(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0005991
(43) 공개일자 2025년01월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/30 (2006.01) *A61K 40/11* (2025.01)
A61K 40/31 (2025.01) *A61K 40/42* (2025.01)
A61K 47/68 (2017.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01) *C12N 5/0783* (2010.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/30 (2013.01)
A61K 40/11 (2025.01)
(21) 출원번호 10-2024-7031784
(22) 출원일자(국제) 2022년09월28일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년09월24일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2022/036260
(87) 국제공개번호 WO 2023/171009
국제공개일자 2023년09월14일
(30) 우선권주장
JP-P-2022-036463 2022년03월09일 일본(JP)

(71) 출원인
가부시키가이샤 큐어드
일본 가나가와켄 요코하마시 나카쿠 야마시타쵸 74-1
국립대학법인 홋가이도 다이가쿠
일본 홋가이도 삿포로시 기따꾸 기따 8죠 니시 5쪼메
고쿠리츠 다이가쿠 호우징 도우카이 고쿠리츠 다이가쿠 기코우
일본국 464-8601, 아이치켄 나고야시 치구사쿠 후로쵸 1
(72) 발명자
미치시타 마사히로
일본, 가나가와 2310023, 요코하마시, 나카구, 74-1 야마시타초, 큐어드 인코퍼레이티드 내
곤도 토루
일본, 홋카이도 0600808, 삿포로시, 키타구, 키타 8조 니시 5초메, 국립대학법인 홋가이도 대학 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
강철중

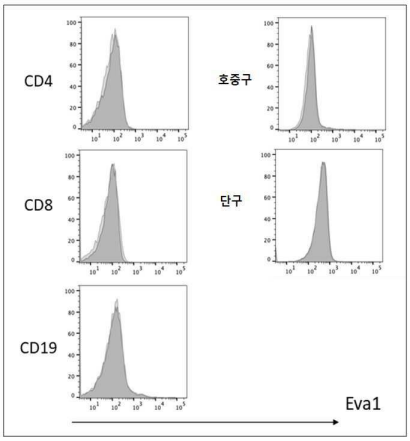
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **Eva1 단백질에 결합하는 인간화 항체 또는 이의 기능적 단편, 항체-약물 복합체 및 키메라 항원 수용체**

(57) 요 약

인간 유래의 Eva1 단백질에 결합하는 인간화 항체 또는 이의 기능적 단편, 상기 인간화 항체 또는 이의 기능적 단편을 포함하는 항체-약물 복합체, 또는 인간 유래의 Eva1 단백질에 결합하는 항체 또는 이의 기능적 단편을 포함하는 키메라 항원 수용체가 제공된다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 40/31 (2025.01)
A61K 40/42 (2025.01)
A61K 47/6803 (2023.08)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C12N 5/0636 (2025.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)
(72) 발명자
데라쿠라 세이타로
일본, 아이치 4648601, 나고야시, 치쿠사구, 후로초, 1, 국립대학법인 도카이 국립 고등교육 연구 시스템
오사키 마사히데
일본, 아이치 4648601, 나고야시, 치쿠사구, 후로초, 1, 국립대학법인 도카이 국립 고등교육 연구 시스템
키요이 히토시
일본, 아이치 4648601, 나고야시, 치쿠사구, 후로초, 1, 국립대학법인 도카이 국립 고등교육 연구 시스템

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호: 1에 기재된 아미노산 서열, Val-Thr-Ser로 이루어지는 아미노산 서열 및 서열번호: 3에 기재된 아미노산 서열을 각각 포함하는 상보성 결정 영역 1 내지 3을 포함하는 경쇄 가변 영역과, 서열번호 4 내지 6에 기재된 아미노산 서열을 각각 포함하는 상보성 결정 영역 1 내지 3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 갖고, 인간 유래의 Eva1 단백질에 결합하는 인간화 항체 또는 이의 기능적 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 경쇄 가변 영역이, 서열번호: 7 내지 10에 기재된 아미노산 서열, 서열번호: 7 내지 10에 기재된 아미노산 서열에 대하여 80% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열 및 서열번호: 7 내지 10에 기재된 아미노산 서열 중 적어도 어느 하나에 있어서 1개 또는 수 개의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입된 아미노산 서열로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 포함하고,

상기 중쇄 가변 영역이, 서열번호: 13 내지 16에 기재된 아미노산 서열, 서열번호: 13 내지 16에 기재된 아미노산 서열에 대하여 80% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열 및 서열번호: 13 내지 16에 기재된 아미노산 서열 중 적어도 어느 하나에 있어서, 1개 또는 수 개의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입된 아미노산 서열로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 포함하는, 인간화 항체 또는 이의 기능적 단편.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 경쇄 가변 영역이, 서열번호: 7에 기재된 아미노산 서열, 서열번호: 7에 기재된 아미노산 서열에 대하여 80% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열, 및, 서열 번호: 7에 기재된 아미노산 서열 중 적어도 어느 하나에 있어서, 1개 또는 수 개의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입된 아미노산 서열로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 포함하고,

상기 중쇄 가변 영역이, 서열번호 13에 기재된 아미노산 서열, 서열번호 13에 기재된 아미노산 서열에 대하여 80% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열, 및 서열번호 13에 기재된 아미노산 서열 중 적어도 하나에 있어서 1개 또는 수 개의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입된 아미노산 서열로부터 선택된 하나의 아미노산 서열을 포함하는, 인간화 항체 또는 이의 기능적 단편.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 기재된 항체 또는 이의 기능적 단편과 약물을 결합시켜 이루어지는 항체-약물 복합체.

청구항 5

제4항에 기재된 항체-약물 복합체를 포함하는 약학 조성물.

청구항 6

인간 유래의 Eva1 단백질에 결합하는 영역, 막 관통 영역 및 세포 내 신호 영역을 포함하는 키메라 항원 수용체.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 인간 유래의 Eva1 단백질에 결합하는 영역이 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 기재된 항체 또는 이의 기능적 단편을 포함하는 영역인, 키메라 항원 수용체.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 인간 유래의 Eva1 단백질에 결합하는 영역이, 아미노 말단측으로부터 순서대로, 경쇄 가

변 영역, 링커, 중쇄 가변 영역이 결합하여 이루어지는 단쇄 가변 영역 단편을 포함하고,

상기 경쇄 가변 영역이,

서열번호 : 1에 기재된 아미노산 서열, Val-Thr-Ser로 이루어지는 아미노산 서열 및 서열번호 : 3에 기재된 아미노산 서열을 각각 포함하는 상보성 결정 영역 1 내지 3을 포함하고,

서열번호: 7에 기재된 아미노산 서열, 서열번호: 7에 기재된 아미노산 서열에 대하여 80% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열, 및 서열번호: 7에 기재된 아미노산 서열 중 적어도 어느 하나에 있어서 1개 또는 수 개의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입된 아미노산 서열로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 포함하고,

상기 중쇄 가변 영역이,

서열번호 : 4 내지 6에 기재된 아미노산 서열을 각각 포함하는 상보성 결정 영역 1 내지 3을 포함하고,

서열번호: 13에 기재된 아미노산 서열, 서열번호: 13에 기재된 아미노산 서열에 대하여 80% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열, 및 서열번호: 13에 기재된 아미노산 서열 중 적어도 어느 하나에 있어서 1개 또는 수 개의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입된 아미노산 서열로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 포함하는, 키메라 항원 수용체.

청구항 9

제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간 유래의 Eva1 단백질에 결합하는 영역과 상기 막 관통 영역이, 10 내지 300개의 아미노산으로 이루어지는 스페이서를 통해 결합하고 있는, 키메라 항원 수용체.

청구항 10

제6항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 내 신호 영역이 CD79A 세포 내 영역 및 CD40 세포 내 영역을 포함하는, 키메라 항원 수용체.

청구항 11

제6항 내지 제10항 중 어느 한 항에 기재된 키메라 항원 수용체를 코딩하는 뉴클레오티드.

청구항 12

제11항에 기재된 뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

청구항 13

제6항 내지 제10항 중 어느 한 항에 기재된 키메라 항원 수용체를 발현하는 세포.

청구항 14

제13항에 있어서, 면역세포인 세포.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 기재된 세포를 포함하는 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 인간 유래의 Eva1 단백질 (인간 Eva1)에 결합하는 인간화 항체 또는 이의 기능적 단편에 관한 것이다. 본 발명은 또한 인간화 항체 또는 이의 기능적 단편을 포함하는 항체-약물 복합체에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 인간 Eva1에 결합하는 항체 또는 이의 기능적 단편을 포함하는 키메라 항원 수용체에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 암은 관상동맥질환과 함께 선진국에서 주된 사인이며, 그 비율도 해마다 증가하고 있다. 그 때문에, 암의 근절

요법의 시급한 개발이 희망되고 있다. 암 뿌리 치료법의 개발에서 암 줄기 세포의 존재가 최근 중요시되고 있다. 암 줄기세포는 암 조직의 극히 일부에만 존재하고 있지만, 자기 복제를 반복하여 더욱 분화함으로써 대다수의 암세포를 창출하는 근원이 되고 있다고 생각되고 있다. 또한, 이러한 강한 종양 형성능을 갖는 한편, 암 줄기세포는 화학요법, 방사선요법에 대하여 강한 내성능을 가지고 있는 것이 시사되고 있다. 그 때문에, 화학요법, 방사선 요법에 의해 암 조직에 있어서 대부분의 암세포가 사멸할 수 있었다고 해도 암 줄기세포가 잔존하는 것에 의해 암의 재발, 전이 등이 발생하게 된다. 암 줄기세포를 표적으로 하여 그것도 사멸시킬 수 있다면 암의 전이나 재발 등의 방지에도 유용한 치료법의 개발로 이어질 것으로 기대되고 있다.

[0003] 이러한 상황을 감안하여, 본 발명자들은 글리오마 및 그 암 줄기세포에서 고발현하고 있는 단백질로서 Eval 단백질을 확인하는데 성공하고 있다. 또한, 이 Eval 단백질의 발현은 글리오마의 악성도와 상관관계가 있으며, 글리오마 환자의 생존율과 환자 유래의 글리오마에서의 Eval 유전자의 발현 사이에는 강한 상관관계가 있음이 밝혀졌다. 또한, Eval 유전자의 기능의 억제가 글리오마 세포의 증식능, 종양 형성능 및 조직 침윤능, 및 글리오마 줄기 세포의 종양 덩어리 형성능의 억제에 있어서 유효하다는 것을 발견하고 있다(특허문헌 1).

[0004] 또한, 암에서 상기 글리오마는 최근 수십 년 동안 수술을 기본으로 방사선 치료 및 화학 요법을 보조 요법으로 하는 치료가 거의 변하지 않았으며, 특히 중추 신경계 조직에서 악성 글리오마 중 가장 악성도 높은 다형성 신경 교모종 (GBM, glioblastoma multiforme)에 대한 효과적인 치료법은 아직 발견되지 않았다. 또한, 악성 글리오마에 대한 표준 치료제로서 테모졸로미드가 사용되고 있지만, 유효 혈중 농도의 수 배의 테모졸로미드에 대해서도 글리오마 줄기세포는 비감수성임을 발명자들은 확인하고 있다. 또한, 이러한 화학요법제에 노출된 암세포는 글리오마에 한정되지 않고, 그것에 대한 내성이 생기고, 다른 복수의 화학요법제에 대해서도 마찬가지로 교차 내성이 생기는 경우도 많다. 또한, 화학요법제는 정상 세포에 대해서도 세포독성을 일으키는 경우가 많고, 이러한 부작용을 저감하기 때문에, 화학요법제의 용량 또는 용법은 종종 제한된다.

[0005] 이러한 현상으로부터, 최근 항암제로서의 항체의 이용이 주목되어, 그 중요성이 인정되고 있다. 예를 들어, 암 특이적인 항원을 표적으로 한 항체라면, 투여한 항체는 암 조직에 집적되는 것으로 추정되므로 항체 의존성 세포독성(ADCC) 활성과 보체 의존성 세포독성 (CDC) 활성에 의한 면역계를 통한 암세포에 대한 공격을 기대할 수 있다.

[0006] 또한, 항체에 세포 독성 물질이나 방사성 핵종 등의 약제를 결합해 두는 것(소위, 항체-약물 복합체(ADC)의 형태를 취하는 것)에 의해 결합한 약제를 효율적으로 종양 부위에 송달하는 것이 가능하다. 이로 인해 다른 조직에 대한 약물 도달량을 줄이고 부작용을 줄일 수 있다.

[0007] 또, 암 특이적 항원에 세포사를 유도하는 활성이 있는 경우는 효능적 활성을 갖는 항체를 투여함으로써, 또한 암 특이적 항원이 세포의 증식 및 생존에 관여하는 경우는 중화 활성을 갖는 항체를 투여함으로써 종양 특이적인 항체의 집적과 항체의 활성에 의해 암의 증식 정지 또는 퇴축을 기대할 수 있다.

[0008] 또한, 항체의 가변 영역을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현시킨 T 세포 (CAR-T)를 투여함으로써, 상기 세포는 표적 항원 양성 암 세포에 대해 HLA 독립적으로 활성화하고 세포 사멸을 유도하는 것도 예상된다.

[0009] 이러한 특성으로부터, 항체는 항암제로서의 적용에 적합하다고 생각되고 있으며, 본 발명자들도 상술한 Eval을 표적으로 하는 항체 의약의 창출을 목적으로 고친화성 항인간 Eval 마우스 항체를 제조(제작)하고, 그 효능을 나타내고 있다(특허문헌 2).

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) [특허문헌 1] 국제공개 제2012/043747호

(특허문헌 0002) [특허문헌 2] 국제공개 제2017/022668호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 암 치료 등에 유용한 항체 또는 이의 기능적 단편, 또는 상기 항체 또는 이의 기능적 단편을 포함하

는 복합체를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명자들은, 항인간 Eva1 마우스 항체(특허문헌 2에 기재된 B2E5-48 마우스 항체)를 인간화하는 것을 시도하고, 인간화한 중쇄 가변 영역 4종(H1~H4) 및 경쇄 가변 영역 4종(L1~L4)을 조합하여 16종류의 인간화 항체를 제조하였다. 그 결과, Eva1 단백질에 대한 결합 친화성이 높고, 또한 생산능(항체가)이 높은 인간화 항체(H2-L2, H2-L4, H3-L4 등의 조합)를 얻는데 성공하였다.

[0013] 또한, 항인간 Eva1 항체의 가변 영역을 포함한 키메라 항원 수용체(CAR)를 제조하고, 그 효능을 평가하였다. 그 결과, 이러한 CAR을 발현시킨 T 세포(CAR-T)는 인간 Eva1에 따른 활성화(사이토카인 생산) 및 세포 증식을 나타냈다. 또한, Eva1 단백질 발현 종양 세포에 대한 세포독성 활성을 나타내는 것이 밝혀졌다.

[0014] 또한, B2E5-48 마우스 항체의 가변 영역을 포함한 CAR에서, 해당 가변 영역을 포함하는 항원 결합성 영역과 막관통 영역 사이의 스페이서 길이를 변경하여 평가한 결과, 이러한 CAR을 발현하는 T 세포를 IL-2가 없는 상태에서 배양한 경우, 스페이서 길이를 232 아미노산으로 하는 CAR-T가 세포 증식 및 사이토카인 생산에서 가장 우수하다는 것이 밝혀졌다. 한편, IL-2 존재 하에서 배양한 경우에는 15 아미노산으로 이루어진 스페이서를 갖는 CAR-T의 세포 증식이 가장 좋았다.

[0015] 또한, 상기 인간화 항체의 가변 영역을 포함한 CAR에 있어서, 인간 Eva1에 따른 활성화 및 세포 증식 등의 관점에서 L2-H2의 조합이 가장 유용하다는 것을 발견하였다. 또한, 항원 인식 부위를 L2-H2로 하는 CAR-T에 관하여, 다양한 세포내 도메인을 시험하고, 그 차이에 의한 반응성의 차이를 평가한 결과, 세포 증식에 있어서 4-1BB, CD79A/CD40의 세포 내 도메인을 갖는 CAR이 우수한 것이 밝혀졌다. 또한, 담암 모델에 상기 CAR-T(L2-H2 hEva1-CAR-T)를 투여하여, 그 항종양 활성 및 안전성을 확인하였다.

[0016] 또한, 상기 인간화 항체를 포함하는 항체-약물 복합체(ADC)를 제조하고, 그 효능을 평가하였다. 그 결과 당해 ADC의 글리오마, 췌장암, 위암 등 다양한 종양에 대한 항종양 활성이 확인되었다. 한편, 투여한 생체에 대한 악영향(체중의 감소, 생존 기간의 단축 등)은 인정되지 않았다.

[0017] 본 발명은 상기 검토 결과에 기초하고, 보다 구체적으로는 이하의 양태를 제공한다.

[0018] <1> 서열번호: 1에 기재된 아미노산 서열, Val-Thr-Ser로 이루어지는 아미노산 서열 및 서열번호: 3에 기재된 아미노산 서열을 각각 포함하는 상보성 결정 영역 1 내지 3을 포함하는 경쇄 가변 영역과, 서열번호 4 내지 6에 기재된 아미노산 서열을 각각 포함하는 상보성 결정 영역 1 내지 3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 갖고, 인간 유래의 Eva1 단백질에 결합하는 인간화 항체 또는 이의 기능적 단편.

[0019] <2> 상기 경쇄 가변 영역이, 서열번호: 7 내지 10에 기재된 아미노산 서열, 서열번호: 7 내지 10에 기재된 아미노산 서열에 대하여 80% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열 및 서열번호: 7 내지 10에 기재된 아미노산 서열 중 적어도 어느 하나에 있어서 1개 또는 수 개의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입된 아미노산 서열로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 포함하고,

[0020] 상기 중쇄 가변 영역이, 서열번호: 13 내지 16에 기재된 아미노산 서열, 서열번호: 13 내지 16에 기재된 아미노산 서열에 대하여 80% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열 및 서열번호: 13 내지 16에 기재된 아미노산 서열 중 적어도 어느 하나에 있어서, 1개 또는 수 개의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입된 아미노산 서열로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 포함하는, 상기 <1>에 기재된 인간화 항체 또는 이의 기능적 단편.

[0021] <3> 상기 경쇄 가변 영역이, 서열번호: 7에 기재된 아미노산 서열, 서열번호: 7에 기재된 아미노산 서열에 대하여 80% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열, 및, 서열 번호: 7에 기재된 아미노산 서열 중 적어도 어느 하나에 있어서, 1개 또는 수 개의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입된 아미노산 서열로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 포함하고,

[0022] 상기 중쇄 가변 영역이 서열번호 13에 기재된 아미노산 서열, 서열번호 13에 기재된 아미노산 서열에 대하여 80% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열, 및 서열번호 13에 기재된 아미노산 서열 중 적어도 하나에 있어서 1개 또는 수 개의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입된 아미노산 서열로부터 선택된 하나의 아미노산 서열을 포함하는 상기 <1>에 기재된 인간화 항체 또는 이의 기능적 단편.

[0023] <4> 상기 <1> 내지 <3> 중 어느 하나에 기재된 항체 또는 이의 기능적 단편과 약물을 결합시켜 이루어지는 항체-약물 복합체.

[0024] <5> 상기 <4>에 기재된 항체-약물 복합체를 포함하는 약학 조성물.

[0025] <6> 인간 유래의 Eva1 단백질에 결합하는 영역, 막 관통 영역 및 세포 내 신호 영역을 포함하는 키메라 항원 수용체.

[0026] <7> 상기 인간 유래의 Eva1 단백질에 결합하는 영역이 상기 <1> 내지 <3> 중 어느 한 항에 기재된 항체 또는 이의 기능적 단편을 포함하는 영역인, 상기 <6>에 기재된 키메라 항원 수용체.

[0027] <8> 상기 인간 유래의 Eva1 단백질에 결합하는 영역이, 아미노 말단측으로부터 순서대로, 경쇄 가변 영역, 링커, 중쇄 가변 영역이 결합하여 이루어지는 단쇄 가변 영역 단편을 포함하고,

[0028] 상기 경쇄 가변 영역이,

[0029] 서열번호 : 1에 기재된 아미노산 서열, Val-Thr-Ser로 이루어지는 아미노산 서열 및 서열번호 : 3에 기재된 아미노산 서열을 각각 포함하는 상보성 결정 영역 1 내지 3을 포함하고,

[0030] 서열번호: 7에 기재된 아미노산 서열, 서열번호: 7에 기재된 아미노산 서열에 대하여 80% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열, 및 서열번호: 7에 기재된 아미노산 서열 중 적어도 어느 하나에 있어서 1개 또는 수 개의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입된 아미노산 서열로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 포함하고,

[0031] 상기 중쇄 가변 영역이,

[0032] 서열번호 : 4 내지 6에 기재된 아미노산 서열을 각각 포함하는 상보성 결정 영역 1 내지 3을 포함하고,

[0033] 서열번호: 13에 기재된 아미노산 서열, 서열번호: 13에 기재된 아미노산 서열에 대하여 80% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열, 및 서열번호: 13에 기재된 아미노산 서열 중 적어도 어느 하나에 있어서 1개 또는 수 개의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입된 아미노산 서열로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 포함하는, 상기 <6>에 기재된 키메라 항원 수용체.

[0034] <9> 상기 인간 유래의 Eva1 단백질에 결합하는 영역과 상기 막 관통 영역이, 10 내지 300개의 아미노산으로 이루어지는 스페이서를 통해 결합하고 있는, 상기 <6> 내지 <8> 중 어느 하나에 기재된 키메라 항원 수용체.

[0035] <10> 상기 세포 내 신호 영역이 CD79A 세포 내 영역 및 CD40 세포 내 영역을 포함하는, 상기 <6> 내지 <9> 중 어느 하나에 기재된 키메라 항원 수용체.

[0036] <11> 상기 <6> 내지 <10> 중 어느 하나에 기재된 키메라 항원 수용체를 코딩하는 뉴클레오티드.

[0037] <12> 상기 <11>에 기재된 뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

[0038] <13> 상기 <6> 내지 <10> 중 어느 하나에 기재된 키메라 항원 수용체를 발현하는 세포.

[0039] <14> 면역세포인, 상기 <13>에 기재된 세포.

[0040] <15> 상기 <13> 또는 <14>에 기재된 세포를 포함하는 약학 조성물.

[0041] 각 서열번호에 기재된 서열은 다음과 같다.

표 1

[0042]

서열 번호:	서열의 명칭
1	경쇄의 CDR1 (인간화 B2E5-48)
2	경쇄의 CDR2 (인간화 B2E5-48)
3	경쇄의 CDR3 (인간화 B2E5-48)
4	중쇄의 CDR1 (인간화 B2E5-48)
5	중쇄의 CDR2 (인간화 B2E5-48)
6	중쇄의 CDR3 (인간화 B2E5-48)
7	경쇄 2의 가변 영역 (인간화 B2E5-48)
8	경쇄 4의 가변 영역 (인간화 B2E5-48)
9	경쇄 1의 가변 영역 (인간화 B2E5-48)
10	경쇄 3의 가변 영역 (인간화 B2E5-48)
11	경쇄 2의 가변 영역 (인간화 B2E5-48) cDNA
12	경쇄 4의 가변 영역 (인간화 B2E5-48) cDNA
13	중쇄 2의 가변 영역 (인간화 B2E5-48)
14	중쇄 4의 가변 영역 (인간화 B2E5-48)
15	중쇄 1의 가변 영역 (인간화 B2E5-48)
16	중쇄 3의 가변 영역 (인간화 B2E5-48)
17	중쇄 2의 가변 영역 (인간화 B2E5-48) cDNA
18	중쇄 3의 가변 영역 (인간화 B2E5-48) cDNA

표 2

[0043]

서열 번호:	서열의 명칭
19	단일 펩티드 및 경쇄의 가변 영역 (B2E5-48) cDNA
20	단일 펩티드 및 경쇄의 가변 영역 (B2E5-48)
21	경쇄의 가변 영역 (B2E5-48)
22	경쇄의 CDR1 (B2E5-48)
23	경쇄의 CDR2 (B2E5-48)
24	경쇄의 CDR3 (B2E5-48)
25	단일 펩티드 및 중쇄의 가변 영역 (B2E5-48) cDNA
26	단일 펩티드 및 중쇄의 가변 영역 (B2E5-48)
27	중쇄의 가변 영역 (B2E5-48)
28	중쇄의 CDR1 (B2E5-48)
29	중쇄의 CDR2 (B2E5-48)
30	중쇄의 CDR3 (B2E5-48)
31	단일 펩티드 및 경쇄의 가변 영역 (C3) cDNA
32	단일 펩티드 및 경쇄의 가변 영역 (C3)
33	경쇄의 가변 영역 (C3)
34	경쇄의 CDR1 (C3)
35	경쇄의 CDR2 (C3)
36	경쇄의 CDR3 (C3)
37	단일 펩티드 및 중쇄의 가변 영역 (C3) cDNA
38	단일 펩티드 및 중쇄의 가변 영역 (C3)
39	중쇄의 가변 영역 (C3)
40	중쇄의 CDR1 (C3)
41	중쇄의 CDR2 (C3)
42	중쇄의 CDR3 (C3)
43	경쇄의 가변 영역 (A5D11-10) cDNA
44	경쇄의 가변 영역 (A5D11-10)
45	경쇄의 CDR1 (A5D11-10)
46	경쇄의 CDR2 (A5D11-10)
47	경쇄의 CDR3 (A5D11-10)
48	중쇄의 가변 영역 (A5D11-10) cDNA
49	중쇄의 가변 영역 (A5D11-10)
50	중쇄의 CDR1 (A5D11-10)
51	중쇄의 CDR2 (A5D11-10)
52	중쇄의 CDR3 (A5D11-10)
53	hEval cDNA
54	hEval
55	mEval cDNA
56	mEval

표 3

[0044]

서열 번호:	서열의 명칭
57	B2E5-48 CAR cDNA
58	B2E5-48 CAR
59	Hinge region:15aa
60	Hinge region:30aa
61	Hinge region:60aa
62	Hinge region:125aa
63	Hinge region:232aa
64	4-1BB IC
65	CD79A IC
66	CD40 IC

[0045] 또한, 표 1에 나타내는 바와 같이, 서열번호: 2는 경쇄의 CDR2(인간화 B2E5-48)의 아미노산 서열(N 말단부터 순서대로, 발린-트레오닌-세린으로 이루어지는 아미노산 서열)을 의도한 것이다(표 7 참조). 그러나, 상기 서열은 4개 미만(3개)의 아미노산의 서열이 되기 때문에, 서열표에 있어서는 「의도적으로 건너뛴(스킵된) 서열」로 취급되고 있다.

발명의 효과

[0046] 본 발명에 따르면, 인간 Eva1을 표적화함으로써 암 등을 치료 또는 예방하는 것이 가능해진다.

도면의 간단한 설명

[0047] 도 1은 정상 인간 혈액 세포에서 인간 Eva1의 발현을 분석한 결과를 나타내는 히스토그램이다.

도 2a는 다양한 종양 세포에서 인간 Eva1의 발현을 분석한 결과를 나타내는 히스토그램이다.

도 2b는 간 내 담관암 예시 (검체 1~3)에서의 인간 Eva1의 발현을 해석한 결과를 나타내는 히스토그램이다.

도 3a는 항-Eva1 항체 서열을 이용한 키메라 항원 수용체 (Eva1-CAR)의 개요를 나타내는 도면이다.

도 3b는 Eva1-CAR 발현 T 세포 (Eva1-CAR-T)의 제조 스케줄의 개요를 나타내는 도면이다.

도 3c는 tEGFR의 발현을 지표로 한 선발 (tEGFR 선택(selection)) 전의 Eva1-CAR 유전자의 도입 효율을 해석한 결과를 나타내는 도트(점) 플롯도이다.

도 3d는 tEGFR 선택 전의 Eva1-CAR 유전자의 도입 효율을 분석한 결과를 나타내는 도트 플롯도이다. 도면 중, 도트는 상기 Eva1-CAR 유전자를 도입한 세포의 유래(5명의 건강한 사람)를 각각 나타낸다. 굵은 선은 평균값을 나타내고 위 아래로 표시돼 있는 工 모양은 표준 오차를 나타낸다.

도 3e는 Eva1-CAR-T의 각종 종양 세포에 대한 사이토카인 (IFN-γ) 생산을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다. 도면 중, 횡축에 있어서 도입한 Eva1-CAR 마다 좌측으로부터 순서대로 CFPAC-1, NCI-H1975, HuCCT-1, MCF7, HepG2, Huh7, OVTOKO, T98G, PA1에 대한 결과를 나타낸다.

도 3f는 Eva1-CAR에서 6 종류의 길이가 다른 스페이서의 개요를 나타내는 도면이다. 도 3f에 도시된 "H00" 내지 "H232"의 표기는 도 3g 내지 3m의 이들에 대응한다.

도 3g는 tEGFR 선택 전의 Eva1-CAR 유전자의 도입 효율을 분석한 결과를 나타내는 도트 플롯도이다. 도면 중, 도트는 상기 Eva1-CAR 유전자를 도입한 세포의 유래(5명의 건강한 사람)를 각각 나타낸다. 굵은 선은 평균값을 나타내고 위 아래로 표시돼 있는 工 모양은 표준 오차를 나타낸다.

도 3h는 tEGFR 선택 후 Eva1-CAR 유전자의 도입 효율을 분석한 결과를 나타내는 도트 플롯도이다. 도면 중, 도트는 상기 Eva1-CAR 유전자를 도입한 세포의 유래(5명의 건강한 사람)를 각각 나타낸다. 굵은 선은 평균값을 나타내고 위 아래로 표시돼 있는 工 모양은 표준 오차를 나타낸다.

도 3i는 Eva1-CAR-T의 각종 종양 세포에 대한 사이토카인 생산을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다. 도면 중, 좌측 그래프에서 IFN-γ 생산을 해석한 결과를 나타내고, 우측 그래프에서 IL-2 생산을 해석한 결과를 나타낸다. 도입된 Eva1-CAR 마다, 왼쪽으로부터 순서대로 HuCCT-1, CFPAC-1, HepG2, OVTOKO에 대한 결과를 나타낸다.

도 3j는 IL-2 부재 하에 항원 자극 후 Eva1-CAR-T의 증폭 효율을 나타내는 그래프이다. 도면 중, 횡축은 항원 자극 (Eva1 양성인 HuCCT-1과의 공동 배양)을 개시한 후의 일 수를 나타낸다. 종축은 Eva1-CAR-T의 세포 수를 나타낸다.

도 3k는 IL-2 부재 하에 항원 자극 후 Eva1-CAR-T의 증폭 효율을 나타내는 그래프이다. 도면 중, 횡축은 도입한 CAR의 종류를 나타낸다. 종축은 Eva1-CAR-T의 세포 수를 나타낸다.

도 3l은 IL-2의 존재 하에서 항원 자극 후 Eva1-CAR-T의 증폭 효율을 나타내는 그래프이다. 도면 중, 횡축은 항원 자극 (Eva1 양성인 HuCCT-1과의 공동 배양)을 개시한 후의 일 수를 나타낸다. 종축은 Eva1-CAR-T의 세포 수를 나타낸다.

도 3m은 IL-2 존재 하에서 항원 자극 후 Eva1-CAR-T의 증폭 효율을 나타내는 그래프이다. 도면 중, 횡축은 도입한 CAR의 종류를 나타낸다. 종축은 Eva1-CAR-T의 세포 수를 나타낸다.

도 4a는 tEGFR 선택 전의 항Eva1 인간화 항체 서열을 이용한 Eva1-CAR(hEva1-CAR) 유전자의 도입 효율을 해석한 결과를 나타내는 도트 플롯도이다. 도면 중, 도트는 상기 hEva1-CAR 유전자를 도입한 세포의 유래(4명의 건강한 사람)를 각각 나타낸다. 위 아래로 표시돼 있는 工 모양은 표준 오차를 나타내고, 위 아래로 표시돼 있는 工 모양에 끼인 중간 선은 평균값을 나타낸다.

도 4b는 tEGFR 선택 후의 hEva1-CAR-T의 증폭 효율을 분석한 결과를 나타내는 도트 플롯도이다. 도면 중, 도트는 상기 hEva1-CAR 유전자를 도입한 세포의 유래(4명의 건강한 사람)를 각각 나타낸다. 위 아래로 표시돼 있는 工 모양은 표준 오차를 나타내고, 위 아래로 표시돼 있는 工 모양에 끼인 중간 선은 평균값을 나타낸다.

도 4c는 hEva1-CAR-T의 다양한 종양 세포에 대한 IFN-γ 생산을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다. 도입된 Eva1-CAR마다, 왼쪽으로부터 순서대로 HuCCT-1, CFPAC-1, HepG2, OVTOKO에 대한 결과를 나타낸다.

도 4d는 hEva1-CAR-T의 다양한 종양 세포에 대한 IL-2 생산을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다. 도입된 Eva1-CAR마다, 왼쪽으로부터 순서대로 HuCCT-1, CFPAC-1, HepG2, OVTOKO에 대한 결과를 나타낸다.

도 4e는 항원 자극 후 hEva1-CAR-T의 증폭 효율을 나타내는 그래프이다. 도면에서 왼쪽에는 IL-2가 없는 경우 결과가 표시되고, 오른쪽에는 IL-2가 있는 경우 결과가 표시된다. 각 그래프에서 횡축은 항원 자극 (Eva1 양성인 HuCCT-1과의 공동 배양)을 시작한 후의 일 수를 나타낸다. 종축은 hEva1-CAR-T의 세포 수를 나타낸다.

도 4f는 세포 내 도메인 및 스페이서 길이가 다른 6 종류의 hEva1-CAR-T (항원 인식 부위 : L2H2)의 개요를 나타내는 도면이다.

도 4g는 tEGFR 선택 전의 hEva1-CAR 유전자의 도입 효율을 분석한 결과를 나타내는 도트 플롯도이다. 도면 중, 도트는 상기 hEva1-CAR 유전자를 도입한 세포의 유래(5명의 건강한 사람)를 각각 나타낸다. 중간 선은 평균값을 나타낸다. 횡축에서의 "28", "41" 및 "79"는 각 CAR이 갖는 세포 내 도메인이 각각 "CD28IC", "4-1BBIC" 및 "CD79A/CD40IC"임을 나타낸다. 또한, "-S" 및 "-L"은 각각 스페이서가 도 4f에 도시된 "H15" 및 "H232"임을 나타낸다.

도 4h는 hEva1-CAR-T의 다양한 종양 세포에 대한 IFN-γ 생산을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다. 도입된 Eva1-CAR마다, 왼쪽에서 순서대로 OVTOKO, CFPAC-1, HepG2, HuCCT, MCF7에 대한 결과를 나타낸다. 횡축에서의 "28", "41" 및 "79"는 각 CAR이 갖는 세포 내 도메인이 각각 "CD28IC", "4-1BBIC" 및 "CD79A/CD40IC"임을 나타낸다. 또한, "-S" 및 "-L"은 각각 스페이서가 도 4f에 도시된 "H15" 및 "H232"임을 나타낸다.

도 4i는 hEva1-CAR-T의 다양한 종양 세포에 대한 IL-2 생산을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다. 도입된 Eva1-CAR마다, 왼쪽에서 순서대로 OVTOKO, CFPAC-1, HepG2, HuCCT, MCF7에 대한 결과를 나타낸다. 횡축에서의 "28", "41" 및 "79"는 각 CAR이 갖는 세포 내 도메인이 각각 "CD28IC", "4-1BBIC" 및 "CD79A/CD40IC"임을 나타낸다. 또한, "-S" 및 "-L"은 각각 스페이서가 도 4f에 도시된 "H15" 및 "H232"임을 나타낸다.

도 4j는 항원 자극 후 hEva1-CAR-T의 증폭 효율을 나타내는 그래프이다. 도면에서 왼쪽 그래프는 IL-2가 없는 경우의 결과를 나타내고, 오른쪽 그래프는 IL-2가 없는 경우의 결과를 보여준다. 각 그래프에서 횡축에 항원 자극 (Eva1 양성인 HuCCT-1과의 공동 배양)을 시작한 후의 일 수를 나타낸다. 종축은 hEva1-CAR-T의 세포 수를 나타낸다. 또한, 일예에서 "28", "41"및 "79"는 각 CAR이 갖는 세포 내 도메인이 각각 "CD28IC", "4-1BBIC" 및 "CD79A / CD40IC"임을 나타낸다. 또한, "-S" 및 "-L"은 각각 스페이서가 도 4f에 도시된 "H15" 및 "H232"임을 나타낸다.

도 4k는 hEva1-CAR-T와 Eva1 양성 골수종 세포 (RPMI-8226)의 공동 배양 시험의 결과를 나타내는 그래프이다. 도면 중, 좌측의 그래프에 있어서, 기증자(donor, 도너) 2의 말초 혈액으로부터 제조한 hEva1-CAR-T의 결과를 나타내고, 우측의 그래프에 있어서, 기증자 3의 말초 혈액으로부터 제조한 hEva1-CAR-T의 결과를 나타낸다. 각 그래프의 종축은 전체 세포에서 차지하는 종양 세포의 비율을 나타낸다. 가로축은 공동 배양을 시작한 후의 시간을 나타낸다.

