(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0132105
(43) 공개일자 2021년11월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/705 (2006.01) *A61K 35/17* (2014.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12N 5/0783* (2010.01)
C12Q 1/68 (2018.01) *G01N 33/53* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/705 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7030111
(22) 출원일자(국제) 2020년02월19일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년09월16일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2020/050401
(87) 국제공개번호 WO 2020/169974
국제공개일자 2020년08월27일
(30) 우선권주장
1902277.1 2019년02월19일 영국(GB)

(71) 출원인
킹즈 컬리지 런던
영국, 런던 더블유씨2알 2엘에스, 스트랜드
(72) 발명자
아놀드 제임스 노블
영국 런던 더블유씨2알 2엘에스 스트랜드 킹즈 컬리지 런던
마허 존
영국 런던 더블유씨2알 2엘에스 스트랜드 킹즈 컬리지 런던
코스티 파라스케바스
영국 런던 더블유씨2알 2엘에스 스트랜드 킹즈 컬리지 런던
(74) 대리인
리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 41 항

(54) 발명의 명칭 **저산소증-반응성 키메라 항원 수용체**

(57) 요 약

본 발명은 치료제에 관한 것으로, 상세하게는 저산소의 조건 하에 선택적 발현 능력을 갖는 치료적 폴리펩티드 및 핵산, 상기 핵산을 포함하는 세포, 및 치료에서, 특히 전형적으로 고형암에서 발견되는 것과 같은 저산소의 조건 하에 선택적 발현을 필요로 하는 방법에서의 이들의 용도에 관한 것이다. 상기 핵산은 신규한 저산소증-반응성 키메라 항원 수용체(CAR)를 코딩한다. 본 발명은 또한 저산소증-반응성 조절 핵산에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
C12N 5/0636 (2013.01)
C12Q 1/68 (2018.05)
G01N 33/53 (2018.05)
C12N 2510/00 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

키메라 항원 수용체(Chimeric Antigen Receptor, CAR)를 코딩하는 핵산 분자로서, 하나 이상의 산소-의존적 분해 도메인(Oxygen-Dependent Degradation Domain, ODD) 및 항종양 특성을 갖는 적어도 하나의 폴리펩티드를 포함하고, 상기 핵산 분자의 발현은 저산소증-반응성 조절 핵산에 의해 저산소증-반응성 방식으로 조절되는 것인, 핵산 분자.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 저산소증-반응성 조절 핵산은 복수의 저산소증-반응성 요소(hypoxia-responsive element, HRE)를 포함하거나, 이로 필수적으로 구성되거나, 이로 구성되고, 상기 복수의 HRE의 각 개별 HRE는 독립적으로 (i) 적어도 하나의 HIF 결합 부위(HIF binding site, HBS): 5'-(A/G)CGT(G/C)-3' (서열번호 1); 및 선택적으로 (ii) 적어도 하나의 HIF 보조 부위(HIF ancillary site, HAS): 5'-CA(C/G)(G/A)(T/C/G)-3' (서열번호 2); 및 (iii) 추가로 선택적으로 적어도 하나의 HNF-4 부위: 5'-TGACCT-3' (서열번호 3)을 포함하는 것인, 핵산 분자.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 HAS가 존재하는 경우, 상기 HBS 및 HAS는 링커에 의해 분리되고, 선택적으로 상기 링커는 적어도 6개 뉴클레오티드의 길이, 예컨대 6 또는 8개 뉴클레오티드의 길이인 것인, 핵산 분자.

청구항 4

청구항 2 또는 3에 있어서, 상기 복수의 HRE는 표 1 (서열번호 5 내지 17)에 나타낸 적어도 하나 또는 복수의 서열 또는 서열번호 5 내지 17 중 어느 하나에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 서열은 표 1에 나타내거나 서열번호 1 및 2로 표시되는 HBS 및 선택적으로 HAS를 포함하는 것인, 핵산 분자.

청구항 5

청구항 2 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 그 이상의 개별 HRE이고, 이는 순차적으로 배치되거나 및/또는 공간적으로 분리될 수 있는 것인, 핵산 분자.

청구항 6

청구항 2 내지 5 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수는 적어도 3개의 개별 HRE이고, 선택적으로 순차적으로 배치되거나, 또는 상기 복수는 적어도 9개의 개별 HRE이고, 선택적으로 순차적으로 배치된 것인, 핵산 분자.

청구항 7

청구항 2 내지 6 중 어느 한 항에 있어서, 상기 저산소증-반응성 조절 핵산은 서열번호 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 또는 27 또는 이의 기능적 단편 또는 이의 상동체 중 어느 하나를 포함하거나, 이로 필수적으로 구성되거나, 이로 구성되고, 상기 기능성 단편 및 상동체는 복수의 HRE를 포함하는 것인, 핵산 분자.

청구항 8

청구항 2 내지 7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 저산소증-반응성 조절 핵산은 서열번호 19 또는 26, 또는 이에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 95% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 이의 상동체를 포함하거나, 이로 필수적으로 구성되거나, 이로 구성되는 것인, 핵산 분자.

청구항 9

청구항 2 내지 8 중 어느 한 항에 있어서, 상기 저산소증 반응성 조절 핵산은 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바

이러스 벡터, 선택적으로 SFG 레트로바이러스 벡터에 포함되는 것인, 핵산 분자.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터의 인핸서 영역은, 복수의 HRE, 바람직하게는 순차적으로 배치되거나 및/또는 공간적으로 분리될 수 있는 9개의 HRE를 포함하도록 변형된 것인, 핵산 분자.

청구항 11

청구항 9 또는 10에 있어서, 상기 인핸서 영역은 복수의 HRE로 대체되고, 선택적으로 상기 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터의 프로모터는 변형되지 않은 것인, 핵산 분자.

청구항 12

청구항 2 내지 11 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HRE는 하기 산소-반응성 유전자: 에리트로포이에틴 (EPO), 혈관내피성장인자 (VEGF), 포스포글리세레이트 키나제 (PGK), 글루코스 수송체 (예: Glut-1), 락테이트 데히드로게나제 (LDH), 알돌라제 (ALD), 에놀라제 (예: ENO3), 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제 (GAPDH), 산화질소 합성효소 (NOS), 헴 옥시게나제, 근육 당분해효소 피루베이트 키나제 (PKM), 엔도텔린-1 (ET-1),

중 어느 하나 이상으로부터 또는 이의 오쏘로그 또는 파라로그로부터 유래되고,

여기에서 상기 HRE(들)은 포유동물 유전자, 선택적으로 인간으로부터 유래되거나 및/또는 인공적으로 합성될 수 있는 것인, 핵산 분자.

청구항 13

선행하는 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ODD는 서열번호 28: X^1X^2LEMLAPYIXMDDDX$^3X^4X^5$로 표시되고, 여기에서 "X^{1-5}" 는 임의의 아미노산 잔기일 수 있고, 선택적으로 X^1은 "L" 또는 임의의 보존적 치환이고; X^2는 "D" 또는 임의의 보존적 치환이고, X^3은 "F" 또는 임의의 보존적 치환이고, X^4는 "Q" 또는 임의의 보존적 치환이고, X^5는 "L" 또는 임의의 보존적 치환인 것인, 핵산 분자.

청구항 14

선행하는 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ODD는 서열번호 29, 30 또는 31로 표시되거나 또는 이에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 95% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖고 서열번호 28을 포함하는 이의 상동체인 것인, 핵산 분자.

청구항 15

선행하는 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ODD는 서열번호 5로 표시되거나 또는 서열번호 5에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체이고, 상기 기능성 단편 또는 변이체는 서열번호 4를 포함하는 것인, 핵산 분자.

청구항 16

선행하는 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항종양 특성을 갖는 폴리펩티드는 세포외 항원-특이적 표적화 영역을 포함하는 것인, 핵산 분자.

청구항 17

선행하는 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항종양 특성을 갖는 폴리펩티드는 종양에 전달하기 위한 하나 이상의 단백질을 포함하고, 상기 단백질은 면역 자극 항체; 세포 활성화 및 종양-사멸 능력을 부여하는 표면 또는 세포내 수용체; T-세포 수용체(TCR); 면역조절 사이토카인(예: IL-12, IL-15), 유인 항체(예: PD 축-상호작용 항체), 및/또는 숙주 세포 기능을 유리하게 변경하는 임의의 기타 핵산(Lck, TCR 제타 사슬, ZAP70 등)을 포함하나 이에 제한되지 않는 것인, 핵산 분자.

청구항 18

선행하는 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항종양 특성을 갖는 폴리펩티드는 정상산소 조건 하에 분해되는 것인, 핵산 분자.

청구항 19

선행하는 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 저산소증은 5% 미만, 바람직하게는 3% 미만의 O_2 농도, 또는 상응하는 비-암성 장기, 조직 또는 세포의 O_2 가용성 또는 부분 압력에 비해 감소된 O_2 가용성을 포함하고, 상기 정상산소는 5% 초과의 O_2 농도를 포함하는 것인, 핵산 분자.

청구항 20

선행하는 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CAR은 적어도 하나의 산소-의존적 분해 도메인(ODD)를 포함하거나 이와 관련된 임의의 CAR이고, 선택적으로 청구항 10 내지 12에 정의된 바와 같고, 상기 CAR의 발현은 청구항 2 내지 12 중 어느 한 항에 따른 조절 핵산 서열의 제어 하에 있는 것인, 핵산 분자.

청구항 21

선행하는 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CAR은 1세대, 2세대, 3세대, 4 세대 CAR, 스플릿(split) CAR 디자인, 무장화(armoured) CAR로부터 선택되는 것인, 핵산 분자.

청구항 22

선행하는 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CAR은 수용체의 ErbB 패밀리에 대해 특이성을 갖는 것인, 핵산 분자.

청구항 23

선행하는 청구항 중 어느 한 항에 따른 CAR을 포함하거나 및/또는 발현하고, 선택적으로 (i) 종양 국소화, 예컨대 케모카인 수용체; (ii) 표적외 효과의 방지; (iii) 생체외(*ex vivo*) 확장의 가능 중 어느 하나 이상을 가능하게 하기 위해 적어도 하나의 추가 CAR 및/또는 추가 키메라 폴리펩티드 및/또는 폴리펩티드를 포함하는, 면역반응성 세포.

청구항 24

청구항 23에 있어서, 상기 추가 키메라 폴리펩티드는 하나 이상의 ODD, 예를 들어 적어도 하나의 ODD와 조합된 인터류킨(인터류킨-ODD)을 포함하고, 상기 인터류킨은 선택적으로 IL12, IL18, IFNg인 것인, 면역반응성 세포.

청구항 25

청구항 23 또는 24에 있어서, 상기 CAR은 저산소의 조건 하에 발현되고, 정상산소 조건 하에 실질적으로 발현되지 않고, 상기 항종양 특성을 갖는 폴리펩티드는 정상산소 조건 하에 실질적으로 분해되는 것인, 면역반응성 세포.

청구항 26

하기를 포함하는 면역반응성 세포의 제조 방법:

a. 개체로부터 림프계-유래 세포 또는 골수계-유래 세포를 분리하는 단계;

b. 청구항 1 내지 22 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 핵산 분자를 도입하도록 상기 세포를 변형하는 단계;

c. 상기 변형된 세포를 생체 외(*ex-vivo*)에서 확장하는 단계;

d. 저산소의 조건 하에 상기 핵산 분자를 발현할 수 있는 확장된 세포를 얻는 단계.

청구항 27

청구항 26에 따른 방법에 의해 수득가능한 면역반응성 세포.

청구항 28

청구항 23 내지 25 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역반응성 세포는 림프계-유래 세포, 예컨대 자연살해세포, B-세포 또는 T-세포, 바람직하게는 T-세포이고; 선택적으로 상기 면역반응성 세포는 골수계-유래 세포, 예컨대 대식세포 또는 호중구이고; 선택적으로 상기 면역반응성 세포는 줄기 세포, 예컨대 iPSC인 것인, 면역반응성 세포.

청구항 29

청구항 26에 따른 방법에 의해 수득가능한 변형된 면역반응성 세포를 투여하는 단계를 포함하거나, 또는 청구항 23 내지 25, 28 및 28 중 어느 한 항에 따른 변형된 면역반응성 세포를 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 혈액암 또는 고형암의 치료 방법.

청구항 30

청구항 29에 있어서, 상기 고형암은 두경부 편평 세포 암종(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)인 것인, 방법.

청구항 31

청구항 30에 있어서, 상기 고형암은 초기 암인 것인, 방법.

청구항 32

청구항 29 내지 31 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여는 종양내, 정맥내, 흉막 삼출(pleural effusion), 복강내 중 어느 하나에 의해 수행되는 것인, 방법.

청구항 33

청구항 26에 따른 방법에 의해 수득가능한 면역반응성 세포 또는 청구항 23 내지 25, 27 및 28 중 어느 한 항에 따른 면역반응성 세포를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 34

청구항 26에 따른 방법에 의해 수득가능한 면역반응성 세포 또는 청구항 23 내지 25, 27 및 28 중 어느 한 항에 따른 면역반응성 세포 및/또는 청구항 33에 따른 약학적 조성물을 포함하는, 키트.

청구항 35

암, 특히 고형암의 치료에서, 청구항 26에 따른 방법에 의해 수득가능한 면역반응성 세포의 용도, 또는 청구항 23 내지 25, 27 및 28 중 어느 한 항에 따른 면역반응성 세포의 용도, 및/또는 청구항 33에 따른 약학적 조성물의 용도.

청구항 36

토닉(tonic) CAR 신호전달의 방지에서, 청구항 2 내지 23 중 어느 한 항에 따른 저산소증-반응성 조절 핵산의 용도 및/또는 청구항 1 내지 22 중 어느 한 항에 따른 핵산의 용도.

청구항 37

저산소증-반응성 조절 핵산으로서, 적어도 9개의 개별 HRE를 포함하며, 선택적으로 상기 HRE는 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터, 선택적으로 SFG 레트로바이러스 벡터에 포함되는 것인, 저산소증-반응성 조절 핵산.

청구항 38

저산소증-반응성 조절 핵산으로서, 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터의 인핸서 영역은 상기 적어도 9개의 HRE를 포함하도록 변형된 것인, 저산소증-반응성 조절 핵산.

청구항 39

청구항 37 또는 38에 있어서, 상기 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터의 인핸서 영역은 복수의 HRE로

실질적으로 대체되고, 선택적으로 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터의 프로모터는 변형되지 않은 것인, 저산소증-반응성 조절 핵산.

청구항 40

키메라 항원 수용체(CAR)를 코딩하는 핵산 분자의 발현을 구동하기 위한, 청구항 37 내지 39 중 어느 한 항에 따른 저산소증-반응성 조절 핵산의 용도로서, 선택적으로 상기 CAR은 선택적으로 하나 이상의 산소-의존적 분해 영역(ODD)를 포함하거나 이와 관련된 것인, 용도.

청구항 41

청구항 29 내지 32 중 어느 한 항에 따른 치료에 대한 개체의 적합성을 결정하는 방법으로서,

PGK1, *SLC2A1*, *CA9*, *ALDOA* 및 *VEGF* 중 적어도 2개, 3개, 4개, 또는 5개 모두의 유전자의 동시발현에 대해 모니터링하는 단계로서, 상기 개체에서 상기 유전자의 동시발현은 치료에 대한 개체의 적합성을 나타내는 것인 단계, 및/또는

개체로부터의 종양 생검의 면역조직화학적 염색을 하는 단계 및 종양 또는 간질(stroma)에서의 HIF 안정화 및/또는 종양의 HIF 안정화된 영역으로의 T-세포 침윤(및/또는 기타 면역반응성 세포의 T-세포 침윤)에 대해 평가하는 단계로서, 상기 종양의 HIF 안정화된 영역으로의 면역반응성 세포의 침윤은 치료에 대한 개체의 적합성을 나타내는 것인 단계를 포함하는 것인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 치료제에 관한 것으로, 상세하게는 저산소증-반응성 발현이 가능한 치료적 폴리펩티드 및 핵산, 이를 포함하는 세포 및 치료적 또는 예방적 치료에서, 특히 고형암 환경에서 전형적으로 발견되는 것과 같은 저산소의 조건 하에 치료제의 선택적 발현을 필요로 하는 방법에서의 이들의 용도에 관한 것이다. 상기 핵산은 신규한 저산소증-반응성 키메라 항원 수용체(CAR)를 코딩할 수 있다. 본 발명은 또한 저산소증-반응성 조절 핵산에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 조작된 T-세포 또는 조작된 T-세포 수용체(TCR)는 인체의 암세포를 표적으로 삼고 파괴하도록 면역 체계를 재지정하는 효과적인 방법이다. CAR T-세포(CAR-T) 요법은 특히 혈액암에 대한 효과적이고 실행 가능한 치료로서 큰 가능성을 보여주었다. 그러나, 고형암 미세환경의 복잡성은 현재의 CAR-T 접근법에 도전 과제를 제기한다. 한 가지 주요 장애물은 종양 특이적 표적 항원의 부족이며, 이의 부재는 정상 조직 내에서 표적외 CAR T-세포 활성화를 초래하여 결과적으로 부작용을 동반하게 된다. 항원 결합 시, CAR는 강력한 T-세포 활성화 및 표적 세포의 후속 세포용해 사멸을 개시한다. 그러나, 종양 세포의 CAR-매개 사멸의 선택성은 현재 전적으로 CAR 항원의 생체분포에 의해 결정된다. 그러므로, 현재 접근법에서, 종양 선택성은 CAR-T 요법의 성공에 매우 중요하며, 이는 CAR T-세포의 종양 표적외(on-target off-tumour) 활성화가 잠재적으로 치명적인 독성을 초래할 수 있기 때문이다.

[0003] 저산소증(hypoxia)은 대부분의 고형 종양의 특징이며, 비효율적인 종양 혈관 구조와 함께, 종양 세포의 증식 및 높은 대사 요구로 인해 건강한 장기/조직(5-10% O_2)에 비해 산소 공급이 불충분한 상태(<2% O_2)가 발생한다. 임상적으로, 저산소증은 예후가 좋지 않고, 화학요법 및 방사선요법 모두에 대한 내성과 관련이 있다. 세포는 구성적으로 발현되는 전사 인자 저산소증-유도성 인자 알파(hypoxia-inducible factor alpha, HIF1α)를 통해 저산소증을 검출하고 빠르게 반응하는 우아한 생물학적 기계를 진화시켰다. 충분한 O_2 조건 하에, HIF1α는 그의 구조 내의 산소-의존적 분해 도메인(Oxygen-Dependent Degradation Domain, ODD) 중의 2개의 프롤린의 수산화를 통해 분해된다. 수산화된 ODD는 폰 히펠-린다우(von Hippel-Lindau) 종양 억제인자에 의해 후속적으로 인식되고, 이는 E3 유비퀴틴 리가아제 복합체의 일부를 형성하며, HIF1α를 유비퀴틴화하고, 그에 의해 프로테아좀 분해를 표적으로 한다. 반대로, O_2 농도를 제한하면, HIF1α는 안정화되고 핵으로 이동하여 HIF1β 및 p300/CBP에 결합한다. 그 후 이 복합체는 전사를 개시하는 여러 저산소증-반응성 유전자의 프로모터 영역에서 저산소증-반응성 요소(Hypoxia Responsive Element, HRE)들과 연관될 수 있다.

[0004] 저산소 텐션(low-oxygen tension)을 이용하는 다양한 암 요법이 개발 중이며, 그 중에서도 저산소증-특이적 유전자 요법, 저산소증-활성화 전구약물, HIF1-상호작용 약물 및 절대 혐기성 박테리아를 포함한다. 저산소증은 종양 미세환경을 건강한 정상산소 조직의 미세환경과 구별하기 때문에, CAR T-세포 발현의 유도에 바람직한 마커를 나타낸다. Juillerat *et al.*, 2017, (Scientific Reports **7**, 39833)은 ODD와 융합된 CAR를 조사했다. 이 접근법이 시험관 내(*in vitro*) 저산소 조건 하에 종양 세포를 사멸시키는 개선된 능력을 CAR T-세포에 부여했지만, 저자는 정상산소 조건 하에 잔류 종양 사멸을 관찰하였으며, 이는 시스템의 바람직하지 않은 누출을 나타낸다.

[0005] 표적외(off-target) 효과를 감소시키기 위해 저산소증 영역으로의 발현을 엄격하게 제한할 수 있는, 예를 들어 CAR 및 CAR T-세포의 형태로, 치료 핵산, 폴리펩티드 및 조작된 세포를 개발하는 것이 바람직할 것이다. 그 결과 이것은 특히 고형암의 치료가 보다 다양한 종양 항원, 특히 종양에서뿐만 아니라 정상 조직에서 발견되는 항원으로 확장될 수 있도록 한다.

[0006] 또한 종양 부위에서 치료제의 발현을 구동시키고 조절하는 것을 가능하게 하는 기술을 개선하는 것이 바람직할 것이다.

[0007] 또한 치료 이전에, CAR T-세포 요법에 대한 개체의 적합성을 결정할 수 있는 것이 바람직할 것이다.

발명의 내용

[0008] [발명의 요약]

[0009] 본 출원인은 하나 이상의 산소 의존적 분해 도메인 (Oxygen dependent Degradation Domains, ODD) 및 항종양 특성을 갖는 적어도 하나의 폴리펩티드를 포함하는 키메라 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 이중 산소-감지 시스템을 고안했으며, 상기 핵산 분자는 복수의 저산소증-반응성 요소(Hypoxia Responsive Element, HRE)를 포함하거나, 이로 필수적으로 구성되거나 또는 이로 구성된 저산소증-반응성 조절 핵산에 작동가능하게 연결된다. 이는 핵산 분자가 저산소 조건 하에 발현되지만 정상산소 조건 하에는 무시할 수 있는 발현을 가능하게 한다. 상기 이중 산소-감지 시스템은, 정상산소 조건에서, ODD의 존재로 인해, 저산소증-반응성 조절 핵산의 작용과 함께, 항종양 특성을 갖는 적어도 하나의 폴리펩티드의 분해를 추가로 제공한다. 상기 핵산 분자 및/또는 키메라 폴리펩티드는 예를 들어 키메라 항원 수용체 (CAR)에 및/또는 면역반응성 세포에 포함되고/되거나 발현될 수 있다. 하나 이상의 ODD에 연결되고 저산소증-반응성 조절 핵산의 제어 하에 발현되는 CAR의 조합 사용은 "hypoxiCAR"로 본 명세서에서 지칭된다. 실질적으로 저산소 조건에서만 발현을 허용하는 저산소증-반응성 조절 핵산과, 항종양 특성을 갖는 폴리펩티드의 정상산소 조건에서 분해를 야기하기 위해 하나 이상의 ODD에 의해 부여된 능력의 조합 사용은, 임의의 표적외(off-target) 효과의 감소 또는 실질적 제거를 가능하게 한다.

[0010] 본 출원인은 또한 hypoxiCAR를 사용한 치료에 대한 개체의 적합성을 결정하는 방법을 개발했다. 이는 *PGK1*, *SLC2A1*, *CA9*, *ALDOA* 및 *VEGFA* 중 어느 2개, 3개, 4개, 또는 5개의 유전자의 동시발현을 모니터링하는 것에 의해 수행될 수 있으며, 여기에서 그러한 동시발현은 치료에 대한 개체의 적합성을 나타낸다.

[0011] 대안적으로 또는 추가적으로, 개체로부터의 종양 생검은 면역조직화학적으로 염색되고 종양 또는 간질에서의 HIF 안정화 및/또는 종양의 HIF 안정화된 영역으로의 T 세포 또는 다른 면역반응성 세포의 침윤에 대해 평가될 수 있으며, 여기에서 그러한 HIF 안정화 또는 종양의 HIF 안정화된 영역으로의 면역반응성 세포의 침윤은 치료에 대한 개체의 적합성을 나타낸다.

[0012] 본 출원인은 또한 본 발명의 저산소증-반응성 조절 핵산이 종래의 조절 핵산에 비해 고형 종양의 부위에서 발현을 더 잘 구동하고 조절할 수 있음을 발견했다.

[0013] [상세한 설명]

[0014] **저산소증-반응성 조절 핵산**

[0015] 본 발명의 제1 양상은 복수의 저산소증-반응성 요소(HRE)를 포함하거나, 이로 필수적으로 구성되거나 또는 이로 구성되는 저산소증-반응성 조절 핵산을 제공한다. 저산소증-반응성 조절 핵산은 저산소의 조건 하에 우선적으로 핵산 분자의 발현을 구동하고 조절할 수 있다.

[0016] 저산소증-반응성 조절 핵산은 복수의 HRE를 내부에 도입하도록 변형된 공지의 조절 핵산으로부터 유래되거나 이를 기반으로 할 수 있다. 대안적으로, 복수의 HRE은 단독으로 그 자체가 조절 기능, 즉 전사를 개시하는 능력 및 이에 작동가능하게 연결된 핵산 분자의 발현을 구동하는 능력을 가질 수 있다. 그러한 경우에, 복수의 HRE은

단독으로 저산소증-반응성 조절 핵산을 구성할 것이다.

[0017] 본 발명의 저산소증-반응성 조절 핵산은 저산소증-반응성이며, 이는 그에 작동가능하게 연결된 핵산 분자의 발현이 저산소 조건 하에 우선적으로 유도됨을 의미한다. 이는 유리하게는 신체의 저산소 영역, 예를 들어 고형 종양, 저산소 조직 및 저산소 장기에서 (지리적 표적화); 또는 특정 기간 동안, 예컨대 저산소증, 허혈의 기간 (시간적 표적화); 또는 특정 환경 조건에 대한 반응으로, 예를 들어 조건이 저산소일 때 (환경적 표적화 또는 유발된 표적화)만 발현이 유도되도록 한다. "우선적" 발현에 대한 본 명세서에서의 언급은 정상산소 조건에 우선하여 저산소 조건 하에 구동되는 발현을 의미하는 것으로 간주된다. 조절 핵산은 때때로 "누출(leaky)" 발현을 갖지만, 본 발명의 저산소증-반응성 조절 핵산은 시험관 내(*in vitro*) 및 생체 내(*in vivo*) 모두에서 정상산소 조건 또는 조직에서 활성화의 증거를 나타내지 않았다.

[0018] 또한, 저산소 환경에서, 본 발명의 조절 핵산은 현재 사용 중인 일부 가장 강력한 렌티바이러스 및 레트로바이러스 프로모터, 예컨대 SFG 프로모터보다 예기치 않게 유리하게 더 강력하다. 그 결과, 저산소 환경에서 종래의 레트로바이러스 및 렌티바이러스 프로모터를 사용할 때 나타나는 발현 수준과 비교하여, 본 발명의 조절 핵산을 사용할 때 종양의 부위에서(즉, 저산소 환경에서) 증가된 발현 수준이 가능하다. 이것은, 예를 들어, 일시적 또는 낮은 수준의 저산소증에서 표적화할 때, 또는 저산소 미세환경에서 특이적으로 높은 부하의 치료제의 전달이 필요할 때, 또는 저밀도 항원을 표적화할 때, 또는 약한 치료제, 예컨대 약한 CAR를 사용할 때, 본 발명의 조절 핵산의 사용을 특히 유리하게 한다.

[0019] 본 발명의 저산소증-반응성 조절 핵산의 사용은 종양의 부위에서 발현이 요구되는 적용에 제한될 필요는 없다. 이는 저산소증-반응성 발현이 요구되는 모든 적용에 사용될 수 있다.

[0020] 본 명세서에서 정의된 용어 "조절 핵산"은 그에 작동가능하게 연결된 핵산 분자의 발현을 구동할 수 있는 핵산을 지칭하며, "발현 구동"은 전사의 개시를 지칭한다. 조절 핵산에 작동가능하게 연결된 핵산 분자의 발현은 또한 전사의 조절에 의존하며, 상기 조절은 발현의 강도 (예를 들어, 세포당 발현되는 이식유전자의 수에 의해 결정됨), 핵산 분자가 발현되는 위치 (예: 조직-특이적 발현), 및 핵산 분자가 발현되는 때 (예: 유도성 발현)와 같은 인자들을 결정한다. 본 명세서에서 정의된 "저산소증-반응성 조절 핵산"은 그러므로 저산소의 조건 하에 그에 작동가능하게 연결된 핵산 분자의 발현을 우선적으로 구동할 수 있다.

[0021] 발현의 조절은 전사 제어 요소를 통해 매개될 수 있고, 이는 일반적으로 발현된 핵산 분자의 5'-플랭킹 또는 업스트림에 있는 핵산 서열에 내장된다. 이 업스트림 핵산 영역은 종종 "프로모터"로 지칭되는데, 이는 전사 개시 복합체의 결합, 형성 및/또는 활성화를 촉진하고, 따라서 3' 다운스트림 핵산 분자의 발현을 구동 및/또는 조절할 수 있기 때문이다.

[0022] 본 명세서에서 사용된 용어 "프로모터"는 작동가능하게 연결된 서열의 발현을 달성(구동 및/또는 조절)할 수 있는 조절 핵산을 지칭한다. "프로모터"는 고전적 게놈 유전자에서 유래된 전사 조절 핵산을 포함한다. 일반적으로 프로모터는 TATA 박스를 포함하며, 이는 전사 개시 복합체를 적절한 전사 개시 시작 부위로 지시할 수 있다. 그러나, 일부 프로모터는 TATA 박스가 없지만 (TATA가 없는 프로모터), 여전히 발현을 구동 및/또는 조절하는 데 완벽히 기능한다. 프로모터는 CCAAT 박스 서열 및 추가 조절 요소(즉, 업스트림 활성화 서열 또는 시스-요소, 예컨대 인핸서 및 사일런서)를 추가로 포함할 수 있다. 용어 (저산소증-반응성) "조절 핵산", "조절 서열" 및 "프로모터"는 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다. 조절 핵산은 "분리된" 것일 수 있고, 즉 그의 원래 공급원으로부터 제거될 수 있다.

[0023] 본 명세서에서 프로모터 또는 조절 핵산에 "작동가능하게 연결된"이라는 언급은 프로모터/조절 핵산이 핵산 분자의 발현을 구동할 수 있도록 하는, 프로모터/조절 핵산 및 발현될 핵산 분자의 배열 및 상대적인 위치를 지칭한다. "핵산 분자"는 적합하게는 유전자, 이식유전자, 코딩 또는 비코딩 서열, RNA 분자 (예: 침묵을 위한 mRNA 또는 RNA, 예컨대 (shRNA, RNAi), 마이크로-RNA 조절 (miR), 촉매 RNA, 안티센스 RNA, RNA 압타머 등), 발현 벡터, TCR, CAR (CAR의 1세대, 2세대, 3세대, 4세대 또는 임의의 후속 세대) 또는 임의의 다른 관심 핵산 서열일 수 있다.

[0024] 저산소증-반응성 조절 핵산은 복수의 HRE을 포함하거나 추가 HRE(들)을 추가하도록 변형된 공지된 조절 서열일 수 있다. 복수의 HRE는 공지된 프로모터 내의 임의의 위치에 배치될 수 있으며 (상기 프로모터는 추가 조절 요소, 예컨대 업스트림 활성화 서열 또는 시스-요소, 예컨대 인핸스 및 사일런서를 포함할 수 있음), 저산소증-반응성을 부여할 수 있거나 기존 수준의 저산소증-반응성을 향상시킬 수 있다. 복수의 HRE는 공지된 프로모터 서열 내에 삽입물일 수 있고/있거나 공지된 프로모터의 전부 또는 일부 또는 부분들을 대체할 수 있다. 추가적으

로 또는 대안적으로, 복수의 HRE는 공지된 인핸서 내의 삽입물일 수 있고/있거나 공지된 인핸서의 전부 또는 일부 또는 부분들을 대체할 수 있다. 복수의 HRE는 공간적으로 분리될 수 있거나 순차적일 수 있거나, 또는 둘 모두의 조합일 수 있다.

[0025] 복수의 HRE를 포함하도록 변형되는 프로모터는 원핵 또는 진핵 프로모터, 예컨대 이의 기능성 단편 및 최소 버전을 포함하는, SFG, hACTB, hEF-1alpha, CAG, CMV, HSV-TK, hACTB, hACTB-R, LTRs, EF1a, SV40, PGK1, Ubc, 인간 베타 액틴, TRE, UAS, Ac5, 폴리헤드린(Polyhedrin), CaMKIIa, GAL1,10, TEF1, GDS, ADH1, CaMV35S, Ubi, H1, U6, T7, T7lac, Sp6, araBAD, trp, lac, Ptac, pL, NFAT-상호작용 프로모터(예컨대 IL-2 프로모터)로부터 선택될 수 있다. 복수의 HRE를 포함하도록 변형될 수 있는 다른 프로모터는 Powel *et al.*, (Discov Med. 2015, 19 (102), 49-57)로부터의 아래 표 1에 나열된 프로모터를 포함하며, 또한 표 1에 나열된 프로모터의 기능성 단편 및 최소 버전을 포함한다.

[0026] 본 발명의 저산소증-반응성 조절 핵산은 키메라 프로모터와 같은 "하이브리드 프로모터"일 수 있고, 이는 복수의 HRE에 더하여 또 다른 프로모터로부터의 일부 또는 부분들, 바람직하게는 기능적 부분(들)을 포함할 수 있다. 그러한 부분들의 예는 최소 프로모터, 활성을 추가적으로 강화하고/하거나 공간적 및/또는 시간적 발현 패턴을 변형하기 위한 추가 조절 요소를 포함한다.

표 1

선택된 유비퀴틴 및 세포-특이적 프로모터의 비교.

프로모터	특이성	상대적 강도	크기 (bps)	참조문헌(들)
CMV	Ubiquitous	+++	750–800	Xu *et al.*, 2001; Gray *et al.*, 2011
CBA (including derivatives: CAG, CBh, etc.)	Ubiquitous	+++	248–1,600	Klein *et al.*, 2002; Ohlfest *et al.*, 2005; Gray *et al.*, 2011
EF-1α	Ubiquitous	++	2,500	Gill *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2001; Ikeda *et al.*, 2002; Gilham *et al.*, 2010
PGK	Ubiquitous	++	426	Gilham *et al.*, 2010
UBC	Ubiquitous	+	403	Gill *et al.*, 2001; Qin *et al.*, 2010
GUSB (hGBp)	Ubiquitous	+	378	Husain *et al.*, 2009
UCOE (Promoter of HNRPA2B1-CBX3)	Ubiquitous	++	600–2,500	Antoniou *et al.*, 2013
hAAT	Liver	++	347–1,500	Van Linthout *et al.*, 2002; Cunningham *et al.*, 2008
TBG	Liver	++	400	Yan *et al.*, 2012
Desmin	Skeletal muscle	+++	1,700	Talbot *et al.*, 2010
MCK	Skeletal muscle	++	595–1,089	Wang *et al.*, 2008; Talbot *et al.*, 2010; Katwal *et al.*, 2013
C5-12	Skeletal, cardiac, and diaphragm	++	312	Wang *et al.*, 2008
NSE	Neuron	+++	300–2,200	Xu *et al.*, 2001
Synapsin	Neuron	+	470	Kügler *et al.*, 2003; Hioki *et al.*, 2007; Kuroda *et al.*, 2008
PDGF	Neuron	+++	1,400	Patterna *et al.*, 2000; Hioki *et al.*, 2007
MecP2	Neuron	+	229	Rastegar *et al.*, 2009; Gray *et al.*, 2011
CaMKII	Neuron	++	364–2,300	Hioki *et al.*, 2007; Kuroda *et al.*, 2008
mGluR2	Neuron	+	1,400	Brené *et al.*, 2000; Kuroda *et al.*, 2008
NFL	Neuron	+	650	Xu *et al.*, 2001
NFH	Neuron	+	920	Xu *et al.*, 2001
nβ2	Neuron	+	650	Xu *et al.*, 2001
PPE	Neuron	+	2,700	Xu *et al.*, 2001
Enk	Neuron	+	412	Xu *et al.*, 2001
EAAT2	Neuron and astrocyte	++	966	Su *et al.*, 2003; Kuroda *et al.*, 2008
GFAP	Astrocyte	++	681–2,200	Brenner *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2008; Dirren *et al.*, 2014
MBP	Oligodendrocytes	++	1,900	Chen *et al.*, 1998

주석: 일반적으로 사용되는 프로모터에 대한 세포 유형 특이성, 상대적 강도 (+는 가장 약한 것이고, +++는 가장 강한 것임), 크기, 및 관련 참조문헌.

[0027]

[0028] (복수의 HRE의) 각 단일 HRE 요소는 독립적으로 적어도 하나의 HIF-결합 부위 (HIF-binding site, HBS) 및 선택적으로 적어도 하나의 HIF 보조 부위 (HIF ancillary site, HAS)를, 임의의 순서로, 포함하거나, 이로 필수적으로 구성되거나 또는 이로 구성되며, 선택적으로 상기 HBS 및 HAS는 링커에 의해 분리된다. 적합하게는 HRE는 HNF-4 부위를 추가로 포함할 수 있다.

[0029] HBS 및 HAS를 모두 포함하는 HRE가 바람직하지만, HAS의 존재는 선택사항이다. 따라서, 본 명세서에서 HRE에 대

한 모든 언급은 HRE에 HAS 요소가 없는 옵션도 포함된다.

[0030] HIF 결합 부위 (HBS): 5'-(A/G)CGT(G/C)-3' (서열번호 1). HBS는 선택적으로 ACGTG일 수 있다.

[0031] HIF 보조 부위 (HAS): 5'-CA(C/G)(G/A)(T/C/G)-3' (서열번호 2). HAS는 선택적으로 CACAG일 수 있다.

[0032] HNF-4 부위: 5'-TGACCT-3' (서열번호 3).

[0033] HBS 및 HAS(존재하는 경우)는 경직되거나 유연할 수 있는 링커에 의해 분리될 수 있다. 적합하게는, 상기 링커는 적어도 6개 뉴클레오티드의 길이, 선택적으로 8개 이상의 뉴클레오티드의 길이이다. 바람직하게는, 링커는 6 또는 8개 뉴클레오티드의 길이이다.

[0034] 상기 링커는 산소-반응성 유전자의 프로모터 영역에서 자연적으로 발견되는 링커에 해당할 수 있다. 적합한 링커의 예는 서열번호 4 (5'-GTCTCA-3')에 제공된다. 다른 적합한 링커는 당업계에 잘 알려져 있고, 통상의 기술자는 링커 디자인의 원리를 잘 알고 있다.

[0035] 아래 표 2는 HRE의 대표적인 비제한적 예를 나타낸다. HRE가 유래된 유전자 공급원은 왼쪽 컬럼에 나타냈다. HBS 및 HAS (존재하는 경우)는 볼드 및 밑줄로 나타냈다.

[0036]

표 2: 다양한 유전자 공급원으로부터의 HRE

유전자 공급원	HBS 및 HAS가 강조표시된 추정 HRE	서열번호
hEPO	GGGCCCT**ACGTG**CTGTCTCA**CACAG**C	서열번호 5
mEPO	GGGCCCT**ACGTG**CTGCCTCGCATGGC	서열번호 6
hPGK	TGTC**ACGTC**CTGCACGACGCGAGTA	서열번호 7
mPGK	CGCGTCGTGCAGG**ACGTG**ACAAAT	서열번호 8
mLDH	CCAGCGG**ACGTG**CGGGAACCC**ACGTG**TAGG	서열번호 9
Glucose trpt	TCCACAG**GCGTG**CCGTCTGA**CACGC**A	서열번호 10
hVEGF	CCACAGTGCAT**ACGTG**GGCTCCAA**CAGGT**CCTCTT	서열번호 11
mVEFG	T**ACGTG**GG (인간, 마우스, 래트에서 보존됨)	서열번호 12
rVEGF	ACAGTGCAT**ACGTG**GGCTTC**CACA**	서열번호 13
hNOS	ACT**ACGTG**CTGCCTAGG	서열번호 14
hAldolase	CCCCTCGG**ACGTGA**CTCGGAC**CACAT**	서열번호 15
hEnolase	ACGCTGAGT**GCGTG**CGGGACTCGGAGT**ACGTG**ACGGA	서열번호 16
mHeme Oxygenase	CGGACGCTG**GCGTG**GC**ACGTC**CTCTC	서열번호 17

[0037] 상기 표 2에 나타낸 HRE-함유 유전자 외에도, 다른 유전자 공급원은 하기를 포함한다: 알돌라제 A, 알돌라제 C, HIF-1b, HIF-2b, CTLA-4, PHD2, PHD3, 에놀라제 1, 에놀라제 2, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제, 글루코스 포스페이트 이소머라제 1, HIF-3a, 1L-10, 인터페론-g, 림프구 활성화 유전자 3, 미토콘드리아 코딩된 12S rRNA, 6-포스포프룩토-2-키나제/프룩토스-2,6-비포스파타제3, 포스포프룩토키나제; 포스포글리세레이트 키나제 1, 포스포글루코무타제 2, 피루베이트 키나제, 퍼포린 1, glut1, glut3, 트리오세포스페이트 이소머라제 1, 혈관내피성장인자 A, 폰 히펠-린다우(Von Hippel-Lindau) 종양 억제제. 전술한 유전자는 Gropper *et al.*, 2017 (Cell Reports 20, 2547-2555)에 저산소증에 노출되면 T-세포에서 상향조절되는 것으로 나타났다. 따라서 저산소증-반응성 조절 핵산에 포함된 HRE는 전술한 유전자 중 어느 하나 또는 표 2에 나열된 유전자 중 어느 하나에서 유래될 수 있다. 대안적으로, 저산소증-반응성 조절 핵산에 포함된 HRE는 인공적으로 합성될 수 있다.

[0038] 저산소증-반응성 조절 핵산은 표 2에 나타낸 서열 (서열번호 5-17) 중 적어도 하나 또는 복수, 또는 서열번호 7-19 중 어느 하나에 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 이로 필수적으로 구성되거나, 또는 이로 구성될 수 있으며, 상기 서열은 표 1에 나타낸 바와 같은 또는 본 명세서에서 정의된 바와 같은 HBS (및 선택적으로 또한 HAS)를 적어도 포함하거나, 이로 필수적으로 구성되거나, 이로 구성된다.

[0039] 저산소증-반응성 조절 핵산은 복수의 HRE를 포함하거나, 이로 필수적으로 구성되거나, 또는 이로 구성되며, 각 개별 HRE 요소는 하기의 임의의 조합을, 임의의 순서로, 포함하거나, 이로 필수적으로 구성되거나, 이로 구성된다:

[0040] (i) 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15개 또는 그 이상의, 예를 들어 서열번호 1로 표시된 바와 같은, HIF-결합 부위 (HBS), 및 선택적으로

[0041] (ii) 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15개 또는 그 이상의, 예를 들어 서열번호 2로 표시된 바와 같은, HIF 보조 부위 (HAS), 및 선택적으로

[0042] (iii) 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15개 또는 그 이상의, 예를 들어 서열번호 3로 표시된 바와 같은, HNF-4 부위.

[0043] 저산소증-반응성 조절 핵산은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 그 이상 카피의 서열번호 1, 선택적으로 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 그 이상 카피의 서열번호 2, 및 추가로 선택적으로 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 그 이상 카피의 서열번호 3을 포함하거나, 이로 필수적으로 구성되거나, 또는 이로 구성될 수 있다.

[0044] 본 명세서에서 정의된 HRE의 "복수"는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 그 이상 카피의 단일 HRE 요소를 의미하는 것으로 간주되며, 단일 HRE 요소는 본 명세서에서 정의된 바와 같다. 복수의 HRE를 구성하는 단일 (개별) HRE 요소들은 공간적으로 분리될 수 있고(예: 인핸서, 링커, 개재 서열(intervening sequence)과 같은 요소에 의해 분리됨), 순차적일 수 있고, 또는 둘 모두의 조합일 수 있다. 유리하게는, 저산소증-반응성의 강도는 저산소증-반응성의 증가와 상관되는 HRE의 수의 증가와 함께 필요에 따라 조정될 수 있다.

[0045] 일 구체예에 따르면, 저산소증-반응성 조절 핵산 또는 복수의 HRE는 3개의 순차적인 "HBS-링커-HAS" 서열, 즉, HBS-링커-HAS-링커-HAS-링커-HAS-링커-HBS-링커-HAS를 포함하거나, 이로 필수적으로 구성되거나, 또는 이로 구성된다. 상기 링커는 본 명세서에서 정의된 바와 같거나 임의의 적절한 링커이다. 대안적인 구체예에서, 링커가 없거나, 여기에서 모든 HBS-HAS가 링커에 의해 분리된 것은 아니다. 대안적인 구체예에서, HAS 요소는 존재하지 않는다.

[0046] 일 구체예에 따르면, 저산소증-반응성 조절 핵산 또는 복수의 HRE는 6개의 순차적인 "HBS-링커-HAS" 서열, 즉, HBS-링커-HAS-링커-HBS-링커-HAS-링커-HBS-링커-HAS-링커-HBS-링커-HAS-링커-HBS-링커-HAS-링커-HBS-링커-HAS를 포함하거나, 이로 필수적으로 구성되거나, 또는 이로 구성된다. 상기 링커는 본 명세서에서 정의된 바와 같거나 임의의 적절한 링커이다. 대안적인 구체예에서, 링커가 없거나, 여기에서 모든 HBS-HAS가 링커에 의해 분리된 것은 아니다. 대안적인 구체예에서, HAS 요소는 존재하지 않는다.

[0047] 일 구체예에 따르면, 저산소증-반응성 조절 핵산 또는 복수의 HRE는 9개의 순차적인 "HBS-링커-HAS" 서열, 즉, HBS-링커-HAS-링커-HBS-링커-HAS-링커-HBS-링커-HAS-링커-HBS-링커-HAS-링커-HBS-링커-HAS-링커-HBS-링커-HAS-링커-HBS-링커-HAS-링커-HBS-링커-HAS-링커-HBS-링커-HAS를 포함하거나, 이로 필수적으로 구성되거나, 또는 이로 구성된다. 상기 링커는 본 명세서에서 정의된 바와 같거나 임의의 적절한 링커이다. 대안적인 구체예에서, 링커가 없거나, 여기에서 모든 HBS-HAS가 링커에 의해 분리된 것은 아니다. 대안적인 구체예에서, HAS 요소는 존재하지 않는다.

