



등록특허 10-2794702



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년04월11일
(11) 등록번호 10-2794702
(24) 등록일자 2025년04월08일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/08 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 9/127 (2025.01) *A61K 9/51* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 14/705* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 7/08 (2013.01)
A61K 39/0011 (2025.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7009561
- (22) 출원일자(국제) 2018년08월31일
심사청구일자 2021년08월31일
- (85) 번역문제출일자 2020년04월01일
- (65) 공개번호 10-2020-0047660
- (43) 공개일자 2020년05월07일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2018/049260
- (87) 국제공개번호 WO 2019/046818
국제공개일자 2019년03월07일
- (30) 우선권주장
62/553,669 2017년09월01일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문현
WO1999045954 A1*
WO2011119484 A1
WO2015059690 A1
WO2010037395 A2

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 18 항

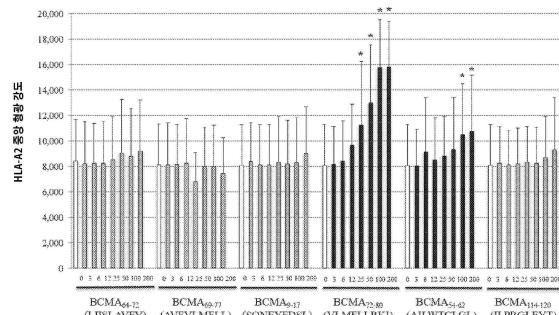
심사관 : 김정아

- (54) 발명의 명칭 암의 치료를 위한 BCMA 및 TACI 항원에 특이적인 면역원성 펩타이드

(57) 요약

본 개시내용은 B-세포 성숙 항원(BCMA) 및 막횡단 활성화제 및 CAML 상호작용화제(TACI)에 특이적인 면역원성 펩타이드, 및 이의 사용 방법에 관한 것이다.

대 표 도



T2 세포에 대해 평소된 BCMA 펩타이드(μg/ml)

(52) CPC특허분류

A61K 9/127 (2025.01)
A61K 9/5153 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/70578 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2039/5154 (2025.01)
A61K 2039/5158 (2025.01)
A61K 2039/55516 (2013.01)
A61K 2039/55555 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 13-17 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열로 이루어진 웹타이드.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열번호 13 또는 서열번호 14에 제시된 아미노산 서열로 이루어진 웹타이드.

청구항 3

제1항에 있어서, 서열번호 15, 서열번호 16 또는 서열번호 17에 제시된 아미노산 서열로 이루어진 웹타이드.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 웹타이드 및 제2 제제를 포함하는, 인간 대상체에서 암 또는 전암성 질환 (pre-malignant disease)을 치료하기 위한 약학적 조성물로서, 제2 제제는 항-OX40 항체, 항-GITR 항체, 및 항-LAG3 항체로 이루어진 군에서 선택되는 약학적 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 웹타이드 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 인간 대상체에서 암 또는 전암성 질환을 치료하기 위한 약학적 조성물.

청구항 6

나노입자, 및 서열번호 13-17 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열로 이루어진 웹타이드를 포함하는, 인간 대상체에서 암 또는 전암성 질환을 치료하기 위한 약학적 조성물로서, 웹타이드는 나노입자에 캡슐화되는 약학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

- (i) 나노입자는 폴리(D,L-락티드-co-글리콜리드)(PLGA)를 포함하거나;
- (ii) 나노입자는 폴리(락틱-co-글리콜산)-폴리(에틸렌 글리콜)(PLGA-PEG) 공중합체를 포함하거나; 또는
- (iii) 나노입자는 리포솜인 약학적 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 웹타이드를 코딩하는 핵산.

청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 웹타이드를 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터로서, 핵산 서열은 프로모터, 조절 요소, 또는 발현 제어 서열에 작동가능하게 연결되는 것인 벡터.

청구항 10

제9항의 벡터를 포함하는 배양 세포로서,

- (i) 세포는 포유동물 세포이거나;
- (ii) 세포는 인간 세포이거나; 또는
- (iii) 세포는 면역 세포인 배양 세포.

청구항 11

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 펩타이드를 코딩하는 핵산을 포함하는 바이러스로서, 바이러스가 렌티바이러스, 아데노바이러스, 또는 아데노-관련 바이러스인 바이러스.

청구항 12

인간 대상체에서 암 또는 전암성 질환을 치료하기 위한 약학적 조성물로서, 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 펩타이드, 또는 제6항 또는 제7항의 조성물, 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 13

인간 대상체에서 암 또는 전암성 질환을 치료하기 위한 약학적 조성물로서, 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 펩타이드, 제2 제제, 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물로서, 제2 제제는 항-OX40 항체, 항-GITR 항체, 및 항-LAG3 항체로 이루어진 군에서 선택되는 약학적 조성물.

청구항 14

제12항에 있어서, 인간 대상체는 암을 갖고,

- (i) 암은 혈액학적 암이거나;
- (ii) 암은 다발성 골수종이거나;
- (iii) 암 세포는 암성 형질 세포이거나; 또는

(iv) 암 세포는 BCMA 또는 TACI를 발현하고, 암 세포에서의 BCMA 또는 TACI의 수준은 건강한 인간 대상체에서의 형질 세포보다 적어도 20% 더 높은;

약학적 조성물.

청구항 15

제13항에 있어서, 인간 대상체는 암을 갖고,

- (i) 암은 혈액학적 암이거나;
- (ii) 암은 다발성 골수종이거나;
- (iii) 암 세포는 암성 형질 세포이거나; 또는

(iv) 암 세포는 BCMA 또는 TACI를 발현하고, 암 세포에서의 BCMA 또는 TACI의 수준은 건강한 인간 대상체에서의 형질 세포보다 적어도 20% 더 높은;

약학적 조성물.

청구항 16

인간 대상체에서 암 또는 전암성 질환을 치료하기 위한 약학적 조성물로서, 약학적 조성물은 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 펩타이드, 또는 제6항 또는 제7항의 조성물, 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하며;

암은 혈액암이거나, 또는 암은 다발성 골수종, 백혈병 또는 림프종이고;

전암성 질환은 의미불명의 단클론 감마글로불린병증(MGUS) 또는 무증상 다발성 골수종이고;

인간 대상체는 BCMA 또는 TACI를 과발현하는 하나 이상의 암 세포를 갖고, 암 세포에서의 BCMA 또는 TACI의 수준은 정상 세포보다 적어도 20% 더 높고, 인간 대상체는 MHC 분자를 발현하는 하나 이상의 암 세포를 갖는 약학적 조성물.

청구항 17

인간 대상체에서 암 또는 전암성 질환을 치료하기 위한 약학적 조성물로서, 약학적 조성물은 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 펩타이드, 제2 제제, 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하며;

암은 혈액암이거나, 또는 암은 다발성 골수종, 백혈병 또는 림프종이고;

전암성 질환은 의미불명의 단클론 gammaglobulin病증(MGUS) 또는 무증상 다발성 골수종이고;

인간 대상체는 BCMA 또는 TACI를 과발현하는 하나 이상의 암 세포를 갖고, 암 세포에서의 BCMA 또는 TACI의 수준은 정상 세포보다 적어도 20% 더 높고, 인간 대상체는 MHC 분자를 발현하는 하나 이상의 암 세포를 갖고,

제2 제제는 항-OX40 항체, 항-GITR 항체, 및 항-LAG3 항체로 이루어진 군에서 선택되는 약학적 조성물.

청구항 18

BCMA 또는 TACI 특이적 세포독성 T 세포를 생성 및/또는 증식시키는 시험관내 방법으로서, 하나 이상의 세포독성 T 세포를, 서열번호 13-17 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열로 이루어진 웹타이드로 펠스된 하나 이상의 항원 제시 세포와 접촉시키는 것을 포함하는 시험관내 방법.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2017년 9월 1일에 출원된 미국 가출원 제62/553,669호를 우선권으로 주장한다. 상기 가출원의 전체 내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0003] 연방 후원된 연구의 진술

[0004] 본 발명은 미국 국립보건원에 의해 수여된 승인 번호 P50-100007, P01-78378, 및 R01-50947 하에 정부 지원으로 이루어졌다. 미국 정부는 본 발명에서 특정 권리를 갖는다.

기술 분야

[0006] 본 개시내용은 B-세포 성숙 항원(B-cell maturation antigen, BCMA) 및 막횡단 활성화제 및 CAML 상호작용화제 (Transmembrane activator and CAML interactor, TACI)에 특이적인 면역원성 웨타이드, 및 이의 사용 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] 암은 현재 인간 사망률이 가장 높은 질환 중 하나이다. 세계 보건 기구 통계 데이터에 따르면, 2012년에 세계적인 암 발생 건수와 사망 건수는 각각 1400만 명 및 820만 명에 이르렀다. 미국에서, 암은 전체 사망의 최소 25%를 차지한다.

[0008] 최근에, 다양한 유형의 암을 치료하기 위한 새로운 요법이 개발되었다. 암에 걸린 환자는 종종, 예컨대, 수술, 화학요법 및/또는 면역 요법을 사용하여 치료된다. 이들 환자들에 대한 예후는 때때로 여전히 만족스럽지 못하다. 따라서, 암을 치료하기 위한 효과적인 요법 및/또는 예방 요법이 시급하다.

발명의 내용

[0009] 본 개시내용은, 부분적으로, 면역원성 웨타이드, T 세포(예컨대, CD8⁺ 세포독성 T 세포(CTL) 및/또는 CD4⁺ 헬퍼 T 세포), 및 B-세포 성숙 항원(B-cell maturation antigen, BCMA) 또는 막횡단 활성화제 및 CAML 상호작용화제 (Transmembrane activator and CAML interactor, TACI)에 특이적인 웨타이드를 캡슐화하는 나노입자(예컨대, 중합체성 나노캐리어 또는 리포솜 나노입자), 및 이의 사용 방법에 관한 것이다.

[0010] 일 양태에서, 본 개시내용은 서열번호 13-17 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열과 동일하거나, 1 내지 6개의 아미노산 잔기가 상이한 아미노산 서열을 포함하거나, 그로 본질적으로 구성되거나, 또는 그로 구성되는 웨타이드에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 서열번호 13-17의 위치 1에 있는 아미노산은 변경되지 않는다. 일부 구현예에서, 서열번호 13-17의 위치 1, 2, 또는 9 중 하나 이상에 있는 아미노산(들)은 또 다른 아미노산으로 치환된다. 예를 들어, 위치 1, 2, 또는 9가 치환되거나; 위치 1 및 2가 치환되거나; 위치 2 및 9가 치환되거나; 위치 1 및 9가 치환되거나; 또는 위치 1, 2, 및 9가 치환된다. 특정 구현예에서, 웨타이드는 9 내지 30개의 아미노산 길이(즉, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30개)이다.

[0011] 일부 구현예에서, 아미노산 서열은 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 또는 서열번호 17이다.

[0012] 일부 구현예에서, 웨타이드는 서열번호 13-17 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함하며, 웨타이드는 아미노산 서열의 N- 및/또는 C-말단에 1 내지 15개(즉, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15개)의 아미노산을 포함한다.

[0013] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 서열번호 1-17 중 어느 하나와 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도

55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일한 아미노산 서열로 구성되는 제1 아미노산 서열; 및 제1 아미노산 서열과 이종인 제2 아미노산 서열을 포함하거나, 그로 본질적으로 구성되거나, 또는 그로 구성되는 웨타이드에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 서열 번호 1-17의 위치 1, 2, 또는 9 중 하나 이상에 있는 아미노산(들)은 또 다른 아미노산으로 치환된다. 예를 들어, 위치 1, 2, 또는 9가 치환되거나; 위치 1 및 2가 치환되거나; 위치 2 및 9가 치환되거나; 위치 1 및 9가 치환되거나; 또는 위치 1, 2, 및 9가 치환된다. 특정 구현예에서, 웨타이드는 9 내지 30개의 아미노산 길이(즉, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30개)이다.

[0014] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 서열번호 1-17 중 어느 하나와 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 그로 본질적으로 구성되거나, 또는 그로 구성되는 웨타이드에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 서열번호 1-17의 위치 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8 중 하나 이상에 있는 아미노산(들)은 또 다른 아미노산으로 치환된다. 예를 들어, 위치 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8이 치환되거나; 위치 3 및 4가 치환되거나; 위치 3 및 5가 치환되거나; 위치 3 및 6이 치환되거나; 위치 3 및 7이 치환되거나; 위치 3 및 8이 치환되거나; 위치 4 및 5가 치환되거나; 위치 4 및 6이 치환되거나; 위치 4 및 7이 치환되거나; 위치 4 및 8이 치환되거나; 위치 5 및 6이 치환되거나; 위치 5 및 7이 치환되거나; 위치 5 및 8이 치환되거나; 위치 6 및 7이 치환되거나; 위치 6 및 8이 치환되거나; 위치 7 및 8이 치환되거나; 또는 위치 3, 4, 5, 6, 7, 및 8의 군으로부터 3개의 상이한, 4개의 상이한, 5개의 상이한, 또는 6개의 상이한 위치의 임의의 조합이 치환된다.

[0015] 일부 구현예에서, 웨타이드는 주조직적합성 복합체(MHC) 분자에 결합한다. 일부 구현예에서, MHC 분자와 결합된 웨타이드는 T 세포 상의 항원 특이적 T 세포 수용체에 의해 인식된다. 일부 구현예에서, MHC 분자는 MHC 클래스 I 분자 또는 MHC 클래스 II 분자이다. 일부 구현예에서, MHC 클래스 I 분자는 HLA-A(예컨대, HLA-A2, HLA-A24, HLA-A1, HLA-A3, HLA-A30, HLA-A26, HLA-A68, 또는 HLA-A11), HLA-B 또는 HLA-C이다. 일부 구현예에서, MHC 분자는 HLA-A2 분자 또는 HLA-A24 분자이다.

[0016] 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 바와 같은 웨타이드 및 제2 제제를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 구현예에서, 제2 제제는 BCMA 및 TACI 특이적 반응을 향상시키는 화합물, 예컨대 (1) 사이토카인 및 케모카인; (2) 항-PD1, 항-PDL1, 항-CTLA4, 항-LAG3, 및 항-TIM3을 포함하는 체크포인트 억제제; (2) 항-CD28, 항-CD40L(CD154), 항-41BB(CD137), 항-OX40 및 항-GITR을 포함하는 면역 작용제, (3) 단일 제제로서 및/또는 텍사메타손과 조합된 레날리도미드, 포말리도미드, 탈리도미드 유사체, IMiDS 화합물, 및/또는 HDAC 억제제(예컨대, ACY241)를 포함하는 면역 조절제; (4) 보조제; (5) 백신, 세포 요법 및/또는 항체를 포함하는 BCMA 및 TACI 특이적 반응을 증가시키는 치료제; (6) 웨타이드 기반 백신, 상이한 유형의 백신(RNA 백신, DNA 백신), 세포 요법, 특이적 조절제 및/또는 특이적 억제제를 포함하는 BCMA 및 TACI 특이적 반응을 교대시키는 치료제; 및 (7) 생물학적 및 비생물학적 접근법을 포함하여 질환에 대한 면역 반응을 광범위하게 커버하기 위해 BCMA 및 TACI 표적화 요법에 독립적인 접근법을 갖는 치료제로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 제2 제제는 면역 자극제(예컨대, 사이토카인 또는 T 헬퍼 에피토프)이다. 일부 구현예에서, 제2 제제는 T 헬퍼 에피토프이다. 일부 구현예에서, T 헬퍼 에피토프는 PADRE 서열 또는 유니버설 파상풍 톡소이드 T 헬퍼(TT Th) 에피토프이다. 일부 구현예에서, 제2 제제는 보조제이다. 보조제는 프로인트 완전 보조제, 프로인트 불완전 보조제, 명반(alum), 틀 수용체에 대한 리간드, QS21, RIBI, 콜레라 독소(CT), 이콜라이(*E. coli*) 이열성(heat labile) 독소(LT), 돌연변이성 CT(MCT), 및 돌연변이성 이콜라이 이열성 독소(MLT)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 제2 제제는 틀 유사 수용체-3 리간드(예컨대, 폴리 ICLC), 인터페론 알파(IFN α), 인터페론 감마(IFN γ), 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF), 항-인터루킨 6(IL-6), IL-6 억제제, 항-OX40 항체, 항-GITR 항체이다. 일부 구현예에서, 제2 제제는 체크포인트 억제제(예컨대, 항-LAG3 항체)이다. 일부 구현예에서, 제2 제제는 단일 제제로서 및/또는 텍사메타손과 조합된 레날리도미드, 포말리도미드, 탈리도미드 유사체, IMiDS 화합물, 및/또는 HDAC 억제제(예컨대, ACY241)를 포함하는 면역 조절제이다.

[0017] 일 양태에서, 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 바와 같은 웨타이드 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 BCMA 및 TACI 특이적 반응을 향상시키는 화합물, 예컨대 (1) 사이토카인 및 케모카인; (2) 항-PD1, 항-PDL1, 항-CTLA4, 항-LAG3, 및 항-TIM3을 포함하는 체크포인트 억제제; (2) 항-CD28, 항-CD40L(CD154), 항-41BB(CD137), 항-OX40 및 항-GITR을 포함하는 면역 작용제, (3) 단일 제제로서 및/또는 텍사메타손과 조합된 레날리도미드, 포말리도미드, 탈리도미드 유사체, IMiDS 화합물, 및/또는 HDAC 억제제(예컨대, ACY241)를 포함하는 면역 조절제; (4) 보조제; (5) 백신, 세포 요법 및/또는 항체를 포함하는 BCMA 및 TACI 특이적 반응을 증가시키는 치료제; 및 (6) 질환에 대한 면역 반응을

광범위하게 커버하기 위해 BCMA 및 TACI 표적화 요법에 독립적인 접근법을 갖는 치료제로 이루어진 군으로부터 선택된 제제를 포함한다. 일부 경우에, 약학적 조성물은 보조제(예컨대, 프로인트 완전 보조제, 프로인트 불완전 보조제, 명반, 툴 수용체에 대한 리간드, QS21, RIBI, 콜레라 독소(CT), 이콜라이 이열성 독소(LT), 돌연변이성 CT(MCT), 및 돌연변이성 이콜라이 이열성 독소(MLT)); 면역 작용제(예컨대, 항-OX40 항체, 항-GITR 항체); 체크포인트 억제제(예컨대, 항-LAG3 항체); 또는 면역 조절제(예컨대, 단일 제제로서 및/또는 텍사메타손과 조합된 레날리도미드, 포말리도미드, 탈리도미드 유사체, IMiDS 화합물, 및/또는 HDAC 억제제(예컨대, ACY241)) 중 하나 이상을 포함한다.

[0018] 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 체크포인트 억제제를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 체크포인트 억제제는 항-LAG3 항체이다. 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 레날리도미드를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 단일 제제로서 및/또는 텍사메타손과 조합된 레날리도미드, 포말리도미드, 탈리도미드 유사체, IMiDS 화합물 및/또는 HDAC 억제제(예컨대, ACY241)를 추가로 포함한다.

[0019] 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 BCMA에 특이적인 T 세포(예컨대, CTL)를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 TACI에 특이적인 T 세포(예컨대, CTL)를 추가로 포함한다. 특정 경우에, CTL은 서열번호 13 또는 14 중 하나 이상을 포함하거나 그것으로 구성되는 웨타이드에 대한 노출에 의해 수득된 CTL이다. 다른 경우에, CTL은 서열번호 15-17 중 어느 하나 이상을 포함하거나 그것으로 구성되는 웨타이드에 대한 노출에 의해 수득된 CTL이다. 일부 경우에, CTL은 기억 CD8⁺ CTL이다. 일부 경우에, CTL은 기억 CD8⁺ CD45RO⁺ CTL이다. 일부 경우에, CTL은 비기억 CD8⁺ CTL이다. 일부 경우에, CTL은 효과기 CD8⁺ CTL이다. 일부 경우에, CTL은 활성화된 CD8⁺ CTL이다. 일부 경우에, CTL은 테트라머-양성 CD8⁺ CTL이다. 일부 경우에, CTL은 공동자극 분자 발현을 상향 조절한 CD8⁺ CTL이다. 일부 경우에, CTL은 체크포인트 분자 발현을 상향조절한 CD8⁺ CTL이다. 일부 경우에, CTL은 사이토카인(들)을 생산하고/거나 중요한 세포용해 마커(들)(예컨대 CD107, 그랜자임(Granzyme), 퍼포린(Perforin)) 발현 및/또는 생산을 상향조절한 CD8⁺ CTL이다. 일부 경우에, CTL은 종양 또는 다른 표적에 대한 활성을 갖는 CD8⁺ CTL이다.

[0020] 일 양태에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 바와 같은 웨타이드를 코딩하는 핵산에 관한 것이다. 특정 경우에, 핵산은 RNA(예컨대, mRNA)이다. 다른 구현예에서, 핵산은 DNA이다. 일부 경우에, RNA 또는 DNA는 나노캐리어(예컨대, PLGA와 같은 중합체성 또는 리포솜성)에 캡슐화된다. RNA 및 DNA는 다른 조절 서열(예컨대, 출발 코돈, 정지 코돈, 폴리A 테일)을 포함할 수 있다.

[0021] 일 양태에서, 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 바와 같은 웨타이드를 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 핵산 서열은 프로모터, 조절 요소, 또는 발현 제어 서열에 작동가능하게 연결된다.

[0022] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 바와 같은 벡터를 포함하는 배양 세포에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 세포는 포유동물 세포, 인간 세포, 또는 면역 세포이다.

[0023] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 바와 같은 웨타이드를 코딩하는 핵산을 포함하는 바이러스를 제공한다. 일부 구현예에서, 바이러스는 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 인간 포미 바이러스(human foamy virus), 파르보바이러스, 점액종 바이러스, 뉴캐슬병 바이러스, 레오바이러스, 세네카 벨리 바이러스(Seneca valley virus), 홍역 바이러스, 폴리오바이러스, 백시니아 바이러스, 단순 포진 바이러스, 또는 수포성 구내염 바이러스(vesicular stomatitis virus)이다.

[0024] 일 양태에서, 본 개시내용은 적어도 2개의 상이한 웨타이드의 조합에 관한 것으로서, 적어도 2개의 상이한 웨타이드는 서열번호 13-17에 제시된 아미노산 서열을 갖는 웨타이드의 군으로부터 선택된다. 조합은 서열번호 13-17 중 하나 이상에서 1 내지 4개의 치환을 갖는 웨타이드를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 치환은 위치 1, 2, 또는 9 중 하나 이상의 위치에 있다. 일부 경우에, 위치 1은 변경되지 않는다. 일부 경우에, 웨타이드는 9 내지 30개의 아미노산 길이이다. 일부 구현예에서, 조합은 서열번호 13-17에 제시된 아미노산 서열을 갖는 적어도 2, 3, 4, 또는 모든 5개의 웨타이드를 포함한다. 일부 경우에, 조합은 서열번호 13-17에 제시된 2개 이상의 웨타이드를 포함하며, 2개 이상의 웨타이드는 아미노산 서열의 N- 및/또는 C-말단에 1 내지 15개(즉, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15개)의 아미노산을 갖는다.

[0025] 일 양태에서, 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 바와 같은 웨타이드의 조합; 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 BCMA 및 TACI 특이적 반응을 향상시

키는 화합물, 예컨대 (1) 사이토카인 및 케모카인; (2) 항-PD1, 항-PDL1, 항-CTLA4, 항-LAG3, 및 항-TIM3을 포함하는 체크포인트 억제제; (2) 항-OX40 및 항-GITR을 포함하는 면역 작용제, (3) 단일 제제로서 및/또는 텍사메타손과 조합된 레날리도미드, 포말리도미드, 탈리도미드 유사체, IMiDS 화합물, 및/또는 HDAC 억제제(예컨대, ACY241)를 포함하는 면역 조절제; (4) 보조제; (5) 백신, 세포 요법 및/또는 항체를 포함하는 BCMA 및 TACI 특이적 반응을 증가시키는 치료제; 및 (6) 질환에 대한 면역 반응을 광범위하게 커버하기 위해 BCMA 및 TACI 표적화 요법에 독립적인 접근법을 갖는 치료제로 이루어진 군으로부터 선택되는 제제를 포함한다. 일부 경우에, 약학적 조성물은 보조제(예컨대, 프로인트 완전 보조제, 프로인트 불완전 보조제, 명반, 틀 수용체에 대한 리간드, QS21, RIBI, 콜레라 독소(CT), 이콜라이 이열성 독소(LT), 돌연변이성 CT(MCT), 및 돌연변이성 이콜라이 이열성 독소(MLT)); 면역 작용제(예컨대, 항-OX40 항체, 항-GITR 항체); 체크포인트 억제제(예컨대, 항-LAG3 항체); 및/또는 단일 제제로서 및/또는 텍사메타손과 조합된 레날리도미드, 포말리도미드, 탈리도미드 유사체, IMiDS 화합물, 및/또는 HDAC 억제제(예컨대, ACY241) 중 하나 이상을 포함한다.

[0026] 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 면역 작용제를 추가로 포함한다. 일부 경우에, 면역 작용제는 항-OX40 항체 또는 항-GITR 항체일 수 있다. 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 체크포인트 억제제를 추가로 포함한다. 일 경우에, 체크포인트 억제제는 항-LAG3 항체이다. 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 단일 제제로서 및/또는 텍사메타손과 조합되어 레날리도미드, 포말리도미드, 탈리도미드 유사체, IMiDS 화합물, 및/또는 HDAC 억제제(예컨대, ACY241)를 추가로 포함한다. 일 양태에서, 본 개시내용은 또한 단리된 수지상 세포를 포함하는 조성물을 제공하며, 수지상 세포는 그의 표면 상에 웨بت아이드 서열을 제시하고, 웨بت아이드 서열은 BCMA 항원(서열번호 18) 및 TACI 항원(서열번호 19) 중 하나 또는 둘 모두의 적어도 하나의 주조직적합성 복합체(MHC) 클래스 I 웨بت아이드 에피토프를 포함한다.

[0027] 일부 구현예에서, MHC 클래스 I 웨بت아이드 에피토프는 HLA-A2 웨بت아이드 에피토프이다.

[0028] 일부 구현예에서, MHC 클래스 I 웨بت아이드 에피토프는 HLA-A24 웨بت아이드 에피토프이다.

[0029] 일부 구현예에서, 수지상 세포는 웨بت아이드 서열을 포함하는 웨بت아이드에 대한 노출에 의해 시험관내에서 웨بت아이드 서열을 획득한다.

[0030] 일부 구현예에서, 웨بت아이드 서열은 합성 웨بت아이드 서열이다. 일부 구현예에서, 웨بت아이드 서열은 서열번호 1-12 및 서열번호 13-17 중 어느 하나에 제시된 서열이다. 일부 경우에, 웨بت아이드 서열은 서열번호 13-17에 제시되어 있지만 1 내지 4개의 아미노산 치환을 갖는 서열이다. 특정 경우에, 치환은 위치 1, 2, 또는 9 중 하나 이상에 있다. 일 특정 구현예에서, 웨بت아이드 서열은 서열번호 13이다. 또 다른 구현예에서, 웨بت아이드는 서열번호 13이지만 1 내지 4개의 아미노산 치환을 갖는다. 특정 경우에, 치환은 위치 1, 2, 또는 9 중 하나 이상에 있다. 또 다른 특정 구현예에서, 웨بت아이드 서열은 서열번호 16이다. 또 다른 구현예에서, 웨بت아이드는 서열번호 16이지만 1 내지 4개의 아미노산 치환을 갖는다. 특정 경우에, 치환은 위치 1, 2, 또는 9 중 하나 이상에 있다.

[0031] 일부 구현예에서, 조성물은 10^5 내지 10^8 개의 수지상 세포를 포함한다.

[0032] 일부 구현예에서, 조성물은 서열번호 1-12 및 서열번호 13-17 중 어느 하나에 제시된 웨بت아이드를 추가로 포함한다. 일 특정 구현예에서, 웨بت아이드 서열은 서열번호 13이다. 또 다른 특정 구현예에서, 웨بت아이드 서열은 서열번호 16이다. 일부 구현예에서, 조성물은 BCMA 및 TACI 특이적 반응을 향상시키는 화합물, 예컨대 (1) 사이토카인 및 케모카인; (2) 항-PD1, 항-PDL1, 항-CTLA4, 항-LAG3, 및 항-TIM3을 포함하는 체크포인트 억제제; (2) 항-CD28, 항-CD40L(CD154), 항-41BB(CD137), 항-OX40 및 항-GITR을 포함하는 면역 작용제, (3) 단일 제제로서 및/또는 텍사메타손과 조합되어 레날리도미드, 포말리도미드, 탈리도미드 유사체, IMiDS 화합물, 및/또는 HDAC 억제제(예컨대, ACY241)를 포함하는 면역 조절제; (4) 보조제; (5) 백신, 세포 요법 및/또는 항체를 포함하는 BCMA 및 TACI 특이적 반응을 증가시키는 치료제; (6) 웨بت아이드 기반 백신, 상이한 유형의 백신(RNA 백신, DNA 백신), 세포 요법, 특이적 조절제 및/또는 특이적 억제제를 포함하는 BCMA 및 TACI 특이적 반응을 교대시키는 치료제; 및 (7) 생물학적 및 비생물학적 접근법을 포함하여 질환에 대한 면역 반응을 광범위하게 커버하기 위해 BCMA 및 TACI 표적화 요법에 독립적인 접근법을 갖는 치료제로 이루어진 군으로부터 선택되는 제제를 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 면역 작용제(예컨대, 항-OX40 항체, 항-GITR 항체)를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 체크포인트 억제제(예컨대, 항-LAG3 항체)를 추가로 포함한다.

[0033] 일 양태에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 바와 같은 웨بت아이드(예컨대, 서열번호 13-17을 포함하거나 그것으로 구성되는 웨بت아이드), 또는 본원에 기재된 바와 같은 조성물(예컨대, 약학적 조성물)을 인간 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 이를 필요로 하는 인간 대상체에서 BCMA 및/또는 TACI 발현 세포(예컨대, 암 세포)에 대한

면역 반응을 유도하는 방법에 관한 것이다. 또 다른 구현예에서, 웨타이드는 서열번호 13이지만 1 내지 4개의 아미노산 치환을 갖는다. 특정 경우에, 치환은 위치 1, 2, 또는 9 중 하나 이상에 있다. 또 다른 특정 구현예에서, 웨타이드 서열은 서열번호 16이다. 또 다른 구현예에서, 웨타이드는 서열번호 16이지만 1 내지 4개의 아미노산 치환을 갖는다. 특정 경우에, 치환은 위치 1, 2, 또는 9 중 하나 이상에 있다.

- [0034] 일부 구현예에서, 대상체는 BCMA 및/또는 TACI를 발현하는 암을 가지며, 면역 반응은 이러한 암 세포에 대한 것이다.
- [0035] 일부 구현예에서, 대상체는 BCMA 및/또는 TACI를 발현하는 비암 세포를 가지며, 면역 반응은 비암 세포에 대한 것이다.
- [0036] 일부 구현예에서, 암은 혈액학적 암(예컨대, 다발성 골수종)이다. 일부 구현예에서, 암 세포는 형질 세포(예컨대, 암성 형질 세포)이다. 일부 구현예에서, 인간 대상체는 불응성 다발성 골수종을 갖는다. 일부 구현예에서, 인간 대상체는 동종이식 후 재발하는 불응성 다발성 골수종을 갖는다.
- [0037] 일부 구현예에서, 암 세포는 BCMA를 발현하며, 암 세포에서의 BCMA의 수준은 건강한 인간 대상체에서의 형질 세포보다 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 또는 적어도 50% 더 많다.
- [0038] 일부 구현예에서, 암 세포는 TACI를 발현하며, 암 세포에서의 TACI의 수준은 건강한 인간 대상체에서의 형질 세포보다 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 또는 적어도 50% 더 많다.
- [0039] 일부 구현예에서, 방법은 BCMA에 특이적인 CTL을 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 TACI에 특이적인 CTL을 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 경우에, CTL은 서열번호 13 또는 14 중 하나 이상을 포함하거나 그것으로 구성되는 웨타이드에 대한 노출에 의해 수득된 CTL이다. 일부 경우에, CTL은 서열번호 13 또는 14이지만 1 내지 4개의 치환을 갖는 웨타이드에 노출된다. 일부 경우에, 치환은 위치 1, 2, 또는 9 중 하나 이상에 있다. 일부 경우에, 웨타이드는 9 내지 30개의 아미노산 길이이다. 다른 경우에, CTL은 서열번호 15-17 중 어느 하나 이상을 포함하거나 그것으로 구성되는 웨타이드에 대한 노출에 의해 수득된 CTL이다. 일부 경우에, CTL은 서열번호 15, 16, 또는 17이지만 1 내지 4개의 치환을 갖는 웨타이드에 노출된다. 일부 경우에, 치환은 위치 1, 2, 또는 9 중 하나 이상에 있다. 일부 경우에, 웨타이드는 9 내지 30개의 아미노산 길이이다. 일부 경우에, CTL은 기억 CD8⁺ CTL이다. 일부 경우에, CTL은 기억 CD8⁺ CD45RO⁺ CTL이다. 일부 경우에, CTL은 효과기 CD8⁺ CTL이다. 일부 경우에, CTL은 활성화된 CD8⁺ CTL이다. 일부 경우에, CTL은 테트라머-양성 CD8⁺ CTL이다. 일부 경우에, CD8⁺ CTL은 본원에 기재된 웨타이드로 자극될 때 공동 자극 분자 발현을 상향조절하는 CTL이다. 일부 경우에, CD8⁺ CTL은 본원에 기재된 웨타이드로 자극될 때 체크포인트 분자 발현을 상향조절하는 CTL이다. 일부 경우에, CTL은 사이토카인(들)을 생산하고/거나 중요한 세포용해 마커(들)(예컨대 CD107, 그랜자임, 퍼포린) 발현 및/또는 생산을 상향조절한 CD8⁺ CTL이다. 일부 경우에, CTL은 종양 또는 다른 표적에 대한 활성을 갖는 CD8⁺ CTL이다.
- [0040] 일부 구현예에서, 방법은 면역 작용제를 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 면역 작용제는 항-CD28, 항-CD40L(CD154), 항-41BB(CD137), 항-OX40 및 항-GITR이다.
- [0041] 일부 구현예에서, 방법은 체크포인트 억제제(예컨대, 항-LAG3 항체)를 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 방법은 레날리도미드를 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 면역 작용제(예컨대, 항-OX40 항체, 항-GITR 항체), 체크포인트 억제제(예컨대, 항-LAG3 항체), 또는 면역 조절제 중 하나 이상을 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0042] 일부 구현예에서, 방법은 웨타이드 또는 조성물을 인간 대상체에게 투여한 후, 인간 대상체에서 BCMA 및/또는 TACI 발현 암에 대한 면역 반응이 발생하였는지의 여부를 결정하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0043] 일 양태에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 바와 같은 웨타이드, 또는 본원에 기재된 바와 같은 조성물을 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 암 또는 전악성 질환(pre-malignant disease)을 갖는 인간 대상체를 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0044] 일부 구현예에서, 암은 혈액암이다. 일부 구현예에서, 암은 다발성 골수종, 백혈병, 램프종 또는 임의의 B-세포

또는 형질 세포 악성 종양이다.

[0045] 일부 구현예에서, 전악성 질환은 의미불명의 단클론 갑마글로불린병증(MGUS) 또는 무증상 다발성 골수종이다.

[0046] 일부 구현예에서, 방법은 인간 대상체에서 하나 이상의 암 세포가 BCMA 및/또는 TACI를 발현하거나 과발현하는 것을 검출하는 단계를 추가로 포함한다.

[0047] 일부 구현예에서, 인간 대상체는 BCMA 및/또는 TACI를 과발현하는 하나 이상의 암 세포를 가지며, 암 세포에서의 BCMA 및/또는 TACI의 수준은 정상 세포(예컨대, 건강한 대상체에서의 형질 세포)보다 적어도 20% 더 많다.

[0048] 일부 구현예에서, 대상체는 MHC 분자를 발현하는 하나 이상의 암 세포를 갖는다.

[0049] 일부 구현예에서, 방법은 BCMA에 특이적인 CTL을 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 TACI에 특이적인 CTL을 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 경우에, CTL은 서열번호 13 또는 14 중 하나 이상을 포함하거나 그것으로 구성되는 웹타이드에 대한 노출에 의해 수득된 CTL이다. 일부 경우에, CTL은 서열번호 13 또는 14이지만, 1 내지 4개의 치환을 갖는 웹타이드에 노출된다. 일부 경우에, 치환은 위치 1, 2, 또는 9 중 하나 이상에 있다. 일부 경우에, 웹타이드는 9 내지 30개의 아미노산 길이이다. 다른 경우에, CTL은 서열번호 15-17 중 어느 하나 이상을 포함하거나 그것으로 구성되는 웹타이드에 대한 노출에 의해 수득된 CTL이다. 일부 경우에, CTL은 서열번호 15, 16, 또는 17이지만, 1 내지 4개의 치환을 갖는 웹타이드에 노출된다. 일부 경우에, 치환은 위치 1, 2, 또는 9 중 하나 이상에 있다. 일부 경우에, 웹타이드는 9 내지 30개의 아미노산 길이이다. 일부 경우에, CTL은 기억 CD8+ CTL이다. 일부 경우에, CTL은 기억 CD8+ CD45RO+ CTL이다. 일부 경우에, CTL은 효과기 CD8+ CTL이다. 일부 경우에, CTL은 활성화된 CD8+ CTL이다. 일부 경우에, CTL은 테트라머-양성 CD8+ CTL이다. 일부 경우에, CTL은 공동자극 분자 발현을 상향조절한 CD8+ CTL이다. 일부 경우에, CTL은 체크포인트 분자 발현을 상향조절한 CD8+ CTL이다.

[0050] 일부 구현예에서, 방법은 BCMA 및 TACI 특이적 반응을 향상시키는 화합물, 예컨대 (1) 사이토카인 및 케모카인; (2) 항-PD1, 항-PDL1, 항-CTLA4, 항-LAG3, 및 항-TIM3을 포함하는 체크포인트 억제제; (2) 항-OX40 및 항-GITR을 포함하는 면역 작용제, (3) 레날리도미드, 포말리도미드, HDAC 억제제(예컨대, ACY241)를 포함하는 면역 조절제; (4) 보조제; (5) 백신, 세포 요법 및/또는 항체를 포함하는 BCMA 및 TACI 특이적 반응을 증가시키는 치료제; 및 (6) 질환에 대한 면역 반응을 광범위하게 커버하기 위해 BCMA 및 TACI 표적화 요법에 독립적인 접근법을 갖는 치료제로 이루어진 군으로부터 선택되는 제제를 인간 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 면역 작용제를 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 면역 작용제는 항-OX40 항체 또는 항-GITR 항체이다.

[0051] 일부 구현예에서, 방법은 체크포인트 억제제(예컨대, 항-LAG3 항체)를 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 방법은 레날리도미드를 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 면역 작용제(예컨대, 항-OX40 항체, 항-GITR 항체), 체크포인트 억제제(예컨대, 항-LAG3 항체), 또는 면역 조절제 중 하나 이상을 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0052] 일부 구현예에서, 방법은 화학요법 또는 방사선요법을 인간 대상체에게 수행하는 단계를 추가로 포함한다.

[0053] 일 양태에서, 본 개시내용은 하나 이상의 세포독성 T 세포를 서열번호 13 및 서열번호 14로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 웹타이드로 펠스된 하나 이상의 항원 제시 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는, BCMA 특이적 세포독성 T 세포를 생성 및/또는 증식시키는 방법에 관한 것이다. 일부 경우에, CTL은 서열번호 13 또는 14이지만 1 내지 4개의 치환을 갖는 웹타이드에 노출된다. 일부 경우에, 치환은 위치 1, 2, 또는 9 중 하나 이상에 있다. 일부 경우에, 웹타이드는 9 내지 30개의 아미노산 길이이다.

[0054] 일부 구현예에서, 세포독성 T 세포는 기억 세포독성 T 세포이다. 일부 구현예에서, 세포독성 T 세포는 효과기 세포독성 T 세포이다. 일부 경우에, CD8+ CTL은 본원에 기재된 웹타이드로 자극될 때 공동자극 분자 발현을 상향조절하는 CTL이다. 일부 경우에, CD8+ CTL은 본원에 기재된 웹타이드로 자극될 때 체크포인트 분자 발현을 상향조절하는 CTL이다. 일부 경우에, CTL은 사이토카인(들)을 생산하고/거나 중요한 세포용해 마커(들)(예컨대 CD107, 그랜자임, 퍼포린) 발현 및/또는 생산을 상향조절한 CD8+ CTL이다. 일부 경우에, CTL은 중양 또는 다른 표적에 대한 활성을 갖는 CD8+ CTL이다.

[0055] 일부 구현예에서, 항원 제시 세포는 수지상 세포(DC)이다. 일 특정 구현예에서, 웹타이드는 서열번호 13을 포함하거나 구성된다. 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 하나 이상의 세포독성 T 세포를 서열번호 15-17로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 웹타이드로 펠스된 하나 이상의 항원 제시 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는,

TACI 특이적 세포독성 T 세포를 생성하는 방법에 관한 것이다. 일부 경우에, CTL은 서열번호 15, 16, 또는 17이지만 1 내지 4개의 치환을 갖는 웨타이드에 노출된다. 일부 경우에, 치환은 위치 1, 2, 또는 9 중 하나 이상에 있다. 일부 경우에, 웨타이드는 9 내지 30개의 아미노산 길이이다.

- [0056] 일부 특정 구현예에서, 웨타이드는 서열번호 16을 포함하거나 구성된다.
- [0057] 일부 양태에서, 본 개시내용은 또한 표적 세포를 하나 이상의 BCMA 특이적 세포독성 T 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는, 표적 세포를 사멸시키는 방법으로서, 표적 세포는 BCMA를 발현하거나 과발현하는 것인 방법에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 표적 세포는 HLA-A를 발현한다.
- [0058] 일부 구현예에서, 방법은 하나 이상의 BCMA 특이적 세포독성 T 세포를 BCMA 및 TACI 특이적 반응을 향상시키는 화합물, 예컨대 (1) 사이토카인 및 케모카인; (2) 항-PD1, 항-PDL1, 항-CTLA4, 항-LAG3, 및 항-TIM3을 포함하는 체크포인트 억제제; (2) 항-OX40 및 항-GITR를 포함하는 면역 작용제, (3) 단일 제제로서 및/또는 텍사메타손과 조합되어 레날리도미드, 포말리도미드, 탈리도미드 유사체, IMiDS 화합물, 및/또는 HDAC 억제제(예컨대, ACY241)를 포함하는 면역 조절제; (4) 보조제; (5) 백신, 세포 요법 및/또는 항체를 포함하는 BCMA 및 TACI 특이적 반응을 증가시키는 치료제; 및 (6) 질환에 대한 면역 반응을 광범위하게 커버하기 위해 BCMA 및 TACI 표적화 요법에 독립적인 접근법을 갖는 치료제로 이루어진 군으로부터 선택되는 제제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다.
- [0059] 일부 구현예에서, 방법은 하나 이상의 BCMA 특이적 세포독성 T 세포를 면역 작용제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다.
- [0060] 일부 구현예에서, 방법은 서열번호 13 또는 14에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 그것으로 구성되는 웨타이드를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 경우에, 웨타이드는 서열번호 13 또는 14의 아미노산 서열의 N- 및/또는 C-말단에 부가된 1 내지 15개(즉, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15개)의 아미노산을 가질 수 있다.
- [0061] 일부 구현예에서, 면역 작용제는 OX40 작용제 또는 GITR 작용제이다. 일부 구현예에서, 면역 작용제는 항-OX40 항체 또는 항-GITR 항체이다.
- [0062] 일부 구현예에서, 방법은 체크포인트 억제제(예컨대, 항-LAG3 항체)를 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 방법은 레날리도미드를 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 면역 작용제(예컨대, 항-OX40 항체, 항-GITR 항체), 체크포인트 억제제(예컨대, 항-LAG3 항체), 또는 레날리도미드 중 하나 이상을 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0063] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 표적 세포를 하나 이상의 TACI 특이적 세포독성 T 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는, 표적 세포를 사멸시키는 방법으로서, 표적 세포는 TACI를 발현하거나 과발현하는 것인 방법에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 표적 세포는 HLA-A를 발현한다.
- [0064] 일부 구현예에서, 방법은 서열번호 15-17 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 그것으로 구성되는 웨타이드를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 경우에, 웨타이드는 서열번호 15-17의 아미노산 서열의 N- 및/또는 C-말단에 부가된 1 내지 15개(즉, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15)의 아미노산을 가질 수 있다.
- [0065] 일부 구현예에서, 방법은 하나 이상의 TACI 특이적 세포독성 T 세포를 BCMA 및 TACI 특이적 반응을 향상시키는 화합물, 예컨대 (1) 사이토카인 및 케모카인; (2) 항-PD1, 항-PDL1, 항-CTLA4, 항-LAG3, 및 항-TIM3을 포함하는 체크포인트 억제제; (2) 항-OX40 및 항-GITR를 포함하는 면역 작용제, (3) 레날리도미드, 포말리도미드, HDAC 억제제(예컨대, ACY241)를 포함하는 면역 조절제; (4) 보조제; (5) 백신, 세포 요법 및/또는 항체를 포함하는 BCMA 및 TACI 특이적 반응을 증가시키는 치료제; 및 (6) 질환에 대한 면역 반응을 광범위하게 커버하기 위해 BCMA 및 TACI 표적화 요법에 독립적인 접근법을 갖는 치료제로 이루어진 군으로부터 선택되는 제제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다.
- [0066] 일부 구현예에서, 방법은 하나 이상의 TACI 특이적 세포독성 T 세포를 면역 작용제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다.
- [0067] 일부 구현예에서, 면역 작용제는 OX40 작용제 또는 GITR 작용제이다.
- [0068] 일부 구현예에서, 면역 작용제는 항-OX40 항체 또는 항-GITR 항체이다. 일부 구현예에서, 방법은 체크포인트 억

제제(예컨대, 항-LAG3 항체)를 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 방법은 레날리도미드를 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 면역 작용제(예컨대, 항-OX40 항체, 항-GITR 항체), 체크포인트 억제제(예컨대, 항-LAG3 항체), 또는 레날리도미드 중 하나 이상을 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0069] 일 양태에서, 본 개시내용은 복수의 BCMA 특이적 세포독성 T 세포 또는 TACI 특이적 세포독성 T 세포를 인간 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, BCMA 또는 TACI 발현 질환 또는 암을 갖는 인간 대상체를 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0070] 일부 구현예에서, 방법은 서열번호 13-17 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하거나 그것으로 구성되는 웹타이드를 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 경우에, 웹타이드는 1 내지 4개의 치환을 갖는 것을 제외한 서열번호 13-17 중 하나에 제시된 서열을 갖는다. 일부 경우에, 치환은 위치 1, 2, 또는 9 중 하나 이상에 있을 수 있다. 일부 경우에, 웹타이드는 9 내지 30개의 아미노산 길이이다.

[0071] 일부 구현예에서, 방법은 BCMA 및 TACI 특이적 반응을 향상시키는 화합물, 예컨대 (1) 사이토카인 및 케모카인; (2) 항-PD1, 항-PDL1, 항-CTLA4, 항-LAG3, 및 항-TIM3을 포함하는 체크포인트 억제제; (2) 항-OX40 및 항-GITR을 포함하는 면역 작용제, (3) 레날리도미드, 포말리도미드, HDAC 억제제(예컨대, ACY241)를 포함하는 면역 조절제; (4) 보조제; (5) 백신, 세포 요법 및/또는 항체를 포함하는 BCMA 및 TACI 특이적 반응을 증가시키는 치료제; 및 (6) 질환에 대한 면역 반응을 평범위하게 커버하기 위해 BCMA 및 TACI 표적화 요법에 독립적인 접근법을 갖는 치료제로 이루어진 군으로부터 선택되는 제제를 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0072] 일부 구현예에서, 방법은 면역 작용제를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 면역 작용제는 OX40 작용제 또는 GITR 작용제이다. 일부 구현예에서, 면역 작용제는 항-OX40 항체 또는 항-GITR 항체이다.

[0073] 일부 구현예에서, 방법은 체크포인트 억제제(예컨대, 항-LAG3 항체)를 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 방법은 레날리도미드를 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 면역 작용제(예컨대, 항-OX40 항체, 항-GITR 항체), 체크포인트 억제제(예컨대, 항-LAG3 항체), 또는 레날리도미드 중 하나 이상을 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0074] 일부 구현예에서, 세포독성 T 세포는 인간 대상체의 세포로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 세포독성 T 세포는 유도 만능 줄기 세포(induced pluripotent stem cell)로부터 유래된다.

[0075] 일부 구현예에서, 암은 BCMA 및/또는 TACI를 발현한다. 일부 구현예에서, 인간 대상체는 다발성 골수종을 갖는다.

[0076] 일 양태에서, 본 개시내용은

[0077] (a) 대상체로부터 골수 유래 단핵 세포를 수득하는 단계;

[0078] (b) 단핵 세포가 배양 용기에 부착되는 조건 하에서 단핵 세포를 시험관내에서 배양하는 단계;

[0079] (c) 부착성 단핵 세포를 선택하는 단계;

[0080] (d) 세포가 항원 제시 세포로 분화하는 조건 하에서 부착성 단핵 세포를 하나 이상의 사이토카인의 존재 하에 배양하는 단계; 및

[0081] (e) 항원 제시 세포를 본원에 기재된 바와 같은 웹타이드(예컨대, 서열번호 13-17)와 접촉시켜, 주조직적합성 복합체(MHC) 문자 상에 웹타이드를 제시하는 항원 제시 세포를 생성하는 단계

[0082] 를 포함하는 방법에 관한 것이다.

[0083] 일부 구현예에서, 주조직적합성 복합체 문자는 MHC 클래스 I 문자이다.

[0084] 일부 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF) 및 인터루킨-4(IL-4)를 포함한다.

[0085] 일부 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 종양 괴사 인자- α (TNF- α)를 포함한다.

[0086] 일부 구현예에서, 골수 유래 세포는 다발성 골수종으로 진단된 대상체로부터 수득된다.

[0087] 일 양태에서, 본 개시내용은

- [0088] (a) BCMA 특이적 세포독성 T 세포를 본원에 기재된 바와 같은 방법에 의해 생성 및/또는 증식시키는 단계;
- [0089] (b) BCMA 특이적 세포독성 T 세포에서 BCMA에 대한 T 세포 항원 수용체 서열을 결정하는 단계
- [0090] 를 포함하는, BCMA에 대한 T 세포 항원 수용체 서열을 확인하는 방법에 관한 것이다.
- [0091] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 키메라 항원 수용체 T 세포(CAR-T 세포)를 포함하는 조성물을 인간 대상체에
게 투여하는 단계를 포함하는, BCMA 발현 질환 또는 암을 갖는 인간 대상체를 치료하는 방법으로서, CAR-T 세포
는 키메라 항원 수용체를 발현하고, 키메라 항원 수용체는 BCMA에 결합하는 것인 방법에 관한 것이다.
- [0092] 일부 구현예에서, 암은 BCMA를 발현한다. 일부 구현예에서, 인간 대상체는 다발성 골수종을 갖는다.
- [0093] 일부 구현예에서, 방법은 서열번호 13 또는 14 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하거나 그것으로 구성되는 웹
타이드를 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 경우에, 웹타이드는 1 내지 4개의 아미노산
치환을 갖는 것을 제외한 서열번호 13 또는 14에 제시된 서열을 갖는다. 일부 경우에, 치환은 위치 1, 2, 또는
9 중 하나 이상에 있다. 일부 경우에, 웹타이드는 9 내지 30개의 아미노산 길이이다. 일부 구현예에서, 방법은
BCMA 및 TACI 특이적 반응을 향상시키는 화합물, 예컨대 (1) 사이토카인 및 케모카인; (2) 항-PD1, 항-PDL1, 항-
CTLA4, 항-LAG3, 및 항-TIM3을 포함하는 체크포인트 억제제; (2) 항-OX40 및 항-GITR을 포함하는 면역 작용제,
(3) 레날리도미드, 포말리도미드, HDAC 억제제(예컨대, ACY241)를 포함하는 면역 조절제; (4) 보조제; (5)
백신, 세포 요법 및/또는 항체를 포함하는 BCMA 및 TACI 특이적 반응을 증가시키는 치료제; 및 (6) 질환에 대한
면역 반응을 광범위하게 커버하기 위해 BCMA 및 TACI 표적화 요법에 독립적인 접근법을 갖는 치료제로 이루어진
군으로부터 선택된 제제를 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0094] 일부 구현예에서, 방법은 면역 작용제를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 면역
작용제는 OX40 작용제 또는 GITR 작용제이다. 일부 구현예에서, 면역 작용제는 항-OX40 항체 또는 항-GITR 항체
이다.
- [0095] 일부 구현예에서, 방법은 체크포인트 억제제(예컨대, 항-LAG3 항체)를 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로
포함한다. 특정 구현예에서, 방법은 레날리도미드를 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부
구현예에서, 방법은 면역 작용제(예컨대, 항-OX40 항체, 항-GITR 항체), 체크포인트 억제제(예컨대, 항-LAG3 항
체), 또는 레날리도미드 중 하나 이상을 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0096] 일 양태에서, 본 개시내용은
- [0097] (a) TACI 특이적 세포독성 T 세포를 본원에 기재된 바와 같은 방법에 의해 생성 및/또는 증식시키는 단계;
- [0098] (b) TACI 특이적 세포독성 T 세포에서 TACI에 대한 T 세포 항원 수용체 서열을 결정하는 단계
- [0099] 를 포함하는, TACI에 대한 T 세포 항원 수용체 서열을 확인하는 방법에 관한 것이다.
- [0100] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 키메라 항원 수용체 T 세포(CAR-T 세포)를 포함하는 조성물을 인간 대상체에
게 투여하는 단계를 포함하는, TACI 발현 질환 또는 암을 갖는 인간 대상체를 치료하는 방법으로서, CAR-T 세포
는 키메라 항원 수용체를 발현하고, 키메라 항원 수용체는 TACI에 결합하는 것인 방법에 관한 것이다.
- [0101] 일부 구현예에서, 암은 TACI를 발현한다. 일부 구현예에서, 인간 대상체는 다발성 골수종을 갖는다.
- [0102] 일부 구현예에서, 방법은 서열번호 15-17 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하거나 그것으로 구성되는 웹타이
드를 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0103] 일부 구현예에서, 방법은 BCMA 및 TACI 특이적 반응을 향상시키는 화합물, 예컨대 (1) 사이토카인 및 케모카인;
(2) 항-PD1, 항-PDL1, 항-CTLA4, 항-LAG3, 및 항-TIM3을 포함하는 체크포인트 억제제; (2) 항-OX40 및 항-
GITR을 포함하는 면역 작용제, (3) 레날리도미드, 포말리도미드, HDAC 억제제(예컨대, ACY241)를 포함하는 면역
조절제; (4) 보조제; (5) 백신, 세포 요법 및/또는 항체를 포함하는 BCMA 및 TACI 특이적 반응을 증가시키는 치
료제; 및 (6) 질환에 대한 면역 반응을 광범위하게 커버하기 위해 BCMA 및 TACI 표적화 요법에 독립적인 접근법
을 갖는 치료제로 이루어진 군으로부터 선택되는 제제를 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0104] 일부 구현예에서, 방법은 면역 작용제를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 면역
작용제는 OX40 작용제 또는 GITR 작용제이다. 일부 구현예에서, 면역 작용제는 항-OX40 항체 또는 항-GITR 항체
이다.

- [0105] 일부 구현예에서, 방법은 체크포인트 억제제(예컨대, 항-LAG3 항체)를 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 방법은 레날리도미드를 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 면역 작용제(예컨대, 항-OX40 항체, 항-GITR 항체), 체크포인트 억제제(예컨대, 항-LAG3 항체), 또는 레날리도미드 중 하나 이상을 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0106] 일 양태에서, 본 개시내용은 나노입자, 및 서열번호 1-17 중 어느 하나와 적어도 60% 동일한 서열을 포함하는 웨타이드를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 구현예에서, 웨타이드는 서열번호 13의 서열을 포함하거나 구성된다. 특정 경우에, 웨타이드는 서열번호 13이지만 1 내지 4개의 아미노산 치환을 갖는 서열을 갖는다. 일부 경우에, 치환은 위치 1, 2, 또는 9 중 하나 이상에 있다. 웨타이드는 9 내지 30개의 아미노산 길이일 수 있다. 다른 구현예에서, 서열은 서열번호 16의 서열을 포함하거나 구성된다. 특정 경우에, 웨타이드는 서열번호 16이지만 1 내지 4개의 아미노산 치환을 갖는 서열을 갖는다. 일부 경우에, 치환은 위치 1, 2, 또는 9 중 하나 이상에 있다. 웨타이드는 9 내지 30개의 아미노산 길이일 수 있다.
- [0107] 일부 구현예에서, 웨타이드는 나노입자에 캡슐화된다. 일부 구현예에서, 나노입자는 리포솜이다.
- [0108] 일부 구현예에서, 나노입자는 생분해성 중합체를 포함한다. 일부 구현예에서, 나노입자는 폴리(D,L-락티드-co-글리콜리드)(PLGA)를 포함한다. 일부 구현예에서, 나노입자는 폴리(락틱-co-글리콜산)-폴리(에틸렌 글리콜)(PLGA-PEG) 공중합체를 포함한다.
- [0109] 일부 구현예에서, 아미노산 서열은 서열번호 13이다. 일부 구현예에서, 아미노산 서열은 서열번호 14이다. 일부 구현예에서, 아미노산 서열은 서열번호 15이다. 일부 구현예에서, 아미노산 서열은 서열번호 16이다. 일부 구현예에서, 아미노산 서열은 서열번호 17이다. 특정 경우에, 웨타이드는 서열번호 13 내지 17 중 어느 하나이지만 1 내지 4개의 아미노산 치환을 갖는 서열을 갖는다. 일부 경우에, 치환은 위치 1, 2, 또는 9 중 하나 이상에 있다. 웨타이드는 9 내지 30개의 아미노산 길이일 수 있다.
- [0110] 일부 구현예에서, 나노입자는 보조제를 포함한다. 일부 구현예에서, 나노입자는 톤 유사 수용체 작용제(예컨대, R848 또는 메틸화되지 않은 CpG 올리고데옥시뉴클레오타이드)를 포함한다.
- [0111] 일 양태에서, 본 개시내용은 암을 갖는 인간 대상체를 치료하는 방법에 관한 것이다. 방법은 본원에 기재된 바와 같은 조성물(예컨대, 나노입자)을 인간 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 대상체는 다발성 골수종을 갖는다.
- [0112] 일부 구현예에서, 암은 BCMA를 발현한다. 다른 구현예에서, 암은 TACI를 발현한다.
- [0113] 일부 구현예에서, 방법은 서열번호 15-17 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하거나 그것으로 구성되는 웨타이드를 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 웨타이드는 1 내지 4개의 아미노산 치환을 갖는 것을 제외한 서열번호 15-17 중 하나에 제시된 서열을 갖는다. 치환은 위치 1, 2, 또는 9 중 하나 이상에 있다. 웨타이드는 9 내지 30개의 아미노산 길이일 수 있다.
- [0114] 일부 구현예에서, 방법은 BCMA에 특이적인 CTL을 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 TACI에 특이적인 CTL을 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 경우에, CTL은 서열번호 13 또는 14 중 하나 이상을 포함하거나 그것으로 구성되는 웨타이드에 대한 노출에 의해 수득된 CTL이다. 다른 경우에, CTL은 서열번호 15-17 중 어느 하나 이상을 포함하거나 그것으로 구성되는 웨타이드에 대한 노출에 의해 수득된 CTL이다. 일부 경우에, CTL은 기억 CD8+ CTL이다. 일부 경우에, CTL은 기억 CD8+ CD45RO+ CTL이다. 일부 경우에, CTL은 효과기 CD8+ CTL이다. 일부 경우에, CTL은 활성화된 CD8+ CTL이다. 일부 경우에, CTL은 테트라머-양성 CD8+ CTL이다. 일부 경우에, CTL은 공동자극 분자 발현을 상향조절한 CD8+ CTL이다. 일부 경우에, CTL은 체크포인트 분자 발현을 상향조절한 CD8+ CTL이다. 일부 구현예에서, 방법은 면역 작용제를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 면역 작용제는 OX40 작용제 또는 GITR 작용제이다. 일부 구현예에서, 면역 작용제는 항-OX40 항체 또는 항-GITR 항체이다.
- [0115] 일부 구현예에서, 방법은 체크포인트 억제제(예컨대, 항-LAG3 항체)를 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 방법은 레날리도미드를 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 면역 작용제(예컨대, 항-OX40 항체, 항-GITR 항체), 체크포인트 억제제(예컨대, 항-LAG3 항체), 또는 레날리도미드 중 하나 이상을 인간 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0116] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 기술을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 방법 및 물질은 본 발명에서 사용하기 위

해 본원에 기재되며; 당업계에 공지된 다른 적합한 방법 및 물질이 또한 사용될 수 있다. 물질, 방법, 및 실시 예는 단지 예시적인 것이며 제한하고자 하는 것이 아니다. 본원에 언급된 모든 문헌, 특히 출원, 특히, 서열, 데이터베이스 항목, 및 기타 참고문헌은 그 전체가 참조로 포함된다. 충돌이 있는 경우, 정의를 포함하는 본 명세서가 우선할 것이다.

[0117] 본 발명의 다른 특징 및 장점은 다음의 상세한 설명 및 도면, 및 청구범위로부터 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0118] 도 1A-1I는 다발성 골수종 세포주 상에서의 BCMA 발현을 나타낸다.

도 2는 HLA-A2에 대한 천연 BCMA 웹타이드의 결합 친화성을 나타낸다.

도 3은 HLA-A2에 대한 천연 TACI 웹타이드의 결합 친화성을 나타낸다.

도 4는 HLA-A2에 대한 BCMA 웹타이드의 결합 친화성을 나타낸다: 천연 웹타이드 대 혜테로클리틱(heteroclitic) 웹타이드.

도 5는 HLA-A2에 대한 TACI 웹타이드의 결합 친화성을 나타낸다: 천연 웹타이드 대 혜테로클리틱 웹타이드.

도 6은 BCMA #4 및 #5 웹타이드의 HLA-A2 안정성을 나타낸다: 천연 웹타이드 대 혜테로클리틱 웹타이드(50 ug/ml).

도 7은 TACI #1, #3 및 #4 웹타이드의 HLA-A2 안정성을 나타낸다: 천연 웹타이드 대 혜테로클리틱 웹타이드(50 ug/ml).

도 8A-8C는 혜테로클리틱 BCMA #4 웹타이드 자극으로 증가된 CD8⁺ 세포독성 T 세포(CTL)를 나타낸다.

도 9A-9C는 혜테로클리틱 BCMA #4 웹타이드 자극으로 감소된 나이브(naive) CTL을 나타낸다.

도 10A-10C는 혜테로클리틱 BCMA #4 웹타이드 자극으로 증가된 기억 CTL을 나타낸다.

도 11A-11C는 혜테로클리틱 BCMA #4 웹타이드 자극을 갖는 CM 대 효과기 세포의 동역학을 나타낸다.

도 12는 혜테로클리틱 BCMA #4 웹타이드에 의한 기억 CD8+ CTL의 유도를 나타낸다.

도 13은 혜테로클리틱 TACI #3 웹타이드에 의한 기억 CD8+ CTL의 유도를 나타낸다.

도 14는 혜테로클리틱 BCMA #4 웹타이드-CTL(N=5)의 항종양 활성을 나타낸다.

도 15는 혜테로클리틱 TACI #3 웹타이드-CTL(n=4)의 항종양 활성을 나타낸다.

도 16은 혜테로클리틱 BCMA #4 웹타이드-CTL의 HLA-A2 특이적 중식을 나타낸다.

도 17은 α-OX40 또는 α-GITR로 처리된 BCMA 특이적 CTL의 중심 기억 세포에 의해 향상된 α-종양 활성을 나타낸다.

도 18A-18C는 혜테로클리틱 BCMA 웹타이드로 자극된 BCMA 웹타이드 특이적 CTL 상의 중요한 T 세포 마커의 상향 조절을 나타낸다.

도 19A-19F는 HLA-A2⁺ MM 세포주에 대한 혜테로클리틱 BCMA₇₂₋₈₀ 특이적 CTL에 의한 HLA-A2 제한된 및 항원 특이적 면역 반응을 나타낸다.

도 20A-20H는 환자의 MM 세포에 대한 혜테로클리틱 BCMA₅₄₋₆₂ 특이적 CTL 또는 혜테로클리틱 BCMA₇₂₋₈₀ 특이적 CTL의 항종양 활성을 나타낸다.

도 21A-21C. 뚜렷한 표현형 및 MM 세포에 대해 높은 수준의 항종양 활성을 나타내는 BCMA₇₂₋₈₀ 특이적 테트라미⁺ CTL.

도 22A-22E. 혜테로클리틱 BCMA₇₂₋₈₀ 웹타이드로 자극시 BCMA 특이적 CTL의 기억 CD8⁺ T 세포의 분화.

도 23A-23C. BCMA 특이적 기억 CTL에 의한 높은 항종양 활성(도 23A) 및 중심 기억 CTL에 의한 가장 높은 수준

의 항종양 활성(도 23B, 도 23C)의 특성화.

도 24A. 25 U266 세포와 함께 공동 배양된(7일) BCMA 웨타이드 특이적 CTL의 결과.

도 24B-24C. 항-LAG3 또는 항-OX40을 이용한 치료에서 헤테로클리티 BCMA72-80 CTL[1명의 HLA-A2+ 개체로부터 생성됨]의 기억 CD8+ T 세포의 향상된 항-골수종 활성.

도 24D. HLA-A2-제한된 방식으로 골수종 세포에 대한 항-OX40을 이용한 치료에서 헤테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀ CTL[HLA-A2⁺ 공여자 1, 공여자 2 또는 공여자 3으로부터 생성됨]의 향상된 항종양 활성.

도 25A-25B. 헤테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀으로 웨타이드 자극 후 CD3+CD8+ T 세포의 백분율.

도 26A-26B. 헤테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀으로 웨타이드 자극 후 CD3+CD4+ T 세포의 백분율.

도 27A-27C는 H929, MMIS, U266 및 OPM1 세포주 상에서는 높지만 유방암 세포주(MDA-MB231) 상에서는 높지 않은 BCMA 발현을 나타낸다.

도 28A-28B는 헤테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀으로 웨타이드 자극 후 PD-1 및 LAG-3을 발현하는 CD3+ CD8+ T 세포의 백분율을 나타낸다.

도 29A-29C는 헤테로클리티 TACI₁₅₄₋₁₆₂ 웨타이드로 자극시 나이브 세포의 기억 CTL로의 분화를 나타낸다.

도 30A-30F는 HLA-A2+ 다발성 골수종 세포(McCAR)에 대한 헤테로클리티 TACI₁₅₄₋₁₆₂ 특이적 CTL의 항종양 활성을 나타낸다.

도 31A-31E는 HLA-A2+ 다발성 골수종 세포에 대한 헤테로클리티 TACI₁₅₄₋₁₆₂ 특이적 CTL의 항종양 활성을 나타낸다.

도 31F는 HLA-A2+ 다발성 골수종 세포에 대한 헤테로클리티 TACI₁₅₄₋₁₆₂ 웨타이드에 의한 웨타이드 특이적 테트라미+ CTL 및 항종양 활성 및 증식의 유도를 나타낸다.

도 32A는 BCMA 웨타이드 로딩된 PLGA 나노입자의 형태학을 나타낸다.

도 32B는 BCMA 웨타이드 로딩된 리포솜 나노입자의 형태학을 나타낸다.

도 32C는 BCMA 웨타이드 정량화를 나타낸다.

도 33A는 시간 의존적 방식으로, 나노입자(PLGA, 리포솜)에 캡슐화시 수지상 세포 상의 BCMA 웨타이드의 더 높은 로딩 효율을 나타낸다.

도 33B는 시간 의존적 방식으로, 나노입자(PLGA, 리포솜)에 캡슐화시 수지상 세포 상의 BCMA 웨타이드-FITC의 더 높은 로딩 효율을 나타낸다.

도 33C는 수지상 세포에 의한 더 높은 PLGA/웨타이드 흡수를 나타낸다.

도 33D는 시간 의존적 방식으로, PLGA에 캡슐화시 수지상 세포에 의한 BCMA 웨타이드-FITC의 더 높은 흡수를 나타낸다.

도 33E는 시간 의존적 방식으로, PLGA에 캡슐화시 T2 세포에 의한 BCMA 웨타이드-FITC의 더 높은 흡수를 나타낸다.

도 34A는 HLA-A2-제한된 방식으로 MM 세포주에 대한 PLGA/BCMA 웨타이드로 생성된 BCMA-CTL에 의한 가장 높은 항-MM 활성을 나타낸다.

도 34B는 HLA-A2-제한된 방식으로 MM 세포주에 대한 PLGA/BCMA 웨타이드로 생성된 BCMA-CTL에 의한 가장 높은 IFN-γ 생산을 나타낸다.

도 34C는 HLA-A2-제한된 방식으로 MM 세포주에 대한 PLGA/BCMA 웨타이드로 생성된 BCMA-CTL에 의한 가장 높은 IL-2 생산을 나타낸다.

도 34D는 HLA-A2-제한된 방식으로 MM 세포주에 대한 PLGA/BCMA 웨타이드로 생성된 BCMA-CTL에 의한 가장 높은

TNF- α 생산을 나타낸다.

도 34E는 HLA-A2-제한된 방식으로 MM 세포주에 대한 PLGA/BCMA 웨타이드로 상이한 HLA-A2 $^{+}$ 개체(N=3)로부터 생성된 BCMA-CTL에 의한 가장 높은 항-MM 활성 및 Th1 유형 사이토카인(IFN- γ , IL-2, TNF- α) 생산을 나타낸다.

도 35A는 종양 세포의 부존재하에, BCMA 웨타이드 자체, PLGA/BCMA 웨타이드 또는 리포솜/BCMA 웨타이드로 생성된 BCMA 특이적 CTL의 기저 활성을 나타낸다.

도 35B는 HLA-A2 $^{+}$ 골수종 환자 #1로부터의 일차 HLA-A2 $^{+}$ CD138 $^{+}$ 종양 세포에 대한 반응으로 PLGA/BCMA 웨타이드로 생성된 BCMA-CTL에 의한 가장 높은 항-MM 활성을 나타낸다.

도 35C는 HLA-A2 $^{+}$ 골수종 환자 #2로부터의 일차 HLA-A2 $^{+}$ CD138 $^{+}$ 종양 세포에 대한 반응으로 PLGA/BCMA 웨타이드로 생성된 BCMA-CTL에 의한 가장 높은 항-MM 활성을 나타낸다.

도 35D는 HLA-A2-제한된 방식으로 골수종 환자의 종양 세포에 대한 PLGA/BCMA 웨타이드로 생성된 BCMA-CTL에 의한 가장 높은 항-MM 활성 및 Th1 유형 사이토카인(IFN- γ , IL-2, TNF- α) 생산을 나타낸다.

도 36A는 BCMA 웨타이드 자체보다 PLGA/BCMA 웨타이드로 생성된 BCMA-CTL에 의한 테트라미 $^{+}$ CD8 $^{+}$ T 세포 및 공동자극 분자 발현(CD28 $^{+}$) CD8 $^{+}$ T 세포의 더 높은 빈도를 나타낸다.

도 36B는 BCMA 웨타이드 자체보다 PLGA/BCMA 웨타이드로 생성된 BCMA-CTL에 의한 웨타이드 특이적 CD8 $^{+}$ T 세포 증식의 더 높은 증가를 나타낸다.

도 36C는 BCMA 웨타이드 자체보다 PLGA/BCMA 웨타이드로 생성된 BCMA-CTL에 의한 웨타이드 특이적 IFN- γ 생산의 더 높은 증가를 나타낸다.

도 37A는 BCMA 웨타이드 자체보다 PLGA/BCMA 웨타이드로 생성된 BCMA-CTL에 의한 골수종 특이적 CD8 $^{+}$ T 세포 증식의 가장 높은 유도를 나타낸다.

도 37B는 BCMA 웨타이드 자체보다 PLGA/BCMA 웨타이드로 반복 자극시, BCMA-CTL[대표적 결과]에서 CD45R0+ 기억/CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$ T 세포 서브세트의 더 높은 증가를 나타낸다.

도 37C는 BCMA 웨타이드 자체보다 PLGA/BCMA 웨타이드로 반복 자극시, BCMA-CTL[N=3 결과]에서 CD45R0+ 기억/CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$ T 세포 서브세트의 더 높은 증가를 나타낸다.

도 37D는 BCMA 웨타이드 자체보다 PLGA/BCMA 웨타이드로 반복 자극시, BCMA-CTL에서 중심 기억/CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$ T 세포 서브세트의 더 높은 유도 및 유지를 나타낸다.

도 38A는 BCMA 웨타이드 자체보다 PLGA/BCMA 웨타이드로 생성된 BCMA-CTL에 의한, HLA-A2-제한된 방식으로, 중심 기억 및 효과기 기억 CTL 및 이들의 골수종 세포에 대한 항-MM 활성의 더 높은 유도를 나타낸다.

도 38B는 BCMA 웨타이드 자체보다 PLGA/BCMA 웨타이드로 생성된 BCMA-CTL에 의한, HLA-A2-제한된 방식으로, 중심 기억 및 효과기 기억 CTL 및 이들의 골수종 세포에 대한 IFN- γ 생산의 더 높은 유도를 나타낸다.

도 38C는 BCMA 웨타이드 자체보다 PLGA/BCMA 웨타이드로 생성된 BCMA-CTL에 의한, HLA-A2-제한된 방식으로, 중심 기억 및 효과기 기억 CTL 및 이들의 골수종 세포에 대한 항-MM 활성 및 IFN- γ , IL-2, TNF- α 생산의 더 높은 유도를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0119] B-세포 성숙 항원(BCMA) 및 막횡단 활성화제 및 CAML 상호작용화제(TACI)는 예컨대, 다발성 골수종 및 다른 혈액학적 악성 종양을 포함하는 많은 암에 특이적인 중요한 항원이다. 본 개시내용은 적어도, 부분적으로, 예컨대, 다발성 골수종(MM) 특이적 T 세포 면역 반응을 생성하는데 사용될 수 있는, BCMA 및 TACI 항원으로부터 유래된 HLA-A2 특이적 면역원성 웨타이드의 확인에 기초한다. 따라서, 본 개시내용은, 예컨대, 대상체에서 종양 세포에 대한 면역 반응을 유도하거나(예컨대, 세포독성 T 세포(CTL) 반응을 자극하거나), 또는 사이토카인 또는 항체의 생산을 자극하는데 사용될 수 있는, BCMA 유래 웨타이드 및 TACI 유래 웨타이드(및 이의 약학적 조성물)에 관한 것이다. 웨타이드는 면역 반응을 유도하는 방법, 항체를 생산하는 방법, 항종양 면역 반응에 관여하

는 사이토카인을 생산하는 방법, 및 암(예컨대, 다발성 골수종)을 치료하는 방법과 같은 다양한 적용에 사용될 수 있다. 웹타이드는 또한 MHC 분자 다양체 조성물에 포함될 수 있고, 예컨대, 세포의 집단에서 T 세포(예컨대, 항원 특이적 T 세포)를 겸출하는데 사용될 수 있다.

[0120] 본 개시내용은 또한 다발성 골수종, 이들의 전악성 질환 또는 다른 암을 포함하는 암 환자, 또는 BCMA 및 TACI 항원을 고유하게 발현하고/하거나 과발현하는 임의의 질환에서, 본원에 기재된 단일 또는 조합 요법으로서, 웹타이드 기반 백신접종, 웹타이드를 포함하는 백신의 다양한 접근법(나노입자 기반 및 바이러스 기반 포함), 조작된 기술(CAR-TCR 요법 기반 및 유도 만능 줄기 세포 기반 포함)로 생체외에서 생성된 BCMA 특이적 T 세포 또는 TACI 특이적 T 세포 및 항원 특이적 T 세포의 입양 전달 또는 웹타이드-펄스된 수지상 세포의 주입을 포함하는 다양한 유형의 치료적 적용을 위한 정보를 제공한다.

BCMA 유래 웹타이드 및 TACI 유래 웹타이드

[0122] 종양 괴사 인자 수용체 수퍼페밀리 구성원 17(TNFRSF17)로도 알려진 B-세포 성숙 항원(BCMA)(NM_001192.2 → NP_001183.2)은 인간에서 TNFRSF17 유전자에 의해 코딩되는 단백질이다. BCMA는 B-세포 활성화 인자(BAFF)를 인식하는 TNF 수용체 수퍼페밀리의 세포 표면 수용체이다. BCMA는 성숙한 B 립프구에서 발현된다. 이 수용체는 종양 괴사 인자(리간드) 수퍼페밀리, 구성원 13b(TNFSF13B/TALL-1/BAFF)에 특이적으로 결합하고, NF-kappaB 및 MAPK8/JNK 활성화를 유발하는 것으로 나타났다. 이 수용체는 또한 다양한 TRAF 패밀리 구성원에 결합하여, 세포 생존 및 증식을 위한 신호를 전달할 수 있다. BCMA는 종종 다양한 암 세포에서, 예컨대, 백혈병, 립프종, 및 다발성 골수종을 갖는 대상체에서 과발현된다.

[0123] 종양 괴사 인자 수용체 수퍼페밀리 구성원 13B(TNFRSF13B)로도 알려진 막횡단 활성화제 및 CAML 상호작용화제 (TACI)(NM_012452.2 → NP_036584.1)는 인간에서 TNFRSF13B 유전자에 의해 코딩되는 단백질이다. TACI는 B 세포의 표면에서 주로 발견되는 TNF 수용체 수퍼페밀리의 막횡단 단백질이다. TACI는 3개의 리간드 APRIL, BAFF 및 CAML을 인식한다. TACI는 또한 다양한 암 세포에서, 예컨대, 백혈병, 립프종, 및 다발성 골수종을 갖는 대상체에서 과발현된다.

[0124] 인간 BCMA 및 인간 TACI의 아미노산 서열이 하기에 나타나 있다.

