

명세서

발명의 명칭: GUCY2C 결합 폴리펩타이드 및 그의 용도

기술분야

- [1] 관련 출원들과의 상호 인용
- [2] 본 출원은 2021년 4월 7일자 대한민국 특허출원 제10-2021-0045510호에 기초한 우선권의 이익을 주장하며, 해당 대한민국 특허출원의 문헌에 개시된 모든 내용은 본 명세서에 일부로서 포함된다.
- [3] 본 출원은 GUCY2C 결합 폴리펩타이드 및 그의 용도와 관련된 것으로, 구체적으로, GUCY2C 결합 폴리펩타이드, 이를 포함하는 융합 단백질, 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역세포, 및 이들의 암 치료 및/또는 진단 용도에 관한 것이다.

[4]

배경기술

- [5] GUCY2C (구아닐레이트 사이클라아제 C (Guanylate cyclase 2C); 구아닐릴 사이클라아제 C (guanylyl cyclase C); GC-C 또는 GCC)는 장액, 전해질 항상성, 세포 증식의 유지 등에 작용하는 막통과 세포 표면 수용체이다. 정상 성인 포유동물에서, GUCY2C는 소장, 대장, 및 직장 내벽을 감싸는 점막 세포에서 발현된다. 이들 세포는 증식, 이동, 분화, 및 세포자멸사의 주기를 겪는데, 증식과 세포자멸사의 불균형은 위장관 내에서 종양의 형성을 유도할 수 있다.

[6]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 이에, 본 명세서에서는 신규한 GUCY2C 결합 폴리펩타이드, 이를 포함하는 융합 단백질, 및 이들의 암 치료 및/또는 진단 용도가 제공된다.
- [8] 일 예는 GUCY2C에 결합하는 GUCY2C 결합 폴리펩타이드를 제공한다.
- [9] 상기 GUCY2C 결합 폴리펩타이드는
- [10] 서열번호 38 내지 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 표현되는 중쇄 CDR1 (이하, CDR-H1), 서열번호 45 내지 53로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 표현되는 CDR-H2, 및 서열번호 54 내지 65로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 표현되는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변영역;
- [11] 서열번호 66 내지 78로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 표현되는 경쇄 CDR1 (이하, CDR-L1), 서열번호 79 내지 88로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 표현되는 CDR-L2, 및 서열번호 89 내지 106으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 표현되는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변영역;
- [12] 또는 이들의 조합
- [13] 을 포함하는 것일 수 있다.

- [14] 일 예에서, 상기 GUCY2C 결합 폴리펩타이드는 상기 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 순서에 무관하게 포함하는 단일사슬 가변단편 (single chain variable fragment; scFv)일 수 있다. 상기 scFv는 상기 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을, N 말단에서 C 말단 방향으로, 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역의 순서 또는 경쇄 가변영역 및 중쇄 가변영역의 순서로 포함할 수 있으며, 예컨대, N 말단에서 C 말단 방향으로, 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역의 순서로 포함할 수 있다. 이 때, 상기 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역은 펩타이드 링커를 통하여 연결되거나 링커 없이 직접 연결된 것일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 1 내지 18로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 표현되는 scFv일 수 있다.
- [15] 다른 예는 상기 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 포함하는, GUCY2C에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원결합단편을 제공한다.
- [16] 다른 예는 상기 GUCY2C 결합 폴리펩타이드와 면역글로불린의 Fc 도메인을 포함하는 융합 단백질을 제공한다.
- [17] 다른 예는 상기 GUCY2C 결합 폴리펩타이드, 항체 또는 이의 항원결합단편 또는 융합단백질과, 약물을 포함하는 접합체를 제공한다. 상기 약물은 항암제, 조영제 등 중에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [18] 다른 예는 GUCY2C 결합 폴리펩타이드를 포함하는 키메라 항원 수용체 (Chimeric antigen receptor)를 제공한다. 상기 키메라 항원 수용체는 GUCY2C 특이적인 것일 수 있다.
- [19] 다른 예는 상기 키메라 항원 수용체를 포함하는 면역 세포를 제공한다. 상기 면역 세포는 상기 키메라 항원 수용체를 세포 표면에 발현하는 면역 세포일 수 있다. 상기 면역 세포는 GUCY2C 특이적 면역 세포일 수 있다.
- [20] 다른 예는 상기 GUCY2C 결합 폴리펩타이드, GUCY2C에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원결합단편, 융합 단백질, 또는 키메라 항원 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 다른 예는 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 다른 예는 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 재조합 벡터를 포함하는 재조합 세포를 제공한다.
- [21] 다른 예는 상기 GUCY2C 결합 폴리펩타이드, GUCY2C에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원결합단편, 융합 단백질, 접합체, 키메라 항원 수용체, 이들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터를 포함하는 재조합 세포, 및 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 및/또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [22] 다른 예는 상기 GUCY2C 결합 폴리펩타이드, GUCY2C에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원결합단편, 융합 단백질, 접합체, 키메라 항원 수용체, 이들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터를 포함하는 재조합 세포, 및 상기 키메라 항원 수용체를

발현하는 면역 세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 약학적 유효량을 암의 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 암의 예방 및/또는 치료 방법을 제공한다.

- [23] 다른 예는 상기 GUCY2C 결합 폴리펩타이드, GUCY2C에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원결합단편, 융합 단백질, 접합체, 키메라 항원 수용체, 이들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터를 포함하는 재조합 세포, 및 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 암의 예방 및/또는 치료에 사용하기 위한 용도 또는 암의 예방 및/또는 치료용 약학적 조성물의 제조에 사용하기 위한 용도를 제공한다.
- [24] 다른 예는 상기 GUCY2C 결합 폴리펩타이드, GUCY2C에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원결합단편, 융합 단백질, 키메라 항원 수용체, 이들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터를 포함하는 재조합 세포, 및 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 암의 진단용 조성물을 제공한다.
- [25] 다른 예는 대상으로부터 얻어진 생물학적 시료에 상기 GUCY2C 결합 폴리펩타이드, GUCY2C에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원결합단편, 융합 단백질, 키메라 항원 수용체, 이들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터를 포함하는 재조합 세포, 및 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 접촉시키는 단계를 포함하는, 암의 진단 방법 또는 암의 진단에 정보를 제공하는 방법을 제공한다. 상기 대상은 암의 진단을 필요로 하는 환자일 수 있으며, 상기 생물학적 시료는 세포, 조직, 체액, 및 이들의 배양물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [26] 다른 예는 상기 GUCY2C 결합 폴리펩타이드, GUCY2C에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원결합단편, 융합 단백질, 키메라 항원 수용체, 이들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터를 포함하는 재조합 세포, 및 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 암의 진단에 사용하기 위한 용도 또는 암의 진단용 조성물 제조에 사용하기 위한 용도를 제공한다.
- [27] 다른 예는 상기 GUCY2C 결합 폴리펩타이드, GUCY2C에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원결합단편, 융합 단백질, 키메라 항원 수용체, 이들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터를 포함하는 재조합 세포, 및 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 GUCY2C 검출용 조성물을 제공한다.

- [28] 다른 예는 생물학적 시료에 상기 GUCY2C 결합 폴리펩타이드, GUCY2C에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원결합단편, 융합 단백질, 키메라 항원 수용체, 이들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터를 포함하는 재조합 세포, 및 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 접촉시키는 단계를 포함하는, GUCY2C 검출 방법을 제공한다. 상기 생물학적 시료는 분리된 세포, 조직, 체액, 및 이들의 배양물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [29] 다른 예는 상기 GUCY2C 결합 폴리펩타이드, GUCY2C에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원결합단편, 융합 단백질, 키메라 항원 수용체, 이들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터를 포함하는 재조합 세포, 및 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 GUCY2C 검출에 사용하기 위한 용도를 제공한다.

[30]

과제 해결 수단

[31] 용어의 정의

[32] 본 명세서에서, GUCY2C (구아닐레이트 사이클라아제 C (Guanylate cyclase 2C); 구아닐릴 사이클라아제 C (guanylyl cyclase C; GC-C 또는 GCC), intestinal guanylate cyclase, guanylate cyclase-C receptor, 또는 the heat-stable enterotoxin receptor (hSTAR))는 장액, 전해질 항상성, 세포 증식의 유지 등에 작용하는 막통과 세포 표면 수용체이다. 일 예에서 GUCY2C는 포유류 유래의 GUCY2C일 수 있으며, 예컨대, 인간 GUCY2C (단백질: GenBank Accession No. NP_004954.2 등; 유전자: GenBank Accession No. NM_004963.4 등), 마우스 GUCY2C (단백질: GenBank Accession No. NP_001120790.1, NP_659504.2 등; 유전자: GenBank Accession No. NM_001127318.1, NM_145067.3 등) 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 일 예에서 GUCY2C는 포유류 (예컨대, 인간, 원숭이 등의 영장류, 마우스, 래트 등의 설치류 등)의 대장암에서 특이적으로 발현하는 것일 수 있으나, 대장 및 식도 위 체장등과 같은 장간막 등에서도 발현할 수 있으며, 특별한 제한이 가해지는 것은 아니다.

[33] 본 명세서에서, 폴리뉴클레오타이드("유전자"와 혼용될 수 있음) 또는 폴리펩타이드("단백질"과 혼용될 수 있음)가 "특정 핵산 서열 또는 아미노산 서열을 포함한다" 또는 "특정 핵산 서열 또는 아미노산 서열로 이루어진다 또는 표현된다" 함은 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드가 상기 특정 핵산 서열 또는 아미노산 서열을 필수적으로 포함하는 것을 의미할 수 있으며, 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드의 본래의 기능 및/또는 목적하는 기능을 유지하는 범위에서 상기 특정 핵산 서열 또는 아미노산 서열에

변이(결실, 치환, 변형, 및/또는 부가)가 가해진 "실질적으로 동등한 서열"을 포함하는 것(또는 상기 변이를 배제하지 않는 것)으로 해석될 수 있다.

- [34] 일 예에서, 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드가 "특정 핵산 서열 또는 아미노산 서열을 포함한다" 또는 "특정 핵산 서열 또는 아미노산 서열로 이루어진다 또는 표현된다" 함은 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드가 (i) 상기 특정 핵산 서열 또는 아미노산 서열을 필수적으로 포함하거나, 또는 (ii) 상기 특정 핵산 서열 또는 아미노산 서열과 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 99.5% 이상, 또는 99.9% 이상의 상동성(identity)을 갖는 핵산 서열 또는 아미노산 서열로 이루어지거나 이를 필수적으로 포함하고 본래의 기능 및/또는 목적하는 기능을 유지하는 것을 의미할 수 있다. 본 명세서에서, 폴리펩타이드, 항체 또는 이의 항원결합단편(예컨대, CDR, 가변영역, 또는 중쇄/경쇄), 융합 단백질, 및 키메라 항원 수용체가 "특정 아미노산 서열을 포함한다 또는 특정 아미노산 서열로 표현되거나 이루어진다" 함은 상기 아미노산 서열을 필수적으로 포함하는 경우, 및 상기 아미노산 서열에 본래의 활성 및/또는 목적하는 활성(예컨대, GUCY2C 결합 활성 등)에 영향이 없는 무의미한 변이(예컨대, 아미노산 잔기의 치환, 결실, 및/또는 추가)가 도입된 경우를 모두 의미하는 것일 수 있다.
- [35] 본 명세서에서, 용어 "상동성(identity)"은 주어진 핵산 서열 또는 아미노산 서열과 일치하는 정도를 의미하며 백분율(%)로 표시될 수 있다. 핵산 서열에 대한 상동성의 경우, 예를 들면, 문헌에 의한 알고리즘 BLAST(참조: Karlin 및 Altschul, *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 5873, 1993)나 Pearson에 의한 FASTA(참조: *Methods Enzymol.*, 183, 63, 1990)를 사용하여 결정할 수 있다. 이러한 알고리즘 BLAST에 기초하여, BLASTN이나 BLASTX라고 불리는 프로그램이 개발되어 있다(참조: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).
- [36] 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 단백질일 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.
- [37] 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($\alpha 2$)를 가진다. 경쇄의 불변 영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가진다.

- [38] 용어 "항원 결합 단편"은 전장 쇠에 존재하는 아미노산 중 적어도 일부가 결합되었지만 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.
- [39] 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.
- [40] 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.
- [41] 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.

[42]

[43] GUCY2C 결합 폴리펩타이드, 항체, 또는 이의 항원결합단편, 융합 단백질

[44] 본 명세서에서 제공되는 GUCY2C 결합 폴리펩타이드, 항체 또는 이의 항원결합 단편은 다음을 포함하는 것일 수 있다:

[45] 서열번호 38 내지 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 표현되는 중쇄 CDR1 (이하, CDR-H1), 서열번호 45 내지 53로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 표현되는 CDR-H2, 및 서열번호 54 내지 65로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 표현되는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변영역;

[46] 서열번호 66 내지 78로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 표현되는 경쇄 CDR1 (이하, CDR-L1), 서열번호 79 내지 88로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 표현되는 CDR-L2, 및 서열번호 89 내지 106으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 표현되는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변영역;

[47] 또는 상기 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역의 조합.

[48] 본 명세서에서 제공되는 GUCY2C 결합 폴리펩타이드는, 항체 또는 이의 항원결합 단편에 포함된 각 CDR들의 아미노산 서열 및 조합을 아래의 표 1 및 표 2에 예시하였다: 표 1은 중쇄 가변영역을, 표 2는 경쇄 가변영역의 각 CDR들의 아미노산 서열을 나타낸 것이다.

