



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0079574  
(43) 공개일자 2022년06월13일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/725 (2006.01)  
C12N 5/0783 (2010.01) G01N 33/68 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07K 16/2866 (2013.01)  
A61P 35/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7013483
- (22) 출원일자(국제) 2022년10월09일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년04월21일
- (86) 국제출원번호 PCT/AU2020/051090
- (87) 국제공개번호 WO 2021/068040  
국제공개일자 2021년04월15일
- (30) 우선권주장  
2019903802 2019년10월09일 오스트레일리아(AU)

- (71) 출원인  
더 카운실 오브 더 퀸즐랜드 인스티튜트 오브 메디컬 리서치  
오스트레일리아 4006 퀸즐랜드 허스톤 허스톤 로드 300
- (72) 발명자  
칸나 라지브  
오스트레일리아, 퀸즐랜드 4006, 허스톤, 300 허스톤 로드  
마틴스 호세 파울로  
오스트레일리아, 퀸즐랜드 4006, 허스톤, 300 허스톤 로드, 씨/-더 카운실 오브 더 퀸즐랜드 인스티튜트 오브 메디컬 리서치
- (74) 대리인  
특허법인한얼

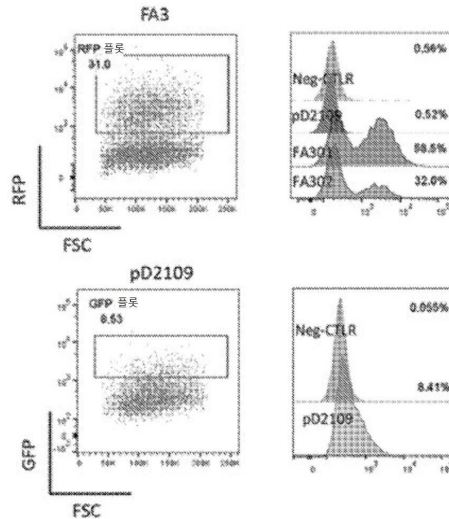
전체 청구항 수 : 총 75 항

(54) 발명의 명칭 EPHA3 표적화 및 이의 용도

(57) 요약

EphA3을 적어도 특이적으로 인식하거나 결합할 수 있는 항원-결합 분자 및 키메라 항원 수용체(CAR)가 개시되어 있다. 또한 의학적 치료 및 예방 방법이 개시되어 있다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

**C07K 14/7051** (2013.01)

**C12N 5/0636** (2013.01)

**G01N 33/68** (2013.01)

**C07K 2317/56** (2013.01)

**C07K 2317/622** (2013.01)

**C07K 2319/02** (2013.01)

**C07K 2319/03** (2013.01)

**C12N 2510/00** (2013.01)

**G01N 2333/715** (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

서열 번호 13-72 및/또는 표 4-7에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 적어도 하나의 상보성 결정 영역(complementarity determining region; CDR)을 포함하는, 임의로 단리된, EphA3 결합제(binding agent).

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

(a) 서열 번호 13-17 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 1; 서열 번호 18 내지 22 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR; 및 서열 번호 23 내지 27 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 3을 포함하는 중쇄 면역글로불린 가변 영역(VH) 폴리펩티드; 및/또는

(b) 서열 번호 28-32 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 1; 서열 번호 33-37 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 2; 및 서열 번호 38-42 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 3을 포함하는 경쇄 면역글로불린 가변 영역(VL) 폴리펩티드를 포함하는 EphA3 결합제.

#### 청구항 3

제2항에 있어서,

(a) VH 폴리펩티드가 서열 번호 153에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 포함하고/하거나;

(b) VL 폴리펩티드가 서열 번호 154에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 EphA3 결합제.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

(a) 서열 번호 43-47 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 1; 서열 번호 48-52 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 2; 및 서열 번호 53-57 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 3을 포함하는 VH 폴리펩티드; 및/또는

(b) 서열 번호 58-62 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 1; 서열 번호 63-67 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 2; 및 서열 번호 68-72 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 3을 포함하는 VL 폴리펩티드를 포함하는 EphA3 결합제.

#### 청구항 5

제4항에 있어서,

(a) VH 폴리펩티드가 서열 번호 155에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 포함하고/하거나;

(b) VL 폴리펩티드가 서열 번호 156에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 EphA3 결합제.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 EphA3 결합제가 항체 또는 항체 단편인 EphA3 결합제.

**청구항 7**

제6항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편이 3C3-1 또는 2D4-1 단클론 항체(monoclonal antibody) 또는 이의 단편인 EphA3 결합제.

**청구항 8**

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 EphA3 결합제가 재조합, 인간 또는 인간화(humanized) 항체, 또는 항체 단편인 EphA3 결합제.

**청구항 9**

(i) 하기 CDR을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

서열 번호 16의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

서열 번호 22의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

서열 번호 27의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3; 및

(ii) 하기 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

서열 번호 32의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1;

서열 번호 37의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2;

서열 번호 42의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3;

을 포함하는, EphA3에 결합할 수 있는 항원-결합 분자(antigen-binding molecule).

**청구항 10**

(i) 하기 CDR을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

서열 번호 47의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

서열 번호 52의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

서열 번호 57의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3

(ii) 하기 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

서열 번호 62의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1;

서열 번호 67의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2;

서열 번호 72의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3;

을 포함하는, EphA3에 결합할 수 있는 항원-결합 분자.

**청구항 11**

제9항에 있어서, 상기 항원-결합 분자가

서열 번호 153의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성(sequence identity)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및

서열 번호 154의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역을 포함하는 항원-결합 분자.

**청구항 12**

제10항에 있어서, 상기 항원-결합 분자가

서열 번호 155의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및

서열 번호 156의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역을 포

함하는 항원-결합 분자.

**청구항 13**

(i) 제9항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 항원-결합 분자, 및 (ii) EphA3 이외의 항원에 결합할 수 있는 항원-결합 분자를 포함하는 항원-결합 분자.

**청구항 14**

제9항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 항원-결합 분자를 포함하는 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor; CAR).

**청구항 15**

서열 번호 1-12에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 적어도 하나의 CDR을 포함하는 항원 결합 도메인, 막관통 도메인(transmembrane domain), 및 세포내 T-세포 신호전달(signalling) 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR).

**청구항 16**

제15항에 있어서, 상기 항원 결합 도메인이

- (a) 서열 번호 13-17 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 1; 서열 번호 18 내지 22 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR; 및 서열 번호 23 내지 27 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 3을 포함하는 중쇄 면역글로불린 가변 영역(VH) 폴리펩티드; 및/또는
- (b) 서열 번호 28-32 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 1; 서열 번호 33-37 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 2; 및 서열 번호 38-42 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 3을 포함하는 경쇄 면역글로불린 가변 영역(VL) 폴리펩티드를 포함하거나, 이로 구성되거나, 이로 본질적으로 구성되는 CAR.

**청구항 17**

제16항에 있어서,

- (a) VH 폴리펩티드가 서열 번호 153에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 포함하고/하거나;
- (b) VL 폴리펩티드가 서열 번호 154에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 CAR.

**청구항 18**

제15항에 있어서, 상기 항원 결합 도메인이

- (a) 서열 번호 43-47 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 1; 서열 번호 48-52 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 2; 및 서열 번호 53-57 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 3을 포함하는 VH 폴리펩티드; 및/또는
- (b) 서열 번호 58-62 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 1; 서열 번호 63-67 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 2; 및 서열 번호 68-72 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 3을 포함하는 VL 폴리펩티드를 포함하거나, 이로 구성되거나, 이로 본질적으로 구성되는 CAR.

**청구항 19**

제18항에 있어서,

- (a) VH 폴리펩티드가 서열 번호 155에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 포함하고/하거나;
- (b) VL 폴리펩티드가 서열 번호 156에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열

을 포함하는 CAR.

**청구항 20**

제15항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 도메인이 서열 번호 158에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 링커(linker)와 같은 링커를 포함하는 CAR.

**청구항 21**

제14항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 리더 서열(leader sequence)을 추가로 포함하는 CAR.

**청구항 22**

제21항에 있어서, 상기 리더 서열이 서열 번호 157에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 이로 본질적으로 구성되는 CAR.

**청구항 23**

제14항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 막관통 도메인이 CD8 막관통 도메인을 포함하는 CAR.

**청구항 24**

제23항에 있어서, 상기 CD8 막관통 도메인이 서열 번호 159에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 CAR.

**청구항 25**

제14항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포내 신호전달 도메인이 CD3 제타(zeta) 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 CAR.

**청구항 26**

제25항에 있어서, 상기 세포내 신호전달 도메인이 서열 번호 162에 제시된 CD3 제타 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 CAR.

**청구항 27**

제14항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 161에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CD28 공동-자극 도메인(co-stimulatory domain) 및/또는 서열 번호 160에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CD137 공동-자극 도메인과 같은 하나 이상의 공동-자극 도메인을 추가로 포함하는 CAR.

**청구항 28**

대상체(subject)에서 암의 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 EphA3 결합제, 또는 제9항 내지 제13항 중 어느 한 항의 항원-결합 분자, 또는 제14항 내지 제27항 중 어느 한 항의 CAR.

**청구항 29**

제1항 내지 제8항 및 제28항 중 어느 한 항에 따른 EphA3 결합제, 또는 제15항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 CAR을 암호화(encoding)하는 단리된 핵산.

**청구항 30**

제29항의 단리된 핵산을 포함하는 유전자 작제물(genetic construct).

**청구항 31**

제9항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 항원 결합 분자, 또는 제14항에 따른 CAR을 암호화하는, 임의로 단리된 핵산 또는 다수의 핵산.

**청구항 32**

제31항에 따른 핵산 또는 다수의 핵산을 포함하는, 발현 벡터(expression vector) 또는 다수의 발현 벡터.

**청구항 33**

제9항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 항원-결합 분자, 제14항에 따른 CAR, 제31항에 따른 핵산 또는 다수의 핵산, 또는 제32항에 따른 발현 벡터 또는 다수의 발현 벡터를 포함하는 세포.

**청구항 34**

제29항의 핵산 및/또는 제30항의 유전자 작제물을 포함하는 숙주 세포(host cell).

**청구항 35**

제34항에 있어서, 상기 숙주 세포가 T-세포이거나 T-세포를 포함하는 숙주 세포.

**청구항 36**

(i) 제34항 또는 제35항의 숙주 세포를 배양하는 단계; 및 (ii) 단계 (i)에서 배양된 상기 숙주 세포로부터 상기 EphA3 결합제 또는 CAR을 단리하는 단계를 포함하여, 단리된 EphA3 결합제 또는 CAR을 생산하는 방법.

**청구항 37**

핵산(들) 또는 발현 벡터(들)로부터의 항원-결합 분자 또는 CAR의 발현에 적합한 조건하에서, 제31항에 따른 핵산 또는 다수의 핵산, 또는 제32항에 따른 발현 벡터 또는 다수의 발현 벡터를 포함하는 세포를 배양하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 38**

(i) 제1항 내지 제8항 및 제28항 중 어느 한 항에 따른 EphA3 결합제; 및/또는  
 (ii) 제15항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 CAR에 결합하고/하거나 이에 대해 발생(raising)하는 항체 또는 항체 단편.

**청구항 39**

제1항 내지 제8항 및 제28항 중 어느 한 항에 따른 EphA3 결합제, 제15항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 CAR, 제29항에 따른 단리된 핵산, 제30항에 따른 유전자 작제물 및/또는 제34항 또는 제35항에 따른 숙주 세포 및 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 조성물.

**청구항 40**

제9항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 항원-결합 분자, 제14항에 따른 CAR, 제31항에 따른 핵산 또는 다수의 핵산, 또는 제32항에 따른 발현 벡터 또는 다수의 발현 벡터, 또는 제33항의 세포를 포함하는 조성물.

**청구항 41**

제40항에 있어서, 제제(예를 들어, 체크포인트 억제제(checkpoint inhibitor)와 같은 면역요법제)를 추가로 포함하는 조성물.

**청구항 42**

치료학적 유효량의 제1항 내지 제8항 및 제28항 중 어느 한 항에 따른 EphA3 결합제, 제15항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 CAR, 제29항에 따른 단리된 핵산, 제30항에 따른 유전자 작제물, 제34항 또는 제35항에 따른 숙주 세포, 및/또는 제39항의 조성물을 대상체에게 투여하여 대상체에서 암을 치료 또는 예방하는 단계를 포함하여, 대상체에서 암을 치료 또는 예방하는 방법.

**청구항 43**

대상체에서 암의 예방 및/또는 치료를 위한 약제의 제조에 있어서의, 제1항 내지 제8항 및 제28항 중 어느 한

항의 EphA3 결합제, 제15항 내지 제27항 중 어느 한 항의 CAR, 제29항에 따른 단리된 핵산, 제30항에 따른 유전자 작제물 및/또는 제34항 또는 제35항에 따른 숙주 세포의 용도.

**청구항 44**

암이 다형성 교모세포종(glioblastoma multiforme)인, 제28항의 EphA3 결합제 또는 CAR, 제42항의 방법 또는 제43항의 용도.

**청구항 45**

제1항 내지 제8항 및 제28항 중 어느 한 항에 따른 EphA3 결합제, 또는 제15항 내지 제28항 중 어느 한 항에 따른 CAR과 EphA3 사이에 복합체(complex)를 형성하여 EphA3 또는 EphA3을 발현하는 세포를 검출하는 단계를 포함하여, EphA3 또는 EphA3을 발현하는 세포를 검출하는 방법.

**청구항 46**

제45항에 있어서, 상기 세포가 암세포이거나 암세포를 포함하는 방법.

**청구항 47**

서열 번호 13 내지 156 및/또는 표 2-5 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 구성되거나 이로 구성되는 단리된 단백질.

**청구항 48**

서열 번호 1 내지 12 및/또는 표 1 중 어느 하나에 제시된 핵산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 핵산 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나 이로 본질적으로 구성되는 단리된 핵산.

**청구항 49**

(a) CMV 항원에 결합함으로써 활성화되는 T-세포 수용체(TCR); 및 (b) EphA3 상의 에피토프(epitope)에 결합하는 항원-결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 인간 T-세포.

**청구항 50**

(내용 없음).

**청구항 51**

제49항에 있어서, 상기 항원-결합 도메인이 중쇄 가변(VH) 영역 및 경쇄 가변(VL) 영역을 포함하는 scFv인 T-세포.

**청구항 52**

(a) CMV 항원에 특이적인 TCR을 발현하는 T-세포 수용체(TCR); 및 (b) EphA3에 결합하는 항원-결합 분자를 포함하는 T-세포.

**청구항 53**

제52항에 있어서, 상기 항원-결합 분자가 중쇄 가변(VH) 영역 및 경쇄 가변(VL) 영역을 포함하는 scFv인 T-세포.

**청구항 54**

제52항 또는 제53항에 있어서, 상기 항원-결합 분자가 CAR인 T-세포.

**청구항 55**

제51항, 제53항 또는 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 VH 영역이 서열 번호 153에 제시된 아미노산 서열을 갖고, VL 영역이 서열 번호 154에 제시된 아미노산 서열을 갖는 T-세포.

**청구항 56**

제51항, 제53항 또는 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 VH 영역이 서열 번호 155에 제시된 아미노산 서열을 갖고, VL 영역이 서열 번호 156에 제시된 아미노산 서열을 갖는 T-세포.

**청구항 57**

제49항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CAR이 CD4, CD8, 및 CD28 막관통 도메인으로부터 선택된 막관통 도메인을 포함하는 T-세포.

**청구항 58**

제49항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CAR이 4-1BB 또는 CD28 공동-자극 도메인으로부터 선택된 공동자극 도메인을 포함하는 T-세포.

**청구항 59**

제49항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CMV 항원이 pp50, pp65, IE-1, gB 및 gH 중 하나 이상으로부터 유래된 펩티드를 포함하는 T-세포.

**청구항 60**

제49항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CMV 항원이 서열 번호 181-211에 제시된 아미노산 서열로부터 선택된 펩티드를 포함하는 T-세포.

**청구항 61**

(a) 대상체로부터 PBMC를 포함하는 세포의 집단(population)을 수득하고 세포를 처리하여 CMV 항원에 결합하는 TCR을 발현하는 T-세포의 하위집단(subpopulation)을 수득하는 단계;

(b) 세포의 하위집단을 처리하여 EphA3의 에피토프에 결합하는 CAR을 암호화하는 벡터를 도입함으로써, CMV 항원에 결합하는 TCR 및 EphA3 상의 에피토프에 결합하는 CAR을 발현하는 이중특이적(bispecific) T-세포의 집단을 생성하는 단계; 및

(c) 이중특이적 T-세포의 집단을 확장시키는 단계를 포함하여, 암을 치료하는데 사용하기 위한 이중특이적 T-세포 집단을 제조하는 방법.

**청구항 62**

제61항에 있어서, 상기 CAR이 EphA3 상의 에피토프에 결합하는 항원-결합 도메인, 스페이서(spacer), 막관통 도메인, 공동-자극 도메인, 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 방법.

**청구항 63**

제62항에 있어서, 상기 항원-결합 도메인이 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 scFv인 방법.

**청구항 64**

제63항에 있어서, 상기 중쇄 가변(VH) 영역이 서열 번호 153에 제시된 아미노산 서열을 갖고, 경쇄 가변(VL) 영역이 서열 번호 154에 제시된 아미노산 서열을 갖는 방법.

**청구항 65**

제63항에 있어서, 상기 중쇄 가변(VH) 영역이 서열 번호 155에 제시된 아미노산 서열을 갖고, 경쇄 가변(VL) 영역이 서열 번호 156에 제시된 아미노산 서열을 갖는 방법.

**청구항 66**

제62항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 막관통 도메인이 CD4, CD8, 또는 CD28 막관통 도메인인 방법.

**청구항 67**

제62항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 공동-자극 도메인이 4-1BB 또는 CD28 공동-자극 도메인인 방법.

**청구항 68**

제62항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (a)에서 세포를 처리하는 것이 펩티드-특이적 T-세포의 증식을 유도할 수 있는 HLA 클래스 I 및 클래스 II-제한된 CMV 펩티드 에피토프를 포함하는 면역원성 펩티드의 풀(pool)에 T-세포를 노출시킴을 포함하는 방법.

**청구항 69**

제62항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T-세포가 CMV 항원에 특이적인 TCR을 발현하고 대상체에 투여하기 전에 T-세포 항원의 존재하에 확장되는 방법.

**청구항 70**

제68항에 있어서, 상기 CMV 항원이 하나 이상의 CMV 펩티드, 또는 CMV 백신을 포함하는 방법.

**청구항 71**

제70항에 있어서, 상기 적어도 하나의 CMV 펩티드가 pp50, p65, IE-I, gB 및 gH로부터 선택되는 방법.

**청구항 72**

제70항 또는 제71항에 있어서, 상기 적어도 하나의 CMV 펩티드가 서열 번호 181-211에 제시된 아미노산 서열로부터 선택되는 방법.

**청구항 73**

제68항에 있어서, 상기 펩티드 풀이 CMV 항원 pp50, pp65, IE-I, gB, 및 gH 각각으로부터 유래된 적어도 하나의 펩티드 에피토프를 포함하는 방법.

**청구항 74**

제73항에 있어서, 펩티드 풀에서 적어도 하나의 CMV 펩티드 에피토프 아미노산 서열이 서열 번호 181-211, 또는 이들의 조합에 제시되는 방법.

**청구항 75**

제74항에 있어서, 상기 펩티드 풀이 각각의 서열 번호 181-211에 제시된 CMV 펩티드 에피토프 아미노산 서열을 포함하는 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 출원은 2019년 10월 9일에 출원된 호주 특허 출원 제2019903802호로부터 우선권을 주장하며, 이의 내용과 요소는 모든 목적을 위해 본원에 참고로 포함된다.

[0002] **발명의 분야**

[0003] 본 발명은 분자생물학 분야, 및 보다 구체적으로 항체 기술에 관한 것이다. 보다 특히, 본 발명은 EphA3을 적어도 특이적으로 인식하거나 결합할 수 있는 항체 또는 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor; CAR)에 관한 것이다. 본 발명은 또한 의학적 치료 및 예방 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0004] 에프린 A형 수용체 3(EphA3)은 결장암, 유방암, 만성 골수성 백혈병(CML) 및 다형성 교모세포종(GBM)을 포함한 다양한 인간 고형 종양 및 백혈병으로부터의 종양 세포에서 과발현되거나 비정상적으로 발현되는 것으로 밝혀졌

다. GBM은 가장 공격적인 고형 뇌종양 중 하나이다. 표준 치료는 최대 외과적 절제, 방사선 요법, 및 테모졸로마이드를 사용한 동반 및 보조 화학요법으로 구성된다. 그러나, 최적의 치료를 하더라도, 초기 진단 후 생존 중앙값은 15개월 미만이다(1). 면역표지점 봉쇄 요법(checkpoint blockade)을 사용한 최근의 발전은 여러 인간 암에 대한 결과를 개선했지만 GBM은 이 치료 접근법 단독에 대해 내성이 있는 것으로 보인다(2). 그럼에도 불구하고, GBM 뿐만 아니라 더 넓은 범위의 암에 대한 신규 치료법의 개발이 여전히 필요하다.

**발명의 내용**

- [0005] 본 발명은 광범위하게는 인간 또는 인간화(humanized), 재조합 항-EphA3 항체를 포함하는 항-EphA3 결합제(binding agent) 및 이의 사용 방법에 관한 것이다. 본 발명의 특정 형태는 EphA3에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR) 및 이를 사용하는 방법을 추가로 제공한다.
- [0006] 광범위한 형태에서, 본 발명은 본원에 기술된 EphA3 단클론 항체(monoclonal antibody)의 하나 이상의 CDR을 포함하는 EphA3 결합제 및 CAR에 관한 것이다.
- [0007] 하나의 측면에서, 본 발명은 서열 번호 13-72 및/또는 표 4-7에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 적어도 하나의 상보성 결정 영역(complementarity determining region; CDR)을 포함하는 EphA3 결합제를 제공한다.
- [0008] 일부 실시양태에서, EphA3 결합제는 다음을 포함한다:
- [0009] (a) 서열 번호 13-17 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 1; 서열 번호 18 내지 22 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR; 및 서열 번호 23 내지 27 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 3을 포함하는 중쇄 면역글로불린 가변 영역(VH) 폴리펩티드; 및/또는
- [0010] (b) 서열 번호 28-32 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 1; 서열 번호 33-37 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 2; 및 서열 번호 38-42 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 3을 포함하는 경쇄 면역글로불린 가변 영역(VL) 폴리펩티드.
- [0011] 이러한 실시양태와 관련하여, VH 폴리펩티드는 적합하게는 서열 번호 153에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 포함하고/하거나; VL 폴리펩티드는 적합하게는 서열 번호 154에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0012] 일부 동일한 실시양태 및 일부 다른 실시양태에서, EphA3 결합제는 다음을 포함한다:
- [0013] (a) 서열 번호 43-47 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 1; 서열 번호 48-52 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 2; 및 서열 번호 53-57 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 3을 포함하는 VH 폴리펩티드; 및/또는
- [0014] (b) 서열 번호 58-62 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 1; 서열 번호 63-67 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 2; 및 서열 번호 68-72 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 3을 포함하는 VL 폴리펩티드.
- [0015] 이와 관련하여, VH 폴리펩티드는 서열 번호 155에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있고/있거나; VL 폴리펩티드는 서열 번호 156에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0016] 적합하게는, EphA3 결합제는 항체 또는 항체 단편이다. 하나의 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 3C3-1 또는 2D4-1 단클론 항체 또는 이의 단편이다. 특정 실시양태에서, EphA3 결합제는 재조합, 인간 또는 인간화 항체, 또는 항체 단편이다.
- [0017] 또 다른 측면에서, 본 발명은 서열 번호 13-72 및/또는 표 4-7에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 적어도 하나의 CDR을 포함하는 항원 결합 도메인, 막관통 도메인(transmembrane domain), 및 세포내 신호전달(signalling) 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)에 존재한다.
- [0018] 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 다음을 포함하거나, 다음으로 구성되거나, 다음으로 본질적으로 구성된다:
- [0019] (a) 서열 번호 13-17 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 1; 서열 번호 18 내지 22 중

어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR; 및 서열 번호 23 내지 27 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 3을 포함하는 중쇄 면역글로불린 가변 영역(VH) 폴리펩티드; 및/또는

- [0020] (b) 서열 번호 28-32 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 1; 서열 번호 33-37 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 2; 및 서열 번호 38-42 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 3을 포함하는 경쇄 면역글로불린 가변 영역(VL) 폴리펩티드.
- [0021] 이러한 실시양태의 경우, VH 폴리펩티드는 서열 번호 153에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있고/있거나; VL 폴리펩티드는 서열 번호 154에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0022] 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 다음을 포함하거나, 다음으로 구성되거나, 다음으로 본질적으로 구성된다:
- [0023] (a) 서열 번호 43-47 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 1; 서열 번호 48-52 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 2; 및 서열 번호 53-57 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 3을 포함하는 VH 폴리펩티드; 및/또는
- [0024] (b) 서열 번호 58-62 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 1; 서열 번호 63-67 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 2; 및 서열 번호 68-72 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR 3을 포함하는 VL 폴리펩티드.
- [0025] 이러한 실시양태의 경우, VH 폴리펩티드는 서열 번호 155에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 70% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있고/있거나; VL 폴리펩티드는 서열 번호 156에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0026] 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 링커(linker)를 포함한다. 하나의 특정 실시양태에서, 링커는 서열 번호 158에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 이것으로 본질적으로 구성된다.
- [0027] 적합하게는, CAR은 서열 번호 157에 제시된 CD8의 리더 또는 신호 펩티드 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열과 같은 리더 또는 신호 펩티드 서열을 추가로 포함한다.
- [0028] 특정 실시양태에서, 막관통 도메인은 서열 번호 159에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 CD8 막관통 도메인과 같은 CD8 막관통 도메인을 포함한다.
- [0029] 적합하게는, 세포내 T 세포 신호전달 도메인은 CD3 제타(zeta) 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0030] 특정 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 서열 번호 162에 제시된 CD3 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0031] 적합하게는, CAR은 서열 번호 161에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CD28 공동-자극 도메인(co-stimulatory domain) 및/또는 서열 번호 160에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CD137 공동-자극 도메인과 같은 하나 이상의 공동-자극 도메인을 추가로 포함한다.
- [0032] 일부 실시양태에서, 제1 측면의 EphA3 결합체 또는 제2 측면의 CAR은 대상체(subject)에서 암, 예를 들면 다형성 교모세포종과 같은 고형 암의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 것이다.
- [0033] 이와 관련하여, 상기 및 본원의 다른 곳에 기술된 항체 및 항원-결합 분자(antigen-binding molecule)는 상당한 항종양 활성을 나타내며, 특히 감소시키는데 효과적이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 암을 가진 대상체로부터 종양을 실질적으로 제거하는 능력을 갖는다.
- [0034] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 및 본원의 다른 곳에 기술된 바와 같은 EphA3 결합체 및/또는 CAR을 암호화(encoding)하는 단리된 핵산을 제공한다.
- [0035] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 및 본원의 다른 곳에 기술된 단리된 핵산을 포함하는 유전자 작제물(genetic construct)에 있다.
- [0036] 여전히 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 또는 본원의 다른 곳에 기술된 핵산 및/또는 유전자 작제물을 포함하

는 숙주 세포(host cell)를 제공한다.

- [0037] 적합하게는, 숙주 세포는 T-세포이거나 이를 포함한다.
- [0038] 또 다른 측면에서, 본 발명은 단리된 EphA3 결합제 또는 CAR을 생산하는 방법에 있으며, 상기 방법은 (i) 제5 측면의 숙주 세포를 배양하는 단계; 및 (ii) 단계 (i)에서 배양된 상기 숙주 세포로부터 상기 EphA3 결합제 또는 CAR을 단리하는 단계를 포함한다.
- [0039] 또 다른 측면에서, 본 발명은 제6 측면의 방법에 의해 생산된 EphA3 결합제 또는 CAR을 제공한다.
- [0040] 또 다른 측면에서, 본 발명은 하기와 결합하고/하거나 이에 대해 발생(raising)하는 항체 또는 항체 단편에 있다:
- [0041] (i) 제1 측면의 EphA3 결합제; 및/또는
- [0042] (ii) 제2 측면의 CAR.
- [0043] 또 다른 측면에서, 본 발명은 제1 또는 제6 측면의 EphA3 결합제, 제2 또는 제6 측면의 CAR, 제3 측면의 핵산, 제4 측면의 유전자 작제물 및/또는 제5 측면의 숙주 세포 및 약제학적으로 허용되는 담체 희석제 또는 부형제를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0044] 여전히 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상체에서 암을 치료 또는 예방하는 방법에 있으며, 상기 방법은 치료학적 유효량의 제1 또는 제6 측면의 EphA3 결합제, 제2 또는 제6 측면의 CAR, 제3 측면의 핵산, 제4 측면의 유전자 작제물, 제5 측면의 숙주 세포 및/또는 제9 측면의 조성물을 대상체에게 투여하여 대상체에서 암을 치료하거나 예방하는 단계를 포함한다.
- [0045] 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상체에서 암의 예방 및/또는 치료를 위한 약제의 제조에 있어서의 제1 또는 제6 측면의 EphA3 결합제, 제2 또는 제6 측면의 CAR, 제3 측면의 핵산, 제4 측면의 유전자 작제물 및/또는 제5 측면의 숙주 세포의 용도를 제공한다.
- [0046] 제1, 제2, 제10 및 제11 측면과 관련하여, 암은 적합하게는 다형성 교모세포종이거나 이를 포함한다.
- [0047] 또 다른 측면에서, 본 발명은 EphA3 또는 EphA3을 발현하는 세포를 검출하는 방법에 있으며, 상기 방법은 제1 측면의 EphA3 결합제, 또는 제2 측면의 CAR과 EphA3 사이에 복합체(complex)를 형성하여 EphA3 또는 EphA3을 발현하는 세포를 검출하는 단계를 포함한다.
- [0048] 적합하게는, 본 방법은 EphA3 또는 EphA3을 발현하는 세포를 EphA3 결합제 또는 CAR과 접촉시키는 초기 단계를 포함한다.
- [0049] 특정 실시양태에서, 세포는 암세포이거나 이를 포함한다.
- [0050] 또 다른 측면에서, 본 발명은 서열 번호 13 내지 156 및/또는 표 4 내지 7 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 본질적으로 구성되거나, 이것으로 구성된 단리된 단백질을 제공한다.
- [0051] 여전히 또 다른 측면에서, 본 발명은 (a) CMV 항원에 대한 결합에 의해 활성화되는 T-세포 수용체(TCR); 및 (b) EphA3 상의 에피토프(epitope)에 결합하는 항원-결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 인간 T-세포를 제공한다.
- [0052] 일부 실시양태에서, 항원-결합 도메인은 중쇄 가변(VH) 영역 및 경쇄 가변(VL) 영역을 포함하는 scFv이다.
- [0053] 유사한 측면에서, 본 발명은 (a) CMV 항원에 특이적인 TCR을 발현하는 T-세포 수용체(TCR); 및 (b) EphA3에 결합하는 항원-결합 분자를 포함하는 T-세포를 제공한다.
- [0054] 여전히 또 다른 측면에서, 본 발명은 서열 번호 1 내지 12 및/또는 표 3 중 어느 하나에 제시된 핵산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 핵산 서열을 포함하거나, 이들로 구성되거나, 이들로 본질적으로 구성된 단리된 핵산에 있다.
- [0055] 본 명세서 전반에 걸쳐, 문맥이 달리 요구하지 않는 한, "포함하다(comprise)", "포함한다(comprises)" 및 "포함하는(comprising)"이라는 단어는 명시된 정수 또는 정수 그룹의 포함을 의미하지만 임의의 다른 정수 또는 정수 그룹의 배제를 의미하지 않는 것으로 이해될 것이다.

[0056] "아미노산 서열의 맥락에서 본질적으로 구성된다"란 인용된 아미노산 서열이 이의 N- 및/또는 C-말단에 추가의 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 아미노산을 포함한다는 것을 의미한다.

[0057] 본원에 사용된 바와 같이, 부정관사 'a' 및 'an'은 단수 또는 복수 요소 또는 특징을 지칭하거나 포괄하기 위해 본원에서 사용되며 "하나" 또는 "단일" 요소 또는 특징을 의미하거나 정의하는 것으로 간주되어서는 안 된다.

### 도면의 간단한 설명

- [0058] **도 1** - Expi293F 세포 발현을 위한 EphA3(P29320|21-541) pcDNA3.4에 대한 클로닝 전략.
- 도 2** - EphA3 (P29320|21-541)의 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯 분석. 레인 M<sub>1</sub>: 단백질 마커 TaKaRa, (Cat No. 3452); 레인 M<sub>2</sub>: 단백질 마커 (GenScript, Cat No. M00521); 레인 1: 환원 조건; 레인 2 비-환원 조건; 레인 P: 양성 대조군으로서의 다중-태그 (GenScript, Cat No. M0101); 1차 항체: 마우스-항-His mAb (GenScript, Cat No. A00186).
- 도 3** - 서브클로닝을 위해 선택된 모 항체 클론(패널 A). 마우스를 재조합 인간 EphA3 단백질(PP29320|21-541)로 면역화시켰다. 하이브리도마를 생성하고 5개의 모 하이브리도마 클론을 EphA3을 발현하는 LK63 종양 세포를 사용한 ELISA 및 FACS에 의한 EphA3 특이성을 기반으로 서브클로닝을 위해 선택하였다(패널 B).
- 도 4** - EphA3에 대해 생성된 단클론 항체는 상이한 결합 효율을 갖는다. 서브클론 상청액을 ELISA(패널 A) 및 FACS(패널 B)에 의해 EphA3 결합 효율에 대해 스크리닝하였다.
- 도 5** - EphA3은 신경교종 세포주에서 발현된다. 배양된 U87, D270 및 U251 세포주에서 3C3-1 항-EphA3를 사용한 유세포 분석.
- 도 6** - (상단) pD2109-FA301\_lres-RFP 및 (하단) 3C3-1 scFv 결합 영역 및 CD28 ζ 또는 4-1BB ζ 신호전달 도메인을 갖는 pD2109-FA302\_lres-RFP CAR 작제물의 도식적 표현.
- 도 7** - HEK293T 세포에서 CAR T 단편(546bp)에 걸쳐 있는 서열의 RT-PCR 및 아가로스 겔 전기영동. Fw - CAGCGGCTACACCTTTACCA 및 Rev - CCGGAGAATCTATCCGGCAC 프라이머.
- 도 8** - 작제물 FA301 및 FA302(RFP 리포터) 및 pD2109(GFP 리포터)에 대해 생성된 EphA3-CAR 렌티바이러스를 사용한 Jurkat 세포의 형질도입.
- 도 9** - Jurkat 세포에서 EphA3-CAR의 표면 발현. 세포를 (왼쪽) FA301 및 (오른쪽) FA302 렌티바이러스로 형질도입하고 플레이트-결합된 EphA3-his 단백질과 함께 배양하였다. 세포를 αEphA3 1차 Ab의 존재 또는 부재하에 염색한 다음 αHis-태그 Ab로 염색하여 EphA3-CAR 표면 발현을 결정하였다.
- 도 10** - CAR-발현 Jurkat 세포는 EphA3에 의해 활성화된다. FA301 및 FA302 형질도입된 Jurkat 세포를 증가하는 농도의 플레이트-결합 EphA3 단백질과 함께 배양하였다. 세포를 FAC에 의한 CD69 발현에 대해 염색하고 CAR을 발현하는 RFP 양성 세포의 수준을 RFP 음성 세포와 비교하였다.
- 도 11** - CAR-발현 Jurkat 세포는 EphA3 발현 종양 세포주에 의해 활성화된다. FA301 형질도입된 Jurkat 세포를 Lk63 세포와 1:10 비율(Jurkat-CAR: Lk63)로 배양하였다. Jurkat 세포를 FAC에 의한 CD69 발현에 대해 염색하고 RFP 양성 세포의 수준을 RFP 음성 세포와 비교하였다.
- 도 12** - CMV 확장된 T-세포에 pD2109 및 FA301 렌티바이러스를 형질도입하였다. 형질도입 효율은 3일 후 FACS에 의해 결정하였다.
- 도 13** - EphA3 CAR T-세포 공동-자극 도메인의 시험관내 비교. (A) 말초 혈액 단핵 세포를 CD3/28+ 비드(다클론 확장)를 사용하여 자극하고 세포를 EphA3 렌티바이러스 FA305 -BB ζ 또는 FA306 - 28 ζ 로 형질도입하고 12일 동안 배양하였다. 비-형질도입(NT) T-세포를 대조군으로 유지하였다. CAR 발현은 항-마우스 IgG(CAR)의 표면 발현 및 FACS에 의한 분석에 의해 평가하였다. (B) EphA3 CAR T-세포 효과기 기능의 특성화. CAR 형질도입된 T-세포를 LK63(EphA3+) 표적 세포와 밤새 배양하고 세포내 TNF를 사용하여 기능을 조사하였다.
- 도 14** - CAR T 세포의 생성. 말초 혈액 단핵 세포를 CD3/28+ 비드(다클론 확장) 또는 다중 CMV 항원으로부터의 26개의 HLA 클래스 I 및 클래스 II-제한된 T-세포 펩티드 에피토프의 풀(pool)을 사용하여 자극하였다. 이들 세포를 EphA3 렌티바이러스로 형질도입하고 14일 동안 배양하였다. 비-형질도입(NT) T-세포를 대조군으로 유지하였다. CAR의 발현 및 CMV-특이성은 항-마우스 IgG(CAR) 및 HLA 복합체 - CMV에 대한 펩티드 사랑체(VTE 및

ELK)에 대한 FACS 분석에 의해 평가하였다.