인간 BCMA (NP_001183.2; 서열번호: 18)

```
1 mlqmagqcsq neyfdsllha cipcqrlcss ntppltcqry cnasvtnsvk gtnailwtcl
61 glsliislav fv1mf1lrki nseplkdefk ntgsgllgma nidleksrtg deiilprgle
121 ytveectced cikskpkvds dhcfplpame egatilvttk tndycks1pa alsateieks
181 isar
```

[0125] 인간 TACI (NP_036584.1; 서열번호: 19)

```
1 ms glgrsrrg grsr vdqeer fpqglwtgva mrs cpeeqyw dp11gtcm sc kt i cnhqsqr
61 tcaafcrs1s crkeqgkfyd h1lrdcis ca sicgqhpkqc ayfcenklrs pvn1ppelrr
121 qrsgevenns dns gryqgle hrg seaspal pglklsadqv alvyst1glc lcav1ccf1v
181 avacf1kkrg dpcscqprs r prqspakssq dhameagspv stspewvtc sfcfpecrap
241 tq esavt pgt pdptc agrwg chrt tvlp cphipdsg1g ivcvpaqegg pga
```

[0126] 본 개시내용은 BCMA 또는 TACI 항원으로부터 유래된 웹타이드(예컨대, 나이브 웹타이드) 및 웹타이드(나이브 웹타이드)로부터 유래된 헤테로클리티크 웹타이드를 제공한다. 이들 웹타이드는 BCMA 또는 TACI 웹타이드의 임의의 부분 또는 단편일 수 있다. 일부 구현예에서, 이들 웹타이드는 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개 초과의 아미노산 잔기의 길이를 갖는다. 일부 구현예에서, 이들 웹타이드는 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개 미만의 아미노산 잔기의 길이를 갖는다. 일부 구현예에서, 이들 웹타이드는 8 내지 12개의 아미노산 잔기, 8 내지 15개의 아미노산 잔기, 9 내지 13개의 아미노산 잔기, 9 내지 12개의 아미노산 잔기, 또는 11 내지 30개의 아미노산 잔기의 길이를 갖는다. 일부 구현예에서, 웹타이드의 길이는 9, 10,

11, 또는 12개의 아미노산 잔기(예컨대, 9개의 아미노산 잔기)이다.

[0128] 일부 구현예에서, BCMA 또는 TACI로부터 유래된 웨타이드는 다음을 포함한다:

[0129] #1. BCMA₆₄₋₇₂(LIISLAVFV) (서열번호 1)

[0130] #2. BCMA₆₉₋₇₇(AVFVLMLFL) (서열번호 2)

[0131] #3. BCMA₉₋₁₇(SQNEYFDLS) (서열번호 3)

[0132] #4. BCMA₇₂₋₈₀(VLMFLLRKI) (서열번호 4)

[0133] #5. BCMA₅₄₋₆₂(AILWTCLGL) (서열번호 5)

[0134] #6. BCMA₁₁₄₋₁₂₂(ILPRGLEYT) (서열번호 6)

[0135] #1. TACI₁₇₈₋₁₈₆(FLVAVACFL) (서열번호 7)

[0136] #2. TACI₁₇₄₋₁₈₂(VLCCFLVAV) (서열번호 8)

[0137] #3. TACI₁₅₄₋₁₆₂(KLSADQVAL) (서열번호 9)

[0138] #4. TACI₁₆₆₋₁₇₄(TLGLCLCAV) (서열번호 10)

[0139] #5. TACI₁₆₁₋₁₆₉(ALVYSTLGL) (서열번호 11)

[0140] #6. TACI₁₅₅₋₁₆₃(LSADQVALV) (서열번호 12)

[0141] 이를 웨타이드는 주조직적합성 복합체(MHC) 분자에 결합할 수 있다. MHC는 면역 시스템, 자가면역, 및 생식에서 중요한 역할을 하는 거대한 유전자 패밀리이다. MHC 분자는 그들의 표면 상에 자기 및 비자기(항원성)를 포함하는 웨타이드를 T-세포에 제시하는 역할을 담당한다. MHC 클래스 I 분자는 짧은 웨타이드에 결합하며, 그의 N- 및 C-말단은 웨타이드 결합 홈의 말단에 위치한 포켓에 고정된다. 많은 이를 웨타이드는 길이 9이지만, 더 긴 웨타이드가 이들의 중심 부분의 팽출(bulging)에 의해 수용되어, 예컨대, 길이 8 내지 15의 웨타이드 결합을 초래할 수 있다. 클래스 II 단백질에 결합하는 웨타이드는 크기가 제한되지 않고 다양할 수 있으며, 예컨대, 11 내지 30개 아미노산 길이일 수 있다. MHC 클래스 II 분자 내의 웨타이드 결합 홈은 양 말단이 개방되어 상대적으로 더 긴 길이를 갖는 웨타이드가 결합할 수 있다. "코어" 9개 잔기 길이의 세그먼트가 웨타이드의 인식에 가장 기여하지만, 측집(flanking) 영역 역시 클래스 II 대립유전자에 대한 웨타이드의 특이성에 중요하다.

[0142] 따라서, 본 개시내용은 또한 본 개시내용에 기재된 임의의 서열을 포함하거나, 구성되거나, 본질적으로 구성되는 서열을 갖는 웨타이드를 제공한다. 일부 구현예에서, 웨타이드는 MHC 클래스 I 분자 및/또는 MHC 클래스 II 분자에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, MHC 클래스 I 분자는 HLA-A(예컨대, HLA-A2, HLA-A24, HLA-A1, HLA-A3, HLA-A30, HLA-A26, HLA-A68, 또는 HLA-A11), HLA-B 또는 HLA-C이다.

[0143] MHC 분자(예컨대, MHC 클래스 I 분자, HLA-A2)에 결합하는 웨타이드의 안정성을 증가시키고, 면역원성을 증가시키며/거나, 면역 반응을 증가시키기 위해, 웨타이드에 다양한 변형이 이뤄질 수 있다. 예를 들어, 면역원성을 증가시키기 위해, 아미노산 잔기는, 예컨대, 본원에 기재된 임의의 웨타이드(예컨대, 서열번호 1-17)의 위치 3, 4, 5, 6, 7, 및/또는 8에서, T 세포 수용체(TCR) 상호작용 부위의 변경에 의해 TCR에 대한 친화성을 향상시킴으로써, 변형될 수 있다.

[0144] 이염기성(dibasic) 아미노산 잔기(예컨대, Arg-Arg, Arg-Lys, Lys-Arg, 또는 Lys-Lys)가 또한 웨타이드의 N- 및 C-말단에 부가될 수 있다. 일부 구현예에서, 아미노산은 앵커 잔기("고정된 앵커 에피토프")를 변형시킴으로써 주조직적합성 복합체(MHC) 결합을 향상시키거나 T 세포 수용체(TCR) 상호작용 부위(예컨대, 서열번호 1-17의 위치 1, 2, 및/또는 9)를 변형시킴으로써 TCR에 대한 결합을 향상시키기 위해 치환된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 에피토프는 임의의 위치에서(예컨대, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개의 위치에서) 변형될 수 있다. 웨타이드는 또한 이들을 T 세포 자극에 대해 "슈퍼항원(superantigen)" 또는 "슈퍼작용제(superagonist)"로 만드는 내부 돌연변이를 포함할 수 있다. 슈퍼항원 웨타이드는 문헌[Pinilla et al, Biotechniques, 13(6): 901-5, 1992; Borras et al, J. Immunol. Methods, 267(1): 79-97, 2002; 미국 공개 제2004/0072246호; 및

Lustgarten et al., J. Immun. 176: 1796-1805, 2006]에 기재된 바와 같이 위치 스캐닝 합성 웨타이드 조합 라이브러리(PS-CSL)로 T 세포를 스크리닝함으로써 생성될 수 있다. 일부 구현예에서, 슈퍼작용제 웨타이드는 웨타이드를 보다 강력한 면역원으로 만드는 1, 2, 3, 또는 4개의 아미노산 치환을 갖는 본원에 기재된 바와 같은 웨타이드이다. 일부 구현예에서, BCMA 또는 TACI로부터 유래된 웨타이드의 제1 아미노산 잔기는 티로신으로 바뀔 수 있다.

[0145] BCMA 또는 TACI로부터 유래된 일부 헤테로클리틱 웨타이드는 하기를 포함한다:

[0146] 헤테로클리틱 #4. BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI)(서열번호 13)

[0147] 헤테로클리틱 #5. BCMA₅₄₋₆₂(YILWTCLGL)(서열번호 14)

[0148] 헤테로클리틱 #1. TACI₁₇₈₋₁₈₆(YLVAVACFL)(서열번호 15)

[0149] 헤테로클리틱 #3. TACI₁₅₄₋₁₆₂(YLSADQVAL)(서열번호 16)

[0150] 헤테로클리틱 #4. TACI₁₆₆₋₁₇₄(YLGCLCAV)(서열번호 17)

[0151] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "헤테로클리틱(heteroclitic)"(예컨대, 헤테로클리틱 웨타이드)은 야생형 서열 또는 원래의 서열을 갖는 상응하는 웨타이드보다 더 면역원성인 웨타이드를 생산하기 위해 야생형 또는 원래의 서열로부터 하나 이상의 아미노산 잔기가 변형된 웨타이드의 한 형태이다.

[0152] 본 개시내용은 본원에 기재된 바와 같은 웨타이드(예컨대, 서열번호 1-17)의 변이체를 추가로 제공한다. 본원에 기재된 웨타이드의 변이체는 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 2개 이하, 1개 이하의 아미노산 치환(예컨대, 5, 4, 3, 2, 또는 1개의 아미노산 치환)을 갖는 웨타이드의 형태를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 웨타이드의 변이체는 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 또는 적어도 4개의 치환을 갖는 웨타이드의 형태를 포함할 수 있다.

[0153] 일부 구현예에서, 서열번호 1-17의 위치 1, 2, 및/또는 9에 있는 아미노산은 HLA 결합 친화성에 기여하며, 따라서 웨타이드 특이적 T 세포 반응에 영향을 미치지 않으면서 치환될 수 있다. 따라서, 웨타이드의 면역원성은 서열번호 1-17의 1, 2 및/또는 9의 위치에서의 치환으로 여전히 유지될 수 있다. 일부 구현예에서, 서열번호 1-17(예컨대, 서열번호 13 또는 서열번호 16)의 위치 1에서의 아미노산이 치환된다. 일부 구현예에서, 서열번호 1-17(예컨대, 서열번호 13 또는 서열번호 16)의 위치 2에서의 아미노산이 치환된다. 일부 구현예에서, 서열번호 1-17(예컨대, 서열번호 13 또는 서열번호 16)의 위치 9에서의 아미노산이 치환된다. 일부 구현예에서, 서열번호 1-17의 위치 1 및 2, 위치 1 및 9, 위치 2 및 9, 또는 위치 1, 2, 및 9에서의 아미노산이 치환된다. 일부 구현예에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 바와 같은 서열(예컨대, 본원에 기재된 바와 같은 치환을 갖거나 갖지 않는 서열번호 1-17 중 하나)을 포함하고 최대 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40개의 아미노산을 갖는 웨타이드를 제공한다. 따라서, 일부 구현예에서, 웨타이드의 길이는 9 내지 20개의 아미노산, 9 내지 30개의 아미노산, 또는 9 내지 40개의 아미노산일 수 있다.

[0154] 치환은 임의의 유형의 아미노산 치환일 수 있으며, 예컨대, 보존적 또는 비보존적일 수 있다. 보존적 치환은 하기 군 내에서의 치환을 포함한다: (1) 발린, 알라닌 및 글리신; 류신, 발린, 및 이소류신; (2) 아스파트산 및 글루탐산; (3) 아스파라긴 및 글루타민; (4) 세린, 시스테인, 및 트레오닌; 리신 및 아르기닌; 및 (5) 페닐알라닌 및 티로신. 비극성 소수성 아미노산은 알라닌, 류신, 이소류신, 발린, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판 및 메티오닌을 포함한다. 극성 중성 아미노산은 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민을 포함한다. 양으로 하전된(염기성) 아미노산은 아르기닌, 리신, 및 히스티딘을 포함한다. 음으로 하전된(산성) 아미노산은 아스파트산 및 글루탐산을 포함한다. 상기 언급된 극성, 염기성 또는 산성 군의 하나의 구성원을 동일한 군의 또 다른 구성원에 의해 치환하는 것은 보존적 치환으로 간주될 수 있다. 대조적으로, 비보존적 치환은 하나의 아미노산을 상이한 특징을 갖는 또 다른 아미노산으로 치환하는 것, 예컨대, 아미노산을 또 다른 군 내의 또 다른 아미노산으로 치환하는 것이다.

[0155] 일부 구현예에서, 임의의 웨타이드의 위치 3, 4, 5, 6, 7, 및 8 중 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 또는 모든 5개)은 치환되지 않는다. 일부 구현예에서, 웨타이드의 위치 3, 4, 5, 6, 7, 및 8 중 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 또는 모든 5개)은 서열번호 1-17로부터 선택된 서열과 동일하다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 위치는 웨타이드의 N-말단부터 시작하는 위치를 지칭한다. 예를 들어, 웨타이드의 위치 3은 웨타이드의 N-말단부터 시

작하는 3번째 아미노산 잔기를 지칭한다. 일부 구현예에서, 서열번호 1-17의 위치 3, 4, 5, 6, 7, 및 8에 있는 잔기는 웹타이드의 인식에 가장 기여한다.

[0156] 본 개시내용은 본 개시내용에 기재된 바와 같은 임의의 서열, 예컨대, 서열번호 1-17, 서열번호 18 및 19, 및 서열번호 1-17을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열과 적어도 50%(예컨대, 60%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) 동일한 서열을 포함하거나, 구성되거나, 또는 본질적으로 구성되는 아미노산 서열 또는 뉴클레오타이드 서열을 추가로 제공한다.

[0157] 2개의 아미노산 서열, 또는 2개의 핵산 서열의 퍼센트 동일성을 결정하기 위해, 서열은 최적 비교 목적을 위해 정렬된다(예컨대, 최적 정렬을 위해 제1 및 제2 아미노산 또는 핵산 서열 중 하나 또는 둘 모두에 갭(gap)이 도입될 수 있고, 비교 목적을 위해 비상동 서열은 무시될 수 있음). 비교 목적을 위해 정렬된 참조 서열의 길이는 참조 서열의 길이의 적어도 80%이고, 일부 구현예에서 적어도 90%, 95%, 또는 100%이다. 이후, 상응하는 아미노산 위치 또는 뉴클레오타이드 위치에 있는 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드들이 비교된다. 제1 서열 내의 위치가 제2 서열 내의 상응하는 위치로서 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드에 의해 점유되면, 분자는 그 위치에서 동일하다(본원에 사용된 바와 같이 아미노산 또는 핵산 "동일성"은 아미노산 또는 핵산 "상동성"과 동등하다). 2개의 서열 간의 백분율 동일성은, 2개의 서열의 최적 정렬을 위해 도입될 필요가 있는 갭의 개수와 각 갭의 길이를 고려하여, 서열들에 의해 공유된 동일한 위치의 개수의 함수이다. 본 개시내용의 목적을 위해, 서열 비교 및 2개의 서열 사이의 퍼센트 동일성의 결정은 12의 갭 페널티(gap penalty), 4의 갭 확장 페널티(gap extend penalty), 및 5의 프레임시프트 갭 페널티(frameshift gap penalty)를 갖는 Blossum 62 스코어링 매트릭스를 사용하여 달성될 수 있다.

[0158] 또한, 제1 아미노산 서열; 및 제1 아미노산 서열과 이종인 제2 아미노산 서열을 포함하거나 그것으로 구성되는 웹타이드가 본원에 제공된다. 제1 아미노산 서열에 "이종인" 아미노산 서열, 또는 용어 "이종 아미노산 서열"은 제1 아미노산 서열에 측접하는 아미노산 서열로서, 측접 서열은 자연에 존재하지 않는다(예컨대, 측접 서열은 자연에서 제1 아미노산 서열에 연결되지 않음). 제1 아미노산 서열은 본원에 기재된 바와 같은 임의의 서열, 예컨대, 서열번호 1-17, 또는 서열번호 1-17로부터 유래된 임의의 서열(예컨대, 서열번호 1-17의 4개 이하의 치환을 갖는 서열)을 포함하거나, 본질적으로 구성되거나, 또는 구성될 수 있다. 이종인 측접 아미노산 서열을 갖는 웹타이드는 일반적으로 서열번호 1-17의 면역원성 웹타이드의 세포에서 생성에 부정적인 영향을 미치지 않는다(그리고 영향을 미치지 않도록 선택됨). 세포 기구는 웹타이드 내의 임의의 추가적인 서열을 제거하여 서열번호 1-17의 면역원성 웹타이드를 생성할 것으로 예상되며, 이 웹타이드는 클래스 I 또는 클래스 II MHC 분자에 의해 제시되어 BCMA 또는 TACI 발현 암 세포에 대한 면역 반응을 자극한다.

[0159] 이종 측접 서열은, 예를 들어, 재조합 단백질(예컨대, FLAG, 폴리히스티딘(예컨대, 헥사히스티딘), 헤마글루터닌(HA), 글루타티온-S-트랜스퍼라제(GST), 또는 말토스 결합 단백질(MBP))의 정체에 사용되는 서열일 수 있다. 이종 서열은 또한 진단 또는 검출 마커로서 유용한 단백질, 예를 들어, 루시퍼라제, 녹색 형광 단백질(GFP), 또는 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제(CAT)일 수 있다. 일부 구현예에서, 웹타이드는 면역글로불린 분자의 전부 또는 일부(예컨대, 면역글로불린 중쇄 불변 영역의 전부 또는 일부)를 함유할 수 있다.

[0160] 일부 구현예에서, 이종 서열은, 예컨대, 면역 반응을 유발하는데 유용한(예컨대, 항체 생성을 위한) 치료적 또는 면역 자극 폴리웹타이드 서열(예컨대, T 헬퍼 에피토프(예컨대, PADRE 에피토프 또는 파상풍 특소이드 유니버설 T 헬퍼 세포 에피토프) 또는 사이토카인 또는 케모카인의 전부 또는 일부) 및/또는 담체(예컨대, KLH)를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 웹타이드는 하나 이상의 링커 웹타이드 서열을 함유할 수 있다. 웹타이드는 또한 표적화 폴리웹타이드를 함유할 수 있다. 이종 서열은 길이가 다양할 수 있고, 일부 경우에 이종 아미노산 서열이 부착된 제1 아미노산 서열보다 더 긴 서열일 수 있다. 제1 아미노산 서열 및 제1 아미노산 서열과 이종인 제2 아미노산 서열을 함유하는 웹타이드는 자연발생 단백질과 서열이 상응하지 않는 것으로 이해된다.

[0161] 본원에 사용된 바와 같이, 표적화 폴리웹타이드는 이들이 부착된 모이어티(또는 모이어티들)(예컨대, 제1 아미노산 서열)를 특정 조직(예컨대, 립프절) 또는 세포(예컨대, 항원 제시 세포 또는 다른 면역 세포)에 표적화하는 폴리웹타이드이거나, 또는 시험관내에 있는 경우, 특이적 단리된 분자 또는 분자 복합체이다. 표적화 폴리웹타이드는, 예컨대, 항체(면역글로불린) 또는 이의 항원 결합 단편 또는 세포 표면 수용체에 대한 리간드일 수 있다. 항체(또는 이의 항원 결합 단편)는, 예컨대, 단클론 항체, 다클론 항체, 인간화 항체, 완전 인간 항체, 단일 사슬 항체, 키메라 항체, 또는 항체의 Fab 단편, F(ab')2 단편, Fab' 단편, Fv 단편, 또는 scFv 단편일 수 있다. Fc 영역(항원 결합 영역을 갖거나 갖지 않음)을 포함하거나 Fc 영역인 항체 단편은 또한 시약을 Fc 수용

체 발현 세포(예컨대, 항원 제시 세포, 예컨대 수지양 수지상 세포(interdigitating dendritic cell), 대식세포, 단핵구, 또는 B 세포)에 표적화하는데 사용될 수 있다. 세포 표면 수용체에 대한 리간드는, 예컨대, 케모카인, 사이토카인(예컨대, 인터루킨 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16), 또는 사멸 수용체 리간드(예컨대, FasL 또는 TNF α)일 수 있다.

[0162] 일부 구현예에서, 이종 서열은, 예컨대, 웨타이드를 세포 또는 세포의 특정 구획(예컨대, 소포체 또는 펄지체)에 전달하는 것을 돋는 "수송 서열"을 포함할 수 있다. 수송 서열은, 예컨대, 막 전위 서열, 트랜스포탄(transportan) 서열, 안테나페디아(antennapedia) 서열, 사이클릭 인테그린 결합 웨타이드, 및 Tat-매개 웨타이드, 또는 이의 변형된 형태를 포함할 수 있다.

[0163] 링커 웨타이드는 제1 아미노산 서열을 하나 이상의 이종 아미노산 서열에 연결할 수 있다. 예를 들어, 링커 웨타이드는 제1 아미노산 서열을 제2 아미노산 서열에 연결할 수 있다. 특정 구현예에서, 링커 웨타이드는 서열번호 1-17 중 어느 하나의 웨타이드를 서열번호 1-17로부터 선택된 제2 웨타이드와 연결할 수 있다. 링커 웨타이드는, 예컨대, 적어도 4개 내지 6개의 아미노산이 글리신인 아미노산의 스트레치(stretch)를 함유하거나 함유할 수 있다(예컨대, Mancebo et al. (1990) MoI. Cell. Biol. 10: 2492-2502 참고). 링커는 또한 6개 이상(예컨대, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12개 이상)의 히스티딘 잔기를 함유하거나 함유할 수 있다. 링커 웨타이드는 적어도 1개(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개 이상)의 프로테아제 절단 부위(들)를 함유하거나 함유할 수 있다. 프로테아제 부위는, 예컨대, 트립신, 키모트립신, 또는 인자 Xa 절단 부위일 수 있다. 이러한 프로테아제 부위는, 예컨대, 제1 아미노산 서열을 이종 서열과 분리하는데 유용할 수 있다. 예를 들어, 폴리히스티딘 서열(예컨대, 정제를 위함)에 연결된 제1 아미노산 서열을 함유하는 웨타이드를 트립신 프로테아제 절단 부위에 의해 발현 및 정제한 후에, 폴리히스티딘 서열은 웨타이드를 트립신과 접촉시킴으로써 제1 아미노산 서열로부터 제거될 수 있다.

[0164] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 아미노-말단 및/또는 카르복시-말단에 이종이거나 천연 단백질에 존재하는 최대 200개(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 또는 200 개)의 아미노산을 갖는 웨타이드(예컨대, 서열번호 1-17 중 어느 하나)를 제공한다.

[0165] 일부 구현예에서, 웨타이드는 본원에 기재된 바와 같은 임의의 서열(예컨대, 서열번호 1-17 중 어느 하나)과 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 서열은 본원에 기재된 바와 같은 임의의 서열(예컨대, 서열번호 1-17 중 어느 하나)로부터 선택된 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개 또는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 아미노산을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 서열은 서열번호 13이다. 일부 구현예에서, 서열은 서열번호 14이다. 일부 구현예에서, 서열은 서열번호 16이다.

[0166] 일부 구현예에서, 웨타이드는 추가적인 서열을 가질 수 있다. 추가적인 서열은 웨타이드의 아미노-말단 또는 카르복시-말단에 위치할 수 있다. 일부 구현예에서, 추가적인 서열은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 또는 200개의 아미노산을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 추가적인 서열은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 또는 200개의 아미노산을 가질 수 있다.

[0167] 특정 경우에, 본 개시내용은 서열번호 13-17로부터 선택된 2개 이상의 웨타이드의 임의의 조합을 포함한다.

[0168] 본원에 기재된 웨타이드는 주조직적합성 복합체(MHC) 분자(예컨대, MHC 클래스 I 분자 또는 MHC 클래스 II 분자)에 결합할 수 있다. 인간에서, MHC는 HLA 복합체로 알려져 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "HLA 슈퍼유형 또는 패밀리"는 공유된 웨타이드 결합 특이성에 기초하여 그룹화된 HLA 분자의 세트를 지칭한다. 특정 아미노산 모티프를 갖는 웨타이드에 대해 약간 유사한 결합 친화성을 공유하는 HLA 클래스 I 분자는 HLA 슈퍼유형으로 분류된다. 용어 HLA 수퍼패밀리, HLA 슈퍼유형 패밀리, HLA 패밀리, 및 HLA xx-유사 분자(여기서, xx는 특정 HLA 유형을 나타냄)는 동의어이다. HLA 클래스 I 분자의 유형은, 예컨대, HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, HLA-A24,

HLA-B7, HLA-B27, HLA-B44, HLA-B58, 또는 HLA-B62를 포함한다. 이러한 HLA 분자는 미국 특허 제7,026,443호에 상세히 기재되어 있으며, 이의 전체 개시내용은 그 전체가 참조로 포함되어 있다.

[0169] 웨타이드는 높은 친화성 또는 중간 친화성을 갖는 MHC 분자에 결합할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, HLA 클래스 I 분자에 대한 웨타이드의 "높은 친화성" 결합은 50 미만(예컨대, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 또는 0.05 미만) nM의 해리 상수(KD)를 갖는 결합으로서 정의된다. "중간 친화성"은 약 50 nM 내지 약 500 nM(예컨대, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 115, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 또는 500 nM)의 KD를 갖는 HLA 클래스 I 분자에 대한 웨타이드의 결합이다. HLA 클래스 II 분자에 대한 웨타이드의 "높은 친화성"은 100 미만(예컨대, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 또는 0.05 미만) nM의 KD를 갖는 결합으로 정의된다. HLA 클래스 II 분자에 대한 웨타이드의 "중간 친화성"은 약 100 내지 약 1000 nM(예컨대, 100, 110, 115, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 또는 1000 nM)의 KD를 갖는 결합이다. 웨타이드 및 MHC 분자의 결합 친화성을 결정하기 위한 방법은 당업계에 공지되어 있다. 적합한 방법은 또한, 예컨대, 미국 특허 제7,026,443호에 기재되어 있다.

[0170] 본원에 기재된 웨타이드는 또한, MHC 분자와 결합하여, T 세포 상의 항원 특이적 T 세포 수용체에 의해 인식될 수 있다. MHC 분자와 결합된 웨타이드가 T 세포 상의 T 세포 수용체에 의해 인식되는지 여부를 결정하기 위해 다양한 적합한 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 정상 대상체의 말초 혈액 림프구(PBL)를 시험관내에서 몇 주 동안 항원 제시 세포의 존재하에 시험 웨타이드와 함께 배양할 수 있다. 이 시간 동안 웨타이드에 특이적인 T 세포가 활성화되고, 이는 예컨대, 증식 분석(H-티미딘 분석의 카르복시플루오레세인 석신이미딜 에스테르(CFSE) 분석), 한계 회석 분석, 세포독성 분석(예컨대, 칼세인-방출 분석), 또는 사이토카인-(예컨대, IFN γ), 림포카인-, 또는 51Cr-방출 분석을 사용하여 검출될 수 있다(예컨대, Wentworth, P. A. et al., Mol. Immunol. 32: 603, 1995; Celis, E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 : 2105, 1994; Tsai, V. et al., J. Immunol. 158: 1796, 1997; Kawashima, I. et al., Human Immunol. 59: 1, 1998 참고, 이들 각각의 본 개시내용은 그 전체가 참조로 포함되어 있음). 적합한 생체내 방법은 HLA 형질전환 마우스를 면역화시키는 것을 포함하며, 보조제 중의 웨타이드를 HLA 형질전환 마우스에 투여하고, 면역화 몇 주 후에, 비장세포를 꺼내어 대략 1주 동안 시험 웨타이드의 존재하에 시험관내에서 배양하고, 웨타이드 특이적 T 세포를, 예컨대, 51Cr-방출 분석을 사용하여 검출한다(예컨대, Wentworth, P. A. et al., J. Immunol. 26: 97, 1996; Wentworth, P. A. et al., Int. Immunol. 8: 651, 1996; Alexander, J. et al., J. Immunol. 159: 4753, 1997 참고, 이들 각각의 본 개시내용은 그 전체가 참조로 포함됨).

[0171] 또한, 항원 특이적 T 세포의 직접 정량화는 검출가능하게 표지된 MHC 복합체, 예컨대 본원에 기재된 MHC 분자 다양체 조성을 중 어느 것 또는 HLA-I 테트라머로 T 세포를 염색함으로써 달성될 수 있다(예컨대, Altman, J. D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10330, 1993 및 Altman, J. D. et al., Science 274: 94, 1996에 기재된 바와 같음, 이들 각각의 본 개시내용은 그 전체가 참조로 포함됨).

[0172] 일부 구현예에서, 웨타이드는 웨타이드의 하나 이상의 특성을 조절하기 위해(예컨대, 증가시키거나 감소시키기 위해) 추가로 변형될 수 있다(예컨대, 웨타이드의 아미노산을 치환될 수 있음). 예를 들어, 본원에 기재된 하나의 웨타이드의 하나 이상(예컨대, 2개, 3개, 또는 4개)의 아미노산은 MHC 분자에 대한 웨타이드의 친화성을 증가시키기 위해 치환될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 하나의 웨타이드의 아미노산(예컨대, 웨타이드의 아미노산 잔기와 접촉하는 T 세포 수용체)은 T 세포 수용체 및 웨타이드 사이의 결합 상호작용을 향상시키기 위해 변형될 수 있다(MHC 분자의 맥락에서). 이러한 변형된 웨타이드는 종종 "변경된 웨타이드 리간드"로 지칭된다(예컨대, Kalergis et al. (2000) J Immunol. 165(1): 280; Conlon et al. (2002) Science 1801; 및 국제 공개 제WO제02070003호, 이들 각각의 본 개시내용은 그 전체가 참조로 포함되어 있음). 웨타이드를 변형시키는 적합한 방법뿐만 아니라 변형의 효과를 결정하기 위한 적합한 방법은, 예컨대, 문헌[Collins et al. (Immunological Reviews(1998) 163: 151-160, 이의 개시내용이 그 전체가 참조로 본원에 포함된)]에 기재되어 있다.

[0173] 본 개시내용은 본원에 기재된 바와 같은 임의의 웨타이드를 포함하는 조성을 추가로 제공한다. 또한, 종양에

대한 요법을 회피하는 종양의 능력에 대응하기 위해, 조성물은 면역 반응을 유도하는 다양한 특이적 웨타이드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 동일한 단백질로부터의 둘 이상의 에피토프가 조성물에 포함될 수 있고, 예컨대, 조성물은 BCMA 또는 TACI로부터 유래된 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 또는 적어도 7개의 상이한 웨타이드를 함유할 수 있다. 또한, BCMA로부터 유래된 적어도 1개(예컨대, 적어도 2개, 3개, 4개, 5개)의 웨타이드 및 TACI로부터 유래된 적어도 1개(예컨대, 적어도 2개, 3개, 4개, 5개)의 웨타이드의 조합 또는 혼합물이 사용될 수도 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 본 개시내용은 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개의 BCMA 유래 웨타이드(예컨대, 서열번호 1-6 및 13-14로부터 선택된 적어도 2개의 BCMA 유래 웨타이드)를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 개시내용은 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개의 TACI 유래 웨타이드(예컨대, 서열번호 7-12 및 16-17로부터 선택된 적어도 2개의 TACI 유래 웨타이드)를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 개시내용은 적어도 1개(예컨대, 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개)의 BCMA 유래 웨타이드 및 적어도 1개(예컨대, 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개)의 TACI 유래 웨타이드를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0174] 일부 구현예에서, 조성물은 면역 자극제(예컨대, 사이토카인 또는 T 헬퍼 에피토프)를 추가로 포함한다. T 헬퍼 에피토프는 PADRE 서열 또는 유니버설 파상풍 톡소이드 T 헬퍼(TT Th) 에피토프일 수 있다. 일부 구현예에서, 조성물은 보조제, 예컨대 프로인트 완전 보조제, 프로인트 불완전 보조제, 명반, 툴 수용체에 대한 리간드, QS21, RIBI, 또는 유사한 면역자극제를 포함한다. 보조제는 또한, 예컨대, 콜레라 독소(CT), 이콜라이 이열성 독소(LT), 돌연변이성 CT(MCT)(Yamamoto et al. (1997) J. Exp. Med. 185: 1203-1210) 및 돌연변이성 이콜라이 이열성 독소(MLT)(Di Tommaso et al. (1996) Infect. Immunity 64: 974-979)를 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 툴 유사 수용체-3 리간드(예컨대, 폴리 ICLC), 인터페론 알파(IFN α), 인터페론 감마(IFN γ), 또는 과립 구-대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF)를 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 면역 작용제, 예컨대, 항-OX40 항체 또는 항-GITR 항체를 추가로 포함한다.

[0175] 일부 구현예에서, 조성물은 화학치료제(예컨대, 레날리도미드)를 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 히스톤 탈아세틸라제 6(HDAC6) 억제제(예컨대, ACY241; Niesvizky, et al. "ACY-241, a novel, HDAC6 selective inhibitor: synergy with immunomodulatory (IMiD®) drugs in multiple myeloma (MM) cells and early clinical results (ACE-MM-200 Study)." (2015): 3040-3040; Bae et al. "Histone deacetylase (HDAC) inhibitor ACY241 enhances anti-tumor activities of antigen-specific central memory cytotoxic T lymphocytes against multiple myeloma and solid tumors." Leukemia (2018): 1)를 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 체크포인트 억제제(예컨대, 항-LAG3 항체) 또는 면역 작용제(예컨대, 항-OX40)를 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 PD-1, CTLA-4, LAG-3, BTLA, PD-L1, CD27, CD28, CD40, CD47, 4-1BB(CD137), CD154, TIGIT, TIM-3, GITR(CD357), OX40, CD20, EGFR, 또는 CD319에 특이적으로 결합하는 항체(예컨대, 인간 항체)를 포함한다.

[0176] 일부 구현예에서, 조성물은 서열번호 13, 서열번호 14, 또는 서열번호 16에 제시된 서열을 포함하는 웨타이드, 및 레날리도미드를 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 서열번호 13, 서열번호 14, 또는 서열번호 16에 제시된 서열을 포함하는 웨타이드, 및 항-OX40 항체, 항-LAG3 항체, 및/또는 항-GITR 항체를 포함한다.

핵산 및 웨타이드를 생산하는 방법

[0177] 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 임의의 웨타이드 중 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14개)을 코딩하는 핵산 서열(뿐만 아니라 핵산 서열을 함유하는 핵산 벡터), 및 이를 생산하는 방법을 특징으로 한다. 이러한 방법은 선택적으로, 본원에 기재된 임의의 웨타이드 중 하나 이상을 코딩하는 핵산 서열을 함유하는 핵산 벡터를 포함하는 세포(또는 세포의 군)를 제공하는 단계로서, 핵산 서열은 발현 제어 서열에 작동가능하게 연결된 것인 단계, 및 웨타이드의 발현을 허용하는 조건 하에 세포를 배양하는 단계를 포함할 수 있다. 방법은 또한 세포로부터, 또는 세포가 배양된 배지로부터 하나 이상의 웨타이드를 단리하는 단계를 포함할 수 있다. 따라서, 일 양태에서, 본 개시내용은 예컨대, 암 백신을 포함하는, RNA 기반 치료제 및 DNA 기반 치료제를 제공한다. 일부 구현예에서, 암 백신은 본원에 기재된 바와 같은 폴리뉴클레오타이드(예컨대, 서열번호 1-17을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드)를 가질 수 있다. 일부 경우에, 폴리뉴클레오타이드는 1 내지 4개의 아미노산 치환을 갖는 것을 제외한 서열번호 1-17 중 하나와 동일한 웨타이드를 코딩한다. 일부 경우에, 치환은 위치 1, 2, 또는 9 중 하나 이상에 있다. 일부 경우에, 웨타이드는 2 내지 30개의 아미노산 길이이다. 일부 경우에, 핵산은 조절 서열(예컨대, 시작 코돈, 정지, 코돈 폴리A 테일)을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, RNA/DNA 암 백신은 중합체성 또는 리포솜성 나노캐리어(예컨대, 나노입자) 내에

서 제제화될 수 있다.

[0179] 본원에 기재된 하나 이상의 웨타이드의 재조합 발현을 위한 핵산 서열 및 벡터(예컨대, 발현 벡터)를 제작하기 위한 적합한 방법은 당업자에게 널리 알려져 있으며, 예컨대, 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual Second Edition vol. 1, 2 and 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York, USA, Nov. 1989]에 기재되어 있고, 이의 개시내용은 그 전체가 참조로 본원에 포함되어 있다. 핵산 및 벡터는, 예컨대, 박테리아, 효모, 또는 포유동물 세포를 포함하는 광범위한 숙주 세포에서 웨타이드를 발현하는데 사용될 수 있다. 핵산 및 벡터는 또한, 예컨대, 하기에 기재된 바와 같은 생체내 및 생체외 방법에서 사용될 수 있다. 웨타이드 코딩 서열은 프로모터, 조절 요소, 또는 발현 제어 서열에 작동가능하게 연결될 수 있다. 프로모터 및/또는 인핸서 요소는 핵산에 의해 코딩된 웨타이드의 발현을 지시할 수 있다. 인핸서는 시간, 위치, 및 수준의 측면에서 발현 특이성을 제공한다. 프로모터와 달리, 인핸서는 프로모터가 존재하면 전사 개시 부위로부터 가변적인 거리에 위치할 때 기능할 수 있다. 인핸서는 또한 전사 개시 부위의 하류에 또는 관련 유전자의 엑손에 위치할 수 있다. 코딩 서열을 프로모터의 제어 하에 두기 위해, 웨타이드의 번역 리딩 프레임의 번역 개시 부위를 프로모터의 하류(3')의 1 내지 약 50 뉴클레오타이드 사이에 위치시킬 필요가 있다. 관심있는 프로모터는, 비제한적으로, 사이토메갈로바이러스 hCMV 즉시 초기 유전자, SV40 아데노바이러스의 초기 또는 후기 프로모터, lac 시스템, trp 시스템, TAC 시스템, TRC 시스템, 파아지 A의 주요 조작자 및 프로모터 영역, fd 코트 단백질의 제어 영역, 3 포스포글리세레이트 키나제에 대한 프로모터, 산 포스파타제의 프로모터, 및 효모 α 교배 인자의 프로모터, 아데노바이러스 EIb 최소 프로모터, 또는 티미딘 키나제 최소 프로모터를 포함한다.

[0180] 웨타이드 코딩 서열, 또는 웨타이드 코딩 서열을 함유하는 벡터는 신호 웨타이드를 코딩하는 리더 서열을 함유할 수 있다. 리더 서열은 본원에 기재된 하나 이상의 웨타이드를 코딩하는 서열의 5' 말단에 있을 수 있다. 신호 웨타이드는 주어진 웨타이드의 즉시 N-말단에 있을 수 있거나, 또는 리더 서열이 웨타이드를 코딩하는 핵산 서열과 인프레임이면 하나 이상(예컨대, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 15 또는 20개)의 아미노산에 의해 그것으로부터 분리될 수 있다. 일반적으로 분비 전에 웨타이드로부터 절단되는 신호 웨타이드(물론 신호 웨타이드가 막횡단 단백질의 삽입을 지시하지 않는 한)는 그것이 부착되는 웨타이드를 번역 동안 숙주 세포 소포체(ER)의 내강 내로 유도한 다음, 웨타이드는 분비 소포를 통해 숙주 세포의 환경 내로 분비된다. 유용한 신호 웨타이드는, 예컨대, 사이토카인 또는 성장 인자의 천연 리더 서열, KDEL(Lys-Asp-Glu-Leu), 또는, 예컨대, 그 전체가 본원에 참조로 포함된 미국 특허 제5,827,516호에 기재된 임의의 신호 서열을 포함한다.

[0181] 일부 구현예에서, 웨타이드 코딩 서열의 5' 말단은 비천연 ATG "출발 서열"을 포함할 수 있다. 즉, 예컨대, ATG 서열은 웨타이드가 적절히 전사 및 번역되도록 웨타이드를 코딩하는 핵산에 부가될 수 있다. 리더 서열은 일반적으로 ATG 출발 서열을 포함하지만, 그렇지 않은 구현예에서, ATG 서열은 리더 서열을 코딩하는 핵산의 5' 말단에 부가될 수 있다.

[0182] 웨타이드 코딩 서열 및 발현 벡터를 제작하기 위한 적합한 방법은 당업자에게 널리 알려져 있으며, 예컨대, 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual Second Edition vol. 1, 2 and 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York, USA, Nov. 1989]에 기재되어 있으며; 이의 개시내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0183] 재조합 벡터는 다양한 방법을 사용하여 세포 내로 도입될 수 있고, 상기 방법은, 적어도 부분적으로, 핵산이 도입되는 세포의 유형에 좌우될 수 있다. 예를 들어, 박테리아 세포는 전기천공 또는 열 충격과 같은 방법을 사용하여 형질전환될 수 있다. 효모 세포를 형질감염시키기 위한 방법은, 예컨대, 스페로플라스트(spheroplast) 기술 또는 전체-세포 염화리튬 효모 형질전환 방법을 포함한다(예컨대, 미국 특허 제4,929,555호; Hinnen et al.(1978) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75: 1929; Ito et al.(1983) J. Bacteriol. 153: 163; 미국 특허 제4,879,231호; 및 Sreekrishna et al.(1987) Gene 59: 115 참고, 이들 각각의 개시내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨). 동물 세포의 형질감염은, 예를 들어, 인산칼슘, 전기천공, 열 충격, 리포솜, 또는 형질감염시약, 예컨대 FUGENE® 또는 LIPOFECT AMINE®을 사용하거나, 또는 네이키드(naked) 핵산 벡터를 용액 중의 세포와 접촉시킴으로써 벡터를 세포에 도입하는 것을 특징으로 할 수 있다(예컨대, 상기 Sambrook et al 참고).

[0184] 본원에 기재된 웨타이드의 소규모 또는 대규모 생산에 사용될 수 있는 발현 시스템은, 비제한적으로, 재조합 박테리오파아지 DNA, 플라스미드 DNA, 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환된 박테리아와 같은 미생물; 재조합 효모 발현 벡터로 형질전환된 진균(예컨대, 효모(예를 들어, 사카로마이세스 및 피카아)); 재조합 바이러스 발현 벡터로 감염된 곤충 세포 시스템(예를 들어, 배콜로바이러스); 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들어, 콜

리플라워 모자이크 바이러스(CaMV) 및 담배 모자이크 바이러스(TMV))로 감염되거나 재조합 플라스미드 발현 벡터(예를 들어, Ti 플라스미드)로 형질전환된 식물 세포 시스템; 또는 포유동물 세포의 계놈으로부터 유래된 프로모터(예를 들어, 메탈로티오네인(metallothionein) 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예를 들어, 아데노바이러스 후기 프로모터, CMV 프로모터, SV40 프로모터, 또는 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터)를 함유하는 재조합 발현 작제물을 갖는 포유동물 세포 시스템(예를 들어, COS, CHO, BHK, 293, VERO, HeLa, MDCK, WI38, 및 NIH 3T3 세포)을 포함한다. 또한, 플라스미드 벡터로 형질감염되거나 또는 바이러스 벡터(예컨대, 특히 헤르페스 바이러스, 레트로바이러스, 백시니아 바이러스, 약독화 백시니아 바이러스, 카나리아 수두 바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-관련 바이러스와 같은 바이러스 벡터)로 감염된 포유동물로부터 직접 수득된 일차 또는 이차 세포가 숙주 세포로서 유용하다.

[0185] 본원에 기재된 임의의 웨타이드의 발현 후, 웨타이드는 표준 기술을 사용하여 배양 세포로부터, 또는 세포가 배양된 배지로부터 단리될 수 있다. 단백질을 단리하는 방법은 당업계에 알려져 있으며, 예컨대, 액체 크로마토그래피(예컨대, HPLC), 친화성 크로마토그래피(예컨대, 금속 키크레이션 또는 면역친화성 크로마토그래피), 이온 교환 크로마토그래피, 소수성-상호작용 크로마토그래피, 침전, 또는 차동 가용화(differential solubilization)를 포함한다.

[0186] 더 작은 웨타이드(예컨대, 200개 미만(예컨대, 175개 미만, 150개 미만, 125개 미만, 100개 미만, 90개 미만, 80개 미만, 70개 미만, 또는 60개 미만)의 아미노산을 갖는 웨타이드)는 FMOC 고상 합성과 같은 표준 화학적 방식에 의해 화학적으로 합성될 수 있다.

[0187] 본원에 기재된 웨타이드는 단리될 수 있으나 단리될 필요는 없다. 본원에 기재된 임의의 웨타이드에 적용되는 용어 "단리된"은 자연적으로 이를 동반하는 구성요소(예컨대, 단백질 또는 다른 자연발생 생물학적 또는 유기 분자)로부터 분리되거나 정제된 웨타이드, 이의 단편(또는 조성물의 경우, 거대분자 복합체)을 지칭한다. 재조합 분자(예컨대, 재조합 웨타이드)는 항상 "단리"될 것으로 이해된다. 전형적으로, 웨타이드(또는 단편 또는 거대분자 복합체)는 제제에서 동일한 유형의 총 분자의 적어도 60 중량%, 70 중량%, 80 중량%, 또는 90 중량%, 예컨대, 샘플에서 동일한 유형의 총 분자의 적어도 60%, 70%, 80%, 또는 90%를 구성할 때 단리된다. 예를 들어, 본원에 기재된 웨타이드는 침전물 또는 샘플에서 총 단백질의 적어도 60 중량%, 70 중량%, 80 중량%, 또는 90 중량%를 구성할 때 단리된 것으로 간주된다. 일부 구현예에서, 제제 중의 분자는 제제에서 동일한 유형의 총 분자의 적어도 75 중량%, 적어도 90 중량%, 또는 적어도 99 중량%로 구성된다.

[0188] 유사하게, 본원에 기재된 웨타이드 코딩 서열 또는 웨타이드 코딩 서열을 함유하는 벡터는 또한 단리될 수 있다. 본원에 기재된 임의의 웨타이드 코딩 서열 또는 벡터에 적용되는 용어 "단리된"은 자연적으로 이를 동반하는 구성요소(예컨대, 핵산, 단백질, 또는 다른 자연발생 생물학적 또는 유기 분자)로부터 분리된거나 정제된 웨타이드 코딩 서열 또는 벡터, 이의 단편을 지칭한다. 재조합 분자(예컨대, 재조합 벡터 또는 웨타이드 코딩 서열)는 항상 "단리"될 것으로 이해된다. 전형적으로, 웨타이드 코딩 서열 또는 벡터(또는 이의 단편)는 제제에서 동일한 유형의 총 분자의 적어도 60 중량%, 70 중량%, 80 중량%, 또는 90 중량%, 예컨대, 샘플에서 동일한 유형의 총 분자의 적어도 60%, 70%, 80%, 또는 90%를 구성할 때 단리된다. 예를 들어, 본원에 기재된 웨타이드 코딩 서열 또는 벡터는 제제 또는 샘플에서 총 핵산의 적어도 60 중량%, 70 중량%, 80 중량%, 또는 90 중량%를 구성할 때 단리된 것으로 간주된다. 일부 구현예에서, 제제 중의 분자는 제제에서 동일한 유형의 총 분자의 적어도 75 중량%, 적어도 90 중량%, 또는 적어도 99 중량%로 구성된다.

[0189] 일부 구현예에서, 단리된 웨타이드, 웨타이드 코딩 서열, 또는 벡터는 분자의 활성(예컨대, MHC 클래스 I 분자 또는 MHC 클래스 II 분자와 같은 MHC 분자에 결합하는 웨타이드의 능력, 또는 세포에서 웨타이드의 발현을 지원하는 벡터의 능력)을 유지시키는 적절한 조건하에 동결, 동결건조, 또는 고정 및 저장될 수 있다.

웨타이드의 가공

[0191] 본원에 기재된 임의의 웨타이드의 발현 또는 합성 후에, 웨타이드는 추가로 가공될 수 있다. 추가 가공은 웨타이드에 대한 화학적 또는 효소적 변형을 포함할 수 있거나, 웨타이드가 변형되는 경우, 가공은 기존 변형의 효소적 또는 화학적 변경, 또는 둘 모두를 포함할 수 있다. 웨타이드의 추가적인 가공은 이종 아미노산 서열, 예컨대, 비제한적으로, 본원에 기재된 임의의 이종 아미노산 서열의 부가(공유 또는 비공유 연결)를 포함할 수 있다. 효소적 처리는 웨타이드를 변형시키는 조건하에 웨타이드를, 예컨대, 하나 이상의 프로테아제, 포스파타제, 또는 키나제와 접촉시키는 것을 포함할 수 있다. 효소적 처리는 웨타이드를 글리코실화하거나 웨타이드의 글리코실화를 변형시킬 수 있는 하나 이상의 효소(예컨대, 올리고사카릴트랜스퍼라제 또는 만노시다제)와 웨타이드를 접촉시키는 것을 포함할 수 있다.

- [0192] 가공은 웨타이드에, 예컨대 검출가능한 표지를 부가하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 웨타이드는 효소(예컨대, 호스래디쉬 페옥시다제, 알칼리 포스파타제, β -갈락토시다제, 또는 아세틸콜린에스테라제), 형광 물질(예컨대, 웜밸리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민, 플루오레세인, 단실 클로라이드, 알로피코시아닌(APC), 또는 피코에리트린), 발광 물질(예컨대, ^{32}P , ^{33}P , ^{125}I , 또는 ^{35}S)으로 검출가능하게 표지될 수 있다.
- [0193] 가공은 또한 웨타이드를 중합체(예컨대, 폴리에틸렌 글리콜 모이아티와 같은 폴리알킬렌 글리콜 모이아티), 또는 나노입자에 결합시키는 것을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 중합체는 N 말단에 있는 웨타이드 상의 부위에서 폴리웨타이드에 결합된다. 일부 구현예에서, 웨타이드는 중합체가 접합될 수 있는 내부 중합체 접합 부위를 제공하는 하나 이상의 내부 아미노산 삽입을 함유할 수 있다.
- [0194] **면역 반응을 유도하는 방법**
- [0195] 본 개시내용은 또한 대상체에서 면역 반응을 유도하기 위한 다양한 방법(예컨대, 웨타이드 기반 백신접종, 나노입자 기반 면역요법, APC 기반 면역요법, T 세포 기반 면역요법, CAR T 세포 기반 면역요법, 또는 유도 만능 줄기 세포 접근법)을 제공한다. 대상체에서 면역 반응을 유도하는 방법은, 예컨대, 본원에 기재된 하나 이상의 조성물(예컨대, 본원에 기재된 임의의 웨타이드(또는 웨타이드를 코딩하는 핵산 서열을 함유하는 발현 벡터)(또는 본원에 기재된 하나 이상의 웨타이드(또는 벡터)를 함유하는 임의의 약학적 조성물))을 대상체에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 조성물은 백신으로서 사용된다.
- [0196] 본원에 기재된 임의의 웨타이드는 본원에 기재된 하나 이상의 웨타이드를 코딩하는 핵산 발현 시스템을 사용하여 면역 반응을 자극하는데 사용될 수 있다. 즉, 대상체에서 면역 반응을 유도하는 방법은 본원에 기재된 하나 이상의 웨타이드를 코딩하는 핵산 서열을 함유하는 발현 벡터(또는 발현 벡터를 함유하는 약학적 조성물)를 대상체에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 면역 반응은 CD8+ T 세포, CD4+ T 세포, 세포독성 T 림프구(CTL), TH1 반응, TH2 반응, 또는 두 유형의 반응의 조합일 수 있다.
- [0197] 상기 방법 중 어느 것은 또한, 예컨대, 대상체에서 암(예컨대, 형질 세포 장애, 예컨대 다발성 골수종, 또는 BCMA 및/또는 TACI를 발현하는 임의의 다른 암)을 치료 또는 예방하는 방법일 수 있다. 용어 "예방하다," "예방하는," 또는 "예방"은, 특정 상태에 대한 특정 치료와 관련하여 본원에서 사용될 때, 치료된 대상체가 임상적으로 관찰가능한 수준의 상태를 전혀 발생시키지 않거나(예컨대, 대상체가 상태의 하나 이상의 증상을 나타내지 않거나, 암의 경우, 대상체가 검출가능한 수준의 암을 발생시키지 않거나), 또는 치료가 없는 것보다 대상체에서 상태가 더 느리게 및/또는 더 적은 정도로(예컨대, 대상체에서 더 적은 증상 또는 더 적은 수의 암 세포) 발생하는 것을 의미한다. 이를 용어는 대상체가 상태의 어떤 측면도 경험하지 않은 상황에만 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 상태의 특정 징후(진행된 암)를 생성할 것으로 예상되었던 암의 초기 진단(예컨대, 대상체의 샘플에서 적은 암 세포의 검출) 중에 치료가 제공되어 대상체가 예상보다 더 적고/거나 더 경미한 상태의 증상을 경험하는 경우, 치료가 상태를 "예방"하였다라고 할 것이다. 치료는 대상체가 암의 경미한 명백한 증상만을 나타낼 때 암(예컨대, 다발성 골수종과 같은 형질 세포 장애)을 "예방"할 수 있다. "예방"은 이렇게 치료된 대상체에 의해 단 하나의 암 세포도 발생하지 않아야 한다는 것을 암시하지는 않는다.
- [0198] 일반적으로, 대상체에게 전달되는 웨타이드는 약학적으로 허용가능한 담체(예컨대, 생리학적 식염수)에 혼탁되어, 경구로, 직장으로, 또는 비경구로 투여될 것이고, 예컨대, 정맥내로, 피하로, 근육내로, 척수강내로, 복강내로, 직장내로, 질내로, 비강내로, 위내로, 기관내로, 또는 폐내로 주사될 것이다.
- [0199] 투여는 약학적 조성물의 볼루스(bolus)의 주기적 주사에 의할 수 있거나 또는 외부(예컨대, IV 백) 또는 내부(예컨대, 생분해성 이식물, 생물인공 장기, 또는 이식된 시약 생산 세포의 콜로니) 저장소(reservoir)로부터 정맥내 또는 복강내 투여에 의해 중단되지 않거나 연속적일 수 있다. 예컨대, 미국 특허 제4,407,957호, 제5,798,113호 및 제5,800,828호를 참고하며, 각각은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.
- [0200] 치료 핵산의 통상적이고 약학적으로 허용가능한 투여 경로는 근육내, 피하, 피내, 경피, 정맥내, 직장(예컨대, 관장체, 좌체), 경구, 위내, 비강내 및 효과적인 흡입 경로의 다른 경로, 및 다른 비경구 투여 경로를 포함하나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다. 투여 경로는 원하는 경우 조합될 수 있고, 핵산 분자 및/또는 면역 반응에 대한 원하는 효과에 따라 조정될 수 있다. 핵산을 대상체에 투여하는 방법은 다양한 공지된 기술, 예컨대 벡터 매개 유전자 전달(예컨대, 바이러스 감염/형질감염, 또는 다양한 다른 단백질 기반 또는 지질 기반 유전자 전달 복합체) 뿐만 아니라 "네이키드" 폴리뉴클레오타이드의 전달을 촉진하는 기술(예컨대 전기천공, "

유전자 총" 전달, 및 폴리뉴클레오타이드를 대상체 또는 대상체의 세포에 도입하는데 사용되는 다양한 다른 기술)을 포함할 수 있다.

[0201] 일반적으로, 필요한 웨타이드 또는 핵산의 투여량은 투여 경로의 선택; 제제의 성질; 대상체의 병의 성질 또는 중증도; 대상체의 면역 상태; 대상체의 크기, 체중, 표면적, 연령, 및 성별; 투여되는 다른 약물; 및 주치의의 판단에 좌우된다.

[0202] 면역 반응을 유도하기 위한 웨타이드의 적합한 투여량은 대상체의 kg당 0.000001 내지 10 mg의 시약 또는 항원성/면역원성 조성물의 범위이다. 다양한 시약 및 다양한 투여 경로의 상이한 효율에 비추어 볼 때, 필요한 투여량의 광범위한 변화가 예상된다. 예를 들어, 비강 또는 직장 투여는 정맥내 주사에 의한 투여보다 더 높은 투여량이 필요할 수 있다. 이들 투여량 수준의 변화는 당업계에서 널리 이해되는 바와 같은 최적화를 위한 표준 실험 일상을 사용하여 조정될 수 있다. 투여는 단일 또는 다중(예컨대, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 20, 50, 100, 150배 이상)일 수 있다. 예를 들어, 웨타이드는 초기 면역화로서 투여된 다음, 이후에 부스터 면역화로서 1회 이상 투여될 수 있다.

[0203] 본원에 기재된 방법의 맨락에서, 대상체에게 투여되는 핵산의 용량은 시간이 지나면서 대상체에서 유익한 치료적 반응을 일으키기나 증상을 완화하기에 충분해야 한다. 사용된 투여량은, 예컨대, 대상체 또는 달성될 임상 목표에 따라 달라질 것이지만, 적합한 투여량 범위는 단일 투여량으로 담체 ml당 최대 약 1 µg, 약 1,000 µg, 약 5,000 µg, 약 10,000 µg, 약 25,000 µg 또는 약 50,000 µg의 핵산을 제공하는 범위이다.

[0204] 치료 효능(예컨대, 대상체에서 면역 반응을 유도하는 하나 이상의 웨타이드 또는 웨타이드를 코딩하는 핵산의 효능)을 최적화하기 위해, 웨타이드 또는 핵산을 함유하는 조성물은 먼저 상이한 투여 요법으로 투여될 수 있다. 단위 용량 및 요법은, 예컨대, 포유동물의 종, 그의 면역 상태, 포유동물의 체중을 포함하는 인자에 좌우된다. 약학적 조성물(예컨대, 본원에 기재된 하나 이상의 웨타이드 또는 하나 이상의 웨타이드를 코딩하는 하나 이상의 핵산 서열을 함유하는 약학적 조성물)의 투여 빈도는 의료 전문가(예컨대, 의사 또는 간호사)의 기술 및 임상 판단에 속한다. 전형적으로, 투여 요법은 최적 투여 파라미터를 확립할 수 있는 임상 시험에 의해 확립된다. 하지만, 전문가는 대상체의 연령, 건강, 체중, 성별 및 의학적 상태에 따라 이러한 투여 요법을 변화시킬 수 있다.

[0205] 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 대상체에게 적어도 2회(예컨대, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 또는 20회 이상) 투여될 수 있다. 예를 들어, 약학적 조성물은 대상체에게 3개월 동안 매월 1회; 1개월 동안 매주 1회; 3년 동안 매년 1회, 5년 동안 매년 1회; 5년마다 1회; 10년마다 1회; 또는 평생 동안 3년마다 1회 투여될 수 있다.

[0206] 본원에 정의된 바와 같이, 웨타이드 또는 웨타이드를 코딩하는 핵산의 "치료적 유효량"은 치료된 대상체에서 면역 반응을 생성할 수 있는 웨타이드 또는 핵산의 양이다. 웨타이드의 치료적 유효량(즉, 유효 투여량)은 대상체 또는 샘플 중량 킬로그램당 밀리그램, 마이크로그램, 나노그램, 또는 피코그램 양(예컨대, 킬로그램당 약 1 나노그램 내지 킬로그램당 약 500 밀리그램, 킬로그램당 약 100 마이크로그램 내지 킬로그램당 약 5 밀리그램, 또는 킬로그램당 약 1 마이크로그램 내지 킬로그램당 약 50 마이크로그램)의 제제를 포함한다. 핵산의 치료적 유효량은 또한 대상체 또는 샘플 중량 킬로그램당 마이크로그램, 나노그램, 또는 피코그램 양(예컨대, 킬로그램당 약 1 나노그램 내지 킬로그램당 약 500 마이크로그램, 킬로그램당 약 1 마이크로그램 내지 킬로그램당 약 500 마이크로그램, 킬로그램당 약 100 마이크로그램 내지 킬로그램당 약 500 마이크로그램, 또는 킬로그램당 약 1 마이크로그램 내지 킬로그램당 약 50 마이크로그램)의 제제를 포함한다.

[0207] 본원에 정의된 바와 같이, 웨타이드 또는 웨타이드를 코딩하는 핵산의 "예방적 유효량"은 치료된 대상체에서 암 세포(예컨대, 다발성 골수종)에 대한 면역 반응을 생성할 수 있는 웨타이드 또는 핵산의 양이며, 상기 면역 반응은 대상체에서 암의 발생을 예방할 수 있거나 대상체가 암을 발생시키거나 계속 발생시킬 가능성을 실질적으로 감소시킬 수 있다. 웨타이드의 예방적 유효량(즉, 효과적인 투여량)은 대상체 또는 샘플 중량 킬로그램당 밀리그램, 마이크로그램, 나노그램, 또는 피코그램 양(예컨대, 킬로그램당 약 1 나노그램 내지 킬로그램당 약 500 마이크로그램, 킬로그램당 약 1 마이크로그램 내지 킬로그램당 약 500 밀리그램, 킬로그램당 약 100 마이크로그램 내지 킬로그램당 약 5 밀리그램, 또는 킬로그램당 약 1 마이크로그램 내지 킬로그램당 약 50 마이크로그램)의 제제를 포함한다. 핵산의 예방적 유효량은 또한 대상체 또는 샘플 중량 킬로그램당 마이크로그램, 나노그램, 또는 피코그램 양(예컨대, 킬로그램당 약 1 나노그램 내지 킬로그램당 약 500 마이크로그램, 킬로그램당 약 1 마이크로그램 내지 킬로그램당 약 500 마이크로그램, 킬로그램당 약 1 마이크로그램 내지 킬로그램당 약 500 마이크로그램, 또는 킬로그램당 약 100 마이크로그램 내지 킬로그램당 약 500 마이크로그램)의 제제를 포함한다.

마이크로그램, 또는 킬로그램당 약 1 마이크로그램 내지 킬로그램당 약 50 마이크로그램)의 제제를 포함한다.

[0208] 일부 구현예에서, 방법은 또한 대상체에게 조성물을 투여한 후에 대상체에서 면역 반응이 발생하였는지 결정하는 단계를 포함할 수 있다. 대상체에서 면역 반응이 발생하였는지의 여부를 결정하기 위한 적합한 방법은, 예컨대, 대상체로부터의 생물학적 샘플에서 웨타이드에 특이적인 항체의 존재를 검출하는 면역분석의 사용을 포함한다. 예를 들어, 대상체에게 웨타이드를 투여한 후, 대상체로부터 생물학적 샘플(예컨대, 혈액 샘플)을 수득하고 웨타이드(들)에 특이적인 항체의 존재에 대해 시험할 수 있다. 면역 반응은 또한 샘플에서 활성화된 T 세포의 존재 또는 양을 분석함으로써 검출될 수 있다. 이러한 분석은, 예컨대, 증식 분석, 한계 희석 분석, 세포독성 분석(예컨대, 림포카인- 또는 51Cr-방출 분석)을 포함한다.

[0209] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 방법(예컨대, BCMA 및 TACI 특이적 반응을 증가시키는 치료제, 백신, 세포 요법, 항체, 및/또는 BCMA 및 TACI 이외의 일부 표적을 표적화하는 치료제 접근법)은 또한 BCMA 및 TACI 특이적 반응을 향상시키는 다양한 유형의 화합물(예컨대 사이토카인 및 케모카인), 체크포인트 억제제(예컨대, 항-PD1, 항-PDL1, 항-CTLA4, 항-LAG3, 및/또는 항-TIM3 항체), 면역 작용제(예컨대, 항-OX40 또는 항-GITR 항체), 면역 조절제(예컨대, 레날리도미드, 포말리도미드, HDAC 억제제, 예컨대 ACY241), 및/또는 보조제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0210] 방법은 또한 하나 이상의 화학치료제, 하나 이상의 형태의 이온화 방사선, 또는 하나 이상의 면역조절제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 하나 이상의 형태의 이온화 방사선은 감마-조사, X-조사, 또는 베타-조사일 수 있다. 하나 이상의 화학치료제는 시스플라틴, 카르보플라틴, 프로카르바진, 메클로레타민, 사이클로포스파미드, 캄프토테신, 아드리아마이신, 이포스파미드, 멜팔란, 클로람부실, 비설판, 니트로소우레아, 닉티노마이신, 다우노루비신, 독소루비신, 블레오마이신, 플리코마이신, 미토마이신, 에토포시드, 베람필, 포도필로톡신, 타목시펜, 탁솔, 탈리도미드, 레날리도미드, 프로테오좀 억제제(예컨대, 보르테조닙), hsp90 억제제(예컨대, 테네스핀마이신), 트랜스플래티넘, 5-플루로우라실, 빙크리스틴, 빈블라스틴, 메토트렉세이트, 또는 임의의 전술한 것의 유사체로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 면역조절제는, 예컨대, 다양한 케모카인 및 사이토카인, 예컨대 인터루킨 2(IL-2), 과립구/대식세포-콜로니 자극 인자(GM-CSF), 및 인터루킨 12(IL-12)를 포함한다. 일부 구현예에서, 웨타이드 또는 웨타이드를 코딩하는 핵산은 면역 조절제, 예컨대 톨 수용체 리간드 또는 보조제와 함께 투여될 수 있다.

[0211] 일부 구현예에서, 추가적인 치료제는 히스톤 탈아세틸라제 6(HDAC6) 억제제(예컨대, ACY241)이다.

[0212] 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가적인 치료제는 면역조절제, 체크포인트 억제제(예컨대, 항-LAG3 항체) 또는 면역 작용제(예컨대, 항-OX40 항체, 항-GITR 항체)일 수 있다.

[0213] 일부 구현예에서, 추가적인 치료제는 B-Raf의 억제제, EGFR 억제제, MEK의 억제제, ERK의 억제제, K-Ras의 억제제, c-Met의 억제제, 역형성 림프종 키나제(ALK)의 억제제, 포스파티딜이노시톨 3-키나제(PI3K)의 억제제, Akt의 억제제, mTOR의 억제제, 이중 PI3K/mTOR 억제제, 브루톤 티로신 키나제(BTK)의 억제제, 및 이소시트레이트 탈수소효소 1(IDH1) 및/또는 이소시트레이트 탈수소효소 2(IDH2)의 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 억제제를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 추가적인 치료제는 인돌아민 2,3-디옥시게나제-1(IDO1)의 억제제(예컨대, 에파카도스타트(epacadostat))이다.

[0214] 일부 구현예에서, 추가적인 치료제는 HER3의 억제제, LSD1의 억제제, MDM2의 억제제, BCL2의 억제제, CHK1의 억제제, 활성화된 헤지호그(hedgehog) 신호전달 경로의 억제제, 및 에스트로겐 수용체를 선택적으로 분해하는 제제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 억제제를 포함할 수 있다.

[0215] 일부 구현예에서, 조합 요법은 하기 중 하나 이상을 포함한다:

[0216] (A) BCMA 및 TACI 특이적 반응을 향상시킬 수 있는 화합물, 예컨대 (1) 사이토카인 및 케모카인, (2) 예컨대, 항-PD1, 항-PDL1, 항-CTLA4, 항-LAG3, 및/또는 항-TIM3 항체를 포함하는 체크포인트 억제제, (3) 예컨대, 항-OX40 및/또는 항-GITR 항체를 포함하는 면역 작용제, (4) 예컨대, 레날리도미드, 포말리도미드, HDAC 억제제, 예컨대 ACY241를 포함하는 면역 조절제,(4) 보조제;

[0217] (B) 본원에 기재된 바와 같은 임의의 치료제(예컨대, 백신, 세포 요법 및/또는 항체) 또는 다른 표적을 표적화하는 독립적인 접근법(예컨대, 비-BCMA 또는 비-TACI 표적화 요법)을 포함하는 BCMA 및 TACI 특이적 반응을 증가시킬 수 있는 치료제; 및

[0218] (C) 추가적인 화합물, 예컨대 B-Raf의 억제제, EGFR 억제제, MEK의 억제제, ERK의 억제제, K-Ras의 억제제, c-

Met의 억제제, 역형성 림프종 키나제(ALK)의 억제제, 포스파티딜이노시톨 3-키나제(PI3K)의 억제제, Akt의 억제제, mTOR의 억제제, 이중 PI3K/mTOR 억제제, 브루톤 티로신 키나제(BTK)의 억제제, 및 이소시트레이트 탈수소효소 1(IDH1) 및 이소시트레이트 탈수소효소 2(IDH2)의 억제제, 및/또는 인돌아민 2,3-디옥시게나제-1(IDO1)의 억제제(예컨대, 에파카도스타트)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 억제제.

[0219] 일부 구현예에서, 추가적인 치료제는 트라베데인, 나브-파클리탁셀, 트레바나닙, 파조파닙, 세디라닙, 팔보시클립, 애베로리무스, 플루오로파리미딘, IFL, 레고라페닙, 레오리신, 알림타, 자이카디아, 수텐트, 템시로리무스, 악시티닙, 애베로리무스, 소라페닙, 보트리엔트, 파조파, IMA-901, AGS-003, 카보잔티닙, 빈플루닌, Hsp90 억제제, Ad-GM-CSF, 테마졸로미드, IL-2, IFNa, 빈블라스틴, 탈로미드, 다카르바진, 사이클로포스파미드, 레날리도미드, 아자시티딘, 레날리도미드, 보르테조미드, 암루비신, 카르필조닙, 프랄라트렉세이트, 및 엔자스타우린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 치료제를 포함할 수 있다.

[0220] 일부 구현예에서, 추가적인 치료제는 보조제, TLR 작용제, 종양 괴사 인자(TNF) 알파, IL-1, HMGB1, IL-10 길항제, IL-4 길항제, IL-13 길항제, IL-17 길항제, HVEM 길항제, ICOS 작용제, CX3CL1을 표적화하는 치료제, CXCL9를 표적화하는 치료제, CXCL10을 표적화하는 치료제, CCL5를 표적화하는 치료제, LFA-1 작용제, ICAM1 작용제, 및 셀렉틴 작용제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 치료제를 포함할 수 있다.

[0221] 일부 구현예에서, 카르보플라틴, 나브-파클리탁셀, 파클리탁셀, 시스플라틴, 페메트렉세드, 쟈시타빈, FOLFOX, 또는 FOLFIRI가 대상체에게 투여된다.

[0222] 일부 구현예에서, 추가적인 치료제는 PD-1, CTLA-4, LAG-3, BTLA, PD-L1, CD27, CD28, CD40, CD47, 4-1BB(CD137), CD154, TIGIT, TIM-3, GITR(CD357), OX40, CD20, EGFR, 또는 CD319에 특이적으로 결합하는 항체(예컨대, 인간 항체)이다. 일부 구현예에서, 추가적인 치료제는 항-OX40 항체, 항-PD-L1 항체, 항-PD-L2 항체, 항-LAG-3 항체, 항-TIGIT 항체, 항-BTLA 항체, 항-CTLA-4 항체, 또는 항-GITR 항체이다.

[0223] 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 웨타이드를 코딩하는 핵산을 포함하는 바이러스 또는 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 웨타이드를 포함하는 바이러스 입자를 제공한다. 다양한 바이러스, 예컨대, 레트로바이러스, 랜티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 알파바이러스 등이 사용될 수 있다. 이들 바이러스는 웨타이드 또는 웨타이드를 코딩하는 이의 핵산을 대상체에게 전달하여 면역 반응을 유도하는데 사용될 수 있다. 유사하게, 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 웨타이드 및/또는 웨타이드를 코딩하는 이의 핵산을 포함하는 리포솜이 또한 웨타이드 또는 핵산을 이를 필요로 하는 대상체에게 전달하여 면역 반응을 유도하는데 사용될 수 있다.

[0224] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 방법은 면역 세포(예컨대, T 세포, CD8+ T 세포, 세포독성 T 세포, 및/또는 CD4+ T 세포)의 면역 반응, 활성(예컨대, 사이토카인, IFN-γ, IL-2, 또는 TNF-α 생산), 또는 수를 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 2배, 3배, 5배, 10배, 20배, 또는 50배 증가시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 방법은 CD107a 탈파립화를 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 2배, 3배, 5배, 10배, 20배, 또는 50배 증가시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 방법은 암 세포를 특이적으로 표적화하거나 본원에 기재된 웨타이드를 인식하는 CD8+ 효과기 T 세포의 수(예컨대, CD8+ 효과기 T 세포의 총 수, 또는 예컨대, CD45+ 세포에서 CD8+의 백분율)를 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 2배, 3배, 5배, 10배, 20배, 또는 50배 증가시킬 수 있다.

나노입자

[0225] 본 개시내용은 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 웨타이드(예컨대, 서열번호 1-17) 또는 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드(예컨대, 서열번호 1-17을 코딩하는 서열)를 포함하는 나노입자 또는 나노캐리어를 추가로 제공한다. 일부 경우에, 나노캐리어는 서열번호 1-17의 아미노산 서열과 동일하지만 1 내지 4개의 아미노산 치환을 갖는 웨타이드를 포함한다. 일부 경우에, 치환은 위치 1, 2, 및 9 중 하나 이상에 있다. 이러한 웨타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드(예컨대, mRNA, DNA)는 또한 나노캐리어에 캡슐화될 수 있다. 나노입자 또는 나노캐리어는 이를 필요로 하는 대상체에게 투여되어 면역 반응을 유도할 수 있다.

[0226] 웨타이드는 다양한 부착 기전을 통해 나노입자 또는 나노캐리어에 부착될 수 있다. 이 부착 기전은 정전기 인력, 공유 결합, 또는 소수성 상호작용일 수 있다. 일부 구현예에서, 나노입자에 보조제가 로딩될 수 있다. 보조제는 수지상 세포 표적화 분자, 예를 들어, 톤 유사 수용체 작용제, 예컨대, TLR7/TLR8의 강력한 합성 작용제로서 인식되는 R-848, 또는 TLR-9의 면역자극 작용제인 메틸화되지 않은 CpG 올리고데옥시뉴클레오타이드, 또는 TLR-4의 면역자극 작용제인 모노포스포릴 지질 A, 또는 엔도솜 막 표적화제, 예컨대, 엔도-포터(Endo-Porter)

펩타이드일 수 있다.

- [0228] 나노입자를 형성하는 중합체는 임의의 생분해성 또는 비생분해성 합성 또는 천연 중합체일 수 있다. 바람직하게는, 중합체는 생분해성 중합체이다. 유용한 생분해성 중합체의 예는 폴리락트산(PLA), 폴리(글리콜산)(PGA), 또는 폴리(락틱-co-글리콜산)(PLGA)을 포함한다. 이들 중합체는 확립된 안전성 기록을 가지며, 인간 대상체에서 사용될 수 있다(Jiang, et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57(3): 391-410, 2005; Aguado and Lambert, *Immunobiology*, 184(2-3): 113-25, 1992; Bramwell, et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57(9): 1247-65, 2005). 다른 양친매성 폴리(아미노산) 나노입자, 양친매성 다당류 나노입자, 또는 폴리이온 나노입자가 본원에 개시된 백신 조성물에 사용될 수 있다(Akagi et al., *Adv Polym Sci.* 247: 31-64, 2012 참고). 전술한 중합체는 단독으로, 물리적 혼합물로서, 또는 공중합체를 형성함으로써 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 나노입자는 폴리(락틱-co-글리콜산)-블록-폴리(L-히스티딘)-블록-폴리(에틸렌 글리콜)(PLGA-PLH-PEG) 삼블록 공중합체; PLGA-PEG 이블록 공중합체, 및 PLA의 혼합물에 의해 형성된다. 이들 공중합체는 표준 기술을 사용하여 합성될 수 있다. 예를 들어, 공중합체 PLGA-PLH-PEG는 블록 엔드-그래프팅(block end-grafting) 전략을 사용하여 합성될 수 있다.
- [0229] 본원에 사용된 바와 같이, "나노입자"는 500 nm 내지 0.5 nm의 범위, 예컨대, 50 내지 500 nm의 직경을 갖거나, 100 내지 400 nm의 직경을 갖거나, 또는 200 내지 400 nm의 직경을 갖는 입자이다.
- [0230] 나노입자 및 나노입자를 제조 및 사용하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예컨대, US 제2016/0008451호, US 제2010/0129439호, US 제2018/0021258호에 기재되어 있고, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. 일부 구현예에서, 나노입자는 리포솜이다. 일부 구현예에서, 나노입자는 중합체성 입자이다.
- [0231] 나노입자를 형성하는 중합체는 임의의 생분해성 또는 비생분해성 합성 또는 천연 중합체일 수 있다. 일부 구현예에서, 중합체는 생분해성 중합체이다. 유용한 생분해성 중합체의 예는 폴리락트산(PLA), 폴리(글리콜산)(PGA), 또는 폴리(락틱-co-글리콜산)(PLGA)을 포함한다. 이들 중합체는 확립된 안전성 기록을 가지며, 인간 대상체에서 사용될 수 있다(Jiang, et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57(3):391-410, 2005; Aguado and Lambert, *Immunobiology*, 184(2-3): 113-25, 1992; Bramwell, et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57(9): 1247-65, 2005). 다른 양친매성 폴리(아미노산) 나노입자, 양친매성 다당류 나노입자, 또는 폴리이온 나노입자가 본원에 개시된 조성물에 사용될 수 있다(Akagi et al., *Adv Polym Sci.* 247:31-64, 2012 참고).
- [0232] 중합체는 단독으로, 물리적 혼합물로서, 또는 공중합체를 형성함으로써 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 나노입자는 폴리(락틱-co-글리콜산)-블록-폴리(L-히스티딘)-블록-폴리(에틸렌 글리콜)(PLGA-PLH-PEG) 삼블록 공중합체; PLGA-PEG 이블록 공중합체, 및 PLA의 혼합물에 의해 형성된다. 이들 공중합체는 표준 기술을 사용하여 합성될 수 있다. 예를 들어, 공중합체 PLGA-PLH-PEG는 블록 엔드-그래프팅 전략을 사용하여 합성될 수 있다. 선형 구조(예컨대, PLGA-PLH-PEG)는 연장된 순환 및 전하 매개 표적화와 양립가능한 몇 가지 특징을 나노입자에게 제공할 수 있다.
- [0233] 일부 구현예에서, 천연 중합체가 사용될 수 있다. 천연 중합체의 예는 알기네이트 및 다른 다당류, 콜라겐, 알부민 및 다른 친수성 단백질, 제인(zein) 및 다른 프롤라민 및 이의 소수성 단백질, 공중합체 및 혼합물을 포함한다. 일반적으로, 이들 물질은 표면 또는 벌크 침식에 의해, 효소적 가수분해 또는 생체내에서 물에 대한 노출에 의해 분해된다.
- [0234] 다른 적합한 생분해성 중합체는, 비제한적으로, 폴리(하이드록시산), 예컨대 락틱산 및 글리콜산의 중합체 및 공중합체, 폴리무수물, 폴리(오르토)에스테르, 폴리에스테르, 폴리우레тан, 폴리(부트산), 폴리(발레르산), 폴리(카프로락톤), 폴리(하이드록시알카노에이트), 및 폴리(락티드-co- 카프로락톤)을 포함한다.
- [0235] 중합체는 친수성 또는 소수성인 생체적합성 중합체일 수 있다. 친수성 중합체는 CARBOPOL™(Noveon에 의해 제조된 고분자량, 가교된, 아크릴산 기반 중합체), 폴리카르보필, 셀룰로스 에스테르, 및 텍스트란을 포함한다.
- [0236] 이들 중합체는 시그마 케미컬(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.); 폴리사이언시즈(Polysciences, Warrenton, Pa.); 알드리치(Aldrich, Milwaukee, Wis.); 플루카(Fluka, Ronkonkoma, N.Y.); 및 바이로라드(BioRad, Richmond, Calif)와 같은 공급업체로부터 수득될 수 있거나, 표준 기술을 사용하여 이들 또는 다른 공급업체로부터 수득된 단량체로부터 합성될 수 있다.
- [0237] 광범위한 중합체 및 이로부터 중합체성 매트릭스를 형성하는 방법은 통상적으로 알려져 있다. 일반적으로, 중합체성 매트릭스는 하나 이상의 중합체를 포함한다. 중합체는 천연 또는 비천연(합성) 중합체일 수 있다. 중합체는 2개 이상의 단량체를 포함하는 동종중합체 또는 공중합체일 수 있다. 서열의 측면에서, 공중합체는 무작위,

블록일 수 있거나, 또는 무작위 및 블록 서열의 조합을 포함할 수 있다. 전형적으로, 본 발명에 따른 중합체는 유기 중합체이다.

