

명세서

항-CD3 항체 및 이를 포함하는 암 치료용 약학적 조성물

5 기술분야

본 발명은 항-CD3 항체 및 이를 포함하는 암 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

10 다양한 사망 원인 중 암에 의한 사망은 2번째로 높은 비중을 차지할 정도로 빈번하게 일어나고 있다. 과거부터 암을 치료하기 위한 다양한 시도가 이루어져왔다. 현재, 암을 치료하기 위한 치료방법으로는 항암제 투여, 방사선 조사 또는 외과적 수술이 이루어지고 있다. 하지만, 이와 같은 치료방법은 암 초기에는 효과적일 수 있으나, 암 말기, 암이 다른 조직으로 전이된 경우 또는 암이 재발
15 된 경우에는 치료효과가 저조하다.

최근, 환자의 말초혈액으로부터 채취한 림프구를 시험관 내에서 대량 배양한 후, 환자에게 재이식 함으로써 암을 치료하는 차용세포 면역치료법 (Adoptive cellular immunotherapy)에 대한 연구가 주목을 받고 있다. 나아가, 환자의 말초혈액으로부터 채취한 면역세포를 시험관에서 대량으로 증식시키고,
20 암세포 용해물과 같은 항원을 처리하여 면역세포를 활성화시킨 후 환자에게 재투여함으로써, 암세포에 특이적인 독성 T세포가 암세포를 제거하도록 하는 기술도 개발되고 있다.

기술적 과제

25 본 발명은 전술한 종래기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 본 발명의 목적은 CD3에 대한 높은 결합 친화도를 가지는 항체 및 이를 이용하여 우수한 암 치료 효능을 가지는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야
30 의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

본 발명의 일 측면은, 서열번호 7, 8, 15 또는 16의 아미노산 서열과 80% 이상의 상동성을 가지는 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역(VL domain) 및 서열번호 18 내지 서열번호 25 중 어느 하나의 아미노산 서열과 80% 이상의 상동성을 가지는 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역(VH domain)을 포함하는 항체를 제공한다.

본 발명의 다른 측면은, 상기 항체의 경쇄 가변 영역(VL domain) 및 중쇄 가변 영역(VH domain)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

본 발명의 또 다른 측면은, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 제공한다.

본 발명의 또 다른 측면은, 상기 발현벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.

본 발명의 또 다른 측면은, 상기 숙주세포를 배양하는 단계를 포함하는 CD3에 특이적으로 결합하는 항체를 제조하는 방법을 제공한다.

본 발명의 또 다른 측면은, 상기 항체 또는 이의 단편을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

본 발명의 항체는 CD3에 대한 높은 친화도(affinity) 및 특이성(specificity)을 가지므로, 암의 예방 또는 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.

본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 항체의 인간 T세포에 대한 결합 친화도를 분석한 결과이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 항체의 원숭이 T세포에 대한 결합 친화도를 분석한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명의 일 측면은, 서열번호 7, 8, 15 또는 16의 아미노산 서열과 80% 이상의 상동성을 가지는 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역(VL domain) 및 서열번호 18 내지 서열번호 25 중 어느 하나의 아미노산 서열과 80% 이상의 상동성을 가지는 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역(VH domain)을 포함하는 항체를 제공한다.

상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 7, 8, 15 또는 16의 아미노산 서열과 80% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상, 가장 바람직하게는 99% 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.

또한, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 18 내지 25 중 어느 하나의 아미노산 서열과 80% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상, 가장 바람직하게는 99% 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.

상기 경쇄 가변 영역과 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체는 CD3(Cluster of differentiation 3)에 특이적으로 결합할 수 있다. 이 때, 상기 항체는 인간 및 원숭이 CD3에 대한 교차 반응성을 가질 수 있다. 즉, 상기 CD3는 인간 유래의 CD3와 원숭이 유래의 CD3를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 명세서에서 사용된 용어 "CD3"는 동물, 바람직하게는 인체 및 원숭이 내에 존재하는 CD3 자체, 임의의 변이체, 이소타입(isotype) 및 상동체(paralog)를 통칭하는 개념을 의미할 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용된 용어 "인간 CD3"는 인간 유래의 CD3를 의미한다. 본 명세서에서 사용된 용어 "원숭이 CD3"는 원숭이 유래의 CD3를 의미한다.

본 명세서에서 사용된 용어 "항체"는 특정 항원과 면역학적 반응성을 가지는 면역글로불린(Ig) 분자로, 항원을 특이적으로 인식하는 수용체 역할의 단백질 분자를 의미한다. 또한, 상기 항체는 전체 항체(whole antibody) 또는 항체 단편(antibody fragment)일 수 있다.

상기 경쇄 및 중쇄 가변 영역에서, CD3에 대한 친화도 및 특이성 등 본 발명의 목적에 부합하는 특성이 유지되는 한, 일부 아미노산이 치환, 삽입

및/또는 결실될 수 있다. 예컨대, 상기 경쇄 및/또는 중쇄 가변 영역에서는 아미노산의 보존적 치환(conservative substitution)이 일어날 수 있다. 보존적 치환은 본래의 아미노산 서열과 유사한 특성을 가지는 다른 아미노산 잔기로의 치환을 의미한다.

- 5 예를 들어 라이신, 아르기닌, 히스티딘은 염기 결사슬을 가지고 있어 유사한 특성을 가지고, 아스팔릭산과 글루타믹산은 산 결사슬을 가진다는 점에서 유사한 특성을 가진다. 또한, 글라이신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판은 비전하 극성 결사슬을 가진다는 점에서 특성이 유사하며, 알라닌, 발린, 루신, 트레오닌, 아이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌은 비극성 결사슬을 가지고 있다는 점에서, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘은 방향족 결사슬을 가지고 있다는 점에서 유사한 특성을 가진다.

- 15 따라서, 상기와 같이 유사한 특성을 가지는 그룹 내에서의 아미노산 치환이 일어나더라도 별다른 특성 변화를 보이지 않을 것이라는 점은 통상의 기술자에게 자명하므로, 상기 항체의 특성이 유지되는 한, 가변 영역 내에서의 보존적 치환에 의한 변이가 일어난 항체도 본 발명의 권리범위에 포함된다.

한편, 상기 항체는 CD3와의 특이적 결합을 통해 T세포, 구체적으로 T세포의 표면에 특이적으로 결합할 수 있다. 이 때, 상기 T세포는 인간 유래의 T세포와 원숭이 유래의 T세포를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- 20 즉, 상기 항체가 체내에 존재하는 경우 CD3와의 특이적 결합을 통해 T세포를 유인할 수 있다. 이에 따라 유인된 T세포는 그 주변의 면역 반응을 유도할 수 있고, 나아가 암세포와 같은 종양 등을 공격할 수도 있다.

