



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년03월05일
(11) 등록번호 10-2222615
(24) 등록일자 2021년02월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/725 (2006.01) A61K 35/17 (2014.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/7051 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7007191
(22) 출원일자(국제) 2015년08월28일
심사청구일자 2020년02월06일
(85) 번역문제출일자 2017년03월15일
(65) 공개번호 10-2017-0045258
(43) 공개일자 2017년04월26일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2015/052494
(87) 국제공개번호 WO 2016/030691
국제공개일자 2016년03월03일
(30) 우선권주장
1415347.2 2014년08월29일 영국(GB)
(56) 선행기술조사문헌
Analytical Biochemistry, Vol. 386, pp.129-131
(2008. 12. 7.)*
국제공개공보 W02014/127261(2014.08.21.)*
J. Mol. Biol., Vol. 368, pp.780-790 (2007)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
유씨엘 비즈니스 리미티드
영국 더블유1터 4티피 런던 토텐햄 코트 로드 97
더 네트워크 빌딩
(72) 발명자
폴 마틴
영국 더블유1터 4티피 런던 토트넘 코트 로드 97
더 네트워크 빌딩 유씨엘 비즈니스 피엘씨 내
코르도바 손
영국 더블유1터 4티피 런던 토트넘 코트 로드 97
더 네트워크 빌딩 유씨엘 비즈니스 피엘씨 내
콩 카이
영국 더블유1터 4티피 런던 토트넘 코트 로드 97
더 네트워크 빌딩 유씨엘 비즈니스 피엘씨 내
(74) 대리인
김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 36 항

심사관 : 김경미

(54) 발명의 명칭 **신호전달 시스템**

(57) 요약

본 발명은, (i) 항원 결합 도메인, 막관통 도메인 및 제1 결합 도메인을 포함하는 수용체 성분; 및 (ii) 신호전달 도메인과, 상기 수용체 성분의 제1 결합 도메인에 특이적으로 결합하는 제2 결합 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 성분을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR) 신호전달 시스템으로서, 작용제 부재 하에, 수용체 성분과 신호전달 성분이 헤테로다имер화하고 항원에 대한 항원 결합 도메인의 결합이 신호전달 도메인을 통한 신호전달을 유도하는 반면, 작용제 존재 하에, 수용체 성분과 신호전달 성분이 헤테로다имер화하지 않고 항원에 대한 항원 결합 도메인의 결합이 신호전달 도메인을 통한 신호전달을 유도하지 않도록, 제1 결합 도메인과 제2 결합 도메인의 결합이 작용제 존재 하에 파괴되는 것인 키메라 항원 수용체(CAR) 신호전달 시스템을 제공한다.

(52) CPC특허분류

C12N 5/0636 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2319/80 (2013.01)

C12N 2510/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

- (i) 항원 결합 도메인, 막관통 도메인 및 제1 결합 도메인을 포함하는 수용체 성분; 및
- (ii) 신호전달 도메인과, 상기 수용체 성분의 제1 결합 도메인에 특이적으로 결합하는 제2 결합 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 성분

을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR) 시스템으로서,

작용제의 존재에 의해 제1 결합 도메인과 제2 결합 도메인의 결합이 파괴되어, 그 결과, 작용제 부재 하에서는, 수용체 성분과 신호전달 성분이 헤테로다имер화하고 항원에 대한 항원 결합 도메인의 결합이 신호전달 도메인을 통한 신호전달을 유도하는 반면, 작용제 존재 하에서는, 수용체 성분과 신호전달 성분이 헤테로다имер화하지 않고 항원에 대한 항원 결합 도메인의 결합이 신호전달 도메인을 통한 신호전달을 유도하지 않는 것인 CAR 시스템.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 수용체 성분이 막관통 도메인과 제1 결합 도메인 사이에 링커를 포함하는 것인 CAR 시스템.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 링커가 서열 번호: 3으로서 제시된 서열을 포함하거나 이 서열로 이루어지는 것인 CAR 시스템.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 결합 도메인이 Tet 리프레서 단백질(TetR) 또는 이의 변이체를 포함하고, 상기 제2 결합 도메인이 전사 유도성 펩티드(TiP) 또는 이의 변이체를 포함하거나; 또는 상기 제1 결합 도메인이 TiP 또는 이의 변이체를 포함하고, 상기 제2 결합 도메인이 TetR 또는 이의 변이체를 포함하며;

상기 작용제가 테트라사이클린, 독시사이클린 또는 미노사이클린 또는 이들의 유사체인 CAR 시스템.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 수용체 성분이 2개의 제1 결합 도메인을 포함하고, 상기 2개의 제1 결합 도메인은 TetR 도메인인 CAR 시스템.

청구항 6

제5항에 있어서, 2개의 TetR 도메인이 링커에 의해 분리되어 있는 것인 CAR 시스템.

청구항 7

제5항에 있어서, 각각의 TetR 도메인이 작용제에 대해 상이한 친화력을 갖는 것인 CAR 시스템.

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 각각 상이한 항원을 인식하는 다중 수용체 성분이 존재하는 것인 CAR 시스템.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 다중 수용체 성분의 결합 도메인은, 각각의 항원이 상이한 신호전달 강도를 전파하도록, 신호전달 성분의 결합 도메인에 대한 결합에 있어서 서로 다른 것인 CAR 시스템.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 다중 수용체 성분의 결합 도메인은, 각각의 항원이 작용제 존재 하에 상이한 신호전달 강도를 전파하도록, 작용제에 대한 결합에 있어서 서로 다른 것인 CAR 시스템.

청구항 11

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신호전달 성분의 신호전달 도메인은 CD3 제타 엔도도메인, CD28 엔도도메인, 41BB 엔도도메인 및 OX40 엔도도메인으로부터 선택되는 단일 엔도도메인을 포함하는 것인 CAR 시스템.

청구항 12

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 신호전달 성분의 신호전달 도메인은 CD3 제타 엔도도메인, CD28 엔도도메인, 41BB 엔도도메인 및 OX40 엔도도메인 중 하나 이상을 포함하는 것인 CAR 시스템.

청구항 13

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 복수의 신호전달 성분을 포함하고, 각각의 신호전달 성분은 신호전달 도메인 및 결합 도메인을 포함하며, 상기 결합 도메인은 각각 수용체 성분의 동일한 결합 도메인을 인식하지만, 상기 신호전달 도메인은 상이한 엔도도메인을 포함하는 것인 CAR 시스템.

청구항 14

제13항에 있어서, 복수의 신호전달 성분은 복수의 결합 도메인을 포함하고, 각각의 결합 도메인은 독립적으로 수용체 성분의 결합 도메인을 상이한 친화력으로 인식하는 것인 CAR 시스템.

청구항 15

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 CAR 신호전달 시스템을 코딩하는 핵산으로서, 수용체 성분과 신호전달 성분이, 번역 후 수용체 성분과 신호전달 성분 사이에서 절단되는 자기 절단형 펩티드에 의해 공발현되는 것인 핵산.

청구항 16

제15항에 따른 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 17

제16항에 따른 벡터를 포함하는, 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터 또는 트랜스포존.

청구항 18

제1항에 따른 CAR 신호전달 시스템을 발현하는 T 세포 또는 NK 세포.

청구항 19

제15항에 따른 핵산 또는 상기 핵산을 포함하는 벡터를 포함하고, 상기 CAR 신호전달 시스템을 발현하는 T 세포 또는 NK 세포.

청구항 20

복수의, 제18항에 따른 T 세포 또는 NK 세포를 포함하는 약학 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 질환을 치료 및/또는 예방하는 데 사용하기 위한 약학 조성물.

청구항 22

하기 단계:

- (i) T 세포 또는 NK 세포 함유 샘플을 분리하는 단계;
 - (ii) T 세포 또는 NK 세포를, 제15항에 따른 핵산 또는 상기 핵산을 포함하는 벡터로 트랜스덕션 또는 트랜스펙션하는 단계; 및
 - (iii) (ii)로부터 얻은 T 세포 또는 NK 세포를 대상체에게 투여하는 단계
- 를 포함하는 방법에 사용하기 위한 조성물로서,
- 상기 조성물은 상기 핵산 또는 상기 벡터를 포함하는 것인 조성물.

청구항 23

대상체에서 질환을 치료 및/또는 예방하는 방법에 사용하기 위한 조성물로서, 상기 방법은 제1항에 따른 CAR 신호전달 시스템을 발현하는 복수의 T 세포 또는 NK 세포를 포함하는 약학 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 상기 방법은 대상체의 독성 활성을 모니터링하는 것을 포함하고, 유해 독성 효과를 줄이기 위해, 제1항에 따른 CAR 신호전달 시스템에 사용하기 위한 작용제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 상기 조성물은 상기 작용제를 포함하는 것인 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 방법은 대상체의 질환 진행을 모니터링하는 것 및/또는 대상체의 독성 활성을 모니터링하는 것을 포함하고, 허용 가능한 수준의 질환 진행 및/또는 독성 활성을 제공하기 위해, 상기 작용제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 것인 조성물.

청구항 25

제21항에 있어서, 상기 질환이 암인 조성물.

청구항 26

제20항에 있어서, 질환의 치료 및/또는 예방용 의약의 제조에 사용하기 위한 약학 조성물.

청구항 27

제15항에 따른 핵산 또는 상기 핵산을 포함하는 벡터를 포함하는 키트.

청구항 28

T 또는 NK 세포를 제조하기 위한 시험관내 방법으로서, 제15항에 따른 핵산 또는 상기 핵산을 포함하는 벡터를 T 또는 NK 세포에 도입하여 상기 CAR 신호전달 시스템을 발현하는 T 또는 NK 세포를 제조하는 단계를 포함하는 것인 시험관내 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 T 또는 NK 세포가 대상체로부터 분리한 샘플로부터 유래된 것인 시험관내 방법.

청구항 30

제1항에 따른 CAR 신호전달 시스템을 발현하는 T 또는 NK 세포를 포함하는, 대상체에서 제1항에 따른 CAR 신호전달 시스템을 억제하기 위한 조성물로서, 상기 조성물은 상기 작용제를 포함하는 것인 조성물.

청구항 31

복수의, 제19항에 따른 T 세포 또는 NK 세포를 포함하는 약학 조성물.

청구항 32

제31항에 있어서, 질환을 치료 및/또는 예방하는 데 사용하기 위한 약학 조성물.

청구항 33

대상체에서 질환을 치료 및/또는 예방하는 방법에 사용하기 위한 조성물로서, 상기 방법은 하기 단계:

(i) T 세포 또는 NK 세포 함유 샘플을 분리하는 단계;

(ii) T 세포 또는 NK 세포를, 제1항에 따른 CAR 신호전달 시스템을 코딩하는 핵산 또는 상기 핵산을 포함하는 벡터로 트랜스펙션 또는 트랜스펙션하는 단계로서, 수용체 성분과 신호전달 성분이, 번역 후 수용체 성분과 신호전달 성분 사이에서 절단되는 자기 절단형 펩티드에 의해 공발현되는 것인 단계; 및

(iii) (ii)로부터 얻은 T 세포 또는 NK 세포를 대상체에게 투여하는 단계

를 포함하고,

상기 방법은 대상체의 독성 활성을 모니터링하는 것을 포함하고, 유해 독성 효과를 줄이기 위해, 제1항에 따른 CAR 신호전달 시스템에 사용하기 위한 작용제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며,

상기 조성물은 상기 작용제를 포함하는 것인 조성물.

청구항 34

제23항에 있어서, 상기 질환이 암인 조성물.

청구항 35

제24항에 있어서, 상기 질환이 암인 조성물.

청구항 36

제1항에 따른 CAR 신호전달 시스템을 코딩하는 핵산 또는 상기 핵산을 포함하는 벡터를 포함하고, 상기 CAR 신호전달 시스템을 발현하는 T 또는 NK 세포를 포함하는, 대상체에서 제1항에 따른 CAR 신호전달 시스템을 억제하기 위한 조성물로서, 수용체 성분과 신호전달 성분이, 번역 후 수용체 성분과 신호전달 성분 사이에서 절단되는 자기 절단형 펩티드에 의해 공발현되고, 상기 조성물은 상기 작용제를 포함하는 것인 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 키메라 항원 수용체 신호전달 시스템에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 종래, 항원 특이적 T 세포는, 표적 항원에 본래 특이적인 말초혈 T 세포의 선택적 증식에 의해 생성되었다. 그러나, 대부분의 암 항원에 특이적인 다수의 T 세포를 선택하여 증식시키는 것은 어렵고 불가능할 때도 많다. 통합 벡터를 이용한 유전자 치료가 상기 문제에 대한 해법을 제공하는데, 그 이유는, 키메라 항원 수용체 (Chimeric Antigen Receptor; CAR)의 트랜스제닉 발현은, 말초혈 T 세포의 벌크 집단의 체외 바이러스 벡터 트랜스펙션에 의해 임의의 표면 항원에 특이적인 수많은 T 세포를 생성할 수 있게 하기 때문이다.