[0238] 본원에 기재된 조성물에 사용하기에 적합한 중합체의 예는, 비제한적으로 폴리에틸렌, 폴리카보네이트(예컨대 폴리(1,3-디옥산-2온)), 폴리무수물(예컨대 폴리(세바스산 무수물)), 폴리프로필푸마레이트, 폴리아미드(예컨대, 폴리카프로락탐), 폴리아세탈, 폴리에테르, 폴리에스테르(예컨대, 폴리락티드, 폴리글리콜리드, 폴리락티드-co-글리콜리드, 폴리카프로락톤, 폴리하이드록시산(예컨대 폴리(하이드록시알카노에이트))), 폴리(오르토에스테르), 폴리시아노아크릴레이트, 폴리비닐 알콜, 폴리우레탄, 폴리포스파젠, 폴리아크릴레이트, 폴리메타크릴레이트, 폴리우레아, 폴리스티렌, 및 폴리아민, 폴리리신, 폴리리신-PEG 공중합체, 및 폴리(에틸렌 이민), 폴리(에틸렌 이민)-PEG 공중합체를 포함한다.

[0239] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 중합체는 21 C.F.R. § 177.2600 하에 미국 식품의약국(FDA)에 의해 인간에서의 사용이 승인된 중합체를 포함하며, 이는 비제한적으로 폴리에스테르(예컨대, 폴리락트산, 폴리(락틱-co-글리콜산), 폴리카프로락تون, 폴리발레로락تون, 폴리(1,3-디옥산-2온)); 폴리무수물(예컨대, 폴리(세바스산 무수물)); 폴리에테르(예컨대, 폴리에틸렌 글리콜); 폴리우레탄; 폴리메타크릴레이트; 폴리아크릴레이트; 및 폴리시아노아크릴레이트를 포함한다.

[0240] 일부 구현예에서, 중합체는 친수성일 수 있다. 예를 들어, 중합체는 음이온성기(예컨대, 포스페이트기, 세페이트기, 카르복실레이트기); 양이온성기(예컨대, 4차 아민기); 또는 극성 기(예컨대, 하이드록실기, 티올기, 아민기)를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 중합체는 소수성일 수 있다. 중합체의 친수성 또는 소수성의 선택은 합성 나노입자 내에 혼입된(예컨대, 결합된) 물질의 성질에 영향을 미칠 수 있다.

[0241] 일부 구현예에서, 중합체는 하나 이상의 모이어티 및/또는 작용기를 이용하여 변형될 수 있다. 다양한 모이어티 또는 작용기가 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 중합체는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 탄수화물, 및/또는 다당류로부터 유래된 비활식 폴리아세탈을 이용하여 변형될 수 있다(Papisov, 2001, ACS Symposium Series, 786:301). 특정 구현예는 미국 특허 제5,543,158호(Gref et al), 또는 WO 공개 WO제2009/051837호(Von Andrian et al)의 일반적인 교시를 사용하여 이뤄질 수 있다.

[0242] 일부 구현예에서, 중합체는 지질 또는 지방산기를 사용하여 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, 지방산기는 부티르산, 카프로산, 카프릴산, 카프르산, 라우르산, 미리스트산, 팔미트산, 스테아르산, 아라키드산, 베렌산, 또는 리그노세르산 중 하나 이상일 수 있다. 일부 구현예에서, 지방산기는 팔미톨레산, 올레산, 박센산, 리놀레산, 알파-리놀레산, 감마-리놀레산, 아라키돈산, 가돌레산, 아라키돈산, 에이코사펜타에노산, 도코사헥사에노산, 또는 에루스산 중 하나 이상일 수 있다.

[0243] 일부 구현예에서, 중합체는 본원에서 총괄적으로 "PLGA"로 지칭되는, 폴리(락트산-co-글리콜산) 및 폴리(락티드-co-글리콜리드)와 같은 락트산 및 글리콜산 단위를 포함하는 공중합체; 및 본원에서 "PGA"로 지칭되는 글리콜산 단위 및 본원에서 총괄적으로 "PLA"로 지칭되는 폴리-L-락트산, 폴리-D-락트산, 폴리-D,L-락트산, 폴리-L-락티드, 폴리-D-락티드, 및 폴리-D,L-락티드와 같은 락트산 단위를 포함하는 동종중합체를 포함하는, 폴리에스테르일 수 있다. 일부 구현예에서, 예시적인 폴리에스테르는, 예를 들어, 폴리하이드록시산; PEG 공중합체 및 락티드 및 글리콜리드의 공중합체(예컨대, PLA-PEG 공중합체, PGA-PEG 공중합체, PLGA-PEG 공중합체, 및 이의 유도체)를 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리에스테르는, 예를 들어, 폴리(카프로락تون), 폴리(카프로락تون)-PEG 공중합체, 폴리(L-락티드-co-L-리신), 폴리(세린 에스테르), 폴리(4-하이드록시-L-프롤린 에스테르), 폴리[a-(4-아미노부틸)-L-글리콜산], 및 이의 유도체를 포함한다. PLGA의 분해 속도는 락트산: 글리콜산 비율을 변경함으로써 조정될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명에 따라 사용되는 PLGA는 대략 85:15, 대략 75:25, 대략 60:40, 대략 50:50, 대략 40:60, 대략 25:75, 또는 대략 15:85의 락트산: 글리콜산 비율을 특징으로 한다.

[0244] 일부 구현예에서, 중합체는 하나 이상의 아크릴 중합체일 수 있다. 특정 구현예에서, 아크릴 중합체는, 예를 들어, 아크릴산 및 메타크릴산 공중합체, 메틸 메타크릴레이트 공중합체, 에톡시에틸 메타크릴레이트, 시아노에틸 메타크릴레이트, 아미노알킬 메타크릴레이트 공중합체, 폴리(아크릴산), 폴리(메타크릴산), 메타크릴산 알킬아미드 공중합체, 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(메타크릴산 무수물), 메틸 메타크릴레이트, 폴리메타크릴레이트, 폴리(메틸 메타크릴레이트) 공중합체, 폴리아크릴아미드, 아미노알킬 메타크릴레이트 공중합체, 글리시딜 메타크릴레이트 공중합체, 폴리시아노아크릴레이트, 및 전술한 중합체 중 하나 이상을 포함하는 조합을 포함한다. 아크릴 중합체는 낮은 함량의 4차 암모늄기를 갖는 아크릴 및 메타크릴산 에스테르의 완전 중합된 공중합체를 포함할 수 있다.

[0245]

일부 구현예에서, 중합체는 양이온성 중합체일 수 있다. 일반적으로, 양이온성 중합체는 음으로 하전된 핵산의 가닥(예컨대, DNA, 또는 이의 유도체)을 응축 및/또는 보호할 수 있다. 아민 함유 중합체, 예컨대 폴리(리신)(Zauner et al., 1998, *Adv. Drug Del. Rev.*, 30:97; and Kabanov et al., 1995, *Bioconjugate Chem.*, 6:7), 폴리(에틸렌 아민)(PEI; Boussif et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 92:7297), 및 폴리(아미도아민) 텐드리머(Kukowska-Latallo et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 93:4897; Tang et al., 1996, *Bioconjugate Chem.*, 7:703; 및 Haensler et al., 1993, *Bioconjugate Chem.*, 4:372)는 생리학적 pH에서 양으로 하전되고, 핵산과 이온 쌍을 형성하며, 다양한 세포주에서 형질감염을 막개한다.

[0246]

일부 구현예에서, 중합체는 양이온성 측쇄를 갖는 분해성 폴리에스테르일 수 있다(Putnam et al., 1999, *Macromolecules*, 32:3658; Barrera et al., 1993, *J. Am. Chem. Soc.*, 115: 11010; Kwon et al., 1989, *Macromolecules*, 22:3250; Lim et al., 1999, *J. Am. Chem. Soc.*, 121:5633; and Zhou et al., 1990, *Macromolecules*, 23:3399). 이들 폴리에스테르의 예는 폴리(L-라티드-co-L-리신)(Barrera et al., 1993, *J. Am. Chem. Soc.*, 115: 11010), 폴리(세린 에스테르)(Zhou et al., 1990, *Macromolecules*, 23:3399), 폴리(4-하이드록시-L-프롤린 에스테르)(Putnam et al., 1999, *Macromolecules*, 32:3658; 및 Lim et al., 1999, *J. Am. Chem. Soc.*, 121:5633), 및 폴리(4-하이드록시-L-프롤린 에스테르)(Putnam et al., 1999, *Macromolecules*, 32:3658; 및 Lim et al., 1999, *J. Am. Chem. Soc.*, 121:5633)를 포함한다.

[0247]

이들 및 다른 중합체의 특성 및 이들을 제조하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있다(예를 들어, 미국 특허 제6,123,727호; 제5,804,178호; 제5,770,417호; 제5,736,372호; 제5,716,404호; 제6,095,148호; 제5,837,752호; 제5,902,599호; 제5,696,175호; 제5,514,378호; 제5,512,600호; 제5,399,665호; 제5,019,379호; 제5,010,167호; 제4,806,621호; 제4,638,045호; 및 제4,946,929호; Wang et al., 2001, *J. Am. Chem. Soc.*, 123:9480; Lim et al., 2001, *J. Am. Chem. Soc.*, 123:2460; Langer, 2000, *Acc. Chem. Res.*, 33:94; Langer, 1999, *J. Control. Release*, 62:7; 및 Uhrich et al., 1999, *Chem. Rev.*, 99:3181). 보다 일반적으로, 특정한 적합한 중합체를 합성하는 다양한 방법은 문헌[Concise Encyclopedia of Polymer Science and Polymeric Amines and Ammonium Salts, Ed. by Goethals, Pergamon Press, 1980; Principles of Polymerization by Odian, John Wiley & Sons, Fourth Edition, 2004; Contemporary Polymer Chemistry by Allcock et al., Prentice-Hall, 1981; Deming et al., 1997, *Nature*, 390:386; 및 미국 특허 제6,506,577호, 제6,632,922호, 제6,686,446호, 및 제6,818,732호]에 기재되어 있다. 전술한 것의 각각은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0248]

일부 구현예에서, 중합체는 선형 또는 분지형 중합체일 수 있다. 일부 구현예에서, 중합체는 텐드리머일 수 있다. 일부 구현예에서, 중합체는 실질적으로 서로 가교될 수 있다. 일부 구현예에서, 중합체는 가교가 실질적으로 없을 수 있다. 일부 구현예에서, 중합체는 가교 단계를 거치지 않고 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 본 발명의 합성 나노입자는 전술한 것 중 어느 것 및 다른 중합체의 블록 공중합체, 그래프트 공중합체, 블렌드, 혼합물, 및/또는 부가물을 포함할 수 있음이 추가로 이해되어야 한다. 당업자는 본원에 열거된 중합체가 본 발명에 따라 사용될 수 있는 중합체의 예시적이지만 포괄적이지 않은 목록을 나타낸다는 것을 인식할 것이다.

[0249]

일부 구현예에서, 합성 나노입자는 선택적으로 하나 이상의 양친매성 독립체(entity)를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 양친매성 독립체는 증가된 안정성, 개선된 균일성, 또는 증가된 점도를 갖는 합성 나노입자의 생산을 촉진할 수 있다. 일부 구현예에서, 양친매성 독립체는 지질막(예컨대, 지질 이중층, 지질 단일층 등)의 내부 표면과 결합될 수 있다. 당업계에 공지된 많은 양친매성 독립체는 본 발명에 따라 합성 나노입자를 제조하는데 사용하기에 적합하다. 이러한 양친매성 독립체는, 비제한적으로, 포스포글리세라이드; 포스파티딜콜린; 디팔미토일 포스파티딜콜린(DPPC); 디올레일포스파티딜 에탄올아민(DOPE); 디올레일옥시프로필트리에틸암모늄(DOTMA); 디올레오일포스파티딜콜린; 콜레스테롤; 콜레스테롤 에스테르; 디아실글리세롤; 디아실글리세롤석시네이트; 디포스파티딜 글리세롤(DPPG); 헥산데칸올; 지방산 알코올, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜(PEG); 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에테르; 표면 활성 지방산, 예컨대 팔미트산 또는 올레산; 지방산; 지방산 모노글리세라이드; 지방산 디글리세라이드; 지방산 아미드; 소르비탄 트리올레에이트(Span®85) 글리코콜레이트; 소르비탄 모노라우레이트(Span®20); 폴리소르베이트 20(Tween®20); 폴리소르베이트 60(Tween®60); 폴리소르베이트 65(Tween®65); 폴리소르베이트 80(Tween®80); 폴리소르베이트 85(Tween®85); 폴리옥시에틸렌 모노스테아레이트; 서팩틴(surfactin); 폴록사마; 소르비탄 지방산 에스테르, 예컨대 소르비탄 트리올레에이트; 레시틴; 리소레시틴; 포스파티딜세린; 포스파티딜이노시톨; 스팽고미엘린; 포스파티딜에탄올아민(cephalin); 카르디오리핀; 포스파티드산; 세레브로시드; 디세틸포스페이트; 디팔미토일포스파티딜글리세롤; 스테아릴아민; 도데실아민; 헥사데실-아민; 아세틸 팔미테이트; 글리세롤 리시놀레에이트; 헥사데실 스테아레이트; 이소프로필 미리스테이트; 틸록사폴; 폴리(에틸렌 글리콜)5000-포스파티딜에탄올아민; 폴리(에틸렌 글리콜)400-모노스테아레이트; 인지질;

높은 계면활성제 특성을 갖는 합성 및/또는 천연 세제; 데옥시콜레이트; 사이클로텍스트린; 카오토로픽 염; 이온쌍제; 및 이들의 조합을 포함한다. 양친매성 독립체 구성요소는 상이한 양친매성 독립체의 혼합물일 수 있다. 당업자는 이것이 계면활성제 활성을 갖는 물질의 예시적이지만 포괄적이지 않은 목록임을 인식할 것이다. 임의의 양친매성 독립체가 본 발명에 따라 사용될 합성 나노입자의 생산에 사용될 수 있다.

[0250] 일부 구현예에서, 합성 나노입자는 선택적으로 하나 이상의 탄수화물을 포함할 수 있다. 탄수화물은 천연 또는 합성일 수 있다. 탄수화물은 유도체화된 천연 탄수화물일 수 있다. 특정 구현예에서, 탄수화물은 비제한적으로 글루코스, 프력토스, 갈락토스, 리보스, 락토스, 수크로스, 말토스, 트레할로스, 셀바이오스, 만노스, 자일로스, 아라비노스, 글루쿠론산, 갈락투론산, 만누론산, 글루코사민, 갈락토사민, 및 뉴람산을 포함하는, 단당류 또는 이당류를 포함한다. 특정 구현예에서, 탄수화물은 비제한적으로 폴루란, 셀룰로스, 미세결정 셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스(HPMC), 하이드록시셀룰로스(HC), 메틸셀룰로스(MC), 텍스트란, 사이클로텍스트란, 글리코겐, 하이드록시에틸전분, 카라기난, 글리콘, 아밀로스, 키토산, N,O-카르복실메틸키토산, 알긴 및 알긴산, 전분, 키틴, 이눌린, 곤약, 글루코만난, 푸스틀란, 헤파린, 히알루론산, 커드란, 및 잔탄을 포함하는 다당류이다. 구현예에서, 본 발명의 합성 나노입자는 탄수화물, 예컨대 다당류를 포함하지 않는다(또는 명시적으로 배제한다). 특정 구현예에서, 탄수화물은 비제한적으로 만니톨, 소르비톨, 자일리톨, 에리트리톨, 말티톨, 및 락터톨을 포함하는, 당 알코올과 같은 탄수화물 유도체를 포함할 수 있다.

[0251] 일부 구현예에서, 나노입자는 서열번호 13, 서열번호 14, 또는 서열번호 16(예컨대, 서열번호 13)에 제시된 서열을 포함하는 웨타이드를 포함한다. 특정 경우에, 본원에 개시된 나노입자는 하기 기재된 또 다른 요법(예컨대, APC 기반 요법, CTL 기반 요법, 웨타이드 백신 요법)과 조합하여 투여될 수 있다. 일부 경우에, 본원에 개시된 나노입자는 면역 작용제(예컨대, 항-OX40 항체; 항-GITR 항체), 체크포인트 억제제(예컨대, 항-LAG3 항체), 및/또는 레날리도미드와 조합하여 인간 대상체에게 투여될 수 있다.

항원 제시 세포(APC) 기반 면역요법

[0253] 대상체에서 면역 반응을 유도하기 위한 생체외 전략은 대상체로부터 수득된 적합한 항원 제시 세포(예컨대, 수지상 세포, 단핵구, 또는 대식세포)를 본원에 기재된 임의의 웨타이드와 접촉시키는 것을 포함할 수 있다. 대안적으로, 세포는 하나 이상의 웨타이드를 코딩하는 핵산(예컨대, 발현 벡터)으로 형질감염될 수 있고, 선택적으로 웨타이드의 발현을 허용하는 시간 동안 및 조건 하에서 배양될 수 있다. 형질감염 방법은 세포 및 세포 내로 형질감염되는 핵산의 유형에 따라 달라질 것이다. 접촉 또는 형질감염 후, 세포는 대상체로 돌아간다.

[0254] 세포는 MHC 클래스 I 또는 II 분자를 발현하는 임의의 광범위한 유형일 수 있다. 예를 들어, 세포는 골수 세포, 대식세포, 단핵구, 수지상 세포, T 세포(예컨대, T 헬퍼 세포, CD4+ 세포, CD8+ 세포, 또는 세포독성 T 세포), 또는 B 세포를 포함할 수 있다.

[0255] 따라서, 본 개시내용은 APC(예컨대, 수지상 세포)를 포함하는 조성물을 제공하며, APC는 그의 표면 상에 웨타이드 서열을 제시하며, 웨타이드 서열은 BCMA 항원(서열번호 18) 및 TACI 항원(서열번호 19) 중 하나 또는 둘 모두의 적어도 하나의 주조직적합성 복합체(MHC) 클래스 I 또는 클래스 II 웨타이드 에피토프를 포함한다. 일부 구현예에서, APC는 수지상 세포이다. 일부 구현예에서, MHC 웨타이드 에피토프는 MHC 클래스 I 웨타이드 에피토프(예컨대, HLA-A2 또는 HLA-A24 웨타이드 에피토프)이다. 일부 구현예에서, APC는 웨타이드 서열을 포함하는 합성 웨타이드에 대한 노출에 의해 시험관내에서 웨타이드 서열을 획득한다.

[0256] 임의의 생체외 방법의 일부 구현예에서, 대상체, 또는 대상체와 다른 동일한 종의 대상체(동종이계)로부터 수득되는 세포는 시약(또는 면역원성/항원 조성물)과 접촉되고 대상체에게 투여될 수 있다.

[0257] 일부 구현예에서, 조성물은 적어도 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 또는 10^9 APC(예컨대, 수지상 세포)를 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 또는 10^{10} 미만의 APC(예컨대, 수지상 세포)를 포함한다.

a. 항원 제시 세포의 제조

[0259] 대상체(예컨대, 다발성 골수종 환자)에게 투여하기 적합한 항원 제시 세포(APC), 예컨대 수지상 세포(DC)는 이러한 세포가 발견되는 임의의 조직으로부터 단리 또는 수득될 수 있거나, 또는 배양 및 제공될 수 있다. APC(예컨대, DC)는, 예로서, 포유동물의 골수 또는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)에서, 포유동물의 비장에서 또는 포유동물의 피부에서 발견될 수 있다(즉, DC와 유사한 특정 품질을 갖는 랑게르ハン스 세포가 피부에서 발견될 수 있음). 예를 들어, 골수는 포유동물로부터 채취되고 DC의 성장을 촉진하는 배지에서 배양될 수 있다. GM-CSF, IL-4 및/또는 다른 사이토카인(예컨대, TNF-α), 성장 인자 및 보충제가 이 배지에 포함될 수 있다. 적절한 사이토

카인을 함유하는 배지 중의 배양에서 적합한 양의 시간(예컨대, DC를 성숙한 DC로 확장 및 분화하기에 적합한 시간, 예컨대, 4, 6, 8, 10, 12, 또는 14일) 후, DC의 집단은 표준 기술을 사용하여 암 백신에서 사용하기 위해 관심 항원의 존재하에(예컨대, BCMA 또는 TACI의 하나 이상의 펩타이드 에피토프, 또는 서열번호 13-17의 적어도 2개의 펩타이드의 조합의 존재하에) 배양 및 채취된다. 항원(예컨대, 단리되거나 정제된 펩타이드, 또는 합성 펩타이드)은 항원당 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 예컨대, 항원당 2, 5, 10, 20, 30, 또는 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 배양에 첨가될 수 있다.

[0260] 일부 구현예에서, APC는 대상체(예컨대, 인간)로부터 단리된다. 단핵 세포는 백혈구성분채집술(Leukapheresis)을 사용하여(예컨대, COBE 스펙트라 성분채집술 시스템(Spectra Apheresis System)을 사용하여) 혈액으로부터 단리된다. 단핵 세포는 37°C에서 2시간 동안 조직 배양 플라스크에서 인큐베이션함으로써 부착성이 된다. 비부착성 세포는 세척에 의해 제거된다. 부착성 세포는 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF)(800 단위/ ml , 임상 등급, Immunex, Seattle, Wash.) 및 인터루킨-4(IL-4)(500 단위/ ml , R&D Systems, Minneapolis, Minn.)가 보충된 배지에서 5일 동안 배양된다. 5일에, 추가 3-4일 동안 배양 배지에 TNF- α 가 첨가된다. 8 또는 9일에, 세포가 채취 및 세척되고, 조직 회전기 상에서 16-20시간 동안 펩타이드 항원과 함께 인큐베이션된다. 펩타이드 항원은 ~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (항원당)의 농도로 배양에 첨가된다.

[0261] 당업자에게 인식되는 바와 같이, 다양한 다른 방법이 APC를 단리하는데 사용될 수 있다. DC는 이들이 존재하는 모든 조직에서 적은 수로 존재하므로, DC의 단리 및 농축이 필요하다. 반복 밀도 구배 분리, 형광 활성화된 세포 분류 기술, 양성 선택, 음성 선택, 또는 이들의 조합을 수반하는 많은 절차가 단리된 DC의 농축된 집단을 수득하기 위해 일상적으로 사용된다. DC를 단리하기 위한 이러한 방법에 대한 지침은 문헌[O'Doherty, U. et al., J. Exp. Med., 178: 1067-1078, 1993; Young and Steinman, J. Exp. Med., 171: 1315-1332, 1990; Freudenthal and Steinman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 7698-7702, 1990; Macatonia et al., Immunol., 67: 285-289, 1989; Markowicz and Engleman, J. Clin. Invest., 85: 955-961, 1990; Mehta-Damani et al., J. Immunol., 153: 996-1003, 1994; and Thomas et al., J. Immunol., 151: 6840-6852, 1993]에서 발견될 수 있다. 인간 말초 혈액으로부터 DC를 단리하는 한 가지 방법은 미국 특허 제5,643,786호에 기재되어 있다.

[0262] 본원에 기재된 방법에 따라 제조된 수지상 세포는 종양 용해물(예컨대, 신경 종양 용해물)에 노출된 수지상 세포에 존재하는 에피토프보다 더 높은 평균 밀도로 항원에 상응하는 에피토프를 제시한다. 항원 제시 세포 상의 하나 이상의 항원의 상대적 밀도는 간접 및 직접 방식 모두에 의해 결정될 수 있다. 나이브 동물의 일차 면역 반응은 대략적으로 항원 제시 세포의 항원 밀도에 비례한다(Bullock et al., J. Immunol., 170: 1822-1829, 2003). 따라서, 항원 제시 세포의 두 집단 사이의 상대적 항원 밀도는 동물을 각각의 집단으로 면역화하고, B 또는 T 세포를 단리하고, 예컨대, 테트라미 분석, ELISPOT, 또는 정량적 PCR에 의해 특이적 항원에 대한 특이적 면역 반응을 모니터링함으로써 추정될 수 있다.

[0263] 상대적 항원 밀도는 또한 직접적으로 측정될 수 있다. 하나의 방법에서, 항원 제시 세포를 MHC-항원 복합체에 특이적으로 결합하는 항체로 염색한 다음, 세포를 분석하여 각 세포에 결합하는 항체의 상대적 양을 결정한다(예컨대, Gonzalez et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102: 4824-4829, 2005 참고). 항체 결합을 분석하는 예시적인 방법은 유세포 분석법 및 형광 활성화된 세포 분류를 포함한다. 분석 결과는, 예컨대, 개별 MHC-항원 복합체의 염색에 대해 양성인 세포의 비율 또는 세포당 염색의 평균 상대적인 양으로서 보고될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포당 염색의 상대적인 양의 히스토그램이 생성될 수 있다.

[0264] 일부 구현예에서, 항원 밀도는 MHC에 결합된 펩타이드의 직접 분석에 의해, 예컨대, 질량 분석법에 의해 직접 측정될 수 있다(예컨대, Purcell and Gorman, Mol. Cell. Proteomics, 3: 193-208, 2004 참고). 전형적으로, MHC 결합된 펩타이드는 몇 가지 방법 중 하나에 의해 단리된다. 하나의 방법에서, 항원 제시 세포의 세포 용해물은 종종 작은 펩타이드를 농축하기 위한 한외여과 후에 분석된다(예컨대, Falk et al., J. Exp. Med., 174: 425-434, 1991; Rotzkhke et al., Nature, 348: 252-254, 1990 참고). 또 다른 방법에서, MHC 결합된 펩타이드는, 예컨대, 산 용리에 의해, 세포 표면으로부터 직접 단리된다(예컨대, Storkus et al., J. Immunother., 14: 94-103, 1993; Storkus et al., J. Immunol., 151: 3719-27, 1993 참고). 또 다른 방법에서, MHC-펩타이드 복합체는 항원 제시 세포 용해물로부터 면역친화성 정제된 다음, 산 처리에 의해 MHC 결합된 펩타이드가 용리된다(예컨대, Falk et al., Nature, 351: 290-296 참고). MHC 결합된 펩타이드의 단리 후, 펩타이드는 종종 분리 단계(예컨대, 액체 크로마토그래피, 모세관 겔 전기영동, 또는 2차원 겔 전기영동) 후에 질량 분석법에 의해 분석된다. 개별적인 펩타이드 항원은 항원 제시 세포의 집단에서 각 항원의 상대적인 평균 비율을 결정하기 위해 질량 분석법을 사용하여 확인 및 정량화될 수 있다. 일부 방법에서, 항원 제시 세포의 두 집단에서의 펩타이드의 상대적 양은 한 집단의 안정한 동위원소 표지 후 질량 분석법을 사용하여 비교된

다(Lemmel et al., Nat. Biotechnol., 22: 450-454, 2004 참고).

b. 항원 제시 세포의 투여

[0265] APC 기반 암 백신은 임의의 적합한 전달 경로에 의해 환자 또는 시험 동물에게 전달될 수 있고, 이는 주사, 주입, 접종, 직접 수술 전달, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 암 백신은 삼각근(deltoid) 영역 또는 액와(axillary) 영역에서 인간에게 투여된다. 예를 들어, 백신은 피내 주사로서 액와 영역내로 투여된다. 일부 구현예에서, 백신은 정맥내로 투여된다.

[0266] 세포를 투여하기 위한 적절한 담체는 일상적인 기술에 의해 당업자에 의해 선택될 수 있다. 예를 들어, 약학적 담체는 완충 식염수 용액, 예컨대, 세포 배양 배지일 수 있고, 세포 생존력을 보존하기 위한 DMSO를 포함할 수 있다.

[0267] 본 발명의 방법을 달성하는 암 백신으로서 환자에게 투여하는데 적절한 APC의 양 및 이러한 가장 간편한 투여 경로는 백신 자체의 제제처럼 다양한 인자에 기초할 수 있다. 이들 인자 중 일부는 환자의 신체적 특징(예컨대, 연령, 체중, 및 성별), 종양의 물리적 특징(예컨대, 위치, 크기, 성장률, 및 접근가능성), 및 전반적인 치료 요법과 관련하여 다른 치료적 방법론(예컨대, 화학요법, 및 빔 방사선 요법)이 구현되고 있는 정도를 포함한다. 질환 상태를 치료하기 위해 본 발명의 방법을 구현하는데 고려해야 하는 다양한 인자에도 불구하고, 포유동물은 단일 투여로 약 0.05 mL 내지 약 2 mL 용액(예컨대, 식염수) 중의 약 10^5 내지 약 10^8 APC(예컨대, 10^7 APC)로 투여될 수 있다. 추가적인 투여는 상기 기재된 인자 및 다른 인자, 예컨대 종양 병리의 중증도에 따라 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 약 10^6 APC의 약 1 내지 약 5회 투여가 2주 간격으로 수행된다.

[0268] DC 백신접종은 다른 치료를 수반할 수 있다. 예를 들어, DC 백신접종을 받는 환자는 또한 화학요법, 방사선, 및 /또는 수술 요법을 동시에 받고 있을 수 있다. 화학요법과 함께 DC 백신접종을 사용하여 암을 치료하는 방법은 문헌[Wheeler et al., 미국 특허 공개 제2007/0020297]에 기재되어 있다. 일부 구현예에서, DC 백신접종을 받는 환자는 이미 암에 대한 화학요법, 방사선, 및/또는 수술 치료를 받았다. 일부 구현예에서, DC 백신접종을 받는 환자는 문헌[Yu and Akasaki, WO 2005/037995]에 기재된 바와 같이 COX-2 억제제로 치료된다.

T 세포 기반 면역요법

[0269] 면역 반응을 자극하기 위한 생체외 방법은 또한 시험관내에서 T 세포(예컨대, 대상체로부터 수득된 림프구의 집단에서)를 T 세포(예컨대, 세포독성 T 세포 및/또는 CD4+ 헬퍼 T 세포)를 활성화시키는데 충분한 시간 동안(및 조건 하에) 본원에 기재된 웨타이드 중 하나에 결합된 MHC 분자를 발현하는 항원 제시 세포(APC)와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 따라서, 본 개시내용은 BCMA 특이적 및/또는 TACI 특이적 T 세포(예컨대, 세포독성 T 세포 및/또는 CD4+ 헬퍼 T 세포)를 생성 및/또는 증식시키는 방법을 제공한다. 방법은 하나 이상의 T 세포(예컨대, 세포독성 T 세포 및/또는 CD4+ 헬퍼 T 세포)를 본원에 기재된 바와 같은 웨타이드로 필스된 하나 이상의 항원 제시 세포와 접촉시키는 단계를 포함한다. 이들 T 세포는 세포독성 T 세포, 예컨대, 기억 세포독성 T 세포, 효과기 세포독성 T 세포, 또는 CD4+ 헬퍼 T 세포일 수 있다.

[0270] 활성화된 T 세포는 표적 세포를 사멸시키는데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 방법은 표적 세포를 하나 이상의 BCMA 특이적 세포독성 T 세포와 접촉시키는 단계를 포함하고, 표적 세포는 BCMA를 발현하거나 과발현하고, HLA-A를 발현한다. 일부 구현예에서, 방법은 표적 세포를 하나 이상의 TACI 특이적 세포독성 T 세포와 접촉시키는 단계를 포함하고, 표적 세포는 TACI를 발현하거나 과발현하고, HLA-A를 발현한다.

[0271] 일부 구현예에서, BCMA- 또는 TACI 특이적 T 세포(예컨대, 세포독성 T 세포 및/또는 CD4+ 헬퍼 T 세포)는 본원에 개시된 웨타이드(예컨대, 서열번호 13-17 중 하나 이상), BCMA(예컨대, 서열번호 13 또는 14) 또는 TACI(서열번호 16) 웨타이드를 제시하는 APC, 레날리도미드, 면역조절제, 체크포인트 억제제(예컨대, 항-LAG3 항체) 또는 면역 작용제(예컨대, 항-OX40, 항-GITR)와 조합하여 투여된다. 일부 구현예에서, BCMA 또는 TACI 특이적 CTL T 세포와 함께 투여되는 추가적인 치료제는 PD-1, CTLA-4, LAG-3, BTLA, PD-L1, CD27, CD28, CD40, CD47, 4-1BB(CD137), CD154, TIGIT, TIM-3, GITR(CD357), OX40, CD20, EGFR, 또는 CD319에 특이적으로 결합하는 항체(예컨대, 인간 항체)이다. 일부 구현예에서, 추가적인 치료제는 항-OX40 항체, 항-PD-L1 항체, 항-PD-L2 항체, 항-LAG-3 항체, 항-TIGIT 항체, 항-BTLA 항체, 항-CTLA-4 항체, 또는 항-GITR 항체이다. 일부 구현예에서, T 세포는 면역 작용제, 예컨대, 항-OX40 또는 항-GITR 항체와 조합하여 투여된다.

[0272] 활성화된 T 세포(들)는 또한 세포가 수득된 대상체 내로 재도입될 수 있다. 일부 구현예에서, 대상체 이외의 동일한 종의 대상체로부터 수득된 T 세포(동종이계)는 시약(또는 면역원성/항원성 조성물)과 접촉되고 대상체에게

투여될 수 있다.

[0275] 일부 구현예에서, T 세포는 환자 유래 밀초 혈액 단핵 세포(PBMC)에서 시험관내 유도로부터 유래된다. 하기 프로토콜은 환자 유래의 PBMC로부터 시험관내에서 항원 특이적 CTL을 생산하는데 사용될 수 있다. 수지상 세포를 생성하기 위해, PBMC로부터의 플라스틱 부착성 세포를 가습된 CO₂(5%) 인큐베이터에서 37°C에서 재조합 인간 GM-CSF 및 재조합 인간 IL-4가 보충된 AIM-V 배지에서 배양한다. 6일 후, 배양 중의 미성숙 수지상 세포를 성숙을 위해 재조합 인간 TNF-α로 자극시킨다. 이후, 성숙한 수지상 세포를 8일에 채취하고, 웨브타이드(2 μg/mL)와 함께 mL당 1×10⁶으로 PBS에 재현탁하고, 37°C에서 2시간 동안 인큐베이션한다. 자성 마이크로비드(Miltenyi Biotech, Auburn, Calif.)를 사용하여 PBMC로부터 자가 CD8+ T 세포를 농축한다. CD8+ T 세포(웰당 2×10⁶)를 24-웰 조직 배양 플레이트의 각 웰에서 5% 인간 AB 혈청 및 10 단위/mL rhIL-7(Cell Sciences)이 보충된 2 mL/웰의 AIM-V 배지에서 웰당 2×10⁵ 웨브타이드 펠스된 수지상 세포와 함께 공동 배양한다. 각각의 재자극 2일 후, 규칙적인 간격으로 24시간 후에 약 20 U/ml의 IL-2를 첨가한다. 7일에, 5% 인간 AB 혈청, rhIL-2, 및 rhIL-7(각각 10 단위/mL)이 보충된 AIM-V 배지에서 웨브타이드로 펠스된 자가 수지상 세포로 럼프구를 재자극시킨다. 각각의 재자극 2일 후, 규칙적인 간격으로 24시간 후에 약 20 U/ml의 IL-2를 첨가한다. 7일에, 3회의 재자극 후, 세포를 채취하고 CTL의 활성을 시험한다. 자극된 CD8+ 배양 세포(CTL)를 2 μg/ml Her-2, gp100, AIM-2, MAGE-1, 또는 IL13 수용체 α2 웨브타이드로 펠스된 T2 세포(인간 TAP-결핍 세포주)와 함께 공동 배양한다. 24시간 인큐베이션 후, 배지 중의 IFN-γ를 ELISA 분석에 의해 측정한다.

키메라 항원 수용체(CAR) T-세포 기반 면역요법

[0277] 본 개시내용은 암을 치료하기 위한 키메라 항원 수용체를 발현하는 T 세포의 입양 전달 방법을 추가로 제공한다. CAR 변형된 T 세포는 사실상 임의의 종양 관련 항원(예컨대, BCMA 및/또는 TACI)을 표적화하도록 조작될 수 있다. 일반적으로, T 세포는 환자의 종양 세포 상의 항원에 특이적인 CAR을 발현하도록 유전적으로 조작된 다음, 환자에게 다시 주입된다.

[0278] CAR의 일반적인 형태는 CD3-제타 막횡단- 및 엔도도메인에 융합된, 단쇄 가변 단편(scFv)의 융합체이다. scFV는 T 세포(예컨대, BCMA 특이적 세포독성 T 세포, 또는 TACI 특이적 세포독성 T 세포)의 항원 특이적 수용체, 또는 항원에 특이적으로 결합하는 항체로부터 유래될 수 있다.

[0279] 일부 구현예에서, BCMA 특이적 세포독성 T 세포 또는 TACI 특이적 세포독성 T 세포에서 T 세포 수용체의 서열은, 예컨대, 시퀀싱에 의해 결정된다. BCMA 특이적 세포독성 T 세포 및/또는 TACI 특이적 세포독성 T 세포에서 T 세포 수용체의 서열은 CAR을 생성하는데 사용될 수 있다.

[0280] 일부 구현예에서, 이들 T 세포는 환자로부터 수집된다. 일부 구현예에서, 이들 T 세포는 유도 만능 줄기 세포(iPSC)로부터 수득된다.

[0281] 바이러스 벡터, 예컨대 레트로바이러스, 렌티바이러스 또는 트랜스포손은 종종 트랜스진(예컨대, CAR)을 숙주 세포 계놈 내로 통합하는데 사용된다. 대안적으로, 플라스미드 또는 mRNA와 같은 비통합 벡터는 CAR 유전자를 T 세포에 전달하고, T 세포가 적절한 조건하에 CAR을 발현하도록 하는데 사용될 수 있다.

유도 만능 줄기 세포 접근법

[0283] 종양 특이적 항원을 표적화하는 많은 생체외 확장된 활성화된 항원 특이적 세포독성 T 럼프구(CTL)의 투여를 이용한 입양 T-세포 요법은 선택된 악성 종양에서 내구성 있는 차도를 유도하였다. MHC 분자를 갖는 웨브타이드 복합체로서 이미 가공 및 제시된 세포내 항원을 주로 인식하는 TCR을 사용하는 것(Johnson et al. 2009; Morgan et al. 2006)이 종양 선택성을 더 향상시킬 수 있지만, 외인성 TCR 유전자의 도입은 전이된 내인성 α 및 β 사슬의 불일치를 초래하여, 심각한 자가면역 부작용을 초래할 수 있다(Bendle et al. 2010, Hinrichs et al. 2013). 대조적으로, CAR-T는 비-MHC 제한된 방식으로 세포 표면 상에 발현된 항원을 인식한다. 현재까지, B-세포 항원 CD19를 표적화하는 가장 성공적인 CAR-T 요법은 재발된 및 화학-불응성 B-세포 악성 종양 환자에서 최소 잔류 질환 음성 완전 반응을 달성하였다(Kochenderfer et al. 2010, Grupp et al. 2013). 그럼에도 불구하고, 사이토카인 방출 증후군을 포함하는 부작용을 최소화하고 반응의 내구성을 개선하기 위한 지속적인 노력이 진행되고 있다(Brentjens et al. 2011, Kalos et al. 2011, Kochenderfer et al. 2012, Porter et al. 2011). 중요하게도, CTL은 TCR 기반 또는 CAR 기반 요법에 사용하기 위해 장기간 확장 동안 종양 항원에 지속적으로 노출되며, 이들의 증식 능력("소진됨") 및 말단 분화를 갖는 이들의 기능적 활성을 상실할 수 있다.

- [0284] 이러한 제한을 극복하기 위해, 현재 개발되고 있는 기술은 "유도 만능 줄기 세포(iPSC)"로부터 완전히 희출된 CTL을 이용하는 것이다. 이들 iPSC는 특별한 유형의 다분화능 세포로서, 정의된 전사 인자 세트의 이소성(ectopic) 발현시에 성인 체세포로부터 유래된다. 중요하게도, 종양 항원 특이적 CTL은 항원 특이적 CTL로부터 iPSC 기술에 의해 재프로그래밍될 수 있다(Vizcarra et al. 2013, Ando et al. 2015, Timmermans et al. 2009, Kennedy et al. 2012). 이들 iPSC-CTL은 기능적으로 희출되고, 이들이 유래된 원래의 CTL보다 더 긴 텔로미어(1.5배 증가) 및 더 높은 증식능(5-50배 증가)을 입증한다(Nishimura et al. 2013). 이 강력한 재프로그래밍 치료적 접근법은 항원 특이적 암 면역요법의 효능 및 내구성을 현저하게 증가시키는 잠재력을 갖는다. 따라서, 본 개시내용은 세포독성 T 세포를 희출시키는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 방법은 증식능을 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100배 증가시킬 수 있다.
- [0285] 종양 특이적 CTL의 활성화는 많은 암 면역요법의 주요 목표이다. 암 환자로부터 종양 특이적 T-세포의 단리, 시험관내 제조(활성화 및 확장), 및 이들 T-세포의 환자로의 수혈은 T-세포를 이용한 입양 면역요법의 기본 단계이다. iPSC 기술은 입양 세포 전달 면역요법(ACT)의 효능을 개선하는데 사용될 수 있다.
- [0286] iPSC는 야마나카 인자(Yamanaka factor)(Oct3/4, Sox2, Klf4, 및 c-Myc의 조합)의 레트로바이러스 형질감염을 통해 유도된 분화 세포(예컨대, 섬유아세포, 면역 세포, T 세포, B 세포)로부터 유래될 수 있고, 이를 Flt-3 리간드 및 IL-7와 함께 단층 OP9-DL1 세포 시스템에서 배양함으로써 T-세포 계통으로 분화될 수 있다.
- [0287] 일부 구현예에서, iPSC는 T-세포로부터 생성될 수 있다. 확장 후, 이들 세포는 다시 T-세포로 분화된다. 인간 T 림프구는 iPSC 생성을 위한 세포 공급원으로서 작용할 수 있다. 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)는 백혈구성분채집술 또는 정맥천자에 의해 전혈로부터 분리될 수 있고, 그 다음 CD3+ T-세포는 IL-2 및 항-CD3 항체를 이용한 자극에 의해 확장될 수 있다. T-세포 유래 iPSC(T-iPS)는 재프로그래밍 인자의 레트로바이러스 형질도입에 노출될 때 활성화된 T-세포로부터 생성될 수 있다. 이들 T-iPSC는 이들의 원래의 T-세포 수용체(TCR) 유전자 재배열을 보존하므로, 이들은 암 ACT 요법에 대한 내인성 종양 특이적 TCR 유전자를 갖는 조혈 줄기 세포의 무제한 공급원으로서 사용될 수 있다.
- [0288] 따라서, 일부 구현예에서, iPSC는 항원 특이적 세포독성 T 세포로부터 생성된다. 이들 항원 특이적 T 세포는 본원에 기재된 바와 같은 방법에 의해, 예컨대, 하나 이상의 T 세포를 본원에 기재된 바와 같은 아미노산 서열(예컨대, 서열번호 1-17)을 포함하는 웹타이드로 펠스된 하나 이상의 항원 제시 세포와 접촉시킴으로써 생성된다. T-iPSC는 이들의 원래의 T-세포 수용체(TCR) 유전자 재배열을 보존하기 때문에, 이들 T-iPSC가 T 세포로 분화된 후, 이들 T 세포는 암 세포 상의 BCMA 및/또는 TACI를 인식할 수 있다.
- [0289] 일부 구현예에서, BCMA 및/또는 TACI를 특이적으로 인식하는 CAR을 코딩하는 핵산은 T-iPSC 내로 도입될 수 있다. 이들 T-iPSC가 T 세포로 분화된 후, 이들 T 세포는 암 세포 상의 BCMA 및/또는 TACI를 인식할 수 있다.
- [0290] 일부 구현예에서, 분화된 T 세포는 대상체에게 투여된다. 일부 구현예에서, T-iPSC는 대상체에게 투여된 다음, 이들 세포는 대상체의 체내에서 세포독성 T 세포로 분화된다.
- [0291] **대상체**
- [0292] 대상체는 항원에 대한 면역 반응이 가능한 임의의 동물일 수 있다. 용어 "대상체" 및 "환자"는 명세서 전반에 상호교환적으로 사용되며, 본 개시내용의 방법에 따른 치료가 제공되는 동물, 인간 또는 비인간을 기술한다. 수의학 및 비수의학 적용이 본 발명에 의해 고려된다. 인간 환자는 성인 인간 또는 청소년 인간(예컨대, 18세 미만의 인간)일 수 있다. 인간 외에도, 대상체는 비체한적으로 마우스, 랫트, 햄스터, 기니어 피그, 토끼, 폐럿, 고양이, 개, 및 영장류를 포함한다. 예를 들어, 비인간 영장류(예컨대, 원숭이, 침팬지, 고릴라, 등), 설치류(예컨대, 랫트, 마우스, 게르빌루스쥐(gerbil), 햄스터, 폐럿, 토끼), 토끼목, 돼지(예컨대, 돼지, 미니 돼지), 말, 개, 고양이, 소, 및 다른 가축, 농장 동물, 및 동물원 동물이 포함된다.
- [0293] 대상체는 암을 갖거나, 암을 가질 것으로 의심되거나, 또는 암이 발생할 위험이 있는 대상체일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "암"은 자율 성장 능력, 즉, 빠르게 증식하는 세포 성장을 특징으로 하는 비정상 상태를 갖는 세포를 지칭한다. 용어는 조직병리학적 유형 또는 침습 단계에 관계없이, 모든 유형의 암성 성장 또는 종양발생 과정, 전이성 조직 또는 악성으로 변형된 세포, 조직, 또는 장기를 포함하는 것을 의미한다. 본원에 사용된 바와 같이 용어 "종양"은 암성 세포, 예컨대, 암성 세포의 덩어리를 지칭한다. 본원에 기재된 방법을 사용하여 치료되거나 진단될 수 있는 암은, 예컨대 폐, 유방, 갑상선, 림프, 위장관, 및 비뇨생식관에 영향을 미치는 다양한 장기 시스템의 악성 종양뿐만 아니라 대부분의 결장암, 신장 세포 암종, 전립선암 및/또는 고환 종양, 폐의 비소 세포 암종, 소장의 암 및 식도의 암과 같은 악성 종양을 포함하는 선암종을 포함한다. 일부 구현

예에서, 본원에 기재된 제제는 대상체에서 암종을 치료 또는 진단하기 위해 설계된다. 용어 "암종"은 당업계에서 인식되며, 호흡기계 암종, 위장관계 암종, 비뇨생식계 암종, 고환 암종, 유방 암종, 전립선 암종, 내분비계 암종, 및 흑색종을 포함하는 상피 또는 내분비 조직의 악성 종양을 지칭한다. 일부 구현예에서, 암은 신장 암종 또는 흑색종이다. 예시적인 암종은 자궁경부, 폐, 전립선, 유방, 두경부, 결장 및 난소의 조직으로부터 형성되는 암종을 포함한다. 용어는 또한 예컨대, 암종 및 육종 조직으로 구성되는 악성 종양을 포함하는 암육종을 포함한다. "선암종"은 선상(glandular) 조직으로부터 유래된 암종 또는 종양 세포가 인식 가능한 선상 구조를 형성하는 암종을 지칭한다. 용어 "육종"은 당업계에서 인식되고, 중간엽 유래의 악성 종양을 지칭한다. 일부 구현예에서, 대상체는 혈액학적 암, 예컨대, 다발성 골수종, 백혈병, 비호지킨 림프종, 또는 호지킨 림프종을 갖는다.

[0294] 일부 구현예에서, 대상체는 예컨대, 다발성 골수종, B 세포 관련 악성 종양, 형질 세포 관련 악성 종양, 전악성 질환(예컨대, MM의 전악성 질환, 예컨대 SMM 또는 MGUS)을 포함하는, BCMA 발현/파발현 질환 또는 TACI 발현/파발현 질환을 갖는다.

[0295] 일부 구현예에서, 대상체는 형질 세포 장애를 갖거나, 가질 것으로 의심되거나, 또는 발생할 위험이 있는 대상일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "형질 세포 장애"는 클론 형질 세포(PC) 증식 및 파라단백질(예컨대, 단클론 면역글로불린 및/또는 유리 경쇄(FLC))의 과다분비를 특징으로 하는 질환 또는 장애의 군을 지칭한다.

[0296] 형질 세포 장애의 비제한적인 예는 의미불명의 단클론 감마글로불린병증(MGUS), 다발성 골수종(MM), 반덴스트룀 거대글로불린혈증(WM), 경쇄 아밀로이드증(AL), 고립성 형질세포종(예컨대, 뼈의 고립성 형질세포종, 또는 골수외 형질세포종), 다발신경병증, 장기종대, 내분비병증 단클론 감마글로불린병증 및 피부 변화 증후군(POEMS), 및 종쇄 질환을 포함한다. 다른 형질 세포 장애는, 예컨대, 신장 의미의 단클론 감마글로불린병증(MGRS), MGUS 관련 신경병증, 및 다른 파라단백질성 신경병증을 포함한다.

[0297] MGUS, 무증상 MM(SMM), 및 증상 MM은 동일한 질환의 스펙트럼을 나타낸다. 증상 또는 활성 다발성 골수종은 임의의 수준의 단클론 단백질 및 임의의 CRAB 기준(고칼슘혈증, 신부전, 빈혈, 또는 형질 세포 클론과 관련된 것으로 간주되는 골 병변)의 형태의 골수종 징후 사건(myeloma defining event) 또는 악성 종양의 임의의 새로운 바이오마커(60% 이상의 클론 형질 세포에 의한 BM 개선; 100 이상의 관련된 대 관련되지 않은 FLC의 비율; 및/ 또는 MRI 상의 하나를 초과하는 골 병변의 존재(Kyle R.A. et al., Leukemia, 23: 3-9 (2009); Rajkumar V.S. et al., Lancet Oncology, 15: 12, 2014)로 구성되는 말초 장기 손상의 존재 외에도, 클론 형질 세포에 의한 10% 초과의 BM 침윤 및/또는 생검 입증된 형질세포종을 특징으로 한다. MM은 골수(BM) 공간의 내부 또는 외부에 악성 형질 세포의 개별 클러스터로서, BM의 광범위한 침윤, 및 때때로 형질세포종의 형성을 특징적으로 수반하는 형질 세포 악성 종양이다(Kyle R.A. et al., N. Engl. J. Med., 351: 1860-73(2004)). 이 질환의 결과는 많으며, 다수의 장기 시스템을 포함한다. BM 및 정상 형질 세포 기능의 파괴는 빈혈, 백혈구감소증, 저감마글로불린혈증, 및 혈소판감소증을 유발하며, 이는 다양하게 피로, 감염에 대한 감수성 증가, 및, 덜 흔하게는, 출혈 경향의 증가를 초래한다. 뼈에서의 질환 관여는 골용해성 병변을 생성하고, 뼈 통증을 생성하며, 고칼슘혈증과 관련될 수 있다(Kyle R.A. et al., Blood, 111: 2962-72(2008)).

[0298] 무증상 MM(SMM)은 골수에서 30 g/L 이상의 혈청 면역글로불린(Ig) G 또는 IgA 단클론 단백질 및/또는 10% 이상의 형질 세포를 갖지만 말초 장기 손상 또는 악성 종양 징후 바이오마커의 증거는 없는 것을 특징으로 한다(Rajkumar et al., Lancet, 2014). SMM의 자연사의 연구는 2개의 상이한 유형인 진화하는 무증상 MM 및 비진화하는 무증상 MM이 있음을 시사한다(Dimopoulos M. et al., Leukemia, 23(9): 1545-56(2009)). 진화하는 SMM은 M 단백질의 점진적인 증가 및 1.3년의 활성 다발성 골수종으로의 더 짧은 중간 진행 시간(TTP)을 특징으로 한다. 비진화하는 SMM은 3.9년의 평균 TTP를 가지고, 활성 다발성 골수종으로의 진행 시에 갑자기 변화할 수 있는 보다 안정적인 M 단백질을 갖는다.

[0299] 의미불명의 단클론 감마글로불린병증(MGUS)은 표준 실험실 혈액 검사 동안 혈액에서 비정상 면역글로빈 단백질(파라단백질로 공지됨)이 발견되는 상태이다. MGUS는 다발성 골수종 및 유사한 질환과 유사하지만, 항체의 수준은 더 낮고, 골수에서의 형질 세포(항체를 분비하는 백혈구)의 수는 더 낮으며, 그것은 증상 또는 주요 문제가 없다.

[0300] 일부 구현예에서, 대상체는 다발성 골수종, SMM, 또는 MGUS를 갖는다. 일부 구현예에서, 대상체는 다발성 골수종의 차도가 있는 대상체일 수 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 전악성 질환(예컨대, MM의 전악성 질환, 예컨대 SMM 또는 MGUS)을 갖는다.

[0301] 일부 구현예에서, 대상체는 BCMA 또는 TACI를 발현하거나 과발현하는 한 가지 유형의 암을 가질 수 있다. 따라서, 방법은 또한 하나 이상의 펩타이드(또는 핵산)를 대상체에게 투여하기 전에, 대상체의 암(예컨대, 다발성 골수종)의 하나 이상의 암 세포가 BCMA 또는 TACI를 발현하거나 과발현하는지 결정하는 단계를 포함할 수 있다. 이를 단백질의 발현은 mRNA 및 단백질 발현 모두를 포함한다. 세포에서 단백질 및 mRNA 발현을 검출하는 방법은 당업계에 알려져 있으며, 예컨대, 단백질을 검출하기 위한 효소-결합 면역흡착 분석(ELISA), 웨스턴 및 도트-블롯팅 기술, 또는 면역조직화학 기술 및 mRNA를 검출하기 위한 역전사-중합효소 연쇄 반응(RT-PCR) 또는 노던-블롯팅 기술을 포함한다. 일부 구현예에서, 암 세포에서의 BCMA 또는 TACI의 발현의 평균 수준은 정상 세포(예컨대, 동일한 대상체에서의 정상 조직 세포, 동일한 대상체에서의 정상 형질 세포, 또는 건강한 대상체에서의 조직 세포 또는 형질 세포)에서의 BCMA 또는 TACI의 발현의 평균 수준보다 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 더 높다. 일부 구현예에서, 암 세포에서의 BCMA 또는 TACI의 발현의 평균 수준은 정상 세포(예컨대, 동일한 대상체에서의 정상 조직 세포, 동일한 대상체에서의 정상 형질 세포, 또는 건강한 대상체에서의 조직 세포 또는 형질 세포)에서의 BCMA 또는 TACI의 발현의 평균 수준보다 적어도 2배, 3배, 5배, 10배, 20배, 또는 50배 더 높다.

[0302] 대상체는 암(예컨대, 다발성 골수종)을 갖거나, 가질 것으로 의심되거나, 발생할 위험이 있을 수 있다. "암을 가질 것으로 의심되는" 대상체는 암의 하나 이상의 증상을 갖는 대상체이다. 암의 증상은 당업자에게 널리 알려져 있으며, 일반적으로, 비제한적으로, 통증, 체중 감소, 쇠약, 지나친 피로, 먹기 곤란, 식욕 부진, 만성 기침, 호흡곤란 악화, 객혈, 요혈, 혈변, 메스꺼움, 구토, 복부 충만, 팽만감, 복강내 액체, 질 출혈, 변비, 복부 팽창, 결장의 천공, 급성 복막염(감염, 발열, 통증), 통증, 토혈, 심한 발한, 발열, 고혈압, 빈혈, 설사, 황달(jaundice), 현기증, 오한, 근육 경련, 연하 곤란 등을 포함한다. 다발성 골수종의 증상은 구체적으로, 예컨대, 뼈 통증(예컨대, 등 또는 갈비뼈에서), 혈액 내 높은 수준의 칼슘, 과도한 갈증 또는 배뇨, 변비, 메스꺼움, 식욕 부진, 혼란, 다리의 쇠약 또는 마비, 체중 감소, 또는 반복된 감염을 포함한다.

[0303] 본원에 사용된 바와 같이, "암이 발생할 위험이 있는" 대상체는 암이 발생할 소인, 즉, 종양 억제자 유전자에서의 돌연변이(예컨대, BRCA1, p53, RB, 또는 APC에서의 돌연변이)와 같이 암이 발생할 유전적 소인을 갖거나, 암을 초래할 수 있는 상태에 노출되었거나, 또는 암을 초래할 수 있는 상태에 의해 현재 영향을 받는 대상체이다. 따라서, 대상체가 돌연변이성 또는 발암성 수준의 특정 화합물(예컨대, 담배 연기 내의 발암성 화합물, 예컨대 아크릴레인, 4-아미노바이페닐, 방향족 아민, 벤젠, 벤즈 {a}안트라센, 벤조{a}피렌, 포름알데히드, 하이드라진, 폴로늄-210(라돈), 우레탄, 또는 염화비닐)에 노출되었을 때 대상체는 "암이 발생할 위험이 있을" 수 있다. 대상체가, 예컨대, 다량의 자외선 또는 X-선에 노출되었거나, 또는 종양 유발/관련 바이러스, 예컨대 유두종바이러스, 엡스타인 바 바이러스, B형 간염 바이러스, 또는 인간 T-세포 백혈병-림프종 바이러스에 노출(예컨대, 감염)되었을 때, 대상체는 "암이 발생할 위험이 있다". 또한, 대상체가 염증(예컨대, 만성 염증)을 겪을 때 대상체는 "암이 발생할 위험이 있다". 예컨대, 대상체가 의미불명의 단클론 감마글로불린병증(MGUS)을 갖는 경우, 대상체는 다발성 골수종이 발생할 위험이 있을 수 있다. 따라서, "암을 가질 것으로 의심되는" 또는 "암이 발생할 위험이 있는" 대상체는 관심 종 내의 모든 대상체가 아닌 것으로 이해된다.

[0304] 일부 구현예에서, 방법은 또한 대상체가 암을 갖는지 결정하는 단계를 포함할 수 있다. 이러한 결정을 위한 적합한 방법은 대상체에서 검출되는 암의 유형에 의존하지만, 이는 당업계에 공지되어 있다. 이러한 방법은 정성적 또는 정량적일 수 있다. 예를 들어, 의료 전문가는 대상체가 본원에 기재된 임의의 것과 같은 다발성 골수종의 2개 이상(예컨대, 3개, 4개, 5개, 또는 6개 이상)의 증상을 나타낼 때 대상체를 다발성 골수종을 갖는 것으로 진단할 수 있다. 대상체는 또한 대상체의 소변에서 혈액 칼슘 수준, 백혈구 또는 적혈구 수, 또는 단백질의 양을 측정함으로써 다발성 골수종을 갖는 것으로 결정될 수 있다.

MHC 분자 다양체

[0305] 본 개시내용은 또한 (i) 본원에 기재된 임의의 펩타이드 중 하나 이상 및 (ii) 주조직적합성 복합체(MHC) 분자 다양체를 포함하는 조성물을 특징으로 한다. 다양체는 2개 이상(예컨대, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 이상)의 전체 MHC 분자 또는 MHC 분자의 펩타이드 결합 영역을 함유한다. 하나 이상의 펩타이드는 MHC 분자 다양체와 결합될 수 있다(예컨대, 공유 또는 비공유 결합될 수 있다).

[0306] 다양체의 MHC 분자는 MHC 클래스 I 분자(예컨대, HLA-A2 분자) 또는 MHC 클래스 II 분자일 수 있다. MHC 분자는 포유동물(예컨대, 설치류, 비인간 영장류, 인간, 또는 본원에 기재된 임의의 다른 포유동물) MHC 분자일 수 있다.

[0307] 다양체 내의 2개 이상의 MHC 분자(또는 MHC 분자의 펩타이드 결합 영역)는 동일한 MHC 분자 또는 상이한 MHC 분

자로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, MHC 분자 다양체는 5개의 MHC 분자를 함유할 수 있고, 이들 중 3개는 동일한 MHC 분자이고 이들 중 2개는 처음 3개와 상이하다. 또 다른 실시예에서, 다양체의 각각의 MHC 분자는 상이하다. MHC 분자 중 적어도 하나는 펩타이드 중 적어도 하나에 결합할 수 있다.

[0309] 일부 구현예에서, 상기 조성물은 본원에 기재된 임의의 펩타이드 중 적어도 2개(예컨대, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 또는 15개 이상)를 함유할 수 있다.

[0310] 조성물은 또한 검출가능한 표지와 결합될 수 있다. 예를 들어, 다양체의 MHC 분자 중 하나 이상은 검출가능한 표지에 공유적으로 또는 비공유적으로 결합될 수 있다. 적합한 검출가능한 표지(예컨대, 효소, 형광 물질, 발광 물질, 생물발광 물질, 또는 방사성핵종) 뿐만 아니라 검출가능한 표지를 펩타이드 또는 MHC 분자에 연결하는 방법이 또한 제공된다.

[0311] MHC 다양체 조성물은 다음과 같이 본원에 기재된 펩타이드를 사용하여 생성될 수 있다: HLA 분자에 결합하는 펩타이드는 상응하는 HLA 중쇄 및 β -마이크로글로불린의 존재하에 재폴딩되어 삼분자 복합체를 생성한다. 이후, 복합체는 이전에 중쇄로 조작된 부위에서 중쇄의 카르복실 말단에서 바이오티닐화된다. 이후, 스트렙타비딘의 첨가에 의해 다양체 형성이 유도된다.

[0312] T 세포 수용체는 광범위한 다른 펩타이드-MHC 복합체 중에서 표적 세포 상의 특정 펩타이드-MHC 복합체를 인식 할 수 있기 때문에, 본원에 기재된 MHC 다양체 조성물은, 예컨대, 관련이 없는 T 세포의 집단에서 항원 특이적 T 세포를 검출하는데 사용될 수 있다. 이러한 분석을 위해, 다양체는 일반적으로 검출가능하게 표지될 것이다.

[0313] 예를 들어, 다양체성 MHC 분자/펩타이드 복합체는 면역원에 노출 후 말초 혈액 단핵 세포를 항원 특이적 CTL의 존재에 대해 평가하는 분석에서 사용될 수 있다. MHC 다양체 복합체는 항원 특이적 CTL을 직접 시각화하고(예컨대, Ogg et al., Science 279: 2103-2106, 1998; 및 Altman et al., Science 174: 94-96, 1996 참고), 말초 혈액 단핵 세포의 샘플에서 항원 특이적 CTL 집단의 빈도를 결정하는데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, MHC 다양체를 다양체화하는데 사용되는 검출가능하게 표지된 스트렙타비딘은 다양체의 MHC 분자/펩타이드 복합체에 결합하는 T 세포를 표지하는데 사용될 수 있다. 이를 수행하기 위해, 다양체로 처리된 세포는, 예컨대, 표지(예컨대, 바이오틴에 접합된 형광단)에 노출된다. 이후, 세포는, 예컨대, 유세포 분석법을 사용하여 쉽게 단리되거나 검출될 수 있다.

[0314] 본원에 기재된 펩타이드(및 이의 약학적 조성물), MHC 다양체 함유 조성물, 키트, 및 제조 물품은 다양한 방법에 사용될 수 있다. 예를 들어, 펩타이드는 (i) 대상체(예컨대, 암을 갖는 대상체)에서 면역 반응을 유도하고; (ii) 배양에서 T 세포를 활성화시키고/거나; (iii) 다발성 골수종과 같은 암을 치료 또는 심지어 예방하는데 사용될 수 있다. 본원에 기재된 바와 같은, MHC 다양체 함유 조성물은, 예컨대, 관련이 없는 T 세포의 집단에서 항원 특이적 T 세포를 검출하는데 사용될 수 있다.

대상체에서 항체를 생산하는 방법

[0315] 면역원(예컨대, 본원에 기재된 임의의 펩타이드 중 하나 이상)에 특이적인 항체를 생산하는 방법은 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 펩타이드에 특이적인 항체 또는 항체 단편은, 예컨대, 동물을 사용한 면역화에 의해, 또는 파아지 디스플레이와 같은 시험관내 방법에 의해 생성될 수 있다. 본원에 기재된 펩타이드의 모두 또는 일부가 항체 또는 항체 단편을 생성하는데 사용될 수 있다.

[0316] 펩타이드는 적합한 대상체(예컨대, 토끼, 염소, 마우스, 또는 다른 포유동물, 예컨대 인간)를 펩타이드로 면역화시킴으로써 항체를 제조하는데 사용될 수 있다. 적절한 면역원성 제제는, 예를 들어, 본원에 기재된 조성물 중 어느 것을 함유할 수 있다. 제제는 보조제, 예컨대 프로인트 완전 또는 불완전 보조제, 명반, RIBI, 또는 유사한 면역자극제를 추가로 포함할 수 있다. 보조제는 또한, 예컨대, 콜레라 독소(CT), 이콜라이 이열성 독소(LT), 돌연변이성 CT(MCT)(Yamamoto et al.(1997) J. Exp. Med. 185: 1203-1210) 및 돌연변이성 이콜라이 이열성 독소(MLT)(Di Tommaso et al.(1996) Infect. Immunity 64: 974-979)를 포함한다. MCT 및 MLT는 모 분자에 비해 보조제 활성을 실질적으로 손상시키지 않으면서 독성을 실질적으로 감소시키는 점 돌연변이를 함유한다. 적합한 대상체를 면역원성 펩타이드 제제(예컨대, 본원에 기재된 조성물 중 어느 것)로 면역화시키는 것은 달 다른 항-펩타이드 항체 반응을 유도한다. 일부 구현예에서, 톤 유사 수용체-3 리간드(예컨대, 폴리 ICLC), 인터페론 알파(IFN α), 인터페론 감마(IFN γ), 또는 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF)는, 예컨대, 면역 반응을 증강하기 위해 대상체에게 투여될 수 있다.

[0317] 본원에 사용된 바와 같이 용어 항체는 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 분자의 면역학적 활성 부분(즉, 펩타이드(예컨대, 본원에 기재된 펩타이드)에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 함유하는 분자)을 지칭한다.

본원에 기재된 펩타이드에 특이적으로 결합하는 항체는 펩타이드에 결합하지만 샘플 내의 다른 분자에는 실질적으로 결합하지 않는 항체이다. 면역글로불린 분자의 면역학적 활성 부분의 예는, 예컨대, F(ab) 단편, F(ab')² 단편, 또는 본원에 기재된 임의의 다른 항체 단편을 포함한다.

[0319] 본원에 기재된 방법에 의해 생산된 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 1-17 중 어느 것의 아미노산 서열 내의 또는 아미노산 서열과 중첩하는 에피토프에 선택적으로 결합할 수 있다. 항체는 또한 서열번호 1-17 중 어느 것의 아미노산 서열 내의 또는 아미노산 서열과 중첩하는 에피토프에 결합하는 항체의 결합을 교차 차단하는 항체일 수 있다. 전형적으로, 항체가 10⁻⁶ M 미만의 KD로 결합할 때 에피토프에 대한 항체의 결합은 선택적인 것으로 간주된다. 필요한 경우, 비특이적 결합은 결합 조건을 변화시킴으로써 선택적인 결합을 실질적으로 영향을 미치지 않으면서 감소될 수 있다. "가교 차단"하는 항체 또는 "가교 항체"는 에피토프(예컨대, 서열번호 1-17 중 어느 것 내에 함유되거나 어느 것과 중첩하는 것)에 결합될 때, 펩타이드에 결합하는 제2 항체의 능력을 감소시키거나 제거하는(제1 항체의 부재하에 발생하는 펩타이드의 제2 항체의 결합에 비해) 제1 항체를 지칭한다. 본원에 기재된 방법에 의해 생산된 항체(예컨대, 본원에 기재된 하나 이상의 펩타이드에 특이적인 항체)는, 예컨대, BCMA 또는 TACI를 발현하는 암 세포를 검출하는데 사용될 수 있고, 따라서 본원에 기재된 많은 예시적인 방법에서 유용한 것으로 이해된다.

면역학적 시험

[0320] [0321] 백신접종된 대상체의 항원 특이적 세포 면역 반응은 많은 상이한 분석, 예컨대 테트라머 분석, ELISPOT, 및 정량적 PCR에 의해 모니터링될 수 있다. 이를 방법 및 프로토콜은, 예컨대, 문헌[Current Protocols in Immunology, Coligan, J. et al., Eds., (John Wiley & Sons, Inc.; New York, N.Y.)에 기재되어 있다.

[0322] 테트라머 분석은 혈액 샘플 내의 주어진 항원에 특이적인 T-세포를 검출 및 정량화하는데 사용될 수 있다. 펩타이드와 복합된 재조합 MHC 분자로 구성된 테트라머는 항원 특이적 T 세포의 집단을 확인하는데 사용될 수 있다. 항원에 특이적인 T 세포를 검출하기 위해, 이를 항원으로부터의 펩타이드를 함유하는 형광색소 표지된 특이적 펩타이드 테트라머 복합체(예컨대, 피코에리트린(PE)-tHLA)는 베크만 쿨터(Beckman Coulter, San Diego, Calif.)에 의해 합성 및 제공된다. 특정 CTL 클론 CD8 세포는 10⁵ 세포/50 μl FACS 완충제(포스페이트 완충제 및 1% 불활성화된 FCS 완충제)에 재현탁된다. 세포는 실온에서 30분 동안 1 μl tHLA와 인큐베이션되고, 인큐베이션은 10 μl 항-CD8 mAb(Becton Dickinson, San Jose, Calif.)와 함께 4°C에서 30분 동안 계속된다. 세포는 FACS(Becton Dickinson)에 의한 분석 전에 2 ml의 차가운 FACS 완충제에서 2회 세척된다.

[0323] ELISPOT 분석은 사이토카인 분비 세포를 검출하는데, 예컨대, 백신접종된 환자에서의 세포가 항원에 대한 반응으로 사이토카인을 분비하는지 결정하여, 항원 특이적 반응이 유발되었는지의 여부를 입증하는데 사용될 수 있다. ELISPOT 분석 키트는 R & D Systems(Minneapolis, Minn.)로부터 공급되며, 제조사의 지침에 의해 기재된 바와 같이 수행된다. 백신접종 전후로부터의 반응자(R) 1×10⁵ 환자의 PBMC 세포를 캡처 Ab가 코팅된 니트로셀룰로스막 삽입물을 갖는 96-웰 플레이트에 플레이팅한다. 자극자(S) 세포(항원으로 펄스된 TAP-결핍 T2 세포)를 1:1의 R:S 비율로 첨가한다. 24시간 배양 후, 플레이트를 4회 세척함으로써 세포를 제거한다. 검출 Ab를 각 웰에 첨가한다. 플레이트를 4°C에서 밤새 인큐베이션하고, 세척 단계를 반복할 것이다. 스트렙타비딘-AP와 함께 2시간 인큐베이션 후, 플레이트를 세척한다. BCIP/NBT 크로모겐의 분취물(100 μl)을 각 웰에 첨가하여 스팟을 현상시킨다. 60분 후에 물로 세척하여 반응을 정지시킨다. 스팟을 컴퓨터 지원 이미지 분석(Cellular Technology Ltd, Cleveland, Ohio)을 이용하여 스캔 및 계수한다. 양측 윌콕슨 순위 합 시험(two-tailed Wilcoxon rank sum test)에 의해 결정된 바와 같이, 실험 값이 비펄스된 T2 세포에 대한 평균 스팟 수(백그라운드 값)와 유의하게 상이한 경우, 백그라운드 값을 실험 값에서 차감한다.

[0324] 정량적 PCR은 면역 반응을 평가하는 또 다른 수단이다. 정량적 PCR에 의해 환자에서 IFN-γ 생산을 조사하기 위해, 환자의 백신접종 전 및 백신접종 후 샘플 및 자가 수지상 세포로부터의 동결보존된 PBMC를 10% 환자 혈청을 갖는 RPMI DC 배양 배지에서 해동시키고, 세척하고, 계수한다. PBMC를 24-웰 플레이트에서 2 ml의 배지에 3×10⁶ PBMC로 플레이팅하고; 수지상 세포를 1×10⁶/ml로 플레이팅하고 24 웰 플레이트에서 각 웰에서 2 ml에서 10 μg/ml 종양 펩타이드로 24시간 동안 펄스한다. 수지상 세포를 수집하고, 세척하고, 계수하고, 1×10⁶/ml로 희석하고, 3×10⁵(즉, 300 μl 용액)를 PBMC(DC: PBMC=1: 10)를 갖는 웰에 첨가한다. 2.3 μl IL-2(300 IU/mL)를 3-4일마다 첨가하고, 세포를 배양 개시 후 10일 내지 13일에 채취한다. 그리고 나서, 채취된 세포를 37°C에서 4시간 동안 10 μg/ml 종양 펩타이드로 펄스된 종양 세포 또는 자가 PBMC로 자극한다. 11-13일에, 배양물을 채취

하고, 2회 세척한 다음, 대조군을 위해 사용하는 2개의 웰(표적 없음); 및 종양 세포가 이용가능한 경우 CTL을 종양 세포(1:1)와 함께 공동 배양하는 또 다른 2개의 웰인 4개의 상이한 웰로 나눈다. 종양 세포를 이용할 수 없는 경우, 10 µg/ml 종양 용해물을 CTL에 첨가한다. 4시간의 자극 후, 세포를 수집하고, RNA를 추출하고, IFN-γ 및 CD8 mRNA 발현을 열순환기/형광 카메라 시스템으로 평가한다. PCR 증폭 효율은 자연 로그 진행을 따르며, 선형 회귀 분석은 0.99를 초과하는 상관 계수를 입증한다. 경험적 분석에 기초하여, 1-사이클 차이는 mRNA 양의 2배 차이인 것으로 해석되고, CD8-정규화된 IFN-γ 양이 결정된다. 백신 전의 IFN-γ에 비해 백신 후의 >1.5배의 증가는 양성 I형 백신 반응성에 대한 확립된 표준이다.

[0325] 요법을 선택하는 방법

암(예컨대, 형질 세포 장애, 예컨대 다발성 골수종 또는 BCMA 또는 TACI가 발현되거나 과발현되는 임의의 암)을 가진 대상체를 위한 요법을 선택하는 방법은 선택적으로, 대상체의 하나 이상의 암 세포가 BCMA 또는 TACI를 발현하거나 과발현하는지의 여부를 결정하는 단계; 및 하나 이상의 세포가 BCMA 또는 TACI를 과발현하는 경우, 아미노산 서열이 (i) 대상체에서 면역 반응을 유도할 수 있고; (ii) MHC 분자에 결합할 수 있고; (iii) MHC 분자의 맥락에서, T 세포 상의 T 세포 수용체에 의해 인식될 수 있으면, 본원에 기재된 바와 같은 적어도 하나의 웹타이드(서열번호 1-17 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 웹타이드, 서열번호 1-17과 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 동일하거나 서열번호 1-17 중 어느 것의 아미노산 서열의 4개 이하의 치환을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 웹타이드)를 함유하는 조성물을 대상체를 위한 요법으로서 선택하는 단계를 포함한다.

[0327] 일부 구현예에서, 방법은 대상체의 하나 이상의 암 세포가 MHC 분자, 예컨대, MHC 클래스 I 분자(예컨대, HLA-A2), 또는 MHC 클래스 II 분자를 발현하는지의 여부를 결정하는 단계를 추가로 포함한다.

[0328] 대상체의 암의 하나 이상의 세포(예컨대, 형질 세포)가 BCMA 및 TACI 모두를 발현하거나 과발현하는 경우, 적합한 웹타이드의 조합이 대상체에게 전달될 수 있는 것으로 이해된다. 예를 들어, 대상체의 암의 하나 이상의 세포(예컨대, 형질 세포)가 BCMA 및 TACI 모두를 발현하거나 과발현하는 것으로 결정되는 경우, 요법을 선택하는 방법은 서열번호 1-6 및 13-14 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 적어도 하나의 웹타이드를 함유하는 조성물, 및 서열번호 7-12 및 15-17 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 적어도 하나의 웹타이드를 함유하는 조성물의 조합을 대상체를 위한 요법으로서 선택하는 단계를 포함할 수 있다.

