



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년10월07일  
(11) 등록번호 10-2713140  
(24) 등록일자 2024년09월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/28 (2006.01) A61K 35/17 (2015.01)  
C07K 14/705 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)  
(52) CPC특허분류  
C07K 16/2839 (2013.01)  
A61K 35/17 (2023.05)  
(21) 출원번호 10-2018-7006417  
(22) 출원일자(국제) 2016년08월02일  
심사청구일자 2021년07월20일  
(85) 번역문제출일자 2018년03월06일  
(65) 공개번호 10-2018-0030922  
(43) 공개일자 2018년03월26일  
(86) 국제출원번호 PCT/JP2016/072688  
(87) 국제공개번호 WO 2017/026331  
국제공개일자 2017년02월16일  
(30) 우선권주장  
JP-P-2015-159240 2015년08월11일 일본(JP)  
(56) 선행기술조사문헌  
Geoffrey W. Krissansen et al., FEBS Letters,  
vol. 296, no. 1, pp.25-28, Jan 1992  
Paola Neri et al., Blood, vol. 117, no. 23,  
pp.6202-6213(2011.06.09.)  
WO2014160753 A1

(73) 특허권자  
고꾸리쯔 다이가꾸 호우징 오사까 다이가꾸  
일본 565-0871 오사까후 스이따시 야마다오까 1방  
1고  
(72) 발명자  
호센, 나오키  
일본 5650871 오사까후 스이따시 야마다오까 1방  
1고 고꾸리쯔 다이가꾸 호우징 오사까 다이가꾸  
내  
스기야마, 하루오  
일본 5650871 오사까후 스이따시 야마다오까 1방  
1고 고꾸리쯔 다이가꾸 호우징 오사까 다이가꾸  
내  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
장수길, 오현식, 박보현

전체 청구항 수 : 총 12 항

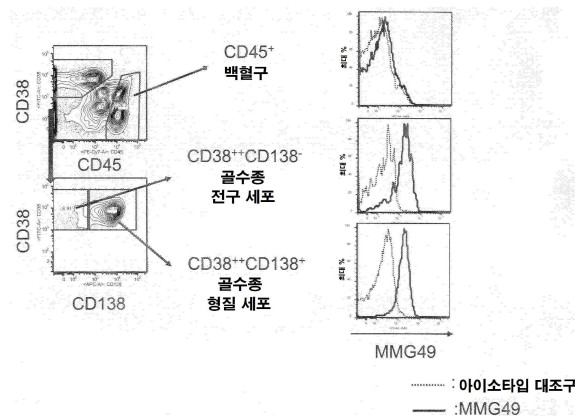
심사관 : 최홍석

(54) 발명의 명칭 항체

(57) 요약

글수중 치료용 약학 조성물의 활성 성분이 제공된다. 본 항체는 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 20 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기를 포함하는 위치에 그의 에피토프를 갖는다.

대표도



(52) CPC특허분류

**C07K 14/705** (2013.01)

**C12N 5/0636** (2023.05)

**C07K 2317/31** (2013.01)

**C07K 2319/03** (2013.01)

**C12N 2510/00** (2013.01)

(72) 발명자

**구마노고, 아츠시**

일본 5650871 오사까후 스이따시 야마다오까 1방

1고 고크리쯔 다이가꾸 호우징 오사까 다이가꾸 내

**다카기, 준이치**

일본 5650871 오사까후 스이따시 야마다오까 1방

1고 고크리쯔 다이가꾸 호우징 오사까 다이가꾸 내

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

서열번호 1에 설명된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1,  
서열번호 2에 설명된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2, 및  
서열번호 3에 설명된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3  
을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및  
서열번호 6에 설명된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR1,  
서열번호 7에 설명된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR2, 및  
서열번호 8에 설명된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR3  
을 포함하는 경쇄 가변 영역  
을 포함하는, 항체.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 항체는:  
서열번호 4에 설명된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및/또는  
서열번호 9에 설명된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역  
을 포함하는, 항체.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 다중특이성 항체인, 항체.

#### 청구항 4

제1항 또는 제2항의 항체를 암호화하는 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드.

#### 청구항 5

제4항의 폴리뉴클레오티드를 보유하는 단리된 숙주 세포.

#### 청구항 6

서열번호 1에 설명된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1,  
서열번호 2에 설명된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2, 및  
서열번호 3에 설명된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3  
을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및  
서열번호 6에 설명된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR1,  
서열번호 7에 설명된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR2, 및  
서열번호 8에 설명된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR3  
을 포함하는 경쇄 가변 영역  
을 포함하는 키메라성 항원 수용체.

#### 청구항 7

제6항의 키메라성 항원 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드.

#### 청구항 8

제7항에 있어서, 서열번호 22에 설명된 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드.

#### 청구항 9

제7항의 폴리뉴클레오티드를 보유하는 세포로서, 인간 체내에 존재하는 상태의 세포, 인간 생식 세포 및 인간 배아 세포를 제외한 것인, 세포.

#### 청구항 10

제9항에 있어서, 키메라성 항원 수용체 T-세포인, 세포.

#### 청구항 11

제1항 또는 제2항의 항체, 또는 상기 항체의 항원 인식 부위를 포함하는 키메라성 항원 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 보유하는 세포를 포함하는, 다발성 골수종의 치료용 약학 조성물로서, 상기 세포는 인간 체내에 존재하는 상태의 세포, 인간 생식 세포 및 인간 배아 세포를 제외한 것인, 약학 조성물.

#### 청구항 12

제1항 또는 제2항의 항체, 또는 상기 항체의 항원 인식 부위를 포함하는 키메라성 항원 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 보유하는 키메라성 항원 수용체 T-세포를 포함하는, 다발성 골수종의 치료용 약학 조성물로서, 상기 세포는 인간 체내에 존재하는 상태의 세포를 제외한 것인, 약학 조성물.

#### 청구항 13

삭제

#### 청구항 14

삭제

#### 청구항 15

삭제

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 신규 항체, 그의 이용 등이 개시된다.

### 배경 기술

[0002] 형질 세포(plasma cell)의 종양성 증식을 일으키는 질환의 통상적인 예인 다발성 골수종은, 모든 암 중 약 1%를 차지하며, 모든 혈액학적 악성 종양 중 10%를 조금 넘게 차지한다. 다발성 골수종은 골수에 존재하는 형질 세포가 암성이 되고 (결과적으로 이상 형질 세포가 됨), 단일클론성으로 성장하게 되는 질환이다.

[0003] 다발성 골수종에서, 이상 형질 세포 (골수종 세포)는 신체 전체에 걸쳐 골수로 퍼지고, 전체 신체를 통해 골수의 모든 부분에서 성장한다. 이상 형질 세포가 성장하면, 뼈의 파괴를 포함한 각종 증상들이 나타난다. 골수종 세포는 이상 면역글로불린인 M 단백질을 생산하여 혈중 M 단백질 농도를 증가시키고, 따라서 혈액은 점질성이 된다.

[0004] M 단백질은, 신체로 들어온 병원균과 같은 이물질을 인식하는 본래의 항체로서 기능하지 않는다. 따라서, 면역능이 감소된다. 이러한 현상은 많은 장기에 영향을 미치며, 이에 따라 각종 증상이 나타난다. 통상적인 증상은 뼈의 통증 및 손상, 고칼슘혈증, 신장병 및 신부전, 빈혈 등이 있다.



- [0005] 현재, 다발성 골수종의 치료로서, 프로테아좀 저해제, iMID, 예컨대 탈리도마이드 및 그의 유도체, 특히 레날리도마이드, 및 예를 들어 프레드니손과 조합되어 사용되는 멜팔란을 이용하는 화학요법, 및 조혈성 줄기 세포 이식이 주로 사용된다.
- [0006] 그러나, 골수종 세포는 대부분의 경우 결국에는 그러한 치료제들에 대해 저항성을 획득한다. 따라서, 골수종 환자가 발병 후 약 3 년 내지 약 5 년의 평균 생존 기간을 갖는 가망 없는 예후를 갖는 것이 현재 치료 수단의 현실이다. 추가적으로, 그러한 치료제는 표적으로 제공되는 종양 세포에만 특이적으로 작용하는 것이 아니므로, 정상 세포에도 독성을 나타내는 문제를 가지고, 결과적으로 심각한 부작용을 일으킨다.
- [0007] 단일클론성 항체를 이용하는 다발성 골수종의 치료 방법을 개발하기 위한 시도가 있어 왔다. 예를 들어, 항-CS1 항체, 및 항-CD38 항체 등이 유망한 것으로 여겨진다 (비특허문헌 1 및 2). 추가적으로, 특허문헌 1에는 항-인간 CD48 단일클론성 항체를 활성 성분으로서 사용하는, 다발성 골수종 등에 대한 치료제가 개시되어 있다.
- [0008] 인테그린은 주로  $\alpha$ -사슬 및  $\beta$ -사슬의 헤테로다имер를 형성하여 생체 내 세포 표면 상에서 수용체로서의 기능을 제공한다. 그러한 인테그린의  $\alpha$ -사슬 및  $\beta$ -사슬의 많은 조합이 존재한다.
- [0009] 추가적으로, 비특허문헌 4 내지 6에는, 키메라성 항원 수용체 T-세포 (CAR-T 세포)가 개시되어 있으며, 이는 특정 항원에 대해 친화성을 갖는 항원 인식 부위를 포함한다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) PTL 1: WO 2010/117059 A1

### 비특허문헌

- [0011] (비특허문헌 0001) NPL 1: Journal of Clinical Oncology, 2012 Jun 1; 30(16): 1953-9.
- (비특허문헌 0002) NPL 2: Journal of immunology, 2011 Feb 1; 186(3): 1840-8.
- (비특허문헌 0003) NPL 3: J Biol Chem. 2012 May 4; 287(19): 15749-59.
- (비특허문헌 0004) NPL 4: J Immunol. 2009 Nov 1; 183(9): 5563-74.
- (비특허문헌 0005) NPL 5: N Engl J Med. 2014 Oct 16; 371(16): 1507-17.
- (비특허문헌 0006) NPL 6: Nat Biotechnol. 2002 Jan; 20(1): 70-5.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0012] 항-CS1 항체는 골수종 세포에 대해 비교적 높은 특이성을 갖는다. 그러나, 항체 단독으로는 높은 항-골수종 효과를 갖는다고 할 수 없고, 단일 약제로서 그의 유효성은 임상 시험에서 증명되지 않았다. 항-CS1 항체의 항-종양 효과는 레날리도마이드와의 병용을 통해 증가됨이 발견되었고, 그의 병용에 대한 승인을 받고자 하는 것이 고려된다. 한편, CD38은 CD34-양성 조혈성 전구세포를 포함하는 많은 정상 혈액 세포에서 또한 발현되며, 따라서 다발성 골수종의 치료 표적으로서 낮은 특이성을 갖는 항원이다. 이러한 환경 하에서, 본 발명의 목적은 예를 들어, 다발성 골수종과 같이 형질 세포의 종양성 증식을 수반하는 질환의 치료에 더욱 효과적인 수단을 제공하고자 하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명의 발명자들은 그러한 목적을 달성하기 위하여 광범위한 연구를 수행하였으며, 그 결과로서, 골수종 세포 및 그의 전구체에 대한 특이적 결합을 표지로서 이용하여 스크리닝을 수행함으로써 MMG49 항체를 수득하였다. 추가적으로, 본 발명자들은 그러한 항체가 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 특정 영역에 결합한다는 것을 확인

하였으며, 그러한 항체의 항원 인식 부위를 이용하여 생성된 CAR-T 세포가 골수종의 치료에 극히 유용함을 발견하였다. 추가적으로, 본 발명자들은 MMG49 항체의 에피토프가 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 20 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역에 존재함을 또한 밝혔다.

- [0014] 본 발명은 그러한 발견을 기반으로 완성되었으며, 아래 설명된 광범위한 태양의 발명을 포함한다.
- [0015] (I) 항체
- [0016] 항체 (I)은 다음 항목 (I-1) 내지 항목 (I-25)에서 설명되는 항체를 포함한다.
- [0017] (I-1)
- [0018] 항-인간 인테그린  $\beta_7$  항체로서, 그의 에피토프가 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 20 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역에 존재하는, 항체.
- [0019] (I-1A)
- [0020] 항목 (I-1)에 있어서, 그의 에피토프가 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 33 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역에 존재하는, 항체.
- [0021] (I-1B)
- [0022] 항목 (I-1)에 있어서, 그의 에피토프가 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 20 번째 내지 90 번째 아미노산 잔기 위치의 영역에 존재하는, 항체.
- [0023] (I-1C)
- [0024] 항목 (I-1)에 있어서, 그의 에피토프가 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 33 번째 내지 90 번째 아미노산 잔기 위치의 영역에 존재하는, 항체.
- [0025] (I-2)
- [0026] 항목 (I-1)에 있어서, 그의 에피토프에 대한 친화성이 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 379 번째 내지 721 번째 아미노산 잔기 위치의 영역의 적어도 일부 존재 하에서 증가하는, 항체.
- [0027] (I-3)
- [0028] 항목 (I-2)에 있어서, 그의 에피토프에 대한 친화성이 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 417 번째 내지 721 번째 아미노산 잔기 위치의 영역의 적어도 일부 존재 하에서 증가하는, 항체.
- [0029] (I-4)
- [0030] 항목 (I-2)에 있어서, 그의 에피토프에 대한 친화성이 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 564 번째 내지 721 번째 아미노산 잔기 위치의 영역의 적어도 일부 존재 하에서 증가하는, 항체.
- [0031] (I-5)
- [0032] 항목 (I-2)에 있어서, 그의 에피토프에 대한 친화성이 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 379 번째 내지 563 번째 아미노산 잔기 위치의 영역의 적어도 일부 존재 하에서 증가하는, 항체.
- [0033] (I-6)
- [0034] 항목 (I-2)에 있어서, 그의 에피토프에 대한 친화성이 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 417 번째 내지 563 번째 아미노산 잔기 위치의 영역의 적어도 일부 존재 하에서 증가하는, 항체.
- [0035] (I-7)
- [0036] 항목 (I-2)에 있어서, 그의 에피토프에 대한 친화성이 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 379 번째 내지 416 번째 아미노산 잔기 위치의 영역의 적어도 일부 존재 하에서 증가하는, 항체.
- [0037] (I-8)

- [0038] 항목 (I-1) 내지 항목 (I-7) 중 어느 하나에 있어서, 그의 에피토프에 대한 친화성이 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 활성화를 통해 증가되는, 항체.
- [0039] (I-9)
- [0040] 항-인간 인테그린  $\beta_7$  항체로서, 골수종 세포 상에서 발현된 인간 인테그린  $\beta_7$ 에 대한 그의 친화성이 정상 세포 상에서 발현된 인간 인테그린  $\beta_7$ 에 대한 친화성보다 더욱 높은, 항체.
- [0041] (I-10)
- [0042] 항목 (I-1) 내지 항목 (I-9) 중 어느 하나에 있어서, 그의 에피토프가 MMG49 항체의 에피토프와 동일한, 항체.
- [0043] (I-11)
- [0044] 항목 (I-1) 내지 항목 (I-10) 중 어느 하나에 있어서,
- [0045] 서열번호 1에 설명된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1;
- [0046] 서열번호 2에 설명된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2; 및/또는
- [0047] 서열번호 3에 설명된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3
- [0048] 을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는
- [0049] 서열번호 6에 설명된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR1;
- [0050] 서열번호 7에 설명된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR2; 및/또는
- [0051] 서열번호 8에 설명된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR3
- [0052] 을 포함하는 경쇄 가변 영역
- [0053] 을 포함하는, 항체.
- [0054] (I-12)
- [0055] 항목 (I-1) 내지 항목 (I-10) 중 어느 하나에 있어서,
- [0056] 서열번호 4에 설명된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및/또는
- [0057] 서열번호 9에 설명된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역
- [0058] 을 포함하는, 항체.
- [0059] (I-13)
- [0060] 항목 (I-1) 내지 항목 (I-12) 중 어느 하나에 있어서, Fv, scFv, 디아바디(diabody), 트라이아바디(triobody), 테트라바디, 또는 이들의 조합인, 항체.
- [0061] (I-14)
- [0062] 항목 (I-1) 내지 항목 (I-11) 중 어느 하나에 있어서, 불변 영역을 포함하는, 항체.
- [0063] (I-15)
- [0064] 항목 (I-1) 내지 항목 (I-12) 및 항목 (I-14) 중 어느 하나에 있어서, 키메라성 항체인, 항체.
- [0065] (I-16)
- [0066] 항목 (I-1) 내지 항목 (I-12) 및 항목 (I-14) 중 어느 하나에 있어서, 인간화된 항체인, 항체.
- [0067] (I-17)
- [0068] 항목 (I-1) 내지 항목 (I-12) 및 항목 (I-14) 중 어느 하나에 있어서, 인간 항체인, 항체.
- [0069] (I-18)
- [0070] 항목 (I-1) 내지 항목 (I-12) 및 항목 (I-14) 내지 항목 (I-17) 중 어느 하나에 있어서, 면역글로불린, Fab,

F(ab')<sub>2</sub>, 미니바디(minibody), scFv-Fc, 또는 이의 조합인, 항체.

- [0071] (I-19)
- [0072] 항목 (I-1) 내지 항목 (I-12) 및 항목 (I-14) 내지 항목 (I-18) 중 어느 하나에 있어서, IgA, IgD, IgE, IgG, 또는 IgM인, 항체.
- [0073] (I-20)
- [0074] 항목 (I-1) 내지 항목 (I-12) 및 항목 (I-14) 내지 항목 (I-19) 중 어느 하나에 있어서, 서열번호 5에 설명된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및/또는 서열번호 10에 설명된 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함하는, 항체.
- [0075] (I-21)
- [0076] 항목 (I-1) 내지 항목 (I-20) 중 어느 하나에 있어서, 세포독성 활성을 갖는, 항체.
- [0077] (I-22)
- [0078] 항목 (I-21)에 있어서, 세포독성 활성은 ADCC 활성 및/또는 CDC 활성인, 항체.
- [0079] (I-23)
- [0080] 항목 (I-1) 내지 항목 (I-22) 중 어느 하나에 있어서, 다중특이성 항체인, 항체.
- [0081] (I-24)
- [0082] 항목 (I-1) 내지 항목 (I-23) 중 어느 하나에 있어서, 거기에 결합된 세포독소(cytotoxin)를 갖는, 항체.
- [0083] (I-25)
- [0084] 항목 (I-1) 내지 항목 (I-24) 중 어느 하나에 있어서, 단일클론성 항체인, 항체.
- [0085] (II) 폴리뉴클레오티드
- [0086] 폴리뉴클레오티드 (II)는 하기 항목 (II-1)에 설명된 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0087] (II-1)
- [0088] 항체 (I)의 아미노산 서열을 암호화하는 염기 서열을 갖는, 폴리뉴클레오티드.
- [0089] (III) 숙주 세포
- [0090] 숙주 세포 (III)은 하기 항목 (III-1) 또는 항목 (III-2)에 설명된 숙주 세포를 포함한다.
- [0091] (III-1)
- [0092] 폴리뉴클레오티드 (II)를 보유하는(harbor), 숙주 세포.
- [0093] (III-2)
- [0094] 항목 (III-1)에 있어서, 진핵세포인, 숙주 세포.
- [0095] (IV) 키메라성 항원 수용체
- [0096] 키메라성 항원 수용체 (IV)는 하기 항목 (IV-1) 내지 (IV-5)에 설명된 키메라성 항원 수용체를 포함한다.
- [0097] (IV-1)
- [0098] 그 에피토프가 항체 (I)의 에피토프와 동일한, 키메라성 항원 수용체.
- [0099] (IV-2)
- [0100] 항목 (IV-1)에 있어서, 항체 (I)의 항원 인식 부위를 포함하는 키메라성 항원 수용체.
- [0101] (IV-3)
- [0102] 항목 (IV-1) 또는 항목 (IV-2)에 있어서, 항원 인식 부위가:
- [0103] 서열번호 1에 설명된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1;

- [0104] 서열번호 2에 설명된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2; 및/또는
- [0105] 서열번호 3에 설명된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3
- [0106] 을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는
- [0107] 서열번호 6에 설명된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR1;
- [0108] 서열번호 7에 설명된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR2; 및/또는
- [0109] 서열번호 8에 설명된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR3
- [0110] 을 포함하는 경쇄 가변 영역
- [0111] 을 포함하는, 키메라성 항원 수용체.
- [0112] (IV-4)
- [0113] 항목 (IV-1) 내지 항목 (IV-3) 중 어느 하나에 있어서, 항원 인식 부위가:
- [0114] 서열번호 4에 설명된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및/또는
- [0115] 서열번호 9에 설명된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역
- [0116] 을 포함하는, 키메라성 항원 수용체.
- [0117] (IV-5)
- [0118] 항목 (IV-1) 내지 항목 (IV-4) 중 어느 하나에 있어서, 서열번호 21에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 키메라성 항원 수용체.
- [0119] (V) 폴리뉴클레오티드
- [0120] 폴리뉴클레오티드 (V)는, 폴리뉴클레오티드 (II)와 달리, 하기 항목 (V-1) 또는 항목 (V-2)에 설명된 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0121] (V-1)
- [0122] 키메라성 항원 수용체 (IV)의 아미노산 서열을 암호화하는, 폴리뉴클레오티드.
- [0123] (V-2)
- [0124] 항목 (V-1)에 있어서, 서열번호 22에 나타낸 염기 서열을 갖는, 폴리뉴클레오티드.
- [0125] (VI) 세포
- [0126] 세포 (VI)은 숙주 세포 (III)과 달리, 하기 항목 (VI-1) 내지 항목 (VI-4) 중 어느 하나에 설명된 세포를 포함한다.
- [0127] (VI-1)
- [0128] 폴리뉴클레오티드 (V)를 보유하는, 세포.
- [0129] (VI-2)
- [0130] 항목 (VI-1)에 있어서, 진핵 세포인, 세포.
- [0131] (VI-3)
- [0132] 항목 (VI-1) 또는 항목 (VI-2)에 있어서, T-세포 또는 NK 세포인, 세포.
- [0133] (VI-4)
- [0134] 항목 (VI-1) 내지 항목 (VI-3) 중 어느 하나에 있어서, 키메라성 항원 수용체 T-세포 또는 키메라성 항원 수용체 NK 세포인, 세포.
- [0135] (VII) 약학 조성물
- [0136] 약학 조성물 (VII)은 하기 항목 (VII-1) 내지 항목 (VII-5)에 설명된 약학 조성물을 포함한다.

- [0137] (VII-1)
- [0138] 항체 (I) 또는 세포 (VI)을 포함하는, 약학 조성물.
- [0139] (VII-2)
- [0140] 항목 (VII-1)에 있어서, 세포가 키메라성 항원 수용체 T-세포 (VI-4)인, 약학 조성물.
- [0141] (VII-3)
- [0142] 항목 (VII-1) 또는 항목 (VII-2)에 있어서, 암 치료용인 약학 조성물.
- [0143] (VII-4)
- [0144] 항목 (VII-3)에 있어서, 암은 혈액암인, 약학 조성물.
- [0145] (VII-5)
- [0146] 항목 (VII-4)에 있어서, 혈액암은 형질 세포의 종양성 증식을 유발하는 질환인, 약학 조성물.
- [0147] (VIII) 질환의 치료 또는 예방 방법
- [0148] 질환의 치료 또는 예방 방법 (VIII)은 하기 항목 (VIII-1) 내지 항목 (VIII-6)에 설명된 질환의 치료 또는 예방 방법을 포함한다.
- [0149] (VIII-1)
- [0150] 항체 (I) 또는 세포 (VI)의 치료유효량을 피험자에게 투여하는 것을 포함하는, 질환의 치료 또는 예방 방법.
- [0151] (VIII-2)
- [0152] 항목 (VIII-1)에 있어서, 세포가 키메라성 항원 수용체 T-세포 (VI-4)인, 치료 또는 예방 방법.
- [0153] (VIII-3)
- [0154] 항목 (VIII-1) 또는 항목 (VIII-2)에 있어서, 질환이 암이고, 피험자는 암이 발병된 환자 또는 암 발병 위험을 갖는 동물인, 치료 또는 예방 방법.
- [0155] (VIII-4)
- [0156] 항목 (VIII-3)에 있어서, 암은 혈액암인, 치료 또는 예방 방법.
- [0157] (VIII-5)
- [0158] 항목 (VIII-4)에 있어서, 혈액암은 형질 세포의 종양성 증식을 유발하는 질환인, 치료 또는 예방 방법.
- [0159] (VIII-6)
- [0160] 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 활성형을 표적하는 다발성 골수종의 치료 또는 예방 방법.
- [0161] (IX) 사용
- [0162] 사용 (IX)는 하기 항목 (IX-1) 내지 항목 (IX-5)에 설명된 사용을 포함한다.
- [0163] (IX-1)
- [0164] 약학 조성물의 생산을 위한, 항체 (I) 또는 세포 (VI)의 사용.
- [0165] (IX-2)
- [0166] 항목 (IX-1)에 있어서, 세포가 키메라성 항원 수용체 T-세포 (VI-4)인, 사용.
- [0167] (IX-3)
- [0168] 항목 (IX-1) 또는 항목 (IX-2)에 있어서, 암의 치료를 위한, 사용.
- [0169] (IX-4)
- [0170] 항목 (IX-3)에 있어서, 암이 혈액암인, 사용.

- [0171] (IX-5)
- [0172] 항목 (IX-4)에 있어서, 혈액암이 형질 세포의 종양성 증식을 유발하는 질환인, 사용.
- [0173] (X) 스크리닝 방법
- [0174] 스크리닝 방법 (X)는 하기 항목 (X-1) 내지 항목 (X-5)에 설명된 스크리닝 방법을 포함한다.
- [0175] (X-1)
- [0176] 화합물 라이브러리로부터, 인간 인테그린  $\beta_7$ 에 특이적으로 결합하고, 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 20 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역에 결합하는 후보 물질을 선발하는 단계를 포함하는, 암의 치료 또는 예방을 위한 약학 조성물의 활성 성분에 대한, 스크리닝 방법.
- [0177] (X-2)
- [0178] 항목 (X-1)에 있어서, 세포독성 활성을 갖는 물질을 선발하는 단계를 추가로 포함하는, 스크리닝 방법.
- [0179] (X-3)
- [0180] 항목 (X-1) 또는 항목 (X-2)에 있어서, 선발되는 물질이 단일클론성 항체인, 스크리닝 방법.
- [0181] (X-4)
- [0182] 항목 (X-1) 내지 항목 (X-3) 중 어느 하나에 있어서, 암이 혈액암인, 스크리닝 방법.
- [0183] (X-5)
- [0184] 항목 (X-4)에 있어서, 혈액암이 형질 세포의 종양성 증식을 유발하는 질환인, 스크리닝 방법.
- [0185] (XI) 진단 방법
- [0186] 진단 방법 (XI)은 하기 항목 (XI-1) 내지 항목 (XI-5)에 설명된 진단 방법을 포함한다.
- [0187] (XI-1)
- [0188] 피험자로부터 채집된 샘플을 항체 (I)과 접촉시키는 단계를 포함하는, 암의 진단 방법.
- [0189] (XI-2)
- [0190] 항목 (XI-1)에 있어서, 피험자로부터 채집된 샘플이 혈액 또는 골수액인, 진단 방법.
- [0191] (XI-3)
- [0192] 항목 (XI-1) 또는 항목 (XI-2)에 있어서, 항체 (I)에 결합하는 세포가 탐지될 때, 피험자는 암이 발병했거나, 암의 발병 위험을 갖는다는 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함하는, 진단 방법.
- [0193] (XI-4)
- [0194] 항목 (XI-3)에 있어서, 암은 혈액암인, 진단 방법.
- [0195] (XI-5)
- [0196] 항목 (XI-4)에 있어서, 세포가 형질 세포이며, 암이 형질 세포의 종양성 증식을 유발하는 질환인, 진단 방법.
- [0197] (XII) 키트
- [0198] 키트 (XII)는 하기 항목 (XII-1) 내지 항목 (XII-3)에 설명된 키트를 포함한다.
- [0199] (XII-1)
- [0200] 항체 (I)을 포함하는, 암 진단용 키트.
- [0201] (XII-2)
- [0202] 항목 (XII-1)에 있어서, 암이 혈액암인, 키트.
- [0203] (XII-3)



[0204] 항목 (XII-2)에 있어서, 암이 형질 세포의 종양성 증식을 유발하는 질환인, 키트.

### 발명의 효과

[0205] 본 발명의 항체는 정상 세포를 인식하지 않아서, 약학 조성물의 활성 성분으로서 유용하다. 구체적으로, 본 발명의 항체는 암 치료제 (예를 들어, 혈액암)의 활성 성분으로서 유용하다.

[0206] 본 발명의 항체는, 그의 항원 인식 부위를 키메라성 항원 수용체에 적용함으로써 생산된 키메라성 항원 수용체 T-세포가 상기 설명된 바와 같은 그러한 약학 조성물의 활성 성분으로서 사용될 수 있기 때문에, 유용하다.

### 도면의 간단한 설명

[0207] 도 1은 FACS의 이용을 통한, MMG49 항체의 골수종 환자 유도된 골수 세포에의 결합을 분석함으로써 실시예 2에서 획득된 결과이다. (왼쪽) 골수종 전구 세포 분획 (골수종 전구 세포), 골수종 형질 세포 분획 (골수종 형질 세포), 및  $CD45^+$  백혈구 ( $CD45^+$  백혈구)의 동정 방법을 예시하는 도표이다. (오른쪽) 각 분획에 대한 MMG49 항체의 결합을 보여주는 그래프.

도 2는 FACS에 의한, 골수종 환자-유도된 골수 세포들의, 골수종 전구 세포 분획, 골수종 형질 세포 분획, 및  $CD45^+$  백혈구에 대한 MMG49 항체의 결합을 분석함으로써 실시예 2에서 획득된 결과를 보여주는 그래프이다 (UPN1 내지 UPN5).

도 3은, 실시예 3에서의 발현 클로닝 방법에 의해, MMG49 항체에 의해 인식된 항원 단백질을 동정하는 공정의 예시이다. MMG49 항체에 결합하는 BaF3 세포를, FACS 선별(sorting)에 의해, 0.1% 이하의 초기 농도에서부터 농축하는 공정이 예시된다.

도 4는, Crisp-cas9 시스템을 이용하여 생성된 ITGB7-결핍 U266 세포를 MMG49 항체 또는 FIB27 항체 (구매가능한 항-인테그린  $\beta_7$  항체)로 염색하고, 이어서 FACS 분석하여, 실시예 4에서 획득된 결과를 보여주는 그래프이다.

도 5는, MMG49 항체 또는 아이소타입(isotype) 대조구 항체를 이용하여 MM1s 골수종 세포로부터 유도된 세포 용해액으로부터 면역침강된 생성물을 SDS-PAGE 처리한 후, 구매가능한 항-인테그린  $\beta_7$  항체 (Abcam plc)를 이용하여 웨스턴 블롯(western blot)을 수행함으로써, 실시예 4에서 획득된 결과를 보여주는 이미지이다.

도 6은, FACS의 이용을 통해, 건강한 사람의 말초 혈액 세포 (도면에서, B-세포, T-세포, 단핵구, 호중구, 적혈구 세포, 및 혈소판은 왼쪽으로부터 언급된 순서대로 나타냄)의 각 세포 분획에 대한 MMG49 항체, FIB27 항체, 및 FIB504 항체 각각의 결합을 분석함으로써, 실시예 5에서 획득된 결과를 보여주는 그래프이다.

도 7은, FACS에 의해, 골수종 환자-유도된 골수 세포의 각각의 세포 분획에 대한 MMG49 항체의 결합을 분석함으로써, 실시예 5에서 획득된 결과를 보여주는 그래프이다. 왼쪽에 각 세포 분획의 동정 방법이 예시되며, 오른쪽에는 각각의 분획에 대한 MMG49의 결합을 보여주는 그래프를 보여준다. 도 7a는 조혈성 줄기 세포와 전구세포 분획, 및 골수종 세포간의 비교를 나타내며, 도 7b는 B/T 림프구 분획들, 골수종 전구 세포 및 골수종 형질 세포 분획 간의 비교를 보여준다.

도 8은, FACS의 이용을 통해, 각종 골수종 세포주, 및 말초 혈액으로부터 유도된 T-세포 및 B-세포 각각에 대한, MMG49 항체 및 FIB27 항체 각각의 결합을 분석함으로써 실시예 6에서 획득된 결과를 보여주는 그래프이다. FACS 분석에 의해, 상기 언급된 세포들 내에서 ITGA4 (항-인테그린  $\alpha_4$  항체의 결합)의 발현 및 ITGAЕ (항-인테그린  $\alpha_E$  항체의 결합)의 발현을 확인하는 결과가 또한 나타난다.

도 9는, FACS에 의해, U266 세포 및 ITGA4 (인테그린  $\alpha_4$ )-결핍 U266 세포에 대한 MMG49 항체 및 FIB27 항체의 결합을 분석함으로써, 실시예 6에서 획득된 결과를 보여주는 그래프이다. FACS에 의해, 상기 언급된 세포에서, ITGA4 (항-인테그린  $\alpha_4$  항체의 결합)의 발현을 분석함으로써 획득된 결과가 또한 나타난다.

