(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0034205
(43) 공개일자 2024년03월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 14/52* (2006.01)
C07K 14/54 (2024.01) *C07K 14/725* (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2863 (2013.01)
A61K 39/4611 (2023.05)
(21) 출원번호 10-2024-7003837
(22) 출원일자(국제) 2022년07월14일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년02월01일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2022/027735
(87) 국제공개번호 WO 2023/286840
국제공개일자 2023년01월19일
(30) 우선권주장
JP-P-2021-118056 2021년07월16일 일본(JP)

(71) 출원인
노일 이뮨 바이오테크 가부시키가이샤
일본 도쿄도 미나토쿠 시바다이몬 2쵸메 12방 10고
(72) 발명자
타마다 코지
일본 7558505 야마구치 우베시 미나미코구시 1초메 1-1, 야마구치 유니버시티, 팩컬티 오브 메디슨 앤 헬스 사이언시스 나이
사코다 유키미
일본 7558505 야마구치 우베시 미나미코구시 1초메 1-1, 야마구치 유니버시티, 팩컬티 오브 메디슨 앤 헬스 사이언시스 나이
아다치 케이시
일본 7558505 야마구치 우베시 미나미코구시 1초메 1-1, 야마구치 유니버시티, 팩컬티 오브 메디슨 앤 헬스 사이언시스 나이
(74) 대리인
특허법인필앤온지

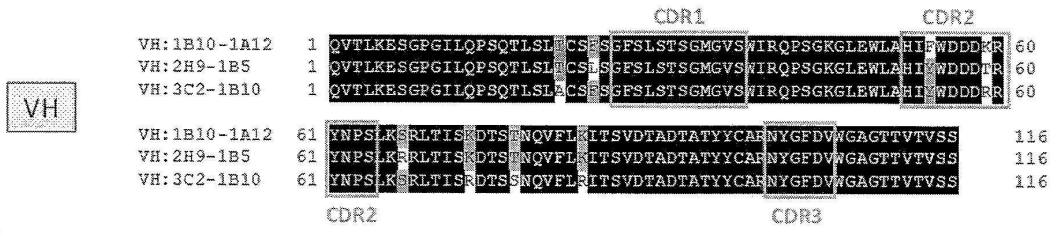
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 **항EGFRviii 항체, 폴리펩타이드, 상기 폴리펩타이드를 발현하는 세포, 상기 세포를 포함하는 의약 조성물, 상기 세포의 제조 방법 및 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 또는 벡터**

(57) 요 약

(a-1)~(a-3)로 이루어지는 군에서 선택되는, 특정 CDR 서열을 가지는 항체인, 항EGFRviii 항체, 상기 항체를 포함하는 폴리펩타이드, 상기 폴리펩타이드를 발현하는 세포, 상기 세포를 포함하는 의약 조성물, 상기 세포의 제조 방법 및 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 또는 벡터.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
A61K 39/4631 (2023.05)
A61K 39/464404 (2023.05)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/521 (2013.01)
C07K 14/5418 (2013.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C12N 5/0636 (2023.05)
C07K 2319/02 (2013.01)
C07K 2319/03 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 (a-1)~(a-3)으로 이루어지는 군에서 선택되는 항체 또는 그 항원 결합 단편인 항EGFRviii 항체:

(a-1) 서열번호 1 또는 4에 기재된 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역과,

서열번호 2, 3, 5 또는 6에 기재된 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역,

을 포함하며,

EGFRviii에 대한 결합능을 가지는 항체 또는 그 항원 결합 단편;

(a-2) 서열번호 1 또는 4에 기재된 아미노산 서열에서 1개 또는 복수개의 아미노산이 변이된 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역과,

서열번호 2, 3, 5 또는 6에 기재된 아미노산 서열에서 1개 또는 복수개의 아미노산이 변이된 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역,

을 포함하며,

EGFRviii에 대한 결합능을 가지는 항체 또는 그 항원 결합 단편; 및

(a-3) 서열번호 1 또는 4에 기재된 아미노산 서열과 90% 이상의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역과,

서열번호 2, 3, 5 또는 6에 기재된 아미노산 서열과 90% 이상의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역,

을 포함하고,

EGFRviii에 대한 결합능을 가지는 항체 또는 그 항원 결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 중쇄 가변 영역이 서열번호 1 또는 4에 기재된 아미노산 서열에서, 21 위치에 T, 24 위치에 F, 54 위치에 F, 59 위치에 K, 67 위치에 S, 73 위치에 K, 77 위치에 T 또는 K, 및 83 위치에 K 또는 T를 가지는 항EGFRviii 항체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 경쇄 가변 영역이, 서열번호 2, 3, 5 또는 6에 기재된 아미노산 서열 에서, 4 위치에 M, 16 위치에 E 또는 G, 27 위치에 Q, 35 위치에 K, 55 위치에 S, 58 위치에 N, 74 위치에 R, 79 위치에 K, 81 위치에 S, 87 위치에 D, 99 위치에 V를 가지는 항EGFRviii 항체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하고;

상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 3에

기재된 아미노산 서열을 포함하고;

또는,

상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 4에 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 5 또는 서열번호 6에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 항EGFRviii 항체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체가 단쇄 항체인 항EGFRviii 항체.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 단쇄 항체가, 상기 경쇄 가변 영역, 상기 중쇄 가변 영역과 상기 경쇄 가변 영역을 연결하는 펩타이드 링커 및 상기 중쇄 가변 영역을 N 말단으로부터 순서대로 포함하는 항EGFRviii 항체.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 단쇄 항체가 하기 (I)~(III)로 이루어지는 군에서 선택되는 폴리펩타이드인 항EGFRviii 항체:

(I) 서열번호 12~18 및 38로 이루어지는 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드;

(II) 서열번호 12~18 및 38로 이루어지는 군에서 선택되는 아미노산 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열로 이루지며, EGFRviii에 대한 결합능을 가지는 폴리펩타이드; 및

(III) 서열번호 12~18 및 38로 이루어지는 군에서 선택되는 아미노산 서열에서 1개 또는 복수개의 아미노산이 변이된 아미노산 서열로 이루어지며, EGFRviii에 대한 결합능을 가지는 폴리펩타이드.

청구항 8

표적 항원 결합 영역, 막 관통 영역 및 시그널 전달 영역을 포함하고,

상기 표적 항원 결합 영역이 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 기재된 항EGFRviii 항체를 포함하는 폴리펩타이드.

청구항 9

제8항에 있어서,

키메라 항원 수용체인 폴리펩타이드.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 기재된 폴리펩타이드를 발현하는 세포.

청구항 11

제10항에 있어서,

IL-7 및 CCL19 중 적어도 하나를 더 발현하는 세포.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서,

상기 세포가 면역 세포인 세포.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 면역 세포가 T세포인 세포.

청구항 14

제8항 또는 제9항에 기재된 폴리펩타이드를 코딩하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 15

제14항에 있어서,

IL-7을 코딩하는 염기서열 및 CCL19를 코딩하는 염기서열 중 적어도 하나를 더 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 16

제14항 또는 제15항에 기재된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

청구항 17

제16항에 있어서,

IL-7을 코딩하는 염기서열 및 CCL19를 코딩하는 염기서열 중 적어도 하나를 더 포함하는 벡터.

청구항 18

제14항 또는 제15항에 기재된 폴리뉴클레오티드를 세포에 도입하는 것을 포함하는 폴리펩타이드를 발현하는 세포의 제조 방법.

청구항 19

제16항 또는 제17항에 기재된 벡터를 세포에 도입하는 것을 포함하는 폴리펩타이드를 발현하는 세포의 제조 방법.

청구항 20

제10항 내지 제13항 중 어느 한 항에 기재된 세포를 포함하는 의약 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서,

종양을 치료 또는 예방하기 위한 의약 조성물인 의약 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은, 항EGFRviii 항체, 폴리펩타이드, 상기 폴리펩타이드를 발현하는 세포, 상기 세포를 포함하는 의약 조성물, 상기 세포의 제조 방법 및 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 또는 벡터에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 키메라 항원 수용체(Chimeric Antigen Receptor: 이하, 「CAR」라고도 한다.)는 암세포의 세포 표면 항원을 인식하는 표적 항원 결합 영역과 T세포의 활성화를 유도하는 시그널 전달 영역을 융합시킨 인공적인 키메라 단백질이다.

[0003] 예를 들면, 말초혈 T세포(말초혈 T림프구)에 CAR을 코딩하는 유전자를 도입함으로써, CAR발현 T세포(이하, 「CAR-T 세포」라고도 한다.)를 대량으로 제작하는 것이 가능해진다. 이러한 CAR-T 세포는 종양 반응성을 가지며, 주요 조직 적합 유전자 복합체(MHC)와의 상호 작용에 의존하지 않고 암세포의 상해를 가이드하는 것이 가능해진다.

[0004] CAR-T 세포의 투여에 따른 암 면역 요법, 보다 구체적으로는, 환자에게서 T세포를 채취하고, 이러한 T세포에 CAR을 코딩하는 유전자를 도입하고 증폭하여 다시 환자에게 이입하는 요법은, 현재 세계적으로 임상 시험이 진행되고 있으며, 백혈병이나 림프종 등의 조혈 기관 악성 종양 등에 있어 유효성을 나타내는 결과가 얻어지고 있다.

[0005] CAR-T 세포에 의한 암 면역 요법에서는, 대상으로 하는 종양에 특이적으로 발현하는 표적 항원의 탐색이 요구되고 있다. 또한, 그 표적 항원에 특이적으로 결합하여, CAR의 표적 항원 결합 영역으로서 이용할 수 있는 항체가 필요해진다. 표적 항원 결합 영역으로서 이용하는 항체는 CAR의 일부로서 발현시켰을 때 발현률이 충분히 높고, CAR을 발현시킨 세포가 높은 항종양 효과를 나타낼 필요가 있다. 반드시 항원에 대한 친화성이 높은 항체가 CAR에 유용하다고는 할 수 없으며, 표적 항원 결합 영역으로서 이용할 수 있는 항체의 탐색은 용이하지 않다.

[0006] 한편, CAR-T 세포 요법은 고형 종양에 대해서 효과를 얻는 것이 어렵다고 여겨져 왔다. 그 요인으로서 CAR-T 세포의 생체내에서의 생존률이 낮은 것, 종양 국소에 대한 집적이 낮은 것, 종양 세포가 분비하는 면역 억제 인자 등에 의한 활성 저해가 있는 것 등으로 생각되고 있다.

[0007] 이러한 문제를 해결하는 방법으로서, CAR을 코딩하는 핵산과 함께 T세포의 면역 기능 촉진 인자를 코딩하는 핵산을, T세포에 도입하는 방법이 보고되고 있다. 예를 들면, 특허 제6761113호 공보에는 고형 종양 항원을 표적 항원으로 하는 CAR, 및 고형 종양에 대해서 유효한 CAR-T 세포가 개시되어 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 일본 특허 제6761113호 공보

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 특허문헌 1에서는 표적 항원으로서의 강글리오시드 GM2에 대해서 유효성을 나타내는 CAR-T 세포가 개시되어 있지만, 고형 종양 항원에서 강글리오시드 GM2 이외를 표적 항원으로 하는 CAR, 및 고형 종양에 대해서 유효한 CAR-T 세포 및 그것에 이용할 수 있는 펩타이드의 개발이 더욱 요구되고 있다.

[0010] 본 발명에 따른 일 실시 형태가 해결하려고 하는 과제는, EGFRviii에 특이적으로 결합하며, 키메라 항원 수용체의 표적 항원 결합 영역으로서도 이용할 수 있는 신규 항체를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명에 따른 다른 실시 형태가 해결하려고 하는 과제는, 상기 신규 항체를 포함하는 폴리펩타이드, 그 폴리펩타이드를 발현하는 세포, 그 폴리펩타이드를 코딩하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 또는 벡터, 및 그 세포를 포함하는 의약 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 일 실시 형태는, 이하의 양태를 포함한다.

[0013] <1> 하기 (a-1)~(a-3)로 이루어지는 군에서 선택되는 항체 또는 그 항원 결합 단편인 항EGFRviii 항체:

[0014] (a-1) 서열번호 1 또는 4에 기재된 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역,

[0015] 서열번호 2, 3, 5 또는 6에 기재된 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역,

[0016] 을 포함하며,

[0017] EGFRviii에 대한 결합능을 가지는 항체 또는 그 항원 결합 단편;

[0018] (a-2) 서열번호 1 또는 4에 기재된 아미노산 서열에서 1개 또는 복수개의 아미노산이 변이된 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역,

[0019] 서열번호 2, 3, 5 또는 6에 기재된 아미노산 서열에서 1개 또는 복수개의 아미노산이 변이된 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역,

[0020] 을 포함하며,

[0021] EGFRviii에 대한 결합능을 가지는 항체 또는 그 항원 결합 단편; 및

[0022] (a-3) 서열번호 1 또는 4에 기재된 아미노산 서열과 90% 이상의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역,

[0023] 서열번호 2, 3, 5 또는 6에 기재된 아미노산 서열과 90% 이상의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역,

[0024] 을 포함하며,

[0025] EGFRviii에 대한 결합능을 가지는 항체 또는 그 항원 결합 단편.

[0026] <2> 상기 중쇄 가변 영역이, 서열번호 1 또는 4에 기재된 아미노산 서열에서, 21 위치에 T, 24 위치에 F, 54 위치에 F, 59 위치에 K, 67 위치에 S, 73 위치에 K, 77 위치에 T 또는 K 및 83 위치에 K 또는 T를 가지는 <1>에 기재된 항EGFRviii 항체.

[0027] <3> 상기 경쇄 가변 영역이, 서열번호 2, 3, 5 또는 6에 기재된 아미노산 서열에서, 4 위치에 M, 16 위치에 E 또는 G, 27 위치에 Q, 35 위치에 K, 55 위치에 S, 58 위치에 N, 74 위치에 R, 79 위치에 K, 81 위치에 S, 87 위치에 D, 99 위치에 V를 가지는 <1> 또는 <2>에 기재된 항EGFRviii 항체.

[0028] <4> 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하고;

[0029] 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열을 포함하고;

[0030] 또는,

[0031] 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 4에 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 5 또는 서열번호 6에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 <1> 내지 <3> 중 어느 하나에 기재된 항EGFRviii 항체.

[0032] <5> 상기 항체가 단쇄 항체인 <1> 내지 <4> 중 어느 하나에 기재된 항EGFRviii 항체.

[0033] <6> 상기 단쇄 항체가, 상기 경쇄 가변 영역, 상기 중쇄 가변 영역과 상기 경쇄 가변 영역을 연결하는 펩타이드 링커 및 상기 중쇄 가변 영역을 N 말단으로부터 순서대로 포함하는 <5>에 기재된 항EGFRviii 항체.

[0034] <7> 상기 단쇄 항체가 하기 (I)~(III)로 이루어지는 군에서 선택되는 폴리펩타이드인 <5>에 기재된 EGFRviii 항체:

[0035] (I) 서열번호 12~18 및 38로 이루어지는 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드;

[0036] (II) 서열번호 12~18 및 38로 이루어지는 군에서 선택되는 아미노산 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열로 이루지며, EGFRviii에 대한 결합능을 가지는 폴리펩타이드; 및

[0037] (III) 서열번호 12~18 및 38로 이루어지는 군에서 선택되는 아미노산 서열에서 1개 또는 복수개의 아미노산이 변이된 아미노산 서열로 이루어지며, EGFRviii에 대한 결합능을 가지는 폴리펩타이드.

[0038] <8> 표적 항원 결합 영역, 막 관통 영역 및 시그널 전달 영역을 포함하고,

[0039] 상기 표적 항원 결합 영역이 <1> 내지 <7> 중 어느 하나에 기재된 항EGFRviii 항체를 포함하는 폴리펩타이드.

[0040] <9> 키메라 항원 수용체인 <8>에 기재된 폴리펩타이드.

[0041] <10> <8> 또는 <9>에 기재된 폴리펩타이드를 발현하는 세포.

[0042] <11> IL-7 및 CCL19 중 적어도 하나를 더 발현하는, 바람직하게는 외래성 IL-7 및 외래성 CCL19 중 적어도 하나를 더 발현하는 <10>에 기재된 세포.

[0043] <12> 상기 세포가 면역 세포인 <10> 또는 <11>에 기재된 세포.

[0044] <13> 상기 면역 세포가 T세포인 <12>에 기재된 세포.

[0045] <14> <8> 또는 <9>에 기재된 폴리펩타이드를 코딩하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

[0046] <15> IL-7을 코딩하는 염기서열 및 CCL19를 코딩하는 염기서열 중 적어도 하나를 더 포함하는, 바람직하게는 외래성 핵산으로서 더 포함하는 <14>에 기재된 폴리뉴클레오티드.

[0047] <16> <14> 또는 <15>에 기재된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

[0048] <17> IL-7을 코딩하는 염기서열 및 CCL19를 코딩하는 염기서열 중 적어도 하나를 더 포함하는, <16>에 기재된 벡터.

[0049] <18> <14> 또는 <15>에 기재된 폴리뉴클레오티드를 세포에 도입하는 것을 포함하는 폴리펩타이드를 발현하는 세포의 제조 방법.

[0050] <19> <16> 또는 <17>에 기재된 벡터를 세포에 도입하는 것을 포함하는, 폴리펩타이드를 발현하는 세포의 제조 방법.

[0051] <20> <10> 내지 <13> 중 하나에 기재된 세포를 포함하는 의약 조성물.

[0052] <21> 종양을 치료 또는 예방하기 위한 의약 조성물인 <20>에 기재된 의약 조성물.

발명의 효과

[0053] 본 발명의 일 실시 형태에 의하면, EGFRviii에 특이적으로 결합하며, 키메라 항원 수용체의 표적 항원 결합 영역으로서도 이용할 수 있는 신규 항체를 제공할 수 있다.

[0054] 본 발명의 다른 실시 형태에 의하면, 상기 신규 항체를 포함하는 폴리펩타이드, 그 폴리펩타이드를 발현하는 세포, 그 폴리펩타이드를 코딩하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 또는 벡터 및 그 세포를 포함하는 의약품 조성물을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0055] 도 1a는 EGFRviii에 결합하는 항체의 아미노산 서열을 해석한 결과의 일 예를 나타내는 도면이다.

도 1b는 EGFRviii에 결합하는 항체의 아미노산 서열을 해석한 결과의 일 예를 나타내는 도면이다.

도 2a는 항EGFRviiiCAR의 발현 레벨을 유세포 분석(flow cytometry)에 의해 측정한 결과의 일 예를 나타내는 도면이다.

도 2b는 항EGFRviiiCAR의 발현 레벨을 유세포 분석에 의해 측정한 결과의 일 예를 나타내는 도면이다.

도 2c는 항EGFRviiiCAR의 발현 레벨을 유세포 분석에 의해 측정한 결과의 일 예를 나타내는 도면이다.

도 2d는 항EGFRviiiCAR의 발현 레벨을 유세포 분석에 의해 측정한 결과의 일 예를 나타내는 도면이다.

도 2e는 항EGFRviiiCAR의 발현 레벨을 유세포 분석에 의해 측정한 결과의 일 예를 나타내는 도면이다.

도 2f는 항EGFRviiiCAR의 발현 레벨을 유세포 분석에 의해 측정한 결과의 일 예를 나타내는 도면이다.

도 2g는 항EGFRviiiCAR의 발현 레벨을 유세포 분석에 의해 측정한 결과의 일 예를 나타내는 도면이다.

도 2h는 항EGFRviiiCAR의 발현 레벨을 유세포 분석에 의해 측정한 결과의 일 예를 나타내는 도면이다.

도 2i는 항EGFRviiiCAR의 발현 레벨을 유세포 분석에 의해 측정한 결과의 일 예를 나타내는 도면이다.

도 3a는 항EGFRviiiCAR의 발현 레벨을 유세포 분석에 의해 측정한 결과의 일 예를 나타내는 도면이다.

도 3b는 항EGFRviiiCAR의 발현 레벨을 유세포 분석에 의해 측정한 결과의 일 예를 나타내는 도면이다.

도 3c는 항EGFRviiiCAR의 발현 레벨을 유세포 분석에 의해 측정한 결과의 일 예를 나타내는 도면이다.

도 3d는 항EGFRviiiCAR의 발현 레벨을 유세포 분석에 의해 측정한 결과의 일 예를 나타내는 도면이다.

도 4a는 PRIME EGFRviii CAR-T 세포의 세포 상해 활성을 측정한 결과의 일 예를 나타내는 도면이다.

도 4b는 PRIME EGFRviii CAR-T 세포의 세포 상해 활성을 측정한 결과의 일 예를 나타내는 도면이다.

도 5a는 항EGFRviiiCAR의 발현 레벨을 유세포 분석에 의해 측정한 결과의 일 예를 나타내는 도면이다.

도 5b는 항EGFRviiiCAR의 발현 레벨을 유세포 분석에 의해 측정한 결과의 일 예를 나타내는 도면이다.

도 5c는 항EGFRviiiCAR의 발현 레벨을 유세포 분석에 의해 측정한 결과의 일 예를 나타내는 도면이다.

도 5d는 항EGFRviiiCAR의 발현 레벨을 유세포 분석에 의해 측정한 결과의 일 예를 나타내는 도면이다.

도 5e는 항EGFRviiiCAR의 발현 레벨을 유세포 분석에 의해 측정한 결과의 일 예를 나타내는 도면이다.

도 6a는 PRIME EGFRviii CAR-T 세포의 세포 상해 활성을 측정한 결과의 일 예를 나타내는 도면이다.

도 6b는 PRIME EGFRviii CAR-T 세포의 세포 상해 활성을 측정한 결과의 일 예를 나타내는 도면이다.

도 7은 PRIME EGFRviii CAR-T 세포와 EGFRviii 발현 세포(교아종 세포 U87MGviii 4. 12 세포) 또는 EGFRviii 비발현 세포(U87MG 세포)의 비(E:T비)를 1:3으로 했을 때의 배양 상청의 IFNɣ 농도를 측정한 결과의 일 예를 나타내는 도면이다.

도 8a는 정상인 도너의 샘플을 이용한 경우의 항EGFRviiiCAR의 발현 레벨을 유세포 분석에 의해 측정한 결과의 일 예를 나타내는 도면이다.

도 8b는 정상인 도너의 샘플을 이용한 경우의 항EGFRviiiCAR의 발현 레벨을 유세포 분석에 의해 측정한 결과의 일 예를 나타내는 도면이다.

도 8c 정상인 도너의 샘플을 이용한 경우의 항EGFRviiiCAR의 발현 레벨을 유세포 분석에 의해 측정한 결과의 일 예를 나타내는 도면이다.

도 8d는 정상인 도너의 샘플을 이용한 경우의 항EGFRviiiCAR의 발현 레벨을 유세포 분석에 의해 측정한 결과의 일 예를 나타내는 도면이다.

도 9a는 ATP 어세이에 의해, EGFRviii 비발현 종양 세포를 표적으로 하여 PRIME EGFRviii CAR-T 세포 및 활성화 T세포의 세포 상해 활성의 측정 결과의 일 예를 나타내는 도면이다.

도 9b는 ATP 어세이에 의해, EGFRviii 발현 종양 세포를 표적으로하여 PRIME EGFRviii CAR-T 세포 및 활성화 T세포의 세포 상해 활성의 측정 결과의 일 예를 나타내는 도면이다.

도 9c는 ATP 어세이에 의해, EGFRviii 비발현 종양 세포를 표적으로 하여 PRIME EGFRviii CAR-T 세포 및 활성화 T세포의 세포 상해 활성의 측정 결과의 일 예를 나타내는 도면이다.

도 9d는 ATP 어세이에 의해, EGFRviii 발현 종양 세포를 표적으로 하여 PRIME EGFRviii CAR-T 세포 및 활성화 T세포의 세포 상해 활성의 측정 결과의 일 예를 나타내는 도면이다.

도 10은 종양 세포를 PE 표식한 항인간EGFRviii 항체로 염색하여 유세포 분석 해석한 결과의 일 예를 나타내는 도면이다.

도 11은 종양 세포를 이식한 종양 모델 마우스의 등 부분 사진의 일 예를 나타내는 도면이다.

도 12a는 종양 모델 마우스의 종양 체적의 변화 결과의 일 예를 나타내는 그래프이다.

도 12b는 종양 모델 마우스의 종양 체적의 변화 결과의 일 예를 나타내는 그래프이다.

도 12c는 종양 모델 마우스의 종양 체적의 변화 결과의 일 예를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0056] 이하, 본 발명의 내용에 대해 상세하게 설명한다. 이하에 기재하는 구성 요건의 설명은 본 발명의 대표적인 실시 형태에 기초하여 이루어질 수 있으나, 본 발명은 그러한 실시형태에 한정되는 것은 아니다.

[0057] 한편, 본 명세서에서, 수치 범위를 나타내는 「~」는 그 전후에 기재되는 수치를 하한값 및 상한값으로 하여 포함하는 의미로 사용된다.

[0058] 본 발명 중에 단계적으로 기재되어 있는 수치 범위에서, 하나의 수치 범위에서 기재된 상한값 또는 하한값은, 다른 단계적인 기재의 수치 범위의 상한값 또는 하한값으로 치환될 수 있다. 또한, 본 발명 중에 기재되어 있는

수치 범위에서, 그 수치 범위의 상한값 또는 하한값은 실시예에 나타나 있는 값으로 치환될 수 있다.