[0003] 키메라 항원 수용체는, T 세포의 이펙터 기능에 단클론 항체(mAb)의 특이성을 접합한 단백질이다. 이들의 일반적인 형태는, 모두, T 세포 생존 및 활성화 신호를 전달하는 화합물 엔도도메인에 연결되어 있는 항원 인식 아미노 말단, 스페이서, 막관통 도메인을 갖는 I형 막관통 도메인 단백질의 형태이다(도 1(a) 참조).

[0004] 이러한 분자들의 가장 일반적인 형태는, 스페이서 및 막관통 도메인을 통해 신호전달 엔도도메인에 융합된, 표적 항원을 인식하는 단클론 항체로부터 유도된 단일쇄 가변 단편(scFv)의 융합체이다. 이러한 분자들은 그 표적의 scFv에 의한 인식에 반응하여 T 세포의 활성화를 유도한다. T 세포가 그러한 CAR를 발현할 경우, 이들은 표적 항원을 발현하는 세포를 인식하여 사멸시킨다. 종양 관련 항원에 대한 몇 종의 CAR가 개발되었고, 그러한 CAR 발현 T 세포를 이용한 양자 면역세포 이입(adoptive transfer) 접근법이 현재 각종 암의 치료를 위한 임상 시험 중에 있다.

[0005] CAR 연구로부터 많은 독성이 보고되었고, 이론적 독성이 추가로 존재한다. 그러한 독성으로는 대식세포 활성화 증후군(MAS)을 초래하는 CAR T 세포의 지속적인 집중 활성화 및 "온-타겟 오프-종양("On-target off-tumour") 독성, 즉 정상 조직의 표적 항원의 인식에 의해 유발되는 면역학적 독성을 들 수 있다.

- [0006] MAS는 T 세포의 지속적인 항원 유도 활성화 및 증식에 의해 유발되고, 이것은 엄청난 양의 염증성 사이토카인을 방출시켜 대식세포의 과활성화 및 면역 활성화의 피드 포워드 사이클(feed-forward cycle)을 야기하는 것으로 추정된다. 혈청 IL-6 중의 큰 스파이크(spike)가 특징적이고, 이 증후군은 ICU 입원을 요하는 심각한 전신 질환으로 이어질 수 있다.
- [0007] 다른 CAR와 관련해서도 온-타겟 오프-종양 독성이 보고되었고, 예를 들어, 신세포 암종 항원 CAIX에 대한 CAR로 치료된 환자 그룹은 예상치 못했던, 치료를 제한하는 담즙 독성을 나타내었다. CAR 연구와 관련하여 2명의 사망자가 보고되었다: 한 환자는 다량의 3세대 항-ERBB2 CAR T 세포를 주입받은 직후 발생한 호흡 곤란 증후군으로 사망하였고, 다른 환자는 다른 연구에서 2세대 항-CD19 CAR를 사용한 CLL 치료에 따른 가능한 사이토카인 폭풍이 발생한 후 사망하였다.
- [0008] 이러한 독성은 상세한 동물 연구 또는 비인간 영장류 연구에도 불구하고 예측하는 것이 매우 어렵다. 결정적인 점은, 소형 분자 및 생물제제와는 달리, CAR T 세포는 반감기를 갖지 않고, 환자는 투여를 중단할 수 없고 작용제가 분해/배설되기를 기다려야 한다는 것이다. CAR T 세포는 자율적이며 생각하여 증식할 수 있다. 따라서, 독성이 진행성이 되고 급격히 진행할 수 있다.
- [0009] 자살 유전자는, 이들을 발현하는 세포를 조건부로 파괴할 수 있는 유전적으로 발현되는 요소이다. 그 예로는 세포를 간사이클로비어에 민감하게 만드는 허피스-심플렉스 바이러스 티미민 키나제, 세포를 소분자 호모다이머라 이저에 민감하게 만드는 유도성 카스파제 9, 및 세포를 리톡시마에 민감하게 만드는 CD20 및 RQR8을 들 수 있다.
- [0010] 이 기술은, CAR T 세포 치료에 어느 정도의 안전성을 부가하지만, 한계도 있다. 첫째, 이 기술은 자살 작용제를 첨가하면 모든 CAR T 세포가 파괴되는 이원 접근법이다. 또한, 의학적 치료제는 종종 치료 범위(therapeutic window)를 갖는다. 자살 유전자로, 허용 가능한 독성을 갖는 효능을 얻을 수 있도록 제품의 효능을 조정할 수가 없다. 둘째, 자살 유전자가 상기에 기재한 면역 독성 중 일부에 도움이 되는지가 명확하지 않다: 예를 들어, 대식세포 활성화 증후군이 유발될 즈음에는, 당연히 더 이상 CAR T 세포의 영속을 필요로 하지 않을 것이고 자살 유전자는 더 이상 도움이 되지 않을 것이다. 아마도 자살 유전자가 작동하기에는 너무 빨리 더 급성의 사이토카인 방출 증후군이 발생할 것이다.
- [0011] 따라서, 전술한 단점들 및 문제점과 관련되지 않은, CAR T 세포를 제어하는 대안적인 방법이 필요한 실정이다.

발명의 내용

- [0012] 본 발명자들은, CAR의 항원 인식 성분과 신호전달 성분을 분리하여, CAR 시스템의 항원 인식 성분에 항원이 계속 결합되어 있음에도 불구하고, 신호전달을 신속히 억제/종결할 수 있는 시스템을 제조할 수 있다는 것을 발견하였다. 신호전달의 억제는, 그렇지 않으면 발생하는, CAR의 세포의 항원 결합 성분(본원에서 수용체 성분이라 함)과 CAR의 세포내 신호전달 성분의 공국재화(co-localisation)와 상호작용을 억제하는 소분자 등의 작용제(agent) 존재 하에 발생한다.
- [0013] 따라서, 제1 측면에서, 본 발명은
- [0014] (i) 항원 결합 도메인, 막관통 도메인 및 제1 결합 도메인을 포함하는 수용체 성분; 및
- [0015] (ii) 신호전달 도메인과, 상기 수용체 성분의 제1 결합 도메인에 특이적으로 결합하는 제2 결합 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 성분
- [0016] 을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR) 시스템으로서, 작용제 부재 하에, 수용체 성분과 신호전달 성분이 헤테로다이머화하고 항원에 대한 항원 결합 도메인의 결합이 신호전달 도메인을 통한 신호전달을 유도하는 반면, 작용제 존재 하에, 수용체 성분과 신호전달 성분이 헤테로다이머화하지 않고 항원에 대한 항원 결합 도메인의 결합이 신호전달 도메인을 통한 신호전달을 유도하지 않도록, 제1 결합 도메인과 제2 결합 도메인의 결합이 작용제 존재 하에 파괴되는 것인 키메라 항원 수용체(CAR) 시스템을 제공한다.
- [0017] 상기 수용체 성분은 막관통 도메인과 제1 결합 도메인 사이에 링커를 포함할 수 있다.
- [0018] 상기 링커는 서열 번호: 3으로서 제시된 서열을 포함하거나 이 서열로 이루어질 수 있다.
- [0019] 상기 제1 결합 도메인은 Tet 리프레서 단백질(TetR) 또는 이의 변이체를 포함할 수 있고, 상기 제2 결합 도메인은 TetR 유도성 펩티드(TiP, Klotzsche 등의 문헌[The Journal of biological chemistry; 2005; 280(26);

24591-9)]에 기재됨)(TiP)를 포함할 수 있거나, 또는 그 반대일 수 있다. 이 경우, 작용제는 테트라사이클린, 독시사이클린 또는 미노사이클린 또는 이의 유사체일 수 있다.

- [0020] 수용체 성분은, TetR 도메인인 2개의 제1 결합 도메인을 포함할 수 있다. 상기 2개의 TetR 도메인은 링커에 의해 분리될 수 있다. 각각의 TetR 도메인은 작용제에 대해 상이한 친화력을 가질 수 있다.
- [0021] 본 발명의 제1 측면의 CAR 시스템은, 각각 상이한 항원을 인식하는 다중 수용체 성분을 포함할 수 있다.
- [0022] 다중 수용체 성분의 제1 결합 도메인들은, 각각의 항원이 상이한 신호전달 강도를 전파하도록 신호전달 성분의 제2 결합 도메인에 대한 결합에 있어서 상이할 수 있다.
- [0023] 다중 수용체 성분의 제1 결합 도메인들은, 각각의 항원이 작용제 존재 하에 상이한 신호전달 강도를 전파하도록 작용제에 대한 결합에 있어서 상이할 수 있다.
- [0024] 신호전달 성분의 신호전달 도메인은 CD3 제타 엔도도메인, CD28 엔도도메인, 41BB 엔도도메인 및 OX40 엔도도메인으로부터 선택되는 단일 엔도도메인을 포함할 수 있다.
- [0025] 신호전달 성분의 신호전달 도메인은 CD3 제타 엔도도메인, CD28 엔도도메인, 41BB 엔도도메인 및 OX40 엔도도메인 중 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 제1 측면의 CAR 시스템은 복수의 신호전달 성분을 포함할 수 있고, 각각의 신호전달 성분은 신호전달 도메인 및 제2 결합 도메인을 포함하며, 여기서 제2 결합 도메인은 각각 수용체 성분의 동일한 제1 결합 도메인을 인식하지만, 신호전달 도메인은 상이한 엔도도메인을 포함한다.
- [0027] 복수의 신호전달 성분은 복수의 제2 결합 도메인들을 포함하고, 각각의 제2 결합 도메인은 독립적으로 상이한 친화력으로 수용체 성분의 제1 결합 도메인을 인식한다.
- [0028] 제2 측면에서, 본 발명은, 항원 결합 도메인, 막관통 도메인 및 제1 결합 도메인을 포함하는, 본 발명의 제1 측면의 CAR 시스템에 사용하기에 적합한 수용체 성분을 제공한다.
- [0029] 제3 측면에서, 본 발명은 신호전달 도메인 및 제2 결합 도메인을 포함하는, 본 발명의 제1 측면의 CAR 시스템에 사용하기에 적합한 신호전달 성분을 제공한다.
- [0030] 제4 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제2 측면에 따른 수용체 성분을 코딩하는 핵산 서열을 제공한다.
- [0031] 제5 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제3 측면에 따른 신호전달 성분을 코딩하는 핵산 서열을 제공한다.
- [0032] 제6 측면에서, 본 발명은, 수용체 성분과 신호전달 성분이, 번역 후 수용체 성분과 신호전달 성분 사이에서 절단되는 자기 절단형 펩티드에 의해 공발현되는, 본 발명의 제1 측면의 CAR 시스템을 코딩하는 핵산 서열을 제공한다.
- [0033] 제7 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제4 내지 제6 측면에 따른 핵산 서열을 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0034] 제8 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제7 측면에 따른 벡터를 포함하는 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터 또는 트랜스포존을 제공한다.
- [0035] 제9 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제2 측면에 따른 수용체 성분과 본 발명의 제3 측면에 따른 신호전달 성분을 발현하는 T 세포 또는 NK 세포를 제공한다.
- [0036] T 세포 또는 NK 세포는 본 발명의 제4 내지 제6 측면에 따른 핵산 또는 본 발명의 제7 또는 제8 측면에 따른 벡터를 포함할 수 있다.
- [0037] 제10 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제9 측면에 따른 복수의 T 세포 또는 NK 세포를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0038] 제11 측면에서, 본 발명은 질환의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 본 발명의 제10 측면에 따른 약학 조성물을 제공한다.
- [0039] 제12 측면에서, 본 발명은, 본 발명의 제10 측면에 따른 약학 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 질환의 치료 및/또는 예방 방법에 관한 것이다.
- [0040] 본 발명의 제12 측면에 따른 방법은,