또한, 일예에서 "28", "41" 및 "79"는 각 CAR이 갖는 세포 내 도메인이 각각 "CD28IC", "4-1BBIC" 및 "CD79A/CD40IC"임을 나타낸다. 또한, "s" 및 "L"은 각각 스페이서가 도 4f에 도시된 "H15" 및 "H232"임을 나타낸다.

도 4l은 hEva1-CAR-T와 51Cr로 표지된 각종 종양 세포주를 공동 배양하여 세포 독성 활성을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다. 도면에서 종축은 배양 상등액 중 51Cr 방출량에 기초한 손상된 세포의 비율을 나타낸다. 횡축에서 다양한 종양 세포주는 Eva1의 발현이 음성인지 양성인지를 보여준다. 일예에서 "41"과 "79"는 각 CAR이 갖는 세포 내 도메인이 각각 "4-1BBIC" 및 "CD79A/CD40IC"임을 나타낸다. 또한, "S" 및 "L"은 각각 스페이서가 도 4f에 도시된 "H15" 및 "H232"임을 나타낸다.

도 4m은 도 4l에 나타낸 결과에 기초하여, 각종 종양 세포주에서의 인간 Eva1의 발현량과 각종 종양 세포주에 대한 hEva1-CAR-T의 세포 독성 활성과의 상관성을 해석한 결과를 나타내는 그래프이다. 도면에서 종축은 배양 상등액 중 51Cr 방출량에 기초한 손상된 세포의 비율을 나타낸다. 횡축에서, 다양한 종양 세포주에서 항-인간 Eva1 항체를 이용한 유동 세포 계측법 분석에 의해 수득된 평균 형광 강도(MFI)를 나타내며, 이는 Eva1 발현량과 상관관계가 있다. 일예에서 "41" 및 "79"는 각 CAR이 갖는 세포 내 도메인이 각각 "4-1BBIC" 및 "CD79A/CD40IC"임을 나타낸다. 또한, "S" 및 "L"은 각각 스페이서가 도 4f에 도시된 "H15" 및 "H232"임을 나타낸다.

도 4n은 서로 다른 두 명의 기증자 (기증자 A, 기증자 B)로부터 유래된 말초 혈액으로부터 제조된 L2H2 hEva1-CAR-T를 반딧불이·루시퍼라제 유전자가 도입된 인간 폐 선암 세포주 (H1975)를 운반하는 마우스에 도입하고, 상기 CAR-T의 항 종양 활성을 생물 발광 이미징에 의해 분석하였다. 그 결과를 보여주는 도면이다. L2H2 hEva1-CAR로서, 항원 인식 부위(L2H2)와 막 관통·세포 내 도메인(4-1BB 또는 CD79A/CD40을 포함하는 도메인)을 쇼트 스페이서(도면 중 "short hinge(쇼트 힌지)"로 표기, 도 4f에 나타내는 "H15")로 연결한 것을 이용하였다. 대조군으로서, tEGFR 도입 세포(tEGFR만을 유전자 도입한 Mock CAR-T 세포)의 투여 예도 제조하여 분석하였다. 또한, 도면 중의 "Day(일)"은 CAR-T를 투여한 후의 일 수를 나타낸다. 또한, 4-1BB를 막 관통·세포 내 도메인에 포함하는 L2H2 hEva1-CAR-T의 투여예의 「Day14」에 있어서, 2마리 적게 되어 있지만, 실험 수술의 문제에 의해 사망한 것에 의한다. 발광 스펙트럼은 도 4p 및 4r에도 적용된다.

도 4o는 서로 다른 2명의 기증자(기증자 A, 기증자 B)로부터 유래된 말초 혈액으로부터 제조한 L2H2 hEva1-CAR-T를, 반딧불이·루시퍼라제 유전자가 도입된 인간 췌장암 세포주(CFPAC1)를 담지하는 마우스에 도입하고, 해당 CAR-T의 항 종양 활성을 생물 발광 이미징에 의해 분석한 결과를 나타내는 도면이다. L2H2 hEva1-CAR로서, 항원 인식 부위(L2H2)와 막 관통·세포 내 도메인(4-1BB 또는 CD79A/CD40을 포함하는 도메인)을 쇼트 힌지로 연결한 것을 이용하였다. 대조군으로서, tEGFR 도입 세포의 투여예도 제조하여 분석하였다. 또한, 도면 중의 "Day(일)"은 CAR-T를 투여한 후의 일 수를 나타낸다. 발광 스펙트럼은 도 4p 및 4r에도 적용된다.

도 4p는 서로 다른 두 명의 기증자 (기증자 A, 기증자 B)로부터 유래된 말초 혈액으로부터 제조된 L2H2 hEva1-CAR-T를 반딧불이·루시퍼라제 유전자가 도입된 인간 췌장암 세포주 (CFPAC1) 또는 인간 폐 선암 세포주 (H1975)를 운반하는 마우스에 도입하고, 당해 CAR-T의 항종양 활성을 생물 발광 이미징에 의해 분석한 결과를 나타내는 도면이다. L2H2 hEva1-CAR로서, 항원 인식 부위(L2H2)와 막 관통·세포 내 도메인(4-1BB 또는 CD79A/CD40을 포함하는 도메인)을 쇼트 힌지로 연결한 것을 이용하였다. 대조군으로서, tEGFR 도입 세포의 투여예도 제조하여 분석하였다. 또한, 도면 중의 "Day(일)은 CAR-T를 투여한 후의 일 수를 나타낸다. 발광 스펙트럼은 도 4p 및 4r에도 적용된다.

도 4q는 상이한 2명의 기증자(기증자 A, 기증자 B)로부터 유래된 말초 혈액으로부터 제조한 L2H2 hEva1-CAR-T를 반딧불이·루시퍼라제 유전자가 도입된 인간 췌장암 세포주(CFPAC1) 또는 인간 폐 선암 세포주(H1975)를 운반하는 마우스에 도입하고, 상기 CAR-T의 항종양 활성을 생물 발광 이미징에 의해 시간 경과에 따른 분석 결과 (발광 강도)를 나타내는 그래프이다. L2H2 hEva1-CAR로서, 항원 인식 부위(L2H2)와 막 관통·세포 내 도메인(4-1BB 또는 CD79A/CD40을 포함하는 도메인)을 쇼트 힌지로 연결한 것을 사용하였다. 대조군으로서, tEGFR 도입 세포의 투여예도 제조하여 분석하였다.

도 4r은 기증자 C로부터 유래된 말초 혈액으로부터 제조된 L2H2 hEva1-CAR-T를 반딧불이·루시퍼라제 유전자가 도입된 인간 담관암 세포주 (HuCCT 세포)를 담지하는 마우스에 도입하고, 상기 CAR-T의 항종양 활성을 생물 발광 이미징에 의해 분석한 결과를 나타내는 도면이다. L2H2 hEva1-CAR로서, 항원 인식 부위(L2H2)와 막 관통·세포 내 도메인(4-1BB 또는 CD79A/CD40을 포함하는 도메인)을, 쇼트 힌지로 연결한 것을 사용하였다. 대조군으로서, tEGFR 도입 세포의 투여예도 제조하여 분석하였다. 또한, 도면 중의 "Day(일)"은 CAR-T를 투여한 후의 일 수를 나타낸다.

도 4s는 기증자 C로부터 유래된 말초 혈액으로부터 제조한 L2H2 hEva1-CAR-T를 반딧불이·루시퍼라제 유전자가 도입된 인간 담관암 세포주(HuCCT 세포)를 담지하는 마우스에 도입하여 분석 결과를 보여주는 도면이다. L2H2

hEva1-CAR로서, 항원 인식 부위(L2H2)와 막 관통·세포 내 도메인(4-1BB 또는 CD79A/CD40을 포함하는 도메인)을 쇼트 힌지로 연결한 것을 이용하였다. 대조군으로서, tEGFR 도입 세포의 투여예도 제조하여 분석하였다. 또한, 도면 중, 좌측의 그래프는 상기 CAR-T의 항종양 활성을 생물 발광 이미징에 의해 경시적으로 분석한 결과(발광 강도)를 나타낸다. 오른쪽의 그래프는 상기 CAR-T를 투여한 담암 마우스에서의 종양 체적을 경시적으로 분석한 결과를 나타낸다.

도 5는 항인간 Eva1 인간화 항체를 포함하는 항체-약물 복합체 (B2E5-ADC)의 제조 공정의 개요를 나타내는 도면이다.

도 6a는 B2E5-ADC의 글리오마 (hGIC E6, hGIC E16)에 대한 세포 독성 실험의 결과를 나타내는 그래프이다. 도면에서, 각 그래프의 종축은 종양 세포의 생존율을 나타내고, 횡축은 ADC 또는 항체의 배지에 첨가 농도를 나타낸다.

도 6b는 B2E5-ADC의 췌장암 (BxPC3)에 대한 세포 독성 실험의 결과를 나타내는 그래프이다. 도면에서, 각 그래프의 종축은 종양 세포에서의 손상 정도를 반영하는 흡광도를 나타낸다. 횡축은 ADC 또는 약물 (DM1)의 배지에 첨가 농도를 나타낸다.

도 6c는 B2E5-ADC의 위암 (MKN74)에 대한 세포 독성 실험의 결과를 나타내는 그래프이다. 도면에서, 각 그래프의 종축은 종양 세포의 생존율을 나타낸다. 횡축은 ADC 또는 항체의 배지에 첨가 농도를 나타낸다.

도 7은 B2E5-ADC의 마우스에 대한 독성 시험의 결과를 나타내는 그래프이다. 보다 구체적으로는, 야생형 (C57BL/6) 또는 누드 마우스(SKN/slc)에 꼬리 정맥(intravenous injection) 또는 요추 천자(intrahecal injection, 척추관 주사)에 의해, B2E5-ADC (100, 33, 10㎍)를 단일 투여하여 이들 마우스에서 체중의 시간에 따른 변화를 나타내는 그래프이다. 도면 중, 원, 삼각, 사각형은 각각 마우스 1 개체의 데이터를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] <항 Eva1 항체>

[0049] 본 발명은 인간 유래의 Eva1 단백질 (인간 Eva1)에 결합하는 항체 또는 이의 기능적 단편에 관한 것이다.

[0050] 본 발명에 있어서, "Eva (Epithelial V-like antigen, 상피 V-유사 항원) 1"은 1 회 막 관통 형의 세포막 단백질이며 MPZL2 (Myelin protein Zero-like 2, 미엘린 단백질 제로-유사 2)라고도 불리는 세포 골격계에 관련된 분자이다. 인간 유래의 것이면 전형적으로는 서열번호: 54에 기재된 아미노산 서열로 이루어지는 단백질(서열번호: 53에 기재된 뉴클레오티드 서열이 코딩하는 단백질)이다. 그러나 유전자의 DNA 서열은 돌연변이 등에 의해 자연계에서 (즉, 비인공적으로) 돌연변이되고, 그것에 코딩되는 단백질의 아미노산 서열도 그에 따라 변형된다. 따라서, 본 발명에 따른 "Eva1 단백질"은 상기 전형적인 아미노산 서열로 이루어진 단백질에 특정되지 않고, 이러한 천연 변이체를 포함한다.

[0051] 본 발명의 "항체"는 면역 글로불린의 모든 클래스 및 서브 클래스를 포함한다. "항체"는 폴리클로날 항체 및 모노클로날 항체를 포함한다. "폴리클로날 항체"는 상이한 에피토프에 대한 상이한 항체를 포함하는 항체 제제이다. 또한, "모노클로날 항체"란, 실질적으로 균일한 항체의 집단으로부터 얻어지는 항체를 의미한다. 폴리클로날 항체와는 대조적으로, 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정기를 인식하는 것이다. 본 발명의 항체는 바람직하게는 모노클로날 항체이다. 본 발명의 항체는 자연 환경의 성분으로부터 분리 및/또는 회수된 (즉, 단리된) 항체이다.

[0052] 본 발명의 항체의 인간 Eva1에 대한 반응성은 KD(해리 상수)값으로서 10^{-6} 이하인 것이 바람직하고, 6×10^{-7} 이하인 것이 보다 바람직하다. "반응성"은 항원인 인간 Eva1에 대한 결합 친화성 및/또는 특이성을 의미한다. 이러한 반응성은 통상의 기술자라면 면역학적 방법에 의해 평가할 수 있고, 예를 들면 후술하는 실시예에 나타내는 바와 같이, 표면 플라즈몬 공명법에 의한 해석에 의해 KD값으로서 구할 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 인간 Eva1 단백질 이외에, 다른 동물 유래의 Eva1 단백질(예를 들면, 마우스 Eva1 단백질(전형적으로는 서열번호: 56에 기재된 아미노산 서열로 이루어지는 단백질, 서열번호: 55에 기재된 뉴클레오티드 서열이 코딩하는 단백질))에 결합하는 항체일 수 있다.

[0053] 본 발명의 항체는 ADCC 활성 및 CDC 활성으로부터 선택된 적어도 하나의 세포 독성 활성을 가질 수 있고, ADCC 활성 및 CDC 활성 모두를 가질 수 있다.

[0054] 본 발명에 있어서 "ADCC 활성(항체 의존성 세포 독성 활성)"이란, 표적 세포의 세포 표면 항원에 항체가 결합했

을 때, 그 항체의 Fc 영역에 이펙터 세포(NK 세포, 단구 등의 면역 세포)가 추가로 결합함으로써, 상기 세포가 활성화되어 그에 따라 인자를 방출하여 표적 세포를 살상하는 활성을 의미한다. 한편, "CDC 활성(보체 의존성 세포독성 활성)"이란, 항체가 표적 세포에 결합하면 보체 시스템이 활성화되어, 그 결과 표적 세포를 용해시키는 활성을 의미한다.

[0055] 또한, 본 발명의 항체는 바람직하게는 0.01㎍/㎖에서 인간 Eva1을 발현하는 표적 세포에 대하여 ADCC 활성을 갖는 항체이다. 본 발명의 항체가 이러한 ADCC 활성을 갖고 있는지 여부는, 예를 들면, 특허문헌 2의 실시예에 기재된 방법으로 측정할 수 있고, 보다 구체적으로는, 인간 Eva1을 발현시킨 다우디(Ｄａｕｄｉ) 세포를 표적 세포로 하고, 그 세포 용해율로 ADCC 활성을 평가한 경우에 있어서, 0.01㎍/㎖의 본 발명의 항체를 사용한 경우의 ADCC 활성은 바람직하게는 세포 용해율이 30% 이상이며, 보다 바람직하게는 50% 이상, 더욱 바람직하게는 70% 이상이다.

[0056] 또한, 본 발명의 항체는 바람직하게는 0.30㎍/㎖, 보다 바람직하게는 0.01㎍/㎖에서 인간 Eva1을 발현하는 표적 세포에 대하여 CDC 활성을 갖는 항체이다. 본 발명의 항체가 이러한 CDC 활성을 갖고 있는지 여부는, 예를 들면, 특허문헌 2의 실시예에 기재된 방법으로 측정할 수 있고, 보다 구체적으로는, 인간 Eva1을 발현시킨 다우디 세포를 표적 세포로 하고, 그 세포 용해율로 CDC 활성을 평가한 경우에 있어서, 0.30㎍/mL의 본 발명의 항 Eva1 항체를 사용한 경우의 CDC 활성은 바람직하게는, 세포 용해율이 20% 이상이고, 보다 바람직하게는 40% 이상, 더욱 바람직하게는 60 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상이다.

[0057] 본 발명의 항체는 또한 항종양 활성을 가질 수 있다. 본 발명에 있어서 "항종양 활성"이란, 암세포의 증식을 억제하는 활성, 암세포의 죽음을 유도하는 활성 및 암세포의 전이를 억제하는 활성 중 적어도 어느 하나의 활성을 의미하다. 항종양 활성은, 예를들어 특허문헌 2의 실시예에 기재된 바와 같은 담암 모델(B16 흑색종 세포를 접종한 마우스 등)을 이용한 분석에 의해 평가할 수 있다. 보다 구체적으로는, B16 흑색종 세포를 마우스에 정맥내 투여 등을 한 후, 그 다음날 또는 수주일 후부터, 매일 또는 수일 간격으로 항 Eva1 항체를 정맥 내 투여 등을 한다. 그리고, 폐에 형성된 B16 흑색종 세포의 콜로니 수를 계측함으로써, 생체 내에서의 항암 활성을 평가할 수 있다. 음성 대조군으로서, 동일한 아이소타입을 갖는 대조 항체를 투여할 수도 있고, PBS 등을 투여할 수도 있다. 그리고, 항 Eva1 항체 투여군에 있어서의 콜로니 형성수가 음성 대조 투여군에 있어서의 그것보다 적은 경우(음성 대조 투여군에 있어서의 콜로니 형성수를 100%로 했을 때에, 바람직하게는 60% 이하, 보다 바람직하게는 40% 이하, 더욱 바람직하게는 20% 이하, 보다 더 바람직하게는 10% 이하)에서 상기 항 Eva1 항체가 항종양 활성을 갖는 것으로 판정할 수 있다.

[0058] 본 발명의 항체는, 인간 Eva1에 대한 반응성을 가지고 있으면 되고, 그 유래, 종류, 형상 등은 특별히 한정되지 않는다. 구체적으로는, 비인간 동물 유래의 항체(예를 들어, 마우스 항체, 토끼 항체, 래트 항체, 낙타 항체), 인간 유래의 항체, 키메라 항체, 인간화 항체를 포함한다.

[0059] 본 발명에 있어서 "비인간 동물 유래의 항체"로서는, 예를 들면 특허문헌 2에 개시되어 있는 이하와 같은 가변 영역을 보유하는 인간 Eva1에 대한 항체를 들 수 있다.

[0060] (a) 서열 번호: 27에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역과, 서열 번호: 21에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 보유하는 항체.

[0061] (b) 서열번호: 39에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역과, 서열 번호: 33에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 보유하는 항체.

[0062] (c) 서열번호: 49에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역과, 서열 번호: 44에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 보유하는 항체.

[0063] 또한, 본 발명은 예를 들면 하기와 같은 CDR을 보유하는 인간 Eva1에 대한 항체에 관한 것이다.

[0064] (a) 서열 번호: 27에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역으로부터 결정되는 중쇄 CDR1 내지 3과, 서열 번호: 21에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역으로부터 결정되는 경쇄 CDR1 내지 3을 보유하는 항체.

[0065] (b) 서열번호: 39에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역으로부터 결정되는 중쇄 CDR1 내지 3과, 서열 번호: 33에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역으로부터 결정되는 경쇄 CDR1 내지 3을 보유하는 항체.

[0066] (c) 서열번호: 49에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역으로부터 결정되는 중쇄 CDR1 내지 3과,

서열 번호: 44에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역으로부터 결정되는 경쇄 CDR1 내지 3을 보유하는 항체.

[0067] 또한, 이러한 항체에 관하여 가변 영역의 아미노산 서열에 기초하여 CDR을 결정하는 방법으로서는 특별히 제한은 없지만, 예를 들면, Chotia, IMGT, Kabat, Aho 등의 공지의 넘버링 스킴(계획)을 들 수 있고, 보다 구체적으로 Chothia 넘버링 방법에 의해 결정된 예는 다음과 같은 CDR을 보유하는 인간 Eva1에 대한 항체를 포함할 수 있다.

[0068] (a-1) 서열 번호: 28 내지 30에 기재된 아미노산 서열을 각각 중쇄 CDR1 내지 3으로서 보유하고, 또한 서열 번호 : 22 내지 24에 기재된 아미노산 서열을 각각 경쇄 CDR1 내지 3으로서 보유하는 항체.

[0069] (b) 서열 번호: 40 내지 42에 기재된 아미노산 서열을 각각 중쇄 CDR1 내지 3으로서 보유하고, 또한 서열 번호: 34 내지 36에 기재된 아미노산 서열을 각각 경쇄 CDR1 내지 3으로서 보유하는, 항체.

[0070] (c) 서열 번호: 50 내지 52에 기재된 아미노산 서열을 각각 중쇄 CDR1 내지 3으로서 보유하고, 또한 서열 번호: 45 내지 47에 기재된 아미노산 서열을 각각 경쇄 CDR1 내지 3으로서 보유하는, 항체.

[0071] 또한, IMGT 넘버링법에 의해 결정된 예로서, 이하와 같은 CDR을 보유하는 인간 Eva1에 대한 항체를 들 수 있다.

[0072] (a-2) 서열번호: 4 내지 6에 기재된 아미노산 서열을 각각 중쇄 CDR1 내지 3으로서 보유하고, 또한 서열번호: 1에 기재된 아미노산 서열, Val-Thr-Ser로 이루어지는 아미노산 서열 및 서열번호: 3에 기재된 아미노산 서열을 각각 경쇄 CDR1 내지 3으로서 보유하는 항체.

[0073] 또한, 본 발명에 있어서는, 이러한 특정 아미노산 서열로 이루어지는 가변 영역 및/또는 CDR을 유지하는 항체뿐만 아니라, 원하는 활성(항원에 대한 반응성 등)을 감소시키지 않고, 그 아미노산 서열이 변형된 항체가 포함된다. 이러한 아미노산 서열 변이체는, 예를 들면, 상술한 가변 영역 등을 코딩하는 DNA에의 변이 도입에 의해, 또는 펩티드 합성에 의해 제조할 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어 항체의 아미노산 서열 내의 잔기의 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입을 포함한다. 항체의 아미노산 서열이 변형되는 부위는, 변형되기 전의 항체와 동등한 활성을 갖는 한 항체의 중쇄 또는 경쇄의 불변 영역일 수도 있고, 또한 가변 영역(프레임 영역(FR) 및 CDR)일 수도 있다. CDR 이외의 아미노산의 변형은 항원과의 반응성에 대한 영향이 상대적으로 적다고 생각되지만, 현재는 CDR의 아미노산을 변형하여 항원에 대한 친화성(친화도)이 향상된 항체를 스크리닝하는 방법이 알려져 있다(ＰＮＡＳ，１０２：８４６６－８４７１（２００５），Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，Ｄｅｓｉｇｎ＆Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ，２１：４８５－４９３（２００８）、국제공개 제２００２／０５１８７０호，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２８０：２４８８０－２４８８７（２００５），Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，Ｄｅｓｉｇｎ＆Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ，２１：３４５－３５１（２００８）、ＭＡｂｓ．Ｍａｒ－Ａｐｒ；６（２）：４３７－４５（２０１４））．또한, 현재는 통합 계산 화학 시스템 등(예를 들어, Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｏｐｅｒａｔｉｎｇ Ｅｎｖｉｒｏｍｅｎｔ、캐나다 ＣＣＧ사 제)을 이용함으로써 항원에 대한 친화성이 향상된 항체를 모델링할 수도 있다(예를 들어, ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｒｓｉ．ｃｏ．ｊｐ／ｋａｇａｋｕ／ｃｓ／ｃｃｇ／ｐｒｏｄｕｃｔｓ／ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ／ｐｒｏｔｅｉｎ．ｈｔｍｌ 참조)．또한, Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ Ｄｅｓ Ｓｅｌ．２０１０ Ａｕｇ；２３（８）：６４３－５１에 기재된 바와 같이, 항원에 대한 친화성에 있어서, 중쇄 가변 영역의 CDR1 및 경쇄 가변 영역의 CDR3이 관여하지 않는 예가 알려져 있다. 또한, 마찬가지로 Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ４４：１０７５－１０８４（２００７）는 대부분의 항체에서 경쇄 가변 영역의 CDR2가 항원에 대한 친화성에 관여하지 않는다는 것을 보고하였다. 이와 같이, 항체의 항원에 대한 친화성에 있어서는, 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 각각의 CDR1 내지 3의 모두를 필요로 하지 않아도, 동등한 활성을 발휘할 수 있다. 실제로, Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ．２００３ Ｊｕｌ １８；３０７（１）：１９８－２０５、Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．２００４ Ｊｕｌ ９；３４０（３）：５２５－４２，Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．２００３ Ａｕｇ ２９；３３１（５）：１１０９－２０에서, 원래의 항체 중 적어도 하나의 CDR을 보유함으로써 항원에 대한 친화성이 유지되는 예가 보고되었다.

[0074] 또한, 본 발명의 항체에 관하여, 가변 영역에서 변형되는 아미노산의 수는, 바람직하게는 10 아미노산 이내, 보다 바람직하게는 5 아미노산 이내, 더욱 바람직하게는 3 아미노산 이내(예를 들어, 2 아미노산 이내, 1 아미노산)이다. 또한, 이러한 변형은 모두 항원과의 반응성에의 영향이 적다는 관점에서 CDR 이외, 즉 FR에 적용되는 것이 바람직하다. 또한, CDR에 있어서 변형되는 아미노산의 수는, 바람직하게는 5 아미노산 이내, 보다 바람직하게는 3 아미노산 이내(예를 들면, 2 아미노산 이내, 1 아미노산)이다.

[0075] 아미노산의 변형은 바람직하게는 보존적인 치환이다. 본 발명에 있어서 "보존적인 치환"이란, 화학적으로 유사

한 측쇄를 갖는 다른 아미노산 잔기로 치환하는 것을 의미한다. 화학적으로 유사한 아미노산 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 군은 본 발명이 속하는 기술 분야에 잘 알려져 있다. 예를 들면, 산성 아미노산(아스파르트산 및 글루탐산), 염기성 아미노산(리신 · 아르기닌 · 히스티딘), 중성 아미노산에 있어서는, 탄화수소쇄를 갖는 아미노산(글리신 · 알라닌 · 발린 · 류신 · 이소류신 · 프롤린), 히드록시기를 갖는 아미노산(세린 · 트레오닌), 황을 포함하는 아미노산(시스테인 · 메티오닌), 아미드기를 갖는 아미노산(아스파라쇼트 · 글루타민), 이미노기를 갖는 아미노산(프롤린), 방향족기를 갖는 아미노산(페닐알라닌 · 티로신 · 트립토판)으로 분류할 수 있다.

[0076] 또한, 변형 후의 아미노산 서열이, 상술한 특정 아미노산 서열로 이루어지는 가변 영역과 아미노산 서열 수준에서 80% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역을 보유하는 항체도, 변형되기 전의 항체와 동등한 활성을 갖는 한 본 발명의 항체에 포함된다. 이러한 상동성으로서는, 적어도 80%이면 좋지만, 바람직하게는 85% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상(예를 들면, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99 % 이상)이다. 또한, 서열의 상동성은 ＢＬＡＳＴＰ (아미노산 수준) 프로그램 (Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ. Ｊ. Ｍｏｌ. Ｂｉｏｌ., ２１５：４０３－４１０, １９９０) 을 이용하여 결정할 수 있다. 상기 프로그램은 Ｋａｒｌｉｎ과 Ａｌｔｓｃｈｕｌ에 의한 알고리즘 ＢＬＡＳＴ (Ｐｒｏｃ. Ｎａｔｌ. Ａｃａｄ. Ｓｃｉ. ＵＳＡ, ８７：２２６４－２２６８, １９９０, Ｐｒｏｃ. Ｎａｔｌ. Ａｃａｄ. Ｓｃｉ. ＵＳＡ, ９０：５８７３－５８７７, １９９３) 를 기반으로 한다. ＢＬＡＳＴＰ에 의해 아미노산 서열을 분석하는 경우, 파라미터는, 예를 들면 점수(ｓｃｏｒｅ)=５０, 길이(ｗｏｒｄｌｅｎｇｔｈ)=３이라고 가정한다. 또한, Gapped BLAST 프로그램을 이용하여 아미노산 서열을 해석하는 경우는 Ａｌｔｓｃｈｕｌ 등 (Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ. ２５：３３８９－３４０２, １９９７)에 기재된 바와 같이 수행할 수 있다. BLAST 및 Gapped BLAST 프로그램을 사용하는 경우, 각 프로그램의 디폴트 파라미터가 사용된다. 이들 분석 방법의 구체적인 방법은 공지되어 있다.

[0077] 또한, "동등한 활성을 갖는"이란, 예를 들면, 항원에 대한 반응성이 표적 항체(예를 들면, 특허문헌 2에 기재된 B2E5-48 마우스 항체)와 동등(예를 들면, 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상)하다는 것을 의미한다.

[0078] 또한, 본 발명의 항체의 변형은 예를 들면, 글리코실화 부위의 수 또는 위치를 변화시키는 등의 항체의 번역 후 공정의 변형일 수 있다. 이로써, 예를 들어 항체의 ADCC 활성을 향상시킬 수 있다. 항체의 글리코실화는 전형적으로 N-결합 또는 O-결합이다. 항체의 글리코실화는 항체를 발현하는데 사용되는 숙주 세포에 크게 의존한다. 글리코실화 패턴의 변형은 당 생산에 관련된 특정 효소의 도입 또는 결실 등의 공지된 방법으로 행할 수 있다(일본 특허 공개 제2008-113663호 공보, 미국 특허 제5047335호, 미국 특허 제5510261호, 미국특허 제5278299호, 국제공개 제99/54342호). 또한, 본 발명에 있어서는, 항체의 안정성을 증가시키는 등의 목적으로 탈아미드화되는 아미노산 또는 탈아미드화되는 아미노산에 인접하는 아미노산을 다른 아미노산으로 치환함으로써 탈아미드화를 억제할 수 있다. 또한 글루탐산을 다른 아미노산으로 치환하여 항체의 안정성을 높일 수 있다. 본 발명은 또한 안정화된 항체를 제공한다.

[0079] 본 발명에서 "키메라 항체"는 특정 항체의 가변 영역과 이종 항체의 불변 영역을 연결하는 항체이다. 키메라 항체는, 예를 들면, 항원을 마우스에 면역하고, 그 마우스 모노클로날 항체의 유전자로부터 항원과 결합하는 항체 가변부(가변 영역)를 잘라내어, 인간 골수 유래의 항체 불변부(불변 영역) 유전자와 결합하고, 이것을 발현 벡터에 혼입하여 숙주에 도입하여 생산함으로써 얻을 수 있다(예를 들면, 일본 특허 공개 평8-280387호 공보, 미국 특허 제4816397호 공보, 미국 특허 제4816567호 공보, 미국 특허 제5807715호 공보).

[0080] 키메라 항체의 불변 영역에는 통상, 인간 유래의 항체의 것이 사용된다. 예를 들어 중쇄에서 Cγ1, Cγ2, Cγ3, Cγ4, Cμ, Cδ, Cα1, Cα2 및 Cε을 불변 영역으로 사용할 수 있다. 또한 경쇄에서는 Cκ와 Cλ를 불변 영역으로 사용할 수 있다. 이들 불변 영역의 아미노산 서열 및 이를 코딩하는 염기 서열은 공지되어 있다. 또한, 항체 자체의 안정성 또는 항체 생산의 안정성을 개선하기 위해, 인간 유래의 항체 불변 영역 중의 1개 또는 수 개의 아미노산을 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입을 할 수 있다.

[0081] 본 발명에 있어서 "인간화 항체"란, 비인간 동물 유래의 항체의 CDR의 유전자 서열을 인간 유래의 항체 유전자에 이식(CDR 그래프팅)한 항체이며, 그 제조 방법은 오버랩 익스텐션 PCR 등, 공지되어 있다(예를 들어, 유럽 특허 출원 공개 제239400호 명세서, 유럽 특허 출원 공개 제125023호 명세서, 국제 공개 제90/07861호, 국제 공개 제96/02576호). 항체의 가변 영역은 일반적으로 4개의 FR에 끼워진 3개의 CDR로 구성된다. CDR은 실질적으로 항체의 결합 특이성을 결정하는 영역이다. CDR의 아미노산 서열은 다양성이 풍부하지만, FR을 구성하는 아미노산 서열은 상이한 결합 특이성을 갖는 항체들 사이에서도 높은 상동성을 나타내는 경우가 많다. 따라서 일반적으로 CDR의 이식은 한 항체의 결합 특이성을 다른 항체에 이식 할 수 있다고한다. 또한, CDR의 기능 유지의 관

점에서, 비인간 유래 CDR의 인간 FR로의 이식에 있어서는, 그 비인간 동물 유래의 FR과 상동성이 높은 인간 FR이 선택된다. 즉, CDR 내의 아미노산은 항원을 인식할 뿐만 아니라, CDR의 근방에 있는 FR의 아미노산과 배위하고, CDR의 루프 구조의 유지에도 관여하고 있기 때문에, 이식해야 할 CDR에 인접한 FR의 아미노산 서열과 상동성이 높은 아미노산 서열로 이루어지는 인간 FR을 이용하는 것이 바람직하다.

[0082] 비인간 동물 유래의 FR과 상동성이 높은 공지의 인간 FR의 검색을, 예를 들면, 인터넷에서 이용 가능한 항체에 특화된 검색 시스템(ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｂｉｏｉｎｆ．ｏｒｇ．ｕｋ／ａｂｙｓｉｓ／)을 이용하여 행할 수 있다. 이와 같이 하여 얻어진 인간 FR의 서열과 일치하도록, 비인간 유래의 항체의 CDR 이외의 서열에 변이를 도입할 수 있다. 대안적으로, 검색에 의해 수득된 인간 FR의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자(cDNA)가 이용가능한 경우, 그 서열에 비인간 유래 CDR을 도입할 수 있다. 돌연변이의 도입 등은 핵산 합성, 부위 특이적 돌연변이 유발 등의 당업계에 공지된 기술을 이용하여 행할 수 있다.

[0083] 이와 같이 하여 제조된 인간화 항체의 항원에 대한 결합 활성을 정성적으로 또는 정량적으로 측정하여 평가함으로써, CDR을 통해 연결되었을 때에 CDR이 양호한 항원 결합 부위를 형성하는 인간 유래 항체의 FR을 적절하게 선택할 수 있다. 또한 필요에 따라 Ｓａｔｏ，Ｋ．ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ，１９９３，５３，８５１－８５６ 등에 기재된 방법에 따라 인간화 항체의 CDR이 적절한 항원 결합 부위를 형성하도록 FR의 아미노산 잔기를 치환할 수도 있고, 또한 상기 아미노산을 치환한 변이형 항체의 항원에 대한 결합 활성을 측정하여 평가함으로써, 원하는 성질을 갖는 변이 FR 서열을 선택할 수 있다.

[0084] 본 발명에 있어서, "인간화 항체"로서는 예를 들면, 서열번호: 1에 기재된 아미노산 서열, Val-Thr-Ser로 이루어지는 아미노산 서열 및 서열번호: 3에 기재된 아미노산 서열을 각각 포함하는 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역과, 서열 번호: 4 내지 6에 기재된 아미노산 서열을 각각 포함하는 CDR1 내지 3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 갖고, 인간 유래의 Eva1 단백질에 결합하는, 인간화 항체를 들 수 있다.

[0085] 보다 구체적으로는, 후술하는 실시예에 나타내는 바와 같이,

[0086] 경쇄 가변 영역이, 서열 번호: 7 내지 10에 기재된 아미노산 서열, 서열 번호: 7 내지 10에 기재된 아미노산 서열에 대하여 80% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열 및 서열 번호: 7 내지 10에 기재된 아미노산 서열 중 적어도 어느 하나에 있어서, 1개 또는 수 개의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입된 아미노산 서열로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 포함한다.

[0087] 중쇄 가변 영역이, 서열 번호: 13 내지 16에 기재된 아미노산 서열, 서열 번호: 13 내지 16에 기재된 아미노산 서열에 대하여 80% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열 및 서열 번호: 13 내지 16에 기재된 아미노산 서열 중 적어도 어느 하나에 있어서, 1 또는 수 개의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입된 아미노산 서열로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 포함하는 인간화 항체를 들 수 있다.

[0088] 또한, 가변 영역의 변형 및 상동성 등에 대해서는, "비인간 동물 유래의 항체"에서 설명한 바와 같지만, 본 발명의 인간화 항체에 있어서, CDR의 서열은 변형되지 않고, 경쇄 가변 영역 CDR1 내지 3 및 중쇄 가변 영역 CDR1 내지 3의 서열은 각각, 서열 번호: 1에 기재된 아미노산 서열, Val-Thr-Ser로 이루어지는 아미노산 서열 및 서열 번호: 3에 기재된 아미노산 서열 및 서열 번호: 4 내지 6에 기재된 아미노산 서열에 특정되어 있는 것이 바람직하다.