[0329] 하나 이상의 세포가 BCMA, TACI, 및/또는 MHC 분자를 발현하는지의 여부를 결정하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플(예컨대, 혈액 샘플 또는 림프절 조직 샘플)은 세포(또는 세포 용해물)에 의해 발현된 BCMA 및 TACI 폴리펩타이드의 존재 또는 양을 검출하기 위해 본원에 기재된 방법에 의해 제조된 BCMA 및/또는 TACI 특이적 항체를 사용하여 시험될 수 있다. 생물학적 샘플을 폴리펩타이드의 존재 또는 양에 대해 분석하는 방법은, 예컨대, ELISA, 면역조직화학, 유세포 분석법, 웨스턴-블로팅, 또는 도트-블로팅 분석을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 임의의 방법은 또한 대상체로부터 생물학적 샘플을 제공하고/거나 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계를 포함할 수 있다. 본원에 기재된 방법을 위한 적합한 생물학적 샘플은 임의의 생물학적 유체, 세포, 조직, 또는 이의 분획을 포함하며, 이는 관심 분석물 단백질을 포함한다. 생물학적 샘플은, 예를 들어, 대상체로부터 수득된 표본일 수 있거나 이러한 대상체로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 샘플은 생검에 의해 수득된 조직 절편, 또는 조직 배양에 놓이거나 조직 배양에 적합한 세포일 수 있다. 생물학적 샘플은 또한 세포-함유 생물학적 유체, 예컨대 소변, 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 정액, 객담, 뇌척수액, 눈물, 점액 또는 흡인물(예컨대, 폐 또는 젖꼭지 흡인물), 또는 종이 또는 종합체 기관 상에 흡수된 샘플일 수 있다. 생물학적 샘플은, 원하는 경우, 특정 세포 유형을 함유하는 분획으로 추가로 분별될 수 있다. 예를 들어, 혈액 샘플은 혈청 또는 특정 유형의 혈액 세포, 예컨대 적혈구 또는 백혈구를 함유하는 분획으로 분별될 수 있다. 원하는 경우, 샘플은 조직 및 생물학적 유체의 조합과 같은 대상체로부터의 샘플 유형의 조합일 수 있다.

[0330] 생물학적 샘플은 대상체, 예컨대, 암(예컨대, 다발성 골수종)을 갖거나, 가질 것으로 의심되거나 발생할 위험이 있는 대상체로부터 수득될 수 있다. 생물학적 샘플을 수득하기 위한 임의의 적합한 방법이 사용될 수 있지만, 예시적인 방법은, 예컨대, 정맥절개술(phlebotomy), 면봉(예컨대, 구강 면봉), 흡인, 또는 미세 바늘 흡인물 생검 절차를 포함한다. 미세 바늘 흡인에 민감한 조직의 비제한적인 예는 림프절, 폐, 갑상선, 유방, 및 간을 포함한다. 샘플은 또한, 예컨대, 미세절제(예컨대, 레이저 캡처 미세절제(LCM) 또는 레이저 미세절제(LMD)), 방광 세척, 도말(PAP 도말), 또는 관 세척에 의해 수집될 수 있다.

[0331] 의료 전문가는 또한 암을 치료하기 위한 하나 이상의 추가적인 치료제 또는 항암제의 부작용을 치료하기 위한 하나 이상의 약제를 선택, 처방 및/또는 투여할 수 있다. 다발성 골수종을 치료하기 위한 적합한 화학치료제는,

예컨대, 멜팔란, 사이클로포스파미드, 빙크리스틴, 독소루비신, 프레드니손, 텍사메타손, 프로테오좀 억제제(예컨대, 보르테조닙), 탈리도미드, 또는 레날리도미드를 포함한다. 항암제의 부작용은, 예컨대, 빙혈, 위장관 증상(예컨대, 메스꺼움, 구토, 설사), 백혈구감소증(감염을 유발할 수 있는 백혈구 수의 감소), 일시적인 탈모, 또는 혈소판감소증(출혈을 유발할 수 있는 혈소판 수의 감소)를 포함한다. 따라서, 의료 전문가는 에포에틴 알파(예컨대, Procrit® 또는 Epogen®)와 같은 항빈혈 약제와 함께 빙크리스틴과 같은 화학치료제를 대상체에게 처방 또는 투여할 수 있다.

[0332] 핵산 백신

본 개시내용은 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 폴리펩타이드를 코딩하는, 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드, 예컨대, 폴리뉴클레오타이드 작제물을 포함하는 핵산 백신(NAV)을 제공한다. 예시적인 폴리뉴클레오타이드는 예컨대, 폴리뉴클레오타이드 작제물을 포함하며, 이는 DNA, RNA, 항원 코딩 RNA 폴리뉴클레오타이드, 예컨대, mRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드, 예컨대, 항원 코딩 RNA 폴리뉴클레오타이드는 적어도 하나의 화학적 변형을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 핵산 백신은 중합체성 또는 리포솜성 나노캐리어(예컨대, 나노입자) 내에서 제제화될 수 있다.

[0334] 일부 구현예에서, 보조제 또는 면역 강화제는 또한 하나 이상의 NAV와 함께 또는 조합되어 투여될 수 있다 일부 구현예에서, 보조제는 T-세포 및/또는 B-세포 및/또는 NK 세포를 프라임하기 위해 공동 신호로서 작용한다.

[0335] NAV는 이들의 원자가가 다를 수 있다. 원자는 NAV 또는 NAV 폴리뉴클레오타이드(예컨대, RNA 폴리뉴클레오타이드) 또는 폴리펩타이드에서 항원성 구성요소의 수를 지칭한다. 일부 구현예에서, NAV는 1가이다. 일부 구현예에서, NAV는 2가이다. 일부 구현예에서, NAV는 3가이다. 일부 구현예에서 NAV는 다가이다. 다가 백신은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 이상의 항원 또는 항원성 모이어티(예컨대, 항원성 펩타이드 등)를 포함할 수 있다. NAV의 항원성 구성요소는 단일 폴리뉴클레오타이드 또는 별도의 폴리뉴클레오타이드 상에 있을 수 있다.

[0336] NAV는 치료제 또는 예방제로서 사용될 수 있다. 이들은 의약에서 사용하기 위해 및/또는 면역 효과기 세포의 프라이밍을 위해 제공되며, 예컨대 생체외에서 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 자극/형질감염시키고 활성화된 세포를 재주입하기 위해 사용된다. 예를 들어, 본원에 기재된 NAV는 대상체에게 투여될 수 있고, 폴리뉴클레오타이드는 생체내에서 번역되어 항원을 생산한다. 인간 및 다른 포유동물에서 질환 또는 상태의 진단, 치료 또는 예방을 위한 조성물, 방법, 키트, 및 시약이 제공된다. 활성 치료제는 NAV, NAV를 함유하는 세포 또는 상기 NAV에 함유된 폴리뉴클레오타이드로부터 번역된 폴리펩타이드를 포함할 수 있다.

[0337] 본원에 기재된 NAV의 폴리뉴클레오타이드를 사용하여 세포, 조직 또는 유기체에서 폴리펩타이드(예컨대, 항원 또는 면역원)의 번역을 유도하는 방법이 본원에 제공된다. 이러한 번역은 생체내, 생체외, 배양내, 또는 시험관내일 수 있다. 세포, 조직 또는 유기체는 관심 폴리펩타이드(예컨대, 항원 또는 면역원)를 코딩하는 적어도 하나의 번역가능한 영역을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 NAV를 함유하는 조성물의 유효량과 접촉된다.

[0338] NAV 조성물의 "유효량"은, 적어도 부분적으로, 표적 조직, 표적 세포 유형, 투여 수단, 폴리뉴클레오타이드의 물리적 특징(예컨대, 변형된 뉴클레오사이드의 크기 및 정도) 및 NAV의 다른 구성요소, 및 다른 결정요인에 기초하여 제공된다. 일반적으로, NAV 조성물의 유효량은, 바람직하게는 동일한 항원을 코딩하는 상응하는 비변형된 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 조성물보다 더 효율적으로, 세포에서 항원 생산의 기능으로서 유도되거나 증가된 면역 반응을 제공한다. 증가된 항원 생산은 증가된 세포 형질감염(즉, NAV로 형질감염된 세포의 백분율), 폴리뉴클레오타이드로부터 증가된 단백질 번역, 감소된 핵산 분해(예컨대, 변형된 폴리뉴클레오타이드로부터 단백질 번역의 증가된 지속에 의해 입증된 바와 같음), 또는 숙주 세포의 변경된 선천적 면역 반응에 의해 입증될 수 있다.

[0339] 본 개시내용은 또한 이를 필요로 하는 포유동물 대상체에서 폴리펩타이드 항원의 생체내 번역을 유도하는 방법을 제공한다. 여기에서, 적어도 하나의 구조적 또는 화학적 변형 및 폴리펩타이드(예컨대, 항원 또는 면역원)를 코딩하는 번역가능한 영역을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 NAV 조성물의 유효량이 본원에 기재된 전달 방법을 사용하여 대상체에게 투여된다. 폴리뉴클레오타이드는 폴리뉴클레오타이드가 세포에서 번역되는 양 및 다른 조건 하에 제공된다. 폴리뉴클레오타이드가 위치하는 세포, 또는 세포가 존재하는 조직은 1회 이상의 NAV 투여로 표적화될 수 있다.

[0340] 본원에 기재된 단백질은 세포 내에, 잠재적으로 세포질 또는 핵과 같은 특정 구획 내에 위치하기 위해 조작될 수 있거나, 세포로부터의 분비 또는 세포의 원형질 막으로의 전위를 위해 조작될 수 있다.

[0341]

일부 구현예에서, 핵산(예컨대, DNA, RNA)은 하나 이상의 변형을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 정의된 바와 같은 핵산 분자(예컨대, RNA 분자)는 뉴클레오타이드 유사체/변형, 예컨대 백본 변형, 당 변형 또는 염기 변형을 함유할 수 있다. 본 발명과 관련된 백본 변형은 본원에 정의된 바와 같은 핵산 분자에 함유된 뉴클레오타이드의 백본의 포스페이트가 화학적으로 변형된 변형이다. 본 발명과 관련된 당 변형은 본원에 정의된 바와 같은 핵산 분자의 뉴클레오타이드의 당의 화학적 변형이다. 또한, 본 발명과 관련된 염기 변형은 핵산 분자의 뉴클레오타이드의 염기 모이어티의 화학적 변형이다. 이 맥락에서, 뉴클레오타이드 유사체 또는 변형은 바람직하게는 전사 및/또는 번역에 적용 가능한 뉴클레오타이드 유사체로부터 선택된다.

[0342]

핵산 분자 내로 흔입될 수 있는 변형된 뉴클레오사이드 및 뉴클레오타이드는 당 모이어티에서 변형될 수 있다. 예를 들어, RNA 분자의 2' 하이드록실기(OH)는 많은 상이한 "옥시" 또는 "데옥시" 치환기로 변형 또는 대체될 수 있다. "옥시"-2' 하이드록실기 변형의 예는, 비제한적으로, 알록시 또는 아릴옥시(-OR, 예컨대, R=H, 알킬, 사이클로알킬, 아릴, 아르알킬, 헤테로아릴 또는 당); 폴리에틸렌글리콜(PEG), $-O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$; 2' 하이드록실이, 예컨대, 메틸렌 다리에 의해, 동일한 리보스 당의 4' 탄소에 연결된 "잠금" 핵산(LNA); 및 아미노기(-O-아미노, 여기서 아미노기, 예컨대, NRR은 알킬아미노, 디알킬아미노, 헤테로사이클릴, 아릴아미노, 디아릴아미노, 헤테로아릴아미노, 또는 디헵테로아릴 아미노, 에틸렌 디아민, 폴리아미노일 수 있음) 또는 아미노알록시를 포함한다.

[0343]

당(sugar) 기는 또한 리보스 내의 상응하는 탄소보다 반대 입체화학 구조를 갖는 하나 이상의 탄소를 함유할 수 있다. 따라서, 변형된 핵산 분자는, 예를 들어, 당으로서 아라비노스를 함유하는 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0344]

포스페이트 백본은 변형된 뉴클레오사이드 및 뉴클레오타이드에서 추가로 변형될 수 있으며, 이는 본원에 기재된 바와 같은 핵산 분자(예컨대, RNA) 내로 흔입될 수 있다. 백본의 포스페이트 기는 하나 이상의 산소 원자를 상이한 치환기로 대체함으로써 변형될 수 있다. 또한, 변형된 뉴클레오사이드 및 뉴클레오타이드는 비변형된 포스페이트 모이어티를 본원에 기재된 바와 같은 변형된 포스페이트로 완전히 대체하는 것을 포함할 수 있다. 변형된 포스페이트 기의 예는, 비제한적으로, 포스포로티오에이트, 포스포로셀레네이트, 보라노 포스페이트, 보라노 포스페이트 에스테르, 수소 포스포네이트, 포스포로아미데이트, 알킬 또는 아릴 포스포네이트 및 포스포트리에스테르를 포함한다. 포스포로디티오에이트는 황에 의해 대체된 비연결 산소를 갖는다. 포스페이트 링커는 또한 연결 산소를 질소(브릿지된 포스포로아미데이트), 황(브릿지된 포스포로티오에이트) 및 탄소(브릿지된 메틸렌-포스포네이트)로 대체함으로써 변형될 수 있다.

[0345]

본원에 기재된 바와 같은 핵산 분자(예컨대, RNA 분자) 내로 흔입될 수 있는 변형된 뉴클레오사이드 및 뉴클레오타이드는 핵염기 모이어티에서 추가로 변형될 수 있다. RNA에서 발견되는 핵염기의 예는, 비제한적으로, 아데닌, 구아닌, 시토신 및 우라실을 포함한다. 예를 들어, 본원에 기재된 뉴클레오사이드 및 뉴클레오타이드는 넓은 홈 표면에서 화학적으로 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, 넓은 홈 화학적 변형은 아미노기, 티올기, 알킬기, 또는 할로기를 포함할 수 있다.

[0346]

일부 구현예에서, 뉴클레오타이드 유사체/변형은 염기 변형으로부터 선택될 수 있고, 이는, 예컨대, 2-아미노-6-클로로퓨린리보사이드-5'-트리포스페이트, 2-아미노퓨린-리보사이드-5'-트리포스페이트; 2-아미노아데노신-5'-트리포스페이트, 2'-아미노-2'-데옥시시티딘-트리포스페이트, 2-티오시티딘-5'-트리포스페이트, 2-티오우리딘-5'-트리포스페이트, 2'-플루오로티미딘-5'-트리포스페이트, 2'-0-메틸 이노신-5'-트리포스페이트 4-티오우리딘-5'-트리포스페이트, 5-아미노알릴시티딘-5'-트리포스페이트, 5-아미노알릴우리딘-5'-트리포스페이트, 5-브로모시티딘-5'-트리포스페이트, 5-브로모우리딘-5'-트리포스페이트, 5-브로모-2'-데옥시시티딘-5'-트리포스페이트, 5-브로모-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트, 5-아이오도시티딘-5'-트리포스페이트, 5-아이오도-2'-데옥시시티딘-5'-트리포스페이트, 5-아이오도우리딘-5'-트리포스페이트, 5-아이오도-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트, 5-메틸시티딘-5'-트리포스페이트, 5-메틸우리딘-5'-트리포스페이트, 5-프로피닐-2'-데옥시시티딘-5'-트리포스페이트, 5-프로피닐-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트, 6-아자시티딘-5'-트리포스페이트, 6-아자우리딘-5'-트리포스페이트, 6-클로로퓨린리보사이드-5'-트리포스페이트, 7-데아자아데노신-5'-트리포스페이트, 7-데아자구아노신-5'-트리포스페이트, 8-아자아데노신-5'-트리포스페이트, 8-아지도아데노신-5'-트리포스페이트, 벤즈이미다졸-리보사이드-5'-트리포스페이트, N1-메틸아데노신-5'-트리포스페이트, N1-메틸구아노신-5'-트리포스페이트, N6-메틸아데노신-5'-트리포스페이트, 06-메틸구아노신-5'-트리포스페이트, 슈도우리딘-5'-트리포스페이트, 또는 프로마이신-5'-트리포스페이트, 잔토신-5'-트리포스페이트로부터 선택될 수 있다. 5-메틸시티딘-5'-트리포스페이트, 7-데아자구아노신-5'-트리포스페이트, 5-브로모시티딘-5'-트

리포스페이트, 및 슈도우리딘-5'-트리포스페이트로 이루어진 염기 변형된 뉴클레오타이드의 군으로부터 선택된 염기 변형에 대한 뉴클레오타이드가 특히 바람직하다.

[0347] 일부 구현예에서, 핵산 분자는 이른바 "5' 캡" 구조의 첨가에 의해 변형될 수 있다. 5'-캡은 독립체, 전형적으로 변형된 뉴클레오타이드 독립체이며, 일반적으로 성숙한 mRNA의 5'-말단을 "캡핑"한다. 5'-캡은 전형적으로 변형된 뉴클레오타이드에 의해, 특히 구아닌 뉴클레오타이드의 유도체에 의해 형성될 수 있다. 바람직하게는, 5'-캡은 5'-5'-트리포스페이트 연결을 통해 5'-말단에 연결된다. 5'-캡은 메틸화될 수 있고, 예컨대 m7GpppN일 수 있고, 여기서 N은 5'-캡을 갖는 핵산의 말단 5' 뉴클레오타이드, 전형적으로 RNA의 5'-말단이다. m7GpppN은 중합효소 II에 의해 전사된 mRNA에서 자연적으로 발생하는 5'-캡 구조이며, 따라서 본 발명에 따른 변형된 RNA에 포함되는 변형으로 간주되지 않는다.

[0348] 핵산 백신을 제조하고 사용하는 방법은, 예컨대, US제20070269451호, US제20160317647호, US제9872900호, 및 US제2017002984호에 기재되어 있으며, 이를 각각은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

약학적 조성물

[0349] 본원에 기재된 임의의 웹타이드, 웹타이드를 코딩하는 핵산, 나노입자, 및 세포는 약학적 조성물에 혼입될 수 있다. 조성물은 하나 이상의 웹타이드(및/또는 웹타이드를 코딩하는 핵산) 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 표현 "약학적으로 허용가능한 담체"는 약학적 투여와 양립가능한, 용매, 분산 매질, 코팅, 항균 및 항진균제, 등장성 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 하나 이상의 웹타이드는 시럽, 엘럭서, 혼탁액, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 로젠지, 트로키, 수용액, 크림, 연고, 로션, 젤, 유화액 등의 형태의 약학적 조성물로서 제제화될 수 있다. 보충 활성 화합물(예컨대, 하나 이상의 화학치료제)이 또한 조성물 내로 혼입될 수 있다.

[0350] 약학적 조성물은 일반적으로 그의 의도된 투여 경로와 양립가능하도록 제제화된다. 투여 경로의 예는 경구, 직장, 및 비경구, 예컨대, 정맥내, 근육내, 피내, 피하, 흡입, 경피, 또는 경점막을 포함한다. 비경구 적용에 사용되는 용액 또는 혼탁액은 하기 구성요소를 포함할 수 있다: 멸균 희석제, 예컨대 주사용수, 식염수 용액, 고정유, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 다른 합성 용매; 항균제, 예컨대 벤질 알콜 또는 메틸 파라벤; 항산화제, 예컨대 아스코브산 또는 아황산수소나트륨; 칼레이트제, 예컨대 에틸렌디아민테트라아세트산; 완충제, 예컨대 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트 및 등장성을 조절하기 위한 제제, 예컨대 염화나트륨 또는 벡스트로스. pH는 산 또는 염기, 예컨대 염산 또는 수산화 나트륨으로 조정될 수 있다. 조성물은 앰플, 일회용 주사기 또는 유리 또는 플라스틱으로 제조된 다중 용량 바이알에 밀봉될 수 있다.

[0351] 주사용에 적합한 약학적 조성물은 멸균 수용액(수용성인 경우) 또는 분산액 및 멸균 주사용 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 정맥내 투여를 위해, 적합한 담체는 생리학적 식염수, 정균 수, 크레모포어 EL™(BASF, Parsippany, NJ.) 또는 인산염 완충 식염수(PBS)를 포함한다. 모든 경우에, 약학적 조성물은 멸균되어야 하고, 용이한 주사가능성이 존재할 정도로 액체이어야 한다. 그것은 제조 및 보관 조건에서 안정해야 하며, 박테리아 및 진균과 같은 미생물에 의한 임의의 오염으로부터 보존되어야 한다. 담체는, 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅의 사용에 의해, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지에 의해 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물에 의한 오염의 예방은 다양한 항균 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코브산, 티메로살 등에 의해 달성될 수 있다. 많은 경우, 등장화제, 예를 들어, 당, 폴리알콜, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 염화나트륨을 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 것이다. 주사용 조성물의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 조성물에 포함시킴으로써 촉진될 수 있다.

[0352] 멸균 주사용 용액은 필요한 경우 성분 중 하나 또는 조합을 갖는 적절한 용매에 필요한 양의 하나 이상의 웹타이드(또는 웹타이드를 코딩하는 하나 이상의 핵산)를 혼입시킨 다음, 여과 멸균함으로써 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 웹타이드(들)(또는 웹타이드(들)를 코딩하는 핵산(들))를 염기성 분산 매질 및 상기 열거된 것으로부터 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균 비허를 내로 혼입시킴으로써 제조된다. 멸균 주사용 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 제조 방법은 이의 이전에 멸균 여과된 용액으로부터 활성 성분 및 임의의 추가적인 원하는 성분의 분말을 생성하는 진공 건조 또는 동결 건조를 포함할 수 있다.

[0353] 경구 조성물은 일반적으로 불활성 희석제 또는 식용 담체를 포함한다. 경구 치료 투여의 목적을 위해, 하나 이상의 웹타이드는 부형제와 함께 혼입될 수 있고 정제, 트로키, 또는 캡슐, 예컨대, 젤라틴 캡슐의 형태로 사용

될 수 있다. 경구 조성물은 또한 구강 세정제로 사용하기 위해 액체 담체를 사용하여 제조될 수 있다. 약학적으로 양립가능한 결합제, 및/또는 보조제 물질이 조성물의 일부로서 포함될 수 있다. 정제, 환제, 캡슐, 트로키 등은 하기 성분 중 어느 하나, 또는 유사한 성질의 화합물을 함유할 수 있다: 결합제, 예컨대 미세결정 셀룰로스, 검 트라가칸트 또는 젤라틴; 부형제, 예컨대 전분 또는 락토스, 봉해제, 예컨대 알긴산, 프리모겔, 또는 옥수수 전분; 윤활제, 예컨대 마그네슘 스테아레이트 또는 스테로트(sterote); 활액제, 예컨대 콜로이드성 이산화규소; 감미제, 예컨대 수크로스 또는 사카린; 또는 풍미제, 예컨대 페퍼민트, 메틸 살리실레이트, 또는 오렌지 풍미제.

[0355] 분말 및 정제는 1% 내지 95%(w/w)의 개별 웨타이드 또는 2개 이상의 웨타이드의 혼합물을 함유할 수 있다. 특정 구현예에서, 웨타이드는 약 5% 내지 70%(w/w)의 범위일 수 있다. 적합한 담체는 마그네슘 카보네이트, 마그네슘 스테아레이트, 탈크, 당, 락토스, 텍스트린, 전분, 젤라틴, 트라가칸트, 메틸셀룰로스, 나트륨 카르복시메틸셀룰로스, 저용점 왁스, 코코아 버터 등이다. 용어 "제제"는 다른 담체를 갖거나 갖지 않는 웨타이드가 담체에 의해 둘러싸여 그와 결합되는 캡슐을 제공하는 담체로서 캡슐화 물질을 갖는 웨타이드(또는 핵산)의 제제를 포함하는 것으로 의도된다. 유사하게, 카세이 및 로젠지가 포함된다. 정제, 분말, 캡슐, 환제, 카세이, 및 로젠지는 경구 투여에 적합한 고체 투여 형태로서 사용될 수 있다.

[0356] 경구 사용에 적합한 수성 용액은 활성 구성요소를 물에 용해시키고 원하는 경우 적합한 착색제, 풍미제, 안정제, 및 중점제를 첨가함으로써 제조될 수 있다. 경구 사용에 적합한 수성 혼탁액은 미분된 활성 구성요소를 천연 또는 합성 검, 수지, 메틸셀룰로스, 나트륨 카르복시메틸셀룰로스, 및 다른 널리 알려진 혼탁제와 같은 점성 물질을 이용하여 물에 분산시킴으로써 제조될 수 있다.

[0357] 흡입에 의한 투여의 경우, 웨타이드 또는 핵산은 적합한 추진제, 예컨대, 기체, 예컨대 이산화탄소, 또는 분무기를 함유하는 가압 용기 또는 디스펜서로부터 에어로졸 분무의 형태로 전달될 수 있다.

[0358] 전신 투여는 또한 경점막 또는 경피 수단에 의할 수 있다. 경점막 또는 경피 투여의 경우, 투과되는 장벽에 적절한 침투제가 제제에 사용된다. 이러한 침투제는 일반적으로 당업계에 알려져 있으며, 예를 들어, 경점막 투여를 위해, 세제, 담즙염, 및 푸시드산 유도체를 포함한다. 경점막 투여는 비강 분무 또는 좌제의 사용을 통해 달성될 수 있다. 경피 투여의 경우, 웨타이드 또는 핵산은 당업계에 일반적으로 공지된 바와 같은 연고, 고약, 겔, 또는 크림으로 제제화될 수 있다.

[0359] 웨타이드 또는 핵산은 또한 좌제(예컨대, 코코아 버터 및 다른 글리세라이드와 같은 통상적인 좌제 기제를 이용하여) 또는 직장 전달을 위한 체류 관장의 형태로 제조될 수 있다.

[0360] 일부 구현예에서, 웨타이드 또는 핵산은 임플란트 및 미세캡슐화된 전달 시스템을 포함하는 제어 방출 제제와 같이 웨타이드가 체내로부터 빠르게 제거되는 것을 방지할 담체를 이용하여 제조될 수 있다. 생분해성, 생체양립가능한 중합체, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르, 및 폴리락트산이 사용될 수 있다. 이러한 제제의 제조 방법은 당업자에게 명백할 것이다. 물질은 또한 알자사(Alza Corporation) 및 노바 파마슈티칼스사(Nova Pharmaceuticals, Inc.)로부터 상업적으로 수득될 수 있다. 리포솜 혼탁액(예컨대, APC 특이적 항원에 대한 단클론 항체를 갖는 APC에 표적화된 리포솜 포함)은 또한 약학적으로 허용가능한 담체로서 사용될 수 있다. 이들은, 예를 들어, 미국 특허 제4,522,811호에 기재된 바와 같이, 당업자에게 공지된 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0361] 투여 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 경구 또는 비경구 조성물을 투여량 단위 형태로 제제화하는 것이 유리 할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 투여량 단위 형태는 치료될 대상체에 대한 단위 투여량으로 적합한 물리적 이산 단위를 지칭하고; 각 단위는 필요한 약학적 담체와 관련하여 원하는 치료적 효과를 생성하도록 계산된 미리 결정된 양의 웨타이드(또는 핵산)를 함유한다. 투여량 단위는 또한 사용 설명서를 첨부할 수 있다.

[0362] 웨타이드를 코딩하는 핵산 분자는 벡터에 삽입될 수 있고 유전자 요법 벡터로서 사용될 수 있다. 유전자 요법 벡터는, 예를 들어, 정맥내 주사, 국소 투여에 의해(예컨대, 미국 특허 제5,328,470호 참고) 또는 정위 주사에 의해(예컨대, Chen, et al.(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3054-3057 참고) 대상체에게 전달될 수 있다. 유전자 요법 벡터의 약학적 제제는 허용가능한 희석제에 유전자 요법 벡터를 포함할 수 있거나, 또는 유전자 전달 비히클이 포함된 서방형 매트릭스를 포함할 수 있다. 대안적으로, 완전한 유전자 전달 벡터가 재조합 세포, 예컨대, 레트로바이러스 벡터로부터 온전한 상태로 생산될 수 있는 경우, 약학적 제제는 유전자 전달 시스템을 생산하는 하나 이상의 세포를 포함할 수 있다.

[0363] 유전자 전달 비히클의 추가적인 예는, 비제한적으로, 리포솜, 천연 중합체 및 합성 중합체를 포함하는 생체양립

가능한 중합체; 지질단백질; 폴리펩타이드; 다당류; 지질다당류; 인공 바이러스 외막; 금속 입자; 박테리아; 바이러스, 예컨대 배콜로바이러스, 아데노바이러스, 및 레트로바이러스; 박테리오파아지; 코스미드; 플라스미드; 진균 벡터 및 다양한 진핵 및 원핵 숙주에서의 발현용으로 기재된 당업계에 전형적으로 사용되는 다른 재조합비히클을 포함하며, 유전자 요법뿐만 아니라 단순한 단백질 발현에 사용될 수 있다.

[0364] 바이러스 벡터의 예는 레트로바이러스 벡터, 랜티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스 벡터, 알파바이러스 벡터 등을 포함한다. 항체 또는 이의 단편과 같은 표적화 모이어티를 포함하는 리포솜은 또한 대상체에게 전달하기 위한 핵산의 약학적 조성물을 제조하는데 사용될 수 있다.

[0365] 본원에 기재된 임의의 약학적 조성물은 하기 기재된 바와 같은 투여를 위한 설명서와 함께 용기, 팩, 또는 디스펜서에 포함될 수 있다.

키트 및 제조 물품

[0367] 본 개시내용은 또한 다양한 키트를 특징으로 한다. 키트는 본원에 기재된 임의의 웨პ타이드(또는 하나 이상의 웨პ타이드를 코딩하는 핵산 서열을 함유하는 발현 벡터) 중 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 이상); 및 웨პ타이드를 대상체에게 투여하기 위한 설명서를 포함할 수 있다. 키트는 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체 및/또는 하나 이상의 면역 자극제를 포함할 수 있다. 면역 자극제는, 예컨대, T 헬퍼 에피토프, 변경된 웨პ타이드 리간드, 또는 보조제일 수 있다. 키트는 또한 하나 이상의 치료제, 진단제, 또는 예방제를 함유할 수 있다. 하나 이상의 치료제, 진단제, 또는 예방제는, 비제한적으로: (i) 염증 반응을 조절하는 제제(예컨대, 아스피린, 인도메타신, 이부프로펜, 나프록센, 스테로이드, 크로몰린 나트륨, 또는 테오필린); (ii) 신장 및/또는 심혈관 기능에 영향을 미치는 제제(예컨대, 푸로세미드, 티아자이드, 아밀로라이드, 스피로노락토, 캡토프릴, 에날라프릴, 리시노프릴, 딜티아젬, 니페디핀, 베라파밀, 디곡신, 이소르딜, 도부타민, 리도카인, 퀴니딘, 아데노신, 디지탈리스, 메바스타틴, 로바스타틴, 심바스타틴, 또는 매발로네이트); (iii) 위장관 기능에 영향을 미치는 약물(예컨대, 오메프라졸 또는 수크랄레이트); (iv) 항생제(예컨대, 테트라사이클린, 클린다마이신, 암포테리신 B, 퀴닌, 메티실린, 반코마이신, 페닐실린 G, 아목실린, 젠타마이신, 에리트로마이신, 시프로플록사신, 독시사이클린, 스트렙토마이신, 젠타마이신, 토브라마이신, 클로람페니콜, 이소니아지드, 플루코나졸, 또는 아만타딘); (v) 항암제(예컨대, 사이클로포스파미드, 메토트렉세이트, 플루오로우라실, 시타라빈, 머캅토퓨린, 빈블라스틴, 빙크리스틴, 독소루비신, 블레오마이신, 미토마이신 C, 하이드록시우레아, 프레드니손, 타목시펜, 시스플라틴, 또는 데카르바진); (vi) 면역조절제(예컨대, 인터루킨, 인터페론(예컨대, 인터페론 감마(IFN- γ), 과립구 대식세포-콜로니 자극 인자(GM-CSF), 종양 괴사 인자 알파(TNF α), 종양 괴사 인자 베타(TNF β), 사이클로스포린, FK506, 아자티오프린, 스테로이드); (ix) 혈액 및/또는 혈액 형성 장기에 작용하는 약물(예컨대, 인터루킨, G-CSF, GM-CSF, 에리트로포이에틴, 혼파린, 와파린, 또는 쿠마린); 또는 (vii) 호르몬(예컨대, 성장 호르몬(GH), 프로락チン, 항체 형성 호르몬, TSH, ACTH, 인슐린, FSH, CG, 소마토스타틴, 에스트로겐, 안드로겐, 프로게스테론, 성선 자극 호르몬-방출 호르몬(GnRH), 티록신, 트리아이오도티로닌); 호르몬 길항제; 석회화 및 골 전환(bone turnover)에 영향을 미치는 제제(예컨대, 칼슘, 포스페이트, 과라갑상선 호르몬(PTH), 비타민 D, 비스포스포네이트, 칼시토닌, 플루오라이드)를 포함한다.

[0368] 일부 구현예에서, 키트는 본원에 기재된 BCMA 및/또는 TACI 항체 중 어느 것의 하나 이상(예컨대, 1, 2, 또는 3개 이상)을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 키트는 상이한 단백질에 각각 특이적인 2개의 항체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 키트는 하나의 BCMA 특이적 항체(본원에 기재됨) 및 하나의 TACI 특이적 항체(본원에 기재됨)를 함유할 수 있다. 키트는 선택적으로 생물학적 샘플을 BCMA, 및/또는 TACI 단백질 중 하나 이상의 존재 또는 양에 대해 분석하기 위한 설명서를 포함할 수 있다. 또한 용기; 및 용기 내에 함유된 조성물을 포함하는 제조 물품을 특징으로 하며, 조성물은 포유동물(예컨대, 인간)에서 면역 반응을 유도하기 위한 활성 성분을 포함하고, 활성 성분은 본원에 기재된 임의의 웨პ타이드 중 하나 이상(예컨대, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 이상)을 포함하며, 용기는 조성물이 포유동물(예컨대, 본원에 기재된 임의의 포유동물)에서 면역 반응을 유도하는데 사용되는 것임을 나타내는 라벨을 갖는다. 라벨은 또한 다발성 골수종을 갖거나, 가질 것으로 의심되거나, 발생할 위험이 있는 포유동물에게 투여될 것임을 나타낼 수 있다. 제조 물품의 조성물은 견조 또는 동결건조될 수 있고, 예컨대, 견조 또는 동결건조된 조성물을 용해시키기 위한 하나 이상의 용액(및/또는 설명서)을 포함할 수 있다.

[0369] 제조 물품은 조성물을 또한 포유동물에게 투여하기 위한 설명서를 포함할 수 있다.

실시예

[0371] 본 발명은 하기 실시예에 더 상세히 설명되며, 실시예는 청구범위에 기재된 발명의 범위를 제한하지 않는다.

실시예 1. 다발성 골수종 세포주 상에서 BCMA 발현

[0373] 11개의 MM 세포주 및 1개의 유방암 세포주(MDA-MB231)를 포함하는 총 12개의 암 세포주를 각각의 하기 클론에 특이적인 항체로 염색함으로써 이들의 BCMA 항원의 발현 수준에 대해 평가하였다; #1. ANC3B1(LifeSpan Biosciences, Cat# LS-C357630), #2. VICKY1(LifeSpan Biosciences, Cat# LS-C18662), 및 #3. 19F2(BioLegend, Cat# 357506). 세포주 중에서, H929(MM 세포주)가 가장 높은 수준의 BCMA 발현을 나타내었고, MDA-MB231(유방암 세포주; BCMA 음성)이 최소 수준의 BCMA 발현을 나타내었다(**도 1A-1I**).

실시예 2. HLA-A2에 특이적인 BCMA 및 TACI 천연 웹타이드의 선택

[0375] BCMA 또는 TACI 항원으로부터 각각 유래된 6개의 천연 웹타이드는 하기와 같이 확인되었다:

[0376] #1. BCMA₆₄₋₇₂(LIISLAVFV) (서열번호 1)

[0377] #2. BCMA₆₉₋₇₇(AVFVLMFLL) (서열번호 2)

[0378] #3. BCMA₉₋₁₇(SQNEYFDLS) (서열번호 3)

[0379] #4. BCMA₇₂₋₈₀(VLMFLLRKI) (서열번호 4)

[0380] #5. BCMA₅₄₋₆₂(AILWTCLGL) (서열번호 5)

[0381] #6. BCMA₁₁₄₋₁₂₂(ILPRGLEYT) (서열번호 6)

[0382] #1. TACI₁₇₈₋₁₈₆(FLVAVACFL) (서열번호 7)

[0383] #2. TACI₁₇₄₋₁₈₂(VLCCFLVAV) (서열번호 8)

[0384] #3. TACI₁₅₄₋₁₆₂(KLSADQVAL) (서열번호 9)

[0385] #4. TACI₁₆₆₋₁₇₄(TLGLCLCAV) (서열번호 10)

[0386] #5. TACI₁₆₁₋₁₆₉(ALVYSTLGL) (서열번호 11)

[0387] #6. TACI₁₅₅₋₁₆₃(LSADQVALV) (서열번호 12)

실시예 3. HLA-A2 분자에 대한 BCMA 또는 TACI 천연 웹타이드의 결합 친화성

[0389] 열거된 BCMA 웹타이드를 T2 세포주를 사용하여 HLA-A2 특이적 결합능에 대해 평가하였다. 분석에서, T2 세포를 세척하고, 무혈청 AIM-V 배지에 1×10^6 세포/ml의 최종 농도로 재현탁시키고, 24-웰 조직 배양 플레이트의 웰로 옮겼다. 세포를 상이한 농도의 각각의 BCMA 웹타이드(0-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인간 β 2-마이크로글로불린(Sigma)로 펄스하고, 가습된 공기 중에서 37°C, 5% CO₂에서 인큐베이션 하였다. 밤새 인큐베이션 후, 세포를 세척하고, 4°C에서 15분 동안 마우스 항-인간 HLA-A2-FITC mAb로 염색하고, CellQuest™ v2.1 소프트웨어(Becton Dickinson, San Jose, CA)를 갖는 FACSsort™ 유세포 분석기를 사용하여 분석하였다. HLA-A2에 대한 웹타이드 결합을 HLA-A2 특이적 웹타이드 결합에 의해 야기된 T2 세포 상의 HLA-A2 분자의 상향조절에 의해 결정하였고, 유세포 분석에 의해 평균 형광 강도(MFI)를 측정함으로써 입증하였다. 평가된 BCMA 웹타이드 중에서, "#4. BCMA₇₂₋₈₀(VLMFLLRKI(서열번호 4))"이 가장 높은 수준의 HLA-A2 특이성을 나타내었고, "#5. BCMA₅₄₋₆₂(AILWTCLGL(서열번호 5))"가 두 번째로 높은 수준의 특이성을 나타내었다(**도 2**). 평가된 TACI 웹타이드 중에서, TACI #5를 제외한 모든 웹타이드가 HLA-A2 특이성을 나타내었지만, 가장 높은 수준은 "#4. TACI₁₆₆₋₁₇₄(TLGLCLCAV(서열번호 10))"에 의해 측정되었다(**도 3**).

실시예 4. HLA-A2 분자에 대한 BCMA 또는 TACI 천연 웹타이드의 안정성

[0391] HLA-A2 분자에 대한 웹타이드 결합의 안정성을 개선하기 위해, 다음의 혜테로클리틱 BCMA 또는 TACI 웹타이드를 설계하였다:

[0392] 헤테로클리티 #4. BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI)(서열번호 13)

[0393] 헤테로클리티 #5. BCMA₅₄₋₆₂(YILWTCLGL)(서열번호 14)

[0394] 헤테로클리티 #1. TACI₁₇₈₋₁₈₆(YLVAVACFL)(서열번호 15)

[0395] 헤테로클리티 #3. TACI₁₅₄₋₁₆₂(YLSADQVAL)(서열번호 16)

[0396] 헤테로클리티 #4. TACI₁₆₆₋₁₇₄(YLGLCLCAV)(서열번호 17)

[0397] 천연 및 헤테로클리티 BCMA 및 TACI 웨타이드를 T2 세포주를 사용하여 HLA-A2 결합 안정성에 대해 조사하였다. T2 세포를 각각의 웨타이드로 펠스하였다. 밤새 인큐베이션 후, 세포를 세척하여 비결합 웨타이드를 제거하였고; 이들을 상기 나타낸 바와 같이 결합 친화성 및 하기와 같이 안정성에 대해 평가하였다. 세포를 37 °C 및 5% CO₂에서 1시간 동안 10 μg/ml 브레펠린 A(Sigma)와 함께 인큐베이션하여 새로 합성된 HLA-A2 분자의 세포 표면 발현을 차단하였다. 웨타이드/HLA-A2 결합 안정성을 브레펠린 처리 후 0, 2, 4, 6 및 18시간에 평가하였다. 인큐베이션 기간 후, 세포를 채취하고, 세척하고, 마우스 항-인간 HLA-A2-FITC mAb로 염색하고, 유세포 분석법에 의해 분석하였다. "헤테로클리티 #4 BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI(서열번호 13))", "헤테로클리티 #5 BCMA₅₄₋₆₂(YILWTCLGL(서열번호 14))" 및 "헤테로클리티 #3 TACI₁₅₄₋₁₆₂(YLSADQVAL(서열번호 16))"의 HLA-A2 결합 친화성은 그들의 천연 웨타이드로부터 증가하였다(도 4 및 5). 결합 안정성 면에서, "헤테로클리티 #4 BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI(서열번호 13))" 및 "헤테로클리티 #3 TACI₁₅₄₋₁₆₂(YLSADQVAL(서열번호 16))" 웨타이드는 천연 웨타이드와 비교하여 0, 2, 4, 6 및 18시간을 포함하는 평가된 모든 시점에서 이들의 HLA-A2 친화성의 유의한 개선을 나타내었다(도 6 및 7). 따라서, MM 특이적 세포독성 T 세포(CTL)를 생성하는 면역원성 잠재력의 추가 평가를 위해 헤테로클리티 #4 BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI(서열번호 13)) 및 헤테로클리티 #3. TACI₁₅₄₋₁₆₂(YLSADQVAL(서열번호 16) 웨타이드를 선택하였다.

[0398] 실시예 5. BCMA 또는 TACI 웨타이드 특이적 CD3⁺CD8⁺ CTL의 유도

[0399] MM 세포주를 표적화하는 기능적 활성의 평가를 위해 상이한 HLA-A2⁺ 정상 공여자로부터 웨타이드 특이적 CTL을 생성하였다. 웨타이드 특이적 CTL을 생성하기 위해, 동일한 공여자로부터 생성된 성숙한 수지상 세포(mDC)를 무혈청 AIM-V 배지에 재현탁시키고, 가습된 공기 중에서 37°C, 5% CO₂에서 밤새 50 μg/ml의 헤테로클리티 #4 BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI(서열번호 13)) 웨타이드 또는 "헤테로클리티 #3 TACI₁₅₄₋₁₆₂(YLSADQVAL(서열번호 16))" 웨타이드로 펠스하였다. 웨타이드 펠스된 mDC를 세척하고, 계수하고, 10 Gy에서 조사하고, 10% 인간 AB 혈청이 보충된 AIM-V 배지에서 1:20 항원-제시 세포/웨타이드-대-CD3⁺ T 세포 비율로 CD3⁺ T 세포를 프라이밍하는데 사용하였다. 배양물을 총 4 사이클 동안 웨타이드로 펠스된 조사된 T2 세포로 7일마다 재자극시켰다. T 세포를 생체외에서 유지시키기 위해, IL-2(50 U/ml)를 두 번째 자극 2일 후에 배양물에 첨가하였다. 대조군 T 세포 배양물을 IL-2(50 U/ml)의 존재하에 동일한 배양 조건하에 유지시켰지만, 웨타이드 자극은 없었다. 생성된 CTL의 표현형을 웨타이드 자극의 각 사이클 1주 후에 평가하였다. 유세포 분석은 집단의 점진적 증가와 함께 헤테로클리티 #4 BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI(서열번호 13))으로 자극된 CD3⁺CD8⁺ T 세포 서브세트의 표현형의 뚜렷한 변화를 나타내었다. 헤테로클리티 BCMA 웨타이드에 의한 CD3⁺CD8⁺ T 세포 증가는 이전에 면역원성 웨타이드로서 확인된 면역원성 CD138₂₆₀₋₂₆₈(GLVGLIFAV(서열번호 20))과 유사하였고, 이는 BCMA 웨타이드의 잠재적인 면역원성을 시사한다. BCMA 웨타이드 특이적 CTL 배양물은 비웨타이드 자극된 대조군 T 세포(~20%)와 비교하여 4 사이클의 웨타이드 자극시 더 높은 백분율의 CD8⁺ T 세포(~80%)를 함유하였다(도 8A-8C).

[0400] 실시예 6. 헤테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀ 웨타이드 자극에 의한 감소된 나이브 및 증가된 기억 CD3⁺CD8⁺ CTL

[0401] 항원 특이적 CTL은 이들의 뚜렷한 세포 표면 항원의 발현에 의해 나이브 T 세포로부터 활성화된/기억 T 세포로서 표현형적으로 확인될 수 있다. BCMA-CTL의 표현형을 나이브 및 기억 세포의 표현형을 분석함으로써 잠재적인 효과기 세포로서 조사하였다. 50 μg/ml 헤테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI(서열번호 13))로 펠스된 항원 제시

세포로 HLA-A2⁺ 정상 공여자의 CD3⁺ T 세포를 매주 반복 자극시켜 BCMA 펫타이드 특이적 CTL을 생성하였다. 각 펫타이드 자극 1주 후, 생성된 CTL을 유세포 분석법에 의해 이들의 표현형 프로파일에 대해 평가하였다. BCMA-CTL은 대조군 T 세포와 비교하여 나이브 CD3⁺CD8⁺ T 세포의 감소된 빈도를 나타내었다(공여자 1: 비자극시 80% 대 4 사이클의 자극시 2%; 공여자 2: 비자극시 83% 대 4 사이클의 자극시 2%). 혜테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI(서열번호 13)) 펫타이드를 갖는 기억 CD3⁺CD8⁺ T 세포(공여자 1: 비자극시 18% 대 4 사이클의 자극 시 86%; 공여자 2: 비자극시 10% 대 4 사이클의 자극시 92%)의 빈도에서 상응하는 증가가 관찰되었다. 이들 표현형 변화는 혜테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI(서열번호 13))을 이용한 CD3⁺ T 세포의 반복된 자극이 기억 세포의 표현형을 갖는 CD8⁺ CTL의 확장을 초래하였음을 입증하며, 이는 BCMA 펫타이드의 면역원성을 나타낸다(도 9 및 10).

[0402] 실시예 7. 혜테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀ 펫타이드 자극에 의한 중심 기억 및 효과기 CD3⁺CD8⁺ CTL의 빈도 변화

혜테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI(서열번호 13)) 펫타이드로 T 세포 자극시 중심 기억 및 효과기 세포의 추가 평가를 수행하였다. BCMA 펫타이드에 의한 중심 기억 CTL의 확장이 3 사이클의 자극 후에 검출되었고, 이는 효과기 CTL의 감소와 일치하였다. 4 사이클의 펫타이드 자극시, 중심 기억 CTL의 감소 및 효과기 기억 세포를 포함한 효과기 CTL의 증가가 또한 검출되었다. 혜테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI(서열번호 13)) 펫타이드를 사용한 CD8⁺ T 세포에서의 이러한 표현형 변화의 패턴은 CD138₂₆₀₋₂₆₈(GLVGLIFAV(서열번호 20))로 자극된 세포와 유사하였다(도 11A-11C).

[0404] 실시예 8. 혜테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI-서열번호 13) 펫타이드 또는 혜테로클리티 TACI₁₅₄₋₁₆₂(YLSADQVAL-서열번호 16) 펫타이드로 자극된 특이적 CTL은 특이적 T 세포 서브유형을 나타내는 뚜렷한 표현형을 나타낸다.

본 발명자들은 또한 펫타이드로 자극된 CD3⁺ T 세포 배양에서 CD8⁺ T 세포 서브세트 내에서 나이브(CD45RO⁻/CCR7⁺), 중심 기억(CD45RO⁺/CCR7⁺), 효과기 기억(CD45RO⁺/CCR7⁻) 및 말단 효과기(CD45RO⁻/CCR7⁻) 세포의 빈도에서 혜테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI(서열번호 13)) 펫타이드 또는 혜테로클리티 TACI₁₅₄₋₁₆₂(YLSADQVAL(서열번호 16)) 펫타이드로 자극된 CTL 내의 CD3⁺CD8⁺ T 세포 서브세트에서 뚜렷한 표현형 변화를 관찰하였다. 4 사이클의 펫타이드 자극 후, 효과기 기억 CD3⁺CD8⁺ T 세포의 빈도는 증가하였고, 이는 나이브 T 세포(CD45RO⁻/CCR7⁺/CD3⁺CD8⁺) 및 중심 기억 T 세포(CD45RO⁺/CCR7⁺/CD3⁺CD8⁺)의 상응하는 감소와 관련되었다. 따라서, 이를 결과는 선택된 혜테로클리티 BCMA 또는 TACI 펫타이드로 CD3⁺ T 세포를 반복 자극시키는 것이 항원 특이적 CTL의 특징인 CD3⁺CD8⁺ T 세포 서브세트의 뚜렷한 표현형 변화 및 확장을 초래한다는 것을 입증한다(도 12 및 도 13).

[0406] 실시예 9. BCMA 특이적 CTL 및 TACI 특이적 CTL은 세포독성 활성을 유도하고, Th1-유형의 사이토카인(IFN-γ, IL-2, TNF-α)을 생산하고, HLA-A2 제한된 방식으로 MM 세포로의 41BB 발현을 상향조절한다.

혜테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI(서열번호 13)) 펫타이드 또는 혜테로클리티 TACI₁₅₄₋₁₆₂(YLSADQVAL(서열번호 16))로 자극된 펫타이드 특이적 CTL이 골수종 세포를 용해시키고 항종양 활성에 관여하는 중요한 사이토카인을 생성하는 능력을 유세포 분석에 의해 분석하였다. BCMA-CTL 및 TACI 특이적 CTL은 HLA-A2⁺ U266 세포의 인식시에 세포독성 활성의 척도인 CD107a 탈과립 마커를 발현하는 세포의 빈도의 유의한 증가를 입증하였고, 이는 HLA-A2⁻ OPM2 세포보다 더 높았다. IFN-γ, IL-2, 및 TNF-α 생산 수준의 증가가 HLA-A2⁺ MM 세포에 대해 BCMA 특이적 CTL 및 TACI 특이적 CTL에서 검출되었지만, HLA-A2⁻ MM 세포에 대해서는 검출되지 않았으며, 이는 면역 반응이 HLA-A2 제한된 방식임을 입증한다(도 14 및 도 15).

[0408] 실시예 10. BCMA 특이적 CTL은 HLA-A2 제한된 및 항원 특이적 방식으로 MM 세포에 대한 반응으로 중식한다.

혜테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI(서열번호 13))으로 자극된 펫타이드 특이적 CTL의 기능적 활성을 CFSE-중식 분석을 사용하여 추가로 분석하였다. BCMA 펫타이드 특이적 CTL에서의 CD8⁺ T 세포의 증식을 4일에 측정하였고,

이는 HLA-A2⁺ MM(U266), HLA-A2⁺ 유방암(MDA-MB231) 또는 HLA-A2⁻ MM(MM1S) 세포로 자극 후 CFSE-표지된 CTL(개이트된 CFSE 저)의 형광 감소에 의해 입증되었다. BCMA-CTL은 HLA-A2⁺ U266 MM 세포주에 대한 반응으로 유의한 CD8⁺ T 세포 증식을 유도하였다(증식 세포: 46%). 하지만, CD8⁺ T 세포 증식은 MDA-MB231 또는 MM1S에 반응하여 유도되지 않았고, 배지 단독에서 배양 세포(10%)와 마찬가지로 낮은 수준(11% - 14%)을 유지하였다. 종합하면, 이들 결과는 BCMA-CTL이 골수종 세포에 특이적으로 반응하고 이들의 CD8+ T 세포 증식이 HLA-A2 제한적이고 항원 특이적이라는 것을 시사한다(도 16).

[0410] 실시예 11. 면역 작용제와 조합된 BCMA 특이적 CTL에 의한 더 높은 수준의 세포독성

헤테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI(서열번호 13))으로 자극된 웹타이드 특이적 CTL의 활성을 48시간 동안 항-OX40 또는 항-GITR로 세포의 처리시에 측정하였다. 개이트된 CD3⁺CD8⁺ T 세포에서 CD107a 탈과립에 의해 세포독성 수준을 측정하였다. 처리되지 않은 그룹(43%)과 비교하여 항-OX40(92%) 또는 항-GITR(55%)로 BCMA 웹타이드 특이적 CTL의 처리시에 CD107a 탈과립이 증가하였음이 관찰되었고, 이는 면역 작용제와의 조합 치료가 BCMA-CTL의 항종양 활성을 유도하는데 도움이 된다는 것을 시사한다(도 17).

[0412] 실시예 12. BCMA 특이적 중심 기역 CD8+ 세포독성 T 림프구에 의한 다발성 골수종의 선택적 표적화

줄기 세포 이식 패러다임에 새로운 요법을 포함시키는 다발성 골수종(MM)의 치료법의 최근의 진보에도 불구하고, 진행중인 DNA 손상 및 게놈 진화는 많은 환자에서 재발의 기초가 된다. 따라서, 뚜렷한 작용 기전을 가진 새로운 치료적 접근법이 필요하다. B 세포 악성 종양의 면역 반응성과 결합된 구성적 또는 진화하는 유전적 복잡성은 단클론 항체, 이중특이적 항체, 면역독소, 및 CAR T 세포를 포함하는 MM에서의 면역요법 옵션의 개발을 자극하였다. MM 환자 특이적 CAR T 세포 요법이 주목할만한 깊은 반응을 달성하였지만, 반응의 지속성은 확립되지 않았고, 이들은 노동 집약적이며, 시간 소모적이고, 비싸다. 이러한 한계를 극복하기 위해, 본 실시예는 환자를 보다 광범위하고 효율적으로 치료하기 위한 상용(off-the-shelf) 면역요법으로서 면역원성 웹타이드 기반 암 백신을 제공한다. 웹타이드 기반 치료적 접근법은 재조합 단백질, mRNA, 또는 DNA 기반 백신의 제한이 없으며, 적합한 번역(mRNA의 경우) 또는 전사(DNA의 경우)에 필요한 추가적인 단계와 함께, 내재화, 단백질을 HLA에 대한 최적 면역원성 웹타이드로 분해하는 과정을 필요로 한다. 면역원성 에피토프 백신 접근법을 사용하여 MHC 제한을 극복하고 보다 다양한 환자 집단을 치료하기 위해, 웹타이드 각테일을 모아 주요 HLA 서브타입을 포함시켰다. 또한, 레날리도미드는 웹타이드 백신 특이적 면역 반응 및 기역 세포독성 T 세포(CTL) 활성을 증가시켜, 체크포인트 억제제 및/또는 면역 작용제와의 조합 접근법을 위한 토대를 마련한다. 또한, 면역원성 웹타이드에 의해 유발된 항종양 효능은 효과기 세포의 생성시 "에피토프 확산"을 유도하는 이들의 능력에 의해 향상될 수 있으며, 이에 의해 표적화된 용해된 암 세포가 새로운 항원성 에피토프를 방출하고, 이는 이후에 항원 제시 세포에 의해 흡수되고, CTL의 새로운 레퍼토리에 제시된다.

B 세포 성숙 항원(BCMA)은 TNF 수용체 수퍼페밀리 17(TNFRSF17)의 구성원이며 B-세포 성숙 및 형질 세포로의 분화를 조절하는데 중요한 역할을 하는 시스테인 풍부 세포외 도메인을 함유하는 유형 III 막횡단 단백질로서 특성화된다. MM 세포 성장 및 생존 인자 B 세포 활성화 인자(BAFF) 및 증식 유도 리간드(APRIL)에 대한 수용체로서, BCMA는 MM 세포의 생존에 필요하며, 이는 BCMA를 유망한 치료 표적으로 만든다. 거의 모든 MM 종양 세포는 BCMA를 발현하며, 그것은 종양 세포의 확인을 위한 마커로서 제안되었다. 성숙한 B 및 수명이 긴 형질 세포의 서브세트 상에서의 이의 선택적 발현은 BCMA 지향 치료 접근법의 유리한 치료 지수(therapeutic index)를 추가로 시사한다. 현재 BCMA는, 심지어 재발된 불응성 MM에서 유망한 임상 결과와 함께, 항체(네이키드 항체, 항체-약물 접합체, 및 이중특이적 항체) 및 세포 요법(키메라 항원 수용체 T-세포)을 포함하는 몇 가지 면역요법 전략에 의해 표적화되고 있다. 또한, 혈청 가용성 BCMA는 MM 및 만성 림프성 백혈병 환자에서 상승하며, 예후 마커 및 반응의 모니터로서 역할을 할 수 있다. 마지막으로, 가장 최근의 연구는 BCMA가 비조혈 조직에서 발현된다는 것을 나타낸다: BCMA는 비소 세포 폐암 세포주에서 비정상적으로 발현되고 ERK1/2 신호전달 경로를 통해 종양에서 역할을 할 수 있다. 이들 데이터는 MM 및 잠재적으로 BCMA 발현 고형 종양에서 면역요법 전략으로 BCMA를 표적화하는 것을 지지한다.

본 실시예는 MM 세포에 대해 효과적이고 오래 지속되는 면역을 갖는 항원 특이적 CD8⁺ CTL을 생성함으로써 BCMA를 표적화하는 웹타이드 기반 면역요법 접근법을 제공한다. 매우 효과적인 항종양 활성을 갖는 MM 특이적 반응을 유도할 수 있는 신규한 면역원성 천연 및 헤테로클리티 HLA-A2 특이적 BCMA 웹타이드가 확인되었다. 중요하게도, 헤테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI(서열번호 13)) 웹타이드는 HLA-A2 분자에 대해 가장 큰 친화성/안정성

및 HLA-A2⁺ 환자의 MM 세포 및 MM 세포주에 대해 다기능적 활성을 갖는 BCMA 특이적 기억 CTL의 강력한 유도와 함께, 가장 높은 면역원성을 입증하였다. 실험은 암 백신 및 입양 면역요법 프로토콜에서 이 신규한 조작된 면역원성 BCMA₇₂₋₈₀ 웨타이드의 임상 적용을 위한 프레임워크를 나타내고, MM 또는 BCMA 발현 암 환자에서 오래 지속되는 기억 항종양 면역성을 제공한다.

[0416] 특히, 이 결과는 새로 진단된 MM 환자(N=616)로부터 수득된 CD138⁺ 종양 세포 상의 종양 관련 항원이 현재의 다발성 골수종(MM) 특이적 면역요법의 폭 및 범위를 확장하는데 사용될 수 있음을 보여준다. 이들 실험은 MM 세포에 대해 효과적이고 오래 지속되는 면역 반응을 매개하는 BCMA 특이적 기억 CD8⁺ CTL을 생성함으로써, MM 세포 성장 및 생존을 촉진하는 B-세포 성숙 항원(BCMA)을 표적화하도록 설계된다. 여기서, 실험은 BCMA, BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI(서열번호 13)) 및 BCMA₅₄₋₆₂(YILWTCLGL(서열번호 14))에 특이적인 신규한 조작된 웨타이드가 이들의 천연 웨타이드와 비교하여 HLA-A2에 대해 개선된 친화성/안정성을 나타내며 증가된 활성화(CD38, CD69) 및 공동 자극(CD40L, OX40, GITR) 분자 발현을 갖는 BCMA 특이적 CTL을 유도한다는 것을 보여준다. 중요하게도, 헤테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀ 특이적 CTL은 MM에 대해 다기능적 Th1 특이적 면역 활성[IFN-γ/IL-2/TNF-α 생산, 증식, 세포독성]을 입증하였고, 이는 테트라머⁺ 및 기억 CD8⁺ CTL 집단의 확장과 직접적으로 관련되었다. 항-OX40 또는 항-LAG3과 조합될 때, 헤테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀ 특이적 CTL은 특히 중심 기억 CTL에 의해 MM에 대해 증가된 세포독성을 나타내었다. 이들 결과는 MM 및 다른 BCMA 발현 종양 환자에서 오래 지속되는 자가 항종양 면역성을 생성하기 위한 백신접종 및 입양 면역요법 전략에서 헤테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀ 웨타이드 단독 및 항-LAG3 및/또는 항-OX40과 조합된 헤테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀ 웨타이드의 임상 적용을 위한 프레임워크를 제공한다.

[0417] 다음의 물질 및 방법이 본 실시예에서 사용되었다.

물질 및 방법

세포주

[0420] MM 세포주, MM1S, OPM2, OPM1, H929, OCIMY5, RPMI, U266, KMS1, HSB2, McCAR 및 ANBL6, 및 유방암 세포주 MDA-MB-231은 ATCC(Manassas, VA)로부터 수득하였다. HLA-A2 분자를 발현하는 인간 B 및 T 세포 하이브리드인 T2 세포주는 몰드램 박사(J. Mollidrem, University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston, TX)에 의해 제공받았다. 세포주를 10% 우태아 혈청(FCS; BioWhittaker, Walkersville, MD), 100 IU/ml 폐닐실린 및 100 μg/ml 스트렙토마이신(Gibco-Life Technologies)이 보충된 DMEM(MM 및 T2 세포의 경우; Gibco-Life Technologies, Rockville, MD) 또는 Leibovitz's L-15(MDA-MB231의 경우; ATCC, Manassas, VA) 배지에서 배양하였다.

시약

[0422] 형광색소 접합된 항-인간 BCMA, HLA-A2, CD3, CD8, CD38, CD40L, CD69, 41BB, CCR7, CD45RO, CD107a, IFN-γ, IL-2, TNF-α, PD1, LAG3, OX40 및 GITR 단클론 항체(mAb)는 벡톤 딕킨슨(Becton Dickinson, BD)(San Diego, CA), 라이프스팬 바이오사이언스(LifeSpan Bioscience, Seattle, WA) 또는 바이오레전드(BioLegend, San Diego, CA)로부터 구입하였다. 라이브/데드 아쿠아 염색 키트(Live/Dead Aqua stain kit)는 몰리큘러 프로브즈(Molecular Probes, Grand Island, NY)로부터 구입하였다. 재조합 인간 GM-CSF는 이뮤넥스(Immunex, Seattle, WA)로부터 수득하였고; 인간 IL-2, IL-4, IFN-α 및 TNF-α는 R&D 시스템즈(R&D Systems, Minneapolis, MN)로부터 구입하였다. BCMA 웨타이드 특이적 테트라머-PE는 MBL 인터네셔널 코포레이션(MBL International Corporation, Woburn, MA)에 의해 합성하였다. LAG3 또는 OX40에 대한 임상 등급 mAb는 브리스톨-마이어스 스퀴브(Bristol-Myers Squibb, New York, NY)에 의해 제공받았다.

합성 웨타이드

[0424] 천연 BCMA 웨타이드[BCMA₆₄₋₇₂(LIISLAVFV(서열번호 1)), BCMA₆₉₋₇₇(AVFVLMFLL(서열번호 2)), BCMA₉₋₁₇(SQNEYFDSL(서열번호 3)), BCMA₇₂₋₈₀(VLMFLLRKI(서열번호 4)), BCMA₅₄₋₆₂(AILWTCLGL(서열번호 5)), BCMA₁₁₄₋₁₂₀(ILPRGLEYT(서열번호 6))], 헤테로클리티 BCMA 웨타이드[hBCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI(서열번호 13)), hBCMA₅₄₋₆₂(YILWTCLGL(서열번호 14)), hBCMA₉₋₁₇(YQNEYFDSL(서열번호 22))] 및 HIV-Gag₇₇₋₈₅(SLYNTVATL(서열번호 21))를 표준 fmoc(9-플루오레닐메틸-옥시카르보닐) 화학에 의해 합성하고, 역상 크로마토그래피를 사용하여 >95%까지 정제하고, 질량 분석법

(Biosynthesis, Lewisville, TX)에 의해 분자 질량을 검증하였다.

[0425] **HLA-A2 친화성 및 안정성 분석**

T2 세포를 다양한 용량의 웨타이드 및 β -마이크로글로불린(3 $\mu\text{g}/\text{ml}$)(Sigma, St Louis, MO)으로 밤새 펄스하였다. 밤새 인큐베이션 후, 세포를 HLA-A2-PE mAb로 염색하고 FACSCanto™ 유세포 분석기(BD)를 사용하여 분석하였다. 웨타이드/HLA-A2 복합체 안정성을 HLA-A2-PE mAb를 이용한 염색 및 유세포 분석에 의해 브레펠린 A 처리 후 0, 2, 4, 6 및 14시간에 웨타이드 로딩된 T2 세포에서 측정하였다.

[0427] **수지상 세포의 생성**

말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 단리된 단핵구를 10% FCS가 보충된 RPMI-1640 배지(Gibco-Life Technologies)에서 1,000 단위/ ml GM-CSF 및 1,000 단위/ ml IL-4의 존재하에 7일 동안 배양하였다. 신선한 배지와 GM-CSF 및 IL-4를 격일로 배양물에 첨가하였다. 1,000 단위/ ml IFN- α 및 10 ng/ ml TNF- α 와 함께 3일간 추가 인큐베이션 후 7일에 성숙한 DC(mDC)를 수득하였다.

[0429] **BCMA 웨타이드 특이적 CTL의 유통**

HLA-A2 $^+$ 공여자로부터 수득된 CD3 $^+$ T 세포를 웨타이드 펄스된 항원 제시 세포(APC)로 반복 자극시켜 생체외에서 BCMA 웨타이드 특이적 CTL(BCMA-CTL)을 생성하였다. 간략하게, 웨타이드(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 펄스된 APC를 조사하고(10 Gy), 1 APC/웨타이드: 20 T 세포 비율로 T 세포를 자극하는데 사용하였다. T 세포 배양물을 7일마다 재자극시키고 IL-2(50 단위/ ml)의 존재하에 10% 인간 AB 혈청(BioWhittaker)이 보충된 AIM-V 배지에 유지시켰다.

[0431] **BCMA 웨타이드 특이적 CTL 또는 종양 세포의 표현형 분석**

라이브/데드 아쿠아 염색 키트 및 형광색소 접합된 항-인간 mAb 및 태트라미-PE로 염색 후 BCMA-CTL 상에서 표현형 특성화를 수행하였다. 대안적으로, MM 및 유방암 세포주를 형광색소 접합된 BCMA 또는 HLA-A2 mAb로 염색하였다. 염색 후, 세포를 세척하고, 2% 파라포름알데히드에서 고정시키고, 유세포 분석법에 의해 분석하였다.

[0433] **카르복시 플루오레세인 석신이미딜 에스테르(CFSE) 추적에 의한 세포 증식**

BCMA-CTL을 CFSE(Molecular Probes)로 표지하고, IL-2(10 단위/ ml)의 존재하에 조사된(10 Gy) 종양 세포 또는 웨타이드 펄스된 APC와 함께 공동 인큐베이션하였다. 공동 배양 4, 5, 6 또는 8일에, 세포를 채취하고 라이브/데드 아쿠아 염색 키트 및 CD3/CD8/CD45RO/CCR7 mAb로 염색하였다. CD3 $^+$ CD8 $^+$ CTL 증식의 수준을 유세포 분석법에 의해 측정된 바와 같이 CFSE 형광 강도의 감소로서 결정하였다.

[0435] **CD107a 탈과립 및 세포내 IFN- γ /IL-2/TNF- α 사이토카인 생산**

BCMA-CTL의 기능적 세포용해 활성을 유세포 분석법에 의한 CD107a 탈과립 및 Th1 사이토카인 생산에 의해 측정하였다. 간략하게, BCMA-CTL을 CD107a mAb의 존재하에 종양 세포 또는 T2/웨타이드와 함께 공동 인큐베이션하였다. 1시간 인큐베이션 후, CD28/CD49d mAb, 브레펠린 A, 및 모넨신(BD)을 추가 5시간 동안 첨가하였다. 세포를 채취하고, PBS에서 세척하고, T 세포 항원에 특이적인 mAb와 함께 인큐베이션하였다. 표면 염색 후, 세포를 고정/투과시키고, 항-IFN- γ /IL-2/TNF- α mAb로 염색하고, Perm/Wash 용액(BD)으로 세척하고, 2% 파라포름알데히드에서 고정시키고, 유세포 분석법에 의해 분석하였다.

[0437] **통계학적 분석**

결과가 평균 \pm SE로 표시된다. 비쌍 스튜던트 t-검정을 사용하여 그룹을 비교하였다. $p < 0.05$ 일 때 차이가 유의한 것으로 간주하였다.

[0439] **HLA-A2 분자에 대한 BCMA 웨타이드 결합 친화성 및 안정성.**

BIMAS 및 NetCTL을 포함하는 다양한 검색 소프트웨어 프로그램을 사용하여 전장 BCMA 단백질 서열을 평가하여 HLA-A2 친화성, 연장된 반감기 해리 속도, 프로테아좀 C 밀단 절단, 및 TAP 수송을 갖는 에피토프를 예측하였다. 선택된 6개의 천연 웨타이드[BCMA₆₄₋₇₂(LIISLAVFV), BCMA₆₉₋₇₇(AVFVLMFLL), BCMA₉₋₁₇(SQNEYFDSDL), BCMA₇₂₋₈₀(VLMFLLRKI), BCMA₅₄₋₆₂(AILWTCLGL), BCMA₁₁₄₋₁₂₀(ILPRGLEYT)] 중에서, BCMA₇₂₋₈₀(VLMFLLRKI) 및 BCMA₅₄₋₆₂(AILWTCLGL)가 용량 의존적 방식으로 가장 높은 HLA-A2 결합 친화성을 나타내었다. 설계된 헤테로클리티 웨타이드 중에서, 헤테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI(서열번호 13)) 및 헤�테로클리티 hBCMA₅₄₋₆₂(YILWTCLGL(서열번호

14))가 이들의 천연 웹타이드(n=3, $p < 0.05$)와 비교하여, HLA-A2 결합 친화성에서 가장 높은 증가를 나타내었다. 대조적으로, 비-HLA-A2 특이적 BCMA₉₋₁₇(SQNEYFDSL)에서 앵커 모티프를 헤테로클리티 BCMA₉₋₁₇(YQNEYFDSL(서열번호 22))로 대체하는 것은 그의 HLA-A2 친화성 상태를 변경하지 않았고, 이는 HLA-A2 특이적 웹타이드 내에서의 변형에 의해서만 개선된 HLA-A2 친화성을 나타낸다.

[0441] 웹타이드로 펠스된 T2 세포의 브레펠린 A 처리 후 BCMA₇₂₋₈₀ 및 BCMA₅₄₋₆₂ HLA-A2 특이적 웹타이드의 HLA-A2 안정성을 평가하였다. 천연 BCMA₇₂₋₈₀ 및 BCMA₅₄₋₆₂ 웹타이드는 6시간 초과 동안 연장된 HLA-A2 안정성을 나타내었고, 이는 헤테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI(서열번호 13)) 및 BCMA₅₄₋₆₂(YILWTCLGL(서열번호 14))로 조작함으로써 더 향상되었다. 전반적으로, 가장 높은 수준의 HLA-A2 친화성 및 안정성은 시험된 각 시점에서 BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI(서열번호 13))에서 검출되었고, 이는 HLA-A2 양성 대조군 HIV-Gag₇₇₋₈₅ 웹타이드보다 더 높았다.

[0442] 헤테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI(서열번호 13)) 또는 BCMA₅₄₋₆₂(YILWTCLGL(서열번호 14))를 이용하여 생성된 BCMA 특이적 CTL은 증가된 T 세포 활성화 및 공동자극 분자 발현을 나타낸다.

[0443] 헤테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀ 웹타이드 특이적 CTL(hBCMA₇₂₋₈₀ CTL) 또는 헤테로클리티 hBCMA₅₄₋₆₂ 웹타이드 특이적 CTL(hBCMA₅₄₋₆₂ CTL)의 표현형 특성화를 유세포 분석법을 사용하여 4번째 웹타이드 자극 후에 수행하였다. 두 CTL 집단은 증가된 활성화 마커(CD69, CD38) 발현을 나타내었고, hBCMA₇₂₋₈₀ CTL에서 가장 높은 상향조절이 검출되었으며; CD38은 기저선 23%로부터 80%까지 증가하였고; CD69는 기저선 7%로부터 38%까지 증가하였다(도 18A). 또한, hBCMA₇₂₋₈₀ CTL은 hBCMA₅₄₋₆₂ CTL보다 41BB, CD40L, OX30, 및 GITR 공동자극 분자의 더 높은 발현을 나타내었다(도 18B 및 18C).

[0444] 도 18A-18C에서, HLA-A2+ 개체로부터 수득된 CD3+ T 세포를 각각의 헤테로클리티 BCMA 웹타이드인 BCMA72-80(YLMFLLRKI(서열번호 13)) 또는 BCMA54-62(YILWTCLGL(서열번호 14))로 펠스된 조사된 APC로 매주 자극시켰다. 4번째 자극 사이클 1주 후, CD3+CD8+ T 세포를 유세포 분석법에 의해 분석하였다. T 세포 활성화 마커(CD69, CD38) 및 공동자극 분자(41BB, CD40L, OX30, GITR)의 발현을 CD8+ T 세포 상에서 평가하였다. 결과는 상이한 개체(N=3)로부터 생성된 BCMA-CTL을 사용한 3개의 독립적인 실험의 대표(도 18A 및 18B) 또는 요약(도 18C)으로서 입증된다.

[0445] 헤테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀ 특이적 CTL은 MM 세포주에 대한 반응으로 항원 특이적 항종양 활성을 나타낸다.

[0446] 각 웹타이드 자극 후 hBCMA₇₂₋₈₀ CTL의 표현형 및 활성을 평가하였다. 생성된 특이적 CTL(n=3)에서 헤테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI(서열번호 13))로 자극시에 % CD3⁺CD8⁺ T 세포의 점진적인 증가(도 25A-25B) 및 % CD3⁺CD4⁺ T 세포의 상응하는 감소(도 26A-26B)가 관찰되었다. 동시에, BCMA mAb 클론(ANC3B1, VICKY1, 19F2)으로 염색된 표적 세포의 표현형 분석은 H929, MMIS, U266 및 OPM1 세포주에서 높은 BCMA 발현을 나타내었지만, 유방암 세포주(MDA-MB231)에서 그렇지 않았다(도 27A-27C). 기능적 활성의 평가에서, hBCMA₇₂₋₈₀ CTL은 HLA-A2⁻ BCMA⁺ MM1S(7%), HLA-A2⁺ BCMA⁻ MDA-MB231(9%), 또는 배지 단독(6%)과 비교하여 HLA-A2⁺ BCMA⁺ U266(49%)에 대한 반응으로 유의하게(* $p < 0.05$) 더 높은 CD3⁺CD8⁺ T 세포 증식을 나타내었다(도 19A-19D; 히스토그램). 이러한 HLA-A2 제한된 및 MM 특이적 CD8⁺ CTL 증식은 3명의 HLA-A2⁺ 개체로부터 생성된 hBCMA₇₂₋₈₀ CTL에서 일관되게 관찰되었다(도 19E; 막대 그래프). 또한, hBCMA₇₂₋₈₀ CTL은 HLA-A2⁺ U266에 대한 반응으로 CD107a 탈파립 마커(47.1%)를 발현하고 그랜자임 B(32.6%) 및 퍼포린(29.9%)을 생산하는 CD8⁺ T 세포의 증가를 입증하였지만 HLA-A2⁺ MDA-MB231 세포에는 반응하지 않았다(도 19F). HLA-A2 제한된 방식으로 BCMA⁺ MM 세포에 대한 IFN-γ / IL-2/TNF-α 생산, 41BB 상향조절, 및 CD107a 탈파립에 의해 측정된 바와 같이, 다른 HLA-A2⁺ 개체(N=5)로부터 생성된 hBCMA₇₂₋₈₀ CTL에서 항종양 활성의 일관된 결과가 관찰되었다. 이들 데이터는 헤테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀ 웹타이드에 의한 MM 특이적 면역 반응의 유도를 추가로 입증한다.

[0447] 도 19A-19F에서, 헤테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI(서열번호 13)) 웹타이드로 반복 자극시켜 생성된 BCMA 특이적

CTL을 BCMA⁺ MM 세포 또는 BCMA⁻ 유방암 세포에 대한 반응으로 증식, CD107a 탈과립, 그랜자임 B/퍼포린 생산, IFN-γ /IL-2/TNF-α 생산, 및 41BB 상향조절에 의한 그들의 항원 특이적 및 HLA-A2 제한된 CD8⁺ T 세포 반응에 대해 조사하였다. 결과는 상이한 개체(N=3)로부터 생성된 BCMA-CTL을 사용하는 3개의 독립적인 실험의 대표(도 19A-19F) 또는 요약으로서 입증된다.

[0448] **HLA-A2⁺ 환자 MM 세포에 대한 헤테로클리티ック BCMA₇₂₋₈₀ CTL 기능적 면역 반응.**

[0449] MM 환자의 CD138⁺ 종양 세포를 표적 세포로서 사용하여 각각의 헤테로클리티ック 웨타이드를 이용하여 생성된 BCMA 특이적 CTL을 평가하였다. 헤테로클리티ック BCMA₅₄₋₆₂와 비교하여, BCMA₇₂₋₈₀ 웨타이드는 CD107a 탈과립(hBCMA₅₄₋₆₂ CTL 13.8% 대 hBCMA₇₂₋₈₀ CTL 21.5%) 및 IL-2 생산(각각 4.4% 대 16.3%)에 의해 측정된 바와 같이, 환자 MM 세포에 대해 보다 강력한 항원 특이적 CTL 및 항종양 활성을 유발하였다(도 20A). hBCMA₇₂₋₈₀ CTL은 HLA-A2 제한된 방식으로 CD107a 탈과립, 그랜자임 B/IFN-γ /TNF-α 상향조절(도 20B), 및 퍼포린/IL-2 생산(n=3)(도 20C-20H)을 포함하여 환자 세포에 대해 더 높은 항-MM 활성을 일관되게 입증하였다. 따라서, hBCMA₇₂₋₈₀ CTL에서 검출된 항-MM 반응은 더 높은 활성화(CD69, CD38) 및 공동자극 분자 발현(41BB, CD40L, OX40, GITR)과 일치하였다(도 18A-18C). 이를 데이터는 헤�테로클리티ック BCMA₇₂₋₈₀의 면역원성에 대한 추가적인 증거를 제공하고 새로운 MM 치료에서 잠재적인 임상 적용을 지지한다.

[0450] 도 20A-20H에서, 헤�테로클리티ック BCMA 웨타이드 특이적 CTL을 환자의 MM 세포에 대한 이들의 기능적 활성을 대해 평가하였다. BCMA-CTL의 특이적 활성을 기저선 반응(종양 세포 없이 자극됨)과 비교하여 HLA-A2 음성 또는 HLA-A2 양성 MM 환자로부터 수득된 CD138⁺ 종양 세포에 대한 반응으로 측정하였다. 결과는 상이한 개체(N=3)로부터 생성된 BCMA 특이적-CTL을 사용한 3개의 독립적인 실험의 대표(도 20A, 도 20B) 또는 요약(도 20C-20H)으로서 입증된다.