**도 15** - 다클론 및 CMV-특이적 T-세포에서 EphA3 CAR T-세포 효과기 기능 및 세포독성의 비교. (A) CAR 형질도 입된 T-세포를 LK63(EphA3+) 표적 세포와 밤새 배양하고 세포내 IFN- $\gamma$ , TNF 및 CD107a의 세포 표면 동원을 사용하여 기능을 조사하였다.

**도 16** - EphA3 CAR T-세포 시험관내 세포독성의 특성화. (A) EphA3-CAR을 발현하는 T-세포가 EphA3+ 종양을 특이적으로 제거하는 능력은 U251(EphA3+) 및 U87(EphA3-) 신경교종 세포주의 실시간 표적-유도 세포용해에 의해 측정하였다. (B & C) U251 표적 세포주를 사용하여 1:1, 5:1 및 10:1 효과기 대 표적 비율에서 다클론 및 CMV-특이적 EphA3-CAR의 RTCA 분석.

**도 17** - EphA3 CAR T-세포는 GBM의 이종이식 모델에서 강력한 항-GBM 반응을 매개한다. (A) 실험 설계의 도식적 표현. NRG 마우스의 옆구리(이종 모델)에 루시퍼라제-발현 신경교종 세포주 U251(EphA3+) 또는 U87(EphA3-)을 피하 이식하였다. 종양 크기를 생물발광에 의해 측정하거나 결정하였다. 종양이 대략 25mm<sup>2</sup>에 도달하면, 마우스는 정맥내 EphA3-CAR, NT(비형질도입) T-세포 또는 CAR19(비특이적 CAR T-세포)를 제공받았다. (B) CD4+ 및 CD8+ 백분율 및 (C) 17일차에 수집된 혈액에서 Ki67 발현의 대표적인 FACS 플롯 분석. (D) U251 종양 부담을 매주 결정하여 종양 퇴행에 대한 CAR-T 세포 요법의 영향을 평가하였다. (E) U251 및 U87 보유 마우스에서 CAR EphA3 치료의 비교 (F) U251(왼쪽) 및 U87(오른쪽) 발광성 종양 이종이식 마우스의 생체내 영상화. (G) EphA3-CAR 처리 또는 대조군 세포(NT 또는 CAR19)를 제공받은 마우스에 대한 카플란-마이어 생존 곡선.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0059] 서열의 간단한 설명
- [0060] 서열 번호 1 클론 3C3-1 중쇄 CDR1 뉴클레오티드 서열
- [0061] 서열 번호 2 클론 3C3-1 중쇄 CDR2 뉴클레오티드 서열
- [0062] 서열 번호 3 클론 3C3-1 중쇄 CDR3 뉴클레오티드 서열
- [0063] 서열 번호 4 클론 3C3-1 경쇄 CDR1 뉴클레오티드 서열
- [0064] 서열 번호 5 클론 3C3-1 경쇄 CDR2 뉴클레오티드 서열
- [0065] 서열 번호 6 클론 3C3-1 경쇄 CDR3 뉴클레오티드 서열
- [0066] 서열 번호 7 클론 2D4-1 중쇄 CDR1 뉴클레오티드 서열
- [0067] 서열 번호 8 클론 2D4-1 중쇄 CDR2 뉴클레오티드 서열
- [0068] 서열 번호 9 클론 2D4-1 중쇄 CDR3 뉴클레오티드 서열
- [0069] 서열 번호 10 클론 2D4-1 경쇄 CDR1 뉴클레오티드 서열
- [0070] 서열 번호 11 클론 2D4-1 경쇄 CDR2 뉴클레오티드 서열
- [0071] 서열 번호 12 클론 2D4-1 경쇄 CDR3 뉴클레오티드 서열
- [0072] 서열 번호 13 클론 3C3-1 중쇄 CDR1 아미노산 서열 (Chothia)
- [0073] 서열 번호 14 클론 3C3-1 중쇄 CDR1 아미노산 서열 (AbM)
- [0074] 서열 번호 15 클론 3C3-1 중쇄 CDR1 아미노산 서열 (Kabat)
- [0075] 서열 번호 16 클론 3C3-1 중쇄 CDR1 아미노산 서열 (Contact)
- [0076] 서열 번호 17 클론 3C3-1 중쇄 CDR1 아미노산 서열 (IMGT)
- [0077] 서열 번호 18 클론 3C3-1 중쇄 CDR2 아미노산 서열 (Chothia)
- [0078] 서열 번호 19 클론 3C3-1 중쇄 CDR2 아미노산 서열 (AbM)
- [0079] 서열 번호 20 클론 3C3-1 중쇄 CDR2 아미노산 서열 (Kabat)
- [0080] 서열 번호 21 클론 3C3-1 중쇄 CDR2 아미노산 서열 (Contact)

- [0081] 서열 번호 22 클론 3C3-1 중쇄 CDR2 아미노산 서열 (IMGT)
- [0082] 서열 번호 23 클론 3C3-1 중쇄 CDR3 아미노산 서열 (Chothia)
- [0083] 서열 번호 24 클론 3C3-1 중쇄 CDR3 아미노산 서열 (AbM)
- [0084] 서열 번호 25 클론 3C3-1 중쇄 CDR3 아미노산 서열 (Kabat)
- [0085] 서열 번호 26 클론 3C3-1 중쇄 CDR3 아미노산 서열 (Contact)
- [0086] 서열 번호 27 클론 3C3-1 중쇄 CDR3 아미노산 서열 (IMGT)
- [0087] 서열 번호 28 클론 3C3-1 경쇄 CDR1 아미노산 서열 (Chothia)
- [0088] 서열 번호 29 클론 3C3-1 경쇄 CDR1 아미노산 서열 (AbM)
- [0089] 서열 번호 30 클론 3C3-1 경쇄 CDR1 아미노산 서열 (Kabat)
- [0090] 서열 번호 31 클론 3C3-1 경쇄 CDR1 아미노산 서열 (Contact)
- [0091] 서열 번호 32 클론 3C3-1 경쇄 CDR1 아미노산 서열 (IMGT)
- [0092] 서열 번호 33 클론 3C3-1 경쇄 CDR2 아미노산 서열 (Chothia)
- [0093] 서열 번호 34 클론 3C3-1 경쇄 CDR2 아미노산 서열 (AbM)
- [0094] 서열 번호 35 클론 3C3-1 경쇄 CDR2 아미노산 서열 (Kabat)
- [0095] 서열 번호 36 클론 3C3-1 경쇄 CDR2 아미노산 서열 (Contact)
- [0096] 서열 번호 37 클론 3C3-1 경쇄 CDR2 아미노산 서열 (IMGT)
- [0097] 서열 번호 38 클론 3C3-1 경쇄 CDR3 아미노산 서열 (Chothia)
- [0098] 서열 번호 39 클론 3C3-1 경쇄 CDR3 아미노산 서열 (AbM)
- [0099] 서열 번호 40 클론 3C3-1 경쇄 CDR3 아미노산 서열 (Kabat)
- [0100] 서열 번호 41 클론 3C3-1 경쇄 CDR3 아미노산 서열 (Contact)
- [0101] 서열 번호 42 클론 3C3-1 경쇄 CDR3 아미노산 서열 (IMGT)
- [0102] 서열 번호 43 클론 2D4-1 중쇄 CDR1 아미노산 서열 (Chothia)
- [0103] 서열 번호 44 클론 2D4-1 중쇄 CDR1 아미노산 서열 (AbM)
- [0104] 서열 번호 45 클론 2D4-1 중쇄 CDR1 아미노산 서열 (Kabat)
- [0105] 서열 번호 46 클론 2D4-1 중쇄 CDR1 아미노산 서열 (Contact)
- [0106] 서열 번호 47 클론 2D4-1 중쇄 CDR1 아미노산 서열 (IMGT)
- [0107] 서열 번호 48 클론 2D4-1 중쇄 CDR2 아미노산 서열 (Chothia)
- [0108] 서열 번호 49 클론 2D4-1 중쇄 CDR2 아미노산 서열 (AbM)
- [0109] 서열 번호 50 클론 2D4-1 중쇄 CDR2 아미노산 서열 (Kabat)
- [0110] 서열 번호 51 클론 2D4-1 중쇄 CDR2 아미노산 서열 (Contact)
- [0111] 서열 번호 52 클론 2D4-1 중쇄 CDR2 아미노산 서열 (IMGT)
- [0112] 서열 번호 53 클론 2D4-1 중쇄 CDR3 아미노산 서열 (Chothia)
- [0113] 서열 번호 54 클론 2D4-1 중쇄 CDR3 아미노산 서열 (AbM)
- [0114] 서열 번호 55 클론 2D4-1 중쇄 CDR3 아미노산 서열 (Kabat)
- [0115] 서열 번호 56 클론 2D4-1 중쇄 CDR3 아미노산 서열 (Contact)
- [0116] 서열 번호 57 클론 2D4-1 중쇄 CDR3 아미노산 서열 (IMGT)

- [0117] 서열 번호 58 클론 2D4-1 경쇄 CDR1 아미노산 서열 (Chothia)
- [0118] 서열 번호 59 클론 2D4-1 경쇄 CDR1 아미노산 서열 (AbM)
- [0119] 서열 번호 60 클론 2D4-1 경쇄 CDR1 아미노산 서열 (Kabat)
- [0120] 서열 번호 61 클론 2D4-1 경쇄 CDR1 아미노산 서열 (Contact)
- [0121] 서열 번호 62 클론 2D4-1 경쇄 CDR1 아미노산 서열 (IMGT)
- [0122] 서열 번호 63 클론 2D4-1 경쇄 CDR2 아미노산 서열 (Chothia)
- [0123] 서열 번호 64 클론 2D4-1 경쇄 CDR2 아미노산 서열 (AbM)
- [0124] 서열 번호 65 클론 2D4-1 경쇄 CDR2 아미노산 서열 (Kabat)
- [0125] 서열 번호 66 클론 2D4-1 경쇄 CDR2 아미노산 서열 (Contact)
- [0126] 서열 번호 67 클론 2D4-1 경쇄 CDR2 아미노산 서열 (IMGT)
- [0127] 서열 번호 68 클론 2D4-1 경쇄 CDR3 아미노산 서열 (Chothia)
- [0128] 서열 번호 69 클론 2D4-1 경쇄 CDR3 아미노산 서열 (AbM)
- [0129] 서열 번호 70 클론 2D4-1 경쇄 CDR3 아미노산 서열 (Kabat)
- [0130] 서열 번호 71 클론 2D4-1 경쇄 CDR3 아미노산 서열 (Contact)
- [0131] 서열 번호 72 클론 2D4-1 경쇄 CDR3 아미노산 서열 (IMGT)
- [0132] 서열 번호 73 클론 3C3-1 HFR1 아미노산 서열 (Chothia)
- [0133] 서열 번호 74 클론 3C3-1 HFR1 아미노산 서열 (AbM)
- [0134] 서열 번호 75 클론 3C3-1 HFR1 아미노산 서열 (Kabat)
- [0135] 서열 번호 76 클론 3C3-1 HFR1 아미노산 서열 (Contact)
- [0136] 서열 번호 77 클론 3C3-1 HFR1 아미노산 서열 (IMGT)
- [0137] 서열 번호 78 클론 3C3-1 HFR2 아미노산 서열 (Chothia)
- [0138] 서열 번호 79 클론 3C3-1 HFR2 아미노산 서열 (AbM)
- [0139] 서열 번호 80 클론 3C3-1 HFR2 아미노산 서열 (Kabat)
- [0140] 서열 번호 81 클론 3C3-1 HFR2 아미노산 서열 (Contact)
- [0141] 서열 번호 82 클론 3C3-1 HFR2 아미노산 서열 (IMGT)
- [0142] 서열 번호 83 클론 3C3-1 HFR3 아미노산 서열 (Chothia)
- [0143] 서열 번호 84 클론 3C3-1 HFR3 아미노산 서열 (AbM)
- [0144] 서열 번호 85 클론 3C3-1 HFR3 아미노산 서열 (Kabat)
- [0145] 서열 번호 86 클론 3C3-1 HFR3 아미노산 서열 (Contact)
- [0146] 서열 번호 87 클론 3C3-1 HFR3 아미노산 서열 (IMGT)
- [0147] 서열 번호 88 클론 3C3-1 HFR4 아미노산 서열 (Chothia)
- [0148] 서열 번호 89 클론 3C3-1 HFR4 아미노산 서열 (AbM)
- [0149] 서열 번호 90 클론 3C3-1 HFR4 아미노산 서열 (Kabat)
- [0150] 서열 번호 91 클론 3C3-1 HFR4 아미노산 서열 (Contact)
- [0151] 서열 번호 92 클론 3C3-1 HFR4 아미노산 서열 (IMGT)
- [0152] 서열 번호 93 클론 3C3-1 LFR1 아미노산 서열 (Chothia)

- [0153] 서열 번호 94 클론 3C3-1 LFR1 아미노산 서열 (AbM)
- [0154] 서열 번호 95 클론 3C3-1 LFR1 아미노산 서열 (Kabat)
- [0155] 서열 번호 96 클론 3C3-1 LFR1 아미노산 서열 (Contact)
- [0156] 서열 번호 97 클론 3C3-1 LFR1 아미노산 서열 (IMGT)
- [0157] 서열 번호 98 클론 3C3-1 LFR2 아미노산 서열 (Chothia)
- [0158] 서열 번호 99 클론 3C3-1 LFR2 아미노산 서열 (AbM)
- [0159] 서열 번호 100 클론 3C3-1 LFR2 아미노산 서열 (Kabat)
- [0160] 서열 번호 101 클론 3C3-1 LFR2 아미노산 서열 (Contact)
- [0161] 서열 번호 102 클론 3C3-1 LFR2 아미노산 서열 (IMGT)
- [0162] 서열 번호 103 클론 3C3-1 LFR3 아미노산 서열 (Chothia)
- [0163] 서열 번호 104 클론 3C3-1 LFR3 아미노산 서열 (AbM)
- [0164] 서열 번호 105 클론 3C3-1 LFR3 아미노산 서열 (Kabat)
- [0165] 서열 번호 106 클론 3C3-1 LFR3 아미노산 서열 (Contact)
- [0166] 서열 번호 107 클론 3C3-1 LFR3 아미노산 서열 (IMGT)
- [0167] 서열 번호 108 클론 3C3-1 LFR4 아미노산 서열 (Chothia)
- [0168] 서열 번호 109 클론 3C3-1 LFR4 아미노산 서열 (AbM)
- [0169] 서열 번호 110 클론 3C3-1 LFR4 아미노산 서열 (Kabat)
- [0170] 서열 번호 111 클론 3C3-1 LFR4 아미노산 서열 (Contact)
- [0171] 서열 번호 112 클론 3C3-1 LFR4 아미노산 서열 (IMGT)
- [0172] 서열 번호 113 클론 2D4-1 HFR1 아미노산 서열 (Chothia)
- [0173] 서열 번호 114 클론 2D4-1 HFR1 아미노산 서열 (AbM)
- [0174] 서열 번호 115 클론 2D4-1 HFR1 아미노산 서열 (Kabat)
- [0175] 서열 번호 116 클론 2D4-1 HFR1 아미노산 서열 (Contact)
- [0176] 서열 번호 117 클론 2D4-1 HFR1 아미노산 서열 (IMGT)
- [0177] 서열 번호 118 클론 2D4-1 HFR2 아미노산 서열 (Chothia)
- [0178] 서열 번호 119 클론 2D4-1 HFR2 아미노산 서열 (AbM)
- [0179] 서열 번호 120 클론 2D4-1 HFR2 아미노산 서열 (Kabat)
- [0180] 서열 번호 121 클론 2D4-1 HFR2 아미노산 서열 (Contact)
- [0181] 서열 번호 122 클론 2D4-1 HFR2 아미노산 서열 (IMGT)
- [0182] 서열 번호 123 클론 2D4-1 HFR3 아미노산 서열 (Chothia)
- [0183] 서열 번호 124 클론 2D4-1 HFR3 아미노산 서열 (AbM)
- [0184] 서열 번호 125 클론 2D4-1 HFR3 아미노산 서열 (Kabat)
- [0185] 서열 번호 126 클론 2D4-1 HFR3 아미노산 서열 (Contact)
- [0186] 서열 번호 127 클론 2D4-1 HFR3 아미노산 서열 (IMGT)
- [0187] 서열 번호 128 클론 2D4-1 HFR4 아미노산 서열 (Chothia)
- [0188] 서열 번호 129 클론 2D4-1 HFR4 아미노산 서열 (AbM)

- [0189] 서열 번호 130 클론 2D4-1 HFR4 아미노산 서열 (Kabat)
- [0190] 서열 번호 131 클론 2D4-1 HFR4 아미노산 서열 (Contact)
- [0191] 서열 번호 132 클론 2D4-1 HFR4 아미노산 서열 (IMGT)
- [0192] 서열 번호 133 클론 2D4-1 LFR1 아미노산 서열 (Chothia)
- [0193] 서열 번호 134 클론 2D4-1 LFR1 아미노산 서열 (AbM)
- [0194] 서열 번호 135 클론 2D4-1 LFR1 아미노산 서열 (Kabat)
- [0195] 서열 번호 136 클론 2D4-1 LFR1 아미노산 서열 (Contact)
- [0196] 서열 번호 137 클론 2D4-1 LFR1 아미노산 서열 (IMGT)
- [0197] 서열 번호 138 클론 2D4-1 LFR2 아미노산 서열 (Chothia)
- [0198] 서열 번호 139 클론 2D4-1 LFR2 아미노산 서열 (AbM)
- [0199] 서열 번호 140 클론 2D4-1 LFR2 아미노산 서열 (Kabat)
- [0200] 서열 번호 141 클론 2D4-1 LFR2 아미노산 서열 (Contact)
- [0201] 서열 번호 142 클론 2D4-1 LFR2 아미노산 서열 (IMGT)
- [0202] 서열 번호 143 클론 2D4-1 LFR3 아미노산 서열 (Chothia)
- [0203] 서열 번호 144 클론 2D4-1 LFR3 아미노산 서열 (AbM)
- [0204] 서열 번호 145 클론 2D4-1 LFR3 아미노산 서열 (Kabat)
- [0205] 서열 번호 146 클론 2D4-1 LFR3 아미노산 서열 (Contact)
- [0206] 서열 번호 147 클론 2D4-1 LFR3 아미노산 서열 (IMGT)
- [0207] 서열 번호 148 클론 2D4-1 LFR4 아미노산 서열 (Chothia)
- [0208] 서열 번호 149 클론 2D4-1 LFR4 아미노산 서열 (AbM)
- [0209] 서열 번호 150 클론 2D4-1 LFR4 아미노산 서열 (Kabat)
- [0210] 서열 번호 151 클론 2D4-1 LFR4 아미노산 서열 (Contact)
- [0211] 서열 번호 152 클론 2D4-1 LFR4 아미노산 서열 (IMGT)
- [0212] 서열 번호 153 클론 3C3-1 중쇄 아미노산 서열
- [0213] 서열 번호 154 클론 3C3-1 경쇄 아미노산 서열
- [0214] 서열 번호 155 클론 2D4-1 중쇄 아미노산 서열
- [0215] 서열 번호 156 클론 2D4-1 경쇄 아미노산 서열
- [0216] 서열 번호 157 CD8 신호 펩티드 서열
- [0217] 서열 번호 158 스페이서(spacer)/링커 아미노산 서열
- [0218] 서열 번호 159 CD8 힌지 및 막관통 아미노산 서열
- [0219] 서열 번호 160 4-1BB/CD137 공동-자극 도메인
- [0220] 서열 번호 161 CD28 공동-자극 도메인
- [0221] 서열 번호 162 CD3- $\zeta$  세포내 신호전달 도메인
- [0222] 서열 번호 163 IRES 핵산 서열
- [0223] 서열 번호 164 M\_Cayenne RFP 아미노산 서열
- [0224] 서열 번호 165 인간 EphA3 아미노산 서열 (전구체)

- [0225] 서열 번호 166 인간 EphA3 성숙 아미노산 서열
- [0226] 서열 번호 167 인간 EphA3 세포외 도메인 아미노산 서열
- [0227] 서열 번호 168 인간 EphA3 막관통 도메인 아미노산 서열
- [0228] 서열 번호 169 인간 EphA3 세포질 도메인 아미노산 서열
- [0229] 서열 번호 170 인간 EphA3 Eph 리간드-결합 도메인 아미노산 서열
- [0230] 서열 번호 171 인간 EphA3 피브로넥틴 III형 도메인 아미노산 서열
- [0231] 서열 번호 172 인간 EphA3 피브로넥틴 III형 도메인 아미노산 서열
- [0232] 서열 번호 173 인간 EphA3 단백질 키나제 도메인 아미노산 서열
- [0233] 서열 번호 174 인간 EphA3 멸균 알파 모티프 아미노산 서열

[0234] **발명의 상세한 설명**

[0235] 본 발명은 적어도 부분적으로 EphA3에 대한 단클론 항체의 생산에 이은 이들 단클론 항체의 결합 도메인을 기반으로 하는 키메라 항원 수용체(CAR)의 생성에 기초한다. 이러한 단클론 항체는 다형성 교모세포종과 같은 암의 치료 및/또는 예방에 특히 적합할 수 있다. 추가로, 이러한 CAR을 발현하는 T 세포는 암을 가진 대상에서 입양 면역요법에 적합할 수 있다.

[0236] 본 발명은 공지된 항-EphA3 항체와 비교하여 신규 및/또는 개선된 특성을 갖는 신규 EphA3 결합 분자에 관한 것이다. 하나의 측면에서, 본 발명은 서열 번호 13-72 및/또는 표 2-5 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 적어도 하나의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 신규한 EphA3 결합 분자를 제공한다.

[0237] EphA3

[0238] 에프린 A형 수용체 3(EphA3; 또한 예를 들어 EPH 수용체 A3; EPH-유사 키나제 4; 인간 배아 키나제; 티로신-단백질 키나제 TYR04; 및 티로신-단백질 키나제 수용체 ETK1이라고도 함)은 전장 EphA3 단백질 및 이의 단편, 변이체 및 유도체를 포함하는 알려진 모든 자연 발생 EphA3 분자를 포함한다. EphA3은 포유동물 EphA3, 예를 들어 UniProtKB 수탁 번호 P29320(서열 번호 165에 제시된 바와 같음)으로 확인된 인간 EphA3을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 인간에서, EphA3은 EPHA3 유전자(ETK, ETK1, HEK 및 TYR04로도 알려짐)에 의해 암호화된다. EphA3의 기능은, 예를 들어, 전문이 본원에 참고로 포함된 문헌[Boyd et al., J Biol Chem, 267(5): 3262-3267]에 기술되어 있다. EphA3는 인접 세포에 있는 막-결합된 에프린 계열 리간드에 되는 대로 결합하여 인접 세포로의 접촉-의존적 양방향 신호전달을 유도하는 수용체 티로신 키나아제로 기능하는 ~110kDa 단일-통과 I형 막관통 단백질이다.

[0239] 서열 번호 165의 N-말단 20개 아미노산은 신호 펩티드를 구성하므로 성숙한 형태의 EphA3(즉, 신호 펩티드를 제거하기 위한 처리 후)는 서열 번호 166에 나타난 아미노산을 갖는다. 서열 번호 165의 위치 21 내지 541은 세포외 도메인(서열 번호 167)을 형성하고, 위치 542 내지 565는 막관통 도메인(서열 번호 168)을 형성하고, 위치 566 내지 983은 세포질 도메인(서열 번호 169)을 형성한다. 세포외 도메인은 Eph 리간드-결합 도메인(서열 번호 170에 나타난, 서열 번호 165의 위치 29 내지 207); 두 개의 피브로넥틴 III형 도메인(각각 서열 번호 171 및 172에 나타난, 서열 번호 165의 위치 325 내지 435, 및 서열 번호 165의 위치 436 내지 531)을 포함한다. 세포질 도메인은 단백질 키나제 도메인(서열 번호 173에 나타난, 서열 번호 165의 위치 621 내지 882)을 포함한다. 세포질 도메인은 또한 멸균 알파 모티프(SAM)(서열 번호 174에 나타난, 서열 번호 165의 위치 911 내지 975)를 포함한다.

[0240] EphA3 성숙 아미노산 서열:

```
MDCQLSILLLLSCSVLDSFGELIPQPSNEVNLDSKTIQGELGWISYPSHGWEIIS
GVDEHYTPIRTYQVCNVMDHSQNNWLRNWNVPRNSAQKIYVELKFTLRDCNSIP
LVLGTCKETFNLYMESDDDHGVKFRHQFTKIDTIAADESFTQMDLGDRILKLN
TEIREVGPVNKKGFYLAFAQDVGACVALVSVRVYFKKCPFTVKNLAMFPDTPMD
```

[0241]

SQSLVEVRGSCVNNKEEDPPRMYCSTEGEWLVPIGKCSNAGYEERGFMCQ  
 ACRPGFYKALDGNMKCAKCPPHSSTQEDGSMNCRCENNYFRADKDPSSMACT  
 RPPSSPRNVISINETSVIDLWSWPLDTGGRKDVTFNIICKCGWNIKQCEPCSP  
 NVRFLPRQFGLTNTTVTVDLLAHTNYTFEIDAVNGVSELSSPPRQFAAVSITTNQ  
 AAPSPVLTIKKDRTSRNSISLSWQEPEHPNGIILDYEVKYYEKQESETSITLRRAR  
 GTNVTISSLKPDITVYFQIRARTAAAGYGTNSRKFEFETSPDFSISGESSQVVMIAI  
 SAAVAIIILLTVVIYVLIGRFCGYKSKHGADKRLHFGNGHLKLPGLRITYVDPHTYE  
 DPTQAVHEFAKELDATNISIDKVVGAGEFGEVCSGRLKLPKKEISVAIKTLKVG  
 TEKQRRDFLGEASIMGQFDHPNIIRLEGVVTKSKPVMIVTEYMENGLDLSFLRKH  
 DAQFTVIQLVGLRGIASGMKYLSDMGYVHRDLAARNILINSNLVCKVSDFGLSR  
 VLEDDPEAAVYTRGGKIPRWTSPEAIAYRKFTSASDVWSYGVILWEVMSYGERP  
 YWEMSNQDVIKAVDEGYRLPPMDCPAALYQLMLDCWQKDRNNRPKFEQIVSI  
 LDKLIRNPGSLKIITSAARPSNLLLDQSNVDITFRRTGDWLNQVWTAHCKEIFT  
 GVEYSSCDTIKISTDDMKKVGVTVVGPQKKIISIKALETSKNGPVPV

[0242]

[0243]

[서열 번호 165]

[0244]

본 명세서에서, "EphA3"은 임의의 종으로부터의 EphA3을 지칭하고 임의의 종으로부터의 EphA3 이소형, 단편, 변이체(돌연변이체 포함) 또는 상동체를 포함한다.

[0245]

본원에 사용된 바와 같이, 단백질의 "단편", "변이체" 또는 "상동체"는 임의로 참조 단백질(예를 들어, 참조 이소형)의 아미노산 서열에 대해 적어도 60%, 바람직하게는 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 아미노산 서열 동일성(sequence identity) 중 하나를 갖는 것을 특징으로 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 참조 단백질의 단편, 변이체, 이소형 및 상동체는 참조 단백질에 의해 수행되는 기능을 수행하는 능력을 특징으로 할 수 있다.

[0246]

"단편"은 일반적으로 단백질의 아미노산 서열의 100% 미만을 구성하는 참조 단백질의 분절, 도메인, 부분 또는 영역을 지칭한다. "변이체"는 일반적으로 참조 단백질의 아미노산 서열과 관련하여 하나 이상의 아미노산 치환, 삽입, 결실 또는 기타 변형을 포함하지만 참조 단백질의 아미노산 서열에 대해 상당한 정도의 서열 동일성(예를 들어, 적어도 60%)을 유지하는 아미노산 서열을 갖는 단백질을 지칭한다. "이소형"은 일반적으로 참조 단백질의 종과 동일한 종에 의해 발견되는 참조 단백질의 변이체를 지칭한다. "상동체"는 일반적으로 참조 단백질의 종과 비교하여 상이한 종에 의해 생성된 참조 단백질의 변이체를 지칭한다. 상동체는 오르소로그(orthologue)를 포함한다.

[0247]

단편은(아미노산 수에 의해) 임의의 길이일 수 있지만, 임의로 참조 단백질(즉, 단편이 유도된 단백질)의 길이의 적어도 20%일 수 있으며 참조 단백질의 길이의 50%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 중 하나의 최대 길이를 가질 수 있다. EphA3의 단편은 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 550 또는 약 600개 이하 아미노산 중 하나의 최소 길이를 가질 수 있고, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 550 또는 약 600개 이하 아미노산 중 하나의 최대 길이를 가질 수 있다.

[0248]

일부 실시양태에서, EphA3은 포유동물(예를 들어, 영장류(레서스, 시노몰구스, 비인간 영장류, 또는 인간) 및/또는 설치류(예를 들어, 래트 또는 뮤린) EphA3)로부터의 EphA3이다. EphA3의 이소형, 단편, 변이체 또는 상동체는 임의로, 주어진 종, 예를 들어 인간으로부터의 미성숙 또는 성숙 EphA3 이소형의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 아미노산 서열 동일성 중 하나를 가짐을 특징으로 할 수 있다.

[0249]

이소형, 단편, 변이체 또는 상동체는 임의로, 기능적 특성/활성에 대한 적절한 검정에 의해 분석에 의해 결정된 바와 같이, 예를 들어 참조 EphA3의 기능적 특성/활성을 갖는 기능적 이소형, 단편, 변이체 또는 상동체일 수 있다. 예를 들면, EphA3의 이소형, 단편, 변이체 또는 상동체는, 예를 들어, EphA5와의 연관성을 나타내거나 키나제 활성을 보유할 수 있다.

[0250]

일부 실시양태에서, EphA3은 서열 번호 165 또는 166에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 아미노산 서열 동일성 중 하나를 갖는 아미노산 서열을

포함하거나, 이들로 구성된다. 일부 실시양태에서, EphA3의 단편은 서열 번호 167, 170, 171, 172, 또는 이들의 조합 중 하나에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 아미노산 서열 동일성 중 하나를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 구성된다.

- [0251] EphA3는 단백질 티로신 키나제 계열의 에프린 수용체 서브패밀리의 구성원이며, 악성 흑색종, 교모세포종, 폐암 및 유방암을 포함한 다양한 인간 암에서 비정상적으로 발현되는 것으로 알려져 있다. EphA3의 증가된 발현은 중앙 세포 증식, 혈관신생 및 침습을 촉진할 수 있다.
- [0252] 표적 분자에 대한 관심 영역
- [0253] 본 발명의 항원-결합 분자는 특히 관심있는 EphA3의 영역을 표적으로 하도록 특이적으로 설계되었다. 2단계 접근법에서, 표적화된 EphA3 영역은 예측된 항원성, 기능 및 안전성에 대한 분석에 따라 선택되었다. EphA3의 표적 부위에 특이적인 항체는 특이적 단클론 항체를 발생시키기 위해 표적 부위에 상응하는 펩티드를 면역원으로 사용하고, 천연 상태에서 EphA3에 결합할 수 있는 항체를 확인하기 위해 후속 스크리닝을 사용하여 제조하였다. 이 접근법은 항체 에피토프에 대한 제어를 제공한다.
- [0254] 본 발명의 항원-결합 분자는 이들이 결합하는 EphA3의 영역을 참조하여 정의할 수 있다. 본 발명의 항원-결합 분자는 EphA3의 특정 관심 영역에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서 항원-결합 분자는 연속적인 아미노산 서열(즉, 아미노산 1차 서열)로 구성된 EphA3의 선형 에피토프에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항원-결합 분자는 아미노산 서열의 아미노산의 불연속 서열로 구성된 EphA3의 구조적 에피토프에 결합할 수 있다.
- [0255] 일부 실시양태에서, 항원-결합 분자는 EphA3에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항원-결합 분자는 EphA3의 세포외 영역(예를 들어, 서열 번호 167에 나타난 영역)에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항원-결합 분자는 Eph 리간드-결합 도메인의 도메인(예를 들어, 서열 번호 170에 나타난 영역)에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항원-결합 분자는 피브로넥틴 III형 도메인(예를 들어, 서열 번호 171 및 172에 나타난 영역) 중 하나 또는 둘 다에 결합한다.
- [0256] 항체가 결합하는 펩티드/폴리펩티드의 영역은 X-선 결정학, 항체 항원 복합체의 임의의 분석, 펩티드 스캐닝, 돌연변이유발 매핑, 질량 분석법에 의한 수소-중수소 교환 분석, 파지 디스플레이, 경쟁 ELISA 및 단백질 분해-기반 "보호" 방법을 포함한 당업계에 잘 알려진 다양한 방법을 사용하여 숙련가에 의해 결정될 수 있다. 이러한 방법은, 예를 들면, 전문이 본원에 참고로 포함된 문헌[Gershoni et al., BioDrugs, 2007, 21 (3): 145-156]에 기술되어 있다.
- [0257] 일부 실시양태에서 항원-결합 분자는 EphA3의 동일한 영역 또는 EphA3의 중첩 영역을 본원에 기술된 항체 클론 3C3-1 또는 2D4-1 중 하나의 VH 및 VL 서열을 포함하는 항체에 의해 결합되는 EphA3의 영역에 결합할 수 있다.
- [0258] 본원에 사용된 "단리된"이란 자연 상태에서 제거되거나 달리 인간 조작을 거친 EphA3 결합 분자와 같은 물질을 의미한다. 단리된 물질은 자연 상태에서 일반적으로 동반되는 성분이 실질적으로 또는 본질적으로 없을 수 있거나, 자연 상태에서 일반적으로 동반되는 성분과 함께 인공 상태에 있도록 조작될 수 있다. 단리된 물질은 재조합, 화학적 합성, 농축, 정제 또는 부분 정제된 형태일 수 있다.
- [0259] 본원에 사용된 "단백질"은 아미노산 중합체이며, 여기서 아미노산은 D-아미노산, L-아미노산, 자연 및/또는 비자연 아미노산을 포함할 수 있다. 본원에서 전형적으로 사용되는 바와 같이, "펩티드"는 50개 이하의 연속 아미노산을 포함하는 단백질이다. 본원에서 전형적으로 사용되는 바와 같이, "폴리펩티드"는 50개 이상의 연속 아미노산을 포함하는 단백질이다. 용어 "단백질"은 당단백질 및 지단백질과 같은 단백질-함유 분자를 포함하는 것으로 이해되어야 하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0260] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 서열 번호 165, 166, 167, 170, 171, 또는 172 중 하나의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 구성된 폴리펩티드에 결합할 수 있다.
- [0261] 항원-결합 분자가 특정 펩티드/폴리펩티드에 결합하는 능력은 ELISA, 면역 블롯(예를 들어, 웨스턴 블롯), 면역 침강, 표면 플라즈몬 공명(SPR; 예를 들어, 참조; Hearty et al., Methods Mol. Biol. (2012) 907: 411-442), 또는 생물층 간섭법(예를 들어, 참조; Lad et al., (2015) J. Biomol. Screen 20(4): 498-507)에 의한 분석을 포함할 수 있다. 숙련가에게 잘 알려진 방법으로 분석할 수 있다.
- [0262] 항원 결합 분자가 참조 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 또는 폴리펩티드에 결합할 수 있는 실시양태에서, 펩티드 또는 폴리펩티드는 참조 아미노산 서열의 한쪽 또는 양쪽 말단에 하나 이상의 추가 아미노산을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서 펩티드/폴리펩티드는, 예를 들면, 참조 아미노산 서열의 한쪽 또는 양쪽 말단에 1-5,

1-10, 1-20, 1-30, 1-40, 1-50, 5-10, 5-20, 5-30, 5-40, 5-50, 10-20, 10-30, 10-40, 10-50, 20-30, 20-40 또는 20-50개의 추가 아미노산을 포함한다.

