상청액을 폐기하였다. 셀트래이스(CellTrace) FCSE 증식 균주를 18 μ l의 멸균 DMSO에 재구성하고, 1 μ l의 용액을 10 ml의 멸균 PBS에 회석하였다. 세포 펠릿을 1 ml의 CFSE 회석액에 재현탁하고, 실온에서 직사광을 피해 8분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 1 ml의 HI FBS를 세포 현탁액에 첨가하여, 초파 CFSE를 켄칭(quench)하였다. 세포를 10% FBS를 포함하는 RPMI-1640에서 2회 세정하였다. 10 ml의 RPMI에서 재구성한 후, 세포를 계수하고 세포 생존율을 스프레드 시트에 기록하였다. 세포를 2.2×10^5 /ml로 회석하고, 사용 전까지 37°C에서 인큐베이션하였다.

[0370] 정상 공여자로부터의 범(pan) T 세포를 37°C의 수조에서 해동시킨 후, 동결 바이알의 내용물을 50-ml 원뿔형 바이알로 옮기고, 15 ml의 차가운 배양 배지에서 재구성하였다. 이어서, 세포를 1350 rpm으로 4°C에서 3분 동안 원심분리하였다. 상청액을 버리고, 세포 펠릿을 5 내지 10 ml의 배양 배지에서 재구성하였다. T 세포를 계수하고 생존율을 기록하였다. 이어서, 세포를 1.1×10^6 /ml의 배양 배지에서 재구성하였다.

- [0371] 2×10^5 개의 표적 세포를 96-웰 U형 바닥 플레이트의 웰에 첨가한 후, Fc 차단제 (2mg/ml의 최종 농도로)를 첨가하였다. 모든 세포주를 실온에서 10분 동안 인큐베이션하여, Fc 수용체 활성을 차단하였다. 1×10^5 개의 T 세포를 웰에 첨가하였다 (5:1 효과기:표적 비). 표적 및 T 세포를 혼합한 후, 20 μ l의 BCMA \times CD3 항체 희석액을 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트들을 48시간 동안 5% CO₂, 37°C에서 인큐베이션하였다.
- [0372] 2일 후, 플레이트를 1350 rpm으로 3분 동안 4°C에서 원심분리하고, 100 μ l의 상청액을 개별 플레이트로 옮기며, 사이토카인 방출 검정을 위해 -80°C에서 저장하였다. 세포를 200 μ l의 PBS에서 세정하고, 20분 동안 실온에서 50 μ l의 근적외선 생존/사망 염색(근적외선 생존/사망 stain) (1:200 희석액) 및 항-CD25 PE 항체 (1:50 희석액)에서 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 200 μ l의 FACS 완충액에서 1회 세정하고, 150 μ l의 FACS 완충액에서 마지막으로 재구성하였다. FACS칸토 II 및 플로우조 7.6을 사용하여 표적 세포독성 (% 표적) 및 T 세포 활성화 CD25+ (% 생존 T 세포)에 대해 세포를 분석하였다. 그래프패드 프리즘 6에서 최소 제곱법을 사용하여 가변 기울기 (4개의 파라미터) 함수를 갖는 비선형 회귀를 사용하여 데이터의 그래핑(graphing) 및 피팅(fitting)을 수행하였다.
- [0373] 도 8은 T 세포 표면 상의 CD25 상향 조절에 의해 평가시 BCMB72가 일관된 표적-특이적 T 세포 활성화를 촉진한다는 것을 보여준다. Fc 차단제를 사용하여 표적 세포로의 항체의 Fc 수용체-의존성 결합을 방지한다. 일반적으로, 데이터 점은 생성된 곡선 피트를 따라 꼭 맞게 정렬되고, T 세포 공여자간에 가변성이 거의 없다. BCMA⁻ 세포의 경우 4 내지 10% (백그라운드 수준과 동등한) 및 BCMA⁺ 세포의 경우 45 내지 85%의 최대 활성화가 달성되었다. 다수의 정상 공여자의 T 세포를 사용하는 2개의 독립적인 실험으로부터의 EC₅₀ 및 최대 T 세포 활성화 값의 요약이 표 9에 나타나 있다.
- [0374] 도 10은 BCMB72가 BCMA⁺ 세포주에 대해 일관되게 강한 세포독성을 가짐을 나타낸다. Fc 차단제를 사용하여 표적 세포에 대한 BCMB72의 Fc 수용체-의존성 결합을 방지한다. 일반적으로, 데이터 점은 생성된 곡선 피트를 따라 꼭 맞게 정렬되고, T 세포 공여자간에 가변성이 거의 없다. BCMA⁻ 세포의 경우 4 내지 18% 및 BCMA⁺ 세포의 경우 62 내지 97%의 최대 용해율이 달성되었다. 다수의 정상 공여자의 T 세포를 사용하는 2개의 독립적인 실험으로부터의 EC₅₀ 및 최대 용해율 값의 요약이 표 11에 나타나 있다.
- [0375] 다른 6개의 BCMA \times CD3 항체는 83 내지 93%의 최대 세포독성 (도 12a) 및 2개의 상이한 공여자 T 세포 (도 12b)를 사용하여 BCMA⁺ H929 세포에 대한 74 내지 83% 범위의 T 세포 활성화를 나타내었다. 이러한 6개의 BCMA \times CD3 항체 분자는 0.04 내지 0.09 nM 범위의 EC₅₀ 값으로 BCMA+ 표적 세포를 사멸하는 데 효과적이다.
- [0376] **실시예 11: BCMA+ 세포주에서의 BCMB72의 결합 효율**
- [0377] 다양한 BCMA+ 세포주의 악성 백그라운드에 대한 BCMB72 결합에 대한 EC₅₀ 값을 평가하였다. 간단히 말하면, 이 중특이성 항체 BCMB72 (BCMA \times CD3)를 PBS 중에서 750 μ g/ml로 희석하였다. 적정을 96-웰 U형 바닥 플레이트에서 PBS 중의 3배 연속 희석으로 준비하였다. 마지막 컬럼을 PBS 단독으로 두었다 (비히클 대조군).
- [0378] H929 표적 세포를 글루타맥스, 10% FBS 및 25mM 헤페스가 보충된 항생제 무함유 RPMI 1640 배지 (배양 배지)에서 배양하였다. 분석을 위해, 표적 세포 밀도 및 생존율을 측정하고, 이어서 세포를 5분 동안 4°C에서 1000 rpm으로 원심분리하였다. 이어서, 세포 펠릿을 10 ml의 PBS에서 세정하고, 1000 rpm로 5분 동안 다시 원심분리하였다. 세포를 5.5×10^5 개의 세포/ml의 PBS에 재현탁하고, 96-웰 U형 바닥 플레이트의 웰 당 90 μ l의 세포 혼탁액, 이어서 10 μ l/웰의 BCMB72 희석액을 분취하였다. 플레이트를 4°C에서 1시간 동안 암실에서 인큐베이션한 후, 5분 동안 1000 rpm으로 원심분리하고, 상청액을 폐기하였다. 세포 펠릿을 200 μ l의 FACS 완충액에서 2회 세정하였다. 인간 IgG4 Fc에 대한 PE 표지된 2차 항체를 FACS 완충액에서 1:25로 용해시키고, 해당 웰에 50 μ l의 믹스를 첨가하였다. 샘플을 20분 동안 4°C에서 인큐베이션하고, 상기한 바와 같은 FACS 완충액에서 세정하여, 150 μ l의 FACS 완충액에서 FACS칸토 II에서의 분석을 위해 재구성하였다. BCMB72 결합에 대해 플로우조 (FlowJo) 7.6을 사용하여 데이터를 분석하고 그래프패드 프리즘 6에서 최소 제곱법을 사용하는 가변 기울기 함수를 사용한 비선형 회귀를 사용하여 데이터의 그래프 및 피팅을 수행하였다.
- [0379] 도 6에 도시된 바와 같이, BCMB72는 실험한 BCMA+ 세포주 모두에 결합할 수 있다. H929 세포와의 결합에 대한 EC₅₀은 14.7 nM, MM.1R 세포에 대한 것은 9.74 nM, EJM 세포에 대한 것은 17.5 nM, LP1 세포에 대한 것은 22.3

nM, U-2932 세포에 대한 것은 7.92 nM이었다.

[0380] 실시예12: 정상 인간 공여자로부터의 생체외 전혈에서의 BCMA 발현 및 BCMB72 결합의 분석

백혈구 상의 BCMA 및 BCMB72 결합의 발현을 3명의 정상적인 인간 공여자로부터의 생체외 전혈에서 평가하였다. 간단히 말하면, 정상 인간 공여자로부터의 신선한 말초 혈액을 실험 전에 헤파린-코팅된 튜브에 저장하였다. 혈액을 100 μ l의 분취량으로 96-웰 U형 바닥 플레이트로 피펫팅하였다. 염색 항체는 실험용 스프레드 시트에 표시된 대로 마스터 믹스로 준비하였다. 마스터 믹스를 BCMA 또는 BCMB72에 대한 항체와 함께 혈액에 직접 첨가하였다. 실온에서 30분간 인큐베이션한 후, 혈액을 포함하는 플레이트를 1350 rpm으로 3분 동안 4°C에서 원심분리하였다. 상청 혈장액을 폐기하고, 펠릿에 4회의 연속 RBC 용해를 적용하였는데, 이때 각각의 세정 사이에 5분간 인큐베이션하였다. 용해가 완료된 후, 펠릿을 PBS로 1회 세정한 다음, 1:200 생존/사망 근적외선 염색 및 1:50 항-IgG4 PE (BCMB72를 포함하는 웰의 경우만)으로 PBS에서 염색하였다. 플레이트를 실온에서 15분 동안 추가로 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 200 μ l의 FACS 완충액으로 세정하고, LSRFortessa에서의 분석을 위해 150 μ l의 FACS 완충액에서 마지막으로 재구성하였다. 각 웰에서 약 100,000개의 이벤트(event)를 수집하였다. 분석을 플로우조 7.6에서 수행하였다.

[0382] 도 7에 도시된 바와 같이, 3명의 정상적인 공여자에서 림프구, 단핵구, 과립구 또는 형질세포양 DC 상에 BCMA 발현이 관찰되지 않았다. BCMB72는 모든 3명의 공여자에서 공여자 사이에 다양한 강도로 CD3+ T 세포로의 결합을 보여주었다. BCMB72는 이 분석에서 시험한 다른 세포 유형에는 결합하지 않았다.

[0383] 실시예13: 사이토카인 프로파일에 대한 BCMB72 효과

[0384] T 세포 매개성 사멸 검정으로부터의 상청액 중의 사이토카인 프로파일을 BCMB72 및 대조 항체를 사용하여 평가하였다. T 세포 및 항체를 T-세포 매개성 세포독성 검정에서처럼 도말하였다 (실시예10 참조). 인큐베이션 48시간 후, 세포 상청액을 수화하고, MSD 기반 ELISA를 사용하여 사용하여 상이한 (10/30 Plex) 사이토카인을 측정하였다. 사이토카인 수준을 pg/mL로 표현하고, 그레프페드 브리즘 6에서 가변 기울기 (4개의 파라미터) 함수를 갖는 비선형 회귀를 사용하여 데이터의 그래핑 및 피팅을 수행하였다. RPMI8226 세포주로부터의 6개의 사이토카인의 EC₅₀ 값을 6개의 T 세포 공여자를 사용하여 도 13에 나타내었다. 데이터는 T 세포 활성화로 인한 중요한 사이토 카인 방출을 나타낸다. 대조군 항체에서는 사이토 카인 방출이 낮게 관찰되고/관찰되지 않았다 (데이터는 나타내지 않음).

[0385] 실시예14: T-세포 활성화 및 T-세포 매개성 표적 세포 사멸에서 HEK- 및 CHO-생성된 (일시적 & 안정된 세포주) BCMB72의 기능 비교

[0386] 상이한 세포 및 상이한 발현 모드에서 생성된 이중특이성 항체는 활성이 다양할 수 있다. 따라서, HEK (일시적 발현) 또는 CHO 세포 (일시적 또는 안정된 발현)에서 생성된 BCMB72의 시험관 내 효능을 평가하였다.

[0387] BCMB72를 PBS에서 800 μ g/ml로 희석하였다. 각 실험에서 나타낸 바와 같이, 적정을 96-웰 U형 바닥 플레이트에서 PBS 중의 3배 또는 4배 연속 희석으로 준비하였다. 마지막 컬럼을 PBS 단독으로 두었다 (비히클 대조군).

[0388] H929 표적 세포를 글루타맥스, 10% FBS 및 25mM 헤페스가 보충된 항생제 무함유 RPMI 1640 배지 (배양 배지)에서 배양하였다. 셋업하는 날 (1일) 세포를 계수하고, 1000만개의 세포를 1350 rpm으로 3분 동안 원심분리하고, 상청액을 폐기하였다. 셀트레이스 FCSE 종식 군주를 18 μ l의 멜균 DMSO에 재구성하고, 1 μ l의 용액을 10 ml의 멜균 PBS에 희석하였다. H929 세포 펠릿을 1 ml의 CFSE 희석액에 재현탁하고, 실온에서 직사광을 피해 8분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 1 ml의 HI FBS를 세포 혼탁액에 첨가하여, 초과 CFSE를 켄칭하였다. 세포를 10% FBS를 포함하는 1640 RPMI에서 2회 세정하였다. 10 ml의 RPMI에서 재구성한 후, 세포를 계수하고 세포 생존율을 스프레드 시트에 기록하였다. 세포를 나타낸 농도로 희석하고, 사용 전까지 37°C에서 인큐베이션하였다.

[0389] 정상 공여자로부터의 T 세포를 37°C의 수조에서 해동시킨 후, 바이알의 내용물을 50-ml 원뿔형 바이알로 옮기고, 15 ml의 차가운 배양 배지에서 재구성하였다. 이어서, 세포를 1350 rpm으로 4°C에서 3분 동안 원심분리하였다. 상청액을 버리고, 세포 펠릿을 5 내지 10 ml의 배양 배지에서 재구성하였다. T 세포를 계수하고 배양 배지에서 적절한 농도로 재구성하였다 (각 실험에 대한 스프레드 시트 참조).

[0390] H929 세포를 웰에, 이어서 T 세포 (5:1 효과기:표적 비)를 첨가하였다. 이러한 세트의 연구에서 Fc 차단제는 사용되지 않았다. 표적 및 T 세포를 혼합한 후, 20 μ l의 BCMB72 희석액을 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트

들을 48시간 동안 5% CO₂, 37°C에서 인큐베이션하였다.

[0391] 2일 후, 세포를 함유하는 플레이트를 원심분리하고, 사이토카인 방출 검정을 위해 상청액을 폐기하거나 저장하였다. 세포를 200 μl의 PBS에서 세정하고, 20분 동안 실온에서 50 μl의 근적외선 생존/사망 염색 (1:200 회색액) 및 항-CD25 PE 항체 (1:50 회색액)에서 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 200 μl의 FACS 완충액에서 1회 세정하고, 150 μl의 FACS 완충액에서 마지막으로 재구성하였다. 동일한 날에 FACS칸토 II를 사용하여 세포에 유세포 분석법을 수행하고, 표적 세포독성 (% 표적) 및 T 세포 활성화 CD25+ (% 생존 T 세포)에 대해 플로우 조 7.6에서 분석하였다. 그래프패드 프리즘 6에서 최소 제곱법을 사용하여 가변 기울기 (4개의 파라미터) 함수를 갖는 비선형 회귀를 사용하여 데이터의 그래프 및 피팅을 수행하였다.

[0392] 도 14에 도시된 바와 같이, HEK 세포에서 생산된 BCMB72와 CHO 세포에서 생산된 BCMB72는 표적 세포에 대한 세포 독성 및 T 세포에 대한 자극성 측면에서 T 세포 리다이렉션 분석에서 사실상 동일하게 수행된다. 최대 사멸의 85% 및 T 세포 활성화의 80%를 일반적으로 달성하였다. 세포독성에 대한 평균 EC₅₀ 값이 HEK 세포에서 생성된 BCMB72의 경우 0.29 nM이고, CHO 세포에서 생성된 BCMB72의 경우 0.42- 0.47 nM이었다. T 세포 활성에 대한 평균 EC₅₀ 값이 HEK 세포에서 생성된 BCMB72의 경우 0.28 nM이고, CHO 세포에서 생성된 BCMB72의 경우 0.37-0.41 nM이었다. 스튜던트 t-검정을 사용한 비교용 분석은 EC₅₀ 값 사이에 통계적 유의성을 나타내지 않았다.

[0393] 실시예15: BCMB72에 의한 P38 신호전달 활성화

[0394] BAFF 및 APRIL 모두는 2개의 수용체 BCMA (B 세포 성숙 항원, TNFRSF 17) 및 TACI (막관통 활성화제 및 CAML 상호작용자, TNFRSF 13b)에 결합한다. BCMA의 관여는 JNK 및 P38 MAPK 신호전달 경로를 활성화한다. BCMA × CD3 이중특이성 항체인 BCMB72는 BCMA에 대한 효능을 발휘할 수도 있다 이 연구에는 두 부분이 포함하였다. 1. 단순 웨스턴 분석 검정을 개발하여 APRIL 또는 BAFF 처리 후 H929 또는 MM1.R 세포에서 P38a MAPK 변화를 모니터링하는 단계. 2. 새로 개발된 분석법을 사용하여 BCMB72가 BCMA에 대해 어떠한 효능적 효과가 있는지 확인하는 단계.

