

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

WO 2024/106941 A1

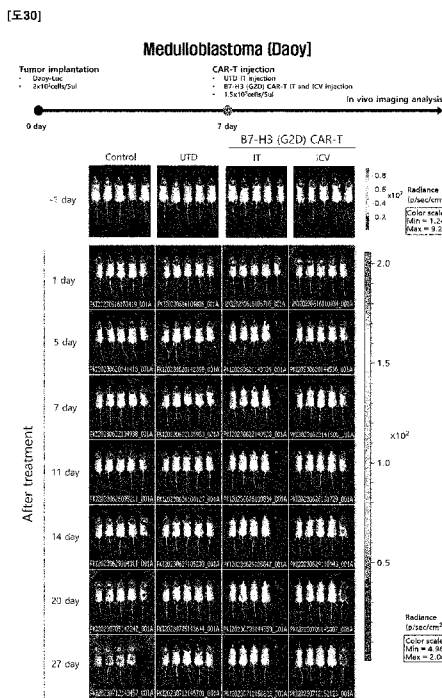
2024년 5월 23일 (23.05.2024)

WIPO | PCT

- (51) 국제특허분류: *C07K 14/725* (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2023/018364
- (22) 국제출원일: 2023년 11월 15일 (15.11.2023)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2022-0152914 2022년 11월 15일 (15.11.2022) KR
10-2023-0154995 2023년 11월 10일 (10.11.2023) KR
- (71) 출원인: 주식회사 셀랩메드 (CELLABMED INC.) [KR/KR]; 02708 서울특별시 성북구 정릉로 161, 3층, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 주안나 (JU, Anna); 02717 서울특별시 성북구 보국문로 58, C동 202호, Seoul (KR). 김민구 (KIM, Min-Gu); 02844 서울특별시 성북구 보문로 32길 102-4, 102호, Seoul (KR). 이보람 (LEE, Boram); 13235 경기도 성남시 중원구 박석로 72번길 7-1, 1층, Gyeonggi-do (KR). 이상은 (LEE, Sangun); 04302 서울특별시 용산구 청파로 85길 38, 4층, Seoul (KR). 전영하 (JEON, Yeongha); 22860 인천광역시 서구 서로3로 255, 2902동 1801호, Incheon (KR). 이송재 (LEE, Song-Jae); 08210 서울특별시 구로구 경인로 619-3, 801호, Seoul (KR). 송성원 (SONG, Seong-Won); 15866 경기도 군포시 산본천로 12, 624동 403호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 충현 (CHUNG HYUN PATENT & LAW FIRM); 06779 서울특별시 서초구 동산로 23 베네피관 8층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

(54) Title: B7-H3 CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: B7-H3 키메라 항원 수용체 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to: an expression cassette comprising a polynucleotide that encodes a chimeric antigen receptor effective in cancer treatment; and an effector cell into which the expression cassette is transduced. Particularly, if a chimeric antigen receptor comprising an antigen-binding domain specifically binding to a B7-H3 antigen, which is highly expressed in various cancer, is expressed on an effector cell such as a T lymphocyte, the present invention can be effectively used as an immunotherapy method for cancer diseases associated with B7-H3.

(57) 요약서: 본 발명은 암 치료에 효과적인 키메라 항원 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 카세트 및 상기 발현 카세트가 형질도입된 효과기 세포에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 다양한 암에서 높게 발현하는 B7-H3 항원에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체를 T 림프구 등 효과기 세포에 발현시키는 경우 B7-H3와 관련된 암 질환의 면역 치료방법으로서 유용하게 이용될 수 있다.

ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: B7-H3 키메라 항원 수용체 및 이의 용도

기술분야

[1] 본 발명은 암 치료에 효과적인 키메라 항원 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 카세트 및 상기 발현 카세트가 형질도입된 효과기 세포에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 전 세계 고형항암제 시장은 '21년 약 1,010억 달러(약 126조 원)에서 '28년 약 2,520억 달러(약 310조 원)으로 연 평균 12.5% 성장할 것으로 전망되었다. '28년 세부질환별 시장 규모는 비소세포암(NSCLC, Non-small cell lung cancer) 약 520억 달러(약 65조 원), 유방암(Breast cancer) 약 460억 달러(약 57조 원), 전립선암(Prostate cancer) 약 210억 달러(약 26조 원), 흑색종(Melanoma) 약 160억 달러(약 20조 원), 신세포암(RCC, Renal cell carcinoma) 약 130억 달러(약 16조 원) 등으로 주요 다섯 개 암 종이 전체의 약 60% 비중을 차지할 것으로 예측된다(Evaluate Pharma Market Explorer, 2022).

[4] 국가암등록통계사업을 통해 수집된 우리나라 2019년 국가암 등록 통계를 살펴보면, 2015년 이후 암 환자 수는 매년 증가하였으며, 2019년 신규 발생한 암환자 수는 2018년도 대비 8,844명 (3.6%) 증가한 25만 4,718명이다(보건복지부. 2019년 국가암등록 통계자료).

[5] 국가암검진사업을 통한 6대암으로 분류되는 유방암, 위암, 대장암, 간암, 폐암 그리고 자궁경부암에 대해서 장기 추세를 보면, 6대암 중 5개의 암종인 폐암, 대장암, 간암, 위암, 그리고 자궁경부암의 발생률은 최근 10여 년간 감소 추세를 보여주거나, 유의미한 증가를 보이지 않는다. 반면 나머지 유방암의 발생률은 20년간 지속적으로 증가하는 추세를 보이고 있다.

[6] 유방암은 3가지 지표인 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체 그리고 표피성장인자 (HER2)를 기준으로 분류한다. 3가지 지표 검사시 전부 '음성 (발견되지 않음)'으로 확인되면 삼중음성 유방암으로 진단한다.

[7] 유방암은 진단 후 5년 생존율이 90% 이상이지만, 삼중음성 유방암은 70% 정도이다. 3~4기의 삼중음성 유방암 환자들의 5년 생존율은 30%정도에 불과하다. 이는 삼중음성 유방암을 제외한 다른 3~4기 유방암 환자들의 5년 생존율이 약 50%인 것과 비교하면 낮은 수치이다. 또한 조기 발견 환자의 30%정도가 외과적 수술 후 5년 내 사망 위험을 경험할 정도로 삼중음성 유방암의 진행이 빠르고 공격적이다.

[8] 삼중음성 유방암의 경우 암세포의 변이가 많으며, 다른 장기로의 전이가 다른 유방암보다 빠르기 때문에 치료에 여러 한계가 존재한다. 뿐만 아니라, 삼중음성

유방암은 초기에 치료해도 약 50% 환자가 재발을 경험할 정도로 예후가 나쁘다. 현재 유방암 치료제는 에스트로젠과 프로게스테론 그리고 표피성장인자 수용체를 표적으로 해서 치료한다. 따라서 이들 수용체가 음성인 삼중음성 유방암 환자들은 해당 약물을 이용하여 치료 효과를 기대하기 어렵다.

- [9] 성인암 뿐만 아니라 소아암의 비율도 적지 않은 범위로 발생되고 있다. 소아암의 발생빈도는 전세계적으로 비슷하며, 대한민국의 경우 매년 1,000~1,200여명이 소아암으로 진단을 받는다. 이는 소아 10만 명당 매년 약 1명이 소아암으로 진단을 받으며 이는 전체 암환자의 약 1%을 차지하고 있다. 소아암은 1세부터 9세 사이 아동의 질병 사망률 1위로 교통사고로 사망한 아동 수보다 많을 정도로 매우 위험한 질병이다.
- [10] 대표적인 소아암으로는 백혈병, 림프종 그리고 뇌종양으로 나눌 수 있다. 백혈구 중에서도 림프구계 백혈구가 제대로 성숙하지 못하고 암세포로 변하는 백혈병인 림프모구백혈병의 경우 치료 성적이 매우 좋아 완치율이 80~90% 가량이 되며, 급성골수성 백혈병 역시 70%의 완치율을 보이고 있다. 그러나, 소아 뇌종양의 경우 예후가 좋지 않아 새로운 치료법 개발이 필요한 실정이다. 보건복지부 중앙암등록본부 자료에 의하면 2020년에 대한민국에서는 247,952건의 암이 새로이 발생했는데, 그 중 뇌종양은 전체 암 발생의 0.7%인 1,795건으로 확인되었다. 이 중에서 소아청소년 뇌종양은 총 152건으로 10세~19세에서 74건 그리고 9세 이하에서 78건이 발생하였다고 보고하였다. 남녀 성비는 1.8:1로 남자에게 더 많이 발생했다. 국가암정보센터에 따르면 소아청소년기에 호발하는 뇌종양으로는 수모세포종 (Medulloblastoma), 성상세포종 (Astrocytoma), 뇌실막세포종 (Ependymoma), 두개인두종 (Craniopharyngioma), 뇌간신경아교종 (Brainstem glioma) 그리고 배세포종 (Germ cell tumor)이며, 뇌종양은 악성도, 발생위치 그리고 구성하는 세포에 따라서 나눌 수 있다.
- [11] 이 중 수모세포종은 소뇌 중양부에서 자라며, 뇌척수액을 통해 전이를 일으키기도 한다. 두통 등의 뇌압상승 징후, 운동장애, 뇌신경 마비 징후 그리고 의식장애 등을 나타내며, 소아기 악성 뇌종양 중 가장 흔한 암이다. 뇌종양중 뇌간신경아교종은 뇌의 부위 중 중뇌, 뇌교, 연수에서 발생하는 교종으로 구음장애 연하장애, 사시, 안면 신경마비등 다발성 뇌신경 장애나 반신부전 마비가 오며, 2년 생존율이 10% 미만으로 예후가 가장 나쁜 소아 뇌종양이다. 현, 뇌종양의 치료법으로는 수술 또는 수술과 방사선 치료를 함께 하는 것이 가장 기본적으로 치료이며 종양 조직 결과에 따라서 항암화학용법을 시도하기도 한다.
- [12] 수모세포종에 대한 수술적 치료의 경우 소뇌함구증후군 (Cerebellar mutism syndrome CMS) 이 수술 환자의 25%에게 나타나는데, 소뇌함구증후군은 소뇌를 포함한 뇌의 특정 부위를 종양 제거 수술을 받은 환자에서 발생할 수 있는 상태이며, 수술 후 약 1~2일 후 증상이 나타나며 증상으로는 말수가 줄어들고, 균형 잡기가 어려워 걸기가 힘들거나 근육 긴장 소실 등이 포함된다. 소뇌함구증후군에 따른 증상들은 시간이 흐르면서 서서히 사라지게 된다. 하지만, 수술 후 방사

선조사를 바로 실시하는데 이 또한, 어려움이 존재한다. 수술 후 보조 두개척추 방사선 치료법은 뇌척수액(Cerebrospinal fluid, CSF)에서 수포종이 전파되는 것을 방지하기 위해 수포종의 전체 뇌와 척추를 치료하는 데 사용되는데, 두개척추 방사선 치료는 의심할 여지없이 생존을 연장하지만, 아쉽게도 방사선 치료법은 매년 2-4포인트의 지능발달 지수 (Intelligence Quotient, IQ) 감소를 희생해야 한다.

- [13] 연수막 전이암은 전체 고형암의 약 5-20%에서 나타난다고 알려져 있으며 이 중 폐암, 유방암, 흑색종이 많은 비중을 차지하고 있다. 연수막전이암으로 전이되는 환자의 비율 역시 폐암, 유방암, 흑색종에서 많은 빈도수로 나타나고 있다(Cancers (Basel). 2021;13). 2020년 국가암등록 통계에 따르면 2020년 폐암은 28,949명, 유방암은 24,923명이 진단된 것으로 알려져 있기에 위의 두가지 암에서 발생하는 연수막 전이암 환자수만 국내에서 한 해에 최소 2500명 이상이 될 것으로 예상이 되며 다른 적응증 유래 연수막전이암 환자수 및 진단법과 치료제의 발전을 고려하면 그 수는 더욱 늘 것으로 예상된다. 하지만 늘어나는 환자수에 비해 효과적인 치료제 개발은 쉽지 않은 상황이다. 뇌실 내로 메토티렉세이트 (Methotrexate)같은 항암제를 투여하거나 국소 방사선 치료가 증상 개선에 도움이 될 수 있으나 치료를 받더라도 중앙생존기간이 6개월 이내로 예후가 매우 좋지 않다(대한내과학회지. 2011;제81권:제3호). 그나마 최근 혈관-뇌장벽을 효과적으로 통과하는 타그리소 같은 타깃치료제들이 연수막전이암에도 효과적이라고 알려져 있으나 적용가능한 환자수가 제한적이며 타깃치료제들은 내성이 생기는 문제를 안고 있다(Neurotherapeutics. 2022;19:1782-1798).

- [14] 최근, 키메라 항원 수용체 변형 T 세포 (Chimeric antigen receptor, CAR-T)세포의 경우 혈액암을 대상으로 치료제로의 가능성이 입증되었으며, 다양한 연구를 통해서 CAR-T 세포치료제가 혈액암 뿐만 아니라 고형암 치료에도 효과를 나타낼 가능성이 있음을 암시한다.

- [15] 한편, B7-H3은 소아뇌암, 연수막전이암, 삼중음성 유방암 등을 비롯한 다양한 암종에서 높게 발현된다고 알려져 있으며, 이러한 B7-H3의 고발현은 부정적인 임상적 치료 결과와 관련되어 있다.

- [16] 따라서 본 발명자는 암에서 높게 발현하고 있는 B7-H3에 대하여 다양한 암에 대한 관계성 및 수모세포종, 연수막전이암 그리고 삼중음성 유방암 등에 있어서 키메라 항원 수용체(CAR)의 치료제로의 가능성을 확인하고 본 발명을 하기에 이르렀다.

[17]

- [18] 상기한 배경기술로서 설명된 사항들은 본 발명의 배경에 대한 이해 증진을 위한 것일 뿐, 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 이미 알려진 종래기술에 해당함을 인정하는 것으로 받아들여져서는 안 될 것이다.

[19]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [20] 이에 본 발명자들은 다양한 암종에서 높게 발현하고 있는 B7-H3를 타겟팅하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 효과기 세포를 개발하고자 노력하였다. 그 결과 본 발명자들은 B7-H3와 결합하는 항원 결합 도메인이 포함된 효과기 세포가 다양한 종류의 암세포주에 특이적으로 결합하여 암세포 사멸 효과를 나타내는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [21] 따라서 본 발명의 목적은, B7-H3와 결합하는 항원 결합 도메인(antigen-binding domain); 힌지 영역(hinge region); 막관통 도메인(transmembrane domain); 보조 자극 도메인(co-stimulatory domain); 및 세포질 신호 전달 도메인(intracellular signaling domain)을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화(coding)하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 카세트를 제공하는데 있다.
- [22] 본 발명의 다른 목적은, 상기 발현 카세트를 포함하는 제조합 발현 벡터를 제공하는데 있다.
- [23] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 제조합 발현 벡터로 형질 도입된, 분리된 효과기 세포를 제공하는데 있다.
- [24] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 B7-H3와 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는, 분리된 효과기 세포를 제공하는데 있다.
- [25] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 효과기 세포 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는데 있다.
- [26] 본 발명의 또 다른 목적은, 이를 필요로 하는 대상에게, 상기 효과기 세포를 투여하는 단계를 포함하는, 암의 치료방법을 제공하는데 있다.
- [27]
- [28] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.
- [29]

과제 해결 수단

- [30] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 B7-H3와 결합하는 항원 결합 도메인(antigen-binding domain); 힌지 영역(hinge region); 막관통 도메인(transmembrane domain); 보조 자극 도메인(co-stimulatory domain); 및 세포질 신호 전달 도메인(intracellular signaling domain)을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화(coding)하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 카세트를 제공한다.
- [31]
- [32] 암세포를 포함하는 항원발현세포 (Antigen presenting cell, APC)의 표면에는 B7-family protein이 발현되어 있고 T cell 표면 단백질과의 상호작용을 통하여 T cell의 작용을 조절한다. B7-H3는 APC에 발현된 B7 family protein 중 하나로 T cell의 작용을 저해하는 immune checkpoint로 알려져 있다(Front Immunol. 2021; 12:

- 701006). B7 family protein은 T cell의 작용을 서로 다른 기전으로 조절하므로 B7-H3를 타겟하는 항체의 B7-H3에 대한 특이성이 매우 중요하다.
- [33] 본 명세서에서 용어 “키메릭 항원 수용체(CAR)”는 항원 결합 도메인(antigen-binding domain), 힌지 영역(hinge region), 막관통 도메인(transmembrane domain), 보조 자극 도메인(co-stimulatory domain) 및 세포질 신호 전달 도메인(intracellular signaling domain)을 포함하는 폴리펩타이드를 지칭한다.
- [34] 제1 세대 CAR는 CD3 ζ 를 세포내 신호전달 도메인으로 포함하는 반면, 제2 세대 CAR는 다양한 단백질에서 유래된 적어도 하나의 보조 자극 도메인을 추가로 포함한다. 제2 세대 CAR에서의 보조 자극 도메인은 예를 들어 CD28, CD2, 4-1BB(CD137) 및 OX-40(CD134)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 제3 세대 CAR은 두 가지 보조 자극 도메인, 예를 들어, CD28, 4-1BB, OX-40, 및 CD2 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [35] 본 명세서에서 용어 "항체"는 당업계의 용어이며 본 명세서에서 상호 교환하여 사용될 수 있고, 항원에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 가진 분자를 말한다. 본 명세서에서 사용된 용어는 전체 항체 및 임의의 항원 결합 단편(즉 "항원-결합 부분") 또는 이들의 단쇄를 포함한다. 하나의 구체예에서, "항체"는 이항 화물 결합에 의해 상호-연결된 적어도 2개의 중쇄(H)와 2개의 경쇄(L)를 포함하는 당단백질, 또는 이의 항원-결합 부분을 말한다. 다른 구체예에서, "항체"는 단일 가변 도메인, 예를 들어 VHH 도메인을 포함하는 단쇄 항체를 말한다. 각 중쇄는 중쇄 가변 영역(VH로 약기)과 중쇄 불변 영역으로 이루어진다. 특정 자연-발생 항체에서, 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인 CH1, CH2 및 CH3으로 이루어진다. 특정 자연-발생 항체에서, 각 경쇄는 경쇄 가변 영역(VL로 약기)과 경쇄 불변 영역으로 이루어진다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인 CL로 이루어진다.
- [36] VH 및 VL 영역은 프레임워크 영역(FR)이라 칭하는, 더 보존되는 영역들이 산재된, 상보성 결정 영역(CDR)이라 칭하는, 초가변성의 영역으로 더 세분될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 3개의 CDR과 4개의 FR로 이루어지며, 이들은 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 및 FR4의 순서로 아미노-말단에서 카복시-말단을 향해 배열된다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 항체의 불변 영역은 면역 시스템의 다양한 세포(예를 들어 이펙터 세포) 및 정통 보체 시스템의 제1 성분(C1q)를 포함하는 숙주 조직 또는 인자들과 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다.
- [37] 항체는 면역글로불린 분자의 임의의 타입(예를 들어 IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 또는 IgY), 임의의 유형(예를 들어 IgD, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 또는 IgA2), 또는 임의의 아형(예를 들어 인간에서 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4; 및 마우스에서 IgG1, IgG2a, IgG2b 및 IgG3)를 가질 수 있다. 면역글로불린, 예를 들어 IgG1은 몇몇 알로타입으로 존재하며, 이들은 최대 몇 개의 아미노산이 서로 상이하다. 본 명세서에 개시된 항체는 통상 알려진 이소타입, 유형, 아형, 또는 알로타입 중 어느 것으로부터 유래할 수 있다. 특정 구체예에서, 본 명세서에 개시된 항체는 IgG1,

IgG2, IgG3, 또는 IgG4 아형 또는 이들의 임의의 하이브리드이다. 특정 구체예에서, 항체는 인간 IgG1 아형 또는 인간 IgG2 또는 인간 IgG4 아형의 것이다.

[38] "항체"는, 예로서, 자연-발생 및 비-자연-발생 항체; 단클론성 및 다클론성 항체; 키메라 및 인간화된 항체; 인간 및 비-인간 항체, 전체 합성 항체; 단쇄 항체; 단일 특이적 항체; 다중특이적 항체(이중특이적 항체를 포함); 2개의 중쇄와 2개의 경쇄 분자를 포함하는 테트라머 항체; 항체 경쇄 모노머; 항체 중쇄 모노머; 항체 경쇄 다이머; 항체 중쇄 다이머; 항체 경쇄-항체 중쇄 쌍; 인트라바디; 헤테로콘주게이트 항체; 1가 항체; 낙타화 항체; 아피바디; 항-이디오타입(항-Id) 항체(예를 들어 항-항-Id 항체를 포함), 및 충분히 항원 결합할 수 있는 단일 모노머 가변 항체 도메인(예를 들어 VH 도메인 또는 VL 도메인)으로 구성된 결합 분자를 포함하는 단일-도메인 항체(sdAb)를 포함한다(Harmen M. M. and Haard H. J. *Appl Microbiol Biotechnol.* 77(1): 13-22 (2007)).

[39] 본 명세서에서 사용된 용어 "항원 결합 도메인(antigen binding domain)"은 항원 타겟을 특이적으로 인식 및 결합할 수 있는 임의의 단백질 또는 폴리펩타이드 도메인을 지칭한다. 상기 도메인은 항원(예를 들어, 인간 Ig-like-V-type 1 또는 Ig-like-V-type 2의 도메인)에 특이적으로 결합하는 능력을 보유한 임의의 단백질 또는 폴리펩타이드일 수 있다. 상기 항원 결합 도메인은 (i) VL, VH, CL, 및 CH1 도메인으로 구성된 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 이황화물 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')₂ 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 구성된 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 팔의 VL 및 VH 도메인으로 구성된 Fv 단편, 및 이황화물-연결된 Fvs(sdFv); (v) VH 도메인으로 구성된 dAb 단편(Ward et al., (1989) *Nature* 341: 544-546); 및 (vi) 분리된 상보성 결정 영역(CDR) 또는 (vii) 합성 링커에 의해 선택적으로 이어질 수 있는 둘 이상의 분리된 CDR의 조합을 포함하나, 이로 제한되는 것은 아니다. 또한, Fv 단편의 두 도메인인 VL과 VH는 별개의 유전자에 의해 코딩되지만, 이들은 합성 링커에 의해, 재조합 방법을 사용하여 이어질 수 있으며, 이로써 VL과 VH 영역이 쌍을 이루어 1가 분자를 형성한 단일 단백질 사슬이 될 수 있다(단쇄 Fv(scFv)라고 한다)(예를 들어 Bird et al., (1988) *Science* 242:423-426; 및 Huston et al., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 참조). 바람직하게는 상기 항원 결합 도메인은 Fab 또는 scFv일 수 있다.

[40] 본 명세서에서 사용된 용어 "가변영역" 또는 "가변도메인"은 당업계에서 통상적으로 상호 교환하여 사용된다. 가변영역은 전형적으로 항체의 일부분, 일반적으로 경쇄 또는 중쇄의 일부분, 전형적으로 성숙한 중쇄에서 약 110 내지 120개 아미노산 및 성숙한 경쇄에서 약 90 내지 115개 아미노산을 말하며, 이들은 항체와 서열이 광범하게 상이하고 이의 특정 항원에 대한 특정 항체의 결합 및 특이성 때문에 사용된다. 서열 변동성은 상보성 결정 영역(CDR)이라고 불리는 영역에 집중되며, 가변 도메인에서 더 고도로 보존된 영역은 프레임워크 영역(FR)이라고 불린다.

- [41] 경쇄 및 중쇄의 CDR은 항원과 항체의 상호작용 및 특이성을 주로 담당한다고 여겨진다. 특정 구체에에서, 가변영역은 인간 가변영역이다. 특정 구체에에서, 가변영역은 설치류 또는 뮤린 CDR과 인간 프레임워크 영역(FR)을 포함한다. 특정 구체에에서, 가변영역은 영장류(예를 들어 비-인간 영장류) 가변영역이다. 특정 구체에에서, 가변영역은 설치류 또는 뮤린 CDR과 영장류(예를 들어 비-인간 영장류) 프레임워크 영역(FR)을 포함한다.
- [42] 본 명세서에서 사용된 용어 "중쇄"는 항체와 관련하여 사용되었을 때, 불변도메인의 아미노산 서열에 기초하여, 임의의 상이한 타입, 예를 들어 알파(α), 델타(δ), 엡실론(ϵ), 감마(γ) 및 뮤(μ)를 말할 수 있으며, 이들은 각각 IgG의 아형, 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함하여, 항체의 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM 유형을 발생시킨다.
- [43] 본 명세서에서 사용된 용어 "경쇄"는 항체와 관련하여 사용되었을 때, 불변도메인의 아미노산 서열에 기초하여 임의의 상이한 타입, 예를 들어 카파(κ) 및 람다(λ)를 말할 수 있다. 경쇄 아미노산 서열은 당업계에 잘 공지되어 있다. 특정한 구체에에서, 경쇄는 인간 경쇄이다.
- [44] 본 명세서에서 용어 "VL" 및 "VL 도메인"은 상호 교환하여 사용되며 항체의 경쇄 가변영역을 말한다.
- [45] 용어 "VH" 및 "VH 도메인"은 상호 교환하여 사용되며 항체의 중쇄 가변영역을 말한다.
- [46] 본 명세서에서 사용된 용어 "항원"은 임의의 천연 또는 합성 면역원성 물질, 예컨대 단백질, 펩타이드 또는 합텐을 말한다. 항원은 B7-H3 또는 이의 단편일 수 있다.
- [47] 본 명세서에서 사용된 "에피토프"는 당업계의 용어로서 항체 또는 항원 결합도메인이 특이적으로 결합할 수 있는 항원의 국소화된 영역을 말한다. 에피토프는, 예를 들어 폴리펩타이드의 연속(contiguous) 아미노산들(선형 또는 연속 에피토프)일 수 있거나, 또는 에피토프는, 예를 들어 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들의 둘 이상의 비-연속 영역들이 합쳐진 것(입체형태적, 비-선형, 불연속, 또는 비-연속 에피토프)일 수 있다. 연속 아미노산으로부터 형성된 에피토프는 항상 그렇지는 않지만 전형적으로 변성 용매에 노출시 보유되고, 3차 접힘에 의해 형성된 에피토프는 전형적으로 변성 용매로 처리시 상실된다. 에피토프는 전형적으로 독특한 공간적 입체형태에서 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 20개 아미노산을 포함한다. 에피토프가 주어진 항체에 의해 결합된 것을 결정하는 방법(즉 에피토프 맵핑)이 당업계에 잘 공지되어 있고, 이것은 예를 들어 면역블롯팅 및 면역침전 분석을 포함하며, 중첩 또는 연속 펩타이드가 주어진 항체(예를 들어 항-B7-H3 항체)와의 반응성에 대해 시험된다. 에피토프의 공간적 입체형태를 결정하는 방법은 당업계의 기술 및 본 명세서에 개시된 것들을 포함하며, 예를 들어 엑스선 결정학, 2-차원 핵자기공명 및 HDX-MS를 포

합한다(예를 들어 Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996) 참조).

- [48] 둘 이상의 항체 또는 항원 결합 도메인과 관련하여 용어 "동일한 에피토프에 결합한다"는 주어진 방법에 의해 결정되었을 때 항체 또는 항원 결합 도메인들이 아미노산 잔기의 동일한 세그먼트에 결합한다는 것을 의미한다. 항체 또는 항원 결합 도메인이 본 명세서에 제시된 항원 결합 도메인과 "B7-H3 상의 동일한 에피토프"에 결합하는지의 여부를 결정하는 기술은, 예를 들어 에피토프 맵핑 방법, 에컨대 에피토프의 원자 분해능을 제공하는 항원:항체 복합체의 결정의 엑스선 분석 및 수소/중수소 교환 질량분광법(HDX-MS)을 포함한다. 다른 방법은 항체와 항원 단편 또는 항원의 돌연변이된 변이체의 결합을 모니터링하며, 여기서 항원 서열 내에서 아미노산 잔기의 변형으로 인한 결합의 손실이 주로 에피토프 성분의 표시로서 간주된다. 이에 더하여, 에피토프 맵핑을 위한 컴퓨터 조합 방법이 또한 사용될 수 있다. 이들 방법은 조합 파지 디스플레이 펩타이드 라이브러리로부터 특정한 짧은 펩타이드를 친화성 분리할 수 있는 관심 항체의 능력에 의존한다. 동일한 VH 및 VL 또는 동일한 CDR1, 2 및 3 서열을 가진 항체는 동일한 에피토프에 결합할 것으로 예상된다.
- [49] "표적과의 결합에 대해 다른 항체와 상호 경쟁(cross-compete)하는" 항원 결합 도메인은 나머지 항체와 표적의 결합을 (부분적으로 또는 완전히) 저해하는 항체를 말한다. 두 항체 또는 항원 결합 도메인이 표적과의 결합에 대해 서로 경쟁하는지의 여부, 즉 하나의 항원 결합 도메인이 나머지 항체와 표적의 결합을 저해하는지의 여부와 저해하는 정도는 공지된 경합 실험을 사용하여 결정될 수 있다. 특정 구체예에서, 항원 결합 도메인은 다른 항체와 표적의 결합에서 경쟁하며 이 결합을 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%까지 저해한다. 저해 또는 경쟁의 수준은 항체가 "차단 항체"(즉 표적과 먼저 인큐베이션된 저온 항체)인지에 따라 상이할 수 있다. 경쟁 분석은, 예를 들어 E.d. Harlow and David Lane, Cold Spring Harb Protoc; 2006; doi:10.1101/pdb.prot4277 또는 E.d. Harlow and David Lane에 의한 "Using Antibodies"(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA 1999)의 제11장에 제시된 대로 수행될 수 있다. 경합 항체는 (예를 들어 입체 장애에 의해) 동일한 에피토프, 중첩 에피토프 또는 인접 에피토프에 결합한다.
- [50] 용어 "기준 항체" 또는 "reference antibody"는 상기 동일한 에피토프, 중첩 에피토프 또는 인접 에피토프에 결합하는 경합 항체의 분석의 기준이 되는 항체를 의미하며, 상기 경합 항체와 에피토프와의 결합에서 상호-경쟁(cross-compete)한다.
- [51] 다른 경합 결합 분석은 고체상 직접 또는 간접 방사성면역분석(RIA), 고체상 직접 또는 간접 효소면역분석(EIA), 샌드위치 경합 분석(Stahli et al., *Methods in Enzymology* 9:242 (1983) 참조); 고체상 직접 바이오틴-아비딘 EIA(Kirkland et al., *J. Immunol.* 137:3614 (1986) 참조); 고체상 직접 표지화 분석, 고체상 직접 표지화 샌드위치 분석(Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring

Harbor Press (1988) 참조); 1-125 표지를 사용한 고체상 직접 표지 RIA(Morel et al., *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988) 참조); 고체상 직접 바이오틴-아비딘 EIA(Cheung et al., *Virology* 176:546 (1990) 참조); 및 직접 표지화 RIA(Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990) 참조)를 포함한다.