도 10은, 37 °C에서 20 분 동안  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$  또는  $Mn^{2+}$  존재 하에서 처리된, 인테그린  $\alpha_4\beta_7$ -강제 발현 K562 세포 및 인간 정상 말초 혈액-유도된 T-세포가 MMG49 항체 또는 아이소타입 항체와 반응하도록 하고, 이후 이차 항체로서 항-마우스 IgG 항체를 이용하여 세포를 염색하고, 염색된 세포를 FACS 분석함으로써 실시예 7에 획득된 결



과를 나타내는 그래프이다.

도 11은, 실시예 8에서 인간/마우스 키메라성 인테그린  $\beta_7$  단백질의 구축 및 상기 단백질을 일시적으로 발현하도록 유발된 293T 세포에 대한 MMG49 항체의 결합의 존재 또는 부재를 예시하는 도면이다.

도 12는, FACS에 의해, 인간/마우스 키메라성 인테그린  $\beta_7$  단백질을 일시적으로 발현하도록 유발된 293T 세포에 대한 MMG49 항체의 결합을 분석함으로써 실시예 8에서 취득된 결과를 보여주는 그래프이다.

도 13은, 도 12에 나타난 결과를 요약하는 그래프이다. 도 13의 그래프에서, 세로 축은 항체에 결합된 세포의 백분율을 나타내고, 가로축은 각종 인간/마우스 키메라성 인테그린  $\beta_7$  단백질을 나타낸다.

도 14는, MM1s 세포 및 KMS12BM 세포를, 인간 IgG4 항체 불변 도메인에 대한 MMG49 항체의 가변 영역의 결합에 의해 키메라화된 MMG49 항체를 이용하여 염색함으로써 취득된 결과를 보여주는 그래프이다.

도 15는, MMG49 항체의 가변 영역을 이용하여 CAR 구축물을 생성하는 방법을 예시하는 도이다.

도 16은, MMG49 항체의 가변 영역을 이용하여 CAR 구축물을 발현시키는 T-세포를 PE-항-인간 F(ab')<sub>2</sub> 항체를 이용하여 염색함으로써 취득된 결과를 보여주는 그래프이다.

도 17은, MMG49 항체-유래 CAR-T 세포 또는 그 안에 GFP가 도입된 T-세포 (대조구)와 인테그린  $\beta_7$ 을 발현하지 않는 K562 세포 또는 인테그린  $\alpha_4\beta_7$ 을 강제 발현시키는 K562 세포와의 공동 배양을 통해 생산된 IFN- $\gamma$  및 IL2의 양을 ELISA에 의해 정량적으로 결정함으로써 실시예 11에서 취득된 결과를 보여주는 그래프이다. \*:  $p < 0.05$ .

도 18은, MMG49 항체-유래 CAR-T 세포 또는 그 안에 GFP가 도입된 T-세포 (대조구)와 MMG49 항원-발현 세포 또는 비-발현 세포와의 공동 배양을 통해 생산된 IFN- $\gamma$ 의 양을 ELISA에 의해 정량적으로 결정함으로써 실시예 11에서 취득된 결과를 보여주는 그래프이다.

도 19는, MMG49 항체-유래 CAR-T 세포 또는 그 안에 GFP가 도입된 T-세포 (대조구)와 MMG49 항원-발현 세포 또는 비-발현 세포와의 공동 배양을 통해 생산된 IL2의 양을 ELISA에 의해 정량적으로 결정함으로써 실시예 11에서 취득된 결과를 보여주는 그래프이다.

도 20은, 인테그린  $\beta_7$ 을 발현하지 않는 K562 세포 또는 인테그린  $\alpha_4\beta_7$ 을 강제 발현시키는 K562 세포에 대하여, MMG49 항체-유래 CAR-T 세포 또는 그 안에 GFP가 도입된 T-세포 (대조구)에 의해 유발된 세포 손상의 정도를, <sup>51</sup>Cr 살해능 검사(killing assay)에 의해 측정함으로써 실시예 11에서 취득된 결과를 보여주는 그래프이다. 도 20의 각각의 그래프의 y-축은 세포 손상 백분율 (%)을 나타낸다.

도 21은, MMG49 항원-발현 세포 또는 비-발현 세포에 대하여, MMG49 항체-유래 CAR-T 세포 또는 그 안에 GFP가 도입된 T-세포 (대조구)에 의해 유발된 세포 손상의 정도를, <sup>51</sup>Cr 살해능 검사에 의해 측정함으로써 실시예 11에서 취득된 결과를 보여주는 그래프이다.

도 22는, 실시예 12에서 NOG 마우스의 골수 내에 그래프트된(engrafted) 골수종 세포주 MM1s에 대한 치료 실험의 설계, 및 그 결과를 예시 및 보여주는 도 및 그래프이다. MMG49 항체-유래 CAR-T 세포 또는 그 안에 GFP가 도입된 T-세포 (대조구)를 이송한지 1 주 후의 골수 세포를 채집하고 FACS에 의해 분석하였다. MM1s 세포는 인간 CD138<sup>+</sup> 세포로서 동정될 수 있다. MMG49 항체-유래 CAR-T 세포-투여된 군에서, 골수 내 MM1s 세포는 거의 완전히 사라졌다.

도 23은, 실시예 12에서 NOG 마우스의 전신에 그래프트된 골수종 세포주 MM1s에 대한 치료 실험의 설계, 및 그 결과를 예시 및 보여주는 도, 이미지, 및 그래프이다. MMG49 항체-유래 CAR-T 세포 또는 그 안에 GFP가 도입된 T-세포 (대조구)의 이송 전 및 후의 골수종 세포의 양을 IVIS 이미징에 기초한 형광 강도 측정법에 의해 평가하였다. MMG49 항체-유래 CAR-T 세포-투여된 군에서, 골수 내 MM1s 세포는 거의 완전히 사라졌다.

도 24는, 인간 기원의 인테그린  $\beta_7$ 의 아미노산 서열 및 마우스 기원의 인테그린  $\beta_7$ 의 아미노산 서열 간의 비교를 예시하는 도이다.

도 25는, 실시예 13에서, 인간/마우스 키메라 인테그린  $\beta_7$  단백질의 구축 및 단백질을 일시적으로 발현시키는

293T 세포에 대한 MMG49 항체의 결합의 존재 또는 부재를 예시 및 보여주는 도 및 그래프이다.

도 26은, 실시예 14에서 MMG49 항체의 에피토프를 검사하는 실험의 결과를 보여주는 그래프이다. 가로 축 상의 MFI는 MMG49 항체에 대한 결합 강도를 나타내고, 숫자가 높을수록 더욱 높은 활성을 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0208] 본 명세서에서, "포함하다" 및 "갖는다"는, 소위 열린 표현이지만, 각각의 개념은 "이루어지는"이라는 닫힌 표현을 포함하는 개념이며, 일 구현예에서는 "이루어지는"으로 대체될 수 있다.
- [0209] "골수종 전구 세포"는 골수종 형질 세포로 분화하기 전 단계에서의 전구 세포로서, CD38은 고도로 발현하지 않는 성숙한 형질 세포에 대해 특이적인 마커로서의 역할을 하는 CD138은 발현하지 않는 것을 특징으로 한다. 따라서, 골수종 전구 세포는 종종 "CD38<sup>++</sup>CD138<sup>-</sup> 세포" 또는 "CD19<sup>-</sup>CD38<sup>++</sup>CD138<sup>-</sup> 세포"로서 지칭된다.
- [0210] "골수종 형질 세포"는 일반적으로 골수종 세포로도 불리며, 이상 면역글로불린인 M 단백질을 생산하는 세포이다. 골수종 형질 세포는 CD38을 고도로 발현하는데 추가하여 CD138을 발현한다. 따라서, 골수종 형질 세포는 종종 "CD38<sup>++</sup>CD138<sup>+</sup> 세포" 또는 "CD19<sup>-</sup>CD38<sup>++</sup>CD138<sup>+</sup> 세포"로서 지칭된다.
- [0211] 골수종 전구 세포 및 골수종 형질 세포는 또한 다발성 골수종 외에 형질 세포의 종양성 증식을 유발하는 질환에서, 종양 전구 세포 및 종양성 형질 세포를 각각 의미한다.
- [0212] "조혈성 전구 세포"는 각종 조혈성 세포로 분화될 수 있는 세포이다. 조혈성 전구 세포는 CD34를 발현하는 것을 특징으로 한다. 따라서, 본 명세서에서 조혈성 전구 세포는 종종 "CD34<sup>+</sup> 세포"로 지칭된다.
- [0213] (I) 항체
- [0214] 항체 (I)은 바람직하게는 그 에피토프가 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 20 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역에 존재하는 항-인간 인테그린  $\beta_7$  항체이다.
- [0215] 더욱 바람직한 항체 (I)의 예로는: 그 에피토프가 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 33 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역에 존재하는 항체; 및 그 에피토프가 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 20 번째 내지 90 번째 아미노산 잔기 위치의 영역에 존재하는 항체를 포함할 수 있다. 그의 가장 바람직한 예는, 그 에피토프가 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 33 번째 내지 90 번째 아미노산 잔기 위치의 영역에 존재하는 항체일 수 있다.
- [0216] 인간 인테그린  $\beta_7$ 은 특별히 한정되지 않으며, 서열번호 31에 나타난 아미노산 서열을 갖는 막관통 단백질, 인테그린  $\alpha$ 와 헤테로다이머를 형성할 수 있는 단백질일 수 있다. 인테그린  $\alpha$ 의 특정 예로는 인테그린  $\alpha_4$  및 인테그린  $\alpha_E$ 가 포함될 수 있다.
- [0217] 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 아미노산 서열의 특정 예로는, 서열번호 31에 나타난 아미노산 서열에 추가하여, 예를 들어: NCBI 데이터베이스에 열거된, ACCESSION: EAW96675, VERSION: EAW96675.1, GI: 119617081; ACCESSION: NM000889, VERSION: NM000889.2, GI: 540344585; ACCESSION: XM005268851, VERSION: XM005268851.2, GI: 767974096; ACCESSION: XM006719376, VERSION: XM006719376.2, GI: 767974098; 및 ACCESSION: XM005268852, VERSION: XM005268852.3, GI: 767974097에 기재된 아미노산 서열이 포함될 수 있다.
- [0218] 인간 인테그린  $\beta_7$ 에 대한 하기 설명은 서열번호 31에 나타난 아미노산 서열을 기준으로 한다. 그러나, 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 임의의 다른 아미노산 서열에 대하여, 당업자는 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 다른 아미노산 서열의 어떤 영역 또는 부위가 아래 설명되는 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 영역 및/또는 부위에 상응하는지를, 생물정보학 기반 가상 실험(in silico)으로 서열번호 31에 나타난 아미노산 서열에 대한 다른 아미노산 서열의 상동성을 결정함으로써 용이하게 판단할 수 있다.
- [0219] 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 1 번째 내지 19 번째 아미노산 잔기 위치의 영역은 신호 펩타이드로서의 역할을 하고, 인간 인테그린  $\beta_7$ 이 생체 내에서 막 단백질로서 기능하는 경우, 부재하는 펩타이드 단편(fragment)이다. 따라서, 인간 인테그린  $\beta_7$ 이 막 단백질로서의 기능을 나타내는 경우, 그의 N-말단은 상기 언급된 아미노산 서열의 20 번째

위치의 아미노산 잔기이다.

- [0220] 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 20 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역은 PSI 도메인을 포함한다. 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 PSI 도메인 및 마우스 인테그린  $\beta_7$ 의 PSI 도메인은 약 80% 이상의 높은 상동성을 갖는 것으로 알려져 있다. 그러나, 도 24에 예시된 바와 같이, 서로 비교 시, 인간 인테그린  $\beta_7$ 과 마우스 인테그린  $\beta_7$ 의 PSI 도메인을 포함하는 20 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역의 아미노산 잔기들은 총 15 개 아미노산 잔기, 구체적으로 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 23 번째 위치, 26 번째 위치, 28 번째 위치, 30 번째 위치, 32 번째 위치, 35 번째 위치, 36 번째 위치, 38 번째 위치, 41 번째 위치, 42 번째 위치, 48 번째 위치, 93 번째 위치, 94 번째 위치, 102 번째 위치, 및 109 번째 위치에서 서로 상이하다.
- [0221] 따라서, 그러한 15개 아미노산 잔기 중 임의의 하나 이상, 바람직하게는 둘 이상, 더욱 바람직하게는 셋 이상과 연결된 항체 (I)의 에피토프가 바람직하다. 구체적으로, 항체 (I)의 에피토프는 바람직하게는 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 23 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역에 존재하며, 더욱 바람직하게는 23 번째 내지 48 번째 아미노산 잔기 위치의 영역, 또는 93 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역에 존재한다.
- [0222] 또다른 더욱 바람직한 구현예에서 항체 (I)의 에피토프는: 23 번째 내지 48 번째의 아미노산 잔기 위치의 영역; 93 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역; 또는 23 번째 내지 48 번째의 아미노산 잔기 위치의 영역과 93 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역의 조합인 3차원 영역일 수 있다.
- [0223] 항체 (I)의 에피토프는 선형 에피토프일 수 있거나, 입체 에피토프 (비-선형 에피토프라고도 함)일 수 있다. 선형 에피토프는 연속된 아미노산 잔기가 에피토프로서 제공되는 경우이고, 입체 에피토프는 연속되지 않은 아미노산 잔기로 형성된 에피토프라는 것이 당업자에게 공지되어 있다.
- [0224] 예를 들어, 상기 언급된 23 번째 내지 48 번째의 아미노산 잔기 위치의 영역과 93 번째 내지 109 번째의 아미노산 잔기 위치의 영역과의 조합인 3차원 영역이 에피토프로서 제공되는 경우는 입체 에피토프에 상응하는 예로서 제공될 수 있으며, 20 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역에 포함된 비-연속적 아미노산 잔기의 영역이 에피토프로서 제공되는 경우 또한 입체 에피토프 내에 포함된다.
- [0225] 상기 언급된 에피토프 중, 48 번째 위치의 아미노산 잔기는 항체 (I)의 에피토프에 강하게 관련되거나, 항체 (I)의 에피토프 내에 포함되는 것이 바람직하다.
- [0226] 당업자는 구체적인 선형 에피토프 및 입체 에피토프를, 예를 들어 JP 2011-527572 A, JP 2009-534401 A, 또는 문헌 ["Dissecting antibodies with regards to linear and conformational epitopes." Forsstrom B, Axnas BB, Rockberg J, Danielsson H, Bohlin A, Uhlen M. PLoS One. 2015 Mar 27; 10(3): e0121673. doi: 10.1371/journal.pone.0121673. eCollection 2015]을 참조하여 이해할 수 있다.
- [0227] 즉, 상기 내용은, 항체 (I)이 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 20 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역에 특이적으로 결합하고, 구체적으로, 바람직하게는 23 번째 내지 109 번째 위치에서의 영역에 특이적으로 결합하고, 더욱 바람직하게는 23 번째 내지 48 번째 위치 및/또는 93 번째 내지 109 번째의 위치에서의 영역에 특이적으로 결합하는 항체임을 의미한다.
- [0228] 추가적으로, 에피토프로서 제공되는, 인테그린  $\beta_7$ 의 20 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역에 결합하는 항체 (I)의 특성은 에피토프에 대한 친화성을 종종 지칭한다. 따라서, 용어 "에피토프에 대한 친화성이 증가된다"는 표현은 "에피토프에 대한 특이적 결합능이 증가된다"는 의미와 동일하다.
- [0229] 용어 "특이적"은 용어 "선택적"과 구별될 수 있다.
- [0230] 항체 (I)의 또다른 구현예로서, 에피토프에 대한 항체 (I)의 친화성은 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 379 번째 내지 721 번째 아미노산 잔기 위치의 영역의 적어도 일부 존재 하에서 증가되는 것이 바람직하다.
- [0231] "379 번째 내지 721 번째 아미노산 잔기 위치의 영역의 적어도 일부"라는 표현은 379 번째 내지 721 번째 아미노산 잔기 위치의 영역 중 적어도 일부 및 그의 일부 영역이 사용될 수 있음을 의미한다. "그의 일부 영역"의 특정 예로는: 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 417 번째 내지 721 번째 아미노산 잔기 위치의 영역의 적어도 일부; 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 564 번째 내지 721 번째 아미노산 잔기 위치의 영역의 적어도 일부; 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 379 번째 내지 563 번째 아미노산 잔기 위치의 영역의 적어도 일부; 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 417 번째 내지 563 번째 아미노

산 잔기 위치의 영역의 적어도 일부; 및 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 379 번째 내지 416 번째 아미노산 잔기 위치의 영역의 적어도 일부를 포함한다. 즉, 에피토프의 항체 (I)의 친화성은 임의의 그러한 영역 존재 하에서 증가될 수 있다.

[0232] 용어 "존재 하에"는, 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 20 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역 및 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 379 번째 내지 721 번째 아미노산 잔기 위치의 영역의 적어도 일부가 동일한 분자 내에 존재할 수 있거나, 두 개의 영역이 별개의 분자로서 존재할 수 있음을 의미한다. 두 개의 영역이 동일한 분자 내에 존재하는 것이 바람직하다. 용어 "존재 하에"는 "에 의해"로 해석될 수 있다.

[0233] 당업자는 에피토프에 대한 상기 언급된 항체 (I)의 친화성이 증가된다는 것을, 예를 들어 아래 설명되는 실시예에 기재된, 통상 사용되는 면역분석법에 의해 용이하게 확인할 수 있다.

[0234] 예를 들어, 실시예 8에 기재된 각종 인간/마우스 키메라성 인테그린  $\beta_7$  단백질이고, 인간 기원의 인테그린  $\beta_7$ 의 1 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역을 포함하며, 인간 기원의 인테그린  $\beta_7$ 의 722 번째 내지 798 번째 아미노산 잔기 위치의 영역을 포함하는, 인간/마우스 키메라성 인테그린  $\beta_7$  단백질 (#4960)을 발현하는 세포를 준비하고, 인간 기원의 인테그린  $\beta_7$ 의 379 번째 내지 721 번째 아미노산 잔기 위치의 #4960의 영역이 마우스 기원의 인테그린  $\beta_7$ 의 379 번째 내지 721 번째 아미노산 잔기 위치의 영역으로 치환된 인간/마우스 키메라성 인테그린  $\beta_7$  단백질 (#4961)을 준비한다. 이 경우, 에피토프에 대한 항체 (I)의 친화성에서의 증가는 후자 (#4961)를 발현하는 세포 및 전자 (#4960)를 발현하는 세포 간의 항체 (I)의 결합 정도를 비교함으로써 확인될 수 있다.

[0235] 항체 (I)의 또다른 구현예로서, 에피토프에 대한 항체 (I)의 친화성은 인간 인테그린  $\beta_7$ 을 활성화함으로써 증가되는 것이 바람직하다. 아마도, 활성화된 인간 인테그린  $\beta_7$ 은 에피토프를 포함하는 영역에서의 구조적 특징을 갖기 때문에, 에피토프에 대한 항체 (I)의 친화성이 증가된다.

[0236] 인간 인테그린  $\beta_7$ 을 활성화하는 방법은 알려져 있다. 예를 들어, 포르볼 에스테르, 예컨대 PMA, 망간염 등이 인간 인테그린  $\beta_7$ 을 발현하는 세포, 예를 들어 혈액 세포 및 면역 세포, 예컨대 형질 세포, NK 세포, T-세포, B-세포, 림프아구, 버킷(Burkitt) 림프종-유래 세포, 및 수지상 세포로부터 선택된 세포들 상에서 작용가능하도록 함으로써, 상기 세포에서 발현된 인간 인테그린  $\beta_7$ 은 활성화될 수 있다. 추가적으로, 상기 언급된 특정 세포들에 한정되지는 않지만, 인간 인테그린  $\beta_7$ 을 발현하는 세포가 사용되고, 포르볼 에스테르, 망간염 등으로 처리되어 인간 인테그린  $\beta_7$ 을 활성화할 수 있다.

[0237] 당업자는 에피토프에 대한 항체 (I)의 친화성이 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 활성화를 통하여 증가된다는 것을, 예를 들어 하기 기재된 실시예에 설명된 통상 사용되는 면역분석법에 의해 용이하게 확인할 수 있다.

[0238] 예를 들어, 실시예 8에 설명된 각종 인간/마우스 키메라성 인테그린  $\beta_7$  단백질로, 1 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역을 포함하는, #4960 또는 #4961을 발현하는 세포를 준비하고, 상기 세포를 실시예 7에 기재된 인테그린  $\beta_7$ -활성화 수단에 제공한다. 그 후, 활성화 처리 전과 후의 친화성을, 면역분석 수단을 이용한 측정을 통하여 서로 비교한다. 따라서, 활성화 후 세포 내에서 에피토프에 대한 항체 (I)의 친화성의 증가가 확인될 수 있다.

[0239] 항체 (I)의 또다른 구현예로서, 항체 (I)은 정상 세포 상에서 발현된 인간 인테그린  $\beta_7$ 에 대한 친화성보다 골수종-유래 세포 상에서 발현된 인간 인테그린  $\beta_7$ 에 대해 더 높은 친화성을 갖는 특징을 갖는 항-인간 인테그린  $\beta_7$  항체일 수 있다.

[0240] 세포가 건강한 사람으로부터 유래되는 한, 정상 세포는 특별히 한정되지 않으며, 예를 들어, 혈액-유래 정상 세포일 수 있다. 그러한 정상 세포들 중, 정상형 형질 세포가 바람직하다.

[0241] 항체가 그러한 정상 세포 상에서 발현된 인간 인테그린  $\beta_7$ 에 대한 친화성보다 골수종 세포 상에서 발현된 인간 인테그린  $\beta_7$ 에 대해 더 높은 친화성을 갖는다는 것을 확인하는 방법은, 당업자가 예를 들어, 하기 기재된 실시

예에 기재된 통상 사용되는 면역분석법을 이용하여 용이하게 수행할 수 있다.

- [0242] "통상 사용되는 면역분석법"이라는 표현은, 본 방법이 항원과 관계없이 각종 항체를 사용하는 측정을 포함하는 한, 특별히 한정되지 않는다. 그의 예로는, 유세포분석법 (FACS), 그 안에 포함되는 세포 선별, 웨스턴 블로팅, ELISA, 면역침강법, SPR법, 및 QCM법을 포함할 수 있다.
- [0243] 항체 (I)의 또다른 구현예로서, 항체 (I)의 에피토프는 바람직하게는 이후 설명되는 실시예에 개시된 MMG49 항체의 에피토프와 동일하다. MMG49 항체와 동일한 항체가 가장 바람직하다. MMG49 항체를 생산하는 방법에 대해, 하기 설명되는 실시예를 참조할 수 있다.
- [0244] 항체 (I)의 또다른 구현예로서, 항체 (I)은 바람직하게는 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함하는 구현예의 항체이다. 즉, 항체 (I)은 중쇄 가변 영역 단독일 수 있거나, 경쇄 가변 영역 단독일 수 있다. 항체 (I)은 바람직하게는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체이다.
- [0245] 가변 영역은 항원 인식 부위라고도 하며, 항체가 항원을 인식하는 중요한 부위임을 당업자는 이해할 것이다. 이러한 가변 영역은 초가변 영역 (상보성 결정 영역 [CDR]으로도 지칭됨)이라는 3 개의 영역을 가지며, 상기 CDR 이 항체의 항원 인식 기능에 가장 관련된 극히 중요한 영역이라는 것 또한 당업자에게 공지되어 있다.
- [0246] 항체 (I)의 다른 구현예에 포함된 중쇄 가변 영역은 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2, 및 중쇄 CDR3 중 임의의 하나 이상을 포함한다. 즉, 중쇄 가변 영역은 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2, 또는 중쇄 CDR3을 단독으로 포함할 수 있고, 바람직하게는 적어도 중쇄 CDR3을 포함한다. 더욱 바람직한 구현예는, 아미노-말단 (N-말단)으로부터 언급된 순서대로 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2, 및 중쇄 CDR3을 포함한다.
- [0247] 경쇄 가변 영역은 중쇄 가변 영역과 유사할 수 있는데, 즉 예를 들어, 경쇄 CDR1, 경쇄 CDR2, 및 경쇄 CDR3 중 임의의 하나를 포함하고, 바람직하게는 적어도 경쇄 CDR3을 포함하고, 바람직하게는 경쇄 가변 영역의 N-말단으로부터 언급된 순서대로 경쇄 CDR1, 경쇄 CDR2, 및 경쇄 CDR3을 포함한다.
- [0248] 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 각각에서 CDR1 내지 CDR3 외의 영역은 때때로 FR로서 지칭된다. 더욱 구체적으로, N-말단과 CDR1 사이의 영역은 FR1로 지칭되며, CDR1과 CDR2 사이의 영역은 FR2로 지칭되고, CDR2과 CDR3 사이의 영역은 FR3으로 지칭되고, CDR3과 카르복시-말단 (C-말단) 사이의 영역은 FR4로 지칭되고, 상기 이름은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 각각에 대해 지정된다.
- [0249] 중쇄 CDR1 내지 CDR3 및 경쇄 CDR1 내지 CDR3의 아미노산 서열은 특별히 한정되지 않는다. 그의 예로는, MMG49 항체의 중쇄 CDR 1 내지 3 또는 경쇄 CDR 1 내지 3으로서의 역할을 하는, 서열번호 1에 나타난 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1, 서열번호 2에 나타난 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2, 서열번호 3에 나타난 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3, 서열번호 6에 나타난 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR1, 서열번호 7에 나타난 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR2, 및 서열번호 8에 나타난 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR3이 포함된다.
- [0250] 중쇄 CDR1 내지 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역의 바람직한 구현예로서, MMG49 항체의 중쇄 가변 영역인, 서열번호 4에 나타난 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역이 예를 들어 제공될 수 있다. 추가적으로, 경쇄 CDR1 내지 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역의 바람직한 구현예로서, MMG49 항체의 경쇄 가변 영역인, 서열번호 9에 나타난 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역이 예를 들어 제공될 수 있다.
- [0251] 서열번호 1 내지 서열번호 4 및 서열번호 6 내지 서열번호 9에 나타난 MMG49 항체의 상기 언급된 아미노산 서열은 아래 표 1에 나타난 바와 같다. 표 1에서 서열번호 4 및 서열번호 9에 나타난 중쇄 및 가변 영역의 각각의 아미노산 서열에서 밑줄 부분은 N-말단으로부터 언급된 순서대로 CDR1, CDR2, 및 CDR3에 위치된 부분을 나타낸다.

표 1

<MMG49 항체의 아미노산 서열>		
중쇄	CDR1 (서열번호 1)	GYTFSSYW
	CDR2 (서열번호 2)	MLPGSGSS
	CDR3 (서열번호 3)	ARGDGNWYFDV
	가변 영역 (서열번호 4)	MEWTWVFLFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELMKPGASVKISCKASGYTFSSYIEWVKQ RPGHGLEWIGEMLP <u>SGSS</u> NYNEKFKGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCA RGDGNWYFDVWGAG



경쇄	CDR1 (서열번호 6)	SSVGY
	CDR2 (서열번호 7)	ATS
	CDR3 (서열번호 8)	QQWSSDPPT
	가변 영역 (서열번호 9)	MDFQVQIFSFLIISASVIMSRGQIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVGYMHWFQ QKPGSSPKPWIIYATSNLASGVPARFSGSESGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSSDP PTFGGGTKLEIK

- [0253] 항체 (I)의 구조는 한정되지 않는다. 구조의 특정 예로는, Fv, scFv, 디아바디, 트라이아바디, 및 테트라바디가 포함되며, 구조는 이들 구조들을 적절히 조합함으로써 수득될 수도 있다. 추가적으로, 조합된 구조를 포함하는 그러한 구조들 역시 때때로 각각 단편 항체로도 지칭된다. 그러한 단편 항체는 Fv를 포함하는 인공적으로 설계된 재조합 단백질일 수 있거나, 단백질과 같은 생체 분자와 융합된 것일 수 있다.
- [0254] Fv는 항체의 최소 구조 단위로도 지칭되며, 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역이 비-공유결합 분자간 상호작용을 통해 서로 연결된 구조이다. 또한, Fv는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역에 존재하는 시스테인 잔기의 티올기가 서로 이황화 결합을 형성한 구조일 수 있다.
- [0255] scFv는 중쇄 가변영역의 C-말단 및 경쇄 가변 영역의 N-말단이 링커를 통해 연결되고, 단일사슬 항체로도 지칭되는 구조이다. 추가적으로, 링커를 통해 연결되는 C-말단 및 N-말단은 경쇄 가변 영역의 C-말단 및 중쇄 가변 영역의 N-말단일 수 있다. scFv의 구조는 Fv에서와 같은, 비-공유결합 분자간 상호작용 등에 기초한 연결에 의해 형성될 수 있다.
- [0256] 디아바디, 트라이아바디, 테트라바디는, 상기 언급된 scFv가 다이머, 트라이머, 및 테트라머를 각각 형성하는 구조이며, Fv 등에서와 같은 가변 영역들 간에 비-공유결합 분자간 상호작용을 통해 구조적으로 가장 안정한 상태로 연결된 구조이다.
- [0257] 당업자는 그러한 각종 구조들 중 임의의 것을 갖는 항체 (I)을: 통상 사용되는 유전자 조작 수단을 이용하여 발현 벡터를 구축하는 단계; 및 그러한 발현 벡터와 함께 항체 생산에 적합한 숙주 세포, 예컨대 원핵 세포 (예컨대 대장균 또는 악티노마이세테스(actinomycetes)) 또는 진핵 세포 (예컨대 효모 세포, 곤충 세포, 또는 포유동물 세포)를 사용하는 발현 시스템, 통상 사용되는 무세포 발현 시스템 등을 이용하는 단계에 의해, 용이하게 생산할 수 있다. 생산된 항체는 높은 순도 상태로 수득되도록 통상 사용되는 정제 공정에 적절히 투입될 수 있다.
- [0258] 항체 (I)의 또다른 구현예로서, 항체 (I)은 불변 영역을 함유할 수 있다. 불변 영역은 다음과 같은 것으로 당업자에게 이해된다: 중쇄 불변 영역은 CH1, CH2, 및 CH3을 포함하고, 경쇄 불변 영역은 CL을 포함한다. 추가적으로, CH2 및 CH3을 포함하는 영역은 종종 Fc 도메인으로 명명된다.
- [0259] 특정 기원의 불변 영역이 특별히 한정되지 않는다. 이의 예에는 대량 생산이 가능한 동물 중, 인간에게 밀접하게 관련된 동물 중, 인간에게 투여 시 면역원성을 일으킬 가능성이 적은 동물 중 등으로부터 유래하는 불변 영역, 예를 들어 인간 기원, 마우스 기원, 쥐 기원, 토끼 기원, 원숭이 기원, 및 침팬지 기원의 불변 영역이 포함될 수 있다.
- [0260] 항체 (I)에서, 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역이 마우스 기원의 아미노산 서열을 갖는 경우, 예를 들어 인간 기원의 불변 영역이 그와 함께 조합되어, 그에 의해 키메라성 항체로서 항체 (I)을 제공할 수 있다.
- [0261] 추가로, 상기 언급된 키메라성 항체에서 중쇄 FR1 내지 FR4 및/또는 경쇄 FR1 내지 FR4는, 인간 기원의 아미노산 서열로 치환될 수 있어서, 이에 의해 인간 항체로서 항체 (I)을 제공한다.
- [0262] 나아가, 상기 언급된 인간화된 항체에서 중쇄 CDR1 내지 CDR3 및/또는 경쇄 CDR1 내지 CDR3은, CDR의 기능이 감소되지 않는 범위까지 인간 기원의 아미노산 서열로 치환될 수 있어서, 이에 의해 인간 항체로서 항체 (I)을 제공한다. 용어 "인간 항체"는 때때로 "완전히 인간화된 항체"로 명명된다.
- [0263] 불변 영역을 포함하는 구현예의 항체 (I)의 구조의 예는 Fab, F(ab')<sub>2</sub>, 미니바디, 및 scFv-Fc와 같은 구조, 및 중쇄 가변 영역과 중쇄 불변 영역을 각각 갖는 중쇄의 쌍, 및 경쇄 가변 영역과 경쇄 불변 영역을 각각 갖는 경쇄의 쌍을 포함하는 4-사슬 구조를 갖는 면역글로불린을 포함할 수 있다. 나아가, 그러한 구조를 적절하게 조합함으로써 수득된 구조 또한 사용될 수 있다. 추가적으로, 조합된 구조를 포함하는 그러한 구조는 때때로 각각 단편 항체로 명명된다. 그러한 단편 항체는 Fv를 포함하는 인공적으로 설계된 재조합 단백질일 수 있거나, 단백질과 같은 생체 분자와 융합된 것일 수 있다.

