



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0113578
(43) 공개일자 2023년07월31일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/725 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)
C12N 5/0784 (2010.01) G01N 33/574 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C07K 16/28 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2023-7021077
(22) 출원일자(국제) 2021년11월26일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년06월22일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2021/133514
(87) 국제공개번호 WO 2022/111633
국제공개일자 2022년06월02일</p> <p>(30) 우선권주장
202011364033.6 2020년11월27일 중국(CN)</p> | <p>(71) 출원인
선샤인 레이크 파르마 컴퍼니 리미티드
중국 523000 광둥 동관 송산 레이크 노던 인더스트리얼 에어리어</p> <p>(72) 발명자
동 권지
중국 광둥 523871 동관 창안 타운 상샤 전안 로드 넘버 368 동양광 하이-테크 파크</p> <p>장 쿠오
중국 광둥 523871 동관 창안 타운 상샤 전안 로드 넘버 368 동양광 하이-테크 파크
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
제일특허법인(유)</p> |
|--|--|

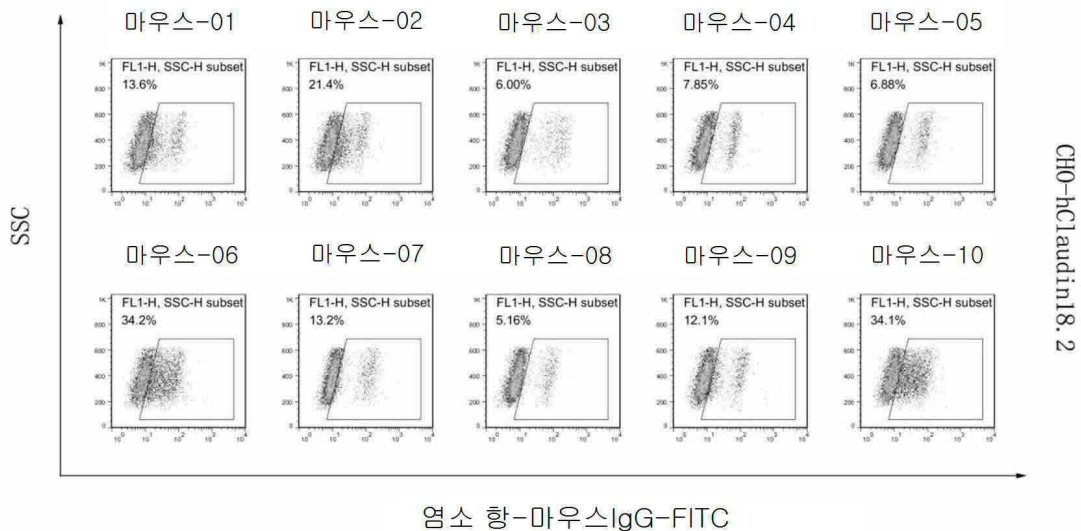
전체 청구항 수 : 총 40 항

(54) 발명의 명칭 **CLDN18.2 항체 및 그의 용도**

(57) 요약

CLDN18.2를 특이적으로 인식하는 능력을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 및 키메라 항원 수용체가 제공된다. 상기 항체, 항원-결합 단편 또는 키메라 항원 수용체는 하기 서열로부터 선택된 적어도 하나의 CDR 서열 또는 그와 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다: 서열번호: 1, 서열번호: 2, 서열번호: 3, 서열번호: 7, 서열번호: 8 및 서열번호: 9에 나타난 경쇄 가변 영역의 CDR 서열; 및 서열번호: 4, 서열번호: 5, 서열번호: 6, 서열번호: 10, 서열번호: 11 및 서열번호: 12에 나타난 중쇄 가변 영역의 CDR 서열.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 14/7051 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 5/0636 (2023.05)
C12N 5/0639 (2023.05)
C12N 5/0646 (2023.05)
G01N 33/57484 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/52 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)

(72) 발명자

위 텡팅

중국 광둥 523871 동관 창안 타운 상샤 전안 로드
넘버 368 동양광 하이-테크 파크

왕 쉬팡

중국 광둥 523871 동관 창안 타운 상샤 전안 로드
넘버 368 동양광 하이-테크 파크

쉬 러

중국 광둥 523871 동관 창안 타운 상샤 전안 로드
넘버 368 동양광 하이-테크 파크

자오 광후이

중국 광둥 523871 동관 창안 타운 상샤 전안 로드
넘버 368 동양광 하이-테크 파크

예 천루이

중국 광둥 523871 동관 창안 타운 상샤 전안 로드
넘버 368 동양광 하이-테크 파크

평 리야

중국 광둥 523871 동관 창안 타운 상샤 전안 로드
넘버 368 동양광 하이-테크 파크

린 지형

중국 광둥 523871 동관 창안 타운 상샤 전안 로드
넘버 368 동양광 하이-테크 파크

지앙 옌

중국 광둥 523871 동관 창안 타운 상샤 전안 로드
넘버 368 동양광 하이-테크 파크

천 샤오핑

중국 광둥 523871 동관 창안 타운 상샤 전안 로드
넘버 368 동양광 하이-테크 파크

리 웬지아

중국 광둥 523871 동관 창안 타운 상샤 전안 로드
넘버 368 동양광 하이-테크 파크

명세서

청구범위

청구항 1

하기 서열 중 적어도 하나로부터 선택된 상보성-결정 영역(CDR) 서열 또는 그와 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, CLDN18.2를 인식하는 능력을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편:

서열번호: 1, 서열번호: 2, 서열번호: 3, 서열번호: 7, 서열번호: 8 및 서열번호: 9에 나타난 경쇄 가변 영역의 CDR 서열; 및

서열번호: 4, 서열번호: 5, 서열번호: 6, 서열번호: 10, 서열번호: 11 및 서열번호: 12에 나타난 중쇄 가변 영역의 CDR 서열.

청구항 2

제1항에 있어서,

항체가,

서열번호: 1, 2 및 3 각각에 나타난 경쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열 또는 서열번호: 1, 2 및 3과 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열; 또는

서열번호: 7, 8 및 9 각각에 나타난 경쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열 또는 서열번호: 7, 8 및 9와 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열

을 포함하는, 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 3

제1항에 있어서,

항체가,

서열번호: 4, 5 및 6 각각에 나타난 중쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열 또는 서열번호: 4, 5 및 6과 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열; 또는

서열번호: 10, 11 및 12 각각에 나타난 중쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열 또는 서열번호: 10, 11 및 12와 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열

을 포함하는, 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 4

제1항에 있어서,

펩티드 E와 비교하여, 항체 또는 항원-결합 단편이, CLDN 18.2를 특이적으로 인식하는 주된 에피토프로서 펩티드 A를 사용하고, 펩티드 E의 서열이 서열번호: 14의 아미노산 서열을 가지고, 펩티드 A의 서열이 서열번호: 13의 아미노산 서열을 갖는, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 5

제1항에 있어서,

항체가 중쇄 골격(framework) 영역 서열 및 경쇄 골격 영역 서열 중 적어도 하나를 포함하고,

상기 중쇄 골격 영역 서열 및 경쇄 골격 영역 서열 중 적어도 하나의 적어도 일부가 뮤린(murine) 항체, 인간 항체, 영장류 항체 또는 그의 돌연변이체 중 적어도 하나로부터 유래되는, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 6

제1항에 있어서,

항체가, 서열번호: 15 또는 서열번호: 16에 나타난 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 가지고/가지거나,

항체가, 서열번호: 17 또는 서열번호: 18에 나타난 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역을 가지고,

선택적으로, 항체가 서열번호: 15에 나타난 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 및 서열번호: 17에 나타난 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역을 가지고,

선택적으로, 항체가, 서열번호: 16에 나타난 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 및 서열번호: 18에 나타난 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역을 갖는,

항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 7

제1항에 있어서,

항체가 중쇄 불변 영역 및 경쇄 불변 영역 중 적어도 하나를 포함하고,

상기 중쇄 불변 영역 및 경쇄 불변 영역 중 적어도 하나의 적어도 일부가 무린 항체, 인간 항체, 영장류 항체 또는 그의 돌연변이체 중 적어도 하나로부터 유래되는, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 8

제1항에 있어서,

항체의 경쇄 불변 영역 및 중쇄 불변 영역 둘 다가 무린 IgG 항체 또는 그의 돌연변이체로부터 유래되는, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 9

제1항에 있어서,

서열번호: 19, 서열번호: 20, 서열번호: 32 또는 서열번호: 34에 나타난 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 갖는 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 10

제1항에 있어서,

서열번호: 21, 서열번호: 22, 서열번호: 31 또는 서열번호: 33에 나타난 아미노산 서열을 갖는 중쇄를 갖는 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 11

제1항에 있어서,

항체가 단일쇄 항체, 키메라 항체(chimeric antibody), 다량체 항체 또는 CDR-이식된 항체인, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 12

제11항에 있어서,

항체가 단일쇄 항체이고,

상기 단일쇄 항체가, 서열번호: 23 또는 서열번호: 24에 나타난 아미노산 서열을 갖는, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 13

제1항에 있어서,

항원-결합 단편이 Fab 단편, (Fab)₂ 단편, scFv-Fc 융합 단백질, scFv-Fv 융합 단백질, Fv 단편, 및 최소 인식

단위 중 적어도 하나를 포함하는, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 14

세포의 영역을 포함하는 키메라 항원 수용체로서,

상기 세포의 영역이 단일쇄 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고,

상기 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역이, 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 따라 결정되는, 키메라 항원 수용체.

청구항 15

제14항에 있어서,

키메라 항원 수용체가 막관통(transmembrane) 영역 및 세포내 영역을 추가로 포함하고,

상기 막관통 영역이 CD8 막관통 영역을 포함하고,

상기 세포내 영역이, ICOS, 4-1BB 및 CD3 ζ 쇄의 세포내 분절을 포함하는, 키메라 항원 수용체.

청구항 16

제15항에 있어서,

ICOS의 세포내 분절의 N-말단이 CD8 막관통 영역의 C-말단에 연결되고,

ICOS의 세포내 분절의 C-말단이 4-1BB의 세포내 분절의 N-말단에 연결되고,

4-1BB의 세포내 분절의 C-말단이 CD3 ζ 쇄의 N-말단에 연결되는, 키메라 항원 수용체.

청구항 17

제14항의 키메라 항원 수용체를 발현하고, 선택적으로 T 림프구, DC 세포, NK 세포 및 NKT 림프구 중 적어도 하나를 포함하는 면역 세포.

청구항 18

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 제14항에 따른 키메라 항원 수용체를 암호화하는 핵산 분자.

청구항 19

제18항에 있어서,

핵산 분자가 DNA인, 핵산 분자.

청구항 20

제18항 또는 제19항의 핵산 분자를 운반하는 발현 벡터.

청구항 21

제20항에 있어서,

발현 벡터가 진핵세포 발현 벡터 또는 바이러스이고, 바람직하게 상기 바이러스가 렌티바이러스(lentivirus)인, 발현 벡터.

청구항 22

제18항 또는 제19항의 핵산 분자 또는 제20항 또는 제21항의 발현 벡터를 운반하고, 상기 핵산 분자에 의해 암호화된 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 제14항에 따른 키메라 항원 수용체를 발현하는 제조법 세포.

청구항 23

제22항에 있어서,
 제조합 세포가 진핵 세포이고, 선택적으로, 제조합 세포가 포유동물 세포인, 제조합 세포.

청구항 24

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 그의 항원-결합 단편;
 제14항 내지 제16항 중 어느 한 항의 키메라 항원 수용체;
 제17항의 면역 세포;
 제18항 또는 제19항의 핵산 분자;
 제20항 또는 제21항의 발현 벡터; 또는
 제22항 또는 제23항의 제조합 세포
 를 포함하는 약학 조성물.

청구항 25

CLDN 18.2 관련 질병의 진단, 치료 또는 예방을 위한 약제의 제조에 있어서의, 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 제14항 내지 제16항 중 어느 한 항의 키메라 항원 수용체, 제17항의 면역 세포, 제18항 또는 제19항의 핵산 분자, 제20항 또는 제21항의 발현 벡터, 제22항 또는 제23항의 제조합 세포, 또는 제24항의 약학 조성물의 용도.

청구항 26

제25항에 있어서,
 CLDN18.2 관련 질병이 종양을 포함하는, 용도.

청구항 27

제26항에 있어서,
 종양이, CLDN 18.2를 발현하는 고형 종양을 포함하고,
 선택적으로, 상기 고형 종양이 위암, 췌장암, 식도암 및 폐암을 포함하는, 용도.

청구항 28

치료 효과량의 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 제14항 내지 제16항 중 어느 한 항의 키메라 항원 수용체, 제17항의 면역 세포, 제18항 또는 제19항의 핵산 분자, 제20항 또는 제21항의 발현 벡터, 제22항 또는 제23항의 제조합 세포, 또는 제24항의 약학 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 대상에서 CLDN 18.2 관련 질병을 진단, 치료 또는 예방하는 방법.

청구항 29

제28항에 있어서,
 CLDN18.2 관련 질병이 종양을 포함하는, 방법.

청구항 30

제29항에 있어서,
 종양이, CLDN 18.2를 발현하는 고형 종양을 포함하고,
 선택적으로, 상기 고형 종양이 위암, 췌장암, 식도암 및 폐암을 포함하는, 방법.

청구항 31

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서,

대상에서 CLDN 18.2 관련 질병을 진단, 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한, 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 키메라 항원 수용체, 면역 세포, 핵산 분자, 발현 벡터, 재조합 세포, 또는 약학 조성물.

청구항 32

제31항에 있어서,

CLDN18.2 관련 질병이 종양을 포함하는, 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 키메라 항원 수용체, 면역 세포, 핵산 분자, 발현 벡터, 재조합 세포, 또는 약학 조성물.

청구항 33

제32항에 있어서,

종양이 CLDN 18.2를 발현하는 고형 종양을 포함하고,

선택적으로, 상기 고형 종양이 위암, 췌장암, 식도암 및 폐암을 포함하는, 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 키메라 항원 수용체, 면역 세포, 핵산 분자, 발현 벡터, 재조합 세포, 또는 약학 조성물.

청구항 34

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 항체를 포함하는, CLDN 18.2를 검출하기 위한 키트.

청구항 35

CLDN 18.2를 검출하거나 CLDN 18.2 관련 질병을 진단하기 위한 키트의 제조에 있어서의, 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 제14항 내지 제16항 중 어느 한 항의 키메라 항원 수용체, 제17항의 면역 세포, 제18항 또는 제19항의 핵산 분자, 제20항 또는 제21항의 발현 벡터, 또는 제22항 또는 제23항의 재조합 세포의 용도.

청구항 36

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 제14항 내지 제16항 중 어느 한 항의 키메라 항원 수용체, 제17항의 면역 세포, 제18항 또는 제19항의 핵산 분자, 제20항 또는 제21항의 발현 벡터, 또는 제22항 또는 제23항의 재조합 세포를 포함하는 키트를 사용하여 대상에서 CLDN 18.2를 검출하거나 CLDN 18.2 관련 질병을 진단하는 방법.

청구항 37

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서,

CLDN 18.2를 검출하거나 CLDN 18.2 관련 질병을 진단하기 위한 키트의 제조에 사용하기 위한, 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 키메라 항원 수용체, 면역 세포, 핵산 분자, 발현 벡터, 또는 재조합 세포.

청구항 38

CLDN 18.2에서 펩티드 A 이외의 다른 에피토프를 인식하는 항체를 스크리닝하는데 있어서의, 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 용도.

청구항 39

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 사용하는 것을 포함하는, CLDN 18.2에서 펩티드 A 이외의 다른 에피토프를 인식하는 항체를 스크리닝하는 방법.

청구항 40

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

CLDN 18.2에서 펩티드 A 이외의 다른 에피토프를 인식하는 항체를 스크리닝하는데 사용하기 위한, 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 생명공학 분야에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 CLDN18.2 항체 및 그의 용도에 관한 것이다. 보다 특히, 본 발명은 CLDN18.2를 특이적으로 인식하는 능력을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 키메라 항원 수용체, 면역 세포, 핵산 분자, 발현 벡터, 재조합 세포, 약학 조성물, 약학적 용도, CLDN18.2 검출용 키트, CLDN18.2 검출용 키트의 용도 및 스크리닝 항체의 용도에 관한 것이다.
- [0002] 관련 출원의 교차-참조
- [0003] 본 출원은 전체적으로 본원에 참고로 도입된, 2020년 11월 27일자로 중국 국가지식재산청에 출원된 중국 특허출원 제202011364033.6호의 우선권 및 이점을 주장한다.