- [0263] 일부 실시양태에서, 참조 아미노산의 한쪽 또는 양쪽 말단(즉, N-말단 및 C-말단)에 제공된 추가 아미노산(들)은 EphA3의 아미노산 서열의 맥락에서 참조 서열의 말단 위치에 상응한다. 예를 들자면, 항원-결합 분자가 서열 번호 #3#의 서열 및 서열 번호 #3#의 C-말단에 두 개의 추가 아미노산을 포함하는 펩티드 또는 폴리펩티드에 결합할 수 있는 경우, 두 개의 추가 아미노산은 둘 다 발린일 수 있으며 서열 번호 165의 위치 542 및 543에 상응한다.
- [0264] 일부 실시양태에서 항원-결합 분자는 본원에 기술된 항체 클론 3C3-1 또는 2D4-1 중 하나의 VH 및 VL 서열을 포함하는 항체에 의해 결합되는 펩티드/폴리펩티드에 결합할 수 있다.
- [0265] 항원-결합 분자
- [0266] 본 발명은 EphA3에 결합할 수 있는 항원-결합 분자를 제공한다.
- [0267] "항원-결합 분자" 표적 항원에 결합할 수 있는 분자를 지칭하며, 이들이 관련 표적 분자에 대한 결합을 나타내는 한 단클론 항체, 다클론 항체, 단일특이적 항체 및 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적(bispecific) 항체), 및 항체 단편을 포함한다.
- [0268] 특정 실시양태에서, 본원에 기술된 EphA3 결합 분자는 항체 또는 항체 단편이다. 본원에 사용된 "항체"는 면역글로불린 단백질이거나 이를 포함한다. 용어 "면역글로불린"은 면역글로불린 동형 IgA, IgD, IgM, IgG 및 IgE 및 이의 항원-결합 단편을 포함하는 포유동물 면역글로불린 유전자 복합체의 임의의 항원-결합 단백질 산물을 포함한다. 용어 "면역글로불린"에는 재조합, 키메라 또는 인간화되거나, 자연 발생적이든 인간 개입에 의해(예를 들어 재조합 DNA 기술에 의해) 생산되든 간에, 달리 변경되거나 변이된 아미노산 잔기, 서열 및/또는 글리코실화를 포함하는 면역글로불린이 포함된다.
- [0269] 일반적으로, 항체 및 항체 단편은 다클론성 또는 단클론성일 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 3C3-1 또는 2D4-1 단클론 항체 또는 이의 단편과 같은 도 1에 제공된 단클론 항체 중 하나(또는 이의 단편)이다.
- [0270] 본 발명은 또한 이의 범위내에 본원에 기술된 다클론 또는 단클론 항체의 Fv, Fc, Fab 또는 F(ab')<sub>2</sub> 단편과 같은 항체 단편을 포함한다. 대안적으로, 본 발명의 EphA3 결합체는 단일쇄 Fv(scFv) 및/또는 scFab 항체를 포함할 수 있다. 이러한 scFv는, 예를 들면, 미국 특허 제5,091,513호, 유럽 특허 제239,400호 또는 본원에 참고로 포함된 문헌[Winter & Milstein, 1991, Nature 349:293]의 기사에 각각 기술된 방법에 따라 제조할 수 있다. 본 발명은 또한 다수의 scFv를 포함하는 다가 재조합 항체 단편, 소위 디아바디(diabody), 트리아바디(triabody) 및/또는 테트라바디, 뿐만 아니라 이량체화-활성화된 데미바디를 포함하는 것으로 고려된다(예를 들어, 제WO/2007/062466호). 예를 들자면, 이러한 항체는 문헌[Holliger et al., 1993 Proc Natl Acad Sci USA 90:6444-6448]; 또는 문헌[Kipriyanov, 2009 Methods Mol Biol 562:177-93]에 기술된 방법에 따라 제조될 수 있으며, 이들은 전문가 본원에 참고로 포함된다.
- [0271] 또한 항체는 적절한 숙주 세포에서 항체 또는 항체 단편을 암호화하는 핵산을 발현함으로써 재조합 합성 항체 또는 항체 단편으로서 생산될 수 있음을 인지할 것이다. 재조합 항체 발현 및 선택 기술의 비제한적 예는 문헌 [Chapter 17 of Coligan et al., CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY and Zuberbuhler et al., 2009, Protein Engineering, Design & Selection 22 169]에 제공되어 있다.
- [0272] 전형적으로, 항체는 각각 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3 아미노산 서열을 포함하는 각각의 경쇄(V<sub>L</sub> 또는 VL) 및 중쇄(V<sub>H</sub> 또는 VH) 가변 영역; 및 각각의 경쇄(C<sub>L</sub>) 및 중쇄(CH<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>) 불변 영역을 포함한다. 따라서, 항체는 일반적으로 6개의 CDR(중쇄 가변 영역에 3개 및 경쇄 가변 영역에 3개)를 포함한다. 6개의 CDR은 함께 표적 항원에 결합하는 항체의 일부인 항체의 파라토프를 정의한다.
- [0273] 본 발명의 항원-결합 분자는 EphA3에 결합할 수 있는 단클론 항체(mAb)의 서열을 사용하여 설계 및 제조할 수 있다. 단일쇄 가변 단편(scFv), Fab 및 F(ab')<sub>2</sub> 단편과 같은 항체의 항원-결합 영역도 사용/제공될 수 있다. "항원-결합 영역"은 주어진 항체가 특이적인 표적에 결합할 수 있는 항체의 임의의 단편이다.
- [0274] V<sub>H</sub> 영역 및 V<sub>L</sub> 영역은 각 CDR의 어느 한 쪽에 프레임워크 영역(FR)을 포함하며, 이것은 CDR에 대한 스캐폴드를

제공한다. N-말단에서 C-말단까지, V<sub>H</sub> 영역은 다음 구조를 포함하고: N term-[HC-FR1]-[HC-CDR1]-[HC-FR2]-[HC-CDR2]-[HC-FR3]-[HC-CDR3]-[HC-FR4]-C term; V<sub>L</sub> 영역은 다음 구조를 포함한다: N term-[LC-FR1]-[LC-CDR1]-[LC-FR2]-[LC-CDR2]-[LC-FR3]-[LC-CDR3]-[LC-FR4]-C term.

- [0275] CDR 식별 및 넘버링은 Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)), Chothia (Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)), AbM 및 Contact를 포함한 임의의 공지된 CDR 넘버링 시스템에 따를 수 있다.
- [0276] 일부 실시양태에서, 항원-결합 분자는 EphA3에 결합할 수 있는 항원-결합 분자의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항원-결합 분자는 EphA3에 결합할 수 있는 항원-결합 분자의 FR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항원-결합 분자는 EphA3에 결합할 수 있는 항원-결합 분자의 CDR 및 FR을 포함한다. 즉, 일부 실시양태에서 항원-결합 분자는 EphA3에 결합할 수 있는 항원-결합 분자의 V<sub>H</sub> 영역 및 V<sub>L</sub> 영역을 포함한다.
- [0277] 일부 실시양태에서 항원-결합 분자는 본원에 긴밀하게 기술된 EphA3-결합 항체(즉, 항-EphA3 항체 클론 3C3-1 또는 2D4-1)의 VH/VL 영역이거나 이로부터 유래된 V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub> 영역을 포함한다.
- [0278] CDR 아미노산 서열의 비제한적인 예는 서열 번호 13-72 및/또는 표 2-5에 제시되어 있다. CDR 식별 및 넘버링은 abYsis 버전 3.4.1 및 IMGT/V-QUEST를 사용하여 수행하였다. 본 발명에 따른 항체는 1, 2 또는 3개 V<sub>L</sub> CDR 아미노산 서열(예를 들어, CDR1, CDR2 및/또는 CDR3) 및/또는 1, 2, 또는 3개 V<sub>H</sub> CDR 아미노산 서열(예를 들어, CDR1, CDR2 및/또는 CDR3), 예를 들어 서열 번호 13-72 및/또는 표 2-5에 제시된 것들을 포함할 수 있다.
- [0279] 일부 실시양태에서, EphA3 결합체는 다음을 포함한다:
- [0280] (a) 서열 번호 13-17 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR1; 서열 번호 18 내지 22 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR2; 및 서열 번호 23 내지 27 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 중쇄 면역글로불린 가변 영역 (VH) 폴리펩티드; 및/또는
- [0281] (b) 서열 번호 28-32 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR1; 서열 번호 33-37 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR2; 및 서열 번호 38-42 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 경쇄 면역글로불린 가변 영역 (VL) 폴리펩티드.
- [0282] 이러한 실시양태와 관련하여, VH 폴리펩티드는 적절하게는 서열 번호 153에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하고/하거나; VL 폴리펩티드는 적절하게는 서열 번호 154에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0283] 대안적인 실시양태에서, EphA3 결합체는 다음을 포함한다:
- [0284] (a) 서열 번호 43-47 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR1; 서열 번호 48-52 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR2; 및 서열 번호 53-57 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 VH 폴리펩티드; 및/또는
- [0285] (b) 서열 번호 58-62 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR1; 서열 번호 63-67 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR2; 및 서열 번호 68-72 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 VL 폴리펩티드.
- [0286] 이와 관련하여, VH 폴리펩티드는 서열 번호 155에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있고/하거나; VL 폴리펩티드는 서열 번호 156에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0287] 본원에 긴밀하게 기술된 항체의 VH 영역 및 VL 영역의 CDR 및 FR은 국제 IMGT(ImMunoGeneTics) 정보 시스템에 따라 하기에 정의되며(LeFranc et al., Nucleic Acids Res., (2015) 43 (Database issue): D413-22), 이것은 문헌[LeFranc et al., Dev. Comp. Immunol. (2003) 27: 55-77]에 기술된 바와 같은 IMGT V-DOMAIN 넘버링 규칙을 사용한다. 일부 실시양태에서, 항원-결합 분자는 하기 (1) 또는 (2)에 따른 VH 영역을 포함한다:
- [0288] (1) (3C3-1) 다음 CDR을 포함하는 VH 영역:

- [0289] 서열 번호 16의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1;
- [0290] 서열 번호 22의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2;
- [0291] 서열 번호 27의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3;
- [0292] 또는 HC-CDR2, HC-CDR2, 또는 HC-CDR3 중 하나 이상에서 하나 또는 둘 또는 세 개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.
- [0293] (2) (2D4-1) 다음 CDR을 포함하는 VH 영역:
- [0294] 서열 번호 47의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1;
- [0295] 서열 번호 52의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2;
- [0296] 서열 번호 57의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3;
- [0297] 또는 HC-CDR2, HC-CDR2, 또는 HC-CDR3 중 하나 이상에서 하나 또는 둘 또는 세 개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.
- [0298] 일부 실시양태에서, 항원-결합 분자는 하기 (3) 또는 (4)에 따른 VH 영역을 포함한다:
- [0299] (3) (3C3-1) 다음 FR을 포함하는 VH 영역:
- [0300] 서열 번호 97의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR1;
- [0301] 서열 번호 102의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR2;
- [0302] 서열 번호 107의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR3;
- [0303] 서열 번호 112의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR4;
- [0304] 또는 HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3, 또는 HC-FR4 중 하나 이상에서 하나 또는 둘 또는 세 개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.
- [0305] (4) (2D4-1) 다음 FR을 포함하는 VH 영역:
- [0306] 서열 번호 137의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR1;
- [0307] 서열 번호 142의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR2;
- [0308] 서열 번호 147의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR3;
- [0309] 서열 번호 152의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR4;
- [0310] 또는 HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3, 또는 HC-FR4 중 하나 이상에서 하나 또는 둘 또는 세 개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.
- [0311] 일부 실시양태에서 항원-결합 분자는 상기 (1) 및 (2) 중 하나에 따른 CDR, 및 상기 (3) 또는 (4)에 따른 FR을 포함하는 VH 영역을 포함한다.
- [0312] 일부 실시양태에서, 항원-결합 분자는 하기 (5) 또는 (6) 중 하나에 따른 VH 영역을 포함한다:
- [0313] (5) (1)에 따른 CDR 및 (3)에 따른 FR을 포함하는 VH 영역.
- [0314] (6) (2)에 따른 CDR 및 (4)에 따른 FR을 포함하는 VH 영역.
- [0315] 일부 실시양태에서, 항원-결합 분자는 하기 (7) 또는 (8)에 따른 VL 영역을 포함한다:
- [0316] (7) (3C3-1) 다음 CDR을 포함하는 VL 영역:
- [0317] 서열 번호 32의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1;
- [0318] 서열 번호 37의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2;
- [0319] 서열 번호 42의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3;
- [0320] 또는 LC-CDR2, LC-CDR2, 또는 LC-CDR3 중 하나 이상에서 하나 또는 둘 또는 세 개의 아미노산이 다른 아미노산

으로 치환된 이의 변이체.

- [0321] (8) (2D4-1) 다음 CDR을 포함하는 VL 영역:
- [0322] 서열 번호 62의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1;
- [0323] 서열 번호 67의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2;
- [0324] 서열 번호 72의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3;
- [0325] 또는 LC-CDR2, LC-CDR2, 또는 LC-CDR3 중 하나 이상에서 하나 또는 둘 또는 세 개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.
- [0326] 일부 실시양태에서, 항원-결합 분자는 하기 (9) 또는 (10)에 따른 VL 영역을 포함한다:
- [0327] (9) (3C3-1) 다음 FR을 포함하는 VL 영역:
- [0328] 서열 번호 97의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR1;
- [0329] 서열 번호 102의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR2;
- [0330] 서열 번호 107의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR3;
- [0331] 서열 번호 112의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR4;
- [0332] 또는 LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3, 또는 LC-FR4 중 하나 이상에서 하나 또는 둘 또는 세 개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.
- [0333] (10) (2D4-1) 다음 FR을 포함하는 VL 영역:
- [0334] 서열 번호 137의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR1;
- [0335] 서열 번호 142의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR2;
- [0336] 서열 번호 147의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR3;
- [0337] 서열 번호 152의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR4;
- [0338] 또는 LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3, 또는 LC-FR4 중 하나 이상에서 하나 또는 둘 또는 세 개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.
- [0339] 일부 실시양태에서 항원-결합 분자는 상기 (1) 및 (2) 중 하나에 따른 CDR 및 상기 (3) 또는 (4)에 따른 FR을 포함하는 VL 영역을 포함한다.
- [0340] 일부 실시양태에서, 항원-결합 분자는 하기 (11) 또는 (12) 중 하나에 따른 VH 영역을 포함한다:
- [0341] (11) (7)에 따른 CDR 및 (9)에 따른 FR을 포함하는 VH 영역.
- [0342] (12) (8)에 따른 CDR 및 (10)에 따른 FR을 포함하는 VH 영역.
- [0343] 항체의 항원-결합 영역의 VH 및 VL 영역은 함께 Fv 영역을 구성한다. 일부 실시양태에서, 본 발명에 따른 항원-결합 분자는 EphA3에 결합하는 Fv 영역을 포함하거나, 이들로 구성된다. 일부 실시양태에서, Fv의 VH 및 VL 영역은 링커 영역, 즉 단일쇄 Fv(scFv)에 의해 연결된 단일 폴리펩티드로서 제공된다.
- [0344] 일부 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 단리된 항체 및 CAR의 단편을 제공한다.
- [0345] 본 발명의 단편은 본원에 기술된 방법에 의해 생성될 수 있다. 대안적으로, 단편은, 예를 들면, endoLys-C, endoArg-C, endoGlu-C 및 V8-프로테아제와 같은 프로테아제로 항체 또는 CAR 단백질의 소화에 의해 생성될 수 있다. 소화된 단편은 당업계에서 잘 알려진 크로마토그래피 기술에 의해 정제될 수 있다.
- [0346] 본 발명의 특정 실시양태는 본 발명의 EphA3 항원-결합 분자의 면역원성 단편을 제공한다. "면역원성"은 인간, 마우스 또는 토끼와 같은 동물에 투여시 면역 반응을 유발할 수 있음을 의미한다. 면역 반응은 B 및/또는 T 림프구, NK 세포, 과립구, 대식세포 및 수지상 세포와 같은 면역 세포 및/또는 항체, 사이토카인 및 케모카인과 같은 분자를 포함하는 면역계의 선천성 및/또는 적응성 암의 생성, 활성화 또는 자극을 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다.

[0347] 항체 단편은 Fab 및 Fab'2 단편, 디아바디, 트리아바디, 이중특이적 항체 및 단일쇄 항체 단편(예를 들어, ScFv)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 항체 단편은 서열 번호 13-72에 제시된 것과 같은 CDR1, 2 및/또는 3 아미노산 서열, 또는 서열 번호 153-156에 제시된 것과 같은 V<sub>H</sub> 및/또는 V<sub>L</sub> 아미노산 서열의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 바람직한 항체 단편은 적어도 하나의 전체 경쇄 가변 영역 CDR 및/또는 적어도 하나의 전체 중쇄 가변 영역 CDR을 포함한다.

[0348] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 EphA3 결합체는 재조합, 인간 또는 인간화 항체, 또는 항체 단편이다. 본원에 광범위하게 사용된 "인간화" 항체는 비-인간 "외래" 종으로부터 수득된 변형된 항체 또는 항체 단편을 포함하여 전적으로 또는 적어도 부분적으로 인간 기원의 항체를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 및 항체 단편은 "외래" 항체에 대한 유해한 면역 반응을 유도하지 않으면서 동일하거나 다른 "외래" 종에서 생성되거나 유래된 하나의 종에 투여 가능하도록 변형될 수 있다. 상보성 결정 영역(CDR) 또는 가변 영역(즉, V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub> 도메인)을 포함하는 것과 같은 인간 또는 비-인간 항체 단편은 인간 항체 스캐폴드 또는 골격에 "이식"되어 "인간화" 항체 또는 항체 단편을 생성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 인간 또는 비인간 CDR 또는 V<sub>L</sub> 및 V<sub>L</sub> 도메인이 인간 항체 불변 영역과 재조합적으로 이식된다.

[0349] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 면역글로불린 중쇄 불변 서열의 하나 이상의 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역글로불린 중쇄 불변 서열은 IgG(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgA(예를 들어, IgA1, IgA2), IgD, IgE, 또는 IgM의 중쇄 불변 서열이거나 이로부터 유래된다.

[0350] 일부 실시양태에서, 면역글로불린 중쇄 불변 서열은 인간 면역글로불린 G 1 불변 서열(IGHG1: UniProt 수탁 번호 P01857, v1; 서열 번호 175)이다. 서열 번호 175의 위치 1 내지 98은 CH1 영역을 형성한다(서열 번호 176). 서열 번호 175의 위치 99 내지 110은 CH1과 CH2 영역 사이에 힌지 영역을 형성한다(서열 번호 177). 서열 번호 175의 위치 111 내지 223은 CH2 영역을 형성한다(서열 번호 178). 서열 번호 175의 위치 222 내지 330은 CH3 영역을 형성한다(서열 번호 179).

[0351] 면역글로불린 중쇄 불변 감마 1

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTC  
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD  
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK  
TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE  
NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL  
SLSPGK [ 서열 번호 175]

[0352] 일부 실시양태에서, CH1 영역은 서열 번호 176의 서열, 또는 서열 번호 176의 아미노산 서열에 대해 적어도 60%, 바람직하게는 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 아미노산 서열 동일성 중 하나를 갖는 서열을 포함하거나 이들로 구성된다.

[0354] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 면역글로불린 경쇄 불변 서열의 하나 이상의 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역글로불린 경쇄 불변 영역은 인간 면역글로불린 람다 불변 서열(IGLA; CA), 예를 들어, IGLC1, IGLC2, IGLC3, IGLC6, 또는 IGLC7이다. 일부 실시양태에서 CL 영역은 서열 번호 180의 서열, 또는 서열 번호 180의 아미노산 서열에 대해 적어도 60%, 바람직하게는 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 아미노산 서열 동일성 중 하나를 갖는 서열을 포함하거나 이들로 구성된다.

[0355] 면역글로불린 람다 불변 영역

MRPGTGQGGLEAPGEPGNLRQRWPLLLLGLAVVTHGLLRPTAASQSRALGPG  
APGSSRSLSLRWGRFLLQRGSWTGPRCWPRGFQSKHNSVTHVFGSGTQLT  
VLSQPKATPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLMNDFYPGILTVTWKADGTPITQGV  
EMTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWRSRRSYSCQVMHEGSTVEKTVAPAECS  
[ 서열 번호 180]

[0356]

[0357] 면역글로불린 카파 불변 영역

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE  
SVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0358] [ 서열 번호 212]

[0359] 항체의 항원-결합 영역의 VL 및 경쇄 불변 (CL) 영역, 및 VH 영역 및 중쇄 불변 1 (CH1) 영역은 함께 Fab 영역을 구성한다. 일부 실시양태에서, 항원-결합 분자는 VH, CH1, VL 및 CL(예를 들어, C<sub>κ</sub> 또는 C<sub>λ</sub>)을 포함하는 Fab 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fab 영역은 VH 및 CH1을 포함한다(예를 들어, VH-CH1 융합 폴리펩티드). 일부 실시양태에서, Fab 영역은 VH 및 CL을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다(예를 들어, VH-CL 융합 폴리펩티드). 일부 실시양태에서, Fab 영역은 VH 및 CL을 포함하는 폴리펩티드(예를 들어, VH-CL 융합 폴리펩티드) 및 VL 및 CH를 포함하는 폴리펩티드(예를 들어, CL-CH1 융합 폴리펩티드)를 포함하고; 즉, 일부 실시양태에서 Fab 영역은 CrossFab 영역이다. 일부 실시양태에서, Fab 또는 CrossFab의 VH, CH1, VL, 및 CL 영역은 링커 영역에 의해 연결된 단일 폴리펩티드로서, 즉 단일 쇠 Fab(scFab) 또는 단일 쇠 CrossFab(scCrossFab)로서 제공된다.

[0360] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 EphA3에 결합하는 Fab 영역을 포함하거나, 이것으로 구성하거나, 이것으로 본질적으로 구성된다.

[0361] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 항원-결합 분자는 EphA3에 결합하는 전체 항체를 포함하거나 이것으로 구성된다. 본원에 사용된 "전체 항체"는 면역글로불린(Ig)의 구조와 실질적으로 유사한 구조를 갖는 항체를 지칭한다. 상이한 종류의 면역글로불린과 이의 구조가, 예를 들면, 전문이 본원에 참고로 포함된 문헌[Schroeder and Cavacini, JAllergy Clin Immunol (2010) 125(202): S41-S52]에 기술되어 있다.

[0362] G형의 면역글로불린(즉, IgG)은 2개의 중쇄와 2개의 경쇄를 포함하는 약 150kDa 당단백질이다. N-말단에서 C-말단까지, 중쇄는 VH 다음에 3개의 불변 도메인(CH1, CH2 및 CH3)을 포함하는 중쇄 불변 영역을 포함하고, 유사하게 경쇄는 VL 다음에 CL을 포함한다. 중쇄에 따라, 면역글로불린은 IgG(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgA(예를 들어, IgA1, IgA2), IgD, IgE 또는 IgM으로 분류될 수 있다. 경쇄는 카파(κ) 또는 람다(λ)일 수 있다.

[0363] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 항원-결합 분자는 EphA3에 결합하는 IgG, 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgA(예를 들어, IgA1, IgA2), IgD, IgE, 또는 IgM을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 이것으로 본질적으로 구성된다.

[0364] 적합하게는, EphA3 결합제는 EphA3 단백질의 에피토프에 결합한다. 본원에 일반적으로 사용되는 "에피토프"는 단백질의 아미노산의 연속적 또는 불연속적 서열을 포함하는 항원성 단백질 단편이며, 여기서 에피토프는 항체 또는 기타 항원 수용체와 같은 면역계의 요소에 의해 인식되거나 결합될 수 있다.

[0365] 본 발명은 또한 본원에 개시된 EphA3 결합제의 변이체를 포함한다. 하나의 실시양태에서, 변이체는 본원에서 CDR "변이체"로 지칭되는, 서열 번호 13-72 중 어느 하나와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 EA3 결합제이다. 또 다른 실시양태에서, 변이체는 서열 번호 153-156번 중 어느 하나의 V<sub>H</sub> 및/또는 V<sub>L</sub> 아미노산 서열과 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0366] 적합하게는, CDR 또는 다른 변이체(들) 중 적어도 하나를 포함하는 EphA3 결합제는 EphA3 단백질에 결합할 수 있다.

[0367] 특정 실시양태에서, 변이체는 서열 번호 13-156 중 어느 하나에 제시된 것과 같은, 참조 단백질(예를 들어, 참조 이소형)의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는다. 본원에 개시된 단백질 "변이체"는 하나 이상의 아미노산이 결실, 삽입 또는 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 일부 아미노산은 펩티드의 생물학적 활성을 변화시키지 않으면서 치환되거나 결실될 수 있다는 것이 당업계에서 잘 이해된다(보존적 치환). 일부 실시양태에서, 단편, 변이체, 이소형 및 상동체 또는 참조 단백질은 참조 단백질에 의해 수행되는 기능을 수행하는 능력을 특징으로 할 수 있다.

[0368] 보존적 아미노산 치환은 당업계에 공지되어 있으며, 특정 물리적 및/또는 화학적 특성을 갖는 하나의 아미노산이 동일하거나 유사한 화학적 또는 물리적 특성을 갖는 다른 아미노산으로 교환되는 아미노산 치환을 포함한다. 예를 들어, 보존적 아미노산 치환은 산성/음전하 극성 아미노산을 다른 산성/음전하 극성 아미노산(예를 들어,

Asp 또는 Glu)으로 치환, 무극성 측쇄가 있는 아미노산을 비극성 측쇄를 갖는 다른 아미노산(예를 들어, Ala, Gly, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Cys, Val 등)으로 치환, 염기성/양전하 극성 아미노산을 다른 염기성/양전하 극성 아미노산(예를 들어 Lys, His, Arg 등)으로 치환, 극성 측쇄가 있는 비하전된 아미노산을 극성 측쇄가 있는 다른 비하전된 아미노산(예를 들어, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr 등)으로 치환, 베타 분지 측쇄가 있는 아미노산을 베타 분지 측쇄가 있는 다른 아미노산(예를 들어, Ile, Thr, 및 Val)으로 치환, 방향족 측쇄가 있는 아미노산을 방향족 측쇄가 있는 다른 아미노산(예를 들어, His, Phe, Trp, 및 Tyr)으로 치환 동일 수 있다.

[0369] 각각의 단백질과 핵산 사이의 서열 관계를 설명하기 위해 본원에서 일반적으로 사용되는 용어는 "비교 창 (comparison window)", "서열 동일성", "서열 동일성 백분율" 및 "실질적 동일성"을 포함한다. 각각의 핵산/단백질은 각각 (1) 핵산/단백질이 공유하는 완전한 핵산/단백질 서열의 단지 하나 이상의 부분, 및 (2) 핵산/단백질 사이에 분기하는 른 하나 이상의 부분을 포함할 수 있기 때문에, 서열 비교는 전형적으로 "비교 창"을 통해 서열을 비교하여 서열 유사성의 국소 영역을 식별하고 비교함으로써 수행된다. "비교 창"은 참조 서열과 비교되는 전형적으로 6, 9 또는 12개의 연속 잔기의 개념적 분절을 지칭한다. 비교 창은 각 서열의 최적 정렬을 위한 참조 서열과 비교하여 약 20% 이하의 추가 또는 결실(즉, 갭)을 포함할 수 있다. 비교 창을 정렬하기 위한 최적의 서열 정렬은 컴퓨터화된 알고리즘 구현에 의해(Geneworks program by Intelligenetics; GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, USA, 본원에 참고로 포함됨) 또는 검사 및 선택된 다양한 방법 중 어느 하나에 의해 생성된 최상의 정렬(즉, 비교 창에 대해 가장 높은 비율의 상동성을 야기함)에 의해 수행될 수 있다. 예를 들면 본원에 참고로 포함된 문헌[Altschul et al., 1997, Nucl. Acids Res. 25 3389]에 개시된 것과 같은 BLAST 프로그램 제품군을 참조할 수도 있다. 서열 분석에 대한 자세한 논의는 문헌[Unit 19.3 of CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY Eds. Ausubel et al. (John Wiley & Sons Inc NY, 1995-2015)]에서 찾아볼 수 있다.

[0370] 용어 "서열 동일성"은 가장 넓은 의미로 표준 알고리즘을 사용하는 적절한 정렬과 관련하여, 비교 창에 걸쳐 서열이 동일한 정도를 고려하여 정확한 뉴클레오티드 또는 아미노산 일치 수를 포함하는 것으로 본원에서 사용된다. 따라서, "서열 동일성의 백분율"은 비교 창에 걸쳐 두 개의 최적으로 정렬된 서열을 비교하고, 동일한 핵산 염기(예를 들어, A, T, C, G, I)가 두 서열에서 발생하는 위치의 수를 결정하여 일치하는 위치의 수를 산출하고, 일치하는 위치의 수를 비교 창의 총 위치 수(즉, 창(window) 크기)로 나누고, 결과에 100을 곱하여 서열 동일성의 백분율을 산출함으로써 계산된다. 예를 들면, "서열 동일성"은 DNASIS 컴퓨터 프로그램(Version 2.5 for windows; available from Hitachi Software engineering Co., Ltd., South San Francisco, California, USA)에 의해 계산된 "일치 백분율"을 의미하는 것으로 이해될 수 있다.

[0371] 본원에 개시된 항체, 항체 단편 또는 이의 변이체의 유도체가 또한 제공된다.

[0372] 본원에 사용된 항체, 항체 단편 또는 이의 변이체의 "유도체"는, 예를 들면, 다른 화학적 모이어티와의 접합 또는 복합체화, 번역후 변형(예를 들어, 인산화, 유비퀴틴화, 글리코실화), 화학적 변형(예를 들어, 가교결합, 아세틸화, 비오틴화, 산화 또는 환원 등), 표지와의 접합(예를 들어, 형광단, 효소, 방사성 동위원소) 및/또는 당 업계에서 이해되는 바와 같은 추가 아미노산 서열의 포함에 의해 변경되었다.

[0373] 이와 관련하여, 숙련가는 단백질의 화학적 변형과 관련된 보다 광범위한 방법론에 대해 문헌[Chapter 15 of CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE, Eds. Coligan et al. (John Wiley & Sons NY 1995-2015)]을 참조한다.

[0374] 추가 아미노산 서열은 융합 단백질을 생성하는 융합 파트너 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 예를 들자면, 융합 파트너 아미노산 서열은 단리된 융합 단백질의 검출 및/또는 정제를 도울 수 있다. 비제한적인 예는 금속-결합(예를 들어, 폴리히스티딘) 융합 파트너, 말토스 결합 단백질(MBP), 단백질 A, 글루타티온 S-트랜스퍼라제(GST), 형광 단백질 서열(예를 들어, GFP, RFP), 에피토프 태그, 예를 들어 myc, FLAG 및 혈구응집소 태그를 포함한다.

[0375] 본 발명의 단리된 단백질(예를 들어, EphA3 항체, 항체 단편 및 CAR), 변이체, 단편 및/또는 유도체는 펩티드 단편을 생산하기 위한 화학적 합성, 재조합 DNA 기술 및 단백질 가수분해 절단을 포함하지만 이에 제한되지 않는 당업계에 공지된 임의의 수단에 의해 생성될 수 있다.

[0376] 화학 합성은 고체상 및 용액상 합성을 포함한다. 이러한 방법은 당업계에 잘 알려져 있지만 SYNTHETIC VACCINES

Ed. Nicholson (Blackwell Scientific Publications)의 제9장 및 CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan et al., (John Wiley & Sons, Inc. NY USA 1995-2008)제15장에 제공된 바와 같은 화학적 합성 기술의 예를 참조한다. 이와 관련하여, 국제 공개 제WO 99/02550호 및 국제 공개 제WO 97/45444호를 또한 참조한다.

- [0377] 하나의 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 EphA3 항체, 항체 단편 및/또는 CAR 단백질은 재조합 단백질이다.
- [0378] 재조합 단백질은, 예를 들면, 문헌[Sambrook et al., MOLECULAR CLONING. A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 1989), 특히 섹션 16 및 17; CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY Eds. Ausubel et al., (John Wiley & Sons, Inc. NY USA 1995-2008), 특히 제10장 및 제16장; 및 CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan et al., (John Wiley & Sons, Inc. NY USA 1995-2008), 특히 제1장, 제5장 및 제6장]에 기술된 바와 같은 표준 프로토콜을 사용하여 당업계의 숙련가에 의해 편리하게 제조될 수 있다.
- [0379] 키메라 항원 수용체(CAR)
- [0380] 본 발명은 또한 본 발명의 항원-결합 분자 또는 폴리펩티드를 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 제공한다.
- [0381] 따라서, 본 발명의 관련 측면에서 서열 번호 13-72에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 적어도 하나의 CDR을 포함하는 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 및 세포내 T 세포 신호 전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 제공한다.
- [0382] CAR은 T-세포 신호전달 도메인에 연결된 항체(예를 들어, 단일 쇠 가변 단편(scFv))의 항원 결합 도메인을 함유하는 인공적으로 작제된 하이브리드 단백질 또는 폴리펩티드이다. CAR의 특징은 T-세포 특이성과 반응성을 비-MHC-제한된 방식으로 선택된 표적에 대해 재지시하는 능력 및 단클론 항체의 항원-결합 특성을 이용하는 능력을 포함한다. 비-MHC-제한된 항원 인식은 CAR을 발현하는 T 세포에 항원 처리와 무관하게 항원을 인식하는 능력을 제공하여 중앙 탈출의 주요 메커니즘을 우회한다. 더욱이, T-세포에서 발현될 때, CAR은 유리하게는 내인성 T 세포 수용체(TCR) 알파 및 베타 쇠와 이량체화되지 않는다. CAR 구조 및 조작용, 예를 들면, 전문이 본원에 참고로 포함된 문헌[Dotti et al, Immunol Rev (2014) 257(1)]에 검토되어 있다. CAR은 세포막 앵커 영역(막관통 도메인으로도 알려짐) 및 신호전달 영역에 연결된 항원-결합 영역을 포함한다. 임의의 힌지 영역은 항원-결합 영역과 세포막 앵커 영역 사이의 분리를 제공할 수 있으며 가요성 링커로서 작용할 수 있다. 본 발명의 CAR은 본 발명에 따른 폴리펩티드를 포함하거나, 이들로 구성하거나, 이들로 본질적으로 구성된 항원-결합 영역을 포함한다.
- [0383] 세포막 앵커 영역은 CAR의 항원-결합 도메인과 신호전달 영역 사이에 제공되고, CAR을 발현하는 세포의 세포막에 CAR을 고정시키기 위해 세포의 공간에 항원-결합 영역 및 세포 내부에 신호전달 영역을 제공한다. 일부 실시양태에서, CAR은 CD3- $\zeta$ , CD4, CD8, 또는 CD28 중 하나에 대한 막관통 영역 아미노산 서열로 구성되거나 유래된다. 적합하게는, 막관통 도메인은 CD8 $\alpha$ , CD8 $\beta$ , 4-1BB/CD137, CD28, CD34, CD4, Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$ , CD16, OX40/CD134, CD3- $\zeta$ , CD3 $\epsilon$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , TCR $\alpha$ , CD32, CD64, VEGFR2, FAS, FGFR2B 및 이들의 임의의 조합으로부터 선택된 막 단백질로부터 유래된다. 일부 특정 실시양태에서, 막관통 도메인은 일반적으로 우수한 수용체 안정성을 제공하는 CD8 및/또는 CD28 막관통 도메인으로부터 유래될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 참조 아미노산 서열 "로부터 유래된" 영역은 적어도 참조 서열에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일한 아미노산 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 막관통 도메인은 서열 번호 159에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0384] 본원에 기술된 키메라 수용체의 막관통 도메인(즉, 세포막 앵커 영역)은 당업계에 공지된 임의의 형태일 수 있다. 본원에 사용된 "막관통 도메인"은 세포막, 바람직하게는 진핵 세포막에서 열역학적으로 안정한 임의의 단백질 구조를 지칭한다. 본원에 사용된 키메라 수용체에서 사용하기에 적합한 막관통 도메인은 자연 발생 단백질로부터 수득될 수 있다. 대안적으로, 이것은 합성, 비-자연 발생 단백질 세그먼트(예를 들어, 세포막에서 열역학적으로 안정한 소수성 단백질 세그먼트; 예를 들어, 본원에 참고로 포함된 미국 특허 제7,052,906호 및 PCT 공개 제WO 2000/032776호 참조)일 수 있다. 이를 위해, 막관통 도메인은 소수성 알파 나선을 포함할 수 있다.
- [0385] 임의의 세포내 또는 세포질 T-세포 신호전달 도메인(예를 들어, CD3- $\zeta$  또는 Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$ )은 CAR-발현 T-세포의 인산화 및 활성화를 위해 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM)를 포함하는 것과 같은 본원에 기술된 키메라 수용체를 작제하는데 사용될 수 있다. 본원에서 사용되는 "ITAM"은 많은 면역 세포에서 발현되는 신호전달 분자의 꼬리 부분에 일반적으로 존재하는 보존된 단백질 모티프이다. 항원 인식 후, 수용체가 클러스터링되고 신호가 세포로 전달된다. 가장 일반적으로 사용되는 T-세포 신호전달 성분은 3개의 ITAM을 포함하는 CD3- $\zeta$ 의 신

호전달 성분이다. 이것은 항원이 결합된 후 T 세포에 활성화 신호를 전달한다. 그러나, CD3-ζ 세포질 신호전달 도메인은 완전히 적절한 활성화 신호를 제공하지 않을 수 있고, 앞서 기술된 것과 같은 추가의 공동-자극 신호 전달 도메인이 이용될 수 있음을 인지할 것이다. 예를 들면, 키메라 CD28 및/또는 4-1BB/CD137을 CD3-ζ와 함께 사용하여 증식/생존 신호를 전달하거나 세 가지 모두를 함께 사용할 수 있다. 따라서, 본 발명의 CAR의 엔도도메인은 CD28 공동-자극 도메인(예를 들어, 서열 번호 161), 4-1BB/CD137 공동-자극 도메인(예를 들어, 서열 번호 160) 및 CD3-ζ 세포내 신호전달 도메인(예를 들어, 서열 번호 162)을 포함할 수 있다.