- [0264] Fab는 중쇄 불변 영역에서 중쇄 가변 영역과 CH1을 포함하는 중쇄 단편, 및 경쇄 가변 영역과 경쇄 불변 영역을 포함하는 경쇄를 포함하고, 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역이 상기 언급된 비-공유결합 분자간 상호작용을 통해 서로 연결되거나, 이황화물 결합을 통해 서로 결합된 구조를 갖는다. 나아가, Fab는 CH1과 CL이 그 안에 개별적으로 존재하는 시스테인 잔기의 티올 기들 간의 이황화물 결합을 형성하도록 할 수 있다.
- [0265] F(ab')<sub>2</sub>는 Fab의 쌍을 갖고, CH1들이 그 안에 개별적으로 포함된 시스테인 잔기의 티올 기들 간에 이황화물 결합을 형성한 구조를 갖는다.
- [0266] 미니바디는 scFv 및 CH3을 포함하는 각각의 항체 단편의 쌍을 갖고, 그러한 항체 단편들이 CH3들 간의 비-공유결합 분자간 상호작용을 통해 서로 연결된 구조를 갖는다.
- [0267] scFv-Fc는 scFv, CH2, 및 CH3을 포함하는 각각의 항체 단편의 쌍을 갖고, 미니바디에서와 같이, 항체 단편들이 CH3들 간의 비-공유결합 분자간 상호작용을 통해 서로 연결되고, 개별적인 CH3들 내에 포함된 시스테인 잔기의 티올 기들 간에 이황화물 결합을 형성한 구조를 갖는다.
- [0268] 당업자는 불변 영역을 포함하지 않는 항체 (I)을 이용하는 것과 같이, 그러한 임의의 각종 구조를 갖는 불변 영역을 포함하는 항체 (I)을, 통상적으로 사용된 유전자 조작 수단을 이용하여 발현 벡터를 구축하고, 그러한 발현 벡터와 함께, 항체 생산에 적합한 숙주 세포를 사용하는 발현 시스템을 이용함으로써 용이하게 생산할 수 있다. 생산된 항체는 고순도의 상태로 수득되도록, 통상적으로 사용되는 정제 공정에 적절하게 투입될 수 있다.
- [0269] Fab는 예를 들어, 파파인과 같은 단백분해효소로 면역글로불린 IgG를 분해시킴으로써 수득될 수 있다. 추가적으로, F(ab')<sub>2</sub>, F(ab')<sub>2</sub>는 펩신과 같은 단백분해 효소로 IgG를 분해함으로써 수득될 수 있다.
- [0270] 불변 영역을 포함하는 각각의 상기 언급된 항체 (I) 중, 바람직한 구조는 면역글로불린이다. 그러한 면역글로불린의 하위 유형은 특별히 제한되지 않으며, 이들의 예는 IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM을 포함할 수 있다. 이들 중, IgG가 바람직하며, 예를 들어, 마우스 기원의 IgG의 경우에, IgG2가 4 개 하위군들 중 바람직하다.
- [0271] 불변 영역을 포함하는 각각의 상기 언급된 항체 (I) 중, 더욱 바람직한 구현예의 항체는 서열번호 5에 나타난 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및/또는 서열번호 10에 나타난 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 항체다. 가장 바람직한 항체는 서열번호 5에 나타난 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 10에 나타난 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 항체이다.
- [0272] 상황에 따라 돌연변이가 상기 언급된 각각의 아미노산 서열로 도입될 수 있다. 그러한 돌연변이는 중쇄 CDR 및 경쇄 CDR 내로 도입될 수 없는 것이 바람직하다. 즉, 돌연변이는 바람직하게는 중쇄 FR 또는 경쇄 FR로 도입된다. 항체 (I)이 불변 영역을 포함하는 경우, 하기 설명되는 ADCC 활성 또는 CDC 활성을 조절하기 위한 돌연변이에 더하여, 돌연변이가 추가로 도입될 수 있다.
- [0273] 돌연변이가 도입된 아미노산 잔기의 특정 수는 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 돌연변이 도입 전의 아미노산 서열과 돌연변이 도입 후의 아미노산 서열 간의 동일성은 약 70%, 바람직하게는 약 75%, 더욱 바람직하게는 약 80%, 더욱 바람직하게는 약 85%, 더욱 바람직하게는 약 90%, 더욱 바람직하게는 약 95%, 더욱 바람직하게는 약 96%, 더욱 바람직하게는 약 97%, 더욱 바람직하게는 약 98%, 가장 바람직하게는 약 99%이다. 이러한 수치는 반올림으로 수득된 것이다.
- [0274] 용어 "동일성"은 둘 이상의 필적가능한 아미노산 서열에서 서로 동일한 아미노산 서열의 정도를 지칭한다. 따라서, 소정의 두 개의 아미노산 서열 간의 동일성이 증가함에 따라, 그러한 서열은 동일성이 더 높을 뿐만 아니라 유사성도 더 높다고 말할 수 있다.
- [0275] 아미노산의 동일성은 구매가능하거나 인터넷을 통해 입수가능한 분석 도구 (예를 들어, FASTA, BLAST, PSI-BLAST, 또는 SSEARCH와 같은 소프트웨어)를 이용하여 계산될 수 있다. 예를 들어, BLAST 검색에 일반적으로 사용되는 주요 초기 설정은 아래 설명되는 바와 같다. 즉, 아미노산 서열들 간의 동일성에 대한 값 (%)은, blastp를 프로그램으로 사용하여, Expect 값을 10으로 설정하고, 모든 Filters를 OFF로 하고, Matrix에 대해 BLOSUM62를 사용하고, Gap existence cost, Per residue gap cost, 및 Lambda ratio를 11, 1 및 0.85 (디폴트 (default) 값)으로 각각 설정하고, 다른 각종 파라미터 또한 디폴트 값으로 설정하여, 어드밴스드(advanced) BLAST 2.1 상에서 검색을 수행함으로써 계산될 수 있다.
- [0276] 돌연변이의 아미노산 서열 내로의 상기 언급된 도입은 치환, 결실, 삽입 등을 지칭한다. 특정 돌연변이 도입은, 돌연변이 도입이 통상 사용되는 방법을 이용하여 달성될 수 있는 한, 특별히 한정되지 않는다. 예를 들어, 치환

의 경우, 보존적 치환 기술이 사용될 수 있다.

- [0277] 용어 "보존적 치환 기술"은 특정 아미노산 잔기를 그에 유사한 결사슬을 갖는 아미노산 잔기로 치환하는 것을 수반하는 기술을 의미한다.
- [0278] 예를 들어, 염기성 결사슬, 예컨대 리신, 아르기닌, 및 히스티딘을 각각 갖는 아미노산 잔기들 간의 치환은 보존적 치환 기술이다. 추가적으로, 다음 아미노산 잔기들 간의 치환들은 각각 유사하게 보존적 치환 기술이다: 산성 결사슬을 각각 갖는 아미노산 잔기, 예컨대 아스파르트산 및 글루탐산; 비하전된 극성 결사슬을 각각 갖는 아미노산 잔기, 예컨대 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 및 시스테인; 비극성 결사슬을 각각 갖는 아미노산 잔기, 예컨대 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 및 트립토판;  $\beta$ -분지된 결사슬을 각각 갖는 아미노산 잔기, 예컨대 트레오닌, 발린, 및 이소류신; 및 방향족 결사슬을 각각 갖는 아미노산 잔기, 예컨대 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 및 히스티딘.
- [0279] 항체 (I)의 또다른 구현예로서, 항체 (I)은 세포독성 활성을 가질 수 있다. 세포독성 활성은 항체가 세포에 결합하고, 그 결과로서 그 항체에 결합된 세포에 일부 손상을 유발시키는 그러한 활성을 지칭한다.
- [0280] 그러한 세포독성 활성의 예는, ADCC 활성 및 CDC 활성을 포함한다. 용어 "ADCC 활성"은 항체-의존성 세포독성 활성(Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity)의 약자이며, 항체의 불변영역에 특이적인 수용체를 발현하는 NK 세포와 같이, 세포독성 활성을 갖는 세포를 항체의 부근에 리쿠르팅(recruiting)하여, 이에 의해 항체가 그러한 세포 등의 작용을 통해 결합되는 세포에 손상을 유도하는 활성이다.
- [0281] 용어 "CDC 활성"은 보체-의존성 세포독성 활성(Complement-Dependent Cytotoxicity)의 약자이며, 항체가 보체를 그의 부근에 리쿠르팅하여, 이에 따라 그러한 보체의 활성을 통해 항체에 결합된 세포에 손상을 유발하는 작용을 유도하는 활성을 지칭한다.
- [0282] 본 명세서에서, ADCC 활성 및 CDC 활성 각각은, 적절한 문헌 [Lazar GA et al., Proc Natl Acad Sci USA, 103: 4005-10 (2006), Shields RL et al., J Biol Chem, 276: 6591-604 (2001)], Moore GL et al., J Immunol, 159:3613-21 (1997), An Z et al., MAbs, 1:572-9 (2009)]을 참조하며, 돌연변이를 불변 영역으로 도입함으로써 조절될 수 있다.
- [0283] 예를 들어, 불변 영역이 인간 IgG<sub>1</sub>인 경우, ADCC 활성은 S239D, I332E, S239D/I332E, S239D/I332E/A330L, S298A, K334A, S298A/K334A, 또는 S298A/E333A/K334A와 같은 돌연변이를 도입함으로써 증가될 수 있다.
- [0284] 추가적으로, 불변 영역이 상기에서와 같은 인간 IgG<sub>1</sub>인 경우, ADCC 활성은 V234A/G237A, 또는 H268Q/V309L/A330S/P331S와 같은 돌연변이를 도입함으로써 감소될 수 있다.
- [0285] CDC 활성에 대하여, 불변 영역이 인간 IgG<sub>1</sub>인 경우, 활성은 S267E, H268F, S324T, S267E/H268F, S267E/S324T, H268F/S324T, 또는 S267E/H268F/S324T와 같은 돌연변이를 도입함으로써 증가될 수 있다.
- [0286] ADCC 활성은 Brunner K.T. 등의 방법 (문헌 [Brunner, K.T., et al., Immunology, 1968. 14:181-96])에 따라 측정될 수 있다. 예를 들어, 골수종 세포는 10% FCS로 보충된 RPMI1640 배지 내에서 배양되며, 세포의 수가  $0.5 \times 10^4$  내지  $1.0 \times 10^4$ 일 수 있도록 준비된다. 거기에 적절한 양의  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ 를 첨가하고, 37 °C에서 1 시간 동안 반응되도록 하여  $^{51}\text{Cr}$ 로 세포를 표지하고, 결과의 세포를 세척한 후 표적 세포로서 사용한다. 이펙터 세포로서, 10% FBS, 10 ng/ml 마우스 GM-CSF, 및 40 IU/ml 인간 IL2로 보충된 RPMI1640 내에서 6 일 동안 SCID 마우스 골수 세포를 배양하여 수득된 것 등이 사용될 수 있다. 96-웰 플레이트에, 시험될 항체 또는 대조구로서 제공되는 그의 아이소타입 항체를 최종 농도 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$  내지 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 첨가하고, 표적 세포 ( $1.0 \times 10^4$  세포) 및 이펙터 세포 ( $5 \times 10^5$  세포)가 추가로 첨가된다. 혼합물을 37 °C에서 4 시간 동안 반응시키고, 원심분리 후, 상등액 내로 방출된  $^{51}\text{Cr}$ 을  $\gamma$ -계수기로 측정한다. ADCC 활성은 다음 등식에 기초하여 결정될 수 있다.
- [0287] 
$$\text{ADCC 활성} = \frac{([\text{표적 세포로부터의 } ^{51}\text{Cr 방출}] - [\text{항체-자유 상태 하에서의 자발적 } ^{51}\text{Cr 방출}])}{([1\% \text{ 트리톤 X-100 첨가에 의해 유발된 최대 } ^{51}\text{Cr 방출 양}] - [\text{항체-자유 상태 하에서의 자발적 } ^{51}\text{Cr 방출}])} \times 100$$
- [0288] CDC 활성은 Brunner K.T., 등의 방법 (문헌 [Brunner, K.T., et al., Immunology, 1968. 14:181-96])에 따라 측정될 수도 있다. 예를 들어, 표적 세포로서 사용되는 골수종 세포는 10% FCS로 보충된 RPMI1640 배지 내에서



배양되고, 세포 수가  $0.5 \times 10^4$  내지  $1.0 \times 10^4$ 일 수 있도록 준비된다. 거기에 적절한 양의  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ 를 첨가하고, 37°C에서 1 시간 동안 반응되도록 하여  $^{51}\text{Cr}$ 로 세포를 표지하고, 결과의 세포를 세척한 후 표적 세포로서 사용한다. 96-웰 플레이트에, 소 태아 혈청으로 보충된 RPMI 1640 배지에 현탁된 시험될 항체 또는 대조구로서 제공되는 아이소타입 항체를 최종 농도  $0.5 \mu\text{g/mL}$  내지  $50 \mu\text{g/mL}$ 로 첨가하고, 그 후 표적 세포 및 보체를 첨가하고, 이어서 1.5 시간 동안 반응시킨다. 반응액을 원심분리 후, 상등액 내로 방출된  $^{51}\text{Cr}$ 을  $\gamma$ -계수기로 측정한다. CDC 활성은 다음 등식에 기초하여 결정될 수 있다.

- [0289]  $\text{CDC 활성} = \{([\text{표적 세포로부터의 } ^{51}\text{Cr 방출}] - [\text{항체-자유 상태 하에서 자발적인 } ^{51}\text{Cr 방출}]) / (1\% \text{ 트리톤 X-100 첨가에 의해 유발된 최대 } ^{51}\text{Cr 방출량}] - [\text{항체-자유 상태 하에서 자발적인 } ^{51}\text{Cr 방출}])\} \times 100$
- [0290] 세포독성 활성을 갖는 항체는, 예를 들어 상기 언급된 방법을 이용하여 세포독성 활성의 존재 또는 부재를 평가하고, 활성을 갖는 항체를 선별함으로써 획득될 수 있다.
- [0291] 항체 (I)의 또다른 구현예로서, 항체 (I)은 다중특이성 항체일 수 있다. 즉, 항체 (I)은 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 20 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역 외의 항원 (이 항원은 이하에서 기타 항원으로서 지칭됨)에 대해 특이성이 있는 결합능을 가질 수 있다.
- [0292] 기타 항원은 바람직하게는 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 20 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역에 대해 구조적으로 유사하지 않은 항원이다.
- [0293] 구체적인 기타 항원은 특별히 한정되지 않는다. 그의 예로는 CD3, CD16, C1q, 및 아데노바이러스 knob 도메인, 및 이들 항원의 적절한 조합 중 적어도 하나를 적절히 기타 항원으로 사용할 수 있다. 상기에서 예로서 주어진 항원들 중 하나는 기타 항원으로서 선택될 수 있는 것이 바람직하다. 즉, 바람직한 다중특이성 항체는 2특이적 항체이다.
- [0294] 당업자는 그러한 다중특이성 항체를, 통상 사용되는 기술을 적절히 사용함으로써 용이하게 생산할 수 있다. 예를 들어, 다중특이성 항체는 하기 방식으로 획득될 수 있다: 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 20 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역, 또는 인간 인테그린  $\beta_7$  중 20 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역만이 인간 기원이고, 나머지는 비-인간 기원, 예컨대 마우스 기원인 키메라성 인테그린  $\beta_7$ 에 상응하는 펩타이드 단편을 발현하는 세포로 면역화된 동물로부터 획득된, B-세포와 같은, 항체-생산 세포를 이용하여 생성된 하이브리도마를 제조하고: 개별적으로, 하이브리도마는 상기 언급된 기타 항원으로 면역화된 동물로부터 획득된, B-세포와 같은 항체-생산 세포를 이용하여 생성되며; 통상 사용되는 방법에 의해, 상기 언급된 하이브리도마들 간의 세포 융합에 의해 획득된 신규 하이브리도마 (신규 하이브리도마는 2특이적 항체를 생산하는 경우 쿼드로마 (quadroma)로도 지칭된다)에 대한 스크리닝을 수행한다.
- [0295] 상기 내용에 추가하여, 예를 들어, 2특이적 항체의 경우, 2특이적 항체는 하기 (1) 내지 (4)에서 설명된 절차에 의해 생성될 수 있다:
- [0296] (1) 에피토프로서 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 20 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역을 사용하는, 상기 언급된  $\text{F(ab')}_2$ 의 구조를 갖는 항체가 생성된다;
- [0297] (2) 한편, 기타 항원에 특이적으로 결합하는  $\text{F(ab')}_2$ 의 구조를 갖는 항원이 또한 유사하게 생성된다;
- [0298] (3) 상기 (1) 및 (2)에서 획득된 각각의  $\text{F(ab')}_2$  구조의 항체를 DTT와 같은 환원제로 처리한 후, 처리된 생성물 중 임의의 하나를 엘만(Elman) 시약으로 추가 처리한다; 그리고
- [0299] (4) 상기 (3)에서 획득된  $\text{F(ab')}_2$  구조의 처리된 항체를 혼합하고, 서로 반응하도록 둔다.
- [0300] 2특이적 항체는 하기 (A) 내지 (D)에서 설명된 절차에 의해 생산될 수도 있다.
- [0301] (A) 에피토프로서 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 20 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역을 사용하는 항체가 생산된다.
- [0302] (B) 한편, 기타 항체에 특이적으로 결합하는 항체가 유사하게 생성된다.

- [0303] (C) (A) 및 (B)에서 수득된 개별적인 가변 영역의 아미노산 서열 및 그 가변 영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 염기 서열이 동정된다.
- [0304] (D) 필요한 경우 불변 영역 및 링커 서열에 대한 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드와 함께, 상기 (C)에서 동정된 개별적인 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드가 그 안에 포함된 발현 벡터가 생성되며, 이후 이 발현 벡터는 항체 생산에 적합한 숙주 세포, 예컨대 CHO 세포 내로 도입된다.
- [0305] 항체 (I)의 또다른 구현예로서, 항체 (I)은 거기에 결합된 세포독소 (세포독성 활성을 갖는 성분)를 가질 수 있다. 세포독소는 세포독소가 세포의 사멸 또는 세포 성장의 저해와 같이, 세포에 어떤 손상을 일으키는 물질인 한, 특별히 한정되지 않는다.
- [0306] 그러한 세포독소의 예로는: 알킬화제, 예컨대 시클로포스파미드 수화물, 이포스파미드, 티오테파, 부설판, 멜팔란, 니무스틴 염산염, 라니무스틴, 다카르바진, 및 테모졸로미드; 대사 길항제, 예컨대 메토트렉세이트, 페메트렉시드 나트륨 수화물, 플루오로우라실, 독시플루리딘, 카페시타빈, 테가푸르, 시타라빈, 젬시타빈 염산염, 플루다라빈 인산염, 벨라라빈, 클라드리빈, 및 칼슘 레보폴리네이트; 항생제 물질, 예컨대 독소루비신 염산염, 다우노루비신 염산염, 피라루비신, 에피루비신 염산염, 이다루비신 염산염, 아클라루비신 염산염, 암루비신 염산염, 미토잔트론 염산염, 미토마이신 C, 악티노마이신 D, 블레오마이신 염산염, 페플로마이신 염산염, 지노스타틴 스티말라머, 및 칼리케아마이신; 미세소관 저해제, 예컨대 빈크리스틴 황산염, 빈블라스틴 황산염, 빈데신 황산염, 및 파클리탁셀; 방향화효소 저해제, 예컨대 아나스트로졸, 이그제메스탄, 레트로졸, 및 파드로졸 염산염 수화물; 백금화제, 예컨대 시스플라틴, 카르보플라틴, 네다플라틴, 및 옥살리플라틴; 국소이성화효소 저해제, 예컨대 이리노테칸 염산염 수화물, 노기테칸 염산염, 에토포사이드, 및 소부족산; 부신피질 스테로이드, 예컨대 프레드니솔론 및 텍사메타손; 탈리도마이드 및 그의 유도체, 구체적으로 레날리도마이드; 단백질분해효소 저해제로서 제공되는 보르테조미; 및 방사성 동위원소, 예컨대 90-이트륨이 포함된다.
- [0307] 특히, 칼리케아마이신, 멜팔란, 빈크리스틴 황산염, 독소루비신 염산염, 프레드니솔론, 텍사메타손, 탈리도마이드, 레날리도마이드, 및 보르테조미가 바람직하며, 항체와의 결합에 대해 우수성이 입증된 칼시케아마이신이 더욱 바람직하다.
- [0308] 그러한 세포독소 각각은 구매가능하며, 한 종류 또는 둘 이상의 적절한 조합이 상기 언급된 세포독소로부터 선택될 수 있다.
- [0309] 세포독소와 상기 언급된 항체 간의 결합 방식은 특별히 한정되지 않으며, 당업자는 세포독소를, 예를 들어, 통상 사용되는 유전자 조작 기술 또는 단백질 조작 기술을 적절히 사용함으로써 상기 언급된 항체에 용이하게 결합시킬 수 있다. 더욱 구체적으로, 예를 들어 세포독소를 링커를 통하여 항체 (I)의 아미노산 잔기 결사슬의 작용기, 예컨대 아미노기, 티올기, 구아니딜 기, 히드록시기, 또는 카르복실기에 결합시키는 것을 포함하는 방법이 제공될 수 있다.
- [0310] 항체 (I)은 다클론성 항체일 수 있거나 단일클론성 항체일 수 있다. 항체 (I)은 바람직하게는 단일클론성 항체이다.
- [0311] 용어 "단일클론성"은 실질적으로 균일한 집단으로부터 수득됨을 의미하고, "단일클론성 항체"는 그러한 집단으로부터 수득된 항체를 의미한다. 즉, 그러한 집단에 포함된 개별적인 항체들은, 소량으로 존재할 수 있는 자연 발생적인 돌연변이를 제외하고, 서로 동일한 것으로 이해된다.
- [0312] 추가로, 항체의 특이적 결합 표적 (에피토프)에 관하여, 예를 들어, 항체 (I)의 경우, 에피토프는 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 20 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역에 존재한다. 이와 관련하여, 다클론성 항체의 경우, 에피토프는 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 20 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역에 있는 부위들인 한편, 단일클론성 항체의 경우, 에피토프는 단일 부위이다. 이러한 이유로, 단일클론성 항체는 고도의 특이성을 나타내며, 이에 따라 더욱 유리하다.
- [0313] 수식어로서 사용되는 용어 "단일클론성"은 상기 설명된 바와 같이 실질적으로 균일한 집단으로부터 수득되는 것을 의미하는 것으로 이해되며, 항체의 생산 방법을 특정하는 수식어로서 이해되어서는 안된다.
- [0314] 상기 언급된 방법 외에, 당업자는 하이브리도마 방법, 아래 설명되는 폴리뉴클레오티드 (II)를 보유하는 숙주 세포 (III)을 이용하는 재조합 DNA 방법, 파지 라이브러리로부터의 분리 등을 이용함으로써 항체 (I)을 용이하게 생산할 수 있다.

- [0315] 예를 들어, 항체 생산에 적합한 동물, 예컨대 마우스, 래트, 또는 토끼를 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 20 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역에 상응하는 펩타이드로 면역화하는 단계; 그 후 B-세포를 회수하고, 회수된 B-세포를 하이브리도마 방법으로 처리하는 단계; 및 상기 설명된 항체 (I)에 의해 나타나는 기능을 표지로서 이용하여 스크리닝을 수행하여 그로써 항체 (I)을 생산하는 단계를 포함하는 소정의 방법이 제공될 수 있다.
- [0316] 상기에 추가하여, 인테그린  $\beta_7$ 의 20 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역에서만 인간 기원이고 나머지는 비-인간 기원, 예컨대 마우스 기원인, 키메라성 인테그린  $\beta_7$ 을 발현하는 세포를 생산하는 단계; 항체 생산에 적합한 동물, 예컨대 마우스, 래트, 또는 토끼 (바람직하게는 마우스)를 세포로 면역화하는 단계; 그 후 B-세포를 회수하고, 회수된 B-세포를 하이브리도마 방법으로 처리하는 단계; 및 상기 설명된 항체 (I)에 의해 나타나는 기능을 표지로서 이용하여 스크리닝을 수행하여 그로써 항체 (I)을 생산하는 단계를 포함하는 소정의 방법이 제공될 수 있다.
- [0317] 항체 (I)에 의해 나타나는 기능의 예로는, 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 380 번째 내지 721 번째의 아미노산 잔기 위치의 영역의 적어도 일부 존재 하에서, 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 20 번째 내지 109 번째의 아미노산 잔기 위치의 영역에 대한 친화성에서의 증가; 및 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 활성화를 통한 친화성의 증가가 포함될 수 있다. 따라서, 항체 (I)은 그러한 기능을 이용하는, 아래 설명되는 스크리닝 방법 (X)에 나타난 방법에 의해 수득될 수 있다.
- [0318] 항체 (I)에 대한 에피토프는 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 20 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역에 존재하며, 이에 따라 항체 (I)은 인테그린  $\beta_7$ 을 발현하는 세포 상에서, 상기 언급된 ADCC 활성 및 CDC 활성 뿐만 아니라, 아포토시스-유도 활성, 생존 시그널-차단 활성 등을 그러한 세포 상에서 하나 또는 둘 이상 조합함에 의해, 세포독성 활성 등을 나타내는 것으로 기대된다. 따라서, 항체 (I)을 포함하는 조성물은 아래 상술되는 바와 같이 약학 조성물 (VII)로서 유용하다.
- [0319] 구체적으로, 항체 (I)은 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 20 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역을 에피토프로서 이용하고, 에피토프에 대한 항체 (I)의 친화성은 인테그린  $\beta_7$ 의 활성화를 통해 증가된다. 인테그린  $\beta_7$ 의 활성형은 혈액 세포, 예컨대 형질 세포에서 발현되어, 이에 따라 항체 (I)은 그의 암 (예를 들어 혈액암)에 대한 약학 조성물의 활성 성분으로서 사용된다. 구체적으로, 항체 (I)은 상기 언급된 세포 내에서 이상성을 유발하는 질환에 대한 약학 조성물로서 효과적으로 사용된다 (예를 들어 골수종 또는 다발성 골수종).
- [0320] (II) 폴리뉴클레오티드
- [0321] 폴리뉴클레오티드 (II)는 항체 (I)의 아미노산 서열을 암호화하는 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드이다. 용어 "폴리뉴클레오티드"는 예를 들어, 리보뉴클레오티드, 데옥시리보뉴클레오티드, 이들의 임의의 하나의 뉴클레오티드 등이 알려진 방법에 의해 적절히 변경된, 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태를 포함한다.
- [0322] 당업자는 항체 (I)의 아미노산 서열에 기초하여, 예를 들어 생물정보학 기반 가상 실험으로 폴리뉴클레오티드 (II)의 염기 서열을 적절하게 결정할 수 있다. 그러한 염기 서열을 결정하기 위해 사용되는 코돈의 종류는 한정되지 않는다. 염기 서열은 바람직하게는 폴리뉴클레오티드가 사용되는 숙주의 코돈 빈도를 고려하여 바람직하게 결정된다.
- [0323] 폴리뉴클레오티드 (II)의 특정 염기 서열은 특별히 한정되지 않는다. 항체 (I)의 일 구현예로서 동정된 아미노산 서열을 나타내는 각각의 서열 번호 및 그러한 아미노산 서열을 암호화하는 염기 서열을 나타내는 서열번호 간의 관련성을 아래 표 2에 나타낸다. 즉, 폴리뉴클레오티드 (II)의 바람직한 염기 서열은 서열번호 11 내지 서열번호 20에 설명된 염기 서열이다.

표 2

아미노산 서열	염기 서열
서열번호 1	서열번호 11
서열번호 2	서열번호 12
서열번호 3	서열번호 13
서열번호 4	서열번호 14
서열번호 5	서열번호 15
서열번호 6	서열번호 16
서열번호 7	서열번호 17

서열번호 8	서열번호 18
서열번호 9	서열번호 19
서열번호 10	서열번호 20

- [0325] 폴리뉴클레오티드 (II)는 벡터 내로 포함되는 구현예를 사용할 수 있다. 벡터는 특별히 한정되지 않으며, 예를 들어 클로닝용 벡터 또는 발현용 벡터일 수 있으며, 그의 의도된 용도는 한정되지 않는다.
- [0326] 추가적으로, 발현용 벡터는 대장균 또는 악티노마이세테스와 같은 원핵 세포용 벡터일 수 있거나, 효모 세포, 곤충 세포 또는 포유동물 세포와 같은 진핵 세포용 벡터일 수 있다.
- [0327] 신호 펩타이드를 암호화하는 염기 서열은 폴리뉴클레오티드 (II)의 5'-말단부 (항체 (I)의 N-말단부에 상응)에 적절히 첨가될 수 있다.
- [0328] 폴리뉴클레오티드 (II)를 사용하는 구체적인 방법은 특별히 한정되지 않는다. 예를 들어, 폴리뉴클레오티드 (II)는 하기 숙주 세포 (III) 내로 도입함으로써 항체 (I)을 발현하는 데 사용될 수 있다.
- [0329] (III) 숙주 세포
- [0330] 숙주 세포 (III)은 폴리뉴클레오티드 (II)를 보유하는 세포이다. 용어 "보유"는 폴리뉴클레오티드 (II)가 세포 내에 존재하는 상태의 유지를 지칭하며, 방출이 적극적인지의 여부에 관계없이 세포가 폴리뉴클레오티드를 세포 밖으로 자발적으로 방출시키지 않는 상태를 의미한다.
- [0331] 숙주 세포 (III)이 폴리뉴클레오티드 (II)를 보유하는 구현예는 특별히 한정되지 않는다. 예를 들어, 폴리뉴클레오티드는 세포 내 벡터 형태로 보유될 수 있거나, 폴리뉴클레오티드 (II)는 세포 내 계놈 내로 통합되는 형태로 보유될 수 있다.
- [0332] 숙주 세포 (III)의 특정 세포 유형은 진핵 세포, 예컨대 효모 세포, 곤충 세포, 또는 포유동물 세포일 수 있거나, 원핵 세포, 예컨대 대장균 또는 악티노마이세테일 수 있으며, 특별히 한정되지는 않는다.
- [0333] (IV) 키메라성 항원 수용체
- [0334] 키메라성 항원 수용체는 인공 T-세포 수용체(TCR)-유사 단백질이고, T-세포의 세포막 상에서 발현된 항원 인식 부위 (세포 외 도메인에 상응)가 바람직한 항원 인식 부위로 대체되고, T-세포 자신의 기능, 예컨대 세포독성 활성을 더욱 효과적으로 나타낼 수 있도록 구축된 단백질이다.
- [0335] 키메라성 항원 수용체 (IV)는 에피토프가 항체 (I)의 에피토프와 동일하고, 더욱 구체적으로는 항체 (I)의 항원 인식 부위를 포함하는 단백질인 키메라성 항원 수용체이다. 즉, 키메라성 항원 수용체 내에 포함된 항원 인식 부위에 존재하는 에피토프는 항체 (I)에서 상술된 것과 같을 수 있다.
- [0336] 더욱 구체적으로, 키메라성 항원 수용체 (IV)는 항체 (I)의 항원 인식 부위, 스페이스 서열, 막관통 도메인, 공동 자극자, 및 TCR 세포 내 도메인이 키메라성 항원 수용체 (IV)의 N-말단으로부터 언급된 순서대로 배열된 단백질이다.
- [0337] 키메라성 항원 수용체 (IV) 내에 배열된 항체 (I)의 항원 인식 부위는 항체 (I)에서 상술된 바와 같을 수 있으며, 이의 특정 예로는 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역이 포함될 수 있다. 특히, 항원 인식 부위는 바람직하게는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 갖는 한편 scFv의 구조를 갖는다.
- [0338] 그러한 scFv에서, 예를 들어, 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역 사이에서, 약 10 개 내지 약 25 개 아미노산 잔기로 이루어지는 스페이스 서열이 적절하게 배열될 수 있다. 아미노산 잔기의 수는 더욱 바람직하게는 약 15 개 내지 18 개이다. 그러한 스페이스 서열은 키메라성 항원 수용체 (IV) 내에 배열되는 상기 언급된 스페이스 서열과 동일할 수 있거나, 그와 상이할 수 있다.
- [0339] 키메라성 항원 수용체 (IV) 내에 배열된 스페이스 서열은 특별히 한정되지 않는다. 예를 들어, 스페이스 서열은 약 10 개 내지 약 25 개 아미노산 잔기로 이루어질 수 있다. 아미노산 잔기의 수는 바람직하게는 약 15 개 내지 약 18 개이다.
- [0340] 키메라성 항원 수용체 (IV) 내에 배열된 막관통 도메인은 특별히 한정되지 않는다. 구체적으로, T-세포 등에서 발현되는 CD28 또는 4-1BB와 같은 단백질로부터 유래된 세포 막관통 도메인이 사용될 수 있으며, 이는 그 안에 돌연변이가 적절하게 도입되는 것을 허용한다.