[0395] 세포 치료

[0396] 치료 전에 5% CO₂의 존재 하에 24시간 동안 37°C에서 무혈청 RPMI 배지에 H929 또는 MM1.R 세포를 1.5e6/ml로 접종하였다. 치료 당일에, 세포를 회전시켜, 무혈청 RPMI에 1.5e6/ml로 재현탁하였다. 시간 경과 분석을 위해, 세포를 투브 당 5 ml로 10개의 투브로 분취하였다 각각 0, 5, 15, 30 및 60분 동안 37°C에서 5% CO₂의 존재 하에 세포의 각각의 투브를 1000 ng/ml의 APRIL (R&D 시스템즈 cat#5860-AP-010) 또는 1000ng/ml의 BAFF (R&D 시스템즈 cat#2149-BF-010)로 처리하였다. 인큐베이션 후, 세포 용해물을 만들기 위해 세포를 즉시 펠렛화하고 -80°C에서 동결시켰다. BCMB72 작용제 효과 검정을 위해, H929 세포 처리군을 표 13에 열거하였다. BCMB72 작용제 효과 검정을 2회 수행하였다.

[0397] [표 13]

BCMB72 작용제 효과 검정을 위한 치료군

캡슐	치료 (15 분)
1	APRIL 0 ng/ml
2	APRIL 1000 ng/ml
3	BAFF 0 ng/ml
4	BAFF 1000 ng/ml
5	BCMB72 0 ng/ml
6	BCMB72 10 ng/ml
7	BCMB72 100 ng/ml
8	BCMB72 1000 ng/ml
9	BCMB72 10000 ng/ml

[0398]

단순 웨스턴 분석을 위한 세포 용해물 제조

[0400] 세포를 포스파타제 및 포스파타제 억제제를 함유하는 RIPA 완충액으로 용해시켰다. 바이오라드(BioRad) DC 단백질 분석 (바이오라드 # 500-0112) 및 소혈청 알부민 표준물질을 사용하여 스펙트라맥스 플러스 384 마이크로 플레이트 판독기(SpectraMax Plus 384 microplate reader) (미국 캘리포니아주 서니베일 소재의 몰레큘러 디바

이시즈(Molecular Devices))에서 단백질 농도를 측정하였다.

[0401] 단순 웨스턴 분석

프로틴심플 사용 설명서에 따라 웨스-래빗(Wes-Rabbit) (12-230 KDa) 마스터 키트 (프로틴심플 # PS-MK01)으로 단순 웨스턴 분석을 수행하였다. 요약하면, 세포 용해물 샘플을 마스터 믹스와 최종 농도의 1x 샘플 완충액, 1x 형광 분자량 마크 및 40 mM 다이티오토레이톨 (DTT)로 혼합한 후, 95°C에서 5분 동안 가열하였다. 샘플, 블로킹 시약, 1차 항체인 포스포(phosphor)-p38 MAPK (써모피셔(ThermoFisher) : VWR # MA5-15182) 또는 액틴-베타(Actin-beta) (셀 시그널링(Cell Signaling), # 8457S), HRP-접합 2차 항체, 화학발광 기질, 및 분리 및 적층 매트릭스를 또한 심플 웨즈(Simple Wes) 마이크로 플레이트의 지정된 웰로 분배하였다. 플레이트를 로딩한 후, 분리 전기영동 및 면역 검출 단계가 모세관 시스템에서 일어났고, 완전히 자동화되었다. 전기영동 동안, 적층 및 분리 매트릭스를 통한 분자량을 기준으로 단백질을 분리하고, 전매 광활성화 포획 화학(proprietary, photoactivated capture chemistry)을 사용하여 모세혈관 벽에 고정시켰다. 항체 희석제 II (프로틴심플 #042-203)를 사용하여 1차 항체를 1:50로 희석시켰다. 표적 단백질을 1차 항체로 60분 동안, 이어서 HRP-접합된 2차 항체로 면역탐침화(immunoprobbed)하였다. 시몬(Simon)-단순 웨스턴 분석을 실온에서 수행하고, 장비의 기본 설정을 사용하였다. 디지털 이미지를 컴파스(Compass) 소프트웨어 (프로틴심플)로 분석하고, 검출된 단백질의 정량화된 데이터를 분자량, 신호/피크 강도 및 피크 면적으로 기록하였다.

[0403] 결과

시간 경과 연구로부터 얻은 정보에 기초하여, BCMB72 작용제 분석을 15분 배양 종료점을 사용하는 H929 세포로 수행하였다. p38 MAPK 신호를 인간 베타 액틴 신호에 의해 정규화하였다. 두 가지 분석으로부터의 정규화된 p38 MAPK 신호의 평균을 도 15에 나타내었다. BCMB72 작용제 분석은 BCMB72가 H929 세포에서 BCMA에 대해 작용제 효과가 없음을 보여주었다.

[0405] 실시예 16: BCMB72에 의한 NF-κB 신호전달

BCMA는 내인성 리간드에 반응하여 NF-κB 신호 전달을 유도할 수 있는 표면 수용체이다. NF-κB 경로 활성화에 대한 BCMA와의 BCMA72 결합의 효과는 NF-κB 프로모터 하에서 알칼리 포스파타제 (SEAP)를 발현하는 BCMA-발현 리포터 세포주를 사용하여 평가하였다.

세포를 글루타맥스 및 10% FBS (배양 배지)가 보충된 DMEM 배지에서 배양하였다. 실험 전 저녁에 세포에 트립신처리 (37°C에서 미리 가온시킨 0.25% 트립신에서 5분)하여 수화하고 30 ml 배지에서 세정하였다. 이어서, 세포를 5분 동안 4°C에서 1,000 rpm으로 원심분리하고, 무혈청 DMEM (글루타맥스 포함)에서 2.5×10^5 세포/ml로 재구성하였다. 5×10^4 개의 세포를 96-웰 평면 바닥 플레이트의 웰에 첨가하고, 37°C에서 16시간 동안 인큐베이션하였다.

다음 날 아침, 다양한 자극성 시약 (TNFα, APRIL, BCMB72)을 해당 웰에 첨가하고 (실험 플레이트 맵 참조), 플레이트를 37°C에서 추가로 16시간, 24시간 또는 48시간 동안 인큐베이션하였는데, 이는 각각 신호전달의 초기, 중기, 후기를 나타낸다. 각 시점 후에, 10 μl의 조건 배양 배지를 웰에서 수집하여, SEAP 키트 (카이만(Cayman), 600272)에 제공된 96-웰 고체 플레이트로 옮기고, 뚜껑을 덮었다. 무혈청 DMEM (글루타맥스 포함)에서 1:10의 별크(bulk) 표준물 (5 U/ml)로 희석한 후, 1:2 연속 희석물 (희석 범위는 50-0.78 mU/ml임)을 제조하여 SEAP 표준물을 제조하였다. 샘플을 포함하는 플레이트를 65°C에서 30분 동안 인큐베이션하여, 내인성 알칼리성 포스파타제를 불활성시키고; 이러한 분석에서 발현된 SEAP는 이러한 인큐베이션 조건에서 안정적이다. 10 μl의 표준 희석액을 적절한 웰에 첨가한 후, 플레이트를 실온에서 인큐베이션하였다. 50 μl의 기질 용액을 모든 웰에 첨가하고, 샘플을 잠시 교반하여 용액을 웰에 분배시켰다. 샘플을 20 내지 30분 동안 인큐베이션하고, 퍼킨엘머 인비전 2014 멀티라벨 판독기(PerkinElmer EnVision 2104 Multilabel Reader)를 사용하여 화학발광을 평가하였다. 모든 발광 판독값을 표준 곡선을 기준으로 활동 단위 농도로 변환하고, 값을 Microsoft Excel 2010에서 분석하고 그래픽 분석을 위해 그레프패드 프리즘 6에 임포팅(imported)하였다.

도 16은 APRIL이 0.46 nM의 낮은 농도로 BCMA를 자극할 수 있는 반면, 일반적으로 BCMB72는 10 nM 미만의 농도에서 BCMA-형질 전환 세포에서 NF-κB 경로를 활성화시키지 않음을 입증하였다. 중증 BCMB72-의존성 활성화는 높은 (44-133 nM) BCMB72 농도에서 관찰되었다.

[0410] 실시예 17: 표적 세포의 부재 하에 T 세포 활성화에 대한 BCMA의 세포외 도메인의 외인성 첨가의 효과

BCMA 세포외 도메인 (ECD)은 용액에서 삼량체를 형성할 수 있다. 따라서, 표적 세포의 부재 하에 다수의 이중

특이성 항체가 BCMA ECD 삼량체에 결합하고, TCR 복합체에 가교결합할 수 있는 가능성을 보여준다. 이는 표적-독립적인 방식으로 T 세포를 활성화시킬 수 있다. 이 연구는 BCMA의 외인성 첨가 ECD가 표적 세포와의 상호작용 없이 CD25 발현 수준에서 T 세포 활성화를 유발할 수 있는지 여부를 조사 하였다.

- [0412] BCMB72 (BCMA × CD3) 및 대조군 (널 × CD3)을 PBS에서 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 희석하였다. 적정을 96-웰 U형 바닥 플레이트에서 PBS 중의 3배 연속 희석으로 준비하였다. 마지막 컬럼을 PBS 단독으로 두었다 (비히를 대조군).
- [0413] 가용성 BCMA ECD (sBCMA)를 PBS에서 36 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (6.67 μM)로 희석하였다. 적정을 96-웰 U형 바닥 플레이트에서 PBS 중의 3배 연속 희석으로 준비하였다. 가장 위 웰을 PBS 단독으로 두었다 (비히를 대조군).
- [0414] 정상 공여자로부터의 범(pan) T 세포를 37°C의 수조에서 해동시킨 후, 동결 바이알의 내용물을 50- mL 원뿔형 바이알로 옮기고, 30 mL 의 차가운 배양 배지에서 재구성하였다. 이어서, 세포를 1350 rpm으로 4°C에서 3분 동안 원심분리하였다. 상청액을 버리고, 세포 펠릿을 10 mL 의 배양 배지에서 재구성하였다. T 세포를 계수하고 생존율을 기록하였다. 이어서, 세포를 $0.525 \times 10^6/\text{mL}$ 의 배양 배지에서 재구성하였다.
- [0415] 1×10^5 개의 T 세포 ($190 \mu\text{L}$)를 웰에 첨가한 후, 5 μL 의 sBCMA 희석액 및 5 μL 의 BCMB72 희석액을 첨가하였다. 플레이트를 48시간 동안 5% CO_2 , 37°C에서 인큐베이션하였다.
- [0416] 2일 후, 플레이트를 3분 동안 4°C에서 1500 rpm으로 원심분리하고, 상청액을 폐기하였다. 세포 펠릿을 200 μL 의 PBS에서 세정하고, 20분 동안 실온에서 50 μL 의 근적외선 생존/사망 염색 (1:200 희석액) 및 항-CD25 PE 항체 (1:50 희석액)에서 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 200 μL 의 FACS 완충액에서 1회 세정하고, 150 μL 의 FACS 완충액에서 마지막으로 재구성하였다. FACS칸토 II 및 플로우조 7.6을 사용하여 T 세포 활성화 CD25+ (% 생존 T 세포)에 대해 세포를 분석하였다. 그레프패드 프리즘 6에서 최소자승법에 따른 비선형 회귀를 사용하여 데이터의 그래프 및 피팅을 수행하였다.
- [0417] 정상 공여자로부터의 T 세포는 BCMB72의 존재 하에 sBCMA ECD-매개성 활성화를 나타내지 않았다. 작은 백분율의 T 세포 (10-15%)의 약한 활성화가 높은 농도 ($>40 \text{nM}$)의 BCMB72에서 sBCMA-독립적인 방식으로 관찰되었다(도 17).
- [0418] **실시예18: T 세포 활성화 및 BCMB72-의존성 세포독성에 대한 BCMA, APRIL 및 BAFF의 가용성 ECD의 효과**
- [0419] 가용성 BCMA ECD는 BCMA × CD3 항체의 싱크(sink) 역할을 수행할 수 있는 반면에, APRIL 및 BAFF는 표면 수용체 및 BCMA × CD3 항체 사이의 상호작용의 경쟁적 억제제가 될 수 있다. BCMB72-의존성 세포 사멸의 시험관내 세포독성 효능에 대한 가용성 BCMA ECD 및 내인성 리간드 APRIL 및 BAFF의 효과를 정상 공여자 M7077로부터의 범 T 세포 및 불멸화된 세포주 H929를 사용하여 T 세포 방향전환 검정에서 평가하였다.
- [0420] BCMB72를 PBS에서 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 희석하였다. 적정을 96-웰 U형 바닥 플레이트에서 PBS 중의 3배 연속 희석으로 준비하였다. 마지막 컬럼을 PBS 단독으로 두었다 (비히를 대조군). 가용성 BCMA ECD를 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 희석하고, APRIL 및 BAFF를 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 희석하였다. 두 시약에 대한 적정을 96-웰 U형 바닥 플레이트에서 PBS 중의 3배 연속 희석으로 준비하였다.
- [0421] H929 표적 세포를 글루타맥스, 10% FBS 및 25mM 헤페스가 보충된 항생제 무함유 RPMI 1640 배지 (배양 배지)에서 배양하였다. 셋업하는 날 (1일), 표적 세포를 계수하고, 1000만개의 세포를 1350 rpm으로 3분 동안 원심분리한 후, 상청액을 폐기하였다. 셀트레이스 FCSE 증식 균주를 18 μL 의 멸균 DMSO에 재구성하고, 1 μL 의 용액을 10 mL 의 멸균 PBS에 희석하였다. 세포 펠릿을 1 mL 의 CFSE 희석액에 재현탁하고, 실온에서 직사광을 피해 8분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 1 mL 의 HI FBS를 세포 혼탁액에 첨가하여, 초과 CFSE를 켄칭하였다. 세포를 10% FBS를 포함하는 RPMI-1640에서 2회 세정하였다. 10 mL 의 RPMI에서 재구성한 후, 세포를 계수하고 세포 생존율을 스프레드 시트에 기록하였다. 세포를 $2.2 \times 10^5/\text{mL}$ 로 희석하고, 사용 전까지 37°C에서 인큐베이션하였다.
- [0422] 정상 공여자로부터의 범(pan) T 세포를 37°C의 수조에서 해동시킨 후, 동결 바이알의 내용물을 50- mL 원뿔형 바이알로 옮기고, 30 mL 의 차가운 배양 배지에서 재구성하였다. 이어서, 세포를 1350 rpm으로 4°C에서 3분 동안 원심분리하였다. 상청액을 버리고, 세포 펠릿을 10 mL 의 배양 배지에서 재구성하였다. T 세포를 계수하고 생존율을 기록하였다. 이어서, 세포를 $1.1 \times 10^6/\text{mL}$ 의 배양 배지에서 재구성하였다.
- [0423] 2×10^5 의 H929 세포를 96-웰 U형 바닥 플레이트의 웰에 첨가하였고; Fc 차단제를 사용한 인큐베이션은 이러한 연구에 필요하지 않다. 1×10^5 개의 T 세포를 웰에 첨가하였다 (5:1 효과기:표적 비). 표적 및 T 세포가 혼합

된 후, sBCMA, APRIL 또는 BAFF 중 하나의 $20 \mu\text{l}$ 를 웰에 첨가한 후, $5 \mu\text{l}$ 의 항체 희석액을 첨가하였다. 플레이트를 48시간 동안 $5\% \text{CO}_2$, 37°C 에서 인큐베이션하였다.

[0424] 2일 후, 플레이트를 3분 동안 4°C 에서 1500 rpm으로 원심분리하고, 상청액을 폐기하였다. 세포를 $200 \mu\text{l}$ 의 PBS에서 세정하고, 20분 동안 실온에서 $50 \mu\text{l}$ 의 근적외선 생존/사망 염색 (1:200 희석액) 및 항-CD25 PE 항체 (1:50 희석액)에서 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 $200 \mu\text{l}$ 의 FACS 완충액에서 1회 세정하고, $150 \mu\text{l}$ 의 FACS 완충액에서 마지막으로 재구성하였다. FACS칸토 II 및 플로우조 7.6을 사용하여 표적 세포독성 (% 표적) 및 T 세포 활성화 CD25+ (% 생존 T 세포)에 대해 세포를 분석하였다. 그래프패드 프리즘 6에서 최소 제곱법을 사용하여 가변 기울기 (4개의 파라미터) 함수를 갖는 비선형 회귀를 사용하여 데이터의 그래핑 및 피팅을 수행하였다.

[0425] BCMB72는 가용성 BCMA ECD의 존재 하에 H929 세포에서 세포독성을 발휘할 수 있고, 이때 고용량 ($>160 \text{nM}$)의 sBCMA ECD에서 EC_{50} 상의 약간의 효과 (2배 증가)를 가지며; T 세포 활성화는 유사하게 영향을 받았다 (도 18a 및 도 18d 참조). APRIL은 고용량 (46nM)에서 세포 세포독성 및 T 세포 활성화에 대한 EC_{50} 값을 6배 증가시킨 반면에, 저용량에서는 분석에 미미한 영향을 주었다 (도 18b 및 18e 참조). 최대 사멸은 sBCMA 또는 APRIL에 영향을 받지 않았다. 대조적으로, 외인성 BAFF는 51nM 이하의 농도에서 BCMB72-매개성 세포독성에 전혀 영향을 주지 않았다 (도 18c 참조). 예상한 바와 같이, 모든 경우에 T 세포 활성화 포텐셜은 사멸 데이터와 잘 일치하였다 (도 18f 참조).