[0059] 또한, 본 발명에서, 「질량%」와 「중량%」와 「Wt%」는 동일한 의미이며, 「질량부」와 「중량부」는 동일한 의미이다.

[0060] 또한, 본 발명에서 둘 이상의 바람직한 양태의 조합은 보다 바람직한 양태이다.

[0061] 본 발명에 의해 제공되는 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오티드, 벡터 및 세포는 단리된 상태일 수 있다. 즉, 본 명세서에서 기재하는 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오티드, 벡터 및 세포는, 단리된 폴리펩타이드, 단리된 폴리뉴클레오티드, 단리된 벡터 및 단리된 세포일 수 있다.

[0062] (항EGFRviii 항체)

[0063] 본 발명에 따른 항EGFRviii 항체는, 하기 (a-1)~(a-3)로 이루어지는 군에서 선택되는 항체 또는 항원 결합 단편이다.

[0064] 본 발명에 따른 항EGFRviii 항체는, 하기의 특정 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역(이하, 「VH 영역」이라고도 할 수 있다.)의 CDR1, CDR2 및 CDR3과, 하기의 특정 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역(이하, 「VL 영역」이라고도 할 수 있다.)의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하며, EGFRviii에 대한 결합능을 가지는 항체 또는 항원 결합 단편임에 따라, EGFRviii에 특이적으로 결합하며, 또한 키메라 항원 수용체(CAR)의 표적 항원 결합 영역으로서도 이용할 수 있다.

[0065] 항EGFRviii 항체로는 단일 클론 항체 또는 다클론 항체를 들 수 있지만, EGFRviii에 대한 특이성의 관점에서, 단일 클론 항체인 것이 바람직하다.

[0066] <항체 또는 항원 결합 단편>

[0067] 본 발명에 따른 항EGFRviii 항체는 하기 (a-1)~(a-3)로 이루어지는 군에서 선택되는 항체 또는 항원 결합 단편이다.

[0068] 상기 항체 또는 항원 결합 단편로는, EGFRviii에 대한 결합능을 가지고 있으면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, 후술하는 단쇄 항체(scFv), Fab, diabody, ScDb, $scFv_2$-Fc, IgG-scFv, scFv-HSA-scFv, Fab-scFv-Fc, Fab-scFv, scFv-Fc 등의 저분자 항체를 들 수 있다.

[0069] 〔(a-1)~(a-3)〕

[0070] (a-1) 서열번호 1 또는 4에 기재된 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역,

[0071] 서열번호 2, 3, 5 또는 6에 기재된 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역,

[0072] 을 포함하며,

[0073] EGFRviii에 대한 결합능을 가지는 항체 또는 그 항원 결합 단편이다.

[0074] (a-2) 서열번호 1 또는 4에 기재된 아미노산 서열로부터 1개 또는 복수개의 아미노산이 변이된 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역,

[0075] 서열번호 2, 3, 5 또는 6에 기재된 아미노산 서열로부터 1개 또는 복수개의 아미노산이 변이된 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역,

[0076] 을 포함하며,

[0077] EGFRviii에 대한 결합능을 가지는 항체 또는 그 항원 결합 단편이다.

[0078] (a-3) 서열번호 1 또는 4에 기재된 아미노산 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역,

[0079] 서열번호 2, 3, 5 또는 6에 기재된 아미노산 서열과 70% 이상의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역,

[0080] 을 포함하며,

[0081] EGFRviii에 대한 결합능을 가지는 항체 또는 그 항원 결합 단편이다.

[0082] (a-1)에서 규정되는 중쇄 가변 영역은 서열번호 1 또는 4에 기재된 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역 중의 CDR1의 아미노산 서열, CDR2의 아미노산 서열 및 CDR3의 아미노산 서열을 포함하고 있으면, 이들 이외의 부분에서 서열번호 1 또는 4에 기재된 아미노산 서열과 다를 수 있다. 즉, 중쇄 가변 영역 중의 CDR1 영역, CDR2 영역 및 CDR3 영역 이외의 부분에서는 서열번호 1 또는 4에 기재된 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역과 다를 수 있다. (a-1)에서 규정되는 경쇄 가변 영역은 서열번호 2, 3, 5 또는 6에 기재된 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역 중의 CDR1의 아미노산 서열, CDR2의 아미노산 서열 및 CDR3의 아미노산 서열을 포함하고 있으면, 이들 이외의 부분에서 서열번호 2, 3, 5 또는 6에 기재된 아미노산 서열과 다를 수 있다. 즉, 경쇄 가변 영역 중의 CDR1 영역, CDR2 영역 및 CDR3 영역 이외의 부분에서는 서열번호 2, 3, 5 또는 6에 기재된 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역과 다를 수 있다. (a-2) 및 (a-3)에서의 서열번호 1 또는 4에 기재된 아미노산 서열 및 서열번호 2, 3, 5 또는 6에 기재된 아미노산 서열에서의 변이의 위치는 CDR1, CDR2 및 CDR3 이외의 영역일 수 있다.

[0083] 상기 CDR1, CDR2 및 CDR3의 「CDR」란, 항체 분자의 가변 영역에서 항원과 직접 접촉하는 영역으로 추정되며, 상보성 결정 영역(Complementarity Determining Region: CDR)을 포함하는 영역을 가리킨다.

[0084] 한편, CDR은 CDR의 정의로서 알려진 임의의 정의에서 결정할 수 있으며, 예를 들면, Kabat, Chothia, AbM, contact, IMGT, Aho, Mrtin(Enhanced Chothia) 등에 의한 정의를 이용할 수 있다. 본 발명에 따른 항EGFRviii 항체의 CDR의 아미노산 서열은 어느 정의에 의한 것이어도 무방하다.

[0085] - VH 영역의 Kabat의 정의에 의한 CDR1~3의 아미노산 서열 -

[0086] 서열번호 1 또는 4에 기재된 아미노산 서열로 이루어지는 VH 영역의 CDR1~3의 일 예로서, Kabat의 정의에 의한 CDR1~3의 아미노산 서열을 각각 서열번호 31~33로 나타낸다.

[0087] - VL 영역의 Kabat의 정의에 의한 CDR1~3의 아미노산 서열 -

[0088] 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열로 이루어지는 VL 영역의 CDR1의 일 예로서, Kabat의 정의에 의한 CDR1의 아미노산 서열을 서열번호 37에 나타낸다.

[0089] 서열번호 3, 5 또는 6에 기재된 아미노산 서열로 이루어지는 VL 영역의 CDR1의 일 예로서, Kabat의 정의에 의한 CDR1의 아미노산 서열을 서열번호 34에 나타낸다.

[0090] 또한, 서열번호 2, 3, 5 또는 6에 기재된 아미노산 서열로 이루어지는 VL 영역의 CDR2 및 CDR3의 일 예로서, Kabat의 정의에 의한 CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열을 각각 서열번호 35 및 36에 나타낸다.

[0091] (a-1)~(a-3)에서, 중쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역으로는 서열번호 4인 것이 바람직하다.

[0092] (a-1)~(a-3)에서, 경쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역으로는 서열번호 5 또는 6인 것이 바람직하다.

[0093] 상기 (a-2)에서, 「복수개」는, 예를 들면 2개~30개일 수 있으며, 2~20개인 것이 바람직하고, 2개~10개인 것이 보다 바람직하며, 2개~5개인 것이 더 바람직하고, 예를 들면, 2개, 3개, 4개 또는 5개일 수 있다. 또한, 「변이」는 결실(deletion), 치환, 부가 및 삽입 중 어느 하나일 수 있으며, 이들의 조합일 수도 있다.

[0094] 또한, 변이의 위치는 CDR1~CDR3 이외의 영역(즉, 프레임워크 영역)인 것이 바람직하다.

[0095] 인간 항체의 프레임워크 서열로는, 예를 들면, GenBank 등의 공지의 서열 데이터베이스에 등록되어 있는 인간 항체의 아미노산 서열의 프레임워크 서열, 인간 항체의 각 서브 그룹에 유래하는 공통 서열(Human Most Homologous Consensus Sequence; Kabat, E.A.의 Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept.Health and HumanServices, 1991)로부터 선택된 아미노산 서열 등에서 선택할 수 있다.

[0096] 상기 (a-3)에서, 서열 동일성은 70% 이상인 한 특별히 한정되지 않지만, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 또는 99% 이상일 수 있다.

[0097] 한편, 아미노산 서열끼리의 서열 동일성(즉, 상동성)은 2개의 아미노산 서열을, 대응하는 아미노산이 가장 많이 일치하도록 삽입 및 결실에 해당되는 부분에 갭을 넣으면서 병치하고, 얻어진 얼라인먼트 중의 갭을 제외한 아미노산 서열 전체에 대한 일치된 아미노산의 비율로서 구해진다.

[0098] 아미노산 서열끼리의 서열 동일성은, 해당 기술 분야에서 공지된 각종 상동성 검색 소프트웨어를 이용하여 구할 수 있다. 예를 들면, 아미노산 서열의 서열 동일성의 값은 공지의 상동성 검색 소프트웨어 BLASTP에 의해 얻어진 얼라인먼트를 바탕으로 한 계산에 의해 얻을 수 있다.

[0099] EGFRviii에 대해서 특이적으로 결합하며, 키메라 항원 수용체 CAR의 표적 항원 결합 영역으로서도 이용할 수 있는 관점에서, 본 발명에 따른 항EGFRviii 항체는, 상기 중쇄 가변 영역이 서열번호 1 또는 4에 기재된 아미노산 서열에서, 21 위치에 T, 24 위치에 F, 54 위치에 F, 59 위치에 K, 67 위치에 S, 73 위치에 K, 77 위치에 T 또는 K 및 83 위치에 K 또는 T를 가지는 것이 바람직하다.

[0100] 한편, 서열번호 1 또는 4에 기재된 아미노산 서열에서, 21 위치에 T란, 서열번호 1 또는 4에 기재된 아미노산 서열과 정렬했을 때, 서열번호 1 또는 4에 기재된 아미노산 서열의 N말단측에서부터 세어 21번째에 대응하는 위치의 아미노산이 T인 것을 의미한다.

[0101] EGFRviii에 대하여 특이적으로 결합하며, 키메라 항원 수용체의 표적 항원 결합 영역으로서도 이용할 수 있는 관점에서, 본 발명에 따른 항 EGFRviii 항체는 상기 경쇄 가변 영역이 서열번호 2, 3, 5 또는 6에 기재된 아미노산 서열에서, 4 위치에 M, 16 위치에 E 또는 G, 27 위치에 Q, 35 위치에 K, 55 위치에 S, 58 위치에 N, 74 위치에 R, 79 위치에 K, 81 위치에 S, 87 위치에 D, 99 위치에 V를 가지는 것이 바람직하다.

[0102] 한편, 본 명세서에서, 아미노산 또는 아미노산 잔기를 알파벳 한 개 문자 또는 3개 문자로 나타낼 수 있다.

[0103] 〔SG서열〕

[0104] 상기 항EGFRviii 항체는 EGFRviii에 대한 결합 성능을 유지하는 점에서, 아미노산 서열 중의 Asn-Gly(NG) 서열이 Ser-Gly(SG) 서열로 변환되어 있는 것이 바람직하고, 경쇄 가변 영역에서의 NG 서열이 SG 서열로 변환되어 있는 것이 보다 바람직하며, 경쇄 가변 영역에서의 CDR1의 NG 서열이 SG 서열로 변환되어 있는 것이 더욱 바람직하다.

[0105] NG 서열을 SG 서열로 변환된 아미노산 서열로는, 예를 들면, 서열번호 3, 5 또는 6에 기재된 아미노산 서열을 들 수 있다.

[0106] 〔인간 항체〕

[0107] 항EGFRviii 항체가 유래되는 생물은 특별히 한정되지 않으며, 인간, 마우스, 래트, 햄스터, 토끼 및 원숭이 등의 동물에 유래하는 항체일 수 있지만, 인간 항체인 것이 바람직하다.

[0108] 또한, 본 발명에 따른 항EGFRviii 항체는, 단일 클론 항체 뿐만 아니라 키메라 항체, 인간화 항체 및 이중 특이성 항체(bispecific antibody) 등의 인위적으로 개변된 항체도 포함한다.

[0109] 임상에서의 유용성의 관점에서, 항EGFRviii 항체는 인간화 항체인 것이 바람직하다. 인간화 항체의 제작 방법으로는 특별히 제한되지 않으며, 공지의 방법을 이용하여 제작할 수 있다. 예를 들면, 유전자 공학을 이용하여 마우스에서 제작한 항체의 항원 결합 부위를 인간 유래의 항체 분자에 이식하여 제작하는 방법 등을 들 수 있다.

[0110] 인간화 항체(인간 항EGFRviii 항체)로는, 예를 들면, 서열번호 4에 기재된 아미노산 서열을 중쇄 가변(VH) 영역으로서 가지며, 서열번호 5 또는 6에 기재된 아미노산 서열을 경쇄 가변(VL) 영역으로서 가지는 항체 등을 들 수 있다.

[0111] 본 발명에 따른 항EGFRviii 항체의 제작 방법은 특별히 제한되지 않으며, 공지의 항체 제작 방법을 이용할 수 있다. 예를 들면, 항EGFRviii 항체를 코딩하는 서열을 가지는 핵산을 발현 벡터에 삽입하고, 그 발현 벡터를 숙주 세포에 도입하여 발현시키는 방법을 이용할 수 있다.

[0112] <단쇄 항체(scFv)>

[0113] 본 발명에 따른 항EGFRviii 항체는 단쇄 항체(scFv: single chain variable fragment)일 수 있다.

[0114] scFv는 항체의 중쇄 가변 영역(VH 영역)과 경쇄 가변 영역(VL 영역)을 펩타이드 링커로 연결한 폴리펩타이드이다. scFv는 후술하는 키메라 항원 수용체(CAR)의 표적 항원 결합 영역으로서 일반적으로 이용되고 있다.

[0115] scFv에서, VH 영역과 VL 영역을 펩타이드 링커로 결합하는 순서는 특별히 제한되지 않으며, N말단측으로부터, VH 영역, 펩타이드 링커 및 VL 영역의 순서일 수 있고, VL 영역, 펩타이드 링커 및 VH 영역의 순서일 수도 있다.

[0116] 본 발명의 일 실시 형태에서, scFv는 상기 항체의 경쇄 가변 영역, 중쇄 가변 영역과 상기 경쇄 가변 영역을 연결하는 펩타이드 링커 및 중쇄 가변 영역을, N말단으로부터 순서대로 포함하는 것이 바람직하다.

[0117] scFv에서, VH 영역과 VL 영역을 연결하는 펩타이드 링커는 특별히 한정되지 않으며, scFv에 일반적으로 이용되고 있는 것을 사용할 수 있다.

[0118] 펩타이드 링커의 예로는, 예를 들면, 링커 15(서열번호 41), 링커 25(서열번호 42) 등을 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다.

[0119] 항EGFRviii 항체가 scFv인 경우, 상기 scFv는 하기 (I)~(III)으로 이루지는 군에서 선택되는 폴리펩타이드일 수 있다.

[0120] (I) 서열번호 12~18 및 38로 이루어지는 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드;

[0121] (II) 서열번호 12~18 및 38로 이루어지는 군에서 선택되는 아미노산 서열과 70% 이상의 서열 동일성(바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 더 바람직하게는 95% 이상, 더욱 바람직하게는 97% 이상의 동일성)을 가지는 아미노산 서열로 이루어지며, EGFRviii에 대한 결합능을 가지는 폴리펩타이드; 및

[0122] (III) 서열번호 12~18 및 38로 이루어지는 군에서 선택되는 아미노산 서열로부터 1개 또는 복수개의 아미노산이 변이된 아미노산 서열로 이루어지며, EGFRviii에 대한 결합능을 가지는 폴리펩타이드.

[0123] 상기 (II)에서의 서열 동일성은 상기 (a-3)에서의 서열 동일성과 동일한 의미이며 바람직한 양태도 마찬가지이다.

[0124] 상기 (III)에서의 「복수개」란, 상기 (a-2)에서의 「복수개」와 동일한 의미이며, 바람직한 양태도 마찬가지이다.

[0125] scFv로는,

[0126] (I) 서열번호 13, 15 또는 17의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드;

[0127] (II) 서열번호 13, 15 또는 17의 아미노산 서열과 70% 이상의 서열 동일성(바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 더 바람직하게는 95% 이상, 더욱 바람직하게는 97% 이상의 동일성)을 가지는 아미노산 서열로 이루어지며, EGFRviii에 대한 결합능을 가지는 폴리펩타이드; 및

[0128] (III) 서열번호 13, 15 또는 17의 아미노산 서열로부터 1개 또는 복수개의 아미노산이 변이된 아미노산 서열로 이루어지며, EGFRviii에 대한 결합능을 가지는 폴리펩타이드인 것이 바람직하고,

[0129] (I) 서열번호 15 또는 17의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드;

[0130] (II) 서열번호 15 또는 17의 아미노산 서열과 70% 이상의 서열 동일성(바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 더 바람직하게는 95% 이상, 더욱 바람직하게는 97% 이상의 동일성)을 가지는 아미노산 서열로 이루어지며, EGFRviii에 대한 결합능을 가지는 폴리펩타이드; 및

[0131] (III) 서열번호 15 또는 17의 아미노산 서열로부터 1개 또는 복수개의 아미노산이 변이된 아미노산 서열로 이루어지며, EGFRviii에 대한 결합능을 가지는 폴리펩타이드인 것이 보다 바람직하다.

[0132] (폴리펩타이드)

[0133] 본 발명에 따른 폴리펩타이드는, 표적 항원 결합 영역, 막 관통 영역 및 시그널 전달 영역을 포함하는 것이 바람직하고, 표적 항원 결합 영역이 상기 항EGFRviii 항체이다.

[0134] 본 발명의 일 양태에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는, 키메라 항원 수용체(CAR)인 것이 바람직하다.

[0135] 본 명세서에서, 「키메라 항원 수용체(CAR)」란, 항원을 특이적으로 인식하는 항체 유래의 부분과 면역 세포의 활성화를 유도하는 시그널 전달 영역을 융합시킨 인공적인 키메라 단백질을 의미한다.

[0136] 키메라 항원 수용체로는, 표적 항원 결합 영역, 막 관통 영역 및 시그널 전달 영역을 포함하는 키메라 단백질인 것이 바람직하다. 표적 항원 결합 영역으로는 본 발명에 따른 항EGFRviii 항체를 포함하는 것이 바람직하다.

[0137] 본 발명에 따른 폴리펩타이드가 CAR이면서, 폴리펩타이드에 포함되는 표적 항원 결합 영역이 항EGFRviii 항체인 경우, 항EGFRviiiCAR라고 칭할 수 있다.

[0138] 한편, 키메라 단백질이란, 2종 이상의 이종 단백질에 유래하는 서열을 포함하는 단백질을 의미한다.

[0139] CAR은 상기 3개의 영역만을 포함하는 것에 한정되지 않으며, 다른 영역을 더 포함하는 것도 포함한다.

[0140] 이하, 본 발명에 따른 폴리펩타이드가 포함하는 각 영역의 상세에 대하여 설명한다.

[0141] <표적 항원 결합 영역>

[0142] 「표적 항원 결합 영역」이란, 본 발명에 따른 폴리펩타이드 중 표적 항원에 결합하는 영역이며, 세포 외에 위치하는 영역을 의미한다. 한편, 세포의 상세에 대해서는 후술한다.

[0143] 예를 들면, 키메라 항원 수용체(CAR) 유전자가 도입된 T세포(이하, 「CAR-T 세포」라고도 한다.)에서 발현된 CAR은, 세포막으로 이행하고, 세포 외에 위치하는 표적 항원 결합 영역과 세포 내에 위치하는 T세포 활성화 시그널 전달 영역이, 세포막을 관통하는 막 관통 영역을 통하여 연결되어 있는 상태가 된다. CAR-T 세포가 표적 항원을 막 항원으로서 가지는 세포에 접하면, 표적 항원 결합 영역이 그 표적 항원에 결합하고, 이에 따라 T세포 활성화 시그널 전달 영역으로부터 T세포 내에 T세포 활성화 시그널이 전달되어 T세포가 활성화된다. 본 발명에 따른 폴리펩타이드를 T세포 이외의 세포에서 발현시키는 경우에도 동일한 방법 또는 그에 준하는 방법에 따라 해당 세포를 활성화하는 것이 가능하다.

[0144] 〔EGFRviii〕

[0145] 본 발명에 따른 폴리펩타이드에서, 표적 항원 결합 영역이 결합하는 표적 항원은 EGFRviii이다.

[0146] EGFRviii는 표피 성장 인자 수용체(EGFR)의 변이체의 하나이며, 정상 세포에는 발현되고 있지 않은 것으로 생각되고 있다.

[0147] EGFRviii는, 다형성 교아종, 신경교종, 퇴형성 성상세포종, 수아세포종, 유방암, 비소세포 폐암, 난소암, 췌장암, 신장세포암, 방광암, 전립선암, 대장암, 두경부암, 중추 신경계의 암, 피부암 및 이들이 전이암 등에서 발현하고 있는 것으로 알려져 있어 암치료의 표적 마커 중 하나이다.

[0148] 본 발명에 따른 폴리펩타이드의 표적 항원 결합 영역은, 본 발명에 따른 항EGFRviii 항체를 포함한다. 이 때문에, 상기 표적 항원 결합 영역은 항EGFRviii 항체의 설명시에 서술한 CDR를 포함하고 있다.

[0149] 한편, CDR는, CDR의 정의로서 알려진 임의의 정의에서 결정할 수 있으며, 예를 들면, Kabat, Chothia, AbM, contact, IMGT, Aho, Mrtin(Enhanced Chothia) 등에 의한 정의를 이용할 수 있다.

[0150] 표적 항원 결합 영역으로는, 상기의 항EGFRviii 항체의 단쇄 항체(scFv)를 포함하는 폴리펩타이드는, 표적 항원 결합 영역의 바람직한 예이다. 2개의 다른 항원에 결합하는 표적 항원 결합 영역을 가지는 이중 특이성 항체로 한 경우, 그 중 하나의 표적 항원 결합 영역을 상기의 항EGFRviii 항체로 할 수 있다.

[0151] 단쇄 항체(scFv)는 상기 항EGFRviii 항체에서의 scFv와 동일한 의미이며, 바람직한 양태도 마찬가지이다.

[0152] <막 관통 영역>

[0153] 본 발명에 따른 폴리펩타이드는, 막 관통 영역을 포함하는 것이 바람직하다.

[0154] 본 명세서에서, 「막 관통 영역」이란, 본 발명에 따른 폴리펩타이드가 세포에서 발현하였을 때 세포막을 관통하여 존재하며, 세포외 영역과 세포내 영역을 연결하는 영역을 의미한다.

[0155] 막 관통 영역은, 세포막을 관통하는 기능을 가지는 폴리펩타이드이면 특별히 한정되지 않는다. 막 관통 영역은 천연 단백질에 유래하는 것일 수 있으며, 인위적으로 설계한 것일 수도 있다.

[0156] 천연 단백질에 유래하는 막 관통 영역은 임의의 막결합 단백질 또는 막 관통 단백질로부터 취득할 수 있다. 막 관통 영역은, 표적 항원 결합 영역에 대한 표적 항원의 결합에 대응하여, T세포 활성화 시그널 전달 영역에 활성화 시그널을 전달하는 것이 바람직하다.

[0157] 막 관통 영역으로는 특별히 제한은 없지만, 예를 들면, T세포 수용체의 α사슬 및 β사슬, CD3ζ, CD28, CD3ε, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, ICOS, CD154, GITR 등의 막 관통 영역을 들 수 있다.

[0158] 이들 중에서도 CD8의 막 관통 영역인 것이 바람직하다.

[0159] 막 관통 영역의 단백질이 유래되는 생물은 특별히 한정되지 않으며, 인간, 마우스, 래트, 햄스터, 토끼 및 원숭

이 등일 수 있으나, 인간인 것이 바람직하다. 이러한 단백질의 아미노산 서열은, GenBank 등의 공지의 서열 데이터 베이스로부터 입수 가능하다. 예를 들면, 인간 CD8의 아미노산 서열의 예로는, GenBank 번호: NM_001768.6으로 등록된 것 등을 들 수 있다. 막 관통 영역의 아미노산 서열로는, 예를 들면 서열번호 19 및 20에 기재된 아미노산 서열을 들 수 있다.

[0160] 또한, 막 관통 영역은, 상기와 같은 천연 단백질 유래의 막 관통 영역의 변이체일 수 있다.

[0161] 천연 단백질 유래의 막 관통 영역의 변이체의 예로는, 예를 들면, 이하와 같은 것을 들 수 있다.

[0162] (2a) 천연 단백질 유래의 막 관통 영역의 아미노산 서열(예, 서열번호 19 및 20)과 70% 이상의 서열 동일성(상동성)을 가지는 아미노산 서열로 이루어지며, 막 관통능을 가지는 폴리펩타이드.