배경 기술

- [0004] 위암은 암-관련 사망률에서 세 번째 순위를 차지하며 세계에서 치료하기에 가장 어려운 암 중 하나로 간주된다. 진행성 또는 전이성 위암 또는 위식도 접합부(GEJ) 선암종 환자에서, 전체 생존 중앙값(mOS)은 10개월을 넘지 않는다. 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER-2) 표적 요법 및 면역 관문 억제제가 특정 집단에 좋은 소식을 가져왔지만, 진행성 위암에서는 다른 표적을 찾는 것이 필수적이다.
- [0005] 클라우딘(Claudin)은 세포들 사이에서의 분자 교환을 제어하는 밀착 연결을 유지하는 역할을 하는 단백질 계열이다. 상기 클라우딘은 위, 췌장 및 폐 조직에 널리 분포하며 관련 조직 질병을 진단하고 치료하는데 사용될 수 있다. CLDN18.2 아형은 위 조직에서 소량으로만 특이적으로 발현되고 다른 정상 조직에서는 발현되지 않는 아형이고; 상기 아형은 매우 선택적이며, 위암 세포, 췌장암 세포 및 기타 암 세포에서 다량으로 발현된다. 그러므로, CLDN18.2를 표적 치료에 특이적으로 만드는 종양 약물 치료에 이상적인 표적이다. 인간 및 마우스 Claudin18.2 단백질 사이의 높은 상동성 정도(90%보다 높은 상동성)로 인해, 통상적인 면역화 절차는 효과적인 면역 항체를 생성할 수 없다.
- [0006] CLDN18.2에 대한 고도로 특이적인 항체의 개발은 종양의 진단 및 치료에 매우 중요함을 알 수 있다.

발명의 내용

- [0007] 상기 문제들을 해결하기 위해, 본 발명자들은 hClaudin18.2의 전장 유전자를 함유하는 플라스미드를 사용하여 Claudin18.2 유전자가 녹아웃된 C57 마우스를 면역화하였고, 하이브리도마 융합 기술을 통해 친화성 및 결합 에피토프가 상이한 2개의 항-Claudin18.2 무린 항체를 스크리닝하였다. 상기 두 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역은 유전자 서열분석에 의해 수득하였다. 링커를 사용하여, 상기 경쇄 가변 영역과 중쇄 가변 영역을 직렬로 연결하여 다양한 후속 용도를 위한 VL-링커-VH 구조를 형성하였다.
- [0008] 본 발명의 첫 번째 양태에서, 본 발명은 CLDN 18.2를 특이적으로 인식하는 능력을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다. 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 하기의 서열로부터 선택된 적어도 하나의 CDR 서열 또는 그와 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다: 경쇄 가변 영역의 CDR 서열: 서열번호: 1 내지 3, 서열번호: 7 내지 9; 중쇄 가변 영역의 CDR 서열: 서열번호: 4 내지 6, 서열번호: 10 내지 12.
- [0009] SQSLLNSGNQKNYL(서열번호: 1).
- [0010] YWAST(서열번호: 2).
- [0011] CQNDYSYPFTF(서열번호: 3).
- [0012] SQSLFNSGNQKNYL(서열번호: 7).
- [0013] YWAST(서열번호: 8).
- [0014] CQNDYSYPLTF(서열번호: 9).
- [0015] SGYTFTSYWM(서열번호: 4).
- [0016] MIHPNSGSTN(서열번호: 5).

- [0017] CARRYYSISPDYW(서열번호: 6).
- [0018] SGYTFDYNM(서열번호: 10).
- [0019] YINPNNGGTS(서열번호: 11).
- [0020] CVTTRYLAVW(서열번호: 12).
- [0021] 본 발명의 실시양태에 따르면, 상기 언급된 항체는 CLDN18.2 단백질 분자 또는 그 표면에 상기 분자를 갖는 세포, 조직, 장기 등을 특이적으로 표적화하고 이에 결합하여, 항원-항체 복합체를 형성하고 생물학적 기능을 발휘할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 전술한 항체 또는 항원-결합 단편은 다음의 추가의 기술적 특징 중 적어도 하나를 추가로 포함할 수 있다:
- [0023] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 항체는 다음을 포함한다:
- [0024] 각각 서열번호: 1, 2 및 3에 나타난 경쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열 또는 서열번호: 1, 2 및 3과 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열; 또는
- [0025] 각각 서열번호: 7, 8 및 9에 나타난 경쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열 또는 서열번호: 7, 8 및 9와 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열.
- [0026] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 항체는 다음을 포함한다:
- [0027] 각각 서열번호: 4, 5 및 6에 나타난 중쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열 또는 서열번호: 4, 5 및 6과 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열; 또는
- [0028] 각각 서열번호: 10, 11 및 12에 나타난 중쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열 또는 서열번호: 10, 11 및 12와 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열.
- [0029] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 펩티드 E와 비교하여, 상기 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 펩티드 A를 CLDN 18.2를 특이적으로 인식하는 주된 에피토프로 사용하며, 여기서 펩티드 E의 서열은 서열번호: 14에 나타내었고, 펩티드 A의 서열은 서열번호: 13에 나타내었다.
- [0030] DLYNNPVTAVFNYQGLWRSC (서열번호:14).
- [0031] DQWSTQDLYNNPVTAVFNYQGC (서열번호:13).
- [0032] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 서열번호: 1 내지 3 및 서열번호: 4 내지 6의 서열 중 어느 하나를 갖는 항체는 펩티드 A가 위치한 에피토프에만 결합하고; 서열번호: 7 내지 9 및 서열번호: 10 내지 12의 서열 중 어느 하나를 갖는 항체는 펩티드 A 및 E로 구성된 복합 에피토프에 결합할 수 있으며, 이때 펩티드 A가 주된 에피토프이다.
- [0033] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 항체는 중쇄 골격 영역 서열 및 경쇄 골격 영역 서열 중 적어도 하나를 포함하고, 여기서 상기 중쇄 골격 영역 서열 및 경쇄 골격 영역 서열 중 적어도 하나의 적어도 일부는 무린 항체, 인간 항체, 영장류 항체 또는 이들의 돌연변이체 중 적어도 하나로부터 유래된다.
- [0034] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 항체는 서열번호: 15 및 서열번호: 16 중 어느 하나에 나타난 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 가지고/가지거나, 서열번호: 17 및 서열번호: 18 중 어느 하나에 나타난 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역을 갖는다.
- [0035] DIVMTQSPSSLSVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQNDYSYPTFGSGTKLEIK(서열번호:15).
- [0036] DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLFNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYFCQNDYSYPLTFGAGTKLELR (서열번호:16).
- [0037] QVQLQQPGSELVKGASVKLSCKASGYFTFSYWMHWVKRPGQGLEWIGMIHPNSGSTNYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARRYYSISPDYWGGTTLTVSS(서열번호:17).
- [0038] EVQLQQSGPELVRPGASVKMSCKASGYFTFDYNNMHWKQSHGKSLIEWIGYINPNNGGTSYNNQKFKGKATLTVNKSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCVTTRYLAVWGTTTIVTVSS(서열번호:18).

- [0039] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 항체는 서열번호: 15의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 및 서열번호: 17의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역을 갖는다.
- [0040] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 항체는 서열번호: 16의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 및 서열번호: 18의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역을 갖는다.
- [0041] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 항체는 중쇄 불변 영역 및 경쇄 불변 영역 중 적어도 하나를 포함하고, 상기 중쇄 불변 영역 및 경쇄 불변 영역 중 적어도 하나의 적어도 일부는 무린 항체, 인간 항체, 영장류 항체 또는 이들의 돌연변이체 중 적어도 하나로부터 유래된다.
- [0042] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 항체의 경쇄 불변 영역 및 중쇄 불변 영역은 둘 다 무린 IgG 항체 또는 그의 돌연변이체로부터 유래된다. 본 발명의 실시양태의 항체에 따르면, 항체의 경쇄 불변 영역 및 중쇄 불변 영역은 둘 다 인간 IgG4, IgG3 또는 IgG1에서 유래된다.
- [0043] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 항체는 서열번호: 19 및 서열번호: 20 중 어느 하나에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 갖는다:
- [0044] DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLFNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTLSVVAEDLAVYFCQNDYSYPLTFGAGTKLELRADAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSEKQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTKEDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREK(서열번호:19).
- [0045] DIVMTQSPSSLSVTAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTLSVVAEDLAVYYCQNDYSYPTFGSGTKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSEKQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTKEDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREK(서열번호:20).
- [0046] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 항체는 서열번호: 21 및 서열번호: 22 중 어느 하나에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 중쇄를 갖는다:
- [0047] EVQLQQSGPELVRPGASVKMSCKASGYFTDYNMHVVKQSHGKSLLEWIGYINPNNGGTSYKQKFKGKATLTVNKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCVTTRYLAVWGTTTIVSSAKTTPPSVYPLAPGCGDTTSSVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSVHTFPAALQSGLYTMSSSVTPSSTWPSQIVTCSVAHPASSTTVDKKLEPSGPISTINCPCKECKKCPAPNLEGGPSVFIKPPNIDKDLMIKSLTPKVTCTVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSITRVVSTLPIQHQDWMGKFKCKVNNKDLPSPIERTISKIKGLVRAPQVYILPPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFPNGDISVEWTSNGHTEENYKDTAPVLDSDGSYFIYSKLNMKTSKWEKTDTSFSCNVRHEGLKNYYLKKTISRSPGK(서열번호:21).
- [0048] QVQLQQPGESELVKPGASVKLSCKASGYFTSYWVHVKRPPGQGLEWIGMIHPNSGTSYKQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARRYYGSISPDYWGQGTTLTVSSAKTTPPSVYPLAPGCGDTTSSVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSVHTFPAALQSGLYTMSSSVTPSSTWPSQIVTCSVAHPASSTTVDKKLEPSGPISTINCPCKECKKCPAPNLEGGPSVFIKPPNIDKDLMIKSLTPKVTCTVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSITRVVSTLPIQHQDWMGKFKCKVNNKDLPSPIERTISKIKGLVRAPQVYILPPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFPNGDISVEWTSNGHTEENYKDTAPVLDSDGSYFIYSKLNMKTSKWEKTDTSFSCNVRHEGLKNYYLKKTISRSPGK(서열번호:22).
- [0049] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 서열번호: 21의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호: 19의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 갖는 항체는 m1B6 항체이다. 서열번호: 22의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호: 20의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 갖는 항체는 m1E7 항체이다.
- [0050] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 항체는 단일쇄 항체, 키메라 항체, 다량체 항체 또는 CDR-이식 항체이다.
- [0051] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 항체는 단일쇄 항체이고, 상기 단일쇄 항체는 서열번호: 23 및 서열번호: 24 중 어느 하나에 나타낸 아미노산 서열을 갖는다:
- [0052] DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLFNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTLSVVAEDLAVYFCQNDYSYPLTFGAGTKLELRGGGGSGGGGSGGGSEVQLQQSGPELVRPGASVKMSCKASGYFTDYNMHVVKQSHGKSLLEWIGYINPNNGGTSYKQKFKGKATLTVNKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCVTTRYLAVWGTTTIVSS(서열번호:23).
- [0053] DIVMTQSPSSLSVTAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTLSVVAEDLAVYYCQNDYSYPTFGSGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGSQVQLQQPGESELVKPGASVKLSCKASGYFTSYWVHVKRPPGQGLEWIGMIHPNSGTSYKQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARRYYGSISPDYWGQGTTLTVSS(서열번호:24).
- [0054] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 서열번호: 23의 아미노산 서열을 갖는 항체는 1B6 항체로 지칭되고, 서열번호: 24의 아미노산 서열을 갖는 항체는 1E7 항체로 지칭된다. 이들 중에서, 서열번호: 23 및 서열번호:

24에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 항체는 N-말단에서 C-말단으로 VL-링커-VH로 나타낼 수 있다. VL은 경쇄 가변 영역을 나타내고, VH는 중쇄 가변 영역을 나타낸다. 링커는 VL과 VH를 연결하는 연결 쇠를 나타낸다.

- [0055] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 항체는 키메라 항체 IB6 및 IE7일 수 있으며, 키메라 항체 IB6은 서열번호: 31의 중쇄 및 서열번호: 32의 경쇄를 갖는다.
- [0056] EVQLQQSGPELVRPGASVKMSCKASGYTFTDYNMHVVKQSHGKSLIEWIGYINPNNGGTSYQKFKGKATLTVNKSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCVTTRYLAVWGTGTTVTVSSASTKGPSVFLPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKQKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호:31).
- [0057] DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLFNSGNQKNYL TWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFRTGSGSGTDFTLTISVVAEDLAVYFCQNDYSYPLTFGAGTKLELRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호:32).
- [0058] 키메라 항체 IE7은 서열번호: 33의 중쇄 및 서열번호: 34의 경쇄를 갖는다.
- [0059] QVQLQQPGESELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHVKRPGQGLEWIGMIHPNSGSTNYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARRYYSISPDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFLPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKQKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호:33).
- [0060] DIVMTQSPSSLSVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYL TWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFRTGSGSGTDFTLTISVVAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호:34).
- [0061] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 항원-결합 단편은 Fab 단편, (Fab)₂ 단편, scFv-Fc 융합 단백질, scFv-Fv 융합 단백질, Fv 단편 및 최소 인식 단위 중 적어도 하나를 포함한다.
- [0062] 본 발명의 두 번째 양태에서, 본 발명은 키메라 항원 수용체를 제공한다. 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 키메라 항원 수용체는 세포의 영역을 포함하는데, 여기서 상기 세포의 영역은 단일쇄 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역은 본 발명의 첫 번째 양태에서 제공되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 따라 결정된다. 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 키메라 항원 수용체는 항체의 항원 인식 능력을 기반으로 생물학적 역할을 하는 약물의 제조에 사용될 수 있다.
- [0063] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 키메라 항원 수용체는 막관통 영역 및 세포내 영역을 추가로 포함하며, 여기서 상기 막관통 영역은 CD8 막관통 영역을 포함하고, 세포내 영역은 ICOS 세포내 분절, 4-1BB 및 CD3 ζ 쇠를 포함한다.
- [0064] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, ICOS 세포내 분절의 N-말단은 CD8 막관통 영역의 C-말단에 연결되고, ICOS 세포내 분절의 C-말단은 4-1BB 세포내 분절의 N-말단에 연결되고, 4-1BB 세포내 분절의 C-말단은 CD3 ζ 쇠의 N-말단에 연결된다. 본 발명자는 키메라 항원 수용체의 면역자극 인자의 막관통 영역 및 세포내 분절이 상기 순서대로 연결되어 있고, 수득된 키메라 항원 수용체가 바이러스에서 높은 발현 역가를 가지며, 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포가 CLDN18.2를 발현하는 종양 세포에 대한 유의미한 특이적 사멸 효과를 가지고, 비특이적 사멸 및 세포염증 인자 반응은 약한 것을 확인하였다.
- [0065] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 키메라 항원 수용체의 구조는 신호 펩티드-항-Claudin 18.2 scfv-CD8 힌지 + CD8TM-ICOS-4-1BB-CD3 ζ 이고, 여기서 항-Claudin 18.2 scfv의 아미노산 서열은 서열번호: 23 및 서열번호: 24 중 어느 하나에 나타나 있다.
- [0066] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 키메라 항원 수용체의 신호 펩티드의 아미노산 서열은 서열번호: 25에 나타나 있다.
- [0067] MGVKVLFALICIAVAEA(서열번호:25)
- [0068] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 키메라 항원 수용체의 CD8 힌지의 아미노산 서열은 서열번호: 26에 나타나 있다

다.