- 25 상기 항체의 경쇄 및 중쇄 가변 영역은 CDR(Complementarity determining region) 및 FR(Framework region)으로 이루어질 수 있다. 통상적으로 CDR은 특정 항원에 대한 결합 특이성을 제공하고, FR은 항체의 접합 구조를 형성하거나 CDR의 결합을 지지하는 등의 기능을 한다.

상기 항체는 기존 마우스 항-CD3 항체인 SP34의 CDR은 그대로 유지하되, 불변 영역(Fc) 및 가변 영역의 FR의 아미노산 일부 또는 전부가 인간의 항체로 치환된 것일 수 있다.

- 30 상기 항체는 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1;

서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2; 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3; 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1; 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2; 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3을 포함할 수 있다.

5 이에 따라, 상기 항체는 인간 CD3에 특이적으로 결합하는 인간화(humanized) 항체일 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어 "인간화 항체"는 마우스와 같은 비인간 항체의 면역글로불린(Immunoglobulin)으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체를 의미하며, 이는 초가변 영역에 해당하는 서열을 제외한 모든 부분이 인간 항체의 서열로 치환된 항체를 의미할 수 있다.

10 또한, 용어 "초가변 영역(HVR)"은 항체의 서열에서 초가변성을 나타내거나, 구조상 규정된 루프를 형성하는 가변부위의 영역을 의미한다. 이를 나타내는 설명법 중 카바트 상보성 결정 영역(CDR)은 서열 가변성에 기초하여 영역을 분류하는 방식으로 가장 일반적으로 사용되고 있다.

상기 항체는 그 기능이 유지되는 한 항체 단편(antibody fragment)으로도
15 사용될 수 있다. 상기 항체 또는 항체 단편은 CD3에 대한 결합 기능을 유지하는 단쇄 항체, 디아바디(diabody), 트리아바디(triabody), 테트라바디(tetrabody), Fab 단편, F(ab')₂ 단편, Fd, scFv, 도메인 항체, 미니바디(minibody), 스캐프, IgD 항체, IgE 항체, IgM 항체, IgG1 항체, IgG2 항체, IgG3 항체, IgG4 항체, 항체 불변영역의 유도체들, 단백질 스캐폴드(protein scaffolds)에 기초한
20 인공항체 등일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

한편, 상기 항체는 종양 세포의 증식 억제 효능이 있는 항암 약물이 결합된 항체-약물 접합체(ADC, Antibody-drug conjugate) 형태로도 사용될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어 "항암"은 암의 "예방" 및 "치료" 효과를 포함하고, 상기 "예방"은 암을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
25 또한, 상기 "치료"는 암의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경시키는 모든 행위를 의미한다.

상기 항체-약물 접합체에 사용될 수 있는 약물은 세포독성 또는 세포증식 억제 효과를 갖는 임의의 화합물, 상기 화합물의 부분 또는 작용기를 포함하며, 마이크로튜불린(microtubulin) 구조 형성 억제제, 유사분열(meiosis) 억제제,
30 RNA 중합효소 억제제, 토포아이소머라아제(topoisomerase) 억제제, DNA

인터칼레이터(DNA intercalators), DNA 알킬레이터(DNA alkylator), 리보솜 억제제, miRNA, shRNA, siRNA, 방사선 동위원소, 독소 등이 포함되며, 상기 화합물에서 1종 이상이 사용될 수 있다.

상기 약물에는 마이탄시노이드, 아우리스타틴, 돌라스타틴, 트리코테센, CC1065(NSC 298223), 칼리케아미신, 탁산, 안트라시클린, 메토틀렉세이트, 아드리아마이신, 빈데신, 빈카 알카로이드(빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포시드), 독소루비신, 멜팔란, 미토마이신 C, 클로람부실, 다우노루비신, 다우노마이신, 에토포시드, 테니포시드, 카르미노마이신, 아미노프테린, 닥티노마이신, 미토마이신류, 블레오마이신류, 에스페라미신류, 다른 에네딘 항생제, 5-플루오로우라실, 기타 질소 머스타드 및 그의 입체 이성질체, 동배체, 동족체 또는 유도체, 시스-백금 및 시스-백금 동족체, 기타 삽입제인 효소 및 그의 단편, 예를 들어 핵산 분해 효소, 항생제, 독소(세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적 활성 독소 또는 소분자 독소), 시스플라틴, CPT-11, 파클리탁셀 및 도세탁셀 등의 각종 항종양 또는 항암제 등이 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

또한, 방사선 동위원소(방사선 핵종)에는 ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re 등이 있으며, 특정 암유전자(oncogene)의 발현을 억제시킬 수 있는 마이크로 RNA(miRNA), siRNA 및 shRNA 등도 사용될 수 있다.

상기 항-CD3 항체와 약물의 결합은 항체 내의 라이신이나 시스테인과 같은 아미노산 잔기의 티올(thiol)기 등의 기능기를 이용하여 접합되는 것이 바람직하고, 필요한 경우 통상적으로 사용되는 링커-매개(linker-mediated)의 형태로 접합시키는 것도 가능하며, 말레이미드 또는 요오드아세트아마이드 계열의 링커가 사용될 수도 있다.

항체 또는 그의 단편에 약물을 접합시킬 경우에는 항체 또는 단편의 CD3에 대한 결합능 및 특이성 등에 영향을 감소시키기 위한 측면에서 약물을 항원 결합부위의 반대편인 C-말단 부위에 접합시킬 수 있고, 단편이 아닌 전항체를 사용할 경우에는 Fc 영역에 접합시킬 수도 있다.

또한, 상기 항체는 이를 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR, Chimeric antigen receptor) 기반 치료제로도 사용될 수 있다. 이러한 치료제의 예로서는

CAR-T세포(Chimeric antigen receptor T Cell) 또는 CAR-NK 세포(Chimeric antigen receptor Natural killer cell) 치료제가 바람직할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

상기 항체는 항-CD3 항체를 포함하는 이중특이적 항체(bispecific antibody)의 형태로도 사용될 수 있다. 이중특이적 항체는 2가지 항원에 동시에 결합할 수 있는 능력을 가진 항체로서, 통상적으로 서로 다른 항원에 결합하는 각각의 중쇄 및 경쇄 쌍이 연결된 형태로 존재할 수 있다.

또한, 상기 이중특이적 항체는 VL과 VH가 짧은 링커 펩타이드(linker peptide)로 연결되어 있는 scFv(single-chain antibody fragments)가 scFv1-scFv2(-Fc) 형태로 연결된 이중특이성 단일사슬 항체(bispecific single chain antibody), VH를 이용한 sdAb(single domain antibody) 기반의 이중항체, 독일 Micromet사의 BiTE 기술(<http://www.micromet.de> 참조)을 이용한 이중특이적 항체의 형태 등으로도 이용 가능하다.