[0048] 각 개별 HRE 요소를 구성하는 부분, 즉, HBS, 및 선택적으로 HAS 및 추가로 선택적으로 HNF-4는 임의의 순서일 수 있다. 상기 부분은, 예컨대 적절한 링커, 개재 서열 등의 사용을 통해, 순차적으로 배치되거나 및/또는 공간적으로 분리될 수 있다. 순차적인 위치는 본 명세서에서 "직렬로(in tandem)" 또는 "스택된(stacked)"이라고도 지칭한다.

[0049] HRE 또는 HRE를 구성하는 부분(즉, HBS, 및 선택적으로 HAS 및 추가로 선택적으로 HNF-4)은 적합하게는 임의의 산소-반응성 유전자, 바람직하게는 포유동물 유전자 공급원, 예컨대 인간 유전자 공급원으로부터 유래될 수 있거나, 인공적으로 합성될 수 있다. 이러한 산소-반응성 유전자의 예는, 다른 것들 중에서도, 표 2에 나열된 유전자; Gropper *et al.*, 2017 (Cell Reports 20, 2547-2555)에 나타낸 바와 같은 저산소증에 노출되면 T-세포에서 상향조절되는 상기 나열된 유전자; 에리트로포이에틴(erythropoietin, EPO), 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF), 포스포글리세레이트 키나제(phosphoglycerate kinase, PGK), 글루코스 수송체 (예: Glut-1), 락테이트 데히드로게나제(lactate dehydrogenase, LDH), 알돌라제(aldolase, ALD), 에놀라제 (예: ENO3), 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH), 산화질소 합성효소(nitric oxide synthetase, NOS), 헴 옥시게나제(heme oxygenase), 근육 당분해효소 피루베이트 키나제 (muscle glycolytic enzyme pyruvate kinase, PKM), 엔도텔린-1(endothelin-1, ET-1)을 포

함하며, 전술된 것 중 어느 하나의 오쏘로그 또는 파라로그를 포함한다. "오쏘로그(orthologues)"와 "파라로그(paralogues)"는 유전자의 조상 관계를 설명하기 위해 사용된 진화론적 개념을 포괄하는 상동성의 두 가지 형태이다. 용어 "파라로그"는 종의 게놈 내에서 파라로그성 유전자를 유발하는 유전자 복제에 관한 것이다. 용어 "오쏘로그"는 종 분화로 인한 다른 유기체에서의 상동 유전자와 관련이 있다. 오쏘로그 및 파라로그는 (상호) 블라스트 검색을 사용하여 통상의 기술자에 의해 용이하게 식별될 수 있다.

[0050] 복수의 HRE는 발현 벡터, 레트로바이러스 벡터, 또는 렌티바이러스 벡터, 예컨대 pELNS 등, 또는 CAR을 발현하기에 적합한 임의의 벡터 내에 임의의 위치에 위치될 수 있다. 선택적으로, 복수의 HRE은 레트로바이러스 발현 벡터, 예를 들어, 프로모터의 임의의 위치 또는 레트로바이러스 프로모터의 긴 말단 반복 (long terminal repeats, LTR)에 위치된다. 복수의 HRE는 예를 들어 LTR 내 임의의 위치에 위치될 수 있고, 및/또는 오픈 리딩 프레임(open reading frame, ORF)에 병치될 수 있다. 복수의 HRE는 예를 들어 LTR, 인핸서 및/또는 프로모터의 실질적으로 전부 또는 일부를 HRE로 대체할 수 있다. 선택적으로, LRT의 3' 말단은 복수의 HRE를 포함하도록 변형된다. 선택적으로 SFG 레트로바이러스 벡터의 3' LTR은, 선택적으로 천연 프로모터 또는 이의 일부를 유지하면서, 천연 인핸서의 전체를 복수의 HRE로 실질적으로 대체하도록 변형된다.

[0051] 아래 서열번호 18은 SFG 레트로바이러스 벡터에서 비변형된 3' LTR을 나타낸다.

[0052] 서열번호 18

[0053] CTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAACCCCTCACTCGGGGCGCCAGTCCTCCGATTGACTGAGTCGCCCGGGTACCCGTGTATCCAATAAACCCTCTTGCAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTGTTCCTTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCA

[0054] 9개의 HRE를 포함하도록 변형된 SFG 레트로바이러스 벡터의 MLV 인핸서 영역은 아래에 나타냈다. 아래 서열번호 19는 HRE 변형된 3' LTR의 서열을 나타낸다. 밑줄 섹션은 9개의 순차적으로 배치된 HRE를 나타내며, 단일 HRE 요소는 볼드 밑줄로 표시된다.

[0055] 서열번호 19

[0056] ctagc**GGCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTGTCTGAC**GGCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTGTCTGACGGCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTGTCTGACGGCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTGTCTGACGGCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTGTCTGACGGCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTGTCTGACtCTAGA*GAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAACCCCTCACTCGG*GGCGCCAGTCCTCCGATTGACTGAGTCGCCCGGGTACCCGTGTATCCAATAAACCCTCTTGCAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTGTTCCTTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCA

[0057] 서열번호 20 내지 25는 서열번호 18 및 19의 구성 부분에 주석을 단다. 통상의 기술자에게 명백한 바와 같이, 모든 구성 부분이 기능에 필요한 것은 아니다. 또한, 서열번호 20 내지 25로 표시된 하나 이상의 구성 부분을 사용하여 본 명세서에서 정의된 바와 같은 하이브리드 프로모터를 생성할 수 있다.

[0058] MLV 프로모터: 서열번호 20

[0059] GAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAACCCCTCACTCGG

[0060] CCAAT 박스: 서열번호 21

[0061] CTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTCGCGCGCTTC

[0062] TATA 박스: 서열번호 22

[0063] TGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAACCCCTCACTCGGGGCGCCAGTCCTCCGAT

[0064] 폴리 A 부위: 서열번호 23

[0065] TGACTGAGTCGCCCGGGTACCCGTGTATCCAATAAACCCTCTTGCAGTTGCA

[0066] strong-stop-cDNA를 위한 RNA 주형: 서열번호 24

[0067] GCGCCAGTCCTCCGATTGACTGAGTCGCCCGGGTACCCGTGTATCCAATAAACCCTCTTGCAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTGTTCCTTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCA

[0068] 11-염기 역 반복: 서열번호 25

[0069] GGGGTCTTTCA

[0070] 대안적으로, 복수의 HRE은 그 자체로 충분한 조절 기능/프로모터 활성, 즉, 전사를 개시하고, 이에 작동가능하게 연결된 핵산 분자의 발현을 구동 및 조절하는 능력을 가질 수 있으며, 이 경우 복수의 HRE 단독으로 저산소증-반응성 조절 핵산을 구성할 것이다. 복수의 HRE의 각 개별 HRE 요소는 공간적으로 분리될 수 있거나(예: 인핸서, 링커, 개재 서열과 같은 요소에 의해 분리됨), 또는 순차적일 수 있거나, 또는 둘 모두의 조합일 수 있다.

[0071] 아래 서열번호 26은 복수의 HRE 그 자체가 저산소증-반응성 조절 핵산을 구성하는 예를 보여준다. 9개의 순차적인 HRE 카피를 나타내며, 단일 HRE 요소는 밑줄 표시되었다.

[0072] 서열번호 26

[0073] GGCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTGTCTGACGGCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTGTCTGACGGCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTGTCTGACGGCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTGTCTGACGGCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTGTCTGACGGCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTGTCTGACGGCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTGTCTGACGGCCCTACGTGCTGTCT

[0074] 아래 서열번호 27은 단일 HRE 요소의 예를 나타내며, HBS 및 HAS는 볼드체로 나타냈다. 저산소증-반응성 조절 핵산은 적어도 HBS 및 선택적으로 HAS 요소를 포함하는 서열번호 27 또는 이의 일부의 다중 카피, 예를 들어, 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 그 이상의 카피의 서열번호 27 또는 이의 일부를 포함하거나, 이로 필수적으로 구성되거나, 또는 이로 구성될 수 있다. 각 개별 HRE 카피는 공간적으로 분리될 수 있거나(예: 인핸서, 링커, 개재 서열과 같은 요소에 의해 분리됨), 또는 순차적일 수 있거나(본 명세서에서 "직렬로" 또는 "스택된"으로도 지칭함), 또는 둘 모두의 조합일 수 있다.

[0075] 서열번호 27

[0076] GGCCCT**ACGTG**CTGTCT**CACAC**AGCCTGTCTGAC

[0077] 본 발명은 또한 본 발명의 조절 핵산의 기능적 단편을 제공하며, 본 명세서에서 정의된 바와 같은 "기능적 단편"은 복수의 HRE를 포함하거나, 이로 필수적으로 구성되거나, 또는 이로 구성되며, 이에 작동가능하게 연결된 핵산 분자의 발현을 구동하고 조절하는 능력을 보유한다. 기능적 단편은 이들이 유래되거나 단편이 기반으로 하는 비변형 서열과 동일한 방식으로 (비록 동일한 정도는 아닐지라도) 발현을 구동 및/또는 조절하는 능력을 보유한다. 적합한 기능적 단편은 통상의 기술자에게 잘 알려진 표준 기술을 사용하여 발현을 구동 및/또는 조절하는 능력에 대해 시험될 수 있다. 기능적 단편은 적어도 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485, 490, 495, 500개 또는 그 이상의 그들이 유래된 서열의 연속적인 뉴클레오티드를 포함한다. 특정 구체예에서, 기능적 단편은 서열번호 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 또는 27의 기능적 단편이고, 상기 기능적 단편은 본 명세서에서 정의된 바와 같은 복수의 HRE를 포함하거나 이로 구성된다.

[0078] 또 다른 구체예에 따르면, 저산소증-반응성 조절 핵산은 서열번호 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 또는 27 또는 이의 기능적 단편 또는 이의 상보체로 표시되거나, 또는 이를 포함하거나, 이로 필수적으로 구성되거나, 또는 이로 구성된다.

[0079] 저산소증-반응성 조절 핵산은 또한 서열번호 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 또는 27 중 어느 하나와 또는 본 명세서에서 정의된 바와 같은 기능적 단편과, 엄격한 혼성화 조건 하에 혼성화할 수 있는 서열을 포함하거나, 이로 필수적으로 구성되거나, 또는 이로 구성될 수 있고, 상기 혼성화 서열은 복수의 HRE를 포함하거나, 이로 필수적으로 구성되거나, 또는 이로 구성되고, 이에 작동가능하게 연결된 핵산 분자의 발현을 구동 및 조절하는 능력을 보유한다. 엄격한 조건 하에서의 혼성화는 정의된 온도 및 염 농도의 조건 하에 표적 핵산 분자에

혼성화하는 핵산 분자의 능력을 지칭한다. 전형적으로, 엄격한 혼성화 조건은 천연 듀플렉스의 용융 온도 (T_m)보다 25° C 내지 30° C (예를 들어, 20° C, 15° C, 10° C 또는 5° C) 낮다. T_m을 계산하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 비제한적인 예로서, 엄격한 혼성화를 달성하기 위한 대표적인 염 및 온도 조건은 65° C에서 1X SSC, 0.5% SDS이다. 약어 SSC는 핵산 혼성화 용액에 사용되는 버퍼를 지칭한다. 1리터의 20X (20배 농축액) 스톡 SSC 버퍼 용액 (pH 7.0)은 175.3 g 소듐 클로라이드 및 88.2 g 소듐 시트레이트를 함유한다. 혼성화를 달성하기 위한 대표적인 시간은 12시간이다.

[0080] 저산소증-반응성 조절 핵산은 서열번호 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 또는 27 또는 이의 기능적 단편에 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 상동체를 포함하거나 이로 구성될 수 있고, 상기 상동체는 복수의 HRE를 포함하거나, 이로 필수적으로 구성되거나, 또는 이로 구성된다. 백분율 동일성은 정렬 프로그램을 사용하여 계산될 수 있다. 바람직하게는 페어 와이즈(pair wise) 글로벌 정렬 프로그램이 사용될 수 있고, 이는 Needleman-Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 443-453, 1970)의 알고리즘을 구현한다. 이 알고리즘은 일치 수를 최대화하고 간격 수를 최소화한다. 이러한 프로그램은 예를 들어 GAP, Needle (EMBOSS 패키지), stretcher (EMBOSS 패키지) 또는 Align X (Vector NTI suite 5.5)이며, 표준 파라미터(예를 들어 갭 개방 패널티 15 및 갭 확장 패널티 6.66)를 사용할 수 있다. 대안적으로, Smith-Waterman (Advances in Applied Mathematics 2, 482-489 (1981))의 알고리즘을 구현하는 로컬 정렬 프로그램이 사용될 수 있다. 이러한 프로그램은 예를 들어 Water (EMBOSS 패키지) 또는 matcher (EMBOSS 패키지)이다.

[0081] 본 발명의 저산소증-반응성 조절 핵산의 다른 변이체 또는 서열번호 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 또는 27의 변이체는 돌연변이 변이체, 치환 변이체, 삽입 변이체, 유도체, 개재 서열을 포함하는 변이체, 스플라이스 변이체 및 대립유전자 변이체를 포함하며, 상기 변이체는 복수의 HRE를 포함하거나 이로 구성된다.

[0082] 핵산의 "돌연변이 변이체"는 재조합 DNA 조작 기술 또는 뉴클레오티드 합성을 사용하여 용이하게 만들 수 있다. 이러한 기술의 예는 M13 돌연변이유발, T7-Gen *in vitro* 돌연변이유발 (USB, Cleveland, Ohio), QuickChange 부위 지정 돌연변이유발 (Stratagene, San Diego, Calif.), PCR-매개 부위-지정 돌연변이유발 또는 기타 부위-지정 돌연변이유발 프로토콜을 통한 부위 지정 돌연변이유발을 포함한다. 대안적으로, 본 발명의 핵산은 무작위로 돌연변이될 수 있다.

[0083] "치환 변이체"는 핵산 서열에서 적어도 하나의 잔기가 제거되고 다른 잔기가 그 자리에 삽입된 변이체를 지칭한다. 핵산 치환은 전형적으로 단일 잔기의 치환이지만, 핵산 서열에 가해지는 기능적 제약에 따라 클러스터링될 수 있으며; 삽입은 일반적으로 약 1 내지 약 10개 핵산 잔기 정도이며, 결실은 약 1 내지 약 20개 잔기 범위일 수 있다.

[0084] 핵산의 "삽입 변이체"는 하나 이상의 핵산 잔기가 해당 핵산의 미리결정된 부위에 도입된 변이체이다. 삽입은 단일 또는 다중 뉴클레오티드의 서열내 삽입뿐만 아니라 5'-말단 및/또는 3'-말단 융합을 포함할 수 있다. 일반적으로, 핵산 서열 내의 삽입은 약 1 내지 10개 잔기 정도의 5'- 또는 3'-말단 융합보다 작을 것이다. 5'- 또는 3'-말단 융합의 예는 효모 2-하이브리드 시스템 또는 효모 1-하이브리드 시스템에서 사용된 바와 같은 전사 활성화제의 결합 도메인 또는 활성화 도메인의 코딩 서열, 또는 파지 코트 단백질의 그것, (히스티딘)6-태그, 글루타티온 S-트랜스페라제-태그, 단백질 A, 말토스-결합 단백질, 디히드로폴레이트 리덕타제, 태그 · 100 에피토프, c-myc 에피토프, FLAG®-에피토프, lacZ, CMP (칼모둘린-결합 펩티드), HA 에피토프, 단백질 C 에피토프 및 VSV 에피토프를 포함한다.

[0085] 용어 핵산의 "유도체"는 천연 핵산과 비교하여 천연 및 비-천연 발생 핵산 잔기의 치환 및/또는 결실 및/또는 부가를 포함할 수 있다. 유도체는, 예를 들어, 메틸화된 뉴클레오티드, 또는 인공 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0086] 조절 서열은 개재 서열에 의해 중단될 수 있다. "개재 서열(intervening sequence)"은 또 다른 서열을 파괴하는 임의의 핵산 또는 뉴클레오티드를 의미한다. 개재 서열의 예는 인트론, 핵산 태그, T-DNA 및 이동가능한 핵산 서열, 예컨대 트랜스포존 또는 재조합을 통해 동원될 수 있는 핵산을 포함한다. 특정 트랜스포존의 예는 Ac (활성화제), Ds (해리), Spm (억제-돌연변이 인자) 또는 En을 포함한다. 개재 서열이 인트론인 경우, 대안적인 스플라이스 변이체가 발생할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어 "대안적인 스플라이스 변이체"는 개재 인트론이 절단, 대체 또는 추가된 핵산 서열의 변이체를 포함한다. 이러한 스플라이스 변이체는 자연에서 발견되거나 인공적으로 발견될 수 있다.

[0087] 본 발명의 저산소증-반응성 조절 핵산은, 본 명세서에 정의된 바와 같은, 저산소의 조건 하에 발현을 구동할 수 있고, 5% 미만 (예컨대 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5% 0.25% 또는 0.1% 미만 또는 mmHg 등가물)의 O_2 농도 또는 상응하는 비-암성 장기, 조직 또는 세포의 O_2 가용성 또는 부분 압력에 비해 감소된 O_2 가용성을 의미하는 것으로 간주된다. 반대로, 본 명세서에서 정의된 "정상산소"는 5% 초과의 O_2 농도 또는 건강한 장기와 관련된 O_2 가용성을 의미하는 것으로 간주된다. 통상의 기술자는 임의의 주어진 환경이 저산소 또는 정상산소인지 여부를 용이하게 결정할 수 있을 것이다. 프로모터의 예상되는 사용에 따라, 통상의 기술자는 상이한 수의 HRE를 사용하여 저산소증 반응성의 정도를 조절할 수 있을 것이며, HRE 카피의 증가는 저산소증 반응성의 증가와 상관된다.

[0088] 저산소증-반응성 조절 핵산은 핵산 분자의 발현을 구동할 수 있으며, 상기 핵산 분자는 적합하게는 유전자, 이식유전자, 코딩 또는 비-코딩 서열, RNA 분자(예: 침묵을 위한 mRNA 또는 RNA 분자, 예컨대 (shRNA, RNAi), 마이크로-RNA 조절 (miR), 촉매 RNA, 안티센스 RNA, RNA 압타머 등), 발현 벡터, 및 조작된 수용체, 예컨대 CAR (CAR의 1세대, 2세대, 3세대, 4세대 또는 임의의 후속 세대) 또는 TCR, 또는 임의의 기타 관심 서열일 수 있다.

[0089] 조작된 수용체

[0090] 일 양상에서, 저산소증-반응성 조절 핵산은, 면역반응성 세포에서 발현될 때, 세포에 미리결정된 항원 특이성을 부여하고, 미리결정된 항원에 세포가 결합할 때, 세포에 활성화 신호 및, 선택적으로, 하나 이상의 공동자극 신호를 전달하는, 조작된 수용체의 발현을 구동한다. 전형적인 구체예에서, 면역반응성 세포는 자연살해세포, 불변 NKT-세포, NK T-세포, B-세포, T-세포, 예컨대 세포독성 T-세포, 헬퍼 T-세포 또는 조절 T-세포, αβ T-세포, γδ T-세포, 또는 골수-유래 세포, 예컨대 대식세포 또는 호중구, 줄기세포, 유도 만능 줄기 세포(iPSC)이다.

[0091] 조작된 수용체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 저산소증-반응성 조절 핵산을 작동가능하게 연결하는 것은 조작된 수용체에 저산소증-반응성 발현을 부여하고/하거나 그것이 면역반응성 세포를 고형 종양 덩어리로 표적화 하는 데 적합하게 만든다.

[0092] 최초의 키메라 항체-TCR은 Kuwana *et al*. 1987 (Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 149, No. 3)에 의해 만들어졌다. 최초의 CAR 중 하나는 이스라엘의 Weizmann 연구소에서 Zelig Eshhar *et al*. 에 의해 개발되었다(Gross *et al*., 1989 (PNAS, Vol. 86, pp. 10024-10028); Eshhar *et al*., 1993 (PNAS, Vol. 90, pp. 720-724)). 그들의 발견에 기초하여, 항체로부터의 Fab 항원 결합 영역과 세포내 TCR 신호전달 도메인의 융합은 키메라 수용체를 발생시키며, 이는 T-세포 상에서 발현될 때 기능적이고 특정 MHC/HLA 독립 항원에 반응하여 TCR 신호를 전달한다. 다양한 기능적 도메인을 포함하는 CAR의 모듈식 구조는 항원 특이성의 선택을 허용하고 신호전달 강도를 미세하게 제어한다. CAR은 단일 사슬 가변 단편 (scFv)를 포함할 수 있고, 이는 TAA 또는 수용체에 대한 펩티드 리간드 또는 펩티드의 융합에 특이적인 항체의 가변 중쇄 (VH) 및 경쇄 (VL) 영역, 적절한 스페이서 도메인, 예를 들어, CD8, CD28 또는 IgG-Fc, 당업계에 잘 알려진 다른 것들; 막횡단 도메인 및 엔도도메인을 함유한다. 스페이서는 효율적인 신호 발생을 위해 T-세포 원형질막에서 최적의 거리에 scFv를 배향한다. 이 외에도, 스페이서는 수용체 동종이량체화, 유연성 및 분리 및 응집에 중요한 역할을 한다. 신호전달 엔도도메인은 본래의 TCR 활성화를 위한 공동-자극을 제공하는 신호 전달 모티프를 함유하는 단백질로 구성된다. 엔도도메인은 무엇보다도 CD3 ζ, FcRγ, CD28, OX40 및/또는 4-1BB를 함유할 수 있으며, 이들 도메인의 조합은 시간이 지남에 따라 더욱 정교해진 키메라 수용체의 세대를 결정한다.

[0093] 본 발명의 제1 양상에 따른 저산소증-반응성 조절 핵산 조절 요소는 임의의 조작된 수용체의 발현을 구동하고 조절하기 위해 사용될 수 있다.

[0094] 또한, 특정 구체예에서, 조작된 수용체, 예컨대 CAR은, 본 명세서에서 정의된 바와 같은 하나 이상의 산소-의존적 분해 도메인 (ODD), 및 항종양 특성을 갖는 적어도 하나의 폴리펩티드를 포함한다.

[0095] CAR의 모듈 특성으로 인해, 하나 이상의 ODD 또는 키메라 폴리펩티드는 임의의 공지된 CAR 디자인에 용이하게 포함될 수 있다: 예를 들어, 이들은 1세대, 2세대, 3세대, 4세대 또는 후속 세대의 CAR; 스플릿(split) CAR 시스템; TRUCK 또는 무장화(armoured) CAR 등에 포함될 수 있다. 공지된 CAR은 본 명세서에서 정의된 바와 같은 하나 이상의 ODD의 포함을 통해, 및/또는 본 발명의 제1 양상에 따른 저산소증-반응성 조절 핵산의 사용을 통해, 저산소증 반응성을 부여하거나 개선된 저산소증 반응성을 부여하도록 조절될 수 있다.

[0096] 1세대 CAR은 세포외 결합 도메인, 힌지 영역, 막횡단 도메인 및 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인으로 구성된다. 일반적으로, 세포외 결합 도메인은 종양 항원-반응성 항체에서 유래된 단일-사슬 가변 단편 (scFv)를 포

함하며, 일반적으로 종양 항원에 대해 높은 특이성을 갖는다. 1세대 CAR은 전형적으로 CD3ζ 사슬 도메인 또는 이의 변형된 유도체를 세포내 신호전달 도메인으로서 포함하며, 이는 신호의 1차 전달자이다.

[0097] 2세대 CAR은 또한 공동-자극 도메인, 예컨대 CD28 및/또는 4-1BB를 함유한다. 세포내 공동-자극 도메인의 포함은 T-세포 증식, 사이토카인 분비, 아포토시스에 대한 저항성, 및 생체 내(*in vivo*) 지속성을 개선한다. 2세대 CAR의 공동-자극 도메인은 전형적으로 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인과 시스(cis) 및 업스트림에 있다.

[0098] 3세대 CAR은 T-세포 활성을 증가시키기 위해, 다수의 공동-자극 도메인을 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인과 시스(cis)로 결합한다. 예를 들어, 3세대 CAR은 CD3z에서 유래된 세포내 신호전달 도메인과 함께, CD28 및 41BB에서 유래된 공동-자극 도메인을 포함할 수 있다. 다른 3세대 CAR은 CD3z에서 유래된 세포내 신호전달 도메인과 함께, CD28 및 OX40에서 유래된 공동-자극 도메인을 포함할 수 있다.

[0099] 4세대 CAR (TRUCK 또는 무장화(armoured) CAR라고도 함)은, 2세대 CAR의 발현을 항-종양 활성을 향상시키는 인자(예: 사이토카인, 공동-자극 리간드, 케모카인 수용체 또는 면역 조절의 추가 키메라 수용체 또는 사이토카인 수용체)와 결합한다. 인자들은 CAR과 트랜스(trans) 또는 시스(cis)로 있을 수 있고, 전형적으로 CAR과 트랜스(trans)로 있을 수 있다.

[0100] CAR 또는 CAR을 코딩하는 핵산은 표적외 효과, 용량 조절, 활성화의 위치 및 시기를 다루기 위한 다른 메커니즘을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, CAR을 코딩하는 핵산은 자살 유전자(들), 예컨대 단순포진바이러스 티미딘 키나제 (HSV-TK) 또는 유도성 카스파제 9 (iCas9), 또는 표적외 효과를 제어할 수 있는 다른 수단을 포함할 수 있다. CAR 활성의 제어를 위한 다른 수단은 소분자 제제의 사용을 포함한다(예를 들어, Giordano-Attinese *et al.*, 2020, Nature Biotechnology Letters에 보고된 바와 같음). 이들 제어 시스템은 면역반응성 세포의 아포토시스를 유도하기 위해 세포외 분자에 의해 활성화될 수 있다.

[0101] 또 다른 예는 2개 이상의 항원-특이적 표적화 영역(본 명세서에서 정의된 바와 같음)을 발현하도록 설계된 CAR을 포함한다. CAR은 CAR의 치료 기능이 종양 항원 및 양성 외인성 분자 모두의 존재를 필요로 하는 스플릿 CAR 시스템일 수 있다. 이러한 시스템은 ODD의 전개를 제어하기 위해 본 발명에서 사용될 수 있다.

[0102] 다양한 구체예에서, 조작된 수용체는 1세대 CAR, 예컨대 Eshhar *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993) 90(2):720-724에 설명된 것이다.

[0103] 다양한 구체예에서, 조작된 수용체는 공동-자극 키메라 수용체, 예컨대 Krause *et al.*, *J. Exp. Med.* (1998) 188(4):619-26에 설명된 것이다.

[0104] 다양한 구체예에서, 조작된 수용체는 2세대 CAR, 예컨대 Finney *et al.*, *J. Immunol.* (1998) 161(6):2791-7; Maher *et al.*, *Nat. Biotechnol.* (2002) 20(1):70-75; Finney *et al.*, *J. Immunol.* (2004) 172(1):104-113; 및 Imai *et al.*, *Leukemia* (2005) 18(4):676-84에서 설명된 것이다.

[0105] 다양한 구체예에서, 조작된 수용체는 3세대 CAR, 예컨대 Pule *et al.* (2005), *Mol. Ther.* 12(5):933-941; Geiger *et al.*, *Blood* (2001) 98:2364-71; 및 Wilkie *et al. J. Immunol.* (2008) 180(7):4901-9에서 설명된 것이다.

[0106] 다양한 구체예에서, 조작된 수용체는 Ahmed *et al.*, *Mol. Ther. Nucleic Acids* (2013) 2:e105에서 설명된 바와 같은 탠덤 (Tan)CAR이다.

[0107] 다양한 구체예에서, 조작된 수용체는 Chmielewski *et al.*, *Cancer Res.* (2011), 71:5697-5706 (2011)에서 설명된 바와 같은 TRUCK CAR이다.

[0108] 다양한 구체예에서, 조작된 수용체는 Pegram *et al.*, *Blood* (2012) 119:4133-4141 및 Curran *et al.*, *Mol. Ther.* (2015) 23(4):769-78에 설명된 바와 같은 무장화(Armoured) CAR이다.

[0109] 다양한 구체예에서, 조작된 수용체는 WO 2013/019615에서 설명된 바와 같은 스위치 수용체(Switch Receptor)이다.

[0110] 다양한 구체예에서, 조작된 수용체는 다른 조작된 구축물과 함께 세포에서 발현된다.

[0111] 이들 구체예의 일부에서, 조작된 수용체는 Stephan *et al. Nat. Med.* (2007) 13(12):1440-49에 설명된 바와 같이 시스 및 트랜스에서 공동-자극을 제공하기 위해 다른 조작된 구축물과 함께 세포에서 발현된다.

[0112] 이들 구체예의 일부에서, 조작된 수용체는 이중-표적 CAR을 제공하기 위해 다른 조작된 구축물과 함께 세포에서

발현되며, 예컨대 Wilkie *et al.*, *J. Clin. Immunol.* (2012) 32(5):1059-70에서 설명된 것이다.

[0113] 이들 구체예 중 일부에서, 조작된 수용체는 Fedorov *et al.*, *Sci. Transl. Med.* (2013) 5(215):215ra172에서 설명된 바와 같이, 억제 CAR (NOT 게이트)를 제공하기 위해 다른 조작된 구축물과 함께 세포에서 발현된다.

[0114] 이들 구체예 중 일부에서, 조작된 수용체는 Kloss *et al.*, *Nat. Biotechnol.* (2013) 31(1):71-5 및 WO 2014/055668에서 설명된 바와 같이, 조합 CAR (AND 게이트)을 제공하기 위해 다른 조작된 구축물과 함께 세포에서 발현된다.

[0115] 이들 구체예 중 일부에서, 조작된 수용체는 Foster *et al.*, (2014), Abstract, http://www.bloodjournal.org/content/124/21/1121?sso-checked=true에 설명된 바와 같이, Go-CAR T를 제공하기 위해 다른 조작된 구축물과 함께 세포에서 발현된다.

[0116] 이들 구체예 중 일부에서, 조작된 수용체는 Zhao *et al.*, *Cancer Cell* (2015) 28:415028에서 설명된 바와 같이, 조작된 공동-자극을 제공하기 위해 다른 조작된 구축물과 함께 세포에서 발현된다.

[0117] 이들 구체예 중 일부에서, 조작된 수용체는 Roybal *et al.*, *Cell* (2016) 164:770-79에서 설명된 바와 같은 SynNotch/순차적 AND 게이트를 제공하기 위해 다른 조작된 구축물과 함께 세포에서 발현된다.

[0118] 특정 바람직한 구체예에서, 조작된 수용체는 WO 2017/021701에서 설명된 바와 같이, 평행 CAR (parallel CAR, pCAR)을 제공하기 위해 다른 조작된 구축물과 함께 세포에서 발현된다. pCAR은 하기를 포함하는 2세대 키메라 항원 수용체를 포함할 수 있다:

[0119] (a) 신호전달 영역;

[0120] (b) 공동-자극 신호전달 영역;

[0121] (c) 막횡단 도메인; 및

[0122] (d) 표적 항원의 제1 에피토프와 특이적으로 상호작용하는 결합 요소; 및

[0123] 하기를 포함하는 키메라 공동자극 수용체

[0124] (e) (b)와 상이한 공동-자극 신호전달 영역;

[0125] (f) 막횡단 도메인; 및

[0126] (g) 표적 항원의 제2 에피토프와 특이적으로 상호작용하는 결합 요소.

[0127] 다양한 구체예에서, 조작된 수용체는 조작된 T-세포 수용체이고, 예컨대 WO 2010/026377; WO 2010/133828; WO 2011/001152; WO 20123/013913; WO 2013/041865; WO 2017/109496; WO 2017/163064; 및 WO 2018/234319에서 설명된 것이다.

[0128] 구체예에서, CAR은 종양 베드로 이동하거나 침윤하는 수단을 포함한다. 예를 들어, CAR은 하나 이상의 케모카인 수용체를 포함할 수 있다.

[0129] 추가 조작된 수용체가 포함될 수 있다. 추가 조작된 수용체는 종양 베드로 이동하거나 침윤하는 수단을 포함하도록 설계될 수 있다. 예를 들어, 추가 조작된 수용체는 키메라 사이토카인 수용체 또는 케모카인 수용체를 포함할 수 있다.

[0130] 아래에서 추가로 논의되는 바와 같이, 전술한 것과 같은 임의의 공지된 CAR 디자인 또는 유형은 하나 이상의 ODD의 사용을 통해 및/또는 본 발명의 제1 양상에 따른 저산소증-유도성 조절 서열의 사용을 통해 저산소 조건하에 발현 및 조절 능력을 포함하도록 조절될 수 있다.

[0131] 저산소증-유도성 조절 서열 및 아래에 추가로 논의되는 하나 이상의 ODD의 선택적 포함에 더하여, CAR은 전형적으로 아래 I 내지 IV에 기재된 하기 공지된 성분을 포함할 것이다.

[0132] <u>I. 세포외 항원-특이적 표적화 영역 (또는 항종양 특성을 갖는 폴리펩티드)</u>

[0133] 적어도 하나의 ODD에 더하여, 키메라 폴리펩티드는 항종양 특성을 갖는 적어도 하나의 폴리펩티드를 포함하며, 이는 본 명세서에서 세포외 항원-특이적 표적화 영역으로도 지칭된다. 세포외 항원-특이적 표적화 영역 및 하나 이상의 ODD는 연결될 수 있다.

[0134] 종양으로의 전달을 위한 이러한 단백질은 하기 중 어느 하나 이상을 포함하나 이에 제한되지 않는다: 면역 자극

항체; 세포 활성화 및 종양-사멸 능력을 부여하는 표면 또는 세포내 수용체; T-세포 수용체 (TCR).

[0135] 항원-특이적 표적화 영역은 미리결정된 관심 항원에 결합하는 능력을 CAR에 제공한다. 항원-특이적 표적화 영역은 바람직하게는 임상적 관심 항원을 표적화한다. 항원-특이적 표적화 영역은 생물학적 분자(예: 세포 표면 수용체 또는 이의 성분)를 특이적으로 인식하고 이에 결합하는 능력을 보유하는 임의의 단백질 또는 펩티드일 수 있다. 항원-특이적 표적화 영역은 관심 있는 생물학적 분자에 대한 임의의 자연 발생, 합성, 반합성 또는 재조합적으로 생성된 결합 파트너를 포함한다. 예시적인 항원-특이적 표적화 영역은 항체 또는 항체 단편 또는 유도체, 수용체의 세포외 도메인, 세포 표면 분자/수용체에 대한 리간드, 또는 이의 수용체 결합 도메인, 및 종양 결합 단백질을 포함한다.

[0136] 바람직한 구체예에서, 항원-특이적 표적화 영역은 항체이거나 또는 항체로부터 유래된다. 항체-유래 표적화 도메인은 항체의 단편 또는 항체의 하나 이상의 단편의 유전적으로 조작된 생성물을 포함할 수 있으며, 상기 단편은 항원과의 결합에 관여한다. 예는 가변 영역 (Fv), 상보성 결정 영역 (CDR), Fab, 단일 사슬 항체 (scFv), 중쇄 가변 영역 (VH), 경쇄 가변 영역 (VL) 및 단일-도메인 항체 (VHH)를 포함한다. 항원-특이적 표적화 영역은 추가적으로 또는 대안적으로 모노바디를 포함하거나 또는 이로 구성되거나 또는 이로부터 유래될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 결합 도메인은 단일 사슬 항체 (scFv)이다. scFv는 뮤린, 인간 또는 인간화된 scFv일 수 있다.

[0137] 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 관련된 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"은 항체의 중쇄 또는 경쇄의 가변 영역에서 고도로 가변적인 루프를 지칭한다. CDR은 항원 입체구조와 상호작용하고 항원에 대한 결합을 크게 결정할 수 있다(일부 프레임워크 영역이 결합에 관여하는 것으로 알려져 있음). 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은 각각 3개의 CDR을 함유한다. "중쇄 가변 영역" 또는 "VH"는 프레임워크 영역으로 알려진 플랭킹 스트레치 사이에 개재된 3개의 CDR을 함유하는 항체의 중쇄 단편을 지칭하며, 이는 CDR보다 고도로 보존되고, CDR을 지지하기 위해 스캐폴드를 형성한다. "경쇄 가변 영역" 또는 "VL"은 프레임워크 영역 사이에 개재된 3개의 CDR을 함유하는 항체의 경쇄 단편을 지칭한다.

[0138] "Fv"는 완전한 항원 결합 부위를 보유하는 항체의 가장 작은 단편을 지칭한다. F 단편은 단일 중쇄의 가변 영역에 결합된 단일 경쇄의 가변 영역으로 구성된다. "단일-사슬 Fv 항체" 또는 "scFv"는 직접적으로 또는 펩티드 링커 서열을 통해 서로 연결된 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역으로 구성된 조작된 항체를 지칭한다.

[0139] 미리결정된 항원에 특이적으로 결합하는 CAR의 항원 결합 영역은 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 이러한 방법은 파지 디스플레이, 인간 또는 인간화 항체를 생성하기 위한 방법, 또는 인간 항체를 생산하도록 조작된 트랜스제닉 동물 또는 식물을 사용하는 방법을 포함한다. 부분적으로 또는 완전히 합성된 항체의 파지 디스플레이 라이브러리가 이용가능하며, 표적 분자에 결합할 수 있는 항체 또는 이의 단편에 대해 스크리닝될 수 있다. 인간 항체의 파지 디스플레이 라이브러리도 이용가능하다. 일단 확인되면, 항체를 코딩하는 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열은 분리 및/또는 결정될 수 있다.

[0140] 현재 CAR에 의해 표적화될 수 있는 항원은 고형암과 관련된 세포 상에서 발현되는 항원을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0141] 표적화되는 항원은 이에 제한되지 않으나 하기 및 그의 유도체 및 변이체 중 하나 이상 및 임의의 조합으로부터 선택될 수 있다: 확장된 ErbB 패밀리, Erbb1, Erbb3, Erbb4, Erbb2/HER-2, 뮤신, PSMA, CEA, 메조텔린, GD2, MUC1, 폴레이트 수용체, GPC3, CAIX, FAP, NY-ESO-1, gp100, PSCA, ROR1, PD-L1, PD-L2, EpCAM, EGFRvIII, CD19, GD3, CLL-1, 도관 상피 뮤신(ductal epithelial mucin), Gp36, TAG-72, 글리코핑고리피드, 신경교종-연관 항원, 베타-hCG, AFP (알파-페토프로테인) 및 렉틴-반응성 AFP, 티로글로불린, RAGE (receptor for advanced glycation end products), TERT, 텔로머라제, 카르복실에스테라제, M-CSF, PSA, 서비빈(surviving), PCTA-1, MAGE, CD22, IGF-1, IGF-2, IGF-1 수용체, MHC-연관 종양 펩티드, 5T4, 종양 간질-연관 항원, WT1, MLANA, CA 19-9, BCMA, v6 인테그린, 바이러스-특이적 항원.

[0142] 바람직한 세포외 항원-특이적 표적화 영역은 T1E (Davies *et al.*, 2012, Mol Med 18:565-576), 서열번호 32이다. 기능적 단편 및 이의 변이체도 포함될 수 있으며, 여기에서 상기 변이체는 서열번호 32에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는다.

[0143] T1E 펩티드 (인간 TGFα 및 EGF로부터 유래됨); 서열번호 32

[0144] VVSHFNDCPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKWWELR (서열번호 32).

[0145] II. 세포내 신호전달 도메인 (엔도도메인으로도 지칭함)

[0146] 적합한 세포내 신호전달 도메인은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, Love *et al*. Cold Spring Harbor Perspect. Biol 2010 2(6)l a002485에 예를 들어 리뷰된 바와 같은 면역-수용체-티로신-기반-활성화-모티프(Immune-receptor-Tyrosine-based-Activation-Motif, ITAM)를 포함하는 임의의 영역을 포함한다. 특정 구체예에서, 신호전달 영역은 US 특허 제7,446,190호에 예를 들어 설명된 인간 CD3 [zeta] 사슬의 세포내 도메인, 또는 그의 변이체를 포함한다.

[0147] 세포내 신호전달 도메인은 또한 간접 신호전달을 위한 전사 인자일 수 있다.

[0148] 세포내 도메인은 서열번호 33 또는 이의 기능적 단편 또는 변이체로 표시될 수 있으며, 상기 변이체는 서열번호 33에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는다.

[0149] CD3z 또는 CD3 제타 (세포내 도메인); 서열번호 33

[0150] RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQALPPR (서열번호 33).

[0151] III. 막횡단 도메인

[0152] CAR은 세포막의 표면에서 발현되므로 전형적으로 막횡단 도메인을 포함한다. 적합한 막횡단 도메인은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 유형 I, 유형 II 또는 유형 III 막횡단 단백질 중 임의의 것을 포함하는 막횡단 도메인을 갖는 임의의 단백질로부터의 막횡단 서열을 포함한다. CAR의 막횡단 도메인은 또한 인공 소수성 서열을 포함할 수 있다. CAR의 막횡단 도메인은 이량체화되지 않도록 선택될 수 있다. 적합한 막횡단 도메인은 CD8a, CD28, CD4 또는 CD3 막횡단 도메인을 포함한다.

[0153] 일 구체예에서, 막횡단 도메인은 서열번호 34로 표시되거나 또는 이의 기능적 단편 또는 변이체이며, 상기 변이체는 서열번호 34에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는다.

[0154] CD28 (막횡단 도메인); 서열번호 34

[0155] IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDF AAYRS (서열번호 34).

[0156] IV. 공동-자극 도메인

[0157] 적합한 공동-자극 도메인은 또한 당업계에 잘 알려져 있으며, B7/CD28 패밀리의 멤버, 예컨대 B7-1, B7-2, B7-H1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H6, B7-H7, BTLA, CD28, CTLA-4, Gi24, ICOS, PD-1, PD-L2 또는 PDCD6; 또는 ILT/CD85 패밀리 단백질, 예컨대 LILRA3, LILRA4, LILRB1, LILRB2, LILRB3 또는 LILRB4; 또는 종양 괴사 인자(TNF) 슈퍼패밀리 멤버, 예컨대 4-1BB, BAFF, BAFF R, CD27, CD30, CD40, DR3, GITR, HVEM, LIGHT, 림포톡신-알파, OX40, RELT, TACI, TL1A, TNF-알파 또는 TNF RII; 또는 SLAM 패밀리의 멤버, 예컨대 2B4, BLAME, CD2, CD2F-10, CD48, CD58, CD84, CD229, CRACC, NTB-A 또는 SLAM; 또는 TIM 패밀리의 멤버, 예컨대 TIM-1, TIM-3 또는 TIM-4; 또는 기타 공동-자극 분자, 예컨대 CD7, CD96, CD160, CD200, CD300a, CRTAM, DAP12, Dectin-1, DPPIV, EphB6, 인테그린 알파 4 베타 1, 인테그린 알파 4 베타 7/LPAM-1, LAG-3 또는 TSLP R를 포함한다.

[0158] 구체예들에서, CAR은 복수의 공동-자극 도메인, 예를 들어 2개 이상의 공동-자극 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 공동-자극 도메인은 CD28, 4-1BB 및/또는 OX40로부터 유래된다.

[0159] 구체예들에서, 공동-자극 도메인은 CD28이거나 또는 CD28로부터 유래된다.

[0160] 구체예들에서, 공동-자극 도메인은 4-1BB이거나 또는 4-1BB로부터 유래된다.

[0161] **ODD를 포함하는 키메라 폴리펩티드**

[0162] 일 구체예에 따르면, 저산소증-반응성 조절 핵산은 (i) 하나 이상의 산소-의존적 분해 도메인 (ODD) 및 (ii) 항종양 특성을 갖는 적어도 하나의 폴리펩티드를 포함하는 키메라 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자에 작동가능하게 연결된다.

[0163] ODD는 임의의 ODD-함유 단백질, 예컨대 ATF-4, HIF1-알파, HIF2-알파 및 HIF3-알파로부터 유래될 수 있으며, 이는 인간과 같은 포유동물 공급원으로부터의 것일 수 있거나 인공적으로 생성될 수 있다.

[0164] ODD는 서열번호 28 (X^1X^2LEMLAPYIX$_M$DDD$X^3X^4X^5$)로 표시될 수 있고, 여기에서 "X^{1-5}"은 임의의 아미노산 잔기일 수 있다. 선택적으로, X^1은 "L" 또는 임의의 보존적 치환이고; X^2는 "D" 또는 임의의 보존적 치환이고, X^3은 "F" 또는 임의의 보존적 치환이고, X^4는 "Q" 또는 임의의 보존적 치환이고, X^5는 L 또는 임의의 보존적 치환이다.

[0165] 선택적으로, ODD는 서열번호 29, 30 또는 31로 표시되거나, 서열번호 29, 30 또는 31에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 그의 상동체 또는 변이체일 수 있으며, 상기 상동체 또는 변이체는 서열번호 28을 포함한다.

