



공개특허 10-2023-0108288



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0108288
(43) 공개일자 2023년07월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/46 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/46 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7019446
- (22) 출원일자(국제) 2021년11월15일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2023년06월09일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2021/041839
- (87) 국제공개번호 WO 2022/102768
국제공개일자 2022년05월19일
- (30) 우선권주장
JP-P-2020-189988 2020년11월16일 일본(JP)
- (71) 출원인
아스텔라스세이야쿠 가부시키가이샤
일본 도쿄도 츠오쿠 니혼바시혼초 2초메 5반 1고
국립연구개발법인 고쿠리즈간켄큐센터
일본국 도쿄도 츠오쿠 츠키지 5-1-1
- (72) 발명자
덴다 요시유키
일본 도쿄도 츠오쿠 니혼바시혼초 2초메 5반 1고
아스텔라스세이야쿠 가부시키가이샤 내
유리 마사토시
일본 도쿄도 츠오쿠 니혼바시혼초 2초메 5반 1고
아스텔라스세이야쿠 가부시키가이샤 내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
제일특허법인(유)

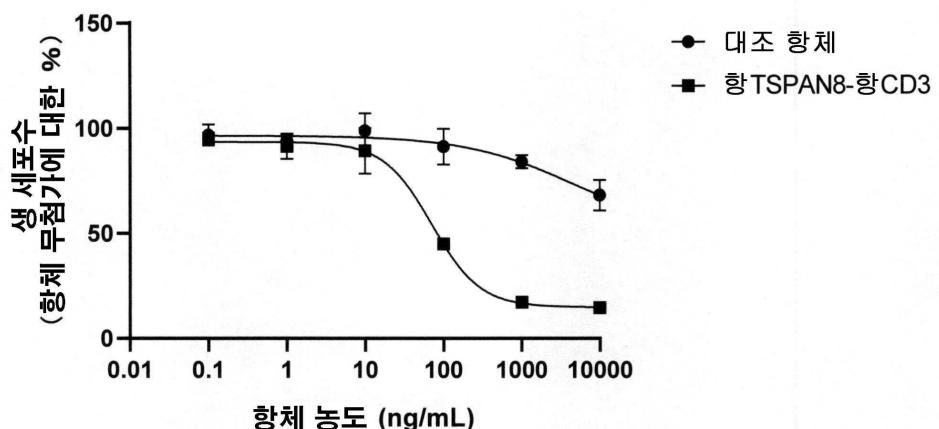
전체 청구항 수 : 총 55 항

(54) 발명의 명칭 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체 및 항TSPAN8 항체

(57) 요 약

본 발명의 과제는, 인간의 치료 또는 예방에 이용할 수 있는 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체 및 항TSPAN8 항체를 제공하는 것이다. 환자로부터 단리한 암 복막 파종 세포를 인간 모노클로날 항체 산생 마우스에 면역하여, 암 복막 파종 세포에 선택적인 결합을 나타낸 16B11 항체 및 16B12 항체를 취득했다. 이들 항체는, TSPAN8의 아미노산 번호 126~155의 영역에 결합하는 항TSPAN8 항체이며, 암 복막 파종 세포에 발현하는 TSPAN8에 대해서 강한 결합 활성을 나타냈다. 더욱이, 16B11의 서열에 기초하여 제작한 항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체는, *in vitro*에 있어서 TSPAN8 발현 암 세포에 대한 세포 상해 활성을 나타내고, *in vivo*에 있어서 TSPAN8 발현 암 세포 담암 마우스에 대한 항종양 작용 및 복막 파종 모델 마우스의 생존 기간을 연장했다.

대 표 도 - 도10a



(52) CPC특허분류

C07K 16/28 (2013.01)

C07K 16/2809 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

(72) 발명자

야마주쿠 다이스케

일본 도쿄도 주오구 니혼바시혼초 2초메 5반 1고
아스텔라스세이야쿠 가부시키가이샤 내

쓰쓰미 다케시

일본 도쿄도 주오구 니혼바시혼초 2초메 5반 1고
아스텔라스세이야쿠 가부시키가이샤 내

구스자키 유코

일본 도쿄도 주오구 니혼바시혼초 2초메 5반 1고
아스텔라스세이야쿠 가부시키가이샤 내

사사키 히로키

일본 도쿄도 주오구 쓰키지 5초메 1반 1고 국립연구개발법인 고쿠리츠간켄큐센터 내

지와키 후미코

일본 도쿄도 주오구 쓰키지 5초메 1반 1고 국립연구개발법인 고쿠리츠간켄큐센터 내

고마쓰 마사유키

일본 도쿄도 주오구 쓰키지 5초메 1반 1고 국립연구개발법인 고쿠리츠간켄큐센터 내

명세서

청구범위

청구항 1

TSPAN8 및 CD3에 결합하는 이중 특이성 항체로서,

(a) 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 프래그먼트 및 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 Fab 영역,

(b) 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역, 및,

(c) (a)의 Fab 영역의 중쇄 프래그먼트에 연결되는 제1 Fc 폴리펩티드 및 (b)의 항CD3-scFv 영역에 연결되는 제2 Fc 폴리펩티드로 이루어지는 Fc 영역

을 포함하는, 이중 특이성 항체.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역이, 서열 번호 6의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 6의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 6의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하고, 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역이, 서열 번호 8의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 8의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 8의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하거나; 또는,

항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역이, 서열 번호 10의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 10의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 10의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하고, 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역이, 서열 번호 12의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 12의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 12의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는,

이중 특이성 항체.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역이, 서열 번호 6의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지고, 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역이 서열 번호 8의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지거나; 또는,

항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역이, 서열 번호 10의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지고, 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역이 서열 번호 12의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는,

이중 특이성 항체.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

항TSPAN8 항체의 Fab 영역이, 서열 번호 6의 아미노산 번호 1부터 219까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 프래그먼트 및 서열 번호 8의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄로 이루어지거나; 또는,

항TSPAN8 항체의 Fab 영역이, 서열 번호 10의 아미노산 번호 1부터 219까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄

프래그먼트 및 서열 번호 12의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄로 이루어지는,
이중 특이성 항체.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

항CD3 항체의 중쇄 가변 영역이, 서열 번호 14의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 50부터 68까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 101부터 114까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하고, 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역이, 서열 번호 14의 아미노산 번호 168부터 181까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 197부터 203까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 236부터 244까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는, 이중 특이성 항체.

청구항 6

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

항CD3 항체의 중쇄 가변 영역이 서열 번호 14의 아미노산 번호 1부터 125까지의 아미노산 서열로 이루어지고, 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역이 서열 번호 14의 아미노산 번호 146부터 254까지의 아미노산 서열로 이루어지는, 이중 특이성 항체.

청구항 7

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

항CD3-scFv 영역이 서열 번호 14의 아미노산 번호 1부터 254까지의 아미노산 서열로 이루어지는, 이중 특이성 항체.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

해당 이중 특이성 항체는, 서열 번호 6의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 6의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 6의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄, 서열 번호 8의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 8의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 8의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄, 및, 서열 번호 14의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 50부터 68까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 101부터 114까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 168부터 181까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 197부터 203까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 236부터 244까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 포함하거나; 또는,

해당 이중 특이성 항체는, 서열 번호 10의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 10의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 10의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄, 서열 번호 12의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 12의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 12의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄, 및, 서열 번호 14의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 50부터 68까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 101부터 114까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 168부터 181까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 197부터 203까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 236부터 244까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 포함하거나; 또는,

CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 197부터 203까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 236부터 244까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 포함하는,

이중 특이성 항체.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

해당 이중 특이성 항체는, 서열 번호 6의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄, 서열 번호 8의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄, 및, 서열 번호 14의 아미노산 번호 1부터 125까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 146부터 254까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 포함하거나; 또는,

해당 이중 특이성 항체는, 서열 번호 10의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄, 서열 번호 12의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄, 및, 서열 번호 14의 아미노산 번호 1부터 125까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 146부터 254까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 포함하는,

이중 특이성 항체.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

LALA 변이(L234A 및 L235A(여기에서, 상기 변이 위치는 인간 Ig γ 1 정상 영역에 있어서의 EU 인덱스에 따르는 아미노산 위치이다))를 포함하는 Fc 영역을 포함하는, 이중 특이성 항체.

청구항 11

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서,

N297G 변이(여기에서, 상기 변이 위치는 인간 Ig γ 1 정상 영역에 있어서의 EU 인덱스에 따르는 아미노산 위치이다)를 포함하는 Fc 영역을 포함하는, 이중 특이성 항체.

청구항 12

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서,

노브즈 인투 홀즈(Knobs into holes) 변이를 포함하는 Fc 영역을 포함하는, 이중 특이성 항체.

청구항 13

제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 있어서,

LALA 변이, N297G 변이, 및 노브즈 인투 홀즈 변이를 포함하는 Fc 영역을 포함하는, 이중 특이성 항체.

청구항 14

제 12 항 또는 제 13 항에 있어서,

노브즈 인투 홀즈 변이가, Fc 영역을 형성하는 1개의 Fc 폴리펩티드에 있어서의 T366W 변이, 및 Fc 영역을 형성하는 다른 1개의 Fc 폴리펩티드에 있어서의 T366S, L368A 및 Y407V 변이인(여기에서, 상기 변이 위치는 인간 Ig γ 1 정상 영역에 있어서의 EU 인덱스에 따르는 아미노산 위치이다), 이중 특이성 항체.

청구항 15

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 있어서,

제1 Fc 폴리펩티드가 서열 번호 6의 235부터 451까지의 아미노산 서열로 이루어지고, 제2 Fc 폴리펩티드가 서열 번호 14의 270부터 486까지의 아미노산 서열로 이루어지는 Fc 영역을 포함하는, 이중 특이성 항체.

청구항 16

제 1 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항에 있어서,

항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 헌지 영역을 개재시켜 연결되고, 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 헌지 영역을 개재시켜 연결되어 있는, 이중 특이성 항체.

청구항 17

제 1 항에 있어서,

서열 번호 6의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄, 서열 번호 8의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄, 및 서열 번호 14의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3-scFv 영역과 제2 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 포함하는, 이중 특이성 항체.

청구항 18

제 2 항 내지 제 17 항 중 어느 한 항에 있어서,

번역후 수식된, 이중 특이성 항체.

청구항 19

제 18 항에 있어서,

번역후 수식이, 중쇄 가변 영역 N말단의 파이로글루타밀화 및/또는 중쇄 C말단 리신 결실인, 이중 특이성 항체.

청구항 20

하기 (a)~(e)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드:

(a) 서열 번호 6의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,

(b) 서열 번호 8의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,

(c) 서열 번호 10의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,

(d) 서열 번호 12의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,

(e) 서열 번호 14의 아미노산 번호 1부터 125까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 146부터 254까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 21

하기 (a)~(c)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드:

(a) 서열 번호 6의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,

(b) 서열 번호 8의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,

(c) 서열 번호 14의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 22

제 20 항 또는 제 21 항에 기재된 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 발현 벡터.

청구항 23

제 22 항에 기재된 발현 벡터로 형질 전환된, 숙주 세포.

청구항 24

서열 번호 6의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 서열 번호 8의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 및, 서열 번호 14의 아미노산 번호 1부터 125까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 146부터 254까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 25

서열 번호 6의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 서열 번호 8의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 및, 서열 번호 14의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 26

TSPAN8 및 CD3에 결합하는 이중 특이성 항체의 생산 방법으로서, 제 23 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항에 기재된 숙주 세포를 배양하는 공정을 포함하는, 생산 방법.

청구항 27

제 1 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항에 기재된 이중 특이성 항체 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는, 의약 조성물.

청구항 28

제 1 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항에 있어서,

암의 치료에 사용하기 위한, 이중 특이성 항체.

청구항 29

제 27 항에 있어서,

암의 치료를 위한, 의약 조성물.

청구항 30

제 1 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항에 기재된 이중 특이성 항체의 치료 유효량을 대상에게 투여하는 공정을 포함하는, 암을 치료하는 방법.

청구항 31

암의 치료를 위한 의약 조성물의 제조에 있어서의, 제 1 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항에 기재된 이중 특이성 항체의 사용.

청구항 32

인간 TSPAN8 발현 암 세포에 선택적으로 결합하는 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트.

청구항 33

서열 번호 2의 아미노산 번호 126부터 155까지 인간 TSPAN8의 영역에 존재하는 적어도 1개의 아미노산에 결합하는, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트.

청구항 34

제 33 항에 있어서,

상기 인간 TSPAN8의 영역에 존재하는 적어도 서열 번호 2의 아미노산 번호 131의 아미노산에 결합하는, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트.

청구항 35

하기 (a) 및 (b)로부터 선택되는 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트:

(a) 서열 번호 4의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 4의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및, 서열 번호 8의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 8의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 8의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트;

(b) 서열 번호 10의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 10의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 10의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및, 서열 번호 12의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 12의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 12의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트.

청구항 36

제 35 항에 있어서,

하기 (a) 및 (b)로부터 선택되는, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트:

(a) 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역, 및, 서열 번호 8의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트;

(b) 서열 번호 10의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역, 및, 서열 번호 12의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트.

청구항 37

제 35 항에 있어서,

하기 (a) 및 (b)로부터 선택되는, 항TSPAN8 항체:

(a) 서열 번호 4의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 및 서열 번호 8의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄를 포함하는, 항TSPAN8 항체;

(b) 서열 번호 10의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 및 서열 번호 12의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄를 포함하는, 항TSPAN8 항체.

청구항 38

인간 TSPAN8 발현 암 세포에 대한 결합에 관해서 제 33 항 내지 제 37 항 중 어느 한 항에 기재된 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트와 경합하는, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트.

청구항 39

제 32 항 내지 제 38 항 중 어느 한 항에 있어서,

T 세포 또는 NK 세포의 표면 항원에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트와 연결된, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트.

청구항 40

제 39 항에 있어서,

T 세포의 표면 항원이 CD3인, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트.

청구항 41

제 40 항에 있어서,

T 세포의 표면 항원에 대한 항원 결합 프래그먼트가 항CD3 항체의 scFv인, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트.

청구항 42

제 32 항 내지 제 41 항 중 어느 한 항에 있어서,

번역후 수식된, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트.

청구항 43

제 42 항에 있어서,

번역후 수식이, 중쇄 가변 영역 N말단의 파이로글루타밀화 및/또는 중쇄 C말단 리신 결실인, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트.

청구항 44

제 32 항 내지 제 43 항 중 어느 한 항에 기재된 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트의 융합체, 또는 복합체, 혹은 제 32 항 내지 제 43 항 중 어느 한 항에 기재된 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트를 세포 표면에 발현시킨 세포.

청구항 45

하기 (a)~(d)로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 폴리뉴클레오티드:

(a) 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,

(b) 서열 번호 8의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,

(c) 서열 번호 10의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,

(d) 서열 번호 12의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 46

하기 (a)~(d)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드:

- (a) 서열 번호 4의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,
- (b) 서열 번호 8의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,
- (c) 서열 번호 10의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,
- (d) 서열 번호 12의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 47

제 45 항 또는 제 46 항에 기재된 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 발현 벡터.

청구항 48

제 47 항에 기재된 발현 벡터로 형질 전환된, 숙주 세포.

청구항 49

하기 (a) 또는 (b)로부터 선택되는, 숙주 세포:

- (a) 제 45 항에 기재된 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 및 제 45 항에 기재된 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 숙주 세포;
- (b) 제 46 항에 기재된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 및 제 46 항에 기재된 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 50

항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트의 생산 방법으로서, 제 48 항 또는 제 49 항의 어느 숙주 세포를 배양하는 공정을 포함하는, 생산 방법.

청구항 51

암의 치료에 사용하기 위한, 제 32 항 내지 제 43 항 중 어느 한 항에 기재된 항TSPAN8 항체 혹은 그의 항원 결합 프래그먼트, 또는 제 44 항에 기재된 융합체, 복합체 혹은 세포.

청구항 52

제 32 항 내지 제 43 항 중 어느 한 항에 기재된 항TSPAN8 항체 혹은 그의 항원 결합 프래그먼트, 또는 제 44 항에 기재된 융합체, 복합체 혹은 세포를 포함하고, 추가로 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는, 의약 조성물.

청구항 53

제 52 항에 있어서,

암의 치료를 위한, 의약 조성물.

청구항 54

제 32 항 내지 제 43 항 중 어느 한 항에 기재된 항TSPAN8 항체 혹은 그의 항원 결합 프래그먼트의 치료 유효량을 대상에게 투여하는 공정, 또는 제 44 항에 기재된 융합체, 복합체 혹은 세포의 치료 유효량을 대상에게 투여하는 공정을 포함하는, 암을 치료하는 방법.

청구항 55

암의 치료를 위한 의약 조성물의 제조에 있어서의, 제 32 항 내지 제 43 항 중 어느 한 항에 기재된 항TSPAN8 항체 혹은 그의 항원 결합 프래그먼트의 사용, 또는 제 44 항에 기재된 융합체, 복합체 혹은 세포의 사용.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은, 인간의 치료에 이용하는 의약 조성물의 유효 성분으로서 유용한 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체 및 항TSPAN8 항체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

전이성 위암이란, 원발성 위암이 근종보다 깊게 침윤하여, 위벽을 싸는 장막을 끊고, 림프절이나 복강, 더욱이 혈액이나 림프액을 개재시켜 여러 가지 장기에 전이된 상태를 말하고, 전이성 위암 환자의 반수 이상의 환자에서 복강에의 파종이 인정된다. 말기의 환자에서는, 복막 파종에 의해 야기된 복수 저류를 원인으로 하는 복부의 부종, 계속적인 팽만감, 통증, 구토, 호흡 곤란, 불면증 및 피로 등의 증상이 알려져 있다(World J. Gastroenterol., 2016, Vol. 22, p. 6829-6840, Int. J. Cancer, 2010, Vol. 127, p. 2209-2221). 그렇지만, 위암 복막 파종 환자의 수술에 의한 완전한 치유는 곤란하고, 위암 복막 파종의 표준 요법인 화학요법도 유효성이 충분하지는 않기 때문에, 이들 환자의 5년 생존율은 약 2%로 매우 예후가 나빠, 위암 복막 파종에 대한 유효한 치료법이 요망되고 있다. 또한, 복막 파종은, 난소암·대장암·췌장암 등을 원발로 하는 많은 암 환자에서도 인정되고 있고(Int. J. Adv. Res., 2016, Vol. 4, p. 735-748), 이들 환자에 대한 치료법도 확립되어 있지 않다.

[0003]

암 치료용 항체의 개발에 있어서, 암 세포에 선택적인 발현을 나타내는 종양 관련 항원(Tumor Associated Antigen; TAA)을 여러 가지 방법에 의해 동정하는 시도가 이루어지고 있다. 그 방법의 하나로서, 암 세포를 동물에 면역하여 항체를 제작하여, 암 세포에 발현하는 TAA에 결합하는 항체를 취득하는 방법이 보고되어 있다(Biochem. Biophys. Res. Commun., 2018, Vol. 505, p. 181e-186, FEBS Open Bio, 2017, Vol. 7, p. 627-635).

[0004]

테트라스파닌 8(Tetraspanin-8; TSPAN8)은 테트라스파닌 패밀리에 속하는 4회 막관통 단백질이며, 소세포외 루프(small extracellular loop; SEL)와 대세포외 루프(large extracellular loop; LEL)라고 하는 2개의 세포외 루프 영역과 3개의 세포질 도메인을 갖고, 토대 단백질로서 다종 다양한 막관통 단백질 및 세포질 단백질을 갖는 분자 클러스터를 형성한다. TSPAN8은 세포 접착, 세포 운동성, 세포의 활성화 및 증식 등에 대해서 관여함이 알려져 있고, 위암, 췌암, 대장암, 간장암 등에서 고발현이 인정되어, TSPAN8 발현 항진과 암의 진전 또는 전이의 관련성 등이 보고되어 있다(비특허문헌 1). 항TSPAN8 항체를 이용한 암의 진단이나 치료를 목표로 한 연구가 행해지고 있다(특허문헌 1~2, 및 비특허문헌 1~2).

[0005]

분화 항원군 3(Cluster of Differentiation 3; CD3)은, T 세포 표면에 있어서 T 세포 수용체(T cell receptor; TCR)와 복합체를 형성하는 것에 의해 T 세포에 활성화 시그널을 전달하는 단백질이다. CD3은, 감마(γ), 엘타(δ), 입실론(ϵ), 제타(ζ) 및 에타(η)쇄의 5종류의 서브유닛으로 이루어지는 복합체이며, 각 서브유닛은 ϵ γ , ϵ δ , ζ ζ 의 3종류의 2량체를 형성한다. CD3은 정상 T 세포 및 종양성 T 세포의 어느 것에도 발현하고 있으므로 T 세포의 마커로서 사용되고 있고, 또한, 암의 치료를 목적으로 한 각종 항TAA 항체와 항CD3 항체를 포함하는 이중 특성 항체의 의약품으로서의 응용이 여러 가지 보고되어 있다(비특허문헌 3).

[0006]

낮은 항체 농도로 암 세포 선택적인 세포 상해 활성을 얻을 수 있는 획기적인 방법으로서, 여러 가지 항체 포맷으로 이루어지는 이중 특이성 T 세포 리크루트 항체(bispecific T-cell-recruiting antibodies)가 보고되어 있고, T 세포 매개성 면역 요법에 대한 그들 항체의 효과가 검토되고 있다(비특허문헌 4). 이중 특이성 T 세포 리크루트 항체는, 암 세포 표면에 발현하는 TAA에 대한 항체와, T 세포에 결합하는 항체를 포함하는 이중 특이성 항체이다. T 세포에 결합하는 항체로서는, 항CD3 항체가 많이 이용되고 있다. 항TAA와 항CD3 항체를 포함하는 분자의 이중 특이성 T 세포 리크루트 항체는, 표적 암 세포와 세포 상해성 T 세포(Cytotoxic T Lymphocyte; CTL)의 물리적 거리를 접근시켜, 항CD3 항체에 의해 CTL을 활성화하여, CTL의 세포 상해 활성에 의해 암 세포를 살상한다(Redirected T Cell Cytotoxicity; RTCC). 항CD3-항상피 세포 접착 분자(Epithelial

Cell Adhesion Molecule; EpCAM) 이중 특이성 항체인 카투막소마브(catumaxomab)나 항CD3-항CD19(Cluster of Differentiation 19) 이중 특이성 항체인 블리나투모마브(blinatumomab)는 이미 임상에 있어서의 효과가 확인되어 있고(Int. J. Cancer, 2010, Vol. 127, p. 2209-2221, N. Engl. J. Med., 2017, Vol. 376, p. 836-847), 현재도 여러 가지 TAA에 대한 이중 특이성 T 세포 리크루트 항체의 연구 개발이 이루어지고 있다. 그렇지만, 현재까지, 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체는 알려져 있지 않다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007]

(특허문헌 0001) 국제 공개 2012/010696호

(특허문헌 0002) 국제 공개 2015/130115호

비특허문헌

[0008]

(비)특허문헌 0001) 바이오몰리큘즈(Biomolecules), (스위스), 2020; 10(3): p. 383

(비)특허문헌 0002) 캔서즈(Cancers), (스위스), 2019; 11(2): p. 179

(비)특허문헌 0003) 파마콜로지 앤드 쟈라퓨틱스(Pharmacology and Therapeutics), (영국), 2018; 182: p. 161-175

(비)특허문헌 0004) 마브스(mAbs), 2017; 9(2): p. 182-212

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009]

본 발명의 과제는, 인간의 치료에 이용할 수 있는 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체 및 항TSPAN8 항체를 제공하는 것에 있다.

과제의 해결 수단

[0010]

본 발명자들은, 암 세포에 선택적인 치료약의 창제를 목적으로 하여, 환자로부터 단리한 암 복막 과종 세포를 인간 모노클로날 항체 산생 마우스에 면역하여 항체를 추득하는 수법에 의해 항TSPAN8 항체인 16B11 및 16B12를 추득했다(실시예 1). 해당 항체는, 정상 세포에 발현하고 있는 TSPAN8에 비해 암 복막 과종 세포에 발현하고 있는 TSPAN8에 강하게 결합했다(실시예 1~5). 16B11 및 16B12의 에피토프 해석에 의해, 해당 항체는 인간 TSPAN8의 아미노산 번호 126 내지 155의 아미노산 서열로 이루어지는 영역을 에피토프로서 인식하는 것, 더욱이, 인간 TSPAN8의 131번째의 트레오닌이 해당 항체와의 결합에 필수인 것을 알 수 있었다(실시예 4). 또한, 16B11의 Fc 영역을 인간 서열로 한 완전 인간 항체인 16B11.1을 제작하여(실시예 3), 해당 완전 인간 항체가 60As6-Luc/GFP 세포에 대해서 세포 상해 활성을 나타냄을 발견했다(실시예 6).

[0011]

더욱이, T 세포에 의한 항원 선택적인 항종양 활성을 높이기 위해서, 서열 번호 6의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 8의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 1부터 125까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 146부터 254까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역을 포함하는, 항TSPAN8-항CD3 이중 특이적 항체를 제작했다(실시예 7). 이 이중 특이성 항체는, TSPAN8 및 CD3에 결합하여(실시예 8), 세포 표면에 TSPAN8을 발현하는 암 세포에 대해서 세포 상해 활성을 나타내어(실시예 9, 10, 12-1, 12-2), *in vivo*에 있어서 마우스의 생존 기간을 연장하고, 항종양 작용을 발휘함을 확인했다(실시예 11 및 12-3).

[0012]

즉, 본 발명은, 이하의 [1] ~ [55]에 관한 것이다.

- [0013] [1] TSPAN8 및 CD3에 결합하는 이중 특이성 항체로서,
- [0014] (a) 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 프래그먼트 및 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 Fab 영역,
- [0015] (b) 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역, 및,
- [0016] (c) (a)의 Fab 영역의 중쇄 프래그먼트에 연결되는 제1 Fc 폴리펩티드 및 (b)의 항CD3-scFv 영역에 연결되는 제2 Fc 폴리펩티드로 이루어지는 Fc 영역
- [0017] 을 포함하는, 이중 특이성 항체.
- [0018] [2] [1]에 기재된 이중 특이성 항체로서,
- [0019] 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역이, 서열 번호 6의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 6의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 6의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하고, 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역이, 서열 번호 8의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 8의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 8의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하거나; 또는,
- [0020] 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역이, 서열 번호 10의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 10의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 10의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하고, 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역이, 서열 번호 12의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 12의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 12의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는,
- [0021] 이중 특이성 항체.
- [0022] [3] [1]에 기재된 이중 특이성 항체로서,
- [0023] 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역이, 서열 번호 6의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지고, 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역이 서열 번호 8의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지거나; 또는,
- [0024] 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역이, 서열 번호 10의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지고, 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역이 서열 번호 12의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는,
- [0025] 이중 특이성 항체.
- [0026] [4] [1]에 기재된 이중 특이성 항체로서,
- [0027] 항TSPAN8 항체의 Fab 영역이, 서열 번호 6의 아미노산 번호 1부터 219까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 프래그먼트 및 서열 번호 8의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄로 이루어지거나; 또는,
- [0028] 항TSPAN8 항체의 Fab 영역이, 서열 번호 10의 아미노산 번호 1부터 219까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 프래그먼트 및 서열 번호 12의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄로 이루어지는,
- [0029] 이중 특이성 항체.
- [0030] [5] 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역이, 서열 번호 14의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 50부터 68까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 101부터 114까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하고, 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역이, 서열 번호 14의 아미노산 번호 168부터 181까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 197부터 203까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 236부터 244까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는, [1] ~ [4] 중 어느 한 항에 기재된 이중 특이성 항체.
- [0031] [6] 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역이 서열 번호 14의 아미노산 번호 1부터 125까지의 아미노산 서열로 이루어

지고, 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역이 서열 번호 14의 아미노산 번호 146부터 254까지의 아미노산 서열로 이루어지는, [1] ~ [4] 중 어느 한 항에 기재된 이중 특이성 항체.

[0032] [7] 항CD3-scFv 영역이 서열 번호 14의 아미노산 번호 1부터 254까지의 아미노산 서열로 이루어지는, [1] ~ [4] 중 어느 한 항에 기재된 이중 특이성 항체.

[0033] [8] [1]에 기재된 이중 특이성 항체로서,

[0034] 해당 이중 특이성 항체는, 서열 번호 6의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 6의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 6의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄, 서열 번호 8의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 8의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 8의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄, 및, 서열 번호 14의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 50부터 68까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 101부터 114까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 168부터 181까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 197부터 203까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 236부터 244까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 포함하거나; 또는,

[0035] 해당 이중 특이성 항체는, 서열 번호 10의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 10의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 10의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄, 서열 번호 12의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 12의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 12의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄, 및, 서열 번호 14의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 50부터 68까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 101부터 114까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 168부터 181까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 197부터 203까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 236부터 244까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 포함하는,

[0036] 이중 특이성 항체.

[0037] [9] [1]에 기재된 이중 특이성 항체로서,

[0038] 해당 이중 특이성 항체는, 서열 번호 6의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄, 서열 번호 8의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄, 및, 서열 번호 14의 아미노산 번호 1부터 125까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 146부터 254까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 포함하거나; 또는,

[0039] 해당 이중 특이성 항체는, 서열 번호 10의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄, 서열 번호 12의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄, 및, 서열 번호 14의 아미노산 번호 1부터 125까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 146부터 254까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 포함하는,

[0040] 이중 특이성 항체.

[0041] [10] LALA 변이(L234A 및 L235A(여기에서, 상기 변이 위치는 인간 Ig γ 1 정상 영역에 있어서의 EU 인덱스에

따르는 아미노산 위치이다)를 포함하는 Fc 영역을 포함하는, [1] ~ [9] 중 어느 한 항에 기재된 이중 특이성 항체.

[0042] [11] N297G 변이(여기에서, 상기 변이 위치는 인간 Igγ1 정상 영역에 있어서의 EU 인덱스에 따르는 아미노산 위치이다)를 포함하는 Fc 영역을 포함하는, [1] ~ [10] 중 어느 한 항에 기재된 이중 특이성 항체.

[0043] [12] 노브즈 인투 홀즈(Knobs into holes) 변이를 포함하는 Fc 영역을 포함하는, [1] ~ [11] 중 어느 한 항에 기재된 이중 특이성 항체.

[0044] [13] LALA 변이, N297G 변이, 및 노브즈 인투 홀즈 변이를 포함하는 Fc 영역을 포함하는, [1] ~ [12] 중 어느 한 항에 기재된 이중 특이성 항체.

[0045] [14] 노브즈 인투 홀즈 변이가, Fc 영역을 형성하는 1개의 Fc 폴리펩티드에 있어서의 T366W 변이, 및 Fc 영역을 형성하는 다른 1개의 Fc 폴리펩티드에 있어서의 T366S, L368A 및 Y407V 변이인(여기에서, 상기 변이 위치는 인간 Igγ1 정상 영역에 있어서의 EU 인덱스에 따르는 아미노산 위치이다), [12] 또는 [13]에 기재된 이중 특이성 항체.

[0046] [15] 제1 Fc 폴리펩티드가 서열 번호 6의 235부터 451까지의 아미노산 서열로 이루어지고, 제2 Fc 폴리펩티드가 서열 번호 14의 270부터 486까지의 아미노산 서열로 이루어지는 Fc 영역을 포함하는, [1] ~ [14] 중 어느 한 항에 기재된 이중 특이성 항체.

[0047] 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 헌지 영역을 개재시켜 연결되고, 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 헌지 영역을 개재시켜 연결되어 있는, [1] ~ [15] 중 어느 한 항에 기재된 이중 특이성 항체.

[0048] [17] [1]에 기재된 이중 특이성 항체로서,

서열 번호 6의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄, 서열 번호 8의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄, 및 서열 번호 14의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3-scFv 영역과 제2 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 포함하는, 이중 특이성 항체.

[0050] [18] 번역후 수식된, [2] ~ [17] 중 어느 한 항에 기재된 이중 특이성 항체.

[0051] [19] 번역후 수식이, 중쇄 가변 영역 N말단의 파이로글루타밀화 및/또는 중쇄 C말단 리신 결실인, [18]에 기재된 이중 특이성 항체.

[0052] 하기 (a)~(e)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드:

[0053] (a) 서열 번호 6의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,

[0054] (b) 서열 번호 8의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,

[0055] (c) 서열 번호 10의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,

[0056] (d) 서열 번호 12의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,

[0057] (e) 서열 번호 14의 아미노산 번호 1부터 125까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 146부터 254까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

[0058] 하기 (a)~(c)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드:

[0059] (a) 서열 번호 6의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결

된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,

[0060] (b) 서열 번호 8의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,

[0061] (c) 서열 번호 14의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

[0062] [22] [20] 또는 [21]에 기재된 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 발현 벡터.

[0063] [23] [22]에 기재된 발현 벡터로 형질 전환된, 숙주 세포.

[0064] [24] 서열 번호 6의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 서열 번호 8의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 및, 서열 번호 14의 아미노산 번호 1부터 125까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 146부터 254까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 숙주 세포.

[0065] [25] 서열 번호 6의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 서열 번호 8의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 및, 서열 번호 14의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 숙주 세포.

[0066] [26] TSPAN8 및 CD3에 결합하는 이중 특이성 항체의 생산 방법으로서, [23] ~ [25] 중 어느 한 항에 기재된 숙주 세포를 배양하는 공정을 포함하는, 생산 방법.

[0067] [27] [1] ~ [19] 중 어느 한 항에 기재된 이중 특이성 항체 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는, 의약 조성물.

[0068] [28] 암의 치료에 사용하기 위한, [1] ~ [19] 중 어느 한 항에 기재된 이중 특이성 항체.

[0069] [29] 암의 치료를 위한, [27]에 기재된 의약 조성물.

[0070] [30] [1] ~ [19] 중 어느 한 항에 기재된 이중 특이성 항체의 치료 유효량을 대상에게 투여하는 공정을 포함하는, 암을 치료하는 방법.

[0071] [31] 암의 치료를 위한 의약 조성물의 제조에 있어서의, [1] ~ [19] 중 어느 한 항에 기재된 이중 특이성 항체의 사용.

[0072] [32] 인간 TSPAN8 발현 암 세포에 선택적으로 결합하는 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트.

[0073] [33] 서열 번호 2의 아미노산 번호 126부터 155까지의 인간 TSPAN8의 영역에 존재하는 적어도 1개의 아미노산에 결합하는, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트.

[0074] [34] [33]에 기재된 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트로서, 상기 인간 TSPAN8의 영역에 존재하는 적어도 서열 번호 2의 아미노산 번호 131의 아미노산에 결합하는, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트.

