



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0089564
(43) 공개일자 2025년06월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/32 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2851 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2025-7018720(분할)
(22) 출원일자(국제) 2018년02월08일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2024-7004661
원출원일자(국제) 2018년02월08일
심사청구일자 2024년02월07일
(85) 번역문제출일자 2025년06월05일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/017470
(87) 국제공개번호 WO 2018/148445
국제공개일자 2018년08월16일
(30) 우선권주장
62/456,535 2017년02월08일 미국(US)

(71) 출원인
드래곤플라이 세라퓨틱스, 인크.
미국 02451 매사추세츠 월섬 씨드 애비뉴 180 식
스쓰 플로어
(72) 발명자
창, 그레고리, 피.
미국 02155 매사추세츠주 메드퍼드 사운더스 스트
리트 143
청, 앤, 에프.
미국 01773 매사추세츠주 링컨 모닝사이드 레인
25
(74) 대리인
(뒷면에 계속)
양영준, 이상남

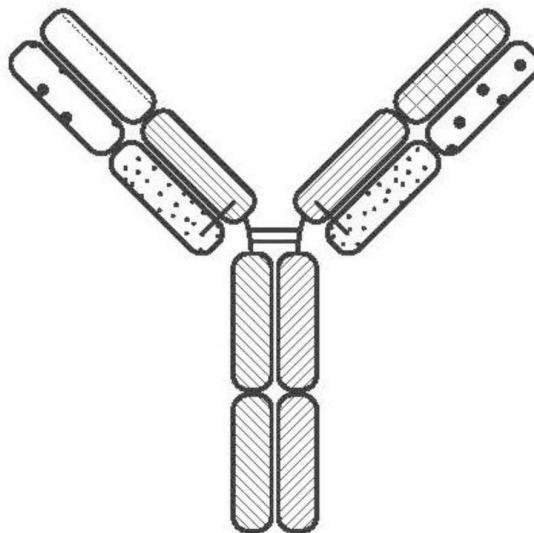
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 천연 킬러 세포의 활성화를 위한 다중-특이적 결합 단백질 및 암 치료에서의 그의 치료적 용도

(57) 요약

중양 연관 항원, NKG2D 수용체, 및 CD16에 결합하는 다중-특이적 결합 단백질, 뿐만 아니라 암의 치료에 유용한 제약 조성물 및 치료 방법이 기재된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 16/283 (2013.01)

C07K 16/2878 (2013.01)

C07K 16/2887 (2013.01)

C07K 16/32 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/526 (2013.01)

C07K 2317/55 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2317/732 (2013.01)

(72) 발명자

해니, 윌리엄

미국 01778 매사추세츠주 웨일랜드 링컨 로드 61

그린버그, 아샤

미국 02421 매사추세츠주 렉싱턴 팔론 로드 37

명세서

청구범위

청구항 1

단백질의 용도.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 관련 출원의 상호 참고
- [0002] 본 출원은 2017년 2월 8일에 출원한 미국 가특허 출원 번호 62/456,535를 우선권으로 주장하며, 그의 전체 내용은 모든 목적을 위해 본원에 참고로 포함된다.
- [0003] 서열 목록
- [0004] 본 출원은 ASCII 포맷으로 전자적으로 제출된 서열 목록을 포함하며, 이는 그의 전문이 본원에 참고로 포함된다. 2018년 2월 6일에 생성된 상기 ASCII 사본은 DFY-001PC_SL.txt로 명명되고, 71,169 바이트의 크기를 갖는다.
- [0005] 본 발명의 분야
- [0006] 본 발명은 종양-연관 항원, NKG2D 수용체 및 CD16에 결합하는 다중-특이적 결합 단백질에 관한 것이다.

배경 기술

- [0007] 암의 치료를 위해 문헌에서 보고된 실질적인 연구 노력 및 과학적 진보에도 불구하고 상기 질환은 계속해서 상당한 건강 문제이다. 가장 흔히 진단되는 일부 암에는 전립선암, 유방암 및 폐암이 포함된다. 전립선암은 남성에서 가장 흔한 형태의 암이다. 유방암은 여성에서 주된 사망 원인이다. 이들 암에 대한 현재의 치료 옵션은 모든 환자에 대해 효과적이지 않고/거나 실질적인 부작용을 가질 수 있다. 다른 유형의 암 또한 기존 치료 옵션을 이용하여 치료하기가 여전히 힘들다.
- [0008] 암 면역요법은 고도로 특이적이고 환자 자신의 면역계를 이용하여 암 세포의 파괴를 용이하게 할 수 있기 때문에 바람직하다. 융합 단백질, 예컨대 이중-특이적 T-세포 결속체는 종양 세포 및 T-세포에 결합하여 종양 세포의 파괴를 용이하게 하는, 문헌에 기재된 암 면역요법이다. 특정한 종양-연관 항원 및 특정한 면역 세포에 결합하는 항체는 문헌에 기재되어 있다. 예를 들어, WO 2016/134371 및 WO 2015/095412를 참고한다.
- [0009] 천연 킬러 (NK) 세포는 선천성 면역계의 성분이고, 순환 림프구의 대략 15%를 구성한다. NK 세포는 사실상 모든 조직에 침투하며, 원래 사전 민감화에 대한 필요없이 효과적으로 종양 세포를 사멸시키는 능력을 특징으로 하였다. 활성화된 NK 세포는 세포독성 T 세포와 유사한 수단에 의해 - 즉, 퍼포린 및 그랜자임을 함유하는 세포용해성 과립을 통해서, 뿐만 아니라 사멸 수용체 경로를 통해서 표적 세포를 사멸시킨다. 활성화된 NK 세포는 또한 표적 조직으로 다른 백혈구의 동원을 촉진시키는 염증성 시토카인, 예컨대 IFN-감마 및 케모카인을 분비한다.
- [0010] NK 세포는 그들의 표면 상의 다양한 활성화 및 억제 수용체를 통해 신호에 반응한다. 예를 들어, NK 세포가 강한 자가-세포와 직면할 때, 그들의 활성화는 킬러-세포 이뮤노글로불린-유사 수용체 (KIR)의 활성화를 통해 억제된다. 대안적으로, NK 세포가 외래 세포 또는 암 세포와 직면할 때, 이들은 그들의 활성화 수용체 (예를 들어, NKG2D, NCR, DNAM1)를 통해 활성화된다. NK 세포는 또한 그들의 표면 상의 CD16 수용체를 통해 일부 이뮤노글로불린의 불변 영역에 의해 활성화된다. 활성화에 대한 NK 세포의 전반적인 민감도는 자극 및 억제 신호의 합에 따라 좌우된다.

발명의 내용

- [0011] 본 발명은 암 세포 상의 종양-연관 항원에 결합하고, 천연 킬러 세포 상의 NKG2D 수용체 및 CD16 수용체에 결합

하여 천연 킬러 세포를 활성화시키는 다중-특이적 결합 단백질, 이러한 다중-특이적 결합 단백질을 포함하는 제약 조성물, 및 이러한 다중-특이적 단백질 및 제약 조성물을 이용하는 치료 방법, 예컨대 암 치료 방법을 제공한다. 이러한 단백질은 1종 초과 NK 활성화 수용체에 결합할 수 있고, NKG2D에 대한 천연 리간드의 결합을 차단할 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 단백질은 인간에서, 및 다른 종, 예컨대 설치류 및 시노물구스 원숭이에서 NK 세포를 효능화시킬 수 있다. 본 발명의 다양한 측면 및 실시양태는 하기에 더욱 상세하게 기재된다.

[0012] 일부 실시양태에서, 다중-특이적 결합 단백질은 NKG2D에 결합하는 제1 항원-결합 부위; 종양-연관 항원에 결합하는 제2 항원-결합 부위; 및 CD16에 결합하기에 충분한 항체 Fc 도메인, 그의 부분, 또는 CD16에 결합하는 제3 항원-결합 부위를 포함할 수 있다.

[0013] 일부 실시양태에서, 다중-특이적 결합 단백질은 3가이며, 이는 동일한 종양-연관 항원에 둘 다 결합하는 제1 및 제2 항원 결합 부위; NKG2D에 결합하는 제3 항원 결합 부위; 및 CD16에 결합하기에 충분한 항체 Fc 도메인, 그의 부분을 포함한다.

[0014] 일부 실시양태에서, 다중-특이적 결합 단백질은 4가이며, 이는 동일한 종양-연관 항원에 둘 다 결합하는 제1 및 제2 항원 결합 부위; NKG2D에 둘 다 결합하는 제3 및 제4 항원 결합 부위; 및 CD16에 결합하기에 충분한 항체 Fc 도메인, 그의 부분을 포함한다.

[0015] 항원-결합 부위는 각각 항체 중쇄 가변 도메인 및 항체 경쇄 가변 도메인 (예를 들어, 항체에서와 같이 배열되거나, 또는 함께 융합되어 scFv를 형성함)을 포함할 수 있거나, 또는 항원-결합 부위 중 하나 이상은 단일 도메인 항체, 예컨대 V_{HH} 항체, 예컨대 낙타과 항체 또는 V_{NAR} 항체, 예컨대 연골 어류에서 발견되는 것들일 수 있다. 일부 예에서, 종양-연관 항원은 HER2, CD20, CD33, B-세포 성숙 항원 (BCMA), EpCAM, CD2, CD19, CD30, CD38, CD40, CD52, CD70, EGFR/ERBB1, IGF1R, HER3/ERBB3, HER4/ERBB4, MUC1, cMET, SLAMF7, PSCA, MICA, MICB, TRAILR1, TRAILR2, MAGE-A3, B7.1, B7.2, CTLA4, 및 PD1로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0016] 본 발명의 또 다른 측면은 환자에서 암을 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 암의 치료를 필요로 하는 환자에게 본원에 기재된 다중-특이적 결합 단백질의 치료 유효량을 투여하여 암을 치료하는 것을 포함한다. 다중-특이적 결합 단백질을 이용하여 치료하기 위한 예시적인 암에는 예를 들어 HER2를 발현하는 암종이 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 NKG2D-결합 도메인 (우측 아암), 종양 연관 항원-결합 도메인 (좌측 아암), 및 CD16에 결합하는 Fc 도메인 또는 그의 부분을 함유하는 다중-특이적 결합 단백질의 대표도이다.

도 2는 scFv 포맷의 NKG2D-결합 도메인 (우측 아암), 종양 연관 항원-결합 도메인 (좌측 아암) 및 CD16에 결합하는 Fc 도메인 또는 그의 부분을 함유하는 다중-특이적 결합 단백질의 대표도이다.

도 3은 트리오파 형태 TriNKET의 대표도이며, 이는 IgG-유사 형태를 유지하는 삼관능성의 이중특이적 항체이다. 이 키메라는 2가지 모 항체로부터 유래된 2개의 절반 항체로 이루어지고, 이들 각각은 1개의 경쇄 및 1개의 중쇄를 갖는다. 트리오파 형태는 1/2의 래트 항체 및 1/2의 마우스 항체를 함유하는 이중이량체성 구축물일 수 있다.

도 4는 KiH 공통 경쇄 (LC) 형태의 TriNKET의 대표도이며, 이는 낚-인투-홀 (knobs-into-holes, KIH) 기술과 관련이 있다. KiH는 표적 1 및 2에 결합하는 2개의 Fab 및 이중이량체화 돌연변이에 의해 안정화된 Fc를 함유하는 이중이량체이다. KiH 포맷의 TriNKET는 2개의 상이한 중쇄, 및 두 HC 모두와 쌍을 형성한 공통 경쇄를 함유하는, 표적 1 및 표적 2에 결합하는 2개의 fab를 갖는 이중이량체성 구축물일 수 있다.

도 5는 이중-가변 도메인 이뮤노글로불린 (DVD-IgTM) 형태의 TriNKET의 대표도이며, 이는 가요성 천연 발생 링커를 통해 2개의 모노클로날 항체의 표적 결합 도메인을 조합하고, 4가 IgG-유사 분자를 생성한다. DVD-IgTM는 항원 2를 표적으로 하는 가변 도메인이 항원 1을 표적으로 하는 Fab의 가변 도메인의 N 말단에 융합된 동종이량체성 구축물이고, 상기 구축물은 정상 Fc를 함유한다.

도 6은 직교(Orthogonal) Fab 계면 (Ortho-Fab) 형태의 TriNKET의 대표도이며, 이는 Fc에 융합된, 표적 1 및 표적 2에 결합하는 2개의 Fab를 함유하는 이중이량체성 구축물이다. LC-HC 쌍 형성은 직교 계면에 의해 보장된다. 이중이량체화는 Fc에서의 돌연변이에 의해 보장된다.

도 7은 2 in1Ig 포맷의 TriNKET의 대표도이다.

도 8은 ES 형태의 TriNKET의 대표도이며, 이는 Fc에 융합된, 표적 1 및 표적 2에 결합하는 2개의 상이한 Fab를 함유하는 이중이량체성 구축물이다. 이중이량체화는 Fc에서 정전기적 조정 돌연변이에 의해 보장된다.

도 9는 Fab 아암 교환 형태의 TriNKET의 대표도이다: 중쇄 (HC) 및 부착된 경쇄 (LC) (절반-분자)를 또 다른 분자로부터의 중쇄-경쇄 쌍과 교체함으로써 Fab 아암을 교환하여 이중특이적 항체를 생성하는 항체. Fab 아암 교환 형태 (cFae)는 표적 1 및 2에 결합하는 2개의 Fab, 및 이중이량체화 돌연변이에 의해 안정화된 Fc를 함유하는 이중이량체이다.

도 10은 SEED 바디 형태의 TriNKET의 대표도이며, 이는 표적 1 및 2에 결합하는 2개의 Fab, 및 이중이량체화 돌연변이에 의해 안정화된 Fc를 함유하는 이중이량체이다.

도 11은 LuZ-Y 형태의 TriNKET의 대표도이며, 여기서 류신 지퍼를 사용하여 2개의 상이한 HC의 이중이량체화를 유도한다. LuZ-Y 형태는 Fc에 융합된, 표적 1 및 2에 결합하는 2개의 상이한 scFab를 함유하는 이중이량체이다. 이중이량체화는 Fc의 C-말단에 융합된 류신 지퍼 모티프에 의해 보장된다.

도 12는 Cov-X-바디 형태의 TriNKET의 대표도이다.

도 13a-13b는 $\kappa\lambda$ -바디 형태의 TriNKET의 대표도이며, 이는 이중이량체화 돌연변이에 의해 안정화된 Fc에 융합된 2개의 상이한 Fab를 갖는 이중이량체성 구축물이며: 항원 1을 표적으로 하는 Fab1은 카파 LC를 함유하는 반면에, 항원 2를 표적으로 하는 제2 Fab는 람다 LC를 함유한다. 도 13a는 $\kappa\lambda$ -바디의 한 형태의 예시적인 대표도이고; 도 13b는 또 다른 $\kappa\lambda$ -바디의 예시적인 대표도이다.

도 14는 ELISA 검정에서 인간 재조합 NKG2D에 대한 NKG2D-결합 도메인 (클론으로 열거됨)의 결합 친화도를 입증하는 그래프이다.

도 15는 ELISA 검정에서 시노물구스 재조합 NKG2D에 대한 NKG2D-결합 도메인 (클론으로 열거됨)의 결합 친화도를 입증하는 그래프이다.

도 16은 ELISA 검정에서 마우스 재조합 NKG2D에 대한 NKG2D-결합 도메인 (클론으로 열거됨)의 결합 친화도를 입증하는 그래프이다.

도 17은 유동 세포분석법에 의해 인간 NKG2D를 발현하는 EL4 세포에 대한 NKG2D-결합 도메인 (클론으로 열거됨)의 결합을 입증하는 그래프이며, 백그라운드 대비 평균 형광 강도 (MFI) 배수를 제시한다.

도 18은 유동 세포분석법에 의해 마우스 NKG2D를 발현하는 EL4 세포에 대한 NKG2D-결합 도메인 (클론으로 열거됨)의 결합을 입증하는 그래프이며, 백그라운드 대비 평균 형광 강도 (MFI) 배수를 제시한다.

도 19는 천연 리간드 ULBP-6과 경쟁함으로써 재조합 인간 NKG2D-Fc에 대한 NKG2D-결합 도메인 (클론으로 열거됨)의 특이적 결합 친화도를 입증하는 그래프이다.

도 20은 천연 리간드 MICA와 경쟁함으로써 재조합 인간 NKG2D-Fc에 대한 NKG2D-결합 도메인 (클론으로 열거됨)의 특이적 결합 친화도를 입증하는 그래프이다.

도 21은 천연 리간드 Rae-1 델타와 경쟁함으로써 재조합 마우스 NKG2D-Fc에 대한 NKG2D-결합 도메인 (클론으로 열거됨)의 특이적 결합 친화도를 입증하는 그래프이다.

도 22는 인간 NKG2D-CD3 제타 융합 단백질을 발현하는 TNF-알파 양성 세포의 백분율을 정량화함으로써 NKG2D-결합 도메인 (클론으로 열거됨)에 의한 인간 NKG2D의 활성화를 제시하는 그래프이다.

도 23은 마우스 NKG2D-CD3 제타 융합 단백질을 발현하는 TNF-알파 양성 세포의 백분율을 정량화함으로써 NKG2D-결합 도메인 (클론으로 열거됨)에 의한 마우스 NKG2D의 활성화를 제시하는 그래프이다.

도 24는 NKG2D-결합 도메인 (클론으로 열거됨)에 의한 인간 NK 세포의 활성화를 제시하는 그래프이다.

도 25는 NKG2D-결합 도메인 (클론으로 열거됨)에 의한 인간 NK 세포의 활성화를 제시하는 그래프이다.

도 26은 NKG2D-결합 도메인 (클론으로 열거됨)에 의한 마우스 NK 세포의 활성화를 제시하는 그래프이다.

도 27은 NKG2D-결합 도메인 (클론으로 열거됨)에 의한 마우스 NK 세포의 활성화를 제시하는 그래프이다.

도 28은 종양 세포에 대한 NKG2D-결합 도메인 (클론으로 열거됨)의 세포독성 효과를 제시하는 그래프이다.

도 29는 시차 주사 형광측정법에 의해 측정되는 NKG2D-결합 도메인 (클론으로 열거됨)의 용점을 제시하는 그래프이다.

프이다.

도 30은 다중-특이적 결합 단백질에 의한 인간 NK 세포의 증진된 활성화를 제시하는 그래프이다.

도 31은 다중-특이적 결합 단백질이 인간 NK 세포에 의해 종양 표적 세포에 대해 높은 수준의 세포독성을 유도하였음을 제시하는 그래프이다.

도 32는 다중-특이적 결합 단백질이 인간 NK 세포에 의해 종양 표적 세포에 대해 높은 수준의 세포독성을 유도하였음을 제시하는 그래프이다.

도 33은 다중-특이적 결합 단백질이 인간 NK 세포에 의해 종양 표적 세포에 대해 높은 수준의 세포독성을 유도하였음을 제시하는 그래프이다.

도 34는 다중-특이적 결합 단백질이 인간 NK 세포에 의해 종양 표적 세포에 대해 높은 수준의 세포독성을 유도하였음을 제시하는 그래프이다.

도 35는 다중-특이적 결합 단백질이 마우스 NK 세포에 의해 종양 표적 세포에 대해 높은 수준의 세포독성을 유도하였음을 제시하는 그래프이다.

도 36은 다중-특이적 결합 단백질이 마우스 NK 세포에 의해 종양 표적 세포에 대해 높은 수준의 세포독성을 유도하였음을 제시하는 그래프이다.

도 37은 EL4 세포 상에서 발현된 NKG2D에 대한 CD33-표적화 TriNKET의 결합 프로파일이다. 도 37은 CD33-결합 도메인이 제2 표적화 아암으로서 사용되었을 때 2가지 TriNKET의 결합을 제시한다.

도 38은 EL4 세포 상에서 발현된 NKG2D에 대한 HER2-표적화 TriNKET의 결합 프로파일이다. 도 38은 이제 HER2 제2 표적화 아암과 쌍을 형성한 동일한 2개의 NKG2D-결합 도메인을 제시한다.

도 39는 EL4 세포 상에서 발현된 NKG2D에 대한 BCMA-표적화 TriNKET의 결합 프로파일이다.

도 40은 EL4 세포 상에서 발현된 NKG2D에 결합하는 CD20-표적화 TriNKET의 히스토그램이다. 비염색 EL4 세포는 형광 신호에 대한 음성 대조군으로서 사용하였다. 비염색: 채워짐; CD20-TriNKET-F04: 실선; CD20-TriNKET-C26: 점선.

도 41은 MV4-11 인간 AML 세포 상에서 발현된 CD33에 대한 CD33-표적화 TriNKET의 결합 프로파일이다.

도 42는 인간 786-0 신세포 암종 세포 상에서 발현된 HER2에 대한 HER2-표적화 TriNKET의 결합 프로파일이다.

도 43은 MM.1S 인간 골수종 세포 상에서 발현된 BCMA에 대한 BCMA-표적화 TriNKET의 결합 프로파일이다.

도 44는 Raji 인간 림프종 세포 상에서 발현된 CD20에 결합하는 CD20-표적화 TriNKET의 히스토그램이다. 비염색 세포를 형광 신호에 대한 음성 대조군으로서 사용하였다. 비염색: 채워짐; CD20-TriNKET-F04: 실선; CD20-TriNKET-C26: 점선.

도 45a-45c는 CD16 및 NKG2D를 사용하여 NK 세포의 상승작용적 활성화의 막대 그래프이다. 도 45a는 CD107a의 수준을 입증하고; 도 45b는 IFN γ 의 수준을 입증하고; 도 45c는 CD107a 및 IFN γ 의 수준을 입증한다. 그래프는 평균 ($n = 2$) $\pm$ SD를 나타낸다. 데이터는 5명의 상이한 건강한 공여자를 이용하는 5회의 독립적인 실험을 대표한다.

도 46은 NKG2D 및 CD16을 표적화하는 TriNKET를 이용하여 NK 세포의 활성화를 제시하는 막대 그래프이다. 시험한 항체는 인간 IgG1 이소타입이었다. 그래프는 평균 ($n = 2$) $\pm$ SD를 나타낸다.

도 47a - 47c는 CD107a 탈가림화 및 IFN γ 시토카인 생산에서의 증가에 의해 나타나는 바와 같이 TriNKET 및 트라스투주맵이 HER2-양성 인간 종양 세포와의 공동-배양에서 일차 인간 NK 세포를 활성화시킬 수 있음을 입증하는 막대 그래프이다. 모노클로날 항체 트라스투주맵과 비교하면, 두 TriNKET 모두 다양한 인간 HER2 암 세포에 의해 인간 NK 세포의 우수한 활성화를 나타내었다. 도 47a는 인간 NK 세포가 SkBr-3 세포와 함께 배양될 때 TriNKET에 의해 활성화됨을 제시한다. 도 47b는 인간 NK 세포가 Colo201 세포와 함께 배양될 때 TriNKET에 의해 활성화됨을 제시한다. 도 47c는 인간 NK 세포가 HCC1954 세포와 함께 배양될 때 TriNKET에 의해 활성화됨을 제시한다.

도 48a - 48b는 CD33-발현 인간 AML 세포주 MV4-11과의 공동-배양에서 휴지된 또는 IL-2-활성화된 인간 NK 세포의 TriNKET-매개된 활성화를 입증하는 선 그래프이다. 도 48a는 휴지 인간 NK 세포의 TriNKET-매개된 활성화를

제시한다. 도 48b는 동일한 공여자로부터의 IL-2-활성화된 인간 NK 세포의 TriNKET-매개된 활성화를 제시한다.

도 49a - 49b는 IL-2-활성화된 및 휴지된 인간 NK 세포를 이용하여 세포독성 활성의 TriNKET 증진을 입증하는 그래프이다. 도 49a는 휴지된 인간 NK 세포에 의한 SkBr-3 종양 세포의 특이적 용해 백분율을 제시한다. 도 49b는 IL-2-활성화된 인간 NK 세포에 의한 SkBr-3 종양 세포의 특이적 용해 백분율을 제시한다.

도 50a-50b는 TriNKET가 트라스투주맵에 비해 HER2 중간 및 낮은 암에 대해 보다 양호한 이점을 제공한다는 것을 입증하는 그래프이다. 도 50a는 HER2 높은-SkBr-3 종양 세포의 활성화된 인간 NK 세포 사멸을 제시한다. 도 50b는 HER2 낮은-786-0 종양 세포의 인간 NK 세포 사멸을 제시한다. TriNKET는 낮은 HER2 발현을 갖는 암 세포에 대해 트라스투주맵에 비해 더 큰 이점을 제공한다.

도 51a - 51c는 3가지 인간 AML 세포주, Molm-13 세포주 (도 51a), Mv4-11 세포주 (도 51b), 및 THP-1 세포주 (도 51c)에 대한 높은-친화도 FcR γ I (CD64)의 발현을 제시하는 히스토그램이다.

도 52a-52b는 Molm-13 (도 52b) 또는 THP-1 (도 52a) 세포와의 공동-배양에서 인간 NK 세포의 모노클로날 항체 또는 TriNKET 매개된 활성화의 선 그래프이다.

도 53a - 53c는 표적으로서 3가지 인간 AML 세포주를 이용하는 인간 NK 세포독성 검정의 선 그래프이다. 도 53a는 CD64를 발현하지만 THP-1에 비해 낮은 수준으로 발현하는 Mv4-11 세포가 모노클로날 항-CD33에 의해 감소된 효능을 나타내었음을 제시한다. 도 53b는 CD33에 대한 모노클로날 항체가 CD64를 발현하지 않는 Molm-13 세포에 대해 양호한 효능을 나타냄을 입증한다. 도 53c는 THP-1 세포가 모노클로날 항-CD33 단독에 의해서는 효과를 나타내지 않았음을 입증한다. 도 53c에 나타난 선 그래프의 식별은 도 53a-53b의 선 그래프에도 적용가능하다.

도 54a & 54b는 건강한 공여자로부터의 B 세포가 TriNKET-매개된 용해에 민감함을 제시하는 막대 그래프이다.

도 54c & 54d는 골수 세포가 TriNKET-매개된 용해에 저항성을 제시하는 막대 그래프이다.

도 55는 장기간 공동-배양에서 SkBr-3 종양 세포의 TriNKET-매개된 hPBMC 사멸의 선 그래프이다.

도 56은 RMA/S-HER2 피하 SC2.2 효능의 연구 설계의 흐름도이다.

도 57은 SC2.2가 피하 RMA/S-HER2 종양 성장에 대해 효과가 없음을 제시하는 선 그래프이다.

도 58a - 58b는 mcFAE-C26.99 TriNKET에 의한 시험관내 결합을 제시하는 그래프이다. 4배 희석에 의해 60 μ g/mL의 지정된 항체를 2×10^5 B16F10 종양 세포 (도 58a) 또는 EL4-mNKG2D 세포 (도 58b)에 첨가하였다. 염소 항-마우스 PE 이차 항체를 이용하여 결합을 평가한 후에, 유동 세포측정 분석을 수행하였다.

도 59는 mcFAE-C26.99 TriNKET에 의해 매개된 증가된 NK 세포독성을 제시하는 그래프이다.

도 60a - 60b는 B16F10 s.c. 모델에서 mcFAE-C26.99 TriNKET의 항-종양 효능을 제시한다. 마우스를 150 μ g의 용량으로 주사되는 (도 60a) 이소타입 대조군 마우스 IgG2a mab C1.18.4 및 마우스 항-Tyrp-1 모노클로날 항체 또는 (도 60b) 이소타입 대조군 마우스 IgG2a mab C1.18.4 및 mcFAE-C26.99 TriNKET로 복강내로 처리하였다 (6, 8, 10, 12, 14, 16 및 21 일째). 종양 성장을 28 일 동안 평가하였다. 그래프는 개별 마우스의 종양 성장 곡선을 제시한다.

도 61a - 61b는 B16F10 i.v. 모델에서 mcFAE-C26.99 TriNKET의 항-종양 효능을 제시한다. 도 61a는 항체를 150- μ g 용량으로 투여할 때의 종양 부담을 나타낸다 (4, 6, 8, 11, 13, 15 일째). 도 61b는 항체를 150- μ g 용량으로 투여할 때의 종양 부담을 나타낸다 (7, 9, 11, 13, 15 일째). 종양 시도 18 일 후에, 마우스를 안락 사시키고, 표면 폐 전이를 평점하였다.

도 62는 인간 NK 세포가 CD20+ Raji 세포와 함께 배양될 때 TriNKET에 의해 활성화됨을 제시하는 막대 그래프이다.

도 63은 BCMA 양성 MM.1S 인간 골수종 세포와 함께 배양시 인간 NK 활성화를 제시하는 막대 그래프이다.

도 64는 TriNKET가 KMS12-PE 골수종 세포의 인간 NK 세포 용해를 증진시킴을 제시하는 그래프이다.

도 65는 상이한 NKG2D-결합 도메인을 갖는 BCMA-표적화 TriNKET가 KMS12-PE 골수종 세포의 인간 NK 세포 용해를 증진시킴을 제시하는 그래프이다.

도 66은 하나의 분자에서 삼중-특이적 결합이 최대 NK 세포 활성을 위해 중요함을 제시하는 선 그래프이다.

도 67은 Fc에 융합된, 표적 1에 결합하는 Fab 및 표적 2에 결합하는 scFab를 포함하는 Oasc-Fab 이중이량체성 구축물을 제시한다. 이중이량체화는 Fc에서의 돌연변이에 의해 보장된다.

도 68은 항원 1 및 2에 결합하는 2개의 상이한 Fab, 및 이중이량체화 돌연변이에 의해 안정화된 Fc를 함유하는 이중이량체성 구축물인 DuetMab이다. Fab 1 및 2는 정확한 LC 및 HC 쌍 형성을 보장하는 차별적인 S-S 브릿지를 함유한다.

도 69는 이중이량체화에 의해 안정화된 Fc에 융합된, 표적 1 및 2에 결합하는 2개의 상이한 Fab를 갖는 이중이량체성 구축물인 CrossmAb이다. CL 및 CH1 도메인 및 Vh 및 VL 도메인이 전환되고, 예를 들어 CH1은 VL과 일렬로 융합된 반면에, CL은 VH와 일렬로 융합된다.

도 70은 항원 2에 결합하는 Fab가 항원 1에 결합하는 Fab의 HC의 N 말단에 융합된 동종이량체성 구축물인 Fit-Ig이다. 상기 구축물은 야생형 Fc를 함유한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 본 발명은 암 세포 상의 종양-연관 항원에 결합하고, 천연 킬러 세포 상의 NKG2D 수용체 및 CD16 수용체에 결합하여 천연 킬러 세포를 활성화시키는 다중-특이적 결합 단백질, 이러한 다중-특이적 결합 단백질을 포함하는 제약 조성물, 및 이러한 다중-특이적 단백질 및 제약 조성물을 이용하는 치료 방법, 예컨대 암의 치료 방법을 제공한다. 본 발명의 다양한 측면은 섹션별로 하기에 설명되지만, 하나의 특별한 섹션에 기재된 본 발명의 측면이 임의의 다른 섹션으로 제한되지 않는다.
- [0019] 본 발명의 이해를 용이하게 하기 위해, 수많은 용어 및 문구가 하기에 정의된다.
- [0020] 본원에서 사용된 바와 같이, 단수형 용어는 "하나 이상"을 의미하고, 문맥상 부적절하지 않다면 복수형을 포함한다.
- [0021] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "항원-결합 부위"는 항원 결합에 참여하는 이뮤노글로불린 분자의 부분을 지칭한다. 인간 항체에서, 항원 결합 부위는 중쇄 ("H") 및 경쇄 ("L")의 N-말단 가변 ("V") 영역의 아미노산 잔기에 의해 형성된다. 중쇄 및 경쇄의 V 영역 내에 있는 3개의 고도로 분기한 스트레치는 "초가변 영역"으로 지칭되며, 이는 "프레임워크 영역" 또는 "FR"로 공지된 더욱 보존된 플랭킹 스트레치들 사이에 삽입되어 있다. 따라서, 용어 "FR"은 이뮤노글로불린에서 초가변 영역들 사이에서 그에 인접하여 천연적으로 발견되는 아미노산 서열을 지칭한다. 인간 항체 분자에서, 경쇄의 3개의 초가변 영역 및 중쇄의 3개의 초가변 영역은 서로에 대해 삼차원 공간으로 배치되어 항원-결합 표면을 형성한다. 항원-결합 표면은 결합된 항원의 삼차원 표면에 대해 상보성이고, 각각의 중쇄 및 경쇄의 3개의 초가변 영역은 "상보성-결정 영역" 또는 "CDR"로 지칭된다. 특정한 동물, 예컨대 낙타 및 연골 어류에서는, 항원-결합 부위가 단일 항체 쇄에 의해 형성되어, "단일 도메인 항체"를 제공한다. 항원-결합 부위는 무손상 항체로서, 항원-결합 표면을 보유하는 항체의 항원-결합 단편으로, 또는 단일 폴리펩티드에서 중쇄 가변 도메인을 경쇄 가변 도메인에 연결하기 위해 펩티드 링커를 사용하는 재조합 폴리펩티드, 예컨대 scFv로 존재할 수 있다.
- [0022] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "종양 연관 항원"은 암과 연관된 단백질, 당단백질, 강글리오시드, 탄수화물, 지질을 비롯하여 이로 제한되지 않는 임의의 항원을 의미한다. 이러한 항원은 악성 세포 상에서 또는 종양 미세환경에서, 예컨대 종양-연관 혈관, 세포외 매트릭스, 간염성 간질, 또는 면역 침윤물 상에서 발현될 수 있다.
- [0023] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "대상체" 및 "환자"는 본원에 기재된 방법 및 조성물에 의해 치료되는 유기체를 지칭한다. 이러한 유기체에는 바람직하게는 포유류 (예를 들어, 무린, 원숭이, 말, 소, 돼지, 개, 고양이 등)이 포함되고, 더욱 바람직하게는 인간이 포함된다.
- [0024] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "유효량"은 유익한 또는 원하는 결과를 달성하는데 충분한 화합물 (예를 들어, 본 발명의 화합물)의 양을 지칭한다. 유효량은 하나 이상의 투여, 적용 또는 용량으로 투여될 수 있고, 특정한 제형 또는 투여 경로로 제한되는 것으로 의도되지 않는다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "치료하는"은 상태, 질환, 장애 등을 개선시키는 임의의 효과, 예를 들어 줄이거나, 감소시키거나, 조절하거나, 완화시키거나, 제거하거나, 또는 이들의 증상을 완화시키는 것을 포함한다.
- [0025] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "제약 조성물"은 조성물이 생체내 또는 생체외에서 진단적 또는 치료적으로 사용하기에 특히 적합하게 만드는 불활성 또는 활성의 담체와 활성 작용제의 조합물을 지칭한다.

- [0026] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "제약상 허용가능한 담체"는 임의의 표준 제약 담체, 예컨대 인산염 완충된 식염수 용액, 물, 에멀전 (예를 들어, 오일/물 또는 물/오일 에멀전), 및 다양한 유형의 습윤제를 지칭한다. 조성물은 또한 안정화제 및 보존제를 포함할 수 있다. 담체, 안정화제 및 아주반트의 예에 대해서는, 예를 들어 문헌 [Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., Mack Publ. Co., Easton, PA [1975]]를 참고한다.
- [0027] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "제약상 허용가능한 염"은 대상체에게 투여시 본 발명의 화합물 또는 그의 활성 대사물 또는 잔기를 제공할 수 있는, 본 발명의 화합물의 임의의 제약상 허용가능한 염 (예를 들어, 산 또는 염기)을 지칭한다. 관련 기술분야의 기술자에게 공지된 바와 같이, 본 발명의 화합물의 "염"은 무기 또는 유기 산 및 염기로부터 유래될 수 있다. 예시적인 산에는 염산, 브로민화수소산, 황산, 질산, 과염소산, 푸마르산, 말레산, 인산, 글리콜산, 락트산, 살라실산, 숙신산, 톨루엔-p-술폰산, 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 메탄술폰산, 에탄술폰산, 포름산, 벤조산, 말론산, 나프탈렌-2-술폰산, 벤젠술폰산 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다. 다른 산, 예컨대 옥살산은 그 자체로는 제약상 허용가능하지 않지만, 본 발명의 화합물 및 그들의 제약상 허용가능한 산 부가 염을 수득하는데 있어서 중간체로서 유용한 염의 제조에서 사용될 수 있다.
- [0028] 예시적인 염기에는 알칼리 금속 (예를 들어, 나트륨) 수산화물, 알칼리토 금속 (예를 들어, 마그네슘) 수산화물, 암모니아, 및 화학식 NW_4^+ 의 화합물 (여기서 W는 C_{1-4} 알킬임) 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다.
- [0029] 예시적인 염에는 아세테이트, 아디페이트, 알기네이트, 아스파르테이트, 벤조에이트, 벤젠술포네이트, 비스페이트, 부티레이트, 시트레이트, 캄포레이트, 캄포르술포네이트, 시클로펜탄프로피오네이트, 디글루코네이트, 도테실술포네이트, 에탄술포네이트, 푸마레이트, 플루코헵타노에이트, 글리세로포스페이트, 헤미술포네이트, 헵타노에이트, 헥사노에이트, 히드로클로라이드, 히드로브로마이드, 히드로아이오다이드, 2-히드록시에탄술포네이트, 락테이트, 말레에이트, 메탄술포네이트, 2-나프탈렌술포네이트, 니코티네이트, 옥살레이트, 팔모에이트, 펙티네이트, 퍼슬레이트, 페닐프로피오네이트, 피크레이트, 피발레이트, 프로피오네이트, 숙시네이트, 타르트레이트, 티오시아네이트, 토실레이트, 운데카노에이트 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다. 염의 다른 예에는 적합한 양이온, 예컨대 Na^+ , NH_4^+ 및 NW_4^+ (여기서 W는 C_{1-4} 알킬 기임) 등과 배합된 본 발명의 화합물의 음이온이 포함된다.
- [0030] 치료적 용도의 경우, 본 발명의 화합물의 염은 제약상 허용가능한 것으로 고려된다. 그러나, 제약상 허용가능하지 않은 산 및 염기의 염 또한 예를 들어 제약상 허용가능한 화합물의 제조 또는 정제에 사용될 수 있다.
- [0031] 명세서에 걸쳐, 조성물이 특정한 성분을 갖거나, 수반하거나 또는 포함하는 것으로 기재되거나, 또는 공정 및 방법이 특정한 단계를 갖거나, 수반하거나 또는 포함하는 것으로 기재된 경우에는, 인용된 성분들로 본질적으로 이루어지거나 또는 그들로 이루어진 본 발명의 조성물이 있고, 인용된 가공 단계들로 본질적으로 이루어지거나 또는 그들로 이루어진 본 발명에 따른 공정 및 방법이 있는 것으로 추가로 고려된다.
- [0032] 일반적으로, 백분율을 특징하는 조성은 달리 명시하지 않는다면 중량을 기준으로 한다. 추가로, 변수에 대한 정의가 수반되지 않는다면, 상기 변수의 이전의 정의가 적용된다.
- [0033] **I. 단백질**
- [0034] 본 발명은 암 세포 상의 종양-연관 항원에 결합하고, 천연 킬러 세포 상의 NKG2D 수용체 및 CD16 수용체에 결합하여 천연 킬러 세포를 활성화시키는 다중-특이적 결합 단백질을 제공한다. 다중-특이적 결합 단백질은 본원에 기재된 제약 조성물 및 치료 방법에서 유용하다. 천연 킬러 세포 상의 NKG2D 수용체 및 CD16 수용체에 대한 다중-특이적 결합 단백질의 결합은 암 세포의 파괴에 대한 천연 킬러 세포의 활성을 증진시킨다. 암 세포 상의 종양-연관 항원에 대한 다중-특이적 결합 단백질의 결합은 암 세포가 천연 킬러 세포에 근접하게 만들고, 이는 천연 킬러 세포에 의한 암 세포의 직접적인 및 간접적인 파괴를 용이하게 한다. 예시적인 다중-특이적 결합 단백질에 대한 추가의 기재가 하기에 제공된다.
- [0035] 다중-특이적 결합 단백질의 제1 성분은 NKG2D 수용체-발현 세포에 결합하며, 상기 세포에는 NK 세포, $\gamma \delta$ T 세포 및 $CD8^+ \alpha \beta$ T 세포가 포함될 수 있으나 이로 제한되지 않는다. NKG2D-결합시, 다중-특이적 결합 단백질은 천연 리간드, 예컨대 ULBP6 및 MICA가 NKG2D에 결합하는 것을 차단할 수 있다.
- [0036] 다중-특이적 결합 단백질의 제2 성분은 하나 이상의 종양-연관 항원에 결합하며, 상기 항원에는 HER2, CD20, CD33, BCMA, EpCAM, CD2, CD19, CD30, CD38, CD40, CD52, CD70, EGFR/ERBB1, IGF1R, HER3/ERBB3, HER4/ERBB4,

MUC1, cMET, SLAMF7, PSCA, MICA, MICB, TRAILR1, TRAILR2, MAGE-A3, B7.1, B7.2, CTLA4, 및 PD1이 포함될 수 있으나 이로 제한되지 않는다.

[0037] 다중-특이적 결합 단백질의 제3 성분은 백혈구의 표면 상의 Fc 수용체인 CD16을 발현하는 세포, 예컨대 천연 킬러 세포, 대식세포, 호중구, 호산구, 거대 세포, 및 여포성 수지상 세포에 결합한다.