[0166] 서열번호 29 (HIF1-알파 아미노산 401-603, 서열번호 28은 볼드체로 표시됨)

[0167] APAAGDTIISLDFGSNDTETDDQQLEEVPLYNDVMLPSPNEKLQNINLAMSPLPTAETPKPLRSSADPALNQEVALKLEPNPESLELSFTMPQIQDQTPSPS
DGSTRQSSPEPNSPSEYCFYVDSDMVNEFKLELVEKLFAEDTEAKNPFSTQDTDLD**LEMLAPYIPMDDD**FQLRSFDQLSPLESSSASPESASPQSTVTVFQ

[0168] 서열번호 30 (HIF1-알파 아미노산 530-603, 서열번호 28은 볼드체로 표시됨)

[0169] EFKLELVEKLFAEDTEAKNPFSTQDTDLD**LEMLAPYIPMDDD**FQLRSFDQLSPLESSSASPESASPQSTVTVFQ

[0170] 서열번호 31 (HIF1-알파 아미노산 530-653, 서열번호 28은 볼드체로 표시됨)

[0171] EFKLELVEKLFAEDTEAKNPFSTQDTDLD**LEMLAPYIPMDDD**FQLRSFDQLSPLESSSASPESASPQSTVTVFQQTQIQEPTANATTTTATTDELKTVTKDR
MEDIKILIASPSPTHIHKETTS

[0172] 추가적으로 또는 대안적으로, ODD는 서열번호 29, 30 또는 31, 또는 서열번호 29, 30 또는 31에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖고 서열번호 28을 포함하는 그의 상동체 또는 변이체를 코딩하는 핵산에 의해 코딩될 수 있다.

[0173] 본 명세서에서 정의된 "상동체"는 서열번호 29, 30 또는 31에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖고, 서열번호 27을 포함한다. 이러한 맥락에서 (및 본원의 다른 곳에서 언급된) 동일성은 예를 들어 염기 서열로서 서열번호 29, 30 또는 31으로 BLASTP 컴퓨터 프로그램을 사용하여 결정될 수 있다. BLAST 소프트웨어는 http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi (2009년 3월 12일 액세스 가능)에서 공개적으로 이용가능하다.

[0174] 보다 일반적으로, 달리 언급되지 않는 한, 본 명세서에서 언급된 용어 "변이체"는 사슬 내에 하나 이상의 아미노산이 삽입, 제거 또는 대체된 합성 변이체뿐만 아니라 기본 서열의 자연 발생 다형성 형태인 폴리펩티드 서열을 지칭한다. 변이체는 기본 서열과 유사한 생물학적 효과를 생성한다.

[0175] 아미노산 치환은 광범위하게 유사한 특성을 갖는 동일한 클래스의 다른 아미노산으로 아미노산이 대체되는 "보존적"인 것으로 간주될 수 있다. 비-보존적 치환은 아미노산의 다른 유형 또는 클래스의 아미노산으로 대체되는 경우이다.

[0176] 아미노산 클래스는 다음과 같이 정의된다:

클래스	아미노산 예
비극성:	A, V, L, I, P, M, F, W
비전하 극성:	G, S, T, C, Y, N, Q
산성:	D, E
염기성:	K, R, H.

[0177]

[0178] 통상의 기술자에게 잘 알려진 바와 같이, 보존적 치환에 의해 펩티드의 1차 구조를 변경하는 것은 해당 펩티드의 활성을 크게 변경하지 않을 것이며, 왜냐하면 서열에 삽입된 아미노산의 측쇄는 치환된 아미노산의 측쇄와 유사한 결합 및 접촉을 형성할 수 있기 때문이다. 이는 치환이 펩티드의 입체구조를 결정하는 데 중요한 영역에 있는 경우에도 마찬가지이다.

[0179] 비-보존적 치환도 상기 설명된 폴리펩티드의 기능을 방해하지 않는다면 가능할 수 있다. 광범위하게 말하면, 폴

리펩티드의 생물학적 활성을 변형하지 않고 더 적은 비-보존적 치환이 가능할 것이다.

[0180] 저산소증-반응성 조절 핵산은 하나 이상의 ODD를 포함하는 키메라 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자에 작동가능하게 연결된다. 키메라 폴리펩티드는, 예를 들어, 서열번호 29, 30 및 31, 및 본원에서 정의되고 서열번호 28을 포함하는 그의 상동체 및 변이체 중 어느 하나로 표시된, 적어도 1, 2, 3, 4, 5개 또는 그 이상의 ODD를 포함할 수 있다. 둘 이상의 ODD 사용이 예상되는 경우, 동일한 구축물 또는 별도의 구축물로 제공될 수 있으며; 동일한 구축물에 있는 경우, 순차적이거나 공간적으로 분리될 수 있다.

[0181] 하나 이상의 ODD는 폴리펩티드 또는 핵산 (RNA 포함)의 어느 곳에도 위치할 수 있다. 예를 들어, 이들은 C- 또는 N-말단 또는 폴리펩티드 사슬 사이의 어느 곳에도 위치할 수 있으며, 폴리펩티드 사슬에 직접 부착되거나 또는 링커를 사용하여 폴리펩티드 사슬에 연결되며, 상기 폴리펩티드는 항종양 특성을 갖는다. 적합한 링커는 당업계에 잘 알려져 있으며, 경직되거나 유연할 수 있다. 일 구체예에서, ODD(들)은 CAR에 포함될 수 있고, 선택적으로 CAR의 C-말단 끝에 융합될 수 있다.

[0182] 본 발명의 폴리펩티드 및 이를 코딩하는 핵산, CAR 및 면역반응성 세포는 이중 감지/이중 발현이 가능하며, 즉 고형암 환경에서 발견되는 것과 같은 저산소의 조건 하에 종양-표적화 폴리펩티드의 활성 또는 발현을 유발하지만, 정상산소 환경에서 활성 또는 발현이 거의 또는 전혀 없다. 이것은 본 발명의 제1 양상에서 설명된 저산소증-반응성 조절 핵산에 의해 구동되는 발현과 함께, ODD(들)에 의해 영향을 받는 항종양 특성을 갖는 폴리펩티드의 분해 덕분이다.

[0183] 본 발명의 제1 양상에 따른 저산소증-반응성 조절 핵산은 하나 이상의 산소-의존적 분해 도메인(ODD) 및 항종양 특성을 갖는 적어도 하나의 폴리펩티드를 포함하는 키메라 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자의 발현을 조절할 수 있다. 키메라 폴리펩티드의 발현은 하나 이상의 ODD와 조합된, 조절 서열의 작용 덕분에 저산소증-반응성 방식으로 제어되며, 여기에서 시스템의 엄격성은, 예를 들어, HRE 카피의 수 및/또는 ODD의 수를 조절함으로써 조절될 수 있다.

[0184] 적어도 하나의 ODD에 더하여, 키메라 폴리펩티드는 항종양 특성을 갖는 적어도 하나의 폴리펩티드를 포함한다. 종양으로의 전달을 위한 이러한 단백질은, 하기 중 어느 하나 이상을 포함하나, 이에 제한되지 않는다: 면역 자극 항체; 세포 활성화 및 종양-사멸 능력을 부여하는 표면 또는 세포내 수용체; T-세포 수용체 (TCR), NK 수용체, Toll유사 수용체. 또한, 항종양 특성을 갖는 폴리펩티드와 결합하는 공동-수용체도, 예를 들어, 세포내 신호전달을 촉진하기 위해, 포함된다.

[0185] 일 구체예에 따르면, 핵산에 의해 코딩되는 키메라 폴리펩티드는 CAR 폴리펩티드 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 본 발명의 추가 양상은 CAR을 제공하며, 이의 발현은 본 발명의 제1 양상에 따른 조절 핵산 서열에 의해 구동되며, 상기 CAR은 또한 하나 이상의 ODD 및 항종양 특성을 갖는 적어도 하나의 폴리펩티드를 포함한다.

[0186] 본 발명에 따른 CAR의 예는 아래에 제공되며, 아미노산 서열 (서열번호 35) 및 상응하는 뉴클레오티드 서열 (서열번호 36)이 제시되고, 여기에서 CSF1-R 리더 서열 (선택적인 추가 글리신을 포함함)은 볼드 및 밑줄로 표시되고, T1E 펩티드 (인간 TGF 및 EGF에서 유래됨)는 볼드체로 표시되고; CD28 (세포외, 막횡단 및 세포내 도메인)은 이탤릭체로 표시되고; CD3 세포내 도메인은 밑줄표시되고, ODD 도메인 (인간 HIF1-알파)는 회색 음영으로 표시된다.

[0187] T1E28z CAR 및 융합된 ODD 아미노산 서열 (서열번호 35)

[0188] **MGPGVLLLLLVATAWHGQG(G)VVSHFNDCPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYAC**
NCVVGYIGERCQYRDLKWWELRAAA*IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIIHVKGKHLCPSPLFP*
GPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYA
*PPRDFAAYRS*RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGK
PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALH
MQALPPRAPAAGDTIISLDFGSNDTETDDQQLEEVPLYNDVMLPSPNEKLQNINLAMSPL
PTAETPKPLRSSADPALNQEVALKLEPNPESLELSFTMPQIQDQTPSPSDGSTRQSSPEPNS
PSEYCFYVDSDMVNEFKLELVEKLFAEDTEAKNPFSTQDTDLDLEMLAPYIPMDDDFQL
RSFDQLSPLESSSASPESASPQSTVTVFQ

[0189] 상응하는 뉴클레오티드 서열 (서열번호 36)

ATGGGCCCAGGAGTTCTGCTGCTCCTGCTGGTGGCCACAGCTTGGCATGGTCAGGGAGGTGT
GGTGTCGCACTTCAATGACTGTCCACTGTCGCACGATGGATACTGCCTCCATGATGGTGTGT
GCATGTACATCGAGGCATTGGACAAGTATGCATGCAACTGTGTCGTCGGCTACATCGGAGA
GCGATGTCAGTACCGAGACCTGAAGTGGTGGGAACTGAGAGCGGCCGC*AATTGAAGTTATGTA*
TCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTT
GTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCT
GGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGG
CTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAG
*CCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC*AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGAcg
CCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGT
ACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAAC
CCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGG
ATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCAC
CAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGCCCCAGCCGCTGGAGACAC
AATCATATCTTTAGATTTTGGCAGCAACGACACAGAAACTGATGACCAGCAACTTGAGGAAGTACCA
TTATATAATGATGTAATGCTCCCCTCACCCAACGAAAAATTACAGAATATAAATTTGGCAATGTCTCC
ATTACCCACCGCTGAAACGCCAAAGCCACTTCGAAGTAGTGCTGACCCTGCACTCAATCAAGAAGTT
GCATTAAAATTAGAACCAAATCCAGAGTCACTGGAACTTTCTTTTACCATGCCCCAGATTCAGGATCA
GACACCTAGTCCTTCCGATGGAAGCACTAGACAAAGTTCACCTGAGCCTAATAGTCCCAGTGAATAT
TGTTTTTATGTGGATAGTGATATGGTCAATGAATTCAAGTTGGAATTGGTAGAAAAACTTTTTGCTGA
AGACACAGAAGCAAAGAACCCATTTTCTACTCAGGACACAGATTTAGACTTGGAGATGTTAGCTCCC
TATATCCCAATGGATGATGACTTCCAGTTACGTTCCTTCGATCAGTTGTCACCATTAGAAAGCAGTTC
CGCAAGCCCTGAAAGCGCAAGTCCTCAAAGCACAGTTACAGTATTCCAG

[0190]

[0191] 폴리뉴클레오티드

[0192] 본 발명의 일 양상에 따르면, 키메라 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자가 제공되며, 상기 키메라 폴리펩티드는 CAR을 포함할 수 있다.

[0193] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 DNA 또는 RNA를 포함할 수 있다. 이들은 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있다. 수많은 상이한 폴리뉴클레오티드가 유전자 코드의 축퇴의 결과로서 동일한 폴리펩티드를 코딩할 수 있다는 것이 통상의 기술자에 의해 이해될 것이다. 또한, 통상의 기술자는, 일상적인 기술을 사용하여, 본 발명의 폴리펩티드가 발현될 임의의 특정 숙주 유기체의 코돈 사용을 반영하기 위해 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 폴리펩티드 서열에 영향을 미치지 않는 뉴클레오티드 치환을 만들 수 있음이 이해되어야 한다.

[0194] 폴리뉴클레오티드는 당업계에서 이용가능한 임의의 방법에 의해 변형될 수 있다. 이러한 변형은 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 생체 내(*in vivo*) 활성 또는 수명을 향상시키기 위해 수행될 수 있다.

[0195] DNA 폴리뉴클레오티드와 같은 폴리뉴클레오티드는 재조합적으로, 합성적으로 또는 통상의 기술자에게 이용가능한 임의의 수단에 의해 생산될 수 있다. 이들은 또한 표준 기술에 의해 클로닝될 수 있다.

[0196] 더 긴 폴리뉴클레오티드는 일반적으로 재조합 수단을 사용하여, 예를 들어 중합효소 연쇄 반응(PCR) 클로닝 기술을 사용하여 생산될 것이다. 이것은 클로닝하려는 표적 서열의 측면에 있는 한 쌍의 프라이머(예: 약 15 내지 30개 뉴클레오티드)를 제조하는 것, 프라이머를 동물 또는 인간 세포에서 얻은 mRNA 또는 cDNA와 접촉시키는 것, 설계된 영역의 증폭을 야기하는 조건 하에 중합효소 연쇄 반응을 수행하는 것, 증폭된 단편을 분리하는 것(예: 아가로스 겔로 반응 혼합물을 정제하는 것에 의함) 및 증폭된 DNA를 회수하는 것을 수반할 것이다. 프라이머는 증폭된 DNA가 적절한 벡터로 클로닝될 수 있도록 적절한 제한효소 인식 부위를 함유하도록 설계될 수 있다.

[0197] 본 폴리뉴클레오티드는 선택 마커를 코딩하는 핵산 서열을 추가로 포함할 수 있다. 적절한 선택 마커는 당업계에 잘 알려져 있으며, 형광 단백질 - 예컨대 녹색 형광 단백질 (GFP)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 선택 마커를 코딩하는 핵산 서열은 폴리시스트론 핵산 구축물의 형태로 본 CAR을 코딩하는 핵산 서열과 조합되어 제공될 수 있다. 이러한 핵산 구축물은 벡터로 제공될 수 있다.

[0198] CAR 및 선택 마커를 코딩하는 핵산 서열은 별개의 실체로서 각 폴리펩티드의 발현을 가능하게 하는 동시-발현 부위에 의해 분리될 수 있다. 적합한 동시-발현 부위는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 내부 리보솜 진입 부위 (internal ribosome entry sites, IRES) 및 자가-절단 펩티드를 포함한다.

[0199] 추가의 적합한 동시-발현 부위/서열은 자가-절단 또는 절단 도메인을 포함한다. 이러한 서열은 단백질 생산 동안 자동-절단 되거나, 또는 세포에 존재하는 일반적인 효소에 의해 절단될 수 있다. 따라서, 폴리펩티드 서열에 이러한 자가-절단 또는 절단 도메인의 포함은 제1 및 제2 폴리펩티드가 단일 폴리펩티드로 발현이 가능하도록 하고, 이는 후속적으로 절단되어 별개의 분리된 기능적 폴리펩티드를 제공한다.

[0200] 선택 마커의 사용은 유리하며, 이는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터가 성공적으로 도입된(코딩된 CAR이 발현되도록) 세포를 일반적인 방법, 예를 들어 유세포 분석을 사용하여 출발 세포 집단으로부터 선택되고 분리되도록 하기 때문이다.

[0201] 코돈 최적화

[0202] 본 발명에서 사용된 폴리뉴클레오티드는 코돈-최적화될 수 있다. 코돈 최적화는 WO 1999/41397 및 WO 2001/79518에서 이전에 설명되었다. 상이한 세포는 특정 코돈의 사용법에 차이가 있다. 이 코돈 편향은 세포 유형에서 특정 tRNA의 상대적 풍부도에서의 편향에 해당한다. 서열의 코돈을 변경하여 상응하는 tRNA의 상대적 풍부도와 일치하도록 맞춤화함으로써, 발현을 증가시킬 수 있다. 같은 이유로, 상응하는 tRNA가 특정 세포 유형에서 드문 것으로 공지된 코돈을 의도적으로 선택함으로써 발현을 감소시키는 것이 가능하다. 따라서, 추가 정도의 번역 제어가 이용가능하다.

[0203] 벡터

[0204] 본 발명의 추가 양상은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터를 제공한다.

[0205] 벡터는 한 환경에서 다른 환경으로 엔티티를 이동할 수 있도록 하거나 용이하게 하는 도구이다. 본 발명에 따르면, 그리고 예로서, 재조합 핵산 기술에 사용되는 일부 벡터는 핵산의 세그먼트 (예: 이종 DNA 세그먼트, 예컨대 이종 cDNA 세그먼트)와 같은 엔티티가 표적 세포로 이동되도록 한다. 벡터는 비바이러스성 또는 바이러스성일 수 있다. 재조합 핵산 기술에 사용되는 벡터의 예는 플라스미드, mRNA 분자 (예: 시험관 내 전사된 mRNA), 염색체, 인공 염색체 및 바이러스를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 벡터는 또한, 예를 들어, 네이키드 (naked) 핵산 (예: DNA)일 수 있다. 가장 단순한 형태의 벡터는 그 자체가 관심 뉴클레오티드일 수 있다.

[0206] 본 발명에서 사용되는 벡터는, 예를 들어, 플라스미드, mRNA 또는 바이러스 벡터일 수 있으며, 폴리뉴클레오티드의 발현을 위한 프로모터 및 선택적으로 프로모터의 조절자를 포함할 수 있다.

[0207] 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터는 형질전환 및 형질도입과 같은 당업계에 공지된 다양한 기술을 사용하여 세포 내로 도입될 수 있다. 여러 기술이 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 재조합 바이러스 벡터, 예컨대 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 배큘로바이러스 및 단순포진바이러스 벡터; 핵산의 직접 주입 및 생물학적 형질전환이 있다.

[0208] 비바이러스성 전달 시스템은 DNA 형질감염 방법을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 여기에서, 형질감염은 비바이러스 벡터를 사용하여 유전자를 표적 세포에 전달하는 과정을 포함한다.

[0209] 전형적인 형질감염 방법은 전기천공법, DNA 바이오리스틱, 지질-매개 형질감염, 압축 DNA-매개 형질감염, 리포좀, 면역리포좀, 리포펙틴, 양이온성 제제-매개 형질감염, CFAs (cationic facial amphiphiles) (*Nat. Biotechnol.* (1996) 14: 556) 및 이의 조합을 포함한다.

[0210] 형질감염을 위한 다른 방법은 DNA, RNA, mRNA, 단백질, 플라스미드, 트랜스포사제 활성을 갖는 단백질, DNA를 절단하는 능력을 갖는 단백질 (예: sgRNAs (small guide RNAs)에 결합된 Cas 단백질, 핵산 편집용 분자, 예컨대 Cas9 단백질 단독 또는 가이드 RNA (gRNA)에 연결된 Cas9단백질)을 포함한다.

[0211] 핵산을 편집하기 위한 다양한 방법, 예를 들어 유전자 녹아웃, 녹-인 또는 유전자의 발현이 하향조절되거나 과발현되도록 유발하기 위한, 또는 하나 이상의 결실, 삽입 또는 치환의 형태로 돌연변이를 유도하기 위한 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 다양한 뉴클레아제 시스템의 사용, 예컨대 ZFN (zinc finger nucleases), TALEN (transcription activator-like effector nucleases), 메가뉴클레아제 또는 이들의 조합이 핵산 편집에 대해 당업계에 공지되어 있으며, 본 발명에서 사용될 수 있다. 최근에는, CRISPR (the clustered regularly interspersed short palindromic repeats)/CRISPR-연관 (Cas) (CRISPR/Cas) 뉴클레아제 시스템이 게놈 조작에 보다 일반적으로 사용되었다. CRISPR/Cas 시스템은, 예를 들어 WO2013/176772, WO2014/093635 및 WO2014/089290에 상세히 설명되어 있다.

[0212] 예를 들어, CRISPR/Cas9은 Cas9에 대한 결합 부위 및 변형될 영역에 특이적인 표적화 서열을 갖는 가이드 RNA

(gRNA) 서열을 포함할 수 있다. Cas9은 gRNA에 결합하여 표적 영역에 결합하고 절단하는 리보핵단백질을 형성한다. CRISPR/Cas 9 플랫폼 (유형 II CRISPR/Cas 시스템) 외에도, 유형 I CRISPR/Cas 시스템, 유형 III CRISPR/Cas 시스템, 및 유형 V CRISPR/Cas 시스템을 포함하는 대체 시스템이 존재한다. 임의의 상기 CRISPR 시스템을 사용하여 본 발명의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터를 제조할 수 있다.

[0213] 면역반응성 세포

[0214] 본 발명의 추가 양상은 하나 이상의 산소-의존적 분해 도메인 (ODD) 및 항종양 특성을 갖는 적어도 하나의 폴리펩티드를 포함하는 키메라 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 면역반응성 세포를 제공한다. 다수의 핵산이 IRES 또는 자가-절단 2A 펩티드에 의해 분리된, 바이시스트론 또는 폴리시스트론 벡터의 형태로 상기 저산소증-반응성 조절 핵산에 작동가능하게 연결될 수 있다. 추가 양상에서, 본 발명은 면역반응성 세포에서 하나 이상의 산소-의존적 분해 도메인 (ODD) 및 항종양 특성을 갖는 적어도 하나의 폴리펩티드를 포함하는 CAR을 제공한다.

[0215] 일 구체예에서, 면역반응성 세포는 CAR(들)을 코딩하는 핵산을 발현할 수 있다. 이들 세포는 "조작된 세포"이며, 이는 세포가 세포에 의해 자연적으로 코딩되지 않는 폴리뉴클레오티드를 포함하거나 발현하도록 변형되었음을 의미한다. 대안적으로, 조작된 세포는 자연적으로 발현된 폴리뉴클레오티드를 과발현하거나 또는 자연 발현을 감소/침묵시키도록 (예를 들어, shRNA로 녹다운) 변형될 수 있다. 세포를 조작하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 세포의 유전적 변형, 예를 들어 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 형질도입과 같은 형질도입, 리포펙션, 폴리에틸렌글리콜, 인산칼슘 및 전기천공을 포함한 형질감염 (예컨대 일시적 형질감염 - DNA 또는 RNA 기반)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 임의의 적합한 방법을 사용하여 핵산 서열을 세포 내로 도입할 수 있다.

[0216] 따라서, 본 명세서에서 설명된 CAR을 코딩하는 핵산 분자는 상응하는 비변형 세포에 의해 자연적으로 발현되지 않는다. 적합하게는, 조작된 세포는 그의 게놈이, 예를 들어 형질도입 또는 형질감염에 의해, 변형된 세포이다. 적합하게는, 조작된 세포는 그의 게놈이 레트로바이러스 형질도입에 의해 변형된 세포이다. 적합하게는, 조작된 세포는 그의 게놈이 렌티바이러스 형질도입에 의해 변형된 세포이다.

[0217] 본 명세서에서 사용된 용어 "도입된"은 외래 DNA 또는 RNA를 세포 내로 삽입하는 방법을 지칭한다. 본 명세서에서 사용된 용어 도입된은 형질도입 및 형질감염 방법을 모두 포함한다. 형질감염은 비바이러스성 방법에 의해 핵산을 세포 내로 도입하는 과정이다. 형질도입은 바이러스성 벡터를 통해 외래 DNA 또는 RNA를 세포 내로 도입하는 과정이다. 본 발명에 따른 조작된 세포는 바이러스 벡터로 형질도입, DNA 또는 RNA로 형질감염을 포함하는 많은 수단 중 하나에 의해 본 명세서에서 설명된 CAR을 코딩하는 DNA 또는 RNA를 도입함으로써 생성될 수 있다. 세포는 본 명세서에서 설명된 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 도입 이전 또는 도입 후에 활성화 및/또는 확장될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 "활성화된"은 세포가 자극되어 세포가 증식하도록 하는 것을 의미한다. 본 명세서에서 사용된 "확장된"은 세포 또는 세포의 집단이 증식하도록 유도되었음을 의미한다. 세포의 집단의 확장은 예를 들어 집단에 존재하는 세포의 수를 계수함으로써 측정될 수 있다. 세포의 표현형은 유세포 분석과 같은 당업계에 공지된 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0218] 하나 이상의 ODD 및 항종양 특성을 갖는 적어도 하나의 폴리펩티드를 포함하는 키메라 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자는, 임의의 포유동물 세포, 바람직하게는 면역반응성 세포 또는 종양 세포에 포함될 수 있다. 세포는 시험관 내(*in vitro*) 또는 생체 내(*in vivo*)일 수 있다. 면역반응성 세포는 키메라 폴리펩티드를 포함할 수 있으며, 이는 그 자체로 키메라 항원 수용체 (CAR)에 포함될 수 있고, 여기에서 CAR은 저산소의 조건 하에 발현되며, 정상산소 조건 하에 실질적으로 발현되지 않는다.

[0219] 적합한 면역반응성 세포는 림프계-유래 세포, 예컨대 자연 살해 세포, NK T-세포, 불변 NKT-세포, 또는 T-세포, 예컨대 세포독성 T-세포, 헬퍼 T-세포 또는 조절 T-세포; αβ T-세포, γδ T-세포, B-세포, 또는 골수계-유래 세포, 예컨대 대식세포 또는 호중구; 줄기 세포, 유도 만능 줄기 세포 (iPSC)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0220] 적합하게는, 면역반응성 세포, 예컨대 T-세포는 개체로부터 수득된 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)로부터 분리된다. 적합하게는 상기 개체는 포유동물, 바람직하게는 인간이다. 면역반응성 세포는 "기성 제품(off the shelf)" CAR T-세포의 경우에 선택적으로 동종이형일 수 있으며, 여기에서 T 세포는 반드시 암을 갖는 개체로부터 유래되는 것은 아니다 (예를 들어 Depil *et al.*, 2020 (Nature Reviews Drug Discovery) 참조).

[0221] 적합하게는 세포는 개체와 일치하거나 자가조직이다. 세포는 환자 자신의 말초 혈액으로부터 (제1자) 또는 기증

자 말초 혈액으로부터의 조혈모세포 이식의 환경에서 (제2자) 또는 연결되지 않은 기증자의 말초 혈액 (제3자)에서 생체 외(*ex vivo*)에서 생성될 수 있다. 적합하게는 세포는 개체와 일치하거나 자가 조직이다.

[0222] 본 발명의 추가 양상은 본 발명의 방법에 의해 수득가능하거나 수득된 면역반응성 세포, 특히 T-세포, 및 이를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0223] 면역반응성 세포의 제조 방법

[0224] 본 발명의 추가 양상에서, 면역반응성 세포를 제조하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 하기를 포함한다:

[0225] - 개체 (암 환자 또는 건강한 기증자일 수 있음)로부터 림프계-유래 세포 또는 골수계-유래 세포를 분리하는 단계;

[0226] - 본 명세서에서 설명된 핵산 분자 및/또는 CAR을 도입하도록 상기 세포를 변형하는 단계;

[0227] - 상기 변형된 세포를 생체 외(*ex-vivo*)에서 확장하는 단계;

[0228] - 저산소의 조건 하에 핵산 분자 및/또는 CAR을 발현할 수 있는 세포를 얻는 단계.

[0229] 핵산 분자 또는 CAR의 발현은 본 명세서에서 정의된 바와 같은 복수의 HRE를 포함하는 저산소증-반응성 조절 핵산에 의해 구동된다.

[0230] 본 발명의 면역반응성 세포는 바이러스 벡터로 형질도입, DNA 또는 RNA로 형질감염을 포함하는 많은 수단 중 하나에 의해, 본 명세서에서 정의된 바와 같은 핵산 분자 및/또는 CAR(들)을 코딩하는 DNA 또는 RNA를 도입함으로써 생성될 수 있다.

[0231] 본 발명의 세포는 본 명세서에서 정의된 바와 같은 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 세포에 (예를 들어 형질도입 또는 형질감염에 의해) 도입함으로써 제조될 수 있다. 적합하게는, 상기 세포는 개체로부터 분리된 샘플에서 유래될 수 있다.

[0232] 본 발명의 추가 양상은 본 발명의 방법에 의해 수득가능한 면역반응성 세포, 및 이를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0233] 약학적 조성물

[0234] 약학적 조성물은 치료적 유효량의 약학적 활성제를 포함하거나, 이로 필수적으로 구성되거나 또는 이로 구성되는 조성물이며, 상기 약학적 활성제는 여기에서 변형된 면역반응성 세포이다. 이는 바람직하게는 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제 (이의 조합을 포함함)를 포함한다. 치료 용도로 허용가능한 담체 또는 희석제는 잘 알려져 있으며, 예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., (A. R. Gennaro edit. 1985)에 설명된다. 약학적 담체, 부형제 또는 희석제의 선택은 의도된 투여 경로 및 표준 약학 기준과 관련하여 선택될 수 있다. 약학적 조성물은 담체, 부형제 또는 희석제로서 또는 이에 더하여 임의의 적합한 결합제(들), 윤활제(들), 현탁제(들), 코팅제(들) 또는 가용화제(들)을 포함할 수 있다.

[0235] 약학적으로 허용가능한 담체의 예는, 예를 들어, 물, 염 용액, 알코올, 실리콘, 왁스, 페트로리움 젤리, 식물성 오일, 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 리포좀, 당, 젤라틴, 락토스, 아밀로스, 마그네슘 스테아레이트, 탈크, 계면활성제, 규산, 점성 파라핀, 향유, 지방산 모노글리세리드 및 디글리세리드, 페트로에트랄 지방산 에스테르, 히드록시메틸-셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈 등을 포함한다.

[0236] 치료 방법

[0237] 본 발명의 추가 양상은 본 발명의 면역반응성 세포를 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 종양의 치료 방법을 제공한다.

[0238] 본 명세서에서 설명된 치료에 적합한 개체는 포유동물, 예컨대 인간, 비인간 영장류, 소, 말, 돼지, 양, 염소, 개, 고양이, 토끼 또는 설치류를 포함한다. 바람직한 구체예에서, 개체는 인간이다. 다른 포유동물 개체, 특히 인간에서 치료 효능을 입증하기 위한 모델로서 통상적으로 사용되는 포유동물 (예: 뮤린, 영장류, 돼지, 개 또는 토끼 동물)에서의 본 명세서에서 설명된 방법의 실시도 포함된다. 표준 용량-반응 연구는 투여량 및 투여 일정을 최적화하기 위해 사용된다.

[0239] "투여"는 임의의 다양한 공지된 방법 및 전달 시스템을 사용하여 개체에 면역반응성 세포를 물리적으로 도입하는 것을 지칭한다. 예는 종양내 (intratumoural (i.t.)), 정맥내 (intravenous (i.v.)), 근육내, 피하,

복강내, 흉막내, 척추, 흉막 삼출 (pleural effusion) 또는 기타 비경구 투여 경로, 예를 들어 주사 또는 주입에 의한 것을 포함한다. 본 명세서에서 사용된 문구 "비경구 투여"는 일반적으로 주사에 의한 장내 및 국소 투여 이외의 투여 방식을 의미하며, 정맥내, 근육내, 동맥내, 척추강내, 림프내, 병변내, 피막내, 강내, 안와내, 심장내, 피내, 복강내, 기관경유, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입, 및 생체 내(*in vivo*) 전기천공을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 투여는 또한, 예를 들어 1회, 복수회, 및/또는 하나 이상의 연장된 기간에 걸쳐 수행될 수 있다.

[0240] 면역반응성 세포는 표적 세포 집단에 대한 T-세포 매개 면역 반응을 자극하기 위한 요법 또는 예방적 치료에 유용하다. 본 발명은 이를 필요로 하는 개체에서 표적 세포 집단에 대한 T-세포 매개 면역 반응을 자극하는 방법을 추가로 제공하며, 상기 방법은 환자에게 상기 설명된 면역반응성 세포의 집단을 투여하는 단계를 포함한다.

[0241] 면역반응성 세포는 고형암의 치료에 특히 유용하다. 본 발명에 따른 CAR-기반 항암 면역요법에서, T-림프구는 암 환자 (또는 건강한 기증자)로부터 분리되고, 예를 들어 레트로/렌티-바이러스 벡터에 의해 변형 및 생체 외(*ex-vivo*) 확장되어 세포 표면에서 CAR 분자를 구성적으로 발현하며, 종양 세포에 의해 표면에 발현된 종양-연관 항원 (tumour-associated antigen, TAA)에 대한 결합 특이성을 갖고, 그 다음 환자 내로 재주입된다 (도 1). 그 결과, 환자 자가 T-세포 및/또는 비-환자 유래 동종이형 T-세포의 큰 집단이 암성 세포를 사멸시키는 방향으로 재지정된다. 또한, CAR의 이중 산소 감지 특성은 표적외 효과를 감소 또는 제거되도록 하고 (ODD(들)의 활성과 함께 저산소증 반응성 프로모터의 사용을 통해), 더 나아가, 통상적인 구성적 레트로바이러스 프로모터와 비교하여 저산소증-반응성 프로모터의 예기치 않게 증가된 강도로 인해 종양 부위에서 항종양 폴리펩티드의 발현이 증가한다.

[0242] 질병을 치료하는 방법은 본 발명의 면역반응성 세포의 치료적 용도에 관한 것이다. 이와 관련하여, 세포는 기존 질병 또는 상태를 갖는 개체에게 투여되어 질병과 연관된 적어도 하나의 증상을 경감, 감소 또는 개선하고/하거나 질병의 진행을 늦추거나, 감소 또는 차단할 수 있다.

[0243] 치료 방법은 본 발명의 세포의 예방적 용도를 포함할 수 있다. 이와 관련하여, 세포는 아직 질병에 걸리지 않고/않거나 질병의 어떤 증상도 나타나지 않은 개체에게 투여되어 질병의 원인은 예방 또는 손상시키거나 또는 질병과 연관된 적어도 하나의 증상의 발병을 감소 또는 예방할 수 있다. 개체는 질병에 대한 소인이 있거나 또는 발병할 위험이 있는 것으로 생각될 수 있다.

[0244] 치료 방법은 T-세포를 사용하여 수행될 필요는 없지만, 다른 적합한 면역반응성 세포, 예컨대 림프계-유래 세포, 예컨대 자연 살해 세포, B-세포, 불변 NKT-세포 또는 T-세포, 예컨대 세포독성 T-세포, 헬퍼 T-세포 또는 조절 T-세포; 또는 골수계-유래 세포, 예컨대 대식세포 또는 호중구를 사용하여 수행될 수 있다.

[0245] 개시된 방법은 암 치료, 예를 들어, 완전한 암 소멸을 포함하는 암 성장의 억제, 암 전이 억제, 및 암 내성 촉진에 유용하다. 용어 "암 성장"은 일반적으로 암 내에서 보다 발달된 형태로의 변화를 시사하는 여러 지표 중 어느 하나를 지칭한다. 암 성장의 억제를 측정하기 위한 지표는 암 세포 생존의 감소, 암 부피 또는 형태의 감소 (예를 들어, 컴퓨터 단층촬영 (CT), 초음파 촬영 또는 기타 이미징 방법을 사용하여 결정됨), 지연된 종양 성장, 종양 혈관구조의 파괴, 지연된 과민성 피부 검사의 개선된 성능, 세포용해성 T-림프구의 활성의 증가, 및 종양-특이적 항원 수준의 감소를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 용어 "암 내성"은 암 성장, 특히 이미 갖고 있는 암의 성장에 저항하는 개체의 개선된 능력을 지칭한다. 즉, 용어 "암 내성"은 개체에서 암 성장에 대한 감소된 경향을 지칭한다.

[0246] 암을 갖는 개인의 암세포는 개인의 정상 체세포와 면역학적으로 구별될 수 있다. 예를 들어, 암세포는 개인의 정상 체세포에 의해 발현되지 않는 항원 (즉, 종양 항원)을 발현할 수 있다. 종양 항원은 당업계에 잘 알려져 있으며, 본 명세서에서 더 상세히 설명되어 있다.

[0247] 다양한 유형의 암이 당업계에 공지되어 있다. 암은 전이성 또는 비-전이성일 수 있다. 암은 가족성 또는 산발성일 수 있다. 일부 구체예에서, 암은 백혈병 및 다발성 골수종으로 구성된 군으로부터 선택된다. 본 발명의 방법을 사용하여 치료될 수 있는 추가 암은, 예를 들어, 양성 및 악성 고형 종양 및 양성 및 악성 비-고형 종양을 포함한다.

[0248] 예를 들어, 암은 고형 종양, 예를 들어, 암종 또는 육종을 포함할 수 있다.

[0249] 암종은, 조직 주변을 침윤, 예를 들어, 침입하여 전이를 일으키는 상피 세포로부터 유래된 악성 신생물을 포함한다. 선암종은 선 조직으로부터, 또는 인식가능한 선 구조를 형성하는 조직으로부터 유래된 암종이다.

[0250] 치료될 수 있는 암종은 부신피질(adrenocortical) 암종, 선방(acinar) 암종, 선방세포(acinic cell) 암종, 선방상(acinous) 암종, 샘낭(adenocystic) 암종, 선양낭포(adenoid cystic) 암종, 선양편평세포(adenoid squamous cell) 암종, 선암종(cancer adenomatosum), 샘평편상피(adenosquamous) 암종, 부속기관(adnexel) 암종, 부신피질의 암(cancer of adrenal cortex), 부신겉질샘(adrenocortical) 암종, 알도스테론-생성(aldosterone-producing) 암종, 알도스테론-분비(aldosterone-secreting) 암종, 폐포(alveolar) 암종, 폐포상피(alveolar cell) 암종, 법랑모세포(ameloblastic) 암종, 팽대부(ampullary) 암종, 갑상선의 역형성암(anaplastic cancer of thyroid gland), 아포크린(apocrine) 암종, 기저세포(basal cell) 암종, 기저세포(basal cell) 암종, 폐포(alveolar) 암종, 면포기저세포(comedo basal cell) 암종, 낭포성기저세포(cystic basal cell) 암종, 피부경화증-유사 기저세포(morphea-like basal cell) 암종, 다중심성기저세포(multicentric basal cell) 암종, 결절-궤양 기저세포(nodulo-ulcerative basal cell) 암종, 색소성기저세포(pigmented basal cell) 암종, 경화성기저세포(sclerosing basal cell) 암종, 표재성기저세포(superficial basal cell) 암종, 기저양(basaloid) 암종, 기저편평세포(basosquamous cell) 암종, 담관(bile duct) 암종, 간외담관(extrahepatic bile duct) 암종, 간내담관(intrahepatic bile duct) 암종, 세기관지(bronchioalveolar) 암종, 세기관지성(bronchiolar) 암종, 기관지폐포(bronchioloalveolar) 암종, 기관지폐포(bronchoalveolar) 암종, 기관지폐포세포(bronchoalveolar cell) 암종, 기관지 생성(bronchogenic) 암종, 대뇌모양(cerebriform) 암종, 담관세포(cholangiocelluarl) 암종, 융모막(chorionic) 암종, 맥락막 신경총(choroids plexus) 암종, 투명세포(clear cell) 암종, 배설강생성 항문(cloacogenic anal) 암종, 콜로이드(colloid) 암종, 면포(comedo) 암종, 차궁체부(corpus) 암종, 자궁내막암(cancer of corpus uteri), 코르티솔-생성(cortisol-producing) 암종, 면상(cribriform) 암종, 원통형(cylindrical) 암종, 원통형 세포(cylindrical cell) 암종, 관(duct) 암종, 관성(ductal) 암종, 전립선의 관암(ductal cancer of the prostate), DCIS (ductal cancer in situ), 에크린(eccrine) 암종, 배아(embryonal) 암종, 암 엔 퀘라세(cancer en cuirasse), 자궁내막(endometrial) 암종, 자궁내막암(cancer of endometrium), 자궁내막(endometroid) 암종, 표피양(epidermoid) 암종, 혼합 종양외 암(cancer ex mixed tumour), 다형선종외 암(cancer ex pleomorphic adenoma), 외장성(exophytic) 암종, 섬유층판(fibrolamellar) 암종, 섬유성암(cancer fibro ' sum), 갑상선의 여포암(follicular cancer of thyroid gland), 위(gastric) 암종, 젤라틴형(gelatinform) 암종, 젤라틴상(gelatinous) 암종, 거대세포(giant cell) 암종, 갑상선 거대세포암(giant cell cancer of thyroid gland), 거대세포암(cancer gigantocellulare), 선(glandular) 암종, 과립상 세포(granulose cell) 암종, 간세포(hepatocellular) 암종, 허들세포(Hurthle cell) 암종, 부신모양(hypernephroid) 암종, 영아 배아(infantile embryonal) 암종, 섬세포 암종(islet cell carcinoma), 유방의 염증성 암(inflammatory cancer of the breast), 원위치발생암(cancer in situ), 도관내(intraductal) 암종, 표피내(intraepidermal) 암종, 상피내(intraepithelial) 암종, 청소년 배아(juvenile embryonal) 암종, 쿨치츠키세포(Kulchitsky-cell) 암종, 대세포(large cell) 암종, 연수막(leptomeningeal) 암종, 소엽(lobular) 암종, 침윤 소엽(infiltrating lobular) 암종, 침윤성 소엽(invasive lobular) 암종, LCIS (lobular cancer in situ), 림프상피(lymphoepithelial) 암종, 수질암(cancer medullare), 수질(medullary) 암종, 갑상선의 수질암(medullary cancer of thyroid gland), 수질 갑상선(medullary thyroid) 암종, 흑색증(melanotic) 암종, 수막(meningeal) 암종, 메르켈세포(Merkel cell) 암종, 형이상세포(metatypical cell) 암종, 미세유두(micropapillary) 암종, 점액성(mucinous) 암종, 암 점막(cancer muciparum) 암종, 암 점막세포(cancer mucocellulare) 암종, 점막표피양(mucoepidermoid) 암종, 암 점막(cancer mucosum) 암종, 점액(mucous) 암종, 비인두(nasopharyngeal) 암종, 피부의 신경내분비암(neuroendocrine cancer of the skin), 비침윤성(noninfiltrating) 암종, 비-소세포 암종, NSCLC (non-small cell lung cancer), 귀리세포(oat cell) 암종, 골화성 암(cancer ossificans), 뼈모양(osteoid) 암종, 파제트(Paget's) 암종, 유두상(papillary) 암종, 갑상선 유두암(papillary cancer of thyroid gland), 팽대부주위(periampullary) 암종, 전이 전(preinvasive) 암종, 가시세포(prickle cell) 암종, 원발성 골내(primary intrasseous) 암종, 신장세포(renal cell) 암종, 반흔(scar) 암종, 주혈흡충 방광(schistosomal bladder) 암종, 슈나이더(Schneiderian) 암종, 경성(scirrhous) 암종, 피지샘(sebaceous) 암종, 인환세포(signet-ring cell) 암종, 암 심플렉스(cancer simplex), 소세포(small cell) 암종, SCLC (small cell lung cancer), 방추세포(spindle cell) 암종, 암 해면체(cancer spongiosum), 편평(squamous) 암종, 편평세포(squamous cell) 암종, 말단관(terminal duct) 암종, 역형성 갑상선(anaplastic thyroid) 암종, 여포성 갑상선(follicular thyroid) 암종, 수질 갑상선(medullary thyroid) 암종, 유두상 갑상선(papillary thyroid) 암종, 피부 섬유주암(trabecular cancer of the skin), 이행세포(transitional cell) 암종, 세뇨관(tubular) 암종, 갑상선의 미분화 암(undifferentiated cancer of thyroid gland), 자궁 체부(uterine corpus) 암종, 사마귀모양(verrucous) 암종, 융모상(villous) 암, 암 융모(cancer villosum), 난황(yolk sac) 암종, 특히 두경부의 편평세포(squamous cell particularly of the head and neck)

암종, 식도 편평세포(oesophageal squamous cell) 암종, 및 구강 암 및 암종을 포함한다.

[0251] 또 다른 광범위한 암 범주는 육종 및 섬유육종을 포함하며, 이는 세포가 배아 결합 조직과 같은 원섬유 또는 균질한 물질에 임베딩되어 있는 종양이다.

[0252] 표적화될 수 있는 육종은 지방육종, 폐포 연부 육종, 암색모세포육종, 조류육종, 포도상육종, 포도육종, 닭 육종, 클로로마토스(chloromatous) 육종, 연골모세포육종, 신장의 투명세포 육종, 배아육종, 자궁내막 간질 육종, 상피모양육종, 유잉(Ewing's) 육종, 근막육종, 섬유아세포육종, 가금 육종, 거대세포육종, 과립구육종, 혈관내피세포육종, 호지킨(Hodgkin's) 육종, 특발성 다색 출혈 육종, B 세포의 면역모세포 육종, T-세포의 면역모세포 육종, 젠슨(Jensen's) 육종, 카포시(Kaposi's) 육종, 백혈구육종, 림프계육종, 흑색증육종, 혼합세포육종, 다발성육종, 림프관육종, 특발성 출혈성 육종, 다능성 원발성 뼈 육종, 골아세포성육종, 골형성성육종, 뼈주위육종, 다형성육종, 슈도-카포시(pseudo-Kaposi) 육종, 세망세포육종, 뇌의 세망세포육종, 횡문근육종, 루스(Rous) 육종, 연조직육종, 방추세포육종, 활액육종, 모세혈관확장성육종, 뼈의 육종(골육종)/악성 섬유성 조직구종, 및 연조직 육종을 포함한다.