[0163] (2b) 천연 단백질 유래의 막 관통 영역의 아미노산 서열(예, 서열번호 19 및 20)로부터 1개 또는 복수개의 아미노산이 변이된 아미노산 서열로 이루어지며, 막 관통능을 가지는 폴리펩타이드.

[0164] 상기 막 관통 영역의 아미노산 서열 (2a)에서, 서열 동일성은 70% 이상인 한 특별히 한정되지 않지만, 80% 이상인 것이 바람직하고, 85% 이상인 것이 보다 바람직하고, 90% 이상인 것이 더욱 바람직하고, 95% 이상인 것이 특히 바람직하다.

[0165] 상기 막 관통 영역의 아미노산 서열 (2b)에서, 「복수개」는, 예를 들면, 2~10개일 수 있으며, 2~5개인 것이 바람직하고, 2~4개인 것이 보다 바람직하고, 2개 또는 3개인 것이 더욱 바람직하다. 또한, 「변이」는, 결실, 치환, 부가 및 삽입 중 어느 하나일 수 있으며, 이들의 조합일 수도 있다.

[0166] <시그널 전달 영역>

[0167] 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 시그널 전달 영역을 포함하는 것이 바람직하다. 시그널 전달 영역으로는 표적 항원 결합 부위(즉, 항EGFRviii 항체)가 표적 항원인 EGFRviii에 결합했을 때, 본 발명에 따른 폴리펩타이드를 발현하고 있는 세포 내에 시그널 전달하는 것이 가능한 영역이면 된다. 한편, 세포의 상세에 대해서는 후술한다.

[0168] 일 예로서, 세포로서 T세포를 이용하는 경우, 시그널 전달 영역으로는 T세포 활성화 시그널 전달 영역인 것이 바람직하다.

[0169] 본 명세서에서, 「시그널 전달 영역」이란, 본 발명에 따른 폴리펩타이드가 세포에서 발현되었을 때, 세포 내에 위치하며, 세포 내에 시그널을 전달하는 영역을 의미한다.

[0170] 본 명세서에서, 「시그널 전달 영역」이란, 본 발명에 따른 폴리펩타이드가 세포에서 발현되었을 때, 세포 내에 위치하며, 세포 내에 해당 세포의 활성화 시그널을 전달하는 영역을 의미한다.

[0171] T세포에서는, T세포 수용체(TcellReceptor: TCR)에 MHC((Major Histocompatibility Complex; 주요 조직 적합성 복합체)·펩타이드 복합체가 결합하면, TCR·CD3 복합체를 통하여 세포 내에 T세포 활성화 시그널이 전달되어, 여러가지 인산화 시그널이 야기된다(1차 시그널 전달). CAR-T 세포에서는, 표적 항원 결합 부위에 항원이 결합함으로써, MHC와의 상호작용에 의존하지 않고 T세포에 1차 시그널을 전달하는 것이 가능하다.

[0172] 또한, T세포의 세포 표면상에 발현하는 공자극 분자(예를 들면, 후술하는 CD28, 4-1BB 등)는, 항원 제시 세포의 세포 표면상에 발현하는 각 공자극 분자에 특이적인 리간드와의 결합에 의해, 세포 내에 공자극 시그널을 전달하여, T세포의 활성화를 보조하는 것으로 알려져 있다(2차 시그널 전달). CAR-T 세포에서는, 이러한 공자극 분자를 CAR에 포함시킴으로써, 표적 항원 결합 부위가 항원에 결합하면, T세포에 2차 시그널을 전달할 수 있다.

[0173] 본 명세서에서, 「T세포 활성화 시그널 전달」이란, 상기 1차 시그널 전달 및 2차 시그널 전달을 모두 포함한다. 또한, 「T세포 활성화 시그널 전달 영역」이란, 상기 1차 시그널 전달 및 2차 시그널 전달 중 적어도 하나에 관여하는 단백질의, 해당 시그널 전달에 관여하는 세포내 영역을 의미한다.

[0174] 시그널 전달 영역은 세포의 활성화 시그널 전달에 관여하는 단백질의 세포 활성화 시그널 전달 영역이면 특별히 한정되지 않는다.

[0175] 예를 들면, 1차 시그널 전달에는, 면역 수용체 활성화 타이로신 모티프(immunoreceptor tyrosine-based activation motif: ITAM)가 관여하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 시그널 전달 영역의 예로는 ITAM를 가지는 단백질의 세포 활성화 시그널 전달 영역을 들 수 있다.

[0176] ITAM을 가지는 단백질의 예로는, 예를 들면, CD3ζ, FcRγ, FcRβ, CD3γ, CD3δ, CD3ε, CD5, CD22, CD79a,

CD79b, CD66d 등을 들 수 있다. ITAM를 포함하는 시그널 전달 영역은, 본 발명에 따른 폴리펩타이드에 이용하는 세포 활성화 시그널 전달 영역의 바람직한 예이다. 보다 바람직한 예로는, CD3ζ 등의 세포 활성화 시그널 전달 영역을 들 수 있다.

[0177] 또한, 2차 시그널 전달에는, 상기와 같이 공자극 분자가 관여한다. 따라서, 시그널 전달 영역의 예로는 공자극 분자의 시그널 전달 영역도 들 수 있다.

[0178] 공자극 분자로는, 예를 들면, CD2, CD4, CD5, CD8, CD27, CD28, OX040(CD134), 4-1BB(CD137), ICOS, CD154, HVEM(Herpesvirus entry mediator), GITR, FcReceptor-associated γchain 등을 들 수 있다. 이러한 단백질의 세포 활성화 시그널 전달 영역 또한, 본 발명에 따른 폴리펩타이드에 이용하는 세포 활성화 시그널 전달 영역의 바람직한 예이다.

[0179] 보다 바람직한 예로는, CD28, 4-1BB 등의 세포 활성화 시그널 전달 영역을 들 수 있다.

[0180] 상기 시그널 전달 영역의 단백질이 유래되는 생물은 특별히 한정되지 않으며, 인간, 마우스, 래트, 햄스터, 토끼 및 원숭이 등일 수 있으나, 인간인 것이 바람직하다. 한편, 이들의 단백질의 아미노산 서열은 GenBank 등의 공지의 서열 데이터 베이스로부터 입수 가능하다.

[0181] 예를 들면, 인간 CD3ζ의 아미노산 서열의 예로는, GenBank 번호: NM_000734.3으로 등록된 것 등을 들 수 있으며, 시그널 전달 영역의 아미노산 서열로는 서열번호 25에 기재된 아미노산 서열을 들 수 있다.

[0182] 또한, 인간 CD28의 아미노산 서열의 예로는 GenBank 번호: NM_006139.2로 등록된 것 등을 들 수 있으며, 시그널 전달 영역의 아미노산 서열로는 서열번호 26에 기재된 아미노산 서열을 들 수 있다. 또한, 인간 4-1BB의 아미노산 서열의 예로는, GenBank 번호: NM_001561.5로 등록된 것 등을 들 수 있으며, 시그널 전달 영역의 아미노산 서열로는 서열번호 27에 기재된 아미노산 서열을 들 수 있다.

[0183] 또한, 시그널 전달 영역은, 상기와 같은 천연 단백질 유래의 시그널 전달 영역의 변이체일 수 있다. 천연 단백질 유래의 활성화 시그널 전달 영역의 변이체의 예로는, 예를 들면, 이하와 같은 것을 들 수 있다.

[0184] (3a) 천연 단백질 유래의 시그널 전달 영역의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 25~27)과 70% 이상의 서열 동일성(상동성)을 가지는 아미노산 서열로 이루지며, 세포 활성화 시그널 전달능을 가지는 폴리펩타이드.

[0185] (3b) 천연 단백질 유래의 시그널 전달 영역의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 25~27)로부터 1개 또는 복수개의 아미노산이 변이된 아미노산 서열로 이루지며, 세포 활성화 시그널 전달능을 가지는 폴리펩타이드.

[0186] 상기 시그널 전달 영역의 아미노산 서열 (3a)에서, 서열 동일성은 70% 이상인 한 특별히 한정되지 않으나, 80% 이상인 것이 바람직하고, 85% 이상인 것이 보다 바람직하고, 90% 이상인 것이 더욱 바람직하고, 95% 이상인 것이 특히 바람직하다.

[0187] 상기 아미노산 서열 (3b)에서, 「복수개」는, 예를 들면 1차 시그널 전달에 관여하는 단백질의 것을 이용하는 경우에는 2~30개일 수 있으며, 2~20개인 것이 바람직하고, 2~10개인 것이 보다 바람직하고, 2~5개인 것이 더욱 바람직하다. 또한, 예를 들면, 공자극 분자의 것을 이용하는 경우에는, 「복수개」는 2~15개일 수 있고, 2~10개인 것이 바람직하고, 2~5개인 것이 더 바람직하고, 2개 또는 3개인 것이 더욱 바람직하다.

[0188] 또한, 「변이」는 결실, 치환, 부가 및 삽입 중 어느 하나일 수 있으며, 이들의 조합일 수도 있다.

[0189] 본 발명에 따른 폴리펩타이드가 포함하는 시그널 전달 영역의 수는 1개에 한정되지 않으며, 복수종의 시그널 전달 영역을 포함할 수 있다. 이 경우, 복수종의 시그널 전달 영역은 동일한 시그널 전달 영역일 수 있으며, 다른 시그널 전달 영역일 수도 있다.

[0190] 본 발명에 따른 폴리펩타이드로는, 시그널 전달 영역을 2개 이상 포함하는 것이 바람직하다. 이 경우, 본 발명에 따른 폴리펩타이드가 포함하는 시그널 전달 영역은 1차 시그널 전달에 관여하는 시그널 전달 영역과 2차 시그널 전달에 관여하는 시그널 전달 영역의 조합인 것이 바람직하다.

[0191] 구체적인 예로는, CD3ζ와 CD28의 세포 활성화 시그널 전달 영역의 조합, CD3ζ와 4-1BB의 세포 활성화 시그널 전달 영역의 조합, CD3ζ와 CD28와 4-1BB의 세포 활성화 시그널 전달 영역의 조합 등을 들 수 있다.

[0192] 한편, 1차 시그널 전달에 관여하는 시그널 전달 영역과 2차 시그널 전달에 관여하는 시그널 전달 영역을 조합하는 경우, 1차 시그널 전달에 관여하는 시그널 전달 영역을 C말단측에 배치하는 것이 바람직하다.

[0193] 상기의 구체적인 예로는, CD3ζ의 T세포 활성화 시그널 전달 영역을, CD28 또는 4-1BB의 T세포 활성화 시그널

전달 영역보다 C말단측에 배치하는 것이 바람직하다. CD28와 4-1BB를 함께 이용하는 경우 어떠한 배치 순서여도 무방하나, N말단측에서부터 CD28, 4-1BB 순으로 배치하는 예를 들 수 있다.

[0194] T세포 활성화 시그널 전달 영역을 1개만 이용하는 경우에는, 1차 시그널 전달에 관여하는 T세포 활성화 시그널 전달 영역을 이용하는 것이 바람직하고, CD3ζ의 T세포 활성화 시그널 전달 영역을 이용하는 것이 보다 바람직하다.

[0195] 〔그 외의 영역〕

[0196] 본 발명에 따른 폴리펩타이드는, 상기막 관통 영역, 및 시그널 전달 영역 이외의 영역(이하, 「다른 영역」이라고도 한다.)을 포함하고 있을 수 있다. 다른 영역의 예로는, 세포외 힌지 영역, 세포질 영역, 스페이서 영역, 시그널 펩타이드 등을 들 수 있다.

[0197] -세포외 힌지 영역-

[0198] 본 발명에 따른 폴리펩타이드는, 세포외 힌지 영역을 포함하고 있을 수 있다.

[0199] 본 명세서에서, 「세포외 힌지 영역」이란, 세포외의 표적 항원 결합 영역과 막 관통 영역을 연결하는 영역을 의미한다. 세포외 힌지 영역은 막 관통 영역의 일부가 될 수도 있다.

[0200] 세포외 힌지 영역은, 표적 항원 결합 영역과 막 관통 영역을 연결할 수 있는 것이면 특별히 한정되지 않는다. 세포외 힌지 영역을 구성하는 단백질로는, 천연 단백질에 유래하는 것일 수 있으며, 인위적으로 설계된 것일 수도 있다.

[0201] 세포외 힌지 영역은, 예를 들면, 1개~100개 정도의 아미노산, 바람직하게는 10개~70개 정도의 아미노산으로 구성할 수 있다. 세포외 힌지 영역은, 표적 항원 결합 영역의 EGFRviii 결합능을 방해하지 않으면서, 시그널 전달 영역에 의한 시그널 전달을 방해하지 않는 것인 것이 바람직하다.

[0202] 세포외 힌지 영역으로는, 예를 들면, CD8, CD28, CD4 등의 세포외 힌지 영역을 들 수 있다. 또한, 세포외 힌지 영역으로서 면역 글로불린(예를 들면, IgG4 등)의 힌지 영역을 사용할 수 있다. 세포외 힌지 영역으로는 CD8의 세포외 힌지 영역이 바람직하다.

[0203] 상기 세포외 힌지 영역의 단백질이 유래되는 생물은 특별히 한정되지 않으며, 인간, 마우스, 래트, 햄스터, 토끼 및 원숭이 등일 수 있지만, 인간인 것이 바람직하다. 한편, 이들 세포외 힌지 영역을 구성하는 단백질의 아미노산 서열은 GenBank 등의 공지의 서열 데이터 베이스로부터 입수 가능하다. 인간 CD8의 아미노산 서열의 예로는 상기의 것을 들 수 있다.

[0204] 세포외 힌지 영역의 아미노산 서열로는, 예를 들면, 서열번호 21 및 22에 기재된 아미노산 서열을 들 수 있다.

[0205] 또한, 세포외 힌지 영역은, 상기와 같은 천연 단백질 유래의 세포외 힌지 영역의 변이체일 수 있다. 천연 단백질 유래의 세포외 힌지 영역의 변이체의 예로는, 예를 들면 이하와 같은 것을 들 수 있다.

[0206] (4a) 천연 단백질 유래의 세포외 힌지 영역의 아미노산 서열(예, 서열번호 21 및 22)과 70% 이상의 서열 동일성(상동성)을 가지는 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩타이드.

[0207] (4b) 천연 단백질 유래의 세포외 힌지 영역의 아미노산 서열(예, 서열번호 21 및 22)로부터 1개 또는 복수개의 아미노산이 변이된 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩타이드.

[0208] 상기 세포외 힌지 영역의 아미노산 서열 (4a)에서, 서열 동일성은 70% 이상인 한 특별히 한정되지 않지만, 80% 이상인 것이 바람직하고, 85% 이상인 것이 보다 바람직하고, 90% 이상인 것이 더욱 바람직하고, 95% 이상인 것이 특히 바람직하다.

[0209] 상기 세포외 힌지 영역의 아미노산 서열 (4b)에서, 「복수개」는, 예를 들면 2~20개일 수 있으며, 2~15개인 것이 바람직하고, 2~10개인 것이 보다 바람직하고, 2~5개인 것이 더욱 바람직하다. 또한, 「변이」는 결실, 치환, 부가 및 삽입 중 어느 하나일 수 있으며, 이들 조합일 수도 있다.

[0210] - 스페이서 영역 -

[0211] 본 발명에 따른 폴리펩타이드는, 상기의 표적 항원 결합 영역, 막 관통 영역, 시그널 전달 영역 등의 각 영역이 스페이서 영역을 통하여 연결되어 있을 수 있다.

[0212] 본 명세서에서, 「스페이서 영역」이란, 단백질의 2개의 기능 영역(도메인)을 연결하는 짧은 펩타이드를 나타낸

다. 스페이서 영역은 특별히 한정되지 않으며, 키메라 단백질의 제작에 일반적으로 이용되는 것을 사용할 수 있다.

[0213] 스페이서 영역의 길이로는 1~100 아미노산, 바람직하게는 10~50 아미노산을 들 수 있다. 스페이서 영역의 예로는, 글리신-세린 연속 서열 등을 들 수 있다.

[0214] -시그널 펩타이드-

[0215] 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 시그널 펩타이드를 포함하고 있을 수 있다.

[0216] 본 명세서에서, 「시그널 펩타이드」는 막 단백질이나 분비 단백질의 국재화를 지시하는 펩타이드를 나타낸다. 시그널 펩타이드는, 일반적으로 막 단백질의 N말단에 존재하는 5개~60개 정도의 아미노산으로 이루어지는 펩타이드이며, 국재화가 완료된 성숙 단백질에서는 시그널 펩타이드가 제거되어 있다.

[0217] 본 발명에 따른 폴리펩타이드가 포함하는 시그널 펩타이드는, 세포막에 대한 국재화를 지시하는 시그널 펩타이드인 것이 바람직하고, 막 단백질의 시그널 펩타이드인 것이 바람직하다.

[0218] 시그널 펩타이드의 예로는, T세포 수용체의 α사슬 및 β사슬, CD3ζ, CD28, CD3ε, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, ICOS, CD154, GITR, 면역 글로불린 중쇄, 면역 글로불린 경쇄 등의 시그널 펩타이드를 들 수 있다.

[0219] 시그널 펩타이드의 아미노산 서열의 구체적인 예로는, 서열번호 23 및 24에 기재된 아미노산 서열을 들 수 있다.

[0220] 본 발명에 따른 폴리펩타이드에서, 상기의 각 영역은, N말단으로부터 표적 항원 결합 영역, 막 관통 영역 및 시그널 전달 영역의 순서로 배치하는 것이 바람직하다. 이러한 각 영역은, 서로 직접 연결되어 있을 수 있으며, 다른 영역이나 스페이서 서열 등을 통하여 연결되어 있을 수도 있다.

[0221] 본 발명에 따른 폴리펩타이드가 세포외 힌지 영역을 포함하는 경우, 세포외 힌지 영역은 표적 항원 결합 영역과 막 관통 영역 사이에 배치되는 것이 바람직하다.

[0222] 또한, 본 발명에 따른 폴리펩타이드가 시그널 펩타이드를 포함하는 경우, 시그널 펩타이드는 폴리펩타이드의 N말단에 배치되는 것이 바람직하다.

[0223] 본 발명에 따른 폴리펩타이드의 구체적인 예로는, 항EGFRviii 항체의 scFv를 포함하는 표적 항원 결합 영역, CD8의 막 관통 영역(또는 그 변이체), CD28의 세포 활성화 시그널 전달 영역(또는 그 변이체), 4-1BB의 T세포 활성화 시그널 전달 영역(또는 그 변이체) 및 CD3ζ의 세포 활성화 시그널 전달 영역(또는 그 변이체)을 포함하는 폴리펩타이드를 들 수 있다.

[0224] 다른 바람직한 예로는, 항EGFRviii의 scFv를 포함하는 표적 항원 결합 영역, CD8의 세포외 힌지 영역(또는 그 변이체), CD8의 막 관통 영역(또는 그 변이체), CD28의 세포 활성화 시그널 전달 영역(또는 그 변이체), 4-1BB의 세포 활성화 시그널 전달 영역(또는 그 변이체) 및 CD3ζ의 T세포 활성화 시그널 전달 영역(또는 그 변이체)을 포함하는 CAR을 들 수 있다.

[0225] 다른 바람직한 예로는, 항EGFRviii의 scFv를 포함하는 표적 항원 결합 영역, CD8의 세포외 힌지 영역(또는 그 변이체), CD8의 막 관통 영역(또는 그 변이체), 4-1BB의 세포 활성화 시그널 전달 영역(또는 그 변이체) 및 CD3ζ의 세포 활성화 시그널 전달 영역(또는 그 변이체)을 포함하는 CAR을 들 수 있다.

[0226] 그와 같은 본 발명에 따른 폴리펩타이드(바람직하게는 CAR)로는, 예를 들면, 서열번호 12~18 및 38로 이루어지는 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 scFv를 포함하는 CAR을 들 수 있다.

[0227] (세포)

[0228] 본 발명에 따른 세포는, 본 발명에 따른 폴리펩타이드를 발현하는 세포인 것이 바람직하다.

[0229] 본 발명에 따른 세포는, 상기 폴리펩타이드(이하, 편의상 「항EGFRviiiCAR」라고도 하지만, 상기 폴리펩타이드는 CAR에 한정되는 것은 아니다.)를 발현하고 있는 것이 바람직하다.

[0230] EGFRviii를 발현하는 세포(EGFRviii 발현 세포)에서, EGFRviii는 세포 표층에 많이 존재하고 있다. 본 발명에 따른 세포가 EGFRviii를 발현하는 세포에 접하면, 항EGFRviiiCAR의 표적 항원 결합 영역에 의해 EGFRviii 발현 세포 표층의 EGFRviii에 결합하고, 이에 따라 본 발명에 따른 세포가 활성화되어, 세포 상해성 과립의 방출이나

사이토카인 산생이 일어나, 이들 세포 상해성 과립이나 사이토카인에 의해 EGFRviii 발현 세포가 파괴되는 것으로 추정하고 있다.

[0231] 본 발명에 따른 세포는 포유 동물 세포인 것이 바람직하다. 포유 동물 세포로는, 예를 들면, 인간 세포, 또는 마우스, 래트, 소, 양, 말, 개, 돼지, 원숭이 등의 비인간 포유 동물 세포일 수 있다. 이들 중에서도, 포유 동물 세포로는 인간 세포인 것이 보다 바람직하다.

[0232] 세포의 종류는 특별히 한정되지 않으며, 혈관을 통해서 암조직에 도달할 수 있는 세포를 널리 이용할 수 있다. 예를 들면, 혈액, 골수액, 비장, 흉선, 림프절 등에서 채취된 세포; 원발성 종양, 전이성 종양, 암성 복수 등의 암조직에 침윤하는 면역 세포, 간엽계 줄기 세포 등을 들 수 있다.

[0233] 본 발명에서, 「면역 세포」란, 생체에서 면역 기능을 담당하는 세포를 의미한다. 또한, 면역 세포는 면역 담당 세포로 불릴 수 있다. 면역 세포는 생체에서 분리된 세포인 것이 바람직하다. 면역 세포로는, 예를 들면, T세포, 내추럴 킬러 세포(NK 세포), B세포 등의 림프구계 세포, 단구, 마크로파지, 수지상 세포 등의 항원 제시 세포, 호중구, 호산구, 호염기구, 비만 세포 등의 과립구 등을 들 수 있다.

[0234] 보다 구체적으로는, 말초혈로부터 분리된 말초혈 단핵구 등을 바람직하게 이용할 수 있다.

[0235] 말초혈 단핵구에 포함되는 세포 중에서도, 이펙터 세포가 바람직하고, 이펙터 세포로는, 예를 들면 T세포 및 그 전구 세포가 이용된다. T세포의 종류는 특별히 한정되지 않으며, αβT세포, γδT세포, CD8 양성 T세포, 세포 상해성 T세포, CD4 양성 T세포, 헬퍼 T세포, 메모리 T세포, 나이브 T세포, 종양 침윤 T세포, 내추럴 킬러 T세포 등의 어느 T세포여도 무방하다.

[0236] 이들 중에서도, T세포로는 CD8 양성 T세포 또는 세포 상해성 T세포인 것이 보다 바람직하다.

[0237] <<IL-7 및 CCL19>>

[0238] 본 발명에 따른 세포는 항EGFRviiiCAR에 더하여, 인터로이킨(Interleukin: IL)-7(IL-7) 및 케모카인(C-C 모티프) 리간드 19(Chemokine(C-Cmotif) Ligand19: CCL19) 중 적어도 하나를 더 발현하고 있는 것이 바람직하다.

[0239] 본 발명에 따른 세포는, (i) 항EGFRviiiCAR 및 (ii) IL-7과 CCL19 중 적어도 하나를 발현하는 세포인 것이 바람직하고, 항EGFRviiiCAR, IL-7 및 CCL19를 발현하는 세포인 것이 더 바람직하다. 상기 IL-7 및/또는 CCL19는 외래성인, 즉 외래성 핵산으로부터 발현하는 것이 바람직하다.

[0240] IL-7은 T세포의 생존에 필수인 사이토카인이며, 골수, 흉선, 림프 기관·조직의 스트로마 세포 등의 비조혈 세포에 의해 산생되지만, T세포에서의 산생은 대부분 인정되지 않는다.

[0241] 한편, CCL19는 주로, 림프절의 수지상 세포나 마크로파지로부터 산생되고, 그 수용체인 CC 케모카인 수용체 7(Chemokine(C-Cmotif) Receptor7: CCR7)를 통하여 T세포나 B세포, 성숙한 수지상 세포의 이동(migration)를 야기하는 기능을 갖는다.

[0242] IL-7 및 CCL19가 유래되는 생물은 특별히 한정되지 않으며, 인간, 마우스, 래트, 햄스터, 토끼 및 원숭이 등일 수 있으나, 인간인 것이 바람직하다. 한편, 이들의 단백질의 아미노산 서열은 GenBank 등의 공지의 서열 데이터베이스로부터 입수 가능하다.

[0243] 인간 IL-7의 아미노산 서열의 예로는, GenBank 번호: NM_000880.3(서열번호 28)으로 등록된 것 등을 들 수 있다. 또한, 인간 CCL19의 아미노산 서열의 예로는, GenBank 번호: NM_006274.2(서열번호 29)로 등록된 것 등을 들 수 있다.