- [52] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 항원 결합 도메인은 B7-H3의 도메인인 Ig-like-V-type, Ig-like-V-type 1, 및/또는 Ig-like-V-type 2 도메인의 아미노산 서열 내에 위치한 에피토프에 결합한다.
- [53] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 항원 결합 도메인은 서열번호 36의 Ig-like-V-type 1 서열, 서열번호 38의 Ig-like-V-type 2 서열 및 서열번호 40의 Ig-like-V-type 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 B7-H3 도메인의 아미노산 서열 내에 위치한 에피토프에 결합한다.
- [54] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 항원 결합 도메인은 서열번호 36의 아미노산 잔기 2 내지 6(즉, EVQVP), 서열번호 38의 아미노산 잔기 6 내지 10(즉, EVQVP) 및 서열번호 40의 아미노산 잔기 2 내지 6(즉, EVQVS)에 해당하는 하나 이상의 아미노산에 결합한다.
- [55] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 항원 결합 도메인은 인간 유래의 Ig-like-V-type 1, 및/또는 Ig-like-V-type 2 도메인의 아미노산 서열 내에 위치한 에피토프(예를 들어 EVQVP) 및 마우스 유래의 Ig-like-V-type 도메인의 아미노산 서열 내에 위치한 에피토프(예를 들어 EVQVS)에 모두 결합하여 암세포 사멸 효과를 나타내는 바, 치료용 효과기 세포(예를 들어, CAR-T 또는 CAR-NK)로 개발 시 효율적인 항암효과를 나타낼 것으로 예상된다.
- [56] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 B7-H3와 결합하는 항원 결합 도메인은 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 및 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하며, 여기서 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3은 각각 서열번호 3, 4, 및 5로 구성되고, 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3은 각각 서열번호 6, 7, 및 8로 구성된다.
- [57] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 항원 결합 도메인은 경쇄 가변영역 및 중쇄 가변영역을 포함한다.
- [58] 상기 경쇄 가변영역은 서열번호 9에 제시된 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [59] 상기 경쇄 가변영역은 서열번호 3, 4, 및 5로 구성된 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하면서, 서열번호 9에 제시된 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [60] 상기 중쇄 가변영역은 서열번호 10에 제시된 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

- [61] 상기 중쇄 가변영역은 서열번호 6, 7, 및 8로 구성된 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하면서, 서열번호 10에 제시된 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [62] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 항원 결합 도메인은 서열번호 9로 구성된 경쇄 가변영역을 포함한다.
- [63] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 항원 결합 도메인은 서열번호 10으로 구성된 중쇄 가변영역을 포함한다.
- [64] 또한, 상기 경쇄 가변영역은 서열번호 21에 제시된 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [65] 상기 경쇄 가변영역은 서열번호 3, 4, 및 5로 구성된 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하면서, 서열번호 21에 제시된 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [66] 상기 중쇄 가변영역은 서열번호 22에 제시된 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [67] 상기 중쇄 가변영역은 서열번호 6, 7, 및 8로 구성된 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하면서, 서열번호 22에 제시된 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [68] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 항원 결합 도메인은 서열번호 21로 구성된 경쇄 가변영역을 포함한다.
- [69] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 항원 결합 도메인은 서열번호 22로 구성된 중쇄 가변영역을 포함한다.
- [70] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 항원 결합 도메인은 서열번호 9로 구성된 경쇄 가변영역 및 서열번호 10으로 구성된 중쇄 가변영역을 포함하는 기준 항체와, 상기 에피토프와의 결합에서 상호 경쟁한다.
- [71] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 항원 결합 도메인은 서열번호 21로 구성된 경쇄 가변영역 및 서열번호 22로 구성된 중쇄 가변영역을 포함하는 기준 항체와, 상기 에피토프와의 결합에서 상호 경쟁한다.
- [72] "힌지 영역(hinge region)"은 항원 결합 도메인을 효과기 세포 표면으로부터 떨어져 위치시켜 적합한 세포/세포 접촉, 항원 결합 및 활성화를 가능하게 하는 역할을 하며, CAR는 일반적으로 상기 항원 결합 도메인과 막관통 도메인(transmembrane domain, TM) 사이에 하나 이상의 힌지 영역을 포함한다.

- [73] 상기 힌지 영역은 천연 또는 합성일 수 있다. 상기 힌지 영역은 천연 면역글로블린 힌지 영역 또는 변경된 면역글로블린 힌지 영역의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [74] 본 명세서에 기재된 CAR에 사용하기에 적합한 다른 예시적인 힌지 영역은 막 단백질의 세포외 영역으로부터 유래된 힌지 영역, 예를 들어 CD8 α , CD4, CD28, PD1, CD152 및 CD7을 포함하며, 이들은 상기 분자로부터의 야생형 힌지 영역이거나 변경될 수 있다.
- [75] 본 명세서에서 용어 “막관통 도메인(transmembrane domain, TM)”은 세포막을 가로지르며 세포외 및 세포내 신호전달 도메인을 연결하는 기능을 할 수 있는 것으로 알려진 임의의 올리고펩타이드 또는 폴리펩타이드를 의미한다.
- [76] “막관통 도메인”은 세포외 결합 부분과 세포내 신호전달 도메인을 융합하며 CAR을 면역 효과기 세포의 원형질막에 고정시키는 상기 CAR의 부분이다. 상기 TM 도메인은 천연 또는 합성일 수 있다. 상기 막관통 도메인은 T-세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 쇄, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 또는 CD154로부터 유래될 수 있다(즉 적어도 이들의 막관통 영역(들)을 포함할 수 있다).
- [77] 본 명세서에서 용어 “세포내 신호전달 도메인(intracellular signaling domain)”은 B7-H3 폴리펩타이드에 대한 유효한 항-B7-H3 CAR 결합의 메시지를 면역 효과기 세포의 내부로 전달하여 효과기 세포 기능, 예를 들어 상기 CAR-결합된 표적 세포로의 세포독성 인자의 방출 또는 상기 세포의 CAR 도메인에 대한 항원 결합으로 유도된 다른 세포 반응을 포함한 활성화, 사이토킨 생성, 증식 및 세포독성 활성을 유도하는데 관여하는 상기 CAR의 부분을 지칭한다.
- [78] 본 명세서에서 용어 “효과기 기능”이란 면역 효과기 세포의 전문화된 기능을 지칭한다. 예를 들어 T 세포의 효과기 기능은 사이토킨의 분비를 포함한 세포용해 활성이거나 또는 상기 활성을 도울 수 있다. 따라서, “세포내 신호전달 도메인”이란 용어는 상기 효과기 기능 신호를 전달하고 상기 세포가 전문화된 기능을 수행하도록 지시하는 단백질 부분을 지칭한다. 상기 세포질 신호 전달 도메인은 4-1BB, CD28, OX40, CD3 ζ 의 기능적 신호 전달 도메인, 및 이들의 조합으로부터 선택될 수 있다.
- [79] 본 명세서에서 용어 “보조 자극 도메인(costimulatory domain)”은 세포 내에서 생물학적 과정(process)의 활성화 또는 억제를 일으키는 신호를 전송하는 도메인으로 기능하는 것으로 알려진 임의의 올리고펩타이드 또는 폴리펩타이드를 의미한다. 상기 보조 자극 도메인은 MHC 클래스 I 분자, TNF 수용체 단백질, 이뮤노글로블린-유사 단백질, 시토카인 수용체, 인테그린, 신호전달 림프구성 활성화 분자 (signaling lymphocytic activation molecule, SLAM), 활성화 NK 세포 수용체, BTLA(B an T lymphocyte attenuator), 톨-유사 리간드 수용체(Toll-like ligand receptor), OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS

(CD278), GATR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8알파, CD8베타, IL2R 베타, IL2R 감마, IL7R 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, NKG2C, 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), SLAM (SLAMF, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, 또는 CD83의 보조 자극 도메인일 수 있다.

[80]

[81] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 전술한 발현 카세트를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공한다.

[82]

[83] 본 명세서에서 용어 "발현"은 프로모터에 의해 구동되는 특정 뉴클레오타이드 서열의 전사 및/또는 번역을 포괄하는 용어로 사용된다.

[84]

본 명세서에서 용어 "발현 카세트"는 발현될 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결된 발현 제어 서열을 갖는 재조합 폴리뉴클레오타이드, 또는 상기 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 구조체(컨스트럭트), 전달체 또는 발현 벡터를 지칭한다. 본 명세서에서 "발현 카세트"는 항원 결합 도메인, 힌지 영역, 막관통 도메인, 세포질 신호 전달 도메인, 보조 자극 도메인 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 도메인 및/또는 영역을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화(coding)하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[85]

본 명세서에서 용어 "벡터"는 상기 폴리뉴클레오타이드(핵산) 서열을 복제할 수 있는 세포로의 도입을 위해서 폴리뉴클레오타이드 서열을 삽입할 수 있는 전달체를 의미한다. 폴리뉴클레오타이드 서열은 외생(Exogenous) 또는 이종(Heterologous)일 수 있다. 벡터로서는 플라스미드, 코스미드 벡터 및 바이러스 벡터(레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-부속 바이러스 벡터 등)를 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 당업자는 표준적인 재조합 기술에 의해 벡터를 구축할 수 있다(Maniatis, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988; 및 Ausubel et al., In: *Current Protocols in Molecular Biology*, John, Wiley & Sons, Inc, NY, 1994 등).

[86]

본 명세서에서 용어 "발현 벡터"는 전사되는 유전자 산물 중 적어도 일부분을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한 벡터를 의미한다. 일부의 경우에는 그 후 RNA 분자가 단백질, 폴리펩타이드, 또는 펩타이드로 번역된다. 발현 벡터에는 다양한 조절서열을 포함할 수 있다. 전사 및 번역을 조절하는 조절서열과 함께 벡터 및 발현 벡터에는 또 다른 기능도 제공하는 핵산 서열도 포함될 수 있다.

[87]

- [88] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 전술한 재조합 발현 벡터가 형질 도입된, 효과기 세포를 제공한다.
- [89]
- [90] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 전술한 B7-H3와 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 키메릭 항원 수용체(CAR)를 포함하는, 효과기 세포를 제공한다.
- [91]
- [92] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 B7-H3와 결합하는 항원 결합 도메인은 서열번호 36의 아미노산 잔기 2 내지 6(즉, EVQVP), 서열번호 38의 아미노산 잔기 6 내지 10(즉, EVQVP) 및 서열번호 40의 아미노산 잔기 2 내지 6(즉, EVQVS)에 해당하는 하나 이상의 아미노산에 결합한다.
- [93] 본 명세서에서 용어 "효과기 세포"는 하나 이상의 효과기 기능(예를 들어 세포 독성 세포 살해 활성, 사이토킨의 분비, ADCC 및/또는 CDC의 유도)을 갖는 면역계의 임의의 세포이다. 본 발명의 면역 효과기 세포는 자가조직/자생("자기") 또는 비-자가조직("비-자기", 예를 들어 동종이계, 동계 또는 이종)일 수 있다. 본 명세서에서 "자가조직"은 동일한 피실험자로부터의 세포를 지칭한다. 본 명세서에서 "동종이계"는 비교 세포와 유전학적으로 상이한 동일한 종의 세포를 지칭한다. 본 명세서에서 "동계"는 비교 세포와 유전학적으로 일치하는 상이한 피실험자의 세포를 지칭한다. 본 명세서에서 "이종"은 비교 세포와 상이한 종의 세포를 지칭한다. 상기 효과기 세포는 수지상 세포, 킬러 수지상 세포, 비만세포, 자연살해 세포, B 림프구, T 림프구, 대식세포 또는 이들의 전구세포, 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 T 림프구는 세포독성 T 림프구, 조절 T 림프구, 헬퍼 T 림프구 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [94] "T 세포" 또는 "T 림프구"란 용어는 당해 분야에 인지되어 있으며 흥선세포, 미숙한 T 림프구, 성숙한 T 림프구, 휴지 T 림프구, 또는 활성화된 T 림프구를 포함함을 의미한다. T 세포는 T 헬퍼(Th) 세포, 예를 들어 T 헬퍼 1 (Th1) 또는 T 헬퍼 2 (Th2) 세포일 수 있다. T 세포는 헬퍼 T 세포 (HTL; CD4⁺ T 세포) CD4⁺ T 세포, 세포독성 T 세포 (CTL; CD8⁺ T 세포), CD4⁺CD8⁺ T 세포, CD4⁺CD8⁻ T 세포, 또는 T 세포들의 임의의 다른 부분집합일 수 있다. 특정한 실시 양태에 사용하기에 적합한 T 세포의 다른 예시적인 집단은 나이브 T 세포 및 기억 T 세포를 포함한다.
- [95] 상기 효과기 세포는 상기 벡터에 의해 형질감염(Transfected), 형질도입(Transduced) 또는 형질전환(Transformed) 될 수 있으며, 이는 외생의 폴리뉴클레오타이드(핵산분자)가 세포 내에 전달되거나 도입되는 과정을 포함한다. 본 명세서에서 용어 "형질도입"은 상기 형질감염(Transfected) 및 형질전환(Transformed)을 포함하는 의미로 사용된다.
- [96] 본 발명의 세포는 바람직하게는 분리된 세포이다.

- [97] 본 명세서에서 용어 "분리된" 또는 "분리된 세포"는 자연 상태에서부터 변경, 분리되거나 제거된 세포를 지칭한다. 예를 들어, 살아있는 동물에 자연적으로 존재하는 세포는 "분리된" 것이 아니며, 자연 상태의 공존하는 재료로부터 부분적으로 또는 완전히 분리된 동일한 세포는 "분리된" 것이다. 분리된 세포는 실질적으로 정제된 형태로 존재할 수 있거나, 비-자연 환경에 존재할 수 있다. 따라서, 분리된 세포는 세포가 자연적으로 발생하는 것과는 상이한 환경에 있으며, 예를 들어, 자연에서 발견되지 않는 농도로 농축시키는 것과 같이 이의 자연 환경으로부터 분리된다.
- [98] 효과기 세포(예를 들어, T 세포)는 하나 이상의 방식으로 변형될 수 있다. 효과기 세포(예를 들어, T 세포)는 하나 이상의 유형의 세포 표면 상에 존재하는 항원에 대한 수용체인 적어도 하나의 비-자연 분자를 발현할 수 있다. 일부 실시양태에서, 효과기 세포는 자연에서 발견되지 않는 적어도 하나의 합성 분자를 포함하거나 발현하도록 조작되기 때문에 자연에서 발견되지 않는 효과기 세포(예를 들어, T 세포)를 포함한다. 특정 실시양태에서, 효과기 세포(예를 들어, T 세포)는 B7-H3와 같은 특정 종양 항원을 표적화하는 CAR을 포함하는 적어도 하나의 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 조작된다. 특정 실시양태에서, 효과기 세포는 T 세포, 예를 들어 CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, Treg 세포, Th1 T 세포, Th2 T 세포, Th17 T 세포, 비특이적 T 세포, 또는 전술한 것 중 임의의 것의 조합을 포함하는 T 세포의 집단일 수 있다. 키메라 항원 수용체로 조작된 효과기 세포(예를 들어, T 세포)는 암 치료에 대한 큰 치료 잠재력을 가지고 있다. CAR을 사용하면, 수용체가 항원을 인식하도록 프로그래밍될 수 있으며, 결합되는 경우 효과기 세포를 활성화하여 해당 항원을 발현하는 세포를 사멸시킨다. 따라서, 종양 세포 상에서 발현되는 항원에 대한 CAR(들)을 발현하는 효과기 세포는 종양 세포를 표적화하고 사멸시킬 수 있다. 예를 들어, 혈액학적 암에 대한 CD19-표적 CAR-형질도입 T 세포(CD19-CAR-T 세포)의 최근 임상 시험은 CAR-T 기술의 강력한 효과를 나타내었다. (Kochenderfer, J. N. 등. (2010) *Blood* 116: 4099-4102; Porter, D. L., 등. (2011) *N. Engl. J. Med.* 365: 725-733; Grupp, S. A. 등. (2013) *N. Engl. J. Med.* 368: 1509-1518, Kochenderfer, J. N. 등. (2015) *J. Clin. Oncol.* 33: 540-549, Brown, C. E. 등. (2016) *N. Engl. J. Med.* 375: 2561-2569).
- [99] 본 발명의 세포는 바람직하게는 인-비트로 또는 엑스-비보 세포이다.
- [100]
- [101] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 전술한 효과기 세포의 의약 용도 (for use as a medicament)를 제공한다.
- [102]
- [103] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 전술한 효과기 세포 및 억제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 억제학적 조성물을 제공한다.
- [104]

- [105] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 이를 필요로 하는 대상에게, 전술한 효과기 세포를 투여하는 단계를 포함하는, 암의 치료방법을 제공한다.
- [106]
- [107] 대상의 암(또는 종양)을 치료하는 방법이 본 명세서에 개시되며, 이 방법은 상기 효과기 세포(재조합 발현 벡터가 형질 도입된 효과기 세포 또는 상기 B7-H3와 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 효과기 세포)를 대상에 투여하는 것을 포함한다. 특정 구체예에서, 항-B7-H3 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 B7-H3에 특이적으로 결합하고 T cell 매개 암세포 사멸 효과를 나타낸다.
- [108] 일부 구체예에서, 본 명세서에 개시된 방법은 대상의 암(또는 종양)의 성장을 저해 및/또는 감소시킨다. 특정 구체예에서, 종양 성장(예를 들어 종양 부피 또는 중량)은 기준(예를 들어 본 명세서에 개시된 조성물을 투여 받지 않았던 대상에서의 상응하는 종양 부피 또는 중량)과 비교하여 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 100%까지 감소된다. 일부 구체예에서, 본 명세서에 개시된 방법은 기준(예를 들어 본 명세서에 개시된 조성물을 투여 받지 않았던 대상에서의 상응하는 빈도)과 비교하여 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 100%까지 평균 종양 성장 저해(TGI)를 증가시킨다. 일부 구체예에서, 본 명세서에 개시된 조성물(예를 들어 전술한 효과기 세포)의 투여는 기준(예를 들어 본 명세서에 개시된 조성물, 예를 들어 전술한 효과기 세포를 투여 받지 않았던 대상에서의 상응하는 값)과 비교하여 적어도 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일 또는 그 이상까지 평균 생존을 증가시킨다.
- [109] 일부 구체예에서, 본 명세서에 개시된 방법으로 치료될 수 있는 종양은 전형적으로 기존 항암제에 반응성인 암들 및 전형적으로 기존 항암제에 비반응성인 암들로부터 유래된다. 일부 구체예에서, 암은 고상 종양 또는 혈액 악성물(액상 종양)을 가진 암이다.
- [110] 치료를 요하는 암의 비제한적 예들은 뇌종양, 수모세포종, 연수막전이암, 편평세포암종, 소-세포 폐암(SCLC), 비-소 세포 폐암, 편평 비-소 세포 폐암(NSCLC), 비편평 NSCLC, 위장관암, 신암(예를 들어 투명 세포암종), 난소암, 간암, 담도암, 비인두암, 결직장암, 자궁내막암, 신장암(예를 들어 신장 세포암종(RCC)), 전립선암(예를 들어 호르몬 난치성 전립선 선암종), 갑상선암, 부갑상선암, 췌장암, 자궁경부암, 위암, 방광암, 간세포암, 유방암, 결장암종, 두경부암(또는 암종), 후두암, 생식 세포 종양, 소아암, 비강 자연 살해, 흑색종(예를 들어 전이성 악성 흑색종, 예컨대 피부 또는 안내 악성 흑색종), 뼈암, 피부암, 자궁암, 항문 부위의 암, 고환암, 나팔관의 암종, 자궁내막의 암종, 자궁경부의 암종, 질의 암종, 외음부의 암종, 식도암, 소장암, 대장암, 결장암, 비만세포종, 내분비계의 암, 부갑상선의 암, 부신의 암, 연조직의 육종, 요도의 암, 성기의 암, 소아의 고상 종양, 요

관의 암, 신우의 암종, 중앙 혈관형성, 뇌하수체 선종, 카포시 육종, 상피상 암, 편평 세포 암, T-세포 림프종, 석면에 의해 유발된 것들을 포함하는 환경 유발 암, 바이러스 관련 암 또는 바이러스 기원의 암(예를 들어 인간 유두종 바이러스(HPV-관련 또는 -기원 종양)), 및 두 가지 주요 혈액 세포 계통, 즉 골수성 셀라인(이것은 과립구, 적혈구, 혈소판, 대식세포 및 비만 세포를 생성함) 또는 림프성 셀라인(이것은 B, T, NK 및 혈장 세포를 생성함) 중 어느 하나로부터 유래된 혈액학상의 악성물, 예컨대 모든 종류의 백혈병, 림프종, 및 골수종, 예를 들어 급성, 만성, 림프구성 및/또는 골수성 백혈병, 예컨대 급성 백혈병(ALL), 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 림프구성 백혈병(CLL) 및 만성 골수성 백혈병(CML), 비분화 AML(MO), 골수모구성 백혈병(M1), 골수모구성 백혈병(M2; 세포 성숙화 동반), 전골수성 백혈병(M3 또는 M3 변이형[M3V]), 골수단핵구성 백혈병(M4 또는 호산구증가증 동반 M4 변이형[M4E]), 단핵구성 백혈병(M5), 적백혈병(M6), 거핵아구 백혈병(M7), 분리된 과립구성 육종, 및 녹색종; 림프종, 예컨대 호지킨 림프종(HL), 비-호지킨 림프종(NHL), B 세포 혈액학상의 악성물, 예를 들어 B-세포 림프종, T-세포 림프종, 림프모구세포종 림프종, 단구성 B-세포 림프종, 점막-관련 림프성 조직(MALT) 림프종, 역형성(예를 들어 Ki 1+) 거대-세포 림프종, 성인 T-세포 림프종/백혈병, 맨틀 세포 림프종, 혈관-면역아구성 T-세포 림프종, 혈관중심 림프종, 장 T-세포 림프종, 원발성 종격동 B-세포 림프종, 전구체 T-림프모구성 림프종, T-림프모구성; 및 림프종/백혈병(T-Lbly/T-ALL), 말초 T-세포 림프종, 림프모구성 림프종, 이식 후 림프증식 장애, 진성 조직구성 림프종, 원발성 유출 림프종, B세포 림프종, 림프모구성 림프종(LBL), 림프 계통의 조혈성 종양, 급성 림프모구성 백혈병, 미만성 거대 B-세포 림프종, 버킷 림프종, 소포성 림프종, 미만성 조직구성 림프종(DHL), 면역아구성 거대 세포 림프종, 전구체 B-림프모구성 림프종, 피부 T-세포 림프종(CTLC)(균상식육종 또는 시자리 증후군이라고도 한다), 및 왈덴스트렘 마크로글로블린혈증을 동반한 림프모구세포종 림프종(LPL); 골수종, 예컨대 IgG 골수종, 경쇄 골수종, 비분비성 골수종, 무증상 다발성 골수종(smoldering myeloma)(무통성 골수종이라고도 함), 고립 형질세포종(solitary plasmocytoma), 및 다발성 골수종, 만성 림프구성 백혈병(CLL), 모양 세포 림프종; 골수 계통의 조혈성 종양, 섬유육종 및 횡문근육종을 포함하는 간엽 기원의 종양; 섬유육종, 횡문근육종, 및 골육종을 포함하는 간엽 기원의 정상피종, 기형암종, 종양; 및 흑색종, 색소성건피증, 각질가시세포종, 정상피종, 갑상선 소포성 암 및 기형암종을 포함하는 기타 종양들, 림프 계통의 조혈성 종양, 예를 들어 제한은 아니지만 소 세포 및 대뇌양 세포 타입을 포함하여 T-전림프구성 백혈병(T-PLL)과 같은 T-세포 장애를 포함하는 T-세포 및 T-세포 종양; T-세포 타입의 거대 과립 림프구 백혈병(LGL); a/d T-NHL 간비장 림프종; 말초/흉선 뒤(post-thymic) T 세포 림프종(다형성 및 면역아구성 서브타입); 혈관중심(코) T-세포 림프종; 머리 또는 목의 암, 신암, 직장암, 갑상선의 암; 급성 골수성 림프종, 및 이들의 임의의 조합을 포함한다.

- [111] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 암은 뇌종양, 소아암, 수모세포종, 연수막 전이암, 유방암, 폐암, 췌장암, 대장암, 간암, 전립선암, 난소암, 위암, 식도암, 림프종, 흑색종, 신장암, 섬유육종, 결장암, 결직장암, 자궁내막암, 갑상선암, 부갑상선암, 자궁경부암, 방광암, 두경부암, 뼈암, 피부암, 자궁암, 고환암, 담도암, 기관지암, 비인두암, 후두암 및 요관암으로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상의 암인 것이다.
- [112] 일부 구체예에서, 본 명세서에 개시된 방법은 또한 전이성 암, 절제 불가능한, 난치성 암(예를 들어 기존의 암 요법, 예를 들어 면역요법, 예를 들어 차단 PD-(L)1 항체에 의한 요법에 대해 내성인 암), 및/또는 재발성 암의 치료에 사용될 수 있다. 특정 구체예에서, 본 명세서에 개시된 방법은 재발성 암의 치료에 사용될 수 있다.
- [113] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 약제학적 조성물은 면역치료제, 화학치료제, 표적화 치료제, 또는 방사선치료제를 포함하는 추가의 암 제제와 조합하여 사용될 수 있다.
- [114] 일부 구체예에서, 본 명세서에 개시된 방법은 기존의 암 요법으로서 화학요법을 포함한다.
- [115] 일부 구체예에서, 본 명세서에 개시된 방법은 하는 대상(예를 들어 종양이 침범된)의 생존 지속기간을 효과적으로 증가시킨다. 예를 들어, 대상의 생존 지속기간은 기준 개체(예를 들어 본 명세서에 개시된 조성물, 전술한 효과기 세포로 치료되지 않은 다른 대상)과 비교했을 때 적어도 약 1개월, 적어도 약 2개월, 적어도 약 3개월, 적어도 약 4개월, 적어도 약 5개월, 적어도 약 6개월, 적어도 약 7개월, 적어도 약 8개월, 적어도 약 9개월, 적어도 약 10개월, 적어도 약 11개월, 또는 적어도 약 1년 또는 그 이상까지 증가된다. 또 다른 구체예에서, 본 명세서에 개시된 방법은 대상의 생존 지속기간을, 기준 대상(예를 들어 본 명세서에 개시된 조성물, 예를 들어 전술한 효과기 세포로 치료되지 않은 다른 대상)의 생존 지속기간보다 더 긴 수준으로(약 1개월 더 길게, 약 2개월 더 길게, 약 3개월 더 길게, 약 4개월 더 길게, 약 5개월 더 길게, 약 6개월 더 길게, 약 7개월 더 길게, 약 8개월 더 길게, 약 9개월 더 길게, 약 10개월 더 길게, 약 11개월 더 길게, 또는 약 1년 더 길게) 증가시킨다.
- [116] 일부 구체예에서, 본 발명의 방법은 대상의 질환 진행 없는 생존 지속기간을 증가시킨다. 예를 들어, 대상의 질환 진행 없는 생존 지속기간은 기준 대상(예를 들어 본 명세서에 개시된 조성물, 예를 들어 전술한 효과기 세포로 치료되지 않은 다른 대상)과 비교했을 때 적어도 약 1개월, 적어도 약 2개월, 적어도 약 3개월, 적어도 약 4개월, 적어도 약 5개월, 적어도 약 6개월, 적어도 약 7개월, 적어도 약 8개월, 적어도 약 9개월, 적어도 약 10개월, 적어도 약 11개월, 또는 적어도 약 1년 까지 증가된다.
- [117] 일부 구체예에서, 본 명세서에 개시된 방법은 일군의 대상에서의 반응 속도를 효과적으로 증가시킨다. 예를 들어, 일군의 대상에서의 반응 속도는 기준 대상

(예를 들어 본 명세서에 개시된 조성물, 예를 들어 전술한 효과기 세포로 치료되지 않은 다른 대상)과 비교했을 때 적어도 약 2%, 적어도 약 3%, 적어도 약 4%, 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 99% 또는 적어도 약 100% 까지 증가된다.

- [118] 일부 구체예에서, 본 방법에서 치료될 대상은 비-인간 동물, 예컨대 래트 또는 마우스 등이다. 일부 구체예에서, 본 방법에서 치료될 대상은 인간이다.
- [119] 본 발명은 또한 다른 암 제제와 조합하여 대상의 암을 치료하는 방법을 포함한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 방법에서 유용한 상기 효과기 세포는 조합 요법으로, 즉 적어도 하나의 다른 항암제 및/또는 면역조정제 제제와 조합하여 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 방법에서 유용한 전술한 효과기 세포는 암의 치료에 사용되는 다른 화합물, 약물, 및/또는 제제와 조합하여 투여될 수 있다. 이러한 화합물, 약물, 및/또는 제제는, 예를 들어 화학요법 약물, 소분자 약물, 또는 암에 대한 면역 반응을 자극하는 항체를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 본 명세서에 개시된 방법은 표준 치료(예를 들어 수술, 방사선 및 화학요법)와 조합하여 사용된다. 다른 구체예에서, 본 명세서에 개시된 방법은 유지 요법, 예를 들어 종양의 발생이나 재발을 방지하고자 하는 요법으로서 사용된다.
- [120] 일부 구체예에서, 본 명세서에 개시된 전술한 효과기 세포는 면역치료제, 화학치료제, 표적화 치료제, 방사선치료제(방사선 요법), 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 하나 이상의 추가의 암 제제와 조합하여 사용될 수 있다.
- [121] 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정제(Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA) 중에서 원하는 정도의 순도를 가진, 본 명세서에 개시된 전술한 효과기 세포를 포함하는 조성물이 본 명세서에 개시된다. 허용되는 담체, 부형제 또는 안정제는 이용된 투약량 및 농도에서 수혜자에게 비독성이며, 버퍼, 예컨대 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 보존제(예컨대 염화 옥타데실 디메틸벤질암모늄; 염화헥사메토늄; 염화벤잘코늄; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레졸시놀; 사이클로헥산올; 3-펜타놀; 및 m-크레졸); 저 분자량(약 10개 잔기 미만) 폴리펩타이드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 리신; 단당류, 이당류, 및 글루코오스, 만노오스, 또는 덱스트린을 포함하는 다른 탄수화물들; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 수크로오스, 만니톨, 트레할로오스 또는 소르비톨; 염-형성 반대-이온, 예컨대 나트륨; 금속 복합체(예를 들어 Zn-단백질 복합체); 및/또는 비-이온 계면활성제, 예컨대 TWEEN®, PLURONICS® 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함한다.

- [122] 일부 구체예에서, 약제학적 조성물은 본 명세서에 개시된 전술한 효과기 세포를, 약제학적으로 허용되는 담체 중에 포함한다. 특정 구체예에서, 약제학적 조성물은 본 명세서에 개시된 전술한 효과기 세포의 유효량, 및 선택적으로 하나 이상의 추가의 예방 또는 치료제를, 약제학적으로 허용되는 담체 중에 포함한다. 일부 구체예에서, 전술한 효과기 세포는 약제학적 조성물에 포함된 유일한 활성 성분이다.
- [123] 비경구 제조물에서 사용된 약제학적으로 허용되는 담체는 수성 비히클, 비수성 비히클, 항균제, 등장제, 버퍼, 항산화제, 국소 마취제, 현탁 및 분산제, 유화제, 금속 이온의 봉쇄 또는 킬레이트화제 및 다른 제약학적으로 허용되는 물질을 포함한다. 수성 비히클의 예들은 염화나트륨 주사액, 링거 주사액, 등장 텍스트로오스 주사액, 멸균수 주사액, 텍스트로오스 및 락테이트 링거 주사액을 포함한다. 비수성 비히클은 식물 기원의 고정유, 면실유, 옥수수유, 참깨유 및 땅콩유를 포함한다. 정균 또는 정진균 농도의 항균제가 다수-용량 용기에 패키징된 비경구 제조물에 첨가될 수 있으며, 이들은 페놀 또는 크레졸, 수은함유물질, 벤질 알코올, 클로로부탄올, 메틸 및 프로필 p-하이드록시벤조산 에스테르, 티메로살, 염화벤잘코늄 및 염화벤제토늄을 포함한다. 등장제는 염화나트륨 및 텍스트로오스를 포함한다. 버퍼는 포스페이트 및 시트레이트를 포함한다. 항산화제는 중황산나트륨을 포함한다. 국소 마취제는 프로카인 염산염을 포함한다. 현탁 및 분산제는 나트륨 카복시메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스 및 폴리비닐피롤리돈을 포함한다. 유화제는 폴리소르베이트 80(TWEEN® 80)을 포함한다. 금속 이온의 봉쇄 또는 킬레이트화제는 EDTA를 포함한다. 약제학적으로 허용되는 담체는 또한 수 혼화성 비히클용 에틸 알코올, 폴리에틸렌 글리콜 및 프로필렌 글리콜을 포함하고, pH 조정용 수산화나트륨, 염산, 시트르산 또는 락트산을 포함할 수 있다.
- [124] 약제학적 조성물은 대상에 대한 임의의 투여 경로에 맞게 제제화될 수 있다. 투여 경로의 구체적인 예들은 비내, 경구, 비경구, 척추강내, 뇌실내, 폐, 피하, 또는 심실내 경로를 포함한다. 피하, 근육내 또는 정맥내 주사를 특징으로 하는 비경구 투여가 또한 고려된다. 주사가능물질이 종래의 형태로, 액체 용액 또는 현탁액, 주사 전에 액체 중에서 용액 또는 현탁액으로 되기에 적합한 고체 형태, 또는 에멀전으로서 제조될 수 있다. 주사가능물질, 용액 및 에멀전은 또한 하나 이상의 부형제를 함유한다. 적합한 부형제는, 예를 들어 물, 식염수, 텍스트로오스, 글리세롤 또는 에탄올이다. 이에 더하여, 원한다면, 투여될 약제학적 조성물은 또한 소량의 비-독성 보조 물질, 예컨대 습윤 또는 유화제, pH 완충제, 안정제, 용해성 증진제, 및 다른 제제들, 예컨대 나트륨 아세테이트, 소르비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민 올레에이트 및 사이클로덱스트린을 함유할 수 있다.
- [125] 전술한 효과기 세포의 비경구 투여용 제조물은 바로 주사가능한 멸균 용액, 피하주사용 정제를 포함하는 사용 직전에 용매와 바로 조합될 수 있는 멸균 건조 가용성 제품, 예컨대 동결건조된 분말, 바로 주사가능한 멸균 현탁액, 사용 직전

에 비히클과 바로 조합될 수 있는 멸균 건조 불용성 제품 및 멸균 에멀전을 포함한다. 용액은 수성 또는 비수성일 수 있다.

[126] 생체내 투여에 사용되는 조성물은 멸균될 수 있다. 예를 들어, 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 멸균될 수 있다.