상기 이중특이적 항체는 상기 항-CD3 항체가 면역효능세포-특이적 표적분자에 대한 결합능을 가지는 항체 또는 그 단편과 결합된 형태로 존재할 수 있다. 면역효능세포 특이적 표적 분자는 TCR/CD3, CD16(FcγRIIIa), CD44, CD56, CD69, CD64(FcγRI), CD89 및 CD11b/CD18(CR3)에서 선택되는 것이 바람직할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 다른 측면은, 상기 항체의 경쇄 가변 영역(VL domain) 및 중쇄 가변 영역(VH domain)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 이를 포함하는 발현벡터를 제공한다.

상기 항체 또는 상기 항체 단편의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 즉 유전자는 상기 항-CD3 항체의 아미노산 서열로부터 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 도출할 수 있다.

본 명세서에서 사용된 용어 "발현벡터"는 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 재조합 벡터로서, 삽입된 유전자가 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 의미한다. 상기 항-CD3 항체를 코딩하는 유전자는 별개의 벡터에 삽입될 수도 있고, 하나의 벡터에 삽입된 형태로 이용될 수도 있다.

구체적으로, 상기 항-CD3 항체의 아미노산 서열을 코딩하는

폴리뉴클레오티드가 각각 별개 또는 하나의 벡터에 삽입된 형태로 이용될 수 있으며, 중쇄 또는 그 가변영역 등을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 각각 별개 또는 하나의 벡터에 삽입된 형태로 이용될 수 있다.

본 명세서에서 사용된 용어 "작동 가능하게 연결된(operably linked)"은
 5 목적하는 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다. 재조합 벡터와의 작동 가능한 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위 특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용하여 용이하게 할 수 있다.

10 상기 항-CD3 항체의 생산에 적합한 발현벡터는 프로모터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열을 포함할 수 있다. 개시 코돈 및 종결 코돈은 일반적으로 번역원성 표적 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 일부로 간주되고, 유전자 작제물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을
 15 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 일반 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 프로모터로는 lac, tac, T3, 및 T7의 원핵 세포, 원숭이 바이러스 40(SV40), 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, 사람 면역 결핍 바이러스(HIV), 예를 들면 HIV의 긴 말단 반복부(LTR) 프로모터, 몰로니 바이러스, 시토메갈로바이러스(CMV), 엡스타인 바 바이러스(EBV), 로우스
 20 사코마 바이러스(RSV) 프로모터뿐만 아니라, β -액틴 프로모터, 사람 헤로글로빈, 사람 근육 크레아틴, 사람 메탈로티오네인 유래의 진행세포 프로모터 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

 상기 발현벡터는 이를 함유하는 숙주세포를 선택하기 위한 선택성 마커를 포함할 수 있다. 선택성 마커는 벡터로 형질전환된 세포를 선별하기 위한 것으로,
 25 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 단백질의 발현과 같은 선택 가능한 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 선택제(selective agent)가 처리된 환경에서는 선별 마커를 발현하는 세포만 생존하므로 형질 전환된 세포를 선별할 수 있다. 또한, 상기 벡터가 복제 가능한 발현벡터인 경우, 복제가 개시되는 특정 핵산 서열인 복제원점(replication
 30 origin)을 포함할 수 있다.

외래 유전자를 삽입하기 위한 재조합 발현벡터로는 플라스미드, 바이러스, 코즈미드 등 다양한 형태의 벡터를 사용할 수 있다. 재조합 벡터의 종류는 원핵세포 및/또는 진핵세포의 각종 숙주세포에서 원하는 유전자를 발현하고 원하는 단백질을 생산하는 기능을 하는 한 특별히 한정되지 않으나, 강력한 5 활성을 나타내는 프로모터와 강한 발현력을 보유하면서 자연 상태와 유사한 형태의 외래 단백질을 대량으로 생산할 수 있는 벡터가 바람직할 수 있다.

상기 항-CD3 항체를 발현시키기 위해 다양한 발현 숙주/벡터 조합이 이용될 수 있다. 진핵숙주에 적합한 발현벡터로는 SV40, 소 유두종바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus), 10 시토메갈로바이러스 및 레트로바이러스로부터 유래된 발현 조절 서열 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 세균 숙주에 사용할 수 있는 발현벡터에는 pET, pRSET, pBluescript, pGEX2T, pUC벡터, colE1, pCR1, pBR322, pMB9, 및 이들의 유도체와 같이 대장균(*Escherichia coli*)에서 얻어지는 세균성 플라스미드, RP4와 같이 보다 넓은 숙주 범위를 갖는 플라스미드, γ gt10과 γ gt11, 15 NM989와 같은 매우 다양한 파지 람다(phage lambda) 유도체로 예시될 수 있는 파지 DNA, 및 M13과 필라멘트성 단일가닥의 DNA 파지와 같은 기타 다른 DNA 파지가 포함될 수 있다. 효모 세포에 유용한 발현벡터는 2 micron 플라스미드 및 그의 유도체일 수 있다. 곤충 세포에 유용한 벡터는 pVL941일 수 있다.

본 발명의 또 다른 측면은, 상기 발현벡터로 형질전환된 숙주세포를 20 제공한다. 상기 발현벡터는 숙주세포에 삽입되어 형질 전환체를 형성할 수 있다. 상기 벡터의 적합한 숙주세포는 대장균, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.), 슈도모나스 속(*Pseudomonas* sp.), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 또는 스태필로코쿠스 속(*Staphylococcus* sp.)과 같은 원핵 세포일 수 있다. 또한, 아스페르길러스 25 속(*Aspergillus* sp.)과 같은 진균, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로마세스 속(*Schizosaccharomyces* sp.) 및 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*)와 같은 효모, 그 밖의 하등진핵 세포, 및 곤충으로부터의 세포와 같은 고등 진핵생물의 세포와 같은 진핵 세포일 수 있다. 또한 상기 숙주세포는 식물, 포유동물로부터

유래할 수도 있다. 바람직하게는, 원숭이 신장 세포7(COS7, monkey kidney cells)세포, NSO 세포(마우스 기원의 골수종 세포), SP2/0 세포(마우스 기원의 골수종 세포), 기타 골수종 세포주, 차이나이즈 햄스터 난소(CHO, Chinese hamster ovary) 세포, W138 세포(diploid human cell culture), 어린 햄스터 신장(BHK, Baby hamster kidney)세포, MDCK, HuT 78 세포 및 HEK293 세포 등을 사용할 수 있고, 바람직하게는 CHO 세포를 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 명세서에서 사용된 용어 "숙주세포로의 형질전환"은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다.

