(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0009550
(43) 공개일자 2025년01월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/68 (2017.01) *A61K 31/202* (2006.01)
A61K 31/4741 (2006.01) *A61K 31/5517* (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/6803 (2023.08)
A61K 31/202 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7042931(분할)
(22) 출원일자(국제) 2018년07월31일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2020-7005140
원출원일자(국제) 2018년07월31일
심사청구일자 2021년07월30일
(85) 번역문제출일자 2024년12월26일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2018/055753
(87) 국제공개번호 WO 2019/025983
국제공개일자 2019년02월07일
(30) 우선권주장
62/539,825 2017년08월01일 미국(US)
62/596,194 2017년12월08일 미국(US)

(71) 출원인
메디뮨 엘엘씨
미국 20878 메릴랜드주 게이테르스부르크 원 메디뮨 웨이
(72) 발명자
키너, 크리스타
미국 20878 메릴랜드주 게이테르스부르크 원 메디뮨 웨이 메디뮨 엘엘씨 내
바키, 리나
미국 20878 메릴랜드주 게이테르스부르크 원 메디뮨 웨이 메디뮨 엘엘씨 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장덕순, 류현경

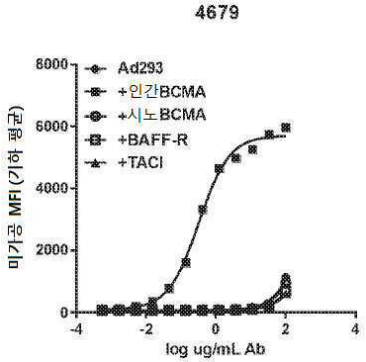
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **BCMA 단클론 항체-약물 접합체**

(57) 요 약

본 발명은 세포독소에 접합된, B-세포 성숙 항원(BCMA)에 대해 생성된 단클론 항체, 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 항체-약물 접합체(ADC)에 관한 것이다. 본 발명은 또한 항체-약물 접합체를 포함하는 조성물, 및 BCMA를 발현하는 다발성 골수종 세포(다발성 골수종 줄기 세포 포함)를 ADC와 접촉시켜 다발성 골수종 세포를 사멸시키는 방법을 제공한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 31/4741 (2013.01)
A61K 31/5517 (2013.01)
A61K 31/7048 (2013.01)
A61K 47/6849 (2017.08)
A61K 47/6867 (2017.08)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 16/2878 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/21 (2013.01)
(72) 발명자
샤오, 샤오동
미국 21702 메릴랜드주 프레데릭 배너 힐 로드 2201
허트, 엘레인 엠.
미국 20878 메릴랜드주 게이테르스부르크 원 메디뮨 웨이 메디뮨 엘엘씨 내
타이스, 데이비드
미국 20878 메릴랜드주 게이테르스부르크 원 메디뮨 웨이 메디뮨 엘엘씨 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

세포독소에 접합된, B-세포 성숙 항원(BCMA)에 대해 생성된 단클론 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 항체-약물 접합체(ADC)이며, 상기 세포독소는 항-미소관제, 피롤로벤조다이아제핀(PBD), RNA 폴리머라제 II 억제제, 또는 DNA 알킬화제이고,

상기 단클론 항체는

(a) 서열 번호 1의 상보성 결정 영역 1(HCDR1) 아미노산 서열, 서열 번호 2의 HCDR2 아미노산 서열 및 서열 번호 3의 HCDR3 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

(b) 서열 번호 4의 상보성 결정 영역 1(LCDR1) 아미노산 서열, 서열 번호 5의 LCDR2 아미노산 서열 및 서열 번호 6의 LCDR3 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항체-약물 접합체(ADC).

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하는, 항체-약물 접합체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하는, 항체-약물 접합체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하고 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하는, 항체-약물 접합체.

청구항 5

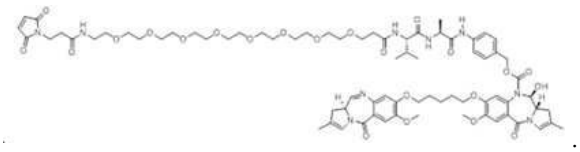
제1항에 있어서, 상기 세포독소는 메이탄시노이드(maytansinoid), 오리스타틴(auristatin) 및 튜불리신(tubulysin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항-미소관제인, 항체-약물 접합체.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 세포독소는 피롤로벤조다이아제핀(PBD)인, 항체-약물 접합체.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 피롤로벤조다이아제핀은 하기 구조를 가진 SG3249인, 항체-약물 접합체:



청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 항체-약물 접합체 및 약학적-허용 담체를 포함하는, 다발성 골수종을 치료하기 위한 약학 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 항체-약물 접합체를 포함하는, 다발성 골수종을 치료하는 방법에 사용하기 위한 약학 조성물이며,

상기 방법은 BCMA를 발현하는 다발성 골수종 세포를 상기 항체-약물 접합체와 접촉시켜, 항체-약물 접합체가 다

발성 골수종 세포상의 BCMA에 결합하고 다발성 골수종 세포를 사멸시키는 단계를 포함하는, 약학 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서, 다발성 골수종 세포를 사멸시키는 방법에 사용하기 위한 약학 조성물이며, 상기 방법은 BCMA를 발현하는 다발성 골수종 세포를 상기 약학 조성물과 접촉시켜, 항체-약물 접합체가 다발성 골수종 세포상의 BCMA에 결합하고 다발성 골수종 세포를 사멸시키는 단계를 포함하는, 약학 조성물.

청구항 11

BCMA를 발현하는 다발성 골수종 세포를 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 항체-약물 접합체와 접촉시켜, 항체-약물 접합체가 다발성 골수종 세포상의 BCMA에 결합하고 다발성 골수종 세포를 사멸시키는 단계를 포함하는, 다발성 골수종 세포를 사멸시키는 방법이며, 상기 다발성 골수종 세포는 *시험관내*에 있는, 방법.

청구항 12

BCMA를 발현하는 다발성 골수종 세포를 제8항의 약학 조성물과 접촉시켜, 항체-약물 접합체가 다발성 골수종 세포상의 BCMA에 결합하고 다발성 골수종 세포를 사멸시키는 단계를 포함하는, 다발성 골수종 세포를 사멸시키는 방법이며, 상기 다발성 골수종 세포는 *시험관내*에 있는, 방법.

청구항 13

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 항체-약물 접합체를 포함하는, 다발성 골수종을 치료하는 방법에 사용하기 위한 약학 조성물이며,

상기 방법은 BCMA를 발현하는 다발성 골수종 줄기 세포를 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 항체-약물 접합체와 접촉시켜, 항체-약물 접합체가 다발성 골수종 줄기 세포상의 BCMA에 결합하고 다발성 골수종 줄기 세포를 사멸시키는 단계를 포함하는, 약학 조성물.

청구항 14

BCMA를 발현하는 다발성 골수종 줄기 세포를 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 항체-약물 접합체와 접촉시켜, 항체-약물 접합체가 다발성 골수종 줄기 세포상의 BCMA에 결합하고 다발성 골수종 줄기 세포를 사멸시키는 단계를 포함하는, 다발성 골수종 줄기 세포를 사멸시키는 방법이며, 상기 다발성 골수종 줄기 세포는 *시험관내*에 있는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 전자적으로 제출된 자료의 참고-통합

[0002] 2018년 7월 31일에 생성되고 파일명이 "BCMA-100-WO-PCT-SeqListing.TXT"이며 크기가 16,498바이트인 ASCII(Text) 파일로서 식별되고 본원과 함께 제출되는 컴퓨터-판독가능 뉴클레오티드/아미노산 서열 목록이 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

배 경 기 술

[0003] 다발성 골수종(MM)은 클론 형질 세포의 축적을 특징으로 하는 악성종양이다(예를 들어, 문헌[Palumbo et al., *New England J. Med.*, *364*(11): 1046-1060 (2011)], 및 문헌[Lonial et al., *Clinical Cancer Res.*, *77*(6): 1264-1277 (2011)] 참고). MM을 위한 현재의 치료법은 화학요법, 방사선, 수술, 바이오포스포네이트(biophosphonate) 및 자가 줄기-세포 이식(ASCT)을 포함한다. 이들 치료법은 종종 관해를 야기하지만, 거의 모든 환자가 결국에는 재발하고 사망한다(예를 들어, 문헌[Lonial et al., *supra*] 및 문헌[Rajkumar, *Nature Rev. Clinical Oncol*, *5*(8): 479-491 (2011)] 참고).

[0004] B-세포 성숙 항원(BCMA)은 B-세포 계통의 세포상에 발현되는 종양 괴사 패밀리 수용체(TNFR) 구성원이다(문헌[Laabi et al., *Nucleic Acids Research*, 22(7): 1147-1154 (1994)]). BCMA 발현은 최종 분화된 B 세포에서 가장 높다. BCMA는 장기 체액성 면역 유지를 위해 형질 세포의 생존을 매개하는데 관여한다. BCMA의 발현은 많은 암, 자가면역 장애, 및 감염성 질환에 연관되었다. BCMA RNA는 다발성 골수종 세포에서 보편적으로 검출되었으

며, BCMA 단백질은 여러 연구자에 의해 다발성 골수종 환자로부터의 형질 세포 표면에서 검출되었다(예를 들어, 문헌[Novak et al, *Blood*, *103*(2): 689-694 (2004)]; 문헌[Neri et al., *Clinical Cancer Research*, *73*(19): 5903-5909 (2007)]; 문헌[Bellucci et al., *Blood*, *105*(10): 3945-3950 (2005)]; 및 문헌[Moreaux et al., *Blood*, *703*(8): 3148-3157 (2004)] 참고). 따라서, BCMA는 다발성 골수종을 위한 가능한 치료 표적으로서 조사되어 왔다.

[0005] 다발성 골수종을 치료하기 위한 방법에서 사용될 수 있는 조성물이 여전히 필요하다. 본 발명은 그러한 조성물과 방법을 제공한다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 세포독소에 접합된, B-세포 성숙 항원(BCMA)에 대해 생성된 단클론 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 항체-약물 접합체(ADC)를 제공한다. 단클론 항체는 (a) 서열 번호 1의 상보성 결정 영역 1(HCDR1) 아미노산 서열, 서열 번호 2의 HCDR2 아미노산 서열 및 서열 번호 3의 HCDR3 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 (b) 서열 번호 4의 상보성 결정 영역 1(LCDR1) 아미노산 서열, 서열 번호 5의 LCDR2 아미노산 서열 및 서열 번호 6의 LCDR3 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0007] 또한, 본 발명은 전술한 항체-약물 접합체를 포함하는 조성물, 및 BCMA를 발현하는 다발성 골수종 세포(다발성 골수종 줄기 세포 포함)를 ADC와 접촉시켜 다발성 골수종 세포를 사멸시키는 방법을 제공한다.

[0008] 본 발명은 또한 (a) 서열 번호 1의 상보성 결정 영역 1(HCDR1) 아미노산 서열, 서열 번호 2의 HCDR2 아미노산 서열 및 서열 번호 3의 HCDR3 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 (b) 서열 번호 4의 상보성 결정 영역 1(LCDR1) 아미노산 서열, 서열 번호 5의 LCDR2 아미노산 서열 및 서열 번호 6의 LCDR3 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, BCMA에 대해 생성된 단클론 항체, 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 실시예 1에 개시된 huBCMA, cynoBCMA, BAFF-R, 및 TACI를 발현하는 부착성 293(Ad293) 세포에의 정제된 항체의 FACS 결합을 보여주는 일련의 그래프이다(도 1a~1c). 15B2GL 단클론 항체는 BAFF-R 및/또는 TACI에 결합하지 않은 유일한 시험된 시노몰구스(cynomolgus) 교차-반응성 항체였다.

도 2는 실시예 4에 개시된 대로, *시험관내*에서 BCMA 항체 약물-접합체가 다발성 골수종(MM) 및 형질 세포 백혈병(PCL) 세포를 사멸시키는 능력을 보여주는 그래프이다. 도 2a~2h는 표시된 ADC로 처리된 특정 BCMA-발현 다발성 골수종 및 형질 세포 백혈병 세포주의 생존능을 보여주는 한편, 도 2i 및 2j는 BCMA를 발현하지 않는 세포주의 생존능을 보여준다.

도 3은 실시예 4에 개시된 대로, 인간 BMCA를 발현하는 Ad293 세포로부터 수집된 조절된 배지에서 ADC I09-SG3249와 비교할 때(도 3a) 또는 인간 BMCA를 발현하는 Ad293 세포로부터 수집된 조절된 배지에서 ADC J6M0-mc-MMAF 및 J6M0-SG3249와 비교할 때(도 3b), 항체 약물 접합체 15B2GL-SG3249에 의한 가용성 BMCA의 존재하에서의 다발성 골수종 세포주의 사멸을 보여주는 그래프를 함유한다.

도 4는 미처리 마우스와 비교할 때, BCMA-표적화 ADC 15B2GL-SG3249, I09-SG3249, L15-SG3249 및 J6M0-mc-MMAF의 처리에 대한 반응으로 다발성 골수종의 H929 이종이식 마우스 모델에서 종양 부피의 변화를 보여주는 그래프이다.

도 5는 미처리 마우스와 비교할 때, ADC 15B2GL-SG3249, I09-SG3249, L15-SG3249, J6M0-mc-MMAF, 및 이소타입 대조군 IgG1-SG3249의 처리에 대한 반응으로 다발성 골수종의 JJN3 이종이식 마우스 모델에서 종양 부피의 변화를 보여주는 그래프이다.

도 6은 미처리 마우스와 비교할 때, ADC 15B2GL-SG3249, I09-SG3249, L15-SG3249, 및 J6M0-mc-MMAF의 처리에 대한 반응으로 형질세포 백혈병의 MM.1S 이종이식 마우스 모델에서 종양 부피의 변화를 보여주는 그래프이다.

도 7은 미처리 마우스와 비교할 때, ADC 15B2GL-SG3249 및 J6M0-mc-MMAF의 처리에 대한 반응으로 형질세포 백혈병의 MM.1R 이종이식 마우스 모델에서 종양 부피의 변화를 보여주는 그래프이다.

도 8은 MM 줄기 세포에서의 BCMA의 발현을 보여주는 일련의 그래프 및 유세포분석법 곡선을 함유한다. BCMA 발현은 MM 형질 세포(CD19-CD138+, 회색 선) 및 MM 줄기 세포(CD19+CD138-, 흑색 선) 둘 모두에서 검출되었다.

도 9는 클론형성 분석법(clonogenic assay)에서 ADC J6M0-mc-MMAF와 비교할 때, 환자 샘플 MM263(도 9a), MM276(도 9b), MM277(도 9c), 및 MM284(도 9d)로부터의 MM 줄기 세포의 ADC 15B2GL-SG3249에 대한 민감성을 보여주는 일련의 그래프를 함유한다. 대조군은 미처리 세포 및 400 ng/mL의 최고 용량의 비-특이적 IgG1-SG3249 접합체를 포함한다. 형성된 콜로니의 수를 100%로 설정된 미처리 배양물에서 형성된 수에 정규화하였다.

도 10은 실시예 7에 개시된 대로, *시험관내*에서 다발성 골수종(MM) 및 형질 세포 백혈병(PCL) 세포를 사멸시키는 BCMA 항체 약물-접합체의 능력을 보여주는 그래프이다. 도 10a~10h는 표시된 ADC로 처리된 특정 BCMA-발현 다발성 골수종 및 형질 세포 백혈병 세포주의 생존능을 보여주는 한편, 도 10i 및 10j는 BCMA를 발현하지 않는 세포주의 생존능을 보여준다.

도 11은 미처리 마우스와 비교할 때, BCMA-표적화 ADC 15B2GL-SG3400, J6M0-SG3400, 및 이소타입 대조군 IgG1-SG3400의 처리에 대한 반응으로 다발성 골수종의 H929 이종이식 마우스 모델에서 종양 부피의 변화를 보여주는 그래프이다.

도 12는 미처리 마우스와 비교할 때, BCMA-표적화 ADC 15B2GL-SG3400, J6M0-SG3400, 및 이소타입 대조군 IgG1-SG3400의 처리에 대한 반응으로 형질 세포 백혈병의 MM.1S 이종이식 마우스 모델에서 종양 부피의 변화를 보여주는 그래프이다.

도 13은 SPR-기반 프로테온(ProteOn) 시스템을 이용하여 인간 BCMA에의 15B2GL, I09, P10, 및 L15 항체 결합의 친화성 및 동력학 측정을 보여주는 그래프이다.

도 14는 SPR-기반 프로테온 시스템을 이용하여 인간 BCMA에의 N22, M02, 및 J6M0 항체 결합의 친화성 및 동력학 측정을 보여주는 그래프이다.

도 15는 유세포분석에 의해 측정된 NCI-H929, MM.1S, 및 Ad293+huBCMA 세포주에의 15B2GL, L15, I09, 또는 J6M0 항체의 결합을 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 본 발명은 세포독소에 접합된, B-세포 성숙 항원(BCMA)에 대해 생성된 단클론 항체, 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 항체-약물 접합체(ADC)를 제공한다. 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "항체-약물 접합체"는 화학적 링커를 통해 세포독성제(일반적으로 높은 전신 독성을 가진 소분자 약물)에 부착된 단클론 항체(mAb)를 포함하는 화합물을 말한다. 일부 실시 형태에서, ADC는 링커를 함유하도록 화학적으로 변형된 소분자 세포독소를 포함할 수 있다. 링커는 그 후 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 세포독소를 접합하기 위해 사용된다. 세포 표면상의 표적 항원에의 결합시에, ADC는 내부화되고 리소좀으로 수송되고 여기서 세포독소는 절단가능 링커의 단백질 분해에 의해(예를 들어, 리소좀에서 발견되는 카텝신 B에 의해) 또는 만일 비-절단가능 링커를 통해 세포독소에 부착되면 항체의 단백질분해성 분해에 의해 방출된다. 세포독소는 이어서 리소좀으로부터 시토졸 또는 핵으로 전위하고, 여기서 이것은 그의 작용 기전에 따라 그의 표적에 결합할 수 있다.

[0011] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "단클론 항체"는 B-세포의 단일 클론에 의해 생산되며 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 말한다. 대조적으로, 용어 "다클론 항체"는 상이한 B-세포에 의해 생산되며 동일한 항원의 상이한 에피토프에 결합하는 항체 집단을 말한다. 본 명세서에 개시된 항체-약물 접합체는 전체 항체 또는 항체 단편을 포함할 수 있다. 전체 항체는 전형적으로 4개의 폴리펩티드로 이루어진다: 중(H)쇄 폴리펩티드의 두 개의 동일한 카피 및 경(L)쇄 폴리펩티드의 두 개의 동일한 카피. 중쇄의 각각은 하나의 N-말단 가변(VH) 영역 및 3개의 C-말단 불변(CH1, CH2 및 CH3) 영역을 함유하며, 각각의 경쇄는 하나의 N-말단 가변(VL) 영역 및 하나의 C-말단 불변(CL) 영역을 함유한다. 경쇄 및 중쇄의 각 쌍의 가변 영역은 항체의 항원 결합 부위를 형성한다. VH 및 VL 영역은 동일한 일반 구조를 가지며, 각 영역은 4개의 골격 영역을 포함하며, 그 서열은 상대적으로 보존된다. 골격 영역은 3개의 상보성 결정 영역(CDR)에 의해 연결된다. CDR1, CDR2, 및 CDR3으로 알려진 3개의 CDR은 항원 결합을 책임지는, 항체의 "초가변 영역"을 형성한다.