[127]

발명의 효과

[128] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[129] (i) 본 발명은 B7-H3와 결합하는 항원 결합 도메인, 힌지 영역, 막관통 도메인, 보조 자극 도메인 및 세포질 신호 전달 도메인을 포함하는 키메릭 항원 수용체 (CAR)를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 카세트를 제공한다.

[130] (ii) 또한, 본 발명은 상기 발현 카세트를 포함하는 재조합 발현 벡터로 형질 도입된 효과기 세포를 제공한다.

[131] (iii) B7-H3는 수모세포종, 연수막전이암 그리고 삼중음성 유방암을 비롯한 다양한 암종에서 높게 발현되는 바, 본 발명의 항원 결합 도메인을 포함하는 키메릭 항원 수용체를 T 림프구 등 효과기 세포에 발현시키는 경우 B7-H3와 관련된 암 질환의 면역 치료방법으로서 유용하게 이용될 수 있다.

[132]

도면의 간단한 설명

[133] 도 1은 항체 라이브러리를 이용한 바이오패닝 (Biopanning)의 개요도다.

[134] 도 2a는 완전항체로 제작한 2D IgG의 recombinant human 4Ig B7-H3, recombinant human 2Ig B7-H3 및 recombinant mouse B7-H3에 대한 결합력을 indirect ELISA로 확인한 도면이다.

[135] 도 2b는 2D IgG의 Raji 및 BT-20 세포주에 대한 결합력을 FACS 방법으로 확인한 도면이다.

[136] 도 3a는 인간화 항체인 G2D IgG의 recombinant human 4Ig B7-H3, recombinant human 2Ig B7-H3 및 recombinant mouse B7-H3에 대한 결합력을 indirect ELISA로 확인한 도면이고, 도 3b는 인간화 항체인 G2D IgG의 recombinant human 4Ig B7-H3, recombinant human 2Ig B7-H3 및 recombinant mouse B7-H3에 대한 결합력을 SPR 방법으로 확인한 도면이다.

[137] 도 4는 암세포를 포함하는 antigen presenting cell (APC)에 발현된 B7 family protein과 T cell의 상호작용을 보여주는 도면이다.

[138] 도 5는 G2D IgG의 B7 family protein 중 B7-H3에 대한 특이성을 indirect ELISA로 확인한 도면이다.

[139] 도 6은 B7-H3 발현 Raji 세포주에 대한 G2D IgG의 결합력을 FACS 방법으로 확인한 도면이다. 도 6a는 human 4Ig, 2Ig B7-H3 발현 Raji 세포주에 대한 결합력을 확인한 도면이고, 도 6b는 mouse B7-H3 발현 Raji 세포주에 대한 결합력을 확인한 도면이다.

- [140] 도 7은 G2D IgG의 epitope을 확인한 도면이다. 도 7a는 G2D IgG의 epitope 유형을 확인하기 위하여 recombinant 4Ig B7-H3 단백질에 대한 G2D IgG의 결합을 western blot으로 확인한 도면이고, 도 7b는 G2D IgG가 결합하는 human 4Ig B7-H3 peptide를 확인한 도면이다. 도 7c는 G2D IgG의 epitope으로 예상되는 EVQVP가 포함된 human 4Ig B7-H3 peptide에 대한 G2D IgG의 결합을 확인한 도면이며, 도 7d는 human 4Ig B7-H3 전체 아미노산에서 G2D IgG의 epitope을 표시한 도면이다. 도 7e는 human 4Ig B7-H3 단백질 구조에서 G2D IgG의 epitope을 표시한 도면이다.
- [141] 도 8은 대장암 세포주에 대한 G2D 항체 결합 분석 결과를 나타낸 도면이다.
- [142] 도 9는 간암 세포주에 대한 G2D 항체 결합 분석 결과를 나타낸 도면이다.
- [143] 도 10은 뇌종양 세포주에 대한 G2D 항체 결합 분석 결과를 나타낸 도면이다.
- [144] 도 11은 췌장암 세포주에 대한 G2D 항체 결합 분석 결과를 나타낸 도면이다.
- [145] 도 12는 전립선암 세포주에 대한 G2D 항체 결합 분석 결과를 나타낸 도면이다.
- [146] 도 13은 폐암 세포주에 대한 G2D 항체 결합 분석 결과를 나타낸 도면이다.
- [147] 도 14는 난소암 세포주에 대한 G2D 항체 결합 분석 결과를 나타낸 도면이다.
- [148] 도 15는 유방암 세포주에 대한 G2D 항체 결합 분석 결과를 나타낸 도면이다.
- [149] 도 16은 삼중음성 유방암 세포주에서 B7-H3 발현 분석 결과를 나타낸 도면이다.
- [150] 도 17은 삼중음성 유방암 세포 하나당 B7-H3 발현 분자수를 나타낸 도면이다.
- [151] 도 18은 Mouse 암세포주에 대한 G2D 항체 결합력 분석 결과를 나타낸 도면이다.
- [152] 도 19는 소아뇌암(수모세포종) 세포주에 대한 G2D 항체 결합 분석 결과를 나타낸 도면이다.
- [153] 도 20은 B7-H3 (CD276)에 특이적으로 결합하는 2세대 키메라 항원 수용체, anti-B7-H3 (G2D) CAR를 갖는 벡터의 구축에 대한 개열지도를 나타낸 도면이다.
- [154] 도 21은 Anti-B7-H3 (G2D) 유전자 발현 CAR-T 세포의 G2D scFv 발현률을 체크한 도면이다.
- [155] 도 22는 B7-H3을 발현하는 삼중음성 유방암 세포주 (MDA-MB-231)에 대한 anti-B7-H3 (G2D) CAR 유전자 발현 T 세포의 세포사멸 능력 (LDH) 측정된 결과를 나타낸 도면이다.
- [156] 도 23은 B7-H3을 발현하는 삼중음성 유방암 세포주 MDA-MB-231 그리고 BT-20에 대한 anti-B7-H3 (G2D) CAR 유전자 발현 T 세포의 사이토카인 (IFN-gamma) 생성을 체크한 도면이다.
- [157] 도 24는 B7-H3을 발현하는 삼중음성 유방암 세포주 (MDA-MB-231), 난소암 세포주 (A2780) 그리고 뇌종양 세포주 (U87)에 대한 anti-B7-H3 (G2D) CAR 유전자 발현 T 세포 활성을 확인한 도면이다.

- [158] 도 25는 B7-H3을 발현하는 삼중음성 유방암 세포주 (MDA-MB-231), 난소암 세포주 (A2780) 그리고 뇌종양 세포주 (U87)에 대한 anti-B7-H3 (G2D) CAR 유전자 발현 T 세포의 표적세포 사멸 현상 (Crystal violet)을 확인한 도면이다.
- [159] 도 26은 뇌종양 동물모델에서의 anti-B7-H3 (G2D) CAR 유전자 발현 T 세포의 효력을 확인한 도면이다.
- [160] 도 27은 비소세포폐암 동물모델에서의 anti-B7-H3 (G2D) CAR 유전자 발현 T 세포의 효력을 확인한 도면이다.
- [161] 도 28은 연수막전이암 동물모델에서의 anti-B7-H3 (G2D) CAR 유전자 발현 T 세포의 효력을 확인한 도면이다.
- [162] 도 29는 B7-H3을 발현하는 수모세포종 세포주 (Daoy 그리고 D283)에 대한 anti-B7-H3 (G2D) CAR 유전자 발현 T 세포의 세포사멸 능력 (LDH) 측정
- [163] 도 30은 수모세포종 동물모델에서의 anti-B7-H3 (G2D) CAR 유전자 발현 T 세포의 효력을 확인한 도면이다.
- [164] 도 31은 Human 2Ig 그리고 4Ig B7-H3 구조 및 mouse 2Ig B7-H3 구조를 발현하는 Raji 세포에 대한 anti-B7-H3 (G2D) CAR 유전자 발현 T 세포의 사이토카인 (IFN- γ) 분비 결과를 나타낸 도면이다.

[165]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [166] 이하, 실시 예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[167]

[168] 실시예

[169] 실시예 1: B7-H3 양성 클론 스크리닝 (B7-H3 positive clone screening)

[170] 1-1. B7-H3에 결합하는 클론 선별

- [171] 도 1과 같이 phage display 기술을 이용하여 B7-H3 양성 클론을 선별하였다. 먼저, 마그네틱 비드 (ThermoFisher Scientific, 미국)에 recombinant human 4Ig B7-H3 (Sino Biological, 중국) 2.5 μ g을 접합시켰다. B7-H3가 발현하지 않는다고 알려진 Raji cell pellet과 반응시켜 Raji cell에 결합하는 파아지를 미리 제거하고 3% 우혈청 알부민 (Millipore, 미국) 용액에 분산시킨 비면역 닭 파아지 라이브러리 (chicken naive phage library)와 마그네틱 비드에 접합된 4Ig B7-H3를 상온에서 2 시간 동안 반응하게 하여 B7-H3에 친화력을 가진 파아지를 결합시킨 후, 이를 0.5% Tween 20 (Amresco, 미국)이 포함된 완충용액으로 세척하고, 산성 용액을 이용하여 용출하였다. 용출된 파아지는 다음 라운드 바이오패닝을 위해 대장균 ER2738에 감염시켜 밤새 배양하여 증식시켰다. 이러한 과정을 4차례 반복하며 바이오패닝을 진행하였다. 1차에서 1회, 2~3차에서 3회, 4차에서 5회 세척하여

바이오패닝 횃수가 증가할수록 세척 횃수가 증가하여 결합력이 높은 파아지를 축적하였다.

[172] 4차 바이오패닝 결과물의 플레이트로부터 선별된 96개의 클론을 96 딥웰 (deep well) 플레이트에서 100 µg/ml 카베니실린, 70 µg/ml 카나마이신 및 VCSM13 헬퍼 파아지를 넣고 37°C에서 밤새 배양하여 scFv 클론이 발현된 파아지의 증식을 유도하였다. 상기에서 수득한 배양액을 원심분리를 통해 파아지를 포함한 배지 상등액을 얻어 recombinant human 4Ig B7-H3, recombinant human 2Ig B7-H3 (R&D Systems, 미국) 및 recombinant mouse B7-H3 (Sino Biological, 중국)가 각각 코팅되어 있는 ELISA 플레이트에 넣고 37°C에서 2시간 동안 반응하였으며, HRP가 접합되어 있는 항-M13 항체 (Sino Biological, 중국)를 이차항체로 이용하여 각각의 B7-H3에 결합하는 클론을 phage ELISA로 확인하고 강한 신호를 나타내는 2D 클론을 선별하였다.

[173]

[174] **1-2. 선별한 항체의 염기서열 분석**

[175] 선별한 B7-H3에 양성 signal을 나타내는 2D 클론을 가지고 있는 ER2738을 SB 배지를 이용하여 밤새 배양한 후 원심분리하여 균체를 얻었다. DNA mini prep kit (Geneall, 한국)를 이용하여 plasmid DNA를 확보하고 표 1의 프라이머를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 분석한 2D 클론은 표 2의 CDR 서열을 가진다. 2D 클론의 경쇄 및 중쇄 가변영역 아미노산 서열을 표 3에 나타냈다.

[176]

[177] [표1]

선별한 클론의 염기서열 분석에 사용된 프라이머

scFv 시퀀싱 프라이머		
1	ACA CTT TAT GCT TCC GGC	정방향 (서열번호 1)
2	CAA AAT CAC CGG AAC CAG AG	역방향 (서열번호 2)

[178]

[표2]

선별한 2D 클론의 CDR 아미노산 서열

경쇄 가변영역 CDR		
LCDR1	LCDR2	LCDR3
SGGSIGYG(서열번호 3)	YNDRRPS (서열번호 4)	GSADSSSTYTGI (서열번호 5)
중쇄 가변영역 CDR		
HCDR1	HCDR2	HCDR3
SYPMV(서열번호 6)	SINSGGSWTGYGAAVK G	AYGAATIDA (서열번호 8)

(서열번호 7)

[179]

[표3]

선별한 클론의 경쇄 및 중쇄 가변영역의 아미노산 서열

	아미노산	서열번호
경쇄 가변영역	ALTQPSSVSANLGGTVKITCSGGSIGYGWYQQKAPG SAPVTVIYYNDRRPSDIPSRFSGSKSGSANTLTITGVQ ADDEAIYYCGSADSSSTYTGFAGTTLTVL	9
중쇄 가변영역	AVTLDESGGGLQTPGGGLSLVCKASGFDFSSYPMV WVRQAPGKGLYVASINSGGSWTGYGAAVKGRATI SRDNGQSTVRLQLNNLRAEDTATYYCARAYGAATI DAWGHGTEVIVSS	10

[180]

[181]

실시예 2: 선별한 클론의 완전항체 전환 및 발현/정제

[182]

2-1. 선별한 클론의 완전항체 전환

[183]

상기 실시예 1에 따라 선별한 클론인 2D는 scFv 형태이므로 PCR을 통해 완전항체 (full-length IgG)로 전환하였다. 먼저 scFv를 포함하는 pComb3x로부터 중쇄 및 경쇄의 가변영역과 불변영역의 절편을 하기 표 4의 V_L, C_K 및 V_H, C_H 프라이머 조합을 이용해서 PCR을 통하여 수득하였다. 수득한 항체의 가변영역과 불변영역을 이용하여 하기 표 4의 LC 및 HC 프라이머 조합을 사용하여 PCR을 수행하여 각각의 항체의 중쇄와 경쇄를 확보하였다. 중쇄는 *EcoRI*과 *NotI* (New England Biolab, 영국) 효소를 처리하였고 마찬가지로 동일한 제한효소로 처리된 동물세포 발현용 벡터인 pCMV (ThermoFisher Scientific, 미국)에 라이게이션 하였다. 또한 경쇄는 *XbaI* (New England Biolab, 영국) 효소를 사용하여 처리하였으며 마찬가지로 동일한 제한효소로 처리된 pCMV 벡터에 라이게이션 하였다. 라이게이션이 완료된 플라스미드는 DH5α competent cell (New England Biolab, 영국)에 열충격을 가하여 형질전환하였고, 확보한 콜로니를 대량 배양하여 플라스미드를 확보하였다.

[184]

[185]

[표4]

선별한 클론의 완전항체 클로닝에 사용한 프라이머

	프라이머	서열	서열번호
V _L	정방향	GGT CTT TGT ATA CAT GTT GCT GTG GTT GTC T GG TGT TGA AGG AGC CCT GAC TCA GCC GT	11

	역방향	GGC CAC GGT CCG TAG GAC GGT CAG GGT	12
C _k	정방향	CGG ACC GTG GCC GCC CCC TC	13
	역방향	TAG TTC TAG AAC TAG CAC TCG CCC CG	14
LC	정방향	GGG AAT TCT AGA GGA TCG AAC CCT TTG CAA GCT TCG GCA CGA GCA GAC CAG CAT GGG CA T CAA GAT GGA GAC ACA TTC TCA GGT CTT TG T ATA CAT GTT G	15
	역방향	TAG TTC TAG AAC TAG CAC TCG CCC CG	14
V _H	정방향	CTT CCT GTC AGT AAC TAC AGG TGT CCA CTC C GC CGT GAC GTT GGA C	16
	역방향	CCC TTG GTG GAG GCG GAG GAG ACG ATG AC	17
C _H	정방향	GCC TCC ACC AAG GGC CC	18
	역방향	GTG AGC GGC CGC TCA CTT GCC GGG GGA	19
HC	정방향	CAG AAT TCA CTC TAA CCA TGG AAT GGA GCT G GG TCT TTC TCT TCT TCC TGT CAG TAA CTA CAG	20
	역방향	GTG AGC GGC CGC TCA CTT GCC GGG GGA	19

[186]

[187]

[188]

2-2. 발현/정제

완전항체로 전환시킨 중쇄와 경쇄 각각의 플라스미드를 폴리에틸렌이민 (polyethylenimine, PEI) (Polysciences, 미국)과 150 mM NaCl을 이용하여 Expi293F 세포 (Invitrogen, 미국)에 형질도입하고 Freestyle 293 발현배지 (Invitrogen, 미국)에서 37°C, 8% CO₂ 및 55% 습도 조건으로 Erlenmeyer 플라스크에서 7일간 부유 배양 하였다. 발현 세포 배양액을 4,000 rpm로 10분 간 원심분리한 후, 상등액을 취해 0.22 µm 필터로 여과하였다. 여과된 상등액은 4°C에서 HiTrap Mabelect Prisma, 1 mL (GE Healthcare, 미국) 컬럼에 결합을 유도하였다. 결합된 레진은 10 cv (column volume)의 20 mM Sodium phosphate (pH 7.0)과 1 M 염화나트륨 용액으로 세척 후, 100 mM Sodium citrate (pH 3.0)과 150 mM 염화나트륨 용액을 사용하여 결합된 항체를 용출한 후, 1 M Tris-HCL (pH 9.0)으로 중화하였다. Slide-A-Lyzer Dialysis 카세트 (ThermoFisher Scientific, 미국)를 이용하여 pH 7.2 ~ 7.4 PBS로 완충액 교환을 진행 후 SDS-PAGE를 통해 정제된 항체의 경쇄와 중쇄의 크기 및 순도를 최종적으로 확인하였으며, 그 결과 이론적 계산치와 일치하는 분자량과 고순도의 항체가 생산되었음을 확인할 수 있었다.

[189]

[190]

[191]

실시예 3: 항원 결합력 분석

3-1. 재조합 항원 단백질에 대한 결합력 분석

[192] 상기 실시예 2에서 제작한 2D IgG의 재조합 B7-H3 단백질에 대한 결합력을 indirect ELISA로 확인하였다. Indirect ELISA는 50 μ l의 PBS에 1 μ g/ml로 recombinant human 4Ig B7-H3, recombinant human 2Ig B7-H3 및 recombinant mouse B7-H3를 각각 희석하여 96웰 면역 플레이트 (Corning, 미국)에 넣고 4°C에서 보관하여 밤새 흡착시켰다. 3% 우혈청 알부민이 포함된 완충용액으로 상온에서 1시간 반응시킨 후, 0.5% Tween 20이 포함된 완충용액으로 3회 세척하고, 순차적 농도(0.0001, 0.0003, 0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 nM)로 희석한 각각의 항체를 웰 당 50 μ l씩 처리하였다. 항원에 항체가 결합할 수 있도록 상온에서 2시간 반응시킨 후, 0.5% Tween 20이 포함된 완충용액으로 3회 세척하였다. 항인간 면역글로블린 Fc-HRP 항체 (Jackson ImmunoResearch, 미국)를 1:3,000으로 희석하여 웰당 50 μ l씩 처리한 후, 상온에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 0.5% Tween 20이 포함된 완충용액으로 3회 세척한 후, 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 (TMB) (ThermoFisher Scientific, 미국) 50 μ l씩 넣고 10분간 발색 시켰다. 분광광도계 (Biotek, 미국)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정 한 결과, 2D IgG는 B7-H3에 결합하는 결과를 나타냈고 결합력은 4Ig B7-H3, 2Ig B7-H3, mouse B7-H3 순이었다 (도 2a).

[193]

[194] **3-2. B7-H3 발현 세포주에 대한 결합력 분석**

[195] Raji 세포주는 B7-H3가 발현하지 않는 B7-H3-음성 세포주로 알려져 있으며 (Mol Ther Oncolytics. 2020;17:180-189), BT-20 세포주를 포함하는 다양한 유방암 세포에 B7-H3가 과발현 되어 있다고 알려져 있다 (Mol Cancer Ther. 2011;10(6):960-71).

[196] B7-H3 음성 세포주인 Raji 세포주와 B7-H3 양성 세포주인 BT-20세포주를 사용하여 2D IgG의 결합력을 FACS로 분석하였다. 5×10^5 개의 BT-20 및 Raji 세포를 2D IgG 1 μ g이 포함되거나 포함되지 않은 PBS로 현탁하고 30분간 4°C에서 반응 후에 원심분리를 통해 상층액을 제거하였다. 상층액 제거 후 각각의 세포를 PBS를 이용하여 2회 세척하였다. 세척이 완료된 세포를 원심분리후 FITC-conjugated Alexa Fluor goat anti-Human IgG (H+L) 항체 (Invitrogen, 미국)을 넣고 4°C조건에서 3분간 반응 후 원심분리를 통해 상층액을 제거하였다. 상층액 제거 후 각각의 세포를 PBS를 이용하여 2회 세척 후 유세포분석을 진행하고, 그 결과를 도 2b에 나타냈다. 2D IgG는 B7-H3 음성 세포주인 Raji에 결합하지 않았고, B7-H3 양성 세포주인 BT-20에 강하게 결합하였다 (도 2b).

[197]

[198] **실시예 4: 2D의 인간화 항체 (humanized antibody)인 G2D 제작**

[199] **4-1. 2D의 인간화**

[200] 2D IgG는 chicken/human chimeric antibody이므로 humanized antibody를 확보하기 위하여 다음과 같은 방법으로 인간화를 수행하였다.

[201] 2D의 인간화를 위해, 2D의 경쇄 가변영역 내 3개의 FR(LFR1, LFR2, LFR3)을 IGLV3-25*02의 FR로 치환하였고 중쇄 가변영역 내 3개의 FR(HFR1, HFR2, HFR3)을 IGHV3-64*04의 FR로 치환하였다. 그 후, 아미노산의 물리화학적 성질의 유사성 또는 비유사성을 고려하여 특정한 아미노산을 모항체 (2D)의 아미노산으로 다시 치환하였다. 모항체 (2D)로 다시 치환된 아미노산은 경쇄 가변영역에서 L46T, S66K, V71N이고, 중쇄 가변영역에서 T28D, F67A이다. 항체 도메인의 아미노산 잔기 번호는 당업계에서 통상적으로 사용되는 카바트 EU 넘버링 시스템(Kabat EU numbering system, Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, 1991)에서와 같은 EU 지수번호에 따름)에 따라 넘버링하였다. 경쇄 가변영역의 J gene은 US2010-0056386을 참고하여 FGGGTKLTVL로 고정하였고, 중쇄 가변영역의 J gene은 US2014-0206849를 참고하여 WGQGTTVTVSS로 고정하였다. 인간화 2D를 G2D로 명명하였고, 그 염기서열을 표 5에 표시하였다.

[202]

[203] [표5]

G2D의 경쇄 및 중쇄 가변영역 아미노산 서열

경쇄 가변영역		
G2D (VL)	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGGSIGYGWYQQKAPGQ APVTVIYYNDRRPSGIPERFSGSKSGTTNLTISGVQAED EADYYCGSADSSSTYTGFGGGTKLTVL	서열번호 21
중쇄 가변영역		
G2D (VH)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFDSSYPMVWVR QAPGKGGLEYVSSINSGGSWTGYGAAVKGRATISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTATYYCARAYGAATIDAWGQGTT VTVSS	서열번호 22

[204] 상기 표에서 밑줄친 부분은 CDR 영역이고, 볼드체는 모항체 (2D)로 다시 치환된 아미노산을 나타낸다.

[205]

[206] **4-2. G2D의 완전 항체 전환 및 발현/정제**

[207] 상기에 기술한 G2D 가변영역의 DNA를 scFv 형태로 합성하고 (Cosmogenetech, 한국), 하기 표 6의 프라이머 조합을 사용하여 PCR을 통해 완전 항체로 전환하였다. 완전항체 전환 및 발현/정제는 전술한 실시예 2와 동일한 방법으로 수행하였다.

[208]

[209] [표6]

G2D 완전항체 클로닝에 사용한 프라이머

	프라이머	서열	서열번호
V _L	정방향	TCT CAG GTC TTT GTA TAC ATG TTG CTG TGG T TG TCT GGT GTT GAA GGA TCC TAC GAG TTG A CG CAG	23
	역방향	GGG CGG CCA CGG TCC GGA GAA CTG TCA GTT TCG TTC C	24
C _K	정방향	CGG ACC GTG GCC GCC CCC TC	25
	역방향	TAG TTC TAG AAC TAG CAC TCG CCC CG	26
LC	정방향	GGG AAT TCT AGA GGA TCG AAC CCT TTG CAA GCT TCG GCA CGA GCA GAC CAG CAT GGG CA T CAA GAT GGA GAC ACA TTC TCA GGT CTT TG T ATA CAT GTT G	27
	역방향	TAG TTC TAG AAC TAG CAC TCG CCC CG	26
V _H	정방향	CTT CCT GTC AGT AAC TAC AGG TGT CCA CTC C CA GGT CCA GCT GGT TGA AAG	28
	역방향	GGC CCT TGG TGG AGG CGC TAG ACA CTG TCA CGG TTG	29
C _H	정방향	GCC TCC ACC AAG GGC CC	30
	역방향	GTG AGC GGC CGC TCA CTT GCC GGG GGA	31
HC	정방향	CAG AAT TCA CTC TAA CCA TGG AAT GGA GCT G GG TCT TTC TCT TCT TCC TGT CAG TAA CTA CAG	32
	역방향	GTG AGC GGC CGC TCA CTT GCC GGG GGA	31

[210]

[211] 실시예 5: G2D IgG의 항원 결합력 및 특이성 분석

[212] 5-1. Indirect ELISA를 이용한 재조합 항원 단백질에 대한 결합력 분석

[213] 상기 실시예 4에서 제작한 G2D IgG의 재조합 B7-H3 단백질에 대한 결합력을 indirect ELISA로 확인하였다. Indirect ELISA는 전술한 실시예 3-1과 동일한 방법으로 수행하였다.

[214] Indirect ELISA 결과 G2D IgG는 2D IgG와 마찬가지로 B7-H3에 결합하였고 결합력은 4Ig B7-H3, 2Ig B7-H3, mouse B7-H3 순이었다 (도 3).

[215]

[216] **5-2. Surface Plasmon Resonance Measurement System (SPR)**을 이용한 재조합 항원 단백질에 대한 결합력 분석

[217] 광학적 원리를 이용하여 항원-항체 결합력 및 kinetics 측정이 가능한 SPR 분석을 통하여 G2D IgG의 B7-H3에 대한 결합력을 확인하였다. SPR 분석은 결합 속도 (K_a)와 해리 속도 (K_d)의 확인이 가능하고 이를 통하여 K_D 값을 구할 수 있으므로 정량적인 결합력 분석이 가능하다.

[218] SPR 분석은 Biacore T200 (Cytiva, 미국) 장비를 사용하여 수행하였다. CM5 chip (Cytiva, 미국)에 Anti-human Fc antibody (Jackson ImmunoResearch, 미국)를 7658~7908 RU로 고정하고 그 위에 G2D IgG를 400~460 RU로 캡처하였다. 4Ig B7-H3는 0.3125~10 nM, 2Ig B7-H3는 25~800 nM, mouse B7-H3는 15.625~500 nM로 주입하였다. 각각의 B7-H3에 대한 association/dissociation time을 4분/7분으로 설정하고 분석을 수행하였다. 분석 결과 4Ig B7-H3에 대하여 10^9 M 수준의 결합력을 보였고 2Ig B7-H3에 대하여 10^7 M 수준, mouse B7-H3에 대하여 10^6 M 수준의 결합력을 보였다 (도 3b, 표 7). Indirect ELISA와 유사한 결과를 확인하였고, G2D IgG가 recombinant 4Ig, 2Ig 및 mouse B7-H3에 모두 결합할 수 있음을 확인하였다.

[219]

[220] [표7]

SPR 분석을 통하여 확인한 G2D IgG의 B7-H3에 대한 결합력

Analyte	Ligand	K_a (1/Ms)	K_d (1/s)	K_D (M)
4Ig B7-H3	G2D IgG	2.357×10^6	1.465×10^{-2}	6.216×10^{-9}
2Ig B7-H3		2.494×10^4	2.875×10^{-3}	1.153×10^{-7}
Mouse B7-H3		5.270×10^5	5.961×10^{-1}	1.131×10^{-6}

[221]

[222] **5-3. 재조합 B7-family protein**에 대한 특이성 분석

[223] 암세포를 포함하는 항원발현세포 (Antigen presenting cell, APC)의 표면에는 B7-family protein이 발현되어 있고 T cell 표면 단백질과의 상호작용을 통하여 T cell의 작용을 조절한다 (도 4). B7-H3는 APC에 발현된 B7 family protein 중 하나로 T cell receptor는 아직 규명되지 않았지만 T cell의 작용을 저해하는 immune checkpoint로 알려져 있다 (Front Immunol. 2021; 12: 701006). B7 family protein은 T cell의 작용을 서로 다른 기전으로 조절하므로 B7-H3를 타겟하는 항체의 B7-H3에 대한 특이성이 매우 중요하다. 그러므로 G2D IgG의 B7-family protein에 대한 특이성을 indirect ELISA로 분석하였다.

[224] Indirect ELISA는 B7-DC (Sino Biological, 중국), B7-1 (Sino Biological, 중국), B7-2 (Sino Biological, 중국), B7-H2 (Sino Biological, 중국), B7-H4 (Sino Biological,

중국), B7-H1 (Sino Biological, 중국), 4Ig B7-H3, 2Ig B7-H3를 1 µg/ml로 코팅한 96 웰 면역 플레이트를 사용하여 실시예 3-1과 동일한 방법으로 수행하였다.

[225] Indirect ELISA 결과 G2D IgG는 B7 family protein 중 4Ig, 2Ig B7-H3에만 결합하였다 (도 5). 이러한 결과는 G2D IgG의 B7-H3에 대한 우수한 특이성을 보여준다.

[226]

[227] **5-4. 세포 표면에 발현된 B7-H3에 대한 결합력 분석**

[228] 재조합 단백질과 세포 표면 단백질은 서열이 동일하지만 구조적인 차이가 있을 수 있으므로 세포 표면 단백질에 대한 항체의 결합 확인은 필수적이다. 세포 표면에 발현하는 B7-H3에 대한 결합 여부를 확인하기 위하여 B7-H3 음성 세포주인 Raji 세포주에 4Ig, 2Ig 및 mouse B7-H3 세포 외 도메인을 포함하는 구조를 도입하였다. 녹색 형광 단백질 (Green fluorescent protein, GFP) 삽입을 통하여 세포 표면에 발현되는 2Ig, 4Ig 및 mouse B7-H3를 확인하였다. 세포 표면에 발현된 B7-H3에 대한 G2D IgG의 결합을 실시예 3-2와 동일한 방법으로 확인하였다. 이차항체는 goat anti-Human IgG (H+L) 594 항체 (Invitrogen, 미국)을 사용하였다. 세포주에 대한 결합은 정량적인 확인이 어려우므로 대조 항체로 현재 임상단계에 진입하였으며 대한민국 특허로 등록된 (등록번호: 10-1828570) enoblituzumab을 사용하였다.

[229] G2D IgG는 B7-H3가 발현하지 않은 Raji-Vector control에 결합하지 않고 4Ig, 2Ig B7-H3를 발현시킨 Raji-4Ig B7-H3, Raji-2Ig B7-H3에 결합하였다 (도 6a). 세포 표면에 발현된 4Ig 및 2Ig B7-H3에 대한 G2D IgG의 결합력은 대조항체인 enoblituzumab 보다 높았다. Human B7-H3와 유사하게 G2D IgG는 Raji-Vector control에는 결합하지 않고 mouse B7-H3를 발현시킨 Raji-mouse B7-H3에는 결합하였다 (도 6b). 대조항체인 enoblituzumab은 mouse B7-H3에는 결합하지 않았다. 치료용 항체는 체내에 주입되어 세포에 발현된 항원에 특이적으로 결합하여 치료효과를 나타내므로 세포에 발현된 항원에 대한 결합력이 우수할수록 좋은 치료효과를 기대할 수 있다. 도 6a 및 b를 통하여 G2D IgG의 세포 표면 B7-H3에 대한 특이적이고 우수한 결합을 확인할 수 있다.

[230]

[231] **5-5. G2D IgG의 epitope 확인**

[232] Epitope은 항원 결정 부위로써 항체가 인식하고 결합할 수 있는 항원의 특정한 서열을 의미한다. Epitope에 따라 항체의 치료효과가 상이할 수 있고 면역항암제의 경우 면역세포 활성화 정도 역시 상이할 수 있으므로 항체의 epitope 확인은 의약품 개발에서 중요한 부분이다.

[233] Western blot을 통하여 G2D가 4Ig B7-H3를 인식하는 것을 확인하여 (도 7a), G2D IgG가 linear epitope을 가짐을 알 수 있었다. 따라서 linear epitope mapping을 진행하였다. Linear epitope mapping을 앵클론(주)에 의뢰하였고 독일의 Pepperprint GmbH에서 수행하였다. 4Ig B7-H3 아미노산을 15개씩 14개가 겹치도록 합성하여 peptide microarray를 제작하고 항체를 반응시키고 이차항체로 peptide에 결

합하는 항체를 확인하였다 (도 7b). 그 결과 G2D IgG는 EVQVP 서열을 가지는 peptide에 결합하였다 (도 7c). EVQVP는 4Ig B7-H3의 Ig-like V-type1 및 Ig-like V-type2 domain에 위치한다 (도 7d 및 e). 같은 방법으로 대조항체인 enoblituzumab의 epitope을 확인하였을 때 이들의 epitope은 GYPEAE 서열이 포함된 부분으로 확인되었고 (도 7b), GYPEAE는 4Ig B7-H3의 Ig-like C2-type1 및 Ig-like C2-type2에 위치한다 (도 7d 및 e). 결과적으로 G2D IgG가 대조항체인 enoblituzumab과 상이한 epitope을 가짐을 확인하였다.