구체적으로 전기천공법(electroporation), 원형질 융합, 인산 칼슘(CaPO_4) 침전, 염화 칼슘(CaCl_2) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로 박테리아 매개된 형질 전환, PEG, 덱스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질 전환 방법 등을 이용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 또 다른 측면은, 상기 숙주세포를 배양하는 단계를 포함하는, CD3에 특이적으로 결합하는 항체를 제조하는 방법을 제공한다. 구체적으로, 상기 항체의 제조방법은 상기 항-CD3 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제조하는 단계; 상기 재조합 벡터를 숙주세포에 형질전환시켜 배양하는 단계; 및 상기 배양된 형질 전환체로부터 인간화 항체를 분리 및 정제하는 단계;를 포함할 수 있다.

상기 재조합 벡터가 발현되는 형질 전환체를 영양배지에서 배양함으로써 인간화 항체를 대량으로 생산할 수 있으며, 배지와 배양조건은 숙주세포에 따라 관용되는 것을 적절히 선택할 수 있다. 배양 시 세포의 생육과 단백질의 대량 생산에 적합하도록 온도, 배지의 pH 및 배양시간 등의 조건들을 적절하게 조절할 수 있다.

상기와 같이 재조합으로 생산된 항-CD3 항체는 배지 또는 세포 분해물로부터 회수될 수 있다. 막 결합형인 경우, 적합한 계면활성제 용액(예, 트리톤-X 100)을 사용하거나 효소적 절단에 의해 막으로부터 유리될 수 있다. 인간화 항체 발현에 사용된 세포는 동결-해동 순화, 음파처리, 기계적 파괴 또는 세포 분해제와 같은 다양한 물리적, 화학적 수단에 의해 파괴될 수 있으며, 통상적인 생화학 분리 기술에 의해서 분리, 정제될 수 있다. 전기영동, 원심분리,

겔여과, 침전, 투석, 크로마토그래피(이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 면역흡착 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피 등), 등전점 포커싱 등을 이용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 또 다른 측면은, 상기 항체 또는 이의 단편을 포함하는 암
5 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

상기 약학적 조성물로 치료할 수 있는 암의 종류는 고형암 및 혈액암을 모두 포함할 수 있고, 바람직하게는 CD3가 발현되는 모든 암을 포함할 수 있다. 이 때, 상기 항체는 CD3와의 특이적 결합을 통해 T세포를 유인함으로써 암세포의 사멸을 유도할 수 있다.

10 구체적으로, 상기 암은 췌장암, 간암, 위암, 폐암, 대장암, 직장암, 갑상선암, 식도암, 신장암, 방광암, 전립선암, 자궁경부암, 유방암, 혈액암, 피부암, 상피암, 뇌암, 중추신경암 또는 난소암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수
15 있다. 경구 투여 시에는 결합제, 활탁제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있고, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소 투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다.

20 상기 약학적 조성물의 제형은 상술한 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여 시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릴시르, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조될 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조될 수 있다.

또한, 상기 약학적 조성물은 막 투과성을 향상시킬 수 있는 계면활성제를
25 포함할 수 있다. 이러한 계면활성제는 스테로이드에서 유도된 것이거나 N-[1-(2,3-디올레오일)프로필-N,N,N-트리메틸암모늄클로라이드(DOTMA)] 등의 양이온성 지질, 또는 콜레스테롤 헤미숙시네이트, 포스파티딜 글리세롤 등의 각종 화합물일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 또 다른 측면은, 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하여 암을
30 치료하거나 암의 성장을 억제하는 방법이 제공된다. 상기 항-CD3 항체를

포함하는 약학적 조성물은 암세포 또는 그들의 전이를 치료하거나 암의 성장을 억제하기 위해 약학적으로 효과적인 양으로 투여될 수 있다. 암 종류, 환자의 연령, 체중, 증상의 특성 및 정도, 현재 치료법의 종류, 치료 회수, 투여 형태 및 경로 등 다양한 요인에 따라 달라질 수 있으며, 해당 분야의 전문가들에 의해
5 용이하게 결정될 수 있다.

상기 약학적 조성물은 상기한 약리학적 또는 생리학적 성분과 함께 투여되거나 순차적으로 투여될 수 있으며, 또한 추가의 종래의 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 이러한 투여는 단일 또는 다중 투여일 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여
10 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

본 명세서에서 사용된 용어 "개체"는 상기 약학적 조성물을 투여하여 경감, 억제 또는 치료될 수 있는 상태 또는 질환을 앓고 있거나 그러한 위험이 있는 포유동물을 의미하며, 바람직하게 사람을 의미한다.

본 명세서에서 사용된 용어 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 개체에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 약학적 조성물은 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 경로를 통해서도 투여될 수 있다. 이러한 투여
15 방법으로 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여 또는 직장내 투여 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 다만 경구 투여시, 단백질은 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 하는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 제약 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있도록 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
20

본 발명의 또 다른 측면은, 암을 예방 또는 치료하기 위한 본 발명의
25 항체의 용도를 제공한다.

본 발명의 또 다른 측면은, 암의 예방 또는 치료용 약제를 제조하기 위한 본 발명의 항체의 용도를 제공한다.

본 발명의 또 다른 측면은, 본 발명의 항체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

발명의 실시를 위한 형태

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 목적으로 기술된 것으로서, 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

5

실시예 1. 인간화 항-CD3 항체 후보 제작

실시예 1.1. 인간화 대상 후보 항체 선정

항-CD3 항체로 알려진 마우스 SP34의 경쇄 가변 영역(VL domain) 및 중쇄 가변 영역(VH domain)의 아미노산 서열을 웹 기반 데이터베이스(IgBLAST)에
10 입력한 뒤, 가장 유사한 인간 배아의 항체 서열을 검색하였다. 그 결과, 마우스 SP34의 경쇄 가변 영역과 *Homo sapiens* IGLV7-46*01(IGMT gene name)의 아미노산 서열 유사도가 가장 높게 나타났고, 마우스 SP34의 중쇄 가변 영역과 *Homo sapiens* IGHV3-73*02(IGMT gene name)의 아미노산 서열 유사도가 가장 높게 나타났다.

15

실시예 1.2. 경쇄 가변 영역 인간화

SP34의 경쇄 가변 영역과 가장 유사한 인간 배아의 항체인 *Homo sapiens* IGLV7-46*01(IGMT gene name)의 CDR 아미노산 서열을 마우스 SP34의 CDR 서열로 교체하여 부분적으로 인간화된 SP34의 경쇄 가변 영역을 제조하였다.

20 상기 부분적으로 인간화된 SP34경쇄 가변 영역의 항원 결합성을 향상시키기 위해, FR(Framework region) 서열 중 항원과의 결합성에 중요한 기능을 수행할 것으로 생각되는 아미노산 잔기를 마우스 SP34와 동일하게 치환하였다. 이에 따라 제조된 인간화 SP34의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 하기 표 1에 나타내었다.