[0038] 다중-특이적 결합 단백질은 하기 예시에 제시되지만 이로 제한되지 않는 몇몇 포맷을 가질 수 있다. 한 포맷은 제1 이뮤노글로불린 중쇄, 제2 이뮤노글로불린 중쇄 및 이뮤노글로불린 경쇄를 포함하는 이중이량체성 다중-특이적 항체이다. 제1 이뮤노글로불린 중쇄는 제1 Fc (힌지-CH2-CH3) 도메인, 제1 가변 중쇄 도메인 및 임의적인 제1 CH1 중쇄 도메인을 포함한다. 이뮤노글로불린 경쇄는 가변 경쇄 도메인 및 불변 경쇄 도메인을 포함하며; 제1 이뮤노글로불린 중쇄와 함께, 이뮤노글로불린 경쇄는 NKG2D에 결합하는 항원-결합 부위를 형성한다. 제2 이뮤노글로불린 중쇄는 제2 Fc (힌지-CH2-CH3) 도메인, 제2 가변 중쇄 도메인 및 제2 임의적인 CH1 중쇄 도메인을 포함하며, 제1 이뮤노글로불린 중쇄와 쌍을 형성한 것과 동일한 이뮤노글로불린 경쇄와 쌍을 형성할 수 있으나, 이뮤노글로불린 경쇄가 제2 이뮤노글로불린 중쇄와 쌍을 형성하면, 생성된 항원 결합 부위는 종양 항원에 결합한다. 제1 Fc 도메인 및 제2 Fc 도메인은 함께 CD16에 결합할 수 있다 (도 1).

[0039] 또 다른 예시적인 포맷은 제1 이뮤노글로불린 중쇄, 이뮤노글로불린 경쇄 및 제2 이뮤노글로불린 중쇄를 포함하는 이중이량체성 다중-특이적 항체와 관련이 있다. 제1 이뮤노글로불린 중쇄는 NKG2D에 결합하는 단일쇄 Fv (scFv)에 링커 또는 항체 힌지를 통해 융합된 제1 Fc (힌지-CH2-CH3) 도메인을 포함한다. 다양한 링커가 scFv와 제1 Fc 도메인을 연결하거나 또는 scFv 자체 내에서 연결할 수 있다. 또한, scFv는 전반적인 scFv 구조를 안정화시키기 위해 디설피드 결합의 형성을 가능하게 하는 돌연변이를 도입할 수 있다. scFv는 또한 전반적인 제1 이뮤노글로불린 중쇄의 등전점을 변경시키고/거나 더욱 용이한 하류 정제를 가능하게 하기 위해 돌연변이를 도입할 수 있다. 제2 이뮤노글로불린 중쇄는 제2 Fc (힌지-CH2-CH3) 도메인 및 제2 가변 중쇄 도메인 및 제2 임의적인 CH1 중쇄 도메인을 포함한다. 이뮤노글로불린 경쇄는 가변 경쇄 도메인 및 불변 경쇄 도메인을 포함한다. 제2 이뮤노글로불린 중쇄는 이뮤노글로불린 경쇄와 쌍을 형성하고, 종양 항원에 결합한다. 제1 Fc 도메인 및 제2 Fc 도메인은 함께 CD16에 결합할 수 있다 (도 2).

[0040] 이중이량체성 다중-특이적 단백질의 대안적인 포맷은 제1 이뮤노글로불린 중쇄, 제2 이뮤노글로불린 중쇄, 제1 이뮤노글로불린 경쇄 및 제2 이뮤노글로불린 경쇄를 포함한다. 제1 이뮤노글로불린 중쇄는 제1 Fc (힌지-CH2-CH3) 도메인, 제1 가변 중쇄 도메인 및 임의적인 제1 CH1 중쇄 도메인을 포함한다. 제1 이뮤노글로불린 경쇄는 가변 경쇄 도메인 및 불변 경쇄 도메인을 포함한다. 제1 이뮤노글로불린 중쇄와 함께, 제1 이뮤노글로불린 경쇄는 종양 항원에 결합하는 항원-결합 부위를 형성한다. 제2 이뮤노글로불린 중쇄는 제2 Fc (힌지-CH2-CH3) 도메인, 제2 가변 중쇄 도메인 및 제2 임의적인 CH1 중쇄 도메인을 포함한다. 제2 이뮤노글로불린 경쇄는 가변 경쇄 도메인 및 불변 경쇄 도메인을 포함한다. 제2 이뮤노글로불린 중쇄와 함께, 이뮤노글로불린 경쇄는 동일한 종양 항원에 결합하는 항원-결합 부위를 형성한다. 제2 이뮤노글로불린 중쇄는 제1 이뮤노글로불린 중쇄와 쌍을 형성하는 이뮤노글로불린 경쇄와 동일할 수 있는 이뮤노글로불린 경쇄와 쌍을 형성할 수 있으나, 이뮤노글로불린 경쇄가 제2 이뮤노글로불린 중쇄와 쌍을 형성하면, 생성된 항원 결합 부위는 종양 항원에 결합하는 제2 항원-결합 부위이다. 특정 실시양태에서, 제1 Fc 도메인 및 제2 Fc 도메인은 함께 CD16에 결합할 수 있다 (도 1).

[0041] 하나 이상의 추가의 결합 모티프가 임의적으로 링커 서열을 통해 불변 영역 CH3 도메인의 C-말단에 융합될 수 있다. 특정 실시양태에서, 항원-결합 부위는 단일-쇄 또는 디설피드-안정화된 가변 영역 (ScFv)일 수 있거나, 또는 4가 또는 3가 분자를 형성할 수 있다.

[0042] 일부 실시양태에서, 다중-특이적 결합 단백질은 트리옴프 형태를 갖고, 이는 IgG-유사 형태를 유지하는 삼관능성의 이중특이적 항체이다. 이 키메라는 2가지 모 항체로부터 유래된 2개의 절반 항체로 이루어지며, 이들 각각은 1개의 경쇄 및 1개의 중쇄를 갖는다.

[0043] 일부 실시양태에서, 다중-특이적 결합 단백질은 낚-인투-홀 (KIH) 기술과 관련이 있는 KIH 공통 경쇄 (LC) 형태를 갖는다. KIH는 C_H3 도메인이 각각의 중쇄에서 "낚" 또는 "홀"을 생성하도록 조작하여 이중이량체화를 촉진하는 것과 관련이 있다. "낚-인투-홀 (KIH)" Fc 기술에 대한 개념은, 소형 잔기를 벌크 잔기로 치환시킴으로써 (즉, EU 넘버링에서 T366W_{CH3A}) 1개의 CH3 도메인 (CH3A)에 "낚"을 도입시키는 것이었다. "낚"을 수용하기 위해, 낚에 가장 가까운 이웃 잔기를 더 작은 잔기로 교체함으로써 (즉, T366S/L368A/Y407V_{CH3B}) 다른 CH3 도메인 (CH3B) 상에 상보적인 "홀" 표면이 생성되었다. "홀" 돌연변이는 구조화된-가이드된 파지 라이브러리 스크

리닝에 의해 최적화되었다 (Atwell S, Ridgway JB, Wells JA, Carter P. Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library. *J Mol Biol* (1997) 270(1):26-35). KiH Fc 변이체의 X-선 결정 구조 (Elliott JM, Ultsch M, Lee J, Tong R, Takeda K, Spiess C, *et al.*, Antiparallel conformation of knob and hole aglycosylated half-antibody homodimers is mediated by a CH2-CH3 hydrophobic interaction. *J Mol Biol* (2014) 426(9):1947-57; Mimoto F, Kadono S, Katada H, Igawa T, Kamikawa T, Hattori K. Crystal structure of a novel asymmetrically engineered Fc variant with improved affinity for FcγR3s. *Mol Immunol* (2014) 58(1):132-8)는, CH3 도메인 코어 계면 사이에서 입체적 상보성에 의해 유도된 소수성 상호작용에 의해 이중이량체화가 열역학적으로 선호되는 반면에, 좁-좁 및 홀-홀 계면은 각각 입체 장애 및 유리한 상호작용 방해로 인해 동종이량체를 선호하지 않는다.

[0044] 일부 실시양태에서, 다중-특이적 결합 단백질은 이중-가변 도메인 이뮤노글로불린 (DVD-Ig™) 형태를 가지며, 이는 2개의 모노클로날 항체의 표적 결합 도메인을 가요성 천연 발생 링커를 통해 조합하고, 4가 IgG-유사 분자를 생성한다.

[0045] 일부 실시양태에서, 다중-특이적 결합 단백질은 직교 Fab 계면 (Ortho-Fab) 형태를 갖는다. ortho-Fab IgG 접근법에서 (Lewis SM, Wu X, Pustilnik A, Sereno A, Huang F, Rick HL, *et al.* Generation of bispecific IgG antibodies by structure-based design of an orthogonal Fab interface. *Nat. Biotechnol.* (2014) 32(2):191-8), 구조-기반 영역별 설계는 1개의 Fab에서만 LC 및 HC_{VH-CH1} 계면에서 상보성 돌연변이를 도입하고, 다른 Fab에서는 어떠한 변화도 주지 않는다.

[0046] 일부 실시양태에서, 다중-특이적 결합 단백질은 2 in1Ig 포맷을 갖는다. 일부 실시양태에서, 다중-특이적 결합 단백질은 ES 형태를 가지며, 이는 Fc에 융합된, 표적 1 및 표적 2에 결합하는 2개의 상이한 Fab를 함유하는 이중이량체성 구축물이다. 이중이량체화는 Fc에서 정전기적 조정 돌연변이에 의해 보장된다. 일부 실시양태에서, 다중-특이적 결합 단백질은 κλ-바디 형태를 가지며, 이는 이중이량체화 돌연변이에 의해 안정화된 Fc에 융합된 2개의 상이한 Fab를 갖는 이중이량체성 구축물이고: 항원 1을 표적으로 하는 Fab1은 카파 LC를 함유하는 반면에, 항원 2를 표적으로 하는 제2 Fab는 람다 LC를 함유한다. 도 13a는 κλ-바디의 한 형태의 예시적인 대표도이고; 도 13b는 또 다른 κλ-바디의 예시적인 대표도이다.

[0047] 일부 실시양태에서, 다중-특이적 결합 단백질은 Fab 아암 교환 형태 (중쇄 및 부착된 경쇄 (절반-분자)를 또 다른 분자로부터의 중쇄-경쇄 쌍과 교체함으로써 Fab 아암을 교환하여 이중특이적 항체를 생성하는 항체)를 갖는다. 일부 실시양태에서, 다중-특이적 결합 단백질은 SEED 바디 형태를 갖는다. 가닥-교환 조작된 도메인 (SEED) 플랫폼은 비대칭의 이중특이적 항체-유사 분자를 생성하도록 설계되었으며, 이는 천연 항체의 치료적 적용을 확장시키는 능력을 갖는다. 이 단백질 조작된 플랫폼은 보존된 CH3 도메인 내의 이뮤노글로불린의 구조적으로 관련된 서열의 교환을 기반으로 한다. SEED 설계는 AG/GA 이중이량체의 효율적인 생성을 가능하게 하는 반면에, AG 및 GA SEED CH3 도메인의 동종이량체는 선호하지 않는다. (Muda M. *et al.*, *Protein Eng. Des. Sel.* (2011, 24(5):447-54)). 일부 실시양태에서, 다중-특이적 결합 단백질은 LuZ-Y 형태를 가지며, 여기서 류신 지퍼를 사용하여 2개의 상이한 HC의 이중이량체화를 유도한다. (Wranik, BJ. *et al.*, *J. Biol. Chem.* (2012), 287:43331-9).

[0048] 일부 실시양태에서, 다중-특이적 결합 단백질은 Cov-X-바디 형태를 갖는다. 이중특이적 CovX-바디에서, 2개의 상이한 펩티드가 분지형 아제티딘 링커를 이용하여 함께 결합하고, 부위-특이적인 방식으로 온화한 조건하에 스캐폴드 항체에 융합된다. 약물작용발생단은 기능적 활성을 담당하는 반면에, 항체 스캐폴드는 긴 반감기 및 Ig-유사 분포를 부여한다. 약물작용발생단은 화학적으로 최적화될 수 있거나 또는 다른 약물작용발생단과 교체되어, 최적화되거나 또는 독특한 이중특이적 항체를 생성할 수 있다. (Doppalapudi VR *et al.*, *PNAS* (2010), 107(52):22611-22616).

[0049] 일부 실시양태에서, 다중-특이적 결합 단백질은 Fc에 융합된, 표적 1에 결합하는 Fab 및 표적 2에 결합하는 scFab를 포함하는 Oasc-Fab 이중이량체성 형태를 갖는다. 이중이량체화는 Fc에서의 돌연변이에 의해 보장된다.

[0050] 일부 실시양태에서, 다중-특이적 결합 단백질은 DuetMab 형태를 가지며, 이는 항원 1 및 2에 결합하는 2개의 상이한 Fab, 및 이중이량체화 돌연변이에 의해 안정화된 Fc를 포함하는 이중이량체성 구축물이다. Fab 1 및 2는 정확한 LC 및 HC 쌍 형성을 보장하는 차별적인 S-S 브릿지를 함유한다.

[0051] 일부 실시양태에서, 다중-특이적 결합 단백질은 CrossmAb 형태를 가지며, 이는 이중이량체화에 의해 안정화된 Fc에 융합된, 표적 1 및 2에 결합하는 2개의 상이한 Fab를 갖는 이중이량체성 구축물이다. CL 및 CH1 도메인

및 VH 및 VL 도메인이 전환되고, 예를 들어 CH1은 VL과 일렬로 융합된 반면에, CL은 VH와 일렬로 융합된다.

[0052] 일부 실시양태에서, 다중-특이적 결합 단백질은 Fit-Ig 형태를 가지며, 이는 항원 2에 결합하는 Fab가 항원 1에 결합하는 Fab의 HC의 N 말단에 융합된 동종이량체성 구조물이다. 상기 구조물은 야생형 Fc를 함유한다.

[0053] 표 1은 조합되어 NKG2D에 결합할 수 있는 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인의 펩티드 서열을 열거한다.

표 1		
클론	중쇄 가변 영역 아미노산 서열	경쇄 가변 영역 아미노산 서열
ADI-27705	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQYNSYPI TFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:2)
ADI-27724	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:3)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRA SQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRL IYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFT LTISRLEPEDFAVYYCQYQGSSPIT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:4)
ADI-27740 (A40)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:5)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICR ASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQYHSFYT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:6)
ADI-27741	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:7)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICR ASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQSNSYYT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:8)
ADI-27743	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL

[0054]

	DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:9)	IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQYNSYPT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:10)
ADI-28153	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW GFDPWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:11)	ELQMTQSPSSLSASVGDRVITICR TSQSISSYLNWYQQKPGQPPKLLI YWASTRESGVPRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDSATYYCQQSYDIPY TFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:12)
ADI-28226 (C26)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:13)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQYGSFPIT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:14)
ADI-28154	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:15)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTDF LTISSLQPDDFATYYCQQSKEVPW TFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:16)
ADI-29399	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:17)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQYNSFPT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:18)
ADI-29401	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGT LVTVSS	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICR ASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQYDIYPT FGGGTKVEIK

[0055]

	(SEQ ID NO:19)	(SEQ ID NO:20)
ADI-29403	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTVISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:21)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCR ASQISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQYDSYPT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:22)
ADI-29405	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTVISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:23)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCR ASQISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQYGSFPT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:24)
ADI-29407	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTVISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:25)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCR ASQISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQYQSFT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:26)
ADI-29419	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTVISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:27)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCR ASQISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQYSSFSTF GGGKVEIK (SEQ ID NO:28)
ADI-29421	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTVISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:29)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCR ASQISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQYESYST FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:30)
ADI-29424	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCR ASQISSWLAWYQQKPGKAPKLL

[0056]

	DHSGSTNYNPSLKSRTVISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:31)	IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQYDSFIF GGGTKVEIK (SEQ ID NO:32)
ADI-29425	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTVISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:33)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQYQSYPT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:34)
ADI-29426	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTVISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:35)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICR ASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQYHSFPT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:36)
ADI-29429	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTVISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:37)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICR ASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQYELYSY TFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:38)
ADI-29447 (F47)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTVISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:39)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQYDTFIF GGGTKVEIK (SEQ ID NO:40)
ADI-27727	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKAS GGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGG IPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTS TAYMELSSLRSEDVAVYYCARGDSSI RHAYYYYGMDVWGQGTITVTVSS	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCK SSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKP GQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC QQYYSTPITFGGGTKVEIK

[0057]

	(SEQ ID NO:41)	(SEQ ID NO:42)
ADI-29443 (F43)	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSG GSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSI YYSGSTYYNPSLKSRTVISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARGSDRF HPYFDYWGGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:43)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA SQSVSRYLAWYQQKPGQAPRLLI YDASNRATGIPARFSGSGSGTDFT LTISSLEPEDFAVYYCQQFDTWPP TFGGGKVEIK (SEQ ID NO:44)
ADI-27744 (A44)	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASG FTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAI SGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGG YYDSGAGDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:45) CDR1 (SEQ ID NO:51) - FTFSSYAMS CDR2 (SEQ ID NO:52) - AISGSGGSTYYADSVKG CDR3 (SEQ ID NO:53) - AKDGGYYDSGAGDY	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCR ASQGIDSWLAWYQQKPGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQGVSY PRTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:46) CDR1 (SEQ ID NO:54) - RASQGIDSWLA CDR2 (SEQ ID NO:55) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:56) - QQGVSYPR
ADI-27749 (A49)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSS ISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAP MGAAAGWFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:47) CDR1 (SEQ ID NO:57) - FTFSSYSMN CDR2 (SEQ ID NO:58) - SISSSSYIYYADSVKG CDR3 (SEQ ID NO:59) - ARGAPMGAAAGWFD	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCR ASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQGVSP RTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:48) CDR1 (SEQ ID NO:60) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:61) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:62) - QQGVSPRT

[0058]

ADI-29463 (F63)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTGYMHWRQAPGQGLEWM GWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTR DTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR DTGEYYDTDDHGMDVWGQGTITVTV SS (SEQ ID NO:49) CDR1 (SEQ ID NO:63) - YTFTGYMH CDR2 (SEQ ID NO:64) - WINPNSGGTNYAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO:65) - ARDTGEYYDTDDHGMDV	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRA SQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLI YGASTRATGIPARFSGSGSGTEFT LTISSLQSEDFAVYYCQDDYWP PTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:50) CDR1 (SEQ ID NO:66) - RASQSVSSNLA CDR2 (SEQ ID NO:67) - GASTRAT CDR3 (SEQ ID NO:68) - QDDYWPPT
ADI-29404 (F04)	QVQLQWVGAGLLKPSETLSLTCVY GGFSFGYYWSWIRPPGKLEWIGEI DHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO:78)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDFFATYYCEQYDSYPT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:79)
ADI-28200	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGG IIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCARRGRK ASGSFYYYGMDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO:80)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCE SSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPG QPPKPLIYWASTRESGVPDFSGS GSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ NDYSYPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:81)

[0059]

[0060]

대안적으로, US 9,273,136에 기재된 바와 같이, SEQ ID NO:69로 정의되는 중쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO:70으로 정의되는 경쇄 가변 도메인과 쌍을 형성하여, NKG2D에 결합할 수 있는 항원-결합 부위를 형성할 수 있다.

SEQ ID NO:69

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIRYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGLGDGTYFDYW
GQGTTVTVSS

SEQ ID NO:70

QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGKAPKLLIYYDDLPSG
VSDRFSGSKSGTSAFLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVL

[0061]

[0062]

대안적으로, US 7,879,985에 기재된 바와 같이, SEQ ID NO:71로 정의되는 중쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO:72로 정의된 경쇄 가변 도메인과 쌍을 형성하여, NKG2D에 결합할 수 있는 항원-결합 부위를 형성할 수 있다.

SEQ ID NO:71

QVHLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSDDSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGHISYSGSAN
YNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCANWDDAFNIWGQGTMTVTS
S

SEQ ID NO:72

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI
PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK

[0063]

[0064]

Fc 도메인 내에서, CD16 결합은 힌지 영역 및 CH2 도메인에 의해 매개된다. 예를 들어, 인간 IgG1 내에서, CD16과의 상호작용은 주로 CH2 도메인에 있는 아미노산 잔기 Asp 265 - Glu 269, Asn 297 - Thr 299, Ala 327 - Ile 332, Leu 234 - Ser 239, 및 탄수화물 잔기 N-아세틸-D-글루코사민에 집중된다 (문헌 [Sondermann *et al.*, Nature, 406(6793):267-273] 참고). 공지된 도메인을 기준으로 하여, 돌연변이는 예컨대 파지-디스플레이된 라이브러리 또는 효모 표면-디스플레이된 cDNA 라이브러리를 이용함으로써 CD16에 대한 결합 친화도를 증진시키거나 감소시키기 위해 선택될 수 있거나, 또는 상호작용의 공지된 삼차원 구조를 기준으로 하여 고안될 수 있다.

[0065]

이종이량체성 항체 중쇄의 조립체는 동일한 세포에서 2개의 상이한 항체 중쇄 서열을 발현시킴으로써 달성될 수 있고, 이는 각각의 항체 중쇄의 동종이량체의 조립체, 뿐만 아니라 이종이량체의 조립체를 유도할 수 있다. 이종이량체의 바람직한 조립체의 촉진은 US13/494870, US16/028850, US11/533709, US12/875015, US13/289934, US14/773418, US12/811207, US13/866756, US14/647480, US14/830336에서 제시된 바와 같이 각각의 항체 중쇄 불변 영역의 CH3 도메인에서 상이한 돌연변이를 도입시킴으로써 달성될 수 있다. 예를 들어, 돌연변이는 인간 IgG1을 기준으로 CH3 도메인에서 이루어질 수 있고, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드 내에서 아미노산 치환의 구별되는 쌍의 도입은 이들 2개의 쇠가 서로 선택적으로 이종이량체화하는 것을 가능하게 한다. 하기 기재된 아미노산 치환의 위치는 모두 카바트(Kabat)에서와 같이 EU 인덱스에 따라 넘버링된다.

[0066]

한 시나리오에서, 제1 폴리펩티드에서의 아미노산 치환은 원래의 아미노산을 아르기닌 (R), 페닐알라닌 (F), 티로신 (Y) 또는 트립토판 (W)으로부터 선택된 더 큰 아미노산으로 교체하고, 제2 폴리펩티드에서의 적어도 1개의 아미노산 치환은 원래의 아미노산(들)을 알라닌 (A), 세린 (S), 트레오닌 (T) 또는 발린 (V)으로부터 선택된 더 작은 아미노산(들)로 교체하고, 이로써 더 큰 아미노산 치환 (용기부)이 더 작은 아미노산 치환 (공동)에 들어 맞는다. 예를 들어, 한 폴리펩티드는 T366W 치환을 도입할 수 있고, 다른 것은 T366S, L368A 및 Y407V를 비롯한 3개의 치환을 도입할 수 있다.

[0067]

본 발명의 항체 중쇄 가변 도메인은 임의적으로 항체 불변 영역, 예컨대 CH1 도메인이 있거나 없이 힌지, CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 IgG 불변 영역과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열에 커풀링될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 불변 영역의 아미노산 서열은 인간 항체 불변 영역, 예컨대 인간 IgG1 불변 영역, IgG2 불변 영역, IgG3 불변 영역, 또는 IgG4 불변 영역과 적어도 90% 동일하다. 일부 다른 실시양태에서, 상기 불변 영역의 아미노산 서열은 또 다른 포유류, 예컨대 토끼, 개, 고양이, 마우스 또는 말로부터의 항체 불변 영역과 적어도 90% 동일하다. 인간 IgG1 불변 영역에 비해 하나 이상의 돌연변이를 불변 영역에, 예를 들어 Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 및/또는 K439에서 도입할 수 있다. 예시적인 치환에는 예를 들어 Q347E, Q347R, Y349S, Y349K, Y349T, Y349D, Y349E, Y349C, T350V, L351K, L351D, L351Y, S354C, E356K, E357Q, E357L, E357W, K360E, K360W, Q362E, S364K, S364E, S364H, S364D, T366V, T366I, T366L, T366M, T366K, T366W, T366S, L368E, L368A, L368D, K370S, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, K392F, K392D, K392E, T394F, T394W, D399R, D399K, D399V, S400K, S400R, D401K, F405A, F405T, Y407A, Y407I, Y407V, K409F, K409W, K409D, T411D, T411E, K439D, 및 K439E가 포함된다.

[0068]

특정 실시양태에서, 인간 IgG1 불변 영역의 CH1에 도입될 수 있는 돌연변이는 아미노산 V125, F126, P127, T135, T139, A140, F170, P171 및/또는 V173에 있을 수 있다. 특정 실시양태에서, 인간 IgG1 불변 영역의 C_κ에 도입될 수 있는 돌연변이는 아미노산 E123, F116, S176, V163, S174 및/또는 T164에 있을 수 있다.

[0069] 대안적으로, 아미노산 치환은 표 2에 나타낸 하기 치환 세트로부터 선택될 수 있다.

표 2		
	제1 폴리펩티드	제2 폴리펩티드
세트 1	S364E/F405A	Y349K/T394F
세트 2	S364H/D401K	Y349T/T411E
세트 3	S364H/T394F	Y349T/F405A
세트 4	S364E/T394F	Y349K/F405A
세트 5	S364E/T411E	Y349K/D401K
세트 6	S364D/T394F	Y349K/F405A
세트 7	S364H/F405A	Y349T/T394F
세트 8	S364K/E357Q	L368D/K370S
세트 9	L368D/K370S	S364K
세트 10	L368E/K370S	S364K
세트 11	K360E/Q362E	D401K
세트 12	L368D/K370S	S364K/E357L
세트 13	K370S	S364K/E357Q
세트 14	F405L	K409R
세트 15	K409R	F405L

[0070]

[0071] 대안적으로, 아미노산 치환은 표 3에 나타낸 하기 치환 세트로부터 선택될 수 있다.

표 3		
	제1 폴리펩티드	제2 폴리펩티드
세트 1	K409W	D399V/F405T
세트 2	Y349S	E357W
세트 3	K360E	Q347R
세트 4	K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
세트 5	Q347E/K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
세트 6	Y349S/K409W	E357W/D399V/F405T

[0072]

[0073] 대안적으로, 아미노산 치환은 표 4에 나타난 하기 치환 세트로부터 선택될 수 있다.

표 4		
	제1 폴리펩티드	제2 폴리펩티드
세트 1	T366K/L351K	L351D/L368E
세트 2	T366K/L351K	L351D/Y349E
세트 3	T366K/L351K	L351D/Y349D
세트 4	T366K/L351K	L351D/Y349E/L368E
세트 5	T366K/L351K	L351D/Y349D/L368E
세트 6	E356K/D399K	K392D/K409D

[0074]

[0075] 대안적으로, 각각의 폴리펩티드 쇠에서 적어도 1개의 아미노산 치환은 표 5로부터 선택될 수 있다.

표 5	
제1 폴리펩티드	제2 폴리펩티드
L351Y, D399R, D399K, S400K, S400R, Y407A, Y407I, Y407V	T366V, T366I, T366L, T366M, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, K392F K392D, K392E, K409F, K409W, T411D 및 T411E

[0076]

[0077] 대안적으로, 적어도 1개의 아미노산 치환은 표 6에 나타난 하기 치환 세트로부터 선택될 수 있으며, 제1 폴리펩티드 컬럼에서 나타난 위치(들)은 임의의 공지된 음으로 하전된 아미노산으로 교체되고, 제2 폴리펩티드 컬럼에서 나타난 위치(들)은 임의의 공지된 양으로 하전된 아미노산으로 교체된다.

표 6	
제1 폴리펩티드	제2 폴리펩티드
K392, K370, K409, 또는 K439	D399, E356, 또는 E357

[0078]

[0079] 대안적으로, 적어도 1개의 아미노산 치환은 표 7에 나타난 하기 치환 세트로부터 선택될 수 있으며, 제1 폴리펩티드 컬럼에서 나타난 위치(들)은 임의의 공지된 양으로 하전된 아미노산으로 교체되고, 제2 폴리펩티드 컬럼에서 나타난 위치(들)은 임의의 공지된 음으로 하전된 아미노산으로 교체된다.

표 7	
제1 폴리펩티드	제2 폴리펩티드
D399, E356, 또는 E357	K409, K439, K370, 또는 K392

[0080]

[0081] 대안적으로, 아미노산 치환은 표 8에 나타난 하기 치환 세트로부터 선택될 수 있다.

표 8	
제1 폴리펩티드	제2 폴리펩티드
T350V, L351Y, F405A, 및 Y407V	T350V, T366L, K392L, 및 T394W

[0082]

- [0083] 대안적으로 또는 추가로, 이중다량체 단백질의 구조적 안정성은 제1 또는 제2 폴리펩티드 쇄에 S354C 및 반대쪽 폴리펩티드 쇄에 Y349C를 도입함으로써 증가될 수 있고, 이는 2개의 폴리펩티드의 계면 내에서 인공적인 디설파이드 브릿지를 형성한다.
- [0084] 상기 기재된 다중-특이적 단백질은 관련 기술분야의 기술자에게 널리 공지된 재조합 DNA 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 제1 이뮤노글로불린 중쇄를 코딩하는 제1 핵산 서열을 제1 발현 벡터에 클로닝할 수 있고; 제2 이뮤노글로불린 중쇄를 코딩하는 제2 핵산 서열을 제2 발현 벡터에 클로닝할 수 있고; 이뮤노글로불린 경쇄를 코딩하는 제3 핵산 서열을 제3 발현 벡터에 클로닝할 수 있고; 제1, 제2 및 제3 발현 벡터를 함께 숙주 세포에 안정하게 형질감염시켜, 다량체 단백질을 생성할 수 있다.
- [0085] 다중-특이적 단백질의 최고 수율을 달성하기 위해, 제1, 제2 및 제3 발현 벡터의 상이한 비를 연구하여 숙주 세포로의 형질감염을 위해 최적의 비를 결정할 수 있다. 형질감염 이후, 세포 은행을 생성하기 위해 관련 기술분야에 공지된 방법, 예컨대 제한된 희석, ELISA, FACS, 현미경 검사 또는 클론펙스(Clonepix)를 이용하여 단일 클론을 단리할 수 있다.
- [0086] 클론을 생물 반응기 규모 증가에 적합한 조건하에 배양하고, 다중-특이적 단백질의 발현을 유지할 수 있다. 다중-특이적 단백질을 관련 기술분야에 공지된 방법, 예컨대 원심분리, 심층 여과, 세포 용해, 균질화, 냉동-해동, 친화도 정제, 겔 여과, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 교환 크로마토그래피, 및 혼합-방식 크로마토그래피를 이용하여 단리하고 정제할 수 있다.
- [0087] **II. TriNKET의 특징**
- [0088] 특정 실시양태에서, NKG2D-결합 도메인 및 종양 연관 항원에 대한 결합 도메인을 포함하는 본원에 기재된 TriNKET는 인간 NKG2D를 발현하는 세포에 결합한다. 특정 실시양태에서, NKG2D-결합 도메인 및 종양 연관 항원에 대한 결합 도메인을 포함하는 TriNKET는 동일한 종양 연관 항원-결합 도메인을 갖는 모노클로날 항체에 필적하는 수준으로 종양 연관 항원에 결합한다. 예를 들어, NKG2D-결합 도메인 및 트라스투주맵으로부터의 HER2-결합 도메인을 포함하는 TriNKET는 트라스투주맵에 필적하는 수준으로 세포 상에서 발현된 HER2에 결합할 수 있다.
- [0089] 그러나, 본원에 기재된 TriNKET는 종양 성장을 감소시키고 암 세포를 사멸시키는데 더욱 효과적이다. 예를 들어, HER2 발현 종양/암 세포를 표적으로 하는 본 개시내용의 TriNKET는 SC2.2 (NKG2D에 대한 리간드인 ULBP-6에 연결된 트라스투주맵으로부터 유래된 scFv로부터 형성된 단일 쇄 이중특이적 분자)에 비해 더욱 효과적이다. SC2.2는 HER2+ 암 세포 및 NKG2D+ NK 세포에 동시에 결합한다. 따라서, HER2+ 암 세포 개수를 감소시키는데 있어서 SC2.2의 효과를 시험하였다. 시험관내 활성화 및 세포독성 검정은, SC2.2가 NK 세포의 활성화 및 사멸에 효과적이었음을 입증하였다. 그러나, SC2.2는 RMA/S-HER2 피하 종양 모델에서 효능을 입증하는데 실패하였다. SC2.2의 효능을 또한 생체 내에서 RMA/S-HER2 과발현 공통 유전자 마우스 모델에서 시험하였다. 이 마우스 모델에서, SC2.2는 비히클 대조군에 비해 종양 성장의 조절을 입증하는데 실패하였다. 따라서, SC2.2가 NK 세포를 활성화 및 사멸시킬 수 있고, HER2+ 암 세포에 결합할 수 있지만, 이들 성질은 HER2+ 종양 성장을 효과적으로 조절하는데 불충분하였다.
- [0090] 특정 실시양태에서, NKG2D-결합 도메인 및 종양 연관 항원에 대한 결합 도메인을 포함하는 본원에 기재된 TriNKET는 항원을 발현하는 종양 세포와 함께 배양될 때 일차 인간 NK 세포를 활성화시킨다. NK 세포 활성화는 CD107a 탈과립화 및 IFN γ 시토킨 생산에서의 증가에 의해 나타난다. 추가로, 종양 연관 항원-결합 도메인을 포함하는 모노클로날 항체와 비교할 때, TriNKET는 항원을 발현하는 종양 세포의 존재하에 인간 NK 세포의 우수한 활성화를 나타낸다. 예를 들어, 모노클로날 항체 트라스투주맵과 비교할 때, HER2-결합 도메인을 갖는 본 개시내용의 TriNKET는 HER2-발현 암 세포의 존재하에 인간 NK 세포의 우수한 활성화를 나타낸다.
- [0091] 특정 실시양태에서, NKG2D-결합 도메인 및 종양 연관 항원에 대한 결합 도메인을 포함하는 본원에 기재된 TriNKET는 항원을 발현하는 종양 세포의 존재하에 휴지된 및 IL-2-활성화된 인간 NK 세포의 활성을 증진시킨다. 휴지된 NK 세포는 IL-2-활성화된 NK 세포에 비해 적은 백그라운드 IFN γ 생산 및 CD107a 탈과립화를 나타내었다. 특정 실시양태에서, 휴지된 NK 세포는 IL-2-활성화된 NK 세포에 비해 IFN γ 생산 및 CD107a 탈과립화에서 더 큰 변화를 나타낸다. 특정 실시양태에서, IL-2-활성화된 NK 세포는 TriNKET로의 자극 이후에 IFN γ +; CD107a+가 되는 세포의 더 큰 백분율을 나타내었다.
- [0092] 특정 실시양태에서, NKG2D-결합 도메인 및 종양 연관 항원에 대한 결합 도메인 (종양 연관 항원의 비제한적인 예에는 CD20, BCMA 및 HER2가 포함됨)을 포함하는 본원에 기재된 TriNKET는 항원을 발현하는 종양 세포의 존재

하에 휴지된 및 IL-2-활성화된 인간 NK 세포의 세포독성 활성을 증진시킨다. 추가로, 종양 연관 항원에 대한 결합 도메인 (종양 연관 항원의 비제한적인 예에는 CD20, BCMA 및 HER2가 포함됨)을 포함하는 TriNKET (예를 들어, A40-TriNKET, A44-TriNKET, A49-TriNKET, C26-TriNKET, F04-TriNKET, F43-TriNKET, F47-TriNKET, 및 F63-TriNKET)는 동일한 종양 연관 항원 결합 부위를 포함하는 모노클로날 항체에 비해 종양 세포에 대해 활성화된 및 휴지된 NK 세포 반응을 더욱 강력하게 지시한다. 특정 실시양태에서, TriNKET는 동일한 종양 항원 결합 부위를 포함하는 모노클로날 항체에 비해 중간 및 낮은 종양 항원을 발현하는 종양 세포에 대한 이점을 제공한다. 따라서, TriNKET를 포함하는 요법은 모노클로날 항체 요법에 비해 우수할 수 있다.

[0093]

특정 실시양태에서, 모노클로날 항체에 비해, 종양 연관 항원에 대한 결합 도메인 (종양 연관 항원의 비제한적인 예에는 CD20, BCMA 및 HER2가 포함됨)을 포함하는 본원에 기재된 TriNKET (예를 들어, A40-TriNKET, A44-TriNKET, A49-TriNKET, C26-TriNKET, F04-TriNKET, F43-TriNKET, F47-TriNKET, 및 F63-TriNKET)는 Fc 수용체 (FcR)의 높은 발현을 갖는 암, 또는 높은 수준의 FcR을 갖는 종양 미세환경에 있는 암의 치료에 유리하다. 모노클로날 항체는 무엇보다도 ADCC, CDC, 식균작용 및 신호 차단을 비롯한 다중 메커니즘을 통해 종양 성장에 대한 그들의 효과를 발휘한다. Fc γ R 중에서, CD16은 IgG Fc에 대해 가장 낮은 친화도를 갖고; Fc γ RI (CD64)는 높은-친화도 FcR이며, CD16에 비해 약 1000배 더 강력하게 IgG Fc에 결합한다. CD64는 여러 조혈 계통, 예컨대 골수 계통에서 정상적으로 발현되고, 이들 세포 유형으로부터 유래된 종양, 예컨대 급성 골수성 백혈병 (AML)에서 발현될 수 있다. 종양으로 침윤하는 면역 세포, 예컨대 MDSC 및 단핵구는 또한 CD64를 발현하고, 종양 미세환경에 침윤하는 것으로 공지되어 있다. 종양에 의한 또는 종양 미세환경에서 CD64의 발현은 모노클로날 항체 요법에 대해 해로운 효과를 가질 수 있다. 항체가 높은-친화도 수용체에 결합하는 것을 선호하기 때문에, 종양 미세환경에서 CD64의 발현은 이들 항체가 NK 세포의 표면 상의 CD16에 결합하는 것을 어렵게 만든다. TriNKET는 NK 세포 표면 상의 2개의 활성화 수용체를 표적화함으로써 모노클로날 항체 요법에 대한 (종양 또는 종양 미세환경에서) CD64 발현의 해로운 효과를 극복할 수 있다. NK 세포 상의 2개의 활성화 수용체의 이중 표적화가 NK 세포에 대한 더욱 강력한 특이적 결합을 제공하기 때문에, 종양 세포에서 CD64 발현과 무관하게, TriNKET는 모든 종양 세포에 대한 인간 NK 세포 반응을 매개할 수 있다.

[0094]

일부 실시양태에서, 종양 연관 항원에 대한 결합 도메인 (종양 연관 항원의 비제한적인 예에는 CD20, BCMA 및 HER2가 포함됨)을 포함하는 본원에 기재된 TriNKET (예를 들어, A40-TriNKET, A44-TriNKET, A49-TriNKET, C26-TriNKET, F04-TriNKET, F43-TriNKET, F47-TriNKET, 및 F63-TriNKET)는 감소된 온-표적 오프-종양 부작용을 통해 더욱 양호한 안전성 프로파일을 제공한다. 천연 킬러 세포 및 CD8 T 세포 둘 다 종양 세포를 직접적으로 용해시킬 수 있지만, NK 세포 및 CD8 T 세포가 종양 세포로부터 자가의 정상 세포를 인식하는 메커니즘은 상이하다. NK 세포의 활성화는 활성화 (NCR, NKG2D, CD16 등) 및 억제 (KIR, NKG2A 등) 수용체로부터 신호의 균형에 의해 조절된다. 이들 활성화 및 억제 신호의 균형은 NK 세포가 스트레스 받았거나, 바이러스에 감염되었거나 또는 형질전환된 자가-세포로부터 건강한 자가-세포를 결정하는 것을 가능하게 한다. 자가-관용의 '빌트-인' 메커니즘은 정상의 건강한 조직을 NK 세포 반응으로부터 보호하는데 도움이 될 것이다. 이 원리를 확장시키기 위해, NK 세포의 자가-관용은 오프-종양 부작용 없이 또는 증가된 치료 범위에서 TriNKET가 자가 및 종양 둘 다에서 발현되는 항원을 표적으로 하는 것을 가능하게 할 것이다. 천연 킬러 세포와 달리, T 세포는 활성화 및 이펙터 기능을 위해 MHC 분자에 의해 제시되는 특정한 펩티드의 인식을 필요로 한다. T 세포는 면역요법의 일차 표적이었고, 여러 전략은 종양에 대한 T 세포 반응을 제지시키는 것으로 개발되었다. T 세포 이중특이적, 체크포인트 억제제, 및 CAR-T 세포는 모두 FDA에 의해 승인되었지만, 종종 용량-제한 독성으로 어려움이 있다. T 세포 이중특이적 및 CAR-T 세포는 종양 세포의 표면 상의 항원을 표적으로 하는 결합 도메인을 이용하고, 이펙터 세포에 활성화 신호를 전도하는 조작된 신호전달 도메인을 이용함으로써 TCR-MHC 인식 시스템에 대해 작용한다. 항-종양 면역 반응을 유도하는데 효과적임에도 불구하고, 이들 요법은 종종 시토키인 방출 증후군 (CRS), 및 온-표적 오프-종양 부작용과 연관된다. TriNKET는 NK 세포 활성화 및 억제의 천연 시스템을 '무효화'하지 않을 것이기 때문에 이러한 맥락에서 독특하다. 대신에, TriNKET는 상기 균형을 흔들도록 고안되고, 건강한 자가 세포에 대한 NK 관용은 유지하면서 NK 세포에 추가의 활성화 신호를 제공한다.

[0095]

일부 실시양태에서, 종양 연관 항원에 대한 결합 도메인 (종양 연관 항원의 비제한적인 예에는 CD20, BCMA 및 HER2가 포함됨)을 포함하는, NKG2D-결합 도메인을 포함하는 본원에 기재된 TriNKET (예를 들어, A40-TriNKET, A44-TriNKET, A49-TriNKET, C26-TriNKET, F04-TriNKET, F43-TriNKET, F47-TriNKET, 및 F63-TriNKET)는 동일한 종양 항원-결합 도메인을 포함하는 모노클로날 항체에 비해 종양의 진행을 더욱 효과적으로 지연시킨다. 일부 실시양태에서, NKG2D-결합 도메인 및 종양 항원-결합 도메인을 포함하는 TriNKET는 동일한 종양 항원-결합 도메인을 포함하는 모노클로날 항체에 비해 암 전이에 대해 더욱 효과적이다.

