

명세서

발명의 명칭: 메소텔린에 특이적으로 결합하는 항-메소텔린 키메라 항원 수용체

기술분야

- [1] 메소텔린에 특이적으로 결합하는 항-메소텔린 키메라 항원 수용체에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 최근 면역관문억제제, CAR-T 세포 치료제와 같은 면역항암제가 다양한 암에서 효과를 입증하고 있지만, 고형암은 이러한 새로운 형태의 면역항암제에도 치료효율이 크게 반응하지 않는다고 보고된다. 이는 종양을 둘러싼 섬유 조직이 면역치료 반응을 방해하고, 약물 전달이 어렵기 때문으로 추정된다. 따라서, 특이적이고 보다 효과적인 CAR-T 암 치료 방법으로서 고형암 세포 표면에 특이적으로 과발현되는 단백질을 암 항원으로써 표적하는 항체를 개발하고, 이를 이용하여 효과적으로 고형암을 치료할 수 있는 방법에 대한 연구의 필요성이 대두되고 있다.

- [3] 한편, 메소텔린은 글리코실포스파티딜이노시톨 (GPI) 도메인에 의해 세포 표면에 앵커링된 당단백질로, 인체의 강 (cavity)과 내부기관을 둘러싸는 중피 (mesothelium)에 제한적으로 낮게 발현하는 것이 정상이나 췌장암, 중피종, 난소암, 비소세포성 폐암 등의 암에서 풍부하게 발현되는 것으로 알려져 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [4] 일 양상은 항-메소텔린 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하는 것이다.
- [5] 다른 양상은 상기 항-메소텔린 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 분리된 핵산을 제공하는 것이다.
- [6] 또 다른 양상은 상기 분리된 핵산을 포함하는 벡터를 제공하는 것이다.
- [7] 또 다른 양상은 상기 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공하는 것이다.
- [8] 또 다른 양상은 상기 숙주세포를 배양하여 항체를 발현시키는 단계를 포함하는 항-메소텔린 항체를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.
- [9] 또 다른 양상은 항원 결합 도메인, 힌지 (hinge) 도메인, 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체를 제공하는 것이다.
- [10] 또 다른 양상은 상기 키메라 항원 수용체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.
- [11] 또 다른 양상은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공하는 것이다.
- [12] 또 다른 양상은 상기 벡터로 형질전환된 세포를 제공하는 것이다.
- [13] 또 다른 양상은 상기 세포를 포함하는 약학적 조성물; 상기 세포의 의약적 용도; 및 치료학적 유효량의 상기 세포를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암을

예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

- [14] 본 출원의 다른 목적 및 이점은 첨부한 청구범위 및 도면과 함께 하기의 상세한 설명에 의해 보다 명확해질 것이다. 본 명세서에 기재되지 않은 내용은 본 출원의 기술 분야 또는 유사한 기술 분야 내 숙련된 자이면 충분히 인식하고 유추할 수 있는 것이므로 그 설명을 생략한다.

기술적 해결방법

- [15] 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [16]
- [17] 일 양상은 항-메소텔린 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [18] 상기 "메소텔린 (mesothelin: MSLN)"은 총 아미노산 길이가 630aa인 세포 표면 당단백질로 (NCBI Gene ID: 10232), 일부 세포, 특히 특정 종양 세포에서 선택적으로 발현되며, 하기에 메소텔린 단백질의 아미노산 서열을 나타내었다.
- [19] MALPTARPLLGSCGTPALGSLLFLLFSLGWVQPSRTLGETGQEAAPLDGVL
ANPPNISSLSRQLLGFPCAIEVSGLSTERVRELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAH
RLSEPPEDLDALPLDLLLFLNPDAFSGPQACTRFFSRITKANVDLLPRGAPERQR
LLPAALACWGVVRSLLSEADVRLGGLACDLPGRFVAESAEVLLPRLVSCPGP
LDQDQGEAARAALQGGPPYGPSTWSVSTMDALRGLLPVLGQPIIRSIPQGIV
AAWRQRSSRDPSWRQPRTILRPRFRREVEKTACPSGKKAREIDESLIFYKKWE
LEACVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDELYPQGYPESVIHLGY
LFLKMSPEDIRKWNVTSLKALLEVNGHEMSPQAPRRPLPQVATLIDRFV
KGRGQLDKDLDLTAFYPGYLCSLPEELSSVPPSSIWAVRPQDLDTCDPRQL
DVLYPKARLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMK
LRTDAVLPLTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDLDLGLG
LQGGIPNGYLVLDLSMQEALSGTPCLLGGPVLTVLALLLASTLA (서열번호
40)
- [20] 메소텔린은 정상 중피 세포 (mesothelial cells)에서는 낮은 발현을 보이지만, 고형암 (고형 종양)에서 높게 발현되며, 식도암 (esophageal cancer), 유방암 (breast cancer), 삼중음성 유방암 (triple-negative breast cancer: TNBC), 위암 (gastric cancer), 담관암 (cholangiocarcinoma), 췌장암 (pancreatic cancer), 대장암 (colon cancer), 폐암 (lung cancer), 흉선암 (thymic carcinoma), 중피종 (mesothelioma), 난소암 (ovarian cancer), 자궁내막암 (endometrial cancer), 자궁경부암 (cervical cancer), 자궁 장액성 암종 (uterin serous carcinoma: USC) 및 소아 급성 골수성 백혈병 (acute myeloid leukemia: AML) 등에서 과발현이 확인되었다 (Cancer Discov. 2016 Feb;6(2):133-46.; J Reprod Immunol. 2020;139:103115.; Gynecol

Oncol. 2007;105(3):563-570.; Eur J Haematol. 2007;79(4):281-286.).

- [21] 일 실시예에서는, 파지 디스플레이 항체 라이브러리 패닝을 통해 표적 항원인 메소텔린에 특이적으로 결합하는 항체로서 MSLN34, MSLN37 및 MSLN38을 제조하였다.
- [22] 본 명세서에서 용어 "항체"는 항원에 선택적으로 작용하여 생체 면역에 관여하는 단백질의 총칭을 말하는 것으로, 그 종류는 특별히 제한되지 않는다. 항체의 중쇄와 경쇄는 가변영역을 포함하는 에피토프를 인식하는 항원 결합 부위를 가지고 있고, 가변영역의 서열 변화에 따라 항원 특이성이 나타나게 된다. 항원 결합 부위의 가변영역은 가변성이 적은 구조 영역 (Framework region: FR)과 가변성이 큰 상보성 결정 영역 (Complementarity determining region: CDR)으로 나뉘지고, 중쇄와 경쇄 모두 CDR1, 2, 3 로 나뉘지는 3개의 CDR 부위와, 4개의 FR 부위를 가진다. 각각의 사슬의 CDR은 전형적으로 N-말단으로부터 시작하여 순차적으로 CDR1, CDR2, CDR3로 명명되고, 또한 특정 CDR이 위치하고 있는 사슬에 의해서 식별된다.
- [23] 본 명세서에서 용어 "상보성 결정 영역"은 항체의 가변영역 중에서 항원과의 결합 특이성을 부여하는 부위를 의미한다.
- [24] 본 명세서에서 용어 "에피토프"는 항체가 특이적으로 결합할 수 있는 항원분자 내의 특정한 입체분자구조를 의미한다.
- [25] 상기 항체는 단일클론 항체, 다특이적 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체(예를 들어, 인간화 무린 항체)를 모두 포함한다. 또한, 상기 항체는 디아바디, 트리아바디, 및 테트라바디를 포함할 수 있다.
- [26] 본 명세서에서 항체란 항원 결합능을 보유한 항체의 "항원 결합 단편" 또는 "항체 단편"을 포함한다. 상기 항원 결합 단편은 상보성 결정 영역을 하나 이상 포함하는 항체 단편, 예컨대, scFv, (scFv)₂, scFv-Fc, Fab, Fab' 및 F(ab')₂로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다. 항체 단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변영역 및 중쇄의 첫번째 불변영역 (CH1)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역 (hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')₂ 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv는 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역만을 가지고 있는 최소의 항체조각이다. 이중쇄 Fv (two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역이 연결되어 있다. 단쇄 Fv (single-chain Fv: scFv)는 일반적으로 펩티드 링커를 통하여 중쇄의 가변영역과 경쇄의 가변영역이 공유결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다.
- [27] 일 양상의 항-메소텔린 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 1로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열번호 2로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 서열번호 3으로 이루어진 아미노산

- 서열을 포함하는 중쇄 CDR3, 및 서열번호 4로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열번호 5로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 서열번호 6으로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3; 또는
- [28] 서열번호 13으로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열번호 14로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 서열번호 15로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3, 및 서열번호 16으로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열번호 17로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 서열번호 18로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [29] 상기 항-메소텔린 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 19 또는 23으로 이루어진 아미노산 서열과 80% 이상의 서열 상동성 (sequence homology), 바람직하게는 90% 이상의 서열 상동성, 보다 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성, 보다 더 바람직하게는 100%의 상동성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [30] 상기 항-메소텔린 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 20 또는 24로 이루어진 아미노산 서열과 80% 이상의 서열 상동성 (sequence homology), 바람직하게는 90% 이상의 서열 상동성, 보다 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성, 보다 더 바람직하게는 100%의 상동성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [31] 상기 항-메소텔린 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 19로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 20으로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [32] 상기 항-메소텔린 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 23으로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 24로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [33] 일 구체예에 있어서, 상기 항-메소텔린 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 19로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 20으로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 항-메소텔린 scFv일 수 있다 (항-MSLN34 scFv).
- [34] 다른 구체예에 있어서, 상기 항-메소텔린 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 23으로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 24로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 항-메소텔린 scFv일 수 있다 (항-MSLN38 scFv).
- [35] 상기 일 양상에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 메소텔린을 특이적으로 인식할 수 있는 범위 내에서, 본 명세서에 기재된 항-메소텔린 특이적 결합 항체의 서열뿐만 아니라, 이의 생물학적 균등물도 포함할 수 있다. 예를 들면, 항체의 결합 친화도 및/또는 기타 생물학적 특성을 보다 더 개선시키기 위하여 항체의 아미노산 서열에 추가적인 변화를 줄 수 있다.