실시예19: 시험관 내 BCMA와의 결합에 대한 BCMB72, APRIL 및 BAFF의 경쟁

[0427] 2개의 TNF 리간드, APRIL 및 BAFF는 BCMA에 결합할 수 있고, 세포 생존 및 증식을 유도하는 신호전달 캐스케이드를 유도할 수 있다. BCMA의 세포외 도메인은 이러한 2개의 리간드뿐만 아니라 이러한 모티프에 대해 생성된 항체에 결합하는 짧은 54개의 아미노산 단편이다. 여기서, BCMB72에 대한 이러한 리간드의 경쟁적 성질을 평가하였다.

[0428] 검정을 ELISA 기반 포맷으로 설정하였다. 경쟁 분석을 위한 준비에서, BCMA-Fc는 MSD 설포(Sulfo)태그로 표지되어야 한다. 50ug 바이알의 BCMA-Fc를 500uL PBS에서 재구성하여, 0.1mg/mL ($3.125\mu\text{M}$ 단량체)를 얻었다. 150nmol NHS-설포태그를 물 50uL 에 용해시켜, 3mM 용액을 얻었다. 10x 과량의 표지 반응을 위해 5.2uL 의 3mM NHS-설포태그 (15.6nmol)를 500uL 의 BCMA-Fc (1.56nmol 단량체)에 첨가하였다. 반응을 2시간 동안 실온에서 암실에 두었다. 50uL 의 1M 트리스를 첨가하여, 반응하지 않은 NHS를 켄칭하였다. 과량의 설포태그 및 트리스를 제거하고, PBS 평형화된 2mL 의 7k MWCO 제바 스핀 컬럼(Zeba spin column)으로 완충액 교환에 의해 제거하였다. 최종 부피는 $\sim630\text{uL}$ 이었으므로, 최종 설포태그-BCMA-Fc는 $2.5\mu\text{M}$ 으로 사용되었다.

[0429] 경쟁 분석을 위해, 항-BAFF (100ug) 및 항-APRIL (100ug)을 200uL 의 PBS에서 재구성하여, 0.5mg/mL 스톡 용액을 얻었다. 30uL (6ug)의 항-APRIL 및 항-BAFF를 각각 2.97mL 의 PBS에 용해시켜, 2ug/mL 의 용액을 얻었다. 96 웰 MSD 고결합 플레이트의 모든 웰에, 25uL 의 2ug/mL 항-APRIL을 첨가하였다. 제2 96 웰 MSD 고결합 플레이트의 모든 웰에, 25uL 의 2ug/mL 항-BAFF를 첨가하였다. 플레이트를 4°C 에서 하룻밤 동안 두어, 항체를 고정시켰다. 항-APRIL 및 항-BAFF 코팅된 플레이트를 버리고, $300\text{uL}/\text{웰}$ 수퍼블록(SuperBlock)을 첨가하였다. RT에서 1시간 블로킹한 후, 플레이트를 PBS-T로 3회 세정하였다. 10ug 의 각각의 재조합 APRIL 및 BAFF를 100uL 의 PBS에 재현탁하여, 0.1mg/mL 용액을 얻었다. APRIL 및 BAFF 각각의 3mL 의 2ug/mL 용액을 60uL 의 새로 재구성된 단백질을 2.94mL 의 수퍼블록에 희석하여 제조하였다. 25uL 의 2ug/mL APRIL을 항-APRIL 코팅된 플레이트의 각 웰에 첨가하고, 25uL 의 2ug/mL BAFF를 항-BAFF 코팅된 플레이트의 각 웰에 첨가하였다. RT에서 1시간 포획한 후, 플레이트를 PBS-T로 3회 세정하였다. 500ug 항-BCMA (R&D Sys Mab193)를 1mL 의 PBS에 재구성하여, 스톡 용액의 0.5mg/mL ($3.3\mu\text{M}$)를 얻었다. 항-BCMA Mab193, BCMB72.004 및 대조 항체 (널 \times CD3)를 수퍼블록에서 $1\mu\text{M}$ 로 희석하였다. 100uL 의 항체를 200uL 의 수퍼블록에서 혼합하여 11pt 3배 연속 희석 시리지를 제조하였다. 상기 5.928mL 의 수퍼블록으로부터의 72uL 의 단백질을 희석하여, 6mL 의 30nM 설포태그-BCMA-FC를 제조하였다. 단계 11로부터의 각 항체 25uL 를 하기 도 1에 플레이트 맵에 따라 APRIL/BAFF 포획된 플레이트의 각 웰에 첨가였다. 25uL 의 30nM 설포태그-BCMA-Fc를 두 플레이트의 각각의 웰에 첨가하였다. RT에서 1시간 후, 플레이트를 PBS-T로 3회 세정하였다. 150uL 의 1x MSD 판독 완충액 T를 모든 웰에 첨가하고, 플레이트를 섹터(sector) 6000 이미저(imager)에서 스캐닝하였다. 실험을 두 번째 독립적인 세트의 결과를 얻기 위해 상술한 바와 같이 정확히 반복하였다.

[0430] 도 19에서 도시된 바와 같이, 대조 항체 (널 \times CD3)없이 증가하는 양의 BCMB72로 인큐베이션한 경우, BCMA-Fc

단백질은 플레이트 결합된 APRIL 및 BAFF에 결합하는 것이 방지되었다. 관찰은 각각 세 번의 반복된 두 번의 독립적인 실험 간에 일관성이 있었다.

[0431] 실시예20: 다발성 골수종 환자 골수 CD138 양성 세포의 BCMB72 결합 및 세포독성.

다발성 골수종 환자의 1 차 샘플에서 BCMB72의 효능을 평가하기 위해, 5 명의 환자의 동결된 다발성 골수종 샘플과 건강한 공여자의 T 세포를 사용한 세포 독성 사멸 분석에서 이 항체를 시험하였다. 항체 결합 및 T 세포 활성화 포텐셜을 또한 측정하였다.

[0433] BCMB72 결합 분석

100 μ l의 세포 혼탁액, 이어서 95 μ l의 배양 배지를 96 웰 U형 바닥 플레이트의 각 웰당 분취하였다. 이어서 BCMB72 또는 대조군의 5 μ l의 연속 희석액을 웰에 첨가하고, 플레이트를 1시간 동안 4°C에서 인큐베이션하였다. 염색 후 세포를 1,200 rpm으로 3분 동안 원심분리하고, 200 μ l의 PBS로 1 회 세정하였다. 세포를 다시 원심분리한 후, 상청액을 버린 다음, 펠릿을 50 μ l의 근적외선 생존/사멸 염색 (1:200 희석), 항인간 IgG4 Fc PE 항체 (1:50 희석), 항-CD138 (MI15 1:50) 및 DL-101 1:50 희석)에서 재구성하여, 암실에서 실온에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 원심분리하고, 200 μ l의 FACS 완충액에서 세정하여, 150 μ l의 FACS 완충액에서 마지막으로 재구성하였다. FACS칸토 II 및 플로우조 7.6을 사용하여 CD138+ MNC에 대한 BCMB72 결합 강도에 대해 샘플을 분석하였다. 그래프패드 프리즘 6에서 최소 제곱법을 사용하여 가변 기울기 (4개의 파라미터) 함수를 갖는 비선형 회귀를 사용하여 데이터의 피팅을 수행하였다.

[0435] T 세포 방향전환 분석

1 \times 10⁵개의 표적 세포, 이어서 1 \times 10⁵개의 T 세포를 96-웰 U형 바닥 플레이트의 웰에 첨가하였다 (5:1 효과기: 표적 근사 비율, 골수-유래 비만 세포에서 계수한 평균 20% 형질 세포가 제공됨). 표적 및 T 세포를 혼합한 후, 5 μ l의 BCMB72 희석액을 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 48시간 동안 5% CO₂, 37°C에서 인큐베이션하였다.

[0437] 2일 후, 플레이트를 원심분리하고, 상청액 폐기하였다. 세포를 200 μ l의 PBS에서 세정하고, 근적외선 생존/사망 군주 (1:200 희석), 항-CD138 (MI15 1:50 및 DL-101 1:50 희석), 항-TCR α / β (1:50 희석) 및 항-CD25 PE (1:50 희석)을 포함하는 50 μ l의 PBS에서 20분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 200 μ l의 FACS 완충액에서 1회 세정하고, 150 μ l의 FACS 완충액에서 마지막으로 재구성하였다. FACS칸토 II 및 플로우조 7.6을 사용하여 형질 세포독성 (% 사망 CD138+ 세포) 및 T 세포 활성화 CD25+ (% 생존 T 세포)에 대해 세포를 분석하였다. 그래프패드 프리즘 6에서 최소 제곱법을 사용하여 가변 기울기 (4개의 파라미터) 함수를 갖는 비선형 회귀를 사용하여 데이터의 그래프 및 피팅을 수행하였다.

[0438] 결과

[0439] 도 20은 BCMB72가 CD138⁺ 형질 세포의 손실에 의해 입증되는 바와 같이 48 시간 후에 모든 환자 샘플을 용량의 준적 방식으로 결합하여, 사멸을 유도한다는 것을 보여준다. T 세포 활성화 데이터는 예상대로 사멸 데이터와 잘 연관된다. T 세포 활성화에 대한 평균 EC₅₀은 1 nM 범위에 있다. 이러한 데이터는 BCMB72가 시험관 내에서 1차 다발성 골수종 골수 세포를 사멸시킬 수 있음을 확인시켜 준다.

[0440] 실시예21: PBMC-인간화 NSG 마우스에서의 H929 인간 다발성 골수종 이종이식편의 종양형성 예방에서 BCMB72의 항-종양 효능

[0441] 이러한 연구는 PBMC (말초 혈액 단핵 세포) - 인간화된 NSG (NOD SCID 감마) 마우스에서 H929 인간 다발성 골수종 (MM) 이종 이식편의 종양 형성을 예방하는 BCMB72의 효능을 평가하였다. NSG 마우스는 성숙 기능성 T, B 및 자연 살해 세포 (NK)가 결핍된 면역 손상된 군주이다. 연령이 일치된 암컷 NSG 마우스에게 연구 7 일째에 1 \times 10⁷ 인간 PBMC를 정맥 주사하였다. PBMC 접종 후 1 일째에, 각각의 마우스에게 H929 인간 MM 세포 (200 μ L의 PBS 중 5 \times 10⁶개의 세포)를 오른쪽 뒷다리 옆구리에 피하 주사 (sc)한 후, PBS 및 BCMB72 0.1 μ g (0.005 mg/kg), 0.5 μ g (0.025 mg/kg) 및 1 μ g (0.05 mg/kg)를 정맥내 (IV) 투여하였다. PBS 대조군과 BCMB72를 2일 또는 3일에 1회로 총 5회 투여하였다. H929 sc 종양은 PBS 및 0.1 μ g BCMB72 처리 군에서 초기에 종양 세포 이식 8일 후부터 검출가능하였다. 이 두 군의 종양은 평균 종양 부피가 22일째에 >500 mm³이 될 때까지 계속 증가하였다. 24일까지, PBS 대조군의 평균 종양 부피는 1000 mm³을 초과하였다. 흥미롭게도, sc H929 종양은 0.5 μ g 및 1 μ g BCMB72로 처리한 마우스에서 성장하지 않았다 (도 21). 따라서, BCMB72는 0.5 및 1 μ g/동물로 처리한

모든 동물에서 H929 인간 MM 이종 이식편의 종양 형성을 억제하였다.

[0442] 실시예22: BCMB72로 처리한 PBMC-인간화 NSG 마우스에서의 H929 (인간 다발성 골수종 세포) 이종 이식편으로부터의 마우스 혈청에서의 가용성 BCMA 정량화

[0443] 이러한 연구는 혈청형 H929 이종 이식 마우스의 가용성 BCMA 수준을 정량화하고, 가용성 BCMA 수준을 이러한 동물의 종양 부담과 관련시키기 위해 설계되었다.

[0444] 간단히 말하면, 이종 이식 연구 샘플의 혈청을 R & D 시스템즈에서 얻은 BCMA 효소-결합 면역 흡착 분석법 (ELISA)으로 분석하였다. 혈청을 해동하고, 시약 회석제로 1:50으로 회석하고 하룻밤 동안 4°C에서 인큐베이션 하였다. BCMA ELISA를 제조사의 프로토콜에 따라 수행하였다. ELISA 플레이트를 450 nm로 설정한 MD 스펙트로 맥스 플레이트 판독기 M5 (캘리포니아주 서니베일 소재의 몰레큘러 디바이시즈)를 사용하여 분석하였다. ELISA의 각 웰은 원래 이종 이식 연구에서 하나의 마우스의 혈청과 일치하였다.

[0445] PBS 단독 또는 0.1 μ g/마우스의 BCMB72와 비교하는 경우, 1 μ g 및 0.5 μ g의 BCMB72로 처리한 마우스의 마우스 혈청에서 가용성 BCMA 농도가 유의하게 감소하였다 (도 22). 이러한 데이터는 이종 이식 연구를 뒷받침하는데, 여기서 BCMB72 1 μ g 및 0.5 μ g으로 처리한 마우스에서 종양 성장이 없거나 최소였다. 이러한 데이터는 혈청 샘플의 가용성 BCMA가 다발성 골수종의 정후를 평가할 수 있는 잠재적인 바이오 마커로서 통찰력을 가질 수 있음을 시사하며, 가용성 BCMA 조사는 질환 부담을 모니터링하는 데 도움이 될 수 있다.

서열 목록의 간단한 설명

서열 번호	유형	종	설명	서열
1	PRT	인간	BCMA	MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQ LRCSSNTPLTCQRYCNASVTNSVKG TNAILWTCLGLSLIISLAVFVLMFLLR KINSEPLKDEFKNTGSGLLGMANIDL EKSRTGDEIILPRGLEYTVEECTCEDC IKSKPKVDS DHCFLPAMEEGATILV TTKTNDYCKSLPAALSATEIEKSISAR
2	PRT	마우스	BCMA	MAQQCFHSEYFDSLLHACKPCHLRC SNPPATCQPYCDPSVTSSVKGTYTTL WIFLGLTLVLSLALFTISFLRKMNPE ALKDEPQSPGQLDGSAQLDKADTEL TRIRAGDDRIFPRSLEYTVEECTCEDC VKS PKGDSDHFFLPAMEEGATILV TTKTGDYKGSSVPTALQSVVMGMEKP THTR
3	PRT	사이노	BCMA	MLQMARQCSQNEYFDSLLHDCKPCQ LRCSSNTPLTCQRYCNASMTNSVKG MNAILWTCLGLSLIISLAVFVLTFLR KMSSEPLKDEFKNTGSGLLGMANID LEKGRTGDEIVLPRGLEYTVEECTCE DCIKNPKVDS DHCFLPAMEEGATI LVTTKTNDYCNLSAALSVTEIEKSIS AR
4	PRT	인간	BCMB69, BCMB117, BCMB118, BCMB119, BCMB120, BCMB125, BCMB126, BCMB127, BCMB128 및 BCMB129-HCDR1	SGSYFWG
5	PRT	인간	BCMB69, BCMB117, BCMB118, BCMB119, BCMB120, BCMB123, BCMB124, BCMB125, BCMB126, BCMB127, BCMB128, BCMB176, BCMB179, BCMB180, BCMB181 및 BCMB182-HCDR2	SIYYSGITYYNPSLKS
6	PRT	인간	BCMB69, BCMB117, BCMB121, BCMB122, BCMB123, BCMB124 및 BCMB129-HCDR3	HDGAVAGLFDY
7	PRT	인간	BCMB121, BCMB122 및 BCMB123 HCDR1	SSYYYWG
8	PRT	인간	BCMB121, BCMB122, BCMB129, BCMB130, BCMB131 및 BCMB177-HCDR2	SIYYSGSTYYNPSLKS
9	PRT	인간	BCMB118-HCDR3	HDAATAGLFDY
10	PRT	인간	BCMB124, BCMB130 및 BCMB131-HCDR1	SGSYYWG
11	PRT	인간	BCMB178, BCMB186, BCMB187 및 BCMB188-HCDR2	SIYYSGWTYYNPSLKS
12	PRT	인간	BCMB119-HCDR3	HEGATAGLFDY