[234]

[235] B7-H3의 서열 및 이의 도메인 서열과 G2D 항체가 결합하는 에피토프 서열은 다음과 같다(표 8).

[236]

[237] B7-H3 서열

[238] Human 4Ig B7-H3 (서열번호 33)

[239] MLRRRGSPGMGVHVGAAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGTDATL

CCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSA
 YANRTALFPDLLAQGNASLRLQVRVADEGSFTCFVSIRD
 FGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSY
 QGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSIL
 RVVLGANGTYSCLVARNPVLQQDAHSSVTITPQRSPTGAV
EVQVPEDPVVALVGTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQ
 LTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLR
 LQVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMT
 LEPNKDLRPGDVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGVPLTG
 NVTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVARNPVLQ
 QDAHGSVTITGQPMTFPEALWVTVGLSVCLIALLVALAF
 CWRKIKQSCEEENAGAEDQDGEGEGSKTALQPLKHSDSKEDDGQEIA

[240]

[241] Human 2Ig B7-H3 (서열번호 34)

[242] MLRRRGSPGMGVHVGAAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGTDATL

CCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSA
 YANRTALFPDLLAQGNASLRLQVRVADEGSFTCFVSIRD
 FGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSY
 RGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSVL
 RVVLGANGTYSCLVARNPVLQQDAHGSVTITGQPMTFPEA
 LWVTVGLSVCLIALLVALAFVCWRKIKQSCEEENAGAEDQ
 DGEGEGSKTALQPLKHSDSKEDDGQEIA

[243]

[244] Mouse B7-H3 (서열번호 35)

[245] MLRGWGGPSVGVCVRTALGVLCLCLTGAVEEVQVSEDPVVALVDTDATL
 RCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGS
 YSNRTALFPDLLVQGNASRLRQRVVRTDEGSYTCFVSIQD
 FDSAAVSQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGNMVTITCSSYQ
 GYPEAEVFWKDGQGVPLTGNVTTSQMANERGLFDVHSVLR
 VVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPLTFPPEAL
 WVTVGLSVCLVLLVALAFVCWRKIKQSCEEENAGAEDQD
 GDGEGSKTALRPLKPSENKEDDGQEIA

[246]

[247] [표8]

B7-H3 도메인 서열 및 에피토프의 위치

	도메인	서열	서열번호
Human 4I g B7-H3	Ig-like-V -type 1	<u>LEVQV</u> PEDPV VALVGTDATL CCSFSPEPGF SL AQLNLIWQ LTDTKQLVHS FAEGDQGS YAN RTALFPD LLAQGNASLR LQRVVADEG SFTCF VSIRD FGSAAVSLQV A	36
	Ig-like-C 2-type 1	PSMTLEPNKD LRPDGTVTIT CSSYQGYPEA EV FWQDGQGV PLTGNVTTSQ MANEQGLFDV HSI LRVVLGA NGTYSCLVRN PVLQQDAHSS VTIT	37
	Ig-like-V -type 2	PTGAVE <u>EVQV</u> PEDPVVALVGT DATLRCSFSP EP GFSLAQLN LIWQLTDTKQ LVHSFTEGRD QGS YANRTA LFPDLLAQN ASRLRQRVVADEGS FTCFV SIRDFGSAAV SLQVA	38
	Ig-like-C 2-type 2	PSMTLEPNKD LRPDGTVTIT CSSYRGYPEA EV FWQDGQGV PLTGNVTTSQ MANEQGLFDV HS VLRVVLGA NGTYSCLVRN PVLQQDAHGS VTI T	39
Human 2I g B7-H3	Ig-like-V -type 1	<u>LEVQV</u> PEDPV VALVGTDATL CCSFSPEPGF SL AQLNLIWQ LTDTKQLVHS FAEGDQGS YAN RTALFPD LLAQGNASLR LQRVVADEG SFTCF VSIRD FGSAAVSLQV A	36
	Ig-like-C 2-type 1	PSMTLEPNKD LRPDGTVTIT CSSYRGYPEA EV FWQDGQGV PLTGNVTTSQ MANEQGLFDV HS VLRVVLGA NGTYSCLVRN PVLQQDAHGS VTI T	39

Mouse B7-H3	Ig-like V-type	VEVQVSEDPV VALVDTDATL RCSFSPEPGF SL AQLNLIWQ LTDTKQLVHS FTEGRDQGS A YSN RTALFPD LLVQGNASLR LQRVRVTDEG SYTCF VSIQD FDSAASLQV A	40
	Ig-like C2-type	PSMTLEPNKD LRPGNMVTIT CSSYQGYPEA EV FWKDGQGV PLTGNTTTSQ MANERGLFDV HS VLRVVLGA NGTYSCLVRN PVLQQDAHGS VTI T	41

[248] 상기 서열에서 밑줄 볼드체 부분은 G2D 항체가 결합하는 B7-H3의 에피토프를 나타낸다.

[249]

[250] 실시예 6: 암 세포주에 대한 G2D 항체 결합 분석

[251] 6-1. 실험 방법

[252] B7-H3에 특이적으로 결합하는 G2D 항체에 대한 암 세포주와의 결합력을 확인하기 위해서 대장암, 간암, 뇌종양, 췌장암, 전립선암, 폐암, 난소암, 그리고 유방암의 세포주를 사용하였다. 대장암 세포주로는 HCT 116 (Cat No. CCL-247, ATCC)과 HT-29 (Cat No. HTB-38, ATCC) 두 종의 세포주, 간암 세포주로는 HepG2 (Cat No. 88065, KCLB) 세포주, 뇌종양 세포주로는 A172 (Cat No. 21620, KCLB), U251 (Cat No. HTB-17, ATCC) 그리고 U87 (Cat No. HTB-14, ATCC) 세 종의 세포주, 췌장암 세포주로는 MIA-PaCa2 (Cat No. CRL-1420, ATCC)와 PanC-1 (Cat No. 21469, KCLB) 두 종의 세포주, 전립선암으로는 PC-3 (Cat No. 21435, KCLB) 세포주, 폐암 세포주로는 A549 (Cat No. CCL-185, ATCC)와 NCI-H1975 (Cat No. CRL-5908, ATCC) 두 종의 세포주, 난소암으로는 A2780 (Cat No. 93112519, Sigma) 세포주 그리고 유방암 세포주로는 MDA-MB-453 (Cat No. 30131, KCLB), MDA-MB-231 (Cat No. 30026, KCLB) 그리고 SK-BR-3 (Cat No. 30030, KCLB) 세포주를 이용하여 유세포 분석을 진행하였다.

[253] 각각의 세포를 5×10^5 cells의 세포와 $1 \mu\text{g}$ 의 G2D 항체를 30분간 4°C 에서 반응 후에 원심분리를 통해 상층액을 제거하였다. 상층액 제거 후 각각의 세포를 PBS를 이용하여 2회 세척하였다. 세척이 완료된 세포를 원심분리후 FITC-conjugated Alexa Fluor goat anti-Human IgG (H+L) 항체 (Cat No. A11013, Invitrogen)을 넣고 4°C 조건에서 30분간 반응 후 원심분리를 통해 상층액을 제거하였다. 상층액 제거 후 각각의 세포를 PBS를 이용하여 2회 세척 후 유세포분석을 진행하였다.

[254] 유세포 분석 결과에 대한 비교군으로 commercial B7-H3 (APC-conjugated anti-human B7-H3 (CD276) (Cat No. 351006, BioLegend)을 이용하여 각각의 세포주에 대한 B7-H3 (CD276)의 발현을 확인 및 비교하였다. 또한, G2D 항체의 대조군으로는 FITC-conjugated Alexa Fluor goat anti-Human IgG (H+L) 항체 시료만 처리한 군 (Secondary)을 포함시켰으며, anti-human B7-H3 (CD276) 항체의 대조군으로

Mouse IgG1 kappa Isotype Control APC (Cat No. 17-4714-42, Invitrogen) 시료만 처리한 (Isotype)을 포함시켰다.

[255]

[256] **6-2. 실험 결과**

[257] 대장암 세포주 HCT 116과 HT-29 두 종의 세포주에 대한 G2D와 commercial B7-H3 항체에 대한 결합력은 두 항체에 대한 두 종의 세포주 모두 95% 이상의 결합력을 확인하였다 (도 8).

[258] 간암 세포주 HepG2 세포주에 대한 G2D와 commercial B7-H3 항체에 대한 결합력은 HepG2 세포주에 대해서 두 항체 모두 95% 이상의 결합력을 확인하였다 (도 9).

[259] 뇌종양 세포주 A172, U251 그리고 U87 세 종의 세포주에 대한 G2D와 commercial B7-H3 항체에 대한 결합력은 두 항체에 대한 세 종의 세포주 모두 95% 이상의 결합력을 확인하였다 (도 10).

[260] 췌장암 세포주 MIA-PaCa2와 PanC-1 두 종의 세포주에 대한 G2D와 commercial B7-H3 항체에 대한 결합력은 두 항체에 대한 두 종의 세포주 모두 95% 이상의 결합력을 확인하였다 (도 11).

[261] 전립선암 세포주 PC-3에 대한 G2D와 commercial B7-H3 항체에 대한 결합력은 두 항체에 대하여 95% 이상의 결합력을 확인하였다 (도 12).

[262] 폐암 세포주 A549와 NCI-H1975 두 종의 세포주에 대한 G2D와 commercial B7-H3 항체에 대한 결합력은 A549 세포주에 대해서 두 항체 모두 95% 이상의 결합력을 보여주었으며, NCI-H1975 세포주에 대해서 G2D 항체는 80% 이상의 결합력을 보여주었으며, commercial B7-H3 항체의 경우 95% 이상의 결합력을 확인하였다 (도 13).

[263] 난소암 세포주 A2780에 대한 G2D와 commercial B7-H3 항체에 대한 결합력은 두 항체에 대하여 95% 이상의 결합력을 확인하였다 (도 14).

[264] 유방암 세포주 MDA-MB-453, MDA-MB-231 그리고 SK-BR-3 세포주에 대한 G2D와 commercial B7-H3 항체에 대한 결합력은 MDA-MB-231 세포주에 대해서 두 항체 모두 95% 이상의 결합력을 보여주었으며, SK-BR-3 세포주에 대해서 G2D 항체는 35% 이상의 결합력을 보여주었으며, commercial B7-H3 항체의 경우 70% 이상의 결합력을 확인하였다. 반면, MDA-MB-453 세포주에 대해서 두 항체 모두 5% 이하의 결합력을 확인하였다 (도 15).

[265] 상기 결과로부터, 본 발명의 G2D 항체와 commercial B7-H3 항체는 다양한 암 세포주에 대한 B7-H3 단백질과의 결합양상이 유사함을 확인할 수 있었다. 결과적으로, commercial B7-H3 항체와 결합력이 유사한 G2D 항체를 이용하여 B7-H3가 고발현되는 암을 표적 할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[266]

[267] 실시예 7: 삼중음성 유방암 세포주에서 B7-H3 발현 분석

[268] **7-1. 실험 방법**

- [269] 삼중음성 유방암세포주에서의 B7-H3의 발현을 분석하기 위해서 총 8종의 삼중음성 유방암세포주 MDA-MB-453, MDA-MB-231, HCC-70 (Cat No. 9S0070, KCLB), Hs 578T (Cat No. 30126, KCLB), HCC-1143 (Cat No. 9S1143, KCLB), BT-20 (Cat No. 60061, KCLB), HCC-1937 (Cat No. 9S1937, KCLB) 그리고 HCC-38 (Cat No. 9S0038, KLCB)를 사용하였다. 구체적으로는 각각의 삼중음성 유방암세포를 5×10^5 cells의 세포와 1 μ g의 PE-conjugated anti-human B7-H3 단일클론 항체 (Cat No. 331606, Biolegend)를 30분간 4°C에서 반응후에 원심분리를 통해 상층액을 제거하였다. 상층액 제거 후 각각의 세포를 PBS를 이용하여 2회 세척하였다. 상층액 제거 후 각각의 세포를 PBS를 이용하여 2회 세척 후 유세포분석을 통해서 삼중음성 유방암세포주에서 B7-H3 (CD276) 발현률을 분석하였다. 대조군으로 isotype control (Cat No. 400111, Biolegend) 시료를 포함시켰다.
- [270]
- [271] **7-2. 실험 결과**
- [272] 8종의 삼중음성 유방암세포주의 B7-H3을 분석해 본 결과, MDA-MB-453을 제외하고는 나머지 7종의 삼중음성 유방암세포주에서는 90% 이상의 B7-H3을 발현하고 있음을 확인하였다(도 16).
- [273]
- [274] **실시예 8: 삼중음성 유방암 세포 하나당 B7-H3 발현 분자수**
- [275] **8-1. 실험 방법**
- [276] B7-H3을 발현하는 삼중음성 유방암세포주에 대하여 세포 하나에 B7-H3 발현 분자수를 확인하기 위해서 QuantiBRITE PE (Cat No. 340495, BD Biosciences) 유세포분석 방법을 사용하였다. 구체적으로는 QuantiBRITE 비드의 새로운 튜브를 0.5 mL의 염색 완충액을 이용하여 제공된 튜브 내에서 재구성하였다. 샘플을 FACSCanto \pm 유세포분석기 (BD Biosciences) 상에서 습득하였다. 각 분석과 함께 보상 제어를 작동시켜 적절한 기기 설정을 선택하고 각 샘플에 대하여 적어도 10,000개의 이벤트를 수집하였다. 습득 제어 및 분석을 위해 BD FACSDiva™ (BD Biosciences)를 사용하였다.
- [277] QuantiBRITE 분석은 공지된 수의 PE 분자와 접합된 4개의 비드 집단을 갖는 비드 표준을 활용한다. 데이터 분석을 위해, G1 게이트를 FSC-H/SSC-H 분산 그래프 상의 비드 단일항 (singlet) 주위로 끌어당겼다. 이후, 이 게이트된 비드 집단을 FL2-H의 히스토그램 그래프를 이용하여 분석하여 PE 염색 수준을 평가하였다. 개별적인 마커를 4개의 비드 집단 (M1-4)의 피크 주위로 끌어당기고 각 비드 집단의 FL2에 대한 기하 평균을 결정하였다. 각비드의 FL2 기하 평균을 로그-로그 (log-log) 그래프 내의롯트 (lot) 특이적 PE/비드 값에 대해 도시하였다. 선형회귀를 수행하여 하기 방정식을 이용한 표준곡선을 얻었다:
- [278] $y = mx + c$, "m"은 기울기이고, "c"는 y-절편임.

[279] 삼중음성 유방암세포주 샘플 분석을 위해, G1 게이트를 SSC-H/FL4-H 점 그래프 상의 목적하는 양성 형광 세포 집단 주위로 끌어당겼다. 이후, 이 게이트된 세포 집단을 FL2-H의 히스토그램 그래프를 이용하여 분석하여 PE-표지된 항체 염색 수준을 평가하였다. PE-conjugated anti-human B7-H3 단일클론 항체로 염색된 각 혈액 세포 샘플뿐만 아니라 염색되지 않은 대조군 샘플에 대하여 FL2 기하 평균을 결정하였다. FL2에 대한 모든 기하 평균값을 비드 표준 곡선에 대해 도시하고 세포당 PE에 대한 값을 외삽하였다. 두 항체-PE 접합체가 대략 1:1의 PE:Ab 비율이므로, 세포당 PE에 대한 값은 세포당 결합된 항체의 수 값에 해당한다. 각 삼중음성 유방암세포주당 동일한 실험을 수행하였다.

[280]

[281] **8-2. 실험 결과**

[282] B7-H3를 발현하는 7종의 삼중음성 유방암세포주 중에서 HCC-38, HCC-1937, BT-20, HCC-1143, Hs 578T, MDA-MB-231 그리고 HCC-70 순으로 세포 하나에 B7-H3 발현 분자수가 높게 분석되었다 (도 17).

[283]

[284] **실시예 9: Mouse 암세포주에 대한 G2D 항체 결합력 분석**

[285] **9-1. 실험 방법**

[286] Human 2Ig 그리고 4Ig B7-H3 뿐만 아니라 mouse 2Ig B7-H3에 특이적으로 결합하는 G2D 항체에 대한 마우스 세포주와의 결합력을 확인하기 위해서 마우스 폐암, 췌장암, 그리고 유방암의 세포주를 사용하였다.

[287] 폐암 세포주로는 3LL (Cat No. CRL-1642, ATCC), 췌장암 세포주로는 Panc-02 (Cat No. SC078-luc, GeneTarget) 그리고 유방암 세포주로는 4T1 (Cat No. CRL-2539, ATCC)를 이용하여 유세포 분석을 진행하였다.

[288] 각각의 세포를 5×10^5 cells의 세포와 1 μ g의 G2D 항체를 30분간 4°C에서 반응 후에 원심분리를 통해 상층액을 제거하였다. 상층액 제거 후 각각의 세포를 PBS를 이용하여 2회 세척하였다. 세척이 완료된 세포를 원심분리후 goat anti-Human IgG (H+L) 594 항체 (Cat No. A11014, Invitrogen)을 넣고 4°C조건에서 30분간 반응 후 원심분리를 통해 상층액을 제거하였다. 상층액 제거 후 각각의 세포를 PBS를 이용하여 2회 세척 후 유세포분석을 진행하였다.

[289] 유세포 분석 결과에 대한 비교군으로 Alexa Fluor 647 Rat Anti-Mouse B7-H3 (CD276) (Cat No. 562862, BD Biosciences)을 이용하여 각각의 마우스 세포주에 대한 B7-H3 (CD276)의 발현을 확인 및 비교하였다. 또한, G2D 항체의 대조군으로는 goat anti-Human IgG (H+L) 594 항체 시료만 처리한 군 (Secondary)을 포함시켰으며, Anti-Mouse B7-H3 (CD276) 항체의 대조군으로 Alexa Fluor 647 Rat IgG2A, k Isotype Control (Cat No. 557690, BD Biosciences) 시료만 처리한 (Isotype)을 포함시켰다.

[290]

[291] **9-2. 실험 결과**

[292] 폐암 세포주 3LL에 대해서 G2D 항체는 90% 이상의 결합력을 보여주었으며, commercial B7-H3 항체의 경우 95% 이상의 결합력을 확인하였다. 유방암 세포주 4T1에 대해서 G2D 항체는 50% 이상의 결합력을 보여주었으며, commercial mouse B7-H3 항체의 경우 90% 이상의 결합력을 보여주었다. 다른 마우스 암세포주인 췌장암 세포주 Panc-02에 대해서 G2D 항체는 85% 이상의 결합력을 보여주었으며, commercial mouse B7-H3 항체의 경우 90% 이상의 결합력을 보여주었다 (도 18).

[293]

[294] 실시예 10: 소아뇌암, 수모세포종 세포주에 대한 G2D 항체 결합 분석

[295] 10-1. 실험 방법

[296] B7-H3에 특이적으로 결합하는 G2D 항체에 대한 소아뇌암종 수모세포종 세포주와의 결합력을 확인하기 위해서 수모세포종 세포주 Daoy (Cat No. HTB-186, ATCC)를 이용하여 유세포분석을 진행하였다.

[297] Daoy 세포를 5×10^5 cells의 세포와 1 μ g의 G2D 항체를 30분간 4°C에서 반응후에 원심분리를 통해 상층액을 제거하였다. 상층액 제거 후 각각의 세포를 PBS를 이용하여 2회 세척하였다. 세척이 완료된 세포를 원심분리후 goat anti-Human IgG (H+L) 594 항체 (Cat No. A11014, Invitrogen)을 넣고 4°C조건에서 30분간 반응 후 원심분리를 통해 상층액을 제거하였다. 상층액 제거 후 각각의 세포를 PBS를 이용하여 2회 세척 후 유세포분석을 진행하였다.

[298]

[299] 10-2. 실험 결과

[300] 그 결과는 도 19에 나타내었다. 수모세포종 Daoy 세포주에 대한 B7-H3 발현 G2D 항체에 대한 결합력은 90% 이상의 결합력을 확인하였다. 본 발명으로부터 B7-H3 (G2D) CAR-T가 소아뇌암인 수모세포종을 표적할수 있음을 확인하였다.

[301]

[302] 실시예 11: B7-H3 (CD276)에 특이적으로 결합하는 2세대 키메라 항원 수용체, anti-B7-H3 (G2D) CAR를 갖는 벡터의 구축

[303] B7-H3 (CD276)에 특이적으로 결합하는 G2D 항체 단편 (Single-chain variable fragment, scFv; 서열번호 42 및 43)을 이용하여 CAR-콘스트럭트를 제작하기 위하여 CD8 α 힌지 (hinge) 영역(서열번호 44 및 45), CD8 막횡단 도메인 (Transmembrane, TM; 서열번호 46 및 47)을 사용하였으며 T 세포 활성화를 위한 세포질 신호전달 도메인으로 CD137(서열번호 48 및 49) 및 CD3 ζ (서열번호 50 및 51)를 사용하였다. CD137은 tumor necrosis factor superfamily member 9 활성 신호전달 도메인 (coactivation signaling domain)을, CD3 ζ 는 CD3 제타 살해 (killing) 신호 도메인을 나타낸다(도 20).

[304]

[305] 실시예 12: Anti-B7-H3 (G2D) 유전자 발현 CAR-T 세포의 G2D scFv 발현률 체크

[306] **12-1. 실험 방법**

[307] 말초 혈액 단핵 세포는 건강한 공여자로부터 얻은 전혈 (whole blood)을 Ficoll-Paque premium (GE healthcare, 17-5442-03)를 이용하여 단핵구층 (buffy coat)의 단핵 세포만을 획득하였다. 분리된 PBMC를 1×10^6 세포에 Human IL2 (NOVARTIS) 500IU/mL 조건으로 있는 상태에서 항-CD3 단일클론 항체 (OKT3, eBioscience, Cat No. 16-0037-81) 100 ng/mL와 항-CD28 단일클론 항체 (eBioscience, Cat No. 16-0289-85) 100 ng/mL을 첨가하여 OpTmizer™ CTS™ T-Cell Expansion Supplement (Gibco, A10484-02), CTS™ Immune Cell SR (Gibco, A25961-01) 그리고 GlutaMAX™-I CTS™ (100X) (Gibco, A12860-01) 가 함유된 CTS™ T-Cell Expansion Basal Medium (Gibco, A10221-01)에 배양함으로써 T 세포 분화를 활성화시켰다. 활성화된 T 세포에 anti-B7-H3 (G2D) CAR 바이러스를 이용하여 형질도입을 진행하였다.

[308] Anti-B7-H3 (G2D) CAR 발현 T 세포는 75 T 플라스크에서 Human IL2를 500IU/mL이 포함된 T 세포 배양배지를 이용하여 증식하였다. 이러한 방식으로 증식된 anti-B7-H3 (G2D) CAR을 발현하는 T 세포는 다양한 분석 실험에 사용되었다.

[309] T 세포 배양 배지(OpTmizer CTS 배지 (Cat No. A10221-01, Gibco))에 배양 중 (배양일, 10일) anti-B7-H3 (G2D) CAR 발현 T 세포 (1×10^6) 를 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고, 2% bovine serum albumin을 함유한 PBS을 이용하여 anti-B7-H3 (G2D) CAR 발현 T 세포를 2회 세척하였다. 세척이 완료된 세포를 원심분리후 APC-conjugated anti-Human F(ab)2 항체 (Cat No. 109-136-097, Jackson ImmunoResearch)을 넣고 4°C조건에서 30분간 반응 후 원심분리를 통해 상층액을 제거하였다. 상층액 제거 후 각각의 세포를 PBS를 이용하여 2회 세척 후 유세포분석을 진행하였다. 유세포 분석 결과에 대한 대조군으로 CAR 바이러스에 형질도입 되지 않은 (Untransduced T 세포, UTD) 시료를 포함시켰다.

[310]

[311] **12-2. 실험 결과**

[312] Anti-B7-H3 (G2D) CAR 발현 T 세포에서 anti-B7-H3 (G2D) CAR 발현을 확인하기 위해서 실험방법에 따라 유세포 분석을 진행하였다. CAR 바이러스에 형질도입 되지 않은 T 세포의 B7-H3 (G2D) 발현은 0.0 % 이며, anti-B7-H3 (G2D) CAR 유전자가 전달된 T 세포의 경우 42.9 % 발현률을 나타내었다 (도 21). 결과적으로, anti-B7-H3 (G2D) 구조가 정상적으로 T 세포의 표면에 발현됨을 확인할 수 있었다.

[313]

[314] 실험예 1. B7-H3을 발현하는 삼중음성 유방암 세포주 (MDA-MB-231)에 대한 anti-B7-H3 (G2D) CAR 유전자 발현 T 세포의 세포사멸 능력 (LDH) 측정

[315] **1-1. 실험방법**

[316] B7-H3을 발현하는 삼중음성 유방암 세포주 (MDA-MB-231)에 대한 anti-B7-H3 (G2D) CAR-T 세포의 세포 용해 활성을 측정하기 위해서 CytoTox96 Non-radio cytotoxicity assay LDH (Cat No. G1781, Promega) 키트를 사용하여 세포 사멸 분석 (Cytotoxicity assay)을 진행하였다. 구체적으로는 anti-B7-H3 (G2D) CAR-T 세포 (Effector 세포)는 10일 배양 후에 사용하였으며 96 웰 플레이트에 (Effector:Target, E:T ratio)의 비율 (5:1, 2.5:1, 1.25:1 그리고 0.625:1)로 세포를 넣고 37°C에서 18시간 동안 반응시켰다. 본 시험의 대조군으로 CAR 바이러스에 형질 도입 되지 않은 (Untransduced T 세포, UTD) 시료를 포함시켰다.

[317]

[318] **1-2. 실험 결과**

[319] Anti-B7-H3 (G2D) CAR-T 세포는 E:T ratio (0.625:1, 1.25:1, 2.5:1 및 5:1)에 따라 삼중음성 유방암 세포주 MDA-MB-231에 대해 18%, 30%, 48% 그리고 61%의 세포사멸 능력을 보였다. 대조군으로 CAR 바이러스에 형질도입 되지 않은 UTD 세포는 E:T ratio (0.625:1, 1.25:1, 2.5:1 및 5:1)에 따라 3%, 5%, 8% 그리고 19%의 LDH 값을 나타내었다 (도 22). 결과적으로 anti-B7-H3 (G2D) CAR-T 세포의 경우 삼중음성유방암 세포주에 대하여 사멸능력이 있음을 확인하였다.

[320]

[321] **실험예 2. B7-H3을 발현하는 삼중음성 유방암 세포주 MDA-MB-231 그리고 BT-20에 대한 anti-B7-H3 (G2D) CAR 유전자 발현 T 세포의 사이토카인 (IFN-gamma) 생성 체크**

[322] **2-1. 실험 방법**

[323] B7-H3을 발현하는 삼중음성 유방암세포주 (MDA-MB-231 그리고 BT-20)에 대한 anti-B7-H3 (G2D) CAR-T 세포의 활성을 확인하기 위해서, 96웰 플레이트에 삼중음성 유방암세포주 MDA-MB-231 또는 BT-20 세포를 4×10^5 넣고, anti-B7-H3 (G2D) CAR-T 세포를 1×10^5 넣고 37°C₂ incubator에서 18 시간 배양하였다. 대조군으로 CAR 바이러스에 형질도입 되지 않은 세포 시료를 포함시켰다. 삼중음성 유방암세포주 MDA-MB-231 그리고 BT-20 세포주에 대한 anti-B7-H3 (G2D) CAR-T 세포의 IFN-gamma의 양을 분석하기 위해서 human IFN-gamma immunoassay kit (Cat No. DIF50C, R&D)을 이용하여 진행하였다. 본 시험의 대조군으로 CAR 바이러스에 형질도입 되지 않은 (Untransduced T 세포, UTD) 시료를 포함시켰다.

[324]

[325] **2-2. 실험 결과**

[326] 삼중음성 유방암세포주 MDA-MB-231 그리고 BT-20에 대한 anti-B7-H3 (G2D) CAR-T 세포의 IFN-gamma 분비 결과는 도 23에 나타내었다. 구체적으로, 삼중음성 유방 세포주 MDA-MB-231와 BT-20와의 공배양에 따른 IFN-gamma의 양은

anti-B7-H3 (G2D) CAR-T의 경우 CAR 바이러스에 형질 도입되지 않은 시료에 비해 높은 IFN-gamma을 분비하였다.

[327] 결과적으로, 삼중음성 유방암세포주인 MDA-MB-231 그리고 BT-20 세포에 대한 anti-B7-H3 (G2D) CAR-T의 하위 신호체계가 활성화되는 것을 확인할 수 있었다.

[328]

[329] **실험예 3. B7-H3을 발현하는 삼중음성 유방암세포주 (MDA-MB-231), 난소암 세포주 (A2780) 그리고 뇌종양 세포주 (U87)에 대한 anti-B7-H3 (G2D) CAR 유전자 발현 T 세포의 표적세포 사멸현상 (Crystal violet) 확인**

[330] **3-1. 실험 방법**

[331] B7-H3을 발현하는 다양한 고형암에 대한 anti-B7-H3 (G2D) CAR-T 세포의 항암 활성능을 다른 방법을 통해 확인하기 위해서 삼중음성 유방암세포주 뿐만 아니라 B7-H3를 발현하는 난소암 세포주 (A2780) 그리고 뇌종양 세포주 (U87)와 공배양 후 살아 있는 표적세포에만 염색되는 crystal violet 용액 (Cat No. V5265, Sigma)을 처리하여 anti-B7-H3 (G2D) CAR-T 세포의 표적세포 사멸현상을 확인하였다.

[332] 삼중음성 유방암세포주 (MDA-MB-231, 2×10^5 세포), 난소암 세포주 (A2780, 2×10^5 세포)와 anti-B7-H3 (G2D) CAR-T 세포 5×10^5 를 12웰 플레이트에 48시간 공배양을 진행하였다. 뇌종양 세포주 U87의 경우 1×10^5 와 anti-B7-H3 (G2D) CAR-T 세포 2.5×10^5 를 12웰 플레이트에 48시간 공배양 후 PBS을 이용하여 죽은 세포를 완벽하게 제거하고 0.1 % crystal violet 용액을 이용하여 살아 있는 표적 세포주를 염색하였다.

[333] 살아 있는 표적세포주 (MDA-MB-231, A2780 그리고 U87)의 crystal violet 염색이 완료된 후, PBS을 이용하여 1회 세척한 후 anti-B7-H3 (G2D) CAR-T 세포의 표적세포주에 대한 사멸현상을 확인하였다. 대조군으로 CAR 바이러스에 형질도입 되지 않은 (Untransduced T 세포, UTD) 시료를 포함시켰다.

[334]

[335] **3-2. 실험 결과**

[336] 표적세포와 anti-B7-H3 (G2D) CAR-T 세포와의 공배양 24시간 경과 후 (도 24) 항원과의 결합을 통하여 anti-B7-H3 (G2D) CAR-T 세포의 활성이 이루어짐을 aggregation을 통해서 확인하였다.

[337] B7-H3 발현하는 고형암 세포주인 MDA-MB-231, A2780 그리고 U87 세포와 anti-B7-H3 (G2D) CAR-T와 공배양을 진행할 경우 대조군인 UTD 세포에 비해 crystal violet 용액에 대한 염색이 적게 되었다. 대조군으로 CAR 바이러스에 형질도입 되지 않은 UTD 세포 시료의 경우 MDA-MB-231, A2780 그리고 U87 세포의 crystal violet 용액에 대한 염색이 유지되는 것을 확인할 수 있었다 (도 25).