- [0069] TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD(서열번호:26)
- [0070] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 키메라 항원 수용체의 CD8TM의 아미노산 서열은 서열번호: 27에 나타나 있다
- [0071] IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC(서열번호:27)
- [0072] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 키메라 항원 수용체의 ICOS의 아미노산 서열은 서열번호: 28에 나타나 있다.
- [0073] CWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTL(서열번호:28)
- [0074] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 키메라 항원 수용체의 4-1BB의 아미노산 서열은 서열번호: 29에 나타나 있다.
- [0075] KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL(서열번호: 29)
- [0076] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 키메라 항원 수용체의 CD3 ζ의 아미노산 서열은 서열번호: 30에 나타나 있다.
- [0077] RVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPKRRKPNQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR(서열번호:30)
- [0078] 본 발명의 세 번째 양태에서, 본 발명은 면역 세포를 제공한다. 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 면역 세포는 본 발명의 두 번째 양태에서 제안된 키메라 항원 수용체를 발현한다. 본 발명의 실시양태에 따른 면역세포는 생체내 및 시험관내에서 우수한 사멸 효과를 갖는다.
- [0079] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 전술한 핵산 면역 세포는 다음의 추가적인 기술적 특징을 더 포함할 수 있다:
- [0080] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 면역 세포는 T 림프구, DC 세포, NK 세포 및 NKT 림프구 중 적어도 하나를 포함한다. 본 발명의 실시양태에 따른 면역 세포는 본 발명의 첫 번째 양태에서 제공되는 항체 또는 본 발명의 두 번째 양태에서 제공되는 키메라 항원 수용체를 사용하여 표적 단백질, 세포, 조직, 장기 등을 인식 및 사멸한다. 다음, 생물학적 기능을 수행한다.
- [0081] 본 발명의 네 번째 양태에서, 본 발명은 핵산 분자를 제공한다. 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 핵산 분자는 본 발명의 첫 번째 양태에서 제공되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 본 발명의 두 번째 양태에서 제공되는 키메라 항원 수용체를 암호화한다. 본 발명의 실시양태에 따른 핵산 분자에 의해 암호화되는 항체 또는 항원-결합 단편은 CLDN 18.2를 특이적으로 표적화하고 결합할 수 있으며, 높은 항원-결합 활성을 갖는다.
- [0082] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 전술한 핵산 분자는 다음의 추가적인 기술적 특징을 더 포함할 수 있다:
- [0083] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 핵산 분자는 DNA이다.
- [0084] 본 발명의 다섯 번째 양태에서, 본 발명은 발현 벡터를 제공한다. 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 발현 벡터는 본 발명의 네 번째 양태에서 제공되는 핵산 분자를 운반한다. 본 발명의 실시양태에 따른 발현 벡터가 적절한 수용 세포에 도입된 후, 상기 벡터는 조절 시스템의 매개하에 CLDN18.2를 특이적으로 인식하는 전술한 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 발현을 효과적으로 실현할 수 있으며, 이로써 시험관내에서 항체 또는 항원-결합 단편의 대량 획득을 실현할 수 있다.
- [0085] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 전술한 핵산 분자는 다음의 추가적인 기술적 특징을 더 포함할 수 있다:
- [0086] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 발현 벡터는 진핵세포 발현 벡터 또는 바이러스이다. 바람직하게는, 바이러스는 렌티바이러스이다. 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 상기 진핵세포 발현 벡터는 CHO 세포일 수 있다.
- [0087] 본 발명의 여섯 번째 양태에서, 본 발명은 제조합 세포를 제공한다. 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 제조합 세포는 본 발명의 네 번째 양태에서 제공되는 핵산 분자 또는 본 발명의 다섯 번째 양태에서 제공되는 발현 벡터를 운반한다. 벡터는 핵산 분자에 의해 암호화되는 본 발명의 첫 번째 양태에서 제공되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 본 발명의 두 번째 양태에서 제공되는 키메라 항원 수용체를 발현한다. 본 발명의 실시양태에 따른 제조합 세포는 CLDN18.2를 특이적으로 인식하는 전술한 항체 또는 항원-결합 단편의 시험관 내 발현 및 대량 획득을 위해 사용될 수 있다.
- [0088] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 전술한 제조합 세포는 다음의 추가적인 기술적 특징 중 적어도 하나를 더 포함할 수 있다:
- [0089] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 상기 제조합 세포는 진핵 세포이고, 선택적으로 제조합 세포는 포유동물 세포

이다. 본 발명의 실시양태에 따른 재조합 세포는 전술한 발현 벡터를 숙주 세포에 도입하여 획득되며, 상기 벡터는 전기형질도입, 리포솜, 주사 등의 방법에 의해 숙주 세포에 도입될 수 있다.

- [0090] 본 발명의 일곱 번째 양태에서, 본 발명은 약학 조성물을 제공한다. 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 약학 조성물은 본 발명의 첫 번째 양태에서 제공되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 본 발명의 두 번째 양태에서 제공되는 키메라 항원 수용체, 본 발명의 세 번째 양태에서 제공되는 면역 세포, 본 발명의 네 번째 양태에서 제공되는 핵산 분자, 본 발명의 다섯 번째 양태에서 제공되는 발현 벡터, 또는 본 발명의 여섯 번째 양태에서 제공되는 재조합 세포를 포함한다. 본 발명의 실시양태에 따른 약학 조성물에 함유된 항체 또는 발현된 항체는 CLDN 18.2를 특이적으로 표적화하여 결합할 수 있고, 강한 특이성을 가지며, 우수한 표적화 효과를 발휘함으로써, 약학 조성물에서 다른 약물의 생물학적 효과, 예를 들면, CLDN18.2 분자의 활성 억제, CLDN18.2 분자를 발현하는 세포의 사멸 등을 실현할 수 있다. 또한, 본 발명의 실시양태에 따른 약학 조성물은 본 발명의 첫 번째 양태에서 제안된 CLDN 18.2를 특이적으로 표적화할 수 있는 항체에 의존하여, 진단 시약과 함께, 진단 역할을 수행한 다음, 유기체의 CLDN18.2 부분의 비정상적 발현에 대한 진단에서 역할을 할 수 있고, 예를 들면, 유기체에서 CLDN18.2를 비정상적으로 발현하는 세포, 조직 및 장기의 시각적 관찰을 달성하기 위해 진단 핵종, 나노물질 등과 결합됨으로써, 의료 종사자 또는 과학 연구자가 병변을 보다 정확하게 판단할 수 있도록 지원할 수 있다.
- [0091] 본 발명의 여덟 번째 양태에서, 본 발명은 CLDN 18.2 관련 질병의 치료 또는 예방을 위한 약제의 제조에 있어서, 전술한 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 키메라 항원 수용체, 면역 세포, 핵산 분자, 발현 벡터, 재조합 세포 및/또는 약학 조성물의 용도를 제공한다. 본 발명의 실시양태의 적용에 따르면, 약학 조성물은 CLDN18.2의 비정상적 발현을 갖는 질병, 예를 들면, 위암, 췌장암, 폐암 등을 진단, 치료 또는 예방하는데 사용될 수 있다.
- [0092] 본 발명의 실시양태에 따르면, 상기 언급한 용도는 다음의 추가적인 기술적 특징 중 적어도 하나를 더 포함할 수 있다.
- [0093] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, CLDN 18.2 관련 질병은 종양을 포함한다.
- [0094] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 종양은 Claudin 18.2를 발현하는 고�형 종양을 포함한다. 선택적으로, 고�형 종양은 위암, 췌장암, 식도암 및 폐암을 포함한다.
- [0095] 본 발명의 여덟 번째 양태에서, 본 발명은 대상에게 치료 효과량의 전술한 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 키메라 항원 수용체, 면역 세포, 핵산 분자, 발현 벡터, 재조합 세포 및/또는 약학 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상에서 CLDN 18.2 관련 질병을 진단, 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.
- [0096] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, CLDN 18.2 관련 질병은 종양을 포함한다.
- [0097] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 종양은 CLDN 18.2를 발현하는 고�형 종양을 포함한다. 선택적으로, 고�형 종양은 위암, 췌장암, 식도암 및 폐암을 포함한다.
- [0098] 본 발명의 여덟 번째 양태에서, 본 발명은 대상에서 CLDN 18.2 관련 질병을 진단, 치료 또는 예방하는 데 사용하기 위한 전술한 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 키메라 항원 수용체, 면역 세포, 핵산 분자, 발현 벡터, 재조합 세포 및/또는 약학 조성물을 제공한다.
- [0099] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, CLDN 18.2 관련 질병은 종양을 포함한다.
- [0100] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 종양은 Claudin 18.2를 발현하는 고�형 종양을 포함한다. 선택적으로, 고�형 종양은 위암, 췌장암, 식도암 및 폐암을 포함한다.
- [0101] 본 발명의 아홉 번째 양태에서, 본 발명은 CLDN 18.2를 검출하기 위한 키트를 제공한다. 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 상기 키트는 본 발명의 첫 번째 양태에서 제공되는 항체를 포함한다. 전술한 CLDN18.2 항체는 CLDN18.2를 특이적으로 표적화하고 결합할 수 있다. 본 발명의 실시양태에 따른 키트는 CLDN18.2의 특이적 검출을 달성할 수 있다. 예를 들어, 항체가 형광단과 결합되는 경우, 형광 검출 장치를 사용하여 CLDN18.2의 국소화 또는 실시간 검출을 실현할 수 있고; 항체가 비오틴 및 다른 마커와 결합되는 경우, CLDN18.2의 정성적 또는 정량적 검출은 발색 시약에 의해 달성될 수 있고; 항체는 또한 항-항체와 결합하여 샌드위치 또는 이중-샌드위치 방법을 달성한 다음, 신호 단계별 증폭을 달성하여 CLDN 18.2를 검출할 수 있다.
- [0102] 본 발명의 열 번째 양태에서, 본 발명은 CLDN 18.2를 검출하거나 CLDN 18.2 관련 질병을 진단하기 위한 키트의

제조에 있어서 전술한 항체, 전술한 핵산 분자, 전술한 발현 벡터 또는 전술한 재조합 세포의 용도를 제공한다. 본 발명의 실시양태에 따르면, 키트는 CLDN18.2의 고발현, 저발현 및 무발현과 같은 발현 수준을 직접 검출하여, 질병의 진단을 실현할 수 있다. 또한, 진단 핵종과 조합되는 것과 같이 다른 진단 시약과 조합되어 유기체, 조직 및 세포의 상태를 파악하여 체내에서 CLDN18.2를 발현하는 세포의 수, 조직의 크기 및 위치 등을 시각화할 수 있다.

- [0103] 본 발명의 열 번째 양태에서, 본 발명은 전술한 항체, 전술한 핵산 분자, 전술한 발현 벡터 또는 전술한 재조합 세포를 포함하는 키트를 사용하여 대상에서 CLDN 18.2를 검출하거나 CLDN 18.2 관련 질병을 진단하는 방법을 제공한다.
- [0104] 본 발명의 열 번째 양태에서, 본 발명은 CLDN 18.2를 검출하거나 CLDN 18.2 관련 질병을 진단하기 위한 키트의 제조에 사용하기 위한, 전술한 항체, 전술한 핵산 분자, 전술한 발현 벡터 또는 전술한 재조합 세포를 제공한다.
- [0105] 본 발명의 열한 번째 양태에서, 본 발명은 CLDN 18.2에서 펩티드 A 이외의 다른 에피토프를 인식할 수 있는 항체를 스크리닝하는데 있어서 전술한 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 용도를 제공한다. 본 발명의 실시양태에 따르면, 항체와 항원의 펩티드 A의 에피토프가 단단하게 결합되어 복합체를 형성한다. 이때, 본 발명의 항체는 항원의 펩티드 A의 에피토프를 차단하며, 이는 항체 스크리닝에 사용될 수 있다. 스크리닝된 항체는 항원의 펩티드 A 이외의 다른 에피토프에 결합할 수 있다. 또한, 펩티드 A의 에피토프에 결합하는 항체도 스크리닝할 수 있으며, 펩티드 A의 에피토프에 결합하는 스크리닝된 항체는 본 발명의 항체보다 우수한 항원 결합 능력을 갖는다.
- [0106] 본 발명의 열한 번째 양태에서, 본 발명은 전술한 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 사용하는 것을 포함하는, CLDN 18.2에서 펩티드 A 이외의 다른 에피토프를 인식하는 항체를 스크리닝하는 방법을 제공한다.
- [0107] 본 발명의 열한 번째 양태에서, 본 발명은 CLDN 18.2에서 펩티드 A 이외의 다른 에피토프를 인식하는 항체를 스크리닝하는데 사용하기 위한 전술한 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0108] 본 발명의 추가의 양태 및 이점은 하기의 설명에서 부분적으로 제공될 것이며, 일부는 하기의 설명으로부터 명백해지거나 본 발명의 실시를 통해 이해될 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0109] 본 발명의 상기 및/또는 추가의 양태 및 이점은 하기의 도면과 함께 실시양태의 설명으로부터 명백하고 이해하기에 용이하게 될 것이다.
 - 도 1은 본 발명의 한 실시양태에 따른 면역화 후 마우스 혈청 검사이다.
 - 도 2는 본 발명의 한 실시양태에 따른 m1B6/m1E7 하이브리도마 상등액의 특이성 검출이다.
 - 도 3은 본 발명의 한 실시양태에 따른 m1B6/m1E7 단일클론 항체의 친화성 검출이다.
 - 도 4는 본 발명의 한 실시양태에 따른 m1B6/m1E7 단일클론 항체의 비특이성 검출이다.
 - 도 5는 본 발명의 한 실시양태에 따른 항-Claudin 18.2 scFv-Fc 융합 단백질의 친화성 검출이다.
 - 도 6은 본 발명의 한 실시양태에 따른 항-Claudin 18.2 항체의 에피토프 동정이다.
 - 도 7은 본 발명의 한 실시양태에 따른 상이한 항-Claudin 18.2 CAR-T의 사멸 검출이다.
 - 도 8은 본 발명의 한 실시양태에 따른 상이한 항-Claudin 18.2 CAR-T의 양성률이다.
 - 도 9는 본 발명의 한 실시양태에 따른 NCI-H460 마우스 모델에서 항-Claudin 18.2 CAR-T의 평가이다.
 - 도 10은 본 발명의 한 실시양태에 따른 Calu-6 마우스 모델에서 항-Claudin 18.2 CAR-T의 평가이다.
 - 도 11은 본 발명의 한 실시양태에 따른 항-Claudin 18.2 항체의 ADCC 활성 검출이다.
 - 도 12는 본 발명의 한 실시양태에 따른 항-Claudin 18.2 항체의 CDC 활성 검출이다.
 - 도 13은 본 발명의 한 실시양태에 따른 BXPC3 종양 모델에서 항-Claudin 18.2 항체의 약력학적 검증이다.
 - 도 14는 본 발명의 한 실시양태에 따른 BXPC3 종양 모델에서 항-Claudin 18.2 항체의 체중 변화의 검출이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0110] 실시예

[0111] 본 발명의 실시양태를 하기에서 상세하게 설명한다. 실시양태들의 예가 첨부된 도면에 도시되어 있고, 동일하거나 유사한 참조 번호는 동일하거나 유사한 요소, 또는 동일하거나 유사한 기능을 갖는 요소를 나타낸다. 첨부된 도면을 참조하여 하기에서 기술되는 실시양태는 예시적이고, 본 발명을 설명하기 위한 것이며, 본 발명을 한정하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0112] 또한, "첫 번째" 및 "두 번째"라는 용어는 설명의 목적으로만 사용된 것이며, 상대적인 중요성을 나타내거나 암시하는 것으로 또는 나타낸 기술적 특징의 수를 암시적으로 나타내는 것으로 이해될 수 없다. 그러므로, "첫 번째" 및 "두 번째"로 정의된 특징은 명시적으로 또는 암시적으로 적어도 하나의 특징을 포함할 수 있다. 본 발명의 설명에서, "복수"는 달리 특별히 정의되지 않는 한 적어도 2개, 예를 들면, 2개, 3개 등을 의미한다.

[0113] 여기서, ADCC는 항체-의존성 세포독성을 지칭한다. IgG 항체가 Fab 분절을 통해 표적 세포 표면의 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 경우, 그의 Fc 분절은 Fc γ R을 가진 살해 세포와 같은 효과기 세포(NK 세포, 단핵구-대식세포, 호중구)에 결합하여 효과기 세포의 사멸 활성을 촉발하고 표적 세포를 직접 사멸시킨다.

[0114] 여기서, CDC는 보체-의존성 세포독성, 즉, 보체에 관여하는 세포독성을 지칭한다. 특정 항체는 세포막 표면의 상응하는 항원에 결합하여 복합체를 형성하여 보체의 고전적 경로를 활성화하고, 형성된 막 공격 복합체는 표적 세포에 용해 효과를 발휘한다.

[0115] 항체

[0116] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "항체"는 특정 항원에 결합할 수 있는 면역글로불린 분자이다. 항체는 더 가벼운 분자량을 갖는 2개의 경쇄 및 더 무거운 분자량을 갖는 2개의 중쇄로 구성된다. 중쇄(H) 및 경쇄(L)는 다이설파이드 결합에 의해 연결되어 테트라펩티드 쇠 분자를 형성한다. 이들 중에서, 펩티드 쇠의 아미노 말단(N-말단)의 아미노산 서열이 크게 달라지는데, 이를 가변 영역(V 영역)이라고 한다. 카복실 말단(C-말단)은 변화가 거의 없이 비교적 안정하며, 이를 불변 영역(C 영역)이라고 한다. L 및 H 쇠의 V 영역은 각각 VL 및 VH로 지칭된다.

[0117] 가변 영역의 일부 영역은 아미노산 조성 및 배열 순서의 변화 정도가 더 높다. 이들은 초가변 영역(HVR)이라고 한다. 초가변 영역은 항원과 항체가 결합하는 부위로, 상보성-결정 영역(complementarity-determining region, CDR)이라고도 한다. 중쇄 및 경쇄 가변 영역 둘 다에 3개의 CDR이 있다.

[0118] 본 발명은 hClaudin18.2의 전장 유전자를 함유하는 pCDNA3.4 플라스미드를 사용하여 CLDN 18.2 유전자 녹아웃 C57 마우스를 면역화하고, 하이브리도마 융합 기술을 통해 상이한 친화성 및 결합 에피토프를 갖는 2개의 항-CLDN 18.2 무린 항체를 스크리닝하였다. 항체 단편은 CLDN18.2 항원에 특이적으로 결합할 수 있으며, 이는 종양과 같이 CLDN18.2를 비정상적으로 발현하는 질병의 치료를 표적으로 할 수 있다.