[0075] [35] 하기 (a) 및 (b)로부터 선택되는 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트:

(a) 서열 번호 4의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 4의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및, 서열 번호 8의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 8의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 8의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트;

- [0077] (b) 서열 번호 10의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 10의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 10의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및, 서열 번호 12의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 12의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 12의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트.
- [0078] [36] 하기 (a) 및 (b)로부터 선택되는, [35]에 기재된 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트:
- [0079] (a) 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역, 및, 서열 번호 8의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트;
- [0080] (b) 서열 번호 10의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역, 및, 서열 번호 12의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트.
- [0081] [37] 하기 (a) 및 (b)로부터 선택되는, [35]에 기재된 항TSPAN8 항체:
- [0082] (a) 서열 번호 4의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 및 서열 번호 8의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄를 포함하는, 항TSPAN8 항체;
- [0083] (b) 서열 번호 10의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 및 서열 번호 12의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄를 포함하는, 항TSPAN8 항체.
- [0084] [38] 인간 TSPAN8 발현 암 세포에 대한 결합에 관해서 [33] ~ [37] 중 어느 한 항에 기재된 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트와 경합하는, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트.
- [0085] [39] T 세포 또는 NK 세포의 표면 항원에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트와 연결된, [32] ~ [38] 중 어느 한 항에 기재된 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트.
- [0086] [40] T 세포의 표면 항원이 CD3인, [39]에 기재된 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트.
- [0087] [41] T 세포의 표면 항원에 대한 항원 결합 프래그먼트가 항CD3 항체의 scFv인, [40]에 기재된 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트.
- [0088] [42] 번역후 수식된, [32] ~ [41] 중 어느 한 항에 기재된 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트.
- [0089] [43] 번역후 수식이, 중쇄 가변 영역 N말단의 파이로글루타밀화 및/또는 중쇄 C말단 리신 결실인, [42]에 기재된 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트.
- [0090] [44] [32] ~ [43] 중 어느 한 항에 기재된 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트의 융합체 또는 복합체, 혹은 [32] ~ [43] 중 어느 한 항에 기재된 항TSPAN8 또는 그의 항원 결합 프래그먼트를 세포 표면에 발현시킨 세포.
- [0091] [45] 하기 (a)~(d)로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 폴리뉴클레오티드:
- [0092] (a) 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,
- [0093] (b) 서열 번호 8의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,
- [0094] (c) 서열 번호 10의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,
- [0095] (d) 서열 번호 12의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0096] [46] 하기 (a)~(d)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드:

- [0097] (a) 서열 번호 4의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,
- [0098] (b) 서열 번호 8의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,
- [0099] (c) 서열 번호 10의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,
- [0100] (d) 서열 번호 12의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0101] [47] [45] 또는 [46]에 기재된 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 발현 벡터.
- [0102] [48] [47]에 기재된 발현 벡터로 형질 전환된, 숙주 세포.
- [0103] [49] 하기 (a) 또는 (b)로부터 선택되는, 숙주 세포:
- [0104] (a) [45]에 기재된 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 및 [45]에 기재된 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 숙주 세포;
- [0105] (b) [46]에 기재된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 및 [46]에 기재된 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 숙주 세포.
- [0106] [50] 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트의 생산 방법으로서, [48] 또는 [49] 중 어느 하나의 숙주 세포를 배양하는 공정을 포함하는, 생산 방법.
- [0107] [51] 암의 치료에 사용하기 위한, [32] ~ [43] 중 어느 한 항에 기재된 항TSPAN8 항체 혹은 그의 항원 결합 프래그먼트, 또는 [44]에 기재된 융합체, 복합체 혹은 세포.
- [0108] [52] [32] ~ [43] 중 어느 한 항에 기재된 항TSPAN8 항체 혹은 그의 항원 결합 프래그먼트, 또는 [44]에 기재된 융합체, 복합체 혹은 세포를 포함하고, 추가로 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는, 의약 조성물.
- [0109] [53] 암의 치료를 위한, [52]에 기재된 의약 조성물.
- [0110] [54] [32] ~ [43] 중 어느 한 항에 기재된 항TSPAN8 항체 혹은 그의 항원 결합 프래그먼트의 치료 유효량을 대상에게 투여하는 공정, 또는 [44]에 기재된 융합체, 복합체 혹은 세포의 치료 유효량을 대상에게 투여하는 공정을 포함하는, 암을 치료하는 방법.
- [0111] [55] 암의 치료를 위한 의약 조성물의 제조에 있어서의, [32] ~ [43] 중 어느 한 항에 기재된 항TSPAN8 항체 혹은 그의 항원 결합 프래그먼트의 사용, 또는 [44]에 기재된 융합체, 복합체 혹은 세포의 사용.

발명의 효과

- [0112] 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이적 항체는, 암 항원인 TSPAN8과 T 세포 표면 분자인 CD3의 양쪽에 결합하여, 암 세포와 T 세포의 물리적인 거리를 접근시키는 것에 의해, T 세포에 의한 암 세포 살상 작용을 증강시키는 것이다. 또한, 본 발명의 항TSPAN8 항체는, TSPAN8에 결합하는 것에 의해, 암 세포를 살상하는 효과를 갖는다. 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이적 항체 및 항TSPAN8 항체, 또는 상기 항체를 포함하는 의약 조성물은, 암의 치료를 위해서 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [도 1a] 도 1a는, 항TSPAN8 항체(16B11, 16B12, 9F6, 18C10)의 KM-291-As에 대한 결합성을 플로 사이토메트리법에 의해 측정한 결과를 나타낸다. 도면의 16B11, 16B12, 9F6, 18C10은 항체명을 나타낸다. 도면의 가로축은 형광 강도를 나타내고, 세로축은 셀 카운트를 나타낸다. 도면 중의 백색은 음성 컨트롤 항체의 결합을 나타내고, 진한 회색은 항TSPAN8 항체의 결합을 나타낸다.
- [도 1b] 도 1b는, 항TSPAN8 항체(16B11, 9F6, 18C10)의 KM-555-As에 대한 결합성을 플로 사이토메트리법에 의해 측정한 결과를 나타낸다. 도면의 16B11, 9F6, 18C10은 항체명을 나타낸다. 도면의 가로축은 형광 강도를 나타내고, 세로축은 셀 카운트를 나타낸다. 도면 중의 백색은 음성 컨트롤 항체의 결합을 나타내고, 진한 회색

은 항TSPAN8 항체의 결합을 나타낸다.

[도 1c] 도 1c는, 항TSPAN8 항체(16B11, 9F6, 18C10)의 KM-556-As에 대한 결합성을 플로 사이토메트리법에 의해 측정한 결과를 나타낸다. 도면의 16B11, 9F6, 18C10은 항체명을 나타낸다. 도면의 가로축은 형광 강도를 나타내고, 세로축은 셀 카운트를 나타낸다. 도면 중의 백색은 음성 컨트롤 항체의 결합을 나타내고, 진한 회색은 항TSPAN8 항체의 결합을 나타낸다.

[도 2a] 도 2a는, 항TSPAN8 항체(16B11, 16B12, 9F6, 5B7, 12C12, 13A9, 15D1, TAL69)의 배양 인간 복막 중피 세포에 대한 결합성을 플로 사이토메트리법에 의해 측정한 결과를 나타낸다. 도면의 가로축은 형광 강도를 나타내고, 세로축은 셀 카운트를 나타낸다. 도면 중의 백색은 음성 컨트롤 항체의 결합을 나타내고, 진한 회색은 항TSPAN8 항체의 결합을 나타낸다.

[도 2b] 도 2b는, 항TSPAN8 항체(18C10, 19E4, 21F7, TAL69)의 배양 인간 복막 중피 세포에 대한 결합성을 플로 사이토메트리법에 의해 측정한 결과를 나타낸다. 도면의 가로축은 형광 강도를 나타내고, 세로축은 셀 카운트를 나타낸다. 도면 중의 백색은 음성 컨트롤 항체의 결합을 나타내고, 진한 회색은 항TSPAN8 항체의 결합을 나타낸다.

[도 3a] 도 3a는, 항TSPAN8 항체(16B11, 16B12, 9F6, 18C10, TAL69)의 KM-501-As에 대한 결합성을 플로 사이토메트리법에 의해 측정한 결과를 나타낸다. 도면의 가로축은 형광 강도를 나타내고, 세로축은 셀 카운트를 나타낸다. 도면 중의 백색은 음성 컨트롤 항체의 결합을 나타내고, 진한 회색은 항TSPAN8 항체의 결합을 나타낸다.

[도 3b] 도 3b는, 항TSPAN8 항체(16B11, 16B12, 9F6, 18C10, TAL69)의 KM-503-As에 대한 결합성을 플로 사이토메트리법에 의해 측정한 결과를 나타낸다. 도면의 가로축은 형광 강도를 나타내고, 세로축은 셀 카운트를 나타낸다. 도면 중의 백색은 음성 컨트롤 항체의 결합을 나타내고, 진한 회색은 항TSPAN8 항체의 결합을 나타낸다.

[도 4] 도 4는, 항TSPAN8 항체(16B11, 16B12, 9F6, 5B7, 12C12, 13A9, 15D1, 18C10, 19E4, 21F7, TAL69)의 인간 제대 혈관 내피 세포 도너 2에 대한 결합성을 플로 사이토메트리법에 의해 측정한 결과를 나타낸다. 도면의 가로축은 형광 강도를 나타내고, 세로축은 셀 카운트를 나타낸다. 도면 중의 백색은 음성 컨트롤 항체의 결합을 나타내고, 진한 회색은 항TSPAN8 항체의 결합을 나타낸다.

[도 5a] 도 5a는, 항TSPAN8 항체(16B11, 16B12, TAL69)의 인간 마우스 TSPAN8-GFP 키메라 단백질 또는 인간 래트 TSPAN8-GFP 키메라 단백질을 발현한 CHO-K1 세포(키메라 단백 발현 CHO-K1 세포)에 대한 결합성을 플로 사이토메트리법에 의해 측정한 결과를 나타낸다. 도면의 가로축은 형광 강도를 나타내고, 세로축은 셀 카운트를 나타낸다. 도면 중의 회색은 야생형 인간 TSPAN8 발현 CHO-K1 세포, 흑색은 키메라 단백 발현 CHO-K1 세포, 백색은 모크 세포에의 항TSPAN8 항체의 결합을 나타낸다. 실험은 *duplicate*로 실시했다.

[도 5b] 도 5b는 인간, 마우스, 래트 및 필리핀원숭이의 4종류의 TSPAN8 단백질의 아미노산 번호 126~155로 이루어지는 서열의 상동성을 나타낸다. 아스테리스크는 완전 일치의 아미노산인 것을 나타내고, 도트는 4종 중 3종이 동일한 아미노산인 것을 나타낸다. 스페이스는 2종 이상이 상이한 아미노산인 것을 나타낸다.

[도 5c] 도 5c는 항TSPAN8 항체(16B11, 16B12, TAL69)의 인간 TSPAN8 단백질의 T131A 변이체 또는 T131N 변이체에 대한 결합성을 플로 사이토메트리법에 의해 측정한 결과를 나타낸다. 도면의 가로축은 형광 강도를 나타내고, 세로축은 셀 카운트를 나타낸다. 도면 중의 회색은 야생형 인간 TSPAN8 발현 CHO-K1 세포, 흑색은 변이체 발현 CHO-K1 세포, 백색은 모크 세포에의 항TSPAN8 항체의 결합을 나타낸다. 실험은 *duplicate*로 실시했다.

[도 6a] 도 6a는, 16B11의 NSC-15CF에의 결합에 대한 다른 항TSPAN8 항체(Competitor(CPTR): 16B11, 9F6, 18C10, TAL69)에 의한 경합 작용을 플로 사이토메트리법에 의해 측정한 결과를 나타낸다. 도면의 가로축은 형광 강도를 나타내고, 세로축은 셀 카운트를 나타낸다. 도면 중의 회색은 음성 컨트롤 항체 존재하에서의 형광 표지 16B11의 결합을 나타내고, 백색은 형광 표지 16B11 미염색의 히스토그램을 나타낸다.

[도 6b] 도 6b는, 형광 표지 항TSPAN8 항체(16B11, 9F6, 18C10)의 NSC-15CF에의 결합에 대한 16B12에 의한 경합 작용을 플로 사이토메트리법에 의해 측정한 결과를 나타낸다. 도면의 가로축은 형광 강도를 나타내고, 세로축은 셀 카운트를 나타낸다. 도면 중의 회색은 음성 컨트롤 항체 존재하에서의 형광 표지 항TSPAN8 항체의 결합을, 흑색은 16B12 존재하에서의 형광 표지 항TSPAN8 항체의 결합을 나타내고, 백색은 형광 표지 항체 미염색의 히스토그램을 나타낸다.

[도 6c] 도 6c는, 16B12의 NSC-15CF에의 결합에 대한 다른 항TSPAN8 항체(CPTR: 16B12, 16B11, 9F6, 18C10,

TAL69)에 의한 경합 작용을 플로 사이토메트리법에 의해 측정한 결과를 나타낸다. 도면의 가로축은 형광 강도를 나타내고, 세로축은 셀 카운트를 나타낸다. 도면 중의 회색은 음성 컨트를 항체 존재하에서의 형광 표지 16B12의 결합을, 흑색은 다른 항TSPAN8 항체(CPTR) 존재하에서의 형광 표지 16B12의 결합을 나타내고, 백색은 형광 표지 항체 미염색의 히스토그램을 나타낸다.

[도 7] 도 7은, 60As6-Luc/GFP 세포와 인간 NK 세포의 공배양계에 있어서의, 16B11.1의 세포 상해 활성을 나타낸다. 가로축은 항체 농도, 세로축은 60As6-Luc/GFP 세포로부터 산생되는 루시페라제 활성으로부터 산출된 세포 상해 활성을 나타낸다. ●, ▲는 각각 대조 항체, 16B11.1의 각 농도에 있어서의 세포 상해 활성의 평균치를 나타낸다. 에러 바는 표준 편차를 나타낸다.

[도 8] 도 8은, TSPAN8의 LEL 영역 웨타이드 및 CD3 ε δ 복합 단백에 대한 항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체의 결합 활성을 나타낸다. 가로축은 항체 농도, 세로축은 항체의 결합량을 나타낸다. 도 8a, 도 8b는 각각, TSPAN8의 LEL 영역 웨타이드, CD3 ε δ 복합 단백에 대한 항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체의 결합량의 평균치를 나타낸다. 에러 바는 표준 편차를 나타낸다.

[도 9] 도 9는, 60As6-Luc/GFP 세포와 인간 말초혈 단핵 세포의 공배양계에 있어서의 항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체의 세포 상해 활성을 나타낸다. 가로축은 항체 농도, 세로축은 60As6-Luc/GFP 세포의 항체 첨가 3일 후의 형광 면적에 있어서 항체 무첨가를 100%로 했을 때의 세포 증식(%)을 나타낸다. ●는 항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체의 각 농도에 있어서의 세포 증식의 평균치를 나타낸다. 에러 바는 표준 편차를 나타낸다.

[도 10a] 도 10a는, 항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체의 인간 위암 환자 복수 세포 중의 위암 세포에 대한 세포 상해 활성을 나타낸다. 가로축은 항체 농도, 세로축은 위암 세포의 항체 첨가 3일 후의 생 세포수에 있어서 항체 무첨가를 100%로 했을 때의 생 세포수(%)를 나타낸다. ●, ■는 각각 대조 항체, 항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체의 각 농도에 있어서의 생 세포수(%)의 평균치를 나타낸다. 에러 바는 표준 편차를 나타낸다.

[도 10b] 도 10b는, 항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체에 의한 인간 위암 환자 복수 세포 중의 CD4 양성 T 세포의 활성화를 CD25의 발현 유도로 나타낸 도면이다. 가로축은 항체 농도를 나타낸다. 세로축은, 복수중 CD4 양성 T 세포에 항체를 첨가한 3일 후의 CD25 발현량의 배율 변화를 나타낸다. ●, ■는 각각 대조 항체, 항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체의 각 농도에 있어서의 CD25의 발현량의 배율 변화의 평균치를 나타낸다. 에러 바는 표준 편차를 나타낸다.

[도 10c] 도 10c는, 항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체에 의한 인간 위암 환자 복수 세포 중의 CD8 양성 T 세포의 활성화를 CD25의 발현 유도로 나타낸 도면이다. 가로축은 항체 농도를 나타낸다. 세로축은, 복수중 CD8 양성 T 세포에 항체를 첨가한 3일 후의 CD25 발현량의 배율 변화를 나타낸다. ●, ■는 각각 대조 항체, 항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체의 각 농도에 있어서의 CD25의 발현량의 배율 변화의 평균치를 나타낸다. 에러 바는 표준 편차를 나타낸다.

[도 11a] 도 11a는 위암 복막 파종 모델에 있어서의 항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체의 항종양 효과를 나타낸다. 세로축은 복강 중의 60As6-Luc/GFP 세포가 발현하는 루시페라제에 의한 루시페린의 발광량의 평균치를 나타낸다. 에러 바는 표준 오차를 나타낸다. 가로축은 항체 투여량을 나타낸다. 유의 확률 P치는, 더넷(Dunnett)의 다중 비교 검정에 의해 대조군의 발광량과 항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체 투여군의 발광량을 비교하는 것에 의해 구했다. 도면 중의 **는, P치가 유의 수준 0.01보다 작은 군을 나타낸다.

[도 11b] 도 11b는 위암 복막 파종 모델에 있어서의 항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체에 의한 생존 일수에 대한 효과를 나타낸다. 세로축은 생존율을 나타낸다. 가로축은 암 세포 이식후 일수를 나타낸다. 항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체 및 ExpandedpanT 세포는 ▲로 나타나는 60As6-Luc/GFP 이식 후 7, 10일 후에 투여되었다.

[도 12] 도 12는, 16B11의 다양한 암 세포주에 대한 결합성을 플로 사이토메트리법에 의해 측정한 결과를 나타낸다. 도면의 가로축은 형광 강도를 나타내고, 세로축은 셀 카운트를 나타낸다. 도면 중의 백색은 음성 컨트를 항체의 결합을 나타내고, 진한 회색은 16B11의 결합을 나타낸다.

[도 13a] 도 13a는, 항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체에 의한 인간 말초혈 단핵 세포 공배양하에서의 다양한 암 세포주에 대한 세포 상해 활성을 나타낸다. 가로축은 항체 농도, 세로축은 각 암 세포주의 항체 첨가 3일 후의 생 세포수에 있어서 항체 무첨가를 100%로 했을 때의 생 세포수(%)를 나타낸다. 각 심볼은 항

TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체의 각 농도에 있어서의 각 암 세포주의 생 세포수(%)의 평균치(quadruplicate)를 나타낸다.

[도 13b] 도 13b는, 항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체에 의한 인간 말초혈 단핵 세포와 다양한 암 세포주 모두 배양 중의 CD4 양성 T 세포의 활성화를 CD25의 발현 유도로 나타낸 도면이다. 가로축은 항체 농도를 나타낸다. 세로축은 항체를 첨가한 3일 후의 CD4 양성 T 세포의 CD25 발현량의 배율 변화를 나타낸다. 각 심볼은 항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체의 각 농도에 있어서의 CD25의 발현량의 배율 변화의 평균치(quadruplicate)를 나타낸다.

[도 13c] 도 13c는, 항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체에 의한 인간 말초혈 단핵 세포와 다양한 암 세포주를 공배양 중의 CD8 양성 T 세포의 활성화를 CD25의 발현 유도로 나타낸 도면이다. 가로축은 항체 농도를 나타낸다. 세로축은, 항체를 첨가한 3일 후의 CD8 양성 T 세포의 CD25 발현량의 배율 변화를 나타낸다. 각 심볼은 항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체의 각 농도에 있어서의 CD25의 발현량의 배율 변화의 평균치(quadruplicate)를 나타낸다.

[도 14] 도 14는 인간 PBMC 이입 HT-29 세포 피하 담암 모델에 있어서의 항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체의 항종양 효과를 나타낸다. 도 14a은 항체 투여 개시 후의 일수에 있어서의 종양 체적의 평균치 및 에러바는 표준 오차를 나타낸다. 도 14b는 투여 개시 11일 후의 각 개체의 종양 체적의 값 및 획선은 평균치와 표준 오차를 나타내고, 가로축은 항체 투여량을 나타낸다. 유의 확률 P치는, 더넷의 다중 비교 검정에 의해 PBS 투여군의 종양 체적과 항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체 투여군의 종양 체적을 비교하는 것에 의해 구했다. 도면 중의 **는, P치가 유의 수준 0.01보다 작은 군을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0114] 이하에, 본 발명에 대해 상술한다.

[0115] <정의>

[0116] 본 명세서의 용어는, 이하에서 특별히 정의되지 않는 한, 당해 기술 분야에서 당업자에게 일반적으로 사용되고 있는 의미로 사용된다.

[0117] 항체(또는 면역글로불린)란, 단일한 서열을 갖는 중쇄 2개와, 단일한 서열을 갖는 경쇄 2개로 이루어지는 좌우 대칭 Y자형의 구조를 갖는 4쇄 구조로 이루어지는 당단백질을 말한다. 항체에는 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE의 5개의 클래스가 존재한다. 항체 분자의 기본 구조는 각 클래스 공통이며, 분자량 5만~7만의 중쇄 2개와 2만~3만의 경쇄 2개가 다이설파이드 결합 및 비공유 결합에 의해 결합하여, 분자량 15만~19만의 Y자형의 4쇄 구조로 이루어지는 항체 분자를 형성한다. 중쇄는, 통상 약 440개의 아미노산을 포함하는 폴리펩티드쇄로 이루어지고, 클래스마다 특징적인 구조를 갖고, IgG, IgM, IgA, IgD, IgE에 대응하여 각각, Ig γ , Ig μ , Ig α , Ig δ , Ig ϵ 라고 불린다. 더욱이 IgG에는, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4의 서브클래스가 존재하고, 각각에 대응하는 중쇄는 Ig γ 1, Ig γ 2, Ig γ 3, Ig γ 4라고 불린다. 경쇄는, 통상 약 220개의 아미노산을 포함하는 폴리펩티드쇄로 이루어지고, L형과 K형의 2종이 알려져 있고, 각각 Ig λ , Ig κ 라고 한다. 상기 2종의 경쇄는, 어느 종류의 중쇄와도 짹을 이를 수 있다.

[0118] 항체 분자의 쇄내 다이설파이드 결합은, 중쇄에는 4개(Ig μ , Ig ϵ 에는 5개), 경쇄에는 2개 존재하고, 아미노산 100~110잔기마다 1개의 루프를 이루고 있다. 그들의 입체 구조는 각 루프 사이에서 유사하고, 구조 단위 또는 도메인이라고 불린다. 중쇄, 경쇄 모두 N말단에 위치하는 도메인은 가변 영역이라고 불리고, 동종 동물의 동일 클래스(또는 서브클래스)로부터 산생된 항체여도 다양한 아미노산 서열을 갖고, 항체와 항원의 결합 특이성 결합에 관여함이 알려져 있다. 가변 영역보다도 하류의 C말단측의 도메인의 아미노산 서열은, 각 클래스 또는 서브클래스마다 거의 일정하고, 정상 영역이라고 불리고 있다. 중쇄는, N말단으로부터 C말단을 향해 중쇄 가변 영역(VH) 및 중쇄 정상 영역(CH)을 갖는다. CH는 추가로 N말단측으로부터 CH1 도메인, CH2 도메인, 및 CH3 도메인의 3개의 도메인으로 나눠진다. 경쇄는, N말단으로부터 C말단을 향해 경쇄 가변 영역(VL) 및 경쇄 정상 영역(CL)을 갖는다.

[0119] VH 및 VL에 존재하는 3개의 상보성 결정 영역(CDR)의 아미노산 서열은 변화가 매우 크고, 가변 영역의 가변성에 기여하고 있다. CDR은, 중쇄와 경쇄의 N말단 각각에 CDR1, CDR2, CDR3의 순번으로 존재하는 대략 5~10아미노산 잔기로 이루어지는 영역으로서, 항원 결합 부위를 형성한다. 한편, 가변 영역의 CDR 이외의 부분은 프레임 워크 영역(FR)이라고 불리고, FR1~4로 이루어지고, 아미노산 서열의 변화는 비교적 적다.

- [0120] 항체를 단백질 분해 효소인 파파인으로 처리하면, 3개의 항체 단편이 얻어진다. N말단측의 2개의 단편은 Fab(항원 결합 단편, Fragment, antigen binding) 영역이라고 불리고 있다. 본 명세서에 있어서, 「Fab 영역」이란, 중쇄의 VH와 CH1 도메인 및 경쇄(VL와 CL)로 이루어지는 영역을 가리키고, 당해 Fab 영역이 구성하는 선단 부분의 항원 결합 부위에서 항원과 결합한다. 본 명세서에 있어서, 「중쇄 프래그먼트」란, Fab 영역을 구성하는 중쇄의 VH와 CH1 도메인으로 이루어지는 프래그먼트를 가리킨다.
- [0121] 또한, C말단측의 단편을 Fc(결정화 가능 단편, Fragment, crystallizable) 영역이라고 부른다. 본 명세서에 있어서, 「Fc 폴리펩티드」는, 중쇄의 CH2 도메인 및 CH3 도메인으로 이루어지는 폴리펩티드를 말하고, 「Fc 영역」은 2개의 Fc 폴리펩티드로 이루어지는 복합체를 가리킨다.
- [0122] 중쇄 프래그먼트와 Fc 폴리펩티드는 힌지 영역이라고 불리는 부분으로 연결되어 있다. 또한, 항체의 2개의 중쇄는 힌지 영역에서 다이설파이드 결합하고 있다.
- [0123] 본 명세서에 있어서 「항원」이란, 일반적으로 이용되고 있는 의미로 이용되고, 특히, 항체, 항원 결합 프래그먼트 등의 항원 결합 단백질이 특이적으로 결합 할 수 있는 문자 또는 문자의 일부를 나타내는 용어로서 이용된다. 항원은 단백질, 핵산 등의 문자일 수 있다. 1개의 항원은, 상이한 항체 등과 상호작용할 수 있는 1개 또는 그 이상의 에피토프를 갖는 경우도 있다.
- [0124] 본 명세서에 있어서 「에피토프」 또는 「항원 결정기」란, 항원 결합 단백질이 인식하여 결합하는 항원의 특정의 구조 단위를 의미하고, 항체 또는 T 세포 수용체 등의 항원 결합 단백질에 의해 결합될 수 있는 모든 결정기를 포함한다. 에피토프 결정기는, 아미노산, 당족쇄, 포스포릴기 또는 셀酹일기 등의 문자의 화학적으로 활성인 표면기를 포함할 수 있고, 특이적인 3차원 구조의 특징 및/또는 특이적인 전하적 특장을 가질 수 있다. 항원이 단백질인 경우, 항체 등에 직접 접촉하는 특정의 아미노산을 포함한다. 일반적으로, 특정의 표적 항원에 대해서 특이적인 항체는, 단백질 및/또는 고분자의 복잡한 혼합물 중에 있어서, 표적 항원 상의 에피토프를 우선적으로 인식한다. 에피토프는, 표면에 접촉 가능한 아미노산 잔기 및/또는 당족쇄로 이루어지는 경우가 많고, 통상은 6~10개의 아미노산이나 5~8개의 단당의 서열로 이루어진다. 에피토프는, 특유의 3차원 구조 특성과, 특유의 전하 특성을 갖는 경우가 있다. 에피토프는, 결합에 직접 관여하는 아미노산 잔기와, 결합에 직접적으로는 관여하지 않는 그 외의 아미노산 잔기를 포함해도 된다. 항원 결합 단백질이 결합하는 에피토프의 동정은, 예를 들어, 질량 분석법(예를 들어, 수소-중수소 교환 질량 분석(Hydrogen/Deuterium eXchange Mass Spectrometry; HDX-MS), 알라닌 스캐닝 변이 유발법, 결정 해석법, 펩타이드 경합법 등의 당업자에게 주지의 방법을 이용하여 동정할 수 있다.
- [0125] 본 명세서에 있어서 「경합」 또는 「경합하는」이란, 2종류 이상의 항체를 동시에 또는 연속적으로 반응액에 첨가했을 경우에, 한쪽의 항체가 다른 쪽의 항체의 항원에의 결합을 방해하는 것에 의해, 다른 쪽의 항체의 항원에 대한 결합능이 저하되는 것을 말한다.
- [0126] 본 명세서에 있어서 「항원 결합 프래그먼트」란, 항체에서 유래하는 항원 결합 활성을 갖는 적어도 1개의 폴리펩티드쇄를 포함하는 문자이다. 대표적인 항원 결합 프래그먼트로서는, 1쇄 가변 영역 프래그먼트(scFv), Fab 프래그먼트, Fab' 프래그먼트, F(ab')₂ 프래그먼트를 들 수 있다. scFv는, 링커로 연결된 VH와 VL로 구성되는, 1가의 항원 결합 프래그먼트이다. Fab 프래그먼트는, 경쇄와 중쇄의 VH, CH1 도메인을 포함하는 프래그먼트로 구성되는, 1가의 항원 결합 프래그먼트이다. Fab' 프래그먼트는, 경쇄와, 중쇄의 VH, CH1 도메인과 힌지 영역의 일부를 포함하는 프래그먼트로 구성되는, 1가의 항원 결합 프래그먼트이며, 이 힌지 영역의 부분에는 중쇄간 S-S 결합을 구성하고 있던 시스테인 잔기가 포함된다. F(ab')₂ 프래그먼트는, Fab' 프래그먼트가 다이설파이드 결합으로 연결되어 있는 2가의 문자이다. 1가란, 항원 결합 부위를 1개 포함하는 것을, 2가란, 항원 결합 부위를 2개 포함하는 것을 의미한다.
- [0127] 본 명세서에 있어서 「scFv 영역」이란, 링커로 연결된 VH와 VL을 포함하는, 1가의 항원 결합 프래그먼트를 포함하는 영역을 가리킨다.
- [0128] 한팔(One-armed) 항체도 항원 결합 프래그먼트의 일종이며, 1개의 Fab 영역 및 1개의 Fc 영역을 포함하고, 해당 Fab 영역의 중쇄 프래그먼트가, 해당 Fc 영역의 2개의 Fc 폴리펩티드 중 하나에 연결된 구조를 갖는다. 하나의 실시형태에 있어서, 한팔 항체는, 1개의 중쇄(VH, CH1 도메인, 힌지 영역, Fc 폴리펩티드(CH2 도메인 및 CH3 도메인), 1개의 경쇄(VL 및 CL), 및 Fc 폴리펩티드를 포함한다.
- [0129] 본 명세서에 있어서 「다중 특이성 항체」란, 2 이상의 상이한 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항체를 말하

고, 결합하는 항원의 수에 따라, 예를 들어, 이중 특이성 항체, 삼중 특이성 항체라고 불린다. 다중 특이성 항체에는, 각각 상이한 항원에 결합할 수 있는 2 이상의 항체 및/또는 항원 결합 프래그먼트의 복합체가 포함되고, 본 명세서 중에서 사용되는 「항체」는, 문맥상 특별히 제한되지 않는 한, 다중 특이성 항체를 포함한다.

[0130] 본 명세서에 있어서 「이중 특이성 항체」란, 2개의 상이한 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항체를 말한다. 「항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체」란, TSPAN8에 대한 결합 활성 및 CD3에 대한 결합 활성을 갖는 이중 특이성 항체를 의미한다.

[0131] 본 명세서에 있어서 「인간 항체」는, 인간 면역글로불린 아미노산 서열을 갖는 항체를 나타낸다. 본 명세서에 있어서 「인간화 항체」는, CDR 이외의 아미노산 잔기의 일부, 대부분, 또는 전부가, 인간 면역글로불린 분자에서 유래하는 아미노산 잔기로 치환된 항체를 나타낸다. 인간화의 방법으로서는, 특별히 제한되지 않지만, 예를 들어, 미국 특허 제5225539호, 미국 특허 제6180370호 등을 참조하여 인간화 항체를 제작할 수 있다.

[0132] 본 명세서 중에서 사용되는 항체의 아미노산 잔기 번호는 Kabat 넘버링 또는 EU 인텍스(Kabat 등, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed, 1991, NIH Publication No. 91-3242)를 지정함으로써, 그들의 넘버링 시스템에 따라 규정할 수 있다.

[0133] 본 명세서에 있어서, 「제1」 또는 「제2」라고 하는 용어는, 부분의 각 종류가 2개 이상 존재하는 경우, 편의 상 구별하기 위해서 사용된다. 이와 같은 용어의 사용은, 명료하게 기술하고 있는 것이 아닌 한, 특정의 순서나 의미를 부여하는 것을 의도하고 있는 것은 아니다.

[0134] 본 명세서에 있어서, 「연결」 또는 「연결된」이란, 복수의 성분(예를 들어, Fab 영역 및 Fc 폴리펩티드)이, 직접 또는 1개 혹은 복수의 중개물(예를 들어, 웨타이드 링커)을 개재시켜 결합하고 있음을 의미한다. 본 명세서에 있어서 「웨타이드 링커」란, 가변 영역 사이를 연결하기 위한, 유전자 공학에 의해 도입할 수 있는 1 이상의 임의의 아미노산 잔기를 의미한다. 본 발명에서 사용되는 웨타이드 링커의 길이는 특별히 한정되지 않고, 목적에 따라 당업자가 적절히 선택하는 것이 가능하다.

[0135] 본 명세서에 있어서, 「동일성」이란, EMBOSS Needle(Nucleic Acids Res., 2015, Vol. 43, pW580-W584)를 이용하여, 디폴트로 준비되어 있는 파라미터에 의해 얻어진 Identity의 값을 의미한다. 상기의 파라미터는 이하와 같다.

[0136] Gap Open Penalty=10

[0137] Gap Extend Penalty=0.5

[0138] Matrix=EBLOSUM62

[0139] End Gap Penalty=false

[0140] 본 명세서에 있어서, 「대상」이란, 그 예방 또는 치료를 필요로 하는 인간 또는 그 외의 동물을 의미한다. 어느 태양에서는, 그 예방 또는 치료를 필요로 하는 인간이다.

[0141] <본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체>

[0142] 본 발명은, 이하에 나타내는 TSPAN8 및 CD3에 결합하는 이중 특이성 항체(「항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체」라고도 칭한다)를 제공한다:

[0143] TSPAN8 및 CD3에 결합하는 이중 특이성 항체로서,

[0144] (a) 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 프래그먼트 및 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 Fab 영역,

[0145] (b) 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역, 및

[0146] (c) (a)의 Fab 영역의 중쇄 프래그먼트에 연결되는 제1 Fc 폴리펩티드 및 (b)의 항CD3-scFv 영역에 연결되는 제2 Fc 폴리펩티드로 이루어지는 Fc 영역

[0147] 을 포함하는, 이중 특이성 항체.

[0148] 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체는, 제1 항체의 하나의 Fab 영역, 제2 항체의 scFv 영역, 및 1개의 Fc 영역을 포함하는 구조를 갖는다. 이와 같은 구조의 항체는, 「병따개(Bottle-opener)형 항체」라고도 불리

고 있다(국제 공개 2014/110601호). 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체는, 인간 항체 또는 인간화 항체이다.

[0149] 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체는, Fab 영역으로서, 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 프래그먼트, 및 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄로 이루어지는, 항TSPAN8 항체 Fab 영역을 포함한다.

[0150] 하나의 실시형태에 있어서, 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역은, 서열 번호 6의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 6의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 6의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하고, 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역은, 서열 번호 8의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 8의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 8의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함한다.

[0151] 하나의 실시형태에 있어서, 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역은, 서열 번호 10의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 10의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 10의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하고, 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역이, 서열 번호 12의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 12의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 12의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함한다.

[0152] 하나의 실시형태에 있어서, 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역은, 서열 번호 6의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지고, 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역은, 서열 번호 8의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어진다.

[0153] 하나의 실시형태에 있어서, 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역은, 서열 번호 10의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지고, 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역이 서열 번호 12의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어진다.

[0154] 항TSPAN8 항체 Fab 영역의 중쇄 프래그먼트의 CH1 도메인이 유래하는 중쇄 정상 영역으로서는, Ig γ , Ig μ , Ig α , Ig δ 또는 Ig ϵ 의 어느 정상 영역도 선택 가능하다. Ig γ 로서는, 예를 들어, Ig γ 1, Ig γ 2, Ig γ 3 또는 Ig γ 4부터 선택하는 것이 가능하다. 하나의 실시형태에 있어서, 항TSPAN8 항체 Fab 영역의 중쇄 프래그먼트는, 인간 Ig γ 1 정상 영역에서 유래하는 CH1 도메인을 포함한다.

[0155] 항TSPAN8 항체 Fab 영역의 경쇄의 CL로서는, Ig λ 또는 Ig κ 의 어느 정상 영역도 선택 가능하다. 하나의 실시형태에 있어서, 항TSPAN8 항체 Fab 영역은, Ig κ 정상 영역인 CL을 포함한다. 하나의 실시형태에 있어서, 항TSPAN8 항체 Fab 영역의 경쇄는, 인간 Ig κ 정상 영역인 CL을 포함한다.

[0156] 하나의 실시형태에 있어서, 항TSPAN8 항체 Fab 영역은, 서열 번호 6의 아미노산 번호 1부터 219까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 프래그먼트 및 서열 번호 8의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄로 이루어진다. 하나의 실시형태에 있어서, 항TSPAN8 항체 Fab 영역은, 서열 번호 10의 아미노산 번호 1부터 219까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 프래그먼트 및 서열 번호 12의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄로 이루어진다.

[0157] 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체는, scFv 영역으로서, 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역을 포함한다. 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체에 있어서, 당해 분야에서 공지된 항CD3-scFv 영역 또는 당해 분야에서 공지된 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 서열 정보에 기초하여 제작한 항CD3 항체의 scFv 영역을 사용해도 된다. 공지된 항CD3 항체로서는, OKT3, UTCH1, L2K, TR66 등의 클론이 알려져 있고, 그들의 서열은 이중 특이성 항체로서 사용되고 있다(Pharmacol. Ther., 2018, Vol. 182, p. 161-175).

[0158] 하나의 실시형태에 있어서, 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역은, 서열 번호 14의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 50부터 68까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 101부터 114까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하고, 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역은, 서열 번호 14의 아미노산 번호 168부터 181까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 197부터 203까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 236부터 244까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함한다.