[0253] 치료될 수 있는 림프종은 후천성 면역 결핍 증후군 (AIDS)-관련 림프종, 비-호지킨 림프종, 호지킨(Hodgkin's) 림프종, T-세포 림프종, T-세포 백혈병/림프종, 아프리카림프종, B-세포림프종, B-세포 단핵구 림프종, 소 악성 림프종, 버킷(Burkitt's) 림프종, 중심세포림프종, 표피성림프종, 미만성림프종, 미만성림프종, 대세포림프종, 미만성림프종, 소세포 및 대세포 혼합 림프종, 미만성림프종, 소절단세포림프종, 여포성림프종, 여포중심세포림프종, 여포성림프종, 소절단 및 대세포 혼합 림프종, 여포성림프종, 대세포우세림프종, 여포성림프종, 소절단세포우세림프종, 거대여포림프종, 거대여포성림프종, 육아종성림프종, 조직구림프종, 거대세포림프종, 면역모세포림프종, 거대절단세포림프종, 거대 비절단세포 림프종, 레너트(Lenner's) 림프종, 림프모구림프종, 림프구성림프종, 중간체림프종; 림프구성림프종, 중간분화된림프종, 형질세포양림프종; 잘 분화되지 않은 림프구성림프종, 소림프구성림프종, 잘 분화된 림프구성림프종, 소의 림프종; 점막-연관 림프 조직(MALT) 림프종, 맨틀세포림프종, 맨틀구역림프종, 번연부림프종, 지중해림프종, 혼합 림프구-조직구 림프종, 결절림프종, 형질세포양림프종, 다형성림프종, 일차 중추신경계 림프종, 일차 삼출 림프종, 소 B-세포 림프종, 소절단세포림프종, 소 비절단세포 림프종, T-세포 림프종; 복잡한 T-세포 림프종, 피부 T-세포 림프종, 소림프구 T-세포 림프종, 정의되지 않은 림프종, u-세포 림프종, 미분화 림프종, aids-관련 림프종, 중추신경계 림프종, 피부 T-세포 림프종, 삼출(체강 기반) 림프종, 흉선 림프종, 및 피부 T-세포 림포증을 포함한다.

[0254] 표적화될 수 있는 백혈병 및 기타 혈액세포 악성종양은 급성 림프모구성, 급성 골수성, 급성 림프구성, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성, 모양세포성, 적혈구백혈병, 림프모구성, 골수성, 림프구성, 골수성, 백혈병, 모양세포성, T-세포성, 단핵구성, 골수모구성, 과립구성, 그로스(gross), 핸드 미러-세포성, 호염기성, 조혈성, 조직구성, 백혈구감소성, 림프계성, 실링(Schilling's), 줄기세포성, 골수단핵구성, 단핵구성, 전림프구성, 전골수모구세포성, 미세골수모구성, 거핵모세포성, 거핵구성, 리더세포(Rieder cell)성, 소(bovine), 무백혈병성, 비만세포성, 골수성, 형질세포성, 아백혈병성, 다발성골수종, 비림프구성, 만성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 진성 적혈구증가증, 림프종, 호지킨병, 비-호지킨 림프종 (무통성 및 고등급 형태), 다발성 골수증, 발덴스트롬 거대글로불린혈증, 중쇄질환, 골수이형성 증후군, 골수이형성 및 만성 골수성 백혈병을 포함한다.

[0255] 치료될 수 있는 뇌 및 중추신경계 (CNS) 암 및 종양은 성상세포종 (소뇌 및 대뇌 포함), 뇌간 신경교종, 뇌종양, 악성 신경교종, 뇌실막종, 교모세포종, 수모세포종, 천막상 원시 신경외배엽 종양, 시각 경로와 시상하부 신경교종, 두개외 생식세포 종양, 수모세포종, 골수이형성 증후군, 희수돌기아교종, 골수이형성/골수증식성 질환, 골수성 백혈병, 골수계 백혈병, 다발성 골수종, 골수증식성 장애, 신경모세포종, 형질세포 신생물/다발성 골수종, 중추신경계 림프종, 내인성 뇌종양, 성상세포 뇌종양, 신경교종, 및 중추신경계의 전이성 종양세포침습을 포함한다.

[0256] 치료될 수 있는 위장관암은 간외담관암, 결장암, 결장 및 직장암, 결장직장암, 담낭암, 위(gastric, stomach)암, 위장관 유암 종양, 위장관 유암 종양들, 위장관기질종양, 방광암, 섬세포암종 (내분비 췌장), 췌장암, 섬세포 췌장암, 전립선암 직장암, 침샘암, 소장암, 결장암, 및 결장직장 종양형성과 연관된 폴립을 포함한다.

[0257] 치료될 수 있는 폐 및 호흡기 암은 기관지 선종/유암종, 식도암, 하인두암, 후두암, 하인두암, 폐 유암 종양, 비-소세포폐암, 소세포폐암, 폐의 소세포암종, 중피종, 비강 및 부비동암, 비인두암, 비인두암, 구강암, 구강 및 입술 암, 구강인두암; 부비동 및 비강 암, 및 흉막 폐모세포종을 포함한다.

[0258] 치료될 수 있는 요로 및 생식기 암은 자궁경부암, 자궁내막암, 난소상피암, 생식선외 생식세포 종양, 두개외 생식세포 종양, 생식선외 생식세포 종양, 난소생식세포종양, 임신 영양막 종양, 비장암, 신장암, 난소암, 난소상피암, 고등급 장액성 난소암, 난소생식세포종양, 난소 저악성 잠재성 종양, 음경암, 신세포암 (암종 포함), 신세포암, 신우 및 요관암(이행세포암), 신우 및 요관의 이행세포암, 임신 영양막 종양, 고환암, 요관 및 신우암, 이행세포암, 요도암, 자궁내막암, 자궁육종, 질암, 외음부암, 난소암종, 워발성 복막 상피암종, 자궁경부암종, 자궁암 및 난포의 고형종양), 표재성 방광 종양, 방광의 침윤성 이행세포 암종, 및 근육-침윤성 방광암을 포함한다.

[0259] 치료될 수 있는 피부암 및 흑색종(비흑색종 뿐만 아니라)은 피부 T-세포 림프종, 안내 흑색종, 인간 피부 각질세포의 종양 진행, 기저세포 암종, 및 편평세포암을 포함한다. 표적화될 수 있는 간암은 간외담관암, 및 간세포암을 포함한다. 표적화될 수 있는 안암은 안내흑색종, 망막모세포종 및 안내흑색종을 포함한다.

[0260] 치료될 수 있는 호르몬암은 부갑상선암, 송과체 및 천막상 원시 신경외배엽 종양, 뇌하수체 종양, 흉선종 및 흉선 암종, 흉선종, 흉선암, 갑상선암, 부신피질의 암, 및 부신피질자극호르몬(ACTH)-생성 종양을 포함한다.

[0261] 표적화될 수 있는 여러 종류의 기타 암은 진행성 암, AIDS-관련암, 항문암 부신피질암, 재생불량성 빈혈, 아닐린-유도 및 베텔-유도 암, 바이요 뺨 암(buyo cheek cancer), 대뇌형(cerebriform), 굴뚝 청소부 암종(chimney-sweeps' carcinoma), 점포 파이프-유도 암(clay pipe-induced cancer), 콜로이드암, 낭포성암, 수지상암, 암 듀스(cancer a deux), 관암, 염색 작업자 암, 뇌종류(encephaloid) 암, 암 엔 퀘라세(cancer en cuirasse), 자궁내막암, 내피암, 상피암, 선암, 원위치발생암(cancer in situ), 강암(Kang cancer), 캉리암(Kangri cancer), 잠복암, 수질암, 흑색증, 물-스피너(mule-spinners') 암, 잠재암, 파라핀암, 콜타르노동자(pitch worker's) 암, 반흔암, 주혈흡충속 방광(schistosomal bladder) 암, 경암, 림프절암, 속질암, 그을음(soot) 암, 방추세포암, 스웜프(swamp) 암, 타르암 및 관상암(tubular cacer)을 포함한다.

[0262] 표적화될 수 있는 여러 종류의 기타 암은 또한 유암종(위장관 및 기관지), 캐슬만병(Castleman's disease), 만성 골수증식성 장애, 건초의 투명세포육종(clear cell sarcoma of tendon sheaths), 유잉의 종양 패밀리(Ewing's family of tumours), 두경부암, 임술 및 구강 암, 잠복 원발성 전이성 편평 경부암, 다발성 내분비종양 증후군, 윌름스 종양(Wilms' tumour), 균상식육종, 갈색세포종, 세자리 증후군(Sezary syndrome), 천막상 원시 신경외배엽 종양, 원발 부위를 알 수 없는 종양, 복막 삼출, 악성 흉막 삼출, 융모성 신생물, 및 혈관주위세포종을 포함한다.

[0263] 암은 특히 폐암, 유방암, 난소암, 두경부암, 췌장암, 상피종, 육종, 신경모세포종, 전립선암, 결장직장암, 위암, 소장암, 간암, 골암, 고환암, 신장암, 갑상선암 중 어느 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0264] 치료에 대한 개체의 적합성을 결정하는 방법

[0265] 본 발명의 추가 양상은 본 발명의 면역반응성 세포를 사용한 치료에 대한 개체의 적합성을 결정하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 *PGK1*, *SLC2A1*, *CA9*, *ALDOA* 및 *VEGFA* 유전자 중 적어도 2개, 3개, 4개 또는 5개 모두의 동시발현을 모니터링하는 단계를 포함할 수 있고, 여기에서 상기 개체에서 상기 유전자의 동시발현은 치료에 대한 개체의 적합성을 나타낸다. 전술한 유전자의 발현 수준은 건강한 대조군에서의 유전자 발현 수준과 비교하여 증가되거나 변경될 수 있다.

[0266] 추가적으로 또는 대안적으로, 본 발명의 면역반응성 세포를 사용한 치료에 대한 개체의 적합성은 개체로부터의 생검 조직을 면역조직화학적으로 염색하는 단계 및 종양 또는 간질(stroma)에서 HIF 안정화를 평가하는 단계 및/또는 종양의 HIF 안정화된 영역으로의 T 세포 (및/또는 기타 면역반응성 세포) 침윤을 모니터링하는 단계에 의해 결정될 수 있다. 종양의 HIF 안정화된 영역으로의 면역반응성 세포의 침윤은 HypoxiCAR 시스템을 포함하는 본 발명의 면역반응성 세포를 사용한 치료에 대한 개체의 적합성을 나타낸다.

[0267] 키트

[0268] 본 발명의 추가 양상은 하기 중 임의의 하나 이상을 포함하는 키트를 제공한다: 본 발명의 폴리펩티드, 핵산, 구축물, 벡터, CAR, 면역반응성 세포 및/또는 약학적 조성물.

[0269] 핵산, 폴리펩티드, CAR 구축물, CAR 벡터는 키트와 조합될 수 있고, 이는 인 시투(*in situ*)에서 본 발명의 면역반응성 세포를 생성하기 위해 제공된다.

[0270] 용도

[0271] 본 발명의 추가 양상은 암, 특히 고형암의 치료에서, 본 발명에 따른 면역반응성 세포 또는 이를 포함하는 약학적 조성물의 용도를 제공한다.

[0272] 또한, 암, 특히 고형암의 치료에서, 본 발명의 폴리펩티드, 핵산, 구축물, 벡터, CAR 및 면역반응성 세포의 용도, 또는 이를 포함하는 약학적 조성물의 용도를 제공한다.

[0273] 본 발명은 또한 동일한 조건 하에 상응하는 비변형된 야생형 대응물과 비교하여 저산소 조건 하에 CAR의 증가된 발현을 구동하는 본 발명의 조절 핵산의 용도를 제공한다. 본 발명의 저산소증-반응성 조절 서열의 용도는 일시적인 또는 낮은 수준의 저산소증에서 표적화할 때, 저밀도 항원을 표적화할 때 및 약한 치료제, 예컨대 약한 CAR을 사용할 때, 특히 유리하다.

[0274] 또한, 토닉(tonic) CAR 신호전달의 방지 또는 감소에서, 본 발명의 제1 양상에 따른 저산소증-반응성 조절 핵산의 용도를 제공한다. 또한, 토닉 CAR 신호전달의 방지에서, 본 발명의 이중 감지 시스템의 용도 (즉, 하나 이상의 ODD의 용도와 함께 저산소증-반응성 조절 핵산의 용도)를 제공한다.

[0275] 유리하게는, 토닉 CAR 신호전달은 본 발명의 이중 감지 시스템을 통해 실질적으로 방지되거나 감소된다. CAR T-세포에서 토닉 항원-독립적 신호전달은, 생체 외(*ex vivo*) 확장 동안 및 생체 내(*in vivo*) 주입 후 모두에서, T 세포의 분화 및 고갈을 증가시켜 생체 내(*in vivo*) 효능을 감소시킬 수 있다. 이 기본 토닉 신호전달은 일반적으로 CAR의 높은 세포 표면 밀도 및 자가 응집 특성으로 인해 존재한다. 유리하게는, 본 발명의 방법에서, CAR-코딩 DNA를 함유하는 면역반응성 세포는, 저산소 환경, 즉, 고형 종양이 아닌 한, 그의 세포 표면에서 어떤 CAR도 발현하지 않는다(또는 최소한의 수만 발현한다). 이 CAR T-세포가 저산소증의 영역에서 또는 종양 미세환경에서 발견될 때, 항원 표적이 존재하는 경우, 이는 그의 표면 세포에서 고밀도로 CAR을 발현할 것이고, 이는 지속적인 T-세포 활성화 및 T-세포 매개 종양 사멸을 일으킬 것이다.

[0276] 본 명세서의 상세한 설명 및 청구범위 전반에 걸쳐, 단어 "포함하다" 및 "함유하다"와 그의 변형, 예를 들어 "포함하는" 및 "포함하다"는, "비제한적으로 포함하는"을 의미하며, 다른 구성요소, 정수 또는 단계를 배제하지 않는다. 더욱이, 단수는 문맥이 달리 요구하지 않는 한 복수를 포괄한다: 특히, 부정관사가 사용되는 경우, 명세서는 문맥이 달리 요구하지 않는 한 단수뿐만 아니라 복수도 고려하는 것으로 이해되어야 한다.

[0277] 본 발명의 각 양상의 바람직한 특징은 임의의 다른 양상과 관련하여 설명된 바와 같을 수 있다. 본 출원의 범위 내에서, 선행 단락, 청구범위 및/또는 하기 설명 및 도면, 및 특히 이의 개별 특징에 기재된 다양한 양상, 구체예, 실시예 및 대안이 독립적으로 또는 임의의 조합으로 취해질 수 있음이 명시적으로 의도된다. 즉, 모든 구체예 및/또는 임의의 구체예의 특징은 그러한 특징이 호환되지 않는 한 임의의 방식 및/또는 조합으로 조합될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0278] 이제 본 발명의 하나 이상의 구체예가 첨부 도면을 참조하여 단지 예로서 설명될 것이며, 여기에서:

도 1은 CAR T-세포 면역요법의 개략도를 나타낸다. CAR T-세포 면역요법의 실시에서, T-세포는 암 환자로부터 분리되고, 예를 들어 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 입자 또는 RNA 전기천공을 사용하여 생체 외(*ex-vivo*)에서 유전적으로 변형된다. 이 수단에 의해, T-세포는 관심 종양 항원에 대한 특이적 결합 친화성을 갖는 키메라 수용체 (CAR)를 발현하도록 조작된다. 이 유전적 변형에 이어, 생성된 CAR-발현 T-세포는 적절한 사이토카인을 사용하여 확장되고, 확장된 집단은 환자 내로 재주입되어 암의 T-세포 매개 표적화를 야기한다.

도 2는 포유동물 세포에서 산소 감지의 개략도를 나타낸다. 정상산소의 조건 하에 (왼쪽), HIF1α는 산소를 필요로 하는 과정에서 PHD 효소에 의해 수산화된다. 그 다음, 수산화된 HIF1α는 pVHL 유비퀴틴 리가아제에 결합할 수 있으며, 이는 HIF1α 분자에 유비퀴틴을 추가하여 프로테아좀 분해를 유발한다. 저산소의 조건 하에 (오른쪽), 산소의 부족으로 인해, HIF1α 수산화 및 분해가 차단되어 HIF1α의 안정화를 야기한다. 그 다음, 안정화된 HIF1α는 핵으로 이동하고 여기에서 HIF1β 및 기타 분자(예컨대 P300 및 CBP)와 복합체를 형성한다. 이 복합체는 저산소증-유도성 유전자의 업스트림에 존재하는 HIF-결합 부위(HRE)에 결합할 수 있으며, 이의 전사를 활성화한다.

도 3은 세포독성 T-림프구 (CTL)가, 순환계에서 또는 조직에서 정상 산소 장력 하에 있을 때, 그 표면에 어떠한 인공 수용체도 발현하지 않을 것인 본 발명의 시스템의 개략도를 나타낸다. 그러나, 그것이 저산소 영역에 위치

할 때, CTL은 관심 암 항원에 대한 특이적 결합 친화성을 가질 것인 세포 표면 CAR을 발현할 것이다. 따라서, CTL-매개 사멸은 저산소증-반응성 조절 핵산으로 인해 저산소증 및 관심 항원이 모두 존재할 때에만 일어날 것이다.

도 4는 HIF-결합 또는 보조 부위에서 뉴클레오티드의 빈도 로고를 나타낸다: **A.** 인간 저산소증-유도성 유전자에서 HIF-결합 뉴클레오티드의 빈도 **B.** 마우스 저산소증-유도성 유전자에서 HIF-결합 뉴클레오티드의 빈도 **C.** 저산소증-유도성 유전자에서 HIF-보조 뉴클레오티드의 빈도. 각 문자의 높이는 각 위치에서 해당 뉴클레오티드의 발생 빈도를 나타낸다.

도 5는 3개의 직렬 HRE 디자인의 예를 나타낸다. 인간 에리트로포이에틴 (hEPO) HRE는 3개의 HRE를 직렬로 포함하며, 여기에서 각 단일 HRE는 인간 EPO 유전자에서 유래된 HIF-결합-링커-HIF-보조 서열을 포함한다. 인간 혈관내피성장인자 A (hVEGFA) HRE는 3개의 HRE를 직렬로 포함하며, 여기에서 각 단일 HRE는 인간 VEGFA 유전자에서 유래된 HIF-결합-링커-HIF-보조 서열을 포함한다. 인간 글루코스 수송체 3 (hGLUT3) HRE는 3개의 HRE를 직렬로 포함하며, 여기에서 각 단일 HRE는 인간 GLUT3 유전자에서 유래된 HIF-결합-링커-HIF-보조 서열을 포함한다.

도 6은 기술을 최적화하기 위해 사용되는 구축물의 선형 맵 표현을 나타낸다: **A.** 클릭 비틀 루시퍼라제 (cbluc) 및 강화된 녹색 형광 단백질 (eGFP) cDNA를 함유하는 긴 말단 반복 (LTR) 비변형 SFG 리포터 레트로바이러스 구축물 (리포터 SFG), **B.** hEPO HRE가 3' LTR 내에 삽입된 변형된 리포터 SFG 벡터, **C.** hVEGF HRE가 3' LTR 내에 삽입된 변형된 리포터 SFG 벡터, **D.** hGLUT3 HRE가 3' LTR 내에 삽입된 변형된 리포터 SFG 벡터.

도 7은 HIF1α 아미노산 서열 (UniProt 데이터베이스)을 나타낸다.

도 8은 기술을 최적화하기 위해 사용되는 추가 구축물의 선형 맵 표현을 나타낸다: **A.** cbluc 루시퍼라제-ODD 융합을 함유하는 리포터 SFG 벡터, **B.** cbluc 루시퍼라제-ODD 융합 및 hEPO HRE LTR 변형을 함유하는 리포터 SFG 벡터, **C.** cbluc 루시퍼라제-ODD 융합 및 hVEGFA HRE LTR 변형을 함유하는 리포터 SFG 벡터, **D.** cbluc 루시퍼라제-ODD 융합 및 hGLUT3 HRE LTR 변형을 함유하는 리포터 SFG 벡터.

도 9는 웨스턴 블롯 결과를 나타낸다. 이 결과는 0.1% 산소 및 20% 산소에서 인큐베이션 후 세포주 (293T, HT1080, T47D 및 Jurkat)에서 검출된 HIF1α 단백질 수준 (및 β-액틴 레퍼런스)을 나타낸다. 막대 차트는 HIF1α 밴드의 강도를 나타낸다. 이는 밴드를 그래프로 그리고 ImageJ를 사용하여 곡선 아래 면적 (AUC)을 계산함으로써 계산되었다.

도 10은 게이팅 전략 및 형질도입된 세포의 eGFP 형광 신호를 측정하는 것에 의한 (비변형 SFG 리포터 구축물의) 형질도입 효율의 결정을 나타낸다 (도 6 및 8). 7-AAD 음성 세포 (생존 세포)는 게이팅되고 히스토그램에서 eGFP 형광을 평가하는 데 사용된다.

도 11은 qPCR 분석 검증을 나타낸다. 그래프는 형질도입된 세포에서 게놈 TATA-박스 결합 단백질 유전자 (TBP) 및 루시퍼라제 (luc; 구축물에 의해 코딩됨)를 검출하기 위한, 열 사이클 수 및 나노그램 단위의 DNA 양 (Log 스케일) 간의 선형 (y=x) 관계를 나타낸다.

도 12는 표시된 구축물에 대해 각각의 정상산소 조건 (왼쪽 막대)과 비교하여 5% (A), 1% (B) 및 0.1% (C) 산소 (오른쪽 막대) 인큐베이션 18시간 후 293T 세포로부터 얻은 상대 광량 단위 (RLU)를 나타낸다.

도 13은 표시된 구축물에 대해 100 또는 0 μM 코발트 클로라이드에서 18시간 동안 293T 세포의 배양 후에 얻은 상대 광량 단위 (RLU) 데이터를 나타낸다.

도 14는 건강한 마우스 조직에서 ErbB 수용체 (egfr 및 erbb2-4) 및 인테그린 β6 (intgb6) 유전자의 mRNA 발현을 나타낸다. 총 13개의 조직이 본 실험에서 분석되었다. 조직들은 하우스키핑 유전자 Tbp에 상대적인 각 mRNA의 발현 수준에 따라 순위가 매겨졌다.

도 15는 정상산소의 조건 하에 루시퍼라제의 발현에서 대조군 (구성적)에 비해 3개 및 9개 HRE 카피의 효과를 나타낸다. HRE의 포함은 다운스트림 리포터 이식유전자 (루시퍼라제)의 발현을 유의미하게 침묵시켰다. NT: 비형질도입된(non-transduced); 구성적 (Constitutive): 야생형 비-HRE 변형 LTR; 3HRE: 3개의 직렬 HRE 요소를 함유하도록 변형된 LTR; 9HRE: 9개의 직렬 HRE 요소를 함유하도록 변형된 LTR. HRE 요소는 인간 EPO 유전자 프로모터에서 유래되었다. 다수 HRE를 함유하도록 LTR (레트로바이러스 프로모터)을 변형함으로써, 루시퍼라제의 발현은 정상산소의 조건 하에 유의미하게 감소했다.

도 16은 저산소의 조건 하에 루시퍼라제 발현 유도 배수를 나타낸다 (저산소의 조건 하에서의 유전자 발현을 정

상산소의 조건 하에 관찰된 유전자 발현으로 나눔으로써 계산됨). 구성적(Constitutive): 야생형 비-HRE 변형 LTR; 3HRE: 3개의 직렬 HRE 요소를 함유하도록 변형된 LTR; 9HRE: 9개의 직렬 HRE 요소를 함유하도록 변형된 LTR. 저산소 조건 하에 (0.1% O_2), 루시퍼라제의 발현은 프로모터에 포함된 HRE의 수와 상관관계가 있다.

도 17은 비변형 LTR을 함유하는 SFG 벡터에서 클릭 비틀 루시퍼라제의 C-말단에 상이한 길이의 인간 HIF1α ODD (아미노산 번호가 표시됨)를 융합하는 효과를 나타낸다. 정상산소 조건에서 유전자 발현을 평가했다. 구성적(Constitutive): ODD 추가 없음 vs 루시퍼라제에 상이한 표시된 길이의 ODD의 융합.

17A: 클릭 비틀 루시퍼라제의 C-말단에 융합된 가변적 ODD를 함유하는 구축물.

17B: A에 나타낸 구축물로 형질도입된, 비형질도입된 (NT), 또는 구성적 형질도입된 (야생형 비 ODD 변형 클릭 비틀 루시퍼라제) T47D 세포를 18시간 동안 저산소증 (0.1% 산소)에 노출시켰다. 유도 배수는 각 구축물에서 정상산소 발현에 상대적인 저산소증에서 관찰되는 루시퍼라제 발현 유도이다. N=3 선=평균 및 오차 막대 SEM.

도 18은 루시퍼라제의 C-말단에 융합된 인간 HIF1α ODD (아미노산 401-603)와 9개 HRE 프로모터 구조의 조합을 나타낸다. 이 이중 산소 감지 시스템은 정상산소의 조건 하에 루시퍼라제의 발현이 검출가능하지 않았으나, 저산소 조건 (0.1% 산소)에서 전환되었다.

도 19는 T4-CAR T-세포가 정맥내(i.v.) 주입 후 간 및 폐에 강하게 존재함을 나타낸다. 루시퍼라제 리포터를 동시 발현하는 T4-CAR T-세포는 확립된 피하 SKOV3 종양을 갖는 NSG 면역저하 마우스에 정맥내(i.v.) 주사되었다. CAR T-세포는 IVIS 생물발광 이미저를 사용하여 추적되었다.

(**a**)는 피하로 이식된 확립된 SKOV3 인간 난소 종양을 갖는 3마리의 마우스 (왼쪽) 및 주입 후 4일째에 대표적인 마우스로부터 절개된 장기/종양 (오른쪽)에서 T4-CAR T-세포 내에 발현되는 루시퍼라제의 검출된 광 (사진에서 파란색/녹색으로 나타냄)을 나타낸다.

(**b**) 각 표시된 장기에서 루시퍼라제 신호의 정량화 (n=6마리의 개별 마우스). 주입 후 4일 시점에서 볼 수 있는 바와 같이, 이들 세포는 종양보다는 폐 및 간에 우선적으로 존재한다.

(**c**) T4-CAR T-세포는, 전부는 아니지만 대부분의 상피 세포에서 발현되는 Erbb 수용체 패밀리에 의해 형성된 8개의 동종이량체 및 이종이량체에 대한 특이성을 갖는다. *Erbb* 패밀리의 mRNA 발현에 대한 중요한 장기의 분석 (하우스키핑 유전자 Tbp에 상대적으로 제시됨)은, T4-CAR T-세포가 초기에 축적되는 폐와 간 모두가 CAR 리간드의 풍부한 공급원임을 입증했다. N=6 (생물학적 복제물 결합됨).

도 20은 0.1% 산소 (예: 저산소 조건; n=3 개별 CAR 제제)에 노출 후 20시간에 표시된 그룹에서 게이팅된 (gated) 검출가능한 CAR T-세포에서 CAR 발현의 중앙 형광 강도 (MFI)를 나타낸다. 'T4'는 표준 SFG 벡터 (LTR-기반 레트로바이러스 프로모터)를 사용하여 발현되고, 'HRE-CAR'은 변형된 SFG 벡터 (SFG 벡터의 LTR에 삽입된 9x HRE 요소)를 사용하여 발현된다. 코딩된 HRE CAR은 추가 ODD를 함유하지 않는다. 예상치 못하게, CAR 발현의 중앙 형광 강도 (MFI)는 HRE-CAR 그룹에서 더 컸다.

도 21은 HypoxiCAR T-세포 이펙터 기능이 저산소 조건으로 엄격하게 제한됨을 나타낸다: (**a**) 인간 T-세포로 형질도입된 CAR 구축물 (9x HRE이 직렬로 있음, 표시되지 않음) 및 이들의 모듈식 배열 (게놈에 통합된 경우)을 나타내는 개략도. LTR-긴 말단 반복. (**b**) 표면 CAR 및 CD8 α 를 평가하는 대표적인 유세포 분석 도트 플롯 ($CD8^+$ T-세포를 식별하기 위함). 데이터는 염색 및 유세포 분석 전에 18시간 동안 정상산소 또는 저산소 (0.1% O_2) 조건에서 유지되었던, 살아있는 ($7AAD^-$) $CD3^+$ T4-CAR T-세포, HypoxiCAR T-세포 또는 비형질도입된 T-세포에 의한 CAR 발현을 입증한다. (**c-h**) 건강한 기증자 $CD3^+$ T-세포 (n=6)를 형질도입하여 T4-CAR 또는 HypoxiCAR T-세포를 생성하고, (**c**) 정상산소 조건으로 다시 옮기기 전에 최대 18시간 동안 0.1% O_2 저산소 조건에 두었으며, 여기에서 CAR 발현은 유세포 분석을 사용하여 표시된 시간에 평가되었다. (**d**) 패널 (c)에서 0.1% O_2 저산소증에 노출된 18시간에 T4-CAR 및 HypoxiCAR T-세포에서 CAR 발현의 중앙 형광 강도 (MFI)이다. (**e**) 감소하는 농도의 O_2에 18시간 노출 후 HypoxiCAR T-세포에서 검출가능한 표면 CAR 발현; 정상산소 조건 하에 발현과 비교하여 통계적 유의성을 평가하였다. (**f**) 정상산소 및 0.1% O_2 저산소 조건에서 표시된 시간에 T4 CAR, HypoxiCAR, 또는 CD3-절단된 HypoxiCAR (세포내 신호전달을 방지하기 위해 CD3엔도도메인이 제거됨) T-세포에 의한 시험관 내(*in vitro*) SKOV3 종양 세포 사멸. (**f**)에서 사용된 T-세포로부터 방출된 IL-2 (**g**) 및 IFN-γ (**h**)의 정량화. ELISA 분석은 SKOV3 세포에 대한 노출 후 72시간에 수집된 배지에서 수행되었으며, 형질도입되지 않은 T-세포 ("T-세

포")를 사용하여 수행된 공동-배양과 비교하였다. 수행된 모든 통계적 비교를 나타내었다. 막대 차트의 막대는 그룹 평균을 나타내며, 각 점은 그룹에서 개별 건강한 기증자를 나타낸다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

도 22는 패널에서 A) T-세포의 게놈에 통합될 때 HypoxiCAR 레트로바이러스 구축물의 개략도를 나타낸다. HypoxiCAR T-세포는 HN3 종양을 갖는 NSG 마우스로 정맥내(i.v.) 또는 종양내(i.t.) 주사했다. B) 주입 24시간 후, 종양을 절제하고, 효소-분해하고, 유세포 분석 이전에 관심 마커에 대해 염색하였다. 표지된 조직에 존재하는 게이팅된(gated) HypoxiCAR T-세포 ($CD3^+$ and $CD45^+$)를 나타내며, 이는 세포 표면 CAR 발현에 대해 평가되었따 (히스토그램의 x축). CAR 발현은 종양에 존재하는 T-세포에서만 검출되었다. C) 표면 CAR 발현 (B에서 볼 수 있음)의 정량화, 여기에서 각 점은 각 조직에 대한 개별 마우스를 나타낸다.

도 23은 HypoxiCAR이 SKOV3 및 LL2 종양에서 종양-선택적 CAR 발현을 제공함을 나타낸다: (**a**) NSG 마우스 (n=6 마우스)에서 성장된 SKOV3 종양의 성장 곡선. (**b**) 희생 24시간 전에 HypoxiCAR로 정맥내(i.v.) 및 종양내(i.t.) 주사된 SKOV3 종양 보유 마우스의 효소-분산 조직 및 혈액에서 검출가능한 세포 표면 HypoxiCAR 발현을 나타내는 대표적인 누적 히스토그램. 히스토그램은 CAR 아이소타입 염색된 종양과 함께, 게이팅된 살아있는 ($7AAD^-$) $Ter119^-$ $CD45^+$ $CD3^+$ T-세포 (회색 히스토그램) (왼쪽) 및 각 조직에서 검출가능한 CAR을 갖는 퍼센트 T-세포의 전체 코호트 정량화를 나타낸다 (n = 6 개별 마우스). (**c**) **b**에서 설명된 것과 동일한 실험이지만, LL2 종양 보유 *Rag2*$^{-/-}$ 마우스를 사용하였으며, 각 조직 내에 T-세포에 의한 대표적인 세포 표면 HypoxiCAR 발현 (왼쪽) 및 각 조직에서 HypoxiCAR T-세포를 발현하는 퍼센트 CAR의 정량화 (오른쪽)를 나타낸다 (n=3 개별 마우스). 막대 차트에서 막대는 그룹 평균을 나타내며, 각 점은 그룹에서 개별 건강한 마우스를 나타낸다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

도 24: T4-CAR T-세포는 건강한 장기에서 염증을 유발한다. (A) T4-CAR을 나타내는 다이어그램. (B) 유세포 분석을 사용하여 평가된, 살아있는 ($7AAD^-$) $CD3^+$ T4-CAR 또는 비형질도입된 인간 T-세포에서 세포 표면 CAR 발현을 나타내는 대표적인 히스토그램. (C-E) 피하 HN3 종양 세포 접종 후 13일째에, 비히클 또는 $10x10^6$ 비형질도입된 T-세포 또는 T4-CAR T-세포를 마우스에 정맥내(i.v.) 주입하였다 (n=5). (C) 실험을 묘사한 개략도. (D) 마우스의 체중 변화. 화살표는 T-세포 주입을 나타낸다; 십자가는 인도적 종료시점이 초과되어 도태된 동물을 나타낸다. (E) 주입 24시간 후 혈청 사이토카인. (F) 저용량 인간 ErbB-CAR/Luc T-세포 ($4.5x10^6$)를 SKOV3 종양 보유 NSG 마우스에 정맥내(i.v.) 주입하고, 4일 후, 생물발광 영상화를 전신 및 절개된 장기에 대해 수행했다. (G) 모든 장기 (n=6)의 퍼센트로 광자/s/단위 면역의 정량화, LN-사타구니 림프절(inguinal lymph node), SI=소장(small intestine). (H,I) 저용량 (4.5×10^6 세포) T4-CAR 또는 형질도입되지 않은 T-세포 또는 비히클의 정맥내(i.v.) 주입 5일 후 폐 (H) 및 간 (I)에서 H&E 염색된 섹션 (왼쪽) 및 골수 침윤의 정량화 (오른쪽). 화살표는 골수 침윤을 나타낸다. (J,K) 종양 보유 NSG 마우스에서 환원적으로-활성화된 피모니다졸에 대한 조직 섹션의 면역조직화학 (IHC) 염색 (J) 및 염색의 정량화 (K). 모든 실험은 생물학적 반복을 나타낸다. 선형 차트, 점은 평균을 표시하고, 오차 막대는 s.e.m을 나타낸다. 막대 차트는 평균 및 점 개별 마우스를 나타낸다. * P<0.05, ** P<0.01.

도 25: HyoxiCAR T-세포 이펙터 기능은 저산소증에 엄격하게 제한된다. (**A**) 정상산소 및 저산소의 조건 하에 HypoxiCAR을 나타내는 다이어그램. (**B**) 유세포 분석을 사용하여 평가된, 정상산소 또는 18시간 저산소 (0.1% O_2) 조건에서 살아있는($7AAD^-$) $CD3^+$ T4-CAR, HypoxiCAR 및 비형질도입된 인간 T-세포에 대한 세포 표면 CAR 발현을 나타내는 대표적인 히스토그램. (**C**) 유세포 분석을 사용하여 평가된, 저산소 (0.1% O_2) 또는 정상산소의 조건 하에 표시된 시간에서 HypoxiCAR T-세포에 대한 표면 CAR 발현. 값은 18시간 저산소증에서 관찰된 값으로 정규화되었다 (n=6). (**D**) 0.1, 1, 5%, 20% O_2에 18시간 노출 후 HypoxiCAR T-세포에 대한 표면 CAR 발현 (n=6). 값은 0.1% O_2에서 관찰된 값으로 정규화되었다. (**E-G**) 정상산소 및 0.1% O_2 저산소 조건에서, T4-CAR, HypoxiCAR, CD3-절단된 HypoxiCAR ($CD3^-$; 세포내 신호전달을 방지하기 위함) 및 비형질도입된 T-세포 (CAR^+ 이펙터 대 표적 whddid 세포 비율 1:1)에 의한 시험관 내(*in vitro*) SKOV3 종양 세포 사멸. 정상산소 및 0.1% O_2 저산소 조건 하에, SKOV3 세포에 각각 24시간 및 48시간 노출 후 각 T-세포에서 배지로 방출된 (**F**) IL-2 및 (**G**) IFNɣ의 정량화. 차트에서 막대는 평균을 나타내고, 점은 각 개별 건강한 기증자를 나타낸다. 데이터포인트는 병렬로 수집되었고, 생물학적 반복을 나타낸다. 선 차트에서, 점은 평균을 표시하고, 오차막대는 s.e.m을 나타

낸다. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, **** P<0.0001.

도 26: HypoxiCAR T-세포는 전신 독성 없이 항종양 효능을 제공한다. (A-C) 피하 HN3 종양-보유 NSG 마우스는 희생 72시간 전에 인간 HypoxiCAR T-세포 (2.5×10^5 세포 종양내(i.t.) 및 7.5×10^5 세포 정맥내(i.v.))를 정맥내(i.v.) 및 종양내(i.t.) 둘 모두로 주사하였다. (A) 본 실험을 묘사한 개략도. (B) 표시된 효소-분산 조직 및 혈액에서 살아있는 유핵 세포 ($7AAD^-$, $Ter119^-$), $CD45^+$ $CD3^+$ HypoxiCAR T-세포에 대한 표면 CAR 발현을 나타내는 대표적인 히스토그램 및 (C) n=9 개별 마우스에서 각 조직에서 정량화. (D-F) 피하 HN3 종양 세포 접종 16일 후, 마우스에 비히클 또는 10×10^6 T4-CAR, HypoxiCAR 또는 비형질도입된 인간 T-세포 (대조군)를 정맥내(i.v.) 주입하였다 (n=4 마우스). (D) 본 실험을 묘사한 개략도. (E) 마우스의 체중 변화. (F) 주입 24시간 후 혈청 사이토카인. (G,H) 저용량 (4.5×10^6) T4-CAR 또는 HypoxiCAR T-세포를 NSG 마우스로 정맥내(i.v.) 주입하였다. 5일 후 표시된 조직을 절제하고, 폐 (G)와 간 (H)에서 골수 침윤을 기록했다. (I) (D-F)로부터의 HN3 종양 성장 곡선, 화살표는 CAR T-세포 주입 지점을 표시한다. 모든 실험은 생물학적 반복을 나타낸다. 막대 차트는 평균을 나타내며 각 점은 개별 마우스이다. 선 차트에서, 점은 평균을 표시하며 오차막대는 s.e.m을 나타낸다. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, **** P<0.0001.

도 27: T-세포는 저산소 두경부 편평세포 암종 (SCCHN)의 HIF1α 안정화된 영역에서 제외되지 않는다. (A-C) HRE-조절 유전자 특징은 SCCHN 종양에서 알려진 HRE-조절 유전자로부터 구성되었다 (n=528). (**A**) 개별 유전자에 대한 Pearson 상관계수를 표시하는 히트맵. (**B**) 종양 (T) 단계에 기반한 특징 발현 (T1 n=48, T2 n=136, T3 n=99, T4 n=174). (**C**) HRE-조절 유전자 특징의 고발현 및 저발현에 대한 3기 및 4기 SCCHN 환자의 생존 곡선 (각각 n=87). (**D**) HIF1α (적색) 및 CD3 (갈색)에 대한 대표적인 IHC 염색 SCCHN 섹션 (n = 60). (**E-F**) SCCHN 종양에서 상피내 T-세포 (IET)의 풍부도는 낮음/없음 (n=40) 및 높음 (n=55)으로 그룹화되었다. IET의 예는 (D)에 검은색 화살표로 표시된다. IET 수는 종양의 HIF1α 안정화 (H)-점수에 대해 평가되었다 (**E**). 많은 수의 IET가 존재하는 종양의 경우, 종양의 HIF-1α 안정화된 영역 (H-TIL)에 직접 침윤하는 종양 침윤 림프구는 부재 (n=55개 종양 중 6개) 또는 존재(n=55개 종양 중 46개)로 그룹화되었다. H-TIL의 예는 (D)에서 흰색 화살표로 표시된다. H-IET 수는 종양의 H-점수에 대해 평가되었다 (**F**). (**G**) DAPI (핵; 파란색)로 염색된 구강 혀 암종 및 CD3 (녹색) 및 HIF1α (적색)에 대한 항체의 공초점 이미지; 흰색은 CD3 및 HIF1α의 공동-국소화를 나타낸다. 박스 플롯은 중앙값 및 상위/하위 사분위수를 나타내고, 위스커(whisker)는 최고 및 최저 값을 나타낸다. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, **** P<0.0001.

도 28: HypoxiCAR T-세포는 확립된 SKOV3 종양에 대한 항종양 효능을 제공한다. 인간 HypoxiCAR T-세포 ($10x10^6$ i.v.) 또는 비형질도입된 대조군 T-세포를 확립된 피하 SKOV3 종양을 보유하는 NSG 마우스로 정맥내(i.v.) 주사하였다. 차트는 마우스의 각 코호트의 성장 곡선을 나타낸다. 화살표는 CAR T-세포 주입 지점을 표시한다. 점은 평균을 나타내고 오차막대는 s.e.m을 나타낸다.

도 29: T4 (구성적 비-HRE-변형됨) 또는 HRE-변형된 (HRE 단독, ODD 결여) CAR T-세포를 정상산소 (20% 산소) 또는 저산소 조건 (0.1% 산소)에서 표시된 CAR+ 이펙터 대 표적 비율로 SCOV3 표적 세포주와 함께 24시간 동안 배양하였다. **A.** 24시간 공동-배양 후 공동-배양물에서 생존가능한 표적의 %를 나타낸다. **B.** 표적에 의한 T-세포의 항원-특이적 자극 후 공동-배양물에서 방출된 IL-2를 나타낸다. 표시된 데이터는 패널 A에 대해 4명의 독립적인 기증자의 T-세포를 사용한 n=4개의 독립적인 실험의 평균, 및 패널 B에 대해 3명의 독립적인 기증자의 T-세포를 사용한 n=3개의 독립적인 실험의 평균을 나타낸다. 오차막대는 SEM을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0279] 실시예

[0280] 본 발명은 이제 하기 실시예들을 참조하여 설명될 것이다.

[0281] 재료 및 방법

[0282] **구축물**

[0283] 각각 인간 EPO, VEGFA 및 GLUT3의 3개의 직렬 HBS를 함유하는 3개의 HRE 서열은 GeneArt (ThermoFisher Scientific)에 의해 합성되었고, NheI 및 XbaI 제한 부위가 측면에 배치되었다. 이러한 서열은 서브클로닝되었고, SFG Moloney 뮤린 백혈병 바이러스 플라스미드의 3' LTR 내의 천연 NheI/XhoI 서열을 대체하였다. 3' LTR

의 특정 변형은 제한 효소 부위 및 각 HRE 카세트에 대한 상보적 서열을 함유하는 프라이머를 사용하여 달성된 HRE를 함유하는 XhoI/EcoRI-측면 중간 단편의 합성에 의해 달성되었다. 중복 PCR 및 단편의 서브클로닝은 SFG 벡터로의 삽입을 달성했다. 다음으로, P2A에 의해 분리된 클릭 비틀 루시퍼라제의 녹색-방출 변이체 및 녹색 형광 단백질을 코딩하는 단백질-코딩 서열을 SFG의 NcoI/XhoI 부위로 클로닝하였다. 제한효소 절단은 37° C에서 New England Biolab에서 구입한 효소 및 버퍼를 사용하여 수행하였다. 에티디움 브로마이드로 염색된 1.2% 아가로스 젤에서 DNA가 검출되었으며, DNA ladder에 따라 평가된 적절한 크기의 밴드가 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)를 사용하여 젤에서 절제 및 추출되었다. 점착성 말단 결찰은 T4 DNA 리가아제 (ThermoFisher Scientific)에 의해 16 ° C에서 1시간 동안 촉매화되었다.

[0284] **CAR/리포터 구축물 클로닝**

[0285] 인간 T1E CAR 함유 SFG 레트로바이러스 벡터를 변형하여 본 연구에서 사용된 구축물을 생성하였다. 인간 HIF1α의 아미노산 401-603 (서열번호 29)을 코딩하는 전장 ODD cDNA는 gBlock® (Integrated DNA Technologies)로 합성되었으며, 중첩 PCR을 통해 T1E CAR 내 CD3ζ의 C-말단에 추가되었고, 플래티넘 *Pfx* DNA 폴리머라제 (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 하기 프라이머를 사용하였다; 5'-TCCAGCGGCTGGGGCGCGAGGGGGCAGGGCC-3' 및 5'-GGCCCTGCCCCCTCGCGCCCCAGCCGCTGGA-3'. PCR 산물은 1.2% 아가로즈 (Sigma-Aldrich) 겔에서 전개되었고, 산물 크기는 1kb Plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific)에 대해 추정되었다. 예상 크기의 단편을 QIAquick® Gel Extraction 키트를 사용하여 절제하고 정제하였다. T1E CAR-ODD는 AgeI 및 XhoI 제한 엔도뉴클레아제(New England Biolabs)를 사용하여 SFG 플라스미드와 T1E CAR-ODD cDNA에 구축된 *AgeI* 및 *XhoI* 제한 효소 부위를 절단하여 SFG 벡터로 클로닝하였다. 제한 엔도뉴클레아제 분해된 벡터 및 구축물을 QIAquick PCR 정제 키트 (QIGEN)를 사용하여 정제하고, T4 리가아제(Thermo Fisher scientific)를 사용하여 라이게이션 한 후, One Shot Stbl3쪠 화학적 컴피턴트(competent) *E. coli* (Thermo Fisher Scientific)로 형질전환 하였다. 암피실린 (Santa Cruz Biotechnology) 함유 Luria Bertani (LB) 아가 (Sigma-Aldrich) 플레이트를 사용하여 형질전환된 *E. coli* 를 선별하였다. 형질전환된 콜로니를 100 μg/ml 암피실린이 포함된 LB broth (Sigma-Aldrich)에서 성장시킨 다음, QIAGEN Plasmid Midi 또는 Maxi 키트를 사용하여 정제하였다. 최종 구축물은 서열 검증되었다 (Source BioScience). 유사한 접근법을 사용하여, 하기 추가 변형이 이루어졌다: 구성적 리포터 구축물은 이전에 실험실에서 생성된 리포터 구축물인 바이러스 P2A 서열에 의해 분리된 클릭 비틀 루시퍼라제 (Luc) 및 eGFP를 사용하여 생성하였다. 이는 플래티넘 *Pfx* DNA 폴리머라제 (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 정방향 프라이머 5'- CCATGGTGAAGCGTGAGAAAAATG-3' 및 역방향 프라이머 5'- CTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC-3'로 PCR 증폭하여 달성하였다. 증폭된 산물을 NcoI 및 XhoI (New England Biolabs)로 분해하고, *NcoI* 및 *XhoI*와 T4 DNA 리가아제 (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 SFG 벡터로 클로닝하였다. 전장 ODD(상기 설명된 바와 같음)도 정방향 5'-GAGAAGGCCGGCGGTGCCCCAGCCGCTGGA-3' 및 역방향 5'-CCTCAAAGCACAGTTACAGTATTCCAGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAG-3' 프라이머를 사용하여 중첩 PCR에 의해 리포터 구축물에서 Luc의 C-말단에 추가하여, 상보적 오버행이 있는 ODD를 증폭하였다. 이어서, 정방향 5'-CCATGGTGAAGCGTGAGAAAAATG-3' 및 역방향 5'-CTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC-3' 프라이머를 사용한 중첩 융합 PCR을 수행하여 *NcoI* 및 *XhoI* 제한 부위가 측면에 있는 루시퍼라제-ODD-P2A-eGFP를 코딩하는 단편을 생성하였고, 이를 사용하여 루시퍼라제-ODD-P2A-eGFP를 SFG 벡터에 삽입하였다. HRE 변형은 SFG 레트로바이러스 벡터의 3' LTR에서 표적이 되었으며, 이는 3' LTR 영역이 통합 시 5' LTR에 복사되기 때문이다. HIF-결합 및 보조 부위를 모두 함유하는 9개의 직렬 5'-GGCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTGTCTGAC-3' HRE 모티프를 함유하는 DNA를 gBlock® (Integrated DNA Technologies)로 합성하고, NheI 및 Xba1 제한 엔도뉴클레아제 (New England Biolabs)를 사용하여 *NheI* 및 *XbaI* 제한 엔도뉴클레아제 사이에 SFG 벡터의 3' LTR로 서브클로닝하였다. T1E CAR CD3$^-$ 절단된 대조군 구축물은 측면에 *SbfI* 및 *XhoI* 제한 부위를 갖도록 gBlock® (Integrated DNA Technologies)로 합성하였고, SbfI 및 XhoI 제한 엔도뉴클레아제 (New England Biolabs)를 사용하여 HRE-변형된 SFG 벡터로 서브클로닝하였다. 바이시스트로닉 루시퍼라제-T2A-CAR 구축물을 생성하기 위해, *AgeI* 및 *NotI* 제한 부위가 측면에 있는 루시퍼라제-T2A-T1E 펩티드 바인더를 포함하도록 설계된 gBlock® (Integrated DNA Technologies)을 T1E CAR 구축물에 삽입하였다.