[49] [표 1]

clone ID	CDR-H1	SEQ ID NO	CDR-H2	SEQ ID NO	CDR-H3	SEQ ID NO
A01	GYTFTSYY	38	INPSGGST	46	DGQWLQFDY	54
A02	GGTLSSYA	39	IIPILGIT	47	DQRPASMDV	55
A03	GGTFSSYT	40	IIPILGIA	48	DYSSSWNSMDV	56
A04	GGTLSSYA	39	IIPILGIT	47	DQRPASMDV	55
A05	GGTFSSYT	40	IIPVLGIA	49	DYSSSWNSMDV	56
A06	GGTFSSYT	41	IIPILGIA	48	DYSSSWNSMDV	56
A07	GGSISSYY	42	IYYSGST	50	DVWGSGQSFDS	57
A08	GFTFSSYW	43	IKQDGSE K	51	APWYSSSPTPYGM DV	58
A10	GGTFSSYA	44	IPIFGTA	52	TRYIWGSYRAYGM DV	59
A12	GGTLSSYA	39	IIPILGIT	47	DQRPASMDV	55
B01	GGTLSSYA	39	IIPILGIT	47	DQRPASMDV	55
B07	GYTFTSYY	38	INPSGGST	46	GTYSWGWTIDY	60
B08	GGTFSSYA	44	IPIFGTA	52	GHYYMDV	61
B10	GGTFSSYA	44	IPIFGTA	52	GHYYMDV	61
B11	GGTFSSYA	44	IPIFGTA	52	GIQPLRYYGMDV	62
B12	GFTFSSYS	45	IYSGGST	53	GAGTLNAFDI	63

C01	GGTFSSYA	44	IPIFGTA	52	GYSSIIYYYGMDV	64
C02	GGTFSSYT	40	IIPILGIA	48	DRSYNWLDP	65
C07	GGSFSGY Y	107	INHRGNT	108	ERGYTYGNFDH	109

[50] [표 2]

clone ID	CDR-L1	SEQ ID NO	CDR-L2	SEQ ID NO	CDR-L3	SEQ ID NO
A01	QSLKKSDGN TY	66	KVS	79	MQGSHWPPT	89
A02	SSDVGGYIY	67	DVS	80	SSYAGSNNYV	90
A03	SSDIGYYHY	68	EDS	81	SSFTSRSTWV	91
A04	SSDVGGYIY	67	DVS	80	SSYTSSNNYY	92
A05	SSDVGGYNY	69	DVS	80	SSYAGSNNFV	93
A06	SSDVGAYNY	70	EVS	82	SSYAGSNNWV	94
A07	SGSIASNY	71	EHS	83	QSYDVSNRV	95
A08	QDISNY	72	GAS	84	QQSYSTPLT	96
A10	QSISSH	73	YAS	85	QQSISLPYT	97
A12	SSDVGGYIY	67	DVS	80	SSYTSSNNYV	98
B01	SSDVGGYNY	69	EVS	82	STVTSLSYTV	99
B07	QSLVYTDGNT Y	74	KVS	79	MHSKQWPPT	100
B08	QSVSSN	75	GAS	84	QQYNNWPS	101
B10	QSVSSN	75	GAS	84	QQYNNWPT	102
B11	SSNIGSNY	76	RNN	86	AAWDDSLSGR GV	103
B12	SSDVGAYS	77	AVT	87	SSFAGGSTLV	104
C01	SSDVGGYNY	69	DVS	80	GSYTSDGTLV	105
C02	ISDVGDYNY	78	DVN	88	SSYTSSSTLV	106
C07	QSVSRN	110	GAS	84	QQYKTPRT	111

- [51] 일 예에서, 상기 GUCY2C 결합 폴리펩타이드는 앞서 설명한 중쇄 CDR을 포함하는 중쇄 가변영역, 및 경쇄 CDR을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 것일 수 있다. 상기 중쇄 가변영역은 상기한 바와 같은 중쇄 CDR 및 면역글로불린 (예컨대, IgA, IgD, IgE, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, 등)의 프레임워크를 포함하는 것일 수 있다 (예, FR1-(CDR-H1)-FR2-(CDR-H2)-FR3-(CDR-H3)-FR4의 구조). 상기 경쇄 가변영역은 상기한 바와 같은 경쇄 CDR 람다 (Lambda) 또는 카파(Kappa) 서브타입의 프레임워크를 포함하는 것일 수 있다 (예, FR1-(CDR-L1)-FR2-(CDR-L2)-FR3-(CDR-L3)-FR4의 구조).
- [52] 일 구체예에서, 상기 GUCY2C 결합 폴리펩타이드는 앞서 설명한 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역이 펩타이드 링커를 통하거나 통하지 않고 연결된 단일사슬 폴리펩타이드인 scFv (single chain variable fragment)일 수 있다.
- [53] 상기 펩타이드 링커는 1 내지 100개 또는 2 내지 50개의 임의의 아미노산으로 이루어진 폴리펩타이드일 수 있으며, 그 포함된 아미노산 종류는 제한이 없다. 예컨대, 상기 펩타이드 링커는, Gly, Asn 및/또는 Ser 잔기를 포함할 수 있으며, Thr 및/또는 Ala과 같은 중성 아미노산들도 포함될 수 있다. 펩타이드 링커에 적합한 아미노산 서열은 당 업계에 공지되어 있다. 한편, 상기 링커는 상기 scFv의 GUCY2C 결합 기능에 영향을 미치지 않는 한도 내에서, 그 길이를 다양하게 결정할 수 있다. 예컨대, 상기 펩타이드 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. 일 예에서, 상기 펩타이드 링커는 (G4S)_n (n은 (G4S)의 반복수)로서, 1 내지 10의 정수, 예컨대 2 내지 5의 정수)로 표현되는 것일 수 있다.
- [54] 일 구체예에서, 상기 scFv 형태의 GUCY2C 결합 폴리펩타이드는 서열번호 1 내지 18 중에서 선택된 아미노산 서열로 표현되는 것일 수 있으며, 이들 아미노산 서열을 아래의 표 3에 예시하였다:

[55] [표 3]

scFv ID	scFv Region (Protein; N→C)	SEQ ID NO
A01	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS <u>GYTF</u> <u>TSYY</u> MHWVRQ APQGQGLEWMGRI <u>INPSGG</u> <u>ST</u> SYAQEFQGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSEDTAVYYCARD <u>DGQWLQ</u> <u>FDY</u> WGQGTLVTVSSG GGGSGGGGSGGGASDIVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSS <u>QS</u> <u>LLKKSDGNTY</u> LSWYHQRPGQSPRRLIY <u>KV</u> SNRDSGVPDRF SGSGSDTDFTLKISRVEDVGIYYC <u>MOGSHWPPT</u> FGQGTK VEIK	1
A02	EVQLVQPGAIEVKKPGSSVKVSCKAS <u>GGTLSS</u> <u>YAI</u> SWVRQA PGQGLEWMGRI <u>IPILGIT</u> NYAQKFQGRVTITADKSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYFCARD <u>DORPASMDV</u> WGQGTLVTVSSGGG GSGGGGSGGGASQSELTQPASVSGSPGQSITISCTGT <u>SSDVG</u> <u>GYIY</u> VSWYQQHPGKVPKLMIH <u>DV</u> SHRPSGVSNRFSGSRSGN TASLTISGLQAEDEADYFC <u>SSYAGSNNY</u> VFGTGTKVTVL	2
A03	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS <u>GGTF</u> <u>SSYT</u> ISWVRQA PGQGLEWMGRI <u>IPILG</u> IANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARD <u>DYSSSWNSMDV</u> WGQGTLVTVSSG GGGSGGGGSGGGASQSGLTQPPSASGSPGQSVTISCTGT <u>SSD</u> <u>IGYYHY</u> VSWYQQHPGKAPKLMIIY <u>ED</u> SKRPSGISNRFSGSKS GTTASLTVSGLQAEDEAHYYC <u>SSFTSRSTWV</u> FGGGTQLTVL	3
A04	EVQLVQPGAIEVKKPGSSVKVSCKAS <u>GGTLSS</u> <u>YAI</u> SWVRQA PGQGLEWMGRI <u>IPILGIT</u> NYAQKFQGRVTITADKSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYFCARD <u>DORPASMDV</u> WGQGTLVTVSSGGG GSGGGGSGGGASQSELTQPASVSGSPGQSITISCTGT <u>SSDVG</u> <u>GYIY</u> VSWYQQHPGKVPKLMIH <u>DV</u> SHRPSGVSNRFSGSRSGN TASLTISGLQAEDEADYFC <u>SSYTSSNNY</u> VFGTGTKVTVL	4
A05	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS <u>GGTF</u> <u>SSYT</u> ITWVRQA PGQGLEWMGRI <u>IPVLG</u> IANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARD <u>DYSSSWNSMDV</u> WGQGTLVTVSSG GGGSGGGGSGGGASQSGLTQPRSVSGSPGQSVTISCTGT <u>SSD</u> <u>VGGYNY</u> VSWYQQHPGKAPKLMIIY <u>DV</u> SKRPSGVPDRFSGSK SGNTASLTVSGLHAEDEADYYC <u>SSYAGSNNFV</u> VFGTGTKVT VL	5

A06	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFGSYTISWVRQA PGQGLEWMGRIPILGIANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARDYSSSWNSMDVWGQGLTVTVSSG GGSGGGGGSGGGASQSGLTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSD VGAYNYVSWYQQHPGKAPKLMIEVSKRPSGVPDRFSASK SGNTASLTVSGLQAEDEADYYCSSYAGSNNWVFGGGTKLTVL	6
A07	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPG KGLEWIGSIYYSGSTNYNPSLKSRTISRDKSKNQLFLKLS MTAADTAVYYCARDVWGSQSFDSWGQGLTVTVSSGGG GSGGGGGSGGGASNFMILTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIA SNYVQWYQQRLGSSPTTVIYEHSRRPSGVPDRFSASIDSSSN SASLTISGLKTEDEADYYCQSYDVSNRVFGGGTKLTVL	7
A08	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFESSYWMSWVRQA PGKGLEWVANIKODGSEKYYVDSVKGRFTISRDNANKSLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKAPWYSSSPTYGMDVWGQGT LTVTVSSGGGGSGGGGGSGGGASDIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPRRLIYGASTLMSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOQSYSTPLTFGGGK VEIK	8
A10	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFESSYAIWVRQA PGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARTRYIWGSYRAYGMDVWGQGT TVSSGGGGSGGGGGSGGGASDIQMTQSPSSMSASVGDRVTIT CRASQSISSHLNWYQQLPGNAPTLLIYYASNLSQGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPDDEFATYYCQOQISLPYTFGQGTKVEIK	9
A12	EVQLVQPGAIEVKKPGSSVKVSCKASGGTLSSYAIWVRQA PGQGLEWMGRIPILGITNYAQKFQGRVTITADKSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYFCARDORPASMDVWGQGLTVTVSSGGG GSGGGGGSGGGASQSELTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVG GYIYVSWYQQHPGKVPKLMIHVSHRPSGVSNRFSGSRSGN TASLTISGLQAEDEADYFCSSYTSSNNYVFGTGKVTVL	10
B01	EVQLVQPGAIEVKKPGSSVKVSCKASGGTLSSYAIWVRQA PGQGLEWMGRIPILGITNYAQKFQGRVTITADKSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYFCARDORPASMDVWGQGLTVTVSSGGG	11

	GSGGGGSGGGASQSGLTQPASVSGSPGQSITISCTGT <u>SSDVG</u> <u>GYNV</u> VSWYQQHPGKAPKLMY <u>EVSN</u> NRPSGVSNRFSGSKSG NTASLTISGLQAEDEADYYC <u>STVTSLSITY</u> VFGTGTCLTVL	
B07	EVQLVQSGAEVKRPGSSVKVSCKAS <u>GYTFTSY</u> MHWVRQ APGQGLEWMGI <u>INPSGGST</u> SYAQKFQGRVTMTTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCAAG <u>TYSSGW</u> <u>TIDY</u> WGQGTTVTVS SGGGGSGGGGSGGGASDIVMTQSPSLPVTLGQPASISCRSS <u>QSLVYTDGNTY</u> LNWFQQRPGQSPRRLIY <u>KVSN</u> NRDSGVPDR FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYC <u>MHSKQWPPT</u> FGGGT KVEIK	12
B08	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS <u>GGTFESSY</u> AISWVRQA PGQGLEWMGG <u>IPIFGT</u> ANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARG <u>HYYYMDV</u> WGQGTTVTVSSGGG GSGGGGSGGGASDIVMTQSPATLSVSPGEGATLSCRAS <u>QSV</u> <u>SSN</u> LAWYQQKPGRAPRLLIY <u>GAS</u> TRATGIPARFSGSGSGTEF TLTISSLQSEDAVYYC <u>QOYNNWPS</u> FGGGTKLEIK	13
B10	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS <u>GGTFESSY</u> AISWVRQA PGQGLEWMGG <u>IPIFGT</u> ANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARG <u>HYYYMDV</u> WGQGTTVTVSSGGG GSGGGGSGGGASDIVMTQSPATLSVSPGEGATLSCRAS <u>QSV</u> <u>SSN</u> LAWYQQKPGRAPRLLIY <u>GAS</u> TRATGIPARFSGSGSGTEF TLTISSLQSEDAVYYC <u>QOYNNWPT</u> FGGGTKLEIK	14
B11	QVQLVESGAEVKKPGSSVKVSCKAS <u>GGTFESSY</u> AISWVRQA PGQGLEWMGG <u>IPIFGT</u> ANYAQKFQGRVTITADESTSTAYM ELSGLRSEDTAVYYCARG <u>IOPLRYYGMDV</u> WGQGTLLTVSS GGGGSGGGGSGGGASQSALTQPPSASGTPGQRTISCSGSS <u>NIGSNY</u> VYWYQQLPGTAPKLLIY <u>RNN</u> QRPSGVPDRFSGSKS GTSASLAISGLRSEDEADYYC <u>AAWDDSLSGRGV</u> FGGGTQL TVL	15
B12	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS <u>GFTFESSY</u> SMNWVRQA PGKGLEWVSV <u>IYSGGST</u> THYADSVKGRFTISRHNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARG <u>AGTLNAFDI</u> WGQGTTVTVSSGG GGSGGGGSGGGASQSGLTQPPSTSGSPGQSVTISCTGT <u>SSDY</u> <u>GAYS</u> YVSWYQQHPGKAPKLLIY <u>AVT</u> KRPSGVPDRFSGSKS GNTASLTVSGLQDEDEADYYC <u>SSFAGGSTLV</u> FGGGTKLTV L	16

C01	QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS <u>GGTFSSYA</u> ISWVRQA PGQGLEWMGG <u>IIPIFGT</u> ANYAQKFQGRVTITADESTSTAYM ELSSLRSED ~~T~~ AVYYCVR <u>GYSSII</u> YYYGMDVWGQGTMTVTV SSGGGGSGGGGSGGGASQSGLTQPRSVSGSPGQSVTISCTGT <u>SSDVGGYNY</u> VSWYQQHPGKAPKLMY <u>DVSKR</u> PSGVSDRFS GSKSGNTASLTISGLQAED ~~E~~ ADYYC <u>GSYTSDGTLV</u> FGGGTLK LTVL	17
C02	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS <u>GGTFSSYT</u> ISWVRQA PGQGLEWMGR <u>IIPIGLI</u> ANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYM ELSSLRSED ~~T~~ AVYYCAR <u>DRSYN</u> WLD <u>PWGR</u> GLTVTVSSGGG GSGGGGSGGGASQSALTQPVSVSGSPGQSITISCTGT <u>ISDVG</u> <u>DYNY</u> VSWYQQHPGKAPKLMY <u>DVNNR</u> PSGVSNRFSGSKSG NTASLTISGLQAED ~~E~~ ADYYC <u>SSYTSSSTLV</u> FGGGTLKTLTVL	18