[0096] 상기 기재는 본 발명의 여러 측면 및 실시양태를 기재한다. 본 특허 출원은 구체적으로 상기 측면 및 실시양태의 모든 조합 및 치환을 고려한다.

[0097] III. 치료적 적용

[0098] 본 발명은 종양 연관 항원에 대한 결합 도메인 (종양 연관 항원의 비제한적인 예에는 CD20, BCMA 및 HER2가 포함됨)을 포함하는 본원에 기재된 다중-특이적 결합 단백질 (예를 들어, A40-TriNKET, A44-TriNKET, A49-TriNKET, C26-TriNKET, F04-TriNKET, F43-TriNKET, F47-TriNKET, 및 F63-TriNKET) 및/또는 본원에 기재된 제약 조성물을 이용하여 암을 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법을 이용하여 다양한 암, 예컨대 고형 종양, 림프종 및 백혈병을 치료할 수 있다. 치료할 암의 유형은 바람직하게는 다중-특이적 결합 단백질이 결합하는 암 세포의 유형과 일치한다. 예를 들어, 상피 세포 부착 분자 (EpCAM)를 발현하는 암, 예컨대 EpCAM을 발현하는 결장암의 치료는 바람직하게는 다중-특이적 결합 단백질에 결합하는 본원에 기재된 다중-특이적 결합 단백질을 이용하여 치료된다. 상기 치료 방법의 추가의 측면 및 실시양태가 하기에 기재된다.

[0099] 따라서, 본 발명의 한 측면은 암의 치료가 필요한 환자에게 종양 연관 항원에 대한 결합 도메인 (종양 연관 항원의 비제한적인 예에는 CD20, BCMA 및 HER2가 포함됨)을 포함하는 본원에 기재된 다중-특이적 결합 단백질 (예를 들어, A40-TriNKET, A44-TriNKET, A49-TriNKET, C26-TriNKET, F04-TriNKET, F43-TriNKET, F47-TriNKET, 및 F63-TriNKET)의 치료 유효량을 투여하여 암을 치료하는 것을 포함하는, 환자에서 암을 치료하는 방법을 제공한다. 치료를 위한 예시적인 암에는 고형 종양, 백혈병 및 림프종이 포함된다.

[0100] 치료 방법은 치료할 암에 따라 특징화될 수 있다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 암은 고형 종양이다. 특정한 다른 실시양태에서, 암은 뇌암, 방광암, 유방암, 자궁경부암, 결장암, 결장직장암, 자궁내막암, 식도암, 백혈병, 폐암, 간암, 흑색종, 난소암, 췌장암, 전립선암, 직장암, 신암, 위암, 고환암, 또는 자궁암이다. 여전히 다른 실시양태에서, 암은 혈관화 종양, 편평 상피 암종, 선암종, 소세포 암종, 흑색종, 신경교종, 신경모세포종, 육종 (예를 들어, 혈관육종 또는 연골육종), 후두암, 이하선암, 담도암, 갑상선암, 말단 흑자 흑색종, 광선 각화증, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 아테노이드 낭성 암종, 선종, 선육종, 선편평 상피 암종, 항문관암, 항문암, 항문직장암, 성상세포 종양, 바르톨린샘 암종, 기저 세포 암종, 담관암, 골암, 골수암, 기관지암, 기관지샘 암종, 유암종, 담관 암종, 연골육종, 맥락막종 유두종/암종, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 투명 세포 암종, 결합 조직암, 낭선종, 소화계암, 십이지장암, 내분비계암, 내배엽성 종양, 자궁내막 과다형성, 자궁내막 간질성 육종, 자궁내막모양 선암종, 자궁내막 세포 암, 상의세포 암, 상피 세포 암, 유잉 육종, 안구 및 안와 암, 여성 색식기암, 국소 결절성 과다형성, 담낭암, 위 전정부 암, 위 기저부 암, 가스트린종, 교모세포종, 글루카곤종, 심장암, 혈관모세포종, 혈관내피종, 혈관종, 간선종, 간선종증, 간담관암, 간세포 암종, 호지킨병, 회장암, 인슐린종, 상피내 신형성, 상피내 편평 상피 신형성, 간내 담관암, 침윤성 편평 상피 암종, 공장암, 관절암, 카포시 육종, 골반암, 거대 세포 암종, 큰창자암, 평활근육종, 악성 김정사마귀 흑색종, 림프종, 남성 생식기 암, 악성 흑색종, 악성 중피 종양, 수모세포종, 수질상피종, 뇌막암, 중피암, 전이성 암종, 구강암, 점막표피양 암종, 다발성 골수종, 근육암, 비강암, 신경계암, 신경상피 선암종, 결절성 흑색종, 비-상피성 피부암, 비-호지킨 림프종, 귀리 세포 암종, 희소돌기아교세포암, 구강암, 골육종, 유두상 장액성 선암종, 음경암, 인두암, 뇌하수체 종양, 형질세포종, 가육종, 폐 모세포종, 직장암, 신 세포 암종, 호흡계암, 망막모세포종, 횡문근육종, 육종, 장액성 암종, 부비동암, 피부암, 소세포 암종, 소장암, 평활근육암, 연조직암, 소마토스타틴-분비 종양, 척추암, 편평 상피 암종, 횡문근육암, 중피세포하 암, 표재 확산 흑색종, T 세포 백혈병, 설암, 미분화 암종, 수노관암, 요도암, 비뇨기 방광암, 비뇨계암, 자궁경부암, 자궁체부암, 포도막 흑색종, 질암, 사마귀모양 암종, VIP종, 외음암, 잘 분화된 암종, 또는 윌름스 종양이다.

[0101] 특정한 다른 실시양태에서, 암은 비-호지킨 림프종, 예컨대 B-세포 림프종 또는 T-세포 림프종이다. 특정 실시양태에서, 비-호지킨 림프종은 B-세포 림프종, 예컨대 미만성 거대 B-세포 림프종, 원발성 종격동 B-세포 림프종, 여포성 림프종, 소형 림프구성 림프종, 맨틀 세포 림프종, 변연부 B-세포 림프종, 림프절의 변연부 B-세포 림프종, 결절성 변연부 B-세포 림프종, 비장 변연부 B-세포 림프종, 버킷 림프종, 림프구성질세포성 림프종, 모발상 세포 백혈병, 또는 원발성 중추신경계 (CNS) 림프종이다. 특정한 다른 실시양태에서, 비-호지킨 림프종은 T-세포 림프종, 예컨대 전구체 T-림프모구성 림프종, 말초 T-세포 림프종, 피부 T-세포 림프종, 혈관면역모구성 T-세포 림프종, 림프절외 천연 킬러/T-세포 림프종, 장질환 유형 T-세포 림프종, 피하 지방층염-유사 T-세포 림프종, 역형성 거대 세포 림프종, 또는 말초 T-세포 림프종이다.

[0102] 치료할 암은 암 세포의 표면 상에서 발현되는 특정한 항원의 존재에 따라 특징화될 수 있다. 특정 실시양태에서, 암 세포는 다음 중 하나 이상을 발현한다: HER2, CD20, CD33, BCMA, EpCAM, CD2, CD19, CD30, CD38, CD40,

CD52, CD70, EGFR/ERBB1, IGF1R, HER3/ERBB3, HER4/ERBB4, MUC1, cMET, SLAMF7, PSCA, MICA, MICB, TRAILR1, TRAILR2, MAGE-A3, B7.1, B7.2, CTLA4, 및 PD1.

[0103] 특정 실시양태에서, 종양 연관 항원에 대한 결합 도메인 (종양 연관 항원의 비제한적인 예에는 CD20, BCMA 및 HER2가 포함됨)을 포함하는 본 개시내용의 단백질 (예를 들어, A40-TriNKET, A44-TriNKET, A49-TriNKET, C26-TriNKET, F04-TriNKET, F43-TriNKET, F47-TriNKET, 및 F63-TriNKET)에 종양 또는 암 세포 및 천연 킬러 세포를 노출시킴으로써, 종양 세포 사멸 (용해, 사멸, 절제, 생존 감소 또는 세포 증식 등과 동의어)을 직접적으로 또는 간접적으로 증진시키는 방법에서, 또는 종양 세포 사멸 (용해, 사멸, 절제, 생존 감소 또는 세포 증식 등과 동의어)을 직접적으로 또는 간접적으로 증진시키는 방법에서 사용하기 위한 의약의 제조에서, 본 개시내용의 단백질을 사용한다. 상기 기재된 바와 같이 단백질에 대해 반응성인 종양 세포는 단백질의 제2 항원-결합 부위가 결합하는 종양-연관 항원을 발현한다. 예를 들어, 예시적인 실시양태에서, C26-TriNKET-CD20을 사용하여 CD20-발현 종양 또는 암 세포 (휴지된 또는 활성화된)를 표적화하고; 또 다른 예시적인 실시양태에서, C26-TriNKET-BMCA를 사용하여 BMCA-발현 종양 또는 암 세포 (휴지된 또는 활성화된)를 표적화한다.

[0104] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 단백질을 암 치료가 필요한 대상체에서 암을 치료하는 방법에서, 또는 암 치료가 필요한 대상체에서 암을 치료하는 방법에서 사용하기 위한 의약의 제조에서 사용하며, 이는 종양 연관 항원에 대한 결합 도메인 (종양 연관 항원의 비제한적인 예에는 CD20, BCMA 및 HER2가 포함됨)을 포함하는 본 개시내용의 단백질 (예를 들어, A40-TriNKET, A44-TriNKET, A49-TriNKET, C26-TriNKET, F04-TriNKET, F43-TriNKET, F47-TriNKET, 및 F63-TriNKET) 또는 상기 단백질을 포함하는 제형을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 상기 기재된 바와 같이 단백질에 대해 반응성인 암 세포는 단백질의 제2 항원-결합 부위가 결합하는 종양-연관 항원을 발현한다. 예를 들어, 예시적인 실시양태에서, C26-TriNKET-CD20을 사용하여 CD20-발현 암 세포 (휴지된 또는 활성화된)를 표적화하고; 또 다른 예시적인 실시양태에서, C26-TriNKET-BMCA를 사용하여 BMCA-발현 종양 또는 암 세포 (휴지된 또는 활성화된)를 표적화한다.

[0105] IV. 조합 요법

[0106] 본 발명의 또 다른 측면은 조합 요법을 제공한다. 본원에 기재된 다중-특이적 결합 단백질을 암을 치료하기 위해 추가의 치료제와 조합하여 사용한다.

[0107] 암 치료에서 조합 요법의 일부로서 사용될 수 있는 예시적인 치료제에는 예를 들어 방사선, 미토마이신, 트레티노인, 리보무스틴, 겐시타빈, 빈크리스틴, 에토포시드, 클라드리빈, 미토브로니톨, 메토틱세이트, 독소루비신, 카르보쿠온, 펜토스타틴, 니트라클린, 지노스타틴, 세트로렉릭스, 레트로졸, 란티트렉세드, 다우노루비신, 파드로졸, 포테무스틴, 티말파신, 소부족산, 네다플라틴, 시타라빈, 비칼루타미드, 비도렐빈, 베스나리논, 아미노글루테티미드, 암사크린, 프로글루미드, 엘리프티늄 아세테이트, 케탄세린, 독시플루리딘, 에트레티네이트, 이소트레티노인, 스트렙토조신, 니무스틴, 빈데신, 플루타미드, 드로게닐, 부토신, 카르모푸르, 라족산, 시조필란, 카르보플라틴, 미토라톨, 테가푸르, 이포스파미드, 프레드니무스틴, 피시바닐, 레바미솔, 테니포시드, 임프로술판, 에노시타빈, 리수리드, 옥시메톨론, 타목시펜, 프로게스테론, 메피티오스탄, 에피티오스타놀, 포르메스탄, 인터페론-알파, 인터페론-2 알파, 인터페론-베타, 인터페론-감마, 콜로니 자극 인자-1, 콜로니 자극 인자-2, 데니류킨 디프티톡스, 인터류킨-2, 루테인화 호르몬 방출 인자, 및 그의 동족 수용체에 대한 차별적인 결합, 및 증가된 또는 감소된 혈청 반감기를 나타낼 수 있는 상기 언급된 작용제의 변형체가 포함된다.

[0108] 암 치료에서 조합 요법의 일부로서 사용될 수 있는 추가의 작용제 부류는 면역 체크포인트 억제제이다. 예시적인 면역 체크포인트 억제제에는 (i) 세포독성 T-림프구-관련 항원 4 (CTLA4), (ii) 프로그래밍된 세포 사멸 단백질 1 (PD1), (iii) PDL1, (iv) LAG3, (v) B7-H3, (vi) B7-H4, 및 (vii) TIM3 중 하나 이상을 억제하는 작용제가 포함된다. CTLA4 억제제 이필리무맙은 흑색종의 치료를 위해 미국 식품의약국에 의해 승인되었다.

[0109] 암 치료에서 조합 요법의 일부로서 사용될 수 있는 여전히 다른 작용제는 비-체크포인트 표적 (예를 들어, 헤르셉틴) 및 비-세포독성제 (예를 들어, 티로신-키나제 억제제)를 표적으로 하는 모노클로날 항체 작용제이다.

[0110] 항암제의 여전히 다른 카테고리에는 예를 들어 (i) ALK 억제제, ATR 억제제, A2A 길항제, 염기 절단 복구 억제제, Bcr-Ab1 티로신 키나제 억제제, 브루톤 티로신 키나제 억제제, CDC7 억제제, CHK1 억제제, 시클린-의존성 키나제 억제제, DNA-PK 억제제, DNA-PK 및 mTOR 둘 다의 억제제, DNMT1 억제제, DNMT1 억제제 + 2-클로로-데옥시아데노신, HDAC 억제제, 헥시호그 신호전달 경로 억제제, IDO 억제제, JAK 억제제, mTOR 억제제, MEK 억제제, MELK 억제제, MTH1 억제제, PARP 억제제, 포스포이노시티드 3-키나제 억제제, PARP1 및 DHODH 둘 다의 억제제,

프로테아좀 억제제, 토포이소머라제-II 억제제, 티로신 키나제 억제제, VEGFR 억제제, 및 WEE1 억제제로부터 선택된 억제제; (ii) OX40, CD137, CD40, GITR, CD27, HVEM, TNFRSF25 또는 ICOS의 효능제; 및 (iii) IL-12, IL-15, GM-CSF 및 G-CSF로부터 선택된 시토카인이 포함된다.

[0111] 본 발명의 단백질은 또한 원발성 병변의 수술적 제거에 대해 부가적으로 사용될 수 있다.

[0112] 다중-특이적 결합 단백질 및 추가의 치료제의 양 및 상대적인 투여 시기는 원하는 조합된 치료 효과를 달성하기 위해 선택될 수 있다. 예를 들어, 이러한 투여가 필요한 환자에게 조합 요법을 투여할 때, 조합물 중의 치료제, 또는 치료제를 포함하는 제약 조성물 또는 조성물들은 임의의 순서로, 예를 들어 순차적으로, 공동으로, 함께, 동시에 등으로 투여될 수 있다. 추가로, 예를 들어, 추가의 치료제(들)이 그의 예방적 또는 치료적 효과를 발휘하는 동안에 다중-특이적 결합 단백질을 투여할 수 있거나, 또는 그 반대로 할 수 있다.

[0113] V. 제약 조성물

[0114] 본 개시내용은 또한 종양 연관 항원에 대한 결합 도메인 (종양 연관 항원의 비제한적인 예에는 CD20, BCMA 및 HER2가 포함됨)을 포함하는 본원에 기재된 단백질 (예를 들어, A40-TriNKET, A44-TriNKET, A49-TriNKET, C26-TriNKET, F04-TriNKET, F43-TriNKET, F47-TriNKET, 및 F63-TriNKET)의 치료 유효량을 함유하는 제약 조성물을 특징으로 한다. 상기 조성물은 다양한 약물 전달 시스템에서 사용하기 위해 제형화될 수 있다. 1종 이상의 생리학적으로 허용가능한 부형제 또는 담체 또한 적절한 제형을 위해 조성물에 포함될 수 있다. 본 개시내용에서 사용하기에 적합한 제형은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed., 1985]에서 확인한다. 약물 전달을 위한 방법의 간단한 검토를 위해서는, 예를 들어 문헌 [Langer, Science 249:1527-1533, 1990])을 참고한다.

[0115] 본 개시내용의 정맥내 약물 전달 제형은 액, 펜 또는 시린지에 함유될 수 있다. 특정 실시양태에서, 액은 튜브 및/또는 니들을 포함하는 채널에 연결될 수 있다. 특정 실시양태에서, 제형은 동결건조된 제형 또는 액체 제형일 수 있다. 특정 실시양태에서, 제형은 냉동-건조되고 (동결건조되고), 약 12-60개 바이알에 함유될 수 있다. 특정 실시양태에서, 제형은 냉동-건조될 수 있고, 45 mg의 냉동-건조된 제형이 하나의 바이알에 함유될 수 있다. 특정 실시양태에서, 약 40 mg - 약 mg의 냉동-건조된 제형이 하나의 바이알에 함유될 수 있다. 특정 실시양태에서, 12, 27 또는 45개 바이알로부터의 냉동 건조된 제형을 조합하여 정맥내 약물 제형에서 단백질의 치료적 용량을 수득한다. 특정 실시양태에서, 제형은 액체 제형일 수 있고, 약 250 mg/바이알 내지 약 1000 mg/바이알로 보관될 수 있다. 특정 실시양태에서, 제형은 액체 제형일 수 있고, 약 600 mg/바이알로 보관될 수 있다. 특정 실시양태에서, 제형은 액체 제형일 수 있고, 약 250 mg/바이알로 보관될 수 있다.

[0116] 본 개시내용은 제형을 형성하는 완충된 용액 중에 단백질의 치료 유효량을 포함하는 액체 수성 제약 제형으로 존재할 수 있다.

[0117] 이들 조성물은 통상적인 멸균화 기술에 의해 멸균될 수 있거나, 또는 멸균 여과될 수 있다. 생성된 수성 용액을 그대로 사용하기 위해 포장하거나 또는 동결건조시킬 수 있고, 동결건조된 제제는 투여하기 전에 멸균 수성 담체와 조합된다. 제제의 pH는 전형적으로 3 내지 11, 더욱 바람직하게는 5 내지 9 또는 6 내지 8, 및 가장 바람직하게는 7 내지 8, 예컨대 7 내지 7.5일 것이다. 고체 형태로 생성된 조성물은 다중 단일 용량 단위로 포장될 수 있고, 이들 각각은 상기 언급된 작용제 또는 작용제들을 고정된 양으로 함유한다. 고체 형태의 조성물은 또한 용통성 있는 양을 위해 컨테이너에 포장될 수 있다.

[0118] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 단백질을 만니톨, 시트르산 일수화물, 시트르산나트륨, 인산 이나트륨 이수화물, 인산이수소나트륨 이수화물, 염화나트륨, 폴리소르베이트 80, 물, 및 수산화나트륨과 조합하여 포함하는, 연장된 반감기를 갖는 제형을 제공한다.

[0119] 특정 실시양태에서, pH-완충된 용액 중에 본 개시내용의 단백질을 포함하는 수성 제형이 제조된다. 본 발명의 완충제는 약 4 내지 약 8, 예를 들어 약 4.5 내지 약 6.0, 또는 약 4.8 내지 약 5.5 범위의 pH를 가질 수 있거나, 또는 약 5.0 내지 약 5.2의 pH를 가질 수 있다. 상기 인용된 pH에 대해 중간 범위 또한 본 개시내용의 일부로서 의도된다. 예를 들어, 상한 및/또는 하한으로서 상기 인용된 임의의 값의 조합을 이용하는 값의 범위가 포함되는 것으로 의도된다. 이 범위 내에서 pH를 조절하는 완충제의 예에는 아세트이트 (예를 들어, 아세트산 나트륨), 숙시네이트 (예컨대, 숙신산나트륨), 글루코네이트, 히스티딘, 시트레이트 및 다른 유기 산 완충제가 포함된다.

[0120] 특정 실시양태에서, 제형은 약 4 내지 약 8 범위의 pH를 유지하기 위해 시트레이트 및 포스페이트를 함유하는 완충제 시스템을 포함한다. 특정 실시양태에서, pH 범위는 약 4.5 내지 약 6.0, 또는 약 pH 4.8 내지 약 5.5,

또는 약 5.0 내지 약 5.2의 pH 범위일 수 있다. 특정 실시양태에서, 완충제 시스템은 시트르산 이수화물, 시트르산나트륨, 인산이나트륨 이수화물, 및/또는 인산이수소나트륨 이수화물을 포함한다. 특정 실시양태에서, 완충제 시스템은 약 1.3 mg/ml의 시트르산 (예를 들어, 1.305 mg/ml), 약 0.3 mg/ml의 시트르산나트륨 (예를 들어, 0.305 mg/ml), 약 1.5 mg/ml의 인산이나트륨 이수화물 (예를 들어 1.53 mg/ml), 약 0.9 mg/ml의 인산이수소나트륨 이수화물 (예를 들어, 0.86), 및 약 6.2 mg/ml의 염화나트륨 (예를 들어, 6.165 mg/ml)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 완충제 시스템은 1-1.5 mg/ml의 시트르산, 0.25 내지 0.5 mg/ml의 시트르산나트륨, 1.25 내지 1.75 mg/ml의 인산이나트륨 이수화물, 0.7 내지 1.1 mg/ml의 인산이수소나트륨 이수화물, 및 6.0 내지 6.4 mg/ml의 염화나트륨을 포함한다. 특정 실시양태에서, 제형의 pH를 수산화나트륨으로 조정한다.

[0121] 등장화제로서 작용하고, 항체를 안정화시킬 수 있는 폴리올 또한 제형에 포함될 수 있다. 폴리올은 제형의 원하는 등장성과 관련하여 변할 수 있는 양으로 제형에 첨가된다. 특정 실시양태에서, 수성 제형은 등장성일 수 있다. 첨가되는 폴리올의 양 또한 폴리올의 분자량과 관련하여 변경될 수 있다. 예를 들어, 이당류 (예컨대, 트레할로스)에 비해 보다 적은 양의 단당류 (예를 들어, 만니톨)를 첨가할 수 있다. 특정 실시양태에서, 등장화제로서 제형에서 사용될 수 있는 폴리올은 만니톨이다. 특정 실시양태에서, 만니톨 농도는 약 5 내지 약 20 mg/ml일 수 있다. 특정 실시양태에서, 만니톨의 농도는 약 7.5 내지 15 mg/ml일 수 있다. 특정 실시양태에서, 만니톨의 농도는 약 10-14 mg/ml일 수 있다. 특정 실시양태에서, 만니톨의 농도는 약 12 mg/ml일 수 있다. 특정 실시양태에서, 폴리올 소르비톨이 제형에 포함될 수 있다.

[0122] 세제 또는 계면활성제 또한 제형에 포함될 수 있다. 예시적인 세제에는 비이온성 세제, 예컨대 폴리소르베이트 (예를 들어, 폴리소르베이트 20, 80 등) 또는 폴록사머 (예를 들어, 폴록사머 188)가 포함된다. 첨가되는 세제의 양은 제형화된 항체의 응집을 감소시키고/거나 제형에서 입자의 형성을 최소화시키고/거나 흡착을 감소시키도록 하는 양이다. 특정 실시양태에서, 제형은 폴리소르베이트인 계면활성제를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 제형은 세제 폴리소르베이트 80 또는 트윈 80을 함유할 수 있다. 트윈 80은 폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄모노올레에이트를 기재하기 위해 사용되는 용어이다 (문헌 [Fiedler, Lexikon der Hifsstoffe, Editio Cantor Verlag Aulendorf, 4th ed., 1996] 참고). 특정 실시양태에서, 제형은 약 0.1 mg/mL 내지 약 10 mg/mL의 폴리소르베이트 80, 또는 약 0.5 mg/mL 내지 약 5 mg/mL를 함유할 수 있다. 특정 실시양태에서, 약 0.1% 폴리소르베이트 80이 제형에 첨가될 수 있다.

[0123] 실시양태에서, 본 개시내용의 단백질 생성물은 액체 제형으로 제형화된다. 액체 제형은 고무 스톱퍼로 밀폐되고 알루미늄 크립트 밀봉 마개로 밀봉된 USP / Ph Eur 유형 I 50R 바이알에서 10 mg/mL 농도로 제공될 수 있다. 스톱퍼는 USP 및 Ph Eur에 따라 엘라스토머로 제조될 수 있다. 특정 실시양태에서, 바이알은 60 mL의 추출가능한 부피가 가능하도록 61.2 mL의 단백질 생성물 용액으로 충전될 수 있다. 특정 실시양태에서, 액체 제형은 0.9% 식염수 용액으로 희석될 수 있다.

[0124] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 액체 제형은 안정화 수준에서 당과 조합된 10 mg/mL 농도의 용액으로서 제조될 수 있다. 특정 실시양태에서, 액체 제형은 수성 담체 중에서 제조될 수 있다. 특정 실시양태에서, 안정화제는 정맥내 투여에 바람직하지 않거나 적합하지 않은 점도를 생성할 수 있는 것보다는 적은 양으로 첨가될 수 있다. 특정 실시양태에서, 당은 이당류, 예를 들어 수크로스일 수 있다. 특정 실시양태에서, 액체 제형은 또한 완충화제, 계면활성제 및 보존제 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0125] 특정 실시양태에서, 액체 제형의 pH는 제약상 허용가능한 산 및/또는 염기의 첨가에 의해 설정될 수 있다. 특정 실시양태에서, 제약상 허용가능한 산은 염산일 수 있다. 특정 실시양태에서, 염기는 수산화나트륨일 수 있다.

[0126] 응집 외에도, 탈아미드화는 발효, 수확/세포 정화, 정제, 약물 물질/약물 생성물 보관 및 샘플 분석 동안에 일어날 수 있는 펩티드 및 단백질의 흔한 생성물 변형이다. 탈아미드화는 단백질로부터 NH₃의 소실에 의해 가수분해가 일어날 수 있는 숙신이미드 중간체를 형성하는 것이다. 숙신이미드 중간체는 모 펩티드의 17 달톤 질량 감소를 일으킨다. 후속적인 가수분해는 18 달톤 질량 증가를 일으킨다. 숙신이미드 중간체의 단리는 수성 조건하에서의 불안정성으로 인해 어렵다. 따라서, 탈아미드화는 전형적으로 1 달톤 질량 증가로서 검출가능하다. 아스파라긴의 탈아미드화는 아스파르트산 또는 이소아스파르트산을 생성한다. 탈아미드화 속도에 영향을 미치는 파라미터에는 pH, 온도, 용매 유전 상수, 이온 강도, 일차 서열, 국지적 폴리펩티드 형태 및 삼차 구조가 포함된다. 펩티드 채에서 Asn에 인접한 아미노산 잔기는 탈아미드화 속도에 영향을 미친다. 단백질 서열에서 Asn 이후의 Gly 및 Ser은 탈아미드화에 대한 더욱 높은 민감성을 일으킨다.

[0127] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 액체 제형은 단백질 생성물의 탈아미노화를 방지하기 위한 pH 및 습도의 조

건하에 보존될 수 있다.

- [0128] 본원에서 관심 수성 담체는 제약상 허용가능하고 (인간에게 투여하기에 안전하고 무독성임) 액체 제형의 제조에 유용한 것이다. 예시적인 담체에는 주사용 멸균수 (SWFI), 주사용 정균수 (BWHI), pH 완충된 용액 (예를 들어, 포스페이트-완충된 식염수), 멸균 식염수 용액, 링거 용액 또는 텍스트로스 용액이 포함된다.
- [0129] 보존제는 박테리아 작용을 감소시키기 위해 본원의 제형에 임의적으로 첨가될 수 있다. 보존제의 첨가는 예를 들어 다중-사용 (다중-용량) 제형의 생산을 용이하게 할 수 있다.
- [0130] 정맥내 (IV) 제형은 특정한 예에서, 예컨대 환자가 이식 후에 IV 경로를 통해 모든 약물을 제공받으면서 입원해 있을 때 바람직한 투여 경로일 수 있다. 특정 실시양태에서, 액체 제형을 투여하기 전에 0.9% 염화나트륨 용액으로 희석한다. 특정 실시양태에서, 주사를 위해 희석된 약물 생성물은 등장성이고, 정맥내 주입에 의한 투여에 적합하다.
- [0131] 특정 실시양태에서, 염 또는 완충제 성분은 10 mM - 200 mM의 양으로 첨가될 수 있다. 염 및/또는 완충제는 제약상 허용가능하고, "염기 형성" 금속 또는 아민과 함께 다양한 공지된 산 (무기 및 유기)으로부터 유래된다. 특정 실시양태에서, 완충제는 포스페이트 완충제일 수 있다. 특정 실시양태에서, 완충제는 글리시네이트, 카르보네이트, 시트레이트 완충제일 수 있으며, 이러한 경우에, 나트륨, 칼륨 또는 암모늄 이온이 반대이온으로 작용할 수 있다.
- [0132] 보존제는 박테리아 작용을 감소시키기 위해 본원의 제형에 임의적으로 첨가될 수 있다. 보존제의 첨가는 예를 들어 다중-사용 (다중-용량) 제형의 생산을 용이하게 할 수 있다.
- [0133] 본원에서 관심 수성 담체는 제약상 허용가능하고 (인간에게 투여하기에 안전하고 무독성임) 액체 제형의 제조에 유용한 것이다. 예시적인 담체에는 주사용 멸균수 (SWFI), 주사용 정균수 (BWHI), pH 완충된 용액 (예를 들어, 포스페이트-완충된 식염수), 멸균 식염수 용액, 링거 용액 또는 텍스트로스 용액이 포함된다.
- [0134] 본 개시내용은 단백질 및 동결건조 보호제를 포함하는 동결건조된 제형으로 존재할 수 있다. 동결건조 보호제는 당, 예를 들어 이당류일 수 있다. 특정 실시양태에서, 동결건조 보호제는 수크로스 또는 말토스일 수 있다. 동결건조된 제형은 또한 완충화제, 계면활성제, 벌크화제 및/또는 보존제 중 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0135] 동결건조된 약물 생성물의 안정화에 유용한 수크로스 또는 말토스의 양은 적어도 1:2의 단백질 대 수크로스 또는 말토스의 중량 비일 수 있다. 특정 실시양태에서, 단백질 대 수크로스 또는 말토스의 중량 비는 1:2 내지 1:5일 수 있다.
- [0136] 특정 실시양태에서, 동결건조 이전에 제형의 pH는 제약상 허용가능한 산 및/또는 염기의 첨가에 의해 설정될 수 있다. 특정 실시양태에서, 제약상 허용가능한 산은 염산일 수 있다. 특정 실시양태에서, 제약상 허용가능한 염기는 수산화나트륨일 수 있다.
- [0137] 동결건조 이전에, 본 개시내용의 단백질을 함유하는 용액의 pH는 6 내지 8일 수 있다. 특정 실시양태에서, 동결건조된 약물 생성물을 위한 pH 범위는 7 내지 8일 수 있다.
- [0138] 특정 실시양태에서, 염 또는 완충제 성분은 10 mM - 200 mM의 양으로 첨가될 수 있다. 염 및/또는 완충제는 제약상 허용가능하고, "염기 형성" 금속 또는 아민과 함께 다양한 공지된 산 (무기 및 유기)으로부터 유래된다. 특정 실시양태에서, 완충제는 포스페이트 완충제일 수 있다. 특정 실시양태에서, 완충제는 글리시네이트, 카르보네이트, 시트레이트 완충제일 수 있고, 이러한 경우에, 나트륨, 칼륨 또는 암모늄 이온이 반대이온으로 작용할 수 있다.
- [0139] 특정 실시양태에서, "벌크화제"가 첨가될 수 있다. "벌크화제"는 동결건조된 혼합물에 질량을 추가하고, 동결건조된 케이크의 물리적 구조에 기여하는 (예를 들어, 개방 공극 구조체를 유지하는 본질적으로 균일한 동결건조된 케이크의 생산을 용이하게 함) 화합물이다. 예시적인 벌크화제에는 만니톨, 글리신, 폴리에틸렌 글리콜 및 소르비톨이 포함된다. 본 발명의 동결건조된 제형은 이러한 벌크화제를 함유할 수 있다.
- [0140] 보존제는 박테리아 작용을 감소시키기 위해 본원의 제형에 임의적으로 첨가될 수 있다. 보존제의 첨가는 예를 들어 다중-사용 (다중-용량) 제형의 생산을 용이하게 할 수 있다.
- [0141] 특정 실시양태에서, 동결건조된 약물 생성물은 수성 담체에 의해 구성될 수 있다. 본원에서 관심 수성 담체는 제약상 허용가능하고 (예를 들어, 인간에게 투여하기에 안전하고 무독성임) 동결건조 이후에 액체 제형의 제조에 유용한 것이다. 예시적인 희석제에는 주사용 멸균수 (SWFI), 주사용 정균수 (BWHI), pH 완충된 용액 (예를

들어, 포스페이트-완충된 식염수), 멸균 식염수 용액, 링거 용액 또는 텍스트로스 용액이 포함된다.

[0142] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 동결건조된 약물 생성물은 주사용 멸균수, USP (SWFI) 또는 0.9% 염화나트륨 주사, USP에 의해 재구성된다. 재구성하는 동안에, 동결건조된 분말은 용액으로 해리된다.

[0143] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 동결건조된 단백질 생성물은 약 4.5 mL 주사용수로 재구성되고 0.9% 식염수 용액 (염화나트륨 용액)에 의해 희석된다.

[0144] 본 발명의 제약 조성물에서 활성 성분의 실제 투여 수준은 환자에게 독성이 없이 특정한 환자, 조성 및 투여 방식에 대해 원하는 치료 반응을 달성하는데 효과적인 활성 성분의 양을 수득하도록 달라질 수 있다.

[0145] 특정한 용량은 각각의 환자에 대해 균일한 용량, 예를 들어 50-5000 mg의 단백질일 수 있다. 대안적으로, 환자의 용량은 대략적인 환자의 체중 또는 표면적에 맞추어질 수 있다. 적절한 용량을 결정하기 위한 다른 인자에는 치료하거나 예방할 질환 또는 상태, 질환의 중증도, 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 의학적 상태가 포함될 수 있다. 치료를 위한 적절한 용량을 결정하기 위해 필요한 계산의 추가의 개량은 특히 본원에 개시된 용량 정보 및 검정에 비추어 관련 기술분야의 기술자에 의해 일상적으로 이루어진다. 용량은 적절한 용량-반응 데이터와 함께 사용되는 용량을 결정하기 위해 공지된 검정을 이용하여 또한 결정될 수 있다. 개별 환자의 용량은 질환의 진행을 모니터링하면서 조정될 수 있다. 용량이 효과적인 농도에 도달하거나 그를 유지하기 위해 조정될 필요가 있는지를 보기 위해 환자에서 표적화가능한 구축물 또는 복합체의 혈액 수준을 측정할 수 있다. 약물유전체학을 이용하여 표적화가능한 구축물 및/또는 복합체, 및 그의 용량이 주어진 개체에 대해 가장 효과적일 가능성이 있는지를 결정할 수 있다 (Schmitz *et al.*, *Clinica Chimica Acta* 308: 43-53, 2001; Steimer *et al.*, *Clinica Chimica Acta* 308: 33-41, 2001).

[0146] 일반적으로, 체중을 기준으로 하는 용량은 약 0.01 µg 내지 약 mg/kg 체중, 예컨대 약 0.01 µg 내지 약 mg/kg 체중, 약 0.01 µg 내지 약 50 mg/kg 체중, 약 0.01 µg 내지 약 10 mg/kg 체중, 약 0.01 µg 내지 약 1 mg/kg 체중, 약 0.01 µg 내지 약 µg/kg 체중, 약 0.01 µg 내지 약 50 µg/kg 체중, 약 0.01 µg 내지 약 10 µg/kg 체중, 약 0.01 µg 내지 약 1 µg/kg 체중, 약 0.01 µg 내지 약 0.1 µg/kg 체중, 약 0.1 µg 내지 약 mg/kg 체중, 약 0.1 µg 내지 약 50 mg/kg 체중, 약 0.1 µg 내지 약 10 mg/kg 체중, 약 0.1 µg 내지 약 1 mg/kg 체중, 약 0.1 µg 내지 약 µg/kg 체중, 약 0.1 µg 내지 약 10 µg/kg 체중, 약 0.1 µg 내지 약 1 µg/kg 체중, 약 1 µg 내지 약 mg/kg 체중, 약 1 µg 내지 약 50 mg/kg 체중, 약 1 µg 내지 약 10 mg/kg 체중, 약 1 µg 내지 약 1 mg/kg 체중, 약 1 µg 내지 약 µg/kg 체중, 약 1 µg 내지 약 50 µg/kg 체중, 약 1 µg 내지 약 10 µg/kg 체중, 약 10 µg 내지 약 mg/kg 체중, 약 10 µg 내지 약 50 mg/kg 체중, 약 10 µg 내지 약 10 mg/kg 체중, 약 10 µg 내지 약 1 mg/kg 체중, 약 10 µg 내지 약 µg/kg 체중, 약 10 µg 내지 약 50 µg/kg 체중, 약 50 µg 내지 약 mg/kg 체중, 약 50 µg 내지 약 50 mg/kg 체중, 약 50 µg 내지 약 10 mg/kg 체중, 약 50 µg 내지 약 1 mg/kg 체중, 약 50 µg 내지 약 µg/kg 체중, 약 µg 내지 약 100 mg/kg 체중, 약 100 µg 내지 약 50 mg/kg 체중, 약 100 µg 내지 약 10 mg/kg 체중, 약 100 µg 내지 약 1 mg/kg 체중, 약 1 mg 내지 약 100 mg/kg 체중, 약 1 mg 내지 약 50 mg/kg 체중, 약 1 mg 내지 약 10 mg/kg 체중, 약 10 mg 내지 약 100 mg/kg 체중, 약 10 mg 내지 약 50 mg/kg 체중, 약 50 mg 내지 약 100 mg/kg 체중이다.

[0147] 용량은 매일, 매주, 매월 또는 매년마다 1회 이상, 또는 심지어 2 내지 20 년마다 1회로 제공될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 체액 또는 조직에서 표적화가능한 구축물 또는 복합체의 측정된 체류 시간 및 농도를 기준으로 하여 투여를 위한 반복 속도를 용이하게 추정할 수 있다. 본 발명의 투여는 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 피하, 흉막내, 척추강내, 강내로, 카테터를 통한 관주에 의해, 또는 직접적인 병변내 주사에 의한 것일 수 있다. 이는 매일 1회 이상, 매주 1회 이상, 매월 1회 이상, 및 매년 1회 이상 투여될 수 있다.

[0148] 상기 기재는 본 발명의 여러 측면 및 실시양태를 기재한다. 본 특허 출원은 상기 측면 및 실시양태의 모든 조합 및 치환을 고려한다.