13	PRT	인간	BCMB176, BCMB177, BCMB178, BCMB179, BCMB180, BCMB181, BCMB182, BCMB183, BCMB184, BCMB185, BCMB186, BCMB187 및 BCMB188-HCDR1	SSSYFWG
14	PRT	인간	BCMB183, BCMB184 및 BCMB185-HCDR2	SIYYSGRTYYNPSLKS
15	PRT	인간	BCMB120-HCDR3	HSGATAGLFDY
16	PRT	인간	BCMB125 및 BCMB131-HCDR3	HEGAVAGLFDY
17	PRT	인간	BCMB126-HCDR3	HSGAVAGLFDY
18	PRT	인간	BCMB127 및 BCMB130-HCDR3	HDAAVAGLFDY
19	PRT	인간	BCMB128, BCMB176, BCMB177 및 BCMB178-HCDR3	HDGATAGLFDY
20	PRT	인간	BCMB179, BCMB183 및 BCMB186-HCDR3	HQGATAGLFDY
21	PRT	인간	BCMB180, BCMB184 및 BCMB187-HCDR3	HHGATAGLFDY
22	PRT	인간	BCMB181-HCDR3	HWGATAGLFDY
23	PRT	인간	BCMB182, BCMB185 및 BCMB188-HCDR3	HYGATAGLFDY
24	PRT	인간	BCMB69, BCMB117, BCMB118, BCMB119, BCMB120, BCMB121, BCMB122, BCMB123, BCMB124, BCMB125, BCMB126, BCMB127, BCMB128, BCMB129, BCMB130, BCMB131, BCMB176, BCMB177, BCMB178, BCMB179, BCMB180, BCMB181, BCMB182, BCMB183, BCMB184, BCMB185, BCMB186, BCMB187 및 BCMB188 -LCDR1	GGNNIGSKSVH
25	PRT	인간	BCMB69, BCMB117, BCMB118, BCMB119, BCMB120, BCMB121, BCMB122, BCMB123, BCMB124, BCMB125, BCMB126, BCMB127, BCMB128, BCMB129, BCMB130, BCMB131, BCMB176, BCMB177, BCMB178, BCMB179, BCMB180, BCMB181, BCMB182, BCMB183, BCMB184, BCMB185, BCMB186, BCMB187 및 BCMB188 -LCDR2	DDSDRPS

[0448]

26	PRT	인간	BCMB69, BCMB117, BCMB118, BCMB119, BCMB120, BCMB121, BCMB122, BCMB123, BCMB124, BCMB125, BCMB126, BCMB127, BCMB128, BCMB129, BCMB130, BCMB131, BCMB176, BCMB177, BCMB178, BCMB179, BCMB180, BCMB181, BCMB182, BCMB183, BCMB184, BCMB185, BCMB186, BCMB187 및 BCMB188 -LCDR3	QVWDSSSDHVV
27	PRT	인간	BCMB69-VH	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSG GSISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSI YYSGITYYNPSLKSRTVISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVA GLFDYWGQGTLTVSSA
28	PRT	인간	BCMB69, BCMB118, BCMB119, BCMB120, BCMB122, BCMB123, BCMB124, BCMB125, BCMB126, BCMB127, BCMB128, BCMB129, BCMB130, BCMB131, BCMB177, BCMB178, BCMB179, BCMB180, BCMB181, BCMB182, BCMB183, BCMB184, BCMB185, BCMB186, BCMB187 및 BCMB188 -VL	SYVLTQPPSVVAPGQTARITCGGNN IGSKSVHWYQQPPGQAPVVVYDDS DRPSGIPERFSGNSNGNTATLTISRVE AGDEAVYYCQVWDSSDHVVFGGG TKLTVL
29	PRT	인간	BCMB118-VH	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSG GSISSGSYYWGWIRQPPGKGLEWIGS YYSGITYYNPSLKSRTVISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARHDAAT AGLFDYWGQGTLTVSSA
30	PRT	인간	BCMB121-VL	SYVLTQPPSVVAPGQTARITCGGNN IGSKSVHWYQQKPGQAPVLLVYDDS DRPSGIPERFSGNSNGNTATLTISRVE AGDEADYYCQVWDSSDHVVFGGG TKLTVL
31	PRT	인간	BCMB119-VH	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSG GSISSGSYYWGWIRQPPGKGLEWIGS YYSGITYYNPSLKSRTVISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARHEGAT AGLFDYWGQGTLTVSSA
32	PRT	인간	BCMB120-VH	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSG GSISSGSYYWGWIRQPPGKGLEWIGS YYSGITYYNPSLKSRTVISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARHSGAT AGLFDYWGQGTLTVSSA

33	PRT	인간	BCMB121 및 BCMB122-VH	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSG GSISSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSI YYSGSTYYNPSLKSRTVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAV AGLFDYWGQGTLTVSSA
34	PRT	인간	BCMB123-VH	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSG GSISSSYYFWGWIRQPPGKGLEWIGSI YYSGITYYYNPSLKSRTVTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVA GLFDYWGQGTLTVSSA
35	PRT	인간	BCMB124-VH	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSG GSISGSYYWGWIRQPPGKGLEWIGS IYSGITYYYNPSLKSRTVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAV AGLFDYWGQGTLTVSSA
36	PRT	인간	BCMB125-VH	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSG GSISGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSI YYSGITYYYNPSLKSRTVTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARHEGAVA GLFDYWGQGTLTVSSA
37	PRT	인간	BCMB126-VH	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSG GSISGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSI YYSGITYYYNPSLKSRTVTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARHSGAVA GLFDYWGQGTLTVSSA
38	PRT	인간	BCMB127-VH	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSG GSISGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSI YYSGITYYYNPSLKSRTVTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARHDAAVA GLFDYWGQGTLTVSSA
39	PRT	인간	BCMB128-VH	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSG GSISGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSI YYSGITYYYNPSLKSRTVTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARHDGATA GLFDYWGQGTLTVSSA
40	PRT	인간	BCMB129-VH	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSG GSISGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSI YYSGSTYYNPSLKSRTVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAV AGLFDYWGQGTLTVSSA
41	PRT	인간	BCMB130-VH	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSG GSISGSYYWGWIRQPPGKGLEWIGS IYSGSTYYNPSLKSRTVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARHDAAV AGLFDYWGQGTLTVSSA
42	PRT	인간	BCMB131-VH	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSG GSISGSYYWGWIRQPPGKGLEWIGS IYSGSTYYNPSLKSRTVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARHEGAV AGLFDYWGQGTLTVSSA
43	PRT	인간	BCMB177-VH	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSG GSISSSYYFWGWIRQPPGKGLEWIGSI YYSGRTYYNPSLKSRTVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAT AGLFDYWGQGTLTVSSA

44	PRT	인간	BCMB178-VH	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSG GSISSSYFWGWRQPPGKLEWIGSI YYSGWTYYNPSLKSRTVISVDTSKN QFSKLSSVTAADTAVYYCARHDGA TAGLFDYWGQGTLTVSSA
45	PRT	인간	BCMB179-VH	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSG GSISSSYFWGWRQPPGKLEWIGSI YYSGITYYNPSLKSRTVISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARHQGATA GLFDYWGQGTLTVSSA
46	PRT	인간	BCMB180-VH	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSG GSISSSYFWGWRQPPGKLEWIGSI YYSGITYYNPSLKSRTVISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARHHGATA GLFDYWGQGTLTVSSA
47	PRT	인간	BCMB181-VH	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSG GSISSSYFWGWRQPPGKLEWIGSI YYSGITYYNPSLKSRTVISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARHWGAT AGLFDYWGQGTLTVSSA
48	PRT	인간	BCMB182-VH	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSG GSISSSYFWGWRQPPGKLEWIGSI YYSGITYYNPSLKSRTVISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARHYGATA GLFDYWGQGTLTVSSA
49	PRT	인간	BCMB183-VH	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSG GSISSSYFWGWRQPPGKLEWIGSI YYSGRTYYNPSLKSRTVISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARHQGAT AGLFDYWGQGTLTVSSA
50	PRT	인간	BCMB184-VH	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSG GSISSSYFWGWRQPPGKLEWIGSI YYSGRTYYNPSLKSRTVISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARHHGAT AGLFDYWGQGTLTVSSA
51	PRT	인간	BCMB185-VH	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSG GSISSSYFWGWRQPPGKLEWIGSI YYSGRTYYNPSLKSRTVISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARHYGAT AGLFDYWGQGTLTVSSA
52	PRT	인간	BCMB186-VH	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSG GSISSSYFWGWRQPPGKLEWIGSI YYSGWTYYNPSLKSRTVISVDTSKN QFSKLSSVTAADTAVYYCARHQGA TAGLFDYWGQGTLTVSSA
53	PRT	인간	BCMB187-VH	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSG GSISSSYFWGWRQPPGKLEWIGSI YYSGWTYYNPSLKSRTVISVDTSKN QFSKLSSVTAADTAVYYCARHHGA TAGLFDYWGQGTLTVSSA
54	PRT	인간	BCMB188-VH	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSG GSISSSYFWGWRQPPGKLEWIGSI YYSGWTYYNPSLKSRTVISVDTSKN QFSKLSSVTAADTAVYYCARHYGA TAGLFDYWGQGTLTVSSA

55	PRT	인간	CD3B219-중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRD DSKNSLYLQMQNSLKTEDTAVYYCAR HGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALG CLVKDVFPEPVTWSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT KTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG PPCPCPAPEAAGGPSVFLPPPKD LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSGK
56	PRT	인간	CD3B219-경쇄	QTVVTQEPLTVSPGGTVLTCRSST GAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIG GTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFG GGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEE LQANKATLVC LISDFYPGAVTVAWK ADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAA SSYSLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGS TVEKTVAPTECS
57	PRT	인간	BCMB117-VH	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSG GSISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSI YYSGITYYNPSLKSRTVTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVA GLFDYWGQGTLTVSSA
58	PRT	인간	BCMB176-VH	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSG GSISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSI YYSGITYYNPSLKSRTVTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARH DGATAGLFDYWGQGTLTVSSA
59	PRT	인간	CD3B219-VH	TYAMN
60	PRT	인간	CD3B219-VH	RIRSKYNNYATYYAASVKG
61	PRT	인간	CD3B219-VH	HGNFGNSYVSWFAY
62	PRT	인간	CD3B219-VL	RSSTGAVTTSNYAN
63	PRT	인간	CD3B219-VL	GTNKRAP
64	PRT	인간	CD3B219-VL	ALWYSNLWV

65	PRT	인간	BCMB69-종 쇄	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSG GSISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSI YYSGITYYNPSLKSRTVTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVA GLFDYWGQGTLTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPABLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTKTTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPCCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLGK
66	PRT	인간	BCMB123, BCMB128, BCMB129, BCMB177, BCMB178, BCMB179, BCMB180, BCMB181, BCMB182, BCMB183, BCMB184, BCMB185, BCMB186, BCMB187 및 BCMB188 -경 쇄	SYVLTQPPSVVAPGQTARITCGGNN IGSKSVHWYQQPPGQAPVVVYDDS DRPSGIPERFSGNSNGNTATLTISRVE AGDEAVYYCQVWDSSSDHVVFGGG TKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQ ANKATLVCILISDFYPGAVTVAWKAD SSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSY LSSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS
67	PRT	인간	BCMB117-종 쇄	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSG GSISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSI YYSGITYYNPSLKSRTVTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVA GLFDYWGQGTLTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPABLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTKTTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPCCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLGK

[0453]

68	PRT	인간	BCMB123-종체	QLQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSG GSISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSI YYSGITYYNPSLKSRTVTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVA GLFDYWGQGTLTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVWSNNSGALTSGVHTFPAVLQSSG GLYSLSSVVTVPSSSLGTKTTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPAE AAGGGSVFLFPKPKDTLMISRTPEV CVVVDVSQEDPEVQFNWYVGDVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLT TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSGK
69	PRT	인간	BCMB128-종체	QLQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSG GSISGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSI YYSGITYYNPSLKSRTVTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARHDGATA GLFDYWGQGTLTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEV PTVWSNNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTKTTCNVD KPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPAE AAGGGSVFLFPKPKDTLMISRTPEV CVVVDVSQEDPEVQFNWYVGDVEV VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN QPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLT TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSGK
70	PRT	인간	BCMB129-종체	QLQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSG GSISGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSI YYSGSTYYNPSLKSRTVTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAV AGLFDYWGQGTLTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEV PTVWSNNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTKTTCNVD KPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPAE AAGGGSVFLFPKPKDTLMISRTPEV CVVVDVSQEDPEVQFNWYVGDVEV VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN QPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLT TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSGK

71	PRT	인간	BCMB176-종체	QLQLQESGPLVKPSETSLTCTVSG GSISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSI YYSGITYYNPSLKSRTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARHDGA TA GLFDYWGQGTLTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTKTTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAP EAAGGSPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVGVE VHNAKTPREEQFNSTYRVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLGK
72	PRT	인간	BCMB177-종체	QLQLQESGPLVKPSETSLTCTVSG GSISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSI YYSGRTYYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARHDGA TAG LFDFWGQGTLTVSSASTKGPS VFPPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAP EAAGGSPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVGVEV EVHNAKTPREEQFNSTYRVSVLTVLHQ VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLGK
73	PRT	인공	IgG4PAA	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPV VLQSSGLYSLSSVTVPSLSSGTQTYTC NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAP EAAGGSPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVGVEV HNAKTPREEQFNSTYRVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISAK KGOPREPOVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
74	PRT	인간	IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPV VLQSSGLYSLSSVTVPSLSSGTQTYTC NVDHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEPEVKFNWYVGVEV EVHNAKTPREEQFNSTYRVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNALPPAPIEKTISAK KGOPREPOVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

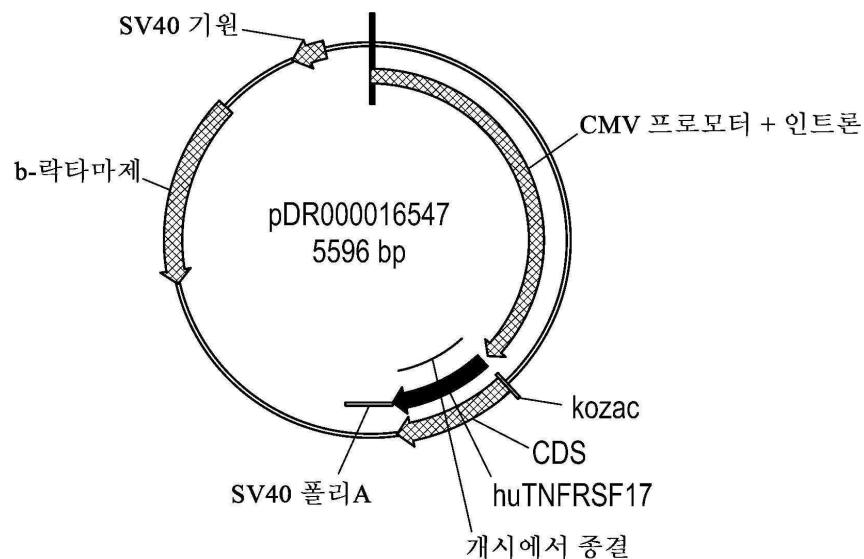
75	PRT	인간	Fab	QLQLQESGPLVKPSETSLTCTVSG GSISGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSI YYSGITYYNPSLKSRTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVA GLFDYWGQGTLTVSSASTKGPSV PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCHHHHHH
76	PRT	인간	BCMB69, BCMB118, BCMB119, BCMB120, BCMB122, BCMB124, BCMB125, BCMB126, BCMB127, BCMB130, BCMB131-종체	SYVLTQPPSVVAPGQTARITCGGNN IGSKSVHWYQQPPGQAPVVVYDDS DRPSGIPERFGSGNSGNTATLTIISRVE AGDEAVYYCQVWDSSSDHVVFGGG TKLTVLGQPKAAPSVTLFPSSSEELQ ANKATLVCLISDFYPGAFTVAWKGD SSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSY LS LTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS

[0455]

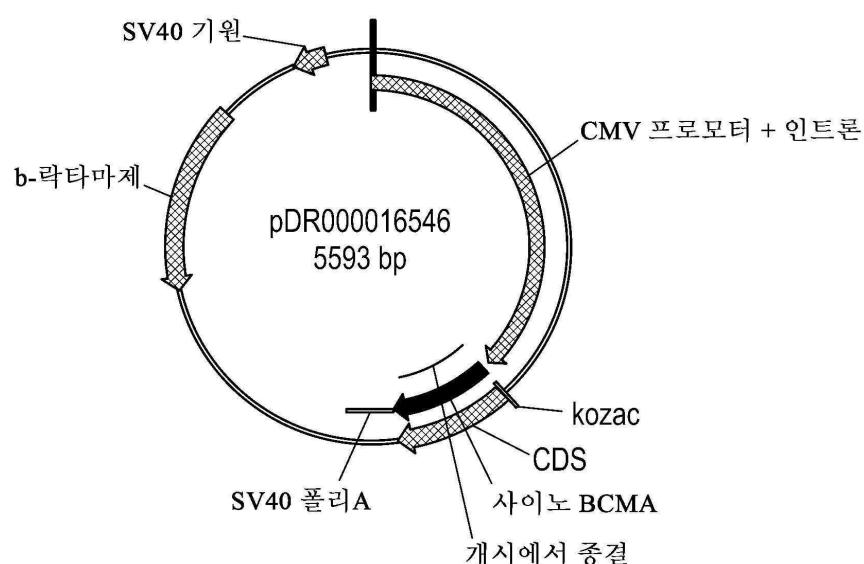
[0456]