- [56] (표 3에서, 굵은 글씨 및 밑줄로 표시된 영역은 순서대로 CDR-H1, CDR-H2, 및 CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, 및 CDR-L3를 나타냄) 다른 구체예에서, 상기 항체 또는 이의 항원결합 단편은, 앞서 설명한 6개의 CDR을 포함하고, 면역글로불린 (예컨대, IgA, IgD, IgE, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, 등) 및 램다 또는 카파 타입을 기반으로 하는 것일 수 있다. 상기 항체는 단클론 항체일 수 있으며, 동물(예컨대, 마우스, 래빗 등) 유래 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 또는 인간 항체일 수 있다.
- [57] 다른 예는 GUCY2C 결합 폴리펩타이드와 면역글로불린의 Fc 도메인을 포함하는 융합 단백질을 제공한다.
- [58] 상기 GUCY2C 결합 폴리펩타이드는 앞서 설명한 바와 같다. 상기 면역글로불린의 Fc 도메인은 포유류 (예컨대, 인간, 원숭이 등의 영장류, 마우스, 래트 등의 설치류 등)의 면역글로불린 (예컨대, IgA, IgD, IgE, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, 등)의 Fc 도메인일 수 있다. 상기 Fc 도메인은 힌지 영역을 포함하거나 포함하지 않을 수 있으며, CH2, CH3, 또는 이들 모두를 포함하는 것일 수 있다. 본 명세서에서 제공되는 융합 단백질에 있어서, 상기 GUCY2C 결합 폴리펩타이드와 면역글로불린의 Fc 도메인은 순서와 무관하게 연결될 수 있으며, 예컨대, 상기 GUCY2C 결합 폴리펩타이드는 면역글로불린의 Fc 도메인의 C 말단 또는 N 말단에 연결되거나, 두 개 이상의 GUCY2C 결합 폴리펩타이드가 면역글로불린의 Fc 도메인의 C 말단 또는 N 말단 중 하나 이상에 연결될 수 있다. 상기 GUCY2C 결합 폴리펩타이드와 면역글로불린의 Fc 도메인 폴리펩타이드는 링커를 통하여 연결되거나 링커 없이 직접 연결될 수 있다.
- [59] 본 명세서에서 제공되는 GUCY2C 결합 폴리펩타이드, 항-GUCY2C 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 GUCY2C (예컨대, 인간 GUCY2C)에 대한 결합 친화도 (K

d)가, 예를 들어, 표면 플라즈몬 공명 (Surface plasmon resonance, SPR)으로 측정된 경우를 기준으로, 10mM 이하, 5 mM 이하, 1mM 이하, 0.5mM 이하, 0.2mM, 또는 0.15mM 이하일 수 있으며, 예를 들어 0.001nM 내지 10mM, 0.005nM 내지 10mM, 0.01nM 내지 10mM, 0.05nM 내지 10mM, 0.1nM 내지 10mM, 0.5nM 내지 10mM, 1nM 내지 10mM, 0.001nM 내지 5mM, 0.005nM 내지 5mM, 0.01nM 내지 5mM, 0.05nM 내지 5mM, 0.1nM 내지 5mM, 0.5nM 내지 5mM, 1nM 내지 5mM, 0.001nM 내지 1mM, 0.005nM 내지 1mM, 0.01nM 내지 1mM, 0.05nM 내지 1mM, 0.1nM 내지 1mM, 0.5nM 내지 1mM, 1nM 내지 1mM, 0.001nM 내지 0.5mM, 0.005nM 내지 0.5mM, 0.01nM 내지 0.5mM, 0.05nM 내지 0.5mM, 0.1nM 내지 0.5mM, 0.5nM 내지 0.5mM, 1nM 내지 0.5mM, 0.001nM 내지 0.2mM, 0.005nM 내지 0.2mM, 0.01nM 내지 0.2mM, 0.05nM 내지 0.2mM, 0.1nM 내지 0.2mM, 0.5nM 내지 0.2mM, 1nM 내지 0.2mM, 0.001nM 내지 0.15mM, 0.005nM 내지 0.15mM, 0.01nM 내지 0.15mM, 0.05nM 내지 0.15mM, 0.1nM 내지 0.15mM, 0.5nM 내지 0.15mM, 또는 1nM 내지 0.15mM일 수 있다.

[60] 다른 예는 앞서 설명한 항체 또는 이의 항원결합단편 또는 융합 단백질과, 약물이 접합된 접합체를 제공한다. 상기 약물은 항암제, 조영제 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[61] 상기 항암제는 메이탄신(maytansine), 아우리스타틴(auristatin) 계열 약물, 칼리케아마이신(calicheamycin) 계열 약물, 피롤로벤조디아제핀(pyrrolobenzodiazepine) 계열 약물, 두오카마이신(duocarmycin), 도세탁셀 (Docetaxel), 독소루비신 (Doxorubicin), 카보플라틴 (파라플라틴)[Carboplatin(paraplatin)], 시스플라틴 (Cisplatin), 시클로포스파미드 (Cyclophosphamide), 이포스파미드 (Ifosfamide), 니드란 (Nidran), 질소머스타드(Nitrogen mustard), 메클로에타민 염산염 (Mechlorethamine HCL), 블레오마이신 (Bleomycin), 미토마이신 C (Mitomycin C), 시타라빈 (Cytarabine), 플루로우라실 (Fluorouracil), 젬시타빈 (Gemcitabine), 트리메트렉세이트 (Trimetrexate), 메토크렉세이트 (Methotrexate), 에토포시드 (Etoposide), 빈블라스틴 (Vinblastine), 비노렐빈 (vinorelbine), 알림타 (Alimta), 알트레타민 (Altretamine), 프로카바진 (Procarbazine), 파클리탁셀 (탁솔) (Paclitaxel (Taxol)), 탁소텔 (Taxotere), 토포테칸 (Topotecan), 이리노테칸 (Irinotecan) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 조영제는 산화철(iron oxide), 가돌리늄(gadolinium), 방사성 동위원소 (예, 요오드, 금, 탈륨, 팔라듐, 세슘, 이트륨, 갈륨, 구리, 디스프로슘, 루비듐, 루테튬, 레듐, 플루오린, 비스무트 등) 등과 같은 MRI (자기공명영상) 조영제 및 PET (Positron Emission Tomography, 양전자단층촬영) 조영제 등에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[62]

[63] 키메라 항원 수용체 (Chimeric antigen receptor: CAR), 키메라 항원 수용체 발현

세포

- [64] 다른 예는 GUCY2C 결합 폴리펩타이드를 포함하는 키메라 항원 수용체 (Chimeric antigen receptor; CAR)를 제공한다. 상기 GUCY2C 결합 폴리펩타이드는 다른 CAR 성분과 함께 단일 사슬의 일부로서 발현되도록 조작될 수 있기 때문에 키메라 항원 수용체에 사용하기에 적합할 수 있다. 상기 키메라 항원 수용체는 GUCY2C 특이적인 것일 수 있다.
- [65] 키메라 항원 수용체는 전형적으로 GUCY2C 결합 폴리펩타이드를 포함하는 세포외 도메인(extracellular domain; ectodomain); 막관통 도메인(transmembrane domain); 세포내 신호 전달 도메인(intracellular signaling domain 또는 T cell activation domain; endodomain)을 포함할 수 있다. 또한, 상기 세포외 도메인은 상기 폴리펩타이드와 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.
- [66] 따라서, 바람직한 일례로, 키메라 항원 수용체는 GUCY2C 결합 폴리펩타이드를 포함하는 세포외 도메인; 막관통 도메인; 1개 이상의 공동자극 도메인; 및 세포내 신호 전달 도메인을 포함할 수 있다. 각각의 도메인은 이종일 수 있다. 즉, 상이한 단백질 채로부터 유래된 서열로 구성될 수 있다. 각각의 도메인은 짧은 올리고- 또는 폴리펩타이드 링커, 예를 들어 2 내지 10개의 아미노산 길이의 링커로 연결될 수 있다. 또한 키메라 항원 수용체는 각 도메인이 연결된 하나의 폴리펩타이드 사슬로 이루어질 수 있다.
- [67] 세포외 도메인은 전술한 바와 같은 GUCY2C 결합 폴리펩타이드를 포함하며, 이는 암세포 표면에 발현하는 GUCY2C를 인지한다.
- [68] 세포외 도메인은 스페이서 영역 (또는 힌지 영역)을 더욱 포함할 수 있다. 스페이서 영역은 GUCY2C 결합 폴리펩타이드와 막관통 도메인 사이에 위치할 수 있다. 스페이서 영역은 GUCY2C 결합 폴리펩타이드가 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역세포(이하, 'CAR 발현 면역세포'로도 칭해짐; 예컨대, CAR-NK, CAR-T 세포 등 포함)의 세포막과 일정 거리를 두고 보다 유연하게 표적 항원을 인식할 수 있도록 한다. 스페이서 영역은 전형적으로 폴리펩타이드일 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.
- [69] 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/또는 CH3 도메인의 전부 또는 일부에서 유래될 수 있고, 예를 들어 Fc 영역일 수 있다. IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IGG4 등)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.

- [70] 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.
- [71] 공동자극 도메인은 공동자극신호가 전달되는 부위로 CAR 발현 면역세포가 면역반응을 일으키고 자가증식을 하도록 신호를 전달하는 부위이다. 이는 CAR 발현 면역세포의 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, 톨리칸 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), SELPLG (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.
- [72] 세포 내 신호 전달 도메인은 GUCY2C 결합 폴리펩타이드에 결합한 항원에 대해 면역세포의 면역반응을 활성화시키는 부위이다. 상기 신호 전달 도메인은

면역세포 수용체 (예, T 세포 수용체(TCR) 등)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 GUCY2C 결합 폴리펩타이드 부위가 표적에 결합시, CAR 발현 면역세포를 활성화할 수 있다. 예를 들어, CAR는 면역세포 (예컨대, NK 세포, T 세포 등)의 기능, 예를 들어 세포 용해 활성 또는 T-헬퍼 활성을 자극하고, 사이토카인 또는 다른 인자의 분비를 유도할 수 있다.

- [73] 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 폴리펩타이드 (tHER2 또는 tEGFR 또는 절단된 PSMA 등) 와 함께 발현될 수 있다.
- [74] 상기 키메라 항원 수용체에서, 외부 도메인 (항원 결합 도메인 및 스페이서 도메인), 막관통 도메인, 및 내부 도메인 (임의의 1개의 보조자극인자 또는 2개 중 적어도 1개 이상의 보조자극인자, 및 신호전달 도메인)은 N 말단에서 C 말단 방향 또는 C 말단에서 N 말단 방향으로 순서대로 연결된 단일가닥 폴리펩타이드일 수 있다.
- [75] 다른 예는 상기한 키메라 항원 수용체를 포함하는 면역 세포를 제공한다. 상기 면역 세포는 상기 GUCY2C 특이적 키메라 항원 수용체를 세포 표면에 발현하는 GUCY2C 특이적 면역 세포일 수 있다. 일 예에서, 상기 면역 세포는 상기 키메라 항원 수용체를 발현하도록 유전적으로 조작된 세포, 예컨대, 상기 키메라 항원 수용체의 암호화 폴리뉴클레오타이드 또는 이를 포함하는 제조합 벡터(발현 벡터)가 도입된 면역 세포일 수 있다.
- [76] 면역 세포는 T 세포, 종양 침윤 림프구 (Tumor Infiltrating Lymphocyte, TIL), NK(Natural killer) 세포, TCR(T cell antigen receptor)-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. 상기 면역 세포는 포유류 (예컨대, 인간, 원숭이 등의 영장류, 마우스, 래트 등의 설치류 등) 유래의 세포일 수 있다.
- [77] 면역 세포는 자가 또는 동종일 수 있다. 자가는 치료대상 환자로부터 유래된 것을 말한다. 동종은 치료대상 환자와 동일한 종의 다른 개체에서 유래된 것을

말한다.

- [78] 또한 면역 세포는 인간 유도만능 줄기세포(iPSC)에서 유래한 것일 수 있다. iPSC에서 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.
- [79] 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.
- [80] 본 명세서에서 용어 "자연살해세포(Natural Killer cells)" 또는 "NK 세포"는 선천성 면역계의 주요 성분을 구성하는 세포독성 림프구로서, 대형과립림프구(large granular lymphocyte, LGL)로 정의되고 림프계 전구세포(common lymphoid progenitor, CLP) 생성 B 및 T 림프구로부터 분화된 제3의 세포를 구성한다. 상기 "자연살해세포" 또는 "NK 세포"는 임의의 조직 공급원(source)으로부터 유래된 추가적인 변형이 없는 자연살해세포를 포함하고, 성숙한 자연살해세포뿐 아니라, 자연살해 전구세포를 포함할 수 있다. 상기 자연살해세포는 인터페론 또는 대식세포-유래 사이토카인에 대한 반응으로 활성화되고, 자연살해 세포는 "활성화 수용체" 및 "억제성 수용체"로 표지되는, 세포의 세포 독성 활성을 제어하는 2가지 유형의 표면 수용체를 포함한다. 자연살해세포는 임의의 공급원, 예를 들어 태반 조직, 태반 관류액, 제대혈, 태반혈, 말초혈, 지라, 간 등으로부터의 조혈 세포, 예를 들어 조혈 줄기 또는 전구체로부터 생성될 수 있다.
- [81] 상기 용어 "수용체"는 특정 물질과 결합하여 NK 세포의 활성을 변화시키는 모든 분자를 말한다. 상기 특정 물질은 화학적 조성물, 체내 유래 또는 인공적인 특정 단백질, 펩티드, 콜레스테롤, 당단백질을 포함하며, 다른 면역 세포 또는 NK 세포 스스로에 의한 사이토카인 또는 케모카인, 또는 표적 세포 또는 NK 세포 자체의 특정 수용체 또는 막단백질을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 수용체는, NK 세포의 세포 표면에 위치하여 특정 물질과 결합하여 세포 내로 신호 전달하여 NK 세포의 활성을 일으키는 경우뿐만 아니라, 세포막을 통과하여 세포막 내면 또는 세포질에 존재하는 수용체로서 외부 특정 자극 물질과 결합하여 신호전달 작용을 일으킬 수 있는 모든 수용체를 포함한다. 상기 수용체의 예로는 CD16, CD25, CD69, CD117, NKG2D, CD94/NKG2A, 2B4 (CD244), DNAM-1 (CD226), CD2, CXCR3, NKp30, NKp44, NKp46 및 NKp80가 있을 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 수용체 중 CD117 발현이 낮고, CD94/NKG2D 발현이 높을 경우 NK 세포가 성숙 표현형(maturation phenotype)을 나타내는 것이라고 판단할 수 있다. 상기 "수용체"에는 사이토카인 관련 수용체인 "사이토카인 수용체"도 포함되며, 사이토카인 수용체에는 IL-15Ra, IL-18Ra, CD122, PD-1(CD279) 및 ICAM-1(CD54)이 포함되나, 이에 제한되지

않는다.

- [82] 상기 NK 세포는 퍼포린(Perforin; Prf1), 그랜자임 B(Granzyme B; GzmB), 인터페론-감마(Interferon- γ ; IFN- γ), 종양 괴사인자-알파(Tumor Necrosis Factor- α ; TNF- α) 등의 사이토카인 분비를 통해 직접적으로 표적 암세포 사멸(Apoptosis)를 매개함으로써 암세포를 살상할 수 있다. 따라서, NK 세포에서 상기 세포 사멸 과정에서의 주된 인자인 IFN- γ , 그랜자임 B(granzyme B) 및 퍼포린(perforin)을 포함하는 작동체 분자(Effector molecule)의 분비 정도를 확인하여 NK 세포의 살상 능력을 확인할 수 있다.
- [83]
- [84] 폴리뉴클레오타이드, 재조합 벡터, 재조합 세포
- [85] 본 명세서에서, 앞서 설명한 GUCY2C 결합 폴리펩타이드, GUCY2C에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원결합단편, 융합 단백질, 및 키메라 항원 수용체, 및 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 재조합적 또는 합성적으로 생산된 것일 수 있다.
- [86] 다른 예는 상기 GUCY2C 결합 폴리펩타이드, GUCY2C에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원결합단편, 융합 단백질, 또는 키메라 항원 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 일 구체예에서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 인간에서의 발현을 위하여 코돈 최적화된 것일 수 있다.
- [87] 일 예에서, 서열번호 1 내지 18의 아미노산 서열로 표현되는 GUCY2C 결합 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 20 내지 37의 핵산 서열로 표현되는 것일 수 있다.
- [88] 다른 예는 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 상기 재조합 벡터는 상기 폴리뉴클레오타이드를 숙주 세포에서 발현시키기 위한 발현 벡터일 수 있다. 다른 예는 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 재조합 벡터를 포함하는 재조합 세포를 제공한다. 상기 재조합 세포는 숙주 세포에 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 재조합 벡터가 도입된 것일 수 있다.
- [89] 다른 예는 상기 폴리뉴클레오타이드를 적절한 숙주 세포에서 발현시키는 단계를 포함하는 GUCY2C 결합 폴리펩타이드, GUCY2C에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원결합단편, 융합 단백질, 또는 키메라 항원 수용체의 제조 방법을 제공한다. 상기 발현시키는 단계는 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 세포를 배양하는 단계를 포함할 수 있다.
- [90] 용어 "벡터(vector)"는 숙주 세포에서 목적 유전자(DNA 또는 RNA)를 발현시키기 위한 수단을 의미한다. 예를 들어, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터 및 박테리오파아지 벡터, 바이러스 벡터 등을 예시할 수 있다. 일 구체예에서, 상기 벡터는 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터(AAV), 뮤린 백혈병 바이러스 벡터, SFG 벡터, 마쿨로바이러스 벡터, 엠스타인 바르 바이러스 벡터, 파포바바이러스 벡터,

백시니아 바이러스 벡터, 단순 포진 바이러스 벡터 등으로 이루어진 군에서 선택된 바이러스 벡터일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 일 구체예에서, 상기 재조합 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예를 들면, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHC79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지 (예를 들면, λ gt4 λ B, λ -Charon, λ Δ z1 및 M13 등) 또는 바이러스 (예를 들면, SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.

