(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0070408
(43) 공개일자 2024년05월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2803 (2013.01)
A61K 47/6803 (2023.08)
(21) 출원번호 10-2023-0148227
(22) 출원일자 2023년10월31일
심사청구일자 2023년10월31일
(30) 우선권주장
1020220143216 2022년10월31일 대한민국(KR)

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
김효리
서울특별시 광진구 아차산로 262, C동 4305호
고경남
서울특별시 송파구 올림픽로 435, 226동 1003호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인더웨이브

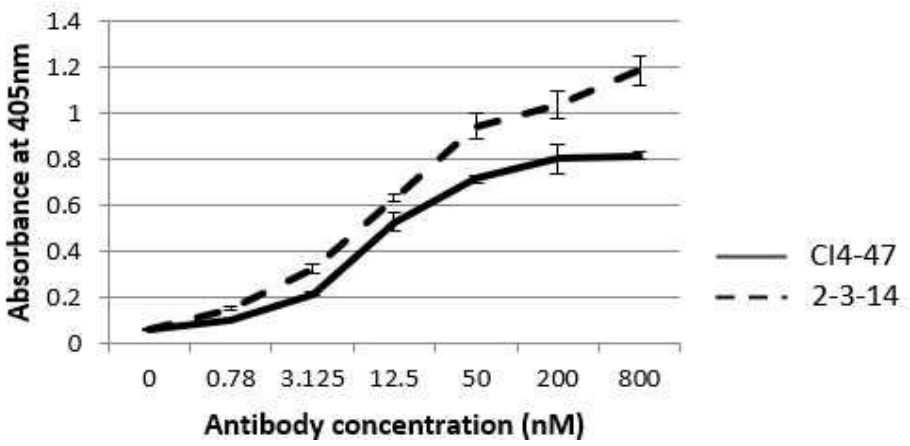
전체 청구항 수 : 총 32 항

(54) 발명의 명칭 **CD22에 결합하는 항체, 이를 포함하는 이중특이적 항체, 키메라 항원 수용체, 항체 약물 복합체 및 이의 용도**

(57) 요 약

CD22에 결합하는 항체, 이를 포함하는 이중특이적 항체, 키메라 항원 수용체, 항체 약물 복합체 및 이의 용도에 관한 것으로, 일 양상에 따르면, CD19 치료제 불응 환자에 대해서도 효과적으로 암 치료 효과를 가질 수 있다. 또한, CD22 CAR NK cell 또는 이중 특이적 CD22/CD19 CAR NK cell을 이용할 경우, 현저히 향상된 암세포 수 감소 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 16/2809 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2317/73 (2013.01)
(72) 발명자
김나영
서울특별시 광진구 아차산로78길 10, 102동 504호
박성훈
서울특별시 광진구 면목로 32-5, 204호
김민송
부산광역시 북구 백양대로1102번길 24, D동 202호
한민아
부산광역시 기장군 철마면 고촌로 11, 211동 601호
이아늠
서울특별시 강북구 한천로170길 1-9, 2층

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711142287
과제번호	2018R1C1B6008852
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	CD19과 CD123에 대한 이중표적 키메라 항원 수용체를 발현시킨 NK 세포의 개발 및 유효성 평가
기 여 율	1/1
과제수행기관명	울산대학
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열로 표시되는 CDR1 영역, 서열번호 3또는 4의 아미노산 서열로 표시되는 CDR2 영역 및 서열번호 5 또는 6의 아미노산 서열로 표시되는 CDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변부위; 및

서열번호 7 내지 12 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 CDR1 영역, 서열번호 13 내지 15 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 CDR2 영역 및 서열번호 16 내지 19 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 CDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 부위;를 포함하는 CD22에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 20 내지 22로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 경쇄 가변부위; 및

서열번호 23 내지 29로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 중쇄 가변부위;를 포함하는 것인, CD22에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간화한 것인, CD22에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 제1항의 항체에 인간 불변 카파 영역(Cκ) 및 HA 태그(Hemagglutinin tag) 단백질; 또는 인간면역글로불린 중쇄 영역과 경쇄 영역;을 더 포함하는, CD22에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 30 및 43 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 것인, CD22에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편.

청구항 6

항-CD22 항체 또는 이의 단편; 및

항-cotinine 항체 또는 이의 단편을 포함하고,

상기 항-CD22 항체 또는 이의 단편은 청구항 1 내지 5 중 어느 하나의 항체 또는 이의 단편인 것인, 항-CD22 및 항-cotinine 이중특이적 항체.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 항-CD22 및 항-cotinine 이중특이적 항체는 서열번호 44 또는 46의 아미노산 서열로 표시되는 것인, 항-CD22 및 항-cotinine 이중특이적 항체.

청구항 8

항-CD22 항체 또는 이의 단편; 및

항-CD3 항체 또는 이의 단편을 포함하고,

상기 항-CD22 항체 또는 이의 단편은 청구항 1 내지 5 중 어느 하나의 항체 또는 이의 단편인 것인, 항-CD22 및 항-CD3 이중특이적 항체.

청구항 9

제8항에 있어서, 항-CD22 및 항-CD3 이중특이적 항체 또는 이의 단편은 서열번호 47 내지 54로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 것인, 항-CD22 및 항-CD3 이중특이적 항체.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 11

제10항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

청구항 12

제11항의 벡터로 형질전환된 재조합 세포.

청구항 13

항원 결합 도메인(antigen binding domain);

막관통 도메인(transmembrane domain);

힌지 도메인(hinge domain);

세포내 보조 자극 도메인(co-stimulatory domain); 및

세포 내 신호전달 도메인(intracellular signal transduction domain)을 포함하는 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor: CAR)로서,

상기 항원 결합 도메인은 CD22에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편인 것인, 키메라 항원 수용체.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 항원 결합 도메인은 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열로 표시되는 CDR1 영역, 서열번호 3 또는 4의 아미노산 서열로 표시되는 CDR2 영역 및 서열번호 5 또는 6의 아미노산 서열로 표시되는 CDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변부위; 및

서열번호 7 내지 12 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 CDR1 영역, 서열번호 13 내지 15 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 CDR2 영역 및 서열번호 16 내지 19 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 CDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 부위;를 포함하는 것인, 키메라 항원 수용체.

청구항 15

제13항에 있어서, 상기 항원 결합 도메인은 서열번호 20 내지 22로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 경쇄 가변부위; 및

서열번호 23 내지 29로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 중쇄 가변부위;를 포함하는 것인, 키메라 항원 수용체.

청구항 16

제13항에 있어서, 상기 항원 결합 도메인은 힌지 도메인에 의해 막 관통 도메인에 연결되는 것인, 키메라 항원 수용체.

청구항 17

제13항에 있어서, 상기 막관통 도메인의 C말단 부분에 상기 세포내 보조 자극 도메인;과 세포 내 신호전달 도메인이 순차적으로 결합한 것인, 키메라 항원 수용체.

청구항 18

제13항에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체는 서열번호 56의 아미노산 서열로 표시되는 것인, 키메라 항원 수용

체.

청구항 19

제13항에 있어서, 상기 항원 결합 도메인은 CD19 결합 도메인을 더 포함하는 것인, CD19 및 CD22를 표적으로 하는 이중특이적 키메라 항원 수용체.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 CD19 결합 도메인은 CD22에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인과 링커(linker)로 연결된 것인, CD19 및 CD22를 표적으로 하는 이중특이적 키메라 항원 수용체.

청구항 21

제19항에 있어서, 상기 이중특이적 키메라 항원 수용체는 상기 CD19 결합 도메인의 C말단과 CD22 결합 도메인의 N말단을 링커로 연결한 것인, CD19 및 CD22를 표적으로 하는 이중특이적 키메라 항원 수용체.

청구항 22

제19항에 있어서, 상기 이중특이적 키메라 항원 수용체는 상기 CD22 결합 도메인의 C말단과 CD19 결합 도메인의 N말단을 링커로 연결한 것인, CD19 및 CD22를 표적으로 하는 이중특이적 키메라 항원 수용체.

청구항 23

제19항에 있어서, 상기 이중특이적 키메라 항원 수용체는 CD19에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 가변부위 - CD22에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 가변부위 - CD22에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 가변부위 - CD19에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 가변부위 순서로 순차적 연결된 것을 특징으로 하는, CD19 및 CD22를 표적으로 하는 이중특이적 키메라 항원 수용체.

청구항 24

제19항에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체는 서열번호 57 내지 59으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 것인, 이중특이적 키메라 항원 수용체.

청구항 25

제13항 내지 제24항 중 어느 한 항의 키메라 항원 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 26

제25항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

청구항 27

제26항의 벡터로 형질전환된 재조합 세포.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 세포는 NK 세포, T 세포, 세포독성 T 세포 및 조절 T 세포 중 어느 하나인 것인, 세포.

청구항 29

CD22 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 이를 포함하는 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 약물 모이어티; 및 상기 약물 모이어티와 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 연결하는 링커를 포함하는 항체 약물 접합체

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 링커는 절단성 링커 또는 비절단성 링커인 것인, 접합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염

청구항 31

제1항의 CD22에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편; 제6항의 항-CD22 및 항-cotinine 이중특이적 항체; 제11항의 항-CD22 및 항-CD3 이중특이적 항체; 제13항의 CD22에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체; 제18항의 CD19 및 CD22를 표적으로 하는 이중특이적 키메라 항원 수용체; 또는 제28항의 항체 약물 결합체;를 포함하는 B 세포에 의해 매개되는 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 B 세포에 의해 매개되는 질병은 종양, 림프종, 비호치킨 림프종(non-Hogkins lymphoma: NHL), 공격적 NHL, 재발성 공격적 NHL, 재발성 지연성 NHL, 불응성 NHL, 불응성 지연성 NHL, 만성 림프성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia: CLL), 소형 림프성 림프종, 백혈병, 모발성 세포 백혈병(hairy cell leukemia: HCL), 급성 림프성 백혈병(acute lymphocytic leukemia: ALL), 버킷트 림프종 및 외투 세포 림프종로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 B 세포에 의해 매개되는 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 신규한 CD22에 결합하는 항체, 이를 포함하는 이중특이적 항체, 키메라 항원 수용체, 항체 약물 복합체 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] CD22는 NHL, 급성 림프모구백혈병(acute lymphoblastic leukaemia: B-ALL), 만성 림프모구백혈병(chronic lymphocytic leukaemia: B-CLL) 및 특히 급성 비림프구 백혈병(acute non-lymphocytic leukaemia: ANLL)을 포함하는, 대부분의 B세포 백혈병 및 림프종에서 발현된다.

[0003] CD22는 B세포 발생 초기에 세포질에서 검출되고, IgD와 동시에 세포 표면에 나타나며, 대부분의 성숙한 B세포에서 발견된다. B세포가 활성화되면 발현이 증가하고, CD22는 분화말기에 상실되며, 일반적으로 형질세포(plasma cell)에는 존재하지 않는 것으로 보고되었다. 또한, CD22는 pre-B 세포 단계에서 발현되고 성숙한 B 세포에 유지되며 발현은 B 세포로 제한되는 특징이 있어 악성 B 세포의 면역 요법에 대한 유망한 표적이다. 더욱이, CD22 표적 치료는 CD19 하향 조절 또는 CD19-CAR 치료에 대한 내성에 대한 좋은 대안으로 평가되고 있다.

[0004] 이에, 표적 질환 범위를 증가시키기 위한, 신규한 CD22에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편을 개발하고, 더 나아가 상기 CD22 특이적 항체 및 이의 단편을 포함하는 이중특이적 항체, 이중특이성 CAR(chimeric antigen receptor), CAR-발현 면역 세포 및 항체 약물 복합체의 개발이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 일 양상은 CD22 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하는 것이다.

[0006] 다른 양상은 CD22 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 이중특이적 항체를 제공하는 것이다.

[0007] 또 다른 양상은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 핵산을 제공하는 것이다.

[0008] 또 다른 양상은 상기 핵산을 발현하는 숙주세포를 제공하는 것이다.

[0009] 또 다른 양상은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor: CAR)를 제공하는 것이다.

[0010] 또 다른 양상은 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역세포를 제공하는 것이다.

[0011] 또 다른 양상은 CD22 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 항체약물중합체(ADC)를 제공하는 것이다.

[0012] 또 다른 양상은 상기 항체, 이중특이적항체 또는 항체약물중합체를 포함하는 B 세포에 의해 매개되는 질병 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 일 양상은 CD22에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편을 제공한다.

[0014] 본 명세서에서 용어, "항체 (antibody)", "항원-결합 영역 또는 부위 (antigen-binding region or site)" 또는 "항원-결합 폴리펩티드 (antigen-binding polypeptide)"는 항원을 특이적으로 인식하고 이에 결합하는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 복합체를 지칭할 수 있다. 항체는 전체 항체 및 이의 임의의 항원-결합 단편 또는 단일 사슬일 수 있다. 따라서, 용어 "항체 (antibody)"는 항원에 결합하는 생물학적 활성을 갖는 면역글로불린 분자의 적어도 일부를 포함하는 임의의 단백질 또는 펩티드 함유 분자를 포함할 수 있다. 이러한 예로는 중쇄 또는 경쇄의 상보성 결정 영역 (complementarity determining region: CDR) 또는 이의 리간드 결합 부분, 중쇄 또는 경쇄 가변 영역, 중쇄 또는 경쇄 불변 영역, 프레임워크 (framework: FR) 영역, 또는 이의 임의의 부분, 또는 결합 단백질의 적어도 하나의 부분을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0015] 일 구체예에서, 항체는 모노클로날 항체, 단일특이적 항체, 이중특이적 항체, 삼중특이적 항체, 이중 항체, 다중특이적 항체, 다중 항체, 미니바디, 도메인 항체, 항체 모방체 (또는 합성 항체), 키메라 항체, 인간화 항체 또는 항체 융합체 (또는 항체 접합체) 및 이의 단편을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 본원에 개시된 다양한 형태의 항체를 포함할 수 있다.

[0016] 본 명세서에서 용어, "항원 (antigen)" 또는 "면역원 (immunogen)"은 예를 들어 항원-결합 단백질 (예를 들어, 항체 또는 이의 면역학적으로 기능적 항원-결합 단편)이 결합할 수 있고, 동물에서 항원에 결합할 수 있는 항체의 생성에 사용될 수 있는, 분자 또는 분자의 일부를 의미할 수 있다. 항원은 상이한 항체 또는 이의 단편과 상호작용할 수 있는 에피토프를 하나 이상 포함할 수 있다.

[0017] 본 명세서에서 용어, "항체 단편(antibody fragment)" 또는 "항원 결합 단편(antigen-binding fragment)"은 전장 사슬과 비교하여 일부 아미노산이 부족하지만 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항체의 일부를 포함할 수 있다. 이러한 단편은 표적 항원에 특이적으로 결합하거나, 또는 특정 에피토프에 결합하는데 다른 항체 또는 항원-결합 단편과 경쟁할 수 있다는 측면에서, 생물학적 활성을 갖는 것으로 간주될 수 있다. 일 양상에서, 이러한 단편은 전장 경쇄 또는 중쇄에 존재하는 적어도 하나의 CDR을 포함하고, 일부 구체예에서 이는 짧은 사슬의 중쇄 및/또는 경쇄, 또는 이의 일부를 포함할 수 있다. 이러한 생물학적 활성 단편은 재조합 DNA 기술에 의해 생성될 수 있거나, 또는 예를 들어 온전한 항체를 효소적으로 또는 화학적으로 절단함으로써 생성될 수 있다. 면역학적으로 기능적 면역글로불린 단편은 Fab, Fab', F(ab')2, scFab, dsFv, Fv, scFv, scFv-Fc, scFab-Fc, 디아바디, 미니바디, scAb, dAb, half-IgG 또는 이의 조합을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 또한, 이는 인간, 마우스, 래트, 낙타과 (camelid) 또는 토끼를 포함하지만 이에 한정되지 않는 임의의 포유동물로부터 유래될 수 있다. 항체의 기능적 부분 예컨대 본원에 기재된 하나 이상의 CDR은 2차 단백질 또는 저분자 화합물과 공유 결합에 의해 연결될 수 있으며, 이에 의해 특정 표적에 대한 표적 치료제로서 사용될 수 있다. 용어 "항체 단편 (antibody fragment)"은 압타머 (aptamers), 스피에겔머 (spiegelmers) 및 디아바디 (diabodies)를 포함한다. 용어 "항체 단편 (antibody fragment)"은 또한 특정 항원에 결합하여 복합체를 형성함으로써 항체와 같이 작용하는 임의의 합성 또는 유전자 조작된 단백질을 포함할 수 있다.

[0018] 상기 "Fc" 영역은 항체의 CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 2개의 중쇄 단편을 포함할 수 있다. 이들 2개의 중쇄 단편은 2개 이상의 디설파이드 결합 및 CH3 도메인의 소수성 상호작용에 의해 서로 조합될 수 있다.

[0019] 상기 "Fab 단편"은 CH1 및 가변 영역만을 포함하는 1개의 중쇄 및 1개의 경쇄로 구성될 수 있다. Fab 분자의 중쇄는 다른 중쇄 분자와 디설파이드 결합을 형성하지 않을 수 있다.

[0020] 상기 "Fab' 단편"은 Fab 단편에 추가하여, 중쇄의 CH1 및 CH2 도메인 사이의 영역을 포함하며, 이는 Fab' 단편의 2개의 분자의 2개의 중쇄 사이에 디설파이드 결합을 형성하여 F(ab')2 분자를 형성할 수 있다.

[0021] 상기 "F(ab')2 단편"은 전술한 바와 같이 가변 영역, CH1, 및 CH1 및 CH2 도메인 사이의 불변 영역의 일부를 포함하는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하고, 이에 의해 2개의 중쇄 사이에 사슬내 디설파이드 결합 (intrachain disulfide bond)이 형성된다. 따라서 F(ab')2 단편은 2개의 Fab' 단편으로 구성되고, 2개의 Fab' 단편은 이들 사이의 디설파이드 결합에 의해 서로 결합할 수 있다.