[0012] ADC는 항체의 항원-결합 단편을 포함할 수 있다. 용어 "항체 단편", "항원-결합 단편", "항체의 기능성 단편" 및 "항원-결합 부분"은 본 명세서에서 상호교환가능하게 사용되며 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유한 항체의 하나 이상의 단편 또는 부분을 말한다(일반적으로, 문헌[Holliger et al., *Nat. Biotech.*, *23*(9): 1126-1129 (2005)] 참고). 항체 단편은 예를 들어, 하나 이상의 CDR, 가변 영역(또는 그의 일부), 불변 영역(또

는 그의 일부), 또는 그 조합을 포함할 수 있다. 항체 단편의 예는 (i) VL, VH, CL, 및 CH1 도메인으로 이루어지는 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 다이설파이드 가교에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')2 단편; (iii) 항체의 단일 암(arm)의 VL 및 VH 도메인으로 이루어지는 Fv 단편; (iv) 두 도메인이 단일 폴리펩티드 쇄로서 합성되도록 하는 합성 링커에 의해 연결된 Fv 단편의 두 도메인(즉, VL 및 VH)으로 이루어지는 1가 분자인 단일쇄 Fv(scFv)(예를 들어, 문헌[Bird et al., *Science*, *242*: 423-426 (1988)]; 문헌[Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *85*: 5879-5883 (1988)]; 및 문헌[Osbourn et al., *Nat. Biotechnol.*, *16*: 778 (1998)] 참고) 및 (v) 각 폴리펩티드 쇄가, 동일한 폴리펩티드 쇄상의 VH와 VL 사이의 페어링(pairing)을 허용하기에는 너무 짧아서 상이한 VH-VL 폴리펩티드 쇄상의 상보성 도메인간의 페어링을 추진시켜 2개의 기능성 항원 결합 부위를 가진 이량체 분자를 생성하는 펩티드 링커에 의해 VL에 연결된 VH를 포함하는, 폴리펩티드 쇄의 이량체인 디아바디(diabody)를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 항체 단편은 당업계에 알려져 있으며 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제2009/0093024 A1호에 보다 상세히 개시된다.

[0013] 일 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 항체-약물 접합체는 B-세포 성숙 항원(BCMA, CD269로도 알려짐)에 대해 생성된, 단클론 항체, 또는 그의 항원-결합 단편을 포함한다. BCMA는 종양 괴사 인자 수용체 수퍼패밀리의 구성원이다(예를 들어, 문헌[Thompson et al., *J. Exp. Medicine*, *192*(1): 129-135 (2000)], 및 문헌[Mackay et al., *Annu. Rev. Immunol.*, *21*: 231-264 (2003)] 참고). BCMA는 B-세포 활성화 인자(BAFF) 및 증식 유도 리간드(APRIL)에 결합한다(예를 들어, 문헌[Mackay et al., *supra*], 및 문헌[Kalled et al, *Immunological Reviews*, *204*: 43-54 (2005)] 참고). 비악성 세포중에서, BCMA는 형질 세포 및 성숙 B-세포의 서브세트에서 주로 발현되는 것으로 보고되었다(예를 들어, 문헌[Laabi et al., *EMBO J.*, *77*(11): 3897-3904 (1992)]; 문헌[Laabi et al., *Nucleic Acids Res.*, *22*(7): 1147-1154 (1994)]; 문헌[Kalled et al., *supra*]; 문헌[O'Connor et al., *J. Exp. Medicine*, *199*(1): 91-97 (2004)]; 및 문헌[Ng et al., *J. Immunol.*, *173*(2): 807-817 (2004)] 참고). BCMA가 결핍된 마우스는 건강하며 정상적인 수의 B-세포를 가지지만, 오래가는 형질 세포의 생존이 손상된다(예를 들어, 문헌[O'Connor et al, *supra*]; 문헌[Xu et al., *Mol. Cell. Biol.*, *21*(12): 4067-4074 (2001)]; 및 문헌[Schiemann et al., *Science*, *293*(5537): 2111-2114 (2001)] 참고). BCMA RNA는 다발성 골수종 세포에서 보편적으로 검출되었으며, BCMA 단백질은 여러 연구자에 의해 다발성 골수종 환자로부터의 형질 세포 표면에서 검출되었다(예를 들어, 문헌[Novak et al, *Blood*, *103*(2): 689-694 (2004)]; 문헌[Neri et al., *Clinical Cancer Research*, *73*(19): 5903-5909 (2007)]; 문헌[Bellucci et al., *Blood*, *105*(10): 3945-3950 (2005)]; 및 문헌[Moreaux et al., *Blood*, *703*(8): 3148-3157 (2004)] 참고).

[0014] 일부 실시 형태에서, 본 발명은 항체-약물 접합체와 독립적인, 상기에 개시한 BCMA에 대해 생성된 단클론 항체, 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다. 단클론 항체, 또는 그의 항원-결합 단편은 (a) 서열 번호 1의 상보성 결정 영역 1(HCDR1) 아미노산 서열, 서열 번호 2의 HCDR2 아미노산 서열 및 서열 번호 3의 HCDR3 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 (b) 서열 번호 4의 상보성 결정 영역 1(LCDR1) 아미노산 서열, 서열 번호 5의 LCDR2 아미노산 서열 및 서열 번호 6의 LCDR3 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 다른 실시 형태에서, 단클론 항체는 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0015] BCMA에 대해 생성된 단클론 항체, 또는 그의 항원-결합 단편은 BCMA 또는 그의 에피토프에 대한 임의의 적합한 결합 친화성을 포함할 수 있다. 용어 "친화성"은 두 에이전트의 가역적 결합을 위한 평형 상수를 말하며 해리 상수(K_D)로서 표현된다. 관심 항원 또는 에피토프에 대한 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 친화성은 당업계에 알려진 임의의 방법을 이용하여 측정될 수 있다. 그러한 방법은 예를 들어, 형광 활성화된 세포 분류(FACS), 표면 플라즈몬 공명(예를 들어, 비아코어(Biacore), 프로테온), 생물층 간섭계(biolayer interferometry)(BLI, 예를 들어, 옥테트(Octet)), 동력학 배제 분석(kinetics exclusion assay)(예를 들어, 킨엑스에이(KinExA)), 분리가능 비드(예를 들어, 자기 비드), 항원 패닝(antigen panning), 및/또는 ELISA(예를 들어, 문헌[Janeway et al. (eds.), *Immunobiology*, 5th ed., Garland Publishing, New York, N.Y., 2001] 참고)를 포함한다. 구체적 항체의 결합 친화성은 결합 친화성을 분석하기 위하여 사용되는 방법에 따라 변할 것임이 당업계에 알려져 있다.

[0016] BCMA의 가용성 형태(sBCMA)는 다발성 골수종 환자의 혈청에서 검출되었으며, 보고된 값은 3.8 내지 1062 ng/mL 범위이며(문헌[Lee et al *Br J Haematol* 2016], 문헌[Sanchez et al *Br J Haematol* 2012]), 분자의 전체 세포외 도메인으로 이루어진다(문헌[Laurent et. al. *Nat Commun* 2015]). 따라서, sBCMA는 항체-기반 치료법의 효과를 감소시킬 수 있다. sBCMA 및 재조합 단량체 인간 BCMA의 기능적 특징은 유사하다(문헌[Laurent et. al. *Nat Commun* 2015]). 따라서, BCMA 항체-약물 접합체의 효능에 대한 sBCMA의 잠재적 효과를 완화시키기 위하여,

재조합 단량체 인간 BCMA에의 약한 결합 및 막-결합 BCMA에의 강한 결합을 보유하는 항체 성분을 선택하는 것이 바람직하다.

[0017] 리간드에 대한 결합제의 친화성, 예를 들어, 에피토프에 대한 항체의 친화성은, 예를 들어, 약 1 피코몰(pM) 내지 약 1 마이크로몰(μM)(예를 들어, 약 1 피코몰(pM) 내지 약 1 나노몰(nM), 또는 약 1 nM 내지 약 1 마이크로몰(μM))일 수 있다. 일 실시 형태에서, 단클론 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 100 나노몰 이하(예를 들어, 100 nM, 약 90 nM, 약 80 nM, 약 70 nM, 약 60 nM, 약 50 nM, 약 40 nM, 약 30 nM, 약 20 nM, 또는 약 10 nM, 또는 전술한 값 중 어느 두 값에 의해 한정된 범위)의 K_D로 BCMA에 결합할 수 있다. 다른 실시 형태에서, 단클론 항체는 10 나노몰 이하(예를 들어, 약 9 nM, 약 8.5 nM, 약 8 nM, 약 7.5 nM, 약 7 nM, 약 6.5 nM, 약 6 nM, 약 5.5 nM, 약 5 nM, 약 4.5 nM, 약 4 nM, 약 3.5 nM, 약 3 nM, 약 2.5 nM, 약 2 nM, 약 1.5 nM, 약 1 nM, 약 0.9 nM, 약 0.8 nM, 약 0.7 nM, 약 0.6 nM, 약 0.5 nM, 약 0.4 nM, 약 0.3 nM, 약 0.2 nM, 약 0.1 nM, 약 0.05 nM, 약 0.025 nM, 약 0.01 nM, 약 0.001 nM, 또는 전술한 값 중 어느 두 값에 의해 한정된 범위)의 K_D로 BCMA에 결합할 수 있다. 다른 실시 형태에서, 단클론 항체는 200 pM 이하(예를 들어, 약 190 pM, 약 175 pM, 약 150 pM, 약 125 pM, 약 110 pM, 약 100 pM, 약 90 pM, 약 80 pM, 약 75 pM, 약 60 pM, 약 50 pM, 약 40 pM, 약 30 pM, 약 25 pM, 약 20 pM, 약 15 pM, 약 10 pM, 약 5 pM, 약 1 pM, 또는 전술한 값 중 어느 두 값에 의해 한정된 범위)의 K_D로 BCMA에 결합할 수 있다.

[0018] 일 실시 형태에서, 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 측정할 때, 단량체 BCMA에의 BCMA 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 친화성은 약 90 nM, 약 80 nM, 약 70 nM, 약 60 nM, 약 50 nM, 약 40 nM, 약 30 nM, 또는 전술한 값 중 어느 두 값에 의해 한정된 범위, 예를 들어, 약 50 nM 내지 약 70nM, 약 55 nM 내지 약 65 nM, 또는 약 58nM 내지 약 62 nM이다.

[0019] 일 실시 형태에서, FACS에 의해 측정할 때, 막-결합된 BCMA에의 BCMA 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 친화성은 10 나노몰 이하(예를 들어, 약 9 nM, 약 8.5 nM, 약 8 nM, 약 7.5 nM, 약 7 nM, 약 6.5 nM, 약 6 nM, 약 5.5 nM, 약 5 nM, 약 4.5 nM, 약 4 nM, 약 3.5 nM, 약 3 nM, 약 2.5 nM, 약 2 nM, 약 1.5 nM, 약 1 nM, 약 0.9 nM, 약 0.8 nM, 약 0.7 nM, 약 0.6 nM, 약 0.5 nM, 약 0.4 nM, 약 0.3 nM, 약 0.2 nM, 약 0.1 nM, 약 0.05 nM, 약 0.025 nM, 약 0.01 nM, 약 0.001 nM, 또는 전술한 값 중 어느 두 값에 의해 한정된 범위)이다.

[0020] 단클론 항체의 항원-결합 부분 또는 단편은 그 부분이 BCMA에 결합하는 한은 임의의 크기일 수 있다. 이 점에 있어서, BCMA에 대해 생성된 단클론 항체(본 명세서에서 "항-BCMA 단클론 항체"로도 불림)의 항원 결합 부분 또는 단편은 바람직하게는 약 5 내지 18개(예를 들어, 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18개, 또는 전술한 값 중 어느 두 값에 의해 한정된 범위)의 아미노산을 포함한다.

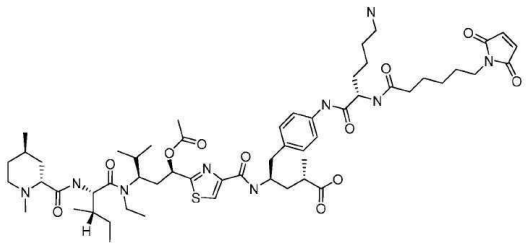
[0021] 일 실시 형태에서, 항체-약물 접합체는 항-BCMA 단클론 항체의 가변 영역을 포함한다. 이 점에 있어서, ADC는 항-BCMA 단클론 항체의 경쇄 가변 영역, 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역과 중쇄 가변 영역 둘 모두를 포함할 수 있다. 바람직하게는, ADC는 항-BCMA 단클론 항체의 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함한다. BCMA에 결합하는 단클론 항체는 예를 들어, 국제 특허 출원 공개 WO 제2010/104949호에 개시된다. 일 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 ADC의 단클론 항체는 (a) SYSMN(서열 번호 1)의 상보성 결정 영역 1(HCDR1) 아미노산 서열, SISGSSNYIYYADSVKG(서열 번호 2)의 HCDR2 아미노산 서열, 및 GGNYYVEYFQY(서열 번호 3)의 HCDR3 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 (b) RASQYISSNYLA(서열 번호 4)의 상보성 결정 영역 1(LCDR1) 아미노산 서열, GASNRAT(서열 번호 5)의 LCDR2 아미노산 서열, 및 QQYGSSPIT(서열 번호 6)의 LCDR3 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 다른 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 ADC의 단클론 항체는 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다.

[0022] 용어 "세포독소" 및 "세포독성제"는 세포의 기능을 억제 또는 방지하고/하거나 세포의 파괴(세포 사멸)를 야기하고/하거나, 항-증식 효과를 나타내는 임의의 분자를 말한다. ADC의 세포독소 또는 세포독성제는 또한 ADC의 "탑재물(payload)"로도 당업계에서 불리는 것이 이해될 것이다. 세포독성제의 많은 부류가 ADC 분자에서 잠재적 유용성을 가진 것으로 당업계에 알려져 있으며 본 명세서에 개시된 ADC에서 사용될 수 있다. 그러한 세포독성제의 부류는 예를 들어, 항-미소관제(예를 들어, 오리스타틴(auristatin) 및 메이탄시노이드(maytansinoid)), 피롤로벤조다이아제핀(PBD), RNA 폴리머라제 II 억제제(예를 들어, 아마톡신(amatoxin)), 및 DNA 알킬화제(예를 들어, 인돌리노벤조다이아제핀 슈도다이머(pseudodimer))를 포함한다. 본 명세서에 개시된 ADC에서 사용될 수 있는 구체적인 세포독성제의 예는 아마니틴(amanitin), 오리스타틴, 칼리케아미신(calicheamicin), 다우노마이

신(daunomycin), 독소루비신(doxorubicin), 두오카르마이신(duocarmycin), 돌라스타틴(dolastatin), 에네다이인(enediyne), 렉시트롭신(lexitropsin), 탁산(taxane), 퓨로마이신(puromycin), 메이탄시노이드, 빈카 알카로이드(vinca alkaloid), 튜불리신(tubulysin), 및 피롤로벤조다이아제핀(PBD)을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 더욱 구체적으로, 세포독성제는 예를 들어, AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB, 오리스타틴 E, 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), CC-1065, SN-38, 토포테칸(topotecan), 모르폴리노-독소루비신(morpholino-doxorubicin), 리족신(rhizoxin), 시아노모르폴리노-독소루비신, 돌라스타틴(dolastatin)-10, 에치노마이신(echinomycin), 콤브레타트스타틴(combretatstatin), 칼리케아미신, 메이탄신, DM1, DM4, 빈블라스틴(vinblastine), 메토트렉세이트(methotrexate), 네트롭신(netropsin) 또는 그의 유도체 또는 유사체일 수 있다. ADC에서 사용하기에 적합한 세포독소는 또한 예를 들어, 국제 특허 출원 공개 WO 제2015/155345호 및 WO 제2015/157592호에 개시된다.

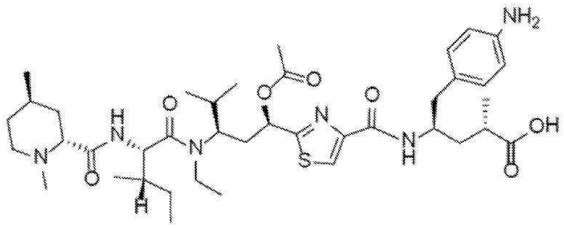
[0023] 일 실시 형태에서, 세포독성제는 항-미소관제, 예를 들어, 튜불리신, 메이탄시노이드, 오리스타틴 또는 그의 유도체일 수 있다. 용어 "항-미소관제" 및 "미소관-표적화제"는 동의어이며 미소관을 방해함으로써 세포 분열을 억제하는 에이전트를 말한다. 튜불리신은 믹소박테리아 종으로부터 분리된 천연 산물 클래스의 구성원이며(문헌[Sasse et al., *J. Antibiot.*, *53*: 879-885 (2000)]), 이것은 튜불린 중합화를 억제하고 세포 주기 정지 및 어팝토시스를 유도하는 유사분열 저해제로 작용한다(문헌[Steinmetz et al., *Chem. Int. Ed.*, *43*: 4888-4892 (2004)]; 문헌[Khalil et al., *Chem. Biochem.*, *7*: 678-683 (2006)]; 문헌[Kaur et al., *Biochem. J.*, *396*: 235-242 (2006)]). 튜불리신의 예는 예를 들어, 국제 특허 출원 공개 WO 제2015/157594호, WO 제2004/005326호, WO 제2012/019123호, WO 제2009/134279호, WO 제2009/055562호, WO 제2004/005327호; 미국 특허 제7,776,841호, 제7,754,885호 및 제7,816,377호; 및 미국 특허 출원 공개 제2010/0240701호, 제2011/0021568호 및 제2011/0263650호에 개시된다.

[0024] 일부 양태에서, 튜불리신은 참고로 본원에 포함되는 WO 제2015/157594호에 개시된 화합물이며, 예를 들어, 하기 구조를 가진 화합물:



[0025]

[0026] 또는 하기 구조를 가진 화합물:



[0027]

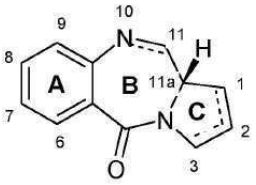
[0028] 이다.

[0029] 메이탄시노이드는 미소관 단백질 튜불린의 중합화를 억제하여, 미소관의 형성을 방지한다(예를 들어, 미국 특허 제6,441,163호 및 문헌[Remillard et al., *Science*, *189*: 1002-1005 (1975)] 참고). 메이탄시노이드는 세포 배양 모델을 이용하여 *시험관내*에서 그리고 실험 동물 시스템을 이용하여 *생체내*에서 종양 세포 성장을 억제하는 것으로 나타났다. 또한, 메이탄시노이드의 세포독성은 예를 들어, 메토트렉세이트, 다우노루비신 및 빈크리스틴과 같은 종래의 화학요법제보다 1000배 크다(예를 들어, 미국 특허 제5,208,020호 참고). 메이탄시노이드는 메이탄신, 메이탄시놀(maytansinol), 메이탄시놀의 C-3 에스테르 및 다른 메이탄시놀 유사체 및 유도체를 포함한다(예를 들어, 미국 특허 제5,208,020호 및 제6,441,163호 참고). 메이탄시놀의 C-3 에스테르는 자연 발생이거나 합성적으로 유도될 수 있다. 또한, 자연 발생 및 합성 C-3 메이탄시놀 에스테르는 둘 모두 단순 카르복실산을 가진 C-3 에스테르, 또는 N-메틸-L-알라닌의 유도체를 가진 C-3 에스테르로 분류될 수 있으며, 후자는 전자

보다 더 세포독성이다. 합성 메이탄시노이드 유사체는 또한 당업계에 알려져 있으며 예를 들어, 문헌[Kupchan et al., *J. Med. Chem.*, *21*: 31-37 (1978)]에 개시된다. 메이탄시놀 및 그의 유사체와 유도체를 생성하는 방법은 예를 들어, 미국 특허 제4,151,042호에 개시된다. 본 명세서에 개시된 ADC와 관련하여 사용될 수 있는 메이탄시노이드의 예는 N2'-데아세틸-N2'-(3-머캡토-1-옥소프로필)-메이탄신(DM1) 및 N2'-데아세틸-N2'-(4-머캡토-4-메틸-1-옥소펜틸)-메이탄신(DM4)을 포함하지만 이에 한정되지 않는다 .