- [36] 예를 들어, 상기 항체는 보존적 치환을 통해서 항체의 아미노산 서열이 치환될 수 있다. 여기서 "보존적 치환"이란 1개 이상의 아미노산을 해당 폴리펩티드의 생물학적 또는 생화학적 기능의 손실을 야기하지 않는 유사한 생화학적 특성을 갖는 아미노산으로 치환하는 것을 포함하는 폴리펩티드의 변형을 지칭한다. "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기를 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체시키는 치환이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 부류는 당업계에 규정되어 있다. 이들 부류는 염기성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 대전되지 않은 극성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비-극성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지된 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)을 포함한다. 일 양상에 따른 항체가 보존적 아미노산 치환을 통해 항체의 일부 아미노산 서열이 치환되더라도 여전히 원래의 활성을 보유할 수 있음을 예상할 수 있다.
- [37] 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 일 양상의 항체 또는 이를 코딩하는 핵산 분자는 서열번호에 기재된 서열과 실질적인 동일성 (substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 열라인 (align)하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 열라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 61%의 상동성, 보다 바람직하게는 70%의 상동성, 보다 더 바람직하게는 80%의 상동성, 보다 더 바람직하게는 90%의 상동성, 보다 더 바람직하게는 95%의 상동성, 가장 바람직하게는 98%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 열라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다.
- [38]
- [39] 다른 양상은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 분리된 핵산을 제공한다.
- [40] 본 명세서에서 용어 "핵산"은 DNA 및 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미이며, 핵산에서 기본 구성단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드 뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체 (analogue)도 포함한다. 일 양상의 중쇄 및 경쇄 가변영역을 코딩하는 핵산의 서열은 변형될 수 있다. 상기 변형은 뉴클레오타이드의 추가, 결실, 또는 비보존적 치환 또는 보존적 치환을 포함한다.
- [41] 상기 핵산은 상기 핵산의 뉴클레오타이드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 실질적인 동일성은 일 양상의 뉴클레오타이드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 열라인 (align)하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 열라인 된

서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 보다 바람직하게는 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성을 나타내는 뉴클레오티드 서열을 의미한다.

[42]

[43] 또 다른 양상은 상기 분리된 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다. 상기 벡터는 적합한 숙주세포 (host cell)에서 항체 또는 그의 항체 단편의 발현을 위하여, 부분적이거나 전장인 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 DNA를 표준 분자 생물학 기술 (예를 들어 PCR 증폭 또는 목적 항체를 발현하는 하이브리도마를 사용한 cDNA 클로닝)로 수득할 수 있으며, DNA (유전자) 삽입물이 발현될 수 있도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함할 수 있다. "작동가능하게 연결된 (operably linked)"이란 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현 조절 서열과 목적하는 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결 (functional linkage)되어 있는 것으로, 발현 조절 서열에 의해 유전자가 발현될 수 있도록 연결된 것을 의미한다. 상기 "발현 조절 서열 (expression control sequence)"이란 특정한 숙주세포에서 작동가능하게 연결된 DNA 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열, 전사, 및 해독의 종결을 조절하는 서열, 개시 코돈, 종결 코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 등을 포함한다. 당업자는 형질전환시킬 숙주세포의 선택, 단백질의 발현 수준 등과 같은 인자에 따라 조절 서열을 달리 선택하여, 발현 벡터의 디자인이 달라질 수 있음을 인식할 수 있다.

[44] 상기 벡터는 클로닝과 항체 제조 분야에서 통상적으로 사용되는 벡터라면 그 종류가 특별히 제한되지 않으며, 그 예로는 플라스미드 벡터, 코스미드 벡터, 박테리오파지 벡터, 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 상기 플라스미드에는 대장균 유래 플라스미드 (pBR322, pBR325, pUC118, 및 pUC119, pET-21b(+)), 바실러스 서브틸리스 유래 플라스미드 (pUB110 및 pTP5), 및 효모 유래 플라스미드 (YEpl3, YEpl24, 및 YCp50) 등이 있으며, 상기 바이러스는 레트로바이러스, 아데노바이러스 또는 백시니아 바이러스와 같은 동물 바이러스, 배칼로 바이러스와 같은 곤충 바이러스 등이 사용될 수 있다. 파지 표시 등에 통상적으로 사용되는 pComb3 계열의 벡터를 사용할 수도 있고, 항체를 포유류 세포에서 발현하기 위하여 포유류 세포에서 단백질을 발현하기 위하여 통상적으로 사용되는 벡터, 예를 들어 pcDNA 나 pVITRO 등의 벡터를 사용할 수 있다.

[45]

[46] 또 다른 양상은 상기 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.

[47] 본 명세서에서 용어 "형질전환 (transformation)"은 본래의 세포가 가지고 있던 것과 다른 종류의 외래 유전자가 있는 DNA사슬 조각 또는 플라스미드가 세포들 사이에 침투되어 원래 세포에 존재하던 DNA와 결합함으로써 세포의

유전형질을 변화시키는 분자생물학적 기술을 의미한다. 상기 벡터는 숙주세포에 형질주입 또는 트랜스펙션 (transfection)된다. 형질주입 또는 트랜스펙션시키기 위해 원핵 또는 진핵 숙주세포 내로 외인성 핵산 (DNA 또는 RNA)을 도입하는 데에 통상 사용되는 여러 종류의 다양한 기술, 예를 들어 전기영동법, 인산칼슘 침전법, DEAE-텍스트란 트랜스펙션 또는 리포펙션 (lipofection) 등을 사용할 수 있다. 일 양상에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 박테리아 (*E. coli*)나 효모 (Yeast)등의 미생물, 또는 포유류 세포에의 적용 가능성을 고려하여 진핵 세포, 바람직하게는 포유류 숙주세포에서 발현될 수 있다. 상기 포유류 숙주세포는 예를 들어, 중국 햄스터 난소 (Chinese Hamster Ovary: CHO) 세포, NSO 골수종 세포, COS 세포, SP2 세포, F2N 세포, HEK293 세포 및 항체 생산 하이브리도마 세포로 이루어지는 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[48]

[49] 또 다른 양상은 상기 숙주세포를 배양하여 항체를 발현시키는 단계를 포함하는 항-메소텔린 항체를 제조하는 방법을 제공한다.

[50]

상기 방법은 일 양상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생산하기 위한 숙주세포를 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 DNA가 작동가능하게 연결된 벡터로 형질전환하는 단계를 포함할 수 있다. 선택된 숙주세포와 재조합 발현 벡터의 종류는 앞서 서술한 바와 같으며, 적절한 형질전환 방법을 선택하여 본 단계를 실시할 수 있다. 상기 항체 유전자를 코딩하는 재조합 발현 벡터가 포유류 숙주세포 내로 도입될 경우 항체는 숙주세포에서 항체가 발현되게 하기에 충분한 기간 동안, 또는 더 바람직하게는 숙주세포가 배양되는 배양 배지 내로 항체가 분비되게 하기에 충분한 기간 동안 숙주세포를 배양함으로써 제조될 수 있다.

[51]

또한, 상기 방법은 추가적으로 상기 형질전환된 숙주세포를 배양하여 숙주세포에 도입된 재조합 발현 벡터로부터 일 양상에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 폴리펩티드가 생산되도록 하는 단계를 포함할 수 있다. 선택한 숙주세포를 배양하기 위한 배지 조성과 배양 조건, 배양 시간 등을 적절하게 선택할 수 있으며, 숙주세포에서 생산되는 항체 분자는 세포의 세포질 내에 축적되거나, 적절한 신호 서열에 의하여 세포 외부 또는 배양 배지로 분비되거나, 페리플라즈م 등으로 표적화되도록 할 수 있다. 또한, 일 양상에 따른 항체가 메소텔린에 대한 결합특이성을 유지하도록 당업계에 공지되어 있는 방법을 이용하여 단백질 리폴딩 시키고 기능성 구조를 갖도록 할 수 있다. 또한 IgG 형태의 항체를 생산하는 경우, 중쇄와 경쇄는 별개의 세포에서 발현시키고 별도의 단계에서 중쇄와 경쇄를 접착시켜 완전한 항체를 구성하도록 제조할 수도 있고, 중쇄와 경쇄를 동일한 세포에서 발현되도록 하여 세포 내부에서 완전한 항체를 형성하도록 할 수도 있다.

[52]

또한, 상기 방법은 숙주세포에서 생산된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을

수득하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다. 숙주세포에서 생산된 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 폴리펩티드의 특성, 숙주세포의 특성, 발현 방식 또는 폴리펩티드의 표적화 여부 등을 고려하여 수득 방법을 적절히 선택 및 조절할 수 있다. 예를 들어, 배양 배지로 분비된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 숙주세포를 배양한 배지를 수득하고, 원심 분리하여 불순물을 제거하는 등의 방법으로 항체를 회수할 수 있고, 필요에 따라 세포 내 특정 소기관이나 세포질에 존재하는 항체를 세포 외부로 방출하여 회수하기 위하여 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 기능적 구조에 영향을 미치지 않는 범위에서 세포를 용해시킬 수도 있다.