[0386] CAR의 신호전달 영역은 또한 표적 단백질에 결합시 CAR-발현 T-세포의 활성화를 촉진하기 위해 공동-자극 분자의 신호전달 영역으로부터 유래된 공동-자극 서열을 포함할 수 있다. 숙주 세포(예를 들어, 면역 세포)에서 공동-자극 신호전달 도메인의 활성화는 세포가 사이토카인의 생성 및 분비, 식세포 특성, 증식, 분화, 생존 및/또는 세포독성을 증가 또는 감소시키도록 유도할 수 있다. 임의의 공동-자극 분자의 공동-자극 신호전달 도메인은 본원에 기술된 키메라 수용체에서의 사용에 적합할 수 있다. 공동-자극 신호전달 도메인의 유형(들)은 키메라 수용체가 발현될 면역 세포의 유형(예를 들어, T 세포, NK 세포, 대식세포, 호중구 또는 호산구) 및 원하는 면역 효과기 기능(예를 들어, ADCC 효과)과 같은 인자에 기반하여 선택될 수 있다. 즉, 본원에 사용된 용어 "공동-자극 신호전달 도메인"은 효과기 기능과 같은 면역 반응을 유도하기 위해 세포 내에서 신호 전달을 매개하는 단백질의 적어도 일부를 지칭한다. 본원에 기술된 키메라 수용체의 공동-자극 신호전달 도메인은 신호를 전달하고 T 세포, NK 세포, 대식세포, 호중구, 또는 호산구와 같은 면역 세포에 의해 매개되는 반응을 조절하는 공동-자극 단백질의 세포질 신호전달 도메인일 수 있다.

[0387] 키메라 수용체에 사용하기 위한 예시적인 공동-자극 신호전달 도메인은 제한 없이, B7/CD28 패밀리의 구성원(예를 들어, B7-1/CD80, B7-2/CD86, B7-H1/PD-L1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H6, B7-H7, BTLA/CD272, CD28, CTLA-4, Gi24/VISTA/B7-H5, ICOS/CD278, PD-1, PD-L2/B7-DC, 및 PDCD6); TNF 슈퍼패밀리의 구성원(예를 들어, 4-1BB/TNFSF9/CD137, 4-1BB 리간드/TNFSF9, BAFF/BLyS/TNFSF13B, BAFF-R/TNFRSF13C, CD27/TNFRSF7, CD27 리간드/TNFSF7, CD30/TNFRSF8, CD30 리간드/TNFSF8, CD40/TNFRSF5, CD40 리간드/TNFSF5, DR3/TNFRSF25, GITR/TNFRSF18, GITR 리간드/TNFSF18, HVEM/TNFRSF14, LIGHT/TNFSF14, 림포톡신-알파/TNF-β, OX40/TNFRSF4, OX40 리간드/TNFSF4, RELT/TNFRSF19L, TACI/TNFRSF13B, TL1A/TNFSF15, TNF, 및 TNFR11/TNFRSF1B); SLAM 패밀리의 구성원(예를 들어, 2B4/CD244/SLAMF4, BLAME/SLAMF8, CD2, CD2F-10/SLAMF9, CD48/SLAMF2, CD58/LFA-3, CD84/SLAMF5, CD229/SLAMF3, CRACC/SLAMF7, NTB-A/SLAMF6, 및 SLAM/CD150); 및 CD2, CD7, CD53, CD82/Kai-1, CD90/Thy1, CD96, CD160, CD200, CD300a/LMIR1, HLA 클래스 I, HLA-DR, Ikaros, 인테그린 α4/CD49d, 인테그린 α4b1, 인테그린 α4b7/LPAM-1, LAG-3, TCL1A, TCL1B, CRTAM, DAP12, 텍틴-1/CLEC7A, DPPIV/CD26, EphB6, TIM-1/KIM-1/HAVER, TIM-4, TSLP, TSLP R, 림프구 기능 관련 항원-1(LFA-1), 및 NKG2C와 같은 임의의 다른 공동-자극 분자를 포함하는 공동-자극 단백질의 세포질 신호전달 도메인일 수 있다. 일부 실시양태에서, 공동-자극 신호전달 도메인은 4-1BB, CD28, OX40, ICOS, CD27, GITR, HVEM, TIM1, LFA1 (CD11a) 또는 CD2, 또는 이의 임의의 변이체의 것이다. 일부 실시양태에서, 공동-자극 신호전달 도메인은 4-1BB(예를 들어, 서열 번호 160) 및/또는 CD28(예를 들어, 서열 번호 161)로부터 유래된다.

[0388] 또한 공동-자극 신호전달 도메인이 면역 세포의 면역 반응을 조절할 수 있도록, 본원에 기술된 공동자극 신호전달 도메인 중 어느 것의 변이체가 본 개시내용의 범위 내에 있다. 추가로, 키메라 수용체는 하나 이상의 공동-자극 신호전달 도메인(예를 들어, 2, 3, 4개 또는 그 이상)을 포함할 수 있는 것으로 예상된다. 일부 실시양태에서, 키메라 수용체는 2개 이상의 동일한 공동자극 신호전달 도메인, 예를 들면, CD28의 공동-자극 신호전달 도메인의 2개 카피를 포함한다. 일부 실시양태에서, 키메라 수용체는 본원에 기술된 임의의 2개 이상의 공동-자극 단백질과 같은 상이한 공동-자극 단백질로부터의 2개 이상의 공동-자극 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 경우에, CAR은 상이한 세포내 신호전달 경로의 공동-자극을 제공하도록 조작된다. 예를 들면, CD28 공동-자극과 관련된 신호전달은 포스포티로신노시톨 3-키나제(P13K) 경로를 우선적으로 활성화하는 반면, 4-1BB-매개된 신호 전달은 TNG 수용체 관련 인자(TRAF) 어댑터 단백질을 통해 이루어진다. 따라서 CAR의 신호전달 영역은 때때로 하나 이상의 공동자극 분자의 신호전달 영역으로부터 유래된 공동자극 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 CAR은 CD28, OX30, 4-1BB, ICOS 및 CD27 중 하나 이상의 세포내 도메인의 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 이로부터 유래되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된 하나 이상의 공동-자극 서열을 포함한다.

[0389] 임의의 힌지 영역은 항원-결합 도메인과 막관통 도메인 사이의 분리를 제공할 수 있으며, 가요성 링커로서 작용할 수 있다. 힌지 영역은 IgG1로부터 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 CAR은 IgG1의 힌지 영역의 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 이로부터 유도되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된 힌

지 영역을 포함한다.

- [0390] 본 발명의 CAR은, 예를 들면, 당업계에 공지된 바와 같은 1세대, 2세대, 3세대 또는 4세대(즉, 보편적 사이토카인-매개 사멸을 위해 재지시된 T-세포(TRUCKS)와 연관된) CAR인 것으로 간주될 수 있는 것으로 예상된다. 1세대 CAR은 전형적으로 힌지 및 막관통 도메인을 통해 항체-유래 scFv를 T 세포 수용체의 CD3-제타( $\zeta$  또는  $z$ ) 세포 내 신호전달 도메인에 연결한다. 2세대 CAR은 공동자극 신호를 제공하기 위해 추가 도메인(예를 들어, CD28, 4-1BB 또는 ICOS)을 포함한다. 3세대 CAR은 전형적으로 TCR CD3- $\zeta$  쇄와 융합된 두 개의 공동자극 도메인을 포함한다. 3세대 공동자극 도메인은, 예를 들면, CD3- $\zeta$ , CD27, CD28, 4-1BB, ICOS, DAP-10 또는 OX40의 조합을 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명의 CAR은 단일 쇄 가변 단편(scFv)으로부터 유래된 엑토도메인, 힌지, 막관통 도메인, 및 CD3- $\zeta$  및/또는 공동-자극 분자로부터 유래된 1(1세대), 2(2세대) 또는 3(3세대) 신호전달 도메인을 갖는 엔도도메인을 포함할 수 있다.
- [0391] 일부 실시양태에서, CAR은 4세대 CAR로도 알려진 사이토카인 활성화에 대해 재지시된 T 세포(예를 들어, TRUCK)와 연관된다. TRUCKS는 CAR T 세포의 효과기 활성을 촉발하고 또한 표적 조직(예를 들어, EphA3를 발현하는 종양 조직)에 축적되는 유전자이식 사이토카인(예를 들어, IL-12)을 방출하기 위한 비히클로서 사용되는 CAR-재지시된 T-세포이다. 유전자이식 사이토카인은 구성적으로 만들어지거나 표적의 CAR 관여시 방출된다. TRUCK 세포는 표적 부위에 다양한 치료 사이토카인을 침착시킬 수 있다. 이것은 표적화된 부위에 치료학적 농도를 초래할 수 있으며 이러한 동일한 사이토카인의 전신 독성을 피할 수 있다.
- [0392] 본 발명의 CAR은 적합하게는 EphA3에 대한 항원 특이성을 갖는다. 본원에 사용된 "항원 특이성을 갖는다" 및 "항원-특이적 반응을 유도한다"라는 문구는 항원에 대한 CAR의 결합이 면역 반응을 유도하도록 CAR이 항원에 특이적으로 결합하여 면역학적으로 인식할 수 있음을 의미한다. 특정 이론 또는 메커니즘에 결부됨이 없이, EphA3에 대한 항원-특이적 반응을 유도함으로써 본원에 기술된 CAR은 다음 중 하나 이상을 제공하는 것으로 믿어진다: EphA3-발현 암 세포의 표적화 및 파괴, 암 세포 감소 또는 제거, 종양 부위(들)에 대한 면역 세포의 침윤 촉진, 및 항암 반응 강화/확장.
- [0393] 본 발명의 하나의 실시양태는 도 1에 제공된 것과 같은 본원에 기술된 단클론 항체 중 하나의 항원 결합 도메인을 포함하는 CAR을 제공한다. 특정 실시양태에서, CAR은 EphA3에 특이적으로 결합하는 3C3 또는 2D4 단클론 항체의 항원 결합 도메인을 포함한다. 이와 관련하여, 본 발명의 바람직한 실시양태는 3C3 또는 2D4의 항원 결합 도메인의 단일 쇄 가변 단편(scFv)을 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 이로 본질적으로 구성된 항원-결합 도메인을 포함하는 CAR을 제공한다.
- [0394] 항원 결합 도메인은 경쇄 가변 영역 및/또는 중쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 본 발명의 실시양태에서, 중쇄 가변 영역은 CDR1 영역, CDR2 영역 및 CDR3 영역을 포함한다. 이와 관련하여, 항원 결합 도메인은 서열 번호 13-17 또는 이에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 중쇄 CDR1 영역; 서열 번호 18-22 또는 이에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 중쇄 CDR2 영역; 및 서열 번호 23-27 또는 이에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 중쇄 CDR3 영역 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 대안적인 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 서열 번호 43-47 또는 이에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 중쇄 CDR1 영역; 서열 번호 48-52 또는 이에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 중쇄 CDR2 영역; 및 서열 번호 53-57 또는 이에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 중쇄 CDR3 영역 중 하나 이상을 포함한다. 바람직하게는, 중쇄는 서열 번호 13-27 또는 서열 번호 43-57 또는 이에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열로부터 선택된 CDR1 영역, CDR2 영역, 및 CDR3 영역 모두를 포함한다.
- [0395] 본 발명의 실시양태에서, 경쇄 가변 영역은 경쇄 CDR1 영역, 경쇄 CDR2 영역, 및 경쇄 CDR3 영역을 포함할 수 있다. 이와 관련하여, 항원 결합 도메인은 서열 번호 28-32 또는 이에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 경쇄 CDR1 영역; 서열 번호 33-37 또는 이에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 경쇄 CDR2 영역; 및 서열 번호

38-42 또는 이에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 경쇄 CDR3 영역 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 대안적인 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 서열 번호 58-62 또는 이에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 경쇄 CDR1 영역; 서열 번호 63-67 또는 이에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 경쇄 CDR2 영역; 및 서열 번호 68-72 또는 이에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 경쇄 CDR3 영역 중 하나 이상을 포함한다. 바람직하게는, 경쇄는 서열 번호 28-42 또는 서열 번호 58-72 또는 이에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열로부터 선택된 CDR1 영역, CDR2 영역, 및 CDR3 영역 모두를 포함한다.

[0396] 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 영역은 서열 번호 153 또는 155 또는 이에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 이로 본질적으로 구성될 수 있다. 항원 결합 도메인의 경쇄 가변 영역은 서열 번호 154 또는 155 또는 이에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 이로 본질적으로 구성될 수 있다. 따라서, 본 발명의 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 서열 번호 153 또는 이에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 번호 154 또는 이에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 대안적인 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 서열 번호 155 또는 이에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 번호 156 또는 이에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 항원 결합 도메인은 서열 번호 153과 154 또는 서열 번호 155와 156 또는 이에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0397] 본 발명의 실시양태에서, 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역은 스페이스 또는 링커 서열에 의해 연결될 수 있다. 링커는 임의의 적합한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 본 발명의 실시양태에서, 링커는 서열 번호 158 에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 이로 본질적으로 구성될 수 있다.

[0398] 추가로, CAR은 추가의 스페이스 또는 링커 서열을 포함하여 항원 결합 도메인을 막관통 도메인과 연결하고 항원 결합 도메인을 이의 엔도도메인으로부터 공간적으로 분리할 수 있다. 가요성 스페이스 또는 힌지 영역은 항원 결합 도메인이 EphA3 결합을 가능하게 하도록 상이한 다양한 방향으로 배열되도록 한다. 예를 들자면, IgG, IgA, IgM, IgE, 또는 IgD 항체와 같은 항체의 힌지 도메인은 또한 본원에 기술된 키메라 수용체에서 사용하기에 적합하다. 일부 실시양태에서, 힌지 도메인은 항체의 불변 도메인 CH1 및 CH2를 연결하는 힌지 도메인이다. 따라서, 추가 스페이스 서열은, 예를 들면, IgG1 Fc 영역, IgG1 힌지 또는 CD8 스토크 또는 힌지, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0399] 항원 결합 도메인은 리더 또는 신호 펩티드 서열을 추가로 포함할 수 있는 것으로 예상된다. 리더 서열(leader sequence)은 새로 합성된 단백질의 N-말단에 존재하는(예를 들어, 중쇄 가변 영역에 인접하여 위치된) 펩티드 서열(예를 들어, 약 5개, 약 10개, 약 15개, 약 20개, 약 25개 또는 약 30개 아미노산 길이)일 수 있으며, 이것은 단백질을 분비 경로로 지시한다. 리더 서열은 CD8, 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF) 수용체, CD28, 뮤린 카파 쇠 및 CD16으로부터 유래된 것과 같은 당업계에 공지된 임의의 적합한 리더 서열을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 리더 서열은 CD8 리더 서열이다. 이와 관련하여, 항원 결합 도메인은 서열 번호 157 또는 이에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 이로 본질적으로 구성된 리더 서열을 포함할 수 있다. 본 발명의 실시양태에서, 리더 서열은 세포의 표면에서 CAR의 발현을 촉진할 수 있지만, 발현된 CAR에서 리더 서열의 존재는 CAR이 기능하기 위해 필요하지 않다. 따라서, 세포 표면 상에서 CAR의 발현시, 리더 서열은 CAR로부터 절단될 수 있다. 이와 같이, 본 발명의 실시양태에서, CAR에는 리더 서열이 없다.

- [0400] CAR의 항원 결합 도메인은 일반적으로 스페이서 및/또는 힌지 영역 및 막관통 도메인을 통해, 세포내 또는 세포질 T-세포 신호전달 도메인을 포함하거나 이와 관련된 엔도도메인에 융합된다. CAR이 표적-항원에 결합할 때, 이것이 발현되는 T 세포에 활성화 신호의 전달을 초래한다. 엔도도메인은 신호 전달에 관여하는 CAR의 부분이고 이러한 방식으로 하나 이상의 공동자극 도메인 및/또는 하나 이상의 세포내 T-세포 신호전달 도메인을 포함할 수 있다.
- [0401] 본원에 기술된 CAR의 기능적 부분이 본 발명의 범위에 포함된다. CAR과 관련하여 사용될 때 용어 "기능적 부분"은 본 발명의 CAR의 임의의 부분 또는 단편을 지칭하며, 이러한 부분 또는 단편은 그것이 일부인 CAR(모 CAR)의 생물학적 활성을 보유한다. 기능적 부분은, 예를 들면, 모 CAR과 유사한 정도로, 동일한 정도로, 또는 더 높은 정도로 표적 세포를 인식하거나 질병을 검출, 치료 또는 예방하는 능력을 보유하는 CAR의 부분을 포함한다. 모 CAR과 관련하여, 기능적 부분은, 예를 들어, 모 CAR의 약 10%, 25%, 30%, 50%, 68%, 80%, 90%, 95%, 또는 그 이상을 포함할 수 있다.
- [0402] 기능적 부분은 부분의 아미노 또는 카복시 말단에, 또는 양쪽 말단에 추가 아미노산을 포함할 수 있으며, 추가 아미노산은 모 CAR의 아미노산 서열에서 발견되지 않는다. 바람직하게는, 추가 아미노산은 기능성 부분의 생물학적 기능, 예를 들어, 표적 세포 인식, 암 검출, 암 치료 또는 예방 등을 방해하지 않는다. 보다 바람직하게는, 추가 아미노산은 모 CAR의 생물학적 활성과 비교하여 생물학적 활성을 향상시킨다.
- [0403] 본원에 기술된 CAR의 기능적 변이체가 본 발명의 범위에 포함된다. 본원에 사용된 용어 "기능적 변이체"는 모 CAR에 대해 실질적 또는 상당한 서열 동일성 또는 유사성을 갖는 CAR, 폴리펩티드 또는 단백질을 지칭하며, 이러한 기능적 변이체는 그것의 변이체인 CAR의 생물학적 활성을 보유한다. 기능적 변이체는, 예를 들면, 모 CAR과 유사한 정도로, 동일한 정도로 또는 더 높은 정도로 표적 세포를 인식하는 능력을 보유하는 본원에 기술된 CAR(모 CAR)의 변이체를 포함한다. 모 CAR과 관련하여, 기능적 변이체는, 예를 들어, 모 CAR에 대한 아미노산 서열에서 적어도 약 30%, 약 50%, 약 75%, 약 80%, 약 90%, 약 98%, 약 99% 또는 그 이상 동일할 수 있다.
- [0404] 기능적 변이체는, 예를 들면, 적어도 하나의 보존적 아미노산 치환을 갖는 모 CAR의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 기능적 변이체는 적어도 하나의 비보존적 아미노산 치환을 갖는 모 CAR의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 이 경우, 비보존적 아미노산 치환이 기능적 변이체의 생물학적 활성을 방해하거나 억제하지 않는 것이 바람직하다. 비보존적 아미노산 치환은 기능적 변이체의 생물학적 활성이 모 CAR과 비교하여 증가되도록 기능적 변이체의 생물학적 활성을 향상시킬 수 있다.
- [0405] 본 발명의 실시양태의 CAR(기능적 부분 및 기능적 변이체 포함)은 임의의 길이일 수 있으며, 즉, CAR(또는 이의 기능적 부분 또는 기능적 변이체)이 이들의 생물학적 활성(예를 들어, 항원에 특이적으로 결합하거나, 포유동물에서 질병에 걸린 세포를 검출하거나, 포유동물에서 질병을 치료 또는 예방하는 능력 등)을 유지하는 한 임의의 수의 아미노산을 포함할 수 있다. 예를 들면, CAR은 약 50개 내지 약 5000개 아미노산 길이, 예를 들어 50, 70, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000개 또는 그 이상의 아미노산 길이일 수 있다.
- [0406] 본 발명에 따른 CAR을 포함하는 세포가 또한 제공된다. 본 발명에 따른 CAR은 CAR-발현 면역 세포, 예를 들어, CAR T 세포 또는 CAR NK 세포를 생성하는데 사용될 수 있다. 면역 세포로의 CAR의 조작은 시험관내 배양 동안 수행될 수 있다.
- [0407] 본 발명의 CAR의 항원-결합 영역에는 임의의 적합한 포맷, 예를 들어, scFv, scFab 등이 제공될 수 있다.
- [0408] 핵산 및 벡터
- [0409] 본 발명은 본 발명에 따른 항원-결합 분자, 폴리펩티드 또는 CAR을 암호화하는 핵산, 또는 다수의 핵산을 제공한다.
- [0410] 일부 실시양태에서, 핵산은, 예를 들어, 다른 핵산 또는 자연-발생 생물학적 물질로부터 정제 또는 단리된다. 일부 실시양태에서 핵산(들)은 DNA 및/또는 RNA를 포함하거나 이로 구성된다.
- [0411] 따라서, 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 단리된 단백질(예를 들어, 항체 및 CAR 단백질, 이의 단편, 변이체 및 유도체 포함)을 암호화하거나 이를 암호화하는 핵산 서열에 상보적인 단리된 핵산을 고려한다.
- [0412] 본 발명의 단리된 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 본원에 제공된 하나 이상의 완전한 핵산 서열로부터 용이하게 추론될 수 있지만(예를 들어, 서열 번호 1-12 참조), 이에 제한되지 않는다.

- [0413] 이러한 측면은 또한 본원에서 앞서 기재된 것들과 같은 상기 단리된 핵산의 단편, 변이체 및 유도체를 포함한다.
- [0414] 본원에 사용된 용어 "핵산"은 단일- 또는 이중-가닥 DNA 및 RNA를 지정한다. DNA는 게놈 DNA 및 cDNA를 포함한다. RNA는 mRNA, RNA, RNAi, siRNA, cRNA 및 자가촉매 RNA를 포함한다. 핵산은 또한 DNA-RNA 하이브리드일 수 있다. 핵산은 A, G, C, T 또는 U 염기를 포함하는 뉴클레오티드를 전형적으로 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 그러나, 뉴클레오티드 서열은 이노신, 메틸시토신, 메틸이노신, 메틸아데노신 및/또는 티오우리딘과 같은 다른 염기를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0415] 따라서, 특정 실시양태에서, 단리된 핵산은 cDNA이다.
- [0416] "폴리뉴클레오티드"는 80개 이상의 인접 뉴클레오티드를 갖는 핵산인 반면, "올리고뉴클레오티드"는 80개 미만의 인접 뉴클레오티드를 갖는다.
- [0417] "프로브"는 예를 들면 노던 또는 서던 블롯팅에서 상보적 서열을 검출할 목적으로 적합하게 표지된 단일 또는 이중-가닥 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드일 수 있다.
- [0418] "프라이머"는 통상적으로 상보적 핵산 "주형"에 어닐링할 수 있고 Taq 중합효소, RNA-의존성 DNA 중합효소 또는 Sequenase™와 같은 DNA 중합효소의 작용에 의해 주형-의존적 방식으로 확장될 수 있는, 바람직하게는 15-50개의 인접 뉴클레오티드를 갖는 단일-가닥 올리고뉴클레오티드이다.
- [0419] 하나의 실시양태에서, 핵산 변이체는 본 발명의 단리된 단백질의 변이체를 암호화한다.
- [0420] 또 다른 실시양태에서, 핵산 변이체는 본 발명의 단리된 핵산과 적어도 40%, 45%, 50%, 55%, 60% 또는 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 바람직하게는 적어도 70%, 71%, 72%, 73%, 74% 또는 75%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 또는 85%, 및 훨씬 더 바람직하게는 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 뉴클레오티드 서열 동일성을 공유한다.
- [0421] 하나의 특정 실시양태에서, 본 측면의 단리된 핵산은 다음으로 구성된다: (a) (i) 본원에 기술된 항체 및/또는 단리된 CAR 단백질의 분절, 도메인, 부분 또는 영역, 예를 들어, 이의 변이체 또는 유도체를 포함한 서열 번호 13 내지 156 및 표 1에 따른 것을 암호화하는 핵산; 및 (b) 임의로 하나 이상의 추가 핵산 서열. 이와 관련하여, 추가 핵산 서열은 단리된 핵산 서열의 5'(5-프라임) 및/또는 3'(3-프라임) 말단에 있을 수 있는 이중 핵산 서열일 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0422] 본 발명은 또한 예를 들어 코돈 서열 중복성을 이용함으로써 변형된 핵산을 고려한다. 보다 특정한 예에서, 코돈 사용은 특정 유기체 또는 세포 유형에서 핵산의 발현을 최적화하도록 변형될 수 있다.
- [0423] 본 발명은 추가로 본 발명의 핵산에서 변형된 퓨린(예를 들면, 이노신, 메틸이노신 및 메틸아데노신) 및 변형된 피리미딘(예를 들어, 티오우리딘 및 메틸시토신)의 용도를 제공한다.
- [0424] 본 발명의 단리된 핵산은 문헌[Chapter 2 and Chapter 3 of CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Eds. Ausubel et al. John Wiley & Sons NY, 1995-2008)]에 기술된 것과 같은 표준 프로토콜을 사용하여 편리하게 제조될 수 있다는 것은 당업계의 숙련가에 의해 잘 인지될 것이다.
- [0425] 또 다른 실시양태에서, 상보적 핵산은 높은 엄격도 조건하에 본 발명의 핵산에 혼성화된다.
- [0426] "혼성화하다 및 혼성화"는 DNA-DNA, RNA-RNA 또는 DNA-RNA 하이브리드를 생성하기 위한 적어도 부분적으로 상보적인 뉴클레오티드 서열의 쌍형성을 나타내기 위해 본원에서 사용된다. 상보적 뉴클레오티드 서열을 포함하는 하이브리드 서열은 염기-쌍형성을 통해 발생한다.
- [0427] 본원에 사용된 "엄격도"는 온도 및 이온 강도 조건, 및 혼성화 동안 특정 유기 용매 및/또는 세제의 존재 또는 부재를 지칭한다. 엄격도가 높을수록, 혼성화하는 뉴클레오티드 서열 간의 상보성의 필요 수준이 높아진다.
- [0428] "엄격한 조건"은 상보적 염기의 빈도가 높은 핵산만이 혼성화되는 조건을 지정한다.
- [0429] 엄격한 조건은 본원에 참고로 포함된 상기 Ausubel 등의 제2.9장 및 제2.10장에 기술된 바와 같이 당업계에 잘 알려져 있다. 숙련된 수신자는 또한 다양한 요인이 혼성화의 특이성을 최적화하기 위해 조작될 수 있음을 인식할 것이다. 최종 세척의 엄격도의 최적화는 높은 정도의 혼성화를 보장하는 역할을 할 수 있다.
- [0430] 상보적 뉴클레오티드 서열은 뉴클레오티드가 매트릭스(바람직하게는 니트로셀룰로스와 같은 합성 막)에 고정되

는 단계, 혼성화 단계, 및 전형적으로 표지된 프로브 또는 기타 상보적 핵산을 사용하는 검출 단계를 포함하는 블롯팅 기술에 의해 식별될 수 있다. 서던 블롯팅은 상보적 DNA 서열을 식별하는데 사용되고; 노던 블롯팅은 상보적 RNA 서열을 식별하는데 사용된다. 도트 블롯팅 및 슬롯 블롯팅은 상보적 DNA/DNA, DNA/RNA 또는 RNA/RNA 폴리뉴클레오티드 서열을 식별하는데 사용될 수 있다. 이러한 기술은 당업계의 숙련자들에게 잘 알려져 있으며, 상기 Ausubel 등에, 제2.9.1번 내지 제2.9.20번에 기술되어 있다. 이러한 방법에 따르면, 서던 블롯팅은 겔 전 기영동에 의해 크기에 따라 DNA 분자를 분리하고, 크기-분리된 DNA를 합성 막으로 옮기고, 막 결합된 DNA를 상보적 뉴클레오티드 서열에 혼성화시킴을 포함한다. 플라크 또는 콜로니 혼성화의 과정을 통해서와 같이 cDNA 또는 게놈 DNA 라이브러리에서 상보적 핵산을 식별할 때 대안적인 블롯팅 단계가 사용된다. 이러한 과정의 또 다른 전형적인 예는 문헌[Chapters 8-12 of Sambrook et al., MOLECULAR CLONING. A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 1989)]에 기술되어 있다.

- [0431] 고정된 핵산에 혼성화된 표지된 핵산을 검출하는 방법은 당업계의 종사자에게 잘 알려져 있다. 이러한 방법은 자가방사선술, 화학발광, 형광 및 비색 검출을 포함한다.
- [0432] 핵산은 또한 핵산 서열 증폭 기술을 사용하여 단리, 검출 및/또는 재조합 DNA 기술에 적용될 수 있다.
- [0433] 열적 방법 및 등온 방법을 모두 포함하는 적합한 핵산 증폭 기술은 숙련된 수신자에게 잘 알려져 있으며, 중합 효소 연쇄 반응(PCR); 가닥 변위 증폭(SDA); 회전환 복제(RCR); 핵산 서열-기반 증폭(NASBA), Q-β 레플리카제 증폭, 재조합효소 중합효소 증폭(RPA) 및 헬리카제-의존성 증폭을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0434] 본원에 사용된 "증폭 산물"은 핵산 증폭에 의해 생성된 핵산 산물을 지칭한다.
- [0435] 핵산 증폭 기술은 당업계에 잘 알려진 바와 같이 qPCR, 실시간 PCR 및 경쟁적 PCR과 같은 특정 정량적 및 반정량적 기술을 포함할 수 있다.
- [0436] 일부 실시양태에서, 핵산은 핵산의 전달 및 발현을 촉진하는 유전자 작제물에 있을 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 핵산 또는 다수의 핵산을 포함하는 하나의 벡터 또는 다수의 벡터를 제공한다.
- [0437] 따라서, 또 다른 측면에서, 본 발명은 (i) 본원에 기술된 단리된 핵산; 또는 (ii) 이에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산을 포함하는 유전자 작제물을 제공한다. 하나의 실시양태에서, 단리된 핵산은 벡터 (예를 들어, 발현 벡터(expression vector)) 내의 하나 이상의 조절 서열에 작동가능하게 연결되거나 결합된다.
- [0438] 적합하게는, 유전자 작제물은 당업계에 잘 알려진 바와 같이 플라스미드, 박테리오파지, 코스미드, 효모 또는 박테리아 인공 염색체의 형태이거나 이들의 유전 성분을 포함한다. 유전자 작제물은 재조합 DNA 기술에 의한 조작 및/또는 본 발명의 핵산 또는 암호화된 단백질의 발현을 위해 박테리아 또는 다른 숙주 세포에서의 단리된 핵산의 유지 및 증식에 적합할 수 있다.
- [0439] 숙주 세포 발현의 목적을 위해, 유전자 작제물은 발현 작제물일 수 있다. 적합하게는, 발현 작제물은 발현 벡터에서 하나 이상의 추가 서열에 작동가능하게 연결된 본 발명의 핵산을 포함한다. 본원에 사용된 "벡터"는 외인성 핵산을 세포 내로 전달하기 위한 비히클로서 사용되는 핵산 분자이다. 벡터는 세포에서 핵산의 발현을 위한 벡터일 수 있다. "발현 벡터"는 플라스미드와 같은 자가-복제 염색체의 벡터, 또는 숙주 게놈에 통합되는 벡터일 수 있다. 이와 관련하여, 벡터는 세포가 EphA3-특이적 CAR 또는 EphA3 결합제를 발현하도록 T-세포와 같은 숙주 세포에 본 발명의 핵산을 전달할 수 있다. 이를 위해, 벡터는 이상적으로 T 세포에서 지속적으로 높은 수준의 발현이 가능해야 한다.
- [0440] 이러한 벡터는 발현될 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터 서열을 포함할 수 있다. 벡터는 또한 종결 코돈 및 발현 인핸서를 포함할 수 있다.
- [0441] "작동가능하게 연결된"이란 상기 추가의 뉴클레오티드 서열(들)(예를 들어, 조절 핵산 서열)이 바람직하게는 전사를 개시, 조절 또는 달리 제어하기 위해 본 발명의 핵산에 대해 위치한다는 것을 의미한다. 전형적으로, 선택된 핵산 서열 및 조절 핵산 서열(예를 들어, 프로모터 및/또는 인핸서)은 핵산 서열의 발현이 조절 서열의 영향 또는 제어하에 놓이도록 (따라서 발현 카세트를 형성) 하는 방식으로 공유적으로 연결된다.
- [0442] 조절 뉴클레오티드 서열은 일반적으로 발현에 사용되는 숙주 세포에 적합할 것이다. 다수 유형의 적절한 발현 벡터 및 적합한 조절 서열이 다양한 숙주 세포에 대해 당업계에 공지되어 있다.
- [0443] 전형적으로, 상기 하나 이상의 조절 뉴클레오티드 서열은 프로모터 서열, 리더 또는 신호 서열, 리보솜 결합 부

위, 전사 시작 및 종결 서열, 번역 시작 및 종결 서열, 인핸서 또는 활성인자 서열을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

- [0444] 당업계에서 공지된 바와 같은 구성적 또는 유도성 프로모터가 본 발명에 의해 고려된다.
- [0445] 적합한 벡터는 플라스미드, 바이너리 벡터, DNA 벡터, mRNA 벡터, 바이러스 벡터, 트랜스포존-기반 벡터, 및 인공 염색체를 포함한다.
- [0446] 특정 실시양태에서, 발현 벡터는 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터, 헤르페스바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터(예를 들어, 감마레트로바이러스 벡터; 예를 들어, 뮤린 백혈병 바이러스(MLV)-유래 벡터), 렌티바이러스 벡터, 백시니아 바이러스 벡터 및 배큘로바이러스 벡터와 같은 하나 이상의 바이러스 전달 시스템이거나 이를 포함한다.
- [0447] 일부 실시양태에서, 벡터는 진핵 벡터일 수 있으며, 예를 들어, 진핵 세포에서 벡터로부터 단백질의 발현에 필요한 요소를 포함하는 벡터일 수 있다. 일부 실시양태에서, 벡터는 단백질 발현을 유도하기 위해, 예를 들어, 시토크로미 바이러스(CMV) 또는 SV40 프로모터를 포함하는 포유동물 벡터일 수 있다.
- [0448] 추가의 측면에서, 본 발명은 본원에 기술된 핵산 분자 또는 유전자 작제물로 형질전환된 숙주 세포를 제공한다.
- [0449] 발현에 적합한 숙주 세포는 원핵 세포 또는 진핵 세포일 수 있다. 예를 들면, 적합한 숙주 세포는 포유동물 세포(예를 들어, m HeLa, HEK293T, Jurkat 세포), 효모 세포(예를 들어, 사카로마이세스 세레비시에), 배큘로바이러스 발현 시스템의 유무에 관계없이 사용되는 곤충 세포(예를 들어, Sf9, 트리코플루시아 니(Trichoplusia ni)), 식물 세포(예를 들어, 클라미도모나스 라인하르트티(Chlamydomonas reinhardtii), 페오닥틸룸 트라이코르뉴툼(Phaeodactylum tricornerutum)) 또는 박테리아 세포, 예를 들어 대장균을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 숙주 세포(원핵 세포이든 진핵 세포이든) 내로의 유전자 작제물의 도입은, 예를 들면, 문헌[CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY Eds. Ausubel et al., (John Wiley & Sons, Inc. 1995-2009), 특히 9장 및 16장]에 기술된 바와 같이 당업계에 잘 알려져 있다.
- [0450] CAR-발현 세포
- [0451] 본 개시내용은 또한 본 개시내용에 따른 CAR을 포함하거나 발현하는 세포를 제공한다. 또한, 본 개시내용에 따른 CAR을 암호화하는 핵산을 포함하거나 발현하는 세포가 제공된다. T-세포로의 CAR의 조작은 입양 T-세포 요법을 위한 T-세포의 확장 동안 일어나는 것과 같이 형질도입 및 발현을 위해, 시험관내, 배양 동안 수행될 수 있다. CAR을 발현하도록 면역 세포를 조작하는 방법은 숙련자에게 알려져 있으며, 예를 들면, 전문이 본원에 참고로 포함된 문헌[Wang and Riviere, Mol Ther Oncolytics, (2016) 3: 16015]에 기술되어 있다. "적어도 하나의 세포"는 다수의 세포, 예를 들어, 이러한 세포의 집단(population)을 포함하는 것으로 인지될 것이다.
- [0452] 본 개시내용에 따른 CAR을 포함하거나 발현하는 세포는 진핵 세포, 예를 들어 포유동물 세포일 수 있다. 포유동물은 인간, 또는 비인간 포유동물(예를 들어, 토끼, 기니피그, 래트, 마우스 또는 기타 설치류(Rodentia 목의 임의의 동물 포함), 고양이 개, 돼지, 양, 염소, 소(소, 예를 들어, 젖소, 또는 Bos 목의 임의의 동물 포함), 말(Equidae 목의 임의의 동물 포함), 당나귀, 및 비인간 영장류)일 수 있다.
- [0453] 일부 실시양태에서, 세포는 인간 대상체로부터 유래하거나 이들로부터 획득되었을 수 있다. CAR-발현 세포가 대상체의 치료에 사용하기 위한 것인 경우, 세포는 CAR-발현 세포로 치료될 대상체로부터 유래할 수 있거나(즉, 세포는 자가 유래일 수 있음), 또는 세포는 상이한 대상체로부터 유래할 수 있다(즉, 세포는 동종이계일 수 있음).
- [0454] 특정 실시양태에서, 세포는 면역 세포이거나 이를 포함한다. 세포는 조혈 기원의 세포, 예를 들어, 호중구, 호산구, 호염기구, 수지상 세포, 림프구 또는 단핵구일 수 있다. 림프구는, 예를 들어, T-세포, B 세포, NK 세포, NKT 세포, 또는 선천성 림프구 세포(ILC), 또는 이들의 전구체일 수 있다. 세포는 CD3 폴리펩티드(예를 들어, CD3 $\gamma$ , CD3 $\epsilon$ , CD3 $\zeta$ , 또는 CD3 $\delta$ ), TCR 폴리펩티드(TCR $\alpha$  또는 TCR $\beta$ ), CD27, CD28, CD4 또는 CD8을 발현할 수 있다.
- [0455] 적합하게는, 면역 세포는 CD4+ 헬퍼 T-세포 및/또는 CD8+ 세포독성 T-세포(예를 들어, 세포독성 T-림프구(CTL))를 포함하는 T-세포이거나 이를 포함한다. 이와 관련하여, 본 측면의 T-세포는 CD4+ 헬퍼 T-세포/CD8+ 세포독성 T-세포의 혼합 집단으로 존재할 수 있다.
- [0456] CAR T-세포의 사용은 이들이 전신 투여될 수 있고 원발성 및 전이된 종양 둘 다에 귀소될 것이라는 이점과 관련

이 있다(문헌 참조: Manzo et al., Human Mol Genetics (2015) R67-73).