[0030] 오리스타틴은 잘-용인된 용량에서 상당한 전임상 활성을 나타낸 매우 강력한 항유사분열제의 부류를 대표한다(문헌[Law et al., *Cancer Res.*,*66*: 2328-2337 (2006)]; 문헌[Ma et al., *Clin. Cancer Res.*,*12*: 2591-2596 (2006)]; 문헌[Tse et al., *Cancer Res.*, *12*: 1373-1382 (2006)]; 및 문헌[Oflazoglu et al., *Br. J. Haematol.*,*142*: 69-73 (2008)], 및 문헌[Oflazoglu et al., *Clin. Cancer Res.*,*14*: 6171-6180 (2008)]). 오리스타틴 ADC는 현재 전임상 및 임상 시험에서 평가중이다. 본 명세서에 개시된 ADC와 관련하여 사용될 수 있는 오리스타틴의 예는 모노메틸 오리스타틴 E(MMAE) 및 관련된 분자 모노메틸오리스타틴 F(MMAF)를 포함하지만 이에 한정되지 않는다(예를 들어, 문헌[Doronina et al., *Nat. Biotechnol.*,*21*: 778-784 (2003)]; 및 문헌[Doronina et al., *Bioconjug. Chem.*, *17*: 114-124 (2006)] 참고).

[0031] 일 실시 형태에서, 세포독성제는 피롤로벤조다이아제핀(PBD) 또는 PBD 유도체일 수 있다. PBD는 핵으로 전위되어 핵에서 DNA를 가교하여, 유사분열동안 복제를 방지하고, 단일쇄 파괴를 유도하여 DNA를 손상시키고, 이어서 어팝토시스를 유도한다. 일부 PBD는 또한 DNA의 특정 서열을 인식하고 결합하는 능력을 가진다. PBD는 하기 일반 구조를 가진다:



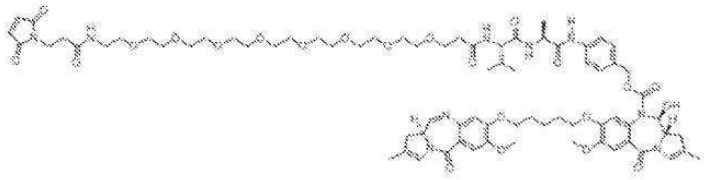
[0032] .

[0033] PBD는 그들의 방향족 A링 및 피롤로 C링 둘 모두에서, 치환기의 수, 타입 및 위치에서, 그리고 C링의 포화 정도에서 상이하다. B-링에서는, N10-C11 위치에 이민(N=C), 카르비놀아민(NH-CH(OH)), 또는 카르비놀아민 메틸 에테르(NH-CH(OMe))가 있으며, 이것은 DNA 알킬화를 책임지는 친전자성 중심이다. 모든 알려진 천연 산물들이 키랄 C11a 위치에서 (S)-형태를 가지며 이것은 C링으로부터 A링을 향해 볼 때 우회선(right-handed twist)을 그들에게 제공한다. 이 특징은 또한 B-형태 DNA의 마이너 그루브(minor groove)와의 이소헬리시티(isohelicity)를 위한 적절한 3차원 형상을 PBD에 제공하여, 결합 부위에서의 꼭끼워맞춤(snug fit)을 유도한다(문헌[Kohn, In: *Antibiotics III*. Springer-Verlag, New York, pp. 3-11 (1975)]; 및 문헌[Hurley and Needham-VanDevanter, *Acc. Chem. Res.*,*19*: 230-237 (1986)]). PBD는 마이너 그루브에서 부가체를 형성하여, DNA 프로세싱의 방해를 유도할 수 있다.

[0034] 첫 번째 PBD 항-종양 항생제인 안트라마이신은 1965년에 발견되었다(문헌[Leimgruber et al., *J. Am. Chem. Soc.*, *87*: 5793-5795 (1965)]; 문헌[Leimgruber et al., *J. Am. Chem. Soc.*, *87*: 5791-5793 (1965)]). 그 이후, 많은 자연 발생 PBD가 보고되었으며, 10가지가 넘는 합성 경로가 다양한 유사체를 위해 개발되었다(문헌[Thurston et al., *Chem. Rev.*, 433-465 (1994)]; 및 문헌[Antonow, D. and Thurston, D.E., *Chem. Rev.*, *111*: 2815-2864 (2011)]). 패밀리 구성원은 아베이마이신(abbeymycin)(문헌[Hochlowski et al., *J. Antibiotics*, *40*: 145-148 (1987)]), 치카마이신(chicamycin)(문헌[Konishi et al., *J. Antibiotics*, *37*: 200-206 (1984)]), DC-81(일본 특허 제58180487호; 문헌[Thurston et al., *Chem. Brit.*, *26*: 767-772 (1990)]; 및 문헌[Bose et al., *Tetrahedron*, *48*: 751-758 (1992)]), 마제트라마이신(mazethramycin)(문헌[Kuminoto et al., *J. Antibiotics*, *33*: 665-667 (1980)]), 네오트라마이신(neothramycin) A 및 B(문헌[Takeuchi et al., *J. Antibiotics*, *29*: 93-96 (1976)]), 포로트라마이신(porothramycin)(문헌[Tsunakawa et al., *J. Antibiotics*, *41*: 1366-1373 (1988)]), 프로트라카르신(prothracarcin)(문헌[Shimizu et al., *J. Antibiotics*, *29*: 2492-2503 (1982)]; 및 문헌[Langley and Thurston, *J. Org. Chem.*, *52*: 91-97 (1987)]), 시바노마이신(sibanomicin)(DC-102)(문헌[Hara et al., *J. Antibiotics*, *41*: 702-704 (1988)]; 및 문헌[Itoh et al., *J. Antibiotics*, *41*: 1281-1284 (1988)]), 시비로마이신(sibiromycin)(문헌[Leber et al., *J. Am. Chem. Soc.*, *110*: 2992-2993 (1988)]) 및 토마마이신(tomamycin)(문헌[Arima et al., *J. Antibiotics*, *25*: 437-444 (1972)])을 포함한다. PBD를 포함하는 ADC뿐만 아니라 PBD가 또한 국제 특허 출원 공개 WO 제

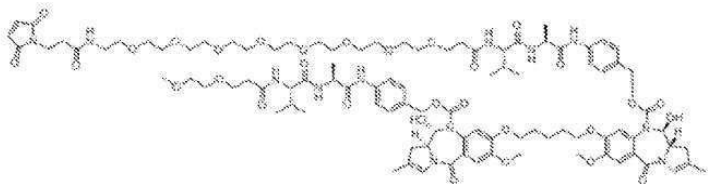
2015/155345호 및 WO 제2015/157592호에 개시된다.

[0035] 일 실시 형태에서, PBD는 본 명세서에서 "SG3249"로도 불리며 WO 제2014/057074호에 상세히 개시된 PBD 3249이며, 하기 구조를 가진다:



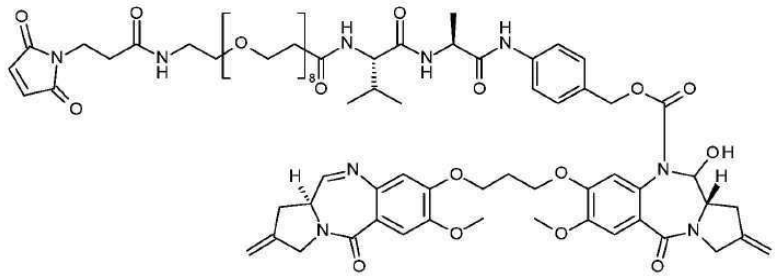
[0036]

[0037] 다른 실시 형태에서, PBD는 본 명세서에서 "SG3315"로도 불리며 WO 제2015/052322호에 상세히 개시된 PBD 3315이며, 하기 구조를 가진다:



[0038]

[0039] 다른 실시 형태에서, PBD는 2017년 2월 10일에 출원된 PCT/EP2017/052988호에 상세히 개시되며 화합물 23으로도 불리는 SG3400이며, 하기 구조를 가진다:



[0040]

[0041] BCMA 단클론 항체, 또는 그의 항원-결합 단편은 부위-특이적 또는 비-부위 특이적 접합 방법을 비롯한 당업계에 알려진 임의의 적합한 방법을 이용하여 세포독소에 접합될 수 있다. 항체를 위한 종래의 접합 전략은 전형적으로 리신 또는 시스테인을 통해, 항체, 그의 항원-결합 단편에 탑재물을 무작위로(즉, 비-특이적으로) 접합시키는 것에 의존한다. 따라서, 일부 양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 예를 들어, 항체 또는 항체 단편의 부분적 환원에 의해 그리고 이어서 링커 모이어티가 부착되어 있거나 부착되어 있지 않은 원하는 에이전트와의 반응에 의해, 세포독성제에 무작위로 접합된다. 예를 들어, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 다이티오트레이톨(DTT) 또는 유사한 환원제를 이용하여 환원될 수 있다. 링커 모이어티가 부착되어 있거나 부착되어 있지 않은 세포독성제는 그 후 다이메틸 설폭사이드(DMSO)의 존재하에서 환원된 항체 또는 항체 단편에 몰 과량으로 추가될 수 있다. 접합 후, 과량의 유리 시스테인이 미반응 에이전트를 급랭(quench)하기 위해 첨가될 수 있다. 반응 혼합물은 그 후 정제되고 포스페이트 완충된 염수(PBS)내로 완충액-교환될 수 있다.

[0042] 다른 실시 형태에서, 세포독성제는 특정 반응성 아미노산 잔기에서 부위-특이적 접합 방법을 이용하여 BCMA 단클론 항체에 접합되어, 균일한 화학양론을 가진 균질한 ADC 제제를 생성할 수 있다. 부위-특이적 접합은 시스테인 잔기 또는 비-천연 아미노산을 통해서일 수 있다. 일 실시 형태에서, 세포독성제는 적어도 하나의 시스테인 잔기를 통해, 항체, 또는 그의 항원 결합 단편에 접합될 수 있다. 구체적으로, 예를 들어, 세포독성제는 BCMA 단클론 항체의 Fc 영역내의 특정 카밧(Kabat) 위치에서 아미노산의 측쇄에 화학적으로 접합될 수 있다. 이와 관련하여, 세포독성제는 위치 239, 248, 254, 273, 279, 282, 284, 286, 287, 289, 297, 298, 312, 324, 326, 330, 335, 337, 339, 350, 355, 356, 359, 360, 361, 375, 383, 384, 389, 398, 400, 413, 415, 418, 422, 440, 441, 442, 443 및 446 중 적어도 하나에서의 시스테인을 포함하지만 이에 한정되지 않는, 항체의 Fc 영역내의 임의의 적합한 위치에서의 시스테인 잔기를 통해 BCMA 단클론 항체에 접합될 수 있으며, 여기서 넘버링은 카밧에서 EU 인덱스에 해당한다. 일 실시 형태에서, 세포독성제는 BCMA 단클론 항체의 특정 카밧 위치 239 및/또는 442에서의 시스테인 잔기를 통해 및/또는 BCMA 항체의 카밧 위치 239와 240 사이에 삽입된 아미노산 잔기

를 통해 BCMA 단클론 항체에 접합될 수 있다(문헌[Dimasi et al., *Mol Pharm*, 14(5):1501-1516 (2017)]). 대안적으로, 세포독성제는 예를 들어, 힌지와 중-경쇄에서의 설프히드릴 반응기를 통해서와 같은, 티올-말레이미드 연결을 통해 BCMA 단클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편에 접합될 수 있다.

[0043] 본 명세서에 개시된 BCMA 단클론 항체는 거기에 접합된 적어도 하나의 세포독소 분자를 포함하지만; BCMA 단클론 항체는 원하는 치료 효과를 이루기 위하여 거기에 접합된 임의의 적합한 수의 세포독소 분자(예를 들어, 1, 2, 3, 4개 또는 더 많은 세포독소 분자)를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 본 명세서에 개시된 ADC는 BCMA 단클론 항체에 접합된 2개의 세포독소 분자를 포함한다.

[0044] 본 명세서에 개시된 BCMA 항체는 입양 세포 이식(adoptive cell transfer)(ACT), 이중특이적 T-세포 관여항체(bispecific T-cell engager)(BiTE) 및 나노입자와 같은, BCMA를 표적화하는 것이 바람직한 임의의 치료제를 위해 유용하다. 일 실시 형태에서, 본 발명은 T-세포 활성화 모이어티에 연결된 본 명세서에 개시된 BCMA 단클론 항체의 항원 결합 도메인을 포함하는 키메릭 항원 수용체(CAR)를 제공한다. "키메릭 항원 수용체(CAR)"는 T-세포 시그널링 또는 T-세포 활성화 모이어티에 연결된 항체의 항원 결합 도메인(예를 들어, 단일쇄 가변 단편(scFv))을 함유하는 인공적으로 작제된 하이브리드 단백질 또는 폴리펩티드이다. CAR 구조는 지난 20년에 걸쳐서 단클론 항체(mAb)로부터 유도된 단일쇄 가변 단편(scFv) 및 TCR ζ 쇄로부터의 시그널링 모티프를 가장 일반적으로 통합하도록 발달되었다("1세대" CAR로 불림(예를 들어, 문헌[Okur, F.V., Brenner, M.K., *Methods Mol. Biol.*, *651*: 319-45 (2010)]; 및 문헌[Lee et al., *Clin. Cancer. Res.*, *18*(10): 2780-2790 (2012) 참고). 더욱 최근에는, 2세대 및 3세대 CAR이 개발되었으며, 이것은 예를 들어, CD28, 4-1BB(CD137), 및/또는 CD134(OX-40)로부터의 공자극 활성화 모티프 하나("2세대") 또는 둘("3세대")을 포함하며, 이것은 생체내에서 증식, 세포독성 및 지속성을 향상시킨다(예를 들어, 문헌[Finney et al., *J. Immunol.*, *172*: 104-13 (2004)]; 문헌[Imai et al., *Leukemia*, *18*: 676-84 (2004)]; 문헌[Maher et al., *Nat Biotechnol.*, *20*:70-5 (2002)]; 문헌[Milone et al., *Mol Ther.*, *17*: 1453-64 (2009)]; 및 문헌[Lee et al., *supra*] 참고).

[0045] CAR의 항원 결합 도메인은 본 명세서에 개시된 전체 단클론 항체 또는 단클론 항체 단편을 포함할 수 있다. 일 실시 형태에서, CAR의 항원 결합 도메인은 항-BCMA 단클론 항체의 단일쇄 Fv(scFv) 단편을 포함할 수 있다. 키메릭 항원 수용체 및 CAR을 생성하는 방법은 예를 들어, 문헌[Riviere, I. and M. Sadelain, *Mol. Ther.*, *25*(5): 1117-1124 (2017)]; 문헌[Davila, M.L. and M. Sadelain, *Int. J. Hematol.*, *104*(1): 6-17 (2016)]; 및 미국 특허 출원 공개 제2015/0051266 A1호에 추가로 개시된다.

[0046] 본 발명은 또한 상기에 개시된 항체 또는 항체-약물 접합체 및 약학적 허용(예를 들어, 생리학적 허용) 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 당업계에 알려진 임의의 적합한 담체가 본 발명의 맥락에서 사용될 수 있다. 담체의 선택은 부분적으로, 조성물이 투여될 수 있는 구체적 부위 및 조성물을 투여하기 위해 사용되는 구체적 방법에 의해 결정될 것이다. 조성물은 선택적으로 멸균될 수 있다. 조성물은 예를 들어, 문헌[*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21st Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2001)]에 개시된 종래 기술에 따라 생성될 수 있다.

[0047] 조성물은 바람직하게는 다발성 골수종을 치료하거나 예방하는데 효과적인 양으로 항체 또는 항체-약물 접합체를 포함한다. 따라서, 본 발명은 다발성 골수종 세포를 사멸시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 BCMA를 발현하는 다발성 골수종 세포를 본 명세서에 개시된 항체 또는 항체-약물 접합체 또는 본 명세서에 개시된 항체 또는 ADC를 포함하는 조성물과 접촉시키는 것을 포함하며, 이에 의해 항체 또는 항체-약물 접합체는 다발성 골수종 세포 상의 BCMA에 결합하고 다발성 골수종 세포를 사멸시킨다. 본 발명은 또한 다발성 골수종의 치료를 위한 의약의 제조에서, 본 명세서에 개시된 항체 또는 ADC, 또는 항체 또는 ADC를 포함하는 조성물의 용도를 제공한다. 본 명세서에 토의된 대로, 형질 세포 골수종 또는 칼러병(Kahler's disease)으로도 알려진 다발성 골수종은 정상적으로는 항체의 생산을 책임지는 백혈구 타입인 형질 세포의 암이다(문헌[Raab et al., *Lancet*, *374*: 324-329 (2009)]). 다발성 골수종은 해마다 100,000명 중 1~4명이 걸린다. 이 질환은 남자에서 더 흔하며, 아직 알려지지 않은 이유로 백인 미국인에서보다 흑인 미국인에서 2배 더 흔하다. 다발성 골수종은 가장 덜 흔한 혈액암(14%)이며 모든 암 중 1%를 차지한다(문헌[Raab et al., *supra*]). 다발성 골수종의 치료는 전형적으로 고-용량 화학요법 및 이어서 조혈 줄기 세포 이식(동종이계 또는 자가)에 관련되지만; 그러한 치료를 받은 다발성 골수종 환자에서 높은 재발률이 일반적이다. 상기에 토의된 바처럼, BCMA는 다발성 골수종 세포에 의해 높게 발현된다(예를 들어, 문헌[Novak et al., *supra*]; 문헌[Neri et al., *supra*]; 문헌[Bellucci et al., *supra*]; 및 문헌[Moreaux et al., *supra*] 참고).

[0048] 본 명세서에서 입증된 대로, BCMA는 또한 다발성 골수종 줄기 세포에서 발현된다. 따라서, 본 발명은 다발성 골

수종 줄기 세포를 사멸시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 BCMA를 발현하는 다발성 골수종 줄기 세포를 본 명세서에 개시된 항체-약물 접합체, 또는 본 명세서에 개시된 ADC를 포함하는 조성물과 접촉시키는 것을 포함하며, 이에 의해 항체-약물 접합체는 다발성 골수종 줄기 세포상의 BCMA에 결합하고 다발성 골수종 줄기 세포를 사멸시킨다. 다발성 골수종 줄기 세포는 CD19의 표면 발현 및 CD138 표면 발현의 결여에 의해 다발성 골수종 환자의 골수에서 동정될 수 있다(예를 들어, 문헌[Matsui et al., *Blood*, *103*:2332-6 (2004)] 참고). 이들 세포는 독특하게 클론형성성이며 면역결핍 마우스에 이식되는 반면, CD138+CD19-로 정의된, 골수종 형질 세포는 그렇지 않다. 다발성 골수종 줄기 세포는 또한 현재의 치료법에 저항성이다(문헌[Matsui et al.,*Cancer Res.*,*68*:190-7 (2008)]).

[0049] 본 명세서에 개시된 항체-약물 접합체, 또는 항체-약물 접합체를 포함하는 조성물은 *생체외*, *생체내* 또는 *시험관내*에서 BCMA를 발현하는 다발성 골수종 세포 집단과 접촉될 수 있다. "*생체외*"는 자연 조건의 최소한의 변화를 가지고 유기체의 바깥의 인공 환경에서 세포 또는 조직내에서 또는 세포 또는 조직상에서 수행되는 방법을 말한다. 대조적으로, 용어 "*생체내*"는 정상적인, 본래의 상태의 살아있는 유기체내에서 수행되는 방법을 말하는 한편, "*시험관내*" 방법은 보통의 생물학적 맥락으로부터 분리된 유기체 성분을 이용하여 수행된다. 일 실시 형태에서, 다발성 골수종 세포는 본 명세서에 개시된 ADC 또는 ADC를 포함하는 조성물과 *생체내*에서 접촉되는 인간 다발성 골수종 세포이다.