- [338] 결과적으로, B7-H3가 발현하는 삼중음성 유방암, 난소암 그리고 뇌종양 세포주에 대해서 anti-B7-H3 (G2D) CAR-T에 대한 활성 및 세포사멸능력을 지님을 확인할 수 있었다.
- [339]
- [340] **실험예 4. B7-H3을 발현하는 뇌종양 세포주 (U87), 비소세포폐암 세포주 (H1299) 그리고 연수막전이암 세포주 (Brain-meta, BM-H1299) 세포주에 대한 anti-B7-H3 (G2D) CAR 유전자 발현 T 세포의 동물 효력 평가 확인**
- [341] **4-1. 실험 방법**
- [342] 뇌종양 (교모세포종) 동물 모델에서의 anti-B7-H3 (G2D) CAR 유전자 발현 T 세포의 항암 효과를 확인하기 위해서, NSGA 마우스에 1×10^5 U87 세포 5 ul를 이용하여 NSGA 마우스의 뇌에 직접 U87세포를 이식하여 생착을 유도하였다. 생착 5일 후, 시험동물의 체중 측정 및 *in vivo* luciferase 이미징을 이용하여 종양의 크기가 고르게 분배되었음을 확인하였다. 시험군은 대조군 (Control)과 시험물질의 투여군 {B7-H3 (G2D) CAR-T}으로 구성하였다. 대조군에는 PBS를 투여하였으며, 시험물질 투여군에는 5×10^7 anti-B7-H3 (G2D) CAR-T 세포 농도로 정맥으로 단회 투여하였다.
- [343] 비소세포폐암 동물 모델에서의 anti-B7-H3 (G2D) CAR 유전자 발현 T 세포의 항암 효과를 확인하기 위해서, NSGA 마우스에 5×10^5 H1299 세포 50 ul를 이용하여 NSGA 마우스의 폐에 직접 H1299세포를 이식하여 생착을 유도하였다. 생착 5일 후, 시험동물의 체중 측정 및 *in vivo* luciferase 이미징을 이용하여 종양의 크기가 고르게 분배되었음을 확인하였다. 시험군은 대조군 (Control)과 시험물질의 투여군 {UTD 그리고 B7-H3 (G2D) CAR-T}으로 구성하였다. 대조군에는 PBS를 투여하였으며, 시험물질 투여군에는 5×10^7 anti-B7-H3 (G2D) CAR-T세포 농도로 정맥으로 단회 투여하였다.
- [344] 연수막전이암 동물 모델에서의 anti-B7-H3 (G2D) CAR 유전자 발현 T 세포의 항암 효과를 확인하기 위해서, 뇌전이 폐암 세포주 (BM-H1299)를 제작하였다. NSGA 마우스에 5×10^4 BM-H1299 세포 5 ul를 이용하여 NSGA 마우스의 뇌에 직접 BM-H1299세포를 이식하여 생착을 유도하였다. 생착 3일 후, 시험동물의 체중 측정 및 *in vivo* luciferase 이미징을 이용하여 종양의 크기가 고르게 분배되었음을 확인하였다. 시험군은 대조군 (Control)과 시험물질의 투여군 {UTD 그리고 B7-H3 (G2D) CAR-T}으로 구성하였다. 대조군에는 PBS를 투여하였으며, 시험물질 투여군에는 1.5×10^6 anti-B7-H3 (G2D) CAR-T세포 농도로 ICV (뇌실내투여)로 단회 투여하였다.
- [345]
- [346] **4-2. 실험 결과**
- [347] 뇌종양 (교모세포종) 동물 모델에서의 anti-B7-H3 (G2D) CAR 유전자 발현 T 세포의 항암 효과를 확인해 본 결과, 약물을 처리하지 않은 대조군 (Control)의 뇌종

양 크기에 비해서 anti-B7-H3 (G2D) CAR-T 투여군에서 뇌종양의 크기가 감소된 결과를 보여주었다. 이러한 결과로부터, 뇌종양 세포주 (U87)가 이식된 동물 모델에 대해서 anti-B7-H3 (G2D) CAR-T가 종양 크기를 감소시키는 데 따라서, B7-H3를 발현하는 뇌종양 모델에서 anti-B7-H3 (G2D) CAR-T가 효과적으로 작용함을 확인할 수 있었다(도 26).

[348] 비소세포폐암 동물 모델에서의 항암 효과를 확인해 본 결과, anti-B7-H3 (G2D) CAR-T 투여 초기에는 비교그룹 (Control 그리고 UTD)과의 차이점이 없지만 17일 경과 후 anti-B7-H3 (G2D) CAR-T 그룹의 종양이 비교그룹 (Control 그리고 UTD) 보다 감소됨을 확인하였다(도 27).

[349] 연수막전이암 동물 모델에서의 항암 효과를 확인해 본 결과, Control과 UTD 그룹의 경우 대부분 개체의 종양이 척수로 전이됨을 확인하였다. 반면 anti-B7-H3 (G2D) CAR-T 투여 그룹의 경우 대부분의 개체의 종양이 척수로 전이가 되지 않음을 확인하였다(도 28).

[350] 결과적으로 anti-B7-H3 (G2D) CAR-T의 경우 뇌종양, 비소세포폐암 그리고 연수막전이암에 효과적으로 적용 가능하다.

[351]

[352] **실험 예 5. B7-H3을 발현하는 수모세포종 세포주 (Daoy 그리고 D283)에 대한 anti-B7-H3 (G2D) CAR 유전자 발현 T 세포의 세포사멸 능력 (LDH) 측정**

[353] **5-1. 실험 방법**

[354] B7-H3을 발현하는 수모세포종 세포주 (Daoy 그리고 D283-Cat No. HTB-185, ATCC)에 대한 anti-B7-H3 (G2D) CAR-T 세포의 세포 용해 활성을 측정하기 위해서 CytoTox96 Non-radio cytotoxicity assay LDH (Cat No. G1781, Promega) 키트를 사용하여 세포사멸 분석 (Cytotoxicity assay)을 진행하였다. 구체적으로는 anti-B7-H3 (G2D) CAR-T 세포 (Effector 세포)는 10일 배양 후에 사용하였으며 96 웰 플레이트에 Effector:Target를 E:T ratio의 비율 5:1 2.5:1 그리고 1.25:1로 세포를 넣고 37°C에서 18시간 동안 반응시켰다. 본 시험의 대조군으로 CAR 바이러스에 형질도입 되지 않은 (Untransduced T 세포, UTD) 시료를 포함시켰다.

[355]

[356] **5-2. 실험 결과**

[357] Anti-B7-H3 (G2D) CAR-T 세포는 E:T ratio (1.25:1, 2.5:1 및 5:1)에 따라 D283 세포주에 대해 18 %, 44 % 그리고 66 %의 세포사멸 능력을 보였으며, Daoy 세포주에 대해 50%, 70% 그리고 84%의 세포사멸 능력을 보였다. Daoy 세포주의 대조군으로 CAR 바이러스에 형질도입 되지 않은 UTD 세포는 E:T ratio (2.5: 1 및 5:1)에 따라 3% 그리고 13%의 LDH 값을 나타내었다. 결과적으로 anti-B7-H3 (G2D) CAR-T 세포의 경우 수모세포종 세포에 대하여 사멸능력이 있음을 확인하였다 (도 29).

[358]

[359] 실험예 6. 소아뇌암, 수모세포종 세포주 (Daoy)에 대한 anti-B7-H3 (G2D) CAR 유전자 발현 T 세포의 항암 효과 확인

[360] 6-1. 실험 방법

[361] 소아뇌암 수모세포종 동물 모델에서의 anti-B7-H3 (G2D) CAR 유전자 발현 T 세포의 항암 효과를 확인하기 위해서, NSGA 마우스에 2×10^5 Daoy 세포 5 μ l를 이용하여 NSGA 마우스의 소뇌에 직접 이식하여 생착을 유도하였다. 생착 7일 후, 시험동물의 체중 측정 및 *in vivo* luciferase 이미징을 이용하여 종양의 크기가 고르게 분배되었음을 확인하였다. 시험군은 1개의 대조군 (Vehicle)과 2개의 시험물질의 투여군 {UTD 세포, B7-H3 (G2D) CAR-T}으로 구성하였으며, 각 군당 5마리씩 분배하였다. 종양이식 후 7일에 CAR 바이러스에 형질도입 되지 않은 T 세포 (UTD)를 1.5×10^6 세포 농도로 IT (종양내 투여)로 단회 투여하였으며, anti-B7-H3 (G2D) CAR-T 세포를 1.5×10^6 세포 농도로 IT (종양내 투여) 또는 ICV (뇌실내투여)으로 단회 투여하였다.

[362]

[363] 6-2. 실험 결과

[364] 그 결과는 도 30에 나타내었다. 대조군 (Control과 UTD)의 종양의 경우 생착시점으로 부터 종양의 성장이 확인되었다. 반면, anti-B7-H3 (G2D) CAR-T 세포를 투여한 그룹의 경우 투여 방법 (IT 그리고 ICV)에 차이점이 없이 대부분 개체에서 종양이 제거됨을 확인하였다. 이러한 결과로부터 수모세포종 세포 (Daoy)가 이식된 동물 모델에 대해서 anti-B7-H3 (G2D) CAR-T가 종양 크기를 감소함에 따라서, B7-H3를 발현하는 수모세포종 모델에서 anti-B7-H3 (G2D) CAR-T가 효과적으로 작용함을 확인할 수 있었다. 결과적으로 anti-B7-H3 (G2D) CAR-T의 경우 수모세포종에 효과적으로 적용 가능하며, 두 가지 투여 방법 (IT 그리고 ICV) 모두 효과적으로 anti-B7-H3 (G2D) CAR-T가 종양으로 이동됨을 확인하였다.

[365]

[366] 실험예 7. Human 2Ig 그리고 4Ig B7-H3 구조 및 mouse 2Ig B7-H3 구조를 발현하는 Raji 세포에 대한 anti-B7-H3 (G2D) CAR 유전자 발현 T 세포의 사이토카인 (IFN-gamma) 생성 체크

[367] 7-1. 실험 방법

[368] Anti-B7-H3 (G2D) CAR-T의 표적 특이적인 활성을 확인하기 위해서 B7-H3가 발현하지 않은 세포주 (Raji)을 이용하여 B7-H3 (G2D) CAR-T의 활성을 분석하였다. 96웰 플레이트에 Raji, Raji-2ig B7-H3, Raji-4Ig B7-H3 또는 Raji-m2Ig B7-H3 세포를 4×10^5 넣고, anti-B7-H3 (G2D) CAR-T 세포를 1×10^5 넣고 37°C incubator에서 18시간 배양하였다. 대조군으로 CAR 바이러스에 형질도입 되지 않은 세포 시료인 UTD를 포함시켰다. Human 2Ig 그리고 4Ig B7-H3 구조 및 mouse 2Ig B7-H3 구조를 발현하는 Raji 세포에 대한 anti-B7-H3 (G2D) CAR-T 세포의 IFN-

gamma의 양을 분석하기 위해서 human IFN-gamma immunoassay kit (R&D)을 이용하여 진행하였다.

[369]

[370] **7-2. 실험 결과**

[371] Human 2Ig 그리고 4Ig B7-H3 구조 및 mouse 2Ig B7-H3 구조를 발현하는 Raji 세포에 대한 anti-B7-H3 (G2D) CAR-T 세포의 IFN-gamma 분비 결과는 도 31에 나타내었다. 구체적으로, Human 2Ig 그리고 4Ig B7-H3 구조 및 mouse 2Ig B7-H3 구조를 발현하는 Raji 세포와의 공배양에 따른 IFN-gamma의 양은 anti-B7-H3 (G2D) CAR-T의 경우 CAR 바이러스에 형질 도입되지 않은 시료에 비해 높은 IFN-gamma을 분비하였다.

[372]

[373] 결과적으로, 본 발명의 B7-H3 CAR-T의 경우 human 뿐만 아니라 mouse B7-H3에 특이적으로 결합하여 소아뇌암, 성인뇌암, 연수막전이암, 비소세포폐암, 삼중음성 유방암 그리고 다양한 암에 대한 신호체계가 활성화되는 것을 확인할 수 있었다.

[374]

[375] 이상, 본 발명의 실시예들에 대하여 설명하였으나, 해당 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 특허청구범위에 기재된 본 발명의 사상으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서, 구성 요소의 부가, 변경, 삭제 또는 추가 등에 의해 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있을 것이며, 이 또한 본 발명의 권리범위 내에 포함된다고 할 것이다.

청구범위

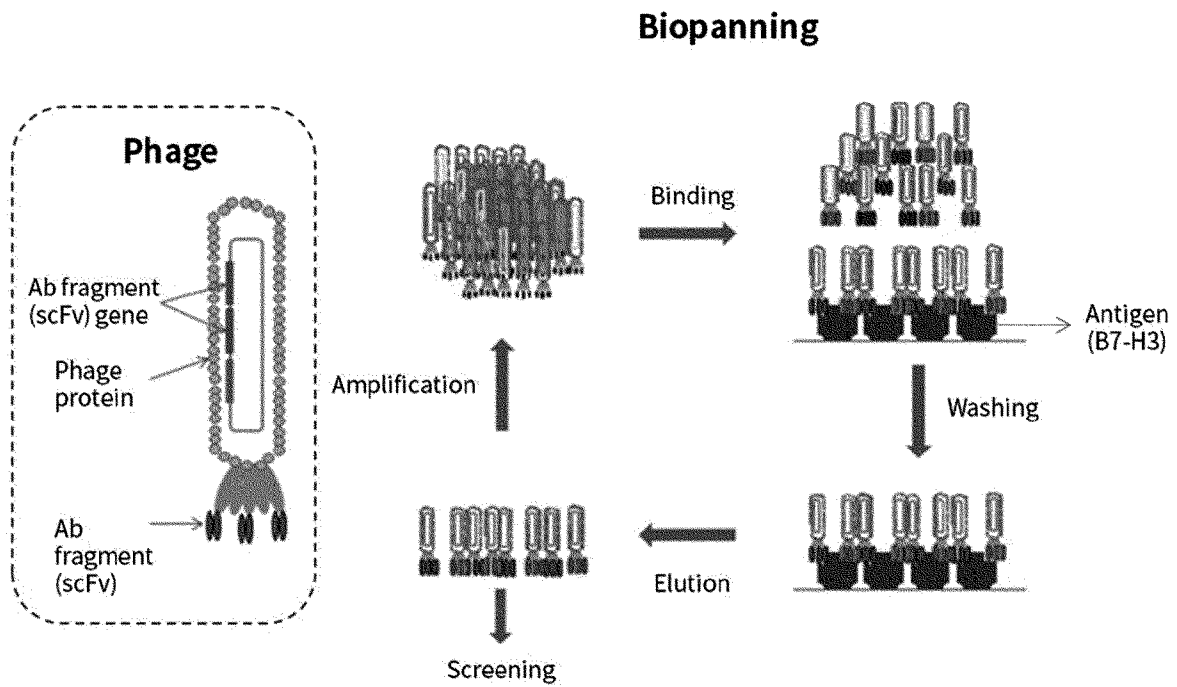
- [청구항 1] B7-H3와 결합하는 항원 결합 도메인(antigen-binding domain); 힌지 영역(hinge region); 막관통 도메인(transmembrane domain); 보조 자극 도메인(co-stimulatory domain); 및 세포질 신호 전달 도메인(intracellular signaling domain)을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화(coding)하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 카세트.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 B7-H3와 결합하는 항원 결합 도메인은 서열번호 36의 Ig-like-V-type 1 서열, 서열번호 38의 Ig-like-V-type 2 서열 및 서열번호 40의 Ig-like-V-type 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 B7-H3 도메인의 아미노산 서열 내에 위치한 에피토프에 결합하는 것을 특징으로 하는, 발현 카세트.
- [청구항 3] 제 2 항에 있어서,
상기 B7-H3와 결합하는 항원 결합 도메인은 서열번호 36의 아미노산 잔기 2 내지 6(즉, EVQVP), 서열번호 38의 아미노산 잔기 6 내지 10(즉, EVQVP) 및 서열번호 40의 아미노산 잔기 2 내지 6(즉, EVQVS)에 해당하는 하나 이상의 아미노산에 결합하는 것을 특징으로 하는, 발현 카세트.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서,
상기 B7-H3와 결합하는 항원 결합 도메인은 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 및 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하며, 여기서 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3은 각각 서열번호 3, 4, 및 5로 구성되고, 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3은 각각 서열번호 6, 7, 및 8로 구성되는 것을 특징으로 하는, 발현 카세트.
- [청구항 5] 제 4 항에 있어서, 상기 B7-H3와 결합하는 항원 결합 도메인은 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변영역을 포함하며,
(i) 상기 경쇄 가변영역은 서열번호 9에 제시된 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하고; 및
(ii) 상기 중쇄 가변영역은 서열번호 10에 제시된 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 발현 카세트.
- [청구항 6] 제 5 항에 있어서, 상기 B7-H3와 결합하는 항원 결합 도메인은 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변영역을 포함하며,
상기 경쇄 가변영역은 서열번호 9로 구성되고, 상기 중쇄 가변영역은 서열번호 10으로 구성되는 것을 특징으로 하는, 발현 카세트.
- [청구항 7] 제 4 항에 있어서, 상기 B7-H3와 결합하는 항원 결합 도메인은 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변영역을 포함하며,

- (i) 상기 경쇄 가변영역은 서열번호 21에 제시된 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함; 및
- (ii) 상기 중쇄 가변영역은 서열번호 22에 제시된 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 발현 카세트.

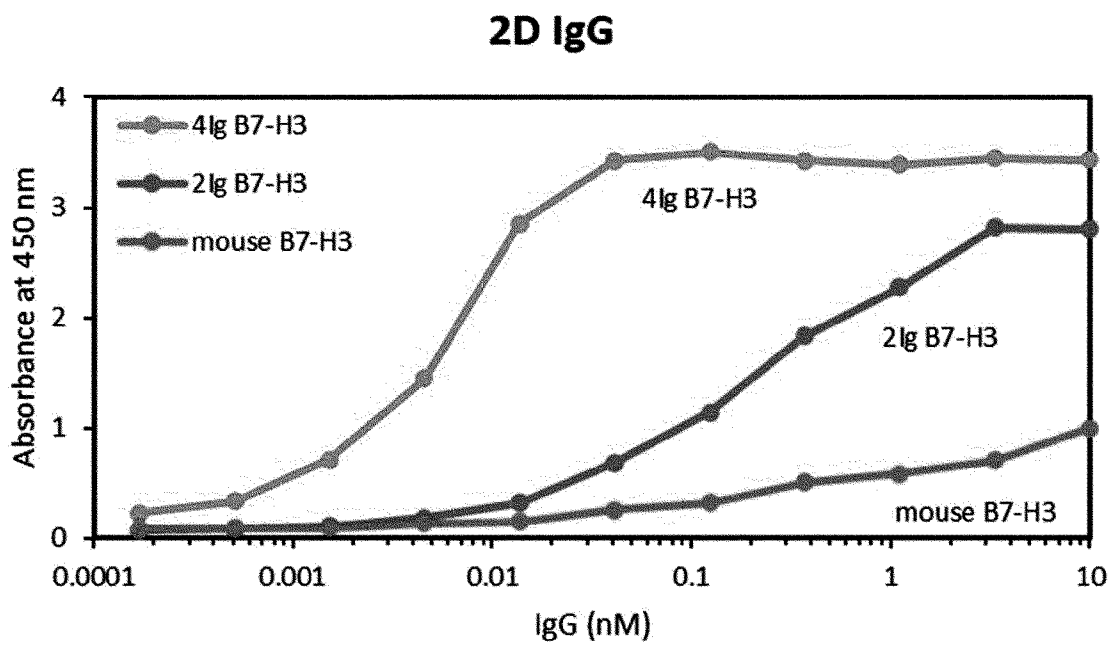
- [청구항 8] 제 7 항에 있어서, 상기 B7-H3와 결합하는 항원 결합 도메인은 경쇄 가변영역 및 중쇄 가변영역을 포함하며, 상기 경쇄 가변영역은 서열번호 21로 구성되고, 상기 중쇄 가변영역은 서열번호 22로 구성되는 것을 특징으로 하는, 발현 카세트.
- [청구항 9] 제 1 항에 있어서, 상기 CAR의 힌지 영역은 CD8 α , CD4, CD28, PD1, CD152 또는 CD7의 힌지 영역인 것을 특징으로 하는, 발현 카세트.
- [청구항 10] 제 1 항에 있어서, 상기 CAR의 막관통 도메인은 T-세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타쇄, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 또는 CD154의 막관통 도메인인 것을 특징으로 하는, 발현 카세트.
- [청구항 11] 제 1 항에 있어서, 상기 CAR의 보조 자극 도메인은 MHC 클래스 I 분자, TNF 수용체 단백질, 이뮤노글로불린-유사 단백질, 시토카인 수용체, 인테그린, 신호전달 림프구성 활성화 분자 (signaling lymphocytic activation molecule, SLAM), 활성화 NK 세포 수용체, BTLA(B an T lymphocyte attenuator), 톨-유사 리간드 수용체(Toll-like ligand receptor), OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8알파, CD8베타, IL2R 베타, IL2R 감마, IL7R 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, NKG2C, 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), SLAM (SLAMF, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, 또는 CD83의 보조 자극 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는, 발현 카세트.

- [청구항 12] 제 1 항에 있어서,
상기 CAR의 세포질 신호 전달 도메인은 4-1BB, CD28, OX40, CD3 ζ 의 기능적 신호 전달 도메인, 및 이들의 조합으로부터 선택되는 세포질 신호 전달 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는, 발현 카세트.
- [청구항 13] 제 1 항의 발현 카세트를 포함하는 재조합 발현 벡터.
- [청구항 14] 제 13 항의 재조합 발현 벡터로 형질 도입된, 분리된 효과기 세포.
- [청구항 15] B7-H3와 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함하는, 분리된 효과기 세포로서,
상기 B7-H3와 결합하는 항원 결합 도메인은 서열번호 36의 아미노산 잔기 2 내지 6(즉, EVQVP), 서열번호 38의 아미노산 잔기 6 내지 10(즉, EVQVP) 및 서열번호 40의 아미노산 잔기 2 내지 6(즉, EVQVS)에 해당하는 하나 이상의 아미노산에 결합하는 것을 특징으로 하는, 효과기 세포.
- [청구항 16] 제 14 항 또는 제 15 항에 있어서, 상기 효과기 세포가 수지상 세포, 킬러 수지상 세포, 비만세포, 자연살해 세포, B 림프구, T 림프구, 대식세포 또는 이들의 전구세포, 또는 이들의 조합인 것을 특징으로 하는, 효과기 세포.
- [청구항 17] 제 16 항에 있어서, 상기 T 림프구가 세포독성 T 림프구, 조절 T 림프구, 헬퍼 T 림프구 또는 이들의 조합인 것을 특징으로 하는, 효과기 세포.
- [청구항 18] 제 14 항 또는 제 15 항의 효과기 세포 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 19] 제 18 항에 있어서, 상기 암은 B7-H3를 발현하는 암종에 의한 것을 특징으로 하는, 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 20] 제 18 항에 있어서, 상기 암은 뇌종양, 소아암, 수모세포종, 연수막전이암, 유방암, 폐암, 췌장암, 대장암, 간암, 전립선암, 난소암, 위암, 식도암, 림프종, 흑색종, 신장암, 섬유육종, 결장암, 결직장암, 자궁내막암, 갑상선암, 부갑상선암, 자궁경부암, 방광암, 두경부암, 뼈암, 피부암, 자궁암, 고환암, 담도암, 기관지암, 비인두암, 후두암 및 요관암으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 21] 이를 필요로 하는 대상에게, 제 14 항 또는 제 15 항의 효과기 세포를 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료방법.
- [청구항 22] 제 14 항 또는 제 15 항의 효과기 세포의 의약 용도(for use as a medicament).

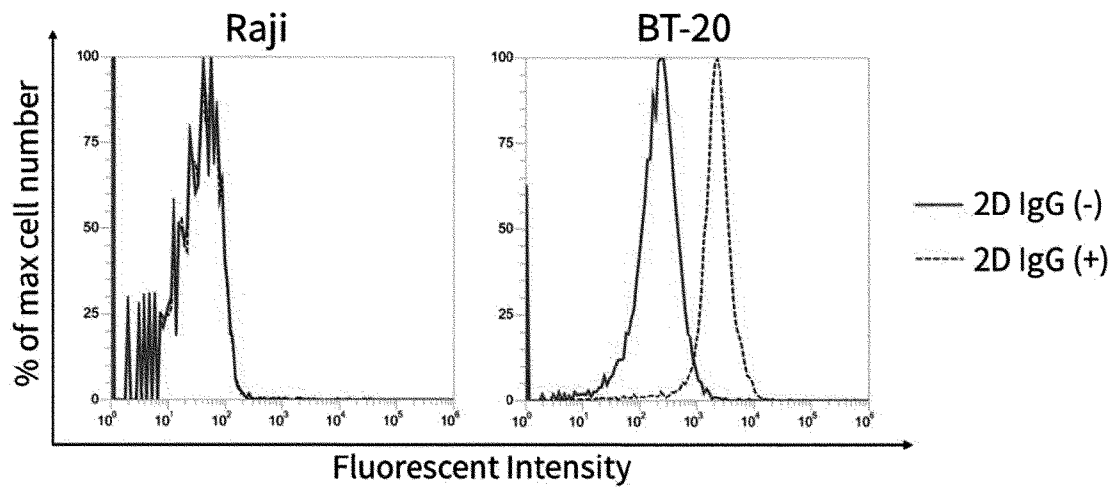
[도1]



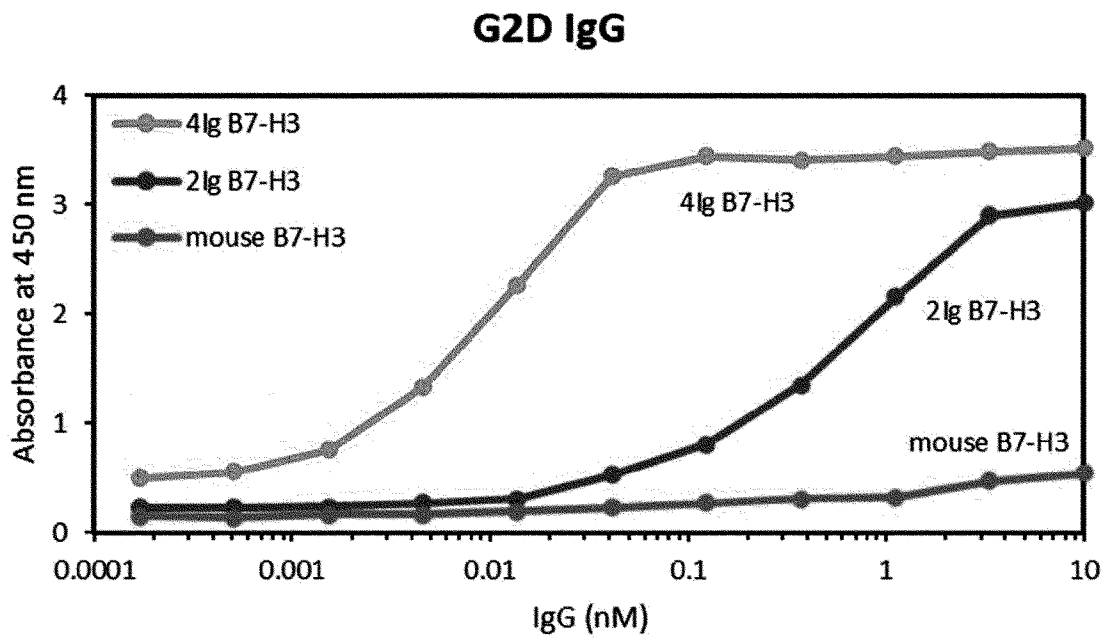
[도2a]



[도2b]

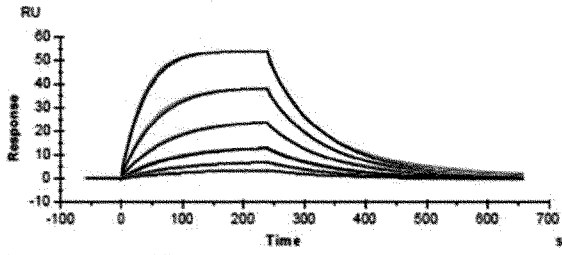


[도3a]



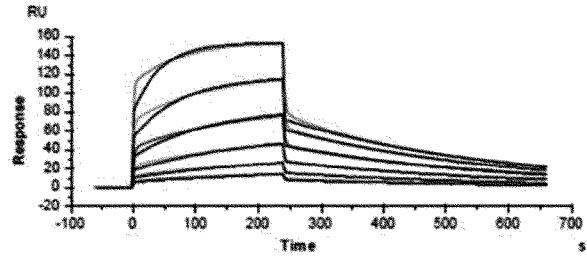
[도3b]

4Ig B7-H3



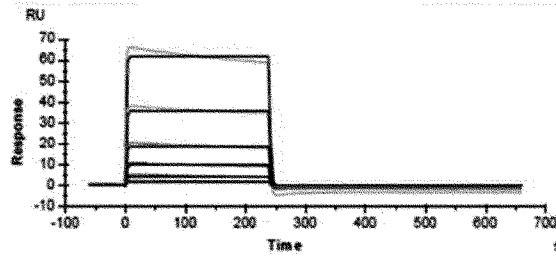
$K_D(M): 6.216 \times 10^{-9}$

2Ig B7-H3



$K_D(M): 1.153 \times 10^{-7}$

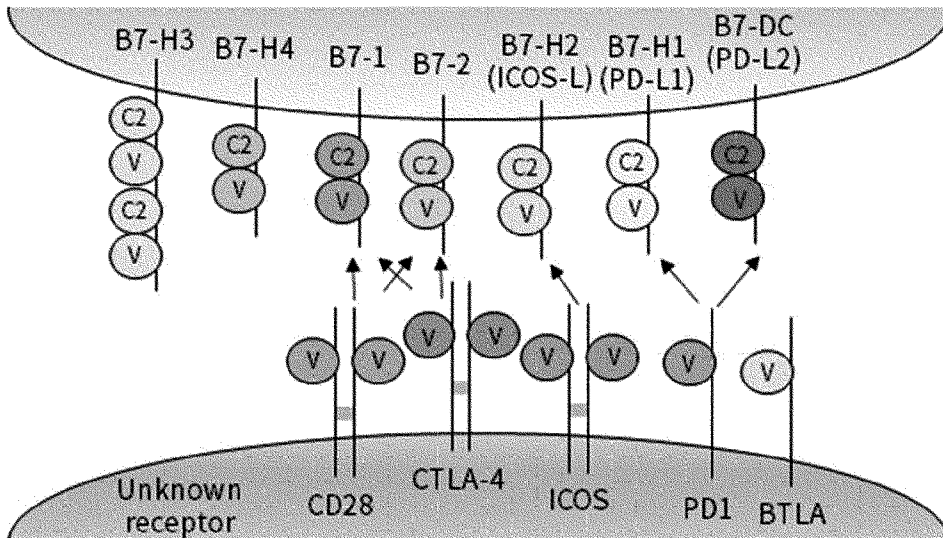
Mouse B7-H3



$K_D(M): 1.131 \times 10^{-6}$

[도4]

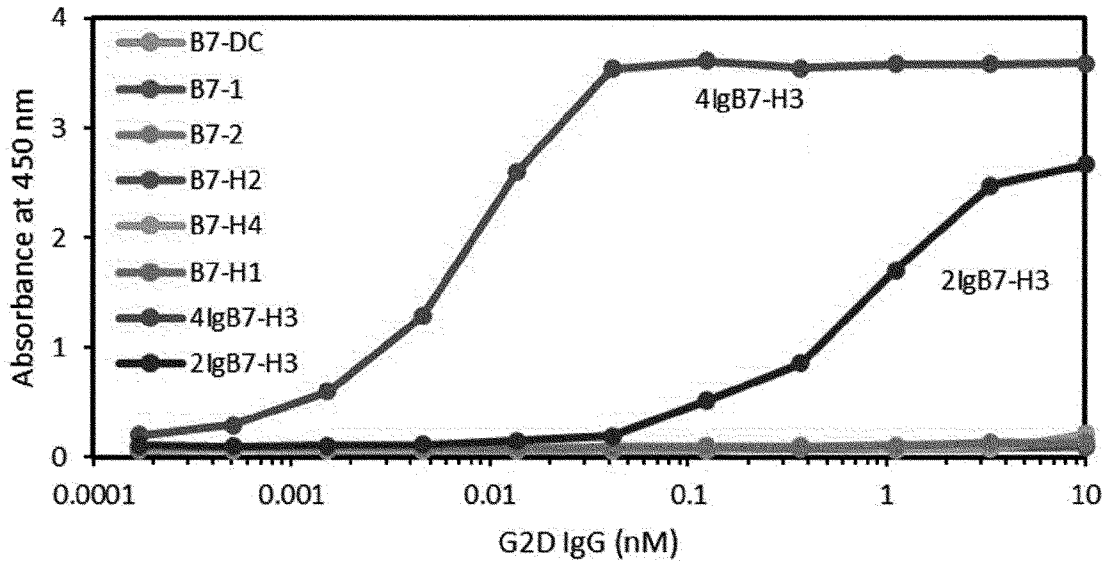
APC



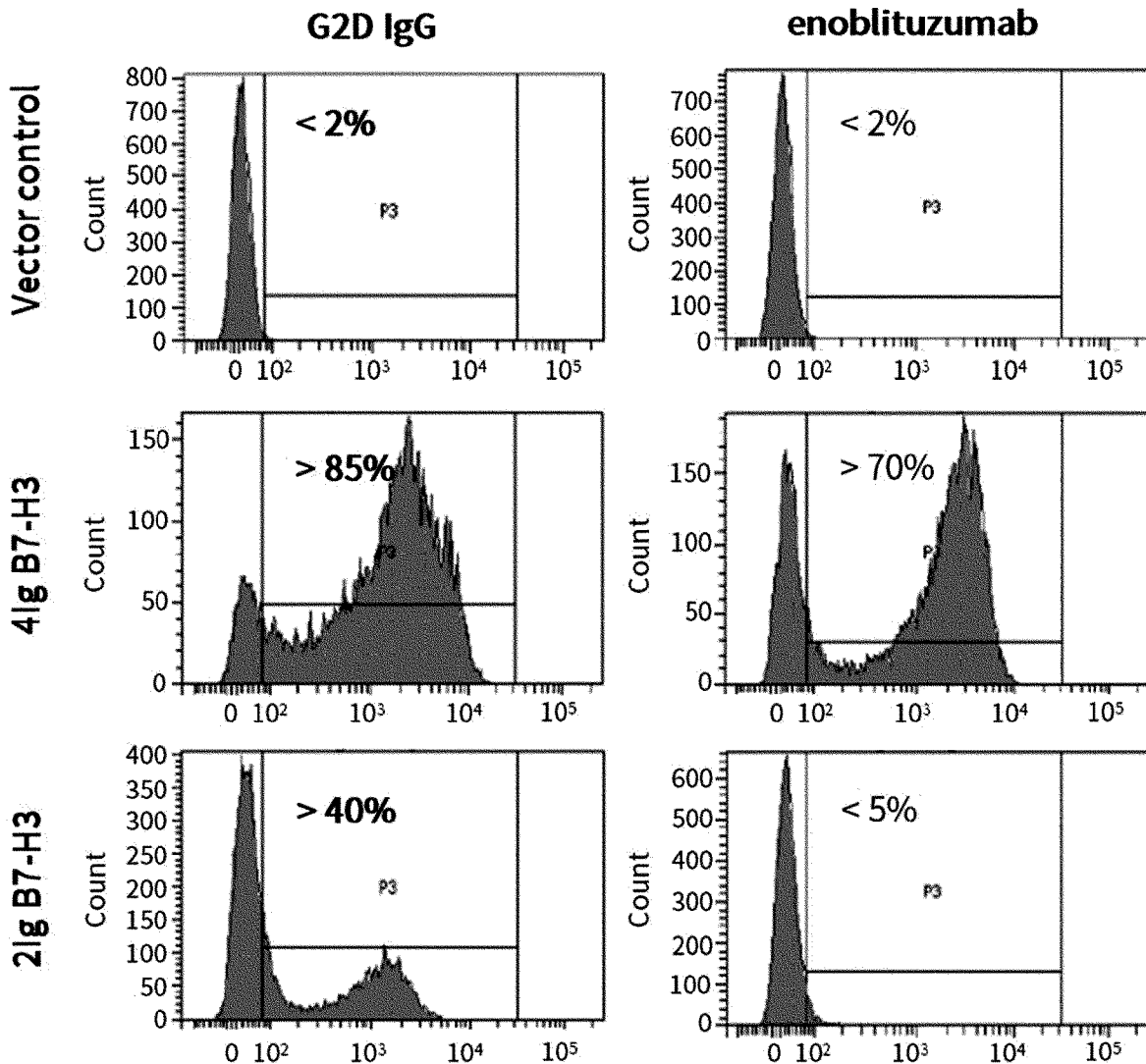
T cell

[도5]