- [0457] 일부 실시양태에서, 세포는 항원-특이적 T-세포이다. 이러한 유형의 실시양태에서, "항원-특이" T-세포는 T-세포가 특이적인 항원, 또는 상기 항원을 발현하는 세포에 반응하여 T-세포의 특정 기능적 특성을 나타내는 세포이다. 일부 실시양태에서, 특성은 효과기 T-세포, 예를 들어, 세포독성 T-세포와 관련된 기능적 특성이다.
- [0458] 일부 실시양태에서, 항원-특이적 T-세포는 하기 특성 중 하나 이상을 나타낼 수 있다: 예를 들어, T-세포가 특이적인 항원을 포함/발현하는 세포에 대한 세포독성; 예를 들어, T-세포가 특이적인 항원 또는 T-세포가 특이적인 항원을 포함/발현하는 세포에 반응하여, 증식, IFN- $\gamma$  발현, CD107a 발현, IL-2 발현, TNF 발현, 퍼포린 발현, 그랜자임 발현, 그랜줄리신 발현 및/또는 FAS 리간드(FASL) 발현. 항원-특이적 T-세포는 적절한 MHC 분자에 의해 제시될 때 T-세포가 특이적인 항원의 펩티드를 인식할 수 있는 TCR을 포함한다. 항원-특이적 T-세포는 CD4+ T-세포 및/또는 CD8+ T 세포일 수 있다.
- [0459] 일부 실시양태에서, T-세포가 특이적인 항원은 바이러스, 예를 들어, 시토메갈로바이러스(CMV), 엡스타인-바 바이러스(EBV), 아데노바이러스, 인간 유두종 바이러스(HPV), 인플루엔자 바이러스, 홍역 바이러스, B형 간염 바이러스(HBV), C형 간염 바이러스(HCV), 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV) 또는 단순 포진 바이러스(HSV)의 펩티드 또는 폴리펩티드일 수 있다.
- [0460] 유리하게는, 본 발명의 단리된 CAR은 환자의 기존 면역 레퍼토리에 관계없이 EphA3에 대한 특이성을 갖는 다량의 T-세포( $>10^8$ - $10^{10}$  개 세포/환자)를 생성할 수 있는 신속하고 신뢰할 수 있는 접근법인 CAR 유전자 전달에 이용될 수 있다. 예를 들면, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 형질도입은 사전-활성화된 T 세포와의 단지 48시간의 배양을 필요로 할 수 있다. 추가로, 다수의 자가 T-세포는 백혈구 영동(leukaphoresis) 또는 대상체로부터의 혈액 샘플로부터의 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)의 단리로부터 획득될 수 있다. 따라서, 며칠 안에 주입을 위해  $10^8$ - $10^9$  개의 형질전환 또는 형질감염된 T 세포를 조작하는 것이 가능할 수 있다.
- [0461] 따라서, 본 발명의 숙주 세포(예를 들어, T-세포)는 입양 전달에 의해 암과 같은 EphA3-관련 질환, 장애 또는 상태의 치료에 사용될 수 있다. 이를 위해, T-세포는 유전적으로 변형된 세포의 입양 전달에 사용하기 위해 전형적으로 공여자 대상체를 포함하는 대상체로부터 채취된 생물학적 샘플로부터 단리된다.
- [0462] 바람직하게는, 본 발명의 CAR로 형질도입되거나 형질전환된 T-세포(예를 들어 도 4에 제시된 CAR)는 천연, 중심 기억 세포 및 효과기 기억 세포의 혼합물을 함유한다.
- [0463] 대안적인 실시양태에서, 숙주 세포는 조혈 줄기 세포(HSC)와 같은 줄기 세포이거나 이로부터 유래된다. 따라서, 이를 위해, 숙주 세포는 분화시에 본 발명의 CAR을 발현하는 T-세포를 생성하는 유전자-변형된 줄기 세포일 수 있다.
- [0464] 일부 실시양태에서, T 세포와 같은 숙주 세포는 사이토카인, 케모카인 및/또는 이의 수용체를 발현하도록 유전적으로 조작된다.
- [0465] 이를 위해, CAR T-세포는 종양 세포독성 및 특이성을 향상시키고, 종양 면역억제를 회피하고, 숙주 거부를 피하고, 치료 민감기를 연장하는 여러 방식으로 설계될 수 있다. TRUCK(보편적인 사이토카인 사멸을 위해 제지된 T-세포) T-세포는, 예를 들면, CAR을 보유하지만 또한 종양 사멸을 촉진하는 IL-12와 같은 사이토카인을 발현 및 방출하도록 조작된다. 이러한 세포는 일단 종양 환경에 국소화되면 CAR의 활성화 분자 페이로드를 방출하도록 설계되었기 때문에, 이러한 CART-세포를 때때로 "아머드 CAR(armoured CAR)"이라고도 한다. 예시적인 사이토카인은 IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, M-CSF, GM-CSF, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TNF, TRAIL, FLT3 리간드, 림포타틴, 및 TGF- $\beta$ 를 포함한다.
- [0466] "자가-유도(self-driving)" 또는 "귀소(homing)" CART 세포는 CAR 외에 케모카인 수용체를 발현하도록 조작된다. 특정 케모카인은 종양에서 상향조절될 수 있기 때문에, 케모카인 수용체의 통합은 입양 T 세포에 대한 종양 트래피킹 및 입양 T 세포에 의한 침투를 도와서, CAR T-세포의 특이성과 기능성 둘 다를 향상시킨다. 보편적인 CAR T-세포 또한 CAR을 갖지만, 내인성 TCR(T-세포 수용체) 또는 MFIC(주요 조직 적합성 복합체) 단백질 발현하지 않도록 조작된다. 입양 T-세포 요법의 신호전달 레퍼토리로부터의 이러한 두 단백질의 제거는 각각 이식편 대 숙주 질환 및 거부 반응을 방지한다. 아머드 CART-세포는 또한 종양 면역억제 및 종양-유발 CAR T-세포 기능저하를 회피하는 능력으로 인해 그렇게 명명되었다. 이러한 특정 CAR T-세포는 CAR을 가지며, 체크포인트 억제제(checkpoint inhibitor)를 발현하지 않도록 조작될 수 있다. 대안적으로, 이러한 CAR T-세포는 체크포인트 신호전달을 차단하는 단클론 항체(mAb)와 공동-투여될 수 있다. 항-PDL1 항체의 투여는 CAR TIL(종양

침윤 림프구)의 사멸 능력을 유의하게 회복시켰다. PD1-PDL1 및 CTLA-4-CD80/CD86 신호전달 경로가 조사되었지만, LAG-3, Tim-3, IDO-1, 2B4 및 KIR을 포함한 아머드 CAR-T의 설계에서 다른 면역 체크포인트 신호전달 분자를 표적화하는 것이 가능하다. TIL의 다른 세포내 억제제는 포스파타제(SHP1), 유비퀴틴-리가제(즉, cb1-b) 및 키나제(즉, 디아실글리세롤 키나제)를 포함한다. 아머드 CAR T-세포는 또한 중앙-분비된 사이토카인의 효과로부터 이들을 보호하거나 이들이 내성을 갖도록 하는 단백질을 또는 수용체를 발현하도록 조작될 수 있다. 예를 들면, 이중 음성 형태의 TGF-β 수용체로 형질도입된 CTL(세포독성 T 림프구)은 림프종 분비된 TGF-β에 의한 면역억제에 내성이 있다. 이러한 형질도입된 세포는 이들의 대조군과 비교할 때 *생체내에서* 현저하게 증가된 항종양 활성을 나타내었다.

[0467] 또 다른 측면에서, 본 발명은 (i) 앞서 기술된 이전에 형질전환된 숙주 세포를 배양하는 단계; 및 (ii) 단계 (i)에서 배양된 상기 숙주 세포로부터 상기 단백질을 단리하는 단계를 포함하여, 본원에 기술된 단리된 단백질 (예를 들어, 단리된 EphA3 결합제 또는 CAR)을 생산하는 방법을 제공한다.

[0468] 재조합 단백질은, 예를 들면, 문헌[Sambrook, et al., MOLECULAR CLONING. A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 1989), 특히 섹션 16 및 17; CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY Eds. Ausubel et al., (John Wiley & Sons, Inc. 1995-2009), 특히 제10장 및 제16장; 및 CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan et al., (John Wiley & Sons, Inc. 1995-2009), 특히 제1장, 제5장 및 제6장]에 기술된 바와 같은 표준 프로토콜을 사용하여 당업계의 숙련가에 의해 편리하게 제조될 수 있다.

[0469] 관련 측면에서, 본 발명은 상기 언급된 측면의 방법에 의해 생산되는 단리된 EphA3 결합제 또는 CAR을 제공한다.

[0470] 여전히 추가의 측면에서, 본 발명은 다음에 대해 결합하고/하거나 이에 대해 발생하는 항체 또는 항체 단편에 관한 것이다:

[0471] (i) 첫 번째로 언급된 측면의 EphA3 결합제; 및/또는

[0472] (ii) 두 번째로 언급된 측면의 CAR,

[0473] 이의 단편, 변이체 및 유도체 포함.

[0474] 적합하게는, 상기 항체 또는 항체 단편은 상기 단리된 EphA3 결합제 또는 CAR에 특이적으로 결합한다. 바람직하게는, 항체 또는 항체 단편은 본원에 기술된 CDR, VH 도메인 및/또는 VL 도메인의 전체 또는 부분 아미노산 서열(예를 들어, 서열 번호 13-156)에 특이적으로 또는 선택적으로 결합하거나 이를 인식한다. 이와 관련하여, 본 측면의 항체 또는 항체 단편은 샘플에서 그 특정 CDR, VH 도메인 또는 VL 도메인을 갖는 CAR을 발현하는 T-세포를 검출하거나 단리하는 방법에 사용하기에 적합할 수 있다. 이를 위해, 본 발명의 항체 및 항체 단편은 본원에 기술된 단리된 EphA3 결합제 및 CAR의 친화성 크로마토그래피 정제에 특히 적합할 수 있다. 예를 들면, 상기 Coligan 등의 제9.5장에 기술된 친화성 크로마토그래피 절차를 참조할 수 있다.

[0475] 항체는 다클론 또는 단클론, 천연 또는 재조합일 수 있다. 항체 생산, 정제 및 사용에 적용할 수 있는 잘 알려진 프로토콜은, 예를 들면, 문헌[Chapter 2 of Coligan et al., supra; and Harlow, E. & Lane, D. Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988]에서 찾아볼 수 있으며, 이들 둘 다는 본원에 참고로 포함된다.

[0476] 일반적으로, 본 발명의 항체는 본 발명의 단리된 단백질, 단편, 변이체 또는 유도체에 결합하거나 이와 접합된다. 예를 들면, 항체는 다클론 항체일 수 있다. 이러한 항체는 예를 들면 본 발명의 단리된 단백질, 단편, 변이체 또는 유도체를 마우스 또는 토끼를 포함할 수 있는 생산 종에 주입하여 다클론 항혈청을 수득함으로써 제조될 수 있다. 다클론 항체를 생산하는 방법은 당업계의 숙련가들에게 잘 알려져 있다. 사용될 수 있는 예시적인 프로토콜은 예를 들면 문헌[Coligan et al., supra 및 Harlow & Lane, 1988, supra]에 기술되어 있다.

[0477] 단클론 항체는, 예를 들면, 본원에 참고로 포함된 문헌[Kohler & Milstein, 1975, Nature 256, 495]의 기사에 기술된 바와 같은 표준 방법을 사용하여 생산할 수 있거나, 본 발명의 단리된 단백질, 단편, 변이체 또는 유도체 중 하나 이상이 접종된 생산 종으로부터 유래된 비장 또는 기타 항체 생산 세포를 불멸화함으로써, 예를 들면, 상기 Coligan 등에 기술된 바와 같이 보다 최근의 변형에 의해 생산될 수 있다.

[0478] CMV-특이적 T-세포

[0479] 특정 측면에서, 본원에는 CMV 에피토프(예를 들어, 표 1에 열거된 CMV 에피토프)를 포함하는 펩티드를 인식하는

TCR(예를 들어,  $\alpha\beta$  TCR 또는  $\gamma\delta$  TCR)을 발현하는 CMV-특이적 T 세포(예를 들어, CD4 T-세포 및/또는 CD8 T-세포)가 제공된다. 따라서, 일부 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 T-세포는 표 1에 열거된 CMV 에피토프를 포함하는 펩티드를 인식하는 T-세포이다.

[0480] [표 1]

[0481] 예시적인 CMV 에피토프

에피토프 서열	HLA 제한	hCMV 항원	서열 번호
VTEHDTLLY	A*01:01	pp50	181
YSEHPTFTSQY	A*01:01	pp65	182
NLVPMVATV	A*02:01	pp65	183
VLEETSVML	A*02:01	IE-1	184
YILEETSVML	A*02:01	IE-1	185
AYAQKIFKIL	A*24:01; A*24:02	IE-1	186
QYDPVAALF	A*24:02	pp65	187
TPRVTGGGAM	B*07:02	pp65	188
RIPHERNGFTVL	B*07:02	pp65	189
ELRRKMMYM	B*08:01	IE-1	190
ELKRKMIYM	B*08:01	IE-1	191
QIKVRVDMV	B*08:01	IE-1	192
DELRRKMMY	B*18:01; B*44:02	IE-1	193
IPSINVHHY	B*35:01	pp65	194
CPSQEPMSIYVY	B*35:08	pp65	195
CEDVPSGKL	B*40:01	pp65	196

[0482]

HERNGFTVL	B*40:01 B*40:02	pp65	197
EEAIVAYTL	B*40:01 B*40:02	IE-1	198
QEFFWDANDIY	B*44:02	pp65	199
TRATKMQVI	C*06:02	pp65	200
YAYIYTTYL	B*41:01	gB	201
QAIRETVEL	B*35:01	pp65	202
CRVLCYVL	C*07:02	pp65	203
HELLVLVKAQL	DRB1*11:01	gH	204
AYSNTHSTRYV	DRB1*07	gB	205
QEFFWDANDIYRIFA	DRB3*01:01	pp65	206
CMLTITTARSKYPYH	DRB1*04:01	gH	207
PLKMLNIPSINVHHY	DRB1*01:01	pp65	208
EHPTFTSKYRIQGKL	DRB1*11:01	pp65	209
AGILARNLVPMVATV	DRB1*03:01	pp65	210
KARAKKDELR*	HLA-B*31:01	IE-1	211

[0483]

[0484] 이러한 유형의 일부 바람직한 실시양태에서, T-세포는 상기 및/또는 본원의 다른 곳에 기술된 바와 같이 EphA3 에 결합하는 항원 결합 분자를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 T-세포는 상기 및 본원의

다른 곳에서 기술된 바와 같이 CAR을 발현하도록 조작될 수 있다. 예를 들자면, CMV-특이적 T-세포는 EphA3-결합 CAR을 추가로 포함한다.

- [0485] 일부 측면에서, 본원에는 본원에 기술된 CMV 에피토프 중 하나 이상을 인식하는 T-세포(예를 들어, CTL)의 생성, 활성화 및/또는 증식 유도 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, CTL을 포함하는 샘플(예를 들어, PBMC 샘플)을 단리하고, 본원에 개시된 면역원성 펩티드의 풀에 노출시키고, 자극된 CTL을 수확한다. 바람직하게는, 면역원성 펩티드의 풀은 표 1에 제시된 각각의 CMV 펩티드 에피토프 아미노산 서열로 본질적으로 구성된다. 특정 실시양태에서, 노출된 샘플은 적어도 14일 동안 배양된다. 이러한 일부 실시양태에서, 노출된 샘플은 0일차에 IL-21과 함께 배양된다. 바람직하게는, 노출된 샘플은 2일차에 IL-2와 함께 배양된다. 보다 바람직한 실시양태에서, 노출된 샘플의 배양은 3일마다 IL-2의 첨가를 포함한다.
- [0486] 일부 실시양태에서, PBMC 샘플은 건강한 공여자로부터 유래된다. 특정 실시양태에서, PBMC는 면역손상된 공여자로부터 유래된다. 이러한 일부 실시양태에서, 공여자는 면역억제 요법을 받고 있다. 일부 실시양태에서, 공여자는 고형 장기 이식 수용자이다. 추가 실시양태에서, 공여자는 항바이러스 요법을 받고 있다.
- [0487] 일부 실시양태에서, CTL을 포함하는 샘플(예를 들어, PBMC 샘플)을 클래스 I MHC 복합체 상에 본원에 기술된 CMV 에피토프를 포함하는 펩티드를 제시하는 APC와 함께 배양물에서 배양한다. 이러한 유형의 적합한 APC의 제조는, 예를 들면, 전문이 본원에 참고로 포함된 국제 PCT 특허 공개 제W02019/220209호에 기술되어 있다. APC는 T 세포가 수득되는 대상체의 자가 조직일 수 있다. 일부 실시양태에서, T-세포를 함유하는 샘플을 본원에 제공된 APC와 함께 2회 이상 배양한다. 일부 실시양태에서, T-세포를 적어도 하나의 사이토카인, 예를 들어, IL-2, IL-4, IL-7, IL-15, 및/또는 IL-21의 존재하에 APC와 함께 배양한다. APC를 사용하여 T-세포의 증식을 유도하는 예시적인 방법은, 예를 들면, 본원에 참고로 포함된 미국 특허 공개 제2015/0017723호에 제공되어 있다.
- [0488] CMV 펩티드-특이적 T-세포에 의한 바이오마커의 발현은 유세포 분석과 같은 임의의 적합한 방법에 의해 평가될 수 있다. 일부 실시양태에서, CMV 펩티드-특이적 T 세포는 CMV-특이적 펩티드에 의해 자극되고 유세포 분석을 통해 분류된다. 바람직하게는, CMV 펩티드-특이적 T-세포는 본원에 참고로 포함된 국제 PCT 특허 공개 제 W02019/220209호에 기술된 프로토콜에 따라 자극 및/또는 표면 염색을 겪는다. 일부 실시양태에서, CMV 펩티드-특이적 T-세포는 CD107a에 특이적인 하나 이상의 항체와 함께 배양된 다음 유세포 분석법으로 분류된다. 일부 실시양태에서, CMV 펩티드-특이적 T-세포는 IFN- $\gamma$ , IL-2 및/또는 TNF에 특이적인 항체와 같은 세포내 사이토카인에 결합하는 하나 이상의 항체와 함께 배양된다. 일부 실시양태에서, CMV 펩티드-특이적 T-세포는 세포내 사이토카인에 대한 항체와 함께 배양된 다음 유세포 분석을 통해 분류된다.
- [0489] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 공여자 대상체로부터 T-세포를 포함하는 샘플을 수득함(예를 들어, 공여자 대상체로부터 PBMC 샘플을 수득함)을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 자가 T-세포(예를 들어, CD4+ T-세포 또는 CD8+ T-세포)는 샘플로부터 단리된다. 일부 실시양태에서, 샘플은 대부분 또는 완전히 동종 T 세포로 구성된다.
- [0490] 일부 실시양태에서, 샘플에서 T-세포(예를 들어, CTL)의 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%는 CD107a를 발현한다.
- [0491] 일부 실시양태에서, 샘플에서 T-세포(예를 들어, CTL)의 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%는 IFN- $\gamma$ 를 발현한다.
- [0492] 일부 실시양태에서, 샘플에서 T-세포(예를 들어, CTL)의 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%는 TNF를 발현한다.
- [0493] 일부 실시양태에서, 샘플에서 T-세포(예를 들어, CTL)의 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%는 IL-2를 발현한다.
- [0494] 일부 실시양태에서, 샘플에서 T-세포(예를 들어, CTL)의 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%,



51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 또는 90%는 CD107a, IFN- $\gamma$ , 및 IL-2를 발현한다.

[0503] 일부 실시양태에서, 샘플에서 T-세포(예를 들어, CTL)의 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 또는 90%는 CD107a, IFN- $\gamma$ , 및 TNF를 발현한다.

[0504] 일부 실시양태에서, 샘플에서 T-세포(예를 들어, CTL)의 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 또는 90%는 CD107a, IFN- $\gamma$ , TNF, 및 IL-2를 발현한다.

[0505] 본원에 개시된 방법의 일부 실시양태에서, T-세포(예를 들어, CTL)는 다중 CMV 항원으로부터 유래된 다중 펩티드 에피토프에 대한 반응성을 나타낸다. 이와 관련하여, T-세포(예를 들어, CTL)의 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 또는 90%는 하나 이상의 CMV 에피토프에 반응성이다. 특정 실시양태에서, T-세포(예를 들어, CTL)는 표 1에 제시된 CMV 펩티드 에피토프 아미노산 서열 중 어느 하나 또는 이들의 조합에 반응성이다. 일부 실시양태에서, T-세포(예를 들어, CTL)는 pp50, pp65, IE-1, gB, gH, 중 어느 하나 또는 이들의 조합에 반응성이다.

[0506] T-세포 바이오마커 발현 및/또는 CMV 반응성은, 예를 들어, 면역원성 CMV 펩티드 에피토프의 폴에 대한 노출에 의해 본원에 개시된 방법 중 어느 하나에 의한 T-세포(예를 들어, CTL) 확장 전 또는 후에 측정 및/또는 분석될 수 있다.

[0507] 일부 실시양태에서, CMV 반응성 및 바이오마커 발현은 T-세포(예를 들어, CTL)의 자극 전에 정량화된다. 대안적으로 또는 추가로, CMV 반응성 및 바이오마커 발현은 T-세포(예를 들어, CTL)의 자극 후에 정량화될 수 있다. 일부 실시양태에서, CMV 반응성은 CD107a를 발현하는 샘플에서의 T-세포의 백분율을 정량화함으로써 측정된다. 일부 실시양태에서, CMV 반응성은 IFN- $\gamma$ 를 발현하는 샘플에서의 T-세포의 백분율을 정량화함으로써 측정된다. 일부 실시양태에서, CMV 반응성은 TNF를 발현하는 샘플에서의 T-세포의 백분율을 정량화함으로써 측정된다. 일부 실시양태에서, CMV 반응성은 IL-2를 발현하는 샘플에서의 T-세포의 백분율을 정량화함으로써 측정된다. 일부 실시양태에서, CMV 반응성은 다중 바이오마커(예를 들어, CD107a, IFN- $\gamma$ , TNF, 및 IL-2 중 2개 이상, 바람직하게는 4개 모두)를 발현하는 T-세포의 백분율로서 측정된다. 일부 실시양태에서, CMV 반응성은 CD107a, IFN- $\gamma$ , TNF, 및 IL-2를 발현하는 세포에서의 T-세포의 백분율을 정량화함으로써 계산된다. T-세포는 CMV 반응성 백분율 정량화 전 또는 후에 샘플(예를 들어, PBMC 샘플 또는 T-세포를 포함하는 샘플)로부터 단리될 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, CMV 반응성은 주로 T-세포를 포함하는 샘플에서 원하는 특성(들)을 갖는 T-세포의 백분율이다.

[0508] 일부 실시양태에서, CMV 반응성은 CD107a를 발현하는 샘플에서의 CD8+ 림프구의 백분율을 정량화함으로써 측정된다. 일부 실시양태에서, CMV 반응성은 IFN- $\gamma$ 를 발현하는 샘플에서의 CD8+ 림프구의 백분율을 정량화함으로써 측정된다. 일부 실시양태에서, CMV 반응성은 TNF를 발현하는 샘플에서의 CD8+ 림프구의 백분율을 정량화함으로써 측정된다. 일부 실시양태에서, CMV 반응성은 IL-2를 발현하는 샘플에서의 CD8+ 림프구의 백분율을 정량화함으로써 측정된다. 일부 실시양태에서, CMV 반응성은 다중 바이오마커(예를 들어, CD107a, IFN- $\gamma$ , TNF, 및 IL-2 중 2개 이상, 바람직하게는 4개 모두)를 발현하는 CD8+ 림프구의 백분율로서 측정된다. CD8+ 림프구는 CMV 반응성 백분율 정량화 전 또는 후에 샘플(예를 들어, PBMC 샘플 또는 CD8+ 림프구의 샘플)로부터 단리될 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, CMV 반응성은 주로 CD8+ 림프구를 포함하는 샘플에서 원하는 특성(들)을 갖는 CD8+ 림프구의 백분율이다.

- [0509] 일부 실시양태에서, CMV 반응성은 CD107a를 발현하는 샘플에서의 CD3+ 림프구의 백분율을 정량화함으로써 측정된다. 일부 실시양태에서, CMV 반응성은 IFN- $\gamma$ 를 발현하는 샘플에서의 CD3+ 림프구의 백분율을 정량화함으로써 측정된다. 일부 실시양태에서, CMV 반응성은 TNF를 발현하는 샘플에서의 CD3+ 림프구의 백분율을 정량화함으로써 측정된다. 일부 실시양태에서, CMV 반응성은 IL-2를 발현하는 샘플에서의 CD3+ 림프구의 백분율을 정량화함으로써 측정된다. 일부 실시양태에서, CMV 반응성은 다중 바이오마커(예를 들어, CD107a, IFN- $\gamma$ , TNF, 및 IL-2 중 2개 이상, 바람직하게는 4개 모두)를 발현하는 CD3+ 림프구의 백분율로서 측정된다. CD3+ 림프구는 CMV 반응성 백분율 정량화 전 또는 후에 샘플(예를 들어, PBMC 샘플 또는 CD3+ 림프구의 샘플)로부터 분리될 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, CMV 반응성은 주로 CD3+ 림프구를 포함하는 샘플에서 원하는 특성(들)을 갖는 CD3+ 림프구의 백분율이다.
- [0510] 본 발명의 가장 바람직한 실시양태의 일부에서, T-세포는 이의 표면에 EphA3 항원-결합 분자를 제시한다. 예를 들면, T-세포는 이의 표면에 EphA3-결합 CAR을 제시할 수 있다.
- [0511] T-세포는 대상체에 대해 자가 조직이거나 자가 조직이 아닐 수 있다. 일부 실시양태에서, T-세포는 대상체에게 투여되기 전에 세포 은행에 저장된다. 일부 바람직한 실시양태에서, T-세포는 대상체에 대해 동종이계이다.
- [0512] 약제학적 조성물
- [0513] 여전히 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기술된 EphA3 결합제, 본원에 기술된 CAR, 본원에 기술된 단리된 핵산, 본원에 기술된 유전자 작제물 및/또는 본원에 기술된 숙주 세포 및 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0514] 일부 측면에서 본원에는 약제학적 담체와 함께 제형화된, EphA3 CAR 또는 이의 제제를 발현하거나 제시하는 CMV 특이적 CTL을 포함하는 조성물(예를 들어, 약제학적 조성물) 뿐만 아니라 이러한 약제학적 조성물의 투여 방법이 제공된다.
- [0515] "약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제"는 전신 투여에 안전하게 사용될 수 있는 고체 또는 액체 충전제, 희석제 또는 캡슐화 물질을 의미한다.
- [0516] 일부 실시양태에서, 조성물은 아주반트를 추가로 포함할 수 있다. 본원에 사용된 용어 "아주반트"는 광범위하게는 시험관내 또는 생체내에서 조성물에 대한 면역학적 반응을 변형 또는 향상시키는 면역학적 또는 약리학적 제제를 지칭한다. 예를 들면, 아주반트는 시간이 지남에 따라 항원의 존재를 증가시키고, 항원-제시 세포 항원의 흡수를 돕고, 대식세포와 림프구를 활성화하고, 사이토카인의 생성을 지원할 수 있다. 면역 반응을 변경함으로써, 아주반트는 더 적은 용량의 면역 상호 작용제 또는 제제가 투여 효과 또는 안전성을 증가시킬 수 있게 한다. 예를 들면, 아주반트는 T-세포 고갈을 방지하여 특정 면역 상호 작용제 또는 제제의 효과 또는 안전성을 증가시킬 수 있다. 아주반트의 예는 면역 조절 단백질, 아주반트 65,  $\alpha$ -GalCer, 인산알루미늄, 수산화알루미늄, 인산칼슘,  $\beta$ -글루칸 펩티드, CpG DNA, GPI-0100, 지질 A 및 이들의 변형된 버전(예를 들어, 모노포스포릴화된 지질 A), 리포다당류, 리포반트, 몬타니드, N-아세틸-무라밀-L-알라닌-D-이소글루타민, Pam3CSK4, Quil-A 및 트레할로스 디미콜레이트를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0517] 이들 제형 또는 조성물을 제조하는 방법은 본원에 기술된 제제를 담체 및 임의로 하나 이상의 보조 성분과 결합시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 제형은 본원에 기술된 제제를 액체 담체, 또는 미분된 고체 담체, 또는 둘 다와 균일하고 친밀하게 결합시킨 다음, 필요한 경우, 생성물을 성형함으로써 제조된다.
- [0518] 비경구 투여에 적합한 본 발명의 약제학적 조성물은 당, 알코올, 항산화제, 완충제, 정균제, 제형을 의도된 수용자의 혈액과 등장성으로 만드는 용질 또는 현탁제 또는 증점제를 함유할 수 있는 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 멸균 등장성 수성 또는 비수성 용액, 분산액, 현탁액 또는 에멀전, 또는 사용 직전에 멸균 주사 용액 또는 분산액으로 재구성될 수 있는 멸균 분말과 조합하여 본원에 기술된 하나 이상의 제제를 포함한다.
- [0519] 특정 투여 경로에 따라, 당업계에 잘 알려진 다양한 담체가 사용될 수 있다. 이러한 담체는 당, 전분, 셀룰로스 및 이의 유도체, 맥아, 젤라틴, 활석, 황산칼슘, 식물성 오일(예를 들어, 올리브 오일), 합성 오일, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 알긴산, 인산염 완충 용액, 유화제, 등장성 염수 및 염, 예를 들어 염산염, 브롬화물 및 황산염을 포함하는 무기산염, 아세테이트, 프로피오네이트 및 말로네이트와 같은 유기산염 및 피로젠-비함유 물을 포함하는 그룹으로부터 선택될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물에 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 추가 예는 물, 에탄올, 및 이들의 적합한 혼합물, 및 에틸 올레이트와 같은 주사 가능한 유기 에스테르를 포함한다. 적절한 유동성은, 예를 들면, 레시틴과 같은 코팅 물

질의 사용, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다.

- [0520] 선택된 투여 경로에 관계없이, 적합한 수화된 형태로 사용될 수 있는 본 발명의 제제, 및/또는 본 발명의 약제학적 조성물은 당업계의 숙련자들에게 공지된 통상적인 방법에 의해 약제학적으로 허용되는 투여 형태로 제형화된다.
- [0521] 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 및 부형제를 설명하는 유용한 참고문헌은 문헌에 참고로 포함된 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Publishing Co. N.J. USA, 1991)]이다.
- [0522] 치료학적 용도
- [0523] 본 개시내용의 측면은 특히 대상체에서 암의 치료에서의 본원에 기술된 바와 같은 항원-결합제 및/또는 세포의 용도에 관한 것이다.
- [0524] 따라서, 본 개시내용은 대상체에서 암을 치료 또는 예방하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 대상체에게 치료학적 유효량의 본원에 기술된 EphA3 결합제, 또는 본원에 기술된 바와 같은 EphA3에 특이적인 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 적어도 하나의 T-세포, 또는 본원에 기술된 조성물을 투여하여 대상체에서 암을 치료 또는 예방하는 단계를 포함한다.
- [0525] 본원에서 일반적으로 사용되는 용어 "암", "종양", "악성" 및 "악성 종양"은 종양 발생, 종양 마커의 발현, 종양 억제인자 발현 또는 활성의 손실 및/또는 비정상 또는 이상 세포 표면 마커 발현과 관련된 하나 이상의 유전적 돌연변이 또는 기타 유전적 변화를 포함하는 비정상 또는 이상 세포 증식, 분화 및 /또는 종종 비정상 또는 이상 분자 표현형을 동반하는 이동을 특징으로 하는 질환 또는 상태를 지칭한다.
- [0526] 암은 육종, 암종, 림프종, 백혈병 및 모세포종과 같은 모든 주요 암 형태를 포함하지만 이에 제한되지 않는, <http://www.cancer.gov/cancertopics/alphalist>의 NCI 암 지수에 열거된 바와 같은 임의의 공격적이거나 잠재적으로 공격적인 암, 종양 또는 기타 악성 종양을 포함할 수 있다. 이들은 유방암, 폐 선암종(lung adenocarcinoma)을 포함한 폐암, 난소암, 자궁경부암, 자궁암 및 전립선암을 포함한 생식계 암, 뇌 및 신경계의 암, 두경부암, 결장암, 결장직장암 및 위암을 포함한 위장관암, 간암, 신장암, 흑색종(melanoma) 및 피부 암종과 같은 피부암, 림프구암(lymphoid cancer) 및 골수단핵구암(myelomonocytic cancer)을 포함한 혈구암, 췌장암 및 뇌하수체암과 같은 내분비계 암, 뼈 및 연조직 암을 포함한 근골격계 암을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 특정 실시양태에서, 암은 다형성 교모세포종(glioblastoma multiforme)과 같은 고형 암이다. 적합한 예는, 암은 EphA3을 발현, 예를 들어, 과발현한다.
- [0527] 암을 치료하는 방법은 방지적, 예방적, 또는 치료적일 수 있고 포유동물, 특히 인간에서 암의 치료에 적합할 수 있다. 본원에 사용된 "치료하는", "치료하다" 또는 "치료"는 암 및/또는 이의 증상이 적어도 발병하기 시작한 후 암의 증상을 적어도 개선하는 치료적 개입, 작용 과정 또는 프로토콜을 지칭한다. 암의 치료 또는 완화는 암의 진행을 예방하는데, 예를 들어, 상태의 악화를 예방하거나, 더 심각한 질환 상태의 발병 속도를 늦추는데 효과적일 수 있다. 본원에 사용된 "예방하는", "예방하다" 또는 "예방"은 암 또는 증상의 발달 또는 진행을 예방, 억제 또는 지연하도록 암 및/또는 암의 증상의 발병 전에 개시되는 치료적 개입, 작용 과정 또는 프로토콜을 지칭한다.
- [0528] 일부 실시양태에서, T-세포 용량당 대상체에게 약  $1 \times 10^5$  내지 약  $1 \times 10^8$ 개 T-세포가 투여된다. 일부 실시양태에서, T-세포 용량당 대상체에게 약  $1 \times 10^6$  내지 약  $1 \times 10^7$ 개 T-세포가 투여된다. 일부 실시양태에서,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1.5 \times 10^7$ , 또는  $2 \times 10^7$ 개 T-세포(예를 들어, CTL)가 대상체에게 투여된다. 다중 용량이 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, T-세포(예를 들어, 자가 CTL)의 초기 용량이 투여되고, T-세포(예를 들어, 자가 CTL)의 하나 이상의 추가 용량이, 예를 들어, 치료 과정에 따라 증가하는 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 2회 이상, 3회 이상, 4회 이상, 5회 이상, 6회 이상, 7회 이상, 8회 이상, 9회 이상, 또는 10회 이상의 용량이 투여된다. 대상체는 초기 용량과 동일하거나 상이한 추가 용량을 투여받을 수 있다. 예를 들면, 더 낮은 용량이 투여된 다음 더 높은 용량이 투여될 수 있다. 용량은 매일, 일주일에 두 번, 매주, 격주로, 한 달에 한 번, 2개월에 한 번, 3개월에 한 번, 또는 6개월에 한 번 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 T-세포(예를 들어, 동종 CTL) 투여의 결과로 어떠한 부작용도 경험하지 않는다.
- [0529] 용어 "치료학적 유효량"은 EphA3 결합제 또는 CAR과 같은 특정 제제로 치료되는 대상체에서 원하는 효과를 달성하기에 충분한 상기 제제의 양을 기술한다. 예를 들면, 이것은 암 전이 및 재발을 포함한 암 또는 암 관련 질환, 장애 또는 상태를 감소, 완화 및/또는 예방하는데 필요한, 본원에 기술된 하나 이상의 EphA3 결합제 및/

또는 CAR을 포함하는 조성물의 양일 수 있다. 일부 실시양태에서, "치료학적 유효량"은 암의 증상을 감소시키거나 제거하기에 충분하다. 또 다른 실시양태에서, "치료학적 유효량"은 원하는 생물학적 효과를 달성하기에 충분한 양, 예를 들면 암 성장, 재발 및/또는 전이를 감소 또는 예방하는데 효과적인 양이다.