- [53] 수득한 항체는 크로마토그래피, 필터 등에 의한 여과, 투석 등의 방법을 통해 불순물을 더욱 제거하고 농축하는 과정을 추가로 거칠 수 있다. 수득한 항체의 분리 또는 정제는 통상의 단백질에서 사용되고 있는 분리, 정제 방법, 예를 들어 크로마토그래피에 의해 수행될 수 있다. 상기 크로마토그래피는 예를 들어, 단백질 A 컬럼, 단백질 G 컬럼, 단백질 L 컬럼을 포함하는 친화성 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피 또는 소수성 크로마토그래피를 포함할 수 있다. 상기 크로마토그래피 이외에, 추가로 여과, 초여과, 염석, 투석 등을 조합함으로써 항체를 분리, 정제할 수 있다.
- [54]
- [55] 또 다른 양상은 항원 결합 도메인, 힌지 (hinge) 도메인, 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체를 제공한다.
- [56] 상기 키메라 항원 수용체는 메소텔린에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하므로, 메소텔린에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함한다.
- [57] 상기 항원 결합 도메인은 서열번호 1로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열번호 2로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 서열번호 3으로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3, 및 서열번호 4로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열번호 5로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 서열번호 6으로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3; 또는
- [58] 서열번호 13으로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열번호 14로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 서열번호 15로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3, 및 서열번호 16으로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열번호 17로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 서열번호 18로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3을 포함할 수 있으며, 이는 일 양상에 따른 항-메소텔린 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 동일하므로 중복되는 설명은 생략한다.
- [59] 본 명세서에서 용어 "키메라 항원 수용체 (chimeric antigen receptor: CAR)"는 항원 결합 (인식) 도메인, 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인이 포함되어 키메라 항원 수용체의 구조를 이루고 있는 것을 의미한다.

- [60] 일 구체예에 있어서, 상기 항원 결합 단편은 scFv (single chain variable fragment)일 수 있다.
- [61] 상기 키메릭 항원 수용체에 포함되는 힌지 (hinge) 도메인, 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인은 당해 기술분야에 잘 알려져 있다.
- [62] 상기 힌지 도메인은 항-메소텔린 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 막관통 도메인을 연결하는 도메인으로서, 스페이서 (spacer)라고도 명명되고, T 세포막으로부터 항원 결합 도메인을 확장하기 위한 목적을 갖는다. 상기 힌지 도메인은 CD8 힌지 도메인, IgG1 힌지 도메인, Ig4 힌지 도메인, CD28 세포외 영역, KIR (killer immunoglobulin-like receptor) 세포외 영역 및 이의 조합일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고 본 기술분야에서 통상적으로 사용하는 힌지 도메인을 사용할 수 있다.
- [63] 상기 막관통 도메인은 키메릭 항원 수용체 분자의 지지대 역할을 함과 동시에 힌지 도메인과 세포내 신호전달 도메인을 연결할 수 있다. 막관통 도메인은 키메릭 항원 수용체의 항-메소텔린 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 세포 표면에 위치하고, 세포내 신호전달 도메인이 세포 내에 위치하도록 세포의 세포막을 관통할 수 있다. 상기 막관통 도메인은 CD3제타 (CD3z), CD4, CD8, CD28 또는 KIR 단백질의 막관통 영역일 수 있으며, 바람직하게는 CD8 또는 CD28의 막관통 도메인을 사용할 수 있으나, 키메릭 항원 수용체 제조에 사용되는 통상적인 막관통 도메인이라면 제한없이 사용할 수 있다.
- [64] 상기 세포내 신호전달 도메인은 항-메소텔린 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 의해 전달된 신호를 받아, 키메릭 항원 수용체가 결합된 세포 내로 이를 전달하는 역할을 한다. 상기 세포내 신호전달 도메인은 세포 외에 존재하는 항원 결합 부위에 항체가 결합하면, T 세포 활성화를 가져올 수 있는 신호를 전달하는 부분이라면 특별히 그 종류에 제한되지 않으며, 다양한 종류의 세포내 신호전달 도메인이 사용될 수 있다. 상기 세포내 신호전달 도메인은 예를 들어, 면역수용체 티로신-기초한 활성화 모티프 (tyrosine-based activation motif) 또는 ITAM일 수 있으며, 상기 ITAM은 CD3제타, FcR 감마, FcR 베타, CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CDS, CD22, CD79a, CD79b, CD66d 또는 FcεRIγ에서 유래한 것을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [65] 또한, 일 양상에 따른 키메릭 항원 수용체는 세포내 신호전달 도메인과 함께 공동자극 도메인 (costimulatory domain)을 추가로 포함할 수 있다.
- [66] 상기 공동자극 도메인은, 세포내 신호전달 도메인에 의한 신호에 더하여, T 세포에 신호를 전달하는 역할을 수행하는 부분으로서, 공동자극 분자의 세포 내 도메인을 포함하는, 키메릭 항원 수용체의 세포 내 부분을 의미한다.
- [67] 상기 공동자극 분자는 세포 표면 분자로서, 항원에 대한 림프구의 충분한 반응을 가져오는데 필요한 분자를 의미하며, 그 예로 CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, 또는 B7-H3일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기

공동자극 도메인은 이러한 공동자극 분자 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 분자의 세포 내 부분일 수 있다.

- [68] 상기 막통과 도메인, 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메릭 항원 수용체의 각 도메인들은 선택적으로 짧은 올리고펩티드 또는 폴리펩티드 링커에 의해 연결될 수 있다. 상기 링커는 세포 외에 위치한 항체에 항원이 결합하였을 때, 세포 내 도메인을 통한 T 세포 활성화를 유도할 수 있는 것이라면, 특별히 그 길이에 제한되지 않고 당업계에서 알려진 링커를 사용할 수 있다.
- [69] 또한, 상기 키메릭 항원 수용체는 전술한 바와 같은 항체 및 도메인들의 변형된 형태를 포함할 수 있다. 이때, 상기 변형은 상기 항체 및 도메인들의 기능을 변형시키지 않고, 야생형의 항체 및 도메인의 아미노산 서열에서 하나 이상의 아미노산을 치환, 결실 또는 추가하여 수행될 수 있다. 통상적으로, 상기 치환은 알라닌이거나, 전체 단백질의 전하, 극성 또는 소수성에 영향을 주지 않는 보존적 아미노산 치환 (conservative amino acid substitution)에 의해 수행될 수 있다.
- [70]
- [71] 또 다른 양상은 상기 키메릭 항원 수용체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [72] 상기 폴리뉴클레오티드는 코돈의 축퇴성 (degeneracy)으로 인하여 또는 상기 항원 수용체를 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 코딩영역으로부터 발현되는 항원 수용체의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있고, 코딩영역을 제외한 부분에서도 유전자의 발현에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 다양한 변형 또는 수식이 이루어질 수 있으며, 그러한 변형 유전자 역시 본 발명의 범위에 포함됨을 당업자는 잘 이해할 수 있을 것이다. 즉, 일 양상에 따른 폴리뉴클레오티드는 이와 동등한 활성을 갖는 단백질을 코딩하는 한, 하나 이상의 핵산 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있으며, 이들 또한 본 발명의 범위에 포함된다.
- [73]
- [74] 또 다른 양상은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 및 상기 벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.
- [75] 상기 벡터는 당 분야에 공지된 벡터를 다양하게 사용할 수 있고, 상기 항원 수용체를 생산하고자 하는 숙주세포의 종류에 따라 프로모터 (promoter), 종결자 (terminator), 인핸서 (enhancer) 등과 같은 발현조절 서열, 막 표적화 또는 분비를 위한 서열 등을 적절히 선택하고 목적에 따라 다양하게 조합할 수 있다. 본 발명의 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현

조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다.

- [76] 또한, 상기 벡터를 세포에 도입하여 세포를 형질전환시킬 수 있고, 상기 세포는 이에 제한되는 것은 아니나 T 세포, NK 세포, NKT 세포 또는 감마델타 T 세포 (gamma delta ($\gamma\delta$) T cells)일 수 있다. 상기 세포는 골수, 말초혈액, 말초혈액단핵세포 또는 제대혈로부터 얻거나 제조될 수 있다.
- [77]
- [78] 또 다른 양상은 상기 세포를 포함하는 약학적 조성물; 상기 세포의 의약적 용도; 및 치료학적 유효량의 상기 세포를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [79] 상기 약학적 조성물은 전술한 세포를 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [80] 상기 약학적 조성물 또는 의약적 용도는 암의 예방 또는 치료를 위한 것일 수 있다.
- [81] 본 명세서에서 용어, "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 암 (종양)을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [82] 본 명세서에서 용어, "치료"란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 암 (종양)에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [83] 본 명세서에서 용어, "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 설치류 (랫트, 생쥐, 기니피그 등), 생쥐 (mouse), 개, 고양이, 말, 소, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양 등의 포유류를 의미한다.
- [84] 본 명세서에서 용어 "암"은 세포가 정상적인 성장 한계를 무시하고 분열 및 성장하는 공격적 (aggressive) 특성, 주위 조직에 침투하는 침투적 (invasive) 특성 및 체내의 다른 부위로 퍼지는 전이적 (metastatic) 특성을 갖는 세포에 의한 질병을 총칭한다. 본 명세서에서, 상기 암은 악성 종양 (malignant tumor)과 동일한 의미로 사용되며, 바람직하게는 메소텔린-양성 또는 메소텔린을 과발현하는 암일 수 있다.
- [85] 상기 암은 바람직하게는 고형암일 수 있으며, 예를 들어, 보다 바람직하게는 메소텔린-양성 또는 메소텔린을 과발현하는 고형암일 수 있다. 예를 들어, 상기 고형암은 식도암 (esophageal cancer), 유방암 (breast cancer), 삼중음성 유방암 (triple-negative breast cancer: TNBC), 위암 (gastric cancer), 담관암 (cholangiocarcinoma), 췌장암 (pancreatic cancer), 대장암 (colon cancer), 폐암 (lung cancer), 흉선암 (thymic carcinoma), 중피종 (mesothelioma), 난소암 (ovarian cancer), 자궁내막암 (endometrial cancer), 자궁경부암 (cervical cancer), 자궁장액성 암종 (uterin serous carcinoma: USC) 및 소아 급성 골수성 백혈병 (acute myeloid leukemia: AML)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [86] 일 구체예에서는, 메소텔린을 과발현하는 고형암을 대상으로, 일 양상에 따른 항-MSLN-CAR-T 세포의 투여에 따른 난소암, 중피종 및 췌장암에 대한 세포사멸 효과를 확인하였다.
- [87] 상기 약학적 조성물은 약학적 조성물 전체 중량에 대하여 유효성분인 일 양상의 세포를 10 내지 95 중량%로 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 상기 유효성분 외에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 추가로 함유할 수 있다.
- [88] 상기 세포의 투여량은 질환의 종류, 질환의 중증도, 약학적 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로, 치료기간 및 동시에 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함되는 세포의 유효량은 1×10^5 내지 1×10^{11} cells/kg일 수 있다. 이때, 투여는 하루에 한번 투여할 수 있고, 수회에 나누어 투여할 수도 있다. 본원에 제시된 세포 또는 약학적 조성물의 유효량은 과도한 실험 없이도 경험적으로 결정될 수 있다.
- [89] 상기 약학적 조성물은 약학적 분야에서 통상의 방법에 따라, 목적에 적합한 제형을 갖는 제제될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 약학적 분야에서 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위 투여형의 제제로 제형화시켜 투여할 수 있다. 상기 약학적 제제에는 상기 유효성분 외에 하나 또는 그 이상의 약학적으로 허용 가능한 통상의 불활성 담체, 일 예로, 주사제의 경우에는 보존제, 무통화제, 가용화제 또는 안정화제 등을, 국소 투여용 제제의 경우에는 기제 (base), 부형제, 윤활제 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [90] 또한, 상기 세포 또는 이를 포함하는 약학적 조성물은 당업계에 공지된 다양한 방법으로 개체에 투여될 수 있고, 예를 들어 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여 등으로 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [91] 일 양상에 따른 항-메소텔린 키메릭 항원 수용체는 메소텔린에 대한 특이적 결합능을 나타내어, 메소텔린이 과발현되는 암의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [92] 도 1은 파지 디스플레이 항체 라이브러리 패닝을 통한 항체 스크리닝 과정을 모식화한 도이다.
- [93] 도 2는 고체상 패닝 (solid phase panning)에 따른 결과로서, 패닝 회차에 따른 파지 산출 역가 (output titer, A) 및 용리 역가 비율 (elution titer ratio, B)을 나타낸 도이다.
- [94] 도 3은 마그네틱 비드-매개 솔루션 패닝 (Magnetic bead-mediated solution