[0089] 또한, 이러한 인간화 항체에 있어서, 후술하는 실시예에 나타내는 바와 같이 항원에 대한 반응성이 보다 높다는 관점에서,

[0090] (H2-L2) 경쇄 가변 영역이, 서열 번호:7에 기재된 아미노산 서열, 서열 번호:7에 기재된 아미노산 서열에 대하여 80% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열, 및, 서열 번호: 7에 기재된 아미노산 서열 중 적어도 어느 하나에 있어서, 1개 또는 수 개의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입된 아미노산 서열로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 포함하고,

[0091] 중쇄 가변 영역이 서열 번호 13에 기재된 아미노산 서열, 서열 번호 13에 기재된 아미노산 서열에 대하여 80% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열, 및 서열 번호 13에 기재된 아미노산 서열 중 적어도 어느 하나에 있어서, 1개 또는 수 개의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입된 아미노산 서열로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 포함하는 인간화 항체,

[0092] (H1-L4) 경쇄 가변 영역이, 서열 번호: 8에 기재된 아미노산 서열, 서열 번호: 8에 기재된 아미노산 서열에 대하여 80% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열, 및, 서열 번호: 8에 기재된 아미노산 서열 중 적어도 어느 하나

에 있어서, 1개 또는 수 개의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입된 아미노산 서열로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 포함하고,

[0093] 중쇄 가변 영역이 서열번호: 15에 기재된 아미노산 서열, 서열번호: 15에 기재된 아미노산 서열에 대하여 80% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열, 및 서열번호: 15에 기재된 아미노산 서열 중 적어도 어느 하나에 있어서 1개 또는 수 개의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입된 아미노산 서열로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 포함하는 인간화 항체,

[0094] (H2-L3) 경쇄 가변 영역이, 서열번호: 10에 기재된 아미노산 서열, 서열번호: 10에 기재된 아미노산 서열에 대하여 80% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열 및 서열 번호: 10에 기재된 아미노산 서열 중 적어도 어느 하나에 있어서, 1개 또는 수 개의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입된 아미노산 서열로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 포함하고,

[0095] 중쇄 가변 영역이 서열번호 13에 기재된 아미노산 서열, 서열번호 13에 기재된 아미노산 서열에 대하여 80% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열, 및 서열번호 13에 기재된 아미노산 서열 중 적어도 어느 하나에 있어서 1개 또는 수 개의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입된 아미노산 서열로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 포함하는, 인간화 항체,

[0096] (H2-L4) 경쇄 가변 영역이, 서열번호: 8에 기재된 아미노산 서열, 서열번호: 8에 기재된 아미노산 서열에 대하여 80% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열 및 서열번호: 8에 기재된 아미노산 서열 중 적어도 어느 하나에 있어서, 1개 또는 수 개의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입된 아미노산 서열로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 포함하고,

[0097] 중쇄 가변 영역이 서열번호 13에 기재된 아미노산 서열, 서열번호 13에 기재된 아미노산 서열에 대하여 80% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열 및 서열번호 13에 기재된 아미노산 서열 중 적어도 어느 하나에 있어서 1개 또는 수 개의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입된 아미노산 서열로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 포함하는, 인간화 항체가 바람직한 예로서 언급된다.

[0098] 또, 생산능력의 높은 수준도 고려하기 위해,

[0099] (H2-L2) 경쇄 가변 영역이, 서열번호: 7에 기재된 아미노산 서열, 서열번호: 7에 기재된 아미노산 서열에 대하여 80% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열 및 서열번호: 7에 기재된 아미노산 서열 중 적어도 어느 하나에 있어서, 1개 또는 수 개의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입된 아미노산 서열로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 포함하고,

[0100] 중쇄 가변 영역이 서열번호 13에 기재된 아미노산 서열, 서열번호 13에 기재된 아미노산 서열에 대하여 80% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열, 및 서열번호 13에 기재된 아미노산 서열 중 적어도 어느 하나에 있어서 1개 또는 수 개의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입된 아미노산 서열로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 포함하는, 인간화 항체,

[0101] (H2-L4) 경쇄 가변 영역이, 서열번호: 8에 기재된 아미노산 서열, 서열번호: 8에 기재된 아미노산 서열에 대하여 80% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열 및 서열번호: 8에 기재된 아미노산 서열 중 적어도 어느 하나에 있어서, 1개 또는 수 개의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입된 아미노산 서열로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 포함하고,

[0102] 중쇄 가변 영역이 서열번호 13에 기재된 아미노산 서열, 서열번호 13에 기재된 아미노산 서열에 대하여 80% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열, 및 서열번호 13에 기재된 아미노산 서열 중 적어도 어느 하나에 있어서 1개 또는 수 개의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입된 아미노산 서열로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 포함하는, 인간화 항체,

[0103] (H3-L4) 경쇄 가변 영역이, 서열번호: 8에 기재된 아미노산 서열, 서열번호: 8에 기재된 아미노산 서열에 대하여 80% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열 및 서열번호: 8에 기재된 아미노산 서열 중 적어도 어느 하나에 있어서, 1개 또는 수 개의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입된 아미노산 서열로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 포함하고,

[0104] 중쇄 가변 영역이 서열번호: 16에 기재된 아미노산 서열, 서열번호: 16에 기재된 아미노산 서열에 대하여 80% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열, 및 서열번호: 16에 기재된 아미노산 서열 중 적어도 어느 하나에 있어서 1개 또는 수 개의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입된 아미노산 서열로부터 선택되는 하나의 아미노산

서열을 포함하는, 인간화 항체가 바람직한 예로서 언급된다.

[0105] 또한, 본 발명의 항체로서는 상술한 특정의 아미노산 서열 또는 그의 변이체를 포함하는, 가변 영역 또는 CDR을 보유하는 항체에 대하여, 인간 Eva1에의 결합에서 경쟁하는 항체의 (실시)양태도 취할 수 있다. 즉, 상기 언급된 특정 아미노산 서열 또는 이의 변이체를 포함하는 가변 영역 또는 CDR을 보유하는 항체가 반응성을 나타내는 에피토프에 결합하는 항체의 양태도 취할 수 있다.

[0106] 본 발명에 있어서 "에피토프"란, 항원 중에 존재하는 항원 결정기, 즉 항체 중의 항원 결합 도메인이 결합하는 항원 상의 부위를 의미한다. 따라서, 본 발명에 있어서의 에피토프는 아미노산의 1차 서열 중에서 연속하는 복수의 아미노산으로 이루어지는 폴리펩티드(선형 에피토프)일 수 있고, 아미노산의 1차 서열 중에서 인접하지 않은 아미노산이 펩티드 또는 단백질 의 폴딩 등의 3차원 구조에 의해 근방에 오면 형성되는 폴리펩티드(불연속 에피토프, 구조적 에피토프)일 수 있다. 또한, 이러한 에피토프는 전형적으로 적어도 3개 (예를 들어, 4개), 가장 일반적으로 적어도 5개 (예를 들어, 6 내지 20개, 7 내지 15개, 8 내지 10개)의 아미노산으로 구성된다.

[0107] 또한, 항체가 얻어지는 경우, 통상의 기술자라면 그 항체가 반응성을 나타내는 항원 상의 펩티드 영역(에피토프)을 특정하여, 그 펩티드 영역에 결합하는 다양한 항체를 제조할 수 있다. 또한, 두 항체가 동일하거나 입체적으로 중첩된 에피토프에 결합하는지 여부는 경쟁 분석법에 의해 결정될 수 있다.

[0108] 본 발명에 있어서 항체의 "기능적 단편"이란, 항체의 일부(부분 단편)이며, 인간 Eva1에 반응성을 나타내는 것을 의미한다. 구체적으로는, Fab, Fab', F(ab')2, 가변 영역 단편(Fv), 디설파이드 결합 Fv, 단쇄 가변 영역 단편(단일 가닥 Fv, scFv), sc(Fv)2, 다이아바디, 다특이성 항체, 및 이들 중합체 등을 들 수 있다.

[0109] 본 명세서에서 "Fab"는 하나의 경쇄 및 중쇄의 일부로 구성된 면역 글로불린의 1가 항원 결합 단편을 의미한다. 항체의 파파인 분해 및 재조합 방법으로 얻을 수 있다. "Fab"는 항체의 힌지 영역 중 하나 이상의 시스테인을 포함하여 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에 약간의 잔기를 첨가함으로써 Fab와 다르다. "F(ab')2"는 두 경쇄 및 두 중쇄 부분으로 구성된 면역 글로불린의 2가 항원 결합 단편을 의미한다.

[0110] "가변 영역 단편 (Fv)"은 완전한 항원 인식 및 결합 부위를 갖는 최소 항체 단편이다. Fv는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역이 비공유 결합에 의해 강하게 연결된 이량체이다. "단쇄 가변 영역 단편 (단일 가닥 Fv, scFv)"은 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하며, 이들 영역은 단일 폴리펩티드 쇄에 존재한다. "sc(Fv)2"는 2개의 중쇄 가변 영역 및 2개의 경쇄 가변 영역을 링커 등으로 결합하여 단일쇄로 한 것이다. "다이아바디"는 2개의 항원 결합 부위를 갖는 작은 항체 단편이며, 이 단편은 동일한 폴리펩티드 사슬 내에 경쇄 가변 영역에 결합된 중쇄 가변 영역을 포함하며, 각 영역은 다른 사슬의 상보적인 영역과 쌍을 이루고 있다. "다특이성 항체"는 적어도 2개의 상이한 항원에 대한 결합 특이성을 갖는 모노클로날 항체이다. 예를 들어, 2개의 중쇄가 상이한 특이성을 갖는 2개의 면역 글로불린 중쇄/경쇄 쌍의 동시 발현에 의해 제조될 수 있다.

[0111] 본 발명의 항체는 하이브리도마법에 의해 제조할 수 있고, 또한 재조합 DNA법에 의해 제조할 수도 있다. 하이브리도마법은 전형적으로 콜러 및 밀스타인 방법(Ｋｏｈｌｅｒ＆Ｍｉｌｓｔｅｉｎ, Ｎａｔｕｒｅ, ２５６：４９５（１９７５))을 들 수 있다. 이 방법에 있어서의 세포 융합 공정에 사용되는 항체 생산 세포로는, 항원(인간 Eva1, 그 부분 펩티드, 그들에 Fc 단백질 등이 융합되어 있는 단백질, 또는 이들을 발현하는 세포 등)으로 면역된 동물(예를 들어, 마우스, 래트, 햄스터, 토끼, 원숭이, 염소) 비장 세포, 림프절 세포, 말초 혈액 백혈구 등이 있다. 면역화되지 않은 동물로부터 미리 단리된 상기 세포 또는 림프구 등에 대하여 항원을 배지에서 작용시킴으로써 얻어진 항체 생산 세포도 사용할 수 있다. 골수종 세포로는 공지된 다양한 세포주를 사용할 수 있다. 항체 생산 세포 및 골수종 세포는 이들이 융합 가능하다면 상이한 동물종 기원일 수 있지만, 바람직하게는 동일한 동물종 기원이다. 하이브리도마는 예를 들어 항원으로 면역화된 마우스로부터 얻은 비장 세포와 마우스 골수종 세포 사이의 세포 융합에 의해 생성되고, 후속 스크리닝에 의해 인간 Eva1에 특이적인 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마를 얻을 수 있다. 인간 Eva1에 대한 모노클로날 항체는 하이브리도마를 배양함으로써, 하이브리도마를 투여한 포유류의 복수로부터 얻을 수 있다.

[0112] 재조합 DNA법은, 상기 본 발명의 항체를 코딩하는 DNA를 하이브리도마나 B 세포 등으로부터 클로닝하고, 적당한 벡터에 혼입하여, 이것을 숙주 세포(예를 들면, HEK 세포 등의 포유류 세포주, 대장균, 효모 세포, 곤충 세포, 식물 세포 등)에 도입하고, 본 발명의 항체를 재조합 항체로서 생산하는 수법이다 (예를 들어, Ｐ．Ｊ．Ｄｅｌｖｅｓ, Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ：Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ, １９９７ ＷＩＬＥＹ、Ｐ．Ｓｈｅｐｈｅｒｄ ａｎｄ Ｃ．Ｄｅａｎ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ, ２０００ ＯＸＦＯＲＤ ＵＮＩＶＥＲＳＩＴＹ ＰＲＥＳＳ、Ｖａｎｄａｍｍｅ Ａ．Ｍ．ｅｔ ａｌ．, *Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂ*

iochem. 192:767-775 (1990)). 본 발명의 항체를 코딩하는 DNA의 발현에 있어서는, 중쇄 또는 경쇄를 코딩하는 DNA를 별도로 발현 벡터에 혼입시켜 숙주 세포를 형질전환해도 되고, 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 DNA를 단일 발현 벡터에 혼입하여 숙주 세포를 형질전환할 수 있다(국제공개 제94/11523호 공보 참조). 본 발명의 항체는 상기 숙주 세포를 배양하고, 숙주 세포 내 또는 배양액으로부터 분리·정제하고, 실질적으로 순수하고 균일한 형태로 취득할 수 있다. 항체의 분리·정제는 통상의 폴리펩티드의 정제에 사용되는 방법을 사용할 수 있다. 형질전환 동물 제작 기술을 이용하여, 항체 유전자가 혼입된 형질전환 동물(소, 염소, 양, 돼지 등)을 제작하면, 그 형질전환 동물의 우유로부터 항체 유전자로부터 유래된 모노클로날 항체를 대량으로 취득하는 것도 가능하다.

[0113] 본 발명은 상기 본 발명의 항체를 코딩하는 DNA, 상기 DNA를 포함하는 벡터, 상기 DNA를 보유하는 숙주 세포, 및 상기 숙주 세포를 배양하고, 항체를 회수하는 것을 포함하는 항체의 생산 방법을 제공할 수 있다.

[0114] <항체-약물 복합체>

[0115] 후술하는 실시예에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 항체의 표적인 인간 Eva1은 다양한 암에서 발현된다. 또한, 본 발명의 항체(특히 인간화 항체)는 ADC로서도 유용하다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 항체 (특히 인간화 항체) 또는 이의 기능적 단편과 약물을 결합시켜 이루어지는 항체-약물 복합체 (ADC)의 양태도 취할 수 있다.

[0116] 본 발명의 ADC에서 항체와 결합할 수 있는 "약물"은 특별히 제한되지 않지만, 예를 들어 당업계에 공지된 세포 독성 물질을 포함한다. "세포 독성 물질"은 항암제, 예를 들어, 이리노테칸 (CPT-11), 이리노테칸의 대사 산물 SN-38 (10-히드 록시-7-에틸캄프토테신), 아드리아마이신, 탁솔, 5-플루오로우라실, 나무스틴, 라미니스틴, 테모졸로미드 등의 알킬화제, 겜시타빈

[0117] 히드록시카르바미드 등의 대사 길항제, 에토포시드, 빈크리스틴 등의 식물 알칼로이드, 마이토마이신, 브레오마이신 등의 항암성 항생제, 시스플라틴 등의 백금 제제, 소라페닙, 에를로티닙 등의 분자 표적제, 메토트렉세이트, 시토신 아라비노시드, 6-티오구아닌, 6-메르캅토푸린, 시클로포스파미드, 이포스파미드, 부설판, MMAE(모노메틸아우리스타틴 E), DM1(메르탄신), 칼리키아마이신을 들 수 있다. 세포 독성 물질은 방사성 동위 원소, 예를 들어 32P, 14C, 125I, 3H, 131I, 186Re, 188Re, 10B, 111In, 90Y를 포함한다. 세포 독성 물질로는 세포 독성 활성을 기능시키는 광감수성 물질, 보다 구체적으로는 광조사에 의해 활성화됨으로써 그 자체가 세포상해성(세포독성)을 나타내는 형태로 변화하는 물질이어도 되고, 또한 세포 독성 물질 (세포 독성 물질)을 일으키는 물질일 수 있다. 예를 들어, 클로린스(chlorins), 클로린 e6, 포르피머 나트륨, 탈라포르핀 나트륨, 벨테포르핀, 및 이들의 전구체 및 유도체를 들 수 있다. 또한, 세포 독성 물질로는 독성 펩티드, 예를 들어 사포린, 리신, 시가독 등의 리보솜 불활성화 단백질(RIP)을 들 수 있다.

[0118] 또한, 항체와 세포 독성 물질의 결합은 당업계에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있으며, 직접 결합 및 간접 결합 중 어느 것이어도 된다. 예를 들어, 직접 결합으로서 공유 결합이 이용될 수 있다. 간접적인 결합으로서는, 링커를 통한 결합을 이용할 수 있다.

[0119] 본 발명에서는 항체와 세포 독성 물질이 링커를 통해 결합하는 것이 바람직하다. 링커를 통해 2개의 분자가 결합함으로써 세포 독성 물질의 항원성을 약화시킬 수 있으며, 대상에게 투여하기에 바람직하다. 링커에 대한 일반적인 기술은 예를 들어 Hermanson, G. T. Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996; Harris, J. M. and Zalipsky, S. 편, Poly(ethylene glycol), Chemistry and Biological Applications, ACS Symposium Series, 1997; Veronese, F. and Harris, J. M. 편, Peptide and protein PEGylation. Advanced Drug Delivery Review 54(4), 2002에 기재되어 있다.

[0120] 또한, 링커는 선형 링커(2가 링커) 뿐만 아니라, 분지형 링커(3가 이상의 링커)를 포함한다. 선형 링커는 그 일단에 세포 독성 물질을 갖고, 다른 일단에 항체를 갖는다. 분지형 링커는 일반적으로 각 분지(각 사슬)에 세포 독성 물질을 가지며, 다른 한쪽 끝에 항체를 갖는다. 이러한 링커로서는, 예를 들면 N-숙신이미딜-4-(말레이미드메틸)시클로헥산카르복실레이트(SMCC), 설포숙신이미딜-4-(N-말레이미드메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트(설포-SMCC), N-숙신이미딜-4-(N-말레이미드메틸)-시클로헥산-1-카르복시-(6-아미드카프로에이트)(LC-SMCC), N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오)부티레이트(SPDB), N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(SPDP), 4-말레이미드 부틸산 N-하이드록시숙신이미드 에스테르(GMBS), 3-말레이미드 카프로산 N-히드록시숙신이미드 에스테르(EMCS), m-말레이미드벤조일-N-히드록시숙신이미드 에스테르(MBS), N-(α-말레이미드 아세톡시)-숙신이미드 에

스테르(AMAS), 숙신이미딜-6-(β-말레이미드 프로피온아미드)헥사노에이트(SMPH), N-숙신이미딜-4-(p-말레이미드페닐)-부티레이트(SMPB), N-(p-말레이미드페닐)이소시아네이트(PMPI), 6-말레이미드 카프로일(MC), 말레이미드 프로파노일(MP), p-아미노 벤질옥시카르보닐(PAB), N-숙신이미딜-4-(2-피리딜티오)펜타노에이트(SPP), N-숙신이미딜(4-요오도아세틸)아미노벤조에이트(SIAB), 발린-시트룰린(Val-Cit) 및 알라닌-페닐알라닌(ala-phe)과 같은 펩티드 링커를 포함한다.

[0121] 링커를 통해 항체와 세포 독성 물질을 결합시키는 기술은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 항체와 링커의 결합은 공유 결합 또는 비공유 결합 (이온 결합, 소수성 결합 등), 바람직하게는 공유 결합이다. 이 결합은, 본 발명의 복합체를 대상에게 투여한 경우에 혈액 중에서는 세포 독성 물질이 유리하기 어려운 결합인 것이 바람직하다. 이러한 결합으로서는, 말레이미드기와 티올기의 결합, 할로에스테르와 티올을 반응시켜 얻어지는 결합, 카르복실기와 아미노기의 아미드 결합, 티올기와 티올기의 디설파이드 결합, 아미노기와 알데히드기에 의한 쉬프 염기, 티올기와 카르복실산의 티오에스테르 결합, 히드록시기와 카르복실기의 에스테르 결합, 아미노기와 스쿠아르산 유도체(예를 들어, 디메틸스쿠아르산)에 의한 결합, 디에닐알데히드기와 아미노기의 결합 등을 들 수 있다. 이러한 결합의 구체예로서는, 링커의 일단에 존재하는 말레이미드기와, 항체 상의 시스테인 잔기에 포함되는 티올기의 결합, 링커의 일단에 존재하는 숙신이미드기와, 항체 상의 리신 잔기에 포함되는 아미노기의 탈수 치환 결합(예를 들면, 국제공개 제2008/096760호), 링커의 일단에 존재하는 아미노기와, 항체 상의 아스파르트산 또는 글루탐산에 포함되는 카르복실산과의 탈수 축합 결합(예를 들면, WSCDI를 사용한다) 등을 들 수 있다. 항체와 링커의 결합의 구체적인 방법은 예를 들어 국제공개 제2010/055950호를 참조한다.

[0122] 한편, 항체 또는 링커와 세포 독성 물질의 결합은 공유 결합 또는 비공유 결합(이온 결합, 소수 결합 등)이며, 바람직하게는 공유 결합이다. 특히, 상기 결합은 본 발명의 복합체를 대상에게 투여한 경우에, 혈액 중에서는 세포 독성 물질이 유리하기 어려운 결합인 것이 바람직하다. 이러한 관점에서, 항체 또는 링커와 세포 독성 물질의 결합은 이에 한정되는 것은 아니지만, 바람직하게는 에스테르 결합, 카바메이트 결합, 카보네이트 결합, 티오카르바메이트 결합이며, 보다 바람직하게는 에스테르 결합이다.

[0123] 본 발명의 ADC에 있어서, 항체 1 분자 당의 세포 독성 물질의 결합수(약물 결합수)는 그 유효성, 안전성을 고려하여, 그 수가 일정한 수가 되도록, 반응시키는 원료·시약 사용량 등의 반응 조건을 규정하여 실시한다. 그러나, 저분자 화합물의 화학 반응과는 달리, 상이한 수의 약물이 결합된 혼합물로서 수득되는 것이 통상적이다. 항체 1 분자에 대한 약물의 결합수는 평균값, 즉 평균 약물 결합수로서 특정되고 표기된다. 따라서, 본 명세서에서 특별히 언급하지 않는 한, 약물의 결합수는 평균값을 의미한다.

[0124] 항체 1분자 당의 약물 결합수는, 사용하는 환원제의 종류 및 그 농도, 항체에 대한 링커 및 약물의 농도(몰 과잉률 등), 및 결합 반응에 있어서의 온도 또는 시간을 조정함으로써 제어할 수 있다. "환원제"로서는, 항체 중의 디설파이드 결합을 환원적으로 절단하여 상기 티올기를 통한 결합을 발생시킬 수 있는 것이면 특별히 제한은 없지만, 예를 들면, 디티오슬레이톨(DTT, DL-DTT), 2-메르캅토에틸아민, 메르캅토에탄올, TCEP를 들 수 있다.

[0125] 본 발명에 있어서, 1 항체 당의 약물 평균 결합수는 특별히 제한되는 것은 아니지만, 예를 들어 1 내지 10개이며, 바람직하게는 3 내지 8개이며, 보다 바람직하게는 3 내지 5개이다. 또한, 항체 1 분자 당의 약물 결합수는, 후술하는 실시예에 나타내는 바와 같이, 세포 독성 물질(예를 들면, DM1)의 흡수의 피크에 있어서의 흡광도와 항체의 흡수의 피크인 280nm의 흡광도를 측정하고, 각각이 서로의 흡수 피크에 미치는 영향을 가미하여 연립 방정식을 세워 계산함으로써, 항체와 세포 독성 물질의 농도를 구하고 분자수의 비율을 결정함으로써 구할 수 있다. 또한, DTNB 등의 티올기를 비색 정량하는 시약을 이용하여 구할 수도 있다.

[0126] 또한, 본 발명의 ADC는 대기 중에 방치하거나 또는 재결정함으로써, 수분을 흡수하고, 흡착수가 붙거나, 수화물이 되는 경우가 있고, 이러한 물을 포함하는 화합물 및 염도 본 발명에 포함된다.

[0127] 본 발명의 ADC를 구성하는 원자 중 하나 이상에 원자 동위원소의 비천연 비율도 함유할 수 있다. 원자 동위원소의 예로는 ^{2}H, ^{3}H, ^{125}I, ^{14}C를 들 수 있다. 또한, 본 발명의 ADC는 바이오 이미징 기술 등에서 검출될 수 있다. 따라서, 표지 물질이 결합되어 있어도 된다. 표지 물질은 사용하는 검출 방법 등의 종류에 따라 적절히 선택되지만, 예를 들면 방사성 표지 물질, 형광성 표지 물질, 상자성 표지 물질, 초상자성 표지 물질, 효소 표지 물질을 들 수 있다. 또한, 이러한 표지 물질과 ADC의 결합은 직접적인 것일 수도 있고, 간접적인 것일 수도 있다. 간접적인 결합으로서는, 표지 물질을 결합시킨 2차 항체, 표지 물질을 결합시킨 폴리머(프로테인 A, 단백질 B 등)를 통한 결합을 들 수 있다.

[0128] 보다 구체적으로는, ADC를 표지하는 방사성 동위 원소로서 양전자 방출 핵종을 이용할 수 있다. 예를 들어,

^{64}Cu, ^{18}F, ^{55}Co, ^{66}Ga, ^{68}Ga, ^{76}Br, ^{89}Zr 및 ^{124}I와 같은 양전자 방출 핵종으로 항체를 표지할 수 있다. 이들 양전자 방출 핵종에 의한 ADC의 표지에는 공지의 방법 (Nucl Med Biol. 1999;26(8):943-50. 、J Nucl Med. 2013;54(11):1869-75. 등)을 이용할 수 있다. 또한, 양전자 방출 핵종으로 표지된 ADC가 대상에게 투여된 후에, PET(포지트론 단층 촬영 장치)에 의해 그 방사성 핵종으로부터 방사되는 방사선을 체외로부터 계측하고, 컴퓨터 토모그래피의 수법으로 화상(이미지)으로 변환한다. 이러한 방식으로, 대상에게 투여된 ADC의 표적 부위에의 도달, 집적 등을 추적할 수 있다.

[0129] <키메라 항원 수용체>

[0130] 후술하는 실시예에 나타내는 바와 같이, 본 발명의 항체의 표적인 인간 Eva1은 다양한 암에서 발현된다. 또한, 본 발명의 항체의 가변 영역은 키메라 항원 수용체(CAR) 및 그것을 발현하는 T 세포(소위 CAR-T)에 유용하다. 따라서, 본 발명은 인간 유래의 Eva1 단백질에 결합하는 영역, 막 관통 영역 및 세포 내 신호 영역을 포함하는 CAR의 양태도 취할 수 있다.

[0131] 본 발명에 있어서, "키메라 항원 수용체(Chimeric Antigen Receptor: CAR)"는, 세포외 영역이 되는 인간 유래의 Eva1 단백질에 결합하는 영역, 막 관통 영역, 세포 내 신호 영역이, 그 순서대로 N-말단 측으로부터 배치되고 직접 또는 간접적으로 연결된 키메라 단백질을 의미한다.

[0132] 본 발명에 있어서, "인간 유래의 Eva1 단백질에 결합하는 영역(항원 결합성 영역)"은 예를 들면, 상술한 항체 또는 그 기능적 단편을 사용할 수 있지만, 통상 CAR에는 scFv가 사용된다.

[0133] "scFv"는, 상술한 바와 같이, 모노클로날 항체(면역글로불린)의 경쇄 가변 영역과 중쇄 가변 영역이 링커를 통해 연결된 구조체이며, 항원과의 결합능을 유지하고 있다. scFv에 있어서의 N 말단측의 순서로는 경쇄 가변 영역, 링커, 중쇄 가변 영역이어도 되고, 또한 중쇄 가변 영역, 링커, 경쇄 가변 영역이어도 되지만, 바람직하게는 전자이다.

[0134] scFv에서의 "링커"로서는, 예를 들면 펩티드 링커를 사용할 수 있다. 링커의 길이는 특별히 한정되지 않는다. 예를 들어, 아미노산 수가 5 내지 25개인 링커를 사용할 수 있다. 링커의 길이는 바람직하게는 8 내지 25 아미노산, 더욱 바람직하게는 15 내지 20 아미노산이다. 펩티드 링커의 바람직한 예는 글리신 또는 글리신 및 세린(GGS 링커, GS 링커, GGG 링커 등)을 포함한다. 또한, 서열 번호: 58에 기재된 134 내지 151 위치의 18 아미노산으로 이루어지는 링커도 바람직한 예로서 들 수 있다. 이들 링커를 구성하는 아미노산인 글리신과 세린은, 그 자체의 크기가 작고, 링커 내에서 고차 구조가 형성되기 어렵다는 이점을 갖는다.

[0135] scFv의 기가 되는 모노클로날 항체로서는, 특별히 제한은 없지만, 예를 들면, 상술한 비인간 동물 유래의 항체, 인간 항체, 인간화 항체를 들 수 있다. 또한, 바람직한 예로서도 상술한 바와 같지만, 후술하는 실시예에 나타내는 바와 같이, 인간 Eva1에 따른 활성화 및 세포 증식 등의 관점에서 상기 (H2-L2)의 조합이 바람직하고, 또한 N 말단측으로부터 순서대로 L2, 링커, H2에 연결되어 이루어지는 scFv가 바람직하다.

[0136] 본 발명에 있어서 "막 관통 영역"은, 세포막을 관통하는 기능을 갖고, CAR을 세포막에 연결할 수 있는 폴리펩티드이면 특별히 제한은 없다. 막 관통 영역을 담당하는 폴리펩티드의 유래가 되는 단백질로서는, 예를 들면, CD28, CD3ζ, CD3ε, 4-1BB, CD45, CD4, CD5, CD8α, CD8β, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, ICOS, CD154, GITR, T 세포 수용체의 α 및 β 쇄를 포함한다.

[0137] 본 발명에 있어서 "세포 내 신호 영역"은 CAR이 세포막 상에 배치되었을 때에 세포 내에 배치되는 영역이며, 면역 세포의 이펙터 기능의 발휘에 필요한 신호를 전달하는 것, 즉 항원 결합성 영역이 항원(인간 Eva1)과 결합할 때, 면역 세포의 활성화에 필요한 신호(소위 1차 신호)를 전달할 수 있는 영역이다. 이러한 세포내 신호 영역으로서는, 일반적으로 T 세포 수용체(TCR) 및 CD3 복합체와 같은 활성화 신호 전달 도메인만을 갖는 것(제1 세대 CAR), 활성화 신호 전달 도메인 이외에 공자극 분자 유래의 공자극 신호 전달 도메인(예를 들어, CD28 또는 4-IBB의 세포 내 도메인)을 갖는 것 (제2 세대 CAR), 활성화 신호 전달 도메인 이외에 복수의 공자극 신호 전달 도메인(예를 들어, CD28 및 4-IBB의 세포 내 도메인)을 갖는 것(제3세대 CAR)이 있다. 또한, 본 발명자들이 종전 개발한 CD79A 세포 내 영역 및 CD40 세포 내 영역을 포함하는 것도 들 수 있다(Mol Ther 2021 Sep 1;29(9):2677-2690. 참조).

[0138] "세포 내 신호 영역"은 상기 한 바와 같이 1 차 신호를 전달할 수 있으면 좋고, 상기 신호에 관여하는 단백질의 활성화 신호 전달 도메인을 사용할 수 있다. 1 차 신호 전달에는 면역 수용체 활성화 티로신 모티프 (immunoreceptor tyrosine-based activation motif: ITAM)가 관여하

는 것으로 알려져있다. ITAM을 갖는 단백질로서는, 예를 들면, CD3ζ, FcRγ, FcRβ, CD3γ, CD3δ, CD3ε, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD66d, DAP10, DAP12를 들 수 있다.

[0139] 또한, 상기와 같이, 또한 후술하는 실시예에 나타내는 바와 같이, "CD79A 세포 내 영역 및 CD40 세포 내 영역을 포함하는 것"도, 본 발명에 따른 세포 내 신호 영역으로서 바람직하게 사용된다. 이 경우, CD79A 세포 내 도메인과 CD40 세포 내 도메인의 배치 관계는 특별히 제한되지 않고, N 말단측이 CD79A 세포 내 영역인 양태와, N 말단측이 CD40 세포 내 영역인 경우의 어느 것이나 채용 가능하다. 배치 관계는 바람직하게는 전자이다. CD79A 세포 내 영역 및 CD40 세포 내 영역은 직접 연결되거나 링커를 통해 연결되는 것이 바람직하다. 링커는 NFκB 시그널 활성화 작용이 현저하게 손상되지 않는 한 특별히 제한되지 않고, 임의이다. 링커는 바람직하게는 글리신 또는 글리신과 세린으로 구성된 링커 (GGS 링커, GS 링커, GGG 링커 등)이다. 링커의 길이는 특별히 한정되지 않지만, 예를 들어 1 내지 20 아미노산, 바람직하게는 1 내지 10 아미노산, 보다 바람직하게는 1 내지 5 아미노산이다.

[0140] 본 발명에 있어서 CAR이 포함하는 세포 내 신호 영역의 수는, 1개에 한정되지 않고, 복수의 세포 내 신호 영역을 포함할 수도 있다(예를 들면, 1 내지 5개, 1 내지 3개, 또는 1개 또는 2개의 신호 전달 인자도 포함될 수 있음). 이 경우, 포함하는 복수의 세포 내 신호 영역은 동일하거나 상이할 수 있다.

[0141] 본 발명의 CAR은 전술한 항원 결합성 영역, 막 관통 영역 및 세포 내 신호 영역 이외에 다른 도메인을 포함할 수 있다. 다른 도메인의 예는 공자극 전달 영역, 스페이서 서열, 신호 펩티드 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0142] T 세포 상에 발현되는 공자극 분자는 항원 제시 세포 상에 발현되는 각 공자극 분자에 특이적인 리간드와의 결합에 의해 세포 내로 공자극 신호를 전달하고 T 세포의 활성화를 보조하는 것으로 알려져 있다(2차 신호 전달). 본 발명에 있어서 "공자극 전달 영역"이란, 상기와 같은 공자극 분자의 공자극 신호 전달에 관여하는 세포 내 도메인을 의미한다. 공자극 분자의 예는 CD28, 4-1BB(CD137), OX40(CD134), ICOS, CD2, CD4, CD5, CD8α, CD8β, CD154 등을 포함한다. 본 발명의 CAR은 이들 공자극 분자의 공자극 전달 영역을 포함할 수 있다.

[0143] 본 발명의 CAR이 포함할 수 있는 공자극 전달 영역의 수는 하나에 한정되지 않고, 복수일 수 있다. 본 발명의 CAR은 예를 들어 1 내지 5개, 1 내지 3개, 또는 1개 또는 2개의 공자극 전달 영역을 포함할 수 있다. 본 발명의 CAR이 복수의 공자극 신호 전달 영역을 포함하는 경우, 해당 영역은 동일하거나 상이할 수 있다.

[0144] 본 발명에 있어서 "스페이서"란, 각 영역 등의 사이를 연결하는 서열을 의미하고, 각 영역의 기능을 억제하지 않는 한 특별히 제한은 없고, 또한 그 아미노산수도 특별히 제한되는 것은 아니지만, 통상 1 내지 500 아미노산, 바람직하게는 5 내지 300 아미노산이고, 더욱 바람직하게는 10 내지 100 아미노산이다.

[0145] 특히, 본 발명의 CAR에서, 항원 결합성 영역과 막 관통 영역은 직접 또는 비교적 쇼트 스페이서를 통해 연결되는 것이 바람직하다. 항원 결합성 영역과 막 관통 영역 사이의 스페이서의 구성 아미노산 수는, 예를 들면 1 내지 400이고, 바람직하게는 10 내지 300이다. 또한, 후술하는 실시예에 나타내는 바와 같이, 본 발명의 CAR을 발현하는 세포를 IL-2 부재 하에서 배양하는 경우에는, 세포 증식 및 사이토카인 생산의 관점에서, 상기 구성 아미노산은 150 내지 300 인 것이 보다 바람직하고, 200 내지 250인 것이 더욱 바람직하다. 한편, 본 발명의 CAR을 발현하는 세포를 IL-2 존재 하에서 배양하는 경우에는 상기 구성 아미노산은 10 내지 30인 것이 보다 바람직하다.

[0146] 스페이서의 서열은 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면, IgG, 바람직하게는 인간 IgG(예를 들면, 서브타입 IgG1이나 IgG4)의 힌지부 또는 그 일부, 힌지부와 CH2의 일부, 또는 막 관통 도메인에 이용하는 인자(예를 들어 CD28)의 일부 등의 서열을 스페이서에 사용할 수 있다. 또한, 힌지부 또는 그 일부의 배열을 이용함으로써, 유연성이 풍부한 스페이서가 구성되는 것을 기대할 수 있다. 이러한 스페이서로서는, 구체적으로는 서열번호: 59, 60, 61, 62 또는 62 (서열번호: 58에 기재된 268 내지 499 위치)에 기재된 아미노산 서열로 이루어지는 스페이서를 들 수 있다.

[0147] 본 발명에서 "신호 펩티드"는 CAR의 분비를 촉진하거나 세포막으로의 국소화를 지시하는 펩티드를 의미하며, 리더 서열이라고도 불린다. 신호 펩티드는 통상적으로 항원 결합 영역의 N-말단에 직접 또는 간접적으로 결합될 수 있다. 선택적으로, 세포 프로세싱 및 세포막으로의 CAR의 국재화 동안 항원 결합 영역으로부터 신호 펩티드가 절단될 수 있다. 이러한 신호 펩타이드의 예는 인간 GM-CSF 수용체, T 세포 수용체의 α 및 β 쇄, CD8α, CD8β, CD3ζ, CD28, CD3ε, CD45, CD4, CD5, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, ICOS, CD154, GITR 등의 신호 펩티드를 들 수 있다.

[0148] 이상, 본 발명의 CAR에 있어서의 각 영역 등의 예를 설명했지만, 이들 영역 등에 관한 구체적인 아미노산 서열은, 통상의 기술자라면, 공지의 문헌이나 ＮＣＢＩ（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｇｕｉｄｅ／）등의 데이터베이스를 검색하여 적절히 입수할 수 있다. 또한, 상기 표 3 등에 나타내는 바와 같이, 본 명세서의 서열표에 있어서 구체적인 서열도 개시되어 있다. 또한, 이러한 전형적인 아미노산 서열（예를 들면, NCBI 레퍼런스 시퀀스(서열)）에 한정되지 않고, 본 발명에 관한 영역 등은 해당 영역이 담당하는 기능을 유지하고 있는 한, 이들 전형적인 아미노산 서열에 대한 변이체, 상동체도 포함할 수 있다. 또한, 이러한 변이체, 상동체는 전형적인 아미노산 서열에 대해 통상 높은 상동성을 갖는다. 높은 상동성은 통상 60% 이상이며, 바람직하게는 70% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상(예를 들면, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상)이다.

