

명세서

발명의 명칭: 뮤신 1에 특이적인 폴리펩티드 및 이의 이용 기술분야

- [1] 관련 출원들과의 상호 인용
- [2] 본 출원은 2020년 12월 24일자 한국 특허 출원 제10-2020-0183768호 및 2021년 10월 15일자 한국 특허 출원 제10-2021-0137757호에 기초한 우선권의 이익을 주장하며, 해당 한국 특허 출원의 문헌에 개시된 모든 내용은 본 명세서의 일부로서 포함된다.
- [3] 기술분야
- [4] 뮤신1(Mucin1)에 결합하는 폴리펩티드, 이를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 및 상기 벡터를 포함하는 세포에 관한 것이다. 또한, 뮤신1에 결합하는 폴리펩티드를 포함하는 키메라 항원 수용체, 상기 키메라 항원 수용체를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포, 및 이들을 포함하는 암 치료용 조성물 및 치료 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [5] 뮤신1(Mucin1)은 체내 거의 모든 기관의 상피세포에 존재하는 막 결합형 당단백질이다. 뮤신1은 N-말단 서브유닛(MUC1-N) 및 C-말단 서브유닛(MUC1-C)의 비공유 상호작용으로부터 형성되는 이형이량체 단백질이다. MUC1-C은 세포외 도메인, 막횡단 도메인 및 세포질 꼬리를 형성하고, MUC1-N은 당화부위를 포함하는, 20개의 아미노산(HGVTSAPDTRPAPGSTAPPA)을 함유하는 직렬반복(tandem repeats, TRs)을 반복적으로 포함하며, MUC1-C의 세포외 도메인과 상호 작용하여 MUC1-C과 계속 연결되어 있다.
- [6] 정상 상피 세포에서 뮤신1은 낮은 수준으로 발현되고 상피의 정측막(apical membranes)에 제한적으로 발현되나, 유방암, 폐암, 대장암, 피부암, 갑상선암, 위암, 췌장암, 신장암, 난소암 및 자궁경부암 등의 고형암 세포에서 과잉으로 발현하고 전체 세포 표면에 랜덤하게 발현되며 비정상적으로 당화되는 것으로 알려져 있다. 따라서, 뮤신1은 암 병소를 검출하기 위한 표적 분자로서, 또는 암을 치료하기 위한 표적 분자로서 유용한 것으로 알려져 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 이에, 현재 암 치료용 항-MUC1 항체가 다수 보고되어 있으나, 항체를 이용한 항암요법의 경우 항체가 특이적으로 인식하는 항원이 있는 암세포에만 적용 가능하고 효과 지속기간이 짧으며 장기 투여시 내성이 발생하기도 한다. 따라서,

체내 면역체계를 활성화해 다양한 암에서 지속적으로 강력한 항암 효과를 발휘할 수 있는 기술의 개발이 요구된다.

과제 해결 수단

- [8] 일예는, 뮤신1(Mucin1)에 결합하는 폴리펩티드를 제공한다.
- [9] 다른 예는, 상기 뮤신1-결합 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [10] 다른 예는, 상기 뮤신1-결합 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [11] 다른 예는, 상기 뮤신1-결합 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함하는 세포를 제공한다.
- [12] 다른 예는, 상기 뮤신1-결합 폴리펩티드를 포함하는 키메라 항원 수용체를 제공한다.
- [13] 다른 예는, 상기 키메라 항원 수용체를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [14] 다른 예는, 상기 키메라 항원 수용체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [15] 다른 예는, 상기 키메라 항원 수용체를 발현하거나, 키메라 항원 수용체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 면역 세포를 제공한다.
- [16] 다른 예는, 상기 뮤신1-결합 폴리펩티드; 상기 뮤신1-결합 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드; 상기 뮤신1-결합 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터; 상기 뮤신1-결합 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 세포; 상기 뮤신1-결합 폴리펩티드를 포함하는 키메라 항원 수용체; 상기 키메라 항원 수용체를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드; 상기 키메라 항원 수용체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터; 또는 상기 키메라 항원 수용체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하거나 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포를 포함하는, 암 치료용 조성물을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [17] 도 1은 donor 03 및 donor 04 유래의 T 세포를 이용하여 제작한 본원의 일실시예에 따른 CAR-T 세포들의, MUC1-양성 종양세포(T47D, HEK293T-V1)에 대한 반응성을 평가한 사이토카인 분비 분석 결과이다.
- [18] 도 2는 donor 06 유래의 T 세포를 이용하여 제작한 본원의 일실시예에 따른 CAR-T 세포들의, MUC1-양성 종양세포(T47D)에 대한 반응성을 평가한 사이토카인 분비 분석 결과이다.
- [19] 도 3은 donor 06 유래의 T 세포를 이용하여 제작한 본원의 일실시예에 따른 CAR-T 세포들의, 뮤신1 비발현 세포(HEK293T)에 대한 반응성을 평가한 사이토카인 분비 분석 결과이다.

- [20] 도 4는 donor 03 유래의 T 세포를 이용하여 제작한 본원의 일실시에에 따른 CAR-T 세포들의, 인간유방암세포주인 T47D에 대한 세포 독성실험 결과이다.
- [21] 도 5는 donor 04 유래의 T 세포를 이용하여 제작한 CAR-T 세포들의, 인간유방암세포주인 T47D에 대한 세포 독성실험 결과이다.
- [22] 도 6은 donor 03 유래의 T 세포를 이용하여 제작한 CAR-T 세포들의, 인간배아신장 세포인 HEK293T에 대한 세포 독성실험 결과이다.
- [23] 도 7은 donor 04 유래의 T 세포를 이용하여 제작한 CAR-T 세포들의, 인간배아신장 세포인 HEK293T에 대한 세포 독성실험 결과이다.
- [24] 도 8은 donor 04 유래의 T 세포를 이용하여 제작한 CAR-T 세포들의, 인간배아신장세포주에 MUC1-C를 외제적 발현시킨 HEK293T-V1에 대한 세포 독성실험 결과이다.
- [25] 도 9는 donor 05 유래의 T 세포를 이용하여 제작한 본원의 일실시에에 따른 CAR-T 세포들의, 인간유방암세포주인 T47D에 대한 세포 독성실험 결과이다.
- [26] 도 10은 donor 06 유래의 T 세포를 이용하여 제작한 본원의 일실시에에 따른 CAR-T 세포들의, 인간유방암세포주인 T47D에 대한 세포 독성실험 결과이다.
- [27] 도 11은 donor 07 유래의 T 세포를 이용하여 제작한 본원의 일실시에에 따른 CAR-T 세포들의, 인간배아신장 세포인 HEK293T에 대한 세포 독성실험 결과이다.
- [28] 도 12는 donor 08 유래의 T 세포를 이용하여 제작한 본원의 일실시에에 따른 CAR-T 세포들의, 인간유방암세포주인 HCC70에 대한 세포 독성실험 결과이다.
#2: 2447_2H08; #3: 2447_3A01; #4: 2447_3A08; #5: 2447_3A09; #6: 2447_3A12; #7: 2447_3B07; #8: 2447_3C08; #9: 2447_3H02; #10: 2447_3H08.
- [29] 도 13은 효과기 세포(E)와 표적 세포(T)의 비율 0.3:1 에서 본원의 일실시에에 따른 CAR-T 세포의, 인간 유방암 세포주 (HCC70) 와 인간 정상 유방 세포주 (MCF10A)에 대한 차별적인 세포 독성 결과를 나타낸다. #2: 2447_2H08.
- [30] 도 14는 효과기 세포(E)와 표적 세포(T)의 비율 0.1:1 에서 본원의 일실시에에 따른 CAR-T 세포의, 인간 유방암 세포주 (HCC70) 와 인간 정상 유방 세포주 (MCF10A)에 대한 차별적인 세포 독성 결과를 나타낸다. #2: 2447_2H08.
- [31] 도 15는 PANC1-v1 세포 (MUC1 을 발현시킨 PANC1 췌장암 세포)를 주입한 암 동물 모델에서, 본원의 일실시에에 따른 CAR-T 세포들을 투여한 후 종양 성장 억제를 확인한 결과이다.
- [32] 도 16은 PANC1-v1 세포 (MUC1 을 발현시킨 PANC1 췌장암 세포)를 주입한 암 동물 모델에서, 본원의 일실시에에 따른 CAR-T 세포들을 투여한 후 14일 및 28일 후 혈액 내 인간 면역세포(hCD45+ cell)의 수를 확인한 결과이다.
- [33] 도 17은 PANC1-v1 세포 (MUC1 을 발현시킨 PANC1 췌장암 세포)를 주입한 암 동물 모델에서, 본원의 일실시에에 따른 CAR-T 세포를 두 가지 용량으로 투여한 후 종양 성장 억제를 확인한 결과이다.
- [34] 도 18은 HCC1954 세포 (자연적으로 MUC1 을 발현하는 유방암 세포)를 주입한

암 동물 모델에서, 본원의 일실시에에 따른 CAR-T 세포들을 투여한 후 종양 성장 억제를 확인한 결과이다.

- [35] 도 19는 HCC1954 세포 (자연적으로 MUC1 을 발현하는 유방암 세포)를 주입한 암 동물 모델에서, 본원의 일실시에에 따른 CAR-T 세포들을 투여한 후 일정한 시간 간격으로 혈액 내 인간 면역세포(hCD45+ cell)의 수를 확인한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [36] 본 발명의 한 측면에 따라 뮤신1(Mucin1)에 결합하는 폴리펩티드가 제공된다. 바람직한 일례로, 본원에서 뮤신1에 결합하는 폴리펩티드는 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다.
- [37] 일 구현예로, 다음으로 이루어진 군에서 선택되는 중쇄 가변(VH) 영역 및 경쇄 가변(VL) 영역 쌍을 포함하는, 뮤신1에 결합하는 폴리펩티드가 제공된다:
- [38] - 각각 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3의 아미노산 서열로 기재되는 상보성결정영역(CDR) 1, 2 및 3을 포함하는 VH 영역, 및 각각 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6의 아미노산 서열로 기재되는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VL 영역;
- [39] - 각각 서열번호 11, 서열번호 12 및 서열번호 13의 아미노산 서열로 기재되는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VH 영역, 및 각각 서열번호 14, 서열번호 15 및 서열번호 16의 아미노산 서열로 기재되는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VL 영역;
- [40] - 각각 서열번호 21, 서열번호 22 및 서열번호 23의 아미노산 서열로 기재되는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VH 영역, 및 각각 서열번호 24, 서열번호 25 및 서열번호 26의 아미노산 서열로 기재되는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VL 영역;
- [41] - 각각 서열번호 31, 서열번호 32 및 서열번호 33의 아미노산 서열로 기재되는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VH 영역, 및 각각 서열번호 44, 서열번호 45 및 서열번호 46의 아미노산 서열로 기재되는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VL 영역;
- [42] - 각각 서열번호 51, 서열번호 52 및 서열번호 53의 아미노산 서열로 기재되는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VH 영역, 및 각각 서열번호 54, 서열번호 55 및 서열번호 56의 아미노산 서열로 기재되는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VL 영역;
- [43] - 각각 서열번호 61, 서열번호 62 및 서열번호 63의 아미노산 서열로 기재되는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VH 영역, 및 각각 서열번호 64, 서열번호 65 및 서열번호 66의 아미노산 서열로 기재되는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VL 영역;
- [44] - 각각 서열번호 71, 서열번호 72 및 서열번호 73의 아미노산 서열로 기재되는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VH 영역, 및 각각 서열번호 74, 서열번호 75 및 서열번호 76의 아미노산 서열로 기재되는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VL 영역;
- [45] - 각각 서열번호 81, 서열번호 82 및 서열번호 83의 아미노산 서열로 기재되는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VH 영역, 및 각각 서열번호 84, 서열번호 85 및 서열번호 86의 아미노산 서열로 기재되는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VL 영역; 및
- [46] - 각각 서열번호 91, 서열번호 92 및 서열번호 93의 아미노산 서열로 기재되는

CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VH 영역, 및 각각 서열번호 94, 서열번호 95 및 서열번호 96의 아미노산 서열로 기재되는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VL 영역.