[0451] **헤테로클리티ック BCMA₇₂₋₈₀ 특이적 CTL은 강력한 항-MM 활성을 갖는 CD8⁺ 테트라머⁺ T 세포에 대해 놓축된다.**

[0452] hBCMA₇₂₋₈₀ CTL을 테트라머-양성 집단 내에서 그들의 표현형 및 항종양 활성을 대해 추가로 특성화하였다. 표시된 테트라머-양성 CTL은 활성화(CD38⁺: 테트라머⁺ 대 테트라머⁻: 49.4% 대 3.2%) 및 공동자극 분자 발현(CD40L⁺: 38.0% 대 1.2%, 41BB: 24.7% 대 1.9%, OX40: 46.2% 대 1.7%, 및 GITR: 34.9% 대 1.5%)을 갖는 CD8⁺ T 세포를 유의하게 증가시켰다(도 21A). 몇몇 HLA-A2⁺ 개체(n=3)로부터 생성된 hBCMA₇₂₋₈₀ CTL은 테트라머-음성 세포(6%, 18%, 13%; 공여자 A, B 또는 C BCMA-CTL)와 비교하여, 테트라머-양성 세포(83%, 97%, 97%; 공여자 A, B 또는 C BCMA-CTL)에 의해 U266 MM 세포에 대해 더 높은 수준의 항-MM 활성을 일관되게 입증하였다(도 21B). CD107a-양성 또는 CD107a-음성 CD8⁺ CTL 내의 테트라머-양성 세포의 빈도를 추가로 평가하였다. CD107a-음성 CTL(1%, 2%, 1%; 공여자 A, B 또는 C BCMA-CTL)과 비교하여 탈과립화 CD107a-양성 CTL(82%, 98%, 98%; 공여자 A, B 또는 C) 내에서 유의하게 더 높은 빈도의 테트라머⁺ 세포가 관찰되었다(도 21C). 따라서, 이를 결과는 hBCMA₇₂₋₈₀ CTL의 특이적 항-MM 활성이 BCMA 웨타이드 특이적 테트라머-양성 세포 내에 함유되어 있으며, 이것이 CTL 활성화 및 공동자극 분자의 상향조절을 나타낸다는 것을 확인시켜 준다.

[0453] 도 21A-21C에서, 헤�테로클리티ック BCMA₇₂₋₈₀ 인식 테트라머-양성 CTL 또는 비인식 테트라머-음성 CTL을 CD8⁺ T 세포 상에서 CD38, CD40L, 41BB, OX40 및 GITR의 발현에 대해 분석하였다(도 21A). 헤�테로클리티ック BCMA₇₂₋₈₀ 특이적 CTL(N=3)의 항종양 활성을 테트라머-양성 CTL 또는 테트라머-음성 CTL 서브세트 내에서 CD107 상향조절을 측정함으로써(도 21B); 그리고 CD107a-양성 CTL 또는 CD107a-음성 CTL 내에서 테트라머-양성의 상태를 평가함으로써 추가로 특성화하였다(도 21C).

[0454] **헤테로클리티ック BCMA₇₂₋₈₀ 웨타이드는 MM 특이적 기억 CD8⁺ CTL을 유도한다.**

[0455] BCMA 특이적 CTL 활성을 특성화하기 위해, 기저선과 비교하여, 웨타이드 자극의 2 및 4 사이클 후 나이브: 기억 CTL 서브세트의 조성을 평가하기 위한 실험을 수행하였다. 기저선에서 나이브(CD45RO⁻CCR7⁺)[공여자 1 - 나이브:

83.0%, CM: 0.4%, 공여자 2 - 나이브: 84.1%]로부터; 2 사이클의 웹타이드 자극 후 중심 기억(CM; CD45RO⁺CCR7⁺) [공여자 1 - 나이브: 37.4%, CM: 32.1%, 공여자 2 - 나이브: 19.0%, CM: 49.6%]으로; 그리고 4 사이클의 자극 후 효과기 기억(EM; CD45RO⁺CCR7⁻) CTL(공여자 1 - CM: 44.2%, EM: 54.6%, 공여자 2 - CM: 18.3%, EM: 77.6%)로 진행하는 점진적인 진행형 표현형 변화가 CD8⁺ T 세포에서 검출되었다(도 22A). 전반적으로, 기억 CD8⁺ CTL 발달은 헤테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀ 웹타이드 자극의 각 라운드 후(1, 2, 3, 4 사이클 후)에 점진적으로 증가하였고(도 22B-22C), 이는 나이브 T 세포의 상응하는 감소와 관련되었다(도 22D-22E). 따라서 이들 결과는 헤테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀ 웹타이드로 T 세포의 자극시 기억 CTL의 유도 및 점진적인 발달을 입증한다.

[0456] 도 22A-22E에서, 헤테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀ CTL의 나이브: 기억 표현형(공여자 1, 공여자 2)을 기저선에서(웹타이드 자극 없음) 또는 웹타이드 자극의 각 사이클 1주 후에 분석하였다. 표현형 변화의 패턴, 나이브로부터 기억 CD8⁺ T 세포로의 분화, 및 기억 CTL의 확장은 BCMA 웹타이드 자극의 각 사이클 후 점 도표(도 22A) 및 막대 그래프(도 22B-22E)에서 입증되었다.

중심 기억 hBCMA₇₂₋₈₀ CTL은 가장 큰 항-MM 활성을 입증한다

[0458] 다음으로, 8명(N=8)의 상이한 HLA-A2⁺ 개체로부터 생성된 BCMA 특이적 CTL 내의 특이적 기억 T 세포 서브세트를 이들의 항-MM 활성에 대해 특성화하였다. CD45RO⁻ 비기억 CTL과 비교하여, CD45RO⁺ 기억 CTL은 HLA-A2⁺ U266 MM 세포(비기억 대 기억: 7.25% 대 28.2%) 및 HLA-A2⁺ McCAR MM 세포(비기억 대 기억: 4.14% 대 13.2%)에 대한 반응으로 증가된 CD107a 탈과립을 입증하였다(도 23A; 공여자 A BCMA-CTL). hBCMA₇₂₋₈₀ 특이적 테트라머⁺ 세포는 상이한 개체로부터 생성된 BCMA-CTL에서의 CM 표현형(테트라머⁺ 세포 내의% CM - 공여자 B: 88.2%, 공여자 C: 97.4%, 공여자 D: 100%)을 주로 그리고 일관되게 보여주었다(도 23B). CM CTL을 또한 U266 MM 세포에 대한 이들의 기능적 활성에 대해 평가하였다. 중요하게도, CD107a 탈과립 수준은 CM 세포의 빈도와 직접 관련되었다(CD107a⁺ 세포 내의% CM - 공여자 E: 81.0%, 공여자 F: 82.6%, 공여자 G: 67.0%, 공여자 H: 41.5%)(도 23C). 또한, 더 높은 항-MM 활성을 나타내는 높은 반응자(공여자 E, 공여자 F)는 중간 수준 반응자(공여자 G) 또는 낮은 수준 반응자(공여자 H)와 비교하여 BCMA 웹타이드 특이적 CM CTL의 증가된 빈도를 나타내었다. 따라서 이들 결과는 헤테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀ 웹타이드에 의해 생성된 CM 서브세트에 의해 유도된 뚜렷한 웹타이드 특이성 및 항-MM 활성을 추가로 나타낸다.

[0459] 도 23A-23C에서, 헤테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀ CTL의 항-MM 활성을 HLA-A2⁺ MM 세포에 대한 반응으로 나이브: 기억 CD3⁺CD8⁺ T 세포 서브세트 내에서 평가하였다(U266, McCAR; 도 23A). 중심 기억 CD8⁺ T 세포의 빈도를 헤테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀ CTL의 상이한 CTL 서브세트(N=3)에서; 테트라머-양성 또는 테트라머-음성 CTL 서브세트 내에서(도 23B) 및 CD107a-양성 또는 CD107a-음성 CTL 서브세트 내에서(도 23C) 분석하였다.

LAG3의 억제 또는 OX40의 자극은 hBCMA₇₂₋₈₀ CTL의 중식 및 항-MM 활성을 향상시킨다

[0461] 마지막으로, MM 세포에 매우 반응성인 BCMA-CTL의 특이적 T 세포 서브세트를 특성화하기 위한 실험을 수행하였다. CD8⁺ T 세포 서브세트를 게이팅하여, HLA-A2-제한된 MM 특이적 CTL 중식을 입증하였고, 이들의 나이브: 기억 서브세트를 특성화하였다. U266 MM 세포에 대한 가장 강력한 반응 및 가장 높은 중식 hBCMA₇₂₋₈₀ CTL은 주로 CM 서브세트 내에 있었고(공여자 1: 97.4%, 공여자 2: 100%)(도 24A), 이는 항-MM 활성에서 BCMA 항원 특이적 CTL 내의 CM 서브세트의 주요 역할을 입증한다. 다음으로, 이들 기억 T 세포에 대한 체크포인트 억제제(항-LAG3) 또는 면역 작용제(항-OX40)의 영향을 조사하기 위한 실험을 수행하였다. 항-LAG3 또는 항-OX40으로 처리된 hBCMA₇₂₋₈₀ CTL은, 특히 HLA-A2⁺ U266 MM 세포에 대한 기억 CTL에 의해(비처리된 28.2% 대 항-LAG3 처리된 35.8% 대 항-OX40 처리된 39.5%); 및 HLA-A2⁺ McCAR MM 세포에 대한 기억 CTL에 의해(비처리된 13.2% 대 항-LAG3 처리된 14.5% 대 항-OX40 처리된 20.0%) 향상된 세포독성 활성을 입증하였다(도 24B). 흥미롭게도, 체크포인트 억제제 및 면역 작용제는 BCMA-CTL 내에서 비기억 세포의 항-MM 반응을 향상시키지 않았다. 마지막으로,

항-LAG3 및 항-OX40의 유익한 효과를 hBCMA₇₂₋₈₀ CTL의 CM 및 EM 서브세트 내에서 조사하였다. 각각의 처리는 EM 세포와 비교하여 BCMA 특이적 CM 세포에 더 큰 영향을 유도하였고, 이는 항-LAG3 또는 항-OX40 처리에 대한 반응으로 더 높은 CD107a 탈파립에 의해 입증되었다(도 24C). 따라서 이들 결과는 BCMA 특이적 CM 서브세트 내에서 항-MM 활성을 추가로 향상시키는 hBCMA₇₂₋₈₀ 웨타이드 유도된 CTL과 조합된 항-LAG3 또는 항-OX40 항체의 유용성을 지지한다.

[0462] 도 24A-24C에서, MM 특이적 CD8⁺ T 세포 증식을 유도하는 특이적 서브세트가 U266 세포에 대한 반응으로 헤테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀ 특이적 CTL 내에서 확인되었다(도 24A). 또한, 헤테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀ CTL을 기억 T 세포(도 24B) 또는 중심 기억 T 세포 서브세트에 의한 이들의 항-골수종 활성의 변형에 대해 항-LAG3 또는 항-OX40과 조합하여 평가하였다(도 24C).

논의

[0464] 동종이식 후 재발하는 불응성 MM을 갖는 환자에서도, 공여자 림프구(DLI)의 주입으로 오래 지속되는 반응이 달성되었다. DLI의 이러한 초기의 고무적인 결과는 MM을 치료하기 위한 활성 특이적 면역요법 접근법의 평가를 위한 프레임워크를 제공하였다. 이러한 활성 특이적 면역요법 접근법 중 하나인 암 표적화 백신은 항종양 활성을 갖는 매우 효과적인 CD8⁺ CTL을 유도하는 능력을 입증하였다. 백신접종의 성공은 적절한 환자 집단의 선택, 종양에 선택적으로 발현된 표적화 항원, 및 항원 특이적 기억 항종양 면역 반응을 효과적으로 유도하고 유지하기 위한 조합 접근법을 이용하는 것에 좌우된다. 본 개시내용은 XBP1, CD138 및 CS1 항원으로부터 유래된 면역원성 HLA-A2 및 HLA-A24 특이적 웨타이드를 제공하며, 이는 MM 및 유방, 췌장, 및 결장암을 포함하는 고형 종양에서 고도로 과발현되고, 전임상 및 임상 연구에서 HLA-A2⁺ 또는 HLA-A24⁺ 종양 세포에 대해 항종양 활성을 갖는 웨타이드 특이적 CD8⁺ CTL을 유도하는 이들의 능력을 입증하였다. 또한, 레날리도미드와 같은 면역 조절 약물 또는 히스톤 탈아세틸라제 6 억제제 ACY241과 함께 웨타이드 자극/백신접종의 조합 연구는 종양 세포에 대한 웨타이드 특이적 CTL 활성을 향상시켰다. 실험은 레날리도미드 또는 ACY241과 함께 웨타이드 자극의 조합이 T-bet/Eomes와 같은 전사 조절제의 상향조절 및 AKT의 활성화와 관련된 항원 특이적 CD8⁺ T 세포 활성을 증가시켰음을 입증하였고, 이는 항원 특이적 CTL 분화를 FOXO, mTOR 및 Wnt/β-카테닌 신호전달 경로와 연결한다. 중요하게도, 이들 효과는, 주로 특이적 CM 서브세트 내에서 관찰된 종양 세포에 대한 반응으로 IFN-γ 및 그랜자임 B 생산 및 CD8⁺ T 세포 증식에서 가장 강력한 증가와 함께, 주로 항원 특이적 CD45RO⁺ 기억 CTL에 국한되었다.

[0465] 고무적인 전임상 결과로 인해, XBP1/CD138/CS1 다중웨타이드 백신은 무증상 MM(SMM)을 가진 환자를 치료하기 위한 임상 시험에서 단독으로 그리고 레날리도미드와 조합하여 평가되었을뿐만 아니라 삼중 음성 유방암을 갖는 환자를 치료하기 위한 임상 시험에서 항-PD1과 조합하여 평가되었다. SMM 환자에서, 다중웨타이드 백신은 단일 요법으로서 잘 용인되고 면역원성이며, 이는 IFN-γ 생산을 갖는 테트라머⁺ CD8⁺ CTL의 향상된 빈도에 의해 입증되었고; 또한, 레날리도미드와의 조합은 테트라머-양성 및 IFN-γ 생산을 갖는 CD8⁺ T 세포의 더 높은 배수 증가를 촉발하였다. 중요하게도, XBP1/CD138/CS1 웨타이드에 특이적인 CD45RO⁺ 기억 CTL이 웨타이드 백신에 의해 유도되었고, 레날리도미드와 조합하여 추가로 향상되었다. 안정한 질환 및 반응이 SMM에서 관찰되었지만, SMM에서 활성 질환으로의 진행 시간이 웨타이드 백신접종에 의해 연장될 수 있는지 평가하기 위한 무작위 시험이 필요하다.

[0466] MM 특이적 면역요법을 XBP1/CD138/CS1 항원을 넘어 확장시키기 위해, 본 개시내용은 또한 새로 진단된 MM 환자 (N=616)의 CD138⁺ 종양 세포 상의 추가적인 종양 관련 항원을 확인하였다. 여기에서, 본 개시내용은 정상 및 악성 형질 세포에서 선택적으로 발현된 BCMA 및 MM에서의 몇 가지 현재 면역 치료의 표적을 표적화하는 면역요법 전략의 확인 및 특성화를 제공한다. 실시예는 이들의 천연 BCMA 웨타이드로부터 매우 개선된 HLA-A2 친화성/안정성을 갖는 고도의 면역원성 조작된 BCMA 특이적 나노웨타이드, 헤테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI(서열번호 13)) 및 BCMA₅₄₋₆₂(YILWTCLGL(서열번호 14))을 제공한다. 이들 웨타이드는 HLA-A2 제한된 방식으로 BCMA 특이적 CTL, 증가된 BCMA 특이적 테트라머⁺ 세포, 향상된 CD107 탈파립, Th1-유형 사이토카인(IFN-γ / IL-2/TNF-α) 생산, 및 MM 세포로의 증식을 유발한다. 가장 중요하게도, 자기 재생능 및 MM 세포에 대한 반응과 함께, BCMA 특

이적 기억 CD8⁺ CTL, CM 및 EM 세포 모두의 증가는 MM에서 신규 백신접종 및/또는 면역요법 접근법에서 헤테로클리티 BCMA 웨타이드의 잠재력을 강력하게 지지한다. 실제로, 본 개시내용은 헤테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀ 웨타이드 백신접종, 생체외 BCMA 특이적 CM 세포의 채취 및 확장, 입양 면역요법으로서 이들 CM 세포의 재주입, 및 이후 필요에 따라 BCMA 웨타이드를 이용한 백신접종을 갖는 임상 프로토콜을 제공하여, MM 환자를 효과적으로 치료하는 이들의 지속성을 보장한다.

[0467] BCMA 특이적 기억 CD8⁺ CTL이 공동자극 및 면역 억제 모두를 위해 T 세포 기능을 조절하는 핵심 분자를 발현하였음이 관찰되었다. 공동자극 및 면역 체크포인트 분자의 가장 높은 유도가 MM에 대해 매우 효과적인 다기능적 활성을 입증한 집단인 hBCMA₇₂₋₈₀ 웨타이드 특이적 CTL 내의 CM 서브세트 상에서 검출되었다. 중요하게도, 이러한 발견은 이들의 기능적 항-MM 활성을 향상시키는 체크포인트 억제제 또는 면역 작용제와 BCMA-CTL의 조합 요법의 잠재성을 나타내었다. 이것은, 독성이 연구를 제한하는 PD-1 체크포인트 억제제를 면역조절 약물 레날리도미드 또는 포말리도미드 또는 Ab 다라투무맙과 조합할 때의 최근의 우려를 고려할 때 특히 관련될 수 있다. 여기에서, 실시예는 MM 종양 미세환경 내에서 대안적인 억제 수용체 및 억제 메커니즘을 표적화하려고 시도하였다. 특히, LAG3(CD223)은 CTLA 및 PD1/PD-L1 다음으로 임상에서 표적화되는 세 번째 억제 수용체이며, BCMA 특이적 CM CTL 상에서 발현된다. 동시에, 면역 작용제, 특히 OX40(CD134), 41BB(CD137) 및 GITR(CD357)을 표적화하는 공동자극 종양 괴사 인자 수용체는 항종양 면역 반응을 향상시키는 이들의 치료적 유용성 때문에 상당한 관심을 받았으며; 이들 중에서, 항-OX40 mAb는 최근에 몇 가지 전임상 연구에서 효과기 T 세포 확장 및 기능적 항종양 활성을 증가시킴으로써 종양 퇴행의 유도에서 고무적인 효능을 입증하였다. 중요하게도, 임상 등급 항-LAG3 및 항-OX40(Bristol-Myers Squibb; New York, NY에 의해 제공됨)은 MM 세포에 대한 헤테로클리티 BCMA₇₂₋₈₀ 특이적 CTL의 기능적 활성을 평가하는데 사용되었다. 생체외 실험은 항-LAG3 및 항-OX40 모두가 비기억 CTL의 활성을 영향을 미치지 않으면서 MM 세포에 대해 BCMA-CTL 내의 기억 CTL 기능적 활성을 특이적으로 증가시켰음을 입증하였다. 다수의 HLA-A2⁺ 개체의 T 세포로부터 생성된 BCMA-CTL에 미치는 영향은 항-LAG3보다 항-OX40으로 처리 후에 더 커졌고, BCMA 특이적 CTL 내에서 EM 서브세트에 비해 CM에서 더 커졌다. 이들 연구는 BCMA 웨타이드 특이적 면역요법과 면역 작용제 또는 체크포인트 억제제와의 과학적으로 정통한 조합 임상 시험을 위한 프레임워크를 제공한다.

[0468] 요약하면, 이들 실험은 MM 세포에 대한 기능적 항종양 활성을 갖는 항원 특이적 CD8⁺ CTL을 유도할 수 있는 신규한 면역원성 HLA-A2 특이적 조작된 BCMA 웨타이드를 확인하고 검증하였다. 이들 결과는 MM 환자에서 이러한 매우 면역원성인 헤�테로클리티 BCMA 웨타이드를 백신으로서 및/또는 자가 항원 특이적 기억 CTL의 확장을 위한 자극으로서 치료적으로 적용하기 위한 프레임워크를 제공한다. 이들은 BCMA 유도 항-MM 반응을 향상시키기 위해 BCMA 웨타이드 백신 또는 BCMA 특이적 입양 T 세포 면역요법을 항-OX40 및/또는 항-LAG3과 통합하는 조합의 잠재적인 유용성을 추가로 지지한다.

실시예 13. TACI 특이적 CD8+ 세포독성 T 립프구를 유발하는 HLA-A2 특이적 면역원성 TACI 웨타이드

[0469] [0470] 신규한 면역원성 조작된 헤�테로클리티 TACI₁₅₄₋₁₆₂(YLSADQVAL(서열번호 16)) 웨타이드가 MM에 대해 강력한 다기능적 면역 반응을 갖는 항원 특이적 기억 CD8⁺ CTL을 유도할 수 있음을 입증하기 위한 실험을 수행하였다. 이 실시예의 이러한 결과는 MM 환자에서 헤�테로클리티 TACI 웨타이드의 치료적 적용을 위한 프레임워크를 제공하며, 골수종 또는 TACI를 발현하는 다른 질환을 갖는 환자를 치료하기 위한 TACI 웨타이드 특이적 백신 또는 TACI 웨타이드 특이적 입양 T 세포 면역요법의 치료적 적용을 지지한다.

[0471] 본 실시예에서 다음의 물질 및 방법을 사용하였다.

물질 및 방법

세포주

[0474] HLA-A2⁺(U266 및 McCAR) 및 HLA-A2⁻(OPM2 및 RPMI) MM 세포주는 ATCC(Manassas, VA)로부터 수득하였다. HLA-A2를 발현하는 인간 B 및 T 세포 하이브리드인 T2 세포주는 몰드렘 박사(J. Molldrem, University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston, TX)에 의해 제공받았다. 세포주는 10% 우태아 혈청(FCS; BioWhittaker, Walkersville, MD), 100 IU/ml 페닐실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신(Gibco-Life Technologies)이 보충된 DMEM(MM 및 T2 세포의 경우; Gibco-Life Technologies, Rockville, MD) 배지에서 배양하였다.

[0475]

시약

[0476]

형광색소 접합된 항-인간 단클론 항체(mAb)를 벡톤 딕킨슨(BD)(San Diego, CA), 라이프스팬 바이오사이언스(Seattle, WA) 또는 바이오레전드(San Diego, CA)로부터 구입하였다. 라이브/데드 아쿠아 염색 키트는 몰리큘러 프로브즈(Grand Island, NY)로부터 구입하였다. 재조합 인간 GM-CSF는 이뮤넥스(Seattle, WA)로부터 구입하였고, 인간 IL-2, IL-4, IFN- α 및 TNF- α 는 R&D 시스템즈(Minneapolis, MN)로부터 구입하였다. TACI 웨브타이드 특이적 테트라머-PE는 MBL 인터네셔널 코포레이션(Woburn, MA)에 의해 합성하였다.

[0477]

합성 웨브타이드

[0478]

천연 TACI 웨브타이드[TACI₁₇₈₋₁₈₆(FLVAVACFL(서열번호 7)), TACI₁₇₄₋₁₈₂(VLCCFLVAV(서열번호 8)), TACI₁₅₄₋₁₆₂(KLSADQVAL(서열번호 9)), TACI₁₆₆₋₁₇₄(TLGLCLCAV(서열번호 10)), TACI₁₆₁₋₁₆₉(ALVYSTLGL(서열번호 11)), TACI₁₅₅₋₁₆₃(LSADQVALV(서열번호 12))], 해테로클리틱 TACI 웨브타이드[TACI₁₇₈₋₁₈₆(YLVAVACFL(서열번호 15)), TACI₁₅₄₋₁₆₂(YLSADQVAL(서열번호 16)), TACI₁₆₆₋₁₇₄(YLGCLCAV(서열번호 17))] 및 HIV-Gag₇₇₋₈₅(SLYNTVATL(서열번호 21)) 웨브타이드(HLA-A2 특이적 양성 대조군 웨브타이드)를 표준 fmoc(9-플루오레닐메틸-옥시카르보닐) 화학에 의해 합성하고, 역상 크로마토그래피를 사용하여 >95%까지 정제하고, 질량 분석법에 의해 분자 질량을 검증하였다 (Biosynthesis, Lewisville, TX).

[0479]

HLA-A2 친화성 및 안정성 분석

[0480]

T2 세포를 다양한 농도의 웨브타이드 및 β 2-마이크로글로불린(3 μ g/ml)(Sigma, St Louis, MO)으로 밤새 펄스하였다. 밤새 인큐베이션 후, 세포를 HLA-A2-PE mAb로 염색하고 FACS Canto™ 유세포 분석기(BD)를 사용하여 분석하였다. 웨브타이드/HLA-A2 복합체 결합의 안정성을 브레펠딘 처리 후 0, 2, 4, 6 및 14시간에 웨브타이드 로딩된 T2 세포 상에서 측정한 다음, HLA-A2-PE mAb로 염색하고 유세포 분석하였다.

[0481]

수지상 세포의 생성

[0482]

말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 단리된 단핵구를 10% FCS가 보충된 RPMI-1640 배지(Gibco-Life Technologies)에서 1,000 단위/ml GM-CSF 및 1,000 단위/ml IL-4의 존재하에 7일 동안 배양하였다. 신선한 배지 및 GM-CSF 및 IL-4를 격일마다 배양물에 첨가하였다. 성숙한 DC(mDC)를 1,000 단위/ml IFN- α 및 10 ng/ml TNF- α 와 함께 3일간 추가 인큐베이션 후, 7일에 수득하였다.

[0483]

TACI 웨브타이드 특이적 CTL의 유도

[0484]

HLA-A2⁺ 공여자로부터 수득된 높축된 CD3⁺ T 세포를 웨브타이드 펄스된 항원 제시 세포(APC)로 반복 자극시켜 TACI 웨브타이드 특이적 CTL(TACI-CTL)을 생체외에서 생성하였다. 간략하게, 웨브타이드(50 μ g/ml) 펄스된 APC를 조사하고(10 Gy), 1:20 APC/웨브타이드-대-T 세포 비율로 T 세포를 자극하는데 사용하였다. T 세포 배양물을 7일마다 재자극시키고, IL-2(50 단위/ml)의 존재하에 10% 인간 AB 혈청(BioWhittaker)이 보충된 AIM-V 배지에 유지시켰다.

[0485]

TACI 웨브타이드 특이적 CTL 또는 자극성 중양 세포의 표현형 분석

[0486]

TACI 발현을 확인하기 위해 MM 표적 세포 상에서 표현형 특성화를 수행하였다. 라이브/데드 아쿠아 염색 키트 및 형광색소 접합된 항-인간 mAb로 염색 후 TACI-CTL상에서 표현형 특성화를 수행하였다. 염색 후, 세포를 세척하고, 2% 파라포름알데히드에서 고정시키고, 유세포 분석법에 의해 분석하였다.

[0487]

카르복시 플루오레세인 석신이미딜 에스테르(CFSE) 추적에 의한 세포 증식

[0488]

TACI-CTL을 CFSE(Molecular Probes)로 표지하고, IL-2(10 단위/ml)의 존재하에 조사된(10 Gy) MM 세포 또는 웨브타이드 펄스된 APC와 함께 공동 인큐베이션하였다. 공동 배양 4, 5, 6 또는 8일에, 세포를 채취하고, 라이브/데드 아쿠아 염색 키트 및 CD3, CD8, CD45RO 및 CCR7에 특이적인 형광색소 접합된 항-인간 mAb로 염색하였다. CD3⁺CD8⁺ CTL 증식 수준을 유세포 분석법에 의해 측정된 바와 같이 CFSE 형광 강도의 감소로서 결정하였다.

[0489]

CD107a 탈파립 및 세포내 IFN- γ /IL-2/TNF- α 사이토카인 생산

[0490]

TACI-CTL의 기능적 세포용해 활성을 유세포 분석법에 의한 CD107a 탈파립(세포독성) 및 Th1 사이토카인의 생산에 의해 측정하였다. 간략하게, TACI-CTL을 CD107a mAb의 존재하에 종양 세포 또는 T2/웨브타이드와 함께 공동 인큐베이션하였다. 1시간 후, CD28/CD49d mAb, 브레펠딘 A 및 모넨신(BD)을 추가적인 5시간 인큐베이션 동안 첨가

하였다. 세포를 채취하고, PBS에서 세척하고, 핵심 T 세포 마커에 대한 형광색소 접합된 mAb와 함께 인큐베이션 하였다. 표면 염색 후, 세포를 고정/투과시키고, 항-IFN-γ/IL-2/TNF-α mAb로 염색하고, Perm/Wash 용액(BD)으로 세척하고, 2% 파라포름알데히드에서 고정시키고, 유세포 분석법에 의해 분석하였다.

[0491] 통계 분석

[0492] 결과가 평균 ± SE로 표시된다. 그룹을 비쌍 스튜던트 t-검정을 사용하여 비교하였다. 차이는 $p < 0.05$ 일 때 유의한 것으로 간주하였다.

[0493] 결과

[0494] HLA-A2 분자에 대해 가장 높은 결합 친화성 및 안정성을 갖는 헤테로클리티κ TACI₁₅₄₋₁₆₂ 웹타이드의 확인

[0495] BIMAS 및 NetCTL를 포함하는 다양한 검색 소프트웨어 프로그램을 사용하여 전장 BCMA 단백질 서열을 평가하여 HLA-A2 친화성, 연장된 반감기 해리 속도, 프로테아좀 C 말단 절단, 및 TAP 수송을 갖는 에피토프를 예측하였다. 선택된 6개의 천연 웹타이드[TACI₁₇₈₋₁₈₆(FLVAVACFL(서열번호 7)), TACI₁₇₄₋₁₈₂(VLCCFLVAV(서열번호 8)), TACI₁₅₄₋₁₆₂(KLSADQVAL(서열번호 9)), TACI₁₆₆₋₁₇₄(TLGLCLCAV(서열번호 10)), TACI₁₆₁₋₁₆₉(ALVYSTLGL(서열번호 11)), TACI₁₅₅₋₁₆₃(LSADQVALV(서열번호 12))] 중에서, TACI₁₆₁₋₁₆₉를 제외한 모든 웹타이드가 HLA-A2 특이성을 나타내었지만, 가장 높은 수준의 친화성은 TACI₁₆₆₋₁₇₄에 의해 검출되었다. HLA-A2 분자에 대한 웹타이드의 결합 및 안정성을 개선하기 위해, TACI₁₇₈₋₁₈₆(YLVAVACFL(서열번호 15)), TACI₁₅₄₋₁₆₂(YLSADQVAL(서열번호 16)) 및 TACI₁₆₆₋₁₇₄(YLGCLCAV(서열번호 17)) 웹타이드를 포함하는 3개의 헤테로클리티κ 웹타이드를 설계하고, 합성하고, 이들의 HLA-A2 친화성을 평가하였다. 헤테로클리티κ TACI₁₅₄₋₁₆₂ 웹타이드는 50 μg/ml 및 100 μg/ml의 웹타이드 용량에서 그의 천연 형태로부터 크게 향상된 친화성을 나타내었다. 헤테로클리티κ TACI₁₅₄₋₁₆₂ 웹타이드의 HLA-A2 친화성은 HLA-A2 특이적 양성 대조군 웹타이드로서 제공된 HIV-Gag₇₇₋₈₅(SLYNTVATL(서열번호 21))의 친화성과 유사하였다. 하지만, 조작된 헤테로클리티κ TACI₁₇₈₋₁₈₆ 및 TACI₁₆₆₋₁₇₄ 웹타이드는 이들의 천연 웹타이드와 비교하여 HLA-A2 친화성에서 유의한 개선을 나타내지 않았다. 선택된 TACI 웹타이드(50 μg/ml)를 HLA-A2 분자에 대한 이들의 친화성 및 안정성에 대해 추가로 평가하였다. 가장 높은 HLA-A2 결합 친화성(시간=0) 및 안정성(2, 4, 6 및 18시간)은 그의 천연 웹타이드와 비교하여 헤테로클리티κ TACI₁₅₄₋₁₆₂에서 관찰되었다. 전반적으로, 헤테로클리티κ TACI₁₅₄₋₁₆₂의 HLA-A2 친화성 안정성은 다양한 시점에 HLA-A2 양성 대조군 HIV-Gag₇₇₋₈₅ 웹타이드와 유사하였다. 조사된 TACI 웹타이드 중에서 가장 높은 수준의 HLA-A2 친화성 및 안정성에 기초하여, MM에 대해 항원 특이적 효과기 T 세포를 유도하는 면역원성 잠재성의 추가 평가를 위해 헤테로클리티κ TACI₁₅₄₋₁₆₂를 선택하였다.

[0496] 나이브 CD8⁺ 세포로부터 분화된 항원 특이적 기억 CD8⁺ 세포의 발달 및 확장을 통한 헤테로클리티κ TACI₁₅₄₋₁₆₂ 웹타이드 특이적 CTL의 항종양 활성.

[0497] HLA-A2⁺ 공여자의 농축된 CD3⁺ T 세포를 헤테로클리티κ TACI₁₅₄₋₁₆₂(YLSADQVAL(서열번호 16))로 매주 자극시킨 후, CD8⁺ T 세포에서의 표현형 변화를 나이브: 기억 서브세트 내에서 평가하였다. 기저선[웹타이드 자극 전]에서, CD8⁺ T 세포의 대다수(84.1%)는 나이브(CD45RO⁻CCR7⁺) 세포 서브세트로서 발견되었다. 헤테로클리티κ TACI₁₅₄₋₁₆₂ 웹타이드로 자극시, 헤테로클리티κ TACI₁₅₄₋₁₆₂ 웹타이드 특이적 CTL(hTACI₁₅₄₋₁₆₂ CTL) 내에서 나이브 CTL의 중심 기억 CTL(CM; CD45RO⁺CCR7⁺/CD3⁺CD8⁺)로의 점진적 분화 및 그 다음 효과기 기억 CTL(EM; CD45RO⁺CCR7⁻/CD3⁺CD8⁺)로의 점진적인 분화가 관찰되었다. 기억 CTL의 발달은 헤테로클리티κ TACI₁₅₄₋₁₆₂ 웹타이드로 3 사이클의 웹타이드 자극 후에 검출되었다[나이브: 2.2%, CM: 47.8%, EM: 52.4%]. 4 사이클의 웹타이드 자극[나이브: 0.72%, CM: 24.4%, EM: 74.1%] 및 5 사이클의 자극[나이브: 0.57%, CM: 7.36%, EM: 69.7%] 후 나이브 CTL로부터 기억 CTL 서브세트로 추가 분화가 관찰되었고(도 29A), 이는 기억 T 세포를 발달시키는 웹타이드의 잠재성을 지지한다. 헤테로클리티κ TACI₁₅₄₋₁₆₂ 웹타이드의 면역원성을 추가적인 HLA-A2⁺ 공여자(N=3)로부터 수득된 T 세포에서 추가로 평가하였다(도 29B). 나이브 CD8⁺ CTL의 점진적인 감소 및 기억 CD8⁺ CTL(중심 기억 및 효과기 기억 CTL 모두)의 증가는 헤테로클리티κ TACI₁₅₄₋₁₆₂ 웹타이드로 자극 후 시험된 개체의 모든 T 세포에서 확인되었다. 따라서, 이

들 결과는 기억 CD8⁺ T 세포를 발달시키는 헤테로클리티κ TACI₁₅₄₋₁₆₂ 웨타이드의 능력을 확인시켜 준다.

[0498] 다음으로, 골수종 세포에 대한 반응으로 헤�테로클리티κ TACI₁₅₄₋₁₆₂ 특이적 CTL의 면역 기능적 능력을 평가하기 위한 실험을 수행하였다. CD8⁺ CTL의 증식은 HLA-A2⁺ U266 MM 세포와의 공동 배양시, 헤�테로클리티κ TACI₁₅₄₋₁₆₂ 웨타이드 특이적 CTL에서, 특히 중심 기억 및 효과기 기억 CTL 서브세트를 포함하는 기억 CTL에서 검출되었다. TACI-CTL의 증식 능력은 더 많은 사이클의 TACI₁₅₄₋₁₆₂ 웨타이드 자극 후에 계속 증가하였다[2' 자극: 증식 CM - 38.1%, 증식 EM - 19.2%; 3번째 자극: 증식 CM - 54.4%, 증식 EM - 85.2%; 4번째 자극: 증식 CM - 64.4%, 증식 EM - 86.9%](도 29C). 따라서, 이들 결과는 골수종 세포에 대한 반응으로 기억 CD8⁺ T 세포의 발달 및 지속적인 확장을 통한 헤�테로클리티κ TACI₁₅₄₋₁₆₂ 웨타이드 특이적 CTL의 면역 기능을 추가로 지지한다.

[0499] *HLA-A2-제한된* 방식으로 다기능적 및 Th1 특이적 항-골수종 활성을 입증하는 헤�테로클리티κ TACI₁₅₄₋₁₆₂ 특이적 CTL에서 TACI 특이적 테트라머⁺ CTL의 증식

[0500] hTACI₁₅₄₋₁₆₂ CTL의 기능적 활성을 골수종 세포에 대한 이들의 다기능적 면역 반응에 대해 조사하였다. hTACI₁₅₄₋₁₆₂ CTL은 HLA-A2⁻ RPMI(8.24%) 또는 배지 단독(5.03%)과 비교하여, 종양 세포에 대한 세포독성 활성과 직접적으로 관련된, HLA-A2⁺ McCAR MM 세포에 대한 HLA-A2 제한된 탈파립(CD107a 상향조절)을 입증하였다(도 30A). 또한, hTACI₁₅₄₋₁₆₂ CTL은 HLA-A2⁻ RPMI(IFN-γ 8.26%, TNF-α 7.80%, IL-2 6.42%) 또는 배지 단독(IFN-γ 5.76%, TNF-α 5.52%, IL-2 6.24%)과 비교하여, HLA-A2⁺ McCAR에 대한 반응으로, Th1-유형의 사이토카인, IFN-γ(15.0%), TNF-α(17.5%) 및 IL-2(14.9%)의 더 높은 생산을 입증하였다. CD107a 탈파립 및 IFN-γ 생산에 의해 측정된 바와 같은 특이적 항-MM 활성은, MHC 미스매치된 HLA-A2⁻ MM 세포(RPMI)와 비교하여 HLA-A2⁺ MM 세포(McCAR)에 대해 상이한 HLA-A2⁺ 개체(N=5)로부터 생성된 hTACI₁₅₄₋₁₆₂ CTL에서 일관되게 관찰되었다(도 30B, 3C). 헤�테로클리티κ hTACI₁₅₄₋₁₆₂ CTL의 HLA-A2 특이적 항-MM 활성을 확인하기 위해, HLA-A2⁺ U266 및 HLA-A2⁻ OPM2 세포를 포함한 추가적인 골수종 세포주에 대한 이들의 면역 기능적 활성을 평가하는 실험을 수행하였다. HLA-A2 제한된 기능적 항종양 활성의 동일한 패턴이 HLA-A2⁺ 공여자 1(도 31A) 뿐만 아니라 총 5명의 상이한 HLA-A2⁺ 개체로부터 생성된 hTACI₁₅₄₋₁₆₂-CTL에서 골수종 세포에 대해 관찰되었다(도 31B-31E). 또한, TACI₁₅₄₋₁₆₂ 웨타이드 특이적 테트라머⁺ CTL 및 이들 테트라머⁺ 세포에 대해 양성으로 염색된 hTACI₁₅₄₋₁₆₂ CTL은 HLA-A2⁺ U266 골수종 세포에 대한 반응으로 높은 수준의 CD107a 탈파립 및 증식을 입증하였다(도 31F). 따라서, 이들 결과는 MM 세포에 대해 다기능적 활성(세포독성, Th-1 유형 사이토카인 생산)을 갖는 항원 특이적 CTL을 유발하는 헤�테로클리티κ TACI₁₅₄₋₁₆₂ 웨타이드의 HLA-A2 제한된 면역원성을 입증하며, 이는 골수종 환자에서 면역원성 헤�테로클리티κ TACI₁₅₄₋₁₆₂(YLSADQVAL(서열번호 16)) 웨타이드의 잠재적인 치료적 적용을 지지한다.

[0501] 실시예 14. BCMA 헤�테로클리티κ 웨타이드 캡슐화된 나노입자는 다발성 골수종에 대한 항원 자극성 능력 및 종양 특이적 CD8⁺ 세포독성 T 림프구를 항상시킨다.

[0502] 종양 괴사 인자(TNF) 수용체 수퍼페밀리 및 B 세포 활성화 인자(BAFF) 및 증식-유도 리간드(APRIL)의 결합을 위한 수용체의 구성원인 B-세포 성숙 항원(BCMA)은 MM을 위한 유망한 치료 표적이다. BCMA는 MM 세포 및 형질 세포 상에서 제한된 발현 패턴을 가지며, MM 세포 성장, 생존, 및 약물 내성을 촉진하는 역할을 한다.

[0503] 본 개시내용은 MM 환자에서 항종양 반응을 효과적으로 유발하고 증가시키기 위해 면역 연구의 유망한 영역으로서 BCMA를 표적화하는 나노의약품 기반 치료제를 확인하였다. 몇 가지 나노의약품이 이용가능하며, 항원 캡슐화를 위해 보다 진보된 나노입자 자체물이 개발 중이다. 이를 위해, 본 실시예는 BCMA에 특이적인 신규한 조작된 웨타이드를 제공하며, 불량한 웨타이드 안정성, 효소 분해에 대한 감수성, 및 낮은 항원 흡수 및 전달을 포함하는 유리 웨타이드 백신의 한계를 극복하기 위해 헤�테로클리티κ BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI(서열번호 13)) 웨타이드 캡슐화된 나노입자 기반 암 백신을 사용하였다. 또한, 보다 지속적인 항원 방출 및 증가된 생체이용률 및 면역원성

펩타이드의 제시와 함께, MM 환자에서 보다 강력한 BCMA 특이적 CD8⁺ 세포독성 T 림프구(CTL) 활성을 유도하기 위해 나노기술 기반 암 백신이 개발되었다. 여기에서, MM 환자를 치료하기 위한 BCMA 항원에 특이적인 신규한 나노의약품 기반 치료적 전달 시스템의 잠재력을 조사하기 위한 실험이 수행된다. 본 실시예의 목적은 기능적 항-골수종 활성을 갖는 BCMA 특이적 CD8⁺ CTL을 효과적으로 유발하기 위해 최적의 나노입자 캡슐화된 BCMA 항원 작제물을 설계하는 것이었다.

[0504] 결과는 상이한 항원-방출 동역학을 갖는 나노입자[리포솜 또는 폴리(D,L-락티드-co-글리콜리드)(PLGA)]가 헤테로클리틱 BCMA 펩타이드를 항원 제시 세포에 효과적으로 전달하고 항-MM 활성을 갖는 BCMA 항원 특이적 CTL을 유발하는 능력을 입증하였음을 보여준다. 헤�테로클리틱 BCMA 펩타이드 캡슐화된 나노입자는 유리 펩타이드보다 인간 수지상 세포에 의해 더 높은 흡수를 입증하였고, 가장 높은 흡수는 리포솜 기반 나노입자로 매개되었다. 대조적으로, PLGA 기반 나노입자로 유도된 BCMA 특이적 CTL은 MM 세포에 대해 가장 높은 기능적 활성 및 특이적 면역 반응을 입증하였다. 중요하게도, PLGA/BCMA 펩타이드 나노입자 유도된 BCMA 특이적 CTL은 유리 BCMA 펩타이드 또는 리포솜/BCMA 펩타이드 나노입자를 이용하여 생성된 BCMA-CTL보다 MM 환자의 종양 세포 및 MM 세포주에 대한 반응으로 더 큰 CD107a 탈과립, 항원 특이적 CD8⁺ CTL 증식, 및 Th-1 유형 사이토카인(IFN-γ, IL-2, TNF-α) 생산을 나타내었다. PLGA/BCMA 나노입자에 의해 생성된 BCMA-CTL 내의 CD28 공동자극 분자 상향조절, 테트라머⁺ CTL 생성, 및 펩타이드 특이적 반응은 또한 유리 BCMA 펩타이드 또는 리포솜/BCMA 펩타이드 나노입자로 생성된 BCMA-CTL보다 더 컸다. 또한, PLGA/BCMA 나노입자는 BCMA-CTL 내의 비기억 CD8⁺ T 세포보다 CD107a 탈과립 및 IFN-γ 생산에 의해 입증된, 유의하게 더 높은 항종양 활성을 입증한 항원 특이적 기억 CTL을 유도한다는 것은 최적의 펩타이드 방출 동역학 및 향상된 면역원성과 관련되었다.

[0505] 따라서, 이들 결과는 헤�테로클리틱 BCMA 펩타이드 캡슐화된 나노입자 전략이 수지상 세포 내로 그리고 이후에 T 세포 내로 펩타이드 전달을 향상시켜, MM에 대해 다기능적 활성을 갖는 BCMA 특이적 중심 기억 CTL을 유도한다는 것을 입증한다.

[0506] 이들 결과는 또한 MM에 대한 BCMA 펩타이드 특이적 치료제의 면역원성을 향상시키는 캡슐화된 헤�테로클리틱 BCMA 펩타이드를 사용하는 나노기술의 유용성을 입증한다. 중요하게도, 관찰은 BCMA 특이적 기억 T 세포 면역 반응을 향상시키고, 현재의 펩타이드 기반 암 백신 및 입양 면역요법의 제한을 극복하고, MM에서 환자 결과를 개선하기 위해 PLGA 나노입자 기반 헤�테로클리틱 BCMA 펩타이드 전달의 치료적 적용을 위한 프레임워크를 제공한다.

[0507] 본 실시예에서 다음의 방법 및 물질을 사용하였다.

물질 및 방법

물질

[0510] 폴리(D,L-락티드-co-글리콜리드)(PLGA, 분자량 23,000, 공중합체 비율 50: 50)는 버밍엄 폴리머즈(Birmingham Polymers, Birmingham, AL)로부터 구입하였다. 폴리비닐 알콜(PVA, 평균 분자량 30,000-70,000), 트리플루오로아세트산, 아세토니트릴, 지질다당류, 및 L-15(Leibovitz) 배지는 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich, St Louis, MO)로부터 구입하였다.

[0511] BCMA 펩타이드 로딩된 PLGA-NP의 제제 및 특성화.

[0512] 면역원성 헤�테로클리틱 hBCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI(서열번호 13)) 펩타이드를 사용하여 BCMA 특이적 세포독성 T 림프구(CTL)의 생성을 위한 BCMA 항원 특이적 나노입자 제제를 생산하였다. 이중 유화액-용매 기술을 사용하여 유화액을 안정화시키는 폴리(비닐 알콜)(PVA)과 함께, PLGA-NP를 갖는 hBCMA₇₂₋₈₀ 펩타이드를 제제화하였다. PLGA-NP를 갖는 헤�테로클리틱 hBCMA₇₂₋₈₀ 펩타이드를 실질적으로 이전에 기재된 바와 같이 제제화하였다(Sahoo SK, et al. 2004). 간략하게, PLGA(50: 50 락티드-데-글리콜리드 비율) 및 펩타이드 또는 블랭크(blank) PLGA 자체를 디클로로메탄(DCM)에 유화시키고, 혼합물을 2% PVA에 재현탁시켜 오일 및 물 유화액을 형성하였다. 얼음 버킷에서 10분 동안 55와트에서 마이크로-팁 프로브 울트라-초음파발생기를 사용하여 유화 공정을 완료하였다. 유화액을 실온에서 3시간 동안 교반하여 DCM을 증발시키고 PLGA-NP를 형성하였다. 펩타이드 로딩된 PLGA-NP를 4°C에서 30

분 동안 30,000 rpm에서 한회 원심분리에 의해 회수하여 PVA 및 유리 펫타이드를 고갈시키고, 세척하고, PBS에 재현탁시켰다. PLGA-NP 구조를 평가하기 위해, 나노입자 제제를 24시간 동안 동결건조시키고, 주사 전자 현미경(Hitachi S-4800 현미경, Schaumburg, IL)을 사용하여 시각화하였다.

[0513] BCMA 펫타이드 로딩된 리포솜-NP의 제제 및 특성화.

[0514] 박막 수화 방법을 사용하여 BCMA 펫타이드 로딩된 리포솜-NP를 합성하였다. 리포솜 지질 이중층을 콜레스테롤(MW = 386.654), DOPC(MW = 786.113), 및 DOTAP(MW = 698.542)(Avanti Polar, Alabaster, AL)의 혼합물을 이용하여 제조하였다. 간략하게, 3 mM 콜레스테롤, 5 mM DOPC, 및 5 mM DOTAP의 혼합물의 1 mL 스톡 용액을 클로로포름에서 제조하였다. 회전 증발기(RV 10, IKA, Wilmington, NC)를 사용하여 용매를 증발시켜 플라스크의 바닥에 얇은 지질 필름을 생성하였다. 지질 필름을 밤새 진공 건조시켜 임의의 잔류 유기 용매를 제거하였다. 다음날, 인산나트륨(이염기성; pH 11) 완충제에 용해된 hBCMA₇₂₋₈₀ 펫타이드 및 1% DMSO를 사용하여 10회의 동결-해동 사이클(-80°C 및 37°C)을 사용하여 지질 필름을 수화한 후, 얼음 상에서 1분의 프로브 초음파 처리하여 입자 크기를 원하는 범위로 감소시켰다. 펫타이드 로딩된 리포솜-NP를 한회 원심분리에 의해 회수하고 PBS에 재현탁시켰다. 블랭크 리포솜을 수화 단계를 제외한 동일한 절차에 따라 제조하였고, 여기서 1% DMSO를 갖는 이염기성 완충제를 임의의 펫타이드 없이 사용하였다. 투과 전자 현미경(TEM)을 사용하여 BCMA 펫타이드 로딩된 리포솜-NP의 표면 형태학을 특성화하였다. TEM(JEM-1000, JEOL, Tokyo, Japan)을 사용하여 BCMA 펫타이드 로딩된 리포솜-NP를 시각화하기 위해 우라닐 아세테이트(2%)를 음성 염색으로서 사용하였다.

[0515] PLGA-NP 또는 리포솜-NP에서 BCMA 펫타이드 캡슐화.

[0516] PLGA-NP 또는 리포솜-NP에서의 펫타이드 캡슐화의 수준을 제조사의 제안된 프로토콜에 따라 정량적 형광 펫타이드 분석 키트(Thermo Fisher)를 사용하여 측정하였다. 간략하게, 혼탁액 중의 BCMA 펫타이드, PLGA-NP(10 μl)에 로딩된 BCMA 펫타이드 또는 리포솜-NP(10 μl)에 로딩된 BCMA 펫타이드의 동량을 96-웰 형광-호환성 마이크로플레이트에 3회 로딩하였다. 블랭크 PLGA 또는 블랭크 리포솜을 음성 대조군으로서 사용하였다. 다음으로, 1:1 아세토니트릴:DMSO(70 μl) 및 플루오로브라이트(FluoroBriteBrite™) DMEM(20 μl)의 용액을 각 웰에 첨가하고, 어두운 곳에서 실온에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 아세토니트릴:DMSO 용액을 백그라운드 형광을 측정하기 위한 대조군으로서 사용하였다. 인큐베이션 후, 390 nm/475 nm에서 Ex/Em에서 분광광도계를 사용하여 형광을 측정하였다. 펫타이드 농도를 선형 적합(linear fit)로 생성된 표준 곡선(0 - 1,000 μg/ml)에 기초하여 결정하였다.

[0517] 단핵구 유래 수지상 세포의 생성

[0518] 단핵구 유래 수지상 세포(DC)를 실질적으로 이전에 기재된 바와 같이 생성하였다(Bae et al. 2011, Bae et al. 2012). 간략하게, HLA-A2⁺ 정상 공여자의 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 단리된 단핵구를 10% FCS가 보충된 RPMI-1640 배지(Gibco-Life Technologies)에서 1,000 U/ml GM-CSF 및 1,000 U/ml IL-4의 존재하에 7일 동안 배양하였다. 사이토카인을 함유하는 신선한 배지를 격일마다 교체한다. 흡수 연구를 위해 7일에 배양물로부터 미성숙 수지상 세포를 수집하였다. 7일에 미성숙 수지상 세포 생성시에, 10% FCS-RPMI 중의 신선한 GM-CSF 및 IL-4와 함께, 1,000 U/ml IFN-α 및 10 ng/ml TNF-α를 첨가한 다음, 추가적인 3일 동안 인큐베이션하여 성숙한 DC를 수득하였다. 미성숙 또는 성숙한 DC를 항원 제시 세포(APC)로서 사용하였다.

[0519] 수지상 세포에 의한 BCMA 펫타이드 캡슐화된 나노입자의 결합 및 흡수

[0520] 미성숙 인간 수지상 세포(immDC)를 채취하고, 세척하고, 무혈청 배지(1×10^6 세포/ml)에 재현탁시키고, 5×10^5 세포/웰의 최종 농도로 48-웰 TC-플레이트의 웰에 분취하였다. 세포를 3 μg/ml의 인간 β2-마이크로글로불린의 존재하에 50 ug/ml의 BCMA 펫타이드-FITC 펫타이드 또는 BCMA 펫타이드-FITC 캡슐화된 나노입자로 펄스한 다음, 37°C에서 인큐ベ이션하였다. immDC의 펫타이드 로딩을 유세포 분석법에 의해 시간 의존적 방식(0, 30분, 1시간, 2시간, 6시간, 18시간)으로 평가하였다. 추가적으로, BCMA 펫타이드-FITC 흡수를 2시간 펫타이드 펄스 후 수지상 세포 상에서 공초점 현미경(Nikon widefield Microscope; Tokyo, Japan)에 의해 이미지화하였다. 배양 후, ImmDC를 세척하고, 2% 파라포름알데히드(Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA)로 고정시키고, 300 nM에서 DAPI(Sigma)로 염색하여 세포 핵을 확인하였다.

[0521] 새로 진단된 다발성 골수종 환자로부터 일차 CD138+ 종양 세포의 단리.

[0522] 적절한 사전 동의 후, RoboSep® CD138 양성 면역자기 선택 기술(StemCell Technologies)을 사용하여 HLA-A2⁺

및 HLA-A2⁻ 새로 진단된 다발성 골수종 환자 모두로부터 수득된 골수 단핵 세포(BMMC)로부터 일차 CD138⁺ 세포를 단리하였다.

[0523] BCMA 웹타이드 특이적 CTL의 생성.

[0524] HLA-A2⁺ 정상 공여자로부터 단리된 말초 혈액 단핵 세포를 (1) HLA-A2 특이적 BCMA 면역원성 웹타이드(50 ug/ml), (2) 웹타이드가 없는 블랭크 나노입자(PLGA 또는 리포솜), 또는 (3) BCMA 웹타이드(50 ug/ml) 캡슐화된 나노입자(PLGA/웹타이드 또는 리포솜/웹타이드)로 반복 자극시킴으로써 BCMA 웹타이드 특이적 CTL(BCMA-CTL)을 생체외에서 생성하였다. PBMC를 10% 인간 AB 혈청(BioWhittaker)이 보충된 DMEM 배지에서 배양하고, 총 4 또는 5 사이클 동안 적절한 BCMA 웹타이드로 매주 펄스하였다. IL-2(50 U/ml)를 두 번째 자극 2일 후 T 세포 배양물에 첨가하였다.

[0525] BCMA 웹타이드 캡슐화된 나노입자 자극에 의해 생성된 BCMA-CTL의 표현형 특성화.

[0526] BCMA 웹타이드 특이적 CD8⁺ CTL을 유세포 분석법에 의해 나이브:기억 세포 발달 및 CD28 공동자극 분자의 발현에 대해 평가하였다. 또한, BCMA 웹타이드 특이적 CD8⁺ CTL을 BCMA 웹타이드 특이적 테트라머-PE로 염색하여 배양물 내에서 평가하였다. 37°C에서 30분 동안 테트라머 염색한 후, 세포를 세척하고 CD8-FITC 및 CD28-APC mAb로 염색하였다. 염색 후, 세포를 세척하고 2% 파라포름알데히드에서 고정시키고, LSRII Fortessa™ 유세포 분석기를 사용하여 획득하고, FACS DIVA™ v8.0(BD) 또는 FlowJo v10.0.7(Tree star, Ashland, OR) 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. BCMA-CTL을 총 게이트된 CD3⁺CD8⁺ T 세포 집단 내에서 특이적 기억(중심 기억, 효과기 기억)/비기억 집단의 존재/빈도에 대해 분석하였다.

[0527] BCMA 웹타이드 캡슐화된 나노입자로 생성된 BCMA-CTL의 항-골수종 특이적 기능적 활성의 평가.

(1) BCMA 면역원성 웹타이드(50 µg/ml), (2) 웹타이드가 없는 블랭크 나노입자, 또는 (3) BCMA 웹타이드(50 µg/ml) PGLA/웹타이드 또는 리포솜/웹타이드 나노입자로 생성된 BCMA 특이적 CTL(N=3)을 HLA-A2⁺ 및 HLA-A2⁻ 골수종 세포주 또는 일차 CD138⁺ 종양 세포에 대한 이들의 증식 반응 및 항종양 활성 모두에 대해 평가하였다. 간략하게, CFSE(Molecular Probes) 표지된 CTL을 조사된(10 Gy) 골수종 세포와 공동 배양함으로써 BCMA 항원 특이적 CTL(5×10^5 세포) 증식을 측정하였다. CFSE 분석 3, 4, 5 또는 6일에, 세포를 채취하고, 라이브/데드 아쿠아 및 형광색소 접합된 항-CD3 및 항-CD8 mAb로 염색하고, 유세포 분석법에 의해 분석하였다. BCMA-CTL 기능적 CD107a 탈과립(세포독성) 및 Th1 IFN-γ /IL-2/TNF-α 사이토카인 생산을 골수종 세포주 또는 일차 CD138⁺ 종양 세포에 대한 반응으로 분석하였다. 간략하게, 각각의 BCMA-CTL(5×10^5 세포)을 형광색소 접합된 항-CD107a mAb의 존재하에 표적 세포와 함께 공동 인큐베이션하였다. 1시간 공동배양 후, 브레펠린 A 및 모넨신(BD)의 쟕테일을 첨가하고 추가적인 5시간 동안 인큐베이션하였다. 그리고 나서, 세포를 다양한 세포 표면 항원에 특이적인 라이브/데드 아쿠아 및 형광색소 접합된 mAb로 염색하고, 고정 및 투과화하고, IFN-γ, IL-2 또는 TNF-α에 특이적인 mAb로 세포내 염색하였다. 마지막으로, 세포를 세척하고, 2% 파라포름알데히드에서 고정시키고, LSRII Fortessa™ 유세포 분석기를 사용하여 획득하고, FACS DIVA™ v8.0 또는 FlowJo v10.0.7 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

결과

[0530] 다발성 골수종(MM)은 골수에서 악성 형질 세포의 클론 증식 및 축적, 혈청 및/또는 소변에서 단클론 단백질, 및 골용해성 골 병변의 발달을 특징으로 하는 B-세포 악성 종양이다. 새로운 치료제를 사용한 치료법의 최근 진보에도 불구하고, MM은 여전히 치료가 불가능하다. 전임상 연구는 항-골수종 CD8⁺ CTL이 XBP1, CD138, 및 CS1을 포함하는 다양한 종양 관련 항원(TAA)을 표적화하는 면역원성 HLA-A2 또는 HLA-A24 웹타이드를 이용하여 생성될 수 있음을 보여준다. 또한, 이들 웹타이드를 이용한 백신접종은 임상 시험에서 검출된 바와 같이 MM 특이적 면역 반응을 생성할 수 있다. 골수종에서 항원 특이적 면역요법 및 입양 면역요법의 폭 및 범위를 이들 항원을 넘어 확장시키기 위해, 본 개시내용은 새로 진단된 MM 환자(N=616)로부터 수득된 종양 세포 상에 추가적인 TAA를 제공한다. 여기에서, 본 개시내용은 BCMA에 특이적인 신규한 헤테로클리티크 웹타이드, B_세포 활성화 인자(BAF F)의 결합을 위한 수용체 및 증식-유도 리간드(APRIL)를 제공한다. MM 세포 성장, 생존 및 약물 내성을 촉진하는 그의 중요한 역할과 함께 MM 세포 및 형질 세포 상에서의 그의 제한된 발현 패턴으로 인해, BCMA 항원은 현재 항체, 면역독소, 및 CAR T로 표적화되고 있으나; 유리한 치료 지수를 갖는 보다 효과적인 골수종 특이적 효

과기 세포를 유도할 수 있는 신규한 전달 시스템을 설계할 상당한 필요성이 여전히 남아있다. 환자에서 골수 미세환경 내로 BCMA 웹타이드 전달을 촉진하고 항종양 면역 반응을 증가시키기 위해, 효소적 분해로부터 BCMA 웹타이드의 잠재적 보호를 제공하고 웹타이드 안정성, 흡수, 및 전달을 증가시킴으로써 유리 웹타이드 백신의 한계를 극복하는 나노입자를 사용한 접근법이 설계되었다. 나노기술 기반 암 백신의 목표는 지속적인 항원 방출 및 면역원성 웹타이드의 제시를 통한 더 길고 더 나은 T 세포 자극을 통해, MM 환자에서 보다 강력한 BCMA 특이적 CD8⁺ CTL 면역 반응 및 항종양 활성을 유발하는 것이었다. BCMA 웹타이드를 캡슐화하는 2개의 상이한 유형의 나노입자인 PLGA 및 리포솜을 평가하기 위한 실험을 수행하였다. 웹타이드 단독 또는 리포솜/웹타이드와 비교하여, PLGA/웹타이드는 항원 특이적 기억 CTL 유도와 관련된, 가장 큰 항종양 활성을 갖는 BCMA 특이적 CD8⁺ T 세포를 유발한다. 이들 결과는 골수종에서 BCMA 웹타이드 특이적 항종양 활성을 효과적으로 유도하고 환자 결과를 개선하기 위해, 생분해성 및 생체적합성으로 미국 식품의약국(FDA)에 의해 수여된 인간 사용을 위해 승인된, PLGA 나노비히클을 사용한 치료적 백신접종 및/또는 입양 면역요법 전략을 위한 프레임워크를 제공한다.

[0531] BCMA 웹타이드-캡슐화된 나노입자의 특성화 및 정량.

이중 유화액-용매 기술은 유화액을 안정화시키기 위해 PLGA NP를 제제화하는 가장 일반적으로 사용되는 방법이다. 동결건조된 입자를 동적 광 산란을 사용하여 크기 및 제타-전위 측정을 위해 중류수에 재현탁시켰다. 블랭크 PLGA는 309.0 ± 4.0 nm(n = 3)의 크기를 나타낸 반면, 웹타이드 로딩된 PLGA-NP는 크기가 더 작았고 (257.7 ± 11.5 nm, n = 3), 이는 PLGA 중합체와 웹타이드 사이의 상호작용에 기인할 수 있다. 블랭크 및 PLGA-NP 모두에 대한 제타-전위는 -0.06 내지 -1.1 mV였다. PLGA-NP의 다분산성 지수(PDI)는 ≤ 0.2였고, 이는 균일한 크기 분포를 나타낸다. 블랭크 PLGA 또는 BCMA 웹타이드 캡슐화된 PLGA-NP를 금/팔라듐으로 스퍼터 코팅하고, 50 X에서 20 kV 하에서 주사 전자 현미경을 사용하여 이미지화하여 균일한 크기 분포를 추가로 나타내었다(도 32A). 동시에, 리포솜 제제를 지질 DOTAP를 사용하여 합성하여 BCMA 웹타이드와의 상호작용을 허용하였다. 리포솜 로딩된 BCMA 웹타이드 나노입자는 대략 172 ± 0.7 d.nm(직경, 나노미터)(n = 3) 크기였고, 0.2의 PDI를 나타내었고, 균일한 크기 분포를 나타내었다(도 32B). TEM을 사용하여 웹타이드 로딩된 리포솜을 시각화하기 위해 우라닐 아세테이트를 이용한 음성 염색을 사용하였고, 이는 또한 균일한 크기 분포를 밝혀내었다. 두 NP 제제에 대한 웹타이드 로딩 및 캡슐화 효율을 390 nm/475 nm에서 Ex/Em에서 측정된 형광에 기초하여 정량적 형광측정 웹타이드 분석을 사용하여 평가하였다. 로딩된 웹타이드의 초기 양 대비 PLGA-NP 또는 리포솜-NP에 로딩된 웹타이드의 백분율을 나타내는 웹타이드 캡슐화 효율(%)은 PLGA로 51% ± 1.15%(n = 3) 또는 리포솜으로 49% ± 1.32%(n = 3)였다(도 32C). 블랭크 PLGA 및 블랭크 리포솜은 예상대로 0의 웹타이드 로딩을 가지고 있었다. 웹타이드 캡슐화의 확인/정규화 후, PLGA/웹타이드 및 리포솜/웹타이드 NP를 BCMA 항원 공급원으로 사용하여 항원 특이적 세포독성 T 립프구(CTL)를 생성하였다.

[0533] 수지상 세포에 의한 BCMA 캡슐화된 나노입자의 흡수.

HLA-A2⁺ 공여자의 단핵구로부터 생성된 ImmDC를 사용하여 BCMA 웹타이드 흡수를 평가하였다. 각각의 BCMA-나노입자 유형 또는 웹타이드 단독에 의한 ImmDC에 대한 웹타이드 로딩 효율을 유세포 분석법에 의해 시간 경과에 따라 측정하였다. 더 높은 효율의 ImmDC 웹타이드 로딩이 웹타이드 단독과 비교하여 BCMA 캡슐화된 나노입자에서 검출되었다. 평가된 2개의 나노입자 중에서, 리포솜/웹타이드는 PLGA/웹타이드와 비교하여 시간 경과에 따라 더 빠르고 유지된 더 높은 수준의 웹타이드 로딩(100% 흡수 30분)을 나타내었다(도 33A). 대조적으로, PLGA/웹타이드는 시간 경과에 따라 웹타이드 로딩의 점진적인 증가를 나타내었고, 이는 1시간에 검출되었고(담체 없음/웹타이드, PLGA/웹타이드 대 리포솜/웹타이드: 10 ± 4%, 22 ± 4% 대 100 ± 0%), 6시간에 증가하였고(담체 없음/웹타이드, PLGA/웹타이드 대 리포솜/웹타이드: 42 ± 4%, 59 ± 2% 대 100 ± 0%), 18시간에 최고였다(담체 없음/웹타이드, PLGA/웹타이드 대 리포솜/웹타이드: 55 ± 8%, 83 ± 5% 대 100 ± 0%)(도 33B). ImmDC에 의한 PLGA/웹타이드의 로딩 효율을 18시간 펄스 후 공초점 현미경에 의해 추가로 평가하였다. 더 높은 ImmDC BCMA 웹타이드 로딩은 웹타이드 단독과 비교하여 PLGA/웹타이드에서 관찰되었고(도 33C), 이는 PLGA/웹타이드 제제가 BCMA 웹타이드 전달을 향상시킨다는 것을 확인시켜 주었다. 추가 평가는 유세포 분석법에 의해 측정된 바와 같이, 시간 의존적 방식으로 PLGA/웹타이드에 의한 개선된 ImmDC 웹타이드 로딩을 입증하였다(담체 없음/웹타이드 대 PLGA/웹타이드: 0시간 펄스(기저선) - 4% 대 3%, 2시간 펄스 - 22% 대 36%, 4시간 펄스 - 28% 대 46%, 6시간 펄스 - 43% 대 62%)(도 33D). 또한, 항원 제시 세포로서 T2 세포를 사용하여, 시간 의존적 방식으로 개선된 APC 웹타이드 로딩의 동일한 패턴이 검출되었다(담체 없음/웹타이드 대 PLGA/웹타이드: 30분 펄스 - 1% 대 4%, 2시간 펄스 - 8% 대 11%, 24시간 펄스 - 13% 대 41%)(도 33E). 2개의 항원 제시 세포 유형 사이에서, 일차 ImmDC는 T2 세포보다 더 높은 효율의 웹타이드 흡수를 나타내었다. 따라서, 이들 결과는 항원 제시 세포에 의한

BCMA 웨타이드 로딩을 향상시키기 위해 PLGA/웨타이드 또는 리포솜/웨타이드 모두의 유리한 효과를 입증한다.

[0535] *PLGA/웨타이드 CTL은 다발성 골수종 세포에 대해 가장 높은 기능적 면역 반응을 나타낸다.*

[0536] HLA-A2⁺BCMA⁺(U266, McCAR) 또는 HLA-A2⁻BCMA^{+(RPMI)} 골수종 세포와 함께 인큐베이션 후, BCMA 특이적 CTL을 4번 째 자극 1주 후 이들의 종양 특이적 활성을 대해 평가하였다. (1) BCMA 웨타이드 자체, (2) PLGA/웨타이드 또는 (3) 리포솜/웨타이드에 의해 생성된 BCMA-CTL의 대표적인 유동 세포분석은 HLA-A2⁺ U266 골수종 세포에 대해, CD107a 탈파립(도 34A), IFN-γ 생산(도 34B), IL-2 생산(도 34C), 및 TNF-α 생산(도 34D)을 포함하는 HLA-A2 제한된 항-골수종 활성을 입증하였으나, HLA-A2⁻ RPMI 골수종 세포에 대해서는 그렇지 않았다. 나노입자 생성된 BCMA-CTL 중에서, PLGA/웨타이드는 우수한 항원 특이적 CTL을 유도하였고, 이는 리포솜/BCMA 웨타이드 유도된 CTL보다 이들의 더 높은 수준의 항종양 활성[CD107a 상향조절 및 IFN-γ / IL-2/TNF-α 생산]에 의해 입증되었다. 추가 분석은 추가적인 HLA-A2⁺ 공여자(n=3)로부터 생성된 PLGA/웨타이드-CTL이 HLA-A2⁺BCMA⁺ U266 및 HLA-A2⁺ BCMA^{+(low)} McCAR에 대한 반응으로 가장 높은 항-골수종 활성을 나타내었지만, MHC 미스매치된 HLA-A2⁻BCMA⁺ RPMI 골수종 세포에는 그렇지 않았음을 확인시켜 주었다(도 34E). 이에 비해, 리포솜/웨타이드-CTL은 BCMA 웨타이드-CTL과 비교하여 약간 더 높은 수준의 항-MM 활성을 가지고 있었고, 이들은 모두 PLGA/웨타이드-CTL보다 낮았다. 따라서, 이들 결과는 HLA-A2 제한된 방식으로 다발성 골수종 세포에 대해 다기능적 CTL의 효과적인 유도를 초래하는, PLGA 캡슐화시 BCMA 웨타이드의 향상된 면역원성을 나타낸다.

[0537] 골수종 환자의 일차 CD138⁺ 종양 세포에 대한 PLGA 캡슐화된 BCMA 웨타이드 자극으로 생성된 BCMA-CTL에 의한 가장 높은 항-MM 활성.

[0538] NP 캡슐화를 이용하여 또는 없이 생성된 BCMA 특이적 CTL의 골수종 특이적 기능적 활성을 HLA-A2⁺ 또는 HLA-A2⁻ 골수종 환자의 일차 CD138⁺ 종양 세포에 대해 추가로 평가하였다 BCMA 웨타이드 단독, PLGA/BCMA 웨타이드, 또는 리포솜/BCMA 웨타이드를 이용한 자극에 의해 생성된 3개의 상이한 효과기 세포는 모두 효과기 세포 중에서 CD107a 탈파립 및 IFN-γ / IL-2/TNF-α 생산의 최소 백그라운드 수준을 나타내었다(도 35A). 효과기 CTL 중에서, PLGA/웨타이드-CTL은 일차 HLA-A2⁺ CD138⁺(MM 환자 1) 종양 세포에 대해 가장 높은 항-MM 활성을 입증하였다 [BCMA 웨타이드-CTL 대 PLGA/웨타이드-CTL 대 리포솜/웨타이드-CTL: CD107a⁺ CTL - 15.0% 대 31.7% 대 16.2%, IFN-γ⁺ CTL - 1.9% 대 7.4% 대 3.7%, IL-2⁺ CTL - 14.3% 대 32.3% 대 17.9%, TNF-α⁺ CTL - 16.4% 대 36.8% 대 19.1%](도 35B). DC에 의한 가장 높은 웨타이드 흡수를 가짐에도 불구하고, 리포솜/웨타이드-CTL의 항-MM 활성은 일차 HLA-A2⁺ CD138⁺ 종양 세포에 대해 PLGA/웨타이드-CTL보다 낮았다. 유사한 패턴의 기능적 항-MM 활성이 HLA-A2⁺ MM 환자 #2로부터 수득된 일차 CD138⁺ 종양 세포에 대해 효과기 CTL에서 검출되었고, PLGA/웨타이드-CTL이 가장 높은 활성을 가지고 있었다(도 35C). 대조적으로, 상이한 BCMA-CTL 중 어느 것도 HLA-A2⁻ CD138⁺ 종양 세포에 대해 항종양 활성을 가지고 있지 않았으므로, HLA-A2-제한된 면역 반응을 입증하였다(도 35D). 종합하면, 이들 결과는 가장 높은 수준의 항-골수종 활성이 HLA-A2 제한된 방식으로 일차 CD138⁺ MM 세포에 대한 PLGA/BCMA 웨타이드-CTL에서 관찰된다는 것을 나타낸다. 결과는 또한 PLGA에서 웨타이드 캡슐화시 BCMA 특이적 CTL의 생성을 통해 증가된 항종양 활성의 잠재성을 강조한다.

[0539] *PLGA 캡슐화로 생성된 BCMA-CTL에 의한 증가된 CD28 공동자극 분자 발현 및 웨타이드 특이적 T 세포 증식.*

[0540] PLGA에 의해 매개된 BCMA 특이적 CTL에서의 높은 항종양 활성의 메커니즘을 보다 잘 이해하기 위해, CD8⁺ T 세포 및 BCMA 웨타이드 특이적 테트라머⁺ CTL 상에서 이들의 공동자극 분자의 발현을 평가하기 위한 실험을 수행하였다. BCMA 웨타이드-CTL과 비교하여, PLGA/웨타이드 CTL은 CD8⁺ T 세포 상에서 상향조절된 CD28⁺⁺ 발현을 갖는 세포의 독특한 서브세트를 입증하였다(웨타이드-CTL 대 PLGA/웨타이드-CTL: 15.6% 대 32.0%; 도 36A 상부 패널). 또한, PLGA/웨타이드 CTL은 BCMA 웨타이드 CTL과 비교하여 BCMA 테트라머⁺ 웨타이드 특이적 CTL에 대해 더 높은 비율을 함유하였다(웨타이드-CTL 대 PLGA/웨타이드-CTL: 16.5% 대 35.0%; 도 36A 하부 패널). 또한, 테트라머-음성 CD8⁺ T 세포와 비교하여 테트라머-양성 내에서 더 높은 빈도의 밝은 CD28⁺⁺ 세포가 검출되었다. PLGA/웨타이드 테트라머⁺ CTL은 BCMA 웨타이드 테트라머⁺ CTL보다 더 높은 빈도의 CD28⁺⁺ 밝은 세포를 나타내었다

(51.8% 대 30.3%). 따라서, 이들 결과는 PLGA/펩타이드 유도된 CTL이 밝은 CD28⁺⁺ BCMA 특이적 CTL의 독특한 집단을 갖는 BCMA 특이적 테트라머⁺ 세포의 더 큰 비율을 갖는다는 것을 입증한다. 다음으로, APC에 의해 제시된 그들의 동족 BCMA 웨بت아이드의 인식시 BCMA 웨بت아이드 CTL 및 PLGA/펩타이드 CTL의 증식을 입증하기 위한 실험을 수행하였다. BCMA 웨بت아이드 CTL 및 PLGA/펩타이드 CTL 모두는 비-BCMA 특이적 CD8⁺ T 세포의 기저선 증식(3일, 4일 대 5일: 0%, 1% 대 4%)과 비교하여 시간 의존적인 방식으로 이들의 동족 BCMA 웨بت아이드의 인식시 증가된 증식(3일, 4일 대 5일: 11%, 18% 대 33%)을 입증하였다. 중요하게도, 증식은 모든 시점에 PLGA/펩타이드-CTL에서 더 일찍 발생하였고(3일, 4일 대 5일: 25%, 45% 대 69%)(도 36B), 이는 동족 BCMA 웨بت아이드를 인식하고 이에 반응하는 능력의 증가를 나타낸다. 마지막으로, 동족 BCMA 웨بت아이드에 대한 반응으로 생성된 Th1 사이토카인 생산을 각 효과기 세포 집단에서 측정하였다. PLGA/펩타이드 CTL은 BCMA 웨بت아이드 CTL(2일 인큐베이션 - 31.5%, 4일 인큐베이션 - 42.1%)과 비교하여 더 높은 수준의 IFN-γ 생산(2일 인큐베이션 - 33.8%, 4일 인큐베이션 - 60.6%)을 가지고 있었다(도 36C). 따라서, 이들 결과는 PLGA/펩타이드-CTL에 대한 반응으로 향상된 웨بت아이드 특이적 CD8⁺ T 세포 면역 반응, 증식, 및 IFN-γ 생산을 입증하며, 이는 PLGA/펩타이드 캡슐화가 BCMA 웨بت아이드의 면역원성을 증가시켜 더 높은 항종양 활성을 갖는 CTL을 생성할 수 있음을 나타낸다.