- [0159] 하나의 실시형태에 있어서, 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역은, 서열 번호 14의 아미노산 번호 1부터 125까지의 아미노산 서열로 이루어지고, 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역은, 서열 번호 14의 아미노산 번호 146부터 254까지의 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0160] 항CD3-scFv 영역에 있어서, 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역을 연결하는 웨타이드 링커의 종류 및 길이는 특별히 한정되지 않고, 당업자가 적절히 선택하는 것이 가능하지만, 바람직한 길이는 5아미노산 이상 (상한은 특별히 한정되지 않지만, 통상, 30아미노산 이하, 바람직하게는 20아미노산 이하)이며, 특히 바람직하게는 15아미노산이다. 웨타이드 링커로서, 예를 들어, 글리신-세린 링커(GS 링커)나, 글리신-리신-프롤린-글리신-세린 링커(GKPGS 링커)를 사용할 수 있다. 이와 같은 링커로서는, 예를 들어, 이하를 들 수 있다.
- [0161] Ser
- [0162] Gly-Ser
- [0163] Gly-Gly-Ser
- [0164] Ser-Gly-Gly
- [0165] Gly-Gly-Gly-Ser(서열 번호 15)
- [0166] Ser-Gly-Gly-Gly(서열 번호 16)
- [0167] Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(서열 번호 17)
- [0168] Ser-Gly-Gly-Gly-Gly(서열 번호 18)
- [0169] Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(서열 번호 19)
- [0170] Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly(서열 번호 20)
- [0171] Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(서열 번호 21)
- [0172] Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly(서열 번호 22)
- [0173] (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n
- [0174] (Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)_n
- [0175] Gly-Lys-Pro-Gly-Ser(서열 번호 23)
- [0176] (Gly-Lys-Pro-Gly-Ser)_n
- [0177] 상기의 n은 1 이상의 정수를 나타낸다. 웨타이드 링커의 길이나 서열은 목적에 따라 당업자가 적절히 선택할 수 있다.
- [0178] 하나의 실시형태에 있어서, 항CD3-scFv 영역은, 서열 번호 14의 아미노산 번호 1부터 254까지의 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0179] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체는, 서열 번호 6의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 6의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 6의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄, 서열 번호 8의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 8의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 8의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄, 및, 서열 번호 14의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 50부터 68까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 101부터 114까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 168부터 181까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 197부터 203까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 236부터 244까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 포함한다. 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체는, 서열 번호 10의 아

미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 10의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 10의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역의 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄, 서열 번호 12의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 12의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 12의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄, 및, 서열 번호 14의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 50부터 68까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 101부터 114까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 168부터 181까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 197부터 203까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 236부터 244까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 포함한다.

[0180] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체는, 서열 번호 6의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄, 서열 번호 8의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄, 및, 서열 번호 14의 아미노산 번호 1부터 125까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 146부터 254까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 포함한다. 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체는, 서열 번호 10의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄, 서열 번호 12의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄, 및, 서열 번호 14의 아미노산 번호 1부터 125까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 146부터 254까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 포함한다.

[0181] 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체에 있어서, Fc 영역을 구성하는 제1 Fc 폴리펩티드 및 제2 Fc 폴리펩티드가 유래하는 중쇄 정상 영역으로서는, Ig γ , Ig μ , Ig α , Ig δ 또는 Ig ε 의 어느 정상 영역도 선택 가능하다. Ig γ 로서는, 예를 들어, Ig γ 1, Ig γ 2, Ig γ 3 또는 Ig γ 4부터 선택하는 것이 가능하다. 하나의 실시형태에 있어서, 제1 Fc 폴리펩티드 및 제2 Fc 폴리펩티드는, 인간 Ig γ 1 정상 영역에서 유래하는 Fc 폴리펩티드이다.

[0182] 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체에 있어서의 Fc 영역은, 항체 의존성 세포 상해 활성(ADCC)이나 보체 의존성 상해 활성(CDC)을 저하시키는 변이를 포함해도 된다. L234A란, 인간 Ig γ 1 정상 영역에 있어서의 EU 인덱스에 따르는 아미노산 234위의 류신의 알라닌에의 치환이다. L235A란, 인간 Ig γ 1 정상 영역에 있어서의 EU 인덱스에 따르는 아미노산 235위의 류신의 알라닌에의 치환이다. 인간 Ig γ 1 정상 영역 L234A 및 L235A의 아미노산 변이를 「LALA 변이」라고 한다. 당해 변이는, 항체의 항체 의존성 세포 상해 활성이나 보체 의존성 상해 활성을 저하시킴이 알려져 있다(Mol. Immunol., 1992, Vol. 29, p. 633-639; J. Immunol., 2000, Vol. 164, p. 4178-4184).

[0183] 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체에 있어서의 Fc 영역은, 추가로 다른 공지 기술에 기초하는 변이를 포함해도 된다. 예를 들어, Fc 영역은, N297G 변이(ProteinCell, 2018, Vol. 9, p. 63-73) 또는 노브즈 인투 홀즈(Knobs into holes) 기술에 기초하는 변이(이하, 「노브즈 인투 홀즈 변이」라고도 칭한다)를 포함해도 된다. 노브즈 인투 홀즈 기술은, 한쪽 중쇄의 CH3 영역에 존재하는 아미노산 측쇄를 보다 큰 측쇄(knob; 돌기)로 치환하고, 다른 한쪽 중쇄의 CH3 영역에 존재하는 아미노산 측쇄를 보다 작은 측쇄(hole; 공극)로 치환하는 것에 의해, 돌기가 공극 내에 배치되도록 하여, 중쇄의 헤테로2량체화를 촉진하여, 목적하는 헤테로2량체화 항체 분자를 효율적으로 취득할 수 있는 기술이다(Nature, 1994, Vol. 372, p. 379-383; NatureBiotech., 1998, Vol. 16, p. 677-681; J. Mol. Biol., 1997, Vol. 270, p. 26-35; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2013, Vol. 110, p. E2987-E2996).

[0184] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체는, L234A 및 L235A의 아미노산 변이(LALA 변이)를 포함하는 Fc 영역을 포함한다. 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이

성 항체는, N297G 변이를 포함하는 Fc 영역을 포함한다. 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체는, 노브즈 인투 홀즈 변이를 포함하는 Fc 영역을 포함한다. 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체는, L234A 및 L235A의 아미노산 변이(LALA 변이), N297G 변이, 및 노브즈 인투 홀즈 변이 중 하나 이상의 변이를 포함하는 Fc 영역을 포함한다. 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체는, L234A 및 L235A의 아미노산 변이(LALA 변이), N297G 변이, 및 노브즈 인투 홀즈 변이를 포함하는 Fc 영역을 포함한다. 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체에 포함되는 노브즈 인투 홀즈 변이는, 그 Fc 영역을 형성하는 1개의 Fc 폴리펩티드에 있어서의 T366W 변이, 및 그 Fc 영역을 형성하는 다른 1개의 Fc 폴리펩티드에 있어서의 T366S, L368A 및 Y407V 변이(국제 공개 1998/050431호를 참조)이다.

[0185] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체는, 서열 번호 6의 아미노산 번호 235부터 451까지의 아미노산 서열로 이루어지는 제1 Fc 폴리펩티드 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 270부터 486까지의 아미노산 서열로 이루어지는 제2 Fc 폴리펩티드로 이루어지는 Fc 영역을 포함한다.

[0186] 한편, 본 명세서에 있어서, LALA 변이, N297G 변이, 노브즈 인투 홀즈 변이 등의 아미노산 변이의 기재는, 인간 Ig γ 1 정상 영역에 있어서의 EU 인텍스에 따르는 아미노산 위치에 기초하는 것이다. 예를 들어, 전술한 바와 같이, L234A란, 인간 Ig γ 1 정상 영역에 있어서의 EU 인텍스에 따르는 아미노산 234위의 류신의 알라닌에의 치환이다.

[0187] 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체에 있어서, 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 프래그먼트와 Fc 폴리펩티드(제1 Fc 폴리펩티드)는, 헌지 영역을 개재시켜 연결되어 항TSPAN8 항체의 중쇄를 구성해도 된다.

[0188] 또한, 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체에 있어서, 항CD3-scFv 영역과 Fc 폴리펩티드(제2 Fc 폴리펩티드)는, 헌지 영역을 개재시켜 연결되어도 된다.

[0189] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체는, 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 헌지 영역을 개재시켜 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 포함한다. 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체는, 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 헌지 영역을 개재시켜 연결된 폴리펩티드를 포함한다. 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체는, 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 헌지 영역을 개재시켜 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄, 및 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 헌지 영역을 개재시켜 연결된 폴리펩티드를 포함한다.

[0190] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체는, 서열 번호 6의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 6의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 6의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 헌지 영역을 개재시켜 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄, 서열 번호 8의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 8의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 8의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄, 및, 서열 번호 14의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 50부터 68까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 101부터 114까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 168부터 181까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 197부터 203까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 236부터 244까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 헌지 영역을 개재시켜 연결된 폴리펩티드를 포함한다. 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체는, 서열 번호 10의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 10의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 10의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 헌지 영역을 개재시켜 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄, 서열 번호 12의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 12의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 12의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로

이루어지는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄, 및, 서열 번호 14의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 50부터 68까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 101부터 114까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 168부터 181까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 197부터 203까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 236부터 244까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 헌지 영역을 개재시켜 연결된 폴리펩티드를 포함한다.

[0191] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체는, 서열 번호 6의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 헌지 영역을 개재시켜 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄, 서열 번호 8의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄, 및, 서열 번호 14의 아미노산 번호 1부터 125까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 146부터 254까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 헌지 영역을 개재시켜 연결된 폴리펩티드를 포함한다. 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체는, 서열 번호 10의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 헌지 영역을 개재시켜 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄, 서열 번호 12의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄, 및, 서열 번호 14의 아미노산 번호 1부터 125까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 146부터 254까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 헌지 영역을 개재시켜 연결된 폴리펩티드를 포함한다.

[0192] 하나의 실시형태에 있어서, 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 헌지 영역을 개재시켜 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄는, 서열 번호 6 또는 10의 아미노산 서열로 이루어진다. 하나의 실시형태에 있어서, 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 헌지 영역을 개재시켜 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄는, 서열 번호 6의 아미노산 서열로 이루어진다. 하나의 실시형태에 있어서, 항TSPAN8 항체의 경쇄는, 서열 번호 8 또는 12의 아미노산 서열로 이루어진다. 하나의 실시형태에 있어서, 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 헌지 영역을 개재시켜 연결된 폴리펩티드는, 서열 번호 14의 아미노산 서열로 이루어진다. 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체는, 서열 번호 6 또는 10의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트, 서열 번호 8 또는 12의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄 및 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄, 및 서열 번호 14의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 포함한다. 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체는, 서열 번호 6의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트, 서열 번호 8 또는 12의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄 및 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄, 및 서열 번호 14의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 포함한다.

[0193] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체는, 서열 번호 6의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄, 서열 번호 8의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄, 및 서열 번호 14의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 포함하는, 이중 특이성 항체이다.

[0194] 본 명세서에 있어서 「번역후 수식」이란, 항체를 세포 내에서 발현시켰을 경우에 항체가 번역 후에 수식을 받는 것을 말한다. 번역후 수식의 예로서, 중쇄 N말단의 글루타민 또는 글루타민산의 파이로글루타밀화, 글리코실화, 산화, 탈아마이드화, 당화 등의 수식이나, 중쇄 C말단의 리신의 카복시펩티다제에 의한 절단에 의한 리신 결실을 들 수 있다. 여러 가지 항체에 있어서, 이와 같은 번역후 수식이 생김이 알려져 있다(J. Pharm. Sci., 2008, Vol. 97, p. 2426-2447).

[0195] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체는, 번역후 수식되어 있어도 된다. 하나의 실시형태에 있어서, 번역후 수식은 중쇄 가변 영역 N말단의 파이로글루타밀화 및/또는 중쇄 C말단 리신 결

실이다. N말단의 파이로글루타밀화 또는 C말단 리신 결실에 의한 번역후 수식이 항체의 활성에 영향을 미치는 것은 아님은 당해 분야에서 알려져 있다(A_nalytical Biochemistry, 2006, Vol. 348, p. 24-39).

[0196] 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체는, 인간 TSPAN8(유전자 번호: NM_004616.2) 및 인간 CD3 ε δ 복합 단백(CD3 ε 유전자 번호: NM_000733.3, CD3 δ 유전자 번호: NM_000732.4 또는 NM_001040651.1)에 결합한다. 인간 TSPAN8 및 인간 CD3 ε δ 복합 단백에 결합하는지 여부는, 공지된 결합 활성 측정 방법을 이용하여 확인할 수 있다. 결합 활성을 측정하는 방법으로서는, 예를 들어, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay(ELISA)법, 플로 사이토메트리법 등의 방법을 들 수 있다. ELISA법을 이용하는 경우는, 예를 들어 실시예 8에 기재되는 방법을 이용할 수 있고, 플로 사이토메트리법을 이용하는 경우에는, 예를 들어 실시예 1에 기재되는 방법을 이용할 수 있다.

[0197] 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체는, 본 명세서에 개시되는, 항TSPAN8 항체 및 항CD3-scFv 영역의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 서열 정보 등에 기초하여, 당해 분야에서 공지된 방법을 사용하여, 당업자이면 제작할 수 있다. 또한, 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체의 항CD3-scFv 영역은, 공지된 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 서열 정보 등에 기초하여, 당해 분야에서 공지된 방법을 사용하여, 당업자이면 제작할 수 있다. 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체는, 인간화 항체 또는 인간 항체이다. 인간화 항체의 제작에 임해서는, 당업자에게 주지의 방법을 이용하여, 적절히 백 뮤테이션을 도입해도 된다(Bioinformatics, 2015, Vol. 31, p. 434-435). 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체는, 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어, 후술하는 <본 발명의 이중 특이성 항체를 생산하는 방법 및 해당 방법에 의해 생산되는 본 발명의 이중 특이성 항체>에 기재된 방법에 따라 제조할 수 있다.

[0198] <본 발명의 이중 특이성 항체의 폴리뉴클레오티드>

[0199] 본 발명은 또한, 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체를 생산하기 위해서 사용될 수 있는, 이하의 폴리뉴클레오티드(「본 발명의 이중 특이성 항체의 폴리뉴클레오티드」라고도 칭한다)를 제공한다.

[0200] (1) 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드를 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;

[0201] (2) 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;

[0202] (3) 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

[0203] 상기 (1)의 폴리뉴클레오티드의 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 이중 특이성 항체의 폴리뉴클레오티드는, 이하의 (a) 및 (b)로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드이다:

[0204] (a) 서열 번호 6의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 6의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 6의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;

[0205] (b) 서열 번호 10의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 10의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 10의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

[0206] 상기 (1)의 폴리뉴클레오티드의 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 이중 특이성 항체의 폴리뉴클레오티드는, 이하의 (a) 및 (b)로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드이다:

[0207] (a) 서열 번호 6의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;

[0208] (b) 서열 번호 10의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

[0209] 상기 (1)의 폴리뉴클레오티드의 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 이중 특이성 항체의 폴리뉴클레오티드는,

서열 번호 6의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드이다.

[0210] 상기 (2)의 폴리뉴클레오티드의 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 이중 특이성 항체의 폴리뉴클레오티드는, 이하의 (a) 및 (b)로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드이다:

[0211] (a) 서열 번호 8의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 8의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 8의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;

[0212] (b) 서열 번호 12의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 8의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 12의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

[0213] 상기 (2)의 폴리뉴클레오티드의 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 이중 특이성 항체의 폴리뉴클레오티드는, 이하의 (a) 및 (b)로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드이다:

[0214] (a) 서열 번호 8의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;

[0215] (b) 서열 번호 12의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

[0216] 상기 (2)의 폴리뉴클레오티드의 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 이중 특이성 항체의 폴리뉴클레오티드는, 서열 번호 8의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드이다.

[0217] 상기 (3)의 폴리뉴클레오티드의 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 이중 특이성 항체의 폴리뉴클레오티드는, 이하의 폴리뉴클레오티드이다:

[0218] 서열 번호 14의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 50부터 68까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 101부터 114까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 168부터 181까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 197부터 203까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 236부터 244까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

[0219] 상기 (3)의 폴리뉴클레오티드의 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 이중 특이성 항체의 폴리뉴클레오티드는, 이하의 폴리뉴클레오티드이다:

[0220] 서열 번호 14의 아미노산 번호 1부터 125까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 146부터 254까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

[0221] 상기 (3)의 폴리뉴클레오티드의 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 이중 특이성 항체의 폴리뉴클레오티드는, 서열 번호 14의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드이다.

[0222] 본 발명의 이중 특이성 항체의 폴리뉴클레오티드는, 그의 염기 서열에 기초하여, 당해 분야에서 공지된 방법을 사용하여, 당업자이면 제작할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 이중 특이성 항체의 폴리뉴클레오티드는, 당해 분야에서 공지된 유전자 합성 방법을 이용하여 합성하는 것이 가능하다. 이와 같은 유전자 합성 방법으로서는, 국제 공개 번호 90/07861호에 기재된 항체 유전자의 합성 방법 등의 당업자에게 공지된 여러 가지 방법이 사용될 수 있다.

[0223] <본 발명의 이중 특이성 항체의 발현 벡터>

- [0224] 본 발명은 또한, 이하의 (1)~(3)에 기재된 본 발명의 이중 특이성 항체의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터(「본 발명의 이중 특이성 항체의 발현 벡터」라고도 칭한다)를 제공한다. 이를 폴리뉴클레오티드는, 각각 이 별개의 벡터에 포함되어 있어도 되고, 또는 복수의 폴리뉴클레오티드가 1개의 벡터에 포함되어 있어도 된다.
- [0225] (1) 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0226] (2) 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0227] (3) 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0228] 상기 (1)의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 본 발명의 이중 특이성 항체의 발현 벡터의 하나의 실시형태에 있어서, 해당 발현 벡터는, 이하의 (a) 및 (b)로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드를 포함한다:
- [0229] (a) 서열 번호 6의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 6의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 6의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0230] (b) 서열 번호 10의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 10의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 10의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0231] 상기 (1)의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 본 발명의 이중 특이성 항체의 발현 벡터의 하나의 실시형태에 있어서, 해당 발현 벡터는, 이하의 (a) 및 (b)로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드를 포함한다:
- [0232] (a) 서열 번호 6의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0233] (b) 서열 번호 10의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0234] 상기 (1)의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 본 발명의 이중 특이성 항체의 발현 벡터의 하나의 실시형태에 있어서, 해당 발현 벡터는, 서열 번호 6의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0235] 상기 (2)의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 본 발명의 이중 특이성 항체의 발현 벡터의 하나의 실시형태에 있어서, 해당 발현 벡터는, 이하의 (a) 및 (b)로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드를 포함한다:
- [0236] (a) 서열 번호 8의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 8의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 8의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0237] (b) 서열 번호 12의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 8의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 12의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0238] 상기 (2)의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 본 발명의 이중 특이성 항체의 발현 벡터의 하나의 실시형태에 있어서, 해당 발현 벡터는, 이하의 (a) 및 (b)로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드를 포함한다:
- [0239] (a) 서열 번호 8의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0240] (b) 서열 번호 12의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항

TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

- [0241] 상기 (2)의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 본 발명의 이중 특이성 항체의 발현 벡터의 하나의 실시형태에 있어서, 해당 발현 벡터는, 서열 번호 8의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0242] 상기 (3)의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 본 발명의 이중 특이성 항체의 발현 벡터의 하나의 실시형태에 있어서, 해당 발현 벡터는, 이하의 폴리뉴클레오티드를 포함한다:
- [0243] 서열 번호 14의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 50부터 68까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 101부터 114까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 168부터 181까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 197부터 203까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 236부터 244까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0244] 상기 (3)의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 본 발명의 이중 특이성 항체의 발현 벡터의 하나의 실시형태에 있어서, 해당 발현 벡터는, 이하의 폴리뉴클레오티드를 포함한다:
- [0245] 서열 번호 14의 아미노산 번호 1부터 125까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 146부터 254까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0246] 상기 (3)의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 본 발명의 이중 특이성 항체의 발현 벡터의 하나의 실시형태에 있어서, 해당 발현 벡터는, 서열 번호 14의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0247] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 이중 특이성 항체의 발현 벡터는, 이하의 (a)~(e)로부터 선택되는 1 이상의 수의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터이다:
- [0248] (a) 서열 번호 6의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 6의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 6의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0249] (b) 서열 번호 8의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 8의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 8의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0250] (c) 서열 번호 10의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 10의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 10의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0251] (d) 서열 번호 12의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 8의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 12의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0252] (e) 서열 번호 14의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 50부터 68까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 101부터 114까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 168부터 181까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 197부터 203까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 236부터 244까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

폴리펩티드를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

- [0253] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 이중 특이성 항체의 발현 벡터는, 이하의 (a)~(e)로부터 선택되는 1 이상의 수의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터이다:
- [0254] (a) 서열 번호 6의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0255] (b) 서열 번호 8의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0256] (c) 서열 번호 10의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0257] (d) 서열 번호 12의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0258] (e) 서열 번호 14의 아미노산 번호 1부터 125까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 146부터 254까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0259] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 이중 특이성 항체의 발현 벡터는, 이하의 (a)~(c)로부터 선택되는 1 이상의 수의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터이다:
- [0260] (a) 서열 번호 6의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0261] (b) 서열 번호 8의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0262] (c) 서열 번호 14의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0263] 본 발명의 이중 특이성 항체의 발현 벡터는, 진핵세포(예를 들어, 동물 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 효모) 및/ 또는 원핵세포(예를 들어, 대장균) 등의 각종 숙주 세포 중에 있어서 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 산생할 수 있는 것인 한, 특별히 제한되는 것은 아니다. 이와 같은 발현 벡터로서는, 예를 들어, 플라스미드 벡터, 바이러스 벡터 등을 들 수 있다. 플라스미드 벡터로서는, 예를 들어, pcDNA 시리즈(Thermo Fisher Scientific사), pALTER(등록상표)-MAX(프로메가), pHEK293 Ultra Expression Vector(다카라 바이오사), pEE6.4 또는 pEE12.4(Lonza Biologics사) 등을 사용할 수 있다. 바이러스 벡터로서는, 예를 들어, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 레트로바이러스, 아데노 수반 바이러스를 사용할 수 있다. 예를 들어, 세포에 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 도입하기 위해서 렌티바이러스를 사용하는 경우, 당해 렌티바이러스는, pLVSIN-CMV/EF1 α 벡터(다카라 바이오사), pLenti 벡터(Thermo Fisher Scientific사) 등을 이용할 수 있다. 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 이중 특이성 항체의 발현 벡터에 사용되는 벡터는, pcDNATM 3.4-TOPO(등록상표)(Thermo Fisher Scientific사) 및 pcDNATM 3.1(Thermo Fisher Scientific사)이다.
- [0264] 본 발명의 이중 특이성 항체의 발현 벡터는, 본 발명의 이중 특이성 항체의 폴리뉴클레오티드에 동작 가능하도록 연결된 프로모터를 포함할 수 있다. 동물 세포에서 본 발명의 이중 특이성 항체의 폴리뉴클레오티드를 발현시키기 위한 프로모터로서는, 예를 들어, CMV, RSV, SV40 등의 바이러스 유래 프로모터, 액틴 프로모터, EF(elongation factor) 1 α 프로모터, 히트쇼크 프로모터 등을 들 수 있다. 세균(예를 들어, 에세리키아속균)에서 본 발명의 이중 특이성 항체의 폴리뉴클레오티드를 발현시키기 위한 프로모터로서는, 예를 들어, trp 프로모터, lac 프로모터, λ PL 프로모터, tac 프로모터 등을 들 수 있다. 효모에서 본 발명의 이중 특이성 항체의 폴리뉴클레오티드를 발현시키기 위한 프로모터로서는, 예를 들어, GAL1 프로모터, GAL10 프로모터, PH05 프로모터, PGK 프로모터, GAP 프로모터, ADH 프로모터 등을 들 수 있다.
- [0265] 숙주 세포로서, 동물 세포, 곤충 세포 또는 효모를 이용하는 경우, 본 발명의 이중 특이성 항체의 발현 벡터는,

개시 코돈 및 종지 코돈을 포함할 수 있다. 이 경우, 인핸서 서열, 본 발명의 항체 또는 그 중쇄 혹은 경쇄를 코딩하는 유전자의 5' 측 및 3' 측의 비번역 영역, 분비 시그널 서열, 스플라이싱 접합부, 폴리아데닐레이션 부위, 혹은 복제 가능 단위 등을 포함하고 있어도 된다. 숙주 세포로서 대장균을 이용하는 경우, 본 발명의 발현 벡터는, 개시 코돈, 종지 코돈, 터미네이터 영역, 및 복제 가능 단위를 포함할 수 있다. 본 발명의 발현 벡터는, 목적에 따라 통상 이용되는 약제 선택 마커 유전자(예를 들어, 테트라사이클린 내성 유전자, 암피실린 내성 유전자, 카나마이신 내성 유전자, 네오마이신 내성 유전자, 다이하이드로엽산 환원 효소 유전자)를 포함하고 있어도 된다.

[0266] <본 발명의 형질 전환된 숙주 세포>

본 발명은 또한, 본 발명의 이중 특이성 항체의 발현 벡터에 의해 형질 전환된 숙주 세포(「본 발명의 형질 전환된 숙주 세포」라고도 칭한다)를 제공한다. 본 발명의 형질 전환된 숙주 세포는, 본 발명의 이중 특이성 항체의 발현 벡터에 의한 형질 전환에 의해, 이하의 (1)~(3)의 본 발명의 이중 특이성 항체의 폴리뉴클레오티드의 하나 또는 복수의 폴리뉴클레오티드를 포함하면 되고, 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 형질 전환된 숙주 세포는, 이하의 (1)~(3)의 폴리뉴클레오티드를 모두 포함한다:

(1) 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;

(2) 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;

(3) 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

[0271] 형질 전환되는 숙주 세포로서는, 사용하는 발현 벡터에 적합하고, 해당 발현 벡터로 형질 전환되어, 항체 또는 용합체를 발현할 수 있는 것인 한, 특별히 한정되는 것은 아니다. 형질 전환되는 숙주 세포로서는, 예를 들어, 본 발명의 기술 분야에 있어서 통상 사용되는 종래 세포 또는 인공적으로 수립된 세포 등 여러 가지 세포(예를 들어, 동물 세포(예를 들어, CHO-K1 세포, ExpiCHO-S(등록상표) 세포, CHOK1SV 세포, CHO-DG44 세포, HEK293 세포, NS0 세포), 곤충 세포(예를 들어, Sf9), 세균(에세리키아속균 등), 효모(사카로마이세스속, 피키아속 등) 등)를 들 수 있다. 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 숙주 세포는 CHO-K1 세포, 또는 ExpiCHO-S 세포이다.

[0272] 숙주 세포를 형질 전환하는 방법은, 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어, 인산 칼슘법, 일렉트로포레이션법, 또는 리포액션법 등의 당업자에게 일반적으로 이용되는 방법을 사용할 수 있다.

[0273] 형질 전환된 숙주 세포의 선별은, 당업자에게 일반적으로 사용되고 있는 방법으로 행할 수 있다. 선별 방법에는, 예를 들어, 약제 선택 마커 유전자와 테트라사이클린, 암피실린, 네오마이신 또는 하이그로마이신 등의 약제를 이용한 약제 선택법이나, 한의 희석법, 싱글 셀 소팅법, 또는 콜로니 꽂업법 등의 세포 단리법을 이용할 수 있다.

[0274] 상기 (1)의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 본 발명의 형질 전환된 숙주 세포의 하나의 실시형태에 있어서, 해당 숙주 세포는, 이하의 (a) 및 (b)로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드를 포함한다:

[0275] (a) 서열 번호 6의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 6의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 6의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;

[0276] (b) 서열 번호 10의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 10의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 10의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

[0277] 상기 (1)의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 본 발명의 형질 전환된 숙주 세포의 하나의 실시형태에 있어서, 해당 숙주 세포는, 이하의 (a) 및 (b)로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드를 포함한다:

[0278] (a) 서열 번호 6의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;

- [0279] (b) 서열 번호 10의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0280] 상기 (1)의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 본 발명의 형질 전환된 숙주 세포의 하나의 실시형태에 있어서, 해당 숙주 세포는, 서열 번호 6의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0281] 상기 (2)의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 본 발명의 형질 전환된 숙주 세포의 하나의 실시형태에 있어서, 해당 숙주 세포는, 이하의 (a) 및 (b)로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드를 포함한다:
- [0282] (a) 서열 번호 8의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 8의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 8의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0283] (b) 서열 번호 12의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 8의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 12의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0284] 상기 (2)의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 본 발명의 형질 전환된 숙주 세포의 하나의 실시형태에 있어서, 해당 숙주 세포는, 이하의 (a) 및 (b)로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드를 포함한다:
- [0285] (a) 서열 번호 8의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0286] (b) 서열 번호 12의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0287] 상기 (2)의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 본 발명의 형질 전환된 숙주 세포의 하나의 실시형태에 있어서, 해당 숙주 세포는, 서열 번호 8의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0288] 상기 (3)의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 본 발명의 형질 전환된 숙주 세포의 하나의 실시형태에 있어서, 해당 숙주 세포는, 이하의 폴리뉴클레오티드를 포함한다:
- [0289] 서열 번호 14의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 50부터 68까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 101부터 114까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 168부터 181까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 197부터 203까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 236부터 244까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0290] 상기 (3)의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 본 발명의 형질 전환된 숙주 세포의 하나의 실시형태에 있어서, 해당 숙주 세포는, 이하의 폴리뉴클레오티드를 포함한다:
- [0291] 서열 번호 14의 아미노산 번호 1부터 125까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역, 서열 번호 14의 아미노산 번호 146부터 254까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0292] 상기 (3)의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 본 발명의 형질 전환된 숙주 세포의 하나의 실시형태에 있어서, 해당 숙주 세포는, 서열 번호 14의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3-scFv와 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0293] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 형질 전환된 숙주 세포는, 이하의 (a)~(e)로부터 선택되는 1개 이상의

폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포이다:

- [0294] (a) 서열 번호 6의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 6의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 6의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0295] (b) 서열 번호 8의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 8의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 8의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0296] (c) 서열 번호 10의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 10의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 10의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0297] (d) 서열 번호 12의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 8의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 12의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0298] (e) 서열 번호 14의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 50부터 68까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 101부터 114까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 168부터 181까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 197부터 203까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 236부터 244까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0299] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 형질 전환된 숙주 세포는, 이하의 (a)~(e)로부터 선택되는 1개 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포이다:
- [0300] (a) 서열 번호 6의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,
- [0301] (b) 서열 번호 8의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,
- [0302] (c) 서열 번호 10의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,
- [0303] (d) 서열 번호 12의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,
- [0304] (e) 서열 번호 14의 아미노산 번호 1부터 125까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 146부터 254까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv와 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0305] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 형질 전환된 숙주 세포는, 이하의 (a)~(c)로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포이다:
- [0306] (a) 서열 번호 6의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0307] (b) 서열 번호 8의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴

클레오티드;

[0308] (c) 서열 번호 14의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3-scFv와 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

[0309] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 형질 전환된 숙주 세포는, 서열 번호 6의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 서열 번호 8의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 및, 서열 번호 14의 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0310] <본 발명의 이중 특이성 항체를 생산하는 방법>

[0311] 본 발명은 또한, 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체를 생산하는 방법(「본 발명의 생산 방법」이라고도 칭한다)을 제공한다. 본 발명의 생산 방법에는, <본 발명의 형질 전환된 숙주 세포>에 기재된 형질 전환된 숙주 세포를 배양하여, 해당 세포 또는 해당 배양 상청 중에 해당 항체를 발현시키는 공정, 해당 항체를 회수, 단리, 정제하는 방법 등이 포함될 수 있지만, 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체가 생산되는 한에 있어서, 이들 방법으로 한정되는 것은 아니다.

[0312] 본 발명의 형질 전환된 숙주 세포의 배양은 공지된 방법에 의해 행할 수 있다. 배양 조건, 예를 들어, 온도, 배지의 pH 및 배양 시간은, 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다. 숙주 세포가 동물 세포인 경우, 배지로서는, 예를 들어, 약 5~20%의 태아 소 혈청을 포함하는 MEM 배지(Science, 1959, Vol. 130, p. 432-437), DMEM 배지(Virol., 1959, Vol. 8, p. 396), RPMI-1640 배지(J. Am. Med. Assoc., 1967, Vol. 199, p. 519), 199 배지(Exp. Biol. Med., 1950, Vol. 73, p. 1-8) 등을 이용할 수 있다. 배지의 pH는, 예를 들어, 약 6~8이며, 배양은, 필요에 따라 통기나 교반하면서, 통상 약 30~40°C에서 약 15~336시간 행해진다. 숙주 세포가 곤충 세포인 경우, 배지로서는, 예를 들어, 태아 소 혈청을 포함하는 Grace's 배지(Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1985, Vol. 82, p. 8404) 등을 이용할 수 있다. 배지의 pH는, 예를 들어, 약 5~8이며, 배양은, 필요에 따라 통기나 교반하면서, 통상 약 20~40°C에서 약 15~100시간 행해진다. 숙주 세포가 대장균 또는 효모인 경우, 배지로서는, 예를 들어, 영양원을 함유하는 액체 배지가 적당하다. 영양 배지는, 예를 들어, 형질 전환된 숙주 세포의 생육에 필요한 탄소원, 무기 질소원, 또는 유기 질소원을 포함하고 있다. 탄소원으로서는, 예를 들어, 글루코스, 텍스트란, 가용성 전분, 자당 등이, 무기 질소원 또는 유기 질소원으로서는, 예를 들어, 암모늄염류, 질산염류, 아미노산, 콘 스티프 리커, 펩톤, 카제인, 고기 추출물, 대두박, 감자 추출액 등을 들 수 있다. 소망에 따라 다른 영양소(예를 들어, 무기염(예를 들어, 염화 칼슘, 인산이수소 나트륨, 염화 마그네슘), 비타민류), 항생 물질(예를 들어, 테트라사이클린, 네오마이신, 암피실린, 카나마이신) 등을 포함하고 있어도 된다. 배지의 pH는, 예를 들어, 약 5~8이다. 숙주 세포가 대장균인 경우, 배지로서는, 예를 들어, LB 배지, M9 배지(Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Vol. 3, A2.2) 등을 이용할 수 있다. 배양은, 필요에 따라 통기나 교반하면서, 통상 약 14~43°C에서 약 3~24시간 행해진다. 숙주 세포가 효모인 경우, 배지로서는, 예를 들어, Burkholder 최소 배지(Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1980, Vol. 77, p. 4505) 등을 이용할 수 있다. 배양은, 필요에 따라 통기나 교반하면서, 통상 약 20~35°C에서 약 14~144시간 행해진다. 전술과 같은 배양에 의해, 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체를 발현시킬 수 있다.

[0313] 본 발명의 생산 방법은, 본 발명의 형질 전환된 숙주 세포를 배양하여, 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체를 발현시키는 공정에 더하여, 추가로는, 해당 형질 전환된 숙주 세포로부터 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체를 회수, 단리 또는 정제하는 공정을 포함할 수 있다. 단리 또는 정제 방법으로서는, 예를 들어, 염석, 용매 침전법 등의 용해도를 이용하는 방법, 투석, 한의 여과, 겔 여과 등의 분자량의 차를 이용하는 방법, 이온 교환 크로마토그래피, 하이드록실아파타이트 크로마토그래피 등의 하전을 이용하는 방법, 어피니티 크로마토그래피 등의 특이적 친화성을 이용하는 방법, 역상 고속 액체 크로마토그래피 등의 소수성의 차를 이용하는 방법, 등전점 전기 영동 등의 등전점의 차를 이용하는 방법 등을 들 수 있다. 하나의 실시형태에 있어서, 배양 상청 중에 분비된 항체는, 각종 크로마토그래피, 예를 들어, 프로틴 A 칼럼 또는 프로틴 G 칼럼을 이용한 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제할 수 있다.

[0314] 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체에는, 본 발명의 생산 방법에 의해 생산되는 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체도 포함된다.

[0315] <본 발명의 이중 특이성 항체의 의약 조성물 등>

[0316] 본 발명의 의약 조성물에는, 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포

함하는 의약 조성물이 포함된다. 본 발명의 의약 조성물은, 당해 분야에 있어서 통상 이용되고 있는 부형제, 즉, 약제용 부형제나 약제용 담체 등을 이용하여, 통상 사용되는 방법에 의해 조제할 수 있다. 이들 의약 조성물의 제형의 예로서는, 예를 들어, 주사제, 점적용제 등의 비경구제를 들 수 있고, 정맥내 투여, 피하 투여, 복강내 투여 등에 의해 투여할 수 있다. 제제화에 임해서는, 약학적으로 허용되는 범위에서, 이들 제형에 따른 부형제, 담체, 첨가제 등을 사용할 수 있다.