- [91] 상기 재조합 벡터에서 상기 핵산 분자는 프로모터에 작동적으로 연결될 수 있다. 용어 "작동 가능하게 연결된(operatively linked)"은 뉴클레오타이드 발현 조절 서열(예를 들어, 프로모터 서열)과 다른 뉴클레오타이드 서열 사이의 기능적인 결합을 의미한다. 상기 조절 서열은 "작동 가능하게 연결(operatively linked)"됨으로써 다른 뉴클레오타이드 서열의 전사 및/또는 해독을 조절할 수 있다.
- [92] 상기 재조합 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 재조합 벡터는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다.
- [93] 상기 재조합 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⁺ 프로모터, CMV 프로모터, *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, 아테노 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, 아테노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터, HSV의 *tk* 프로모터 등)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.
- [94] 상기 재조합 세포는 상기 재조합 벡터를 적절한 숙주 세포에 도입시킴으로써 얻어진 것일 수 있다. 상기 숙주세포는 상기 재조합 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 또는 발현시킬 수 있는 세포로서 당업계에 공지된 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 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 등의 대장균, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 쉐린젠시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있으며, 진핵 세포에 형질 전환시키는 경우에는 숙주

세포로서, 효모(*Saccharomyces cerevisiae*), 곤충 세포, 식물 세포 및 동물 세포, 예를 들어, Sp2/0, CHO(Chinese hamster ovary) K1, CHO DG44, CHO S, CHO DXB11, CHO GS-KO, PER.C6, W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, Huh7, 3T3, RIN, MDCK 세포주 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [95] 상기 핵산 분자 또는 이를 포함하는 재조합 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, 리포좀-매개 형질감염법 및 유전자 밤바드먼트 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정하지는 않는다.
- [96] 상기 형질 전환된 숙주 세포를 선별하는 방법은 선택 표지에 의해 발현되는 표현형을 이용하여, 당업계에 널리 알려진 방법에 따라 용이하게 실시할 수 있다. 예를 들어, 상기 선택 표지가 특정 항생제 내성 유전자인 경우에는, 상기 항생제가 함유된 배지에서 형질전환체를 배양함으로써 형질전환체를 용이하게 선별할 수 있다.
- [97] 다른 예는 상기 핵산 분자 또는 이를 포함하는 재조합 벡터를 숙주 세포에서 발현시키는 단계를 포함하는 항-GUCY2C 항체 또는 이의 항원결합단편의 제조 방법을 제공한다. 상기 발현시키는 단계는 상기 핵산 분자 (예컨대 재조합 벡터에 포함됨)를 포함하는 재조합 세포를 상기 핵산 분자의 발현을 허용하는 조건 하에서 배양하는 것에 의하여 수행될 수 있다. 상기 제조 방법은 상기 발현시키는 단계 또는 배양하는 단계 이후에, 배양 배지로부터 항체 또는 항원결합단편을 분리 및/또는 정제하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.
- [98]
- [99] 의약 용도
- [100] 다른 예는 상기 GUCY2C 결합 폴리펩타이드, GUCY2C에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원결합단편, 융합 단백질, 키메라 항원 수용체, 이들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 및 면역 세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 GUCY2C 검출용 조성물을 제공한다.
- [101] 다른 예는 생물학적 시료에 상기 GUCY2C 결합 폴리펩타이드, GUCY2C에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원결합단편, 융합 단백질, 키메라 항원 수용체, 이들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 및 면역 세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 접촉시키는 단계를 포함하는, GUCY2C 검출 방법을 제공한다. 상기 생물학적 시료는 분리된 세포, 조직, 체액, 및 이들의 배양물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 방법에서, 시료 내 GUCY2C 검출은 상기 GUCY2C 결합 폴리펩타이드, GUCY2C에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원결합단편, 융합 단백질, 키메라 항원 수용체, 이들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 및 면역 세포와 GUCY2C와의 반응 확인 (예컨대, 복합체 형성 확인)에 의하여 수행될 수 있다.

- [102] 다른 예는 상기 GUCY2C 결합 폴리펩타이드, GUCY2C에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원결합단편, 융합 단백질, 키메라 항원 수용체, 이들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 및 면역 세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 GUCY2C 검출에 사용하기 위한 용도를 제공한다.
- [103] 다른 예는 상기 GUCY2C 결합 폴리펩타이드, GUCY2C에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원결합단편, 융합 단백질, 키메라 항원 수용체, 이들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 및 면역 세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 암의 진단용 조성물을 제공한다.
- [104] 다른 예는 대상으로부터 얻어진 생물학적 시료에 상기 GUCY2C 결합 폴리펩타이드, GUCY2C에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원결합단편, 융합 단백질, 키메라 항원 수용체, 이들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 및 면역 세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 접촉시키는 단계를 포함하는, 암의 진단 방법 또는 암의 진단에 정보를 제공하는 방법을 제공한다. 상기 대상은 암의 진단을 필요로 하는 환자일 수 있으며, 상기 생물학적 시료는 세포, 조직, 체액, 및 이들의 배양물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 방법에서, GUCY2C가 검출되는 경우, 보다 구체적으로, 상기 GUCY2C 결합 폴리펩타이드, GUCY2C에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원결합단편, 융합 단백질, 키메라 항원 수용체, 및 면역 세포와 GUCY2C와의 복합체가 검출되는 경우, 상기 생물학적 시료가 암세포를 포함하거나, 상기 생물학적 시료가 얻어진 환자가 암환자인 것으로 확인 (결정, 판단)할 수 있다.
- [105] 다른 예는 상기 GUCY2C 결합 폴리펩타이드, GUCY2C에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원결합단편, 융합 단백질, 키메라 항원 수용체, 이들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 및 면역 세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 암의 진단에 사용하기 위한 용도 또는 암의 진단용 조성물 제조에 사용하기 위한 용도를 제공한다.
- [106] 상기 GUCY2C 검출 및/또는 복합체 형성 확인은 통상적인 단백질-단백질 상호작용 또는 단백질-단백질 간 복합체 형성 확인 수단에 의하여 수행될 수 있으며, 예컨대, 면역크로마토그래피(Immunochromatography), 면역조직화학염색, 효소결합 면역흡착 분석(enzyme linked immunosorbent assay: ELISA), 방사선 면역측정법(radioimmunoassay: RIA), 효소 면역분석(enzyme immunoassay: EIA), 형광면역분석(Floresence immunoassay: FIA), 발광면역분석(luminescence immunoassay: LIA), 웨스턴블라팅(Western blotting), 마이크로어레이법, 등으로 이루어진 군으로부터 선택된 방법에 의하여 측정될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [107] 상기 생물학적 시료는 대상(예컨대, 인간, 원숭이 등의 영장류, 마우스, 래트 등의 설치류 등을 포함하는 포유류), 또는 상기 대상으로부터 분리되거나 인공적으로 배양된 세포, 조직, 체액 (예컨대, 혈액, 혈청, 소변, 타액 등) 등일 수 있다.

- [108] 다른 예는 상기 GUCY2C 결합 폴리펩타이드, GUCY2C에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원결합단편, 융합 단백질, 접합체, 키메라 항원 수용체, 이들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터를 포함하는 재조합 세포, 및 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 및/또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [109] 다른 예는 상기 GUCY2C 결합 폴리펩타이드, GUCY2C에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원결합단편, 융합 단백질, 접합체, 키메라 항원 수용체, 이들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터를 포함하는 재조합 세포, 및 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 약학적 유효량을 암의 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 암의 예방 및/또는 치료 방법을 제공한다.
- [110] 다른 예는 상기 GUCY2C 결합 폴리펩타이드, GUCY2C에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원결합단편, 융합 단백질, 접합체, 키메라 항원 수용체, 이들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터를 포함하는 재조합 세포, 및 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 암의 예방 및/또는 치료에 사용하기 위한 용도 또는 암의 예방 및/또는 치료용 약학적 조성물의 제조에 사용하기 위한 용도를 제공한다.
- [111] 본 명세서에서 제공되는 약학 조성물은, 유효성분 (GUCY2C 결합 폴리펩타이드, GUCY2C에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원결합단편, 융합 단백질, 키메라 항원 수용체, 이들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터를 포함하는 재조합 세포, 및/또는 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포)에 더하여, 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 약물의 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 약학 조성물은 또한 약학 조성물 제조에 통상적으로 사용되는 희석제, 부형제, 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 추가로 포함할 수 있다.
- [112] 상기 약학 조성물, 또는 상기 항체 또는 이의 항원결합단편의 유효량은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있다. 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 내피 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여, 또는

병변부위 국소 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 세포(예컨대, 암세포)로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

- [113] 상기 항-GUCY2C 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 약학적 유효량으로 상기 약학 조성물 내에 포함되거나 환자에게 투여될 수 있다. 본 명세서에서 “약학적 유효량”은 상기 유효성분 (GUCY2C 결합 폴리펩타이드, GUCY2C에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원결합단편, 융합 단백질, 키메라 항원 수용체, 및/또는 면역 세포)이 목적하는 효과(예컨대, 항암효과)를 발휘할 수 있는 유효성분의 양을 의미할 수 있다. 상기 약학적 유효량은 환자의 연령, 체중, 성별, 병적 상태, 음식, 배설 속도, 반응 감응성, 제제화 방법, 투여 시간, 투여 간격, 투여 경로, 투여 방식 등의 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 예컨대, 상기 유효성분의 1일 투여량은 0.005 ug/kg 내지 1000mg/kg, 0.005 ug/kg 내지 500mg/kg, 0.005 ug/kg 내지 250mg/kg, 0.005 ug/kg 내지 100mg/kg, 0.005 ug/kg 내지 75mg/kg, 0.005 ug/kg 내지 50mg/kg, 0.01 ug/kg 내지 1000mg/kg, 0.01 ug/kg 내지 500mg/kg, 0.01 ug/kg 내지 250mg/kg, 0.01 ug/kg 내지 100mg/kg, 0.01 ug/kg 내지 75mg/kg, 0.01 ug/kg 내지 50mg/kg, 0.05 ug/kg 내지 1000mg/kg, 0.05 ug/kg 내지 500mg/kg, 0.05 ug/kg 내지 250mg/kg, 0.05 ug/kg 내지 100mg/kg, 0.05 ug/kg 내지 75mg/kg, 또는 0.05 ug/kg 내지 50mg/kg 범위일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 1일 투여량은 단위 용량 형태로 하나의 제제로 제제화되거나, 적절하게 분량하여 제제화되거나, 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.
- [114] 상기 약학 조성물은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 등의 형태로 제형화될 수 있으며, 제형화를 위하여 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [115] 본 발명의 적용 대상 환자는 인간, 원숭이 등을 포함하는 영장류, 마우스, 래트 등을 포함하는 설치류 등을 포함하는 포유류일 수 있다.
- [116] 본 명세서에서 제공되는 조성물 및/또는 방법의 진단 및/또는 치료 대상 암은 고형암 또는 혈액암일 수 있으며, 이에 제한되지 않지만, 대장암, 결장암, 결장직장암, 직장암, 유방암, 폐암, 전립선암, 난소암, 뇌암, 간암, 자궁경부암, 자궁내막암, 자궁암, 신장암, 콩팥모세포종, 피부암, 경구 편평 상피암, 표피암, 비인두암, 두경부암, 골암, 식도암, 방광암, 림프관암(예를들어, 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), 유방 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. 상기 암은 원발성 암 또는 전이성 암일 수 있다. 상기 암은 GUCY2C를 발현 또는 과발현하는 암, 예컨대, GUCY2C를 발현 또는 과발현하는 대장암, 또는 대장암 유래 전이암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [117] 본 명세서에서 암의 치료는 암세포의 증식 저해, 암세포 사멸, 전이 억제 등과 같이 암의 증상의 악화를 방지하거나 완화 또는 호전시키거나, 암을 부분적 또는 전부 소멸시키는 모든 항암 작용을 의미하는 것일 수 있다.
- [118] 일 구체예에서, 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.
- [119] 일 예에서, 본원의 GUCY2C 결합 폴리펩타이드를 포함하는 키메라 항원 수용체를 포함하는 면역세포를 이용하는 항암 치료는, 건강한 사람 또는 치료대상 환자의 혈액에서 면역세포 (예컨대, NK 세포, T 세포 등)를 추출한 뒤, 본원의 GUCY2C 결합 폴리펩타이드를 포함하는 키메라 항원 수용체를 발현하도록 유전적으로 조작하고, 조작된 면역세포를 증폭 배양하고, 배양된 조작 면역세포를 환자에게 투여하는 일련의 과정으로 이루어질 수 있다.
- [120] 바람직한 구현예로, 건강한 사람 또는 치료대상 환자의 혈액에서 면역세포를 추출하는 단계는, 예를 들어 혈액에서 백혈구성분분리채집(leukapheresis 또는 apheresis)을 이용하여 백혈구를 분리한 후 면역세포를 농축하는 과정을 거쳐 면역세포를 추출할 수 있다. 면역세포는 CD4/CD8 구성 수준에서 특정 항체 비드 결합체나 마커를 사용하여 분리될 수 있다. 대안적으로, 줄기세포로부터의 분화를 통해 안정적으로 대량의 면역세포를 얻는 것도 가능하다.
- [121] 상기 추출된 면역세포가 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 면역세포에 주입할 수 있다. CAR는 DNA 형태로 도입될 수도 있고, RNA 형태로 도입된 후 역전사효소에 의해 DNA 로 역전사된 후 면역세포의 게놈에 통합될 수도 있다.
- [122] 상기 조작된 면역세포를 증폭 배양하는 단계는, 당업계 공지된 배양기술에 따라 면역세포를 배양, 증식(proliferation) 및 증폭(expansion) 시킬 수 있다. 이때 바이러스 사용에 대한 안전성과 잘 제작된 CAR 발현 면역세포를 선별하는 기술이 요구된다.
- [123] 마지막으로, 조작 면역세포를 환자에게 다시 투여하는 단계는, 예를 들어 주입(infusion)으로 이루어질 수 있다. 일 예로, CAR 발현 면역세포의 주입 전, 환자는 백혈구 수치를 낮추기 위해, 사이클로포스파미드 또는 플루다라빈 등을 이용한 림프구 제거 조절 화학요법을 받을 수 있다. 또한, CAR 발현 면역세포의

- 지속성을 향상시키기 위하여 IL-2 등의 사이토카인을 함께 투여할 수 있다.
- [124] 환자에게 투여된 조작된 면역세포는 GUCY2C를 발현하는 종양 세포에 대해 면역 반응을 매개할 수 있다. 이러한 면역 반응에는 면역세포의 활성화, 면역세포에 의한 IL-2 및 IFN-감마 등의 사이토카인의 분비, 종양 항원을 인식하는 면역세포의 증식 및 확장, 및 표적-양성 세포의 면역세포-매개된 특이적 사멸(종양 제거)을 포함한다. 예를 들어, CAR 발현 면역세포에서 CAR 가 GUCY2C에 특이적으로 결합하면 면역세포는 CD3 제타의 타이로신-기반 활성화 모티프 (immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM)의 인산화를 통해 활성화되고, 이후, 면역세포의 증식, 세포독성 및/또는 사이토카인 분비가 유도될 수 있다.
- [125] 이와 같이 CAR 발현 면역세포를 이용한 항암 요법은, 근본적으로 환자의 면역 체계를 활성화하여 지속적인 항암 효과를 발휘하기 때문에, 계속 투여하지 않아도 되며, 환자 자신의 면역세포를 이용함으로써 환자 개인 맞춤형 치료가 가능한 장점이 있다.
- [126] 본 명세서에서 제공되는 조성물의 투여는, 질병 상태의 발병 또는 진행을 저해하거나, 중지시키거나, 지연시키거나, 예방하는 면역반응을 일으키거나, 유도하거나 촉진할 수 있다.