[0244] 한편, IL-7 및 CCL19는 시그널 펩타이드를 가지며, 성숙 단백질에서는 시그널 펩타이드는 제거되어 있다.

[0245] 예를 들면, 서열번호 28에 기재된 인간 IL-7의 아미노산 서열에서, 1~25 위치의 서열은 시그널 펩타이드에 해당한다. 또한, 예를 들면, 서열번호 29에 기재된 인간 CCL19의 아미노산 서열에서, 1~21 위치의 서열은 시그널 펩타이드에 해당한다.

[0246] 또한, IL-7 및 CCL19는 상기와 같은 천연 단백질의 변이체일 수 있다. IL-7의 변이체의 예로는, 예를 들면 이하와 같은 것을 들 수 있다.

[0247] (6a) 천연 IL-7의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 28)과 70% 이상의 서열 동일성(상동성)을 가지는 아미노산 서열로 이루어지며, T세포의 면역 기능을 촉진하는 기능을 가지는 폴리펩타이드.

[0248] (6b) 천연 IL-7의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 28)로부터 1개 또는 복수개의 아미노산이 변이된 아미노산 서열로 이루어지어, T세포의 면역 기능을 촉진하는 기능을 가지는 폴리펩타이드.

[0249] 또한, CCL19의 변이체의 예로는, 예를 들면, 이하와 같은 것을 들 수 있다.

[0250] (7a) 천연 CCL19의 아미노산 서열(예, 서열번호 29) 및 70% 이상의 서열 동일성(상동성)을 가지는 아미노산 서열로 이루어지며, T세포의 면역 기능을 촉진하는 기능을 가지는 폴리펩타이드.

[0251] (7b) 천연 CCL19의 아미노산 서열(예, 서열번호 29)로부터 1개 또는 복수개의 아미노산이 변이된 아미노산 서열로 이루어지며, T세포의 면역 기능을 촉진하는 기능을 가지는 폴리펩타이드.

[0252] 한편, 「T세포의 면역 기능을 촉진하는 기능」이란, T세포의 생존, 증식, 세포 상해 활성, 이동 활성, 종양 조직에 대한 침윤 활성 등을 유지 및/또는 촉진하는 기능을 의미한다.

[0253] 상기 (6a) 및 (7a)에서, 서열 동일성은 70% 이상인 한 특별히 한정되지 않지만, 80% 이상인 것이 바람직하고, 85% 이상인 것이 보다 바람직하고, 90% 이상인 것이 더 바람직하고, 95% 이상인 것이 특히 바람직하다.

[0254] 또한, 상기 (6b) 및 (7b)에서, 「복수개」는, 예를 들면 2개~30개일 수 있으며, 2개~20개인 것이 바람직하고, 2개~10개인 것이 보다 바람직하고, 2개~5개인 것이 더 바람직하다.

[0255] 또한, 「변이」는, 결실, 치환, 부가 및 삽입 중 어느 하나일 수 있으며, 이들의 조합일 수도 있다.

[0256] 또한, IL-7 및 CCL19의 변이체는, 이들의 단백질의 시그널 펩타이드를 다른 시그널 펩타이드로 변경한 것일 수 있으며, 시그널 펩타이드를 제거한 것일 수도 있다. 바람직하게는, IL-7 및 CCL19의 변이체는 분비 단백질의 시그널 펩타이드를 가지며, 세포 외에 분비된다.

[0257] 본 발명에 따른 세포가 단리된 세포인 경우, 항EGFRviiiCAR와 함께 IL-7 및 CCL19로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나를 발현, 바람직하게는 외래성 핵산으로부터 발현함에 따라, T세포의 면역 기능이 촉진되어 EGFRviii 발현 세포에 대한 세포 상해 활성, 종양 조직에 대한 침윤, 또는 종양 미세 환경에서의 생존 능력이 뛰어난 세포가 될 수 있다.

[0258] 본 발명에 따른 세포, 바람직하게는 면역 세포는, IL-15, CCL21, IL-2, IL-4, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IP-10, 인터페론-γ, MIP-1α, GM-CSF, M-CSF, TGF-β, TNF-α 등의 다른 면역 기능 제어 인자를 발현하고 있을 수 있지만, 상기 다른 면역 제어 인자로는 IL-12 이외의 면역 기능 제어 인자인 것이 바람직하다. 한편, 이들 다른 면역 제어 인자는, 각각의 인자를 코딩하는 내재성 핵산으로부터 발현될 수 있으며, 각각의 인자를 코딩하는 외래성 핵산으로부터 발현될 수도 있다.

[0259] 일반적으로, 세포에 외래 유전자를 도입하여 강제 발현시키는 경우, 외래 유전자의 수가 많아질수록 발현률이 저하되는 경향이 있다. 따라서, 항EGFRviiiCAR에 더하여 IL-7 및 CCL19 등도 강제 발현시키는 경우, 항EGFRviiiCAR 발현률의 저하가 우려된다. 그러나, 후술하는 실시예에 나타난 바와 같이, 상기 (a-1)~(a-3)로 이루어지는 군에서 선택되는 항EGFRviii 항체를 이용하면, 항EGFRviiiCAR을 충분히 높은 비율로 발현시키는 것이 가능하다. 충분히 높은 발현률이란, 예를 들면, 20% 이상, 25% 이상, 또는 30% 이상의 발현률을 나타낸다.

[0260] 또한, 본 발명에 따른 세포는 항EGFRviiiCAR에 더하여, 자살 유전자를 발현하는 것일 수 있다. 본 발명에 따른 세포가 자살 유전자를 발현하고 있음으로써, 필요에 따라, 본 발명에 따른 세포에 아포토시스를 유도하는 것이 가능해진다.

[0261] 자살 유전자는 특별히 한정되지 않으며, 공지의 것을 이용할 수 있다. 예를 들면, 자살 유전자로는 단순 헤르페스 바이러스의 티미딘키나아제(HSV-TK) 유전자, 유도성 카스파제 9(inducible caspase9) 유전자 등을 들 수 있다. HSV-TK를 발현하는 세포는 간시클로버를 공존시킴으로써 세포사를 유도할 수 있다.

[0262] 또한, 유도성 카스파제 9를 발현하는 세포는 AP1903 등의 이량체 유도 화합물(chemical induction of dimerization: CID)를 공존시킴으로써 세포사를 유도할 수 있다.

[0263] 자살 유전자의 아미노산 서열은 GenBank 등의 공지의 서열 데이터 베이스로부터 입수 가능하다. 또한, 시판하는 자살 유전자를 포함하는 벡터 등의 서열을 이용할 수도 있다.

[0264] 본 발명에 따른 세포는 항EGFRviiiCAR을 포함하는 것이 바람직하다.

[0265] 본 발명에 따른 세포로는 항EGFRviiiCAR, 및 IL-7과 CCL19로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나를 포함하

는 세포인 것이 바람직하고, 항EGFRviiiCAR, IL-7 및 CCL19를 포함하는 세포인 것이 보다 바람직하고, 항EGFRviiiCAR, IL-7, CCL19 및 자살 유전자를 포함하는 세포일 수 있다. 상기 IL-7 및 CCL19는 각각 바람직하게는 스스로를 코딩하는 외래성 핵산(세포외로부터 도입된 벡터 등)으로부터 발현된다.

[0266] 본 발명에 따른 세포는, 후술하는 항EGFRviiiCAR을 코딩하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 세포에 도입함으로써 얻을 수 있다.

[0267] (폴리뉴클레오티드)

[0268] 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드는 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 염기서열을 포함하는 것이 바람직하다.

[0269] 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드는 항EGFRviiiCAR을 코딩하는 염기서열을 포함하는 것이면, 특별히 한정되지 않는다. 항EGFRviiiCAR은 상기 [키메라 항원 수용체(항EGFRviiiCAR)] 의 항에서 기재한 바와 같다.

[0270] 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드는 상기 [키메라 항원 수용체(항EGFRviiiCAR)] 의 항에서 예시한 항EGFRviiiCAR의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 포함하는 것인 것이 바람직하다.

[0271] <염기서열>

[0272] 예를 들면, 표적 항원 결합 영역을 코딩하는 염기서열로는 항EGFRviii 항체의 scFv를 코딩하는 염기서열을 들 수 있다.

[0273] 보다 구체적으로는, 서열번호 1 또는 4에 기재된 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열과 서열번호 2, 3, 5 또는 6에 기재된 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 포함하는 것을 예시할 수 있다.

[0274] 서열번호 4에 기재된 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열로는, 서열번호 8에 기재된 염기서열을 예시할 수 있다. 또한, 서열번호 6에 기재된 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열로는 서열번호 7에 기재된 염기서열을 예시할 수 있다.

[0275] 항EGFRviii 항체의 scFv를 코딩하는 염기서열은 펩타이드 링커를 코딩하는 염기서열로 연결되어 있는 것이 바람직하다. 펩타이드 링커에 대해서는, 상기 「키메라 항원 수용체」의 항에서 기재한 바와 같다. 예를 들면, 상기에서 예시한 링커 15를 코딩하는 염기서열로는 서열번호 43에 기재된 염기서열을 예시할 수 있다. 또한, 링커 25를 코딩하는 염기서열로는 서열번호 44에 기재된 염기서열을 예시할 수 있다.

[0276] 항EGFRviii 항체의 scFv를 코딩하는 염기서열의 구체적인 예로는, 서열번호 9 및 10에 기재된 염기서열 등을 들 수 있다.

[0277] 표적 항원 결합 영역을 코딩하는 염기서열로는, 도입하는 세포의 생물종에 따라 코돈 최적화가 되어 있는 것이 바람직하며, 인간 세포에 도입하는 경우에는 인간 코돈에 최적화되어 있는 것이 바람직하다.

[0278] 또한, 막 관통 영역 및 시그널 전달 영역을 코딩하는 염기서열은 GenBank 등의 공지의 서열 데이터 베이스로부터 입수 가능하다. 또한, 상기 폴리펩타이드(바람직하게는 EGFRviiiCAR)가 세포외 힌지 영역 등의 다른 영역을 포함하는 경우, 그 다른 영역을 코딩하는 염기서열 또한 GenBank 등의 공지의 서열 데이터 베이스로부터 입수 가능하다.

[0279] 예를 들면, 막 관통 영역으로서 인간 CD8의 막 관통 영역을 이용하는 경우, 인간 CD8을 코딩하는 염기서열로는 GenBank 번호: NM_001768.6으로 등록된 것 등을 들 수 있으며, 막 관통 영역을 코딩하는 염기서열로는 서열번호 45에 기재된 염기서열을 예시할 수 있다.

[0280] 또한, 예를 들면, T세포 활성화 시그널 전달 영역으로서 인간 CD3ζ, 인간 CD28, 인간 4-1BB의 T세포 활성화 시그널 전달 영역을 이용하는 경우, 인간 CD3ζ, 인간 CD28, 및 인간 4-1BB를 코딩하는 염기서열로는 각각, GenBank 번호: NM_000734.3, NM_006139.2 및 NM_001561.5로 등록된 것 등을 들 수 있으며, 인간 CD3ζ, 인간 CD28 및 인간 4-1BB의 T세포 활성화 시그널 전달 영역을 코딩하는 염기서열로는 각각 서열번호 46~48에 기재된 염기서열을 예시할 수 있다.

[0281] 상기 각 영역을 코딩하는 염기서열은 공지의 것에 한정되지 않으며, 상기 각 영역을 코딩하는 염기서열이면 어떠한 서열이어도 무방하다. 유전자 코드의 축중에 의해, 1개의 아미노산에 대응하는 코돈은 복수 존재한다. 따라서, 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열은 다수 존재한다. 상기 각 영역을 코딩하는 염기서열은 그들의 영역을 코딩하는 한 유전자 코드의 축중에 의해 생기는 복수의 염기서열 중 어느 것이어도 무방하다.

[0282] 상기 각 영역을 코딩하는 염기서열로는, 도입하는 세포의 생물종에 따라 코돈 최적화가 되어 있는 것이 바람직

하고, 인간 세포에 도입하는 경우에는 인간 코돈에 최적화되어 있는 것이 바람직하다.

[0283] 또한, 상기 각 영역을 코딩하는 염기서열은, 천연 단백질 유래의 각 영역의 변이체를 코딩하는 것일 수도 있다. 각 영역의 변이체에 대해서는, 상기 [키메라 항원 수용체(항EGFRviiiCAR)] 의 항에서 기재한 바와 같다.

[0284] 본 발명에 따른 폴리펩타이드(항EGFRviiiCAR)의 각 영역을 코딩하는 염기서열은, 5' 측에서부터 순서대로, 표적 항원 결합 영역을 코딩하는 염기서열, 막 관통 영역을 코딩하는 염기서열, 시그널 전달 영역을 코딩하는 염기서열의 순서로 배치되어 있는 것이 바람직하다.

[0285] 시그널 펩타이드, 세포외 힌지 영역 등을 이용하는 경우에는, 시그널 펩타이드를 코딩하는 염기서열을 표적 항원 결합 영역을 코딩하는 염기서열의 5' 측에 배치하고, 세포외 힌지 영역을 코딩하는 염기서열을 표적 항원 결합 영역을 코딩하는 염기서열과 막 관통 영역을 코딩하는 염기서열 사이에 배치하는 것이 바람직하다.

[0286] 이들 영역을 코딩하는 염기서열은 직접 연결되어 있을 수 있으며, 스페이서 영역을 코딩하는 염기서열을 통하여 연결되어 있을 수도 있다.

[0287] 스페이서 영역에 대해서는, 상기 [키메라 항원 수용체(항EGFRviiiCAR)] 의 항에서 기재한 바와 같다.

[0288] 상기 폴리펩타이드가 항EGFRviiiCAR인 경우, 항EGFRviiiCAR을 코딩하는 염기서열의 구체적인 예로는, 서열번호 11로 나타내어지는 염기서열 등을 들 수 있다.

[0289] 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드는, 상기 폴리펩타이드(바람직하게는 항EGFRviiiCAR)의 각 영역을 코딩하는 염기서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드를 직접 또는 스페이서 서열을 통하여 연결함으로써 얻어진다. 상기 폴리펩타이드의 각 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는, 각 영역의 염기서열에 기초하여 공지의 방법으로 화학 합성함으로써 취득할 수 있다.

[0290] 또한, T세포 등으로부터 추출한 DNA, T세포 등으로부터 추출한 RNA를 역전사하여 얻은 cDNA를 템플릿으로서, PCR법, LAMP법, TRC법 등의 등온 증폭법 등에 의해, 각 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 증폭하여 취득할 수 있다.

[0291] 이와 같이 하여 얻은 각 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는, 번역 후의 각 영역의 기능이 사라지지 않는 범위 내에서, 치환, 결실, 부가, 삽입 등의 개변을 행할 수 있다.

[0292] 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드는 항EGFRviiiCAR을 코딩하는 염기서열에 더하여, 프로모터, 인핸서, 폴리 A부가 시그널, 터미네이터 등의 제어서열, 다른 단백질을 코딩하는 염기서열 등을 포함하고 있을 수 있다.

[0293] 다른 단백질로는, 예를 들면, IL-7 및 CCL19 등을 들 수 있다. 이들 단백질을 코딩하는 염기서열은 GenBank 등의 공지의 서열 데이터 베이스로부터 입수 가능하다.

[0294] 예를 들면, 인간 IL-7을 이용하는 경우, 인간 IL-7을 코딩하는 염기서열로는 GenBank 번호: NM_002190.2(서열번호 49)로서 등록된 것 등을 들 수 있다. 또한, 인간 CCL19를 이용하는 경우, 인간 CCL19를 코딩하는 염기서열의 예로는, GenBank 번호: NM_006274.2(서열번호 50)로서 등록된 것 등을 들 수 있다.

[0295] 또한, 이들 단백질을 코딩하는 염기서열은, 공지의 것에 한정되지 않으며, 이들 단백질을 코딩하는 염기서열이면 어떠한 서열이어도 무방하며, 유전자 코드의 축중에 의해 생기는 복수의 염기서열 중 어느 하나일 수 있다. 이들 단백질을 코딩하는 염기서열로는, 도입하는 세포의 생물종에 따라, 코돈 최적화가 되어 있는 것이 바람직하고, 인간 세포에 도입하는 경우에는 인간 코돈에 최적화되어 있는 것이 바람직하다.

[0296] 또한, 이들 단백질을 코딩하는 염기서열은, 천연 IL-7 및 천연 CCL19의 변이체를 코딩하는 것일 수 있다. 이들 변이체에 대해서는, 상기 [항EGFRviiiCAR을 발현하는 세포(항EGFRviiiCAR 발현 세포)] 의 항에서 기재한 바와 같다.

[0297] 또한, 다른 단백질로는 자살 유전자를 들 수도 있다. 자살 유전자에 대해서는, 상기 [항EGFRviiiCAR을 발현하는 세포(항EGFRviiiCAR 발현 세포)] 의 항에서 기재한 바와 같다.

[0298] 자살 유전자를 코딩하는 염기서열은 GenBank 등의 공지의 서열 데이터 베이스로부터 입수 가능하다. 또한, 시판하는 자살 유전자를 포함하는 벡터 등의 서열을 이용할 수도 있다.

[0299] 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드가, 다른 단백질을 코딩하는 염기서열을 포함하는 경우, 항EGFRviiiCAR을 코딩하는 염기서열과 상기 다른 단백질을 코딩하는 염기서열 사이에는, 2A 펩타이드 등의 자기 절단형 펩타이드를

코딩하는 염기서열, IRES(internal ribozyme entry site) 서열 등을 개재할 수 있다.

[0300] 또한, 다른 단백질이 2개 이상인 경우, 상기 다른 단백질의 사이에도 자기 절단형 펩타이드, IRES 등을 개재할 수 있다. 이들 서열을 개재함으로써, 하나의 프로모터로부터 복수의 단백질을 독립하여 발현시킬 수 있다.

[0301] 2A 펩타이드로는, 예를 들면, 피코르나 바이러스, 로타 바이러스, 곤충 바이러스, 아프토 바이러스, 트리파노소마 바이러스 등의 2A 펩타이드를 예시할 수 있다.

[0302] 구체적인 예로서, 피코르나 바이러스의 2A 펩타이드(F2A)의 아미노산 서열을 서열번호 40에 나타낸다. 2A 펩타이드를 코딩하는 염기서열은, 도입하는 세포의 생물종에 따라 코돈 최적화가 되어 있는 것이 바람직하고, 인간 세포에 도입하는 경우에는 인간 코돈에 최적화되어 있는 것이 바람직하다. 2A 펩타이드의 절단 위치의 아미노산 서열을 서열번호 39에 나타내지만, C말단의 프롤린과 그 한 개 N말단측의 글리신 사이에 절단된 형태로 단백질이 번역된다.

[0303] 또한, 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드는, 상기 폴리펩타이드(바람직하게는 항EGFRviiiCAR)를 코딩하는 염기서열 및 다른 단백질을 코딩하는 염기서열의 단백질 코드 서열마다, 프로모터, 인핸서, 폴리A 부가 시그널, 터미네이터 등의 제어 서열을 가지는 것일 수 있다. 또한, 일부의 단백질 코드 서열이 독립적으로 제어 서열을 가지며, 그 외의 단백질 코드 서열이 2A 펩타이드, IRES 등을 통하여 연결되어 공통의 제어 서열을 가지는 것일 수 있다.

[0304] (벡터)

[0305] 본 발명에 따른 벡터는 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 염기서열을 포함하는 것이 바람직하다. 상기 폴리뉴클레오티드는 벡터의 형태일 수 있다.

[0306] 벡터의 종류는 특별히 한정되지 않으며, 일반적으로 사용되는 발현 벡터 등을 들 수 있다.

[0307] 벡터는 직쇄상일 수 있고 고리형일 수도 있으며, 플라스미드 등의 비바이러스 벡터일 수 있으며, 바이러스 벡터일 수도 있고, 트랜스포손에 의한 벡터일 수도 있다.

[0308] 벡터로는, 예를 들면, 바이러스 벡터, 플라스미드 벡터, 에피소말 벡터, 인공 염색체 벡터 등을 들 수 있다.

[0309] 바이러스 벡터로는, 예를 들면, 센다이 바이러스벡터, 레트로 바이러스(렌티 바이러스 포함) 벡터, 아데노 바이러스 벡터, 아데노 관련 바이러스 벡터, 헤르페스 바이러스 벡터, 백시니아 바이러스 벡터, 폭스 바이러스 벡터, 폴리오 바이러스 벡터, 신드비스 바이러스 벡터, 라브도 바이러스 벡터, 파라믹소 바이러스 벡터, 오르토믹소 바이러스 벡터 등을 들 수 있다.

[0310] 플라스미드 벡터로는, 예를 들면, pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNAI/Neo 등의 동물세포 발현용 플라스미드 벡터를 들 수 있다.

[0311] 에피소말 벡터는, 염색체외에서 자율 복제 가능한 벡터이다. 에피소말 벡터로는, 예를 들면, EBV(EV바이러스), SV40(Simian virus40) 등에 유래하는 자율 복제에 필요한 서열을 벡터 요소로서 포함하는 벡터를 들 수 있다. 자율 복제에 필요한 벡터 요소로는, 구체적으로는, 복제 개시점과, 복제 개시점에 결합하여 복제를 제어하는 단백질을 코딩하는 유전자를 들 수 있다.

[0312] 예를 들면, EBV에서는 복제 개시점 oriP와 EBNA-1 유전자, SV40에서는 복제 개시점 ori와 SV40LT 유전자를 들 수 있다.

[0313] 인공 염색체 벡터로는, 예를 들면, YAC(Yeast artificial chromosome) 벡터, BAC(Bacterial artificial chromosome) 벡터, PAC(P1-derived artificial chromosome) 벡터 등을 들 수 있다.

[0314] 본 발명에 따른 벡터의 바람직한 예로는, 바이러스 벡터를 들 수 있으며, 보다 바람직한 예로는 레트로 바이러스 벡터를 들 수 있다.

[0315] 레트로 바이러스 벡터로는, pMSGV1 벡터(Tamada K et al., Clin Cancer Res 18: 6436~6445(2012))나 pMSCV 벡터(다카라 바이오사제)를 예시할 수 있다. 레트로 바이러스 벡터를 이용함으로써, 벡터중의 유전자가 호스트 세포의 게놈에 포함되어 호스트 세포중에서 장기간 안정하여 발현시키는 것이 가능해진다.

[0316] 본 발명에 따른 벡터는, 상기 [항EGFRviiiCAR을 코딩하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드] 의 항에서 기재한 염기서열 외에, 복제 개시점, 복제 개시점에 결합하여 복제를 제어하는 단백질을 코딩하는 염기서열, 약

제 내성 유전자, 리포터 유전자 등의 마커 유전자를 코딩하는 염기서열 등을 포함하고 있을 수 있다.

[0317] 본 발명에 따른 폴리펩타이드(바람직하게는 항EGFRviiiCAR)를 코딩하는 염기서열은, 적절한 프로모터의 제어하에서 발현되도록, 벡터내에 배치되는 것이 바람직하다. 또한, 벡터가 다른 단백질을 코딩하는 염기서열을 포함하는 경우는, 그러한 염기서열도 적절한 프로모터의 제어하에서 발현되도록 벡터내에 배치되는 것이 바람직하다.

[0318] 프로모터로는, 예를 들면, SRα프로모터, SV40 초기 프로모터, 레트로 바이러스의 LTR, CMV(사이토메가로 바이러스) 프로모터, RSV(라우스 육종 바이러스) 프로모터, HSV-TK(단순 헤르페스 바이러스 티미딘키나아제) 프로모터, EF1α 프로모터, 메탈로티오네인 프로모터, 히트쇼크 프로모터 등을 들 수 있다.

[0319] 또한, 인간 CMV의 IE 유전자의 인핸서를 프로모터와 함께 이용할 수 있다. 일 예로는, CAG 프로모터(사이토메가로 바이러스 인핸서와 닭β-액틴 프로모터와 β-글로빈 유전자의 폴리A 시그널 부위를 포함한다.) 등을 들 수 있다. 또한, 상기 [항EGFRviiiCAR을 코딩하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드] 에서 기재한 바와 같이, 각 단백질 코드 서열 사이에, 자기 절단형 펩타이드를 코딩하는 염기서열이나 IRES를 배치하고, 공통의 프로모터의 제어하에서 전사되도록 할 수도 있다.

[0320] 본 발명에 따른 벡터는 상기 폴리펩타이드(바람직하게는 항EGFRviiiCAR)를 코딩하는 염기서열에 더하여, IL-7을 코딩하는 염기서열 및 CCL19를 코딩하는 염기서열 중 적어도 하나를 더 포함하는 것이 바람직하고, 항EGFRviiiCAR을 코딩하는 염기서열에 더하여, IL-7을 코딩하는 염기서열 및 CCL19를 코딩하는 염기서열을 더 포함하는 것이 보다 바람직하다.