[0022] 상기 "Fv 영역"은 중쇄 및 경쇄의 각 가변 영역을 포함하지만, 불변 영역은 포함하지 않는 항체일 수 있다.

scFv는 Fv가 가요성 링커에 의해 연결된 것일 수 있다. scFv-Fc는 Fc가 scFv에 연결된 것일 수 있다. 미니바디는 CH3이 scFv에 연결된 것일 수 있다. 디아바디는 scFv의 2개의 분자를 포함할 수 있다. "단일-사슬 가변 단편(single-chain variable fragment)" 또는 "scFv"는 면역글로불린의 중쇄 (VH) 및 경쇄 (VL)의 가변 영역의 융합 단백질을 지칭할 수 있다. 일부 양상에서, 상기 영역은 10개 내지 약 25개의 아미노산의 짧은 링커 펩티드와 연결될 수 있다. 링커는 가요성을 위해 글리신이, 용해도를 위해 세린 또는 트레오닌이 풍부할 수 있으며, VH의 N-말단을 VL의 C-말단과 연결할 수 있거나, 또는 그 반대로 연결할 수 있다. 이러한 단백질은 불변 영역의 제거 및 링커의 도입에도 불구하고, 원래의 면역글로불린의 특이성을 유지할 수 있다. ScFv 분자는 당해 분야에 알려져 있고, 예를 들어 미국특허 제5,892,019호에 기재되어 있다.

[0023] 본 명세서에서, "짧은-사슬 항체 (short-chain antibody: scAb)"는 중쇄 및 경쇄 가변 영역이 가요성 링커에 의해 연결된 중쇄 또는 경쇄 불변 영역의 하나의 가변 영역을 포함하는 단일 폴리펩티드 사슬일 수 있다. 짧은-사슬 항체는 예를 들어 미국특허 제5,260,203호를 참조할 수 있다.

[0024] 본 명세서에서, "도메인 항체 (domain antibody: dAb)"는 중쇄의 가변 영역 또는 경쇄의 가변 영역만을 포함하는 면역학적으로 기능적 면역글로불린 단편일 수 있다. 일 구체예에서, 2개 이상의 VH 영역은 펩티드 링커에 의해 공유 결합으로 연결되어, 2가 도메인 항체를 형성할 수 있다. 이러한 2가 도메인 항체의 2개의 VH 영역은 동일하거나 또는 상이한 항원을 표적으로 할 수 있다.

[0025] 본 명세서에서, "2가 항원-결합 단백질 (bivalent antigen-binding protein)" 또는 "2가 항체 (bivalent antibody)"는 2개의 항원-결합 부위를 포함할 수 있다. 이러한 2가 항체에 포함되는 2개의 항원-결합 부위는 동일한 항원 특이성을 가질 수 있거나, 또는 상이한 항원에 개별로 결합하는 이중-특이적 항체일 수 있다.

[0026] 일 구체예에 따르면 상기 CD22 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열로 표시되는 CDR1 영역, 서열번호 3 또는 4의 아미노산 서열로 표시되는 CDR2 영역 및 서열번호 5 또는 6의 아미노산 서열로 표시되는 CDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변부위; 및 서열번호 7 내지 12 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 CDR1 영역, 서열번호 13 내지 15 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 CDR2 영역 및 서열번호 16 내지 19 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 CDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 부위;를 포함하는 CD22에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편일 수 있다.

표 1

[0027]

명칭	서열	서열번호
VL CDR1	SGGSGGYG	서열번호 1
	SGSNNTYG	서열번호 2
VL CDR2	DNDQRPS	서열번호 3
	DNTNRPS	서열번호 4
VL CDR3	GSYDSSYVGI	서열번호 5
	GSRDSTYVGI	서열번호 6
VH CDR1	GFTFSNYCMQ	서열번호 7
	GFTFSNYCMS	서열번호 8
	GFTFSKHGHY	서열번호 9
	GFTFSRHGMY	서열번호 10
	GFSFSDYGMG	서열번호 11
	GFAFGRSSMG	서열번호 12
VH CDR2	GIGSSGTGTYYGSAVRG	서열번호 13
	SISNTGSYTDYGAAVKG	서열번호 14
	FLGSSSSYTDYGAAVKG	서열번호 15
VH CDR3	DYGSDSGCGWGIYAGEIDA	서열번호 16
	DYGSDSGIGWGIYAGEIDA	서열번호 17
	DYGSDSGVGWGIYAGEIDA	서열번호 18
	SAYGGSYGSSSIDA	서열번호 19

[0028] 일 구체예에 있어서, 상기 표 1에 개시된 경쇄의 각 가변 영역의 CDR 및 중쇄의 각 가변 영역의 CDR은 자유롭게 조합될 수 있다.

[0030] 일 구체예에 있어서, 상기 CD22 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 20 내지 22로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 경쇄 가변부위를 포함할 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 CD22 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 23 내지 29로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 중쇄 가변부위를 포함할 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 CD22 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 20 내지 22로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 경쇄 가변부위; 및 서열번호 23 내지 29로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 중쇄 가변부위;를 포함하는 것일 수 있다.

표 2

[0031]

명칭	서열	서열번호
VL	LTQPSSVSANPGETVKITCSGGSGGYGWYQQKSPGSAPVSLIYDNDQRPSDIPSRFSGSKSG STGTLTITGVQADDEAVYYCGSYDSSYVGIFGAGTTLTVL	서열번호 20
	LTQPPSVSVSPGQTARITCSGGSGGYGWYQQKPGSAPVSVIYDNDQRPSGIPERFSGSSSGTTVTLTISGVQAEDEADYYCGSYDS SYVGIFGGGTKLTVL	서열번호 21
	LTQPSSVSANPGETVKITCSGSNNTYGWYQQKAPGSAPVTVIYDNTNRPSDIPSRFSGSKSGSTNTLTITGVQAEDEAVYFCGSRD STYVGIFGAGTTLTVL	서열번호 22
VH	AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSNYCMQWVRQAPGKGLEWVAGIGSSGTGTYYGS AVRGRATISRDNGQSTVRLQLNNLRAEDTGTYYCARDYGSDSGCGWGIYAGEIDAWGHGTEV IVSS	서열번호 23
	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYCMSWVRQAPGKGLEWVSGIGSSGTGTYYGSAVRGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARDYGSDSGCGWGIYAGEIDA WGQGTLVTVSS	서열번호 24
	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKHGHYWVRQAPGKGLEWVSGIGSSGTGTYYGSAVRGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARDYGSDSGIGWGIYAGEIDA WGQGTLVTVSS	서열번호25
	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRHGMYWVRQAPGKGLEWVSGIGSSGTGTYYGSAVRGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARDYGSDSGVGWGIYAGEIDA WGQGTLVTVSS	서열번호 26
	AVTLDESGGGLQTPGGGLSLVCKASGFSFSDYGMGWVRQAPGKGLEFVASISNTGSYTDYGAAVKGRATISRDNGQSTLRLQLNNL RAEDTGTYFCAKSAYGGSYGSSSIDAWGHGTEVIVSS	서열번호 27
	AVTLDESGGGLQTPGGGLSLVCKASGFAFGRSSMGWVRQAPGKGLEFVASISNTGSYTDYGAAVKGRATISRDNGQSTLRLQLNNL RAEDTGTYFCAKSAYGGSYGSSSIDA WGHGTEVIVSS	서열번호28
	AVTLDESGGGLQTPGGGLSLVCKASGFSFSDYGMGWVRQAPGKGLEFVAFLGSSSSYTDYGAAVKGRATISRDNGQSTLRLQLNNL RAEDTGTYFCAKSAYGGSYGSSSIDA WGHGTEVIVSS	서열번호29

[0032] 일 구체예에 있어서, 상기 표 2에 개시된 경쇄 가변부위 및 중쇄 가변부위는 자유롭게 조합될 수 있다.

[0033] 상기 항체 및/또는 이의 항원 결합 단편은 "변이체 (variants)"를 포함할 수 있다. 상기 변이체는 상기 폴리펩타이드 서열로부터 하나 이상의 아미노산 잔기가 삽입, 결실, 추가 및/또는 치환된 폴리펩타이드를 지칭할 수 있다. 따라서 상기 항체 및/또는 항원 결합 단편의 원하는 생물학적 활성 및/또는 구조를 유지하는 한, 다른 폴리펩타이드에 연결하여 융합 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 상기 변이체는 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 서열에 대해 80%이상, 85%이상, 90%이상, 95%이상, 96%이상, 97%이상, 98%이상 또는 99%이상의 서열 동일성을 가질 수 있고, 예컨대, 약 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 또는 80%의 서열 동일성을 가질 수 있다.

[0034] 일 구체예에 따르면, 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열로 표시되는 CDR1 영역, 서열번호 3또는 4의 아미노산 서열로 표시되는 CDR2 영역 및 서열번호 5 또는 6의 아미노산 서열로 표시되는 CDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변부위; 및 서열번호 7 내지 12 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 CDR1 영역, 서열번호 13 내지 15 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 CDR2 영역 및 서열번호 16 내지 19 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 CDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 부위;를 포함하는 CD22에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편의 서열에 대해 80%이상, 85%이상, 90%이상, 95%이상, 96%이상, 97%이상, 98%이상 또는 99%이상의 서열 동일성을 가질 수 있고, 예컨대, 약 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 또는 80%의 서열 동일성을 가질 수 있다.

[0035] 일 구체예에 따르면, 서열번호 20 내지 22로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 경쇄 가변부위; 및 서열번호 23 내지 29로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 중쇄 가변부위;를 포함하는 것인, CD22에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편의 서열에 대해 80%이상, 85%이상, 90%

이상, 95%이상, 96%이상, 97%이상, 98%이상 또는 99%이상의 서열 동일성을 가질 수 있고, 예컨대, 약 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 또는 80%의 서열 동일성을 가질 수 있다.

[0036] 본 명세서에서 용어, "동일성"은 핵산 분자 사이 및/또는 폴리펩타이드 사이 전반적 관련성을 지칭할 수 있다. 일 구현예에서, 핵산 또는 폴리펩타이드는 그들의 서열이 적어도 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일하면 서로와 "실질적으로 동일한" 것으로 간주할 수 있다. 2개 핵산 또는 폴리펩타이드 서열의 퍼센트 동일성의 계산은, 예를 들어, 최적 비교 목적을 위하여 2개 서열을 정렬함으로써 수행될 수 있다. 특정 구현예에서, 비교 목적을 위하여 정렬된 서열의 길이는 참조 서열의 길이의 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 실질적으로 100%일 수 있다.

[0037] 본 명세서의 항-CD22 항체 또는 이의 단편은 제한 없이, 키메라 항체, 인간화 항체, 또는 완전 인간 항체일 수 있다. 일 양상에서, 항체 또는 이의 단편은 자연 발생하지 않고, 화학적으로 또는 재조합으로 합성될 수 있다. 또한, 본 명세서의 CD22 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 1 내지 29의 아미노산 서열을 가공(engineering)한 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0038] 본 명세서의 용어, “인간화 항체” 란, 인간에 의해 생산된 항체의 것에 상응하는 아미노산 서열을 소유 및/또는 인간 항체를 만들기 위한 기술을 이용하여 만들어진 항체를 의미할 수 있다.

[0039] 일 구체예에 있어서, 상기 CD22에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편은 인간 불변 카파 영역(Cκ) 및 HA 태그(Hemagglutinin tag) 단백질을 더 포함하는 것일 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 인간화한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 30 또는 31의 아미노산 서열로 표시되는 것일 수 있다.

[0040] 일 구체예에 있어서, 상기 인간화한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간면역글로불린 중쇄 영역과 경쇄 영역을 더 포함하는 것 일 수 있다. 예를 들면, 상기 인간면역글로블린은 IgG일 수 있다.

[0041] 일 구체예에 있어서, 상기 인간화한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 32 내지 43 으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 것일 수 있다.

[0043] 다른 양상은 CD22 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 이중특이적 항체를 제공한다.

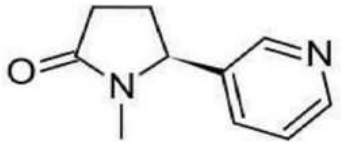
[0044] 본 명세서에서 용어, "이중특이적 (bispecific)", "이중-특이적 (dual-specific)" 항원-결합 단백질 또는 항체는 2개의 상이한 항원-결합 부위를 갖는 혼성 항원-결합 단백질 또는 항체일 수 있다. 이러한 이중특이적 항체는 다중특이적 항원-결합 단백질 또는 다중특이적 항체의 일종으로, 이는 Fab' 단편의 연결 또는 하이브리도마(hybridoma)의 융합과 같은 알려진 다양한 방법에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, Songsivilai and Lachmann, 1990, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321; Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553, 등을 참조할 수 있다. 이중특이적 항원-결합 단백질 또는 항체의 2개의 항원-결합 부위가 결합하는 서로 다른 2개의 에피토프는 동일하거나 또는 상이한 단백질 표적 상에 위치할 수 있다.

[0045] 일 구체예에 따르면, 상기 이중특이적 항체는 항-CD22 및 항-cotinine 이중특이적 항체일 수 있다.

[0046] 상기 항-CD22 및 항-cotinine 이중 특이적 항체는 CD22 단백질을 특이적으로 인식 및/또는 결합할 수 있는 CD22 표적화 모이어티로서 항-CD22 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함할 수 있고, cotinine을 특이적으로 인식 및/또는 결합할 수 있는 cotinine 표적화 모이어티로서 항-cotinine 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함할 수 있다.

[0047] 본 명세서의 용어, "코티닌(cotinine)"은 니코틴의 주요 대사 산물로서, 하기 화학식 1의 구조를 가진다.

화학식 1

[0048] 

[0049] 일 구체예에 있어서, 상기 항-CD22 및 항-cotinine 이중특이적 항체는 항-CD22 항체 또는 이의 단편; 및 항-cotinine 항체 또는 이의 단편을 포함하고, 상기 항-CD22 항체 또는 이의 단편은 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열로 표시되는 CDR1 영역, 서열번호 3 또는 4의 아미노산 서열로 표시되는 CDR2 영역 및 서열번호 5 또는 6의 아미노산 서열로 표시되는 CDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변부위; 및 서열번호 7 내지 12 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 CDR1 영역, 서열번호 13 내지 15 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 CDR2 영역 및 서열번호 16 내지 19 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 CDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 부위;를 포함하는 것 일 수 있다.

[0050] 일 구체예에 있어서, 상기 항-CD22 및 항-cotinine 이중특이적 항체는 항-CD22 항체 또는 이의 단편; 및 항-cotinine 항체 또는 이의 단편을 포함하고, 상기 항-CD22 항체 또는 이의 단편은 서열번호 20 내지 22로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 경쇄 가변부위를 포함하는 것일 수 있다.

[0051] 일 구체예에 있어서, 상기 항-CD22 및 항-cotinine 이중특이적 항체는 항-CD22 항체 또는 이의 단편; 및 항-cotinine 항체 또는 이의 단편;을 포함하고, 상기 항-CD22 항체 또는 이의 단편은 서열번호 23 내지 29로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 중쇄 가변부위를 포함하는 것일 수 있다.

[0052] 일 구체예에 있어서, 상기 항-CD22 및 항-cotinine 이중특이적 항체는 항-CD22 항체 또는 이의 단편; 및 항-cotinine 항체 또는 이의 단편;을 포함하고, 상기 항-CD22 항체 또는 이의 단편은 서열번호 20 내지 22로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 경쇄 가변부위; 및 서열번호 23 내지 29로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 중쇄 가변부위;를 포함하는 것일 수 있다.

[0053] 일 구체예에 있어서, 상기 항-CD22 및 항-cotinine 이중특이적 항체는 항-CD22 항체 또는 이의 단편; 및 항-cotinine 항체 또는 이의 단편;을 포함하고, 상기 항-CD22 항체 또는 이의 단편은 인간화한 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 항-CD22 및 항-cotinine 이중특이적 항체는 항-CD22 항체 또는 이의 단편; 및 항-cotinine 항체 또는 이의 단편;을 포함하고, 상기 항-CD22 항체 또는 이의 단편은 인간 불변 카파 영역(Cκ) 및 HA 태그(Hemagglutinin tag) 단백질을 더 포함하거나, 인간면역글로불린 중쇄 영역과 경쇄 영역을 더 포함하는 것 일 수 있다. 더욱 구체적으로, 상기 항-CD22 및 항-cotinine 이중특이적 항체는 항-CD22 항체 또는 이의 단편; 및 항-cotinine 항체 또는 이의 단편;을 포함하고, 상기 항-CD22 항체는 서열번호 44 또는 46의 아미노산 서열로 표시되는 것일 수 있다.

[0054] 상기 인간 불변 카파 영역(Cκ), HA 태그(Hemagglutinin tag) 단백질 및 인간면역글로불린 중쇄 영역과 경쇄 영역은 전술한 바와 같다.

[0056] 일 구체예에 따르면, 상기 이중특이적 항체는 항-CD22 및 항-CD3 이중 특이적 항체일 수 있다.

[0057] 상기 항-CD22 및 항-CD3 이중 특이 항체는 CD22 단백질을 특이적으로 인식 및/또는 결합할 수 있는 CD22 표적화 모이어티로서 항-CD22 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함할 수 있고, CD3 단백질을 특이적으로 인식 및/또는 결합할 수 있는 CD3 표적화 모이어티로서 항-CD3 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함할 수 있다.

일 구체예에 있어서, 상기 항-CD22 및 항-CD3 이중특이적 항체는 항-CD22 항체 또는 이의 단편; 및 항-CD3 항체 또는 이의 단편을 포함하고, 상기 항-CD22 항체 또는 이의 단편은 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열로 표시되는 CDR1 영역, 서열번호 3또는 4의 아미노산 서열로 표시되는 CDR2 영역 및 서열번호 5 또는 6의 아미노산 서열로 표시되는 CDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변부위; 및 서열번호 7 내지 12 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 CDR1 영역, 서열번호 13 내지 15 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 CDR2 영역 및 서열번호 16 내지 19 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 CDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 부위;를 포함하는

것 일 수 있다.