[47] [표1]

클론명	CDR					
	VH			VL		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
2445_1 F09	GFTVSSN Y (서열번호 1)	IYSGGST (서열번호 2)	DRGWNH GMDV (서열번호 3)	SSEVGSR Y (서열번호 4)	KND (서열번호 5)	AAWDDS LNGYV (서열번호 6)
2447_2 H08	GYTFTNY G(서열번 호 11)	ISAYNGN T (서열번호 12)	DPHILTY YRGGWFD P (서열번호 13)	SLRTSY (서열번호 14)	GKT (서열번호 15)	HSRDSND NYLEV (서열번호 16)
2447_3 A01	GFTFDDY A(서열번 호 21)	ISWNSGSI (서열번호 22)	DISSGWYP GTFDY (서열번호 23)	SLRSYY (서열번호 24)	GKN (서열번호 25)	SSRDSSD DVV (서열번호 26)
2447_3 A08	GYTFTSY G(서열번 호 31)	ISAYNGN T (서열번호 32)	DRATIFGV VTPFDY (서열번호 33)	SIRSYS (서열번호 34)	GKN (서열번호 35)	NSRDSSG NRVV (서열번호 36)
2447_3 A09	GFTFDDY A(서열번 호 41)	ISWNSGSI (서열번호 42)	DVSSGWY WYAFDI (서열번호 43)	SLRSYY (서열번호 44)	GKN (서열번호 45)	NSRDSSG SVV (서열번호 46)
2447_3 A12	GYTFTSY G(서열번 호 51)	ISAYNGN T (서열번호 52)	DPHILTY YRGGWFD P (서열번호 53)	SLRSYY (서열번호 54)	GKN (서열번호 55)	NSRDSSG NHRV (서열번호 56)
2447_3 B07	GFTFDDY A(서열번 호 61)	TSWDGGS T (서열번호 62)	DHSSGWY NGGMDV (서열번호 63)	SLRSYY (서열번호 64)	GKN (서열번호 65)	NSRDSSG NHVV (서열번호 66)
2447_3	GFTFDDY	ISWNSGSI	DRGSGYE	SLRSYY	GKN	NSRDSSG

C08	A(서열번호 71)	(서열번호 72)	GNYYGM DV (서열번호 73)	(서열번호 74)	(서열번호 75)	NHYV (서열번호 76)
2447_3 H02	GFTFDDY A(서열번호 81)	ISWDSGSI (서열번호 82)	DVSSGWY WYAFDI (서열번호 83)	ILRSYY (서열번호 84)	GKN (서열번호 85)	NSRDSSG NRVV (서열번호 86)
2447_3 H08	GFTFDDY A(서열번호 91)	ISWNSGSI (서열번호 92)	DRSSGWY TGSFDY (서열번호 93)	SLRSYY (서열번호 94)	GKN (서열번호 95)	QSRDSSD NRVL (서열번호 96)

- [48] 다른 구현예로, 다음으로 이루어진 군에서 선택되는 중쇄 가변(VH) 영역 및 경쇄 가변(VL) 영역 쌍을 포함하는, 뮤신1에 결합하는 폴리펩티드가 제공된다:- 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;- 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;
- [49] - 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;
- [50] - 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;
- [51] - 서열번호 47의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열번호 48의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;
- [52] - 서열번호 57의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열번호 58의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;
- [53] - 서열번호 67의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;
- [54] - 서열번호 77의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열번호 78의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;
- [55] - 서열번호 87의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열번호 88의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역; 및
- [56] - 서열번호 97의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열번호 98의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역.

[57] [표2]

클론명	VH	VL
2445_1 F09	EVQLLETGGGLIQPGGSLRLSCAA SGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLE WVSVIYSGGSTYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDRGWNHGMVWGQGT LTVSS (서열번호 7)	QSGLTQPPSASGTPGQRTVISC SGSEVGSRYVSWYQQLPGTAPR LLIYKNDRRPSGVPDRFSGSKSG SSASLAISGLRSEDEADYYCAAW DDSLNGYVFGTGTCLTVL (서열번호 8)
2447_2 H08	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTNYGISWVRQAPGQGLE WMGWISAYNGNTNYAQKLQGR VTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDD TAVYYCARDPHILTGYYRGGWFD PWGQGTTVTVSS (서열번호 17)	SYELTQDPAVSVALGQTVTITCQ GDSLRTSYAGWLQQKPGQAPVL VLYGKTSRPSGIPDRFSGSTSGNT ASLTITGAQAEDEAEYFCHSRDS NDNYLEVVFVGGGTCLTVL (서열번호 18)
2447_3 A01	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCA ASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGL EWVSGISWNSGSIVYADFVKGRF TISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDT ALYYCAKDISSGWYPGTFDYWG QGTLVTVSS (서열번호 27)	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCQ GDSLRSYYASWYQQKPGQAPVL VIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNT ASLTVTGAQAEDEADYYCSSRD SSDDVVFVGGGTQLTVL (서열번호 28)
2447_3 A08	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLE WMGWISAYNGNTNYAQKLQGR VTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDD TAVYYCARDRATIFGVVTPFDYW GQGTLVTVSS (서열번호 37)	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCQ GDSIRSYSASWYQQKPGQAPRL VIYGKNNRPSGIPDRVSGSTSGN TASLTVTGAQAEDEADYYCNSR DSSGNRVVFVGGGTQLTVL (서열번호 38)
2447_3 A09	EVQLLES GGGLVQP GRSLRLSCA ATGFTFDDYAMHWVRQAPGKGL EWVSGISWNSGSIGYADSVKGRF TISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDT ASYYCAKDVSSGWYWFYAFDIWG QGTLVTVSS (서열번호 47)	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCQ GDSLRSYYASWYQQKPGQAPVL VIYGKNNRPSGIPGRFSGSSSGNT ASLTVTGAQAEDEADYYCNSRD SGGSVVFVGGGTCLTVL (서열번호 48)
2447_3 A12	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLE WMGWISAYNGNTNYAQKLGRV	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCQ GDSLRSYYASWYQQKPGQAPVL VIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNT

	TMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDT AVYYCARDPHILTGYYRGGWFD WGQGLVTVSS (서열번호 57)	ASLTITGAQAEDEADYYCNSRDS SGNHRVFGGGTKLTVL (서열번호 58)
2447_3 B07	QVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCA ASGFTFDDYAMHWVRQAPGRGL EWVSLTSWDGGSTYYADSVKGR FTISRDNSKNSLYLQMNSLRAEDT ALYYCAKDHSSGWYNGGMDVW GQGTMTVTVSS (서열번호 67)	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCQ GDSLRSYYASWYQQKPGQAPVL VIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNT ASLTITGAQAEDEADYYCNSRDS SGNHVVFSGGGTKLTVL (서열번호 68)
2447_3 C08	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGL EWVSGISWNSGSGYADSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT ALYYCAKDRGSGYEGNYYGMDV WGQGLVTVSS (서열번호 77)	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCQ GDSLRSYYASWYQQKPGQAPVL VIYGKNNRPSGIPDRFSGTSSGNT ASLTITGAQAEDEADYYCNSRDS SGNHVVFSGTKVTVL (서열번호 78)
2447_3 H02	EVQLLES GGGLVQPGRSLRLSCA ASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGL EWVSGISWDSGSGYADSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT ALYYCAKDVSSGWYWFYAFDIWG QGTMLTVTVSS (서열번호 87)	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCQ GDILRSYYASWYQQKPGQAPVL VIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNT ASLTITGAQAEDEADYYCNSRDS SGNRVVFSGGGTKLTVL (서열번호 88)
2447_3 H08	EVQLLES GGGLVQPGRSLRLSCA ASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGL EWVSGISWNSGSDYADSVKGRF TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCARDRSSGWYTGSDYWG QGTMLTVTVSS (서열번호 97)	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCQ GDSLRSYYASWYRQKPGQAPVL VIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNT ASLTIGAQAEDEADYYCQSRDS SDNRVLFSGGGTKVTVL (서열번호 98)

- [58] 본원에서, 용어 "항체"는 특정 항원에 특이적으로 결합하는 단백질을 총칭하는 것으로서 가장 넓은 의미로 사용되며, 면역계 내에서 항원의 자극에 의하여 만들어지는 단백질 또는 이를 화학적 합성 또는 재조합적으로 제조한 단백질을 일 수 있으며, 그 종류는 특별히 제한되지 않는다. 구체적으로는 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 단일클론 항체 (전장 단일클론 항체 포함), 다클론 항체, 다중 특이성 항체 (예, 이중특이성 항체), 합성 항체 (또는 항체 모방체라고도 함), 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 또는 항체 융합체 단백질 (또는 항체 접합체라고도 함)을 포괄한다. 완전한 항체 (예컨대, IgG형)는 2개의 전장(full length) 경쇄 및 2개의 전장 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와

이황화 결합으로 연결되어 있다. 항체의 불변 영역은 중쇄 불변 영역과 경쇄 불변 영역으로 나뉘어지며, 중쇄 불변 영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 또는 엡실론(ϵ) 타입을 가지고, 서브클래스로 감마1(γ 1), 감마2(γ 2), 감마3(γ 3), 감마4(γ 4), 알파1(α 1) 또는 알파2(α 2)를 가진다. 경쇄의 불변 영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가진다.

- [59] 용어 "항원 결합 단편"은 전장 쇠에 존재하는 아미노산 중 적어도 일부가 결합되어있지만 여전히 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항체의 부분을 말한다. 이러한 단편은 표적 항원에 결합하고, 주어진 에피토프에의 결합에 대해 무손상 항체를 포함한 다른 항원 결합 분자와 경쟁할 수 있다는 점에서 생물학적으로 활성이다. 항원 결합 단편은 무손상 항체의 Fc 영역의 불변 중쇄 도메인 (즉, 항체이소형에 따라 즉 CH2, CH3 및 CH4)을 포함하지 않을 수 있다. 항원 결합 단편의 예로는 scFv (single chain variable fragment)(예를 들어, scFv, (scFv)₂ 등), Fab (fragment antigen binding) (예를 들어, Fab, Fab', F(ab')₂ 등), 도메인 항체, 펩티바디, 미니바디, 인트라바디, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디 또는 및 단일-쇄 항체 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 또한 항원 결합 단편은 scFv, 또는 scFv가 면역글로불린 (예컨대, IgA, IgD, IgE, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, 등)의 Fc 부위와 융합된 융합 폴리펩타이드 (scFv-Fc) 또는 경쇄의 불변 영역 (예컨대, 카파 또는 람다)와 융합된 융합 폴리펩타이드 (scFv-C κ (카파 불변영역) 또는 scFv-C λ (람다 불변영역))일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [60] 용어, "중쇄(heavy chain)"는 항원에 특이성을 부여하기 위해 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변영역 도메인 V_H 및 3개의 불변 영역 도메인 C_{H1}, C_{H2} 및 C_{H3}과 힌지(hinge)를 포함하는 전장 중쇄 및 이의 단편을 모두 포함하는 의미로 해석된다. 또한, 용어 "경쇄(light chain)"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변영역 도메인 V_L 및 불변 영역 도메인 C_L을 포함하는 전장 경쇄 및 이의 단편을 모두 포함하는 의미로 해석된다.
- [61] 용어 "상보성 결정 영역 (Complementarity-determining regions, CDR)"은, 항체의 가변 영역 중에서 항원과의 결합 특이성 또는 결합 친화도를 부여하는 부위를 말한다. 일반적으로 중쇄 가변 영역에 3개의 CDR(CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3)이 존재하고, 경쇄 가변 영역에 3개의 CDR(CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3)이 존재한다. 상기 CDR은 항체 또는 이의 단편이 항원 또는 에피토프에 결합하는 데 있어서 주요한 접촉 잔기를 제공할 수 있다. "프레임워크 영역(Framework region, FR)"은 중쇄 및 경쇄의 가변 영역의 비-CDR 부분을 말하며, 일반적으로 중쇄 가변 영역에 4개의 FR(FR-H1, FR-H2, FR-H3 및 FR-H4)이 존재하고, 경쇄 가변 영역에는 4개의 FR(FR-L1, FR-L2, FR-L3 및 FR-L4)이 존재한다. 주어진 CDR 또는 FR의 정확한 아미노산 서열 경계는 카바트(Kabat) 넘버링 체계, 코티아(Chothia) 넘버링 체계, 콘택트(Contact) 넘버링 체계, IMGT 넘버링 체계, Aho 넘버링 체계, AbM 넘버링 체계 등 다수의 잘 알려진 체계 중 어느 하나를

사용하여 용이하게 결정될 수 있다.