[0321] 벡터는 적절한 프로모터에 기능적으로 연결된 항EGFRviiiCAR을 코딩하는 염기서열을 포함하는 것이 바람직하고, 상기 폴리펩타이드(바람직하게는 항EGFRviiiCAR)를 코딩하는 염기서열, IL-7을 코딩하는 염기서열 및 CCL19를 코딩하는 염기서열이, 자기 절단형 펩타이드를 코딩하는 염기서열 또는 IRES를 통하여 연결된 염기서열을 포함하고, 그 염기서열은 적절한 프로모터에 기능적으로 연결되어 있는 것이 보다 바람직하다.

[0322] <<벡터에 포함시키는 염기서열의 조합>>

[0323] 벡터에 포함시킨 염기서열의 조합은 특별히 제한되지 않으며, 상기 폴리펩타이드(바람직하게는 항EGFRviiiCAR)를 코딩하는 염기서열, IL-7을 코딩하는 염기서열 및 CCL19를 코딩하는 염기서열을 각각, 다른 벡터에 실어 세포에 도입할 수 있다. 또한, 이들 염기서열로부터 선택되는 2개 이상의 염기서열을 조합하여 동일한 벡터에 실어 세포에 도입할 수 있다.

[0324] 예를 들면, 본 발명에 따른 폴리펩타이드, IL-7 및 CCL19를 발현시키는 경우, 각각을 코딩하는 염기서열을 다른 벡터에 실어 세포에 도입할 수 있으며, 본 발명에 따른 폴리펩타이드를 코딩하는 염기서열 및 IL-7을 코딩하는 염기서열을 실은 벡터와 CCL-19를 코딩하는 염기서열을 실은 벡터의 2종류를 세포에 도입할 수 있으며, 본 발명에 따른 폴리펩타이드를 코딩하는 염기서열 및 CCL19를 코딩하는 염기서열을 실은 벡터와 IL-7을 코딩하는 염기서열을 실은 벡터의 2종류를 세포에 도입할 수 있고, 본 발명에 따른 폴리펩타이드를 코딩하는 염기서열 및 IL-7을 코딩하는 염기서열을 실은 벡터와 본 발명에 따른 폴리펩타이드를 코딩하는 염기서열 및 CCL19를 코딩하는 염기서열을 실은 벡터의 2종류를 세포에 도입할 수 있으며, 본 발명에 따른 폴리펩타이드를 코딩하는 염기서열, IL-7을 코딩하는 염기서열 및 CCL19를 코딩하는 염기서열을 실은 1종류의 벡터를 세포에 도입할 수 있다.

[0325] 한편, 본 명세서에서, 「프로모터에 기능적으로 연결되었다」라는 것은, 프로모터의 제어하에서 발현되도록, 프로모터의 하류에 연결되어 있는 것을 의미한다. 상기의 예에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드를 코딩하는 염기서열, IL-7을 코딩하는 염기서열 및 CCL19를 코딩하는 염기서열의 배치순서는, 특별히 한정되지 않으며, 임의의 배치 순서로 할 수 있다.

[0326] (폴리펩타이드를 발현하는 세포의 제조 방법)

[0327] 본 발명에 따른 폴리펩타이드를 발현하는 세포의 제조 방법(이하, 간단히 「세포의 제조 방법」이라고도 할 수 있다.)은, 상기 폴리뉴클레오티드를 세포에 도입하는 것을 포함하는 것이 바람직하다. 또한, 본 발명에 따른 폴리펩타이드를 발현하는 세포의 제조 방법은, 상기 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 세포에 도입하는 것을 포함하는 것이 바람직하다.

[0328] 상기 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 세포에 도입하는 방법은 특별히 한정되지 않으며, 공지의 방법을 이용할 수 있다. 예를 들면, 바이러스 감염법, 리포펙션법, 마이크로인젝션법, 칼슘인산법, DEAE-덱스트란법, 일렉트로포

레이션법, 트랜스포손을 이용하는 방법, 파티클 건법 등을 들 수 있다.

[0329] 또한, 세포의 제조 방법에서 이용되는 벡터가 레트로 바이러스 벡터인 경우, 벡터가 가지고 있는 LTR 서열 및 패키징 시그널 서열에 기초하여 적절한 패키징 세포를 선택하고, 그것을 사용하여 레트로 바이러스 입자를 조제할 수 있다.

[0330] 패키징 세포로는, 예를 들면, PG13, PA317, GP+E-86, GP+envAm-12, Psi-Crip 등을 예시할 수 있다. 또한, 트랜스펙션 효율의 높은 293 세포나 293 T세포를 패키징 세포로서 이용할 수 있다.

[0331] 각종 레트로 바이러스 벡터 및 그 벡터의 패키징에 사용 가능한 패키징 세포는 널리 시판되고 있기 때문에, 이러한 시판품을 이용할 수 있다. 예를 들면, GP2-293 세포(다카라 바이오(주)제), Plat-GP 세포(코스모·바이오(주)제), PG13 세포(ATCCCRL-10686), PA317 세포(ATCCCRL-9078) 등을 이용할 수 있으며, Retroviruspackaging Kit Eco(다카라 바이오(주)제) 등의 시판하는 키트를 이용할 수 있다.

[0332] 본 발명에 따른 폴리펩타이드를 발현하는 세포에, IL-7, CCL19, 자살 유전자 등의 다른 외래 단백질을 발현시키는 경우, 이러한 다른 단백질을 코딩하는 염기서열을, 본 발명에 따른 폴리펩타이드(바람직하게는 항EGFRviiiCAR)를 코딩하는 염기서열을 포함하는 벡터에 포함시키도록 할 수 있으며, 다른 벡터에 포함시키도록 할 수도 있다. 다른 단백질을 코딩하는 염기서열을 다른 벡터에 포함시킨 경우, 본 발명에 따른 폴리펩타이드(바람직하게는 항EGFRviiiCAR)를 코딩하는 염기서열을 포함하는 벡터와 동시에 또는 별개로, 상기 벡터를 세포에 도입할 수 있다.

[0333] 또한, 본 발명에 따른 폴리펩타이드를 발현하는 세포는, 본 발명에 따른 폴리펩타이드를 코딩하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를, 공지의 유전자 편집 기술 등을 이용하여 적절한 프로모터의 제어하에서 발현 가능하도록, 세포의 게놈에 포함시킴으로써 제조할 수도 있다.

[0334] 유전자 편집 기술로는, 예를 들면, 징크 핑거 뉴클레아제, TALEN(transcription activation-like effector nuclease), CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat)-Cas 시스템, PPR(pentatricopeptide repeat) 등의 엔도 뉴클레아제를 이용하는 기술을 들 수 있다.

[0335] 본 발명에 따른 폴리펩타이드를 발현하는 세포에 다른 외래 단백질을 발현시키는 경우도 마찬가지로, 유전자 편집 기술 등을 이용하여 다른 외래 단백질을 코딩하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를, 적절한 프로모터의 제어하에서 발현 가능하도록 세포의 게놈에 포함시킬 수 있다. 예를 들면, 적절한 프로모터에 기능적으로 연결된 본 발명에 따른 폴리펩타이드(또는 다른 단백질)를 코딩하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를, 세포 게놈의 비코드 영역 등에 포함시키는 방법; 본 발명에 따른 폴리펩타이드(또는 다른 단백질)를 코딩하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 세포 게놈의 내재성 프로모터의 하류에 포함시키는 방법 등을 들 수 있다.

[0336] 내재성 프로모터로는, 예를 들면, TCRα, TCRβ의 프로모터 등을 들 수 있다.

[0337] -발현의 확인 방법-

[0338] 본 발명에 따른 폴리펩타이드를 코딩하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 세포에 도입한 후, 상기 세포에서의 상기 폴리펩타이드의 발현은, 유세포 분석, RT-PCR, 노던 블로팅, 웨스턴 블로팅, ELISA, 형광 면역 염색 등의 공지의 방법에 의해 확인할 수 있다. 또한, IL-7 및 CCL19 등의 다른 외래 단백질의 발현도, 마찬가지로 공지의 방법에 의해 확인할 수 있다.

[0339] (의약 조성물)

[0340] 본 발명에 따른 의약품 조성물은, 상기 세포를 포함하는 것이 바람직하다.

[0341] 본 발명에 따른 폴리펩타이드를 발현하는 세포는, EGFRviii를 발현하는 세포에 대해서, 특이적인 세포 상해 활성을 나타낸다. 따라서, 상기 폴리펩타이드를 발현하는 세포는, 상기 폴리펩타이드를 발현하는 세포가 관여하는 질환을 치료 또는 예방하기 위해서 사용할 수 있다. EGFRviii는, 폐암, 신경아세포종, 신경교종, 흑색종, 악성중피종, 골수종 등을 비롯한 폭넓은 종양 세포에 발현하고 있는 점에서, 상기 폴리펩타이드를 발현하는 세포를 포함하는 의약 조성물은 종양을 치료 또는 예방하기 위한 의약 조성물로서 이용할 수 있다.

[0342] 종양은, 골조직, 연골 조직, 지방 조직, 근조직, 혈관 조직 및 조혈 조직 중 어느 하나에서 생긴 것일 수 있다. 종양으로는, 예를 들면, 신경교종, 흑색종, 악성중피종, 폐암, 췌장암, 두경부암, 간암, 자궁암, 방광암, 담도암, 식도암, 정소 종양, 갑상선암, 뇌종양, 전립선암, 대장암, 신장암, 난소암, 유방암, 선암, 편평상피암, 샘

평편상피암종, 미분화암, 대세포암, 소세포암, 피부암, 질암, 경부암, 비장암, 기관암, 기관지암, 소장암, 위암, 담낭암, 정소암 등의 암; 골육종, 연골육종, 유잉 육종, 악성 혈관내피종, 악성 신경초종, 연부 조직 육종 등의 육종; 신경아세포종, 간아세포종, 수아세포종, 신아세포종, 췌장아세포종, 흉막폐아세포종, 망막아세포종 등의 아세포종; 배세포종; 림프종, 백혈병, 골수종 등의 혈액암 등을 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다.

[0343] 특히, 본 발명에 따른 의약 조성물은 EGFRviii를 발현하는 종양을 치료 또는 예방하기 위한 의약 조성물로서 바람직하다.

[0344] 종양이 EGFRviii를 발현하고 있는지 아닌지는, 예를 들면, 항EGFRviii 항체 등을 이용한 공지의 방법에 의해 확인할 수 있다.

[0345] EGFRviii의 발현을 확인하는 공지의 방법으로는, 유세포 분석, ELISA, 면역 염색, 형광 면역 염색 등을 예시할 수 있다.

[0346] 본 발명에 따른 폴리펩타이드에 더하여, IL-7 및 CCL19 중 어느 하나 또는 양쪽 모두를 발현하는(바람직하게는 외래성 핵산으로부터 발현한다.) 세포는, EGFRviii를 발현하는 종양이면, 고형 종양에 대해서도 강한 세포 상해 활성을 발휘할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드, 및 IL-7와 CCL19 중 어느 하나 또는 양쪽 모두를 발현하는 세포를 포함하는 의약 조성물은, EGFRviii를 발현하는 고형 종양에 대해서 특히 바람직하게 이용할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드, 및 IL-7와 CCL19 중 어느 하나 또는 양쪽 모두를 발현하는 세포를 포함하는 고형 종양을 치료 또는 예방하기 위한 의약 조성물은, 본 발명에 따른 의약 조성물의 바람직한 예이다.

[0347] 「고형 종양」이란, 조혈계 조직으로부터 발생하는 혈액암 이외의 종양을 의미하며, 상피 세포암 및 비상피 세포암을 포함한다.

[0348] 본 발명에 따른 의약 조성물은, 본 발명에 따른 폴리펩타이드를 발현하는 세포에 더하여, 약학적으로 허용되는 담체 등의 다른 성분을 포함하고 있을 수 있다.

[0349] 다른 성분으로는, 예를 들면, 약학적으로 허용되는 담체 외에, 사이토카인 등의 T세포 활성화 인자, 면역 부활제, 면역 체크 포인트 저해제, 다른 CAR을 발현하는 세포, 항염증제 등을 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다. 약학적으로 허용 되는 담체로는, 세포 배양 배지, 생리 식염수, 인산 완충액, 구연산 완충액 등을 들 수 있다.

[0350] 본 발명에 따른 의약 조성물은, 공지의 방법에 의해 투여할 수 있지만, 바람직하게는 주사 또는 수주(輸注)에 의해 환자에게 투여할 수 있다. 투여 경로로는, 정맥내 투여가 바람직하지만 이에 한정되지 않으며, 종양내 주입 등에 의해 투여할 수도 있다.

[0351] 본 발명에 따른 의약 조성물은, 본 발명에 따른 폴리펩타이드를 발현하는 세포를 치료적 유효량으로 포함할 수 있다.

[0352] 본 명세서에서, 「치료적 유효량」이란, 질환의 치료 또는 예방을 위해 유효한 약제의 양을 의미한다. 치료적 유효량은, 투여 대상의 질환 상태, 연령, 성별, 및 체중 등에 의해 변동될 수 있다. 본 발명에 따른 의약 조성물에서, 상기 폴리펩타이드를 발현하는 세포의 치료적 유효량은, 예를 들면, 상기 폴리펩타이드를 발현하는 세포가 종양의 증식을 억제할 수 있는 양이며, 종양의 축소를 가져오는 양인 것이 바람직하다.

[0353] 본 발명에 따른 의약 조성물의 투여량 및 투여 간격은, 투여 대상의 연령, 성별 및 체중 등, 질환의 종류, 진행도 및 증상 등, 및 투여 방법 등에 의해 적절히 선택할 수 있다.

[0354] 투여량으로는 치료적 유효량을 투여할 수 있으며, 예를 들면 1회의 투여시, 투여 세포의 개수로서 1×10^{4}개~1×10^{10}개, 바람직하게는 1×10^{5}개~1×10^{9}개, 보다 바람직하게는 5×10^{6}개~5×10^{8}개를 들 수 있다.

[0355] 본 발명에 따른 의약 조성물의 투여 간격으로는, 예를 들면 1주마다, 10~30일마다, 1개월마다, 3개월~6개월마다, 1년마다 등으로 할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 폴리펩타이드를 발현하는 세포는, 투여 대상의 체내에서 자율적으로 증식할 수 있기 때문에, 1회의 투여만으로 할 수도 있다. 또한, 투여 후에 체내의 상기 폴리펩타이드를 발현하는 세포의 수를 모니터링하고, 그 결과에 따라 투여 시기를 결정할 수도 있다.

[0356] 또한, 본 발명에 따른 의약 조성물은 다른 항암제와 병용하여 사용할 수 있다. 다른 항암제로는, 시클로포스파

미드 등의 알킬화약, 펜토스타틴 등의 대사길항약, 리툭시맙 등의 분자 표적약, 이매티닙 등의 키나아제 저해제, 보르테조밉 등의 프로테아좀 저해제, 사이클로스포린 등의 칼시뉴린 저해약, 이다루비신 등의 항암성 항생 물질, 이리노테칸 등의 식물 알카로이드, 시스플라틴 등의 플라티늄 제재, 타목시펜 등의 호르몬 요법약, 니볼루맙, 펜펨브로리주맙 등의 면역 제어약 등을 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다.

[0357] 또한, 본 발명에 따른 의약 조성물의 투여 대상은 특별히 제한은 없으며, 인간, 원숭이, 개 등일 수 있다.

[0358] 또한, 다른 양태에서, 본 발명은, 1) 종양을 치료 또는 예방하기 위한 의약 조성물의 제조에서의, 본 발명에 따른 폴리펩타이드를 발현하는 세포의 사용, 2) 본 발명에 따른 폴리펩타이드를 발현하는 세포를 대상(예, EGFRviii를 발현하는 종양에 이환되어 있는 환자, 종양의 외과적 절제를 행한 환자 등)에게 투여하는 것을 포함하는, EGFRviii를 발현하는 종양을 치료 또는 예방하는 방법, 3) 종양의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 본 발명에 따른 폴리펩타이드를 발현하는 세포, 4) 종양을 치료 또는 예방하기 위한 본 발명에 따른 폴리펩타이드를 발현하는 세포의 사용을 제공한다.

[0359] 또한, 다른 양태에서, 본 발명에 따른 벡터를 포함하는, 본 발명에 따른 폴리펩타이드를 발현하는 세포를 제작하기 위한 키트도 제공된다. 상기 키트는 상기본 발명에 따른 벡터를 포함하고 있으면 특별히 제한되지 않으며, 본 발명에 따른 폴리펩타이드를 발현하는 세포를 제작하기 위한 설명서나, 벡터를 세포에 도입하기 위하여 이용하는 시약 등을 포함하고 있을 수 있다.

[0360] 실시예

[0361] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 설명하지만, 본 발명은 이하의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0362] (실시예 1) 항EGFRviii 항체의 제작

[0363] 통상의 방법에 따라, EGFRviii 유래 펩타이드를 이용하여 마우스를 면역하고, EGFRviii를 발현하는 HEK EGFRviii세포와, 발현하지 않는 HEK293 세포를 이용하여 스크리닝을 행하여, EGFRviii에 결합하는 항체를 산생하는 48의 하이브리도마를 얻었다.

[0364] 또한, EGFRviii를 발현하는 CLTH/EGFRviii 세포(Celther Polska사)와 발현하지 않는 293세포(국립연구개발법인 의약 기반·건강·영양 연구소 JCRB 세포 뱅크제)를 이용하여 FACS 해석에 의한 스크리닝을 행하고, 1B10, 2H9 및 3C2의 3개의 클론을 선택하였다.

[0365] 이들 클론에 대해 싱글 클로닝을 실시하였다. EGFRviii 발현 세포주에 대한 결합이 강하며, EGFRviii 비발현 세포주에 대한 결합이 약한 것, 및 세포 증식이 빠른 것을 클론의 선택 기준으로 하여, 1B10-1A12 클론(서열번호 1 및 2), 2H9-1B5 클론(서열번호 51 및 52) 및 3C2-1B10 클론(서열번호 53 및 54)을 선택하여 이후의 실험에 이용하였다.

[0366] 3개의 클론의 아미노산 서열을 해석하여, 얼라인먼트를 행한 결과를 도 1a 및 도 1b에 나타내었다.

[0367] 도 1a 도 1b에 나타낸 바와 같이, 3개의 클론은 서로 높은 서열 동일성을 나타내는 것을 알 수 있었다. 도 1a 및 도 1b 중에 나타나는 CDR은 Kabat의 정의에 따른 것이다.

[0368] (실시예 2) 마우스 항EGFRviiiCAR-T 세포의 검토

[0369] <1B10-1A12 클론에 기초하는 항EGFRviiiscFv의 설계>

[0370] 우선, 1B10-1A12 클론의 VH와 VL, 및 링커 15과 링커 25를 이용하여, 이하의 표 1에 기재된 8종류의 항EGFRviiiscFv를 설계하였다. 단, 이 표 중의 서열번호 13, 15는 이하에 기재된 것(SG)으로 변환된 후의 서열이기 때문에, 실제로는 서열번호 14의 164 위치의 Ser 및 서열번호 16의 174 위치의 Ser는 Asn으로 바꿔 읽는다.

표 1

[0371]

	구성	서열번호
S#020	VL15VH (NG)	13
S#021	VH15VL (NG)	14
S#022	VL25VH (NG)	15
S#023	VH25VL (NG)	16
S#024	VL15VH (SG)	3, 41, 1
S#025	VH15VL (SG)	1, 41, 3
S#026	VL25VH (SG)	3,42, 1
S#027	VH25VL (SG)	1, 42, 3

[0372] 표 1에서, VL15VH는 N말단으로부터 순서대로 1B10-1A12 클론의 VH 영역, 링커 15, 및 1B10-1A12 클론의 VL 영역을 포함하는 것을 의미하고, (NG)는 VL의 CDR1에 NG(Asn-Gly) 서열을 포함하는 것을 의미하며, (SG)는 상기 NG서열이 SG(Ser-Gly) 서열로 변환되어 있는 것을 나타낸다.

[0373] VL의 CDR1에 있는 NG(Asn-Gly) 서열에서는 탈아미드화가 생기기 쉽고, 탈아미드화는 항원 결합 능력을 저하시킬 가능성이 있기 때문에, SG(Ser-Gly) 서열로 변경한 것을 제작하였다.

[0374] <항EGFRviiiCAR의 scFv 서열 및 DNA 단편의 합성>

[0375] 상기 8종류의 항EGFRviiiscFv의 아미노산 서열을 코딩하는 DNA 단편을 합성하였다.

[0376] <항EGFRviiiCAR 발현 벡터의 제작>

[0377] 〔IL-7/CCL19 및 HSV-TK를 발현하는 항EGFRviiiIL-7/CCL19CAR 발현 벡터의 제작〕

[0378] 상기 8종류의 항EGFRviiiscFv에 대하여, 국제 공개 제2017/159736호 팜플렛에 기재된 방법에 준하여, 최초로 N말단측으로부터 항EGFRviiiscFv, 인간 CD8 막관통 영역, 및 인간 CD28, 4-1BB, CD3ζ 세포내 시그널 전달 영역을 순차적으로 구비한 제3 세대 CAR 컨스트럭트를 제작하였다.

[0379] 상기 컨스트럭트의 C말단에 2A 펩타이드(서열번호 39)인 F2A를 가하고, 그 하류에 인간IL-7-F2A-인간CCL19-F2A-HSV-TK를 가하였다. 하기 표 2에 각 아미노산 서열을 나타내었다.

[0380] 다음으로, 상기 pMSGV 벡터내의 항EGFRviiiscFv 영역에, 상기 「항EGFRviiiCAR의 scFv 서열 및 DNA 단편의 합성」란에서 기재한 방법으로 합성한 각 EGFRviiiscFvDNA 단편을, 제한 효소(NcoI 및 NotI) 처리 및 라이게이션에 의해 삽입하고, 각각의 「IL-7/CCL19 발현-항EGFRviiiCAR 벡터」를 제작하였다.

표 2

[0381]

서열 번호	서열명	아미노산 서열
20,22	hCD8	FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN
26	CD28_A_aa	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS
27	4-1 BB_A_aa	RFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE
25	CD3z_A_aa	LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
28	IL-7 human_aa	MFHVSFRYIFGLPPLILVLLPVASSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARK LRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNKILMG TKEH
29	CCL19 human_aa	MALLLALSLLVLWTSPAPTLSGTNDAEDCCLSVTQKPIPGYIVRNFHYLLIKDGCRVPAVVFTTLRGRQLCAPPDQPWVERIIQRLQ RTSAKMKRRSS
39	2A peptide cleavage region	DXEXNPGP
40	F2A_aa	GSGVKQTLNF DLLKLAGDVE SNPGP
41	linker 15_aa	GGGGSGGGGSGGGGS
42	linker 25_aa	SSADDAKKDAAKKDDAKKDDAKKDG

[0382] <IL-7/CCL19 발현-항인간 EGFRviiiCAR 벡터를 도입한 레트로 바이러스의 제작>

[0383] T세포에 유전자를 도입하기 위해 레트로 바이러스를 제작하였다.

[0384] 우선, 트랜스펙션 시약(제품명: 리포펙타민 3000(라이프테크놀로지사제))을 이용하여, 상기 각각의 IL-7/CCL19 발현-항EGFRviiiCAR 벡터와 p-Ampho 플라스미드(다카라바이오사제)를 GP2-293 패키징 세포주(다카라바이오사제)에 트랜스펙션함으로써, IL-7/CCL19 발현-항EGFRviiiCAR 벡터를 도입한 레트로 바이러스를 제작하였다.

[0385] 트랜스펙션으로부터 48시간 후에 상기 항EGFRviii 벡터가 도입된 레트로 바이러스를 함유하는 상청을 각각 회수하였다.

[0386] 상기 GP2-293 세포의 배양액으로는, 10% FCS, 1% 페니실린-스트렙토마이신(후지필름 와코쥰야쿠(주)제)을 첨가한 DMEM를 이용하였다. 또한, 후술하는 실시예에서 이용하는 T세포의 배양액으로는 CTS Immune CELLSR(Gibco사제), 1% 페니실린-스트렙토마이신(후지필름 와코쥰야쿠(주)제), 2.5μg/mL의 암포테리신 B(브리스톨-마이어스 스퀴브사제), 2mM의 L-글루타민을 포함하는 OpTmizer(Gibco사제)를 이용하였다.

[0387] <T세포로의 형질 도입>

[0388] 정상인 도너의 혈액으로부터 채취한 2×10^6개의 말초혈 단핵구를, T세포의 활성화를 위해 항CD3 단일 클론 항체(5μg/mL) 및 레트로넥틴(등록상표)(다카라 바이오(주)제, 25μg/mL)를 고층화한 플레이트상에서, IL-2(Miltenyi사제)와 함께, 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 3일간 배양하였다.

[0389] 배양 개시 후 2일째에, 상기에서 제작한 IL-7/CCL19 발현-항인간 EGFRviiiCAR 벡터를 도입한 레트로 바이러스를 함유하는 상청을, 미리 25μg/mL의 레트로넥틴(다카라 바이오(주)제)으로 코팅한 표면 미처리 24 웰 플레이트에 1 웰당 500μL씩 첨가하여, 2000g, 2시간의 조건으로 원심 분리하여, 레트로 바이러스 프리로드 플레이트를 제작하였다.