panning)에 따른 결과로서, 패닝 회차에 따른 파지 산출 역가 (output titer, A) 및 용리 역가 비율 (elution titer ratio, B)을 나타낸 도이다.

- [95] 도 4는 파지 ELISA를 통해 얻어진 클론들의 항원 MSLN에 대한 특이적 결합을 비교분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [96] 도 5는 메소텔린 과발현 세포주를 이용하여 선별된 클론이 실제 세포막에 존재하는 메소텔린에 결합하는지를 유세포 분석 (flow cytometry)을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [97] 도 6은 메소텔린 과발현 세포주를 이용하여 선별된 클론의 메소텔린에 대한 결합 특이성을 상대적 피크 이동 (peak shift) 값으로 나타낸 도이다.
- [98] 도 7은 정제된 항-MSLN-scFv 항체를 SDS-PAGE로 분석한 결과를 나타낸 도이다 (각 단백질 당 2 μ g씩 로딩). NR: Non-reducing condition, R: Reducing condition (100°C, 10분).
- [99] 도 8은 ELISA를 통해 항-MSLN-scFv 항체의 항원 MSLN에 대한 친화도를 분석한 결과를 나타낸 도이다. A: MSLN 34 clone, B: MSLN 37 Clone, C: MSLN 38 Clone.
- [100] 도 9는 MSLN 특이적 항원결합 도메인을 포함하는 일 양상에 따른 항-MSLN-CAR 발현 시스템의 모식도이다.
- [101] 도 10은 형질도입 1회차 이후, 항-MSLN-CAR가 도입된 T 세포에서 CAR의 발현 확인 및 CD3 양성 T 세포 중에서 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 비율을 측정된 결과를 나타낸 도이다.
- [102] 도 11은 형질도입 2회차 이후, 항-MSLN-CAR가 도입된 T 세포에서 CAR의 발현 확인 및 CD3 양성 T 세포 중에서 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 비율을 측정된 결과를 나타낸 도이다.
- [103] 도 12는 다양한 암세포주를 이용하여 항-MSLN-CAR가 도입된 T 세포의 세포사멸 효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [104] 도 13 내지 16은 항-MSLN34-CAR-T와 항-MSLN38-CAR-T의 메소텔린 특이적 세포사멸 효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [105] 도 17은 항-MSLN34-CAR-T와 항-MSLN38-CAR-T의 중피종 동물모델에서의 암세포 살상 효능 및 체중 변화에 대한 결과를 나타낸 도이다. A: 종양 부피 변화, B: 체중 변화, C: 종양 무게 변화.
- [106] 도 18은 항-MSLN34-CAR-T와 항-MSLN38-CAR-T의 췌장암 동물모델에서의 암세포 살상 효능 및 체중 변화에 대한 결과를 나타낸 도이다. A: 종양 부피 변화, B: 체중 변화, C: 종양 무게 변화.

발명의 실시를 위한 형태

- [107] 이하 일 양상을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 일 양상을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 일 양상의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니며, 일 양상의 실시예는 당업계에서 평균적인

지식을 가진 자에게 일 양상을 보다 완전하게 설명하기 위해서 제공되는 것이다.

[108]

[109] 실시예 1: 파지 디스플레이 항체 라이브러리 패닝

[110] 표적 항원인 메소텔린 (mesothelin: MSLN)에 결합하는 항체를 선별하기 위해, KBIO 인간 합성 scFv 파지디스플레이 라이브러리 KscFv-I을 이용하여 오송첨단의료산업진흥재단 신약개발지원센터에서 구축한 파지 패닝 프로토콜에 따라 MSLN (Acro Biosystems)에 대한 파지 패닝을 4회차까지 수행하였다. 파지 디스플레이 항체 라이브러리 패닝 과정을 도 1에 모식화하여 나타내었다.

[111] 패닝은 항원을 고정하는 방식에 따라 두 가지 방법 (solid, bead)으로 수행하였다. 고체상 패닝 (solid phase panning)의 경우, 인간 메소텔린 단백질 (PBS에서, 1차: 10 μ g/mL, 2차: 5 μ g/mL, 3차: 2.5 μ g/mL, 4차: 1.25 μ g/mL 1mL를 면역 튜브 (immuonotube)에 고정시키고, 상기 면역 튜브에 5% 탈지유 (skim milk)가 포함된 PBS (MPBS) 5mL로 블로킹한 파지 라이브러리 1.3 x 10¹³ c.f.u.를 섞어준 다음 37°C에서 1.5시간 동안 결합시켰다. 그런 다음, PBS-Tween20 (0.05%) (PBS-T) 5mL로 세척하여 결합되지 않은 파지들을 제거하였다 (1차: 3회 세척, 2~4차: 5회 세척). 여기에 100mM 트리메틸아민 (trimethylamine: TEA) 1mL를 튜브에 첨가하여 상온에서 10분간 반응시켜 결합된 파지를 용출시키고, 용출된 파지는 50mL 팔콘 튜브 (Falcon tube)로 옮기고 1M Tris-HCl (pH 7.4) 0.5mL와 잘 섞어 중화시켰다. 상기 용출된 파지를 중간-로그 단계의 *E. coli* TG1 (OD600 = 0.5~0.8) 8.5mL에 감염시켰다. 형질감염된 *E. coli* TG1의 일부는 서열 확인을 위해 플라스미드 DNA를 추출하고, 일부는 파지 ELISA를 통해 항체 스크리닝을 진행하였다. 마그네틱 비드-매개 솔루션 패닝 (Magnetic bead-mediated solution panning)의 경우, 고체상 패닝과 동일한 프로토콜로 수행하되 메소텔린 항원을 면역 튜브 대신 마그네틱 비드 (magnetic bead)에 처리하여 고정시켰다. 공통적으로, 패닝 시 MSLN 단백질이 고정되지 않은 PBS 대조군 패닝도 함께 병행하여 각각의 산출 역가 (output titer)를 매 회차마다 비교하고, 용리 역가 비율 (elution titer ratio, 산출 역가를 대조군의 산출 역가로 나눈 값)을 통해 파지의 농축 (enrichment) 정도를 모니터링하였다. 그 결과를 도 2 및 3에 나타내었다.

[112] 고체상 패닝의 경우, 3회차부터 농축이 시작되어 항원 MSLN에 대한 산출 역가는 PBS 대조군 대비 약 53.4배 (3차), 1061.6배 (4차)의 큰 차이를 보였다 (도 2). 마그네틱 비드를 이용한 패닝의 경우, 3회차 및 4회차의 농축 정도가 항원 MSLN에 대해 PBS 대조군 대비 약 2.0배 (3차), 1.6배 (4차)로 차이를 보이지 않았다 (도 3).

[113]

[114] 실시예 2: 파지 ELISA (phage-specific ELISA)를 통한 양성 클론의 선별

[115] 상기 실시예 1의 파지 패닝에 따라 수득한 파지들 중에서 항원 MSLN에 특이적으로 결합하는 클론 (clone)을 선별하기 위해, 면역 튜브를 이용한 패닝

2회차에서 얻은 282 (94 콜로니 x 3 플레이트)개 클론에 대하여 단일클론 파지 ELISA를 수행하였다. 구체적으로, 96-하프 (half) 웰 ELISA 플레이트에 1 μ g/mL의 인간 MSLN 단백질 (항원)을 웰당 30 μ L씩 넣고 4°C에서 밤새 배양하여 코팅하였다. 음성 대조군으로, 다른 플레이트에는 PBS를 웰당 30 μ L씩 넣고 4°C에서 밤새 배양하였다. 다음 날, 플레이트 내용물을 제거하고, 5% MPBS 150 μ L를 사용하여 플레이트를 실온에서 1시간 동안 블로킹하였다. 그런 다음, 플레이트 내용물을 제거하고, 파지 (~10¹¹ c.f.u.) 30 μ L를 첨가하여 상온에서 1.5시간 동안 배양하였다. 음성 대조군의 경우, 파지 대신 PBS 30 μ L를 첨가하였다. PBS-T (PBS-0.05% Tween 20) 용액으로 플레이트를 4회 세척하고, 항-M13-HRP (PBS에서 1:5,000으로 희석)를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. PBS-T 용액으로 플레이트를 4회 세척하고 각 웰당 TMB 기질 시약 (TMB substrate)을 30 μ L씩 첨가하여 실온에서 8분 동안 배양해 발색반응을 유도하였다. 웰당 2N H₂SO₄ 30 μ L을 첨가하여 발색반응을 정지시킨 뒤 450nm에서의 흡광도 (O.D.)를 측정하였다.