[0050] 본원에서 사용될 때, 용어 "치료", "치료하는" 등은 원하는 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 수득하는 것을 말한다. 바람직하게는, 효과는 치료적이며, 즉, 효과는 질환 및/또는 질환으로 인한 부정적인 증상을 부분적으로 또는 완전히 치유한다. 이를 위하여, 본 방법은 "치료적 유효량"의 항체 또는 ADC 또는 항체 또는 ADC 및 약학적 허용 담체를 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함한다. "치료적 유효량"은 원하는 치료 결과를 이루기 위하여, 필요한 투여량에서 그리고 필요한 기간동안, 효과적인 양을 말한다. 치료적 유효량은 개체의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중과 같은 인자, 및 개체에서 원하는 반응을 유발하는 항체 또는 ADC의 능력에 따라 변할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 ADC의 치료적 유효량은 다발성 골수종 세포상의 BCMA에 결합하고 그들을 파괴하는 양이다.

[0051] 대안적으로, 약리학적 및/또는 생리학적 효과는 예방적일 수 있으며, 즉, 효과는 질환 또는 그의 증상을 완전히 또는 부분적으로 방지한다. 이런 점에서, 본 방법은 다발성 골수종의 소인을 가진 포유동물에게 ADC 또는 ADC를 포함하는 조성물의 "예방적 유효량"을 투여하는 것을 포함한다. "예방적 유효량"은 원하는 예방 결과(예를 들어, 질환 개시의 방지)를 이루기 위하여, 필요한 투여량에서 그리고 필요한 기간동안, 효과적인 양을 말한다.

[0052] 치료 또는 예방 효능은 치료된 환자의 주기적인 평가에 의해 모니터될 수 있다. 일 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 ADC는 BMCA-발현 골수종 세포의 증식을 적어도 약 10%(예를 들어, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 100%) 억제하거나 저해한다. 세포 증식은 게놈 DNA내로 라벨링된 뉴클레오시드(예를 들어, 3H-티미딘 또는 브로모데옥시우리딘 Brd(U))의 통합을 측정하는 것과 같은, 당업계에 알려진 임의의 적절한 방법을 이용하여 측정될 수 있다(예를 들어, 문헌[Madhavan, H.N., *J. Stem Cells Regen. Med.*, *3*(1): 12-14 (2007)] 참고).

[0053] 본 명세서에 개시된 항체 또는 ADC, 또는 항체 ADC를 포함하는 조성물은 예를 들어, 정맥내, 복강내, 피하를 비롯한 표준 투여 기술을 이용하여 포유동물(예를 들어, 인간)에게 투여될 수 있다. 더욱 바람직하게는, 항체 또는 ADC 또는 이를 함유하는 조성물은 정맥내 주사에 의해 포유동물에게 투여된다.

[0054] 본 명세서에 개시된 항체 또는 ADC, 또는 항체 또는 ADC를 포함하는 조성물은 하나 이상의 추가적인 치료제와 투여될 수 있으며, 이것은 포유동물에게 공동투여될 수 있다. 본 명세서에서 사용될 때 용어 "공동투여"는 하나 이상의 추가적인 치료제와 본 명세서에 개시된 항체 또는 ADC 또는 항체 또는 ADC-함유 조성물을, 항체 또는 ADC가 하나 이상의 추가적인 치료제의 효과를 향상시킬수 있거나 그 역이 되도록, 시간적으로 충분히 가깝게 투여하는 것을 말한다. 이와 관련하여, 항체 또는 ADC 또는 이를 함유하는 조성물이 먼저 투여될 수 있고, 하나 이상의 추가적인 치료제가 두 번째로 투여될 수 있으며, 또는 그 반대일 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 ADC 또는 이를 함유하는 조성물은 다발성 골수종의 치료 또는 방지를 위하여 다른 에이전트(예를 들어, 아쥬반트)와 조합되어 투여될 수 있다. 이 점에 있어서, 항체 또는 ADC 또는 항체 또는 ADC-함유 조성물은 예를 들어, 당업계에 알려진 임의의 적합한 화학요법제, 이온화 방사선, 소분자 항암제, 암 백신, 생물학적 치료법(예를 들어, 다른 단클론 항체, 암-사멸 바이러스, 유전자요법, 및 입양 T-세포 이식) 및/또는 수술을 비롯한 적어도 하나의 다른 항암제와 조합되어 사용될 수 있다.

[0055] 하기 실시예는 본 발명을 추가로 설명하지만, 물론 그 범위를 어떤 방식으로도 제한하는 것으로 이해되어서는

안된다.

[0056] 실시예 1

[0057] 본 실시예는 B-세포 성숙 항원(BCMA)에 대해 생성된 단클론 항체의 생성을 개시한다.

[0058] 문헌[Kilpatrick et al., *Hybridoma*, *16*(4): 381-389 (1997)]에 개시된 RIMMS 면역 방법에 따라, 6주령 암컷 앱렉시스(Ablexis) 트랜스제닉 마우스(앱렉시스, 엘엘씨(Ablexis, LLC), 캘리포니아주 샌프란시스코)에게 정제된 재조합 인간 (rHu) BCMA-Fc 단독을 6회 피하 주사하거나(캠페인(campaign) 1), 또는 rHu BCMA-Fc 및 시노몰구스 BCMA-Fc(Cyno BCMA-Fc) 둘 모두로 또는 Hu BCMA 또는 Cyno BCMA를 발현하는 부착성 293 세포(Ad293)로 여러 부위에서 교대로 면역(캠페인 2)시켰다. 마우스를 2~3일 간격으로 13일의 과정에 걸쳐서 면역시켰다. 각 회의 면역을 위해, 마우스를 먼저 이소플루레인으로 마취시켰다. 면역원을 완전 또는 불완전 프로인트 아쥬반트(Freund's adjuvant) 및 타이터맥스(TITERMAX)® 골드 아쥬반트(시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), 미주리주 세인트 루이스)에서 유화시키고 여러 부위에서 양측으로 주사하였다. 제13일에 시험 혈액을 수집하고, 인간 및 시노몰구스 BCMA를 발현하는 부착성 293 세포에서의 항원 ELISA 및 FACS 결합에서 분석하였다. 우수한 혈청 역가를 가진 마우스에게 복강내로 융합전 부스트(boost)를 제공하고 제17일에 희생시켰다. 림프절 세포를 수집하고 폴리에틸렌 글리콜 융합법(로쉐 다이아그노스틱스(Roche Diagnostics), 인디애나주 인디애나폴리스)에 따라 골수종 세포주 P3-X63-Ag8.653에 융합시켜 안정한 하이브리도마를 생성하였다.

[0059] 직접 결합 ELISA에서 하이브리도마 상등액을 스크리닝하고 이어서 BCMA-발현 A293 세포에서의 FACS에 의해 항-BCMA-특이적 하이브리도마를 동정하였다. 2차-사포린 접합체, Fab-ZAP(어드밴스드 타겟팅 시스템즈(Advanced Targeting Systems), 캘리포니아주 샌디에고, IT-48)를 이용하여 그리고 세포주상에 발현된 내인성 BCMA에의 FACS 결합에 의해, 양성 하이브리도마를, *시험관내*에서 그들이 NCI-H929 다발성 골수종 세포에 결합하고 내부화하고 사멸하는 능력에 대해, 추가 시험하였다. 내부화 및 세포 사멸 효력에 기초하여, 하이브리도마를 그 후 한계 희석 클로닝하고 항체 정제 및 가변 영역 유전자 구조(rescue)를 위해 증식시켰다.

[0060] 첫 번째 캠페인은 44개의 인간-유일 결합자 및 4개의 인간 및 시노몰구스 교차-반응 결합자의 패널을 생성하였다. 이들 48개 항체를 이어서 BCMA-발현 부착성 293 세포 및 내인성 huBCMA-발현 NCI-H929 세포주에서의 FACS에 의해 추가 시험하였다. 내인성 인간 BCMA에의 최상의 결합에 의해 항체의 순위를 매김으로서 25개 하이브리도마 주의 선도 패널을 동정하였다. 총 11개의 하이브리도마가 서브클로닝, 규모-확대, 시퀀싱 및 정제로 진행되었다. 클론을 또한 Fab Zap 기반 사멸에 대해 평가하였다. 하나의 항체(클론 4679)를 추가 평가를 위하여 인간 IgG1으로서 재조합적으로 클로닝하였다.

[0061] 두 번째 캠페인은 rHu/Cyno BCMA-Fc에 의한 면역에 대한 98개 결합자, rHu/CynoBCMA-Fc 및 Cyno BCMA-발현 Ad293 세포에 의한 면역에 대한 9개 결합자, 및 Hu 및 Cyno BCMA 둘 모두를 발현하는 Ad293 세포에 의한 면역에 대한 0개 결합자의 패널을 생성하였다. 이들 하이브리도마를 FACS에 의해 TACI 및 BAFF-R에의 결합에 대해 추가 시험하고, TACI 및 BAFF-R에의 임의의 검출가능한 결합을 나타내는 항체를 제거하였다. Fab Zap 분석과 함께 이들 2차 스크린은 한계 희석 클로닝(LDC)을 위해 더 진행된 8개 하이브리도마의 동정을 야기하였다. 그들의 활성에 기초하여, 그 후 두 클론(클론 756 및 15B2)을 추가 평가를 위해 인간 IgG1으로 전환시켰다.

[0062] 항체 4679, 756, 및 15B2GL(아래에 개시됨)을, Ad293 세포에서 안정하게 발현된 수용체의 재조합 형태를 이용하여 인간 BCMA, 시노몰구스 BCMA, TACI, 및 BAFF-R에의 항체의 결합을 평가하기 위하여 FACS에 의해 분석하였다. 결합 분석은 항체 4679, 756, 및 15B2GL을 4℃에서 45분동안 200,000 세포와 항온처리한 후 PBS+2%FBS로 2회 세척하여 수행하였다. 이어서 세포를 4℃에서 알렉사-플루오르(Alexa-Fluor) 647-라벨링된 2차 항체와 항온처리한 후, PBS+2%FBS에서 2회 세척하였다. 항-BAFF-R, 항-TACI, 및 항-인간 BCMA-APC 라벨링된 항체를 대조군 웰에서 제조사의 권장된 희석에 따라 추가하였다. 세포를 200uL의 PBS+2%FBS+DAPI에 재현탁시키고, 살아있는 세포에의 항체 결합을 벡톤 디킨슨 바이오사이언시즈(Becton Dickinson Biosciences) LSRII 세포측정기를 이용하여 분석하였다. 항체 15B2GL은 도 1에 나타난 대로, BAFF-R 및/또는 TACI에 결합하지 않은, 시험된 유일한 cyno-교차 반응 항체였다.

[0063] 15B2내의 4개의 비-생식세포계 잔기를 돌연변이시키기 위하여 설계된 프라이머를 이용하여 15B2 단클론 항체를 생식세포 형태(15B2GL)로 돌연변이시켰다. 15B2 야생형 DNA를 퀵체인지 라이트닝(QuikChange Lightning) 돌연변이유발(어질런트 게노믹스(Agilent Genomics), 캘리포니아주 산타 클라라)을 위한 주형 DNA로 이용하였다. STBIII 세포(인비트로겐/써모피셔 사이언티픽(Invitrogen/Thermofisher Scientific), 매사추세츠주 월섬)를 형질전환을 위해 이용하였다. 서열 확인 후, BCMA 결합 및 동력학 분석을 수행하여 15B2GL 및 15B2WT의 결합을 비

교하였으며, 15B2GL의 선도 최적화(LO) 클론의 집단을 생성하였다. 요약하면, 15B2를 세균 발현을 위해 설계된 FAb 발현 벡터내로 클로닝하였다. 중쇄내의 27개 잔기 및 경쇄내의 19개 잔기를, 시스테인을 제외한 19개의 상이한 아미노산을 허용하도록 설계된 프라이머로 각각 최소 염기 치환으로(parsimoniously) 돌연변이시켰다. 돌연변이유발은 퀵체인지 라이트닝 돌연변이유발 키트(어질런트 게노믹스, 캘리포니아주 산타 클라라)를 이용하여 수행하였다.

[0064] 총 6000개 클론에 대해, 결합 ELISA에 의해 위치당 대략 100개 콜로니를 스크리닝하였다. 낮은 밀도의 인간 BCMA의 포획에 의해 그리고 세균 발현 48시간 후 세균 상등액을 이용하여 ELISA 결합을 측정하였다. 히트(hit)는 15B2GL 대조군의 2배보다 더 큰 것으로 정의되었다. 개별 아미노산 히트는 비특이적 단백질에의 결합이 없는, 시노몰구스 BCMA에의 ELISA에 의해 확인되었다. 최소 염기 치환 스크린으로부터 동정된 히트를 그 후 프라이머 설계를 위해 조합하여 조합 라이브러리를 생성하였다. 모 주형으로서 15B2GL을 그리고 ELISA 대조군을 이용하여, ELISA 결합을 이용한 상기 FAb 스크리닝 접근법을 조합 라이브러리로서 반복하였다. 이어서 조합 스크리닝 후 동정된 히트를, ADC 접합을 위해 설계된 IgG 포유동물 발현 벡터("Maia")내로 클로닝하였다. 단백질을 293HEK 세포에서 발현시키고 추가 시험을 위하여 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 의해 정제하였다.

[0065] 15B2GL 항체 및 15B2GL의 LO 클론이 *시험관내*에서 H929 다발성 골수종 세포에 결합하고 내부화하고 사멸시키는 능력을, Fab-ZAP을 이용하여 그리고 상기한 대로 세포주에서 발현된 내인성 BCMA에의 FACS 결합에 의해 평가하였다. 요약하면, 항체를 4℃에서 30분동안 200,000 세포와 항온처리한 후 PBS+2% FBS로 2회 세척하였다. 세포를 100 μL의 차가운 PBS+2% FBS에서 재현탁시키고 4℃에서 유지하였다. 일부 시점에서, 세포를 세척하고 따뜻한 RPMI+10% FBS에서 재현탁시키고 37℃ 인큐베이터내에, 5% CO_2에 두었다. 실험의 마지막에, 세포를 세척한 후 4℃에서 알렉사-플루오르 647-라벨링된 2차 항체와 항온처리한 후, PBS+2% FBS에서 2회 세척하였다. 세포를 200 μL의 PBS+2%FBS+DAPI에서 재현탁시키고 살아있는 세포에의 항체 결합을 벡톤 디킨슨 바이오사이언시즈 LSRII 세포측정기를 이용하여 분석하였다. 15B2GL 항체는 항-BCMA 항체 J6M0(미국 특허 제9,273,141호에 개시됨) 및 LO 항체와 비교할 때 이 방법에 의해 독특하고 신속한 내부화를 나타냈다.

[0066] BCMA 결합, 동력학 스크린(상기에 토의됨) 및 내부화에 기초하여, 단클론 항체 15B2GL을 선택하고, 5개의 LO 클론(즉, I09, L15, P10, N22, 및 M02)을 정제 및 15B2GL과의 접합을 위해 선택하였다.

[0067] 단클론 항체 15B2(야생형 및 생식세포계) 및 LO 클론 I09, L15, P10, N22, 및 M02의 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열이 표 1에 나타난다.

[0068] [표 1]

[0069]

항체	아미노산 서열	서열 번호
15B2GL VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFRSYSMNW VRQAPGKGLEWVSSISGSSNYIYYADSVKGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGNYYVEYFQ YWGQGTLVTVSS	7

항체	아미노산 서열	서열 번호
15B2GL VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQYISSNYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASNRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYCQQYGSSPITFGQGTKLEIK	8
15B2WT 가변 중쇄 (VH)	EIQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFRSYSMNW VRQAPGKGLEWVSSISGSSNYIYYADSVKGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARGGNYYVEYFQ YWGQGTLVTVSS	9
15B2WT 가변 경쇄 (VL)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQYISSNYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASNRATGIPDRFSGSGSGTGFTLTI SRLEPEDFAVFYCQQYGSSPITFGQGTKLEIK	10
I09 VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNW VRQAPGKGLEWVSSISGSSNYIYYADSVKGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGNYFVEYFQ QWGQGTLVTVSS	11
I09 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQYISSNYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASNRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYCQQYSSDPITFGQGTKLEIK	12
L15 VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNW VRQAPGKGLEWVSSISGQSNYIYYADSVKGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGNYFVEYFQ YWGQGTLVTVSS	13
L15 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQYISSNNLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASNRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTKLEIK	14
M02 VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNW VRQAPGKGLEWVSSISGQSNYIYYADSVKGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGNYYVEYFQ YWGQGTLVTVSS	15
M02 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQYISSNNLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASNRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYCQQYSSDPITFGQGTKLEIK	16
N22 VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNW VRQAPGKGLEWVSSISGSSNYIYYADSVKGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGNYFVEYFQ YWGQGTLVTVSS	17
N22 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQYISSNYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASNRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYCQQYSSSPITFGQGTKLEIK	18
P10 VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFRSYSMNW VRQAPGKGLEWVSSISGQSNYIYYADSVKGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGNYYVEYFQ YWGQGTLVTVSS	19

[0070]

항체	아미노산 서열	서열 번호
P10 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQYISSNYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASNRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYCQQYTDSPITFGQGTKLEIK	20

[0071]

[0072] 본 실시예의 결과는 BCMA에 대해 생성된 단클론 항체의 생산을 입증한다.

[0073] 실시예 2

[0074] 본 실시예는 본 발명에 따라 세포독소에 접합된 BCMA 단클론 항체를 포함하는 항체-약물 접합체(ADC)를 생산하는 방법을 입증한다.

[0075] 실시예 1에 개시된 15B2GL 단클론 항체 및 최적화된 클론을 부위 특이적 접합(문헌[Thompson et al., *J. Control Release*, *236*: 100-116 (2016)]; 문헌[Dimasi et al. *Mol Pharm.* 2017 May 1;14(5):1501-1516])을 이용하여 PBD 탑재물 SG3249에 접합시켰다. 구체적으로, 정제된 항체를 PBS pH 7.2, 1 mM EDTA(에틸렌다이아민 테트라아세트산)에서 환원제 TCEP(트리스(2-카르복시에틸)포스핀)의 40몰 과량과 3시간동안 37℃에서 항온처리하였다. 항온처리 후, 환원제를 10,000 MWCO 투석 카세트를 이용하여 4℃에서 PBS pH 7.2, 1 mM EDTA에서 2X 투석하고 이어서 25℃에서 4시간동안 20몰 당량의 데하이드로아스코르브산과 항온처리하여 제거하였다. 이어서, 10%(v/v) DMSO내의 스톡 용액으로부터의 PBD 탑재물 SG3249 8 당량을 순차적으로 첨가하고, 부드러운 회전하에

서 1시간동안 실온에서 항온처리하였다. 접합 반응을 (SG3249에 대하여) 4몰 당량의 N-아세틸 시스테인을 첨가하여 급랭시켰다.

[0076] 접합 과정은 8 내지 10%의 응집물 형성을 야기하였다. 거대분자 응집물, 시스테인 급랭된 SG3249를 비롯한 접합 시약을 이전에 개시된 대로(문헌[Thompson et al., *J. Control Release*, *236*: 100-116 (2016)]) 세라믹 하이드록시아파타이트 타입 II 크로마토그래피(CHT)를 이용하여 제거하였다. 부위-특이적 ADC를 25 mM 히스티딘-HCl, 7% 수크로스, 0.02% 폴리소르베이트-80, pH 6에서 제형화하였다.