25 표 1을 참고하면, 마우스 SP34 경쇄 가변 영역의 38, 48, 51, 71번 아미노산 잔기에 무작위 변형을 가하여, 총 16개의 인간화 SP34 경쇄 가변 영역을 제조하였다. 이 때, CD3 항원에 대한 친화도 비교를 위한 대조군으로 마우스 SP34의 경쇄 가변 영역을 이용하였다.

30

【표 1】

클론	가변 영역	아미노산 서열 (굵게 표시된 부분은 순서대로 경쇄 CDR1, CDR2, CDR3를 나타냄)	서열 번호
01	경쇄	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQKPGQAPRTL IYGINKRAPWTPARFSGSL LGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLG	1
02	경쇄	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQKPGQAPRTL IYGINKRAPWTPARFSGSL LGDKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLG	2
03	경쇄	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQKPGQAPRTL IGGINKRAPWTPARFSGSL LGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLG	3
04	경쇄	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQKPGQAPRTL IGGINKRAPWTPARFSGSL LGDKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLG	4
05	경쇄	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQKPGQAPRGL IYGINKRAPWTPARFSGSL LGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLG	5
06	경쇄	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQKPGQAPRGL IYGINKRAPWTPARFSGSL LGDKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLG	6
07	경쇄	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQKPGQAPRGL IGGINKRAPWTPARFSGSL LGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLG	7
08	경쇄	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQKPGQAPRGL IGGINKRAPWTPARFSGSL LGDKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLG	8
09	경쇄	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQKPGQAPRTL IYGINKRAPWTPARFSGSL LGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLG	9
10	경쇄	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQKPGQAPRTL IYGINKRAPWTPARFSGSL LGDKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLG	10
11	경쇄	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQKPGQAPRTL IGGINKRAPWTPARFSGSL LGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLG	11
12	경쇄	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQKPGQAPRTL IGGINKRAPWTPARFSGSL LGDKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLG	12
13	경쇄	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQKPGQAPRGL IYGINKRAPWTPARFSGSL LGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLG	13
14	경쇄	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQKPGQAPRGL IYGINKRAPWTPARFSGSL LGDKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLG	14
15	경쇄	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQKPGQAPRGL IGGINKRAPWTPARFSGSL LGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLG	15
16	경쇄	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQKPGQAPRGL IGGINKRAPWTPARFSGSL LGDKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLG	16
SP34	경쇄	QAVVTQESALTTPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQEKPDHFTGL IGGINKRAPGVPARFSGSL IGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLG	17

실시예 1.3. 중쇄 가변 영역의 인간화

SP34의 중쇄 가변 영역과 가장 유사한 인간 배아의 항체인 *Homo sapiens* IGLV3-73*02(IMG gene name)의 CDR 아미노산 서열을 마우스 SP34의 CDR 서열로
5 교체하여 부분적으로 인간화된 SP34의 중쇄 가변 영역을 제조하였다.

상기 부분적으로 인간화된 SP34중쇄 가변 영역의 항원 결합성을 향상시키기 위해, FR(Framework region) 서열 중 항원과의 결합성에 중요한 기능을 수행할 것으로 생각되는 아미노산 잔기를 마우스 SP34와 동일하게 치환하였다. 이에 따라 제조된 인간화 SP34의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은

하기 표 2에 나타내었다.

- 표 2를 참고하면, 마우스 SP34 중쇄 가변 영역의 49, 78, 79, 81번 아미노산 잔기에 무작위 변형을 가하여, 총 8개의 인간화 SP34 중쇄 가변 영역을 제조하였다. 이 때, CD3 항원에 대한 친화도 비교를 위한 대조군으로 마우스 SP34의 중쇄 가변 영역을 이용하였다.

【표 2】

클론	가변 영역	아미노산 서열 (굵게 표시된 부분은 순서대로 중쇄 CDR1, CDR2, CDR3를 나타냄)	서열 번호
A	중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFTNTYAMNWRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVK DRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSS	18
B	중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFTNTYAMNWRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVK DRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSS	19
C	중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFTNTYAMNWRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVK DRFTISRDDSQSTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSS	20
D	중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFTNTYAMNWRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVK DRFTISRDDSQSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSS	21
E	중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFTNTYAMNWRQASGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVK DRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSS	22
F	중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFTNTYAMNWRQASGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVK DRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSS	23
G	중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFTNTYAMNWRQASGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVK DRFTISRDDSQSTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSS	24
H	중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFTNTYAMNWRQASGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVK DRFTISRDDSQSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSS	25
SP34	중쇄	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFTNTYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVK DRFTISRDDSQSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSS	26

실시에 1.4. 인간화 항-CD3 항체 후보 클로닝

- 앞서 제조한 16개의 경쇄 가변 영역 유전자를 램다 경쇄 불변 영역(λ -CL)이 포함된 pcDNA3.4 동물 세포 발현벡터에 각각 삽입하고, 8개의 중쇄 가변 영역 유전자를 IgG1의 불변 영역(CH1, hinge, CH2, CH3)이 포함된 pcDNA3.4 동물 세포 발현벡터에 각각 삽입하였다.

- 람다 경쇄 불변 영역 및 IgG1 중쇄 불변 영역 각각의 구체적인 아미노산 서열은 아래 표 3에 나타내었다.

【표 3】

클론	불변 영역	아미노산 서열	서열 번호
λ	경쇄	QPKANPTVTLPSPSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAA SSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC	27
IgG1	중쇄	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	28

실시에 1.5. 인간화 항-CD3 항체 후보의 형질주입(transfection)

형질주입 24시간 전, Expi293 배지를 이용하여 2.0×10^6 cells/ml 농도의 Expi293F 세포를 37℃ 온도, 8% CO₂ 조건의 진탕배양기(shaking incubator)에서
 5 125±10 rpm으로 계대하였다. 형질주입 수행 시, 세포수와 세포 생존율(viability)을 측정하여 95% 이상의 세포 생존율을 나타내는지 확인하였다.

125 ml 배양 플라스크에 7.5×10^7 세포수의 세포를 분주한 후, Expi293 배지를 첨가하여 최종 25 ml로 조정하였다(30 ml 기준). Opti-MEM I 배지를 이용하여 30 µg의 항체 발현벡터가 총 1.5 ml가 되도록 섞어 주고 실온에서
 10 5분간 배양하였다. 항체 벡터로는 8종의 중쇄 가변 영역의 발현벡터와 16종의 경쇄 가변 영역의 발현벡터 조합으로 총 128개의 인간화 SP34 IgG1 항체를 사용하였다. 대조군 항체 벡터로는 마우스 인간 키메라 SP34 IgG1 항체를 사용하였다. 구체적인 항체의 조합은 아래 표 4에 나타내었다.