도면

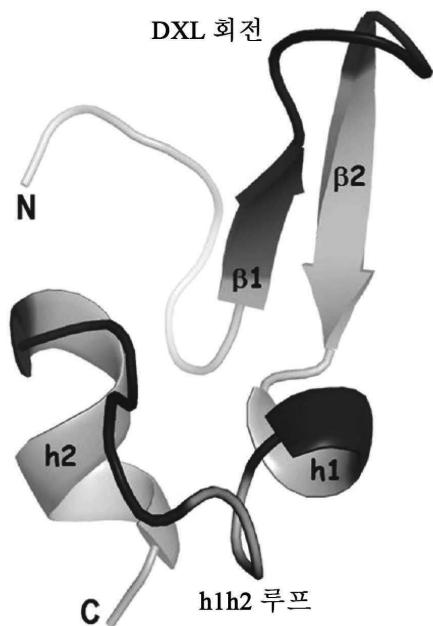
도면 1a



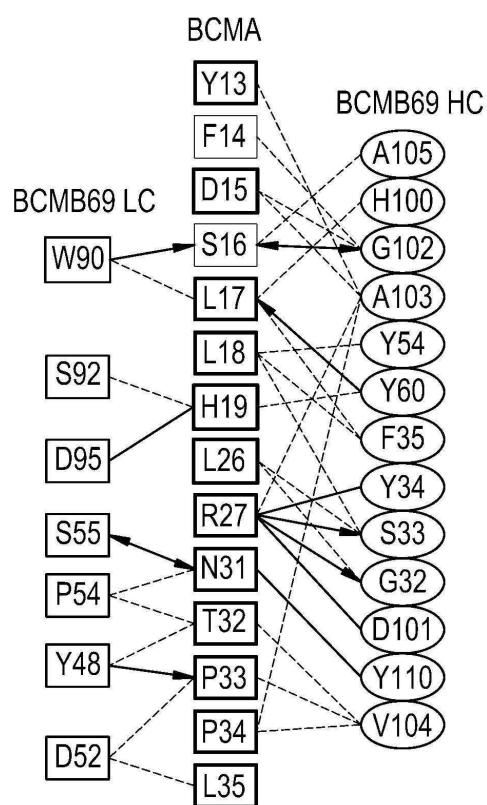
도면 1b



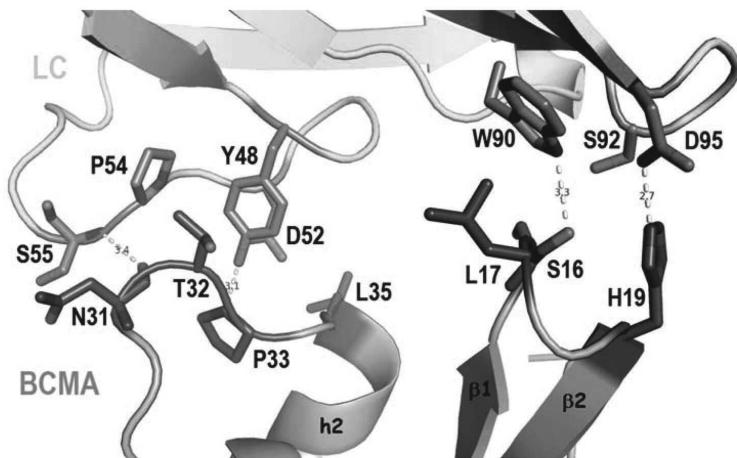
도면2a



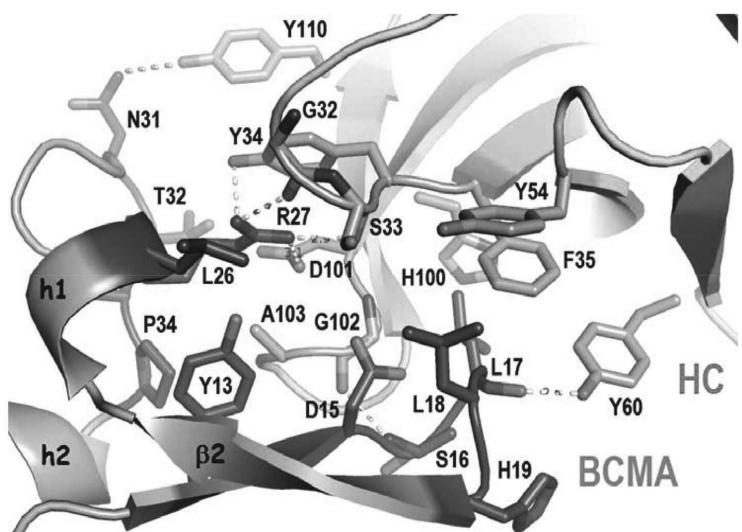
도면2b



도면2c



도면2d



도면3

에피토프

1 54
 인간 BCMA MLQMAQGQCSQNEYFDSLLHACIIPCCQLRCSSNTPPPLTCQRYCNASVTNSVKGTA (서열 번호 1의 1-54)
 사이노 BCMA MLQMARQCSQNEYFDSLLH**DK**KPCCQLRCSS-TPPPLTCQRYCNAS**MT**NSVKG**M**NA (서열 번호 3의 1-53)
 마우스 BCMA **MA**QQC**FHSE**YFDSLLH**ACK**PC**HL**RC**CSN**-**PPA**TC**QPYC**DPSV**TSSV**KG**TY**T (서열 번호 2의 1-49)

파라보포

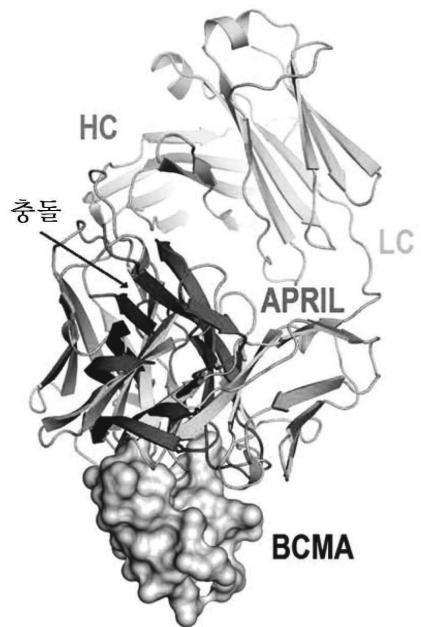
서열 번호 75

1	CDR-H1	CDR-H2	77
BCMB69_HC	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVGGSISS GSYFNGWIRQPPGKGLEWIGS MYSGIT Y YNPSLKSRTVTISVDTSK		
78	CDR-H3		154
BCMB69_HC	NQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR HDGAVAGLFDI WQGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY		231
155			
BCMB69_HC	FPEPVTWSNMGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCHHHHHH		

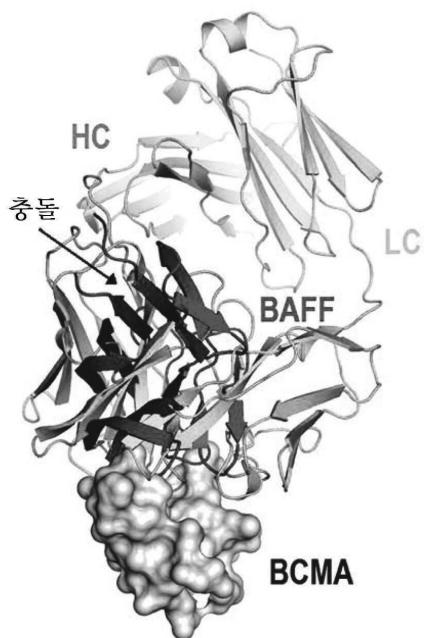
서열 번호 76

1	CDR-L1	CDR-L2	72
BCMB69_LC	SYVLTQPPSVSVAPGQTARIT CGGNNIGSKSVH WYQQPPGQAPVVVV DDS RPS GI PERFSGNSGNTATL		
73	CDR-L3		144
BCMB69_LC	TISRVEAGDEAVYYC QW WSSD HVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPG		214
145			
BCMB69_LC	AVTVAWKGDSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS		

도면4a



도면4b

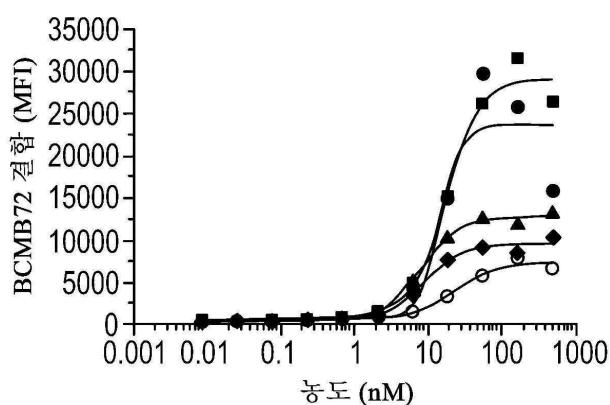


도면5

mAb	Fc-BCMA	제1 복합체 (K_{D1} , nM)	최종 복합체 (K_D , nM)	범위
BCMB72	인간	1.59	0.18	0.15 – 0.20
	사이노	17.8	6.50	5.36 – 7.27
	마우스	283	72.4	62.0 – 82.9

BCMB72 친화도: 인간 > 사이노 >> 마우스

도면6

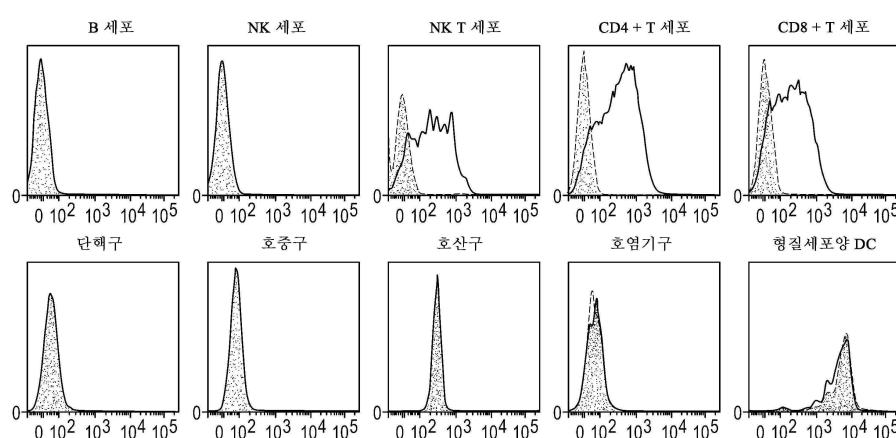


세포:

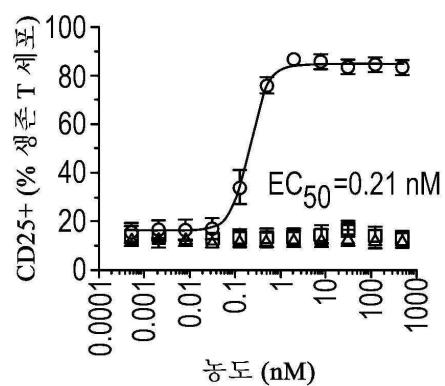
EC50 (nM):

● H929	14.7
◆ MM.1R	8.74
■ EJM	17.5
○ LP1	22.3
▲ U2932	7.92

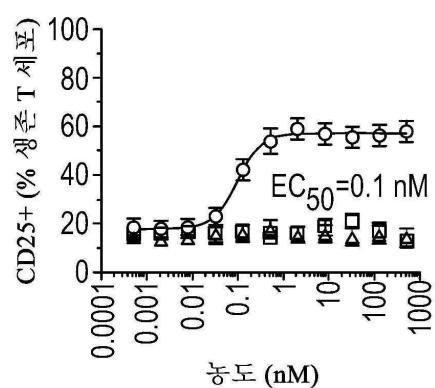
도면7



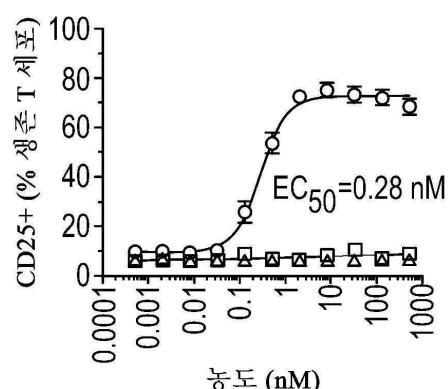
도면8a



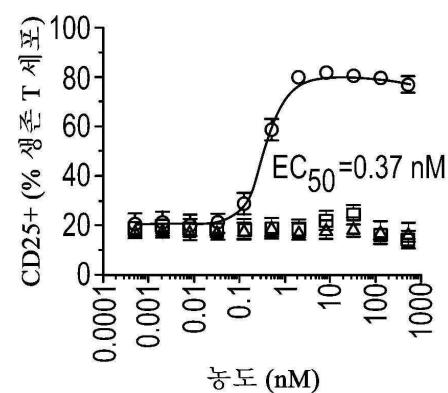
도면8b



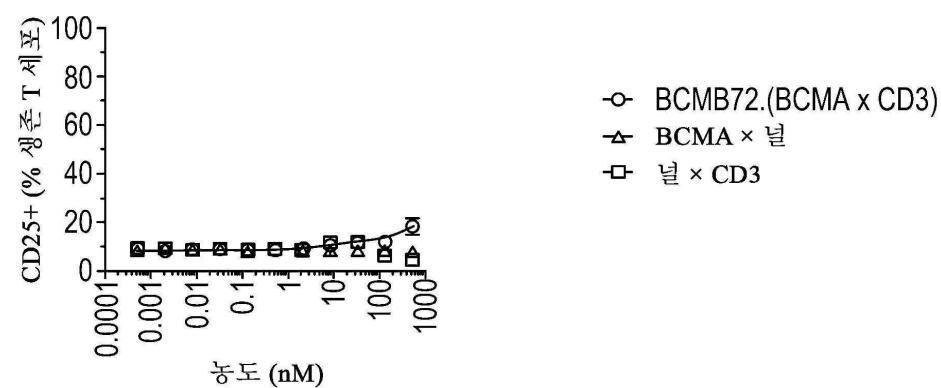
도면8c



도면8d



도면8e



도면9a

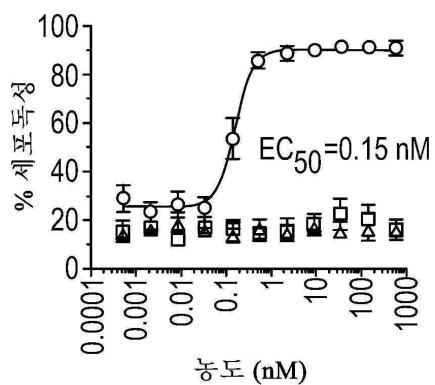
세포주	H929 (BCMA-00271)		H929 (BCMA-00273)	
공여자	EC50 (nM)	% 최대 활성화	EC50 (nM)	% 최대 활성화
M5137	0.1683	89.74	~ 0.5477	68.70
M7197	0.3000	80.73	1.0860	81.11
M6576	0.3178	85.08	0.5134	82.66
M6457	0.2436	74.57	0.7859	81.07
M2550	0.1572	92.34	0.4325	85.24
M6521	0.1313	85.01	데이터 없음	데이터 없음
M7077	데이터 없음	데이터 없음	1.3240	72.96
평균	0.2116	84.64	0.7070	78.53
세포주	MM.1R (BCMA-00271)		MM.1R (BCMA-00273)	
공여자	EC50 (nM)	% 최대 활성화	EC50 (nM)	% 최대 활성화
M5137	0.0968	64.71	0.1296	79.62
M7197	0.1159	45.60	0.1323	70.25
M6576	0.1179	50.93	0.1646	78.08
M6457	0.0776	49.27	0.1042	80.51
M2550	0.1206	60.05	0.3514	83.80
M6521	0.0964	73.62	데이터 없음	데이터 없음
M7077	데이터 없음	데이터 없음	0.2470	66.68
평균	0.0992	57.12	0.1675	76.25
세포주	RPMI 8226 (BCMA-00271)		RPMI 8226 (BCMA-00273)	
공여자	EC50 (nM)	% 최대 활성화	EC50 (nM)	% 최대 활성화
M5137	0.2448	71.81	0.4787	50.33
M7197	0.2260	67.98	0.3357	64.15
M6576	0.2482	77.69	0.3094	70.58
M6457	0.3041	66.83	0.4631	57.15
M2550	0.6072	84.07	0.5163	70.42
M6521	0.1409	67.74	데이터 없음	데이터 없음
M7077	데이터 없음	데이터 없음	0.4055	54.73
평균	0.2777	72.76	0.4024	61.19

도면9b

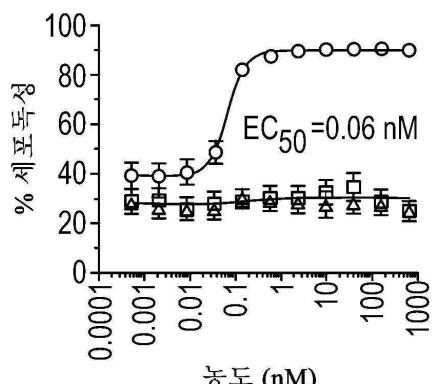
세포주	U266 (BCMA-00271)		U266 (BCMA-00273)	
공여자	EC50 (nM)	% 최대 활성화	EC50 (nM)	% 최대 활성화
M5137	0.2068	85.39	0.4073	73.02
M7197	0.3833	71.98	0.5545	65.98
M6576	0.4521	80.52	0.6042	76.95
M6457	0.3646	74.82	0.4772	61.85
M2550	0.5256	85.30	0.6823	76.24
M6521	0.4068	84.71	데이터 없음	데이터 없음
M7077	데이터 없음	데이터 없음	0.6629	68.31
평균	0.3743	80.41	0.5711	70.34