- [0041] (i) T 세포 또는 NK 함유 샘플을 분리하는 단계;
- [0042] (ii) 본 발명의 제4 내지 제6 측면 중 어느 하나에 따른 핵산 서열 또는 본 발명의 제7 또는 제8 측면에 따른 벡터로 T 또는 NK 세포를 트랜스덕션 또는 트랜스펙션하는 단계; 및
- [0043] (iii) (ii)로부터 얻은 T 세포 또는 NK 세포를 대상체에게 투여하는 단계
- [0044] 를 포함할 수 있다.
- [0045] 상기 방법은, 대상체로부터 사전에 분리하여, 본 발명의 제4 내지 제6 측면 중 어느 하나에 따른 핵산 서열 또는 본 발명의 제7 또는 제8 측면에 따른 벡터로 트랜스덕션/트랜스펙션한 T 세포/NK 세포를 대상체에게 투여하는 것을 포함할 수 있다.
- [0046] 본 발명의 제12 측면에 따른 방법은, 대상체에서의 독성 활성을 모니터링하는 것을 포함할 수 있고, 유해 독성 효과를 감소시키기 위해 본 발명의 제1 측면의 CAR 시스템에 사용하기 위한 작용제를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0047] 상기 방법은, 대상체에서의 질환의 진행을 모니터링하는 것 및/또는 대상체에서의 독성 활성을 모니터링하는 것을 포함할 수 있고, 허용 가능한 수준의 질환 진행 및/또는 독성 활성을 제공하기 위해 본 발명의 제1 측면의 CAR 시스템에 사용하기 위한 작용제를 투여하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 제10 측면에 따른 약학 조성물 또는 본 발명의 제12 측면에 따른 방법의 용도에 있어서, 질환은 암일 수 있다.
- [0049] 제13 측면에서, 본 발명은 질환의 치료 및/또는 예방용 의약의 제조에 있어서의 본 발명의 제10 측면에 따른 약학 조성물의 용도에 관한 것이다.
- [0050] 제14 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제4 내지 제6 측면에 따른 핵산 또는 본 발명의 제7 또는 제8 측면에 따른 벡터를 포함하는 키트를 제공한다.
- [0051] 제15 측면에서, 본 발명은, 본 발명의 제4 내지 제6 측면에 따른 핵산 서열 또는 본 발명의 제7 또는 제8 측면에 따른 벡터를 T 또는 NK 세포에 도입하는 단계를 포함하는, 본 발명의 제9 측면에 따른 T 또는 NK 세포의 제조 방법에 관한 것이다.
- [0052] T 또는 NK 세포는 대상체로부터 분리된 샘플로부터 유래될 수 있다.
- [0053] 제16 측면에서, 본 발명은, 본 발명의 제9 측면에 따른 T 또는 NK 세포를 포함하는 대상체에서, 본 발명의 제1 양태에 따른 CAR 시스템을 억제하는 방법으로서, 작용제를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.
- [0054] 따라서, 본 발명은, 수용체 성분과 신호전달 성분의 공국제화를 방지하는 작용제, 예를 들어 소분자 존재 하에 신호전달이 억제될 수 있는 CAR 시스템을 제공한다. 이것은 CAR 신호전달을 가능하게 하며, 이로써, CAR 세포의 효능이, 약해지지 않은 CAR 신호전달과 관련된 잠재적 독성 효과를 방지할 수 있도록 제어된 방식으로 가역적으로 끝날 수 있도록 한다. 추가로, 본 발명의 시스템은 또한, CAR 세포의 효능이 약리학적으로 제어될 수 있게 하고, 원하는 치료 효과의 달성과 원치않는 독성의 방지 사이에 허용 가능한 균형이 형성되도록 조정될 수 있게 한다.

도면의 간단한 설명

[0055] **도 1** - (a) 전형적인 CAR를 예시하는 모식도. (b) 내지 (d): CAR 엔도도메인의 다양한 세대와 순열: (b) 초기 디자인은 ITAM 신호만을 Fc ϵ R1- γ 또는 CD3 ζ 엔도도메인을 통해 전달하는 반면, 후기 디자인은 동일한 화합물 엔도도메인에서 추가의 (c) 1개 또는 (d) 2개의 공 자극 신호를 전달한다.

도 2 - TetR 및 TiP의 구조. (a) 임의의 단백질의 아미노 말단에 부착된 TiP의 서열; (b) 크리스탈로그래피로 얻은, TetR(PDB 2NS8 유래 및 Luckner *et al*(J. Mol. Biol. 368, 780-790(2007))과 상호작용하는 TiP의 구조. TiP는, 테트라사이클린이 회합하는 잔기의 다수와 회합하여 TetR 호모다имер 내에 깊이 맞물려 있는 것으로 관찰될 수 있다.

도 3 - (a) 막 스페닝 수용체 성분은 세포의 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 및 TetR에의 세포내 링커를 포함한다. 별개의 분자인 신호전달 성분은 하나 또는 여러 개의 T 세포 신호전달 도메인에 대한 TiP의 융합에 의

해 생성되는 세포내 단백질을 포함한다. 테트라사이클린 또는 테트라사이클린 유사체 부재 하에, 수용체 성분과 신호전달 성분은 상호작용하고, 동족 항원 존재 하에 시스템은 신호를 전달한다. (b) 테트라사이클린 또는 테트라사이클린 유사체 존재 하에, TiP는 TetR로부터 이탈되고, 수용체는 동족 항원이 존재하여도 신호를 전달할 수 없다.

도 4 - CD4 유래의 세포내 링커 도메인.

도 5 - 시스템의 기능을 입증하기 위한, eGFP를 갖는 테스트 구성체. (a) 2A 위치에서 자기 절단되어, eGFP에 융합된 TiP와, 엔도도메인으로 TetR을 갖는 CAR를 생성하는, 단일 전사체로서 발현되는 바이시스트로닉(bicistronic) 구성체. (b) 테트라사이클린 부재 하에 이 구성체를 발현하는 SupT1 세포의 형광 현미경 사진. eGFP 형광은 세포막에서 분명히 관찰할 수 있다; (c) 테트라사이클린이 존재할 때의 동일한 세포의 형광 현미경 사진. 여기서, eGFP는 세포질에 있어서, 테트라사이클린이 TiP를 이탈시켰음을 보여준다.

도 6 - 초기 TetCAR 구성체 및 대조군. (a) 2A 위치에서 자기 절단되어, CD3-제타의 엔도도메인에 가요성 링커를 통해 융합된 TiP를 포함하는 신호전달 성분과, CD3을 인식하는 scFv, IgG1의 Fc 도메인 유래의 스페이서, CD4 유래의 막관통 및 세포내 도메인, 및 TetR을 포함하는 수용체 성분을 생성하는, 단일 전사체로서 발현되는 바이시스트로닉 구성체. (b) TiP가 신호전달 성분으로부터 제거된 것 이외에는 동일한 대조군도 구성하였다. (c) 주석이 달린, 기본적 TetCAR의 아미노산 서열이 도시된다.

도 7 - 대조군과 비교한 초기 TetR 구성체의 기능. (a) TetCAR를 BW5 T 세포에서 발현시켰다. 이들 T 세포를, 테트라사이클린 부재 하에 또는 증가하는 농도의 테트라사이클린 존재 하에, 야생형 SupT1 세포 또는 CD3을 발현하도록 조작된 SupT1 세포로 챌린징(challenge)하였다. 야생형 SupT1 세포로 챌린징된 T 세포는 테트라사이클린 존재 또는 부재 하에 활성화되지 않고; CD3을 발현하는 SupT1 세포로 챌린징된 T 세포는 테트라사이클린 부재 하에 활성화되지만, 테트라사이클린 존재 하에 활성화가 신속히 억제되며, 100 nM의 테트라사이클린 존재 하에 활성화가 완전히 억제되었다. (b) TiP 도메인이 결여된 대조군 TetCAR를 BW5로 트랜스덕션하였다. 한번 더, 이들 T 세포를, 테트라사이클린 부재 하에 또는 증가하는 농도의 테트라사이클린 존재 하에, 야생형 SupT1 세포 또는 CD3을 발현하도록 조작된 SupT1 세포로 챌린징하였다. 신호전달 성분에 있어서의 TiP 요소의 결여는 어떠한 조건에서도 신호전달을 유도하지 않았다.

도 8 - 이중 tetR 도메인 tetCAR. tetR은 2개의 TetR이 서로 부착된 상태로 단일체로서 발현된다. 테트라사이클린에 서로 다른 친화력을 갖는 TetR 도메인(및 그에 따른 TiP)가 사용될 경우, TiP의 테트라사이클린 매개 이탈의 반응속도(kinetics)는 신호전달 수준을 조절할 수 있다.

도 9 - 단일 엔도도메인을 포함하는 복수의 신호전달 성분을 이용하는 tetCAR 신호전달 시스템. 단일 CAR가, 다수의 상이한 신호전달 성분들과 함께 발현되며, 상기 성분들 모두 그 아미노 말단에 TiP를 포함하지만, 화합물 신호전달 도메인과는 달리 상이한 개별 신호전달 도메인을 포함한다. 이들은 수용체 성분과 무작위적으로 상호작용한다. 상이한 신호전달 도메인과 이들의 2차 메신저 간의 입체 상호작용의 부재는 그들의 기능을 개선한다.

도 10 - 단일 엔도도메인 및 상이한 TiP 도메인을 포함하는 복수의 신호전달 성분을 이용하는 tetCAR 신호전달 시스템. 각각의 신호전달 성분은 개별 신호전달 도메인으로 이루어진다. 각각의 신호전달 성분은 또한 TiP로 이루어지지만, 각각의 TiP는 TetR 도메인에 대해 상이한 친화력을 갖는다. 따라서, CAR와 신호전달 도메인 간의 상호작용의 화학량은 변화할 수 있다. 도시된 예에서, 신호전달 시스템은 OX40 > CD3제타 > CD28이 되도록 구성된다.

도 11 - 복수의 수용체 성분과, 각각 단일 엔도도메인을 포함하는 복수의 신호전달 성분을 이용하는 tetCAR 신호전달 시스템.

도 12 - 1차 세포에서의 TetCAR 신호전달. (a) 다양한 구성체를 테스트하였다: (i) 전형적인 CAR; (ii) tetCAR; (iii) TiP가 결실된 대조군 tetCAR. (b) CD19에 대해 염색된 비트랜스덕션 세포 및 SupT1.CD19 세포; (c) 항-Fc로 염색된 다양한 CAR 구성체로 트랜스덕션된 T 세포 및 비트랜스덕션 T 세포.

도 13 - 다양한 농도의 테트라사이클린 존재 하에서의, 비트랜스덕션 T 세포, 및 SupT1 세포, SupT1.CD19 세포로 챌린징된 다양한 CAR 구성체((i) 전형적인 제1 세대 CAR, (ii) tetCAR 및 (iii) 대조군 tetCAR)로 트랜스덕션된 T 세포로부터의 인터페론-감마 방출.

도 14 - 표적 세포의 사멸. 크롬 방출 어세이를 테트라사이클린 부재 하에서의 표적 세포(SupT1.CD19)의 사멸을 입증하는 데 이용하였다. 주석: (i) - 정규 CAR; (ii) - tetCAR; (iii) - 대조군 tetCAR(엔도도메인 상에 TiP

없음).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0056]

키메라 항원 수용체(CAR)

[0057]

도 1에 모식적으로 도시된 전형적 CAR는, 세포의 항원 인식 도메인(바인더)을 세포내 신호전달 도메인(엔도도메인)에 연결하는 키메라 I형 막관통 단백질이다. 상기 바인더는 전형적으로 단클론 항체(mAb)로부터 유도된 단일쇄 가변 단편(scFv)이나, 이것은 항체 유사 항원 결합 부위를 포함하는 다른 포맷을 기초로 할 수 있다. 막으로부터 바인더를 분리하여 이것을 적절한 배향으로 만들기 위해 스페이서 도메인이 필요할 수 있다. 사용되는 일반적인 스페이서 도메인은 IgG1의 Fc이다. 보다 콤팩트한 스페이서, 예를 들어, 항원에 따라, CD8 α 유래의 스톱(stalk) 및 심지어 IgG1 힌지 단독이면 충분할 것이다. 막관통 도메인은 세포막 내에 단백질을 고정하고 스페이서를 엔도도메인에 연결한다.

[0058]

초기의 CAR 디자인은 CD3 ζ 또는 Fc ϵ R1의 γ 사슬 중 어느 하나의 세포내 부분으로부터 유도되는 엔도도메인을 가졌다. 그 결과, 이들 제1 세대 수용체는 면역 신호 1을 전달하였고, 이것은 동족 표적 세포의 T 세포 사멸을 유발하는 데에는 충분하였지만, T 세포가 증식 및 생존할 수 있도록 충분히 활성화시키지는 못하였다. 이러한 한계를 극복하기 위해, 화합물 엔도도메인을 구성하였다: T 세포 공자극 분자의 세포내 부분을 CD3 ζ 의 것에 융합하면, 항원 인식 후 활성화 신호와 공자극 신호를 동시에 전달할 수 있는 제2 세대 수용체가 된다. 가장 흔히 사용되는 공자극 도메인은 CD28의 것이다. 이것은, T 세포 증식을 유발하는, 가장 강력한 공자극 신호, 즉 면역 신호 2를 제공한다. TNF 수용체 패밀리의 엔도도메인, 예컨대 생존 신호를 전달하는 밀접하게 관련된 OX40 및 41BB를 포함하는 몇몇 수용체도 개시되었다. 현재는, 활성화 신호, 증식 신호 및 생존 신호를 전달할 수 있는 더욱 더 강력한 제3 세대 CAR도 개시되었다.

[0059]

CAR 코딩 핵산을, 예를 들어, 레트로바이러스 벡터를 사용하여 T 세포에 전달할 수 있다. 이러한 방식으로, 양자 면역세포 이입을 위해 다수의 항원 특이적 T 세포를 생성할 수 있다. CAR가 표적 항원에 결합할 경우, 이것은 이것이 발현되는 T 세포로의 활성화 신호의 전달을 유도한다. 따라서, CAR는 T 세포의 특이성 및 세포독성을, 표적 항원을 발현하는 세포 쪽으로 이끈다.