[0390] 상기 레트로 바이러스 프리로드 플레이트는 각 레트로 바이러스에 대해 2개씩 제작하여 원심 분리를 종료한 후 1.5% BSA/PBS로 세정하고, 사용할 때까지 4℃에서 보존하였다.

[0391] 배양 3일째에, 활성화시킨 세포를 상기 플레이트로부터 회수하고, 세포수가 1×10^5cells/mL가 되도록, 세포 현탁액을 조제하였다. 이 세포 현탁액을 1 웰당 1mL씩 레트로 바이러스 프리로드 플레이트에 첨가하고, IL-2의 존재하에서 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 24시간 배양하여, 첫번째 레트로 바이러스 감염을 행하였다.

[0392] 다음날(배양 4일째), 각 웰의 세포 용액을, 보존하고 있던 2개째의 레트로 바이러스 프리로드 플레이트로 옮겨,

500g으로 1분간 원심 분리 후, 37℃에서 4시간 배양하여, 2회째의 감염을 행하였다.

[0393] 37℃에서 4시간 배양 후, 각 웰의 세포 현탁액 1mL를 새로운 12 웰 세포 배양 플레이트로 옮겨, IL-2를 함유하는 새로운 배양액(OpTmizer)으로 4배로 희석하고, 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 배양하였다.

[0394] 말초혈 단핵구의 배양 개시일로부터 7일째까지 배양하고, IL-7/CCL19 발현-항EGFRviiiCAR 벡터를 도입한 T세포인 항EGFRviiiCAR-T 세포(이하, 「PRIME EGFRviii CAR-T 세포」라고도 한다.)를 얻었다.

[0395] 항PRIME EGFRviii CAR-T 세포는, 외래의 항인간 EGFRviiiCAR을 코딩하는 핵산, 외래의 IL-7을 코딩하는 핵산, 및 외래의 CCL19를 코딩하는 핵산을 함유하고 있다.

[0396] 또한 동시에, CAR 음성 세포 대조군으로서 동일한 정상인 도너로부터 얻은 말초혈 단핵구를 동일한 수법으로 활성화하지만 레트로 바이러스가 감염되지 않은 「CAR, IL-7, 및 CCL19 비발현-T세포」(비유전자 도입 세포: Non-infection, 또는 활성화 T세포: ActT)을 제작하였다.

[0397] <CAR의 발현의 확인>

[0398] 〔유세포 분석 해석〕

[0399] PRIME EGFRviii CAR-T 세포의 발현 레벨에 대하여, 유세포 분석에 의해 측정하였다.

[0400] 활성화한 T세포와 PRIME EGFRviii CAR-T 세포를, 리컴비넌트 EGFRviii 단백질 및 알로피코시아닌(APC) 표식항CD8 단일 클론 항체(Affymetrix사제)에 반응시켜 염색을 행하였다.

[0401] 상기 유세포 분석기는 CytoFLEX S(Beckman Coulter사제)를 이용하고, 데이터 해석은 FlowJo software(Tree Star사제)를 이용하였다.

[0402] (결과)

[0403] 결과를 도 2a~2h에 나타내었다. 도 2a~2h의 각각에서 가로축은 CAR의 발현, 세로축은 CD8의 발현을 나타낸다.

[0404] 도 2a~2h에 나타낸 바와 같이, 활성화한 T세포(도면중의 ActT)에서는, CD8의 발현은 보였으나, CAR의 발현은 보이지 않았다. 한편, IL-7/CCL19 발현-항인간 EGFRviiiCAR 벡터를 도입한 T세포인 「PRIME EGFRviii CAR-T 세포」에서는, scFv의 종류에 상관없이 충분히 높은 발현률을 나타내었다. 그 중에서, VL를 N말단측으로 한 VL15VH와 VL25VH의 발현률이 높은 경향을 보였다.

[0405] <2H9-1B5 클론 및 3C2-1B10 클론에 기초하는 항EGFRviiiCAR-T 세포의 제작>

[0406] 1B10-1A12 클론에 기초하는 것과 동일한 방법으로, 2H9-1B5 클론 및 3C2-1B10클론에 기초하는 PRIME EGFRviii CAR-T 세포를 제작하였다. scFv는 모두 VL25VH(SG)형으로 하였다.

[0407] 발현률을 측정한 결과를 도 3a~3d에 나타내었다.

[0408] 1B10-1A12 클론과의 VH 및 VL의 서열 동일성이 매우 높음에도 불구하고, 1B10-1A12 클론에 기초하는 PRIME EGFRviii CAR-T 세포에서는, 유세포 분석기에 의한 측정 결과가 32.4%인 것에 대하여, 2H9-1B5 클론 및 3C2-1B10 클론에 기초하는 PRIME EGFRviii CAR-T 세포의 측정 결과는 각각 3.6% 및 1.4%로 매우 낮았다. 이는, 2H9-1B5 클론 및 3C2-1 B10 클론의 발현률이 낮은 것, 및/또는 리컴비넌트 EGFRviii 단백질에 대한 결합 친화성이 낮은 것에 따른 것으로 생각된다.

[0409] 이상으로부터, 이후의 실시예에서는 1B10-1A12 클론을 이용하였다.

[0410] <CAR-T 세포의 세포 상해 활성의 측정>

[0411] 1B10-1 A12 클론에 기초하는 PRIME EGFRviii CAR-T 세포에 대해, CAR-T 세포와, EGFRviii 발현 세포(CLTH/EGFRviii 세포) 또는 EGFRviii 비발현 세포(293 세포)의 비(E:T비)를 1:1로 하여 PRIME EGFRviii CAR-T 세포의 세포 상해 활성을 측정한 결과를 도 4a 및 도 4b에 나타내었다. 도 4a 및 도 4b에서, NI는 Non Infection의 세포를 나타내고, 그 세포에 CAR 유전자가 도입되어 있지 않은 것을 의미한다. 또한, NI24%란, CAR의 발현률에 맞추어 해당 세포의 농도를 24%로 조정한 것을 의미하며, 마찬가지로 NI16%란, 해당 세포의 농도를 16%로 조정한 것을 의미한다.

[0412] 도 4a 및 도 4b에 나타낸 바와 같이, NG 서열을 포함하는 scFv와 SG 서열을 포함하는 scFv에서는, 발현률 및 세포 상해 활성에 큰 차이는 보이지 않았다.

[0413] 도 4a에 나타낸 바와 같이, PRIME EGFRviii CAR-T 세포는 scFv의 종류에 상관없이, EGFRviii 발현 세포에 대해서 특이적인 세포 상해 활성을 나타내었다.

[0414] 이상의 결과로부터, 이후의 실험에서는 S#024 VL15VH(SG) 및 S#026 VL25VH(SG)를 이용하였다.

[0415] <제2 세대 컨스트럭트의 검토>

[0416] 1B10-1A12 클론에 기초하는 S#024 VL15VH(SG) 및 S#026 VL25VH(SG)를 scFv로서 가지는 항EGFRviiiCAR에 대하여, 제3 세대 CAR 컨스트럭트 대신 제2 세대 CAR 컨스트럭트를 이용하는 것을 검토하였다.

[0417] 제2 세대 컨스트럭트는, N말단측으로부터 항EGFRviiiscFv, 인간 CD8막 관통 영역, 4-1BB, 및 CD3ζ세포내 시그널 전달 영역을 순차적으로 구비하는 것으로 하였다.

[0418] 발현률을 측정한 결과를 도 5a~5e에 나타내었다.

[0419] 제3 세대 컨스트럭트보다 제2 세대 컨스트럭트가 발현률이 높은 경향을 보였다.

[0420] 또한, PRIME EGFRviii CAR-T 세포와 EGFRviii 발현 세포(교아종 세포 U87MGviii 4.12 세포) 또는 EGFRviii 비발현 세포(U87MG 세포)의 비(E:T비) 대신, PRIME EGFRviii CAR-T 세포의 세포 상해 활성을 측정한 결과를 도 6a 및 도 6b에 나타내었다. 도 6a 및 도 6b에 나타낸 바와 같이, scFv의 구성 및 컨스트럭트가 제2 세대이지 제3 세대인지에 관계없이, 모든 PRIME EGFRviiiCAR-T 세포가 EGFRviii 발현 세포에 특이적으로 세포 상해 활성을 나타내었다. 한편, 도 6a 및 도 6b에서 Act T란, 활성화한 T세포를 의미하며, 대조군으로서 이용하였다.

[0421] 또한, E:T비를 1:3으로 했을 때의 배양 상청의 IFNγ 농도를 측정한 결과를 도 7에 나타내었다. 도 7에 나타낸 바와 같이, EGFRviii 발현 세포와 공생 배양한 경우에서만, PRIME EGFRviii CAR-T 세포가 IFNγ를 분비하고 있는 것을 알 수 있었다. 한편, 도 7에서의 Act T란, 활성화한 T세포를 의미하며, 대조군으로서 이용하였다.

[0422] (실시예 3) 인간 PRIME EGFRviii CAR-T 세포의 검토

[0423] scFv를 인간화하여, 서열번호 4에 기재된 아미노산 서열로 이루어지는 VH와 서열번호 5에 기재된 아미노산 서열로 이루어지는 VL를 이용한 VL25VH형 scFv를 가지는 PRIME-EGFRviii CAR-T 세포 #744를 제작하였다. scFv에서의 NG 서열은 SG 서열로 변환하고, 상기 제2 세대 컨스트럭트를 이용하였으나, 시그널 서열 및 막 관통 영역으로서 이하의 서열을 이용하였다.

[0424] 〔시그널 서열〕

[0425] IgG SS: MDWTWRILFLVAAATGAHS(서열번호 23)

[0426] 〔막 관통 영역〕

[0427] CD8a short:TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITL (서열번호 30)

[0428] 2명의 정상인 도너의 샘플에 대하여 발현률을 측정한 결과를 도 8a~8d에 나타내었다. 모든 CAR에서 높은 발현률을 나타내었다.

[0429] <ATP 어세이에 의한 종양 세포를 표적으로 한 EGFRviii CAR-T 세포의 세포 상해 활성의 측정>

[0430] 종양 세포에 대한 PRIME EGFRviii CAR-T 세포의 비(E:T비)를 다양하게 바꾸어 ATP 어세이를 행하고, PRIME EGFRviii CAR-T 세포에 의한 종양 세포에 대한 세포 상해 활성을 측정하였다.

[0431] -종양 세포 배양 배지의 조제-

[0432] MEM 배지 500 mL에, FBS50mL, 페니실린-스트렙토마이신, 리퀴드 5 mL를 각각 첨가하여, 종양 세포 배양 배지(종양 세포용 배지라고도 칭한다.)를 조제하였다.

[0433] 종양 세포(후술하는 교아종 세포 U87MGviii 4.12)를 상기에서 조제한 종양 세포용 배지에 5×10^5cell/mL가 되도록 희석하고, 콜라겐 코팅한 96 웰 플레이트에 희석한 종양 세포를 100μL/well씩 분주하였다.

[0434] PRIME EGFRviii CAR-T 세포는, 셀 카운터로 세포수 및 생존률을 측정하였다.

[0435] 셀 카운터의 데이터 및 CAR 양성률부터, CAR 양성 세포가 5×10^5cells/mL가 되도록 종양 세포용 배지에 현탁하여, CAR-T 세포액을 조제하였다.

[0436] CAR-T 세포액을 종양 세포용 배지에서 단계 희석한 것을, 종양 세포를 분주한 웰 플레이트에 100μL/well씩 첨가하여 E:T비가 0:1, 0.01:1, 0.03:1, 0.1:1, 0.3:1, 또는 1:1이 되도록 조제하였다.

[0437] 상기 96 웰 플레이트를 37℃, 5vol% CO_2 설정의 CO_2 인큐베이터에 넣고 48시간 공생 배양을 행하였다.

[0438] CO_2 인큐베이터로부터 꺼낸 웰 플레이트로부터 종양 세포 배양 배지를 제거하고, PBS로 세정하였다. 동결 보존하고 있던 CellTiter-Gro Reagent(프로메가사제)를 차광하여 융해한 후, CellTiter-Gro buffer(프로메가사제) 10mL에 CellTiter-Gro substrate(프로메가사제) 1바이알을 전량 투입하고 혼합하여, 96 웰 플레이트에 100μL/well씩 분주하였다.

[0439] 96 웰 플레이트의 뚜껑 위에서부터 알루미늄 호일을 씌우고 25℃, 200rpm(revolutions per minute)으로 10분간 진동시켜, ATP와 반응시켰다. 반응 후, 바로 플레이트 리더로 발광을 측정(Shake 5초(60rpm), Delay 30초)하여, 생세포수를 측정하였다.

[0440] 또한, 대조군으로서 U87MGviii 세포 대신 EGFRviii를 발현하고 있지 않은 신경교아종 세포주 U87MG 세포를 이용하고, PRIME EGFRviii CAR-T 세포 대신 활성화 T세포를 이용하여, 동일하게 측정하였다. 결과를 도 9a~9d에 나타내었다.

[0441] PRIME EGFRviii CAR-T 세포는, EGFRviii 발현 특이적으로 강한 세포 상해 활성을 나타내었다.

[0442] (실시예 4) 항EGFRviiiCAR-T 세포의 in vivo 항종양 활성의 평가

[0443] <교아종 세포 U87MGviii 4.12에서의 EGFRviii의 발현의 확인>

[0444] 〔유세포 분석 해석〕

[0445] 세포 상해 활성을 조사하는 어세이나, in vivo에서의 항종양 활성을 조사하기 위한 동물 모델을 제작하는데 이용하기 위해, 교아종 세포 U87MGviii 4.12(이하, 간단히 「종양 세포」라고도 한다.)의 EGFRviii의 발현을 확인하였다. 구체적으로는, 항인간 EGFRviii 항체의 하이브리도마 배양 상청(클론 1B10-1A12)을 50uL/샘플에 첨가한 후, 2차 항체로서 APC(allophycocyanin) 표식한 항마우스 IgG 항체(Cat. No. 405308 BioLegend사제)를 50ng/샘플에 염색을 행하고, 유세포 분석 해석을 실시했다.

[0446] 상기 유세포 분석기는 CytoFLEX S(Beckman Coulter사제)를 이용하고, 데이터 해석은 FlowJo software(Tree Star사)를 이용하였다.

[0447] (결과)

[0448] 결과를 도 10에 나타내었다. 80% 이상의 종양 세포가 EGFRviii를 발현하고 있음이 확인되었다.

[0449] <마우스 종양 모델을 이용한 치료 효과>

[0450] NGO 유전자와 B2M 유전자의 이중 결손 마우스(NOG-lab/b2m dKO mouse)에, 교아종 세포 U87MGviii 4.12를 1.0×10^6개 마우스 피하에 접종하고, 종양 모델 마우스를 제작했다.

[0451] 피하 접종 10일 후, 미처치군으로서 Hank's balanced salt solution(HBSS)를, 활성화 T세포 투여군으로서 활성화 T세포 1.25×10^7개를, PRIME EGFRviii CAR-T 세포(#744) 투여군으로서 EGFRviii CAR-T 세포 1×10^7개(CAR 발현률 80%의 세포군으로부터 1.25×10^7개)를 각 군 5마리의 종양 모델 마우스의 정맥내에 투여하였다.

[0452] 그 후, 모델 마우스의 종양 체적과 체중을 주 2회 측정하여, 체중이 20% 감소, 또는 현저하게 쇠약함을 보인 모델 마우스는 해부하여, 해부 사진과 종양 전이의 유무를 확인하였다.

[0453] 종양 세포를 접종한 종양 모델 마우스의 등 부분의 사진을 도 11에 나타내었다.

[0454] 종양 모델 마우스의 종양 체적의 변화의 결과를 도 12a~12c에 나타내었다. 가로축은 종양 세포를 마우스에 접종한 후의 일수(마우스에 접종한 날을 0일째로 하였다.), 세로축은 종양 체적(종양의 타원에서 가장 긴 직경×(종양의 짧은 축)^2/2(mm^3))를 나타낸다. 또한, 각 데이터의 번호는 개체 식별 번호이다.

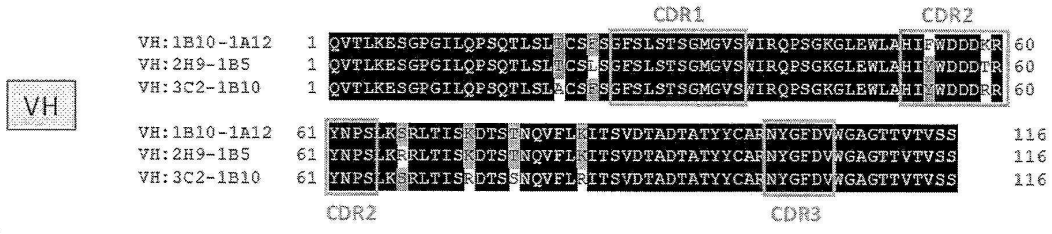
[0455] 미처치군에서는 종양 세포가 생착하지 않은 1열을 제외하고 종양 체적이 증가하였다. 활성화 T세포 투여군에서는 모든 예에서 종양 체적의 대폭적인 증가를 보였다. 한편, PRIME EGFRviii CAR-T 세포 투여군에서는 종양 체

적은 거의 증가하지 않았다.

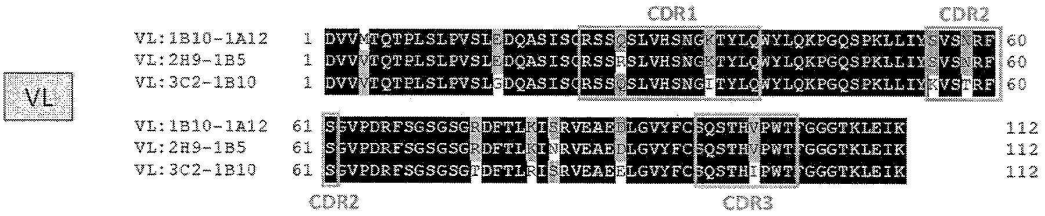
[0456] 도 11 및 도 12a~12c에 나타낸 바와 같이, 종양 모델 마우스에서 PRIME EGFRviii CAR-T 세포(항EGFRviiiCAR-IL-7/CCL19 발현 T세포)가 우수한 항종양 활성을 나타내는 것이 확인되었다.