세포주	MV4-11 (BCMA-00271)		MV4-11 (BCMA-00273)	
공여자	EC50 (nM)	% 최대 활성화	EC50 (nM)	% 최대 활성화
M5137	~ 2.940e+006	~ 1522	~ 1.357	4.702
M7197	6.214	7.572	144	6.156
M6576	~ 1.855e+010	~ 104868	31.41	10.7
M6457	~ 2.294e+007	~ 4196	피트 없음	피트 없음
M2550	~ 4.075e+008	~ 68789	16.85	5.626
M6521	~ 59722	~ 110.5	데이터 없음	데이터 없음
M7077	데이터 없음	데이터 없음	279	8.427
평균	1.531E+12	229246	30.58	6.958

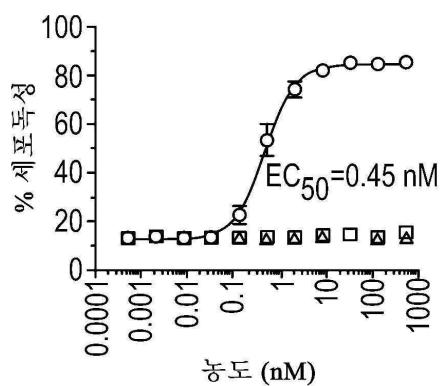
도면10a



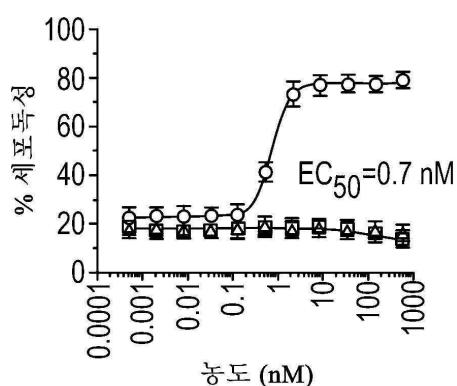
도면10b



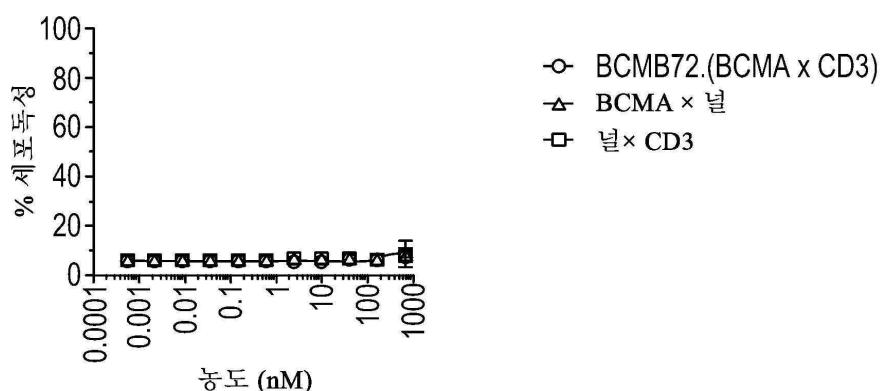
도면10c



도면10d



도면10e



○ BCMB72.(BCMA x CD3)
 ▲ BCMA x 빈
 □ 빈 x CD3

도면11a

세포주	H929 (BCMA-00271)		H929 (BCMA-00273)	
공여자	EC50 (nM)	% 최대 용해율	EC50 (nM)	% 최대 용해율
M5137	0.2376	90.48	1.1630	75.61
M7197	0.1631	92.02	1.3480	82.56
M6576	~ 0.1405	91.75	0.4301	87.14
M6457	0.2294	79.98	0.8720	82.29
M2550	~ 0.1130	92.48	0.3575	89.63
M6521	0.0973	92.27	데이터 없음	데이터 없음
M7077	데이터 없음	데이터 없음	1.7690	80.05
평균	0.1495	89.72	0.8133	83.13

세포주	MM.1R (BCMA-00271)		MM.1R (BCMA-00273)	
공여자	EC50 (nM)	% 최대 용해율	EC50 (nM)	% 최대 용해율
M5137	0.0654	92.97	0.0569	97.23
M7197	0.0824	92.60	0.0945	96.75
M6576	0.0480	90.47	0.0617	95.29
M6457	0.0548	81.00	0.0432	87.92
M2550	0.0595	92.95	0.1212	96.97
M6521	0.0511	87.76	데이터 없음	데이터 없음
M7077	데이터 없음	데이터 없음	0.1008	94.98
평균	0.0617	89.62	0.0766	94.87

세포주	RPMI 8226 (BCMA-00271)		RPMI 8226 (BCMA-00273)	
공여자	EC50 (nM)	% 최대 용해율	EC50 (nM)	% 최대 용해율
M5137	0.5044	82.02	1.0670	81.12
M7197	0.7262	82.47	0.8636	78.55
M6576	0.3366	86.65	0.4842	79.81
M6457	0.6967	76.10	1.0700	69.25
M2550	0.5379	89.73	0.6956	84.73
M6521	0.1625	81.03	데이터 없음	데이터 없음
M7077	데이터 없음	데이터 없음	1.2050	73.50
평균	0.4531	83.55	0.8543	77.99

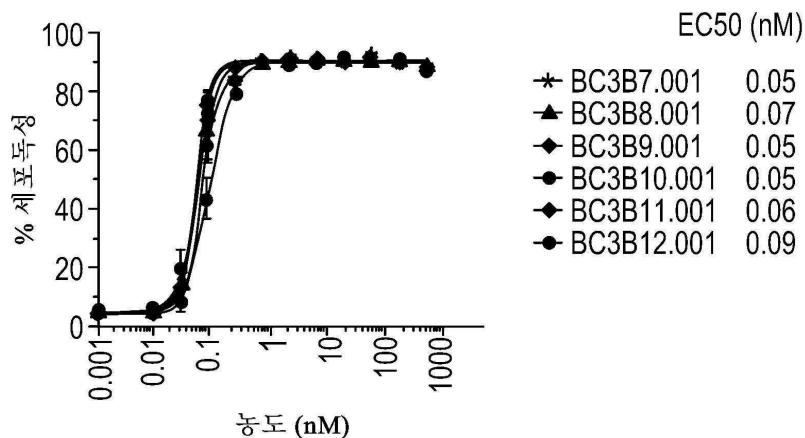
도면11b

세포주	U266 (BCMA-00271)		U266 (BCMA-00273)	
공여자	EC50 (nM)	% 최대 용해율	EC50 (nM)	% 최대 용해율
M5137	0.7610	72.59	1.0180	76.19
M7197	0.7355	76.36	1.1610	77.29
M6576	0.7298	83.86	0.9710	82.34
M6457	0.7734	62.05	1.4320	56.77
M2550	0.6516	83.21	0.9347	85.93
M6521	0.5621	83.09	데이터 없음	데이터 없음
M7077	데이터 없음	데이터 없음	1.1580	74.21
평균	0.7046	76.82	1.0800	75.31

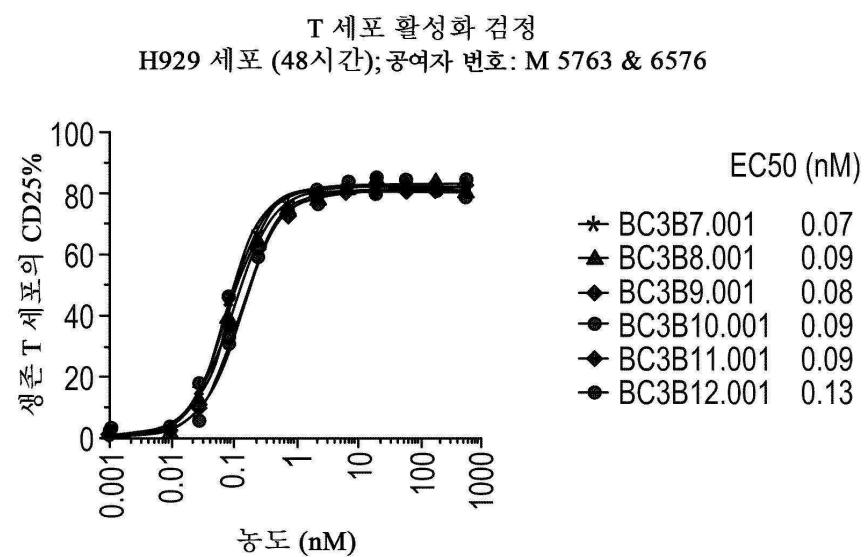
세포주	MV4-11 (BCMA-00271)		MV4-11 (BCMA-00273)	
공여자	EC50 (nM)	% 최대 용해율	EC50 (nM)	% 최대 용해율
M5137	2.038	8.425	~ 0.06555	18.31
M7197	~ 157.1	4.79	피트 없음	피트 없음
M6576	~ 391461	~ 23049	18.61	9.836
M6457	피트 없음	피트 없음	0	-9780
M2550	~ 147.7	8.21	~ 14.70	8.366
M6521	피트 없음	피트 없음	데이터 없음	데이터 없음
M7077	데이터 없음	데이터 없음	~ 1.247e+022	18.68
평균	~ 157.2	7.658	피트 없음	피트 없음

도면12a

T 세포 매개성 세포독성 검정
H929 세포 (48시간): 공여자 번호: M 5763 & 6576



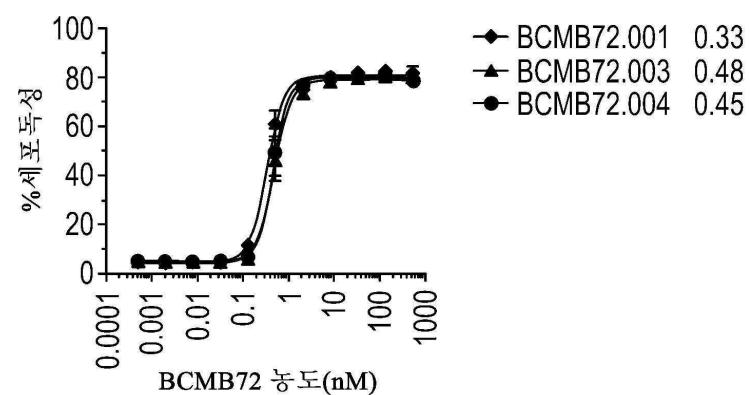
도면12b



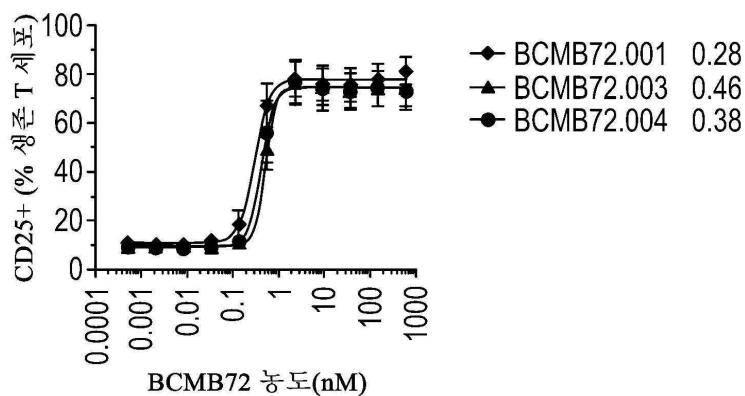
도면13

BCMAxCD3 EC ₅₀ 분석 (nM)						
	M2550	M5137	M6457	M6541	M6576	M7197
IFNg	2.049	~ 2.079	~ 2.112	~ 0.9252	1.366	1.126
TNFa	2.909	2.377	3.717	2.863	1.991	95.15
IL-2	3.262	1.645	2.508	1.297	1.501	1.767
IL-6	2.385	~ 2.054	1.65	~ 0.5650	0.7961	~ 0.5003
IL-8	1.031	0.3267	0.7208	~ 0.1117	0.328	~ 0.4640
IL-10	1.158	~ 0.7865	0.7296	~ 0.5154	~ 0.5217	0.9593