[0119] 일부 실시양태에서, 본 발명은 CLDN18.2를 특이적으로 인식할 수 있는 항체 또는 항원-결합 단편을 제공하며, 여기서 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 하기의 서열에서 선택된 적어도 하나의 CDR 서열, 또는 그와 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다: 서열번호: 1 내지 3, 서열번호: 7 내지 9에 나타낸 경쇄 가변 영역의 CDR 서열, 서열번호: 4 내지 6, 서열번호: 10 내지 12에 나타낸 중쇄 가변 영역의 CDR 서열. 다른 실시양태에서, 본 발명에 의해 제공되는 항체 또는 항원-결합 단편은 상기 중쇄 및 경쇄와 비교하여 보존적 아미노산 치환을 갖는다. "항원-결합 단편"은 항원(ROR2)에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체 단편을 지칭한다. 항원-결합 단편의 예는 Fv 단편, 다이설파이드 결합 안정화된 Fv 단편(dsFv), Fab 단편, (Fab)₂, scFv-Fc 융합 단백질, scFv-Fv 융합 단백질, Fv-Fc 융합 단백질, 다중특이성 항체, 단일 도메인 항체, VHH 나노바디, 도메인 항체, 2가 도메인 항체 또는 항원-결합 단편으로부터 형성된 최소 인식 단위 중 적어도 하나를 포함하나 이로 제한되지 않는다. "보존적 아미노산 치환"은 아미노산을 또 다른 아미노산과 생물학적, 화학적 또는 구조적으로 유사한 잔기로 대체하는 것을 지칭한다. 생물학적으로 유사한 것은, 상기 치환이 CLDN18.2 항체 또는 CLDN18.2 항원의 생물 활성을 파괴하지 않는다는 것을 의미한다. 구조적 유사성은 알라닌, 글리신 또는 세린과 같은 아미노산의 유사한 길이를 갖는 측쇄, 또는 유사한 크기의 측쇄를 지칭한다. 화학적 유사성은 아미노산이 동일한 전하를 갖거나 또는 둘 다 친수성이거나 소수성인 것을 의미한다. 예를 들어, 소수성 잔기인 이소류신, 발린, 류신 또는 메티오닌은 서로 치환된다. 또는, 극성 아미노산을 사용할 수 있다. 예를 들어, 리신은 아르기닌으로 치환되고, 아스파르트산은 글루탐산으로 치환되며, 아스파라긴은 글루타민으로 치환되고, 트레오닌은 세린으로 치

환되는 등이다.

- [0120] 일부 실시양태에서, 본 발명은 항체 또는 항원-결합 단편을 제공하며, 여기서 상기 항체 또는 항원-결합 단편은 서열번호: 17 및 서열번호: 18 중 어느 하나에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열번호: 15 및 서열번호: 16 중 어느 하나에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 갖는다. 본 발명자들은 상기 언급된 항-중쇄 가변 영역 서열의 CDR 영역(서열번호: 4 내지 6, 서열번호: 10 내지 12에 나타낸 바와 같음) 및 경쇄 가변 영역 서열의 CDR 영역(서열번호: 1 내지 3, 서열번호: 7 내지 9에 나타낸 바와 같음)을 항체 서열 정렬 데이터베이스(NCBI, IMG) 또는 관련 소프트웨어를 통해 획득할 수 있다. 다른 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편의 중쇄 가변 영역 서열은 서열번호: 17 및 서열번호: 18에 나타낸 아미노산 서열과 비교하여 보존적 아미노산 치환을 갖는다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편의 경쇄 가변 영역 서열은 서열번호: 15 및 서열번호: 16 중 어느 하나에 나타낸 아미노산 서열과 비교하여 보존적 아미노산 치환을 갖는다. 물론, 이러한 보존적 아미노산 치환은 항체 또는 항원-결합 단편의 생물학적 기능을 변화시키지 않을 것이다. 일부 특정 방식에서, 이러한 보존적 아미노산 치환은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 CDR 영역 이외의 아미노산에서 발생할 수 있다.
- [0121] 본 발명에서, 용어 "m1B6" 및 "m1E7"은 중쇄 및 경쇄를 함유하는 무린 항체로 이해될 수 있고, 용어 "1B6" 및 "1E7"은 VH-링커-VL에 의해 형성된 단일쇄 항체로 이해될 수 있다. 용어 "키메라 항체 1B6" 및 "키메라 항체 1E7"은 무린 항체 m1B6 및 m1E7의 가변 영역을 보유하고 불변 영역을 인간 IgG1로 대체한 키메라 항체로 이해될 수 있다.
- [0122] 일부 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 서열번호: 21 내지 22, 서열번호: 31, 서열번호: 33 중 어느 하나에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호: 19 내지 20, 서열번호: 32, 서열번호: 34 중 어느 하나에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 갖는 항-CLDN18.2 항체를 제공한다.
- [0123] 일부 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 서열번호: 23 내지 24에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 항-CLDN18.2 단일쇄 항체를 제공한다. 본 발명의 실시양태의 단일쇄 항체는 N-말단에서 C-말단으로 VL-링커-VH의 구조를 갖는다. VL은 경쇄 가변 영역을 나타내고, VH는 중쇄 가변 영역을 나타내며, 링커는 VL과 VH를 연결하는 연결 쇠를 나타낸다.
- [0124] 일부 실시양태에서, 본 출원의 항-CLDN18.2 항체는 높은 ADCC 활성 및 낮은 EC50 및 IC50 값을 갖는 CDC 활성을 가지며, 표적 세포에 효과적으로 작용할 수 있다.
- [0125] 일부 실시양태에서, 본 출원의 항-CLDN18.2 항체는 마우스 모델에서 종양 성장을 효과적으로 억제할 수 있고, 체중과 같은 마우스의 다른 물리적 지표에 영향을 미치지 않는다. 본 출원의 항체는 항종양 효과가 우수하고 부작용이 적다.
- [0126] **면역 세포, 키메라 항원 수용체**
- [0127] 용어 "키메라 항원 수용체(CAR)"는 원하는 항원(예를 들어, 종양 항원)에 대한 항체-기반 특이성을 T 세포 수용체-활성화 세포내 도메인과 결합시켜 특정 항-종양 세포 면역 활성을 나타내는 키메라 단백질을 생성하는 분자이다.
- [0128] CLDN18.2를 특이적으로 인식할 수 있는 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 면역 세포 또는 키메라 항원 수용체를 제조하는데 사용될 수 있다.
- [0129] 이를 위해, 본 발명은 또한 세포의 영역을 포함하는 키메라 항원 수용체를 제공하며, 상기 세포의 영역은 단일쇄 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함한다. 여기서, 상기 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역은 CLDN 18.2를 특이적으로 인식할 수 있는 전술한 항체 또는 그의 항원-결합 단편으로부터 선택된다. 단일쇄 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 이외에, 세포의 영역은 또한 단일쇄 가변 단편을 지지하는 힌지 영역을 포함한다.
- [0130] 일부 실시양태에서, 키메라 항원 수용체 내의 가변 중쇄 및 경쇄는 짧은 펩티드에 의해 서로 연결된다. 세포의 영역 이외에, 키메라 항원 수용체는 막관통 영역 및 세포내 영역을 추가로 포함한다. 이들 영역은 항원 인식을 위해 세포내 신호 전달계를 개시할 수 있다.
- [0131] 일부 실시양태에서, 세포내 영역은 CD3 ζ , Fc ϵ RI γ , CD27, CD28, CD137, CD134, MyD88, CD40 세포내 신호 영역 서열, 또는 이들의 조합으로부터 선택되거나; 또는 막관통 영역은 CD8 또는 CD28 막관통 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 키메라 항원 수용체는 다음의 순서로 연결된 항체, 막관통 영역 및 세포내 영역을

포함한다: 본 발명의 항체, CD8 및 CD3 ζ ; 본 발명의 항체, CD8, CD137 및 CD3 ζ ; 또는 본 발명의 항체, CD28 분자의 막관통 영역, CD28 분자의 세포내 신호 영역 및 CD3 ζ ; 또는 본 발명의 항체, CD28 분자의 막관통 영역, CD28 분자의 세포내 신호 영역, CD137 및 CD3 ζ .

- [0132] 일부 실시양태에서, 막관통 영역은 면역자극 인자 막관통 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역자극 인자 막관통 영역은 추가로 CD8 막관통 영역 또는 ICOS 막관통 영역일 수 있다.
- [0133] 일부 실시양태에서, 세포내 영역은 면역자극 인자 및 CD3 ζ 쇠의 세포내 분절을 포함한다.
- [0134] 일부 실시양태에서, 면역자극 인자의 세포내 분절은 CD3 ζ 서열로부터 유래된 세포내 신호전달 도메인과 융합된 ICOS 또는 4-1BB 또는 OX-40을 추가로 포함한다.
- [0135] 일부 실시양태에서, 키메라 항원 수용체는 단일쇄 단일 벡터(예를 들면, 레트로바이러스 벡터) 또는 이중쇄 단일 벡터(예를 들면, 레트로바이러스 벡터) 상의 CD3 ζ 내부 도메인과 융합된 2개의 공-자극 분자를 추가로 포함한다. 절단된 이중쇄 단일 벡터는 2개의 쇠를 발현하며, 그 중 하나는 공자극 분자 및 CD3 ζ 내부 도메인과 융합된 scFv를 함유한다.
- [0136] 일부 실시양태에서, 키메라 항원 수용체는 사이토카인 수용체 및 화학주성 수용체를 추가로 포함한다.
- [0137] 상기 언급된 키메라 항원 수용체가 면역 세포를 제조할 수 있다는 사실에 기초하여, 면역 세포는 상기 언급된 키메라 항원 수용체를 발현할 수 있다.
- [0138] 일부 실시양태에서, 면역 세포는 T 림프구, DC 세포, NK 세포 및 NKT 림프구 중 적어도 하나를 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역 세포는 표면에 CLDN 18.2를 갖는 암 세포를 특이적으로 사멸시킬 수 있고, 생체내 및 시험관내에서 우수한 사멸 효과를 갖는다.
- [0139] CAR을 발현하는 T 세포는 CAR T 세포 또는 CAR 변형된 T 세포로 불린다.
- [0140] 본 발명의 실시양태의 CAR(그의 기능성 부분 및 기능성 변이체 포함)은 당해 분야에 공지된 방법에 의해 수득할 수 있다. CAR은 폴리펩티드 또는 단백질을 제조하기 위한 임의의 적합한 방법에 의해 제조할 수 있다. 폴리펩티드 및 단백질의 드노보 합성에 적합한 방법은 문헌[Chan et al., Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2000]; 문헌[Peptide and Protein Drug Analysis, Reid, R. editor, Marcel Dekker Inc., 2000]; 문헌[Epitope Mapping, Westwood et al. editors, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2001]; 및 미국 특허 제5,449,752호와 같은 참조문헌에 기술되어 있다. 또한, 폴리펩티드 및 단백질은 표준 재조합 방법을 사용하여 본원에 기술된 핵산을 사용하여 재조합적으로 생성할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2001]; 및 문헌[Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994]을 참조하시오. 또한, 본 발명의 일부 CAR(기능성 부분 및 기능성 변이체 포함)은 식물, 세균, 곤충, 포유동물, 예를 들면, 래트, 인간 등과 같은 공급원으로부터 단리 및/또는 정제될 수 있다. 분리 및 정제 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 대안적으로, 본원에 기술된 CAR(그의 기능성 부분 및 기능성 변이체 포함)은 Synpep(캘리포니아주 더블린 소재), Peptide Technologies Corp.(메릴랜드주 게이더스버그 소재) 및 Multiple Peptide Systems(캘리포니아주 샌디에이고 소재)와 같은 회사에 의해 상업적으로 합성될 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명의 CAR은 합성, 재조합, 단리 및/또는 정제될 수 있다.
- [0141] 일부 실시양태에서, 면역 세포는 또한 외인성 사이토카인의 암호화 서열을 운반하거나; 면역 세포는 또한 CD3 ζ 는 함유하지 않지만 CD28의 세포내 신호 도메인, CD137의 세포내 신호 도메인 또는 이 둘의 조합을 함유하는 또 다른 키메라 항원 수용체를 발현하거나; 면역 세포는 또한 케모카인 수용체를 발현하고; 바람직하게는 케모카인 수용체는 CCR을 포함하거나; 면역 세포는 또한 PD-1 발현을 감소시킬 수 있는 siRNA 또는 PD-L1을 차단하는 단백질을 발현하거나; 또는 세포 내 내인성 PD-1이 유전자 편집 기술에 의해 녹아아웃되거나; 또는 면역 세포는 또한 안전 스위치를 발현한다.
- [0142] 본 발명의 또 다른 양태에서, 본 발명은 또한 본 발명의 항체 및 이에 연결된 기능성 분자를 포함하는 다기능성 면역접합체를 제공하고; 상기 기능성 분자는 종양 표면 마커를 표적화하는 분자, 종양을 억제하는 분자, 면역 세포의 표면 마커 또는 검출가능한 마커를 표적화하는 분자로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 면역 세포의 표면 마커를 표적화하는 분자는 T 세포의 표면 마커에 결합하는 항체이며, 이는 본 발명의 항체와 함께 T 세포 참여를 수반하는 2기능성 항체를 형성한다.

- [0143] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "공자극 분자"는 공자극 리간드에 특이적으로 결합함으로써 증식으로 제한되지 않는 공자극 반응을 매개하는 T 세포와 같은 면역 세포 상의 상동성 결합 상대를 지칭한다. 공자극 분자는 항원 수용체 또는 그 리간드 이외의 세포 표면 분자로서, 효과적인 면역 반응을 촉진한다. 공자극 분자는 MHC I 분자, BTLA 및 Toll 리간드 수용체뿐만 아니라, OX40, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1(CD11a/CD18), ICOS(CD278) 및 4-1BB(CD137)를 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 공자극 분자의 예는 CDS, ICAM-1, GITR, BAFRR, HVEM(LIGHTR), SLAMF7, NKp80(KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD160, CD19, CD4, CD8 α , CD8 β , IL2R β , IL2R γ , IL7R α , ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1(CD226), SLAMF4(CD244, 2B4), CD84, CD96(Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9(CD229), CD160(BY55), PSGL1, CD100(SEMA4D), CD69, SLAMF6(NTB-A, Ly108), SLAM(SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME(SLAMF8), SELPLG(CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.
- [0144] 용어 "scFv"는 경쇄를 포함하는 적어도 하나의 가변 영역 항체 단편 및 중쇄를 포함하는 적어도 하나의 가변 영역 항체 단편을 포함하는 융합 단백질을 지칭하며, 여기서 경쇄 및 중쇄 가변 영역은 인접하며(예를 들어, 짧은 유연한 폴리펩티드 링커와 같은 합성 링커를 통해), 단일쇄 폴리펩티드로 발현될 수 있으며, scFv는 그것이 유래된 온전한 항체의 특이성을 유지한다. 명시되지 않는 한, 본원에서 사용되는 바와 같이, scFv는 VL 및 VH 가변 영역을 임의의 순서로(예를 들어, 폴리펩티드의 N-말단 및 C-말단에 대해) 가질 수 있고, scFv는 VL-링커-VH를 포함할 수 있거나 VH-링커-VL을 포함할 수 있다.
- [0145] 본원에서 사용되는 바와 같이 용어 "에피토프" 및 기타 문법적 형태는 항체, B 세포, T 세포 또는 조작된 세포에 의해 인식될 수 있는 항원의 일부를 지칭할 수 있다. 예를 들어, 에피토프는 TCR에 의해 인식되는 종양 에피토프 또는 병원체 에피토프일 수 있거나, 항원에서 다중 에피토프를 인식할 수 있다. 에피토프는 또한 돌연변이될 수 있다.
- [0146] **핵산 분자, 발현 벡터, 재조합 세포**
- [0147] 이들 항체 또는 키메라 항원 수용체를 제조 또는 수득하는 과정에서, 이들 항체 또는 키메라 항원 수용체를 발현하는 핵산 분자는 상이한 벡터에 연결되고 상이한 세포에서 발현되어 상응하는 항체 또는 키메라 항원 수용체를 수득할 수 있다.
- [0148] 이를 위해, 본 발명은 또한 전술한 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 키메라 항원 수용체를 암호화하는 단리된 핵산 분자를 제공한다.
- [0149] 일부 바람직한 실시양태에서, 핵산 분자는 포유동물 세포에서 보다 용이한 발현을 위해 중-최적화된다.
- [0150] 본 발명은 또한 전술한 단리된 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 단리된 폴리뉴클레오티드가 벡터에 연결될 때, 폴리뉴클레오티드는 조절 요소가 폴리뉴클레오티드의 번역 및 발현을 조절할 수 있는 한 벡터 상의 조절 요소에 직접 또는 간접적으로 연결될 수 있다. 물론, 이들 조절 요소는 운반체 자체로부터 직접 유래될 수도 있거나, 또는 외인성일 수 있다(즉 운반체 자체에서 유래되지 않을 수 있음). 물론, 폴리뉴클레오티드는 조절 요소에 작동가능하게 연결될 수 있다. 여기서, "작동 가능하게 연결된"은 외인성 유전자와 벡터의 연결을 지칭하므로, 전사 조절 서열 및 번역 조절 서열 등과 같은 벡터내 조절 요소가 외인성 유전자의 전사 및 번역을 조절하는 그의 예상된 기능을 수행할 수 있다. 물론, 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는데 사용되는 폴리뉴클레오티드는 상이한 벡터에 독립적으로 삽입될 수 있으며, 동일한 벡터에 삽입되는 것이 일반적이다. 통상적으로 사용되는 벡터는, 예를 들어, 플라스미드, 박테리오파지 등일 수 있다.
- [0151] 본 발명은 또한 발현 벡터를 함유하는 재조합 세포를 제공한다. 발현 벡터는 포유동물 세포에 도입되어 재조합 세포를 구축한 다음, 이들 재조합 세포를 사용하여 본 발명에 의해 제공되는 항체 또는 항원-결합 단편을 발현할 수 있다. 재조합 세포를 배양함으로써 상응하는 항체를 얻을 수 있다. 이러한 사용가능한 포유동물 세포는, 예를 들어, CHO 세포일 수 있다.
- [0152] **약학 조성물, 키트 및 약학적 용도 및 키트의 제조에서의 용도**
- [0153] 본 발명은 또한 상기 언급된 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하고, 또한 상기 언급된 키메라 항원 수용체, 면역 세포, 핵산 분자, 발현 벡터, 재조합 세포를 포함할 수 있는 약학 조성물을 제공한다.