[0149] **실시예**

[0150] 본 발명은 이제 일반적으로 기재되고, 하기 실시예를 참고하여 더욱 용이하게 이해될 것이며, 하기 실시예는 본 발명의 특정한 측면 및 실시양태를 기재하기 위한 목적으로만 포함되며, 본 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0151] **실시예 1 - NKG2D-결합 도메인은 NKG2D에 결합한다**

[0152] NKG2D-결합 도메인은 정제된 재조합 NKG2D에 결합한다

- [0153] 인간, 마우스 또는 시노물구스 NKG2D 엑토도메인의 핵산 서열을 인간 IgG1 Fc 도메인을 코딩하는 핵산 서열과 융합하고, 발현시키고자 하는 포유류 세포에 도입하였다. 정제 후에, NKG2D-Fc 융합 단백질을 마이크로플레이트의 웰에 흡착시켰다. 웰을 소 혈청 알부민으로 차단하여 비-특이적 결합을 방지한 후에, NKG2D-결합 도메인을 적정하고, NKG2D-Fc 융합 단백질로 미리 흡착된 웰에 첨가하였다. 서양고추냉이 퍼옥시다제에 접합되어 있고, Fc 교차-반응성을 피하기 위해 인간 카파 경쇄를 특이적으로 인식하는 이차 항체를 이용하여 일차 항체 결합을 검출하였다. 서양고추냉이 퍼옥시다제에 대한 기질인 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 (TMB)을 결합 신호를 가시화하기 위해 웰에 첨가하였고, 흡광도를 450 nM에서 측정하고, 540 nM에서 보정하였다. NKG2D-결합 도메인 클론, 이소타입 대조군 또는 양성 대조군 (SEQ ID NO:45-48, 또는 이바이오사이언스(eBioscience)에서 입수가 가능한 항-마우스 NKG2D 클론 MI-6 및 CX-5로부터 선택됨)을 각각의 웰에 첨가하였다.
- [0154] 이소타입 대조군은 재조합 NKG2D-Fc 단백질에 대해 최소의 결합을 나타낸 반면에, 양성 대조군은 재조합 항원에 가장 강력하게 결합하였다. 모든 클론에 의해 생산된 NKG2D-결합 도메인은 인간 (도 14), 마우스 (도 16), 및 시노물구스 (도 15) 재조합 NKG2D-Fc 단백질에 걸쳐 결합을 입증하였지만, 클론마다 친화도가 달랐다. 일반적으로, 각각의 항-NKG2D 클론은 유사한 친화도로 인간 (도 14) 및 시노물구스 (도 15) 재조합 NKG2D-Fc에 결합하였지만, 마우스 (도 16) 재조합 NKG2D-Fc에 대해서는 더 낮은 친화도를 가졌다.
- [0155] NKG2D-결합 도메인은 NKG2D를 발현하는 세포에 결합한다
- [0156] EL4 마우스 림프종 세포주는 인간 또는 마우스 NKG2D - CD3 제타 신호전달 도메인 키메라 항원 수용체를 발현하도록 조작되었다. NKG2D-결합 클론, 이소타입 대조군 또는 양성 대조군을 100 nM 농도로 사용하여, EL4 세포 상에서 발현된 세포의 NKG2D를 염색하였다. 항체 결합을 형광단-접합된 항-인간 IgG 이차 항체를 이용하여 검출하였다. 세포를 유동 세포분석법에 의해 분석하였고, 백그라운드 대비 배수 (FOB)를 모 EL4 세포와 비교하여 NKG2D-발현 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 이용하여 계산하였다.
- [0157] 모든 클론에 의해 생산된 NKG2D-결합 도메인은 인간 및 마우스 NKG2D를 발현하는 EL4 세포에 결합하였다. 양성 대조군 항체 (SEQ ID NO:45-48, 또는 이바이오사이언스에서 입수가 가능한 항-마우스 NKG2D 클론 MI-6 및 CX-5로부터 선택됨)는 최상의 FOB 결합 신호를 제공하였다. 각각의 클론에 대한 NKG2D 결합 친화도는 인간 (도 17) 및 마우스 (도 18) NKG2D를 발현하는 세포에서 유사하였다 (각각 도 17-18).
- [0158] **실시예 2 - NKG2D-결합 도메인은 천연 리간드가 NKG2D에 결합하는 것을 차단한다**
- [0159] ULBP-6과의 경쟁
- [0160] 재조합 인간 NKG2D-Fc 단백질을 마이크로플레이트의 웰에 흡착시켰고, 비-특이적 결합을 감소시키기 위해 상기 웰을 소 혈청 알부민으로 차단하였다. 포화 농도의 ULBP-6-His-비오틴을 웰에 첨가한 다음, NKG2D-결합 도메인 클론을 첨가하였다. 2-시간 인큐베이션 이후, 웰을 세척하고, NKG2D-Fc 코팅된 웰에 결합된 채로 남아있는 ULBP-6-His-비오틴을 서양고추냉이 퍼옥시다제 및 TMB 기질에 접합된 스트렙타비딘에 의해 검출하였다. 흡광도를 450 nM에서 측정하고, 540 nM에서 보정하였다. 백그라운드를 차감한 후에, NKG2D-Fc 단백질에 대한 NKG2D-결합 도메인의 특이적 결합을 웰에서 NKG2D-Fc 단백질에 대한 결합이 차단된 ULBP-6-His-비오틴의 백분율로부터 계산하였다. 양성 대조군 항체 (SEQ ID NO:45-48로부터 선택됨) 및 다양한 NKG2D-결합 도메인은 ULBP-6이 NKG2D에 결합하는 것을 차단한 반면에, 이소타입 대조군은 ULBP-6과 거의 경쟁하지 않는 것으로 보였다 (도 19).
- [0161] MICA와의 경쟁
- [0162] 재조합 인간 MICA-Fc 단백질을 마이크로플레이트의 웰에 흡착시켰고, 비-특이적 결합을 감소시키기 위해 웰을 소 혈청 알부민으로 차단하였다. NKG2D-Fc-비오틴을 웰에 첨가한 다음, NKG2D-결합 도메인을 첨가하였다. 인큐베이션 및 세척 이후, MICA-Fc 코팅된 웰에 결합된 채로 남아있는 NKG2D-Fc-비오틴을 스트렙타비딘-HRP 및 TMB 기질을 이용하여 검출하였다. 흡광도를 450 nM에서 측정하고, 540 nM에서 보정하였다. 백그라운드를 차감한 후에, NKG2D-Fc 단백질에 대한 NKG2D-결합 도메인의 특이적 결합을 MICA-Fc 코팅된 웰에 대한 결합이 차단된 NKG2D-Fc-비오틴의 백분율로부터 계산하였다. 양성 대조군 항체 (SEQ ID NO:45-48로부터 선택됨) 및 다양한 NKG2D-결합 도메인은 MICA가 NKG2D에 결합하는 것을 차단한 반면에, 이소타입 대조군은 MICA와 거의 경쟁하지 않는 것으로 보였다 (도 20).
- [0163] Rae-1 텔타와의 경쟁
- [0164] 재조합 마우스 Rae-1텔타-Fc (알앤디 시스템즈(R&D Systems)로부터 구입함)를 마이크로플레이트의 웰에 흡착시

켰고, 비-특이적 결합을 감소시키기 위해 웰을 소 혈청 알부민으로 차단하였다. 마우스 NKG2D-Fc-비오틴을 웰에 첨가한 다음, NKG2D-결합 도메인을 첨가하였다. 인큐베이션 및 세척 후에, Rae-1델타-Fc 코팅된 웰에 결합된 채로 남아있는 NKG2D-Fc-비오틴을 스트렙타비딘-HRP 및 TMB 기질을 이용하여 검출하였다. 흡광도를 450 nM에서 측정하고, 540 nM에서 보정하였다. 백그라운드를 차감한 후에, NKG2D-Fc 단백질에 대한 NKG2D-결합 도메인의 특이적 결합을 Rae-1델타-Fc 코팅된 웰에 대한 결합이 차단된 NKG2D-Fc-비오틴의 백분율로부터 계산하였다. 양성 대조군 (SEQ ID NO:45-48, 또는 이바이오사이언스에서 입수가능한 항-마우스 NKG2D 클론 MI-6 및 CX-5로부터 선택됨) 및 다양한 NKG2D-결합 도메인 클론은 Rae-1델타가 마우스 NKG2D에 결합하는 것을 차단한 반면에, 이소타입 대조군 항체는 Rae-1델타와 거의 경쟁하지 않는 것으로 보였다 (도 21).

[0165] **실시예 3 - NKG2D-결합 도메인 클론은 NKG2D를 활성화시킨다**

[0166] 인간 및 마우스 NKG2D의 핵산 서열을 CD3 제타 신호전달 도메인을 코딩하는 핵산 서열에 융합시켜 키메라 항원 수용체 (CAR) 구축물을 수득하였다. 이어서, NKG2D-CAR 구축물을 김슨(Gibson) 조립체를 이용하여 레트로바이러스 벡터에 클로닝시키고, 레트로바이러스 생산을 위해 expi293 세포에 형질감염시켰다. EL4 세포를 8 µg/mL 폴리브렌과 함께 NKG2D-CAR을 함유하는 바이러스로 감염시켰다. 감염 24 시간 후에, EL4 세포에서 NKG2D-CAR의 발현 수준을 유동 세포분석법에 의해 분석하고, 세포 표면 상에서 높은 수준의 NKG2D-CAR을 발현하는 클론을 선택하였다.

[0167] NKG2D-결합 도메인이 NKG2D를 활성화시키는지 여부를 결정하기 위해, 이들을 마이크로플레이트의 웰에 흡착시켰고, NKG2D-CAR EL4 세포를 항체 단편-코팅된 웰 상에서 4 시간 동안 브레펠딘-A 및 모넨신의 존재하에 배양하였다. NKG2D 활성화에 대한 지표인 세포내 TNF-알파 생산을 유동 세포분석법에 의해 검정하였다. TNF-알파 양성 세포의 백분율을 양성 대조군으로 처리된 세포에 대해 정규화하였다. 모든 NKG2D-결합 도메인은 인간 (도 22) 및 마우스 (도 23) NKG2D 둘 다를 활성화시켰다.

[0168] **실시예 4 - NKG2D-결합 도메인은 NK 세포를 활성화시킨다**

[0169] 일차 인간 NK 세포

[0170] 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 밀도 구배 원심분리를 이용하여 인간 말초 혈액 연막으로부터 분리하였다. NK 세포 ($CD3^- CD56^+$)를 자성 비드에 의한 음성 선택을 이용하여 PBMC로부터 분리하였고, 분리된 NK 세포의 순도는 전형적으로 >95%이었다. 이어서, 분리된 NK 세포를 NKG2D-결합 도메인이 흡착되어 있는 마이크로플레이트의 웰로 옮기기 전에, 이들을 100 ng/mL IL-2를 함유하는 배지에서 24-48 시간 동안 배양하였고, 형광단-접합된 항-CD107a 항체, 브레펠딘-A, 및 모넨신을 함유하는 배지에서 배양하였다. 배양 후에, NK 세포를 CD3, CD56 및 IFN-감마에 대한 형광단-접합된 항체를 사용하여 유동 세포분석법에 의해 검정하였다. CD107a 및 IFN-감마 염색을 $CD3^- CD56^+$ 세포에서 분석하여, NK 세포 활성화를 평가하였다. CD107a/IFN-감마 이중-양성 세포에서의 증가는 1개의 수용체보다는 2개의 활성화 수용체의 결속을 통한 보다 양호한 NK 세포 활성화를 나타낸다. NKG2D-결합 도메인 및 양성 대조군 (SEQ ID NO:45-48로부터 선택됨)은 이소타입 대조군에 비해 $CD107a^+$ 및 IFN-감마⁺가 되는 NK 세포의 높은 백분율을 나타내었다 (도 24 & 도 25는 NK 세포 준비를 위해 상이한 공여자의 PBMC를 각각 사용하는 2회의 독립적인 실험을 나타냄).

[0171] 일차 마우스 NK 세포

[0172] 비장을 C57B1/6 마우스로부터 입수하였고, 70 µm 세포 스트레이너를 통해 분쇄하여, 단일 세포 현탁액을 수득하였다. 세포를 펠렛화하고, ACK 용해 완충제 (썬모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific)으로부터 구입함, #A1049201; 155mM 염화암모늄, 10mM 중탄산칼륨, 0.01mM EDTA) 중에 재현탁시켜, 적혈구를 제거하였다. NK 세포 단리를 위해 수확하고 준비하기 전에 남아있는 세포를 100 ng/mL hIL-2와 함께 72 시간 동안 배양하였다. 이어서, 자성 비드를 사용하는 음성 고갈 기술을 이용하여 비장 세포로부터 NK 세포 ($CD3^- NK1.1^+$)를 전형적으로 >90% 순도로 분리하였다. 정제된 NK 세포를 NKG2D-결합 도메인이 흡착되어 있는 마이크로플레이트의 웰로 옮기기 전에, 이들을 100 ng/mL mIL-15를 함유하는 배지에서 48 시간 동안 배양하고, 형광단-접합된 항-CD107a 항체, 브레펠딘-A, 및 모넨신을 함유하는 배지에서 배양하였다. NKG2D-결합 도메인-코팅된 웰에서 배양한 후에, NK 세포를 CD3, NK1.1 및 IFN-감마에 대한 형광단-접합된 항체를 사용하여 유동 세포분석법에 의해 검정하였다. CD107a 및 IFN-감마 염색을 $CD3^- NK1.1^+$ 세포에서 분석하여 NK 세포 활성화를 평가하였다. CD107a/IFN-감마 이중-양성 세포에서의 증가는 1개의 수용체보다는 2개의 활성화 수용체의 결속을 통한 보

다 양호한 NK 세포 활성화를 나타낸다. NKG2D-결합 도메인 및 양성 대조군 (이바이오사이언스에서 입수가능한 항-마우스 NKG2D 클론 MI-6 및 CX-5로부터 선택됨)은 이소타입 대조군에 비해 CD107a⁺ 및 IFN-감마⁺가 되는 NK 세포의 높은 백분율을 나타내었다 (도 26 & 도 27은 NK 세포 준비를 위해 상이한 마우스를 각각 사용하는 2회의 독립적인 실험을 나타냄).

[0173] **실시예 5 - NKG2D-결합 도메인은 표적 종양 세포의 세포독성을 가능하게 한다**

[0174] 인간 및 마우스 일차 NK 세포 활성화 검정은 NKG2D-결합 도메인과 함께 인큐베이션한 후에 NK 세포 상의 증가된 세포독성 마커를 입증한다. 이것이 증가된 종양 세포 용해로 해석되는지 여부를 다루기 위해, 각각의 NKG2D-결합 도메인을 단일특이적 항체로 발달시키는 세포-기반 검정을 이용하였다. Fc 영역은 1개의 표적화 아암으로서 사용된 반면에, Fab 영역 (NKG2D-결합 도메인)은 또 다른 표적화 아암으로서 작용하여, NK 세포를 활성화시켰다. 인간 기원이며 높은 수준의 Fc 수용체를 발현하는 THP-1 세포를 종양 표적으로서 사용하였고, 퍼킨 엘머(Perkin Elmer) DELFIA 세포독성 키트를 사용하였다. THP-1 세포를 BATDA 시약으로 표지화하고, 배양 배지에서 10⁵/mL로 재현탁시켰다. 이어서, 표지화된 THP-1 세포를 마이크로타이터 플레이트의 웰에서 37°C에서 3 시간 동안 NKG2D 항체 및 단리된 마우스 NK 세포와 조합하였다. 인큐베이션 후에, 20 µl의 배양물 상청액을 제거하고, 200 µl의 유로폼 용액과 혼합하고, 어두운 곳에서 진탕하면서 15 분 동안 인큐베이션하였다. 시간-분해 형광 모듈을 구비한 페라스타(PheraStar) 플레이트 판독기에 의해 시간에 걸쳐 형광을 측정하였고 (여기 337nm, 방출 620nm), 특이적 용해를 키트 지침에 따라 계산하였다.

[0175] 양성 대조군, ULBP-6 (NKG2D에 대한 천연 리간드)은 마우스 NK 세포에 의한 THP-1 표적 세포의 증가된 특이적 용해를 나타내었다. NKG2D 항체 또한 THP-1 표적 세포의 증가된 특이적 용해를 나타낸 반면에, 이소타입 대조군 항체는 감소된 특이적 용해를 나타내었다. 점선은 항체를 첨가하지 않고 마우스 NK 세포에 의한 THP-1 세포의 특이적 용해를 나타낸다 (도 28).

[0176] **실시예 6 - NKG2D 항체는 높은 열안정성을 나타낸다**

[0177] NKG2D-결합 도메인의 용점을 시차 주사 형광측정법을 이용하여 검정하였다. 외삽된 겉보기 용점은 전형적인 IgG1 항체에 비해 높았다 (도 29).

[0178] **실시예 7 - 다중-특이적 결합 단백질은 NK 세포를 활성화시키는 증진된 능력을 제시한다**

[0179] 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 밀도 구배 원심분리를 이용하여 인간 말초 혈액 연막으로부터 단리하였다. NK 세포 (CD3⁻CD56⁺)를 자성 비드에 의한 음성 선택을 이용하여 PBMC로부터 단리하였고, 단리된 NK 세포의 순도는 전형적으로 >95%이었다. 이어서 단리된 NK 세포를 다중-특이적 및 이중특이적 결합 단백질이 각각 흡착되어 있는 마이크로플레이트의 웰로 옮기기 전에, 이들을 100 ng/mL IL-2를 함유하는 배지에서 24-48 시간 동안 배양하고, 형광단-접합된 항-CD107a 항체, 브레펠딘-A, 및 모넨신을 함유하는 배지에서 배양하였다. 배양 이후, NK 세포를 CD3, CD56 및 IFN-감마에 대한 형광단-접합된 항체를 이용하여 유동 세포분석법에 의해 검정하였다. CD107a 및 IFN-감마 염색을 CD3⁻CD56⁺ 세포에서 분석하여 NK 세포 활성화를 평가하였다. CD107a/IFN-감마 이중-양성 세포에서의 증가는 보다 양호한 NK 세포 활성화를 나타낸다. AL2.2는 HER2-결합 도메인 (트라스투주맵), NKG2D-결합 도메인 (ULBP-6) 및 인간 IgG1 Fc 도메인을 함유하는 다중-특이적 결합 단백질이다. 이는 트라스투주맵 동종이량체 및 ULBP-6-Fc 동종이량체로부터 출발하여 조절된 Fab-아암 교환 반응 (cFAE)을 통해 제조되었다 (문헌 [Labrijn et al. Nature Protocols 9, 2450-2463] 참고). SC2.2는 트라스투주맵으로부터 유래된 scFv, 및 ULBP-6를 포함하는 단일 체 단백질 (SEQ ID NO:73)이다.

SEQ ID NO: 73

MAAAAIPALLLCLPLLFLFGWSRARRDDPHSLCYDITVIPKFRPGPRWCAVQGQVD
EKTFLHYDCGNKTVTPVSPLGKKNVTMAWKAQNPVLREVVDILTEQLLDIQLENY
TPKEPLTLQARMSCEQKAEGHSSGSWQFSIDGQTFLFDSEKRMWTTVHPGARKMK
EKWENDKDVAMSFHYISMGDCIGWLEDFLMGMDSTLEPSAGAPLAMSSGTTQLRA
TATTLLCCLLIILPCFILPGI

[0180]

[0181] CD107a 및 IFN-감마 염색의 분석은, 이소타입 대조군 IgG는 NK 세포의 활성화를 나타내지 않는 반면에, 이중특

이적 단백질에 비해 다중-특이적 결합 단백질로 자극된 후에 CD107a+ 및 IFN- γ 가 되는 NK 세포의 보다 높은 백분율을 나타내며, 이는 단지 1개 (NKG2D)에 비해 2개의 활성화 수용체 (NKG2D 및 CD16)의 결속을 통한 더욱 강력한 NK 세포 활성화를 입증한다 (도 30). NK 세포 활성화에서 이러한 증가는 더욱 강력한 종양 세포 사멸로 해석되는 것으로 예상된다.

[0182] 실시예 8 - 다중-특이적 결합 단백질은 표적 종양 세포에 대해 증진된 세포독성을 제시한다

[0183] 일차 인간 NK 세포 세포독성 검정

[0184] 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 밀도 구배 원심분리를 이용하여 인간 말초 혈액 연막으로부터 분리하였다. NK 세포 ($CD3^+ CD56^+$)를 자성 비드에 의한 음성 선택을 이용하여 PBMC로부터 분리하였고, 분리된 NK 세포의 순도는 전형적으로 >95%이었다. 이어서, NK 세포를 세포독성 검정에서 사용하기 전에 100ng/mL IL-2를 함유하는 배지에서 밤새 배양하였다. 다음 날, NK 세포를 신선한 배양 배지 중에서 5×10^5 /mL로 재현탁시켰다. 인간 유방암 세포 SkBr-3 세포를 퍼킨 엘머 DELFIA 세포독성 키트에 따라 BATDA 시약으로 표지화하고, 배양 배지 중에서 5×10^4 /mL로 재현탁시켰다. 다중-특이적 결합 단백질의 다양한 희석액을 배양 배지로 만들었다. 이어서, NK 세포, 표지화된 SkBr-3 세포 및 다중-특이적 결합 단백질을 마이크로타이터 플레이트의 웰에서 조합하고, 37°C에서 3 시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후에, 20 μ L의 배양물 상청액을 제거하고, 200 μ L의 유로폼 용액과 혼합하고, 어두운 곳에서 진탕하면서 15 분 동안 인큐베이션하였다. 시간-분해 형광 모듈을 구비한 페라스타 플레이트 판독기에 의해 시간에 걸쳐 형광을 측정하였고 (여기 337nm, 방출 620nm), 특이적 용해를 키트 지침에 따라 계산하였다. AL0.2는 HER2-결합 도메인 (트라스투주맵), NKG2D-결합 도메인 (SEQ ID NO:1-44로부터 선택됨) 및 인간 IgG1 Fc 도메인을 함유하는 다중-특이적 결합 단백질이다. 이는 트라스투주맵 동종이량체 및 항-NKG2D 동종이량체로부터 출발하여 조절된 Fab-아암 교환 반응 (cFAE)을 통해 제조되었다. AL0.2si는 AL0.2를 기반으로 하고, CD16 결합을 제거하는 Fc 도메인에서의 추가의 D265A 돌연변이를 함유한다. 트라스투주맵-si는 트라스투주맵을 기반으로 하고, CD16 결합을 제거하는 Fc 도메인에서의 추가의 D265A 돌연변이를 함유한다. AL2.2는 HER2-결합 도메인 (트라스투주맵), NKG2D-결합 도메인 (ULBP-6) 및 인간 IgG1 Fc 도메인을 함유하는 다중-특이적 결합 단백질이다. SC2.2는 트라스투주맵으로부터 유래된 scFv, 및 ULBP-6을 포함하는 단일 체 단백질이다.

[0185] AL0.2는 용량 의존성 방식으로 트라스투주맵에 비해 인간 NK 세포에 의한 SkBr-3 표적 세포의 증진된 용해를 나타내었고, EC50에서 0.0311의 p 값을 가졌다 (도 31). AL0.2si (도 32) 및 트라스투주맵-si (도 33)은 AL0.2에 비해 SkBr-3 세포의 효능 및 최대 특이적 용해 둘 다에서의 감소를 나타내었고, EC50에서 각각 0.0002 및 0.0001의 p-값을 가졌다 (도 32-33). 또한, AL0.2는 용량 의존성 방식으로 AL2.2에 비해 SkBr-3 세포의 증진된 용해를 나타내었다 (도 34). 이소타입 대조군 IgG는 시험한 임의의 농도에서 특이적 용해의 증가를 나타내지 않았다. 이와 함께, 데이터는 NK 세포 상의 2개의 활성화 수용체 및 1개의 종양 항원에 결합하는 다중-특이적 결합 단백질이 NK 세포 상의 1개의 활성화 수용체 및 1개의 종양 항원에 결합하는 이중특이적 단백질에 비해 인간 NK 세포에 의한 종양 세포의 더욱 강력한 사멸을 유도함을 입증하였다.

[0186] 일차 마우스 NK 세포 세포독성 검정

[0187] 비장을 C57B1/6 마우스로부터 입수하였고, 70 μ m 세포 스트레이너를 통해 분쇄하여, 단일 세포 현탁액을 수득하였다. 세포를 펠렛화하고, ACK 용해 완충제 (썬코 피셔 사이언티픽으로부터 구입함, #A1049201; 155mM 염화암모늄, 10mM 중탄산칼륨, 0.01mM EDTA) 중에 재현탁시켜, 적혈구를 제거하였다. NK 세포 단리를 위해 수확하고 준비하기 전에 남아있는 세포를 100 ng/mL hIL-2와 함께 72 시간 동안 배양하였다. 이어서, 자성 비드에 의한 음성 고갈 기술을 이용하여 비장 세포로부터 NK 세포 ($CD3^+ NK1.1^+$)를 전형적으로 >90% 순도로 분리하였다. 정제된 NK 세포를 세포독성 검정을 위해 10^6 /mL에서 배양 배지에 재현탁시키기 전에 100 ng/mL mIL-15를 함유하는 배지에서 48 시간 동안 배양하였다. RMA-HER2-dTomato, HER2 및 dTomato를 발현하도록 조작된 마우스 종양 세포주, 및 그의 대조군 대응물, RMA zsGreen을 발현하는 세포를 표적으로서 사용하였다. 이들을 배양 배지 중에서 2×10^5 /mL로 재현탁시키고, 마이크로플레이트의 웰에 1:1 비로 시팅하였다. 다중-특이적 단백질의 희석액을 배양 배지로 만들고, NK 세포와 함께 RMA 세포에 첨가하였다. 밤새 37°C에서 5% CO₂하에 인큐베이션한 후에, RMA-HER2-dTomato 및 RMA-zsGreen 세포의 백분율을 형광 리포터를 이용하여 유동 세포분석법에 의해 결정하여, 2가지 세포 유형을 확인하였다. 특이적 표적 세포 사멸 = (1 - ((처리 그룹에서 % RMA-Ca2T-dTomato 세포 * 대

조군 그룹에서 % RMA-zsGreen 세포)/((대조군 그룹에서 % RMA-Ca2T-dTomato 세포 * 처리 그룹에서 % RMA-zsGreen 세포))) * 100%.

[0188] AL2.2는 SC2.2 (도 36) 및 트라스투주맙 (도 35)에 비해 종양 표적에 대한 NK 세포 반응을 재지정하는데 더욱 강력하다. 대조군 단백질은 특이적 표적 사멸에 대해 거의 효과를 나타내지 않았다. 이들 데이터는, NK 세포 상의 2개의 활성화 수용체 및 1개의 종양 항원에 결합하는 다중-특이적 결합 단백질이 NK 세포 상의 1개의 활성화 수용체 및 1개의 종양 항원에 결합하는 이중특이적 단백질에 비해 마우스 NK 세포에 의한 종양 세포의 더욱 강력한 사멸을 유도함을 입증한다.

[0189] 실시예 9 - 다중-특이적 결합 단백질은 NKG2D에 결합한다

[0190] EL4 마우스 림프종 세포주를 도 1에 제시된 바와 같이 각각 NKG2D-결합 도메인, 종양-연관 항원 결합 도메인 (예컨대, CD33-, HER2-, CD20- 또는 BCMA-결합 도메인) 및 CD16에 결합하는 Fc 도메인을 함유하는 인간 NKG2D 삼중특이적 결합 단백질 (TriNKET)을 발현하도록 조작하였고, EL4 세포 상에서 발현된 세포의 NKG2D에 대한 그들의 친화도에 대해 시험하였다. NKG2D에 대한 다중-특이적 결합 단백질의 결합을 형광단-접합된 항-인간 IgG 이차 항체를 이용하여 검출하였다. 세포를 유동 세포분석법에 의해 분석하였고, 백그라운드 대비 배수 (FOB)를 도 EL4 세포와 비교하여 NKG2D-발현 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 이용하여 계산하였다.

[0191] 시험한 TriNKET에는 CD33-TriNKET-C26 (ADI-28226 및 CD33-결합 도메인), CD33-TriNKET-F04 (ADI-29404 및 CD33-결합 도메인), HER2-TriNKET-C26 (ADI-28226 및 HER2-결합 도메인), HER2-TriNKET-F04 (ADI-29404 및 HER2-결합 도메인), CD20-TriNKET-C26 (ADI-28226 및 CD20-결합 도메인), CD20-TriNKET-F04 (ADI-29404 및 CD20-결합 도메인), BCMA-TriNKET-C26 (ADI-28226 및 BCMA-결합 도메인), BCMA-TriNKET-F04 (ADI-29404 및 BCMA-결합 도메인), BCMA-TriNKET-F43 (ADI-29443 및 BCMA-결합 도메인), 및 BCMA-TriNKET-F47 (ADI-29447 및 BCMA-결합 도메인)이 포함된다. 시험한 분자에서 사용된 HER2-결합 도메인은 트라스투주맙의 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인으로 구성되었다. CD33-결합 도메인은 하기 열거된 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인으로 구성되었다.

SEQ ID NO:74:

QVQLVQSGAEVVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYVVHWVRQAPGQGLEWMGYINPY
ND
CDR1
GTKYNEKFKGRVTMTRDTSISTAYMELSLRSDDTAVYYCARDYRYEVYGM₁MDYWG
Q
CDR2
GTLVTVSS
CDR3

SEQ ID NO:75:

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCTASSSVNYIHWYQQKPGQP₁PKLLIYDTSKVASGVP
AR
CDR1
FSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYCQQWRSYPLTFGQGTKLEIK
CDR3

[0192]

[0193] 시험한 분자에서 사용된 CD20-결합 도메인은 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인으로 구성되었다. 시험한 분자에서 사용된 BCMA-결합 도메인은 하기 열거된 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인으로 구성되었다.

EM-801 중쇄 가변 도메인 (SEQ ID NO:82):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGG
 CDR1 CDR2
 STYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGT
 LVTSS CDR3

EM-801 경쇄 가변 도메인 (SEQ ID NO:83):

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI
 CDR1 CDR2
 PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGYPDFTFGQGTKVEIK
 CDR3

EM-901 중쇄 가변 도메인 (SEQ ID NO:76)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWVRQAPGKGLEWVSAISGPS
 ST
 CDR1 CDR2
 YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGT
 LVSS CDR3

EM-901 경쇄 가변 도메인 (SEQ ID NO:77)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSDEYLSWYQQKPGQAPRLLIHSASTRATGI
 PD
 CDR1 CDR2
 RFSGSGSGTDFTLAISRLEPEDFAVYYCQQYGYPDFTFGQGTKVEIK
 CDR3

[0194]

[0195] 데이터는, 단백질이 종양 항원-결합 도메인, 예컨대 CD33, HER2, CD20 및 BCMA를 포함할 때, 본 개시내용의 TriNKET가 NKG2D에 결합함을 나타낸다.

[0196] 실시예 10 - 다중-특이적 결합 단백질은 인간 종양 항원에 결합한다

[0197] 삼중특이적-결합 단백질은 CD33, HER2, CD20 및 BCMA에 결합한다

[0198] CD33을 발현하는 인간 AML 세포주 MV4-11을 이용하여, 종양 연관 항원에 대한 TriNKET의 결합을 검정하였다. TriNKET 및 모 항-CD33 모노클로날 항체를 상기 세포와 함께 인큐베이션하고, 형광단-접합된 항-인간 IgG 이차 항체를 이용하여 결합을 검출하였다. 세포를 유동 세포분석법에 의해 분석하였고, 백그라운드 대비 배수 (FOB)를 이차 항체 대조군에 대해 정규화된 TriNKET 및 모 모노클로날 항-CD33 항체로부터의 평균 형광 강도 (MFI)를 이용하여 계산하였다. CD33-TriNKET-C26 및 CD33-TriNKET-F04는 모 항-CD33 항체와 비교할 때 CD33에 대해 유사한 수준의 결합을 나타낸다 (도 41).

[0199] HER2를 발현하는 인간 암 세포주를 이용하여 종양 연관 항원에 대한 TriNKET의 결합을 검정하였다. 신세포 암 종 세포주 786-0은 낮은 수준의 HER2를 발현한다. TriNKET 및 임의적으로 모 항-HER2 모노클로날 항체 (트라스 투주맵)를 상기 세포와 함께 인큐베이션하였고, 형광단-접합된 항-인간 IgG 이차 항체를 이용하여 결합을 검출 하였다. 세포를 유동 세포분석법에 의해 분석하였고, 백그라운드 대비 배수 (FOB)를 이차 항체 대조군에 대해 정규화된 TriNKET 및 트라스투주맵으로부터의 평균 형광 강도 (MFI)를 이용하여 계산하였다. HER2-TriNKET-C26 및 HER2-TriNKET-F04는 트라스투주맵과 비교할 때 786-0 세포 상에서 발현된 HER2에 대해 유사한 수준의 결합을 나타낸다 (도 42).

[0200] BCMA를 발현하는 MM.1S 인간 골수종 세포를 사용하여 종양 연관 항원 BCMA에 대한 TriNKET의 결합을 검정하였다. TriNKET 및 임의적으로 모 항-BCMA 모노클로날 항체 (EM-801)를 상기 세포와 함께 인큐베이션하였고, 형광단-접합된 항-인간 IgG 이차 항체를 이용하여 결합을 검출하였다. 세포를 유동 세포분석법에 의해 분

석하였고, 백그라운드 대비 배수 (FOB)를 이차 항체 대조군에 대해 정규화된 TriNKET 및 EM-801로부터의 평균 형광 강도 (MFI)를 이용하여 계산하였다. C26--TriNKET-BCMA, F04-TriNKET-BCMA, F43-TriNKET-BCMA 및 F47-TriNKET-BCMA는 EM-801과 비교할 때 MM.1S 세포 상에서 발현된 BCMA에 대해 유사한 수준의 결합을 나타낸다 (도 43).

[0201] CD20을 발현하는 Raji 인간 림프종 세포를 사용하여 와 중양 연관 항원 CD20에 대한 TriNKET의 결합을 검정하였다. TriNKET를 상기 세포와 함께 인큐베이션하였고, 형광단-접합된 항-인간 IgG 이차 항체를 이용하여 결합을 검출하였다. 세포를 유동 세포분석법에 의해 분석하였고, 히스토그램을 플롯하였다. 도 44에 제시된 바와 같이, CD20-TriNKET-C26 및 CD20-TriNKET-F04는 CD20에 동등하게 잘 결합한다.

[0202] **실시예 11 - 다중-특이적 결합 단백질은 NK 세포를 활성화시킨다**

[0203] 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 밀도 구배 원심분리를 이용하여 인간 말초 혈액 연막으로부터 분리하였다. NK 세포 ($CD3^{-}CD56^{+}$)를 자성 비드에 의한 음성 선택을 이용하여 PBMC로부터 분리하였고, 분리된 NK 세포의 순도는 전형적으로 >90%이었다. 분리된 NK 세포를 활성화를 위해 100ng/mL IL-2를 함유하는 배지에서 배양하거나 또는 시토카인 없이 밤새 휴지시켰다. IL-2-활성화된 NK 세포를 활성화 이후 24-48 시간 내에 사용하였다.

[0204] 중양 항원을 발현하는 인간 암 세포를 수확하고, 배양 배지 중에서 2×10^6 /mL로 재현탁시켰다. 중양 항원을 표적으로 하는 모노클로날 항체 또는 TriNKET를 배양 배지에서 회석하였다. 활성화된 NK 세포를 수확하고, 세척하고, 배양 배지 중에서 2×10^6 /mL로 재현탁시켰다. 이어서, 암 세포를 IL-2의 존재하에 모노클로날 항체/TriNKET 및 활성화된 NK 세포와 혼합하였다. 브레펠딘-A 및 모넨신 또한 혼합된 배양물에 첨가하여, 세포내 시토카인 염색을 위해 세포로부터 단백질 수송을 차단하였다. 형광단-접합된 항-CD107a를 혼합된 배양물에 첨가하고, CD3, CD56 및 IFN-감마에 대한 형광단-접합된 항체를 이용하여 FACS 분석을 위한 샘플을 준비하기 전에, 배양물을 4 시간 동안 인큐베이션하였다. CD107a 및 IFN-감마 염색을 $CD3^{-}CD56^{+}$ 세포에서 분석하여 NK 세포 활성화를 평가하였다. CD107a/IFN-감마 이중-양성 세포에서의 증가는 1개의 수용체보다는 2개의 활성화 수용체의 결속을 통한 보다 양호한 NK 세포 활성화를 나타낸다.

[0205] TriNKET는 각각 HER2-발현 SkBr-3 세포 (도 47a), Colo201 세포 (도 47b) 및 HCC1954 세포 (도 47c)와 공동-배양된 인간 NK 세포의 활성화를 매개하고, 이는 CD107a 탈과립화 및 IFN-감마 생산의 증가에 의해 나타난다. SkBr-3 세포 및 HCC1954 세포는 높은 수준의 표면 HER2 발현을 갖고, Colo201은 중간 HER2 발현을 갖는다. 모노클로날 항체 트라스투주맙과 비교하여, TriNKET는 인간 암 세포의 존재하에 인간 NK 세포의 우수한 활성화를 나타낸다. NK 세포 단독, NK 세포 + SkBr-3 세포는 음성 대조군으로서 사용된다.

[0206] TriNKET (C26-TriNKET-HER2 및 F04-TriNKET-HER2)는 CD33-발현 인간 AML Mv4-11 세포와 공동-배양된 인간 NK 세포의 활성화를 매개하고, 이는 CD107a 탈과립화 및 IFN-감마 생산의 증가를 나타낸다. 모노클로날 항-CD33 항체에 비해, TriNKET (C26-TriNKET-HER2 및 F04-TriNKET-HER2)는 HER2를 발현하는 인간 암 세포의 존재하에 인간 NK 세포의 우수한 활성화를 나타내었다 (도 47a-47c).

[0207] **일차 인간 NK 세포는 표적 발현 인간 암 세포주와 공동-배양된 TriNKET에 의해 활성화된다**

[0208] 일차 인간 NK 세포와 CD20-양성 인간 암 세포의 공동-배양은 일차 인간 NK 세포의 TriNKET-매개된 활성화를 일으킨다 (도 62). CD20을 표적으로 하는 TriNKET (예를 들어, C26-TriNKET-CD20 및 F04-TriNKET-CD20)는 CD20-양성 Raji 세포와 공동-배양된 인간 NK 세포의 활성화를 매개하였고, 이는 CD107a 탈과립화 및 IFN- γ 시토카인 생산에서의 증가에 의해 나타난다 (도 62). 모노클로날 항체 리툽시맙과 비교할 때, TriNKET (예를 들어, C26-TriNKET-CD20 및 F04-TriNKET-CD20) 둘 다 인간 NK 세포의 우수한 활성화를 나타내었다 (도 62).

리톡시맵_vH

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGN

CDR1

CDR2

GDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNV

WGAGTTVTVSA (SEQ ID NO:84)

CDR3

리톡시맵_vL

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFAQKPGSSPKPWIYATSNLASGVP

CDR1

CDR2

VRFGSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:85)

CDR3

[0209]

[0210]

일차 인간 NK 세포와 BCMA-양성 MM.1S 골수종 세포의 공동-배양은 일차 인간 NK 세포의 TriNKET-매개된 활성화를 일으킨다. BCMA를 표적으로 하는 TriNKET (예를 들어, C26-TriNKET-BCMA 및 F04-TriNKET-BCMA)는 MM.1S 골수종 세포와 공동-배양된 인간 NK 세포의 활성화를 매개하였고, 이는 CD107a 탈과립화 및 IFN γ 시토카인 생산에서의 증가에 의해 나타난다 (도 63). 이소타입 TriNKET와 비교할 때, BCMA를 표적으로 하는 TriNKET (예를 들어, A44-TriNKET-BCMA, A49-TriNKET-BCMA, C26-TriNKET-BCMA, F04-TriNKET-BCMA, F43-TriNKET-BCMA, F43-TriNKET-BCMA, F47-TriNKET-BCMA, 및 F63-TriNKET-BCMA)는 증가된 NK 세포 활성을 나타내었다 (도 63).

[0211]

실시예 12 - 삼중특이적-결합 단백질은 표적 암 세포의 세포독성을 가능하게 한다

[0212]

말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 밀도 구배 원심분리를 이용하여 인간 말초 혈액 연막으로부터 분리하였다. NK 세포 (CD3⁺ CD56⁺)를 자성 비드에 의한 음성 선택을 이용하여 PBMC로부터 분리하였고, 분리된 NK 세포의 순도는 전형적으로 >90%이었다. 분리된 NK 세포를 활성화를 위해 100ng/mL IL-2를 함유하는 배지에서 배양하거나 또는 시토카인 없이 밤새 휴지시켰다. IL-2-활성화된 또는 휴지된 NK 세포를 다음 날 세포독성 검정에서 사용하였다.

[0213]

인간 NK 세포가 TriNKET의 존재하에 암 세포를 용해시키는 능력을 시험하기 위해, 프로메가(Promega)로부터의 시토 독소(cyto Tox) 96 비-방사선 활성 세포독성 검정 (G1780)을 제조자의 지침에 따라 이용하였다. 간략히, 종양 항원을 발현하는 인간 암 세포를 수확하고, 세척하고, 배양 배지 중에서 $1-2 \times 10^5$ /mL로 재현탁시켰다. 휴지된 및/또는 활성화된 NK 세포를 수확하고, 세척하고, 암 세포에서와 동일한 배양 배지 중에서 $10^5-2.0 \times 10^6$ /mL로 재현탁시켰다. 96 웰 플레이트의 각각의 웰에서, 암 세포 상에서 발현된 종양 항원을 표적으로 하는 TriNKET이 있거나 없이 50 μ L의 암 세포 현탁액을 50 μ L의 NK 세포 현탁액과 혼합하였다. 37°C에서 5% CO₂하에 3 시간 15 분 동안 인큐베이션한 후에, 10x 용해 완충제를 각각 최대 용해 및 음성 시약 대조군으로서 암 세포만을 함유하는 웰에 및 배지만을 함유하는 웰에 첨가하였다. 이어서, 플레이트를 추가 45 분 동안 다시 인큐베이터에 두어서, 총 4 시간의 인큐베이션에 도달하였다. 이어서, 세포를 펠렛화하고, 배양물 상청액을 새로운 96 웰 플레이트로 옮기고, 발달을 위해 기질과 혼합하였다. 새로운 플레이트를 실온에서 30 분 동안 인큐베이션하고, 흡광도를 스펙트럼맥스(SpectraMax) i3x 상에서 492nm에서 판독하였다. 암 세포의 특이적 용해의 백분율을 다음과 같이 계산하였다: % 특이적 용해 = ((실험적 용해 - NK 세포 단독으로부터 자발적 용해 - 암 세포 단독으로부터 자발적 용해) / (최대 용해 - 음성 시약 대조군)) x 100%.

[0214]

TriNKET는 CD33-양성 Molm-13 인간 AML 세포주에 대한 인간 NK 세포의 세포독성을 매개한다. 도 53b에 제시된 바와 같이, 휴지된 인간 NK 세포를 Molm-13 암 세포와 혼합하였고, TriNKET (예를 들어, C26-TriNKET-CD33 및 F04-TriNKET-CD33)는 암 세포에 대해 용량-반응성 방식으로 휴지된 인간 NK 세포의 세포독성 활성을 증진시킬 수 있다. 점선은 TriNKET 없이 휴지된 NK 세포의 세포독성 활성을 나타낸다. 활성화된 인간 NK 세포를 Molm-13 암 세포와 혼합하였고, TriNKET는 암 세포에 대해 용량-반응성 방식으로 활성화된 인간 NK 세포의 세포독성 활성을 항-CD33 항체에 비해 심지어 추가로 증진시킨다 (도 53b).

[0215]

TriNKET는 트라스투주맵, 항-HER2 모노클로날 항체의 세포독성 활성에 비해 낮은 표면 발현을 갖는 표적에 대한 NK 세포 세포독성을 증진시킨다. 휴지된 인간 NK 세포를 높은 HER2-발현 SkBr 종양 세포 및 낮은 HER2-발현

786-O 암 세포와 혼합하였고, 높은 및 낮은 HER2-발현 암 세포에 대한 휴지된 인간 NK 세포의 세포독성 활성을 용량-반응성 방식으로 증진시키는 TriNKET의 능력을 검정하였다. 도 50a 및 도 50b에서 점선은 TriNKET의 부재 하에 암 세포에 대한 휴지된 NK 세포의 세포독성 활성을 나타낸다. 도 50b에 제시된 바와 같이, 활성화된 인간 NK 세포를 낮은 HER2-발현 786-O 세포 및 TriNKET (예를 들어, CD26-TriNKET-HER2 및 F04-TriNKET-HER2)와 혼합할 때, 암 세포에 대한 활성화된 인간 NK 세포의 용량-반응성 세포독성 활성이 관찰되었다.