[0060]

제1 측면에서, 본 발명은, 항원 인식/항원 결합 도메인 및 막관통 도메인이, 세포막에 국재화하는 제1 분자(본원에서 '수용체 성분'이라 함) 상에 제공되는 CAR 시스템에 관한 것이다. 세포내 신호전달 도메인은 제2의 세포내 분자(본원에서 '신호전달 성분'이라 함) 상에 제공된다.

[0061]

중요한 점은, 수용체 성분이 제1 결합 도메인을 포함하고, 신호전달 성분이 수용체 성분의 제1 결합 도메인에 특이적으로 결합하는 제2 결합 도메인을 포함한다는 것이다. 따라서, 제2 결합 도메인에 대한 제1 결합 도메인의 결합은, 수용체 성분과 신호전달 성분의 헤테로다이머화 및 공국재화를 유발한다. 항원이 수용체 성분의 항원 결합 도메인에 결합할 경우, 신호전달 성분을 통한 신호전달이 일어난다.

[0062]

제1 결합 도메인 또는 제2 결합 도메인은 또한 상호관계의 결합 도메인 이외에도 추가의 작용제에 결합할 수 있다. 추가의 작용제는, 예를 들어, 소분자일 수 있다. 작용제와 제1 또는 제2 결합 도메인 간의 결합은 제1 결합 도메인과 제2 결합 도메인 간의 결합보다 더 큰 친화력을 갖는다. 따라서, 작용제가 존재할 경우, 이것은 제1 또는 제2 결합 도메인에 우선적으로 결합하고, 수용체 성분과 신호전달 성분 간의 헤테로다이머화를 억제/파괴한다. 항원이 추가의 작용제 존재 하에 수용체 성분의 항원 결합 도메인에 결합할 경우, 신호전달 성분을 통한 신호전달은 일어나지 않는다.

[0063]

구체적으로, 작용제 존재 하에, 수용체 성분과 신호전달 성분은 확률적으로 분산되게 위치하며, 수용체 성분의 항원 결합 도메인에 의한 항원의 결합은 신호전달 성분을 통한 신호전달을 유도하지 않는다.

[0064]

본원에서, 수용체와 신호전달 성분의 '공국재화' 또는 '헤테로다이머화'는 수용체 성분의 제1 결합 도메인과 신호전달 성분의 제2 결합 도메인의 결합을 통한, 신호전달 성분의 수용체 성분으로의 결합/동원과 유사하다.

[0065]

작용제 존재 하에서의 수용체 성분에 의한 항원 결합은 신호전달 성분을 통한 '비생산적' 신호전달을 유도하는 것이라고 말할 수 있다. 이러한 신호전달은 세포 활성화, 예를 들어 T 세포 활성화를 유도하지 않는다. 작용제 부재 하에서의 수용체 성분에 의한 항원 결합은 신호전달 성분을 통한 '생산적' 신호전달을 유도하는 것이라고 말할 수 있다. 이러한 신호전달은 T 세포 활성화를 이끌어, 예를 들어 표적 세포 사멸 및 T 세포 활성화를 유발한다.

- [0066] 작용제 부재 하에서의 수용체 성분에 의한 항원 결합은, 신호전달 성분을 통한 신호 전달을, 작용제 존재 하에 항원이 수용체 성분에 결합되는 경우에 발생하는 신호전달보다 2배, 5배, 10배, 50배, 100배, 1,000배 또는 10,000배 더 높게 만들 수 있다.
- [0067] 신호전달 성분을 통한 신호전달은 당업계에서 공지된 다양한 방법에 의해 측정할 수 있다. 그러한 방법으로는 신호전달을 억제하는 것, 예를 들어 특이적 단백질 타이로신 키나제(PTK)의 수준, 포스포티로실노시톨 4,5-비스포스페이트(PIP_2)의 분해, 단백질 키나제 C(PKC)의 활성화 및 세포내 칼슘 이온 농도의 상승을 억제하는 것을 포함한다. 기능 관독, 예컨대 T 세포의 클론 증폭, 세포 표면 상에서의 활성화 마커의 상향 조절, 이펙터 세포로의 분화 및 세포독성 또는 사이토카인 분비의 유도도 이용될 수 있다. 예시로서, 본 발명의 실시예에서, 본 발명자들은, 다양한 농도의 작용제 존재 하에 수용체 성분에 항원이 결합할 때의, 본 발명에 따른 CAR 시스템의 수용체 성분 및 신호전달 성분을 발현하는 T 세포에 의해 생성된 인터루킨-2(IL-2)의 수준을 측정하였다.
- [0068] **제1 결합 도메인, 제2 결합 도메인 및 작용제**
- [0069] 본 발명의 CAR 시스템의 제1 결합 도메인, 제2 결합 도메인 및 작용제는, 작용제 부재 하에 수용체 성분과 신호전달 성분의 선택적 공국제화 및 다이머화를 가능하게 하는 분자/펩티드/도메인의 임의의 조합일 수 있다.
- [0070] 따라서, 제1 결합 도메인과 제2 결합 도메인은 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0071] 본 발명의 신호전달 시스템은 특정 다이머화 시스템의 배열에 의해 한정되지 않는다. 수용체 성분은, 신호전달 성분이, 작용제 부재 하에 수용체 성분과 신호전달 성분이 공국제화될 수 있게 하는 상응하는 상보적 결합 도메인을 포함하는 한, 주어진 다이머화 시스템의 제1 결합 도메인 또는 제2 결합 도메인을 포함할 수 있다.
- [0072] 제1 결합 도메인 및 제2 결합 도메인은 펩티드 도메인 및 펩티드 결합 도메인일 수 있고, 그 반대일 수도 있다. 펩티드 도메인 및 펩티드 결합 도메인은 특이적 결합이 가능한 펩티드/도메인의 임의의 조합일 수 있다.
- [0073] 작용제는 제1 결합 도메인과 제2 결합 도메인 사이의 결합보다 더 큰 친화력으로 제1 결합 도메인 또는 제2 결합 도메인에 특이적으로 결합할 수 있는 분자, 예를 들어 소분자이다.
- [0074] 예를 들어, 결합 시스템은 펩티드:펩티드 결합 도메인 시스템을 기초로 할 수 있다. 제1 또는 제2 결합 도메인은 펩티드 결합 도메인을 포함할 수 있고, 다른 결합 도메인은 펩티드보다 더 낮은 친화력으로 펩티드 결합 도메인에 결합하는 펩티드 모방체를 포함할 수 있다. 작용제로서의 펩티드의 사용은 경쟁적 결합을 통해 펩티드 결합 도메인에 대한 펩티드 모방체의 결합을 파괴한다. 펩티드 모방체는 "야생형" 펩티드와 유사한 아미노산 서열을 가질 수 있지만, 펩티드 결합 도메인에 대한 결합 친화력을 감소시키기 위해 하나 이상의 아미노산 변경을 가질 수 있다.
- [0075] 예를 들어, 작용제는, 제1 결합 도메인과 제2 결합 도메인 간의 친화력보다 적어도 10배, 20배, 50배, 100배, 1,000배 또는 10,000배 더 높은 친화력으로 제1 결합 도메인 또는 제2 결합 도메인에 결합할 수 있다.
- [0076] 작용제는 제1 결합 도메인과 제2 결합 도메인 간의 친화력보다 더 높은 친화력으로 제1 결합 도메인 또는 제2 결합 도메인에 우선적으로 결합하는 임의의 약학적으로 허용되는 분자일 수 있다.
- [0077] 작용제는 표적 세포의 세포질로 전달되어 세포내 결합에 이용될 수 있다.
- [0078] 작용제는 혈뇌 장벽을 관통할 수 있다.
- [0079] 펩티드의 공국제화를 제어하기 위한 소분자 시스템, 예를 들어 Tet 리프레서(TetR), TetR 상호작용 단백질(TiP), 테트라사이클린 시스템(Klotzsche *et al.*; J. Biol. Chem. 280, 24591-24599(2005); Luckner *et al.*; J. Mol. Biol. 368, 780-790(2007))은 당업계에 공지되어 있다.
- [0080] **Tet 리프레서(TetR) 시스템**
- [0081] Tet 오페론은 포유동물 세포에 사용하기 위해 적합화된 잘 알려진 생물학적 오페론이다. TetR은 테트라사이클린에 호모다이머로서 결합하여 입체구조적 변화를 겪은 후, TetR 분자의 DNA 결합을 조절한다. Klotzsche 등(상기와 동일)은 TetR을 활성화하는 파지 디스플레이 유래의 펩티드를 개시하였다. 이 단백질(TetR 상호작용 단백질/TiP)은, 테트라사이클린 결합 부위와 중복되지만 동일하지는 않은 TetR 내 결합 부위를 갖는다(Luckner *et al.*; 상기와 동일). 따라서, TiP와 테트라사이클린은 TetR의 결합에 대해 경쟁한다.
- [0082] 본 발명의 CAR 시스템에서, 신호전달 성분의 제2 결합 도메인이 상응하는 상보적 결합 파트너라는 조건 하에, 수용체 성분의 제1 결합 도메인은 TetR 또는 TiP일 수 있다. 예를 들어, 수용체 성분의 제1 결합 도메인이 TetR

일 경우, 신호전달 성분의 제2 결합 도메인은 TiP이다. 수용체 성분의 제1 결합 도메인이 TiP일 경우, 신호전달 성분의 제2 결합 도메인은 TetR이다.

[0083] 예를 들어, 제1 결합 도메인 또는 제2 결합 도메인은 하기 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2로서 제시된 서열을 포함할 수 있다:

서열 번호: 1 – TetR

MSRLDKSKVINSALELLNEVGIEGLTTRKLAQKLGVEQPTLYWHVKNKRALLDALAIEMLD RHHTHFC
PLEGESWQDFLRNNAKSFRCALLSHRDGAKVHLGTRPTEKQYETLENQLAFLCQQGFSL ENALYALSA
VGH

[0084]

서열 번호: 2 – TiP

MWTWNAYAFAPSGGGS

[0085]

[0086] TetR은 기능을 하기 위해서는 호모다имер화되어야 한다. 따라서, 수용체 성분 상의 제1 결합 도메인이 TetR일 경우, 수용체 성분은 막관통 도메인과 제1 결합 도메인(TetR) 사이에 링커를 포함할 수 있다. 이 링커는 TetR이 이웃한 수용체 성분의 TetR과 호모다имер화하여 정확한 방향으로 배향되도록 할 수 있다.

[0087] 링커는 하기 서열 번호: 3으로서 제시된 서열일 수 있다.

서열 번호: 3 – 변형된 CD4 엔도도메인

ALIVLGGVAGLLLFILGLGIFFCVRCRHRRRQAERMAQIKRVVSEKKT AQAPHRFQKTCSPI

[0088]

[0089] 링커는, 대안적으로, 서열 번호: 3으로서 제시된 서열과 유사한 길이 및/또는 도메인 간격 특성을 갖는 대안적인 링커 서열을 포함할 수 있다.

[0090] 링커는, TetR이 이웃한 수용체 성분의 TetR과 호모다имер화하여 정확한 방향으로 배향되도록 할 수 있다면, 서열 번호: 3에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가질 수 있다.

[0091] TetR/TiP 시스템의 한 가지 잠재적 단점은, TetR이 이종(xenogenic)이고 면역원성이라는 것이다. 따라서, TetR 서열은 면역원성이 덜한 변이체일 수 있지만, TiP에 특이적으로 결합하는 능력을 유지한다.

[0092] 제1 및 제2 결합 도메인이 TetR 또는 TiP 또는 이의 변이체일 경우, 작용제는 테트라사이클린, 독시사이클린, 미노사이클린 또는 이들의 유사체일 수 있다.

[0093] 유사체는 TetR에 특이적으로 결합하는 능력을 유지하는 테트라사이클린, 독시사이클린 또는 미노사이클린의 유사체를 말한다.

[0094] 본 발명의 CAR 시스템에 사용될 수 있는 결합 도메인과 작용제의 다른 조합은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, CAR 시스템은 스트렙타비딘/바이오틴에 기초한 결합 시스템을 이용할 수 있다.

[0095] **스트렙타비딘 결합 에피토프**

[0096] 제1 또는 제2 결합 도메인은 하나 이상의 스트렙타비딘 결합 에피토프(들)를 포함할 수 있다. 다른 결합 도메인은 바이오틴 모방체를 포함할 수 있다.