- [0154] 본원에서 제공되는 CLDN18.2 항체는 대상에게 투여하기에 적합한 약학 조성물에 혼입될 수 있다. 일반적으로, 이들 약학 조성물은 본원에서 제공되는 CLDN18.2 항체를 포함한다.
- [0155] 일부 실시양태에서, 이들 약학 조성물은 특정 목표 투여형에 적합한 임의의 용매, 고체 부형제, 희석제, 결합제, 봉해제 또는 다른 액체 부형제, 분산제, 향미제 또는 현탁제, 계면활성제, 등장화제, 증점제, 유화제, 방부제, 고체 결합제, 활택제 또는 윤활제 등을 포함하여 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함한다. 임의의 바람직하지 않은 생물학적 효과를 발생하거나 그렇지 않으면 약학적으로 허용되는 조성물의 임의의 다른 성분과 유해한 방식으로 상호작용하는 것과 같이 본원에 개시된 화합물과 상용할 수 없는 임의의 통상적인 부형제를 제외하고, 그의 사용은 본 발명의 범위 내에 속하는 것으로 간주된다.
- [0156] 예를 들어, 본 발명의 항체는 비경구 투여(예를 들어, 정맥내, 피하, 복강내, 근육내)에 적합한 약학 조성물에 혼입될 수 있다. 이러한 약학 조성물은 다양한 형태로 제조될 수 있다. 예를 들어, 액체 용액(예를 들어, 주사액 및 주입액), 분산액 또는 현탁액, 정제, 환제, 분말, 리포솜 및 좌약을 포함하나 이로 제한되지 않는 액체, 반고체 및 고체 투여형. 전형적인 약학 조성물은 주사액 또는 주입액의 형태이다. 항체는 정맥내 주입 또는 주사, 또는 근육내 또는 피하 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0157] 물론, 본원에서 CLDN18.2 항체는 키트의 일부 또는 필요에 따라 다른 진단 시약으로 제조될 수도 있다. 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 본 발명은 또한 상기 언급된 CLDN18.2 항체를 포함하는 키트를 제공한다. 본 발명에 의해 제공되는 키트는, 예를 들어, CLDN18.2 항원 및 항체의 특이적 결합 성질을 사용하여 검출하는 것을 수반하는 면역블롯팅, 면역침전 등에 사용될 수 있다. 이러한 키트는 다음 중 임의의 하나 이상을 함유할 수 있다: 길항제, CLDN18.2 항체 또는 약물 표준 물질; 단백질 정제 컬럼; 면역글로불린 친화성 정제 완충액; 세포 분석 희석제; 설명서 또는 인쇄물 등. CLDN18.2 항체는 다양한 유형의 진단 시험에 사용할 수 있고, 예를 들어, 다양한 질병 또는 약물, 독소 또는 기타 단백질의 존재를 시험관내 또는 생체내에서 검출할 수 있다. 예를 들어, 대상의 혈청 또는 혈액을 관련 질병에 대해 검사할 수 있다. 암 또는 종양과 같이, 이러한 암 또는 종양은 임의의 조절되지 않는 세포 성장일 수 있다.
- [0158] 일부 실시양태에서, CLDN18.2 항체는, 표적 부위에 대한 정보를 획득하기 위해, 핵종의 방사능을 통해 표적 부위를 검출하기 위해 임의의 검출 시약 또는 치료제, 예를 들어, 진단 핵종, 나노물질 등과 함께 사용될 수 있으며; 또한 핵종의 방사능을 사용하여 표적 세포, 조직 등을 특이적으로 사멸하기 위해 치료용 핵종과 함께 사용될 수 있다.
- [0159] 본 발명에 의해 제공되는 CLDN18.2 항체를 사용하여 상기 언급된 질병을 진단 또는 치료 또는 예방할 때, 본 발명에 의해 제공되는 CLDN18.2 항체를 대상에게 제공할 수 있다. 이를 위해, 본 발명은 본 발명에 의해 제공되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 언급된 질병을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0160] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "치료" 및 "예방", 및 그로부터 파생된 단어는 반드시 100% 또는 완전한 치료 또는 예방을 의미하지는 않는다. 반대로, 다양한 정도의 치료 또는 예방이 있으며, 당해 분야의 숙련자는 치료 또는 예방이 잠재적인 이점 또는 치료 효과를 갖는 것으로 생각한다. 이와 관련하여, 본 발명의 방법은 포유 동물에서 암의 임의의 수준의 치료 또는 예방을 얼마든지 제공할 수 있다. 또한, 본 발명의 방법에 의해 제공되는 치료 또는 예방은 암의 하나 이상의 질병 또는 증상의 치료 또는 예방과 같이 치료 또는 예방되는 질병의 치료 또는 예방을 포함할 수 있다. 또한, 본 문서의 목적상, "예방"은 질병 또는 그 증상 또는 환자의 발병을 지연시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0161] 본 발명은 특정 실시양태를 참조하여 하기에서 설명될 것이다. 이들 실시양태는 단지 설명적인 것이며 어떠한 방식으로든 본 발명을 제한하지 않는다는 것을 유의해야 한다. 구체적인 기술 또는 조건이 실시예에 지시되어 있지 않은 경우, 당해 분야의 문헌 또는 제품 설명에 기재된 기술 또는 조건을 수행한다. 사용되는 시약 또는 기구가 제조사에서 명시되지 않은 경우, 이들은 모두 상업적으로 시판되는 통상적인 제품이다.
- [0162] **실시예 1. 항-Claudin 18.2의 단일클론 스크리닝 및 활성 확인**
- [0163] 1.1 항-Claudin18.2 단일클론 항체의 스크리닝
- [0164] 마우스 면역 및 하이브리도마 스크리닝:
- [0165] Claudin18.2 유전자가 녹아웃된 C57 마우스를 hClaudin18.2의 전장 유전자를 함유하는 pCDNA3.4 플라스미드로 면역화하였다. 각각의 마우스를 60 µg 플라스미드로 근육내 주사에 의해 면역화하였고, 총 10 마리의 마우스를

면역화하였다. 면역화 간격은 2주였다. 플라스미드 면역화 3회 후 7일차에 혈액을 채취하고, 혈청을 100배 희석하였다. hClaudin18.2 발현이 높은 293T 세포를 사용하여 마우스의 면역 반응을 검출하였다. hClaudin18.2 발현이 높은 293T 세포를 이용하여 꼬리 정맥 또는 복강내 임펄스 면역화를 위해 명백한 면역 반응을 나타낸 마우스를 선별하였고(도 1), 각 마우스의 접종량은 1E+07개 세포였다. 3 내지 4일 후, 마우스 비장을 취하여 70 µm 메쉬로 분쇄한 다음, PEG에 의해 SP2/0 세포와 융합 및 플레이팅하고, hClaudin18.2의 발현이 높은 CHO 세포를 하이브리도마 스크리닝에 사용하였다.

[0166] 1.2 hClaudin18.2 및 hClaudin18.1-CHO의 발현이 높은 세포주의 제조:

[0167] hClaudin18.2-CHO 및 hClaudin18.1-CHO의 발현이 높은 세포주를 각각 약 5E+06개 세포로 각각 수집하였으며, 세포 생존율은 95%보다 높았다. 세포를 500 g에서 3분 동안 원심분리에 의해 수집하고, 1% BSA를 함유하는 예냉된 동부피의 PBS로 세척하고 3회 원심분리한 다음, 1% BSA를 함유하는 예냉된 PBS에 1E+07 세포/mL의 밀도로 재현탁하였다. 각 유형의 세포를 튜브당 100 µL의 양으로 4개의 유동 검출 튜브로 나누었다.

[0168] 1.3 m1B6/m1E7 항-Claudin 18.2 단일클론 하이브리도마 상등액 처리:

[0169] 2개의 분취된 세포를 hClaudin18.2-CHO-NC, hClaudin18.2-CHO-마우스 2차 항체, hClaudin18.2-CHO-m1B6, hClaudin18.2-CHO-m1E7로 번호를 매겼다. 1% BSA를 함유하는 예냉된 PBS 100 µL를 NC 및 마우스 2차 항체로 번호가 매겨진 샘플에 첨가하고, 잘 혼합하였다. 상응하는 m1B6/m1E7 단일클론 하이브리도마 세포주 상등액 100 µL를 m1B6/m1E7 표지에 상응하는 유동 튜브에 첨가하고, 잘 혼합하였다. 모든 샘플을 4°C에서 30분간 반응시킨 후, 500 g에서 3분간 원심분리하여 세포를 수집하고, 1% BSA를 함유하는 예냉된 동부피의 PBS로 세척하고, 3회 원심분리한 다음, 세포를 나중에 사용하기 위해 수집하였다.

[0170] 마우스 2차 항체 희석물 제조: PE-표지된 GAM-IgG-PE-표지(ab97024)를 1% BSA를 함유하는 예냉된 PBS로 총 2 mL로 1:500의 비로 희석하였다. 혼합물을 완전히 혼합하고 나중에 사용하기 위해 4°C에 보관하였다. 희석된 마우스 2차 항체 희석액인 hClaudin18.2-CHO-마우스 2차 항체, hClaudin18.2-CHO-m1B6, hClaudin18.2-CHO-m1E7을 튜브당 200 µL의 양을 따라 취하였다. hClaudin18.1-CHO-마우스 2차 항체, hClaudin18.1-CHO-m1B6 및 hClaudin18.1-CHO-m1E7로 처리한 세포를 재현탁하였다. hClaudin18.2-CHO-NC 및 hClaudin18.1-CHO-NC에 1% BSA를 함유하는 예냉된 PBS 200 µL를 첨가하여 세포를 재현탁한 후, 처리된 모든 샘플을 4°C에서 30분 동안 정적으로 반응시킨 다음, 세포를 500 g마다 3분 동안 원심분리하여 수집하고, 1% BSA를 함유하는 예냉된 동부피의 PBS로 세척하고 3회 원심분리한 다음, 나중에 사용하기 위해 수집하였다

[0171] 1.4 유동 검출:

[0172] hClaudin18.2-CHO-NC 및 hClaudin18.1-CHO-NC 샘플을 사용하여 유동 전압을 확인하였다. hClaudin18.2-CHO-마우스 2차 항체 및 hClaudin18.1-CHO-마우스 2차 항체 샘플을 사용하여 음성 검출값을 확인하였다. hClaudin18.2-CHO-m1B6 및 hClaudin18.2-CHO-m1E7을 검출하기 위한 확립된 유동 주형. hClaudin18.1-CHO-m1B6 및 hClaudin18.1-CHO-m1E7 샘플의 유세포분석 결과는 m1B6/m1E7이 매우 우수한 특이적 반응을 나타냄을 보여주었으며, 결과를 도 2에 나타내었다.

[0173] 실시예 2. 항-Claudin 18.2 m1B6/m1E7 단일클론 항체의 친화성 및 특이성 검출

[0174] 항-Claudin 18.2 m1B6/m1E7 복수의 생성 및 정제

[0175] 10 마리의 암컷 BA LB/c 마우스를 취하고 각각에 0.5 mL의 파라핀 오일을 복강에 주사하였다. 마우스는 10일 후에 나중에 사용하기 위해 준비되었다. 10 마리의 마우스를 각 우리에 5마리씩 2개의 우리로 나누었다. 전처리된 1B6/1E7 단일클론 세포주의 1E+06개 세포를 마우스당 복강에 주사하였다. 10 내지 12일 후, 마우스에서 생성된 복수를 수집하고, 각각의 세포주에서 나중에 사용하기 위해 약 10 mL의 복수를 수집하였다.

[0176] 수집된 복수를 10분 동안 12000 g에서 원심분리하여 상등액을 수집한 다음, 50% 포화 황산암모늄을 첨가하였다. 혼합물을 완전히 혼합하고, 4°C에서 30분 동안 방치한 다음, 10000 g에서 10분 동안 원심분리하여 침전물을 수집하였다. 침전물을 동부피의 PBS에 재현탁하고, 0.45 µm 필터 막으로 여과하고, 사용을 위해 준비하였다.

[0177] PBS를 사용하여 4 mL/분의 유량으로 단백질 A 친화 크로마토그래피 컬럼(5 mL 사전충전된 컬럼)을 평형화하였다. 5개의 컬럼 부피를 평형화한 후, 전처리된 m1B6/m1E7을 부하하고 4 mL/min의 속도로 정제하였다. 샘플을 부하한 후, PBS를 사용하여 검출 기준선이 안정될 때까지 계속 행군 다음, 0.1 M pH3.5 아세트산을 용출에 사용하였다. 용출 피크를 수집하고, 1 M 트리스 완충액을 사용하여 용출액의 pH를 pH 7.4로 조정하였다. 정제 후에, 단백질 A 크로마토그래피 컬럼을 5CV용 0.1 M NaOH 완충액으로 세척하고, pH가 중성이 될 때까지 PBS

로 세척한 다음, 각 시험의 기준선이 안정될 때까지 정제수로 세척하였다. 단백질 A 컬럼은 20% 에탄올을 사용하여 보관하였다. 용출된 m1B6/m1E7 샘플을 25kD 투석 주머니로 옮기고 나중에 사용하기 위해 PBS로 투석하였다.

[0178] CHO 과발현 claudin18.1 세포 및 CHO 과발현 claudin18.2 세포를 제조하고, 300 g에서 5분 동안 원심분리한 다음, PBS에 재현탁하고, 이 단계를 2회 반복하였다. 마지막으로, PBS로 농도를 3E+06 세포/mL로 조정하였다. 2개의 항체를 2.5 µg/mL로부터 2배 구배로 0.005 µg/mL까지 10개 구배하에 희석하였다. CHO 과발현 claudin18.1 세포 및 CHO 과발현 claudin18.2 세포를 투명한 96 등근-바닥 웰의 두 줄에 각각 100 µL씩 배치한 다음, 항체를 순서대로 세포에 첨가하고, 1:1로 균일하게 혼합하였다. 각각은 블랭크 웰과 음성 웰로 설정되었다. 혼합물을 4°C 냉장고에 넣고 1시간 동안 배양하였다. 배양 후, 혼합물을 대용량 벤치탑 고속 원심분리기에서 3분 동안 500 g에서 원심분리한 다음, PBS에 재현탁하고, 이 단계를 3회 반복하였다. PE-표지된 염소 항-마우스 2차 항체를 1:500의 농도로 희석하고, 각 웰에 100 µL를 첨가하였다. 블랭크 웰은 단독으로 방치하였다. 혼합물을 4°C 냉장고에 넣고 30분 동안 배양하였다. 배양 후, 혼합물을 대용량 탁상용 고속 원심분리기에서 500 g에서 3분 동안 원심분리한 다음, PBS에 재현탁하고, 이 단계를 3회 반복하였다. 마지막으로, 180 µL의 PBS를 각 웰에 첨가하고, BDverse 유세포 분석기를 사용하여 시험하였다. m1B6의 EC₅₀은 약 0.06 µg/mL이었고, m1E7의 EC₅₀은 약 0.1 µg/mL이었다. 이것은 Claudin 18.1과 교차반응하지 않았으며, 20 µg/mL 농도에서는 Claudin 18.1과 교차반응하지 않았으므로, 우수한 특이성을 나타내었다. 결과는 도 3 및 도 4에 나타낸 바와 같았다.

[0179] **실시예 3. 항-Claudin 18.2 scfv-FC 융합 단백질의 활성 검출**

[0180] Beijing Qingke Biotechnology Co., Ltd.에 1B6 및 1E7 하이브리도마 세포주를 서열분석하도록 위임하였다. 항-Claudin 18.2 scFv-Fc 융합 단백질의 발현 벡터를 분자 클로닝에 의해 구축하였다. 구축된 발현 벡터를 293F 세포에 일시적으로 형질전환시켜 항-Claudin 18.2 scFv-FC 융합 단백질을 발현시켰다. 배지 상등액을 수집하고 12000 g에서 10분 동안 원심분리한 다음, 나중에 사용하기 위해 준비하였다. 단백질 A 크로마토그래피 컬럼을 사용하여 단백질 A 친화 크로마토그래피 컬럼(5 mL 사전충전된 컬럼)을 4 mL/분의 유량으로 PBS로 평형화하였다. 5개의 컬럼 부피를 평형화한 후, 전처리된 m1B6/m1E7(FC 융합 단백질 형태)을 부하하고 4 mL/분의 속도로 정제하였다. 샘플을 부하한 후, 검출 기준선이 안정될 때까지 PBS를 사용하여 계속 행군 다음, 0.1 M pH3.5 아세트산을 사용하여 용출하였다. 용출 피크를 수집하고, 1 M 트리스 완충액을 사용하여 용출액의 pH를 pH 7.4로 조정하였다. 정제 후, 단백질 A 크로마토그래피 컬럼을 5CV용 0.1 M NaOH 완충액으로 세척하고, pH가 중성이 될 때까지 PBS로 세척한 다음, 각 시험의 기준선이 안정될 때까지 정제수로 세척하였다. 단백질 A 컬럼은 20% 에탄올을 사용하여 보관하였다. 용출된 1B6/1E7 샘플을 25 kD 투석 주머니로 옮기고 나중에 사용하기 위해 PBS로 투석하였다.