[0058] 일 구체예에 있어서, 상기 항-CD22 및 항-CD3 이중특이적 항체는 항-CD22 항체 또는 이의 단편; 및 항-CD3 항체 또는 이의 단편을 포함하고, 상기 항-CD22 항체 또는 이의 단편은 서열번호 20 내지 22로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 경쇄 가변부위를 포함하는 것일 수 있다.

[0059] 일 구체예에 있어서, 상기 항-CD22 및 항-CD3 이중특이적 항체는 항-CD22 항체 또는 이의 단편; 및 항-CD3 항체 또는 이의 단편;을 포함하고, 상기 항-CD22 항체 또는 이의 단편은 서열번호 23 내지 29로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 중쇄 가변부위를 포함하는 것일 수 있다.

[0060] 일 구체예에 있어서, 상기 항-CD22 및 항-CD3 이중특이적 항체는 항-CD22 항체 또는 이의 단편; 및 항-CD3 항체 또는 이의 단편;을 포함하고, 상기 항-CD22 항체 또는 이의 단편은 서열번호 20 내지 22로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 경쇄 가변부위; 및 서열번호 23 내지 29로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 중쇄 가변부위;를 포함하는 것일 수 있다.

[0061] 일 구체예에 있어서, 상기 항-CD22 및 항-CD3 이중특이적 항체는 항-CD22 항체 또는 이의 단편; 및 항-CD3 항체 또는 이의 단편;을 포함하고, 상기 항-CD22 항체 또는 이의 단편은 인간화한 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 항-CD22 및 항-CD3 이중특이적 항체는 항-CD22 항체 또는 이의 단편; 및 항-CD3 항체 또는 이의 단편;을 포함하고, 상기 항-CD22 항체 또는 이의 단편은 인간 불변 카파 영역(Cκ) 및 HA 태그(Hemagglutinin tag) 단백질을 더 포함하거나, 인간면역글로불린 중쇄 영역과 경쇄 영역을 더 포함하는 것 일 수 있다. 더욱 구체적으로, 상기 항-CD22 및 항-CD3 이중특이적 항체는 서열번호 47 내지 54로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 것일 수 있다.

[0062] 상기 인간 불변 카파 영역(Cκ), HA 태그(Hemagglutinin tag) 단백질 및 인간면역글로불린 중쇄 영역과 경쇄 영역은 전술한 바와 같다.

[0064] 일 구체예에 따르면, 상기 이중특이적 항체는 항-CD22 및 항-CD19 이중 특이적 항체일 수 있다.

[0065] 상기 항-CD22 및 항-CD19 이중 특이 항체는 CD22 단백질을 특이적으로 인식 및/또는 결합할 수 있는 CD22 표적화 모이어티로서 항-CD22 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함할 수 있고, CD19 단백질을 특이적으로 인식 및/또는 결합할 수 있는 CD19 표적화 모이어티로서 항-CD19 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함할 수 있다.

일 구체예에 있어서, 상기 항-CD22 및 항-CD19 이중특이적 항체는 항-CD22 항체 또는 이의 단편; 및 항-CD19 항체 또는 이의 단편을 포함하고, 상기 항-CD22 항체 또는 이의 단편은 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열로 표시되는 CDR1 영역, 서열번호 3또는 4의 아미노산 서열로 표시되는 CDR2 영역 및 서열번호 5 또는 6의 아미노산 서열로 표시되는 CDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변부위; 및 서열번호 7 내지 12 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 CDR1 영역, 서열번호 13 내지 15 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 CDR2 영역 및 서열번호 16 내지 19 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 CDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 부위;를 포함하는 것 일 수 있다.

[0066] 일 구체예에 있어서, 상기 항-CD22 및 항-CD19 이중특이적 항체는 항-CD22 항체 또는 이의 단편; 및 항-cotinine 항체 또는 이의 단편을 포함하고, 상기 항-CD22 항체 또는 이의 단편은 서열번호 20 내지 22로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 경쇄 가변부위를 포함하는 것일 수 있다.

[0067] 일 구체예에 있어서, 상기 항-CD22 및 항-CD19 이중특이적 항체는 항-CD22 항체 또는 이의 단편; 및 항-CD19 항체 또는 이의 단편;을 포함하고, 상기 항-CD22 항체 또는 이의 단편은 서열번호 23 내지 29로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 중쇄 가변부위를 포함하는 것일 수 있다.

[0068] 일 구체예에 있어서, 상기 항-CD22 및 항-CD19 이중특이적 항체는 항-CD22 항체 또는 이의 단편; 및 항-CD19 항체 또는 이의 단편;을 포함하고, 상기 항-CD22 항체 또는 이의 단편은 서열번호 20 내지 22로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 경쇄 가변부위; 및 서열번호 23 내지 29로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 중쇄 가변부위;를 포함하는 것일 수 있다.

[0069] 일 구체예에 있어서, 상기 항-CD22 및 항-CD19 이중특이적 항체는 항-CD22 항체 또는 이의 단편; 및 항-CD19 항체 또는 이의 단편;을 포함하고, 상기 항-CD22 항체 또는 이의 단편은 인간화한 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 항-CD22 및 항-CD19 이중특이적 항체는 항-CD22 항체 또는 이의 단편; 및 항-CD19 항체 또는 이의 단편;을 포함하고, 상기 항-CD22 항체 또는 이의 단편은 인간 불변 카파 영역(Cκ) 및 HA 태그(Hemagglutinin tag) 단백

질을 더 포함하거나, 인간면역글로불린 중쇄 영역과 경쇄 영역을 더 포함하는 것 일 수 있다.

[0070] 상기 인간 불변 카파 영역(Cκ), HA 태그(Hemagglutinin tag) 단백질 및 인간면역글로불린 중쇄 영역과 경쇄 영역은 전술한 바와 같다.

[0072] 또 다른 양상은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 핵산을 제공한다.

[0073] 본 명세서에서 용어, "핵산" 또는 "폴리뉴클레오티드"는 단일-가닥 및 이중-가닥 뉴클레오티드 중합체를 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드를 구성하는 뉴클레오티드는 리보뉴클레오티드 또는 데옥시리보뉴클레오티드 또는 두 유형의 뉴클레오티드의 변형된 형태일 수 있다. 상기 변형은 브로모우리딘 및 이노신 유도체와 같은 염기 변형, 2',3'-디데옥시리보스와 같은 리보스 변형, 및 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포로셀레노에이트, 포스포로디셀레노에이트, 포스포로아닐로티오에이트, 포스포르아닐라데이트 및 포스포로아미데이트와 같은 뉴클레오티드간 연결 변형을 포함할 수 있다.

[0074] 상기 항체 및 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 핵산 서열은 다수의 유형의 벡터에 클로닝될 수 있다. 예를 들어, 핵산은 플라스미드, 파지미드, 파지 유도체, 동물 바이러스, 및 코스미드로 클로닝될 수 있다. 다른 벡터는 발현 벡터, 복제 벡터, 프로브 생성 벡터, 시컨싱 벡터, 및 바이러스성 벡터를 포함할 수 있다. 다른 예에서, 벡터는, 스푸마바이러스로부터 제조된 레트로바이러스성 벡터의 한 유형인, 발포성 바이러스성 (FV) 벡터일 수 있다. 바이러스성 벡터 설계 및 기술은 Sambrook 등, (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2001)에서, 그리고 기타 바이러스학 및 분자 생물학 메뉴얼에서 기재된 바와 같이 당업계에서 널리 공지된다.

[0075] 본 명세서에서 용어, "벡터"는 숙주 세포 내로 도입되어 형질전환된 숙주 세포를 생산하는 핵산 분자를 의미할 수 있다. 상기 벡터는 복제 기점과 같은 숙주 세포에서 복제를 허용하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 벡터는 또한 하나 이상의 치료 유전자 및/또는 선택 가능한 마커 유전자 및 당업계에 공지된 다른 유전 요소를 포함할 수 있다. 벡터는 세포를 형질도입, 형질전환 또는 감염시켜 세포가 세포에 고유의 것 이외의 핵산 및/또는 단백질을 발현하도록 할 수 있다. 벡터는 임의로 바이러스 입자, 리포솜, 단백질 코팅 등과 같은 세포 내로의 핵산의 진입을 달성하는데 도움이 되는 물질을 포함할 수 있다.

[0077] 또 다른 양상은 상기 벡터로 형질전환 되어 상기 핵산을 발현하는 숙주세포를 제공한다.

[0078] 본 명세서에서 용어, "숙주세포"는 핵산 서열로 형질전환되었거나 형질전환될 수 있어 관심 유전자를 발현하는 세포를 의미할 수 있다. 숙주세포는 관심 유전자가 존재하는 한, 자손이 형태나 유전적 구성이 원래의 모세포와 동일한지 여부에 관계없이 모세포의 자손을 포함할 수 있다.

[0079] 또 다른 양상은 상기 이중특이적 항체를 암호화하는 핵산, 상기 핵산을 포함하는 벡터, 상기 벡터로 형질전환된 세포를 제공한다. 상기 "핵산", "벡터" 및 "세포"는 전술한 바와 같다.

[0081] 또 다른 양상은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor: CAR)를 제공한다.

[0082] 본 명세서에서 용어, "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR"은 도메인 또는 신호전달, 예를 들어 면역 세포, 예를 들어, T 세포 또는 NK 세포를 활성화하는 T-세포 신호전달 또는 T-세포 활성화 도메인에 연결된 항체(예를 들어, 단일 쇄 가변 단편(scFv))의 항원 결합 도메인을 함유하는 인공적으로 작제된 하이브리드 단백질 또는 폴리펩티드를 지칭할 수 있다. CAR은 단클론 항체의 항원-결합 특성을 이용하여 MHC-비제한된 방식으로 선택된 표적에 대한 면역 세포 특이성 및 반응성을 재지정할 수 있다.

[0083] 일 구체예에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체는 항원 결합 도메인(antigen binding domain); 막관통 도메인(transmembrane domain); 힌지 도메인(hinge domain); 세포내 보조 자극 도메인(co-stimulatory domain); 및 세포 내 신호전달 도메인(intracellular signal transduction domain)을 포함하는 것 일 수 있다.

[0084] 본 명세서의 용어 "결합 도메인(binding domain)"은 "세포 외 도메인(extracellular domain)", "세포 외 결합 도메인(extracellular binding domain)", "항원-특이적 결합 도메인(antigenspecific binding domain)" 및 "세포 외 항원-특이적 결합 도메인(extracellular antigen-specific biding domain)"은 상호 교환적으로 사용될

수 있으며, 표적 항원(예를 들어 CD22)에 특이적으로 결합하는 능력을 갖는 키메라 항원 수용체(CAR) 도메인 또는 단편을 의미할 수 있다.

[0085] 일 구체예에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체의 항원 결합 도메인은 힌지 도메인에 의해 막 관통 도메인에 연결되는 것일 수 있다.

[0086] 본 명세서의 용어, "막관통 도메인(transmembrane domain)"은 일반적으로 세포막을 통과하고 세포 내 신호전달 도메인에 연결되어 신호전달의 역할을 하는 부분을 의미한다. 상기 막관통 도메인은 CD8α, CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 및 PD1로 구성된 군에서 선택되는 단백질로부터 유래될 수 있으며, 바람직하게는, 상기 키메라 항원 수용체의 막 관통 도메인은 CD8의 막 관통 도메인일 수 있다.

[0087] 본 명세서의 용어, "힌지 도메인(hinge domain)"은 임의의 올리고펩타이드 또는 폴리펩티드로 이루어지고, 1~100개의 아미노산잔기, 바람직하게는, 10~70 아미노산잔기를 포함하는 것일 수 있으며, CD8 유래 힌지 도메인의 전체 또는 일부를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0088] 본 명세서의 용어, "세포내 보조 자극 도메인(co-stimulatory domain)"은 일반적으로 림프구의 항원에 대한 효과적인 반응에 필요한 세포 표면 분자인 면역 자극 분자를 제공할 수 있는 세포 내 도메인을 지칭한다. 상기 세포내 보조 자극 도메인은 CD28의 세포내 보조 자극 도메인을 포함할 수 있고, OX40 및 4-1BB과 같은 TNF 수용체 패밀리의 세포내 보조 자극 도메인을 포함할 수 있다.

[0089] 본 명세서의 용어, "세포 내 신호전달 도메인(intracellular signal transduction domain)"은 일반적으로 세포 내부에 위치하고 신호를 전달할 수 있는 도메인을 지칭한다. 본 발명에서, 세포 내 신호전달 도메인은 키메라 항원 수용체의 세포 내 신호전달 도메인이다. 예를 들어, 세포 내 신호전달 도메인은 CD3 제타(ζ), CD3 감마(γ), CD3 델타(δ), CD3 엡실론(ε), FcR 감마, FcR 베타, CD5, CD22, CD79a, CD79b 및 CD66d로 구성된 군에서 선택되는 세포내 신호전달 도메인으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0090] 일 구체예에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체는 항원 결합 도메인의 N-말단에 Myc tag 및/또는 신호 펩티드(signal peptide)를 더 포함할 수 있다.

[0091] 본 명세서의 용어, "키메라 항원 수용체의 항원 결합 도메인(antigen binding domain)"은 키메라 항원 수용체에서 특정 항원을 인식하고 결합하는 역할을 하는 부분을 의미하는 것이다.

[0092] 일 구체예에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체의 항원 결합 도메인은 CD19 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함할 수 있다. 예를 들어, CD19 결합 도메인은 FMC63을 이용할 수 있다. 구체적으로, 상기 CD19 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 키메라 항원 수용체(CD19 CAR)는 서열번호 49의 아미노산 서열로 표시되는 것일 수 있다.

[0093] 일 구체예에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체의 항원 결합 도메인은 CD22 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함할 수 있다.

[0094] 구체적으로, 상기 CD22 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 키메라 항원 수용체(CD22 CAR)의 항원 결합 도메인은 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열로 표시되는 CDR1 영역, 서열번호 3 또는 4의 아미노산 서열로 표시되는 CDR2 영역 및 서열번호 5 또는 6의 아미노산 서열로 표시되는 CDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변부위; 및 서열번호 7 내지 12 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 CDR1 영역, 서열번호 13 내지 15 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 CDR2 영역 및 서열번호 16 내지 19 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 CDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 부위;를 포함하는 것일 수 있다.

[0095] 구체적으로, 상기 CD22 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 키메라 항원 수용체(CD22 CAR)의 항원 결합 도메인은 서열번호 20 내지 22로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 경쇄 가변부위; 및 서열번호 23 내지 29로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 중쇄 가변부위;를 포함하는 것일 수 있다.

[0096] 더욱 구체적으로, 상기 CD22 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 키메라 항원 수용체(CD22 CAR)는 서열번호 56의 아미노산 서열로 표시되는 것일 수 있다.

[0098] 또 다른 양상은 이중특이적 키메라 항원 수용체(CD19/CD22 bispecific CAR)를 제공한다.

[0099] 본 명세서에서 용어, "이중특이적 키메라 항원 수용체"는 두 개 이상의 다른 항원을 동시에 인식하고 타겟팅할 수 있는 키메라 항원 수용체를 의미하는 것으로, 두 개 이상의 다른 항원 결합 도메인을 포함하며, 이러한 항원 결합 도메인은 서로 다른 항원에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0100] 구체적으로 상기 이중특이적 키메라 항원 수용체는 항원 결합 도메인(antigen binding domain); 막관통 도메인(transmembrane domain); 힌지 도메인(hinge domain); 세포내 보조 자극 도메인(co-stimulatory domain); 및 세포 내 신호전달 도메인(intracellular signal transduction domain)을 포함하는 것 일 수 있다. 상기 이중특이적 키메라 항원 수용체는 서로 다른 항원을 인식하는 두 개 이상의 항원 결합 도메인을 포함하고, 상기 서로 다른 항원을 인식하는 항원 결합 도메인은 링커로 연결될 수 있다.

[0101] 일 구체예에 있어서, 상기 이중특이적 키메라 항원 수용체는 CD19/CD22 이중특이적 키메라 항원 수용체(CD19/CD22 bispecific CAR)일 수 있다. 구체적으로, 상기 CD19/CD22 이중특이적 키메라 항원 수용체는 CD22 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 및 CD19 결합 도메인을 포함하는 것일 수 있다.

[0102] 본 명세서의 용어, "CD19 결합 도메인"은 CD19에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인으로, CD19 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 의미한다. 일 구체예에 있어서, CD19/CD22 이중특이적 키메라 항원 수용체(CD19/CD22 bispecific CAR)에서 CD19 결합 도메인은 CD22에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인과 링커(linker)로 연결된 것 일 수 있다.

[0103] 일 구체예에 있어서, 상기 CD19/CD22 이중특이적 키메라 항원 수용체는 상기 CD19 결합 도메인의 C말단과 CD22 결합 도메인의 N말단을 링커로 연결한 것일 수 있다.

[0104] 일 구체예에 있어서, 상기 CD19/CD22 이중특이적 키메라 항원 수용체는 상기 CD22 결합 도메인의 C말단과 CD19 결합 도메인의 N말단을 링커로 연결한 것일 수 있다.

[0105] 일 구체예에 있어서, 상기 CD19/CD22 이중특이적 키메라 항원 수용체는 CD19에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 가변부위 - CD22에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 가변부위 - CD22에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 가변부위 - CD19에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 가변부위 순서로 순차적 연결된 것일 수 있다.

[0106] 구체적으로, 상기 CD19/CD22 키메라 항원 수용체는 서열번호 57 내지 59로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 것일 수 있다.

[0108] 또 다른 양상은 상기 키메라 항원 수용체 또는 이중특이적 키메라 항원 수용체를 암호화 하는 핵산, 상기 핵산을 포함하는 벡터, 상기 핵산을 발현하는 세포를 제공한다.

[0109] 일 구체예에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체 또는 이중특이적 키메라 항원 수용체를 암호화 하는 핵산을 발현하는 세포는 면역세포일 수 있다. 더욱 구체적으로, 상기 면역세포는 생체에 침입한 병원균이나, 독소에 저항하여 면역력을 조절하는 세포를 의미할 수 있으며, 자연살해세포, T세포, T 림프구, B세포, 수지상세포, 또는 대식세포를 포함할 수 있다. 또한, 상기 면역 세포는 자가 또는 타가의 면역 세포일 수 있다.