[0077] 단량체 함량, 응집물 및 단편을 결정하기 위하여, 100 ㎍(100 μL 부피)의 항체 또는 ADC를 이용하여 분석적 크기-배제 크로마토그래피(SEC-HPLC)를 수행하였으며, 항체 또는 ADC를 TSKgel G3000WXL 컬럼(토소 바이오사이언스(Tosoh Bioscience), 일본 도쿄)내로 로딩하였다. 이동상은 0.1 M 소듐 설페이트, 0.1 M 소듐 포스페이트 및 10% 이소프로판올, pH 6.8로 이루어졌다. 유량은 1 mL/분이었으며, 각각의 분석은 실온에서 20분동안 실시하였다. 접합 및 약물 로드 분포를 평가하기 위하여 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC-HPLC)를 이용하였으며, 부틸-비다공성 수지(NPR) 컬럼(4.6 ㎜ ID x 3.5 cm, 2.5 ㎛, 토소 바이오사이언스)을 이용하여 수행하였다. 이동상 A는 25 mM Tris-HCl, 1.5 M $(NH_4)_2SO_4$, pH 8.0으로 이루어졌고; 이동상 B는 25 mM Tris-HCl 및 5% 이소프로판올, pH 8.0으로 이루어졌다. 1 mg/mL의 농도의 항체 또는 ADC 100 μL를 로딩하고 13분에 걸쳐서 5% B에서 100% B까지의 구배로 1 mL/분의 유량으로 용리시켰다. 환원된 역상 크로마토그래피(rRP-HPLC)를 이용하여 쇄-특이적 접합을 확인하였다. 항체 및 ADC를 PBS(pH 7.2)내의 42 mM 다이티오트레이톨(DTT)을 이용하여 20분동안 37℃에서 환원시켰다. 10 ㎍의 환원된 항체 또는 ADC를 중합체 역상 매질(PLRP-S) 1000 A 컬럼(2.1 x 50 mm)(어질런트 테크놀로지스(Agilent Technologies), 캘리포니아주 산타 클라라)상에 로딩하고 25분에 걸쳐서 5% B에서 100% B까지의 구배로 1 mL/분의 유량으로 80℃에서 용리시켰다(이동상 A: 물내에 0.1% 트리플루오로아세트산; 이동상 B: 아세토니트릴내에 0.1% 트리플루오로아세트산).

[0078] 중쇄 및 경쇄에서의 접합 및 약물:항체 비(DAR)를, 어질런트 6230 TOF(어질런트 테크놀로지스, 캘리포니아주 산타 클라라)에 결합된 어질런트 1290 시리즈 uHPLC에서 수행된 환원된 액체 크로마토그래피 질량 분석기 분석(rLCMS)에 의해 결정하였다. 2 ㎍의 환원된 항체 또는 ADC를 조르박스(ZORBAX) 신속 분리 고 선명도(rapid resolution high definition)(RRHD) 300-다이페닐 컬럼(2.1 x 50 mm, 1.8 ㎛)(어질런트 테크놀로지스, 캘리포니아주 산타 클라라)상에 로딩하고 2.1분 후에 80% B의 단계 구배를 이용하여 0.5 mL/분의 유량으로 용리시켰다(이동상 A: 물내의 0.1% 포름산 및 이동상 B: 아세토니트릴내의 0.1% 포름산). 양성 타임-오브-플라이트(time-of-flight) MS 스캔을 획득하고, 매스헌터(MassHunter) 소프트웨어(어질런트 테크놀로지스, 캘리포니아주 산타 클라라)를 이용하여 데이터 수집 및 프로세싱을 수행하였다. DAR은 문헌[Thompson et al., *supra*]에 개시된 대로 rLCMS 데이터를 이용하여 계산하였다.

[0079] 접합 효율은 하기 식을 이용하여 결정하였으며, 여기서 2의 이론적 DAR을 이용하였다:

[0080] $$\text{접합 효율} = (\text{결정된 DAR} \times \text{이론적 DAR}) \times \frac{1}{\text{이론적 DAR}}$$

[0081] 시험된 항체의 접합 효율 및 DAR은 표 2에 개시된다.

[0082] [표 2]

작제물 명칭	탑재물	접합 효율	약물:항체 비(DAR)
15B2GL	SG3249	91	1.82
I09	SG3249	91	1.82
L15	SG3249	90	1.80
M02	SG3249	92	1.84
N22	SG3249	91	1.82
P10	SG3249	93	1.86

[0083]

[0084] 본 실시예의 결과는 본 발명에 따라 피롤로벤조다이아제핀에 접합된 BCMA 단클론 항체를 포함하는 ADC의 생산을 입증한다.

[0085] 실시예 3

[0086] 본 실시예는 단량체(가용성) 및 막-결합된 BCMA에 대한 본 명세서에 개시된 단클론 BCMA 항체의 결합 친화성을 입증한다.

[0087] 프로테온 XRP36 장비(바이오-라드(Bio-Rad), 캘리포니아주 허큘레스)를 이용하여 단량체 인간 sBCMA(젠스크립트(GenScript), 뉴저지주 피스카타웨이)를 이용하여 15B2GL 단클론 항체 및 최적화 클론 I09, L15, P10, N22, 및 M02(실시예 1에 개시됨)의 결합을 평가하였다. 비교를 위하여 J6M0의 결합 또한 평가하였다. 표준 아민 결합을 이용하여, ~ 200~600 공명 단위(RU)의 밀도로, 20 mM EDAC(1-에틸-3-(3-다이메틸아미노프로필)카르보다이이미드 하이드로클로라이드) 및 5 mM 설포-NHS (N-하이드록시설포석신이미드)로 예비-활성화된 프로테온 GLC 바이오센서 칩(바이오-라드, 캘리포니아주 허큘레스)의 표면에, 10 mM 소듐 아세테이트 완충액(pH 4.5)에서 제조된 25 ㎍/ml 항-Fc 다클론 항체(잭슨 이뮤노리서치(Jackson ImmunoResearch), 펜실베니아주 웨스트 그로브)를 고정시켰다. 이어서 15B2GL, I09, L15, P10, N22, M02, 및 J6M0을 고정된 항-Fc 다클론 항체에 의한 포획을 위해 1 ㎍/ml의 농도로 주입하였다. 100~6.25 nM 범위의, 0.005 %(v/v) 트윈-20을 가진 PBS(pH 7.4)에서 제조된 sBCMA의 2배 연속 희석액을 600초의 해리 시간으로 75 μL/분으로 150초동안 포획된 표면에 유동시켜 센서 그램을 기록하였다. 프로테온 데이터 분석 소프트웨어를 이용하여 데이터를 분석하였다.

[0088] 이 실험의 결과가 도 13 및 14 그리고 표 3에 나타난다.

[0089] [표 3] 바이오라드 프로테온을 이용한 동력학 측정

항체	Kon	Koff	Kd	nM
15B2GL	3.73E+05	2.27E-02	6.07E-08	60.7
N22	5.36E+05	8.73E-03	1.63E-08	16
I09	6.09E+05	5.99E-03	9.82E-09	9.8
M02	4.99E+05	4.97E-03	9.95E-09	9.9
L15	8.54E+05	3.86E-03	4.51E-09	4.5
P10	7.01E+05	3.73E-03	5.32E-09	5.3
J6M0	4.21E+05	4.69E-04	1.11E-09	1

[0090]

[0091] 막-결합된 인간 BCMA에의 15B2GL, I09, L15 및 J6M0의 결합은 BCMA를 내인성으로 발현하는 다발성 골수종 및 형질 세포 백혈병 세포주(각각 NCI-H929 및 MM.1S)에서 유세포 분석법을 사용하여 평가하였다. 막-결합된 인간 BCMA에의 15B2GL, I09, L15의 결합은 또한 인간 BCMA를 발현하는 Ad293 세포에서 평가하였다. 4℃에서 30분 동안 항-BCMA 항체를 200,000 세포와 항온처리한 후 PBS+2% FBS(FACS 완충액)로 2회 세척하여 결합 분석을 수행하였다. 12 포인트, 3배 희석 시리즈를 사용하여 다양한 항체 농도를 평가하였다. 이어서, 세포를 4℃에서 5 ug/mL 염소-항 인간 IgG-AF647 2차 항체(써모 피셔 사이언티픽, 매사추세츠주 월섬)와 함께 항온처리한 후, PBS+2% FBS에서 2회 세척하였다. 세포를 200 μL의 PBS+2% FBS+DAPI에 재현탁시켰다.

[0092] 비디 바이오사이언시즈(BD Biosciences) LSRII 세포측정기 및 BD 팍스디바(FACSDiva) 소프트웨어(비디 바이오사이언시즈, 캘리포니아주 산호세)를 사용하여 살아있는 단일 세포의 형광을 측정하였다. 플로우조(FlowJo) 소프트웨어(플로우조, 엘엘씨, 오레곤주 애쉬랜드)를 이용하여 데이터를 분석하였다. 평균 형광 강도 값을 사용하여 결합 백분율을 결정하고, 프리즘 소프트웨어(그래프패드 소프트웨어 인크.(GraphPad Software Inc), 캘리포니아주 라호야)를 사용하여 EC50을 결정하였다. 이 실험의 결과가 도 15에 나타난다. SPR 및 유세포분석법 "겉보기 친화성" 데이터의 요약이 표 4에 나타난다.

[0093] [표 4]

항체	결합 친화성 (nM), 단량체 BCMA	겉보기 친화성 (nM), 세포 결합 BCMA		
		NCI-H929	MM.1S	Ad293+huBCMA
15B2GL	60.7	3.14	2.56	3.87
N22	16	ND	ND	ND
I09	9.8	5.4	4.8	5.3
M02	9.9	ND	ND	ND
L15	4.5	4.2	4.2	4.48
P10	5.3	ND	ND	ND
J6M0	1	6.02	6.65	ND

[0094]

[0095] ND = 결정되지 않음

[0096] 본 실시예의 결과는 단클론 항-BCMA 항체 15B2GL이, 이들 분석에서 분석된 다른 단클론 항체와 달리, 막-결합 BCMA에 강력하게 결합하고 단량체(가용성) BCMA에 약하게 결합함을 입증한다.

[0097] 실시예 4

[0098] 본 실시예는 본 명세서에 개시된 항체-약물 접합체를 이용하여 *시험관내*에서 다발성 골수종 및 형질 세포 백혈병 세포를 사멸시키는 방법을 입증한다.

[0099] SG3249에 접합된, 15B2GL 또는 그의 친화성-최적화 클론을 포함하는 항체-약물 접합체에 의한 다발성 골수종 및 형질 세포 백혈병 세포주의 사멸을 셀타이터-글로(CELLTITER-GLO)® 키트(프로메가(Promega), 위스콘신주 매디슨)에서 권장된 프로토콜을 이용하여 *시험관내*에서 평가하였다. 유리 탄두(free warhead) SG3199에 의한 다발성 골수종 및 형질 세포 백혈병 세포주의 사멸 또한 셀타이터-글로® 키트(프로메가, 위스콘신주 매디슨)에서 권장되는 프로토콜을 사용하여 평가하였다. 간단히 말하면, 80 μL RPMI + 10% FBS 중의 $5x10^3$ 세포를 백색 벽 96-웰 플레이트(코닝(Corning)® 코스타(Costar)®, 피셔 사이언티픽, 매사추세츠주 월섬)의 내부 웰에 첨가하였다. 다음의 BCMA-발현 세포주를 시험하였다: NCI-H929, EJM, MM.1R. JJN3, OPM-2, MM.1S, U266.B1, 및 L363. BMCA-음성 세포주 Raji 및 Jurkat 또한 시험하였다. 항체-약물 접합체를 RPMI+10% FBS에서 5x 스톡(2.5 μg/mL)으로 희석하였다. 이어서 처리를 RPMI+10% FBS에서 1:3으로 연속 희석하였다. 이 시리즈의 20 μL를 세포에 두벌로 첨가하여, 최고 농도에서의 0.5 μg/mL부터 최저에서의 $3x10^{-6}$ μg/mL까지 범위의 항체-약물 접합체의 12-포인트 용량 곡선을 생성하였다. 이소타입 항체-약물 접합체(IgG1-SG3249 및 IgG1-mc-MMAF) 및 배지-단독 대조군도 포함시켰다. 플레이트를 37℃, 5% CO_2에서 96시간 동안 항온처리하였다. 항온처리 기간의 마지막에, 기질 용액(프로메가, 위스콘신주 매디슨) 100 μL를 각 웰에 첨가하였다. 엔비젼 멀티라벨(EnVision Multilabel) 플레이트 판독기(퍼킨 엘머(Perkin Elmer), 매사추세츠주 월섬)를 사용하여 발광을 측정하였다. 그래프패드 프리즘 소프트웨어(그래프패드 소프트웨어, 인크., 캘리포니아주 라호야)를 사용하여 데이터를 분석하고 그래프화하였으며, 최대 억제 농도의 절반(IC50)을 결정 하였다.

[0100] 각 세포주에 대한 염색체 전좌 정보는 문헌[Moreaux et al, 2011] 및 문헌[Boersma-Vreugdenhil et al, 2004]에서 가져왔다. BCMA 수용체 수는 AF647-라벨링된 15B2(알렉사 플루오르 647 단백질 라벨링 키트, 써모 피셔 사이언티픽, 매사추세츠주 월섬) 및 알렉사 플루오르 647을 위한 퀀텀(Quantum)™ MESF 키트(뱅스 래보래토리즈(Bangs Laboratories), 인디애나주 피셔스)를 사용하여 결정하였다.

[0101] 이 실험의 결과는 표 5 및 도 2a~2j에 나타난다.

[0102] [표 5] 다발성 골수종 및 형질 세포 백혈병 세포주에서의 시험관내 세포 독성

[0103]

세포주	질환 기원	염색체 전좌	BCMA 수용체 수	15B2GL-SG3249 IC50 (ng/mL)	SG3199 IC50 (pM)
NCI-H929	MM	t(4;14)	18931	5.99	5
EJM	MM	t(14;20)	14325	153	22
MM.1R	PCL	t(14;16)	9449	8.64	3
JJN-3	MM	t(14;16)	3221	36.28	13
OPM-2	MM	t(4;14)	2873	201	19
MM.1S	PCL	t(14;16)	2698	26.8	3
U266B1	MM	t(11;14)	2340	39.7	155
L-363	PCL	t(20;22)	930	31.4	NT
Raji	버킷 림프종	NA	0	>500	NT
Jurkat	T-림프구	NA	0	>500	3

[0104] BCMA = B-세포 성숙 항원; NA = 적용불가능함; NT = 시험되지 않음

[0105] I09-SG3249 ADC와 비교할때, 가용성 BCMA(sBCMA)의 존재하에 *시험관내*에서 다발성 골수종 세포를 사멸시키는 15B2GL-SG3249 ADC의 능력은, 시험된 세포주를 또한 인간 BCMA를 발현하는 Ad293 세포로부터 수집된 BCMA-함유 조절 배지로 처리한 것을 제외하고는, 상기에 개시된 프로토콜을 사용하여 MM.1S 세포에서 평가하였다(도 3a 및

3b). sBCMA의 존재하에서 15B2GL-SG3249 ADC 세포 사멸을 또한 미국 특허 제9,273,141호에 개시된 항-BCMA 항체 J6M0을 포함하는 ADC와 비교하였다. 이 실험의 결과는 도 3에 나타나며, 도 3은 15B2GL-SG3249 ADC 활성이 임상적으로 관련된 수준의 sBCMA의 존재 하에서 ADC I09-SG3249(도 3a), J6M0-mc-MMAF, 및 J6M0-SG3249(도 3b 및 표 6)보다 큰 정도로 유지됨을 입증한다.

[0106] [표 6]

sBCMA (ng/mL)	시험 품목	IC50 (ng/mL)	성능 상실 배수
720	15B2GL-SG3249	29.12	2.01
270	15B2GL-SG3249	22.86	1.58
75	15B2GL-SG3249	16.09	1.11
0	15B2GL-SG3249	14.47	1.00
720	J6M0-SG3249	92.92	19.29
270	J6M0-SG3249	32.26	6.70
75	J6M0-SG3249	12.83	2.66
0	J6M0-SG3249	4.816	1.00
720	I09-SG3249	16.16	5.75
270	I09-SG3249	5.548	1.98
75	I09-SG3249	3.791	1.35
0	I09-SG3249	2.809	1.00
720	J6M0-mc-MMAF	1458	49.80
270	J6M0-mc-MMAF	159.7	5.45
75	J6M0-mc-MMAF	55.55	1.90
0	J6M0-mc-MMAF	29.28	1.00

[0107]

[0108] 본 실시예의 결과는 15B2GL-SG3249 ADC가 *시험관내*에서 다발성 골수종 및 형질 세포 백혈병 세포를 사멸시키며, 세포-사멸 활성이 가용성 BCMA의 존재하에서도 유지됨을 입증한다. 특히, 15B2GL-SG3249 ADC는 *시험관내*에서 MM.1S 및 NCI-H929 둘 모두에 세포독성이 있어서, IC50에 거의 영향을 미치지 않으면서 720 ng/mL 이하의 수준의 sBCMA의 존재하에 종양 세포의 평균 95%를 사멸시켰다. 단량체 BCMA와 막-결합 BCMA 사이에 유사한 친화성을 보유한 항체로부터 개발된 ADC는 720 ng/mL sBCMA의 존재하에서 IC50의 20배 이동과 함께, sBCMA-용량 의존성 효력 강하를 나타냈다.

[0109] 실시예 5

[0110] 본 실시예는 본원에 개시된 항체-약물 접합체를 사용하여 *생체내*에서 다발성 골수종 및 형질 세포 백혈병 세포를 사멸시키는 방법을 입증한다.

[0111] BCMA-발현 다발성 골수종 또는 형질 세포 백혈병 세포주(즉, NCI-H929, JJN-3, MM.1S 및 MM.1R)를, 매트리젤(MATRIGEL)^{TM}(비디 바이오사이언시즈, 캘리포니아주 산호세)을 사용하여 암컷 CB-17 SCID(C.B-17/IcrHsd-Prkdc-scid) 또는 무흉선 누드(Foxn1^{nu}) 마우스에 이식함으로써, 다발성 골수종 및 형질 세포 백혈병의 피하 이종이식 마우스 모델을 생성하였다. 종양이 대략 180 mm^3(NCI-H929 세포), 190 mm^3 (JJN3 세포), 160 mm^3(MM.1S 세포) 또는 175 mm^3(MM.1R 세포)에 도달하면, 마우스를 종양 크기에 기초하여 무작위화하고 투약 그룹에 위치시키고 하기에 개시된 대로 BCMA-표적화 ADC로 처리하였다.

[0112] NCI-H929 이종이식 모델

[0113] 마우스를 0.3 mg/kg의 단일 정맥내 용량의 ADC 15B2GL-SG3249, I09-SG3249, L15-SG3249로 처리하거나, 2주동안 0.3 mg/kg의 용량으로 J6M0-mc-MMAF를 매주 정맥내 투약하였다. 대조군 마우스는 처리하지 않고 두었다. 도 4에 나타낸 바와 같이, 15B2GL-SG3249, I09-SG3249 및 L15-SG3249로 처리된 마우스는 종양 이식후 99일동안 종양 재성장의 증거없이 관찰되었다. 어떤 투약 그룹에서도 체중 감소는 관찰되지 않았다.

[0114] JJN3 이종이식 모델

[0115] 마우스를 1 mg/kg의 단일 정맥내 용량의 15B2GL-SG3249, I09-SG3249 및 L15-SG3249 ADC로 처리하거나, 3주동안 1 mg/kg의 용량으로 J6M0-mc-MMAF ADC를 매주 정맥내 투약하였다. 대조군 마우스는 처리하지 않고 두었다. 도 5에 나타낸 바와 같이, 15B2GL-SG3249, I09-SG3249 및 L15-SG3249로 처리된 마우스는 종양 이식후 104일동안 종

양 재성장의 증거없이 관찰되었다. 어떤 투약 그룹에서도 체중 감소는 관찰되지 않았다.

[0116] MM.1S 이종이식 모델

[0117] 마우스를 1 mg/kg의 단일 정맥내 용량의 15B2GL-SG3249, I09-SG3249, L15-SG3249 ADC로 처리하거나, 4주동안 1 mg/kg의 용량으로 주 2회 J6M0-mc-MMAF로 정맥내 투약하였다. 대조군 마우스는 처리하지 않고 두었다. 도 6에 나타낸 바와 같이, 15B2GL-SG3249, I09-SG3249 및 L15-SG3249로 처리된 마우스는 종양 이식후 99일 동안 종양 재성장의 증거없이 관찰되었다. 어떤 투약 그룹에서도 체중 감소는 관찰되지 않았다.