[0286] **박테리아 형질전환**

[0287] One Shot Stbl3 화학적 컴피턴트 *E. coli* (ThermoFisher Scientific)를 형질전환에 사용했다. 5μl의 라이게이

션 혼합물을 얼음에서 해동된 One Shot Stbl3 세포의 바이알에 첨가했다. 이어서 세포를 얼음에서 30분 동안 인큐베이션 하였다. 다음으로, 세포를 열충격하고(45초, 42° C), 얼음에서 2분 동안 둔 다음, 250μl의 S.O.C. 배지를 첨가하고 바이알을 37° C 박테리아 쉐이커에서 인큐베이션 하였다. 세포를 암피실린(100μg/ml) 아가 플레이트에 펴고, 37° C에서 가습 박테리아 인큐베이터에서 밤새 인큐베이션 하였다. 콜로니를 골라내고, 100μg/ml 암피실린을 함유하는 3ml LB broth에서 성장시켰다. 제조사의 프로토콜에 따라 QIAprep Miniprep Kit (Qiagen)를 사용하여 박테리아로부터 DNA를 추출하였다. DNA는 280nm에서 나노드롭 분광광도계로 정량화하고, Source BioScience로 시퀀싱하였다. SnapGene 소프트웨어를 시퀀싱 정렬 및 검증에 사용하였다.

[0288] **세포주**

[0289] 모든 세포주는 37° C 및 5% CO_2에서 가습 인큐베이터에서 성장시켰다. 인간 배아 신장(Human embryonic kidney, HEK) 293, Phoenix-ECO (Sandra Diebold에서 제공), 인간 섬유육종 세포주 HT1080, BW5147.G.1.4 (ATCC에서 구매), Jurkat (Clone E6-1) (ATCC)는 10% 우태아혈청 (FCS; Thermo Fisher Scientific)이 보충된 RPMI 1640 배지 (Gibco)에서 유지하였다. T47D 세포는 10% FCS 및 인슐린 (0.2 U/ml)이 보충된 RPMI 1640 배지 (Gibco)에서 유지하였다.

[0290] SKOV3 인간 난소 선암종 세포는 원래 ATCC에서 구입했으며, ATCC에서 본 연구를 위해 재인증하였다. HN3 인간 두경부 선암종은 런던의 Ludwig Institute for Cancer Research에서 입수하여 D10 배지, 즉 10% FCS 및 GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific)가 보충된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco)에서 성장시켰다. 뮤린 루이스 폐 암종 (Lewis Lung carcinoma, LL2) 세포는 ATCC에서 구입했으며, 10% FCS로 보충된 RPMI 1640에서 배양하였다. 세포주들은 MycoAlert® 마이코플라스마 검출 키트 (Lonza)를 사용하여 본 연구에서 마이코플라스마가 없는 것으로 확인되었다.

[0291] **마우스**

[0292] NSG (NOD-*scid* IL2Rgamma^{null}) 마우스는 Charles River에서 구입하여 내부에서 사육하였다. Balb/c *Rag2*$^{-/-}$ 마우스는 Adrian Hayday 교수 (KCL)로부터 제공받았다. 수컷 마우스는 HN3와 관련된 연구에 사용되었고, 암컷 마우스는 SKOV3 및 LL2 연구와 관련된 연구에 사용되었다. 이소성 종양 연구에 사용된 모든 마우스는 6-8주령이었고, 체중은 대략 22 g이었다.

[0293] **레트로바이러스의 생성**

[0294] 인간 세포에 대한 친화성을 갖는 레트로바이러스를 생산하기 위해, (6웰 플레이트의 웰당) 1.5 μg의 Peq-Pam 플라스미드 (Moloney GagPol), 1 μg RDF 플라스미드 (RD114 envelope) 및 1.5 μg의 SFG 플라스미드를 사용하여 FuGENE HD 형질감염 시약을 사용하여 50%-60% 컨플루언트(confluent) HEK 293T 세포(Promega, US)로의 삼중 형질감염에 의해 RD114 슈도타입 일시적 레트로바이러스 입자를 생성하였다. Peq-Pam, RDF 및 SFG 플라스미드를 일반 RPMI 1640 배지 (Gibco)에서 15분 동안 실온(RT)에서 인큐베이션 한 다음, 293T 세포에 적가하였다. 레트로바이러스 함유 상층액을 48시간 후에 수확하여 인간 세포주를 형질도입하기 위해 사용하였다.

[0295] **저산소 조건**

[0296] 저산소 챔버는 STEMCELL Technologies (Canada)에서 구입하고, 0.1%, 1% 또는 5% O_2를 함유하고 일정한 5% CO_2를 갖고 밸런스로 N_2를 사용하는 BOC에 의해 공급된 인증된 가스로 퍼지되었다. 챔버는 제조사의 프로토콜에 따라 제1 퍼지 1시간 후에 다시 퍼지되었다. 하나는 저산소 조건에 노출되고 다른 하나는 18시간 동안 정상산소 상태로 유지되는 두 개의 평행 플레이트에 동일한 수의 세포를 플레이팅했다. 그 다음, Perkin Elmer Fusion α-FP 플레이트 리더 (Life Sciences)에서 제조사의 프로토콜에 따라 루시퍼라제 어세이 (Promega, US)를 사용하여 루시퍼라제 활성을 측정했다. 저산소증 반응성 유전자 발현을 평가하기 위한 인큐베이션 시간은 공지된 연구를 기반으로 했다. 저산소 조건은 또한 코발트 (II) 클로라이드 (Sigma-Aldrich, US) (PHD 억제제)를 100μM의 최종 농도에서 사용하여 모방되었다.

[0297] **웨스턴 블롯 분석**

[0298] 1x 농도의 프로테아제 억제제 칵테일 (Thermo Scientific)을 함유하는 웨스턴 용해 버퍼 (2.5ml 1M Tris pH 6.8, 1g SDS, 5ml 글리세롤, 17.5ml 물)에서 세포를 용해시켰다. 세포 용해물의 총 단백질은 Pierce BCA 단백질 분석 키트 (ThermoFisher Scientific)를 사용하여 정량화하였다. SeeBlue 사전 염색된 단백질 ladder (ThermoFisher Scientific)와 함께 각 용해물의 단백질 10ug을 150V에서 12% 소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴

아미드 겔 전기영동 (SDS PAGE)를 사용하여 분리하고, 활성화된 PVDF 니트로셀룰로오스 멤브레인 (Thermo Scientific, Pierce)으로 30V에서 2시간 동안 옮겼다. 멤브레인을 PBS 0.1% Tween-20 중 1% 밀크로 1시간 동안 RT에서 차단한 다음, 토끼 항-HIF1α 항체 (Novus Biologicals, Littleton, CO)로 1% 밀크 중에서(1:2000) 밤새 4 ° C로 또는 다클론 항-β-Actin (1:5000; Abcam)으로 인큐베이션 하였다. 세척 후, 멤브레인을 2차 항-토끼 홀스래디쉬 퍼옥시다제 (HRP) 염소 항-토끼 IgG 항체로 1% 밀크 중에서(1:5000; Invitrogen) 인큐베이션 하였다. 다음으로, HRP 기질 3,3',5,5' 테트라메틸벤지딘 (TMB)를 PVDF 멤브레인에 첨가하고, CL-XPosure Film (Thermo Scientific) 및 웨스턴 블롯 X-선 분석기를 사용하여 신호를 판독했다.

[0299] **정량 PCR**

[0300] 제조사의 프로토콜에 따라 DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Germany)를 사용하여 세포주로부터 게놈 DNA를 추출하고, 280nm 흡광도에서 나노드롭 분광광도계로 측정했다. qPCR은 맞춤 설계된 프라이머를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 ROX (Sigma-Aldrich, US로부터 구입)와 함께 KiCqStart SYBR Green qPCR ReadyMix를 사용하여 수행하여, 게놈에서 Tbp, Luc 또는 T2A 서열로부터 앰플리콘을 생성하였다. 사용된 프라이머는 다음과 같다: 뮤린 Tbp 5'- TGTCTGTCGCAGTAAGAATGGA-3' 및 5'- AAAATCCCAGACACGGTGGG-3', 인간 Tbp 5'-TTTGGTGTTTGCTTCAGTCAG-3' 및 5'-ATACCTAGAAAACAGGAGTTGCTCA-3', Luc 5'- ATTTGACTGCCGGCGAAATG-3' 및 5'-AAGATTCATCGCCGACCACAT-3', T2A 5'-CGGAGAAAGCGCAGC-3' 및 5'- GGGTCCGGGGTTCTCTT-3'. 관심 유전자의 증폭은 ABI 7900HT Fast Real Time PCR 기기(ThermoFisher Scientific)에서 검출되었다.

[0301] **정량 역전사 PCR**

[0302] 건강한 암컷 C57BL/6 마우스를 희생시키고, 하기 장기를 적출했다: 유선, 지방, 간, 신장, 결장, 소장, 위, 골격근, 폐, 심장, 뇌, 후각 망울 및 눈 (n=13). 장기를 RNAlater (Sigma-Aldrich, US) 시약에 담가 세포 RNA를 안정화하고 보호하고, 4 ° C에서 밤새 유지했다. 제조사의 프로토콜에 따라 PrepEase RNA Spin Kit (Affymetrix, US)를 사용하여 조직에서 RNA를 분리하고, 280nm에서 나노드롭 분광광도계를 사용하여 정량화했다. Erbb1-4 및 인테그린 β-6 mRNA 발현은 EXPRESS One-step Superscript qRT-PCR 키트 (ThermoFisher Scientific)를 사용하여 정량 역전사효소 PCR에 의해 정제된 mRNA에서 분석되었으며, 다음을 포함하는 관심 유전자에 대해 요구에 따라 분석을 함께하였다: Egfr Mm01187858_m1, Erbb2 Mm00658541_m1 Erbb3 Mm01159999_m1, Erbb4 Mm01256793_m1, Itgb6 Mm01269869_m1, Tbp Mm01277042_m1. qRT PCR은 ABI 7900HT Fast Real Time PCR 기기 (ThermoFisher Scientific)를 사용하여 수행하였고, 데이터 분석은 Excel에서 수행하였다. RNA는 -80 ° C에서 저장되었다. 모든 유전자의 발현은 하우스키핑 유전자 Tata-결합 단백질(Tata-binding protein, *Tbp*)에 상대적으로 나타냈다.

[0303] **사용된 프라이머 목록:**

프라이머 명칭	서열
Fwd EPO HRE	5' - CCA CCT GTA GGT TTG GCA AGC TAG CGT CCG GGA AAC - 3'
Fwd GLUT3 HRE	5' - CCA CCT GTA GGT TTG GCA AGC TAG CCA CGC CTG TAA TC - 3'
fwd VEGFA HRE	5' - CCA CCT GTA GGT TTG GCA AGC TAG CCC CCC TTT GGG - 3'
Fwd frag 3 downstream Xba HRE	5' - GAA CCA TCA GAT GTT TCC AGG - 3'
Fwd frag A binds in eGFP	5' - ATC CGC CAC AAC ATC GAG - 3'
Rev EPO HRE	5' - CCT GGA AAC ATC TGA TGG TTC TCT AGA CCT CAG GCC CGG - 3'
Rev frag 3 downstream EcoRI	5' - GCG GGC CTC TTC GCT ATT A - 3'
Rev frag A upstream Nhe HRE	5' - TTG CCA AAC CTA CAG GTG G - 3'
fwd HRE from p3 p4 p5	5' - GGT GGT ACC GGT CTG TAG GTT TGG CAA GCT AGC - 3'
fwd primer seq genome to verify orientation of HRE	5' - GAA AGA CCC CAC CTG TAG GTT T - 3'
fwd puro plus AgeI plus buffering	5' - GCC ACG ACC GGT GCC GCC ACC ATC CCC TGA CCC ACG CC - 3'
fwd tataa linker gilbert overlap	5' - GGG TAT ATA ATG GAA GCT CGA ATT CTA GCG - 3'
fwr HRE overlap and skip Nco	5' - CGA AAG GAG CGC ACG ACC AAT TCA ATT GGC CCT ACG TG - 3'
gagSFG seq primer	5' - CGG ATG GCC GCG AGA - 3'
qPCRfwd Luc	5' - ATT TGA CTG CCG GCG AAA TG - 3'
qPCRfwdrefmouseTBP	5' - TGT CTG TCG CAG TAA GAA TGG A - 3'
qPCRreffwdhumanTBP	5' - TTT GGT GTT TGC TTC AGT CAG - 3'
qPCRrefrevhumanTBP	5' - ATA CCT AGA AAA CAG GAG TTG CTC A - 3'
qPCRrefrevmouseTBP	5' - AAA ATC CCA GAC ACG GTG GG - 3'
qPCRrev Luc	5' - AAG ATT CAT CGC CGA CCA CAT - 3'
rev GLUT3 HRE	5' - CCT GGA AAC ATC TGA TGG TTC TCT AGA TTT GGC CAT GTT GAC TAG - 3'
rev VEGFA HRE	5' - CCT GGA AAC ATC TGA TGG TTC TCT AGA GTT CCG GGG TTA GTC AGT - 3'
rev primer seq orientation HRE	5' - CAC CAA AGA GTC CTA AAC GAT C - 3'
rev puro skip Nco site	5' - CAC GTA GGG CCA ATT GAA TTG GTC GTG CGC TCC TTT CG - 3'

[0304]

[0305] **세포 생존력**

[0306] 세포를 차가운 DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) (Gibco)로 두 번 세척하고, PE Annexin V 아포토시스 검출 키트 (BD Biosciences)에 공급된 1X 결합 버퍼에 재현탁했다. 그 다음, 세포를 PE Annexin V 및 7-아미노-액티노마이신 (7-AAD)으로 PE Annexin V 아포토시스 검출 키트 프로토콜 (BD Biosciences)에 따라 15분 동안 실온 암실에서 염색하고, 세척하고, 1X 결합 버퍼에 재현탁하고, 유세포분석기(FACSCanto II Flow cytometer, BD Biosciences)로 분석하였다. 흐름 데이터는 FlowJo 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. PE Annexin V 및 7-AAD 음성 세포는 생존 가능한 것으로 간주되며, PE Annexin V 양성 및 7-AAD 음성 세포는 초기 세포사멸 상태에 있고, PE Annexin V 및 7-AAD 양성 세포는 후기 세포사멸 상태이거나 죽은 것으로 간주되었다.

[0307] **T-세포 분리**

[0308] 인간 T-세포를 분리하기 위해; Guy와 St Thomas의 연구 윤리 위원회의 승인 하에 (REC reference 09/H0804/92) 건강한 지원자로부터 혈액을 얻었다. 혈액을 항응고제(10% 시트레이트)가 함유된 Falcon 튜브에 수집하고, RPMI 1640과 1:1로 혼합하고, Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) 위에 겹쳤다. 샘플을 750 *g* 에서 30분 동안 20C에서 원심분리하여 말초 혈액 단핵 (PBMC) 세포 분획을 분리하였다. PBMC를 함유하는 혈장과 Ficoll 층 사이의 계면을 멸균 파스퇴르 피펫을 사용하여 수확하고, RPMI 1640으로 세척했다. T-세포는 인간 Pan T-세포 분리 키트 (Miltenyi Biotec)를 사용하여 PBMC 분획으로부터 정제하고, 제조사의 프로토콜에 따라 MidiMACs쩨 분리기와 LS 컬럼 (Miltenyi Biotec)을 사용하여 분리하였다. 정제된 인간 T-세포는 CD3/CD28 인간 T-활성화제 Dynabeads (Gibco)를 사용하여 1:1 세포 대 비드 비율로 활성화하였고, 5% 인간 혈청 (Sigma-Aldrich) 및 1X 페니실린/스트렙토마이신으로 보충된 RPMI 1640에서 $3x10^6$으로 조직 배양 플레이트에 시딩하였다. 다음날, 100 IU/ml 재조합 인간 IL-2 (PROLEUKIN)을 배양물에 첨가하였다.

[0309] **T-세포 및 세포주 형질도입**

[0310] 인간 세포에 대해 친화성을 갖는 레트로바이러스를 생산하기 위해, Peq-Pam 플라스미드 (Moloney GagPol), RDF 플라스미드 (RD114 envelope) 및 관심 있는 SFG 플라스미드를 사용하고, FuGENE HD 형질감염 시약 (Promega)을 사용하여, 이전에 설명된 바와 같이 HEK 293T 세포의 삼중 형질감염에 의해 RD114 슈도타입 레트로바이러스 입자를 생성하였다. 뮤린 세포 친화성을 갖는 레트로바이러스를 생산하기 위해, Phoenix-ECO 레트로바이러스 생산자 세포를 관련 플라스미드와 함께 FuGENE HD (Promega)를 사용하여 형질감염하였다. 바이러스 입자를 함유하는 상층액을 수확하고, 관심 세포와 함께 적어도 48 h 동안 인큐베이션하여 이들의 형질도입을 가능하게 했다. T세포는 4 μg/cm^2 RetroNectin (Takara Bio)으로 밤새 4 C에서 사전 코팅된 비조직 배양 처리 플레이트에 형질도입되었다. 인간 T-세포의 레트로바이러스 형질도입 이전에, T-세포 분리 섹션에 언급된 바와 같이 CD3/CD28 인간 T-활성화제 Dynabeads (Gibco)를 제거하고 신선한 IL-2를 첨가하였다. 바이시스트로닉 4αβ-T2A-CAR 구축물을 사용한 T-세포 형질도입의 경우, T-세포 형질도입 후, 인간 IL-4 (Peprotech)를 30 ng/ml 최종 농도로 배양물에 첨가하여 형질도입된 T-세포 집단을 풍부하게 하였다. SKOV-2 및 HN3을 포함하는 부착성 세포주는 4 μg/ml 최종 농도로 폴리브렌 (Santa Cruz Biotechnology Inc)을 함유하는 배지 용액에서 앞서 지시된 바와 같이 생성된 레트로바이러스로 형질도입하여 감염 효율을 증가시켰다. Luc/eGFP를 발현하도록 변형된 세포를 eGFP 형광을 기반으로 하는 BD FACSAria III (BD Biosciences)를 사용한 세포 분류에 의해 정제하였다.

[0311] **시험관 내(*in vitro*) 연구**

[0312] 시험관 내(*in vitro*) 저산소증은 0.1, 1, 5% O_2 중 어느 하나, 5% CO_2 및 밸런스로서 질소를 함유하는 가스 (BOC)로 4분 동안 25L/분으로 퍼지된 저산소증 인큐베이터 챔버 (Stemcell Technologies)를 사용하여 달성되었으며, 그 후 챔버는 밀봉되었다. 이 과정을 1시간 후에 다시 반복하였다. 저산소증-매개 HIF1α 안정화는, 일부 경우에, 달리 언급되지 않는 한, HIF1α 수산화를 억제하는 화학적 $CoCl_2$ (Sigma-Aldrich)를 100 μM 최종 농도에서 사용하여 모방되었다. 시험관 내(*in vitro*) 세포독성 분석에서 $1x10^4$ Luc/eGFP-발현 SKOV3 세포를 96-웰 조직 배양 플레이트에 시딩하고, 형질도입 또는 비형질도입 T-세포를 지시된 이펙터 대 표적 비율로 웰에 첨가하였다. 공배양물을 24시간, 48시간 및 72시간 동안 인큐베이션하고, 표적 세포 생존율은 배지 100 μl당 PBS 중 15mg/ml XenoLight D-루시페린 (PerkinElmer) 1 μl 첨가 후 정상 산소 조건에서 루시퍼라제 정량화에 의해 결정하였다. FLUOstar Omega 플레이트 리더 (BMG Labtech)를 사용하여 발광을 정량화했다. 24시간 및 48시간 공동배양 시점에, 배지 샘플을 공동배양물로부터 취하여, 후속적으로 각각 IL-2 및 IFNγ 정량화에 사용했다. IL-2는 제조사의 프로토콜에 따라 인간 IL-2 ELISA Ready-SET-Go! Kit, 2nd Generation (eBioscience)을 사용하여 정량화하였다. IFNγ는 제조사의 프로토콜에 따라 인간 IFN-감마 DuoSet ELISA 키트 (Bio-Techne)를 사용하여 정량화하였다. 두 ELISA에서 사이토카인 농도는 Fusion alpha-FP 분광광도계 (Perkin-Elmer)에서 450 nm에서의 흡광도 측정에 의해 결정되었다.

[0313] **생체 내(*in vivo*) 연구**

[0314] 종양 세포주 (PBS 중 $2.5x10^5$ 세포)를 6 내지 8주령의 암컷(SKOV3 및 LL2의 경우) 및 수컷(HN3의 경우) 마우스에 피하(s.c.) 주사하여 접종하였다. 일단 종양이 만져지면, 종양의 장(long, L) 및 단(short, S) 치수의 디지털 캘리퍼스 측정을 2일 또는 3일마다 수행하였다. 종양 부피는 다음 방정식을 사용하여 설정하였다: 부피=(S^2xL)/2. EDTA 코팅된 Microvette™ 튜브 (Sarstedt)에서 마우스로부터 혈액 샘플을 채취하고, 이 샘플을 2,000 *g*에서 5분 동안 원심분리하여 혈장을 추출하였다. 지시된 용량의 CAR T-세포를 30 G 니들을 사용하여 꼬리 정맥을 통해 200 μl PBS에 주입하였다. 유세포분석을 위한 종양 조직 및 기타 장기는 이전에 설명된 바와 같이 단일 세포를 방출하기 위해 효소 절단하였다. 간단히 말해, 메스를 사용하여 조직을 잘게썬 다음, 단일 세포를 RPMI (Gibco) 중 *Clostridium Histolyticum* (Sigma-Aldrich)의 1 mg/ml 콜라게나제 I 및 0.1 mg/ml 데옥시리보뉴클레아제 I (AppliChem)와 함께 37° C에서 60분 동안 인큐베이션하여 유리시켰다. 그 다음, 방출된 세포를 70 μm 세포 스트레이너에 통과시킨 후, 유세포분석을 위해 염색하였다. 생존가능한 세포는 트립판 블루 (Sigma-Aldrich)가 배제된 혈구계산기를 사용하여 계산되었다.

[0315] **생물발광 이미징**

[0316] 생체 내(*in vivo*) 루시퍼라제 생체분포를 평가하기 위해, 이미징 10분 전에 멸균 PBS 중 200 μl (15mg/ml) XenoLight D-루시페린 (PerkinElmer)을 마우스에 복강 내(intraperitoneally, i.p.) 주사했다. 동물은 이미징을 위해 마취되었고, 방출된 빛은 생체 내 이미징 시스템 (IVIS®) Lumina Series III (PerkinElmer)를 사용하여 검출하였고, 데이터는 Living Image 소프트웨어 (PerkinElmer)를 사용하여 분석되었다. 빛은 광자/초/단위

면역으로 정량화되었다.

[0317] **유세포 분석**

[0318] 유세포 분석은 이전에 설명된 바와 같이 수행하였다. 하기 항체는 eBioscience에서 구입했으며, 달리 언급되지 않는 한 1 μg/ml로 사용되었다: 항-인간 CD3ε Brilliant Violet 421™ (SK7; Biolegend®), 항-인간 CD8α Alexa Fluor 488 (RPA-T8), 항-인간 CD4 PE (RPA-T4), 항-인간 CD45 Brilliant Violet 510쪠 (HI30 Biolegend®), 항-마우스 CD4 FITC (Clone: RM4-5), 항-마우스 CD8α eFluor®450 (Clone: 53-6.7), 항-마우스 CD3ε PE (Clone: 145-2C11), 중화 항-마우스 CD16/CD32 (Clone: 2.4G2). 형광 마이너스 1 염색된 샘플을 사용하여 배경 염색을 확립하였다. T1E CAR은 비오틴화된 항-인간 EGF 항체 (Bio-Techne: BAF236)로 염색하고, 스트렙타비딘 APC를 사용하여 검출하였다. eGFP는 고유 형광에 의해 검출되었다. 죽은 세포 및 적혈구는 항-Ter-119 PerCP-Cy5.5 (Ter-119; eBioscience)과 함께 1 μg/ml 7-아미노 액티노마이신 D (Cayman Chemical Company)를 사용하여 제외하였다. 데이터는 BD FACS Canto II (BD Biosciences)에서 수집되었다. 데이터는 FlowJo 소프트웨어 (Freestar Inc.)를 사용하여 분석했다.

[0319] **통계**

[0320] 분산의 정규성 및 동질성은 각각 Shapiro-Wilk 정규성 검정 및 F-검정을 사용하여 결정되었다. 그 다음, 통계적 유의성은 GraphPad Prism 6 소프트웨어를 사용하여 파라메트릭 데이터에 대한 양측 언페어드 스튜던트 *t* 검정 (two-sided unpaired Students *t* test) 또는 비파라메트릭 데이터에 대한 Mann-Whitney 검정을 사용하여 결정되었다. 페어드(paired) 데이터를 비교할 때, 페어드 비율 스튜던트 *t* 검정(paired ratio Students *t* test)을 수행하였다. 분산이 같지 않은 그룹을 비교할 때 Welch의 수정이 적용되었다. 종양 성장 곡선의 통계적 분석은 statmod 소프트웨어 패키지의 "CompareGrowthCurves" 기능을 사용하여 수행되었다. 제시된 데이터에서 제외된 이상치는 없었다.

[0321] 결과

[0322] **HRE 디자인**

[0323] Ensembl 데이터베이스에서 얻은 게놈 데이터의 분석에 기초하여, 종간 및 저산소증-유도성 유전자 간에 보존되는 추정 HIF1-결합 부위(HIF1-binding site, HBS)를 확인했다. 본 발명자들은 인간, 마우스 및 래트에서 서로 다른 산소-민감성 유전자로부터 추정 6 뉴클레오티드 (nt) 길이의 HBS를 HIF에 결합하는 6-nt 서열의 각 위치에서 각 뉴클레오티드의 빈도를 기반으로 비교했으며, 서열 로고(logo)는 인간 및 마우스 HBS에 대해 구성되었다 (도 4A 및 4B). HBS 요소의 외부에는 또한 산소-제어 전사와 연관된 게놈 HBS 서열의 8 nt 다운스트림 서열이 있다. 이 부위는 HIF 보조 부위(HIF ancillary site, HAS)로 알려져 있다(도 4C).

[0324] HRE 디자인은 게놈 서열에서 가져온 8nt 링커 영역에 의해 분리된 HBS 및 HAS 부위를 포함했다. 첫 번째 경우에는, 3개의 순차적인 HBS-HAS 서열이 사용되었다. 또한, 상이한 HBS 서열이 HIF에 대해 상이한 민감도를 갖는지 확인하기 위해, 각각 3개의 순차적인 HBS-HAS (단순히 HRE) 서열을 함유하는 3개의 구축물을 초기에 디자인하였다. 이들 구축물 간 차이점은 각 구축물의 HBS가 서로 다른 유전자에서 유래된 것이었다는 점이다(도 5). 이들 유전자는 인간 Epo, 인간 VEGFA 및 인간 GLUT-3이다.

[0325] **LTR에서 HRE**

[0326] 구축물을 숙주세포의 게놈에 안정적으로 통합하기 위해 본 발명자들은 이전에 설명된 바와 같은 변형된 LTR이 있는 SFG 레트로바이러스 벡터를 사용했다. SFG 벡터는 Moloney 뮤린 백혈병 바이러스(Moloney murine leukaemia virus, MMLV)에서 유래된다. 본 발명자들은 숙주 세포 게놈으로의 이식유전자의 통합에 영향을 미치지 않고 LTR 내의 레트로바이러스 인핸서 영역을 변형하려고 시도했다. 이것은 이전에 바이러스 프로모터의 업스트림인 LTR의 NheI/XbaI 부위에 HRE를 클로닝함으로써 달성되었다. 벡터의 비활성화 또는 이의 숙주 게놈에 통합하는 능력을 피하기 위해, 본 발명자들은 NheI/XbaI 영역을 비슷한 길이의 단편으로 대체했다.

[0327] 5' NheI 및 3' Xbal 제한 부위를 포함하는 우리의 HRE 서열을 함유하는 DNA 서열은 GeneArt에 의해 합성되었다. 이러한 서열은 SFG MMLV 벡터의 3' LTR에 있는 NheI/XbaI 부위에 서브클로닝되었다. 본 발명자들은 3' LTR을 변형했지만 5' LTR을 변형하지 않았으며, 이는 역전사가 발생하면, 변형된 3' LTR U3 영역이 5' LTR에 복제되기 때문이다. NheI/XbaI은 SFG에서 고유한 제한 부위가 아니라는 사실 때문에, 본 발명자들은 독특한 제한 부위(XhoI/EcoRI)를 함유하는 순차적 중첩 PCR을 사용하여 여러 단계로 단편을 합성하여, 3' LTR에서 NheI/XbaI 부위의 특이적 변형을 달성하였다. 산소-감지 리포터 구축물을 제조하기 위해, P2A 펩티드(자가-절단 펩티드)에

의해 분리된 클릭 비틀 루시퍼라제 및 녹색 형광 단백질의 녹색-방출 변이체를 SFG 벡터의 NcoI/XhoI 부위로 클로닝했다. 결과 구축물은 도 7에 나타내었다.

[0328] **ODD 추가**

[0329] 본 발명자들은 정상산소의 조건 하에 단백질 분해를 촉진하기 위해 루시퍼라제 리포터에 부착된 ODD 도메인을 갖는 추가 벡터 세트를 동시에 클로닝했다. HIF1α 안정성은 ODD에서 프롤린(p402 및 p564)의 산소-의존적 수산화에 의해 제어된다. 이 서열은 단백질의 분해를 산소-의존적으로 만들기 위해 관심 단백질과 융합되었다. UniProt 데이터베이스를 기반으로 인간 HIF1α의 ODD 도메인 (도 7에서 강조표시됨)은 203개 아미노산 길이인 반면, 마우스 오쏘로그는 213개 아미노산으로 구성된다. 중첩 PCR을 사용하여 본 발명자들은 HIF1α의 아미노산 서열 557-574 (도 7에서 볼드 표시)를 루시퍼라제의 C-말단에 융합했다. 정확한 아미노산 서열 557-574 (LDLEMLAPYIPMDDDFQL)는 인간과 마우스에서 보존된다. 결과 단편(루시퍼라제-ODD 융합)은 도 8에 도시된 바와 같이 LTR-변형 및 LTR-비변형 SFG 리포터 구축물에 삽입되었다.

[0330] 후속 실험에서 본 발명자들은 서열번호 29, 30, 31을 융합했다. 3개의 서열번호는 모두 융합 파트너에 산소 민감성을 부여했으며, 최적의 결과는 서열번호 29, 즉 전체 ODD (401-603)에서 얻어졌다 (도 17).

[0331] **상이한 세포주에서 정상산소 또는 저산소 하에 HIF1α 안정성**

[0332] 세포주들은 정상산소 또는 저산소 조건, 각각 20% 또는 0.1% O_2에서 18시간 동안 배양되었다. 하기 인간 세포주들은 이러한 조건에서 스크리닝되었다: HEK293 T, HT1080, T47D 및 Jurkat (Clone E6-1). 18시간 노출 직후, 세포를 용해하고, 웨스턴 블롯을 수행하여 방법에서 설명된 바와 같이 HIF1α를 정량화하였다. 테스트된 모든 세포주에서, HIF1α는 정상산소(20% O_2)와 비교할 때 저산소 조건(0.1% O_2) 하에 안정화되는 것으로 나타났다 (도 10). ImageJ 소프트웨어를 사용하여 농도계를 사용하여 단백질을 정량화했다. 293T 세포 및 HT1080 세포는 저산소 조건 하에 가장 많은 양의 HIF1α를 가졌지만 이들 세포주에서는 정상산소 조건에서도 일부 HIF1α가 검출되었다. T47D 및 Jurkat 세포는 모두 저산소 조건 하에 HIF1α 단백질이 검출 가능했으나, 정상산소 조건에서는 T47D 및 Jurkat 세포에 대해 검출 가능한 HIF1α 밴드가 보이지 않았다.

[0333] **세포 선택**

[0334] 본 발명자들은 3가지 이유로 초기 실험에서 293T 세포를 사용하기로 선택했다. 첫째, HIF1α 웨스턴 블롯 분석은 293T 세포가 정상산소에서 발견되는 수준보다 5배 더 높은 수준으로 저산소 조건에서 HIF1α 단백질의 강한 발현을 가짐을 보여주었다. 둘째, 본 발명자들은 293T가 T47D와 비교할 때 빠르게 성장하는 세포로, 짧은 시간에 다수의 실험을 수행할 수 있음을 관찰했다. 셋째, 293T 세포는 본 발명자들이 레트로바이러스를 생산하기 위해 사용하는 패키징 세포주이다. 따라서, 레트로바이러스를 생산하기 위한 293T 세포의 형질감염은 293T 세포 자체의 자가-형질도입을 초래한다.

[0335] **유세포 분석에 기반한 형질도입 효율**

[0336] 우리의 구축물에서 이식유전자의 발현은 산소-민감성이기 때문에, 본 발명자들은 정확한 형질도입 효율을 결정하기 위해 유세포 분석에 의존할 수 없다. 구성적 루시퍼라제-P2A-GFP 구축물 (SFG 리포터 구축물)로 형질도입된 293T 세포의 유세포 분석은 83%의 살아있는 세포 집단 (7-AAD 음성)에서 형질도입 효율을 밝혀냈다 (도 10). 이러한 결과는 우리가 사용한 레트로바이러스 형질도입 방법이 효율적으로 작동했음을 나타낸다.

[0337] **LTR 내에서 통합 후 HRE 방향을 검증하기 위한 시퀀싱**

[0338] 3' LTR의 변형이 5' LTR에 복제되었고 통합된 프로바이러스에서 올바르게 배향되었는지 확인하기 위해, 본 발명자들은 형질도입 후 5' LTR 영역을 시퀀싱했다. 게놈 DNA를 형질도입된 293T 세포에서 분리하고, 5' LTR 영역을 PCR을 통해 증폭하고 1.2% 아가로스 겔에서 전개했다. 정확한 길이의 밴드를 절제하고 겔 정제한 다음 시퀀싱했다. 시퀀스 분석은 3' LTR에 대한 HRE 변형이 올바르게 복제되었고 5' LTR에서 올바른 방향을 가지고 있음을 보여주었다.

[0339] **카피 수 분석의 확립/qPCR (카피수) 분석 검증**

[0340] 저산소 조건 하에 루시퍼라제 발현을 정량화하는 분석의 경우, 데이터를 정규화할 필요가 있으며, 이는 모든 세포가 형질도입되지 않을 수 있고 일부 세포에 리포터 구축물의 다수 카피가 함유될 수 있기 때문이다. 이를 허용하기 위해 본 발명자들은 모든 세포 (네이티브 게놈 DNA)에 2개의 카피로 존재하는 참조 유전자 (TBP)의 증폭 및 이식 유전자 (루시퍼라제)의 증폭을 사용하여 정량 PCR (qPCR)을 활용하여, 통합된 이식유전자의 수를 계산

할 수 있도록 하였다. qPCR 프라이머를 설계하기 위해, 본 발명자들은 Ensembl 데이터베이스를 사용하여 인 실리코(*in silico*)에서 다수의 가능한 프라이머 서열을 스크리닝하여 결합의 높은 특이성을 보장했다. PCR에 의해 생성된 앰플리콘이 참조 및 이식유전자 유전자 양을 나타내도록 관심 유전자의 고유한 부위에 결합하는 프라이머를 선택했다. 클릭 비틀 루시퍼라제와 인간 및 마우스 TBP 에 결합하는 프라이머 세트를 설계했다(인간 및 마우스 세포주 모두를 사용하기 때문임). 이 접근법을 사용하여, 하기 3개 세트의 프라이머를 설계했다: 마우스 TBP 유전자에서 특이적으로 94nt 단편을 증폭하는 정방향 마우스 TBP (5' - TGT CTG TCG CAG TAA GAA TGG A - 3') 및 역방향 마우스 TBP (5' - AAA ATC CCA GAC ACG GTG GG - 3'), 인간 TBP에서 특이적으로 103nt 단편을 증폭하는 정방향 인간 TBP (5' - TTT GGT GTT TGC TTC AGT CAG - 3') 및 역방향 인간 TBP (5' - ATA CCT AGA AAA CAG GAG TTG CTC A - 3'), 및 루시퍼라제 이식유전자에서 90nt 단편을 특이적으로 증폭하는 정방향 루시퍼라제 (5' - ATT TGA CTG CCG GCG AAA TG - 3') 및 역방향 루시퍼라제 (5' - AAG ATT CAT CGC CGA CCA CAT - 3').

[0341] 프라이머 결합 특이성 (단일 증폭 산물)을 결정하기 위해, 본 발명자들은 세포에서 추출된 게놈 DNA에 대해 qPCR을 수행하고, 아가로스 겔에서 PCR 산물을 전개하였다. 모든 PCR 산물은 프라이머가 특이적임을 입증하는 적절한 길이의 단일 밴드를 제공했다.

[0342] 카피수 분석을 검증하기 위해, 게놈 DNA를 형질도입되지 않은 세포 및 클릭 비틀 루시퍼라제를 함유하는 구축물로 형질도입된 세포로부터 추출하였다. 200ng의 DNA를 연속 희석하고(1:2), 설계된 프라이머를 사용하여 qPCR을 수행했다. 각 반응은 3회씩 수행되었다. 예상대로, 형질도입되지 않은 세포에서 추출한 DNA에서는 루시퍼라제 앰플리콘이 검출되지 않았다. 형질도입된 세포에서 추출한 DNA를 사용하여 생성된 qPCR 데이터는 루시퍼라제 및 TBP 프라이머 세트로부터의 qPCR 신호와 반응의 사이클 수 간에 선형 관계가 있음을 입증하여, 분석을 검증했다.

[0343] **20%, 5%, 1% 및 0.1% 산소에서 293T 세포의 18시간 인큐베이션**

[0344] 293T 세포는 레트로바이러스로 형질도입되었고, 형질도입 효율은 qPCR에 의해 결정되었다. 비형질도입된 293T 세포 및 루시퍼라제 구축물 1-8로 형질도입된 293T 세포 (도 6 및 8의 A, B, C 및 D)를 시딩하고, 5%, 1% 및 0.1% 산소 및 정상산소(20% 산소)에서 배양하였다. 이러한 조건 하에 18시간 인큐베이션 후, 루시퍼라제 발현 및 세포 생존력을 측정했다. 5% 산소 및 정상산소에서 293T 세포의 18시간 인큐베이션 후 얻은 로우(raw) 상대 광량 단위 (relative light unit, RLU) 데이터는 산소-제어 루시퍼라제 발현 시스템이 생성되었음을 나타낸다 (도 14A). 모든 HRE 및/또는 ODD 변형된 구축물은 정상산소와 비교하여 저산소(5%)에서 RLU의 약간의 증가를 나타내었지만, 이는 더 낮은 산소 농도에서는 나타나지 않았다. 일반적으로, LTR HRE 변형 구축물은 세포가 0.1% 산소에서 유지되었을 때 LTR 야생형 대응물에 비해 더 낮은 RLU를 제공했다. 이전 간행물에 따르면, 더 심각한 저산소증은 정상산소 조건에 비해 저산소 조건에서 단백질 발현의 배수 유도를 증가시키는 경향이 있다. 그러나, 우리의 데이터에서는 이러한 경향을 볼 수 없었다 (도 12C).

[0345] 구축물 내에 ODD 도메인을 추가하는 효과는 변형되지 않은 LTR 구축물 +/-ODD를 구성적으로 발현하는 것을 비교함으로써 가장 잘 평가된다. 도 17 및 18 참조. ODD의 추가는, 실험 전반에 걸쳐 조건에서 루시퍼라제의 검출을 약간만 감소시켰다. 저산소증의 유의한 유도가 없는 것이 장치 또는 실험 절차의 결과였을 가능성이 남아있기 때문에, 이를 배제하기 위해, 본 발명자들은 형질도입된 293T 세포를 100μM 코발트 클로라이드로 18시간 동안 자극하여 저산소 조건을 모방하였다 (HIF1α 분해의 코발트-매개 억제에 의함). 그러나, 코발트 클로라이드가 없을 때와 비교하여 100μM 코발트 클로라이드가 있을 때 루시퍼라제 유도를 관찰하지 못했다 (도 13).

[0346] 도 29는 야생형에 비해 HRE 프로모터의 우월성을 입증한다. 본 발명자들은 HRE 변형이 우수한 프로모터를 야기한다는 것을 관찰했으며, 이는 저산소 상태, 예를 들어 종양 환경에서, 동일한 조건에서 변형되지 않은 야생형 대응물과 비교하여 다운스트림 유전자의 더 나은 발현을 구동한다. 도 29A 및 B는 HRE-변형 단독이 모든 이펙터:표적 비율에서(심지어 1:2와 같은 낮은 E:T에서도) 저산소 (고형 종양) 환경에서 T-세포에서 우수한 표적 사멸 및 활성화 능력을 야기한다는 것을 입증한다. 이것은 일반적으로 환자의 확립된 고형 종양에서 이펙터 대 표적 비율이 낮기 때문에 매우 중요하며, 따라서 HRE-CAR이 낮은 E:T 비율에서 효율적일 수 있는 능력은 중요하며 CAR T-세포 면역요법 결과를 결정할 수 있다. 또한, 이 향상된 CAR 발현은 저산소 상태로 인해 고형 종양 내에서만 발생할 것이며, 따라서 향상된 발현은 종양 특이적이므로, WT CAR의 위험보다 더 큰 종양외 독성의 위험을 제기하지 않을 것이다.

[0347] **프로모터에서 증가하는 수의 HRE 요소의 존재 시 저산소증 유도성**

[0348] 도 15 및 16에 나타낸 바와 같이, 프로모터에서 HRE 요소의 수가 증가함에 따라 저산소증-유도성이 증가한다. 다수 HRE를 함유하도록 LTR (레트로바이러스 프로모터)을 변형하는 것에 의해, 정상산소의 조건에서 루시퍼라제의 발현이 효과적으로 침묵되었다.

[0349] **정상산소 조건 (+/-ODD)에서 루시퍼라제 안정성**

[0350] 다양한 ODD 세그먼트를 루시퍼라제의 C-말단에 융합하였고, 그 결과는 도 20 및 21에 나타나있다. 서열번호 29: ODD 세그먼트 401-603, 서열번호 30: ODD 세그먼트 530-603 및 서열번호 31: ODD 세그먼트 530-653이 테스트되었다. 3개의 ODD 세그먼트 각각의 추가는 정상산소 조건에서 감소된 발현을 가져왔고, 서열번호 29 (401-603 ODD)를 갖는 9개의 HRE 프로모터 구조의 조합은 정상산소 조건에서 루시퍼라제의 발현을 나타내지 않았지만, 이는 저산소 조건에서 전환되었다 (도 18).