[0097] 스트렙타비딘은 박테리아 스트렙토미세스 아비디니(*Streptomyces avidinii*) 유래의 52.8 kDa 단백질이다. 스트렙타비딘 호모테트라머는, 해리 상수(Kd) 약 10^{-15} M로, 바이오틴(비타민 B7 또는 비타민 H)에 대해 매우 높은 친화력을 갖는다. 바이오틴 모방체는, 바이오틴 그 자체가 스트렙타비딘 도메인과 바이오틴 모방체 도메인 사이의 헤테로다имер화를 파괴 또는 방지하기 위한 작용제로서 사용될 수 있도록, 야생형 바이오틴보다 스트렙타비딘에 대한 친화력이 더 적다. 바이오틴 모방체는 스트렙타비딘에, 예를 들어 1 nM 내지 100 μ M의 Kd로 결합할 수 있다.

[0098] '바이오틴 모방체' 도메인은, 예를 들어, 스트렙타비딘에 특이적으로 결합하는 짧은 펩티드 서열(예를 들어, 6 내지 20개, 6 내지 18개, 8 내지 18개 또는 8 내지 15개 아미노산)을 포함할 수 있다.

[0099] 바이오틴 모방체는 하기 표 1에 제시된 서열을 포함할 수 있다.

표 1

표 1. 바이오틴 모방 펩티드

명칭	서열	친화력
긴 나노태그	DVEAWLDERVPLVET (서열 번호: 4)	3.6 nM
짧은 나노태그	DVEAWLGAR (서열 번호: 5)	17 nM
스트랩태그	WRHPQFGG (서열 번호: 6)	72 uM
스트랩태그 II	WSHPQFEK (서열 번호: 7)	
SBP-태그	MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREP (서열 번호: 8)	2.5 nM
cc 스트랩태그	CHPQGPPC (서열 번호: 9)	230 nM
플랭키드 cc 스트랩태그	AECHPQGPPCIEGRK (서열 번호: 10)	

[0100]

[0101]

[0102]

[0103]

[0104]

[0105]

[0106]

[0107]

[0108]

[0109]

[0110]

바이오틴 모방체는 하기 군: 스트랩태그II, 플랭키드cc스트랩태그 및 cc스트랩태그로부터 선택할 수 있다.

스트랩타비딘 도메인은 서열 번호: 11로서 제시된 서열, 또는 바이오틴에 결합하는 능력을 유지하는 이의 단편 또는 변이체를 갖는 스트랩타비딘을 포함할 수 있다.

전장 스트랩타비딘은 159개 아미노산을 갖는다. 159개 잔기의 전장 단백질의 N 말단 및 C 말단은 가공되어, 일반적으로 13 내지 139개 잔기로 이루어지는 더 짧은 '코어' 스트랩타비딘을 형성하며, N 말단 및 C 말단의 제거는 높은 바이오틴 결합 친화력에 필요하다.

"코어" 스트랩타비딘의 서열(잔기 13 내지 139)은 서열 번호: 11로서 나타내어진다.

서열 번호: 11

EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAVGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALG
WTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKV
KPSAAS

스트랩타비딘은 본래 호모테트라머로서 존재한다. 스트랩타비딘 모노머의 2차 구조는 8개의 역평행 β 가닥으로 이루어지고, 이들은 폴딩되어 역평행 베타 배럴 3차 구조를 형성한다. 바이오틴 결합 부위는 각각의 β 배럴의 한쪽 단부에 위치한다. 4개의 동일한 스트랩타비딘 모노머(즉, 4개의 동일한 β 배럴)가 회합하여 스트랩타비딘의 테트라머 4차 구조를 형성한다. 각각의 배럴 내의 바이오틴 결합 부위는, 이웃하는 서브유닛으로부터의 보존된 Trp120과 함께, 배럴의 내부로부터의 잔기로 이루어진다. 이러한 방식으로, 각각의 서브유닛이 이웃하는 서브유닛 상의 결합 부위에 기여하고, 이로써 테트라머는 또한 기능성 다이머의 다이머로 간주될 수 있다.

본 발명의 CAR 시스템의 스트랩타비딘 도메인은 실질적으로 스트랩타비딘 모노머, 다이머 또는 테트라머로 이루어질 수 있다.

스트랩타비딘 모노머, 다이머 또는 테트라머의 서열은 서열 번호: 11에 제시된 서열의 전부 또는 일부, 또는 바이오틴에 결합하는 능력을 유지하는 이들의 변이체를 포함할 수 있다.

변이체 스트랩타비딘 서열은 서열 번호: 11 또는 이들의 기능성 부분에 적어도 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99%의 동일성을 가질 수 있다. 변이체 스트랩타비딘은 바이오틴 결합에 관여하는 하기 아미노산 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 잔기 Asn23, Tyr43, Ser27, Ser45, Asn49, Ser88, Thr90 및 Asp128. 변이체 스트랩타비딘은, 예를 들어, 이들 잔기 중 8개 모두를 포함할 수 있다. 변이체 스트랩타비딘이 결합 도메인 내에 다이머 또는 테트라머로서 존재할 경우, 이것은 또한 이웃하는 서브유닛에 의한 바이오틴 결합에 관여하는 Trp120을 포함할 수 있다.

의약 용도를 위해 오래전부터 단백질-단백질 상호작용을 파괴하는 소분자 작용제가 개발되었다(Vassilev 등의 문헌[Small-Molecule Inhibitors of Protein-Protein Interactions ISBN: 978-3-642-17082-9]에 의해 재검토됨). 기재된 CAR 시스템은 그러한 소분자를 이용할 수 있다. 상호작용이 파괴된 단백질 또는 펩티드(또는 이들 단백질의 관련 단편)가 제1 및/또는 제2 결합 도메인으로서 사용될 수 있고, 소분자가 CAR 활성화를 억제하는 작용제로서 사용될 수 있다. 이러한 시스템은, 시스템은 기재된 바와 같이 기능을 하되, 소분자는 원치않는 약리학적 활성을 갖지 않도록 소분자 및 단백질을 변경함으로써 변화시킬 수 있다(예를 들어, Rivera 등의 문헌

[Nature Med; 1996; 2; 1028-1032]에 기재된 것과 유사한 방식으로).

[0111] 소분자와 같은 작용제를 이용하여 상호작용을 파괴할 수 있는 단백질/펩티드의 리스트가 하기 표 2에 제시된다. 이러한 파괴 가능한 단백질-단백질 상호작용(PPI)이 본 발명의 CAR 시스템에 이용될 수 있다. 이러한 PPI에 대한 추가적인 정보는 White 등의 2008년 문헌[Expert Rev. Mol. Med. 10:e8]으로부터 입수할 수 있다.

표 2

표 2

상호작용 단백질 1	상호작용 단백질 2	PPI의 억제제
p53	MDM2	뉴틀린
항아포토시스성 Bcl2 구성원	아포토시스성 Bcl2 구성원	GX015 및 ABT-737
카스파제-3, -7 또는 -9	아포토시스 단백질의 X 연관 억제제 (XIAP)	DIABLO 및 DIABLO 모방체
RAS	RAF	퓨라노-인덴 유도체
FR2-7	DVL의 PD2 도메인	FJ9
T 세포 인자 (TCF)	사이클릭 AMP 반응 요소 결합 단백질 (CBP)	ICG-001

[0112]

[0113] 당업계에 잘 알려져 있는 기술과 방법을 이용하여, 상기에 기재한 작용제와 동일한 제1 결합 도메인에 경쟁적으로 결합하고 따라서 작용제 부재 하에 본 발명의 신호전달 시스템의 수용체 성분과 신호전달 성분을 공국재화하는 데 이용될 수 있는 제2 결합 도메인을 확인할 수 있다. 예를 들어, 그러한 제2 결합 도메인은 단일 도메인 VHH 라이브러리의 디스플레이에 의해 확인할 수 있다.

[0114] 본 발명의 신호전달 시스템의 제1 결합 도메인 및/또는 제2 결합 도메인은, 상호관계의 결합 도메인에 특이적으로 결합함으로써 수용체 성분과 신호전달 성분의 공국재화를 촉진하는 변이체(들)를 포함할 수 있다.

[0115] 변이체 서열은, 그 서열이 효과적인 다이머화 시스템을 제공한다는 조건 하에, 야생형 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가질 수 있다. 즉, 서열이 작용제 부재 하에 수용체 성분과 신호전달 성분의 충분한 공국재화를 촉진한다면, 항원에 항원 결합 도메인이 결합할 때 생산적인 신호전달이 일어난다.

[0116] 본 발명은 또한, 작용제를 투여하는 단계를 포함하는, 본 발명의 제1 측면의 CAR 시스템을 억제하는 방법에 관한 것이다. 상기에 기재한 바와 같이, 작용제의 투여는, 항원 결합 도메인에 항원이 결합할 때에도 신호전달 성분을 통한 신호전달이 억제되도록 수용체 성분과 신호전달 성분 사이의 공국재화의 파괴를 유도한다.

[0117] 제1 및 제2 결합 도메인은 CAR 시스템을 통한 신호전달을 촉진할 수 있고, 이것은 존재하는 작용제의 농도에 비례한다. 따라서, 작용제는 제1 결합 도메인과 제2 결합 도메인 사이의 결합 친화력보다 높은 친화력으로 제1 결합 도메인 또는 제2 결합 도메인에 결합하지만, 수용체 성분과 신호전달 성분의 공국재화는 저농도의 작용제 존재 하에 완전히 제거되지 않을 수 있다. 예를 들어, 저농도의 작용제는 항원에 반응한 신호전달을, 완전히 억제하지는 않으면서, 그 전체 수준을 감소시킬 수 있다. 작용제의 구체적인 농도는 요구되는 신호전달 수준과 구체적인 결합 도메인 및 작용제에 따라 달라질 것이다. 신호전달 수준과 작용제의 농도와의 상관관계는 상기에 기재한 바와 같이 당업계에 공지된 방법을 이용하여 측정할 수 있다.

[0118] 수용체 성분

[0119] 본 발명은 항원 결합 도메인, 선택적인 스페이서 도메인, 막관통 도메인 및 제1 결합 도메인을 포함하는 수용체 성분을 제공한다. 세포에서 발현될 경우, 수용체 성분은 세포막에 국재화한다. 이 때, 분자의 항원 결합 도메인은 막의 세포외 측에 배향되고, 제1 결합 도메인은 막의 세포내 측에 국재화된다.

[0120] 따라서, 수용체 성분은 본 발명의 CAR 시스템의 항원 결합 기능을 제공한다.

[0121] 항원 결합 도메인

[0122] 항원 결합 도메인은, 전형적 CAR의, 항원을 인식하는 부분이다. 본 발명의 신호전달 시스템에서, 항원 결합 도메인은 수용체 성분 내에 위치한다.

[0123] 항체의 항원 결합 부위에 기초한 것, 항체 모방체, 및 T 세포 수용체를 비롯하여, 다수의 항원 결합 도메인이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 항원 결합 도메인은 단클론 항체 유래의 단일쇄 가변 단편(scFv); 표적 항원의 천연 리간드; 표적에 대해 충분한 친화력을 갖는 펩티드; 카멜리드(camelid)와 같은 단일 도메인 바인더; 다핀(Darpin)과 같은 인공 바인더 싱글; 또는 T 세포 수용체 유래의 단일쇄를 포함할 수 있다.

[0124] 하기 표 1에 나타난 바와 같이, 다양한 종양 관련 항원(TAA)이 공지되어 있다. 본 발명에서 사용되는 항원 결합 도메인은 본원에 나타난 바와 같이 TAA에 결합할 수 있는 도메인일 수 있다.

표 1

암 종류	TAA
미만성 거대 B 세포 림프종	CD19, CD20
유방암	ErbB2, MUC1
AML	CD13, CD33
신경아세포종	GD2, NCAM, ALK, GD2
B-CLL	CD19, CD52, CD160
대장암	플레이트 결합 단백질, CA-125
만성 림프성 백혈병	CD5, CD19
신경교종	EGFR, 비멘틴
다발성 골수종	BCMA, CD138
신세포 암종	카보닉 안하이드라제 IX, G250
전립선암	PSMA
장암	A33

[0125]

[0126] 막관통 도메인

[0127] 막관통 도메인은, 전형적 CAR의 막에 걸쳐져 있는 서열이다. 본 발명의 신호전달 시스템에서, 막관통 도메인은 수용체 성분 내에 위치한다. 이것은 소수성 알파 헬릭스를 포함할 수 있다. 막관통 도메인은 CD28로부터 유도될 수 있으며, 이는 우수한 수용체 안정성을 제공한다.

[0128] 신호 펩티드

[0129] 본 발명의 CAR 시스템의 수용체 성분은, 수용체 성분이 T 세포와 같은 세포에서 발현될 경우, 초기 단백질이 소포체로 보내지고 그 후 세포 표면으로 보내지며, 그 곳에서 발현되도록, 신호 서열을 포함할 수 있다.