- [0341] 키메라성 항원 수용체 (IV) 내에 배열된 공동 자극자는 T-세포 등의 공동 자극자일 수 있으며, 특별히 한정되지 않는다. 예를 들어, 4-1BB, OX40, CD28 등이 사용될 수 있으며, 그 안에 돌연변이가 적절하게 도입되는 것이 허용된다.
- [0342] 키메라성 항원 수용체 (IV) 내에 배열된 TCR 세포 내 도메인은 특별히 한정되지 않는다. 예를 들어, TCR  $\zeta$  사슬 등으로도 명명되는, CD3으로부터 유래된 세포 내 도메인이 사용될 수 있으며, 그 안에 돌연변이가 적절하게 도입되는 것이 허용된다. 면역수용체 티로신계 활성화 모티프 (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif: ITAM)를 포함하도록, 돌연변이가 CD3 내로 도입되는 것이 바람직하다.
- [0343] 키메라성 항원 수용체 (IV)는 바람직하게는 서열번호 21에 나타난 아미노산 서열을 갖는다.
- [0344] 돌연변이는, 상기 언급된 키메라성 항원 수용체를 동정하는 아미노산 서열 내로 적절하게 도입될 수 있다. 추가적으로, 돌연변이는 상기 언급된 각각의 막관통 도메인, 공동 자극자, 및 TCR 세포 내 도메인 내로 유사하게 도입될 수도 있다. 도입되는 돌연변이의 특정 수는 특별히 한정되지 않는다.
- [0345] 예를 들어, 돌연변이 도입 전의 아미노산 서열과 돌연변이 도입 후의 아미노산 서열 간의 동일성은 약 70%, 바람직하게는 약 75%, 더욱 바람직하게는 약 80%, 더욱 바람직하게는 약 85%, 더욱 바람직하게는 약 90%, 더욱 바람직하게는 약 95%, 더욱 바람직하게는 약 96%, 더욱 바람직하게는 약 97%, 더욱 바람직하게는 약 98%, 가장 바람직하게는 약 99%이다. 그러한 수치는 반올림으로 얻은 값이다.
- [0346] 상기 언급된 돌연변이의 아미노산 서열 내로의 도입은 치환, 결실, 삽입 등을 지칭한다. 구체적인 돌연변이 도입은, 돌연변이 도입이 통상 사용되는 방법을 사용하여 달성될 수 있는 한 특별히 한정되지 않는다. 예를 들어, 치환의 경우, 보존적 치환 기술이 사용될 수 있다.
- [0347] 그러한 키메라성 항원 수용체의 생산을 위해, 당업자는 예를 들어 비특허 문헌 4 내지 6 각각에서 설명된 방법을 참조하여 키메라성 항원 수용체를 용이하게 생산할 수 있다.
- [0348] (V) 폴리뉴클레오티드
- [0349] 폴리뉴클레오티드 (V)는 폴리뉴클레오티드 (II)와 달리, 키메라성 항원 수용체 (IV)의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드이다.
- [0350] 폴리뉴클레오티드 (II)에서와 같이, 폴리뉴클레오티드 (V)의 염기 서열은 키메라성 항원 수용체 (IV)의 아미노산 서열을 기준으로, 예를 들어 생물정보학 기반 가상 실험으로 적절히 결정될 수 있다. 염기 서열을 결정하는데 사용되는 코돈의 종류는 한정되지 않는다. 염기 서열은 바람직하게는 폴리뉴클레오티드가 사용되어지는 표적으로서 제공되는 세포의 코돈 빈도를 고려하여 결정된다.
- [0351] 구체적인 염기 서열은 특별히 한정되지 않는다. 예를 들어, 서열번호 22에 나타난 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드가 제공될 수 있으며, 이는 서열번호 21에 나타난 아미노산 서열을 갖는 키메라성 항원 수용체 (IV)의 아미노산 서열에 기초하여 결정된다. 물론, 사용되는 코돈의 종류가 한정되지 않음을 고려하면, 말할 것도 없이, 그러한 아미노산 서열에 기초하여 결정되는 염기 서열은 서열번호 22에 나타난 염기 서열에 한정되지 않는다.
- [0352] 신호 펩타이드를 암호화하는 염기 서열이 폴리뉴클레오티드 (V)의 5'-말단부 (키메라성 항원 수용체 (IV)의 N-말단부에 상응)에 적절히 첨가될 수 있다.
- [0353] 폴리뉴클레오티드 (V)를 사용하는 구체적인 방법은 특별히 한정되지 않는다. 예를 들어, 폴리뉴클레오티드 (V)는 하기 세포 (VI) 내로 도입됨으로써 키메라성 항원 수용체 (IV)를 발현하는 데 사용될 수 있다.
- [0354] (VI) 세포
- [0355] 세포 (VI)은 숙주 세포 (III)과 달리 폴리뉴클레오티드 (V)를 보유하는 세포이다. 용어 "보유하다"는 숙주 세포 (III)에서와 같을 수 있다. 세포의 구체적인 종류는 숙주 세포 (III)에서와 같을 수도 있지만, 세포 (VI)은 바람직하게는 세포독성 활성을 갖는다. 이의 예로는 T-세포, NK 세포, 및 K 세포를 포함할 수 있다. 특히, T-세포의 일종인, 킬러 T-세포 (때때로 세포독성 T-세포 [CTL]로 지칭됨)가 가장 바람직하다.
- [0356] 세포 (VI) 내에 포함된, 키메라성 항원 수용체를 암호화하는, 폴리뉴클레오티드 (V)가 발현된 경우, 키메라성 항원 수용체 (IV)의 성분으로서 제공되는 항체 (I)의 항원 인식 부위는 세포의 외부에 노출되고, 키메라성 항원 수용체 (IV)의 성분으로서 제공되는 막관통 도메인, 공동 자극자, 또는 TCR 세포 내 도메인은 세포막 상이나 세포의 내부에 국재하는 것이 바람직하다.

- [0357] 세포막 상이나 세포 내부에 국재화되는 공동자극자, 또는 도메인은 항체 (I)의 항원 인식 부위가 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 20 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역에 결합하는 경우, 세포 내 세포독성을 유도하는 신호를 활성화한다. 추가적으로, 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 20 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역에 대한 항체 (I)의 친화성은 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 활성화를 통해 증가된다. 따라서, 항체 (I)은 표적으로서 제공되는 활성화형 인테그린  $\beta_7$ 를 발현하는 세포 또는 조직 상에서, 세포독성 활성을 공격하거나, 또는 나타낸다.
- [0358] 그러한 기능을 나타내는 세포가 T-세포인 경우, 세포는 키메라성 항원 수용체 T-세포 (VI-4)로서 지칭된다. 키메라성 항원 수용체 T-세포와 같이, 세포독성 활성을 나타낼 가능성을 갖는 세포, 예컨대 NK 세포 또한, 활성화형 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 20 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역에 대한 항원 인식 부위의 결합과 세포막 또는 세포 내 도메인에서 세포독성 활성을 유도하는 신호의 활성화 간의 협력을 통해, 키메라성 항원 수용체 T-세포 (이러한 세포는 키메라성 항원 수용체 NK 세포로도 지칭됨)에 유사한 효과를 나타낼 수 있다.
- [0359] 상기 설명된 바와 같이, 세포 (VI)은 활성화형 인테그린  $\beta_7$ 를 발현하는 세포 또는 조직 상에서 세포독성 활성 등을 나타낸다. 따라서, 항체 (I)을 이용하는 경우와 같이, 세포 (VI)을 포함하는 조성물은 아래 상술되는 바와 같은 그러한 약학 조성물 (IV)로서 유용하다고 할 수 있다. 활성화형 인테그린  $\beta_7$ 은 혈액 세포, 예컨대 형질 세포에서 발현되며, 이에 따라, 세포 (VI)은 암에 대한 약학 조성물의 활성 성분으로서 사용된다 (예를 들어, 혈액암). 구체적으로, 세포 (VI)은 상기 언급된 세포 내에서 이상성을 유발하는 질환에 대한 약학 조성물로서 효과적으로 사용된다 (예를 들어, 골수종 또는 다발성 골수종).
- [0360] (VII) 약학 조성물
- [0361] 약학 조성물 (VII)은 항체 (I) 또는 세포 (VI)을 포함한다. 세포 (VI)은 바람직하게는 키메라성 항원 수용체 T-세포 (VI-4)이다.
- [0362] 약학 조성물 (VII)에서 항체 (I) 또는 세포 (VI)의 함량은 특별히 한정되지는 않는다. 예를 들어, 항체 (I)의 경우, 함량은 약학 조성물 100 중량부에 대하여 약 0.001 중량부 내지 약 10 중량부일 수 있다. 추가적으로, 세포 (VI)의 경우, 함량은 약 1 세포/mL 내지 약  $10^4$  세포/mL일 수 있다.
- [0363] 약학 조성물 (VII)에 대한 투여 방법은 특별히 한정되지 않는다. 그의 활성 성분은 항체 또는 세포이기 때문에, 비경구 투여 또는 비-장내 투여가 바람직하다. 이의 예로는 정맥 투여, 근육 내 투여, 피하 투여가 포함된다. 특히 정맥 내 투여가 바람직하다.
- [0364] 약학 조성물 (VII)의 제형은, 상기 언급된 투여 방법에 따라, 약물학적으로 허용가능하며 통상 사용되는 담체와 함께 사용될 수 있다. 상기 언급된 바람직한 투여 방법 고려 시, 제형은 바람직하게는 주사이다.
- [0365] 약학 조성물 (VII)의 표적 질환은 특별히 한정되지 않는다. 표적 질환의 특정 예는 암이고, 바람직하게는 혈액 암이며, 더욱 바람직하게는 형질 세포의 종양성 증식을 유발하는 질환이다. 용어 "형질 세포의 종양성 증식을 유발하는 질환"은 이상 형질 세포의 종양성 증식 및 그로부터 분비된 이상 단백질에서의 증가에 의해 특징지어지는 질환을 지칭한다. 그러한 질환의 예로는 골수종, 다발성 골수종, 형질 세포 백혈병, 형질세포종, H 사슬 질환, 및 전신성 AL 아밀로이드증이 포함될 수 있다. 또다른 구현예에서, 약학 조성물 (VII)의 표적 질환은 악성 림프종 또는 백혈병과 같이 상이한 혈액 악성 질환일 수 있다.
- [0366] 약학 조성물 (VII)의 투여 표적 (피험자)은 상기 언급된 질환이 발병된 환자일 수 있거나, 또는 상기 언급된 질환의 발병 위험을 갖는 동물일 수 있다. "발병 위험을 갖는"은 이후 기재되는 진단 방법 (XI)에 의해 결정될 수 있다. 동물은 예를 들어, 포유동물일 수 있으며, 바람직하게는 인간이다.
- [0367] 약학 조성물 (VII)의 투여량은 투여 표적의 각종 조건, 예컨대 질환의 중증도, 투여에 의해 달성되는 원하는 효과의 정도, 체중, 성별, 연령, 및 동물 종에 따라 달라지며, 무조건적으로 결정될 수는 없다. 예를 들어, 활성 성분이 항체 (I)인 경우, 투여량은 일반적으로 일일 당 약  $1 \mu\text{g/kg}$  (체중) 내지 약  $10 \text{ g/kg}$  (체중)일 수 있다. 추가적으로, 활성 성분이 세포 (VI)인 경우, 투여량은 일반적으로 약  $10^4$  세포/kg (체중) 내지 약  $10^9$  세포/kg (체중)일 수 있다.
- [0368] 투여량에서와 같이, 약학 조성물 (VII)의 투여 스케줄 또한 투여 표적의 각종 상태, 예컨대 질환의 중증도에 따라 변화되며, 무조건적으로 결정될 수는 없다. 예를 들어, 약학 조성물 (VII)은 바람직하게는 일일 1 회 내지

한 달 1 회의 빈도로, 상기 언급된 일일 투여량으로 투여된다.

[0369] (VIII) 질환에 대한 치료 또는 예방 방법

[0370] 질환에 대한 치료 또는 예방 방법 (VIII)은 항체 (I) 또는 세포 (VI)의 치료유효량을 피험자에게 투여하는 단계를 포함하는 질환에 대한 치료 또는 예방 방법이다. 세포 (VI)은 바람직하게는 키메라성 항원 수용체 T-세포 (VI-4)이다.

[0371] 피험자는 약학 조성물 (VII)에서와 같을 수 있다. 피험자가 질환이 발병한 환자인 경우, 항체 (I) 또는 세포 (VI)의 치료유효량의 투여는 그에 대한 치료 효과를 달성할 것으로 기대되며, 피험자가 질환의 발병 위험을 갖는 동물인 경우, 투여는 그에 대한 예방 효과를 달성할 것으로 기대된다. 아래 설명되는 진단 방법 (XI)에 설명된 바와 같이, 예방은 통상적으로 사용되는 면역학적 방법에 의해 측정된 수치값이 질환이 발병한 것으로 판단되는 수치에 도달하지 않도록 하는 것을 의미한다.

[0372] 질환은 약학 조성물 (VII)에서와 같을 수 있으며, 예를 들어 암으로 예시된다. 암의 바람직한 예는 형질 세포의 종양성 증식을 유발하는 질환 (예를 들어, 다발성 골수종)일 수 있다.

[0373] 치료유효량은 약학 조성물 (VII)의 투여량에서와 같을 수 있으며, 항체 (I) 또는 세포 (VI)의 제형은 약학 조성물 (VII)의 제형에서와 같을 수 있다. 추가적으로, 항체 (I) 또는 세포 (VI)에 대한 투여 방법, 그에 대한 투여 스케줄 등 또한 약학 조성물 (VII)에서 상술된 바와 같을 수 있다.

[0374] 질환에 대한 치료 또는 예방 방법 (VIII)은 활성화형 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 표적을 포함하는 다발성 골수종의 치료 또는 예방 방법을 포함할 수 있다. 표적의 예는 항체 (I) 또는 세포 (VI)의 적용일 수 있다.

[0375] (IX) 사용

[0376] 사용 (IX)는 약학 조성물의 생산을 위한, 항체 (I) 또는 세포 (IV)의 사용이다.

[0377] 약학 조성물은 약학 조성물 (VII)과 같을 수 있다. 세포 (IV)는 바람직하게는 키메라성 항원 수용체 T-세포 (VI-4)이다.

[0378] 추가적으로, 약학 조성물의 표적 질환 또한 동일하며, 약학 조성물은 예를 들어, 암, 바람직하게는 혈액암, 더욱 바람직하게는 형질 세포의 종양성 증식을 유발하는 질환을 치료하는 데 사용된다 (예를 들어, 골수종 또는 다발성 골수종).

[0379] 게다가, 약학 조성물에서 활성 성분으로서 제공되는 항체 (I) 또는 세포 (VI)의 함량, 그의 제형, 그에 대한 투여 방법, 그에 대한 투여 스케줄 등은 또한 약학 조성물 (VII)에서 상술된 바와 같을 수 있다.

[0380] (X) 스크리닝 방법

[0381] 스크리닝 방법 (X)는 형질 세포의 종양성 증식을 유발하는 질환의 치료 또는 예방에 대한 약학 조성물의 활성 성분에 대한 스크리닝 방법으로, 화합물 라이브러리로부터 인간 인테그린  $\beta_7$ 에 특이적으로 결합하고, 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 20 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역에 결합하는 후보 물질을 선별하는 단계를 포함한다.

[0382] 약학 조성물은 약학 조성물 (VII)과 같을 수 있으며, 암, 바람직하게는 혈액암, 더욱 바람직하게는 형질 세포의 종양성 증식을 유발하는 질환 (예를 들어, 골수종 또는 다발성 골수종)의 치료 또는 예방을 위한 약학 조성물의 활성 성분의 예는 항체 (I)이다.

[0383] 화합물 라이브러리는 특별히 한정되지는 않으며, 기존 라이브러리가 사용될 수 있다. 화합물 라이브러리는 바람직하게는 항체 라이브러리이며, 상기 라이브러리는 바람직하게는 원하는 항원으로 면역화된 동물로부터 수득된 항체-생산 세포, 예컨대 B-세포를 이용하여 생성되는 하이브리도마를 포함한다.

[0384] 여기에서, 바람직한 항원은 특별히 한정되지는 않으며, 바람직하게는 예를 들어, 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 20 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역이다. 바람직한 항원은 더욱 바람직하게는 활성화형 인간 인테그린  $\beta_7$ 이다.

[0385] 후보 물질을 선별하는 방법은 특별히 한정되지는 않는다. 예를 들어, 다음의 단계: 인간 인테그린  $\beta_7$ 에 특이적으로 결합하는 후보 물질을 선별하는 단계; 통상 사용되는 면역분석 수단을 이용하여, 후보 물질이 인간 인테그

린  $\beta_7$ 의 20 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역에 상응하는 펩타이드 단편에 결합한 것을 확인하는 단계; 및 그러한 후보 물질을 선별하는 단계를 포함하는 수단을 사용할 수 있다.

[0386] 추가적으로, 다음의 단계: 인간 인테그린  $\beta_7$ 에 특이적으로 결합하는 후보 물질을 선별하는 단계; 추가로, 통상 사용되는 면역분석 수단을 이용하여, 항체 (I)에 상술된, 인테그린  $\beta_7$ 의 20 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역만이 인간 기원이고, 나머지는 마우스 기원과 같은 비-인간 기원인 키메라성 인테그린  $\beta_7$ 를 발현하는 세포에 결합하는 후보 물질을 확인하는 단계; 및 그러한 후보 물질을 선별하는 단계를 포함하는 수단을 사용할 수 있다. 그러한 후보 물질을 선별하는 단계를 포함하는 수단 또한 사용될 수 있다.

[0387] 추가적으로, 다음의 단계: 인간 인테그린  $\beta_7$ 에 특이적으로 결합하는 후보 물질을 선별하는 단계; 추가로, 항체 (I)에 상술된, 인테그린  $\beta_7$ 의 20 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역만이 인간 기원이고, 나머지는 마우스 기원과 같은 비-인간 기원인 키메라성 인테그린  $\beta_7$ 를 발현하는 세포를, 포르볼 에스테르, 망간염 등으로 처리하고, 처리 전에 비해 처리 후 증가된 결합 정도를 나타내는 후보 물질을 확인하는 단계; 및 그러한 후보 물질을 선별하는 단계를 포함하는 수단을 또한 사용할 수 있다.

[0388] 추가적으로, 다음의 단계: 인간 인테그린  $\beta_7$ 에 특이적으로 결합하는 후보 물질을 선별하는 단계; 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 111 번째 내지 378 번째 아미노산 잔기 위치의 영역이 항체 (I)에 상술된 마우스 기원 중 하나로 치환된 키메라, 및 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 110 번째 내지 721 번째 아미노산 잔기 위치의 영역이 마우스 기원 중 하나로 치환된 키메라를 발현하는 세포를 추가로 생성하는 단계; 이전에 대해 높은 결합 정도를 나타내는 후보 물질을 확인하는 단계; 및 그러한 후보 물질을 선별하는 단계를 포함하는 수단을 또한 사용할 수 있다.

[0389] 나아가, 스크리닝 방법 (X)는 표지로서 세포독성 활성의 존재의 이용을 통해 후보 물질을 선별하는 단계를 또한 포함할 수 있다. 세포독성 활성이 확인되어지는 표적으로서 제공되는 특정 세포는 특별히 한정되지 않는다. 이들의 예는 상기 설명된 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 PSI 도메인에서 특징을 갖는 인간 기원의 활성형 인테그린  $\beta_7$ 를 발현하는 혈액 세포를 포함할 수 있다.

[0390] 여기에서, 스크리닝되는 후보 물질이 항체인 경우, 표지로서 세포독성 활성의 존재를 이용하여 후보 물질을 선별하는 단계는 ADCC 활성 또는 CDC 활성을 갖는 항체를 선별하는 단계일 수 있다.

[0391] 상기 기재된 바와 같은 스크리닝 방법 (X)에 의해 선택되는 후보 물질은 바람직하게는 항체이고, 더욱 바람직하게는 단일클론성 항체이다. 선별되는 후보 물질은 더욱 바람직하게는 항체 (I)이다.

#### [0392] (XI) 진단 방법

[0393] 진단 방법 (XI)는 암에 대한 진단 방법이고, 피험자로부터 채집된 샘플을 항체 (I)과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0394] 피험자는 질환의 치료 또는 예방 방법 (VIII)에서 상술된 피험자에서와 동일할 수 있다.

[0395] 피험자로부터 채집된 샘플은 혈액 또는 골수액일 수 있다.

[0396] 구체적인 진단 방법은 특별히 한정되지 않지만, 예를 들어 항체 (I)에 결합하는 세포가 탐지되는 경우 피험자가 암을 발병했거나, 발병 위험을 갖는 것으로 판단하는 것을 포함할 수 있다.

[0397] 당업자는 통상 사용되는 면역분석 방법을 사용함으로써 결합 정도를 용이하게 결정할 수 있다. 피험자가 암을 발병했는지 및 피험자가 암 발병 위험을 갖는지의 여부 중 어느 하나가 여기에서 측정된 정도에 따라 결정될 수 있다.

[0398] 암의 구체적인 진단은 특별히 한정되지 않지만, 예를 들어 피험자는 혈액암, 더욱 바람직하게는 항체 (I)에 결합하는 세포가 형질 세포인 경우 형질 세포의 종양성 증식 (예를 들어 골수종 또는 다발성 골수종)을 유발하는 질환이 발병한 것으로, 또는 발병 위험을 갖는 것으로 진단될 수도 있다.

#### [0399] (XII) 키트

[0400] 키트 (XII)는 항체 (I)을 포함하는 암 진단용 키트이다.

[0401] 암은 특별히 한정되지 않으며, 상기 언급된 약학 조성물 (VII)에서 상술된 바와 같을 수 있고, 바람직하게는



혈액암, 더욱 바람직하게는 형질 세포의 종양성 증식 (예를 들어 골수종 또는 다발성 골수종)을 유발하는 질환이다.

[0402] 키트 (XII)에는 적절한 매뉴얼이 첨부될 수 있다. 그러한 매뉴얼에서, 상기 언급된 진단 방법 (XI)에서 상술된 방법이 암 진단에 대한 기준으로서의 제공되도록 기재될 수 있다.

[0403] 실시예

[0404] 이제, 본 발명을 더욱 상술하기 위한 실시예가 기재된다. 당연히, 본 발명은 아래 기재된 실시예에 한정되지 않는다.

[0405] 시험 방법: 유세포분석 및 선별

[0406] 하기 실시예에서, 세포를 선별하는 데 사용된 유세포분석 (FACS)을 하기 방식으로 수행하였다.

[0407] 정보 동의를 받은 골수종 환자의 장골에서 채집된 골수 단핵성 세포를 ACK 용액에 현탁시켰고 (150 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  및 10 mM  $\text{KHCO}_3$ ), 그 전체를 4°C에서 3 분 동안 정치시켜 적혈구 세포를 제거하였다. 제거 후, 골수 단핵 세포를 2% 소 태아 혈청으로 보충된 PBS로 세척하고, 이후 비특이적 항체의 결합을 방지하기 위하여, 10%의 인간 AB 혈청을 함유하는 PBS 내에서 블로킹(blocking)을 4°C에서 20 분 동안 수행하였다.

[0408] 그 후, 형광 염료로 표지된 각각의 항체 (아래 참조)를 첨가하여 4°C에서 30 분 동안 염색을 수행하였다. 그 후, 세포를 PBS로 세척하고, 이후 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  프로피디움 요오드화물 (PI)을 함유하는 PBS 내에 현탁시키고, 이어서 FACS 분석하였다. FACS Aria Cell Sorter (Becton Dickinson Immunocytometry Systems 제조)를 이용하여, 세포 분석 및 세포 선별을 수행하였다.

[0409] 세포의 염색을 위해, 하기 단일클론성 항체를 적절히 선별하고 사용하였다.

[0410] · APC-컨쥬게이트된 항-인간 CD34 항체 (BD Pharmingen 제조)

[0411] · PE-Cy7-컨쥬게이트된 항-인간 CD34 항체 (BD Pharmingen 제조)

[0412] · APC/Cy7-컨쥬게이트된 항-인간 CD19 항체 (Biolegend 제조)

[0413] · FITC-컨쥬게이트된 항-인간 CD38 항체 (eBioscience 제조)

[0414] · APC-컨쥬게이트된 항-인간 CD138 항체 (Biolegend 제조)

[0415] · PE/Cy7-컨쥬게이트된 항-인간 CD3 항체 (Biolegend 제조)

[0416] · FITC-컨쥬게이트된 항-인간 CD14 항체 (BD Pharmingen 제조)

[0417] · PE/Cy7-컨쥬게이트된 항-인간 CD45 항체 (Biolegend 제조)

[0418] [실시예 1]

[0419] 골수종 세포주에 결합하고, 건강한 사람의 말초 혈액에는 결합하지 않는 단일클론성 항체 라이브러리의 생성

[0420] 다발성 골수종에 대한 항체 요법에 있어서, 골수종 세포에는 결합하지만, 정상 혈액 세포에는 결합하지 않는 항체를 사용하는 것이 중요하다. 이러한 관점에서, 그러한 항체를 하기 방법에 의해 동정하였다. 먼저, 하기 기술을 이용하여, 각종 골수종 세포주에 결합된 단일클론성 항체의 10,000 개 이상의 클론을 생성하였다.

[0421] Balb/c 마우스들을, 항원으로서 6 종류의 인간 골수종 세포주 (MM.1s 세포, RPMI8226 세포, INA6 세포, U266 세포, OPM2 세포, 및 KMS12BM 세포)를 이용하여 2 주 내지 3 주 동안 1 주당 2 회, 발바닥(footpad)에 면역화시켰다. 그 후, 무릎 아래 림프절을 제거하고, 세포 현탁액을 생성시키고, SP2/0 마우스 골수종 세포주와 세포 융합시켜 하이브리도마를 생성하였다. 세포 융합은 폴리에틸렌 글리콜을 이용하는 방법 (PEG 방법)을 이용하여 수행되었다. 그 후, 세포를 하이포잔틴-아미놉테린-티미딘 배지 (HAT 배지) 내에서 배양시켜 하이브리도마를 선별하였다 (>10,000 클론).

[0422] 최종적으로, 하이브리도마의 배양물 상등액을 이용하여, 면역화에 사용된 골수종 세포주에 결합된, 그리고 건강한 사람 말초 혈액-유래 단핵 세포에는 결합하지 않는 항체를 포함하는 상등액을 FACS를 이용하여 선별하였다. 상기의 결과로서 수득된 골수종 세포에 특이적인 항체 후보는 약 200 개 클론이었으며, 그러한 항체 후보를 발현하는 하이브리도마를 배양하고, 이후 저온보존되었다.

- [0423] [실시예 2]
- [0424] 인간 다발성 골수종 환자 골수 내 골수종 세포에 특이적으로 결합하는 항체의 동정
- [0425] 상기 실시예 1에서 수득된 후보 항체 약 200 개 클론을 사용하여 골수종 환자-유래 골수 세포를 염색하는 데 사용하고, 이어서 FACS를 이용하여 분석하였다.
- [0426] 각각의 후보 항체를 다발성 골수종 환자-유래의 골수 세포에 첨가하였고, 그 세포를 4℃에서 30 분 동안 인큐베이션시킨 후 세척하였다. PE-컨쥬게이트된 항-마우스 IgG 항체가 제2 항체로서 첨가되었고, 세포는 4℃에서 30 분 동안 추가로 인큐베이션되었다. 세척 후, 최종적으로 세포를 APC-컨쥬게이트된 항-인간 CD138 항체, FITC-컨쥬게이트된 항-인간 CD38, 또는 PE/Cy7-컨쥬게이트된 항-인간 CD45를 이용하여 염색하였다. 음성 대조구로서, 후보 항체 대신 거기에 아이소타입 대조구가 첨가된 샘플을 동시에 제조하였다.
- [0427] 그러한 세포들을 FACS를 이용하여 분석하여  $CD45^{-}CD38^{++}CD138^{+}$  골수종 형질 세포 및  $CD45^{-}CD38^{++}CD138^{-}$  골수종 전구 세포에는 결합되지만  $CD45^{+}$  혈액 세포에는 결합하지 않는 항체를 선발하였다.
- [0428] 그 결과, MMG49 항체를 상기 언급된 조건을 만족시키는 항체로서 동정하였다 (도 1 및 도 2). 도면 내 각각의 히스토그램에서 Y-축은 세포 수를 나타내고, X-축은 MMG49 항체의 결합 강도를 나타낸다.
- [0429] [실시예 3]
- [0430] MMG49 항체가 결합하는 항원 단백질의 동정
- [0431] MMG49 항체가 결합된 항원 단백질을 발현 클로닝 방법에 의해 동정하였다.
- [0432] 먼저, cDNA 합성용 수퍼스크립트 초이스 시스템 (superscript choice system) (Invitrogen)을 사용하여, MMG49 항체가 결합하는 것으로 알려진 MM.1s 세포로부터 cDNA 라이브러리를 생성하였고, BstXI 어댑터 (Invitrogen)를 이용하여 pMX 레트로바이러스 벡터 (도쿄대 의학 연구소의 Toxho Kitamura 교수 기증) 내로 삽입시켰다. 이에 따라 생성된 cDNA 라이브러리를 plat-E 세포 (Toshio Kitamura 교수 기증) 내로 도입시켰고, BaF3 세포를 결과의 레트로바이러스를 이용하여 감염시켰다. 이에 따라, MM.1s-유래 cDNA 라이브러리를 발현하는 BaF3 세포를 수득하였다.
- [0433] 그 후, 세포를 MMG49 항체로 염색하고, FACS에 의해 양성 세포를 선별함으로써 세포를 반복적으로 농축시켰다 (도 3). 3차 선별 후, 대부분의 세포는 MMG49 항체에 결합된 세포였다. 그 후, 그러한 세포들에 의해 운반된 레트로바이러스 삽입물을 PCR에 의해 증폭하고, 그 후 서열분석하여 그의 염기 서열을 동정하였다. 결과로서, 세포에 의해 운반된 삽입물이 ITGB7이라는 것이 밝혀졌다.
- [0434] [실시예 4]
- [0435] MMG49 항체가 결합하는 항원이 ITGB7-결핍 골수종 세포의 생성에 의해 ITGB7-발현된 단백질임을 확인
- [0436] ITGB7-결핍 U266 골수종 세포주를 Crisp-cas9 시스템을 이용하여 생성하였다
- [0437] 먼저, ITGB7-특이적 표적 서열로서 제공되는 이중가닥 DNA 서열을 PX330 (addgene) 벡터 내로 삽입함으로써, 벡터를 생성하였다. 이 벡터를, Nucleofector (상표명) II (Lonza)를 사용하여, 약물 선발용 벡터로서 제공되는 선형 하이그로마이신-저항성 유전자 발현 벡터 (Clontech)와 함께 U266 세포로 도입시켰다. 그 후, 하이그로마이신으로 보충된 배지 내에서 배양된 클론에 대해, ITGB7의 발현을 FIB27 항체 (항-인테그린  $\beta_7$  항체; Biolegend)를 이용하여 염색하고, 이어서 FACS로 분석하여, 이로써 ITGB7-결핍 세포를 동정하였다.
- [0438] 그 후, 결과의 ITGB7-결핍 세포를 MMG49 항체를 이용하여 염색하고, FACS로 분석하였다. 결과로서, MMG49 항체가 야생형 U266 세포에 결합된 반면, MMG49 항체의 결합은 ITGB7-결핍 주에서는 완전히 사라졌음이 발견되었다 (도 4). 이는 MMG49가 ITGB7-발현된 단백질 (인테그린  $\beta_7$ )에만 결합됨을 나타낸다.
- [0439] 그 후, MMG49 항체를 이용하여, MM1s 골수종 세포의 용해액으로부터 면역침강을 수행하고, 이어서 SDS-PAGE를 수행하였다. 이어서, 항-인테그린  $\beta_7$  항체 (Miltenyi)를 이용하여 WB를 수행하였다. 결과로서, MMG49 항체를 이용하여 면역침강된 생성물에서 인테그린  $\beta_7$ 이 탐지되었다 (도 5). 이는 MMG49 항체가 인테그린  $\beta_7$ 에 결합됨을 보여준다.