[0541] *PLGA/BCMA 웨بت아이드 자극에 대한 반응으로 향-골수종 활성과 관련된 기억 CD8+ CTL의 효과적인 생성.*

[0542] PLGA/펩타이드, 블랭크 PLGA(대조군), 및 웨بت아이드 단독 유도된 CTL의 기억 세포 발달 및 면역 기능적 활성을 특성화하고 비교하기 위한 실험을 추가로 수행하였다. CFSE 분석에서, PLGA/펩타이드 CTL은 평가된 모든 시점에 BCMA 웨بت아이드-CTL(4일: 12.20%, 6일: 29.20%)보다 (4일: 28.90%, 6일: 44.70%)까지 HLA-A2⁺ U266 세포에 대한 반응으로 더 높은 증식을 나타내었다(도 37A). 비히클로서 PLGA 자체로 자극된 효과기 세포는 4일 및 6일 공동 배양에서 최소 증식(7% 미만)을 나타내었다. 또한, 배지 대조군에서는 증식이 관찰되지 않았으며, 이는 CTL 증식이 골수종 세포에 특이적이라는 증거를 제공한다. 다음으로, BCMA 웨بت아이드 CTL 및 PLGA/펩타이드 CTL 내에서 기억 세포 발달을 특성화하기 위한 실험을 수행하였다. 전반적으로, 웨بت아이드 자극의 각 라운드 후 CTL 기억 세포 발달의 점진적인 증가가 관찰되었고: 총 CD45RO⁺ 기억 CTL은 BCMA 웨بت아이드(3' 자극: 15.3%, 4' 자극: 19.5%, 5' 자극: 79.0%)과 비교하여 PLGA/BCMA 웨بت아이드 자극(3' 자극: 20.7%, 4' 자극: 32.8%, 5' 자극: 93.5%) 후 더 높았다(도 37B). PLGA/펩타이드 CTL 및 BCMA 웨بت아이드 CTL에서의 이러한 기억 세포 발달의 패턴은 웨بت아이드 자극의 2 또는 4 사이클 후에 유지되었다(도 37C). PLGA/펩타이드 CTL 및 BCMA 웨بت아이드 CTL에서 특이적 중심 및 효과기 기억 서브세트 발달을 특성화하기 위한 실험을 또한 수행하였다. 총 CD45RO⁺ 기억 발달과 일치하게도, 중심 기억(CM) 및 효과기 기억(EM) CD8+ T 세포 서브세트 모두는 1 사이클의 자극 후에 점진적으로 증가하였고(PLGA/펩타이드 - CM 5.3%, EM 8.1%, 웨بت아이드 - CM 2.9%, EM 5.7%), 3 사이클의 자극 후에 더 증가하였다(PLGA/펩타이드 - CM 14.8%, EM 13.2%, 웨بت아이드 - CM 12.4%, EM 11.0%). 5 사이클의 웨بت아이드 자극 후, 중심 기억 및 효과기 기억 세포 발달의 비율에서 주된 차이가 관찰되었다(PLGA/펩타이드 - CM 42.4%, EM 32.6%, 웨بت아이드 - CM 3.5%, EM 95.4%). 또한, PLGA/펩타이드 CTL은 효과기 기억 세포로의 추가 분화 없이, 가장 높은 항종양 활성을 갖는 중심 기억 T 세포의 더 높은 비율을 유지하였다(도 37D).

[0543] *PLGA/BCMA 웨بت아이드에 의한 효과적인 향-골수종 활성과 관련된 중심 기억 CD8⁺ CTL의 유지.*

[0544] 특이적 향-MM 활성을 각각의 기억 CTL 서브세트 내에서 추가로 조사하였다. 여기에서, PLGA/펩타이드 또는 BCMA 웨بت아이드를 이용한 자극에 의해 상이한 HLA-A2+ 개체로부터 생성된 BCMA 특이적 CTL의 HLA-A2-제한된 향-골수종 활성이 확인되었다. HLA-A2⁺ U266 골수종 세포에 대한 반응으로 가장 높은 면역 기능적 활성(CD107a 상향조절 및 Th1-유형 사이토카인 생산)이 PLGA/펩타이드에 의해 유도된 CTL에서 일관되게 관찰되었다(도 38A, 38B, 38C). 중요하게도, 가장 높은 향-MM 활성은, CD107a 탈파립(도 38A, 38C), IFN-γ 생산(도 38B, 38C), 및 IL-2/TNF-α 생산(도 38C)에 의해 나타난 바와 같이, 효과기 기억 서브세트와 비교하여 중심 기억 내에서 발견되었다. 따라서, 이들은 PLGA 캡슐화된 BCMA 웨بت아이드가 BCMA 웨بت아이드보다 더 강력한 종양 특이적 CTL 반응을 유도한다는 것을 나타내며, 이는 PLGA/펩타이드 BCMA 항원 특이적 CTL 내에서 중심 기억 세포의 생성 및 유지에 의해 입증된다.

[0545] 이들 결과는 골수종에서의 신규한 백신접종 및/또는 입양 면역요법 치료 프로토콜에서 항종양 활성을 갖는 효과적인 BCMA CTL을 유도하는 PLGA/BCMA 웨بت아이드의 용도를 지지한다.

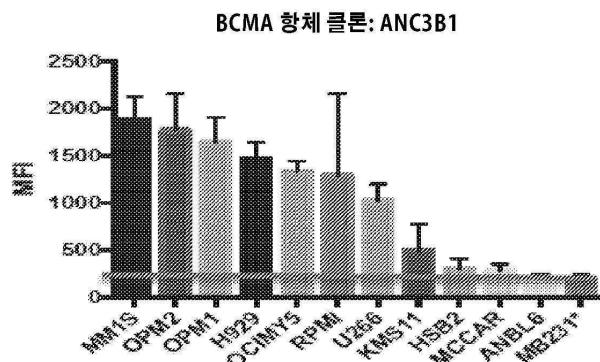
[0546] 다른 구현예

[0547]

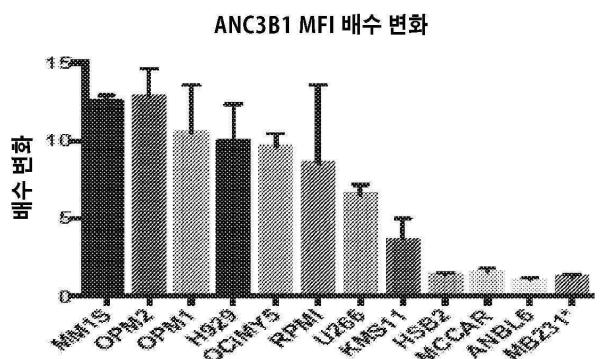
본 발명이 이의 상세한 설명과 관련하여 설명되었지만, 전술한 설명은 첨부된 청구범위의 범위에 의해 정의된 본 발명의 범위를 예시하고자 하는 것이며 제한하고자 하는 것이 아닌 것으로 이해되어야 한다. 다른 양태, 장점, 및 변형은 하기 청구범위의 범위에 속한다.

도면

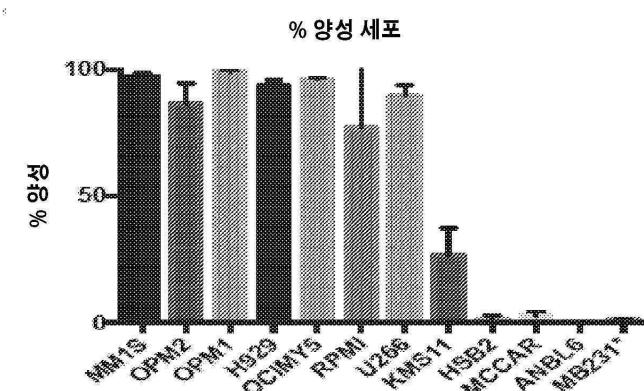
도면 1a



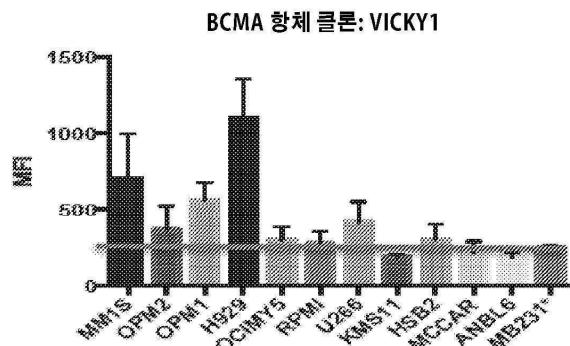
도면 1b



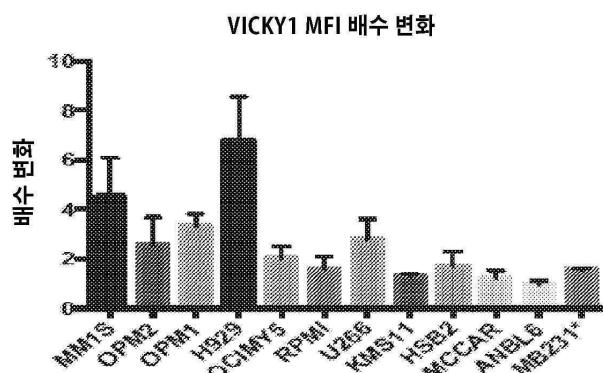
도면 1c



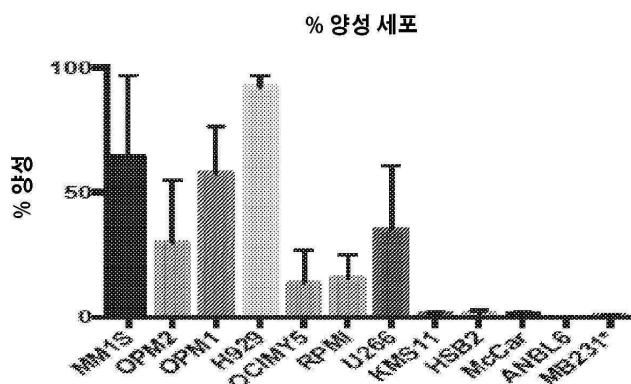
도면 1d



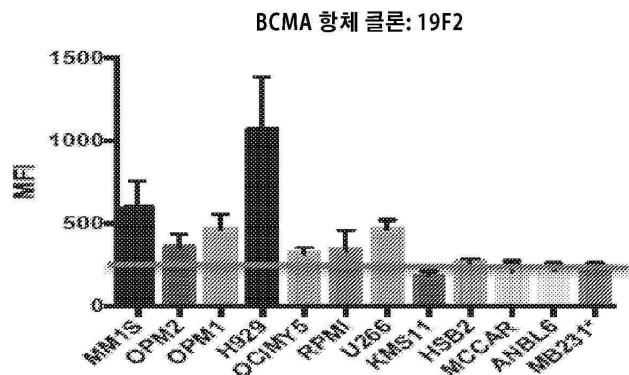
도면 1e



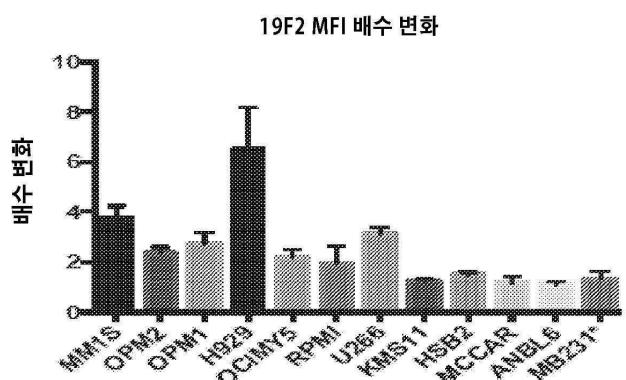
도면 1f



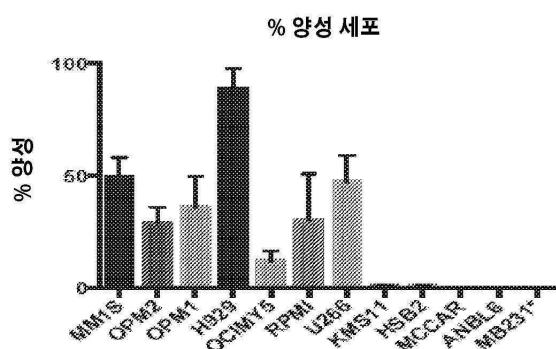
도면 1g



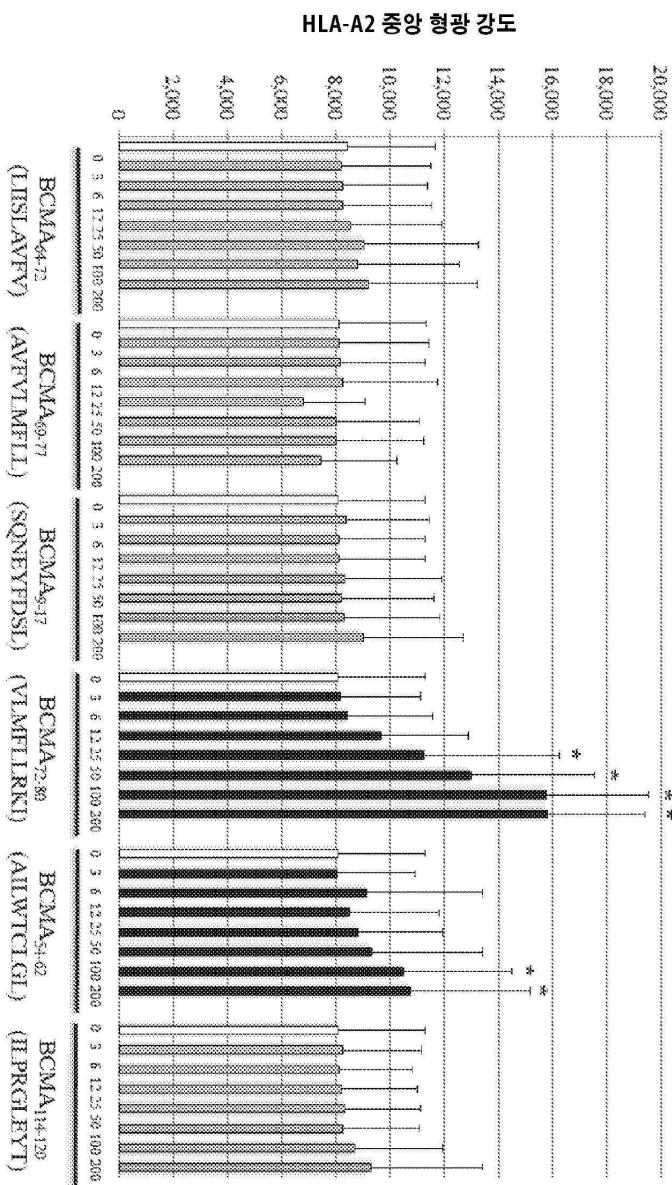
도면 1h



도면 1i

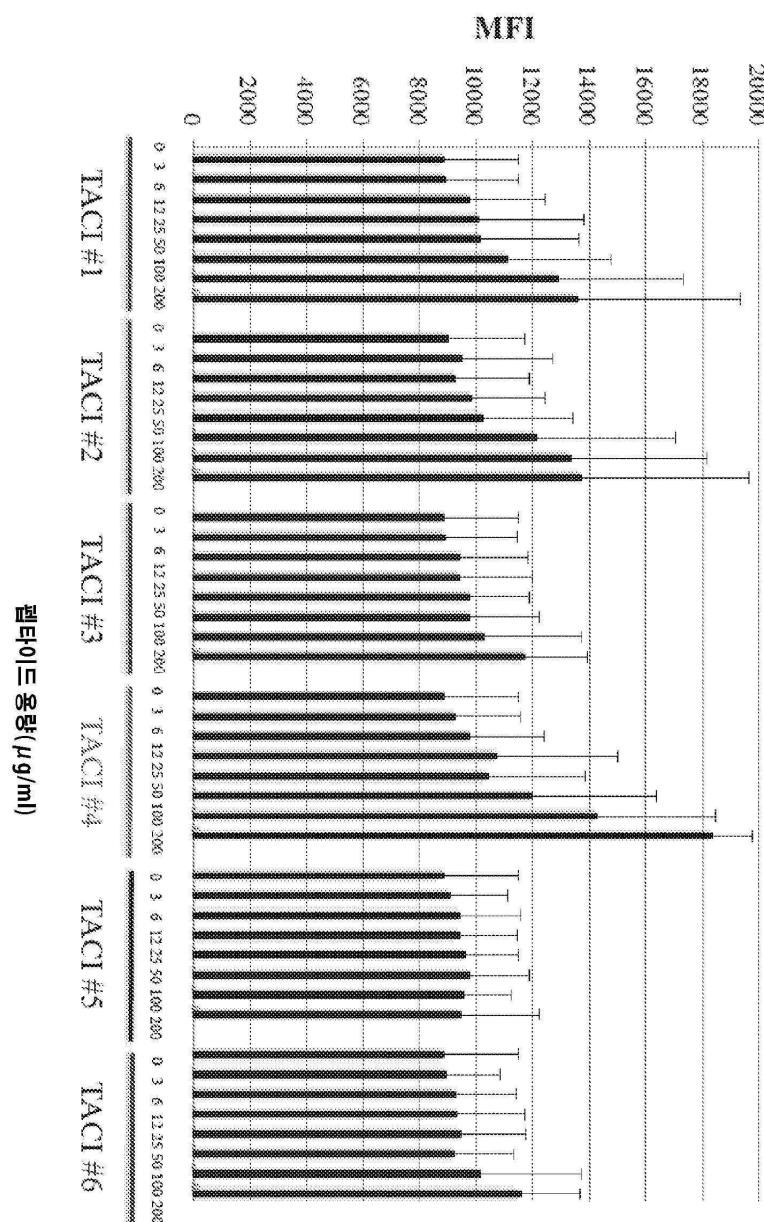


도면2

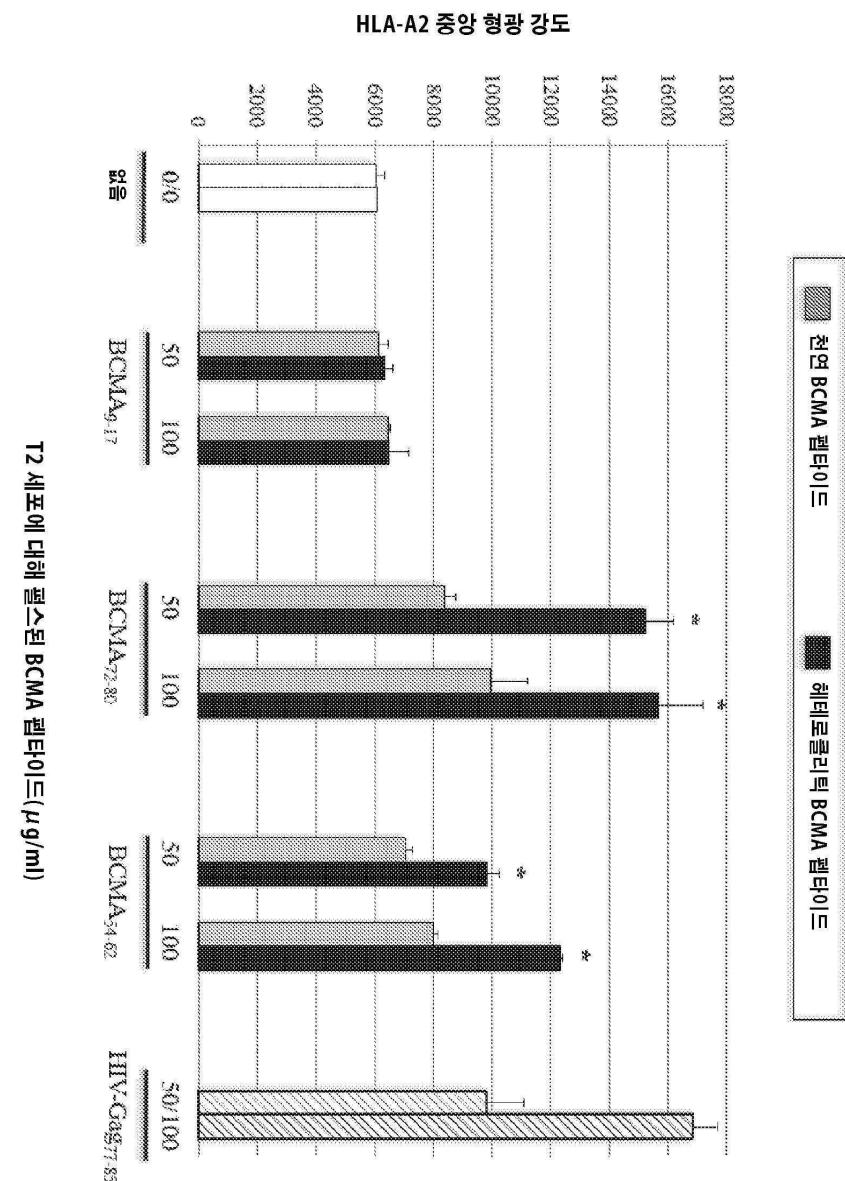


T2 세포에 대해 퀄스틴 BCMA 웰타이드(μg/ml)

도면3

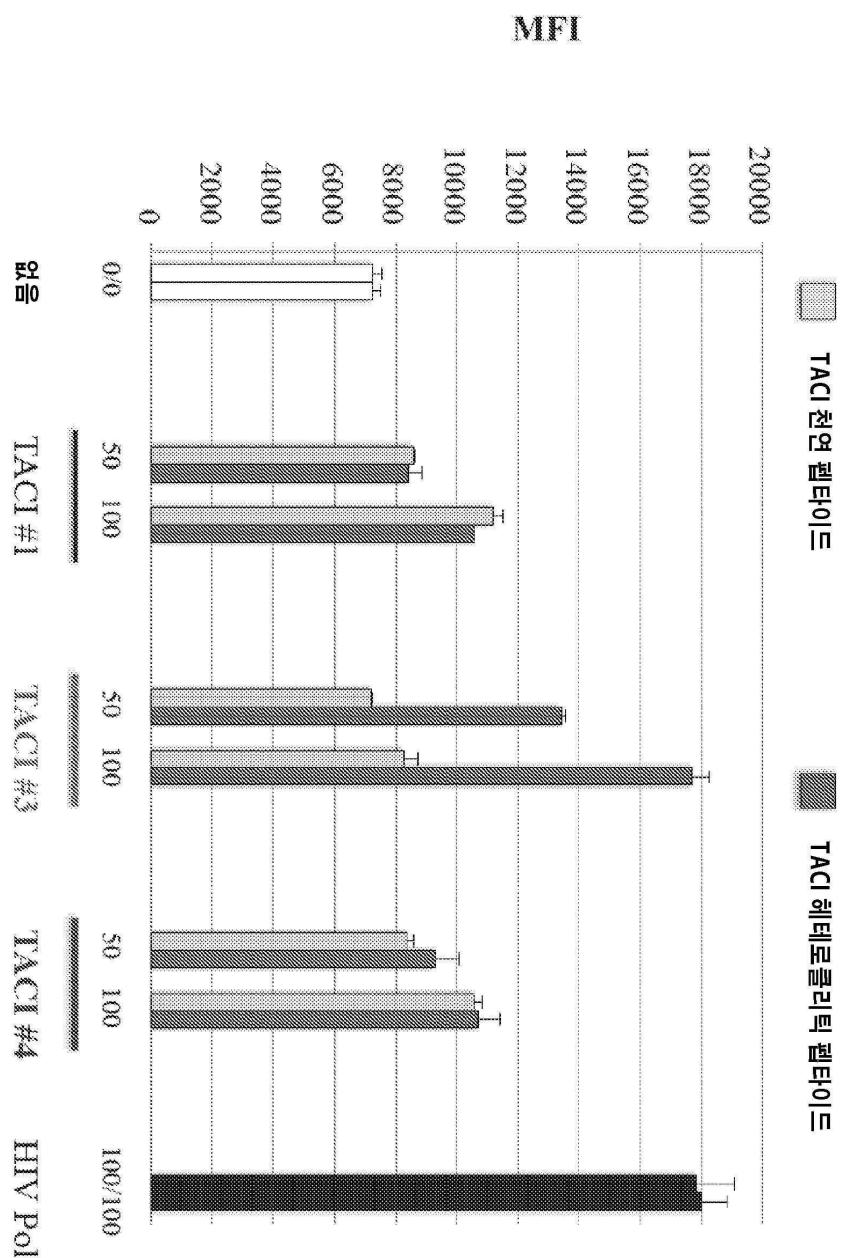


도면4

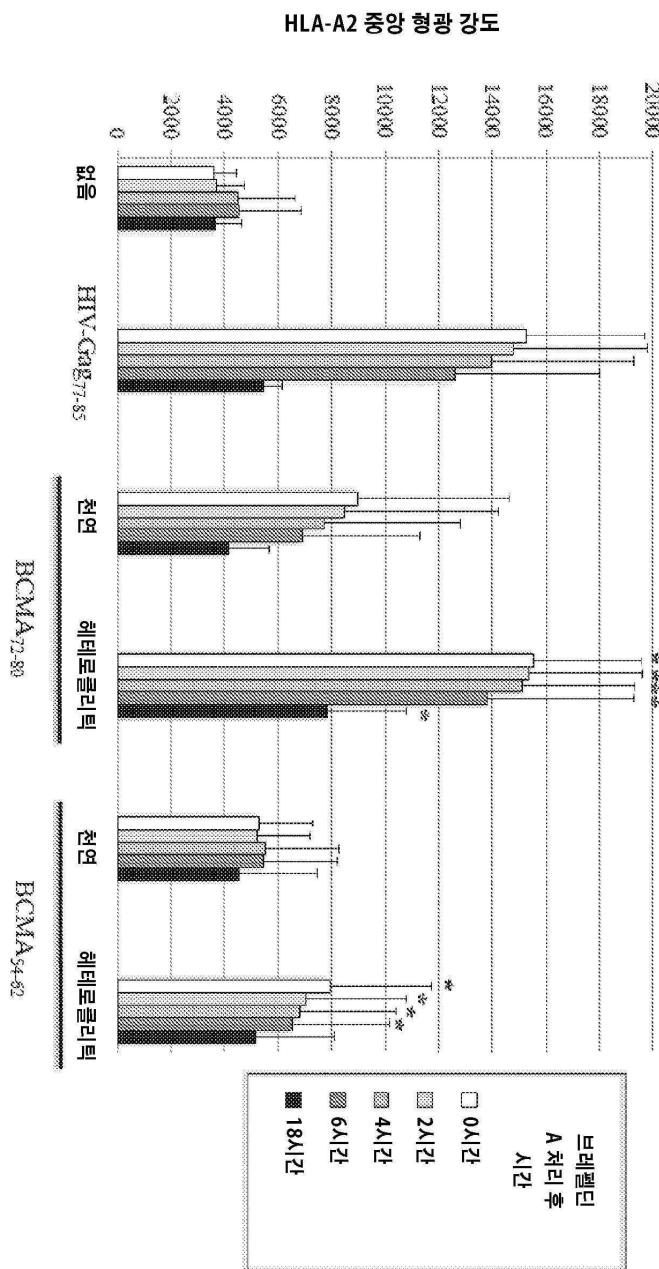


T2 세포에 대해 펠스된 BCMA 웰타이드(μ g/ml)

도면5

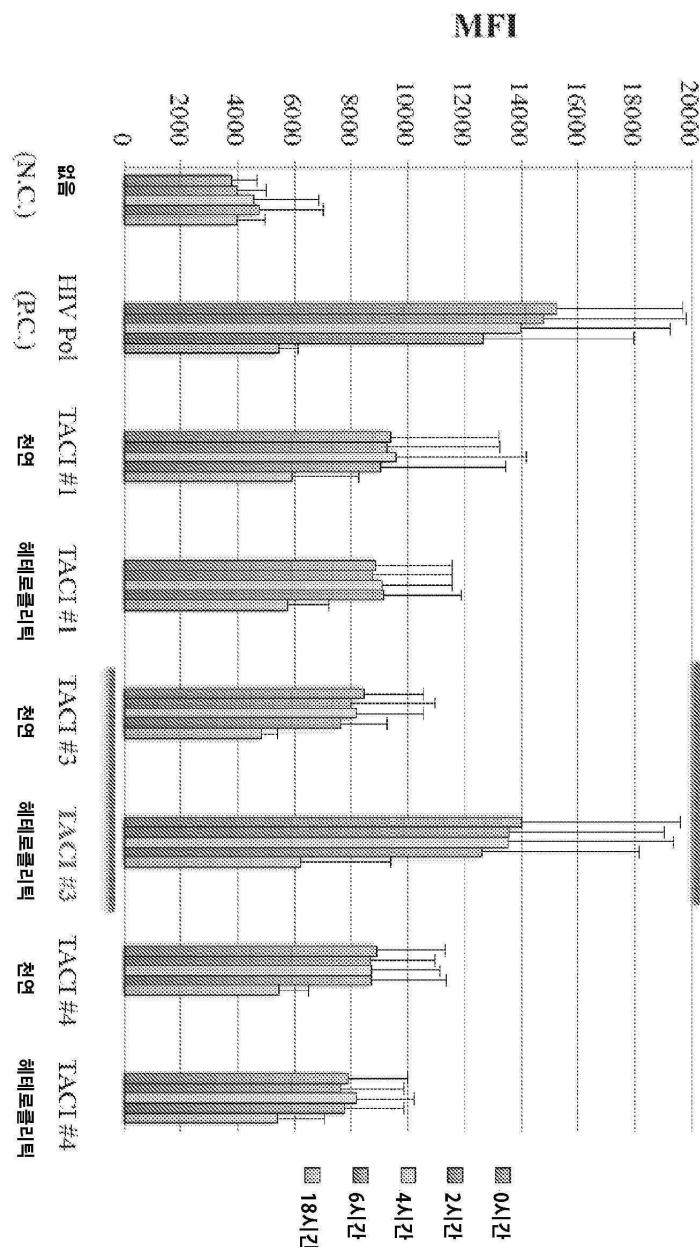


도면6

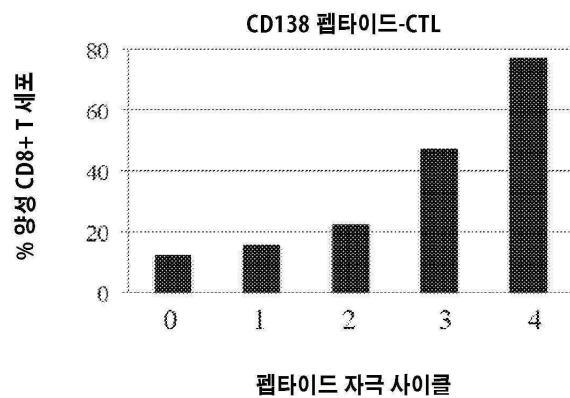


T2 세포에 대해 펄스틴 렐타이드

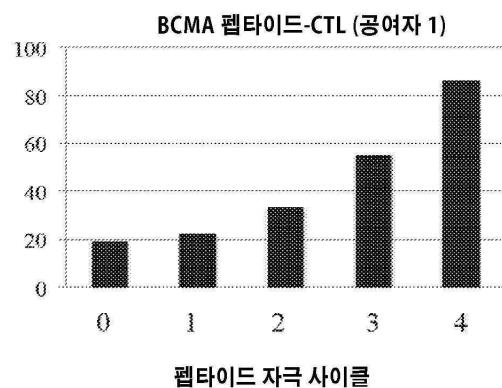
도면7



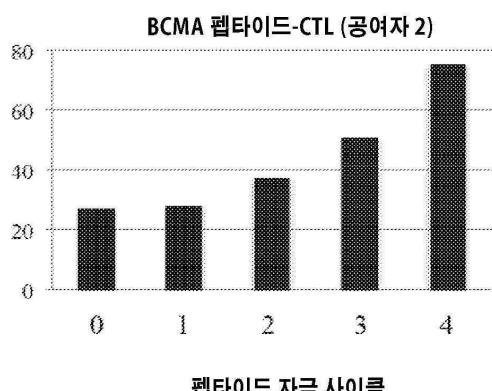
도면8a



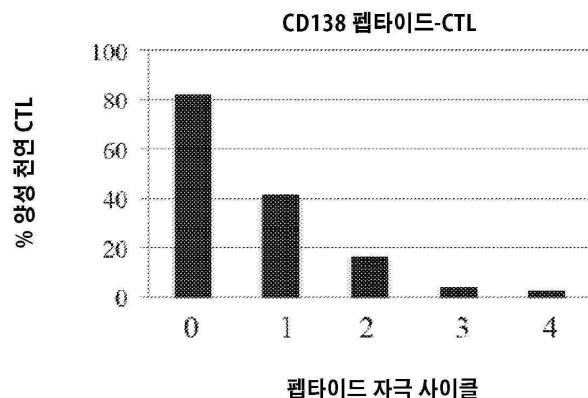
도면8b



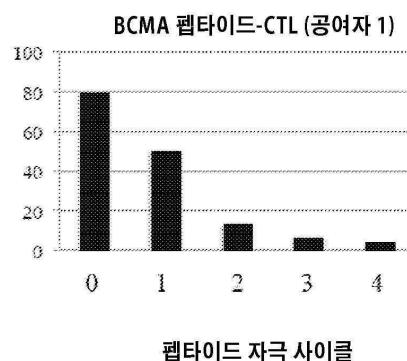
도면8c



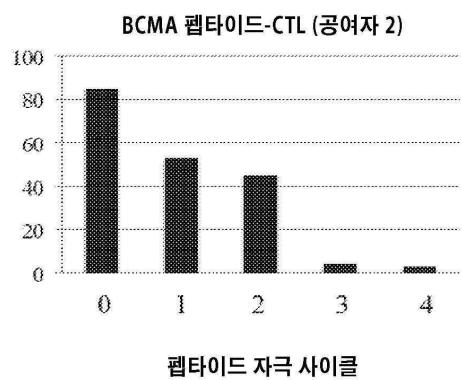
도면9a



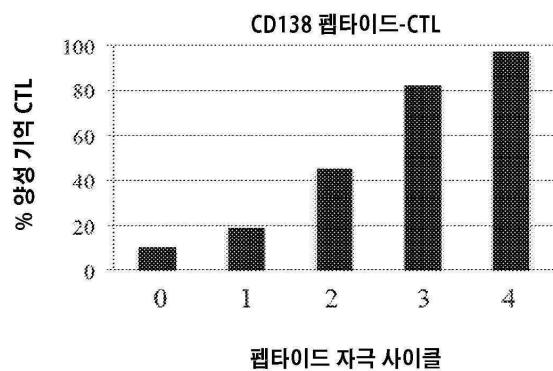
도면9b



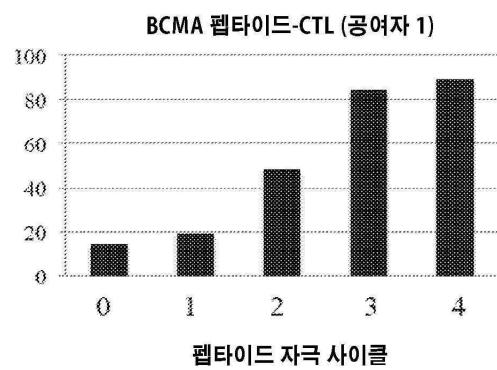
도면9c



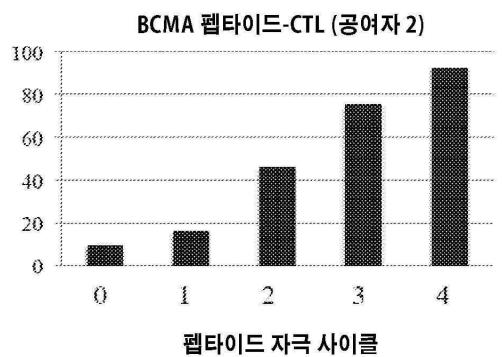
도면10a



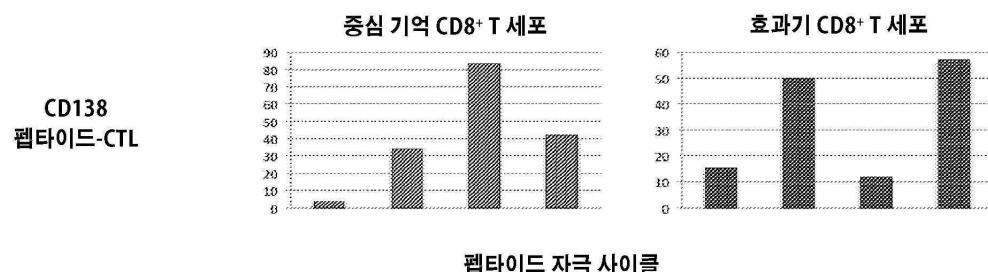
도면10b



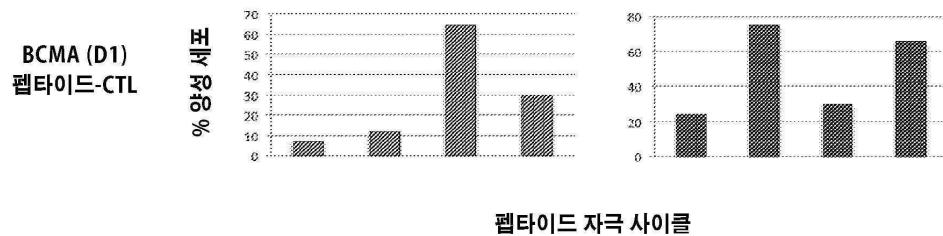
도면10c



도면11a

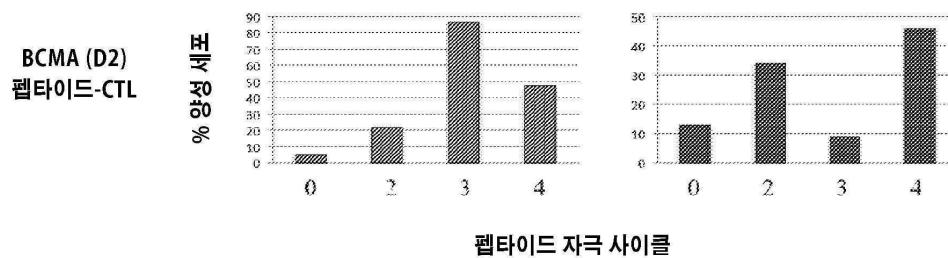


도면11b



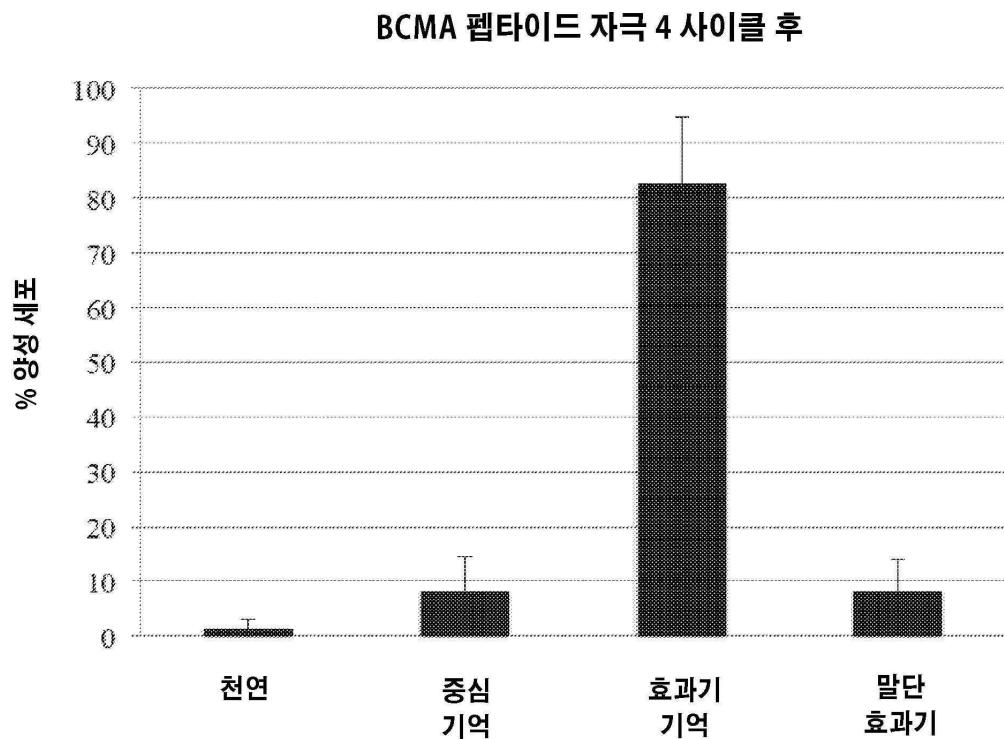
펩타이드 자극 사이클

도면11c



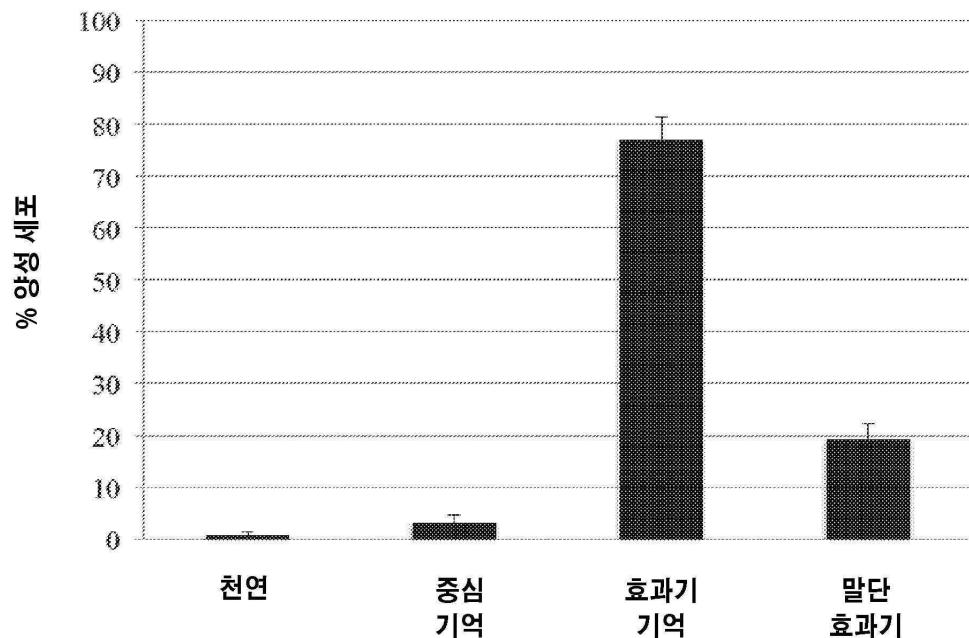
펩타이드 자극 사이클

도면12

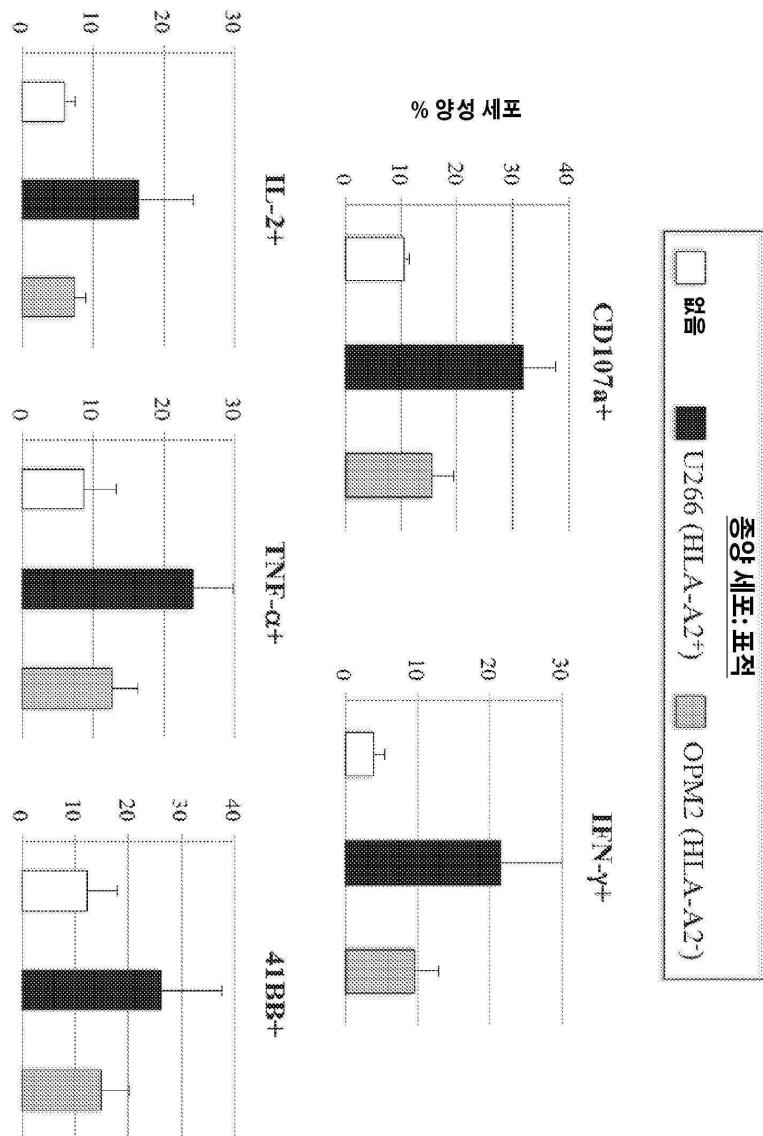


도면13

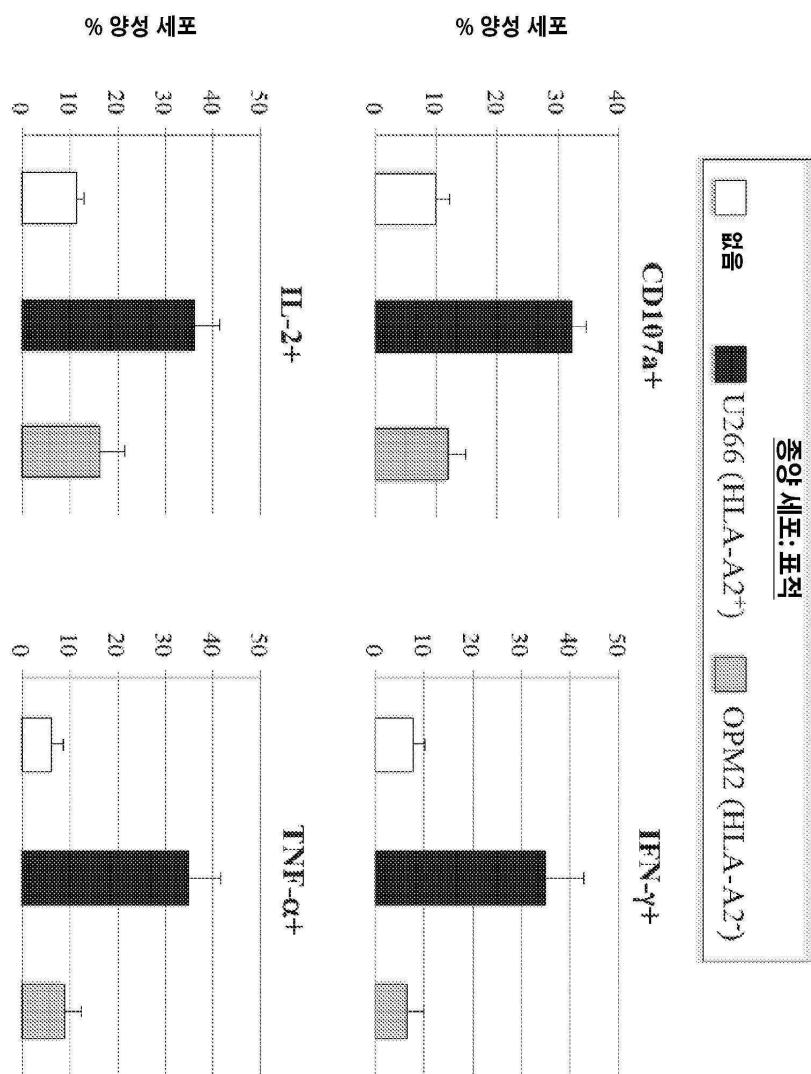
TACI 웹타이드 자극 4 사이클 후



도면14



도면15



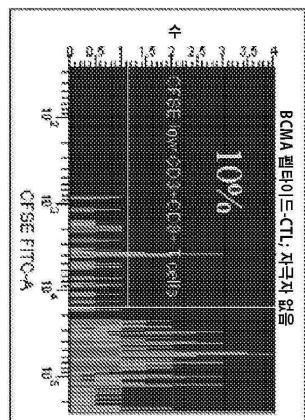
도면16

자극지:

양극

U266

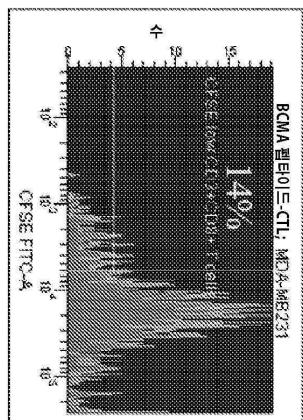
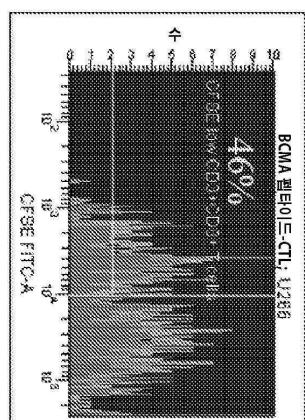
(HLA-A2+ MM 세포)



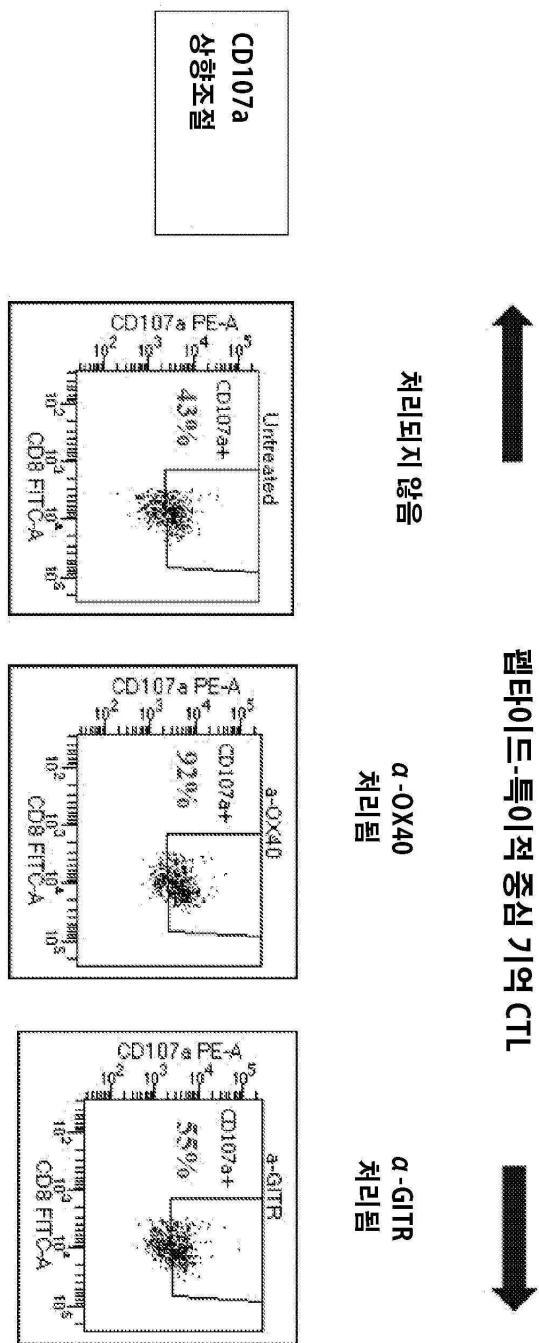
MDA-MB231

(HLA-A2+ 유방암 세포)