[0110] 본 명세서에서 용어, "자연살해세포(Natural Killer cells)" 또는 "NK 세포"는 선천성 면역계의 주요 성분을 구성하는 세포독성 림프구로서, 대형과립림프구(large granular lymphocyte, LGL)로 정의되고 림프계 전구세포(common lymphoid progenitor, CLP) 생성 B 및 T 림프구로부터 분화된 제3의 세포를 구성할 수 있다. 상기 "자연살해세포" 또는 "NK 세포"는 임의의 조직 공급원(source)으로부터 유래된 추가적인 변형이 없는 자연살해세포를 포함하고, 성숙한 자연살해세포뿐 아니라, 자연살해 전구세포를 포함할 수 있다. 상기 자연살해세포는 인터페론 또는 대식세포-유래 사이토카인에 대한 반응으로 활성화되고, 자연살해 세포는 "활성화 수용체" 및 "억제성 수용체"로 표지되는, 세포의 세포 독성 활성을 제어하는 2가지 유형의 표면 수용체를 포함할 수 있다. 자연살해세포는 임의의 공급원, 예를 들어 태반 조직, 태반 관류액, 제대혈, 태반혈, 말초혈, 지라, 간 등으로부터의 조혈 세포, 예를 들어 조혈 줄기 또는 전구체로부터 생성될 수 있다.

[0111] 상기 자연살해세포는 유전적으로 변형 또는 조작된 것일 수 있다. 본 명세에서 "유전적 변형(genetical modification)" 또는 "유전적 조작 (genetical engineering)"이란 세포의 유전물질의 구성 또는 구조를 인위적으로 변경시키는 것을 포함할 수 있다.

[0112] 일 구체예에 있어서, 유전적으로 변형된 자연살해세포는 키메라 항원 수용체를 포함하는 자연살해세포일 수 있다. 키메라 항원 수용체는 항원에 대한 면역 세포(예를 들어, T 림프구)를 유도하고, 상기 면역 세포를 자극하

여 항원을 나타내는 세포를 치사시키는 인공 막 결합 단백질일 수 있다. 키메라 항원 수용체는 항원, 예를 들어 세포 상의 항원에 결합하는 세포외 도메인, 막관통 도메인, 및 면역 세포에 1차 활성화 신호를 전송하는 세포내 (세포질) 신호전달 도메인(즉, 세포내 자극 도메인), 및/또는 공동-자극 도메인을 포함한다. 다른 모든 조건이 충족되며, 키메라 항원 수용체가, 예를 들어 T 림프구, 예를 들어 1차 T 림프구의 표면 상에 발현되고, 키메라 항원 수용체의 세포외 도메인이 항원에 결합할 때, 세포외 신호전달 도메인은 T 림프구에 신호를 전송하여 활성화 및/또는 증식시키며, 또한 상기 항원이 세포 표면 상에 존재하는 경우, 항원을 발현하는 세포를 치사시킬 수 있다. 일부 면역 세포, 예를 들어 T 림프구 및 자연살해세포는 최대 활성화를 위해 2개의 신호, 즉 1차 활성화 신호 및 공동자극 신호가 필요하고, CAR은 또한 세포외 도메인에 대한 항원의 결합이 1차 활성화 신호 및 공동자극 신호 둘다의 전송을 야기하도록, 공동자극 도메인을 포함할 수 있다.

[0113] 또 다른 양상은 CD22 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 항체약물접합체(antibody-drug conjugate: ADC)를 제공한다.

[0114] 또 다른 양상은 CD22 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 이중특이적 항체를 포함하는 항체약물접합체(antibody-drug conjugate: ADC)를 제공한다.

[0115] 구체적으로, 상기 항체약물접합체는 CD22 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 이를 포함하는 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 약물 모이어티; 및 상기 약물 모이어티와 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 연결하는 링커를 포함하는 것 일 수 있다.

[0116] 일 구체예에 있어서, 상기 CD22 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 이중특이적 항체를 포함하는 항체약물접합체는 항-CD22 및 항-cotinine 이중특이적 항체를 포함하는 항체약물접합체일 수 있다.

[0117] 본 명세서에서 용어, "항체 약물 접합체(antibody-drug conjugate: ADC)"는 세포 표면의 특정 표적 항원에 결합하는 항체(antibody) 또는 이의 항원 결합 단편에 세포독성을 가지는 저분자 약물(payload)을 결합시킨 구조의 물질을 의미할 수 있다.

[0118] 일 구체예에 있어서 상기 항체 약물 접합체는 표적 특이성을 지닌 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 링커(linker)를 통해 치료적 제제(약물)를 결합한 것일 수 있다.

[0119] 상기 링커는 절단성 링커 또는 비절단성 링커를 포함할 수 있다. 상기 절단성 링커는 펩타이드 링커와 같이 세포 내 펩티다아제 또는 프로테아제 효소 예를 들어 리소좀 또는 엔도좀 프로테아제에 의해 절단될 수 있다. 예를 들면, 상기 절단성 링커는 프로테아제 절단성 링커(protease cleavable linker), 산-절단성(acid-cleavable) 링커, 디설파이드(disulfide) 링커, 베타-글루쿠로나이드 기반(β-Glucuronide based) 링커 및 베타-갈락토사이드 기반(β-galactoside based) 링커로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 비절단성 링커는 항체가 세포내 가수분해에 의해 비선택적으로 분해된 후에 약물이 방출될 수 있다.

[0120] 일 구체예에 따르면, 상기 치료적 제제는 화학요법 화합물(chemotherapeutic compound), 세포독성 화합물(cytotoxic compound), 면역조절 화합물, 항암제, 항바이러스제, 항균제, 항진균제, 항기생충제 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것 일 수 있다. 예를 들어, 상기 세포독성 화합물은 튜불린 억제제(mitotic inhibitor), DNA 알킬화제(DNA alkyalting agent), 토포아이소머라제 억제제(topoisomerase inhibitor) 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 더욱 구체적으로 상기 치료적 제제는 MMAE_Protein A, cotinine-duocarmycin, 허셉틴(herceptin)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0122] 또 다른 양상은 상기 항체, 항원 결합 단편, 이중특이적항체 또는 항체약물중합체를 포함하는 암치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0123] 본 명세서에서 용어, "암(cancer)" 또는 종양은 세포가 정상적인 성장 한계를 무시하고 분열 및 증식하는 공격적인(aggressive) 특성, 주위 조직에 침투하는 침투적인(invasive) 특성 및 체내의 다른 부위로 퍼지는 전이적인(metastatic) 특성을 갖는 세포에 의한 질병을 총칭할 수 있다.

[0124] 상기 암은 상기 암은 혈액암 또는 고형암일 수 있다.

[0125] 상기 혈액암은 급성 골수성 백혈병(Acute Myeloid Leukemia), 급성 림프모구 백혈병(Acute Lymphoblastic

Leukemia), 만성 골수성 백혈병(Chronic Myelogenous Leukemia), 다발골수종(Multiple Myeloma) 및 림프종(Lymphoma)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0126] 상기 고형암은 유방암, 대장암, 두경부암, 폐암, 위암, 피부암, 결장암, 전립선암, 방광암, 신장암, 직장암, 갑상선암, 간암, 자궁경부암, 피부암, 직장암, 항문암, 요도암, 난소암, 식도암 및 췌장암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0127] 또 다른 양상은 상기 항체, 항원 결합 단편, 이중특이적항체 또는 항체약물중합체를 포함하는 B 세포에 의해 매개되는 질병 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0128] 본 명세서에서 용어, "B 세포에 의해 매개되는 질병"은 B 세포의 비정상적인 활성화 또는 기능에 의해 매개되는 질병을 의미할 수 있다. 구체적으로, 상기 B 세포에 의해 매개되는 질병은 종양, 림프종, 비호치킨 림프종(nonHogkins lymphoma: NHL), 공격적 NHL, 재발성 공격적 NHL, 재발성 지연성 NHL, 불응성 NHL, 불응성 지연성 NHL, 만성 림프성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia: CLL), 소형 림프성 림프종, 백혈병, 모발성 세포 백혈병(hairy cell leukemia: HCL), 급성 림프성 백혈병(acute lymphocytic leukemia: ALL), 버킷트 림프종 및 외투 세포 림프종로 구성된 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0129] 상기 약학적 조성물은 유효성분으로서 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을, 조성물의 총 중량을 기준으로 약 0.1 중량% 내지 약 90 중량%, 구체적으로 약 0.5 중량% 내지 약 75 중량%, 보다 구체적으로 약 1 중량% 내지 약 50 중량%로 함유할 수 있다.

[0130] 상기 약학적 조성물은, 통상적인 방법에 따라 제제로 배합되는 통상적이고 무독성인 약학적으로 허용가능한 첨가제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 추가로 포함할 수 있다.

[0131] 상기 약학적 조성물에 사용되는 첨가제의 예는 감미제, 결합제, 용매, 용해 보조제, 습윤제, 유화제, 등장화제, 흡수제, 붕해제, 산화방지제, 보존제, 윤활제, 활택제, 충전제, 향미제 등을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 첨가제는 락토오스, 덱스트로스, 수크로스, 만니톨, 소르비톨, 셀룰로스, 글리신, 실리카, 활석, 스테아르산, 스테아린, 마그네슘 스테아레이트, 마그네슘 알루미노실리케이트, 전분, 젤라틴, 트라가칸트 검, 알긴산, 나트륨 알기네이트, 메틸셀룰로스, 나트륨 카복시메틸셀룰로스, 한천, 물, 에탄올, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리비닐피롤리돈, 염화나트륨, 염화칼슘, 오렌지 에센스, 딸기 에센스, 바닐라 향 등을 포함할 수 있다.

[0132] 상기 약학적 조성물은 경구 투여(예를 들어, 정제, 환제, 산제, 캡슐제, 시럽 또는 에멀젼) 또는 비경구 투여(예를 들어, 근육내, 정맥내 또는 피하 주사)를 위한 다양한 제제 형태로 배합될 수 있다.

[0133] 구체적으로는, 상기 약학적 조성물은 경구 투여용 제제로 배합될 수 있으며, 이때 사용되는 첨가제로는 셀룰로스, 칼슘 실리케이트, 옥수수 전분, 락토오스, 수크로스, 덱스트로스, 칼슘 포스페이트, 스테아르산, 마그네슘 스테아레이트, 칼슘 스테아레이트, 젤라틴, 활석, 계면활성제, 현탁제, 유화제, 희석제 등이 포함될 수 있다. 또한, 활택제(Glidant)의 예시로는 콜로이드성 이산화규소(Colloidal Silicon Dioxide), 마그네슘 실리케이트(Magnesuim Sillicate) 등이 있고; 희석제(Diluent)의 예시로는 미세결정질 셀룰로오스(Microcrystalline Cellulose), 락토오스 무수물(Lactose Anhydrous), 락토오스 일수화물(Lactose Monohydrate), 규화(silicified) MCC HD 90 등이 있으며, 붕해제(Disintegrant)의 예시로는 크로스카르멜로스 소듐(Croscarmellose Sodium), 크로스포비돈(Crospovidone) 등이 있고; 윤활제(Lubricant)의 예시로는 마그네슘 스테아레이트(Magnesium Stearate), 소듐 라우릴 설페이트(Sodium Lauryl Sulfate), 스테아르산(Stearic Acid) 등이 있다.

[0134] 또한, 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 유제, 시럽제 등이 예시될 수 있으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0135] 또한, 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액제, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔, 마크로골, 트윈61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 한편, 주사제에는 용해제, 등장화제, 현탁화제, 유화제, 안정화제, 방부제 등과 같은 종래의 첨가제가 포함될 수 있다.

[0136] 상기 약학적 조성물은 치료학적으로 유효한 양 또는 약학적으로 유효한 양으로 환자에 투여될 수 있다.

[0137] 용어 "치료학적으로 유효한 양" 또는 "약학적으로 유효한 양"이란 대상 질환을 예방 또는 치료하는데 유효한 화합물 또는 조성물의 양으로서, 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미한다. 상기 유효량의 수준은 환자의 건강 상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0138] 상기 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0139] 구체적으로, 상기 약학적 조성물에서 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 kg 당 약 0.1 mg 내지 약 1,000 mg, 또는 약 5 mg 내지 약 200 mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1회 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로, 범위는 이에 한정되지 않는다.

[0140] 또한, 상기 약학적 조성물은 화학 요법, 방사선 요법, 면역 요법, 호르몬 치료, 골수 이식, 줄기세포 대체 치료, 다른 생물학적 치료, 수술적 개입 또는 이들의 조합과 병용하여 종양 요법을 위해 투여될 수 있다. 예를 들어, 장기적으로 진행되는 다른 치료 전략과 함께 보조 요법으로 사용되거나, 중증 환자에서 종양 퇴행 또는 화학 예방 요법 후 환자의 상태를 유지하기 위해 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0141] 일 양상에 따르면, CD19 치료제 불응 환자에 대해서도 효과적으로 암 치료 효과를 가질 수 있다. 또한, CD22 CAR NK cell 또는 이중 특이적 CD22/CD19 CAR NK cell을 이용할 경우, 현저히 향상된 암세포 수 감소 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0142] 도 1은 재조합 항-CD22 scFv-Cκ-HA 융합 단백질에 대한 효소 면역분석 결과를 나타낸 그래프이다:

도 2는 항-CD22 scFv-Cκ-HA 융합 단백질2-3-14와 CI4-47에 대한 유세포 분석을 나타낸 그래프이다.

도 3은 항-CD22 재조합 단백질의 효소면역분석을 나타낸 그래프이다:

도 3a는 항-CD22 IgG (CI4-47_8-1, CI4-47_8-1_H1-2-1, CI4-47_8-1_H1-2-37) 단백질의 효소 면역분석을 나타낸 그래프이고, 도 3b는 항-CD22 IgG (2-3-14, 2-3-14_H1-24, 2-3-14_H2-40) 단백질의 효소 면역분석을 나타낸 그래프이다.

도 4는 항-CD22 재조합 단백질의 유세포 분석을 나타낸 그래프이다:

도 4a는 항-CD22 IgG 단백질 CI4-47_8-1, CI4-47_8-1_H1-2-1, CI4-47_8-1_H1-2-37 에 대한 유세포 분석을 나타낸 그래프이고, 도 4b는 항-CD22 IgG 단백질 2-3-14, 2-3-14_H1-24, 2-3-14_H2-40 에 대한 유세포 분석을 나타낸 그래프이다.

도 5는 항-CD19 및 항-CD22 단일 특이적 및 이중 특이적 CAR 구조를 나타낸 모식도이다:

도 5a는 항-CD19 및 항-CD22 단일 특이적 CAR구조를 나타낸 모식도이고, 도 5b는 항-CD19/CD22 이중특이적 CAR 구조를 나타낸 모식도이다.

도 6은 항-CD19, 항-CD22, 항-CD19/CD22 이중특이성CAR-NK-92 세포의 시험관내 평가 방법에 대한 모식도이다.

도 7는 CAR-NK-92 세포 및 CFSE로 표지된 OCI-Ly7 세포를 공배양한 후 유세포 분석에 의해 AV/7-AAD를 측정한 그래프이다.

도 8a는 CFSE+ 표적 세포 중 AV+ 7-AAD- 조기 세포사멸 세포 및 AV+ 7-AAD+ 후기 세포사멸 세포(%)를 나타낸 그래프이고, 도 8b는 CFSE+ 표적 세포의 세포 수를 나타낸 그래프이다.

도 9는 항-CD19/CD22 이중특이적 CAR-NK-92 세포의 생체내 암세포 제거능을 나타낸 결과이다:

도 9a는 생체 내 실험 평가 방법에 대한 모식도이고, 도 9b는 항-CD19/CD22 이중특이적 CAR-NK-92 세포의 생체

내 암세포 제거능을 나타낸 그래프이다.

도 10은 Anti-CD22 x anti-cotinine bispecific antibody & cotinine-duocarmycin의 in vitro 세포독성 결과를 나타낸 그래프이다.

도 11은 Anti-CD22 IgG와 MMAE_Protein A 복합체의 in vitro 세포독성 결과를 나타낸 그래프이다:

도 11a는 항-CD22 (CI4-47_8-1) IgG와 MMAE_Protein A 복합체의 세포독성시험 결과이고, 도 11b는 항-CD22 (2-3-14, 2-3-14_H1-24, 2-3-14_H2-40) IgG와 MMAE_Protein A 복합체의 세포독성시험 결과를 나타낸 그래프이다.

도 12는 Anti-CD22 x anti-CD3 bispecific antibody의 in vitro IL-2 secretion assay 결과를 나타낸 그래프이다:

도 12a는 CI4-47 x anti-CD3(blinatumomab) 이중특이적항체 처리군과 CI4-47 x irrelevant antibody 음성대조군항체 처리군의 IL-2 secretion assay 결과이고, 도 12b는 blinatumomab, CI4-47_8-1 x anti-CD3(blinatumomab), CI4-47_8-1_H1-2-1 x anti-CD3(blinatumomab), CI4-47_8-1_H1-2-37 x anti-CD3(blinatumomab) 이중특이적항체 처리군의 IL-2 secretion assay 결과이며, 도 12c는 blinatumomab, 2-3-14 x anti-CD3(blinatumomab), 2-3-14_H1-24 x anti-CD3(blinatumomab), 2-3-14_H2-40 x anti-CD3(blinatumomab) 이중특이적항체 처리군의 IL-2 secretion assay 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0143] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0144] **참조예 1. 세포 배양**

[0145] NK-92 세포를 American Type Culture Collection(manassas, VA, USA)에서 구입하고, NK92 배지에서 α-MEM에서 유지(maintain)하였다: NK92 배지는 12.5% non-heat inactivated fetal bovine serum (FBS) (Welgene), 12.5% heat-inactivated horse serum (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 10 U/ml penicillin, 10 μg/ml streptomycin (Welgene), 20 mM Folic acid (Sigma-Aldrich, USA), 20 mM Myo-inositol (Sigma-Aldrich), 55 mM 2-mercaptoethanol (Thermo Fisher Scientific) 및 100 U/ml recombinant human interleukin (rhIL)-2 (PeproTech, Rocky Hill, NH, USA)를 포함하는 α-MEM (Welgene, Gyeongsangbuk-do, Republic of Korea) 배지이다.