[0216] BCMA 양성 골수종 세포의 TriNKET-매개된 용해를 검정하였다. 도 64는 휴지된 인간 NK 이펙터 세포에 의한 BCMA-양성 KMS12-PE 골수종 세포의 TriNKET-매개된 용해를 제시한다. 동일한 NKG2D-결합 도메인 (A49) 및 상이한 BCMA 표적화 도메인을 사용하는 2가지 TriNKET (cFAE-A49.801 및 cFAE-A49.901)를 시험관 내에서 효능에 대해 시험하였다. 두 TriNKET 모두 KMS12-PE 세포의 NK 세포 용해를 유사한 정도로 증진시켰지만, EM-901 표적화 도메인을 사용한 TriNKET는 증가된 효능을 제공하였다.

[0217] 도 65는 상이한 NKG2D-결합 도메인 (A40, A44, A49, C26, 및 F47) 및 동일한 BCMA 표적화 도메인을 사용하는 몇몇 TriNKET의 세포독성 활성을 제시한다. BCMA-표적화된 TriNKET의 NKG2D-결합 도메인의 변화는 최대 사멸에서 뿐만 아니라 TriNKET의 효능에서의 변동을 제공하였다. 모든 TriNKET는 EM-901 모노클로날 항체에 비해 KMS12-PE 표적 세포의 증가된 사멸을 입증하였다 (도 65).

[0218] 실시예 13

[0219] NKG2D와 CD16을 가교시킴으로써 인간 NK 세포의 상승작용적 활성화를 연구하였다.

[0220] 일차 인간 NK 세포 활성화 검정

[0221] 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 밀도 구배 원심분리를 이용하여 말초 인간 혈액 연막으로부터 분리하였다. 음성 자성 비드 (스텝셀(StemCell) # 17955)를 사용하여 NK 세포를 PBMC로부터 정제하였다. NK 세포는 유동 세포분석법에 의해 결정된 바와 같이 $>90\%$ $CD3^+CD56^+$ 이었다. 이어서, 세포를 활성화 검정에서 사용하기 전에 100 ng/mL hIL-2 (페프로테크(Peprotech) #200-02)를 함유하는 배지에서 48 시간 동안 확장시켰다. 항체를 96-웰 플레이트 바닥 플레이트 상에 $100\text{ }\mu\text{L}$ 멸균 PBS 중 $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ (항-CD16, 바이오레전드(Biolegend) # 302013) 및 $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ (항-NKG2D, 알앤디 #MAB139)의 농도로 밤새 4°C 에서 코팅한 후, 웰을 철저히 세척하여 과잉의 항체를 제거하였다. 탈과립화를 평가하기 위해, IL-2-활성화된 NK 세포를 100 ng/mL hIL2 및 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ APC-접합된 항-CD107a mAb (바이오레전드 # 328619)로 보충된 배양 배지 중에서 5×10^5 세포/mL로 재현탁시켰다. 이어서, 1×10^5 세포/웰을 항체 코팅된 플레이트 상에 첨가하였다. 단백질 수송 억제제 브레펠딘 A (BFA, 바이오레전드 # 420601) 및 모넨신 (바이오레전드 # 420701)을 각각 1:1000 및 1:270의 최종 희석으로 첨가하였다. 플레이트된 세포를 37°C 에서 5% CO_2 하에 4 시간 동안 인큐베이션하였다. IFN- γ 의 세포내 염색을 위해, NK 세포를 항-CD3 (바이오레전드 #300452) 및 항-CD56 mAb (바이오레전드 # 318328)로 표지화하고, 후속적으로 고정하고, 투과화시키고, 항-IFN- γ mAb (바이오레전드 # 506507)로 표지화하였다. NK 세포를 살아있는 $CD56^+CD3^+$ 세포 상에 게이팅한 후에 유동 세포분석법에 의해 CD107a 및 IFN- γ 의 발현에 대해 분석하였다.

[0222] 수용체 조합물의 상대적인 효능을 연구하기 위해, 플레이트-결합된 자극에 의한 NKG2D 또는 CD16의 가교 및 두 수용체의 공동 가교를 수행하였다. 도 45 (도 45a-45c)에 제시된 바와 같이, CD16 및 NKG2D의 조합된 자극은 매우 상승된 수준의 CD107a (탈과립화) (도 45a) 및/또는 IFN- γ 생산 (도 45b)을 나타내었다. 점선은 각각의 수용체의 개별 자극의 상가적 효과를 나타낸다.

[0223] 항-CD16, 항-NKG2D, 또는 두 모노클로날 항체의 조합물에 의한 플레이트-결합된 자극 4 시간 후에 IL-2-활성화된 NK 세포의 CD107a 수준 및 세포내 IFN- γ 생산을 분석하였다. 그래프는 평균 ($n = 2$) $\pm$ SD를 나타낸다. 도 45a는 CD107a의 수준을 입증하고; 도 45b는 IFN- γ 의 수준을 입증하고; 도 45c는 CD107a 및 IFN- γ 생산의 수준을 입증한다. 도 45a-45c에 제시된 데이터는 5명의 상이한 건강한 공여자를 이용한 5회의 독립적인 실험을 대표한다.

[0224] IL-2-활성화된 NK 세포의 CD107a 탈과립화 및 세포내 IFN- γ 생산을 트라스투주맵, 항-NKG2D, 또는 트라스투주맵 및 항-NKG2D 항체의 결합 도메인으로부터 유래된 TriNKET에 의한 플레이트-결합된 자극 4 시간 후에 분석하였다 (도 46). 모든 경우에, 시험한 항체는 인간 IgG1 이소타입이었다. 그래프는 평균 ($n = 2$) $\pm$ SD를 나타낸다.

[0225] 실시예 14

[0226] 세포-발현된 인간 NKG2D에 결합하는 TriNKET의 평가

[0227] 인간 NKG2D에 의해 형질도입된 EL4 세포를 사용하여 세포-발현된 인간 NKG2D에 대한 결합을 시험하였다. TriNKET를 20 µg/mL로 희석한 다음, 계열 희석하였다. mAb 또는 TriNKET 희석액을 이용하여 세포를 염색하고, TriNKET 또는 mAb의 결합을 형광단-접합된 항-인간 IgG 이차 항체를 이용하여 검출하였다. 세포를 유동 세포분석법에 의해 분석하고, 결합 MFI를 이차 항체 대조군에 대해 정규화하여, 백그라운드 값 대비 배수를 획득하였다.

[0228] 세포-발현된 인간 암 항원에 결합하는 TriNKET의 평가

[0229] CD33 또는 HER2를 발현하는 인간 암 세포주를 사용하여, 상이한 NKG2D 표적화 클론으로부터 유래된 TriNKET의 종양 항원 결합을 평가하였다. 인간 AML 세포주 MV4-11을 사용하여, 세포-발현된 CD33에 대한 TriNKET의 결합을 평가하였다. 인간 신세포 암종 세포주 786-0은 낮은 수준의 HER2를 발현하고, 이를 이용하여 세포-발현된 HER2에 결합하는 TriNKET를 평가하였다. TriNKET를 20 µg/mL로 희석하였고, 각각의 세포와 함께 인큐베이션하였다. TriNKET의 결합을 형광단-접합된 항-인간 IgG 이차 항체를 이용하여 검출하였다. 세포를 유동 세포분석법에 의해 분석하였고, CD33 및 HER2를 발현하는 세포에 대한 결합 MFI를 이차 항체 대조군에 대해 정규화하여, 백그라운드 값 대비 배수를 획득하였다.

[0230] 인간 HER2-양성 암 세포주의 항체 결합 능력의 결정

[0231] HER2-양성 인간 암 세포주의 항체 결합 능력 (ABC)을 측정하였다. 방스 랩(Bangs Lab)으로부터의 콰텀 심플리 셀룰러 키트(Quantum Simply Cellular kit)를 사용하였고 (#815), 항체 표지화된 비드의 제조를 위해 제조자의 지침을 따랐다. 간략히, 4개의 비드 집단 각각을 포화량의 항-HER2 항체로 염색하고, 세포 집단 또한 포화량의 동일한 항체로 염색하였다. 샘플 데이터를 각각의 비드 집단, 뿐만 아니라 세포 집단에 대해 획득하였다. 상기 키트에 제공된 퀵칼(QuickCal) 워크시트를 각각의 세포주에 대해 표준 곡선의 생성 및 ABC 값의 외삽을 위해 사용하였다.

[0232] TriNKET에 의한 일차 NK 세포의 활성화

[0233] PBMC를 밀도 구배 원심분리를 이용하여 인간 말초 혈액 연막으로부터 분리하였다. 분리된 PBMC를 세척하고, NK 세포 분리를 위해 준비하였다. NK 세포를 자성 비드에 의한 음성 선택 기술을 이용하여 분리하였고; 분리된 NK 세포의 순도는 전형적으로 >90% CD3⁻CD56⁺이었다. 분리된 NK 세포를 활성화를 위해 100ng/mL IL-2를 함유하는 배지에서 배양하거나 또는 시토키인 없이 밤새 휴지시켰다. IL-2-활성화된 NK 세포를 24-48 시간 이후 사용하였고; 휴지된 NK 세포는 항상 정제 다음 날에 사용하였다.

[0234] 관심 암 표적을 발현하는 인간 암 세포주를 배양물로부터 수확하였고, 세포를 2×10^6 /mL로 조정하였다. 관심 암 표적을 표적으로 하는 모노클로날 항체 또는 TriNKET를 배양 배지에서 희석하였다. 휴지된 및/또는 활성화된 NK 세포를 배양물로부터 수확하였고, 세포를 세척하고, 배양 배지 중에서 2×10^6 /mL로 재현탁시켰다. IL-2, 및 형광단-접합된 항-CD107a를 배양 활성화를 위해 NK 세포에 첨가하였다. 브레펠딘-A 및 모넨신을 배양 배지에 희석하여, 세포내 시토키인 염색을 위해 세포로부터 단백질을 수송을 차단하였다. 96-웰 플레이트에 50 µl의 종양 표적, mAb/TriNKET, BFA/모넨신, 및 NK 세포를 200 µl의 총 배양물 부피를 위해 첨가하였다. 샘플을 FACS 분석을 위해 준비하기 전에, 플레이트를 4 시간 동안 배양하였다.

[0235] 배양 활성화 4 시간 후에, CD3, CD56 및 IFN γ에 대한 형광단-접합된 항체를 사용하여 유동 세포분석법에 의한 분석을 위해 세포를 준비하였다. CD107a 및 IFN γ 염색을 CD3⁻CD56⁺ 집단에서 분석하여 NK 세포 활성화를 평가하였다.

[0236] 일차 인간 NK 세포 세포독성 검정

[0237] PBMC를 밀도 구배 원심분리를 이용하여 인간 말초 혈액 연막으로부터 분리하였다. 분리된 PBMC를 세척하고, NK 세포 분리를 위해 준비하였다. NK 세포를 자성 비드에 의한 음성 선택 기술을 이용하여 분리하였고, 분리된 NK 세포의 순도는 전형적으로 >90% CD3⁻CD56⁺이었다. 분리된 NK 세포를 100ng/mL IL-2를 함유하는 배지에서 배양하거나 또는 시토키인 없이 밤새 휴지시켰다. 다음 날, IL-2-활성화된 또는 휴지된 NK 세포를 세포독성 검정에 사용하였다.

[0238] 시토 톡스 96 LHD 방출 검정:

- [0239] 인간 NK 세포가 종양 세포를 용해시키는 능력을 프로메가로부터의 시토 톡스 96 비-방사선 활성 세포독성 검정 (G1780)을 이용하여 TriNKET을 첨가하거나 첨가하지 않고 측정하였다. 관심 암 표적을 발현하는 인간 암 세포주를 배양물로부터 수확하였고, 세포를 PBS로 세척하고, 표적 세포로서 사용하기 위해 성장 배지 중에서 $1-2 \times 10^5$ /mL로 재현탁시켰다. 50 μ l의 표적 세포 현탁액을 각각의 웰에 첨가하였다. 관심 암 항원을 표적으로 하는 모노클로날 항체 또는 TriNKET를 배양 배지에서 희석하고, 50 μ l의 희석된 mAb 또는 TriNKET를 각각의 웰에 첨가하였다. 휴지된 및/또는 활성화된 NK 세포를 배양물로부터 수확하였고, 세포를 세척하고, 배양 배지에서 원하는 E:T 비에 따라 $10^5-2.0 \times 10^6$ /mL로 재현탁시켰다. 50 μ l의 NK 세포를 플레이트의 각각의 웰에 첨가하여, 총 150 μ l의 배양물 부피를 만들었다. 플레이트를 37°C에서 5% CO₂하에 3 시간 15 분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후에, 10x 용해 완충제를 최대 용해 및 부피 대조군으로서 표적 세포 단독의 웰에 및 배지 단독을 함유하는 웰에 첨가하였다. 이어서, 플레이트를 추가 45 분 동안 인큐베이터에 다시 두어서, 발달시키기 전에 총 4 시간의 인큐베이션을 달성하였다.
- [0240] 인큐베이션 후에, 플레이트를 인큐베이터로부터 제거하고, 세포를 200g에서 5 분 동안 원심분리에 의해 펠렛화하였다. 50 μ l의 배양물 상청액을 깨끗한 마이크로플레이트로 옮기고, 50 μ l의 기질 용액을 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 빛으로부터 보호하고, 실온에서 30 분 동안 인큐베이션하였다. 50 μ l의 중단 용액을 각각의 웰에 첨가하고, 흡광도를 스펙트라맥스 i3x 상에서 492nm에서 관독하였다. % 특이적 용해를 다음과 같이 계산하였다: % 특이적 용해 = ((실험적 방출 - 이펙터로부터 자발적 방출 - 표적으로부터 자발적 방출) / (최대 방출 - 자발적 방출)) * 100%.
- [0241] DELFIA 세포독성 검정:
- [0242] 관심 표적을 발현하는 인간 암 세포주를 배양물로부터 수확하였고, 세포를 PBS로 세척하고, BATDA 시약 (퍼킨 엘머 AD0116)에 의해 표지화를 위해 성장 배지 중에서 10^6 /mL로 재현탁시켰다. 표적 세포의 표지화를 위해 제조자의 지침을 따랐다. 표지화 후에, 세포를 PBS로 3회 세척하고, 배양 배지 중에서 $0.5-1.0 \times 10^5$ /mL로 재현탁시켰다. 백그라운드 웰을 제조하기 위해, 분취량의 표지화된 세포를 따로 두고, 세포를 배지로부터 회전시켰다. 100 μ l의 배지를 주의해서 웰에 삼중으로 첨가하여, 펠렛화된 세포의 교란을 피하였다. 100 μ l의 BATDA 표지화된 세포를 96-웰 플레이트의 각각의 웰에 첨가하였다. 표적 세포로부터 자발적 방출을 위해 웰을 저장하고, 1% 트리톤-X를 첨가함으로써 표적 세포의 최대 용해를 위해 웰을 준비하였다. 관심 종양 표적에 대한 모노클로날 항체 또는 TriNKET를 배양 배지에서 희석하고, 50 μ l의 희석된 mAb 또는 TriNKET를 각각의 웰에 첨가하였다. 휴지된 및/또는 활성화된 NK 세포를 배양물로부터 수확하였고, 세포를 세척하고, 배양 배지에서 원하는 E:T 비에 따라 $10^5-2.0 \times 10^6$ /mL로 재현탁시켰다. 50 μ l의 NK 세포를 플레이트의 각각의 웰에 첨가하여, 총 200 μ l 배양물 부피를 제조하였다. 검정을 진행하기 전에, 플레이트를 37°C에서 5% CO₂하에 2-3 시간 동안 인큐베이션하였다.
- [0243] 2-3 시간 동안 배양한 후에, 플레이트를 인큐베이터로부터 제거하고, 세포를 200g에서 5 분 동안 원심분리에 의해 펠렛화하였다. 20 μ l의 배양물 상청액을 제조자로부터 공급된 깨끗한 마이크로플레이트로 옮기고, 200 μ l의 실온 유로폼 용액을 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 빛으로부터 보호하고, 플레이트 진탕기 상에서 250rpm에서 15 분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 빅터(Victor) 3 또는 스펙트라맥스 i3X 장비를 이용하여 관독하였다. % 특이적 용해를 다음과 같이 계산하였다: % 특이적 용해 = ((실험적 방출 - 자발적 방출) / (최대 방출 - 자발적 방출)) * 100%.
- [0244] 장기인 인간 PBMC 세포독성 검정:
- [0245] SkBr-3 표적 세포를 백맘 3.0 누크라이트 그린(BacMam 3.0 NuLight Green) (#4622)으로 표지화하여, 표적 세포의 추적을 가능하게 하였다. 제조자의 프로토콜에 따라 SkBr-3 표적 세포를 표지화하였다. 아넥신 V 레드 (Annexin V Red) (에센 바이오사이언스(Essen Bioscience) #4641)를 희석하고, 제조자의 지침에 따라 준비하였다. 모노클로날 항체 또는 TriNKET를 배양 배지로 희석하였다. 50 μ l의 mAb 또는 TriNKET, 아넥신 V, 및 휴지된 NK 세포를 표지화된 SkBr-3 세포를 이미 함유하는 96 웰 플레이트의 웰에 첨가하고; 50ul의 완전 배양 배지를 총 200 μ l 배양물 부피를 위해 첨가하였다.
- [0246] 영상 수집을 인큐사이트(Incucyte) S3 상에서 설정하였다. 상, 그린 및 레드 채널에 대한 영상을 웰당 2개의 영상으로 매시간 마다 수집하였다. 영상 분석을 인큐사이트 S3 소프트웨어를 이용하여 수행하였다. 그린 및

레드 채널에 대한 마스크를 생성하여, 각각 종양 세포 및 아넥신 V 양성 세포의 개수를 카운트하였다. % 아넥신 V 양성 Mv4-11 표적 세포를 계산하기 위해, 하기 식을 이용하였다. % 아넥신 V 양성 SkBr-3 세포 = ((중첩 물체 카운트) / (그린 물체 카운트)) * 100%.

[0247] **HER+ 암 세포를 표적으로 하는 TriNKET와 SC2.2의 비교**

[0248] HER2를 표적으로 하는 TriNKET는 SkBr-3 세포 개수를 감소시키는데 있어서 트라스투주맵에 비해 더욱 효과적이었고, 시간 0으로부터의 세포의 60%만이 60 시간 후에 남아 있었다. 종양/암 세포를 발현하는 HER2를 표적으로 하는 본 개시내용의 TriNKET는 SC2.2 (NKG2D에 대한 리간드인 ULBP-6에 연결된 트라스투주맵으로부터 유래된 scFv로부터 형성된 단일쇄 이중특이적 분자)에 비해 더욱 효과적이었다. SC2.2는 HER2+ 암 세포 및 NKG2D+ NK 세포에 동시에 결합한다. 따라서, HER2+ 암 세포 개수를 감소시키는데 있어서 SC2.2의 효과를 연구하였다. 시험관내 활성화 및 세포독성 검정은, SC2.2가 NK 세포를 활성화 및 사멸시키는데 효과적이었음을 입증하였다. 그러나, SC2.2는 RMA/S-HER2 피하 종양 모델에서의 효능을 입증하는데 실패하였다. SC2.2의 효능을 또한 RMA/S-HER2 과발현 공통 유전자 마우스 모델을 이용하여 생체 내에서 시험하였다. 이 마우스 모델에서, SC2.2는 비히클 대조군에 비해 종양 성장의 조절을 입증하는데 실패하였다. 따라서, SC2.2가 비록 NK 세포를 활성화시키고 사멸시킬 수 있으며, HER2+ 암 세포에 결합하지만, 이들 성질은 HER2+ 종양 성장을 효과적으로 조절하는데 불충분하였다.

[0249] **C57B1/6 마우스에서 SC2.2 혈청 반감기의 평가**

[0250] C57B1/6 마우스에서 SC2.2의 혈청 반감기를 결정하기 위해, SC2.2를 형광 태그로 표지화하여 생체 내에서 그 농도를 추적하였다. SC2.2를 IRDye 800CW (리코르(Licor) #929-70020)로 표지화하였다. 표지화된 단백질을 3마리의 C57B1/6 마우스에게 정맥내로 주사하였고, 지정된 시점에서 각각의 마우스로부터 혈액을 수집하였다. 수집한 후에, 혈액을 1000g에서 15 분 동안 원심분리하고, 각각의 샘플로부터 혈청을 수집하고, 모든 시점에서 수집할 때까지 4°C에서 보관하였다.

[0251] 오디세이(Odyssey) CLx 적외선 영상화 시스템을 이용하여 혈청을 영상화하고, 이미지(Image) J 소프트웨어를 이용하여 800 채널로부터의 형광 신호를 정량화하였다. 영상 강도를 첫번째 시점에 대해 정규화하였고, 데이터를 이상성 붕괴 방정식(biphasic decay equation)에 대입하였다. 이 실험 시스템에서, SC2.2의 베타 반감기는 대략 7 시간으로 계산되었다.

[0252] **RMA/S-HER2 피하 종양에 대한 SC2.2의 생체내 시험**

[0253] 생체내 연구를 도 56에 따라 고안하여, 피하 RMA/S-HER2 종양에 대한 SC2.2의 효능을 시험하였다. 인간 HER2로 형질도입된 10^6 RMA/S 세포를 20마리의 C57B1/6 마우스의 옆구리에 피하 주사하였다. 종양 접종 이후 2 일째에 시작하여, SC2.2를 IP 주사를 통해 매일 주입하였다. SC2.2를 비히클 대조군과 함께 높은 및 낮은 농도로 투여하였다. 종양 접종 이후 4 일째에 시작하여, 연구 기간 동안에 월요일, 수요일 및 금요일에 종양을 측정하였다. 종양 부피를 하기 식을 이용하여 계산하였다: 종양 부피 = 길이 x 너비 x 높이

[0254] **TriNKET는 인간 NKG2D를 발현하는 세포에 결합한다**

[0255] TriNKET가 인간 NKG2D를 발현하는 세포에 결합하는 능력을 결정하였다. 도 37 및 도 38은 상이한 NKG2D-결합 도메인을 함유하는 2가지 TriNKET의 용량 반응성 결합을 제시한다. 도 37은 CD33-결합 도메인이 제2 표적화 아암으로서 사용되었을 때 2가지 TriNKET의 결합을 제시한다. 도 38은 이제 HER2 제2 표적화 아암과 쌍을 형성한 동일한 2개의 NKG2D-결합 도메인을 제시한다. 6개의 NKG2D-결합 도메인은 두 종양 표적화 도메인 모두와 동일한 결합 프로파일을 보유한다.

[0256] **TriNKET는 인간 암 항원을 발현하는 세포에 결합한다**

[0257] TriNKET가 인간 암 항원을 발현하는 세포에 결합하는 능력을 결정하였다. 도 41 및 도 42는 세포-발현된 CD33 (도 41) 및 HER2 (도 42)에 대한 TriNKET의 결합을 제시한다. 세포-발현된 항원에 결합하는 TriNKET는 NKG2D-결합 도메인 사이에서 일치하였다. TriNKET는 모 모노클로날 항체와 유사한 수준으로 결합하였다.

[0258] **인간 HER2-양성 암 세포주의 항체 결합 능력**

[0259] 표 9는 HER2 표면 정량화의 결과를 제시한다. SkBr-3 및 HCC1954 세포는 높은 (+++) 수준의 표면 HER2를 갖는 것으로 확인되었다. ZR-75-1 및 Colo201은 중간 수준 (++)의 표면 HER2를 나타내었고, 786-0은 낮은 수준의 HER2 (+)를 나타내었다.

표 9: HER2-양성 암 세포주의 ABC

세포주	HER2 발현	ABC
786-0	낮음	28,162
Colo201	중간	273,568
ZR-75-1	중간	281,026
SkBr-3	높음	6,820,532
HCC1954	높음	10,569,869

일차 인간 NK 세포는 다양한 수준의 HER2를 발현하는 인간 암 세포주와 공동-배양된 TriNKET에 의해 활성화된다

도 47a - 47c는 TriNKET 및 트라스투주맙이 HER2-양성 인간 종양 세포와의 공동-배양에서 일차 인간 NK 세포를 활성화시킬 수 있음을 제시하며, 이는 CD107a 탈과립화 및 IFN γ 시토카인 생산에서의 증가에 의해 나타난다. 모노클로날 항체 트라스투주맙과 비교하여, TriNKET 둘 다 다양한 인간 HER2 암 세포에 의한 인간 NK 세포의 우수한 활성화를 나타내었다.

도 47a는 인간 NK 세포가 SkBr-3 세포와 함께 배양될 때 TriNKET에 의해 활성화됨을 제시한다. 도 47b는 인간 NK 세포가 Colo201 세포와 함께 배양될 때 TriNKET에 의해 활성화됨을 제시한다. 도 47c는 인간 NK 세포가 HCC1954 세포와 함께 배양될 때 TriNKET에 의해 활성화됨을 제시한다.

TriNKET는 휴지된 및 IL-2-활성화된 인간 NK 세포의 활성을 증진시킨다

도 48a - 48b는 CD33-발현 인간 AML 세포주 MV4-11과의 공동-배양에서 휴지된 또는 IL-2-활성화된 인간 NK 세포의 TriNKET-매개된 활성화를 제시한다. 도 48a는 휴지 인간 NK 세포의 TriNKET-매개된 활성화를 제시한다. 도 48b는 동일한 공여자로부터의 IL-2-활성화된 인간 NK 세포의 TriNKET-매개된 활성화를 제시한다. 휴지된 NK 세포는 IL-2-활성화된 NK 세포에 비해 낮은 백그라운드 IFN γ 생산 및 CD107a 탈과립화를 나타내었다. 휴지된 NK 세포는 IL-2-활성화된 NK 세포에 비해 IFN γ 생산 및 CD107a 탈과립화에서의 더 큰 변화를 나타내었다. IL-2-활성화된 NK 세포는 TriNKET에 의한 자극 이후에 IFN γ +; CD107a+가 되는 세포의 더 큰 백분율을 나타내었다.

TriNKET는 휴지된 및 IL-2-활성화된 인간 NK 세포의 세포독성을 증진시킨다

도 49a - 49b는 IL-2-활성화된 및 휴지된 인간 NK 세포를 이용하는 세포독성 활성의 TriNKET 증진을 제시한다. 도 49a는 휴지된 인간 NK 세포에 의한 SkBr-3 종양 세포의 특이적 용해 백분율을 제시한다. 도 49b는 IL-2-활성화된 인간 NK 세포에 의한 SkBr-3 종양 세포의 특이적 용해 백분율을 제시한다. IL-2-활성화된 및 휴지된 NK 세포 집단은 동일한 공여자로부터의 것이었다. 트라스투주맙과 비교시, TriNKET는 활성화된 또는 휴지된 NK 세포 집단에 의해 SkBr-3 세포에 대한 반응을 더욱 강력하게 지시하였다.

TriNKET는 낮은 표면 발현을 갖는 표적에 대한 NK 세포 세포독성을 증진시킨다

도 50a-50b는 TriNKET가 HER2-중간 및 낮은 암에 대해 트라스투주맙에 비해 더 큰 이점을 제공한다는 것을 제시한다. 도 50a는 HER2-높은 SkBr-3 종양 세포의 활성화된 인간 NK 세포 사멸을 제시한다. 도 50b는 HER2-낮은 786-0 종양 세포의 인간 NK 세포 사멸을 제시한다. TriNKET는 낮은 HER2 발현을 갖는 암 세포에 대해 트라스투주맙에 비해 더 큰 이점을 제공한다. TriNKET는 낮은 표면 발현을 갖는 표적에 대해 더 큰 이점을 제공한다.

높은 FcR 발현을 갖는 암의 치료에서 또는 높은 FcR 수준을 갖는 종양 미세환경에서 TriNKET의 이점

모노클로날 항체 요법이 여러 암 유형, 예컨대 혈액학적 및 고형 종양 둘 다의 치료를 위해 승인되었다. 암 치료에서 모노클로날 항체의 사용이 개선된 환자 결과를 갖지만, 여전히 제약이 있다. 메카니즘 연구는 모노클로날 항체가 무엇보다도 ADCC, CDC 식균작용, 및 신호 차단을 비롯한 다중 메카니즘을 통해 종양 성장에 대한 그들의 효과를 발휘한다는 것을 입증하였다.

- [0273] 가장 주목할만하게는, ADCC는 모노클로날 항체가 그들의 효과를 발휘하는 주요 메카니즘인 것으로 생각된다. ADCC는 천연 킬러 세포의 표면 상에서 낮은-친화도 $Fc\gamma RIII$ (CD16)의 항체 Fc 결속에 의존하고, 이는 종양 세포의 직접적인 용해를 매개한다. $Fc\gamma R$ 중에서, CD16은 IgG Fc에 대해 가장 낮은 친화도를 갖고, $Fc\gamma RI$ (CD64)는 높은-친화도 FcR이고, CD16에 비해 약 1000배 더 강력하게 IgG Fc에 결합한다.
- [0274] CD64는 여러 조혈 계통, 예컨대 골수 계통에서 정상적으로 발현되고, 이들 세포 유형으로부터 유래된 종양, 예컨대 급성 골수성 백혈병 (AML)에서 발현될 수 있다. 종양으로 침윤하는 면역 세포, 예컨대 MDSC 및 단핵구는 또한 CD64를 발현하고, 종양 미세환경에 침윤하는 것으로 공지되어 있다. 종양에 의한 또는 종양 미세환경에서의 CD64 발현은 모노클로날 항체 요법에 대해 해로운 효과를 가질 수 있다. 항체가 높은-친화도 수용체에 결합하는 것을 선호하기 때문에, 종양 미세환경에서의 CD64 발현은 이들 항체가 NK 세포의 표면 상의 CD16에 결합하는 것을 어렵게 만든다. TriNKET는 NK 세포 표면 상의 2개의 활성화 수용체를 표적화함으로써 모노클로날 항체 요법에 대한 CD64 발현의 해로운 효과를 극복할 수 있다.
- [0275] **3가지 AML 세포주에서 $FcR\gamma I$ (CD64) 발현**
- [0276] 시험관내 배양 시스템을 개발하여, 높은 및 낮은 수준의 CD64 표면 발현을 갖는 종양에 대한 TriNKET 및 모노클로날 항체의 활성을 시험하였다. Molm-13 및 THP-1은 표면 CD33의 유사한 발현을 갖는 2가지 인간 AML 세포주이지만, Molm-13 세포는 CD64를 발현하지 않는 반면에, THP-1 세포는 그들의 표면 상에서 CD64를 발현한다 (도 51a - 51c). CD33을 표적으로 하는 모노클로날 항체 또는 TriNKET를 이용하여, 모노클로날 항체 또는 TriNKET 요법에 대한 종양에 의한 CD64 발현의 효과를 시험하였다. 도 51a - 51c는 3가지 인간 AML 세포주, Molm-13 세포주 (도 51a), Mv4-11 세포주 (도 51b), 및 THP-1 세포주 (도 51c) 상에서 높은-친화도 $FcR\gamma I$ (CD64)의 발현을 제시한다. Molm-13 세포는 CD64를 발현하지 않는 반면에, Mv4-11 세포는 낮은 수준의 세포 표면 CD64를 갖고, THP-1은 높은 수준의 세포 표면 CD64를 갖는다.
- [0277] **TriNKET는 FcR의 높은 표면 발현을 갖는 종양 세포를 표적화하는데 있어서 이점을 갖는다**
- [0278] 도 52a-52b는 Molm-13 (도 52b) 또는 THP-1 (도 52a) 세포와의 공동-배양에서 인간 NK 세포의 모노클로날 항체 또는 TriNKET 매개된 활성화를 제시한다. 인간 CD33에 대한 모노클로날 항체는 Molm-13 공동-배양 시스템에서 인간 NK 세포의 양호한 활성화를 입증하였고, 이는 증가된 CD107a 탈과립화 및 IFN γ 생산에 의해 입증된다. 모노클로날 항체는 THP-1 공동-배양 시스템에서 효과를 갖지 않고, 높은 수준의 CD64가 종양에 존재한다. 흥미롭게도, TriNKET는 Molm-13 (도 52b) 및 THP-1 (도 52a) 세포 둘 다에 대해 효과적이었던 반면에, 모노클로날 항체는 FcR-Hi THP-1 세포와의 배양에서 NK 세포를 활성화시키는데 실패하였고, 이는 TriNKET가 종양 상의 CD64에 결합하는 것을 극복할 수 있고, 활성화를 위해 NK 세포를 효과적으로 표적화할 수 있음을 나타낸다. NK 세포 상의 2개의 활성화 수용체의 이중 표적화는 NK 세포에 대해 더욱 강력한 특이적 결합을 제공하였다. NK 세포 상의 CD16만을 표적으로 하는 모노클로날 항체는 다른 높은-친화도 FcR에 결합할 수 있고, NK 세포 상의 CD16의 결속을 방지할 수 있다.
- [0279] Molm-13 및 THP-1 공동-배양 시스템을 이용하는 인간 NK 세포 세포독성 검정은 높은-수준의 CD64의 존재하에 TriNKET의 효능을 뒷받침하는 추가의 증거를 제공한다. 이들 세포독성 검정에서, 제3 인간 AML 세포주인 Mv4-11을 사용하였다. Mv4-11 세포 (도 51b)는 낮은 수준의 CD64를 발현하고, 그들의 표면 상의 CD64의 수준에 있어서 THP-1 (도 51c)과 Molm-13 (도 51a) 세포 사이에 속한다.
- [0280] **TriNKET는 $Fc\gamma RI$ 발현과 무관하게 AML 세포주에 대한 효능을 입증한다**
- [0281] 도 53a - 53c는 표적으로서 3가지 인간 AML 세포주를 사용하는 인간 NK 세포독성 검정을 제시한다. CD33에 대한 모노클로날 항체는 CD64를 발현하지 않는 Molm-13 세포 (도 53b)에 대해 양호한 효능을 나타내었다. CD64를 발현하지만 THP-1에 비해 낮은 수준으로 발현하는 Mv4-11 세포 (도 53a)는 모노클로날 항-CD33에 의해 감소된 효능을 나타내었다. THP-1 세포 (도 53c)는 모노클로날 항-CD33 단독에 의해서는 효과를 나타내지 않았다. 종양 세포 상에서 CD64 발현과 무관하게, TriNKET는 여기서 시험한 모든 종양 세포에 대한 인간 NK 세포 반응을 매개할 수 있었다.
- [0282] 도 53a - 53c는 THP-1 세포가 그들의 표면 상에서 높은-친화도 FcR의 높은 수준 발현으로 인해 모노클로날 항체 요법에 대해 보호되었음을 제시한다. TriNKET는 NK 세포의 표면 상의 2개의 활성화 수용체를 표적화함으로써 이러한 보호를 피하였다. 세포독성 데이터는 공동-배양 활성화 실험에서 관찰된 것과 직접적인 상관관계가 있었다. TriNKET는 THP-1 세포에서 관찰된 mAb 요법으로부터의 보호를 피할 수 있었고, 높은 수준의 FcR에도 불구하고 NK 세포 매개된 용해를 유도할 수 있었다.

- [0283] PBMC 배양물에서 정상 골수 및 정상 B 세포의 사멸: TriNKET는 더 적은 온-표적 오프-종양 부작용을 통해 보다 양호한 안전성 프로파일을 제공한다
- [0284] 천연 킬러 세포 및 CD8 T 세포 둘 다 종양 세포를 직접적으로 용해시킬 수 있지만, NK 세포 및 CD8 T 세포가 종양 세포로부터 자가의 정상 세포를 인식하는 메카니즘은 상이하다. NK 세포의 활성화는 활성화 (NCRs, NKG2D, CD16 등) 및 억제 (KIRs, NKG2A 등) 수용체로부터 신호의 균형에 의해 조절된다. 이들 활성화 및 억제 신호의 균형은 NK 세포가 스트레스 받았거나, 바이러스에 감염되었거나 또는 형질전환된 자가-세포로부터 건강한 자가-세포를 결정하는 것을 가능하게 한다. 자가-관용의 '빌트-인' 메카니즘은 정상에 건강한 조직을 NK 세포 반응으로부터 보호하는데 도움이 될 것이다. 이 원리를 확장시키기 위해, NK 세포의 자가-관용은 오프-종양 부작용 없이 또는 증가된 치료 범위에서 TriNKET가 자가 및 종양 둘 다에서 발현되는 항원을 표적으로 하는 것을 가능하게 할 것이다.
- [0285] 천연 킬러 세포와 달리, T 세포는 활성화 및 이펙터 기능을 위해 MHC 분자에 의해 제시되는 특정한 펩티드의 인식을 필요로 한다. T 세포는 면역요법의 일차 표적이었고, 여러 전략은 종양에 대한 T 세포 반응을 재지시하는 것으로 개발되었다. T 세포 이중특이적, 체크포인트 억제제, 및 CAR-T 세포는 모두 FDA에 의해 승인되었지만, 종종 용량-제한 독성으로 어려움이 있다. T 세포 이중특이적 및 CAR-T 세포는 종양 세포의 표면 상의 항원을 표적으로 하는 결합 도메인을 이용하고, 이펙터 세포에 활성화 신호를 전도하는 조작된 신호전달 도메인을 이용함으로써 TCR-MHC 인식 시스템에 대해 작용한다. 항-종양 면역 반응을 유도하는데 효과적임에도 불구하고, 이들 요법은 종종 시토카인 방출 증후군 (CRS), 및 온-표적 오프-종양 부작용과 연관된다. TriNKET는 NK 세포 활성화 및 억제의 천연 시스템을 '무효화'하지 않을 것이기 때문에 이러한 맥락에서 독특하다. 대신에, TriNKET는 상기 균형을 흔들도록 고안되고, 건강한 자가 세포에 대한 NK 관용을 유지하면서 NK 세포에 추가의 활성화 신호를 제공한다.
- [0286] PBMC를 밀도 구배 원심분리에 의해 전혈로부터 분리하였다. 임의의 오염 적혈구를 ACK 용해 완충제에서 인큐베이션에 의해 용해시켰다. PBMC를 PBS로 3회 세척하고, 총 PBMC를 카운트하였다. PBMC를 일차 세포 배양 배지에서 $10^6/\text{mL}$ 로 조정하였다. 1mL의 PBMC를 24 웰 플레이트의 웰에 시딩하였고, 지정된 TriNKET 또는 mAb를 PBMC 배양물에 10ug/mL로 첨가하였다. 세포를 37°C에서 5% CO_2 하에 밤새 배양하였다. 다음 날 (24 시간 후), PBMC를 배양물로부터 수확하였고, FACS 분석을 위해 준비하였다. CD45+; CD19+ B 세포 및 CD45+; CD33+; CD11b+ 골수 세포의 백분율을 상이한 처리 그룹에 걸쳐 분석하였다.
- [0287] 도 54b & 54d는 자가 골수 세포가 TriNKET 매개된 NK 세포 반응으로부터 보호됨을 제시한다. 도 54a & 54b는 건강한 공여자로부터의 B 세포가 TriNKET 매개된 용해에 대해 민감한 반면에, 골수 세포는 TriNKET 용해에 대해 저항성임을 제시한다. CD20을 표적으로 하는 TriNKET로 처리된 PBMC는 CD45+ 림프구 집단을 갖는 CD19+ B 세포의 감소된 빈도를 나타내었지만 (도 54a), CD45+, CDD3-, CD56- 림프구 집단에서는 효과가 없었다 (도 54c). 이들 배양물에서, CD45+, CD19+ 골수 세포의 빈도 (도 54b), 또는 CD33+, CD 33+, CD11b+ 골수 세포의 빈도 (도 54d)는 변하지 않았다.
- [0288] TriNKET는 장기간 공동-배양시에 SkBr-3 종양 세포의 hPBMC 사멸을 매개한다
- [0289] 일차 인간 PBMC 세포독성 검정
- [0290] 도 55는 인간 PBMC와 함께 배양시에 SkBr-3 세포의 장기간 사멸을 제시한다. 단독 배양시에 SkBr-3 세포는 증식하고, 60 시간 내에 거의 두배가 된다. 인간 PBMC를 배양물 중의 SkBr-3 세포에 첨가하였을 때 증식 속도가 느려졌고, CD33을 표적으로 하는 이소타입 대조군 TriNKET를 첨가하였을 때 증식이 또한 느려졌지만, 더 적은 정도로 느려졌다. 배양물을 트라스투주맙 SkBr-3으로 처리하였을 때 더 이상 증식하지 않았고, 시간 0으로부터의 세포의 80%만이 60 시간 후에 남아 있었다. SkBr-3 세포가 HER2 신호 차단에 대해 민감하기 때문에, SkBr-3 세포 성장에 대한 효과는 HER2 신호 차단에 의해 또는 Fc 이펙터 기능, 예컨대 ADCC를 통해 매개될 수 있다.
- [0291] 실시예 15
- [0292] mcFAE-C26.99 TriNKET의 시험관내 항-종양 효능
- [0293] 뮤린 cFAE-C26.99 TriNKET의 결합 활성을 입증하기 위해, Tyrp-1-양성 B16F10 흑색종 세포 (도 58a) 및 뮤린 NKG2D를 과발현하는 EL4 세포주 (EL4-mNKG2D, 도 58b)에 대한 유동 세포분석법 검정에 의해 직접적인 결합을 그의 모노클로날 항체와 비교하여 측정하였다.

[0294] mcFAE-C26.99 TriNKET가 세포독성을 매개하는 능력을 보유하는지 여부를 시험하기 위해, 무린 IL-2-활성화된 NK 세포에 의한 Tyrp-1-양성 B16F10 종양 표적의 사멸을 측정하였다. 도 59에 제시된 바와 같이, 무린 NK 세포는 mcFAE-C26.99의 존재하에 그들의 세포독성 활성이 증가되었다. 중요하게는, 항-Tyrp-1 모노클로날 항체 TA99는 미미한 효과만을 나타내었다.