[0118] MM.1R 이종이식 모델

[0119] 마우스를 1 mg/kg의 단일 정맥내 용량의 15B2GL-SG3249로 처리하거나, 4주동안 3 mg/kg의 용량으로 매주 J6M0-mc-MMAF를 정맥내 투약하였다. 대조군 마우스는 처리하지 않고 두었다. 도 7에 나타낸 바와 같이, 15B2GL-SG3249로 처리된 마우스는 종양 이식후 109일 동안 종양 재성장의 증거없이 관찰되었다. 어떤 투약 그룹에서도 체중 감소는 관찰되지 않았다.

[0120] 본 실시예의 결과는 ADC 15B2GL-SG3249가 BCMA-발현 세포를 표적화하는 다른 ADC와 비교할때 *생체내*에서 증가된 항-종양 효능을 나타낸다는 것을 입증한다.

[0121] 실시예 6

[0122] 본 실시예는 다발성 골수종 줄기 세포가 BCMA를 발현함을 입증한다.

[0123] 다발성 골수종(MM) 환자의 골수는 CD19의 표면 발현 및 CD138 표면 발현의 결여에 의해 환자의 골수에서 동정될 수 있는 암 줄기 세포(CSC)의 작은 집단을 함유한다(문헌[Matsui et al., *Blood*, *103*:2332-6 (2004)]).

[0124] 유세포분석법에 의해 4개의 다발성 골수종 환자 샘플의 줄기 세포 집단에서 BCMA 발현을 평가하였다. 프로테오제넥스, 인크.(Proteogenex, Inc.)(캘리포니아주 컬버 시티)로부터 샘플을 획득하고(표 7 참고), 개별 다발성 골수종(MM) 샘플을 37℃의 수조에서 해동시켰다.

[0125] [표 7] MM 환자 정보

샘플 ID	성별	연령	민족성	임상적 진단	질환 상태
MM263BM	M	63	백인	MM	진단됨
MM277BM	F	66	백인	MM	진단됨
MM276BM	F	81	백인	MM	진단됨
MM284BM	M	84	백인	MM	치료법에 저항성임

[0126]

[0127] 해동된 세포를 10 mL의 PBS에 첨가하고 비셀(ViCELL)™ 계수기(벡크만-코울터 라이프 사이언시즈(Beckmann-Coulter Life Sciences), 인디애나주 인디애나폴리스)를 사용하여 계수하였다. 콜로니 형성 분석을 위해 세포 현탁액의 분취액을 제조하는 한편, 세포 현탁액의 나머지를 저속으로 원심분리하여 세포를 펠렛화하였다. 제조사의 설명서에 따라 세포를 Fc 차단한 다음, 96-웰 플레이트에서 웰당 200,000 세포로 플레이팅하였다. 플레이트를 원심 분리하여 세포를 펠렛화하고, Fc 차단 용액을 따라내고, 세포 샘플을 BV 염색 완충액에 재현탁시킨후, 시판되는 직접 접합된 항체로 구성된 적절한 항체 패널로 염색하였으며, 이들은 표 8 및 9에 나타난다.

[0128] [표 8] 항체 염색 패널

샘플	설 명	항체 패널
1	단일 염색 BV510	CD3-BV510, CD34-BV510, CD14-BV510, CD193-BV510
2	단일 염색 PE	CD138-PE
3	단일 염색 APC	CD19-APC
4	단일 염색 PE/Cy7	BCMA-PE/Cy7
5	염색되지 않음	
6	단일 염색 DAPI	DAPI
7	FMO (BV510)	CD138-PE, CD19-APC, BCMA-PE/Cy7, DAPI
8	FMO (PE)	CD3-BV510, CD34-BV510, CD14-BV510, CD193-BV510, CD19-APC, BCMA-PE/Cy7, DAPI
9	FMO (APC)	CD3-BV510, CD34-BV510, CD14-BV510, CD193-BV510, CD138-PE, BCMA-PE/Cy7, DAPI
10	FMO (PE/Cy7)	CD3-BV510, CD34-BV510, CD14-BV510, CD193-BV510, CD138-PE, CD19-APC, DAPI
11	모든 염색	CD3-BV510, CD34-BV510, CD14-BV510, CD193-BV510, CD138-PE, CD19-APC, BCMA-PE/Cy7, DAPI
12	FMO (DAPI)	CD3-BV510, CD34-BV510, CD14-BV510, CD193-BV510, CD138-PE, CD19-APC, BCMA-PE/Cy7
13	보상 비드 BV510	CD193-BV510
14	보상 비드 PE	CD138-PE
15	보상 비드 APC	CD19-APC
16	보상 비드 PE/Cy7	BCMA-PE/Cy7

[0129]

[0130] [표 9] 유세포분석법 분석을 위해 사용된 항체

항체/시약	클론	판매사	Cat#
CD3-BV510	OKT3	바이오레전드	317332
CD34-BV510	581	바이오레전드	343528
CD14-BV510	M5E2	바이오레전드	301842
CD193-BV510	5E8	바이오레전드	310722
CD19-APC	SJ25C1	비디 바이오사이언시즈	340437
CD138-PE	B-A38	벡크만 코울터	A40316
BCMA-PE/Cy7	19F2	바이오레전드	357508
DAPI		써모피셔 사이언티픽	62248
FC 차단		비디 파민젠	564220
호라이즌 브릴리언트 염색 완충액		비디 바이오사이언시즈	563794
울트라 콤프 비드		이바이오사이언시즈	01-2222-42

[0131]

[0132] 또한, 보상 비드를 시험 항체로 개별적으로 염색하였다. 플레이트를 어둠 속에서 4℃에서 30분동안 항온처리하였다. 플레이트를 원심분리하고 세포를 DPBS+2% FBS에서 세척한 후, 200 μL의 DPBS+2% FBS+DAPI에서 재현탁시켰다. 각 웰로부터의 세포를 BD LSRII 유세포 분석기(비디 바이오사이언시즈, 캘리포니아주 산호세)에서 평가하고 FCS 파일을 생성하였다. 세포 동정은 다음 게이팅 전략을 사용하여 수행하였다: 보상 비드 및 단일 염색 데이터를 이용하여 플로우조®10(플로우조 엘엘씨, 오레곤주 애쉬랜드)에서 자동 보상 매트릭스로 보상을 수행하였다. 이어서, FSC-A 대 SSC-A 플롯을 통해 게이팅된 형질 세포를 DAPI 대 SSC-W 플롯을 통해 살아있는 단일 세포에 대해 선택하였다. 이어서 배제 게이트를 사용하여 BV-510 대 SSC-A 플롯을 통해 CD3, CD14, CD34 및 CD193에 대해 양성으로 염색된 세포를 제거 하였다. 이어서, 이 집단을 CD138-PE 대 CD19-APC 플롯에서 분석하

였다. BCMA 발현에 대한 히스토그램을 CD19+/CD138-로 정의된 MM CSC 집단 및 CD19-/CD138+로 정의된 MM 형질 세포 집단에서 생성하였다. 적절한 형광 마이너스 원(fluorescence minus one)(FMO) 대조군에 기초하여 분석 게이트를 설정하였다. 모든 샘플은 도 7에 도시된 바와 같이, BCMA 발현에 대해 양성인 CD138+CD19- 세포를 적은 백분율로 나타냈다. 줄기 세포 집단에서 BCMA 발현 수준은 일반적으로, 수준이 낮지만 BCMA 발현에 대해 여전히 양성인 MM277을 제외하고는, 형질 세포에서 관찰된 수준과 동일하였다.

[0133] 본 실시예의 결과는 BCMA가 다발성 골수종 암 줄기 세포에서 발현됨을 입증한다.

[0134] 실시예 7

[0135] 본 실시예는 15B2GL-SG3249 항체-약물 접합체가 다발성 골수종 줄기 세포를 사멸시킴을 입증한다.

[0136] MM 줄기 세포가 *시험관내*에서 콜로니를 형성할 수 있기 때문에(문헌[Matsui et al., *Blood*, 103 : 2332-6 (2004)]), ADC 15B2GL-SG3249가 실시예 2에서 규명된 MM 골수 생검에서 클론형성 세포를 사멸시키는 능력을 시험하였다. 구체적으로, 세포를 비셀™ 계수기(벡크만-코울터 라이프 사이언시즈, 인디애나주 인디애나폴리스)를 사용하여 계수하고 플레이팅에 필요한 것보다 10배 높은 밀도로 IMDM+2% FBS에 재현탁시켰다. 메토컬트(METHOCULT)™ H4434 클래식(스템셀 테크놀로지스, 인크.(StemCell Technologies, Inc.), 캐나다 BC주 밴쿠버)을 MM263, MM284 및 MM276의 경우 mL당 2000 세포와, 그리고 MM277의 경우 mL당 4000 세포와, 제조사의 설명서에 따라 혼합하였다. 이어서, mL당 25~400 ng의 시험 ADC 15B2GL-SG3249 및 J6M0-mc-MMAF를 적절한 튜브에 첨가하였다. 대조군 IgG1-SG3249 항체는 mL당 400ng의 고용량으로만 첨가하였다. 모든 튜브를 완전히 볼텍싱하여 혼합한 다음, 방해받지 않고 두어 기포가 정상으로 상승하도록 하였다. 기포가 상승하면, 400 μL를 16-게이지 무딘 말단 바늘로 제거하고 24-웰 초저 부착 플레이트(브이더블유알(VWR), 펜실베니아주 래드너)의 하나의 웰내에 조심스럽게 플레이팅하였다. 각각의 처리물은 플레이트의 내부 웰에 두벌로 플레이팅하였다. PBS를 외부 웰에 첨가하고 플레이트를 7~10일 동안 37℃에서 항온처리하였다. 셀리고(Celigo)® 이미지 세포측정기(넥셀롬 바이오사이언시즈(Nexcelom Biosciences), 매사추세츠주 로렌스)상에서 플레이트를 스캐닝하여 콜로니 형성을 기록하면서 육안으로 콜로니를 계수하였다. 도 8에 나타난 바와 같이, 4가지 경우 모두에서, 15B2GL-SG3249는 클론형성 세포를 사멸시킬 수 있는 반면, J6M0-mc-MMAF는 그렇지 않았다. 시험된 최고 용량(400 ng/mL)에서, 15B2GL-SG3249는 MM263 및 MM284에 대한 콜로니 100 % 및 MM276 및 MM277에 대한 콜로니 87.5% 및 91%를 각각 사멸시킬 수 있었다. 대조적으로, 400 ng/mL의 J6M0-mc-MMAF는 MM263에 대해 형성된 콜로니의 수를 감소시키지 않았으며, 각각 MM276, MM277 및 MM284에 대해 콜로니 형성의 12.5%, 40% 및 50% 감소를 야기하였다.

[0137] 본 실시예의 결과는 항체-약물 접합체 15B2GL-SG3249가 BCMA-발현 다발성 골수종 암 줄기 세포를 표적화하고 사멸시킨다는 것을 입증한다.

[0138] 실시예 8

[0139] 본 실시예는 본 명세서에 개시된 항체-약물 접합체를 사용하여 *시험관내*에서 다발성 골수종 및 형질 세포 백혈병 세포를 사멸시키는 방법을 입증한다.

[0140] SG3400에 접합된 15B2GL을 포함하는 항체-약물 접합체에 의한 다발성 골수종 및 형질 세포 백혈병 세포주의 사멸을 실시예 4에 개시된 바와 같이 셀타이터-글로® 키트(프로메가, 위스콘신주 매디슨)를 사용하여 *시험관내*에서 평가하였다. 다음의 BCMA-발현 세포주를 시험하였다: NCI-H929, EJM, MM.1R. JJN3, OPM-2, MM.1S, U266.B1 및 L363. BMCA-음성 세포주 Raji 및 Jurkat도 시험하였다. 항체-약물 접합체를 RPMI+10% FBS에서 5x 스톡(25 μg/mL)으로 희석하였다. 이어서 처리물을 RPMI+10% FBS에서 1:3으로 연속 희석하였다. 이 시리즈의 20 μL를 세포에 두벌로 첨가하여, 최고 농도에서의 5 μg/mL부터 최저에서의 $2.8x10^{-5}$ μg/mL까지 범위의 항체-약물 접합체의 12-포인트 용량 곡선을 생성하였다. 이소타입 항체-약물 접합체(IgG1-SG3400) 및 배지-단독 대조군도 포함시켰다. 플레이트를 37℃, 5% CO_2에서 96 시간동안 항온처리하였다. 항온처리 기간의 마지막에, 기질 용액(프로메가, 위스콘신주 매디슨) 100 μL를 각 웰에 첨가하였다. 엔비젼 멀티라벨 플레이트 판독기(퍼킨 엘머, 매사추세츠주 월섬)를 사용하여 발광을 측정하였다. 그래프패드 프리즘 소프트웨어(그래프패드 소프트웨어, 인크., 캘리포니아주 라호야)를 사용하여 데이터를 분석하고 그래프화하였다. 이 실험의 결과가 도 10a~10j에 나타난다.

[0141] 본 실시예의 결과는 15B2GL-SG3400 ADC가 *시험관내*에서 다발성 골수종 및 형질 세포 백혈병 세포를 사멸시킴을 입증한다.

[0142] 실시예 9

[0143] 본 실시예는 본 명세서에 개시된 항체-약물 접합체를 사용하여 *생체내*에서 다발성 골수종 및 형질 세포 백혈병 세포를 사멸시키는 방법을 입증한다.

[0144] BCMA-발현 다발성 골수종 또는 형질 세포 백혈병 세포주(즉, NCI-H929 및 MM.1S)를 매트리젤™(비디 바이오사이언시즈, 캘리포니아주 산호세)을 사용하여 암컷 CB-17 SCID(C.B-17/IcrHsd-Prkdc-scid) 마우스에 이식함으로써 다발성 골수종 및 형질 세포 백혈병의 피하 이종이식 마우스 모델을 생성하였다. 종양이 대략 200 mm^3(NCI-H929 세포) 또는 180 mm^3(MM.1S 세포)에 도달하면, 마우스를 종양 크기에 기초하여 무작위화하고 투약 그룹에 배치하고 하기에 개시된 바와 같이 BCMA-표적화 ADC로 처리하였다.

[0145] NCI-H929 이종이식 모델

[0146] 마우스를 1 mg/kg의 ADC IgG1-SG3400 또는 0.3 mg/kg 또는 1 mg/kg의 15B2GL-SG3400의 단일 정맥내 용량으로 처리하거나 0.3 mg/kg 또는 1 mg/kg의 단일 용량의 J6M0-SG3400을 정맥내 투약하였다. 대조군 마우스는 처리하지 않고 두었다. 도 11에 나타낸 바와 같이, 15B2GL-SG3400으로 처리된 마우스는 종양 이식후 74일 동안 종양 재성장의 증거없이 관찰되었다. 어떤 투약 그룹에서도 체중 감소는 관찰되지 않았다.

[0147] MM.1S 이종이식 모델

[0148] 마우스를 1 mg/kg 또는 3 mg/kg의 ADC IgG1-SG3400 또는 15B2GL-SG3400의 단일 정맥내 용량으로 처리하거나 1 mg/kg 또는 3 mg/kg의 용량으로 J6M0-SG3400을 정맥내 투약하였다. 대조군 마우스는 처리하지 않고 두었다. 도 12에 나타낸 바와 같이, 3 mg/kg의 J6M0-SG3400으로 처리된 마우스는 종양 이식후 85일 동안 종양 재성장의 증거없이 관찰되었다. 어떤 투약 그룹에서도 체중 감소는 관찰되지 않았다.

[0149] 본 실시예의 결과는 ADC 15B2GL-SG3400이 *생체내*에서 항-종양 효능을 나타냄을 입증한다.

[0150] 실시예에 기재된 데이터는 단클론 항체 15B2GL을 포함하는 ADC가 전임상 MM 모델에서 강력한 항종양 활성을 나타냄을 입증한다. 중요하게는, *시험관내* 실험은이 활성이 sBCMA의 존재하에 유지됨을 제안한다. 이들 데이터는 또한 강력한 PBD 탑재물을 가진 ADC 15B2GL-SG3249가 큰 골수종 형질 세포뿐만 아니라 보다 정지 성인 CD19+/CD138- 클론형성 세포 둘 모두를 효과적으로 표적화하며, 이는 이 유 전적으로 이질적인 질환에서 보다 지속적인 임상 반응에 대한 기회를 제공할 수 있음을 입증한다.

[0151] 본 명세서에 인용된 간행물, 특허 출원 및 특허를 포함한 모든 참고 문헌은 각각의 참고 문헌이 개별적으로 그리고 구체적으로 참고로 포함되는 것으로 나타내지고 본원에 전체적으로 제시된 것과 동일한 정도로 참고로 본원에 포함된다.

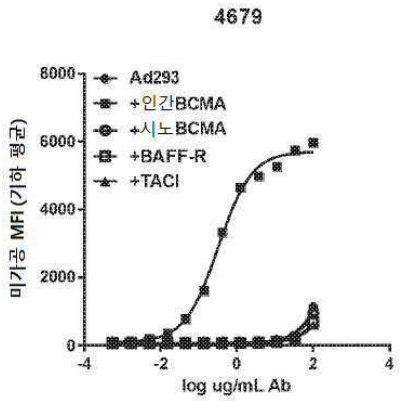
[0152] 본 발명을 설명하는 맥락에서 (특히 다음 청구 범위의 맥락에서) 용어 "하나("a" 및 "an" 및 "the")" 및 "적어도 하나" 및 유사한 지시어의 사용은 본 명세서에서 달리 지시되거나 문맥상 명백하게 모순되지 않는 한, 단수 및 복수를 모두 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 용어 "적어도 하나"와 함께 하나 이상의 항목의 목록을 사용하는 것(예를 들어, "A와 B 중 적어도 하나")은 본 명세서에서 달리 지시되거나 문맥상 명백하게 모순되지 않는 한, 열거된 항목에서 선택된 하나의 항목(A 또는 B) 또는 열거된 항목 중 둘 이상의 조합(A 및 B)을 의미하는 것으로 해석된다. 용어 "포함하는", "가진", "구비하는" 및 "함유하는"은 달리 언급되지 않는 한 개방형 용어(즉, "포함하지만 이에 한정되지 않는"의 의미)로 해석되어야 한다. 본 명세서에서 값의 범위의 언급은 본 명세서에서 다르게 지시되지 않는 한, 범위 내에 속하는 각각의 개별 값을 개별적으로 지칭하는 속기 방법으로서 작용하도록 의도되며, 각각의 개별 값은 마치 본 명세서에서 개별적으로 언급된 것처럼 명세서에 통합된다. 본 명세서에 개시된 모든 방법은 본 명세서에서 달리 지시되거나 문맥상 명백하게 모순되지 않는 한, 임의의 적합한 순서로 수행될 수 있다. 본 명세서에 제공된 임의의 모든 예 또는 예시적인 언어(예를 들어, "와 같은")의 사용은 단지 본 발명을 더 잘 설명하기 위한 것이며 달리 청구되지 않는 한 본 발명의 범위를 제한하지 않는다. 본 명세서의 어떤 언어도 본 발명의 실시에 필수적인 것으로 청구되지 않은 요소를 나타내는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0153] 본 발명을 수행하기 위해 본 발명자들에게 공지된 최상의 모드를 포함하여 본 발명의 바람직한 실시 형태가 본 명세서에 개시된다. 상기 바람직한 실시 형태의 변형은 상기 설명을 읽으면 당업자에게 명백해질 수 있다. 본 발명자들은 당업자가 이러한 변형을 적절히 채택할 것을 기대하며, 본 발명자들은 본 명세서에서 구체적으로 개시된 것외에 다르게도 본 발명을 실시하고자 한다. 따라서, 본 발명은 적용 가능한 법률에 의해 허용되는 바와

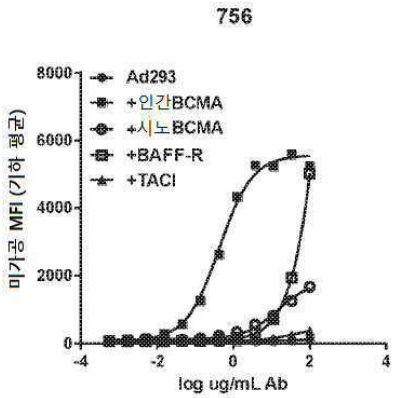
같이 여기에 첨부된 청구 범위에 언급된 주제의 모든 변형 및 등가물을 포함한다. 또한, 본 명세서에서 달리 지시되거나 문맥상 명백하게 모순되지 않는 한, 모든 가능한 변형에서 상기 기재된 요소의 임의의 조합이 본 발명에 포함된다.