발명의 효과

- [127] 본 명세서에서 제공되는 GUCY2C에 높은 친화도로 결합하는 결합 단편 (항체, scFv) 및 이를 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 표면에 발현하는 면역세포는 암, 특히 GUCY2C를 발현하는 암에 대한 우수한 항암 효과를 가지는 항암제로서 유용하게 적용될 수 있다.

[128]

도면의 간단한 설명

- [129] 도 1a는 ELISA를 이용한 scFv의 GUCY2C에 대한 결합 친화도 측정 과정을 개략적으로 보여주는 모식도이다.
- [130] 도 1b는 ELISA로 측정된 scFv의 3종의 GUCY2C(인간 GUCY2C, 원숭이 GUCY2C, 및 마우스 GUCY2C)에 대한 결합 친화도를 보여주는 그래프이다.
- [131] 도 2a는 ELISA를 이용한 scFv의 GUCY2C에 대한 affinity ranking 측정 과정을 개략적으로 보여주는 모식도이다.
- [132] 도 2b 및 2c는 ELISA로 측정된 scFv의 GUCY2C에 대한 affinity ranking 측정 결과를 보여주는 것으로, 2b는 scFv 5nM의 결과를 보여주고, 2c는 scFv 50nM의 결과를 보여준다.
- [133] 도 3a는 scFv의 GUCY2C 세포에 대한 cell binding assay 결과를 보여준다.
- [134] 도 3b는 scFv의 GUCY2C 세포에 대한 cell binding assay 결과 얻어진 MFI (mean of fluorescence intensity)를 나타낸 그래프이다.
- [135] 도 4a는 iPSC에서 분화된 naive NK 세포의 NK 세포 표면 마커의 발현을 유세포

분석을 통해 확인한 결과를 보여주는 그래프이다.

- [136] 도 4b는 iPSC에서 분화된 naive NK 세포의 NK 세포 표면 마커의 발현을 확인한 결과를 보여주는 그래프이다.
- [137] 도 4c는 iPSC에서 분화된 naive NK 세포의 NK 세포의 세포 사멸 과정의 작동체 분자(Effector molecule)의 발현을 확인한 결과를 보여주는 그래프이다.
- [138] 도 5는 anti-GUCY2C CAR가 도입된 NK 세포에서의 anti-GUCY2C CAR의 발현량을 보여주는 그래프이다.
- [139] 도 6a는 GUCY2C를 발현하지 않는 표적세포에 대한 anti-GUCY2C-CAR 발현 NK 세포의 세포독성을 보여주는 그래프이다.
- [140] 도 6b는 GUCY2C를 발현하는 표적세포에 대한 anti-GUCY2C-CAR 발현 NK 세포의 세포독성을 보여주는 그래프이다.
- [141] 도 7은 시험관 내(in vitro)에서 GUCY2C를 발현하지 않는 표적세포 및 GUCY2C를 발현하는 표적세포에 대한 anti-GUCY2C-CAR를 발현하는 NK 세포의 CAR-의존적 살상 능력을 보여주는 그래프이다.
- [142] 도 8은 생체 내(in vivo)에서 anti-GUCY2C-CAR를 발현하는 NK 세포 및 CD19 표적 CAR-NK 세포의 CAR-의존적 살상 능력을 보여주는 그래프이다. GUCY2CCAR-NK는 anti-GUCY2C-CAR를 발현하는 NK 세포를 의미한다.
- [143] 도 9a는 anti-GUCY2C-CAR를 발현하는 NK 세포를 GUCY2C를 발현하는 표적세포와 공동 배양하였을 때, 분비된 IFN- γ 양이 현저하게 높아짐을 확인한 그래프이다. 그래프에서 “No NK”는 NK 세포를 처리하지 않은 실험군으로 0 값에 해당한다.
- [144] 도 9b는 GUCY2C 결합 scFv(5F9, D08, G07)를 포함하는 CAR-NK 세포를 HT29-GUCY2C 세포 및 GUCY2C 양성 암세포인 T84 세포와 공동 배양하였을 때, IFN- γ 양이 현저하게 높아짐을 확인한 그래프이다. 그래프에서 “No NK”는 NK 세포를 처리하지 않은 실험군으로 0 값에 해당한다.
- [145] 도 10은 anti-GUCY2C-CAR를 발현하는 NK 세포 투여 시의 생존률을 대조군(vehicle 투여군)의 생존률과 비교한 그래프이다.

[146]

발명의 실시를 위한 형태

- [147] 이하에서는 실시예를 들어 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하고자 하나, 이는 예시적인 것에 불과할 뿐 본 발명의 범위를 제한하고자 함이 아니다. 아래 기재된 실시예들은 발명의 본질적인 요지를 벗어나지 않는 범위에서 변형될 수 있음은 당 업자들에게 있어 자명하다.

[148]

[149] 실시예 1: GUCY2C 결합 scFv의 제작

- [150] 인간 GUCY2C(R&D Systems, Cat no. 2157-GC; 서열번호 112))를 CD4 (서열번호 115)와 접합시켜 재조합 항원을 준비하고, scFv 라이브러리로부터

상기 항원에 특이적인 scFv를 분비하는 클론을 스크리닝하여, GCUCY2C에 특이적으로 결합하는 18개의 scFv를 확보하였다.

[151]

[152] 상기와 같이 얻어진 scFv 및 이의 암호화 핵산 분자를 아래의 표 4 및 표 5에 각각 나타내었다:

[153] [표4]

scFv 아미노산 서열

scFv ID	Clone ID	Light chain subtype	scFv Region (Protein; N→C)	SEQ ID NO
A01	2426_01_A02	Kappa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS <u>GYTFETS</u> <u>YY</u> MHWVRQAPGQGLEWMGI <u>INPSGGST</u> SYA QEFQGRVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCARD <u>DGQWLQFDY</u> WGQGTLLTVVSSGGGGS GGGGSGGGASDIVMTQSPLSLPVTLGQPASISC RSS <u>QSLKKSDGNTY</u> LSWYHQRPGQSPRRLIY <u>KVS</u> NRDSGVPDFRSGSGSDTDFTLKISRVEDT VGIYYC <u>MOGSHWPPT</u> FGQGTKVEIK	1
A02	2427_01_A08	Lambda	EVQLVQPGAIEVKKPGSSVKVSCKAS <u>GGTLSS</u> <u>Y</u> AISWVRQAPGQGLEWMGR <u>IIPILGIT</u> NYAQK FQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFC AR <u>DORPASMDV</u> WGQGTLLTVVSSGGGGSGGG GSGGGASQSELTQPASVSGSPGQSITISCTGT <u>SS</u> <u>DVGGYIY</u> VSWYQQHPGKVPKLMIH <u>DVSHRPS</u> GVSNRFGSGRSNTASLTISGLQAEDEADYFCS <u>SYAGSNNYV</u> FGTGTKVTVL	2
A03	2427_01_A12	Lambda	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS <u>GGTFES</u> <u>Y</u> TISWVRQAPGQGLEWMGR <u>IIPILGIAN</u> Y AQK FQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYY CARD <u>DYSSSWNSMDV</u> WGQGTLLTVVSSGGGGS GGGGSGGGASQSGLTQPPSASGSPGQSVTISCT GT <u>SSDIGYYHY</u> VSWYQQHPGKAPKLMY <u>EDS</u> KRPSGISNRFGSKSGTTASLTVSGLQAEDEAH YYC <u>SSFTSRSTWV</u> FGGGTQLTVL	3
A04	2427_01_B02	Lambda	EVQLVQPGAIEVKKPGSSVKVSCKAS <u>GGTLSS</u> <u>Y</u> AISWVRQAPGQGLEWMGR <u>IIPILGIT</u> NYAQK FQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFC AR <u>DORPASMDV</u> WGQGTLLTVVSSGGGGSGGG GSGGGASQSELTQPASVSGSPGQSITISCTGT <u>SS</u> <u>DVGGYIY</u> VSWYQQHPGKVPKLMIH <u>DVSHRPS</u>	4

			GVSNRFSGRSGNTASLTISGLQAEDEADYFCS <u>SYTSSNNYY</u> FGTGTKVTVL	
A05	2427_01 _B07	Lambda	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS <u>GGTFSS</u> <u>YTITWVRQAPGQGLEWMGR</u> <u>IIPVLGIAN</u> YAQ KFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCARD <u>DYSSSWNSMDV</u> WGQGTLLTVSSGGGG SGGGSGGGASQSGLTQPRSVSGSPGQSVTISC TGT <u>SSDVGGYNY</u> VSWYQQHPGKAPKLMYD <u>VSKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTVSGLHAED</u> EADYYC <u>SSYAGSNNFV</u> FGTGTKVTVL	5
A06	2427_01 _C01	Lambda	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS <u>GGTFGS</u> <u>YTISWVRQAPGQGLEWMGR</u> <u>IIPILGIAN</u> YAQK FQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYY CARD <u>DYSSSWNSMDV</u> WGQGTLLTVSSGGGG GGGGSGGGASQSGLTQPRSVSGSPGQSVTISCT GT <u>SSDVGAYNY</u> VSWYQQHPGKAPKLMY <u>EVS</u> KRPSGVPDRFSASKSGNTASLTVSGLQAEDEA DYCYC <u>SSYAGSNNWV</u> FGGGTKLTVL	6
A07	2427_01 _C02	Lambda	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS <u>GGSISSYY</u> WSWIRQPPGKGLEWIGSI <u>IYYSGST</u> NYNPSLKS RVTISRDKSKNQLFLKLNSMTAADTAVYYCA R <u>DVWGSGQSFDS</u> WGQGTLLTVSSGGGGSGG GGSGGGASNFMILTQPHSVSESPGKTVTISCTRS <u>SGSIASNY</u> VQWYQQRLGSSPTTVIY <u>EHSRRPS</u> GVPDRFSASIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYY C <u>QSYDVSNRV</u> FGGGTKLTVL	7
A08	2432_01 _D05	Kappa	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSSY</u> <u>WMSWVRQAPGKGLEWVAN</u> <u>IKODGSEK</u> YYV DSVKGRFTISRDNANKSLYLQMNSLRAEDTAV YYCAK <u>APWYSSSPTYGMDV</u> WGQGTLLTVS SGGGSGGGSGGGASDIQMTQSPSSLSASVG DRVITTCQAS <u>ODISNY</u> LNWYQQKPGKAPRRLI Y <u>GASTLMSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE</u> DFATYYC <u>QQSYSTPLT</u> FGGGTKVEIK	8
A10	2432_01 _D08	Kappa	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS <u>GGTFSS</u> <u>YAI</u> SWVRQAPGQGLEWMGG <u>IPIFGTAN</u> YAQ	9

			KFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDNAVY YCAR <u>TRYIWGSYRAYGMDV</u> WGQGTMTVTVS SGGGGSGGGGSGGGASDIQMTQSPSSMSASVG DRVITITCRAS <u>QSISSH</u> LNWYQQLPGNAPTLIIY <u>YAS</u> NLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPDFF ATYYC <u>QOSISLPYT</u> FGQGTKVEIK	
A12	2433_01 _G08	Lambda	EVQLVQPGAIEVKKPGSSVKVSCKAS <u>GGTLSS</u> <u>Y</u> AIWVRQAPGQGLEWMGR <u>IIPILGIT</u> NYAQK FQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYFC AR <u>DORPASMDV</u> WGQGTMTVTVSSGGGGSGGG GSGGGASQSELTQPASVSGSPGQSITISCTGT <u>SS</u> <u>DVGGYIY</u> VSWYQQHPGKVPKLMIH <u>DVSHRPS</u> GVSNRFSGSRSGNTASLTISGLQAEDEADYFCS <u>SYTSSNNYV</u> FGTGTKVTVL	10
B01	2433_01 _H07	Lambda	EVQLVQPGAIEVKKPGSSVKVSCKAS <u>GGTLSS</u> <u>Y</u> AIWVRQAPGQGLEWMGR <u>IIPILGIT</u> NYAQK FQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYFC AR <u>DORPASMDV</u> WGQGTMTVTVSSGGGGSGGG GSGGGASQSGLTQPASVSGSPGQSITISCTGT <u>SS</u> <u>DVGGYNY</u> VSWYQQHPGKAPKLMY <u>EVSNRPS</u> GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC <u>STVTSLSITYV</u> FGTGTKLTVL	11
B07	2436_02 _F10	Kappa	EVQLVQSGAIEVKRPGSSVKVSCKAS <u>GYTFTS</u> <u>YY</u> MHWVRQAPGQGLEWMGI <u>INPSGGST</u> SYA QKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDNAVY YYCAA <u>GTYS</u> SGWTIDYWGQGTMTVTVSSGGG GSGGGGSGGGASDIVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCRSS <u>QSLVYTDGNTY</u> LNWFQQRPQGSPRRLI Y <u>KVSNRDS</u> GVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGIYYC <u>MHSKOWPPT</u> FGGGTKVEIK	12
B08	2436_02 _F11	Kappa	EVQLVQSGAIEVKKPGSSVKVSCKAS <u>GGTFSS</u> <u>Y</u> AIWVRQAPGQGLEWMGG <u>IPIFGT</u> ANYAQ KFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVY YCAR <u>GHHYYMDV</u> WGQGTMTVTVSSGGGGSGG GGSGGGASDIVMTQSPATLSVSPGEGATLSR AS <u>QSVSSN</u> LAWYQQKPGRAPRLLIY <u>GASTRAT</u> GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC <u>Q</u>	13