[0146] Human B cell lymphoma cell line OCI-Ly7(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea) 및 HEK293T 세포(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)는 10% heat-inactivated FBS (Welgene), 100 U/ml penicillin, 및 100 μg/ml streptomycin (Welgene)을 포함하는 DMEM(Welgene) 배지에서 유지하였다.

[0148] **참조예 2. CAR 형질도입 세포의 생성 및 유세포 분석**

[0149] 플라스미드 DNA를 표준 프로토콜에 따라 $CaCl_2$ 0.1 M 용액을 사용하여 준비된 적격 *E.coli*(Stbl3)로 열 충격에 의해 형질전환하였다. CAR 벡터를 Plasmid DNA Midi 준비 키트(Qiagen, Venlo, Netherlands)를 사용하여 분리하였다.

[0150] 렌티바이러스 입자를 생산하기 위해 CAR-발현 벡터를 Lipofectamine 3000(Invitrogen, 미국 매사추세츠주 월섬)을 사용하여 6:3:1:1의 비율로 패키징 플라스미드 벡터, pCAG-KGP1-1R, pCAG4-RTR2 및 pCAG-VSVG을 HEK293T 세포에 형질감염시켰다. 바이러스 함유 배지를 형질감염 48 시간 및 72 시간 후에 수확하고 0.45 μM 필터(Millipore, Burlington, MA, USA)를 통해 여과하였다. 바이러스 상층액을 사용하여 8㎍/ml 폴리브렌(Millipore, Burlington, Massachusetts, USA)으로 사전 처리된 확장된 NK92 세포를 형질감염시켰다. CAR-NK-92 세포의 경우, NK-92 세포를 BD FACSAria제² 세포 분류기에 의해 약 80-99% CAR-발현(Myc+) 세포를 분류하였다.

[0151] 유세포 분석은 APC CD56(NCAM) 단일클론 항체(mAb) (Clone CMSSB; Invitrogen), AlexaFluor-647-접합 Myc-Tag 마우스 mAb(Clone 9B11; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) 또는 일치하는 AlexaFluor-647-접합 마우스 IgG2a, κ 이소형 대조군(Clone MOPC-173; BioLegend)을 사용하여 유세포 분석을 수행하였다. CAR-NK92 세포를 10% 디메틸 설폭사이드(Sigma-Aldrich)를 함유하는 열-불활성화 FBS(Welgene)에서 동결보존하였고 사용

할 때까지 액체 질소 탱크에서 보관하였다.

[0153] **참조예 3. 세포독성 분석**

[0154] 세포독성은 7-아미노-액티노마이신 D(7-AAD) 및 아넥신 V(AV) 분석을 사용하여 분석하였다. 표적 세포인 OCI-Ly7 세포는 제조사의 프로토콜에 따라 Cell Trace Cell Proliferation Kit(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 CFSE(carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester)로 표지하였다. 형질도입 후 2일째에, CAR-αβ T 및 γδ T 세포를 수거하여 완전한 RPMI 배지에 재현탁시키고 CAR-NK92 세포를 NK92 배지를 사용하였다. CAR 형질도입된 세포(이펙터 세포)는 2:1(이펙터:표적)의 이펙터 대 표적 비율로 CFSE 표지된 표적 세포와 공동 배양하였다. 밤새 배양한 후 세포를 Annexin V 결합 완충액(BD Biosciences)으로 세척하고 37° C에서 30분 동안 배양하였다. CAR-NK92 세포의 경우 4시간 동안 배양하였다. 세포를 인간 FcR 차단 시약(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)으로 5분 동안 처리하고 얼음 위에서 15분 동안 7-AAD Viability Staining Solution(BioLegend) 및 Pacific Blue째 Annexin V 항체(BioLegend)로 염색하였다. CFSE-양성 표적 세포는 CytoFLEX(Beckman Coulter Life Sciences)를 사용하여 유세포 분석에 의해 초기 및 후기 세포자멸사에 대해 평가하였다. FlowJo v10(Treestar, Inc., Ashland, OR, USA)을 사용하여 데이터 분석을 수행하였다.

[0156] **참조예 4. NOD/SCID/γc-/-(NSG) 마우스의 생체 내 이종이식 종양 모델 연구**

[0157] NSG(NOD.Cg-PrkdcscidIl2rgtm1Wjl/SzJ) 마우스(JABio, 수원, 대한민국)를 구입하고, OCI-Ly7 세포를 CFSE로 표지하였다. 0일에 NSG 마우스에 1x PBS(대한민국 바이오세상) 중 5x106 세포/200μl를 복강 내 주사하였다. 30분 후, 마우스에 5 x 10^6 CAR 형질도입 세포를 복강내 주사하였다. 2 일째에 1 x PBS 15 ml를 복강에 주입하였다. 그 후, 마우스에서 복막 세척액을 수확하고 CFSE 세포 비율과 CFSE+ 세포 수를 유세포 분석으로 측정하였다. 데이터는 FlowJo v10 소프트웨어로 분석하였다. 모든 마우스 실험 절차는 서울 아산병원 동물병원 동물관리위원회의 승인을 받아 수행하였다(승인번호 2022-12-090).

[0159] **참조예 5. 통계 분석**

[0160] GraphPad Prism v6 소프트웨어(GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)를 사용하여 그래픽 및 통계 분석을 수행하였다. p 값은 다중 비교를 통해 일원 분산 분석에 의해 계산하였다. $P<0.05$는 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다. 모든 데이터는 평균±평균의 표준 오차(SEM)로 표시하였다.

[0162] **실시예1. 항-CD22 scFv 항체의 생성**

[0163] 3마리의 화이트 레그혼 닭을 20㎍의 재조합 인간 CD22-Fc 단백질(Cat.No. 1968-SL, R&D Systems, MN, USA)로 면역화시키고 3회 부스팅하였다. 비장, Fabricius의 활액낭 및 골수를 수확하고TRI Reagent(Invitrogen, CA, USA)를 사용하여 전체 RNA를 분리하였다. scFv 표시 파지 라이브러리를 생성하기 위해 Superscript IV First-Strand Synthesis 시스템(Invitrogen, CA, USA)을 사용하여 상보적 DNA를 합성하였다(C.F. Barbas, Phage Display: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 뉴욕, 2001).

[0164] 라이브러리는 CD22 결합 자기 비드(카탈로그 번호 14302, Invitrogen)를 사용하여 5회 바이오 패닝을 수행하였다. 결합제를 선택하기 위해 파지 함유 배양 상층액과 양고추냉이 과산화효소(horseradish peroxidase, HRP) 결합 항-M13 항체(GE Healthcare, NJ, USA)를 사용하여 파지 효소 면역 분석에서 항체 표시 파지의 반응성을 테스트하였다. 양성 신호를 갖는 파지 클론을 선택하고(OD4050.6), 이들의 염기서열을 결정하였다. 상기 방법으로 얻은 상기 CD22 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 예시를 표 3 및 표 4에 기재하였다.

표 3

[0165]

명칭	서열	서열번호
VL CDR1	SGGSGGYG	서열번호 1
	SGSNNTYG	서열번호 2
VL CDR2	DNDQRPS	서열번호 3
	DNTNRPS	서열번호 4

VL CDR3	GSYDSSYVGI	서열번호 5
	GSRDSTYVGI	서열번호 6
VH CDR1	GFTFSNYCMQ	서열번호 7
	GFTFSNYCMS	서열번호 8
	GFTFSKHGHY	서열번호 9
	GFTFSRHGMY	서열번호 10
	GFSFSDYGMG	서열번호 11
	GFAFGRSSMG	서열번호 12
VH CDR2	GIGSSGTGTYYGSAVRG	서열번호 13
	SISNTGSYTDYGAAVKG	서열번호 14
	FLGSSSSYTDYGAAVKG	서열번호 15
VH CDR3	DYGSDSGCGWGIYAGEIDA	서열번호 16
	DYGSDSGIGWGIYAGEIDA	서열번호 17
	DYGSDSGVGWGIYAGEIDA	서열번호 18
	SAYGGSYGSSSIDA	서열번호 19

표 4

[0166]

명칭	서열	서열번호
VL	LTQPSSVSANPGETVKITCSGGSGGYGWYQQKSPGSAPVSLIYDNDQRPSDIPSRFSGSKSG STGTLTITGVQADDEAVYYCGSYDSSYVGIFGAGTTLTVL	서열번호 20
	LTQPPSVSVSPGQTARITCSGGSGGYGWYQQKPGSAPVSVIYDNDQRPSGIPERFSGSSSGTTVTLTISGVQAEDEADYYCGSYDSSYVGIFGGGTKLTVL	서열번호 21
	LTQPSSVSANPGETVKITCSGSNNTYGWYQQKAPGSAPVTVIYDNTNRPSDIPSRFSGSKSGSTNTLTITGVQAEDEAVYFCGSRDSTYVGIFGAGTTLTVL	서열번호 22
VH	AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSNYCMQWVRQAPGKGLEWVAGIGSSGTGTYYGS AVRGRATISRDNGQSTVRLQLNNLRAEDTGTYYCARDYGSDSGCGWGIYAGEIDAWGHGTEV IVSS	서열번호 23
	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYCMSWVRQAPGKGLEWVSGIGSSGTGTYYGSAVRGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYGSDSGCGWGIYAGEIDA WGQGTLVTVSS	서열번호 24
	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKHGHYWVRQAPGKGLEWVSGIGSSGTGTYYGSAVRGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYGSDSGIGWGIYAGEIDA WGQGTLVTVSS	서열번호25
	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRHGMYWVRQAPGKGLEWVSGIGSSGTGTYYGSAVRGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYGSDSGVGWGIYAGEIDA WGQGTLVTVSS	서열번호 26
	AVTLDESGGGLQTPGGGLSLVCKASGFSFSDYGMGWVRQAPGKGLEFVASISNTGSYTDYGAAVKGRATISRDNGQSTLRLQLNNLRAEDTGTYFCAKSAYGGSYGSSSIDAWGHGTEVIVSS	서열번호 27
	AVTLDESGGGLQTPGGGLSLVCKASGFAFGRSSMGWVRQAPGKGLEFVASISNTGSYTDYGAAVKGRATISRDNGQSTLRLQLNNLRAEDTGTYFCAKSAYGGSYGSSSIDA WGHGTEVIVSS	서열번호28
	AVTLDESGGGLQTPGGGLSLVCKASGFSFSDYGMGWVRQAPGKGLEFVAFLGSSSSYTDYGAAVKGRATISRDNGQSTLRLQLNNLRAEDTGTYFCAKSAYGGSYGSSSIDA WGHGTEVIVSS	서열번호29

[0168] **실시예 2. 항-CD22 재조합 항체 단백질의 발현 및 정제**

[0169] **2.1 항-CD22 scFv-Cκ-HA 융합 단백질**

[0170] 항-CD22 scFv를 인코딩하는 유전자를 인간 불변 카파 영역(Cκ) 및 HA 태그(Hemagglutinin tag)가 지정된 단백질을 발현하기 위해 변형된 pCEP4 포유동물 발현 벡터 내로 서브클로닝하였다(Experimental & Molecular Medicine (2014) 46, e114; doi:10.1038/emm.2014.57). 그리고 구축물을 HEK293F 세포에 형질감염시키고 scFv-Cκ-HA 융합 단백질을 제조사의 지시에 따라 KappaSelect Resin(GE Healthcare)을 사용하여 정제하였다.

[0171] 상기 방법으로 얻은 항-CD22 scFv-Cκ-HA 융합 단백질의 예시를 표 5에 기재하였다.

표 5

[0172]

		서열	서열번호
재조합 항-CD22 scFv-Cκ융합 단백질	2-3-14	LTQPSSVSANPGETVKITCSGSNNTYGWYQQKAPGSAPVTVIYDNTNRPSDIPSRFSGSKSGSTNTLTITGVQAEDEAVYFCGSRDSTYVGIFGAGTTLTVL GGGGSGGGGSGGGGS AVTLDESGGGLQTPGGGLSLVCKASGFSFSDYGMGWVRQAPGKGLEFVASISNTGSYTDYGAAVKGRATISRDNGQSTLRLQLNNLRAEDTGTYFCAKSAYGGSYGSSSIDAWGHGTEVIVSS GGGGSGGGGSGGGGS RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGESGGAYPYDVPDYAS	서열번호 30
	CI4-47	LTQPSSVSANPGETVKITCSGGSGGYGWYQQKSPGSAPVSLIYDNDQRPSDIPSRFSGSKSGSTGTLTITGVQADDEAVYYCGSYDSSYVGIFGAGTTLTVL GGGGSGGGGSGGGGS AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSNYCMQWVRQAPGKGLEWVAGIGSSGTGTYYGSAVRGRATISRDNGQSTVRLQLNNLRAEDTGTYYCARDYGSDSGCGWGIYAGEIDAWGHGTEVIVSS GGGGSGGGGSGGGGS RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGESGGAYPYDVPDYAS	서열번호 31

[0173] **2.2 항-CD22 human IgG 단백질**

[0174] 항-CD22 human IgG 단백질을 발현하기 위해 인간면역글로불린 중쇄 영역과 경쇄 영역 유전자를 포유동물 발현 벡터 내로 서브클로닝하였다. 그리고 중쇄 및 경쇄 구축물을 혼합하여 HEK293F 세포에 형질감염시키고 human IgG 단백질을 제조사의 지시에 따라 MabSelect Resin(GE Healthcare)을 사용하여 정제하였다.

[0175] 상기 방법으로 얻은 항-CD22 human IgG 단백질의 예시를 표 6에 기재하였다.

표 6

[0176]

	서열	서열번호

재조합 항-CD22 IgG 단백질	2-3-14	>light chain LTQPSSVSANPGETVKITCSGSNNTYGWYQQKAPGSAPVTVIYDNTNRPSDIPSRFSGSKSGSTNTLTITGVQAEDEAVYFCGSRDSTYVGIFGAGTTLTVL RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	서열번호 32
		>heavy chain AVTLDESGGGLQTPGGGLSLVCKASGFSFSDYGMGWVRQAPGKGLEFVASISNTGSYTDYGAAVKGRATISRDNGQSTLRLQLNNLRAEDTGTYFCAKSAYGGSYGSSSIDAWGHGTEVIVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	서열번호 33
	2-3-14_H1-24	>light chain LTQPSSVSANPGETVKITCSGSNNTYGWYQQKAPGSAPVTVIYDNTNRPSDIPSRFSGSKSGSTNTLTITGVQAEDEAVYFCGSRDSTYVGIFGAGTTLTVL RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	서열번호 34
		>heavy chain AVTLDESGGGLQTPGGGLSLVCKASGFAFGRSSMGWVRQAPGKGLEFVASISNTGSYTDYGAAVKGRATISRDNGQSTLRLQLNNLRAEDTGTYFCAKSAYGGSYGSSSIDAWGHGTEVIVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	서열번호 35
	2-3-14_H2-40	>light chain LTQPSSVSANPGETVKITCSGSNNTYGWYQQKAPGSAPVTVIYDNTNRPSDIPSRFSGSKSGSTNTLTITGVQAEDEAVYFCGSRDSTYVGIFGAGTTLTVL RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	서열번호 36
		>heavy chain AVTLDESGGGLQTPGGGLSLVCKASGFSFSDYGMGWVRQAPGKGLEFVAFLGSSSSYTDYGAAVKGRATISRDNGQSTLRLQLNNLRAEDTGTYFCAKSAYGGSYGSSSIDAWGHGTEVIVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	서열번호 37
	CI4-47_8-1	>light chain LTQPPSVSVSPGQTARITCSGGSGGYGWYQQKPGSAPVSVIYDNDQRPSGIPERFSGSSSGTTVTLTISGVQAEDEADYYCGSYDSSYVGIFGGGTKLTVL RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	서열번호 38
		>heavy chain EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYCMSWVRQAPGKGLEWVSGIGSSGTGTYYGSAVRGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYGSDSGCGWGIYAGEIDAWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	서열번호 39
	CI4-47_8-1_H1-2-1	>light chain LTQPPSVSVSPGQTARITCSGGSGGYGWYQQKPGSAPVSVIYDNDQRPSGIPERFSGSSSGTTVTLTISGVQAEDEADYYCGSYDSSYVGIFGGGTKLTVL RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	서열번호 40

	>heavy chain EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKHGHYWVRQAPGKGLEWVSGIGSSGTGTYYGSAVRGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYGSDSGIGWGIYAGEIDAWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	서열번호 41
CI4-47_8-1_H1-2-37	>light chain LTQPPSVSVSPGQTARITCSGGSGGYGWYQQKPGSAPVSVIYDNDQRPSGIPERFSGSSSGTTVTLTISGVQAEDEADYYCGSYDSSYVGIFGGGTKLTVL RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	서열번호 42
	>heavy chain EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRHGMYWVRQAPGKGLEWVSGIGSSGTGTYYGSAVRGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYGSDSGVGWGIYAGEIDAWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	서열번호 43

[0177] **2.3 항-CD22 x 항-cotinine 이중특이성 항체 단백질**

[0178] 항-CD22 x 항-cotinine 이중특이성 항체 단백질을 발현하기 위해 항-CD22 scFv, 인간 불변 카파 영역(Cκ), 항-cotinine scFv(US20080226650A1, Fig 2) 유전자를 변형된 pCEP4 포유동물 발현 벡터 내로 서브클로닝하였다. 그리고 구축물을 HEK293F 세포에 형질감염시키고 scFv-Cκ-scFv 단백질을 제조사의 지시에 따라 KappaSelect Resin(GE Healthcare)을 사용하여 정제하였다.

[0179] 상기 방법으로 얻은 항-CD22 x 항-cotinine 이중특이성 항체 단백질의 예시를 표 7에 기재하였다.