- [62] 용어 "가변 영역(variable region)"은 항체를 항원에 결합시키는데 관여하는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 지칭한다. 중쇄 가변(VH) 영역 및 경쇄 가변(VL) 영역은 일반적으로 유사한 구조를 가지며, 각각의 도메인은 4개의 보존된 프레임워크 영역(FR) 및 3개의 CDR을 포함한다.
- [63] 특정 구체예에서, 본원의 뮤신1-결합 폴리펩티드는 scFv (single chain variable fragment), 펩티바디, Fab (fragment antigen binding), 단일클론 항체, 이중특이성 항체, 미니바디, 도메인 항체, 합성 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 또는 항체 융합체 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [64] 바람직한 구체예에서, 본원의 뮤신1-결합 폴리펩티드는 scFv (single chain variable fragment)일 수 있다.
- [65] 용어, "scFv (single chain variable fragment)"는 항체의 중쇄 가변(VH) 영역 및 경쇄 가변(VL) 영역이 공유결합으로 연결된 단일쇄 항체 단편을 말한다. VH 영역 및 VL 영역은 직접 연결되거나, 링커에 의해 연결될 수 있다.
- [66] 링커는 수용성 및/또는 가요성 링커(flexible linker)일 수 있다. 예를 들어, 링커에 의해 VH의 N-말단과 VL의 C-말단이 연결되거나, VH의 C-말단과 VL의 N-말단이 연결될 수 있다. 링커는 펩티드 링커일 수 있으며, 예를 들어 10 내지 30 아미노산 길이, 10 내지 25 아미노산 길이, 10 내지 20 아미노산 길이, 10 내지 15 아미노산 길이, 15 내지 30 아미노산 길이, 15 내지 25 아미노산 길이, 15 내지 20 아미노산 길이, 구체적으로는, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30 아미노산 길이일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [67] 링커에 적합한 아미노산 서열은 당 업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 상기 링커는 유연성을 위해 글리신(Gly)이 풍부할 수 있고, 용해도를 위해 세린(Ser), 아스파라긴(Asn), 알라닌(Ala) 또는 트레오닌(Thr)을 포함할 수 있다. 링커는 Gly, Asn, Ser, Thr 및 Ala로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 총 1 내지 100개, 2 내지 50개, 또는 5 내지 25개를 포함하여 이루어진 것일 수 있다. 비제한적인 예시로는, 링커의 아미노산 서열은 GGGS 또는 GGGGS가 다양한 반복 횟수, 예컨대 2, 3, 4 및 5 회 반복을 갖는 서열일 수 있다. 예를 들어, 링커는 GGGGSGGGSGGGGS, GGGGSGGGSGGGSGGGGS, 또는 GGGGSGGGSGGGAS 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [68] scFv는 불변 영역이 없고 링커가 도입됨에도 불구하고 모 항체의 항원 특이성을 유지한다. scFv는 VH 영역 및 VL 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드로부터 발현될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [69] 바람직한 구현예로, 서열번호 9, 서열번호 19, 서열번호 29, 서열번호 39, 서열번호 49, 서열번호 59, 서열번호 69, 서열번호 79, 서열번호 89 및 서열번호 99로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 scFv 폴리펩티드가 제공된다.
- [70] 본원에서 항체 또는 항원 결합 단편은, 이와 동등한 활성을 보유하는 변이체,

예를 들어 본원에 기재된 아미노산 서열들과 약 80%, 약 81%, 약 82%, 약 83%, 약 84%, 약 85%, 약 86%, 약 87%, 약 88%, 약 89%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98% 또는 약 99% 이상의 동일성을 가지면서 동등한 생물학적 활성을 보유한 변이체도 본원의 범주에 포함될 수 있다.

- [71] 본 발명의 다른 측면에 따라, 상기 류신1-결합 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드가 제공된다.
- [72] 바람직한 구현예로, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 10, 서열번호 20, 서열번호 30, 서열번호 40, 서열번호 50, 서열번호 60, 서열번호 70, 서열번호 80, 서열번호 90 및 서열번호 100으로 이루어진 군에서 선택되는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 또한 본 발명은 상기 서열과 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98% 또는 약 99% 이상의 동일성을 가지면서 동등한 활성을 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 인간에서의 발현을 위한 코돈 최적화될 수 있다.
- [73] 본 발명의 다른 측면에 따라, 상기 류신1-결합 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터가 제공된다.
- [74] 벡터에서 상기 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 용어 "작동 가능하게 연결된(operatively linked)"은 뉴클레오티드 발현 조절 서열(예를 들어, 프로모터 서열)과 다른 뉴클레오티드 서열 사이의 기능적인 결합을 의미한다. 상기 조절 서열은 작동 가능하게 연결됨으로써 다른 뉴클레오티드 서열의 전사 및/또는 해독을 조절할 수 있다.
- [75] 벡터는, 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 상기 발현용 벡터는 당업계에서 식물, 동물 또는 미생물에서 외래의 단백질을 발현하는 데 사용되는 통상의 것을 사용할 수 있다. 상기 벡터는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다.
- [76] 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 사용되는 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예를 들어, pL λ 프로모터, CMV promoter, *trp* 프로모터, *lac* 프로모터, *tac* 프로모터, T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 벡터에 포함되는 진핵 세포에서 작동하는 복제원점은 f1 복제원점, SV40 복제원점, pMB1 복제원점, 아데노 복제원점, AAV 복제원점 및 BBV 복제원점 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 *tk* 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 가질 수 있다.

또한, 필요에 따라 인핸서 서열, 5'측 및 3'측의 비번역 영역, 분비 시그널 서열, 스플라이싱 접합부, 선택마커(예를 들어, 항생제 내성 유전자) 등을 더욱 포함할 수 있다.

- [77] 본 발명의 다른 측면에 따라, 상기 뮤신1-결합 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함하는 세포가 제공된다.
- [78] 상기 세포는 상기 벡터를 적절한 숙주 세포에 도입시킴으로써 얻어진 것일 수 있다. 벡터를 함유하는 숙주 세포는 벡터에 함유된 폴리뉴클레오티드의 클로닝 또는 발현에 유용할 수 있다. 상기 숙주세포는 상기 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 또는 발현시킬 수 있는 세포로서 당업계에 공지된 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있다. 예를 들어, 원핵 세포로는, 예를 들어, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 쉼린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세슨스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있으며, 진핵 세포에 형질 전환시키는 경우에는 숙주 세포로서, 효모(*Saccharomyce cerevisiae*), 곤충 세포, 식물 세포 및 동물 세포, 예를 들어, Sp2/0, CHO(Chinese hamster ovary) K1, CHO DG44, PER.C6, W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, Huh7, 3T3, RIN, MDCK 세포주 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [79] 상기 폴리뉴클레오티드 또는 이를 포함하는 벡터의 숙주 세포 내로의 운반(도입)은, 당업계에 널리 알려진 운반 방법을 사용할 수 있다. 상기 운반 방법은 예를 들어, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, CaCl_2 방법 또는 전기 천공 방법 등을 사용할 수 있고, 숙주 세포가 진핵 세포인 경우에는, 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기 천공법, 리포솜-매개 형질감염법 및 유전자 밤바드먼트 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정하지는 않는다.
- [80] 상기 형질전환된 숙주 세포를 선별하는 방법은 선택 마커에 의해 발현되는 표현형을 이용하여, 당업계에 널리 알려진 방법에 따라 용이하게 실시할 수 있다. 예를 들어, 상기 선택 마커가 특정 항생제 내성 유전자인 경우에는, 상기 항생제가 함유된 배지에서 형질전환체를 배양함으로써 형질전환체를 용이하게 선별할 수 있다. 형질전환된 숙주 세포는 폴리펩티드가 발현 또는 분비되기에 충분한 기간동안 배양될 수 있고, 통상의 단백질에서 사용되고 있는 분리 및 정제 방법, 예를 들어 염석, 용매 침전법 등의 용해도를 이용하는 방법, 투석, 한외 여과, 겔 여과, 도데실황산나트륨-폴리아크릴아미드 겔 전기영동 등 분자량의 차를 이용하는 방법, 이온 교환 크로마토그래피나 히드록실아파타이트 크로마토그래피 등의 하전을 이용하는 방법, 친화성 크로마토그래피 등의 특이적 친화성을 이용하는 방법, 역상 고속 액체 크로마토그래피 등의 소수성의 차를 이용하는 방법, 등전점 전기 영동 등의 등전점의 차를 이용하는 방법 등에 의해 폴리펩티드를 분리 및 정제할 수 있다.
- [81] 본 발명의 다른 측면에 따라, 상기 뮤신1-결합 폴리펩티드를 포함하는 키메라

항원 수용체(chimeric antigen receptor, CAR)가 제공된다. 상기 뮤신1-결합 폴리펩티드는 다른 CAR 성분과 함께 단일 사슬의 일부로서 발현되도록 조작될 수 있기 때문에 키메라 항원 수용체에 사용하기에 적합하다.

- [82] 키메라 항원 수용체는 전형적으로 뮤신1-결합 폴리펩티드를 포함하는 세포외 도메인(extracellular domain); 막관통 도메인(transmembrane domain); 세포내 신호 전달 도메인(intracellular signaling domain 또는 T cell activation domain)을 포함할 수 있다. 또한, 상기 세포외 도메인은 상기 폴리펩티드와 막관통 도메인 사이에 스페이서 영역(또는 힌지 영역)을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 키메라 항원 수용체는 1개 이상의 공동자극 도메인(co-stimulatory domain)을 더욱 포함할 수 있으며, 바람직하게는 공동자극 도메인이 막관통 도메인과 세포내 신호 전달 도메인 사이에 위치할 수 있다.
- [83] 따라서, 바람직한 일례로, 키메라 항원 수용체는 뮤신1-결합 폴리펩티드를 포함하는 세포외 도메인; 힌지 도메인; 막관통 도메인; 1개 이상의 공동자극 도메인; 및 세포내 신호 전달 도메인을 포함할 수 있다. 각각의 도메인은 이종일 수 있다. 즉, 상이한 단백질 쇠로부터 유래된 서열로 구성될 수 있다. 각각의 도메인은 짧은 올리고- 또는 폴리펩티드 링커, 예를 들어 2 내지 10개의 아미노산 길이의 링커로 연결될 수 있다. 또한 키메라 항원 수용체는 각 도메인이 연결된 하나의 폴리펩티드 사슬로 이루어질 수 있다.
- [84] 세포외 도메인은 전술한 바와 같은 뮤신1-결합 폴리펩티드를 포함하며, 이는 암세포 표면에 발현하는 뮤신1을 인지한다.
- [85] 세포외 도메인은 스페이서 영역 (또는 힌지 영역)을 더욱 포함할 수 있다. 스페이서 영역은 뮤신1-결합 폴리펩티드와 막관통 도메인 사이에 위치할 수 있다. 스페이서 영역은 뮤신1-결합 폴리펩티드가 CAR-T 세포의 세포막과 일정 거리를 두고 보다 유연하게 표적 항원을 인식할 수 있도록 한다. 스페이서 영역은 전형적으로 폴리펩티드일 수 있고, 10개 이상의 아미노산 길이, 예를 들어 10 내지 300개 아미노산 길이, 10 내지 250 아미노산 길이, 10 내지 200 아미노산 길이, 10 내지 150 아미노산 길이, 10 내지 100 아미노산 길이, 10 내지 50 아미노산 길이를 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [86] 스페이서 영역은 CD8 α 또는 CD28의 힌지 부위, 또는 면역글로불린 (IgG)의 불변영역 등을 예시할 수 있으며, 이들에 의한 오프-타겟 효과를 제거하기 위하여 돌연변이를 도입할 수 있다. 예를 들어, 면역글로불린 불변 영역은 IgG 힌지 단독, CH2 및 CH3 도메인의 전부 또는 일부에서 유래될 수 있고, 예를 들어 Fc 영역일 수 있다. IgG 는 바람직하게는 IgG2 또는 IgG4 일 수 있다. 일부 구현예에서, 스페이서는 IgG2, IgG4, 및/또는 IgG2 및 IgG4로부터 유래된 힌지, CH2 및 CH3 서열 중 하나 이상을 함유하는 키메라 폴리펩티드일 수 있다. 일부 구현예에서, 힌지 도메인은 서열번호 112의 서열로 표시될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [87] 막관통 도메인은 세포막 도메인과 세포막 내부의 신호전달 도메인을 연결하는

역할을 하며, 천연 또는 합성 공급원으로부터 유래될 수 있다. 공급원이 천연인 경우에, 도메인은 임의의 막-결합 또는 막-횡단 단백질로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 막관통 도메인은 T 세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 사슬, CD3 입실론, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 또는 CD154의 막관통 도메인일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직한 일례로, 막관통 도메인은 CD28 또는 CD8의 막관통 도메인일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 공급원이 합성인 경우, 합성 막관통 도메인은 류신 및 발린과 같은 소수성 잔기를 포함할 수 있으며, 페닐알라닌, 트립토판 및 발린 등을 각 말단에 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 서열번호 113의 서열로 표시될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [88] 공동자극 도메인은 공동자극신호가 전달되는 부위로 CAR-T 세포가 면역반응을 일으키고 자가증식을 하도록 신호를 전달하는 부위이다. 이는 CAR-T 세포의 증식, 세포독성, 지속적인 반응, 수명 연장 등을 향상시키기 위해 선택적으로 도입될 수 있다. 공동자극 도메인은 CD28, OX-40 (CD134), 4-1BB(CD137), CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1 (CD11a/CD18), CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig 알파 (CD79a), DAP-10, Fc 감마 수용체, MHC 클래스 1 분자, TNF 수용체 단백질, 이뮤노글로불린 단백질, 사이토카인 수용체, 인테그린, SLAM (signaling lymphocytic activation molecule), 활성화 NK 세포 수용체, BTLA, 툴리칸 수용체, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8알파, CD8베타, IL-2R 베타, IL-2R 감마, IL-7R 알파, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAMF1(CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, 또는 CD19a 의 신호전달 부위에서 선택된 1종 이상, 예를 들어 1종, 2종 또는 3종일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직한 구현예로는, CD28, OX-40 (CD134), 4-1BB (CD137), CD27 또는 ICOS의 신호전달 부위에서 선택된 1종 이상, 예를 들어 1종, 2종 또는 3종일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 공동자극 도메인은 서열번호 114의 서열로 표시될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [89] 세포내 신호 전달 도메인은 류신1-결합 폴리펩티드에 결합한 항원에 대해 T 세포 면역반응을 활성화시키는 부위이다. 상기 신호 전달 도메인은 T 세포 수용체(TCR)의 성분이거나 타이로신-기반 활성화 모티프 (immunoreceptor