[0149] 또한, 본 발명의 CAR은 1종의 폴리펩티드로 이루어지는 분자일 수 있으며, 2종 이상의 폴리펩티드의 복합체로 이루어지는 분자일 수도 있다. 또한, 본 발명의 CAR은 폴리펩티드 또는 그 복합체로 이루어지는 분자일 수 있으며, 폴리펩티드 또는 그 복합체에 다른 물질(예를 들면, 형광 물질, 방사성 물질, 무기 입자 등)이 연결되어있는 것일 수 있다.

[0150] 본 발명의 CAR은 화학적으로 변형된 것일 수 있다. 본 발명의 CAR을 구성하는 폴리펩티드는 C 말단이 카르복실기(-COOH), 카르복실레이트(-COO-), 아미드(-$CONH_2$) 또는 에스테르(-COOR) 중 어느 것이어도 된다. 여기서 에스테르에 있어서의 R로서는, 예를 들면, 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸 등의 C1-6 알킬기; 예를 들면, 시클로펜틸, 시클로헥실 등의 C3-8 시클로알킬기; 예를 들면, 페닐, α-나프틸 등의 C6-12 아릴기; 예를 들면, 벤질, 페네틸 등의 페닐-C1-2 알킬기; α-나프틸메틸 등의 α-나프틸-C1-2 알킬기 등의 C7-14 아랄킬기; 피발로일옥시메틸기 등이 사용된다. 본 발명의 CAR을 구성하는 폴리펩티드는 C 말단 이외의 카르복실기(또는 카르복실레이트)가 아미드화 또는 에스테르화되어 있어도 된다. 이 경우의 에스테르로서는, 예를 들면 상기 C 말단의 에스테르 등이 사용된다. 또한, 본 발명의 CAR을 구성하는 폴리펩티드에는, N 말단의 아미노산 잔기의 아미노기가 보호기(예를 들면, 포르밀기, 아세틸기 등의 C1-6 알카노일 등의 C1-6 아실기 등)로 보호되어 있는 것, 생체 내에서 절단되어 생성할 수 있는 N 말단의 글루타민 잔기가 피로글루타민 산화한 것, 분자 내의 아미노산의 측쇄 상의 치환기(예를 들면 -OH, -SH, 아미노기, 이미다졸기, 인돌기, 구아니디노기 등)가 적절한 보호기(예를 들면, 포르밀기, 아세틸기 등의 C1-6 알카노일기 등의 C1-6 아실기 등)로 보호되어 있는 것도 포함된다.

[0151] 또한, 본 발명의 CAR은 다른 기능성 단백질을 가질 수 있다. 다른 기능성 단백질로서는 특별히 제한은 없고, 본 발명의 CAR에 부여하고 싶은 기능에 따라 적절히 선택된다. 예를 들어, CAR의 정제 및 검출을 용이하게 하는 목적으로 사용하는 기능성 단백질로는 Myc 태그, His 태그, HA 태그, FLAG 태그(등록상표, Sigma-Aldrich 사), 형광 단백질 태그(GFP 등) 등을 들 수 있다.

[0152] 본 발명의 키메라 항원 수용체는 산 또는 염기와의 제약상 허용되는 염의 형태일 수 있다. 염은 약학적으로 허용되는 염인 한 특별히 한정되지 않고, 산성염, 염기성염의 어느 것이어도 채용할 수 있다. 예를 들면, 산성염의 예로서는 염산염, 브롬화수소산염, 황산염, 질산염, 인산염 등의 무기산염; 아세트산염, 프로피온산염, 타르타르산염, 푸마르산염, 말레산염, 말산염, 구연산염, 메탄술폰산염, 파라톨루엔술폰산염 등의 유기산염; 아스파르트산염, 글루탐산염 등의 아미노산염 등을 들 수 있다. 또한, 염기성염의 예로서, 나트륨염, 칼륨염 등의 알칼리 금속염; 칼슘염, 마그네슘염 등의 알칼리 토금속염 등을 들 수 있다.

[0153] 본 발명의 키메라 항원 수용체는 용매화물의 형태일 수 있다. 용매는 약학적으로 허용되는 것이면 특별히 한정되지 않고, 예를 들면 물, 에탄올, 글리세롤, 아세트산 등을 들 수 있다.

[0154] 또한, 지금까지 CAR을 이용한 실험, 임상 연구 등의 보고가 몇 가지 있고(예를 들면, 랜래。址腥끽르Ｂ깼간괏?, 이들 보고를 참고로 하여, 본 발명의 CAR을 구축할 수 있다. 또한, 후술하는 실시예에 있어서, 구체적인 서열 등도 나타내고 있으므로, 이들을 참고로 하여 본 발명의 CAR을 구축할 수도 있다.

[0155] <키메라 항원 수용체를 코딩하는 뉴클레오티드>

[0156] 본 발명은 본 발명의 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. scFV 등의 항원 결합 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 정보에 대해서는, 표적으로 하는 항원을 인식하는 모노클로날 항체를 제작하고, 이러한 모노클로날 항체의 아미노산 서열을 에드만법 등의 공지의 방법으로 결정하고, 이러한 아미노산 서열에 기초하여 입수할 수도 있다. 또한, 상술한 인간화 항체 등에 대해서는, 본 명세서의 서열표에 있어서도 구체적인 서열을 개시하고 있다. 또한, 당해 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마의 뉴클레오티드 서열을 해석함으로써도 입수

할 수 있다.

[0157] 또한, 항원 결합성 영역을 포함하여, 본 발명의 CAR에 있어서의 각 영역 등을 코딩하는 구체적인 뉴클레오티드 서열은, 통상의 기술자라면 공지의 문헌이나 NCBI(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/)등의 데이터베이스를 검색해도 적절히 입수할 수 있다. 또한, 상기 영역 등을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 공지의 것에 한정되지 않고, 상기 각 영역 등을 코딩하는 뉴클레오티드 서열이면 사용할 수 있다. 유전자 코딩의 축중으로 인해 하나의 아미노산에 상응하는 복수의 코돈이 존재한다. 따라서, 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 다수 존재한다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열은, 본 발명의 CAR을 코딩하는 한 유전자 코딩의 축중에 의해 발생하는 복수의 뉴클레오티드 서열 중 어느 것이어도 된다. 또한, CAR을 발현하는 세포에서의 발현을 최적화하기 위해서, 본 발명의 CAR의 각 영역 등을 코딩하는 뉴클레오티드 서열에서 아미노산을 코딩하기 위해 선택된 코돈을 변형시킬 수 있다.

[0158] 그리고, 통상의 기술자라면 이러한 뉴클레오티드 서열 정보에 기초하여, 화학 합성하는 방법(포스포로아미다이트법 등)이나 PCR에 의해 증폭하는 방법 등의 공지의 기술을 이용하여, 각 영역 등을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제조할 수 있다. 또한, 이와 같이 하여 얻어진 각 영역 등을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 직접 또는 스페이서를 통해 연결함으로써, 본 발명의 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 얻을 수 있다. 또한, 각 영역 등을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 연결은 후술하는 실시예에 나타내는 바와 같이, 예를 들면 중첩 확장 PCR법(overlap extension PCR) 등의 공지의 방법을 이용하여 행할 수 있다.

[0159] <키메라 항원 수용체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터>

[0160] 본 발명은 전술한 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다. 본 발명의 벡터로서는 직쇄상 또는 환상이어도 되고, 예를 들면 바이러스 벡터, 플라스미드 벡터, 에피소멀 벡터, 인공 염색체 벡터, 트랜스포존 벡터를 들 수 있다.

[0161] 바이러스 벡터로서는, 예를 들면 렌티바이러스 등의 레트로바이러스 벡터, 센다이바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노 관련 바이러스 벡터, 헤르페스 바이러스 벡터, 백시니아 바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터, 폴리오바이러스 벡터, 실비스바이러스 벡터, 러브드바이러스 벡터, 파라믹소바이러스 벡터, 오르토믹소바이러스 벡터를 들 수 있다.

[0162] 플라스미드 벡터로서는, 예를 들면 pcDNA3.1, pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNAI/Neo 등의 동물 세포 발현용 플라스미드 벡터를 들 수 있다.

[0163] 에피소멀 벡터는 염색체 밖에서 자율 복제가능한 벡터이다. 에피소멀 벡터를 사용하는 구체적인 수단은 공지되어 있다(Yu et al., Science, 2009년, 324, 797-801페이지, 참조). 에피소멀 벡터로서는, 예를 들면, EBV, SV40 등에 유래하는 자율 복제에 필요한 서열을 벡터 요소로서 포함하는 벡터를 들 수 있다. 자율 복제에 필요한 벡터 요소로서는, 구체적으로는 복제 개시점과 복제 개시점에 결합하여 복제를 제어하는 단백질을 코딩하는 유전자이며, 예를 들면 EBV에 있어서는 복제 개시점 oriP 및 EBNA-1 유전자, SV40에 있어서는 복제 개시점 ori와 SV40LT 유전자를 들 수 있다.

[0164] 인공 염색체 벡터로서는, 예를 들면, YAC (Yeast artificial chromosome, 효모 인공 염색체) 벡터, BAC (Bacterial artificial chromodome, 박테리아 인공 염색체) 벡터, PAC (P1-derived artificial chromosome, P1-유래 인공 염색체) 벡터가 포함된다.

[0165] 이들 벡터에 있어서, 증식이 완만한 세포라도 고효율로 유전자를 도입하기 쉽고, 또한 안정 발현주의 수립이 용이하다는 관점에서 레트로바이러스 벡터가 바람직하다.

[0166] 본 발명의 벡터에는, 상기 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 외에, 프로모터, 인핸서, 폴리A 부가 신호, 터미네이터 등의 발현 제어 서열, 복제 개시점이나 복제 개시점에 결합하여 복제를 제어하는 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열, 다른 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 등을 포함할 수 있다.

[0167] 상기 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드나 후술하는 다른 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드는, 프로모터의 하류에 작동 가능하게 배치함으로써, 각 폴리뉴클레오티드를 효율적으로 전사하는 것이 가능해진다. 이러한 "프로모터"로서는, 예를 들면, CMV(사이토메갈로바이러스) 프로모터, SRα 프로모터, SV40 초기 프로모터, 레트로바이러스의 LTR, RSV(라우스 육종 바이러스) 프로모터, HSV-TK(단순 헤르페스 바이러스 티미딘 키나아제) 프로모터, EF1α 프로모터, 메탈로티오네인 프로모터, 히트 쇼크 프로모터 등을 들 수 있다.

[0168] "다른 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드"로서는, 예를 들면 형광 단백질 유전자, 리포터 유전자, 약물 내성 유

전자 등의 마커 유전자, 사이토 카인 등의 T 세포 활성화에 관여하는 분자를 코딩하는 유전자 등을 들 수 있다. 또한, 예를 들어, IRES, 2A 펩티드 서열 (예를 들어, Thosea asigna 유래의 2A 펩티드 (T2A))를 코딩하는 DNA 등을 사용함으로써, 상기 다른 단백질은 상기 CAR과 함께 폴리시스트로닉에서 발현될 수 있다.

[0169] 또한, CAR을 발현하는 세포를 투여한 대상(암 환자 등)의 체내에서, 투여한 CAR 발현 세포의 아폽토시스를 적절히 유도하기 위해, 자살 유전자를 "다른 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드"로서 본 발명의 벡터는 포함될 수 있다. 자살 유전자로는, 예를 들면, 단순 헤르페스 바이러스의 티미딘 키나아제(HSV-TK), 유도성 카스파제 9(inducible caspase9: iCasp9)를 들 수 있다.

[0170] 또한, 이러한 유전자의 기능을 활성화하는 약제로서는, HSV-TK의 경우 간시클로비르, iCasp9의 경우 이량체 유도 화합물 (chemical induction of dimerization：CID) 인 AP1903 등을 들 수 있다 (Cooper LJ. 등, Cytotherapy. 2006；8 (2) ：105－17페이지, Jensen M. C. 등, Biol Blood Marrow Transplant. 2010 Sep；16 (9) ：1245－56페이지, JonesBS. , Front Pharmacol. 2014 Nov 27；5：254. , Minagawa K. , Pharmaceuticals (Basel). 2015 May 8；8 (2) ：230－49페이지、Bole－Richard E. , Front Pharmacol. 2015 Aug 25；6：174 참조).

[0171] <키메라 항원 수용체를 발현하는 세포>

[0172] 본 발명은 본 발명의 CAR을 발현하는 세포를 제공한다. 본 발명의 세포는 전술한 본 발명의 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 세포에 도입함으로써 얻을 수 있다.

[0173] 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터가 도입되는 "세포"는, 포유류(포유동물) 유래의 세포인 것이 바람직하고, 예를 들면, 인간 유래의 세포, 또는 설치류(마우스, 래트 등), 소, 양, 말, 개, 돼지, 원숭이 등의 비인간 포유류 유래 세포를 사용할 수 있다. 세포의 종류는 특별히 한정되지 않고, 혈액, 골수액 등의 체액이나, 비장, 흉선, 림프절 등의 조직, 종양이나 암성 복수 등으로부터 채취된 세포 등을 사용할 수 있다. 바람직한 예로는 CAR 발현용 세포로서 면역 세포를 들 수 있다.

[0174] "면역 세포"로서는, CD4 양성 CD8 음성 T 세포, CD4 음성 CD8 양성 T 세포, iPS 세포로부터 조제된 T 세포, αβ-T 세포, γδ-T 세포, NK 세포, NKT 세포 등을 들 수 있다. 상기와 같은 림프구 또는 전구 세포를 포함하는 것이면, 다양한 세포 집단을 사용할 수 있다. 말초 혈액에서 채취되는 PBMC (말초 혈액 단핵 세포)는 바람직한 면역 세포 중 하나이다. 즉, 바람직한 일 양태에서는, PBMC에 대하여 유전자 도입 조작을 행한다. PBMC는 통상적인 방법에 따라 또는 그에 준하여 제조될 수 있다.

[0175] 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 도입 전에 CAR 발현용 세포를 활성화시키는 것이 바람직하다. 예를 들어, 항 CD3 항체 및 항 CD28 항체로 자극하여 CAR 발현용 세포를 활성화시킬 수 있다. 보다 구체적으로는, 항 CD3 항체와 항 CD28 항체로 배양면을 코팅한 배양 용기(예를 들면 배양접시)에서 배양함으로써, 항 CD3 항체 및 항 CD28 항체에 의한 자극을 가할 수 있다. 항 CD3 항체와 항 CD28 항체가 코팅된 자기 비드(예를 들어, VERITAS 사가 제공하는 Dynabeads T-Activator CD3/CD28)를 이용하여 당해 자극을 행하는 것도 가능하다.

[0176] 세포의 생존율/증식율을 높이기 위해서는, 활성화 처리 시에 T 세포 증식 인자가 첨가된 배양액을 사용하는 것이 바람직하다. T 세포 증식 인자로서는 IL-2, IL-15, IL-7 등을 사용할 수 있다. IL-2, IL-15, IL-7 등의 T 세포 증식 인자는 통상의 방법에 따라 제조할 수 있다. 또한, 시판품을 이용할 수도 있다. 비인간 동물 종의 T 세포 증식 인자의 사용을 배제하지는 않지만, 일반적으로 T 세포 증식 인자는 인간 유래의 것 (재조합체일 수 있음)을 사용한다.

[0177] 전형적으로, 그 적용(대상으로의 투여) 때문에, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 도입 후의 세포(본 발명의 폴리뉴클레오티드 도입 림프구)를 증식시킨다. 예를 들어, T 세포 성장 인자가 첨가된 배양액을 사용하여 본 발명의 폴리뉴클레오티드 도입 림프구를 배양한다(필요에 따라 계대 배양한다). 상기 배양에 더하여, CAR 발현용 세포의 활성화의 경우와 마찬가지의 처리(재활성화)를 행하는 것으로 해도 된다.

[0178] 또한, 본 발명의 세포의 배양에는, 혈청(인간 혈청, 소 태아 혈청 등)을 첨가한 배지를 사용해도 되지만, 무혈청 배지를 채용함으로써, 임상 응용 시의 안전성이 높고, 또한 혈청 로트 간의 차이에 의한 배양 효율의 차이가 나기 어렵다는 이점을 갖는 세포를 조제할 수 있게 된다. 혈청을 사용하는 경우에는, 자가혈청, 즉 본 발명의 세포의 투여를 받는 대상으로부터 채취한 혈청을 사용하는 것이 바람직하다.

[0179] 또한, 본 발명의 세포는 과도한 면역 반응 등을 억제하는 단백질 (면역 체크 포인트 물질 등)의 기능이 억제된 세포일 수 있다. 이러한 단백질의 예는 Programmed Death 1 (PD1), ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、ＣＴＬＡ４、ＴＩＭ３、ＣＥＡＣＡＭ（ＣＥＡＣＡＭ－１、ＣＥＡＣＡＭ－３、ＣＥＡＣＡＭ－５等）、ＬＡＧ３、ＶＩＳＴＡ、ＢＴＬＡ、ＴＩＧＩＴ、ＬＡＩＲ１、ＣＤ１６０、２Ｂ４、ＣＤ８０、ＣＤ８６、Ｂ７－Ｈ３（ＣＤ２７６）、Ｂ７－Ｈ４（ＶＴＣＮ１）、ＨＶＥＭ（ＴＮＦＲＳＦ１４ 또는 CD270), KIR, A2aR, MHC 클래스 I, MHC 클래스 II, GAL9를 포함한다.

[0180] 또한, 본 발명의 세포는 타가 이식을 용이하게 하기 위해, 내재성의 TCR, HLA 등의 단백질의 기능이 억제되어 있는 세포여도 된다.

[0181] 단백질의 기능을 억제하는 방법으로서는, 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 표적으로 하는 녹아웃법, 상기 유전자의 전사산물과 상보적인 dsRNA(이중쇄 RNA, 예를 들면 siRNA)를 이용하는 방법, 당해 전사산물과 상보적인 안티센스 RNA를 사용하는 방법, 상기 전사 산물을 특이적으로 절단하는 리보자임 활성을 갖는 RNA를 사용하는 방법을 들 수 있다. 또한 부위 특이적인 뉴클레아제 (예를 들어, 징크 핑거 뉴클레아제 (ZFN), 전사 활성화 유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN), CRISPR-Cas9 등의 DNA 이중 가닥 절단 효소)를 이용하여 표적 유전자를 변형시키는 방법인 게놈 편집 방법도 상기 물질의 기능을 억제하기 위해 적합하게 사용된다.

[0182] 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 세포에 도입하는 방법으로서는, 리포펙션법, 마이크로인젝션법, 인산칼슘법, DEAE-덱스트란법, 일렉트로포레이션법, 파티클 건법 등을 들 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터가 레트로바이러스 벡터인 경우, 벡터가 갖는 LTR 서열 및 패키징 신호 서열에 기초하여 적절한 패키징 세포를 선택하고, 이것을 사용하여 레트로 바이러스 입자를 제조할 수 있다. 패키징 세포의 예는 PG13, PA317, GP + E-86, GP + envAm-12, Psi-Crip을 포함한다. 또한, 트랜스펙션 효율이 높은 293 세포나 293T 세포를 패키징 세포로서 사용할 수도 있다.

[0183] 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 세포에 도입한 후, 당해 세포의 CAR의 발현은 유동 세포계측법, RT-PCR, 노던 블롯팅, 웨스턴 블롯팅, ELISA, 형광 면역 염색 등의 공지된 방법에 의해 확인할 수 있다.

[0184] <의약 조성물>

[0185] 본 발명은 본 발명의 항체, ADC 또는 CAR을 발현하는 세포(이하, 간단히 "본 발명의 항체 등"이라고도 함)를 유효성분으로 하는 의약 조성물(예를 들면, 항암제), 및 본 발명의 항체 등의 치료상 또는 예방상의 유효량을, 대상에게 투여하는 공정을 포함하여 이루어지는, Eva1 단백질과 관련된 질환(예를 들어, 암)의 치료 또는 예방의 방법도 제공하는 것이다.

[0186] 본 발명의 항체의 표적으로 하는 Eva1 단백질에 관련된 질환은, Eva1 단백질의 발현이 그 발병, 증상의 진행, 악화 등에 관여하는 질환이면 되고, 예를 들면 암을 들 수 있다.

[0187] 또한, 본 발명의 항체의 표적으로 하는 "암"으로서는, 적어도 인간 Eva1을 발현하고 있으면 되고, 당해 단백질이 발현하고 있는 한, 고형 종양이어도 되고, 백혈병, 림프종 등이어도 된다. 보다 구체적으로, 글리오마(신경줄기세포, 신경계 전구세포 및 신경교세포에서 발생한 종양, 예를 들어, 다형성 신경교모종(GBM), 성세포종(아스트로사이토마), 수아종, 뇌실상위종, 올리고덴드로그리오마, 맥락총 유두종, 특히 퇴적성 아스트로사이토마, 퇴형성 올리고덴드로아스트로사이토마, 퇴형성 올리고덴드로그리오마), 췌장암, 위암, 식도암, 대장암, 담관암, 간세포암, 유방암, 폐암, 신장암, 요로 상피암, 고환암, 전립선암, 두경부암, 갑상선암, 피부암, 자궁경부암, 자궁체부암, 난소암, 혈관종, 근육종, 골수종, 형질세포암, 멜라노마(흑색종)을 들 수 있다. 또한, 이러한 암은 원발성의 것이어도 되고, 전이성의 것이어도 되고, 또한, 본 발명에 따른 암에는 암 줄기 세포도 포함된다.

[0188] 본 발명의 "의약 조성물"은, 본 발명의 항체 등 외에, 약리학상으로 허용되는 다른 성분을 포함할 수 있다. 이러한 다른 성분으로서는, 예를 들면 담체, 유화제, 습윤제, pH 완충제, 배지, 부형제, 붕해제, 완충제, 등장화제, 현탁제, 가용화제, 무통화제, 안정제, 보존제, 방부제를 들 수 있다. 보다 구체적으로, 약리학상 허용되는 다른 성분으로서는, 주사제 등의 액상 제제의 경우에는 수용액(생리 식염수, 주사용수, 인산염 완충액, 포도당 수용액, 글리세롤 수용액 등), 수산화알루미늄 등을 예로 들 수 있다. 또한, 동결건조된 제제의 경우, 당(만니톨, 락토오스, 사카로스 등), 알부민 등을 예로 들 수 있지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 또한, 본 발명의 약학 조성물은 상기 성분이 투여 전에 혼합될 수 있는 키트의 양태일 수 있다. 또한, 주사제로서 사용하는 경우에는 주사기에 도입된 형태일 수 있다.

[0189] 본 발명의 의약 조성물은, 유효 성분으로서, 본 발명의 항체 등 만을 포함하는 것일 수 있고, 당해 항체 등 및 적어도 하나의 다른 항암제를 포함하는 것일 수도 있다. 또한, 본 발명의 항체 등은 다른 항암제와 함께 투여할 수도 있고, 이에 의해 항종양 효과를 증강시킬 수 있다. 이러한 목적으로 사용되는 다른 항암제는, 본 발명의 항체 등과 동시에, 따로따로 또는 연속하여 대상에게 투여될 수도 있고, 각각의 투여 간격을 바꾸어 투여할 수 있다. 이러한 "항암제"로서, 예를 들어, 면역 체크포인트 억제제(항-PD-1 항체 등), 겜시타빈, S-1, 에를로티닙, 5-FU, 테모졸로미드, 류코보린, 이리노테칸(CPT-11), 옥살리플라틴, 아브락산, 카르보플라틴, 파클리탁셀, 페메트렉세드, 소라페닙, 빈블라스틴, LH-RH 유사체(류프롤렐린, 고세렐린 등), 에스트람스틴 포스페이트, 에스트로젠 길항제(타목시펜, 랄록시펜 등), 아로마타제 억제제(아나스트로졸, 레트로졸, 엑세메스탄 등), 국제공개 제2003/038043에 기재된 약제를 들 수 있지만, 항종양 활성을 갖는 약제이면 한정되지 않는다. 또한, 본 발명의 세포를 포함하는 의약 조성물의 경우에는, 다른 성분으로서 세포의 보호를 목적으로 디메틸술폭사이드(DMSO)나 혈청 알부민 등, 세균의 혼입을 저지할 목적으로 항생물질 등을 포함할 수 있다. 또한, 세포의 활성화, 증식 또는 분화 유도 등을 목적으로 사이토카인, 성장 인자, 스테로이드 등의 T 세포 활성화 인자, 비타민류, 면역 자극제, 면역 체크포인트 억제제를 포함할 수도 있고, 본 발명의 세포와 이들 다른 성분을 병용할 수도 있다.

[0190] 의약 조성물의 투여 방법은 투여하는 물질의 종류, 조성물의 양태, 대상의 연령, 체중, 성별, 건강 상태 등에 따라 다르지만, 비경구 투여(예를 들면, 정맥 투여, 동맥 투여, 국소 투여), 경구 투여 중 임의의 투여 경로로 투여될 수 있다. 바람직한 투여 방법은 비경구 투여이고, 보다 바람직하게는 정맥 투여이다. 또한, 전신 투여에 관계없이 국소 투여를 실시할 수 있다. 국소 투여로서, 표적화된 조직, 기관, 기관으로의 직접 주입이 예시될 수 있다.

[0191] 의약 조성물의 투여량은 대상의 연령, 체중, 성별, 건강 상태, 증상의 진행 정도 및 투여되는 의약 조성물의 성분에 따라 달라질 수 있다. 또한, 투여 스케줄도 이들 조건에 의해 적절히 조정되어, 단회 투여 외에, 연속적으로 또는 정기적으로 복수회 투여해도 되지만, 일반적으로, 항체를 정맥 내 투여하는 경우, 성인에게는 체중 1kg당 1일 0.1~1000mg, 바람직하게는 1~100mg이다. 또한, ADC를 투여하는 경우에는, 함유하는 약물량 환산으로 성인에게는 체중 1kg당 1일 0.001~1000mg, 바람직하게는 0.01~100mg이다. 이들 항체 또는 ADC의 투여 횟수로서는, 예를 들면, 1회, 또는 1일 내지 1년간에 1회의 간격(예를 들면, 1주마다, 10~30일마다, 1월마다, 3~6월마다, 반년마다, 1년마다)으로 복수회 투여해도 된다.

[0192] 또한, 세포의 투여량으로서는, 1회의 투여에 있어서 성인에게는 체중 1kg당 투여 세포의 개수로서, $1x10^{3}$ ~ $1x10^{10}$개(바람직하게는 $1x10^{4}$ ~ $1x10^{9}$개, 보다 바람직하게는 $1x10^{5}$ ~ $1x10^{8}$개)로 할 수 있다. 투여 간격으로서는, 예를 들면, 1주마다, 10~30일마다, 1월마다, 3~6월마다, 1년마다 등으로 할 수 있다. 또한, 본 발명의 세포는 투여 대상의 체내에서 자율적으로 증식할 수 있기 때문에, 1회만의 투여로 할 수도 있다. 또한, 투여 후 체내의 본 발명의 세포 수를 모니터링하고, 그 결과에 따라 투여 시기를 결정하도록 해도 된다.

[0193] 또한, 치료 대상이 뇌인 경우에는 혈액뇌 장벽(BBB)의 존재가 종종 문제가 된다. 그러나, 다형신경교아종(GBM) 등을 앓고 있는 사람(인간)은 혈관신생이 생쇼트 뇌종양 내 혈관에 정상적인 뇌에 있는 BBB가 형성되어 있지 않기 때문에, 상기 항체를 정맥 주사 등에 의해 GBM에 전달할 수 있다.

[0194] 또한, BBB가 기능하는 경우에도 이를 회피하여 본 발명의 항체를 투여할 수 있다. 예를 들면, 정위 뇌 수술 방법에 의해 캐뉼라 등을 삽입하고, 해당 캐뉼라를 통해 글리오마 등에 직접 투여하는 방법을 들 수 있다. 또한, 본 발명의 항체를 포함하는 드래그 전달 시스템을 뇌 내에 이식하는 방법을 들 수 있다(Gill et al., Nature Med. 9:589-595 (2003) 등). 또한, 본 발명의 항체를 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터에 의한 BBB에 걸친 뉴런의 형질감염이 포함된다(미국 특허 출원 공개 제2003/0083299호 등).

[0195] 또한, 상기 BBB를 회피하는 방법 외에, 본 발명의 항체를 뇌 장벽 투과물질에 함유 또는 결합시켜 투여하는 방법을 이용할 수도 있다. 뇌 장벽 투과물질로서는, 예를 들면, BBB의 혈관 내피 상의 수용체에 결합하는 항체 결합 단편과 결합하고 있는 리포좀(미국 특허 출원 공개 제2002/0025313호 등), 저밀도 지단백질 입자(미국 특허 출원 공개 제2004/0204354호 등), 아포지방단백질 E(미국 특허 출원 공개 제2004/0131692호 등), 트랜스페린(미국 특허 출원 공개 제2003/0129186호 등), 광견병 바이러스 유래의 29 아미노산으로 이루어진 당단백질(Kumar et al., Nature, 2007년 7월 5일, 448권, 39~43페이지 참조)를 들 수 있다.

[0196] 또한, 수용체 또는 채널의 활성을 제어하여 본 발명의 항체를 투여함으로써, 당해 항체가 BBB를 통과하여 글리오마 등에 전달시킬 수도 있다. 이러한 방법으로서는, 예를 들면, 글루코코르티코이드 차단제를 이용하여 혈액

뇌 장벽의 투과성을 증가시키는 것(미국 특허 출원 공개 제2002/0065259호, 미국 특허 출원 공개 제2003/0162695호, 미국 특허 출원 공개 제2005/0124533호 등), 칼륨 채널을 활성화하는 것(미국 특허 출원 공개 제2005/0089473호 등), ABC 약물 트랜스포터를 저해하는 것(미국 특허 출원 공개 제2003/0073713호 등), 본 발명의 항체를 양이온화하는 것(미국 특허 제5,004,697호 등)을 들 수 있다.

[0197] 이상, 글리오마 등의 뇌에 있어서의 질환을 대상으로 하여 설명했지만, 당해 질환에 있어서의 본 발명의 항체의 투여 방법은 이들에 한정되는 것은 아니고, 또한, 다른 질환에 관해서도 상기 뇌에 있어서의 질환과 마찬가지로, 통상의 기술자라면 그 질환에 적합한 공지된 방법을 적절히 선택하고, 본 발명의 항체를 환부에 작용시킬 수 있다.

[0198] 본 발명에 있어서, 본 발명의 항체 등을 투여하는 "대상"으로서는, 예를 들면, 상기 암 등에 걸린 사람, 상기 암 등이 재발할 우려가 있는 사람, 상기 암 등을 앓을 우려가 있는 사람을 들 수 있다. 또한 본 발명에 있어서, "치료"란 암 등의 표적 질환에 특징적인 증상 또는 관련 증상을 완화하는 것(경증화), 증상의 악화를 저지하거나 지연시키는 등을 포함한다. "예방"이란 질병(장애) 또는 그 증상의 발병, 발현, 재발을 방지 또는 지연시키는 것, 또는 발병, 발현, 재발의 위험성을 저하시키는 것을 말한다.

[0199] [실시예]

[0200] 이하, 실시예에 기초하여 본 발명을 보다 구체적으로 설명하지만, 본 발명은 이하의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0201] <실시예 1> 항인간 Eva1 인간화 항체

[0202] 항인간 Eva1 마우스 항체(특허문헌 2에 기재된 B2E5-48 마우스 항체)를 이하에 나타내는 재료 및 방법을 사용하여 인간화를 시도하였다. 또한, 당해 항체의 경쇄 가변 영역(VL) 및 중쇄 가변 영역(VH)의 아미노산 서열은 각각, 서열번호: 21 및 27에 나타내는 바와 같다.

[0203] (재료 및 방법)

[0204] 1.1 가변 영역의 해석 및 CDR의 동정

[0205] IMGT Domain Gap Align 도구(http://www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/DomainGapAlign.cgi)를 이용하여, B2E5-48 마우스 항체의 가변 영역에서 CDR을 확인하고 가장 일치하는 생식 세포 서열을 분석하였다.

[0206] 1.2 분자 모델링

[0207] VL 및 VH에 대해서는, 공지된 항체의 결정 구조와의 상동성에 기초하여, Absolute Antibody사 내의 소프트웨어를 사용하여 분자 모델을 구축하였다. 이미지는 PyMol을 사용하여 만들었다.

[0208] 1.3 위험이 있는 서열분석

[0209] 항체의 서열에 관하여, 공표되고 있는 단백질의 모티프에 기초하여 특정의 위험(리스크)을 분석하였다. 분석은 Microsoft Excel로 구축된 시스템(Absolute Antibody Sequence Liability Tool (앱솔루트 항체 서열 취약성 툴))을 사용하여 수행하였다. 이 소프트웨어는 아래 표에 표시된 모티프를 기반으로 위험을 평가한다. 또한, 하기 표에 있어서, X는 프롤린 이외의 임의의 아미노산을 나타낸다.

표 4

[0210]

위험	취약성 (Liability)	모티프
높은	글리코실화	NXS or NXT
	유리 시스테인	C
	탈아미드화	NG, NS or QG
	이성질(체)화	DG, DP or DS
중간	탈아미드화	NH
	가수분해	NP
	분열(Cleavage)	TS, KK, RK or KR
	트랜스글루타미나제	LLQG
	인테그린(Integrin) 바인딩	RGD or KGD
	플라스틱 바인딩(binding)	FHENSP or WXXW

[0211] 1.4 유전자 합성과 클로닝

[0212] 하기 표 6에 나타낸 바와 같이, 총 4개의 인간화 중쇄 및 4개의 인간화 경쇄를 설계하였다. 각각을 개별적으로 합성하고, 인간 IgG1 중쇄 발현 벡터 및 인간 κ 경쇄 발현 벡터에 클로닝하였다. 형질감염 시에는, 인간화된 서열의 가능한 한 조합을 실시하여, 합계 16종류의 인간화 항체를 제작하였다. 이들에 더하여, 대조군으로서 키메라형 인간 IgG1(B2E5-48 마우스 항체의 불변 영역을 인간 IgG1형의 그것으로 치환한 것)을 제작하였다.

[0213] 보다 구체적으로, 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 코딩하는 DNA 서열은, Absolute Antibody사 제의 클로닝 벡터나 발현 벡터에 클로닝할 수 있도록, 5' 말단과 3' 말단에 적절한 제한 효소 인식 부위를 추가하여 설계하였다. 또한, 이들 DNA 서열은 인간 세포에서의 발현을 고려하여 코돈을 최적화하였다. 이들 서열에 기초하여 화학적으로 합성한 후, 적절한 종 및 유형의 Absolute Antibody사 제의 벡터에 클로닝하였다. 또한, 서열의 정확성은 DNASTAR Lasergene 소프트웨어를 사용하여 원시 데이터를 분석하고 Sanger Sequence로 확인하였다. 상기 확인을 행한 후, 적절한 크기의 플라스미드 DNA 프레프를 실시하여, 형질감염에 필요한 충분한 양의 고품질의 DNA를 조제하였다.

[0214] 1.5 발현과 정제

[0215] HEK293T 세포를 일시적인 형질감염에 가장 적합한 단계까지 계대하였다. 중쇄 및 경쇄 발현용 벡터를 당해 세포에 도입하고, 6일간 배양하였다. 배양물을 4000rpm으로 원심분리하여 배양 상청액을 회수하고 0.22M 필터로 여과하였다. 제1 단계의 정제는 단백질 A 친화성 크로마토그래피로 실시하고, 시트르산 pH 3.0의 완충액으로 용출한 후, 0.5M 트리스(Tris), pH 9.0으로 중화하였다. 용출된 단백질은 탈염 컬럼을 사용하여 PBS로 완충 교환하였다. 항체 농도는 UV 분광법으로 측정하고, 필요에 따라 농축하였다. 또한, 상기 키메라형 인간 IgG1은 HEK293T 세포 뿐만 아니라 CHO 세포에서도 발현시켜 조제하였다.

[0216] 1.6 항체 분석

[0217] 항체의 순도는 SDS-PAGE 및 HPLC를 사용하여 결정되었다. SEC-HPLC는 Agilent 1100 시리즈 장치에서 적절한 크기 배제 컬럼 (SEC)을 사용하여 수행되었다. 항체의 발현 역가는 단백질 A HPLC로 측정하였다.

[0218] 1.7 표면 플라즈몬 공명 해석

[0219] 인간화 항체 등의 해리 상수 및 결합 상수를 표면 플라즈몬 공명(SPR, 제품명: BiaCore T200(GE Healthcare사 제조))으로 해석하였다.

[0220] 구체적으로는, 먼저 CM5 칩에 인간 IgG 캡쳐 항체를 아민 커플링법에 의해 고정화하였다. 고정화는 기준 셀과 활성 셀 모두에서 수행되었다. 그리고, 이하의 측정 조건을 이용하여, 싱글 사이클법에 의해 항Eval 항체와 hEval의 키네틱스 해석을 수행하였다.