[0351] **시험관 내(*in vitro*) 및 생체 내(*in vivo*) T4-CAR 결과**

[0352] 본 발명자들은 마우스와 인간 모두에서 가능한 ErbB 동종이량체 및 이종이량체의 8/10에 대해 특이성을 갖는 pan-ErbB CAR T1E28z를 활용했다. 리포터 클릭 비틀 루시퍼라제 (Luc)를 동시에 동시발현하도록 CAR 구축물을 변형하여, T-세포로 형질도입되면 생체 내(*in vivo*) 추적을 허용하도록 했다. ErbB-CAR/Luc T-세포는 피하 SKOV3 난소암 이종이식편을 갖는 면역저하 NSG 마우스에 정맥내(i.v.) 주입하였다. CAR T-세포의 생체-분포를 주입 후 4일에 분석하였다. 이 초기 시점에서, 대부분의 세포는 폐와 간에 존재하는 것으로 나타났지만, 종양에 최소한의 흡수가 있었다 (도 19b). ErbB1-4 mRNA 발현에 대한 장기의 프로파일링은 CAR T-세포가 주입 후 축적되는 것으로 관찰된 폐와 간을 포함한 모든 중요한 장기에서 패밀리의 모든 수용체가 발현되었음을 확인했다.

[0353] 저산소증이 종양 미세환경을 건강한 조직과 구별함에 따라, 본 발명자들은 이것을 이용하여 저산소증-감지 T4-CAR을 만들고자 했다. T4는 IL-4가 세포외 도메인에 결합할 때 세포내 IL-2/IL-15 신호를 전달하는 키메라 IL-4 수용체와 동시발현되는 차세대 항-ErbB CAR이며, 이에 의해 T-세포의 CAR-의존적 사멸 능력에 영향을 미치지 않고 생체 외(*ex vivo*) 확장 동안 CAR T-세포를 선택적으로 풍부하게 하는 수단을 제공한다. 본 발명자들은 항-ErbB CAR을 C-말단 203개 아미노산 ODD를 함유하도록 조작하였고, 긴 말단 반복에서 CAR 프로모터가 9개 HRE의 시리즈를 함유하도록 변형하여, CAR이 T-세포로 형질도입될 때 저산소증에 선택적으로 반응하도록 했다 (도식도 21). 시험관 내에서(*in vitro*), 'HypoxiCAR'로 명명된 이 CAR은 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T-세포 집단 모두에서 엄격한 저산소증-특이적 표면 CAR 발현을 입증했다 (도 21b).

[0354] CAR 발현은 매우 동적이고, O_2-의존적 방식으로 '켜기' 및 '끄기'가 가능한 스위치를 나타낸다 (도 21c). HRE는 강력한 프로모터인 것으로 입증되었는데, 이는, 저산소 조건에서, 동일한 형질도입 효율 및 동일한 $CD4/CD8^+$ T-세포 비율에도 불구하고, 모 T4-CAR과 비교하여 단지 약간 더 적은 총 세포 표면 CAR 발현이 관찰되었기 때문이다 (도 21d). HypoxiCAR은 건강한 장기에서 발견되는 O_2 농도(≥5%)에서는 CAR 발현이 존재하지 않지만, 종양 미세환경에서 볼 수 있는 O_2 수준 (≤1%)에서 검출 가능한, 환경 O_2에 대한 반응의 유리한 감도를 입증했다. 더욱이, CAR 발현은 저산소증의 중증도와 양의 상관관계가 있었다 (도 21e).

[0355] 저산소증을 감지하는 HypoxiCAR의 능력을 검증한 후, 본 발명자들은 표적 세포의 저산소증-의존적 사멸을 유도하는 능력을 조사하고자 했다. 이를 위해, ErbB1-4를 발현하는 SKOV3 난소암 세포를 사용했다. 세포를 배양 플레이트에 시딩하고, 정상산소(20% O_2) 및 저산소(0.1% O_2) 조건에서 T4-CAR 또는 HypoxiCAR와 공동 인큐베이션했다. 동등한 형질도입 효율에도 불구하고, HypoxiCAR은 정상산소 조건 하에 유의미한 사멸 없이 SKOV3 세포의 효율적인 저산소증-의존적 사멸을 나타냈다. 표적-세포 사멸은 CAR-매개적이었고, 이는 신호 전달 ($CD3^-$)을 방지하기 위해 HypoxiCAR의 세포내 꼬리가 절단되었을 때 사멸이 폐지되었기 때문이다 (도 21f). 본 발명자들은 또한 이들 공동배양물에서 IL-2 (도 21g) 및 IFNɣ (도 21g-h)의 분비를 평가했으며, 이는 T-세포 반응에서 중요한 역할을 하는 2개의 사이토카인이다. hypoxiCAR T-세포에 의한 사이토카인 생산은 또한 검출가능한 수준이 저산소 조건에서만 발견되도록 엄격하게 조절되었다.

[0356] 생체 내(*in vivo*)에서 이러한 관찰을 번역하기 위해, 본 발명자들은 HypoxiCAR이 ErbB-CAR T-세포의 종양외 독성을 피할 수 있는지 여부를 평가했다. 이것은 임상에서 전산 투여를 방해하는 주요 장애물이다. 종양 환경에서 이 기술을 평가하기 위해, HypoxiCAR T-세포를 HN3 종양-보유 NSG 마우스에 동시에 정맥내(i.v.) 및 종양내(i.t.) 주사하였다. 이 수단에 의해, 생체 외(*ex vivo*) 조사를 위해 종양 및 중요한 장기에서 이들 세포의 급속한 축적을 달성하였다 (도 22A). HypoxiCAR 주입 4일 후, 조직을 수확하고, 효소-분해하고, T-세포를 유세포 분

석을 사용하여 CAR 발현에 대해 평가하였다. HypoxiCAR은 발현의 종양-선택성을 달성했고, 저산소 종양 미세환경 내에서만 표면 CAR 분자를 제시했으며, T-세포가 혈액, 폐 및 간에 위치할 때 CAR 발현은 없었다 (도 22B-C). 이 관찰은 SKOV 종양이 있는 NSG 마우스 및 뮤린 루이스 암종 (LL2) 종양이 있는 *Rag2*$^{-/-}$ 마우스에서도 관찰되었기 때문에 모델 특이적이지 않았다.

[0357] 결과는 불충분한 산소 공급을 특징으로 하는 미세환경인 고형 종양 내에서 panErbB-표적 CAR의 선택적 발현을 달성하는 엄격한 저산소증-감지 CAR T-세포 접근법을 보여준다. 건강한 장기에서 ErbB 수용체의 광범위한 발현에도 불구하고, 이 접근법은 뮤린 이종이식 모델에서 종양외 독성 없이 항종양 효능을 제공한다. 이 동적 산소-감지 안전 스위치는 잠재적으로 고형 악성종양 치료를 위한 CAR T-세포 표적 레퍼토리의 무제한 확장을 촉진한다.

[0358] 종양외 독성을 피하기 위한 접근법을 식별하는 것은 현재 제한되어 있는 암종에 대한 CAR 항원 표적의 완전히 새로운 레퍼토리를 잠금 해제할 가능성을 갖는다.

[0359] 이 문제를 조사하기 위해, 본 발명자들은 가능한 ErbB 수용체 동종이량체 및 이종이량체의 8/10에 대해 특이성을 갖고 마우스와 인간 수용체를 동등하게 결합하는 종 장벽을 교차하는 2세대 pan-항-ErbB CAR T1E28z를 활용했다. 이 CAR은 현재 SCCHN 환자에서 종양내(i.t.) 전달에 의한 1상 평가를 진행 중이다. 이 CAR은 IL-4가 세포외 도메인에 결합할 때 세포내 IL-2/IL-15 신호를 전달하는 키메라 사이토카인 수용체 (4αβ)와 동시발현되어 (도 24A 및 B), 생체 외(*ex vivo*) 확장 동안 CAR T-세포를 선택적으로 풍부하게 하기 위한 수단을 제공하나, T-세포의 CAR-의존적 사멸 능력에는 영향을 미치지 않는다. 이 조합을 T4-면역요법이라고 한다. T4-CAR-T세포의 종양내(i.t.) 전달은 사람에서 안전한 것으로 입증되었을지라도, 정맥내(i.v.) 주입은 이러한 세포가 원발성 종양과 전이 모두에 위치할 수 있도록 하기 때문에 바람직하다. ErbB1-4를 발현하는 HN3 종양을 갖는 면역저하된 NSG 마우스 (도 24C)에 인간 T4-CAR T-세포의 정맥내(i.v.) 주입은 치명적인 독성을 초래했으며, 이는 이들 동물에서 급격한 체중 감소에 의해 명백해졌다 (도 24D). 임상적으로 관찰된 바와 같이, 이들 마우스의 혈액 분석은 전염증성 사이토카인의 증가의 증거를 나타냈다 (도 24E). CAR T-세포의 생체분포를 해결하기 위한 시도에서, 본 발명자들은 CAR 구축물을 루시퍼라제 (Luc) 리포터를 동시에 발현하도록 변형하여 형질도입된 T-세포의 생체 내(*in vivo*) 추적을 허용하도록 했다 (도 24F). 리포터 인간 CAR T-세포의 준-치사 용량의 정맥내 (i.v.) 주입 4일 후 이미징 분석 결과, 대부분이 폐와 간에 축적된 반면, 이들 세포에서 ErbB1-4 (CAR 표적)의 발현에도 불구하고 소수만이 종양에 존재했음을 나타냈다 (도 24G). 간과 폐에서의 축적은 이종이식 시스템의 인공물이 아니었으며, 이는 뮤린 T-세포가 동일한 리포터 CAR을 발현하도록 형질도입되고 *Rag2*$^{-/-}$ 마우스로 정맥내(i.v.) 주입되었을 때 (도 24C), 이들은 동일 조직 및 비장에 축적되었기 때문이다 (도 S3). 특히, 폐가 아닌 간에서 뮤린 T-세포 축적은 CAR-의존적이었고, 이는 Luc 리포터 단독을 발현하는 T-세포가 이 위치에서 상당히 덜 만연했기 때문이다. 폐에서 CAR-비의존적 T-세포 축적은 인테그린-의존적 상호작용으로 인한 것으로 보였다. *ErbB1-4* mRNA 발현의 프로파일링은 4개의 수용체가 모두 폐와 간을 포함한 모든 중요한 장기에서 발현되었음을 확인했다. T4-CAR T-세포-매개 조직 손상의 직접적 증거를 조사하기 위해, 인간 T4-CAR T-세포의 준-치사 용량을 NSG 마우스에 정맥내(i.v.) 주사했고, 간 및 폐의 헤마톡실린 및 에오신 (H&E) 염색 조직 섹션을 사용한 병리조직학적 검사를 5일 후에 수행했다. 이 분석은 폐와 간에서 골수 세포 침윤물의 존재를 나타냈으며(도 24H 및 I), 이는 CAR-매개 염증의 대리 마커를 나타낸다. 침윤물은 호중구(다형핵 세포)와 대식세포일 가능성이 있는 풍부한 세포질을 갖는 큰 단핵구 모두로 구성된, 혈관주위 분포와 실질(parenchyma) 전체에 흩어져 관찰되었다. 간세포 괴사/사멸도 일부 동물에서 관찰되었다. T4-CAR T-세포는 더 낮은 수준으로 신장에 축적되었으며 (도 24G), 이 조직에서 유의미한 염증의 증거는 없었다. 이들 데이터는 간과 폐가 종양외 CAR T-세포 활성화를 위한 두 가지 핵심 장기를 나타냄을 가리킨다.

[0360] 저산소증은 대부분의 고형 종양의 특징이다. 비효율적인 종양 혈관구조와 함께 종양 세포의 증식 및 높은 대사 요구는 건강한 장기/조직(5-10% O_2)에 비해 부적절한 산소 공급 상태(<2% O_2)를 초래한다 (도 24J 및 K). 저산소증은 종양 미세환경을 건강한 정산산소 조직의 미세환경과 구별하기 때문에, CAR T-세포 발현의 유도를 위한 바람직한 마커를 나타낸다 (도 24J 및 K). 엄격한 저산소증-조절 CAR 발현 시스템을 만들기 위해, 본 발명자들은 T4-CAR에 대한 이중-산소 감지 접근법을 개발했다 (도 25A). 이는 C-말단 203개 아미노산 ODD를 항-ErbB CAR에 추가하는 동시에 긴 말단 반복 (LTR) 인핸서 영역에서 CAR 프로모터를 일련의 9개 연속 HRE를 함유하도록 변형하여, CAR 발현이 저산소증에 선택적으로 반응하도록 함으로써 달성되었다. 시험관 내에서(*in vitro*), 'HypoxiCAR'로 명명된 이 CAR는 인간 T-세포의 세포 표면 상에서 CAR 분자의 엄격한 저산소증-특이적 제시를 입증했다 (도 25B). 본 발명자들은 9개 HRE 카세트 또는 ODD가 단독으로 사용된 변형보다 이중-산소 감지 시스템

이 우수함을 입증했다. 두 경우 모두, 이러한 대체 접근법은 정상산소의 조건 하에 CAR 발현의 누출을 보여, 정상산소 조건 하에 종양 세포 사멸을 허용한다. CAR의 HypoxiCAR 발현은 또한 매우 동적이었고, O_2-의존적 방식으로 '켜기' 및 '끄기'를 모두 할 수 있는 스위치를 나타냈다 (도 25C). 추가 시험관 내(*in vitro*) 특징화에서, HypoxiCAR의 절묘한 O_2 감도가 확인되었으며, 이는 CAR 발현이 건강한 장기와 일치하는 O_2 농도 (≥5%)에서는 없었지만 종양 미세환경에서 발견되는 것과 동일한 O_2 농도 (≤1%)에서 세포 표면에 검출 가능하게 되었기 때문이다 (도 25D). 종양-침윤 T-세포는 종양 미세환경에서 빠져나가는 것으로 입증되었으며, 이는 저산소증-경험이 있는 CAR를 발현하는 HypoxiCAR T-세포가 건강한 정상 조직에 다시 들어가는 경우 잠재적인 안전 문제를 강조한다. 그러나, 표적 세포의 세포용해성 T-세포 매개 사멸은 최대 6시간이 소요될 수 있으므로 (*25*), 정상산소에서 이 시간 내에 HypoxiCAR의 표면 CAR의 대략 62±8%가 이미 분해되었을 수 있음이 예상될 수 있고 (도 2C), 유출된 HypoxiCAR T-세포에 의한 종양외 사멸은 제한적일 것으로 예상된다. 더욱이, 일단 HypoxiCAR가 표적을 죽이기에 충분한 CAR을 발현하면, $CD8^+$ T-세포 이동이 동족 항원을 발현하는 종양 세포와 만나는 영역에서 중단되는 것으로 입증된 바와 같이 세포 유출이 제한될 것이다.

[0361] 저산소증을 감지하는 HypoxiCAR의 능력을 검증한 후, 본 발명자들은 종양 표적 세포의 저산소증-의존적 사멸을 유도하는 능력을 조사하고자 했다. SKOV3 난소암 세포를 배양 플레이트에 시딩하고, 정상산소 및 저산소(0.1% O_2) 조건 하에 T4-CAR 또는 HypoxiCAR과 공동 인큐베이션했다. 동등한 형질도입 효율 및 $CD4^+$:$CD8^+$ T-세포 비율에도 불구하고, HypoxiCAR T-세포는 SKOV3 세포의 효율적인 저산소증-의존적 사멸을 나타냈고, 이는 T4-CAR T-세포와 거의 동등했으며, 정상산소 조건에서는 유의한 사멸이 관찰되지 않았다 (도 25E). 표적-세포 파괴는 엄격하게 CAR-의존적이었으며, 이는 HypoxiCAR의 세포내 꼬리가 CD3 신호전달을 방지하기 위해 절단되었을 때 사멸이 폐지되었기 때문이다 (도 25E). 또한 HypoxiCAR는 T-세포 반응에서 중요한 역할을 하는 두 사이토카인인 IL-2 (도 25F) 및 IFNɣ (도 25G) 둘 모두의 엄격한 저산소증-제한된 T-세포 분비를 제공했다.

[0362] HypoxiCAR이 생체 내(*in vivo*)에서 종양-제한적 CAR 발현을 제공할 수 있는지 평가하기 위해, 인간 HypoxiCAR T-세포를 HN3 종양을 갖는 NSG 마우스에 동시에 정맥내(i.v.) 및 종양내(i.t.) 주사했다. 이들 종양은 대략 $500mm^3$의 부피를 갖고 (도 26A), 여기에서 저산소증의 존재가 확인되었다 (도 24J,K). HypoxiCAR T-세포 주입 4일 후, 조직을 수확하고, 효소-절단하고, T-세포를 유세포 분석을 사용하여 CAR 발현에 대해 평가했다. 시험관 내(*in vitro*) 분석에서 예측된 바와 같이 (도 25), HypoxiCAR T-세포는 주입 후 마우스의 혈액, 폐 또는 간에서 회수될 때 검출 가능한 세포 표면 CAR 분자를 발현하지 않았지만, 저산소 종양 미세환경 내의 세포 표면에서 CAR 분자를 발현했다 (도 26B,C). 이 발견은 모델 특이적이지 않았으며, 이는 유사한 관찰이 SKOV3 종양을 갖는 NSG 마우스와 뮤린 루이스 폐 암종(LL2) 종양을 갖는 *Rag2*$^{-/-}$ 마우스 모두에서도 이루어졌기 때문이다. 'Hypoxi' 구축물 요소가 종양 성장의 여러 단계에 걸쳐 활성인지 확인하기 위해, HRE 프로모터가 루시퍼라제-ODD의 발현을 구동하기 위해 사용되는 Hypoxi-루시퍼라제 리포터가 개발되었다. 이 리포터는 SKOV3 및 HN3 세포주로 안정적으로 직접 형질도입되었다. 루시퍼라제-ODD는, 정상산소 조건 하에 종양 세포에서 검출 가능하지 않음에도 불구하고, SKOV3 및 HN3 종양 모두에서, 종양 성장의 모든 단계에서, 심지어 종양이 만져지기 전에도, 생체 내(*in vivo*)에서 검출되었다. 이것은 HypoxiCAR T-세포가 초기 단계 종양에 대해서도 활성일 수 있음을 시사한다. 이를 테스트하기 위해, HypoxiCAR T-세포를 종양이 만져지기 직전에 HN3 종양 세포 주사 후 16일에 마우스에 주입했다. 정상산소 조직에서 T-세포에 대한 CAR 발현이 부재한 상태에서, HypoxiCAR은 또한 다음과 같은 고용량 T4-CAR T-세포의 정맥내(i.v.) 주입을 사용하여 나타나는 치료-제한 독성을 피했다. 실제로, 인간 HypoxiCAR T-세포가 정맥내(i.v.) 주입된 마우스는 주입 후 체중의 급격한 감소를 나타내지 않았으며 (도 26D,E), 전신 순환에서 전염증성 사이토카인의 증거가 없었고 (도 26F), 폐, 간 또는 신장에서 조직 손상의 징후도 없었다 (도 26G,H). 중요하게도, 인간 T4-CAR T-세포가 정맥내(i.v.) 주입된 마우스는 모두 28시간에 인도적 종료시점에 도달했지만 (도 26E), HypoxiCAR T-세포 주입된 마우스는 종양외 독성의 징후를 나타내지 않았고 종양 성장을 방지했다 (도 26I). 이처럼, HypoxiCAR은 현재 신체 전체의 정상 조직에서 발현되는 항원을 표적으로 하는 CAR T-세포의 전신 투여를 방해하는 주요 장애물을 극복한다.

[0363] 저산소증은 SCCHN에서 광범위하게 연구되었다. HypoxiCAR T-세포 면역요법에 가장 적합한 환자를 평가하기 위해, 본 발명자들은 먼저 환자 종양 전사체 데이터를 사용하여 HRE-조절 유전자 특징(signature)을 생성했다. 알려진 HRE-조절 유전자를 동시발현에 대해 분석하고, 유전자 *PGK1*, *SLC2A1*, *CA9*, *ALDOA* 및 *VEGFA*를 활용하여 정제된 특징을 선택했는데, 이들 유전자 간에 유의한 양의 상관관계가 관찰되었기 때문이다 (도 27A). 상이한 SCCHN 하위유형 (인두하부, 후두, 구강 및 구강인두)에 걸쳐 이 특징의 발현에 차이가 없었다. 그러나, 이 5-유

전자 특징의 발현은, 종양 크기에 따라 유의하게 증가하였고 (T-점수; 도 27B), 또한 3기 및 4기 HNSCC 환자에서 더 불량한 생존의 예후였다 (도 27C). 생검 물질에서 저산소증을 예측하기 위해 HRE-조절 유전자 특징을 활용하면 HypoxiCAR 요법에 가장 잘 반응할 수 있는 환자를 평가하는 간단한 수단을 제공할 수 있다.

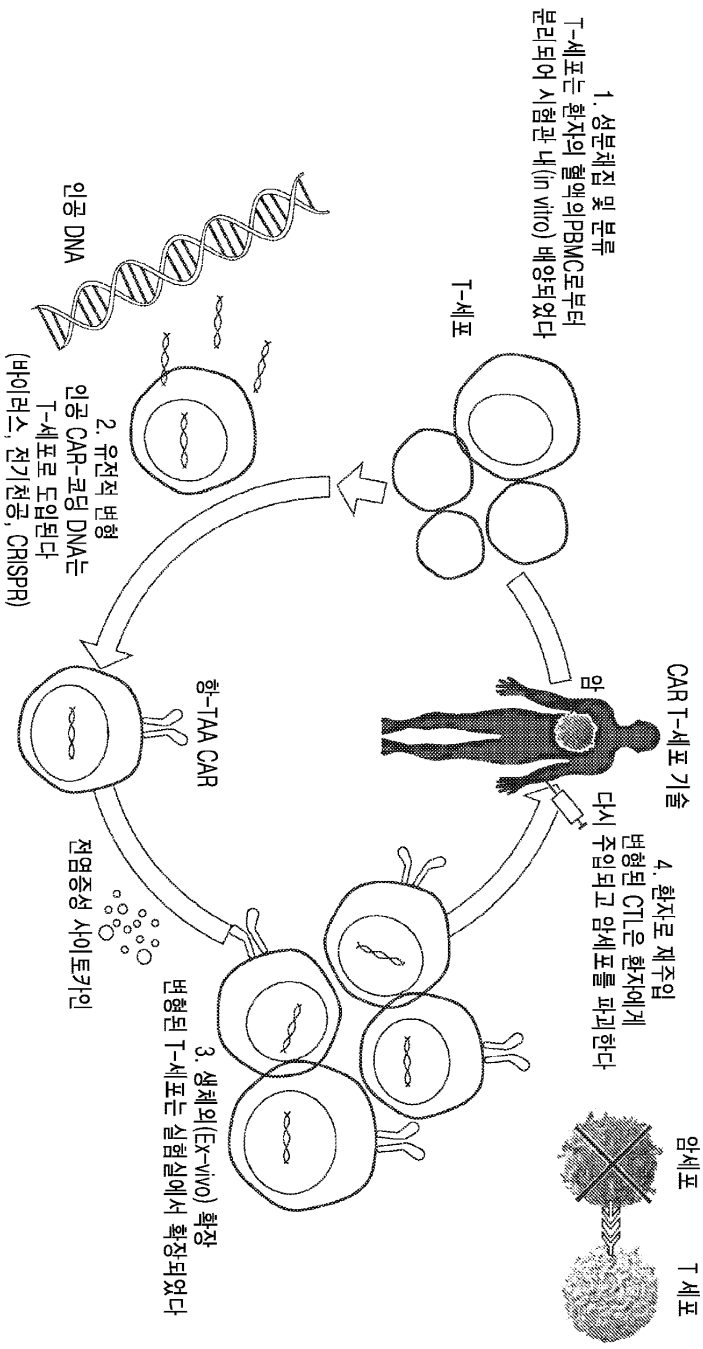
[0364] HypoxiCAR의 CAR 발현을 위한 마스터 전사 인자인 안정화된 HIF1α에 대한 SCCHN 종양 섹션의 면역조직화학 염색은, HIF1α가 안정화된 종양의 넓은 영역을 드러냈다 (도 27D). 여러 인자가 HIF1α를 안정화시킬 수 있지만, 저산소증이 이 관찰에 대한 가장 가능성 있는 설명을 나타낸다. HIF1α 안정화 및 종양내 T-세포 침윤 모두에서 이질성이 환자 간에 관찰되었다. 그러나 고무적으로, HIF1α 안정화의 가장 높은 유병률 및/또는 강도를 갖는 종양은 T-세포가 상피내 공간으로 진입하거나 종양의 HIF1α 안정화된 영역으로 진입하는 것을 배제하지 않았다 (도 27E,F). 면역형광법을 사용하여, 본 발명자들은 또한 HIF1α 안정화된 종양 영역에 침투하는 $CD3^+$ T-세포가 또한 HIF1α 자체를 안정화한다는 것을 입증했으며, 이는 이러한 환경에서 HypoxiCAR T-세포가 활성화될 것임을 시사한다 (도 27G). 이러한 관찰은 HypoxiCAR이 SCCHN과 같은 저산소 종양 유형에서 임상 적용을 찾을 수 있음을 시사하며, 여기에서 유전자 발현 (도 27A-C), HIF1α/CD3에 대한 생검 샘플의 염색 (도 27D-G) 및 ^{64}Cu-ATSM과 같은 저산소증-방사선추적기를 사용한 PET/CT와 같은 이미징 기술은 저산소 종양 미세환경의 존재를 확인하고 환자 선택을 안내하기 위한 바이오마커를 제공할 수 있다.

[0365] CAR T-세포의 종양-특이성을 개선하기 위한 접근법이 개발되었으며, 예컨대 HLA-제시 항원에 대한 특이성을 갖는 T-세포 수용체-모방 CAR, 종양 항원의 결합 표적화, 또는 고밀도 항원을 우선적으로 표적화하기 위한 CAR 친화도의 조정이 있다. 이 연구는 암-선택적 면역요법을 달성하기 위한 대안적 접근법을 입증하며, 이는 종양 미세환경의 가장 타고난 특성 중 하나를 이용한다. 여기에 설명된 '이중 저산소증-감지' 시스템은 강력한 항-종양 효능을 달성하면서 정상 조직에서 다수 표적을 인식하는 CAR의 종양외 독성을 폐지한다. 저산소증-감지 HRE 모듈 및 CAR에 추가된 ODD는 상승적으로 작용하여 엄격한 저산소증-특이적 표적 사멸을 제공한다 (도 25E). 이 접근법은 정상산소의 조건 하에 CAR의 전사 (HRE) 및 안정성 (ODD)을 모두 제한하며, 이들 두 시스템을 동시에 사용할 때, 두 시스템 중 하나를 단독으로 사용할 때 관찰되는 누출을 극복했다.

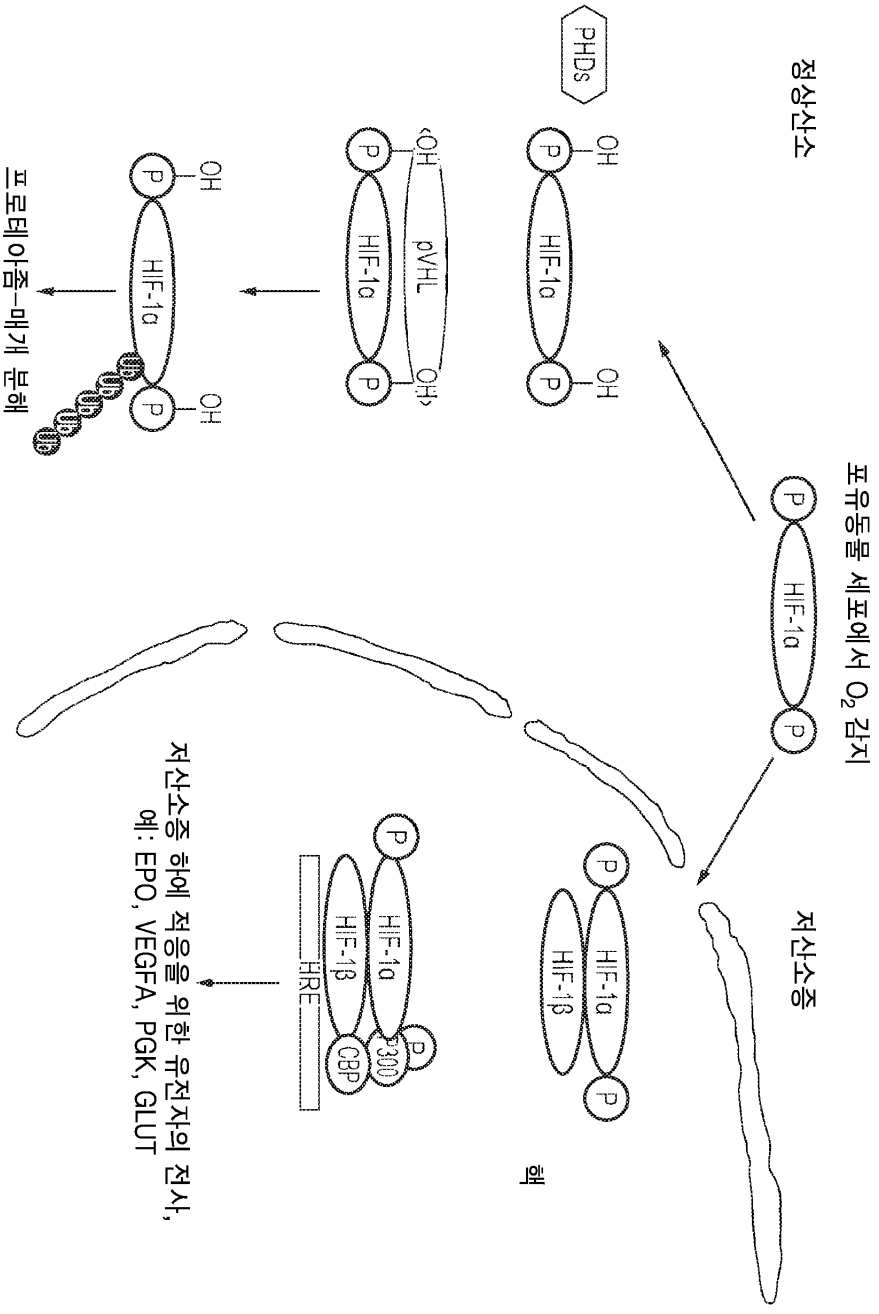
[0366] 저산소 종양 미세환경은 효율적인 면역 반응에 도움이 되지 않는다. 저산소증은 대식세포와 같은 간질 세포 (stromal cell)에서 면역-억제 프로그램을 활성화할 수 있고, 면역 체크포인트 분자의 발현을 조절할 수 있고, 보다 공격적인 종양 세포 표현형을 촉진할 수 있다. 그러나, 고무적으로 본 발명자들은 저산소증이 시험관 내(*in vitro*)에서 직접적으로 T-세포 이펙터 기능에 부정적인 영향을 미치지 않는다는 것을 발견했고(도 25E-G), 이는 다른 연구자들이 관찰한 것과 일치했다. HypoxiCAR T-세포는 또한 저산소 종양의 성장을 방지할 수 있었고 (도 26I), 이는 테스트한 생체 내(*in vivo*) 모델에서, 종양 미세환경이 생체 내(*in vivo*) 항-종양 치료 효능을 전달하는 HypoxiCAR의 능력에 대한 완벽한 장벽이 아님을 시사한다. 또한 미래에는 HypoxiCAR T-세포 요법을 면역 체크포인트 억제제와 같은 미세환경 변형제와 결합할 잠재력이 있고, 이는 종양을 표적하기 위한 이들 세포의 능력을 더욱 개선할 수 있다. 또한, T-세포가 인간 종양의 HIF1α 안정화된 영역에서 배제되지 않기 때문에 (도 27D-F), HypoxiCAR T-세포는 CAR 발현을 활성화하기 위해 적절한 미세환경에 접근할 수 있어야 할 가능성이 있다. 고용량 HypoxiCAR T-세포가 주입된 마우스에서 치료-제한 독성의 증거가 관찰되지 않았지만 (도 26E 및 I), '생리학적 저산소증'이 관찰된 장 점막과 같은 건강한 조직에 미세환경이 있다. 그러한 조직은 HypoxiCAR T-세포의 종양외 활성화가 일어날 수 있는 부위를 나타낼 수 있다. 그에 따라, 자살 스위치를 HypoxiCAR에 통합하여 가장 널리 퍼져 있는 CAR에 추가 수준의 안전성을 제공할 수 있다. 'HypoxiCAR' 이중 산소 감지 시스템이 pan-ErbB-표적 CAR을 사용하여 예시되었지만, 고형 악성종양의 치료에 이용 가능한 안전한 표적의 부족을 극복하기 위해 광범위하게 적용 가능한 전략이 사용될 수 있다.

도면

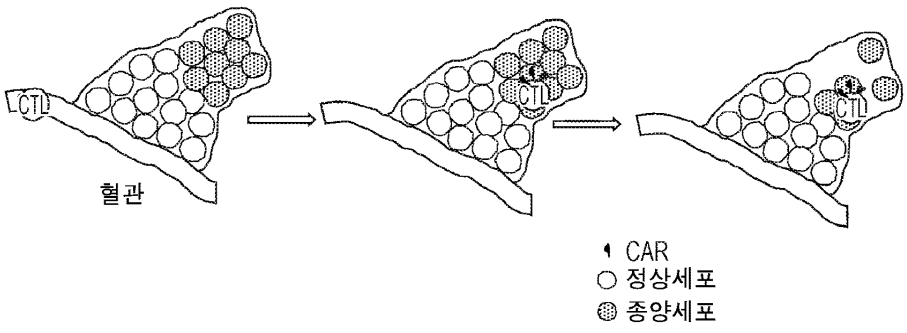
도면1


1. 성분채집 및 분류
T-세포는 환자의 혈액의PBMC로부터
분리되어 시험관 내(in vitro) 배양되었다
T-세포
인공 DNA
2. 유전적 변형
인공 CAR-코딩 DNA는
T-세포로 도입된다
(바이러스, 전기천공, CRISPR)
항-TAA CAR
전염증성 사이토카인
3. 생체외(Ex-vivo) 확장
변형된 T-세포는 실험실에서 확장되었다
암
CAR T-세포 기술
4. 환자로 재주입
변형된 CTL은 환자에게
다시 주입되고 암세포를 파괴한다
암세포
T 세포

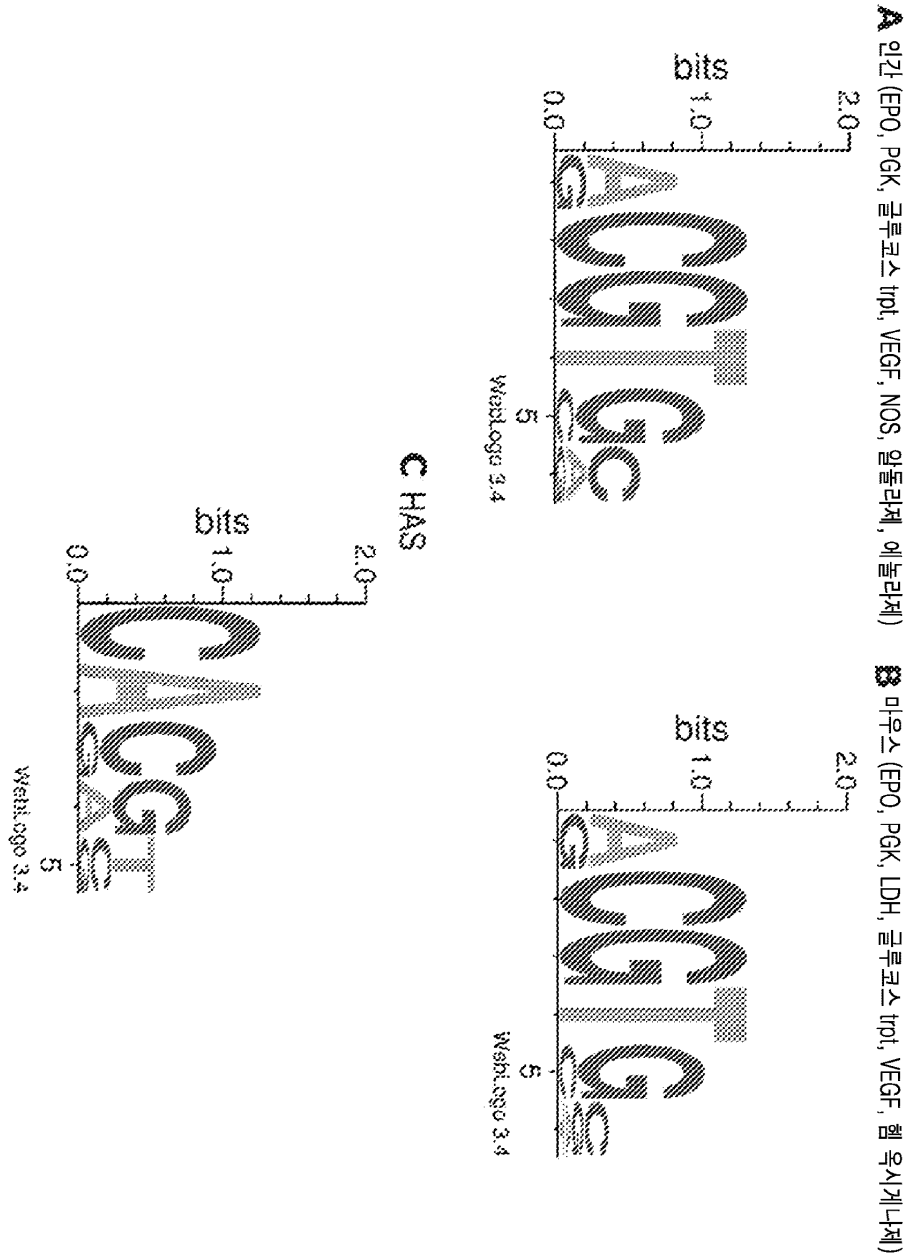
도면2


정상산소
PHDs
OH
P
HIF-1α
P
OH
프로테아좀-매개 분해
OH
P
HIF-1α
P
OH
pVHL
OH
P
HIF-1α
P
OH
포유동물 세포에서 O_2 감지
P
HIF-1α
P
저산소증
P
HIF-1α
HIF-1β
핵
P
HIF-1α
HIF-1β
P
CBP
P
P300
HRE
저산소증 하에 적응을 위한 유전자의 전사,
예: EPO, VEGFA, PGK, GLUT

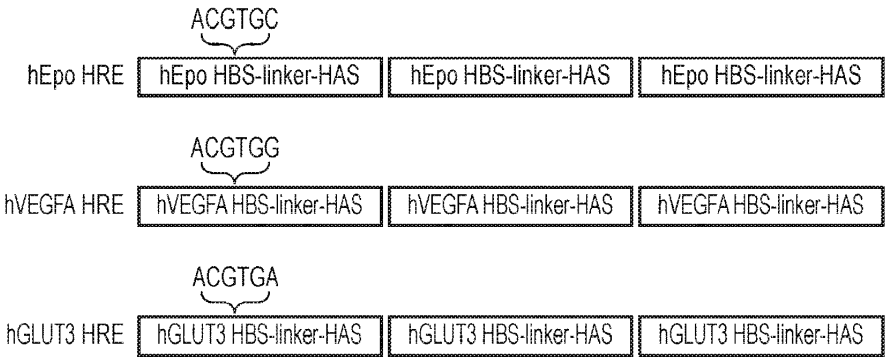
도면3


CTL
혈관
CTL
CTL
CAR
정상세포
종양세포

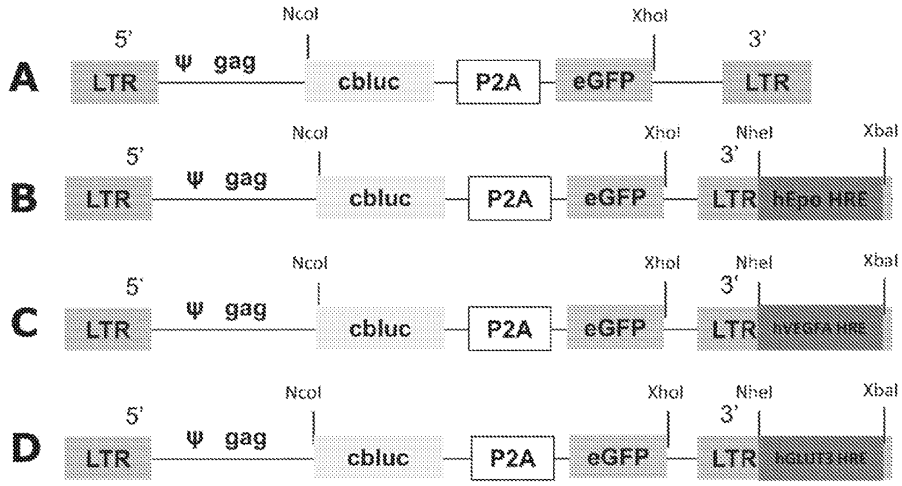
도면4


A 인간 (EPO, PGK, 글루코스 trpt, VEGF, NOS, 알돌라제, 에놀라제)
B 마우스 (EPO, PGK, LDH, 글루코스 trpt, VEGF, 헴 옥시게나제)
C HAS
bits
WebLogo 3.4

도면5


ACGTGC
hEpo HRE
hEpo HBS-linker-HAS
hEpo HBS-linker-HAS
hEpo HBS-linker-HAS
ACGTGG
hVEGFA HRE
hVEGFA HBS-linker-HAS
hVEGFA HBS-linker-HAS
hVEGFA HBS-linker-HAS
ACGTGA
hGLUT3 HRE
hGLUT3 HBS-linker-HAS
hGLUT3 HBS-linker-HAS
hGLUT3 HBS-linker-HAS

도면6

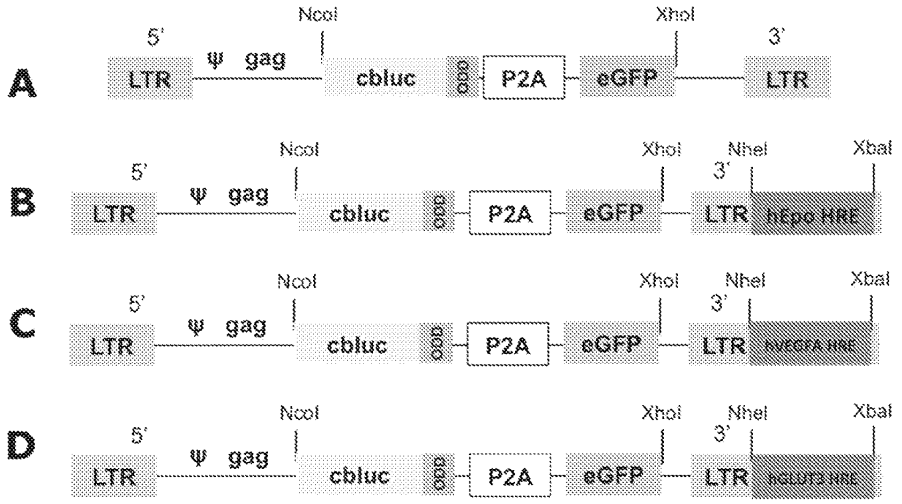


도면7

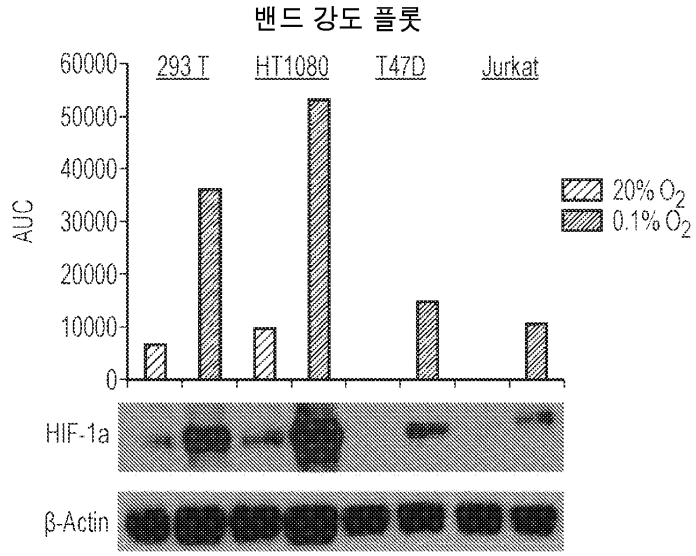
>sp|Q16665|HIF1A_HUMAN Hypoxia-inducible factor 1-alpha OS=Homo sapiens GN=HIF1A PE=1 SV=1

MEGAGGANDKKKISSERRKEKSRDAARSRRSKESEVFYELAHQLPLPHNVSSHLDKASVMRLTISYL
RVRKLLDAGDLDIEDDMKAQMNCFYLKALDGFVMVLTDDGDMIYISDNVNKYMGLTQFELTGHSVFDFT
HPCDHEEMREMLTHRNGLVKKGKEQNTQRSFFLRMKCTLTSRGRTMNIKSATWKVLHCTGHIHVYDTNS
NQPQCGYKKPPMTCLVLICEPIPHPSNIEIPLDSKTFLSRHSLDMKFSYCDERITELMGYEPEELLGRS
IYEYYHALDSDHLTKTHHDMFTKGQVTTGQYRMLAKRGGYVWVETQATVIYNTKNSQPQCIVCVNYVVS
GIIQHDLIFSLQQTECVLKPVESSDMKMTQLFTKVESEDTSSLFDKLKKEPDALTLLAPAAGDTIISLD
FGSNDTETDDQQLEEVPLYNDVMLPSPNEKLQNINLAMSPLPTAETPKPLRSSADPALNQEVALKLEPN
PESLELSFTMPQIQDQTPSPSDGSTRQSSPEPNSPSEYCFYVDSDMVNEFKLELVEKLFAEDTEAKNPF
STQDTDLDLEMLAPYIPMDDDFQLRSFDQLSPLESSSASPESASPQSTLSVFQQTQIQEPTANATTTTA
TTDELKTVTKDRMEDIKILIASPSPTHIHKETTSATSSPYRDTQSRTASPNRAGKGVIEQTEKSHPRSP
NVLSVALSQRTTVPEEELNPKILALQNAQRKRKMEHDGSLFQAVGIGTLLQQPDDHAATTSLSWKRVKG
CKSSEQNGMEQKTIILIPSDLACRLLGQSMDESGLPQLTSYDCEVNAPIQGSRNLLQGEELLRALDQVN