[0317] 본 발명의 의약 조성물에는, 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체의 번역후 수식체를 포함할 수 있다. 예를 들어, C말단 리신의 결실이나 N말단의 파이로글루타밀화의 양쪽 또는 한쪽을 받은 항체 등을 함유하는 의약 조성물도 본 발명에 포함된다.

[0318] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 의약 조성물은, 이하 (a) 및 (b)로부터 선택되는 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체 및/또는 당해 항체의 번역후 수식체를 함유하는 의약 조성물이다:

(a) 서열 번호 6의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 6의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 6의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄, 서열 번호 8의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 8의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 8의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄, 및, 서열 번호 14의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 50부터 68까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 101부터 114까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 168부터 181까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 197부터 203까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 236부터 244까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 포함하는, 이중 특이성 항체;

(b) 서열 번호 10의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 10의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 10의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄, 서열 번호 12의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 12의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 12의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄, 및, 서열 번호 14의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 50부터 68까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 101부터 114까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 168부터 181까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 197부터 203까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 236부터 244까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CD3 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 포함하는, 이중 특이성 항체.

[0321] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 의약 조성물은, 이하 (a) 및 (b)로부터 선택되는 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체 및/또는 당해 항체의 번역후 수식체를 함유하는 의약 조성물이다:

(a) 서열 번호 6의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄, 서열 번호 8의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄, 및, 서열 번호 14의 아미노산 번호 1부터 125까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 146부터 254까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 포함하는, 이중 특이성 항체;

(b) 서열 번호 10의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄, 서열 번호 12의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄, 및, 서열 번호 14의 아미노산 번호 1부터 125까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 14의 아미-

노산 번호 146부터 254까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 포함하는, 이중 특이성 항체.

[0324] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 의약 조성물은, 서열 번호 6의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄 프래그먼트와 제1 Fc 폴리펩티드가 연결된 항TSPAN8 항체의 중쇄, 서열 번호 8의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄, 및 서열 번호 14의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드를 포함하는 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체 및/또는 당해 항체의 번역후 수식체를 함유하는 의약 조성물이다.

[0325] 제제화에 있어서의 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체, 항TSPAN8 항체의 첨가량은, 환자의 증상의 정도나 연령, 사용하는 제제의 제형, 혹은 항체의 결합 역가 등에 따라 상이하지만, 예를 들어, 0.001mg/kg~100mg/kg 정도를 이용할 수 있다.

[0326] <본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체의 의약 용도>

[0327] 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체, 및 그들을 함유하는 의약 조성물은, 암의 치료를 위해서 이용할 수 있다. 또한, 본 발명에는, 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체의 치료 유효량을 대상에게 투여하는 공정을 포함하는, 암을 치료하는 방법이 포함된다. 또한, 본 발명에는, 암의 치료에 사용하기 위한, 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체를 포함한다. 또한, 본 발명에는, 암의 치료용 의약 조성물의 제조에 있어서의, 본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체의 사용이 포함된다. 본 발명에 의한 치료의 대상이 되는 암은, 특별히 한정되지 않지만, 예를 들어, 여러 가지 복막 파종 암, 위암, 폐암, 급성 림프아구성 백혈병(ALL), 급성 골수성 백혈병(AML), 호지킨 림프종, 논호지킨 림프종, B 세포 림프종, 다발성 골수종, T 세포 림프종 등의 혈액암, 골수 이형성 증후군, 선암, 편평상피암, 선편평상피암, 미분화암, 대세포암, 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 중피종, 피부암, 피부 T 세포 림프종, 유방암, 전립선암, 방광암, 질암, 경부암, 두경부암, 자궁암, 자궁경암, 간장암, 담낭암, 담관암, 신장암, 췌장암, 결장암, 대장암, 직장암, 소장암, 위암, 식도암, 정소암, 난소암, 뇌종양 등의 고형암, 및 골 조직, 연골 조직, 지방 조직, 근 조직, 혈관 조직 및 조혈 조직의 암 외에, 연골 육종, 유잉 육종, 악성 혈관 내피종, 악성 슈원종, 골육종, 연부 조직 육종 등의 육종이나, 교아종, 다형성교아종, 간아종, 골수아종, 신아종, 신경아종, 췌아종, 흉막폐아종, 망막아종 등의 아종 등을 들 수 있다.

[0328] <본 발명의 항TSPAN8 항체>

[0329] 본 발명은 또한, 이하에 설명하는, 인간 TSPAN8에 대한 신규 항TSPAN8 항체 또는 그의 결합 프래그먼트를 제공한다. 본 발명에 의해 제공되는 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트를 통틀어 「본 발명의 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트」라고도 칭한다.

[0330] 본 발명은, 인간 TSPAN8 발현 암 세포에 선택적으로 결합하는 항TSPAN8 항체 또는 그의 결합 프래그먼트를 제공한다.

[0331] 본 명세서에 있어서, 「인간 TSPAN8 발현 암 세포에 선택적으로 결합하는」이란, 어느 항TSPAN8 항체를, 시판 항TSPAN8 항체(TAL69, REA443 등) 또는 시판 항TSPAN8 항체와 마찬가지의 결합 프로파일을 나타내는 항TSPAN8 항체(예를 들어 9F6, 18C10 등)와 결합 활성의 비교를 했을 경우에, 시판 항체 등에 비해 인간 TSPAN8 발현 암 세포에 발현하는 TSPAN8에의 결합 강도가, 3배 이상, 바람직하게는 5배 이상, 더 바람직하게는 10배 이상이며, 또한, 정상 세포에 발현하는 TSPAN8에의 결합 강도가 1/3 이하, 바람직하게는 1/5 이하, 더 바람직하게는 1/10 이하인 것을 가리킨다. 항체의 세포에의 결합 강도는, 예를 들어 실시예 1에 나타내는 플로 사이토메트리법으로 얻어진 MFI(Mean Fluorescence Intensity)치, 또는 각 항체의 MFI로부터 각 Isotype MFI를 빼서 산출한 Δ MFI치를 이용하여 산출할 수 있다. 또한, 항체의 세포에의 결합 강도는, 암 세포와 정상 세포를 이용한 ELISA 법 등, 당업자가 통상 사용할 수 있는 방법에 의해서도 측정 및 산출할 수 있다.

[0332] 여기에서, 인간 TSPAN8 발현 암 세포란, 암 환자로부터 단리한 인간 TSPAN8 발현하는 암 세포를 말하고, 실시예 1-1에 기재한 환자 유래의 암 복막 파종 세포 외에, American Type Culture Collection(ATCC) 등의 세포 뱅크 등으로부터 입수 가능한 암 세포주를 이용할 수 있다. 암 세포주로서는, 예를 들어, 실시예 1-1에 기재한 방법으로 환자 복수로부터 수립된 세포주 외에, AGS, KATOIII, SNU5, SNU16, SNU520, ANU719, NCI-N87, HT-29, LoVo, GP2d, AsPC-1, OE19, Li-7Hs746, NUGC-4, OCUM1, MNK45 등의 TSPAN8을 발현하는 세포주를 사용할 수 있다. 또한, 정상 세포란, 정상 조직 유래의 세포를 말하고, 실시예 1-5에서 이용한 환자 유래 복막 중피 세포 외에, 실시예 1-3에서 이용한 인간 말초혈 단핵 세포, 실시예 1-3에서 이용한 배양 복막 중피 세포 등의 시판되

는 초대 배양 세포 또는 세포주를 사용할 수 있다. 하나의 실시형태에 있어서, 정상 세포는 TSPAN8을 발현하고 있다. 하나의 실시형태에 있어서, TSPAN8을 발현하고 있는 정상 세포는 환자 유래 복막 중피 세포 및 실시예 1-3에서 이용한 배양 복막 중피 세포이다. 하나의 실시형태에 있어서, 정상 세포는 TSPAN8을 발현하고 있지 않는 세포이다. 하나의 실시형태에 있어서, TSPAN8을 발현하고 있지 않는 정상 세포는 실시예 1-3에서 이용한 인간 말초혈 단핵 세포이다.

[0333] 본 발명은 또한, TSPAN8 단백질의 일부를 에피토프로서 인식하는 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트를 제공한다. 하나의 실시형태에 있어서, 당해 에피토프는 TSPAN8의 LEL 영역에 포함되는 아미노산 서열로 이루어지는 구조 단위이다. 하나의 실시형태에 있어서, 당해 에피토프는 서열 번호 2의 126부터 155까지의 아미노산 서열로 나타나는 TSPAN8 단백질의 일부의 영역으로 이루어지는 구조 단위이다. 하나의 실시형태에 있어서, 당해 에피토프는 서열 번호 2의 126부터 155까지의 아미노산 서열로 나타나는 TSPAN8 단백질의 일부의 영역에 포함되는 1 또는 2 이상의 아미노산 서열로 이루어지는 구조 단위이다. 하나의 실시형태에 있어서, 당해 에피토프는 적어도 서열 번호 2의 아미노산 번호 131을 포함하는 구조 단위이다.

[0334] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트는, 서열 번호 2의 아미노산 번호 126부터 155까지의 인간 TSPAN8의 영역에 존재하는 적어도 1개의 아미노산에 결합한다. 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트는, 서열 번호 2의 아미노산 번호 126부터 155까지의 인간 TSPAN8의 영역에 존재하는 적어도 1개의 아미노산에 결합하고, 또한, 인간 TSPAN8 발현 암 세포에 선택적으로 결합한다.

[0335] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트는, 서열 번호 2의 아미노산 번호 126부터 155까지의 인간 TSPAN8의 영역에 존재하는 적어도 서열 번호 2의 아미노산 번호 131의 아미노산에 결합한다. 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트는, 서열 번호 2의 아미노산 번호 126부터 155까지의 인간 TSPAN8의 영역에 존재하는 적어도 서열 번호 2의 아미노산 번호 131의 아미노산에 결합하고, 또한, 인간 TSPAN8 발현 암 세포에 선택적으로 결합한다.

[0336] 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트가, 서열 번호 2의 아미노산 번호 126부터 155까지의 인간 TSPAN8의 영역에 존재하는 아미노산(예를 들어, 서열 번호 2의 아미노산 번호 131의 아미노산)에 결합하는지 여부는, 본원 실시예 4-1 및 4-2에 기재된 에피토프 동정 방법을 사용하여 확인할 수 있다.

[0337] 본 발명은 또한, 이하의 (a) 및 (b)에 나타내는, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트를 제공한다:

[0338] (a) 서열 번호 4의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 4의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및, 서열 번호 8의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 8의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 8의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트;

[0339] (b) 서열 번호 10의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 10의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 10의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및, 서열 번호 12의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 12의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 12의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트.

[0340] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트는, 이하의 (a) 및 (b)로부터 선택되는, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트이다:

[0341] (a) 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역, 및, 서열 번호 8의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트;

[0342] (b) 서열 번호 10의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역, 및, 서열 번호 12의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트 또는 그의 항원 결합 프래그먼트.

- [0343] 본 발명의 항TSPAN8 항체의 중쇄 정상 영역으로서는, Ig γ , Ig μ , Ig α , Ig δ 또는 Ig ϵ 의 어느 정상 영역도 선택 가능하다. Ig γ 로서는, 예를 들어, Ig γ 1, Ig γ 2, Ig γ 3 또는 Ig γ 4부터 선택하는 것이 가능하다. 하나의 실시형태에 있어서, 중쇄 정상 영역은 Ig γ 1 정상 영역이며, 예를 들어, 인간 Ig γ 1 정상 영역이다. 또한, 본 발명의 항TSPAN8 항체의 중쇄 정상 영역은, ADCC나 CDC를 저하시키기 위해서 LALA 변이 등의 아미노산 변이를 포함해도 된다. 본 발명의 항TSPAN8 항체의 경쇄 정상 영역으로서는, Ig λ 또는 Ig κ 의 어느 정상 영역도 선택 가능할 수 있다. 하나의 실시형태에 있어서, 경쇄 정상 영역은 Ig κ 정상 영역이며, 예를 들어, 인간 Ig κ 정상 영역이다.
- [0344] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8 항체의 항원 결합 프래그먼트는, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂, 또는 한팔 항체이다.
- [0345] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8 항체는, 이하의 (a) 및 (b)로부터 선택되는, 항TSPAN8 항체이다:
- [0346] (a) 서열 번호 4의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 및 서열 번호 8의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄를 포함하는, 항TSPAN8 항체;
- [0347] (b) 서열 번호 10의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 및 서열 번호 12의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄를 포함하는, 항TSPAN8 항체.
- [0348] 본 발명은 또한, 이하의 (a)~(d)에 나타내는, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트(이들을 통틀어 특히 「본 발명의 경합 항TSPAN8 항체」라고도 칭한다)를 제공한다:
- [0349] (a) 인간 TSPAN8 발현 암 세포에 대한 결합에 관해서 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 8의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체와 경합하는, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트;
- [0350] (b) 인간 TSPAN8 발현 암 세포에 대한 결합에 관해서 서열 번호 10의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 12의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체와 경합하는, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트;
- [0351] (c) 인간 TSPAN8 발현 암 세포에 대한 결합에 관해서 서열 번호 34의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 36의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체와 경합하는, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트;
- [0352] (d) 인간 TSPAN8 발현 암 세포에 대한 결합에 관해서 서열 번호 35의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 37의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체와 경합하는, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트.
- [0353] 본 발명의 경합 항TSPAN8 항체는, 예를 들어, 인간 TSPAN8 발현 세포를 항원으로 하여 공지된 항체 제작 기술을 이용하여 인간 TSPAN8에 대한 항체를 취득하고, 얻어진 항체에 대해, 경합 대상인 항TSPAN8 항체와의 인간 TSPAN8 발현 세포에 대한 결합에 관한 경합 시험을 행하는 것에 의해, 당업자이면 취득 가능하다. 경합 시험으로서는, 플로 사이토메트리법 등, 당업자에게 공지된 방법을 이용할 수 있고, 예를 들어, 실시예 4-3에 기재된 인간 TSPAN8 발현 암 세포를 이용한 경합 시험을 사용할 수 있다. 경합 시험에 사용하는 인간 TSPAN8 발현 암 세포로서는, 전술한 여러 가지 세포가 사용 가능하다.
- [0354] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트는, 하기 (a) 및 (b)의 어느 것으로부터 선택되는, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트이다:
- [0355] (a) 인간 TSPAN8 발현 암 세포에 대한 결합에 관해서 서열 번호 4의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄와 서열 번호 8의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄를 포함하는 항TSPAN8 항체와 경합하는, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트,
- [0356] (b) 인간 TSPAN8 발현 암 세포에 대한 결합에 관해서 서열 번호 10의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄와 서열 번호 12의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄를 포함하는 항TSPAN8 항체와 경합하는, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트.
- [0357] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트는, 하기 (c) 및 (d)의 어느 것으로부터 선택되는, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트이다:

느 것으로부터 선택되는, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트이다:

- [0358] (c) 인간 TSPAN8 발현 암 세포에 대한 결합에 관해서 서열 번호 34의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역과 서열 번호 36의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체와 결합하는, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트,
- [0359] (d) 인간 TSPAN8 발현 암 세포에 대한 결합에 관해서 서열 번호 35의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 37의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항TSPAN8 항체와 결합하는, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트.
- [0360] <본 발명의 다른 이중 특이성 항체>
- [0361] 본 발명은, T 세포 또는 내추럴 사러(Natural Killer; NK) 세포의 표면 항원에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트와 연결된 본 발명의 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트를 포함하는 이중 특이성 항체를 제공한다. 해당 이중 특이성 항체의 형상은 특별히 한정되지 않고, 예를 들어 비특허문헌 3 또는 4에 기재되어 있는 여러 가지 형상의 항체 등, 당업자에 의해 일반적으로 사용될 수 있는 형상을 취할 수 있다.
- [0362] 본 발명은 또한, 이하의 이중 특이성 항체를 제공한다:
- [0363] TSPAN8 및 T 세포 또는 NK 세포의 표면 항원에 결합하는 이중 특이성 항체이며,
- [0364] (a) 본 발명의 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 프래그먼트 및 본 발명의 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄로 이루어지는, 항TSPAN8 항체의 Fab 영역,
- [0365] (b) T 세포 또는 NK 세포의 표면 항원에 대한 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는, T 세포 또는 NK 세포의 표면 항원에 대한 항체의 scFv 영역, 및
- [0366] (c) (a)의 Fab 영역의 중쇄 프래그먼트에 연결된 제1 Fc 폴리펩티드 및 (b)의 scFv 영역에 연결된 제2 Fc 폴리펩티드로 이루어지는, Fc 영역
- [0367] 으로 이루어지는, 이중 특이성 항체.
- [0368] 본 발명의 다른 이중 특이성 항체는, 당업자이면, 비특허문헌 4에 기재된 방법 또는 <본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체>의 기재를 참고로 일반적인 방법을 이용하여 제작할 수 있다. T 세포 또는 NK 세포의 표면 항원에 대한 항체로서는, 현재까지 많은 항체가 알려져 있고(Current Opinion in Biotechnology, 2020, Vol. 65, p. 9-16), 이를 항체의 서열 정보를 사용할 수 있다. 본 발명의 다른 이중 특이성 항체의 실시태양에 대해서는, 항CD3 항체의 scFv 영역을 이용하는 것 이외에는, <본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체>에 기재된 바와 같다. 본 발명의 다른 이중 특이성 항체도 또한, 암의 치료에 사용될 수 있다.
- [0369] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 다른 이중 특이성 항체의 T 세포 또는 NK 세포의 표면 항원에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트로서는, T 세포 또는 NK 세포의 표면 항원에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트이다. 하나의 실시형태에 있어서, 당해 T 세포 또는 NK 세포의 표면 항원에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트, 항CD3 항체, 항CD137 항체, 항PD-1(Programmed cell Death-1) 항체, 항PD-L1(Programmed cell Death 1-Ligand 1), 항체, 항TIGIT(T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains) 항체, 항CD16 항체, 항NKG2D(Natural Killer Group 2, member D) 항체, 또는 그들 항원 결합 프래그먼트이다. 하나의 실시형태에 있어서, 당해 T 세포에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트는, 항CD3 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트이다. 하나의 실시형태에 있어서, 당해 항CD3 항체의 항원 결합 프래그먼트는, 항CD3 항체의 scFv이다.
- [0370] <본 발명의 융합체, 복합체 및 본 발명의 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트를 세포 표면에 발현 시킨 세포>
- [0371] 본 발명은 또한, TSPAN8 이외의 다른 단백질(항체를 포함한다)이나 폴리펩티드를 연결한, 본 발명의 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트(「본 발명의 융합체」라고도 말한다)를 제공한다. 본 발명의 융합체에 이용되는 단백질이나 폴리펩티드는 특별히 한정되지 않고, 예를 들어, 각종 항체, 사이토카인, 케모카인, 인간 혈청 알부민, 각종 태그 웹타이드, 인공 헬릭스 모티프 웹타이드, 말토스 결합 단백질, 글루타티온 S 트랜스페라제, 그 외의 다량체화를 촉진할 수 있는 웹타이드 또는 단백질 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 융합체의 하나의 실시형태에 있어서, 단백질이나 폴리펩티드가, 본 발명의 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트에 연결되어 있다. 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 융합체에 이용되는 단백질이나 폴리펩티드는, 예를

들어 과립구, 내추럴 케일러 T(Natural Killer T; NKT) 세포 등의 면역 세포, 수상 세포, 매크로파지 등의 혈구 세포의 표면 항원에 대한 항체 혹은 그의 항원 결합 프래그먼트, 또는 각종 인터류킨(예를 들어 IL-2, IL-7, IL-12, IL-15) 등의 면역 세포를 활성화하는 폴리펩티드여도 된다. 이 경우, 본 발명의 융합체에 이용되는 단백질이나 폴리펩티드는, 본 발명의 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트에 직접 연결되어 있어도 되고, 또한, 임의의 링커(예를 들어, 웹타이드 링커)를 개재시켜 연결시켜도 된다.

[0372] 본 발명은 또한, 당질, 지질, 금속(방사성 동위체를 포함한다), 유기 화합물(독소, 근적외 형광 색소, 킬레이트 제를 포함한다) 등(「수식체」라고도 말한다)이 결합한, 본 발명의 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트(「본 발명의 복합체」라고도 말한다)를 제공한다. 본 명세서에 있어서, 「수식체」란 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트에 직접 또는 링커 등을 개재시켜 결합하고 있는, 비펩타이드성의 물질을 가리킨다. 본 발명의 복합체에 이용되는 수식체는 특별히 한정되지 않고, 예를 들어, 폴리에틸렌 글라이콜, 당쇄, 인지질, 방사선 동위체(예를 들어, 지르코늄-89(⁸⁹Zr), 이트륨-90(⁹⁰Y), 인듐-111(¹¹¹In), 아스타틴-211(²¹¹At), Aktinium-225(²²⁵Ac)), 유기 화합물, 독소, 근적외 형광 색소(예를 들어 IRDye(등록상표)), 킬레이트제 등을 들 수 있다. 당해 복합체에 이용되는 수식체는, 본 발명의 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트에 직접 결합하고 있어도 되고, 또한, 임의의 링커를 개재시켜 결합하고 있어도 된다. 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 복합체는, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트의 약물 복합체(Antibody Drug Conjugate; ADC)이다. ADC에 이용되는 약물 및 링커는, 당업자가 일반적으로 이용하는 약제 및 링커 중으로부터 선정될 수 있다. 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 복합체는, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트에 방사선 동위체가 결합한 방사성 동위체 표지 항체이다.

[0373] 본 발명은 또한, 본 발명의 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트를 세포 표면에 발현시킨 세포(예를 들어, Chimeric antigen receptor-T cell; CAR-T 세포)를 제공한다. 이와 같은 세포는, 본 발명의 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 이용하여, 당업자이면 제작할 수 있다. 본 발명의 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트를 발현시키는 세포로서는, 각종 면역 세포(T 세포, NK 세포, NKT 세포 등)를 이용할 수 있다.

[0374] 본 발명의 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트, 본 발명의 융합체, 본 발명의 복합체, 및 본 발명의 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트를 세포 표면에 발현시킨 세포는, 인간 TSPAN8(유전자 번호: NM_004616.2)에 결합한다. 인간 TSPAN8에의 결합은, 공지된 결합 활성 측정 방법을 이용하여 확인할 수 있다. 결합 활성을 측정하는 방법으로서는, 예를 들어, ELISA법, 플로 사이토메트리법 등의 방법을 들 수 있다. ELISA법을 이용하는 경우는, 예를 들어 실시예 8에 기재되는 방법을 이용할 수 있고, 플로 사이토메트리법을 이용하는 경우에는, 예를 들어 실시예 1에 기재되는 방법을 이용할 수 있다.

[0375] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트, 본 발명의 융합체, 및 복합체 및 본 발명의 항TSPAN8 항체 혹은 그의 항원 결합 프래그먼트를 세포 표면에 발현시킨 세포에 있어서의 항체 또는 항원 결합 프래그먼트 부분은, 번역후 수식되어 있어도 된다. 하나의 실시형태에 있어서, 번역후 수식이, 중쇄 가변 영역 N말단의 파이로글루타밀화 및/또는 중쇄 C말단 리신 결실이다.

[0376] 본 발명의 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트, 본 발명의 융합체, 및 본 발명의 복합체 및 본 발명의 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트를 세포 표면에 발현시킨 세포는, 본 명세서에 개시되는 본 발명의 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트의 VH 및 VL의 서열 정보, 본 발명의 융합체에 사용되는 다른 웹타이드 또는 단백질(예, 항체), 본 발명의 복합체에 이용되는 수식체의 정보에 기초하여, 당해 분야에서 공지된 방법을 사용하여, 당업자이면 제작할 수 있다. 본 발명의 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트는, 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어, <본 발명의 이중 특이성 항체를 생산하는 방법>의 항에 기재된 방법에 따라 생산할 수 있다.

[0377] <본 발명의 항TSPAN8 항체의 폴리뉴클레오티드, 발현 벡터, 숙주 세포, 및 생산 방법>

[0378] 본 발명은 또한, 이하의 (1)~(4)에 기재된 폴리뉴클레오티드를 제공한다:

[0379] (1) 본 발명의 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드

[0380] (2) 본 발명의 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,

- [0381] (3) 본 발명의 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,
- [0382] (4) 본 발명의 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0383] 상기 (1)의 폴리뉴클레오티드의 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드는, 이하의 (a) 및 (b)로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드이다:
- [0384] (a) 서열 번호 4의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 4의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0385] (b) 서열 번호 10의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 10의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 10의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0386] 상기 (1)의 폴리뉴클레오티드의 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드는, 이하의 (a) 및 (b)로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드이다:
- [0387] (a) 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0388] (b) 서열 번호 10의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0389] 상기 (2)의 폴리뉴클레오티드의 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드는, 이하의 (a) 및 (b)로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드이다:
- [0390] (a) 서열 번호 8의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 8의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 8의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0391] (b) 서열 번호 12의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 12의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 12의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0392] 상기 (2)의 폴리뉴클레오티드의 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드는, 이하의 (a) 또는 (b)로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드이다:
- [0393] (a) 서열 번호 8의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0394] (b) 서열 번호 12의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0395] 상기 (3)의 폴리뉴클레오티드의 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드는, 이하의 (a) 또는 (b)로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드이다:
- [0396] (a) 서열 번호 4에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0397] (b) 서열 번호 10에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

- [0398] 상기 (4)의 폴리뉴클레오티드의 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드는, 이하의 (a) 또는 (b)로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드이다:
- [0399] (a) 서열 번호 8에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0400] (b) 서열 번호 12에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0401] 본 항에 기재된 폴리뉴클레오티드는, 그의 염기 서열에 기초하여, 당해 분야에서 공지된 방법을 사용하여, 당업자이면 제작할 수 있다.
- [0402] 본 발명은 또한, 이하의 (1)~(4)에 기재된 폴리뉴클레오티드 중 1개 또는 복수의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터(「본 발명의 항TSPAN8 항체의 발현 벡터」라고도 칭한다)를 제공한다. 1개의 발현 벡터에 각각의 폴리뉴클레오티드가 1개씩 포함되어 있어도, 복수 포함되어 있어도 된다.
- [0403] (1) 본 발명의 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,
- [0404] (2) 본 발명의 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,
- [0405] (3) 본 발명의 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,
- [0406] (4) 본 발명의 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0407] 상기 (1)의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 본 발명의 항TSPAN8 항체의 발현 벡터의 하나의 실시형태에 있어서, 해당 발현 벡터는, 이하의 (a) 및 (b)로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드를 포함한다:
- [0408] (a) 서열 번호 4의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 4의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0409] (b) 서열 번호 10의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 10의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 10의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0410] 상기 (1)의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 본 발명의 항TSPAN8 항체의 발현 벡터의 하나의 실시형태에 있어서, 해당 발현 벡터는, 이하의 (a) 및 (b)로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드를 포함한다:
- [0411] (a) 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0412] (b) 서열 번호 10의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0413] 상기 (2)의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 본 발명의 항TSPAN8 항체의 발현 벡터의 하나의 실시형태에 있어서, 해당 발현 벡터는, 이하의 (a) 및 (b)로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드를 포함한다:
- [0414] (a) 서열 번호 8의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 8의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 8의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0415] (b) 서열 번호 12의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 12의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 12의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

- [0416] 상기 (2)의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 본 발명의 항TSPAN8 항체의 발현 벡터의 하나의 실시형태에 있어서, 해당 발현 벡터는, 이하의 (a) 또는 (b)로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드를 포함한다:
- [0417] (a) 서열 번호 8의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0418] (b) 서열 번호 12의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0419] 상기 (3)의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 본 발명의 항TSPAN8 항체의 발현 벡터의 하나의 실시형태에 있어서, 해당 발현 벡터는, 이하의 (a) 또는 (b)로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드를 포함한다:
- [0420] (a) 서열 번호 4에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0421] (b) 서열 번호 10에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0422] 상기 (4)의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 본 발명의 항TSPAN8 항체의 발현 벡터의 하나의 실시형태에 있어서, 해당 발현 벡터는, 이하의 (a) 또는 (b)로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드를 포함한다:
- [0423] (a) 서열 번호 8에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0424] (b) 서열 번호 12에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0425] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8 항체의 발현 벡터는, 이하의 (a) 또는 (b)로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터이다:
- [0426] (a) 서열 번호 4의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 4의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 및 서열 번호 8의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 8의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 8의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0427] (b) 서열 번호 10의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 10의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 10의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 및 서열 번호 12의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 12의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 12의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0428] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8 항체의 발현 벡터는, 이하의 (a) 또는 (b)로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터이다:
- [0429] (a) 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 및 서열 번호 8의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0430] (b) 서열 번호 10의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 및 서열 번호 12의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0431] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8 항체의 발현 벡터는, 이하의 (a) 또는 (b)로부터 선택되는 폴리

뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터이다:

- [0432] (a) 서열 번호 4에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 및 서열 번호 8에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0433] (b) 서열 번호 10에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 및 서열 번호 12에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0434] 본 항에 기재된 발현 벡터는, 전술한 <본 발명의 이중 특이성 항체의 발현 벡터>에 기재된 방법에 준하여, 당업자이면 제작할 수 있다.
- [0435] 본 발명은 또한, 이하의 (1)~(4)의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포(「본 발명의 항TSPAN8 항체용의 숙주 세포」라고도 칭한다)를 제공한다. 본 발명의 항TSPAN8 항체용의 숙주 세포는, 본 발명의 항TSPAN8 항체의 발현 벡터에 의한 형질 전환에 의해, 이하의 (1)~(4)의 각각의 폴리뉴클레오티드가 1개씩 포함해도, 복수 포함해도 된다.
- [0436] (1) 본 발명의 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드
- [0437] (2) 본 발명의 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,
- [0438] (3) 본 발명의 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,
- [0439] (4) 본 발명의 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0440] 상기 (1)의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 본 발명의 항TSPAN8 항체용의 숙주 세포의 하나의 실시형태에 있어서, 해당 숙주 세포는, 이하의 (a) 및 (b)로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드를 포함한다:
- [0441] (a) 서열 번호 4의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 4의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0442] (b) 서열 번호 10의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 10의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 10의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0443] 상기 (1)의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 본 발명의 항TSPAN8 항체용의 숙주 세포의 하나의 실시형태에 있어서, 해당 숙주 세포는, 이하의 (a) 및 (b)로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드를 포함한다:
- [0444] (a) 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0445] (b) 서열 번호 10의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0446] 상기 (2)의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 본 발명의 항TSPAN8 항체용의 숙주 세포의 하나의 실시형태에 있어서, 해당 숙주 세포는, 이하의 (a) 및 (b)로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드를 포함한다:
- [0447] (a) 서열 번호 8의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 8의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 8의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0448] (b) 서열 번호 12의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 12의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 12의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하

는 폴리뉴클레오티드.

- [0449] 상기 (2)의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 본 발명의 항TSPAN8 항체용의 숙주 세포의 하나의 실시형태에 있어서, 해당 숙주 세포는, 이하의 (a) 또는 (b)로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드를 포함한다:
- [0450] (a) 서열 번호 8의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0451] (b) 서열 번호 12의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0452] 상기 (3)의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 본 발명의 항TSPAN8 항체용의 숙주 세포의 하나의 실시형태에 있어서, 해당 숙주 세포는, 이하의 (a) 또는 (b)로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드를 포함한다:
- [0453] (a) 서열 번호 4에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0454] (b) 서열 번호 10에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드이다.
- [0455] 상기 (4)의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 본 발명의 항TSPAN8 항체용의 숙주 세포의 하나의 실시형태에 있어서, 해당 숙주 세포는, 이하의 (a) 또는 (b)로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드를 포함한다:
- [0456] (a) 서열 번호 8에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0457] (b) 서열 번호 12에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드이다.
- [0458] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8 항체용의 숙주 세포는, 이하의 (a) 또는 (b)로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드를 포함한다:
- [0459] (a) 서열 번호 4의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 4의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 및 서열 번호 8의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 8의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 8의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0460] (b) 서열 번호 10의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 10의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 10의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 및 서열 번호 12의 아미노산 번호 24부터 34까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 12의 아미노산 번호 50부터 56까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 12의 아미노산 번호 89부터 96까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0461] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8 항체용의 숙주 세포는, 이하의 (a) 또는 (b)로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포이다:
- [0462] (a) 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 및 서열 번호 8의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0463] (b) 서열 번호 10의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 및 서열 번호 12의 아미노산 번호 1부터 107까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

- [0464] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항TSPAN8 항체용의 숙주 세포는, 이하의 (a) 또는 (b)로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포이다:
- [0465] (a) 서열 번호 4에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 및 서열 번호 8에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0466] (b) 서열 번호 10에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 중쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 및 서열 번호 12에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 항TSPAN8 항체의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0467] 본 항에 기재된 숙주 세포는, 전술한 <본 발명의 형질 전환된 숙주 세포>에 기재된 방법에 준하여, 당업자이면 제작할 수 있다.
- [0468] 본 발명은 더욱이, 본 발명의 항TSPAN8 항체용의 숙주 세포를 배양하는 공정을 포함하는, 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트의 생산 방법을 제공한다. 본 방법은, 전술한 <본 발명의 이중 특이성 항체를 생산하는 방법>에 준하여 당업자이면 실시할 수 있다.
- [0469] <본 발명의 항TSPAN8 항체 등의 의약 용도>
- [0470] 본 발명은 또한, 본 발명의 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트, 본 발명의 융합체, 본 발명의 복합체 및 본 발명의 항TSPAN8 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트를 세포 표면에 발현시킨 세포(통틀어 이하 본 항에 있어서 「본 발명의 항TSPAN8 항체 등」이라고 칭한다), 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 의약 조성물을 제공한다. 당해 의약 조성물은, 암의 치료를 위해서 이용할 수 있다. 본 발명은 또한, 본 발명의 항TSPAN8 항체 등의 치료 유효량을 대상에게 투여하는 공정을 포함하는 암을 치료하는 방법, 암의 치료에 사용하기 위한 본 발명의 항TSPAN8 항체 등, 암의 치료용 의약 조성물의 제조에 있어서의 본 발명의 항TSPAN8 항체 등의 사용을 제공한다. 본 발명의 항TSPAN8 항체 등의 의약 용도는, 전술한 <본 발명의 이중 특이성 항체의 의약 조성물 등>의 기재에 준하여 당업자이면 실시할 수 있다. 본 발명의 항TSPAN8 항체 등의 의약 용도의 치료의 대상이 되는 암은, 전술한 <본 발명의 이중 특이성 항체의 의약 조성물 등>에 기재된 암을 들 수 있다.
- [0471] <본 발명의 항CD3 항체>
- [0472] 본 발명은 또한, 이하에 나타내는, 항CD3 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트를 제공한다:
- [0473] 서열 번호 14의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 50부터 68까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 101부터 114까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및, 서열 번호 14의 아미노산 번호 168부터 181까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 14의 아미노산 번호 197부터 203까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 236부터 244까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항CD3 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트.
- [0474] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항CD3 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트는, 서열 번호 14의 아미노산 번호 1부터 125까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 146부터 254까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항CD3 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트이다.
- [0475] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항CD3 항체의 항원 결합 프래그먼트는, scFv이다. 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항CD3 항체의 항원 결합 프래그먼트는, 서열 번호 14의 아미노산 번호 1부터 125까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 14의 아미노산 번호 146부터 254까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항CD3 항체 scFv이다. 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항CD3 항체의 항원 결합 프래그먼트는, 서열 번호 14의 아미노산 번호 1부터 254까지의 아미노산 서열로 이루어지는, 항CD3 항체 scFv이다.
- [0476] 본 발명의 항CD3 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트는, <본 발명의 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체> 등의 본 명세서 중의 기재를 참조하여, 당업자이면 제작할 수 있다. 본 발명의 항CD3 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트는, 공지된 결합 활성 측정 방법을 이용하여 확인할 수 있다. 본 발명의 항CD3 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트는, 예를 들어, 암의 치료에 있어서 사용되는, 종양 항원에 대한 항체와의 이중 특이성 항체에

사용될 수 있다.

[0477] 본 발명에 대해 더 이해를 얻기 위해서 참조하는 특정의 실시예를 여기에 제공하지만, 이들은 예시 목적으로 하는 것으로, 본 발명을 한정하는 것은 아니다.