표 7

[0180]

		서열	서열번호
항-CD22 x 항-cotinine 이중특이성 항체 단백질	2-3-14_ Cκ_anti-cotinine	LTQPSSVSANPGETVKITCSGSNNTYGWYQQKAPGSAPVTVIYDNTNRPSDIPSRFSGSKSGSTNTLTITGVQAEDEAVYFCGSRDSTYVGIFGAGTTLTVL GGGGSGGGGSGGGGS AVTLDESGGGLQTPGGGLSLVCKASGFSFSDYGMGWVRQAPGKGLEFVASISNTGSYTDYGAAVKGRATISRDNGQSTLRLQLNNLRAEDTGTYFCAKSAYGGSYGSSSIDAWGHGTEVIVSS GGGGSGGGGSGGGGS RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSLPVTKSFNRGES GGGGSGGGGSGGGGS ELDLTQTPASVSAAVGGTVTINCQSSQSPYSNEWLSWYQQKPGQAPKVLISRISTLASGVSSRFKGSGSGTQFTLTISDLECGDAATYFCAGGYNFGLFPFGGGTELEIL SSGGGGSGGGGGGSSRSS QSVKESEGRLVTPGGSLTLTCTVSGIDLSRDWMNWVRQAPGEGLEWIGAIGRSGDTYYATWAKGRFTISKTSSRTVTLTVTDLQRSDTATYFCARIPYFGWNNGDIWGPGTLVTI	서열번호 44
	CI4-47_ Cκ_anti-cotinine	LTQPSSVSANPGETVKITCSGGSGGYGWYQQKSPGSAPVSLIYDNDQRPSDIPSRFSGSKSGSTGTLTITGVQADDEAVYYCGSYDSSYVGIFGAGTTLTVL GGGGSGGGGSGGGGS AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSNYCMQWVRQAPGKGLEWVAGIGSSGTGTYYGSAVRGRATISRDNGQSTVRLQLNNLRAEDTGTYYCARDYGSDSGCGWGIYAGEIDAWGHGTEVIVSS GGGGSGGGGSGGGGS RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSLPVTKSFNRGES GGGGSGGGGSGGGGS ELDLTQTPASVSAAVGGTVTINCQSSQSPYSNEWLSWYQQKPGQAPKVLISRISTLASGVSSRFKGSGSGTQFTLTISDLECGDAATYFCAGGYNFGLFPFGGGTELEIL SSGGGGSGGGGGGSSRSS QSVKESEGRLVTPGGSLTLTCTVSGIDLSRDWMNWVRQAPGEGLEWIGAIGRSGDTYYATWAKGRFTISKTSSRTVTLTVTDLQRSDTATYFCARIPYFGWNNGDIWGPGTLVTI	서열번호 45
	Herceptin_Cκ_anti-cotinine	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK GGSSRSSSSGGGGSGGGG EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS GGGGSGGGGSGGGGS RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSLPVTKSFNRGES GGGGSGGGGSGGGGS ELDLTQTPASVSAAVGGTVTINCQSSQSPYSNEWLSWYQQKPGQAPKVLISRISTLASGVSSRFKGSGSGTQFTLTISDLECGDAATYFCAGGYNFGLFPFGGGTELEIL SSGGGGSGGGGGGSSRSS QSVKESEGRLVTPGGSLTLTCTVSGIDLSRDWMNWVRQAPGEGLEWIGAIGRSGDTYYATWAKGRFTISKTSSRTVTLTVTDLQRSDTATYFCARIPYFGWNNGDIWGPGTLVTI	서열번호 46

[0181] **2.4 항-CD22 x 항-CD3 이중특이성 항체 단백질**

[0182] 항-CD22 x 항-CD3 이중특이성 항체 단백질을 발현하기 위해 항-CD22 scFv, GGGGS 펩타이드 링커, blinatumomab의 항-CD3 scFv, hexahistidine tag 유전자를 변형된 pCEP4 포유동물 발현 벡터 내로 서브클로닝하였다. 그리고 구축물을 HEK293F 세포에 형질감염시키고 scFv-GGGGS-scFv-His_6융합 단백질을 제조사의 지시에 따라 Anti-His Resin(GenScript, USA)을 사용하여 정제하였다.

[0183] 상기 방법으로 얻은 항-CD22 x 항-CD3 이중특이성 항체의 예시를 표 8에 기재하였다.

표 8

[0184]

		서열	서열번호
Anti-CD22 x anti-CD3 bispecific antibody	CI4-47 x anti-CD3(blinatumomab)	LTQPSSVSANPGETVKITCSGGSGGYGWYQQKSPGSAPVSLIYDNDQRPSDIPSRFSGSKSGSTGTLTITGVQADDEAVYYCGSYDSSYVGIFGAGTTLTVL GGGGSGGGGSGGGGS AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSNYCMQWVRQAPGKGLEWVAGIGSSGTGTYYGSAVRGRATISRDNGQSTVRLQLNNLRAEDTGTYYCARDYGSDSGCGWGIYAGEIDAWGHGTEVIVSS GGGGS DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSVE GGSGGSGGSGGS GGVDDIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK HHHHHH	서열번호 47
	CI4-47_8-1 x anti-CD3(blinatumomab)	LTQPPSVSVSPGQTARITCSGGSGGYGWYQQKPGSAPVSVIYDNDQRPSGIPERFSGSSSGTTVTLTISGVQAEDEADYYCGSYDSSYVGIFGGGTKLTVL GGGGSGGGGSGGGGS EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYCMSWVRQAPGKGLEWVSGIGSSGTGTYYGSAVRGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYGSDSGCGWGIYAGEIDAWGQGTLVTVSS GGGGS DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSVE GGSGGSGGSGGS GGVDDIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK HHHHHH	서열번호 48
	CI4-47_8-1_H1-2-1 x anti-CD3(blinatumomab)	LTQPPSVSVSPGQTARITCSGGSGGYGWYQQKPGSAPVSVIYDNDQRPSGIPERFSGSSSGTTVTLTISGVQAEDEADYYCGSYDSSYVGIFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGS EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKHGHYWVRQAPGKGLEWVSGIGSSGTGTYYGSAVRGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYGSDSGIGWGIYAGEIDAWGQGTLVTVSS GGGGS DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSVE GGSGGSGGSGGS GGVDDIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK HHHHHH	서열번호 49
	CI4-47_8-1_H1-2-37 x anti-CD3(blinatumomab)	LTQPPSVSVSPGQTARITCSGGSGGYGWYQQKPGSAPVSVIYDNDQRPSGIPERFSGSSSGTTVTLTISGVQAEDEADYYCGSYDSSYVGIFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGS EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRHGMYWVRQAPGKGLEWVSGIGSSGTGTYYGSAVRGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYGSDSGVGWGIYAGEIDAWGQGTLVTVSS GGGGS DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSVE GGSGGSGGSGGS GGVDDIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK HHHHHH	서열번호 50

2-3-14 x anti-CD3(blinatumomab)	LTQPSSVSANPGETVKITCSGSNNTYGWYQQKAPGSAPVTVIYDNTNRPSDIPSRFSGSKSGSTNTLTITGVQAEDEAVYFCGSRDSTYVGIFGAGTTLTVLGGGGSGGGGSGGGGS AVTLDESGGGLQTPGGGLSLVCKASGFSFSDYGMGWVRQAPGKGLEFVASISNTGSYTDYGAAVKGRATISRDNGQSTLRLQLNNLRAEDTGTYFCAKSAYGGSYGSSSIDAWGHGTEVIVSS GGGGS DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSVE GGSGGSGGSGGS GGVDDIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK HHHHHH	서열번호 51
2-3-14_H1-24 x anti-CD3(blinatumomab)	LTQPSSVSANPGETVKITCSGSNNTYGWYQQKAPGSAPVTVIYDNTNRPSDIPSRFSGSKSGSTNTLTITGVQAEDEAVYFCGSRDSTYVGIFGAGTTLTVLGGGGSGGGGSGGGGS AVTLDESGGGLQTPGGGLSLVCKASGFAFGRSSMGWVRQAPGKGLEFVASISNTGSYTDYGAAVKGRATISRDNGQSTLRLQLNNLRAEDTGTYFCAKSAYGGSYGSSSIDAWGHGTEVIVSS GGGGS DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSVE GGSGGSGGSGGS GGVDDIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK HHHHHH	서열번호 52
2-3-14_H2-40 x anti-CD3(blinatumomab)	LTQPSSVSANPGETVKITCSGSNNTYGWYQQKAPGSAPVTVIYDNTNRPSDIPSRFSGSKSGSTNTLTITGVQAEDEAVYFCGSRDSTYVGIFGAGTTLTVLGGGGSGGGGSGGGGS AVTLDESGGGLQTPGGGLSLVCKASGFSFSDYGMGWVRQAPGKGLEFVAFLGSSSSYTDYGAAVKGRATISRDNGQSTLRLQLNNLRAEDTGTYFCAKSAYGGSYGSSSIDAWGHGTEVIVSS GGGGS DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSVE GGSGGSGGSGGS	서열번호 53
Blinatumomab	DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLVSGIPPRFSGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAATYHCQQSTEDPWTFGGGTKLEIK GGGGSGGGGSGGGGS QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIWPGDGDTNYNGKFKGKATLTADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGTTVTVSS GGGGS DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSVE GGSGGSGGSGGS GGVDDIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK HHHHHH	서열번호 54

[0185] **실시예 3 항-CD22 재조합 항체 단백질을 사용한 결합 분석**

[0186] **3.1 항-CD22 scFv-Cκ-HA 융합 단백질을 사용한 ELISA 분석**

[0187] 마이크로타이터 플레이트(Corning Inc., MA, USA)를 4 ℃에서 밤새 인간 CD22-His 단백질(100ng/웰, Sino Biological Inc., Beijing, China)로 코팅하였다. 웰을 37 ℃에서 1시간 동안 PBS(w/v) 중 3% BSA 150μl로 차

단하고, 항-CD22 scFv-Cκ-HA 융합 단백질을 연속적으로 희석한 희석액을 PBS 중 3% BSA로 제작하여 각 웰에 첨가하였다. 그 후, 37 ℃에서 1.5시간 동안 인큐베이션한 후, 플레이트를 PBS중 0.05% Tween-20(PBST) 으로 3회 세척하고 HRP-접합된 항-인간 Cκ 항체(Millipore, CA, USA)와 함께 37 ℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBST로 3회 세척하고, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)(ThermoFisher Scientific Inc., MA, USA)를 첨가하여 결합된 항체의 양을 결정하였다. 마이크로플레이트 분광광도계를 사용하여 생성된 OD405를 측정하였다.

[0188] 재조합 항-CD22 scFv-Cκ-HA 융합 단백질에 대해 효소 면역분석을 실시한 결과를 도 1에 나타내었다.

[0189] 도 1은 재조합 항-CD22 scFv-Cκ-HA 융합 단백질에 대한 효소 면역분석에 대한 결과를 나타낸 그래프이다.

[0190] 도 1에 나타낸 바와 같이, 재조합 항-CD22 scFv-Cκ-HA 융합 단백질(CI4-47, 2-3-14)은 CD22에 잘 결합함을 확인하였다.

[0191] **3.2 항-CD22 scFv-Cκ-HA 융합 단백질을 사용한 유세포 분석**

[0192] OCI-Ly7 세포를 튜브당 3 x 10^5 세포의 밀도로 1.5 ml 튜브에 분주하였다. 항-CD22 scFv-Cκ-HA 융합 단백질(0.25 uM)을 각 튜브에 첨가하고 얼음 위에서 30분 동안 인큐베이션하였다. MACS 완충액(Miltenyi Biotec.)으로 2회 세척한 후, Alexa 647-표지된 마우스 항-HA 항체(Clone #912426, R&D Systems, MN, USA)를 얼음 위에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음, 세포를 MACS 완충액으로 2회 세척하고 MACS 완충액 중 1% 파라포름알데히드 150 μL에 재현탁하고 4 ℃에서 밤새 보관하였다. FACS Canto II 기기(BD Bioscience, San Jose, CA, USA)를 사용하여 세포를 유세포 분석에 의해 분석하였다. 각 샘플에 대해 10,000개의 세포를 분석하였다.

[0193] 재조합 항-CD22 scFv-Cκ-HA 융합 단백질에 대해 유세포 분석을 실시한 결과를 도 2에 나타내었다.

[0194] 도 2는 항-CD22 scFv-Cκ-HA 융합 단백질2-3-14와 CI4-47에 대한 유세포 분석을 나타낸 그래프이다.

[0195] 도 2에 나타낸 바와 같이, 재조합 항-CD22 scFv-Cκ-HA 융합 단백질(CI4-47, 2-3-14)이 OCI-Ly7 세포와 잘 결합함을 확인하였다.

[0196] **3.3 항-CD22 human IgG를 사용한 ELISA 분석**

[0197] 마이크로타이터 플레이트(Corning Inc., MA, USA)를 4 ℃에서 밤새 인간 CD22-His 단백질(100ng/웰, Sino Biological Inc., Beijing, China)로 코팅하였다. 웰을 37 ℃에서 1시간 동안 PBS(w/v) 중 3% BSA 150μl로 차단하고, IgG 단백질을 연속적으로 희석한 희석액을 PBS 중 3% BSA로 제작하여 각 웰에 첨가하였다. 그 후, 37 ℃에서 1.5시간 동안 인큐베이션한 후, 플레이트를 PBS중 0.05% Tween-20(PBST) 으로 3회 세척하고 HRP-접합된 항-인간 IgG (Fc specific) 항체(ThermoFisherScientific, USA)와 함께 37 ℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBST로 3회 세척하고, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)(ThermoFisher Scientific Inc., MA, USA)를 첨가하여 결합된 항체의 양을 결정하였다. 마이크로플레이트 분광광도계를 사용하여 생성된 OD405를 측정하였다.

[0198] 재조합 항-CD22 재조합 단백질에 대해 효소 면역분석을 실시한 결과를 도 3에 나타내었다.

[0199] 도 3은 항-CD22 재조합 단백질의 효소면역분석을 나타낸 그래프이다:

[0200] 도 3a는 항-CD22 IgG (CI4-47_8-1, CI4-47_8-1_H1-2-1, CI4-47_8-1_H1-2-37) 단백질의 효소 면역분석을 나타낸 그래프이고, 도 3b는 항-CD22 IgG (2-3-14, 2-3-14_H1-24, 2-3-14_H2-40) 단백질의 효소 면역분석을 나타낸 그래프이다.

[0201] 도 3에 나타낸 바와 같이, 항-CD22 IgG 단백질은 CD22에 잘 결합함을 확인하였다.

[0202] **3.4 항-CD22 human IgG를 사용한 유세포 분석**

[0203] Raji 세포를 튜브당 3 x 10^5 세포의 밀도로 1.5 ml 튜브에 분주하였다. 항-CD22 IgG 단백질(0.1 uM)을 각 튜브에 첨가하고 얼음 위에서 30분 동안 인큐베이션하였다. MACS 완충액(Miltenyi Biotec.)으로 2회 세척한 후, APC가 표지된 마우스 항-인간 불변 카파 영역(Cκ) 항체를 얼음 위에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음, 세포를 MACS 완충액으로 2회 세척하고 MACS 완충액 중 1% 파라포름알데히드 150 μL에 재현탁하고 4 ℃에서 밤새 보관하였다. FACS Canto II 기기를 사용하여 세포를 유세포 분석에 의해 분석하였다. 각 샘플에 대해 10,000개의 세포를 분석하였다.

[0204] 도 4는 항-CD22 재조합 단백질의 유세포 분석을 나타낸 그래프이다:

[0205] 도 4a는 항-CD22 IgG 단백질 CI4-47_8-1, CI4-47_8-1_H1-2-1, CI4-47_8-1_H1-2-37 에 대한 유세포 분석을 나타낸 그래프이고, 도 4b는 항-CD22 IgG 단백질 2-3-14, 2-3-14_H1-24, 2-3-14_H2-40 에 대한 유세포 분석을 나타낸 그래프이다.

[0206] 도 4에 나타낸 바와 같이, 재조합 항-CD22 IgG 단백질이 Raji 세포와 잘 결합함을 확인하였다.

[0208] **실시예 4 항-CD22 단일 또는 항-CD19/CD22 이중특이성 CAR 구축**

[0209] CD19 CAR-발현 벡터(FMC63-CD8 힌지-BBz-pCL20C-MND)를 Dr. Byoung Y. Ryu(St. Jude Hospital, Memphis, TN, USA)에서 도입하고, pCAG 벡터 백본은 Jun-ichi Miyazaki[25]의 pCAGGS를 참고하여 구축하였다. 이 벡터는 CD8의 신호 펩타이드, FMC63 scFv, CD8의 경첩 및 막횡단 도메인, 4-1BB의 세포질 도메인(세포내 보조 자극 도메인(co-stimulatory domain)), 및 CD3ζ 신호전달 도메인이 포함되어있다. 이 벡터의 FMC63 scFv 유전자의 5' 말단에 MYC 유전자를 태그하여 CD19 CAR 구축물을 제조하였다.

[0210] 상기 CD19 CAR 구축물의 FMC63 scFv 유전자를 제한효소 절단하여 제거하고, CI4-47 유전자를 클로닝하여 CD22 단일 CAR구축물을 제조하였다.

[0211] 상기 CD19 CAR 구축물의 FMC63 scFv 유전자를 제한효소 절단하여 제거하고, FMC63 scFv_CI4-47, CI4-47_FMC63 scFv, LOOPCAR6_FMC63 scFv_CI4-47, FMC63 scFv_2-3-14 유전자를 클로닝하여 CD19/CD22 이중특이적 CAR구축물을 제조하였다.

[0212] 상기 방법으로 제조한 CAR 구축물의 예시를 표9에 기재하였다.