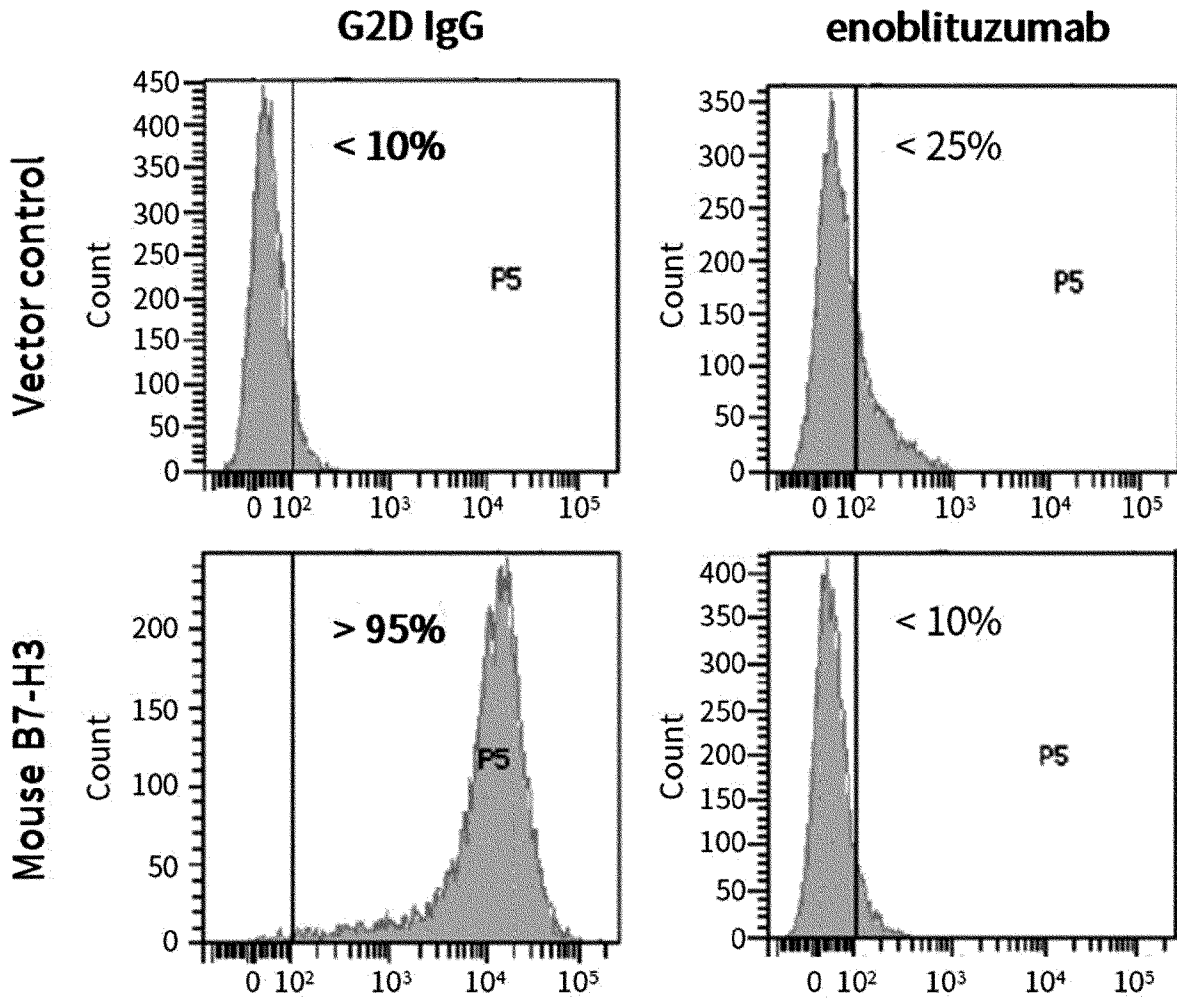
B7 family protein



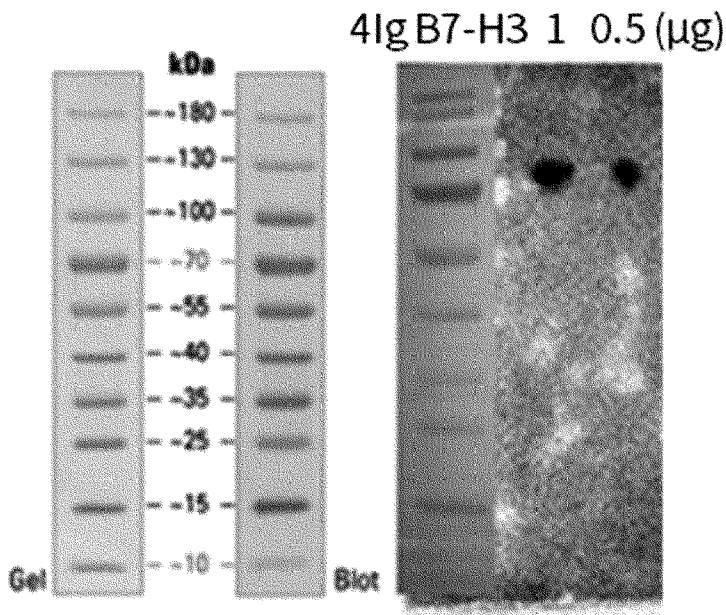
[도6a]



[도6b]

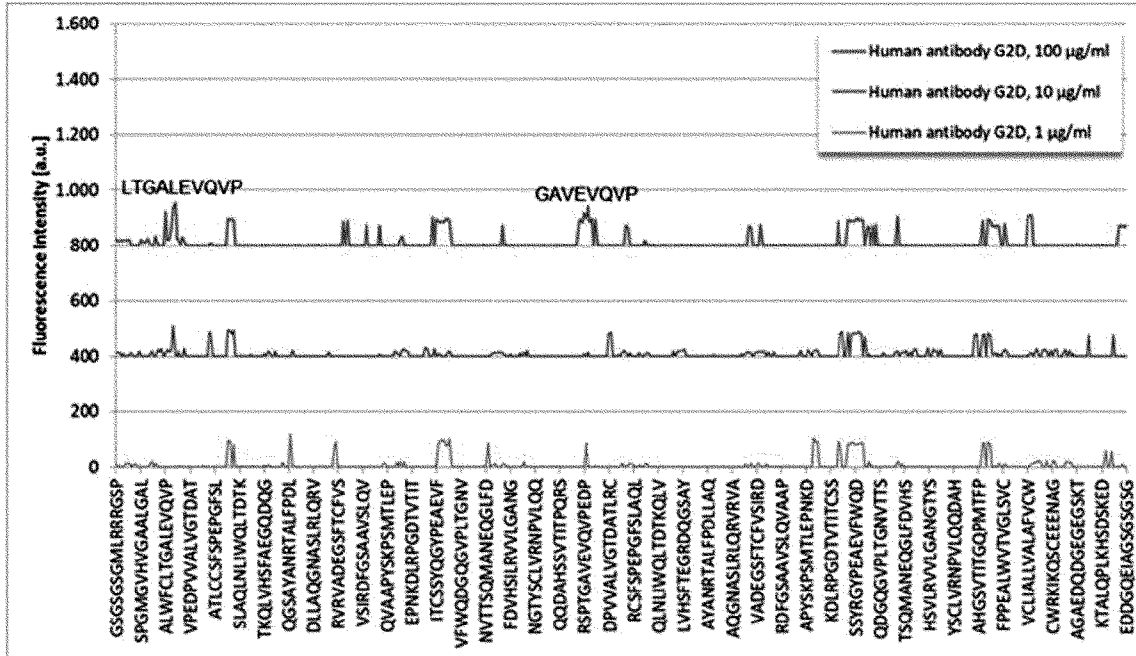


[도7a]

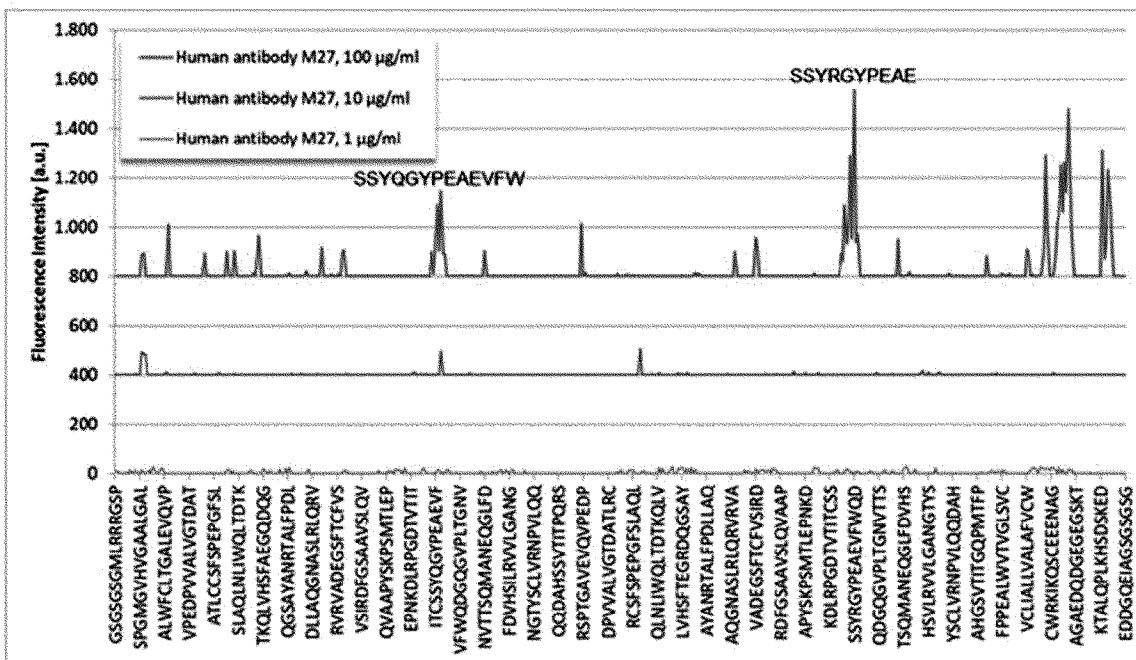


[도 7b]

G2D IgG



enoblituzumab



[도7c]

Ig-like-V type 1

ALGALWFCLTGALEV	0.0
LGALWFCLTGALEVQ	0.0
GALWFCLTGALEVQV	0.0
ALWFCLTGALEVQVP	122.0
LWFCLTGALEVQVPE	17.3
WFCLTGALEVQVPED	24.8
FCLTGALEVQVPEDP	63.0
CLTGALEVQVPEDPV	137.5
LTGALEVQVPEDPVV	153.5
TGALEVQVPEDPVVA	21.0
GALEVQVPEDPVVAL	20.0
ALEVQVPEDPVVALV	0.0
LEVQVPEDPVVALVG	30.5
EVQVPEDPVVALVGT	16.0
VQVPEDPVVALVGTD	0.0
QVPEDPVVALVGTDA	0.0

Ig-like-V type 2

TITPQRSPTGAVEVQ	0.0
ITPQRSPTGAVEVQV	0.0
TPQRSPTGAVEVQVP	89.3
PQRSPTGAVEVQVPE	92.3
QRSPTGAVEVQVPED	80.0
RSPTGAVEVQVPEDP	120.0
SPTGAVEVQVPEDPV	94.8
PTGAVEVQVPEDPVV	141.5
TGAVEVQVPEDPVVA	84.5
GAVEVQVPEDPVVAL	95.0
AVEVQVPEDPVVALV	0.0
VEVQVPEDPVVALVG	92.5
EVQVPEDPVVALVGT	0.0
VQVPEDPVVALVGTD	0.0
QVPEDPVVALVGTDA	0.0

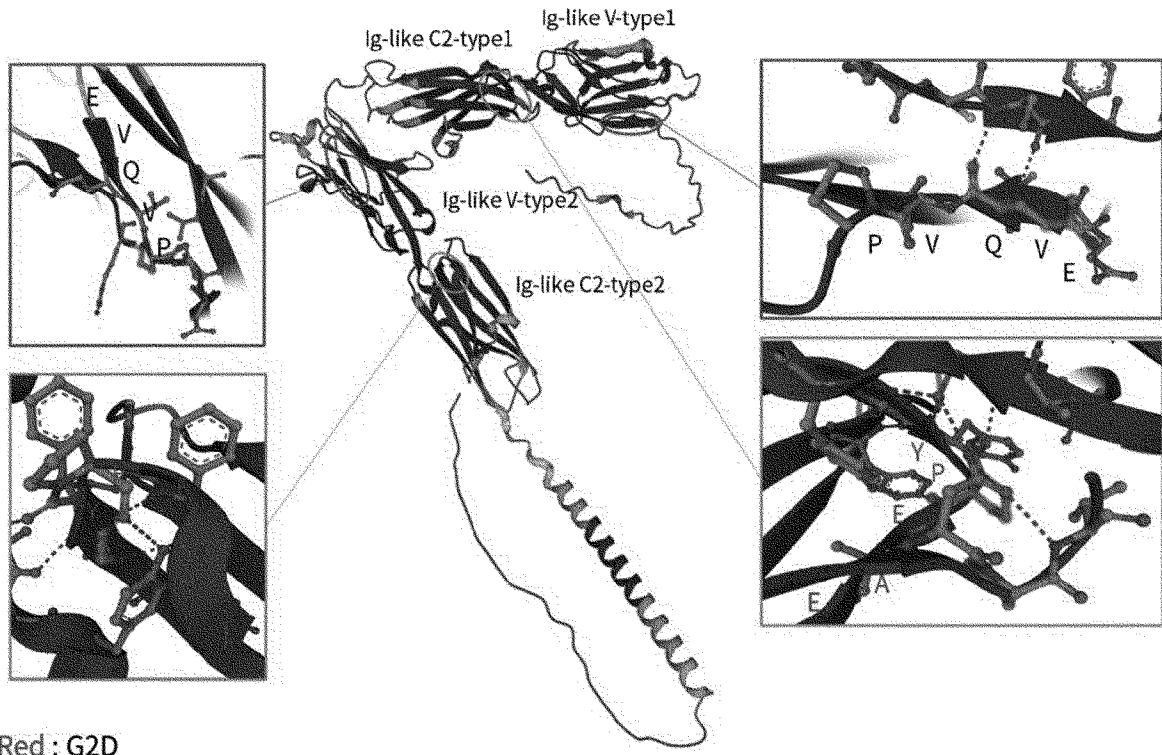
[도7d]

```

1  GSGSGSGLR  RRGSPGMGVH  VGAALGALWF  CLTGALEVQV  PEDPVVALVG  TDATLCCSFS
61  PEPGFSLAQL  NLIWQLTDTK  QLVHSFAEGQ  DQGSAYANRT  ALFPDLAAG  NASLRLQVRV
121  VADEGSFTCF  VSIRDFGSAA  VSLQVAAPYS  KPSMTLEPNK  DLRPGDTVTI  TCSSYQGYPE
181  AEFWQDGQG  VPLTGNVTTS  QMANEQGLFD  VHSILRVVLG  ANGTYSCLVR  NPVLQQDAHS
241  SVTITPQRSP  TGAVEVQVPE  DPVVALVGT  ATLRCFSPE  PGFSLAQLNL  IWQLTDTKQL
301  VHSFTEGRDQ  GSAYANRTAL  FPDLLAQGNA  SLRLQVRVA  DEGSFTCFVS  IRDFGSAAVS
361  LQVAAPYSKP  SMTLEPNKDL  RPGDTVTITC  SSYRGYPEAE  VFWQDGQGV  LTGNVTTSQM
421  ANEQGLFDVH  SVLRVVLGAN  GTYSCLVRNP  VLQQDAHGSV  TITGQPMTFP  PEALWVTVGL
481  SVCLIALLVA  LAFVCWRKIK  QSCEENAGA  EDQDGEGEGS  KTALQPLKHS  DSKEDDGQEI
541  AGSGSGSG
    
```

Blue: G2D epitope 예측 부위
 Red: enoblituzumab epitope 예측 부위

[도7e]



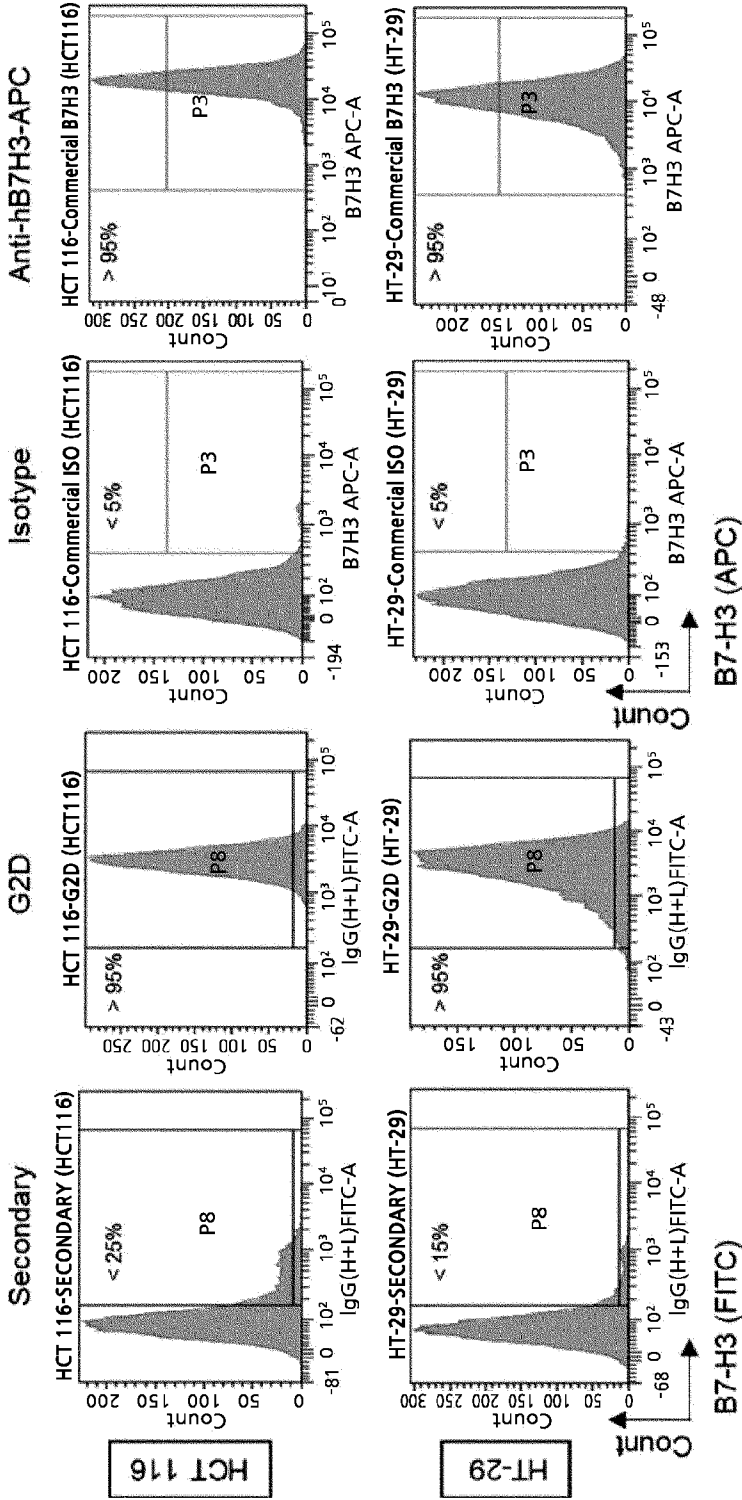
Red : G2D

Orange : enoblituzumab

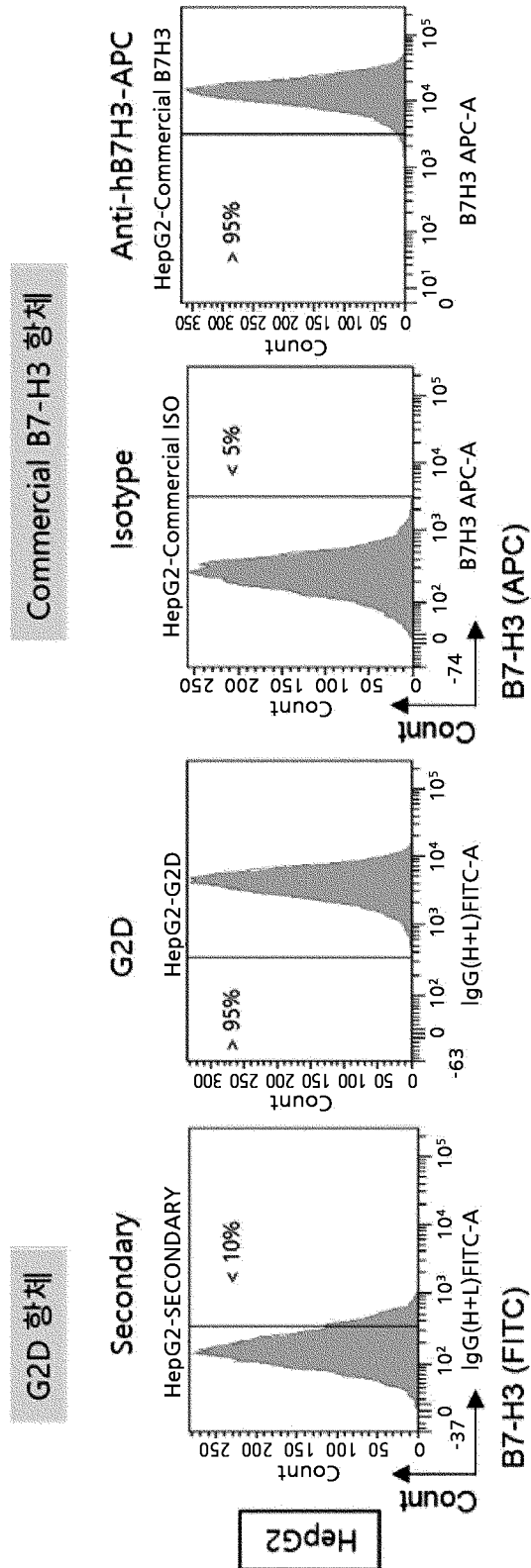
[도 8]

Commercial B7-H3 항체

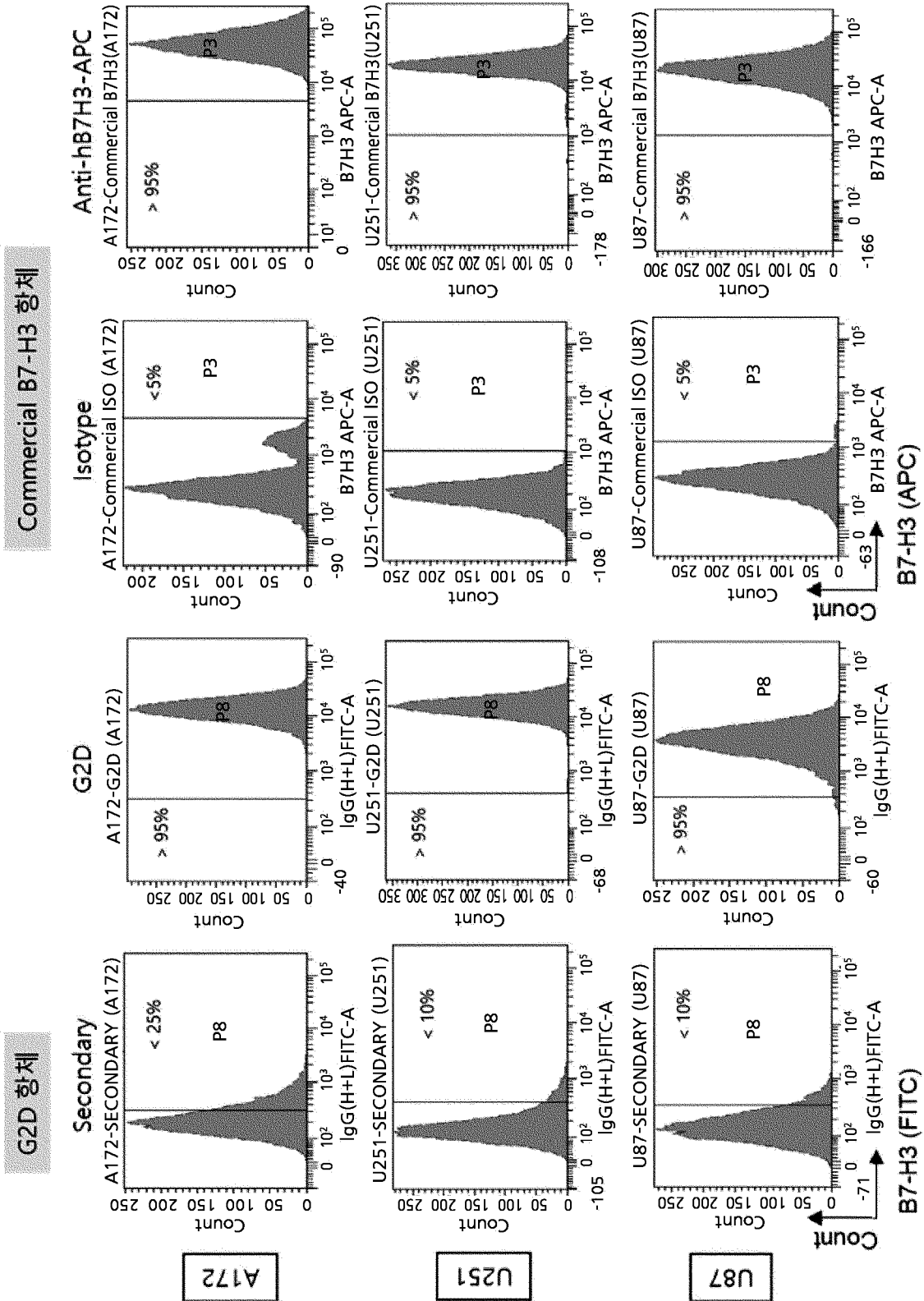
G2D 항체



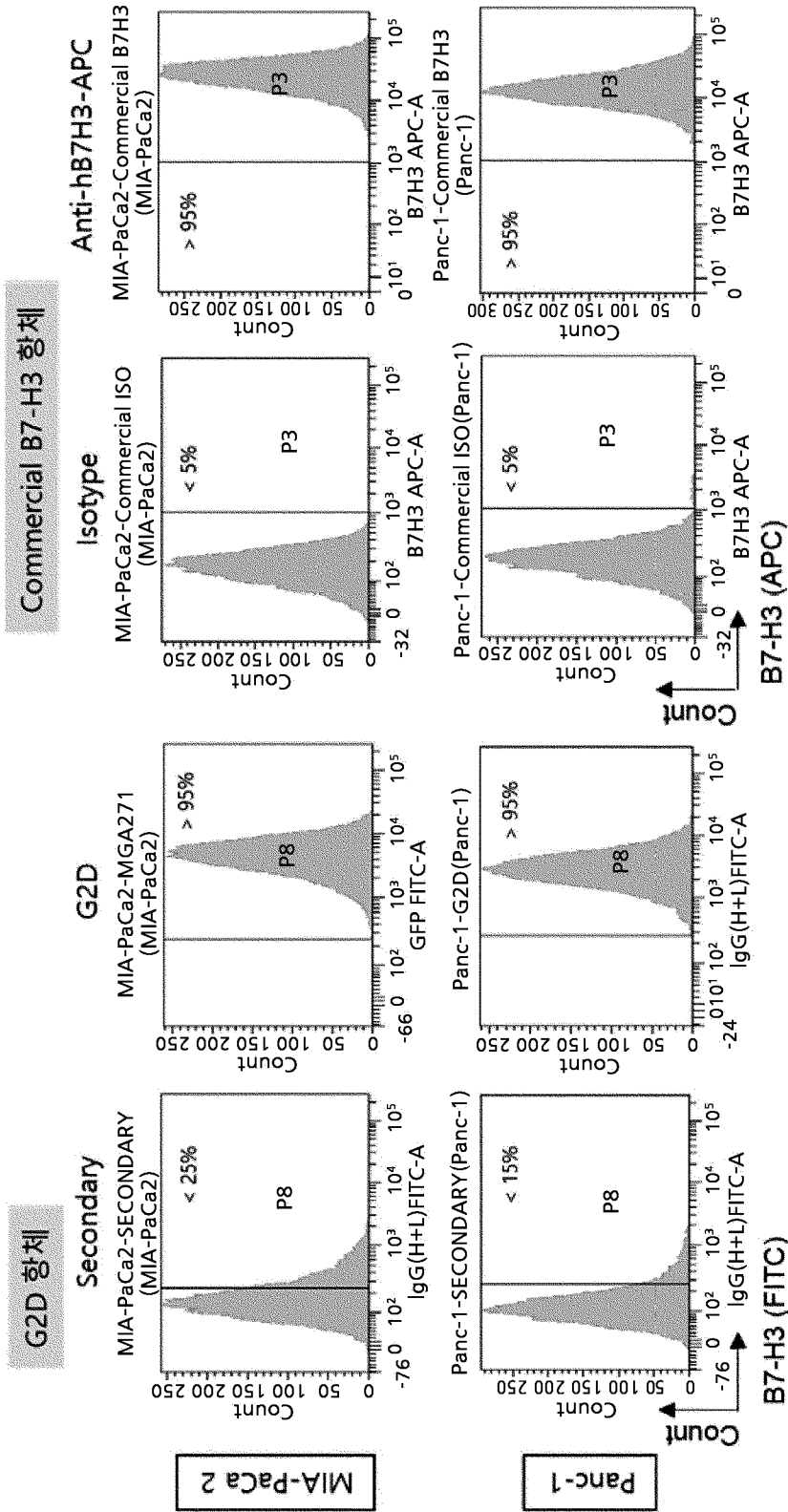
[도9]