			<u>QYNNWPS</u> FGGGTKLEIK	
B10	2436_02 _G01	Kappa	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS <u>GGTFSS</u> <u>Y</u> AISWVRQAPGQGLEWMGG <u>IPIFGT</u> ANYAQ KFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCAR <u>GHYYYMDV</u> WGQGTTTVTVSSGGGGSGG GGSGGGASDIVMTQSPATLSVSPGEGATLSR AS <u>QSVSSN</u> LAWYQQKPGRAPRLLIY <u>G</u> ASTRAT GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDAVYYC <u>Q</u> <u>QYNNWPT</u> FGGGTKLEIK	14
B11	2437_02 _G07	Lambda	QVQLVESGAIEVKKPGSSVKVSCKAS <u>GGTFSS</u> <u>Y</u> AISWVRQAPGQGLEWMGG <u>IPIFGT</u> ANYAQ KFQGRVTITADESTSTAYMELSGLRSEDTAVY YCAR <u>GIOPLRYYGMDV</u> WGQGTTLTVTVSSGGG GSGGGGSGGGASQSALTQPPSASGTPGQRTIS CSGSS <u>SNIGSNY</u> VYWYQQLPGTAPKLLIY <u>RNN</u> QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEAD YYCA <u>AWDDSLSGRGV</u> FGGGTQLTVL	15
B12	2437_02 _G10	Lambda	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS <u>GFTFESSY</u> <u>S</u> MNWVRQAPGKGLEWVSV <u>IYSGGST</u> HYADS VKGRFTISRHNKNTLYLQMNSLRRAEDTAVYY CAR <u>GAGTLNAFDI</u> WGQGTTTVTVSSGGGGSGG GGSGGGASQSGLTQPPSTSGSPGQSVTISCTGT <u>SSDV</u> <u>GAYS</u> <u>Y</u> VSWYQQHPGKAPKLLIY <u>AVTKR</u> PSGVPDRFSGSKSGNTASLTVSGLQDEDEADY YC <u>SSFAGGSTLV</u> FGGGTKLTVL	16
C01	2437_02 _H05	Lambda	QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS <u>GGTFSS</u> <u>Y</u> AISWVRQAPGQGLEWMGG <u>IPIFGT</u> ANYAQ KFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCVR <u>GYSSIYYYYGMDV</u> WGQGTMTVTVSSGG GGSGGGGSGGGASQSGLTQPRSVSGSPGQSVT ISCTGT <u>SSDVGGYNY</u> VSWYQQHPGKAPKLMY Y <u>DVSK</u> RPSGVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAE DEADYYC <u>GSYTS</u> <u>DGTLV</u> FGGGTKLTVL	17
C02	2437_02 _H08	Lambda	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS <u>GGTFSS</u> <u>Y</u> TISWVRQAPGQGLEWMGR <u>IPI</u> LGIANYAQK FQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYY	18

			CARD <u>DRSYNWLD</u> PWGRGTLVTVSSGGGGSGG GGSGGGASQSALTQPVSVSGSPGQSITISCTGT <u>I</u> <u>SDVGDYNY</u> VSWYQQHPGKAPKLMY <u>DV</u> NNR PSGVSNRFGSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYY <u>CSSYTSSSTLV</u> FGGGTKLTVL	
C07 (양성 대조 군)	5F9 scFv	Kappa	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSRNL AWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGS GSGTEFTLTIGSLQSEDFAVYYCQYKTPRT FGQGTNVEIKASGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SELQVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVFGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHRGNTNDNP SLKSRVTISVDTSKNQFALKLSSVTAADTAVY YCARERGYTYGNFDHWGQGTLVTVSS	19

[154] (표 4에서, 굵은 글씨 및 밑줄로 표시된 영역은 순서대로 CDR-H1, CDR-H2, 및 CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, 및 CDR-L3를 나타냄)

[155] [표5]

scFv 암호화 핵산 분자

scFv ID	scFv Region (Nucleotides; 5'→3')	SEQ ID NO
A01	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCATCTGGATACA CCTTCACCAGCTACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCT GGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAATAATCAACCCTAGTGG TGGTAGCACAAGCTACGCACAGGAGTTCCAGGGCAGAGTCA CCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAG CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTG TGCGAGAGATGGGCAGTGGCTTCAATTTGACTACTGGGGCC AAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGGTGGAGGCGGTTCA GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGCTAGCGATATTGTGAT GACACAGTCTCCACTCTCCCTGCCCCGTCACCTTGGGCAGCC GGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAAAGCCTCCTAAAAA AGAGTGATGGGAACACCTACTTGAGTTGGTATCACCAGAGG CCAGGCCAATCTCCACGGCGCCTAATTTATAAGGTTTCTAAT CGGGACTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAGCGGCAGTGGGTC AGACACTGATTTCACTCTGAAAATCAGCAGAGTGGAGACTG AGGATGTTGGAATTTATTACTGCATGCAAGGTTACACTGG CCTCCGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA	20
A02	GAGGTGCAGCTGGTGCAGCCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGC CTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGC ACCCTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCC TGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAGGATCATCCCTATCC TTGGTATAACAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTC ACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGA GCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTTCT GTGCGAGAGATCAGCGGCCGGCGAGCATGGACGTCTGGGG CCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCGAGTGGTGGAGGCGGTT CAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGCTAGCCAGTCTGAG CTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCG ATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGG TTATATCTATGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAAG TCCCCAACTCATGATTCATGATGTCAGTCATCGGCCCTCAG	21

	GGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAGGTCTGGCAACACGG CCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCT GACTATTTCTGCAGCTCATATACAAGCAGCAACAATTATGT CTTCGGAACCTGGGACCAAGGTCACCGTCCTA	
A03	CAGGTCCAGCTGGTGCAATCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGTCCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCA CCTTCAGCAGCTATACTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCT GGACAAGAGCTTGAGTGGATGGGAAGGATCATCCCTATCCT TGGTATAGCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCA CGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAG CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTG TGCGAGAGATTATAGCAGCAGCTGGAACTCTATGGACGTCT GGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGGTGGAGGC GGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGCTAGCCAGTC TGGGCTGACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGGTCTCCTGGACA GTCAGTCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACATTG GTTATTATCACTATGTCTCCTGGTACCAACAACACCCGGGCA AAGCCCCAAACTCATGATTTATGAGGACAGTAAGAGGCC TCAGGGATTTCTAATCGTTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACC ACGGCCTCCCTGACCGTCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGA GGCTCATTATTACTGCAGTTCTTTTACAAGTAGAAGTACTTG GGTGTTTCGGCGGAGGGACCCAGCTCACCGTCCTA	22
A04	GAGGTGCAGCTGGTGCAAGCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGC CTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGC ACCCTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCT TGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAGGATCATCCCTATCC TTGGTATAACAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTC ACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGA GCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTCT GTGCGAGAGATCAGCGGCCGGCGAGCATGGACGTCTGGGG CCAGGGCACCTGGTCACCGTCTCGAGTGGTGGAGGCGGTT CAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGCTAGCCAGTCTGAG CTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCG ATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGG TTATATCTATGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAAG TCCCCAAACTCATGATTCATGATGTCAGTCATCGGCCCTCAG GGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAGGTCTGGCAACACGG	23

	CCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCT GACTATTTCTGCAGCTCATATACAAGCAGCAACAATTATGT CTTCGGAAGTGGGACCAAGGTCACCGTCCTA	
A05	CAGGTCCAGCTGGTGCAATCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCA CCTTCAGCAGCTATACTATCACCTGGGTGCGACAGGCCCT GGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAGGATCATCCCTGTCCT TGGTATAGCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCA CGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAG CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTG TGCGAGAGATTATAGCAGCAGCTGGAACCTCTATGGACGTCT GGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGTGGTGGAGGC GGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGCTAGCCAGTC TGGGCTGACTCAGCCTCGCTCAGTGTCCGGGTCTCCTGGAC AGTCAGTCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGATGTT GGTGGTTATAACTATGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGG CAAAGCCCCCAAACCTCATGATTTATGATGTCAGTAAGCGGC CCTCAGGGGTCCCTGATCGCTTCTCCGGCTCCAAGTCTGGGA ACACGGCCTCCCTGACCGTCTCTGGGCTCCACGCTGAGGAT GAGGCTGATTATTACTGCAGCTCATATGCAGGCAGCAACAA TTTTGTCTTCGGAAGTGGGACCAAGGTCACCGTCCTA	24
A06	CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCA CCTTCGGCAGCTATACTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCT GGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAGGATCATCCCTATCCT TGGTATAGCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCA CGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAG CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTG TGCGAGAGATTATAGCAGCAGCTGGAACCTCTATGGACGTCT GGGGCCAAGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGTGGTGGAGGC GGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGCTAGCCAGTC TGGGCTGACTCAGCCTCGCTCAGTGTCCGGGTCTCCTGGAC AGTCAGTCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGATGTT GGTGCTTATAACTATGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGG CAAAGCCCCCAAACCTCATGATTTATGAGGTCAGTAAGCGGC CCTCAGGGGTCCCTGATCGCTTCTCTGCCTCCAAGTCTGGCA ACACGGCCTCCCTGACCGTCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGAT	25

	GAGGCTGATTATTACTGCAGCTCATATGCAGGCAGCAACAA TTGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA	
A07	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGGCTTGTGAAGCC TTCGGAGACCCTGTCCCTCACTTGCACTGTCTCTGGTGGCTC CATCAGTAGTTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAG GGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTCTATCTATTACAGTGGG AGCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCAT CTCAAGAGACAAGTCGAAGAACCAGTTGTTTCTGAAGTTGA ATTCTATGACCGCCGCGGACACGGCCGTCTATTATTGTGCG AGAGATGTTTGGGGCAGTGGCCAGTCATTTGACAGTTGGGG CCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCGAGTGGTGGAGGCGGTT CAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGCTAGCAATTTTATG CTGACTCAGCCCCACTCTGTGTGCGGAGTCTCCGGGGAAGAC GGTAACCATCTCCTGCACCCGCAGCAGTGGCAGCATTGCCA GCAACTATGTGCAGTGGTACCAGCAGCGCTTGGGCAGTTCC CCCACCACTGTGATCTATGAACATAGCCGAAGACCCTCTGG GGTCCCTGATCGGTTCTCTGCCTCCATCGACAGCTCCTCCAA CTCTGCCTCCCTCACCATCTCTGGACTGAAGACTGAGGACG AGGCTGACTACTACTGTCACTTATGATGTCAGCAATCGA GTGTTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA	26
A08	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCC TGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTAC CTTTAGTAGCTATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAG GGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAAACATAAAGCAAGATGG AAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCA CCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCGCTGTATCTGCAA ATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTATTG TGCGAAAGCCCCGTGGTATAGCAGCTCGCCGACACCCTACG GTATGGACGTCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCG AGTGGTGGAGGCGGTTCAAGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGG CGCTAGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTC TGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCGA GTCAGGACATTAGCAACTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAA CCAGGGAAAGCCCCTAGGCGCCTGATCTATGGTGCATCCAC TTTGATGAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGAT CTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT GAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTAC	27

	ACCTCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA	
A10	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGC CTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGC ACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCC TGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCT TTGGTACAGCAAACACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTC ACGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGA GCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACT GTGCGAGAACACGTTACATTTGGGGGAGTTATCGGGCATAAC GGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTC GAGTGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTG GCGCTAGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCATG TCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGCGC GAGTCAGAGCATTAGCAGTCATTTAAATTGGTATCAGCAGC TGCCAGGCAATGCCCCCTACTCTCCTGATCTATTATGCTTCCA ATTTACAAAGTGGGGTCCCATCTAGGTTCAGTGGCAGTGGA TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAGCCT GATGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTATCAGTCTC CCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGGTGGAGATCAAA	28
A12	GAGGTGCAGCTGGTGCAGCCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGC CTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGC ACCCTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCC TGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAGGATCATCCCTATCC TTGGTATAACAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTC ACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGA GCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTTCT GTGCGAGAGATCAGCGGCCGGCGAGCATGGACGTCTGGGG CCAGGGCACCTGGTCACCGTCTCGAGTGGTGGAGGCGGTT CAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGCTAGCCAGTCTGAG CTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCG ATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGG TTATATCTATGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAAG TCCCCAAACTCATGATTCATGATGTCAGTCATCGGCCCTCAG GGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAGGTCTGGCAACACGG CCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCT GACTATTTCTGCAGCTCATATACAAGCAGCAACAATTATGT CTTCGGAACCTGGGACCAAGGTCAACCGTCCTA	29

B01	GAGGTGCAGCTGGTGCAGCCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGC CTGGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGC ACCCTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCC TGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAGGATCATCCCTATCC TTGGTATAACAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTC ACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGA GCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTTCT GTGCGAGAGATCAGCGGCCGGCGAGCATGGACGTCTGGGG CCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCGAGTGGTGGAGGCGGTT CAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGCTAGCCAGTCTGGG CTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCG ATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGATGTTGGTGG TTATAACTATGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCCAAAG CCCCAAACTCATGATTTATGAGGTCAGTAATCGGCCCTCA GGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACG GCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGC TGATTACTACTGCAGCACAGTTACAAGCCTCAGCACTTATGT CTTCGGAAGTGGGACCAAGCTGACCGTCCTA	30
B07	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAGGC CTGGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCATCTGGATAC ACCTTCACCAGCTACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCC TGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAATAATCAACCCTAGTG GTGGTAGCACAAGCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTC ACCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGA GCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACT GTGCGGCAGGAACGTATAGCAGTGGCTGGACGATTGACTAC TGGGGGCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCGAGTGGTGGAG GCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGCTAGCGAT ATTGTGATGACGCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCTT GGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAAAGCCT CGTATACACTGATGGAAACACCTACTTGAATTGGTTTCAGC AGAGGCCAGGCCAATCTCCAAGGCGCCTAATTTATAAGGTT TCTAACCGGGACTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAGCGGCAG TGGGTCAGGCACTGATTTACACTGAAAATCAGCAGGGTGG AGGCTGAGGATGTTGGGATTTATTACTGCATGCATAGTAAA CAGTGGCCTCCCACCTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAAAT CAAA	31

B08	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGC CTGGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGC ACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCC TGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCT TTGGTACAGCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTC ACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGA GCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACT GTGCGAGAGGACACTACTACTACATGGACGTCTGGGGGCAA GGGACCACGGTCACCGTCTCGAGTGGTGGAGGCGGTTTCAGG CGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGCTAGCGATATTGTGATGA CTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAGGA GCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAA CTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCTGGCCGGGCTCCCAGGC TCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAG CCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTC ACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTAC TGTCAGCAGTATAATAACTGGCCCACTTTCGGCGGAGGGAC CAAGCTGGAGATCAAA	32
B10	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGC CTGGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGC ACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCC TGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCT TTGGTACAGCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTC ACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGA GCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACT GTGCGAGAGGACACTACTACTACATGGACGTCTGGGGGCAA GGGACCACGGTCACCGTCTCGAGTGGTGGAGGCGGTTTCAGG CGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGCTAGCGATATTGTGATGA CTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAGGA GCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAA CTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCTGGCCGGGCTCCCAGGC TCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAG CCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTC ACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTAC TGTCAGCAGTATAATAACTGGCCCACTTTCGGCGGAGGGAC CAAGCTGGAGATCAAA	33
B11	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGC	34

	CTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGC ACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCC TGGACAAGGACTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCT TTGGTACAGCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTC ACGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGA GCTGAGCGGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACT GTGCGAGAGGTATACAGCCTCTTCGCTACTACGGTATGGAC GTCTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGGTGG AGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGCTAGCC AGTCTGCGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCC GGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAA CATCGGAAGTAATTATGTATACTGGTACCAGCAGCTCCCAG GAACGGCCCCCAAACCTCATCTATAGGAATAATCAGCGG CCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGC ACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGA TGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGA GTGGTCGGGGAGTGTTTCGGCGGAGGGACCCAGCTCACCGTC CTA	
B12	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCC TGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTAC CTTCAGTAGCTATAGCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAG GGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGTTATTTATAGCGGTGGT AGCACACACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCAT CTCCAGACACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGA ACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCG AGGGGGGCTGGTACCTTAAATGCTTTTGATATCTGGGGGCA AGGGACCACGGTCACCGTCTCGAGTGGTGGAGGCGGTTTACG GCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGCTAGCCAGTCTGGGCTG ACTCAGCCTCCCTCCACGTCCGGGTCTCCTGGACAGTCAGTC ACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGCTTA TAGCTATGTCTCCTGGTATCAACAACACCCAGGCAAAGCCC CCAAACTTCTCATTTATGCGGTCACTAAGAGGCCCTCGGGG GTCCCTGATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCC TCCCTGACCGTCTCTGGACTCCAGGATGAGGATGAGGCTGA TTATTACTGCAGCTCTTTTGCAGGCGGCAGCACTCTGGTGTT CGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA	35
C01	CAAATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC	36

	TGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCA CCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCT GGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTT TGGTACAGCAAACCTATGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCA CGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAG CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTG TGTGAGAGGATACAGTTCAATATACTACTACTACGGTATGG ACGTCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCGAGTGGT GGAGGCGGTTCAAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGCTAG CCAGTCTGGGCTGACTCAGCCTCGCTCAGTGTCCGGGTCTCC TGGACAGTCAGTCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTG ATGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCCTGGTACCAACAGCACC CAGGCAAAGCCCCCAAACCTCATGATTTATGATGTCAGTAAG CGGCCCTCAGGGGTTTCTGATCGTTCTCTGGCTCCAAGTCT GGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGA GGACGAGGCTGATTATTACTGCGGCTCATATACAAGCGACG GGACTCTAGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA	
C02	CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCA CCTTCAGCAGCTATACTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCT GGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAGGATCATCCCTATCCT TGGTATAGCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCA CGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAG CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTG TGCGAGAGATAGGTCTTACAACCTGGCTCGACCCCTGGGGCC GTGGCACCCCTGGTCACCGTCTCGAGTGGTGGAGGCGGTTCA GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGCTAGCCAGTCTGCGCT GACTCAGCCTGTCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGAT CACCATCTCCTGCACTGGAACCATCAGTGACGTTGGTGATT ATAACTATGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAAGCC CCCAAACCTCATGATTTATGACGTCAATAATCGGCCCTCAGG GGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGC CTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTG ATTATTACTGCAGCTCATATACAAGCAGCAGCACTCTGGTA TTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA	37

[156]

[157] 실시예 2: 선별된 scFv의 GUCY2C에 대한 결합 친화도

- [158] 상기 실시예 1에서 제작된 scFv의 항원 GUCY2C에 대한 결합 친화도를 ELISA를 통하여 측정하였다. 결합 친화도 측정을 위한 항원으로서, 실시예 1에서 준비된 인간 GUCY2C 재조합 항원과 함께, 동일한 방법으로 준비된 monkey GUCY2C 재조합 항원 및 murine GUCY2C 재조합 항원을 사용하여, 각 항원에 대한 친화도를 측정하였다 (도 1a 참조).
- [159] 보다 구체적으로, 준비된 인간 GUCY2C (서열번호 112), 원숭이 GUCY2C (서열번호 114), 그리고 마우스 GUCY2C (서열번호 113)를 각각 rCD4(서열번호 115)과 융합시킨 GUCY2C-rCD4 fusion protein을 Nunc Maxisorp™ 96 well plate에 streptavidin이 코팅된 곳에 binding시킨다. Washing buffer로 결합되지 않은 합성 단백질들을 모두 제거한 이후에 배양액에서 수득된 anti-GUCY2C scFV를 각 well에서 incubation한다. 그 뒤 Eu-anti-tag Ab를 이용하여 DELFIA enhancement된 신호를 읽어 친화도를 측정하였다.

- [160] 상기 사용된 항원의 정보는 다음과 같다:

	Organism	Uniprot ID	NCBI Gene ID	NCBI Reference Sequence
Hu-GUCY2C	Homo sapiens (human)	P25092	2984	NP_004954.2
Mu-GUCY2C	Mus musculus (house mouse)	Q3UWA6	14917	NP_001120790.1
Cy-GUCY2C	Macaca fascicularis (crab-eating macaque)	G7PJX5	102130850	XP_005570270.1
rCD4	Rattus norvegicus	P05540	24932	NP_036837.1

- [162] 또한, 상기 실시예 1에서 제작된 18종의 scFv를 두 가지 농도 (5nM, 50nM)로 준비하고, 이를 각각 ELISA의 1차 항체로 사용하여 GUCY2C 항원을 detection하도록 하여, 각 클론간의 binding affinity의 강도를 측정하고, 이를 이용하여 ranking을 확보하였다. 보다 구체적으로, MaxiSorb 플레이트에 anti-FLAG 항체를 코팅하고 앞서 수득한 scFv들을 첨가하여 결합시킨 후, Washing 과정을 통해 잔존한 scFv를 제거하였다. 여기에 biotinylated 된 human-GUCY2C-rCD4 단백질을 incubation하여 결합시킨 뒤 streptavidin-Europlum을 통해 발색과정을 가지고 DELFIA enhancement를 통해 신호를 읽어 항원에 대한 affinity를 측정하였다.
- [163] 또한, 상기 실시예 1에서 제작된 18종의 scFv의 GUCY2C 항원에 대한 친화력을 SPR (Surface plasmon resonance) 분석법으로 측정하였다. 보다 구체적으로,
- [164] HCA 칩에 protein-G를 150ug/ml 농도로 불인된 5mM의 scFV들과 antigen을 800nM부터 12.5nM까지 다양한 농도로 40ul/sec의 속도로 흘려주었다. MASS2 (Sierra SPR-32; Bruker)를 이용하여 25도씨 조건에서 association time 2min과 dissociation time 10min으로 SPR assay를 수행하였다. Software R3로 데이터를 분석하였다.

- [165] 상기와 같이 측정된 18종 scFv (서열번호 1 내지 18) 및 양성대조군 scFv (5F9 scFv-Fc; 서열번호 19)의 3가지 항원 (인간 GUCY2C, 원숭이 GUCY2C, 및 마우스 GUCY2C)에 대한 결합 친화도 및 affinity ranking 결과를 표 6 및 도 1b (결합 친화도, ELISA), 2b (affinity ranking, 5nM) 및 2c(affinity ranking, 50nM)에 나타내었다:

[166] [표6]

scFv ID	Clone ID	Binding ELISA (Hu-GUC Y2C-rCD 4)	Binding ELISA (Cy-GUC Y2C-rCD 4)	Binding ELISA (Mu-GUC Y2C-rCD 4)	Affinity Ranking ELISA (5 nM)	Affinity Ranking ELISA (50 nM)	Affinity (SPR)
A01	2426_01_A02	30194	28056	352	13814	104387	n.d.
A02	2427_01_A08	48333	60	74	33437	167867	743 nM
A03	2427_01_A12	59173	7871	77	36021	199194	219 nM
A04	2427_01_B02	50995	73	66	30425	173460	311 nM
A05	2427_01_B07	43016	89	62	18286	131086	4394 nM
A06	2427_01_C01	63094	1527	80	35080	185082	716 nM
A07	2427_01_C02	79025	51086	17087	4741	27729	3731 nM
A08	2432_01_D05	58055	2273	1276	8697	54750	n.d.
A10	2432_01_D08	55377	37187	82	81236	242966	48 nM
A12	2433_01_G08	38220	56	53	28096	151338	297 nM
B01	2433_01_H07	39417	4486	70	26219	133243	335 nM
B07	2436_02_F10	68628	48862	66	25925	139097	293 nM
B08	2436_02_F11	61079	33693	56	23307	152983	n.d.
B10	2436_02_G01	34355	21161	82	12521	104751	2856 nM

B11	2437_02_G07	37532	23563	44	14849	89646	1329 nM
B12	2437_02_G10	30920	22095	48	9592	77088	4539 nM
C01	2437_02_H05	37474	21616	51	3090	29476	1148 nM
C02	2437_02_H08	49474	32344	61	11013	86347	1481 nM
C07 (양성 대조 군)	5F9 scFv	83913	49221	41	133261	183619	15 nM

[167] (n.d.: not detected) 표 6 및 도 1b에 나타난 바와 같이, 18종 scFv 모두 인간 GUCY2C에 대한 결합 친화도가 원숭이 GUCY2C, 및 마우스 GUCY2C에 대한 결합 친화도보다 현격하게 높은 것으로 나타나서, 인간 GUCY2C에 특이적으로 결합함을 확인하였다. 또한, 표 6 및 도 2b 및 2c에 나타난 바와 같이, 상대적으로 인간 GUCY2C에 대해 친화력이 높은 scFv에서 원숭이 GUCY2C에 대해서도 친화력이 있는 것을 확인하였다. SPR 결과들을 종합적으로 판단할 경우 A10의 scFv가 비교적 높은 결합력을 가지고, 인간과 원숭이의 GUCY2C에 대한 친화력을 가지고 있음이 확인되었다.

[168]

[169] **실시예 3: Cell binding assay**

[170] GUCY2C가 자연적으로 발현하는 세포를 이용하여, 실시예 1에서 제작된 18종의 scFv가 실제로 세포 표면에 발현하는 GUCY2C를 detection할 수 있는지 확인하였다. 이를 위하여, GUCY2C 양성 암세포인 T84 colon carcinoma cell (ATCC® CCL-248™)을 사용하였다. 대조군으로, GUCY2C 음성인 유방암 세포 T-47D(ATCC® HTB-133™)를 사용하였다.

[171] 트립신-EDTA를 사용하여 상기 두 세포주를 분리한 후, FACS 버퍼 (1x PBS + 2 % BSA)에 넣어 두었다. 상기 18 종의 scFv 및 양성대조군 5F9 scFv 각각 10ug/mL을 T84 및 T-47D 세포와 함께 얼음 위에서 1 시간 동안 배양하였다. 세포에 결합된 scFv는 5 ug/mL의 IgG-Fc-PE Ab (BioLegend; 409304)를 사용하여 검출하였다. 세포를 ToPro®3 (live/dead stain)과 함께 배양한 후 유세포 분석기로 판독하였다. 얻어진 데이터는 FlowJo 10.5 software (FlowJo LLC)를 이용하여 플로팅하였다.

[172] 상기 얻어진 결과를 도 3a에 나타내었다.

[173] 또한, 상기 유세포 분석에서 얻어진 MFI (mean of fluorescence intensity)를 도

3b에 나타내었다.

- [174] 도 3a 및 3b에 나타난 바와 같이, A10 scFv (서열번호 9)가 양성대조군인 5F9와 동등한 정도로 GUCY2C 발현 T84 세포에 결합하는 것으로 확인되었고, B01 scFv (서열번호 11), B11 scFv (서열번호 15), 및 B12 scFv (서열번호 16)도 결합 가능성을 보였다.

[175]

- [176] 실시예 4: anti-GUCY2C-CAR를 발현하는 면역 세포(NK 세포)의 제조

[177] 4.1. Lentivirus 제작

- [178] CAR-NK 세포는 NK 세포 표면에 키메라 항원 수용체(CAR)가 발현된 형태이며, 본 실시예에 사용된 키메라 항원 수용체는 GUCY2C에 결합하는 scFv 폴리펩타이드(실시예 1 및 표 4 참조)를 포함하는 세포 외 도메인, 막 관통 도메인(CD28; encoded by GenBank Accession no. NM_006139.4), 세포 내 신호전달 도메인(CD3제타; encoded by GenBank Accession no. NM_001378516.1)으로 구성되어 있다 (anti-GUCY2C-CAR).

- [179] LentiX-293T (#632180 Clontech)에 Lipofectamine 3000 transfection kit(#L3000015, Invitrogen)와 anti-GUCY2C CAR (GUCY2C 결합 scFv-CD28-CD3제타)를 발현하는 plasmid를 처리하여 transfection하고, Transfection 다음 날부터 이틀동안 상층액을 수득하였다. Lenti-X concentrator(#631232, Clontech)를 이용하여 virus를 농축하였다. 얻어진 precipitate를 CTS-PBS에 풀어서 -80°C에 보관하였다.

- [180] viral RNA isolation kit (#740956, Macherey-Nagel)이용하여 바이러스로부터 RNA를 추출한 후, Lenti-X qRT-PCR titration kit(#631235, Takara) 를 이용하여 virus titer를 측정하였다.

[181]

[182] 실시예 4.2. NK 세포의 준비

- [183] iPSC (CMC-hiPSC-003, 질병관리본부)를 mTeSR™ Plus (STEMCELL Technology, 100-0276)에 2~3 일 간 배양하여 약 직경 500 μ m의 aggregate가 형성되면, 배양액을 STEMdiff™ Hematopoietic Kit (STEMCELL Technology, 05310)의 Medium A로 바꾸어 주어, 조혈모세포(HSC) 분화가 일어나도록 하였다. Medium A에서 3일 간 배양 후, 동일 kit의 Medium B 에서 9일 동안 추가 배양하여 HSC를 수득하였다. 이 때, 2~3일 마다 배양액 중 절반을 덜어내고 동량의 새 배양액을 첨가해주어 배양액을 교체해 주었다.

- [184] HSC는 StemSpan™ NK Cell Generation Kit (STEMCELL Technology, 09960)에 포함되어 있는 Lymphoid Differentiation Coating Material로 표면처리한 플레이트에 옮겨 동일 kit 제품에 포함되어 있는 Lymphoid Progenitor Expansion Medium에서 14일 동안 배양하되, 3~4일 마다 배양액을 절반씩 교체하였다. 이어서 NK Cell Differentiation Medium에서 3~4일 마다 배양액을 절반씩 교체하며 배양하고 14일 후 NK 세포를 수득하였다.

- [185]
- [186] 실시예 4.3.iPSC에서 분화된 naive NK 세포의 표면형 특성 확인
- [187] 상기 실시예 4.2에서 얻은 iPSC에서 분화된 naive NK 세포의 분화가 정상적으로 이루어졌는지 여부와 표면형의 형질 및 NK 세포 고유의 기능(perforin, granzyme B, IFN)을 가지고 있음을 확인하기 위하여, 유세포 분석을 통해 NK 세포 표면 마커의 발현을 확인하고, NK 세포의 세포 사멸 과정의 작동체 분자(Effector molecule)의 발현을 확인하였다.
- [188] 구체적으로, 상기 실시예 4.2에서 얻은 iPSC에서 분화된 naive NK 세포를 도 4a 내지 도 4b에 표시된 각각의 항체로 4°C에서 1시간 동안 incubation한 뒤에 이를 유세포 분석기(FACS)로 확인하였다. 또한, 세포 내부에 발현하고 있는 사이토카인을 확인하기 위해 permeablization kit을 이용하여 세포 표면에 구멍을 뚫고 fixing solution을 이용하여 fixing을 거친 뒤에 도 4c에 표시된 항체 (TNF- α , IFN- γ , perforin, Granzyme B)를 이용하여 염색하였으며, 유세포 분석기를 통해 분석하였다.
- [189] 상기 얻어진 결과를 도 4a 내지 4c에 나타내었다. 도 4a 및 4b에 나타난 바와 같이, anti-GUCY2C CAR를 발현하는 NK 세포는 낮은 CD117 발현과 높은 CD94/NKG2D 발현을 나타내 NK 세포의 성숙 표현형(maturation phenotype)을 나타내었으며, NK 활성화 수용체의 발현이 높고, 사이토카인 수용체가 정상 발현하고 있음을 확인하였다. 또한, 도 4c에 나타난 바와 같이, anti-GUCY2C CAR를 발현하는 NK 세포는 NK 세포의 세포 사멸 과정에서의 주된 인자인 IFN- γ , 그랜자임 B(granzyme B) 및 퍼포린(perforin)의 발현이 높음을 확인하였다.
- [190]
- [191] 실시예 4.4. anti-GUCY2C CAR를 발현하는 NK 세포의 제작
- [192] 상기와 같이 iPSc로부터 NK세포를 얻는 과정에 있어서, 중간 산물인 HSC 단계에서 실시예 4.1에서 준비된 anti-GUCY2C CAR(GUCY2C 결합 scFv-CD28-CD3제타)가 탑재된 lentivirus를 lentiboost (Sirion)와 함께 MOI 3000으로 처리하였으며, 그 다음날 NK 세포로 상기 서술한 방법으로 분화를 진행하였다.
- [193] 상기 분화된 NK 세포에서의 GUCY2C 결합 scFV로서 clone ID A12 (서열번호 3), D08 (서열번호 9), H07 (서열번호 11), G07 (서열번호 15), 또는 5F9 (서열번호 19; positive control)를 포함하는 CAR의 발현을 확인하기 위해, FITC가 conjugation된 goat anti-human Fab antibody (#31628, Invitrogn)을 1:100으로 사용하였으며, 4도씨에서 20 min 인큐베이션하였다. 그 이후 FACS buffer (2% FBS/PBS)로 washing하여 FACS analysis를 통해 발현량을 확인하였다 (LSR fortessa, BD).
- [194] 상기 얻어진 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5에 나타난 바와 같이, 상기 분화된 NK 세포는 모두 GUCY2C 결합 scFV (D08, G07, A12, H07)를 발현함을 확인하였다.