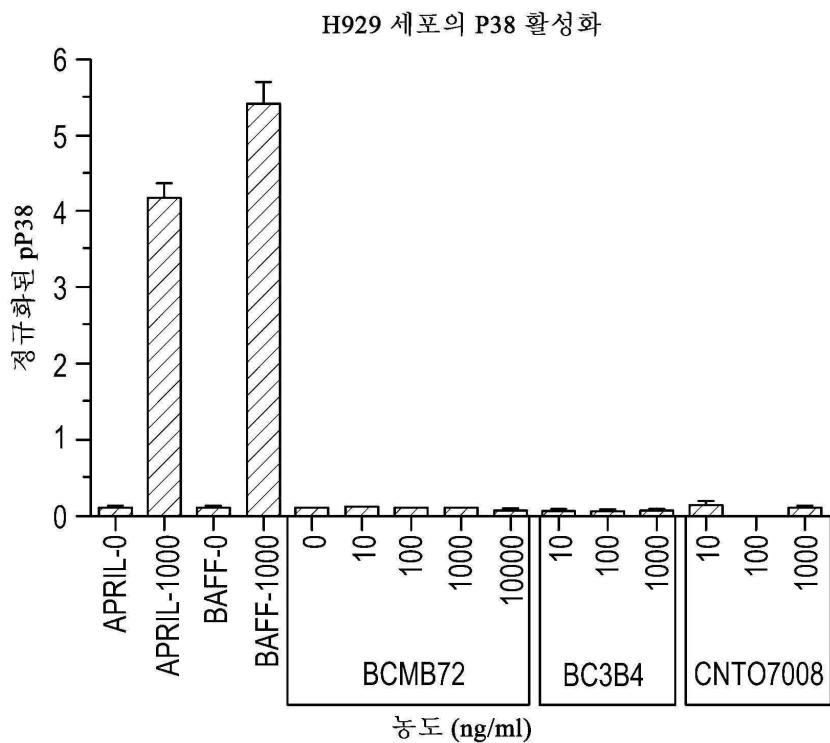
도면14a



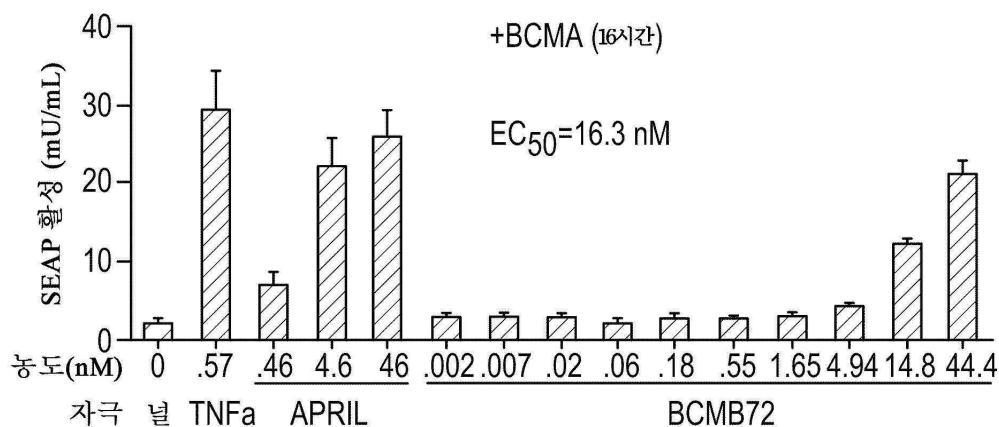
도면14b



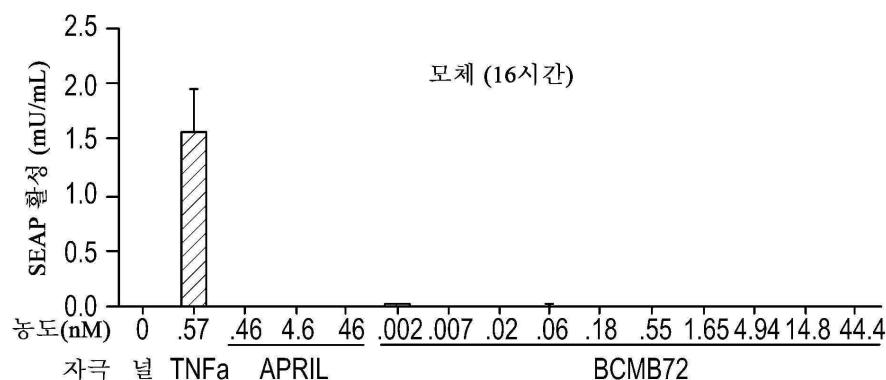
도면15



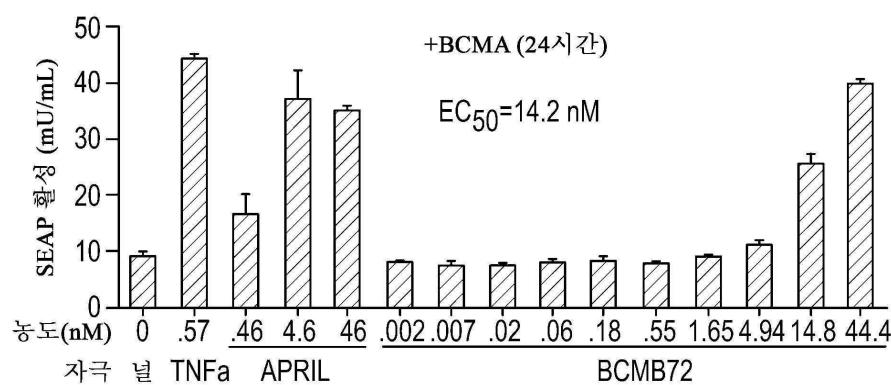
도면16a



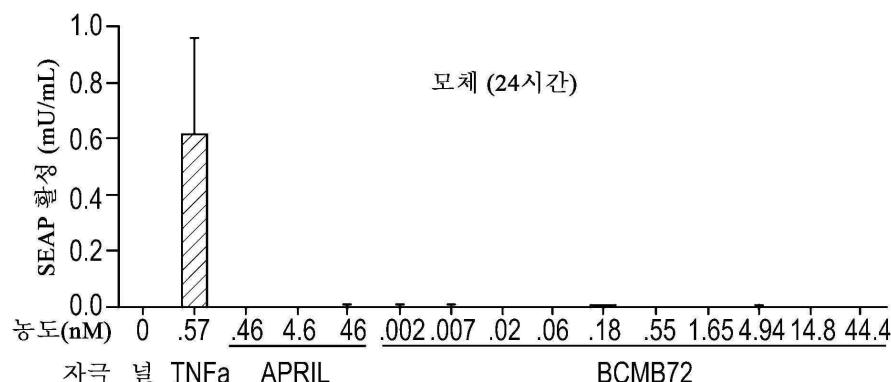
도면 16b



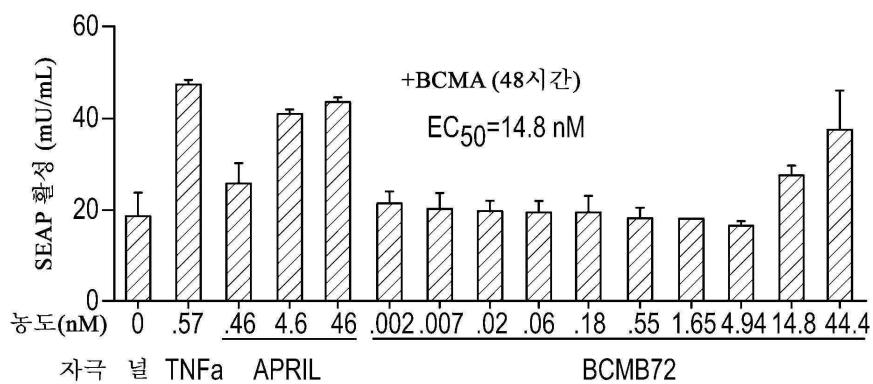
도면 16c



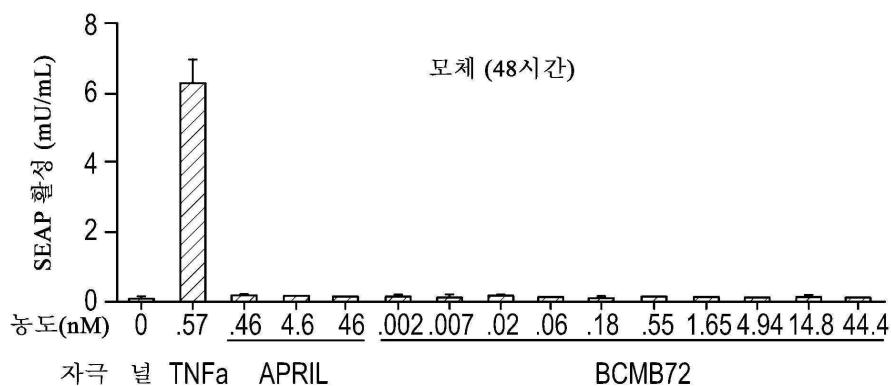
도면 16d



도면16e

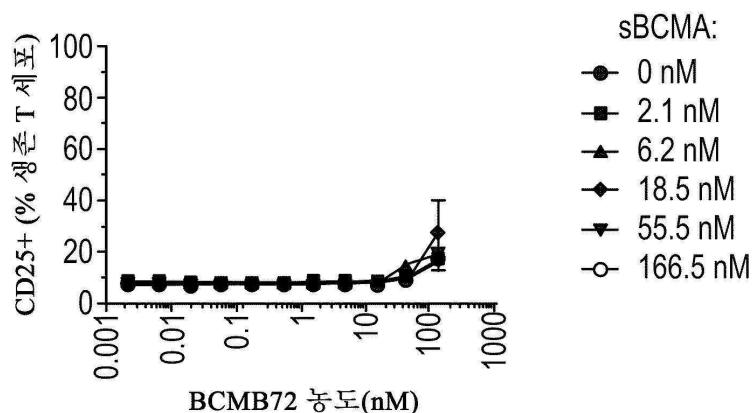


도면16f

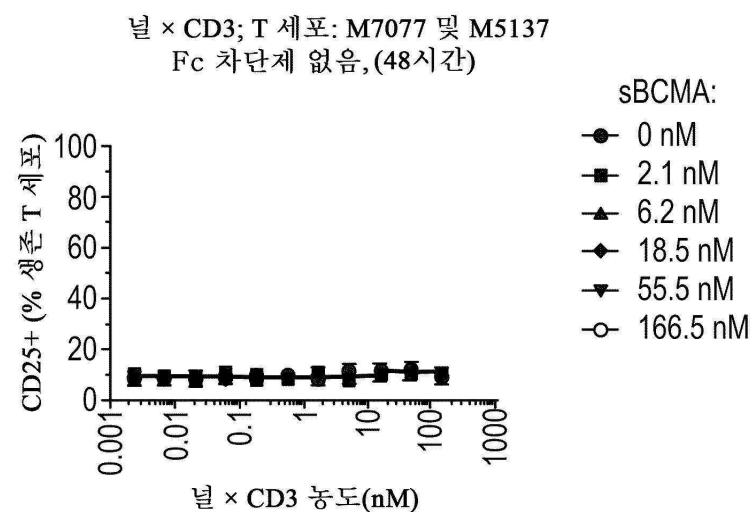


도면17a

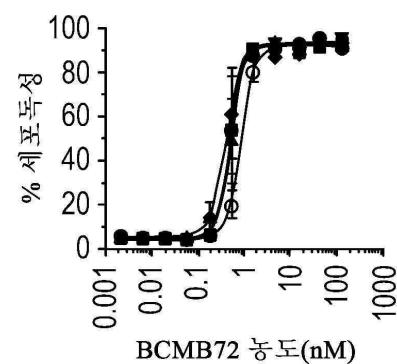
BCMB72; T 세포: M7077 및 M5137
 Fc 차단제 없음, (48시간)



도면17b

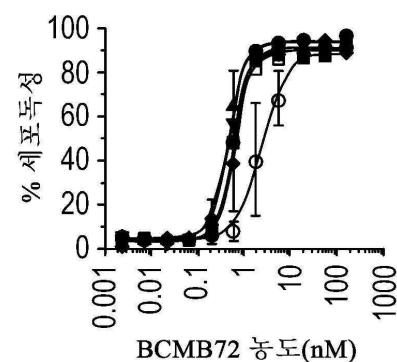


도면18a

sBCMA: EC₅₀(nM):

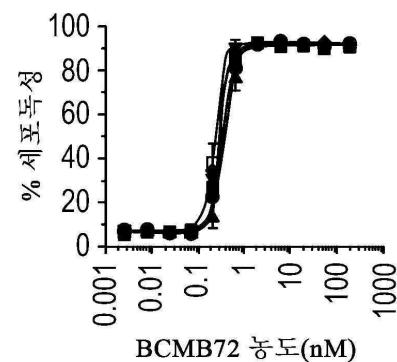
● 0 nM	0.44
■ 2.1 nM	0.51
▲ 6.2 nM	0.50
◆ 18.5 nM	0.50
▼ 55.5 nM	0.55
○ 166.5 nM	0.89

도면 18b

APRIL: EC₅₀ (nM):

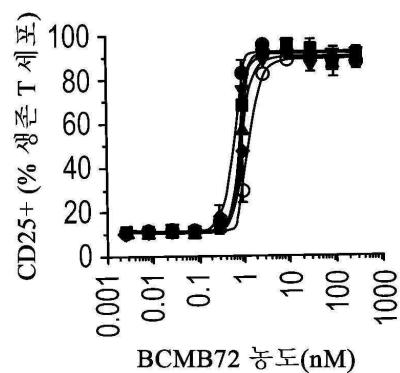
● 0 nM	0.42
■ 0.2 nM	0.56
▲ 0.6 nM	0.54
◆ 1.7 nM	0.52
▼ 5.1 nM	0.54
□ 15.4 nM	0.63
○ 46.1 nM	2.30

도면 18c

BAFF: EC₅₀ (nM):

● 0 nM	0.23
■ 0.2 nM	0.29
▲ 0.6 nM	0.25
◆ 1.9 nM	0.30
▼ 5.7 nM	0.30
□ 17 nM	0.35
○ 51 nM	0.23

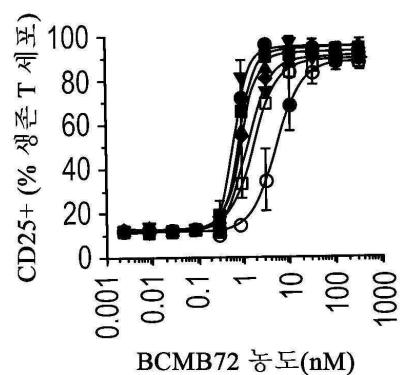
도면 18d



sBCMA: EC₅₀ (nM):

● 0 nM	0.42
■ 2.1 nM	0.52
▲ 6.2 nM	0.54
◆ 18.5 nM	0.51
▼ 55.5 nM	0.58
○ 166.5 nM	0.80

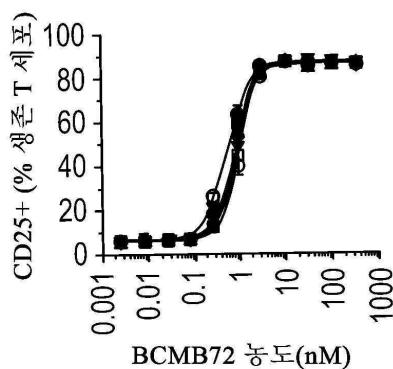
도면 18e



APRIL: EC₅₀ (nM):

● 0 nM	0.40
■ 0.2 nM	0.51
▲ 0.6 nM	0.49
◆ 1.7 nM	0.59
▼ 5.1 nM	0.70
□ 15.4 nM	0.96
○ 46.1 nM	2.73

도면18f

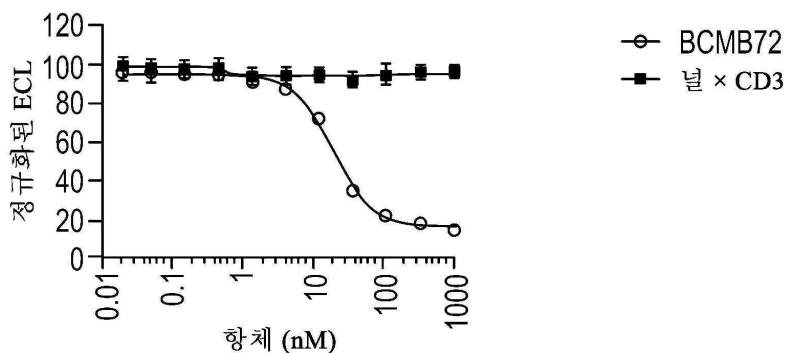


BAFF: EC₅₀ (nM):

● 0 nM	0.37
■ 0.2 nM	0.50
▲ 0.6 nM	0.44
◆ 1.9 nM	0.48
▼ 5.7 nM	0.53
□ 17 nM	0.62
○ 51 nM	0.33

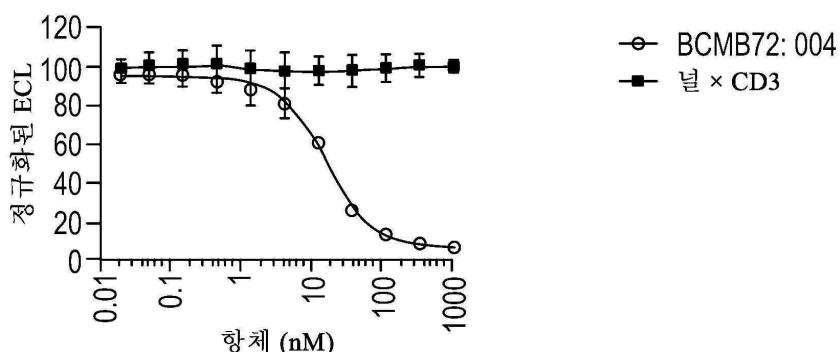
도면19a

APRIL을 포함한 플레이트에 결합하는 BCMA (n=2)

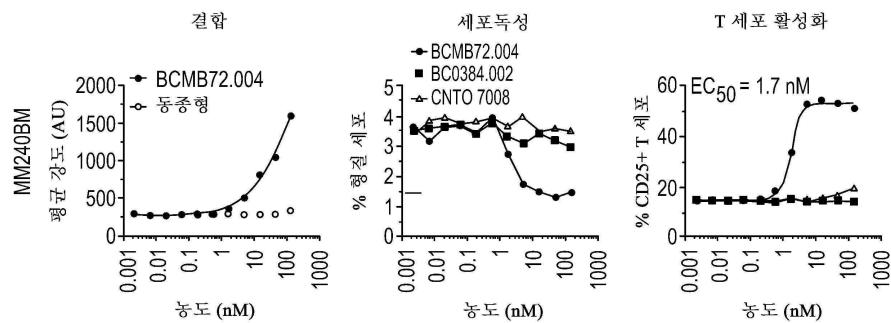


도면19b

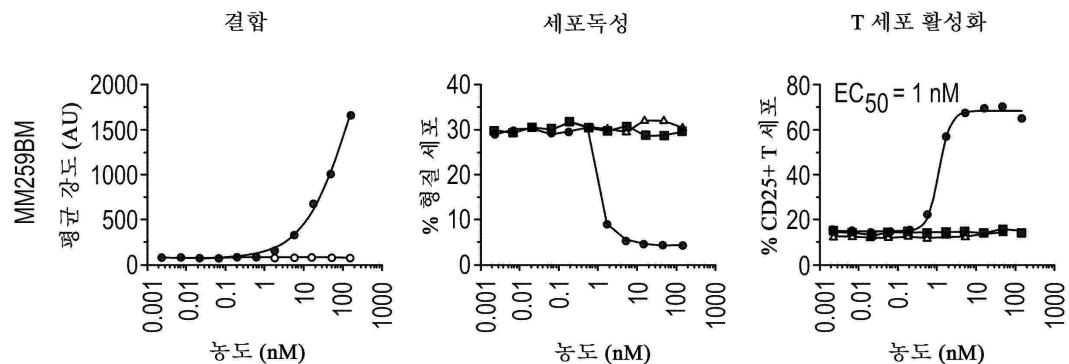
BAFF를 포함한 플레이트에 결합하는 BCMA (n=2)