[0130] 신호 펩티드의 코어는, 단일 알파 헬릭스를 형성하는 경향을 갖는 소수성 아미노산의 긴 스트레치를 포함할 수 있다. 신호 펩티드는 전위(translocation) 시 폴리펩티드가 적절한 토폴로지를 갖도록 하는 데 도움이 되는, 양 전하를 띠는 짧은 아미노산 스트레치로 시작할 수 있다. 신호 펩티드 말단에, 일반적으로 신호 펩티다제에 의해 인식되어 절단되는 아미노산의 스트레치가 존재한다. 신호 펩티다제는 전위 중에 또는 전위가 완료된 후 절단되어, 유리 신호 펩티드 및 성숙 단백질을 생성할 수 있다. 그 후 유리 신호 펩티드는 특정 프로테아제에 의해 분해된다.

[0131] 신호 펩티드는 분자의 아미노 말단에 있을 수 있다.

[0132] 신호 펩티드는, 서열 번호: 12, 13 또는 14로서 제시된 서열, 또는 신호 펩티드가 여전히 CAR의 세포 표면 발현을 유도하도록 기능한다면, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개 아미노산 돌연변이(삽입, 치환 또는 부가)를 갖는 이들의 변이체를 포함할 수 있다.

[0133] 서열 번호: 12: MGTSLLCWMALCLLGADHADG

[0134] 서열 번호: 12의 신호 펩티드는 콤팩트하고 매우 효율적이다. 이것은 말단 글리신 뒤의 절단을 약 95% 제공하여, 신호 펩티다제에 의한 효율적인 제거가 이루어지도록 하는 것으로 예측된다.

- [0135] 서열 번호: 13: MSLPVTALLPLALLLHAARP
- [0136] 서열 번호: 13의 신호 펩티드는 IgG1로부터 유도된다.
- [0137] 서열 번호: 14: MAVPTQVLGLLLLWLTDARC
- [0138] 서열 번호: 14의 신호 펩티드는 CD8로부터 유도된다.
- [0139] **스페이서 도메인**
- [0140] 본원에 기재된 CAR 시스템은 수용체 성분의 항원 결합 도메인과 막관통 도메인을 연결하는 스페이서 서열을 포함할 수 있다. 가요성 스페이서는, 항원 결합 도메인이 결합을 용이하게 하는 다양한 방향으로 배향되도록 한다.
- [0141] 스페이서 서열은, 예를 들어, IgG1 Fc 영역, IgG1 힌지 또는 인간 CD8 스톱 또는 마우스 CD8 스톱을 포함할 수 있다. 스페이서는 대안적으로, IgG1 Fc 영역, IgG1 힌지 또는 CD8 스톱과 유사한 길이 및/또는 도메인 간격 특성을 갖는 대안적인 링커 서열을 포함할 수 있다. 인간 IgG1 스페이서는 Fc 결합 모티프가 제거되도록 변경될 수 있다.
- [0142] 이러한 스페이서에 대한 아미노산 서열의 예는 이하에 제시된다:
- 서열 번호: 15 (인간 IgG1의 힌지-CH2CH3)
 AEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
 DSDGSSFLYSLKTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKKD
- [0143]
- 서열 번호: 16 (인간 CD8 스톱):
 TTTAPRPPPTAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI
- [0144]
- 서열 번호: 17 (인간 IgG1 힌지):
 AEPKSPDKTHTCPPCPKDPK
- [0145]
- 서열 번호: 18 (CD2 엑토도메인)
 KEITNALETWGALGQDINLDIPSFQMSDDIDDIKWEKTSKDKKIAQFRKEKETFKEKDTYKLF
 KNGTLKIKHLKTDDQDIYKVSIDYTKGKNVLEKIFDLKIQERVSKPKISWTCINTTLTCEVMNG
 TDPELNLYQDGKHLKLSQRVITHKWTTSLSAKFCKTAGNKVSKESSVEPVSCPEKGLD
- [0146]
- 서열 번호: 19 (CD34 엑토도메인)
 SLDNNGTATPELPTQGTFSNVSTNVSYQETTTTPSTLGSTSLHPVSQHGNEATTNITETTVKF
 TSTSVITSVYGNTNSSVQSQTSTVISTVFTTPANVSTPETTLKPSLSPGNVSDLTSTSTSLATS
 PTKPYTSSSPILSDIAEKCSGIREVKLTQGICLQNKTSSEAFKKDRGEGELARVLCGEEQ
 ADADAGAQVCSLLLAQSEVRPQCLLLVLNARTEISSKLQLMKKHQSDLKKLGILDFTEQDVA
 SHQSYSQKT
- [0147]
- [0148] **복수의 제1 결합 도메인을 포함하는 수용체 성분**
- [0149] 수용체 성분은 복수의 제1 결합 도메인을 포함할 수 있으며, 따라서 하나보다 많은 신호전달 성분을 동원할 수 있다.
- [0150] 복수의 제1 결합 도메인은 수용체 성분의 단일 세포내 도메인 내에 존재할 수 있다.
- [0151] 수용체 성분은, 각각의 제1 결합 도메인이 세포막의 세포내 측에 배향되도록 적절한 수의 막관통 도메인을 포함할 수 있다. 예를 들어, 수용체 성분은 3개, 5개, 7개, 9개, 11개, 또는 그보다 많은 막관통 도메인을 포함할 수 있다. 이렇게 하여, 단일 수용체 성분은 항원에 반응하여 다중 신호전달 성분을 동원하여 신호전달을 증폭시킬 수 있다.
- [0152] 제1 결합 도메인은 각각, 신호전달 성분의 제2 결합 도메인에 대해 상이한 친화력을 갖는 변이체일 수 있다.
- [0153] **다중 수용체 성분**

[0154] 본 발명의 또 다른 실시형태에서, CAR 시스템은 2개 이상의 수용체 성분을 포함할 수 있으며, 각각의 성분은 상이한 항원을 인식하지만, 동일한 세포내 제1 결합 도메인으로 이루어진다. 이러한 CAR 시스템은 다중 항원을 인식할 수 있을 것이다(도 11). 이것은, 예를 들어 종양 탈출을 방지하는 데 유용할 수 있다. 본 발명의 추가적인 관련된 측면에서, 수용체 성분의 제1 결합 도메인은 신호전달 성분의 제2 결합 도메인에 대한 친화력을 결정하는 잔기에 있어서 차이가 있다. 이렇게 하여, CAR 시스템은, 한 항원에 반응하는 신호전달이 다른 항원에 대한 반응보다 더 크거나 더 작도록 조정될 수 있다(도 11). 이것은 예를 들어 2개의 종양 항원을 동시에 표적화하지만, 하나가 다른 하나보다 더 높은 밀도로 발현될 경우 유용할 수 있다. 이러한 항원에 대한 반응은 과자극에 의해 유발되는 독성을 피하기 위해 하향 조정될 수 있다.

[0155] 2개의 도메인 간의 결합 친화력이 변경되도록 제1 또는 제2 결합 도메인의 아미노산 잔기를 변경하는 데 적합한 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 표적화 돌연변이유발과 무작위 돌연변이유발을 둘 다 이용하는 아미노산의 치환, 부가 및 제를 포함한다. 제1 결합 도메인과 제2 결합 도메인 사이의 결합 친화력을 측정하는 방법 또한 당업계에 잘 알려져 있고, 단백질-단백질 상호작용의 바이오인포매틱스 예측, 친화성 전기영동, 표면 플라즈마 공명, 바이오층 간섭측정, 이중 편파 간섭측정, 정적 광산란 및 동적 광산란을 포함한다.

[0156] 신호전달 성분

[0157] 본 발명은 또한 신호전달 도메인 및 제2 결합 도메인을 포함하는 신호전달 성분을 제공한다. 신호전달 성분은 가용성 분자이고, 따라서, 세포, 예를 들어 T 세포에서 발현될 경우 세포질에 국재화된다.

[0158] 신호전달 성분의 신호전달 도메인은, 이것이 본 발명에 의해 제공되는 수용체 성분과 함께 공국재화되지 않는다면, 이를 통한 신호전달은 발생하지 않는다. 이러한 공국재화는 상기에 기재한 바와 같이 작용제 부재 하에서만 발생한다.

[0159] 세포내 신호전달 도메인

[0160] 세포내 신호전달 도메인은 전형적 CAR의 신호 전달 부분이다. 본 발명의 신호전달 시스템에서, 세포내 신호전달 도메인(신호전달 도메인)은 신호전달 성분 내에 위치한다. 작용제 부재 하에, 막에 결합된 수용체 성분과 세포내 신호전달 성분은 서로 가까워진다. 항원 인식 후, 수용체 클러스터, 네이티브 CD45 및 CD148은 시냅스로부터 축출되고 신호가 세포로 전달된다.

[0161] 따라서, 신호전달 성분의 신호전달 도메인은 전형적 CAR 분자의 엔도도메인과 유사하다.

[0162] 가장 흔히 사용되는 신호전달 도메인 성분은 3개의 ITAM을 포함하는 CD3-제타 엔도도메인의 것이다. 이것은, 항원이 결합된 후, 활성화 신호를 T 세포에 전달한다. CD3-제타는 완벽하게 적절한 활성화 신호를 제공하지는 못하며, 추가적인 공자극 신호전달이 필요할 수 있다. 예를 들어, 키메라 CD28 및 OX40이 증식/생존 신호를 전달하기 위해 CD3-제타와 함께 사용될 수 있거나, 또는 3개 모두 함께 사용될 수 있다(도 1(b)에 예시됨).

[0163] 본원에 기재된 신호전달 성분은 신호전달 도메인을 포함하고, 이것은 CD3-제타 엔도도메인 단독, CD3-제타 엔도도메인과 CD28 또는 OX40 중 어느 하나, 또는 CD28 엔도도메인 및 OX40 및 CD3-제타 엔도도메인을 포함할 수 있다(도 3(a)).

[0164] 본 발명에 따른 CAR 시스템의 신호전달 성분은 서열 번호: 20, 21 또는 22로서 제시된 서열, 또는 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 이들의 변이체를 포함할 수 있다.

서열 번호: 20 - CD3 Z 엔도도메인
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

서열 번호: 21 - CD28 및 CD3 제타 엔도도메인
SKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0166] - 18 -

서열 번호: 22 - CD28, OX40 및 CD3 제타 엔도도메인
 SKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRDQRLPPDAHKKPPGGGSFR
 TPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP
 EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD
 ALHMQALPPR

[0167]

[0168]

변이체 서열은, 그 서열이 효과적인 세포내 신호 전달 도메인을 제공한다면, 서열 번호: 20, 21 또는 22에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가질 수 있다.

[0169]

다중 신호전달 성분

[0170]

본 발명의 제1 측면에 따른 신호전달 시스템은 복수의 신호전달 성분을 포함할 수 있고, 신호전달 성분 각각은 신호전달 도메인 및 제2 결합 도메인을 포함하며, 각각의 제2 결합 도메인은 수용체 성분의 동일한 제1 결합 도메인에 의해 결합되나, 신호전달 도메인은 상이한 엔도도메인을 포함한다(도 9). 이렇게 하여, 상이한 다중 엔도도메인이 동시에 활성화될 수 있다. 이것은 화합물 신호전달 도메인에 비해 유익한데, 왜냐하면 각각의 신호 전달 도메인이 다른 신호전달 도메인에 얽매이지 않은 채로 존재하기 때문이다.

[0171]

각각의 신호전달 성분이 수용체 성분의 제1 결합 도메인에 대한 그들의 친화력을 변경하는 잔기에 있어서 서로 다른 제2 결합 도메인을 포함할 경우, 상이한 신호전달 도메인을 포함하는 신호전달 성분은 상이한 반응속도로 제1 결합 도메인에 결합한다(도 10). 서로 다른 신호전달 성분이 다양한 반응속도/동역학으로 수용체 성분에 동원되기 때문에, 이것은 수용체 성분에 의한 항원 결합에 반응하는 신호전달에 대해 더 큰 제어력을 가능하게 한다. 이것은, 최적의 T 세포 활성화 신호가, 화합물 엔도도메인에 의해 전달되는 고정된 동일한 비의 신호가 아니라, 다양한 비율의 상이한 면역 신호를 요구할 수 있기 때문에 유익하다.

[0172]

핵산

[0173]

본 발명은 제2 측면의 수용체 성분을 코딩하는 핵산 및 제3 측면의 신호전달 성분을 코딩하는 핵산을 추가로 제공한다.

[0174]

본원에서 사용될 때, 용어 "폴리뉴클레오티드", "뉴클레오티드", 및 "핵산"은 서로 동의어이다.

[0175]

당업자라면 다수의 상이한 폴리뉴클레오티드 및 핵산이 유전자 코드의 축퇴성으로 인해 동일한 폴리펩티드를 코딩할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 또한, 당업자라면, 통상적인 기술을 이용하여, 폴리펩티드를 발현시키고자 하는 임의의 특정 숙주 유기체의 코돈 사용빈도를 반영하기 위해 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 폴리펩티드 서열에 영향을 주지 않는 뉴클레오티드 치환을 만들 수 있다는 것이 이해되어야 한다.