- [116] 그 결과, 항원 MSLN에 대해 흡광도 컷-오프 (cut-off)를 각각 0.4 이상으로 정하여 선별하였을 때 2회차에서 총 56개의 양성 클론을 확보하였다. 추가적으로, 면역 튜브를 이용한 패닝 3회차 및 4회차에서 얻은 클론에 대하여도 동일한 방법으로 단일클론 파지 ELISA를 수행하였다. 패닝 3회차에서 얻은 752 (94 콜로니 x 8 플레이트)개 클론에 대하여 파지 ELISA를 수행하고 흡광도 컷-오프를 각각 0.7 또는 0.4 이상으로 정하여 선별한 결과, 총 173개의 양성 클론을 확보하였다. 또한, 패닝 4회차에서 얻은 188 (94 콜로니 x 2 플레이트)개 클론에 대하여 파지 ELISA를 수행하고 흡광도 컷-오프를 0.4 이상으로 정하여 선별한 결과, 총 2개의 양성 클론을 확보하였다 (표 1 내지 4).

- [117] [표1]

2회차 패닝 (2 Round)	흡광도 (450nm)	양성 클론 (positive clone)의 수	특이 클론 (unique clone)의 수
2R-1	> 0.4	25	1
2R-2	> 0.4	14	1
2R-3	> 0.4	17	1
총합		56	3

[118] [표2]

3회차 패닝 (3 Round)	흡광도 (450nm)	양성 클론 (positive clone)의 수	특이 클론 (unique clone)의 수
3R-6	> 0.7	6	0
3R-7	> 0.4	9	1
3R-8	> 0.4	40	1
3R-9	> 0.4	9	0
3R-10	> 0.4	31	3
3R-11	> 0.4	37	0
3R-12	> 0.4	23	1
3R-13	> 0.4	18	0
총합		173	6

[119] [표3]

4회차 패닝 (4 Round)	흡광도 (450nm)	양성 클론 (positive clone)의 수	특이 클론 (unique clone)의 수
4R-4	> 0.4	1	0
4R-5	> 0.4	1	0
총합		2	0

[120] [표4]

2 + 3 + 4회차 패닝	총합
양성 클론 (positive clone)의 수	231
특이 클론 (unique clone)의 수	23
특이 클론의 수 (중복 클론 제외)	9

[121] 다음으로, 상기 실시예 1의 파지 패닝에 따라 수득한 파지들 중에서 항원 MSLN에 특이적으로 결합하는 클론을 추가적으로 더 선별하기 위해, 마그네틱 비드를 이용한 패닝 3회차 및 4회차에서 얻은 클론에 대하여도 동일한 방법으로 단일클론 파지 ELISA를 수행하였다. 패닝 3회차에서 얻은 188 (94 콜로니 x 2 플레이트)개 클론에 대하여 파지 ELISA를 수행하고 흡광도 컷-오프를 각각 0.4 이상으로 정하여 선별한 결과, 총 4개의 양성 클론을 확보하였다. 또한, 패닝 4회차에서 얻은 376 (94 콜로니 x 4 플레이트)개 클론에 대하여 파지 ELISA를 수행하고 흡광도 컷-오프를 0.4 이상으로 정하여 선별한 결과, 총 7개의 양성 클론을 확보하였다 (표 5 내지 7).

[122] [표5]

3회차 패닝 (3 Round)	흡광도 (450nm)	양성 클론 (positive clone)의 수	특이 클론 (unique clone)의 수
B-3R-1	> 0.4	4	2
B-3R-2	> 0.4	0	0
총합		4	2

[123] [표6]

4회차 패닝 (4 Round)	흡광도 (450nm)	양성 클론 (positive clone)의 수	특이 클론 (unique clone)의 수
B-4R-1	> 0.4	0	0
B-4R-2	> 0.4	2	2
B-4R-3	> 0.4	5	3
B-4R-4	> 0.4	0	0
총합		7	5

[124] [표7]

3 + 4회차 패닝		총합
양성 클론 (positive clone)의 수		11
특이 클론 (unique clone)의 수		7
특이 클론의 수 (중복 클론 제외)		7

[125] 실시예 3: 항-MSLN 항체 단편 후보 선별을 위한 서열분석 및 ELISA

[126] 상기 실시예 2에서 선별한 총 415 종의 양성 클론들로부터 파지를 회수한 다음 DNA 서열 분석을 진행하였고, 카바트 (Kabat) 넘버링 시스템에 따라 서열들을 정렬하여 그룹핑하였다. 그 결과, CDR 서열이 다른 항원 MSLN에 대한 16종의 특이 클론 (unique clone)을 선별하였다. 상기 16종 클론의 항원 MSLN에 대한 특이적 결합을 확인하기 위하여 각 파지를 정제하여 파지 역가 (phage titer)를 동일하게 맞춘 후 (1.2×10^{11} pfu/웰), ELISA를 통해 비교하였다. 음성 대조군으로는 MSLN과 동일하게 히스티딘 태그 (His tag)에 접합된 TLR4 항원을 사용하였고, 양성 대조군으로는 이전 연구에서 메소텔린과의 우수한 결합능을 확인한 클론 MSLN3을 사용하였다 (하기 표 8 참조). 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[127] [표8]

클론	영역	아미노산 서열	서열 번호
MSLN 3	HCDR 1	DYAMS	32
	HCDR 2	AISSSGGTTYADSVKG	33
	HCDR 3	EEEGEWREYFDV	34
	LCDR 1	RASQSISSYLN	35
	LCDR 2	ATSTLQS	36
	LCDR 3	QQSYTFPYT	37
	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWVR QAPGKGLEWVSAISSSGGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEEGEWREYFDVWGQ GTLVTVSS	38
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQK PGKAPKLLIYATSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQP EDFATYYCQQSYTFPYTFGQGTKVEIK	39

[128] 도 4에 나타난 바와 같이, 16종 클론 중 MSLN26, MSLN30 및 MSLN31을 제외한 13종 클론이 항원 MSLN에 특이적으로 결합함을 확인하였다.

[129]

[130] 실시예 4: 메소텔린 과발현 세포주를 이용한 결합능 확인

[131] 상기 실시예 3에서 선별한 16종의 파지 클론이 실제 세포막에 존재하는 메소텔린에 결합하는지 알아보기 위하여, 메소텔린 과발현 세포주인 체장암 세포주 AsPC-1 및 대조군으로 인간 만성골수백혈병 세포주 K562를 사용하여 유세포 분석(flow cytometry analysis)을 수행하였다.

[132] 구체적으로, K562 및 AsPC-1 세포를 10^6 cells/웰이 되도록 준비하여 PBS 300 μ L로 세척하였다. 4% MPBS 300 μ L로 4°C에서 30분 동안 세포를 블로킹하고, 동시에 파지 클론 (10^{12} /웰)을 상온에서 1시간 동안 동일하게 블로킹한 후 파지와 세포를 4°C에서 2시간 동안 함께 배양하였다. PBS로 세포를 세척한 후

항-M13-FITC를 1 μ g/mL을 처리하고 4°C에서 1시간 동안 배양하였다. PBS로 세포를 세척한 후, PBS에 세포를 재현탁 시켜 유세포분석기 (BD biosciences)를 이용하여 결과를 분석하였다. 그 결과를 도 5 및 6에 나타내었다.

[133] 도 5에 나타낸 바와 같이, MSLN34, MSLN37 및 MSLN38이 췌장암 세포주 AsPC-1에서 5.0% 이상의 상대적 피크 이동 (peak shift) 값을 나타냄을 확인하였다. 대조군인 K562 세포주에서는 유의한 수준의 피크의 이동이 나타나지 않았다. 상기 결과를 통해, 16종의 클론 중 MSLN34, MSLN37 및 MSLN38이 실제 세포막에 존재하는 메소텔린에 대해 높은 결합 친화성을 보임을 알 수 있었다.

[134] 또한, 도 6에 나타낸 바와 같이, 유세포 분석 결과를 정량화 한 결과 MSLN34, MSLN37 및 MSLN38은 대조군인 K562 세포에 비해 각각 16.2%, 5.9% 및 30.8%의 상대적 피크 이동 값을 보임을 확인하였다. 상기 결과를 통해, 3개 클론 모두 메소텔린이 과발현된 세포주에 특이적으로 결합함을 확인하여, 항-MSLN 항체 단편 생산을 위한 클론으로 최종 선별하였다.