[0221] 측정 조건

[0222] · 시료 구획 온도(Sample compartment temperature): 10℃

[0223] · 실행 중인 완충제(Running buffer): HBS-EP + 완충제, pH 7.4

[0224] · 캡쳐 분자(Capturing molecule): 인간 IgG 항체, 레퍼런스 & 액티브 셀

[0225] · 리간드(Ligand): 각종 항체 5nM, 액티브 셀만

[0226] · 분석물: hEva1-마우스 Fc1, 5, 25, 125, 250nM, 레퍼런스 & 액티브 셀

[0227] · 재생 완충제: 3M $MgCl_2$, 레퍼런스 & 액티브 셀

[0228] · 블랭크(분석물 제로 농도)를 3 사이클

[0229] 또한, 사이클 조건은 아래 표에 나와 있다.

표 5

[0230]

개시	흐름 경로	접촉 시간	흐름 속도	기타
캡쳐	두번째	60 sec	10 μL/min	안정화 60초
시료	둘다(both)	120 sec	30 μL/min	해리 시간 60초
재생	둘다	60 sec	30 μL/min	
시료	흐름 경로	접촉 시간	흐름 속도	
캡쳐	두번째	60 sec	10 μL/min	안정화 60초
시료	둘다	120 sec	30 μL/min	해리 시간 400초
재생	둘다	60 sec	30 μL/min	

[0231] 이상의 재료 및 방법을 사용하여 얻어진 결과를 이하에 나타낸다.

[0232] (결과)

[0233] 2.1 서열(sequence) 해석

[0234] B2E5-48 마우스 항체의 VH 및 VL의 서열을 IGMT Gap Align 도구로 수행하고 모든 알려진 항체 생식 세포의 서열과 비교하여 분석하였다. 그 결과, 도면에는 나타내지 않았지만, 이들 서열은 마우스, 특히 VH에서는 IGHV1-53 패밀리, VL에서는 IGKV4-68에 가장 가까운 서열이었다. 또한, CDR은 IMGT의 정의를 사용하여 할당되었다.

[0235] 2.2 생식세포 계열의 선택

[0236] VH 및 VL의 서열을 Absolute Antibody 사의 인간 생식 세포 계열에 대한 데이터베이스에 정렬하여 분석하였다. 그 결과, 인간화를 위한 프레임워크로서 선택된 생식세포 계열을 하기 표 6에 나타낸다. 상기 표는 인간화 프레임 워크로 선택된 중쇄 및 경쇄 생식 세포 계열과 원래 마우스의 VH 및 VL과의 상동성(%)을 각각 나타낸다.

표 6

[0237]

	생식 세포 계열 ID	상동성 %
중쇄	IGHV1-46*01	67.7
	IGHV7-4-1*02	60.4
경쇄	IGKV3-11*01	66.3
	IGKV1-9*01	63.8

[0238] 2.4 CDR 그래프트 중합

[0239] VH 및 VL의 서열을 CDR 그래프트 알고리즘으로 분석하고, B2E5-48 마우스 항체의 CDR을 선택된 인간 생식 세포

계에 이식하였다. CDR은 주로 항원과의 결합에 관여하는 것으로 정의되지만, 프레임워크 영역이라고 불리는 영역 외부의 아미노산이 결합에 직접 관여하거나 CDR을 올바르게 배치하는 역할을 할 수 있다. 그래서, 결합성을 유지하기 위해서, 프레임워크 영역의 아미노산 중 어느 아미노산을 마우스 유래(오리지날)의 아미노산으로서 남기는지를 구조 유도법을 이용하여 결정하였다. 그 결과, 생성된 서열의 개요를 표 7에 나타낸다. 또한, 표 중에서 서열에서 밑줄이 그어진 서열은 각 가변 영역의 CDR임을 나타낸다.

표 7

ID	서열명 인간생식계열	서열	서열번호:	인간항체와의 상동성
	cAb4053-VH Mouse -	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMH WVKLRPGQGFEWIGEINPTNGGTDYNEKFKRKATLT VDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTIYTTALDYWG QGTTLTVSS	27	67.7%
H1	cAb4054-VH Humanized IGHV1-46*01	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMH WVRQAPGQGLEWIGEINPTNGGTDYNEKFQGRVTLT VDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTIYTTALDYWG QGTLVTVSS	15	84.4%
H2	cAb4058-VH Humanized IGHV1-46*01	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMH WVRQAPGQGLEWMGEINPTNGGTDYNEKFQGRVT MTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTIYTTALDY WGQGTLVTVSS	13	87.5%
H3	cAb4062-VH Humanized IGHV7-4-1*02	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMH WVRQAPGQGLEWIGEINPTNGGTDYNEGFTGRFVLS VDKSSSTAYLQISSLKAEDTAVYYCTIYTTALDYWGQ GTLVTVSS	16	82.3%
H4	cAb4066-VH Humanized IGHV7-4-1*02	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMH WVRQAPGQGLEWMGEINPTNGGTDYNEGFTGRFVF SVDKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCTIYTTALDYWG QGTLVTVSS	14	85.4%
	cAb4053-VL Mouse –	QIVLTQSPALMSASPGERVTLTCSASSSVGYMYWY QQKPGSSPKPWIYVTSNLASGVPARFSGSGSGTSYS LTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPPTFGAGTKLELK	21	66.3%
L1	cAb4054-VL Humanized IGKV3-11*01	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVGYMYWYQ QKPGQAPRPLIYVTSNLASGIPARFSGSGSGTDYTLT ISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPPTFGQGTKLEIK	9	84.2%
L2	cAb4055-VL Humanized IGKV3-11*01	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVGYMYWYQ QKPGQAPRPLIYVTSNRATGIPARFSGSGSGTDYTLT ISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPPTFGQGTKLEIK	7	87.4%
L3	cAb4056-VL Humanized IGKV1-9*01	QIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASSSVGYMYWYQ QKPGKAPKPLIYVTSNLASGVPSRFSGSGSGTEYTL TISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGQGTKLEIK	10	83.0%
L4	cAb4057-VL Humanized IGKV1-9*01	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASSSVGYMYWYQ QKPGKAPKPLIYVTSNLASGVPSRFSGSGSGTEYTL TISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGQGTKLEIK	8	83.2%

[0240]

[0241] 2.5 위험이 있는 서열 해석

[0242] 매우 바람직하지 않은 서열의 위험 (문제)이 인간화된 서열에 도입되지 않았 음을 확인하기 위해, 원래의 마우스 항체의 서열 및 인간화된 서열을 Absolute Antibody Sequence Liability Tool에 적용하였다.

[0243] 그 결과, 표 4에 나타낸 가장 위험한 서열인 글리코실화 모티프 및 유리 시스테인은 상기 마우스 항체 및 인간화 항체에서 모두 검출되지 않았다. 한편, 탈아미드화나 이성화의 모티프는 이들 항체에 존재하고 있는 것이 인정되었다. 그러나, 이들 모티프는 표 4에 나타낸 바와 같이 고위험으로 되어 있지만, 통상 항체에서는 흔히 볼 수 있다. 또한 이러한 모티브 기반 변형은 제조 시에 혼란을 초래할 가능성이 있지만, 많은 경우 관리 방법 여하에 의해 해소할 수 있다. 또한, 필요하다면 돌연변이 도입에 의해 이들 모티프를 제거하는 것도 가능하다. 또한, 중간 및 낮은 위험의 서열은 보다 완전한 항체를 얻는 관점에서 검출되었지만, 항체의 제조 공정에서 문제를 일으키는 것은 거의보고되지 않았다. 따라서, 상기 마우스 항체 및 인간화 항체의 서열은 특별한 문제가 없

는 것으로 판단하였다.

[0244] 3. 항체 제조 및 분석

[0245] 상기한 바와 같이, 16 종류의 인간화 항체의 제조를 시도하였다. 그 결과, 내 6종류는 전혀 상청 중에 항체가 검출되지 않고(H1-L1, H1-L2, H1-L3, H2-L1, H3-L1, H4-L1), 또한 다른 3종류(H2-L3, H3-L3, H4-L2)도 상청 중의 항체 농도(하기 역가(Titer)(mg/L))가 현저하게 낮았다. 이들은 정상적인 항체가 형성되지 않고 배양 상등액에 충분히 분비되지 않은 것으로 생각된다.

표 8

[0246]

	역가 (mg/L)	ka($M^{-1}s^{-1}$)	kd(s^{-1})	K_D(M)
키메라 항체 (CHO)	-	1.901×10^{4}	8.447×10^{-3}	4.449×10^{-7}
키메라 항체 (293T)	60	1.964×10^{4}	9.470×10^{-3}	4.822×10^{-7}
H1-L4	63	1.747×10^{4}	9.313×10^{-3}	5.331×10^{-7}
H2-L2	75	1.972×10^{4}	9.201×10^{-3}	4.666×10^{-7}
H2-L3	3	2.071×10^{4}	8.858×10^{-3}	4.277×10^{-7}
H2-L4	75	1.720×10^{4}	9.101×10^{-3}	5.291×10^{-7}
H3-L2	50	1.677×10^{4}	1.320×10^{-2}	7.871×10^{-7}
H3-L3	13	1.501×10^{4}	1.253×10^{-2}	8.348×10^{-7}
H3-L4	94	1.580×10^{4}	1.380×10^{-2}	8.734×10^{-7}
H4-L2	3	1.898×10^{4}	1.457×10^{-2}	7.677×10^{-7}
H4-L3	38	1.548×10^{4}	1.357×10^{-2}	8.766×10^{-7}
H4-L4	31	1.534×10^{4}	1.525×10^{-2}	9.941×10^{-7}

[0247] 또한, SPR법에 의해 항체의 결합 친화성을 분석한 결과, 상기 표에 나타내는 바와 같이, 모두 평균 해리 상수(K_D)는 10^{-7} 오더(order, 순서)였다. 특히, 인간화 항체에 있어서, H2-L2, H1-L4, H2-L3, H2-L4는 키메라 항체(HEK293T 세포산)와 동일한 정도였다. 또한, 상기 항체 농도도 고려하기 위해, H2-L2, H2-L4, H3-L4가 후술하는 항체 용도에 유용한 것이 시사되었다.

[0248] <참고예> 인간 Eva1 단백질의 발현

[0249] (정상 인간 혈액 세포에서의 Eva1 단백질 발현의 분석)

[0250] 항Eva1 항체의 의약 용도에 있어서의 유용성을 분석하기 위해서, 먼저 후술하는 키메라 항원 수용체(CAR)에 있어서의 유용성을 분석하기 위해서, CAR 발현의 장이 되는 각종 혈액 세포에서의 Eva1 단백질의 발현을 평가하였다.

[0251] 구체적으로는 건강한 사람 말초 혈액을 용혈시켜 (BD FACS Lysing Solution), 그 후 CD4, CD8, CD19, 호중구(선점도(scatter plot)에서 게이트(gate)), 단구 (선점도에서 게이트)로 염색하고, 동시에 마우스 항인간 Eva1 항체 및 2차 항체로 염색하여 유동 세포 계측법으로 해석하였다.

[0252] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, CD4, CD8 T 림프구, CD19B 림프구, 호중구, 단구 모두에서 Eva1 단백질의 발현은 보이지 않았다. 따라서, Eva1 단백질을 항원으로 하는 CAR을 발현하는 혈액 세포는, 당해 세포를 표적으로 하지 않는 개연성이 높은 것이 시사되었다.

[0253] (종양에서의 Eva1 단백질 발현의 분석)

[0254] 다음으로, 각종 종양에서의 Eva1 단백질의 발현을 평가하였다. 구체적으로는 먼저 각종 종양 세포주를 배양 플라스크로부터 박리하여 세포 부유액으로 한 후, 상기 (정상 인간 혈액 세포에서의 Eva1 단백질 발현의 분석)에

기재된 방법과 동일하게 하여 Eva1 단백질을 염색하였다.

[0255] 그 결과, 도 2a에 나타낸 바와 같이, OVTOKO, PA-1 및 T98G에서는 발현을 확인할 수 없었지만, 그 이외의 다양한 종양 세포주에서 Eva1 단백질의 발현이 확인되었다.

[0256] 또한 간내 담관암 사례의 수술 표본의 분리 세포에서의 Eva1 단백질 발현의 분석도 수행하였다. 구체적으로는, 간내 담관암의 수술 표본으로부터, 종양 부분을 채취하여 세포 부유액을 제조하였다 (MACS Tumor Dissociation Kit, humman, Miltenyi Biotec). 또한 종양 세포 분리 키트(Tumor cell isolation kit) 및 인간, 밀테니 바이오텍(human, Miltenyi Biotec)을 사용하여 종양 세포를 순화하고, 상기와 같이 Eva1 단백질을 염색하고, 유동 세포 계측법 분석을 수행하였다.

[0257] 그 결과, 도 2b에 나타낸 바와 같이, 간내 담관암 3개의 예 중 3 예에서 Eva1은 양성이었다.

[0258] <실시예 2> 마우스 항Eva1 항체 서열을 이용한 키메라 항원 수용체

[0259] (항인간 Eva1 마우스 항체 서열을 이용한 Eva1-CAR의 제작)

[0260] 다음으로, Eva1 단백질을 표적으로 하는 키메라 항원 수용체(CAR)의 유용성을 분석하기 위해, 이러한 CAR을 제작하였다. 구체적으로는, 도 3a에 나타낸 바와 같이, 항인간 Eva1 마우스 항체(상기 B2E5-48 마우스 항체)의 VL 및 VH를 사용하여 단쇄 항체를 구축하였다. 그리고 VL-링커-VH 및 VH-링커-VL을 제작하고, 각각 15aa의 쇼트 스페이서 도메인 (서열번호: 58에 기재된 268 내지 282 위치의 아미노산 또는 서열번호: 59에 기재된 아미노산 서열로 이루어짐) 또는 232aa의 롱 스페이서 도메인 (서열번호: 58에 기재된 268 내지 499 위치의 아미노산 또는 서열번호: 63에 기재된 아미노산 서열로 이루어짐)을 통해 CD28 막 관통 영역(CD28TM), CD28 세포 내 도메인(CD28IC), CD3zeta를 연결하여 CAR 분자를 구축하였다.

[0261] 또한, 세포 내 도메인이 없는 EGFR (절단된(truncated) EGFR, tEGFR)을 T2A 서열 뒤에 결합시켰다. 이것은 하나의 mRNA로 전사된 후, 번역 후 T2A 서열에서 CAR 및 tEGFR 분자로 분리되어 1:1의 수로 분포한다. tEGFR은 유전자 전달 마커 및 유전자 도입된 세포의 선택에 사용될 수 있다.

[0262] 구체적으로 Eva1-CAR(N 말단측으로부터의 가변 영역의 순서를 VL, VH로 하고, 상기 롱 스페이서 도메인을 갖는 것)는 하기 표 9에 나타내는 구성을 취한다.

표 9

[0263]

	세포 외 영역							막 관통 · 세포 내 영역					
	리더	항원 결합성			힌지			막 관통	세포 내 신호 영역				
cDNA	1-75	76-393	400-453	454-801	802-846	847-1176	1177-1497	1498-1581	1582-1704	1705-1713	1714-2064	2065-2121	2122-3692
폴리펩티드	1-25	26-131	134-151	152-267	268-282	283-392	393-499	500-527	528-568	569-571	572-688	689-707	708-1064
도메인	GM-CSF 리더 서열 (sequence)	VL	18aa 링커	VH	FC	CH2	CH3	CD28TM	CD28IC	GGG	CD3z	T2A	tEGFR

[0264] 또한, 표 9에 있어서 "cDNA"의 항목에 있어서의 숫자는, 서열번호: 57에 기재된 DNA 서열 중의 위치(bp)를 나타내고, "폴리펩티드"의 항목에 있어서의 숫자는 서열번호: 58에 기재된 서열 중의 위치(아미노산)를 나타낸다.

[0265] (항인간 Eva1 마우스 항체 서열을 이용한 Eva1-CAR-T의 제작)

[0266] 다음으로, 도 3b에 나타낸 바와 같이, Day 0에 건강한 사람 기증자로부터 혈액을 채취하고, CD8 마이크로 비드(Miltenyi Biotec)를 사용하여 CD8 양성 세포로 순화하였다. 그 후, CD3/CD28 비드(Invitrogen)를 이용하여 T 세포:비드 = 1:3이 되는 비율로 혼합하여, T 세포를 활성화시켰다. Day 3에 상기 CAR 분자를 코딩하는 서열을 유전자 도입이 가능한 레트로바이러스를 이용하여 유전자 도입을 행하였다(레트로바이러스의 구축은, Mol Ther 2021 Sep 1; 29(9):2677-2690.에 기재된 방법과 동일하게 실시하였다). 구체적으로는, 레트로넥틴(retronection) 코팅 플레이트에 레트로바이러스를 로딩하고, 2100rpm 120min 스핀(spin)하였다. 그 후 플레이트를 PBS로 세정한 후, 자극한 CD8+T 세포를 파종하고, 800rpm 2min 스핀하였다. Day 4는 레트로넥틴 코팅 플레이트에서 일반적인 배양 접시로 이동시켰다. Day 7에 세포를 회수하고, 비오틴(Biotin)화된 EGFR 항체(Erbitax)를 첨가한 후, MACS 안티-비오틴 비드를 사용하여 tEGFR 양성 세포를 순화시켰다. 순화된 세포는 Day 7에서 Day 10까지 계속 배양을 계속하였다. Day 10에 세포를 세고 저장하였다. 일부는 Day 10에 다시 CD3/CD28 비드를 사용하여 자극을 실시하고, Day 17-20에 실험을 행하였다.

[0267] 또한, 이하에서, 유전자 도입 방식은 동일한 방법을 사용하였다. 또한, 인간 재조합 IL-2 50U/ml를 Day 1, 4, 7, 10, 13, 16, (19)에 첨가하여 배양하였다.

[0268] (항인간 Eva1 마우스 항체 서열을 이용한 Eva1-CAR-T 유전자의 도입 효율)

[0269] 이러한 방식으로 수행된 Day 7의 유전자 전달 효율을 도 3c 및 3d에 나타내었다. 도 3c에 있어서, LH-S(VL-VH를 이용한 CAR에서 스페이서가 짧은 것), HL-S(VH-VL를 이용한 CAR에서 스페이서가 짧은 것) 및 LH-L(VL-VH를 사용한 CAR에서 스페이서가 짧은 것) 및 HL-L(VH-VL을 이용한 CAR에서 스페이서가 긴 것)에 관하여, 대표 플롯(representative plot) (종축 EGFR은 비오틴화 에르비탁스(erbitax)로 1차 염색한 다음 스트렙타비딘(streptavidin)-PE로 2차 염색하였다. 유전자 도입된 세포를 나타낸다)을 나타낸다. 또한, 도 3d에 있어서, 5명의 건강한 기증자 유래 세포를 사용하여 동일한 실험을 행한 결과를 나타낸다. 도 3c 및 3d에 나타낸 바와 같이, 스페이서가 긴 것이 유전자 도입 효율이 높았다.

[0270] (항인간 Eva1 마우스 항체 서열을 이용한 Eva1-CAR-T의 사이토카인 생산능)

[0271] 다음으로, 항인간 Eva1 마우스 항체 서열을 이용한 Eva1-CAR-T의 사이토카인 생산능을 분석하였다. 구체적으로는, 상기와 같이 제작한 CAR-T를 day 17까지 배양하고, 그 세포를 각종 주요 세포주와 1:1로 공배양하고, 6시간의 공배양 후, 고정·세포 내 염색(BD 사이토픽스/사이토펌 완충제(cytofix/cytoperm buffer))를 수행하고 IFN-감마 (IFN-γ)로 염색하였다. 얻어진 결과를 도 3e에 나타낸다.

[0272] 도 3e에 나타낸 바와 같이, EGFR만을 유전자 도입한 모의 T 세포(mock T cell)에서는 IFN-감마 생산은 보이지 않지만, Eva1-CAR-T에서는 IFN-감마 생산이 보였다. 어느 Eva1-CAR-T에서도 Eva1 음성 세포주에 대해서는 IFN-감마 생산은 보이지 않고, Eva1 양성 세포주에 대해서는 IFN-감마 생산이 보여지고 있어, Eva1-CAR-T의 항원 특이성을 확인할 수 있었다. 스페이서가 긴 것이 더 짧은 것보다 강한 IFN-감마 생산이 관찰되었다.

[0273] (Eva1-CAR-T의 스페이서 길이의 최적화)

[0274] 도 3f에 나타낸 바와 같이, 6 종류의 상이한 길이의 스페이서 영역을 갖는 마우스 항체 유래 Eva1-CAR-T를 제작하였다. 스페이서 길이는 0aa, 15aa(서열번호: 59), 30aa(서열번호: 60), 60aa(서열번호: 61), 125aa(서열번호: 62), 232aa(서열번호: 63)로 하였다. 15aa는 이전 실험에서 쇼트 버전(short version)과 동일하고 232aa는 롱 버전(long version)과 동일하다. 이것을 플라스미드에 혼입하여, 마찬가지로 레트로바이러스를 제조하고, 상기 방법과 동일하게 하여 CD8 양성 세포에 유전자 도입을 행하였다.

[0275] (6 종류의 상이한 스페이서 길이의 Eva1-CAR-T의 제작에 있어서의 유전자 도입 효율)

[0276] 이러한 방식으로 수행된, Day 7에 있어서의 유전자 도입 효율(EGFR 염색)을 도 3g에 나타내었다. 그 결과, 스페이서 길이가 30aa, 125aa, 232aa인 CAR의 3개가 다른 3종류보다 유전자 도입 효율이 높은 것이 밝혀졌다(n=5).

[0277] (6 종류의 상이한 스페이서 길이의 Eva1-CAR-T의 증폭 효율(CD3/CD28 비드 자극))

[0278] 또한, 상기 Eva1-CAR-T에, 계속해서 CD3/CD28 비드 자극을 실시하고, Day 17까지 배양을 계속했을 때의 증폭 배율을 도 3h에 나타낸다. 그 결과, CD3/CD28 비드 자극에 의한 증폭 효율에는 차이가 없었다 (n = 5).

[0279] (6 종류의 상이한 스페이서 길이의 Eva1-CAR-T의 사이토카인 생산능)

[0280] 상기 Day 17의 Eva1-CAR-T를 사용하여 실험을 행하였다. 구체적으로는, 종양 세포주와 1:1에서 공배양하고, 6시간 후에 상기와 같은 방법으로 세포를 고정·염색하고, 세포내 IFN-감마, IL-2를 유동 세포 계측법으로 평가하였다. 얻어진 결과를 도 3i에 나타낸다. 상기 도면에서 CD8 양성 세포 중 양성이었던 비율을 나타낸다.

[0281] 도 3i에 나타낸 바와 같이, 스페이서 길이 30aa, 125aa, 232aa를 이용한 3개가 우수한 사이토카인 생산을 나타냈지만, 그 중에서도 232aa의 스페이서를 갖는 Eva1CAR-T 세포가 가장 우수한 사이토카인 생산능을 나타냈다.

[0282] (6 종류의 상이한 스페이서 길이의 Eva1-CAR-T의 증폭 효율(Eva1 자극, IL-2 없음))

[0283] Eva1 양성인 HuCCT-1에 100Gy의 방사선 조사를 실시하고, CAR-T와 1:1로 공배양을 행하고, 이들의 증폭 효율을 분석하였다. 얻어진 결과를 도 3j 및 3k에 나타낸다. 도 3j에서는 각각 시계열에서의 증폭 효율을 나타낸다. 도 3k에서, Day 4에서의 증폭 배율을 플롯한다. 도 3j 및 3k에 나타낸 바와 같이, 스페이서 길이 15aa, 30aa, 232aa를 사용한 경우, 세포 증폭이 좋았다(n=5, 상이한 5명의 기증자 유래 말초 혈액으로부터 CAR-T를 제작).

[0284] (6 종류의 상이한 스페이서 길이의 Eva1-CAR-T의 증폭 효율(Eva1 자극, IL-2 있음))

[0285] 상기와 같이 하여, Eva1 양성인 HuCCT-1에 100Gy의 방사선 조사를 행하고, CAR-T 세포와 1:1로 공배양을 행하였다. 그리고, Day 1, 4, 7과 3일에 1회 IL-2 50U/ml를 첨가하여 배양하였다. 얻어진 결과를 도 31 및 3m에 나타낸다. 도 31은 각각 시계열에서의 증폭 효율을 나타낸다. 도 3m에서, Day 18에서의 증폭 배율을 플롯한다. 도 31 및 3m에 나타낸 바와 같이, 스페이서 길이 15aa, 30aa, 232aa를 사용한 경우, 세포 증폭이 좋은 경향이 인정되었다(n=5, 상이한 5명의 기증자 유래 말초 혈액으로부터 CAR-T를 제작).

[0286] <실시예 3> 항인간 Eva1 인간화 항체 서열을 이용한 키메라 항원 수용체

[0287] (항 Eva1 인간화 항체 서열을 이용한 인간화 Eva1-CAR-T(hEva1CAR-T)의 제작)

[0288] 이어서, 상기 인간화 항체 서열을 이용하여 총 6종류의 Eva1CAR-T를 제작하였다. 구체적으로는, L2-링커-H(L2H2), H2-링커-L2(H2L2), L4-링커-H(L4H2), H2-링커-L4(H2L4), L4-링커-H3(L4H3), H3-링커-L4(H3L4)의 6종류에 관하여, 각각 232aa의 스페이서를 갖는 CAR을 설계하였다. 그리고, 이들 CAR을 코딩하는 DNA를 각각 플라스미드에 혼입하고, 상기와 같이 레트로바이러스를 제조하고, 유전자 도입을 행하였다.

[0289] (6 종류의 항인간 Eva1 인간화 항체를 이용한 hEva1-CAR-T의 제조에 있어서의 유전자 도입 효율)

[0290] 이러한 방법으로 수행된 Day 7의 유전자 전달 효율 (EGFR 염색)을 도 4a에 나타내었다. 당해 도면에 나타내는 바와 같이, L2H2, L4H3을 사용한 경우, 다른 4종류보다 유전자 도입 효율이 높은 것이 밝혀졌다(n=4, 상이한 4명의 기증자 유래 말초 혈액으로부터 CAR-T를 제조).

[0291] (6 종류의 항Eva1 인간화 항체를 이용한 hEva1-CAR-T의 증폭 효율(CD3/CD28 비드 자극))

[0292] 상기에서 제작한 hEva1CAR-T를, 계속하여 CD3/CD28 비드 자극 하에서, Day 17까지 배양을 계속했을 때의 증폭 배율을, 도 4b에 나타낸다. 상기 도면에 나타낸 바와 같이, CD3/CD28 비드 자극에 의한 증폭 효율에 있어서, L2H2, H2L2, H2L4를 사용했을 경우, 다른 3종류보다 양호하였다(n=5, 상이한 5명의 기증자 유래 말초 혈액으로부터 CAR-T를 제조).

[0293] (6 종류의 항Eva1 인간화 항체를 이용한 hEva1-CAR-T의 사이토카인 생산능)

[0294] Day 17의 hEva1-CAR-T를 사용하여 실험을 수행하였다. 구체적으로는, 종양 세포주와 1:1에서 공배양하고, 6시간 후에 상기와 같이 세포를 고정·염색하여 세포 내 IFN-감마, IL-2를 유동 세포 계측법으로 평가하였다. 얻어진 결과를 도 4c 및 4d에 나타낸다. 이들 도면에서는 CD8 양성 세포 중 각 사이토카인이 양성이었던 비율을 나타낸다. 도 4c 및 4d에 나타낸 바와 같이, 각각의 hEva1-CAR-T 마다 큰 차이는 보이지 않았지만, L2H2를 이용한 CAR-T에서 Eva1 음성 세포주인 OVTOKO에 대한 사이토카인 생산이 가장 낮았다.

[0295] (6 종류의 항Eva1 인간화 항체를 이용한 hEva1-CAR-T의 증폭 효율(Eva1 자극))

[0296] 상기와 같이 하여, Eva1 양성인 HuCCT-1에 100Gy의 방사선 조사를 행하고, hEva1CAR-T 세포와 1:1로 공배양을 행하였다. 얻어진 결과를 도 4e에 나타낸다. 도면에서, 좌측은 IL-2 부재 하에서의 배양 결과를 나타내고, 우측은 Day 1, 4, 7 및 3일에 1회 IL-2 50U/ml를 첨가하여 배양한 결과를 나타낸다. 도 4e에 나타낸 바와 같이, 모두 L2H2를 사용한 CAR-T가 가장 양호한 자극 후 증폭을 나타냈다(n=5, 상이한 5명의 기증자 유래 말초 혈액으로부터 CAR-T를 제조).

[0297] (L2H2 hEva1-CAR-T의 세포 내 도메인의 검토)

[0298] 이상과 같이, 인간화 항체를 이용한 CAR에 관하여, L2H2를 이용한 CAR-T가 항원 특이성 및 세포 증식에 있어서 우수하였다. 또한, 실시예 2에 나타낸 바와 같이, 마우스 유래 항체를 사용한 CAR에 관하여, IL-2 부재 하에서의 배양에서는 스페이서 길이가 232aa인 CAR-T가 세포 증식 및 사이토카인 생산에 있어서 가장 좋았다. 한편, IL-2 존재 하에서의 배양에서는 15aa의 스페이서를 갖는 CAR-T의 세포 증식이 가장 좋았다.

[0299] 따라서, 도 4f에 나타낸 바와 같이, L2H2로 이루어진 단쇄 가변 영역 (scFv)과 2개의 스페이서 길이의 스페이서(S : 쇼트 스페이서(short spacer), L : 롱 스페이서(long spacer)를 통해 3 종류의 세포 내 도메인 (CD28IC, 4-1BBIC, CD79A/CD40IC)을 연결한 6 종류의 CAR-T를 제작하였다.

[0300] (6 종류의 hEva1-CAR-T의 제조에 있어서의 유전자 도입 효율)

[0301] 상기 6 종류의 CAR-T 제조에 있어서, Day 7에 있어서의 유전자 도입 효율(EGFR 염색)을 도 4g에 나타낸다. 당해 도면에 나타내는 바와 같이, 4-1BB-L, CD79A/CD40-L의 경우, 유전자 도입 효율이 높았다. 또한 상기와 같이, 쇼트 스페이서(S)보다 롱 스페이서(L)를 갖는 CAR 쪽이 유전자 도입 효율이 높은 것이 여기에서도 재현되었다

(n=5, 상이한 5명의 기증자 유래 말초 혈액으로부터 CAR-T를 제조).

[0302] (6 종류의 L2H2hEva1-CAR-T의 사이토카인 생산능)

[0303] 상기 Day 17의 hEva1-CAR-T를 사용하여 실험을 실시하였다. 구체적으로는, 종양 세포주와 1:1에서 공배양하고, 4시간 후에 상기와 같이 세포를 고정·염색하고, 세포 내 IFN-감마, IL-2를 유동 세포 계측법으로 평가하였다. 얻어진 결과를 도 4h 및 4i에 나타낸다. 이들 도면에서는 CD8 양성 세포 중 각 사이토카인이 양성이었던 비율을 나타낸다. 도 4h 및 4i에 나타낸 바와 같이, 각각의 hEva1-CAR-T 마다 큰 차이는 보이지 않았지만, 쇼트 스페이서보다 롱 스페이서를 갖는 CAR 쪽이 사이토카인 생산능이 높은 것이 여기에서도 재현되었다 (n = 5, 상이한 5명의 기증자 유래 말초 혈액으로부터 CAR-T를 제조).

[0304] (6 종류의 L2H2 Eva1-CAR-T의 자극 후 증폭 효율(Eva1 자극))

[0305] 상기와 같이 Eva1 양성인 HuCCT-1에 100Gy의 방사선 조사를 행하고, hEva1-CAR-T와 1:1로 공배양을 행하였다. 얻어진 결과를 도 4j에 나타낸다. 도면에서, 좌측은 IL-2 부재 하에서의 배양 결과를 나타내고, 우측은 Day 1, 4, 7 및 3일에 1회 IL-2 50U/ml를 첨가하여 배양한 결과를 나타낸다. 도 4j에 나타낸 바와 같이, 모두 4-1BB, CD79A/CD40의 쇼트, 롱 모두 거의 동등하게 좋은 결과를 나타냈다(n=5, 상이한 5명의 기증자 유래 말초 혈액으로부터 CAR-T를 제조).

[0306] (6 종류의 L2H2hEva1-CAR-T를 이용한 공배양 시험)

[0307] L2H2hEva1-CAR-T와 방사선 조사하지 않은 RPMI-8226(골수종 세포주(Myeloma cellline))을 E:T 비(비율) = 1:16으로 공배양을 실시하였다. RPMI-8226을 셀트레이스 바이올렛(CellTrace Violet)으로 표지한 후 배양을 시작하여, RPMI8226과 CAR-T를 구별 가능하게 되었다. 배양 개시로부터 48시간, 72시간, 96시간 후에 일부를 채취하고 유동 세포 계측법을 이용하여 해석을 행하였다. 얻어진 결과를 도 4k에 나타낸다. 상기 도면에서, 모든 세포에서 차지하는 종양 세포의 비율을 나타낸다. 또한, tEGFR은 tEGFR만을 유전자 도입한 Mock CAR-T 세포이기 때문에, 종양 세포는 계속 증가하고 있다. 세포 내 도메인별로 명백한 차이는 발견되지 않았다.

[0308] (6 종류의 L2H2hEva1CAR-T를 이용한 세포 독성 시험(크롬 방출 시험))

[0309] L2H2hEva1-CAR-T와 51Cr로 표지한 각종 종양 세포주를 4시간 공배양하여, 상청 중에 방출된 51Cr을 측정함으로써 손상된 세포의 비율을 조사하였다(크롬 방출 시험). E:T 비율은 10:1, 3:1, 1:1로 하였다. 얻어진 결과를 도 4l 및 4m에 나타낸다. 도 4l에 나타낸 바와 같이, Eva1 양성으로 보이는 세포주에 대해서는 hEva1-CAR-T에 의한 유의한 상해 활성이 관찰되었다. 또한 각 세포 내 도메인에 의한 명확한 차이는 관찰되지 않았다. 또한, 도 4m에 나타낸 바와 같이, 각 세포주의 Eva1-MFI를 횡축에 취하면, MFI와의 상관을 보였다.

[0310] 이상과 같이, 항원 인식 부위를 L2H2로 하는 hEva1-CAR-T에 관하여, 세포 내 도메인의 차이에 의한 반응성의 차이를 평가하였다. 인 비트로(in vitro)에서 세포 증식, 사이토카인 방출, 세포 독성 활성을 확인한 결과, 세포 증식에 있어서 4-1BB, CD79A/CD40의 세포 내 도메인을 갖는 CAR이 우수한 것을 알 수 있었다.

[0311] (담암 모델을 이용한, hEva1-CAR-T에 의한 항종양 활성의 평가)

[0312] 상이한 두 명의 기증자 유래 말초 혈액으로부터 제조된 L2H2 hEva1-CAR-T를 사용하여 항암 효과를 평가하였다. 구체적으로는 이하와 같이 하여 행하였다.

[0313] 7 주령의 NOG 마우스(NOD.Cg-PrkdcscidIl2rgtm1Sug/ShiJic)에 $1x10^6$개의 반딧불이·루시퍼라제 유전자가 각각 도입되어 있는 CFPAC1 세포(인간 췌장암 세포주) 또는 H1975(인간 폐선암)를 복강 내 접종하였다. 2주 후, 2×10^6개의 tEGFR 도입 세포(tEGFR만을 유전자 도입한 Mock CAR-T 세포, 대조군) 또는 L2H2 hEva1-CAR-T를 꼬리 정맥 경유로 정맥 내 투여를 행함으로써, 상기 CAR-T의 항종양 활성을 평가하였다. 상기 평가에서 생물 발광 이미징 (BLI)은 IVIS 스펙트럼 시스템을 사용하여 종양 진행을 평가하기 위해 수행되었다. 얻어진 결과를 도 4n-4q에 나타낸다. 또한 병행하여 체중 측정을 실시하였다.

[0314] 또한, 상기에서 사용한 2명과는 다른 기증자로부터 유래하는 말초 혈액으로부터 제작한 L2H2hEva1-CAR-T를 사용하여, 담관암에 대한 항암 효과도 평가하였다.

[0315] 구체적으로는 먼저 7주령의 NOG 마우스에 $2x10^6$개의 반딧불이·루시퍼라제 유전자 도입 HuCCT 세포(인간 담관암 세포주)를 피하 이식하였다. 2주 후, 종양 직경과 체중을 측정한 후, 2×10^6개 또는 5×10^6개의, tEGFR 도입 세

포(컨트롤) 또는 L2H2 hEva1-CAR-T를, 꼬리 정맥 경유로 정맥 내 투여를 행함으로써, 상기와 마찬가지로 BLI를 지표로 하여, 해당 CAR-T의 항종양 활성을 평가하였다. 종양 체적은, 캘리퍼스를 이용하여 피하 종양의 장경과 단경을 측정하고, "종양의 장경×단경×단경×1/2"에 의해 산출하였다. 얻어진 결과를 도 4r 및 4s에 나타낸다. 또한 병행하여 체중 측정도 실시하였다.