15 【표 4】

클론		중쇄 (VH)							
		A	B	C	D	E	F	G	H
경쇄 (VL)	01	A01	B01	C01	D01	E01	F01	G01	H01
	02	A02	B02	C02	D02	E02	F02	G02	H02
	03	A03	B03	C03	D03	E03	F03	G03	H03
	04	A04	B04	C04	D04	E04	F04	G04	H04
	05	A05	B05	C05	D05	E05	F05	G05	H05
	06	A06	B06	C06	D06	E06	F06	G06	H06
	07	A07	B07	C07	D07	E07	F07	G07	H07
	08	A08	B08	C08	D08	E08	F08	G08	H08
	09	A09	B09	C09	D09	E09	F09	G09	H09
	10	A10	B10	C10	D10	E10	F10	G10	H10

	11	A11	B11	C11	D11	E11	F11	G11	H11
	12	A12	B12	C12	D12	E12	F12	G12	H12
	13	A13	B13	C13	D13	E13	F13	G13	H13
	14	A14	B14	C14	D14	E14	F14	G14	H14
	15	A15	B15	C15	D15	E15	F15	G15	H15
	16	A16	B16	C16	D16	E16	F16	G16	H16

Opti-MEM I 배지를 이용하여 80 μ l의 transfection reagent가 총 1.5 ml가 되도록 섞어 주고 상온에서 5분간 배양하였다. 벡터와 transfection reagent가 각각 들어있는 Opti-MEM I을 부드럽게 섞어주고 20분간 상온에서
 5 반응시킨 후, Expi293F 세포가 포함된 플라스크에 넣어주었다. 37°C 온도, 8% CO₂ 조건의 진탕배양기에서 125 $\pm$ 10 rpm으로 16시간 내지 20시간 동안 배양한 후, transfection enhancer I을 1.5 ml, enhancer II를 150 μ l 첨가하고, 6일간 배양하여 후보 항체들을 수득하였다.

10 실시예 1.6. 항체의 정제

배양액을 4,000 rpm에서 30분 동안 원심분리하고, 0.22 μ m 필터로 여과한 뒤 세포 잔해물을 제거하고 상등액을 얻었다. Mabselect Xtra resin 0.2 ml을 컬럼에 넣고, 레진 볼륨의 10배에 해당하는 Protein A binding buffer를 이용하여 평형을 수행하였다.

15 이후 그래비티(gravity)를 이용하여 상등액을 컬럼에 로딩(loading)하고, 로딩이 완료된 뒤 레진 볼륨의 10배에 해당하는 Protein A binding buffer를 이용하여 컬럼을 세척하였다.

이후 IgG elution buffer를 컬럼에 넣고 용출하였다. 1.5M Tris-Cl을 용출액 1 ml 당 25 μ l를 넣어 중화한 후, OD 280 nm 파장에서 농도를 측정하였다.
 20 농도가 측정된 용출액은 투석을 통해 PBS로 버퍼를 치환하였다.

실시예 2. 인간화 항-CD3 항체 선별

ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)를 이용하여 총 128개의 항-CD3 항체(SP34) 조합 중에서 인간 및 원숭이 CD3에 대해 친화도를 나타내는
 25 항체를 선별하였다.

구체적으로, 재조합 인간, 원숭이(Cynomolgus monkey) CD3 ϵ / δ 이형

중합체를 코팅 버퍼(coating buffer)에 희석하여 96-웰-플레이트에 처리하고, 4℃ 온도에서 12시간 이상 보관하였다. 이후 버퍼를 제거하고, 1% BSA(bovine serum albumin)/PBS 용액을 실온에서 1시간 처리한 후, 용액을 제거하였다. 그 다음, 재조합 CD3가 코팅된 웰에 항체 발현 배양액을 1시간 정도 처리하였다.

- 5 0.05% Tween20/PBS 용액으로 웰을 세척한 후, 겨자무과산화효소(horseradish peroxidase)가 결합된 인간 IgG 항체를 1% BSA/PBS 용액에 희석하여 실온에서 1시간 처리한 후, 용액을 제거하고 0.05% Tween20/PBS 용액으로 웰을 세척하였다.

- 10 TMB(3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidine) 용액을 96-웰-플레이트에 처리하여 실온에서 30분 정도 방치한 다음 정지 용액(stop solution)을 처리하고 바로 흡광도 450 nm 파장에서 발색 정도를 파악하였다. 인간화 SP34 항체 후보들 중에서 발색이 되는 시료들만이 마우스 SP34 항체의 CD3에 대한 친화력을 유지하는 클론을 의미한다. 구체적인 친화력 측정 결과는 아래 표 5에 나타내었다.

15

【표 5】

Clone	흡광도(450nm)			Clone	흡광도(450nm)		
	BSA	human CD3	cyno CD3		BSA	human CD3	cyno CD3
A01	0.107	0.152	0.098	E01	0.078	0.100	0.078
A02	0.071	0.098	0.068	E02	0.077	0.095	0.070
A03	0.092	0.132	0.094	E03	0.098	0.134	0.076
A04	0.063	0.098	0.065	E04	0.080	0.087	0.067
A05	0.152	0.167	0.141	E05	0.083	0.085	0.068
A06	0.084	0.140	0.108	E06	0.206	0.112	0.086
A07	0.089	1.315	2.546	E07	0.097	0.109	0.115
A08	0.094	0.875	2.339	E08	0.106	0.074	0.099
A09	0.061	0.092	0.050	E09	0.072	0.096	0.084
A10	0.077	0.097	0.066	E10	0.064	0.083	0.065
A11	0.072	0.122	0.105	E11	0.065	0.098	0.075
A12	0.060	0.097	0.068	E12	0.059	0.088	0.064
A13	0.098	0.172	0.154	E13	0.085	0.139	0.114
A14	0.082	0.125	0.113	E14	0.068	0.105	0.078
A15	0.099	2.785	2.864	E15	0.130	2.411	2.702
A16	0.068	2.538	2.799	E16	0.089	2.399	2.736
B01	0.055	0.097	0.071	F01	0.084	0.118	0.086
B02	0.059	0.086	0.072	F02	0.062	0.093	0.076
B03	0.071	0.126	0.091	F03	0.078	0.128	0.101
B04	0.053	0.087	0.059	F04	0.057	0.084	0.069