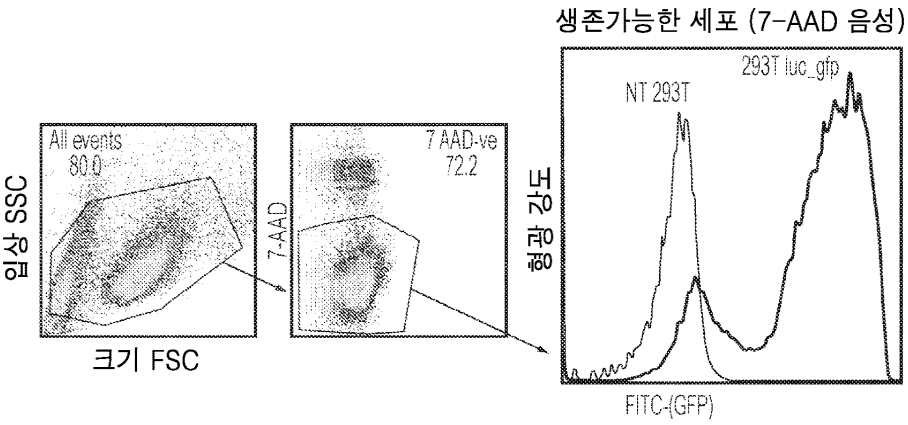
도면8



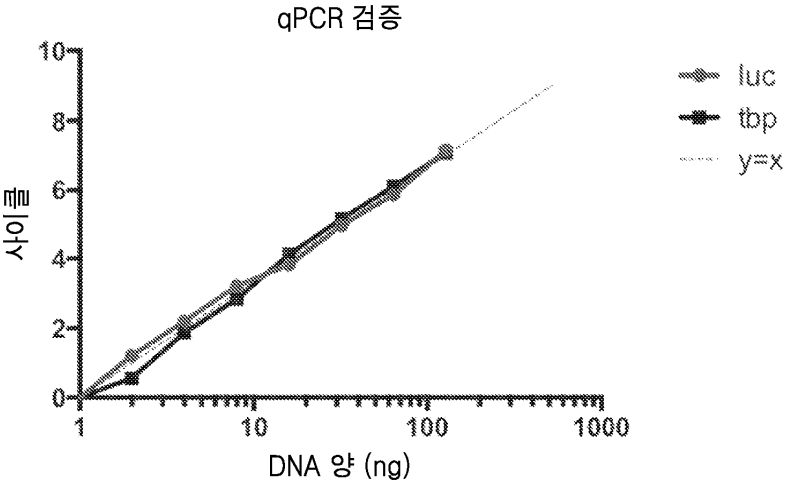
도면9



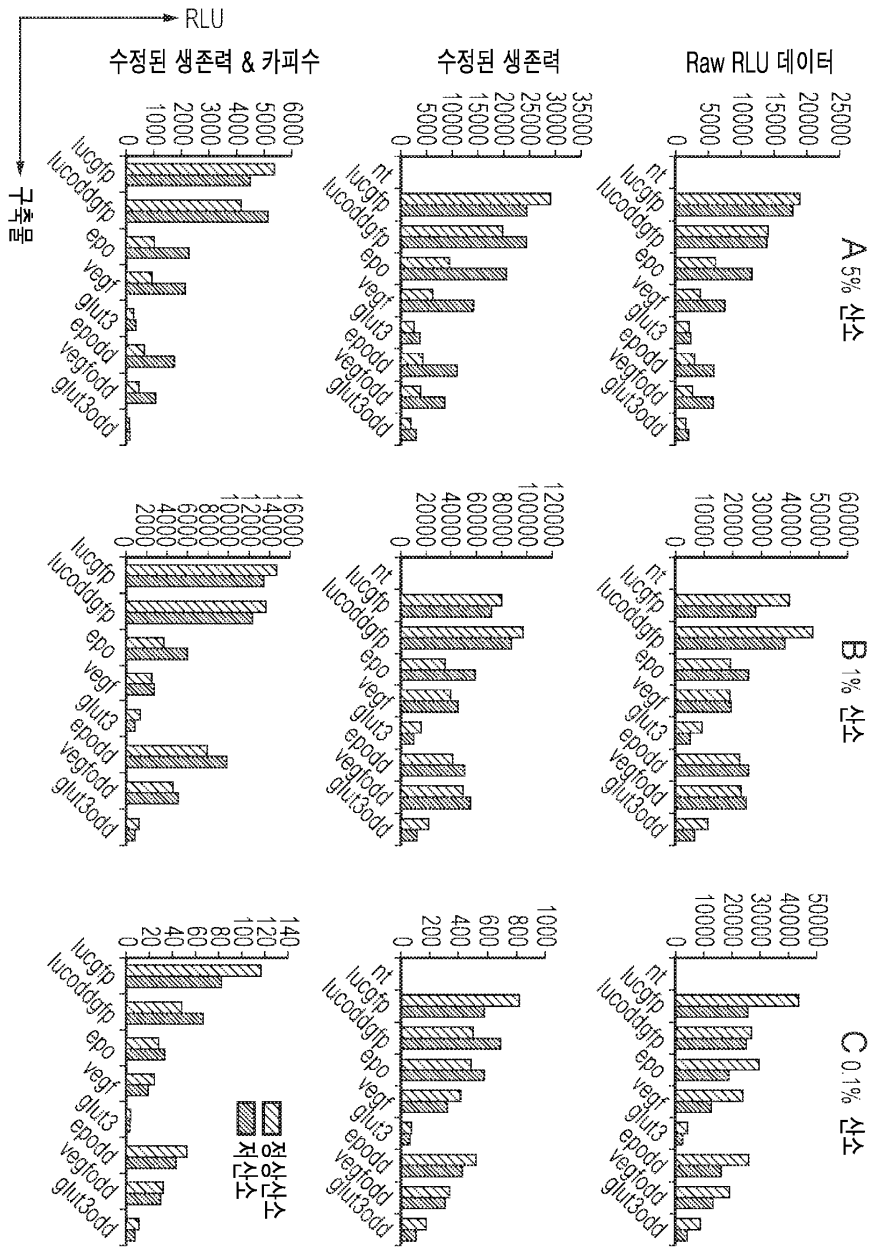
도면10



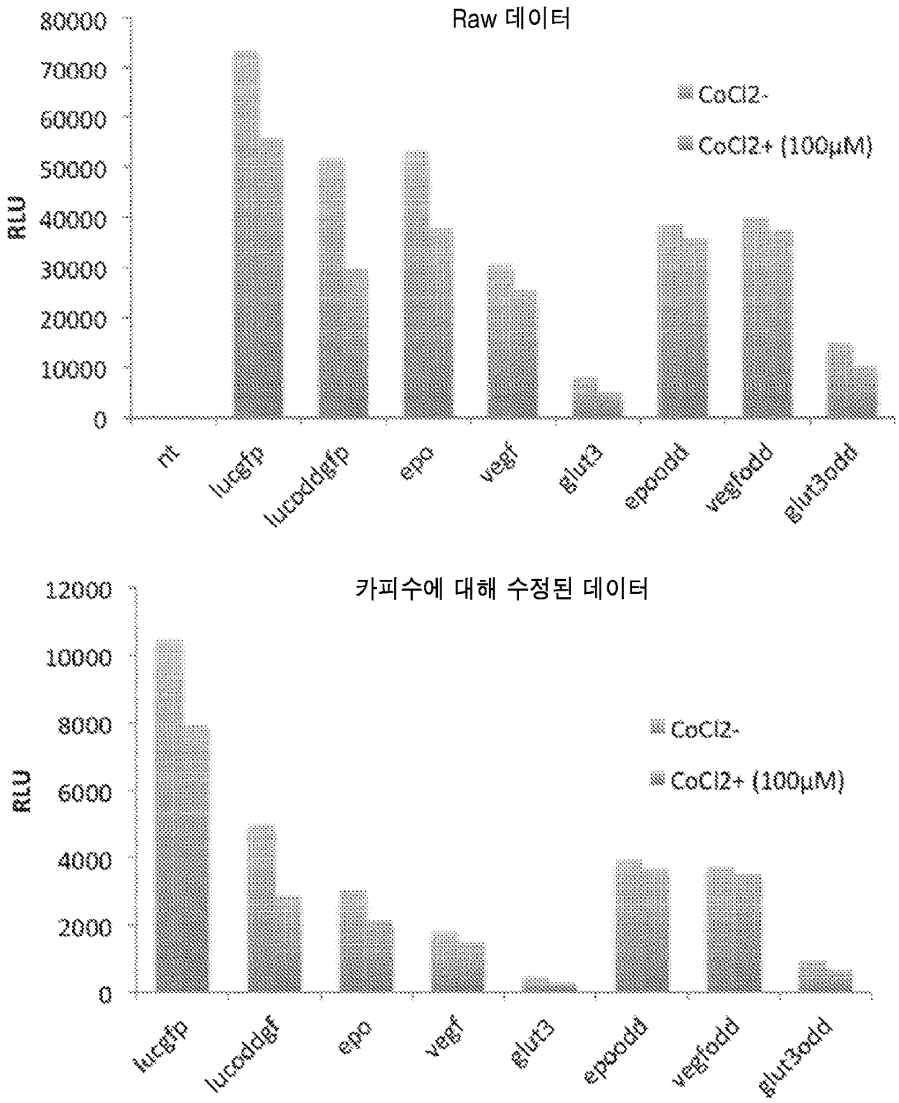
도면11



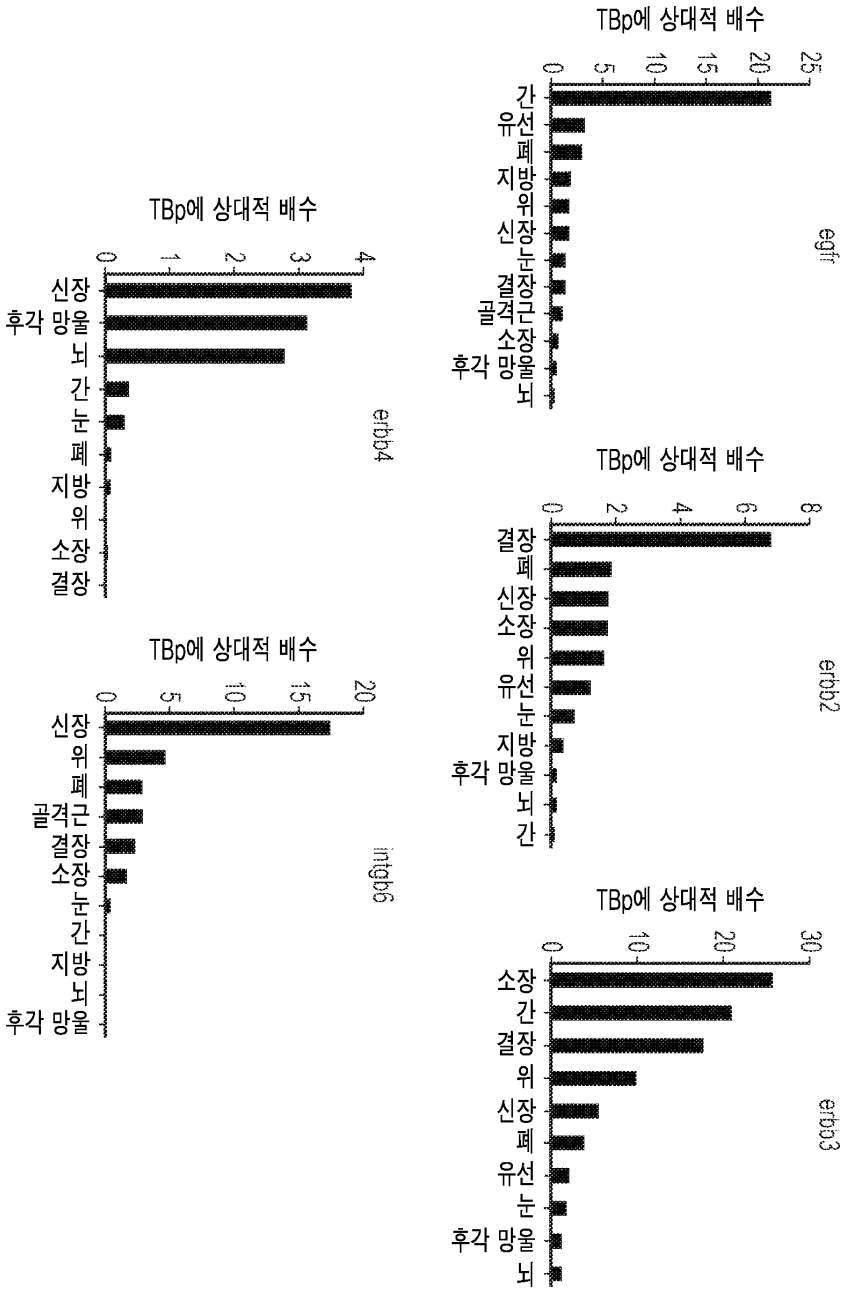
도면12


RLU
구축물
수정된 생존력 & 카피수
수정된 생존력
Raw RLU 데이터
A 5% 산소
B 1% 산소
C 0.1% 산소
nt
lucgfp
lucoddgfp
epo
vegf
glut3
epodd
vegfodd
glut3odd
정상산소
저산소

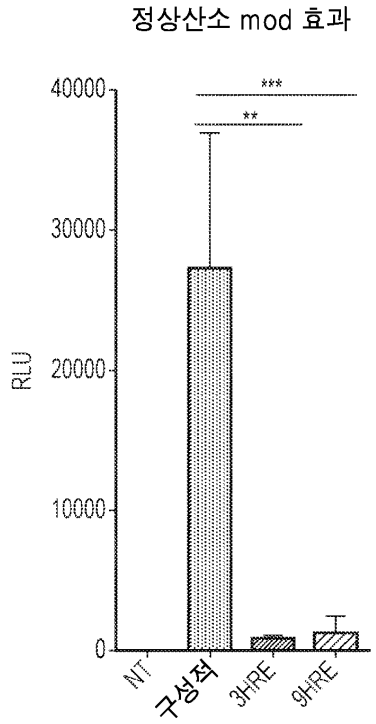
도면13


Raw 데이터
RLU
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
CoCl2-
CoCl2+ (100μM)
nt
lucgfp
lucoddgfp
epo
vegf
glut3
epoodd
vegfodd
glut3odd
카피수에 대해 수정된 데이터
RLU
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
CoCl2-
CoCl2+ (100μM)
lucgfp
lucoddgf
epo
vegf
glut3
epoodd
vegfodd
glut3odd

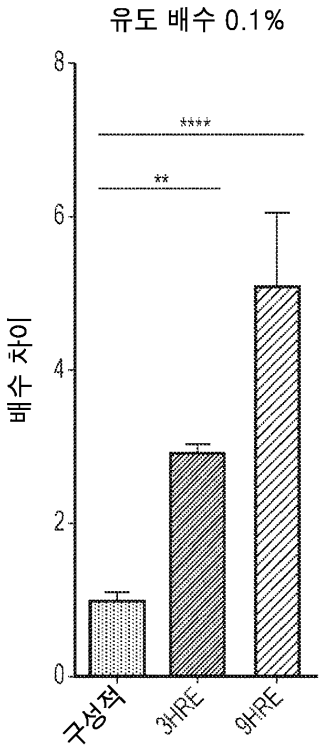
도면14


TBp에 상대적 배수
egfr
간
유선
폐
지방
위
신장
눈
결장
근
골격
소장
망
후각
울
뇌
TBp에 상대적 배수
erbb2
결장
폐
신장
소장
위
유선
눈
지방
후각
망
울
뇌
간
TBp에 상대적 배수
erbb3
소장
간
결장
위
신장
폐
유선
눈
후각
망
울
뇌
TBp에 상대적 배수
erbb4
신장
후각
망
울
뇌
간
눈
폐
지방
위
소장
결장
TBp에 상대적 배수
itgb6
신장
위
폐
골격근
결장
소장
눈
간
지방
뇌
후각
망
울

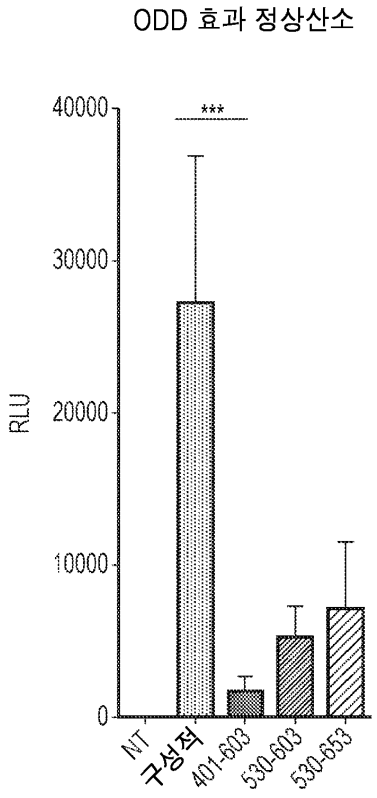
도면15


정상산소 mod 효과
RLU
40000
30000
20000
10000
0
***
**
NT
구성적
3HRE
9HRE

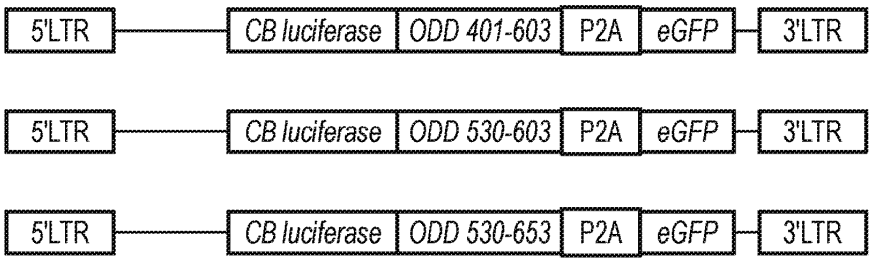
도면16


유도 배수 0.1%
배수 차이
8
6
4
2
0
****
**
구성적
3HRE
9HRE

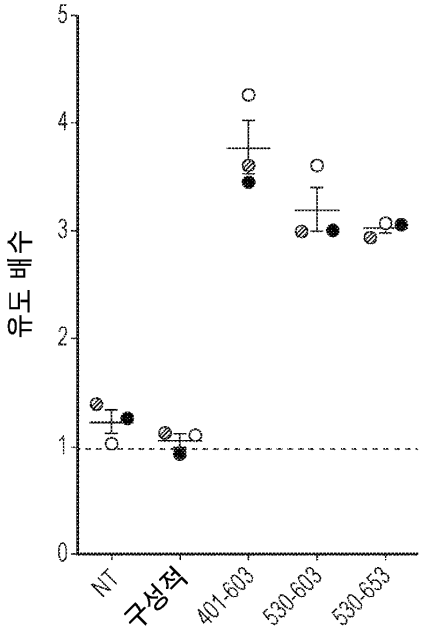
도면17


ODD 효과 정상산소
40000
30000
20000
10000
0
RLU
***
NT
구성적
401-603
530-603
530-653

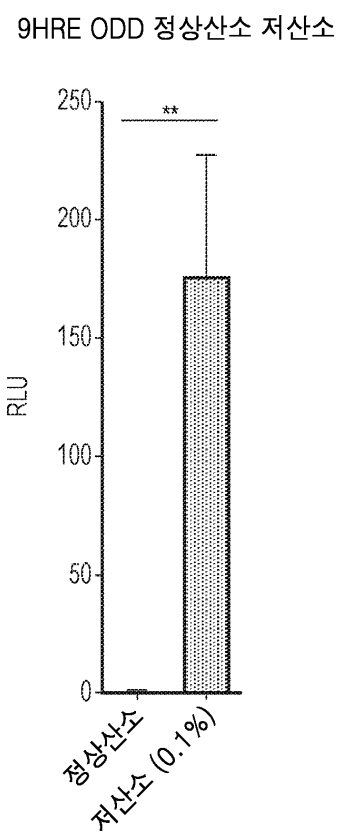
도면17a


5'LTR
CB luciferase
ODD 401-603
P2A
eGFP
3'LTR
5'LTR
CB luciferase
ODD 530-603
P2A
eGFP
3'LTR
5'LTR
CB luciferase
ODD 530-653
P2A
eGFP
3'LTR

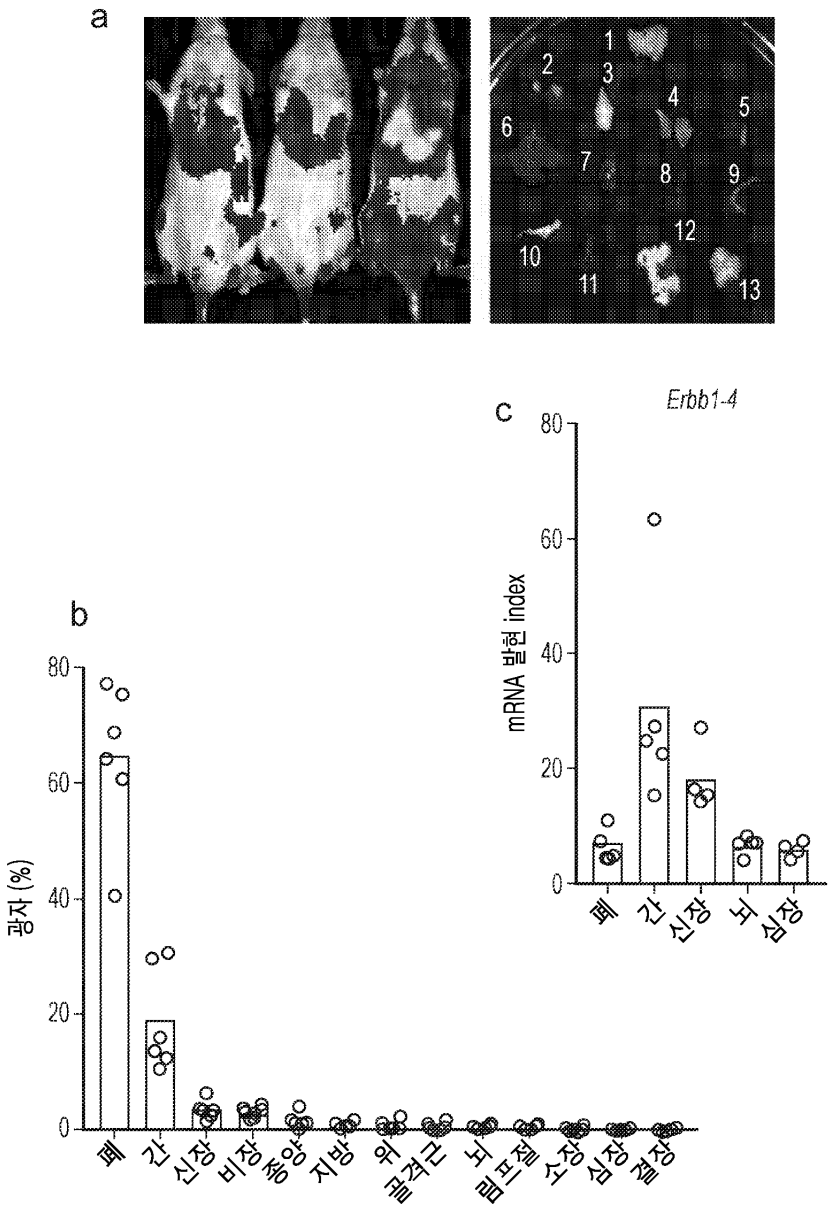
도면17b


유도 배수
0
1
2
3
4
5
NT
구성적
401-603
530-603
530-653

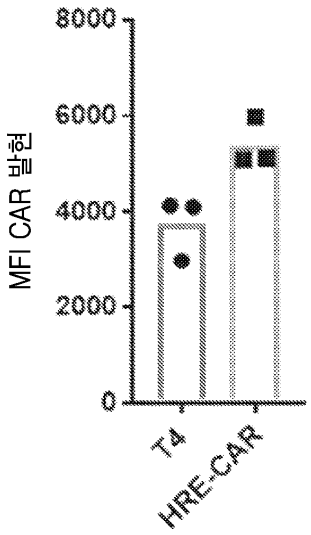
도면18


9HRE ODD 정상산소 저산소
RLU
0
50
100
150
200
250
**
정상산소
저산소 (0.1%)

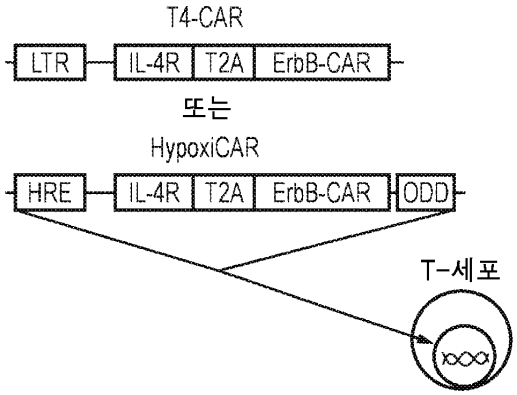
도면19


a
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
b
광자 (%)
0
20
40
60
80
폐
간
신장
비장
췌장
지방
위
골격근
뇌
림프절
소장
심장
결장
c
Erbb1-4
mRNA 발현 index
0
20
40
60
80
폐
간
신장
뇌
심장

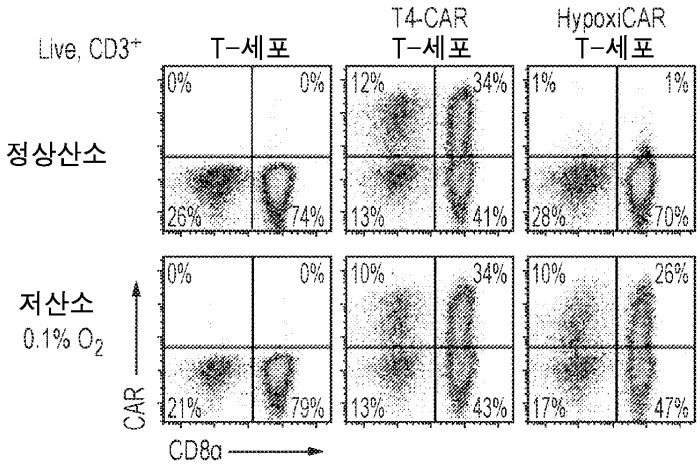
도면20



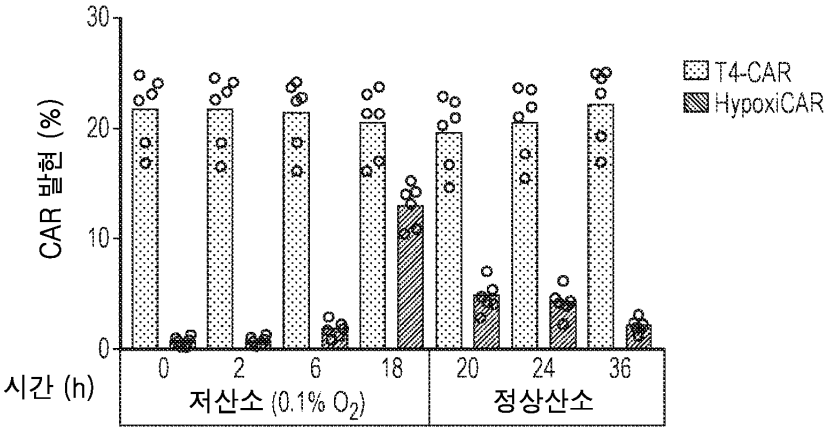
도면21a



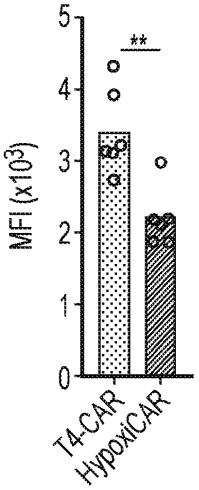
도면21b



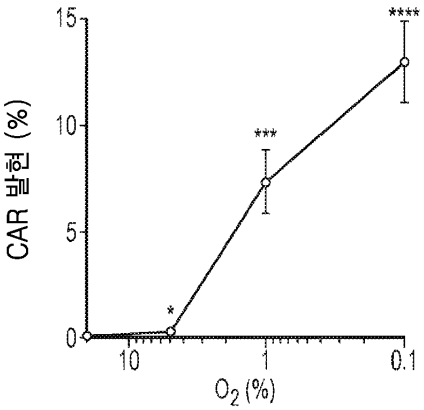
도면21c



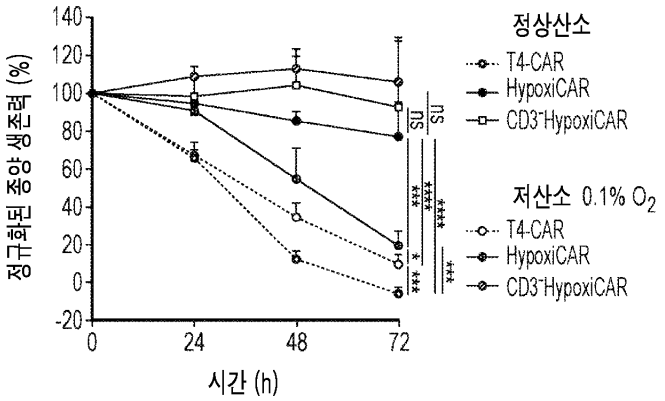
도면21d



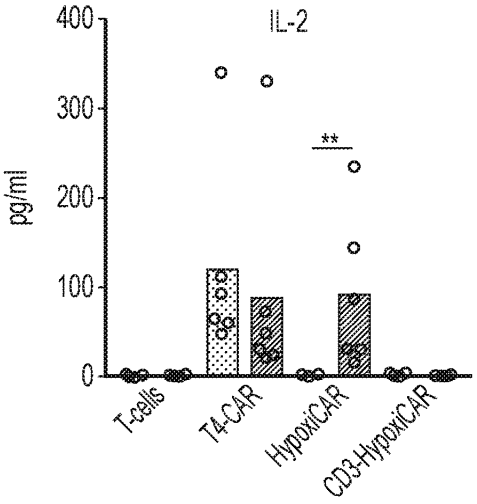
도면21e



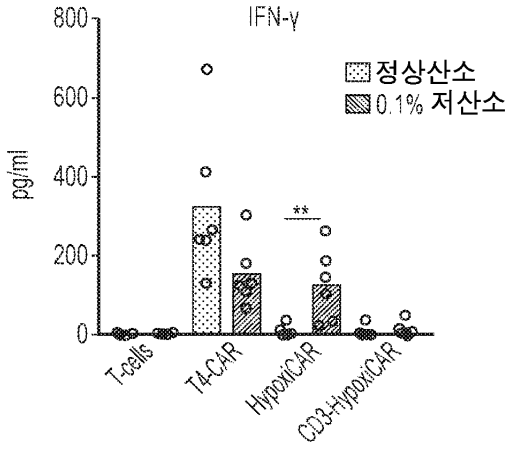
도면21f



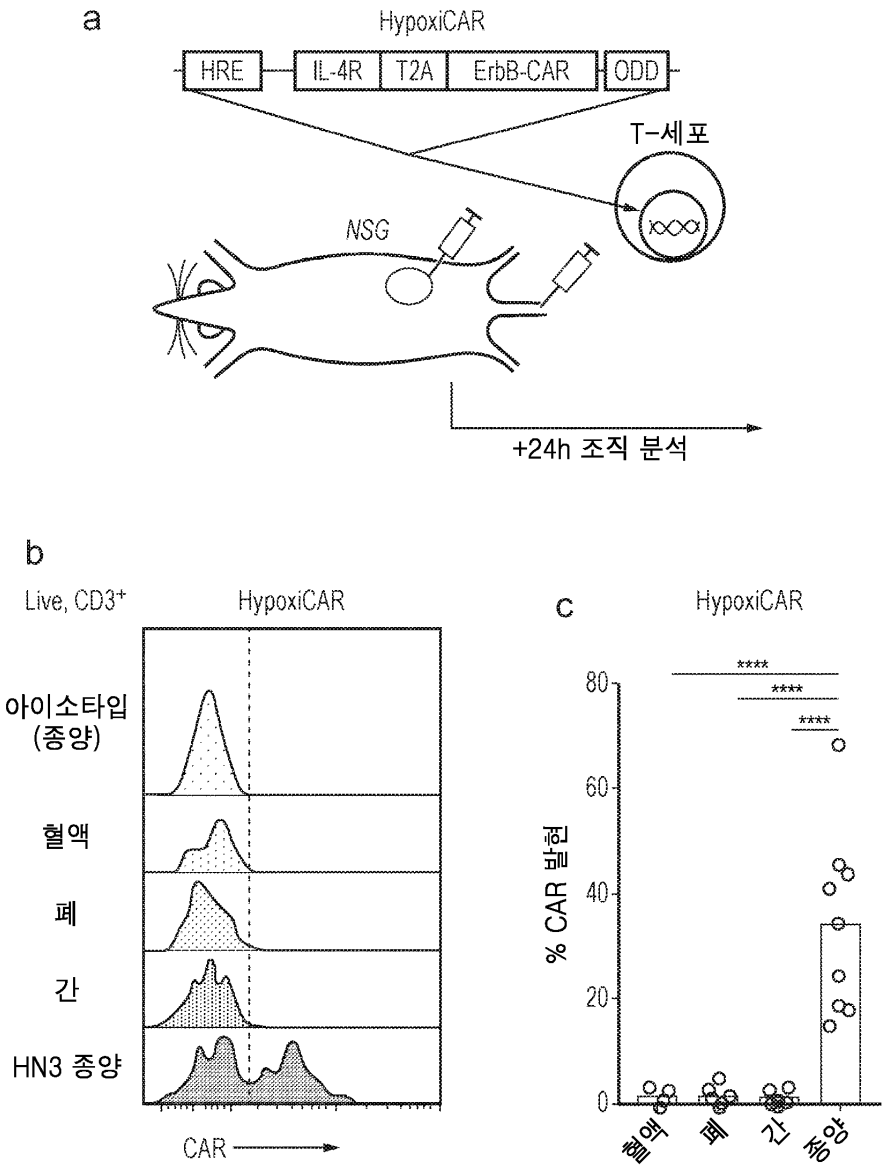
도면21g



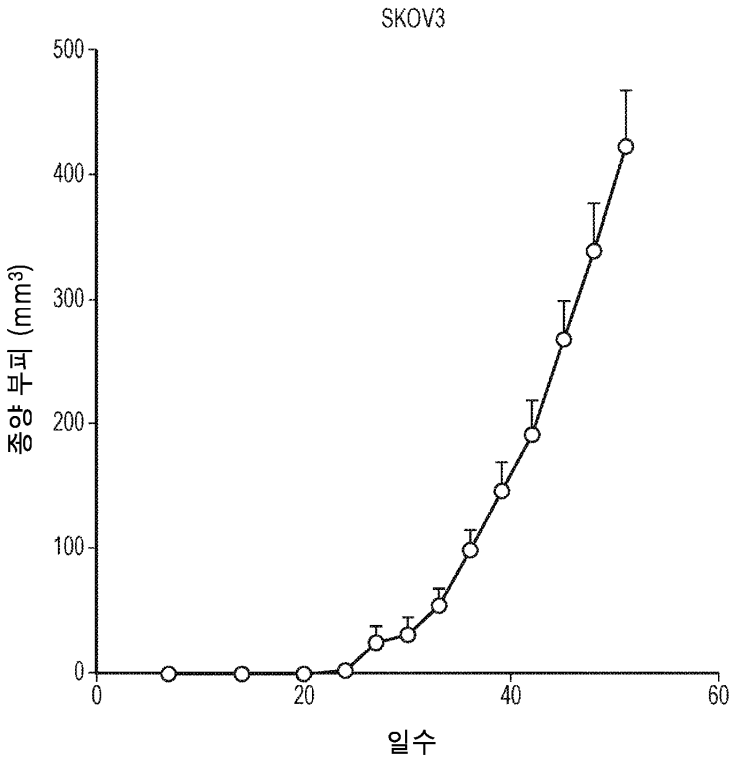
도면21h



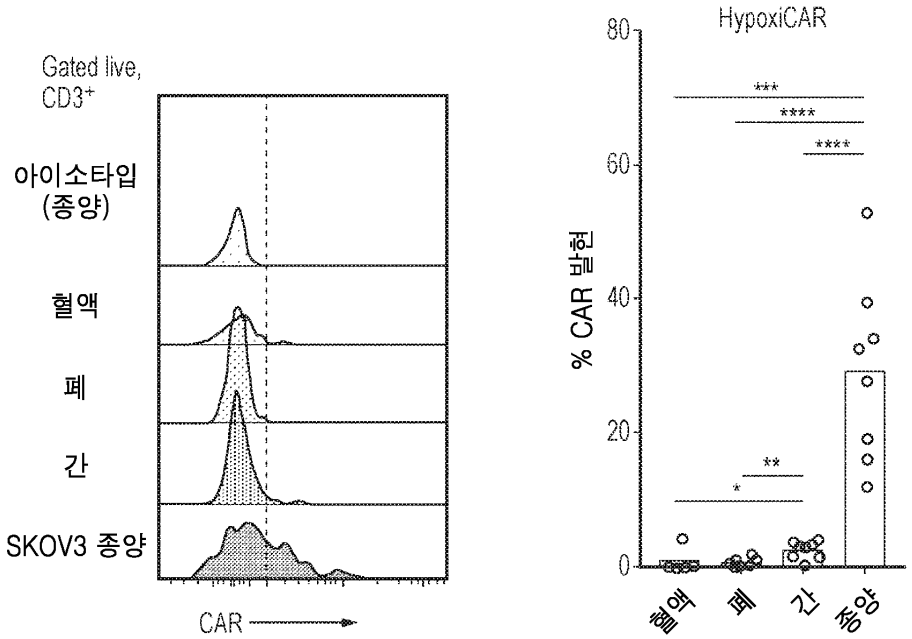
도면22


a
HypoxiCAR
HRE
IL-4R
T2A
ErbB-CAR
ODD
T-세포
NSG
+24h 조직 분석
b
Live, CD3+
HypoxiCAR
아이소타입
(종양)
혈액
폐
간
HN3 종양
CAR
c
HypoxiCAR
% CAR 발현
80
60
40
20
0
****
****
****
혈액
폐
간
종양

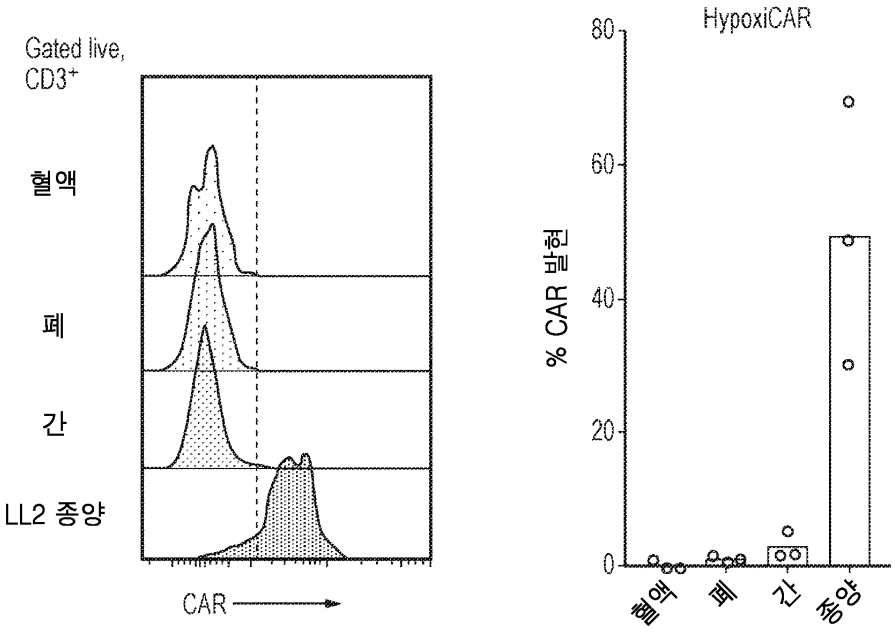
도면23a


SKOV3
종양 부피 (mm³)
500
400
300
200
100
0
0
20
40
60
일수

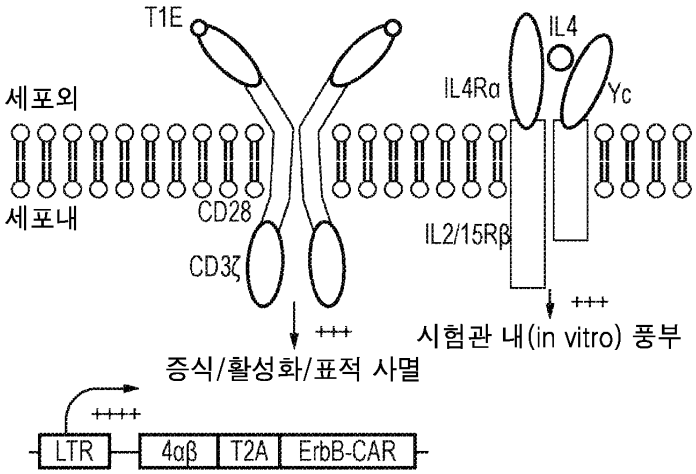
도면23b


Gated live,
CD3+
아이소타입
(종양)
혈액
폐
간
SKOV3 종양
CAR
HypoxiCAR
% CAR 발현
80
60
40
20
0
***
****
****
**
*
혈액
폐
간
종양