[0181] CHO 과발현 claudin18.2 세포를 준비하고 300 g에서 5분 동안 원심분리한 다음 PBS에 재현탁하고, 이 단계를 2회 반복하였다. 마지막으로, PBS로 농도를 3E+06 세포/mL로 조정하였다. 3개의 항체 m1B6/m1E7/IMAB362-FC를 40 µg/mL로부터 4배 구배로 0.04 µg/mL까지 6개의 구배하에 희석하였다. CHO 과발현 claudin18.1 세포 및 CHO 과발현 claudin18.2 세포를 투명한 96 등근-바닥 웰의 두 줄에 각각 100 µL씩 배치한 다음, 항체를 순서대로 세포에 첨가하고, 1:1로 균일하게 혼합하였다. 각각은 블랭크 웰과 음성 웰로 설정되었다. 혼합물을 4°C 냉장고에 넣고 1시간 동안 배양하였다. 배양 후, 혼합물을 대용량 벤치탑 고속 원심분리기에서 3분 동안 500 g에서 원심분리한 다음, PBS에 재현탁하고, 이 단계를 3회 반복하였다. PE-표지된 염소 항-인간 2차 항체를 1:500의 농도로 희석하고, 각 웰에 100 µL를 첨가하였다. 블랭크 웰은 단독으로 방치하였다. 혼합물을 4°C 냉장고에 넣고 30분 동안 배양하였다. 배양 후, 혼합물을 대용량 탁상용 고속 원심분리기에서 500 g에서 3분 동안 원심분리한 다음, PBS에 재현탁하고, 이 단계를 3회 반복하였다. 마지막으로, 180 µL의 PBS를 각 웰에 첨가하고, BDverse 유세포 분석기를 사용하여 시험하였다. m1B6-FC의 EC₅₀은 약 0.5 µg/mL이었고, m1E7-FC의 EC₅₀은 약 2.6 µg/mL이었으며, IMAB362-FC의 EC₅₀은 약 2.0 µg/mL이었다. m1B6은 친화성이 더 높았고, m1E7은 기존 임상 항체와 동일한 친화성을 가졌다. 결과는 도 5에 나타낸 바와 같았다.

[0182] **실시예 4. 항-Claudin 18.2 항체 1B6/1E7 에피토프 동정**

[0183] hClaudin 18.2의 상이한 펩티드들을 하기 아미노산 서열에 따라 합성하였다: 18.2EL1-A: DQWSTQDLYNNPVTAVFNQGC, 18.2EL1-B: YQGLWRSCVRESSGFTECRG, 18.2EL1-C: CRGYFTLLGLPAmLQAVR, 18.2EL1-D: VRESSGFTECRGYFTLLGLP, 18.2EL1-E: DLYNNPVTAVFNQGLWRSC, 18.2EL1-F: DQWSTQDLYNNPVT, 18.2EL1-G: AVFNQGLWRSC, 18.2EL1-H: CVRESSGFTE, 18.2EL1-I: CRGYFTLLGL. 9개의 합성 펩티드를 초음파로 물:아세트니트

릴 = 3:1로 용해시켰고, 용해 후 최종 농도는 1 mg/mL이었다. 각각의 펩티드를 나중에 사용하기 위해 100 μL/1.5 mL EP 튜브로 나누었다. m1B6은 총 1 mL에 대해 2 μg/mL로 희석하였고, m1E7mAb는 총 1 mL에 대해 4 μg/mL로 희석하였으며, IMAB362는 총 1 mL에 대해 20 μg/mL로 희석하였다. 희석된 3개의 항-Claudin18.2 항체를 분취된 펩티드와 1:1의 부피비로 잘 혼합하였다. 대조군을 설정하고, 희석된 m1B6, m1E7, IMAB362를 PBS와 1:1의 부피비로 잘 혼합하였다. 상기 언급된 혼합 시스템을 4°C의 냉장고에 30분 동안 두었다.

[0184] CHO 과발현 claudin18.2 세포를 수집한 다음, 300 g에서 5분 동안 원심분리하고, 동부피의 PBS로 재현탁하였다. 원심분리 및 재현탁 단계를 2회 반복하였다. 마지막으로, PBS로 농도를 3E+06 세포/mL로 조정하였다. 100 μL의 세포 현탁액(2개의 블랭크 대조군 웰 및 1개의 음성 대조군 웰)을 투명한 96 등근-바닥 웰의 각 웰에 첨가하고, 300 g에서 5분 동안 원심분리하여 상등액을 제거하고, 나중에 사용하기 위해 세포 펠릿을 저장하였다

[0185] 배양된 항체 펩티드 혼합 시스템을 상응하는 세포 펠릿에 첨가하고, 세포와 잘 혼합하고 표지하였다. 그런 다음 혼합물을 4°C의 냉장고에 넣고 30분 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후, 혼합물을 300 g에서 5분 동안 원심분리하고 PBS에 재현탁하였다. 이 단계를 3회 반복하였다. PE-표지된 염소 항-마우스 2차 항체를 1:500의 농도로 희석하고, 각 웰에 100 μL를 첨가하였다. 블랭크 웰은 단독으로 방치하였다. 혼합물을 4°C 냉장고에 넣고 30분 동안 배양하였다. 배양 후, 혼합물을 300g에서 5분 동안 원심분리한 다음, PBS에 재현탁하고, 이 단계를 3회 반복하였다. 마지막으로, 180 μL의 PBS를 각 웰에 첨가하고, BD 유세포 분석기를 사용하여 세포 형광 강도를 검출하였다. m1B6은 펩티드 A 및 E로 구성된 복합 에피토프에 결합했으며, 여기서 펩티드 A가 그의 주된 에피토프였다. m1E7은 A 펩티드가 위치한 에피토프에만 결합하였다. IMAB362는 A, C 및 E 펩티드로 구성된 복합 에피토프에 결합했으며, 여기서 펩티드 E가 그의 주된 에피토프였다. 결과는 도 6에 나타난 바와 같았다.

[0186] **실시예 5. 항-Claudin 18.2 CAR-T의 시험관내 종양 사멸 활성 검출**

[0187] 항-Claudin18.2 CAR-T 세포를 구축하였다(m1B6/m1E7/IMAB362). CAR 구조는 신호 펩티드-항-Claudin18.2 scfv-CD8 힌지 + CD8TM-ICOS -4-1BB -CD3 ζ를 포함하여 전술한 바와 같으며, 여기서 항-Claudin 18.2 scfv의 아미노산 서열은, 각각 서열번호: 23 및 서열번호: 24에 나타난 바와 같은 1B6 또는 1E7의 서열이었다. 다른 구조의 아미노산 서열(예를 들면, 신호 펩티드, CD8 힌지 등)은 서열번호: 25 내지 30에 나타내었다.

[0188] 293T 세포를 10 cm 세포 배양 접시당 6E+06개 세포의 양에 따라 플레이팅하고, 나중에 사용하기 위해 37°C 및 5% CO₂에서 밤새 배양하였다. 플레이팅된 세포가 95% 내지 99% 밀집도에 도달했는지를 다음날 관찰하였다.

[0189] 렌티바이러스 패키징 시스템을 표 1에 따라 제조하였다(각각은 10 cm 패키징 시스템이며, m1B6/m1E7/IMAB362/GFP 렌티바이러스를 각각 제조하였다).

표 1

[0190]

구성요소	부피
A 튜브	
Opti-MEM 환원 혈청 배지	1500 μL
리포펙타민 3000 형질감염 시약	41 μL
B 튜브	
Opti-MEM 환원 혈청 배지	1500 μL
P3000 인핸서 시약	35 μL
Virapower 렌티바이러스 패키징 혼합물	13 μL
pLenti 발현 벡터	4.3 μg

[0191] A/B를 준비한 후, 튜브 A의 혼합물을 튜브 B로 옮겼다. 생성된 혼합물을 약하게 완전히 혼합한 다음, 어두운 곳에서 10 내지 20분 동안 가만히 두었다. 10% FBS를 함유하는 DMEM 배지 9 mL를 첨가하고, 나중에 사용하기 위해 완전히 혼합하였다.

[0192] 293T 세포(10 cm 세포 배양 접시)를 미리 준비하고, 배지 상등액을 제거하였다. 상응하는 A/B 혼합 생성물을 상응하는 세포 배양 접시로 조심스럽게 옮기고, 상응하는 표지를 만들었다. 37°C 및 5% CO₂에서 6시간 동안 배양한 후, 피콜(Ficoll) 립프구 분리 용액으로 분리한 건강한 인간 T 세포를 함유하는 새로운 T 세포로 교체하고, 24-웰 플레이트에서 웰당 1E+06개 세포로 배양하였다. 동시에, CD3/CD28 항체-결합 자기 비드(Invitrogen)를 첨가하여 T 세포를 자극하였다. 48시간 후에, 상응하는 렌티바이러스를 추가하여 감염시켰다. 바이러스 감염시 IL-2(300 U/mL)를 첨가하였고, CAR-T 세포를 6일 또는 7일차까지 증식시켜 CAR 유전자 발현을 검출하고 후속 실험

험에 사용하였다.

[0193] CAR-T 및 효과기 세포(H460/18.2-H460)의 효과적인 표적 비를 1:3, 1:1, 3:1, 9:1로 설정하고, 효과기 세포를 수집하고 원심분리관에서 400 g에서 5분동안 원심분리하였다. 상등액을 폐기하였다. 생성된 혼합물을 적절한 양의 PBS로 1회 세척하고, 원심분리하고 상등액을 제거한 다음, 0.5 mL의 CTS 완전 배지를 첨가하고, 혼합물을 재현탁하였다. CAR-T에 상응하는 세포 밀도 및 양성물을 검출하였다. 세포는 나중에 사용하기 위해 CTS 완전 배지로 적절한 밀도로 조정하였다. 96-웰 세포 검출 플레이트에 적절한 양의 희석된 효과기 세포를 가하고, 400 g에서 5분간 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 밀도가 다른 CAR-T 100 μ L를 상응하는 웰에 첨가하고, 세포를 약하게 재현탁하고 잘 혼합한 다음, 각 웰에 100 μ L의 CTS를 첨가하였다. 혼합물을 20시간 동안 배양한 다음, 다음과 같이 시험하였다:

[0194] 20시간 동안 배양한 후, 20 μ L의 용해 완충액을 Vcc 웰 및 TMR 웰에 첨가하고, 잘 혼합하였다. 혼합물을 37°C에서 30분 동안 용해시켰다.

[0195] 혼합물을 실온에서 400 g에서 5분동안 원심분리하고, 상등액 100 μ L를 96-웰 플레이트로 옮겼다. 샘플을 또한 사이토카인 방출을 위해 취하였다.

[0196] 100 μ L 작업 용액을 각 웰에 첨가하였다.

[0197] 혼합물을 실온에서 어두운 곳에서 30분 동안 배양하였다.

[0198] 50 μ L 정지 용액을 각 웰에 첨가하고, 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0199] 비교하면, 1B6/1E7에 의해 구축된 CAR-T는 시험관내에서 명백한 사멸 효과를 가지며 유의미한 용량-효과 관계를 갖는 것으로 밝혀졌다. IMAB362에 의해 구축된 CAR-T와 비교하여, 더 강력한 사멸 효과 및 CAR 양성물을 나타내었다. 결과는 도 7 및 도 8에 나타낸 바와 같았다.

[0200] **실시예 6. 항-Claudin 18.2 CAR-T(Claudin 18.2 NCI-H460 세포)의 생체내 사멸 활성 검출**

[0201] Claudin 18.2 NCI-H460 세포 및 NCI-H460 세포를 RPMI-1640 배지(10% FBS 함유)에서 배양하고 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에 넣었다. 세포가 필요한 수로 성장하면, 대수 증식기에서 세포를 채취하였다. 원래의 배지는 폐기하고, 혼합물을 3분 동안 트립신 처리하였다. 이어서, 10% FBS를 함유하는 RPMI-1640 배지로 절단을 종료하고, 세포를 수집하고 1000 rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 세포 계수 후, 무혈청 RPMI-1640 배지 및 Matrigel 혼합물(1:1 비)을 사용하여 세포 밀도를 5E+07 세포/mL로 조정하였다. 고정된 NOD/SCID 암컷 마우스를 붙잡고, 세포 현탁액을 100 μ L/마우스로 마우스의 오른쪽 등에 피하 주사하였다. Claudin 18.2 NCI-H460 모델에서, 종양이 약 150 mm³로 자라면, 동물들을 군으로 나누어 투여하였다. NCI-H460 모델에서, 종양이 약 250 mm³까지 자랐을 때, 동물들을 군으로 나누어 투여하였다. 각각의 모델은 비히클군, 항-Claudin 18.2-1B6 CAR-T 군의 총 2개 군으로, 각각 6마리씩으로 나누었다. 항-Claudin18.2-1B6 CAR-T 세포를 수집하고, 세포 밀도를 PBS 용액으로 1E+08 세포/mL로 조정하였다. 세포 현탁액을 50 μ L/마우스로 종양에 주입하였다. 비히클 군에서, 종양에 PBS 용액을 50 μ L/마우스로 주입하였다. 종양 길이 및 너비는 2일마다 1회 또는 1주일에 2회 측정하였으며, 종양 부피를 계산하였다(종양 부피 = 종양 길이 * 종양 너비 * 종양 너비/2). 종양 성장 억제율(TGI)을 계산하였다. TX>T0인 경우, TGI = [1-TX/CX]*100%이고; TX<T0인 경우, TGI = [1-(TX-T0)/T0]*100%이다. TX 및 CX는 측정일의 종양 부피이고, T0 및 C0은 투여일의 종양 부피이다. 통계 분석은 SPSS16.0으로 수행하였다.

[0202] NOD/SCID 마우스에서 Claudin 18.2 NCI-H460 세포에 의해 수립된 이식 종양 모델에서, 항-Claudin 18.2-1B6 CAR-T는 종양내 투여 후 종양 성장을 상당히 억제할 수 있었다. 실험 종료 시, 종양 성장 억제율은 134.78%에 달하였다. 두 군 사이의 종양 부피를 통계적으로 분석하였으며, 통계적으로 유의미한 차이가 있었다(P<0.01).

[0203] NOD/SCID 마우스에서 NCI-H460 세포에 의해 수립된 이식 종양 모델에서, 항-Claudin 18.2-1B6 CAR-T는 종양내 투여 후 종양 성장을 억제할 수 없었다. 실험 종료 시, 종양 성장 억제율은 2.17%였다. 두 군 사이의 종양 부피를 통계적으로 분석하였으며, 통계적 차이는 없었다. 결과는 도 9에 나타낸 바와 같았다.

[0204] **실시예 7. 항-Claudin 18.2 CAR-T(Claudin 18.2 Calu-6 세포)의 생체내 사멸 활성 검출**

[0205] Claudin 18.2 Calu-6 세포를 RPMI-1640 배지(10% FBS 함유)에서 배양하고, 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에 넣었다. 세포가 필요한 수로 성장하면, 대수 증식기에서 세포를 채취하였다. 원래의 배지는 폐기하고, 혼합물을 3분 동안 트립신처리하였다. 이어서, 10% FBS를 함유하는 RPMI-1640 배지로 절단을 종료하고, 세포를 수집하고, 1000 rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 세포 계수 후, 무혈청 RPMI-1640 배지 및 Matrigel 혼합물(1:1 비)을

사용하여 세포 밀도를 2.5E+07 세포/mL로 조정하였다. 고정된 NCG 암컷 마우스를 붙잡고, 세포 현탁액을 100 μ L/마우스로 마우스 오른쪽 등 부위에 피하 주사하였다. 종양이 약 150 mm³까지 자라면, 동물을 군으로 나누어 투여하였다. 실험은 비히클군, T 세포군, Claudin 18.2 CAR-T(1B6) 군의 총 3개 군으로, 각각 8마리씩으로 나누었다. Claudin 18.2 CAR-T(1B6) 세포 및 T 세포를 수집하고, 세포 밀도를 PBS 용액을 사용하여 1E+08 세포/mL로 조정하였다. 세포 현탁액을 200 μ L/마우스로 꼬리 정맥에 주입하였다. 비히클군에서, PBS 용액을 200 μ L/마우스로 꼬리 정맥에 정맥내 주사하였다. 종양 길이 및 너비를 1주일에 2회 측정하고, 종양 부피를 계산하였다 (종양 부피=종양 길이*종양 너비*종양 너비/2). 종양 성장 억제율(TGI)을 계산하였다. TX>T0인 경우, TGI = [1-TX/CX]*100%이고; TX<T0인 경우, TGI = [1-(TX-T0)/T0]*100%이다. TX 및 CX는 측정일의 종양 부피이고, T0 및 C0은 투여일의 종양 부피였다. 통계 분석은 SPSS16.0으로 수행하였다.