[0176]

본 발명에 따른 핵산은 DNA 또는 RNA를 포함할 수 있다. 이들은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 이들은 또한, 그 안에 합성 또는 변형 뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 올리고뉴클레오티드에 대한 많은 다양한 유형의 변형이 당업계에 공지되어 있다. 그 예로는 메틸포스포네이트 및 포스포로티오에이트 백본, 분자의 3' 및/또는 5' 말단부의 아크리딘 또는 폴리리신체의 부가를 들 수 있다. 본원에 기재된 용도를 위해, 폴리뉴클레오티드를 당업계에서 이용할 수 있는 임의의 방법으로 변경시킬 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 그러한 변형은 관심있는 폴리뉴클레오티드의 생체내 활성 또는 수명을 증대시키기 위해 수행될 수 있다.

[0177]

뉴클레오티드 서열과 관련한 용어 "변이체", "동족체" 또는 "유도체"는 서열에 대한 하나(또는 그보다 많은) 핵산의 임의의 치환, 변경, 변형, 대체, 결실 또는 부가를 포함한다.

[0178]

본 발명의 핵산은 수용체 성분과 신호전달 성분을 둘 다 코딩하는 핵산일 수 있다.

[0179]

핵산은 절단 부위에 의해 연결된 수용체 성분과 신호전달 성분을 포함하는 폴리펩티드를 생성할 수 있다. 절단 부위는, 폴리펩티드가 생성될 때, 그것이, 임의의 외부 절단 활성을 필요로 하지 않고, 바로 수용체 성분과 신호전달 성분으로 절단되도록 자기 절단성일 수 있다.

[0180]

이하에 제시된 서열을 갖는, 구제역 바이러스(FMDV) 2a 자기 절단형 펩티드를 비롯한 다양한 자기 절단 부위가 공지되어 있다:

[0181]

서열 번호: 23
 RAEGRGSLTTCGDVEENPGP

- [0182] 또는
- 서열 번호: 24
QCTNYALLKLAGDVESNPGP
- [0184] 핵산은 하기 서열 번호: 25로서 제시된 서열을 포함하는 폴리펩티드를 생성할 수 있다.
- 서열 번호: 25
MWTWNAYAFAPSPGGGSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPGEGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRAEGRGSLTCGDVEENPGPMVPTQVLGLLLLLWLTARCDIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASEDIYFNLVWYQQKPGKAPKLLIYDTNRLADGVPSRFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYYCQHYKNYPLTFGQGTKEIKRSGGGSGGGGGGGGGGGGGSRSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYGMHWIRQAPGKGLEWVSSISLNGGSTYYRDSVKGRFTISRDNASTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAQDAYTGGYFDYWGQGTLTVTVSMDDPAEPKSPDKTHTCCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIAARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPEVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGKKDPM.....SGGGGMSRLDKSKVINSALELLNEVGIEGLTTRKLAQKLGVETPTLYWHVKNKRALLDALAIEMLDHRHHTFCFLEGESWQDFLRNNAKSFRCALLSHRDGAKVHLGTRPTEKQYETLENQLAFLCQQGFSLENALYALSAVGHFTLGCVLEDQEHQVAKEERETPTTDSMPPLLRQAIELFDHQGAEPALFGLLELIICGLEKQLKCESGS
- [0185]
- [0186] 여기서,는 항원 결합 도메인 서열이 포함될 수 있는 위치를 나타낸다. 본원에 기재된 바와 같은 임의의 항원 결합 도메인, 예를 들어 scFv가 포함될 수 있다.
- [0187] 공발현 서열은 내부 리보솜 유입 서열(IRES)일 수 있다. 공발현 서열은 내부 프로모터일 수 있다.
- [0188] 본 발명은 또한 제2 측면의 수용체 성분을 코딩하는 핵산 및/또는 제3 측면의 신호전달 성분을 코딩하는 핵산을 포함하는 키트를 제공한다.
- [0189] **벡터**
- [0190] 본 발명은 또한, 제2 측면의 수용체 성분 및/또는 제3 측면의 신호전달 성분을 코딩하는 하나 이상의 핵산 서열(들)을 포함하는 벡터 또는 벡터의 키트를 제공한다. 그러한 벡터는, 핵산 서열(들)이 본 발명의 제1 측면에 따른 CAR 성분의 수용체 성분 및 신호전달 성분을 발현하도록, 핵산 서열(들)을 숙주 세포로 도입하는 데 이용될 수 있다.
- [0191] 벡터는, 예를 들어, 플라스미드 또는 바이러스 벡터, 예컨대 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터, 또는 트랜스포존에 기초한 벡터 또는 합성 mRNA일 수 있다.
- [0192] 벡터는 T 세포 또는 NK 세포를 트랜스펙션 또는 트랜스덕션시킬 수 있다.
- [0193] **세포 용해성 면역 세포**
- [0194] 본 발명은 또한 본 발명의 제1 측면에 따른 CAR 시스템을 포함하는 면역 세포에 관한 것이다.
- [0195] 세포 용해성 면역 세포는 본 발명의 핵산 또는 벡터를 포함할 수 있다.
- [0196] 세포 용해성 면역 세포는 본 발명의 수용체 성분 및 신호전달 성분을 포함할 수 있다.
- [0197] 세포 용해성 면역 세포는 본 발명의 신호전달 성분을 하나 이상 포함할 수 있다. 예를 들어, 세포 용해성 면역 세포는 본 발명의 신호전달 성분을 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 내지 복수개 포함할 수 있다.
- [0198] 세포 용해성 면역 세포는 본 발명의 수용체 성분을 하나 이상 포함할 수 있다. 예를 들어, 세포 용해성 면역 세포는 본 발명의 수용체 성분을 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 내지 복수개 포함할 수 있다.
- [0199] 세포 용해성 면역 세포는 세포 매개 면역에서 중심적 역할을 하는 림프구의 한 유형인 T 림프구 또는 T 세포일 수 있다. 이들은, 세포 표면에서의 T 세포 수용체(TCR)의 존재에 의해, 다른 림프구, 예컨대 B 세포 및 자연 살해 세포(NK 세포)와는 구별될 수 있다. 이하에 요약하는 바와 같이 다양한 유형의 T 세포가 존재한다.
- [0200] 헬퍼 T 세포(TH 세포)는, B 세포의 형질 세포 및 기억 B 세포로의 성숙, 및 세포독성 T 세포 및 대식세포의 활성화를 비롯한 면역 프로세스에서 다른 백혈구를 돕는다. TH 세포는 그 표면 상에 CD4를 발현한다. TH 세포는, 이들이 항원 제시 세포(APC)의 표면 상에 MHC 클래스 II 분자에 의해 펩티드 항원과 함께 제시될 때 활성화된다. 이들 세포는, 다양한 사이토카인을 분비하여 다양한 유형의 면역 반응을 촉진하는 TH1, TH2, TH3, TH17, Th9, 또는 TFH를 비롯한 몇 가지 아형 중 하나로 분화될 수 있다.

- [0201] 세포 용해성 T 세포(TC 세포, 또는 CTL)는 바이러스 감염 세포 및 종양 세포를 파괴하며, 또한, 이식 거부 반응에 연루되어 있다. CTL은 그 표면에 CD8을 발현한다. 이들 세포는 모든 유핵 세포의 표면 상에 존재하는 MHC 클래스 I과 회합된 항원에 결합함으로써 그들의 표적을 인식한다. 조절 T 세포에 의해 분비되는 IL-10, 아데노신 및 기타 분자를 통해, CD8+ 세포는 불활성화되어 아네르기 상태로 될 수 있으며, 이는 실험적 자가면역성 뇌척수염과 같은 자가면역 질환을 예방한다.
- [0202] 기억 T 세포는 감염이 해소된 후 장기간 잔존되는 항원 특이적 T 세포의 아집단이다. 이들은 이들의 동족 항원에 노출되면 다수의 이펙터 T 세포로 빨리 증식하여, 과거 감염에 대한 "기억"을 갖는 면역계를 제공한다. 기억 T 세포는 3종의 아형: 중심 기억 T 세포(TCM 세포) 및 2종의 이펙터 기억 T 세포(TEM 세포 및 TEMRA 세포)를 포함한다. 기억 세포는 CD4+ 또는 CD8+일 수 있다. 기억 T 세포는 전형적으로 세포 표면 단백질 CD45RO를 발현한다.
- [0203] 이전에 서프레스 T 세포로서 알려진 조절 T 세포(Treg 세포)는, 면역 관용의 유지에 중요하다. 이들의 주요 역할은, T 세포 매개 면역을 중단시켜 면역 반응이 끝나는 방향으로 이끌고 흉선에서의 음성 선택 과정을 회피하는 자가 반응성 T 세포를 억제하는 것이다.
- [0204] CD4+ Treg 세포의 2종의 주요 부류, 즉 천연 Treg 세포 및 적응성(adaptive) Treg 세포가 개시되었다.
- [0205] 천연 Treg 세포(CD4+CD25+FoxP3+ Treg 세포로도 알려짐)는 흉선에서 발생하여 TSLP로 활성화된 골수양(CD11c+) 및 형질세포양(CD123+) 수지상 세포 둘 다와 발달하는 T 세포 사이의 상호작용과 연관되어 있다. 천연 Treg 세포는 FoxP3로 불리는 세포내 분자의 존재로 인해 다른 T 세포와 구별될 수 있다. FOXP3 유전자의 돌연변이는 조절 T 세포 발달을 방지하여, 치명적인 자가면역 질환 IPEX를 유발한다.
- [0206] 적응성 Treg 세포(Tr1 세포 또는 Th3 세포로도 알려짐)는 정상적인 면역 반응 중에 생길 수 있다.
- [0207] 자연 살해 세포(또는 NK 세포)는 선천성 면역계의 일부를 형성하는 세포 용해성 세포의 한 유형이다. NK 세포는 MHC 독립적 방식으로 바이러스 감염 세포로부터의 내재 신호에 대한 신속한 반응을 제공한다.
- [0208] NK 세포(선천성 림프계 세포 그룹에 속함)는 대형 과립 림프구(LGL)로서 정의되고, 공통의 림프계 프로제니터 생성 B 및 T 림프구로부터 분화되는 제3 유형의 세포를 구성한다. NK 세포는 골수, 림프절, 비장, 편도 및 흉선에서 분화하고 성숙하며, 그 후 그 곳에서 순환계로 들어가는 것으로 알려져 있다.
- [0209] 본 발명의 CAR 세포는 상기에 언급한 세포 유형 중 임의의 것일 수 있다.
- [0210] 본 발명의 제1 측면에 따른 CAR 시스템의 분자를 발현하는 T 또는 NK 세포는 환자 자신의 말초혈(제1 파티)로부터, 또는 도너 말초혈로부터의 조혈모세포 이식 환경(제2 파티)에서, 또는 관련이 없는 도너로부터의 말초혈(제3 파티)로부터 체외에서 생성할 수 있다.
- [0211] 대안적으로, 본 발명의 제1 측면에 따른 CAR 시스템의 분자를 발현하는 T 또는 NK 세포는 유도성 프로제니터 세포 또는 배아 프로제니터 세포의 T 세포로의 체외 분화로부터 유도될 수 있다. 대안적으로, 용해 기능을 유지하고 치료제로서 작용할 수 있는 불멸화 T 세포주가 사용될 수 있다.
- [0212] 이러한 모든 실시형태에서, CAR 세포는 바이러스 벡터를 이용한 트랜스덕션, DNA 또는 RNA를 이용한 트랜스펙션을 비롯한 다수의 수단 중 하나에 의해 수용체 성분 및 신호전달 성분을 코딩하는 DNA 또는 RNA를 도입함으로써 생성한다.
- [0213] 본 발명의 CAR 세포는, 대상체로부터 얻은 체외 T 또는 NK 세포일 수 있다. T 또는 NK 세포는 말초혈 단핵구(PBMC) 샘플로부터 유래된 것일 수 있다. T 또는 NK 세포는, 항-CD3 단클론 항체를 사용한 처리에 의해, 본 발명의 제1 측면에 따른 CAR 시스템을 제공하는 분자를 코딩하는 핵산으로 트랜스덕션하기 전에, 활성화 및/또는 증식시킬 수 있다.
- [0214] 본 발명의 T 또는 NK 세포는
- [0215] (i) 상기에 열거한 대상체 또는 다른 공급원으로부터 T 또는 NK 세포 함유 샘플을 분리하는 단계; 및
- [0216] (ii) 본 발명의 제2 및 제3 측면에 따른 CAR 시스템의 수용체 성분 및/또는 신호전달 성분을 코딩하는 하나 이상의 핵산 서열(들)로 T 또는 NK 세포를 트랜스덕션 또는 트랜스펙션하는 단계
- [0217] 에 의해 만들어질 수 있다.