[0530] 이상적으로, 제제의 치료학적 유효량은 대상체에서 실질적인 세포독성 효과를 야기하지 않으면서 원하는 결과를 유도하기에 충분한 양이다. 암을 감소, 경감 및/또는 예방하는데 유용한 제제의 유효량은 치료되는 대상체, 임의의 관련 질환, 장애 및/또는 상태의 유형 및 중증도(예를 들어, 임의의 관련된 전이의 수 및 위치), 및 치료 조성물의 투여 방식에 따라 좌우될 것이다.

[0531] 본 측면의 방법은 상기 언급된 것들에 추가하여 하나 이상의 추가의 암 치료를 포함할 수 있음을 인지할 것이다. 이러한 암 치료는 약물 요법, 화학요법, 항체, 핵산 및 기타 생체분자 요법, 방사선 요법, 수술, 영양 요법, 이완 또는 명상 요법 및 기타 자연 요법 또는 전체론 요법을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 일반적으로, 약물, 생체분자(예를 들어, 항체, siRNA와 같은 억제 핵산) 또는 화학요법제는 본원에서 "항암 치료제" 또는 "항암제"로 지칭된다.

[0532] 일부 실시양태에서, 대상체는 또한 항암 화합물을 투여받는다. 예시적인 항암 화합물은 알렘투주맵(Campath®), 알리트레티노인(Panretin®), 아나스트로졸(Arimidex®), 베바시주맵(Avastin®), 백사로텐(Targretin®), 보르테조미(Velcade®), 보수티닙(Bosulif®), 브렌투시맵 베도틴(Adcetris®), 카보잔티닙(Cometriq™), 카르필조미(Kyprolis™), 세톡시맵(Erbitux®), 크리조티닙(Xalkori®), 다사티닙(Sprycel®), 데닐류킨 디프티톡스(Ontak®), 에를로티닙 염산염(Tarceva®), 에버롤리무스(Afmitor®), 액세메스탄(Aromasin®), 폴베스트란트(Faslodex®), 게피티닙(Iressa®), 이브리투모맵 티옥세탄(Zevalin®), 이마티닙 메실레이트(Gleevec®), 이필리무맵(Yervoy™), 파라티닙 디토실레이트(Tykerb®), 레트로졸(Femara®), 닐로티닙(Tasigna®), 오펜투주맵(Arzerra®), 파니투주맵(Vectibix®), 파조파닙 하이드로클로라이드(Votrient®), 페르투주맵(Peijeta™), 프랄라트렉세이트(Folotyn®), 레고라페닙(Stivarga®), 리투시맵(Rituxan®), 로미덱신(Istodax®), 소라페닙 토실레이트(Nexavar®), 수니티닙 말레이트(Sutent®), 타목시펜, 텀시롤리무스(Torisel®), 토레미펜(Fareston®), 토시투모맵 및 13 II-토시투모맵(Bexxar®), 트라스투주맵(Herceptin®), 트레티오인(Vesanoid®), 반데타닙(Caprelsa®), 베무라페닙(Zelboraf®), 보리노스타트(Zolinza®), 및 지브-애플리버셉트(Zaltrap®)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0533] 일부 실시양태에서, 대상체는 또한 화학요법제를 투여받는다. 이러한 화학요법제의 예는 티오테파 및 사이클로포스파미드와 같은 알킬화제; 부설판, 임프로설판 및 피포설판과 같은 알킬 설포네이트; 벤조도파, 카보쿠은, 메투레도파, 및 우레도파와 같은 아지리딘; 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포아미드, 트리에틸렌티오포스포아미드 및 트리메틸올로멜라민을 포함한 에틸렌이민 및 메틸멜라민; 아세트게닌(특히 블라타신 및 블라타신); 캄프토테신(합성 유사체 토포테칸 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065(이의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 크립토포신(특히 크립토포신 1 및 크립토포신 8); 둘라스타틴; 듀오카르마이신(합성 유사체, KW-2189 및 CBI-TM1 포함); 엘류테로빈; 판크라티스타틴; 사르코티딘; 스폰지스타틴; 클로람부실, 클로르나파진, 콜로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노벵비친, 페네스테린, 프레드니루스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드와 같은 질소 머스타드; 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라남누스틴과 같은 니트로우레아; 에네다인 항생제(예를 들어, 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마(1,1) 및 칼리케아미신 오메가(1,1)와 같은 항생제; 다이네미신 A를 포함하는 다이네미신; 클로드로네이트와 같은 비스포스포네이트; 에스페라미신; 뿐만 아니라 네오카르지노스타틴 발색단 및 관련 발색단백 에네다인 항생제 발색단, 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 각티노마이신, 카라비신, 카미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데투루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신(모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 데옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 예소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신 C와 같은 미토마이신, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 퓨로마이신, 켈라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 메토크세이트 및 5-플루오로우라실(5-FU)과 같은 항대사물질; 데놈테린, 메토크세이트, 프테롭테린, 트리메트렉세이트와 같은 엽산 유사체; 플루다라빈, 6-머캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌과 같은 퓨린 유사체; 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘과 같은 피리미딘 유사체; 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토라톤과 같은 안드로겐; 아미노글루테티미드, 미토탄, 트리로스탄과 같은 항부신; 프롤린산과 같은 엽산 보충제; 아세글라톤; 알도포스파미드

글리코시드; 아미노레볼린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 테포파민; 테베콜신; 디아지쿠온; 엘포르미틴; 엘립티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 질산갈륨; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 메이탄신 및 안사미토신과 같은 메이탄시노이드; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단몰; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나멧; 피라루비신; 로속산트론; 포도필린산; 2-에틸하이드라지드; 프로카바진; PSK 다당류 복합체; 라족산; 리족신; 시조푸란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센(특히 T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토라톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드("Ara-C"); 사이클로포스파미드; 티오테파; 탁소이드, 예를 들어, 파클리탁셀 및 독세탁셀; 클로람부실; 쟈시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토포린; 메토티렉세이트; 시스플라틴, 옥살리플라틴 및 카르보플라틴과 같은 백금 배위 착물; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드(VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빈크리스틴; 비노렐빈; 노반트론; 테니포시드; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반드로네이트; 이리노테칸(예를 들어, CPT-11); 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸로미딘(DMFO); 레티노산과 같은 레티노이드; 카페시타빈; 및 상기 중 어느 것의 약제학적으로 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0534] 일부 실시양태에서, 대상체는 또한 면역치료제를 투여받는다. 면역요법은 대상체의 면역계를 사용하여 상태를 치료하거나 예방하는 치료, 예를 들어, 암 백신, 사이토카인, 표적-특이적 항체의 사용, T-세포 요법, 및 수지상 세포 요법을 지칭한다.

[0535] 일부 실시양태에서, 대상체는 또한 면역 조절 단백질을 투여받는다. 면역 조절 단백질의 예는 B 림프구 화학주성인자("BLC"), C-C 모티프 케모카인 11("Eotaxin-1"), 호산구 화학주성 단백질 2("Eotaxin-2"), 과립구 콜로니-자극 인자("G-CSF"), 과립구 대식세포 콜로니-자극 인자("GM-CSF"), 1-309, 세포간 부착 분자 1("ICAM-1"), 인터페론 감마("IFN- $\gamma$ "), 인터류킨-1 알파(IL-1 $\alpha$ "), 인터류킨-1 베타("IL-1 $\beta$ "), 인터류킨 1 수용체 길항제("IL-1ra"), 인터류킨-2("IL-2"), 인터류킨-4("IL-4"), 인터류킨-5("IL-5"), 인터류킨-6("IL-6"), 인터류킨-6 가용성 수용체("IL-6 sR"), 인터류킨-7("IL-7"), 인터류킨-8("IL-8"), 인터류킨-10("IL-10"), 인터류킨-11("IL-11"), 인터류킨-12의 서브유닛 베타("IL-12 p40" 또는 "IL-12 p70"), 인터류킨-13("IL-13"), 인터류킨-15("IL-15"), 인터류킨-16("IL-16"), 인터류킨-17("IL-17"), 케모카인(C-C 모티프) 리간드 2("MCP-1"), 대식세포 콜로니-자극 인자("M-CSF"), 감마 인터페론에 의해 유도된 모노카인("MIG"), 케모카인(C-C 모티프) 리간드 2("MIP-1 $\alpha$ "), 케모카인(C-C 모티프) 리간드 4("MIR-1 $\beta$ "), 대식세포 염증성 단백질-1-델타("MIR-1 $\delta$ "), 혈소판-유래 성장 인자 서브유닛 B("PDGF-BB"), 케모카인(C-C 모티프) 리간드 5, 활성화 조절, 정상 T 세포 발현 및 분비 조절(Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted)("RANTES"), TEMP 메탈로펩티다제 억제제 1("TIMP-1"), TIMP 메탈로펩티다제 억제제 2("TIMP-2"), 종양 괴사 인자, ("TNF"), 종양 괴사 인자, 림프톡신-베타("TNF- $\beta$ "), 가용성 TNF 수용체 타입 1("sTNFRI"), sTNFRIIAR, 뇌-유래 신경영양 인자("BDNF"), 기본 섬유아세포 성장 인자("bFGF"), 골 형태발생 단백질 4("BMP-4"), 골 형태발생 단백질 5("BMP-5"), 골 형태발생 단백질 7("BMP-7"), 신경 성장 인자("b-NGF"), 표피 성장 인자("EGF"), 표피 성장 인자 수용체("EGFR"), 내분비선-유래 혈관 내피 성장 인자("EG-VEGF"), 섬유아세포 성장 인자 4("FGF-4"), 각질세포 성장 인자("FGF-7"), 성장 분화 인자 15("GDF-15"), 교질 세포-유래 신경영양 인자("GDNF"), 성장 호르몬, 헤파린-결합 EGF-유사 성장 인자("HB-EGF"), 간세포 성장 인자("HGF"), 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질 1("IGFBP-1"), 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질 2("IGFBP-2"), 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질 3("IGFBP-3"), 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질 4("IGFBP-4"), 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질 6("IGFBP-6"), 인슐린-유사 성장 인자 1("IGF-1"), 인슐린, 대식세포 콜로니-자극 인자("M-CSFR"), 신경 성장 인자 수용체("NGFR"), 뉴로트로핀-3("NT-3"), 뉴로트로핀-4("NT-4"), 파골세포형성 억제 인자("Osteoprotegerin"), 혈소판-유래 성장 인자 수용체("PDGF-AA"), 포스포티딜이노시톨-글리칸 생합성("PIGF"), Skp, 구이린, F-box 함유 복합체("SCF"), 줄기 세포 인자 수용체("SCFR"), 형질전환 성장 인자 알파("TGF $\alpha$ "), 형질전환 성장 인자 베타-1("TGF $\beta$  1"), 형질전환 성장 인자 베타-3("TGF $\beta$  3"), 혈관 내피 성장 인자("VEGF"), 혈관 내피 성장 인자 수용체 2("VEGFR2"), 혈관 내피 성장 인자 수용체 3("VEGFR3"), VEGF-D 6Ckine, 티로신-단백질 키나제 수용체 FIFO("Ax1"), 베타셀룰린("BTC"), 점막-관련 상피케모카인("CCL28"), 케모카인(C-C 모티프) 리간드 27("CTACK"), 케모카인(C-X-C 모티프) 리간드 16("CXCL16"), C-X-C 모티프 케모카인 5("ENA-78"), 케모카인(C-C 모티프) 리간드 26("Eotaxin-3"), 과립구 화학주성 단백질 2("GCP-2"), GRO, 케모카인(C-C 모티프) 리간드 14("HCC-1"), 케모카인(C-C 모티프) 리간드 16("HCC-4"), 인터류킨-9("IL-9"), 인터류킨-17F("IL-17F"), 인터류킨-18-결합 단백질("IL-18 BP $\alpha$ "), 인터류킨-28A("IL-28A"), 인터류킨 29("IL-29"), 인터류킨-31("IL-31"), C-X-C 모티프 케모카인 10("IP-10"), 케모카인 수용체 CXCR3("1-TAC"), 백혈병 억제 인자("LIF"), 경질, 케모카인(C 모티프) 리간드("Lymphotactin"), 단핵구 화학 주성 인자 단백질 2("MCP-2"), 단핵구 화학 주성 인

자 단백질 3("MCP-3"), 단백질 화학 주성 인자 단백질 4("MCP-4"), 대식세포-유래 케모카인("MDC"), 대식세포 이동 억제 인자("MIF"), 케모카인 (C-C 모티프) 리간드 20("MIP-3 $\alpha$ "), C-C 모티프 케모카인 19("MIR-3 $\beta$ "), 케모카인 (C-C 모티프) 리간드 23("MPIF-1"), 대식세포 자극 단백질 알파 사슬("MSP $\alpha$ "), 뉴클레오솜 조립 단백질 1-유사 4("NAP-2"), 분비된 인단백질 1("Osteopontin"), 폐 및 활성화-조절 사이토카인("PARC"), 혈소판 인자 4("PF4"), 스트로마 세포-유래 인자-1 알파("SDF-1 $\alpha$ "), 케모카인 (C-C 모티프) 리간드 17("IRC"), 흥선-발현된 케모카인("TECK"), 흥선 기질 림포포이에틴("TSLP 4-IBB"), CD 166 항원("ALCAM"), 분화 클러스터 80("B7-1"), 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 17("BCMA"), 분화 클러스터 14("CD14"), 분화 클러스터 30("CD30"), 분화 클러스터 40("CD40 Ligand"), 암배아 항원-관련 세포 부착 분자 1(담즙 당단백질)("CEACAM-1"), 사멸 수용체 6("DR6"), 데옥시티미딘 키나제("Dtk"), 타입 1 막 당단백질("Endoglin"), 수용체 티로신-단백질 키나제 erbB-3("ErbB3"), 내피-백혈구 부착 분자 1("E-Selectin"), 아포토시스 항원 1("Fas"), Fms-유사 티로신 키나제 3("Flt-3L"), 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 1("GITR"), 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 14("HVEM"), 세포간 부착 분자 3("ICAM-3"), IL-1R4, IL-1R1, IL-10R $\beta$ , IL-17R, IL-2R $\gamma$ , IL-21R, 리소좀 막 단백질 2("LIMP2"), 호중구 젤라티나제-관련 리포칼린("Lipocalin-2"), CD62L("L-Selectin"), 림프 내피("LYVE-1"), MHC 클래스 I 폴리펩티드-관련 서열 A("MICA"), MHC 클래스 I 폴리펩티드-관련 서열 B("MICB"), NRGI- $\beta$ 1, 베타-타입 혈소판-유래 성장 인자 수용체("PDGF R $\beta$ "), 혈소판 내피 세포 부착 분자("PECAM-1"), RAGE, A형 간염 바이러스 세포 수용체 1("TIM-1"), 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 IOC("TRAIL R3"), 트라핀 단백질 트랜스글루타미나제 결합 도메인("Trappin-2"), 우로키나제 수용체("uPAR"), 혈관 세포 부착 단백질 1("VGAM-1"), XEDAR, 액티빈 A, 아구티-관련 단백질("AgRP"), 리보뉴클레아제 5("Angiogenin"), 안지오포이에틴 1, 안지오스타틴, 카텡신 S, CD40, 크립틱 패밀리 단백질 IB("Gripto-1"), DAN, Dickkopf-관련 단백질 1("DKK-1"), E-카드헤린, 상피 세포 부착 분자("EpCAM"), Fas 리간드(FasL 또는 CD95L), Fc $\gamma$  RIIB/C, 포위스타틴, 갈렉틴-7, 세포간 부착 분자 2("IGAM-2"), IL-13 R1, IL-13R2, IL-17B, IL-2 Ra, IL-2 Rb, IL-23, LAP, 신경 세포 부착 분자("NrcAM"), 플라스미노겐 활성화제 억제제-1("PAM"), 혈소판 유래 성장 인자 수용체("PDGF-AB"), 레지스틴, 기질 세포-유래 인자 1("SDF-1 $\beta$ "), sgp130, 분비된 frizzled-관련 단백질 2("ShhN"), 시알산-결합 면역글로불린-타입 렉틴("Siglec-5"), ST2, 형질전환 성장 인자-베타 2("TGF $\beta$ 2"), Tie-2, 트롬보포이에틴("TPO"), 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 10D("TRAIL R4"), 골수 세포에 발현된 트리거링 수용체 1("TREM-1"), 혈관 내피 성장 인자 C("VEGF-C"), VEGFR1, 아디포넥틴, 아딤신("AND"), 알파-태아단백("AFP"), 안지오포이에틴-유사 4("ANGPTL4"), 베타-2-마이크로글로불린(" $\beta$ 2M"), 기저 세포 부착 분자("BCAM"), 탄수화물 항원 125("CA125"), 암 항원 15-3("CA15-3"), 암배아 항원("CEA"), cAMP 수용체 단백질("GRP"), 인간 표피 성장 인자 수용체 2("ErbB2"), 폴리스타틴, 난포-자극 호르몬("FSH"), 케모카인 (C-X-C 모티프) 리간드 1("GRO $\alpha$ "), 인간 용모막 성선 자극 호르몬(" $\beta$  HGG"), 인슐린-유사 성장 인자 1 수용체("IGF-1 sR"), IL-1 sRII, IL-3, IL-18 R $\beta$ , IL-21, 랩틴, 매트릭스 메탈로프로테이나제-1("MMP-1"), 매트릭스 메탈로프로테이나제-2("MMP-2"), 매트릭스 메탈로프로테이나제-3("MMP-3"), 매트릭스 메탈로프로테이나제-8("MMP-8"), 매트릭스 메탈로프로테이나제-9("MMP-9"), 매트릭스 메탈로프로테이나제-10("MMP-10"), 매트릭스 메탈로프로테이나제-13("MMP-13"), 신경 세포 부착 분자("NCAM-1"), 엔탁틴("Nidogen-1"), 뉴런 특이적 예놀라제("NSE"), 온코스타틴 M("OSM"), 프로칼시토닌, 프로락틴, 전립선 특이적 항원("PSA"), 시알산-결합 Ig-유사 렉틴 9("Siglec-9"), ADAM 17 엔도펩티다제("TACE"), 티로글로불린, 메탈로프로테이나제 억제제 4("TIMP-4"), TSH2B4, 디스인테그린 및 메탈로프로테이나제 도메인-함유 단백질 9("ADAM-9"), 안지오포이에틴2, 종양 괴사 인자 리간드 슈퍼패밀리 구성원 13, 산성 류신-풍부 핵 인단백질 32 패밀리 구성원 B("APRIL"), 골 형태발생 단백질 2("BMP-2"), 골 형태발생 단백질 9("BMP-9"), 보체 성분 5a("C5a"), 카텡신 L, CD200, CD97, 케메린, 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 6B("Dcr3"), 지방산-결합 단백질 2("FABP2"), 섬유아세포 활성화 단백질, 알파("FAP"), 섬유아세포 성장 인자 19("FGF-19"), 갈렉틴-3, 간세포 성장 인자 수용체("HGFR"), IFN- $\alpha$ / $\beta$  R2, 인슐린-유사 성장 인자 2("IGF-2"), 인슐린-유사 성장 인자 2 수용체("IGF-2R"), 인터류킨-1 수용체 6("IL-1R6"), 인터류킨 24("IL-24"), 인터류킨 33("IL-33"), 칼리크레인 14, 아스파라기닐 엔도펩티다제("Legumain"), 산화된 저밀도 지단백질 수용체 1("LOX-1"), 만노스-결합 렉틴("MBL"), 네프릴리신("NEP"), Notch 동족체 1, 진좌-관련(Drosophila) ("Notch-1"), 과발현된 신아세포종(Nephroblastoma overexpressed)("NOV"), 오스테오액티빈, 예정 세포사 단백질 1("PD-1"), N-아세틸무라모일-L-알라닌 아미다제("PGRP-5"), 세르핀 A4, 분비된 frizzled 관련 단백질 3("sFRP-3"), 트롬보모듈린, 툴-유사 수용체 2("TLR2"), 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 10A("TRAIL R1"), 트랜스페린("TRF"), WIF-1ACE-2, 알부민, AMIGA, 안지오포이에틴 4, B-세포 활성화 인자("BAFF"), 탄수화물 항원 19-9("CA19-9"), CD163, 클러스터린, CRT AM, 케모카인 (C-X-C 모티프) 리간드 14("CXCL14"), 시스타틴 C, 데코린("DCN"), Dickkopf-관련 단백질 3("Dkk-3"), 델타-유사 단백질 1("DLL1"), 페투인 A, 헤파린-결합 성장 인자 1("aFGF"), 엽산 수용체 알파("FOLR1"),

푸린, GPCR-관련 분류 단백질 1("GASP-1"), GPCR-관련 분류 단백질 2("GASP-2"), 과립구 콜로니-자극 인자 수용체("GCSFR"), 세린 프로테아제 헤파신("HAI-2"), 인터류킨-17B 수용체("IL-17B R"), 인터류킨 27("IL-27"), 림프구-활성화 유전자 3("LAG-3"), 아포지단백질 A-V("LDL R"), 펩시노겐 I, 레티놀 결합 단백질 4("RBP4"), SOST, 헤파란 설페이트 프로테오글리칸("Syndecan-1"), 중앙 피사 인자 수용체 수퍼패밀리 구성원 13B("TAG"), 조직 인자 경로 억제제("TFPI"), TSP-I, 중앙 피사 인자 수용체 수퍼패밀리 구성원 10b("TRAIL R2"), TRANCE, 트로포닌 I, 우로키나제 플라스미노겐 활성화제("uPA"), 카드헤린 5, CD144로도 알려진 타입 2 또는 VE-카드헤린(혈관 내피)("VE-Cadherin"), WNT1-유도성 신호전달 경로 단백질 1("WISP-1"), 및 핵 인자 k B의 수용체 활성화제("RANK")를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0536] 일부 실시양태에서, 대상체는 또한 면역 체크포인트 억제제를 투여받는다. 면역 체크포인트 억제는 광범위하게 암 세포가 면역 반응을 예방하거나 하향조절하기 위해 생성할 수 있는 체크포인트를 억제하는 것을 지칭한다. 면역 체크포인트 단백질의 예는 CTLA4, PD-1, PD-L1, PD-L2, A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, KIR, LAG3, TIM-3 또는 VISTA를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 면역 체크포인트 억제제는 면역 체크포인트 단백질에 결합하고 이를 억제하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편일 수 있다. 면역 체크포인트 억제제의 예는 니볼루맙, 펌브롤리주맙, 피딜리주맙, AMP-224, AMP-514, STI-AT110, TSR-042, RG-7446, BMS-936559, MEDI-4736, MSB-0020718G, AUR-012 및 STI-A1010을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0537] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 조성물(예를 들어, 본원에서 제공된 백신 조성물)은 암 및/또는 CMV 감염을 예방하기 위해 예방적으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 백신은 중앙 세포 확장을 억제하기 위해 투여된다. 백신은 환자에서 암 세포 또는 CMV 감염된 세포의 검출 전 또는 후에 투여될 수 있다. 중앙 세포 확장의 억제는 중앙 세포의 성장을 예방, 정지, 둔화 또는 사멸시키는 것을 지칭하는 것으로 이해된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 펩티드, 핵산, 항체 또는 APC를 포함하는 백신의 투여 후, 전염증성 반응이 유도된다. 전염증성 면역 반응은 전염증성 사이토카인 및/또는 케모카인, 예를 들면, IFN- $\gamma$  및/또는 IL-2의 생성을 포함한다. 전염증성 사이토카인 및 케모카인은 당업계에서 잘 알려져 있다.

[0538] 병용 요법은 후속 치료가 투여될 때 투여된 제1 제제의 치료 효과가 완전히 사라지지 않도록 하는 방식으로 활성 화합물의 순차적, 동시적 및 개별적 및/또는 공동 투여를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 제제는 제1 제제와 공동-제형화되거나 별도의 약제학적 조성물로 제형화될 수 있다.

[0539] "투여하는" 또는 "투여"는 특정의 선택된 경로에 의해 본원에 개시된 단리된 EphA3 결합제, CAR, 암호화 핵산, 유전자 작제물, 세포 또는 조성물의 도입을 의미한다.

[0540] EphA3 결합제, CAR 또는 이의 변이체, 또는 암호화 핵산, 또는 유전자 작제물, 또는 세포, 또는 이를 포함하는 조성물의 투여는 임의의 공지된 정맥내, 근육내, 복강내, 두개내, 경피, 경구, 비강내, 항문 및 안구내를 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 공지된 비경구, 국소 또는 장내 경로에 의해 이루어질 수 있다.

[0541] 투여 형태는 정제, 분산액, 현탁액, 주사제, 용액, 시럽, 트로키, 캡슐, 좌약, 에어로졸, 경피 패치 등을 포함한다. 이러한 투여 형태는 또한 이러한 목적을 위해 특별히 설계된 제어 방출 장치 또는 이러한 방식으로 추가로 작용하도록 변형된 다른 형태의 이식물을 주사 또는 이식하는 것을 포함할 수 있다. 치료제의 제어 방출은 이를, 예를 들면, 아크릴 수지, 왁스, 고급 지방족 알코올, 폴리락트산 및 폴리글리콜산 및 특정 셀룰로스 유도체, 예를 들어 하이드록시프로필메틸 셀룰로스를 포함하는 소수성 중합체로 코팅함으로써 수행될 수 있다. 또한, 제어 방출은 다른 중합체 매트릭스, 리포솜 및/또는 미소구체를 사용하여 수행될 수 있다.

[0542] 경구 또는 비경구 투여에 적합한 본 발명의 조성물은 각각 미리 결정된 양의 하나 이상의 본 발명의 치료제를 함유하는 캡슐, 샤넬 또는 정제와 같은 개별 단위로서, 분말 또는 과립으로서 또는 수성 액체, 비수성 액체 중의 용액 또는 현탁액, 수중유 에멀전 또는 유중수 액체 에멀전으로서 제공될 수 있다. 이러한 조성물은 임의의 약학 방법에 의해 제조될 수 있지만 모든 방법은 하나 이상의 필수 성분을 구성하는 담체와 상기 기술된 바와 같은 하나 이상의 제제를 결합시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 조성물은 본 발명의 제제를 액체 담체 또는 미분된 고체 담체 또는 둘 다를 균일하고 친밀하게 혼합한 다음, 필요한 경우 생성물을 원하는 형태로 성형함으로써 제조된다.

[0543] 또 다른 관련 측면에서, 본 발명은 대상체에서 암의 예방 및/또는 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서의 본원에 기술된 EphA3 결합제, 본원에 기술된 CAR, 본원에 기술된 단리된 핵산, 본원에 기술된 유전자 작제물 및/또는 본원에 기술된 숙주 세포의 용도에 있다.

[0544] 하나의 실시양태에서, 암은 다형성 교모세포종(glioblastoma multiforme)이거나 이를 포함한다.

- [0545] 표지 및 접합체
- [0546] 여전히 또 다른 측면에서, 본 발명은 EphA3 또는 EphA3을 발현하는 세포를 검출하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기한 EphA3 결합 분자 또는 CAR과 EphA3 사이에 복합체를 형성하여 EphA3 또는 EphA3을 발현하는 세포를 검출하는 단계를 포함한다.
- [0547] 하나의 실시양태에서, 상기 방법은 EphA3 또는 EphA3를 발현하는 세포를 상기에 또는 본원의 다른 곳에 기술된 EphA3 항원-결합 분자 또는 CAR과 접촉시키는 초기 단계를 포함한다.
- [0548] 따라서, 일부 실시양태에서 본 발명의 항원-결합 분자는 검출가능한 모이어티를 추가로 포함한다.
- [0549] 특정 실시양태에서, 세포는 암세포이거나 이를 포함한다.
- [0550] 따라서, 본원에 개시된 EphA3 결합제 또는 CAR이 암의 의학적 진단을 보조하기 위해 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 적합하게는, 상기 방법은 생물학적 샘플에 존재하거나 생물학적 샘플로부터 수득된 암세포에 의해 발현되는 경우와 같이 EphA3을 검출하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 생물학적 샘플은 인간으로부터 수득된 하나 이상의 체액, 세포, 조직, 기관 또는 기관 샘플을 포함하는 병리학 샘플일 수 있다. 비제한적인 예는 혈액, 혈장, 타액, 혈청, 림프구, 소변, 대변, 양수, 자궁경부 샘플, 뇌척수액, 조직 생검, 골수 및 피부를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0551] 일부 실시양태에서, 항원-결합 분자는 검출가능한 모이어티를 포함한다. 예를 들면, EphA3 항원-결합 분자 및/또는 CAR은 형광 표지, 인광 표지, 발광 표지, 면역검출 표지(예를 들어, 에피토프 태그), 방사성 표지, 화학, 핵산 또는 효소 표지로 표지된다. 항원-결합 분자는 검출가능한 모이어티로 공유 또는 비공유 표지될 수 있다.
- [0552] 형광 표지는, 예를 들어, 플루오레세인, 로다민, 알로피코시아닌, 에오신 및 NDB, 녹색 형광 단백질(GFP), 희토류 킬레이트(예를 들어, 유퀴륨(Eu), 테르븀(Tb) 및 사마륨(Sm)), 테트라메틸 로다민, 텍사스 레드, 4-메틸 움벨리페론, 7-아미노-4-메틸 쿠마린, Cy3 및 Cy5를 포함한다.
- [0553] 방사성 표지는 요오드<sup>123</sup>, 요오드<sup>125</sup>, 요오드<sup>126</sup>, 요오드<sup>131</sup>, 요오드<sup>133</sup>, 브롬<sup>77</sup>, 테크네튬<sup>99m</sup>, 인듐<sup>111</sup>, 인듐<sup>113m</sup>, 갈륨<sup>67</sup>, 갈륨<sup>68</sup>, 루테튬<sup>95</sup>, 루테튬<sup>103</sup>, 루테튬<sup>105</sup>, 수은<sup>207</sup>, 수은<sup>203</sup>, 레늄<sup>99m</sup>, 레늄<sup>101</sup>, 레늄<sup>105</sup>, 스칸듐<sup>47</sup>, 텔루륨<sup>121m</sup>, 텔루륨<sup>122m</sup>, 텔루륨<sup>125</sup>, 툴륨<sup>165</sup>, 툴륨<sup>167</sup>, 툴륨<sup>16</sup>, 구리<sup>67</sup>, 불소<sup>18</sup>, 이트륨<sup>90</sup>, 팔라듐<sup>100</sup>, 비스무트<sup>217</sup> 및 안티몬<sup>211</sup>과 같은 방사성 동위원소를 포함한다.
- [0554] 발광성 표지는 방사성발광성, 화학발광성(예를 들어, 아크리디늄 에스테르, 루미놀, 이소루미놀) 및 생물발광성 표지를 포함한다. 면역검출 가능한 표지는 항편, 펩티드/폴리펩티드, 항체, 수용체 및 리간드, 예를 들어 비오틴, 아비딘, 스트렙타비딘 또는 디곡시제닌을 포함한다. 핵산 표지는 앵타머를 포함한다. 효소 표지는, 예를 들어, 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, 글루코스 옥시다제, 베타-갈락토시다제 및 루시페라제를 포함한다.
- [0555] 일부 실시양태에서 본 발명의 항원-결합 분자는 화학적 모이어티에 접합된다. 화학적 모이어티는 치료 효과를 제공하기 위한 모이어티일 수 있다. 항체-약물 접합체는, 예를 들어, 문헌[Parslow et al., Biomedicines. 2016 Sep; 4(3): 14]에 검토되어 있다. 일부 실시양태에서, 화학적 모이어티는 약물 모이어티(예를 들어, 세포 독성제)일 수 있다. 일부 실시양태에서, 약물 모이어티는 화학요법제일 수 있다.
- [0556] 표지는 비오틴, 아비딘, 디곡시제닌, 효소(예를 들어, 알칼리 포스파타제 또는 호스래디쉬 퍼옥시다제), 형광단(예를 들어, FITC, 텍사스 레드, 쿠마린), 방사성 동위원소(예를 들어, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>67</sup>Ga, <sup>111</sup>In) 및/또는 직접적인 시각적 표지(예를 들어, 금 입자)를 포함하지만 이에 제한되지 않는 그룹으로부터 선택될 수 있다.
- [0557] 적합하게는, EphA3의 검출은 EphA3 결합제 또는 CAR과 EphA3 또는 EphA3을 발현하는 세포 사이에 검출가능한 복합체를 형성하는 단계를 포함한다. 이렇게 형성된 복합체는 면역블롯팅, 면역조직화학, 면역세포화학, 면역침전, ELISA, 유세포분석, 자기 비드 분리, 바이오센서-기반 검출 시스템, 예를 들어 표면 플라즈몬 공명 및 이미징, 예를 들어 PET 이미징을 포함하지만 이에 제한되지 않는 당업계에 공지된 임의의 기술, 검정 또는 수단에 의해 검출될 수 있다.
- [0558] 검출을 용이하게 하기 위해 EphA3 결합제 또는 CAR은 앞서 기술된 바와 같이 직접 표지될 수 있거나 표지된 2차 항체가 사용될 수 있다. 표지는 전술한 바와 같을 수 있다.
- [0559] 일부 실시양태에서, 효소, 효소 기질(예를 들어, 루미놀, AMPPD, NBT), 이차 항체 및/또는 자기 비드와 같지만

이에 제한되지 않는 하나 이상의 검출 시약과 함께 본원에 개시된 항체 또는 항체 단편을 포함하는 검출 키트가 제공될 수 있다.

[0560] 또 다른 측면에서, 본 발명은 서열 번호 13 내지 156 및/또는 표 4-7 중의 어느 하나에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 구성되거나 이로 구성된 단리된 단백질을 제공한다.

[0561] 최종적인 측면에서, 본 발명은 서열 번호 1 내지 12 및/또는 표 3 중의 어느 하나에 제시된 핵산 서열 또는 이에 대해 적어도 70% 동일한 핵산 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나 이로 본질적으로 구성된 단리된 핵산을 제공한다.

[0562] 앞서 언급한 측면과 관련하여, 용어 "대상체"는 인간을 포함한 포유동물, 수형 동물(예를 들어, 말, 낙타, 그레이하운드), 가축(예를 들어, 소, 양, 말) 및 반려 동물(예를 들어, 고양이 및 개)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다.

[0563] 바람직한 실시양태가 상세하게 기술되고 실질적인 효과가 있을 수 있도록, 하기의 비제한적인 실시예를 참조한다.

[0564] **실시예**

[0565] **실시예 1**

[0566] **근거**

[0567] 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 유전자-변형 T 세포를 사용한 임상 면역요법은 혈액암 치료에서 상당한 성공을 보였다.<sup>4</sup> 이러한 돌파구에도 불구하고, 고형 종양을 치료하는데 있어서의 CAR T-세포의 성공은 제한적이었다.

[0568] CAR은 임의의 항체 또는 수용체 리간드의 종양 표적화 특이성을 이용하여 T-세포의 세포용해 효능을 재지시한다. 치료적 가치는 종양 및 낮은 표적외 활성에 대해 특정 암 바이오마커 또는 마커의 조합을 표적화하기 위한 결합 영역의 맞춤형 조작용에 있다. GBM, 및 다수의 다른 암에서, EphA3는 치료 표적으로 확인되었다.<sup>6</sup> EphA3은 암에서 과발현되며 종양 성장, 침습성 및 전이와 관련이 있다.<sup>6-9</sup> EphA3은 종양 세포를 덜 분화된 상태로 유지하는데 중요한 것으로 보이며 암 줄기세포(CSC)의 자가-재생을 촉진한다. 따라서 EphA3의 표적화된 억제 는 고형 암을 치료하기 위한 유망한 치료 접근법이며, CSC를 표적화함으로써, 이종성, 전이성 또는 요법에 내성이 있는 것으로 간주되는 암에 잠재적으로 효과적이다.