실시예

[0479] [실시예 1: 암 복막 과종 세포에 발현하는 항원에 선택적으로 결합하는 항체의 취득]

[0480] [실시예 1-1: 환자 유래의 암 복막 과종 세포의 취득]

[0481] 환자로부터의 암 복막 과종 세포의 취득을 이하의 방법으로 행했다. 환자로부터의 암 복막 과종 세포 취득은, 치와키 후미코, 사사키 히로키에 의한 문헌 「복막 전이 암(위, 췌, 난소암 등) 세포주의 수립」(사사키 히로키 편 「환자 유래 암 모델을 이용한 암 연구 실천 가이드」 요도샤, 2019년, p. 28-37)에 기재한 방법에 준하여 행했다. 환자로부터 채취한 복수를 프로테오세이브(등록상표) SS 50mL 원심관(스미토모 베이클라이트사, MS-52550, 이하, 「50mL 원심관」)에 분주하고, 실온, 430×g로 3분간 원심했다. 상정을 제거한 후에, 침전에 용혈 완충액을 첨가하고, 실온에서 10~20분간 용혈시켰다. 용혈 완충액은, 0.75% 염화 암모늄을 포함하는 17mM Tris-HCl(pH 7.65)을 공경 0.22 μm의 필터로 여과하여 조제했다. 원심 후에 상청을 제거하고, 덜베코 PBS(-)(낫스이 제약사, 05913, 이하 「PBS(-)」)를 50mL 가하여 세포를 세정했다. 그 후, 실온, 430×g로 3분간 원심하고 세포를 회수했다. 회수한 복수 중의 전체 세포를 10% FBS(Thermo Fisher Scientific사, 10270-106), ×1 Antibiotic-Antimycotic(Thermo Fisher Scientific사, 15240062)을 포함하는 RPMI-1640(L-글루타민 함유) 배지(후지필름 와코 준약품사, 189-02025), (이하, FBS 등을 첨가 후의 배지를 「RPMI-1640 배지」라고 칭한다.)에 재현탁했다. 100mm 콜라겐 코트 디시(이하, 「디시」)(IWAKI사, 4020-010)에 세포를 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 개/10mL씩 과종하고, 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터로 배양했다.

[0482] 복수 중의 세포에는, 접착계 세포와 부유계 세포가 존재한다. 접착계 세포에는, 암 세포뿐만 아니라 암 세포 이외의 세포(섬유아세포, 복막 중피 세포 등)도 포함되어 있다. 암 세포 이외의 세포가 암 세포보다 단시간에 박리되는 성질을 이용하여, 이를 세포를 복수 중의 전체 세포로부터 분리했다. 구체적으로는, 전술한 복수 중의 전체 세포를 배양한 디시를 PBS(-)로 세정 후, 0.05% 트립신 EDTA(Thermo Fisher Scientific사, 15400054) 2mL로 수 분간 처리하는 것에 의해 암 세포 이외의 세포를 박리했다. 박리된 세포에 포함되는 암 세포 이외의 세포는, 새로운 디시로 계속 배양하여, 실시예 1-5로 사용했다.

[0483] 암 세포 이외의 세포를 제거한 후, 암 세포가 디시 면적의 80% 컨플루언트 정도까지 증식된 후에, 전체 세포의 1/2을 새로운 디시에 계대하는 작업을 반복하여, 5회 이상 계대한 것을 접착계 암 세포로 했다. 부유계 세포에 대해서는, 배양 디시로부터 배양 상청 5mL와 RPMI-1640 배지 5mL를 새로운 100mm 디시에 과종하여 계대하여, 5회 이상 계대한 것을 부유계 암 세포로 했다. 1인의 환자에서 유래하는 암 복막 과종 세포가 접착계 암 세포와 부유계 암 세포의 양쪽을 포함한 채로 증식하는 경우는, 그들을 혼합계 암 세포로 했다.

[0484] 본 명세서에 있어서, 상기 방법으로 환자로부터 채취한 복수로부터 단리한 접착계 암 세포, 부유계 암 세포 또는 혼합계 암 세포를 총칭하여 「암 복막 과종 세포」라고 칭한다. 취득한 12세포(NSC-7C, NSC-9C, NSC-10C, NSC-14C, NSC-15CF, NSC-16C, NSC-20C, NSC-22C, NSC-24C, NSC-32C, NSC-34C 및 NSC-35C-1(이하, 「12종의 암 복막 과종 세포」라고도 칭한다.))를 이후의 검토에 이용했다.

[0485] [실시예 1-2: 항위암 항원 항체 산생 하이브리도마의 제작]

[0486] 인간 모노클로날 항체 개발 기술 「벨로시뮨」(VelocImmune(등록상표) antibody technology; Regeneron(미국 특허 6596541호)) 마우스를 이용하여 암 복막 과종 세포에 결합하는 항위암 항원 항체를 취득했다.

[0487] 실시예 1-1에서 취득한 암 복막 과종 세포 중 NSC-10C, NSC-35C-1, NSC-24C, NSC-7C, NSC-14C, NSC-34C를 3세포씩으로 나누어 혼합하고, TiterMax(등록상표) Gold ADJUVANT(MERCK사, T2684) 또는 PBS(-)에 혼탁하여, 암 복막 과종 세포 혼탁액을 조제했다. 이 혼탁액을 벨로시뮨 마우스에 면역하고, 통상적 방법에 따라 하이브리도마를 제작했다. 자동 피킹 장치로 하이브리도마의 단(單)콜로니를 단리하여, 모노클론화 하이브리도마 세포(이하, 「클론」)를 취득했다. 단리한 클론을 37°C, 8% CO₂ 인큐베이터로 배양하고, 배양 4일 후 상청을 96웰 플레이트에 회수하여, 이하의 실험에 이용했다.

[0488] [실시예 1-3: 암 복막 과종 세포에 선택적으로 결합하는 항위암 항원 항체의 선별]

1. 암 복막 파종 세포 및 EpCAM 발현 세포에의 항위암 항원 항체의 결합 확인

실시예 1-2에서 얻어진 클론의 세포 상청에는 항체(이하, 「클론 상청에 포함되는 항체」)가 포함되어 있다.

우선, 클론 상청에 포함되는 항체와 실시예 1-1에서 취득한 12종의 암 복막 파종 세포의 결합을 플로 사이토메트리법으로 측정하여, 암 복막 파종 세포에 강하게 결합하는 항체를 산생하는 클론을 선발했다. 플로 사이토메트리에는, BV421 Goat Anti-Mouse Ig(Becton, Dickinson and Company사, 563846)을 이용했다. 다음에, 암 항원인 EpCAM에 결합하는 항체를 제공하는 클론을 제외하기 위해서, 클론 상청에 포함되는 항체와 인간 EpCAM-Myc-DDK 발현 CHO-K1 세포의 결합을 측정했다. 인간 EpCAM-Myc-DDK 발현 CHO-K1 세포는, EPCAM(Myc-DDK-tagged)-Human epithelial cell adhesion molecule(EPCAM)(ORIGENE사, RC201989)을 CHO-K1 세포(ATCC, CCL-61)에 트랜스펙션하는 것에 의해 제작했다. 당해 세포와 클론 상청에 포함되는 항체의 결합을 플로 사이토메트리법으로 측정했다. 플로 사이토메트리법에는, BV421 Goat Anti-Mouse Ig를 이용했다. EpCAM 발현 세포에 결합 활성을 나타내지 않는 상청을 제공하는 클론을 선택하기 위해서, 당해 세포에 결합하는 클론을 제외했다. 양성 컨트롤로서, CD326(EpCAM) Monoclonal Antibody(1B7)(eBioscience사, 14-9326)를 사용했다.

상기 실험에 의해, 12종의 암 복막 파종 세포 중의 10종 이상에 대해 결합하고, 또한, 인간 EpCAM에는 결합하지 않는 항체를 제공하는 클론을 선정했다.

2. 인간 말초혈 단핵 세포에 대한 항체의 결합 확인

추가로, 암 복막 파종 세포에 선택적으로 결합하는 항체를 제공하는 클론을 선발하기 위해서, 인간 말초혈 단핵 세포에 결합하는 항체를 제공하는 클론을 제외했다.

인간 말초혈 단핵 세포와 각 클론이 제공하는 항체의 결합의 측정에는 플로 사이토메트리법을 이용했다. 인간 말초혈 유래 단핵 세포로서, Human Mononuclear Cells from Peripheral Blood(hMNC-PB), pooled, ultra-pure(PromoCell사, C-12908)를 이용했다. 플로 사이토메트리법에는, PE Goat Anti-Mouse Ig(Multiple Adsorption)(Becton, Dickinson and Company사, 550589, 이하 「PE Goat Anti-Mouse Ig」), BV421 Mouse Anti-Human CD3(Becton, Dickinson and Company사, 562426), APC Mouse Anti-Human CD14(Becton, Dickinson and Company사, 555399), BB515 Mouse Anti-Human CD19(Becton, Dickinson and Company사, 564456)를 이용했다.

3. 하이브리도마 상청으로부터의 항체 정제

실시예 1-3의 1. 및 2.의 공정에 있어서 선별한 클론을 CD 하이브리도마 미디엄(Thermo Fisher Scientific사, 11279023)에서 배양했다. 배양 상청으로부터, MabSelect SuRe(GE 헬스케어사, 17-5438-02)를 이용하여, 항체를 정제했다(이하, 「정제 항체」). 항체의 정제는 통상적 방법에 따랐다.

4. 배양 인간 복막 중피 세포에 대한 정제 항체의 결합

암 복막 파종 세포에 선택적으로 결합하는 항체를 선발하기 위해서, 실시예 1-3의 3.에서 얻은 정제 항체로부터 배양 인간 복막 중피 세포에 결합하는 항체를 제외했다. 배양 인간 복막 중피 세포로서 Human Mesothelial Cells(Zenbio사, MES-F, Lot. MESM012916B)(본 명세서에서 「배양 인간 복막 중피 세포」라고 칭한다)를 이용하여, Mesothelial Cell Growth Medium(Zenbio사, MS0-1)에서 배양했다. 정제 항체와 배양 인간 복막 중피 세포의 결합의 측정에는 플로 사이토메트리법을 이용했다. 플로 사이토메트리법에는, PE Goat Anti-Mouse Ig를 이용했다. 배양 인간 복막 중피 세포에 결합하지 않는 또는 약한 결합을 나타내는 항체를 선별하여, 14종의 정제 항체를 취득했다(이하, 「14종의 정제 항체」).

[실시예 1-4: 취득된 항체가 인식하는 항원 분자 후보의 동정]

14종의 정제 항체에 대해 항원 후보 분자의 동정을 행했다. 동정 방법의 예로서, 16B11, 16B12 및 21F7에 있어서의 항원 후보 분자의 동정 방법을 상술한다.

본 실험에 있어서의 컨트롤 항체로서, 암 복막 파종 세포에의 결합 패턴이 16B11과 상이했던 5D3, 9A1, 21A3을 사용했다.

NSC-15CF 세포의 세포 과쇄액을 제작했다. 세포 과쇄액에, 16B11, 16B12, 21F7 및 컨트롤 항체 3종(5D3, 9A1, 21A3) 중 어느 1항체를 첨가했다. 추가로 Dynabeads Protein G(Life Technologies사, 10003D)를 가하고 교반 및 세정을 행했다. Dynabeads Protein G에 결합한 단백질을 Tripsin/LysC(Promega사, V5072)를 이용하여 소화하여, 펩타이드 혼합물을 얻었다. 펩타이드 혼합물을 포함하는 용액을 UltiMate 3000 RSmnano(Thermo Fisher

Scientific사) 및 Orbitrap Fusion(Thermo Fisher Scientific사)을 이용한 LC-MS/MS 측정에 제공했다. 얻어진 LC-MS/MS 데이터를 Progenesis QI for Proteomics(Waters사) 및 Mascot(matrices 사이언스사)의 소프트웨어를 이용하여 비교 정량 해석 및 웹타이드/단백질 동정을 행하여, 결합 단백질을 동정했다. 16B11, 16B12, 또는 21F7의 데이터를 각각 컨트롤 항체의 데이터와 비교하여, 16B11 및 21F7의 항원 후보 분자로서 TSPAN8을 동정했다. 본 실험에서는 16B12의 항원 후보 분자는 동정할 수 없었다.

[0504] 5B7, 9F6, 12C12, 13A9, 15D1, 18C10 및 19E4에 대해서도 상기와 마찬가지의 수법을 이용하여 실험을 행하여, TSPAN8을 항원 후보 분자로서 동정했다. 컨트롤 항체로서 5D3, 9A1, 21A3에 더하여 24C7을 이용했다. 16B12는, 항원 후보 분자의 동정에는 이르지 않았지만, 실시예 1-3에서 16B11과 마찬가지의 결합 프로파일을 나타냈으므로, TSPAN8을 항원 후보라고 추정하여 후의 검토를 행했다.

[0505] 추가로, 항원을 특정하기 위해서, 인간 TSPAN8-Myc-DDK 발현 CHO-K1 세포에 대한 결합 실험을 행했다. 인간 TSPAN8-Myc-DDK 발현 CHO-K1 세포는, CHO-K1 세포에 TSPAN8(Myc-DDK-tagged)-Human tetraspanin 8(TSPAN8)(ORIGENE사, RC202694)(서열 번호 2)을 트랜스펙션하는 것에 의해 제작했다. 결과, 16B11, 16B12, 5B7, 9F6, 12C12, 13A9, 15D1, 18C10, 19E4, 21F7의 10종의 항체(「10종류의 항TSPAN8 항체」라고도 말한다)가 인간 TSPAN8-Myc-DDK 발현 CHO-K1 세포에 결합하여, TSPAN8을 항원으로서 인식함이 확인되었다.

[0506] [실시예 1-5: 항TSPAN8 항체의 각종 세포에 대한 결합 활성의 확인]

1. 암 복막 파종 세포에 대한 결합 활성의 확인 및 수치화

[0508] 위암 환자 복수로부터 단리한 7종의 암 복막 파종 세포(KM-291-As, KM-555-As, KM-556-As, P-249-As, KM-568-As, KM-570-As 및 KM-577-As)와 4종류의 항TSPAN8 항체의 결합을 플로 사이토메트리법에 의해 측정했다.

[0509] KM-291-As는, 환자의 복수로부터 실시예 1-1과 마찬가지의 방법을 이용하여 조제했다. 조제한 KM-291-As에는, CD45를 발현하는 혈구계 세포가 많이 포함되어 있었기 때문에, 암 세포를 농축하기 위해서, CD45 발현 세포를 칼럼으로 제거했다. 상세하게는, 5×10^7 개의 세포를 포함하는 세포 혼탁액을, CD45 MicroBeads, human(Miltenyi Biotec사, 130-045-801)을 이용하여, 통상적 방법에 따라 Pre-Separation Columns(30 μm)(Miltenyi Biotec사, 130-041-407)와 Separation Columns(Miltenyi Biotec사, 130-042-401)(이하, 「Column」)에 통과시켰다. Column 통과액을 50mL 원심관에 회수하고 원심분리했다. 침전에 buffer 10mL를 가하여 세포를 재현탁했다. 이 세포 혼탁액으로부터 5×10^6 개의 세포를 1.5mL 마이크로튜브(WATSON사, 131-7155C)에 분취하고, 원심분리에 의해 침전을 얻었다. 침전에 2% FBS, 100 μg/mL Penicillin-Streptomycin(Thermo Fisher Scientific사, 15140-122)을 포함하는 PBS(FCM buffer)를 950 μL 가하여 세포 혼탁액을 조제했다. FcR Blocking Reagent를 50 μL 가하고 열음 중에서 10분간 반응시켰다. 이 반응액을 7개의 1.5mL 마이크로튜브에 100 μL씩 분주하고, 이하의 방법으로 세포의 염색을 행했다. 7개 중 3개의 마이크로튜브에 mouse IgG1-PE 항체(Miltenyi Biotec사, 130-092-212)를 5 μL씩 가하고, 다음에 Alexa Fluor647 표지된 컨트롤 항체를 각 마이크로튜브에 2.5 μL씩 첨가하여, Isotype control로 했다. 컨트롤 항체로서, mouse IgG2a Isotype control(Becton, Dickinson and Company사, 558053), mouse IgG2b Isotype control(Becton, Dickinson and Company사, 558713), mouse IgG3 Isotype control(Becton, Dickinson and Company사, 560803)의 어느 하나를 사용했다. 나머지 4개의 마이크로튜브에는, CD326(EpCAM)-PE(Miltenyi Biotec사, 130-091-253)을 5 μL씩 가하고, 추가로 16B11, 16B12, 9F6, 18C10을 마이크로튜브에 각각 2.5 μL(0.25 μg/튜브)씩 가하여 세포를 염색하여, 4종류의 평가 항체 샘플로 했다. 각 마이크로튜브는, 항체를 첨가한 후에, 열음 중에서 30분간 반응시켰다. FCM buffer 1mL를 가하여 원심분리를 행하고, 얻어진 침전에, FCM buffer를 500 μL 가하여 세포를 재현탁했다. 7-AAD(Becton, Dickinson and Company사, 559925)를 5 μL 첨가하고, 5mL 셀 스트레이너-캡 부가 라운드 보텀 폴리스타이렌 튜브(CORNING사, 352235)에 전량을 옮기고, FACSVerse flow cytometer(Becton, Dickinson and Company사)를 이용하여 측정을 행했다. 데이터 취득에는 BD FACSuite 소프트웨어(Becton, Dickinson and Company사)를 이용했다.

[0510] KM-555-As, KM-556-As, P-249-As, KM-568-As, KM-570-As, KM-577-As의 조제도, KM-291-As의 조제와 마찬가지의 방법으로 행했다. KM-555-As, KM-556-As와의 결합 측정에 있어서는, 평가 항체 샘플로서 16B11, 9F6 및 18C10을 이용했다. P-249-As와의 결합 측정에 있어서는, 평가 항체 샘플로서 16B11 및 시판 항TSPAN8 항체인 TSPAN8 Antibody, anti-human, REAfinity(130-106-855, Miltenyi사, 본 명세서에 있어서 「REA443」)로 칭한다)를 이용했다. KM-568-As, KM-570-As, KM-577-As와의 결합 측정에 있어서는 평가 항체 샘플로서 16B11, 9F6, 18C10 및 REA443을 이용했다. 모든 실험에 있어서, Isotype Control Antibody, mouse IgG1(130-113-196,

Miltenyi사)을 isotype control로 이용했다. 또한, 세포의 염색에는 IgG2a-VioBlue 항체(Miltenyi Biotec사, 130-113-277) 및 CD326(EpCAM)-VioBlue 항체(Miltenyi Biotec사, 131-113-266)를 이용했다.

[0511] 각 암 복막 과종 세포의 플로 사이토메트리에 의한 측정 결과의 해석은, BD FACSuite 소프트웨어를 이용하여 행했다. 상세하게는, FSC-A(lin)/SSC-A(log)로 플롯하고, 얻어진 세포 집단에 게이트를 걸고, 재차 FSC-W(lin)/FSC-A(lin)로 전개하여, Singlet 집단만을 게이트하여 서브세트를 작성하고 해석을 행했다. KM-291-As 세포의 측정 결과의 해석에 있어서는, 서브세트을, PE(log)/Alexa Fluor647(log)로 전개했다. KM-555-As, KM-556-As, P-249-As, KM-568-As, KM-570-As, KM-577-As의 측정 결과의 해석에 있어서는, VioBlue(log)/Alexa Fluor647(log)로 전개한 데이터를 이용했다. 각 샘플에 대해 1×10^4 개의 세포 서브세트에 대해 데이터를 취득했다. 취득한 fcs 파일을 FlowJo(Becton, Dickinson and Company사)로 해석하여, Alexa Fluor647에 있어서의 히스토그램을 작성했다. Isotype와 각 평가 항체에 대해, 양성 집단의 Alexa Fluor647의 MFI를 각각 산출하고, 각 항체의 MFI로부터 각 Isotype MFI를 빼서 Δ MFI를 산출했다(표 1).

[0512] 얻어진 히스토그램의 예로서, KM-291-As와의 결합 측정에 있어서의 16B11 및 16B12 및 KM-555-As 및 KM-556-As 와의 결합 측정에 있어서의 16B11, 9F6, 18C10의 결합을 나타내는 히스토그램을 각각 도 1a 내지 도 1c에 나타낸다.

2. 배양 인간 복막 중피 세포에 대한 결합 활성을 확인 및 수치화

[0514] 실시예 1-4에서 동정된 10종류의 항TSPAN8 항체와 배양 인간 복막 중피 세포의 결합 활성을 측정했다. 배양 인간 복막 중피 세포는 정상 세포이다.

[0515] 실시예 1-3에서 얻은 10종류의 항TSPAN8 항체 및 시판 항TSPAN8 항체의 Purified anti-human TSPAN8 Antibody(BioLegend사, 363702 Clone TAL69, 본 명세서에서 「TAL69」라고 칭한다)의 배양 인간 복막 중피 세포에의 결합을 플로 사이토메트리법에 의해 측정했다. 2차 항체로서 PE Goat Anti-Mouse Ig를 사용했다. 얻어진 히스토그램을 도 2a 및 도 2b에 나타낸다. 또한, 플로 사이토메트리의 결과를, FlowJo를 이용하여 해석하는 것에 의해, 각 세포 집단의 PE에 대한 MFI를 각각 산출했다. 음성 컨트롤 항체로서, Ultra-LEAF Purified Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl Antibody(BioLegend사, 401408), Purified NA/LE Mouse IgG2a, κ Isotype Control(Becton, Dickinson and Company사, 554645) 및 Purified NA/LE Mouse IgG2b, κ Isotype Control(Becton, Dickinson and Company사, 559530)의 3종의 항체를 해석에 이용했다. 16B11, 16B12, 9F6, 18C10 및 TAL69의 Δ MFI치를 표 1에 기재한다. 항체의 Δ MFI치는, 각 항체의 MFI치로부터 음성 컨트롤 항체의 MFI치를 빼서 산출했다.

3. 위암 복막 과종 환자 유래 복막 중피 세포에 대한 결합 활성을 확인 및 수치화

[0517] 인간 위암 복막 과종 환자의 복수 중으로부터 단리된 복막 중피 세포(본 명세서에서 「환자 유래 복막 중피 세포」라고 칭한다.)인 KM-501-As 및 KM-503-As의 취득을 이하의 방법으로 행했다.

[0518] 실시예 1-1의 세포 수립의 과정에 있어서, 디시 일면에 포석상(鋪石狀)으로 증식된 중피 세포가 보였다. 이 중피 세포를 0.05% 트립신 EDTA를 이용하여 회수하고, 10% FBS, $\times 1$ Antibiotic-Antimycotic을 포함하는 DMEM(고글루코스)(후지필름 와코 준야쿠사, 044-29765) 10mL에 재현탁했다. 4×10^5 개의 세포를 1.5mL 마이크로튜브에 분취하고, 원심분리 후에 상청을 제거하고, FCM buffer를 96 μ L 가하여 세포를 현탁했다. FcR Blocking Reagent를 4 μ L 가하고 얼음 중에서 10분간 반응시켰다. 이 반응액 50 μ L를 다른 1.5mL 마이크로튜브에 분주하여, 세포 2×10^5 개/50 μ L의 마이크로튜브 2개로 했다. 1개의 마이크로튜브에 CD45-APC 항체(Miltenyi Biotec사, 130-091-230) 2 μ L, CD326(EpCAM)-PE(Miltenyi Biotec사, 130-113-264) 0.5 μ L를 가했다. 다른 1개의 튜브에는 mouse IgG2a-APC 항체(Miltenyi Biotec사, 130-091-836) 2 μ L, mouse IgG1-PE 항체 0.5 μ L를 가했다. 각각의 마이크로튜브를 얼음 중에서 30분간 반응시켰다. FCM buffer를 마이크로튜브에 각 1mL 가하여 원심분리하고 상청을 제거했다. 침전에 FCM buffer 500 μ L를 가하여 세포를 재현탁하고, FACSVerse를 이용하여 해석을 행했다. FSC-A(lin)와 SSC-A(log)에 의해 세포 집단을 게이팅하고, 그 서브세트를 PE(log)와 APC(log)로 재차 전개하여 데이터를 취득했다. 취득한 fcs 파일을 FlowJo로 해석했다. 결과, 이 세포 집단은 CD45 음성이고 또한 EpCAM 음성인 정상 세포임을 확인할 수 있었다. 당해 환자 유래 복막 중피 세포는, 복막 과종 시에 암 세포가 생착, 증식하기 위한 토대가 되는 대망(大網)이나 장관막에서 유래하는 정상 세포라고 생각된다. 단리한 환자 유래 복막 중피 세포의 KM-501-As 및 KM-503-As를 이하의 실험에 사용했다.

[0519] KM-501-As 및 KM-503-As에 대한 10종류의 항TSPAN8 항체 및 TAL69의 결합은, 실시예 1-5의 2.에 기재된 배양

인간 복막 중피 세포에 대한 결합의 측정과 마찬가지의 방법으로 실시했다. KM-501-As 및 KM-503-As에 대한 16B11, 16B12, 9F6, 18C10 및 TAL69의 히스토그램을 도 3a 및 도 3b에, Δ MFI치를 표 1에 기재한다.

4. 배양 인간 제대 혈관 내피 세포에 대한 결합 활성의 확인 및 수치화

배양 인간 제대 혈관 내피 세포에 대한 10종류의 항TSPAN8 항체 및 TAL69의 결합을 플로 사이토메트리법에 의해 측정했다. 배양 인간 제대 혈관 내피 세포(PromoCell사, C-12200)는 Endothelial Cell Growth Medium 2 Kit(PromoCell사, C-22111)를 이용하여 배양했다. 음성 컨트롤 항체로서, Ultra-LEAF Purified Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl Antibody, Purified NA/LE Mouse IgG2a, κ Isotype Control, Ultra-LEAF Purified Mouse IgG2b, κ Isotype Ctrl Antibody(BioLegend사, 400348), LEAF Purified Mouse IgG3, κ Isotype Ctrl Antibody(BioLegend사, 401310)를 이용했다. 2차 항체로서 PE Goat Anti-Mouse Ig를 사용했다.

10종류의 항TSPAN8 항체 및 TAL69의 결합의 히스토그램을 도 4에 나타낸다. 16B11, 16B12, 9F6, 18C10 및 TAL69에 대한 Δ MFI치를 표 1에 기재한다. Δ MFI치는, 각 항체의 MFI로부터 음성 컨트롤 항체의 MFI를 빼서 산출했다.

도 1 내지 도 4의 히스토그램의 결과 및 표 1의 결과로부터, 16B11 및 16B12는, 암 복막 파종 세포에 대해서 높은 결합을 나타내지만, 정상 세포(배양 인간 복막 중피 세포, 환자 유래 복막 중피 세포, 배양 인간 제대 혈관 내피 세포)에의 결합은 낮음이 나타났다. 한편, 다른 항TSPAN8 항체인 9F6, 18C10 및 시판 항TSPAN8 항체(TAL69 또는 REA443)의 암 복막 파종 세포에 대한 결합은 16B11 및 16B12보다도 낮고, 정상 세포에 대한 결합은 16B11 및 16B12보다도 높음이 나타났다. 이 결과로부터, 16B11 및 16B12와 다른 항TSPAN8 항체(9F6, 18C10, TAL69 등)는 성질이 크게 상이함이 분명해졌다.

표 1

검체명		16B11	16B12	9F6	18C10	시판 항체 (TAL69)	시판 항체 REA443
암 복막 파종 세포	KM-291-As	64032	37165	12096	11727	n.t. (not tested)	n.t.
	KM-555-As	10388	n.t.	920	447	n.t.	n.t.
	KM-556-As	6604	n.t.	820	846	n.t.	n.t.
	P-249-As	6735	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	87
	KM-568-As	29051	n.t.	2216	2634	n.t.	2796
	KM-570-As	13875	n.t.	274	326	n.t.	606
배양 인간 복막 중피 세포	KM-577-As	426	n.t.	6.6	8.8	n.t.	6
	Zenbio사	61	4	566	n.t.	616	n.t.
환자 유래 복막 중피 세포	n.t.	n.t.	n.t.	370	583		
	KM-501-As	23	5	206	230	181	n.t.
배양 인간 제대 혈관 내피 세포	KM-503-As	76	7	424	544	286	n.t.
	도너 1	0	2	11	3	3	n.t.
	도너 2	45	18	722	1117	633	n.t.
	도너 3	-4	-1	32	82	109	n.t.
	도너 4	-5	3	19	58	92	n.t.
	도너 5	-3	-5	14	35	59	n.t.

[0524]

[실시예 2: 16B11 및 16B12의 서열 결정]

통상적 방법에 따라, 16B11 및 16B12의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자를 클로닝하여, 항체의 서열 결정을 행했다. 벨로시뮨 기술은, 내인성의 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 가변 영역이 대응하는 인간 가변 영역에서 치환된 트랜스제닉 마우스를 이용하여 항체를 제작하는 기술이다. 따라서, 벨로시뮨 기술을 이용하여 얻어진 항체는, 인간 항체의 가변 영역과 마우스 항체의 정상 영역을 갖는 항체(본 명세서에 있어서 「키메라 항체」라고도 칭한다)이다. 얻어진 16B11의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 서열 번호 34에, 해당 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 서열 번호 36에 각각 나타낸다. 얻어진 16B12의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 서열 번호 35에, 해당 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 서열 번호 37에 각각 나타낸다.

- [0527] [실시예 3: 완전 인간 항TSPAN8 항체의 제작]
- [0528] [실시예 3-1: 완전 인간 항TSPAN8 항체 제작에 이용하는 발현 벡터의 제작]
- [0529] 16B11 및 16B12의 완전 인간 항체를, 실시예 2에서 동정한 인간 가변 영역의 아미노산 서열과 인간 정상 영역의 아미노산 서열을 연결하여 제작했다.
- [0530] 16B11 및 16B12의 중쇄 가변 영역의 N말에 서열 번호 38에 기재된 시그널 서열을 코딩하는 아미노산 서열을, C 말에 인간 IgG1 정상 영역의 아미노산 서열(서열 번호 4또는 10의 아미노산 번호 122에서 451까지의 서열)을 각각 연결한 폴리펩티드를 설계했다. 추가로, 당해 폴리펩티드의 중쇄 가변 영역의 16 내지 19번째의 아미노산 서열로 이루어지는 퓨린 절단 서열(J. Biol. Chem., 1992, Vol. 267, p. 16396-16402)의 16번째의 아르기닌(R)을 글리신(G)으로 치환하는 변이를 도입했다. 설계한 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 pcDNA3.4 TOPO(등록상표) 벡터(Thermo Fisher Scientific사)에 도입했다. 제작한 중쇄 벡터를 각각 pcDNA3.4-16B11.1_HC 및 pcDNA3.4-16B12.1_HC라고 칭한다.
- [0531] 또한, 16B11의 경쇄 가변 영역의 N말에 서열 번호 39에 기재된 시그널 서열을 코딩하는 아미노산 서열을, 16B12의 경쇄 가변 영역의 N말에 서열 번호 40에 기재된 시그널 서열을 코딩하는 아미노산 서열을 각각 연결하고, 양 항체의 C말측에 인간 κ 쇄의 정상 영역 아미노산 서열(서열 번호 8 또는 12의 아미노산 번호 108부터 213까지의 서열)을 각각 연결한 폴리펩티드를 설계했다. 설계한 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 pcDNA3.4 TOPO(등록상표) 벡터에 도입했다. 제작한 경쇄 벡터를 각각 pcDNA3.4-16B11_LC 및 pcDNA3.4-16B12_LC라고 칭한다.
- [0532] [실시예 3-2: 완전 인간 항TSPAN8 항체의 제작]
- [0533] pcDNA3.4-16B11.1_HC 및 pcDNA3.4-16B11_LC를 이용하여 16B11.1 항체의 제작을 행했다.
- [0534] 상세하게는, ExpiCHOExpression Medium(Thermo Fisher Scientific사, A2910001)에서 대략 6.0×10^6 개/mL의 농도에 이를 때까지 배양된 ExpiCHO-S 세포(Thermo Fisher Scientific사, A29127)에 대해, pcDNA3.4-16B11.1_HC 및 pcDNA3.4-16B11_LC를 유전자 도입 시약 ExpiFectamineCHO Transfection Kit(Thermo Fisher Scientific사, A29129)를 이용하여 트랜스펙션하고, 12일간 배양했다. 배양 상정을, MabSelectSuRe를 이용하여 정제하여, 완전 인간 항체의 정제 항체를 얻었다. 얻어진 항체를 16B11.1로 칭한다. 16B11.1의 중쇄의 염기 서열을 서열 번호 3에, 그것에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 서열 번호 4에, 해당 항체의 경쇄의 염기 서열을 서열 번호 7에, 그것에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 서열 번호 8에 각각 나타낸다.
- [0535] 16B12.1은, pcDNA3.4-16B12.1_HC 및 pcDNA3.4-16B12_LC를 이용하여 상기와 마찬가지의 방법에 의해 제작할 수 있다. 16B12.1의 중쇄의 염기 서열을 서열 번호 9에, 그것에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 서열 번호 10에, 해당 항체의 경쇄의 염기 서열을 서열 번호 11에, 그것에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 서열 번호 12에 각각 나타낸다.
- [0536] [실시예 4: 항체의 결합하는 항원측의 에피토프 부위의 동정]
- [0537] [실시예 4-1: 수소-중수소 교환 질량 분석법에 의한 에피토프 매핑]
- [0538] 16B11.1의 에피토프를 동정하기 위해서, 수소-중수소 교환 질량 분석(HDX-MS)을 실시했다. 결과, 서열 번호 2의 아미노산 번호 126~155에 상당하는 인간 TSPAN8 영역이 16B11.1의 존재하에서 중수소 교환도가 감소하는 영역으로서 검출되었다. 이 결과로부터, 서열 번호 2의 아미노산 번호 126~155에 상당하는 인간 TSPAN8 영역이 16B11.1의 에피토프라고 추정되었다.
- [0539] [실시예 4-2: 인간 TSPAN8 변이 도입에 의한 중요 에피토프의 염선]
- [0540] 실시예 4-1에서 추정된 영역이 16B11.1의 에피토프인지 여부를 확인하기 위해서, 당해 영역을 마우스 또는 래트의 TSPAN8의 상동하는 영역과 바꿔 넣은 키메라 단백질을 제작하여 결합을 평가했다. 인간 TSPAN8의 아미노산 번호 126~155에 상당하는 마우스 TSPAN8의 아미노산 번호 126~155를 서열 번호 41에, 래트 TSPAN8의 아미노산 번호 126~155를 서열 번호 42에 나타낸다.
- [0541] TSPAN8과 GFP의 융합 단백질을 발현하는 세포를 제작하기 위해서, 실시예 1-4에서 이용한 TSPAN8(Myc-DDK-tagged)-Human tetraspanin 8(TSPAN8)(ORIGENE사, RC202694)로부터 제한 효소를 이용하여 인간 TSPAN8 서열을 절출했다. 절출한 인간 TSPAN8 서열 pCMV6-AC-GFP 벡터(ORIGENE사, PS100010)에 서브클로닝했다(이하, 「인간

TSPAN8-GFP 발현 벡터). 추가로, In-Fusion(등록상표) HD Cloning Kit(다카라 바이오사, 639633)를 이용하여, 서열 번호 2에 기재된 인간 TSPAN8-GFP 발현 벡터의 아미노산 번호 126~155에 상당하는 서열을 마우스 또는 래트 TSPAN8의 아미노산 번호 126~155의 서열로 치환한 벡터를 제작했다. 제작한 벡터를 CHO-K1 세포에 각각 도입하여, 인간 TSPAN8-GFP 단백, 인간 마우스 TSPAN8-GFP 키메라 단백 또는 인간 래트 TSPAN8-GFP 키메라 단백을 일과성으로 발현하는 세포를 제작했다. 제작한 세포를 각각 야생형 인간 TSPAN8 발현 CHO-K1 세포, 인간 마우스 TSPAN8 키메라 단백 발현 CHO-K1 세포 또는 인간 래트 TSPAN8 키메라 단백 발현 CHO-K1 세포라고 칭한다. 또한 pCMV6-AC-GFP 벡터를 CHO-K1 세포에 도입한 세포(모크 세포라고 칭한다)를 제작했다. 이들 세포 중의 GFP 양성 세포에 대한 16B11, 16B12 및 TAL69의 결합을 플로 사이토메트리법에 의해 측정했다. TAL69는 인간 래트, 인간 마우스 TSPAN8 키메라 단백 발현 CHO-K1 세포의 어느 것에 대해서도 결합의 저하는 인정되지 않았다. 16B11 및 16B12는, 인간 래트 TSPAN8 키메라 단백 발현 CHO-K1 세포에 대해서는 야생형 인간 TSPAN8 발현 CHO-K1 세포와 동등한 결합을 나타냈다. 한편, 인간 마우스 TSPAN8 키메라 단백 발현 CHO-K1 세포에 대해서는 야생형 인간 TSPAN8 발현 CHO-K1 세포와 비교하여 결합의 감약이 인정되었다(도 5a).