도면

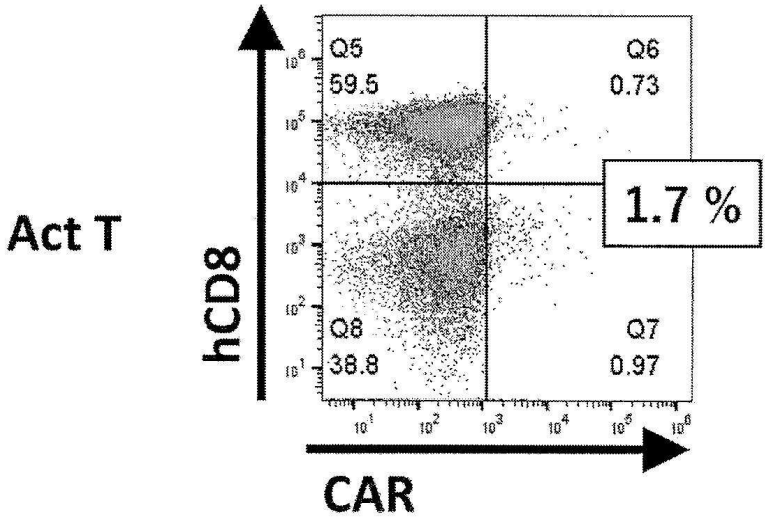
도면1a



도면1b

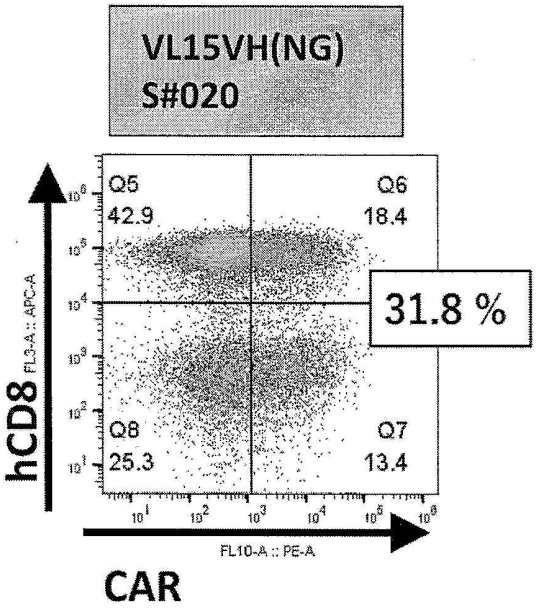


도면2a



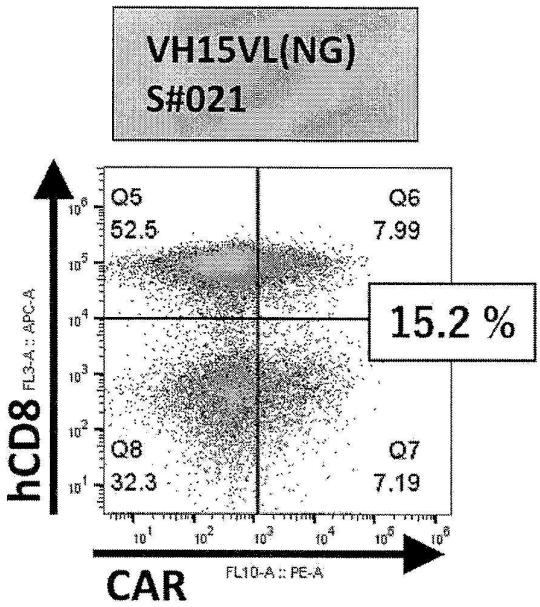
도면2b

NG서열



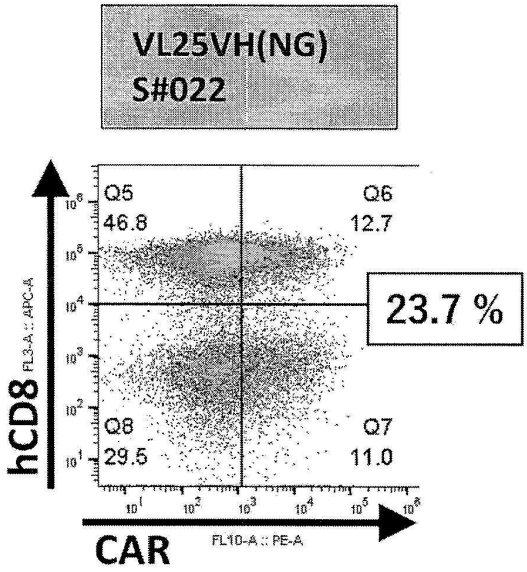
도면2c

NG서열



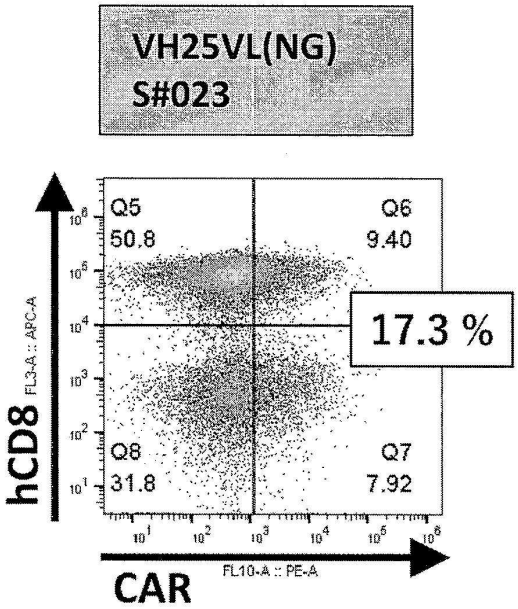
도면2d

NG서열



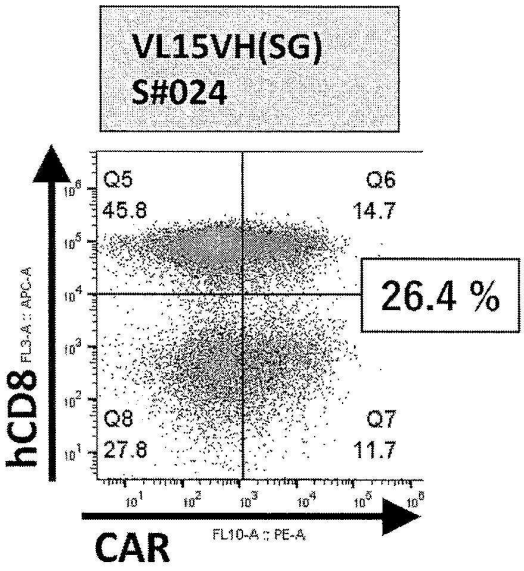
도면2e

NG서열



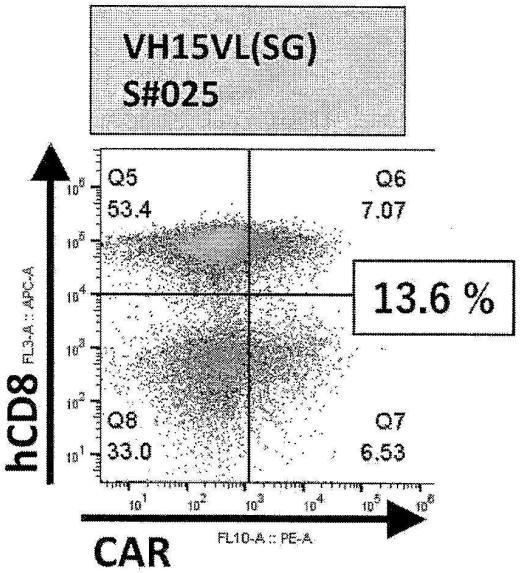
도면2f

SG서열



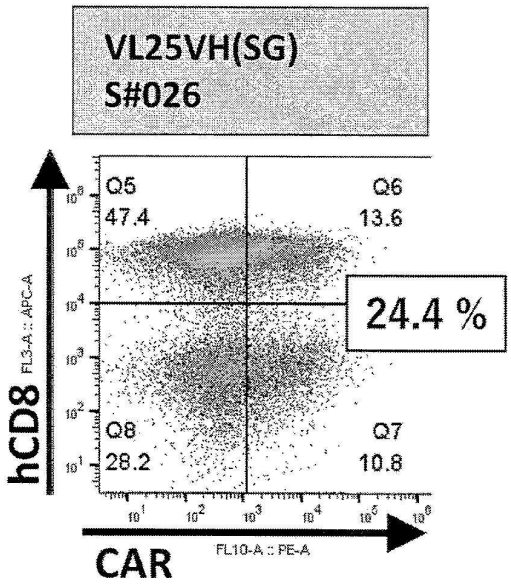
도면2g

SG서열



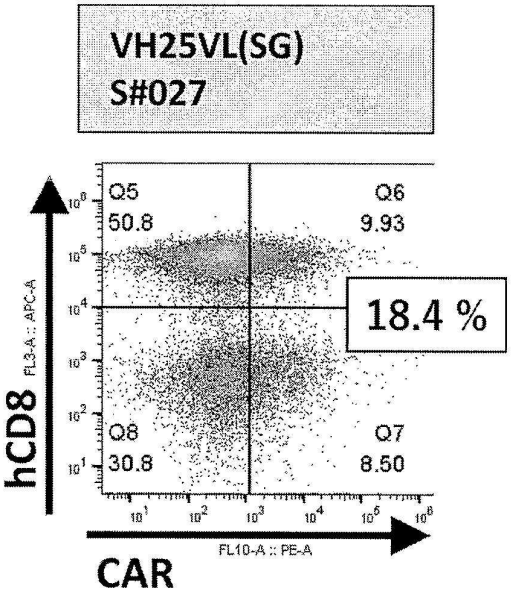
도면2h

SG서열

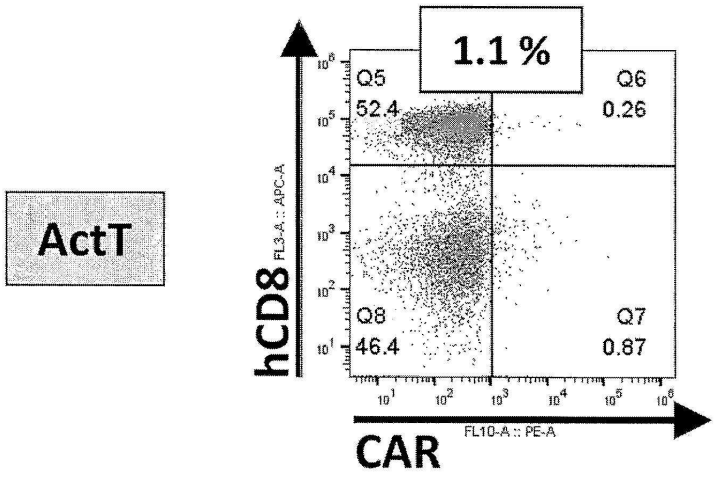


도면2i

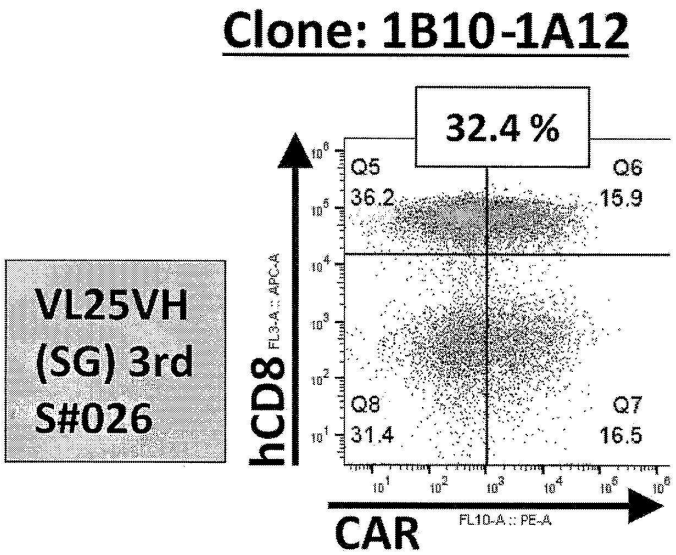
SG서열



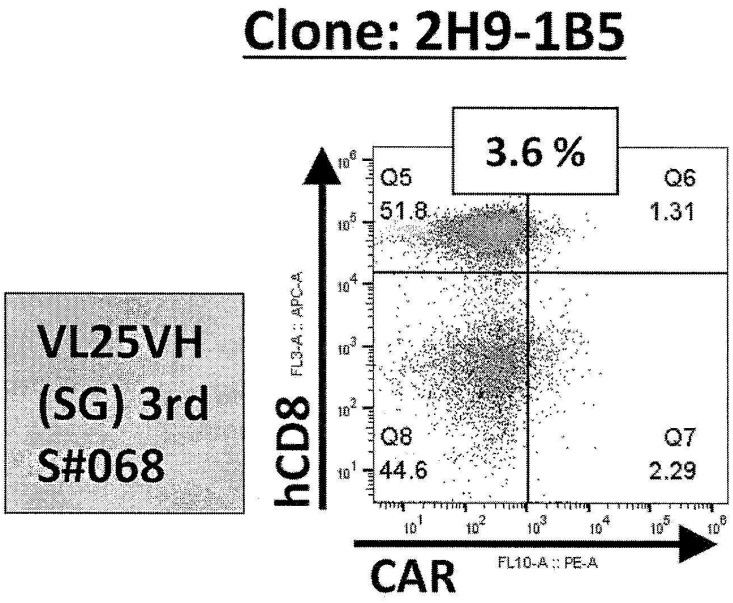
도면3a


ActT
1.1 %
Q5
52.4
Q6
0.26
Q8
46.4
Q7
0.87
hCD8
FL3-A :: APC-A
CAR
FL10-A :: PE-A

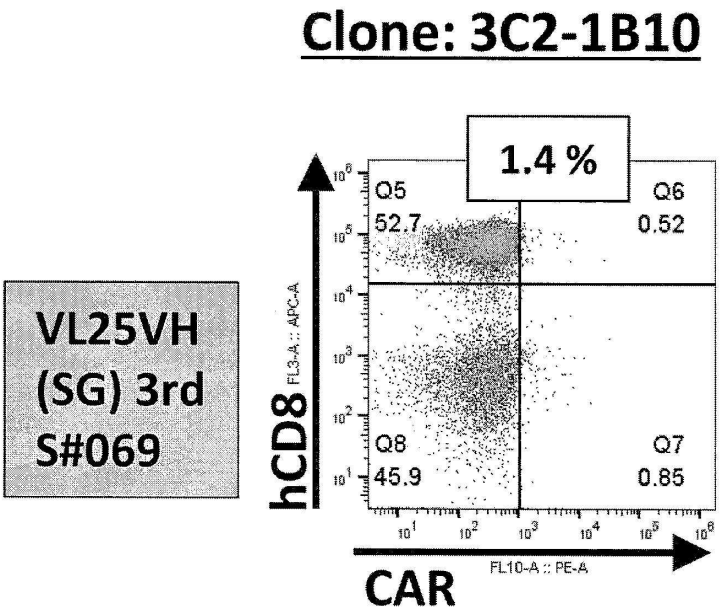
도면3b


Clone: 1B10-1A12
VL25VH
(SG) 3rd
S#026
32.4 %
Q5
36.2
Q6
15.9
Q8
31.4
Q7
16.5
hCD8
FL3-A :: APC-A
CAR
FL10-A :: PE-A

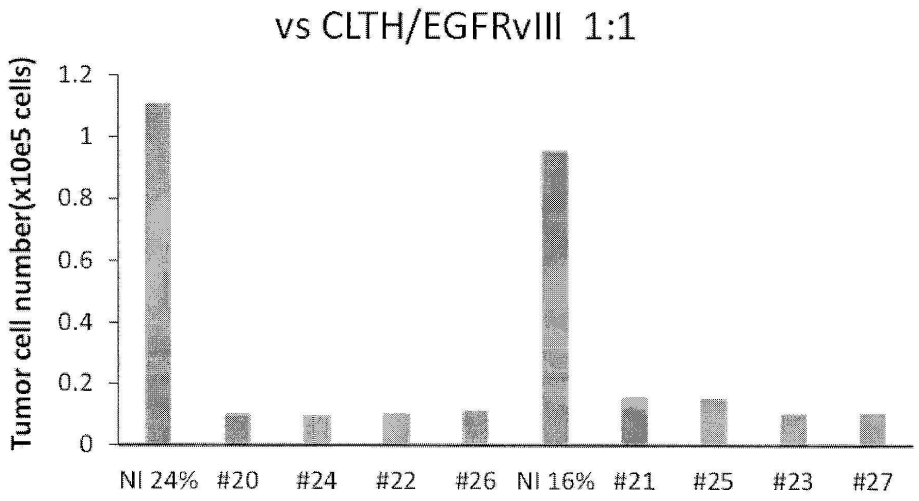
도면3c


Clone: 2H9-1B5
VL25VH
(SG) 3rd
S#068
3.6 %
Q5
51.8
Q6
1.31
Q8
44.6
Q7
2.29
hCD8
FL3-A :: APC-A
CAR
FL10-A :: PE-A

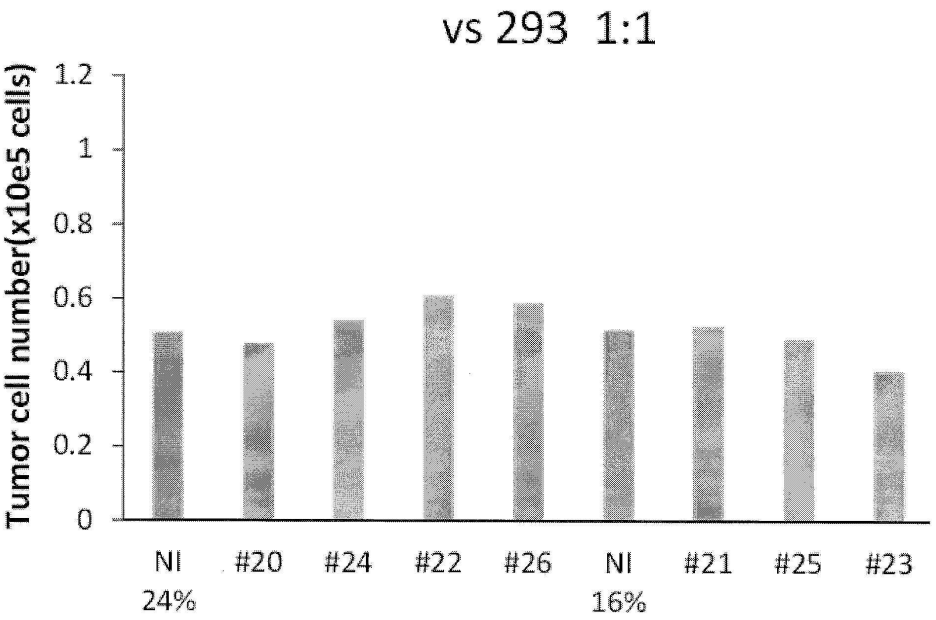
도면3d


Clone: 3C2-1B10
VL25VH
(SG) 3rd
S#069
1.4 %
Q5
52.7
Q6
0.52
Q8
45.9
Q7
0.85
hCD8
FL3-A :: APC-A
CAR
FL10-A :: PE-A

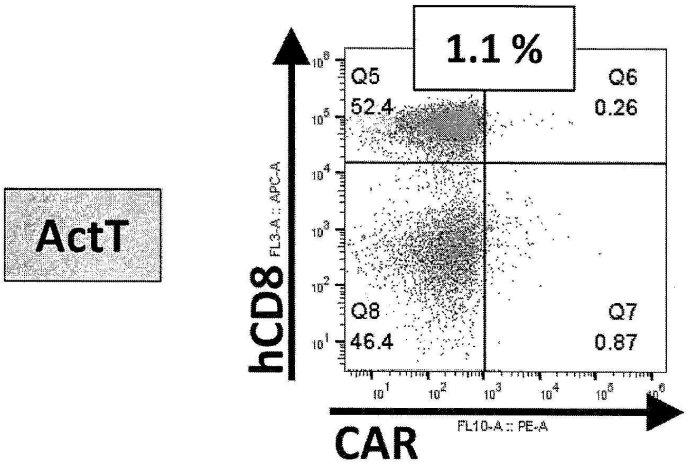
도면4a


vs CLTH/EGFRvIII 1:1
Tumor cell number(x10e5 cells)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
NI 24%
#20
#24
#22
#26
NI 16%
#21
#25
#23
#27

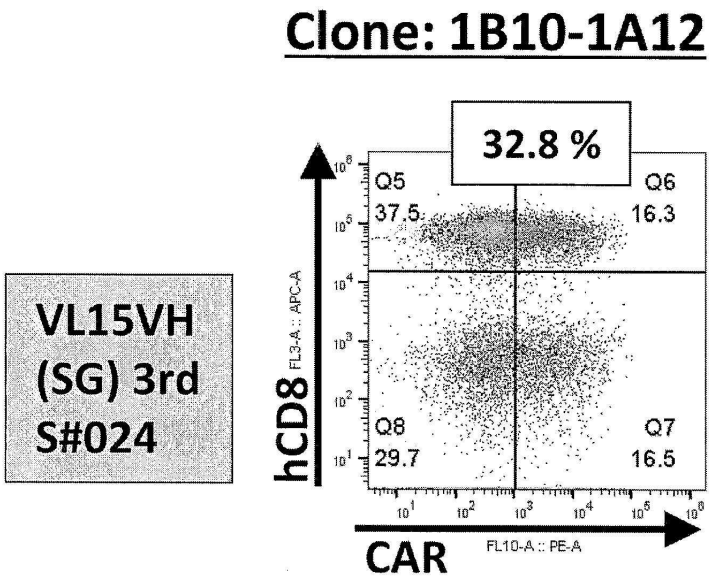
도면4b


vs 293 1:1
Tumor cell number(x10e5 cells)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
NI 24%
#20
#24
#22
#26
NI 16%
#21
#25
#23

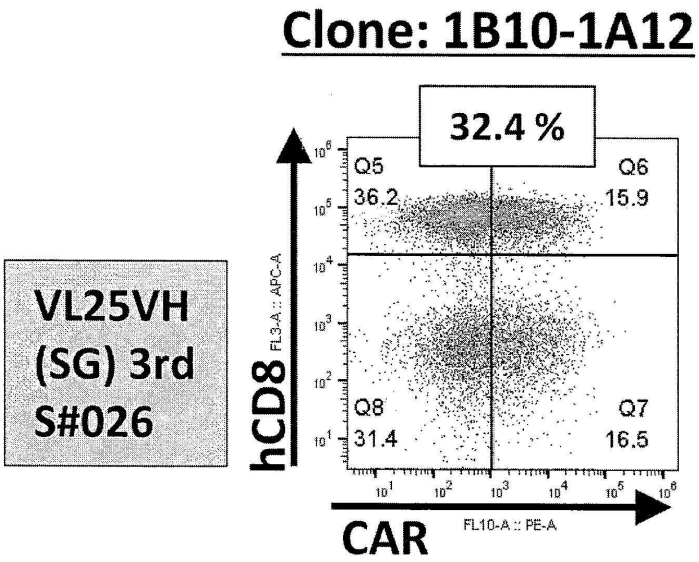
도면5a


ActT
1.1 %
Q5
52.4
Q6
0.26
Q8
46.4
Q7
0.87
hCD8
FL3-A :: APC-A
CAR
FL10-A :: PE-A

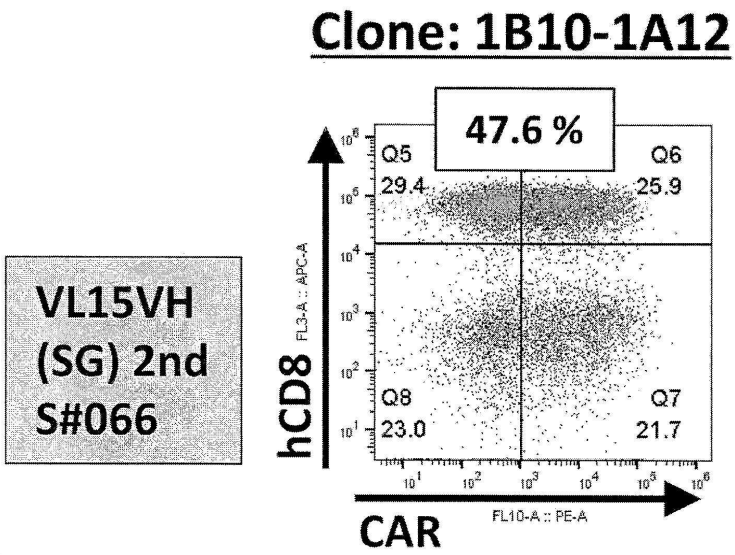
도면5b


Clone: 1B10-1A12
VL15VH
(SG) 3rd
S#024
32.8 %
Q5
37.5
Q6
16.3
Q8
29.7
Q7
16.5
hCD8
FL3-A :: APC-A
CAR
FL10-A :: PE-A

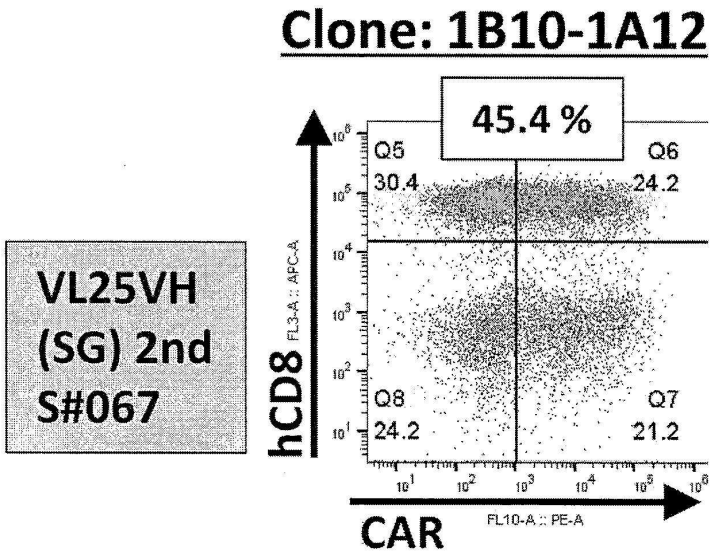
도면5c


Clone: 1B10-1A12
VL25VH
(SG) 3rd
S#026
32.4 %
Q5
36.2
Q6
15.9
Q8
31.4
Q7
16.5
hCD8
FL3-A :: APC-A
CAR
FL10-A :: PE-A

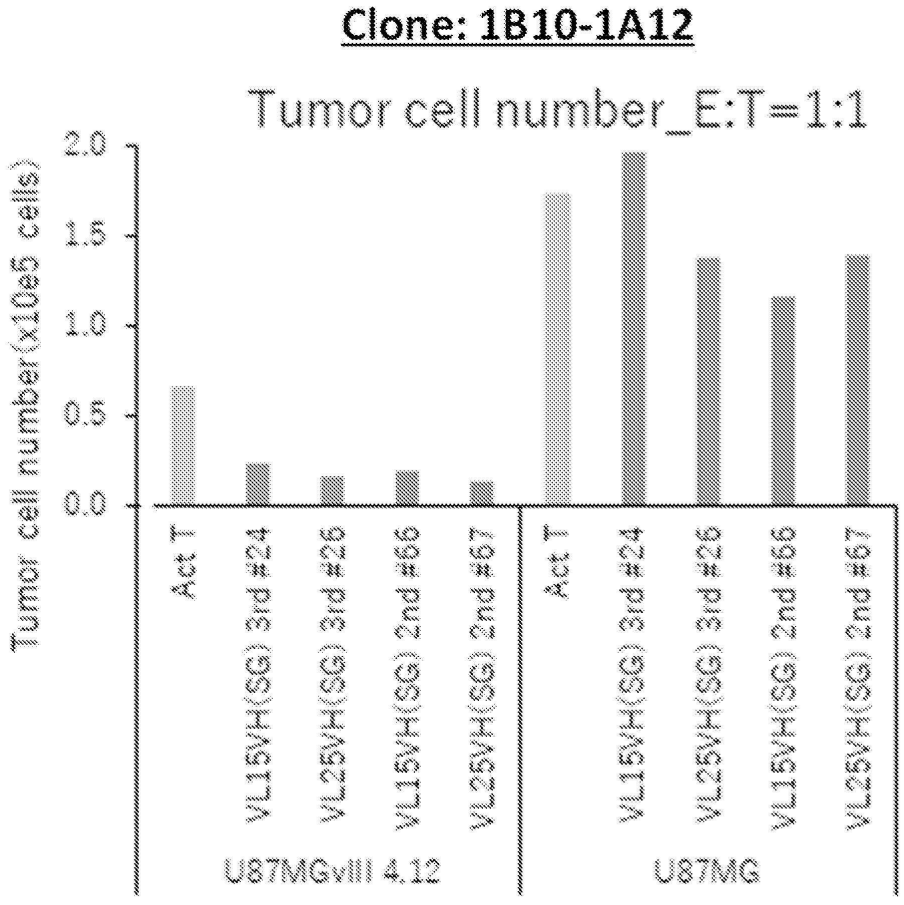
도면5d


Clone: 1B10-1A12
VL15VH
(SG) 2nd
S#066
47.6 %
Q5
29.4
Q6
25.9
Q8
23.0
Q7
21.7
hCD8
FL3-A :: APC-A
CAR
FL10-A :: PE-A

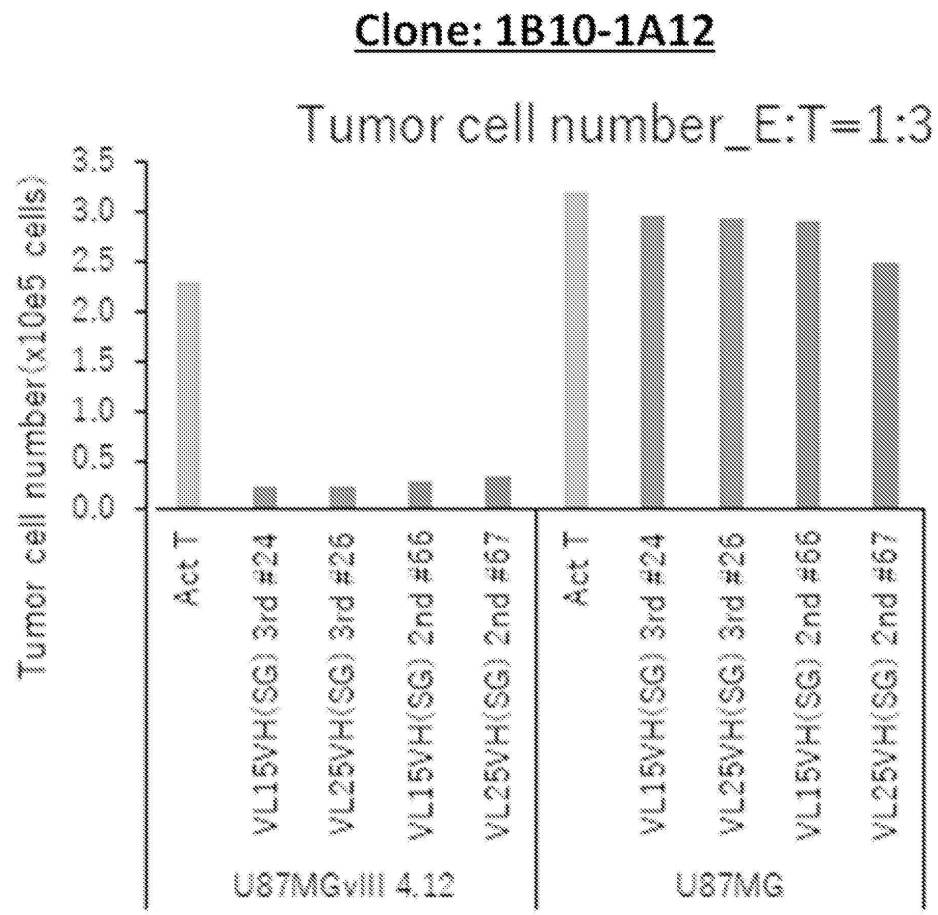
도면5e


Clone: 1B10-1A12
VL25VH (SG) 2nd S#067
45.4 %
Q5
30.4
Q6
24.2
Q8
24.2
Q7
21.2
hCD8
FL3-A :: APC-A
CAR
FL10-A :: PE-A

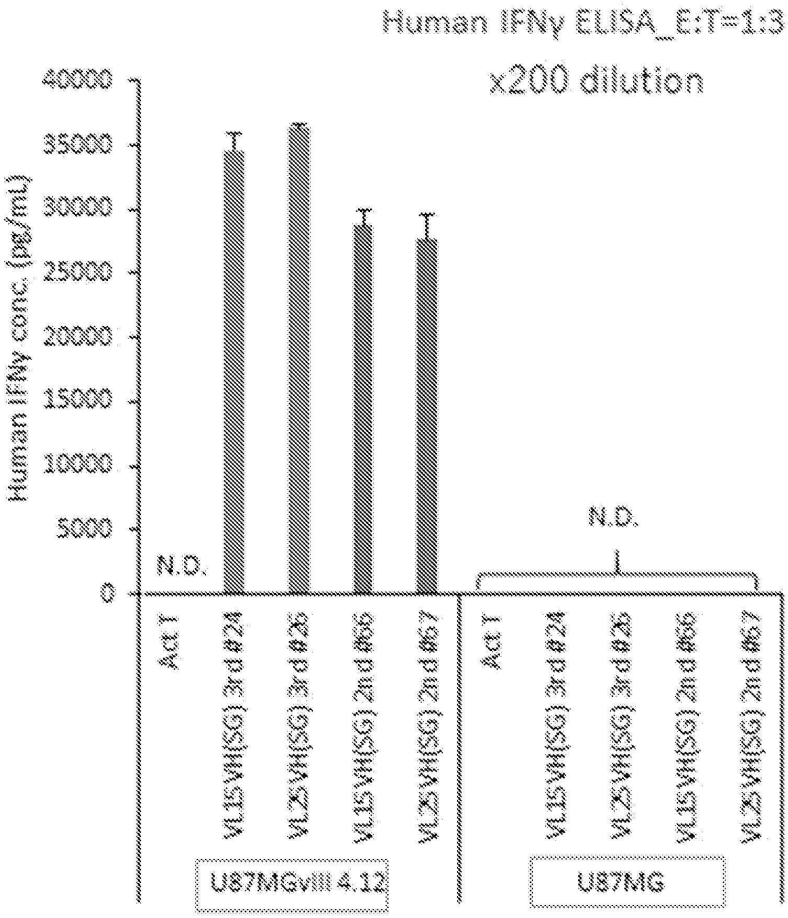
도면6a


Clone: 1B10-1A12
Tumor cell number_E:T=1:1
Tumor cell number(x10e5 cells)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Act T
VL15VH(SG) 3rd #24
VL25VH(SG) 3rd #26
VL15VH(SG) 2nd #66
VL25VH(SG) 2nd #67
U87MGvIII 4.12
U87MG