표 9

[0213]

		서열	서열번호
CD19 CAR	FMC63_CD8	MALPVTALLLPLALLLHAARPEQKLISEEDLDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	서열번호 55
CD22CAR	CI4-47_CD8	MALPVTALLLPLALLLHAARPEQKLISEEDLLTQPSSVSANPGETVKITCSGGSGGYGWYQQKSPGSAPVSLIYDNDQRPSDIPSRFSGSKSGSTGTLTITGVQADDEAVYYCGSYDSSYVGIFGAGTTLTVLGQSSRSSGGGGSSGGGGSAVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSNYCMQWVRQAPGKGLEWVAGIGSSGTGTYYGSAVRGRATISRDNGQSTVRLQLNNLRAEDTGTYYCARDYGSDSGCGWGIYAGEIDAWGHGTEVIVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	서열번호 56

CD19/ CD22 bispecific CAR	FMC63_CI4-47	MALPVTALLLPLALLLHAARPEQKLISEEDLGRADIQMTQTTSSLSASLGDRV TISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYS LTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKG EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWG SETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYA MDYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSLTQPSSVSANPGETVKITCSGGSG GYGWYQQKSPGSAPVSLIYDNDQRPSDIPSRFSGSKSGSTGTLTITGVQADDE AVYYCGSYDSSYVGIFGAGTTLTVLGQSSRSSGGGGSSGGGGSAVTLDESGGG LQTPGGALSLVCKASGFTFSNYCMQWVRQAPGKGLEWVAGIGSSGTGTYYGSA VRGRATISRDNGQSTVRLQLNNLRAEDTGTYYCARDYGSDSGCGWGIYAGEID AWGHGTEVIVSSLINTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	서열번호 57
	CI4-47_FMC63	MALPVTALLLPLALLLHAARPEQKLISEEDLGRALTQPSSVSANPGETVKITC SGGSGGYGWYQQKSPGSAPVSLIYDNDQRPSDIPSRFSGSKSGSTGTLTITGV QADDEAVYYCGSYDSSYVGIFGAGTTLTVLGQSSRSSGGGGSSGGGGSAVTLD ESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSNYCMQWVRQAPGKGLEWVAGIGSSGTGT YYGSAVRGRATISRDNGQSTVRLQLNNLRAEDTGTYYCARDYGSDSGCGWGIY AGEIDAWGHGTEVIVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQTTSSLSASLGDRVTI SCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLT ISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEV KLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSE TTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMD YWGQGTSVTVSSLINTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	서열번호 58
	LOOPCAR6_FMC63_CI4-47	MALPVTALLLPLALLLHAARPEQKLISEEDLGRADIQMTQTTSSLSASLGDRV TISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYS LTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSAVTLDESGGGLQT PGGALSLVCKASGFTFSNYCMQWVRQAPGKGLEWVAGIGSSGTGTYYGSAVRG RATISRDNGQSTVRLQLNNLRAEDTGTYYCARDYGSDSGCGWGIYAGEIDAWG HGTEVIVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGLTQPSSVSANPGETVKITCSGGSGGY GWYQQKSPGSAPVSLIYDNDQRPSDIPSRFSGSKSGSTGTLTITGVQADDEAV YYCGSYDSSYVGIFGAGTTLTVLGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVS GVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQV FLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSLINTTTPAPRP PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLL SLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVK FSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL PPR	서열번호5 9

[0214] 도 5는 항-CD19 및 항-CD22 단일 특이적 및 이중 특이적 CAR 구조를 나타낸 모식도이다:

[0215] 도 5a는 항-CD19 및 항-CD22 단일 특이적 CAR구조를 나타낸 모식도이다. 항-CD19(FMC63) 및 항-CD22(C14-47) 항원 결합 도메인을 통합하여 단일 특이적 CAR를 생성하였다.

[0216] 도 5b는 항-CD19/CD22 이중특이적 CAR 구조를 나타낸 모식도이다. 항-CD19/CD22 이중특이적 CAR 구조는 NK 세포에 대한 CAR 구조를 최적화하기 위해 4개의 상이한 백본 구조를 사용하여 생성하였다.

[0218] **실시예 5. 항-CD22, 항-CD19/CD22 이중특이성CAR-NK-92 세포의 시험관내 평가**

[0219] CAR-NK-92 세포를 CAR 구조를 발현하는 렌티바이러스 벡터로 형질도입 2회 수행한 후, 48시간 내에 Myc+ 세포를 분류하였다. 그리고 CAR-NK-92 세포를 동결보존하였다. 항 CD19/CD22 이중특이성 CAR-NK-92 세포의 시험관내 평가를 위해, CAR-NK-92 세포를 CFSE로 표지된 OCI-Ly7 세포와 4시간 동안 공배양하고 유세포 분석에 의해 AV/7-AAD를 측정하였다. 그리고 그 결과를 도 6 내지 도 8에 나타내었다.

[0220] 도 6은 항-CD19, 항-CD22, 항-CD19/CD22 이중특이성CAR-NK-92 세포의 시험관내 평가 방법에 대한 모식도이다.

[0221] 도 7는 CAR-NK-92 세포 및 CFSE로 표지된 OCI-Ly7 세포를 공배양한 후 유세포 분석에 의해 AV/7-AAD를 측정한

그래프이다.

[0222] 도 8a는 CFSE+ 표적 세포 중 AV+ 7-AAD- 조기 세포사멸 세포 및 AV+ 7-AAD+ 후기 세포사멸 세포(%)를 나타낸 그래프이고, 도 8b는 CFSE+ 표적 세포의 세포 수를 나타낸 그래프이다.

[0223] 도 6 내지 도 8에 나타낸 바와 같이, 항-CD22, 항-CD19/CD22 이중특이성 CAR-NK-92 세포처리 군에서 NK-92세포 처리군보다 암세포 사멸이 증가함을 확인하였다.

[0225] **실시예 6. 항-CD22, 항-CD19/CD22 이중특이성CAR-NK-92 세포의 생체내 평가**

[0226] CFSE로 표지된 OCI-Ly7 세포를 NSG 마우스에 복강내(i.p.) 주사하고 30분 후 CAR-NK-92 세포를 복강내 주사하였다. 그리고 48시간 후, 복막 세척액을 채취하고 유세포 분석을 수행하여 CFSE+ 표적 세포의 수를 측정하였다. 실시예 5의 항-CD22, 항-CD19/CD22 이중특이적 CAR-NK-92 세포의 생체내 평가 과정 및 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0227] 도 9는 항-CD19/CD22 이중특이적 CAR-NK-92 세포의 생체내 암세포 제거능을 나타낸 결과이다:

[0228] 도 9a는 생체 내 실험 평가 방법에 대한 모식도이고, 도 9b는 항-CD22, 항-CD19/CD22 이중특이적 CAR-NK-92 세포의 생체내 암세포 제거능을 나타낸 그래프이다.

[0229] 도 9에 나타낸 바와 같이, 항-CD22, 항-CD19/CD22 이중특이성 CAR-NK-92세포는 체내 암세포를 제거하였다

[0231] **실시예 7. 항-CD22 항체-약물 복합체의 시험관내 세포독성시험**

[0232] **7.1 Anti-CD22 x anti-cotinine bispecific antibody & cotinine-duocarmycin의 in vitro 세포독성 시험**

[0233] 실시예 2.3에서 제작한 항체 단백질과 Levena Biopharma 사에서 conjugation한 duocarmycin conjugated cotinine을 동일 몰농도로 한 튜브에 첨가 후 혼합하여Anti-CD22 x anti-cotinine bispecific antibody 와 cotinine-duocarmycin 복합체를 제작하였다.

[0234] B cell lymphoma 세포주인 Raji cell에 anti-CD22 (CI4-47, 2-3-14) x anti-cotinine bispecific antibody와 cotinine-duocarmycin의 복합체, negative control인 Herceptin x anti-cotinine bispecific antibody와 cotinine-duocarmycin의 복합체, drug only (cotinine-duocarmycin), 및 DMSO를 각각 농도별로 처리하고 세포독성을 확인하였다.

[0235] 구체적으로, 항-CD22 x 항-cotinine bispecific antibody & cotinine-duocarmycin의 in vitro 세포독성을 시험하기 위하여 하루 전날 마이크로타이터 플레이트에Raji 세포를 웰당 4.5 x 10^3/50ul밀도로 분주하였다. 항-CD22 x anti-cotinine bispecific antibody와 cotinine-duocarmycin (Levena Biopharma, USA)을 각각 동일한 몰농도로 섞은 후, 상온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 이 항체-약물 복합체를 RPMI1640 세포배양배지로 희석하고, Raji 세포가 들어있는 웰에 50ul씩 첨가하였다. 72시간 후 제조사의 지시에 따라 CellTiter-Glo(Promega, USA)를 이용하여 살아있는 세포의 발광을 측정하였다.

[0236] Anti-CD22 x anti-cotinine bispecific antibody & cotinine-duocarmycin의 in vitro 세포독성 결과를 도 10에 나타내었다.

[0237] 도 10은 Anti-CD22 x anti-cotinine bispecific antibody & cotinine-duocarmycin의 in vitro 세포독성 결과를 나타낸 그래프이다.

[0238] 도 10에 나타낸 바와 같이, anti-CD22 항체 처리 군에서 negative control 보다 암세포 사멸이 증가함을 확인하였다.

[0240] **7.2 Anti-CD22 IgG와 MMAE_Protein A 복합체의 in vitro 세포독성 시험**

[0241] 실시예 2.2에서 제작한 항체 단백질과 Levena Biopharma 사에서 구매한 MMAE-Protein A를 동일 몰농도로 한 튜브에 첨가해Anti-CD22 IgG와 MMAE_Protein A 복합체를 제작하였다.

[0242] B cell lymphoma 세포주인 Raji cell에 anti-CD22 (CI4-47_8-1, 2-3-14, 2-3-14_H1-24, 2-3-14_H2-40) IgG와

MMAE_Protein A (Levena Biopharma)를 동일 몰농도로 섞은 복합체를 농도별로 처리하고 세포 독성을 확인하였다.

[0243] 구체적으로, 항-CD22 IgG와 MMAE_Protein A 복합체의 in vitro 세포독성을 시험하기 위하여 마이크로타이터 플레이트에Raji 세포를 웰당 4.5 x 10^3/50ul밀도로 분주하였다. 항-CD22 IgG 단백질과 MMAE-Protein A(Levena Biopharma, USA)를 각각 동일한 몰농도로 섞은 후, 상온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 이 항체-약물 복합체를 RPMI1640 세포배양배지로 희석하고, Raji 세포가 들어있는 웰에 50ul씩 첨가하였다. 72시간 후 제조사의 지시에 따라 CellTiter-Glo(Promega, USA)를 이용하여 살아있는 세포의 발광을 측정하였다.

[0244] 도 11은 Anti-CD22 IgG와 MMAE_Protein A 복합체의 in vitro 세포독성 결과를 나타낸 그래프이다:

[0245] 도 11a는 항-CD22 (CI4-47_8-1) IgG와 MMAE_Protein A 복합체의 세포독성시험 결과이고, 도 11b는 항-CD22 (2-3-14, 2-3-14_H1-24, 2-3-14_H2-40) IgG와 MMAE_Protein A 복합체의 세포독성시험 결과를 나타낸 그래프이다.

[0246] 도 11에 나타낸 바와 같이, anti-CD22 항체 처리 군에서 MMAE_Protein A 단독 처리 군보다 암세포 사멸이 증가함을 확인하였다.

[0248] **실시예 8. 항-CD22 x 항-CD3 이중특이성 항체의 시험관내 IL-2 분비 시험**

[0249] B cell lymphoma 세포주인 Raji cell에 anti-CD22 (CI4-47) x anti-CD3 (blinatumomab의 CD3 scFv) bispecific antibody, 및 negative control인 anti-CD22 (CI4-47) x irrelevant scFv bispecific antibody를 각각 농도별로 처리한 후, T 세포주인 Jurkat E6.1 cell와 공동배양하고 세포배양액 내 IL-2 농도를 ELISA로 측정하였다.

[0250] 구체적으로, 96웰 U-bottom 플레이트에 Raji 세포를 1 x 10^4개, Jurkat E6.1 세포를 1 x 10^5개 분주하고, 항-CD22 x 항-CD3 이중특이성 항체를 RPMI1640 세포배양배지로 순차적으로 희석한 후, 세포와 RPMI1640 세포배양배지가 150ul씩 들어있는 웰에 50ul씩 첨가하였다. 72시간 후 원심분리하여 세포배양액을 회수하고, IL-2 농도를 Human IL-2 ELISA kit(ThermoFisher Scientific, USA)를 이용하여 제조사의 지시에 따라 측정하였다.

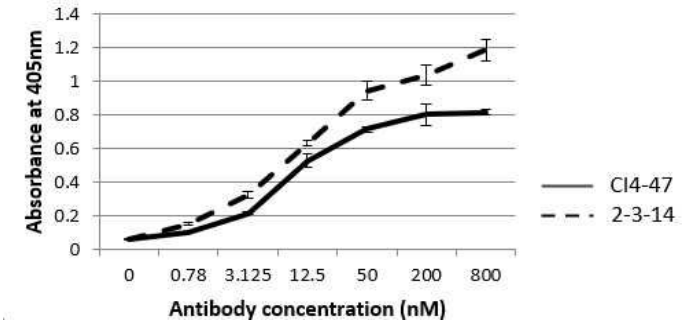
[0251] 도 12는 Anti-CD22 x anti-CD3 bispecific antibody의 in vitro IL-2 secretion assay 결과를 나타낸 그래프이다:

[0252] 도 12a는 CI4-47 x anti-CD3(blinatumomab) 이중특이적항체 처리군과 CI4-47 x irrelevant antibody 음성대조군항체 처리군의 IL-2 secretion assay 결과이고, 도 12b는 blinatumomab, CI4-47_8-1 x anti-CD3(blinatumomab), CI4-47_8-1_H1-2-1 x anti-CD3(blinatumomab), CI4-47_8-1_H1-2-37 x anti-CD3(blinatumomab) 이중특이적항체 처리군의 IL-2 secretion assay 결과이며, 도 12c는 blinatumomab, 2-3-14 x anti-CD3(blinatumomab), 2-3-14_H1-24 x anti-CD3(blinatumomab), 2-3-14_H2-40 x anti-CD3(blinatumomab) 이중특이적항체 처리군의 IL-2 secretion assay 결과이다.

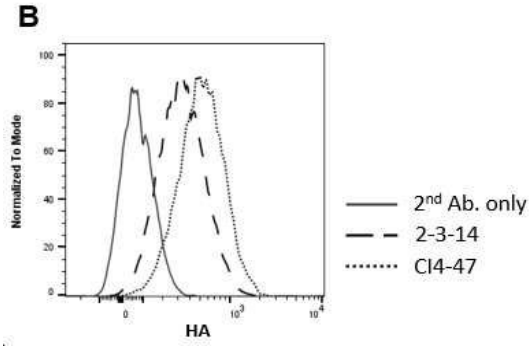
[0253] 도 12에 나타낸 바와 같이, anti-CD22 x anti-CD3 항체 처리 군에서 negative control 보다 IL-2 생성이 증가함을 확인하였다.