[0569] EphA3-표적 치료 항체는 현재 재발성 교모세포종 환자에서 임상 평가하에 있으며, 내약성이 우수하고, 특정 암 코호트에서 유망한 임상 활성을 입증하였다(10). 그러나, 특히 뇌에서 억제제의 약리학적 수준을 달성하고 유지하는데 어려움이 있음을 감안할 때(11), 본 실시예는 잠재적으로 전통적인 전략을 증가하고 뇌에서 표적화된 항 종양 반응을 전달할 수 있는 CAR T-세포를 사용한 접근법을 조사한다.

[0570] **설계**

[0571] **EphA3 단클론 항체**

[0572] 인간 EphA3의 세포외 도메인 서열(P29320, 21 - 541 aa)을 설계, 최적화, 합성하고 pcDNA3.4 벡터에 서브클로닝하였다. 형질감염 등급 플라스미드를 Expi293 세포 발현을 위해 최대로 준비하였다. 복제 전략은 도 1에 나타내어져 있다.

[0573] Expi293F 세포를 오비탈 진탕기에서 8% CO2와 함께 37°C에서 삼각 플라스크 중의 무혈청 Expi293™ 발현 배지에서 성장시켰다. 형질감염 당일, DNA 및 형질감염 시약을 최적의 비율로 혼합한 다음 플라스크에 첨가하였다. 세포 배양 상청액을 6일차에 수집하고 정제를 위해 친화성 정제 컬럼에 부하하였다. 세척 및 적절한 완충액으로 용출시킨 후, 용출된 분획을 폴링하고 완충액을 최종 제형화 완충액으로 교환하였다. 정제된 단백질을 분자량 및 순도 측정을 위해 SDS-PAGE 및 서던 블롯팅으로 분석하였다(도 2). 농도는 BSA를 표준으로 하는 BCA™ 분석에 의해 결정하였으며, 대략 95% 순도를 갖는 1.77mg/mL 단백질을 수득하였고 다중 동결-해동을 피하기 위해 다중 분취량으로 -80°C에서 저장하였다.

[0574] 3마리의 BALB/c 및 3마리의 C57 마우스를 하기 표에 나타난 면역화 일정에 따라 재조합 인간 EphA3 단백질로 면

역화시켰다.

[표 2]

EphA3 (P29320|21 - 541)의 면역화 일정

절차	일정	투여량 및 경로
면역화전 채혈	- 4일차	
1차 면역화	0일차	50 µg / 동물, sc
부스트 1	14일차	25 µg / 동물, sc
시험 채혈 1	21일차	
부스트 2	28일차	25 µg / 동물, sc
시험 채혈 2	35일차	
최종 부스트	50일차	25 µg / 동물, sc
세포 융합	54일차	

SC - 피하

세포 융합 및 클론 플레이팅은 동물의 각 그룹에 대해 전기-융합에 의해 수행하였다. 각 융합체로부터의 모든 융합된 세포를 96-웰 플레이트에 플레이팅하고 컨디셔닝된 배지를 EphA3 단백질로 ELISA에 의해 스크리닝하였다. 양성 상청액은 ELISA에 의해 무관한 his-태그된 단백질에 대해 음성인 것으로 확인되었다. 5개의 모 하이브리도마 클론을 EphA3 특이성을 기반으로 하여 서브클로닝을 위해 선택하였다. 10개의 단클론성 서브클론 상청액을 ELISA에서 재조합 EphA3에 대한 EphA3 결합 효율, 또는 유세포 분석에 의한 EphA3-발현 백혈병 세포주 LK639에 대해 스크리닝하였다(도 3 및 4). 하이브리도마 3C3-1 및 2D4-1은 서열분석을 위해 선택되었지만, 결합 효율이 더 낮은 클론(예를 들어, 6C9-1)은 제외되었다.

서열분석을 위해, TRIzol® 시약을 사용하여 3C3-1 및 2D4-1 하이브리도마 세포로부터 전체 RNA를 단리하였다. 그후 전체 RNA를 PrimeScript™ 1st Strand cDNA 합성 키트를 사용하여 이소형-특이적 안티센스 프라이머 또는 보편적 프라이머를 사용하여 cDNA로 역전사하였다. 중쇄 및 경쇄의 항체 단편은 cDNA 말단의 급속 증폭(RACE)에 의해 증폭시켰다. 증폭된 항체 단편을 표준 클로닝 벡터에 별도로 클로닝하였다. 콜로니 PCR을 수행하여 표 3에 열거된 컨센서스 서열 및 정확한 크기의 삽입물을 가진 클론을 스크리닝하였다.

[표 3]

[0581] 상보성 결정 영역 핵산 서열

3C3-1	DNA 서열	서열 번호
V <sub>H</sub>	CDR1: ATCTACACGATACAC	1
	CDR2: TACATTAATCCTAGCAGTGATTATACTAATTACAATCAGAAGTTCAAGGAC	2
	CDR3: GAAGGGGCGTATGGTAACTACGACTTTGCTATGGACTAC	3
V <sub>L</sub>	CDR1: AGATCTAGTCAGAACATTGTCCATAATAATGGAAACACCTATTTAGAA	4
	CDR2: AAAGTTTCCAACCGATTTTCT	5
	CDR3: TTTCAAACCTTCACATGTTCCGTACACG	6
2D4-1		
V <sub>H</sub>	CDR1: GGCTATGGTGTAAC	7
	CDR2: ATGATATGGGGTGATGGAAGCACAGACTATAATTCAGTTCTCAAATCC	8
	CDR3: GATCGGGGTATTAGTTATTACTATGCTATGGACTAC	9
V <sub>L</sub>	CDR1: AGGGCCAGTAAAAGTGCAGTGCATCTGGCTATAGTTATTTGCAC	10
	CDR2: CTTGCATACAACCTAGGATCT	11
	CDR3: CAGCACAGTAGGGAGTTTCCGCTCACG	12

[0582]

[0583] 3C3-1 및 2D4-1의 상보성 결정 영역(CDR)은 표 4-7에 열거되어 있다.

[0584] 본 발명자들은 다양한 EphA3-특이적 고친화성 상보성 결정 영역(CDR)을 생성하였다. 이러한 고유한 서열은 EphA3-특이적 결합 도메인을 형성하고 CAR T-세포 기술을 사용하여 EphA3를 표적화하는 단일-쇄 가변 단편(scFv)을 생성하는데 사용할 수 있거나 EphA3이 표적인 기타 응용에 사용할 수 있다.

[0585] [표 4]

[0586] 클론 3C3-1 중쇄 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열

영역	정의	서열 단편	잔기	길이	서열 번호
HFR1	Chothia	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKSS-----	20 - 44	25	73
	AbM	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKSS-----	20 - 44	25	74
	Kabat	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKSSGYTFT	20 - 49	30	75
	Contact	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKSSGYTF-	20 - 48	29	76
	IMGT	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKSS-----	20 - 44	25	77
CDR-H1	Chothia	GYFTIY---	45 - 51	7	13
	AbM	GYFTIYTIH	45 - 54	10	14
	Kabat	----IYTIH	50 - 54	5	15
	Contact	---TIYTIH	49 - 54	6	16
	IMGT	GYFTIYI--	45 - 52	8	17
HFR2	Chothia	TIHWVKQRPGQGLEWIGYI	52 - 70	19	78
	AbM	---WVKQRPGQGLEWIG--	55 - 68	14	79
	Kabat	---WVKQRPGQGLEWIG--	55 - 68	14	80
	Contact	---WVKQRPGQGLE-----	55 - 65	11	81
	IMGT	-IHWVKQRPGQGLEWIGY-	53 - 69	17	82
CDR-H2	Chothia	----NPSSDY-----	71 - 76	6	18
	AbM	---YINPSSDYTN-----	69 - 78	10	19
	Kabat	---YINPSSDYTNYNQKFKD	69 - 85	17	20
	Contact	WIGYINPSSDYTN-----	66 - 78	13	21
	IMGT	---INPSSDY-----	70 - 77	8	22
HFR3	Chothia	TNYNQKFKDKATLTADKSSTTAYMQLSSSLTSEDSAVYYCVR	77 - 117	41	83
	AbM	--YNQKFKDKATLTADKSSTTAYMQLSSSLTSEDSAVYYCVR	79 - 117	39	84
	Kabat	-----KATLTADKSSTTAYMQLSSSLTSEDSAVYYCVR	86 - 117	32	85
	Contact	--YNQKFKDKATLTADKSSTTAYMQLSSSLTSEDSAVYYC--	79 - 115	37	86
	IMGT	-NYNQKFKDKATLTADKSSTTAYMQLSSSLTSEDSAVYYC--	78 - 115	38	87
CDR-H3	Chothia	--EGAYGNYDFAMDY	118 - 130	13	23
	AbM	--EGAYGNYDFAMDY	118 - 130	13	24
	Kabat	--EGAYGNYDFAMDY	118 - 130	13	25
	Contact	VREGAYGNYDFAMD-	116 - 129	14	26
	IMGT	VREGAYGNYDFAMDY	116 - 130	15	27
HFR4	Chothia	-WGQGTSTVTVSS	131 - 141	11	88
	AbM	-WGQGTSTVTVSS	131 - 141	11	89
	Kabat	-WGQGTSTVTVSS	131 - 141	11	90
	Contact	YWGQGTSTVTVSS	130 - 141	12	91
	IMGT	-WGQGTSTVTVSS	131 - 141	11	92

HFR = 중쇄 프레임워크 영역

[0587]

[0588] [표 5]

[0589] 클론 3C3-1 경쇄 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열

영역	정의	서열 단편	잔기	길이	서열 번호
LFR1	Chothia	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISC-----	20 - 42	23	93
	AbM	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISC-----	20 - 42	23	94
	Kabat	DVLMTOTPLSLPVSLGDOASISC-----	20 - 42	23	95
	Contact	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQNI	20 - 48	29	96
	IMGT	DVLMTOTPLSLPVSLGDOASISCRSS---	20 - 45	26	97
CDR-L1	Chothia	RSSQNIVHNNNGNTYLE--	43 - 58	16	28
	AbM	RSSQNIVHNNNGNTYLE--	43 - 58	16	29
	Kabat	RSSQNIVHNNNGNTYLE--	43 - 58	16	30
	Contact	-----VHNNNGNTYLEWY	49 - 60	12	31
	IMGT	--QNIVHNNNGNTY----	46 - 56	11	32
LFR2	Chothia	--WYLOKPGQSPKLLIY	59 - 73	15	98
	AbM	--WYLOKPGQSPKLLIY	59 - 73	15	99
	Kabat	--WYLOKPGQSPKLLIY	59 - 73	15	100
	Contact	----LQKPGQSPK----	61 - 69	9	101
	IMGT	LEWYLOKPGQSPKLLIY	57 - 73	17	102
CDR-L2	Chothia	----KVSNRFS	74 - 80	7	33
	AbM	----KVSNRFS	74 - 80	7	34
	Kabat	----KVSNRFS	74 - 80	7	35
	Contact	LLIYKVSNRF-	70 - 79	10	36
	IMGT	----KV----	74 - 75	2	37
LFR3	Chothia	----GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC	81 - 112	32	103
	AbM	----GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC	81 - 112	32	104
	Kabat	----GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC	81 - 112	32	105
	Contact	----SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC	80 - 112	33	106
	IMGT	SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC	76 - 112	37	107
CDR-L3	Chothia	FQTSHVPYT	113 - 121	9	38
	AbM	FQTSHVPYT	113 - 121	9	39
	Kabat	FQTSHVPYT	113 - 121	9	40
	Contact	FQTSHVPY-	113 - 120	8	41
	IMGT	FQTSHVPYT	113 - 121	9	42
LFR4	Chothia	-FGGGTKLEIK	122 - 131	10	108
	AbM	-FGGGTKLEIK	122 - 131	10	109
	Kabat	-FGGGTKLEIK	122 - 131	10	110
	Contact	TFGGGTKLEIK	121 - 131	11	111
	IMGT	-FGGGTKLEIK	122 - 131	10	112

LFR = 경쇄 프레임워크 영역

[0590]

[0591]

[표 6]

[0592] 클론 2D4-1 중쇄 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열

영역	정의	서열 단편	잔기	길이	서열 번호
HFR1	Chothia	QVHLKESGPGGLVAPSQSL SITCTVS-----	20 - 44	25	113
	AbM	QVHLKESGPGGLVAPSQSL SITCTVS-----	20 - 44	25	114
	Kabat	QVHLKESGPGGLVAPSQSL SITCTVSGFSLT	20 - 49	30	115
	Contact	QVHLKESGPGGLVAPSQSL SITCTVSGFSL-	20 - 48	29	116
	IMGT	QVHLKESGPGGLVAPSQSL SITCTVS-----	20 - 44	25	117
CDR-H1	Chothia	GFSLTGY--	45 - 51	7	43
	AbM	GFSLTGYGVN	45 - 54	10	44
	Kabat	-----GYGVN	50 - 54	5	45
	Contact	----TGYGVN	49 - 54	6	46
	IMGT	GFSLTGYG--	45 - 52	8	47
HFR2	Chothia	GVNWIRQPPGKNLEWLGMI	52 - 70	19	118
	AbM	---WIRQPPGKNLEWLG--	55 - 68	14	119
	Kabat	---WIRQPPGKNLEWLG--	55 - 68	14	120
	Contact	---WIRQPPGKNLE-----	55 - 65	11	121
	IMGT	-VNWIRQPPGKNLEWLGMI-	53 - 69	17	122
CDR-H2	Chothia	-----WGDGS-----	71 - 75	5	48
	AbM	---MIWGDGSTD-----	69 - 77	9	49
	Kabat	---MIWGDGSTDYNSVLKS	69 - 84	16	50
	Contact	WLGMIWGDGSTD-----	66 - 77	12	51
	IMGT	----IWGDGSTD-----	70 - 76	7	52
HFR3	Chothia	TDYNSVLKSRLSISKDNAKSQVFLEMNSLQDDDTANYCAR	76 - 116	41	123
	AbM	--YNSVLKSRLSISKDNAKSQVFLEMNSLQDDDTANYCAR	78 - 116	39	124
	Kabat	-----RLSISKDNAKSQVFLEMNSLQDDDTANYCAR	85 - 116	32	125
	Contact	--YNSVLKSRLSISKDNAKSQVFLEMNSLQDDDTANYC--	78 - 114	37	126
	IMGT	-DYNSVLKSRLSISKDNAKSQVFLEMNSLQDDDTANYC--	77 - 114	38	127
CDR-H3	Chothia	--DRGISYYYAMDY	117 - 128	12	53
	AbM	--DRGISYYYAMDY	117 - 128	12	54
	Kabat	--DRGISYYYAMDY	117 - 128	12	55
	Contact	ARDRGISYYYAMD-	115 - 127	13	56
	IMGT	ARDRGISYYYAMDY	115 - 128	14	57
HFR4	Chothia	-WGQGTSVTVSS	129 - 139	11	128
	AbM	-WGQGTSVTVSS	129 - 139	11	129
	Kabat	-WGQGTSVTVSS	129 - 139	11	130
	Contact	YWGQGTSVTVSS	128 - 139	12	131
	IMGT	-WGQGTSVTVSS	129 - 139	11	132

[0593]

[0594] [표 7]

[0595] 클론 2D4-1 경쇄 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열

영역	정의	서열 단편	잔기	길이	서열 번호
LFR1	Chothia	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC-----	21 - 43	23	133
	AbM	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC-----	21 - 43	23	134
	Kabat	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC-----	21 - 43	23	135
	Contact	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSV	21 - 49	29	136
	IMGT	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRAS---	21 - 46	26	137
CDR-L1	Chothia	RASKSVSASGYSYLH--	44 - 58	15	58
	AbM	RASKSVSASGYSYLH--	44 - 58	15	59
	Kabat	RASKSVSASGYSYLH--	44 - 58	15	60
	Contact	-----SASGYSYLHWY	50 - 60	11	61
	IMGT	---KSVSASGYSY---	47 - 56	10	62
LFR2	Chothia	--WYQQKPGQPPKLLIF	59 - 73	15	138
	AbM	--WYQQKPGQPPKLLIF	59 - 73	15	139
	Kabat	--WYQQKPGQPPKLLIF	59 - 73	15	140
	Contact	----QKPGQPPK---	61 - 69	9	141
	IMGT	LHWYQQKPGQPPKLLIF	57 - 73	17	142
CDR-L2	Chothia	----LAYNLGS	74 - 80	7	63
	AbM	----LAYNLGS	74 - 80	7	64
	Kabat	----LAYNLGS	74 - 80	7	65
	Contact	LLIFLAYNLG-	70 - 79	10	66
	IMGT	----LA----	74 - 75	2	67
LFR3	Chothia	-----GVPARFSGSGAGTDFTLNIHPVEEEDAATYYC	81 - 112	32	143
	AbM	-----GVPARFSGSGAGTDFTLNIHPVEEEDAATYYC	81 - 112	32	144
	Kabat	-----GVPARFSGSGAGTDFTLNIHPVEEEDAATYYC	81 - 112	32	145
	Contact	----SGVPARFSGSGAGTDFTLNIHPVEEEDAATYYC	80 - 112	33	146
	IMGT	YNLGSQVVPARFSGSGAGTDFTLNIHPVEEEDAATYYC	76 - 112	37	147
CDR-L3	Chothia	QHSREFPLT	113 - 121	9	68
	AbM	QHSREFPLT	113 - 121	9	69
	Kabat	QHSREFPLT	113 - 121	9	70
	Contact	QHSREFPL-	113 - 120	8	71
	IMGT	QHSREFPLT	113 - 121	9	72
LFR4	Chothia	-FGAGTKLELK	122 - 131	10	148
	AbM	-FGAGTKLELK	122 - 131	10	149
	Kabat	-FGAGTKLELK	122 - 131	10	150
	Contact	TFGAGTKLELK	121 - 131	11	151
	IMGT	-FGAGTKLELK	122 - 131	10	152

[0596]

[0597] **결과**

[0598] **신경교종 세포주의 EphA3**

[0599] 클론 3C3-1을 사용하여 EphA3 발현에 대한 신경교종 세포주를 스크리닝하였다(도 5). U87 세포는 음성이었지만 D270 세포는 EphA3 양성 및 음성 종양 세포의 일부를 발현하였다. U251 세포는 대부분 EphA3 양성이다. 이러한 종양 세포주는 이중 종양(D270)에 대한 면역치료 접근법을 시험하는데 뿐만 아니라 EphA3 발현이 증가된 특히 공격적인 GBM(U251)을 평가하는데 유용할 것이다.

[0600] **EphA3-CAR T-세포**

[0601] 단일-쇄 가변 단편(scFv)은 가요성 펩티드 링커에 의해 함께 연결된 중쇄(VH) 및 경쇄(VL)의 가변 영역으로 구성된다. 클론 3C3-1 및 2D4-1의 scFv 서열을 비교하였으며, 정렬의 동일성은 < 48%이었고, 이것은 이들이 별개의 서열임을 의미한다. 이러한 scFv 서열을 2세대 CAR 작제물을 생성하기 위한 렌티바이러스 발현 플라스미드를 생성하는데 사용하였다. 간략하게, 본 발명자들은 CD3-ζ를 갖는 인간 4-1BB 또는 CD28의 힌지, CD8 막관통 영역 및 세포질 영역에 항-EphA3 scFv에 대한 개별 암호화 서열을 연결하였다(도 6). 서열을 pD2109(렌티바이러스 백본 플라스미드 - ATUM)에 서브클로닝하여 렌티바이러스 발현 플라스미드를 생성하였다. 렌티바이러스 입자는 FIEK293T 인간 배아 신장 세포의 형질감염을 통해 생산하였다. 세포를 리포펙타민 2000을 사용하여 발현 플라스미드(FA301 또는 FA302) 및 pMDL, pREV 및 pVSV-G 플라스미드로 형질감염시켰다. pD2109를 대조군으로 사용하였다. 293T 세포에서 CAR 서열의 발현은 RT-PCR에 의해 확인하였다(도 7). 바이러스 상청액을 형질감염 후 48시간 및 72시간에 수집하였다.

[0602] [표 8]

[0603] CAR을 생성하는데 사용되는 도메인 및 서열. 클론 3C3-1 및 2D4-1의 가변 영역( $V_H$  및  $V_L$ )을 섹션 2.1에 기술된 바와 같이 단클론 항체로부터 서열분석하였다. 다른 서열은 온라인 데이터베이스로부터 추출되거나 ATUM®에 의해 제공되었다.

도메인	서열	서열 번호
3C3-1 $V_H$	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKSSGYTFTIYTIHWVKQRPG QGLEWIGYINPSSDYTNYNQKFKDKATLTADKSSTTAYMQLS SLTSEDSAVYYCVREGAYGNVDFAMDYWGQGTSTVTVSS	153
3C3-1 $V_L$	DVLMTQTPLSLPVSLGDAQISCRSSQNIHNNGNTYLEWYL QKPGQSPKLLIYKVSINRFSGVPDRFSGSGSDFTLTKISRVEA EDLGVYYCFQTSHPVPTFGGGTKLEIK	154
2D4-1 $V_H$	QVHLKESGPGLVAPSSQSLITCTVSGFSLTGYGVNWIRQPPG KNLEWLGMWGDGSTDYNSVLKSRLSISKDNAKSQVFLEMNS LQTDDTANYCARDRGISYYYAMDYWGQGTSTVTVSS	155
2D4-1 $V_L$	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSASGYSYLHWYQQ KPGQPKLLIFLAYNLGSGVPARFSGSGAGTDFTLNIHPVEEE DAATYYCQHSREFPLTFGAGTKLELK	156
CD8 신호 펩티드 AAH25715.1	MALPVTALLPLALLHAARP	157
스페이서/링커	GGGGSGGGSGGGGS	158
CD8 힌지 & 막관통 AAH25715.1	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA CDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	159
4-1BB NP_001552.2	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCEL	160
CD28 세포질 NP_0012300 06.1	RSKRSRLLHSDYMNMPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	161
CD3z_* NP_000725.1	RVKFSRSADAPAYKQGQNLNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*	162
IRES (비 암호화)	TAAGGTCTCTAAAATTCGCCCCCCCTAACGTTACTGGC CGAAGCCGCTTGGAAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATA TGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTGGCAATGTGAGG GCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTGACGAGCATTCTTA GGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTT GAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAA GACAAACAACGTCTGTAGCGACCTTTGCAGGCAGCGGAA CCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCC ACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGCGGCACAACCCAG	163

[0604]

	TGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATG GCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCC CAGAAGGTACCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTC GGTACACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAC GTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGACGTGGTTTTCTTTG AAAAACACGATGATAATATGGCCACAACC	
M_CayenneR FP_*	MVSKGEELIKENMHMKLYMEGTVNNHFKCTSEGEKPYEG TQTMRIKVVEGGPLPFAFDILATSFMYGSRFTFIKYPKIPDFK QSFPEGFTWERVTTYEDGGVVTVMQDTSLEDGCLVYNVKIR GVNFPSPNGPVMQKKTGLWEANTEMLYPADGGLEGRSDMAL KLVGGGHLSCSFVTTYRSKPKAKNLKMPGIHAVDHRLEERLEE SDNEMFVVQREHAVARYCDLPSKLGHKLN*	164

[0605]

[0606]

**Jurkat 세포주에서의 EphA3-CAR 발현**

[0607]

Jurkat 세포는 불멸화된 인간 T-세포주이며 이들은 렌티바이러스-함유 상청액의 역가를 결정하는데 사용되었다. CAR 작제물은 Ires\_RFP와 함께 있으므로, 표면 상의 RFP의 발현을 형질도입의 리포터로 사용하였다. 따라서 형질도입 효율은 Jurkat 세포를 형질도입하고 RFP 발현을 정량함으로써 결정하였다. 형질도입 효율은 32 내지 58% ( $1 \times 10^6$  개 세포)의 범위이고 3.2 내지  $5.8 \times 10^5$  IU/mL의 역가 범위를 초래하였다. 대조군 pD2109\_GFP 렌티

바이러스 역가는  $8 \times 10^4$  IU/mL였다(도 8).

[0608] CAR 및 RFP 서열은 모두 표면 막 발현을 위한 CD8 리더 서열에 의해 비롯된다. 그럼에도 불구하고, CAR의 표면 발현 및 표적에 대한 결합을 확인하기 위해, 세포를 EphA3-Flis 단백질과 함께 배양하고  $\alpha$ His-태그 Ab로 염색하였다. FACS 결과는 EphA3-CAR이 표면에서 발현되고 높은 RFP 발현을 갖는 세포에서 대부분 EphA3에 결합함을 보여준다(도 9). D69는 T-세포의 초기 활성화 마커이며 증식 및 신호 전달에 관여한다. 본 발명자들은 CD69를 Jurkat-CAR 세포의 EphA3-특이적 활성화의 마커로서 사용하였다. RFP 음성 Jurkat 세포에서 높은 수준의 CD69 발현에도 불구하고, 결과는 막-결합된 EphA3과의 상호작용에 의해(도 10) 또는 Lk63 세포(EphA3-양성 종양 세포주)와의 배양에 의해(도 11) CAR 작제물을 발현하는 세포(RFP 양성 세포)에서 보통의 활성화가 일어난다는 것을 보여준다. CD69 발현의 보통의 증가만이 관찰되었지만, Jurkat-CAR에서 활성화 마커의 발현은 CAR 기능의 유망한 지표이다. 따라서, 형질도입에 사용된 감염 다중도(MOI)가 낮아 세포당 통합 수(가능하게는 단지 1)가 적기 때문에 이러한 세포에서 낮은 수준의 활성화가 발생하는 것으로 추측된다. 본 발명자들은 형질도입의 MOI를 증가시키기 위해 렌티바이러스에 집중함으로써 미래에 이 문제를 다룰 것이다.

[0609] **EphA3-CAR을 생성하기 위한 PBMC 유래 T-세포**

[0610] PBMC를 사혈 후 24시간 이내에 밀도 구배 원심분리에 의해 말초 혈액으로부터 수확하였다. PBMC 분획을 제거하고, 세척하고 계수하였다. 다클론 T-세포는 T-세포 TransAct™를 사용한 CD3 및 CD28 자극을 통한 활성화 및 확장에 의해 생성하였다. CMV-특이적 T 세포를 이전에 기술된 프로토콜을 사용하여 PBMC로부터 확장시켰다.<sup>10,11</sup> 간단히 말해서, PBMC의 1/3을 다중 CMV 항원으로부터의 26개 T-세포 펩티드 에피토프의 맞춤형 풀과 함께 1시간 동안 배양하고, 세척한 다음 나머지 PBMC와 혼합한 다음 2 내지  $5 \times 10^6$  개 세포/cm<sup>2</sup>의 밀도로 플라스크에 접종하였다.

[0611] 세포를 pD2109(GFP 리포터) 및 FA301(RFP 리포터) 렌티바이러스를 사용하여 자극 후 2일차에 형질도입하였다. 세포를 2-3일마다 첨가된 재조합 IL-2를 함유하는 배지에서 배양하였다. 형질도입 후 3일차의 FACS는 두 렌티바이러스 모두의 낮은 형질도입 효율을 나타냈다(도 12).

[0612] **결론**

[0613] 본 발명자들은 CAR 렌티바이러스 작제물에서 scFv로서 사용된 EphA3-특이적 단클론 항체를 성공적으로 생성하였다. Jurkat-EphA3-CAR은 표면에서 키메라 단백질을 발현하고 EphA3의 인식시 초기 활성화 마커를 상향조절한다. 본 발명자들은 EphA3-CAR을 사용하여 Jurkat 세포와 CMV-특이적 T-세포 둘 다의 형질도입이 가능함을 추가로 입증한다.

[0614] **실시예 2**

[0615] 바이러스 역가 및 T-세포 형질도입 효율을 개선하기 위한 목적으로 삽입물의 크기를 줄이기 위해 IRES 및 RFP 리포터 서열을 작제물로부터 제거하였다. 이러한 더 작은 작제물 FA3-05-BB $\zeta$  및 FA3-06-28 $\zeta$ 를 사용하여 4°C에서 4시간 동안 10,500rpm(SW 32 Ti 로터)에서의 초원심분리 단계를 포함하여 이전에 기술된 바와 같이 렌티바이러스를 생성하였다. 다클론 T 세포를 배양하고 이전에 기술된 바와 같이 2일차에 형질도입하였다. T 세포를 발현하는 CAR은 항-마우스 IgG AF546으로 표면 염색에 의해 검출하고 세포는 유세포 분석에 의해 분석하였다. CAR 형질도입 효율은 12일차에 낮게 유지되었다. 세포를 CAR+ 발현에 대해 분류하고 20일차까지 배양하였다(도 13a).

[0616] 다음으로 본 발명자들은 이러한 FA3-CAR의 시험관내 기능성을 평가하였다. 형질도입된 T-세포를 EphA3+ 종양 세포주인 LK63으로 밤새 자극하였다. 표준 세포내 염색 프로토콜을 사용하여 본 발명자들은 4-1BB(FA305) 또는 CD28(FA306) 공동 자극이 있는 EphA3-CAR T-세포가 T 세포 활성화 및 면역-조절 분자인 TNF의 필적하는 표적-유도 사이토카인 분비를 겪는다는 것을 확립하였다(도 13b).

[0617] RA3-06-28 $\zeta$  작제물 크기를 Biosettia로부터의 맞춤형 pLV-Ef1a 발현 플라스미드 백본을 사용하여 추가로 감소시켰다. 이러한 플라스미드로 생성된 렌티바이러스로 형질도입된 T 세포를 사용하여 후속 연구를 수행하였으며 이를 CAR EpHA3 T 세포라고 한다.

[0618] CAR EpHA3 렌티바이러스를 다클론 T 세포(항-CD3/28+ 자극된 T-세포) 및 CMV-특이적 T-세포를 형질도입하는데 사용하였다. CAR 발현은 이전에 기술된 바와 같이 결정하였으며 CMV-CAR 특이성은 HLA 복합체 - CMV에 대한 펩티드 사랑체를 사용한 FACS 분석에 의해 결정하였다(도 14). EphA3-CAR의 시험관내 기능성은 이전에 기술된 바

와 같이 결정하였다. 형질도입된 T-세포를 LK63 세포로 밤새 자극하였다. 표준 세포내 염색 프로토콜을 사용하여 본 발명자들은 EphA3-CAR T-세포가 TNF의 표적-유도 사이토카인 분비를 겪는다는 것을 확립하였다. 자극 후, CMV-pepmix로부터 생성된 CAR T-세포는 TNF, IFN  $\gamma$  및 CD107a를 포함한 다중 효과기 분자를 발현하였으며 이것은 이들 세포가 더 큰 사멸 가능성을 갖는다는 것을 시사한다(도 15). EphA3-CAR의 특이성 및 사멸 능력 둘 다를 평가하기 위해, 본 발명자들은 xCELLigence를 사용하여 실시간 세포독성 분석(RTCA)을 수행하였다. 이 분석은 100시간의 기간에 걸쳐 표적 세포 사멸을 측정한다. 내인성 EphA3 발현을 갖는 신경교종 세포주 U251을 음성 대조군으로서 EphA3 음성 신경교종 세포, U87과 함께 양성 표적으로 사용하였다. Day와 동료들의 이전 연구에서는 U251 EphA3+ 신경교 세포주가 표적으로서의 이들 세포의 사용을 검증하는 동소 GBM 모델에서 항-EphA3(클론 IIIA4) 항체에 반응성인 것으로 나타났다.<sup>16</sup> RTCA 분석에서, EphA3-CAR T 세포와 함께 표적 세포의 배양은 처리 100시간 이내에 80% 세포용해를 유도하였으며, EphA3 음성 신경교종 세포의 사멸은 관찰되지 않았다(도 16a). 표적 세포의 EphA3 CAR 사멸은 1:1, 5:1 및 10:1 효과기 대 표적 비율에서 RTCA에 의해 관찰되었다(도 16b). EphA3-CMV CAR T 세포의 사멸 가능성을 EphA3 CAR과 비교하기 위해 본 발명자들은 T 세포: 표적 U251 비율 1:1, 5:1 및 10:1을 사용하여 RTCA를 수행하였으며 특히 10:1에서 표적 세포의 효율적인 사멸이 관찰되었고 EphA3-CMV CAR T 세포에서 더 분명하였다(도 16c).

[0619] **실시예 3**

[0620] **EPhA3-CAR T-세포는 생체내에서 강력한 항종양 효과를 나타낸다**

[0621] CAR EphA3 T-세포가 신경교 세포주에 대해 유의한 *시험관내* 세포독성을 갖는다는 것을 보여준 후, 본 발명자들은 다음으로 *생체내* 치료 가능성을 평가하였다.

[0622] 면역결핍 NOD.Rag1KO.IL2R  $\gamma$  cKO(NRG) 마우스의 옆구리(이종 모델)에 루시페라제-발현 신경교 세포주 U251(EphA3+) 또는 U87(EphA3-)을 피하 이식하였다(도 17a). 종양 크기를 생물발광에 의해 측정하거나 결정하였다. 10일차에, 종양이 대략 25mm<sup>2</sup>에 도달하여 마우스는 2회의 세포 정맥내 주사 중 첫 번째를 제공받았다; EphA3-CAR, NT(비형질도입) 또는 CAR19(비특이적 CAR T 세포) T 세포. 순환 hCD45가 17일차에 검출되었고 대부분 CD4+ CAR T 세포였다(도 17b). 또한, EphA3-CAR T 세포를 제공받은 U251 보유 마우스에서 Ki67의 증가된 발현이 관찰되었으며, 이것은 이러한 처리군에서 이들 CAR T 세포의 표적 유도 증식을 시사한다(도 17c).

[0623] 두드러지게도, CAR EphA3 T-세포로의 처리는 U251(EphA3+) 종양이 이식된 마우스에서 완전한 반응을 유도하였으며 30일차까지 완전한 종양 제거를 유도하였다(도 d, & f). 비형질도입(NT) 또는 비특이적 T-세포(CAR19 T-세포)를 제공받은 마우스 및 U87(EphA3-) 보유 마우스는 종양 성장을 제어할 수 없었다(도 17d - g).

[0624] **결론**

[0625] 이러한 데이터는 이들 CAR T-세포가 EphA3를 표적화하고 강력한 항종양 활성을 매개한다는 것을 분명히 입증한다. EphA3 CAR T-세포로의 처리는 이소성 제노그래프 GBM 종양 모델에서 종양 퇴행을 초래한다. 이러한 데이터는 GBM과 같은 암에 대한 새로운 치료제로서의 EphA3 CAR T-세포의 사용을 뒷받침한다.

[0626] 참고문헌

1. Doubrovina, E. *et al.* Adoptive immunotherapy with unselected or EBV-specific T cells for biopsy-proven EBV+ lymphomas after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* **119**, 2644–2656 (2012).
2. Barrett, D. M., Grupp, S. A. & June, C. H. Chimeric Antigen Receptor- and TCR-Modified T Cells Enter Main Street and Wall Street. *J. Immunol.* **195**, 755–61 (2015).
3. Day, B. W. *et al.* EphA3 Maintains Tumorigenicity and Is a Therapeutic Target in Glioblastoma Multiforme. *Cancer Cell* **23**, 238–248 (2013).
4. Tang, X. X. *et al.* Implications of EPHB6, EFNB2, and EFNB3 expressions in human neuroblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2000) doi:10.1073/pnas.190123297.
5. Xi, H. Q., Wu, X. S., Wei, B. & Chen, L. Eph receptors and ephrins as targets for cancer therapy. *J. Cell. Mol. Med.* **16**, 2894–2909 (2012).
6. Wykosky, J., Gibo, D. M. & Debinski, W. A novel, potent, and specific ephrinA1-based cytotoxin against EphA2 receptor expressing tumor cells. *Mol. Cancer Ther.* (2007) doi:10.1158/1535-7163.mct-07-0200.
7. Swords, R. T. *et al.* KB004, a Novel Non-Fucosylated Humaneered® Antibody, Targeting EphA3, Is Active and Well Tolerated in a Phase I/II Study of Advanced Hematologic Malignancies. *Blood* **124**, (2014).
8. Razpotnik, R., Novak, N., Čurin Šerbec, V. & Rajcevic, U. Targeting Malignant Brain Tumors with Antibodies. *Front. Immunol.* **8**, 1181 (2017).
9. Charmsaz, S. *et al.* EphA3 as a target for antibody immunotherapy in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **31**, 1779–1787 (2017).
10. Smith, C. *et al.* Autologous Adoptive T-cell Therapy for Recurrent or Drug-resistant Cytomegalovirus Complications in Solid Organ Transplant Recipients: A Single-arm Open-label Phase I Clinical Trial. *Clin. Infect. Dis.* **68**, 632–640 (2019).
11. Smith, C. *et al.* Autologous CMV-specific T cells are a safe adjuvant immunotherapy for primary glioblastoma multiforme. *J. Clin. Invest.* (2020) doi:10.1172/JCI138649.
12. Day, B. W. *et al.* EphA3 Maintains Tumorigenicity and Is a Therapeutic Target in Glioblastoma Multiforme. *Cancer Cell* **23**, 238–248 (2013).