[0295] mcFAE-C26.99 TriNKET에 의해 매개되는 증가된 NK 세포독성

[0296] 웰당 약 5×10^3 B16F10 흑색종 세포를 검정 2 일 전에 시딩하였다. 실험하는 날, 5×10^4 무린 IL-2-활성화된 NK 세포를 TA99 mab 또는 mcFAE-C26.99 TriNKET (mcFAE-C26.99는 Fc로서 마우스 IgG2c를 갖는 mC26 및 TA99의 이중이량체임. Gm 돌연변이는 이중이량체를 생성하기 위해 사용된 이중이량체화 돌연변이를 지칭함)의 존재하에 첨가하였다. 4배 희석을 위해 20 μ g/mL의 항체를 사용하였다. 공동-배양 4 시간 후에, 세포독성의 백분율을 LDH 방출에 대해 시토크스96 키트를 사용하여 평가하였다. 점선은 항체의 부재하에 기준선 세포독성을 나타낸다.

mC26_hvL_mCL (볼드체 부분) (이 텔릭체 밑줄친 아미노산은 이중이량체를 생성하기 위해 사용된 이중이량체화 돌연변이임):

DIQMTQSPSTLSASVGDRVITITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGV
PSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQQYGSFPITFGGGTKVEIKRADAAPTVSI
FPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDS
TYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRECE (SEQ ID NO:86)

mC26_hvH_IgG2CGmB

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGST
NYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGLTV
TVSSAKTTAPSVYPLAPVCGGTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVH
TFPALLQSGLYTLSSSVTVTSNTWPSQTITCNVAHPASSTKVDKKIEPRVPITQNP
CPPLKECPPCAAPDLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPMVTCTVVDVSEDDPDVQI
SWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNRA
LPSPIEKTISKPRGPRAPQVYVLPPEAEEMTKKEFSLTCMIKGFLPAEIAVDWTS
NGRTEQNYKNTATVLDSDGSYFMYSRLRVQKSTWERSLFACTSVVHEGLHNHL
TTKTISRSLGK (SEQ ID NO:87)

TA99_mvL_mCL

DIQMSQSPASLSASVGETVTITCRASGNIYNYLAWYQQKQKSPHLLVYDAKTLAD
GVPSRFSGSGSGTQYSLKISSLTEDSGNYCYQHFWSLPFTFGSGTKLEIKRADAAPT
VSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSK
DSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRECE (SEQ ID NO:88)
TA99_mvH_IgG2CGmA

EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKTSGFNIKDYFLHWVRQRPDQGLEWIGWINPDNG
NTVYDPKFQGTASLTADTSSNTVYLQLSGLTSEDYAVYFCTRRDYTYEKAALDYWG
QGASVIVSSAKTTAPSVYPLAPVCGGTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSL
SSGVHTFPALLQSGLYTLSSSVTVTSNTWPSQTITCNVAHPASSTKVDKKIEPRVP
ITQNPCLPLKECPPCAAPDLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPMVTCTVVDVSEDD
PDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKV
NNRALPSPIEKTISKPRGPRAPQVYVLPPEAEEMTKKEFSLTCMITGFLPAEIAV
DWTSNGRTEQNYKNTATVLDSDGSYLMYSKLTVQKSTWERSLFACTSVVHEGL
HNHLTTKTISRSLGK (SEQ ID NO:89)

[0297]

[0298] 실시예 16

[0299] mcFAE-C26.99 TriNKET의 생체내 항-종양 효능

[0300] mcFAE-C26.99가 생체 내에서 항종양 기능을 유도하는지 여부를 시험하기 위해, C57BL/6 마우스에게 2×10^5 B16F10 종양 세포를 피하 주사하였다. 마우스를 이소타입 대조군, 모노클로날 TA99 항체 또는 mcFAE-C26.99 TriNKET로 처리하였다. 모노클로날 TA99 항체로의 처리는 이소타입으로 처리된 대조군 그룹에서와 유사한 종양 진행을 나타내었다. 그러나, mcFAE-C26.99 TriNKET의 투여는 이소타입-처리된 그룹에 비해 지연된 종양 진행을 나타내었다. 약 2×10^5 B16F10 흑색종 세포를 C57BL/6 마우스의 옆구리에 피하 주사하였다. 종양 접종 6 일 후에, 마우스를 무작위화하였다 (그룹당 n=10). 마우스를 150 μ g의 용량으로 주사되는 (도 60a) 이소타입 대조군 마우스 IgG2a mab C1.18.4 및 마우스 항-Typr-1 모노클로날 항체 또는 (도 60b) 이소타입 대조군 마우스 IgG2a mab C1.18.4 및 mcFAE-C26.99 TriNKET로 복강내로 처리하였다 (6, 8, 10, 12, 14, 16 및 21 일째). 종양 성장을 28 일 동안 평가하였다. 그래프는 개별 마우스의 종양 성장 곡선을 제시한다.

[0301] 피하 B16F10 종양 모델 외에도, mcFAE-C26.99 TriNKET 또한 산재성 종양 설정에서 그의 종양 효능에 대해 시험하였다. 1×10^5 B16F10 세포를 마우스에게 정맥내 주사하였다. 4 일째 또는 7 일째에 낮은 (300 μ g/주사) 및 높은 (600 μ g/주사) 항체 용량으로 처리를 시작하였다. 종양 접종 18 일 후에, 폐 전이를 카운트하였다. 종양 접종 4 및 7 일 후에 처리를 시작하였고, TA99 모노클로날 항체 또는 mcFAE-C26.99 TriNKET를 이소타입-처리된 대조군 그룹에 비해 높은 농도로 사용하였을 때 폐 전이의 감소된 개수를 나타내었다. 낮은 농도에서는 mcFAE-C26.99 TriNKET만이 종양 부담을 감소시켰다 (도 61a). 유사한 효과가 항체를 종양 접종 7 일 후에 투여하기 시작하였을 때 관찰되었다. 전반적으로, mcFAE-C26.99 TriNKET 요법은 모든 시험한 조건에서 모노클로날 TA99 항체에 비해 폐 전이의 감소된 개수를 나타내었다. 약 1×10^5 B16F10 흑색종 세포를 C57BL/6 마우스의 꼬리 정맥에 정맥내 주사하였다 (그룹당 n=8). 마우스를 처리하지 않은 채로 두거나 또는 대조군 mab (이소타입, 클론 C1.18.4), 모노클로날 TA99 항체 또는 TA99 TriNKET (mcFAE-C26.99)로 복강내로 처리하였다. 도 61a는 항체를 150- μ g 용량으로 투여하였을 때의 종양 부담을 나타낸다 (4, 6, 8, 11, 13, 15 일째). 도 61b는 항체를 150- μ g 용량으로 투여하였을 때의 종양 부담을 나타낸다 (7, 9, 11, 13, 15 일째). 종양 시도 18 일 후에, 마우스를 안락사시켰고, 표면 폐 전이를 평점하였다 (도 61b).

[0302] 실시예 17

[0303] HER2-양성 세포에 대해 TriNKET, 모노클로날 항체, 또는 이중특이적 항체에 의해 매개된 휴지된 인간 NK 세포의 세포독성 활성

[0304] PBMC를 밀도 구배 원심분리를 이용하여 인간 말초 혈액 연막으로부터 분리하였다. 분리된 PBMC를 세척하고, NK 세포 분리를 위해 준비하였다. NK 세포를 자성 비드에 의한 음성 선택 기술을 이용하여 분리하였고; 분리된 NK 세포의 순도는 전형적으로 >90% CD3-CD56+이었다. 분리된 NK 세포를 100 ng/mL IL-2를 함유하는 배지에서 배양하거나 또는 시토킨 없이 밤새 휴지시켰다. 다음 날, IL-2-활성화된 또는 휴지된 NK 세포를 세포독성 검정에서 사용하였다.

[0305] DELFIA 세포독성 검정:

[0306] 관심 표적을 발현하는 인간 암 세포주를 배양물로부터 수확하였고, 세포를 HBS로 세척하고, BATDA 시약 (퍼킨 엘머 AD0116)에 의해 표지화를 위해 성장 배지 중에서 10^6 /mL로 재현탁시켰다. 표적 세포의 표지화를 위해 제조자의 지침을 따랐다. 표지화 후에, 세포를 HBS로 3회 세척하고, 배양 배지 중에서 $0.5-1.0 \times 10^5$ /mL로 재현탁시켰다. 백그라운드 웰을 제조하기 위해, 분취량의 표지화된 세포를 따로 두고, 세포를 배지로부터 회전시켰다. 100 μ l의 배지를 주의해서 웰에 삼중으로 첨가하여, 펠렛화된 세포의 교란을 피하였다. 100 μ l의 BATDA 표지화된 세포를 96-웰 플레이트의 각각의 웰에 첨가하였다. 표적 세포로부터 자발적 방출을 위해 웰을 저장하고, 1% 트리톤-X를 첨가함으로써 표적 세포의 최대 용해를 위해 웰을 준비하였다. 관심 종양 표적에 대한 모노클로날 항체 또는 TriNKET를 배양 배지에서 희석하고, 50 μ l의 희석된 mAb 또는 TriNKET를 각각의 웰에 첨가하였다. 휴지된 및/또는 활성화된 NK 세포를 배양물로부터 수확하였고, 세포를 세척하고, 배양 배지에서 원하는 E:T 비에 따라 $10^5-2.0 \times 10^6$ /mL로 재현탁시켰다. 50 μ l의 NK 세포를 플레이트의 각각의 웰에 첨가하여, 총 200 μ l 배양물 부피를 제조하였다. 검정을 진행하기 전에, 플레이트를 37°C에서 5% CO₂하에 2-3 시간 동안 인큐베이션하였다.

[0307] 2-3 시간 동안 배양한 후에, 플레이트를 인큐베이터로부터 제거하고, 세포를 200g에서 5 분 동안 원심분리에 의해 펠렛화하였다. 20 μ l의 배양물 상청액을 제조자로부터 공급된 깨끗한 마이크로플레이트로 옮기고, 200 μ l의 실온 유로폼 용액을 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 빛으로부터 보호하고, 플레이트 진탕기 상에서 250rpm에서 15 분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 빅터 3 또는 스펙트라맥스 i3X 장비를 이용하여 판독하였다. % 특이적 용해를 다음과 같이 계산하였다: % 특이적 용해 = ((실험적 방출 - 자발적 방출) / (최대 방출 - 자발적 방출)) * 100%.

[0308] **모노클로날 항체 및 이중특이적 NK 세포 결속체의 조합물은 TriNKET 활성을 재연하지 않는다:**

[0309] 도 66은 HER2-양성 Colo-201 세포주에 대해 TriNKET, 모노클로날 항체, 또는 이중특이적 항체에 의해 매개된 휴지된 인간 NK 세포의 세포독성 활성을 제시한다. HER2를 표적으로 하는 TriNKET (ADI-29404 (F04))는 휴지된 인간 NK 세포에 의한 Colo-201 세포의 최대 용해를 유도하였다. D265A 돌연변이를 TriNKET의 CH2 도메인에 도입하여 FcR 결합을 제거하였다. HER2-TriNKET (ADI-29404 (F04))-D265A는 Colo-201 세포의 용해를 매개하는데 실패하였고, 이는 NK 세포 상의 CD16 및 NKG2D의 이중 표적화의 중요성을 입증하였다. NK 세포에 대한 이중 표적화의 중요성을 추가로 입증하기 위해, 모노클로날 항체 트라스투주맙을 사용하여 HER2를 표적화하고, NK 세포에 의해 ADCC를 매개하였고, 트라스투주맙 단독은 Colo-201 세포의 NK 세포 용해를 증가시킬 수 있지만, 트라스투주맙 단독에 의해 달성된 최대 용해는 TriNKET에 비해 약 4배 더 낮았다. 동일한 분자 상에서 CD16 및 NKG2D를 표적화하는 것의 중요성을 이해하기 위해, TriNKET (ADI-29404 (F04)) 활성을 트라스투주맙과 조합하여 HER2 및 NKG2D를 표적화하는 이중특이적 항체의 활성과 비교하였다. 등몰 농도로 사용하였을 때, 이중특이적 및 트라스투주맙 + 이중특이적 조합물의 실패는 한 분자에 TriNKET의 삼중특이적-결합을 함유하는 것의 중요성을 입증한다.

[0310] **참고문헌의 도입**

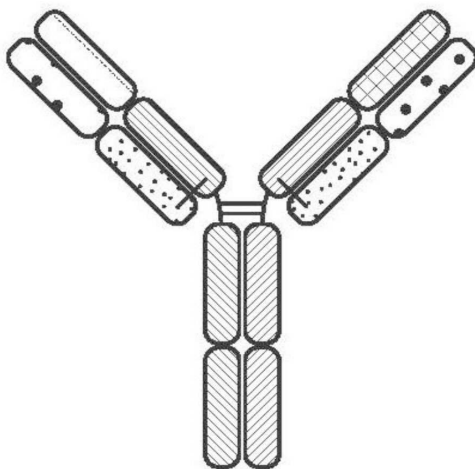
[0311] 본원에 인용된 각각의 특허 문헌 및 과학 논문의 전체 개시내용은 모든 목적을 위해 참고로 포함된다.

[0312] **등가물**

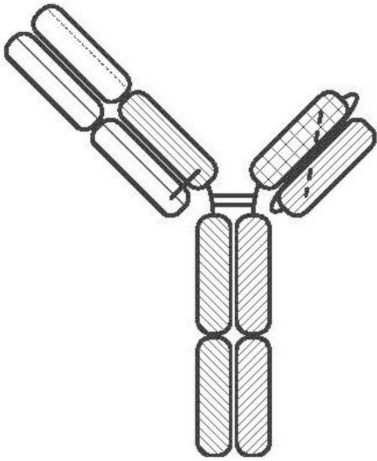
[0313] 본 발명은 그의 개념 또는 필수 특징을 벗어나지 않고 다른 특정한 형태로 실시될 수 있다. 따라서, 상기 실시양태는 본원에 기재된 본 발명을 제한하기 보다는 모든 측면에서 설명하는 것으로 고려된다. 따라서, 본 발명의 범위는 상기 기재에 의해서가 아니라 첨부된 청구항에 의해 지정되고, 청구항의 등가물의 의미 및 범위 내에 있는 모든 변화는 본원에 포함되는 것으로 의도된다.