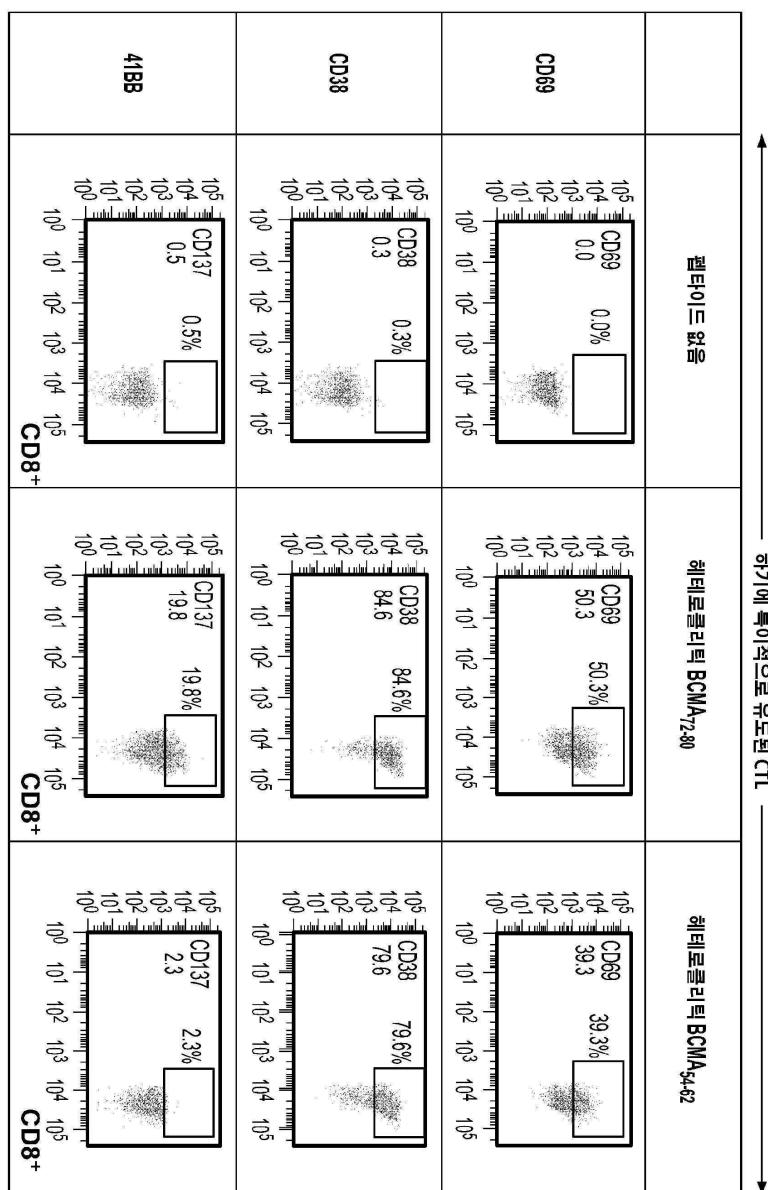
MM13



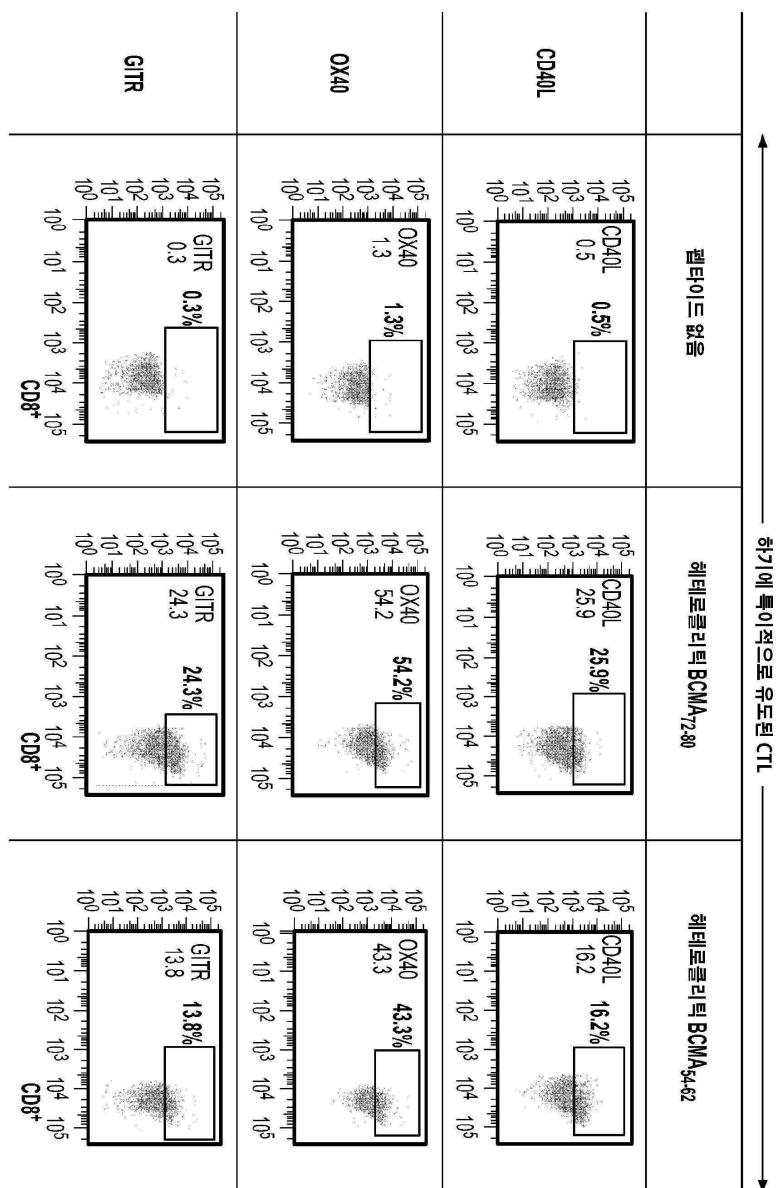
도면17



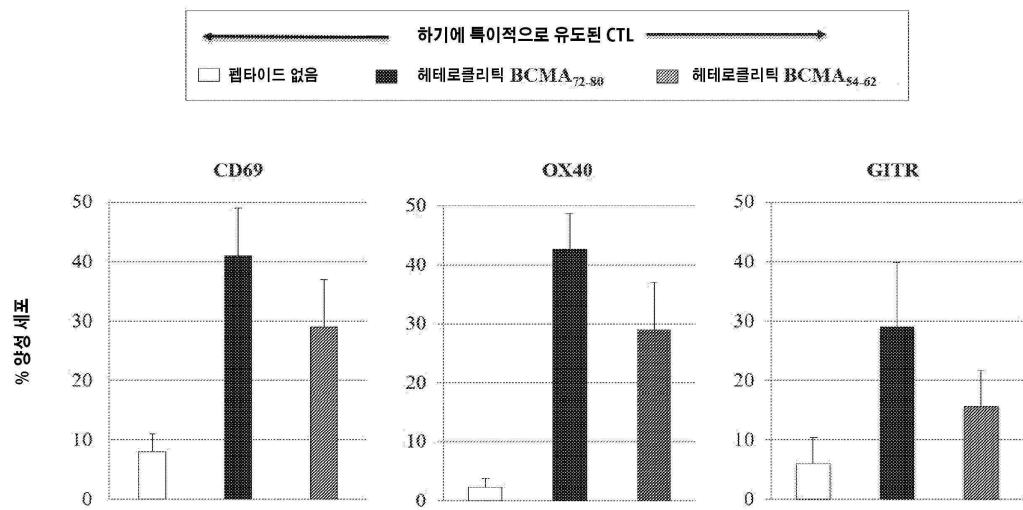
도면 18a



도면 18b



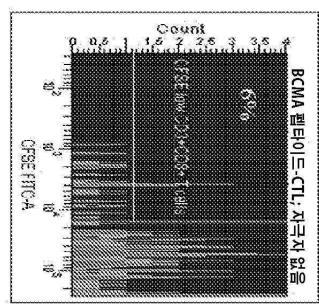
도면 18c



도면 19ae

중앙 세포와 공동 배양된(5일) 헤티로글리тик BCMA_{γ2.80} 렐타이드 특이적 CTL

없음

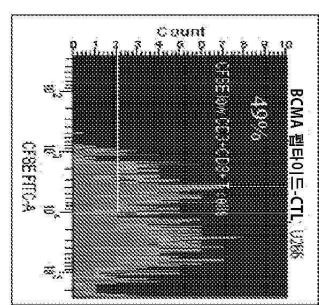


U266

MM1S

MDA-MB231

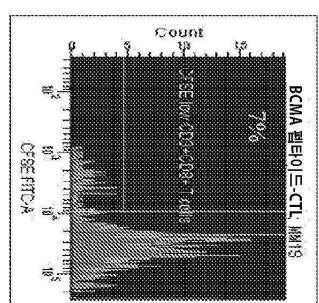
없음



MM1S

MDA-MB231

없음



MDA-MB231

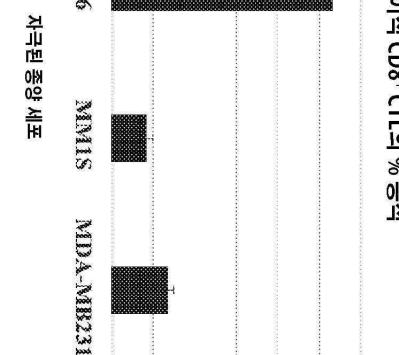
도 19A

도 19B

도 19C

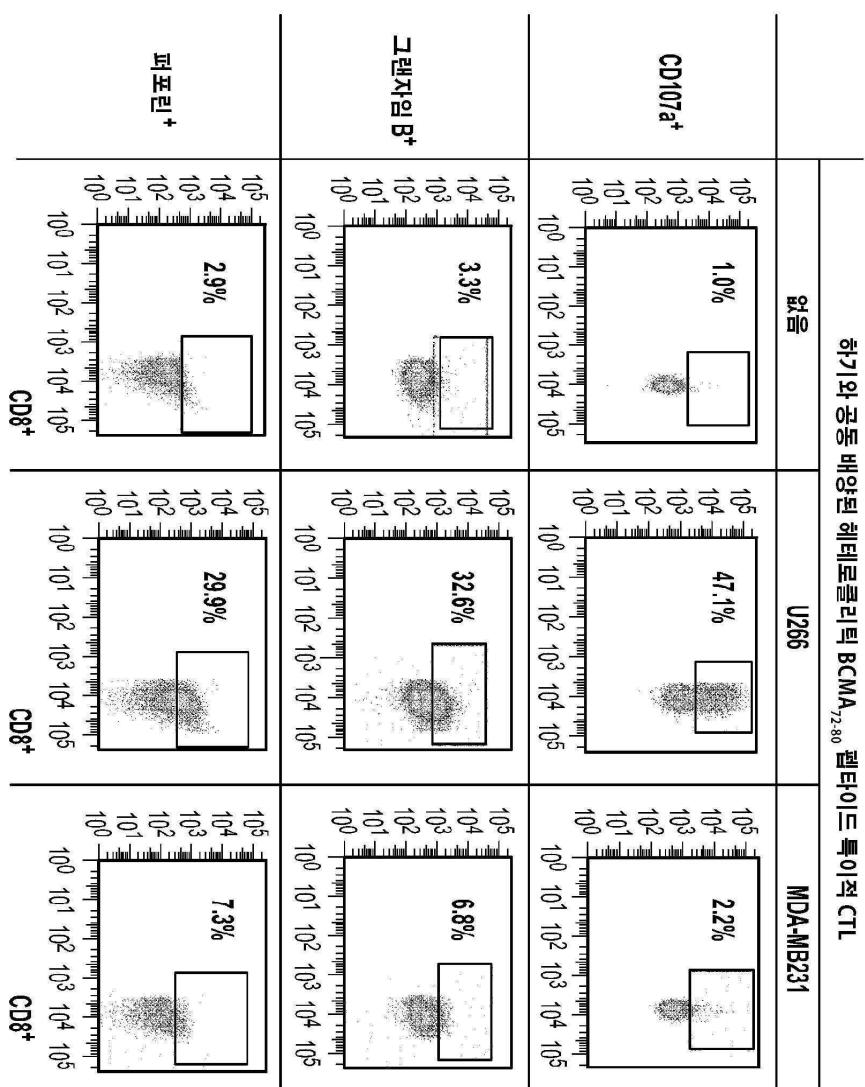
도 19D

BCMA 특이적 CD8⁺ CTL의 % 증식

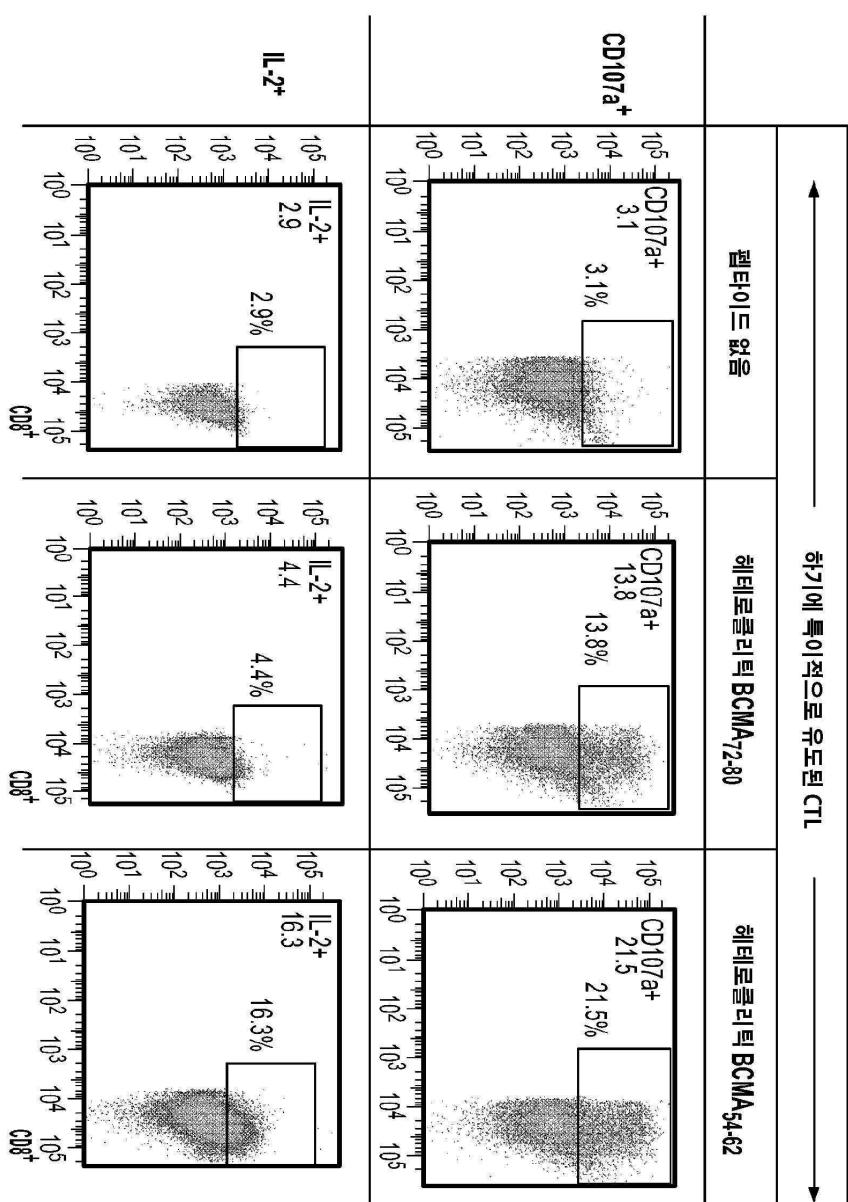


도면 19ae

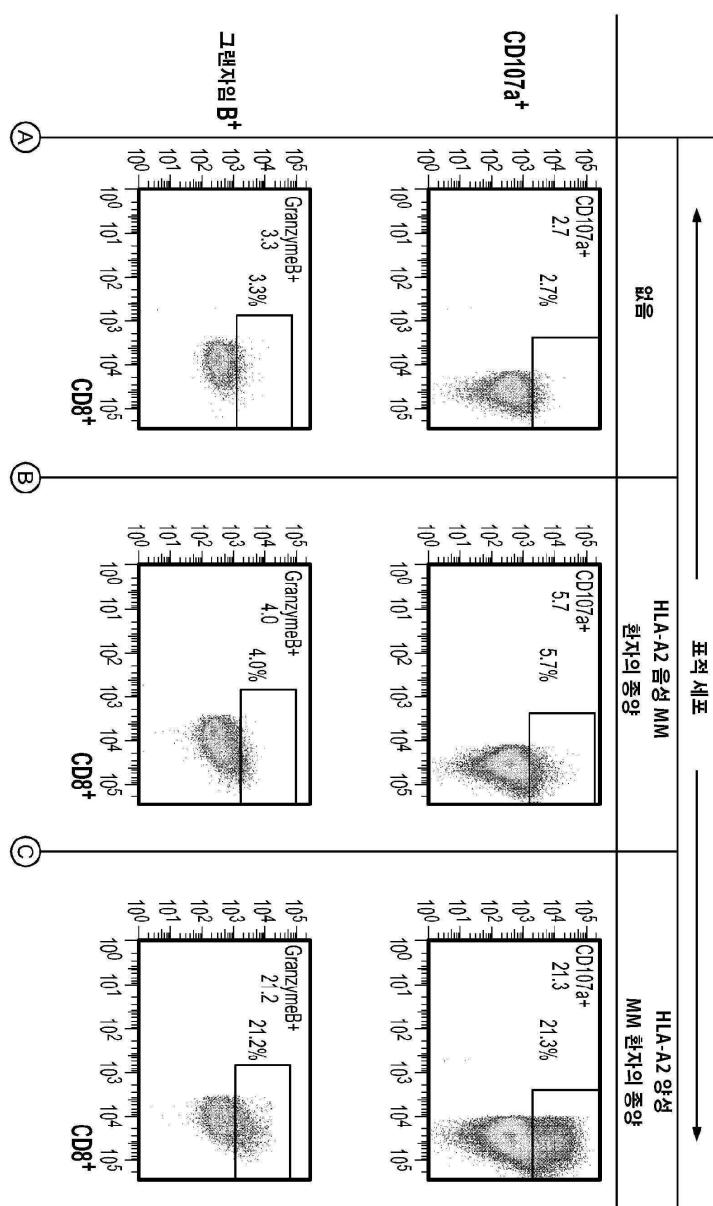
도면 19f



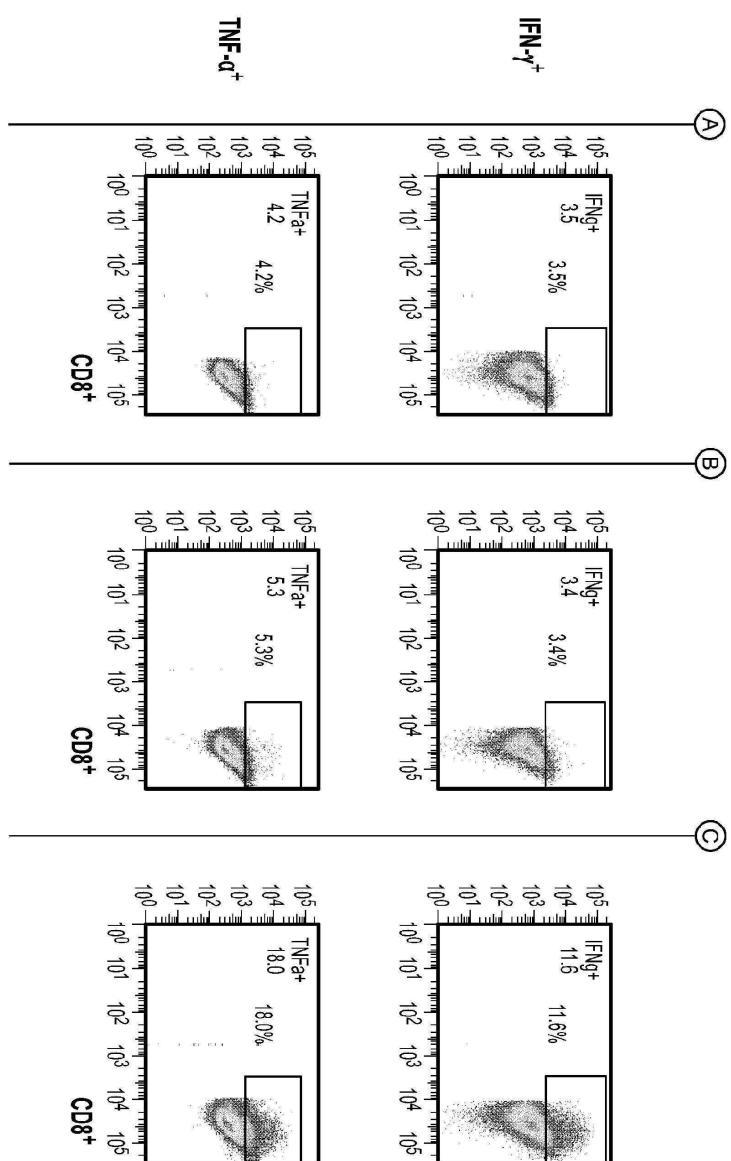
도면20a

표제: HLA-A2⁺ MM 환자의 골수 세포

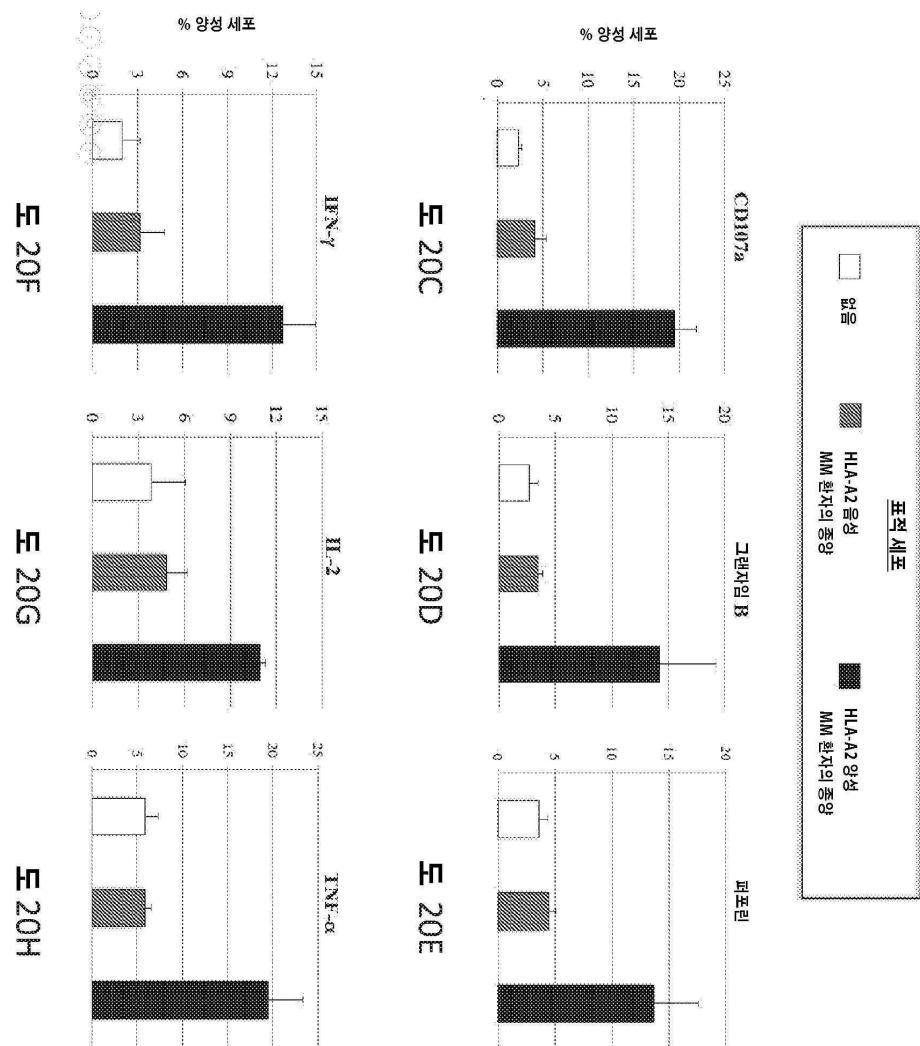
도면20ba



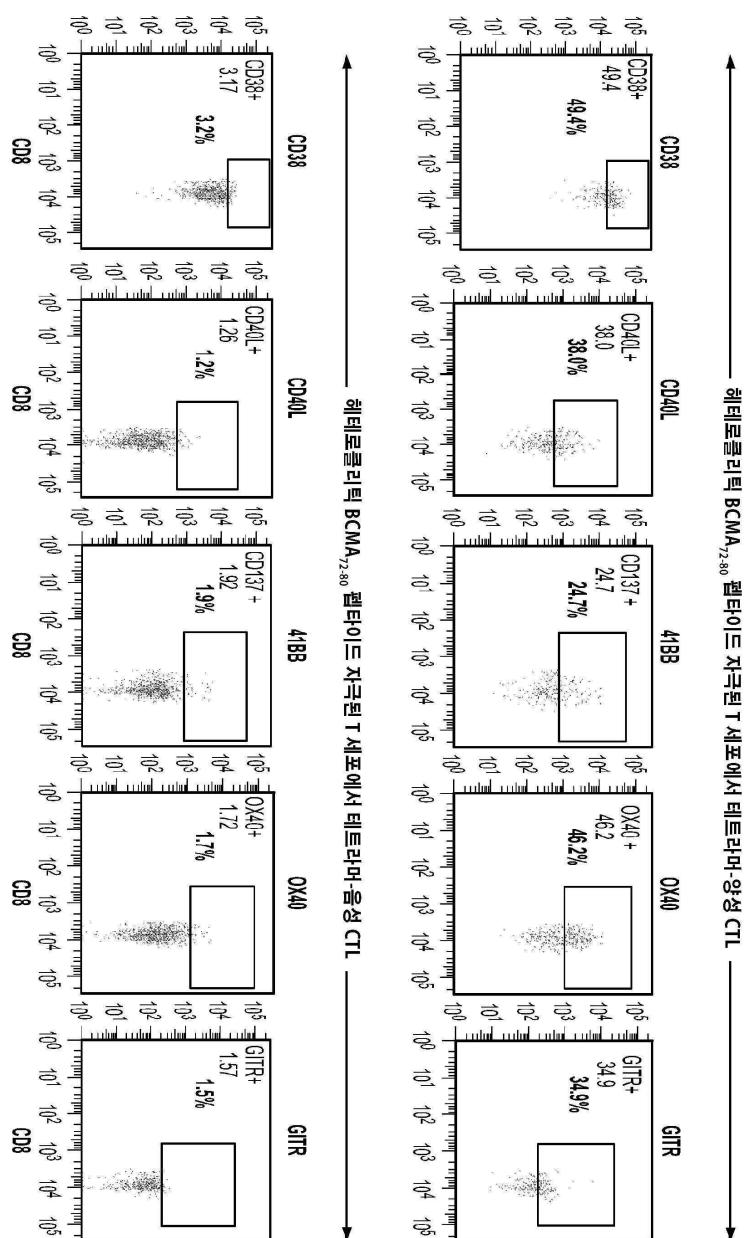
도면20bb



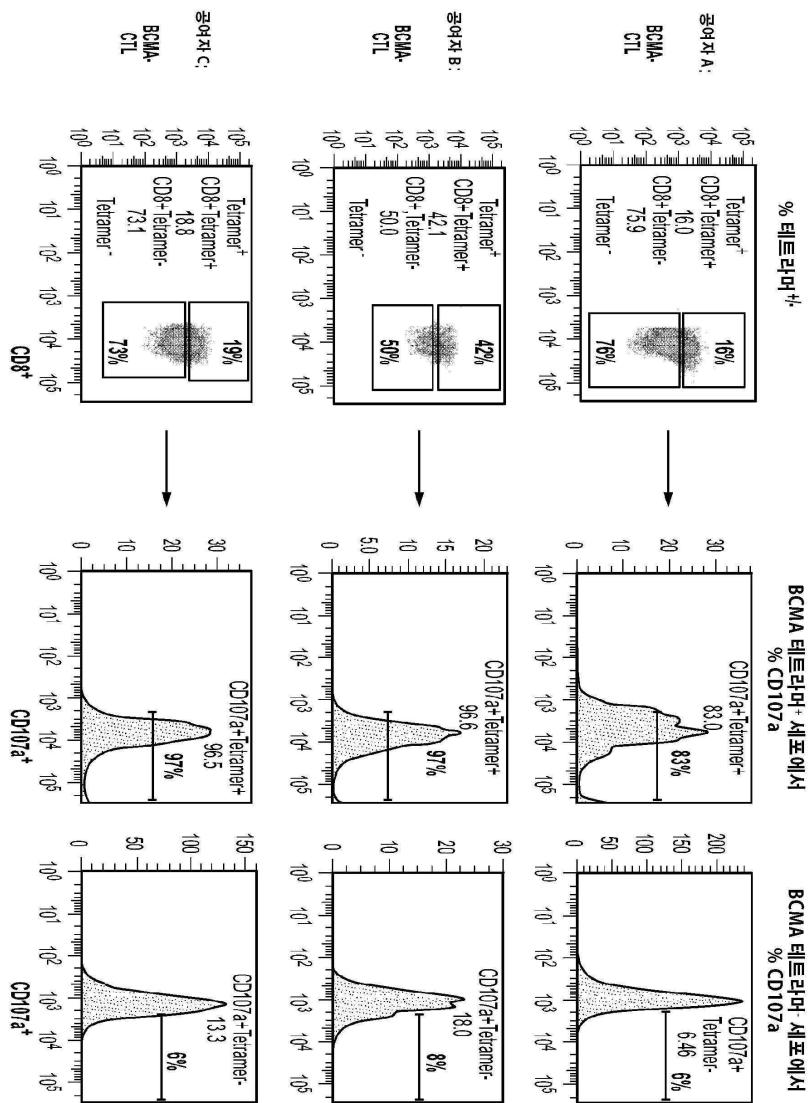
도면20ch



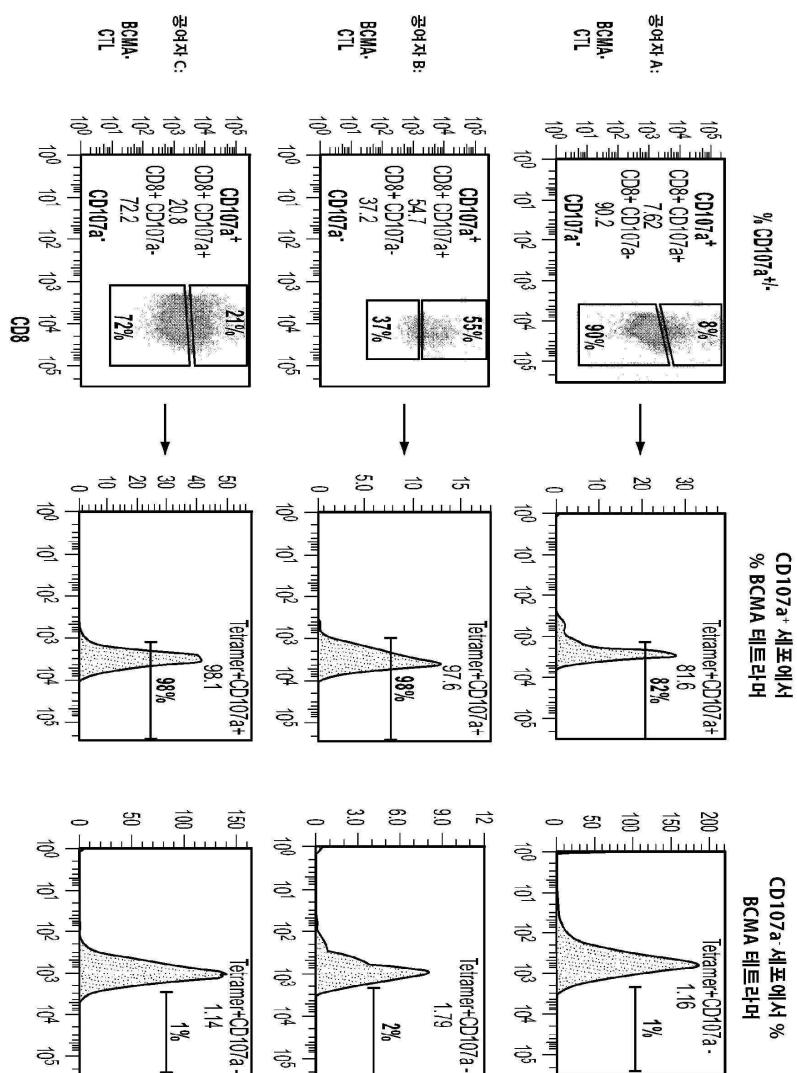
도면21a



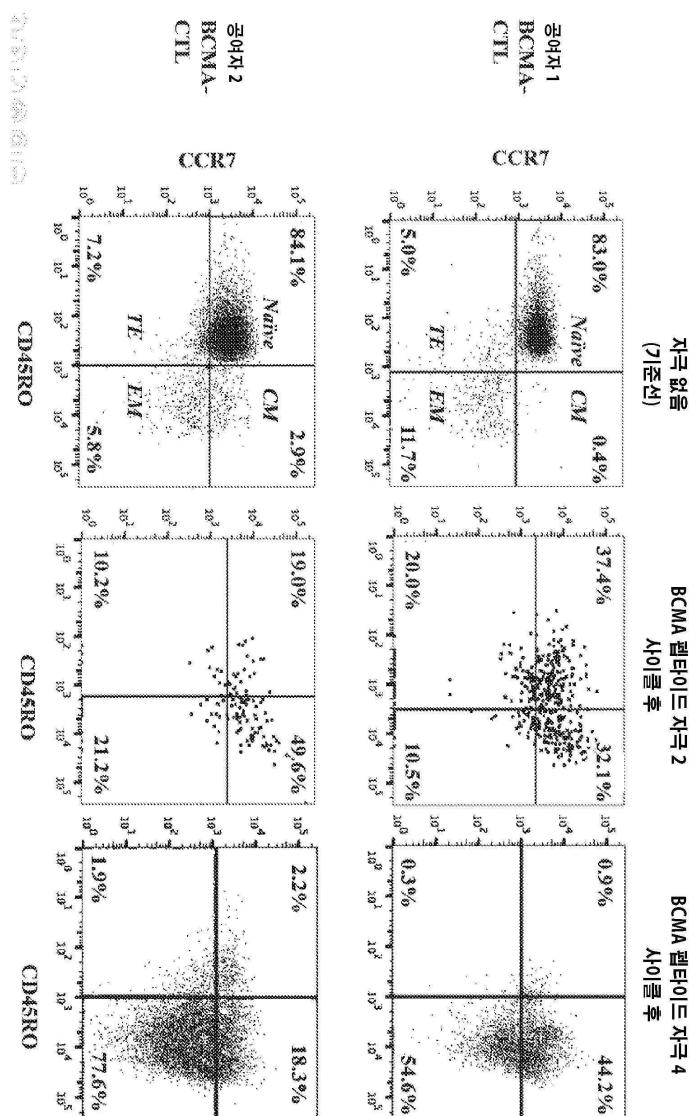
도면21b



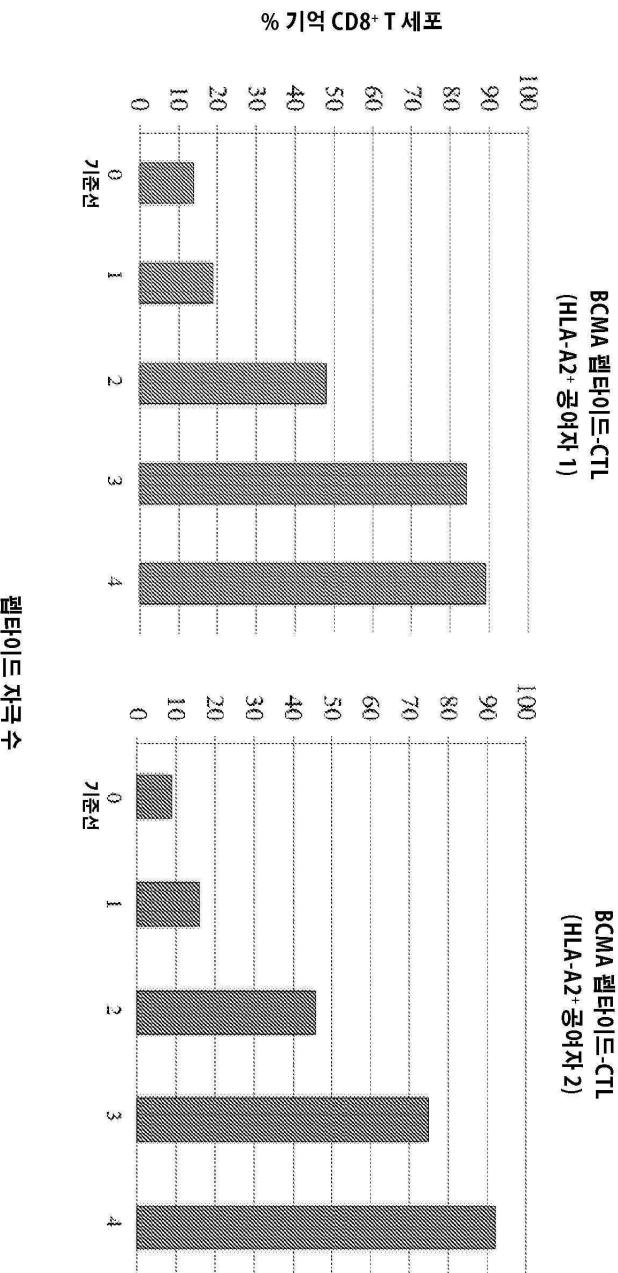
도면21c



도면22a



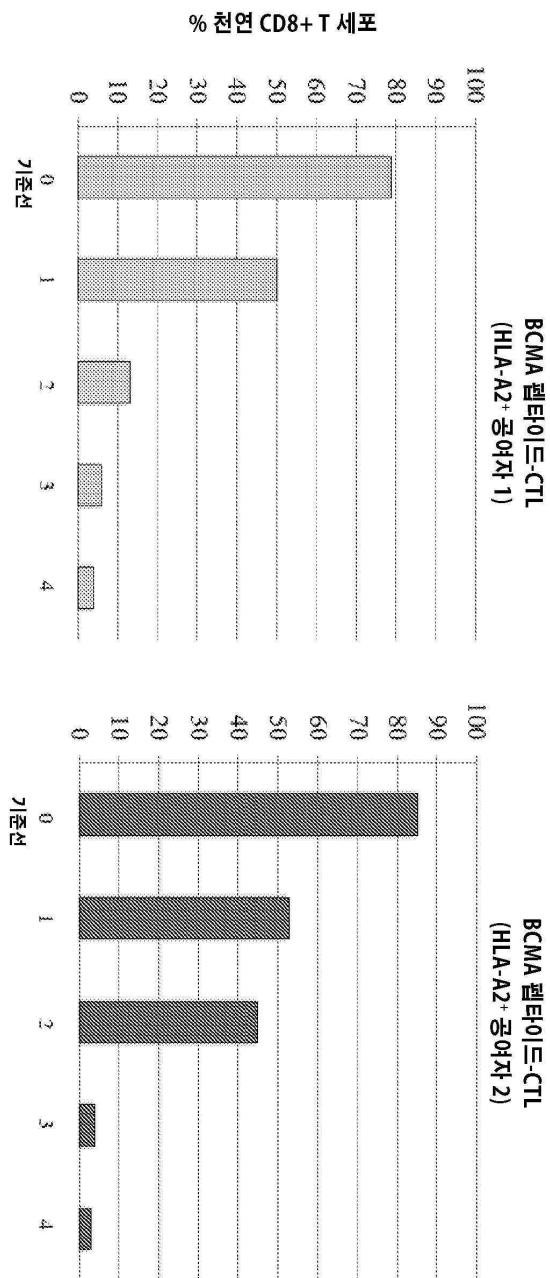
도면22bc



도 22B

도 22C

도면22de

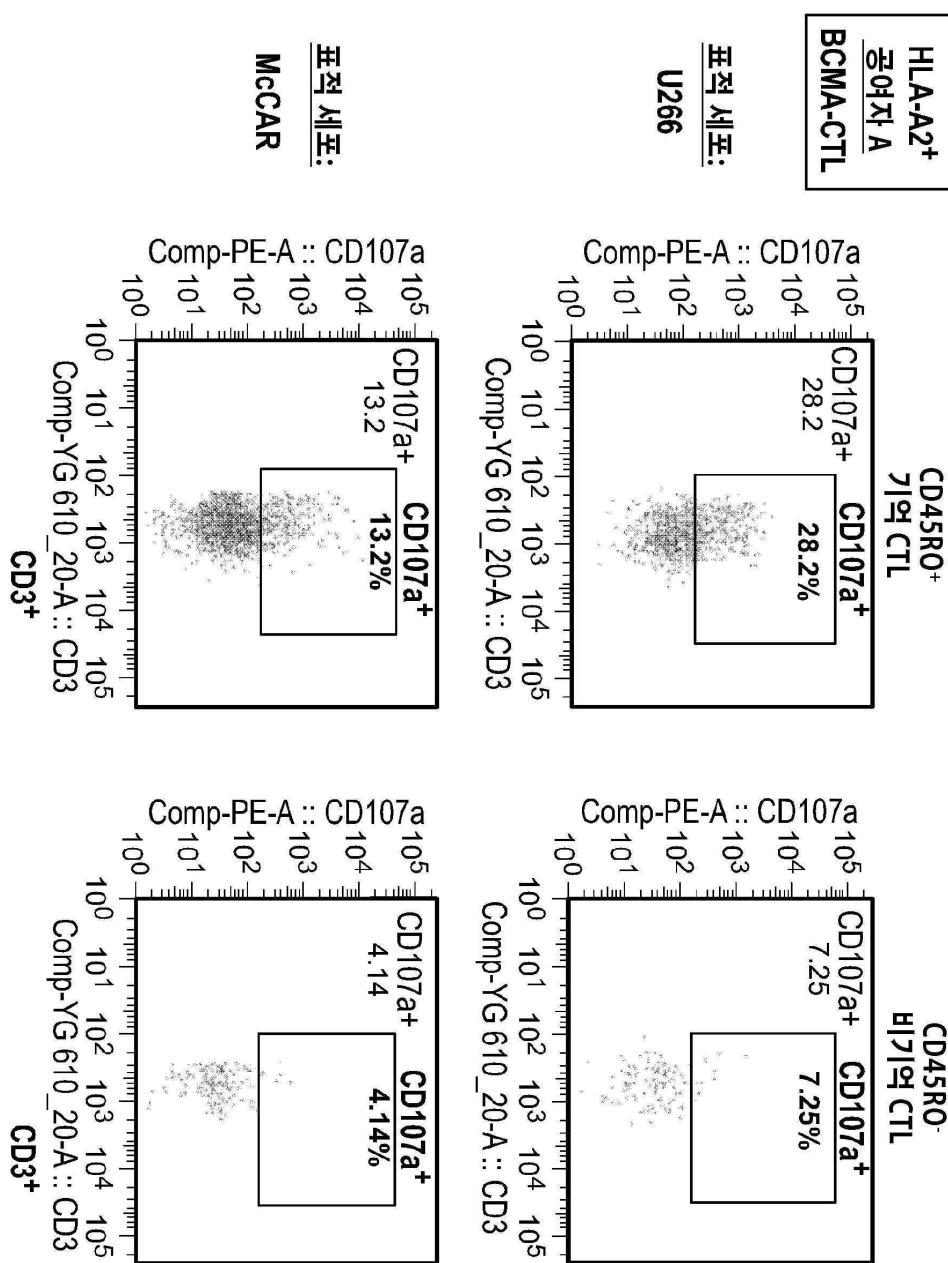


도 22D

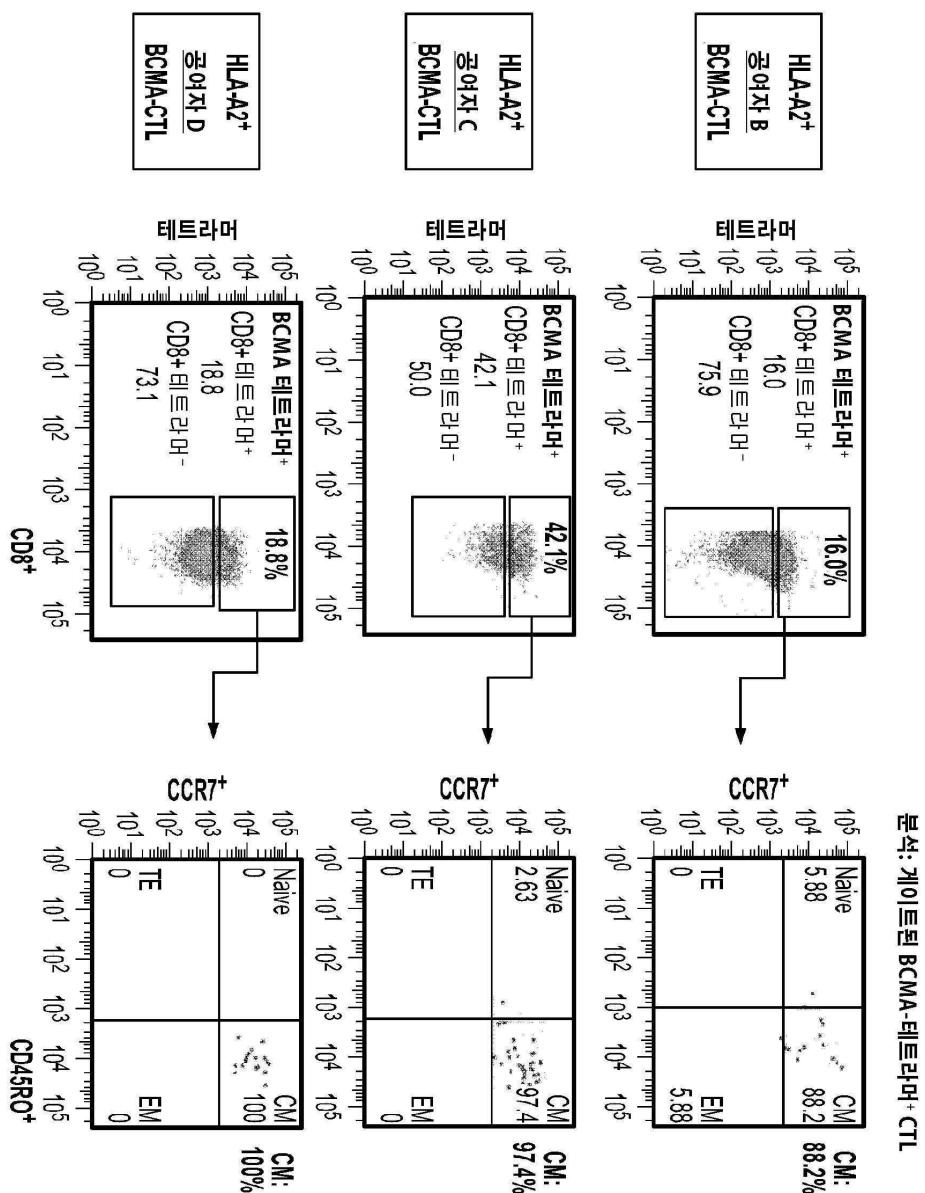
펫타이드 자극 수

도 22E

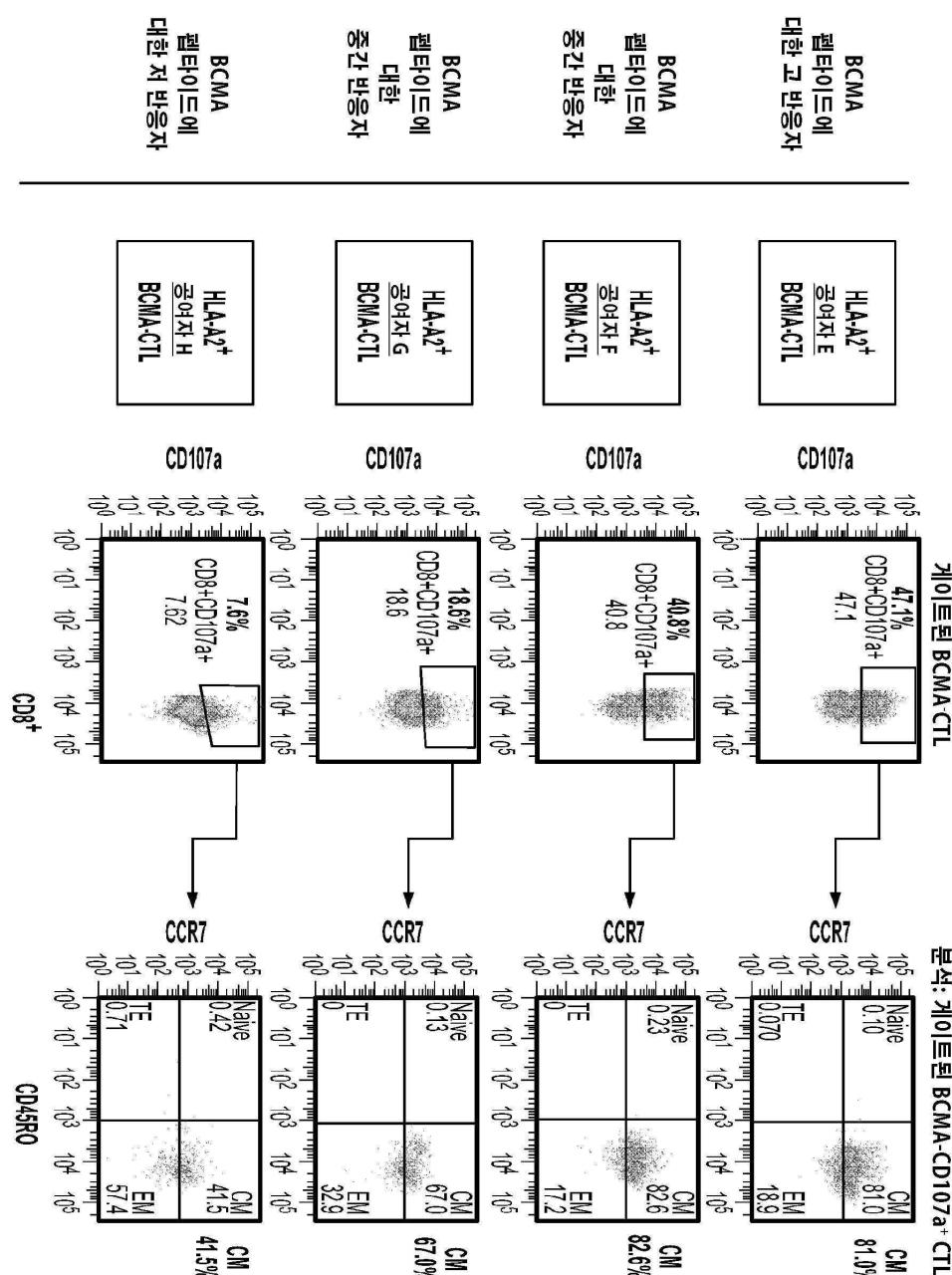
도면23a



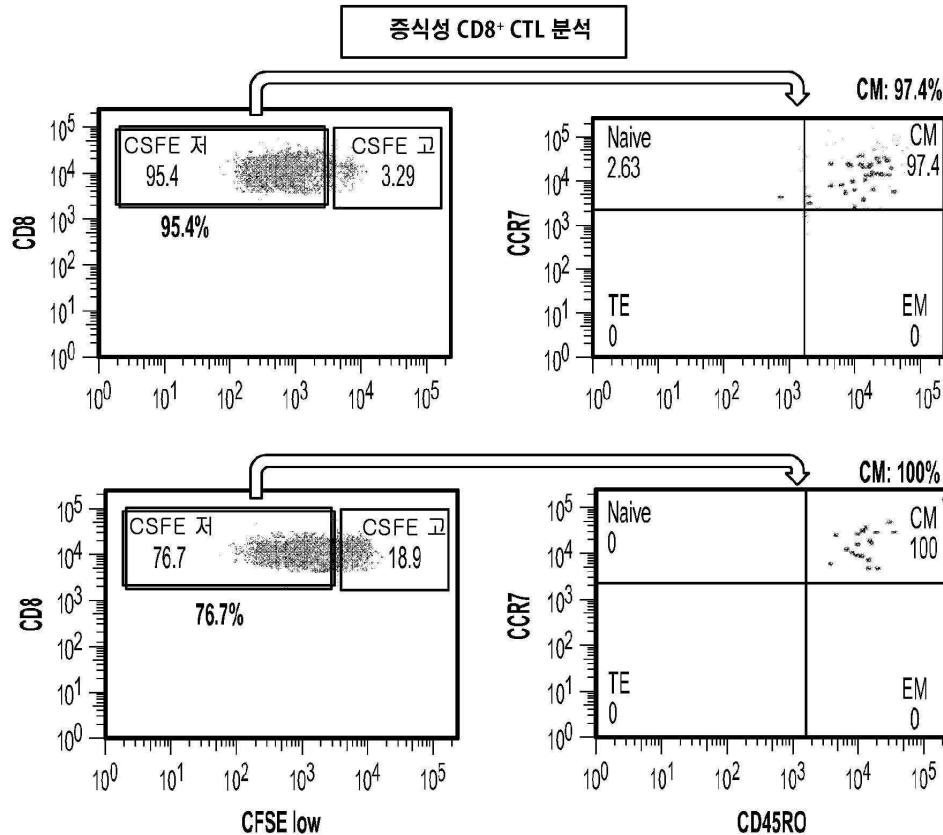
도면 23b



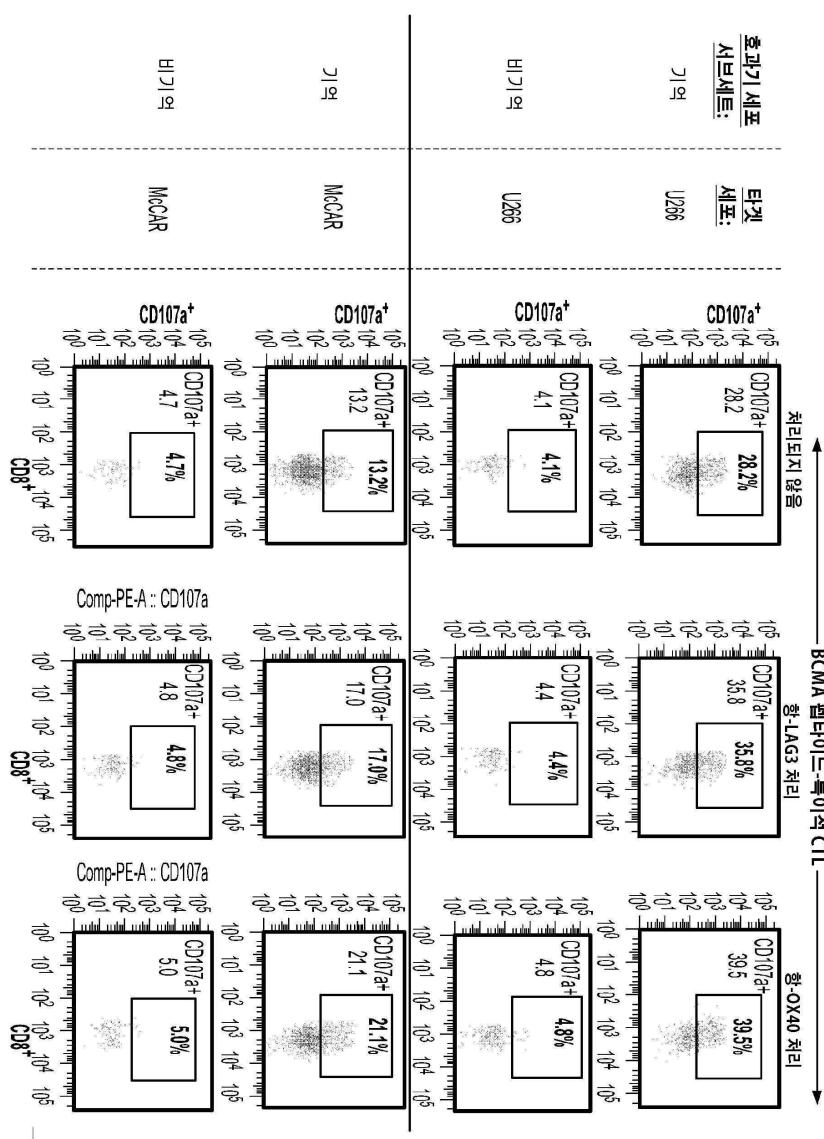
도면23c



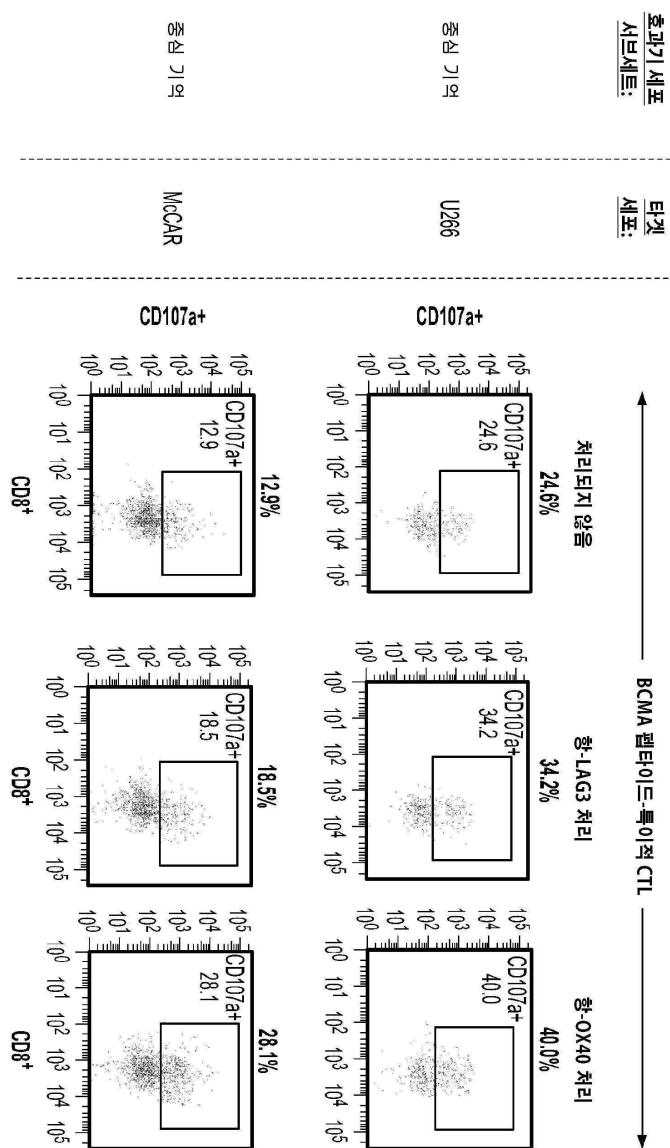
도면24a

U266 세포와 공동 배양된(7일) BCMA 펩타이드-특이적 CTL

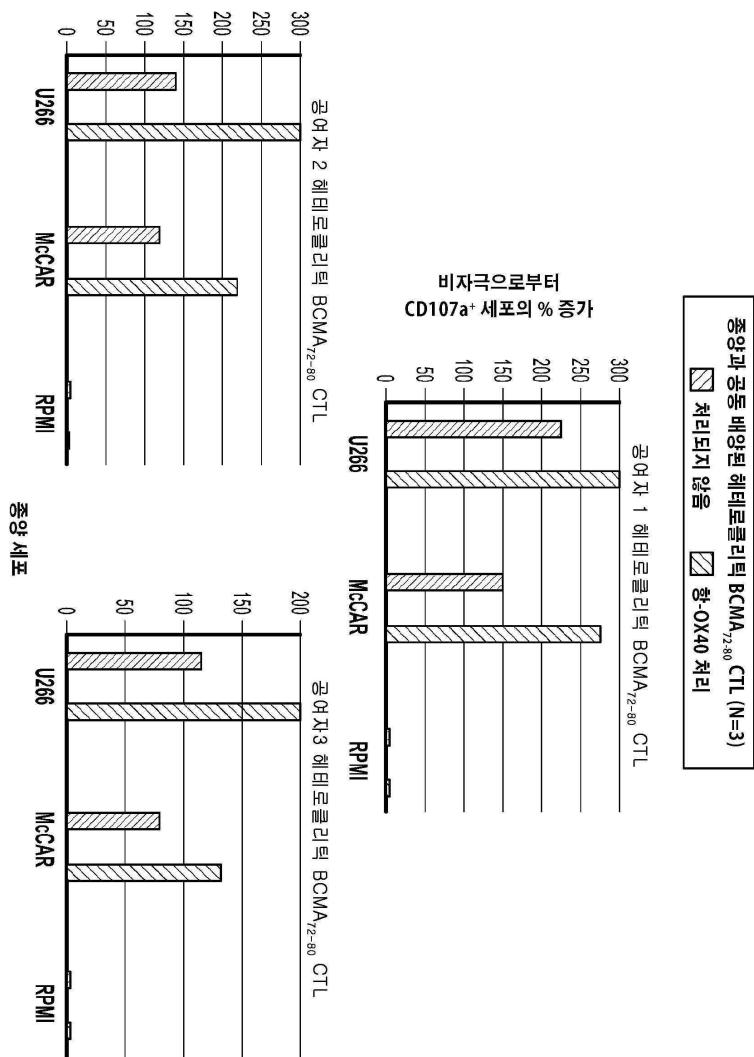
도면24b



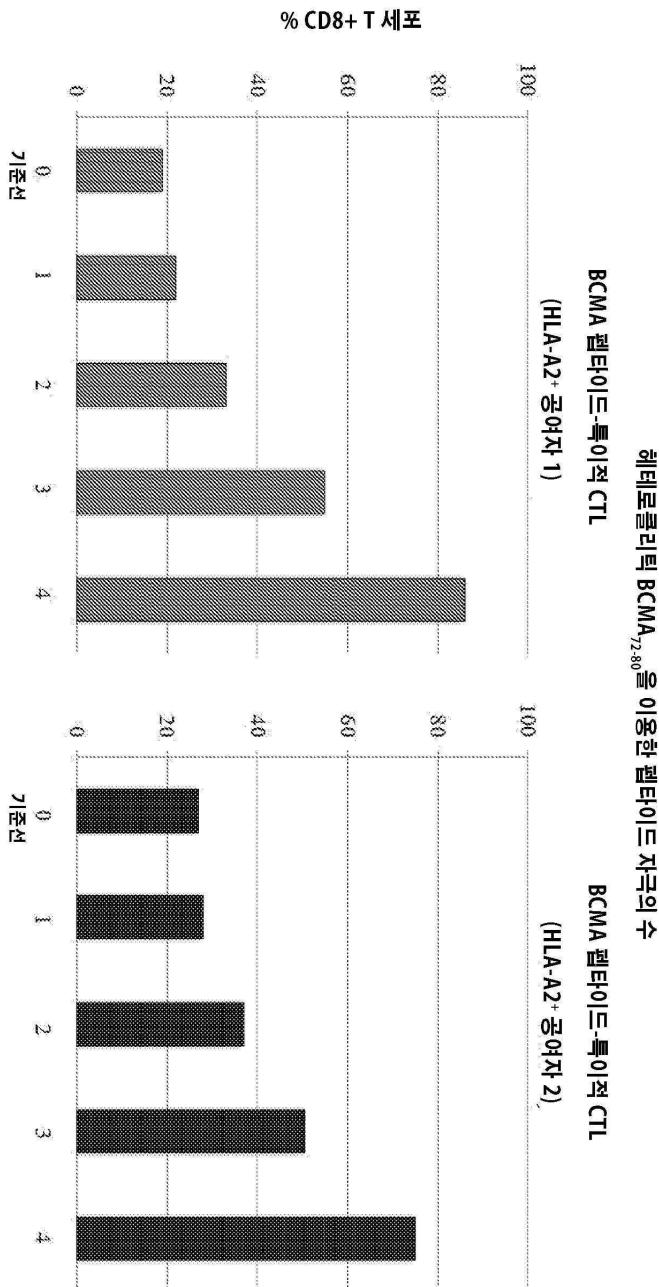
도면24c



도면24d



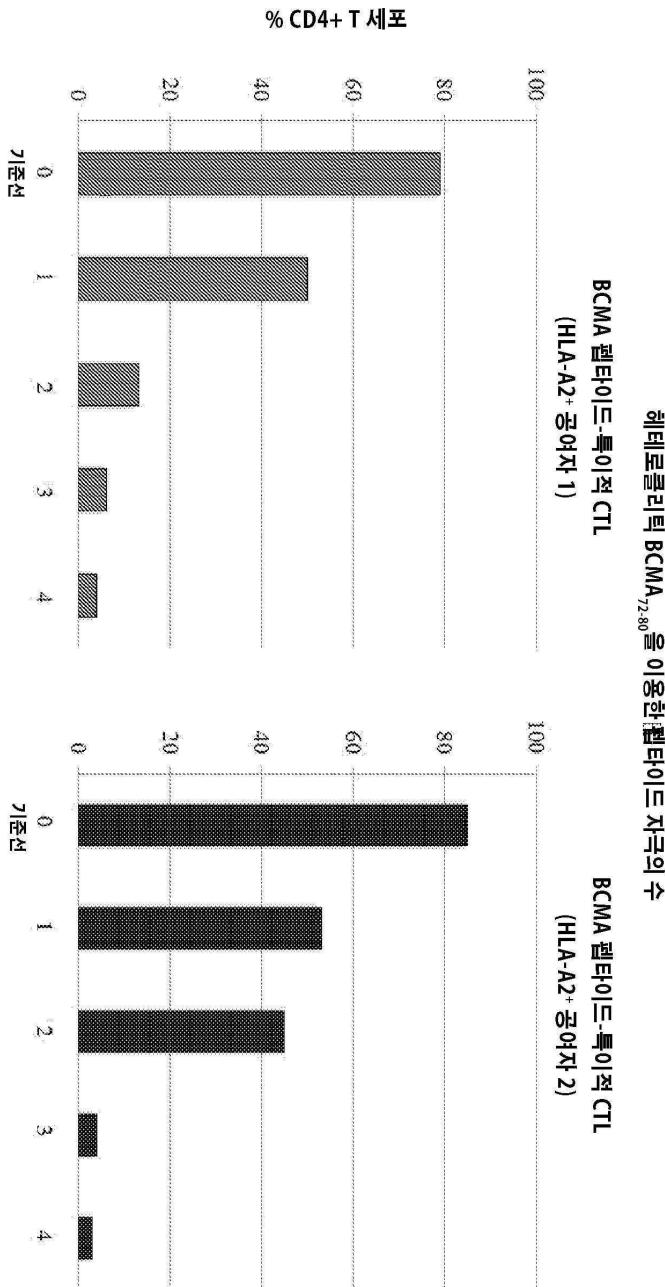
도면25



도 25A

도 25B

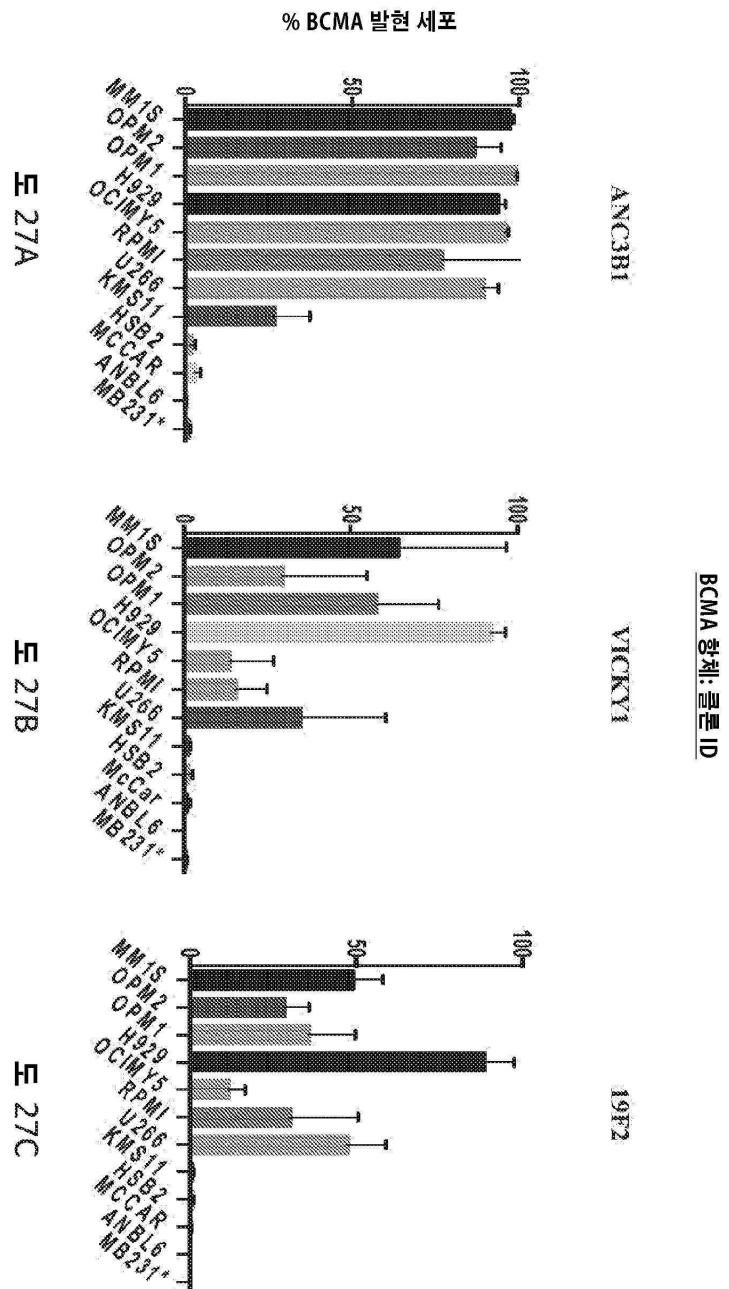
도면26



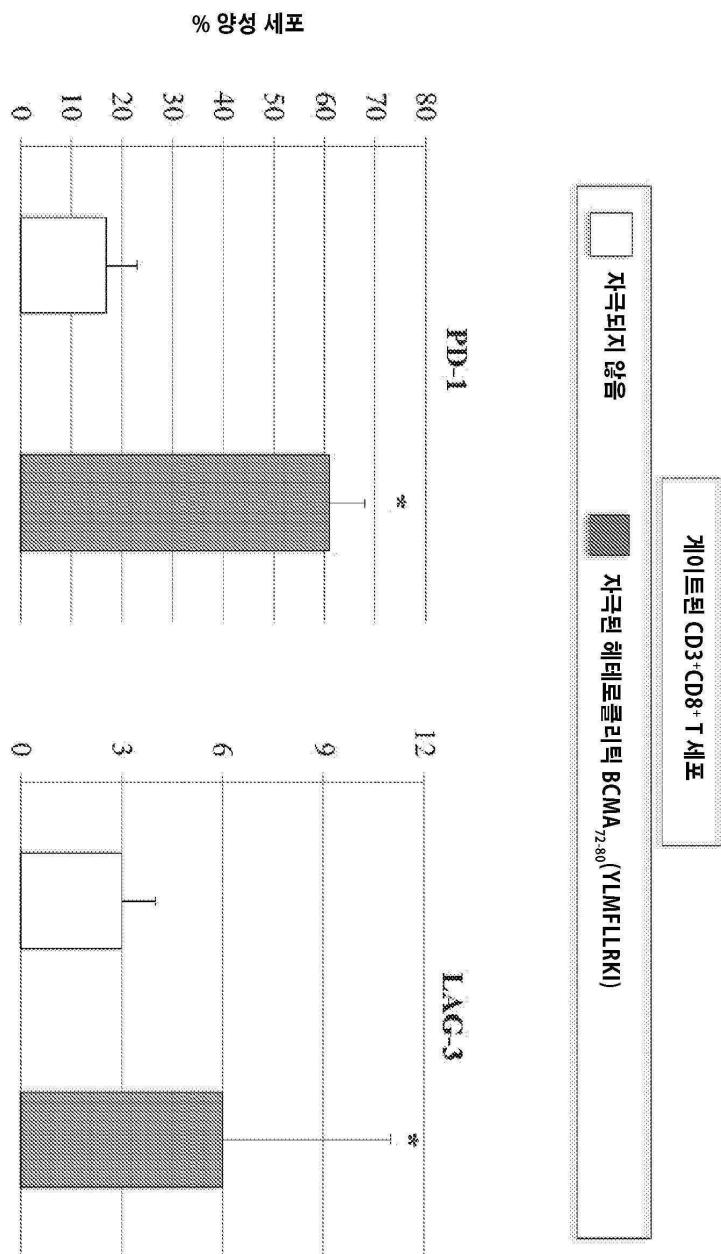
도 26A

도 26B

도면27



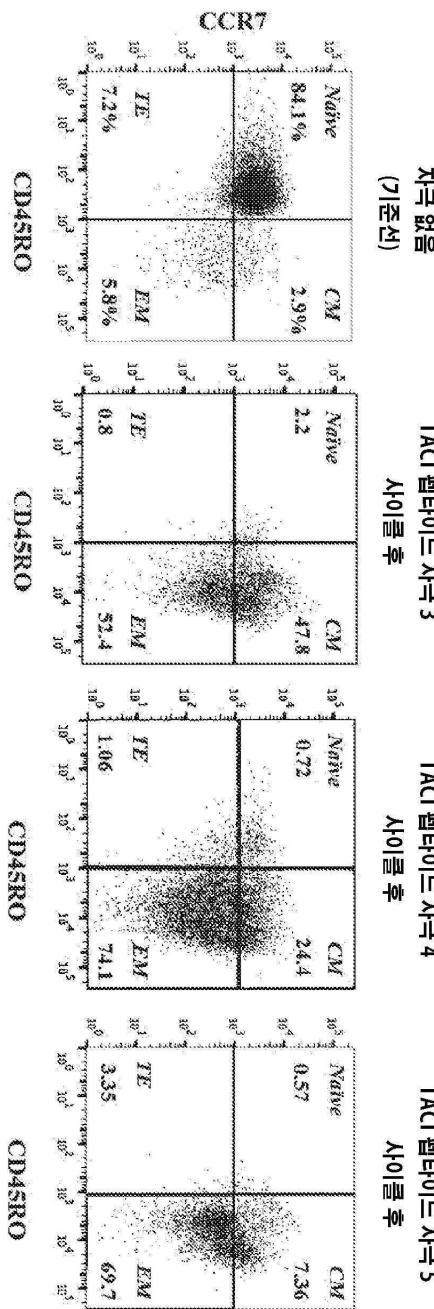
도면28



도면28A

도면28B

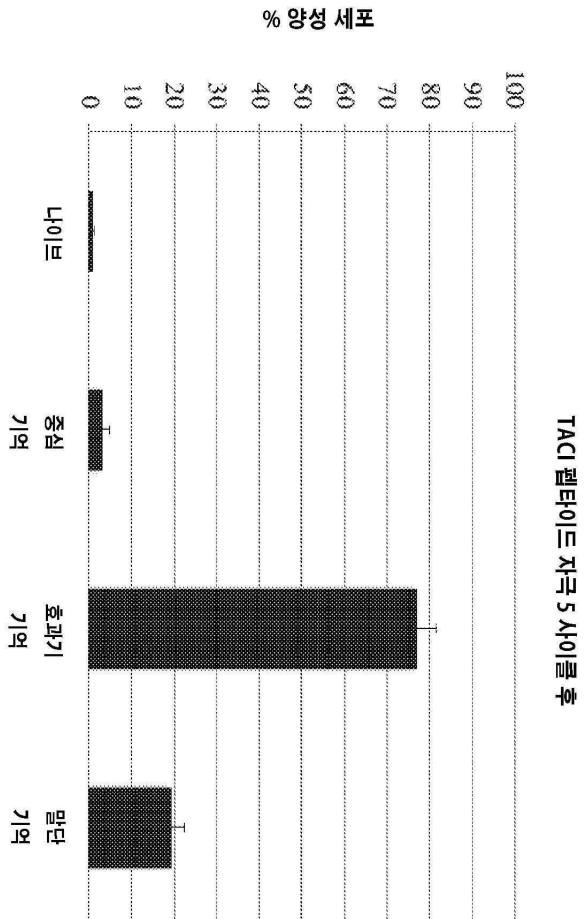
도면29a



해테로클리트 TACI¹⁵⁴⁻¹⁶² 펩타이드로 자극시나 이브 세포의 기억 CTL로의 분화

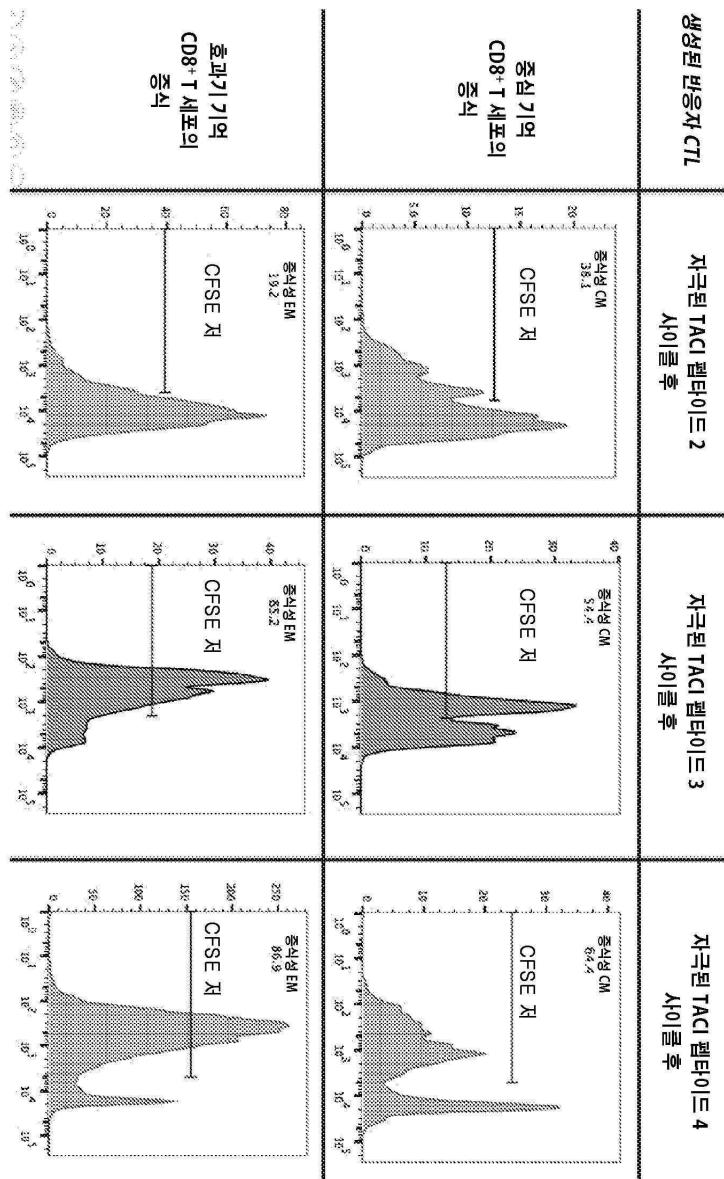
도면29b

유도된 나이브:기억 C8+ CTL의 서브세트

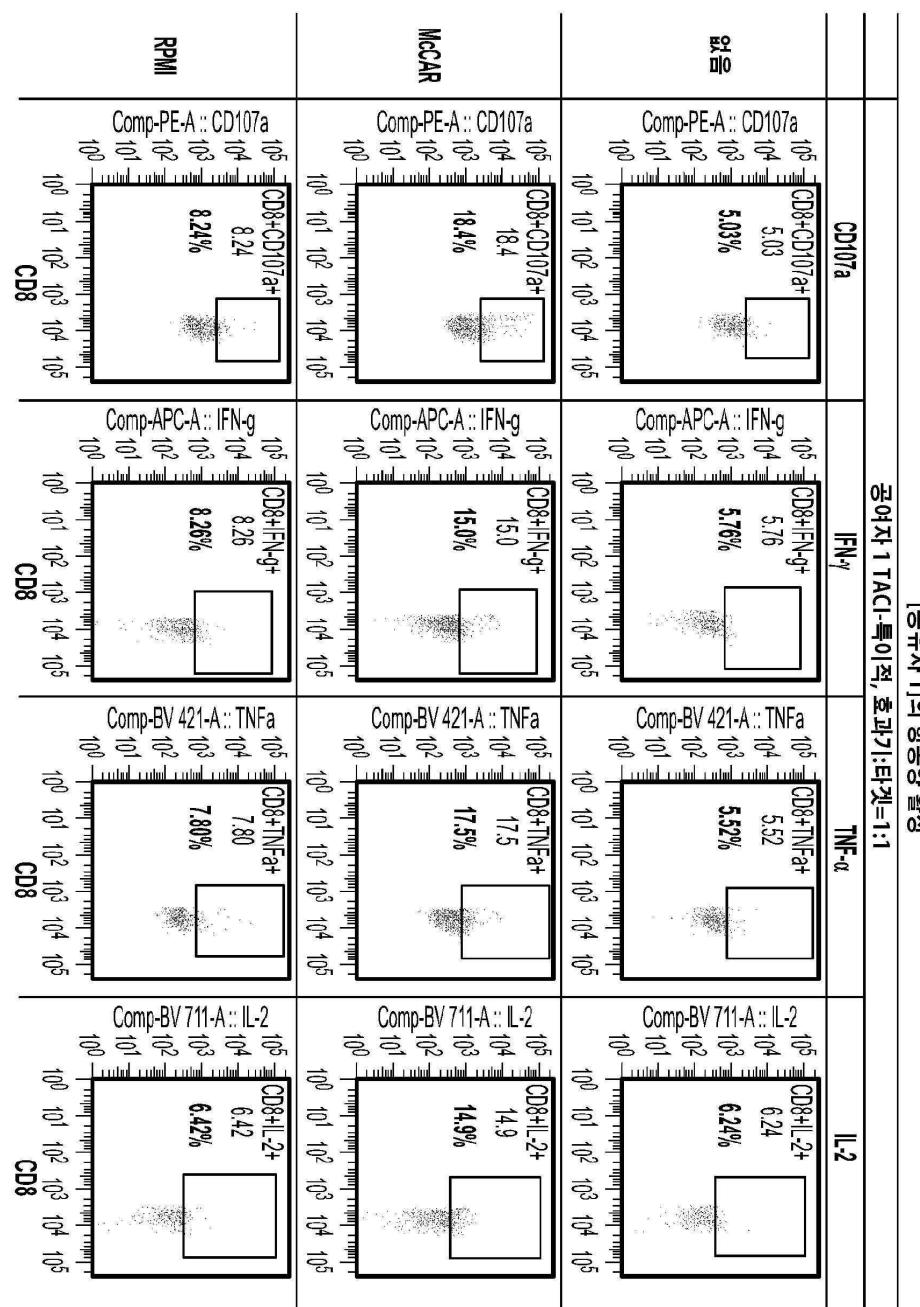


에테로클리틱 TACI₁₅₄₋₁₆₂ 특이적 기억 CTL의 유도

도면29c

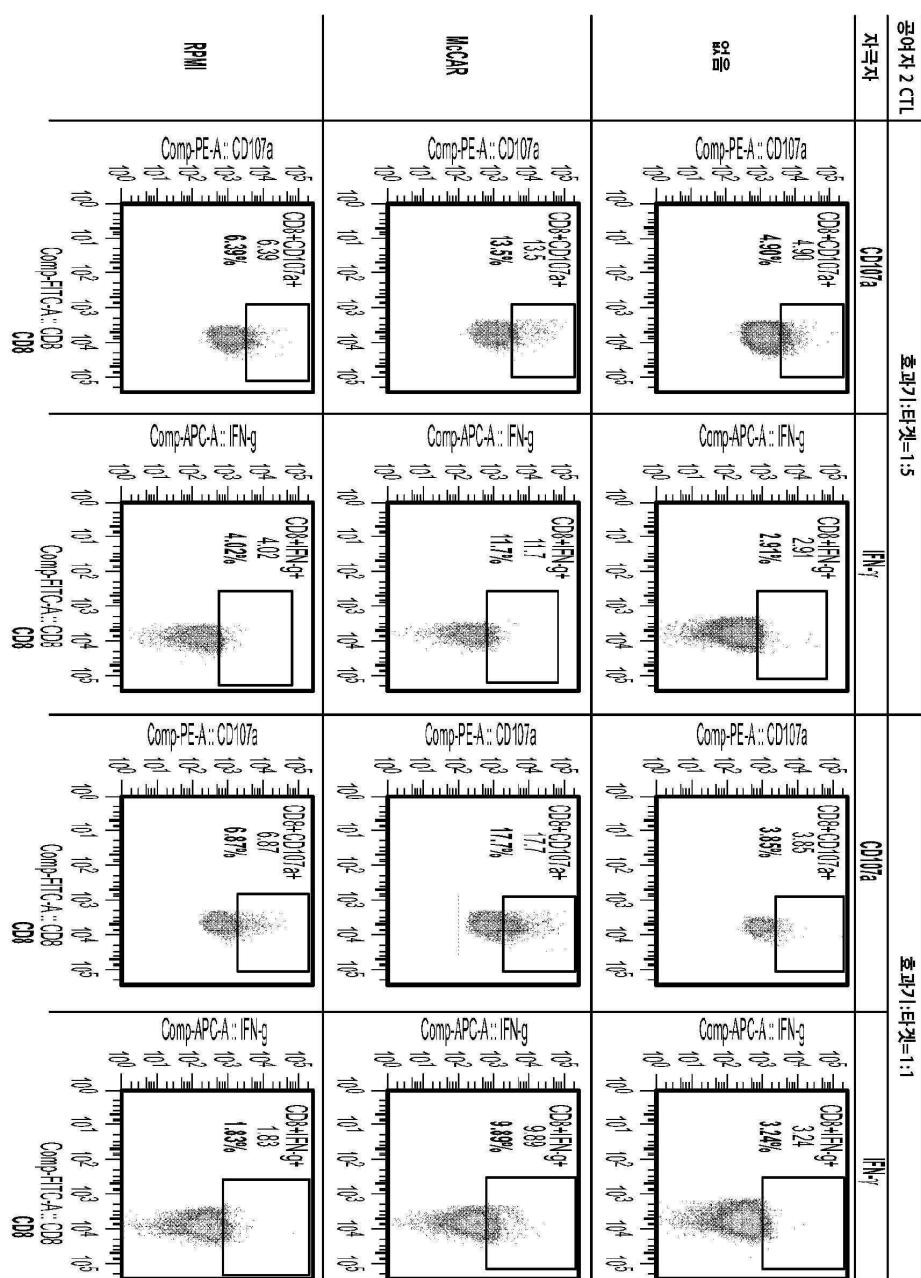


도면30a



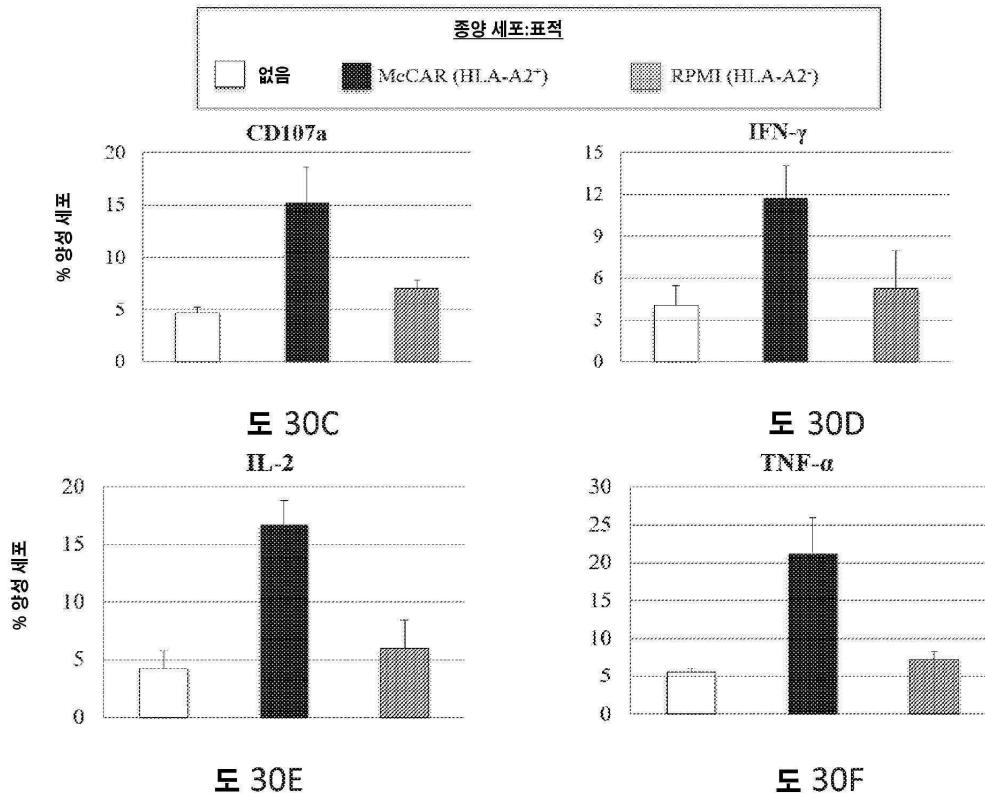
도면30b

HLA-A2⁺ 다발성 골수종 세포(MCCAR)에 대한 헤테로클리티컬 TACI₁₅₄₋₁₆₂ 특이적 CTL [공유자 2]의 항종양 활성

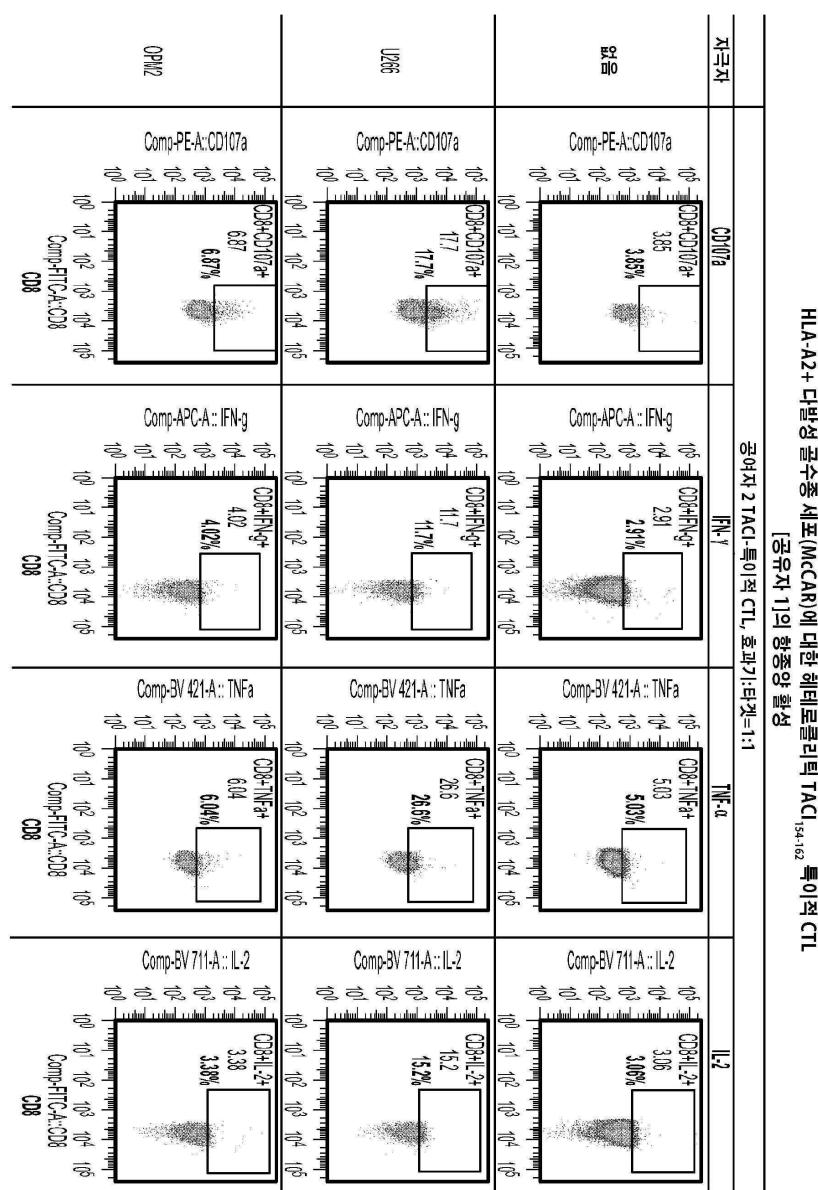


도면30cf

**HLA-A2+ 다발성 골수종 세포(McCAR)에 대한 헤테로클리티
TACI₁₅₄₋₁₆₂ 특이적 CTL [N=5]의 항종양 활성**

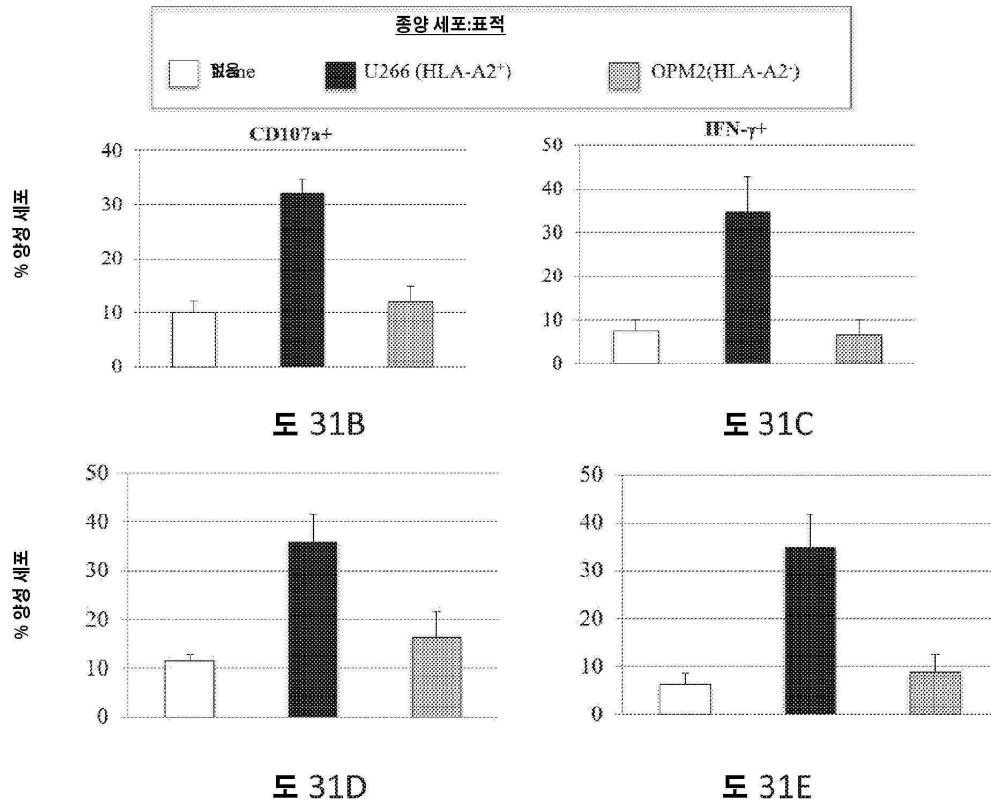


도면31a

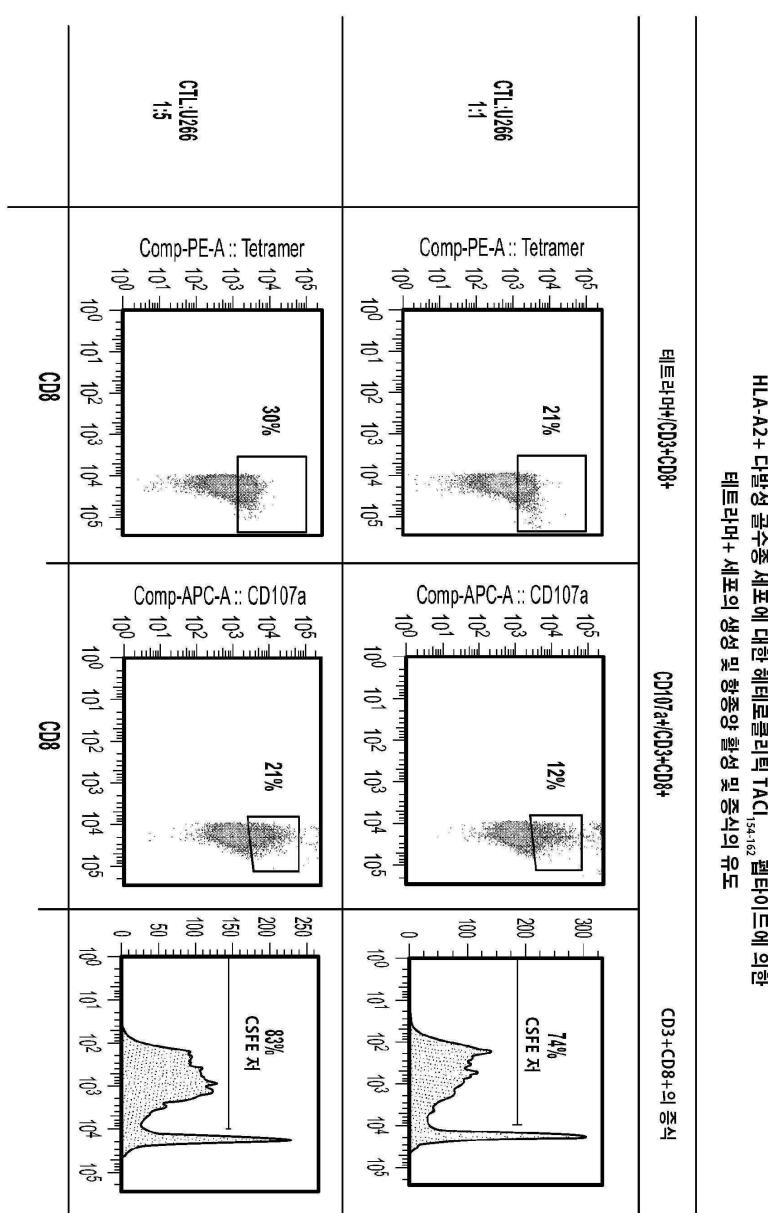


도면31be

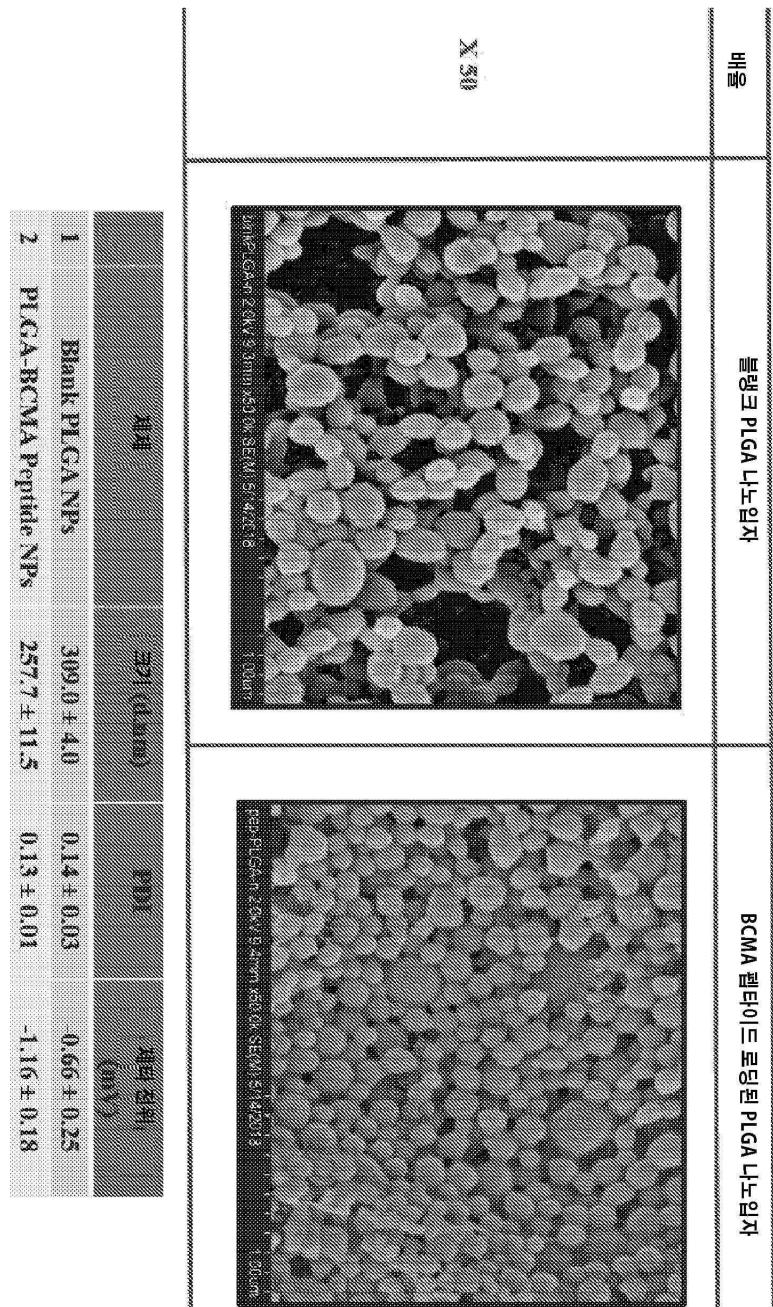
HLA-A2+ 다발성 골수종 세포(U266)에 대한 헤테로클리티 TACI₁₅₄₋₁₆₂ 특이적 CTL [N=5]의 항종양 활성