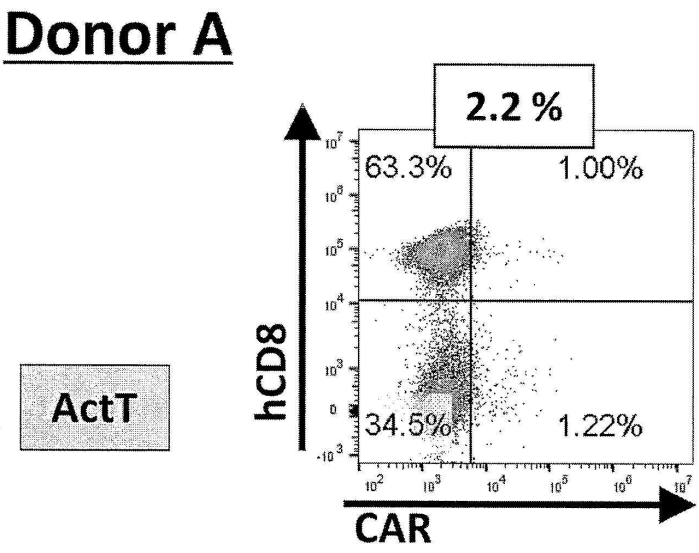
도면6b


Clone: 1B10-1A12
Tumor cell number_E:T=1:3
Tumor cell number(x10e5 cells)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
Act T
VL15VH(SG) 3rd #24
VL25VH(SG) 3rd #26
VL15VH(SG) 2nd #66
VL25VH(SG) 2nd #67
U87MGvIII 4.12
Act T
VL15VH(SG) 3rd #24
VL25VH(SG) 3rd #26
VL15VH(SG) 2nd #66
VL25VH(SG) 2nd #67
U87MG

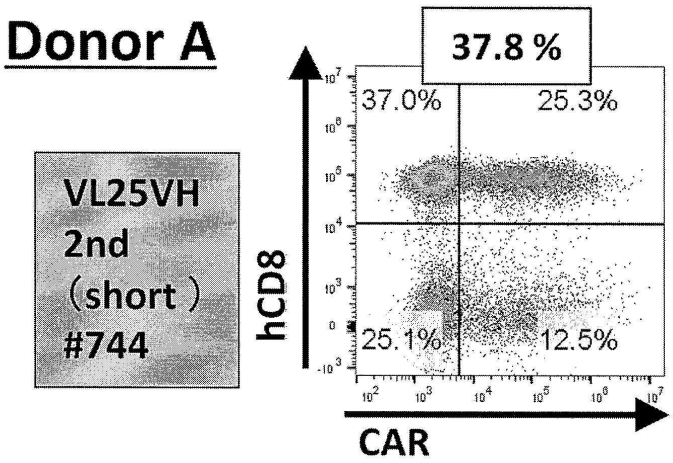
도면7


Human IFNγ ELISA_E:T=1:3
x200 dilution
Human IFNγ conc. (pg/mL)
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
N.D.
N.D.
Act T
VL15VH(SG) 3rd #24
VL25VH(SG) 3rd #26
VL15VH(SG) 2nd #66
VL25VH(SG) 2nd #67
Act T
VL15VH(SG) 3rd #24
VL25VH(SG) 3rd #26
VL15VH(SG) 2nd #66
VL25VH(SG) 2nd #67
U87MGvIII 4.12
U87MG

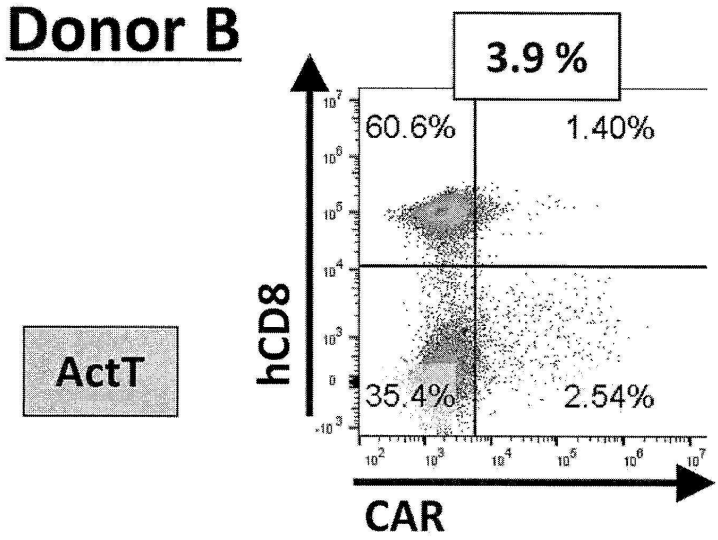
도면8a


Donor A
ActT
2.2 %
63.3%
1.00%
34.5%
1.22%
hCD8
CAR

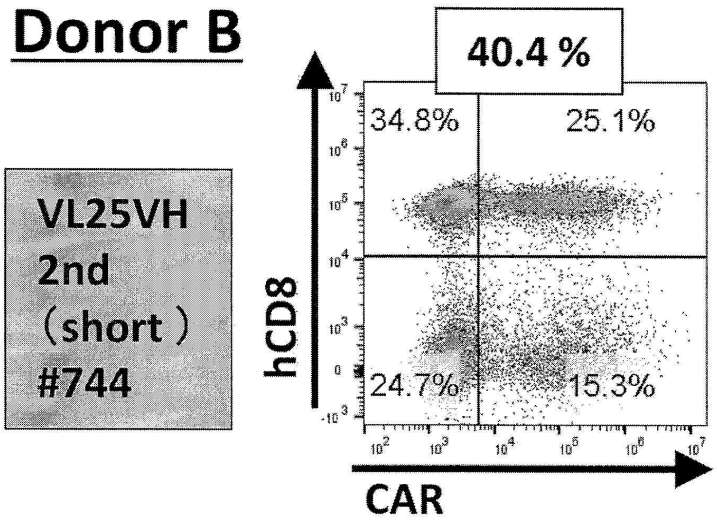
도면8b



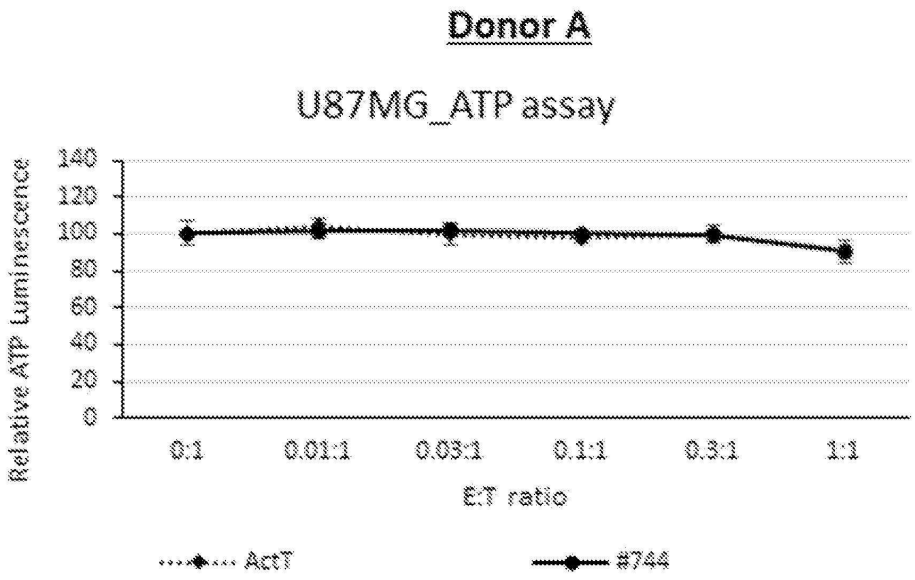
도면8c



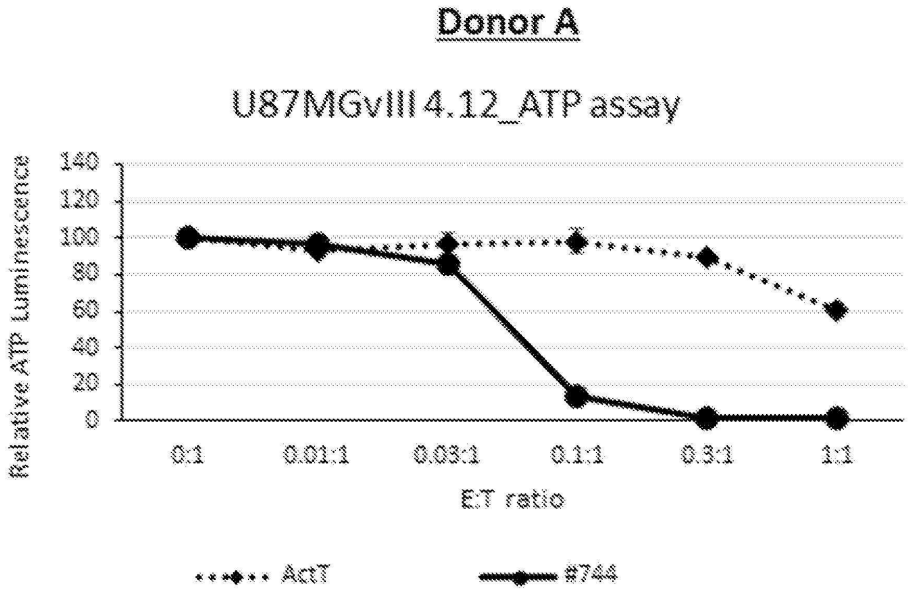
도면8d



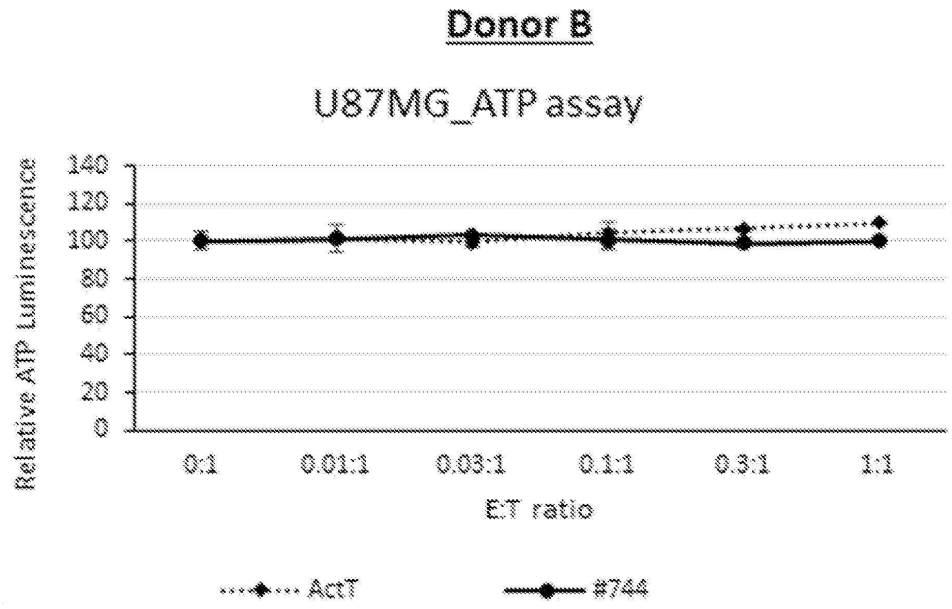
도면9a


Donor A
U87MG_ATP assay
Relative ATP Luminescence
140
120
100
80
60
40
20
0
0:1
0.01:1
0.03:1
0.1:1
0.3:1
1:1
E:T ratio
ActT
#744

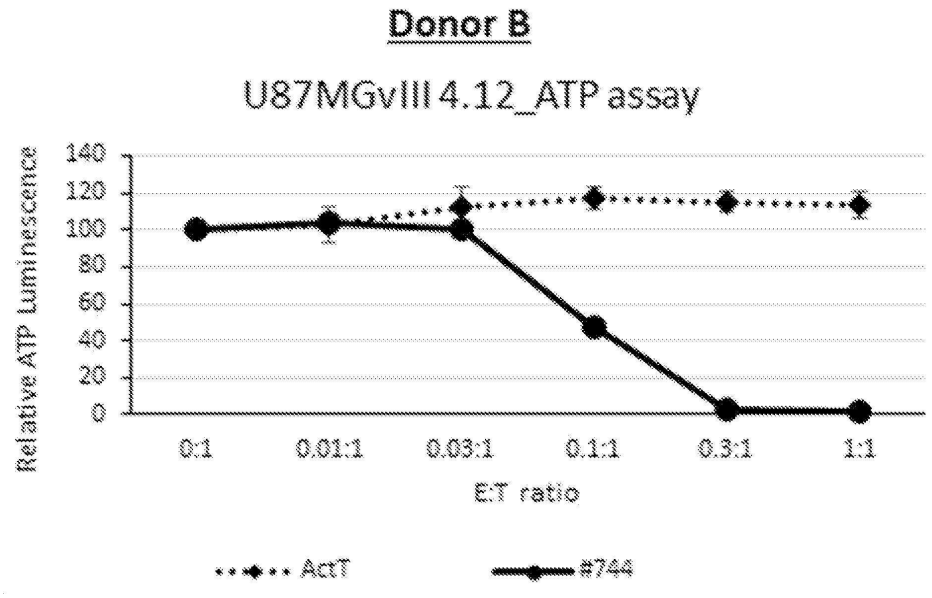
도면9b


Donor A
U87MGvIII 4.12_ATP assay
Relative ATP Luminescence
140
120
100
80
60
40
20
0
0:1
0.01:1
0.03:1
0.1:1
0.3:1
1:1
E:T ratio
ActT
#744

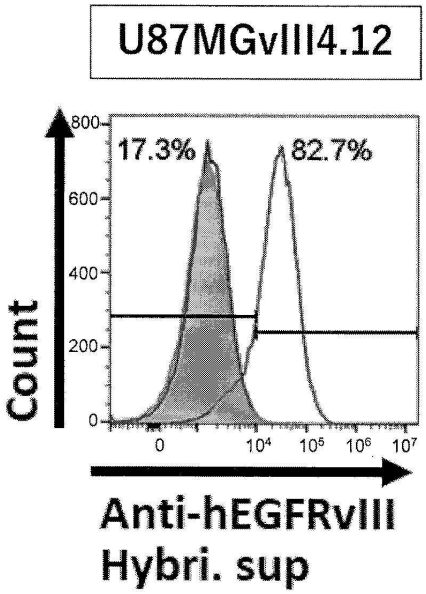
도면9c


Donor B
U87MG_ATP assay
Relative ATP Luminescence
140
120
100
80
60
40
20
0
0:1
0.01:1
0.03:1
0.1:1
0.3:1
1:1
E:T ratio
ActT
#744

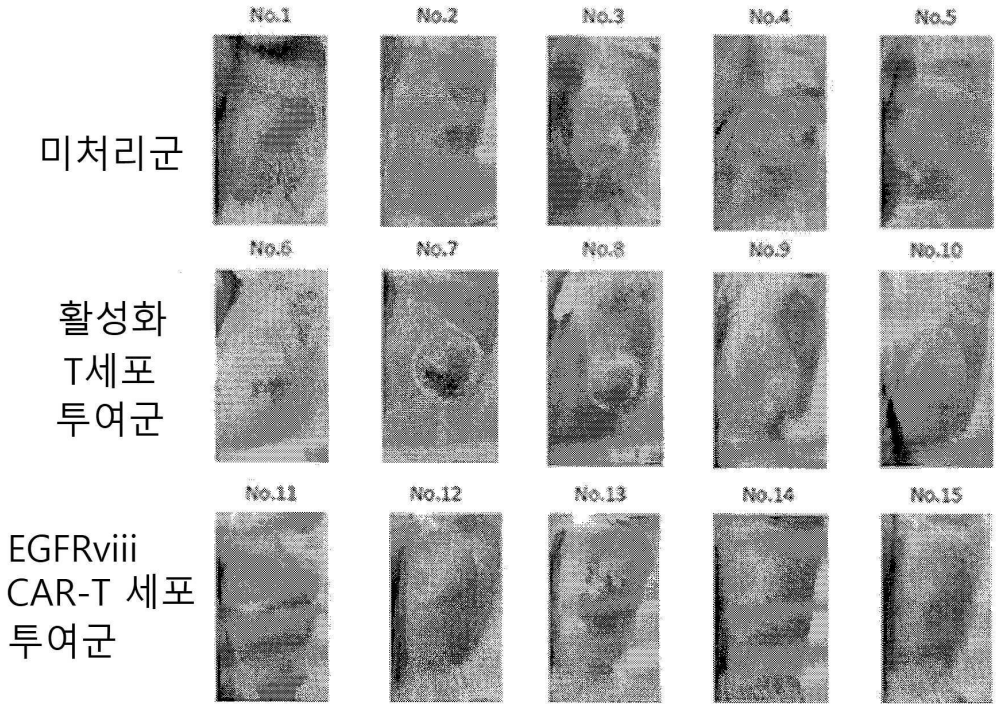
도면9d


Donor B
U87MGvIII 4.12_ATP assay
Relative ATP Luminescence
140
120
100
80
60
40
20
0
0:1
0.01:1
0.03:1
0.1:1
0.3:1
1:1
E:T ratio
ActT
#744

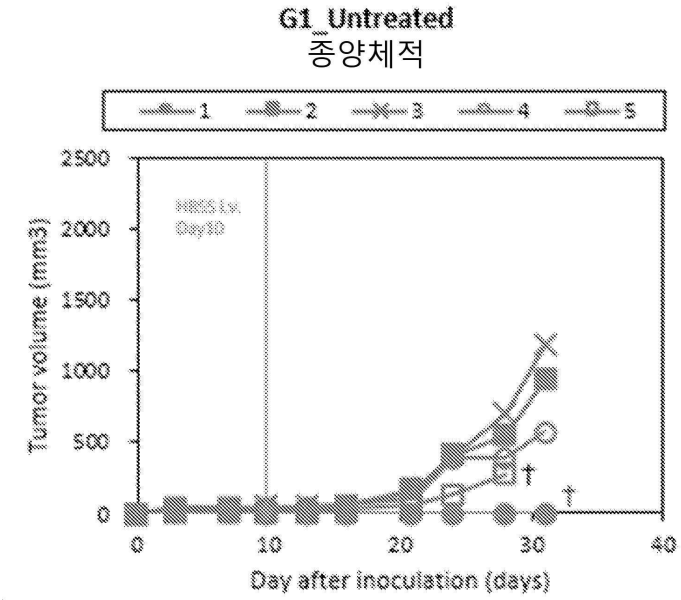
도면10


U87MGvIII4.12
17.3%
82.7%
800
600
400
200
0
Count
0
10⁴
10⁵
10⁶
10⁷
Anti-hEGFRvIII
Hybri. sup

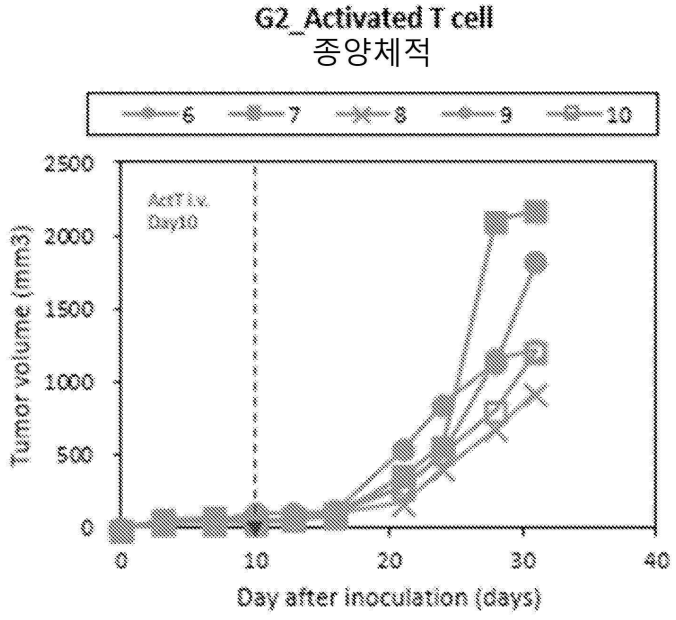
도면11


No.1
No.2
No.3
No.4
No.5
미처리군
No.6
No.7
No.8
No.9
No.10
활성화
T세포
투여군
No.11
No.12
No.13
No.14
No.15
EGFRviii
CAR-T 세포
투여군

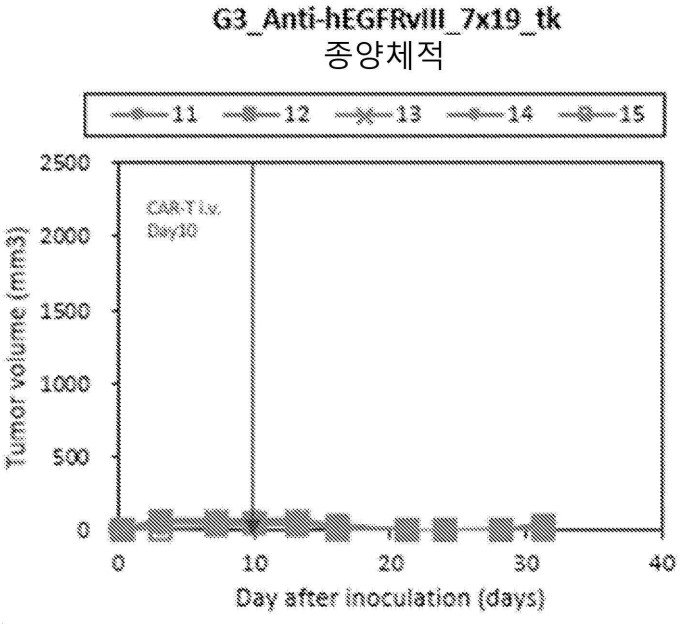
도면12a


G1_Untreated
종양체적
1
2
3
4
5
HBSS i.v.
Day10
Tumor volume (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
Day after inoculation (days)

도면12b


G2_Activated T cell
종양체적
6
7
8
9
10
ActT i.v.
Day10
Tumor volume (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
Day after inoculation (days)

도면12c


G3_Anti-hEGFRvIII_7x19_tk
종양체적
11
12
13
14
15
2500
2000
1500
1000
500
0
CAR-T i.v.
Day10
Tumor volume (mm3)
0
10
20
30
40
Day after inoculation (days)

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.