도면

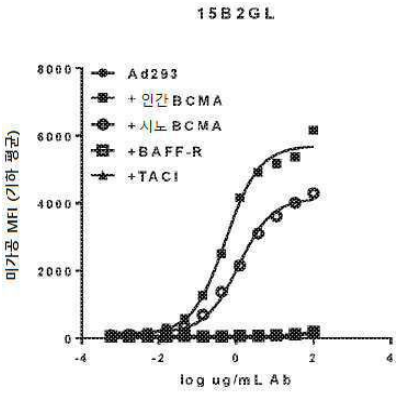
도면1a



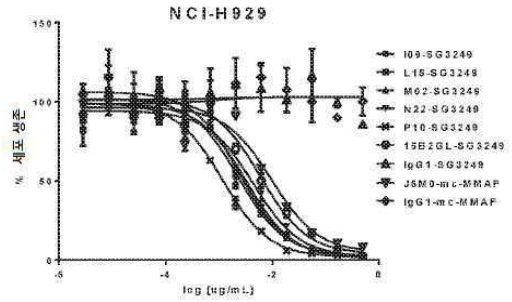
도면1b



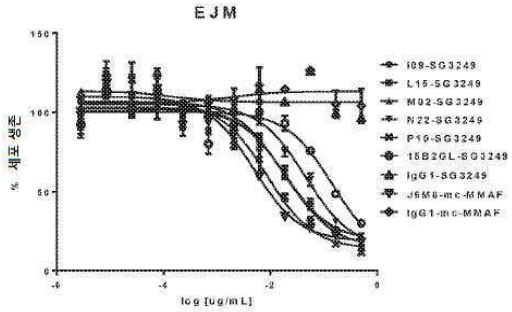
도면1c



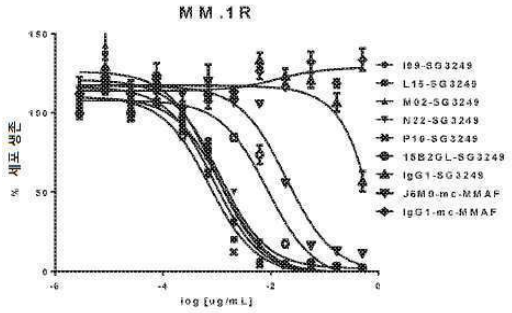
도면2a



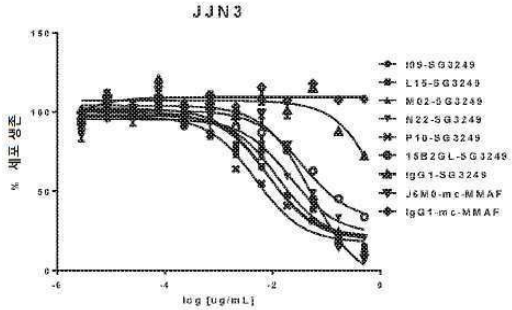
도면2b



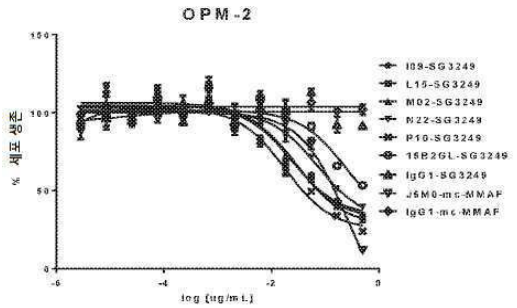
도면2c



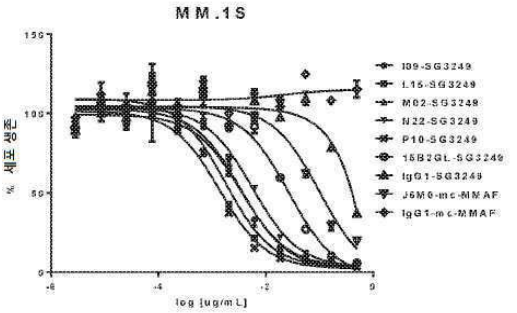
도면2d



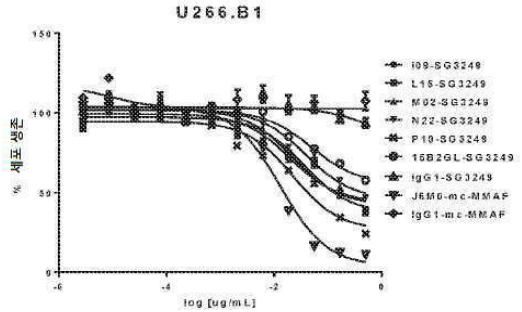
도면2e



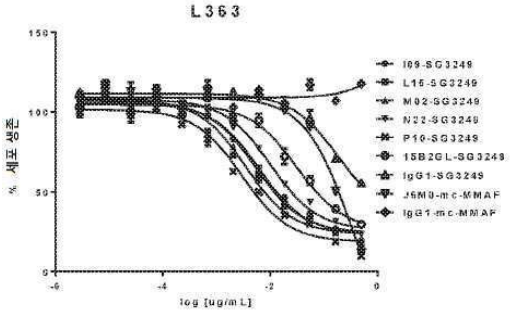
도면2f



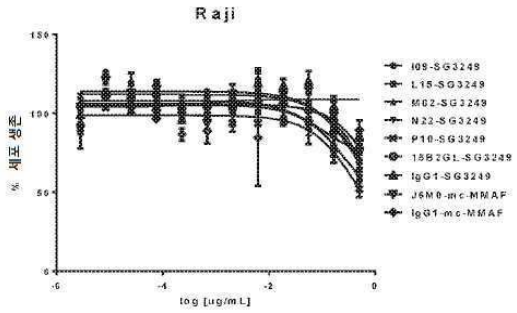
도면2g



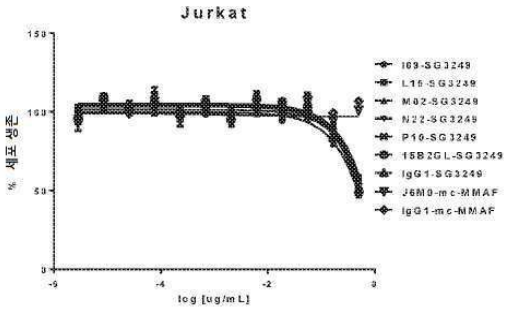
도면2h



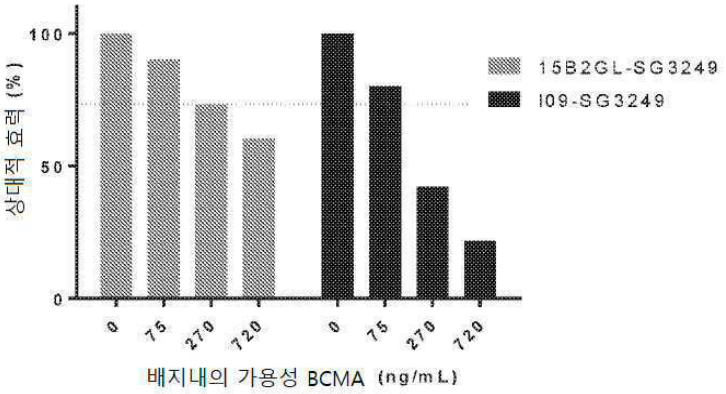
도면2i



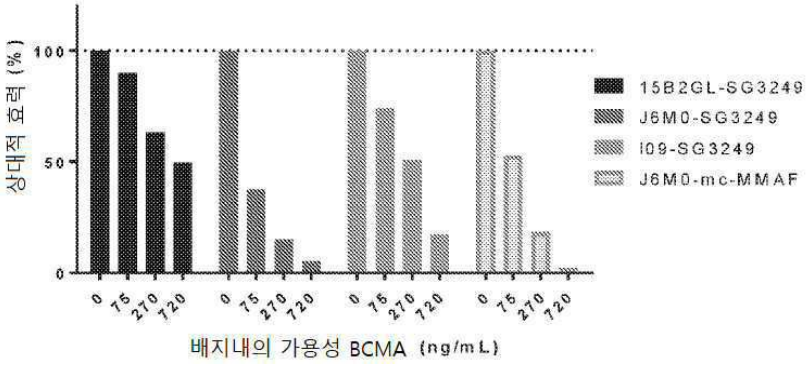
도면2j



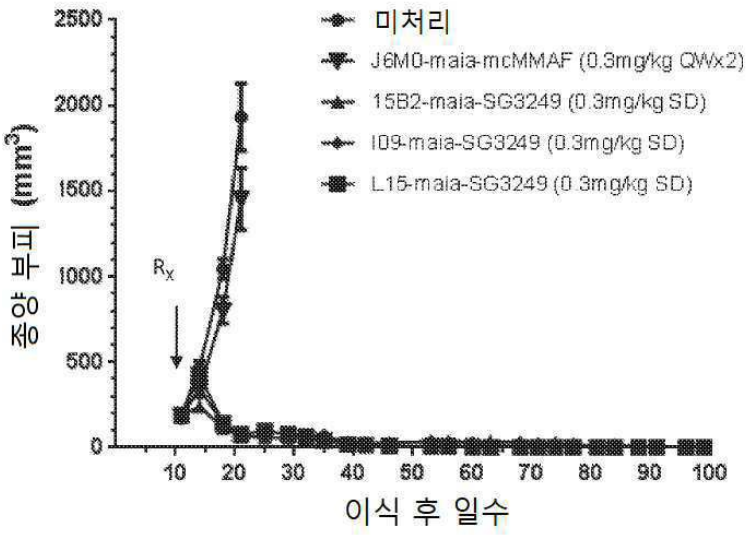
도면3a



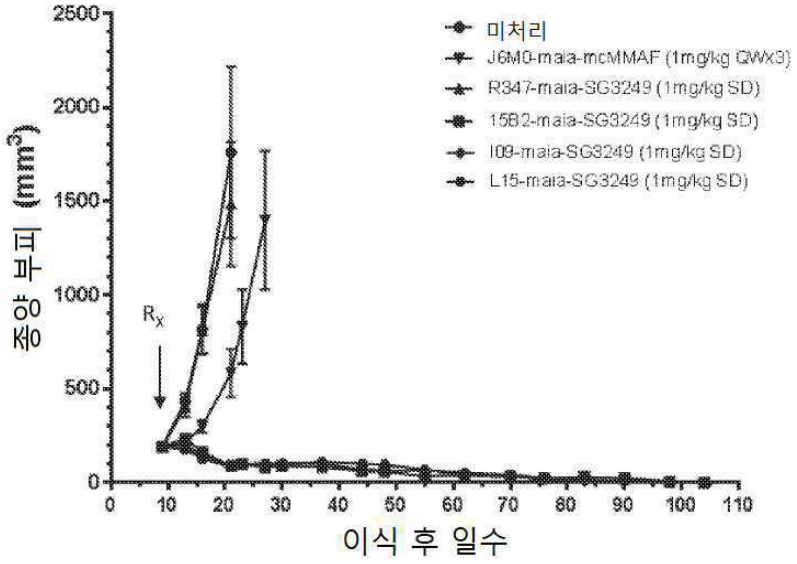
도면3b



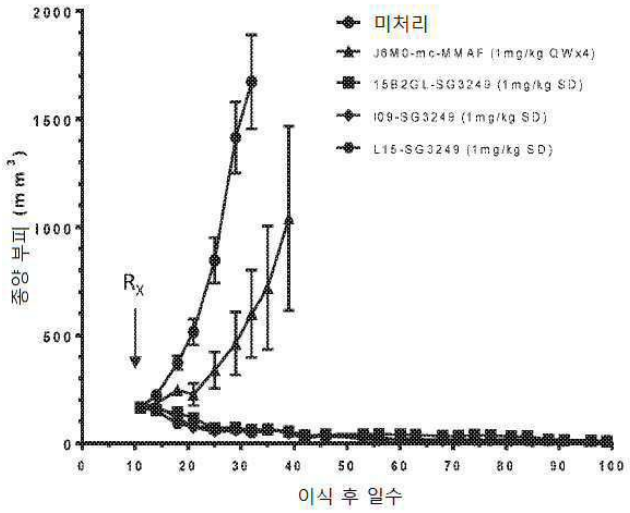
도면4


미처리
J6M0-maia-mcMMAF (0.3mg/kg QWx2)
15B2-maia-SG3249 (0.3mg/kg SD)
I09-maia-SG3249 (0.3mg/kg SD)
L15-maia-SG3249 (0.3mg/kg SD)
종양 부피 (mm3)
Rx
이식 후 일수

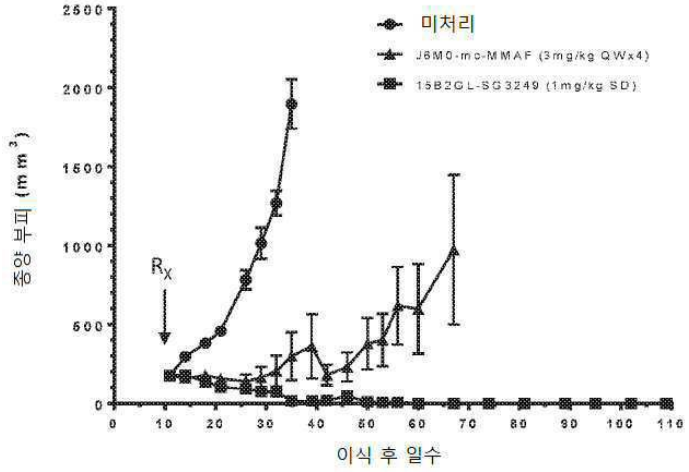
도면5


미처리
J6M0-maia-mcMMAF (1mg/kg QWx3)
R347-maia-SG3249 (1mg/kg SD)
15B2-maia-SG3249 (1mg/kg SD)
I09-maia-SG3249 (1mg/kg SD)
L15-maia-SG3249 (1mg/kg SD)
종양 부피 (mm3)
Rx
이식 후 일수

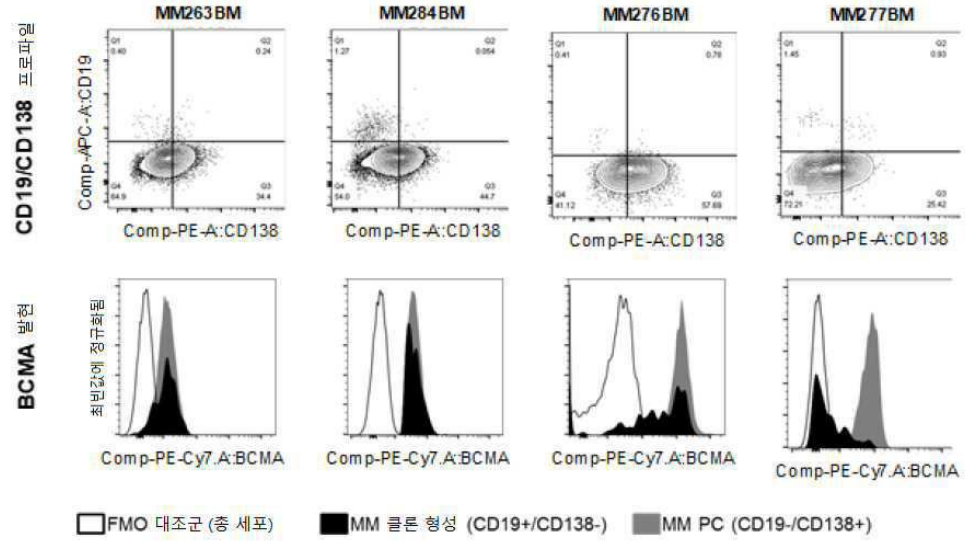
도면6


미처리
J6M0-mc-MMAF (1mg/kg QWx4)
15B2GL-SG3249 (1mg/kg SD)
I09-SG3249 (1mg/kg SD)
L15-SG3249 (1mg/kg SD)
종양 부피 (mm3)
Rx
이식 후 일수

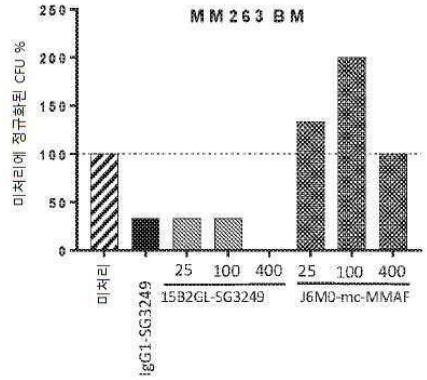
도면7


미처리
J6M0-mc-MMAF (3mg/kg QWx4)
15B2GL-SG3249 (1mg/kg SD)
종양 부피 (mm3)
Rx
이식 후 일수

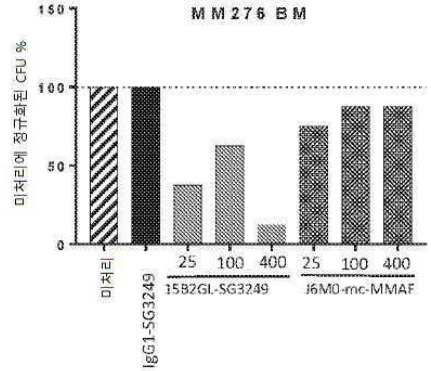
도면8


MM263BM
MM284BM
MM276BM
MM277BM
CD19/CD138 프로파일
Comp-APC-A:CD19
Comp-PE-A:CD138
BCMA 발현
최빈값에 정규화됨
Comp-PE-Cy7.A:BCMA
FMO 대조군 (종 세포)
MM 클론 형성 (CD19+/CD138-)
MM PC (CD19-/CD138+)