B05	0.069	0.102	0.100	F05	0.066	0.105	0.075
B06	0.077	0.138	0.143	F06	0.079	0.115	0.096
B07	0.061	0.718	2.449	F07	0.142	0.133	0.163
B08	0.060	0.424	2.193	F08	0.076	0.134	0.180
B09	0.063	0.096	0.099	F09	0.071	0.099	0.084
B10	0.078	0.098	0.076	F10	0.068	0.118	0.091
B11	0.074	0.132	0.107	F11	0.071	0.138	0.104
B12	0.059	0.098	0.072	F12	0.090	0.090	0.077
B13	0.130	0.169	0.156	F13	0.076	0.192	0.151
B14	0.078	0.127	0.102	F14	0.071	0.114	0.100
B15	0.204	2.709	3.161	F15	0.081	2.489	2.755
B16	0.064	2.370	2.926	F16	0.066	2.455	2.855
C01	0.128	0.131	0.075	G01	0.080	0.113	0.096
C02	0.108	0.099	0.071	G02	0.075	0.146	0.069
C03	0.126	0.140	0.089	G03	0.078	0.098	0.088
C04	0.073	0.093	0.067	G04	0.067	0.129	0.063
C05	0.099	0.107	0.128	G05	0.079	0.109	0.072
C06	0.080	0.108	0.083	G06	0.095	0.118	0.078
C07	0.113	0.960	2.604	G07	0.077	0.118	0.316
C08	0.111	0.446	2.178	G08	0.148	0.137	0.119
C09	0.083	0.109	0.075	G09	0.083	0.106	0.079
C10	0.066	0.096	0.074	G10	0.072	0.099	0.079
C11	0.168	0.288	0.261	G11	0.086	0.104	0.080
C12	0.065	0.087	0.065	G12	0.057	0.085	0.065
C13	0.128	0.179	0.179	G13	0.132	0.265	0.242
C14	0.075	0.107	0.095	G14	0.075	0.105	0.099
C15	0.098	2.454	2.813	G15	0.091	2.415	2.694
C16	0.092	2.369	2.802	G16	0.108	2.482	2.773
D01	0.124	0.136	0.099	H01	0.087	0.121	0.154
D02	0.056	0.150	0.073	H02	0.125	0.111	0.080
D03	0.073	0.159	0.130	H03	0.068	0.113	0.085
D04	0.083	0.091	0.072	H04	0.055	0.077	0.068
D05	0.061	0.121	0.101	H05	0.059	0.078	0.061
D06	0.092	0.136	0.110	H06	0.086	0.134	0.101
D07	0.074	1.168	2.393	H07	0.060	0.110	0.090
D08	0.083	0.897	2.532	H08	0.091	0.118	0.136
D09	0.083	0.122	0.098	H09	0.085	0.141	0.113
D10	0.076	0.117	0.113	H10	0.055	0.088	0.077
D11	0.105	0.138	0.134	H11	0.083	0.122	0.142
D12	0.081	0.095	0.114	H12	0.060	0.099	0.083
D13	0.314	0.569	0.532	H13	0.083	0.175	0.196
D14	0.121	0.149	0.113	H14	0.064	0.096	0.094
D15	0.108	2.529	3.006	H15	0.067	2.436	2.836
D16	0.080	2.655	2.872	H16	0.080	2.461	2.873

상기 표 5의 결과와 같이 A7, A8, A15, A16, B7, B8, B15, B16, C7, C8, C15, C16, D7, D8, D15, D16, E15, E16, F15, F16, G15, G16, H15, H16의 24개

클론이 인간 및 원숭이 CD3에 대한 친화도를 유지하는 것으로 나타났다. 따라서, 상기 24개의 클론을 인간화 항-CD3 항체(SP34)로 선별하였다.

실시예 3. 인간화 항-CD3 항체의 재조합 CD3에 대한 친화도 측정

5 Octet system을 이용하여 상기 실시예 2에 따라 선별한 인간화 항-CD3 항체(SP34)의 재조합 CD3에 대한 친화도를 측정하였다.

구체적으로, 재조합 인간 또는 원숭이 CD3 ϵ/δ 를 1X kinetic buffer에 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 제작하여 200 $\mu\text{l}/\text{well}$ 96-웰-플레이트에 처리하고, 처리된 CD3 ϵ/δ 를 anti-Penta His(HIS1K, Cat#18-5121, Fortebio) 센서에 고정시켰다.

10 상기 ELISA 결과에서 재조합 인간, 원숭이 CD3 ϵ/δ 에 대한 결합 친화도를 나타낸 클론들을 1X kinetic buffer에 50 nM 농도로 제작하여 200 $\mu\text{l}/\text{well}$ 로 처리하였다. 1X kinetic buffer는 10X kinetic buffer(ForteBio, Cat#18-1092)를 PBS로 10배 희석하여 사용하였다.

15 센서에 고정된 CD3 ϵ/δ 와 50 nM 농도의 항체 간의 상호작용을 분석하여 항원/항체간의 친화도를 산출하였고, 그 결과를 아래 표 6에 나타내었다.

【표 6】

Ag	Human CD3E/D			Cyno CD3E/D		
Clone	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
cSP34	2.29E-10	2.62E+05	6.01E-05	1.40E-10	3.78E+05	5.30E-05
A7	1.95E-08	1.19E+05	2.32E-03	2.05E-08	1.53E+05	3.15E-03
B7	2.14E-08	1.98E+05	4.23E-03	3.09E-08	2.08E+05	6.42E-03
C7	2.30E-08	1.52E+05	3.49E-03	2.75E-08	1.94E+05	5.35E-03
D7	1.90E-08	1.13E+05	2.14E-03	2.00E-08	1.43E+05	2.84E-03
A8	2.22E-08	1.02E+05	2.26E-03	2.19E-08	1.47E+05	3.21E-03
B8	2.76E-08	1.48E+05	4.07E-03	2.63E-08	1.99E+05	5.25E-03
C8	2.94E-08	1.08E+05	3.17E-03	3.56E-08	1.66E+05	5.89E-03
D8	3.50E-08	8.20E+04	2.87E-03	2.16E-08	1.23E+05	2.66E-03
A15	2.96E-10	3.23E+05	9.58E-05	3.64E-10	4.53E+05	1.65E-04
B15	5.21E-10	3.71E+05	1.93E-04	6.27E-10	5.23E+05	3.28E-04
C15	4.30E-10	3.76E+05	1.62E-04	6.53E-10	5.25E+05	3.43E-04
D15	2.94E-10	3.27E+05	9.60E-05	5.33E-10	4.37E+05	2.33E-04
E15	1.74E-09	2.25E+05	3.92E-04	1.86E-09	2.90E+05	5.40E-04
F15	1.04E-09	1.97E+05	2.06E-04	1.33E-09	2.24E+05	2.97E-04
G15	1.59E-09	2.09E+05	3.32E-04	1.72E-09	2.69E+05	4.61E-04
H15	9.53E-10	1.99E+05	1.89E-04	1.17E-09	2.30E+05	2.69E-04
A16	2.93E-10	2.75E+05	8.07E-05	6.57E-10	3.70E+05	2.43E-04

B16	4.45E-10	3.22E+05	1.44E-04	6.60E-10	4.66E+05	3.08E-04
C16	4.19E-10	2.68E+05	1.12E-04	8.88E-10	3.84E+05	3.41E-04
D16	4.46E-10	2.40E+05	1.07E-04	6.11E-10	3.56E+05	2.17E-04
E16	1.76E-09	1.62E+05	2.84E-04	2.19E-09	2.20E+05	4.82E-04
F16	8.52E-10	1.41E+05	1.20E-04	1.37E-09	1.85E+05	2.53E-04
G16	1.32E-09	1.53E+05	2.01E-04	1.75E-09	1.95E+05	3.40E-04
H16	8.81E-10	1.36E+05	1.20E-04	1.13E-09	1.82E+05	2.06E-04

상기 표 6의 결과와 같이 모든 클론들이 인간 및 원숭이 CD3 ϵ/δ 에 모두 우수한 친화도를 나타내며, 이들 중 특히 A15, B15, C15, D15, A16, B16, C16, 및 D16 클론의 친화도가 가장 우수한 것으로 확인되었다.