[0627]

도면

도면1

EphA3 (P29320)[21-543]-His 태그 - HisdIII

단백질 서열 : 547 aa

```

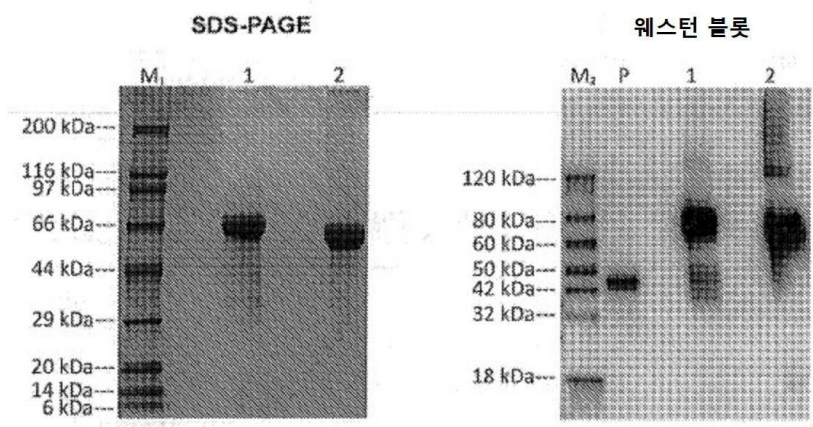
FLIPLPSNEVNLDSKTIQELGWSYPSHGWEISGVDEHYTPRTYQVCNVMDHSQNNWLRTNWVPRNSAQRIYVELKFT
LRDCNSIPLVLGTCKEFTNLYMESDDDHGVKREHQFTKDTIAADESFTQMDLGRILKLNTEIREVGPVKNKGFYLAQDVGACVALVSVRVYFKCPFT
VKNLAMPFDTPVPMDSISLVEVRGSCVNNSEEDPPRMYCSTEGEWLVPIGKCSNAGYEERGFMCQACRPQFYKALDGNMRCARCPPHSSTQEDGSM
NRCRNNYFRADKPPSMACTRPPSPRNVISNINETSVIDWSWPLDTGGRKDVTFNHCRCGWNIKQCEPCSPNVRFLPROFGLNNTTVTDLAHT
NYTFEIDAVNGVSELSPPRQFAAVSITTNQAAPSPLVTIKKDRTRSNSISLSWQEPHPNGIILDYEVKYYEKQEQETSYTLRARGTNTVTSISKPDITVYVQJR
ARTAAAGYGTNSRKFEEFTSPDSFSISGESSQHHHHHHH
    
```

DNA 서열 : 1665 bp

```

GAATTCCTGATGGCTGGTCCTGCATCATCTGTTCTGTGGCCACAGCCACCGGCGTGCACTGAACTGATCCCCAGCCTAGCAAC
GAAGTGAACCTGTGGACAGCAAGACCTCCAGGGCGAAGCTCGGCTGGATCAGCTATCCTTCTCACGGCTGGAAGAGATCAGCGGCTGGACGAG
CACTACACCCCTATCAGAACCTCAAGAGTGTCAACGTGATGACCACAGCCAGAACCACTGGCTGCGGACCAATTGGTGCCTCCGGAATAGCGCC
AGAAAATCTACGTGGAACTGAAGTTCACCTGTGCGGACTGCAACAGCATCCCTCTGGTCTTCTGGCACCTGAAAAGAGACATTCACCTGTACTACATG
GAAAGCGACGACGACCCGCGTGAABTTAGAGAGCACCAGTTCACCAAGATCGACACAATCGCCGCCGACGAGAGCTTACCCAGATGGATCTG
GGCGACAGAATCTGAAAGCTGAACACCGAGATCAGAGAAGTGGGCCCGTGAACAAGAAGGGCTTCTACCTGACCCTCCAGGATGTGGGAGCTTGT
GTGGCTCTGGTGTCTGTGCGGGTGTACTTCAAGAAATGCCCTTCAACGTGAAGAACCTGGCCATGTTCCCGACACCGTGCCTATGGAATAGCCAGAG
CCTGGTGAAGTGCAGGGCCAGCTGTGTGAACAACAGCAAAAGAGAGGACCTCTCGGATGTAAGTGCAGCACCAGGAAAGCGAATGGCTGGTGCCTAT
CGGCAAGTGTCTTGCATGACCGGCTATGAGGAACCGGGCTTCAATGTGCCAGGCTGCAGACCCGGCTTTACAAGGCCCTGACCGCAACATGAA
GTGCGCCAAAGTGTCTCTCACAGCAGCACCACAGAGGACGGCTCCATGAACTGCAGATGCGAGAACAACACTTCCGGGCGGACAAAGBACCACCT
AGCATGGCCTGTACACCGGCTCAAGCAGCCCAAGAAACGTGATCAGCAACATCAACGAGACAAAGCGTGTATCTGGATTGGAGCTGGCCCTGGATA
CAGGCGGACAGAAAGGACGTSACCTTCAACATCATCTGCAAGAAGTGGCGCTGGAACATCAAGCAGTGCAGGCTTGCAGCCCCAACGTCGGTTTC
TGCTAGACAGTTCGGCCTGACCAACACCACCGTGCAGCGTGCAGATCTGCTGGCCACACCAACTACACCTTCGAGATCGACGCGGTGAACGGGCT
GTCAGAGCTTAGCTTCCACCTAGGCAAGTTTGCAGCGTGCATCCACCAATCAGGCTGCTCCATCTCTCTGTGCTGACCATCAAGAAGGACCGGA
CCAGCCGGAACAGCATCAGCTGTCTTGGCAAGAGCTGAGCACCCCAACGSCATCTCTGACTATGAAAGTGAAGTACTACGAGAAGCAAGAGCA
AGAGACAAGCTACACCATCTGAGAGCCAGAGGCACCAACGTGACAATCAGCTCCCTGAAGCCTGACACCATCTACGTGTTCCAGATCCGGGCCAGA
ACAGCCGCGGATACGGCACCAATAGCCGGAAGTTCGAGTTCGAGACTAGCCCGACAGCTTCAGCATCTCTGCGGAGTCTAGCCAGCACCAACC
ATCACCATTAAGCTT
    
```

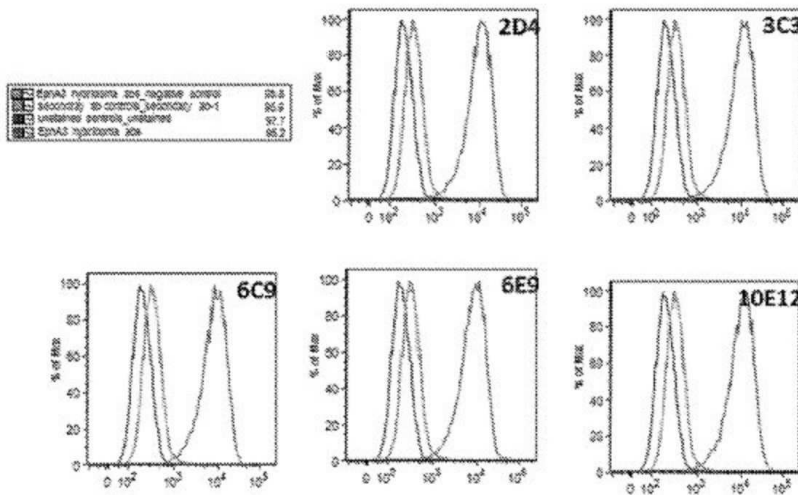
도면2



도면3a

모 클론	450 nm에서의 ELISA OD		LK63 세포를 사용한 FACS ( 매우 양호 MFI=10 <sup>4</sup> ; 양호 및 불량 MFI<10 <sup>4</sup> )	서브클로닝을 위해 선택
	EphA3 단백질	무관한 His-태그된 단백질		
ID1	2.797	0.061	불량	아니오
2A8	3.511	0.066	양호	아니오
2D4	3.237	0.053	매우 양호	예
3C3	3.400	0.053	매우 양호	예
3D2	2.897	0.049	불량	아니오
4B10	2.923	0.056	양호	아니오
6C9	2.956	0.051	매우 양호	예
6C12	3.116	0.056	매우 양호	아니오
6E9	2.651	0.050	매우 양호	예
6G4	3.340	0.051	매우 양호	아니오
9A3	3.654	0.056	양호	아니오
9F11	2.921	0.052	불량	아니오
10B10	3.026	0.050	양호	아니오
10E12	2.901	0.055	매우 양호	예
10G8	2.978	0.055	양호	아니오
12B11	2.975	0.051	양호	아니오
12G2	2.751	0.055	양호	아니오
12H4	2.960	0.050	양호	아니오
15B8	3.065	0.053	양호	아니오
15C1	3.220	0.053	양호	아니오
음성 대조군	0.052	0.049	---	---

도면3b



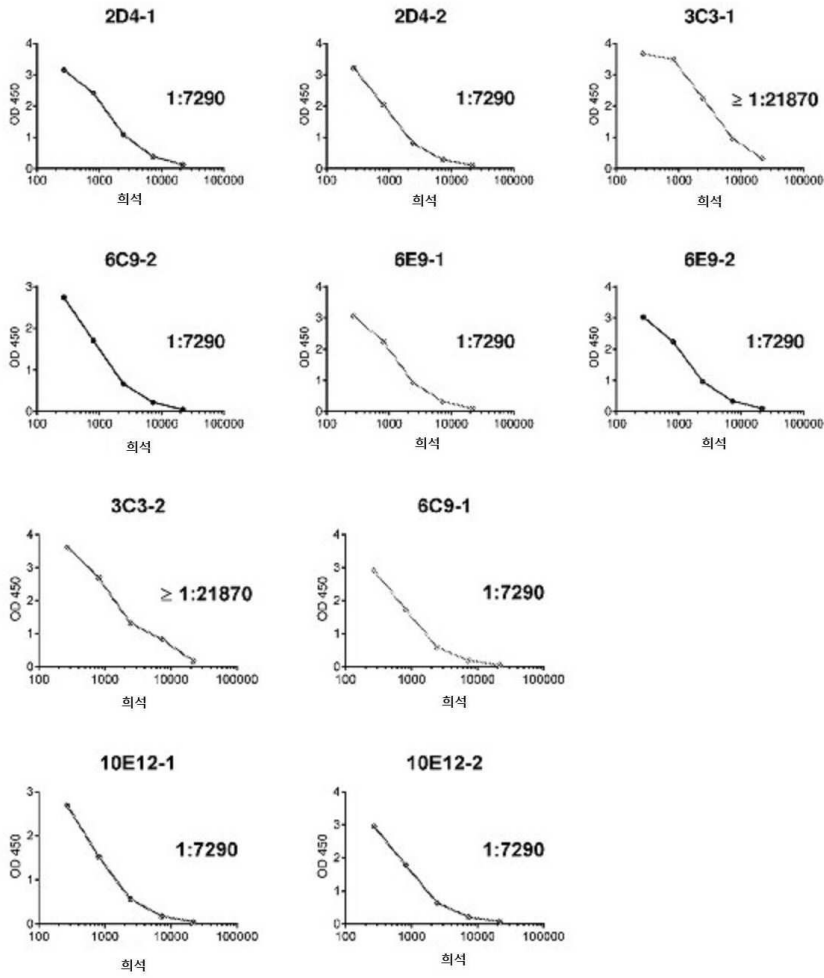
도면4a

ELISA OD450 값

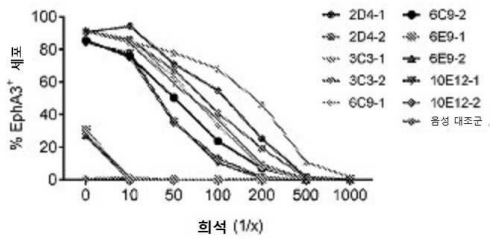
gB-His	2D4-1	2D4-2	3C3-1	3C3-2	6C3-1	6C3-2	6E3-1	6E3-2	10E12-1	10E12-2	음성 대조군
10	0.033	0.060	0.000	0.000	0.002	0.000	0.002	0.005	0.000	0.000	0.000
30	0.054	0.030	0.000	0.000	0.000	0.038	0.024	0.000	0.052	0.000	0.000
80	0.000	0.000	0.005	0.005	0.023	0.015	0.014	0.000	0.001	0.000	0.017
270	0.050	0.023	0.000	0.000	0.007	0.007	0.022	0.000	0.000	0.000	0.000
810	0.050	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2430	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
7290	0.025	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
21870	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

EphA3	2D4-1	2D4-2	3C3-1	3C3-2	6C3-1	6C3-2	6E3-1	6E3-2	10E12-1	10E12-2	음성 대조군
10	2.890	3.900	3.900	3.900	3.720	2.540	2.500	2.844	2.820	3.324	0.000
30	3.450	3.700	3.100	3.900	3.220	2.900	2.870	2.940	2.820	3.020	0.000
80	3.000	3.900	3.900	2.900	2.100	3.200	2.700	3.000	3.000	3.900	0.000
270	3.100	3.220	3.900	3.900	2.900	2.740	3.000	3.000	2.900	2.900	0.000
810	2.400	2.040	3.900	2.900	1.700	1.700	2.240	2.200	1.800	1.700	0.000
2430	1.000	0.000	2.200	1.900	0.900	0.900	0.900	0.900	0.900	0.900	0.000
7290	0.200	0.200	0.900	0.900	0.100	0.200	0.200	0.200	0.100	0.200	0.000
21870	0.100	0.100	0.200	0.200	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

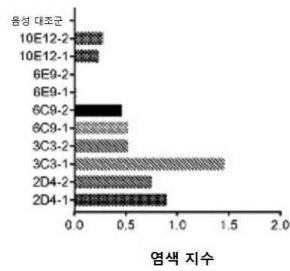
도면4b



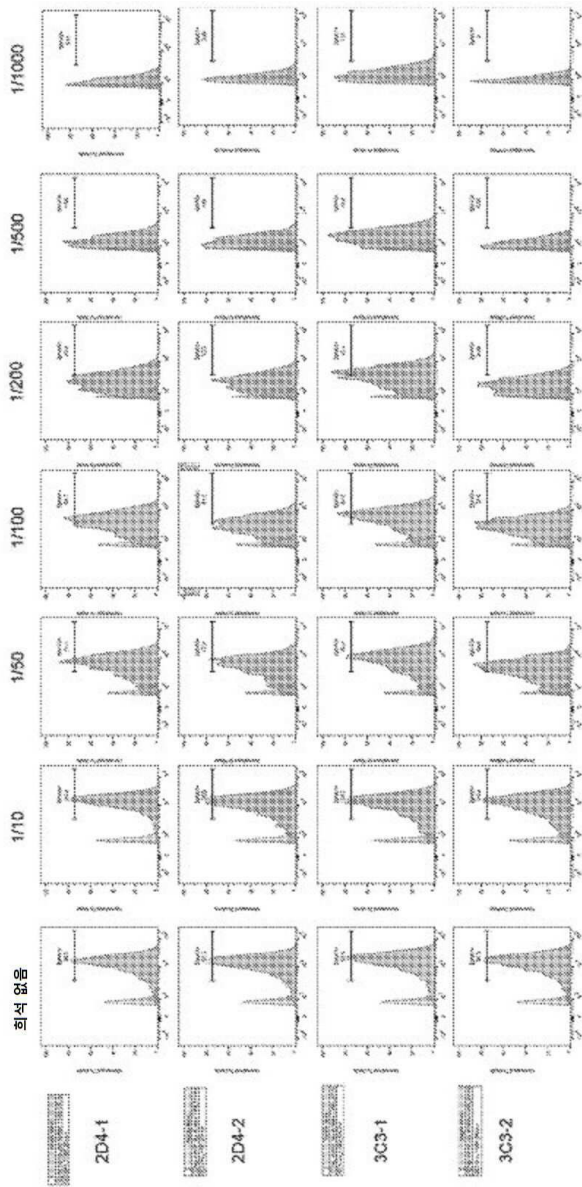
LK 세포 배양된 EphA3 mAb 희석 (희석 없음, 1/10, 1/50, 1/100, 1/200, 1/500, 1/1000)



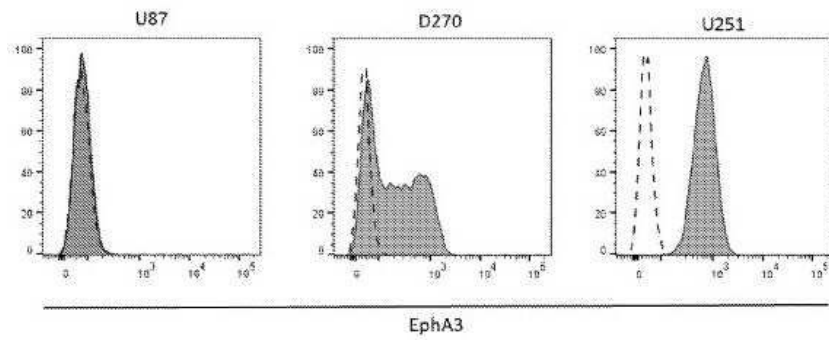
EphA3의 1/200 희석에서의 염색 지수



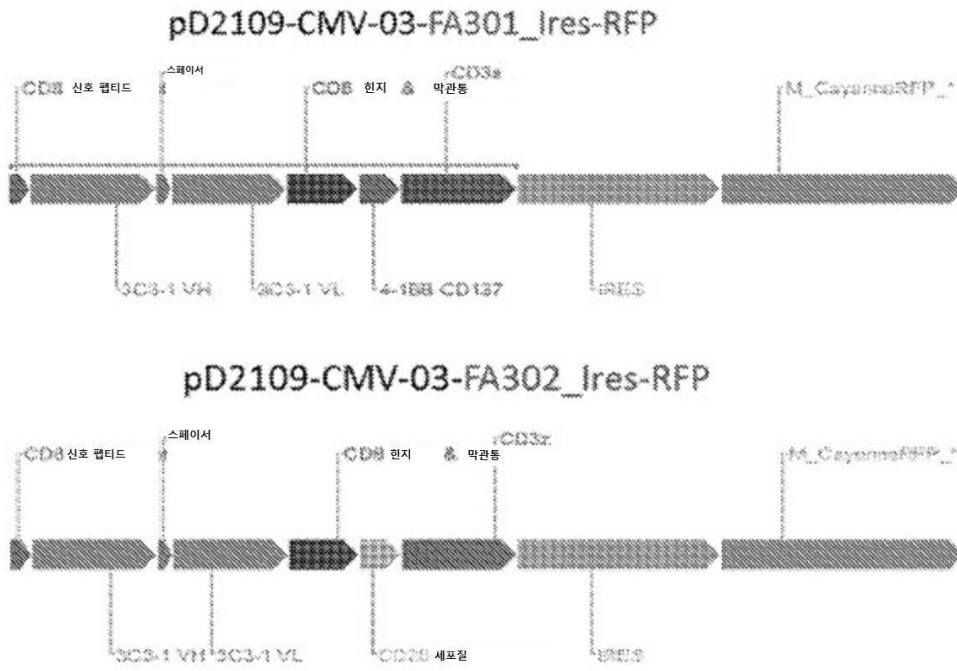
도면4bb



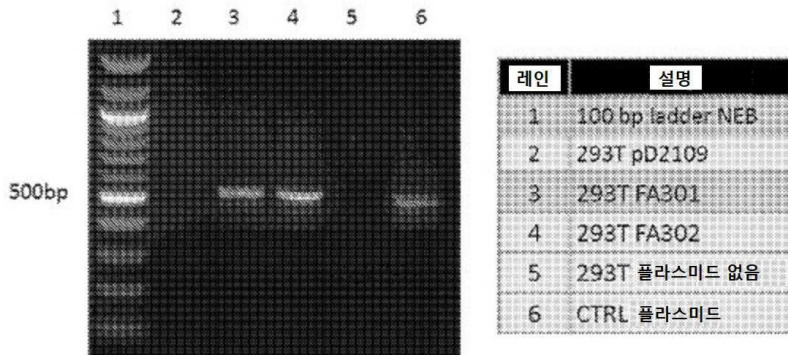
도면5



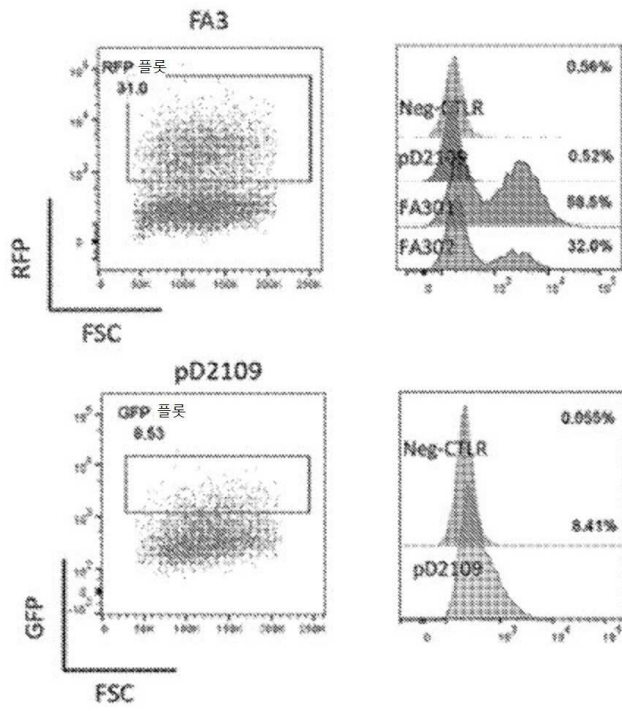
도면6



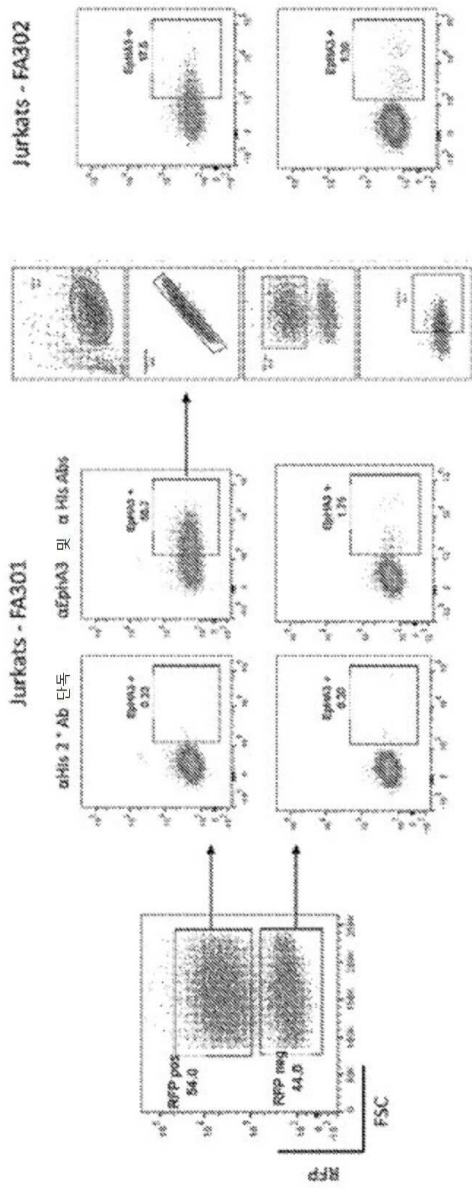
도면7



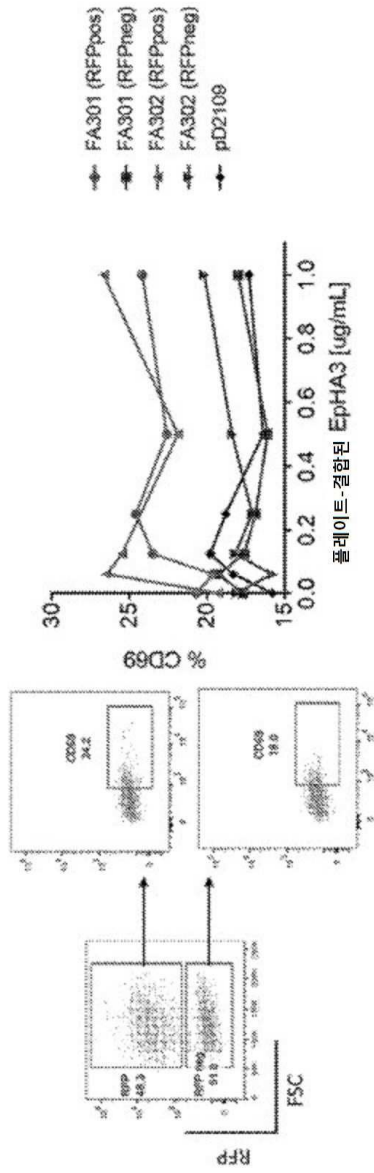
도면8



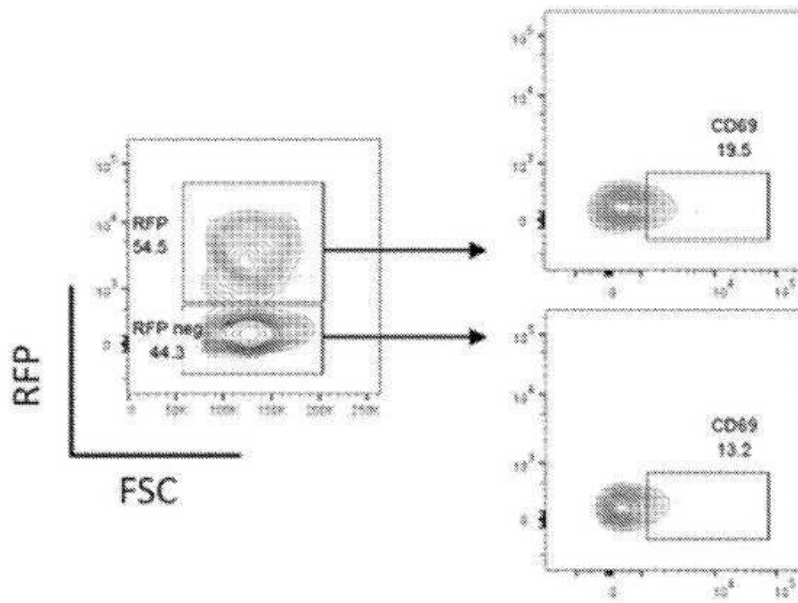
도면9



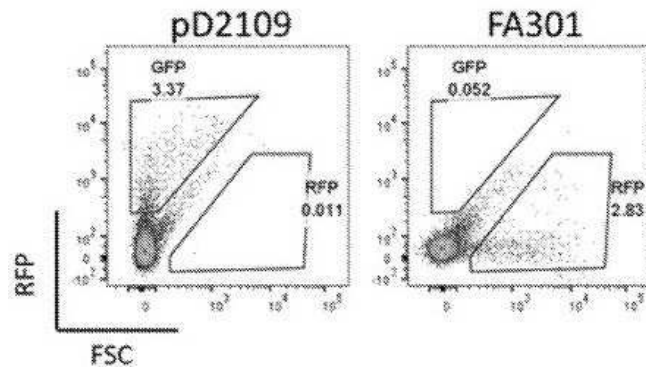
도면10



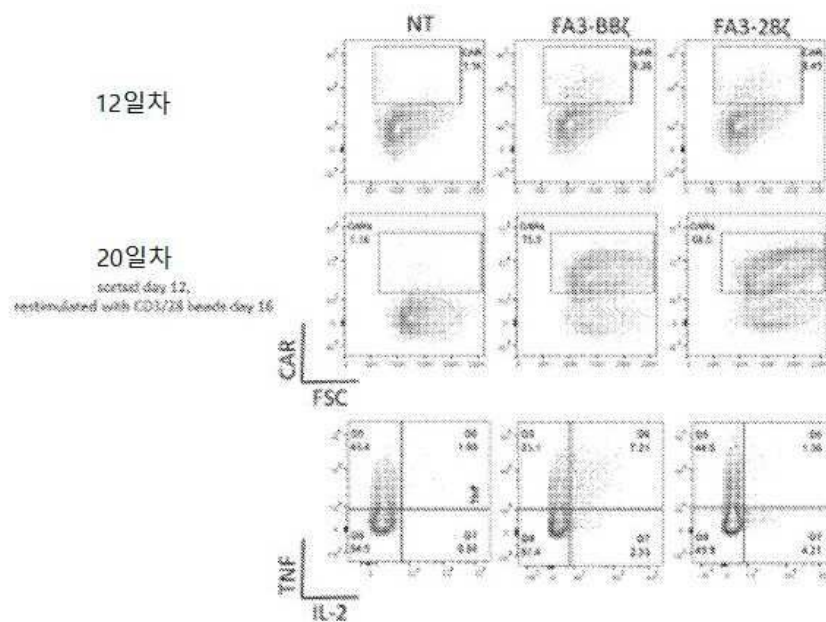
도면11



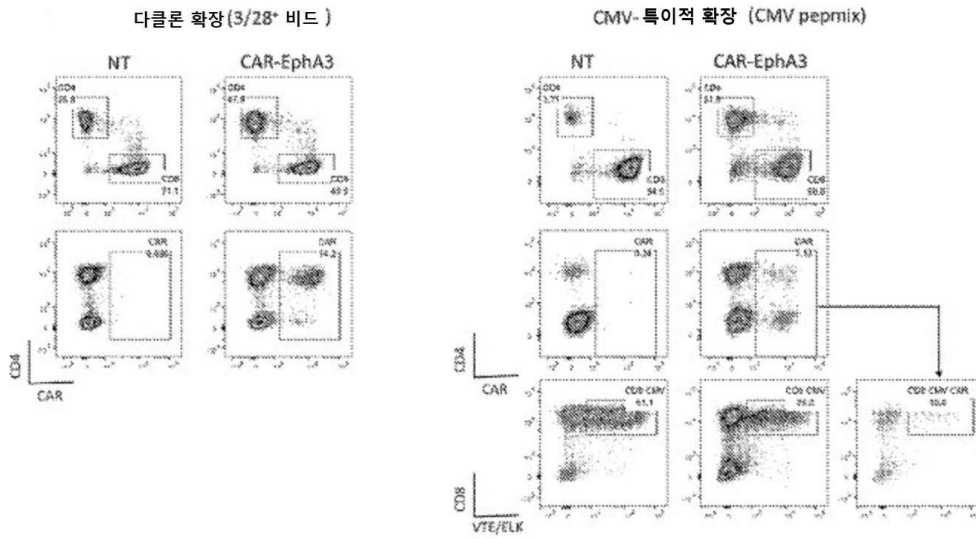
도면12



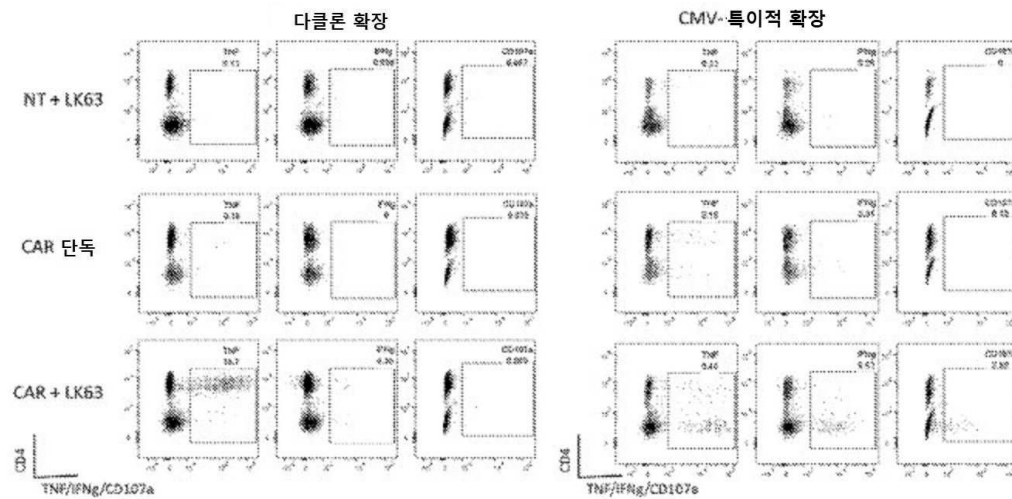
도면13



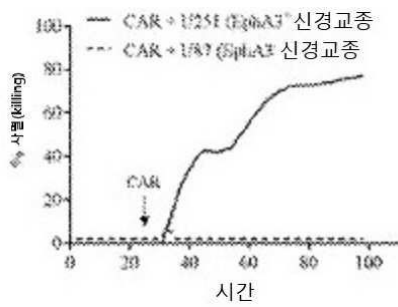
도면14



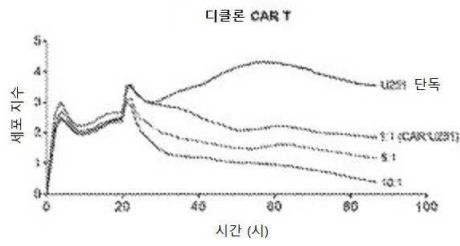
도면15



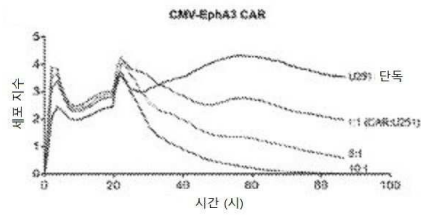
도면16a



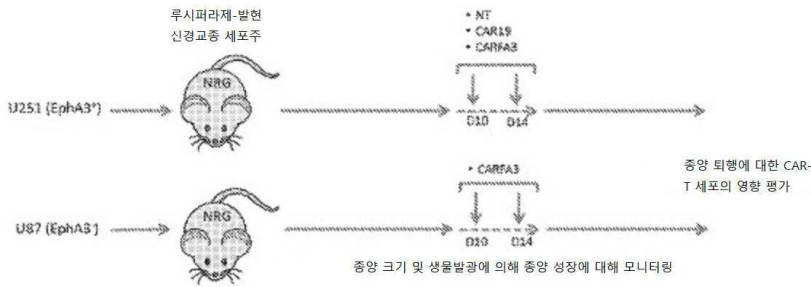
도면16b



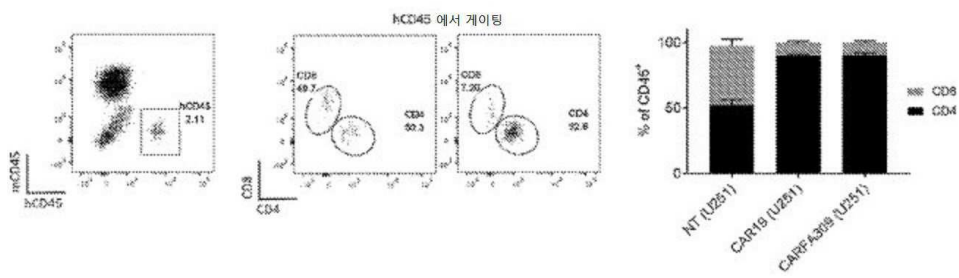
도면16c



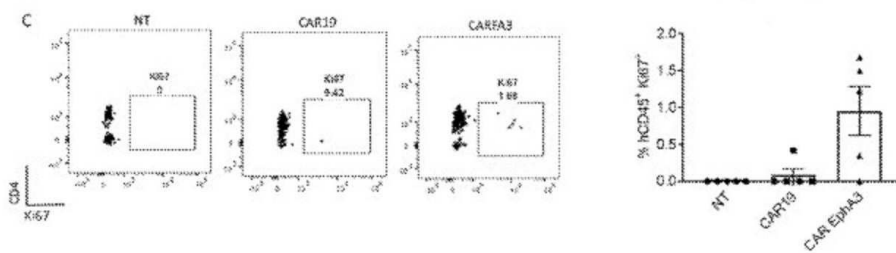
도면17a



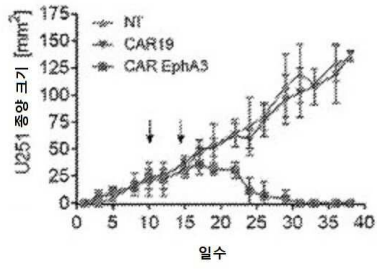
도면17b



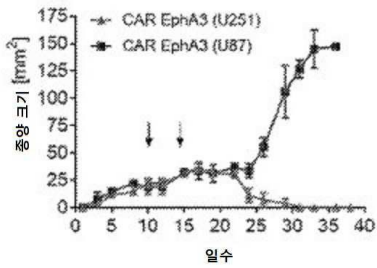
도면17c



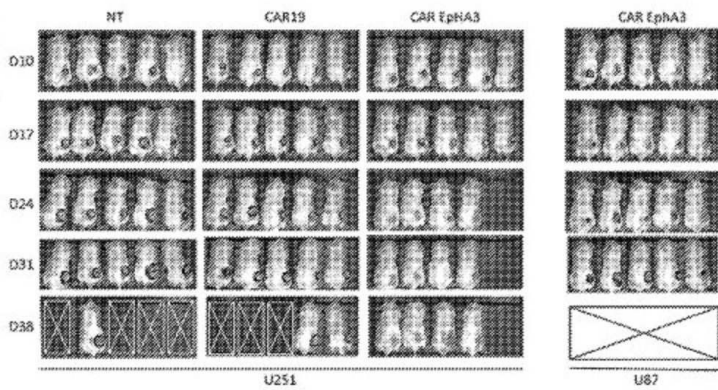
도면17d



도면17e



도면17f



도면17g