- [0440] [실시예 5]
- [0441] 건강한 사람의 말초 혈액 및 골수종 환자 골수의 세포 분획 내 MMG49 항체의 결합 패턴의 측정
- [0442] 구매가능한 항-인테그린  $\beta_7$  항체 (FIB27 항체; Biolegend) 및 MMG49 항체를 이용하여, 건강한 사람의 말초 혈액 및 골수 세포 내 각종 세포 분획에 대한 결합을 측정하였다.
- [0443] HES40을 이용하여 적혈구 세포를 건강한 사람-유래된 말초 혈액 세포로부터 제거한 후 Fc 수용체 블록킹 시약 (Miltenyi)을 첨가하여 비특이적 항체 결합을 블록킹하였다. 그 후, MMG49 항체 또는 FIB27 항체, 또는 아이소 타입 대조구로서 제공되는 마우스 IgG2a를 첨가하고, 세포를 4℃에서 30 분 동안 인큐베이션한 후, 세척하였다. PE-컨쥬게이트된 항-마우스 IgG 항체를 2차 항체로서 첨가하고, 세포를 4℃에서 30 분 동안 추가로 인큐베이션 하였다.
- [0444] 결과로서 수득한 세포를 세척한 후, 최종적으로 APC/Cy7-컨쥬게이트된 항-인간 CD19 항체, FITC-컨쥬게이트된 항-인간 CD14 항체, 또는 PE/Cy7-컨쥬게이트된 항-인간 CD3 항체를 이용하여 염색하였다. 염색 후 FACS를 이용하여 세포를 분석하여, 이에 의해 각 분획에서 MMG49 항체 및 FIB27 항체의 결합을 측정하였다 (도 6).
- [0445] 추가적으로, 1  $\mu\text{l}$ 의 건강한 사람의 말초 혈액으로 보충된 100  $\mu\text{l}$ 의 PBS (EDTA 함유)를, MMG49 항체 또는 FIB27 항체를 이용하여 유사하게 염색하고, 마지막으로 퍼시픽 블루-컨쥬게이트된(Pacific blue-conjugated) 항-인간 CD235 항체 (BD Pharmingen) 또는 FITC-컨쥬게이트된 항-인간 CD41항체 (BD Pharmingen)를 이용하여 염색하였으며, 이에 따라 각 항체의 CD235<sup>+</sup> 적혈구 세포 및 혈소판에 대한 결합의 유무를 FACS 분석으로 유사하게 조사하였다 (도 6). 상기 내용의 결과는, FIB27 항체가 많은 림프구 세포에 강하게 결합하는 반면, MMG49 항체의 상기 언급된 정상 혈액 세포에 대한 결합은 극히 약함을 보여준다.
- [0446] 나아가, 골수종 세포를 제외하고, 각각의 정상 세포 분획에 대한 MMG49 항체의 결합이 골수에서 없는지의 여부를 명확히 하기 위하여, 골수종 환자의 골수 세포를 MMG49 항체를 이용하여 또한 유사하게 염색하였고, 마지막으로 APC-컨쥬게이트된 항-인간 CD34 항체 (BD Pharmingen 제조), Alexa647-컨쥬게이트된 인간 CD3 (BD Pharmingen 제조), Cy7APC-컨쥬게이트된 항-CD19 인간 항체 (BD Pharmingen 제조), PE-Cy7-컨쥬게이트된 항-CD38 인간 항체 (BD Pharmingen 제조), 또는 FITC-컨쥬게이트된 항-CD14 인간 항체 (BD Pharmingen 제조)를 이용하여 염색하였다. 염색 후 그러한 골수종 환자-유래된 골수 세포를 FACS를 이용하여 분석하고, 따라서 각 분획에서 MMG49 항체의 결합을 측정하였다 (도 7). 상기 내용의 결과는, MMG49 항체가 골수종 세포에는 강하게 결합하지만, 조혈성 줄기 세포 및 전구 세포 분획을 포함하는 모든 정상의 혈액 세포에 대해서는 거의 결합하지 않음을 보여준다.
- [0447] [실시예 6]
- [0448] 각종 세포주에 대한 MMG49의 결합 분석
- [0449] 각종 세포주 (MM1s 세포, U266 세포, RPMI8226 세포, 및 JJN3 세포) 내에서 MMG49 항체 및 FIB27 항체의 결합을 FACS를 이용하여 분석하였다. 염색 방법은 실시예 5에 기재된 말초 혈액 등의 경우에서와 같다.
- [0450] 인테그린  $\beta_7$ 은 인테그린  $\alpha_4$  또는 인테그린  $\alpha_E$ 를 이용하여 헤테로다имер을 형성하고, 세포 표면 상에서 발현되는 것으로 알려져 있다. 따라서, 그의 발현은 Alexa647-컨쥬게이트된 항-인간 CD49d 항체 (Biolegend) 및 APC-컨쥬게이트된 항-인간 CD103 항체 (Biolegend)와 함께, FACS를 사용하여 동시에 분석될 수도 있다. CD103은 인테그린  $\alpha_E$ 를 나타내고, CD49d는 인테그린  $\alpha_4$ 를 나타낸다. 실시예 5에서와 동일한 방식으로, 건강한 사람으로부터 유래된 말초 혈액 내 인테그린  $\alpha_E$  및 인테그린  $\alpha_4$ 의 발현 수준을 또한 조사하였다 (도 8).
- [0451] 그 결과, ITGA4는 대부분의 골수종 세포 주에서 발현되었으며, ITGAE는 세포주 중 어떤 것에서도 발현되지 않았다. FIB27 항체는 모든 골수종 세포주에 결합되었지만, MMG49 항체의 결합은 FIB27 항체의 발현 수준과 일치하지 않았다. 나아가, Crisp-cas9 시스템을 이용하여 생성된 ITGA4-결핍 U266 세포에 대한 MMG49 항체 또는 FIB27 항체의 결합을 FACS로 조사하였고, 그 결과 U266 세포에 대한 항체들 둘 모두의 결합이 ITGA4 결핍으로 인해 사라졌음이 발견되었다. 즉, MMG49 항체 및 FIB27 항체 모두가  $\alpha_4\beta_7$  인테그린으로서 발현된  $\beta_7$  인테그린을 인식하였음이 발견되었다.
- [0452] [실시예 7]

- [0453] 인테그린의 활성화와 MMG49 항체의 결합 간의 상관 관계 분석
- [0454] 상기 기재된 MMG49 항체의 독특한 결합 방식을 고려 시, MMG49 항체가 활성화를 통해 구조가 변화된 인테그린  $\beta_7$ 을 인식한 것으로 추정되었다.
- [0455] 상기 관점에서,  $\alpha_4\beta_7$  및 CD4 T-세포 풍부화 키트 (BD pharmingen)를 이용하여 농축된 인간 정상 말초 혈액 CD4T-세포를 강제 발현하도록 유발된 K562 세포를 5 mM EDTA/HBS로 세척하고, 이후 실온에서 30 분 동안, MMG49 항체 또는 FIB27 항체와 함께, 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ /1 mM  $\text{Mg}^{2+}$ /HBS (저활성용 버퍼) 또는 2 mM  $\text{Mn}^{2+}$ /HBS (활성화 버퍼) 내에서 인큐베이션한 후, 세척하였다. PE-컨쥬게이트된 항-마우스 IgG 항체를 2차 항체로서 첨가하였고, 세포를 실온에서 30 분 동안 추가로 인큐베이션하였다. 결과로서 생성된 세포를 FACS를 이용하여 분석하여, 이에 의해 인테그린  $\alpha_4\beta_7$ 이 활성화된 세포 내에서 MMG49 항체 및 FIB27 항체의 결합을 측정하였다.
- [0456] 결과로서,  $\text{Mn}^{2+}$  존재 하에서 MMG49 항체의 결합에서의 향상이 관찰되었다 (도 10). 한편, FIB27 항체의 경우에는 유사한 변화가 관찰되지 않았다. 이는 MMG49 항체가 인테그린  $\beta_7$ 의 활성화된 입체구조에 대해 특이적인 항체라는 가능성을 제안한다.
- [0457] [실시에 8]
- [0458] MMG49 항체에 의한 인식에 필수적인 에피토프의 동정
- [0459] MMG49 항체에 의해 인식된 에피토프를 동정하기 위하여, 도 11에 예시된 바와 같은 8 개 종류의 인간/마우스 키메라성 인테그린  $\beta_7$  단백질을 발현하기 위한 벡터를 중첩(overlapping) PCR 방법을 이용하여 생성하였다.
- [0460] 각각의 발현 벡터가 리포펙션 방법에 의해 293T-세포 내로 도입시킨지 48시간 후에, MMG49 항체의 결합의 존재 또는 부재를 분석하였다. 세포를 1% 태아 소 혈청으로 보충된 PBS에 현탁시키고, MMG49 항체를 첨가하였고, 그 후 전체를 실온에서 30 분 동안 방치하였다. 세척 후, Alexa488-항-마우스 IgG 항체를 첨가하고, 그 전체를 실온에서 30 분 동안 방치하고, 이어서 FACS 분석하였다.
- [0461] 그 결과로서, 전체 인간 기원의 키메라성 인테그린  $\beta_7$  단백질 (#4927)의 경우에서와 거의 동일한 방식으로, 110 번째 내지 721 번째 아미노산 잔기 위치의 영역은 마우스 기원이고, 나머지 (20 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역 및 722 번째 내지 798 번째 아미노산 잔기 위치의 영역)는 인간 기원의 서열을 가진 키메라성 인테그린  $\beta_7$  단백질 (#4960)에 MMG49 항체가 강하게 결합되었음이 드러났다 (도 11 내지 도 13).
- [0462] 722 번째 내지 798 번째의 아미노산 잔기의 위치의 영역이 막관통 도메인 (TM) 및 세포 내 도메인 (세포질성)을 포함하고, 1 번째 내지 19 번째 아미노산 잔기 위치의 영역이 단일 펩타이드라는 사실을 고려하여, 이는 MMG49 항체의 결합에 본질적인 에피토프가 PSI 도메인을 포함하는 20 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역에 존재하였음을 보여주었다.
- [0463] 추가적으로, MMG49 항체는 키메라성 인테그린  $\beta_7$  단백질 (#4960)에 비교 시, 110 번째 내지 378 번째의 아미노산 잔기 위치의 영역은 마우스 기원이고, 20 번째 내지 109 번째의 아미노산 잔기 위치의 영역 및 379 번째 내지 798 번째의 아미노산 잔기 위치의 영역은 인간 기원인, 키메라성 인테그린  $\beta_7$  단백질 (#4961)에 대해 약간 증가된 결합능(avidity)을 가졌으며, 증가된 결합능은 전체가 인간 기원인 키메라성 인테그린  $\beta_7$  단백질 (#4927)의 경우에서와 정확히 동일한 결합 수준이었음이 드러났다.
- [0464] 나아가, MMG49 항체는, MMG49 항체의 에피토프를 포함하는 것으로 나타난, 20 번째 내지 109 번째의 아미노산 잔기 위치의 상기 언급된 영역에서, 1 번째 내지 378 번째의 아미노산 잔기 위치의 영역(1 번째 내지 19 번째의 아미노산 잔기 위치는 신호 펩타이드에 상응하는 영역을 포함함)은 마우스 기원이고, 379 번째 내지 798 번째의 아미노산 잔기 위치의 영역은 인간 기원인 키메라성 인테그린  $\beta_7$  단백질 (#4944), 및 1 번째 내지 416 번째의 아미노산 잔기 위치의 영역은 인간 기원이고, 417 번째 내지 798 번째의 아미노산 잔기 위치의 영역은 인간 기원인 키메라성 인테그린  $\beta_7$  단백질 (#4945)에 대하여, 1 번째 내지 563 번째 아미노산 잔기 위치의 영역은 마우스 기원이고, 564 번째 내지 798 번째 아미노산 잔기 위치의 영역은 인간 기원인 키메라성 인테그린  $\beta_7$  단백질 (#4946) 및 1 번째 내지 721 번째 아미노산 잔기 위치의 영역은 마우스 기원이고, 722 번째 내지 798 번째 아미노산 잔기 위치의 영역은 인간 기원인 키메라성 인테그린  $\beta_7$  단백질 (#4947)에 비해, 결합능이 약간 증가

되었음이 또한 드러났다.

[0465] 상기 언급된 실험 결과를 고려하여, 특이적 결합능, 즉 인테그린  $\beta_7$ 의 20 번째 내지 109 번째 아미노산 잔기 위치의 영역에 대한 MMG49 항체의 친화성은 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 379 번째 내지 721 번째의 아미노산 잔기 위치의 영역에 의해, 즉 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 379 번째 내지 721 번째의 아미노산 잔기 위치의 영역의 존재 하에 증가되었음 또한 드러났다.

[0466] [실시예 9]

[0467] MMG49 항체의 항체 분자 가변 영역의 염기 서열의 결정

[0468] MMG49 항체의 하위부류는 Isotyping 키트 (Roche)를 이용하여 확인되었으며, IgG2a 하위부류인 것으로 확인되었다. 나아가, MMG49 항체의 가변 영역의 염기 서열 및 아미노산 서열을 결정하였다.

[0469] Smarter RACE cDNA 증폭 키트 (Clontech)를 이용하여 서열 결정 방법을 수행하였다. 즉, MMG49 항체를 생산하는 하이브리도마 MMG49로부터 유래된 mRNA로부터 생성된 cDNA를 주형으로 사용하여 PCR 반응에 의해 H-사슬 및  $\kappa$ -사슬 가변 영역의 cDNA 단편을 증폭시키고, 그의 염기 서열을 해석하였다. 해석된 H-사슬 가변 영역의 아미노산 서열 및 염기 서열, 및 초가변 영역 (CDR1 내지 CDR3)을 아래 표 3 및 표 4에 나타내었다.

[0470] 해석된 L-사슬 ( $\kappa$ -사슬)의 아미노산 서열 및 염기 서열, 및 초가변 영역 (CDR1 내지 CDR3) 또한 아래 표 3 및 표 4에 나타내었다.

[0471] MMG49 항체의 분리된 가변 영역 서열의 특이성을 확인하기 위하여, 가변 영역 서열 cDNA를 인간 IgG4 불변 도메인 및 인간 IgL  $\kappa$ -사슬 불변 영역 서열에 결합시켜서 키메라화된 항체를 생성하였다. 구체적으로, 각각의 가변 영역 서열은 In-Fusion 클로닝 키트 (Takara)를 사용하여 pFuse-CH-Ig-hG4 또는 pFuse-CL-Ig-hk (invivogen) 내로 삽입하였다. 그 후, 결과의 생성물을 FreeStyle CHO-S 세포 (Invitrogen) 내로 도입시키고, 그의 배양 상등액 내로 분비된 키메라화된 항체를 회수하였다. 그 후, MMG49 항체가 결합된 MM1s 세포 및 MMG49 항체가 결합되지 않은 KMS12BM 세포는 MMG49-hIgG4로 보충된 버퍼 내에 인큐베이션되고, 세척되었다. 그 후, 비오틀화된 항-인간 IgG (Rockland)를 2차 항체로서 첨가하고, 세포를 다시 세척하고, 이후 스트렙타비딘-PE (Biolegend)을 첨가함으로써 염색하고, 이어서 FACS 분석하였다. 그 결과, MMG49-hIgG4는 본래의 MMG49 항체의 염색 패턴과 유사한 염색 패턴을 나타내었으며, 이는 수득된 가변 영역 서열이 정확하였음을 제안하였다 (도 14).

**표 3**

[0472]

<MMG49의 아미노산 서열>		
중쇄	CDR1 (서열번호 1)	GYTFSSYW
	CDR2 (서열번호 2)	MLPGSGSS
	CDR3 (서열번호 3)	ARGDGNWYFDV
	가변 영역 (서열번호 4)	MEWTWVFLFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELMKPGASVKISCKASGYTFSSYWIEWVKQRPGHGLEWIGEMLPKSGSSNYNEKFKGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGDGNWYFDVWGAG
경쇄	CDR1 (서열번호 6)	SSVGY
	CDR2 (서열번호 7)	ATS
	CDR3 (서열번호 8)	QQWSSDPPT
	가변 영역 (서열번호 9)	MDFQVQIFSFLLISASVIMSRGQIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVGYMHWFQKPGSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSESGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSSDPPTFGGGTKLEIK



표 4

[0473]

<MMG49의 염기 서열>		
중쇄	CDR1 (서열번호 11)	GGCTACACATTCACTAGCTACTGG
	CDR2 (서열번호 12)	ATGTTACCTGGAAGTGGTAGTTCT
	CDR3 (서열번호 13)	GCAAGGGGGGATGGTAAGTACTGGTACTTCGATGTC
	가변 영역 (서열번호 14)	ATGGAATGGACCTGGGTCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGTAAGTGCAGGTGTCC ACTCCCAGGTTCACTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGC CTCAGTGAAGATATCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTCACTAGCTACTGG ATAGAGTGGGTAAAGCAGAGGCTGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGA TGTTACCTGGAAGTGGTAGTTCTAACTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGC CACATTCACTGCAGATACATCTCCAACACAGCCTACATGCAACTCAGCAGC CTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAAGGGGGGATGGTAAGT ACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGG
경쇄	CDR1 (서열번호 16)	TCAAGTGTAGGTTAC
	CDR2 (서열번호 17)	GCCACATCC
	CDR3 (서열번호 18)	CAGCAGTGGAGTAGTGACCCACCGACG
	가변 영역 (서열번호 19)	ATGGATTTTCAAGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCTTCAGTCA TAATGTCCAGAGGACAAATGTGTCTCTCCAGTCTCCAGCAATCCTGTCTGC ATCTCCAGGGGAGAAGGTCACAATGACTGCAGGGCCAGCTCAAGTGTAGGT TACATGCACTGGTTCCAGCAGAAGCCAGGATCTCCCCAAACCTGGATTT ATGCCACATCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCCTCAGTGGCAGTGA GTCTGGGACCTCTTACTCTCTACAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAGATGCT GCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTGACCCACCGACGTTCCGTTGGAG GCACCAAGCTGGAAATCAAA

[0474] [실시예 10]

[0475] MMG49 항체의 항체 분자 가변 영역을 이용하여 키메라성 항원 수용체 T-세포의 생성

[0476] 키메라성 항원 수용체 T-세포 (이하, MMG49 항체-유래 키메라성 항원 수용체 T-세포로서 지칭됨)는 MMG49 항체 분자 가변 영역 서열을 이용하여, 비특허문헌 2 내지 4 등을 참조하여 하기 절차에 의해 생성되었다.

[0477] (1) CD28 및 CD3z의 클로닝:

[0478] RNA를 Trizol (Invitrogen)을 이용하여 Jurkat 세포로부터 채집하고, cDNA를 Superscript III cDNA 합성 키트 (Invitrogen)를 이용하여 생성하였다. 그 후, cDNA를 주형으로서 이용하여, PCR에 의해 CD28 및 CD3z의 cDNA를 증폭시켰고, 이들 각각은 TA 클로닝 키트 (Invitrogen)를 이용하여 클로닝되었으며, 그의 염기 서열은 서열분석에 의해 확인하였다.

[0479] (2) 4 개 단편, 즉, MMG49 항체-유래 VL/VH, 및 CD28/CD3z의 결합:

[0480] 중첩 PCR 방법을 이용하여, MMG49 항체-유래 VL 영역 및 VH 영역, 및 상기 클로닝된 CD28 및 CD3z의 개별적인 유전자 단편은 서로 결합되어 키메라성 cDNA를 생성하였다. 그를 위한 절차 및 사용된 프라이머는 도 15에 예시되어 있다. 사용된 프라이머의 염기 서열을 아래 표 5에 나타내었다.

표 5

[0481]

번호	프라이머명	염기 서열
23	49_car_vk-s5	gaattccaccatggattttcaagtgcagatt
24	49_car_vk-as6	gccggaaccgctagtgagccccgtttgatttccagcttggt
25	593_car_vk_as4	gctgccttctcgcgtgccaggtttgccggaaccgctagtgagacc
26	49_car_vh-s5	aaacctggcagcggagaagcagccaggttcagctgcagcagtc
27	49_car_vh-as6	tgaggagacggtgacctgg
28	49_VKVH28as8	atacataacttcaattgcggcgcgtgaggagacggtgacctgg
29	49carinfus1	ctaggcgccggaattccaccatggattttc
30	tcrcarinfuas4	aatgtcgacctcgagtggtgttagcgag

[0482] 결합된 키메라성 cDNA를, Zeroblunt PCR 클로닝 키트 (Invitrogen)를 이용하여 클로닝하고, 이후 서열분석하여 그의 염기 서열을 확인하였다. 추가적으로, 확인된 염기 서열을 기초로 확인된 아미노산 서열 (서열번호 21) 및

염기 서열 (서열번호 22)을 서열목록에 나타내었다. 서열번호 21에 나타난 아미노산 서열은, 배제되는 서열번호 23에서 상기 나타난 코작(Kozak) 서열 (gaattccacc)을 바로 뒤따르는, 시작 코돈 (atg)으로부터 아미노산 서열로의 전환에 의해 수득된 것이다.

[0483] (3) 발현 벡터 내로의 삽입:

[0484] 순차적으로, (2)에 결합된 키메라성 cDNA를 두 개의 제한 효소 EcoRI/SalI로 절개하고, MSCV-ires-GFP 벡터 내로 삽입하였다.

[0485] 상기에 의해 생성된 MMG49 항체-유래 키메라성 항원 수용체 cDNA 레트로바이러스 벡터를, 리포펙타민 2000 (invitrogen)을 이용하여 gag/pol 및 VSV-G 외피(envelope) 발현 벡터와 함께 293T 세포 내로 삽입하여 이에 의해 레트로바이러스를 생성한다. 유전자 도입으로부터 48 시간 후, 상등액을 회수하고 바이러스 용액으로서 사용하였다.

[0486] (4) T-세포 내로의 도입:

[0487] 순차적으로, MMG49 항체-유래 키메라성 항원 수용체의 cDNA를 아래 기재된 바와 같은 인간 T-세포 내로 도입하였다.

[0488] 먼저, 인간 말초 혈액 단핵 세포를 항-CD3 항체 (eBioscience)로 코팅된 48-웰 플레이트에 첨가하고, 72 시간 동안 배양하였다. 10% 인간 AB 혈청 및 IL-2 (175 IU/L)로 보충된 X-VIVO15 (Lonza)를 배양 배지로서 사용하였으며, 말초 혈액 단핵성 세포를 자극하였다. 그 후, 상기 생성된 바이러스 용액을 Retronectin (Takara)으로 코팅된 48-웰 플레이트에 첨가하고, 바이러스를 1,700×g에서 120 분 동안 원심분리하여 Retronectin에 흡착시켰다. 그 후, 자극 후 말초 혈액 단핵 세포 (T-세포 포함)를 첨가하고, 유전자를 그 안에 도입시켰다. 그 후, 상기 언급된 배지 내에서 배양을 계속하여 MMG49 항체-유래 키메라성 항원 수용체 T-세포를 증폭시켰으며, 이를 다음 조사에서 사용하였다. MMG49 항체의 가변 영역을 이용하여 CAR 구축물을 발현시킨 T-세포를 PE-항-인간 F(ab')<sub>2</sub> 항체 (Jackson Laboratory)를 이용하여 염색하였고, 그 결과, GFP의 발현에 비례하여 인간 F(ab')<sub>2</sub>의 발현이 탐지되었으며, 이는 구축물의 도입을 나타낸다 (도 16). 즉, 도입된 CAR이 세포 표면 상에서 발현되었음을 확인하였다.

[0489] [실시예 11]

[0490] MMG49 항체-유래 키메라성 항원 수용체 T-세포 및 그의 세포독성 활성화에 의한 ITGB7-발현 종양 세포의 인식의 분석

[0491] 상기 언급된 방법에 의해 생성된 MMG49 항체-유래 키메라성 항원 수용체 T-세포 또는 그 안에 단지 GFP만이 도입된 대조구 T-세포를, 인테그린  $\beta_7$ 을 발현하지 않는 K562 세포 또는 인테그린  $\alpha_4\beta_7$ 을 강제 발현하도록 유발된 K562 세포와 공동배양하였으며, 생산된 시토카인의 양을 정량적으로 측정하였다. 구체적으로,  $1 \times 10^5$  개의 각각 T-세포 및 표적 세포를 96-웰 플레이트에 첨가하였다. 24 시간 후, 상등액을 회수하고, IFN- $\gamma$ 의 생산량을 ELISA에 의해 측정하였다. 측정은 Quantikine 키트 (R&D)를 이용하여 수행하였다. 결과로서, MMG49 항체-유래 키메라성 항원 수용체 T-세포와, 인테그린  $\alpha_4\beta_7$ 을 강제 발현하도록 유발된 K562 세포의 공동 배양에서만, 대조구 (그 안에 도입된 GFP 발현 벡터를 갖는 자극된 말초 혈액 단핵성 세포를 유사하게 배양함으로써 수득된 T-세포)에서보다 더 많은 IFN- $\gamma$  및 IL2의 생산이 관찰되었다 (도 17).

[0492] 그 후, MMG49 항체-유래 키메라성 항원 수용체 T-세포 또는 그 안에 단지 GFP만이 도입된 대조구 T-세포를 MMG49 항체가 결합되는 골수종 세포주 (MM.1s 세포, RPMI8226 세포, 및 JJN3 세포) 또는 MMG49 항체가 결합하지 않는 세포들 (KMS12BM, Molt4, 및 라지(Raji) 세포)과 함께 공동배양하였고, 생산된 시토카인의 양을 유사하게 정량적으로 측정하였다. 결과로서, MMG49 항체가 결합된 세포들인, MM.1s, RPMI8226 세포, 및 JJN3 세포만이 MMG49 항체-유래 키메라성 항원 수용체 T-세포와 공동배양된 경우에만, 대조구 (GFP 발현 벡터가 그 안에 도입된 자극된 말초 혈액 단핵 세포를 유사하게 배양함으로써 수득된 T-세포)에서보다 더욱 많은 IFN- $\gamma$  및 IL2의 생산이 관찰되었다 (도 18 및 도 19). 결과는, MMG49 항체-유래 키메라성 항원 수용체 T-세포가 (때때로 MMG49 항원으로서 지칭됨) MMG49 항체에 의해 인식된 항원을 인식함으로써 활성화됨을 나타낸다.

[0493] 추가로, MMG49 항체-유래 키메라성 항원 수용체 T-세포가 골수종 세포주를 손상시켰는지의 여부를 <sup>51</sup>Cr 세포독성 분석에 의해 조사하였다. 먼저, 인테그린  $\beta_7$ 을 발현하지 않는 K562 세포 또는 표적 세포로서 사용되도록 인테그

린  $\alpha_4\beta_7$ 을 강제 발현하도록 유발된 K562 세포를 10% FCS로 보충된 RPMI1640 배지 내에서 배양시키고, 이를 세포 수가  $0.5 \times 10^4$  내지  $1.0 \times 10^4$  이 되도록 제조하였다.

[0494] 거기에 적절한 양의  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ 를 첨가하고, 37℃에서 2 시간 동안 반응하도록 두어 세포를  $^{51}\text{Cr}$ 으로 표지하였으며, 결과의 세포를 세척하고 표적 세포로서 사용하였다. 표적 세포를 소 태아 혈청으로 보충된 RPMI1640 배지 내에 현탁시킨 MMG49 항체-유래 키메라성 항원 수용체 T-세포와 혼합하고, 세포들을 4 시간 동안 공동배양하였다.

[0495] 그 후, 상등액 내로 방출된  $^{51}\text{Cr}$ 을  $\gamma$ -카운터를 이용하여 측정하였다. 세포 손상 백분율 (%)을 하기 식 (1)에 기초하여 결정하였다.

[0496] 
$$(A-B)/(C-D) \times 100 \quad (1)$$

[0497] A: 실험에서 사용된 세포들로부터 방출된  $^{51}\text{Cr}$ 의 양

[0498] B: 항체가 없는 상태 하에서 자발적인  $^{51}\text{Cr}$  방출 양

[0499] C: 1% 트리톤 X-100 첨가에 따른, 최대  $^{51}\text{Cr}$  방출 양

[0500] D: 항체가 없는 상태 하에서 자발적인  $^{51}\text{Cr}$  방출 양.

[0501] 결과로서, MMG49 항체가 결합되는 인테그린  $\alpha_4\beta_7$ 을 강제 발현하도록 유발된 K562 세포에서, 대조구로서 제공되는 GFP만을 발현하는 T-세포에서보다 MMG49 항체-유래 키메라성 항원 수용체 T-세포에 의해 유발되는 더욱 높은 세포 손상이 관찰되었다 (도 20).

[0502] 그 후, MMG49 항체-유래 키메라성 항원 수용체 T-세포 또는 그 안에 GFP만이 도입된 대조구 T-세포를 MMG49 항체가 결합된 골수종 세포주 (MM1s 세포, RPMI8226 세포, 및 JJN3 세포) 또는 MMG49 항체가 결합하지 않은 세포들 (KMS12BM, Molt4, 및 Raji 세포)와 공동배양하고, 유사한 조사를 수행하였다. 그 결과, MMG49 항체가 결합되는 인테그린  $\alpha_4\beta_7$ 을 강제 발현하도록 유발된 K562 세포에서만, 대조구로서 제공되는 GFP만을 발현하는 T-세포에서보다 MMG49 항체-유래 키메라성 항원 수용체 T-세포에 의해 유발되는 더욱 높은 세포 손상이 관찰되었다 (도 21).

[0503] 상기 언급된 결과는 MMG49 항체-유래 키메라성 항원 수용체 T-세포가 MMG49 항체에 의해 인식되는 항원을 발현하는 세포를 특이적으로 손상시킬 수 있음을 보여준다.

[0504] [실시예 12]

[0505] 생체 내에서 MMG49 항체-유래 키메라성 항원 수용체 T-세포의 골수종 세포-제거능의 분석

[0506] 다발성 골수종에 대한 치료 효과를 MMG49 항체-유래 키메라성 항원 수용체 T-세포를 사용하여 생체 내에서 조사하였다.

[0507] 골수종 세포주 MM1s 세포 ( $4 \times 10^5$  세포)를 2.4 Gy에서 방사선 노출시킨 NOG 마우스들의 골수 내로 이식하였다. 5일 후, 마우스들을 MMG49 항체-유래 키메라성 항원 수용체 T-세포-투여군 및 대조구 T-세포-투여군으로 그룹화하고, 각각의 그룹은, 마우스 당  $5 \times 10^6$  세포로 정맥 투여되었다. 투여한 지 7일 후, 골수를 분석하였다. 그 결과, 골수종 세포의 현저한 성장이 대조구 T-세포-투여군의 모든 마우스들에서 명확히 관찰된 반면, 종양은 MMG49 항체-유래 키메라성 항원 수용체 T-세포-투여군에서 거의 완전히 사라졌다. 결과는 MMG49 항체-유래 키메라성 항원 수용체 T-세포의 투여가 심지어는 MMG49 항원을 발현하는 종양을 심지어 생체 내에서 제거하는 능력을 갖는다는 것을 보여준다 (도 22).

[0508] 추가로, 다발성 골수종에 대한 치료 효과는, 골수종-전신 접종된 모델을 이용하여 생체 내에서 조사하였다.

[0509] 루시페라제(luciferase) 유전자가 그 안에 도입된 골수종 세포주 MM1s 세포 ( $5 \times 10^6$  세포)를, 2.4 Gy에서 방사선 노출시킨 NOG 마우스 내로 정맥 이식하였다. 이식한지 5 일 후, 종양 세포의 생장 정도를 IVIS 이미징 시스템 (PerkinElmer)을 이용하여 측정하였다. 그 후, 마우스를 MMG49 항체-유래 키메라성 항원 수용체 T-세포-투여



군 및 대조구 T-세포-투여군으로 그룹화하고, 이식 후 5일 및 7일에 각각의 그룹을 마우스 당  $3 \times 10^6$  세포로 정맥 투여하였다. 두 번째 T-세포를 투여한 지 7 일 후, 종양 부피를 IVIS 이미징 시스템을 이용하여 다시 측정하였다. 그 결과, 골수종 세포의 현저한 성장이 대조구 T-세포 투여군의 모든 마우스들에서 명확하게 나타난 반면, MMG49 항체-유래 키메라성 항원 수용체 T-세포-투여군에서 종양은 거의 완전히 사라졌다 (도 23). 결과는 MMG49 항체-유래 키메라성 항원 수용체 T-세포의 투여가 MMG49 항원을 발현하는 종양을 심지어 생체 내에서 제거하는 능력을 갖는다는 것을 보여준다 (도 22).

[0510] [실시예 13]

[0511] MMG49 항체의 에피토프의 경우, 실시예 8에서의 조사 결과를 더욱 상세하게 조사하는 실험을 수행하였다. 도 25에 예시된 바와 같은 3 개 종류의 인간/마우스 키메라성 인테그린  $\beta_7$  단백질을 발현하기 위한 벡터를 생성하고, 각각의 발현 벡터는 리포펙션 방법에 의해 293T 세포로 도입되었다. 48 시간 후, MMG49 항체 결합의 존재 또는 부재를 FACS에 의해 분석하였다.

[0512] 그 결과, MMG49 항체가, 완전히 인간 기원인 인테그린  $\beta_7$  단백질 (도 11에서 #4927)의 경우에서와 거의 동일한 방식으로, 인테그린  $\beta_7$  단백질의 1 번째 내지 32 번째 및 91 번째 내지 798 번째의 아미노산 잔기 위치의 영역이 마우스 기원이고, 나머지 (33 번째 내지 90 번째의 아미노산 잔기 위치의 영역)는 인간 기원 서열을 갖는 키메라성 인테그린  $\beta_7$  단백질 (도 25에서 ch5.1)에 강하게 결합한다는 것이 시사된다 (도 25).

[0513] 따라서, MMG49 항체의 에피토프는, 인간 인테그린  $\beta_7$  단백질의 33 번째 내지 90 번째의 아미노산 잔기의 위치 내에 포함된다는 것이 강하게 제안되었다.