tyrosine-based activation motif, ITAM)로 알려진 신호 전달 모티프를 함유할 수 있다. 그 예로, 신호 전달 도메인은 TCR 또는 CD3 제타, FcR 감마, CD3 감마, CD3 델타 및 CD3 엡실론으로부터 유래된 신호전달 도메인일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직한 예로는, CD3 제타의 신호전달 도메인일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 세포내 신호 전달 도메인은 세포외 도메인의 뮤신1-결합 폴리펩티드 부위가 표적에 결합시, CAR-T 세포를 활성화할 수 있다. 예를 들어, CAR는 T 세포의 기능, 예를 들어 세포 용해 활성 또는 T-헬퍼 활성을 자극하고, 사이토카인 또는 다른 인자의 분비를 유도할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포내 신호 전달 도메인은 서열번호 115의 서열로 표시될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [90] 일부 구현예에서, CAR은 신호 서열을 포함하는 형태로 발현될 수 있다. 또한 CAR은 발현을 모니터링하는 데 유용한 추가 서열, 예를 들어, 2A 펩타이드와 같은 리보솜 스킵(skip) 서열 또는 절단형 세포 표면 폴리펩티드 (tHER2 또는 tEGFR 또는 절단된 PSMA 등) 와 함께 발현될 수 있다.
- [91] 본 발명의 다른 측면에 따라, 상기 키메라 항원 수용체를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 인간에서의 발현을 위한 코돈 최적화될 수 있다.
- [92] 본 발명의 다른 측면에 따라, 상기 키메라 항원 수용체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터가 제공된다. 벡터는 유전자 클로닝을 위한 벡터, 단백질의 발현을 위한 벡터, 또는 유전자의 전달을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 클로닝 또는 발현을 위한 벡터의 경우 상세한 사항은 전술한 바와 같다.
- [93] 기술분야에 공지된 임의의 벡터가 본 발명에 적합할 수 있다. 예를 들어, 벡터는 바이러스 벡터일 수 있다. 예를 들어, 벡터는 레트로바이러스 벡터, DNA 벡터, 뮤린 백혈병 바이러스 벡터, SFG 벡터, 플라스미드, RNA 벡터, 아데노바이러스 벡터, 바쿨로바이러스 벡터, 엡스타인 바르 바이러스 벡터, 파포마바이러스 벡터, 백시니아 바이러스 벡터, 단순 포진 바이러스 벡터, 아데노바이러스 연관 벡터 (AAV), 또는 렌티바이러스 벡터일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [94] 본 발명의 다른 측면에 따라, 상기 뮤신1-결합 폴리펩티드를 포함하는 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포가 제공된다.
- [95] 면역 세포는 T 세포, 종양 침윤 림프구 (Tumor Infiltrating Lymphocyte, TIL), NK(Natural killer) 세포, TCR-발현 세포, 수지상 세포, 또는 NK-T 세포를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 또한 면역세포는 인간 유도만능 줄기세포(iPSC)에서 유래한 것일 수 있다. 면역 세포는 공지된 임의의 공급원으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 면역 세포는 조혈 줄기 세포 집단으로부터 시험관내 분화되거나, 환자로부터 획득될 수 있다. 면역 세포는 예를 들어, 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직, 감염 부위로부터의 조직, 복수, 흉막 삼출, 비장 조직, 및 종양으로부터 획득될 수 있다. 또한, 면역 세포는 관련 기술분야에서 입수 가능한 1종 이상의 면역

세포주로부터 유래될 수 있다.

- [96] 면역 세포는 자가(autologous) 또는 동종(allogenic)일 수 있다. 자가는 치료대상 환자로부터 유래된 것을 말한다. 동종은 치료대상 환자와 동일한 종의 다른 개체에서 유래된 것을 말한다.
- [97] 또한 면역 세포는 인간 유도만능 줄기세포(iPSC)에서 유래한 것일 수 있다. iPSC 에서 유래한 면역세포는 자가 또는 동종 면역세포에 비하여 자체증식이 가능하여 대량증식이 용이하고 모든 사람에게 적용가능한 범용적인 세포치료제 제작이 가능하며 균질한 생산과 원가 절감이 가능한 이점이 있다.
- [98] 면역 세포는 미세주입, 전기천공, 초음파천공, 바이오리스틱 (예를 들어, 유전자 총), 지질 형질감염, 중합체 형질감염, 칼슘 포스페이트 침전, 원형질체 융합, 리포좀-매개 형질 감염, 나노입자 또는 폴리플렉스 등의 방법을 사용하여 벡터에 의해 형질감염 또는 형질도입될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [99] 본 발명의 다른 측면에 따라, 상기 뮤신1-결합 폴리펩티드; 상기 뮤신1-결합 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드; 상기 뮤신1-결합 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터; 상기 뮤신1-결합 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 세포; 상기 뮤신1-결합 폴리펩티드를 포함하는 키메라 항원 수용체; 상기 키메라 항원 수용체를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드; 상기 키메라 항원 수용체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터; 또는 상기 키메라 항원 수용체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하거나 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포를 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 조성물이 제공된다.
- [100] 본 발명의 다른 측면에 따라, 상기 뮤신1-결합 폴리펩티드; 상기 뮤신1-결합 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드; 상기 뮤신1-결합 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터; 상기 뮤신1-결합 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 세포; 상기 뮤신1-결합 폴리펩티드를 포함하는 키메라 항원 수용체; 상기 키메라 항원 수용체를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드; 상기 키메라 항원 수용체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터; 또는 상기 키메라 항원 수용체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하거나 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포의 유효량을 암의 예방 또는 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 및/또는 치료 방법이 제공된다.
- [101] 본 발명의 다른 측면에 따라, 상기 뮤신1-결합 폴리펩티드를 포함하는 키메라 항원 수용체를 포함하는 T 세포를 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 조성물이 제공된다.
- [102] 본 발명의 다른 측면에 따라, 상기 뮤신1-결합 폴리펩티드를 포함하는 키메라 항원 수용체를 포함하는 T 세포의 유효량을 암의 예방 또는 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 및/또는 치료 방법이 제공된다.
- [103] 예를 들어, 암은 고형암 또는 혈액암일 수 있고, 비제한적인 예시로는, 유방암,

폐암, 전립선암, 난소암, 뇌암, 간암, 자궁경부암, 자궁내막암, 자궁암, 결장암, 대장암, 결장직장암, 직장암, 신장암, 콩팥모세포종, 피부암, 경구 편평 상피암, 표피암, 비인두암, 두경부암, 골암, 식도암, 방광암, 림프관암(예를 들어, 호지킨 림프종 또는 비-호지킨 림프종), 위암, 췌장암, 고환암, 갑상선암, 갑상샘소포암, 흑색종, 골수종, 다발성 골수종, 중피종, 골육종, 골수이형성 증후군, 간엽 기원의 종양, 연조직 육종, 지방육종, 위장 기질 육종, 악성 말초 신경집 종양 (MPNST), 유잉 육종, 평활근육종, 간엽 연골육종, 림포육종, 섬유육종, 횡문근육종, 기형암종, 신경모세포종, 수모 세포종, 신경교종, 피부의 양성 종양, 또는 백혈병일 수 있다. 폐암은, 예를 들어 소세포폐암종(SCLC) 또는 비-소세포폐암종(NSCLC)일 수 있다. 백혈병은, 예를 들어 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 골수성 백혈병(CML), 급성 림프구성 백혈병(ALL) 또는 만성 림프구성 백혈병(CLL)일 수 있다.

- [104] 바람직하게, 암은 MUC1 단백질이 발현된 암으로서, 유방암, 피부암, 췌장암, 전립선암, 폐암, 갑상선암, 위암, 난소암, 대장암, 간암, 담낭암, 신장암, 자궁경부암, 또는 방광암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 암은 원발성 암 또는 전이성 암일 수 있다.
- [105] 치료대상 환자는 2차적인 항-과다증식 요법을 받고 있는 환자일 수 있다. 예를 들어, 2차적인 항-과다증식 요법은 화학요법, 방사선요법, 면역요법, 광선요법, 냉동요법, 독소요법, 호르몬요법, 또는 외과수술일 수 있다.
- [106] 본원의 뮤신1-결합 폴리펩티드를 포함하는 키메라 항원 수용체를 포함하는 T 세포를 이용한 CAR-T 항암 치료는, 건강한 사람 또는 치료대상 환자의 혈액에서 T 세포를 추출한 뒤, 본원의 뮤신1-결합 폴리펩티드를 포함하는 키메라 항원 수용체를 발현하도록 유전적으로 조작하고, 조작된 T 세포를 증폭 배양하고, 배양된 조작 T 세포를 환자에게 투여하는 일련의 과정으로 이루어질 수 있다.
- [107] 바람직한 구현예로, 건강한 사람 또는 치료대상 환자의 혈액에서 T 세포를 추출하는 단계는, 예를 들어 혈액에서 백혈구성분분리채집(leukapheresis 또는 apheresis)을 이용하여 백혈구를 분리한 후 T 세포를 농축하는 과정을 거쳐 T 세포를 추출할 수 있다. T 세포는 CD4/CD8 구성 수준에서 특정 항체 비드 결합체나 마커를 사용하여 분리될 수 있다. 대안적으로, 줄기세포로부터의 분화를 통해 안정적으로 대량의 T 세포를 얻는 것도 가능하다.
- [108] 상기 추출된 T 세포가 본원에서 제공하는 키메라 항원 수용체를 발현하도록 유전적으로 조작하는 단계는, 예를 들어 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 디자인된 핵산분자를 벡터, 예를 들어, 바이러스 벡터(렌티바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터 등)를 이용하여 T 세포에 주입할 수 있다. CAR는 DNA 형태로 도입될 수도 있고, RNA 형태로 도입된 후 역전사효소에 의해 DNA로 역전사된 후 T 세포의 게놈에 통합될 수도 있다. 또한, 동종 세포치료제의 경우 이식편대숙주질환(GvHD) 등 거부반응을 일으키지 않도록, 공여자 T 세포에서 이식 거부 반응을 유도하는 유전자들을 제거하거나 교정하는

유전자 조작을 추가로 가할 수 있다.

- [109] 상기 조작된 T 세포를 증폭 배양하는 단계는, 당업계 공지된 배양기술에 따라 T 세포를 배양, 증식(proliferation) 및 증폭(expansion) 시킬 수 있다. 이때 바이러스 사용에 대한 안전성과 잘 제작된 CAR-T 세포를 선별하는 기술이 요구된다.
- [110] 마지막으로, 조작 T 세포를 환자에게 다시 투여하는 단계는, 예를 들어 주입(infusion)으로 이루어질 수 있다. 바람직한 일례로, CAR-T 세포의 주입 전, 환자는 백혈구 수치를 낮추기 위해, 사이클로포스파미드 또는 플루다라빈 등을 이용한 림프구 제거 조절 화학요법을 받을 수 있다. 또한, CAR-T 세포의 지속성을 향상시키기 위하여 IL-2 등의 사이토카인을 함께 투여할 수 있다.
- [111] 환자에게 투여된 조작된 T 세포는 뮤신1을 발현하는 종양 세포에 대해 면역 반응을 매개할 수 있다. 이러한 면역 반응에는 T 세포의 활성화, T 세포에 의한 IL-2 및 IFN-감마 등의 사이토카인의 분비, 종양 항원을 인식하는 T 세포의 증식 및 확장, 및 표적-양성 세포의 T 세포-매개된 특이적 사멸(종양 제거)을 포함한다. 예를 들어, CAR-T 세포에서 CAR 가 뮤신1에 특이적으로 결합하면 T 세포는 CD3 제타의 타이로신-기반 활성화 모티프 (immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM) 의 인산화를 통해 활성화되고, 이후, T 세포의 증식, 세포독성 및/또는 사이토카인 분비가 유도될 수 있다.
- [112] 이와 같이 CAR-T 세포를 이용한 항암 요법은, 근본적으로 환자의 면역 체계를 활성화하여 지속적인 항암 효과를 발휘하기 때문에, 계속 투여하지 않아도 되며, 환자 자신의 T 세포를 이용함으로써 환자 개인 맞춤형 치료가 가능한 장점이 있다.
- [113] 본원의 조성물의 투여는, 질병 상태의 발병 또는 진행을 저해하거나, 중지시키거나, 지연시키거나, 예방하는 면역반응을 일으키거나, 유도하거나 촉진할 수 있다.
- [114] 용어 "유효량"은 인간을 비롯한 개체에게 투여하였을 때, 원하는 결과를 달성하는데 충분한 양, 예를 들어 암을 치료 또는 예방하는데 효과적인 양을 의미한다. 유효량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 질환의 중증도, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 다양한 인자에 따라 달라질 수 있다. 투여량 또는 치료 용법은 당업자들이 이해하는 바와 같이 최적의 치료 반응을 제공하도록 조정할 수 있다.
- [115] 치료학적 유효량을 이용한 치료 용법은 1회 투여로 구성되거나, 또는 다른 예로, 일련의 적용을 포함할 수 있다. 치료기의 기간은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 질환의 중증도, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 다양한 인자에 따라 결정된다. 또한, 치료에 사용되는 항암 조성물의 유효 투여량은 개별 치료 용법의 코스 동안 높이거나 낮출 수 있는 것으로 이해될 것이다. 투여량에 변화가 생길 수 있으며, 당해 기술 분야에 공지된 표준 진단 분석을 통해 명확해질 수 있다. 본 발명의 조성물은, 몇몇 측면들에서, 통상적인 항암제, 방사선치료, 호르몬 치료, 바이오테라피 및/또는

외과적 종양 절제를 이용한 치료 전에, 치료 중에 또는 치료 후에, 투여할 수 있다.