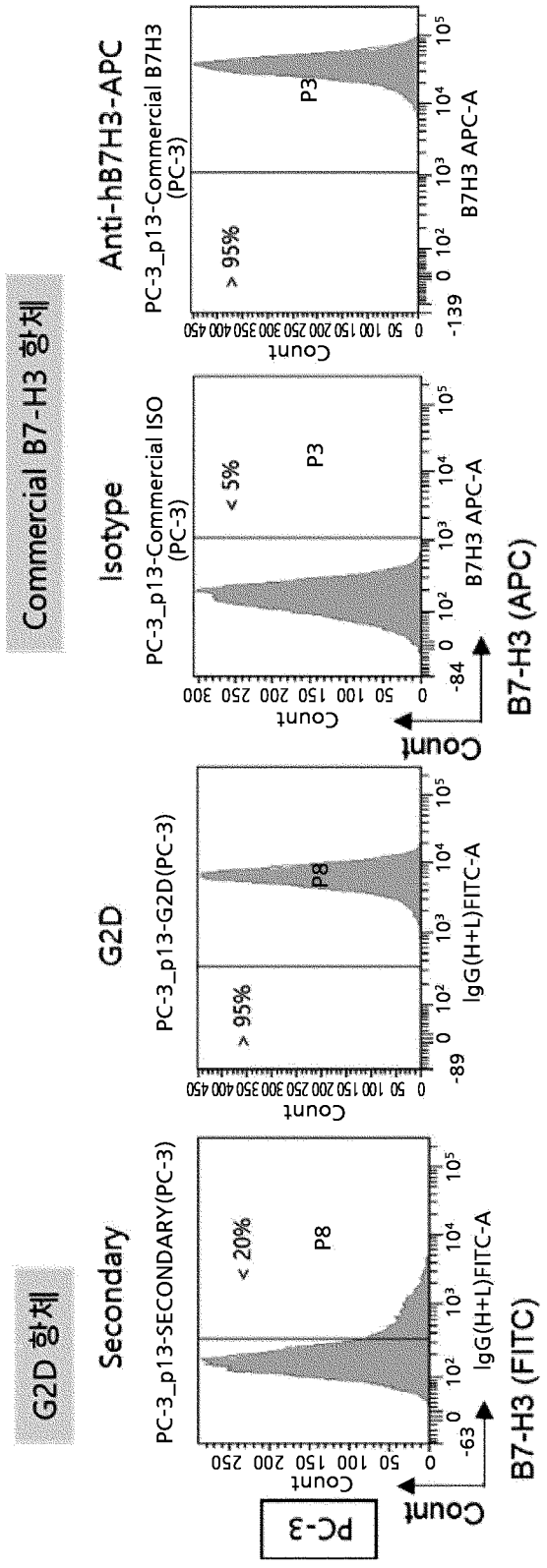
[표 10]



[F11]



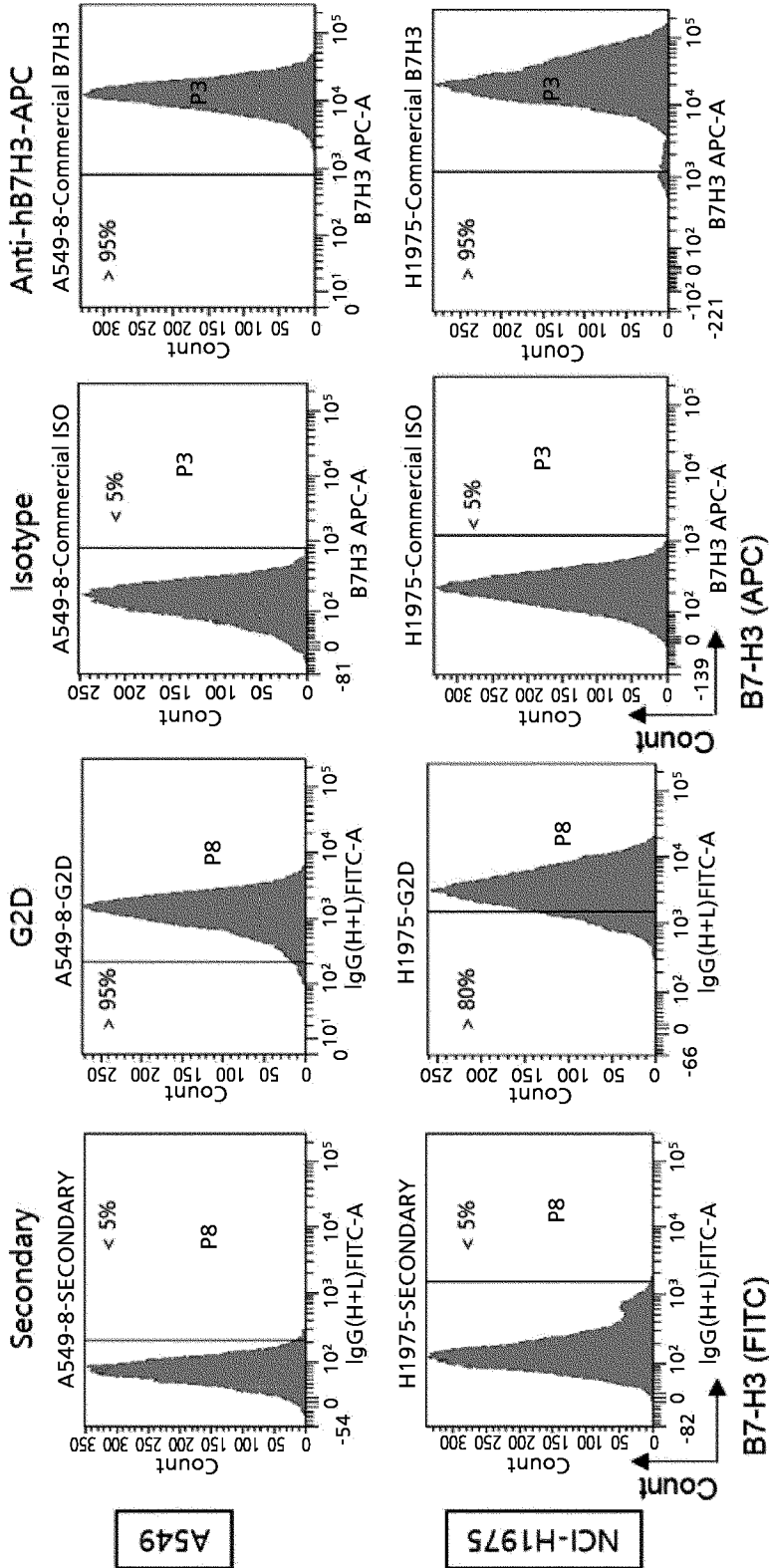
[도 12]



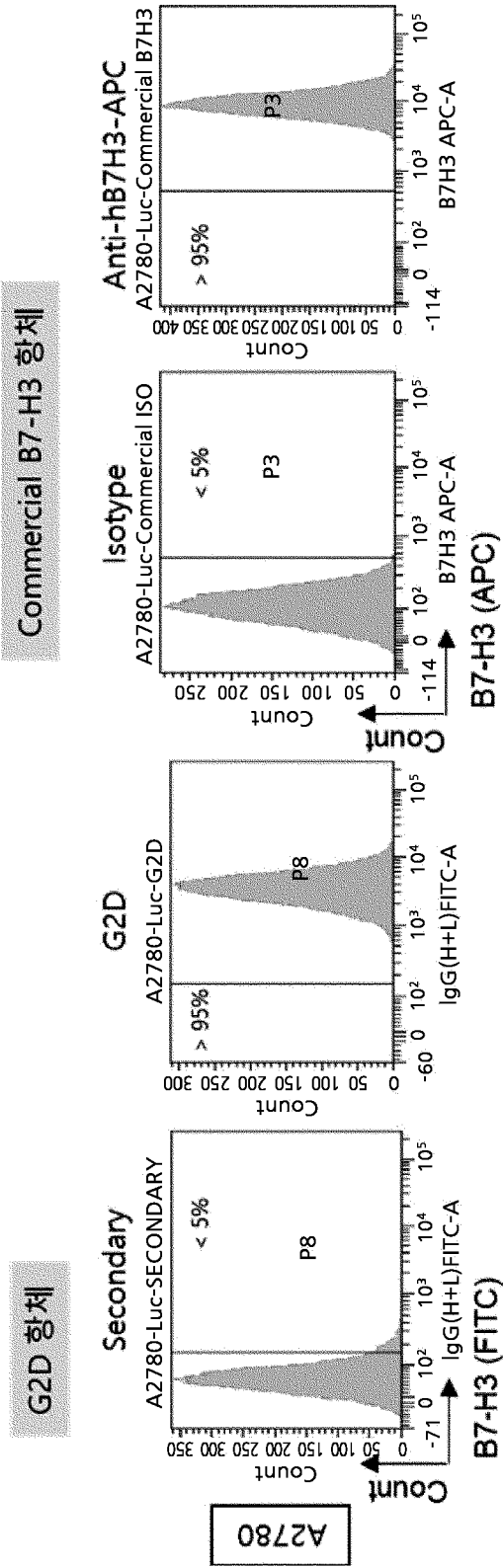
[표 13]

Commercial B7-H3 항체

G2D 항체



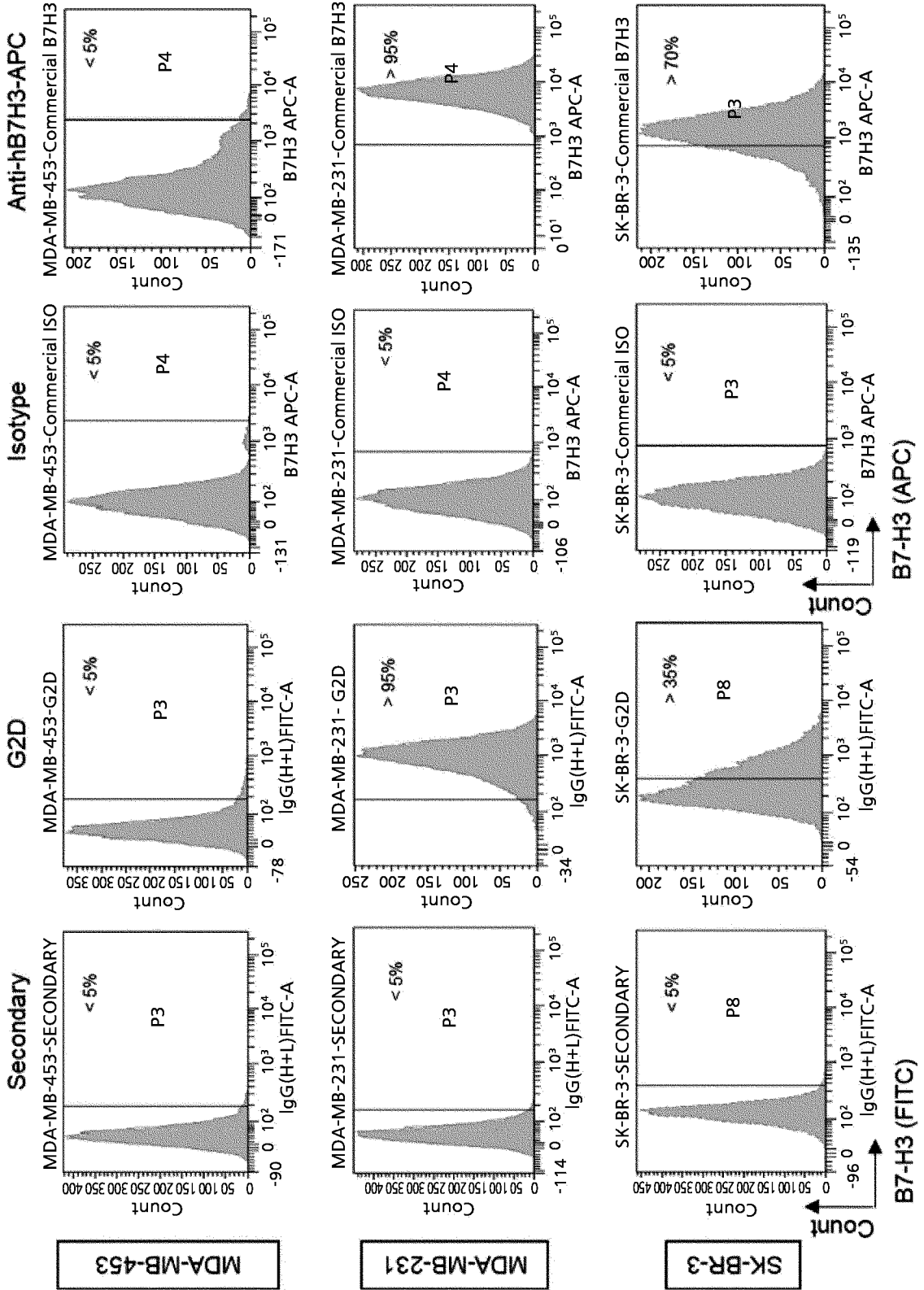
[도 14]



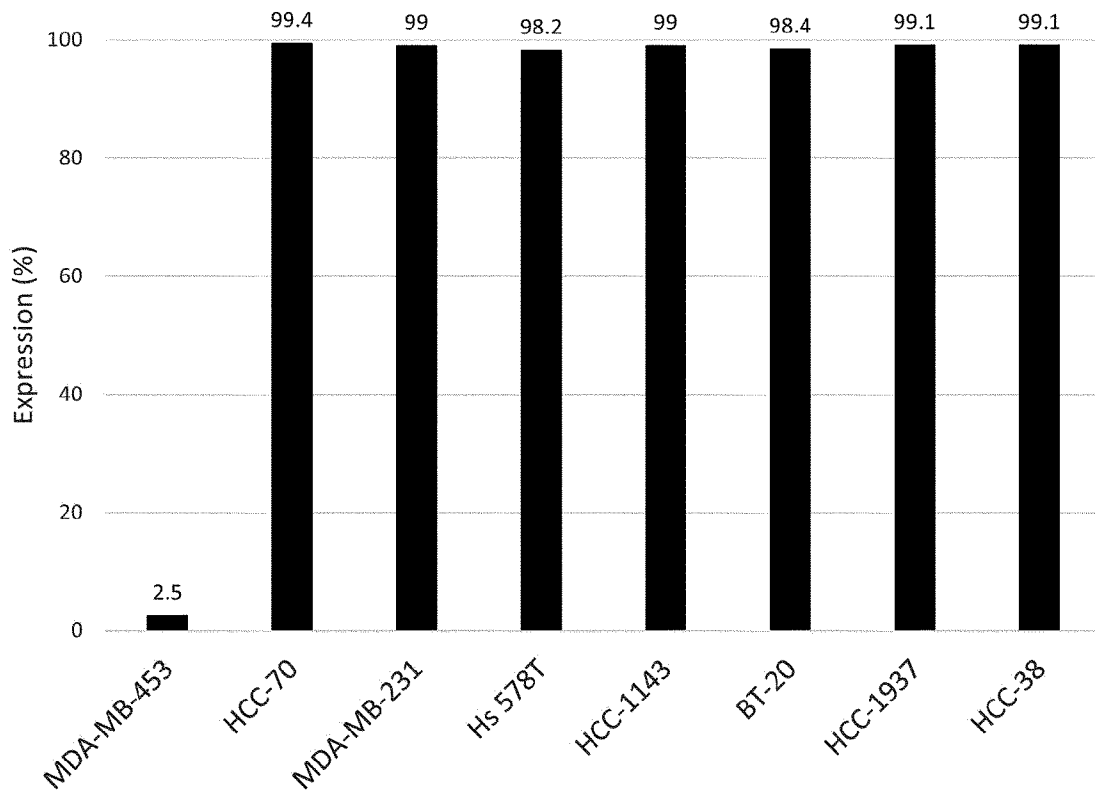
[표 15]

Commercial B7-H3 항체

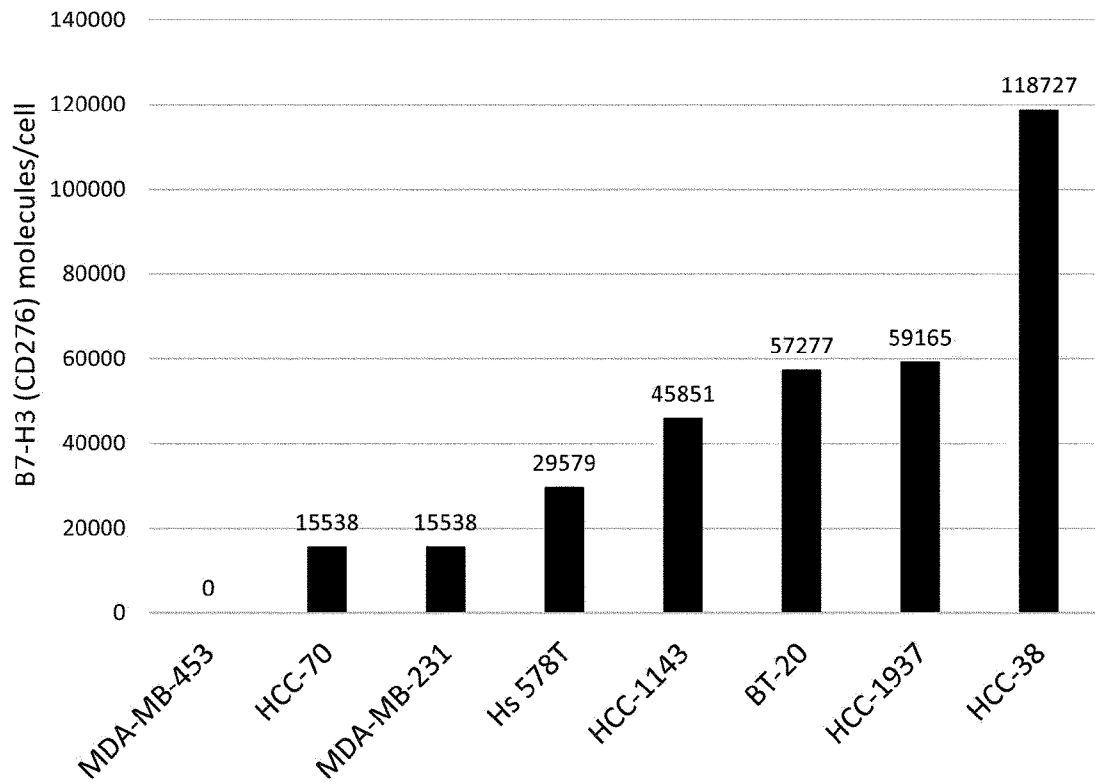
G2D 항체



[도 16]



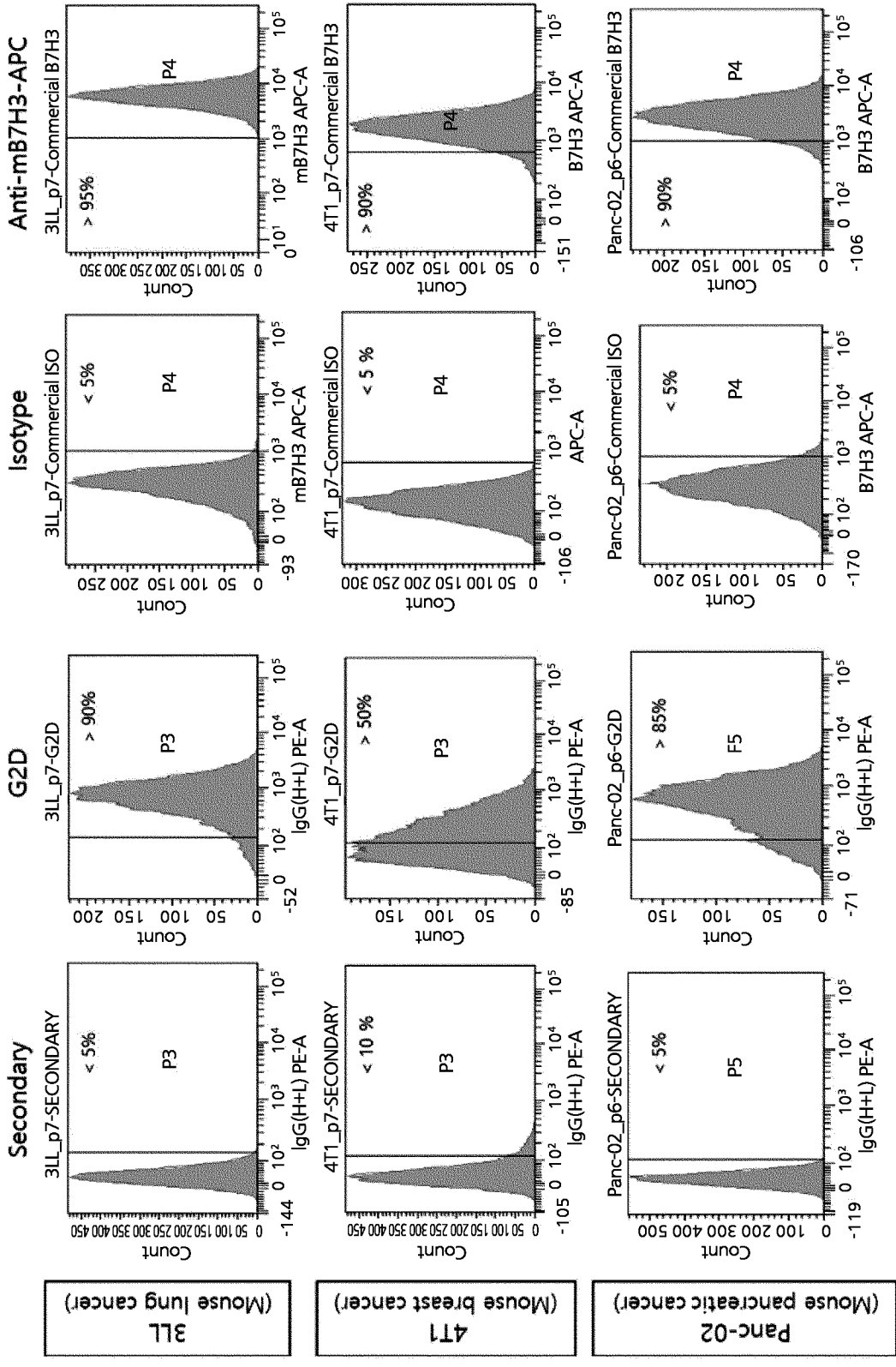
[도 17]



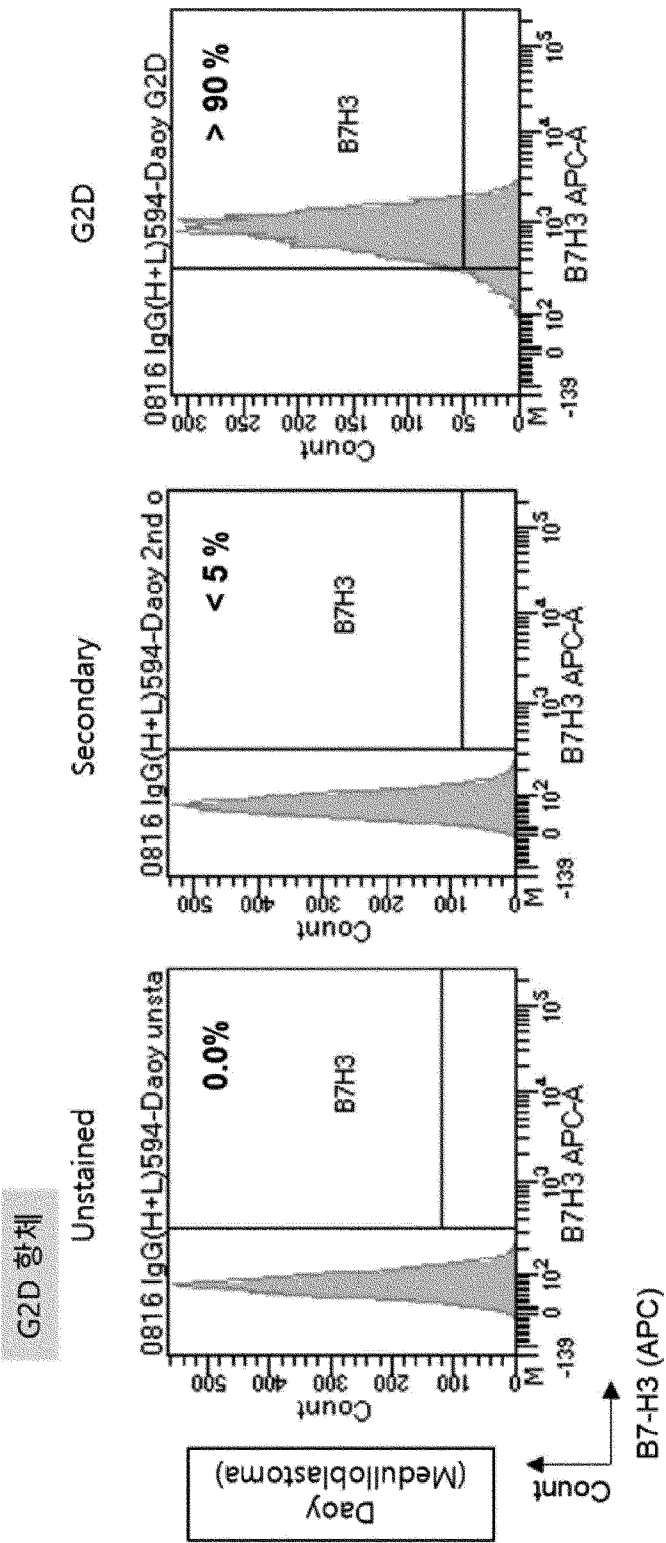
[표 18]

Commercial B7-H3 항체

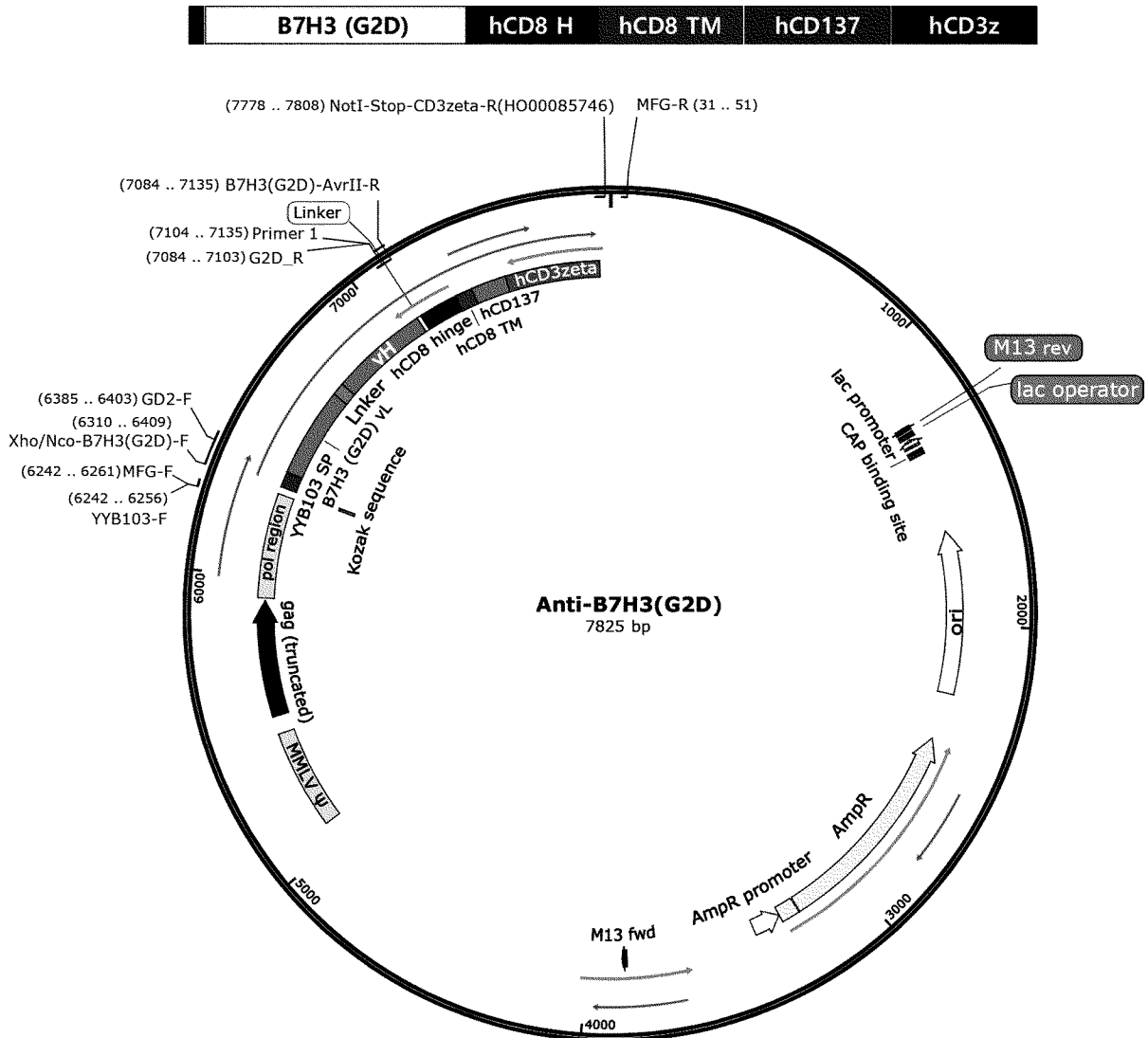
G2D 항체



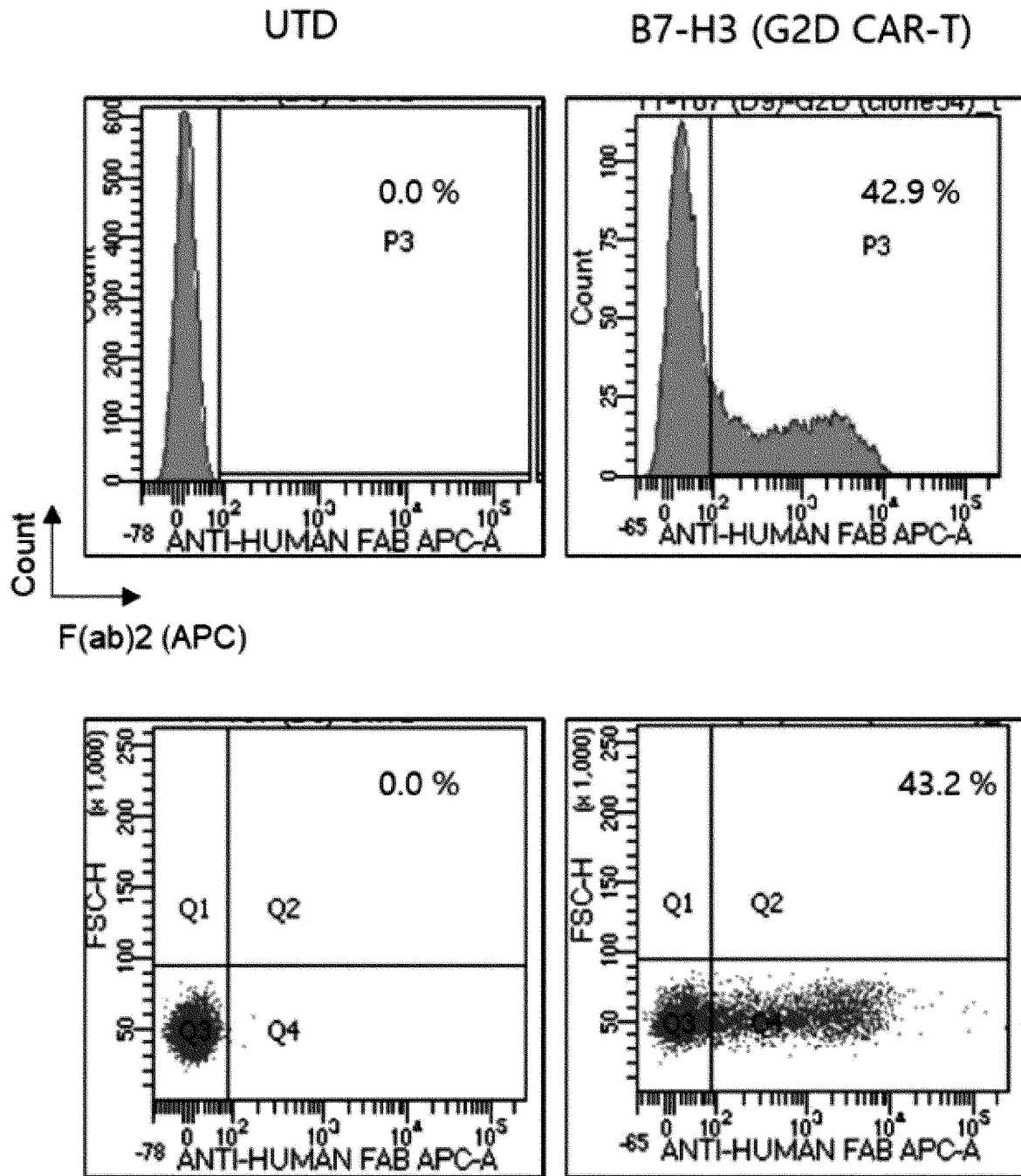
[도 19]