[0316] 또한, 상기 어느 담암 모델에의 투여예에 있어서, L2H2 hEva1-CAR로서, 항원 인식 부위(L2H2)와 막 관통·세포내 도메인(4-1BB 또는 CD79A/CD40을 포함하는 도메인)을, 상기 쇼트 스페이서로 연결한 것을 사용하였다. 또한, 이러한 CAR을 발현하는 T 세포는, 상기와 동일한 방법으로 제작하고, 도 3b에 있어서의 10일째에, 비드에 의한 재자극을 행하지 않고, 배지를 세포 보존액(Cell banker)으로 치환하고, 액체 질소 속에서 보존하였다. 그 동결 CAR-T를 융해하여 밤새 배양한 후, 비드로 재자극을 행하고, 비드 자극으로부터 1주일 후에 상기와 같이 담암 마우스에 투여하였다.

[0317] 도 4n 내지 4s에 나타낸 결과로부터 명백한 바와 같이, 췌장암, 폐암, 담관암 중 어느 것에 대해서도 L2H2 hEva1-CAR-T의 항암 효과가 확인되었다. 또한, 도면에는 나타내지 않았지만, 투여 기간 중의 각 마우스의 체중 변화에 있어서, 이상 및 현저한 차이는 없었고, 투여 대상에서 악영향을 보이지 않았다.

[0318] <실시예 3> 항인간 Eva1 인간화 항체를 포함하는 항체-약물 복합체

[0319] 상술한 인간화 B2E5-48 항체 H2-L2 (이하, B2E5-H2-L2라고도 함)를 사용하여 항체-약물 복합체 (ADC)를 제조하였다.

[0320] 구체적으로는 먼저 pcDNA3.4를 사용하여 B2E5-L2 발현용 벡터 TPG986과 B2E5-H2 발현용 벡터 TPG987을 제작하였다. 각각 E. coli JM109에 도입하여 발현시키고, NucleoBond Xtra Midi Kit (MACHEREY-NAGEL)를 사용하여 정제하였다.

[0321] 다음으로, 상기 벡터 및 ExpiFectamine CHO 형질감염 시스템(Transfection System)을 사용하여 ExpiCHO 세포에서 B2E5-H2-L2를 일시적으로 발현시켰다. 그 후, 얻어진 배양 상청액을 ProteinA 컬럼에 통과시켜 항체를 흡착시켰다. 낮은 pH에서 용출시킨 후 중화시킨 후, Capto adhere로 정제한 후 한외 여과를 수행하였다. 또한, 얻어진 항체에 대하여, 분자량, 서열, Eva1에 대한 결합능을 확인하였다.

[0322] 다음으로, 도 5에 나타낸 바와 같이, B2E5-H2-L2에 링커(SMCC)를 반응시키고, 당해 항체에 MCC기를 도입하였다. 그리고, 당해 링커와 DM1을 반응시켰다.

[0323] 구체적으로는 먼저, 상기에서 조제한 B2E5-H2-L2의 용매를 PBS 6.5/EDTA로 완충 교환하였다. 이어서 SMCC (1.84mg)의 DMSO 용액 (0.40mL; 항체 1분자에 대하여 약 5.1 당량 상당)을 실온에서 첨가하고, 반응 용액의 항체 농도를 20mg/mL로 조정하여 튜브·로테이터를 사용하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 이 반응 용액을 정제하여 SMCC 유도화된 항체를 얻었다.

[0324] 이어서, 상기 용액에 PBS 6.5/EDTA(2.56mL) 및 N2-데아세틸-N2-(3-메르캅토-1-옥소프로필)-메이탄신(4.67mg; DM1, Journal of Medicinal Chemistry, 2006년, 49권, 14호, 4392항)의 DMA(디메틸아세트아미드) 용액(0.93mL; SMCC 유도화된 항체 1분자에 대하여 약 5.8당량 상당)을 실온에서 첨가하고, 반응 용액의 항체 농도를 10mg/mL로 조정하여 튜브·로테이터를 사용하여 실온에서 16.5시간 반응, 정제하여 목적 화합물을 함유하는 용액을 얻었다. 이어서, 정제하여 여분의 성분을 제거한 후, 9.0 g/L의 농도로 6% 수크로스, 0.02% Tween20, 10 mM 석신산소듐 용액(pH 5.0) 중에 보존하였다.

[0325] 그리고, ADC의 분자량, 서열, Eva1에 대한 결합능, 약물 항체비(DAR) 등을 확인하였다. 또한, DAR은 DM1의 흡수의 피크인 252nm의 흡광도와 항체의 흡수의 피크인 280nm의 흡광도를 측정하고, 각각이 서로의 흡수 피크에 미치는 영향을 가미하여 연립 방정식을 세워 계산함으로써, 항체와 DM1의 농도를 구하고, 분자수의 비를 결정함으로써 구하였다. 결과, 상기에서 제작한 ADC에 있어서의 DAR은 3.8이었다.

[0326] <실시예 4> 항체-약물 복합체의 항종양 활성

[0327] 상기에서 조제한, 항인간 Eva1 인간화 항체를 포함하는 ADC(B2E5-ADC)의 항종양 활성을, 이하와 같이 하여 평가하였다.

[0328] (B2E5-ADC의 글리오마에 대한 세포 독성 실험)

[0329] 96-웰 디쉬(well dish)에 1웰 당 1000세포의 인간 글리오마 줄기세포(hGIC)를 파종하였다. 이어서, 2배 단계 희석한 B2E5-H2-L2, B2E5-ADC 또는 Kadcyla(트라스투주마부엠탄신)를 100㎕/웰 첨가한다. 37℃의 CO_2 인큐베이터

에서 3일 동안 배양하였다. 그리고, 각 웰에 5㎕의 MTT(5mg/ml, 와코 순약)를 첨가하고, 37℃의 CO_2 인큐베이터 내에서 2시간 배양하였다. 배양액을 폐기한 후, 90㎕의 DMSO를 첨가하고, 세포를 용해한 후 벤치마크(Bio-Rad)를 사용하여 흡광도(570nm)를 측정하였다. 얻어진 결과를 도 6a에 나타낸다.

[0330] 또한, 양성 대조군(100%)으로서, 항체 부재 하의 웰에서의 측정값을 사용하였다. 또한, 네거티브 컨트롤(0%)로서, 항체 부재하의 웰에 5㎕의 1% 트리톤(Triton)X100을 첨가하여 얻어진 측정값을 사용하였다.

[0331] (B2E5-ADC의 췌장암에 대한 세포 독성 실험)

[0332] 트립신 처리에 의해 배양 접시로부터 회수한 췌장암 세포주(BxPC3)를 5×10^4 cells/mL로 희석하고, 96홀 플레이트에 각 웰 100μL씩 파종하고, CO_2 인큐베이터 내(37℃, CO_2 농도 5%)에서 24시간 배양하였다. 배지 (RPMI-1640, 와코(Wako) 187-02705, 10% FBS)를 아스피레이터로 흡인하고 신선한 배지를 각 웰 900μL씩 첨가하였다. DM1 및 B2E5-ADC 각각을 PBS로 희석하고 (DM1 : 3800nM ~ 0.93nM, B2E5-ADC : 1000nM ~ 0.24nM), 10μL씩 BxPC3에 첨가하였다. CO_2 인큐베이터에서 48 시간 배양한 후, Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST (동인 화학)를 사용하여 죽은 세포로부터 방출된 LDH를 측정하였다. 얻어진 결과를 도 6b에 나타낸다.

[0333] (B2E5-ADC의 위암에 대한 세포 독성 실험)

[0334] 10cm 세포 배양 접시에서 배양한 위암 세포주(MKN74)에, 2.5g/L-트립신/1mmol/L-EDTA 용액, 페놀 레드 함유 [나카라이테스크 32777-15]를 1mL 첨가하고, 37℃로 5분 둔 후, 배지를 3 mL 첨가하고, 15 mL 원침관으로 회수하였다. 1200rpm에서 5분간 원심분리하고, 아스피레이터로 배지를 흡인하고, 새로운 배지를 첨가하여 재현탁하였다. 트리판 블루를 사용하여 1 μL 당 세포 수를 세고 30000 cells/mL가 되도록 조정하였다.

[0335] 96 웰 배양 플레이트에 100 μL (3000 cells/well) 씩 시딩하고, CO_2 인큐베이터에서 24 시간 동안 배양하였다. 아스피레이터로 배지를 흡인하고, 신선한 배지를 각 웰 90 ㎕씩 첨가하였다. PBS를 사용하여, B2E5-H2-L2 및 B2E5-ADC를 각각 단계 희석(6.5 ㎍/mL~)하고, 각 웰에 10μL씩 첨가하고, CO_2 인큐베이터에서 72시간 배양하였다. 그리고, 생세포 측정 시약[나카라이테스크 07553-44]를 각 웰 10μL 첨가하고 CO_2 인큐베이터 내에서 3시간 배양한 후, 450nm의 흡광도를 측정하였다. 측정 결과를 바탕으로 Image J로 피팅을 실시하여 그래프를 작성하고, B2E5-ADC의 위암에 대한 세포 독성을 평가하였다. 얻어진 결과를 도 6c에 나타낸다.

[0336] (B2E5-ADC 단회 투여 마우스 독성 시험)

[0337] 꼬리 정맥 또는 요추 천자에 의해 9~10주령의 C57BL/6 수컷 마우스(일본 클레어) 또는 10주령의 수컷 누드 마우스(SKN/slc, 일본 SLC)에 B2E5-ADC(100, 33, 10㎍)를 1회 투여(각 투여 농도 당 3개체 준비)하고, 경시적으로 체중을 측정하였다. 얻어진 결과를 도 7에 나타낸다.

[0338] (B2E5-ADC를 이용한 실험 결과의 정리)

[0339] 도 6a에 나타낸 바와 같이, B2E5-ADC는 농도 의존적으로 hGIC에 대한 상해 활성을 나타내었다. 한편, B2E5-H2-L2 및 Kadcyla는 hGIC에 대한 상해 활성이 관찰되지 않았다. 또한, 도 6b 및 6c에 나타낸 바와 같이, 상기 신경교종 뿐만 아니라 췌장암 및 위암에 대해서도 B2E5-ADC의 항종양 활성이 확인되었다.

[0340] 한편, B2E5-ADC의 마우스에 대한 독성 시험을 행한 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, B2E5-ADC 투여에 의한 마우스에 대한 영향은 관찰되지 않고, 투여 후 1개월 이상의 생존이 확인되었다.

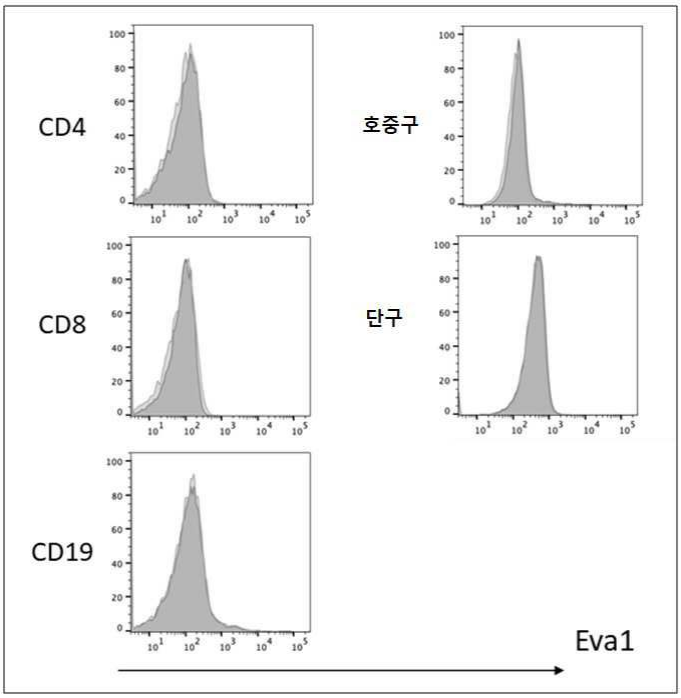
산업상 이용가능성

[0341] 산업상 이용가능성

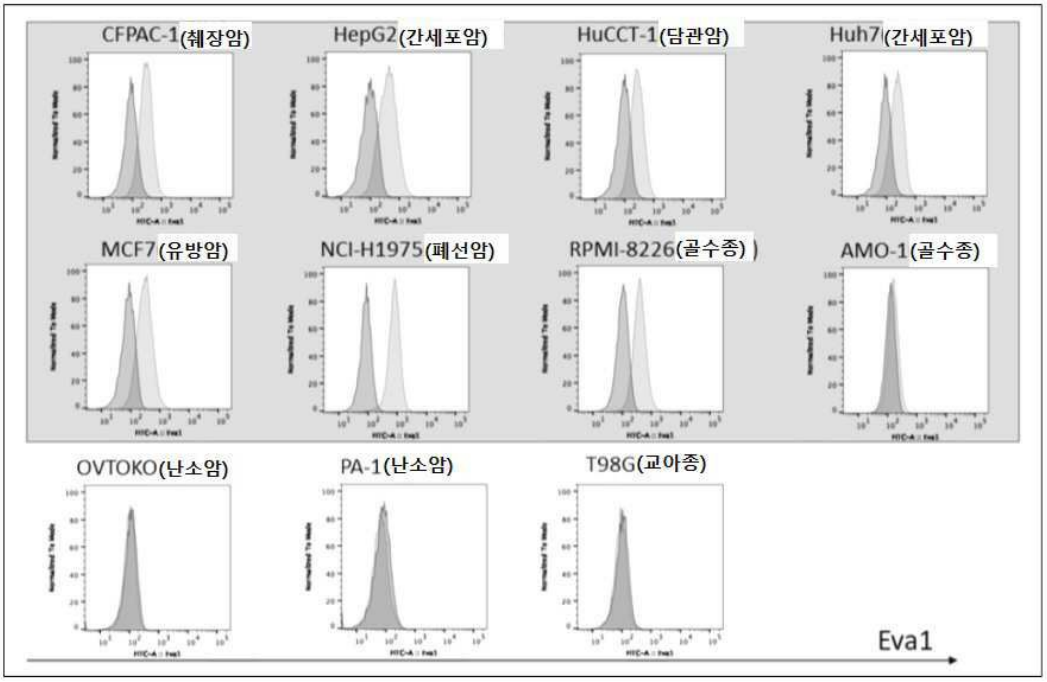
[0342] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 의하면, 인간 Eval을 표적으로 함으로써, 높은 항종양 활성을 발휘하는 것이 가능해진다. 따라서, 본 발명은 암을 치료 또는 예방하기 위한 약제 등으로서 유용하다.

도면

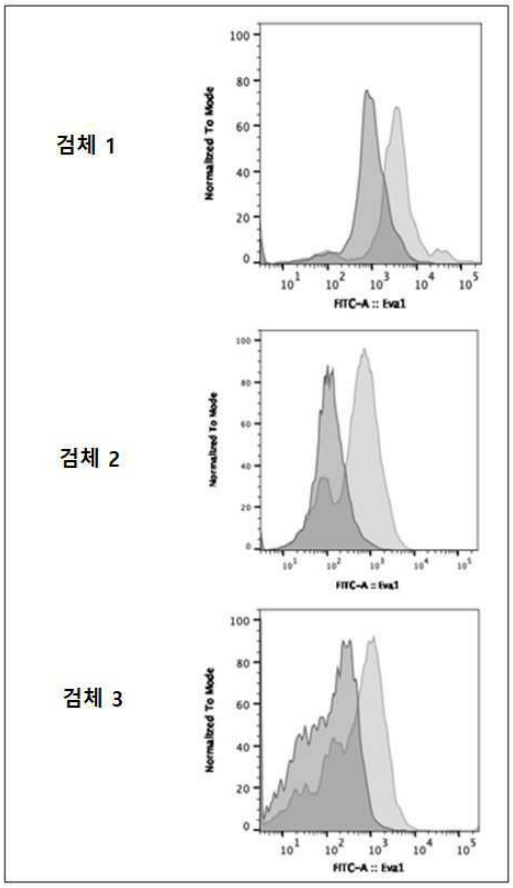
도면1


CD4
호중구
CD8
단구
CD19
Eva1

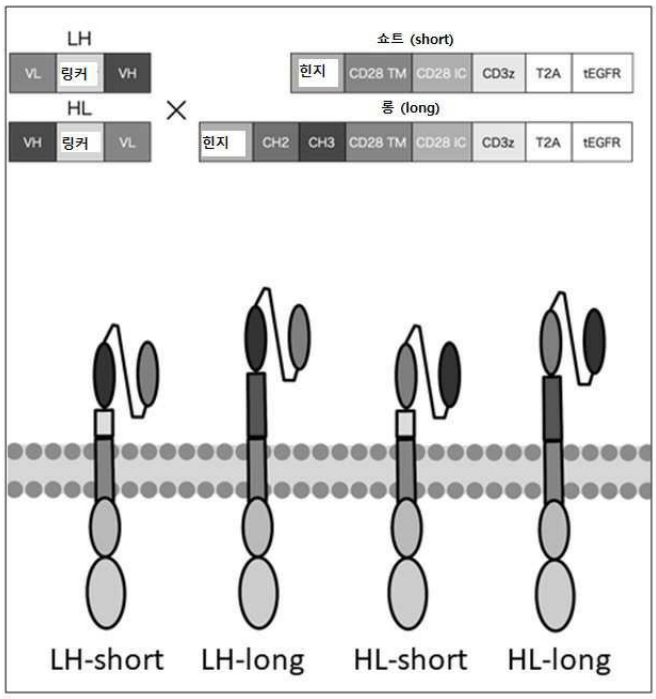
도면2a


CFPAC-1(췌장암)
HepG2(간세포암)
HuCCT-1(담관암)
Huh7(간세포암)
MCF7(유방암)
NCI-H1975(폐선암)
RPMI-8226(골수종))
AMO-1(골수종)
OVTOKO(난소암)
PA-1(난소암)
T98G(교아종)
Eva1

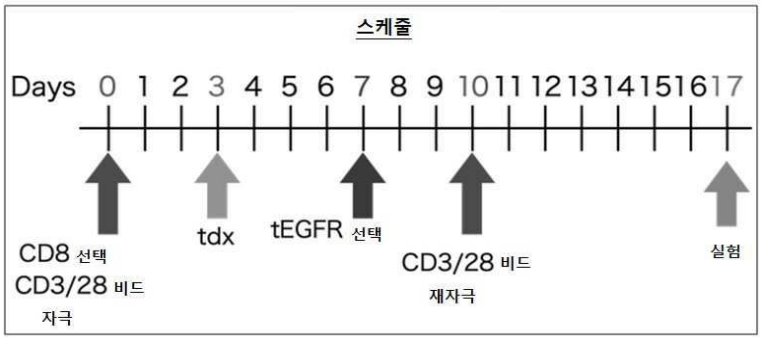
도면2b


검체 1
검체 2
검체 3
Normalized To Mode
FITC-A :: Eva1

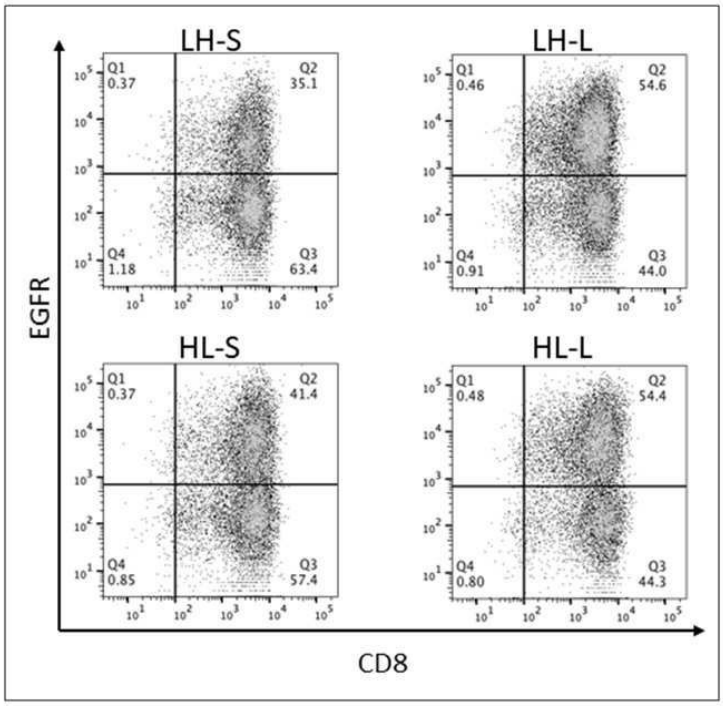
도면3a


LH
VL
링커
VH
HL
VH
링커
VL
숏트 (short)
힌지
CD28 TM
CD28 IC
CD3z
T2A
tEGFR
롱 (long)
힌지
CH2
CH3
CD28 TM
CD28 IC
CD3z
T2A
tEGFR
LH-short
LH-long
HL-short
HL-long

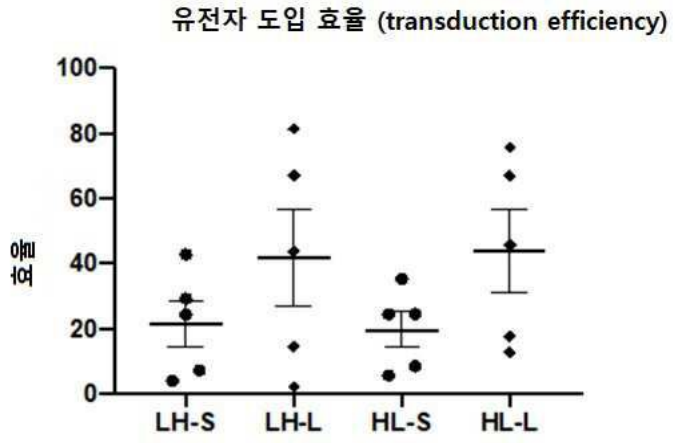
도면3b



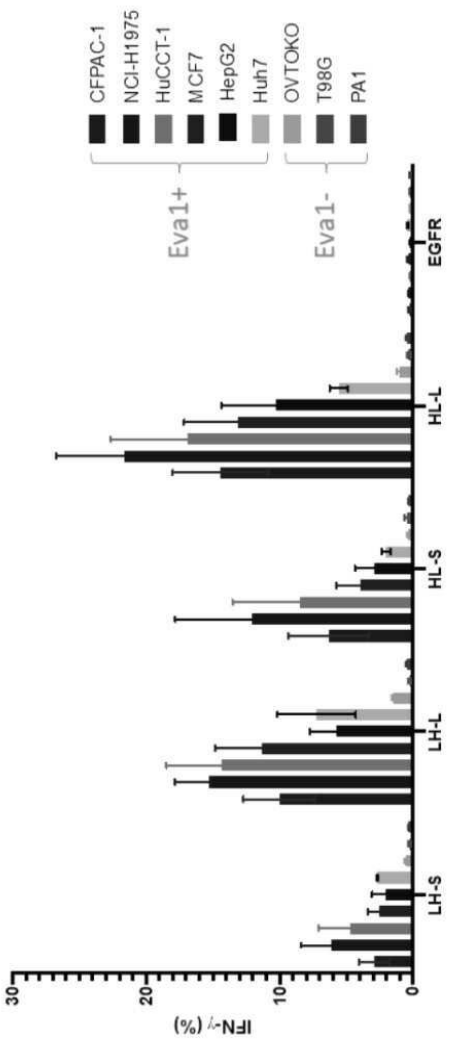
도면3c



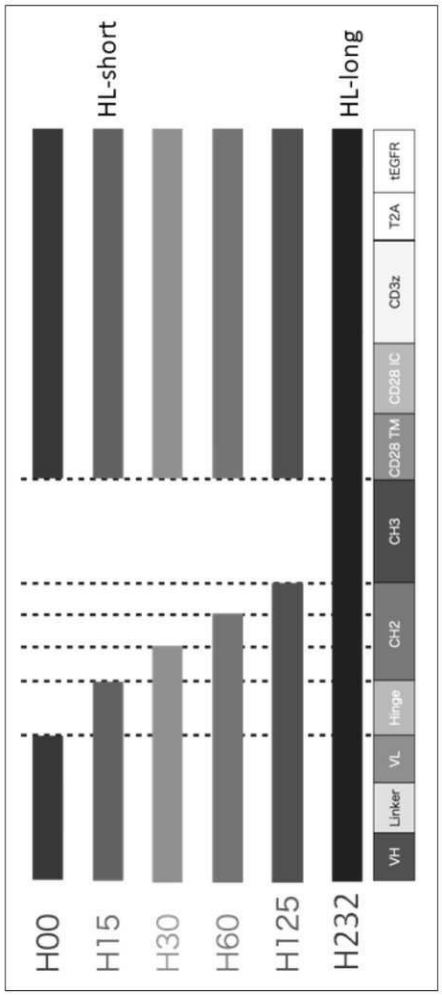
도면3d



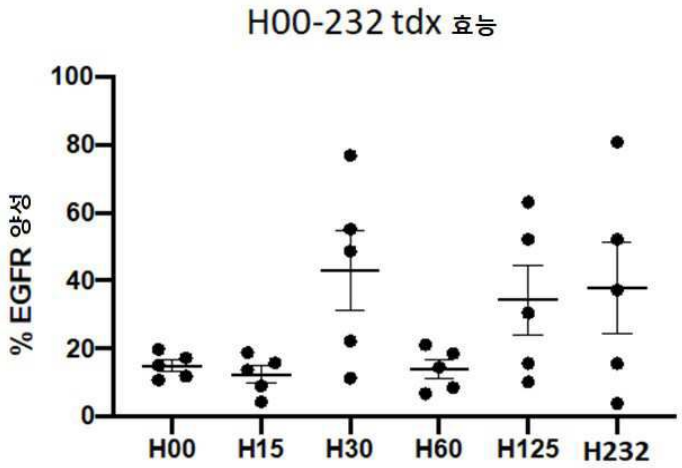
도면3e


CFPAC-1
NCI-H1975
HuCCT-1
MCF7
HepG2
Huh7
OVTOKO
T98G
PA1
Eva1+
Eva1-
EGFR
HL-L
HL-S
LH-L
LH-S
IFN-γ (%)
0
10
20
30

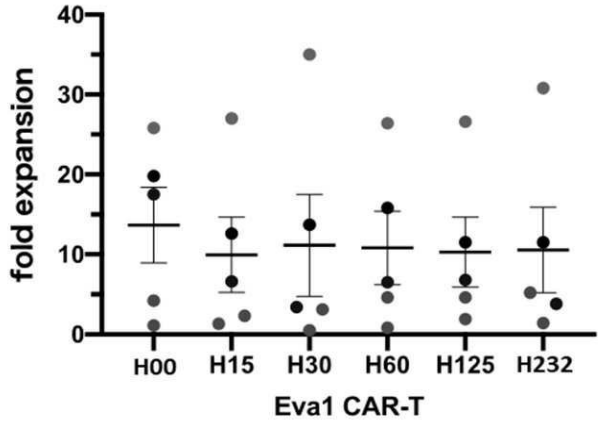
도면3f


HL-short
HL-long
tEGFR
T2A
CD3z
CD28 IC
CD28 TM
CH3
CH2
Hinge
VL
Linker
VH
H00
H15
H30
H60
H125
H232

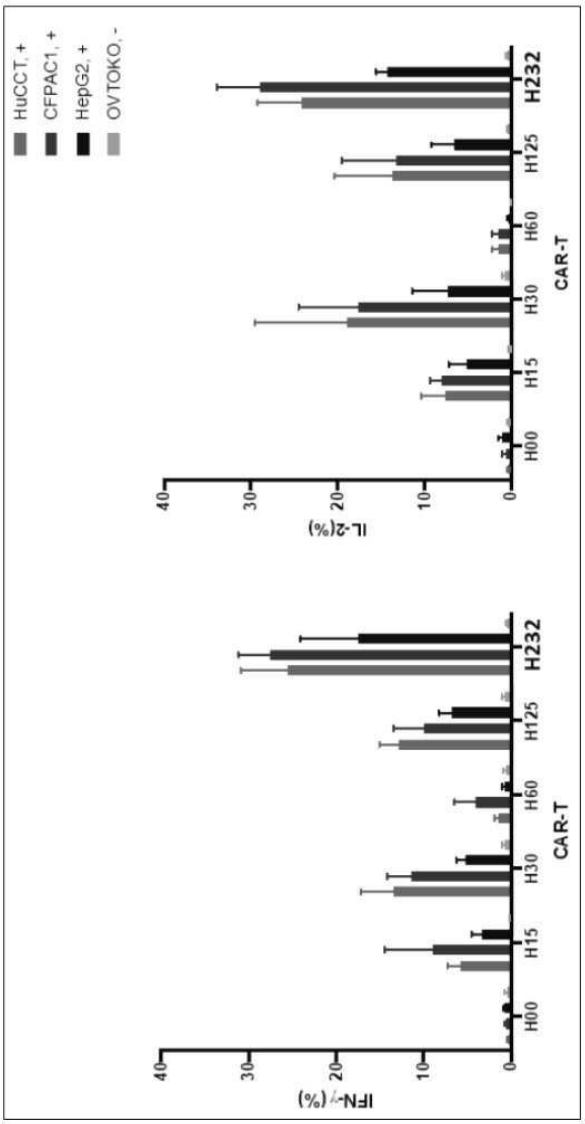
도면3g


H00-232 tdx 효능
% EGFR 양성
100
80
60
40
20
0
H00
H15
H30
H60
H125
H232

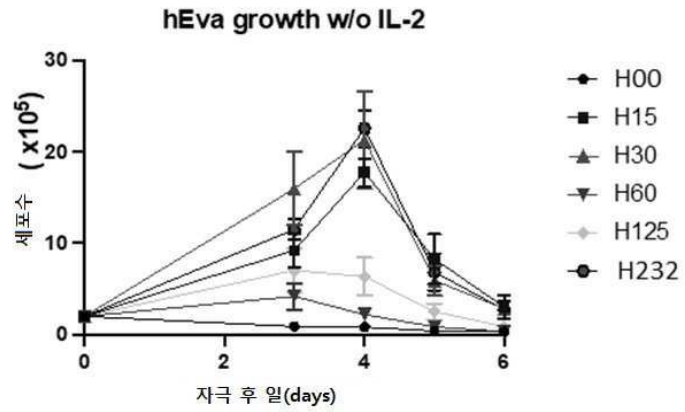
도면3h


fold expansion
40
30
20
10
0
H00
H15
H30
H60
H125
H232
Eva1 CAR-T

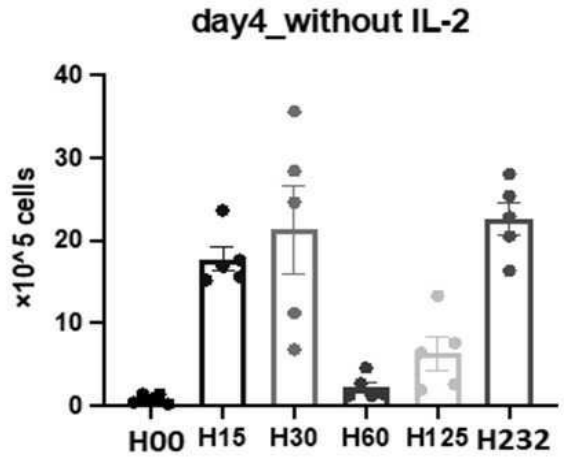
도면3i


HuCCT, +
CFPAC1, +
HepG2, +
OVTOKO, -
H232
H125
H60
H30
H15
H00
CAR-T
IL-2(%)
IFN-γ (%)
40
30
20
10
0

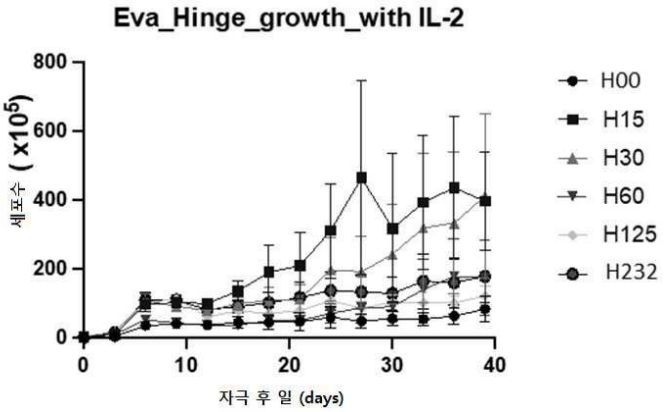
도면3j



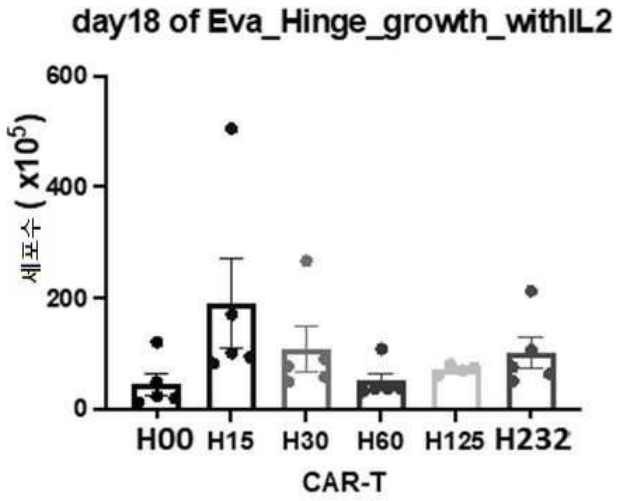
도면3k



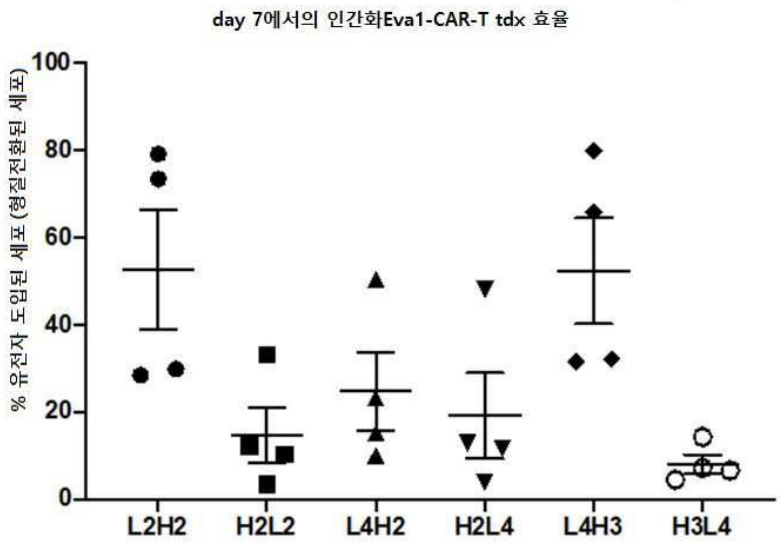
도면3l



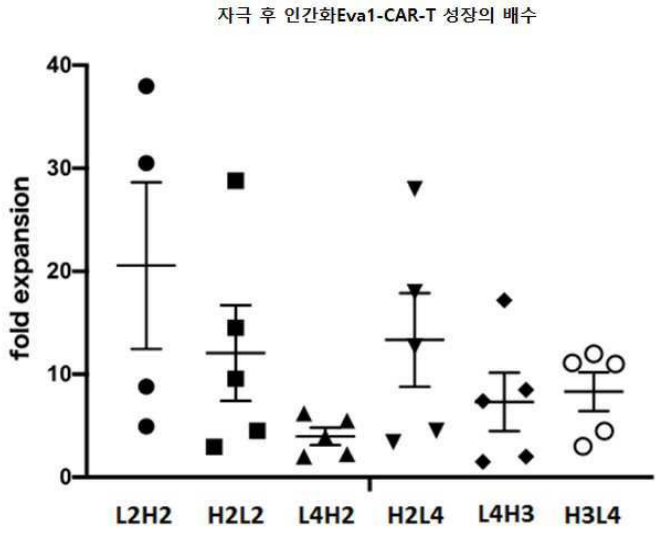
도면3m


day18 of Eva_Hinge_growth_withIL2
세포수 (X10^5)
600
400
200
0
H00
H15
H30
H60
H125
H232
CAR-T

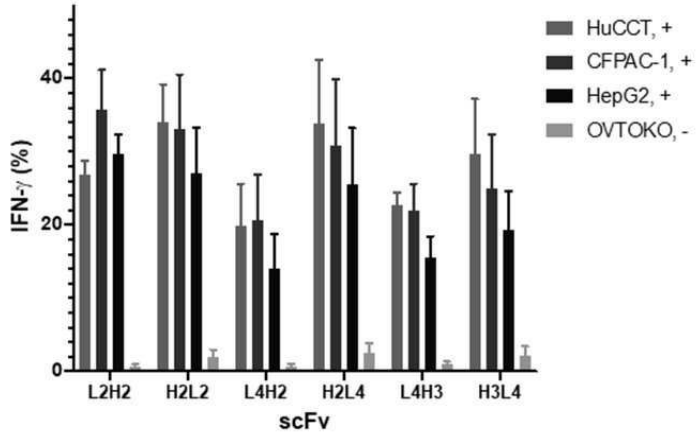
도면4a


day 7에서의 인간화Eva1-CAR-T tdx 효율
% 유전자 도입된 세포 (형질전환된 세포)
100
80
60
40
20
0
L2H2
H2L2
L4H2
H2L4
L4H3
H3L4