도면31f



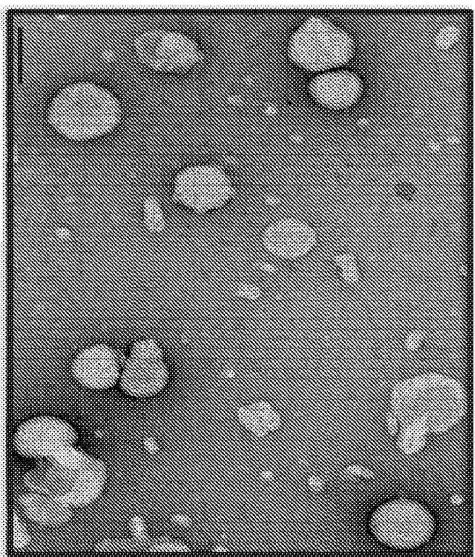
도면32a



도면32b

1	리포솜-펩타이드	172 ± 0.7	0.204 ± 0.005
	제조	크기 (nm)	PDI

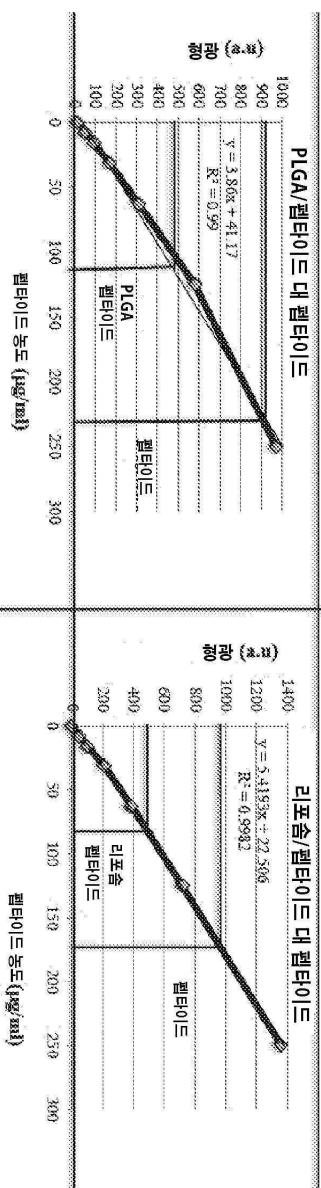
100 nm를 나타냄



BCMA 펩타이드 로딩된 리포솜 나노입자

도면32c

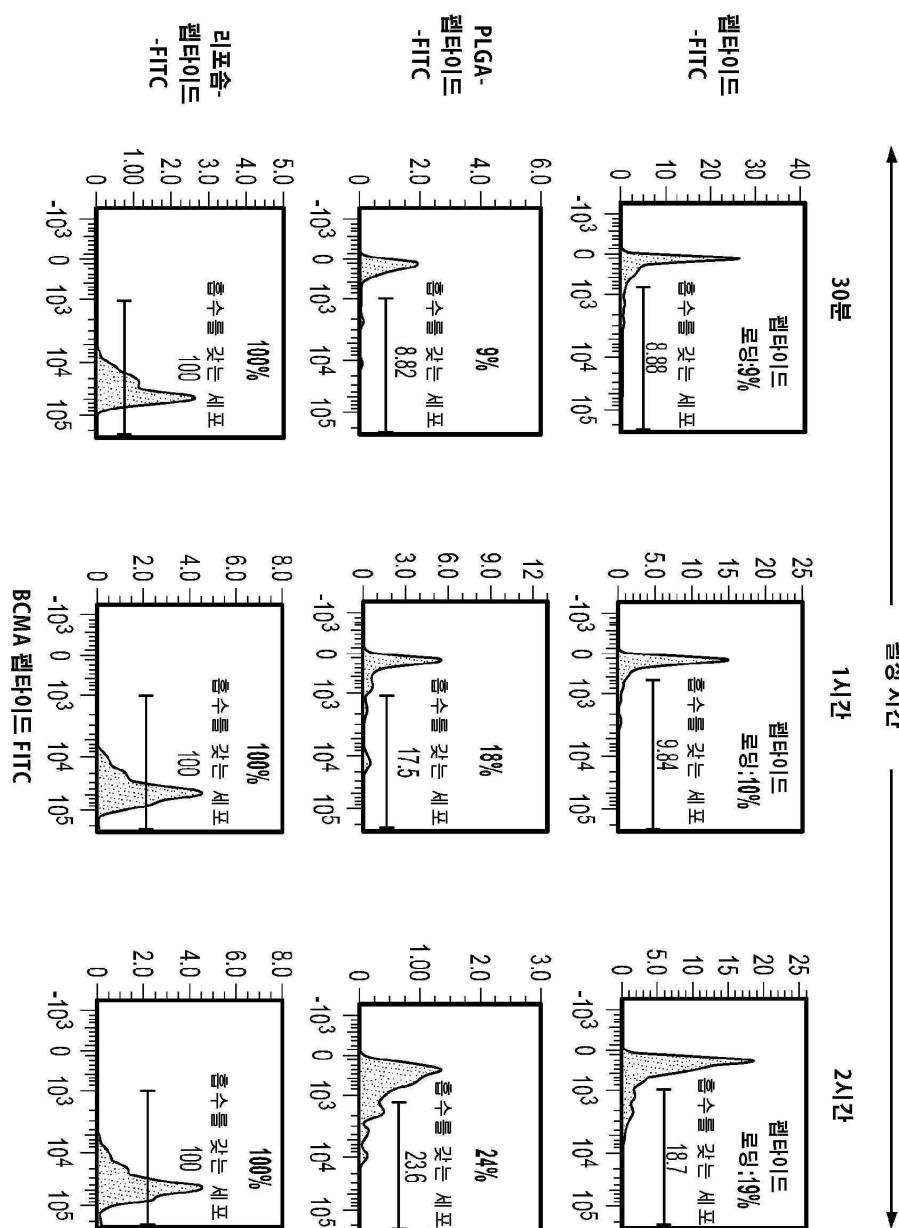
BCMA 펩타이드 정량화



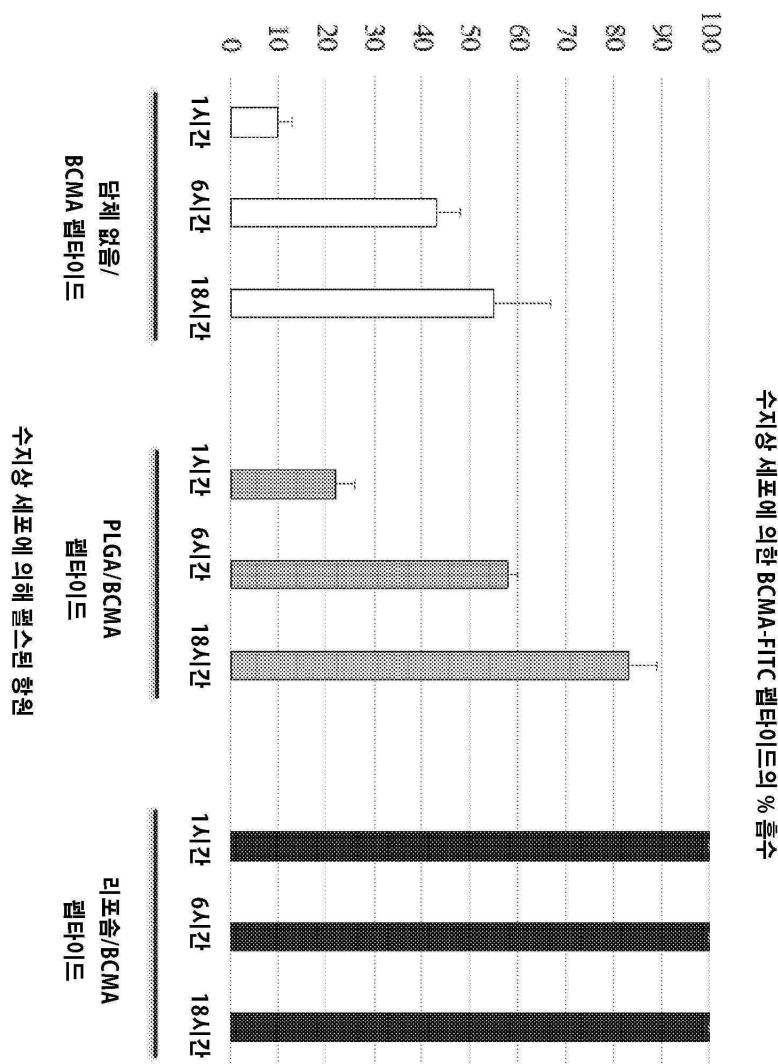
Final Conc. (μg/ml) (1:2 DF)		Final Conc. (μg/ml) (1:2 DD)	
펩타이드	914	926	펩타이드
PLGA-펩타이드	434	114	PLGA-펩타이드
풀补齐	8	0	풀补齐
PLGA			PLGA

51%
49%

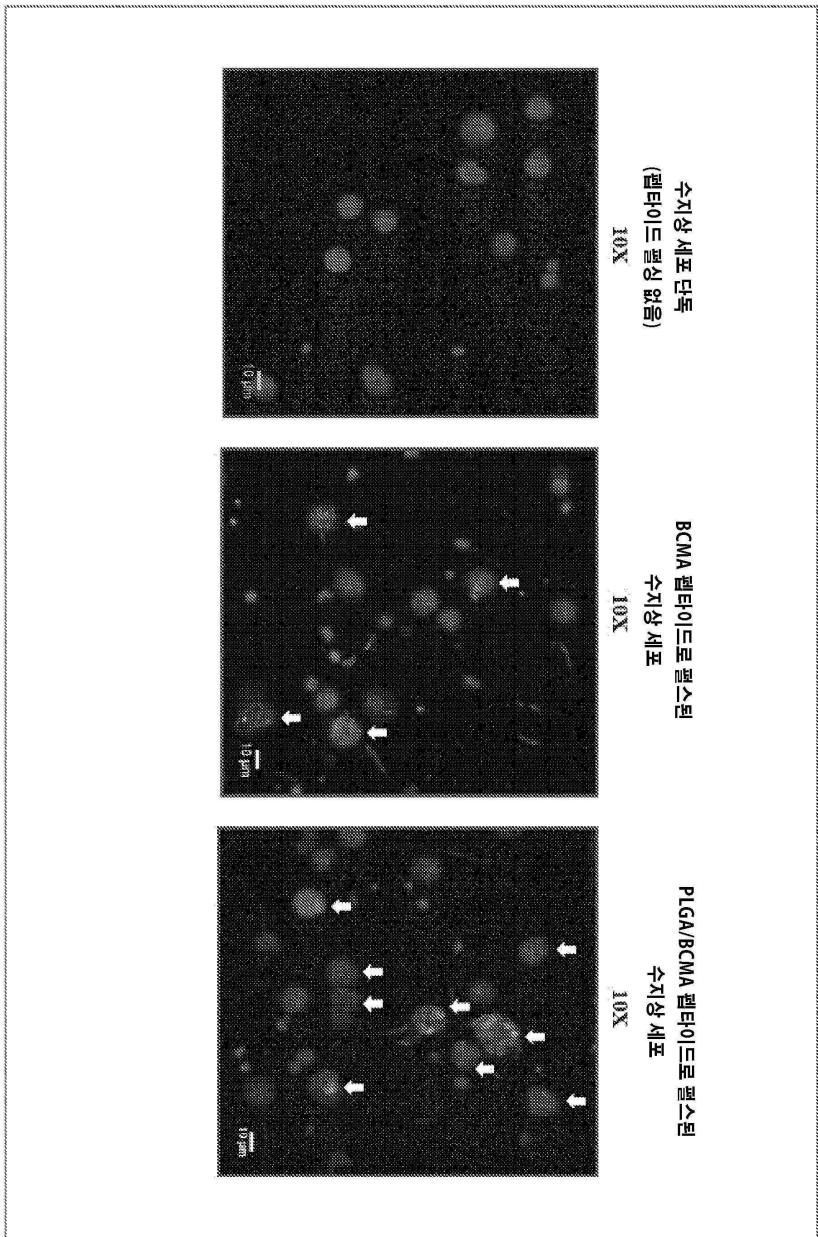
도면33a



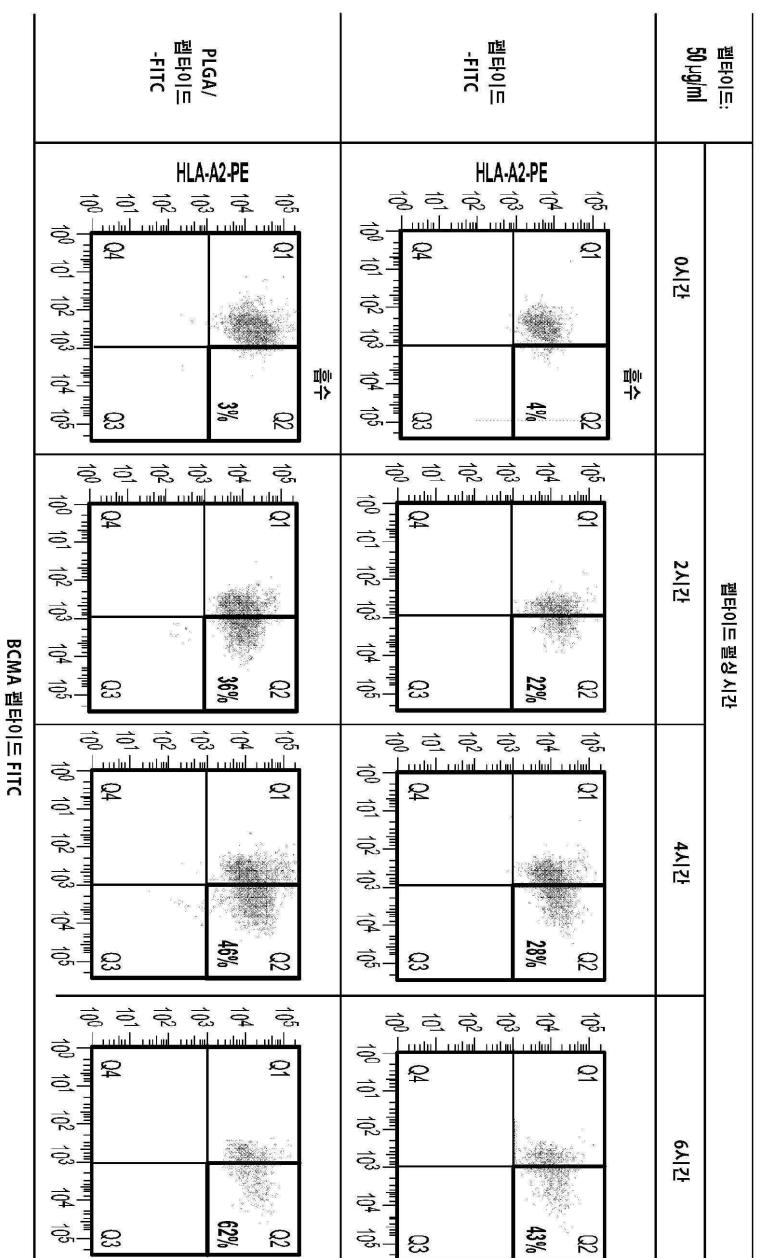
도면33b



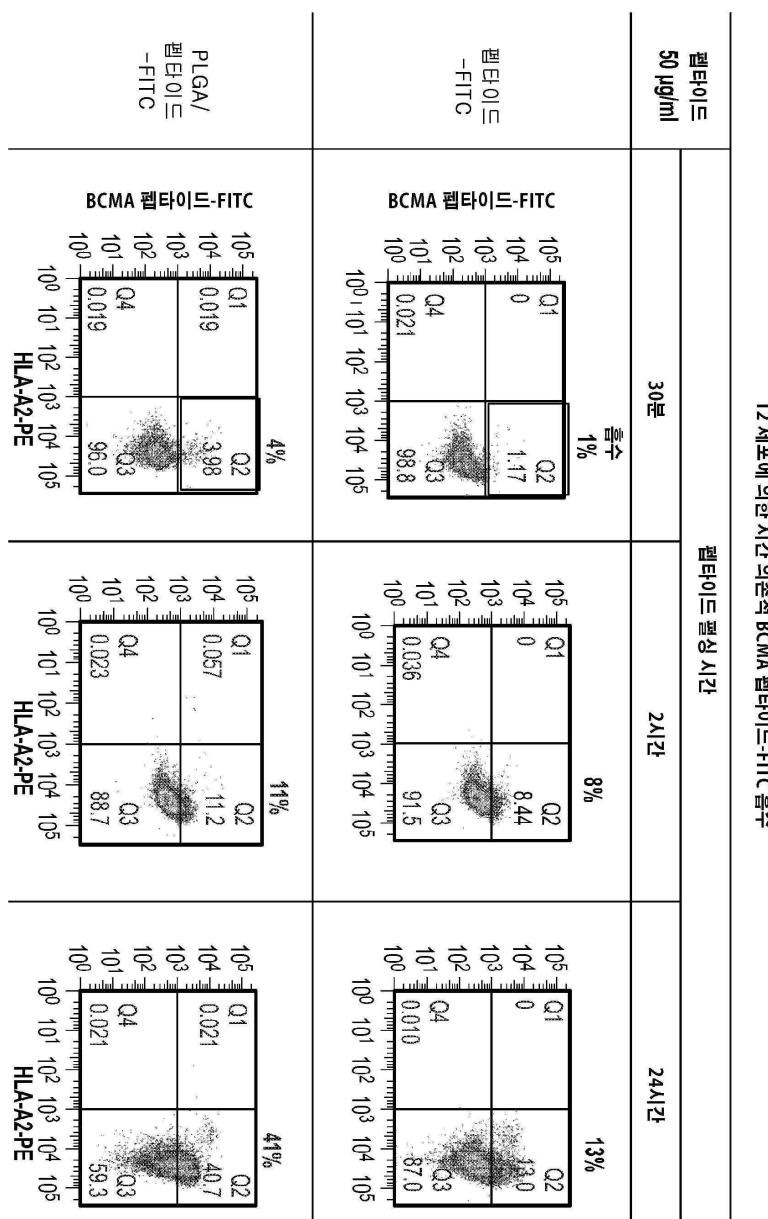
도면33c



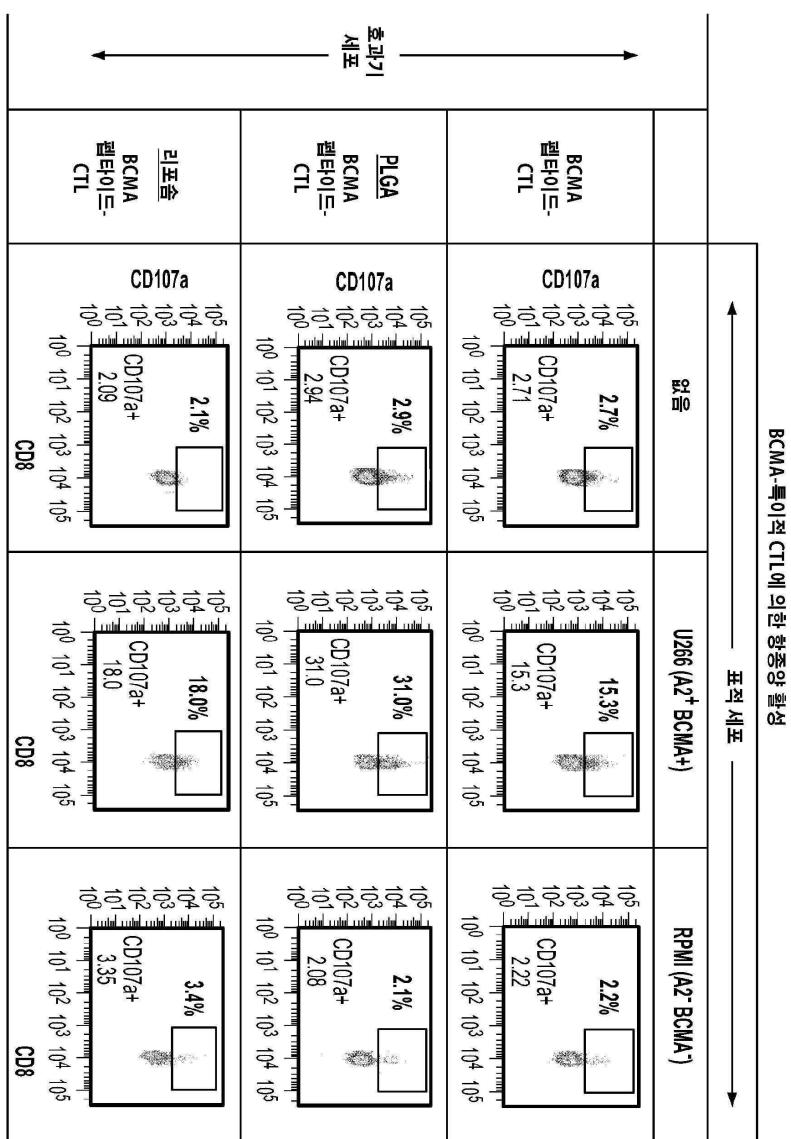
도면33d



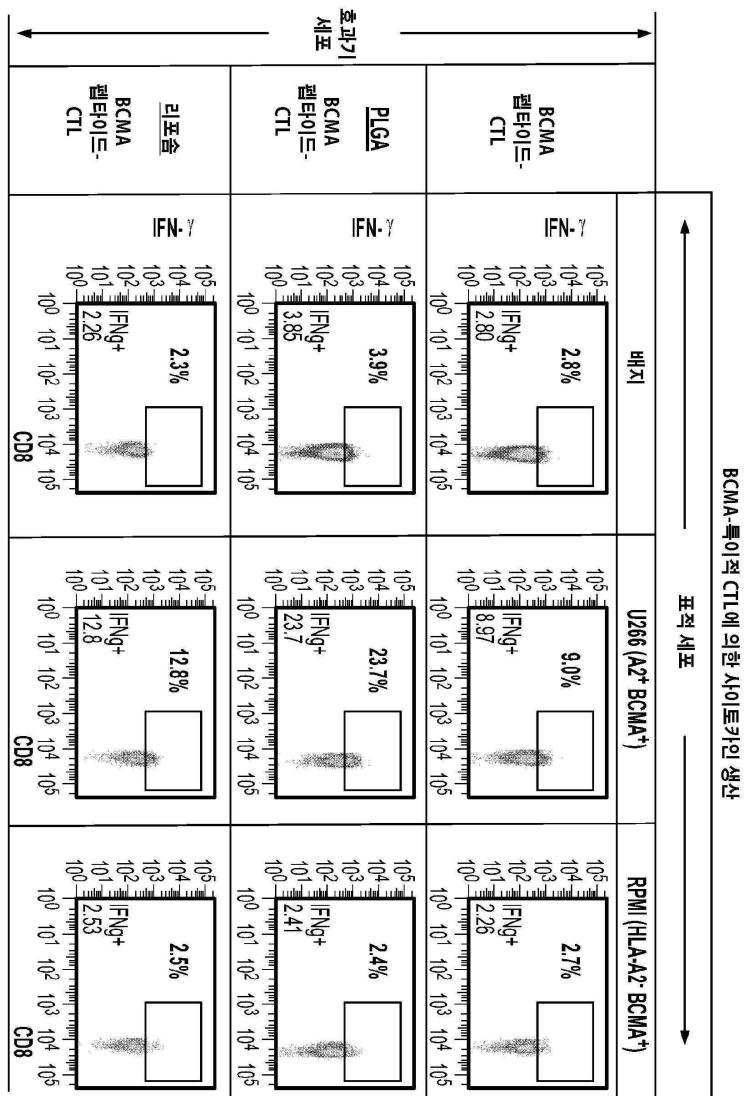
도면33e



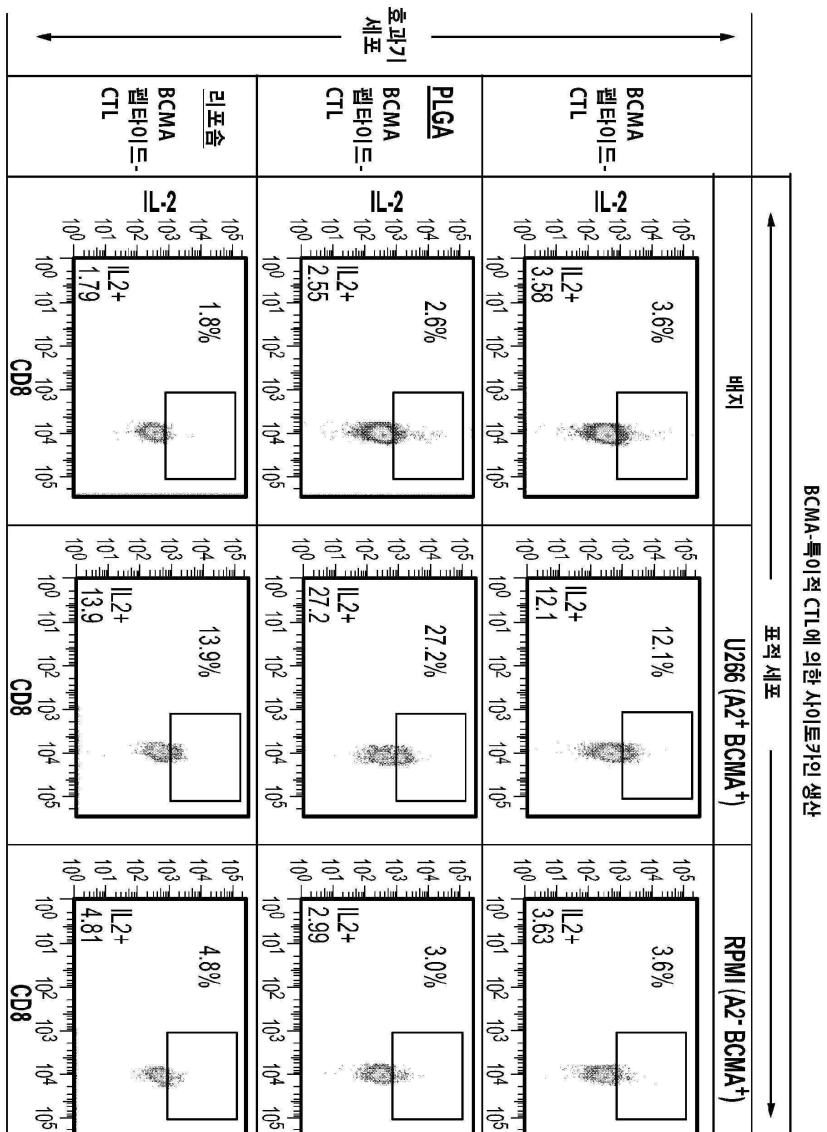
도면34a



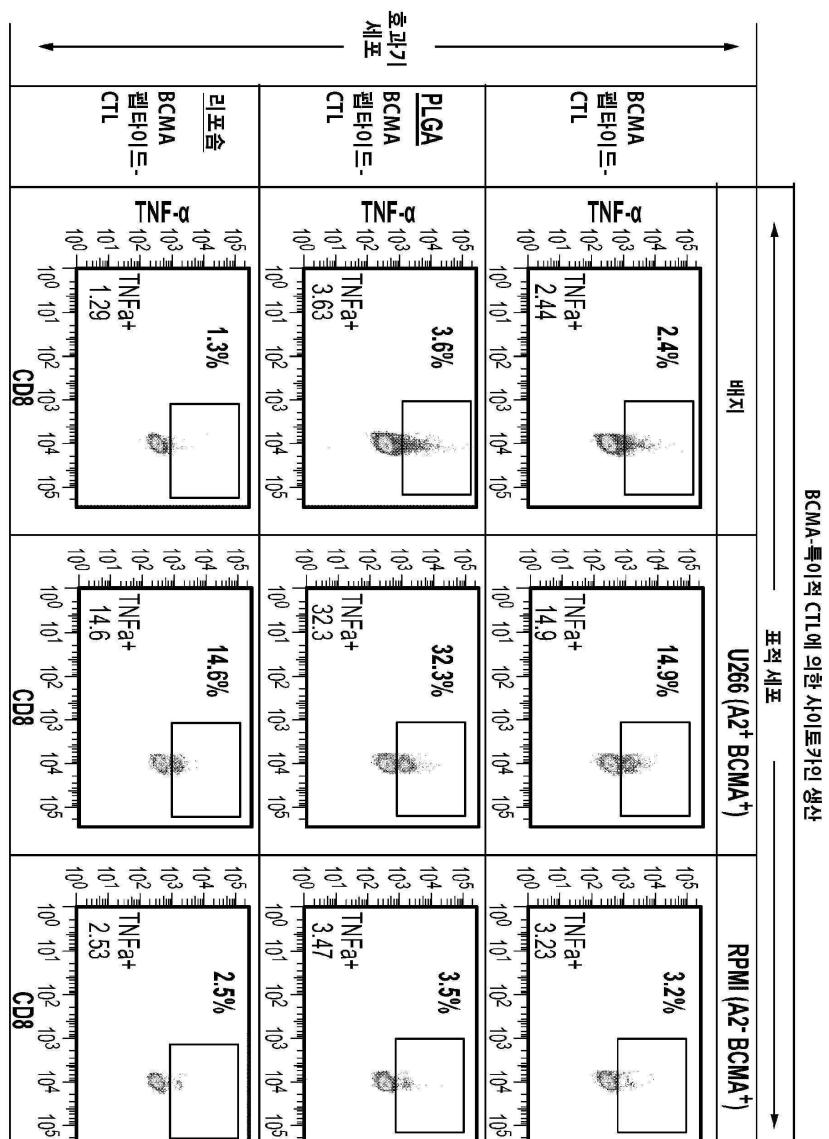
도면34b



도면34c

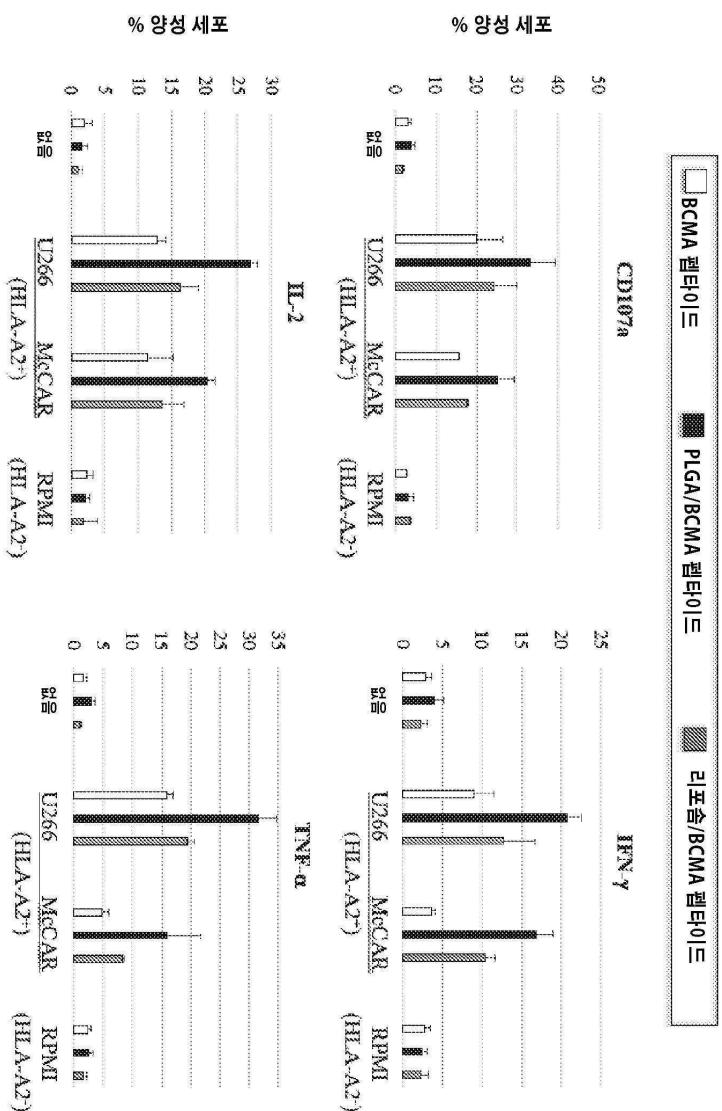


도면34d



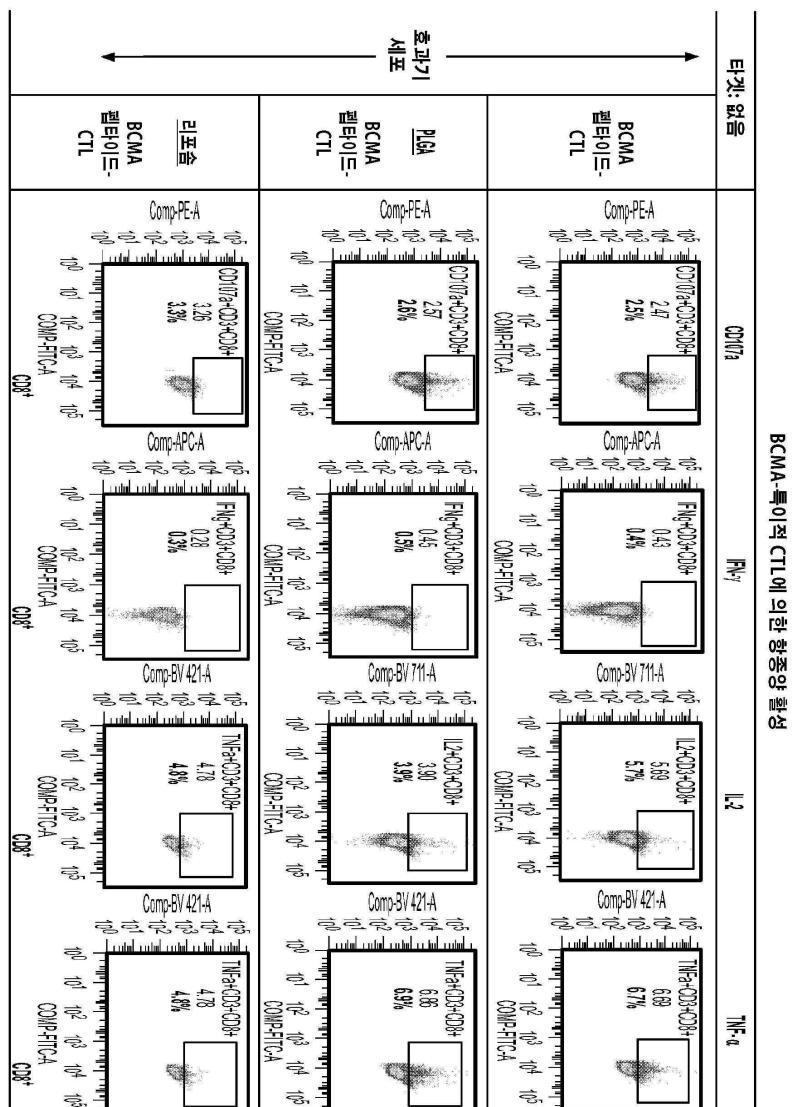
도면34e

BCMA-특이적 CTL에 의한 항종양 활성

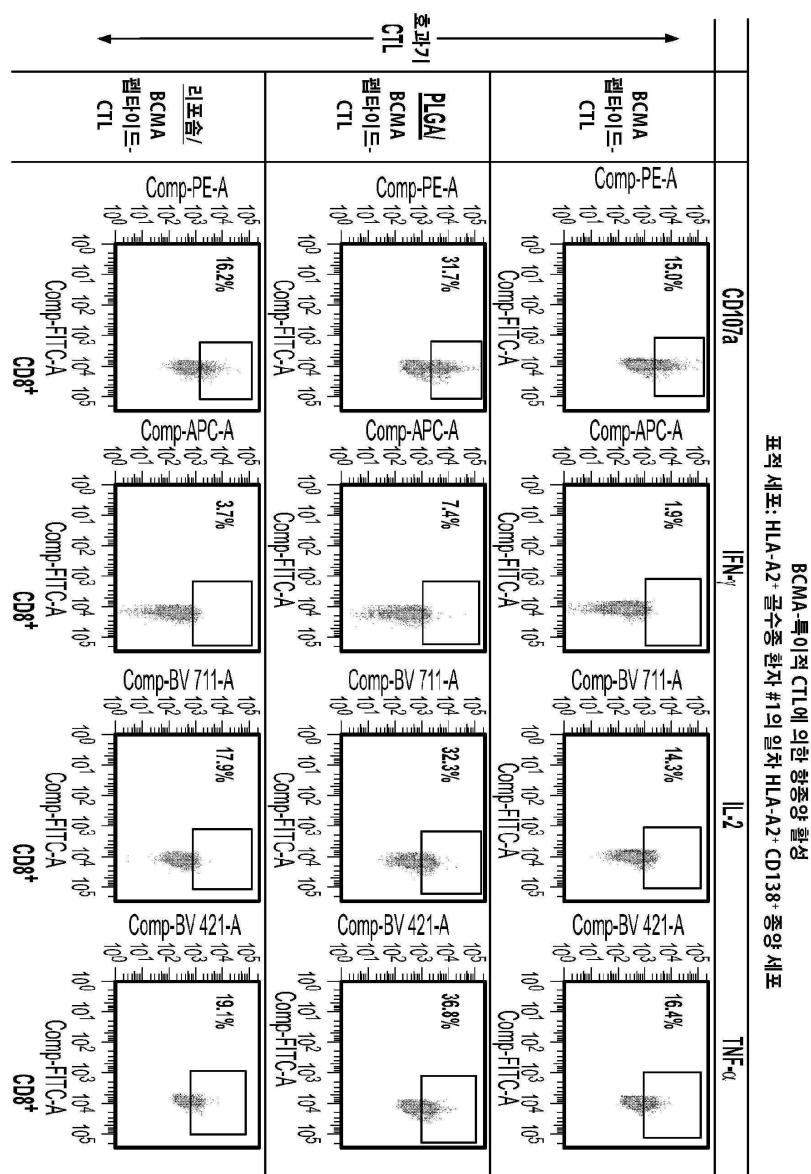


표적 세포: 다발성 끌수증 세포주

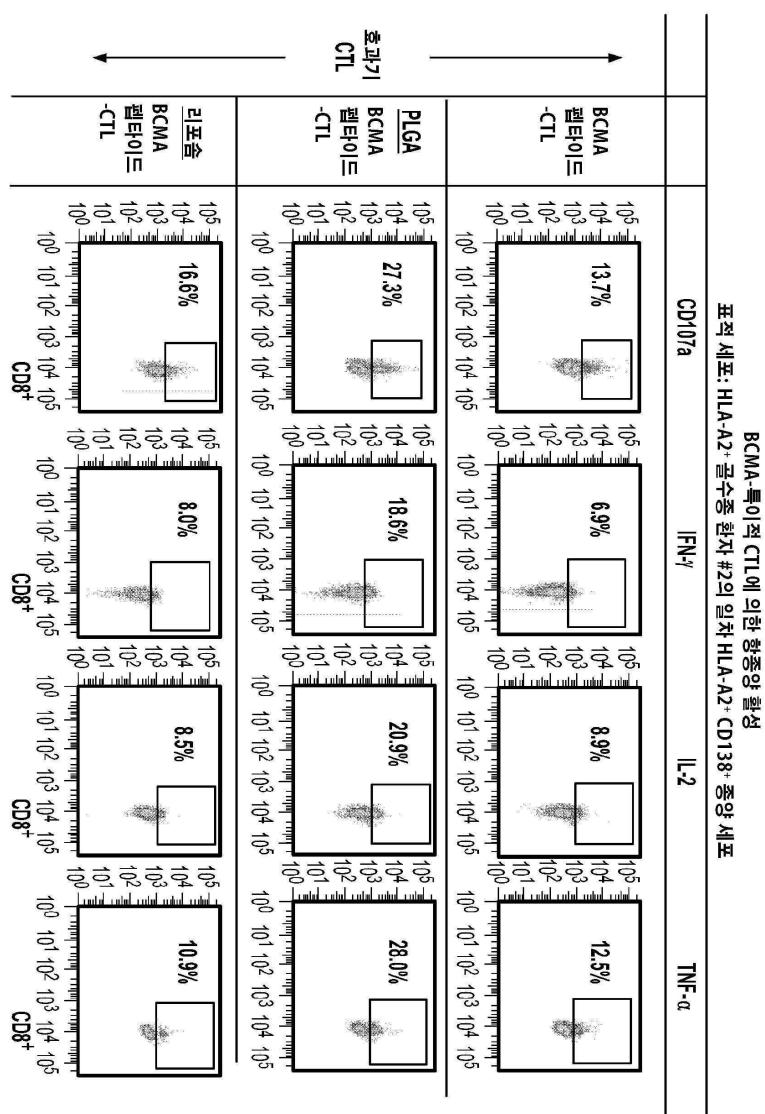
도면35a



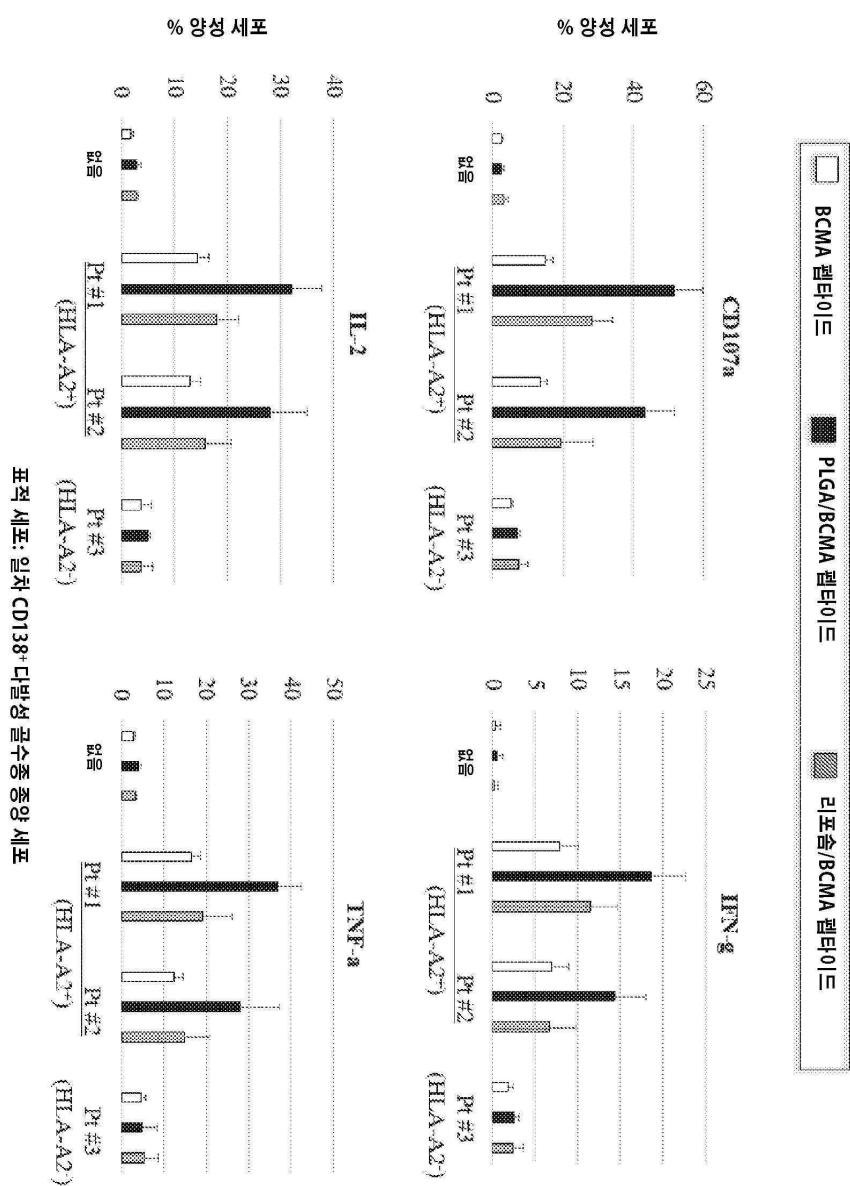
도면35b



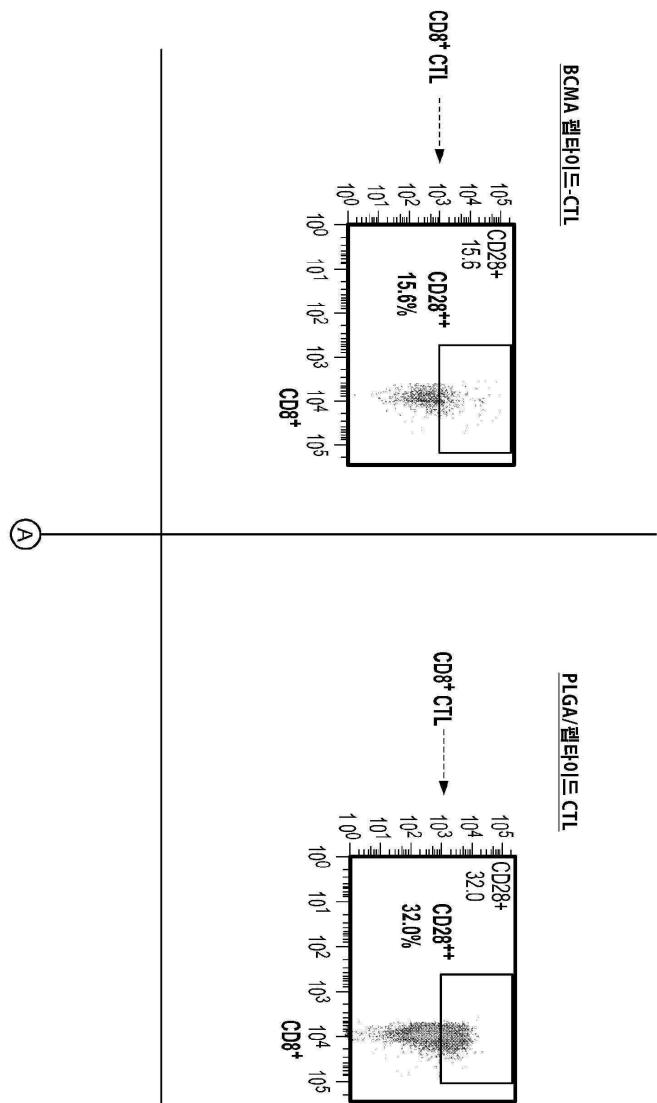
도면35c



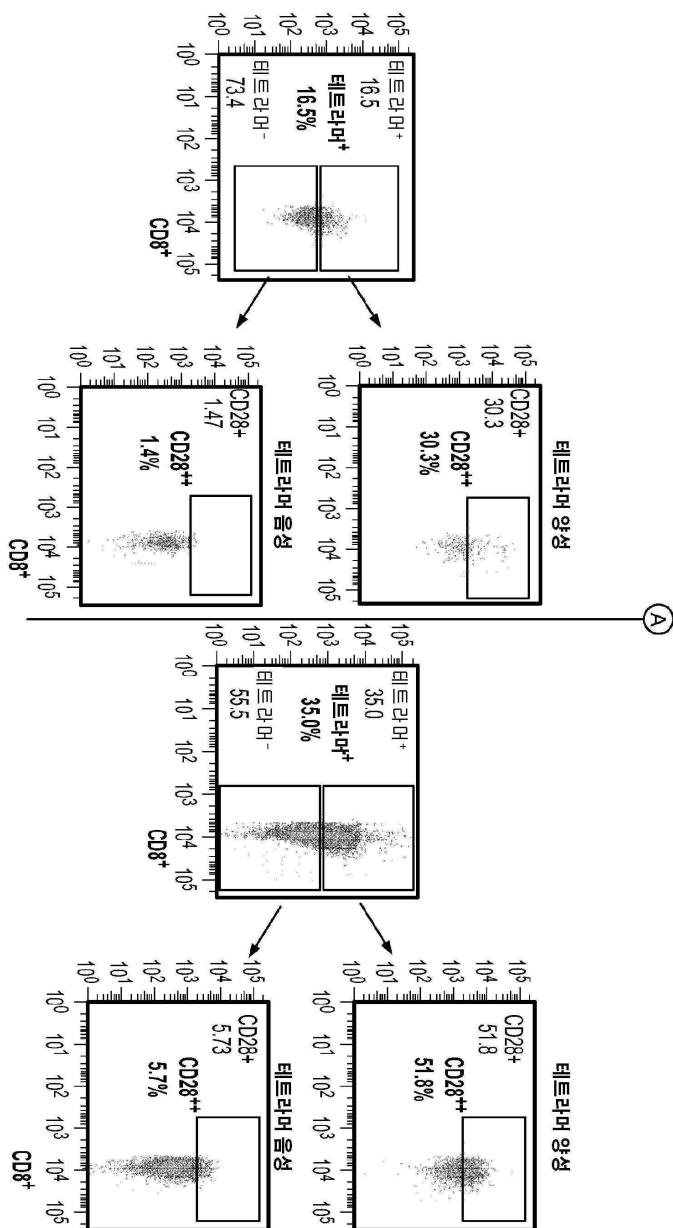
도면35d



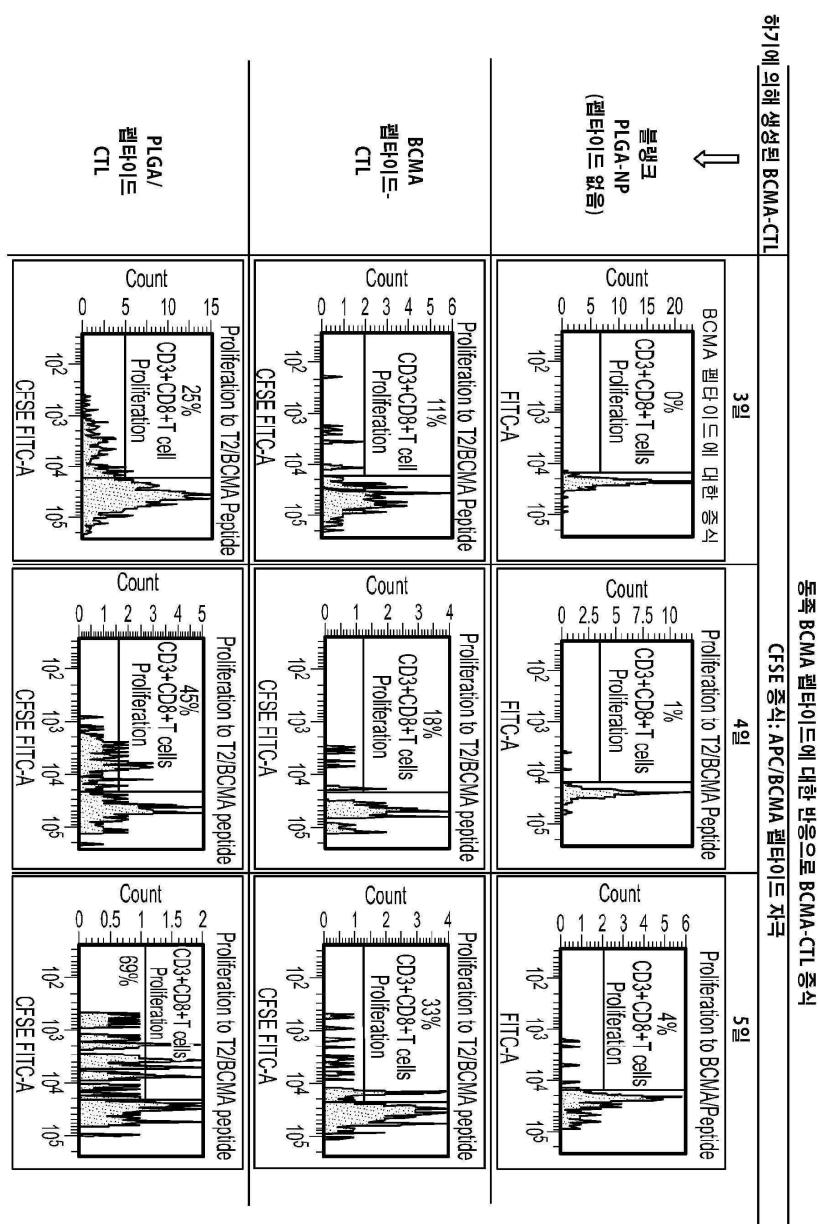
도면36a



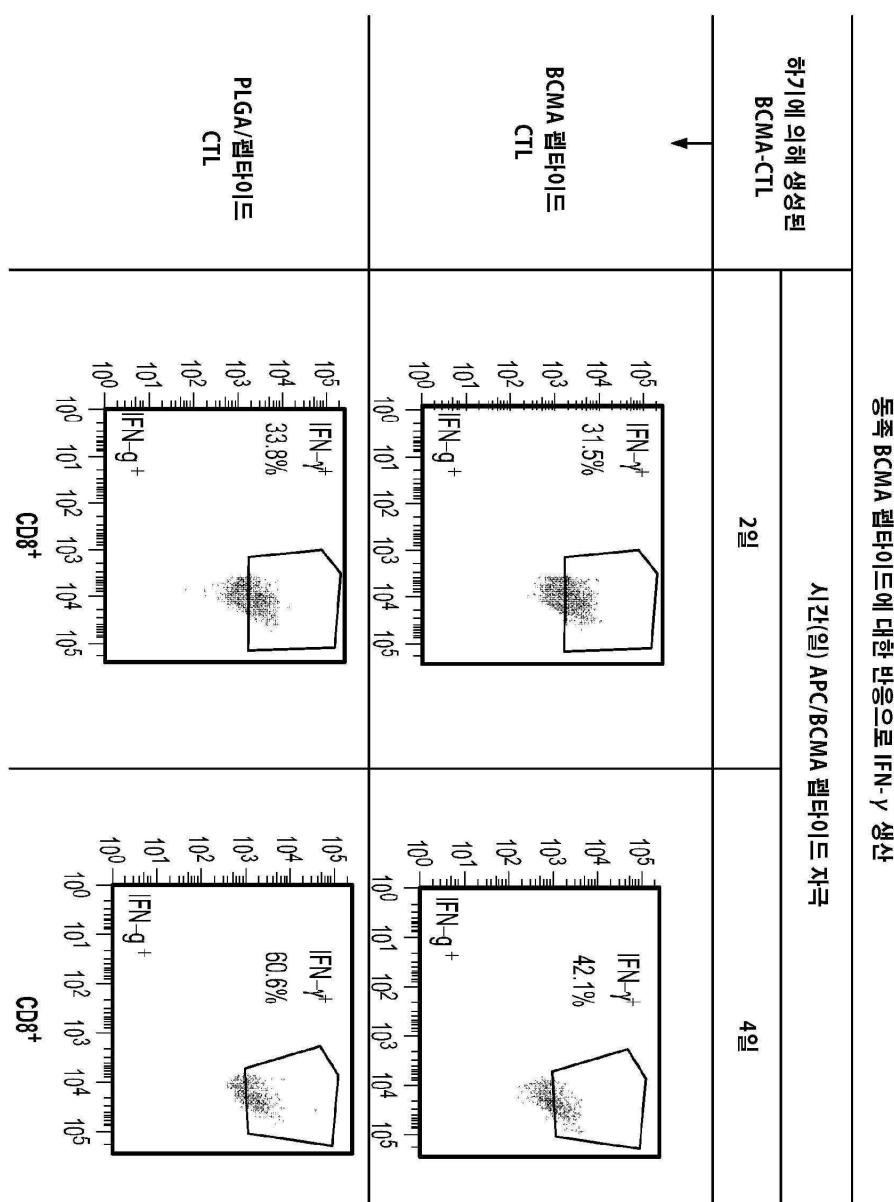
도면36ab



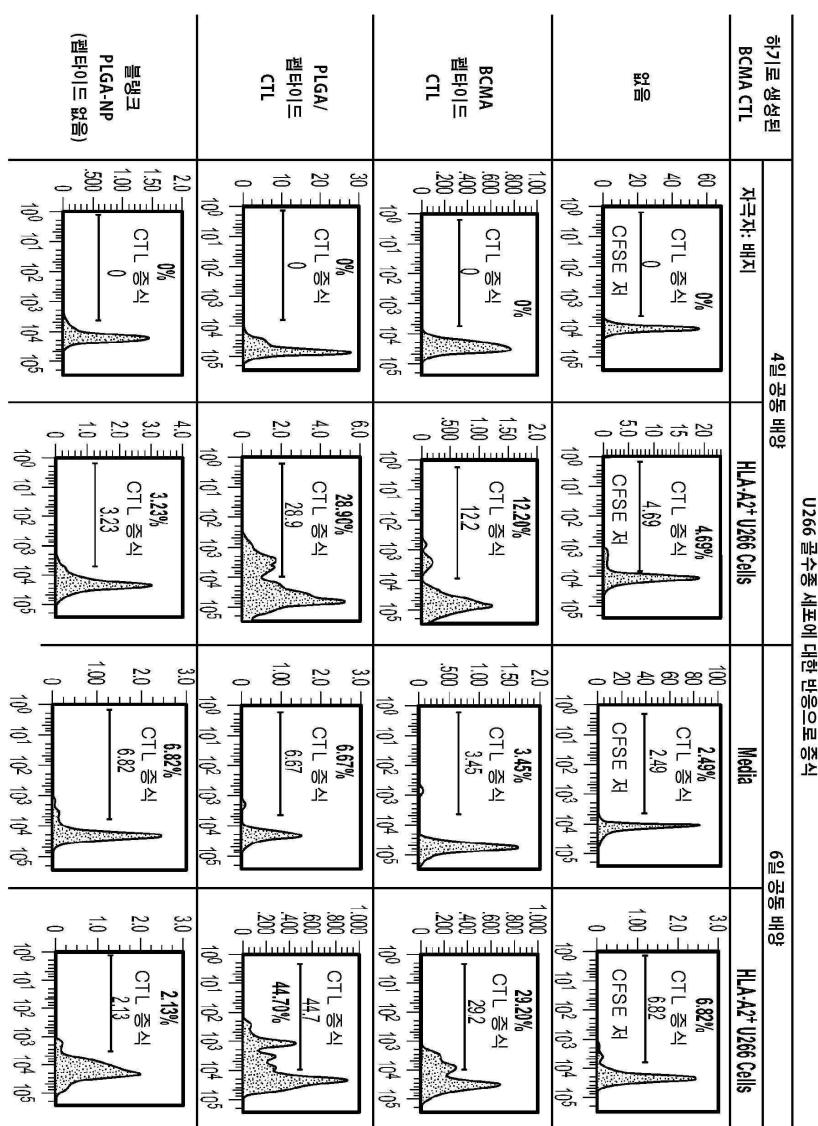
도면36b



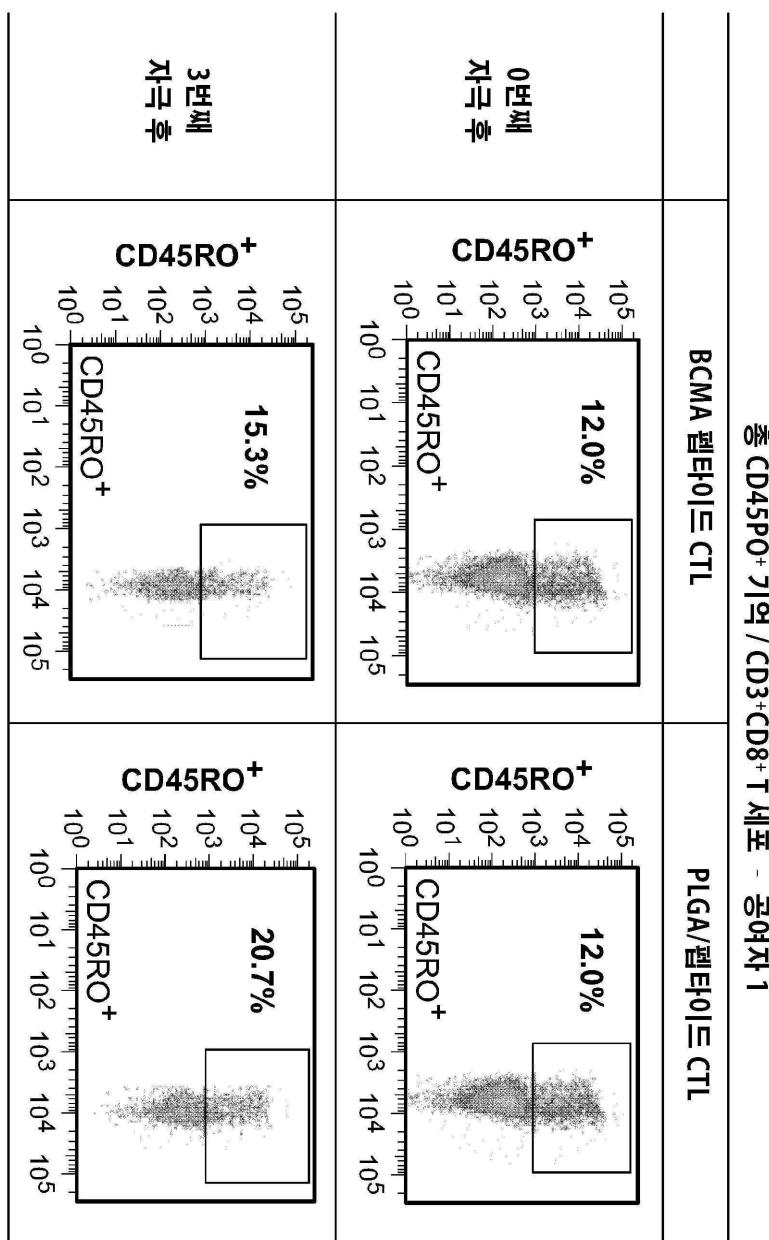
도면36c



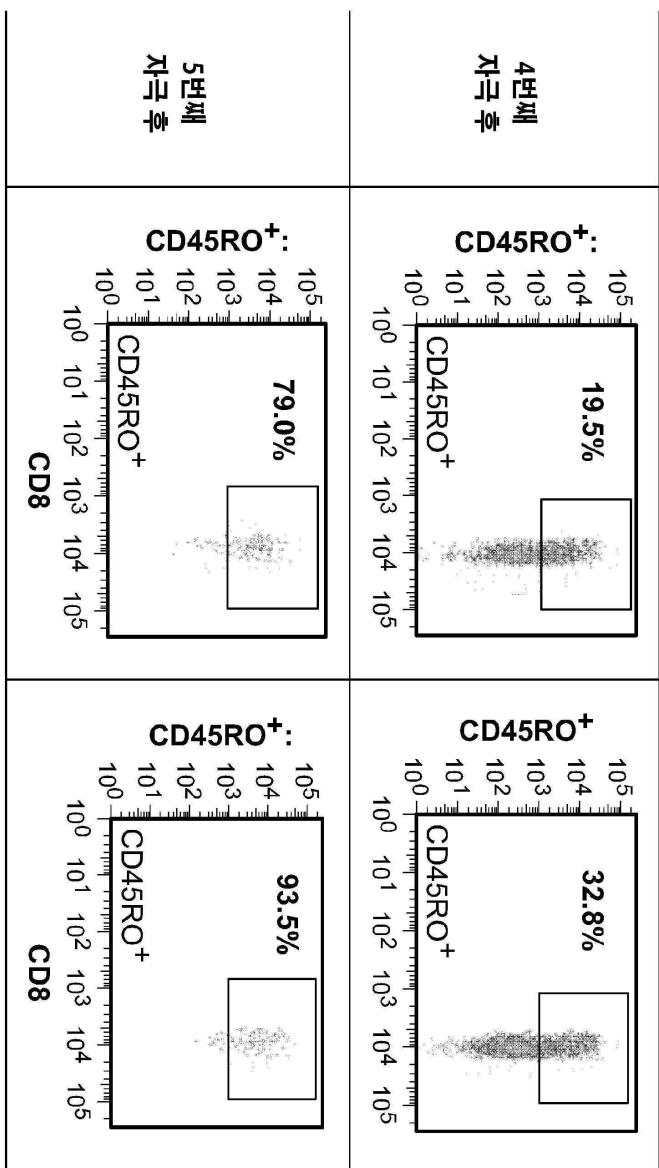
도면37a



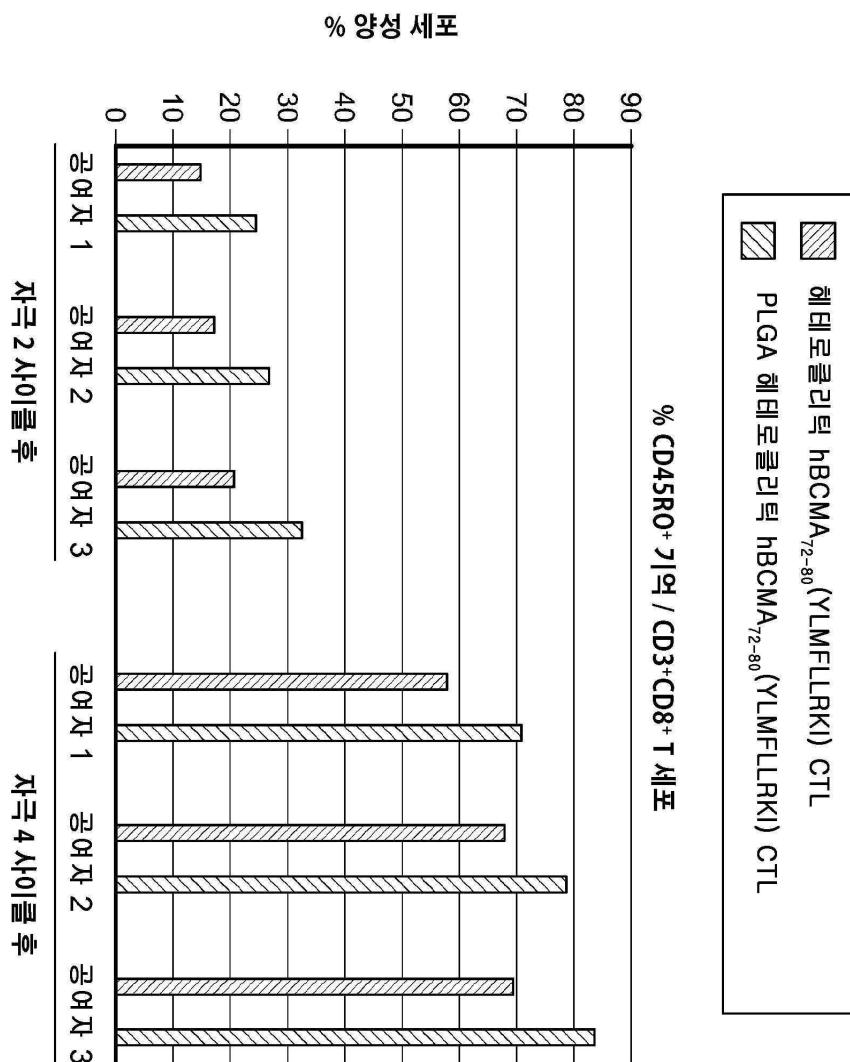
도면37ba



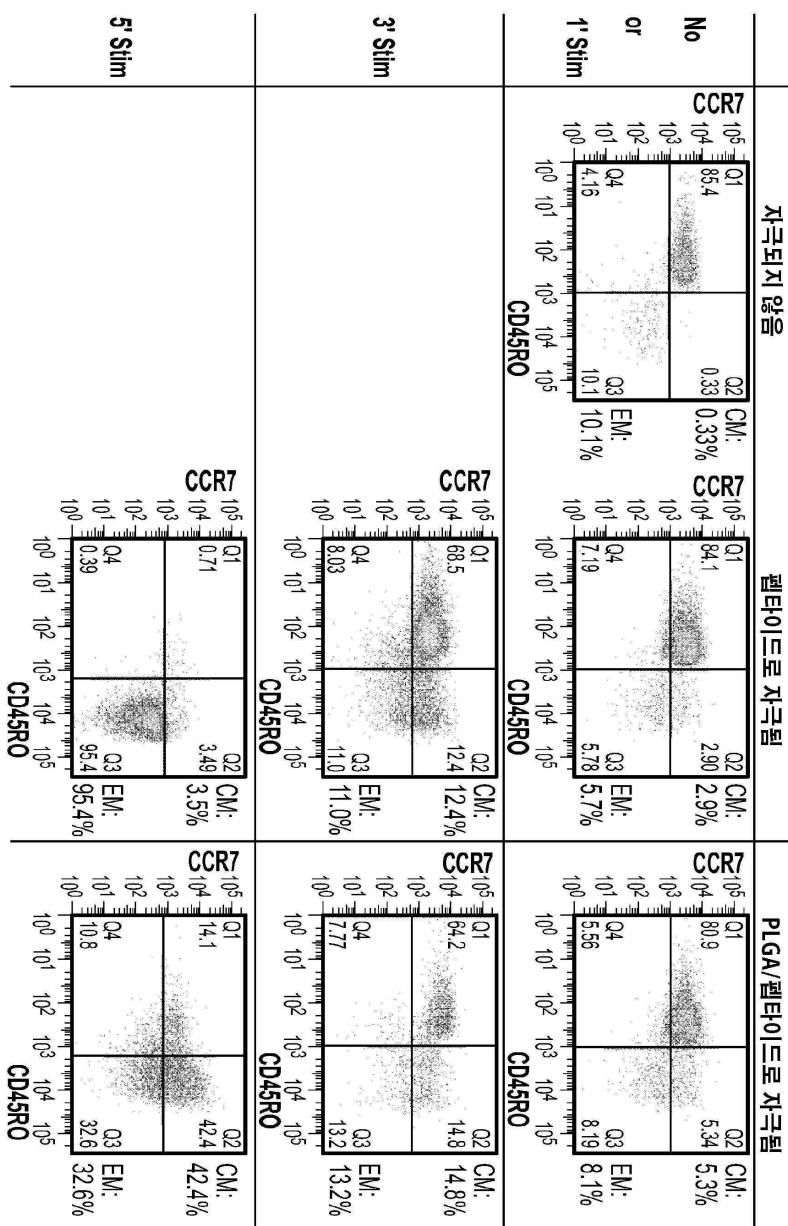
도면37bb



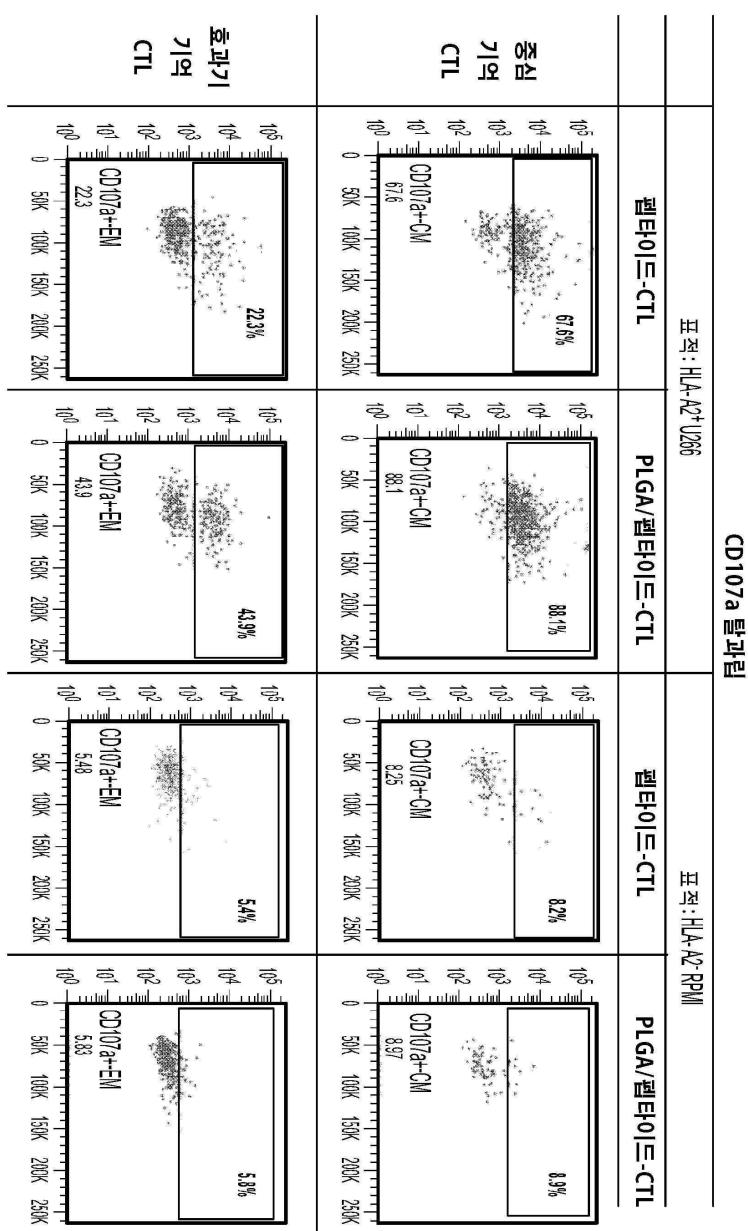
도면37c



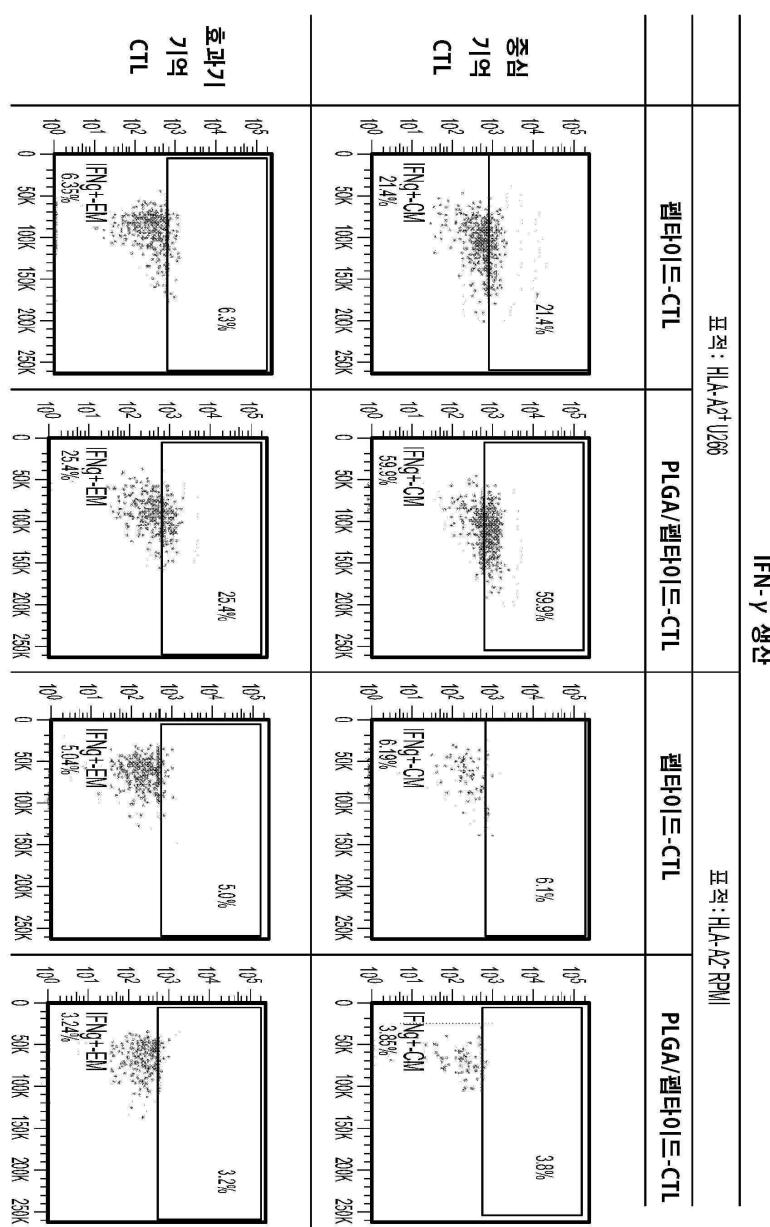
도면37d

PLGA/펩타이드-CTL 중심 기억 및 효과기 기억 세포 발달(CD3⁺CD8⁺) 증여자 1

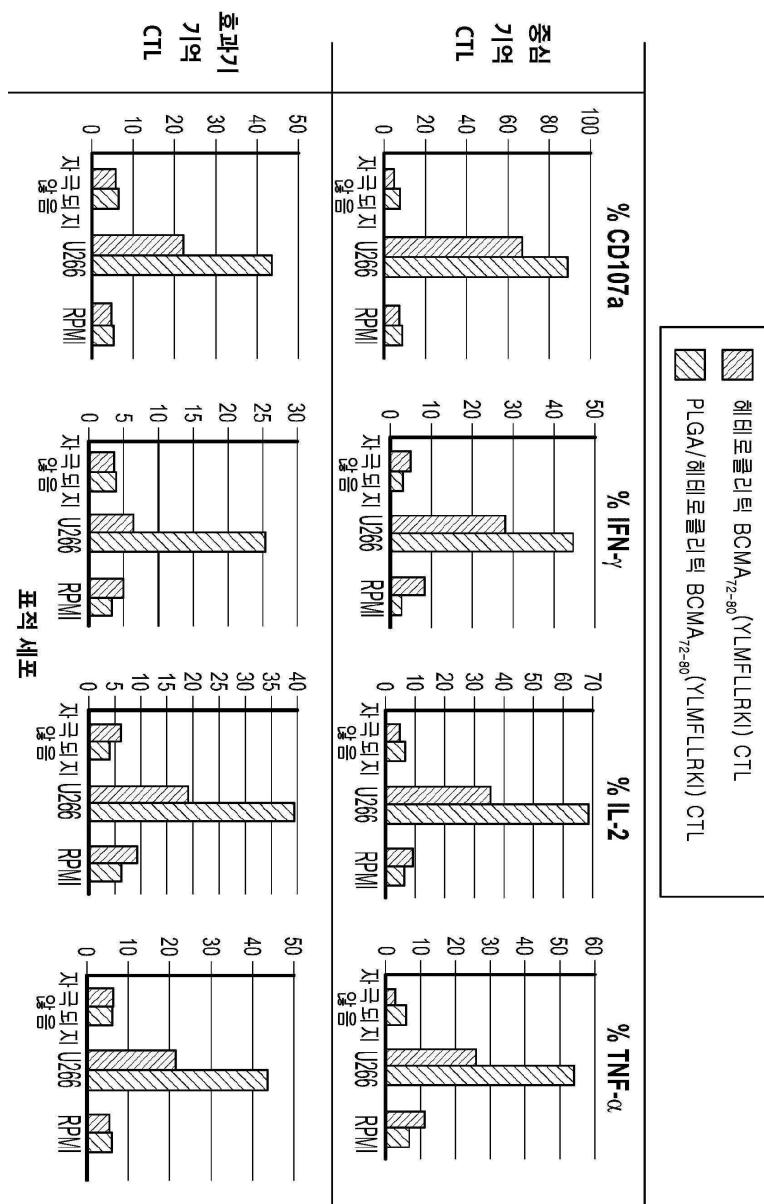
도면38a



도면38b



도면38c



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.

<120> IMMUNOGENIC PEPTIDES SPECIFIC TO BCMA AND TACI ANTIGENS FOR
TREATMENT OF CANCER

<130> 00530-0337W01

<140> PCT/US2018/049260

<141> 2018-08-31

<150> 62/553,669

<151> 2017-09-01

<160> 24

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 1

Leu Ile Ile Ser Leu Ala Val Phe Val

1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 2

Ala Val Phe Val Leu Met Phe Leu Leu

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 3

Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser Leu

1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 4

Val Leu Met Phe Leu Leu Arg Lys Ile

1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 5

Ala Ile Leu Trp Thr Cys Leu Gly Leu

1 5

<210> 6

<211> 9

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 6

Ile Leu Pro Arg Gly Leu Glu Tyr Thr

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 7

Phe Leu Val Ala Val Ala Cys Phe Leu

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 8

Val Leu Cys Cys Phe Leu Val Ala Val

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 9

Lys Leu Ser Ala Asp Gln Val Ala Leu

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223>

> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 10

Thr Leu Gly Leu Cys Leu Cys Ala Val

1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 11

Ala Leu Val Tyr Ser Thr Leu Gly Leu

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 12

Leu Ser Ala Asp Gln Val Ala Leu Val

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 13

Tyr Leu Met Phe Leu Leu Arg Lys Ile

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400>

> 14

Tyr Ile Leu Trp Thr Cys Leu Gly Leu

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 15

Tyr Leu Val Ala Val Ala Cys Phe Leu

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 16

Tyr Leu Ser Ala Asp Gln Val Ala Leu

1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 17

Tyr Leu Gly Leu Cys Leu Cys Ala Val

1 5

<210> 18

<211> 184

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

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> 19		
<211> 293		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 19		
Met Ser Gly Leu Gly Arg Ser Arg Arg Gly Gly Arg Ser Arg Val Asp		
1	5	10
Gln Glu Glu Arg Phe Pro Gln Gly Leu Trp Thr Gly Val Ala Met Arg		
20 25 30		
Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met		
35	40	45
Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala		
50	55	60
Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp		
65	70	75
His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His		
85 90 95		
Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Pro Val		
100	105	110
Asn Leu Pro Pro Glu Leu Arg Arg Gln Arg Ser Gly Glu Val Glu Asn		
115	120	125
Asn Ser Asp Asn Ser Gly Arg Tyr Gln Gly Leu Glu His Arg Gly Ser		
130	135	140
Glu Ala Ser Pro Ala Leu Pro Gly Leu Lys Leu Ser Ala Asp Gln Val		
145 150 155 160		
Ala Leu Val Tyr Ser Thr Leu Gly Leu Cys Leu Cys Ala Val Leu Cys		
165	170	175
Cys Phe Leu Val Ala Val Ala Cys Phe Leu Lys Lys Arg Gly Asp Pro		
180	185	190

Cys Ser Cys Gln Pro Arg Ser Arg Pro Arg Gln Ser Pro Ala Lys Ser

195 200 205

Ser Gln Asp His Ala Met Glu Ala Gly Ser Pro Val Ser Thr Ser Pro

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

Gly Arg Trp Gly Cys His Thr Arg Thr Thr Val Leu Gln Pro Cys Pro

260 265 270

His Ile Pro Asp Ser Gly Leu Gly Ile Val Cys Val Pro Ala Gln Glu

275 280 285

Gly Gly Pro Gly Ala

290

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 20

Gly Leu Val Gly Leu Ile Phe Ala Val

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 21

Ser Leu Tyr Asn Thr Val Ala Thr Leu

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 22

Tyr Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser Leu

1 5

<210> 23

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic 6xHis tag"

<400> 23

His His His His His His

1 5

<210> 24

<211> 4

<212> PRT

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown:

KDEL sequence"

<400> 24

Lys Asp Glu Leu

1