[0542] 인간 마우스 TSPAN8 키메라 단백 발현 CHO-K1 세포에 대한 결합 활성의 감약에 기여하는 아미노산 서열을 특정하기 위해서, 인간, 마우스, 래트 및 필리핀원숭이의 TSPAN8 단백질에 대해, 인간 TSPAN8의 아미노산 서열의 126~155에 상당하는 서열의 비교를 행했다(도 5b). 마우스, 래트 및 필리핀원숭이 TSPAN8의 아미노산 서열의 126~155에 상당하는 서열을 각각 서열 번호 41, 42 및 43에 나타낸다. 결과, 마우스의 TSPAN8 단백질만에서 아미노산 서열이 상이한 것은 131번째의 아미노산뿐이었다. 이 정보에 의해, 서열 번호 2에 기재된 인간 TSPAN8 단백질의 131번째의 트레오닌(T)이 16B11 또는 16B12와의 결합에 중요하다는 것이 추찰되었다.

[0543] 추가로, 인간 TSPAN8의 131번째의 아미노산이 16B11 또는 16B12의 결합에 기여하고 있는지 여부를 확인하기 위해서, 당해 아미노산의 치환체를 제작했다. 구체적으로는, 서열 번호 2의 인간 TSPAN8-GFP에 있어서의 인간 TSPAN8의 아미노산 서열의 131번째의 트레오닌(T)을 알라닌(A) 또는 아스파라긴(N)으로 치환한 인간 TSPAN8-GFP 융합 단백질(각각, 「인간 TSPAN8(T131A)-GFP」 또는 「인간 TSPAN8(T131N)-GFP」라고 칭한다)을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 벡터를 제작하고, CHO-K1 세포에 그들 벡터를 유전자 도입하여, 인간 TSPAN8(T131A)-GFP, 인간 TSPAN8(T131N)-GFP를 일과성으로 발현시킨 세포를 구축했다. 구축한 세포를 인간 TSPAN8(T131A) 발현 CHO-K1 세포 또는 인간 TSPAN8(T131N) 세포라고 칭한다. 이들 세포 중의 GFP 양성 세포에 대한 16B11, 16B12 및 TAL69의 결합을 플로 사이토메트리법에 의해 측정했다(도 5c). 결과, 인간 TSPAN8(T131A) 발현 CHO-K1 세포 및 인간 TSPAN8(T131N) 발현 CHO-K1 세포에 대한 16B11 및 16B12의 결합은, 야생형 인간 TSPAN8 발현 CHO-K1 세포에 대한 결합에 비해 감약하고 있었다. 한편, TAL69는 어느 세포에 대해서도 동등한 결합 활성을 나타냈다. 결과, 에피토프라고 동정된 서열 번호 2의 아미노산 번호 126~155에 대응하는 인간 TSPAN8의 영역에 있어서, 131번째의 트레오닌이 16B11 및 16B12와의 결합에 필수적인 아미노산임을 알 수 있었다.

[0544] 각 TSPAN8 발현 세포에의 결합의 MFI로부터 모크 세포에의 결합의 MFI를 빼서 산출한 ΔMFI 의 값을 표 2-1에 기재한다. 또한, 표 2-1의 야생형 인간 TSPAN8 발현 CHO-K1 세포에의 결합의 ΔMFI 를 100으로 했을 때의 인간 마우스 TSPAN8 키메라 단백 발현 CHO-K1 세포, 인간 래트 TSPAN8 키메라 단백 발현 CHO-K1 세포 및 인간 TSPAN8(T131A) 또는 T131N) 발현 CHO-K1 세포에의 결합의 ΔMFI 상대치를 표 2-2에 나타낸다.

[0545] [표 2-1]

	16B11	16B12	TAL69
인간TSPAN8(야생형)	172723	26673	132771
인간 래트 키메라TSPAN8	160579	22352	96180
인간 마우스 키메라 TSPAN8	5274	102	304830
인간 TSPAN8(T131A)	23373	12189	184065
인간 TSPAN8(T131N)	3457	2629	143332

[0546]

[표 2-2]

	16B11	16B12	TAL69
인간TSPAN8(야생형)	100	100	100
인간 래트 키메라TSPAN8	93	84	72
인간 마우스 키메라 TSPAN8	3	0	230
인간 TSPAN8(T131A)	14	46	139
인간 TSPAN8(T131N)	2	10	108

[0548]

[실시예 4-3: 결합 경합 실험]

[0550] 16B11 또는 16B12와 다른 항TSPAN8 항체(9F6, 18C10 또는 TAL69)가 TSPAN8과의 결합에 있어서 경합하는지 여부를 조사했다.

[0551] 16B11과 다른 항TSPAN8 항체(9F6, 18C10 또는 TAL69)의 경합을 조사하기 위해서, NSC-15CF 세포에의 16B11의 결합량의 변화를 플로 사이토메트리법에 의해 측정했다(실험 1; 도 6a). 구체적으로는, 2×10^5 개의 NSC-15CF에, 종농도 $1 \mu\text{g/mL}$ 의 Alexa Fluor647 표지 16B11과 다른 항TSPAN8 항체(16B11, 9F6, 18C10 또는 TAL69 중 1항체)를 종농도 $100 \mu\text{g/mL}$ 가 되도록 첨가하고, NSC-15CF에의 16B11의 결합량을 플로 사이토미터로 측정했다. 음성 컨트롤 항체로서, Ultra-LEAF Purified Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl Antibody, Ultra-LEAF Purified Mouse IgG2a, κ Isotype Ctrl Antibody(BioLegend사, 400264), Ultra-LEAF Purified Mouse IgG2b, κ Isotype Ctrl Antibody를 이용했다. 결과, 16B11의 결합은 자신의 16B11을 첨가했을 경우에만 감약했다.

[0552] 16B12와 다른 항TSPAN8 항체(16B11, 9F6, 18C10 또는 TAL69)의 경합을 조사하기 위해서, NSC-15CF에의 16B12에 의한 16B11, 9F6 또는 18C10의 결합량의 변화를 플로 사이토메트리법에 의해 측정했다(실험 2; 도 6b). 구체적으로는, 1×10^5 개의 NSC-15CF에, 종농도 $0.25 \mu\text{g/mL}$ 의 Alexa Fluor647 표지 16B11, 9F6 또는 18C10과 종농도 $100 \mu\text{g/mL}$ 의 16B12를 첨가하고, NSC-15CF에의 16B11, 9F6 또는 18C10의 결합량을 플로 사이토미터로 측정했다. 음성 컨트롤 항체로서, LEAF Purified Mouse IgG3, κ Isotype Ctrl Antibody를 이용했다. 결과, 16B12에 의해 16B11의 결합이 감약했다. 그 외의 항체의 결합에는 영향을 주지 않았다. 마찬가지로 Alexa Fluor647 표지 16B12와 다른 항TSPAN8 항체(16B11, 16B12, 9F6, 18C10 또는 TAL69)를 이용한 경합 실험을 실시했다(실험 3; 도 6c). 음성 컨트롤 항체로서, LEAF Purified Mouse IgG3, κ Isotype Ctrl Antibody, Ultra-LEAF Purified Mouse IgG2a, κ Isotype Ctrl Antibody, Ultra-LEAF Purified Mouse IgG2b, κ Isotype Ctrl Antibody 및 Ultra-LEAF Purified Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl Antibody를 이용했다. 결과, 16B12의 결합은 16B11 및 16B12 자신을 첨가했을 경우에만 감약했다. 16B11 및 16B12의 결합은 서로 경합하는 것이므로, 16B11과 16B12는 근사한 에피토프를 인식한다고 추찰되었다. 각 표지 항체 결합의 MFI로부터 미염색 세포의 MFI를 빼서 산출한 값에 있어서 Isotype Control을 경합 항체로서 첨가했을 때의 값을 100으로 했을 때의 경합 항체 첨가 시의 상대치를 표 3에 나타낸다.

표 3

실험 1

경합 항체	아이소타입 컨트롤에 의한 경합에 대한%
16B11	12
9F6	98
18C10	119
TAL69	180

실험 2

형광 표지 항체	아이소타입 컨트롤에 의한 경합에 대한%
16B11	0
9F6	100
18C10	109

실험 3

경합 항체	아이소타입 컨트롤에 의한 경합에 대한%
16B12	1
16B11	2
9F6	94
18C10	133
TAL69	112

[0553]

[실시예 5: 60As6-Luc/GFP 세포의 제작]

[0555] 위암 환자 복수 유래 주화 세포인 60As6 세포에 luciferase 단백질 및 녹색 형광 단백질(GFP)을 발현시킨 60As6-Luc/GFP 세포를, 이하의 방법으로 제작했다.

[0556] [실시예 5-1: Luc/GFP를 포함하는 바이러스 용액의 제작]

[0557] L293T 세포(Thermo Fisher Scientific사, K4975-00)를 이용하여, 통상적 방법에 따라 렌티바이러스의 제작을 행했다.

[0558] 렌티바이러스의 제작에는, MISSION(등록상표) Lentiviral Packaging Mix(SIGMA사, SHP001) 및 pCDH-CMV-GL3-EF1a-GFP-T2A-puro 개변 벡터(히로시마 대학 의계과학연구과 세포 분자생물학연구실 다카하시 료우 준교수로부터 기증(PLoS One, 2015, Vol. 10, e0123407, Front Biosci., 2008, Vol. 13, p. 1619-1633))을 이용했다. 바이러스를 포함하는 세포의 배양 상청으로부터, 45 μ m Millipore(등록상표)-HV 필터(Merck Millipore사, SLHV033RS)를 이용하여 바이러스를 여과한 것을 바이러스 용액으로 하고, -80°C에서 동결 보존했다.

[0559] [실시예 5-2: 60As6 세포에의 바이러스의 감염]

[0560] 60As6 세포(국립 암 연구 센터 야나기하라 가즈요시 선생으로부터 기증)에의 바이러스의 감염은, 통상적 방법에 따라 행했다. 배지에는, 10% FBS를 포함하는 RPMI-1640을 사용했다. 감염 3일 후에 60As6 세포 플레이트로부터 배양액을 제거하고, 10% FBS, 2 μ g/mL Puromycin(Thermo Fisher Scientific사, A-11138-02) 포함하는 RPMI-1640(selection 배지)으로 치환하여, 배양을 계속했다. 그 후, selection 배지에서의 배양 및 계대를 반복하는 것에 의해 미감염의 세포를 제거하고, 바이러스가 완전히 제거된 것을 확인했다. 수립한 세포를 60As6-Luc/GFP 세포라고 칭한다. 이 세포는, luciferase 및 GFP를 발현하고 있었다. 추가로, 60As6-Luc/GFP 세포는 내인성으로 TSPAN8이 고발현하고 있음을 플로 사이토메트리법에 의해 확인했다.

[0561] [실시예 6: 완전 인간 항체인 16B11.1의 ADCC 활성 평가]

[0562] 완전 인간 항체 항TSPAN8 항체의 16B11.1에 의해 유도되는 ADCC 활성을 측정했다. ADCC 활성은, 이벡터 세포가 표적 세포를 상해하는 작용을 평가함으로써 측정이 가능하다. 본 실시예에서는, 이벡터 세포인 NK 세포와 표적 세포인 60As6-Luc/GFP 세포의 공배양하에 있어서, 16B11.1에 의해 NK 세포가 활성화되고, 그 결과로서 60As6-Luc/GFP 세포가 ADCC 활성에 의해 상해되는 세포 상해 활성을, Luciferase를 지표로 측정했다.

[0563] NK 세포는, 동결 인간 PBMC(ePBMC(등록상표), Characterized Cryopreserved Human PBMC, Cellular Technology Limited사, CTL-CP1)로부터 NK 세포 단리 키트(NK Cell Isolation Kit, human, Miltenyi Biotec사, 130-092-657)를 이용하여 단리하고, NK 세포용 배지(NKMACSMedium, Miltenyi Biotec사, 130-114-429)에서 배양한 것을 사용했다.

[0564] 환자 96웰 플레이트(Sumitomo Bakelite사, MS-9096U)에 5% FBS(Hyclone사, SH30084.03) 함유 RPMI-1640(SIGMA사, R8758-500mL) 배지에 혼탁한 60As6-Luc/GFP 세포를 5×10^3 개/25 μ L/well, NK 세포를 5×10^4 개/50 μ L/well씩 과종했다. 추가로, 16B11.1 또는 음성 컨트롤 항체로서의 자사제의 항KLH 항체(3G6)를 종농도 1, 10, 100, 1000, 10000ng/mL가 되도록 희석한 용액을 25 μ L/well 첨가하고, 24시간 후의 Luciferase의 발광량을 루시페라제 정량화 키트(ONE-Glo Luciferase Assay System, Promega사, E6120)를 이용하여 측정했다. Luciferase의 발광량은 60As6-Luc/GFP 세포의 생존량을 나타내기 때문에, Luciferase의 발광량의 감소에 의해 ADCC 활성에 의한 세포 상해 활성을 측정할 수 있다.

[0565] 도 7의 세로축은 배지만을 측정했을 경우의 Luciferase의 발광량을 100%로 하고, 항체 무첨가 시의 60As6-Luc/GFP 세포 중의 Luciferase의 발광량을 0%로 했을 경우의 각 샘플의 Luciferase의 발광량의 상대치를 나타낸다. 가로축은 각 웰에 첨가한 항체의 농도를 나타낸다. 도 7에 나타낸 바와 같이, 16B11.1을 첨가했을 경우만 ADCC 활성에 의해 표적 세포가 상해되었다.

[0566] [실시예 7: 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체의 제작]

[0567] [실시예 7-1: 항TSPAN8 항체의 이중 특이성 항체 벡터 제작]

[0568] 16B11.1의 중쇄의 아미노산 번호 238 및 239(EU 인덱스: 234 및 235)의 아미노산을 각각 류신(L)으로부터 알라닌(A)으로 치환한 LALA 변이(L234A 및 L235A), 아미노산 번호 370, 372 및 411(EU 인덱스: 366, 368 및 407)의 아미노산을 각각 트레오닌(T)으로부터 세린(S), L로부터 A, 티로신(Y)으로부터 발린(V)으로 치환하는 노브즈 인 투 홀즈(Knobs into holes) 변이, 및, 아미노산 번호 301(EU 인덱스: 297)의 아미노산을 아스파라긴(N)으로부터 글리신(G)으로 치환하는 변이를 도입했다. 설계한 16B11.1의 중쇄 아미노산 서열을 서열 번호 6에 나타낸다. 제작한 벡터를 pcDNA3.4-16B11.1_HC_H라고 칭한다.

[0569] [실시예 7-2: 항인간 CD3 항체의 이중 특이성 항체 벡터 제작]

[0570]

인간화 항CD3 항체의 서열 설계는, 일본 특허 제5686953호에 기재된 마우스 항CD3 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 서열을 기초로, 문현(Front Biosci., 2008, Vol. 13, p. 1619-1633)에 기재된 방법에 준하여 행했다. 이 때에, 백뮤테이션을 도입했다. 입체 구조 정보(PDB Code: 5FCS)를 MOLISI Inc.사가 제공하는 통합 계산 화학 시스템 MOE로 해석하여, 프레임워크 영역 내의 백뮤테이션 도입 위치를 결정했다. 인간화 항CD3 항체는, 중쇄 가변 영역(서열 번호 14 아미노산 번호 1 내지 125), 링커(서열 번호 14 아미노산 번호 126 내지 145), 경쇄 가변 영역(서열 번호 14 아미노산 번호 146 내지 254), 헌지(서열 번호 14 아미노산 번호 255 내지 269), CH2 도메인(서열 번호 14 아미노산 번호 270 내지 379) 및, CH3 도메인(서열 번호 14 아미노산 번호 380 내지 486)의 순서로 배치되도록 설계했다. 추가로, 서열 번호 14에는 (1) 아미노산 번호 44와 아미노산 번호 247에 해당하는 아미노산을 시스테인(C)으로 치환, (2) 아미노산 번호 259(EU 인덱스: 220)의 아미노산을 C로부터 S로 치환, (3) 아미노산 번호 273 및 274(EU 인덱스: 234 및 235)의 아미노산을 L로부터 A로 치환하는 LALA 변이, (4) 아미노산 번호 405(EU 인덱스: 366)의 아미노산을 T로부터 트립토판(W)으로 치환하는 Knobs into holes 변이, (5) 아미노산 번호 336(EU 인덱스: 297)의 아미노산을 N으로부터 G로 치환하는 변이가 도입되어 있다. 이들 변이를 도입하기 위해, 각각의 변이점을 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 합성하고, pcDNA3.1(+) 벡터(Thermo Fisher scientific사, V79020)에 삽입했다. 제작한 벡터를 pcDNA3.1-m7-scFV_K라고 칭한다. 제작한 인간화 항CD3 항체의 염기 서열을 서열 번호 13에, 아미노산 서열을 서열 번호 14에 나타낸다.

[0571]

[실시예 7-3: 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체의 제작]

[0572]

항TSPAN8 항체의 Fab 영역과, 항CD3 항체의 scFv 영역과, Fc 영역에 의해 구성되는 이중 특이성 항체를 제작하기 위해서, pcDNA3.4-16B11.1_HC_H, pcDNA3.4-16B11_LC, pcDNA3.1-m7_scFV_K를 실시예 3의 방법과 마찬가지로 ExpiCHO-S(등록상표) 세포에 트랜스펙션했다. 배양 상청을 MabSelect SuRe를 이용하여 정제하고, 추가로 젤 여과 칼럼 HiLoad26/600 Superdex(등록상표) 200pg(GE 헬스케어사, 28-9893-36)을 이용하여 정제하는 것에 의해, 순도 95% 이상의 정제 항체를 얻었다. 얻어진 항체를 항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체라고 칭한다.

[0573]

[실시예 8: 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체의 결합 활성 평가]

[0574]

항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체의 TSPAN8와 CD3에 대한 결합 활성을, TSPAN8의 LEL 단백 또는 CD3 ε δ 복합 단백을 이용한 ELISA법에 의해 각각 평가했다.

[0575]

상세하게는, PBS로 희석한 TSPAN8 Protein, Human, Recombinant(SinoBiological사, 15683-H07H) 또는 Human CellExpCD3 epsilon & CD3 delta Heterodimer, Human Recombinant(BioVision사, P1183-10) 1 μg/mL를 384-Well White Plates, MaxiSorp(Nunc사, 460372)에 30 μL/well 첨가했다. 4°C에서 종야(終夜) 정치한 후에 상청을 제거하고, Blocking One(Nacalai Tesque사, 03953-95)를 120 μL/well 첨가했다. 실온에 1시간 정치한 후에, 상청을 제거하고, TBST buffer(Thermo Fisher scientific사, 28360)로 2회 세정 후, 10% Blocking One 함유 TBST로 희석한 항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체를 30 μL/well씩 첨가하고, 실온에서 1시간 정치했다. 항체 용액을 제거하고, TBST buffer로 2회 세정 후, 10% Blocking One 함유 TBST로 5000배 희석한 Goat Anti-Human Kappa, Mouse ads-HRP(SouthernBiotech사, 2061-05)를 30 μL/well 첨가하고, 실온에서 30분간 정치했다. 항체 용액을 제거하고, TBST buffer로 4회 세정 후, BM Chemiluminescence ELISA Substrate(POD)(Roche사, 11582950001)를 30 μL/well 첨가했다. 실온에서 15분 반응시킨 후에, ARVO X3(PerkinElmer사)으로 화학발광을 측정했다. 결과, TSPAN8 및 CD3에 대한 EC50치는 각각 1.0 μg/mL(8.1nM), 4.6 μg/mL(36nM)로 산출되었다(도 8).

[0576]

[실시예 9: 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체의 RTCC 활성 평가]

[0577]

RPMI-1640(Thermo Fisher Scientific사, 11875-119) 500mL에 FBS 50mL, MEM Non-essential Amino Acid(Merck 사, M7145) 5mL, Sodium pyruvate(Merck사, S8636) 5mL, GlutaMAX I(Thermo Fisher Scientific사, 35050-061) 5mL, 페니실린 스트렙토마이신(Thermo Fisher Scientific사, 15070-063) 5mL, HEPES(Thermo Fisher Scientific 사, 15630-080) 5mL를 가한 것을 배양 배지로서 이용했다(이하, 본 실시예에서 「배양 배지」라고 칭한다). 실시예 4에서 제작한 60As6-Luc/GFP 세포를 배양 배지로 2×10^5 개/mL로 조제한 세포 혼탁액을 평저 96웰 플레이트(IWAKI사, 3860-096)에 50 μL씩 과종하고, 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양했다. 3시간 후, 배양 배지로 1×10^6 개/mL로 조제한 동결 인간 말초혈 단핵 세포(LP. CR. MNC10M; AllCells LLC사, 4W-270)를, 배양 중의 96웰 플레이트에 100 μL씩 과종했다. 종농도 0, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000, 10000ng/mL가 되도록 조제한 항

TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체를 $50 \mu\text{L}$ 씩 첨가하고, 37°C , 5% CO_2 배양하, IncuCyte(등록상표) ZOOM(싸토리우스사)으로 각 웰의 형광(GFP) 면적을 3일 후에 측정했다. 형광 면적을 세포 증식의 지표로 하여, 도 9에 세포 증식 곡선을 나타냈다. 도 9의 세로축은, 배지만의 웰의 형광 면적을 0%로 하고, 항체 용액 미첨가의 웰의 형광 면적을 100%로 했을 경우의 60As6-Luc/GFP 세포의 형광 면적의 상대치를 나타낸다. 결과, 항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체는 TSPAN8 발현 위암 세포인 60As6-Luc/GFP 세포에 대해, *in vitro*에 있어서 세포 증식 억제 작용을 나타냈다.

[0578] [실시예 10: 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체의 환자 복수 세포를 이용한 약효 평가]

환자 복수 세포에 포함되는 암 세포 및 면역 세포에 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체가 결합하면, 면역 세포가 활성화되어 암 세포가 상해된다. 항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체에 의한 암 세포 상해 작용 및 면역 세포 활성화 작용을 이하의 방법으로 평가했다.

환자 복수 세포는 실시예 1-1과 마찬가지로 환자 복수를 용혈 처리까지 실시한 후, 동결 보존된 세포를 이용했다. 용해된 세포를 실시예 9와 마찬가지의 배양 배지로 2×10^6 개/mL가 되도록 조제하고, 그 세포 용액을 평저 96웰 플레이트에 $100 \mu\text{L}/\text{well}$ 씩 과종했다. 피험 항체로서 항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체 및 대조 항체(16B11.1의 Fab를 항KLH(키홀 림펫 헤모시아닌) 항체의 Fab로 치환한 항KLH 항체와 항CD3 항체의 바이스페시픽 항체)를 사용했다. 피험 항체는, $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 로부터 10배 공비로 $0.1\text{ng}/\text{mL}$ 까지 희석했다. 피험 항체를, 세포를 과종한 96웰 플레이트에 첨가한 후에, 37°C , 5% CO_2 인큐베이터에서 배양했다. 배양에는, 배양 배지를 사용했다. 3일 후에 세포를 회수하고, V저 마이크로 플레이트에 살종(撒種)했다. 회수 시에 플레이트에 접착되어 있던 세포는 Accutase(Innovative Cell Technologies사, AT-104)로 박리한 후, V저 마이크로 플레이트에 첨가했다. $720 \times g$ 2분 원심분리한 후에 상청을 제거하고, staining buffer(10% FBS 함유 PBS 0.09% NaN_3 2mM EDTA)에 40분의 1 양의 Human BD Fc Block(Becton, Dickinson and Company사, 564220)을 가한 액체를 $20 \mu\text{L}/\text{well}$ 로 첨가했다. 각각의 웰에 대해 staining buffer로 희석한 FITC Mouse Anti-Human CD4(Becton, Dickinson and Company사, 550628), APC-H7 Mouse Anti-Human CD8(Becton, Dickinson and Company사, 560179), APC Mouse Anti-Human CD45(Becton, Dickinson and Company사, 555485), PE Mouse Anti-Human CD25(Becton, Dickinson and Company사, 555432), Brilliant Violet 421 anti-human CD326(EpCAM) Antibody(BioLegend사, 324220)를 $10 \mu\text{L}/\text{well}$ 씩 가하고 4°C 에서 50분 정지했다. 세포를 staining buffer로 1회 세정한 후, 1/200 양의 7-AAD solution을 포함하는 staining buffer에 재현탁하고, CytoFLEX S(Beckman Coulter사)를 이용하여 플로 사이토메트리법에 의해 각종 항체의 복수 세포에의 결합을 측정했다. 데이터 해석은 FlowJo로 행했다. 생 세포의 지표인 7-AAD 음성 세포 획분에 대해, 면역 세포의 지표인 CD45 및 암 세포의 지표인 EpCAM로 전개했다. CD45 음성 EpCAM 양성 암 세포는 Fsc(1in)와 Ssc(1in)에 전개하고, 단편화한 분획을 제외한 세포를 암 세포의 생 세포수로 했다. 추가로, CD45 양성 획분의 CD4 또는 CD8 양성 세포에 있어서의 활성화 마커의 CD25의 발현을 측정하여, anti-CD25-PE 형광 강도의 MFI를 산출했다. 도 10a에는, 암 세포의 생 세포수의 변화를 나타낸다. 세로축은, 항체 용액 미첨가 시의 암 세포의 세포수를 100%로 했을 때의 세포수의 상대치를 나타낸다. 도 10b 및 10c에는, 피험 항체에 의한 CD4 양성 T 세포 및 CD8 양성 T 세포 상의 CD25 발현량의 변화를 나타낸다. 세로축은, anti-CD25-PE 형광 강도의 MFI의 상대치를 산출한 값을 나타낸다.

결과, 도 10a에 나타내는 바와 같이 항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체 첨가에 의해 복수 중 암 세포의 생 세포수의 감소가 인정되고, 도 10b, 도 10c에 나타내는 바와 같이 복수 중 CD4 양성 T 세포와 CD8 양성 T 세포의 활성화가 관찰되었다. 이 결과로부터, 항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체는 복수 중 CD4 양성 T 세포와 CD8 양성 T 세포를 활성화하여 복수 중 암 세포를 살상시킴이 시사되었다.

[0582] [실시예 11: 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체의 *in vivo* 항종양 평가]

항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체에 의한 *in vivo* 항종양 작용을, 위암 복막 과종 모델을 이용하여 평가했다.

[0584] [실시예 11-1: Expanded panT 세포의 제작]

PBS로 $3 \mu\text{g}/\text{mL}$ 로 용해한 항CD3 항체(BioLegend사, 317315)를 24웰 플레이트(IWAKI사, 3820-024)에 $250 \mu\text{L}$ 씩 첨가하고, 4°C 에서 정지했다. 다음날, 플레이트를 배양 배지로 2번 세정한 후에 배양 배지를 첨가하고, 후술하는 세포 과종까지 실온에서 정지했다. HPBMC, human peripheral blood mononuclear cells, Cryopreserved(LONZA 사, CC-2702)로부터 panT 세포(CD4T 세포 및 CD8T 세포의 양쪽을 포함한다)를 단리했다. 단리에는 PanT Cell

Isolation Kit, human(Miltenyi Biotec사, 130-096-535)을 이용하여, 첨부된 프로토콜에 기초하여 실험을 행했다. 전술한 24웰 플레이트로부터 배양 배지를 제거하고, 플레이트에 배양 배지로 3×10^6 개/mL로 조제한 panT 세포를 500 μ L씩 과종했다. 추가로 20ng/mL의 인간 IL-2(PeproTech사, 200-2) 및 2 μ g/mL의 항CD28 항체(BioLegend사, 302923)를 포함하는 배양 배지를 500 μ L씩 첨가하고, 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양을 행했다. 세포를, 새로운 플레이트(IWAKI사, 3810-006)에 배양 개시 3일 후, 5일 후 및 7일 후에 계대하고, 종농도 10ng/mL가 되도록 IL-2를 첨가했다. 배양 개시 7일 후와 10일 후의 세포를 회수하여, 실시예 10-2에 있어서 사용했다. 여기에서 단리, 증식시킨 세포를 Expanded panT 세포라고 칭한다.

[0586] [실시예 11-2: 위암 복막 파종 모델에 있어서의 약효 확인]

각 군 7예의 7주령 C.B17/Icr-scid/scidJcl 암컷 마우스(닛폰 클레아사)의 복강 내에 1×10^6 개/1mL/PBS의 60As6-Luc/GFP 세포를 이식했다. 이식 6일 후에 60As6-Luc/GFP 세포에 도입되어 있는 Luciferase에 의한 기질 Luciferin의 발광량을 지표로 하여, 각 군이 균등해지도록 군나누기를 행했다. Luciferin의 발광량은 종양 체적을 나타내는 지표로서 이용했다.

[0588] 상세하게는, 각 개체에 3mg Luciferin(VivoGlo Luciferin, In Vivo Grade, Promega사, P1043)을 0.5mL의 PBS에 용해한 용액을 복강 내에 투여하고, 투여 10분 후에 발광량을 IVIS Lumina II(perkinelmer사)로 측정했다. 다음에 60As6-Luc/GFP 세포 이식 7일 후 및 10일 후에 1×10^7 개의 expanded panT 세포를 0.5mL의 PBS에 혼탁한 액 및 0, 0.3, 1.0, 3.0mg/kg 항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체를 0.2mL의 PBS에 혼탁한 액을 복강내 투여했다. 위암 세포 이식 14일 후에, Luciferin의 발광량을 측정하여, 종양 체적의 증감을 평가했다. 또한, 동일 복막 파종 모델 마우스의 생존을 60As6-Luc/GFP 세포 이식 34일 후에까지 관찰했다. 도 11a에 나타내는 바와 같이, 항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체 투여군에 있어서, 유의한 종양 체적 축소 작용이 나타나고, 도 11b에 나타내는 바와 같이, 1.0 및 3.0mg/kg 투여군에 있어서는, 유의한 생존 기간 연장 효과가 인정되었다. 표 4에 생존 중앙치 및 검정 결과를 나타낸다. 표 중의 유의 확률 P치는, 로그 랭크 검정에 의해 대조군(용매 투여군)의 생존 기간과 항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체 투여군의 생존 기간을 비교하는 것에 의해 구했다. **는, P치가 본페로니의 방법으로 보정한 유의 수준 0.01/3보다 작은 군을 나타낸다.

표 4

처리		생존 중앙치	유의자	P 치
대조군	PBS	23	—	—
항 TSPAN8(16B11)-항 CD3	0.3 mg/kg	23	ns	
이중 특이성 항체	1.0 mg/kg	29	**	0.0006
	3.0 mg/kg	33	**	0.0006

Log-rank (Mantel-Cox) test (Bonferroni correction)

[0589]

[실시예 12: 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체의 각 암 종양 세포주에 대한 작용]

[실시예 12-1: 항TSPAN8 항체의 각 암 종양 세포주에 대한 결합 활성의 확인]

위암 세포주(KATOIII 세포: Japanese Collection of Research Bioresources(JCRB), JCRB0611, NUGC-4 세포: RIKEN BioResource Research Center(BRC), RCB1939, 60As6-Luc/GFP 세포), 결장암 세포주(HT-29 세포: ATCC, HTB-38, LoVo 세포: ATCC, CCL-229, GP2d 세포: The European Collection of Authenticated Cell Cultures(ECACC), 95090714), 췌장암 세포주(AsPC-1 세포: ATCC, CRL-1682), 식도암 세포주(OE19 세포: ECACC, 96071721), 간장암 세포주(Li-7 세포: RIKEN BRC, RCB1941)에 대한 Alexa Fluor647 표지 16B11의 결합을 플로사이토메트리법에 의해 측정했다. 음성 컨트롤 항체로서, 자사제의 항KLH 항체(173A1)를 Alexa Fluor647 표지하여 이용했다. 각 암 종양 세포주에 있어서의 16B11과 음성 컨트롤 항체의 결합의 히스토그램을 도 12에 나타낸다.

[0593]

[실시예 12-2: 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체의 각 암 종양 세포주에 대한 RTCC 활성 평가]

KATOIII 세포, NUGC-4 세포, HT-29 세포, LoVo 세포, GP2d 세포, AsPC-1 세포, OE19 세포, Li-7 세포를 배양 배지로 2×10^5 개/mL로 조제하고, 평저 96웰 플레이트(IWAKI사, 3860-096)에 50 μ L씩 과종하고, 37°C, 5% CO₂ 인

큐베이터에서 배양했다. 배양 배지로 1×10^6 개/mL로 조제한 동결 인간 말초혈 단핵 세포(LONZA사, CC-2702)를, 배양 중의 96웰 플레이트에 100 μ L씩 과종했다. 항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체를, 40 μ g/mL 또는 20 μ g/mL을 최고 농도로 하여, 2배 공비가 되도록 배양 배지로 희석했다. 희석한 항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체를 50 μ L 첨가했다(최고 종농도는 10 μ g/mL 또는 5 μ g/mL). 암 세포주, 동결 인간 말초혈 단핵 세포 및 항체를 첨가한 96웰 플레이트를 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양했다. 3일 후에 세포를 회수하고, V저 마이크로플레이트에 살종했다. 회수 시에 배양 플레이트에 접착되어 있던 세포는 Accutase(Innovative Cell Technologies사, AT104)로 박리한 후, V저 마이크로플레이트에 첨가했다. 720×g에서 2분간 원심분리한 후에 상청을 제거하고, staining buffer에 40분의 1 양의 Human BD Fc Block을 가한 액체를 20 μ L/well 첨가했다. 각각의 웰에 대해 staining buffer로 희석한 APC Mouse Anti-Human CD4(Becton, Dickinson and Company사, 555349), APC-H7 Mouse anti-Human CD8, Brilliant Violet 421 Mouse Anti-Human CD45(Becton, Dickinson and Company사, 563879), PE Mouse Anti-Human CD25를 10 μ L/well씩 가하고 4°C에서 1시간 정지했다. staining buffer로 1회 세정한 후, 1/200 양의 7-AAD solution을 가했다. staining buffer에 재현탁하고, CytoFLEX S를 이용하여 플로 사이토메트리법에 의해 각종 항체의 결합을 측정했다. 데이터 해석은 FlowJo로 행했다. 생 세포의 지표인 7-AAD 음성 세포 획분 중의 CD45 음성 세포수를 암 세포의 생 세포 수로 했다. 항체 용액 미첨가를 100%로 했다. 추가로 CD45 양성 획분의 CD4 또는 CD8 양성 세포에 대해 활성화 마커의 CD25의 발현을 anti-CD25-PE 형광 강도의 MFI를, 항체 용액 미첨가를 1로 했을 경우의 배율 변화로서 각각 산출했다. 결과, 도 13a에 나타내는 바와 같이 항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체 첨가에 의해 TSPAN8 발현 암 세포의 생 세포수의 감소가 보였다. 더욱이, 도 13b 및 도 13c에 나타내는 바와 같이, CD4 양성 T 세포와 CD8 양성 T 세포의 활성화가 각각 관찰되었다.

[0595]

[실시예 12-3: 인간 PBMC 이입 HT-29 세포 피하 담암 모델에 있어서의 약효 확인]

[0596]

정상 인간 PBMC(Precision for Medicine, 33000-10M)를 1.25×10^7 개/mL가 되도록 PBS에 혼탁하고, 6주령 NOD/Shi-scid, IL-2R γ KO(NOG) 암컷 마우스(인비보 사이언스)에게 2.5×10^6 개/200 μ L의 세포를 마우스 꼬리 정맥 내에 주사했다. 인간 PBMC 이입의 10일 후, HT-29 세포를 5×10^7 개/mL가 되도록 PBS에 혼탁하고, 5×10^6 개/100 μ L로 마우스의 피하에 담암했다. HT-29 세포의 담암으로부터 10일 후에 노기스를 사용하여 종양 체적을 측정하고, 각 군 균등해지도록 군나누기를 행했다(n=10). 항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체의 투여를 동일부터 개시했다. 투여 첫날을 0일째라고 정의했다. 0, 4, 7일째에 마우스에 PBS 또는 0.3, 1, 3, 10mg/kg의 항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체를 정맥내 투여했다. 0, 4, 7, 및 11일째에 종양 체적을 측정했다(도 14a). 종양 체적 [mm^3]은 다음 식으로 계산했다.