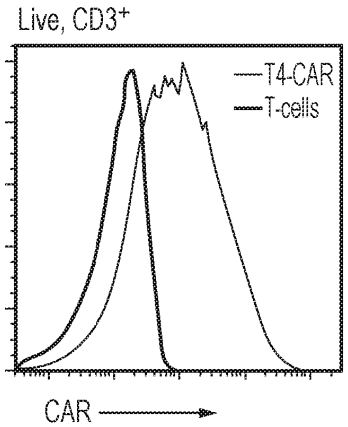
도면23c



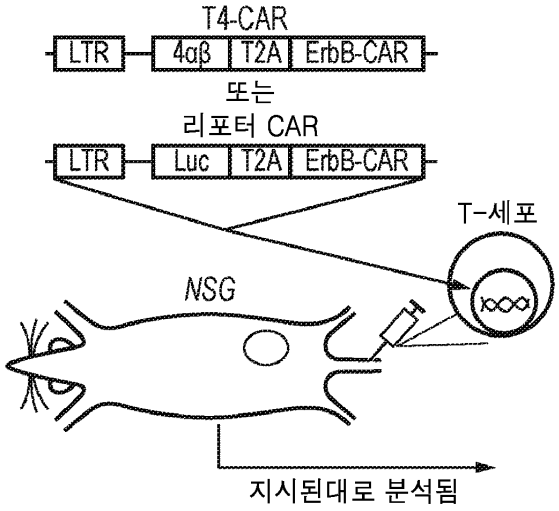
도면24a



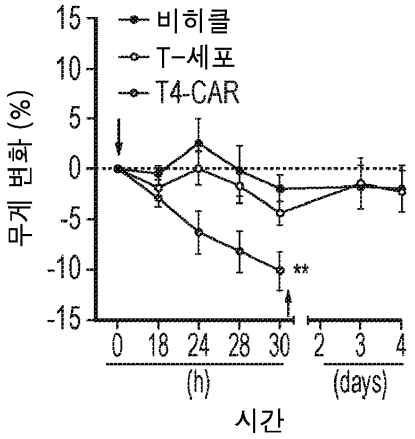
도면24b



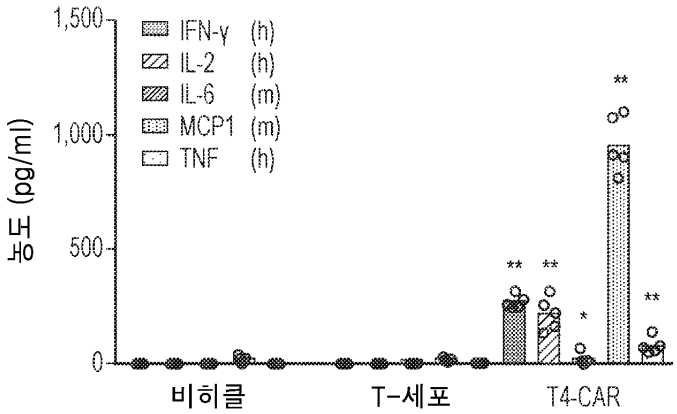
도면24c



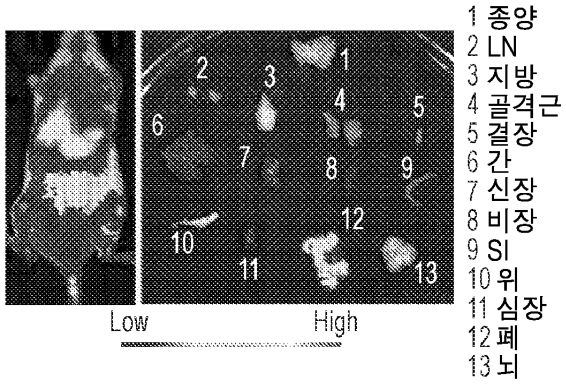
도면24d



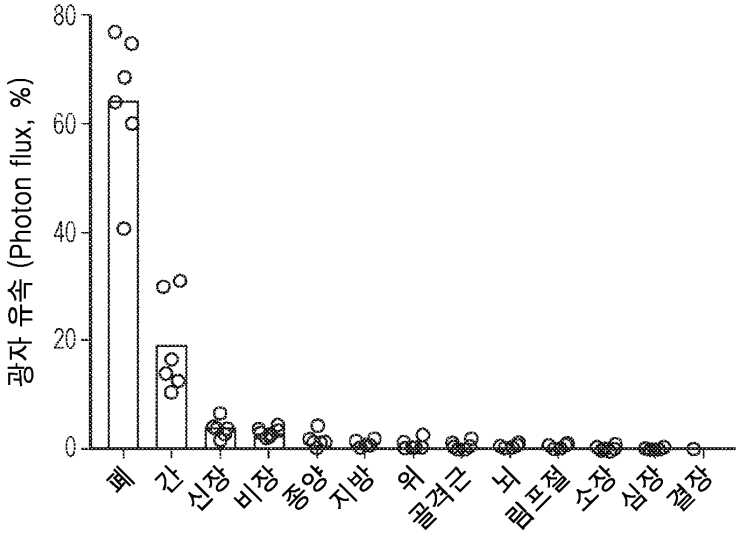
도면24e



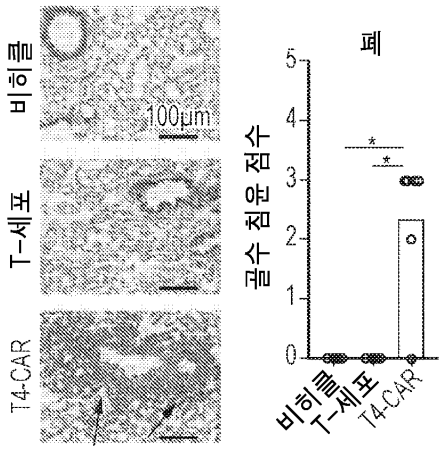
도면24f



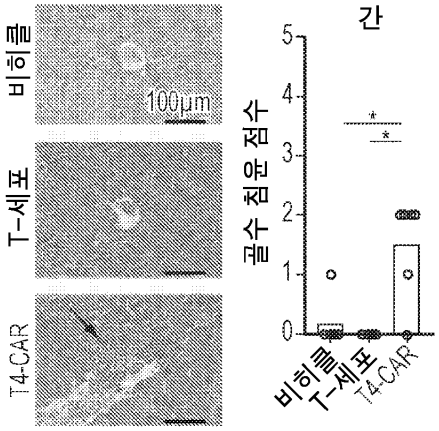
도면24g



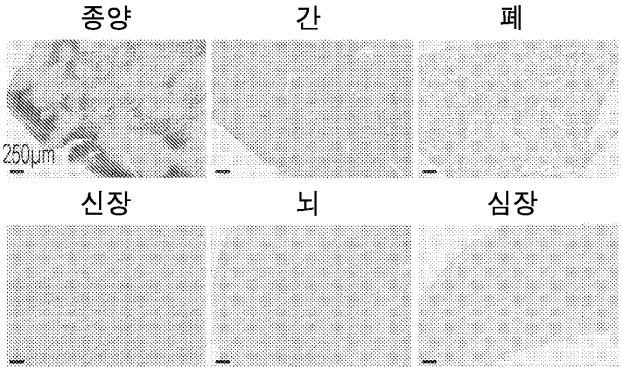
도면24h



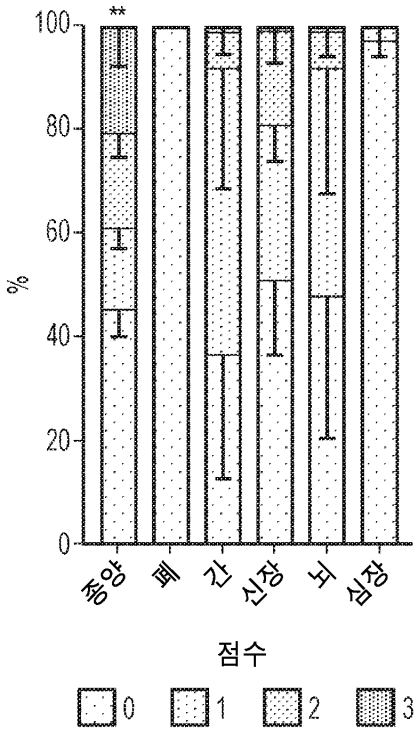
도면24i



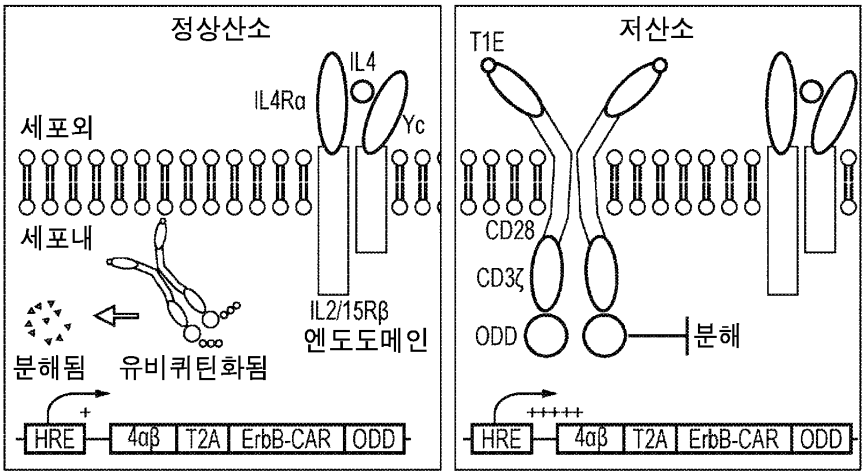
도면24j



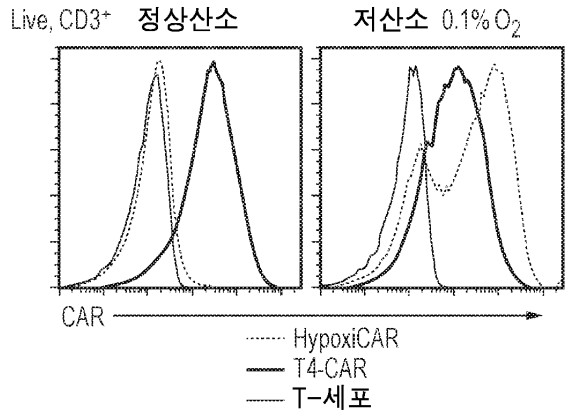
도면24k



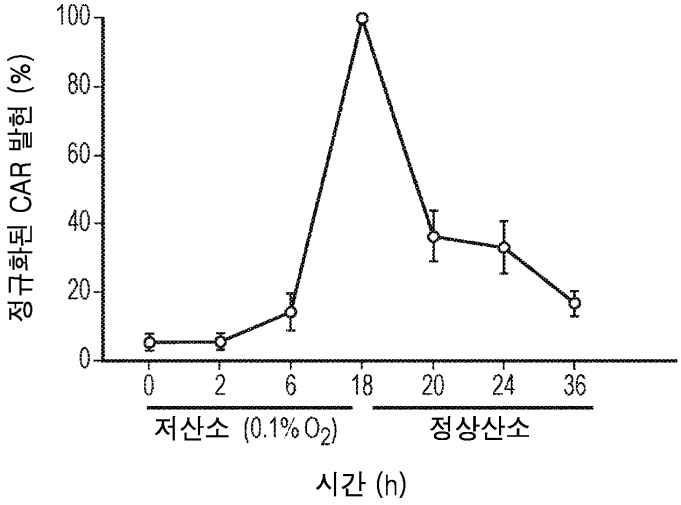
도면25a



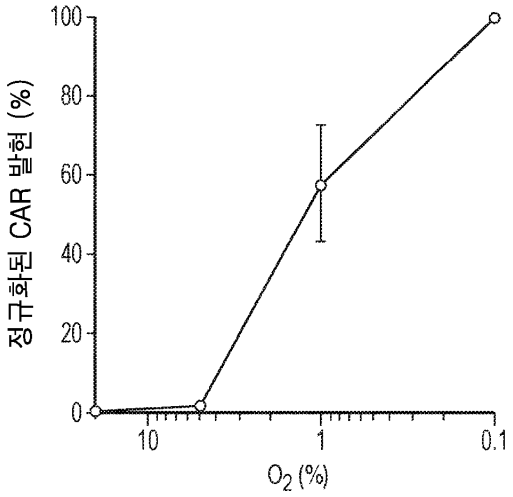
도면25b



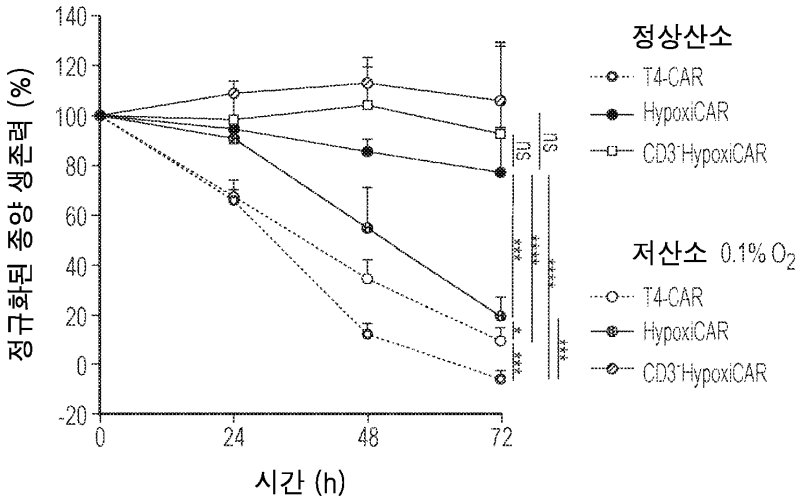
도면25c



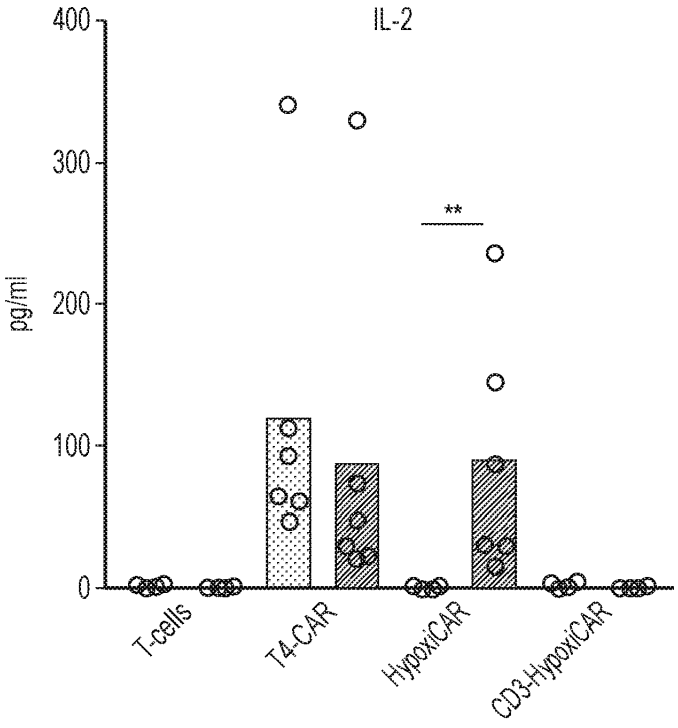
도면25d


정규화된 CAR 발현 (%)
100
80
60
40
20
0
10
1
0.1
O2 (%)

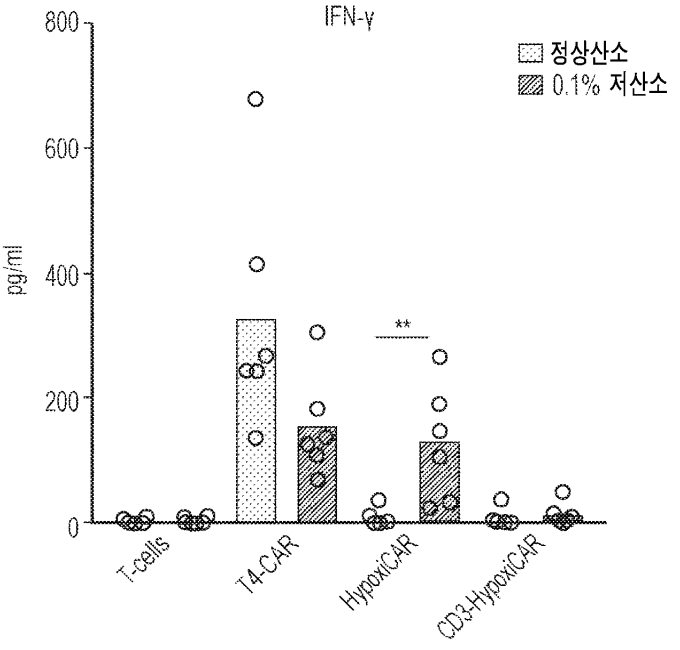
도면25e


정규화된 종양 생존력 (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
0
24
48
72
시간 (h)
정상산소
T4-CAR
HypoxiCAR
CD3-HypoxiCAR
저산소 0.1% O2
T4-CAR
HypoxiCAR
CD3-HypoxiCAR
n.s.
n.s.
****
***
*
***
****
***

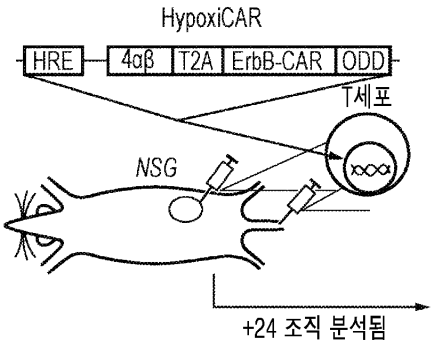
도면25f


IL-2
400
300
200
100
0
pg/ml
**
T-cells
T4-CAR
HypoxiCAR
CD3-HypoxiCAR

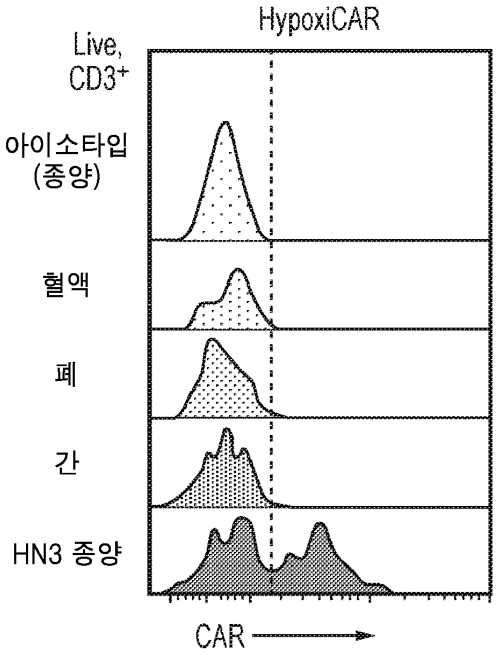
도면25g


IFN-γ
정상산소
0.1% 저산소
800
600
400
200
0
pg/ml
**
T-cells
T4-CAR
HypoxiCAR
CD3-HypoxiCAR

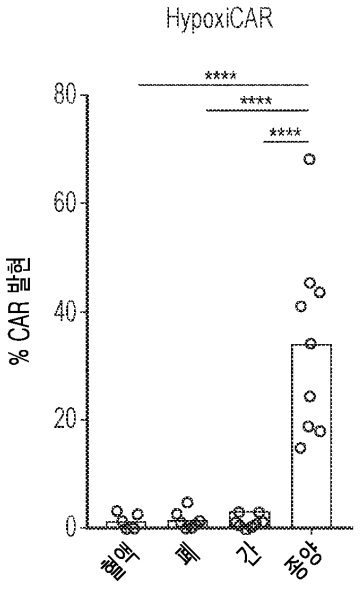
도면26a



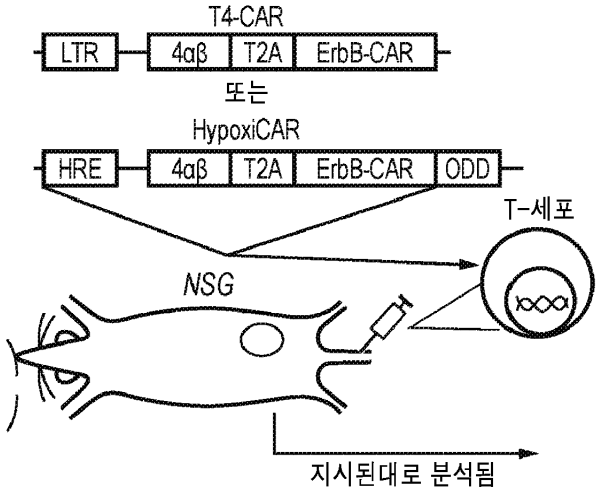
도면26b



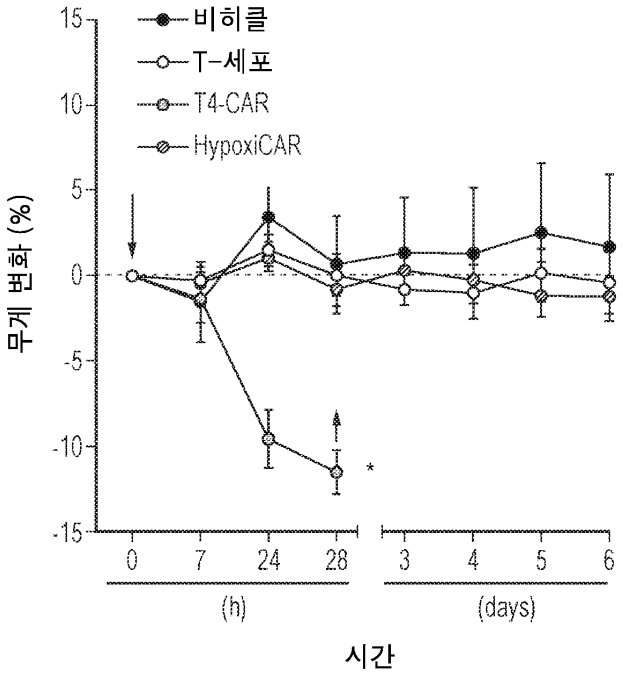
도면26c



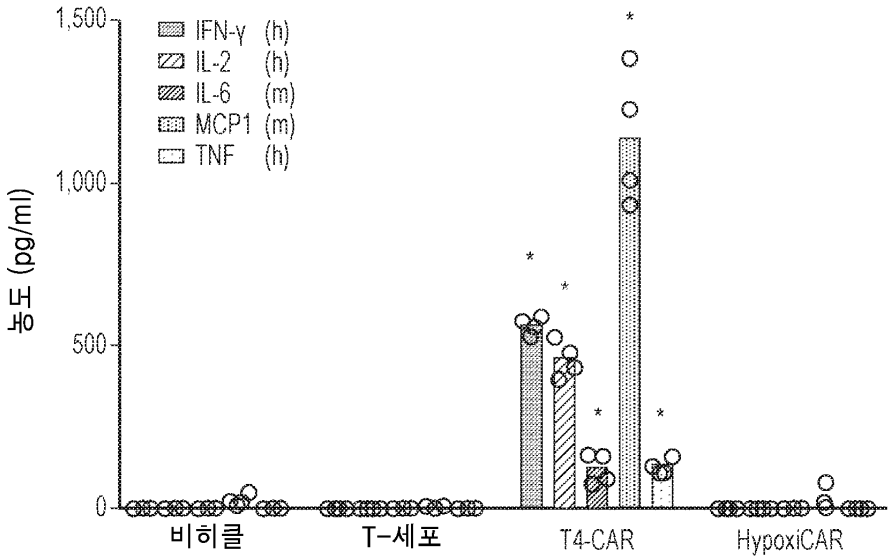
도면26d


T4-CAR
LTR
4αβ
T2A
ErbB-CAR
또는
HypoxiCAR
HRE
4αβ
T2A
ErbB-CAR
ODD
T-세포
NSG
지시된대로 분석됨

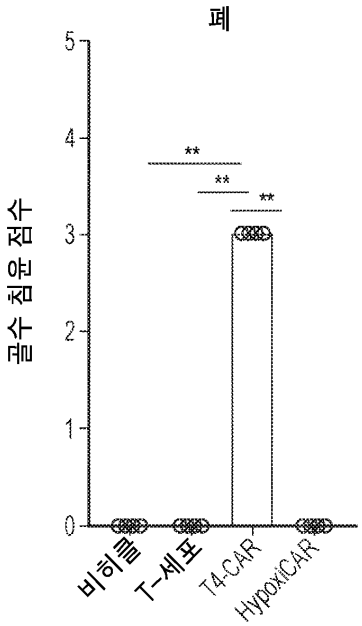
도면26e


비히클
T-세포
T4-CAR
HypoxiCAR
무게 변화 (%)
15
10
5
0
-5
-10
-15
*
0
7
24
28
3
4
5
6
(h)
(days)
시간

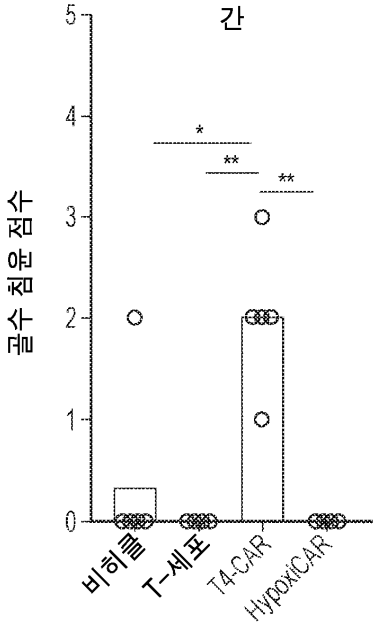
도면26f


1,500
1,000
500
0
농도 (pg/ml)
IFN-γ (h)
IL-2 (h)
IL-6 (m)
MCP1 (m)
TNF (h)
비히클
T-세포
T4-CAR
HypoxiCAR

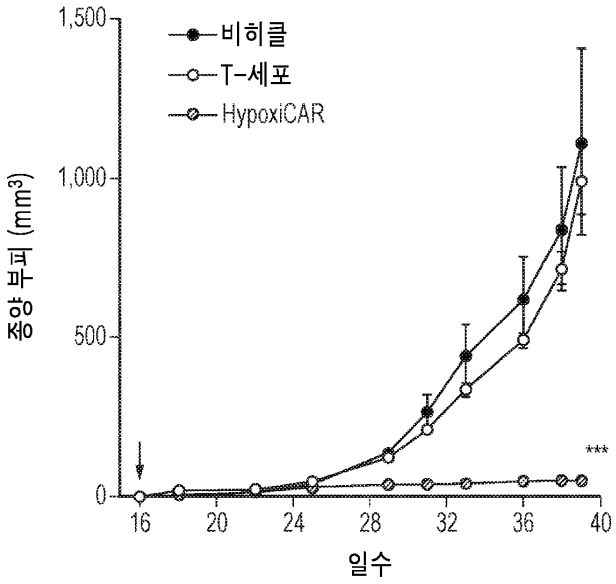
도면26g


폐
골수 침윤 점수
5
4
3
2
1
0
**
**
**
비히클
T-세포
T4-CAR
HypoxiCAR

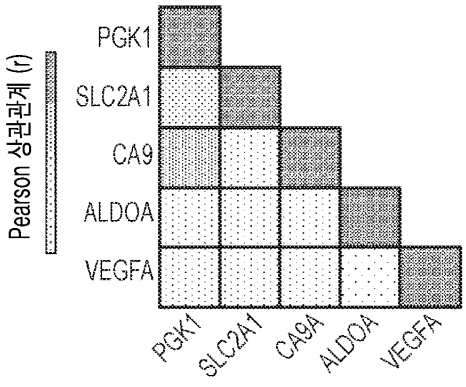
도면26h


간
골수 침윤 점수
5
4
3
2
1
0
*
**
**
비히클
T-세포
T4-CAR
HypoxiCAR

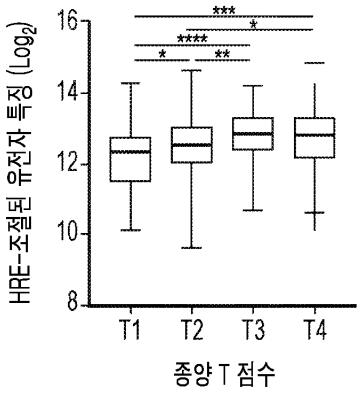
도면26i


종양 부피 (mm³)
1,500
1,000
500
0
비히클
T-세포
HypoxiCAR
***
16
20
24
28
32
36
40
일수

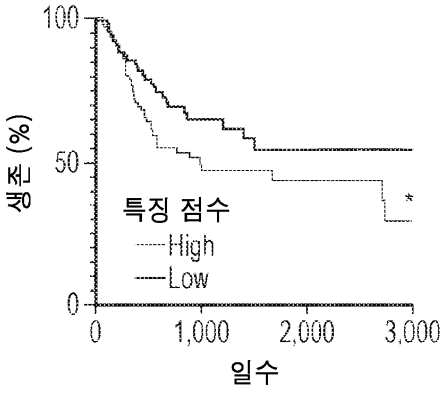
도면27a



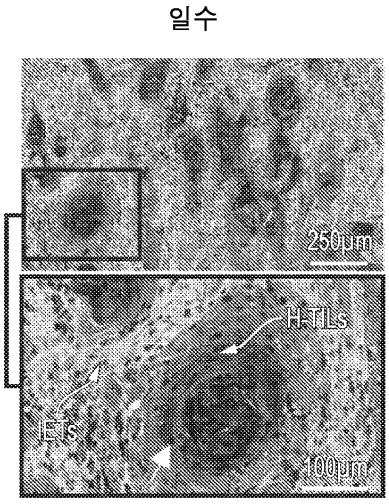
도면27b



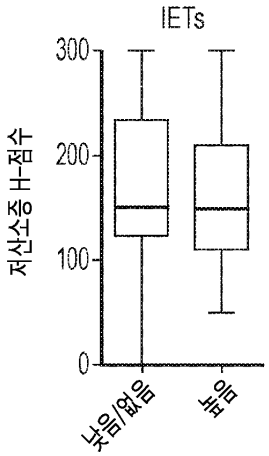
도면27c



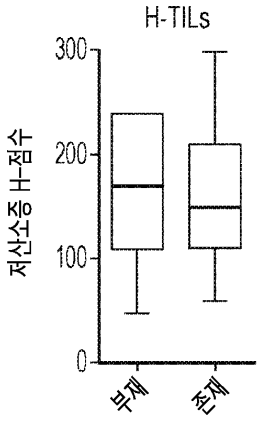
도면27d



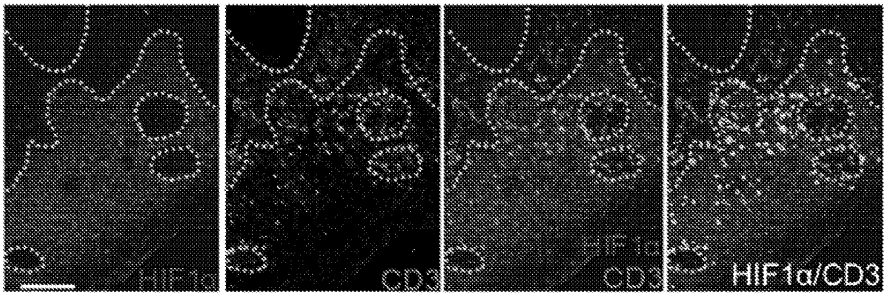
도면27e



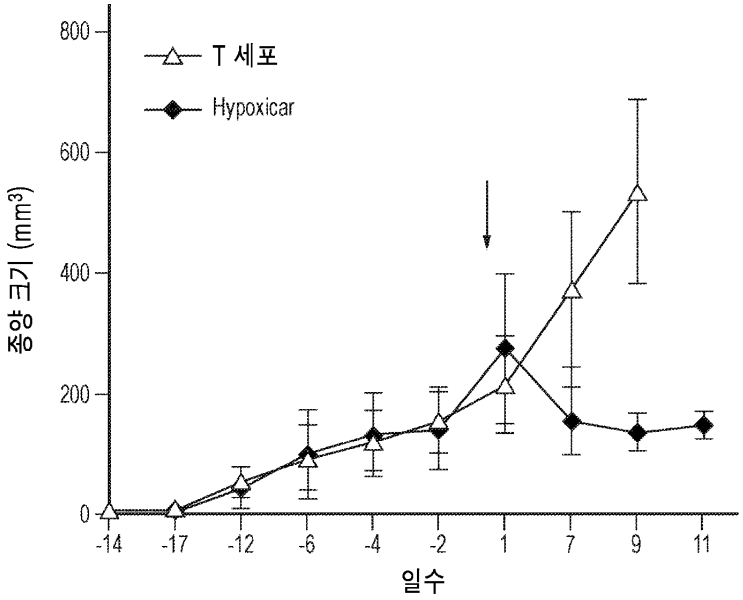
도면27f



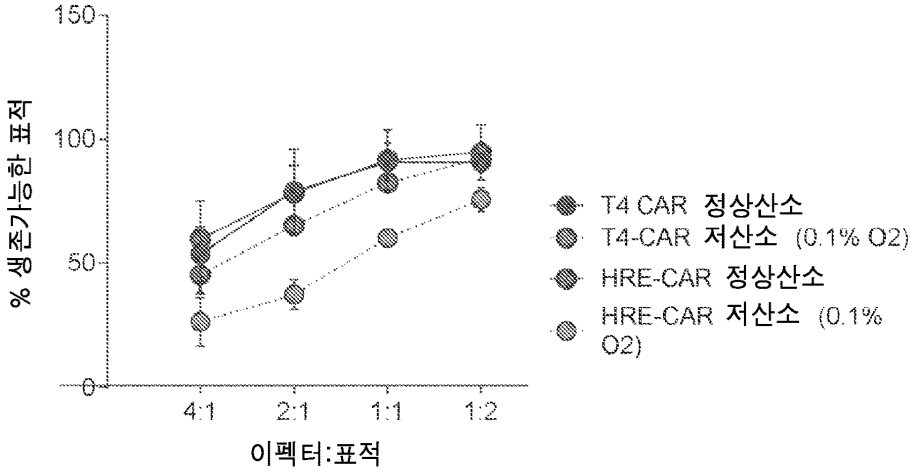
도면27g



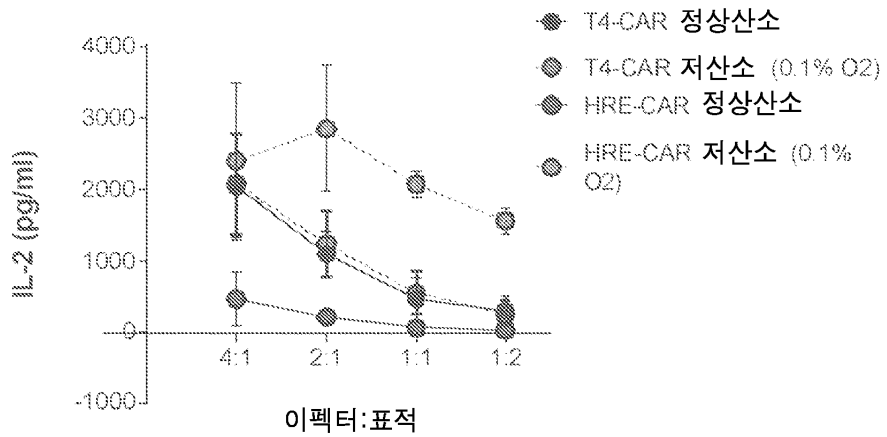
도면28



도면29a



도면29b



이펙터:표적

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> King's College London

<120> Therapeutic Agents

<130> P3468PC00

<150> 1902277.1

<151> 2019-02-19

<160> 31

<170> PatentIn version 3.5

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

gggccctacg tgctgtctca cacagc 26

<210> 6

<211> 26

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 6

gggccctacg tgctgcctcg catggc 26

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 7

tgtcacgtcc tgcacgacgc gagta 25

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 8

cgcgtcgtgc aggacgtgac aaat 24

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 9

ccagcggacg tgcgggaacc cacgtgtagg 30

<210> 10

<211> 26

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 10

tccacaggcg tgccgtctga cacgca 26

<210> 11

<211> 35

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 11

ccacagtgca tacgtgggct ccaacaggtc ctctt 35

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Rattus exulans

<400> 13

acagtgcata cgtgggcttc caca 24

<210> 14

<211> 17

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 14

actacgtgct gcctagg 17

<210> 15

<211> 26

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 15

cccctcggac gtgactcgga ccacat 26

<210> 16

<211> 37

<212> DNA

<213> homosapiens

<400> 16

acgctgagtg cgtgcgggac tcggagtacg tgacgga 37

<210> 17

<211> 26

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 17

cggacgctgg cgtggcacgt cctctc 26

<210> 18

<211> 470

<212> DNA

<213> Moloney murine sarcoma virus

<400> 18

ctgaatatgg gccaaacagg atatctgtgg taagcagttc ctgccccggc tcagggccaa 60

gaacagatgg aacagctgaa tatgggccaa acaggatatc tgtggtaagc agttcctgcc 120

ccggctcagg gccaagaaca gatggtcccc agatgcggtc cagccctcag cagtttctag 180

agaaccatca gatgtttcca gggtgcccca aggacctgaa atgaccctgt gccttatttg 240

aactaaccaa tcagttcgct tctcgcttct gttcgcgcgc ttctgctccc cgagctcaat 300

aaaagagccc acaacccctc actcggggcg ccagtcctcc gattgactga gtcgcccggg 360

tacccgtgta tccaataaac cctcttgcag ttgcatccga cttgtggtct cgctgttcct 420

tgggagggtc tcctctgagt gattgactac ccgtcagcgg gggtctttca 470

<210> 19

<211> 606

<212> DNA

<213> Moloney murine sarcoma virus

<400> 19

ctagcggccc tacgtgctgt ctcacacagc ctgtctgacg gccctacgtg ctgtctcaca 60

cagcctgtct gacggcccta cgtgctgtct cacacagcct gtctgacggc cctacgtgct 120

gtctcacaca gcctgtctga cggccctacg tgctgtctca cacagcctgt ctgacggccc 180

tacgtgctgt ctcacacagc ctgtctgacg gccctacgtg ctgtctcaca cagcctgtct 240

gacggcccta cgtgctgtct cacacagcct gtctgacggc cctacgtgct gtctcacaca 300

gcctgtctga ctctagagaa ccatcagatg tttccagggt gccccaagga cctgaaatga 360

ccctgtgcct tatttgaact aaccaatcag ttcgcttctc gcttctgttc gcgcgcttct 420

gctccccgag ctcaataaaa gagcccacaa cccctcactc ggggcgccag tcctccgatt 480

gactgagtcg cccgggtacc cgtgtatcca ataaaccctc ttgcagttgc atccgacttg 540

tggtctcgct gttccttggg agggtctcct ctgagtgatt gactacccgt cagcgggggt 600

ctttca 606

<210> 20

<211> 145

<212> DNA

<213> Moloney murine sarcoma virus

<400> 20

gaaccatcag atgtttccag ggtgccccaa ggacctgaaa tgaccctgtg ccttatttga 60

actaaccaat cagttcgctt ctcgcttctg ttcgcgcgct tctgctcccc gagctcaata 120

aaagagccca caacccctca ctcgg 145

<210> 21

<211> 107

<212> DNA

<213> Moloney murine sarcoma virus

<400> 21

ctagagaacc atcagatgtt tccagggtgc cccaaggacc tgaaatgacc ctgtgcctta 60

tttgaactaa ccaatcagtt cgcttctcgc ttctgttcgc gcgcttc 107

<210> 22

<211> 60

<212> DNA

<213> Moloney murine sarcoma virus

<400> 22

tgctccccga gctcaataaa agagcccaca acccctcact cggggcgcca gtcctccgat 60

<210> 23

<211> 52

<212> DNA

<213> Moloney murine sarcoma virus

<400> 23

tgactgagtc gcccgggtac ccgtgtatcc aataaaccct cttgcagttg ca 52

<210> 24

<211> 143

<212> DNA

<213> Moloney murine sarcoma virus

<400> 24

gcgccagtcc tccgattgac tgagtcgccc gggtacccgt gtatccaata aaccctcttg 60

cagttgcatc cgacttgtgg tctcgctgtt ccttgggagg gtctcctctg agtgattgac 120

tacccgtcag cgggggtctt tca 143

<210> 25

<211> 11

<212> DNA

<213> Moloney murine sarcoma virus

<400> 25

ggggtctttc a 11

<210> 26

<211> 255

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 26

ggccctacgt gctgtctcac acagcctgtc tgacggccct acgtgctgtc tcacacagcc 60

tgtctgacgg ccctacgtgc tgtctcacac agcctgtctg acggccctac gtgctgtctc 120

acacagcctg tctgacggcc ctacgtgctg tctcacacag cctgtctgac ggccctacgt 180

gctgtctcac acagcctgtc tgacggccct acgtgctgtc tcacacagcc tgtctgacgg 240

ccctacgtgc tgtct 255

<210> 27

<211> 34

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 27

ggccctacgt gctgtctcac acagcctgtc tgac 34

<210> 28

<211> 13

<212> PRT

<213> homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 28

Leu Glu Met Leu Ala Pro Tyr Ile Xaa Met Asp Asp Asp

1 5 10

<210> 29

<211> 203

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Ala Pro Ala Ala Gly Asp Thr Ile Ile Ser Leu Asp Phe Gly Ser Asn

1 5 10 15

Asp Thr Glu Thr Asp Asp Gln Gln Leu Glu Glu Val Pro Leu Tyr Asn

20 25 30

Asp Val Met Leu Pro Ser Pro Asn Glu Lys Leu Gln Asn Ile Asn Leu

35 40 45

Ala Met Ser Pro Leu Pro Thr Ala Glu Thr Pro Lys Pro Leu Arg Ser

50 55 60

Ser Ala Asp Pro Ala Leu Asn Gln Glu Val Ala Leu Lys Leu Glu Pro

65 70 75 80

Asn Pro Glu Ser Leu Glu Leu Ser Phe Thr Met Pro Gln Ile Gln Asp

85 90 95

Gln Thr Pro Ser Pro Ser Asp Gly Ser Thr Arg Gln Ser Ser Pro Glu

100 105 110

Pro Asn Ser Pro Ser Glu Tyr Cys Phe Tyr Val Asp Ser Asp Met Val

115 120 125

Asn Glu Phe Lys Leu Glu Leu Val Glu Lys Leu Phe Ala Glu Asp Thr

130 135 140

Glu Ala Lys Asn Pro Phe Ser Thr Gln Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu

145 150 155 160

Met Leu Ala Pro Tyr Ile Pro Met Asp Asp Asp Phe Gln Leu Arg Ser

165 170 175

Phe Asp Gln Leu Ser Pro Leu Glu Ser Ser Ser Ala Ser Pro Glu Ser

180 185 190

Ala Ser Pro Gln Ser Thr Val Thr Val Phe Gln

195 200

<210> 30

<211> 74

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 30

Glu Phe Lys Leu Glu Leu Val Glu Lys Leu Phe Ala Glu Asp Thr Glu

1 5 10 15

Ala Lys Asn Pro Phe Ser Thr Gln Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu Met

20 25 30

Leu Ala Pro Tyr Ile Pro Met Asp Asp Asp Phe Gln Leu Arg Ser Phe

35 40 45

Asp Gln Leu Ser Pro Leu Glu Ser Ser Ser Ala Ser Pro Glu Ser Ala

50 55 60

Ser Pro Gln Ser Thr Val Thr Val Phe Gln

65 70

<210> 31

<211> 124

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 31

Glu Phe Lys Leu Glu Leu Val Glu Lys Leu Phe Ala Glu Asp Thr Glu

1 5 10 15

Ala Lys Asn Pro Phe Ser Thr Gln Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu Met

20 25 30

Leu Ala Pro Tyr Ile Pro Met Asp Asp Asp Phe Gln Leu Arg Ser Phe

35 40 45

Asp Gln Leu Ser Pro Leu Glu Ser Ser Ser Ala Ser Pro Glu Ser Ala

50 55 60

Ser Pro Gln Ser Thr Val Thr Val Phe Gln Gln Thr Gln Ile Gln Glu

65 70 75 80

Pro Thr Ala Asn Ala Thr Thr Thr Thr Ala Thr Thr Asp Glu Leu Lys

85 90 95

Thr Val Thr Lys Asp Arg Met Glu Asp Ile Lys Ile Leu Ile Ala Ser

100 105 110

Pro Ser Pro Thr His Ile His Lys Glu Thr Thr Ser

115 120

<210> 32

<211> 500

<212> PRT

<213> fusion

<400> 32

Met Gly Pro Gly Val Leu Leu Leu Leu Leu Val Ala Thr Ala Trp His

1 5 10 15

Gly Gln Gly Gly Val Val Ser His Phe Asn Asp Cys Pro Leu Ser His

20 25 30

Asp Gly Tyr Cys Leu His Asp Gly Val Cys Met Tyr Ile Glu Ala Leu

35 40 45

Asp Lys Tyr Ala Cys Asn Cys Val Val Gly Tyr Ile Gly Glu Arg Cys

50 55 60

Gln Tyr Arg Asp Leu Lys Trp Trp Glu Leu Arg Ala Ala Ala Ile Glu

65 70 75 80

Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr

85 90 95

Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro

100 105 110

Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu

115 120 125

Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val

130 135 140

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr

145 150 155 160

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro

165 170 175

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser

180 185 190

Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu

195 200 205

Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg

210 215 220

Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln

225 230 235 240

Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr

245 250 255

Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp

260 265 270

Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala

275 280 285

Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Ala Pro Ala Ala Gly Asp Thr

290 295 300

Ile Ile Ser Leu Asp Phe Gly Ser Asn Asp Thr Glu Thr Asp Asp Gln

305 310 315 320

Gln Leu Glu Glu Val Pro Leu Tyr Asn Asp Val Met Leu Pro Ser Pro

325 330 335

Asn Glu Lys Leu Gln Asn Ile Asn Leu Ala Met Ser Pro Leu Pro Thr

340 345 350

Ala Glu Thr Pro Lys Pro Leu Arg Ser Ser Ala Asp Pro Ala Leu Asn

355 360 365

Gln Glu Val Ala Leu Lys Leu Glu Pro Asn Pro Glu Ser Leu Glu Leu

370 375 380

Ser Phe Thr Met Pro Gln Ile Gln Asp Gln Thr Pro Ser Pro Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Thr Arg Gln Ser Ser Pro Glu Pro Asn Ser Pro Ser Glu Tyr

405 410 415

Cys Phe Tyr Val Asp Ser Asp Met Val Asn Glu Phe Lys Leu Glu Leu

420 425 430

Val Glu Lys Leu Phe Ala Glu Asp Thr Glu Ala Lys Asn Pro Phe Ser

435 440 445

Thr Gln Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu Met Leu Ala Pro Tyr Ile Pro

450 455 460

Met Asp Asp Asp Phe Gln Leu Arg Ser Phe Asp Gln Leu Ser Pro Leu

465 470 475 480

Glu Ser Ser Ser Ala Ser Pro Glu Ser Ala Ser Pro Gln Ser Thr Val

485 490 495

Thr Val Phe Gln

500

<210> 33

<211> 1500

<212> DNA

<213> fusion

<400> 33

atgggcccag gagttctgct gctcctgctg gtggccacag cttggcatgg tcagggaggt 60

gtggtgtcgc acttcaatga ctgtccactg tcgcacgatg gatactgcct ccatgatggt 120

gtgtgcatgt acatcgaggc attggacaag tatgcatgca actgtgtcgt cggctacatc 180

ggagagcgat gtcagtaccg agacctgaag tggtgggaac tgagagcggc cgcaattgaa 240

gttatgtatc ctcctcctta cctagacaat gagaagagca atggaaccat tatccatgtg 300

aaagggaaac acctttgtcc aagtccccta tttcccggac cttctaagcc cttttgggtg 360

ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt 420

attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg ctcctgcaca gtgactacat gaacatgact 480

ccccgccgcc ccgggcccac ccgcaagcat taccagccct atgccccacc acgcgacttc 540

gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc aggagcgcag acgcccccgc gtaccagcag 600

ggccagaacc agctctataa cgagctcaat ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg 660

gacaagagac gtggccggga ccctgagatg gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag 720

gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggcctacag tgagattggg 780

atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg cacgatggcc tttaccaggg tctcagtaca 840

gccaccaagg acacctacga cgcccttcac atgcaggccc tgcccccctcg cgccccagcc 900

gctggagaca caatcatatc tttagatttt ggcagcaacg acacagaaac tgatgaccag 960

caacttgagg aagtaccatt atataatgat gtaatgctcc cctcacccaa cgaaaaatta 1020

cagaatataa atttggcaat gtctccatta cccaccgctg aaacgccaaa gccacttcga 1080

agtagtgctg accctgcact caatcaagaa gttgcattaa aattagaacc aaatccagag 1140

tcactggaac tttcttttac catgccccag attcaggatc agacacctag tccttccgat 1200

ggaagcacta gacaaagttc acctgagcct aatagtccca gtgaatattg tttttatgtg 1260

gatagtgata tggtcaatga attcaagttg gaattggtag aaaaactttt tgctgaagac 1320

acagaagcaa agaacccatt ttctactcag gacacagatt tagacttgga gatgttagct 1380

ccctatatcc caatggatga tgacttccag ttacgttcct tcgatcagtt gtcaccatta 1440

gaaagcagtt ccgcaagccc tgaaagcgca agtcctcaaa gcacagttac agtattccag 1500

<210> 34

<211> 55

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 34

Val Val Ser His Phe Asn Asp Cys Pro Leu Ser His Asp Gly Tyr Cys
1 5 10 15
Leu His Asp Gly Val Cys Met Tyr Ile Glu Ala Leu Asp Lys Tyr Ala
20 25 30
Cys Asn Cys Val Val Gly Tyr Ile Gly Glu Arg Cys Gln Tyr Arg Asp
35 40 45
Leu Lys Trp Trp Glu Leu Arg
50 55

<210> 35

<211> 112

<212> PRT

<213
> homo sapiens

<400> 35

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
1 5 10 15
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65 70 75 80
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

<210> 36

<211> 107

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 36

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn

1 5 10 15

Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu

20 25 30

Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly

35 40 45

Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe

50 55 60

Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn

65 70 75 80

Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr

85 90 95

Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

100 105