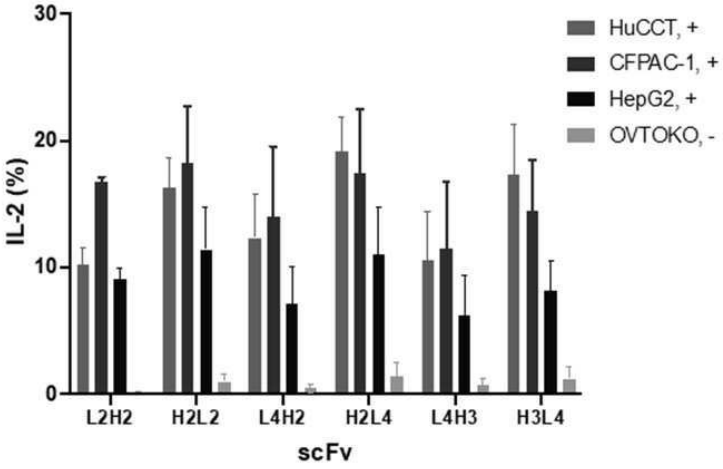
도면4b



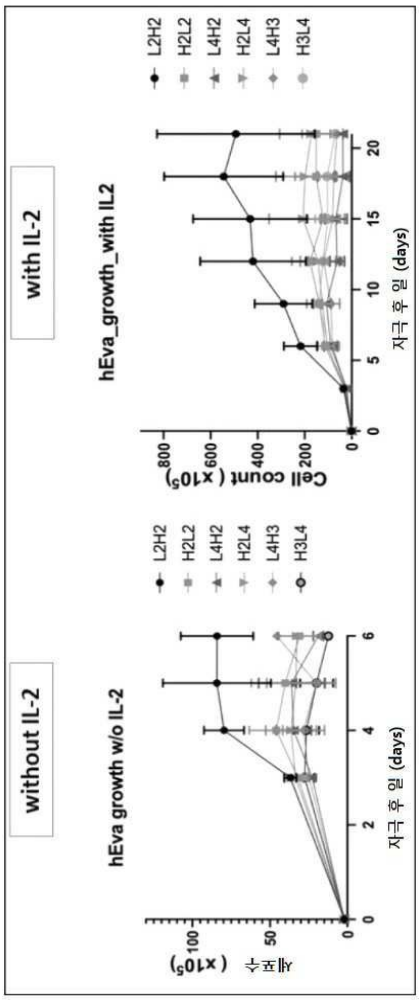
도면4c



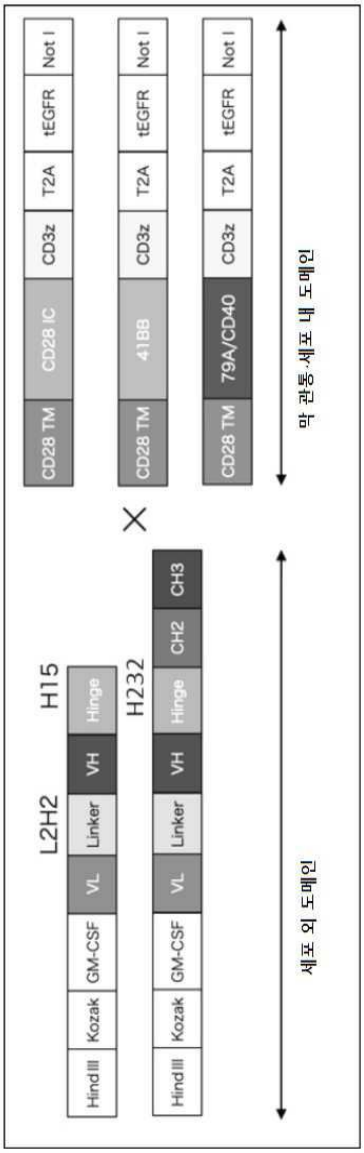
도면4d



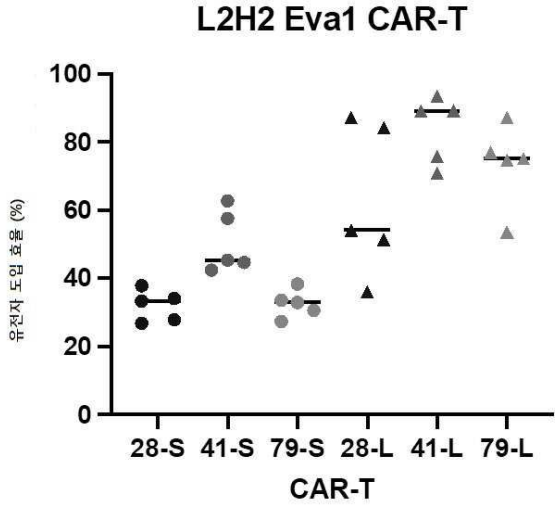
도면4e


without IL-2
hEva growth w/o IL-2
L2H2
H2L2
L4H2
H2L4
L4H3
H3L4
세포수 (x10⁵)
0
50
100
0
2
4
6
자극 후 일 (days)
with IL-2
hEva_growth_with IL2
L2H2
H2L2
L4H2
H2L4
L4H3
H3L4
Cell count (x10⁵)
0
200
400
600
800
0
5
10
15
20
자극 후 일 (days)

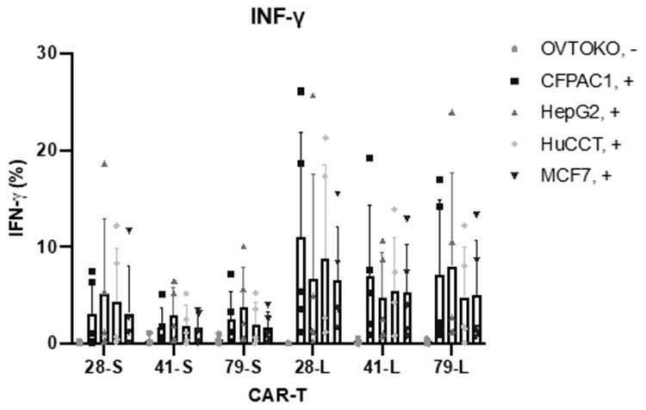
도면4f


Not I
tEGFR
T2A
CD3z
CD28 IC
CD28 TM
41BB
79A/CD40
막 관통·세포 내 도메인
H15
H232
L2H2
Hinge
VH
Linker
VL
GM-CSF
Kozak
Hind III
CH2
CH3
세포 외 도메인

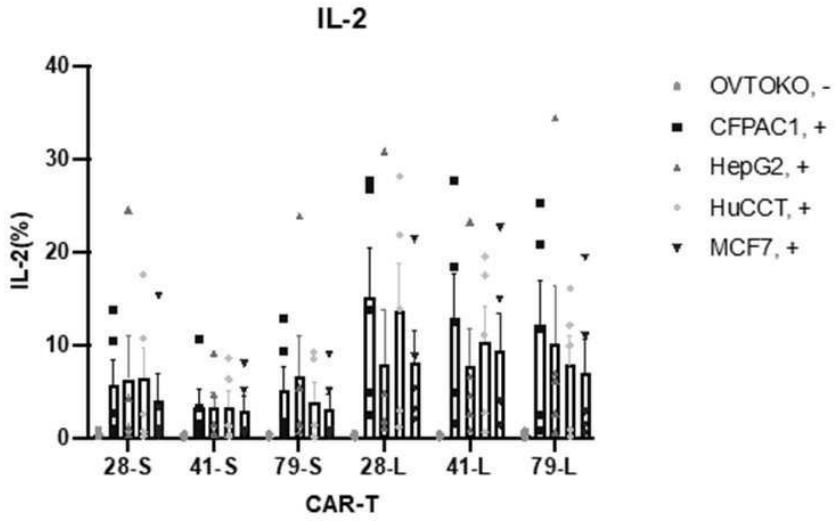
도면4g


L2H2 Eva1 CAR-T
유전자 도입 효율 (%)
100
80
60
40
20
0
28-S
41-S
79-S
28-L
41-L
79-L
CAR-T

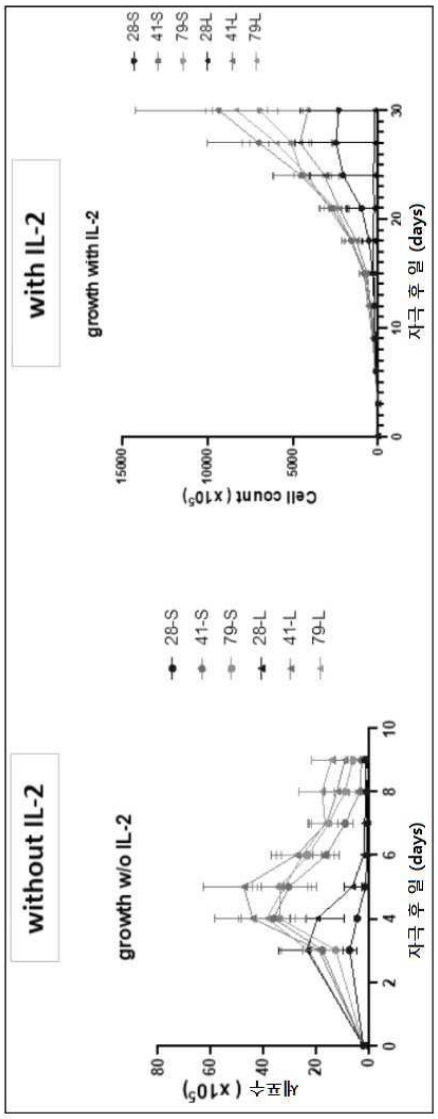
도면4h


INF-γ
IFN-γ (%)
30
20
10
0
28-S
41-S
79-S
28-L
41-L
79-L
CAR-T
OVTOKO, -
CFPAC1, +
HepG2, +
HuCCT, +
MCF7, +

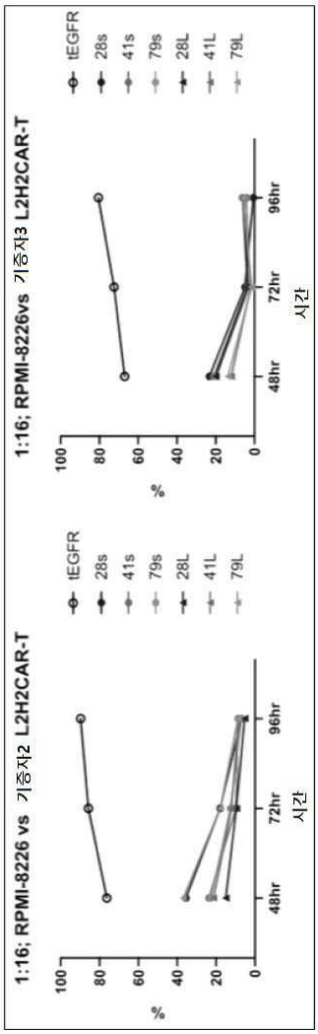
도면4i


IL-2
IL-2(%)
40
30
20
10
0
28-S
41-S
79-S
28-L
41-L
79-L
CAR-T
OVTOKO, -
CFPAC1, +
HepG2, +
HuCCT, +
MCF7, +

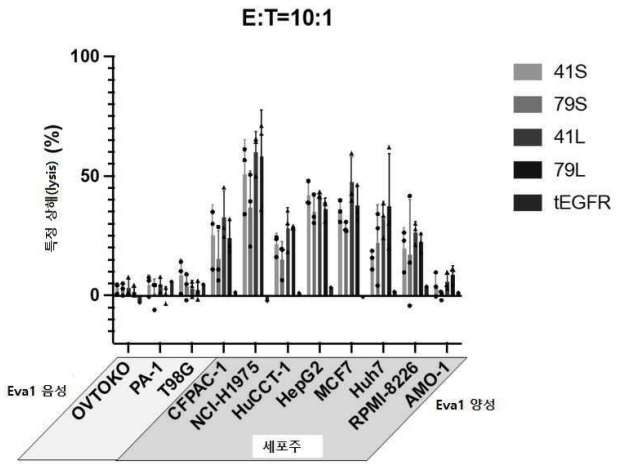
도면4j


without IL-2
growth w/o IL-2
세포수 (x10⁵)
자극 후 일 (days)
28-S
41-S
79-S
28-L
41-L
79-L
with IL-2
growth with IL-2
Cell count (x10⁵)
자극 후 일 (days)

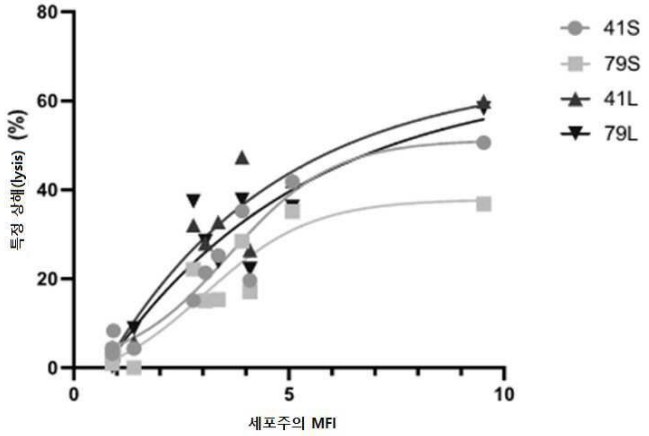
도면4k


1:16; RPMI-8226 vs 기증자2 L2H2CAR-T
1:16; RPMI-8226vs 기증자3 L2H2CAR-T
tEGFR
28s
41s
79s
28L
41L
79L
%
시간
48hr
72hr
96hr
0
20
40
60
80
100

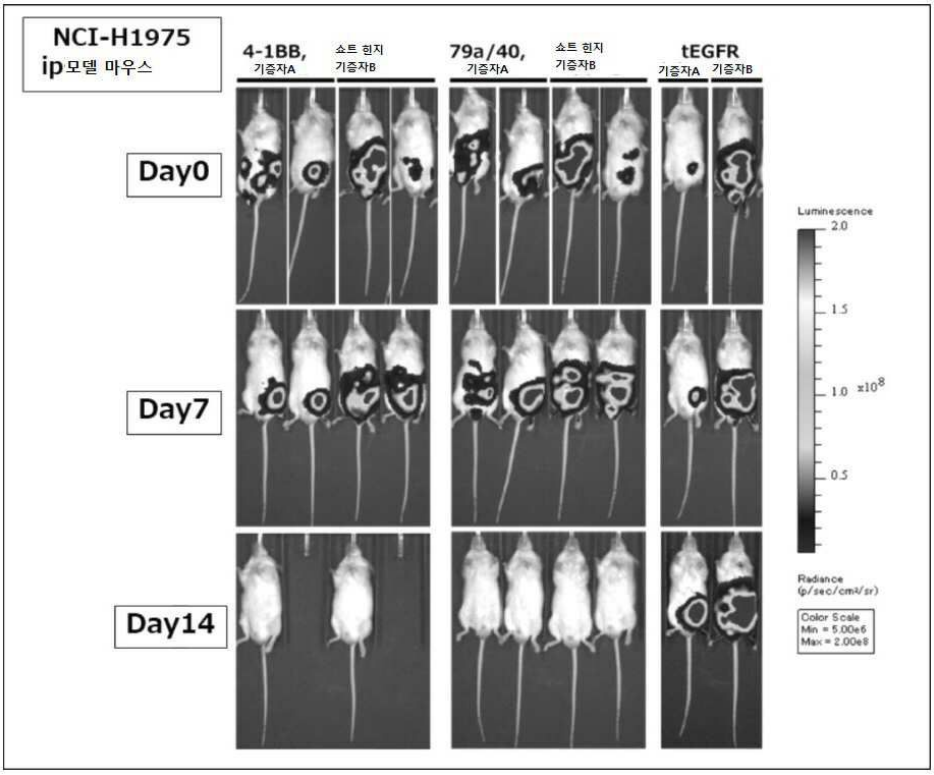
도면4l


E:T=10:1
41S
79S
41L
79L
tEGFR
특정 살해(lysis) (%)
100
50
0
Eva1 음성
Eva1 양성
OVTOKO
PA-1
T98G
CFPAC-1
NCI-H1975
HuCCT-1
HepG2
MCF7
Huh7
RPMI-8226
AMO-1
세포주

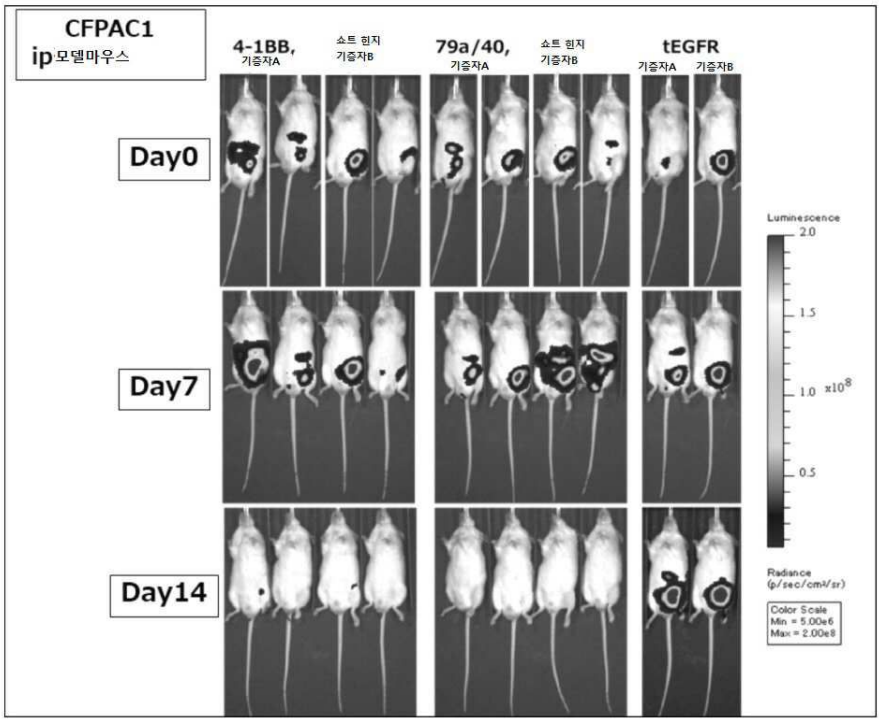
도면4m


80
60
40
20
0
0
5
10
특정 상해(lysis) (%)
세포주의 MFI
41S
79S
41L
79L

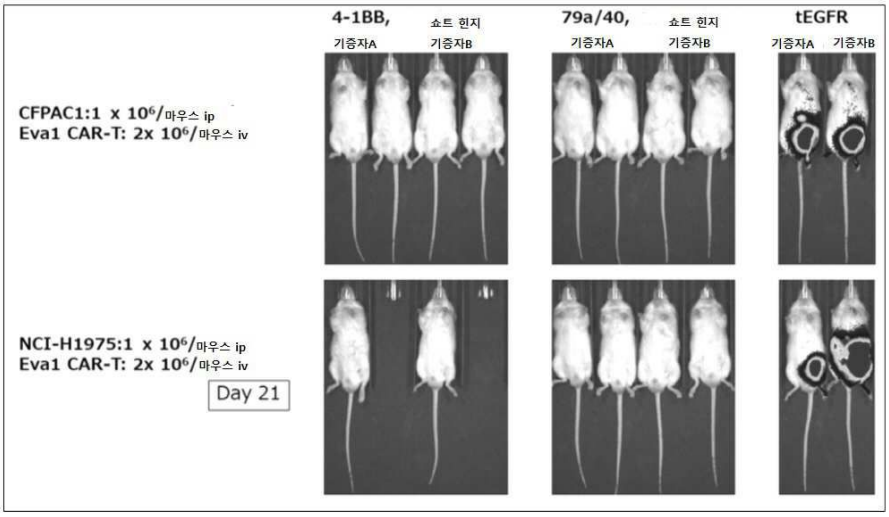
도면4n


NCI-H1975
ip모델 마우스
4-1BB,
기증자A
쇼트 힌지
기증자B
79a/40,
기증자A
쇼트 힌지
기증자B
tEGFR
기증자A
기증자B
Day0
Day7
Day14
Luminescence
2.0
1.5
1.0
0.5
x10^8
Radiance
(p/sec/cm²/sr)
Color Scale
Min = 5.00e6
Max = 2.00e8

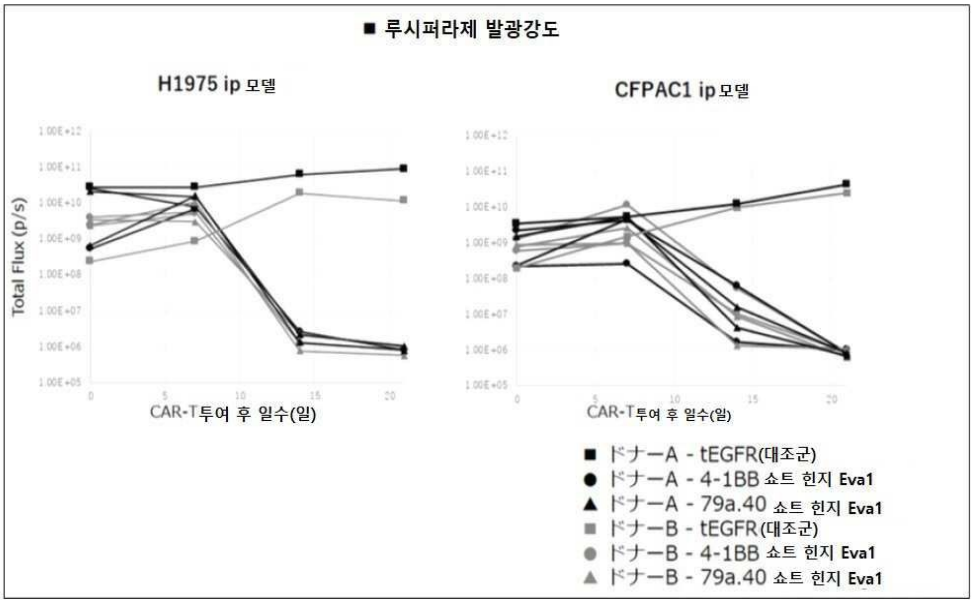
도면4o


CFPAC1
ip모델마우스
4-1BB,
기증자A
쇼트 힌지
기증자B
79a/40,
기증자A
쇼트 힌지
기증자B
tEGFR
기증자A
기증자B
Day0
Day7
Day14
Luminescence
2.0
1.5
1.0
x10^8
0.5
Radiance
(p/sec/cm²/sr)
Color Scale
Min = 5.00e6
Max = 2.00e8

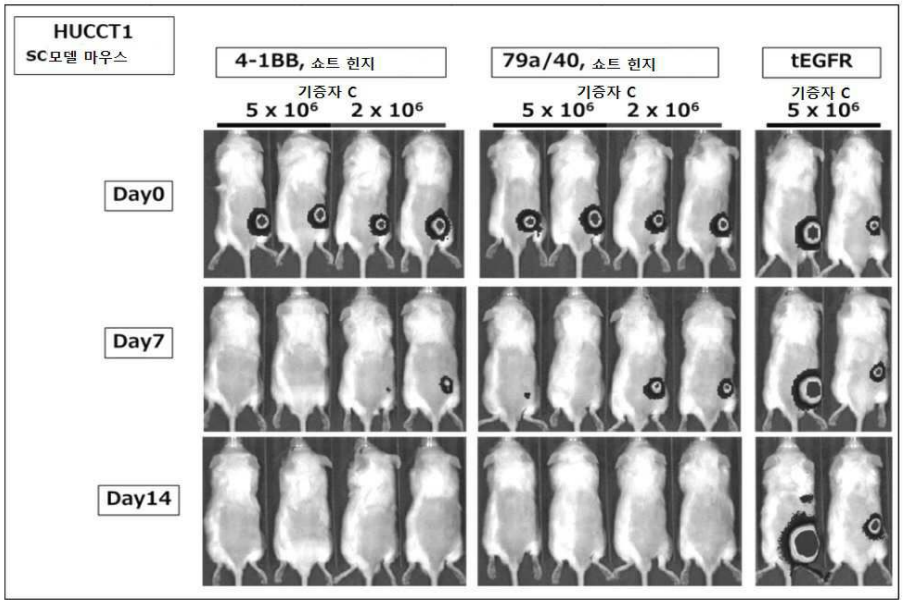
도면4p


4-1BB,
기증자A
쇼트 힌지
기증자B
79a/40,
기증자A
쇼트 힌지
기증자B
tEGFR
기증자A
기증자B
CFPAC1:1 x 10⁶/마우스 ip
Eva1 CAR-T: 2x 10⁶/마우스 iv
NCI-H1975:1 x 10⁶/마우스 ip
Eva1 CAR-T: 2x 10⁶/마우스 iv
Day 21

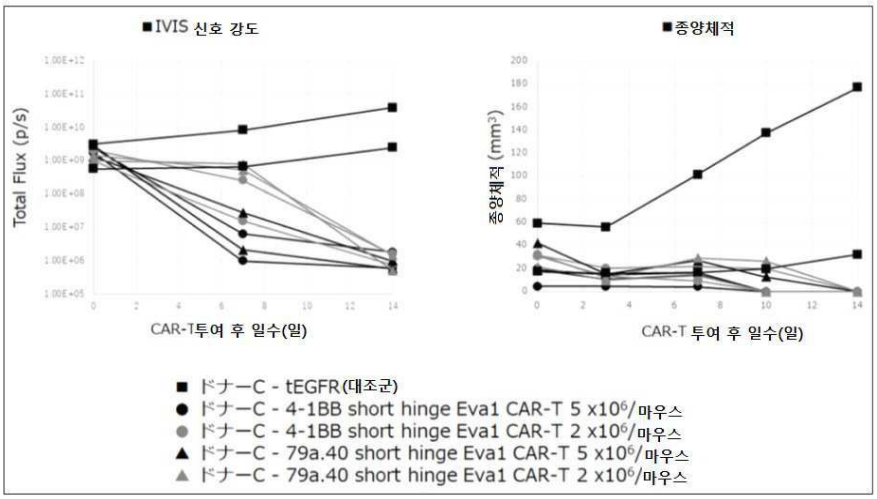
도면4q


■ 루시퍼라제 발광강도
H1975 ip 모델
CFPAC1 ip 모델
Total Flux (p/s)
CAR-T투여 후 일수(일)
CAR-T투여 후 일수(일)
■ ドナーA - tEGFR(대조군)
● ドナーA - 4-1BB 쇼트 힌지 Eva1
▲ ドナーA - 79a.40 쇼트 힌지 Eva1
■ ドナーB - tEGFR(대조군)
● ドナーB - 4-1BB 쇼트 힌지 Eva1
▲ ドナーB - 79a.40 쇼트 힌지 Eva1

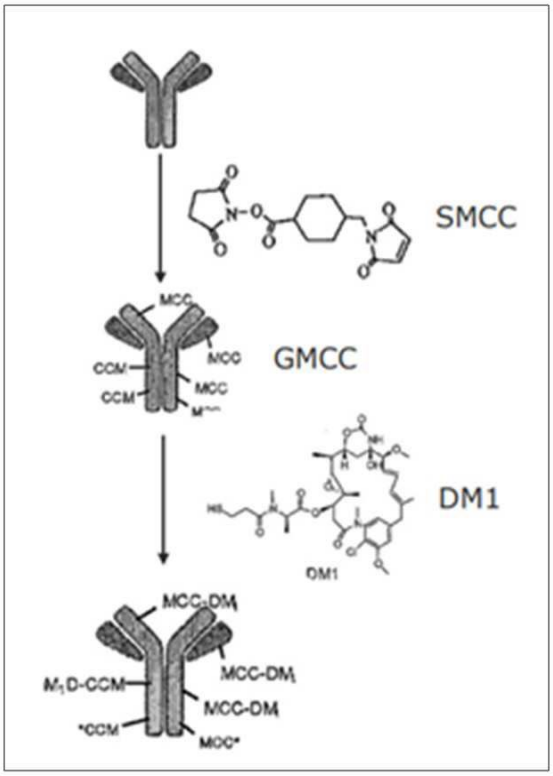
도면4r


HUCCT1
SC모델 마우스
4-1BB, 쇼트 힌지
79a/40, 쇼트 힌지
tEGFR
기증자 C
5 x 10⁶
2 x 10⁶
5 x 10⁶
2 x 10⁶
기증자 C
5 x 10⁶
Day0
Day7
Day14

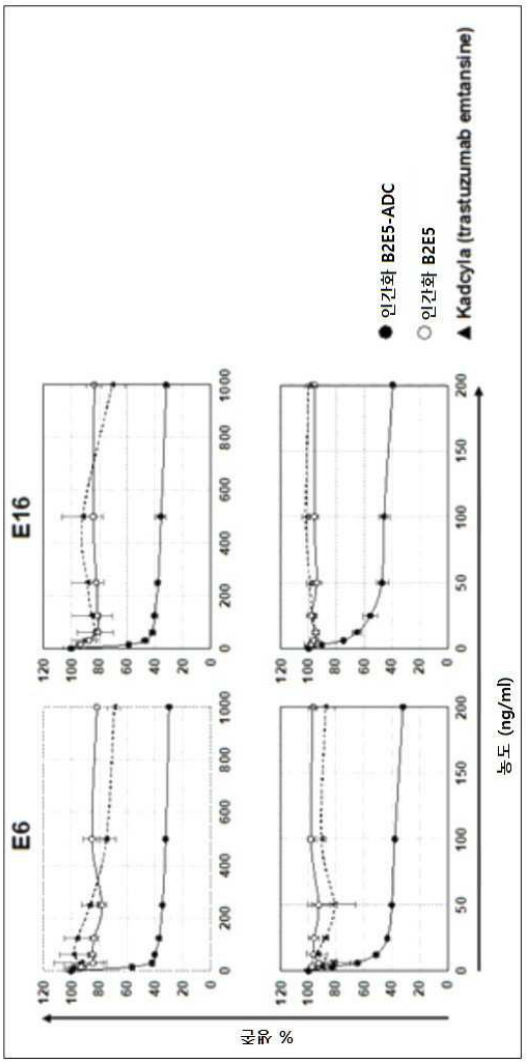
도면4s


■IVIS 신호 강도
Total Flux (p/s)
CAR-T투여 후 일수(일)
■종양체적
종양체적 (mm³)
CAR-T 투여 후 일수(일)
■ ドナーC - tEGFR(대조군)
● ドナーC - 4-1BB short hinge Eva1 CAR-T 5 x10⁶/마우스
● ドナーC - 4-1BB short hinge Eva1 CAR-T 2 x10⁶/마우스
▲ ドナーC - 79a.40 short hinge Eva1 CAR-T 5 x10⁶/마우스
▲ ドナーC - 79a.40 short hinge Eva1 CAR-T 2 x10⁶/마우스

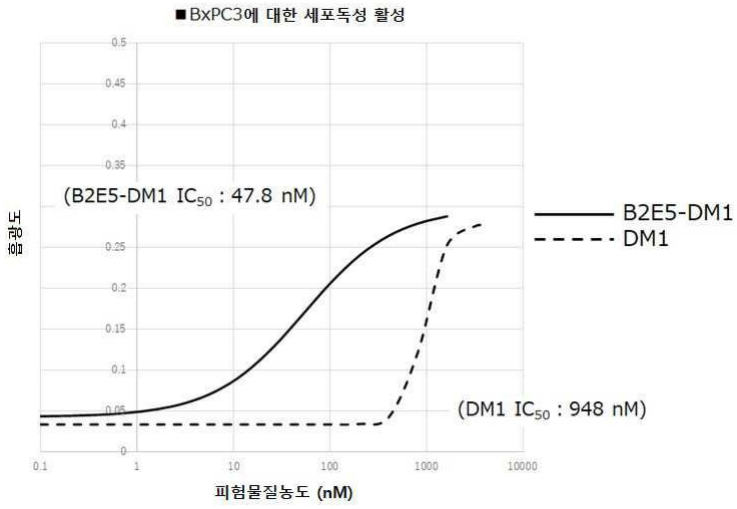
도면5


SMCC
GMCC
DM1
MCC-DM1
MCC-DM1
MCC-DM1
MCC-DM1
MCC*

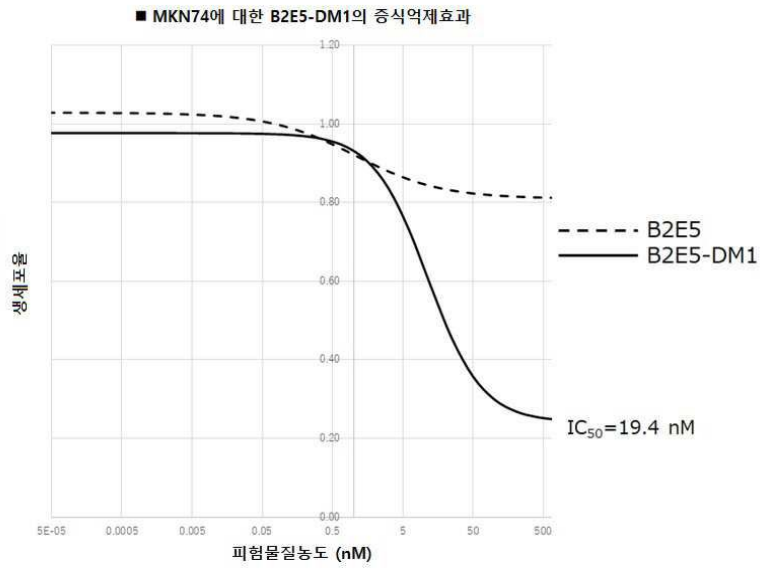
도면6a


● 인간화 B2E5-ADC
○ 인간화 B2E5
▲ Kadcyla (trastuzumab emtansine)
E16
E6
농도 (ng/ml)
굴유 %

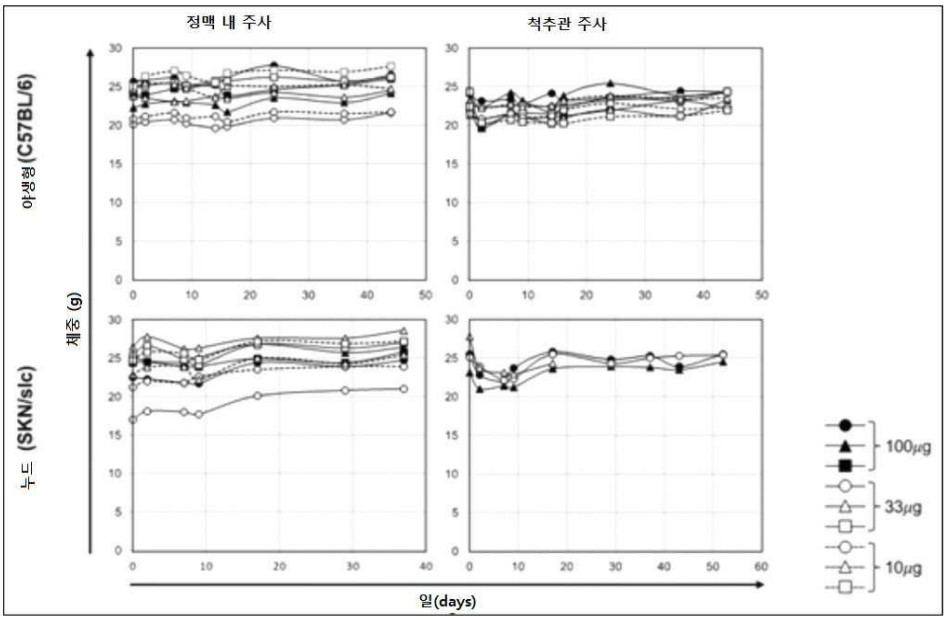
도면6b


■BxPC3에 대한 세포독성 활성
(B2E5-DM1 IC50 : 47.8 nM)
(DM1 IC50 : 948 nM)
B2E5-DM1
DM1
흡광도
피험물질농도 (nM)

도면6c



도면7



서 열 목 록

Sequence Listing Information:

DTD Version: V1_3

File Name: IBPF22-534WO.xml

Software Name: WIPO Sequence

Software Version: 2.3.0

Production Date: 2024-09-12

General Information:

Current application / Applicant file reference: IBPF22-534WO

Earliest priority application / IP Office: JP

Earliest priority application / Application number: 2022-36463

Earliest priority application / Filing date: 2022-03-09

Applicant name: CURED Inc.