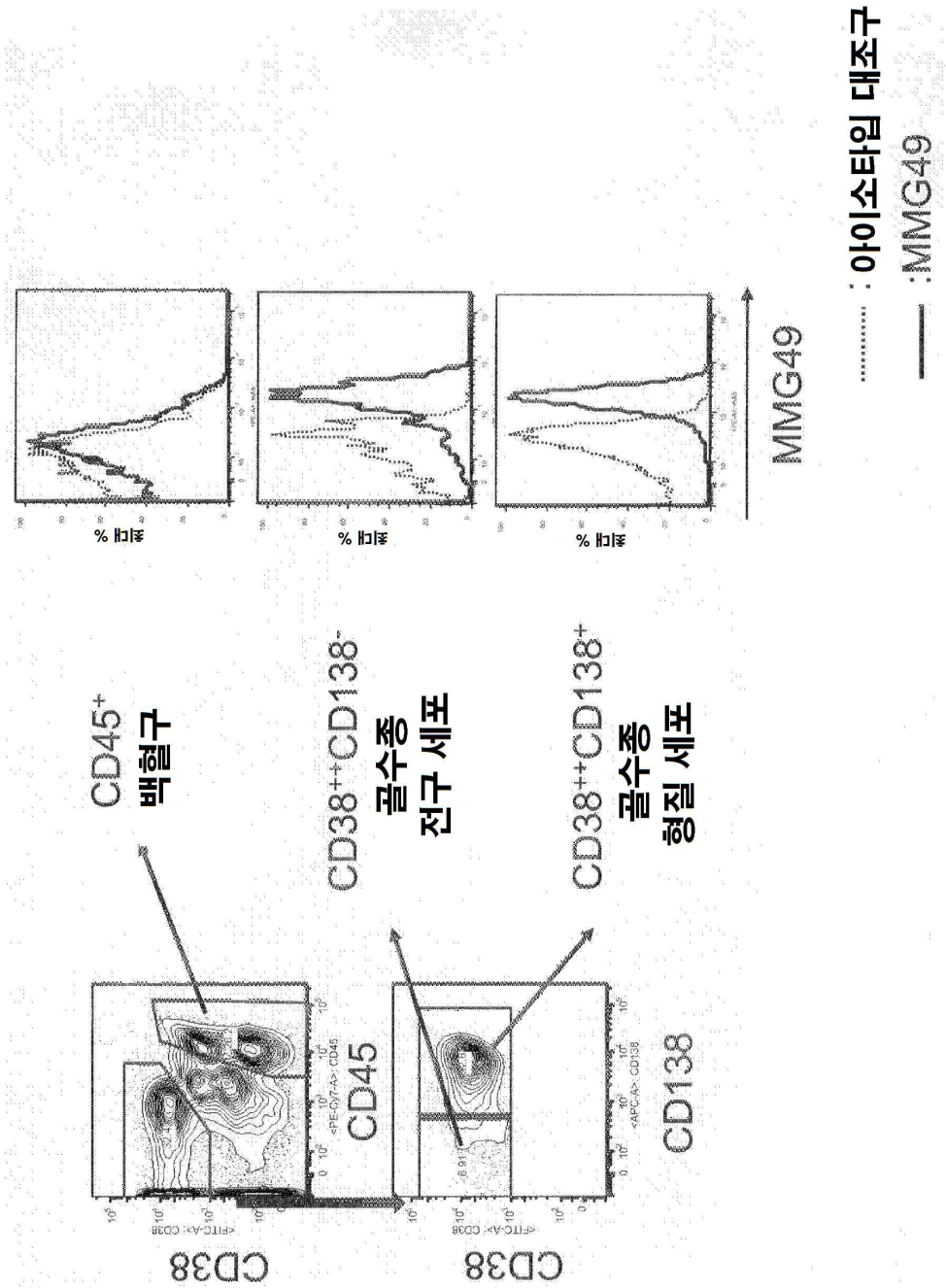
[0514] [실시예 14]

[0515] 인간 인테그린  $\beta_7$  중 단지 하나 또는 두 개의 아미노산을 마우스 기원의 아미노산 서열 (R35E/N36D, H38D, M41L/L42Q, 및 A48V)로 돌연변이시켜 수득된 인간 인테그린  $\beta_7$ , 마우스 인테그린  $\beta_7$ , 및 각종 변형체를 발현하는 벡터를 리포펙션 방법에 의해 293T 세포 내로 도입시키고, 그 후 실시예 8에서와 동일한 방식으로 실험을 수행하였다. 그 결과 도 26에 나타난 바와 같이, 인간 인테그린  $\beta_7$ 에 비교시, A48V 변형체만이 MMG49 항체에 대해 현저히 감소된 결합능을 가졌고, 마우스 인테그린  $\beta_7$ 의 수치에 가까운 수치를 가졌음이 발견되었다. 이 결과는 인간 인테그린  $\beta_7$ 의 48 번째 위치에서의 아미노산 잔기가 MMG49 항체의 에피토프에 강하게 관련되거나 MMG49 항체의 에피토프 내에 포함됨을 밝혀주었다.

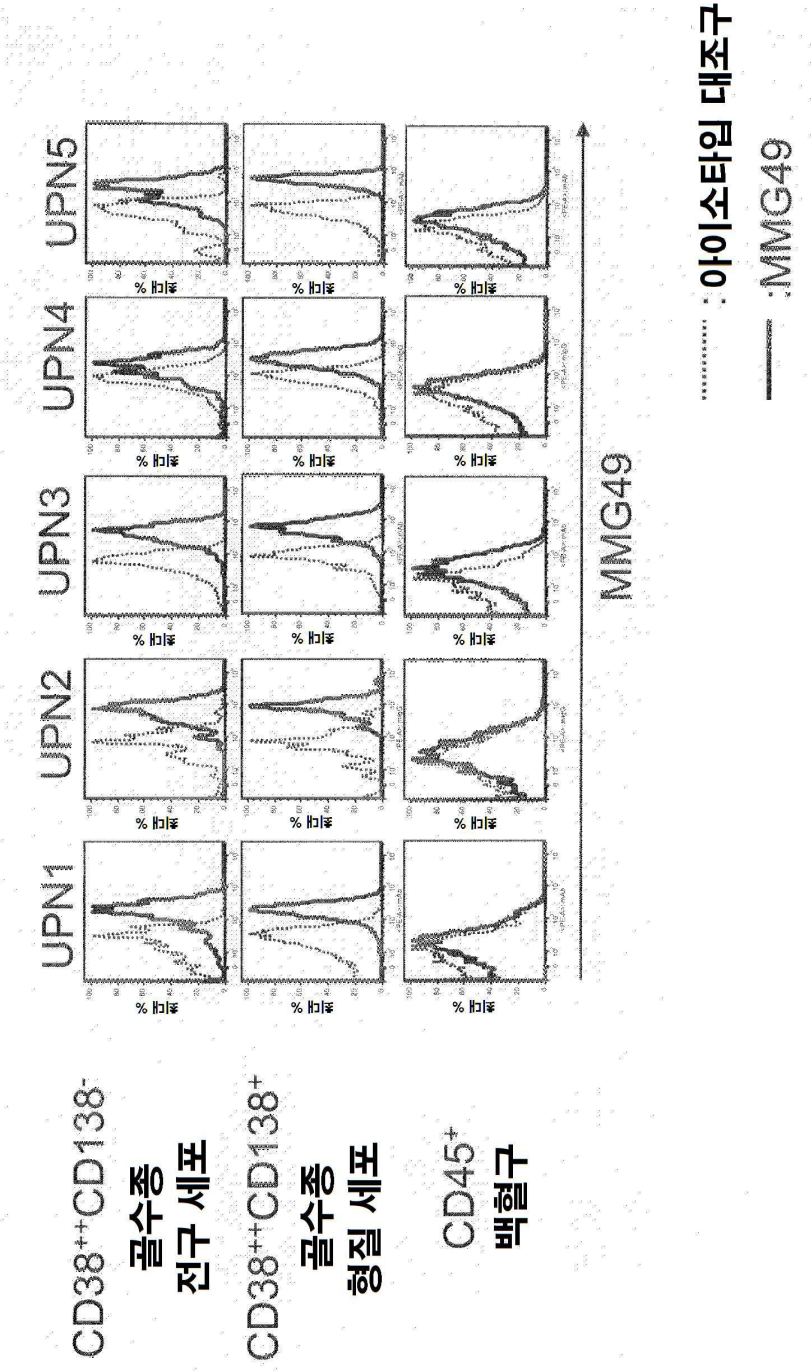
[0516] 본 명세서에서 설명된 염기 서열 및 아미노산 서열을 아래 나타내었다.