[0597]

(종양 장축의 길이 [mm]) × (종양 단축의 길이 [mm])² × 0.5

[0598]

도 14b에 나타내는 바와 같이, 항TSPAN8(16B11)-항CD3 이중 특이성 항체는, HT-29 종양의 증식을 0.3, 1, 3, 및 10mg/kg으로 유의하게 억제했다.

산업상 이용가능성

[0599]

본 발명의 항TSPAN8 항체 및 항TSPAN8-항CD3 이중 특이성 항체 등의 항TSPAN8 항체의 융합체는, 암의 치료에 유용할 것으로 기대된다. 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 발현 벡터, 형질 전환된 숙주 세포, 및 항체를 생산하는 방법은, 상기 항TSPAN8 항체 및 그 융합체를 생산하는 데 유용하다.

서열목록 자유텍스트

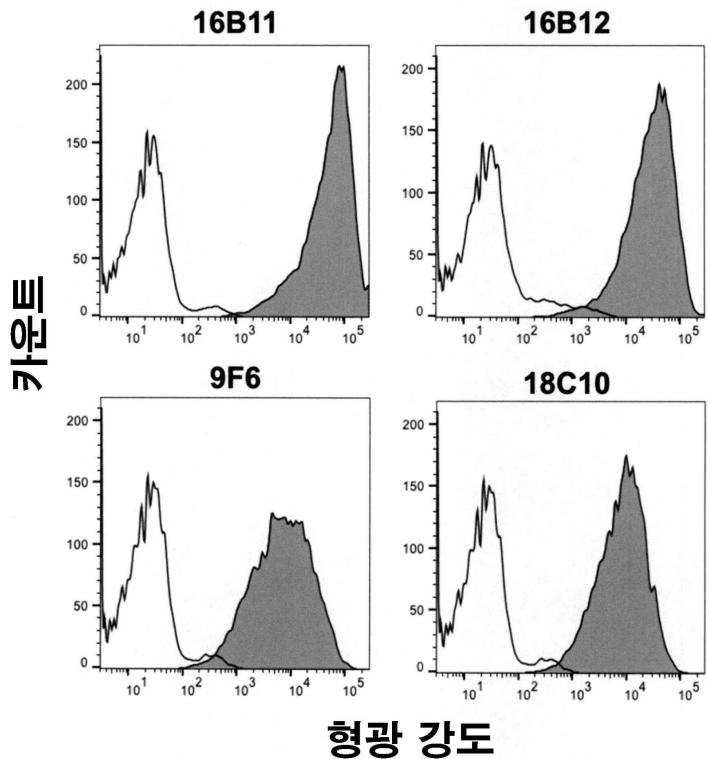
[0601]

이하의 서열목록의 숫자 표제 <223>에는, 「Artificial Sequence」의 설명을 기재한다. 구체적으로는, 서열 번호 2는 인간 TSPAN8-Myc-DDK의 아미노산 서열을 나타내고, 서열 번호 1에 나타나는 염기 서열은, 서열 번호 2에 나타나는 인간 TSPAN8의 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열이다. 서열 번호 4, 6, 또는 10은 항TSPAN8 항체의 중쇄의 아미노산 서열이며, 서열 번호 3, 5, 또는 9에 나타나는 염기 서열은, 서열 번호 4, 6, 또는 10에 나타나는 항TSPAN8 항체의 중쇄의 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열이다. 서열 번호 8 또는 12의 서열은 항TSPAN8 항체의 경쇄의 아미노산 서열이며, 서열 번호 7 또는 11에 나타나는 염기 서열은, 서열 번호 8 또는 12에 나타나는 항TSPAN8 항체의 경쇄 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열이다. 서열 번호 14는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩티드가 연결된 폴리펩티드의 아미노산 서열이며, 서열 번호 13에 나타나는 염기 서열은, 서열

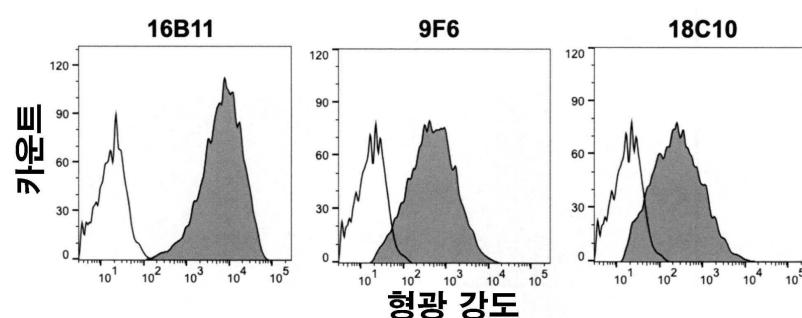
번호 14에 나타나는 항CD3-scFv 영역과 제2 Fc 폴리펩ти드가 연결된 폴리펩티드의 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열이다. 서열 번호 15~23은 발명의 상세한 설명에서 기재한 각종 링커의 아미노산 서열이다. 서열 번호 24~37은 16B11 및 16B12의 CDR 및 가변 영역의 아미노산 서열이다. 서열 번호 38~40은 시그널 서열의 아미노산 서열이다. 서열 번호 41~43은 각각 마우스, 래트 또는 필리핀원숭이의 TSPAN8의 아미노산 번호 126~155의 영역의 아미노산 서열이다.

도면

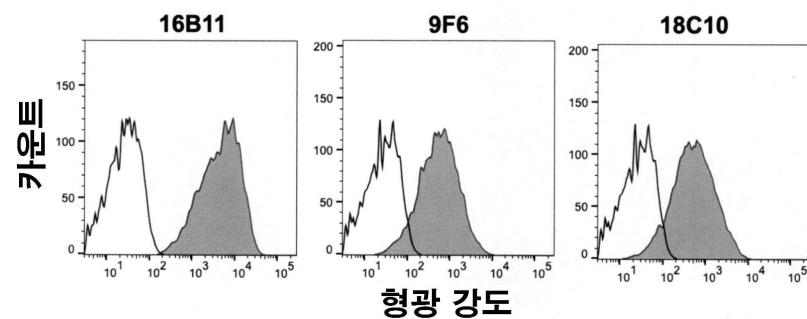
도면 1a



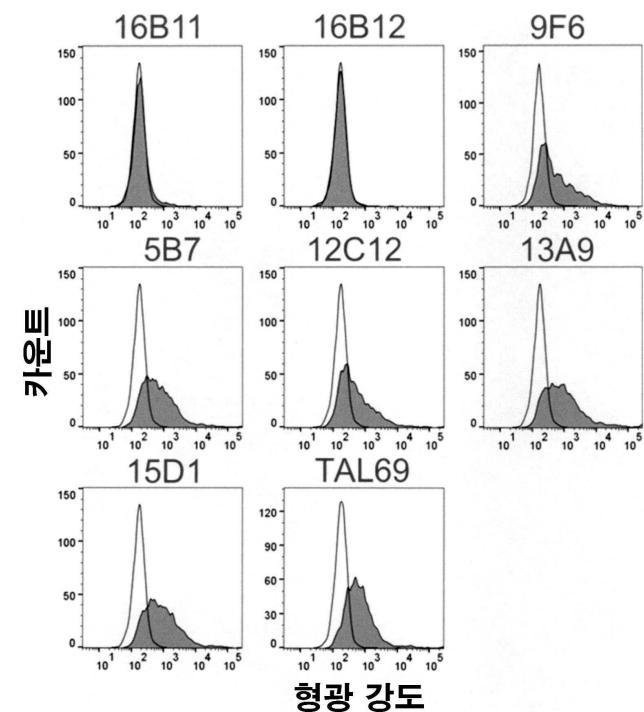
도면 1b



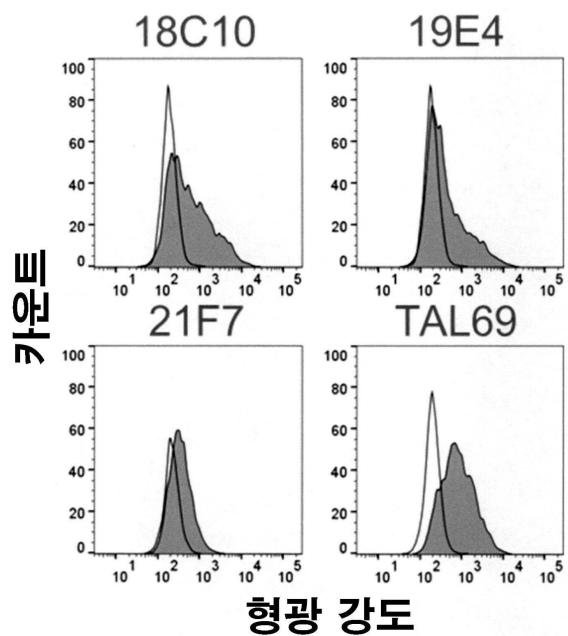
도면1c



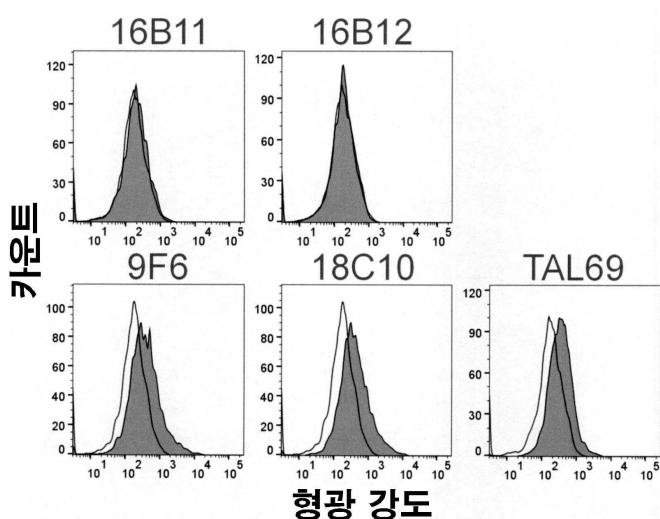
도면2a



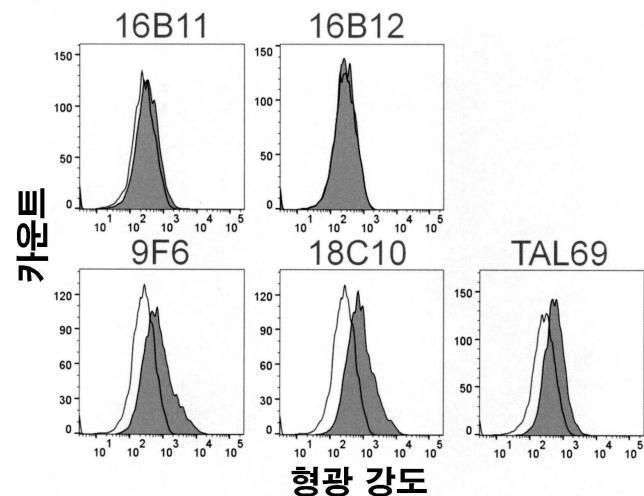
도면2b



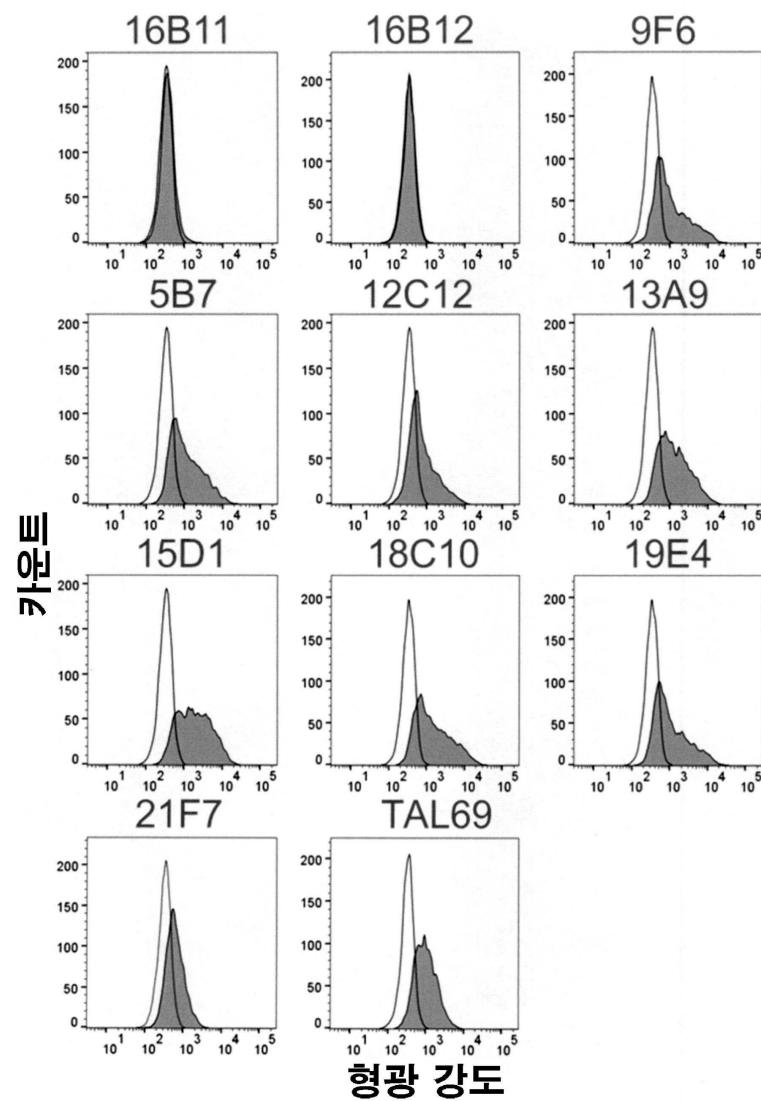
도면3a



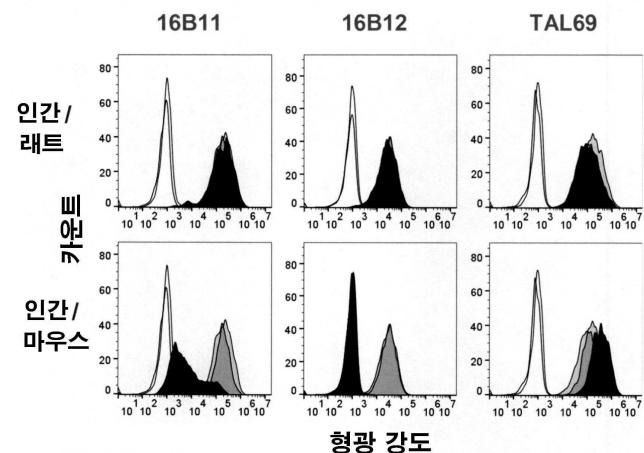
도면3b



도면4



도면5a

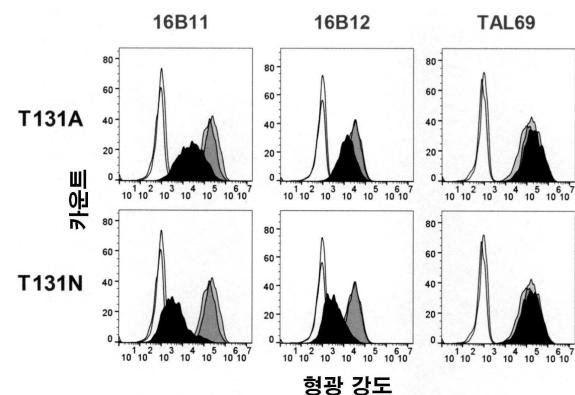


도면5b

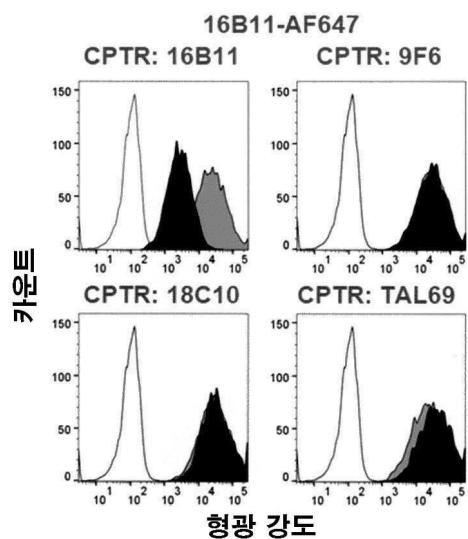
인간	1 2 6 :	K L L S A T G E S E K Q F Q E A I I V F Q E E F K C C G L V	1 5 5
마우스	1 2 6 :	K L L S D N T D E A K D F Q K A M I I V F Q S E F K C C G L E	1 5 5
래트	1 2 6 :	K L L S E T S N E A K E V Q K A M I A F Q S E F K C C G L R	1 5 5
필리핀원숭이	1 2 6 :	K L L S T T G E S A K Q F Q Q A M A E F Q K E F K C C G L V	1 5 5

* * * * . . * . * . * * * * * *

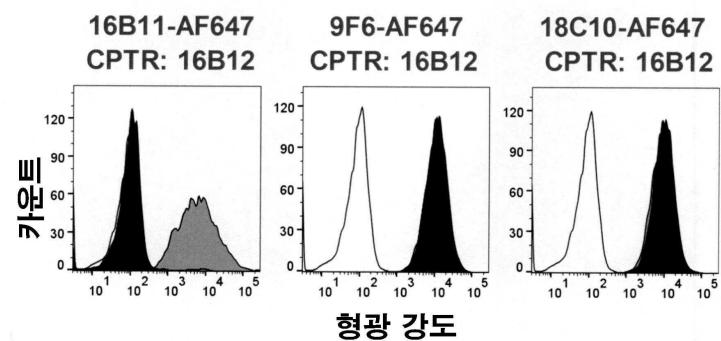
도면5c



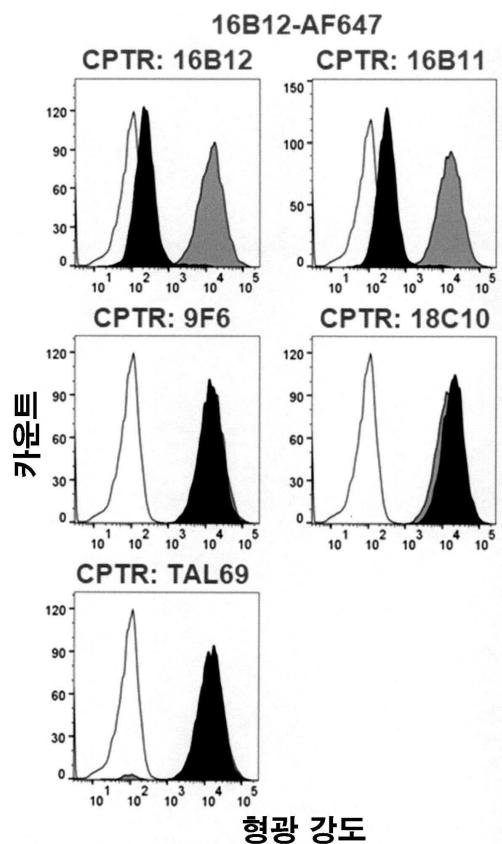
도면6a



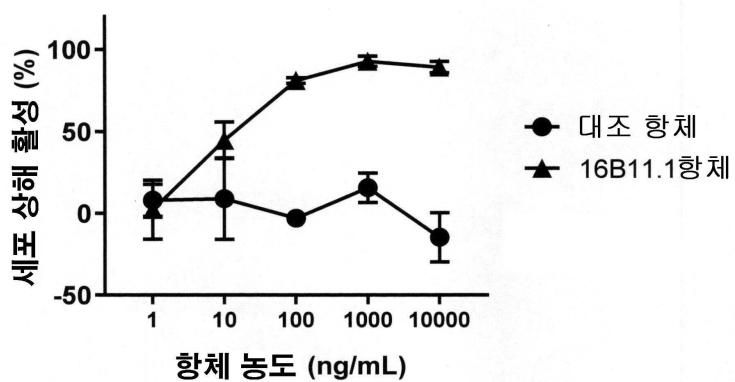
도면6b



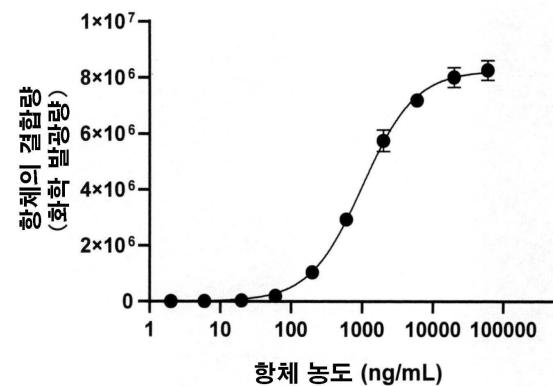
도면6c



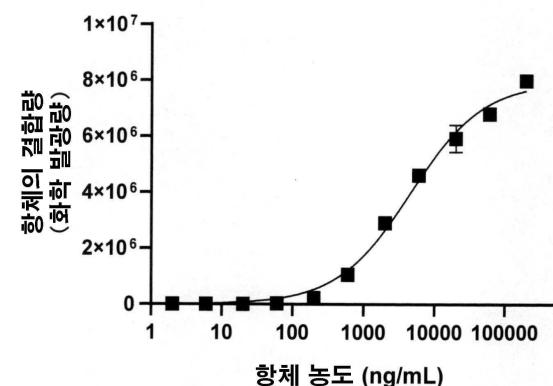
도면7



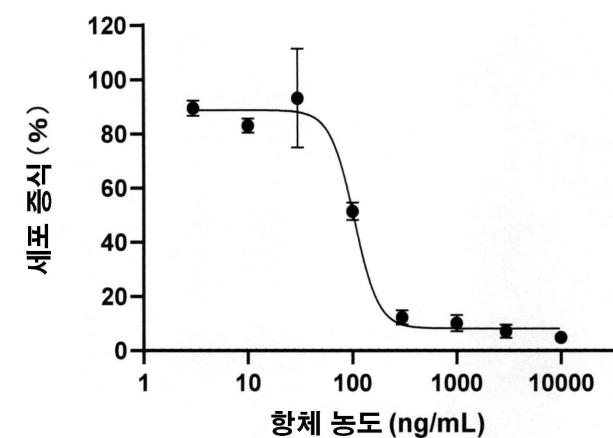
도면8a



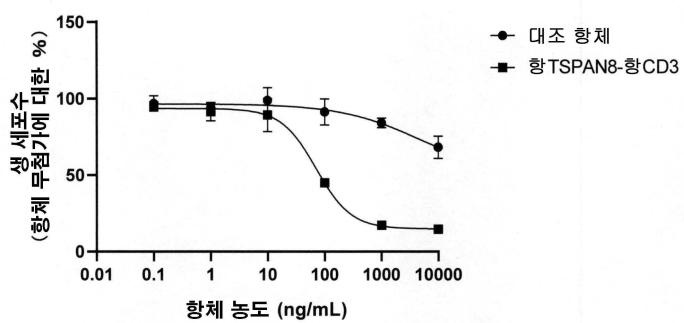
도면8b



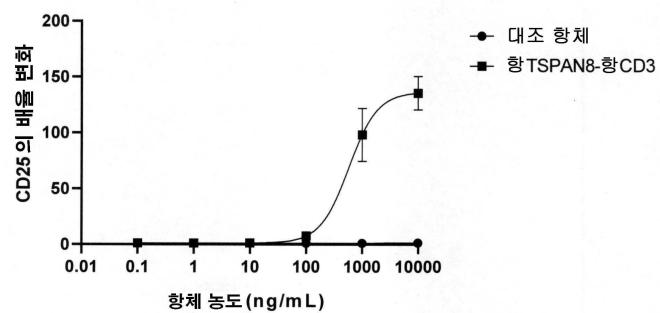
도면9



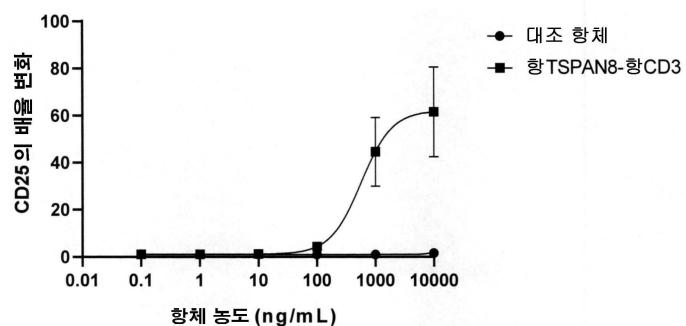
도면 10a



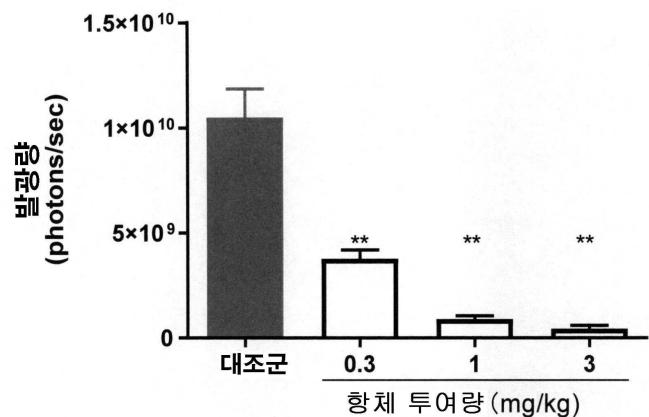
도면 10b



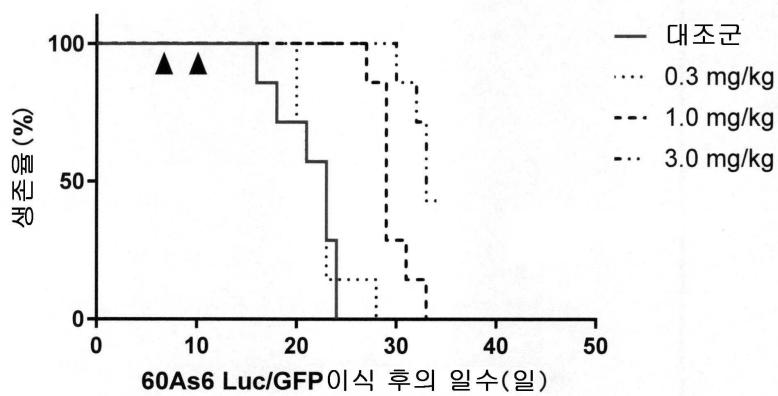
도면 10c



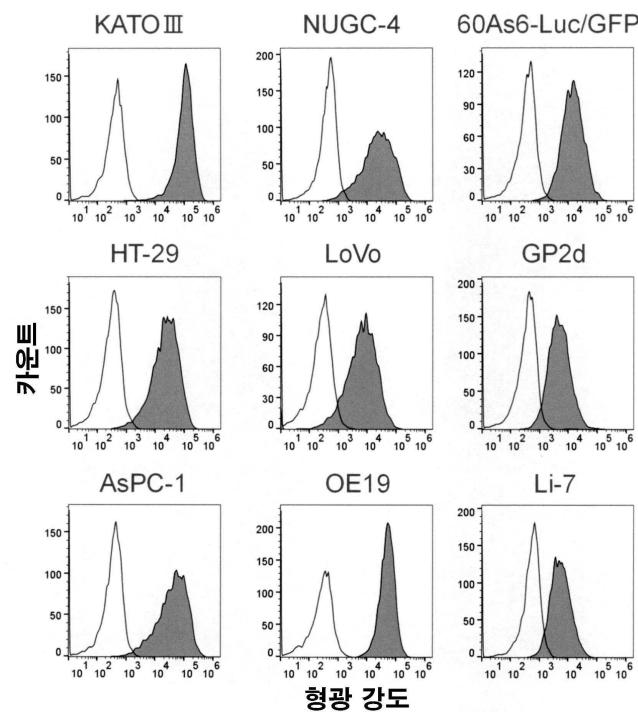
도면11a



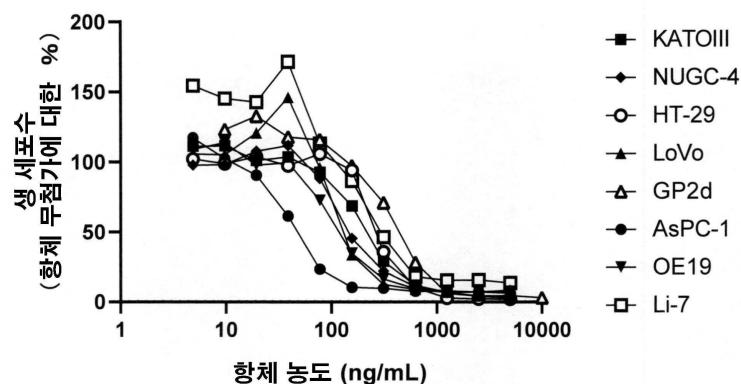
도면11b



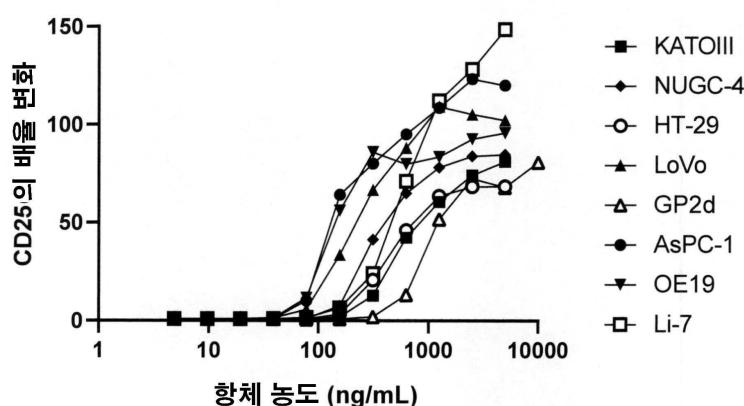
도면12



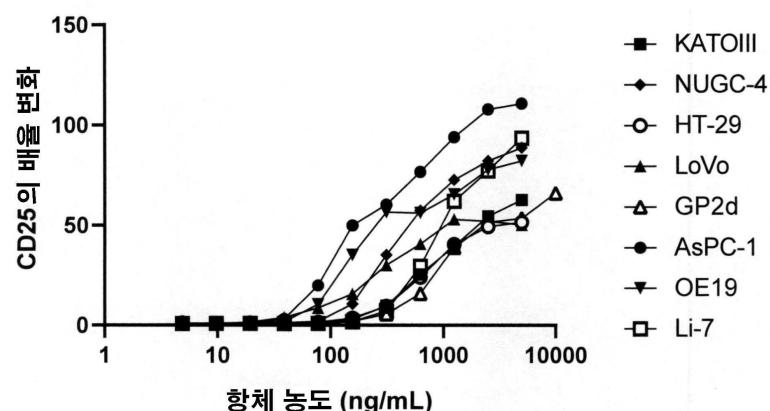
도면 13a



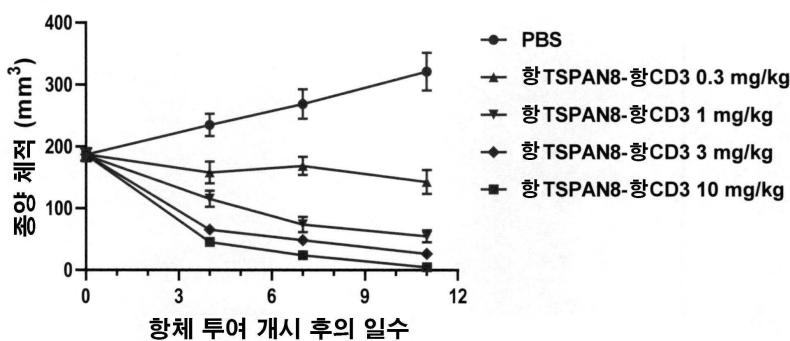
도면 13b



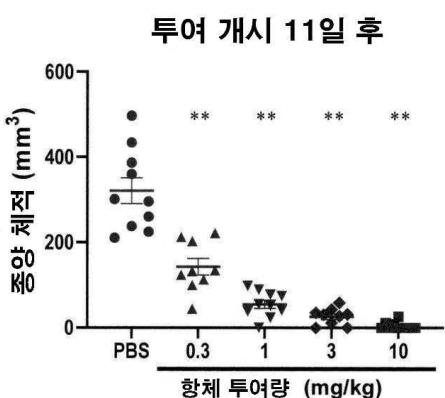
도면 13c



도면 14a



도면 14b



서 롤 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Astellas Pharma Inc.