- [116] 본원의 조성물은 약학적으로 허용되는 담체, 희석제, 및 부형제 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 첨가제와 함께 제공될 수 있다.
- [117] 상기 약학적으로 허용되는 담체는, 항체의 제제화에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 조성물은 상기 성분들 이외에 약학적 조성물 제조에 통상적으로 사용되는 희석제, 부형제, 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 추가로 포함할 수 있다.
- [118] 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있다. 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 내피 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여 및 직장내 투여 등으로 투여할 수 있다. 경구 투여시, 단백질 또는 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [119] 상기 세포는 표준 투여 기술, 제형 또는 디바이스를 사용하여 투여될 수 있다. 조성물의 저장 및 투여를 위한 주사기 및 바이알과 같은 제형 및 디바이스를 적절히 사용할 수 있다. 세포의 투여는 자가 (autologous), 동종 (allogenic), 또는 이종 (xenogenic) 일 수 있다. 말초 혈액 유래 면역 세포 또는 이의 자손(예를 들어, 생체 내, 생체 외 또는 시험관 내 유래)은 카테터 투여, 전신 주사, 국소 주사, 정맥 주사 또는 비경구 투여를 포함하는 국소 주사를 통해 투여될 수 있다. 면역 세포 치료제를 투여할 때, 일반적으로 이는 주사 가능한 단위 투여량 형태(용액, 현탁액, 에멀전)으로 제형화될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 비경구적으로 투여될 수 있다. 제형은 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 내피 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여 및 직장내 투여를 포함한다.
- [120] 일부 구현예에서 조성물은 멸균 액체 제제로서, 예를 들어, 등장성 수용액, 현탁액, 에멀전, 분산액 또는 점성 조성물로 제공되며, 이는 일부 측면에서 선택된 pH로 완충될 수 있다. 액체 제제는 일반적으로 겔, 다른 점성 조성물 및 고체 조성물보다 제조가 보다 용이하다. 또한, 액체 조성물은 특히 주사에 의해 투여하기가 편리하다. 다른 한편으로, 점성 조성물은 특정 조직과의 보다 긴 접촉 기간을 제공하기 위해 적절한 점도 범위 내에서 제형화될 수 있다. 액체 또는 점성 조성물은 예를 들어, 물, 식염수, 인산 완충 식염수, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액상 폴리에틸렌 글리콜) 및 이의 적합한 혼합물을

함유하는 용매 또는 분산 배지일 수 있는 담체를 포함할 수 있다.

- [121] 멸균 주사용 용액은 적합한 담체, 희석제 또는 멸균수, 생리식염수, 포도당, 텍스트로스 등과 같은 부형제와의 혼화제와 같은 용매에 결합 분자를 통합함으로써 제조될 수 있다. 조성물은 또한 동결 건조될 수 있다. 조성물은 투여 경로 및 원하는 제조 경로에 따라 습윤제, 분산제 또는 유화제(예를 들어, 메틸셀룰로오스), pH 완충제, 겔화 또는 점도 향상 첨가제, 방부제, 향미제, 색소 등과 같은 보조 물질을 함유할 수 있다.
- [122] 항균 방부제, 항산화제, 킬레이트화제 및 완충액을 포함한 조성물의 안정성 및 멸균성을 향상시키는 다양한 첨가제를 첨가할 수 있다. 미생물의 작용의 예방은 다양한 항균 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산 등에 의해 보장될 수 있다. 주사용 약학적 형태의 장기간 흡수는 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 사용에 의해 초래될 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

- [123] 이하 본 발명을 다음의 실시예에 의하여 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 그러나 이들은 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 제한되는 것은 아니다.

[124]

[125] 실시예 1. 뮤신1에 결합하는 scFv의 제조

- [126] 인간 뮤신1(서열번호 110)을 CD4(서열번호 111)와 접합시켜 재조합 항원을 준비하고, scFv 라이브러리로부터 상기 항원에 특이적인 scFv를 분비하는 클론을 스크리닝하여, 뮤신1에 특이적으로 결합하는 scFv 10 종을 선별하였다. 선별된 scFv 10종과, 이후 실험에 사용된 양성대조군 scFv G03 (WO2018/174544의 표 6의 G3 항체의 아미노산 서열을 이용하여 만든 양성대조군임)의 서열 정보를 표 3에 나타내었다.

[127] [표3]

클론명	scFv 아미노산 서열
2445_1F09	EVQLLETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLE WVSVIYSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDRGWNHGM DVWGQGT LVT VSSGGGGSGGGGSGGGASQS GLTQPPSASGTPGQRVTISCSGGSSEVGSRYVSWYQQLPGTAPRLLI YKNDRRPSGVPDRFSGSKSGSSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDS LNGYVFGTGTKLTVL (서열번호 9)
2447_2H08	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTNYGISWVRQAPGQGL EWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSD DTAVYYCARDPHILTGYYRGGWFD PWGQGTTVT VSSGGGGSGGG GSGGGASSYELTQDPAVSVALGQTVTITCQGDSLRTSYAGWLQQKP GQAPVLVLYGKTSRPSGIPDRFSGSTSGNTASLTITGAQAEDAEYF CHSRDSNDNYLEVVFGGGT KLTVL (서열번호 19)
2447_3A01	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGL EWVSGISWNSGSIVYADFVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDT ALYYCAKDISSGWYPGTFDYWGQGT LVT VSSGGGGSGGGGSGGGA SSYELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVL VIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTVTGAQAEDADYYCSSRDS SDDVVFGGGTQLTVL (서열번호 29)
2447_3A08	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGL EWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSD DTAVYYCARDRATIFGVVTPFDYWGQGT LVT VSSGGGGSGGGGSG GGASSYELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSIRSYSASWYQQKPGQA PRLVIYGKNNRPSGIPDRVSGSTSGNTASLTVTGAQAEDADYYCNS RDSSGNRVVFGGGTQLTVL (서열번호 39)
2447_3A09	EVQLLES GGGLVQPGRSLRLSCAATGFTFDDYAMHWVRQAPGKGL EWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDT ASYYCAKDVS SGWYWYAFDIWGQGT LVT VSSGGGGSGGGGSGGG ASSYELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPV LVIYGKNNRPSGIPGRFSGSSSGNTASLTVTGAQAEDADYYCNSRD SGGSVVFGGGT KLTVL (서열번호 49)
2447_3A12	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGL EWMGWISAYNGNTNYAQKL RGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSD DTAVYYCARDPHILTGYYRGGWFD PWGQGTLVT VSSGGGGSGGG GSGGGASSYELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKP

	GQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYY CNSRDSSGNHRVFGGGTKLTVL (서열번호 59)
2447_3B 07	QVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGRG LEWVSLTSWDGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNSLYLQMNSLRAE DTALYYCAKDHSSGWYNGGMDVWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGGS GGGASSYELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPG QAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYC NSRDSSGNHVVFGGGTKLTVL (서열번호 69)
2447_3C 08	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGL EWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDT ALYYCAKDRGSGYEGNYYGMDVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGASSYELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPG QAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGTTS GNTASLTITGAQAEDEADYYC NSRDSSGNHYVFGTGTKVTVL (서열번호 79)
2447_3 H02	EVQLLES GGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGL EWVSGISWDSGSIGYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDT ALYYCAKDVSSGWYWYAFDIWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS ASSYELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDILRSYYASWYQQKPGQAPV LVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRD SSGNRVVFGGGTKLTVL (서열번호 89)
2447_3 H08	EVQLLES GGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGL EWVSGISWNSGSIDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCARDRSSGWYTGSDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS ASSYELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYRQKPGQAPV LVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLT IIGAQAEDEADYYCQSRDS SDNRVLFGGGTKVTVL (서열번호 99)
G03	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISKVSGYTFTSYWMHWVQQAPGKG LEWIGYINPGTGYIEYNQKFKDRVTITADKSTD TAYMELSSLRSED TAVYYCASSTAPFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGASEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCKASQDIKSYLSWYQQKPGQAPRLLIYYAT RLADGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCLQYDESPYTFGQ GTKLEIK (서열번호 109)

[128] [표4]

클론명	scFv 염기 서열
2445_1F09	GAGGTGCAGCTGTTGGAGACTGGAGGAGGCTTGATCCAGCCTGG GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGGTTACCGTCAG TAGCAACTACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGC TGGAGTGGGTCTCAGTTATTTATAGCGGTGGTAGCACATATTACG CAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCC AAGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGA CACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCGCGGCTGGAACCACG GTATGGACGTCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT GGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGCTAG CCAGTCTGGGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCG GGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTCTGGGGGCAGCTCAGAAGTC GGAAGTAGATATGTGTCCTGGTACCAGCAACTCCCAGGAACGGC CCCCAGACTCCTCATCTATAAGAATGATCGGCGGCCCTCAGGGG TCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCTCCTCAGCCTCCC TGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACT GTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAATGGTTATGTCTTCGGAAC GGGACCAAGCTGACCGTCCTA (서열번호 10)
2447_2H08	GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGG GGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTAC CAACTACGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGC TTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAATGGTAACACAAAC TATGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACAC ATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTG ACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCCGCATATTTTGA CTGGTTATTATAGGGGAGGGTGGTTCGACCCCTGGGGGCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCGAGTGGTGGAGGCGGTTACAGGCGGAGG TGGCTCTGGCGGTGGCGCTAGCTCCTATGAGCTGACTCAGGACCC TGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGTGACAGTCACCATCACGTGCCA AGGAGACAGCCTCAGAACCTCTTATGCAGGCTGGCTCCAGCAGA AGCCAGGACAGGCCCTGTACTCGTCCTCTATGGTAAAACCAGC CGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCACCTCAGGA AACACAGCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAGGATGA GGCTGAGTATTTCTGTCACTCCCGGGACAGCAATGATAACTATCT AGAGGTGGTTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (서열번호 20)

2447_3 A01	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGG GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTGA TGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCC TGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTAGCATAGTCT ATGCGGACTTTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAAC GCCAAGAAGTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGA GGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAAAGATATTTCAAGTGGCTG GTACCCAGGGACCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCA CCGTCTCGAGTGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGC GGTGGCGCTAGCTCCTATGAGCTGACTCAGGACCTGCTGTGTCT GTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAG CCTCAGAAGCTATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGAC AGGCCCCGTGACTTGTCTATGGTAAAAACAACCGGCCCTCAG GGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAACACAGCT TCCTTGACCGTCACTGGGGCTCAGGCGGAAGACGAGGCTGACTA TACTGTAGCTCCCGGGACAGCAGTGATGATGTGGTATTCGGCG GAGGGACCCAGCTCACCGTCCTA (서열번호 30)
2447_3 A08	GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGG GGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTAC CAGCTACGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGC TTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAATGGTAACACAAAC TATGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACAC ATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTG ACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCGGGCTACGATT TTTGGAGTGGTTACCCCCCTTTGACTACTGGGGCCAAGGAACCTG GTCACCGTCTCGAGTGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTC TGGCGGTGGCGCTAGCTCCTATGAGCTGACTCAGGACCCCGCTGT GTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGGATCACATGCCAGGGAG ACAGTATTAGAAGTTATTCTGCCAGCTGGTACCAGCAGAAGCCA GGGCAGGCCCTCGCCTTGTTATCTATGGTAAAAACAACCGGCC CTCAGGGATCCCAGACCGAGTCTCTGGCTCCACTTCAGGAAATA CAGCTTCCTTGACCGTCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCT GACTATTACTGTAAGTCCCGGGACAGCAGTGGAACCGTGTGGT ATTCGGCGGAGGGACCCAGCTCACCGTCCTA (서열번호 40)
2447_3 A09	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGG CAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCACTGGATTACCTTTGA TGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCC

	TGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTAGCATAGGC TATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAA CGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTG AGGACACGGCCTCGTATTACTGTGCAAAAGATGTTAGCAGTGGC TGGTACTGGTATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGAACCCTGGTC ACCGTCTCGAGTGGTGGAGGCGGTTCAAGGCGGAGGTGGCTCTGG CGGTGGCGCTAGCTCCTATGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTC TGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACA GCCTCAGAAGCTATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGA CAGGCCCCCTGTA CT TGT CATCTATGGTAAAAACAACCGGCCCTCA GGGATCCCAGGCCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAACACAGC TTCCTTGACCGTCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACT ATTACTGTAATTCCCGGGACAGCGGTGGTTCTGTGGTTTTCGGCG GAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (서열번호 50)
2447_3 A12	GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGG GGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTAC CAGCTATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGC TTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAATGGTAACACAAAC TATGCACAGAAGCTCCGGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACAC ATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTG ACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCCGCATATTTTGA CTGGTTATTATAGGGGAGGGTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGC ACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGGTGGAGGCGGTTCAAGGCGGAGG TGGCTCTGGCGGTGGCGCTAGCTCCTATGAGCTGACTCAGGACCC TGCTGTGTCTGTGGTCTTGGGACAGACAGTCAGGATCACATGCCA AGGAGACAGCCTCAGAAGCTATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGA AGCCAGGACAGGCCCTGTA CT TGT CATCTATGGTAAAAACAAC CGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGG AAACACAGCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATG AGGCTGACTATTACTGTA ACT CCCGGGACAGCAGTGGTAACCAT CGTGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (서열번호 60)
2447_3B 07	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGTCGTGGTACAGCCTGG GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTGA TGATTATGCCATGCACTGGGTCCGTCAAGCTCCGGGGAGGGGTC TGGAGTGGGTCTCTCTTACTAGTTGGGATGGTGGTAGCACATACT ATGCAGACTCTGTGAAGGGTCGATTACCATCTCCAGAGACAAC

	AGCAAAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACCGCCTTGTATTACTGTGCAAAAGATCATAGCAGCGGCTGGTACAACGGGGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCGAGTGGTGGAGGCGGTTCAAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGCTAGCTCCTATGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGCTATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCTGTACTTGTTCATCTATGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAACCTCCCGGGACAGCAGTGGTAACCATGTGGTATTGCGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (서열번호 70)
2447_3C 08	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTAGCATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAAAGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAAAGATAGGGGTAGTGGCTACGAAGGAACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGTGGTGGAGGCGGTTCAAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGCTAGCTCCTATGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGCTATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAAGCCAGGACAGGCCCTGTACTTGTTCATCTATGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGTACCACCTCAGGAACACAGCCTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAACCTCCCGGGACAGCAGTGGTAACCATATTGTCTTCGGAAGTGGGACCAAGGTCACCGTCCTA (서열번호 80)
2447_3 H02	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGGATAGTGGTAGCATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAAAGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAAAGATGTTAGCAGTGGCTGGTACTGGTATGCTTTTGATATCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC

	ACCGTCTCGAGTGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGG CGGTGGCGCTAGCTCCTATGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTC TGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACA TCCTCAGAAGTTATTATGCAAGTTGGTACCAGCAGAAGCCAGGA CAGGCCCCCTGTACTTGTCAATTTATGGTAAAAACAACCGGCCCTCA GGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAACACAGC TTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACT ATTACTGTAACCTCCCGGGACAGCAGTGGTAACCGTGTGGTATTCTG GCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (서열번호 90)
2447_3 H08	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGG CAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTGA TGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCC TGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTAGCATAGAC TATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA TTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTG AGGACACAGCTGTGTACTACTGTGCGAGAGATCGGAGTAGTGCC TGGTACACGGGGTCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGT CACCGTCTCGAGTGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTG GCGGTGGCGCTAGCTCCTATGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGT CTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGAC AGCCTCAGAAGCTATTATGCAAGCTGGTACCGGCAGAAGCCAGG ACAGGCCCCCTGTACTTGTCACTATGGTAAAAACAACCGGCCCTC AGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCAGCTCGGGAACACAG CTTCCTTGACCATCATTGGGGCTCAGGCGGAAGACGAGGCTGAC TATTACTGTCAGTCCCGGGACAGCAGTGATAACCGTGTTCATTCT GGCGGAGGGACCAAGGTCACCGTCCTA (서열번호 100)

- [129] 상기 scFv 를 포함하는 scFv-Fc 항체의 뮤신1 항원에 대한 친화력을 Biacore T200 (GE healthcare)를 사용하여 측정하였다. Series S Sensor Chip CM5 (GE healthcare, Cat. No. BR-1005-30) 상에 Amine Coupling Kit (GE healthcare, Cat. No. BR-1000-50)을 이용하여 anti-human IgG (Fc) 항체 (GE healthcare, Cat. No. BR-1008-39, 최종 농도 25 ug/mL)를 5 uL/min으로 360초 동안 흘려 약 5000-7000 RU로 고정시켰다. 항원인 인간 MUC1 단백질을 25 nM부터 400 nM까지의 농도 범위 내에서 서로 다른 5개의 농도로 30 uL/min의 속도로 주입하여, 하기 표와 같이 k_a 과 k_d 값을 구하고, 이로부터 K_D 값을 계산하였다. 그 결과 뮤신1에 대한 결합 친화도를 나타내는 K_D (M) 값을 표 5에 나타내었다.

[130] [표5]

클론명	K _D (M)
2447_2H08	94.8 x 10 ⁻⁹
2447_3A01	51.5 x 10 ⁻⁹
2447_3A08	320.3 x 10 ⁻⁹
2447_3A09	62.1 x 10 ⁻⁹
2447_3A12	13.8 x 10 ⁻⁹
2447_3B07	51.7 x 10 ⁻⁹
2447_3C08	24.0 x 10 ⁻⁹
2447_3H02	58.8 x 10 ⁻⁹
2447_3H08	39.9 x 10 ⁻⁹
G03	27.6 x 10 ⁻⁹

[131]

[132] 실시예 2. 뮤신1에 결합하는 scFv 를 이용한 CAR-T 세포의 제조[133] **2-1. CAR 를 발현하는 렌티바이러스 전달 벡터 제작**

[134] scFv 폴리펩티드 서열을 포함하는 세포 외 도메인(표 4의 염기서열), 힌지(CD8 α)(서열번호 112) 및 막 관통 도메인(CD28)(서열번호 113), 공동자극 도메인 (CD28)(서열번호 114), 및 세포 내 신호전달 도메인(CD3제타) (서열번호 115)을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 렌티바이러스 벡터(transfer vector 또는 expression vector)를 제조하였다. CAR의 scFv 부분은 screening 업체로부터 공급받은 플라스미드에서 PCR을 단편을 분리하였으며 힌지 (hinge), 막 관통 단백질, CD28 및 CD3z 신호전달 도메인은 기합성된 플라스미드에서 PCR로 단편 분리하였다. 두 개의 단편은 Takara사의 In-Fusion HD 클로닝 키트를 이용하여 Clonotech사의 pLVX-EF1alpha 벡터에 클로닝하였다. 이렇게 클로닝된 렌티바이러스 벡터는 동사의 Lenti-X Expression System (EF1a Version) (제품코드 631253)에서 제공되는 패키징 플라스미드와 함께 Takara사의 Lenti-X 293T Cell Line에 트랜스펙션 (제품코드 632180)시켰으며 24시간 후 soup를 분리하여 그 안에 있는 렌티바이러스를 추후 연구에 사용하였다.

[135]

[136] **2-2. 렌티바이러스 입자의 생성**

[137] 렌티바이러스를 생성하기 위하여 상기 제조한 렌티바이러스 전달 벡터(transfer vector 또는 expression vector)와 패키징 플라스미드 혼합체(lentivirus packaging plasmid mix)를 리포좀 핵산 전달 시약(lipofectamine, Gibco)을 사용하여 Lenti-X 293T 세포(Takara 제품번호 632180)에 트랜스펙션(transfection)하였다. 형질주입

하루 전에 HEK293T 세포를 배양 플레이트 면적의 6~70% 가량 존재하도록 준비하였다. 배지는 10% 열에 의해 불활성화된 우태아혈청(FBS, Gibco) 이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM, Gibco)을 사용하였으며, 배양 플레이트는 100mm 또는 150mm 크기를 사용하였다. 배양 조건으로 37°C, 5% CO₂, 가습조건을 유지하였다. 전달 벡터와 렌티바이러스 패키징 플라스미드 혼합체 그리고 리포좀 핵산 전달 시약을 제조업체의 설명에 따라 비율을 맞추어 상온에서 혼합한 뒤, 배양 중인 플레이트 위의 HEK293T 세포에 drop 방식으로 처리함으로써 HEK293T 세포를 형질 주입시켰다. 형질 주입 후 HEK293T 세포에서 제작된 렌티바이러스는 세포 밖으로 분출되어 나와 바이러스 입자(virus particle) 형태로 세포 배양액에 존재하였다. 이에 형질주입 48시간 뒤, 배양 플레이트에서 세포 배양액만을 걷어내 원심분리를 진행하여 렌티바이러스 입자를 펠렛 형태로 얻었다. 이후 용액을 이용하여 펠렛을 풀어낸 뒤 즉시 사용하거나, 초저온 냉동고에 보관하였다. 용액은 앞서 사용한 DMEM 배지 혹은 T 세포 배양에 사용되는 CTS optimizer T cell Expansion SFM 1L 병(Gibco)에 Optimizer T-Cell Expansion Supplement(26ml) 첨가하고, CTS Innume Cell SR(Serum Replacement, Gibco)를 최종 2%가 되도록 첨가하고, CTS GlutaMAX-I Supplement 100X(Gibco)를 최종 1X가 되도록 첨가한 것을 사용하였다.

[138]

[139] **2-3. CAR-T 세포의 제조**

[140] 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 샘플은 가톨릭대학교와의 연구 협약을 통해 공급받았으며 가톨릭대학교 임상연구심사위원회(The Catholic University of Korea-Institutional Review Board)의 승인을 거쳐 공여자 모집 및 혈액 채취를 진행하였다. 모두 정상인의 혈액을 사용하였다. 본원의 실시예에서 "Donor"은 실험에 사용된 PBMC 샘플의 공여자를 지칭하며, Donor 뒤의 숫자는 공여자가 각각 상이함을 의미한다 (예를 들어, Donor 03, Donor 04, Donor 05, Donor 06, Donor 07, Donor08, Donor 18-09, Donor 20-01 등으로 표시함). T세포 표면에 키메라 항원 수용체(CAR)가 발현된 CAR-T 세포를 제조하기 위해, 동결 PBMC 바이알을 37°C 항온 수조에서 해동하였다. 동결 PBMC 해동 다음 날, 세포 수 측정 후 세포를 새로운 배지로 교체하였다. 이와 동시에 T 세포 특이적 증폭 비드(Dynabeads Human T-expander CD3/CD28, Gibco)를 사용하여 T-세포를 활성화하고, 렌티바이러스 형태로 되어있는 키메라 항원 수용체(CAR)를 활성화된 세포 수에 맞추어 처리하여 T 세포에 형질도입(transduction) 시켰다. 형질 전환된 T세포를 배양하기 위해 여과된 멸균 증류수로 풀어낸 인터류킨-2(Interleukin-2, Novartis) 현탁액을 배지 양 기준 100IU/ml이 되도록 첨가하고, 이후의 배양기간 동안 배지 교체 혹은 첨가 시 마다 지속적으로 넣어주었다. 세포 배양 기간은 활성화시킨 후 전체 10-11일로 하며, 배지는 세포 수에 따라 1~2일 마다 교체 혹은 새로이 첨가하며 배양을 진행하고, 배양 기간이 끝나면 세포 배양을 마무리하고 CAR-T 세포 제작을 완료하였다. 제작된 CAR-T

세포는 즉시 사용하거나 세포 동결보존액과 혼합하여 세포 동결용 바이알에 주입 후 액화질소탱크(Liquid Nitrogen Tank)에 보관하였다. 제작된 CAR-T 세포의 키메라 항원 수용체(CAR)의 발현량 확인 및 특성 분석은 유세포분석(FACS)을 통해서 진행하였다.

[141]

[142] 실시예 3.가용성 scFv의 뮤신1-발현 세포에 대한 친화력 분석

[143] 이하, 특별한 언급이 없는 한, 본원의 실시예에서 사용한 세포주에 대한 정보는 다음과 같다:

[144] - PANC-1; 한국세포주은행, 21469

[145] - HCC1954; 한국세포주은행, 9S1954

[146] - HCC70; 한국세포주은행, 9S0070

[147] - T47D; 한국세포주은행, 30133

[148] - HEK293T; ATCC, CRL-3216

[149] - Huh7; 한국세포주은행, 60104

[150] - HepG2; ATCC, HB-8065

[151] - SK-N-SH; 한국세포주은행, 30011

[152] 실시예 3에서 사용한 세포주는 총 4종류이고 이중 음성대조군으로 HEK293(ATCC) 및 PANC-1 (ATCC) 세포주를 사용하였으며 양성대조군으로 HEK293T-v1 (ATCC 및 LG화학에서 형질전환) 및 T47D (한국세포주은행) 세포주를 사용하였다. 양성대조군으로 사용한 HEK293T-v1 세포주는 뮤신1을 발현하지 않는 HEK293T 세포주에 MUC1의 C 서브유닛을 발현시킨 세포주이다. 사용한 scFv는 11종류이며 이 중 양성대조군은 G03이다 (표 3). 실시예 1에서 제조한 가용성 scFv를 5배씩 희석하여 총 8단계의 농도로 준비하였다. 각 단계별 농도는 380µg/mL, 76µg/mL, 15.2µg/mL, 3.04µg/mL, 0.608µg/mL, 0.1216µg/mL, 0.02432µg/mL, 0.004864µg/mL였다. 가용성 scFv 희석 및 세포 세척시 사용한 버퍼는 2% FBS, 10mM EDTA가 들어간 PBS이다. 4종류의 세포를 1X10⁶/mL로 준비하여 96well U-bottom 세포 배양 플레이트에 1X10⁵/100µl/well로 넣고 1500RPM에서 5분간 원심분리하였다. 앞서 만들어둔 가용성 scFv를 50µl/well로 처리하였다. 4°C에서 1시간 정치하였다. 세포 세척용 버퍼를 150µl/well로 넣고 섞어준 후 1500RPM에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 버린 후 세포 세척용 버퍼를 200µl/well로 넣고 섞어준 후 1500RPM에서 5분간 원심분리하였다. Goat anti-human IgG Fc-biotin antibody(Invitrogen, A18821)을 500배 희석하여 50µl/well로 처리하였다. 4°C에서 20분간 정치하였다. 세포 세척용 버퍼를 150µl/well로 넣고 섞어준 후 1500RPM에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 버린 후 세포 세척용 버퍼를 200µl/well로 넣고 섞어준 후 1500RPM에서 5분간 원심분리하였다. PE-Streptavidin(BD Pharmingen, 554061)을 1000배 희석하여 50µl/well로 처리하였다. 4°C에서 20분간 정치하였다. 세포 세척용 버퍼를 150µl/well로 넣고 섞어준 후 1500RPM에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을

버린 후 세포 세척용 버퍼를 200 μ l/well로 넣고 섞어준 후 1500RPM에서 5분간 원심분리하였다. 세포 세척용 버퍼를 80 μ l/well로 넣고 섞어준 후 유세포분석기로 분석하였다.