도면

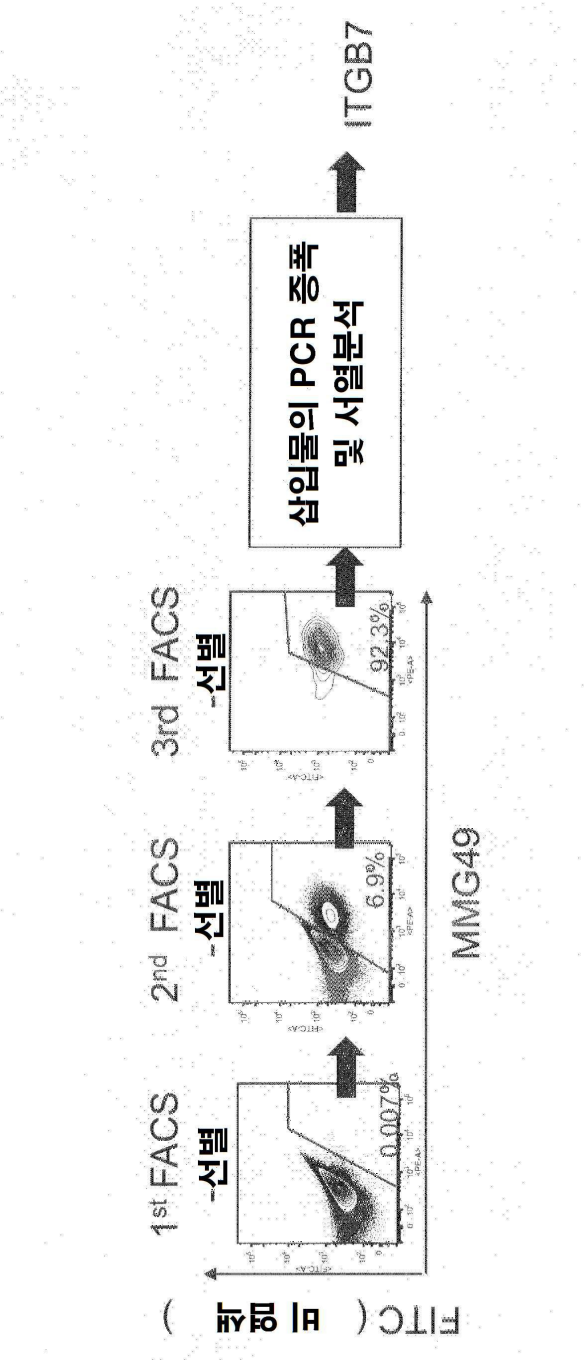
도면1



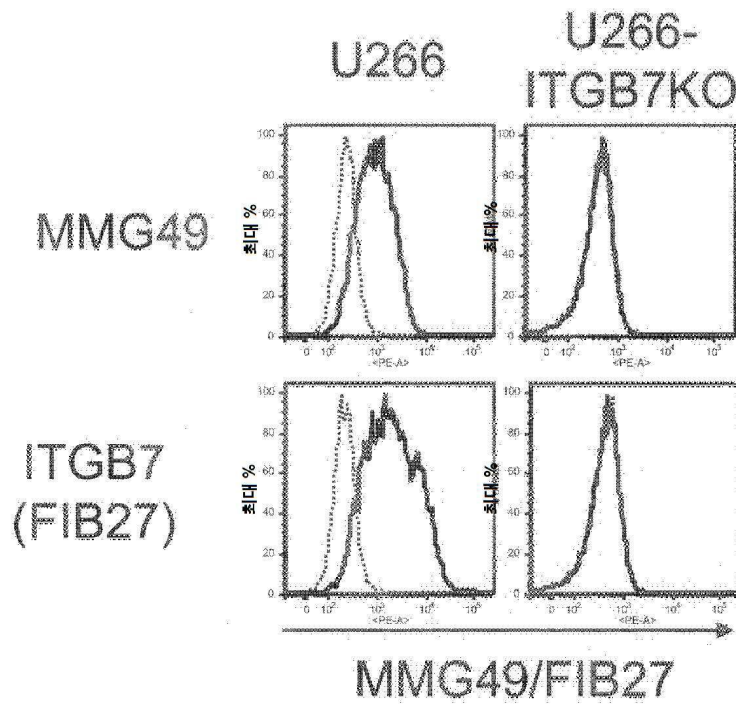
도면2



도면3

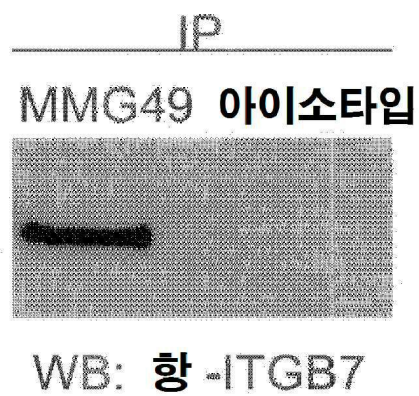


도면4

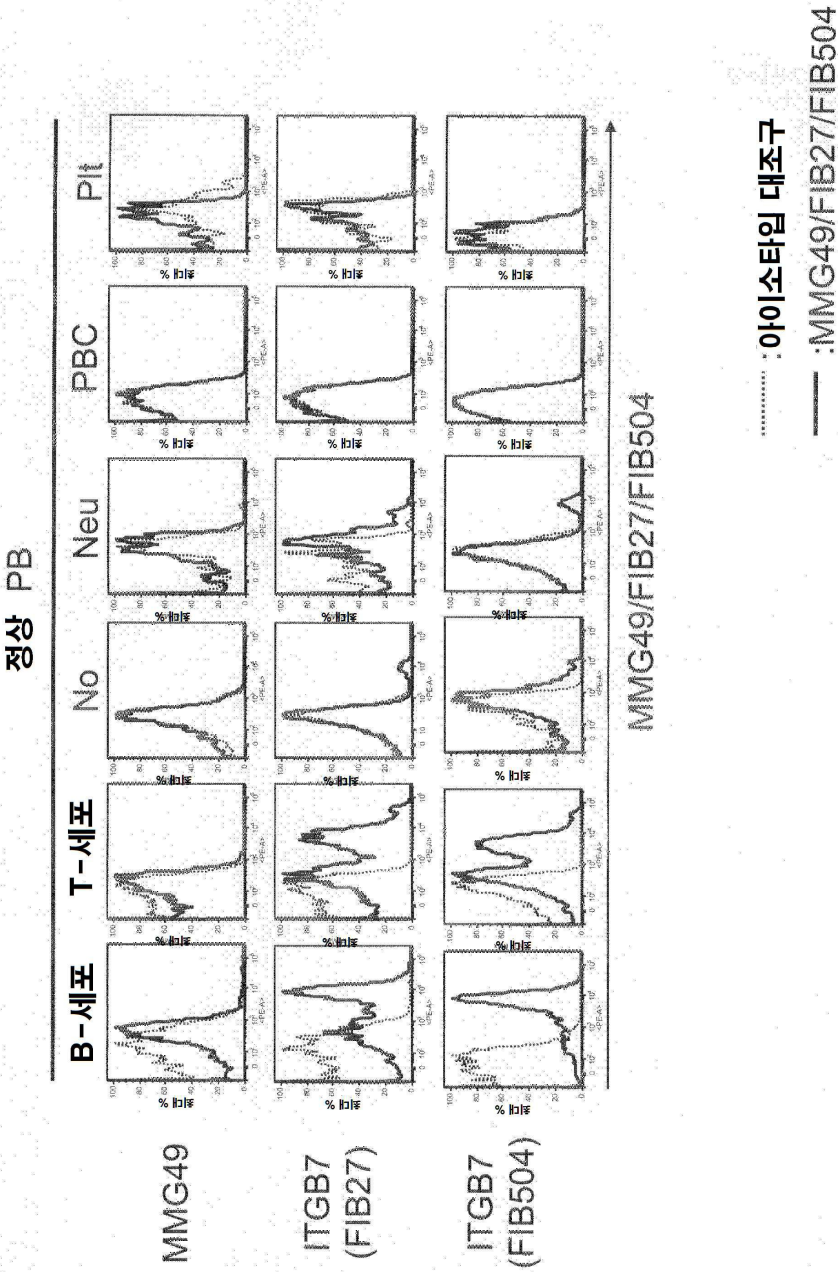


..... : 아이소타입 대조구  
 ——— : MMG49

도면5

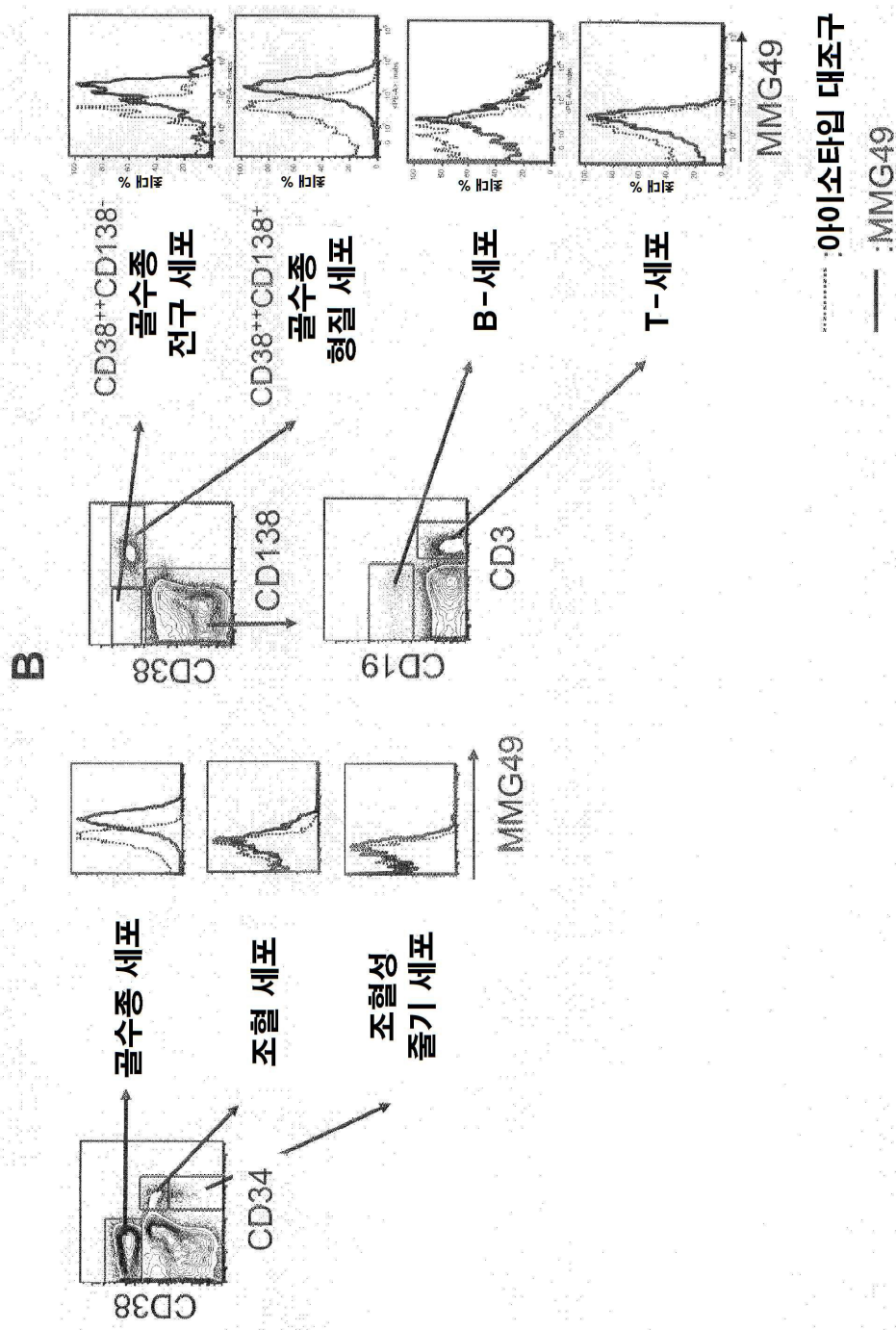


도면6

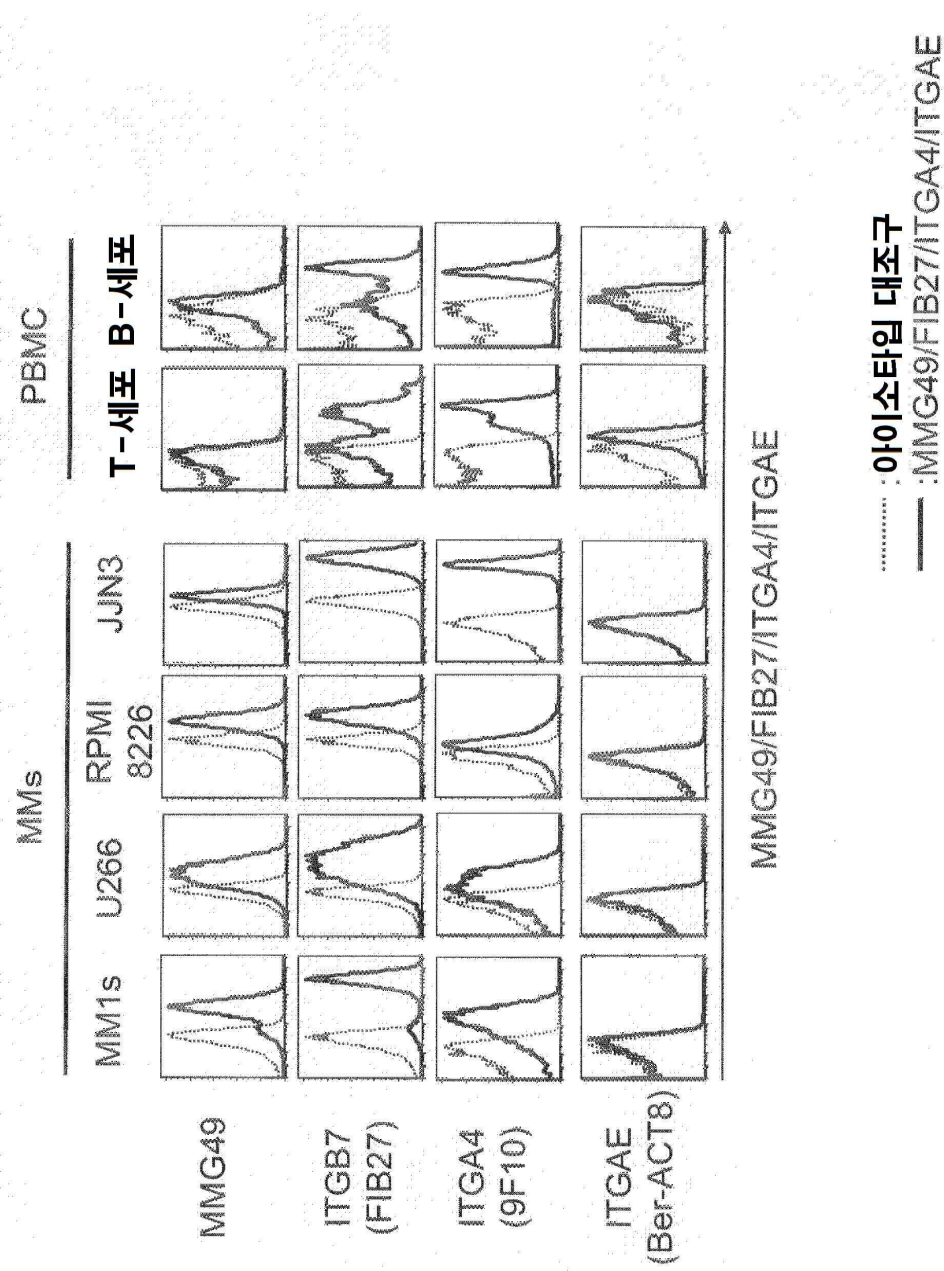




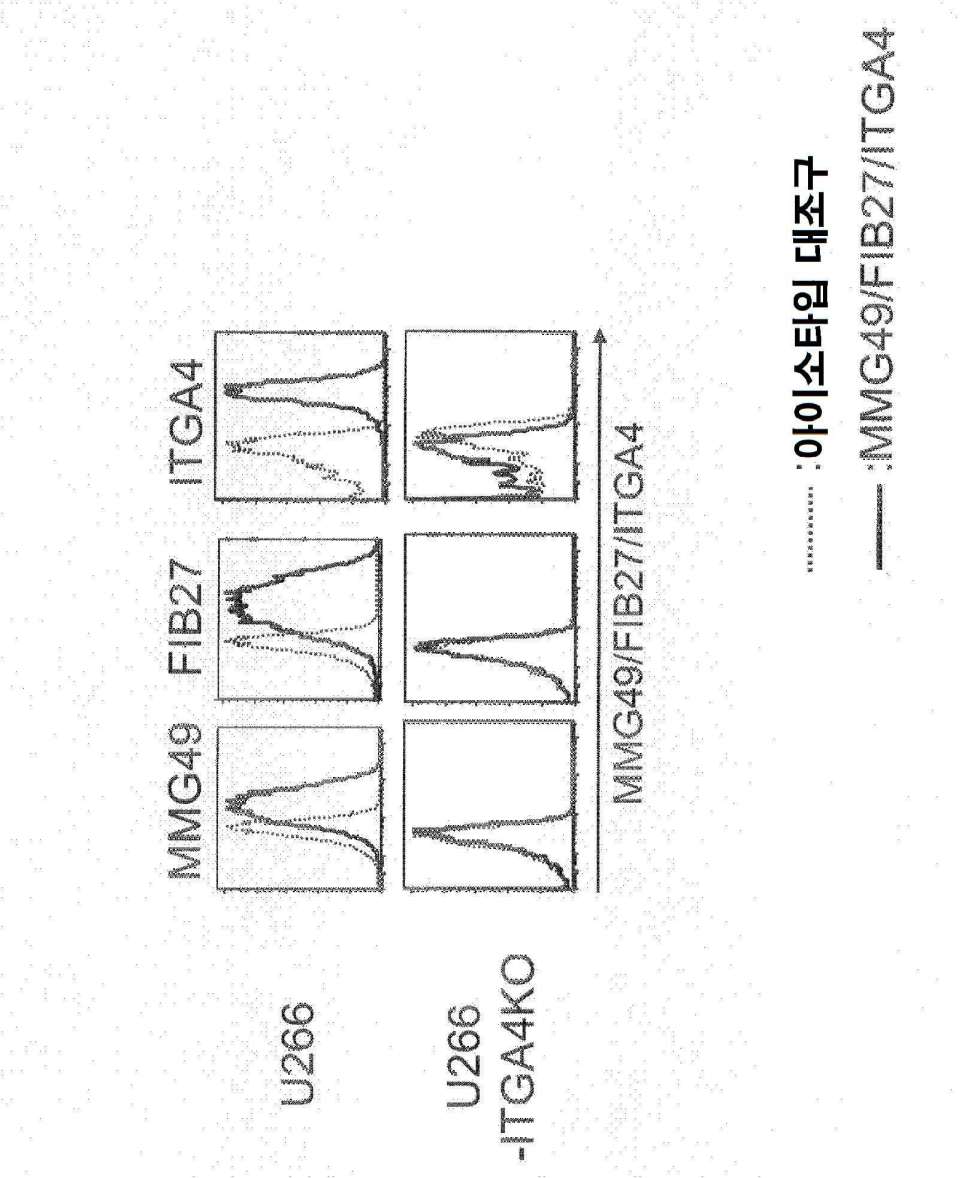
도면7



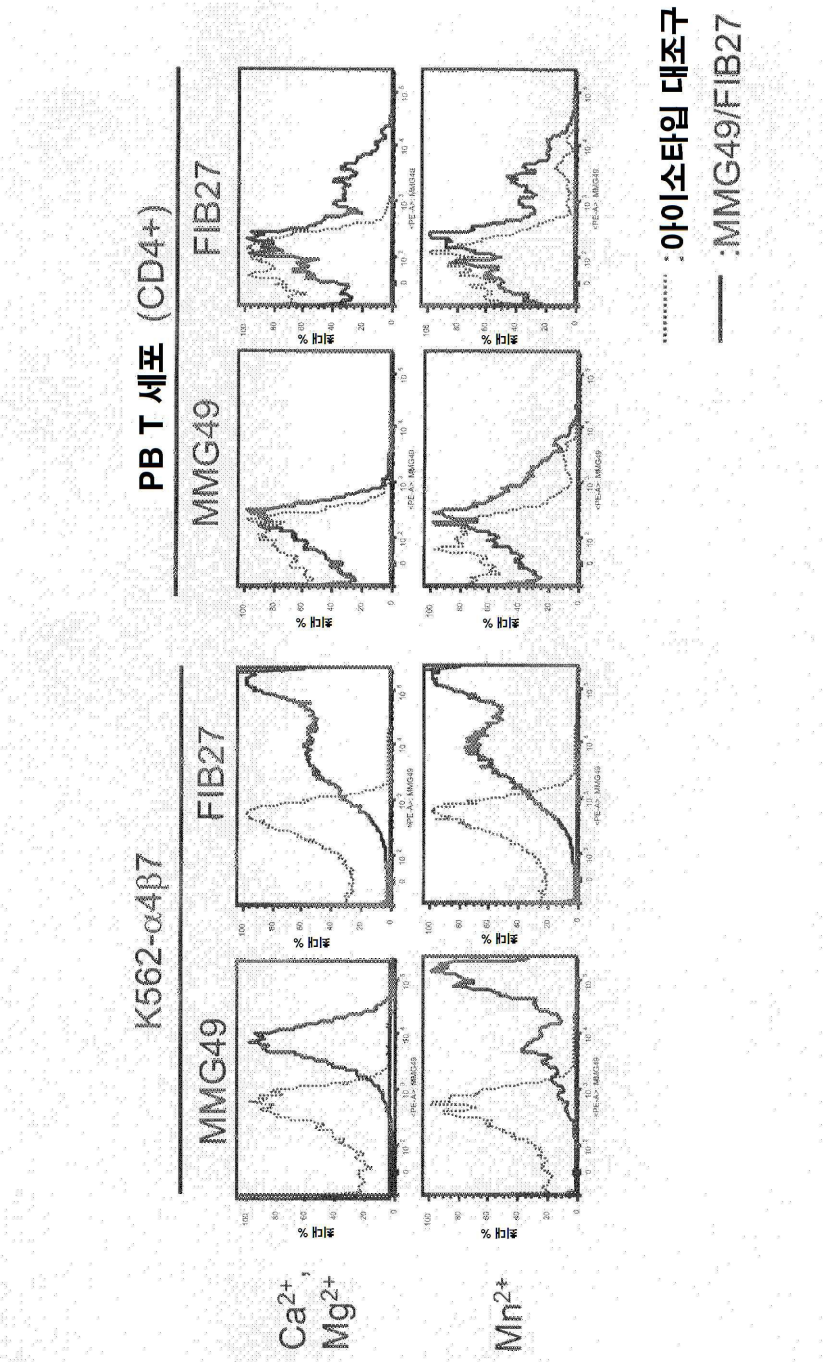
도면8



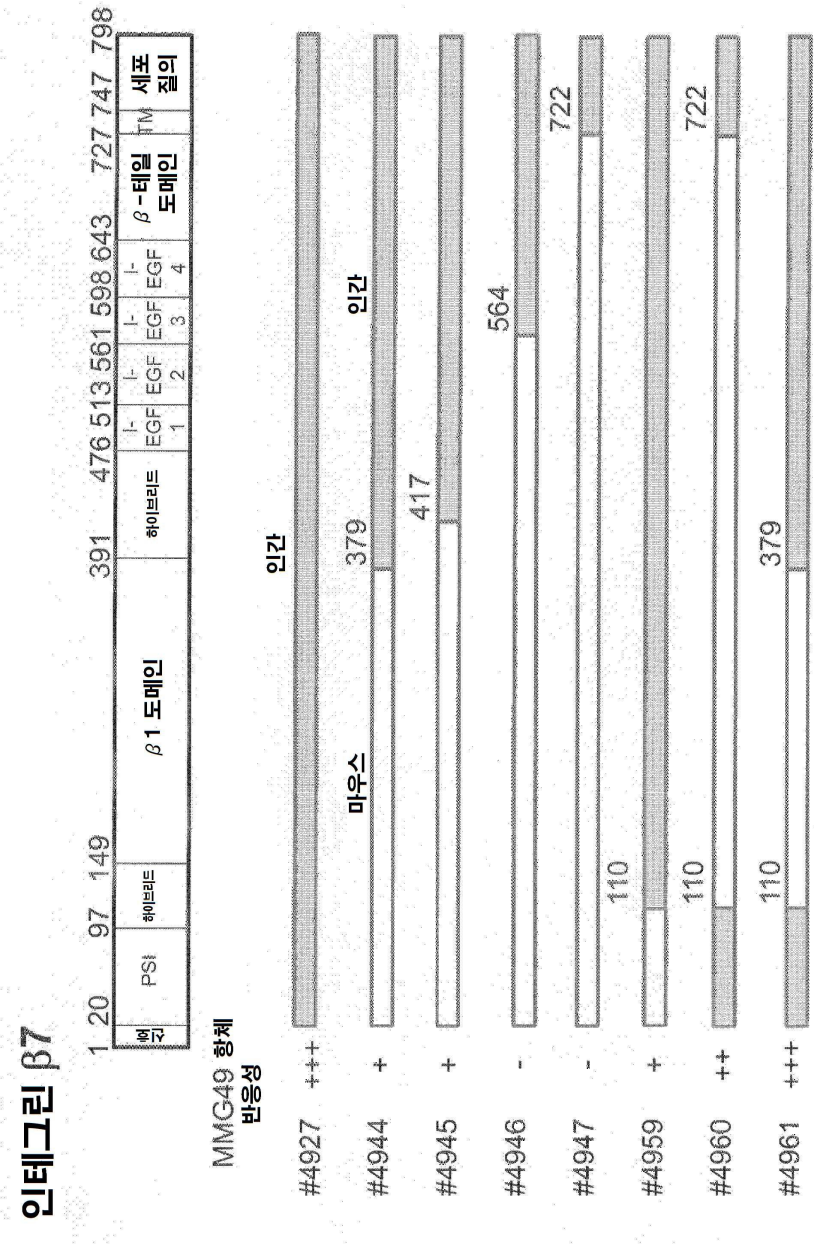
도면9



도면10

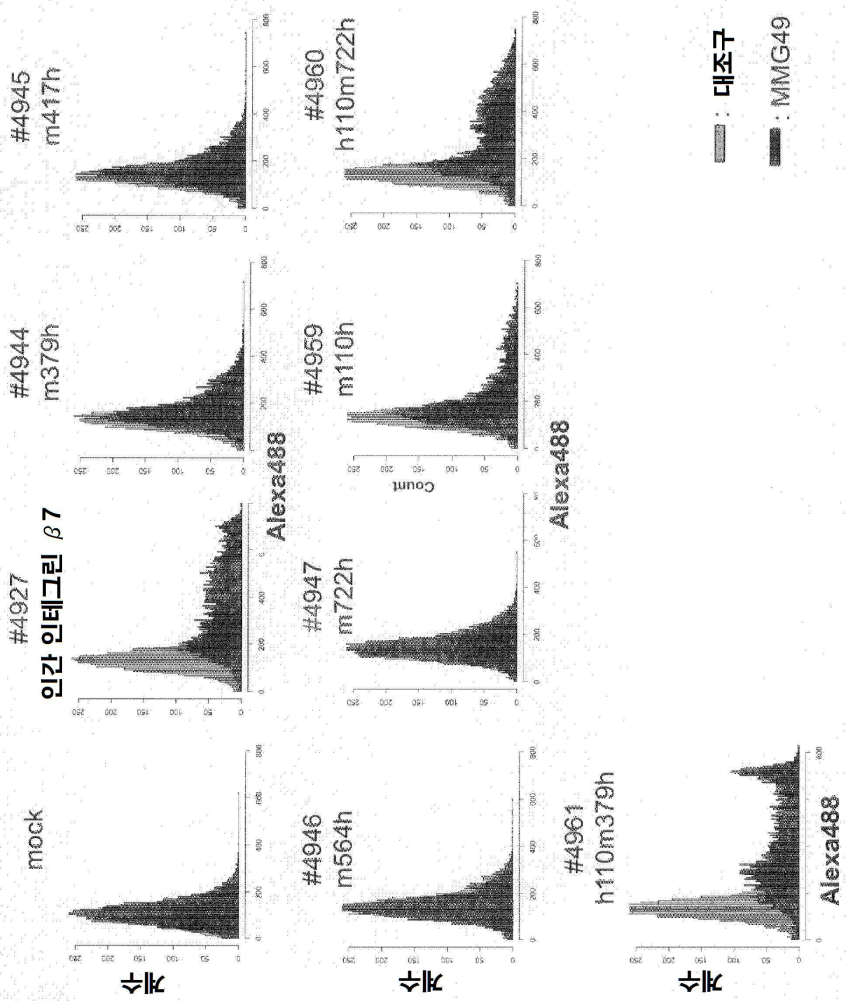


도면11



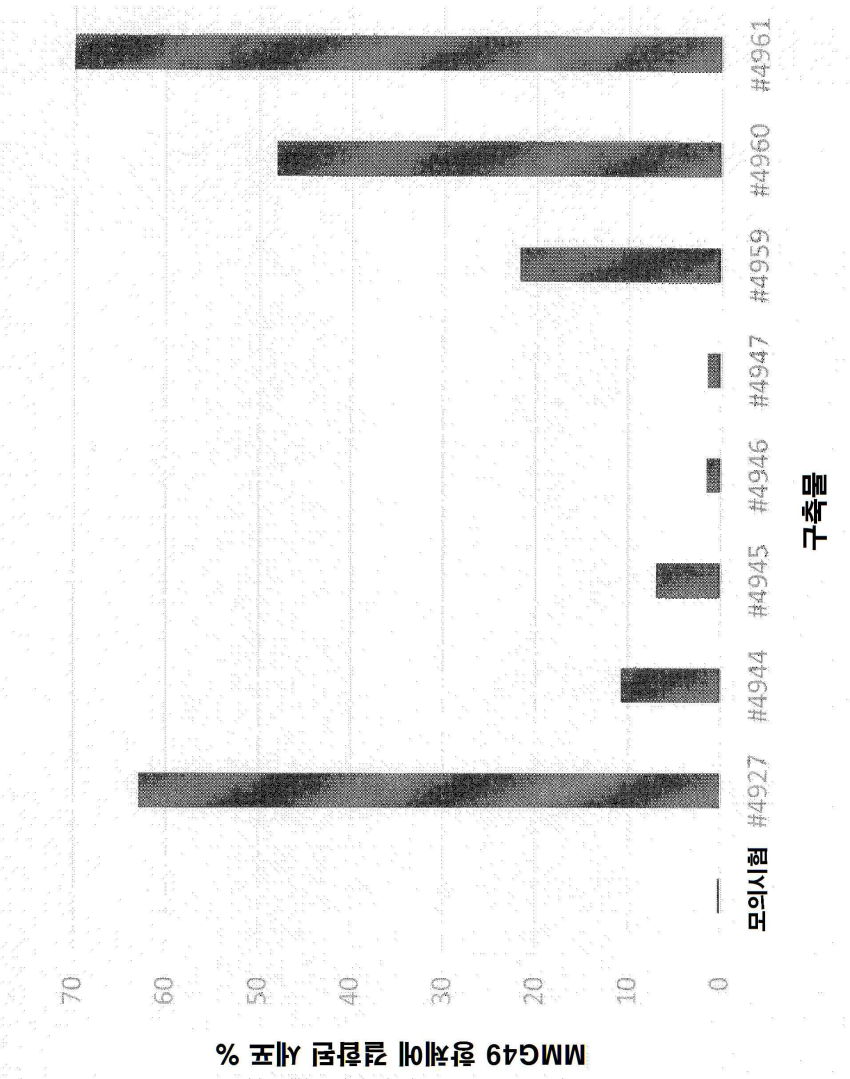


도면12

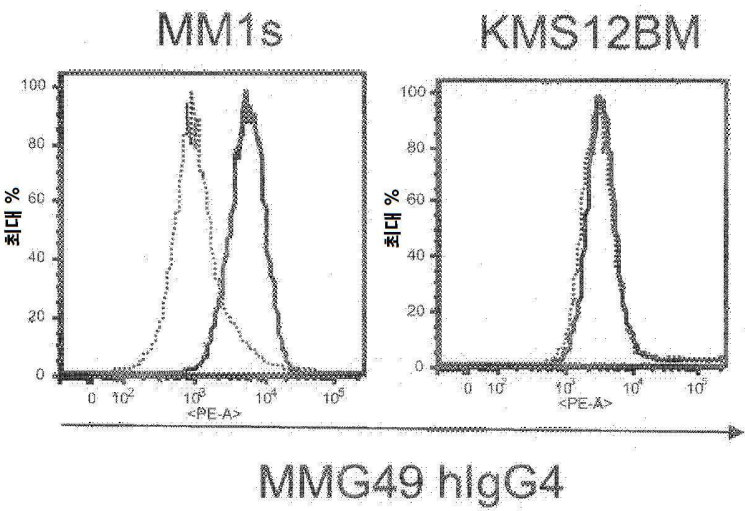




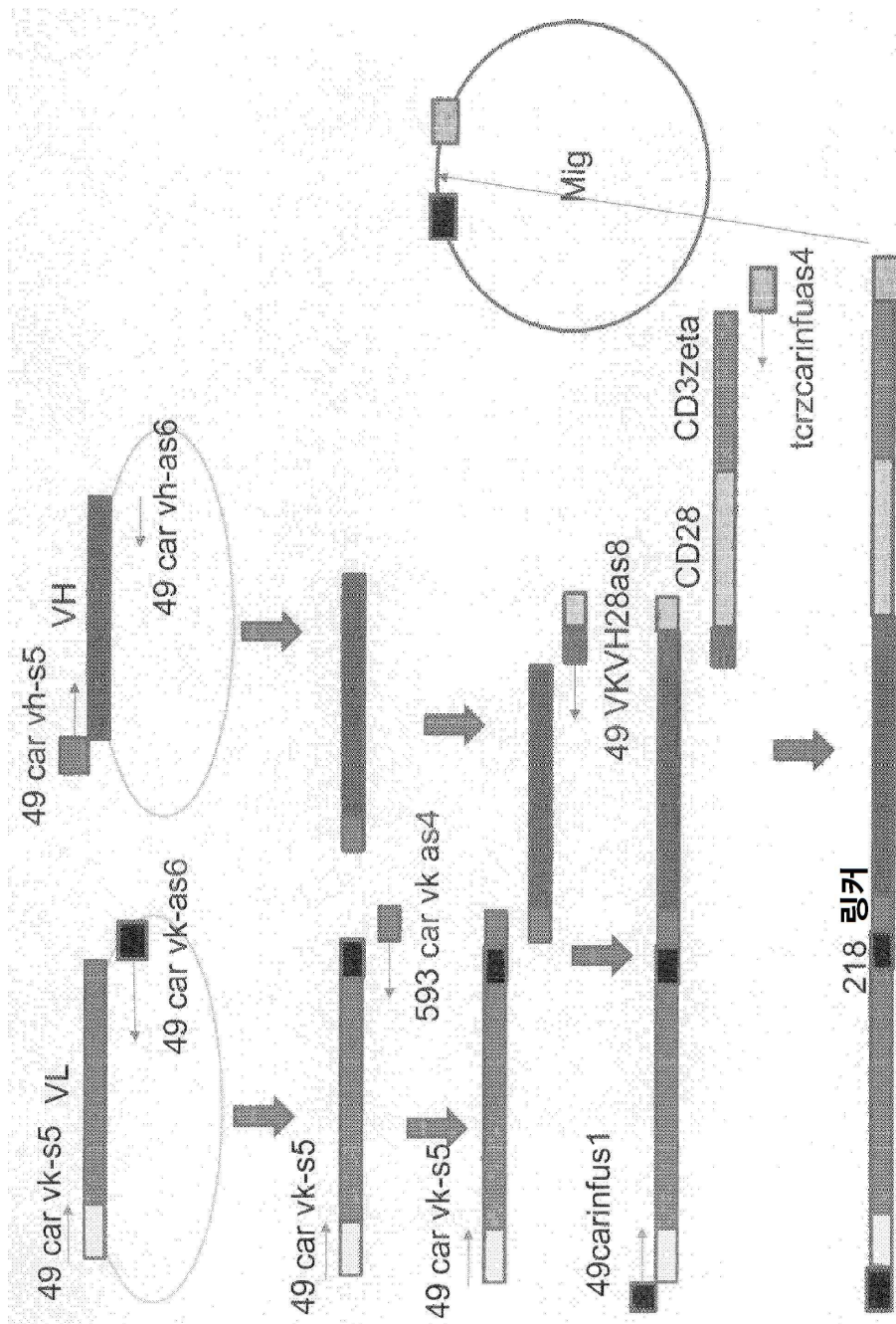
도면13



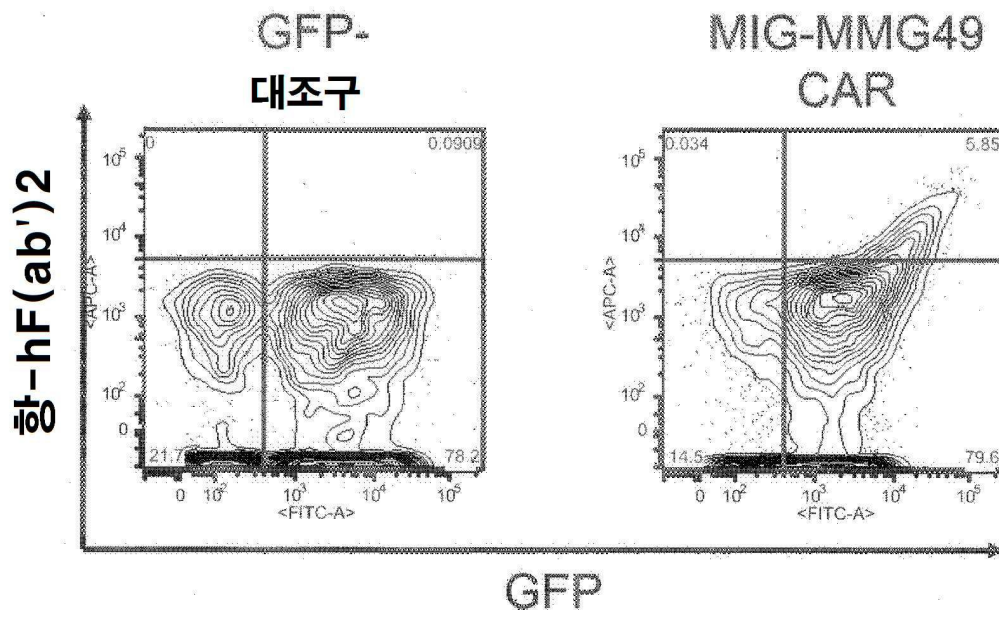
도면14



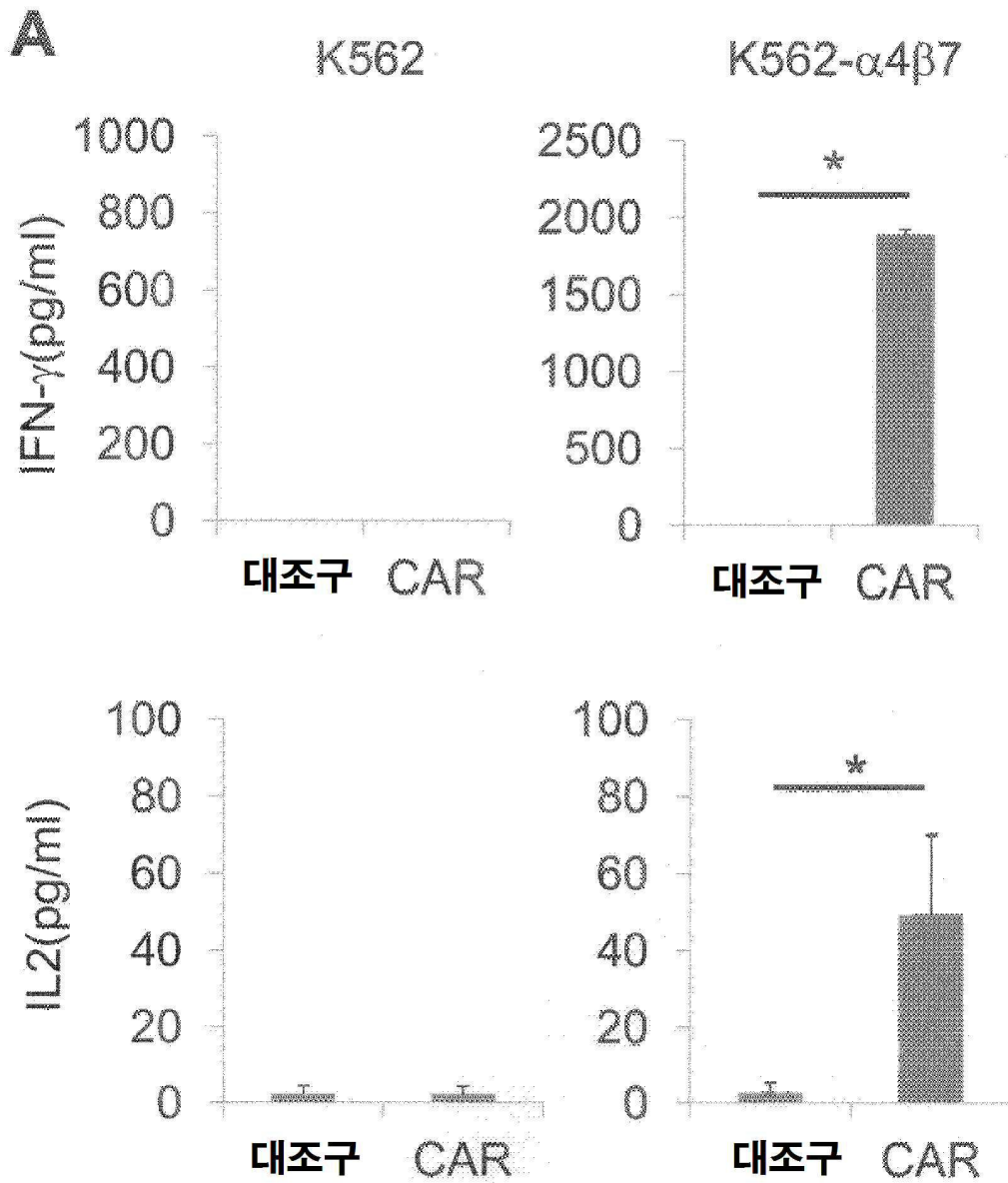
도면15



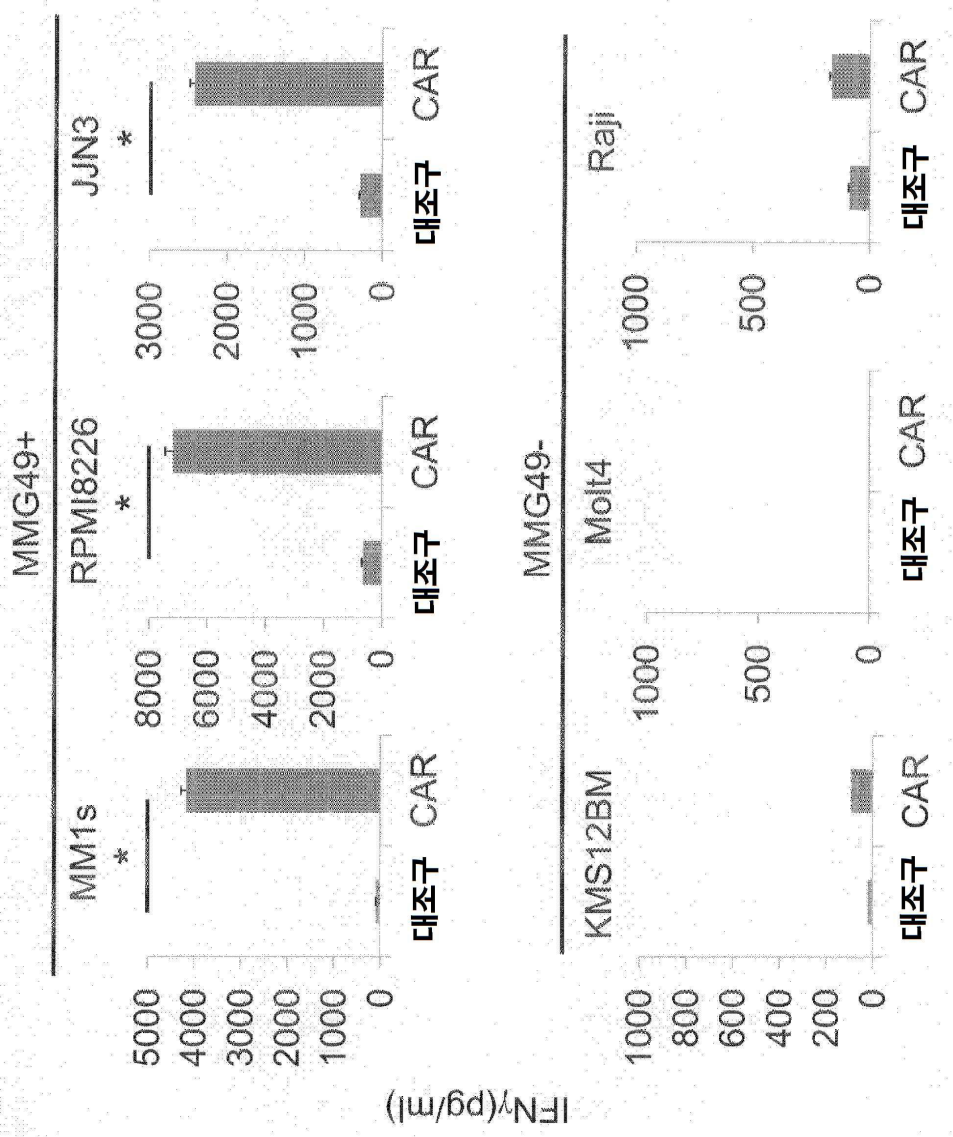
도면16



도면17

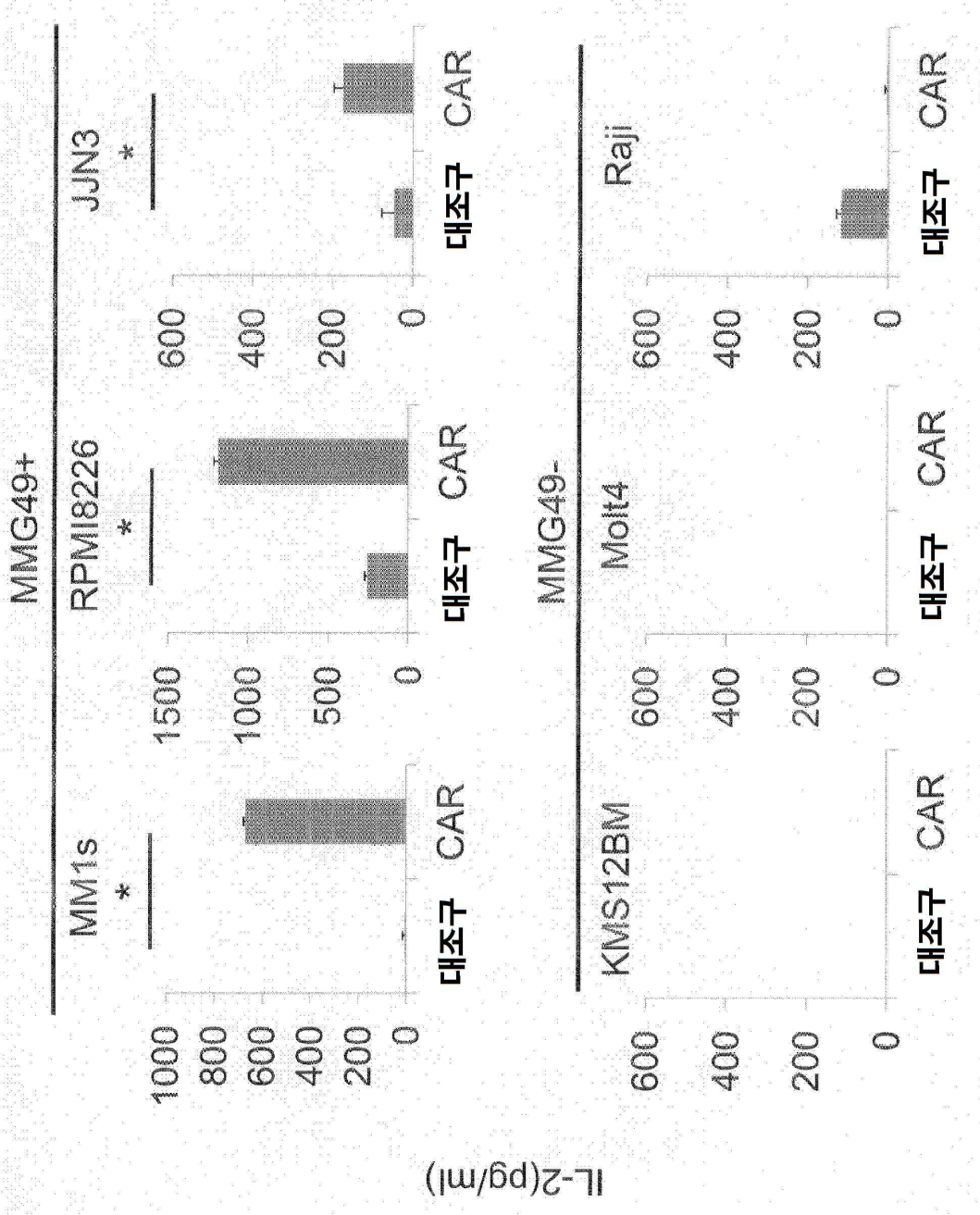


도면18

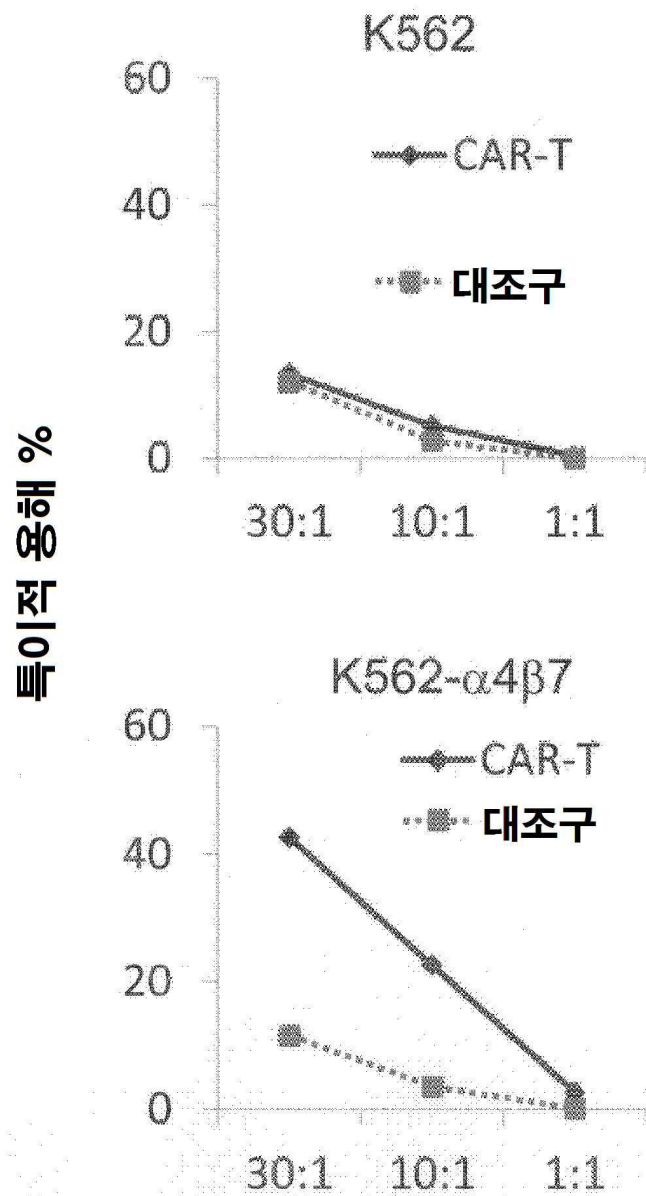




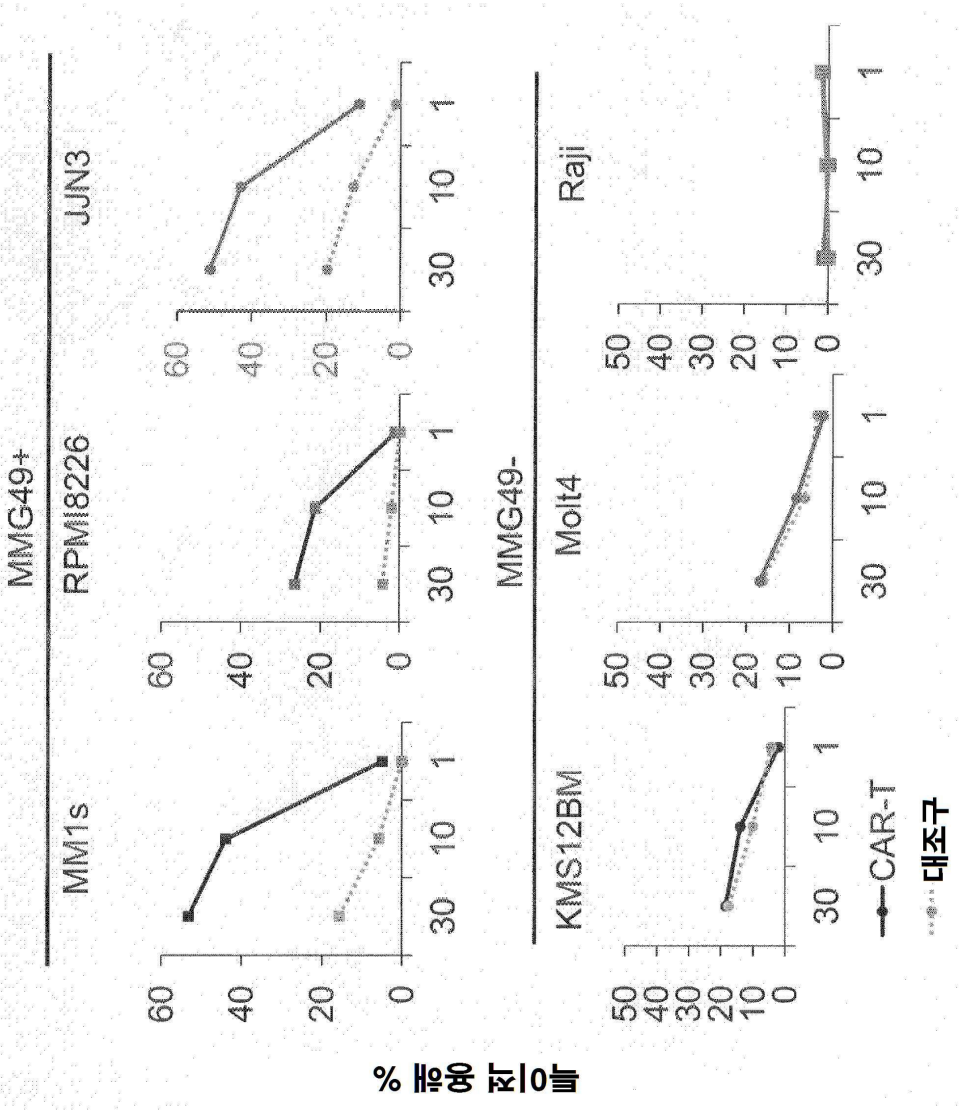
도면19



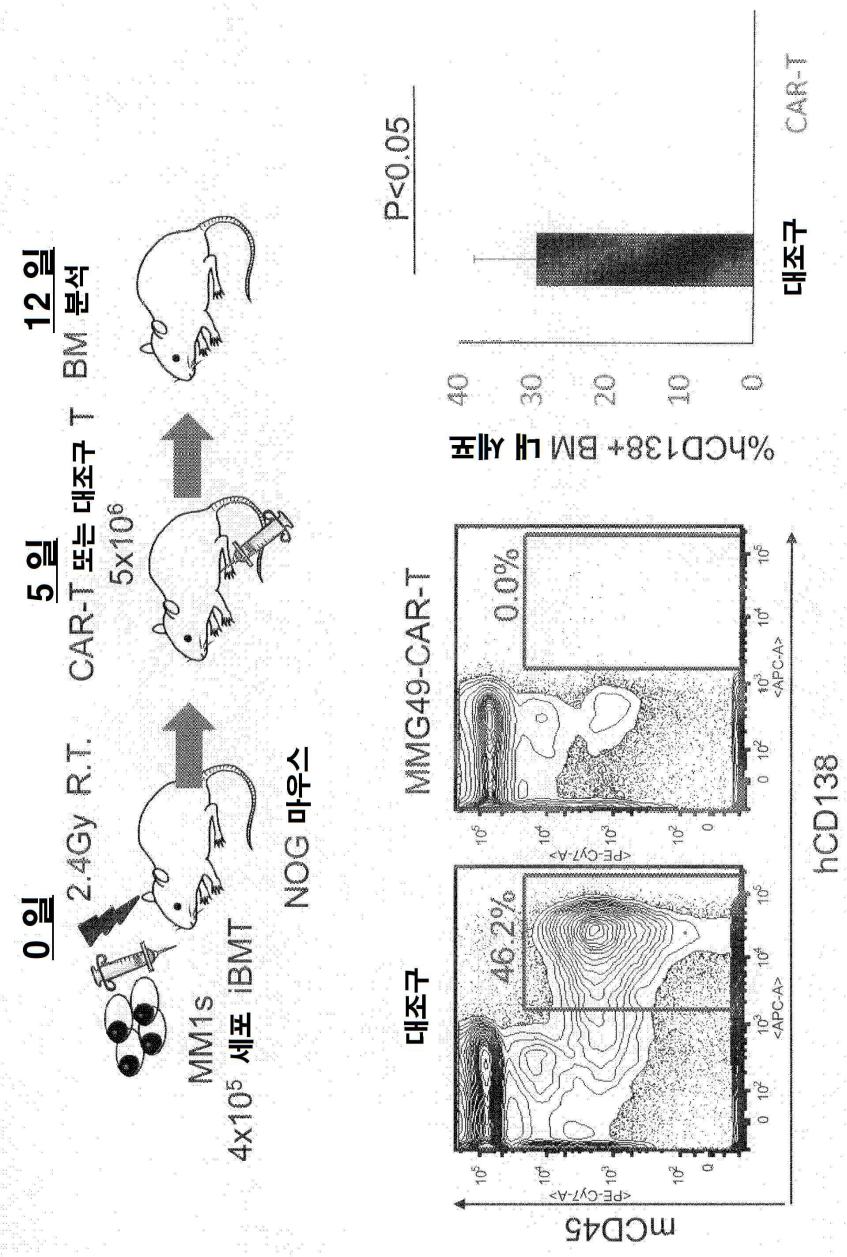
도면20



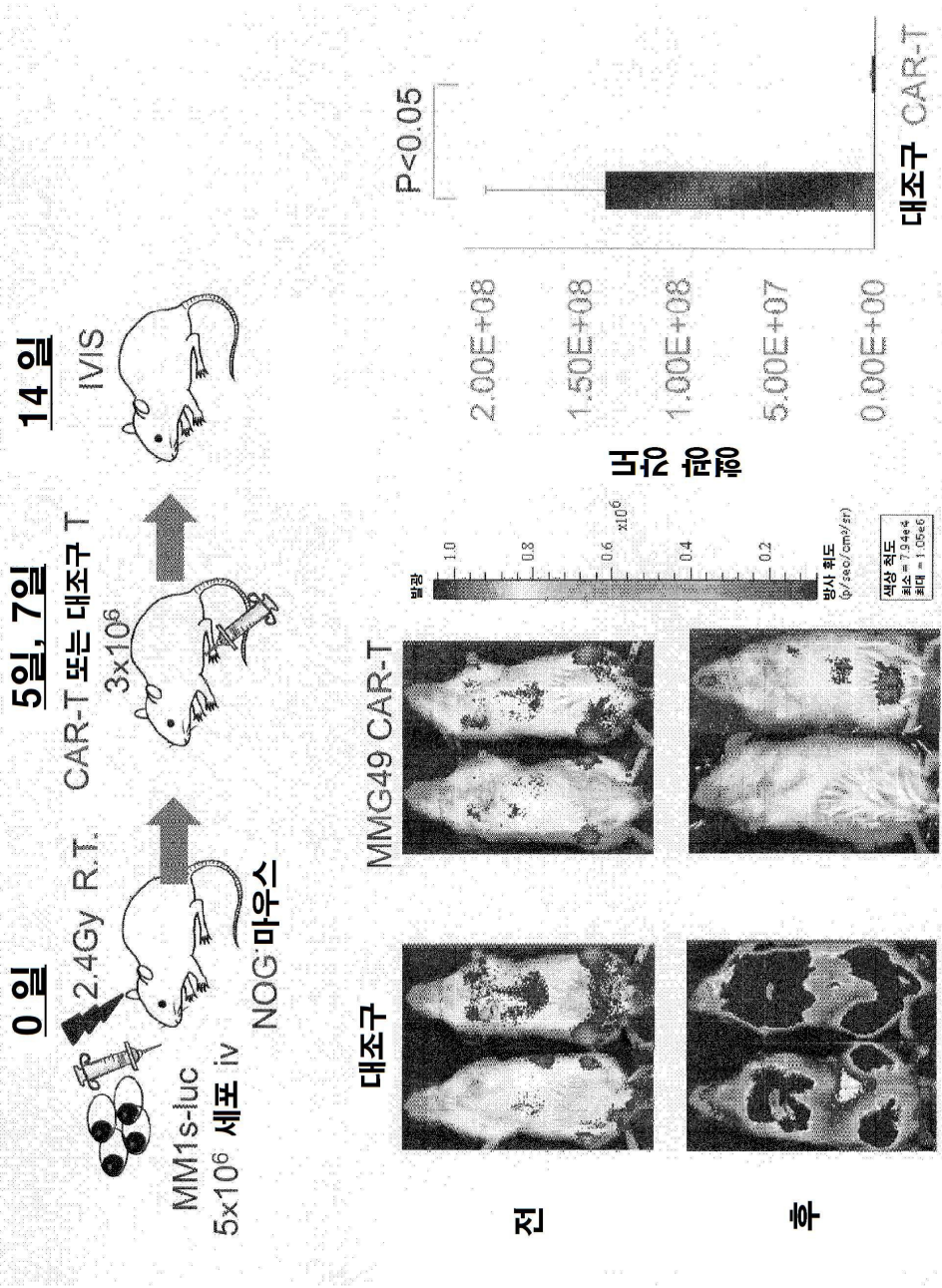
도면21



도면22



도면23

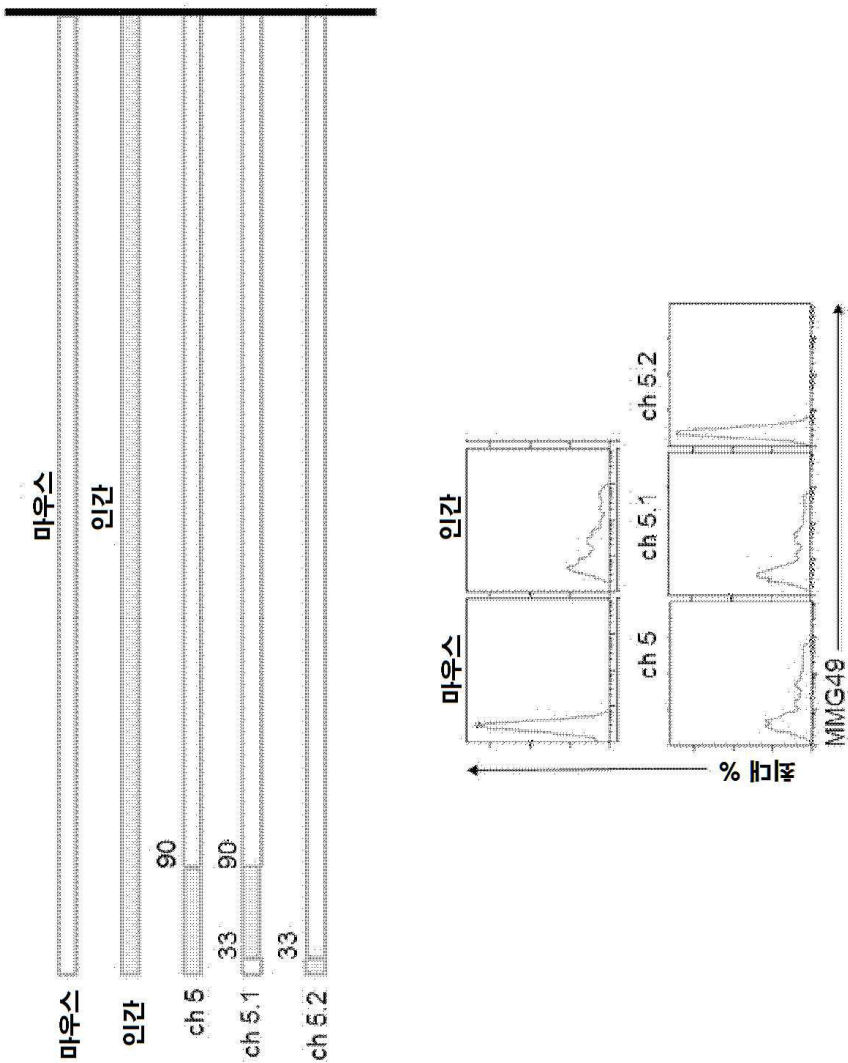




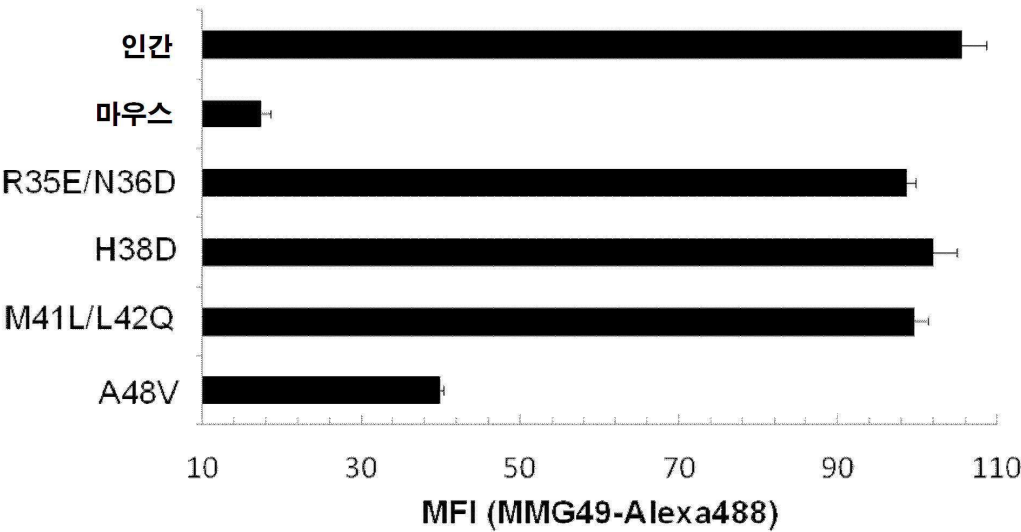
# 정렬: 인간 대 마우스 β 7 인테그린

인간	b7	1:RVVLENYVIVLVISTEELVLAALPSVSAALPNNVHLLKSLVLSQVLCILSHFSAMQVNTAFSAEAKRCAPRERLLAKG	50
마우스	b7	1:RVQDQTVLIIIVLSQSGELDQVIESCEALKEVHFDLSQCSQVTECQVCEILSHFISAMQVNTAFSAEAKRCATTEILLAKG	50
인간	b7	91:CPHLEIEPFGCEVLQDDELSCARGGATLA:PRVNTILRGEPCQLQVRIKRLGCVYDVLIVMLSYHKDDELRYQLGHALIV	130
마우스	b7	91:CPHLEIEPFGCEVLQDDELSCARGGATLA:PRVNTILRGEPCQLQVRIKRLGCVYDVLIVMLSYHKDDELRYQLGHALIV	130
인간	b7	191:ELQVYHISVRIGFGSEVDENVLEFVSTVTSKZIEHPETNIEKCSSEFTEHVLSTIDAQVFEFVRGVRGVEGNLDSPEGGETALIQAL	270
마우스	b7	191:ELQVYHISVRIGFGSEVDENVLEFVSTVTSKZIEHPETNIEKCSSEFTEHVLSTIDAQVFEFVRGVRGVEGNLDSPEGGETALIQAL	270
인간	b7	271:CGEQICWAVNRLVETSDTFHTACDDELCOFNPSDCRCHLDSNCTYETEFEDYFVTVQVRAALSANIQDIFAVTSALPYQELR	360
마우스	b7	271:CGEQICWAVNRLVETSDTFHTACDDELCOFNPSDCRCHLDSNCTYETEFEDYFVTVQVRAALSANIQDIFAVTSALPYQELR	360
인간	b7	361:ELXPKKAVGEISDSNVVQIIMKYNILGSTVILRHSSIFPGYHISZSCGEPKREGRKEDRSGCHVRINQTVTFVSLQATHCLE	450
마우스	b7	361:QIKPFAVGRISFDSNVVQIINTAYNLSSTV:VHSPVPPGVSTISFSAKGPPTTFGLGRSQNDVRVNTQTVFVWTQATHCLP	450
인간	b7	451:EMFLIKUNALGFSEELIAYNLIENCKRSDIQKQAPCSVCGHILQVCKSLAPKLGKLLGSAELSPINETSURAPAKTEPLCSGM	540
마우스	b7	451:EMFLIKUNALGFSEELIAYNLIENCKRSDIQKQAPCSVCGHILQVCKSLAPKLGKLLGSAELSPINETSURAPAKTEPLCSGM	540
인간	b7	541:GRQCCGRCSGCSGHLCECDNASCEHIEGILCSFGRQCGVCHIANRIGRACCSGMDSCIISPEGLCSHGRCCKNCCQLDGY	630
마우스	b7	541:GRQCCGRCSGCSGQOGRLCEDDASCHEHIEGILCSFGRQCGVCHIANRIGRACCSGMDSCIISPEGLCSHGRCCKNCCQLDGY	630
인간	b7	631:YSAICIQTPGCKTPQFRNRDCAKCAFTGTATNGSTADHEVVTALPTIDHCKERTILNQIPFTIANDDAKATVTVRVPQKKG	720
마우스	b7	631:YGAICDQLGKSPCEQTEDCAKCEATFGTGLRANKSVVALGNVILLAPNLDGKCEKILIDKQIFFTLV-HAASFIIVLRVQKKG	719
인간	b7	721:ADHTQAVLGCYGGIVAVGELVLAVLSVLIWDABEYSDFEKIQCKKQSNP:VYSALITTIMPEQ--EADSEPL	798
마우스	b7	720:VDHTRAILGCTGGIVAVGELVLAVRSVETDRKTRFEKQCKKQNNKQNNF:YNSALITTVNPFQGNKSEPSLITREAD	806

도면25



도면26



# 서열 목록

## SEQUENCE LISTING

<110> OSAKA UNIVERSITY

<120> Antibody

<130> P16-107W0

<150> @JP 2015-159240

<151> @2015-08-11

<160> 31

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH CDR1 of MMG49 antibody

<400> 1

Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp

1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH CDR2 of MMG49 Antibody

<400> 2

Met Leu Pro Gly Ser Gly Ser Ser

1 5

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH CDR3 of MMG49 Antibody

<400> 3

Ala Arg Gly Asp Gly Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 4

<211> 131

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH of MMG49 Antibody

<400> 4

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

1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys

20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

35 40 45

Ser Ser Tyr Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Met Leu Pro Gly Ser Gly Ser Ser Asn Tyr Asn

65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asp Gly Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp

115 120 125

Gly Ala Gly

130

<210> 5

<211> 461

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain of MMG49 Antibody

<400> 5

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

1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys  
20 25 30  
Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
35 40 45  
Ser Ser Tyr Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu  
50 55 60  
Glu Trp Ile Gly Glu Met Leu Pro Gly Ser Gly Ser Ser Asn Tyr Asn  
65 70 75 80  
Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn  
85 90 95  
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val  
100 105 110  
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asp Gly Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp  
115 120 125  
Gly Ala Gly Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro  
130 135 140  
Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val  
145 150 155 160  
Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser  
165 170 175  
Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu  
180 185 190  
Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser  
195 200 205  
Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val  
210 215 220  
Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro  
225 230 235 240  
Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile  
245 250 255  
Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile



260 265 270  
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln  
275 280 285  
Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln  
290 295 300  
Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu  
305 310 315 320  
Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys

325 330 335  
Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys  
340 345 350  
Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro  
355 360 365  
Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr  
370 375 380  
Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys

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

450 455 460  
<210> 6  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> VL CDR1 of MMG49 Antibody  
<400> 6  
Ser Ser Val Gly Tyr

1 5

<210> 7

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL CDR2 of MMG49 Antibody

<400> 7

Ala Thr Ser

1

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL CDR3 of MMG49

<400> 8

Gln Gln Trp Ser Ser Asp Pro Pro Thr

1 5

<210> 9

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL of MMG49 ANtibody

<400> 9

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser

1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile

20 25 30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser

35 40 45

Ser Ser Val Gly Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser

50 55 60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro

65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Glu Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile  
85 90 95  
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp  
100 105 110  
Ser Ser Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
115 120 125  
<210> 10  
<211> 234  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Light Chain of MMG49 Antibody  
<400> 10  
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser  
1 5 10 15  
Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile  
20 25 30  
Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser  
35 40 45  
Ser Ser Val Gly Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser  
50 55 60  
Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
65 70 75 80  
Ala Arg Phe Ser Gly Ser Glu Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile  
85 90 95  
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp  
100 105 110  
Ser Ser Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
115 120 125  
Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln  
130 135 140  
Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr  
145 150 155 160

Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln

165 170 175  
 Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 180 185 190  
 Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg  
 195 200 205  
 His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro  
 210 215 220  
 Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
 225 230

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH CDR1 of MMG49 Antibody

<400> 11

ggctacacat tcagtagcta ctgg 24

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH CDR2 of MMG49 Antibody

<400> 12

atgttacctg gaagtggtag ttct 24

<210> 13

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH CDR3 of MMG49 Antibody

<400> 13

gcaagggggg atggtaacta ctggtacttc gatgtc 36

<210> 14

<211> 393

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH of MMG49 Antibody

<400> 14

```
atggaatgga cctgggtctt tctcttctc ctgtcagtaa ctgcaggtgt ccactcccag      60
gttcagctgc agcagctctgg agctgagctg atgaagcctg gggcctcagt gaagatatcc    120
tgcaaggctt ctggctacac attcagtagc tactggatag agtgggtaaa gcagaggcct      180
ggacatggcc ttgagtggat tggagagatg ttacctggaa gtggtagtgc taactacaat      240
gagaagttca agggcaaggc cacattcact gcagatacat cctccaacac agcctacatg      300
caactcagca gcctgacatc tgaggactct gccgtctatt actgtgcaag gggggatggt      360
```

```
aactactggt acttcgatgt ctggggcgca ggg                                     393
```

<210> 15

<211> 1383

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain of MMG49 Antibody

<400> 15

```
atggaatgga cctgggtctt tctcttctc ctgtcagtaa ctgcaggtgt ccactcccag      60
gttcagctgc agcagctctgg agctgagctg atgaagcctg gggcctcagt gaagatatcc    120
tgcaaggctt ctggctacac attcagtagc tactggatag agtgggtaaa gcagaggcct      180
ggacatggcc ttgagtggat tggagagatg ttacctggaa gtggtagtgc taactacaat      240
gagaagttca agggcaaggc cacattcact gcagatacat cctccaacac agcctacatg      300
```

```
caactcagca gcctgacatc tgaggactct gccgtctatt actgtgcaag gggggatggt      360
aactactggt acttcgatgt ctggggcgca ggggctaaaa caacagcccc atcggtctat      420
ccactggccc ctgtgtgtgg agatacaact ggctcctcgg tgactctagg atgcctggtc      480
aagggttatt tccctgagcc agtgaccttg acctggaact ctggatccct gtccagtgg      540
gtgcacacct tccagctgt cctgcagtct gacctctaca ccctcagcag ctcagtgact      600
glaacctga gcacctggcc cagccagtcc atcacctgca atgtggcca cccggcaagc      660
agcaccaagg tggacaagaa aattgagccc agagggccca caatcaagcc ctgtcctcca      720
```

```
tgcaaatgcc cagcacctaa cctcttgggt ggaccatccg tcttcattct cctccaaag      780
atcaaggatg tactcatgat ctccctgagc cccatagtca catgtgtggt ggtggatgtg      840
```



agcgaggatg acccagatgt ccagatcagc tggtttgtga acaacgtgga agtacacaca 900  
gctcagacac aaacccatag agaggattac aacagtactc tccgggtggt cagtgcctc 960  
cccatccagc accaggactg gatgagtggc aaggagtcca aatgcaaggt caacaacaaa 1020  
gacctccag cgcccatcga gagaaccatc tcaaaaccca aagggtcagt aagagctcca 1080  
caggtatatg tcttgctcc accagaagaa gagatgacta agaaacaggt cactctgacc 1140

tgcattgtca cagacttcat gcctgaagac atttacgtgg agtggaccaa caacgggaaa 1200  
acagagctaa actacaagaa cactgaacca gtcttggtact ctgatggttc ttacttcatg 1260  
tacagcaagc tgagagtga aaagaagaac tgggtggaaa gaaatagcta ctctgttca 1320  
gtggtccacg aggtctgca caatcaccac acgactaaga gcttctccg gactccgggt 1380  
aaa 1383

<210> 16

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL CDR1 of MMG49 Antibody

<400> 16

tcaagtgtag gttac 15

<210> 17

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL CDR2 of MMG49 Antibody

<400> 17

gccacatcc 9

<210> 18

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL CDR3 of MMG49 Antibody

<400> 18

cagcagtga gtagtgacc accgacg 27

<210> 19

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL of MMG49 Antibody

<400> 19

atggattttc aagtcagat ttccagcttc ctgctaataca gtgcttcagt cataatgtcc 60

agaggacaaa ttgttctctc ccagctctcca gcaatcctgt ctgcatctcc aggggagaag 120

gtcacaatga ctgcagggc cagctcaagt gtaggttaca tgcactgggt ccagcagaag 180

ccaggatcct cccccaacc ctggatttat gccacatcca acctggcttc tggagtcct 240

gtctgcttca gtggcagtga gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag cagagtggag 300

gtcgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggagta gtgaccacc gacgttcggt 360

ggaggcacca agctggaat caaa 384

<210> 20

<211> 702

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain of MMG49 Antibody

<400> 20

atggattttc aagtcagat ttccagcttc ctgctaataca gtgcttcagt cataatgtcc 60

agaggacaaa ttgttctctc ccagctctcca gcaatcctgt ctgcatctcc aggggagaag 120

gtcacaatga ctgcagggc cagctcaagt gtaggttaca tgcactgggt ccagcagaag 180

ccaggatcct cccccaacc ctggatttat gccacatcca acctggcttc tggagtcct 240