도면

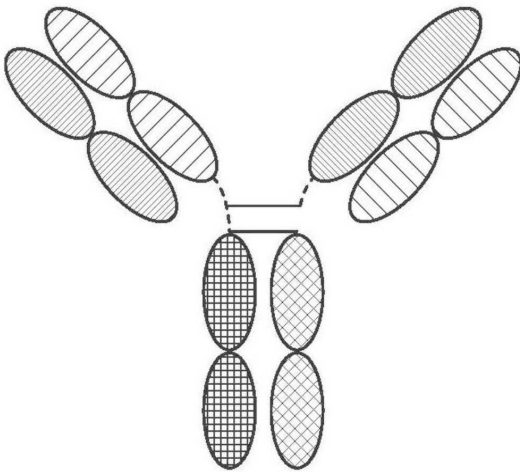
도면1



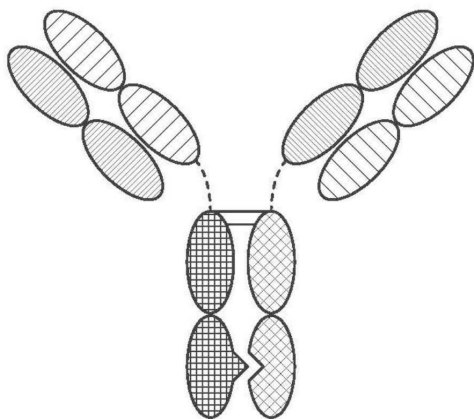
도면2



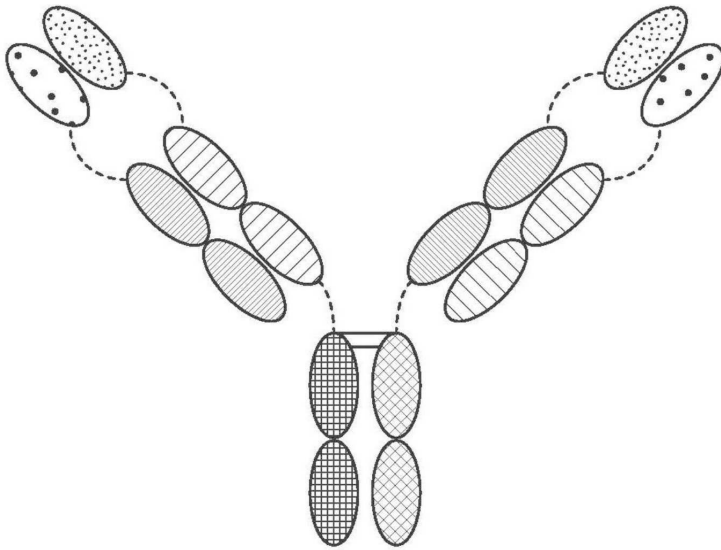
도면3



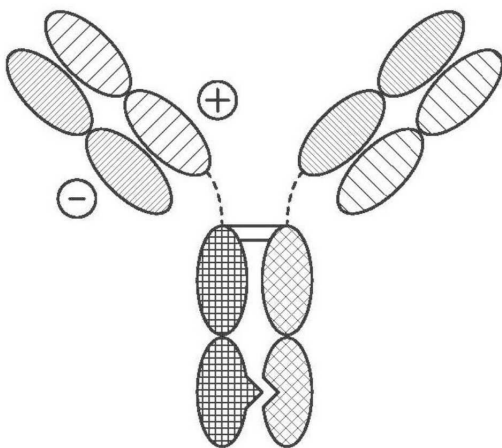
도면4



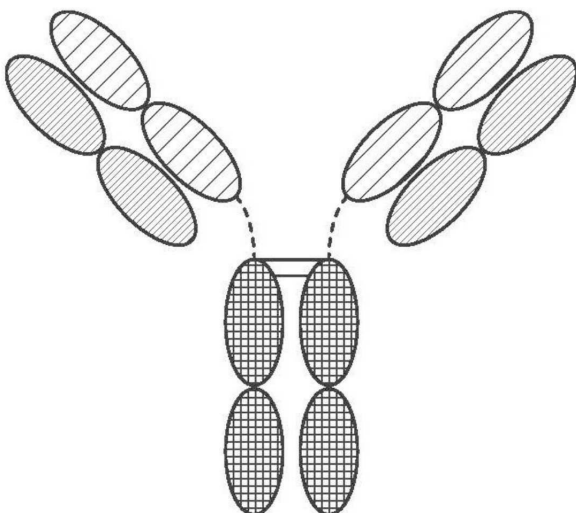
도면5



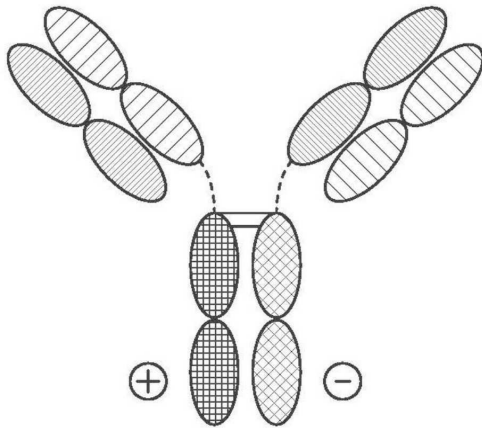
도면6



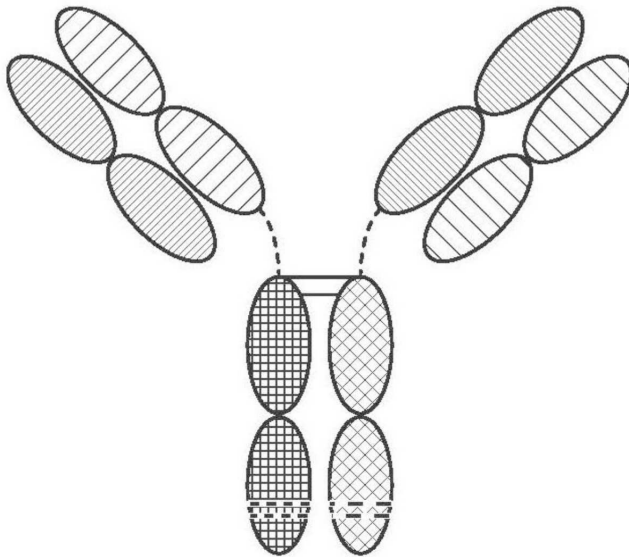
도면7



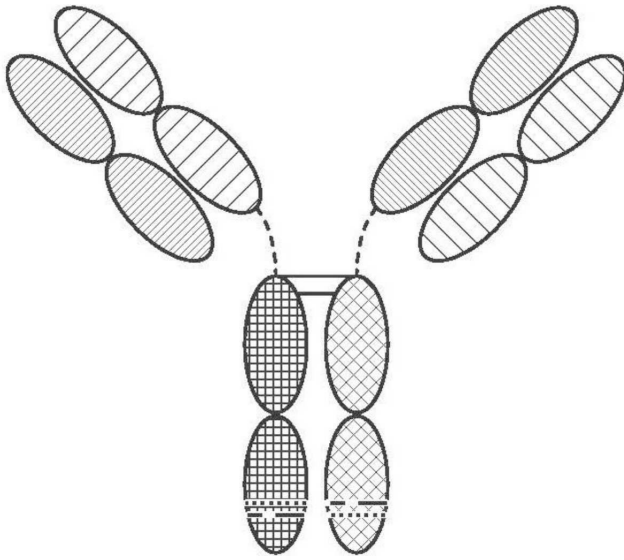
도면8



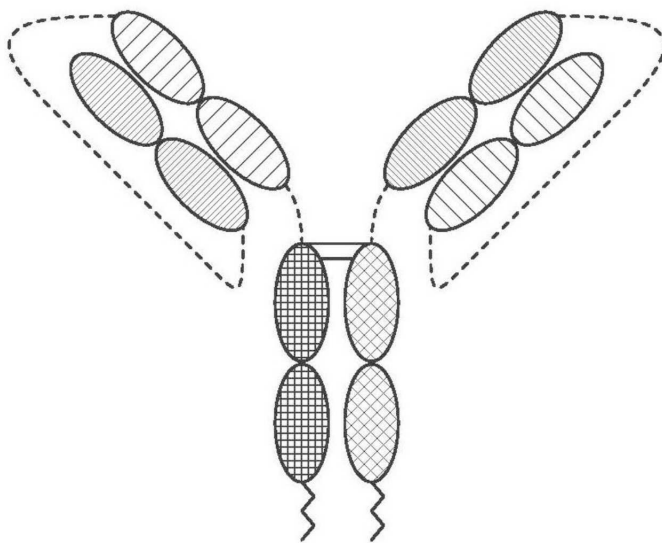
도면9



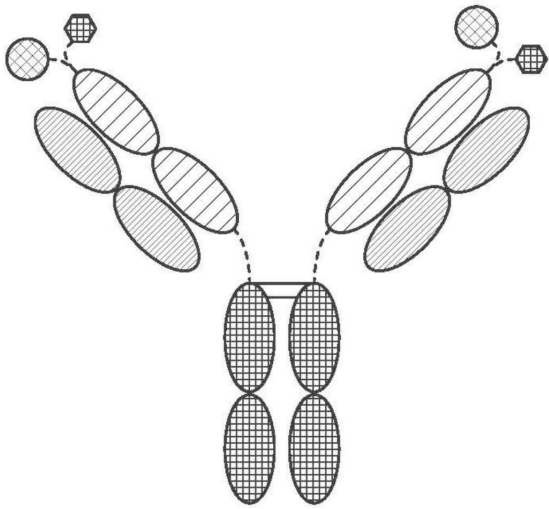
도면10



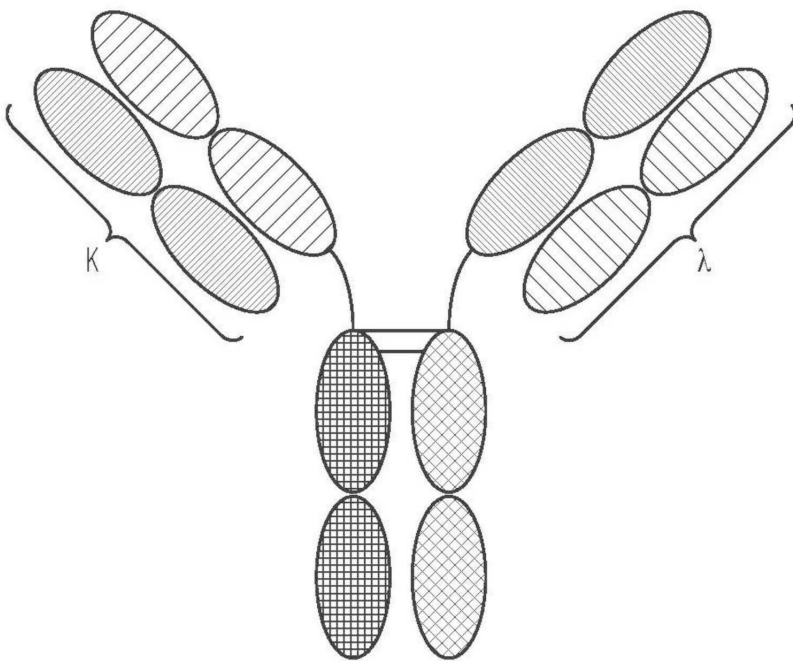
도면11



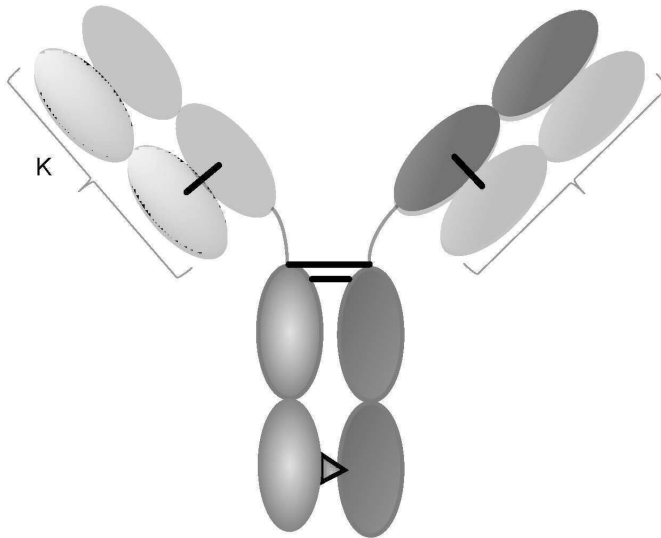
도면12



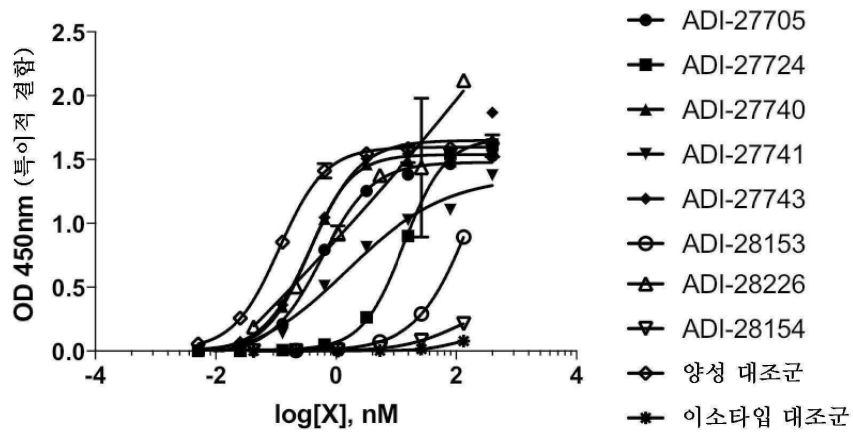
도면13a



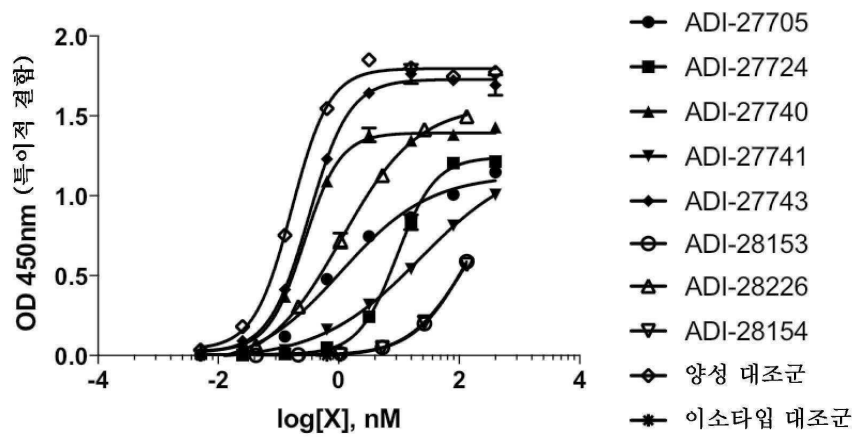
도면13b



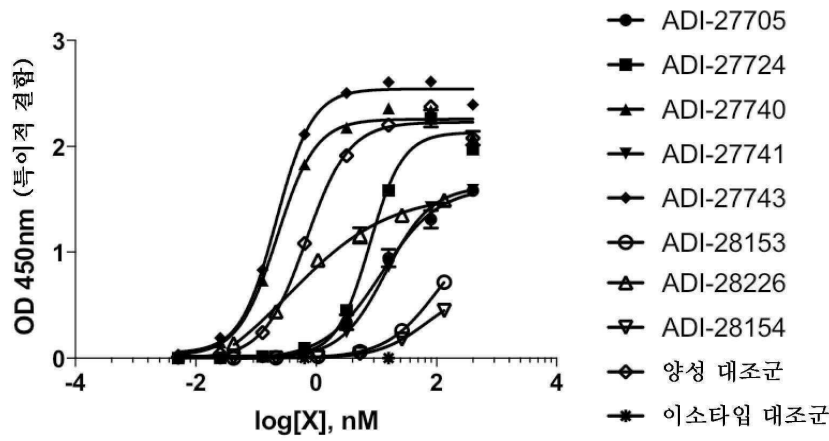
도면14



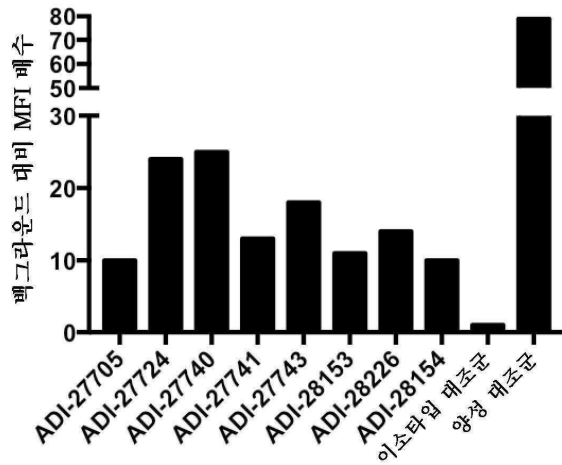
도면15



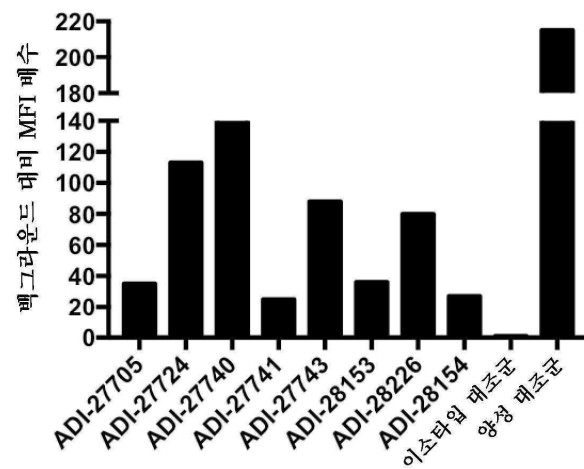
도면16



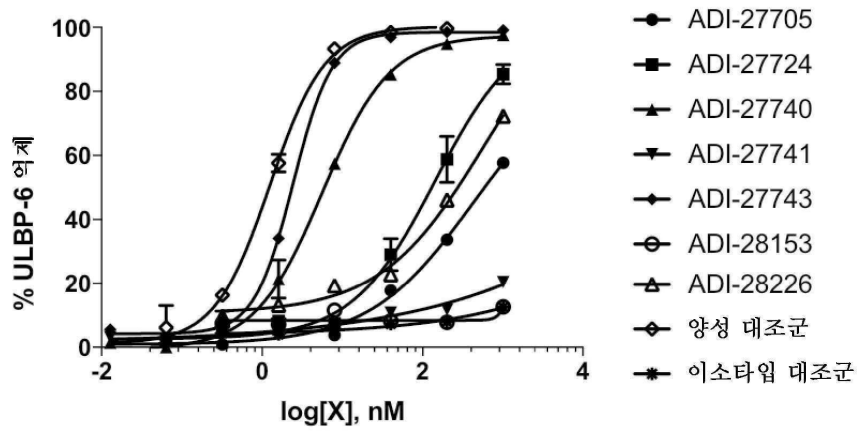
도면17



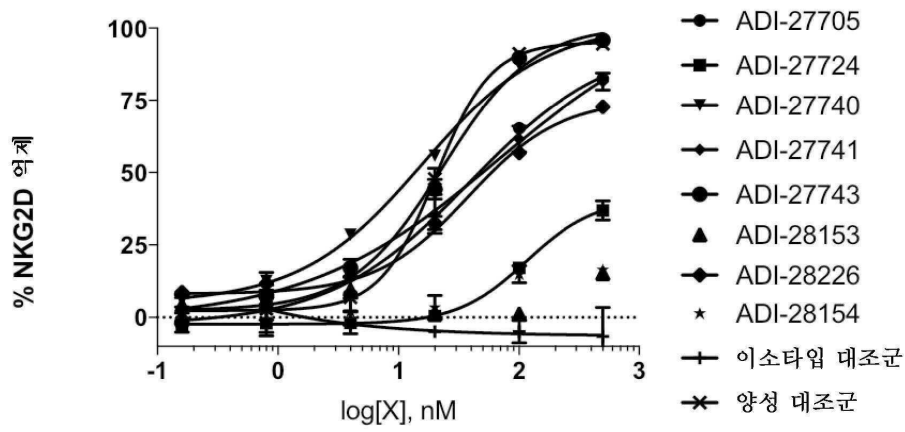
도면18



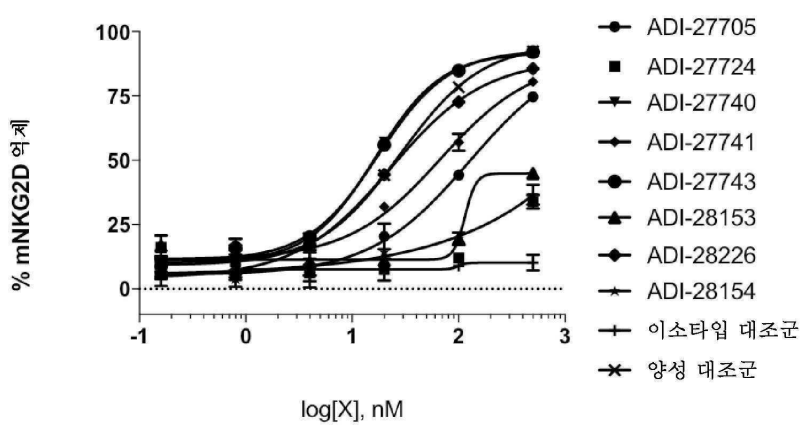
도면19



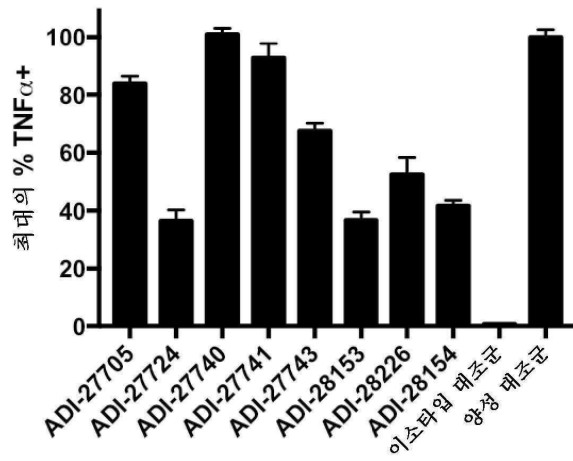
도면20



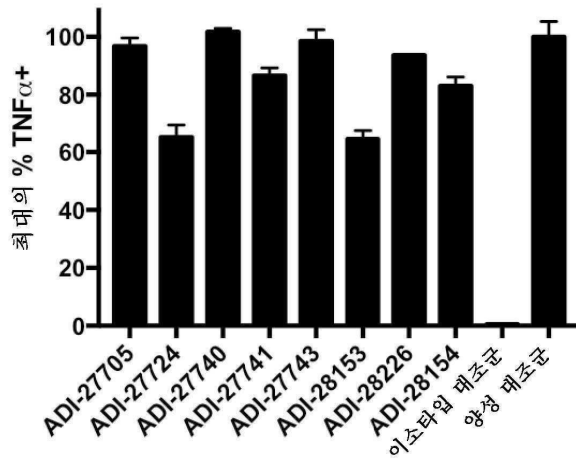
도면21



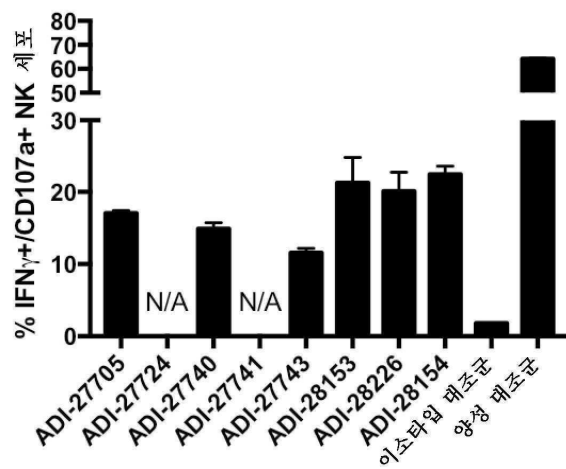
도면22



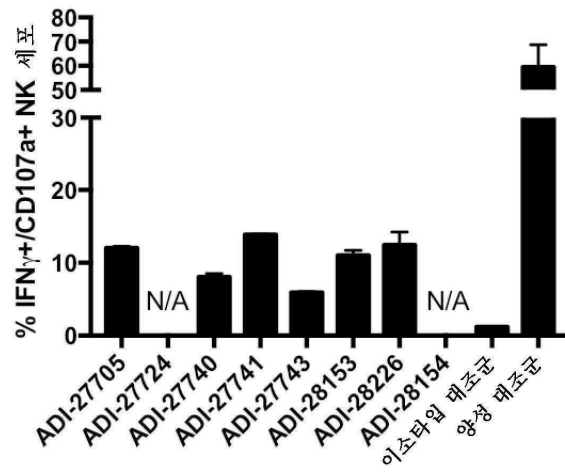
도면23



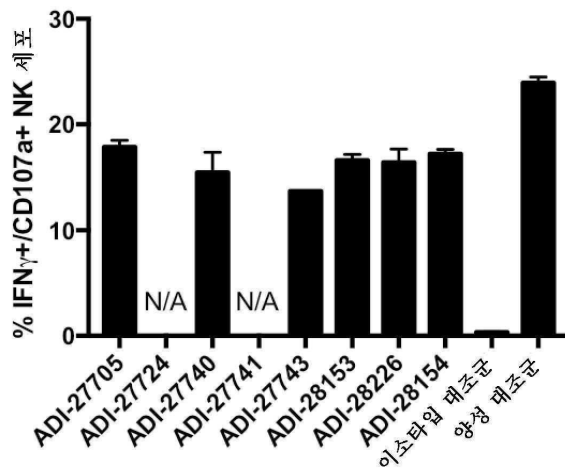
도면24



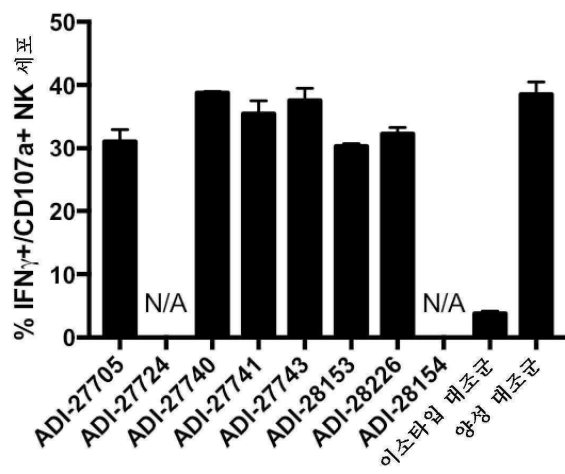
도면25



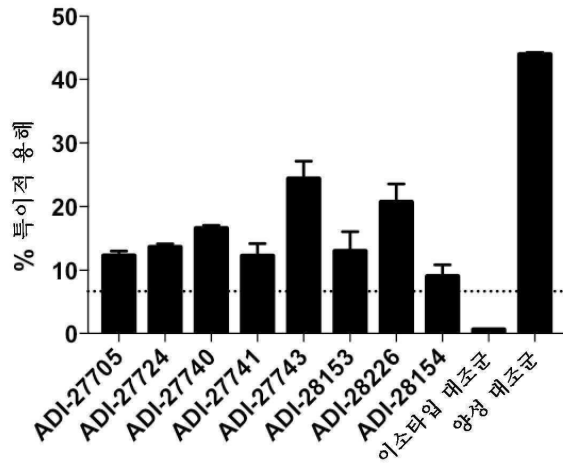
도면26



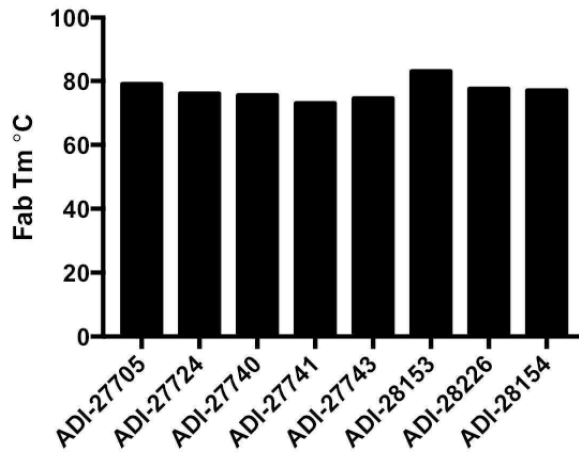
도면27



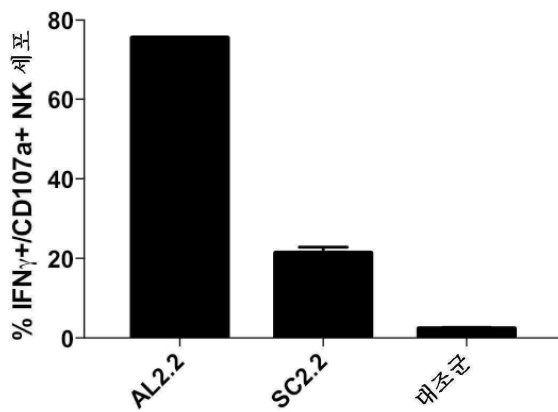
도면28



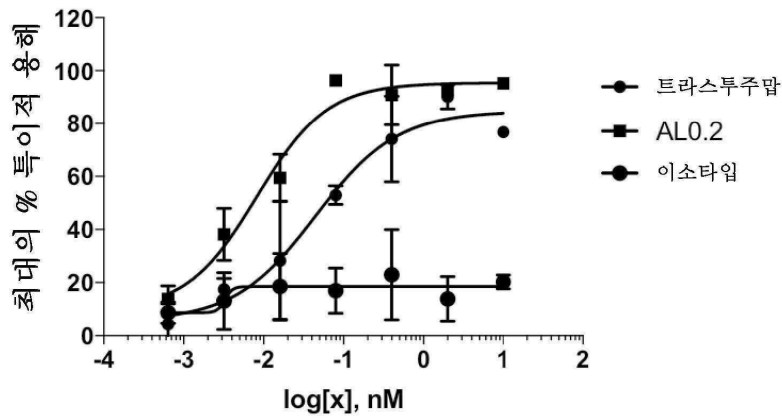
도면29



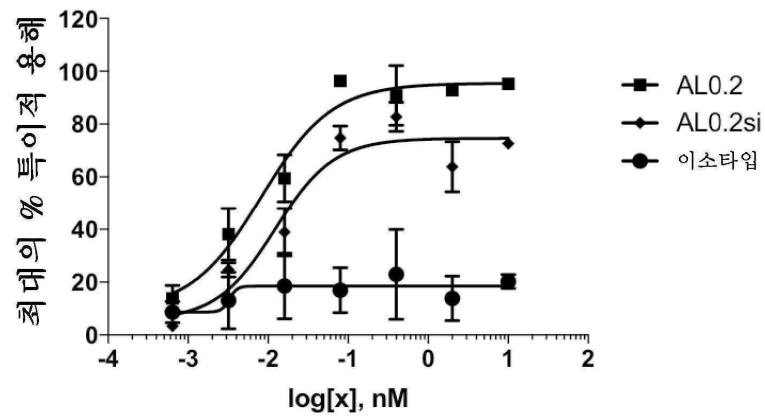
도면30



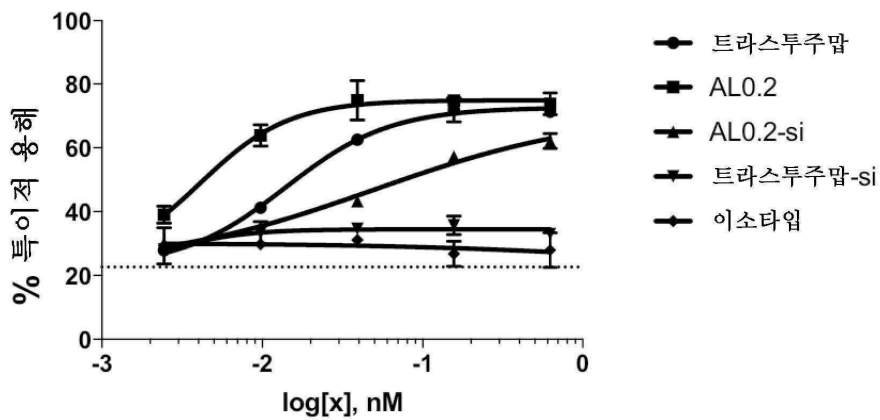
도면31



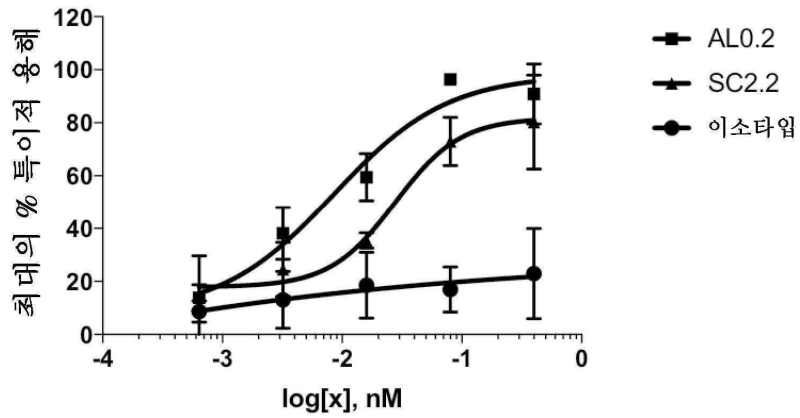
도면32



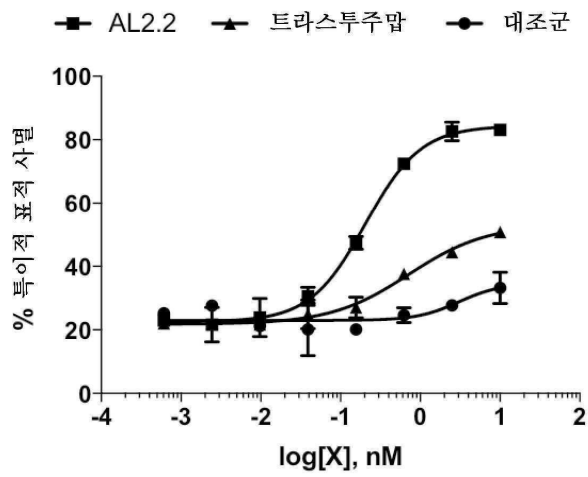
도면33



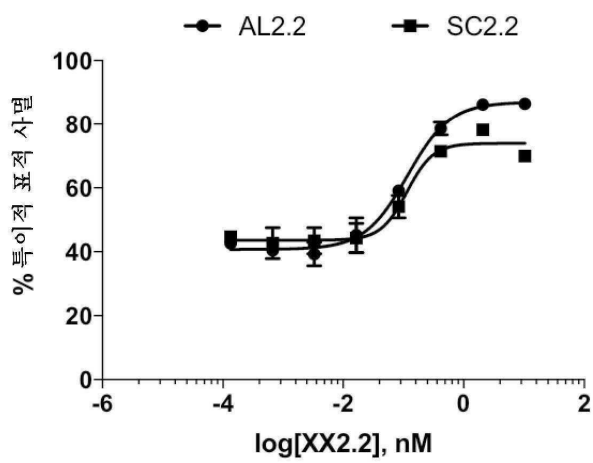
도면34



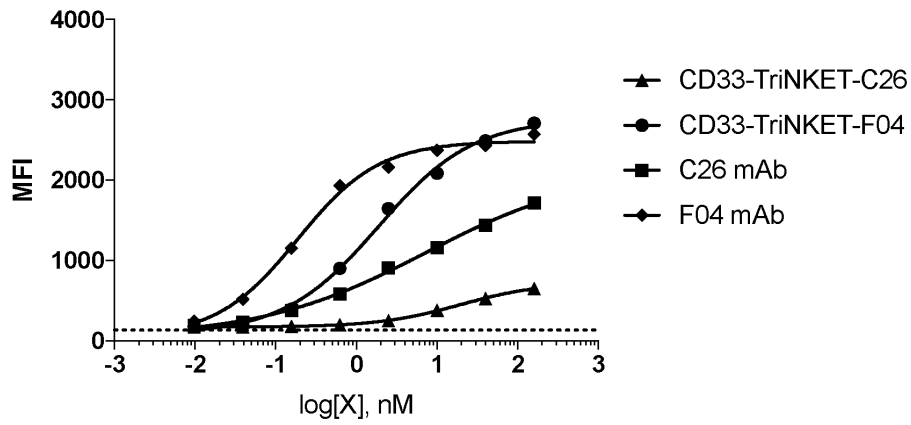
도면35



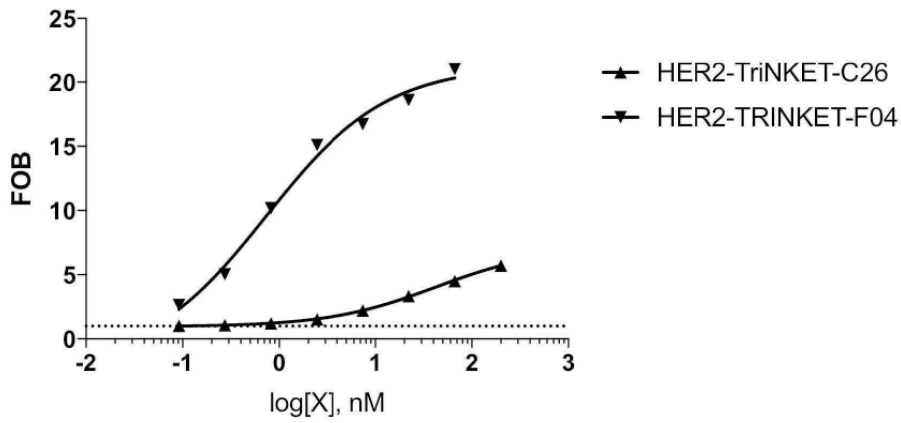
도면36



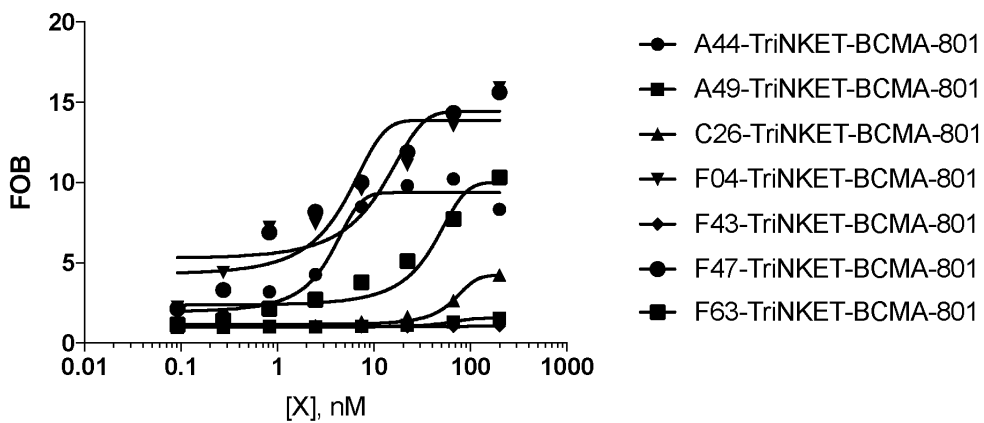
도면37



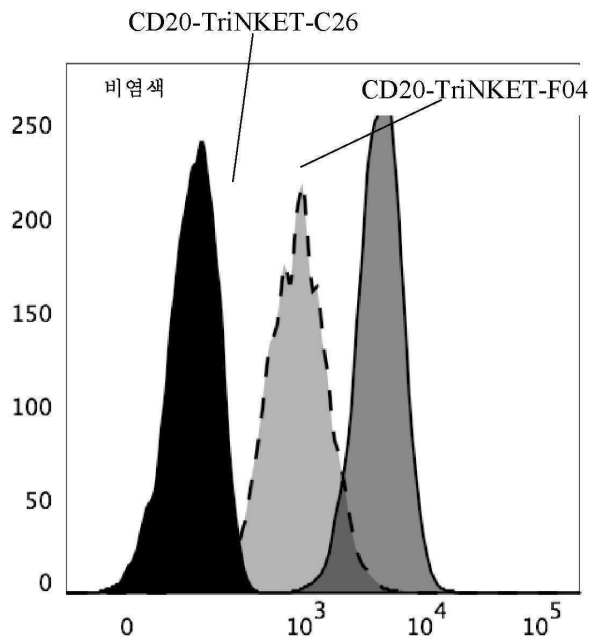
도면38



도면39

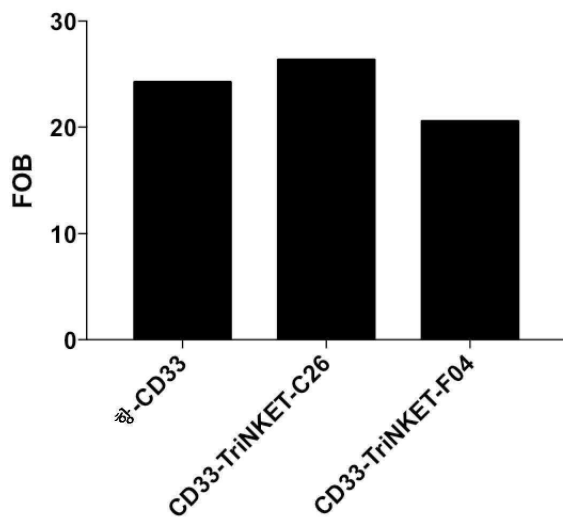


도면40

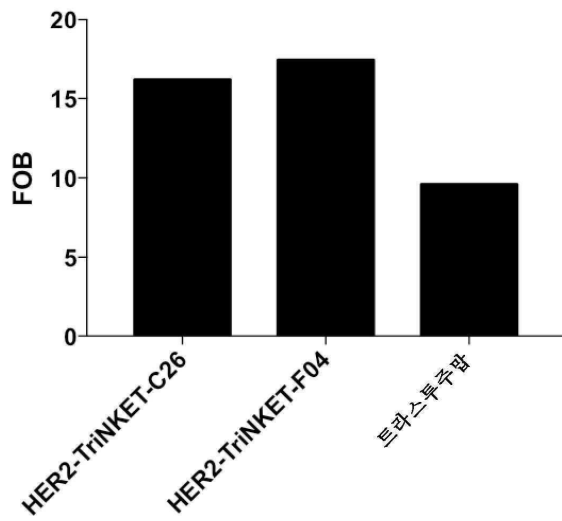


유동 세포분석법에 의해 측정된 형광

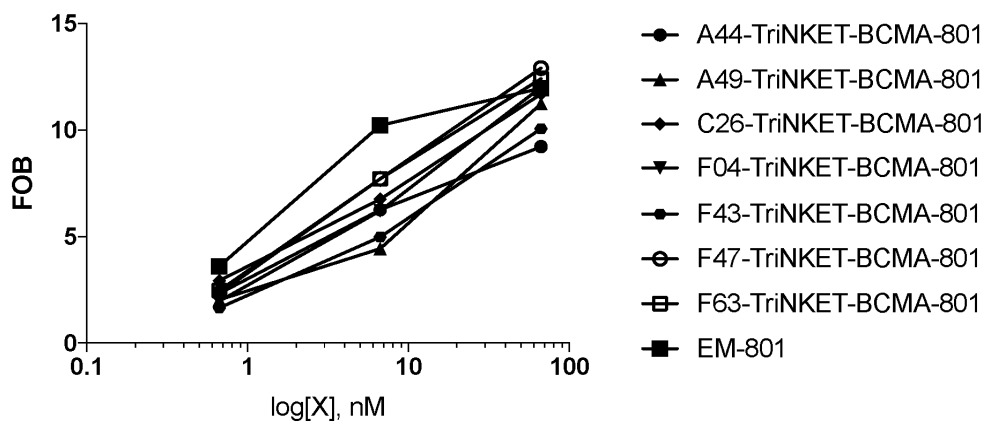
도면41



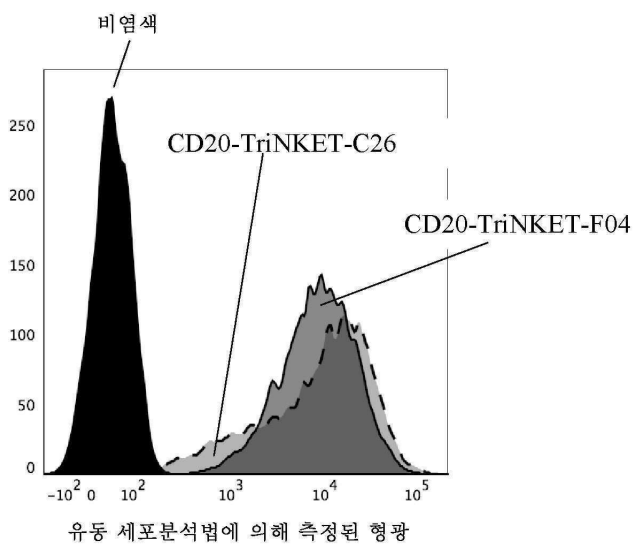
도면42



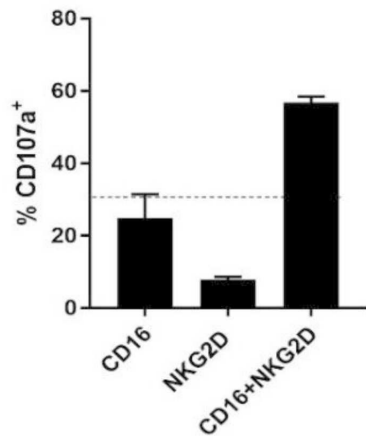
도면43



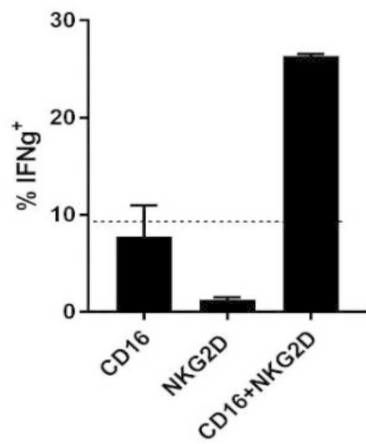
도면44



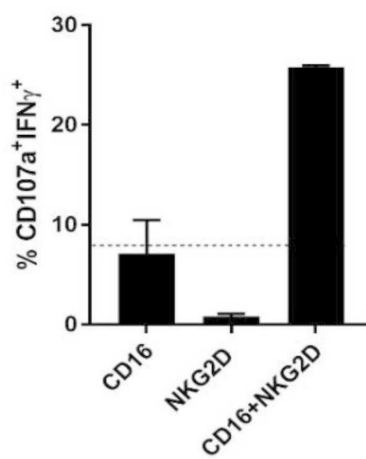
도면45a



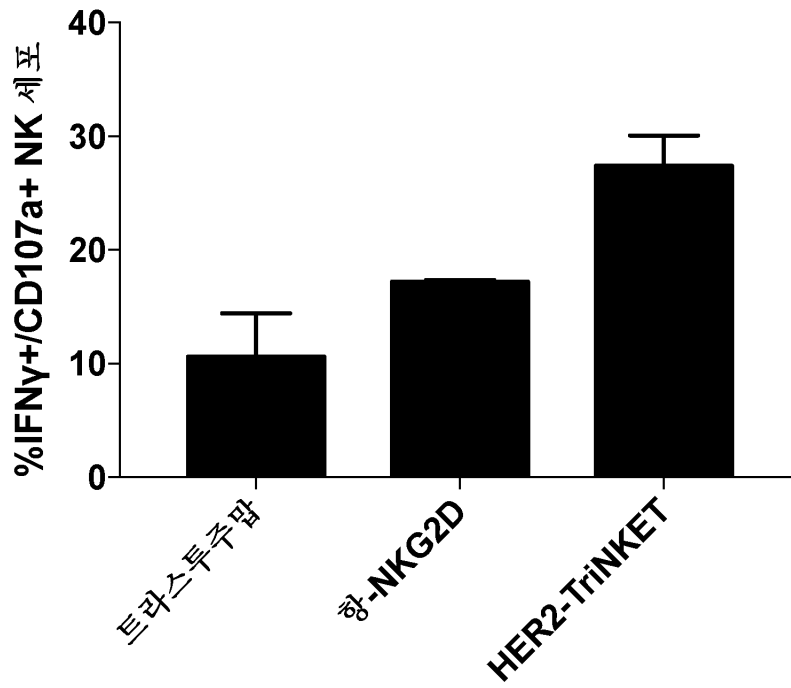
도면45b



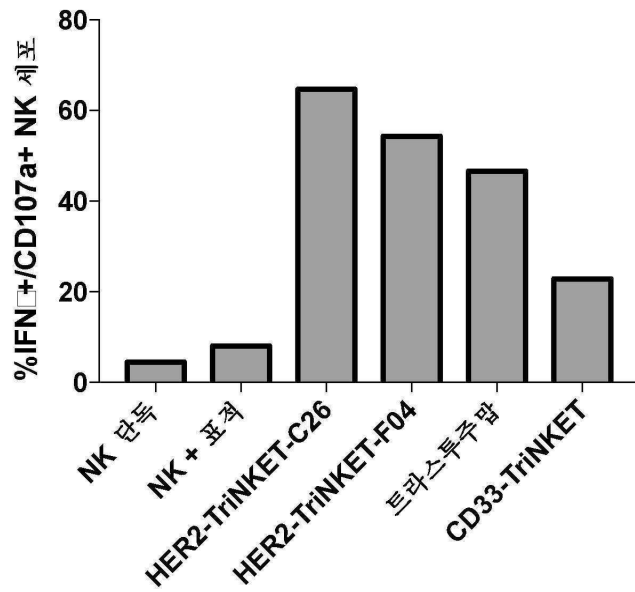
도면45c



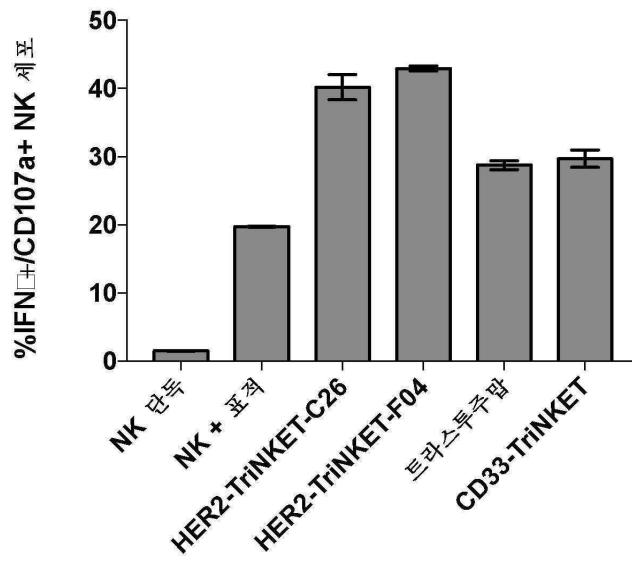
도면46



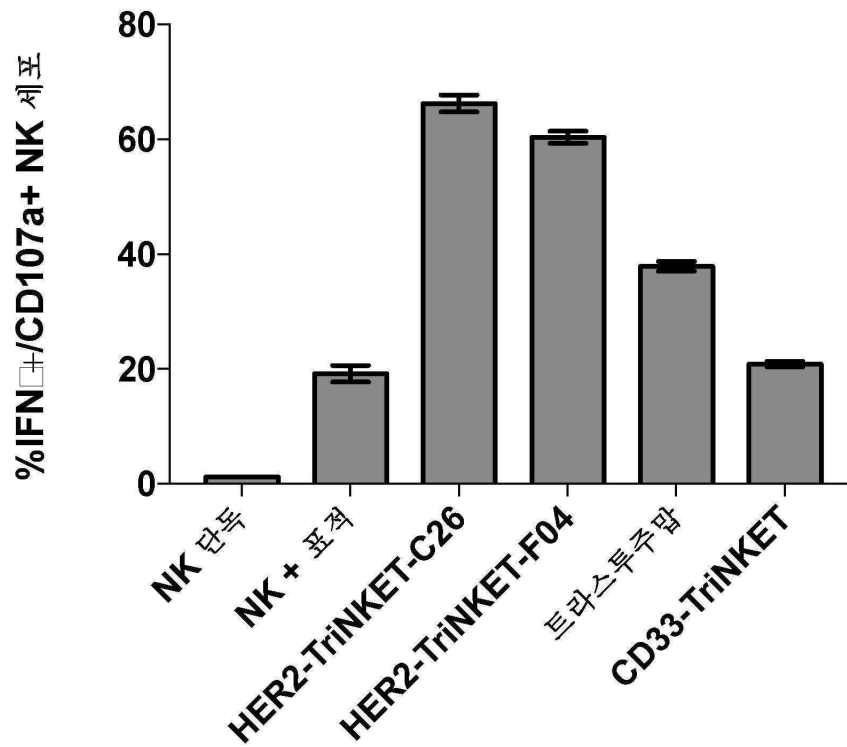
도면47a



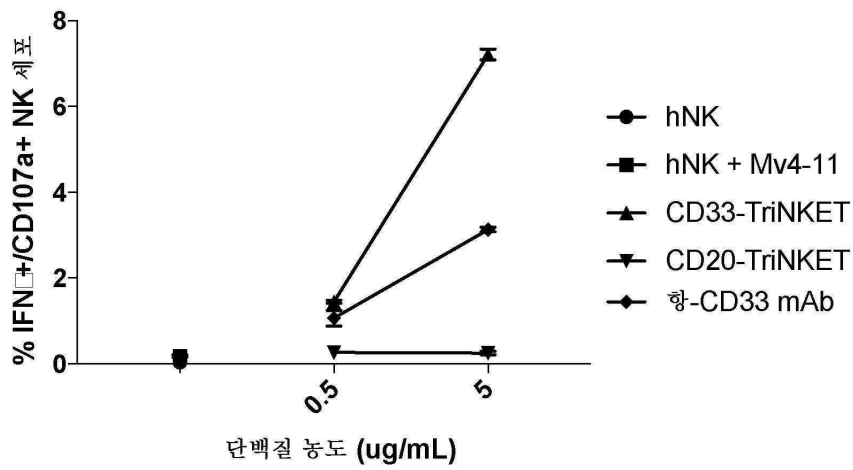
도면47b



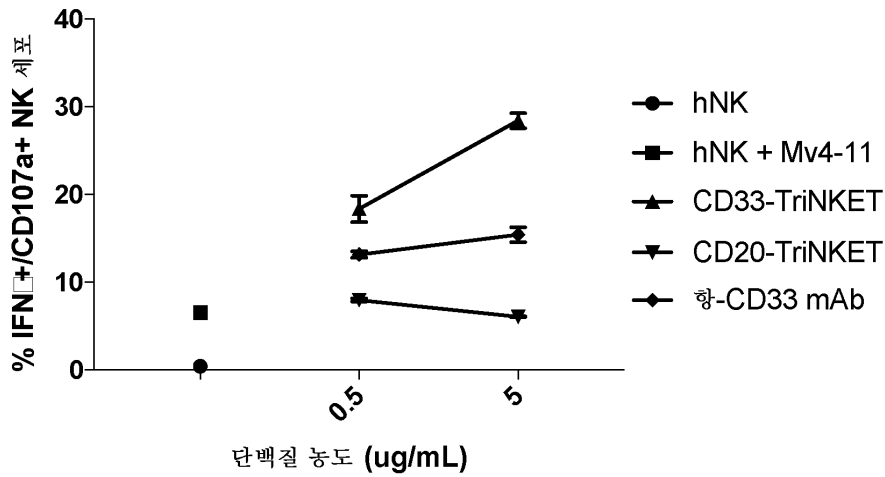
도면47c



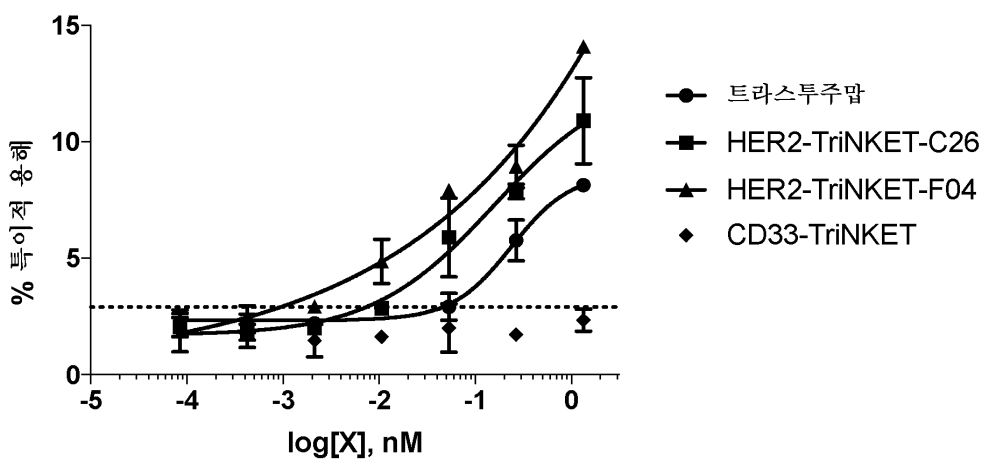
도면48a



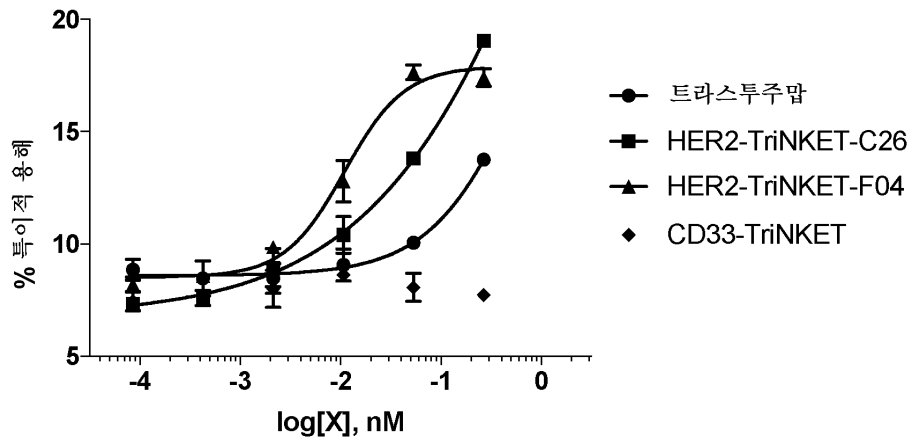
도면48b



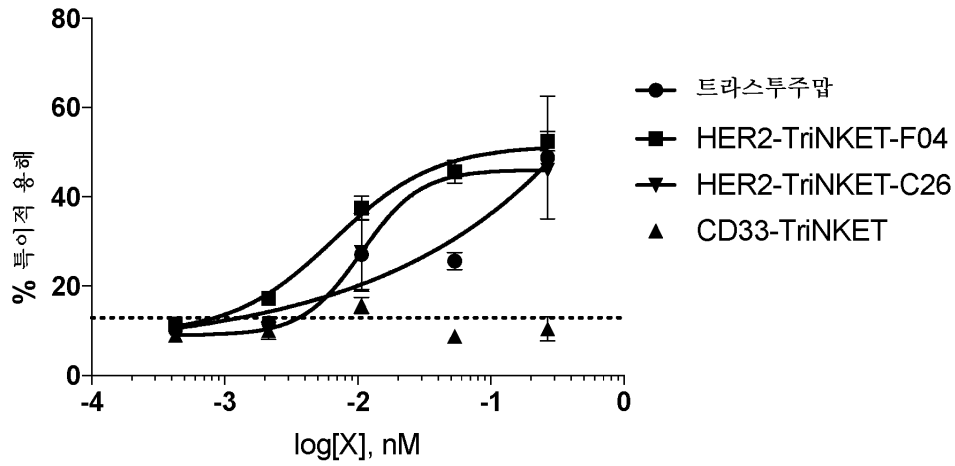
도면49a



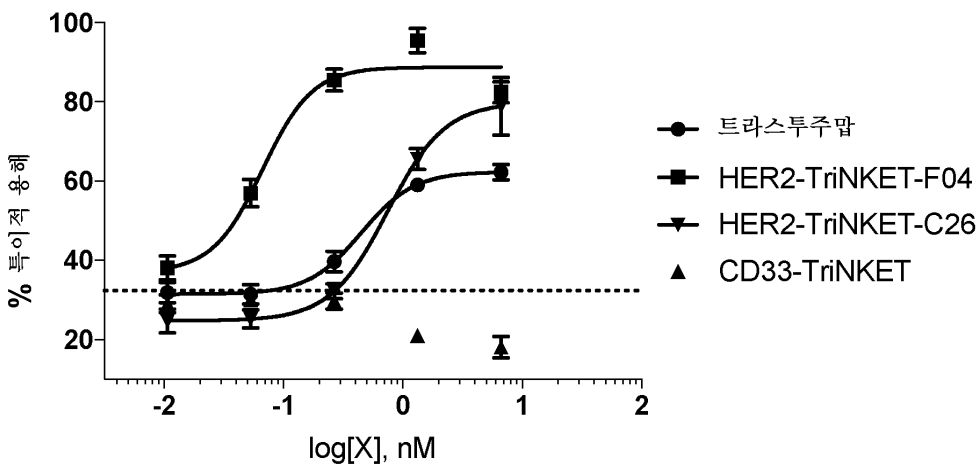
도면49b



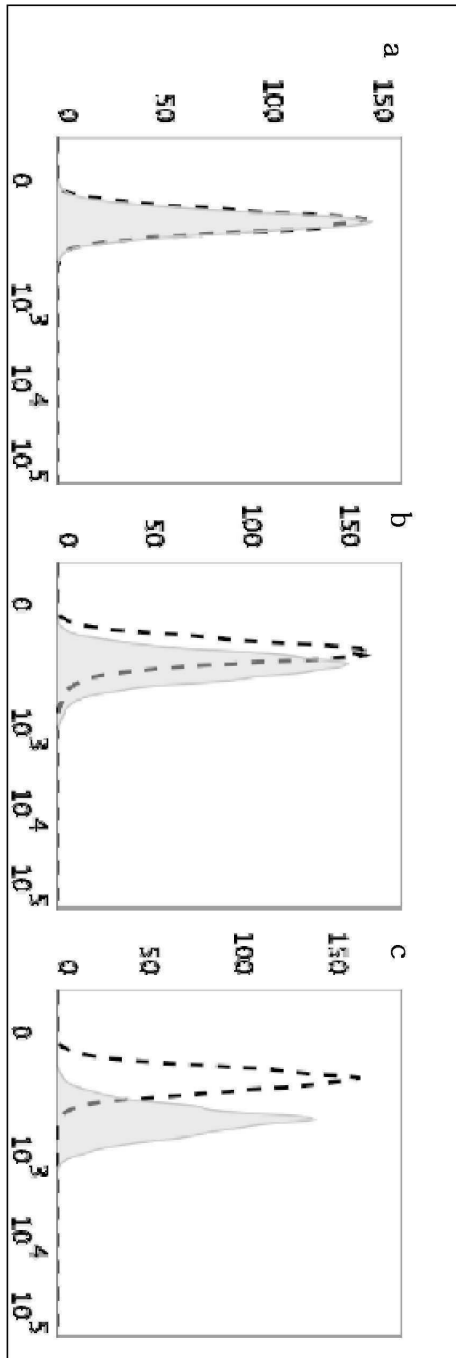
도면50a



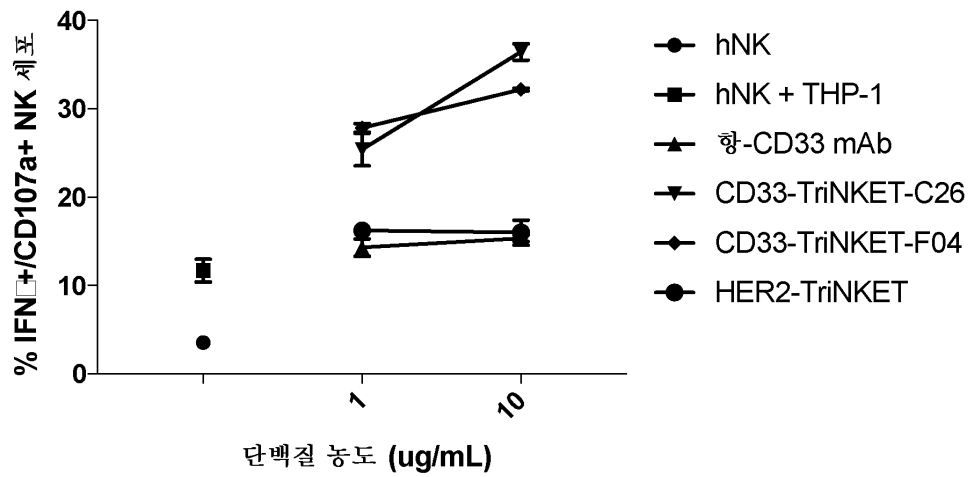
도면50b



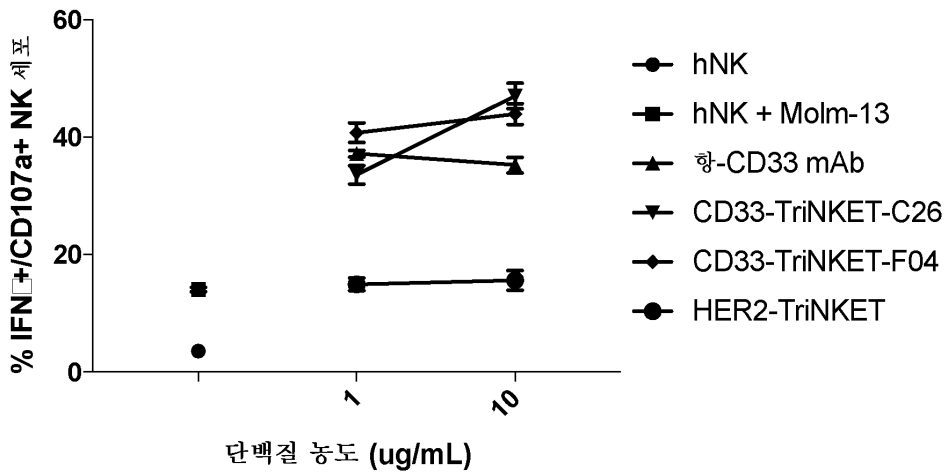
도면51



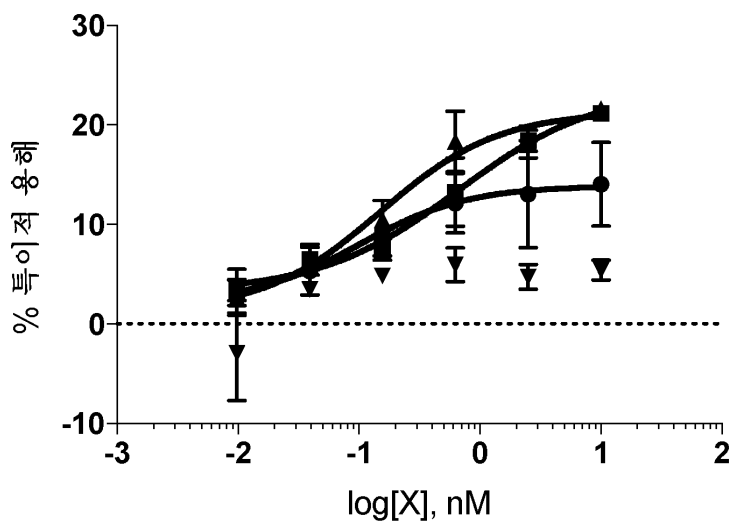
도면52a



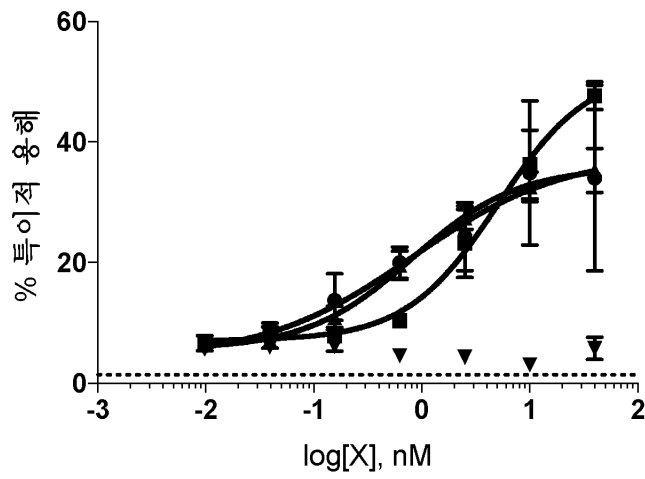
도면52b



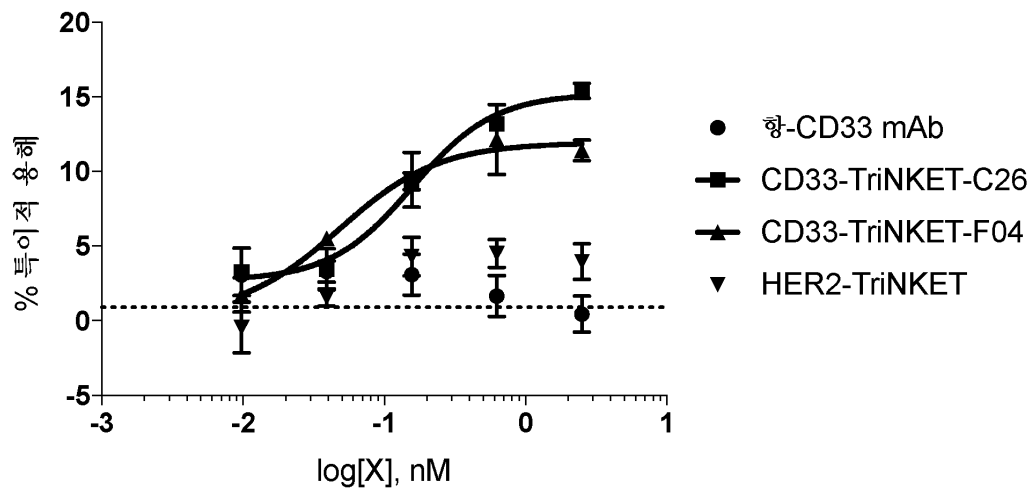
도면53a



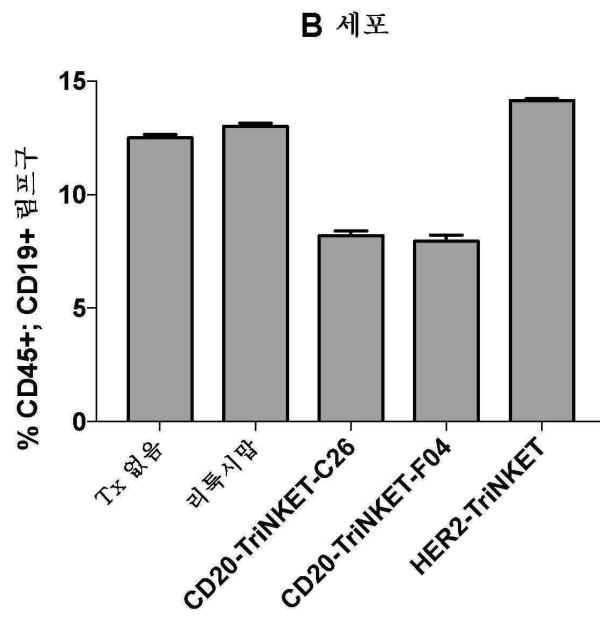
도면53b



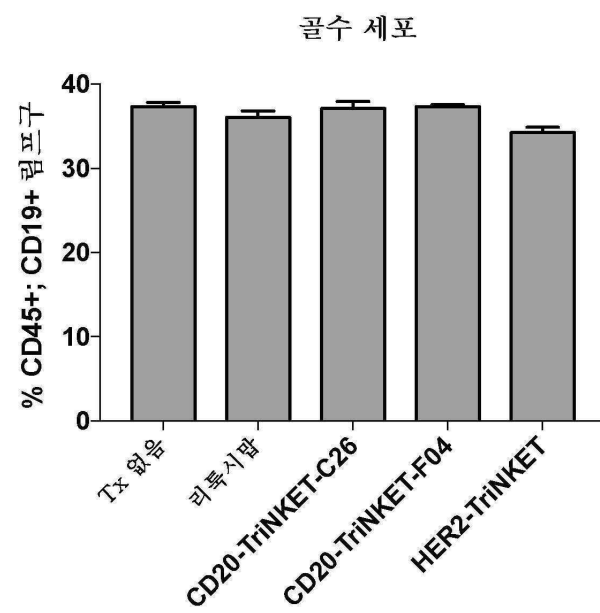
도면53c



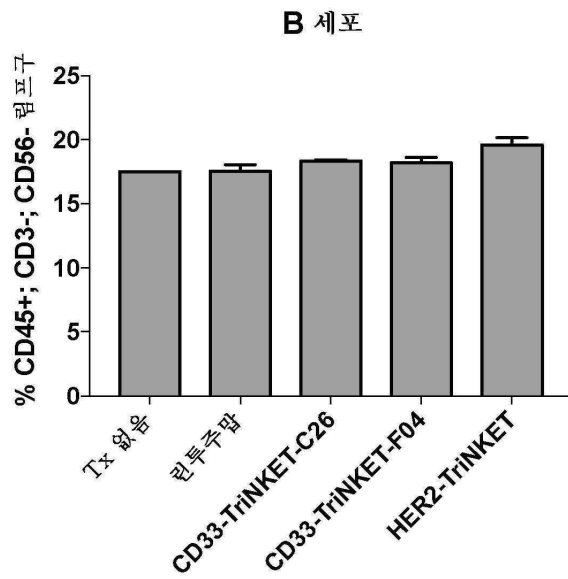
도면54a



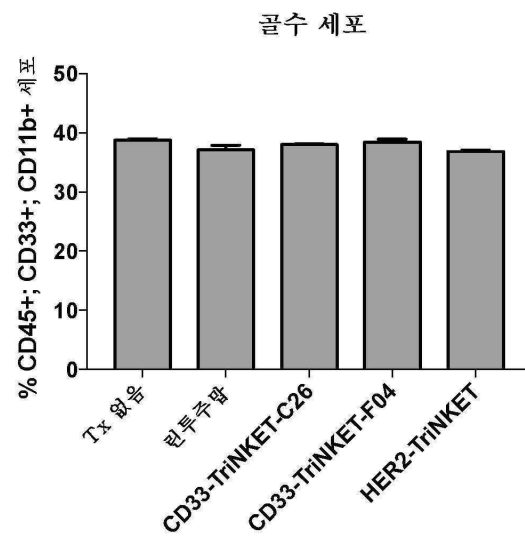
도면54b



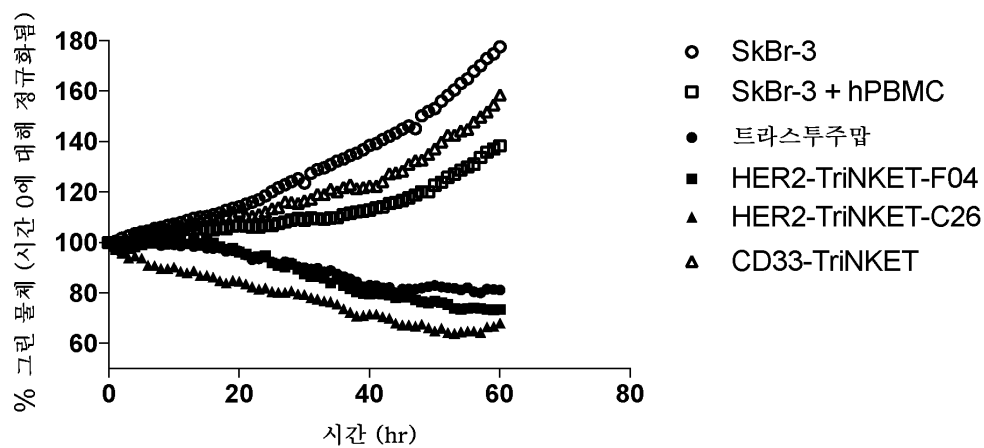
도면54c



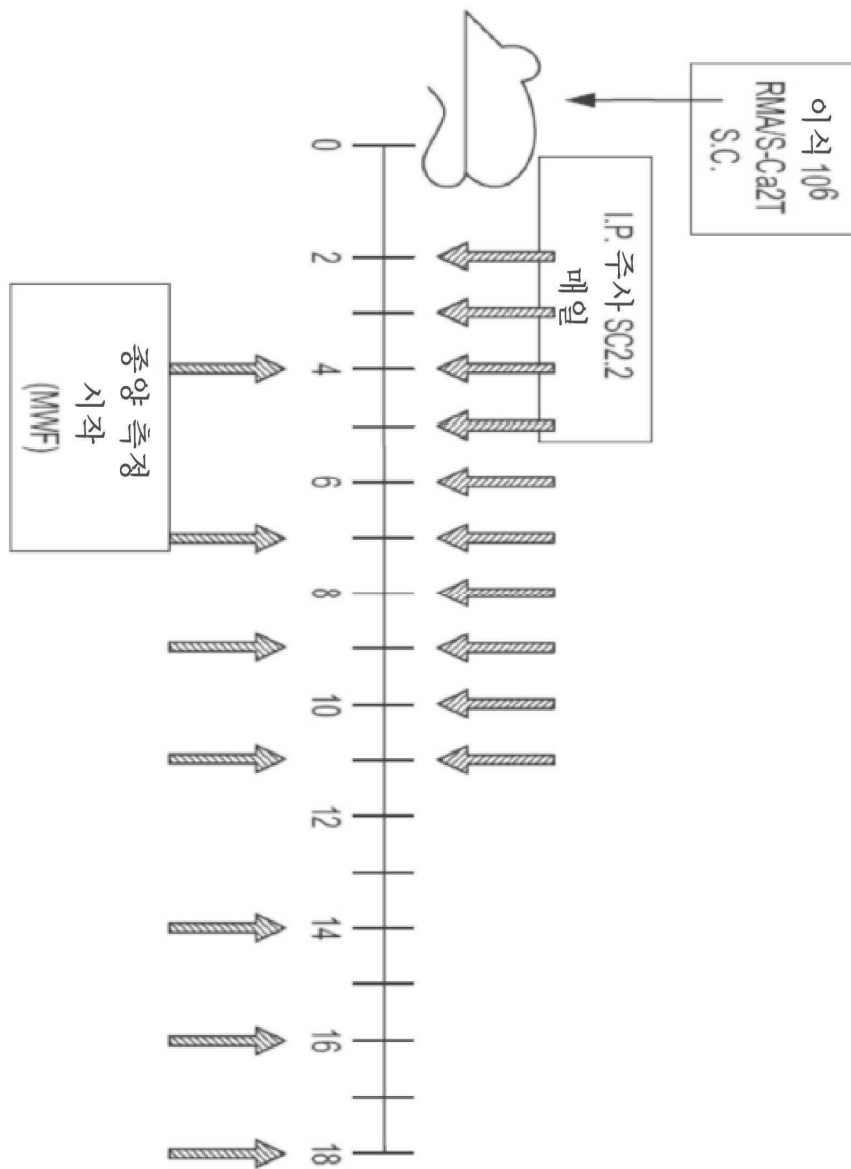
도면54d



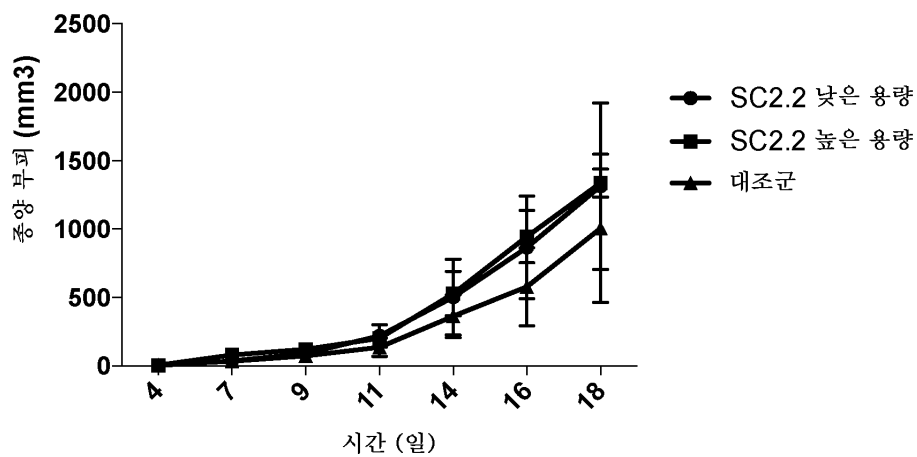
도면55



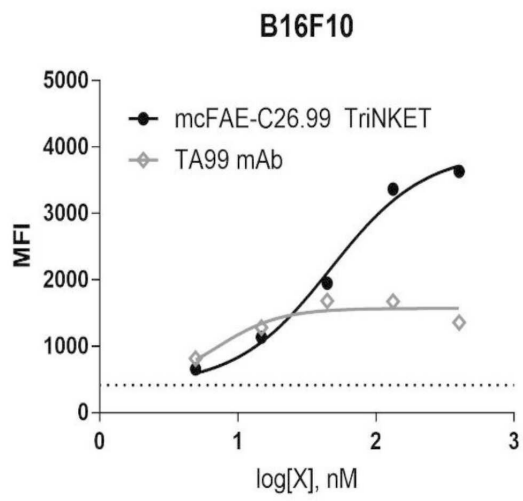
도면56



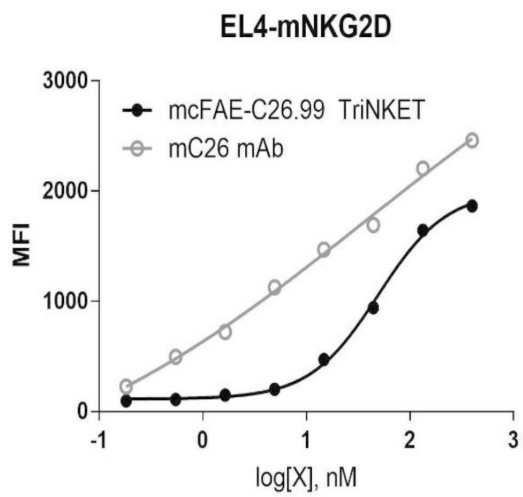
도면57



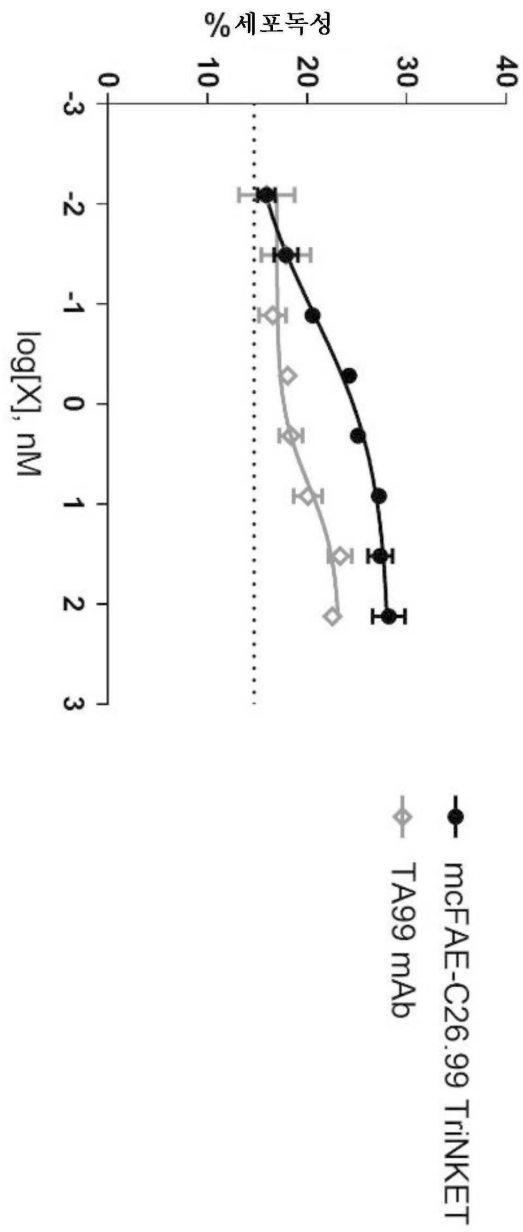
도면58a



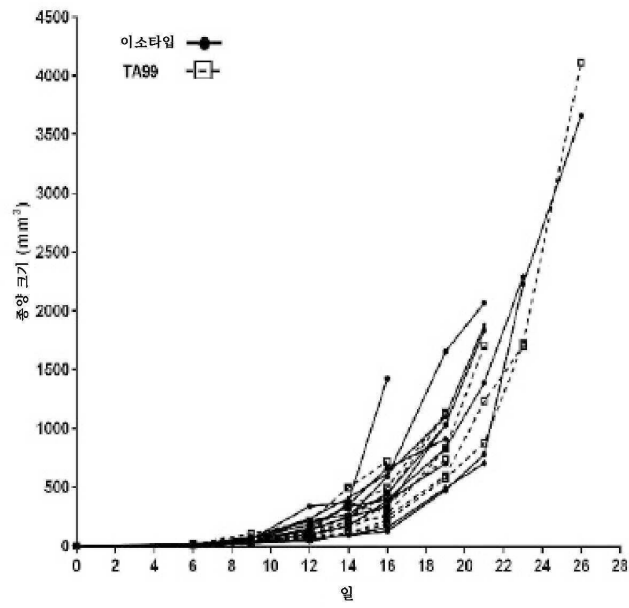
도면58b



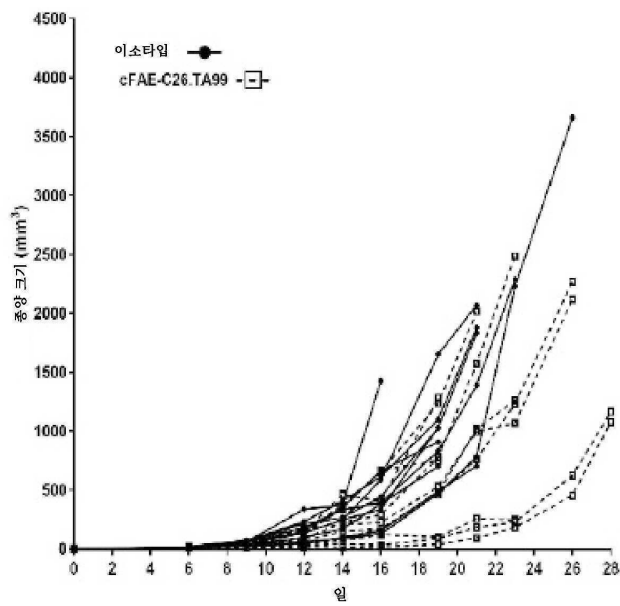
도면59



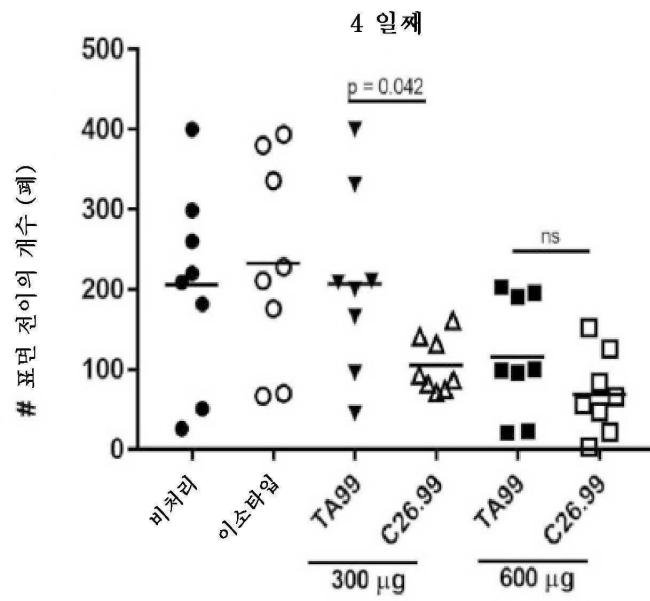
도면60a



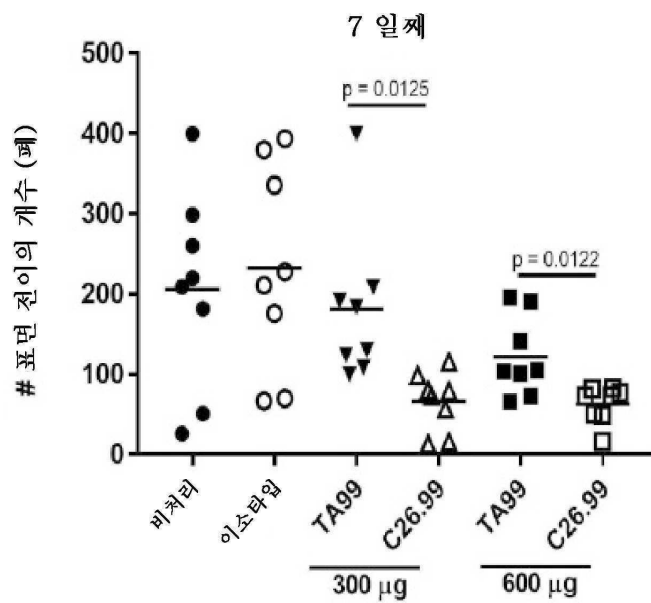
도면60b



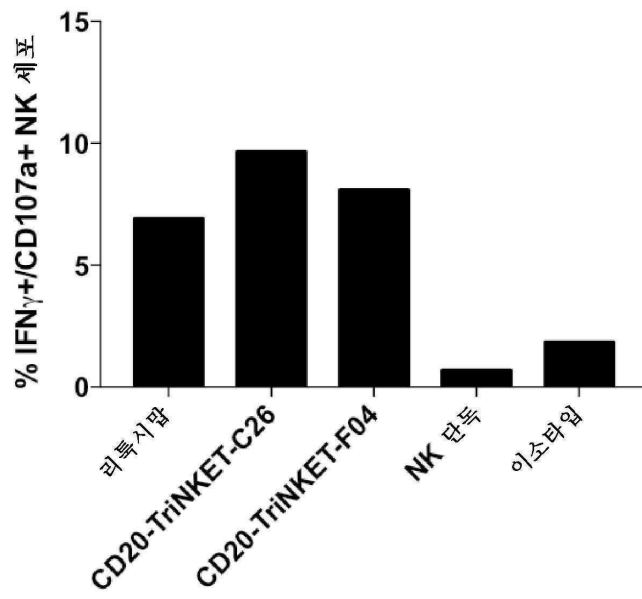
도면61a



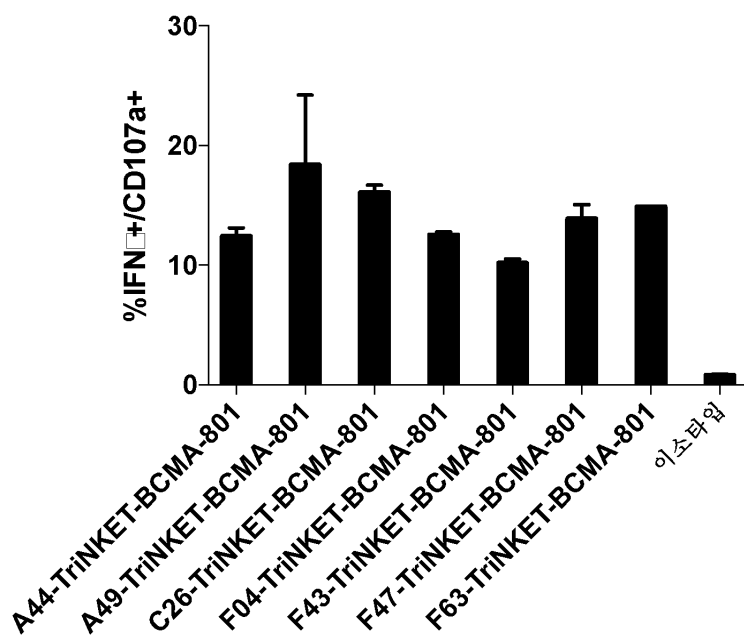
도면61b



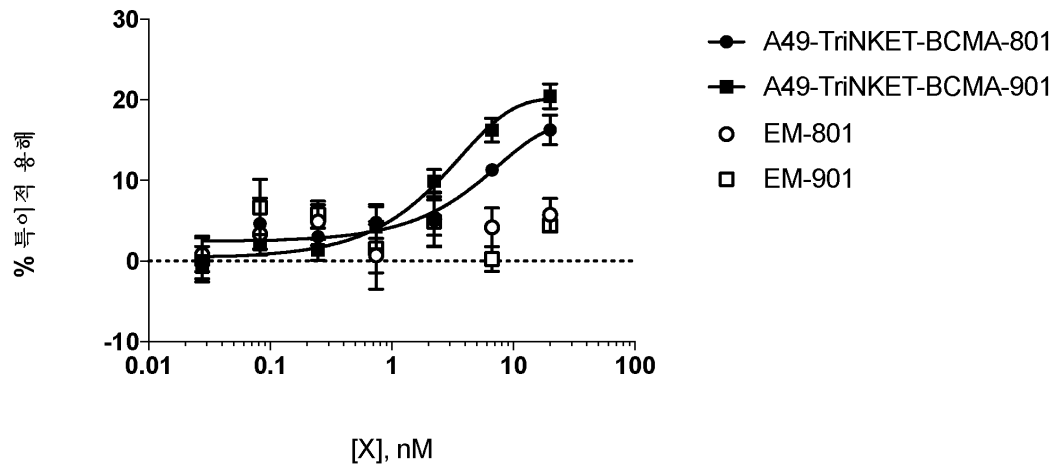
도면62



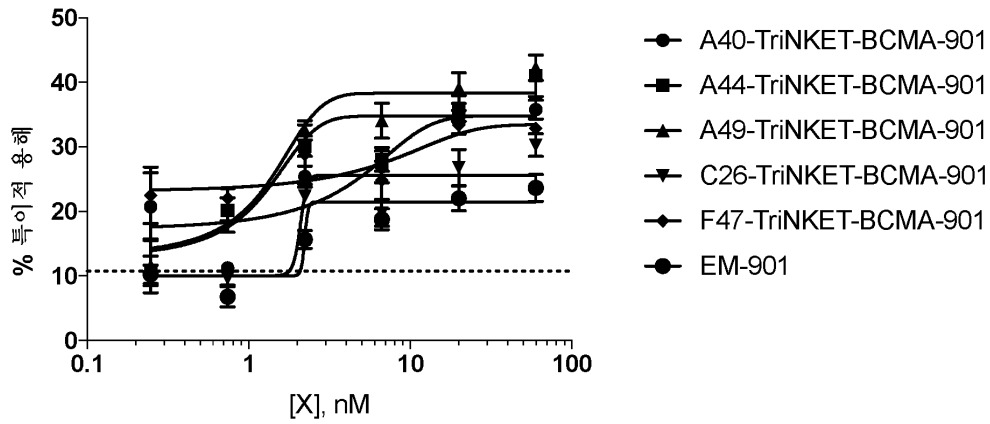
도면63



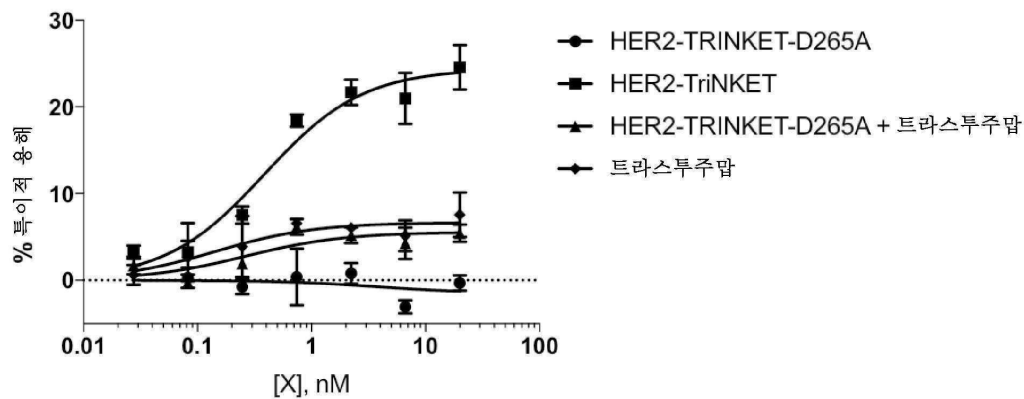
도면64



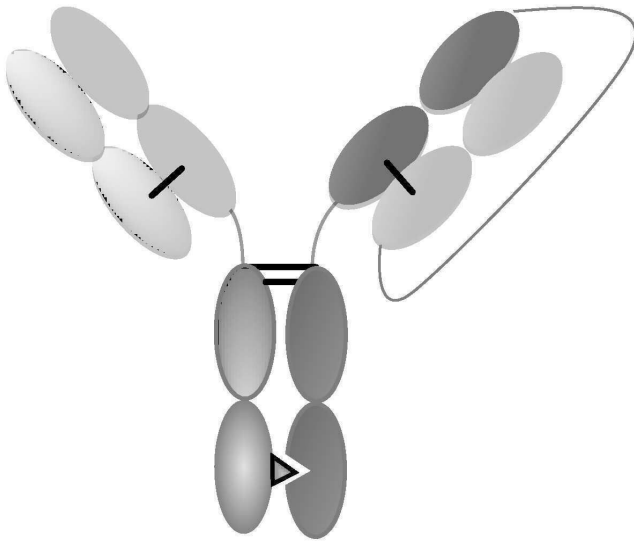
도면65



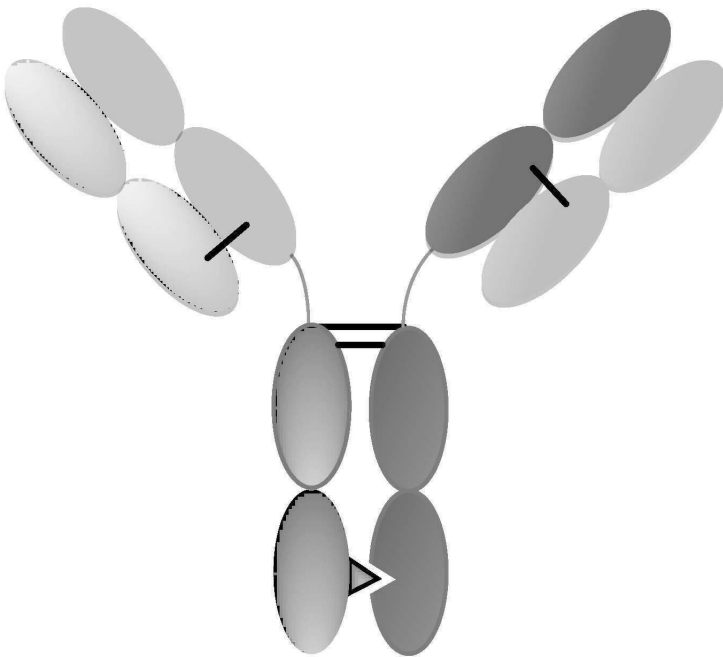
도면66



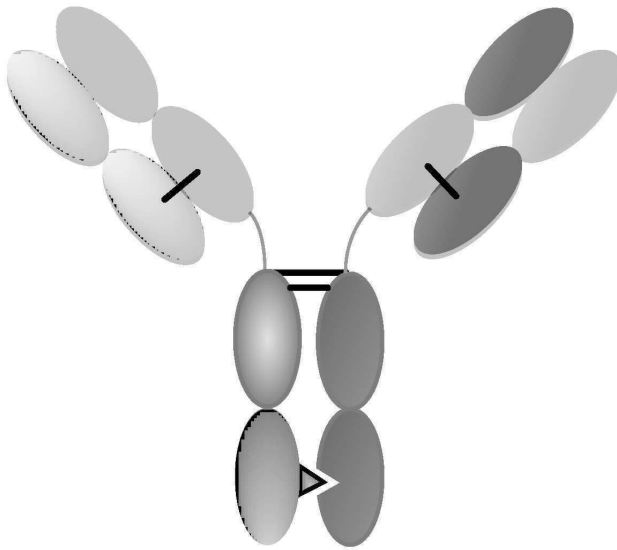
도면67



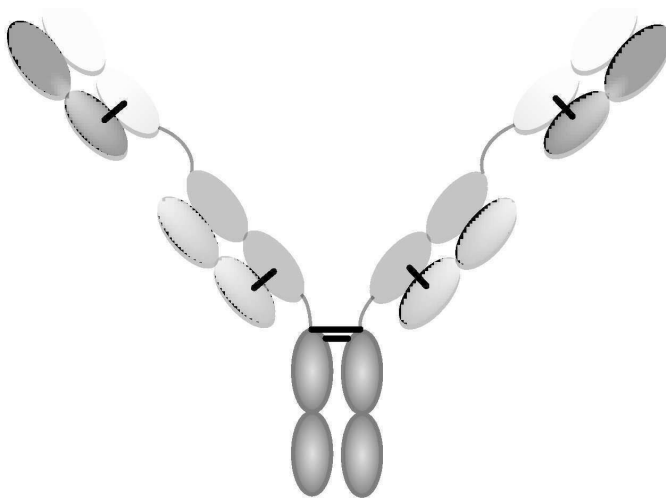
도면68



도면69



도면70



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> ADIMAB, LLC.

<120> MULTI-SPECIFIC BINDING PROTEINS FOR ACTIVATION OF NATURAL KILLER
CELLS AND THERAPEUTIC USES THEREOF TO TREAT CANCER

<130> DFY-001PC

<140><141><150> 62/456,535

<151> 2017-02-08

<160> 89

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 1

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Ala Arg Gly Pro Trp Ser Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 2

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

1 5 10 15

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

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

<210> 3

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 3

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

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Ala Arg Gly Pro Trp Ser Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 4
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide
<400> 4
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

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

65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95
Ile Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 5
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide
<400> 5
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu

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

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

<210> 6

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 6

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Ser Phe Tyr Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 7

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 7

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Ala Arg Gly Pro Trp Ser Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 8

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 8

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

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

<210> 9

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 9

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

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

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

<210> 10

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 10

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

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

<210> 11

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 11

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Ala Arg Gly Pro Trp Gly Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 12

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Asp Ile Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 13

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 13

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

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

<210> 14

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 14

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Phe Pro Ile

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 15

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 15

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr

20 25 30

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

115

<210> 16

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 16

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

100 105

<210> 17

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 17

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Ala Arg Gly Pro Trp Ser Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 18

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 18

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

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

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

<210> 19

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 19

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

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

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

65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Ala Arg Gly Pro Trp Ser Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 20

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 20

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Ile Tyr Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 21

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 21

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

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

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

115

<210> 22

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 22

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

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

<210> 23

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 23

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

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

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

<210> 24

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 24

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

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

<210> 25

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 25

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

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

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Ala Arg Gly Pro Trp Ser Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 26

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 26

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gln Ser Phe Pro Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 27

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 27

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Ala Arg Gly Pro Trp Ser Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 28

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 28

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45
Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

<210> 29

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 29

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

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

<210> 30

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 30

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Ser Tyr Ser Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 31

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 31

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr

20 25 30

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

<210> 32

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 32

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

100 105

<210> 33

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 33

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Ala Arg Gly Pro Trp Ser Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 34

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 34

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

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

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

<210> 35

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 35

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

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

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

65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Ala Arg Gly Pro Trp Ser Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 36

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 36

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Ser Phe Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 37

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 37

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

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

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

115

<210> 38

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 38

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Leu Tyr Ser Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 39

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 39

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Ala Arg Gly Pro Trp Ser Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 40

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 40

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Thr Phe Ile Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 41

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 41

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Asp Ser Ser Ile Arg His Ala Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met

100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 42

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 42