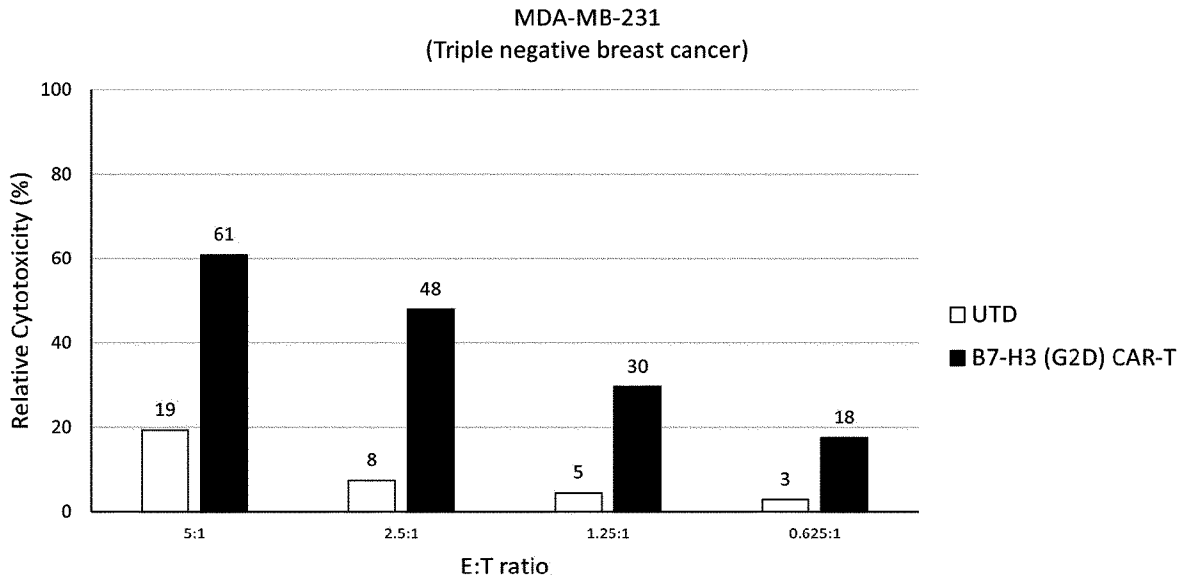
[도 20]



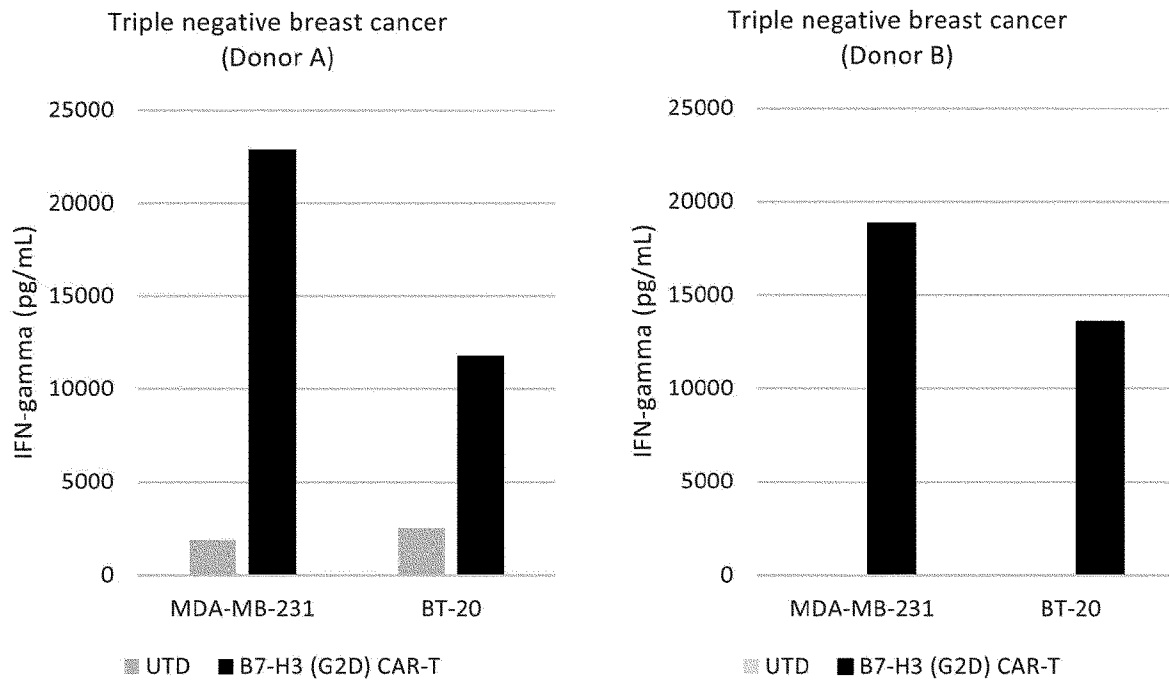
[도21]



[도22]

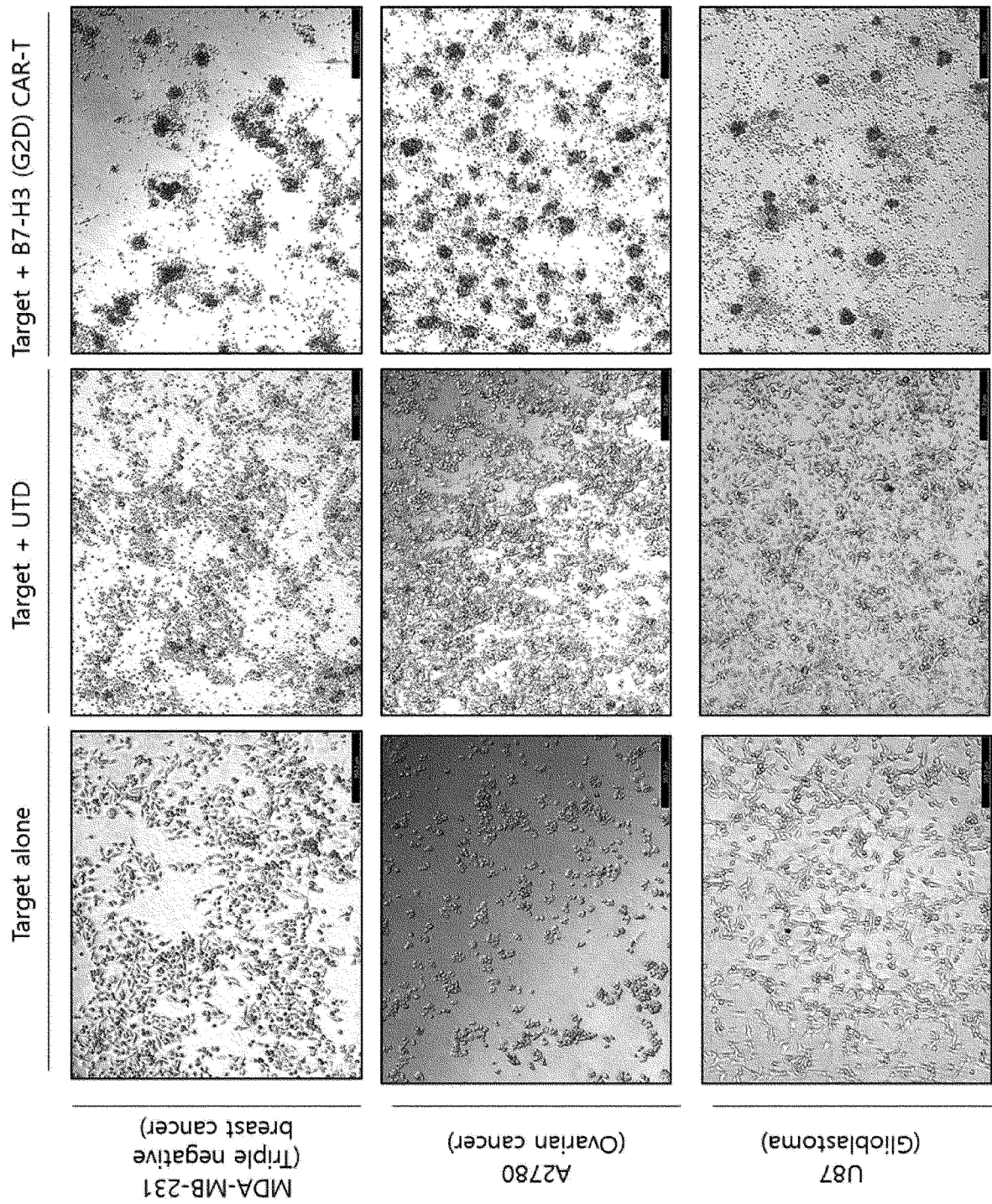


[도23]

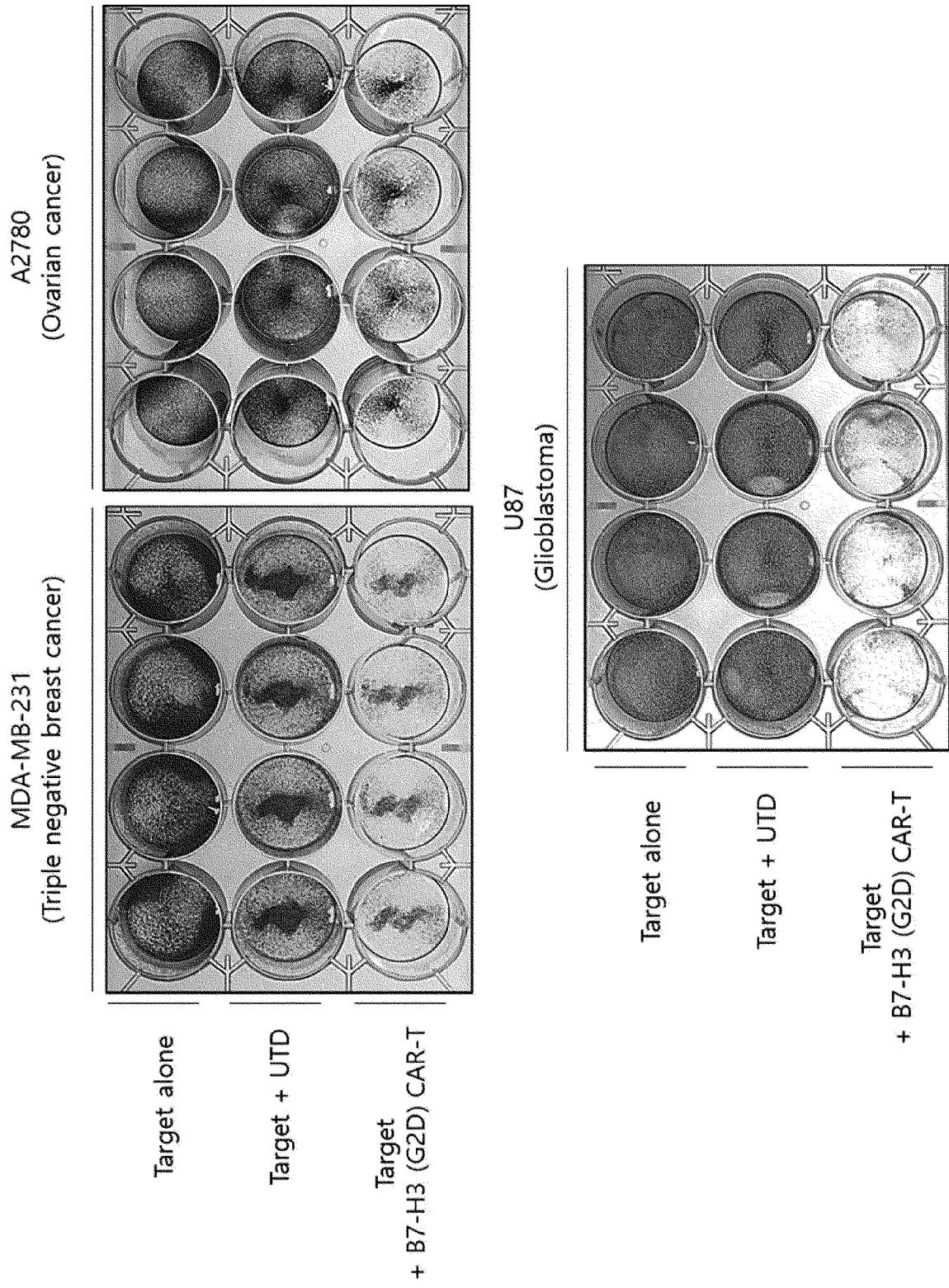


Donor	T Cells	T cells + MDA-MB-231	T cells + BT-20
Donor A	UTD	1896	2524
	B7-H3 (G2D) CAR-T	22889	11785
Donor B	UTD	33	0
	B7-H3 (G2D) CAR-T	18822	13552

[도24]



[도25]



[도27]

Non-small-cell lung cancer (H1299)

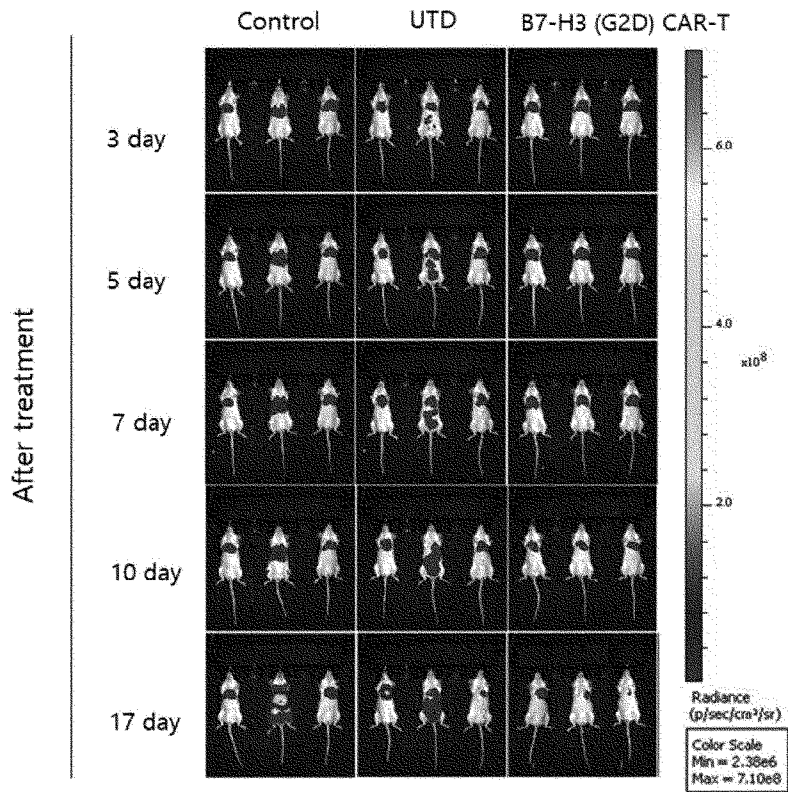
Tumor implantation

- H1299-Luc
- 5×10^5 cells/50ul

CAR-T injection

- UTD and B7-H3 (G2D) CAR-T IV injection
- 5×10^7 cells/300ul

In vivo imaging analysis



[도28]

leptomeningeal metastasis cancer (BM-H1299)

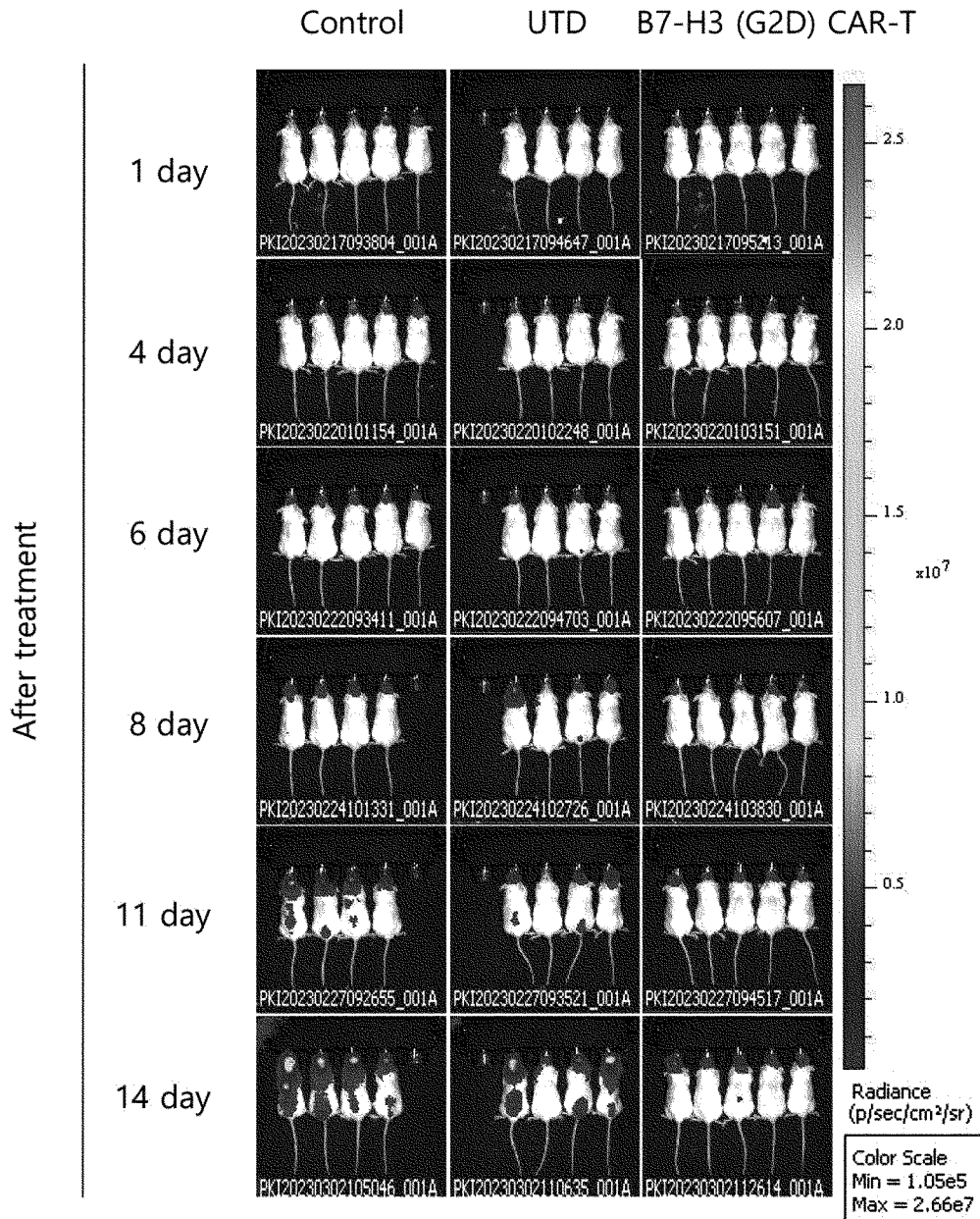
Tumor implantation

- BM H1299-Luc
- 5×10^4 cells/5ul

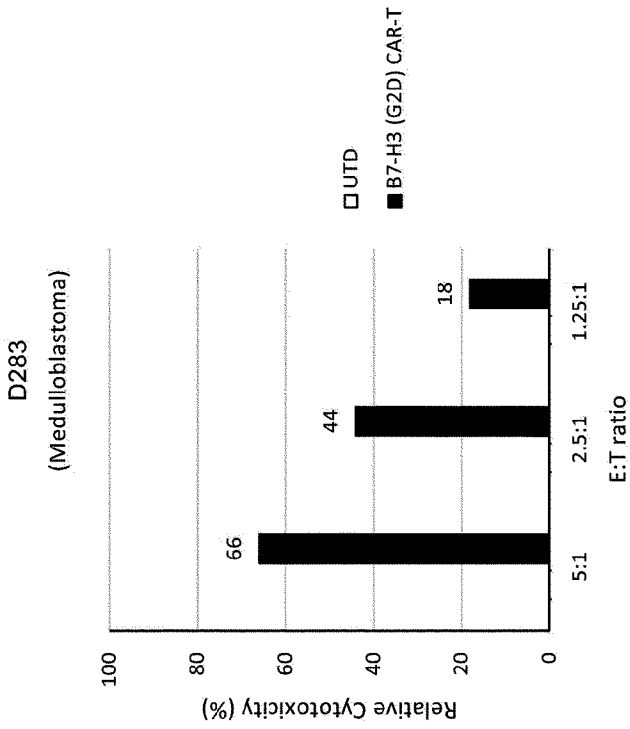
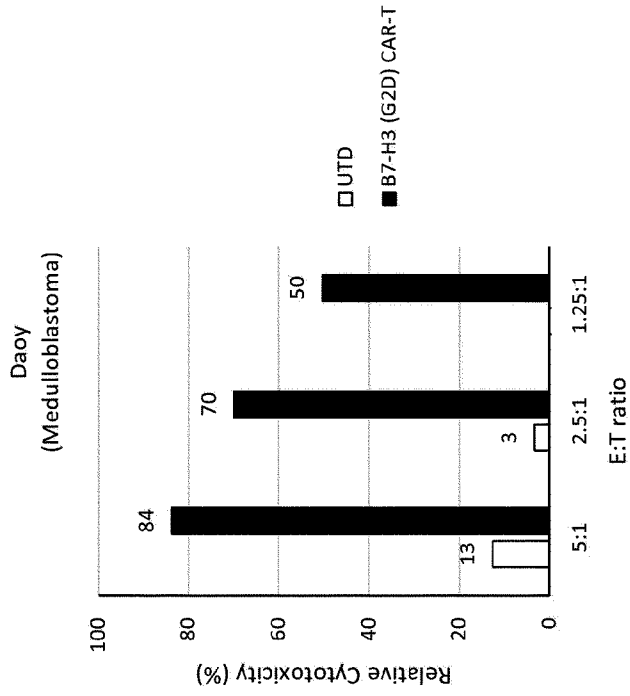
CAR-T injection

- UTD and B7-H3 (G2D) CAR-T ICV injection
- 1.5×10^6 cells/5ul

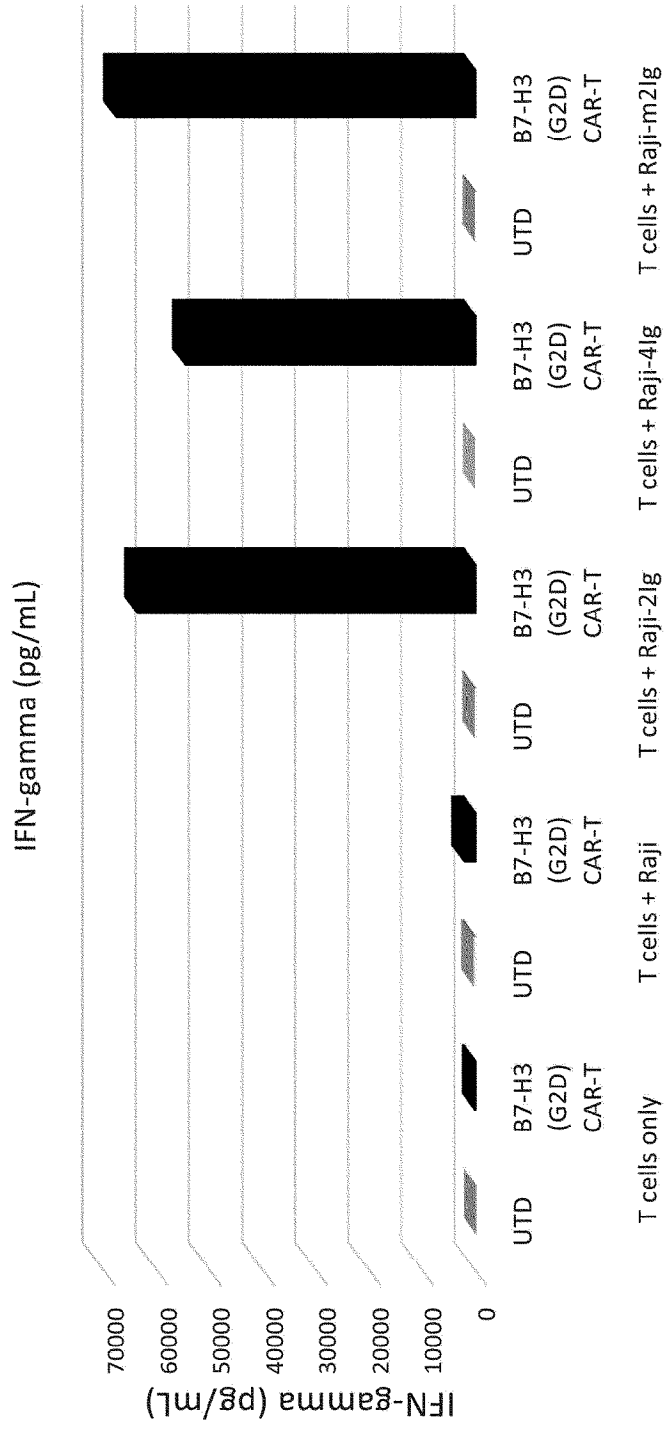
In vivo imaging analysis



[도29]



[도31]



Cells	T cells only	T cells + Raji	T cells + Raji-2Ig	T cells + Raji-4Ig	T cells + Raji-m2Ig
UTD	12	522	332	212	302
B7-H3 (G2D) CAR-T	342	2342	63912	54912	67942

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/018364

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 14/725(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K 14/725(2006.01); A61K 35/17(2015.01); A61K 39/395(2006.01); A61P 35/00(2006.01); A61P 37/04(2006.01); C07K 16/28(2006.01); C12N 15/13(2006.01); C12N 15/62(2006.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: B7-H3, 항원 결합 도메인(antigen binding domain), 힌지 영역(hinge region), 막관통 도메인(transmembrane domain), 보조 자극 도메인(co-stimulatory domain), 세포질 신호 전달 도메인 (intracellular signaling domain), 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor, CAR)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2021-534784 A (SEATTLE CHILDREN'S HOSPITAL (DBA SEATTLE CHILDREN'S RESEARCH INSTITUTE)) 16 December 2021 (2021-12-16) See claims 1, 7, 13, 30, 34, 37-40 and 71-72; and paragraph [0105].	1,9-14,16-20,22 2-8,15
X	MAJZNER, R. G. et al. CAR T Cells Targeting B7-H3, a Pan-Cancer Antigen, Demonstrate Potent Preclinical Activity Against Pediatric Solid Tumors and Brain Tumors. Clin Cancer Res. 15 April 2019, vol. 25, no. 8, pp. 2560-2574. See abstract; and pages 2562 and 2571-2572.	1,9-14,16-20,22
X	WO 2021-244721 A1 (Y-MABS THERAPEUTICS, INC.) 09 December 2021 (2021-12-09) See abstract; and pages 1-2.	1,13-14,16-20,22
A	KR 10-2011789 B1 (CELLABMED INC.) 19 August 2019 (2019-08-19) See entire document.	1-20,22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 February 2024		Date of mailing of the international search report 23 February 2024
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/018364

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 9381244 B2 (THE TRUSTEES OF DARTMOUTH COLLEGE) 05 July 2016 (2016-07-05) See entire document.	1-20, 22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/018364

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **21**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 21 pertains to a method for treatment of the human body, and thus pertains to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/018364

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
JP	2021-534784	A	16 December 2021	CN	113039206	A	25 June 2021
				EP	3844191	A1	07 July 2021
				US	2021-0324083	A1	21 October 2021
				WO	2020-047257	A1	05 March 2020

WO	2021-244721	A1	09 December 2021	CN	115768522	A	07 March 2023
				EP	4161649	A1	12 April 2023
				JP	2023-528344	A	04 July 2023
				KR	10-2023-0024326	A	20 February 2023
				US	2023-0312721	A1	05 October 2023

KR	10-2011789	B1	19 August 2019	CN	108026534	A	11 May 2018
				CN	108026534	B	31 August 2021
				EP	3333264	A1	13 June 2018
				EP	3333264	B1	31 March 2021
				EP	3575403	A1	04 December 2019
				JP	2018-522904	A	16 August 2018
				JP	6751493	B2	09 September 2020
				KR	10-2017-0142995	A	28 December 2017
				US	10975148	B2	13 April 2021
				US	2018-0265585	A1	20 September 2018
				WO	2017-023138	A1	09 February 2017

US	9381244	B2	05 July 2016	AU	2013-312211	A1	16 April 2015
				AU	2015-312211	A1	16 April 2015
				AU	312211	B2	29 March 2018
				CA	2884704	A1	13 March 2014
				CA	2884704	C	04 April 2023
				CN	105246507	A	13 January 2016
				CN	105246507	B	25 January 2019
				CN	109793893	A	24 May 2019
				CN	109793893	B	26 May 2023
				EP	2892558	A1	15 July 2015
				EP	2892558	A4	20 April 2016
				EP	2892558	B1	10 April 2019
				EP	3552628	A1	16 October 2019
				JP	2015-533796	A	26 November 2015
				JP	2018-188451	A	29 November 2018
				JP	6368308	B2	01 August 2018
				JP	6917952	B2	11 August 2021
				US	11529416	B2	20 December 2022
				US	2014-0105912	A1	17 April 2014
				US	2017-0112929	A1	27 April 2017
				US	2020-0085947	A1	19 March 2020
US	2023-0338525	A1	26 October 2023				
WO	2014-039983	A1	13 March 2014				

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 14/725(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 14/725(2006.01); A61K 35/17(2015.01); A61K 39/395(2006.01); A61P 35/00(2006.01); A61P 37/04(2006.01); C07K 16/28(2006.01); C12N 15/13(2006.01); C12N 15/62(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: B7-H3, 항원 결합 도메인(antigen binding domain), 힌지 영역(hinge region), 막관통 도메인(transmembrane domain), 보조 자극 도메인(co-stimulatory domain), 세포질 신호 전달 도메인(intracellular signaling domain), 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor, CAR)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X A	JP 2021-534784 A (시애틀 칠드런스 병원 (디비에이 시애틀 칠드런스 리서치 협회)) 2021.12.16 청구항 1, 7, 13, 30, 34, 37-40, 71-72; 단락 [0105]	1,9-14,16-20,22 2-8,15
X	MAJZNER, R. G. 등, 'CAR T Cells Targeting B7-H3, a Pan-Cancer Antigen, Demonstrate Potent Preclinical Activity Against Pediatric Solid Tumors and Brain Tumors', Clin Cancer Res. 2019.04.15, 제 25권, 제8호, 2560-2574 페이지 요약; 페이지 2562, 2571-2572	1,9-14,16-20,22
X	WO 2021-244721 A1 (Y-MABS THERAPEUTICS, INC.) 2021.12.09 요약; 페이지 1-2	1,13-14,16-20,22
A	KR 10-2011789 B1 (주식회사 셀랩메드) 2019.08.19 전체 문헌	1-20,22
<input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일	
2024년02월22일 (22.02.2024)	2024년02월23일 (23.02.2024)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관	
대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	허주형 전화번호 +82-42-481-5373	

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 9381244 B2 (THE TRUSTEES OF DARTMOUTH COLLEGE) 2016.07.05 전체 문헌	1-20,22

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))
 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부

2. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다

3. 추가 의견:

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

- 1. 청구항: 21
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉, 청구항 21은 인체의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
- 2. 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
- 3. 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 2021-534784 A	2021/12/16	CN 113039206 A	2021/06/25
		EP 3844191 A1	2021/07/07
		US 2021-0324083 A1	2021/10/21
		WO 2020-047257 A1	2020/03/05
WO 2021-244721 A1	2021/12/09	CN 115768522 A	2023/03/07
		EP 4161649 A1	2023/04/12
		JP 2023-528344 A	2023/07/04
		KR 10-2023-0024326 A	2023/02/20
		US 2023-0312721 A1	2023/10/05
KR 10-2011789 B1	2019/08/19	CN 108026534 A	2018/05/11
		CN 108026534 B	2021/08/31
		EP 3333264 A1	2018/06/13
		EP 3333264 B1	2021/03/31
		EP 3575403 A1	2019/12/04
		JP 2018-522904 A	2018/08/16
		JP 6751493 B2	2020/09/09
		KR 10-2017-0142995 A	2017/12/28
		US 10975148 B2	2021/04/13
		US 2018-0265585 A1	2018/09/20
		WO 2017-023138 A1	2017/02/09
		US 9381244 B2	2016/07/05
AU 2015-312211 A1	2015/04/16		
AU 312211 B2	2018/03/29		
CA 2884704 A1	2014/03/13		
CA 2884704 C	2023/04/04		
CN 105246507 A	2016/01/13		
CN 105246507 B	2019/01/25		
CN 109793893 A	2019/05/24		
CN 109793893 B	2023/05/26		
EP 2892558 A1	2015/07/15		
EP 2892558 A4	2016/04/20		
EP 2892558 B1	2019/04/10		
EP 3552628 A1	2019/10/16		
JP 2015-533796 A	2015/11/26		
JP 2018-188451 A	2018/11/29		
JP 6368308 B2	2018/08/01		
JP 6917952 B2	2021/08/11		
US 11529416 B2	2022/12/20		
US 2014-0105912 A1	2014/04/17		
US 2017-0112929 A1	2017/04/27		
US 2020-0085947 A1	2020/03/19		
US 2023-0338525 A1	2023/10/26		
WO 2014-039983 A1	2014/03/13		