gtctgcttca gtggcagtga gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag cagagtggag 300

gtcgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggagta gtgaccacc gacgttcggt 360

ggaggcacca agctggaat caaagcagat gctgcaccaa ctgtatccat cttccacca 420

tccagtgagc agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtgt gttcttgaa caactctac 480

cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg 540

aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcac 600

ttgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca 660

tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gt 702

<210> 21

<211> 485

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAR described in example

<400> 21

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser

1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile

20 25 30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser

35 40 45

Ser Ser Val Gly Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser

50 55 60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro

65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Glu Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile

85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp

100 105 110

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

115 120 125

Arg Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Gly Glu Met Leu Pro Gly Ser Gly Ser Ser Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

195 200 205

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

210 215 220

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
225 230 235 240  
Ala Arg Gly Asp Gly Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly  
245 250 255  
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro  
260 265 270  
Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val  
275 280 285  
Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys  
290 295 300  
Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser  
305 310 315 320  
Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg  
325 330 335  
Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro  
340 345 350  
Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe  
355 360 365  
Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro  
370 375 380  
Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly  
385 390 395 400  
Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro  
405 410 415  
Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr  
420 425 430  
Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly  
435 440 445  
Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln  
450 455 460  
Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln

465                                      470                                      475                                      480

Ala Leu Pro Pro Arg

485

<210> 22

<211> 1468

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAR described in example

<400> 22

gaattccacc atggattttc aagtcagat tttcagcttc ctgctaata gtccttcagt                                      60

cataatgtcc agaggacaaa ttgttctctc ccagtctcca gcaatcctgt ctgcatctcc                                      120

aggggagaag gtcacaatga cttgcagggc cagctcaagt gtaggttaca tgcactggtt                                      180

ccagcagaag ccaggatcct cccccaacc ctggatttat gccacatcca acctggcttc                                      240

tggagtccct gctcgttca gtggcagtga gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag                                      300

cagagtggag gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggagta gtgaccacc                                      360

gacgttcggt ggaggcacca agctggaaat caaacggggc tccactagcg gttccggcaa                                      420

acctggcagc ggagaaggca gccaggttca gctgcagcag tctggagctg agctgatgaa                                      480

gcctggggcc tcaagtgaaga tctctgcaa ggcttctggc tacacattca gtagctactg                                      540

gatagagtgg gtaaagcaga ggctggaca tggccttgag tggattggag agatgttacc                                      600

tggaagtggg agttctaact acaatgagaa gttcaagggc aaggccacat tcaactgcaga                                      660

tacatctcc aacacagcct acatgcaact cagcagcctg acatctgagg actctgccgt                                      720

ctattactgt gcaagggggg atggttaacta ctggtacttc gatgtctggg ggcgaggac                                      780

cacggtcacc gtctctcag cggccgcaat tgaagttatg tatctctctc ctacactaga                                      840

caatgagaag agcaatggaa ccattatcca tgtgaaaggg aaacaccttt gtccaagtcc                                      900

cctatttccc ggaccttcta agcccttttg ggtgctgggtg gtggttgggt gagtctctggc                                      960

ttgctatagc ttgctagtaa cagtggcctt tattattttc tgggtgagga gtaagaggag                                      1020

caggctcctg cacagtgact acatgaacat gactccccgc cggccgggc ccaccgcaa                                      1080

gcattaccag ccctatgccc caccacgca cttcgagcc tatcgctcca gagtgaagtt                                      1140

cagcaggagc gcagacgccc ccgctacca gcaggccag aaccagctct ataacgagct                                      1200

caatctagga cgaagagagg agtacgatgt ttggacaag agacgtggcc gggacctga                                      1260

gatgggggga aagccgagaa ggaagaacc tcaggaaggc ctgtacaatg aactgcagaa                                      1320



agataagatg gcggaggcct acagtgagat tgggatgaaa ggcgagcgcc ggaggggcaa 1380

ggggcacgat ggcctttacc agggctctcag tacagccacc aaggacacct acgacgccct 1440

tcacatgcag gccctgcccc ctcgctaa 1468

<210> 23

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 23

gaattccacc atggattttc aagtcagat t 31

<210> 24

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 24

gccggaaccg ctagtggagc cccgtttgat ttccagcttg gt 42

<210> 25

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 25

gctgccttct ccgctgccag gtttgccgga accgctagtg gagcc 45

<210> 26

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 26

aaacctggca gcggagaagg cagccaggtt cagctgcagc agtc 44

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 27

tgaggagacg gtgaccgtgg 20

<210> 28

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 28

atacataact tcaattgcgg ccgctgagga gacggtgacc gtgg 44

<210> 29

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 29

ctaggcgccg gaattccacc atggattttc 30

<210> 30

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 30

aatgtcgacc tcgagtggct gttagcgag 29

<210> 31

<211> 798

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Met Val Ala Leu Pro Met Val Leu Val Leu Leu Val Leu Ser Arg

1 5 10 15

Gly Glu Ser Glu Leu Asp Ala Lys Ile Pro Ser Thr Gly Asp Ala Thr

20                                      25                                      30  
 Glu Trp Arg Asn Pro His Leu Ser Met Leu Gly Ser Cys Gln Pro Ala  
 35                                      40                                      45  
 Pro Ser Cys Gln Lys Cys Ile Leu Ser His Pro Ser Cys Ala Trp Cys  
  
 50                                      55                                      60  
 Lys Gln Leu Asn Phe Thr Ala Ser Gly Glu Ala Glu Ala Arg Arg Cys  
 65                                      70                                      75                                      80  
 Ala Arg Arg Glu Glu Leu Leu Ala Arg Gly Cys Pro Leu Glu Glu Leu  
 85                                      90                                      95  
 Glu Glu Pro Arg Gly Gln Gln Glu Val Leu Gln Asp Gln Pro Leu Ser  
 100                                      105                                      110  
 Gln Gly Ala Arg Gly Glu Gly Ala Thr Gln Leu Ala Pro Gln Arg Val  
  
 115                                      120                                      125  
 Arg Val Thr Leu Arg Pro Gly Glu Pro Gln Gln Leu Gln Val Arg Phe  
 130                                      135                                      140  
 Leu Arg Ala Glu Gly Tyr Pro Val Asp Leu Tyr Tyr Leu Met Asp Leu  
 145                                      150                                      155                                      160  
 Ser Tyr Ser Met Lys Asp Asp Leu Glu Arg Val Arg Gln Leu Gly His  
 165                                      170                                      175  
 Ala Leu Leu Val Arg Leu Gln Glu Val Thr His Ser Val Arg Ile Gly  
  
 180                                      185                                      190  
 Phe Gly Ser Phe Val Asp Lys Thr Val Leu Pro Phe Val Ser Thr Val  
 195                                      200                                      205  
 Pro Ser Lys Leu Arg His Pro Cys Pro Thr Arg Leu Glu Arg Cys Gln  
 210                                      215                                      220  
 Ser Pro Phe Ser Phe His His Val Leu Ser Leu Thr Gly Asp Ala Gln  
 225                                      230                                      235                                      240  
 Ala Phe Glu Arg Glu Val Gly Arg Gln Ser Val Ser Gly Asn Leu Asp  
  
 245                                      250                                      255  
 Ser Pro Glu Gly Gly Phe Asp Ala Ile Leu Gln Ala Ala Leu Cys Gln  
 260                                      265                                      270

Glu Gln Ile Gly Trp Arg Asn Val Ser Arg Leu Leu Val Phe Thr Ser  
 275 280 285  
 Asp Asp Thr Phe His Thr Ala Gly Asp Gly Lys Leu Gly Gly Ile Phe  
 290 295 300  
 Met Pro Ser Asp Gly His Cys His Leu Asp Ser Asn Gly Leu Tyr Ser  
  
 305 310 315 320  
 Arg Ser Thr Glu Phe Asp Tyr Pro Ser Val Gly Gln Val Ala Gln Ala  
 325 330 335  
 Leu Ser Ala Ala Asn Ile Gln Pro Ile Phe Ala Val Thr Ser Ala Ala  
 340 345 350  
 Leu Pro Val Tyr Gln Glu Leu Ser Lys Leu Ile Pro Lys Ser Ala Val  
 355 360 365  
 Gly Glu Leu Ser Glu Asp Ser Ser Asn Val Val Gln Leu Ile Met Asp  
  
 370 375 380  
 Ala Tyr Asn Ser Leu Ser Ser Thr Val Thr Leu Glu His Ser Ser Leu  
 385 390 395 400  
 Pro Pro Gly Val His Ile Ser Tyr Glu Ser Gln Cys Glu Gly Pro Glu  
 405 410 415  
 Lys Arg Glu Gly Lys Ala Glu Asp Arg Gly Gln Cys Asn His Val Arg  
 420 425 430  
 Ile Asn Gln Thr Val Thr Phe Trp Val Ser Leu Gln Ala Thr His Cys  
  
 435 440 445  
 Leu Pro Glu Pro His Leu Leu Arg Leu Arg Ala Leu Gly Phe Ser Glu  
 450 455 460  
 Glu Leu Ile Val Glu Leu His Thr Leu Cys Asp Cys Asn Cys Ser Asp  
 465 470 475 480  
 Thr Gln Pro Gln Ala Pro His Cys Ser Asp Gly Gln Gly His Leu Gln  
 485 490 495  
 Cys Gly Val Cys Ser Cys Ala Pro Gly Arg Leu Gly Arg Leu Cys Glu  
  
 500 505 510  
 Cys Ser Val Ala Glu Leu Ser Ser Pro Asp Leu Glu Ser Gly Cys Arg

515                      520                      525  
 Ala Pro Asn Gly Thr Gly Pro Leu Cys Ser Gly Lys Gly His Cys Gln  
 530                      535                      540  
 Cys Gly Arg Cys Ser Cys Ser Gly Gln Ser Ser Gly His Leu Cys Glu  
 545                      550                      555                      560  
 Cys Asp Asp Ala Ser Cys Glu Arg His Glu Gly Ile Leu Cys Gly Gly  
  
 565                      570                      575  
 Phe Gly Arg Cys Gln Cys Gly Val Cys His Cys His Ala Asn Arg Thr  
 580                      585                      590  
 Gly Arg Ala Cys Glu Cys Ser Gly Asp Met Asp Ser Cys Ile Ser Pro  
 595                      600                      605  
 Glu Gly Gly Leu Cys Ser Gly His Gly Arg Cys Lys Cys Asn Arg Cys  
 610                      615                      620  
 Gln Cys Leu Asp Gly Tyr Tyr Gly Ala Leu Cys Asp Gln Cys Pro Gly  
  
 625                      630                      635                      640  
 Cys Lys Thr Pro Cys Glu Arg His Arg Asp Cys Ala Glu Cys Gly Ala  
 645                      650                      655  
 Phe Arg Thr Gly Pro Leu Ala Thr Asn Cys Ser Thr Ala Cys Ala His  
 660                      665                      670  
 Thr Asn Val Thr Leu Ala Leu Ala Pro Ile Leu Asp Asp Gly Trp Cys  
 675                      680                      685  
 Lys Glu Arg Thr Leu Asp Asn Gln Leu Phe Phe Phe Leu Val Glu Asp  
  
 690                      695                      700  
 Asp Ala Arg Gly Thr Val Val Leu Arg Val Arg Pro Gln Glu Lys Gly  
 705                      710                      715                      720  
 Ala Asp His Thr Gln Ala Ile Val Leu Gly Cys Val Gly Gly Ile Val  
 725                      730                      735  
 Ala Val Gly Leu Gly Leu Val Leu Ala Tyr Arg Leu Ser Val Glu Ile  
 740                      745                      750  
 Tyr Asp Arg Arg Glu Tyr Ser Arg Phe Glu Lys Glu Gln Gln Gln Leu  
  
 755                      760                      765

Asn Trp Lys Gln Asp Ser Asn Pro Leu Tyr Lys Ser Ala Ile Thr Thr  
 770 775 780  
 Thr Ile Asn Pro Arg Phe Gln Glu Ala Asp Ser Pro Thr Leu  
 785 790 795