[135]

[136] 실시예 5: 항-MSLN 항체 단편 생산 및 정제

[137] 상기 실시예 4에서 선별한 3종 클론을 사용하여, 항체 단편 발현 균주인 Top10F' competent *E. coli*를 형질전환 (transformation)하였다. 그런 다음, 3종 클론으로 형질전환된 *E. coli* 균주를 각각 TB 배지 200mL에서 배양하면서, IPTG (최종농도 0.5mM)로 단백질 발현을 유도한 뒤, 30°C에서 밤새 배양하였다. 상기 배양액을 원심분리하여 세포를 획득하고, 세포형질 추출 (periplasmic extraction)을 통해 수용성 단백질을 확보한 후, 단백질 L 레진 (Protein L resin)을 이용한 친화도 크로마토그래피 (affinity chromatography)를 통해 항-MSLN-scFv 항체를 정제하였다. 상기 정제된 항체 단백질을 SDS-PAGE로 분석하여, 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[138] 상기 정제된 3종 항체 (MSLN34, MSLN37 및 MSLN38)의 아미노산 서열을 확인하여 하기 표 9에 나타내었다. 구체적으로, MSLN34의 중쇄 CDR1-3 아미노산 서열을 각각 서열번호 1 내지 3에, 경쇄 CDR1-3 아미노산 서열을 각각 서열번호 4 내지 6에 나타내고, MSLN37의 중쇄 CDR1-3 아미노산 서열을 각각 서열번호 7 내지 9에, 경쇄 CDR1-3 아미노산 서열을 각각 서열번호 10 내지 12에 나타내고, MSLN38의 중쇄 CDR1-3 아미노산 서열을 각각 서열번호 13 내지 15에, 경쇄 CDR1-3 아미노산 서열을 각각 서열번호 16 내지 18에 나타내었다.

[139] [표9]

클론	영역	아미노산 서열	서열 번호
MSLN34	HCDR 1	DYGMH	1
	HCDR 2	SIYGSGGHTGYADSVKG	2
	HCDR 3	QHAYRYSYAFDV	3
	LCDR 1	RASQSIWNLN	4
	LCDR 2	ATSSLQS	5
	LCDR 3	QQSYSPFT	6
MSLN37	HCDR 1	SYAMH	7
	HCDR 2	GISGSGGTTYADSVKG	8
	HCDR 3	EVEGQSQEYFDI	9
	LCDR 1	RASQSIANYLN	10
	LCDR 2	AASNLQS	11
	LCDR 3	QQSYSPYT	12

MSLN38	HCDR 1	SYAMS	13
	HCDR 2	GISGSGGSTGYADSVKG	14
	HCDR 3	HGQVGGISVFDI	15
	LCDR 1	RASQSI SNWLN	16
	LCDR 2	ATSRLQS	17
	LCDR 3	QQSYSPWT	18
MSLN34	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHW VRQAPGKGLEWVSSIYGSGGHTGYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQHAYRYSYAF DVGQGTLTVSS	19
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI SNWLNWYQ QKPGKAPKLLIYATSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSPFTFGQGGTKVEIK	20
MSLN37	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHW VRQAPGKGLEWVSGISGSGGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEVEGQSQEYFD IWGQGTLTVSS	21
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI ANYLNWYQ QKPGKAPKLLIYAASNLSGVPSPRFSGSGSGTDFTLTIS SSLQPEDFATYYCQQSYSPFTFGQGGTKVEIK	22
MSLN38	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKGLEWVSGISGSGGSTGYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHGQVGGISVFD IWGQGTLTVSS	23
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI SNWLNWYQ QKPGKAPKLLIYATSRQLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSPWTFGQGGTKVEIK	24

[140] 실시예 6: 항-MSLN 항체의 항원에 대한 친화도 분석

[141] 상기 실시예 5에서 제조한 3종의 항-MSLN 항체 단백질을 이용한 ELISA를

통해 각 항체의 항원 MSLN에 대한 친화도를 비교 분석하였다. 구체적으로, MaxiSorb ELISA 플레이트 (Nunc)에 인간 메소텔린 단백질 30 μ L을 웰당 1 μ g/mL의 농도로 코팅하고 4°C에서 밤새 배양하였다. 플레이트 내용물을 제거하고, 5% MPBS 300 μ L를 사용하여 플레이트를 실온에서 1시간 동안 블로킹하였다. 정제된 항체를 PBS에서 연속적으로 희석하여 각 웰에 30 μ L씩 첨가하고 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 음성 대조군으로는, 정제된 항체 대신 PBS 60 μ L를 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 배양하였다.

[142] PBS-T (PBS-0.05% Tween 20) 용액으로 플레이트를 4회 세척하고, 항-StrepMAB HRP (PBS에서 1:5,000으로 희석) 30 μ L를 첨가하여 실온에서 1시간 동안 배양하였다. PBS-T 용액으로 플레이트를 4회 세척하고 각 웰당 TMB 기질 시약을 30 μ L씩 첨가하여 실온에서 8분 동안 배양해 발색반응을 유도하였다. 웰당 2N H₂SO₄ 30 μ L를 첨가하여 발색반응을 정지시킨 뒤 450nm에서의 흡광도 (O.D.)를 측정하였다. 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[143] 도 8에 나타낸 바와 같이, 3종 항체 중에서는 MSLN34가 EC₅₀ 값이 83nM으로 가장 높은 결합 친화도를 보임을 확인하였다.

[144]

[145] **실시예 7: 항-MSLN 키메라 항원 수용체 구축**

[146] 상기 실시예 5에서 제조한 항-MSLN 항체 단백질 중 메소텔린이 과발현된 세포주와 높은 결합 특이성을 보인 MSLN34 및 MSLN38을 바탕으로 항-MSLN 키메라 항원 수용체를 구축하였다 (항-MSLN-CAR).

[147]

[148] **7-1: 항-MSLN-CAR 렌티바이러스 벡터 클로닝**

[149] 벡터로는 신약개발지원센터에서 보유한 2세대 CAR 렌티바이러스용 벡터 (pLV lentiviral vector) 시스템에 속하는 것으로, 상기 시스템은 gag/pol을 코딩하는 pMDLg/pRRE (addgene), Rev 단백질을 코딩하는 외피 (envelope) 플라스미드 pRSV-Rev (addgene) 및 VSV-G 단백질을 코딩하는 외피 플라스미드 pMD2.G (addgene)를 모두 포함한다.

[150] 먼저, 실시예 5에서 제조한 항-MSLN scFv (항원결합 도메인)에 대하여 유전자 클로닝을 실시하였다. MSLN34 및 MSLN38 각각의 항-MSLN scFv와 렌티바이러스 벡터를 XhoI (R0146S, NEB)과 EcoRI (R0101, NEB)로 37°C에서 2시간 동안 절단 (digestion)하고, 아가로스 젤 전기영동한 후, 확인된 산물을 FavorPrep Gel/PCR purification Mini kit (Favorgen)를 사용하여 정제하였다. 정제된 각각의 항-MSLN scFv (100 ng)와 벡터(50 ng)를 2:1의 비율로 16°C에서 16시간 동안 반응시켜 라이게이션 (ligation) 진행한 후, Stbl3 competent cell에 형질전환시켜 콜로니를 수득하였다. 상기 콜로니를 취해 LB 배지 (암피실린) 5mL에서 키워 DNA 플라스미드 미니프렙 (mini-prep)법을 이용하여 플라스미드 DNA를 얻었다. 상기 플라스미드 DNA를 XhoI, EcoRI로 절단하여 삽입시킨 각각의 항-MSLN scFv가 벡터 내에 잘 클로닝 되었는지 확인하였다. 이후

시퀀싱을 하여 최종적으로 DNA 서열을 확인하였다.

- [151] 상기 항-MSLN scFv에 CD8 힌지 (hinge) 및 CD8 TM (transmembrane)을 막관통 영역으로, 4-1BB의 세포질 영역을 신호전달 도메인으로, CD3 제타 (CD3z)의 세포내 도메인을 T 세포 활성화 도메인으로 순차적으로 연결하여 항-MSLN-CAR를 구성하였다. 구체적으로, CD8 신호 서열 (Signal peptide, SP) (서열번호 25), 항-MSLN34 scFv (서열번호 26) 또는 항-MSLN38 scFv (서열번호 27), CD8 힌지 영역 (서열번호 28), CD8 막관통 영역 (서열번호 29), 4-1BB 신호전달 도메인 (서열번호 30) 및 CD3 제타 신호전달 도메인 (서열번호 31)으로 구성된다. 상기 각 도메인을 각각의 제한효소를 이용하여 순차적으로 연결하였고, 각 도메인에 대응하는 구체적인 염기서열 정보를 하기 표 10에 정리하였다.

[152] [표10]

이름	염기서열 (5'-3')	서열 번호
CD8	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTT GCTGCTCCACGCCGCCAGGCCG	25
MSLN3 4 scFv	GAAGTACAGTTGGTCGAAAGTGGCGGTGGCCTCGTGCAAC CGGGTGGTTCAGTGCCTGAGCTGCGCCGCCTCGGGTTTT ACTTTCTCTGATTATGGTATGCACTGGGTTCGTCAGGCGCC GGGCAAGGGTCTCGAATGGGTTTCATCTATCTACGGTTCTG GTGGTCACACTGGTTATGCCGATTCAGTGAAGGGTCGCTTT ACCATTTCCCGTGACAACCTCTAAGAATACTCTGTATCTGCA GATGAACTCGCTGCGTGCCGAAGACACGGCCGTCTATTATT GCGCCAAACAGCATGCATACCGTTACTCTTACGCATTCGAT GTTTGGGGTCAGGGCACTTTAGTGACCGTCTCATCGGGTGG AGGCGGTTCAAGCGGAGGTGGATCCGGCGGTGGCGGATCG GACATTCAAATGACGCAGAGTCCCTCCTCACTGAGTGCTAG CGTGGGCGATCGTGTGACAATTACTTGTCGCGCTAGCCAGT CTATCTCTAATTGGCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCGGGC AAGGCGCCAAAATTGCTGATTTACGCAACTTCCTCTCTGCA GTCTGGTGTACCGTCCCGTTTCTCTGGCAGCGGTTCTGGTA CGGATTTTACCCTGACCATCTCAAGCCTCCAGCCTGAAGAT TTTGCCACCTATTATTGTCAGCAATCTTACTCTTTTCCGTTT ACGTTGCGGCAGGGAATAAAGTGGAATTAAGCCAGCA CC	26
MSLN3 8 scFv	GAAGTACAGTTGGTCGAAAGTGGCGGTGGCCTCGTGCAAC CGGGTGGTTCAGTGCCTGAGCTGCGCCGCCTCGGGTTTT ACTTTCTCTTCTTATGCAATGTCTTGGGTTCGTCAGGCGCCG GGCAAGGGTCTCGAATGGGTTTCAGGTATCTCTGGTTCTGG TGGTCTACTGGTTATGCCGATTCAGTGAAGGGTCGCTTTA CCATTTCCCGTGACAACCTCTAAGAATACTCTGTATCTGCAG ATGAACTCGCTGCGTGCCGAAGACACGGCCGTCTATTATTG CGCCAAACATGGTCAGGTTGGTGGTATCTCTGTTTTCGATA TCTGGGGTCAGGGCACTTTAGTGACCGTCTCATCGGGTGGA GGCGGTTCAAGCGGAGGTGGATCCGGCGGTGGCGGATCGG ACATTCAAATGACGCAGAGTCCCTCCTCACTGAGTGCTAGC GTGGGCGATCGTGTGACAATTACTTGTCGCGCTAGCCAGTC TATCTCTAATTGGCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCGGGC	27