[0206] NCG 마우스에서 Claudin 18.2 Calu-6 세포에 의해 수립된 이식 종양 모델에서, Claudin 18.2 CAR-T(1B6)는 종양내 투여 후 종양 성장을 상당히 억제할 수 있었다. 실험 종료 시, 종양 성장 억제율은 106.56%였다. Claudin 18.2 CAR-T(1B6) 군, 비히클군 및 T 세포군을 통계적으로 분석하였으며, 통계적으로 유의미한 차이가 있었다 (P<0.01). 결과는 도 10에 나타낸 바와 같았다.

[0207] **실시예 8. 항-Claudin 18.2 키메라 항체의 ADCC 활성 검출**

[0208] 본 실시예에서는, CD16 수용체 및 NFAT(활성화된 T 세포의 핵 인자) 반응 요소로 안정적으로 형질감염된 Jurkat-NFAT-Luc-CD16 루시페라제 리포터 유전자 세포주를 사용하였다. 시험 항체(키메라 항체 1B6, 1E7), 및 대조군 항체 IMAB362의 Fab 단편이 표적 세포 BXP3-3-Claudin18.2, Capan-1-Claudin18.2, 및 SK-GT-Claudin18의 항원에 결합했을 때, 효과기 세포 Jurkat-NFAT-Luciferase-CD16 세포의 표면(Fc γ RIIIA)에 결합된 항체의 Fc 분질은 Jurkat-NFAT-Luciferase-CD16 세포에서 NFAT-관련 신호전달 경로의 활성화를 유발하며, 이것은 이어서 루시페라제 발현 수준의 증가를 유도하였다. 항-Claudin 18.2 항체의 ADCC 활성은, 다양한 농도 (100 μ g/mL, 20 μ g/mL, 4 μ g/mL, 0.8 μ g/mL, 0.16 μ g/mL, 0.032 μ g/mL, 0.0064 μ g/mL, 0.00128 μ g/mL, 0.000256 μ g/mL, 0.0000512 μ g/mL)의 시험 항체(키메라 항체 1B6, 1E7) 및 대조군 항체 IMAB362의 작용하에서 효과기 세포 Jurkat-NFAT-Luciferase-CD16의 루시페라제 발현 수준을 검출함으로써 평가하였다. 결과는 도 11에 나타낸 바와 같았다. 도 11에서, 절반-피크 농도의 EC50은 항체의 ADCC 활성을 반영하였다. 절반-피크 농도의 EC50이 작을수록 항체의 ADCC 활성이 강하다. 실험 결과는, 표적 세포 BXP3-3-Claudin 18.2에서 항체 농도가 증가함에 따라 시험 항체(키메라 항체 1B6, 1E7) 및 대조군 항체 IMAB362의 평균값이 안정기 값에 도달할 때까지 점진적으로 증가하였고, 절반이 최고 농도에 도달하였음을 보여주었다. 절반-피크 농도 EC50은 각각 0.002114 μ g/mL, 0.002698 μ g/mL 및 0.003450 μ g/mL이다. 표적 세포 Capan-1-Claudin 18.2에서는, 항체 농도가 증가함에 따라, 시험 항체(1B6, 1E7) 및 대조군 항체 IMAB362의 평균값이 안정기 값에 도달할 때까지 점진적으로 증가하였고, 절반-피크 농도 EC50은 각각 0.002676 μ g/mL, 0.002634 μ g/mL 및 0.003482 μ g/mL이다. 표적 세포 SK-GT-Claudin 18.2에서는, 항체 농도가 증가함에 따라, 시험 항체(키메라 항체 1B6, 1E7)와 대조군 항체 IMAB362의 평균값이 안정기 값에 도달할 때까지 점진적으로 증가하였고, 절반-피크 농도 EC50은 각각 0.004466 μ g/mL, 0.007070 μ g/mL 및 0.009061 μ g/mL이다. 시험한 항체 1B6 및 1E7의 ADCC 활성이 대조군 항체 IMAB362보다 우수함을 알 수 있었다

[0209] **실시예 9. 항-Claudin 18.2 키메라 항체의 CDC 활성 검출**

[0210] 본 실시예에서는, 상이한 농도(90 μ g/mL, 30 μ g/mL, 10 μ g/mL, 3.33 μ g/mL, 1.11 μ g/mL, 0.37 μ g/mL, 0.123 μ g/mL, 0.041 μ g/mL)의 시험 항체(키메라 항체 1B6, 1E7) 및 대조군 항체 IMAB362의 작용하에 CCK8 방법으로 표적 세포 KATOIII-3-Claudin 18.2의 세포 생존율을 검출함으로써 항-Claudin 18.2 항체의 CDC 활성을 평가하였다. 결과는 도 12에 나타낸 바와 같았다. 도 12에서, OD450 값은 세포 생존율을 반영하였다. OD450 값이 작을수록 세포 생존율이 더 나쁘다. 절반 억제 농도의 IC50은 항체의 CDC 활성을 반영하였다. 절반 억제 농도의 IC50이 작을수록 항체의 CDC 활성이 강하다. 실험 결과는, 항체 농도가 증가함에 따라, 시험 항체(키메라 항체 1B6, 1E7) 및 대조군 항체 IMAB362의 OD450값이 0(제로)에 근접할 때까지 점진적으로 감소하였으며, 절반 억제 농도의 IC50은 2.656 μ g/mL, 1.567 μ g/mL 및 4.889 μ g/mL였음을 보여주었다. 시험한 항체 1B6 및 1E7의 CDC 활성이 대조군 항체 IMAB362보다 우수함을 알 수 있었다.

[0211] **실시예 10. 항-Claudin 18.2 항체 피하 이종이식 종양의 항종양 효능 시험**

[0212] 마우스에서 항-Claudin 18.2 항체의 항종양 효능을 평가하기 위해, BXP3-18.2 피하 이종이식 종양 모델을 사용하여 항체 1E7 및 1B6의 항종양 효능을 평가하였다. 대수 증식기의 인간 췌장암 세포 BXP3-18.2를 취하여 원심 분리하였다. 세포를 계수한 후, 무혈청 RPMI-1640 배지 및 Matrigel 혼합물(1:1 비)로 세포 밀도를 약

5.0*10⁷/mL로 조정하였다. 0.1 mL/마우스의 부피를 누드 마우스의 등에 피하 주사하였다. 평균 종양 부피가 약 100 mm³에 도달했을 때, 약물을 무작위 군으로 투여하였다. 마우스에 정맥내 및 복강내로 교대로 투여하였다. IMAB362, 키메라 항체 1E7 및 1B6은 10 mg/kg으로 투여하였다. 각각의 마우스에게 6주 동안 10 μL/g로, 처음 3주 동안은 주 2회, 다음 3주 동안은 주 1회 투여하였다. 투여 0일차부터, 종양 크기 및 마우스 체중을 주 2회 측정하여 종양 부피 및 체중 변화의 추이를 계산하였다. 종양 성장 억제율(TGI)을 시험 평가 지표로 사용하였다. (TGI)% = [1-T/C] × 100%, 여기서 T 및 C는 실험 종료시의 종양 부피이다. SPSS16.0 소프트웨어를 사용하여 통계 분석을 수행하였다. 일원 분산 분석(일원 ANOVA) 검정을 군 사이의 비교에 사용하였다. P<0.05(*)는 통계적 유의성을 나타내었다.

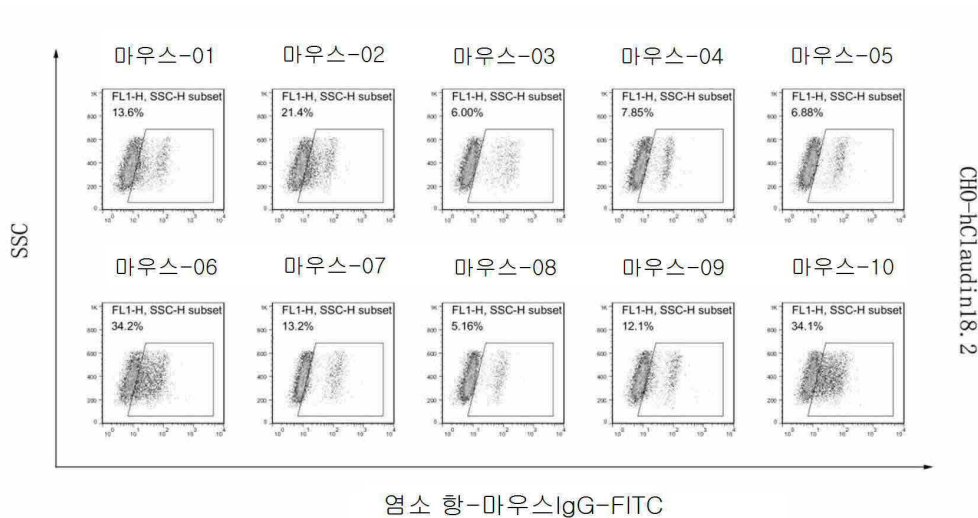
[0213] 실험의 결과를 도 13 및 14에 나타내었다. 항체 IMAB362, 키메라 항체 1E7 및 1B6은 모두 BXPC3-18.2 피하 이종이식 종양 모델의 종양 부피에 특정한 억제 효과를 나타내었다. 항체 IMAB362 및 키메라 항체 1B6은 종양 성장에 동일한 억제 효과를 가졌다. TGI는 36 내지 39%였다. 키메라 항체 1E7은 BXPC3-18.2 종양의 성장을 억제하는데 더 우수한 효과를 나타내었다. TGI=51%. 대조군과 비교하여, 그 차이는 통계적으로 유의미하였으며, 항체 IMAB362 및 1B6, 1E7은 종양-보유 마우스의 체중 증가에 영향을 미치지 않았다.

[0214] 본 명세서 전반에 걸쳐 "한 실시양태", "일부 실시양태", "하나의 실시양태", "또 다른 예", "한 예", "특정 예" 또는 "일부 예"에 대한 언급은 실시양태 또는 예와 관련하여 설명된 특정한 특징, 구조, 재료 또는 특성이 본 개시내용의 적어도 하나의 실시양태 또는 예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전반에 걸쳐 나타나는 상기 용어들이 반드시 본 개시내용의 동일한 실시양태 또는 예를 지칭하는 것은 아니다. 또한, 특정한 특징, 구조, 재료 또는 특성은 하나 이상의 실시양태 또는 예에서 임의의 적절한 방식으로 조합될 수 있다. 또한, 당해 분야의 숙련자는 서로 상충되지 않는 한, 상이한 실시양태, 예 또는 이들의 특징을 통합 및 조합할 수 있다.

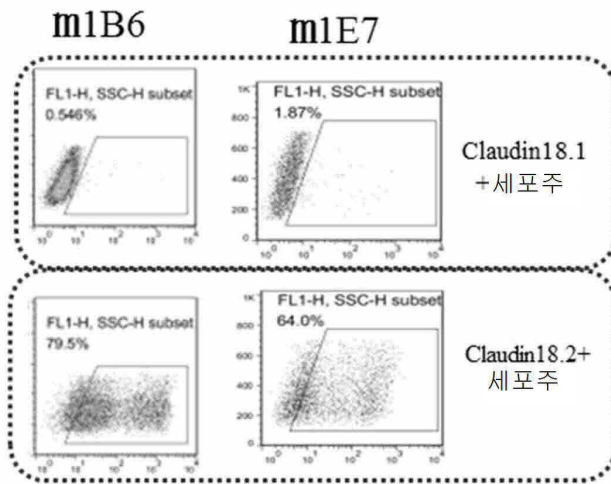
[0215] 비록 예시적인 실시양태들을 나타내고 설명하였지만, 당해 분야의 숙련자는 상기 실시양태들이 본 개시내용을 제한하는 것으로 해석될 수 없으며 변화, 대체 및 수정이 본 개시내용의 진의, 원리 및 범위에서 벗어나지 않고 실시양태에서 이루어질 수 있음을 이해할 것이다.