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Ile Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile

100 105 110

Lys

<210> 43

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 43

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Ala Arg Gly Ser Asp Arg Phe His Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 44

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 44

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Tyr

20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asp Thr Trp Pro Pro

85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 45

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 45

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Asp Gly Gly Tyr Tyr Asp Ser Gly Ala Gly Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 46

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 46

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Val Ser Tyr Pro Arg

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 47

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 47

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

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

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

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

<210> 48

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 48

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

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

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

<210> 49

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 49

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

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

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 50

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 50

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Asp Tyr Trp Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 51

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 52

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 52

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 53

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 53

Ala Lys Asp Gly Gly Tyr Tyr Asp Ser Gly Ala Gly Asp Tyr

1 5 10

<210> 54

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 54

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asp Ser Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 55

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 55

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 56

Gln Gln Gly Val Ser Tyr Pro Arg Thr

1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 57

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ser Met Asn

1 5

<210> 58

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 58

Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 59

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 59

Ala Arg Gly Ala Pro Met Gly Ala Ala Ala Gly Trp Phe Asp Pro

1 5 10 15

<210> 60

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 60

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 61

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 61

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 62

Gln Gln Gly Val Ser Phe Pro Arg Thr

1 5

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 63

Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His

1 5

<210> 64

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 64

Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 65

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 65

Ala Arg Asp Thr Gly Glu Tyr Tyr Asp Thr Asp Asp His Gly Met Asp

1 5 10 15

Val

<210> 66

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 66

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 67

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 67

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 68

Gln Gln Asp Asp Tyr Trp Pro Pro Thr

1 5

<210> 69

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

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

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

<210> 70

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

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

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

85 90 95
 Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 71

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Asp Asp Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Trp Asp Asp Ala Phe Asn Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 72

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro

85

90

95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 73

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 73

Met Ala Ala Ala Ala Ile Pro Ala Leu Leu Leu Cys Leu Pro Leu Leu

1 5 10 15

Phe Leu Leu Phe Gly Trp Ser Arg Ala Arg Arg Asp Asp Pro His Ser

20

25

30

Leu Cys Tyr Asp Ile Thr Val Ile Pro Lys Phe Arg Pro Gly Pro Arg

35

40

45

Trp Cys Ala Val Gln Gly Gln Val Asp Glu Lys Thr Phe Leu His Tyr

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

Val Val Asp Ile Leu Thr Glu Gln Leu Leu Asp Ile Gln Leu Glu Asn

100

105

110

Tyr Thr Pro Lys Glu Pro Leu Thr Leu Gln Ala Arg Met Ser Cys Glu

115

120

125

Gln Lys Ala Glu Gly His Ser Ser Gly Ser Trp Gln Phe Ser Ile Asp

130

135

140

Gly Gln Thr Phe Leu Leu Phe Asp Ser Glu Lys Arg Met Trp Thr Thr

145

150

155

160

Val His Pro Gly Ala Arg Lys Met Lys Glu Lys Trp Glu Asn Asp Lys

165 170 175

Asp Val Ala Met Ser Phe His Tyr Ile Ser Met Gly Asp Cys Ile Gly

180 185 190

Trp Leu Glu Asp Phe Leu Met Gly Met Asp Ser Thr Leu Glu Pro Ser

195 200 205

Ala Gly Ala Pro Leu Ala Met Ser Ser Gly Thr Thr Gln Leu Arg Ala

210 215 220

Thr Ala Thr Thr Leu Ile Leu Cys Cys Leu Leu Ile Ile Leu Pro Cys

225 230 235 240

Phe Ile Leu Pro Gly Ile

245

<210> 74

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 74

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Arg Tyr Glu Val Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 75

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 75

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Ile

20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

35 40 45
Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asn

65 70 75 80
Asp Thr Ala Asn Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Arg Ser Tyr Pro Leu Thr

85 90 95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 76

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 76

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

1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn
20 25 30

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

Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 77

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 77

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asp Glu
20 25 30
Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile His Ser Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ala Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro

85 90 95

Asp Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 78

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 78

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Ala Arg Gly Pro Trp Ser Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 79

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 79

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Glu Gln Tyr Asp Ser Tyr Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 80

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 80

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
Ala Arg Arg Gly Arg Lys Ala Ser Gly Ser Phe Tyr Tyr Tyr Tyr Gly

100 105 110
Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 81

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 81

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Glu Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 82

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 82

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 83

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 83

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65					70					75					80				
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Pro	Pro				
				85						90						95			
Asp	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys							
				100						105									
<210>	84																		
<211>	121																		
<212>	PRT																		
<213>	Artificial Sequence																		
<220><223>	Synthetic polypeptide																		
<400>	84																		
Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala				
1					5					10					15				
Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr				
				20						25						30			
Asn	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Thr	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile				
				35						40						45			
Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Asp	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe				
				50						55						60			
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr				
65					70						75						80		
Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys				
				85						90						95			
Ala	Arg	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Asp	Trp	Tyr	Phe	Asn	Val	Trp	Gly				
				100						105						110			
Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ala											
				115						120									
<210>	85																		
<211>	106																		
<212>	PRT																		
<213>	Artificial Sequence																		
<220><223>	Synthetic polypeptide																		

<400> 85

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 86

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 86

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Phe Pro Ile

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu

145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr

180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys

210

<210> 87

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 87

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

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

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

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

 Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu
 245 250 255
 Met Ile Ser Leu Ser Pro Met Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270
 Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu
 275 280 285
 Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300

Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser
 305 310 315 320
 Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Arg Ala Leu Pro Ser Pro
 325 330 335
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Pro Arg Gly Pro Val Arg Ala Pro Gln
 340 345 350
 Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Ala Glu Glu Met Thr Lys Lys Glu Phe
 355 360 365

Ser Leu Thr Cys Met Ile Lys Gly Phe Leu Pro Ala Glu Ile Ala Val
 370 375 380
 Asp Trp Thr Ser Asn Gly Arg Thr Glu Gln Asn Tyr Lys Asn Thr Ala
 385 390 395 400
 Thr Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Arg Leu Arg
 405 410 415
 Val Gln Lys Ser Thr Trp Glu Arg Gly Ser Leu Phe Ala Cys Ser Val
 420 425 430

Val His Glu Gly Leu His Asn His Leu Thr Thr Lys Thr Ile Ser Arg
 435 440 445

Ser Leu Gly Lys
 450

<210> 88

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 88

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro His Leu Leu Val
 35 40 45

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

 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
 100 105 110
 Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
 115 120 125
 Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
 130 135 140
 Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
 145 150 155 160

 Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
 180 185 190
 Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210
 <210> 89
 <211> 456
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> Synthetic polypeptide
 <400> 89
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
 20 25 30

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

275 280 285
 Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp
 290 295 300
 Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln

 305 310 315 320
 Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Arg Ala
 325 330 335
 Leu Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Pro Arg Gly Pro Val
 340 345 350
 Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Ala Glu Glu Met Thr
 355 360 365
 Lys Lys Glu Phe Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Gly Phe Leu Pro Ala

 370 375 380
 Glu Ile Ala Val Asp Trp Thr Ser Asn Gly Arg Thr Glu Gln Asn Tyr
 385 390 395 400
 Lys Asn Thr Ala Thr Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Leu Met Tyr
 405 410 415
 Ser Lys Leu Thr Val Gln Lys Ser Thr Trp Glu Arg Gly Ser Leu Phe
 420 425 430
 Ala Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His Leu Thr Thr Lys

 435 440 445
 Thr Ile Ser Arg Ser Leu Gly Lys
 450 455