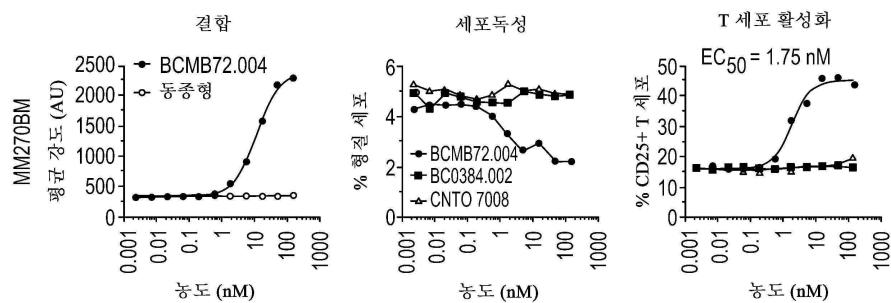
도면20a



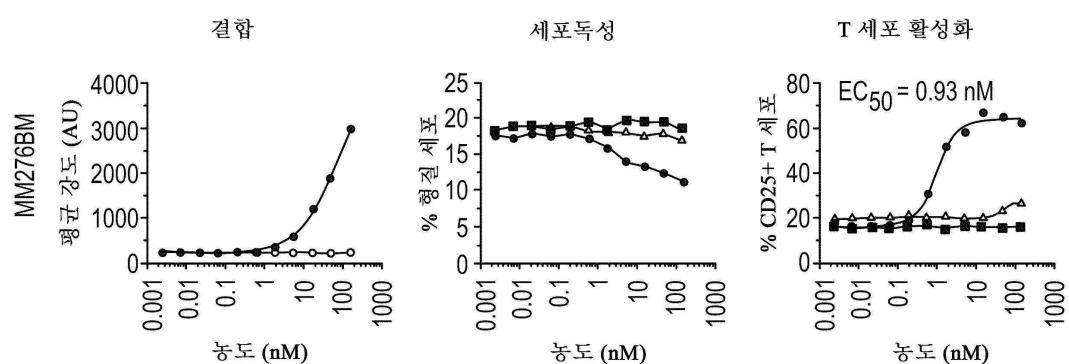
도면20b



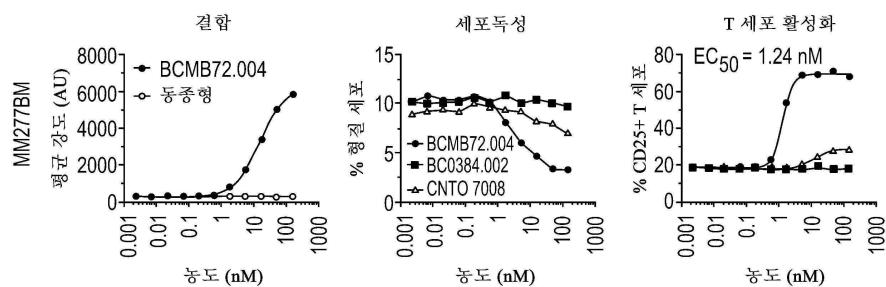
도면20c



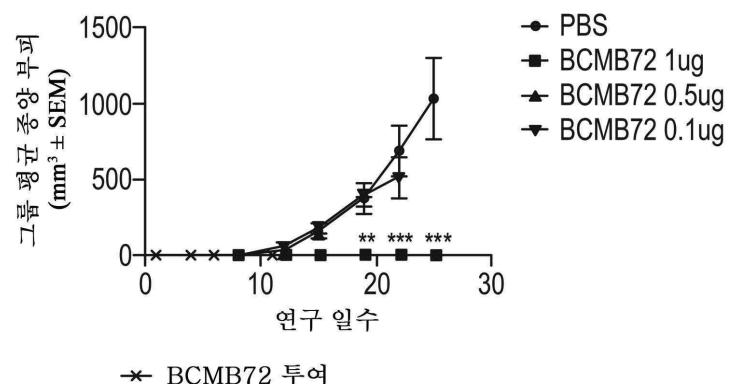
도면20d



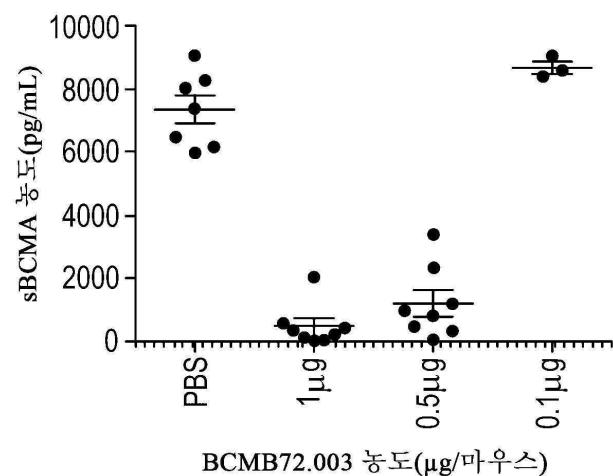
도면20e



도면21



도면22



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> JANSSEN PHARMACEUTICA NV

<120> ANTI-BCMA ANTIBODIES, BISPECIFIC ANTIGEN BINDING MOLECULES THAT

BIND BCMA AND CD3, AND USES THEREOF

<130> PRD3383USNP

<140><141><150> 62/206,246

<151> 2015-08-17

<160> 77

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 184

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser

1 5 10 15

Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr

20 25 30

Pro Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser

35 40 45

Val Lys Gly Thr Asn Ala Ile Leu Trp Thr Cys Leu Gly Leu Ser Leu

50 55 60

Ile Ile Ser Leu Ala Val Phe Val Leu Met Phe Leu Leu Arg Lys Ile

65 70 75 80

Asn Ser Glu Pro Leu Lys Asp Glu Phe Lys Asn Thr Gly Ser Gly Leu

85 90 95

Leu Gly Met Ala Asn Ile Asp Leu Glu Lys Ser Arg Thr Gly Asp Glu

100 105 110

Ile Ile Leu Pro Arg Gly Leu Glu Tyr Thr Val Glu Glu Cys Thr Cys

115 120 125

Glu Asp Cys Ile Lys Ser Lys Pro Lys Val Asp Ser Asp His Cys Phe

130 135 140

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

145 150 155 160

Thr Asn Asp Tyr Cys Lys Ser Leu Pro Ala Ala Leu Ser Ala Thr Glu

165 170 175

Ile Glu Lys Ser Ile Ser Ala Arg

180

<210> 2

<211> 185

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 2

Met Ala Gln Gln Cys Phe His Ser Glu Tyr Phe Asp Ser Leu Leu His

1 5 10 15

Ala Cys Lys Pro Cys His Leu Arg Cys Ser Asn Pro Pro Ala Thr Cys

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Leu Phe Thr Ile Ser Phe Leu Leu Arg Lys Met Asn Pro Glu Ala Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Asp Lys Ala Asp Thr Glu Leu Thr Arg Ile Arg Ala Gly Asp Asp Arg

100 105 110

Ile Phe Pro Arg Ser Leu Glu Tyr Thr Val Glu Glu Cys Thr Cys Glu

115 120 125

Asp Cys Val Lys Ser Lys Pro Lys Gly Asp Ser Asp His Phe Phe Pro

130 135 140

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

145 150 155 160

Gly Asp Tyr Gly Lys Ser Ser Val Pro Thr Ala Leu Gln Ser Val Met

165 170 175

Gly Met Glu Lys Pro Thr His Thr Arg

180 185

<210> 3

<211> 183

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<400> 3

Met Leu Gln Met Ala Arg Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser

1 5 10 15

Leu Leu His Asp Cys Lys Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Thr Pro

20 25 30

Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Met Thr Asn Ser Val

35 40 45

Lys Gly Met Asn Ala Ile Leu Trp Thr Cys Leu Gly Leu Ser Leu Ile

50 55 60
Ile Ser Leu Ala Val Phe Val Leu Thr Phe Leu Leu Arg Lys Met Ser
65 70 75 80

Ser Glu Pro Leu Lys Asp Glu Phe Lys Asn Thr Gly Ser Gly Leu Leu

85 90 95

Gly Met Ala Asn Ile Asp Leu Glu Lys Gly Arg Thr Gly Asp Glu Ile

100 105 110

Val Leu Pro Arg Gly Leu Glu Tyr Thr Val Glu Glu Cys Thr Cys Glu

115 120 125

Asp Cys Ile Lys Asn Lys Pro Lys Val Asp Ser Asp His Cys Phe Pro

130 135 140

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

145 150 155 160

Asn Asp Tyr Cys Asn Ser Leu Ser Ala Ala Leu Ser Val Thr Glu Ile

165 170 175

Glu Lys Ser Ile Ser Ala Arg

180

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ser Gly Ser Tyr Phe Trp Gly

1 5
 <210> 5
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15
 <210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6
 His Asp Gly Ala Val Ala Gly Leu Phe Asp Tyr

1 5 10
 <210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly

1 5

<210> 8
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8

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

1 5 10 15

<210> 9
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9

His Asp Ala Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Ser Gly Ser Tyr Tyr Trp Gly

1 5

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

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

1 5 10 15

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

His Glu Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Ser Ser Ser Tyr Phe Trp Gly

1 5

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

His Ser Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

His Glu Gly Ala Val Ala Gly Leu Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

His Ser Gly Ala Val Ala Gly Leu Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

His Asp Ala Ala Val Ala Gly Leu Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

His Asp Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

His Gln Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 21

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

His His Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

His Trp Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

His Tyr Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His

1 5 10

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213>

> Homo sapiens

<400> 25

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser

1 5

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Val Val

1 5 10

<210> 27

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

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

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

<210> 28

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val

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

85 90 95
 Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 29

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Ala Arg His Asp Ala Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala

115 120

<210> 30

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His

85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 31

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Ala Arg His Glu Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala

115 120

<210> 32

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

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

1 5 10 15

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

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

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

<210> 33

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
 20 25 30
 Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

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

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala

115 120

<210> 34

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Ala Arg His Asp Gly Ala Val Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala

115 120

<210> 35

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

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

1 5 10 15

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala			
115	120		
<210> 36			
<211> 122			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 36			
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu			
1	5	10	15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly			
20	25	30	
Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu			
35	40	45	

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

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala

115 120

<210> 37

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Ala Arg His Ser Gly Ala Val Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala

115 120

<210> 38

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

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

1 5 10 15

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

20	25	30
Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu		
35	40	45
Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser		
50	55	60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe		
65	70	75
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
85	90	95
Cys Ala Arg His Asp Ala Ala Val Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly		
100	105	110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala		
115	120	
<210> 39		
<211> 122		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 39		
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu		
1	5	10
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly		
20	25	30
Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu		
35	40	45
Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser		
50	55	60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe		
65	70	75
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
85	90	95
Cys Ala Arg His Asp Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly		

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala

115 120

<210> 40

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Ala Arg His Asp Gly Ala Val Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala

115 120

<210> 41

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

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

1 5 10 15

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

20	25	30
Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu		
35	40	45
Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser		
50	55	60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe		
65	70	75
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
85	90	95
Cys Ala Arg His Asp Ala Ala Val Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly		
100	105	110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala		
115	120	
<210> 42		
<211> 122		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 42		
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu		
1	5	10
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly		
20	25	30
Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu		
35	40	45
Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser		
50	55	60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe		
65	70	75
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
85	90	95
Cys Ala Arg His Glu Gly Ala Val Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly		

100	105	110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala		
115	120	
<210> 43		
<211> 122		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 43		
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu		
1	5	10
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser		
20	25	30
Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu		
35	40	45
Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser		
50	55	60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe		
65	70	75
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
85	90	95
Cys Ala Arg His Asp Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly		
100	105	110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala		
115	120	
<210> 44		
<211> 122		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 44		
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu		
1	5	10
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser		

20	25	30
Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu		
35	40	45
Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Trp Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser		
50	55	60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe		
65	70	75
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
85	90	95
Cys Ala Arg His Asp Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly		
100	105	110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala		
115	120	
<210> 45		
<211> 122		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 45		
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu		
1	5	10
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser		
20	25	30
Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu		
35	40	45
Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser		
50	55	60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe		
65	70	75
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
85	90	95
Cys Ala Arg His Gln Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly		

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala

115 120

<210> 46

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Ala Arg His His Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala

115 120

<210> 47

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

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

1 5 10 15

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

20	25	30
Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu		
35	40	45
Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser		
50	55	60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe		
65	70	75
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
85	90	95
Cys Ala Arg His Trp Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly		
100	105	110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala		
115	120	
<210> 48		
<211> 122		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 48		
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu		
1	5	10
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser		
20	25	30
Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu		
35	40	45
Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser		
50	55	60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe		
65	70	75
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
85	90	95
Cys Ala Arg His Tyr Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly		

100	105	110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala		
115	120	
<210> 49		
<211> 122		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 49		
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu		
1	5	10
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser		
20	25	30
Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu		
35	40	45
Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser		
50	55	60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe		
65	70	75
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
85	90	95
Cys Ala Arg His Gln Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly		
100	105	110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala		
115	120	
<210> 50		
<211> 122		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 50		
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu		
1	5	10
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser		

20	25	30
Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu		
35	40	45
Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser		
50	55	60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe		
65	70	75
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
85	90	95
Cys Ala Arg His His Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly		
100	105	110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala		
115	120	
<210> 51		
<211> 122		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 51		
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu		
1	5	10
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser		
20	25	30
Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu		
35	40	45
Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser		
50	55	60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe		
65	70	75
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
85	90	95
Cys Ala Arg His Tyr Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly		

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala

115 120

<210> 52

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Trp Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Ala Arg His Gln Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala

115 120

<210> 53

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

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

1 5 10 15

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

20	25	30
Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu		
35	40	45
Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Trp Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser		
50	55	60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe		
65	70	75
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
85	90	95
Cys Ala Arg His His Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly		
100	105	110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala		
115	120	
<210> 54		
<211> 122		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 54		
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu		
1	5	10
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser		
20	25	30
Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu		
35	40	45
Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Trp Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser		
50	55	60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe		
65	70	75
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
85	90	95
Cys Ala Arg His Tyr Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly		

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala

115 120

<210> 55

<211> 452

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180	185	190
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys		
195	200	205
Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu		
210	215	220
Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala		
225	230	235
240		
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		
245	250	255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
260	265	270
Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
275	280	285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr		
290	295	300
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
305	310	315
320		
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser		
325	330	335
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
340	345	350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val		
355	360	365
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val		
370	375	380
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
385	390	395
400		
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Lys Leu Thr		
405	410	415
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
420	425	430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

435 440 445

Ser Leu Gly Lys

450

<210> 56

<211> 215

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

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

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val

65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180	185	190
Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr		
195	200	205
Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser		
210	215	
<210> 57		
<211> 122		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 57		
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu		

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

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

<210> 58		
<211> 122		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 58		
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu		

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

<210> 59

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Thr Tyr Ala Met Asn

1	5
---	---

<210> 60

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala Ser

1	5	10	15
---	---	----	----

Val Lys Gly

<210> 61

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 62

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

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

1 5 10

<210> 63

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro

1 5

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val

1 5

<210> 65

<211> 448

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Ala Arg His Asp Gly Ala Val Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His

195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly

210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Pro Ser

225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro

260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Glu Tyr

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

<210> 66

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

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

1 5 10 15

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

20	25	30	
His Trp Tyr Gln Gln Pro Pro Gly Gln Ala Pro Val Val Val Val Tyr			
35	40	45	
Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser			
50	55	60	
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly			
65	70	75	80
Asp Glu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His			
85	90	95	
Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys			
100	105	110	
Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln			
115	120	125	
Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly			
130	135	140	
Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly			
145	150	155	160
Val Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala			
165	170	175	
Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser			
180	185	190	
Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val			
195	200	205	
Ala Pro Thr Glu Cys Ser			
210			
<210> 67			
<211> 448			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 67			
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu			
1	5	10	15

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

20 25 30

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

35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Ala Arg His Asp Gly Ala Val Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His

195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly

210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Pro Ser

225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro

260	265	270
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
275	280	285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
290	295	300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Glu Tyr		
305	310	315
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr		
325	330	335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
340	345	350
Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
355	360	365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
370	375	380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
385	390	395
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser		
405	410	415
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
420	425	430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
435	440	445
<210> 68		
<211> 448		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 68		
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu		
1	5	10
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser		

20 25 30

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

35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Ala Arg His Asp Gly Ala Val Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His

195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly

210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Pro Ser

225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro

260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

<210> 69

<211> 448

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg His Asp Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

275	280	285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
290	295	300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
305	310	315
320		
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr		
325	330	335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
340 345 350		
Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
355	360	365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
370	375	380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
385	390	395
400		
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser		
405 410 415		
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
420	425	430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
435	440	445
<210> 70		
<211> 448		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 70		
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu		
1	5	10
15		
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly		
20	25	30
Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu		
35	40	45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Ala Arg His Asp Gly Ala Val Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His

195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly

210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser

225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro

260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

290	295	300	
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr			
305	310	315	320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr			
325	330	335	
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu			
340	345	350	
Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys			
355	360	365	
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser			
370	375	380	
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp			
385	390	395	400
Ser Asp Gly Ser Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser			
405	410	415	
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala			
420	425	430	
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys			
435	440	445	
<210> 71			
<211> 448			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 71			
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu			
1	5	10	15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser			
20	25	30	
Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu			
35	40	45	
Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser			
50	55	60	

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Ala Arg His Asp Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His

195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly

210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser

225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro

260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Glu Tyr

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

<210> 72

<211> 448

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65	70	75	80
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr			
85	90	95	
Cys Ala Arg His Asp Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly			
100	105	110	
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser			
115	120	125	
Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala			
130	135	140	
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val			
145	150	155	160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala			
165	170	175	
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val			
180	185	190	
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His			
195	200	205	
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly			
210	215	220	
Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser			
225	230	235	240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg			
245	250	255	
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro			
260	265	270	
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala			
275	280	285	
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val			
290	295	300	
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr			
305	310	315	320

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

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

<210> 73

<211> 327

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 73

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr

65	70	75	80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
85	90	95	
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro			
100	105	110	
Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys			
115	120	125	
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val			
130	135	140	
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp			
145	150	155	160
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe			
165	170	175	
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp			
180	185	190	
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu			
195	200	205	
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg			
210	215	220	
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys			
225	230	235	240
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp			
245	250	255	
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys			
260	265	270	
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser			
275	280	285	
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser			
290	295	300	
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser			
305	310	315	320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

325

<210> 74

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195

200

205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210

215

220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245

250

255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260

265

270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275

280

285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290

295

300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325

330

<210> 75

<211> 230

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

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

1 5 10 15

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

20

25

30

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

35

40

45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50

55

60

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

65	70	75	80
----	----	----	----

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

85	90	95
----	----	----

Cys Ala Arg His Asp Gly Ala Val Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly

100	105	110
-----	-----	-----

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

115	120	125
-----	-----	-----

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

130	135	140
-----	-----	-----

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

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

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

165	170	175
-----	-----	-----

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

180	185	190
-----	-----	-----

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

195	200	205
-----	-----	-----

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

210	215	220
-----	-----	-----

His His His His His

225	230
-----	-----

<210> 76

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

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

1	5	10	15
---	---	----	----

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

20	25	30
----	----	----

His Trp Tyr Gln Gln Pro Pro Gly Gln Ala Pro Val Val Val Val Tyr

35	40	45
Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser		
50	55	60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly		
65	70	75
Asp Glu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His		
85	90	95
Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys		
100	105	110
Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln		
115	120	125
Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly		
130	135	140
Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Gly Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly		
145	150	155
Val Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala		
165	170	175
Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser		
180	185	190
Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val		
195	200	205
Ala Pro Thr Glu Cys Ser		
210		
<210> 77		
<211> 5		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 77		
Gly Ala Val Ala Gly		
1	5	