도면

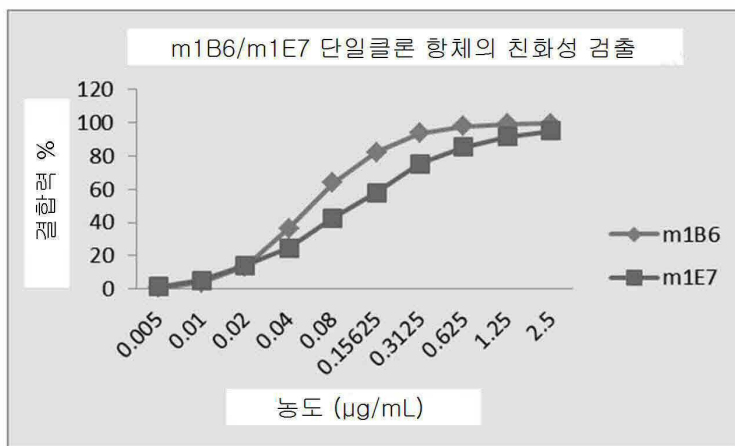
도면1



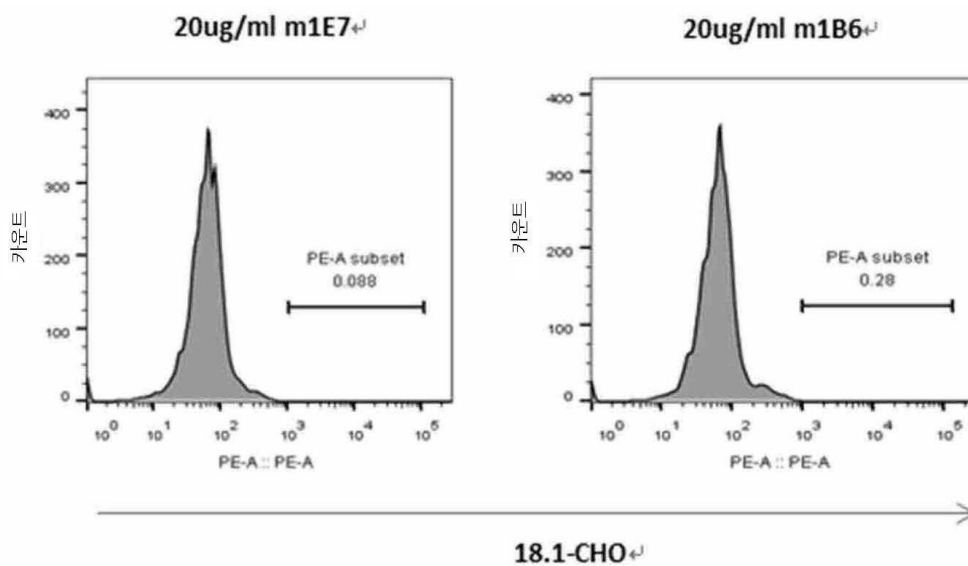
도면2



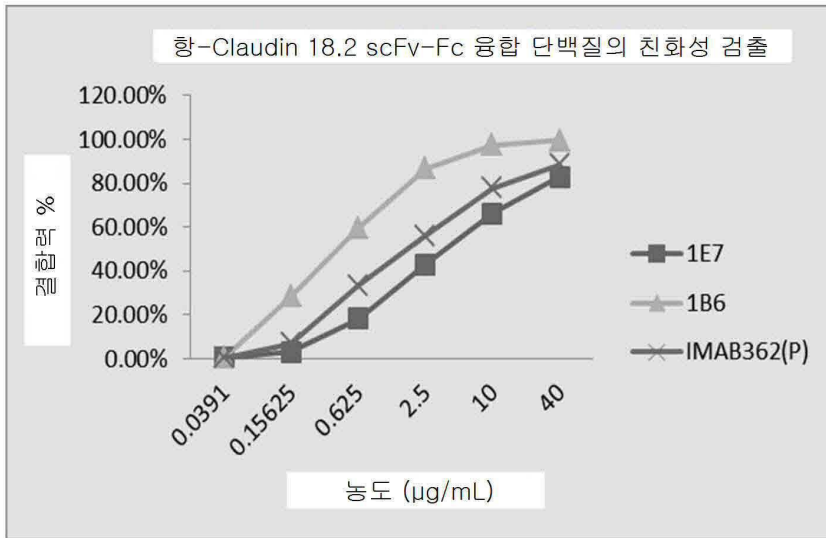
도면3



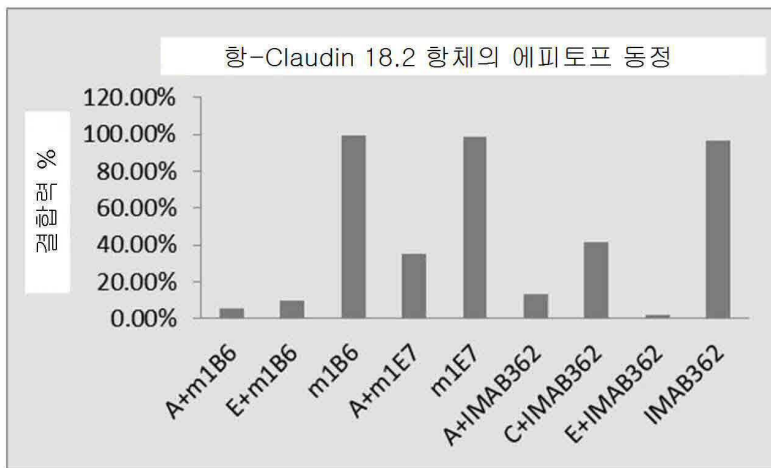
도면4



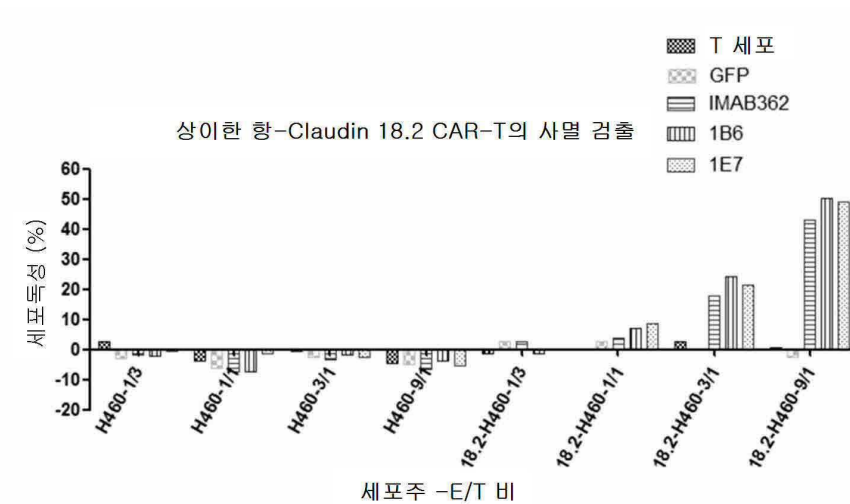
도면5



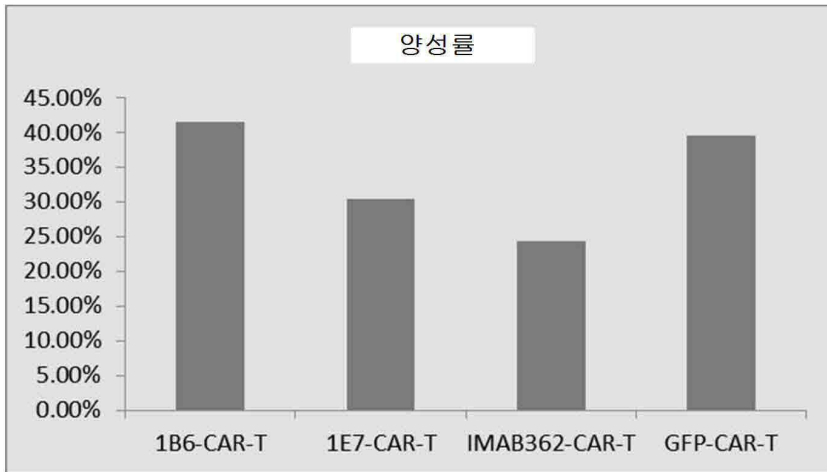
도면6



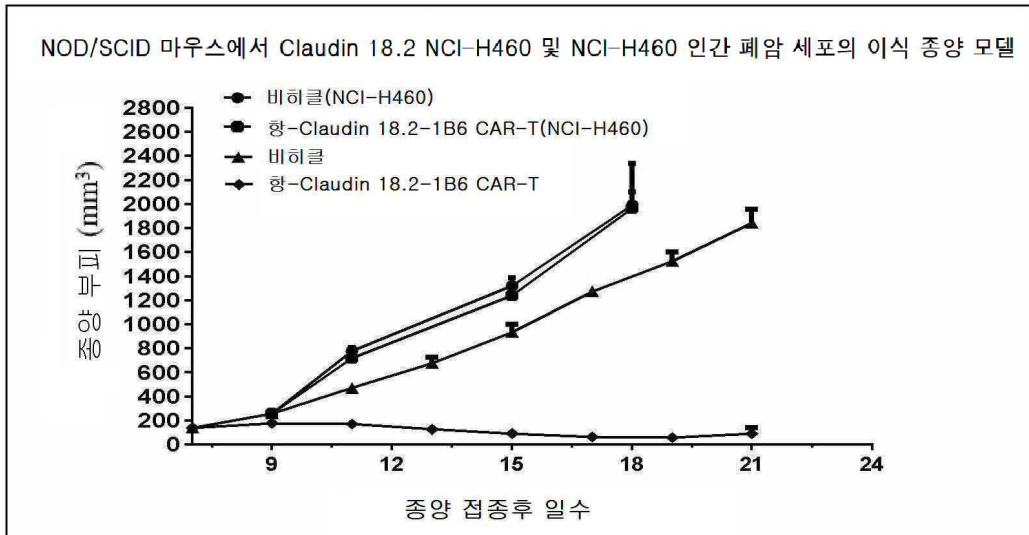
도면7



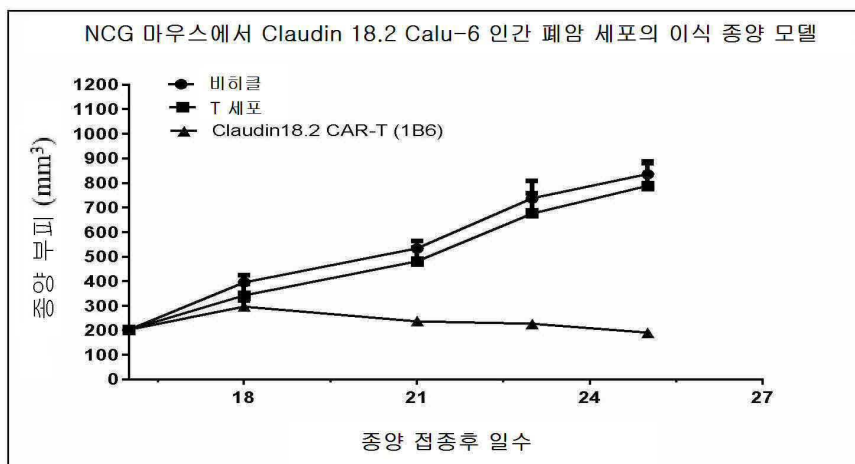
도면8



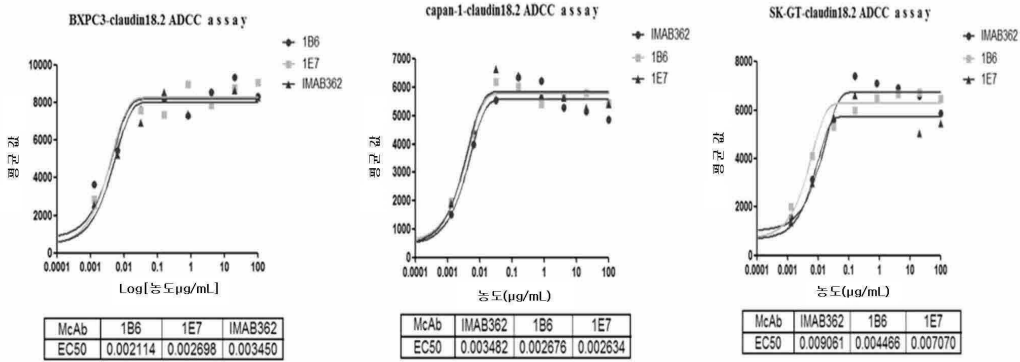
도면9



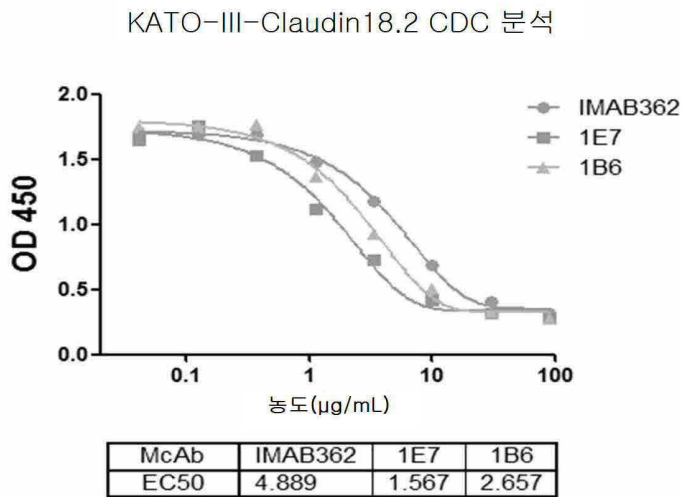
도면10



도면11

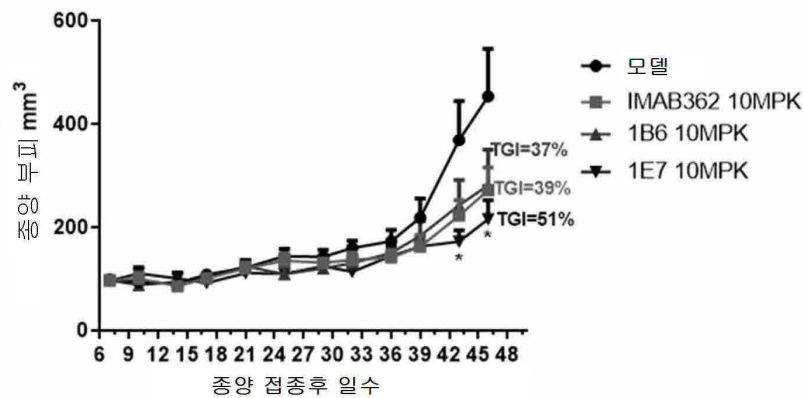


도면12



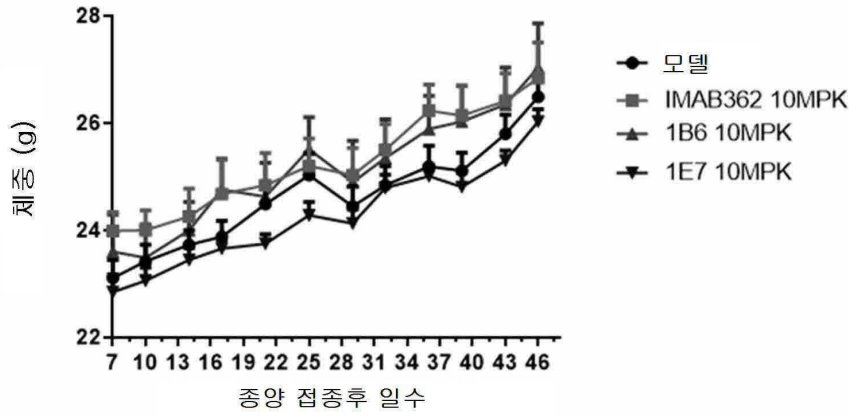
도면13

NU/NU 마우스에서 Claudin18.2 BXPC-3 인간 체장암 이종이식 모델



도면14

상이한 군에서 마우스의 체중 변화
(Claudin18.2 BXPC-3 이종이식 모델)



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> SUNSHINE LAKE PHARMA CO., LTD.

<120> CLDN18.2 ANTIBODY AND USE THEREOF

<130> SI4210229

<140> PCT/CN2021/133514

<141> 2021-11-26

<150> 202011364033.6

<151> 2020-11-27

<160> 34

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence of light chain variable region

<400> 1

Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu

1 5 10

<

210> 2

<211> 5

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CDR sequence of light chain variable region
<400> 2
Tyr Trp Ala Ser Thr
1 5
<210> 3
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CDR sequence of light chain variable region
<400> 3
Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe
1 5 10
<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CDR sequence of heavy chain variable region

<400> 4
Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met
1 5 10
<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CDR sequence of heavy chain variable region
<400> 5
Met Ile His Pro Asn Ser Gly Ser Thr Asn
1 5 10
<210> 6
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence of heavy chain variable region

<400> 6

Cys Ala Arg Arg Tyr Tyr Gly Ser Ile Ser Pro Asp Tyr Trp

1 5 10

<210> 7

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence of light chain variable region

<400> 7

Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu

1 5 10

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence of light chain variable region

<400> 8

Tyr Trp Ala Ser Thr

1 5

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence of light chain variable region

<400> 9

Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe

1 5 10

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence of heavy chain variable region

<400> 10

Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Met

1 5 10

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence of heavy chain variable region

<400> 11

Tyr Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser

1 5 10

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence of heavy chain variable region

<400> 12

Cys Val Thr Thr Arg Tyr Leu Ala Val Trp

1 5 10

<210> 13

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide A

<400> 13

Asp Gln Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val

1 5 10 15

Phe Asn Tyr Gln Gly Cys

20

<210>

> 14

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide E

<400> 14

Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly Leu

1 5 10 15

Trp Arg Ser Cys

20

<210> 15

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain variable region

<400> 15

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile

100 105 110

Lys

<210> 16

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain variable region

<400> 16

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
 20 25 30

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

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

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

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

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

Arg

<210> 17

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain variable region

<400> 17

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Met Ile His Pro Asn Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain

<400> 19

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

1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser

 20 25 30
 Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80
 Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Asn

 85 90 95
 Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu

 100 105 110
 Arg Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser

 115 120 125
 Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn

 130 135 140
 Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu

145 150 155 160
 Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp

 165 170 175
 Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr

 180 185 190
 Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr

 195 200 205
 Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys

 210 215 220

<210> 20

<211> 220

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain

<400> 20

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile

 100 105 110

Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser

 115 120 125

Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn

 130 135 140

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

145 150 155 160

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

 165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr

 180 185 190

Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr

 195 200 205

Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210 215 220
 <210> 21
 <211
 > 451
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Heavy chain
 <400> 21
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Asn Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asn Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Thr Thr Arg Tyr Leu Ala Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 Gly Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Ser Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser
 145 150 155 160
 Leu Ser Ser Ser Val His Thr Phe Pro Ala Leu Leu Gln Ser Gly Leu
 165 170 175
 Tyr Thr Met Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser

His Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser Arg Ser

435 440 445

Pro Gly Lys

450

<210> 22

<211> 455

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain

<400> 22

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Met Ile His Pro Asn Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Arg Tyr Tyr Gly Ser Ile Ser Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Gly Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Ser Val Thr Val Thr Trp

145 150 155 160

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

Lys Leu Asn Met Lys Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser

420 425 430

Cys Asn Val Arg His Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr

435 440 445

Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys

450 455

<210> 23

<211> 243

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sequence of single chain antibody

<400> 23

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160
 Asn Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 165 170 175
 Gly Tyr Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 180 185 190
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asn Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 195 200 205

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 210 215 220
 Val Thr Thr Arg Tyr Leu Ala Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr
 225 230 235 240
 Val Ser Ser

<210> 24

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sequence of single chain antibody

<400> 24

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

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

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95
 Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile

100 105 110
 Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ser Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 130 135 140

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 145 150 155 160

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 165 170 175

Gly Met Ile His Pro Asn Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 180 185 190

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 195 200 205

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 210 215 220

Ala Arg Arg Tyr Tyr Gly Ser Ile Ser Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 225 230 235 240

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 245

<210> 25

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of signal peptide of chimeric antigen receptor

<400> 25

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

1 5 10 15
 Ala

<210> 26

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of CD8 hinge of chimeric antigen receptor

<400> 26

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala

1 5 10 15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly

 20 25 30

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp

 35 40 45

<210> 27

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of CD8TM of chimeric antigen receptor

<400> 27

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu

1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys

 20

<210> 28

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of ICOS of chimeric antigen receptor

<400> 28

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

1 5 10 15

Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser Arg

 20 25 30

Leu Thr Asp Val Thr Leu

 35

<210> 29

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of 4-1BB of chimeric antigen receptor

<400> 29

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met

1 5 10 15
 Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
 20 25 30
 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
 35 40

<210> 30

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of CD3^L of chimeric antigen receptor

<400> 30

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly

1 5 10 15

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

Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
 85 90 95
 Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
 100 105 110

Arg

<210> 31

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain of chimeric antibody IB6

<400> 31

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

 35 40 45

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

 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asn Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

 85 90 95

Val Thr Thr Arg Tyr Leu Ala Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr

 100 105 110

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

 115 120 125

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

 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala

145 150 155 160

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

 165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly

 180 185 190

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

<210> 32

<211> 220

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain of chimeric antibody IB6

<400> 32

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

1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser

 20 25 30
 Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80
 Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Asn

 85 90 95
 Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu

 100 105 110
 Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp

 115 120 125
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn

 130 135 140
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu

145 150 155 160
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp

 165 170 175
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr

 180 185 190
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 34

<211> 220

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain of chimeric antibody IE7

<400> 34

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

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

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

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

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

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

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 165 170 175

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

180

185

190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser

195

200

205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

215

220