- [153] 가용성 scFv의 뮤신1-발현 세포에 대한 친화력은 유세포 분석기의 결과 값 중 PE MFI값으로 확인하였다. 각 세포주에 가용성 scFv는 넣지 않고 다른 형광 항체(Goat anti-human IgG Fc-biotin antibody, PE-Streptavidin)를 이용하여 염색을 진행한 값을 음성대조군값으로 두고, 각 세포별 G03을 380 μ g/mL 농도로 처리했을 때의 값을 양성대조군값으로 두어 다음과 같이 MFI값을 보정하였다:
- [154] (실험값-음성대조군값)/(양성대조군값-음성대조군값) $\times$ 100=실험값의 보정값
- [155] 보정한 값을 이용하여 EC₅₀을 구하였으며, 기술된 결과값은 양성대조군으로 사용한 두가지의 세포주의 결과값이다 (표 6).
- [156] [표6]

클론명	EC ₅₀ (293T-v1) (ug/ml)	EC ₅₀ (T47D) (ug/ml)
G03	3.46	3.56
2445_1F09	1.51 $\times$ 10 ⁷	6.19 $\times$ 10 ⁷
2447_3A01	4.78	11.14
2447_3A08	1.73	3.76
2447_3A09	1.96	2.2
2447_3A12	1.47	0.75
2447_3C08	1.38	2.04
2447_3H02	1.41	1.6
2447_3H08	2.57	5.6
2447_2H08	21.73	130.4
2447_3B07	3.86	3.47

- [157]
- [158] 실시예 4. CAR-T 세포의 사이토카인 분비 분석
- [159] MUC1-양성 종양세포(T47D, HEK293T-V1)에 대한, 항 MUC1 scFv가 CAR 형태로 주입된 면역세포(T 세포)의 반응성을 평가하였다. MUC1이 자연적으로 많이 발현하는 T47D 세포와, 사람의 MUC1의 C 서브유닛을 과발현시킨 HEK293T-V1 세포에, 실시예 2에 따라 제조한, 항 MUC1 scFv가 CAR 형태로 주입된 면역세포 2445_1F09, 2447_3A01, 2447_3A08, 2447_3A09, 2447_3A12, 2447_3C08, 2447_3H02, 2447_3H08, 2447_2H08, 2447_3B07 (또는 일부 도면에서는 각각 1F09, 3A01, 3A08, 3A09, 3A12, 3C08, 3H02, 3H08, 2H08, 3B07로 약칭함) 총 10 종을 종양세포:면역세포의 비율 1:1.5로 맞춰 24시간 동안

동시배양하였다. 이로부터 얻어진 배양액 내의 사이토카인 2종, 즉, 인터페론-감마(IFN γ)와 인터류킨-2(IL-2) 농도를 ELISA를 통하여 확인하였다. ELISA 분석 방법은 통상적으로 사용되는 방법과 같다. 간단히 서술하자면 다음과 같다. 먼저, 96웰 면역 플레이트에 인터페론-감마 또는 인터류킨-2를 잡을 수 있는 캡처 항체(capture antibody)로 코팅하고, 1일 후, 워싱 버퍼(washing buffer)로 충분히 씻어주었다. 블락 버퍼(block buffer)를 웰마다 넣고 상온에서 1시간 정치 후, 다시 워싱 버퍼로 충분히 씻어준다. 절대값을 알기 위하여, 농도를 아는 스탠다드 솔루션과 함께, 배양액 샘플을 각 웰에 넣고 2시간 동안 상온에서 정치하여 반응시켰다. 워싱 버퍼로 충분히 씻어준 후에, 감지 항체(detection antibody)를 넣어 2시간 동안 상온에서 반응시켰다. 워싱 버퍼로 충분히 씻어준 후에, HRP가 표지된 스트렙티아비딘(streptavidin)을 각 웰에 넣어 20분간 상온에서 반응시켰다. 워싱 버퍼로 충분히 씻어준 후에, 기질 용액을 첨가 후 20분 동안 상온에서 반응시키고, 스탑 용액(stop solution)으로 반응을 멈췄다. 각 웰의 사이토카인 농도는 반응에 따른 흡광도로 계산하였다.

[160] 도 1의 G03은 양성대조군이며, 음성대조군으로 어떠한 CAR도 주입되지 않은 군(NO LV)을 사용하였다. 또한 도 1은 총 2개의 T 세포 유래를 이용한 독립적 실험을 대표적으로 보여주는 결과 그래프로서, T 세포의 유래에 따라 Donor 03, Donor 04로 명명하였다. 본 실시예에서 "Donor"는 실험에 사용된 T 세포의 공여자를 지칭하며, Donor 뒤의 숫자는 공여자가 각각 상이함을 의미한다. 도 1은 대조군인 G03을 기준으로 그 흡광도를 평준화한 그래프이며, 테스트된 면역세포들이 사이토카인을 분비함을 보여준다.

[161] 도 2는 MUC1-양성 종양세포(T47D)에 대한, 항 MUC1 scFv가 CAR 형태로 주입된 면역세포의 반응성을 평가한 사이토카인 분비 분석 결과로서, 테스트된 면역세포들이 사이토카인을 분비함을 보여준다. T 세포는 Donor 06에서 유래하였다. 음성대조군으로 어떠한 CAR도 주입되지 않은 군(Control T cell)을 사용하였다.

[162] 도 3은 류신1 비발현 세포(HEK293T)에 대한, 항 MUC1 scFv가 CAR 형태로 주입된 면역세포의 반응성을 평가한 사이토카인 분비 분석 결과로서, 인터페론 감마 사이토카인은 분비하지 않으며 IL-2의 경우 음성대조군 (Control T cell)과 비교하였을 때 분비 양이 크게 증가하지 않는 것을 보여준다. T 세포는 Donor 06에서 유래하였다. 음성대조군으로 어떠한 CAR도 주입되지 않은 군(Control T cell)을 사용하였다.

[163]

[164] 실시예 5. CAR-T 세포의 세포독성 분석

[165] 인간 유방암 세포주(T47D, HCC70, HCC1954), 인간 간암 세포주(Huh7, HepG2), 인간 신경모세포종 세포주(SK-N-SH)은 Korean Cell Line Bank(KCLB, Seoul, Korea)으로부터 구입하였고, 인간배아신장세포주 (HEK293T)는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA)으로부터 구입하였다. T47D, HCC70,

HCC1954 세포는 RPMI-1640 medium(Thermo Fisher Scientific)에서, HEK293T, Huh7, HepG2는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Thermo Fisher Scientific)에서 각각 배양하였다. 모든 배지는 10%(w/v) heat inactivated 우태아혈청(FBS, Thermo Fisher Scientific)을 보충하여 사용하였다. 모든 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 실시예 2에 따라 제조한 CAR-T세포는 CTS complete media (CTS™ OpTmizer™ T Cell Expansion SFM (Gibco, A1048501), 2%(w/v) CTS™ Immune Cell SR (Gibco, A25961-01), 1X GlutaMAX™ Supplement (Gibco, 35050-061)에 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

- [166] CAR-T 세포의 뮤신1-특이적 세포독성을 분석하기 위해, 뮤신1-발현 세포(T47D, HCC70, HCC1954, HEK293T-V1(MUC1-C 외재적 발현세포) 등을 포함한다)와 뮤신1 비발현 세포(HEK293T, HepG2, Huh7, SK-N-SH 등을 포함한다)에 대한 세포 용해도를 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 우선 CellTrace™ CFSE (invitrogen, C34554)로 염색시킨 뮤신1 발현 또는 비 발현 표적 세포를 0.15~0.2 X 10⁶ cells/150ul/well로 분주하여 하루 동안 배양하였다. 같은 날, -196°C 동결 보관 된 CAR-T 세포를 해동시켜, 2 X 10⁶ cells/ml의 농도로 30U/ml의 IL-2 (Novartis, Proleukin)이 포함 된 CTS complete media에 하루 동안 배양하였다. 다음 날, 배양 중인 CAR-T 세포의 CAR 발현율을 Alexa Fluor 488-AffiniPure Goat Anti-Human IgG, F(ab')₂ Fragment Specific (Jackson laboratory, 109-545-097)와 APC Mouse Anti-Human CD3 (BD Pharmingen™, 561811)으로 염색하여 유세포분석기 (FACS, flow cytometer)를 통해 둘다 양성인 비율로 구했다. CAR 발현율을 기반으로 CAR+ T세포의 수가 동일하도록 맞춰준 각 종류의 CAR-T (E, effector cells)를 각 표적 세포의 세포배양액으로 100ul/well의 부피에 맞춰 전날 배양한 CFSE 염색 된 뮤신1 발현 또는 비발현 세포 (T, target cells)의 수에 비례하여 넣어주었다. 37°C, 5% CO₂조건에서 표적 세포에 따라 5시간에서 최대 24시간까지 배양하였다. 이후, CAR-T세포와 표적 세포 모두를 취하여 Fixable Viability Dye eFluor™ 450 (eBioscience™, 65-0863-18), APC Mouse Anti-Human CD3로 염색하여 유세포 분석기를 통해 살아있는 표적세포 수를 구했다. 이때, 살아있는 표적세포 수는 Fixable Viability Dye 음성, CFSE 양성인 세포로 정의하였다. 역가 계산 (killing activity, %)은 다음과 같은 식으로 구했다:

$$[167] \quad \text{역가 계산} = 100 - \left(\frac{(T \text{ cell} + Target \text{ cell})\text{well의 살아있는 Target cell 수}}{(Target \text{ cell})\text{well의 살아있는 Target cell 수}} \times 100 \right) (\%)$$

- [168] 그 결과를, 도 4 내지 도 8에 나타내었다. 이들 도면에서 G03은 양성대조군이며, 음성대조군으로 어떠한 CAR도 주입되지 않은 군(NO LV)을 사용하였다. 또한 이들 도면은 총 2개의 T세포 유래를 이용한 독립적 실험을 대표적으로 보여주는 결과 그래프로서, T 세포의 유래에 따라 Donor 03, Donor 04로 명명하였다. 도 4 내지 도 8에 나타난 바와 같이, 테스트된 면역세포들이 뮤신1-발현 세포들에 세포독성을 나타내었다.