	AAGGCGCCAAAATTGCTGATTTACGCAACTTCCCGTCTGCA GTCTGGTGTACCGTCCCGTTTCTCTGGCAGCGGTTCTGGTA CGGATTTTACCCTGACCATCTCAAGCCTCCAGCCTGAAGAT TTTGCCACCTATTATTGTCAGCAATCTTACTCTTTTCCGTGG ACGTTTCGGGCAGGGAATAAGTGGAAATTAAAGCCAGCA CC	
CD8 hinge	ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCA CCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGC CGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGGCTG GACTTCGCCTGTGAT	28
CD8 TM	ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCT TCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGC	29
4-1BB	AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAAC CATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGG CTGTAGCTGCCGATTTCAGAAAGAAGAAGAGGAGGATGT GAACTG	30
CD3z	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACA CAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAG GACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGG CCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAA CCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAG ATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGC GCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCT CAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATG CAGGCCCTGCCCCCTCGC	31

[153] 7-2: 항-MSLN-CAR이 탑재된 렌티바이러스 생산

[154] 상기 실시예 7-1에서 제작한 재조합 벡터를 HEK293T 세포에 도입하여 항-MSLN-CAR 렌티바이러스를 생산하였다. MSLN 특이적 항원결합 도메인을 포함하는 일 양상에 따른 항-MSLN-CAR 발현 시스템의 모식도를 도 9에 나타내었다. 먼저, DNA 형질전환 하루 전날 100mm 조직배양 디쉬에 HEK293T 세포를 6×10^6 cells/디쉬로 시딩하였다. 다음 날 세포 밀도가 70~80%에 도달하였을 때, 시약 설명서에 따라 리포펙타민 3000 (Lipofectamine 3000, Thermofisher)으로 MSLN-CAR-pLV, pMDLg/pRRE (addgene), pRSV-Rev (addgene), pMD2.G (addgene)(5.5 μ g:3.5 μ g:1.5 μ g:2 μ g)의 형질전환을 진행하였다. 대조군으로는 CD19 (FMC63)를 사용하였다. 형질전환 수행 4시간 이후 3% FBS (Gibco)가 포함된 DMEM 배지로 교체하여 48시간 이후 바이러스 배양액을

수확하였다. 원심분리용 튜브에 20% 수크로스 용액 10mL를 넣고, 그 위에 수확한 바이러스 배양액 20mL를 조심스럽게 올린 다음, SW32T 로터에 장착하여 25,000rpm으로 4°C에서 90분간 초고속 원심분리를 실시하였다. 원심분리가 끝난 다음 튜브 바닥에 있는 바이러스 펠렛이 떨어지지 않게 조심하여 상층액을 버리고, RPMI1640 배지 (Gibco) 400μL를 넣고 냉장고에서 16시간 동안 배양한 후, 재부유시켜 100μL씩 분주하여 -80°C에서 보관하였다.

[155]

[156] **7-3: 렌티바이러스 역가 측정 (titration)**

[157] 렌티바이러스 감염 하루 전날 HeLa 세포를 6-웰 플레이트에 1.5×10^5 cells/웰로 시딩하였다. 다음 날, 바이러스 감염 배지 500μL에 바이러스를 1/100 및 1/1,000으로 희석하여 첨가하고 폴리브렌 (polybrene)을 8μg/mL로 함께 첨가하여 세포에 감염시켰다. 하나의 웰에서, 세포에 Trypsin-EDTA (0.05%)를 처리하여 수확한 후 셀 카운팅하였다. 4시간 후, 세포배양액 1mL를 첨가하고 48시간 이후에 FACS 분석을 통해 바이러스 역가를 측정하였다. 바이러스 역가는 하기 식으로 계산하였다.

[158] [수식1]

바이러스 역가 (TU/mL) = 세포 개수 $\times$ FACS 양성세포의 백분율 (%) $\times$ 희석 계수 (dilution factor) $\times$ 2

[159] 그 결과, 바이러스 역가는 각각 MSLN34-CAR scFv 9.6×10^7 TU/mL, MSLN38-CAR scFv 1.6×10^8 TU/mL로 확인되었다.

[160]

[161] **실시예 8: 항-MSLN-CAR이 도입된 세포의 제작**[162] **8-1: 렌티바이러스 형질도입 (transduction)**

[163] 형질도입은 총 2회에 걸쳐 진행하였다. DPBS 5mL 에 항-CD3 (1μg/mL), 항-CD28 (3μg/mL) 항체를 각각 지정된 농도가 되도록 제조하고 볼텍싱 한 후, 24-웰 플레이트에 500μL/웰로 코팅하여 4°C 냉장고에서 밤새 보관하였다. 다음 날, T 세포 배양액 (10% FBS + RPMI1640 + 200IU IL-2) 9mL에 PBMC (인간 일차 PBMC)를 녹여 1,500rpm으로 5분 동안 원심분리하였다. 이후, 상층액을 제거하고 배양액 1mL에 재부유시켜 셀 카운팅하고, 1×10^6 cells/mL로 희석하여 항체가 코팅된 24-웰 플레이트에 시딩한 뒤, 37°C, CO₂ 배양기에 넣어 배양하였다. 3일 후, PBMC 세포들을 모두 수확하여, 렌티바이러스 감염을 위해 5×10^5 cells/500μL에 렌티바이러스를 MOI (multiple of infection) 5가 되도록 맞춰주고 프로타민 황산염 (protamine sulfate) 10μg/mL를 첨가하여 새로운 24-웰 플레이트에 시딩하였다 (a). 상기 24-웰 플레이트를 300g, 32°C에서 90분 동안 원심분리한 후, 37°C, CO₂ 배양기에 넣어 배양하였다 (b). 다음 날, T 세포를 모두 수확하여 상기 (a), (b) 단계를 한 번 더 수행하였다. 그런 다음, T 세포를 모두 수확하여 1,500rpm으로 5분 동안 원심분리하여 상층액을 제거하고, T 세포를 배양액에 재부유시켜 다시 배양하였다.

[164]

[165] **8-2: 항-MSLN-CAR의 발현 확인**

[166] 상기 실시예 8-1에서 제조한 항-MSLN-CAR가 도입된 T 세포에서 CAR의 발현 유무를 확인하였다. T 세포의 렌티바이러스 형질도입 완료 5일 후, 일부 항-MSLN-CAR-T 세포를 수확하여 biotin-MSLN (Acrobiosystems 또는 Biolegend)을 넣고 20분간 얼음 위에서 배양한 후, 세포를 세척하고, PE-항-biotin 1 μ L을 첨가하여 20분간 얼음 위에서 배양하였다. 세포 세척 후, FACS Canto II (BD)를 이용하여 CAR 발현율을 확인하였다. 또한, 항-MSLN-CAR-T를 14일 동안 배양하면서 최종적으로 분화된 T 세포 (CD3)의 발현을 FACS를 통해 분석하고, CD3 양성 T 세포 중에서 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 비율을 측정하였다. 그 결과를 하기 표 11 및 도 10, 11에 나타내었다.

[167] [표11]

형질도입 회차	클론	CD3 양성 T 세포 %	CAR 발현 %
1회차	CD19 (FMC63)	93.3%	29.2%
1회차	MSLN34 CAR scFv	94.3%	22.4%
1회차	MSLN38 CAR scFv	97.3%	8.99%
2회차	CD19(FMC63)	91.2%	30.9%
2회차	MSLN34 CAR scFv	92.9%	27.2%
2회차	MSLN38 CAR scFv	91.3%	27.9%

[168] 도 10 및 11에 나타낸 바와 같이, 형질도입 1회차 결과 CD4+:CD8+의 비율은 평균적으로 20%:70%이었고, 2회차 결과 CD4+:CD8+의 비율은 10%:80%으로 측정되었다.

[169]

[170] **실시예 9: 항-MSLN-CAR-T 세포의 세포사멸 효과 확인**

[171] 상기 실시예 8에서 제조한 항-MSLN-CAR-T 세포를 이용하여 암세포에 대한 세포사멸 효과를 칼세인-AM법을 통해 확인하였다.

[172] 먼저, 다양한 암세포주 (AsPC-1, MIA PaCa-2, NCI-H2052, OVCAR-3)의 MSLN 발현 정도를 확인하기 위해, 배양 중에 세포 일부를 취하여 biotin-항-MSLN 항체를 이용해서 세포와 결합시켜 FACS 분석을 수행하였다. 그 결과, 췌장암 세포주인 AsPC-1, 난소암 세포주인 OVCAR-3 및 악성 흑막 중피종 세포주인 NCI-H2052 모두에서 MSLN의 발현을 확인하였다. 다만, 췌장암 세포주인 MIA PaCa-2는 다른 암세포주에 비해 MSLN 발현이 현저히 낮게 측정되었다 (도 12).