Applicant name / Language: en

Invention title: Ｅｖａ１タンパク質に結合する、ヒト化抗?又はその機能的?片、抗??物複合?及びキメラ抗原受容?(ja)

Sequence Total Quantity: 66

Sequences:

Sequence Number (ID): 1

Length: 5

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..5

> note, CDR1 of Light Chain (Humanized B2E5-48)

- source, 1..5

> mol_type, protein

> organism, synthetic construct

Residues:

SSVGY 5

Sequence Number (ID): 2

Residues:

000

Sequence Number (ID): 3

Length: 9

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..9

> note, CDR3 of Light Chain (Humanized B2E5-48)

- source, 1..9

> mol_type, protein

> organism, synthetic construct

Residues:

QQWSSNPPT 9

Sequence Number (ID): 4

Length: 8

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..8

> note, CDR1 of Heavy Chain (Humanized B2E5-48)

- source, 1..8

> mol_type, protein

> organism, synthetic construct

Residues:

GYTFTNYW 8

Sequence Number (ID): 5

Length: 8

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..8

> note, CDR2 of Heavy Chain (Humanized B2E5-48)

- source, 1..8

> mol_type, protein

> organism, synthetic construct

Residues:

INPTNGGT 8

Sequence Number (ID): 6

Length: 9

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..9

> note, CDR3 of Heavy Chain (Humanized B2E5-48)

- source, 1..9

> mol_type, protein

> organism, synthetic construct

Residues:

TIYTTALDY 9

Sequence Number (ID): 7

Length: 106

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..106

> note, Variable Region of Light Chain 2 (Humanized B2E5-48)

- source, 1..106

> mol_type, protein

> organism, synthetic construct

Residues:

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASSSVG YMYWYQQKPG QAPRPLIYVT SNRATGIPAR 60

FSGSGSGTDY TLTISSLEPE DFAVYYCQQW SSNPPTFGQG TKLEIK 106

Sequence Number (ID): 8

Length: 106

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..106

> note, Variable Region of Light Chain 4 (Humanized B2E5-48)

- source, 1..106

> mol_type, protein

> organism, synthetic construct

Residues:

DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCRASSSVG YMYWYQQKPG KAPKPLIYVT SNLASGVPSR 60

FSGSGSGTEY TLTISSLQPE DFATYYCQQW SSNPPTFGQG TKLEIK 106

Sequence Number (ID): 9

Length: 106

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..106

> note, Variable Region of Light Chain 1 (Humanized B2E5-48)

- source, 1..106

> mol_type, protein

> organism, synthetic construct

Residues:

QIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASSSVG YMYWYQQKPG QAPRPLIYVT SNLASGIPAR 60

FSGSGSGTDY TLTISSLEPE DFAVYYCQQW SSNPPTFGQG TKLEIK 106

Sequence Number (ID): 10

Length: 106

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..106

> note, Variable Region of Light Chain 3 (Humanized B2E5-48)

- source, 1..106

> mol_type, protein

> organism, synthetic construct

Residues:

QIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCRASSSVG YMYWYQQKPG KAPKPLIYVT SNLASGVPSR 60

FSGSGSGTEY TLTISSLQPE DFATYYCQQW SSNPPTFGQG TKLEIK 106

Sequence Number (ID): 11

Length: 318

Molecule Type: DNA

Features Location/Qualifiers:

- misc_feature, 1..318

> note, Variable Region of Light Chain 2 (Humanized B2E5-48) cDNA

- source, 1..318

> mol_type, other DNA

> organism, synthetic construct

Residues:

gagatcgtgc tgacccagag ccccgccaca ctgtctctga gccccggcga gagagccaca 60

ctgagctgca gagccagctc ctccgtgggc tacatgtact ggtaccagca aaagcccgga 120

caagccccca gacctctgat ttacgtgacc agcaacagag ccaccggcat ccccgccaga 180

tttagcggaa gcggcagcgg caccgactac acactgacca tctcctctct ggagccagag 240

gacttcgccg tgtactactg ccagcagtgg agctccaacc ctcccacctt cggccaaggc 300

accaagctcg agatcaag 318

Sequence Number (ID): 12

Length: 318

Molecule Type: DNA

Features Location/Qualifiers:

- misc_feature, 1..318

> note, Variable Region of Light Chain 4 (Humanized B2E5-48) cDNA

- source, 1..318

> mol_type, other DNA

> organism, synthetic construct

Residues:

gacatccagc tgacccagtc cccttccttt ctgagcgctt ccgtgggcga cagagtgacc 60

atcacatgca gagccagcag cagcgtgggc tacatgtact ggtaccagca gaagcccgga 120

aaggccccca agcctctgat ctacgtgacc agcaatctgg ccagcggcgt gcccagcaga 180

tttagcggct ccggcagcgg cacagagtat acactgacca tcagctctct gcagccagag 240

gacttcgcca cctactactg ccagcagtgg agctccaacc cccccacctt tggccaaggc 300

accaagctcg agatcaag 318

Sequence Number (ID): 13

Length: 116

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..116

> note, Variable Region of Heavy Chain 2 (Humanized B2E5-48)

- source, 1..116

> mol_type, protein

> organism, synthetic construct

Residues:

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYWMHWVRQA PGQGLEWMGE INPTNGGTDY 60

NEKFQGRVTM TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCTIYT TALDYWGQGT LVTVSS 116

Sequence Number (ID): 14

Length: 116

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..116

> note, Variable Region of Heavy Chain 4 (Humanized B2E5-48)

- source, 1..116

> mol_type, protein

> organism, synthetic construct

Residues:

QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT NYWMHWVRQA PGQGLEWMGE INPTNGGTDY 60

NEGFTGRFVF SVDKSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCTIYT TALDYWGQGT LVTVSS 116

Sequence Number (ID): 15

Length: 116

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..116

> note, Variable Region of Heavy Chain 1 (Humanized B2E5-48)

- source, 1..116

> mol_type, protein

> organism, synthetic construct

Residues:

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYWMHWVRQA PGQGLEWIGE INPTNGGTDY 60

NEKFQGRVTL TVDKSSSTAY MELSSLRSED TAVYYCTIYT TALDYWGQGT LVTVSS 116

Sequence Number (ID): 16

Length: 116

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..116

> note, Variable Region of Heavy Chain 3 (Humanized B2E5-48)

- source, 1..116

> mol_type, protein

> organism, synthetic construct

Residues:

QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT NYWMHWVRQA PGQGLEWIGE INPTNGGTDY 60

NEGFTGRFVL SVDKSSSTAY LQISSLKAED TAVYYCTIYT TALDYWGQGT LVTVSS 116

Sequence Number (ID): 17

Length: 348

Molecule Type: DNA

Features Location/Qualifiers:

- misc_feature, 1..348

> note, Variable Region of Heavy Chain 2 (Humanized B2E5-48) cDNA

- source, 1..348

> mol_type, other DNA

> organism, synthetic construct

Residues:

caagtgcagc tggtgcagag cggagccgaa gtgaagaaac ccggagcctc cgtgaaggtg 60

agctgcaagg ccagcggata caccttcacc aactactgga tgcactgggt gagacaagcc 120

cccggccaag gactggagtg gatgggcgag atcaacccca ccaacggcgg caccgactac 180

aatgagaagt tccaaggaag agtgaccatg acagtggaca agagcaccag caccgcctac 240

atggagctga gctctctgag gtccgaggac accgccgtgt actactgcac catctacacc 300

accgctctgg attactgggg ccaaggcaca ctggtgaccg tctcgagc 348

Sequence Number (ID): 18

Length: 348

Molecule Type: DNA

Features Location/Qualifiers:

- misc_feature, 1..348

> note, Variable Region of Heavy Chain 3 (Humanized B2E5-48) cDNA

- source, 1..348

> mol_type, other DNA

> organism, synthetic construct

Residues:

caagtgcagc tggtgcagtc cggcagcgag ctgaagaagc ccggagccag cgtgaaggtg 60

agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc aactactgga tgcactgggt gagacaagcc 120

cccggccaag gactggagtg gattggcgag atcaacccta ccaacggcgg caccgactac 180

aatgagggct tcaccggaag attcgtgctg tccgtggaca aatccagctc cacagcctac 240

ctccagatca gctctctgaa ggccgaggat accgccgtgt actactgcac catctacacc 300

accgctctgg attactgggg ccaaggcaca ctggtgacag tctcgagc 348

Sequence Number (ID): 19

Length: 384

Molecule Type: DNA

Features Location/Qualifiers:

- source, 1..384

> mol_type, other DNA

> organism, Mus musculus

- CDS, 1..384

> note, Signal peptide and Variable Region of Light Chain (B2E5-48)

Residues:

atggattttc aagtgcagat tttcagcttc ctgctaatga gtgcctcagt cataatgtcc 60

aggggacaaa ttgttctcac ccagtctcca gcactcatgt ctgcatctcc aggggagagg 120

gtcaccttga cctgcagtgc cagctcaagt gtaggttaca tgtactggta ccagcagaag 180

ccaggatcct cccccaaacc ctggatttat gtcacatcca acctggcttc tggagtccct 240

gctcgcttca gtggcagtgg gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag cagcatggag 300

gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggagta gtaacccacc tacgttcggt 360

gctgggacca agctggagct gaaa 384

Sequence Number (ID): 20

Length: 128

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- source, 1..128

> mol_type, protein

> organism, Mus musculus

Residues:

MDFQVQIFSF LLMSASVIMS RGQIVLTQSP ALMSASPGER VTLTCSASSS VGYMYWYQQK 60

PGSSPKPWIY VTSNLASGVP ARFSGSGSGT SYSLTISSME AEDAATYYCQ QWSSNPPTFG 120

AGTKLELK 128

Sequence Number (ID): 21

Length: 106

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- SITE, 1..106

> note, Variable Region of Light Chain (B2E5-48)

- source, 1..106

> mol_type, protein

> organism, Mus musculus

Residues:

QIVLTQSPAL MSASPGERVT LTCSASSSVG YMYWYQQKPG SSPKPWIYVT SNLASGVPAR 60

FSGSGSGTSY SLTISSMEAE DAATYYCQQW SSNPPTFGAG TKLELK 106

Sequence Number (ID): 22

Length: 10

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- SITE, 1..10

> note, CDR1 of Light Chain (B2E5-48)

- source, 1..10

> mol_type, protein

> organism, Mus musculus

Residues:

SASSSVGYMY 10

Sequence Number (ID): 23

Length: 7

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- SITE, 1..7

> note, CDR2 of Light Chain (B2E5-48)

- source, 1..7

> mol_type, protein

> organism, Mus musculus

Residues:

VTSNLAS 7

Sequence Number (ID): 24

Length: 9

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- SITE, 1..9

> note, CDR3 of Light Chain (B2E5-48)

- source, 1..9

> mol_type, protein

> organism, Mus musculus

Residues:

QQWSSNPPT 9

Sequence Number (ID): 25

Length: 405

Molecule Type: DNA

Features Location/Qualifiers:

- source, 1..405

> mol_type, other DNA

> organism, Mus musculus

- CDS, 1..405

> note, Signal peptide and Variable Region of Heavy Chain (B2E5-48)

Residues:

atgggatgga gctacatcat tttctttttg gtagcaacag ctacaggtgt ccactcccag 60

gtccaactcc agcagcctgg ggctgaactg gtgaagcctg gggcttcagt gaagttgtcc 120

tgcaaggctt ctggctacac cttcaccaac tactggatgc actgggtgaa gctgaggcct 180

ggacaaggct ttgagtggat tggagagatt aatcctacca atggtggtac tgactacaat 240

gagaagttca agagaaaggc cacactgact gtagacaaat cctccagcac agcctacatg 300

caactcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgcacaat atatactacg 360

gctcttgact actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctca 405

Sequence Number (ID): 26

Length: 135

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- source, 1..135

> mol_type, protein

> organism, Mus musculus

Residues:

MGWSYIIFFL VATATGVHSQ VQLQQPGAEL VKPGASVKLS CKASGYTFTN YWMHWVKLRP 60

GQGFEWIGEI NPTNGGTDYN EKFKRKATLT VDKSSSTAYM QLSSLTSEDS AVYYCTIYTT 120

ALDYWGQGTT LTVSS 135

Sequence Number (ID): 27

Length: 116

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- SITE, 1..116

> note, Variable Region of Heavy Chain (B2E5-48)

- source, 1..116

> mol_type, protein

> organism, Mus musculus

Residues:

QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFT NYWMHWVKLR PGQGFEWIGE INPTNGGTDY 60

NEKFKRKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCTIYT TALDYWGQGT TLTVSS 116

Sequence Number (ID): 28

Length: 7

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- SITE, 1..7

> note, CDR1 of Heavy Chain (B2E5-48)

- source, 1..7

> mol_type, protein

> organism, Mus musculus

Residues:

GYTFTNY 7

Sequence Number (ID): 29

Length: 6

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- SITE, 1..6

> note, CDR2 of Heavy Chain (B2E5-48)

- source, 1..6

> mol_type, protein

> organism, Mus musculus

Residues:

NPTNGG 6

Sequence Number (ID): 30

Length: 7

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- SITE, 1..7
  > note, CDR3 of Heavy Chain (B2E5-48)
- source, 1..7
  > mol_type, protein

  > organism, Mus musculus

Residues:

YTTALDY 7

Sequence Number (ID): 31

Length: 381

Molecule Type: DNA

Features Location/Qualifiers:

- source, 1..381
  > mol_type, other DNA
  > organism, Mus musculus
- CDS, 1..381
  > note, Signal peptide and Variable Region of Light Chain (C3)

Residues:

atgaagtcac agacccaggt cttcgtattt ctactgctct gtgtgtctgg tgctcatggg 60

agtattgtga tgacccagac tcccaaattc ctgcttgtat cagcaggaga cagggttacc 120

ataacctgca aggccagtca gagtgtgagt aatgatgtag cttggtacca acagaagcca 180

gggcagtctc ctaaactgct gatatactat gcatccaatc gctacactgg agtccctgat 240

cgcttcactg gcagtggata tgggacggat ttcactttca ccatcagcac tgtgcaggct 300

gaagacctgg cagtttattt ctgtcagcag gattatagct ctccgtggac gttcggtgga 360

ggcaccaagc tggaaatcaa a 381

Sequence Number (ID): 32

Length: 127

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- source, 1..127

> mol_type, protein

> organism, Mus musculus

Residues:

MKSQTQVFVF LLLCVSGAHG SIVMTQTPKF LLVSAGDRVT ITCKASQSVS NDVAWYQQKP 60

GQSPKLLIYY ASNRYTGVPD RFTGSGYGTD FTFTISTVQA EDLAVYFCQQ DYSSPWTFGG 120

GTKLEIK 127

Sequence Number (ID): 33

Length: 107

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- SITE, 1..107

> note, Variable Region of Light Chain (C3)

- source, 1..107

> mol_type, protein

> organism, Mus musculus

Residues:

SIVMTQTPKF LLVSAGDRVT ITCKASQSVS NDVAWYQQKP GQSPKLLIYY ASNRFTGVPD 60

RFTGSGYGTD FTFTISTVQA EDLAVYFCQQ DYSSPWTFGG GTKLEIK 107

Sequence Number (ID): 34

Length: 11

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- SITE, 1..11

> note, CDR1 of Light Chain (C3)

- source, 1..11

> mol_type, protein

> organism, Mus musculus

Residues:

KASQSVSNDV A 11

Sequence Number (ID): 35

Length: 7

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- SITE, 1..7

> note, CDR2 of Light Chain (C3)

- source, 1..7

> mol_type, protein

> organism, Mus musculus

Residues:

YASNRFT 7

Sequence Number (ID): 36

Length: 9

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- SITE, 1..9

> note, CDR3 of Light Chain (C3)

- source, 1..9

> mol_type, protein

> organism, Mus musculus

Residues:

QQDYSSPWT 9

Sequence Number (ID): 37

Length: 402

Molecule Type: DNA

Features Location/Qualifiers:

- source, 1..402

> mol_type, other DNA

> organism, Mus musculus

- CDS, 1..402

> note, Signal peptide and Variable Region of Heavy Chain (C3)

Residues:

atgaatttcg ggctcagctt gattttcctt gtccttgttt taaaaggtgt cctgtgtgaa 60

gtgaaactgg tggagtctgg gggaggttta gtgcagcctg gagggtccct gaaactctcc 120

tgtgcagcct ctggattcac tttcagtagc tataccatgt cttgggttcg ccagactcca 180

gagaagaggc tggagtgggt cgcatacatt actactggtg ctggtaggac ctactatcca 240

gacactgtaa agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300

caaatgagta gtctgaagtc tgaggacacg gccatgtatt actgtgcaag acatcggggg 360

gactactggg gtcaaggaac ctcagtcacc gtctcctcag cc 402

Sequence Number (ID): 38

Length: 134

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- source, 1..134

> mol_type, protein

> organism, Mus musculus

Residues:

MNFGLSLIFL VLVLKGVLCE VKLVESGGGL VQPGGSLKLS CAASGFTFSS YTMSWVRQTP 60

EKRLEWVAYI TTGAGRTYYP DTVKGRFTIS RDNAKNTLYL QMSSLKSEDT AMYYCARHRG 120

DYWGQGTSVT VSSA 134

Sequence Number (ID): 39

Length: 115

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- SITE, 1..115

> note, Variable Region of Heavy Chain (C3)

- source, 1..115

> mol_type, protein

> organism, Mus musculus

Residues:

EVKLVESGGG LVQPGGSLKL SCAASGFTFS SYTMSWVRQT PEKRLEWVAY ITTGAGRTYY 60

PDTVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLKSED TAMYYCARHR GDYWGQGTSV TVSSA 115

Sequence Number (ID): 40

Length: 7

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- SITE, 1..7

> note, CDR1 of Heavy Chain (C3)

- source, 1..7

> mol_type, protein

> organism, Mus musculus

Residues:

GFTFSSY 7

Sequence Number (ID): 41

Length: 6

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- SITE, 1..6

> note, CDR2 of Heavy Chain (C3)

- source, 1..6

> mol_type, protein

> organism, Mus musculus

Residues:

TTGAGR 6

Sequence Number (ID): 42

Length: 5

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- SITE, 1..5

> note, CDR3 of Heavy Chain (C3)

- source, 1..5

> mol_type, protein

> organism, Mus musculus

Residues:

HRGDY 5

Sequence Number (ID): 43

Length: 324

Molecule Type: DNA

Features Location/Qualifiers:

- source, 1..324

> mol_type, other DNA

> organism, Mus musculus

- CDS, 1..324

> note, Variable Region of Light Chain (A5D11-10)

Residues:

gatatccaga tgacacagac tacatcttcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60

atcagttgca gggcaagtca ggacattagc aattatttaa actggtatca gcagaaacca 120

gatggaactg ttaaactcct tatctactac acatcaagat tacactcagg agtcccatca 180

aggttcagtg gcagtgggtc tcgaatagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa 240

gaagattttg ccacttactt ttgccaacag agtgatacgc ttcctccgtg gacgttcggt 300

ggaggcacca agctggaaat caaa 324

Sequence Number (ID): 44

Length: 108

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- source, 1..108

> mol_type, protein

> organism, Mus musculus

Residues:

DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY TSRLHSGVPS 60

RFSGSGSRID YSLTISNLEQ EDFATYFCQQ SDTLPPWTFG GGTKLEIK 108

Sequence Number (ID): 45

Length: 11

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- SITE, 1..11

> note, CDR1 of Light Chain (A5D11-10)

- source, 1..11

> mol_type, protein

> organism, Mus musculus

Residues:

RASQDISNYL N 11

Sequence Number (ID): 46

Length: 7

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- SITE, 1..7

> note, CDR2 of Light Chain (A5D11-10)

- source, 1..7

> mol_type, protein

> organism, Mus musculus

Residues:

YTSRLHS 7

Sequence Number (ID): 47

Length: 10

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- SITE, 1..10

> note, CDR3 of Light Chain (A5D11-10)

- source, 1..10

> mol_type, protein

> organism, Mus musculus

Residues:

QQSDTLPPWT 10

Sequence Number (ID): 48

Length: 357

Molecule Type: DNA

Features Location/Qualifiers:

- source, 1..357

> mol_type, other DNA

> organism, Mus musculus

- CDS, 1..357

> note, Variable Region of Heavy Chain (A5D11-10)

Residues:

gaggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctagtgcagc cctcacagag cctgtccatc 60

acctgcacag tctctggttt ctcattaact aggtatggtg tacactgggt tcgccagtct 120

ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagtg atatggagtg gtggaagcac agactataat 180

gcagctttca tatccagact gagcatcagc aaggacaatt ccaagagcca agttttcttt 240

aaaatgaaca gtctgcaagc taatgacaca gccatatatt actgtgccag aaatggttac 300

gacgggggct atgctatgga ctactggggt caaggaacct cagtcaccgt ctcctca 357

Sequence Number (ID): 49

Length: 119

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- source, 1..119

> mol_type, protein

> organism, Mus musculus

Residues:

EVQLKESGPG LVQPSQSLSI TCTVSGFSLT RYGVHWVRQS PGKGLEWLGV IWSGGSTDYN 60

AAFISRLSIS KDNSKSQVFF KMNSLQANDT AIYYCARNGY DGGYAMDYWG QGTSVTVSS 119

Sequence Number (ID): 50

Length: 7

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- SITE, 1..7

> note, CDR1 of Heavy Chain (A5D11-10)

- source, 1..7

> mol_type, protein

> organism, Mus musculus

Residues:

GFSLTRY 7

Sequence Number (ID): 51

Length: 5

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- SITE, 1..5

> note, CDR2 of Heavy Chain (A5D11-10)

- source, 1..5

> mol_type, protein

> organism, Mus musculus

Residues:

WSGGS 5

Sequence Number (ID): 52

Length: 11

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- SITE, 1..11

> note, CDR3 of Heavy Chain (A5D11-10)

- source, 1..11

> mol_type, protein

> organism, Mus musculus

Residues:

NGYDGGYAMD Y 11

Sequence Number (ID): 53

Length: 648

Molecule Type: DNA

Features Location/Qualifiers:

- source, 1..648

> mol_type, other DNA

> organism, Homo sapiens

- CDS, 1..648

> note, hEva1

> protein_id, 54

> translation,
MYGKSSTRAVLLLLGIQLTALWPIAAVEIYTSRVLEAVNGTDARLKCTFSSFAPVGDALTVTWNFRPLDGGPEQFVFYYHIDPFQPMSGRFKDRVSWDGNPE
RYDASILLWKLQFDDNGTYTCQVKNPPDVDGVIGEIRLSVVHTVRFSEIHFLALAIGSACALMIIIVIVVVLFQHYRKKRWAERAHKVVEIKSKEEEERLNQE
KKVSVYLEDTD

Residues:

atgtatggca agagctctac tcgtgcggtg cttcttctcc ttggcataca gctcacagct 60

ctttggccta tagcagctgt ggaaatttat acctcccggg tgctggaggc tgttaatggg 120

acagatgctc ggttaaaatg cactttctcc agctttgccc ctgtgggtga tgctctaaca 180

gtgacctgga attttcgtcc tctagacggg ggacctgagc agtttgtatt ctactaccac 240

atagatccct tccaacccat gagtgggcgg tttaaggacc gggtgtcttg ggatgggaat 300

cctgagcggt acgatgcctc catccttctc tggaaactgc agttcgacga caatgggaca 360

tacacctgcc aggtgaagaa cccacctgat gttgatgggg tgatagggga gatccggctc 420

agcgtcgtgc acactgtacg cttctctgag atccacttcc tggctctggc cattggctct 480

gcctgtgcac tgatgatcat aatagtaatt gtagtggtcc tcttccagca ttaccggaaa 540

aagcgatggg ccgaaagagc tcataaagtg gtggagataa aatcaaaaga agaggaaagg 600

ctcaaccaag agaaaaaggt ctctgtttat ttagaagaca cagactaa 648

Sequence Number (ID): 54

Length: 215

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- source, 1..215

> mol_type, protein

> organism, Homo sapiens

Residues:

MYGKSSTRAV LLLLGIQLTA LWPIAAVEIY TSRVLEAVNG TDARLKCTFS SFAPVGDALT 60

VTWNFRPLDG GPEQFVFYYH IDPFQPMSGR FKDRVSWDGN PERYDASILL WKLQFDDNGT 120

YTCQVKNPPD VDGVIGEIRL SVVHTVRFSE IHFLALAIGS ACALMIIIVI VVVLFQHYRK 180

KRWAERAHKV VEIKSKEEER LNQEKKVSVY LEDTD 215

Sequence Number (ID): 55

Length: 648

Molecule Type: DNA

Features Location/Qualifiers:

- source, 1..648

> mol_type, other DNA

> organism, Mus musculus

- CDS, 1..648

> note, mEva1

> protein_id, 56

> translation,
MYGKSPALVLPLLLSLQLTALCPTEAVEIYTSGALEAVNGTDVRLKCTFSSFAPVGDALTVTWNFRPRDGGREQFVFYYHMDPFRPMSGRFKDRVVWDGNPE
RYDVSILLWKLQFDDNGTYTCQVKNPPDVDGLVGTIRLSVVHTVPFSEIYFLAVAIGSACALMIIVVIVVVLFQHFRKKRWADSADKAEGTKSKEEEKLNQG
NKVSVFVEDTD

Residues:

atgtatggca agagccccgc gcttgtgctt ccacttctcc tgagtttaca gctcacagcc 60

ctttgtccta cagaagctgt ggaaatttac acctccgggg ccctggaggc agtcaacggg 120
acagatgttc ggttaaaatg cactttctcc agctttgccc ctgtgggaga tgcgctaact 180
gtgacgtgga atttccgacc tcgagatggg ggtcgtgagc agtttgtatt ctactaccac 240
atggacccct tcaggcccat gagcggacgg ttcaaagacc gggtggtctg ggacggaaac 300
cccgagcgat atgacgtctc catcttgctc tggaagctgc agtttgacga caatgggaca 360
tacacctgcc aggtgaagaa tccacctgat gttgatggtc tggttgggac gatccggctc 420
agcgttgtgc acactgtgcc cttctctgag atctacttcc tggccgtggc cattggctct 480

gcgtgcgcac tgatgatcat cgtagtgatc gtggtagtcc tcttccagca cttccggaaa 540
aagcgatggg cggacagtgc tgataaagcc gaggggacaa aatcaaaaga agaggaaaaa 600
ctcaaccaag gaaacaaggt ctctgttttt gtggaagata cagactaa 648

Sequence Number (ID): 56

Length: 215

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- source, 1..215
  > mol_type, protein
  > organism, Mus musculus

Residues:

MYGKSPALVL PLLLSLQLTA LCPTEAVEIY TSGALEAVNG TDVRLKCTFS SFAPVGDALT 60
VTWNFRPRDG GREQFVFYYH MDPFRPMSGR FKDRVVWDGN PERYDVSILL WKLQFDDNGT 120

YTCQVKNPPD VDGLVGTIRL SVVHTVPFSE IYFLAVAIGS ACALMIIVVI VVVLFQHFRK 180
KRWADSADKA EGTKSKEEEK LNQGNKVSVF VEDTD 215

Sequence Number (ID): 57

Length: 3195

Molecule Type: DNA

Features Location/Qualifiers:

- misc_feature, 1..3195
  > note, B2E5-48 CAR
- source, 1..3195
  > mol_type, other DNA
  > organism, synthetic construct

- CDS, 1..3195

Residues:

atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgcgagctgc cccaccccgc ctttctgctg 60

atccccgaca tccagcaaat tgttctcacc cagtctccag cactcatgtc tgcatctcca 120

ggggagaggg tcaccttgac ctgcagtgcc agctcaagtg taggttacat gtactggtac 180

cagcagaagc caggaagctc ccccaaaccc tggatttatg tcacatccaa cctggcttct 240

ggagtccctg ctcgcttcag tggcagtggg tctgggacct cttactctct cacaatcagc 300

agcatggagg ctgaagatgc tgccacttat tactgccagc agtggagtag taacccacct 360

acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaacgaactg gcagcacctc cggcagcggc 420

aagcctggca gcggcgaggg cagcaccaag ggccaggtcc aactccagca gcctggggct 480

gaactggtga agcctggggc ttcagtgaag ttgtcctgca aggcttctgg ctacaccttc 540

accaactact ggatgcactg ggtgaagctg aggcctggac aaggctttga gtggattgga 600

gagattaatc ctaccaatgg tggtactgac tacaatgaga agttcaagag aaaggccaca 660

ctgactgtag acaaatcctc cagcacagcc tacatgcaac tcagcagcct gacatctgag 720

gactctgcgg tctattactg cacaatatat actacggctc ttgactactg gggccaaggc 780

accactctca cagtctcctc agagcccaaa tcttctgaca aaactcacac atctccaccg 840

tgcccagccc ccgagttcct gggcggaccc agcgtgttcc tgttcccccc caagcccaag 900

gacaccctga tgatcagccg gacccccgag gtgacctgcg tggtggtgga cgtgagccag 960

gaagatcccg aggtccagtt caattggtac gtggacggcg tggaagtgca caacgccaag 1020

accaagccca gagaggaaca gttcaacagc acctaccggg tggtgtctgt gctgaccgtg 1080

ctgcaccagg actggctgaa cggcaaagaa tacaagtgca aggtgtccaa caagggcctg 1140

cccagcagca tcgaaaagac catcagcaag gccaagggcc agcctcgcga gccccaggtg 1200

tacaccctgc ctccctccca ggaagagatg accaagaacc aggtgtccct gacctgcctg 1260

gtgaagggct tctaccccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaacgg ccagcctgag 1320

aacaactaca agaccacccc tcccgtgctg gacagcgacg gcagcttctt cctgtacagc 1380

cggctgaccg tggacaagag ccggtggcag gaaggcaacg tctttagctg cagcgtgatg 1440

cacgaggccc tgcacaacca ctacacccag aagagcctga gcctgtccct gggcaagatg 1500

ttctgggtgc tggtggtggt gggcggggtg ctggcctgct acagcctgct ggtgacagtg 1560

gccttcatca tcttttgggt gcggagcaag cggagcagag gcggccacag cgactacatg 1620

aacatgaccc ccagacggcc tggccccacc cggaagcact accagcccta cgccccaccc 1680

agggactttg ccgcctaccg gtccggcgga gggcgggtga agttcagcag aagcgccgac 1740

gcccctgcct accagcaggg ccagaatcag ctgtacaacg agctgaacct gggcagaagg 1800

gaagagtacg acgtcctgga taagcggaga ggccgggacc ctgagatggg cggcaagcct 1860
cggcggaaga acccccagga aggcctgtat aacgaactgc agaaagacaa gatggccgag 1920
gcctacagcg agatcggcat gaagggcgag cggaggcggg gcaagggcca cgacggcctg 1980
tatcagggcc tgtccaccgc caccaaggat acctacgacg ccctgcacat gcaggccctg 2040
cccccaaggc tcgagggcgg cggagagggc agaggaagtc ttctaacatg cggtgacgtg 2100
gaggagaatc ccggccctag gatgcttctc ctggtgacaa gccttctgct ctgtgagtta 2160
ccacacccag cattcctcct gatcccacgc aaagtgtgta acggaatagg tattggtgaa 2220

tttaaagact cactctccat aaatgctacg aatattaaac acttcaaaaa ctgcacctcc 2280
atcagtggcg atctccacat cctgccggtg gcatttaggg gtgactcctt cacacatact 2340
cctcctctgg atccacagga actggatatt ctgaaaaccg taaaggaaat cacagggttt 2400
ttgctgattc aggcttggcc tgaaaacagg acggacctcc atgcctttga gaacctagaa 2460
atcatacgcg gcaggaccaa gcaacatggt cagttttctc ttgcagtcgt cagcctgaac 2520
ataacatcct tgggattacg ctccctcaag gagataagtg atggagatgt gataatttca 2580
ggaaacaaaa atttgtgcta tgcaaataca ataaactgga aaaaactgtt tgggacctcc 2640

ggtcagaaaa ccaaaattat aagcaacaga ggtgaaaaca gctgcaaggc cacaggccag 2700
gtctgccatg ccttgtgctc ccccgagggc tgctggggcc cggagcccag ggactgcgtc 2760
tcttgccgga atgtcagccg aggcagggaa tgcgtggaca agtgcaacct tctggagggt 2820
gagccaaggg agtttgtgga gaactctgag tgcatacagt gccacccaga gtgcctgcct 2880
caggccatga acatcacctg cacaggacgg ggaccagaca actgtatcca gtgtgcccac 2940
tacattgacg gcccccactg cgtcaagacc tgcccggcag gagtcatggg agaaaacaac 3000
accctggtct ggaagtacgc agacgccggc catgtgtgcc acctgtgcca tccaaactgc 3060

acctacggat gcactgggcc aggtcttgaa ggctgtccaa cgaatgggcc taagatcccg 3120
tccatcgcca ctgggatggt gggggccctc ctcttgctgc tggtggtggc cctggggatc 3180
ggcctcttca tgtga 3195

Sequence Number (ID): 58

Length: 1064

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..1064

> note, B2E5-48 CAR

- SITE, 1..25

> note, GM-CSF leader sequence

- SITE, 26..131

> note, Variable Region of Light Chain (B2E5-48)

- SITE, 134..151

> note, 18aa Linke

- SITE, 152..267

> note, Variable Region of Heavy Chain (B2E5-48)

- SITE, 268..282

> note, FC

- SITE, 283..392

> note, CH2

- SITE, 393..499

> note, CH3

- SITE, 500..527

> note, CD28TM

- SITE, 528..568

> note, CD28IC

- SITE, 569..571

> note, GGG

- SITE, 572..688

> note, CD3z

- SITE, 689..707

> note, T2A

- SITE, 708..1064

> note, tEGFR

- source, 1..1064

> mol_type, protein

> organism, synthetic construct

Residues:

MLLLVTSLLL CELPHPAFLL IPDIQQIVLT QSPALMSASP GERVTLTCSA SSSVGYMYWY 60

QQKPGSSPKP WIYVTSNLAS GVPARFSGSG SGTSYSLTIS SMEAEDAATY YCQQWSSNPP 120

TFGAGTKLEL KRTGSTSGSG KPGSGEGSTK GQVQLQQPGA ELVKPGASVK LSCKASGYTF 180

TNYWMHWVKL RPGQGFEWIG EINPTNGGTD YNEKFKRKAT LTVDKSSSTA YMQLSSLTSE 240

DSAVYYCTIY TTALDYWGQG TTLTVSSEPK SSDKTHTSPP CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK 300

DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV 360

LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL 420

VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM 480

HEALHNHYTQ KSLSLSLGKM FWVLVVVGGV LACYSLLVTV AFIIFWVRSK RSRGGHSDYM 540

NMTPRRPGPT RKHYQPYAPP RDFAAYRSGG GRVKFSRSAD APAYQQGQNQ LYNELNLGRR 600

EEYDVLDKRR GRDPEMGGKP RRKNPQEGLY NELQKDKMAE AYSEIGMKGE RRRGKGHDGL 660

YQGLSTATKD TYDALHMQAL PPRLEGGGEG RGSLLTCGDV EENPGPRMLL LVTSLLLCEL 720

PHPAFLLIPR KVCNGIGIGE FKDSLSINAT NIKHFKNCTS ISGDLHILPV AFRGDSFTHT 780

PPLDPQELDI LKTVKEITGF LLIQAWPENR TDLHAFENLE IIRGRTKQHG QFSLAVVSLN 840

ITSLGLRSLK EISDGDVIIS GNKNLCYANT INWKKLFGTS GQKTKIISNR GENSCKATGQ 900

VCHALCSPEG CWGPEPRDCV SCRNVSRGRE CVDKCNLLEG EPREFVENSE CIQCHPECLP 960

QAMNITCTGR GPDNCIQCAH YIDGPHCVKT CPAGVMGENN TLVWKYADAG HVCHLCHPNC 1020

TYGCTGPGLE GCPTNGPKIP SIATGMVGAL LLLLVVALGI GLFM 1064

Sequence Number (ID): 59

Length: 15

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..15

> note, Hinge region:15aa

- source, 1..15

> mol_type, protein

> organism, synthetic construct

Residues:

EPKSSDKTHT SPPCP 15

Sequence Number (ID): 60

Length: 30

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..30

> note, Hinge region:30aa

- source, 1..30

> mol_type, protein

> organism, synthetic construct

Residues:

EPKSSDKTHT SPPCPAPEFL GGPSVFLFPP 30

Sequence Number (ID): 61

Length: 60

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..60

> note, Hinge region:60aa

- source, 1..60

> mol_type, protein

> organism, synthetic construct

Residues:

EPKSSDKTHT SPPCPAPEFL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSQEDPEVQF 60

Sequence Number (ID): 62

Length: 125

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..125

> note, Hinge region:125aa

- source, 1..125

> mol_type, protein

> organism, synthetic construct

Residues:

EPKSSDKTHT SPPCPAPEFL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSQEDPEVQF 60

NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPSSIEKT 120

ISKAK 125

Sequence Number (ID): 63

Length: 232

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..232

> note, Hinge region:232aa

- source, 1..232

> mol_type, protein

> organism, synthetic construct

Residues:

EPKSSDKTHT SPPCPAPEFL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSQEDPEVQF 60

NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPSSIEKT 120

ISKAKGQPRE PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP 180

PVLDSDGSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSL GK 232

Sequence Number (ID): 64

Length: 42

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..42

> note, 4-1BB IC

- source, 1..42

> mol_type, protein

> organism, synthetic construct

Residues:

KRGRKKLLYI FKQPFMRPVQ TTQEEDGCSC RFPEEEEGGC EL 42

Sequence Number (ID): 65

Length: 61

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..61

> note, CD79A IC

- source, 1..61

> mol_type, protein

> organism, synthetic construct

Residues:

RKRWQNEKLG LDAGDEYEDE NLYEGLNLDD CSMYEDISRG LQGTYQDVGS LNIGDVQLEK 60

P 61

Sequence Number (ID): 66

Length: 62

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..62

> note, CD40 IC

- source, 1..62

> mol_type, protein

> organism, synthetic construct

Residues:

KKVAKKPTNK APHPKQEPQE INFPDDLPGS NTAAPVQETL HGCQPVTQED GKESRISVQE 60

RQ 62

END