- [195]
- [196] 실시예 4.5. anti-GUCY2C-CAR를 발현하는 NK 세포의 시험관 내 세포독성 시험
- [197] GUCY2C 유전자(NM_004963.4)를 pLV-EF1 α -puroR plasmid에 subcloning하고, 상기 실시예 4.1에 기재한 방식을 참조하여 lentivirus를 제작하였다. 준비된 lentivirus를 HT29 세포(ATCC HTB38™)에 transduction하여 GUCY2C를 세포 표면에 발현시키고, 이틀 뒤부터 2.5 μ g/ml 농도의 puromycin을 처리하여 GUCY2C를 발현하는 세포만 선별하였다. 이렇게 2주간의 selection을 거쳐 최종적으로 GUCY2C를 발현하는 HT29 세포주 (HT-GUCY2C)를 확보하였다. 이와 같이 준비된 표적 세포 (HT29 (ATCC HTB38™) 또는 HT29-GUCY2C)를 CFSE proliferation kit (Thermo Fisher, C34554)을 이용하여 labeling하였다.
- [198] PBS를 이용하여 washing 한 뒤에 각 ratio의 effector cell (anti-GUCY2C-CAR 발현 NK 세포)을 100 μ l/well 이 되도록 96well plate에 분주하였다. 각 표적 세포는 고정하고, E(effector cells):T(target cells) ratio에 맞게 NK세포수를 조절하여, E:T ratio 가 10:1, 3:1, 1:1, 0.5:1이 되도록 준비하였다. 이때 negative control을 위해 표적세포만 있는 샘플과 effector 세포만 있는 well도 준비하였다. 이렇게 섞여진 세포는 37도씨 인큐베이터에서 4시간 배양 후, FACS용 washing 버퍼 (10% FBS/PBS)로 세척한 뒤에 최종적으로 DAPI-FACS buffer (DAPI final working 5 μ g/ml) 70 μ l/well 로 sample을 준비한 뒤에 10분 후 FACS(Intellicyt® iQue Screener PLUS)로 분석하였다. 분석된 값을 이용하여 아래의 수식을 통하여 lysis activity를 환산하였다.
- [199] % Cytotoxicity = CFSE+DAPI+cell (dead target cell)/CFSE positive (total target cell) X 100 (%)
- [200] 상기 얻어진 결과를 도 6a (표적세포가 HT29 세포인 경우의 결과) 및 6b (표적세포가 GUCY2C 발현 HT29 세포인 경우의 결과)에 나타내었다. 도 6a 및 6b에 나타난 바와 같이, 4종류의 GUCY2C 결합 scFV(D08, G07, A12, H07)를 포함하는 CAR를 발현하는 NK 세포(CAR-NK)의 세포독성을 확인하였다. CAR-NK가 표적세포가 GUCY2C가 발현하지 않는 대장암 세포주 HT29인 경우에는 약 20% 이하의 세포독성을 보이는 반면, GUCY2C를 과발현하는 HT29-GUCY2C 표적세포주에서는 최대 60%이상의 세포독성을 보여주는 것으로 확인되었다. scFV의 종류에 따라 세포독성의 값이 차이는 있으나 사용된 모든 clone이 GUCY2C에 대해 용량의존적으로 세포독성을 나타냄을 확인하였다.
- [201]
- [202] 4.6 시험관 내(in vitro)에서 anti-GUCY2C-CAR를 발현하는 NK 세포의 CAR 의존적 살상 효과 및 NK 내재적 살상(CAR-비의존적) 효과 확인
- [203] anti-GUCY2C-CAR를 발현하는 NK 세포의 시험관 내에서 CAR 의존적 살상 효과를 확인하기 위하여, GUCY2C 결합 scFV(D08)를 포함하는 CAR를 발현하는

NK 세포를 이용하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

- [204] 구체적으로, 실시예 4.4에 기재된 방법과 동일한 방법으로 표적 세포 (HT29 (ATCC HTB38™) 또는 HT29-GUCY2C)를 확보하고, FACS(Intellicyt® iQue Screener PLUS)로 분석하였다. 분석된 값을 이용하여 아래의 수식을 통하여 lysis activity를 환산하였다.
- [205] $\% \text{ Cytotoxicity} = \text{CFSE+DAPI+cell (dead target cell)}/\text{CFSE positive (total target cell)} \times 100 (\%)$
- [206] 분화는 aggregates를 만들어 일정량 seeding한 뒤에 조혈모세포 분화 미디어를 통해 조혈모세포를 확보하고, 이를 림포이드 전구체(lymphoid progenitor)로 분화시켰다. 이를 다시 NK 세포로 분화시키는 과정을 통해 세포를 수득하였다.
- [207] 상기 얻어진 결과를 도 7 (GUCY2C 표적 CAR-NK 세포의 Clone No. D08)에 나타내었다. 도 7에 나타난 바와 같이, 시험관 내에서 GUCY2C 결합 scFV(D08)를 포함하는 CAR를 발현하는 NK 세포 (GUCY2C 표적 CAR-NK 세포)를 표적 세포주(target cell line)와 공동 배양(co-culture)하였을 때, GUCY2C 결합 scFV(D08)를 포함하는 CAR를 발현하는 NK 세포의 CAR 의존적 살상 효과(CAR dependent killing effect) 및 NK 내재적 살상 효과(CAR-비의존적)를 확인하였다. 즉, 도 7의 GUCY2C-HT29 세포에서 E:T 비율이 증가함 (Effector 세포가 증가함)에 따라 세포 독성도 증가하는 결과를 통해 무작위적이 아닌 CAR 농도 의존적 살상 효과를 가짐을 확인하였으며, mock-HT29 세포에서도 세포 독성을 나타내는 것을 통해 NK 내재적 살상 효과(CAR-비의존적)도 있음을 확인하였다.
- [208]
- [209] 실시예 4.7. 생체 내(in vivo)에서 anti-GUCY2C-CAR를 발현하는 NK 세포의 CAR-의존적 살상 효과 확인 및 NK 내재적 살상(CAR-비의존적) 효과 확인
- [210] 생체 내(in vivo)에서 anti-GUCY2C-CAR를 발현하는 NK의 CAR-의존적 살상 효과 확인 및 NK 내재적 살상(CAR-비의존적) 효과 확인하기 위하여, GUCY2C 결합 scFV(D08)를 포함하는 CAR를 발현하는 NK 세포를 이용하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [211] 구체적으로, 마우스에 CFSE 염색된 표적 세포주(HT29-GUCY2 세포)를 복강 내에 주입 후 1시간 뒤에 GUCY2C 결합 scFV(D08)를 포함하는 CAR를 발현하는 NK 세포를 IL-2/15와 함께 복강 내에 주사하여 마우스 체 내에서 표적 세포의 감소 정도를 확인하였다. 이를 관찰하기 위해 4시간을 기다린 뒤 복강 내에 PBS를 주입하여 다시 회수하는 방식으로 복강 내의 잔존 세포를 획득하고, 이를 유세포 분석 방법을 통해 CFSE 염색약을 측정하는 방식으로 표적세포의 사멸을 관찰하였다.
- [212] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 생체 내에서도 GUCY2C 결합 scFV(D08)를 포함하는 CAR를 발현하는 NK 세포의 CAR 의존적 살상 효과(CAR dependent killing effect) 및 NK 내재적 살상 효과(CAR-비의존적)를 확인하였다.

- [213]
- [214] 실시예 4.8. anti-GUCY2C-CAR를 발현하는 NK 세포의 IFN- γ 분비능 확인
- [215] anti-GUCY2C-CAR를 발현하는 NK 세포의 사멸능에 영향을 미치는 IFN- γ 분비능을 확인하기 위하여, GUCY2C 결합 scFV(5F9, D08, G07)를 포함하는 CAR를 발현하는 NK 세포를 이용하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [216] 구체적으로, IFN- γ 분비능을 측정하기 위하여 ELISA 방법을 사용하였으며, 24시간 동안 표적 세포와 각각의 NK 세포를 공배양(co-culture)한 후, 상층액을 회수하였다. IFN- γ 를 인식하기 위한 항체가 코팅된 플레이트에 회수된 상층액을 incubation하고, 세척 작업을 거쳐 잔존 용액을 제거하였다. 이를 다시 발색이 가능한 IFN- γ 항체를 인식하여 발색 정도를 측정하여 분비된 IFN- γ 를 확인하였다.
- [217] 그 결과, 도 9a에 나타난 바와 같이, anti-GUCY2C-CAR를 발현하는 NK 세포를 GUCY2C를 과발현하는 HT29-GUCY2C 표적 세포주(HT29 GCC 세포)와 공동 배양하였을 때, 분비된 IFN- γ 양이 현저하게 높아짐을 확인하였다. 도 9b에 나타난 바와 같이, CAR를 포함하지 않은 나이브 NK(Naive NK) 세포는 HT29-GUCY2C 세포와의 공동 배양에 의한 IFN- γ 의 양 증가가 없었고, GUCY2C 양성 암세포인 T84 세포와의 공동 배양에 의해서도 상대적으로 적은 양의 IFN- γ 증가가 확인되었다. 반면, GUCY2C 결합 scFV(5F9, D08, G07)를 포함하는 CAR를 발현하는 NK 세포는 HT29-GUCY2C 세포 및 GUCY2C 양성 암세포인 T84 세포와의 공동 배양한 경우, GUCY2C를 발현하지 않는 Mock HT29 세포 대비 IFN- γ 양이 현저하게 높아짐을 확인하였다.
- [218]
- [219] 실시예 4.9. 동물 모델에서 anti-GUCY2C-CAR를 발현하는 NK 세포 투여 시 생존률 확인
- [220] 동물 모델에서 anti-GUCY2C-CAR를 발현하는 NK 세포 투여 시의 생존률을 확인하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [221] 구체적으로, NOG 마우스에 HT29-GUCY2C-Luc cell i.p.(2.5×10^6 cells) 이식 후(D0), day 3에 동일한 양의 HT29세포가 발현하는 마우스들로 군을 분리 (IVIS total flux)하고 CAR NK, Cytokine을 같이 투여하였다. GUCY2C-CAR NK 세포를 1×10^7 cells의 양으로 복강 투여하였으며, 사이토카인의 농도는 hIL-2 (Novartis Proleukin)/10 ug (ip, 4 times/week), hIL-15 (Peprotech)/3 ug (ip, qd)으로 투여하였다. 그런 다음, 각 실험군의 생존률과 생존일을 확인하였다.

[222] [표7]

Group	No.	폐사일		
G1 (HT29-Luc, ip, Vehicle + 시험물질 2)	1	2021-12-14	66	
	2	2021-12-14	66	
	3	2021-12-13	65	
	4	2021-12-14	66	
	5	2021-12-14	66	
	6	2021-12-14	66	
G2 (HT29-Luc, ip, 시험물질 1 + 시험물질 2)	1			95
	2	2021-12-31	83	
	3			95
	4	2021-12-27	79	
	5	2021-12-14	66	
	6	2021-12-30	82	

[223] 그 결과, 표 7 및 도 10에 나타난 바와 같이 대조군에 비해 CAR-NK 세포 투여군에서 생존률이 유의하게 높고, 평균 생존일이 대조군 66일, CAR-NK 세포 투여군 82.5일로, 대조군에 비해 CAR-NK 세포 투여군의 생존일이 긴 것을 확인하였다.

청구범위

- [청구항 1] 다음을 포함하는, GUCY2C 결합 폴리펩타이드:
 서열번호 38 내지 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로
 표현되는 중쇄 CDR1 (이하, CDR-H1), 서열번호 45 내지 53로 이루어진
 군에서 선택된 아미노산 서열로 표현되는 CDR-H2, 및 서열번호 54 내지
 65로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 표현되는 CDR-H3을
 포함하는 중쇄 가변영역;
 서열번호 66 내지 78로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로
 표현되는 경쇄 CDR1 (이하, CDR-L1), 서열번호 79 내지 88로 이루어진
 군에서 선택된 아미노산 서열로 표현되는 CDR-L2, 및 서열번호 89 내지
 106으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 표현되는 CDR-L3을
 포함하는 경쇄 가변영역;
 또는 상기 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역의 조합.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 GUCY2C 결합 폴리펩타이드는 scFv(single chain
 variable fragment)인, GUCY2C 결합 폴리펩타이드.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 서열번호 1 내지 18로 이루어진 군에서 선택된 아미노산
 서열로 표현되는, GUCY2C 결합 폴리펩타이드.
- [청구항 4] 제1항의 GUCY2C 결합 폴리펩타이드를 포함하는 GUCY2C 결합 항체
 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 5] 제1항의 GUCY2C 결합 폴리펩타이드 및 면역글로불린의 Fc 도메인을
 포함하는, 융합 단백질.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 GUCY2C 결합 폴리펩타이드는 서열번호 1 내지
 18로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 표현되는 것인, 융합
 단백질.
- [청구항 7] 세포외 도메인, 막관통 도메인, 및 세포 내 신호전달 도메인을 포함하는
 키메라 항원 수용체로서,
 상기 세포외 도메인은 제2항의 GUCY2C 결합 scFv를 포함하는 것인,
 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor).
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 GUCY2C 결합 scFv는 서열번호 1 내지 18로
 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 표현되는 것인, 키메라 항원
 수용체.
- [청구항 9] 제7항 또는 제8항의 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 면역 세포는 T 세포, 중앙 침윤 림프구, NK(Natural
 killer) 세포, TCR-발현 세포, 수지상 세포, 또는 NK-T 세포인, 면역 세포.
- [청구항 11] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드, 상기 폴리펩타이드를
 포함하는 융합 단백질, 또는 상기 폴리펩타이드를 포함하는 키메라 항원
 수용체를 암호화하는, 폴리뉴클레오타이드.

- [청구항 12] 제11항에 있어서, 서열번호 20 내지 37로 이루어진 군에서 선택된 핵산 서열로 표현되는 것인, 폴리뉴클레오타이드.
- [청구항 13] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드, 상기 폴리펩타이드를 포함하는 융합 단백질, 또는 상기 폴리펩타이드를 포함하는 키메라 항원 수용체를 포함하는, GUCY2C 검출용 조성물.
- [청구항 14] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드, 상기 폴리펩타이드를 포함하는 융합 단백질, 또는 상기 폴리펩타이드를 포함하는 키메라 항원 수용체를 포함하는, 암 진단용 조성물.
- [청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 암은 GUCY2C를 발현하는 것인, 암 진단용 조성물.
- [청구항 16] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 GUCY2C 결합 폴리펩타이드, 상기 GUCY2C 결합 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 GUCY2C 결합 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터, 상기 GUCY2C 결합 폴리펩타이드를 포함하는 키메라 항원 수용체, 상기 키메라 항원 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드; 상기 키메라 항원 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터; 및 상기 키메라 항원 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하거나 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포를 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 17] 제16항에 있어서, 상기 암은 GUCY2C를 발현하는 것인, 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.