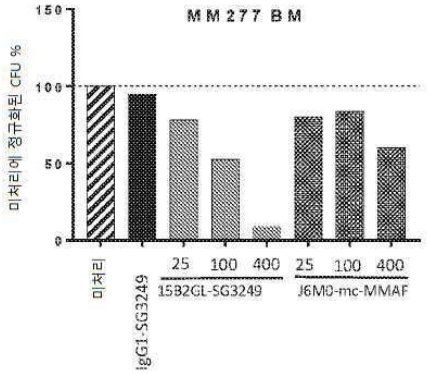
도면9a



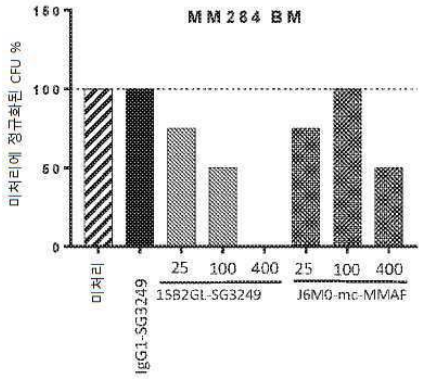
도면9b



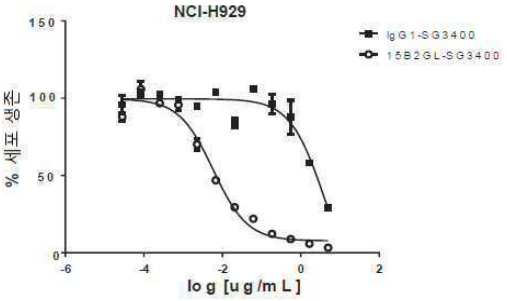
도면9c



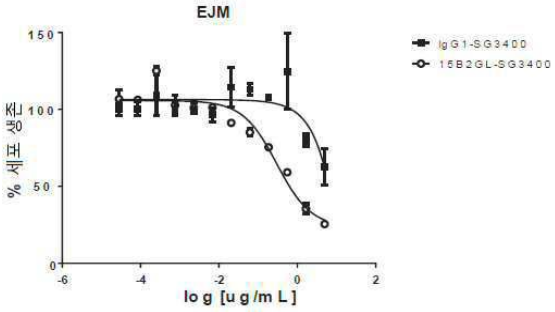
도면9d



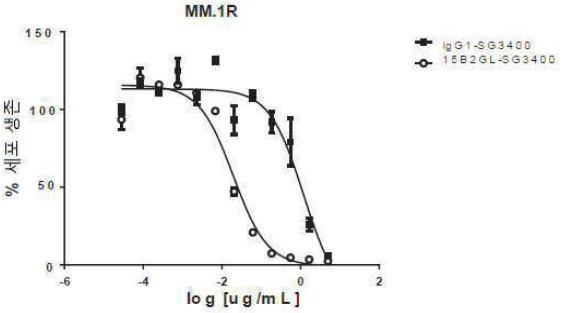
도면10a



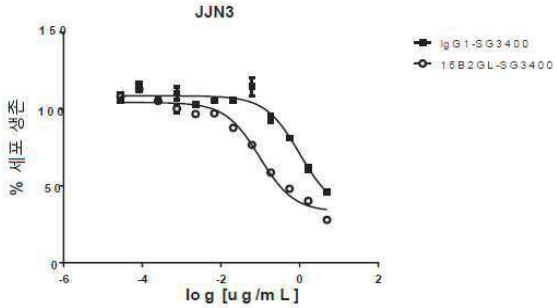
도면10b



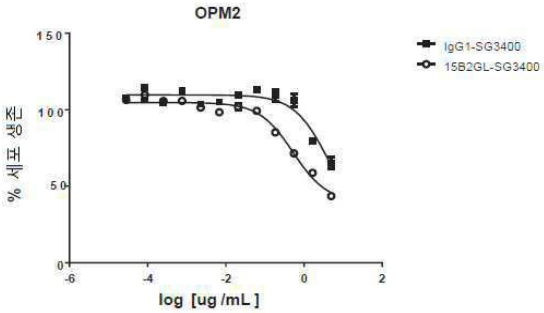
도면10c



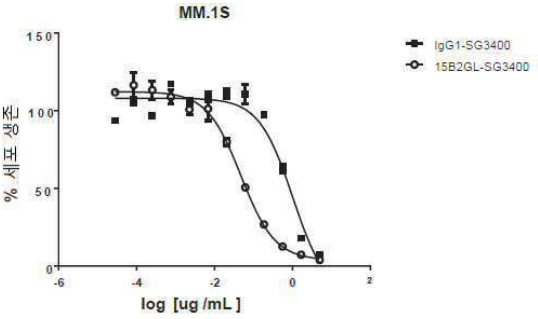
도면10d



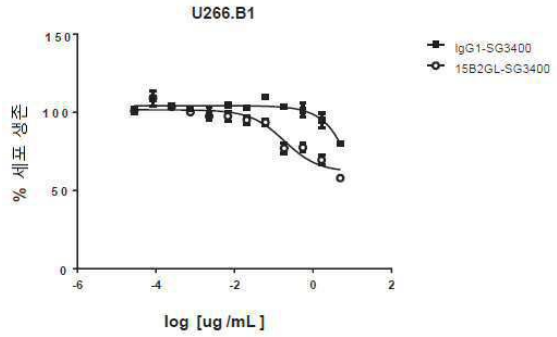
도면10e



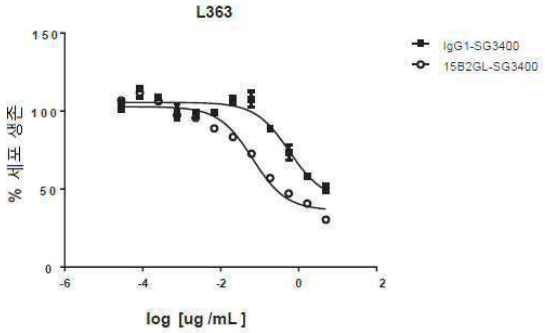
도면10f



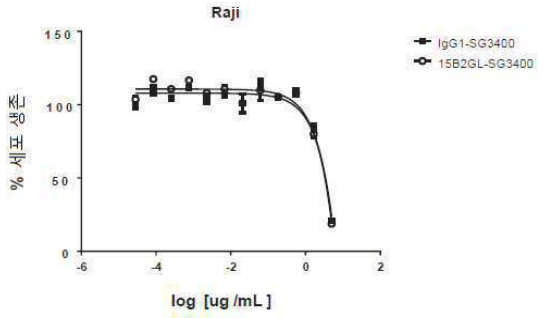
도면10g



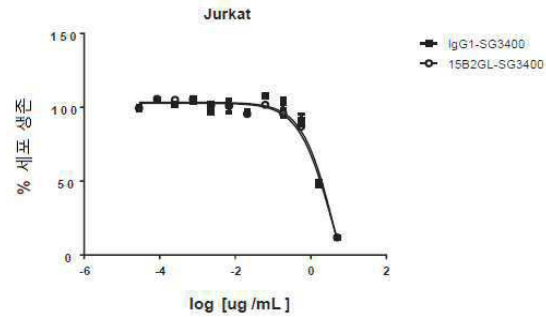
도면10h



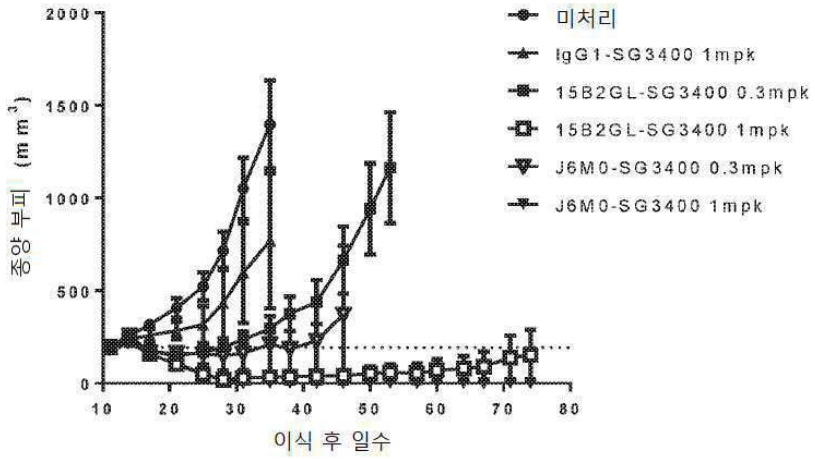
도면10i



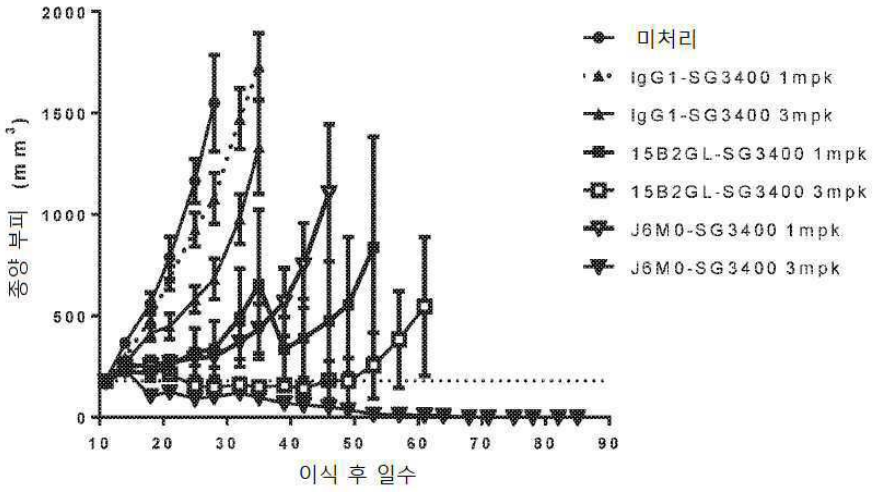
도면10j



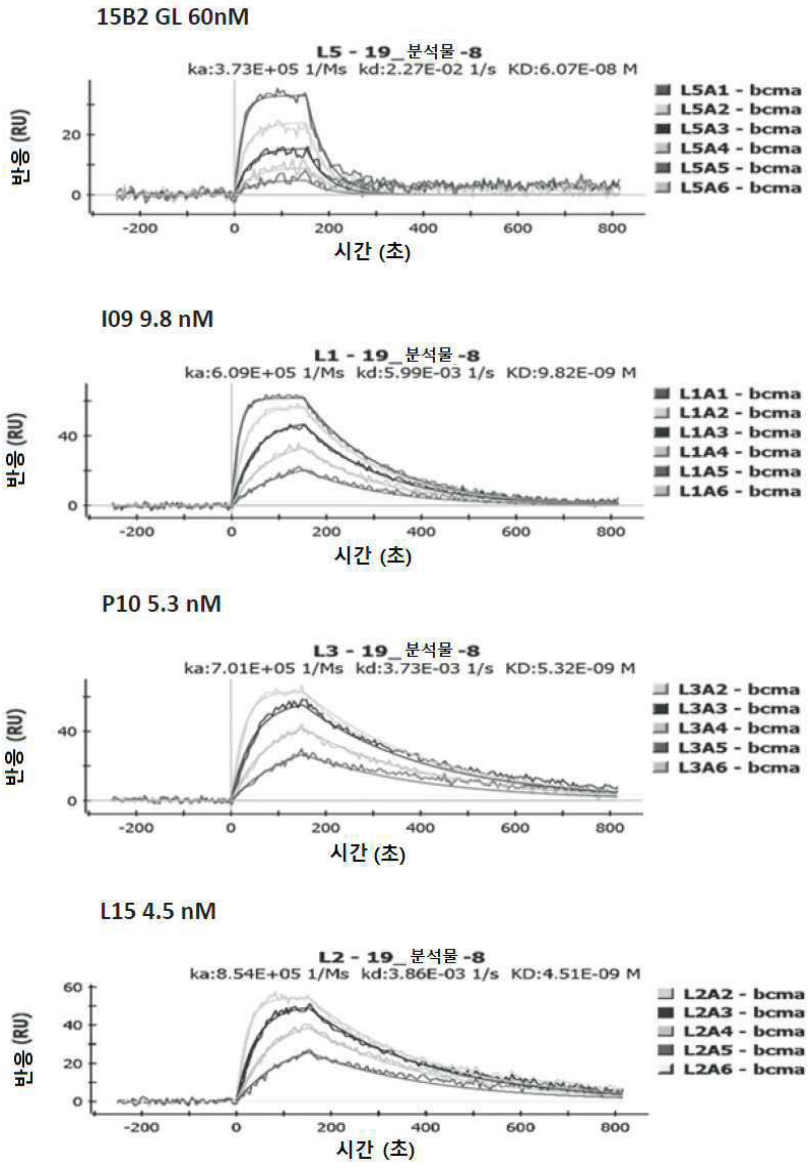
도면11



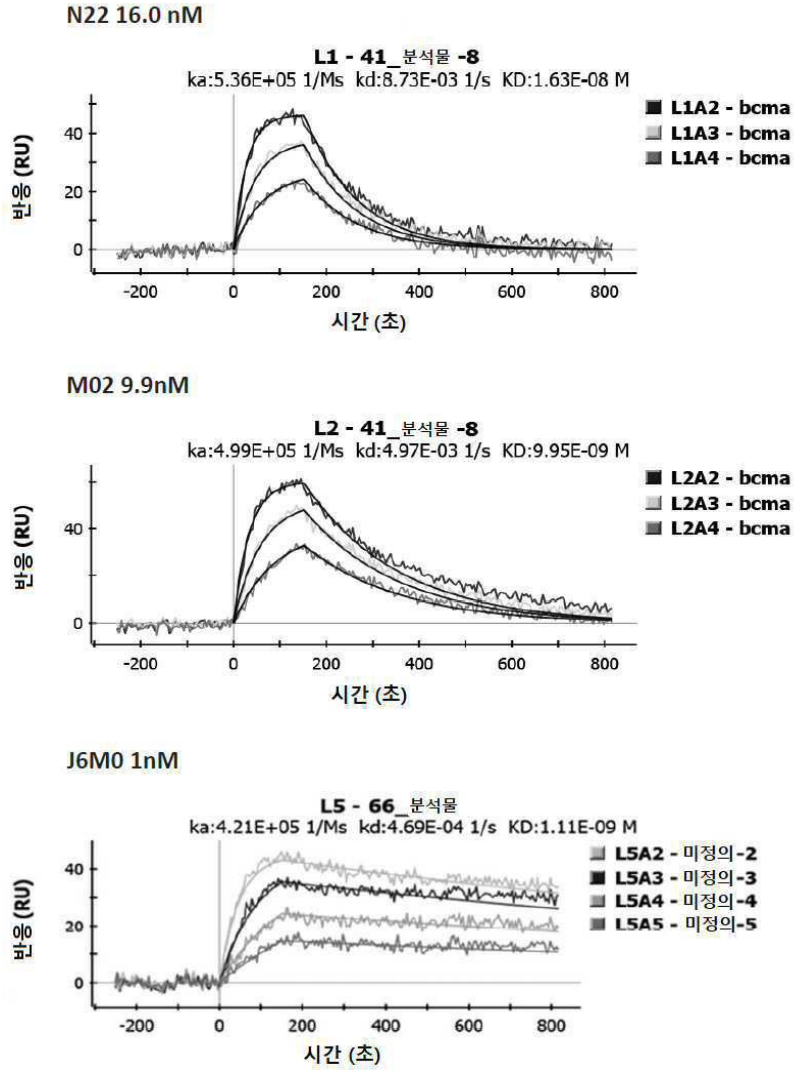
도면12


종양 부피 (mm³)
2000
1500
1000
500
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
이식 후 일수
미처리
IgG1-SG3400 1mpk
IgG1-SG3400 3mpk
15B2GL-SG3400 1mpk
15B2GL-SG3400 3mpk
J6M0-SG3400 1mpk
J6M0-SG3400 3mpk

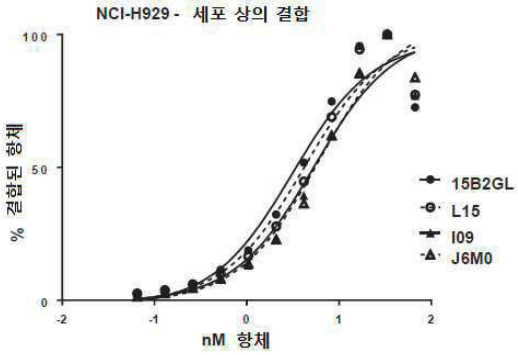
도면13

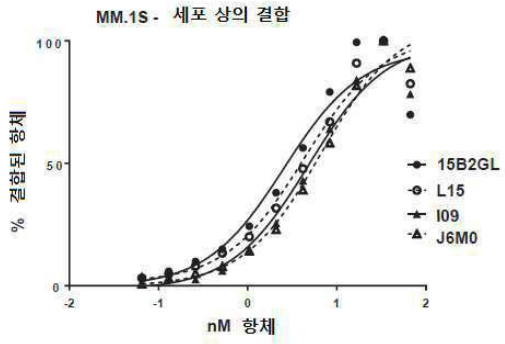

15B2 GL 60nM
L5 - 19_분석물 -8
ka:3.73E+05 1/Ms kd:2.27E-02 1/s KD:6.07E-08 M
반응 (RU)
시간 (초)
L5A1 - bcma
L5A2 - bcma
L5A3 - bcma
L5A4 - bcma
L5A5 - bcma
L5A6 - bcma
I09 9.8 nM
L1 - 19_분석물 -8
ka:6.09E+05 1/Ms kd:5.99E-03 1/s KD:9.82E-09 M
L1A1 - bcma
L1A2 - bcma
L1A3 - bcma
L1A4 - bcma
L1A5 - bcma
L1A6 - bcma
P10 5.3 nM
L3 - 19_분석물 -8
ka:7.01E+05 1/Ms kd:3.73E-03 1/s KD:5.32E-09 M
L3A2 - bcma
L3A3 - bcma
L3A4 - bcma
L3A5 - bcma
L3A6 - bcma
L15 4.5 nM
L2 - 19_분석물 -8
ka:8.54E+05 1/Ms kd:3.86E-03 1/s KD:4.51E-09 M
L2A2 - bcma
L2A3 - bcma
L2A4 - bcma
L2A5 - bcma
L2A6 - bcma

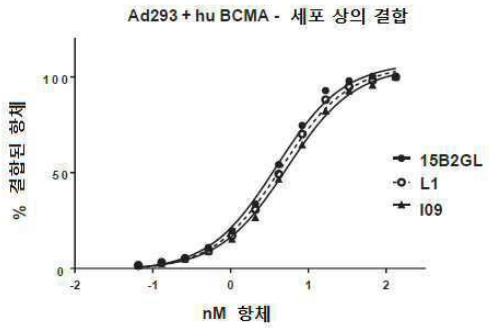
도면14


N22 16.0 nM
L1 - 41_분석물 -8
ka:5.36E+05 1/Ms kd:8.73E-03 1/s KD:1.63E-08 M
L1A2 - bcma
L1A3 - bcma
L1A4 - bcma
반응 (RU)
시간 (초)
M02 9.9nM
L2 - 41_분석물 -8
ka:4.99E+05 1/Ms kd:4.97E-03 1/s KD:9.95E-09 M
L2A2 - bcma
L2A3 - bcma
L2A4 - bcma
반응 (RU)
시간 (초)
J6M0 1nM
L5 - 66_분석물
ka:4.21E+05 1/Ms kd:4.69E-04 1/s KD:1.11E-09 M
L5A2 - 미정의-2
L5A3 - 미정의-3
L5A4 - 미정의-4
L5A5 - 미정의-5
반응 (RU)
시간 (초)

도면15







서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> MEDIMMUNE, LLC

<120> BCMA MONOCLONAL ANTIBODY-DRUG CONJUGATE

<130> BCMA-100-WO-PCT

<150> 62/596194

<151> 2017-12-08

<150> 62/539825

<151> 2017-08-01

<160> 20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 1

Ser Tyr Ser Met Asn

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 2

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

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 3

Gly Gly Asn Tyr Tyr Val Glu Tyr Phe Gln Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Ser Asn Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 5

Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 6

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Ile Thr

1 5

<210> 7

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 7

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 Arg 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 Gly Ser Ser Asn 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 Gly Asn Tyr Tyr Val Glu Tyr Phe Gln Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 8

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 Tyr Ile Ser Ser Asn
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 Asn 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 Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 9
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 9

Glu Ile 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 Arg 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 Gly Ser Ser Asn 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 Leu Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Gly Asn Tyr Tyr Val Glu Tyr Phe Gln Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 10

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 10

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 Tyr Ile Ser Ser Asn

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 Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 11

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 11

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 Gly Ser Ser Asn 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 Gly Asn Tyr Phe Val Glu Tyr Phe Gln Gln Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 12

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 12

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 Tyr Ile Ser Ser Asn
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 Asn 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 Ser Ser Asp Pro
85 90 95

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

<210> 13
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 13
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 Gly Gln Ser Asn 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 Gly Asn Tyr Phe Val Glu Tyr Phe Gln Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 14

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 14

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 Tyr Ile Ser Ser Asn

20 25 30

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

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn 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 Ala Asp Ser Pro

85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 15

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 15

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 Gly Gln Ser Asn 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 Gly Asn Tyr Tyr Val Glu Tyr Phe Gln Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 16
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 Tyr Ile Ser Ser Asn
20 25 30
Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn 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 Ser Ser Asp Pro
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 17

<

211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 17

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 Gly Ser Ser Asn 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 Gly Asn Tyr Phe Val Glu Tyr Phe Gln Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 18

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 18

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 Tyr Ile Ser Ser Asn
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 Asn 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 Ser Ser Ser Pro
85 90 95
Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 19
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic

<400> 19
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 Arg 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 Gly Gln Ser Asn 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 Gly Asn Tyr Tyr Val Glu Tyr Phe Gln Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 20

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 20

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 Tyr Ile Ser Ser Asn
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 Asn 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 Thr Asp Ser Pro
85 90 95

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