[173] 상기 암세포주 (AsPC-1, MIA PaCa-2, NCI-H2052, OVCAR-3)를 각 배양배지에 1 x 10⁶ cells/mL 로 재부유시키고 칼세인-AM (1mg/mL) 5 μ L를 첨가하여 잘 섞어준 뒤 37°C배양기에서 1시간 동안 배양하였다. 이펙터 세포인 CD19-CAR-T

세포, 항-MSLN-CAR-T 세포는 세포 배양액을 첨가하면서 다양한 E:T (effector cell:target cell) 비율로 희석하여 준비하였다. 암세포주에 칼세인-AM 염색 1시간 후, 1,200rpm으로 5분 동안 원심분리하여 세척하고 배양배지 10mL를 첨가하여 재부유시켰다. 그런 다음, 염색된 암세포주를 96-웰 라운드 플레이트에 100 μ L (1×10^4 cells/100 μ L)로 시딩해주고, 그 위에 이펙터 세포를 100 μ L씩 시딩하였다. 대조군으로는 칼세인-AM이 염색된 암세포주에 배양배지 100 μ L만 처리한 군 (spontaneous value)과 2% 트리톤 X-100 (maximum value)을 처리한 군을 사용하였다. 96-웰 라운드 플레이트를 100g에서 1분 동안 원심분리 후, 37°C 배양기에서 4시간 동안 배양하였다. 4시간 후, 웰에 있는 세포들을 파이펫으로 5회 정도 섞어주고, 100g에서 5분 동안 원심분리 후, 상층액만 100 μ L씩 취하여 검정 96-웰 플레이트에 옮겨주었다. 상기 상층액이 들어있는 96-웰 플레이트를 사용하여 형광 마이크로플레이트 리더로 여기파장 (excitation wavelength) 485 nm 및 방출파장 (emission wavelength) 535 nm에서 칼세인 방출을 측정하였다. 측정 값에 대하여, 하기 식을 사용하여 세포사멸 효과를 계산하였다. 그 결과를 도 13 내지 15에 나타내었다.

[174] [수식2]

$$\text{세포사멸 효과 (\%)} = [(experimental\ release - spontaneous\ release) / (maximum\ release - spontaneous\ release)] \times 100$$

[175]

[176] 도 13 내지 15에 나타낸 바와 같이, 항-MSLN34-CAR-T와 항-MSLN38-CAR-T 모두, MSLN의 높은 발현을 확인한 난소암 세포주 OVCAR-3 및 악성 흉막 중피종 세포주 NCI-H2052에서 음성대조군 CD19(FMC63)-CAR-T에 비해 유의미하게 항원 특이적인 세포사멸 효과가 있음을 확인하였다. 다만, 항-MSLN34-CAR-T와 항-MSLN38-CAR-T 모두 MSLN을 적게 발현하는 암세포주인 MIA PaCa-2에서는 음성대조군 대비 특이적인 세포사멸 효과가 관찰되지 않았다. 상기 결과를 통해, 일 양상에 따른 항-MSLN-CAR-T 세포의 세포사멸 효과는 암세포가 발현하는 메소텔린에 특이적임을 확인하였다.

[177] 또한, 상기 실시예 8에서 제조한 항-MSLN-CAR-T 세포 및 GFP (Green fluorescent Protein)를 발현하는 암세포주를 이용하여 암세포에 대한 세포사멸 효과를 확인하였다. GFP를 발현하는 췌장암 세포주 AsPC-1을 각 배양배지에 1×10^6 cells/mL로 재부유하여 배양한 후 이펙터 세포인 CD19-CAR-T 세포, 항-MSLN-CAR-T 세포는 세포 배양액을 첨가하면서 10:1의 E:T 비율로 공배양하였다. Incucyte를 이용하여 48시간까지 GFP를 실시간 측정한 결과를 도 16에 나타내었다. 도 16에 나타낸 바와 같이, 일 양상에 따른 항-MSLN-CAR-T 세포의 처리에 따라 췌장암 세포주인 AsPC-1의 세포사멸 효과가 나타남을 확인하였다.

[178]

[179] 실시예 10: 종양동물모델 기반 항-MSLN-CAR-T 세포의 암세포 사멸 효과 확인

- [180] 상기 실시예 9에서 확인한 항-MSLN-CAR-T 세포의 암세포에 대한 세포사멸 효과를 기반으로 중앙 동물모델을 구축하여 중앙 살상능을 확인하였다.
- [181] 본 시험에 5주령의 수컷 NOG (NOD/Shi-scid/IL-2R γ null) 마우스를 사용하였으며 동물 입수 시 공급처에서 제공한 시험계의 헬스모니터링 성적서를 참고로 하여 입수 동물의 검수검역을 실시하였으며 일주일 순화 후 실험 진행하였다. 사육환경은 본 시험은 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 환기횟수 10~20회/hr, 조명시간 12시간 (오전 8시 점등~오후 8시 소등) 및 조도 150~300Lux이며 칩타입 깔짚을 고압증기멸균 (121°C , 멸균시간 20분, 건조시간 5분)한 후 적량의 깔짚을 폴리카보네이트 사육상자 (W 278 (mm) x L 420 (mm) x H 230 (mm))에 담아 사육하였다. 실험에 공급된 사료는 방사선조사로 멸균한 실험동물용 고형사료 (+40 RMM-SP-10, U8239G10R, SAFE-DIETS, France)를 이용하였으며, 물은 RO수를 물병에 담아 고압멸균기로 멸균한 후, 자유롭게 섭취하도록 하였다.
- [182] 체장암, 중피종 동물모델에 사용된 세포는 *Mycoplasma pneumoniae*, Murine coronavirus (Mouse hepatitis virus, MHV), Murine respirovirus (Sendai virus, SeV) 검사를 진행하고 음성으로 확인된 후 사용하였다. 이식된 암세포 및 CAR-T 세포와 시험군의 구성을 하기 표 12에 나타내었다.
- [183] [표12]

그룹	N수	세포주 (세포수/마리)	투여 물질	투여 경로	용량 (CAR-Ts/마리)	부피
G1	6	AsPC-1 (5×10^6)	HBSS	I.V	-	200uL
G2	6		Mock		-	
G3	6		CD19-CAR-T		5×10^6	
G4	6		항-MSLN34-CAR-T		5×10^6	
G5	6		항-MSLN38-CAR-T		5×10^6	
G6	6	NCI-H2052 (1×10^7)	HBSS		-	
G7	6		Mock		-	
G8	6		CD19-CAR-T		5×10^6	
G9	6		항-MSLN34-CAR-T		5×10^6	
G10	6		항-MSLN38-CAR-T		5×10^6	

- [184] 각 세포는 PBS를 이용하여 세포 농도를 조절하고, 마우스에 200uL씩 피하

이식하였으며 종양 크기로 무작위 배분법에 의하여 군 분리를 실시하였으며 개체 식별은 시험기간 동안 ear-punch법을 사용하고, 사육상자에는 각 군별 식별카드를 부착하였다.

- [185] 실험군 분리 후 항-MSLN-CAR-T 세포를 미정맥으로 단회 투여하였으며, 시험군의 체중과 종양 크기는 투여 개시일부터 주 2회 측정하였다. 투여 개시일 체중을 기준으로 하고, 시험 종료일까지 체중 변화를 관찰하였다. 체중 증감(%)은 아래의 공식을 사용하여 산출하였다.
- [186] [수식3]
- $$\text{체중 증감}(\%) = (\text{체중/day 0에서의 체중}) \times 100$$
- [187] 종양 부피 (mm^3)는 캘리퍼스(calipers)를 이용하여 종양의 단축 (A), 장축 (B)을 측정하고 다음의 공식을 이용하여 산출하였다.
- [188] [수식4]
- $$\text{종양 부피}(\text{mm}^3) = 1/2 \times [A(\text{mm})]^2 \times B(\text{mm})$$
- [189] 체중 및 종양 부피는 마지막 측정 후 채장암, 중피종 각각의 HBSS 투여군과 항-MSLN-CAR-T 투여군을 비교하여 One-way ANOVA의 post-hoc Dunnett's test를 이용하여 통계분석을 진행하였다 (*:p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.001).
- [190] 중피종 종양 (NCI-H2052) 모델에서 항-MSLN-CAR-T 세포의 종양 살상능 유효성을 평가한 결과 항-MSLN34-CAR-T 투여군과 항-MSLN38-CAR-T 투여군에서 1개체 (G4-4)를 제외한 모든 동물에서 종양이 관찰되지 않았으며, HBSS 투여군과 비교하여 투여 13일부터 항-MSLN34-CAR-T 투여군과 항-MSLN38-CAR-T 투여군에서 종양 크기가 현저히 감소하였다 (p<0.05). 대조군 (G1, HBSS 투여군)과 비교하여 항-MSLN38-CAR-T 투여군은 체중 감소 (p<0.05), 경련 증상이 관찰되었으며 투여 후 20일차에 2수가 사망하였다. 상기 결과를 도 17에 나타내었다.
- [191] 채장암 종양 (AsPC-1) 모델에서 항-MSLN-CAR-T 세포의 종양 살상능 유효성을 평가한 결과, HBSS 투여군과 비교하여 CAR-T 투여 후 13일부터 항-MSLN34-CAR-T 투여군과 항-MSLN38-CAR-T 투여군에서 종양 크기가 현저히 감소하였으며 (p<0.05), 부검 시 동일하게 두 군에서 종양 무게가 감소함을 확인하였다 (p<0.05). 대조군 (G6, HBSS 투여군)과 비교하여 항-MSLN38-CAR-T 투여군은 체중 감소하고 (p<0.05), 경련 증상이 관찰되었으며 투여 후 34일차에 1수가 사망하였다. 상기 결과를 도 18에 나타내었다.
- [192] 위의 결과를 종합하면, 채장암, 중피종 모두 암세포에서만 아니라 동물모델에서도 모두 항-MSLN34-CAR-T와 항-MSLN38-CAR-T의 암세포 살상 효능을 확인할 수 있었다.
- [193]
- [194] 전술한 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서

다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다.
그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이
아닌 것으로 이해해야만 한다.