National Cancer Center

<120> anti-TSPAN8-anti-CD3 bispecific antibody and anti-TSPAN8 antibody

<130> FA1535-21168

<150> JP2020-189988

<151> 2020-11-16

<160> 43

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 807

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human TSPAN8-Myc-DDK

<220><221> CDS

<222> (1)..(807)

<400> 1

atg gca ggt gtg agt gcc tgt ata aaa tat tct atg ttt acc ttc aac 48
 Met Ala Gly Val Ser Ala Cys Ile Lys Tyr Ser Met Phe Thr Phe Asn

1	5	10	15	
ttc ttg ttc tgg cta tgt ggt atc ttg atc cta gca tta gca ata tgg				96
Phe Leu Phe Trp Leu Cys Gly Ile Leu Ile Leu Ala Leu Ala Ile Trp				
20	25	30		
gta cga ata agc aat gac tct caa gca att ttt ggt tct gaa gat gta				144
Val Arg Ile Ser Asn Asp Ser Gln Ala Ile Phe Gly Ser Glu Asp Val				
35	40	45		

ggc tct agc tcc tac gtt gct gtg gac ata ttg att gct gta ggt gcc				192
Gly Ser Ser Ser Tyr Val Ala Val Asp Ile Leu Ile Ala Val Gly Ala				
50	55	60		
atc atc atg att ctg ggc ttc ctg gca tgc tgc ggt gct ata aaa gaa				240
Ile Ile Met Ile Leu Gly Phe Leu Ala Cys Cys Gly Ala Ile Lys Glu				
65	70	75	80	
agt cgc tgc atg ctt ctg ttg ttt ttc ata ggc ttg ctt ctg atc ctg				288

Ser Arg Cys Met Leu Leu Leu Phe Phe Ile Gly Leu Leu Leu Ile Leu				
85	90	95		
ctc ctg cag gtg gcg aca ggt atc cta gga gct gtt ttc aaa tct aag				336
Leu Leu Gln Val Ala Thr Gly Ile Leu Gly Ala Val Phe Lys Ser Lys				
100	105	110		
tct gat cgc att gtg aat gaa act ctc tat gaa aac aca aag ctt ttg				384
Ser Asp Arg Ile Val Asn Glu Thr Leu Tyr Glu Asn Thr Lys Leu Leu				

115	120	125		
agc gcc aca ggg gaa agt gaa aaa caa ttc cag gaa gcc ata att gtg				432
Ser Ala Thr Gly Glu Ser Glu Lys Gln Phe Gln Glu Ala Ile Ile Val				
130	135	140		
ttt caa gaa gag ttt aaa tgc tgc ggt ttg gtc aat gga gct gct gat				480
Phe Gln Glu Glu Phe Lys Cys Cys Gly Leu Val Asn Gly Ala Ala Asp				

145	150	155	160	
tgg gga aat aat ttt caa cac tat cct gaa tta tgt gcc tgt cta gat				528
Trp Gly Asn Asn Phe Gln His Tyr Pro Glu Leu Cys Ala Cys Leu Asp				
165	170	175		
aag cag aga cca tgc caa agc tat aat gga aaa caa gtt tac aaa gag				576
Lys Gln Arg Pro Cys Gln Ser Tyr Asn Gly Lys Gln Val Tyr Lys Glu				
180	185	190		
acc tgt att tct ttc ata aaa gac ttc ttg gca aaa aat ttg att ata				624
Thr Cys Ile Ser Phe Ile Lys Asp Phe Leu Ala Lys Asn Leu Ile Ile				
195	200	205		
gtt att gga ata gca ttt gga ctg gca gtt att gag ata ctg ggt ttg				672
Val Ile Gly Ile Ala Phe Gly Leu Ala Val Ile Glu Ile Leu Gly Leu				
210	215	220		
gtg ttt tct atg gtc ctg tat tgc cag atc ggg aac aaa acg cgt acg				720
Val Phe Ser Met Val Leu Tyr Cys Gln Ile Gly Asn Thr Arg Thr				
225	230	235	240	
cg ^g ccg ctc gag cag aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg gca gca aat				768
Arg Pro Leu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Ala Ala Asn				
245	250	255		
gat atc ctg gat tac aag gat gac gac gat aag gtt taa				807
Asp Ile Leu Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys Val				
260	265			
<210> 2				
<211> 268				
<212> PRT				
<213> Artificial Sequence				
<220><223> Synthetic Construct				
<400> 2				
Met Ala Gly Val Ser Ala Cys Ile Lys Tyr Ser Met Phe Thr Phe Asn				
1	5	10	15	
Phe Leu Phe Trp Leu Cys Gly Ile Leu Ile Leu Ala Leu Ala Ile Trp				

20	25	30
Val Arg Ile Ser Asn Asp Ser Gln Ala Ile Phe Gly Ser Glu Asp Val		
35	40	45
Gly Ser Ser Ser Tyr Val Ala Val Asp Ile Leu Ile Ala Val Gly Ala		
50	55	60
Ile Ile Met Ile Leu Gly Phe Leu Ala Cys Cys Gly Ala Ile Lys Glu		
65	70	75
Ser Arg Cys Met Leu Leu Leu Phe Phe Ile Gly Leu Leu Ile Leu		
85	90	95
Leu Leu Gln Val Ala Thr Gly Ile Leu Gly Ala Val Phe Lys Ser Lys		
100	105	110
Ser Asp Arg Ile Val Asn Glu Thr Leu Tyr Glu Asn Thr Lys Leu Leu		
115	120	125
Ser Ala Thr Gly Glu Ser Glu Lys Gln Phe Gln Glu Ala Ile Ile Val		
130	135	140
Phe Gln Glu Glu Phe Lys Cys Cys Gly Leu Val Asn Gly Ala Ala Asp		
145	150	155
Trp Gly Asn Asn Phe Gln His Tyr Pro Glu Leu Cys Ala Cys Leu Asp		
165	170	175
Lys Gln Arg Pro Cys Gln Ser Tyr Asn Gly Lys Gln Val Tyr Lys Glu		
180	185	190
Thr Cys Ile Ser Phe Ile Lys Asp Phe Leu Ala Lys Asn Leu Ile Ile		
195	200	205
Val Ile Gly Ile Ala Phe Gly Leu Ala Val Ile Glu Ile Leu Gly Leu		
210	215	220
Val Phe Ser Met Val Leu Tyr Cys Gln Ile Gly Asn Lys Thr Arg Thr		
225	230	235
Arg Pro Leu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Ala Ala Asn		
245	250	255
Asp Ile Leu Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Val		
260	265	

<210> 3
 <211> 1356
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 16B11.1_HC
 <220><221> CDS
 <222> (1)..(1356)
 <400> 3

cag	gtt	cag	ctg	gtt	gaa	tct	ggc	ggc	gga	gtt	gtt	cag	cct	ggc	gga	48
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
1	5		10		15											
tct	ctg	aga	ctg	tct	tgt	gcc	gcc	tcc	ggc	ttc	acc	ttc	tcc	tct	tac	96
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
20		25		30												
gga	atg	cac	tgg	gtc	cga	cag	gcc	cct	ggc	aaa	gga	ttg	gaa	tgg	gtc	144
Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
35		40		45												
gcc	gtg	att	tgg	tac	gac	ggc	cgg	aac	aag	tac	tac	gcc	gac	tcc	gtg	192
Ala	Val	Ile	Trp	Tyr	Asp	Gly	Arg	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
50		55		60												
aag	ggc	aga	ttc	acc	atc	tct	cgg	gac	aac	tcc	aag	aac	acc	ctg	tac	240
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
65		70		75		80										
ctg	cag	atg	aac	tcc	ctg	aga	gcc	gag	gac	acc	gcc	gtg	tac	tac	tgc	288
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
85		90		95												
acc	aga	gat	cac	tcc	ggc	tcc	ggc	agc	tac	tac	atc	gat	tat	tgg	ggc	336
Thr	Arg	Asp	His	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Ile	Asp	Tyr	Trp	Gly	
100		105		110												
cag	ggc	acc	ctg	gtc	acc	gtg	tcc	tct	gct	tct	acc	aag	gga	ccc	agc	384
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	

115	120	125	
gtg ttc cct ctg gct cct tcc agc aag tct acc tct ggc gga aca gct			432
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala			
130	135	140	
gct ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttt cct gag cct gtg acc gtc			480
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val			
145	150	155	160
tct tgg aac tct ggc gct ctg aca tct ggc gtg cac acc ttt cca gct			528
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala			
165	170	175	
gtg ctg cag tcc tcc ggc ctg tac tct ctg tcc tct gtc gtg acc gtc			576
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val			
180	185	190	
cct tcc agc tct ctg gga acc cag acc tac atc tgc aat gtg aac cac			624
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His			
195	200	205	
aag cct tcc aac acc aag gtg gac aag aag gtg gaa ccc aag tcc tgc			672
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys			
210	215	220	
gac aag acc cac acc tgt cct cca tgt cct gct cca gaa ctg ctc ggc			720
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly			
225	230	235	240
ggt ccc tcc gtt ttc ctg ttt cca cct aag cct aag gac acc ctg atg			768
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met			
245	250	255	
atc tct cgg acc cct gaa gtg aca tgc gtg gtg gtg gat gtg tcc cac			816
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His			
260	265	270	
gag gat ccc gaa gtg aag ttc aat tgg tac gtg gac ggc gtg gaa gtg			864

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 cac aac gcc aag acc aag cct aga gag gaa cag tac aac tcc acc tac 912
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 aga gtg gtg tcc gtg ctg acc gtg ctg cac cag gat tgg ctg aac ggc 960
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

 305 310 315 320
 aaa gag tac aag tgc aag gtg tcc aac aag gcc ctg cct gct cct atc 1008
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335
 gaa aag acc atc tcc aag gct aag ggc cag cct cgg gaa cct cag gtt 1056
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

 tac aca ctg cct cca tct cgg gac gag ctg acc aag aat cag gtg tcc 1104
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 ctg acc tgc ctc gtg aag ggc ttc tac cct tct gat atc gcc gtg gaa 1152
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 tgg gag tcc aac ggc cag cct gag aac aac tac aag aca acc cct cct 1200

 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 gtg ctg gac tcc gac ggc tca ttc ttc ctg tac tcc aag ctg aca gtg 1248
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 gat aag tcc cgg tgg cag cag ggc aac gtg ttc tct tgt tct gtg atg 1296
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

 420 425 430
 cac gag gcc ctg cac aac cac tac acc cag aag agt ctg tct ctg tcc 1344
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

435	440	445	
cct ggc aag tga			1356
Pro Gly Lys			
450			
<210> 4			
<211> 451			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Synthetic Construct			
<400> 4			
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val 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	
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35	40	45	
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Arg 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	
Thr Arg Asp His Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Ile Asp Tyr Trp Gly			
100	105	110	
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser			
115	120	125	
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala			
130	135	140	
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val			
145	150	155	160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala			
165	170	175	

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

325 330 335

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

340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

355 360 365

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

370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

385 390 395 400

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

405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

420	425	430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		

435 440 445
Pro Gly Lys

<210> 5

218 *Mathematical Sequences*

10B11.1_HO_M

220. 221. CDS

~~~~~ (1)..(1550)

cgat gttt ctag tttt gttt gaa tttt ggcc gggc gggat gttt gttt cttt ggc gggat

dim var dim lcu var dim scl dry dry dry var var dim pro dry dry

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

20 25 30

gga atg cac tgg gtc cga cag gcc cct ggc aaa gga ttg gaa tgg gtc

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

35 40 45

gcc gtg att tgg tac gac ggc cgg aac aag tac tac gcc gac tcc gtg

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

50 55 60

aag ggc aga ttc acc atc tct cgg gac aac tcc aag aac acc ctg tac

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

ctg cag atg aac tcc ctg aga gcc gag gac acc gcc gtg tac tac tgc

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

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| acc aga gat cac tcc ggc tcc ggc agc tac tac atc gat tat tgg ggc | 336 |     |     |
| Thr Arg Asp His Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Ile Asp Tyr Trp Gly |     |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |     |
| cag ggc acc ctg gtc acc gtg tcc tct gct tct acc aag gga ccc agc | 384 |     |     |
| Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser |     |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |     |
| gtg ttc cct ctg gct cct tcc agc aag tct acc tct ggc gga aca gct | 432 |     |     |
| Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala |     |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |     |
| gct ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttt cct gag cct gtg acc gtg | 480 |     |     |
| Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val |     |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| tct tgg aac tct ggc gct ctg aca tct ggc gtg cac acc ttt cca gct | 528 |     |     |
| Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala |     |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |     |
| gtg ctg cag tcc tcc ggc ctg tac tct ctg tcc tct gtc gtg acc gtg | 576 |     |     |
| Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val |     |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |     |
| cct tcc agc tct ctg gga acc cag acc tac atc tgc aat gtg aac cac | 624 |     |     |
| Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His |     |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |     |
| aag cct tcc aac acc aag gtg gac aag aag gtg gaa ccc aag tcc tgc | 672 |     |     |
| Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys     |     |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |     |
| gac aag acc cac acc tgt cct cca tgt cct gct cca gaa gct gct ggc | 720 |     |     |
| Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly |     |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
| ggc cct tcc gtg ttt ctg ttc cct cca aag cct aag gac acc ctg atg | 768 |     |     |
| Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met |     |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |     |
| atc tct cgg acc cct gaa gtc acc tgc gtc gtc gtc gat gtc tct cac | 816 |     |     |

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 260 265 270  
 gag gat ccc gaa gtg aag ttc aat tgg tac gtg gac ggc gtg gaa gtg 864  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 275 280 285  
 cac aac gcc aag acc aag cct aga gag gaa cag tac ggc tcc acc tac 912  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr  
 290 295 300  
 aga gtg gtg tcc gtg ctg acc gtg ctg cac cag gat tgg ctg aac ggc 960  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 305 310 315 320  
 aaa gag tac aag tgc aag gtg tcc aac aag gcc ctg cct gct cct atc 1008  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 325 330 335  
 gaa aag acc atc tcc aag gcc aag ggc cag cct agg gaa ccc cag gtt 1056  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 340 345 350  
 tac acc ttg cct cca tct cgg gac gag ctg acc aag aac cag gtg tcc 1104  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 355 360 365  
 ctg tct tgc gct gtg aag ggc ttc tac ccc tcc gat atc gcc gtg gaa 1152  
 Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 370 375 380  
 tgg gag tct aat ggc cag cct gag aac aac tac aag aca acc cct cct 1200  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400  
 gtg ctg gac tcc gac ggc tca ttc ttc ctg gtg tcc aag ctg aca gtg 1248  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val  
 405 410 415  
 gac aag tcc aga tgg cag cag ggc aac gtg ttc tcc tgc agc gtg atg 1296  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

420 425 430

cac gag gcc ctg cac aat cac tac acc cag aag tct ctg tct ctg agc 1344

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

435 440 445

ccc ggc aaa tga 1356

Pro Gly Lys

450

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 451

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Synthetic Construct

&lt;400&gt; 6

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val 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

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

35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Arg 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

Thr Arg Asp His Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Ile Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly

225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr

290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

325 330 335

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

340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

355 360 365

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

370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

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

Pro Gly Lys

450

<210> 7

<211> 642

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 16B11.1\_LC

<220><221> CDS

<222> (1)..(642)

<400> 7

|                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|
| gag att gcc atg aca cag tct ccc gcc aca ctg tct gtt agc cct ggc | 48 |
|-----------------------------------------------------------------|----|

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

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

|                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|
| gag aga gct acc ctg tcc tgt aga gcc tct cag tcc gtg tcc tct aac | 96 |
|-----------------------------------------------------------------|----|

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

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

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| ctg gcc tgg tat cag cag aag cct gga cag gct ccc cgg ctg ttg atc | 144 |
|-----------------------------------------------------------------|-----|

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

|    |    |    |
|----|----|----|
| 35 | 40 | 45 |
|----|----|----|

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| tat ggc gct tct acc aga gct acc ggc ctg cct gct aga ttc tcc ggc | 192 |
|-----------------------------------------------------------------|-----|

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

|    |    |    |
|----|----|----|
| 50 | 55 | 60 |
|----|----|----|

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| tct gga tct ggc acc gag ttt acc ctg acc atc tcc agc ctg cag tcc | 240 |
|-----------------------------------------------------------------|-----|

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

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

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| gag gat ttc gcc gtg tac tac tgc cag cag tac aac aac ttc tgg acc | 288 |     |     |
| Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Phe Trp Thr |     |     |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |     |
| ttc ggc cag ggc acc aag gtg gaa atc aag aga acc gtg gcc gct cct | 336 |     |     |
| Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro |     |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |     |
| tcc gtg ttc atc ttc cca cct tcc gac gag cag ctg aag tcc ggc aca | 384 |     |     |
| Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr |     |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |     |
| gct tct gtc gtg tgc ctg aac aac ttt tac cct cgg gaa gcc aag     | 432 |     |     |
| Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys |     |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |     |
| gtg cag tgg aag gtg gac aat gcc ctg cag agc ggc aac tcc caa gag | 480 |     |     |
| Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu |     |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| tct gtg acc gag cag gac tcc aag gac agc acc tac agc ctg tcc tcc | 528 |     |     |
| Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser |     |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |     |
| aca ctg acc ctg tcc aag gcc gac tac gag aag cac aag gtg tac gcc | 576 |     |     |
| Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala |     |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |     |
| tgc gaa gtg acc cat cag ggc ctg tct agc cct gtg acc aag tct ttc | 624 |     |     |
| Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe |     |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |     |
| aac cgg ggc gag tgc tga                                         | 642 |     |     |
| Asn Arg Gly Glu Cys                                             |     |     |     |
| 210                                                             |     |     |     |
| <210> 8                                                         |     |     |     |
| <211> 213                                                       |     |     |     |
| <212> PRT                                                       |     |     |     |
| <213> Artificial Sequence                                       |     |     |     |

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Synthetic Construct

&lt;400&gt; 8

Glu Ile Ala Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val 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 Leu 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 Tyr Asn Asn Phe Trp Thr

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro

100 105 110

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

115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys

130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu

145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser

165 170 175

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

180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe

195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys

210

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 1356

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&gt;&lt;223&gt; 16B12.1\_HC

&lt;220&gt;&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1356)

&lt;400&gt; 9

|                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|
| cag gtt cag ctg gtt gaa tct ggc ggc gga gtt gtt cag cct ggc gga | 48 |
| Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly     |    |
| 1 5 10 15                                                       |    |
| tct ctg aga ctg tct tgt gcc gcc tcc ggc ttc atc ttc tcc agc tac | 96 |
| Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr |    |
| 20 25 30                                                        |    |

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| gga atg cac tgg gtc cga cag gcc cct ggc aaa gga ttg gaa tgg gtc | 144 |
| Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val |     |
| 35 40 45                                                        |     |
| gcc gtg att tgg tac gac ggc tcc aac aag tac tac gcc gac tcc gtg | 192 |
| Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val |     |
| 50 55 60                                                        |     |
| aag ggc aga ttc acc atc tct cgg gac aac tcc aag aac acc ctg tac | 240 |

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr |     |
| 65 70 75 80                                                     |     |
| ctg cag atg aac tcc ctg aga gcc gag gac acc gcc atg tac tac tgc | 288 |
| Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys |     |
| 85 90 95                                                        |     |
| gcc aga gat cac tac ggc tcc ggc acc tac tac atc gac tat tgg ggc | 336 |
| Ala Arg Asp His Tyr Gly Ser Gly Thr Tyr Tyr Ile Asp Tyr Trp Gly |     |

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| 100 105 110                                                     |     |
| cag ggc acc ctg gtc aca gtg tcc tct gct tct acc aag gga ccc agc | 384 |
| Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser |     |
| 115 120 125                                                     |     |
| gtg ttc cct ctg gct cct tcc agc aag tct acc tcc ggc gga aca gct | 432 |

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

130 135 140

gct ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttt cct gag cct gtg acc acc gtg 480

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

145 150 155 160

tcc tgg aac tct ggc gct ctg aca tct ggc gtg cac acc ttt cca gct 528

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

165 170 175

gtg ctg cag tcc tcc ggc ctg tac tct ctg tcc tct gtc gtg acc acc gtg 576

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

180 185 190

cct tcc agc tct ctg gga acc cag acc tac atc tgc aat gtg aac cac 624

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

195 200 205

aag cct tcc aac acc aag gtg gac aag aag gtg gaa ccc aag tcc tgc 672

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

210 215 220

gac aag acc cac acc tgt cct cca tgt cct gct cca gaa ctg ctc ggc 720

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

225 230 235 240

ggt ccc tcc gtt ttc ctg ttt cca cct aag cct aag gac acc ctg atg 768

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

245 250 255

atc tct cgg acc cct gaa gtg aca tgc gtg gtg gtg gat gtg tcc cac 816

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

260 265 270

gag gat ccc gaa gtg aag ttc aat tgg tac gtg gac ggc gtg gaa gtg 864

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

275 280 285

|                                                                  |      |     |     |
|------------------------------------------------------------------|------|-----|-----|
| cac aac gcc aag acc aag cct aga gag gaa cag tac aac tcc acc tac  | 912  |     |     |
| His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  |      |     |     |
| 290                                                              | 295  | 300 |     |
| aga gtg gtg tcc gtg ctg acc gtg ctg cac cag gat tgg ctg aac ggc  | 960  |     |     |
| Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  |      |     |     |
| 305                                                              | 310  | 315 | 320 |
| aaa gag tac aag tgc aag gtg tcc aac aag gcc ctg cct gct cct atc  | 1008 |     |     |
| Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  |      |     |     |
| 325                                                              | 330  | 335 |     |
| gaa aag acc atc tcc aag gct aag ggc cag cct cggt gaa cct cag gtt | 1056 |     |     |
| Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  |      |     |     |
| 340                                                              | 345  | 350 |     |
| tac aca ctg cct cca tct cggt gac gag ctg acc aag aat cag gtg tcc | 1104 |     |     |
| Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  |      |     |     |
| 355                                                              | 360  | 365 |     |
| ctg acc tgc ctc gtg aag ggc ttc tac cct tct gat atc gcc gtg gaa  | 1152 |     |     |
| Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  |      |     |     |
| 370                                                              | 375  | 380 |     |
| tgg gag tcc aac ggc cag cct gag aac aac tac aag aca acc cct cct  | 1200 |     |     |
| Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Thr Thr Pro Pro      |      |     |     |
| 385                                                              | 390  | 395 | 400 |
| gtg ctg gac tcc gac ggc tca ttc ttc ctg tac tcc aag ctg aca gtg  | 1248 |     |     |
| Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  |      |     |     |
| 405                                                              | 410  | 415 |     |
| gat aag tcc cgg tgg cag cag ggc aac gtg ttc tct tgt tct gtg atg  | 1296 |     |     |
| Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  |      |     |     |
| 420                                                              | 425  | 430 |     |
| cac gag gcc ctg cac aac cac tac acc cag aag agt ctg tct ctg tcc  | 1344 |     |     |
| His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  |      |     |     |

|                                                                 |     |     |      |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|------|
| 435                                                             | 440 | 445 |      |
| cct ggc aag tga                                                 |     |     | 1356 |
| Pro Gly Lys                                                     |     |     |      |
| 450                                                             |     |     |      |
| <210> 10                                                        |     |     |      |
| <211> 451                                                       |     |     |      |
| <212> PRT                                                       |     |     |      |
| <213> Artificial Sequence                                       |     |     |      |
| <220><223> Synthetic Construct                                  |     |     |      |
| <400> 10                                                        |     |     |      |
| Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly |     |     |      |
| 1                                                               | 5   | 10  | 15   |
| Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile 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 Val Ile Trp 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 Met Tyr Tyr Cys |     |     |      |
| 85                                                              | 90  | 95  |      |
| Ala Arg Asp His Tyr Gly Ser Gly Thr Tyr Tyr Ile Asp Tyr Trp Gly |     |     |      |
| 100                                                             | 105 | 110 |      |
| Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser |     |     |      |
| 115                                                             | 120 | 125 |      |
| Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala |     |     |      |
| 130                                                             | 135 | 140 |      |
| Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val |     |     |      |
| 145                                                             | 150 | 155 | 160  |
| Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala |     |     |      |
| 165                                                             | 170 | 175 |      |

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

325 330 335

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

340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

355 360 365

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

370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

385 390 395 400

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

405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 420                                                             | 425 | 430 |     |
| His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser |     |     |     |
| 435                                                             | 440 | 445 |     |
| Pro Gly Lys                                                     |     |     |     |
| 450                                                             |     |     |     |
| <210> 11                                                        |     |     |     |
| <211> 642                                                       |     |     |     |
| <212> DNA                                                       |     |     |     |
| <213> Artificial Sequence                                       |     |     |     |
| <220><223> 16B12.1_LC                                           |     |     |     |
|                                                                 |     |     |     |
| <220><221> CDS                                                  |     |     |     |
| <222> (1)..(642)                                                |     |     |     |
| <400> 11                                                        |     |     |     |
| gag att gtg atg acc cag tct cct gcc aca ctg tcc gtg tct cca ggc |     |     | 48  |
| Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly |     |     |     |
| 1                                                               | 5   | 10  | 15  |
| gag aga gct acc ctg tct tgc aga gct tct cag acc gtg tcc tcc aac |     |     | 96  |
| Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Val Ser Ser Asn |     |     |     |
| 20                                                              | 25  | 30  |     |
| ctg gcc tgg tat cag cag aag cct gga cag gct ccc cgg ctg ttg atc |     |     | 144 |
|                                                                 |     |     |     |
| Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile |     |     |     |
| 35                                                              | 40  | 45  |     |
| tat ggc gct tct acc aga gcc acc ggc ttt ccc gct aga ttc tcc ggc |     |     | 192 |
| Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Phe Pro Ala Arg Phe Ser Gly |     |     |     |
| 50                                                              | 55  | 60  |     |
| tct ggc tct ggc aca gag ttt acc ctg acc atc tcc agc ctg cag tcc |     |     | 240 |
| Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser |     |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  | 80  |
| gag gat ttc gcc gtg tac tac tgc cag cag tac aac aac tgg tgg acc |     |     | 288 |
| Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Trp Thr |     |     |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |     |
| ttc ggc cag ggc acc aag gtg gaa atc aag aga acc gtg gcc gct cct |     |     | 336 |

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro

100 105 110

tcc gtg ttc atc ttc cca cct tcc gac gag cag ctg aag tct ggc acc 384

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

115 120 125

gct tct gtc gtg tgc ctg ctg aac aac ttc tac cct cgg gaa gcc aag 432

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys

130 135 140

gtg cag tgg aag gtg gac aat gcc ctg cag agc ggc aac tcc caa gag 480

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu

145 150 155 160

tct gtg acc gag cag gac tcc aag gac agc acc tac agc ctg tcc tcc 528

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser

165 170 175

aca ctg acc ctg tcc aag gcc gac tac gag aag cac aag gtg tac gcc 576

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

180 185 190

tgc gaa gtg acc cat cag ggc ctg tct agc cct gtg acc aag tct ttc 624

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe

195 200 205

aac cgg ggc gag tgt tga 642

Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 12

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 12

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr 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 Phe 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 Tyr Asn Asn Trp Trp Thr

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro

100 105 110

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

115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys

130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu

145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser

165 170 175

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

180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe

195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 13

<211> 1461

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3-scFv

<220><221> CDS

&lt;222&gt; (1)..(1461)

&lt;400&gt; 13

gaa gta cag ctg gtg gag tct ggc gga ggt ctt atc cag ccc gga ggt 48  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly

|                                                                 |    |    |    |     |
|-----------------------------------------------------------------|----|----|----|-----|
| 1                                                               | 5  | 10 | 15 |     |
| tct ctg cgc ctg agc tgt gca gct tcc ggt ttc acc ttc aac acc tat |    |    |    | 96  |
| Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr |    |    |    |     |
| 20                                                              | 25 |    | 30 |     |
| gcc atg aat tgg gta cgc cag gct cca gga aaa tgt ctg gag tgg gtg |    |    |    | 144 |
| Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val |    |    |    |     |
| 35                                                              | 40 |    | 45 |     |

|                                                                 |    |    |    |     |
|-----------------------------------------------------------------|----|----|----|-----|
| gct cgg att cga agc aaa tac aac aat tat gca acc tac tat gcc gac |    |    |    | 192 |
| Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp |    |    |    |     |
| 50                                                              | 55 | 60 |    |     |
| agt gtc aag gac cgc ttc acc ata agt cgg gat gac tcc aag agc act |    |    |    | 240 |
| Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Thr |    |    |    |     |
| 65                                                              | 70 | 75 | 80 |     |
| ctg tat ctg cag atg aac aac ttg agg gcc gag gat acc gcc gtt tac |    |    |    | 288 |

|                                                                 |     |     |  |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|--|-----|
| Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr |     |     |  |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |  |     |
| tat tgc gta agg cat ggc aac ttc ggt aat tcc tac gtg tcc tgg ttt |     |     |  | 336 |
| Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe |     |     |  |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |  |     |
| gcc tat tgg ggc caa ggg acg ctg gtt aca gtg tca agt gga aag ccc |     |     |  | 384 |
| Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Lys Pro |     |     |  |     |

|                                                                 |     |     |  |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|--|-----|
| 115                                                             | 120 | 125 |  |     |
| ggg tct ggc aaa cct ggg agt ggc aag ccc ggg agt ggg aaa cca gga |     |     |  | 432 |
| Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Lys Pro Gly |     |     |  |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |  |     |
| tcc cag gct gtt gtc act caa gaa ccc agt ctc act gtt tct cca ggc |     |     |  | 480 |
| Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly |     |     |  |     |

|                                                                 |     |     |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |     |     |
|                                                                 |     |     |     | 528 |     |
| ggt aca gtc aca ctc aca tgt cgt agc agc act ggg gct gtg acc acc |     |     |     |     |     |
| Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr |     |     |     |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |     |     |     |
|                                                                 |     |     |     | 576 |     |
| agc aac tat gca aac tgg gtc cag cag aaa ccc ggt caa gct ccc aga |     |     |     |     |     |
| Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg |     |     |     |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |     |     |     |
| gga ttg att ggc ggt acc aat aag cgg gcc cct ggg act cct gct cga |     |     |     | 624 |     |
|                                                                 |     |     |     |     |     |
| Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg |     |     |     |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |     |     |     |
|                                                                 |     |     |     | 672 |     |
| ttt tct ggc tcc ttg ctt gga gat aaa gcc gca ctg act ttg agc ggc |     |     |     |     |     |
| Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly |     |     |     |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |     |     |     |
|                                                                 |     |     |     | 720 |     |
| gct caa cca gag gac gaa gca gag tac tat tgt gct ctg tgg tac tcc |     |     |     |     |     |
| Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser |     |     |     |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |     |     |
|                                                                 |     |     |     | 768 |     |
| aac ctc tgg gtg ttt ggc tgt ggc acc aag gta aca gtg ctg gaa cct |     |     |     |     |     |
| Asn Leu Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Glu Pro |     |     |     |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |     |     |     |
|                                                                 |     |     |     | 816 |     |
| aag tca agc gac aaa aca cac acc tgt cct ccc tgt cca gca cca gag |     |     |     |     |     |
| Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu |     |     |     |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |     |     |     |
|                                                                 |     |     |     |     |     |
| gca gct ggt ggc cca tct gtc ttt ctg ttc cca cca aag ccc aag gac |     |     |     |     | 864 |
| Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp |     |     |     |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |     |     |     |
|                                                                 |     |     |     | 912 |     |
| act ctg atg atc tca cga aca ccc gaa gtg act tgc gta gtg gtg gac |     |     |     |     |     |
| Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp |     |     |     |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |     |     |     |
|                                                                 |     |     |     | 960 |     |
| gtt tct cat gag gat cca gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gat gga |     |     |     |     |     |

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 305 310 315 320  
 gtg gaa gtg cac aat gcc aaa aca aag ccc cgt gag gag cag tac ggc 1008  
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly  
 325 330 335  
 tcc acg tac agg gtt gtc tcc gtt ttg acc gtc ctg cat cag gat tgg 1056  
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 340 345 350  
 ctt aac gga aaa gag tat aag tgc aag gta tcc aat aag gcc ctt ccc 1104  
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
 355 360 365  
 gcc cct atc gag aaa act atc agc aag gcc aaa gga cag ccc aga gag 1152  
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 370 375 380  
 ccc cag gtg tac act ttg cct cct tct agg gat gaa ctc acc aag aat 1200  
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn  
 385 390 395 400  
 cag gtt agc ctg tgg tgc ctg gtg aag ggg ttt tac cca tcc gat att 1248  
 Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 405 410 415  
 gcc gtg gag tgg gaa agc aat ggc caa ccc gag aac aac tat aag aca 1296  
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 420 425 430  
 act cct cct gtg ctg gac tca gat gga agt ttc ttc ctg tac agc aag 1344  
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 435 440 445  
 ctc aca gtg gac aag agc aga tgg cag cag ggc aat gtg ttt tct tgc 1392  
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 450 455 460  
 tct gtc atg cac gaa gcc ctg cac aat cac tac acc cag aaa tcc ctt 1440  
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu

|                                                                 |     |     |      |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|------|
| 465                                                             | 470 | 475 | 480  |
| agt ctg tca cct ggg aag tga                                     |     |     | 1461 |
| Ser Leu Ser Pro Gly Lys                                         |     |     |      |
|                                                                 | 485 |     |      |
| <br>                                                            |     |     |      |
| <210> 14                                                        |     |     |      |
| <211> 486                                                       |     |     |      |
| <212> PRT                                                       |     |     |      |
| <213> Artificial Sequence                                       |     |     |      |
| <220><223> Synthetic Construct                                  |     |     |      |
| <400> 14                                                        |     |     |      |
| Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly     |     |     |      |
| 1                                                               | 5   | 10  | 15   |
| Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr |     |     |      |
| 20                                                              | 25  | 30  |      |
| Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val |     |     |      |
| 35                                                              | 40  | 45  |      |
| Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp |     |     |      |
| <br>                                                            |     |     |      |
| 50                                                              | 55  | 60  |      |
| Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Thr |     |     |      |
| 65                                                              | 70  | 75  | 80   |
| Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr |     |     |      |
| 85                                                              | 90  | 95  |      |
| Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe |     |     |      |
| 100                                                             | 105 | 110 |      |
| Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Lys Pro |     |     |      |
| <br>                                                            |     |     |      |
| 115                                                             | 120 | 125 |      |
| Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Lys Pro Gly |     |     |      |
| 130                                                             | 135 | 140 |      |
| Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly |     |     |      |
| 145                                                             | 150 | 155 | 160  |
| Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr |     |     |      |
| 165                                                             | 170 | 175 |      |

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Asn Leu Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Glu Pro

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp

340 345 350

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro

355 360 365

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu

370 375 380

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn

385 390 395 400

Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

405 410 415

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

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 420                                                             | 425 | 430 |
| Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys |     |     |
|                                                                 |     |     |
| 435                                                             | 440 | 445 |
| Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys |     |     |
| 450                                                             | 455 | 460 |
| Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu |     |     |
| 465                                                             | 470 | 475 |
| Ser Leu Ser Pro Gly Lys                                         |     |     |
|                                                                 |     |     |
| 485                                                             |     |     |
| <210> 15                                                        |     |     |
| <211> 4                                                         |     |     |
| <212> PRT                                                       |     |     |
| <213> Artificial Sequence                                       |     |     |
| <220><223> GGGS linker                                          |     |     |
| <220><221> PEPTIDE                                              |     |     |
| <222> (1)..(4)                                                  |     |     |
|                                                                 |     |     |
| <400> 15                                                        |     |     |
| Gly Gly Gly Ser                                                 |     |     |
| 1                                                               |     |     |
| <210> 16                                                        |     |     |
| <211> 4                                                         |     |     |
| <212> PRT                                                       |     |     |
| <213> Artificial Sequence                                       |     |     |
| <220><223> SGGG linker                                          |     |     |
| <220><221> PEPTIDE                                              |     |     |
| <222> (1)..(4)                                                  |     |     |
| <400> 16                                                        |     |     |
| Ser Gly Gly Gly                                                 |     |     |
| 1                                                               |     |     |
| <210> 17                                                        |     |     |
| <211> 5                                                         |     |     |
| <212> PRT                                                       |     |     |
| <213> Artificial Sequence                                       |     |     |

<220><223> GGGGS linker

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(5)

<400> 17

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SGGGG linker

<220>

><221> PEPTIDE

<222> (1)..(5)

<400> 18

Ser Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 19

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GGGGGS linker

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(6)

<400> 19

Gly Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 20

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SGGGGG linker

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(6)

<400> 20

Ser Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 21

<211> 7

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GGGGGGS linker

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(7)

<400> 21

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SGGGGGG linker

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(7)

<400> 22

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GKPGS linker

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(5)

<400> 23

Gly Lys Pro Gly Ser

1 5

<210> 24

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; 16B11&amp;16B12\_HCDR1

&lt;220&gt;&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(5)

&lt;400&gt; 24

Ser Tyr Gly Met His

1 5

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; 16B11\_HCDR2

&lt;220&gt;&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(16)

&lt;400&gt; 25

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

1 5 10 15

Gly

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; 16B12\_HCDR2

&lt;220&gt;&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(16)

&lt;400&gt; 26

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

1 5 10 15

Gly

&lt;210&gt; 27

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 16B11\_HCDR3

<220><221> BINDING

<222> (1)..(12)

<400> 27

Asp His Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Ile Asp Tyr

|   |   |    |
|---|---|----|
| 1 | 5 | 10 |
|---|---|----|

<210> 28

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 16B12\_HCDR3

<220><221> BINDING

<222> (1)..(12)

<400> 28

Asp His Tyr Gly Ser Gly Thr Tyr Tyr Ile Asp Tyr

|   |   |    |
|---|---|----|
| 1 | 5 | 10 |
|---|---|----|

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 16B11\_LCDR1

<220><221> BINDING

<222> (1)..(9)

<400> 29

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala

|   |   |    |
|---|---|----|
| 1 | 5 | 10 |
|---|---|----|

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 16B12\_LCDR1

<220><221> BINDING

<222> (1)..(9)

<400> 30

Arg Ala Ser Gln Thr Val Ser Ser Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 16B11&16B12\_LCDR2

<220><221> BINDING

<222> (1)..(5)

<400> 31

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

<210> 32

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 16B11\_LCDR3

<220><221> BINDING

<222> (1)..(8)

<400> 32

Gln Gln Tyr Asn Asn Phe Trp Thr

1 5

<210> 33

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 16B12\_LCDR3

<220><221> BINDING

<222> (1)..(8)

<400> 33

Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Trp Thr

1 5

<210> 34

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 16B11\_VH

<220><221> BINDING

<222> (1)..(114)

<400> 34

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

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 Val Ile Trp Tyr Asp Gly Arg 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

Thr Arg Asp His Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Ile Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 35

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 16B12\_VH

<220><221> BINDING

&lt;222&gt; (1)..(113)

&lt;400&gt; 35

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile 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 Val Ile Trp 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 Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp His Tyr Gly Ser Gly Thr Tyr Tyr Ile Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; 16B11\_VL

&lt;220&gt;&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (1)..(97)

&lt;400&gt; 36

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

<210> 37

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 16B12\_VL

<220><221> BINDING

<222> (1)..(98)

<400> 37

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

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

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

<210> 38

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> signal sequence

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(19)

<400> 38

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser

<210> 39

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> signal sequence

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(19)

<400> 39

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

1 5 10 15

Val His Ser

<210> 40

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> signal sequence

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(19)

<400> 40

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; mouseTSPAN8 126-155

&lt;400&gt; 41

Lys Leu Leu Ser Asp Asn Thr Asp Glu Ala Lys Asp Phe Gln Lys Ala

1 5 10 15

Met Ile Val Phe Gln Ser Glu Phe Lys Cys Cys Gly Leu Glu

20 25 30

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; ratTSPAN8 126-155

&lt;400&gt; 42

Lys Leu Leu Ser Glu Thr Ser Asn Glu Ala Lys Glu Val Gln Lys Ala

1 5 10 15

Met Ile Ala Phe Gln Ser Glu Phe Lys Cys Cys Gly Leu Arg

20 25 30

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Macaca fascicula TSPAN8 126-155

&lt;400&gt; 43

Lys Leu Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ser Ala Lys Gln Phe Gln Gln Ala

1 5 10 15

Met Ala Glu Phe Gln Lys Glu Phe Lys Cys Cys Gly Leu Val

20 25 30