도면

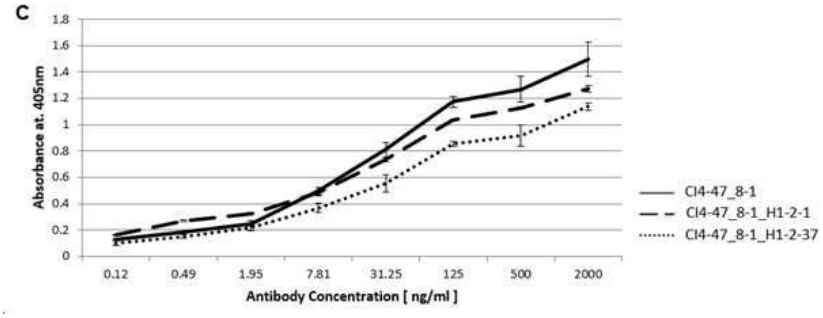
도면1



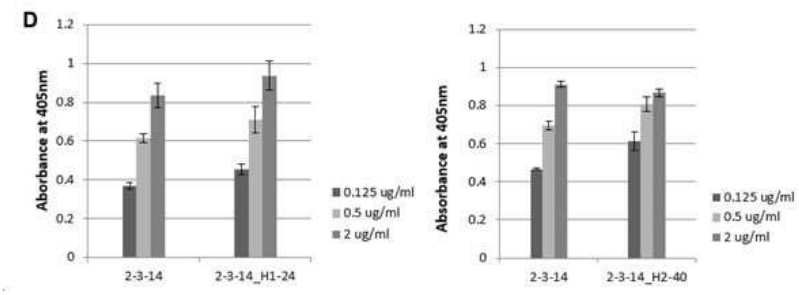
도면2



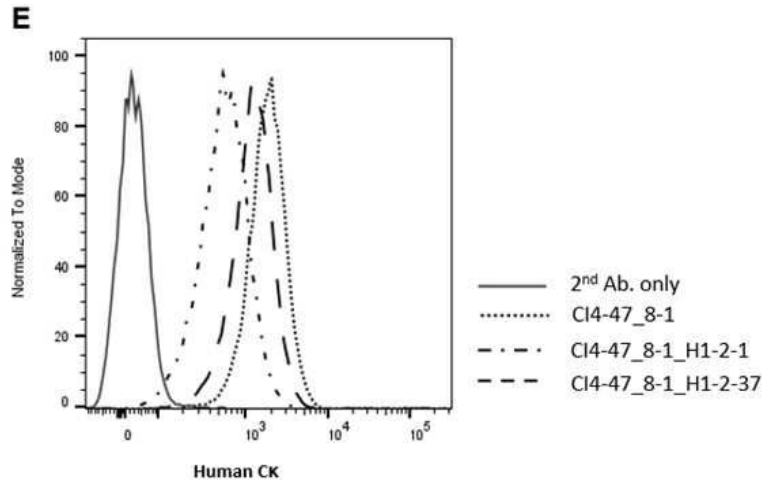
도면3a



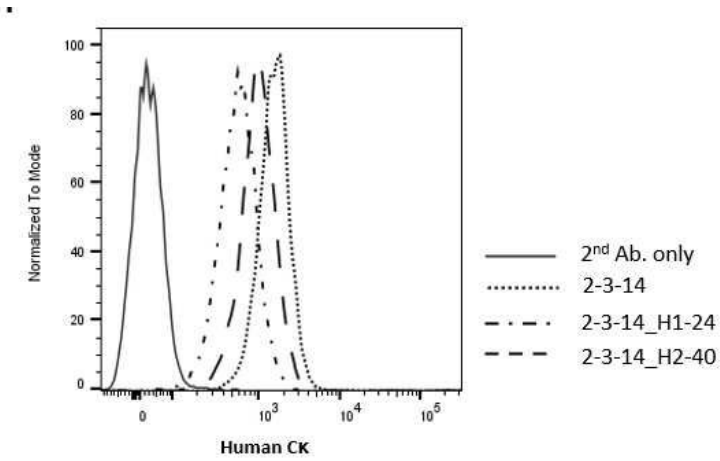
도면3b



도면4a



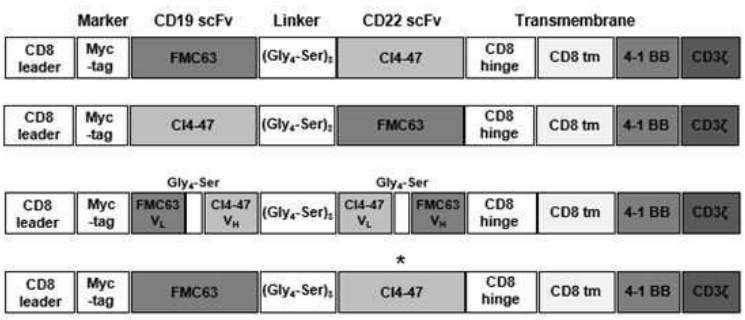
도면4b



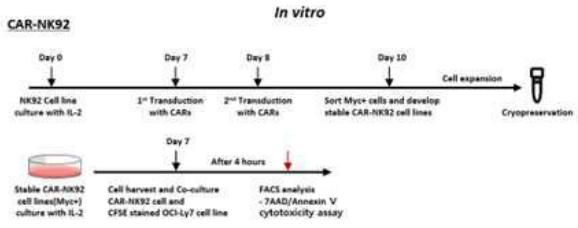
도면5a



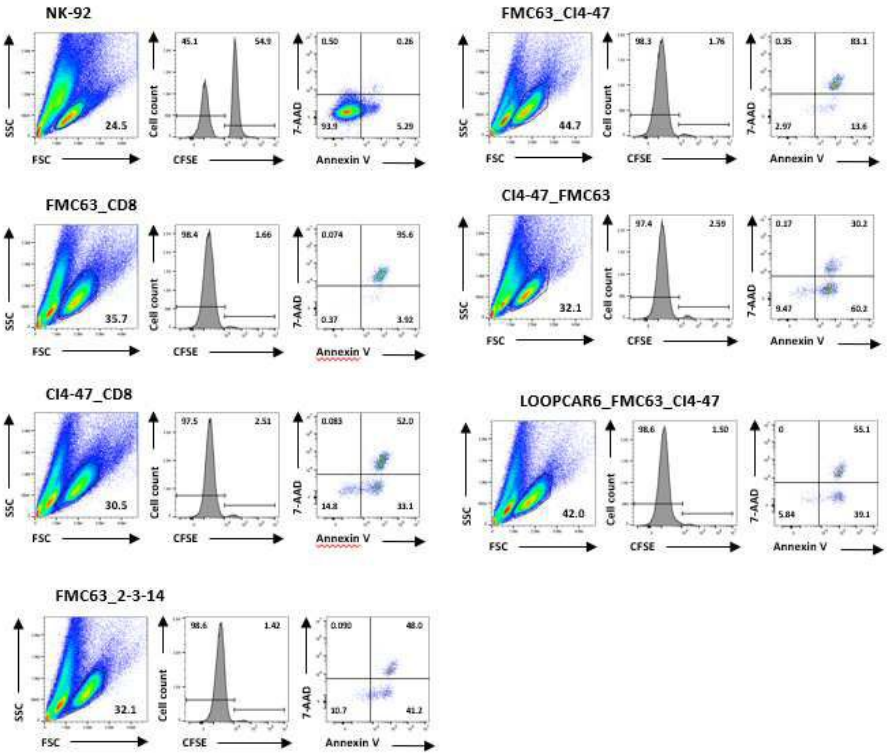
도면5b



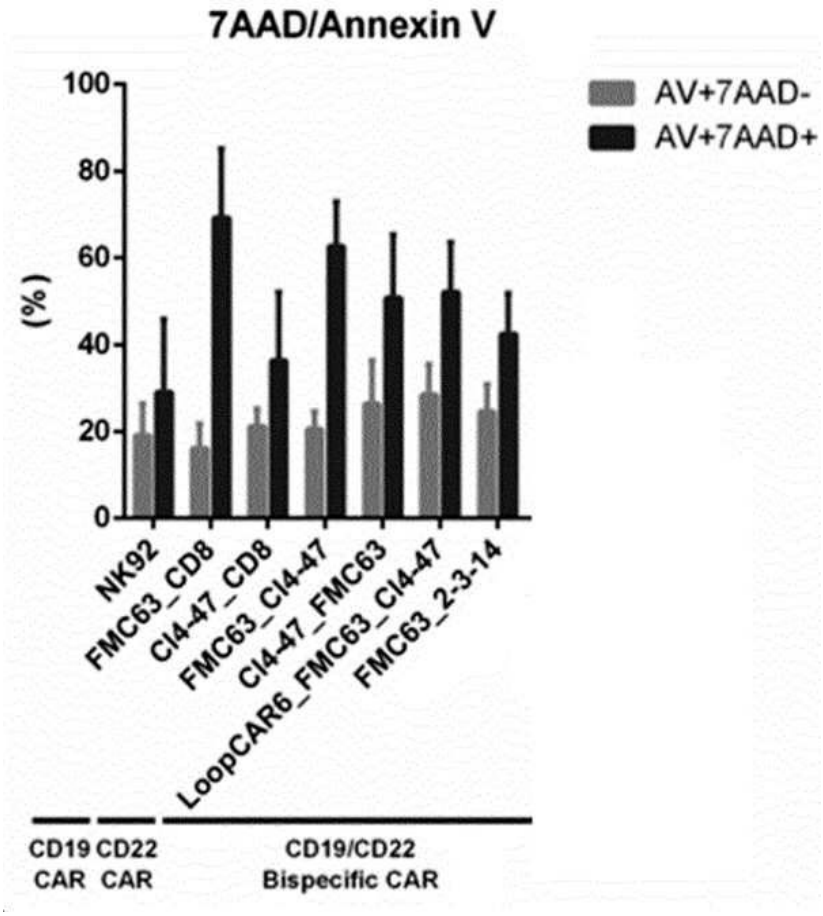
도면6


CAR-NK92
In vitro
Day 0
Day 7
Day 8
Day 10
Cell expansion
NK92 Cell line culture with IL-2
1st Transduction with CARs
2nd Transduction with CARs
Sort Myc+ cells and develop stable CAR-NK92 cell lines
Cryopreservation
Day 7
After 4 hours
Stable CAR-NK92 cell lines(Myc+) culture with IL-2
Cell harvest and Co-culture CAR-NK92 cell and CFSE stained OCI-Ly7 cell line
FACS analysis - 7AAD/Annexin V cytotoxicity assay

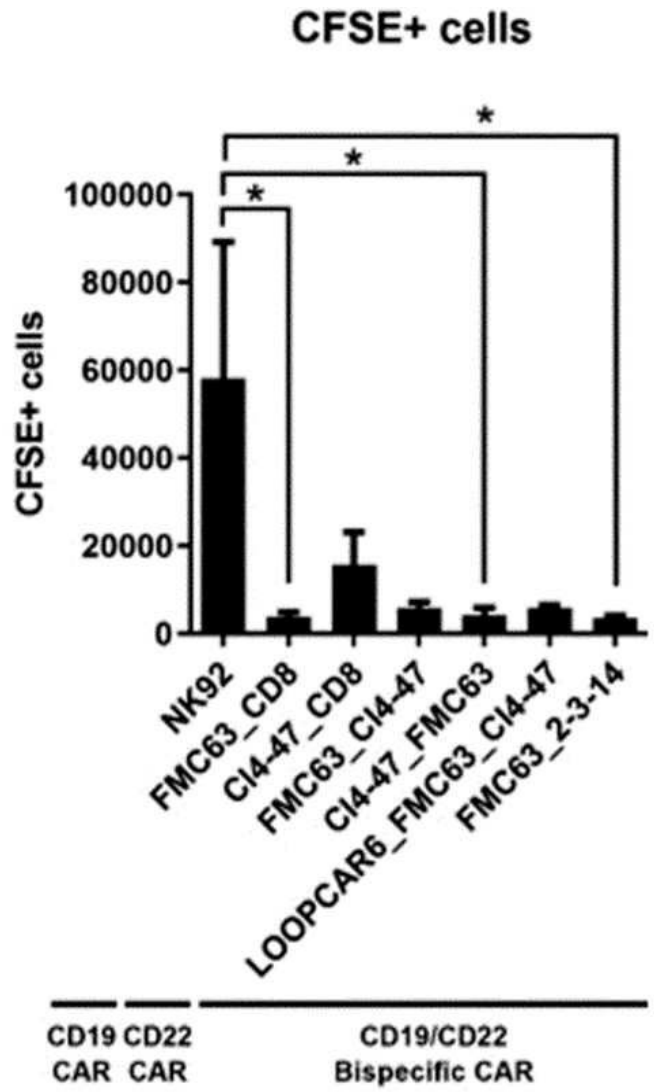
도면7


NK-92
FMC63_CI4-47
FMC63_CD8
CI4-47_FMC63
CI4-47_CD8
LOOPCAR6_FMC63_CI4-47
FMC63_2-3-14
SSC
FSC
Cell count
CFSE
7-AAD
Annexin V

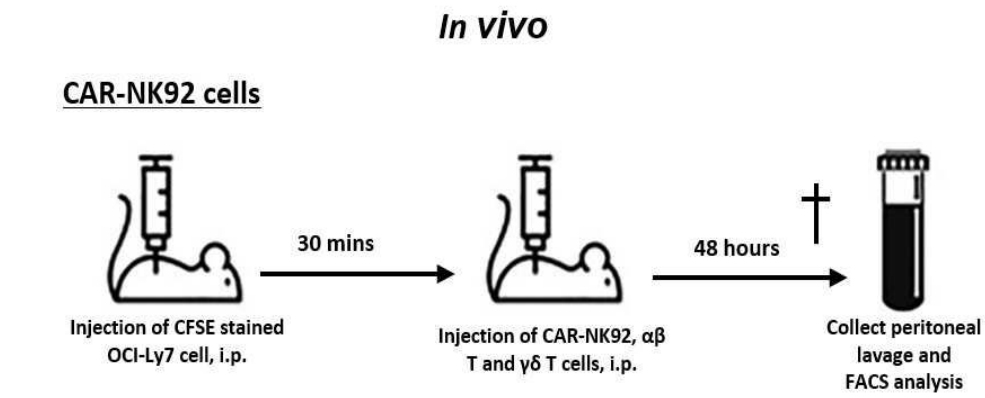
도면8a


7AAD/Annexin V
AV+7AAD-
AV+7AAD+
100
80
60
40
20
0
(%)
NK92
FMC63_CD8
CI4-47_CD8
FMC63_CI4-47
CI4-47_FMC63
LoopCAR6_FMC63_CI4-47
FMC63_2-3-14
CD19 CAR
CD22 CAR
CD19/CD22 Bispecific CAR

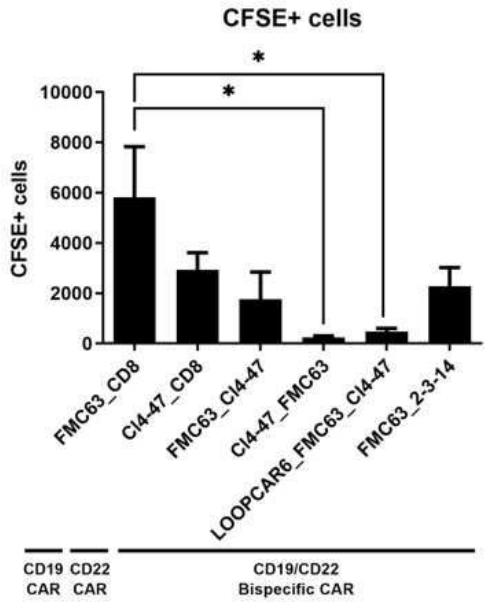
도면8b


CFSE+ cells
CFSE+ cells
100000
80000
60000
40000
20000
0
*
*
*
NK92
FMC63_CD8
CI4-47_CD8
FMC63_CI4-47
CI4-47_FMC63
LOOPCAR6_FMC63_CI4-47
FMC63_2-3-14
CD19 CAR
CD22 CAR
CD19/CD22 Bispecific CAR

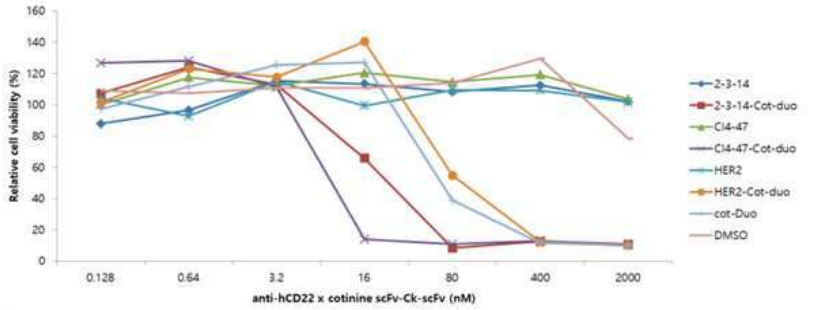
도면9a


In vivo
CAR-NK92 cells
30 mins
48 hours
Injection of CFSE stained OCI-Ly7 cell, i.p.
Injection of CAR-NK92, αβ T and γδ T cells, i.p.
Collect peritoneal lavage and FACS analysis

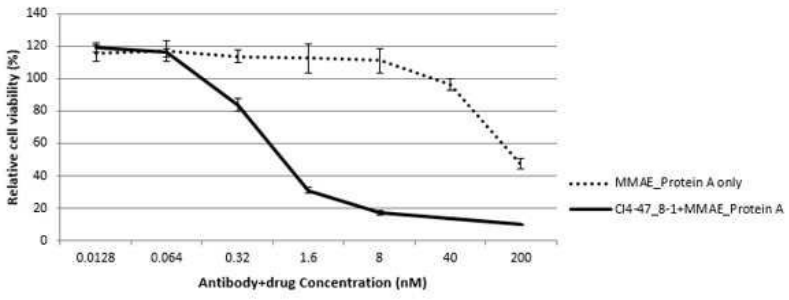
도면9b



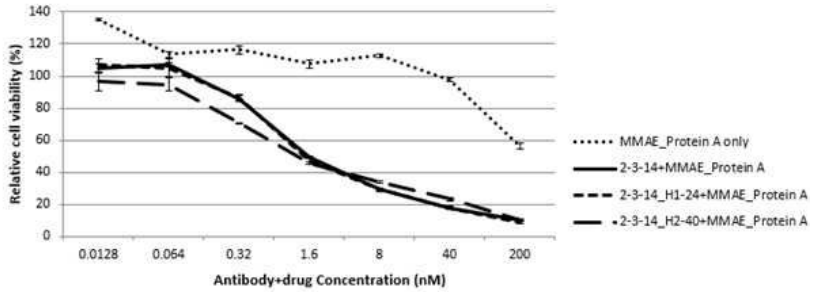
도면10



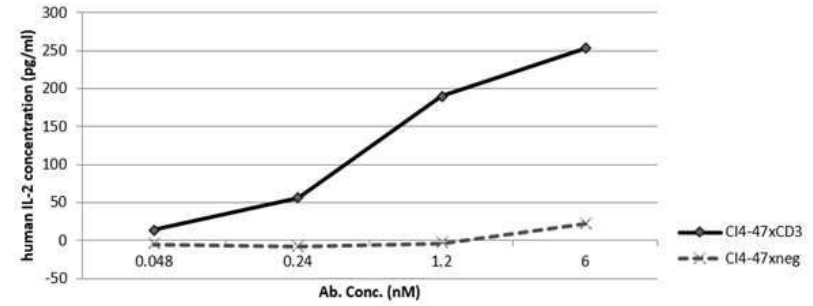
도면11a



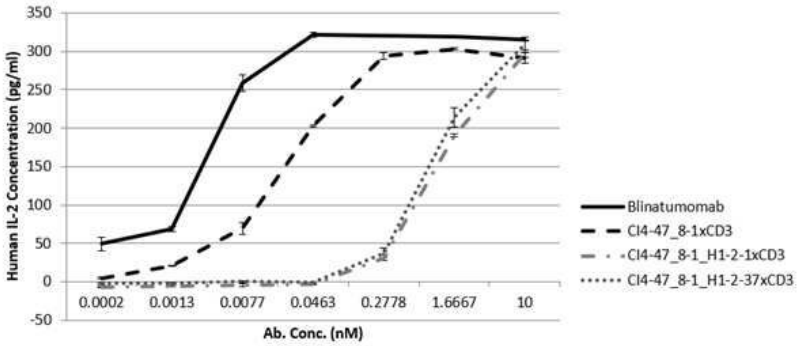
도면11b



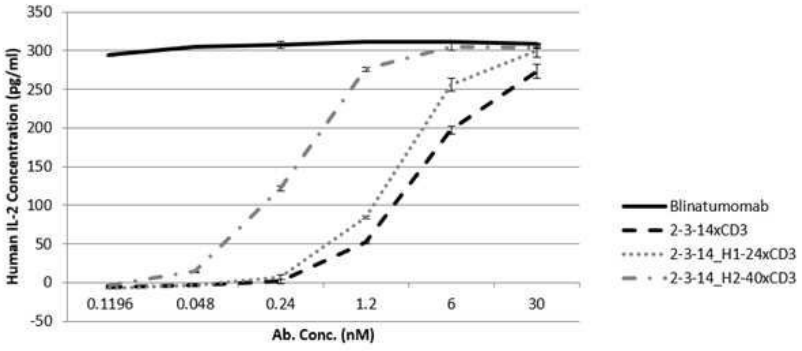
도면12a



도면12b



도면12c



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.