5

실시예 4. 인간화 항-CD3 항체의 인간 T세포에 대한 친화도 측정

유세포분석(Flow cytometry)을 이용하여 상기 실시예 2에 따라 선별한 인간화 항-CD3 항체(SP34)의 인간 T세포에 대한 친화도를 측정하였다.

구체적으로, 항체 시료 한 개당 H9(ATCC® HTB-176TM) 세포를 100 μ l FACS buffer(1% FBS/FACS sheath)에 2×10^5 개씩 준비한 뒤, 1 μ g의 항체를 세포에 처리하고, 4°C 온도의 암실에서 25분간 보관하였다. 이후 3 ml의 FACS buffer를 처리하고, 2,000 rpm에서 3분간 원심분리한 다음 상등액을 버렸다.

다음으로, PE(Phycoerythrin)가 결합된 인간 IgG 항체 1 μ g이 포함된 100 μ l FACS buffer를 세포에 처리하고, 4°C 온도의 암실에서 25분간 보관하였다. 이후 3 ml의 FACS buffer를 처리하고, 2,000 rpm에서 3분간 원심분리한 다음 상등액을 버렸다.

4% 포름알데히드 용액을 세포에 처리하고, 4°C 온도의 암실에서 30분간 보관한 뒤, 3 ml의 FACS buffer를 처리하고, 2,000 rpm에서 3분간 원심분리한 다음 상등액을 버렸다. 350 μ l의 FACS buffer를 처리하고, 유세포 분석기를 이용하여 인간 T세포에 대한 항체들의 친화도 분석을 수행하였다. 분석 결과 도 1에 나타내었다.

도 1을 참고하면, 재조합 인간 CD3 ϵ/δ 에 결합했던 항체들은 모두 인간 T세포에도 특이적으로 결합함을 확인할 수 있다.

실시예 5. 인간화 항-CD3 항체의 원숭이 T세포에 대한 친화도 측정

유세포분석(Flow cytometry)을 이용하여 상기 실시예 2에 따라 선별한 인간화 항-CD3 항체(SP34)의 원숭이 T세포에 대한 친화도를 측정하였다.

구체적으로, 항체 시료 한 개 당 원숭이의 비장세포(splenocyte)를 100 μ l FACS 용액에 106개씩 준비한 뒤, 1 μ g의 항체를 세포에 처리하고, 4°C 온도의 암실에서 25분간 보관하였다. 이후 3 ml의 FACS buffer를 처리하고, 2,000 rpm에서 3분간 원심분리한 다음 상등액을 버렸다.

다음으로, PE가 결합된 인간 IgG 항체 1 μ g이 포함된 100 μ l FACS buffer를 세포에 처리하고, 4°C 온도의 암실에서 25분간 보관하였다. 이후 3 ml의 FACS buffer를 처리하고, 2,000 rpm에서 3분간 원심분리한 다음 상등액을 버렸다.

FITC가 결합된 항-CD20 항체, PE-Cy5가 결합된 항-CD14, 7-AAD 항체, APC-Cy7이 결합된 항-CD16 항체, V450이 결합된 항-CD45 항체를 세포에 처리하고, 4°C 온도의 암실에서 25분간 보관하였다. 이후 3 ml의 FACS buffer를 처리하고, 2,000 rpm에서 3분간 원심분리한 다음 상등액을 버렸다.

4% 포름알데히드 용액을 세포에 처리하고, 4°C 온도의 암실에서 30분간 보관한 뒤, 3 ml의 FACS buffer를 처리하고, 2,000 rpm에서 3분간 원심분리한 다음 상등액을 버렸다. 350 μ l의 FACS buffer를 처리하고, 유세포 분석기를 이용하여 인간 T세포에 대한 항체들의 친화도 분석을 수행하였다. 분석 결과 도 2에 나타내었다.

도 2를 참고하면, 재조합 원숭이 CD3 ϵ / δ 에 결합했던 항체들은 모두 원숭이 T세포에도 특이적으로 결합함을 확인할 수 있다.

이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기의 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

특허청구범위

1. 서열번호 7, 8, 15 또는 16의 아미노산 서열과 80% 이상의 상동성을 가지는 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역(VL domain); 및
서열번호 18 내지 서열번호 25 중 어느 하나의 아미노산 서열과 80% 이상의 상동성을 가지는 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역(VH domain);을 포함하는, 항체.
2. 제1항에 있어서,
상기 항체는 CD3(Cluster of differentiation 3)에 특이적으로 결합하는, 항체.
3. 제2항에 있어서,
상기 CD3는 인간 및 원숭이 유래의 CD3를 포함하는, 항체.
4. 제1항에 있어서,
상기 항체는 T세포(T cell)에 특이적으로 결합하는, 항체.
5. 제4항에 있어서,
상기 T세포는 인간 및 원숭이 유래의 T세포를 포함하는, 항체.
6. 제1항에 있어서,
상기 항체는 인간화(humanized) 항체인, 항체.
7. 제1항에 따른 항체의 경쇄 가변 영역(VL domain) 및 중쇄 가변 영역(VH domain)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.
8. 제7항에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터.
9. 제8항의 발현벡터로 형질전환된 숙주세포.
10. 제9항에 따른 숙주세포를 배양하는 단계를 포함하는, CD3에 특이적으로 결합하는 항체의 제조방법.
11. 제1항에 따른 항체 또는 이의 단편을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
12. 제11항에 있어서
상기 암은 췌장암, 간암, 위암, 폐암, 대장암, 직장암, 갑상선암, 식도암, 신장암, 방광암, 전립선암, 자궁경부암, 유방암, 혈액암, 피부암, 상피암, 뇌암, 중추신경암 또는 난소암인 것인, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
13. 암을 예방 또는 치료하기 위한 제1항의 항체의 용도.

14. 암의 예방 또는 치료용 약제를 제조하기 위한 제1항의 항체의 용도.
15. 제1항의 항체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료방법.