- [169] 도 9 및 도 10은 각각 Donor 05 및 Donor 06 유래의 T 세포를 이용하여 제작한 CAR-T 세포들의, 인간 유방암 세포주인 T47D에 대한 세포 독성실험 결과이고, 도 11은 Donor 07 유래의 T 세포를 이용하여 제작한 CAR-T 세포들의, 인간배아신장 세포인 HEK293T에 대한 세포 독성실험 결과이고, 도 12는 Donor 08 유래의 T 세포를 이용하여 제작한 CAR-T 세포들의, 인간 유방암 세포주 HCC70에 대한 세포 독성실험 결과이다. 도 9 내지 도 12에 나타난 바와 같이, 테스트된 면역세포들이 뮤신1-발현 세포에 세포독성을 나타내었다.
- [170]
- [171] **실시예 6. CAR-T 세포의 뮤신1-특이적 세포독성 분석**
- [172] CAR-T 세포가 항원의 양 차이에 따라 정상 세포와 암 세포를 구분할 수 있는지를 알아보기 위하여, 유방암 세포주 (HCC70) 와 인간 정상 유방 세포주 (MCF10A)에 대한 세포 용해도를 다음과 같은 방법으로 측정하였다: 우선 뮤신1 과발현 세포인 HCC70과 뮤신1을 적게 발현하는 세포인 MCF10A를 각각 다른 농도의 CellTrace™ CFSE (Invitrogen, C34554)로 염색시킨 후 다른 비율로 섞었다. 사용한 비율은 HCC70 : MCF10A가 각 0:0.2, 0.025:0.175, 0.05:0.15, 0.075:0.125, 0.1:0.1, 0.125:0.075, 0.15:0.05, 0.175:0.025, 0.2:0 이다. 일정 비율로 섞인 세포는 0.2×10^6 cells/500ul/well로 분주하여 하루 동안 배양하였다. 같은 날, -196°C 동결 보관된 CAR-T 세포(2447_2H08 scFv 함유 CAR가 발현된 Donor 05 유래 T 세포)를 해동시켜, 2×10^6 cells/ml의 농도로 30U/ml의 IL-2 (Novartis, Proleukin)이 포함된 CTS complete media에 하루 동안 배양하였다. 다음 날, 배양 중인 CAR-T 세포의 CAR (2447_2H08 scFv를 가지고 있는 CAR) 발현율을 Alexa Fluor 488-AffiniPure Goat Anti-Human IgG, F(ab')₂ Fragment Specific (Jackson laboratory, 109-545-097)와 APC Mouse Anti-Human CD3 (BD Pharmingen™, 561811)으로 염색하여 유세포분석기 (FACS, flow cytometer)를 통해 둘다 양성인 비율로 구했다. CAR 발현율을 기반으로 CAR+ T 세포의 수가 동일하도록 맞춰준 각 종류의 CAR-T (E, effector cells)를 각 표적 세포의 세포배양액으로 100ul/well의 부피에 맞춰 전날 배양한 CFSE 염색된 뮤신1 발현 또는 비발현 세포 (T, target cells)의 수에 비례하여 넣어주었다. 37°C, 5% CO₂ 조건에서 표적 세포에 24시간 배양하였다. 이후, CAR-T세포와 표적 세포 모두를 취하여 Fixable Viability Dye eFluor™ 450 (eBioscience™, 65-0863-18), APC Mouse Anti-Human CD3로 염색하여 유세포 분석기를 통해 살아있는 표적세포 수를 구했다. 이때, 살아있는 표적세포 수는 Fixable Viability Dye 음성, CFSE 양성 (HCC70의 경우 강한 CFSE 시그널, MCF10A의 경우 약한 CFSE 시그널)인 세포로 정의하였다. 역가 계산 (killing activity, %)은 실시예5와 동일한 방법으로 수행하였다.
- [173] 그 결과를, 도 13 및 도 14에 나타내었다. 이들 도면에서 음성대조군으로 어떠한 CAR도 주입되지 않은 군(mock T cell)을 사용하였다. 도 13 및 도 14에 나타난 바와 같이, 2447_2H08 scFv를 가지고 있는 CAR-T 세포(도면에서 각각 #2-CAR-T로 표시됨)는 뮤신1을 과발현하는 유방암세포 (HCC70)에 대한

세포사멸능을 보이며 반면 류신1을 약하게 발현하는 정상 유방 세포주 (MCF10A)에 대한 세포독성은 보이지 않거나 현저히 감소된 양으로 보이는 것을 관찰하였다.

[174]

[175] 실시예 7. 동물 모델을 이용한 CAR-T 세포의 항암 효능 분석[176] **7-1. 췌장암 동물 모델을 이용한 항암 효능 분석**

[177] 7주령의 NOG 암컷 마우스에 6×10^6 PANC1-v1 세포 (MUC1 을 발현시킨 PANC1 췌장암 세포)를 피하(s.c.) 주입하고, 종양 체적이 500 mm^3 되었을 때 1×10^6 의 항-MUC1 CAR-T 세포(본원에 따른 scFv 함유 CAR 가 발현된 Donor 18-09 유래 T 세포)를 정맥(i.v.) 투여한 후 종양 성장을 관찰하고, CAR-T 세포 투여 14일과 28일 후에 혈액을 채취하여 혈액 내 인간 면역세포(hCD45+ cell)의 수를 관찰하였다 (그룹당 $n = 5$). 음성대조군으로는 PBS (Vehicle) 주입 군과 CAR 를 발현하지 않는 T 세포 (Control T cell)을 사용하였다.

[178] 그 결과, 도 15 및 도 16에 나타난 바와 같이, 500 mm^3 크기의 종양이 작아지는 것을 관찰하였으며 T 세포 투여 후 약 20일이 경과하였을 때는 외관으로 종양이 관찰되지 않았다. 그러나 음성대조군의 경우 암의 크기가 지속적으로 커지는 것을 관찰할 수 있었다.

[179] 다음으로, 위와 동일한 동물 모델에서, 종양 체적이 1500 mm^3 을 넘었을 때(즉, PANC1-v1 세포 투여 66일 후) 1×10^6 또는 0.5×10^6 의 항-MUC1 CAR-T 세포를 정맥(i.v.) 투여한 후 종양 성장을 관찰하였다 (그룹당 $n = 2$).

[180] 그 결과, 도 17에 나타난 바와 같이, 종양의 크기가 초기에는 커졌으나 약 10일이 경과한 후 그 크기가 점점 작아지면서 30일 경과 후에는 측정하기 힘들 정도로 종양의 크기가 작아졌다.

[181]

[182] **7-2. 유방암 동물 모델을 이용한 항암 효능 분석**

[183] 9주령의 NOG 암컷 마우스에 4×10^6 HCC1954 세포 (자연적으로 MUC1 을 발현하는 유방암 세포주)를 피하(s.c.) 주입하고, 종양 체적이 500 mm^3 되었을 때(세포 투여 23일 후) 0.5×10^6 또는 0.1×10^6 의 항-MUC1 CAR-T 세포(본원에 따른 scFv 함유 CAR 가 발현된 Donor 20-01 유래 T 세포)를 정맥(i.v.) 투여한 후 종양 성장을 관찰하고(그룹당 $n = 7$), T 세포 투여 후 일정한 간격으로 혈액을 채취하여 혈액 내 인간 면역세포(hCD45+ cell)의 수를 관찰하였다 (그룹당 $n = 3$). 음성대조군으로는 PBS (Vehicle) 주입 군과 CAR 를 발현하지 않는 T 세포 (Control T cell)을 사용하였다.

[184] 그 결과, 도 18 및 도 19에 나타난 바와 같이, 500 mm^3 이던 종양의 크기는 CAR-T 세포 투여후 7일 동안 크기가 정체되었으나 그 이후 급격히 감소하면서 25일 이후 측정이 힘들 정도로 작아졌다. 또한 마우스 혈액 내 hCD45+ 세포의 수는 증가하는 양상을 보였으며 약 25일 이후에는 점차 그 수가 감소하였다. 이는 CAR-T 세포들이 항원을 인식한 후 활성화되고 증식하여 혈액내의 세포 수가

증가한 것으로 보인다.

- [185] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

- [청구항 1] 다음으로 이루어진 군에서 선택되는 중쇄 가변(VH) 영역 및 경쇄 가변(VL) 영역 쌍을 포함하는, 뮤신1(Mucin1)에 결합하는 폴리펩티드:
- 각각 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3의 아미노산 서열로 기재되는 상보성결정영역(CDR) 1, 2 및 3을 포함하는 VH 영역, 및 각각 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6의 아미노산 서열로 기재되는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VL 영역;
 - 각각 서열번호 11, 서열번호 12 및 서열번호 13의 아미노산 서열로 기재되는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VH 영역, 및 각각 서열번호 14, 서열번호 15 및 서열번호 16의 아미노산 서열로 기재되는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VL 영역;
 - 각각 서열번호 21, 서열번호 22 및 서열번호 23의 아미노산 서열로 기재되는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VH 영역, 및 각각 서열번호 24, 서열번호 25 및 서열번호 26의 아미노산 서열로 기재되는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VL 영역;
 - 각각 서열번호 31, 서열번호 32 및 서열번호 33의 아미노산 서열로 기재되는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VH 영역, 및 각각 서열번호 44, 서열번호 45 및 서열번호 46의 아미노산 서열로 기재되는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VL 영역;
 - 각각 서열번호 51, 서열번호 52 및 서열번호 53의 아미노산 서열로 기재되는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VH 영역, 및 각각 서열번호 54, 서열번호 55 및 서열번호 56의 아미노산 서열로 기재되는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VL 영역;
 - 각각 서열번호 61, 서열번호 62 및 서열번호 63의 아미노산 서열로 기재되는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VH 영역, 및 각각 서열번호 64, 서열번호 65 및 서열번호 66의 아미노산 서열로 기재되는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VL 영역;
 - 각각 서열번호 71, 서열번호 72 및 서열번호 73의 아미노산 서열로 기재되는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VH 영역, 및 각각 서열번호 74, 서열번호 75 및 서열번호 76의 아미노산 서열로 기재되는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VL 영역;
 - 각각 서열번호 81, 서열번호 82 및 서열번호 83의 아미노산 서열로 기재되는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VH 영역, 및 각각 서열번호 84, 서열번호 85 및 서열번호 86의 아미노산 서열로 기재되는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VL 영역; 및
 - 각각 서열번호 91, 서열번호 92 및 서열번호 93의 아미노산 서열로 기재되는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VH 영역, 및 각각 서열번호 94,

서열번호 95 및 서열번호 96의 아미노산 서열로 기재되는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VL 영역.

[청구항 2]

제1항에 있어서,

다음으로 이루어진 군에서 선택되는 중쇄 가변(VH) 영역 및 경쇄 가변(VL) 영역 쌍을 포함하는, 폴리펩티드:

- 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;
- 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;
- 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;
- 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;
- 서열번호 47의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열번호 48의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;
- 서열번호 57의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열번호 58의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;
- 서열번호 67의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;
- 서열번호 77의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열번호 78의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;
- 서열번호 87의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열번호 88의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역; 및
- 서열번호 97의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열번호 98의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역.

[청구항 3]

제1항에 있어서,

항체 또는 이의 항원 결합 단편인, 폴리펩티드.

[청구항 4]

제1항에 있어서,

scFv (single chain variable fragment), 펩티바디, Fab (fragment antigen binding), 단일클론 항체, 이중특이성 항체, 미니바디, 도메인 항체, 합성 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 또는 항체 융합체 단백질인, 폴리펩티드.

[청구항 5]

제1항에 있어서,

상기 VH 영역 및 상기 VL 영역이 링커에 의해 연결된 것인, 폴리펩티드.

[청구항 6]

제5항에 있어서,

상기 링커의 아미노산 서열이 GGGGSGGGGSGGGAS 인, 폴리펩티드.

[청구항 7]

제1항에 있어서,

서열번호 9, 서열번호 19, 서열번호 29, 서열번호 39, 서열번호 49,

- 서열번호 59, 서열번호 69, 서열번호 79, 서열번호 89 및 서열번호 99로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 scFv인, 폴리펩티드.
- [청구항 8] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 뮤신1-결합 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 9] 제8항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.
- [청구항 10] 제9항의 벡터를 포함하는 세포.
- [청구항 11] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 뮤신1-결합 폴리펩티드를 포함하는, 키메라 항원 수용체 (chimeric antigen receptor).
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 뮤신1-결합 폴리펩티드를 포함하는 세포의 도메인; 막관통 도메인; 및 세포내 신호 전달 도메인을 포함하는, 키메라 항원 수용체.
- [청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 세포의 도메인은 상기 뮤신1-결합 폴리펩티드와 막관통 도메인 사이에 스페이서 영역을 추가로 포함하는, 키메라 항원 수용체.
- [청구항 14] 제13항에 있어서, 상기 스페이서가 CD8 α 또는 CD28의 힌지 부위, 또는 면역글로불린 (IgG)의 불변영역의 전부 또는 일부를 포함하는 것인, 키메라 항원 수용체.
- [청구항 15] 제12항에 있어서, 상기 막관통 도메인이 CD28 또는 CD8의 막관통 도메인인, 키메라 항원 수용체.
- [청구항 16] 제12항에 있어서, 상기 세포내 신호 전달 도메인이 CD3 제타 신호전달 도메인인, 키메라 항원 수용체.
- [청구항 17] 제12항에 있어서, 1개 이상의 공동자극 도메인(co-stimulatory domain)을 더욱 포함하는, 키메라 항원 수용체.
- [청구항 18] 제17항에 있어서, 공동자극 도메인이 막관통 도메인과 세포내 신호 전달 도메인 사이에 위치한 것인, 키메라 항원 수용체.
- [청구항 19] 제17항에 있어서, 공동자극 도메인이 CD28, OX-40, 4-1BB (CD137), CD27 또는 ICOS의 신호전달 도메인인, 키메라 항원 수용체.
- [청구항 20] 제11항의 키메라 항원 수용체를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 21] 제20항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.
- [청구항 22] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 뮤신1-결합 폴리펩티드를 포함하는 키메라 항원 수용체를 발현하거나, 상기 키메라 항원 수용체를 코딩하는

- 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 면역 세포.
- [청구항 23] 제22항에 있어서,
T 세포, 종양 침윤 림프구 (TIL), NK (Natural killer) 세포, TCR-발현 세포, 수지상 세포, 또는 NK-T 세포인, 면역 세포.
- [청구항 24] 제22항에 있어서,
자가 T 세포 또는 동종 T 세포인, 면역 세포.
- [청구항 25] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 뮤신1-결합 폴리펩티드;
상기 뮤신1-결합 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드;
상기 뮤신1-결합 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터;
상기 뮤신1-결합 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 세포;
상기 뮤신1-결합 폴리펩티드를 포함하는 키메라 항원 수용체;
상기 키메라 항원 수용체를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드;
상기 키메라 항원 수용체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터; 또는
상기 키메라 항원 수용체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하거나
상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포를 포함하는,
암의 예방 또는 치료용 조성물.