- [0218] 그 후, T 또는 NK 세포를 정제할 수 있으며, 예를 들어, 항원 결합 폴리펩티드의 항원 결합 도메인의 발현에 기초하여 선별할 수 있다.
- [0219] 본 발명은 또한 본 발명의 제1 측면에 따른 CAR 시스템을 포함하는 T 또는 NK 세포를 포함하는 키트를 제공한다.
- [0220] **약학 조성물**
- [0221] 본 발명은 또한 본 발명의 제1 측면의 CAR 시스템을 발현하는 복수의 세포 용해성 면역 세포를 함유하는 약학 조성물에 관한 것이다. 약학 조성물은 추가로 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함할 수 있다. 약학 조성물은 경우에 따라 1종 이상의 약학적으로 활성인 폴리펩티드 및/또는 화합물을 포함할 수 있다. 그러한 제제는, 예를 들어, 정맥내 주입에 적합한 형태일 수 있다.
- [0222] **치료 방법**
- [0223] 본 발명은 본 발명의 세포 용해성 면역 세포(예를 들어, 상기에 기재한 약학 조성물)를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 질환의 치료 및/또는 예방 방법을 제공한다.
- [0224] 질환 치료 방법은 본 발명의 세포 용해성 면역 세포의 치료 용도에 관한 것이다. 여기서, 상기 세포를, 질환과 관련된 하나 이상의 증상을 완화하거나 저감하거나 개선하기 위해 및/또는 질환의 진행을 늦추거나 저감하거나 차단하기 위해, 기존 질환 또는 병태를 갖는 대상체에게 투여할 수 있다.
- [0225] 질환 예방 방법은 본 발명의 세포 용해성 면역 세포의 예방 용도에 관한 것이다. 여기서, 상기 세포를, 질환의 원인을 예방하거나 약화시키거나 질환과 관련된 하나 이상의 증상의 발달을 저감하거나 예방하기 위해, 질환에 아직 걸리지 않았고/않았거나 질환의 임의의 증상을 나타내지 않은 대상체에게 투여할 수 있다. 상기 대상체는 상기 질환에 대해 소인이 있거나 상기 질환의 발달 위험이 있는 것으로 생각되는 자일 수 있다.
- [0226] 상기 방법은
- [0227] (i) T 또는 NK 세포 함유 샘플을 분리하는 단계;
- [0228] (ii) 상기 세포를 본 발명에 의해 제공되는 핵산 서열 또는 벡터로 트랜스덕션 또는 트랜스펙션하는 단계;
- [0229] (iii) (ii)로부터 얻은 세포를 대상체에게 투여하는 단계
- [0230] 를 포함할 수 있다.
- [0231] T 또는 NK 세포 함유 샘플은, 예를 들어 상기에 기재한 바와 같이 대상체로부터 또는 다른 공급원으로부터 분리할 수 있다. T 또는 NK 세포는 대상체 자신의 말초혈(제1 파티)로부터, 또는 도너 말초혈로부터의 조혈모세포 이식 환경(제2 파티)에서, 또는 관련이 없는 도너로부터의 말초혈(제3 파티)로부터 분리할 수 있다.
- [0232] 본 발명에 의해 제공되는 방법은, 질환의 진행 및 임의의 독성 활성을 모니터링하는 단계, 및 CAR 신호전달을 억제함으로써 임의의 유해 독성 효과를 감소 또는 완화시키기 위해 본 발명의 제1 측면에 따른 CAR 시스템에 사용하기에 적합한 작용제를 투여하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0233] 본 발명에 의해 제공되는 방법은, 질환을 진행을 모니터링하는 단계, 임의의 독성 활성을 모니터링하는 단계, 및 허용 가능한 수준의 질환 진행 및 독성 활성을 제공하기 위해 피험체에게 투여되는 작용제의 용량을 조정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0234] 질환의 진행을 모니터링하는 것은, 질환과 관련된 증상이 저감/개선 또는 증가/악화하는지를 판단하기 위해 경시적으로 질환과 관련된 증상을 평가하는 것을 의미한다.
- [0235] 독성 활성은, 대상체에게 본 발명의 CAR 세포를 투여한 후 본 발명의 CAR에 의해 유발되는 부작용에 관한 것이다. 독성 활성은, 예를 들어, 면역학적 독성, 담즙 독성 및 호흡 곤란 증후군을 포함한다.
- [0236] 본 발명의 제1 측면의 신호전달 시스템을 통한 신호전달의 수준 및 그에 따른 신호전달 시스템을 발현하는 CAR 세포의 활성화 수준은, 존재하는 작용제의 양 또는 작용제가 존재하는 시간의 양을 변경함으로써 조절할 수 있다. 본 발명의 방법에서, CAR 세포 활성화 수준은 대상체에게 투여되는 작용제의 용량을 감소시키거나 투여 빈도를 줄임으로써 증강시킬 수 있다. 반대로, CAR 세포 활성화 수준은 작용제의 용량 또는 대상체에 대한 투여 빈도를 증가시킴으로써 감소시킬 수 있다.
- [0237] 더 높은 수준의 CAR 세포 활성화는 감소된 질환 진행, 그러나 증가된 독성 활성과 관련된 것일 수 있는 한편,

더 낮은 수준의 CAR 세포 활성화는 증가된 질환 진행, 그러나 감소된 독성 활성화와 관련된 것일 수 있다.

- [0238] 본 발명은 또한, 본 발명의 세포를 포함하는 대상체의 질환을 치료 및/또는 예방하는 방법으로서, 제1 측면에 따른 CAR 시스템에 사용하기에 적합한 작용제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 따라서, 상기 방법은 본 발명의 CAR 세포를 이미 포함하는 대상체에게 적절한 작용제를 투여하는 것을 포함한다.
- [0239] 따라서, 대상체에게 투여되는 작용제의 용량, 또는 투여 빈도는, 질환 진행 및/또는 독성 활성화 모두를 허용 가능한 수준으로 만들기 위해 변경될 수 있다. '허용 가능하다'고 판단되는 질환 진행 및 독성 활성화의 특정 수준은 특정 환경에 따라 달라질 것이고 그러한 기준에 의해 평가되어야 한다. 본 발명은 CAR 세포의 활성화 수준이 이러한 적절한 수준이 되도록 그 수준을 변경하는 방법을 제공한다.
- [0240] 작용제는 약학 조성물의 형태로 투여될 수 있다. 약학 조성물은 추가로 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함할 수 있다. 약학 조성물은 경우에 따라 1종 이상의 추가의 약학적으로 활성인 폴리펩티드 및/또는 화합물을 포함할 수 있다. 그러한 제제는, 예를 들어, 정맥내 주입에 적합한 형태일 수 있다.
- [0241] 본 발명은 질환의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 본 발명의 CAR 세포를 제공한다.
- [0242] 본 발명은 또한 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 의약의 제조에 있어서의 본 발명의 CAR 세포의 용도에 관한 것이다.
- [0243] 본 발명은 또한 질환의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 본 발명의 제1 측면에 따른 CAR 시스템을 억제하기에 적합한 작용제를 제공한다.
- [0244] 본 발명은 또한 CAR 세포에서 본 발명의 제1 측면에 따른 CAR 시스템을 억제하는 데 사용하기 위한 작용제를 제공한다.
- [0245] 본 발명은 또한 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 의약의 제조에 있어서의 본 발명의 제1 측면에 따른 CAR 시스템을 억제하는 데 적합한 작용제의 용도를 제공한다.
- [0246] 본 발명의 방법에 의해 치료 및/또는 예방하고자 하는 질환은 감염, 예컨대 바이러스 감염일 수 있다.
- [0247] 본 발명의 방법은 또한, 예를 들어, 자가면역 질환, 알레르기 및 이식편 대 숙주 질환에 있어서의 병원성 면역 반응의 제어를 위한 것일 수 있다.
- [0248] 상기 방법은 암 질환, 예컨대 방광암, 유방암, 결장암, 자궁내막암, 신장암(신세포암), 백혈병, 폐암, 흑색종, 비호지킨 림프종, 췌장암, 전립선암 및 갑상선암의 치료를 위한 것일 수 있다.
- [0249] 본 발명의 CAR 세포는 표적 세포, 예컨대 암 세포를 사멸시킬 수 있다. 표적 세포는 TAA의 발현, 예를 들어 상기 표 1에 제시된 TAA의 발현에 의해 인식될 수 있다.
- [0250] 본 발명의 CAR 세포 및 약학 조성물은 상기에 기재한 질환의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 것일 수 있다.
- [0251] 본 발명의 CAR 세포 및 약학 조성물은 상기에 기재한 방법 중 어느 것에 사용하기 위한 것일 수 있다.
- [0252] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 추가로 기술할 것이며, 이 실시예는 본 발명을 수행함에 있어서 당업자를 돕기 위한 것이고 본 발명의 범위를 어떠한 식으로든 한정하려는 것은 아니다.
- [0253] **실시예**
- [0254] 실시예 1 - TetCAR 신호전달 시스템의 기능성
- [0255] 바이시스트로닉 구성체를 단일 전사체로서 발현시켰으며, 이 전사체는, 2A 부위에서 자기 절단하여, 그의 엔도도메인으로서 TetR을 갖는 CAR 및 eGFP에 융합된 TiP를 생성한다(도 5(a)).
- [0256] 테트라사이클린 부재 하에 이러한 구성체를 발현하는 SupT1 세포의 형광 현미경 관찰은, eGFP 형광을 세포막에서 분명히 관찰할 수 있는 반면(도 5(b)); 테트라사이클린 존재 하에서는 eGFP가 세포질에 존재하였음(도 5(c))을 입증하였다. 이러한 데이터는, 테트라사이클린이 TetR CAR로부터 TiP를 이탈시켰음을 입증한다.
- [0257] 실시예 2 - TetCAR 시스템을 통한 신호전달
- [0258] 바이시스트로닉 구성체를 BW5 T 세포에서 단일 전사체로서 발현시켰으며, 이 전사체는, 2A 위치에서 자기 절단하여, CD3-제타의 엔도도메인에 가요성 링커를 통해 융합된 TiP를 포함하는 신호전달 성분과, CD33 인식 scFv,

IgG1의 Fc 도메인 유래의 스페이서, CD4 유래의 막관통 및 세포내 도메인; 및 TetR을 포함하는 수용체 성분을 생성한다(도 6(a)). 신호전달 성분에 TiP가 없는 것을 제외하고는 동일한 대조군도 발현시켰다(도 6(b)).

[0259] 테트라사이클린 부재 하에 또는 증가하는 농도의 테트라사이클린 존재 하에, BW5 T 세포를, 야생형 SupT1 세포, 또는 CD33을 발현하도록 조작된 SupT1 세포로 챌린징하였다. 야생형 SupT1 세포로 챌린징된 T 세포는 테트라사이클린 존재 또는 부재 하에 활성화하지 않았으며, CD33을 발현하는 SupT1 세포로 챌린징된 T 세포는 테트라사이클린 부재 하에 활성화되었으나, 활성화는 테트라사이클린 존재 하에 신속히 억제되었고, 100 nM의 테트라사이클린 존재 하에 완전히 억제되었다(도 7(a)).

[0260] TiP 도메인이 결여된 대조군 TetCAR도 BW5로 트랜스덕션하였다. 다시 한번, 이들 T 세포를, 테트라사이클린 부재 하에 또는 증가하는 농도의 테트라사이클린 존재 하에, 야생형 SupT1 세포, 또는 CD33을 발현하도록 조작된 SupT1 세포로 챌린징하였다. 신호전달 성분에 있어서의 TiP 요소의 결여는 어떠한 조건에서도 신호전달을 유도하지 않았다(도 7(b)).

[0261] 실시예 3 - 1차 T 세포에서의 TetCAR 시스템의 신호전달

[0262] SupT1 세포(CD19 음성)를, CD19 양성이 되도록 조작하여, 가능한 한 유사한 표적 음성 세포주와 표적 양성 세포주를 생성하였다. 3명의 도너로부터의 1차 인간 T 세포를 3종의 CAR 구성체: (i) "전형적" 1세대 항-CD19 CAR; (ii) 1세대 항-CD19 tetCAR; (iii) 엔도도메인으로부터 TiP가 생략된 대조군 항-CD19 tetCAR로 트랜스덕션하였다. 비트랜스덕션 T 세포와, 다양한 CAR 구성체로 트랜스덕션된 T 세포를 다양한 농도의 테트라사이클린 존재 하에 SupT1 세포 또는 SupT1.CD19 세포로 1:1로 챌린징하였다. 챌린징 48시간 후 상청액을 샘플링하였다. 백그라운드(T 세포 단독) 및 최대(PMA/이오노마이신으로 자극된 T 세포)로부터 얻은 상청액도 샘플이었다. 상청액 중의 인터페론-감마를 ELISA로 측정하였다(도 13). "전형적" CAR T 세포는 테트라사이클린에 관계 없이 SupT1.CD19에 의해 활성화되었다. TetCAR T 세포는 SupT1.CD19 세포에 의해 활성화되었으나, 활성화는 테트라사이클린에 의해 억제되었다. 대조군 TetCAR 및 NT T 세포는 SupT1.CD19 세포에 반응하지 않았다.

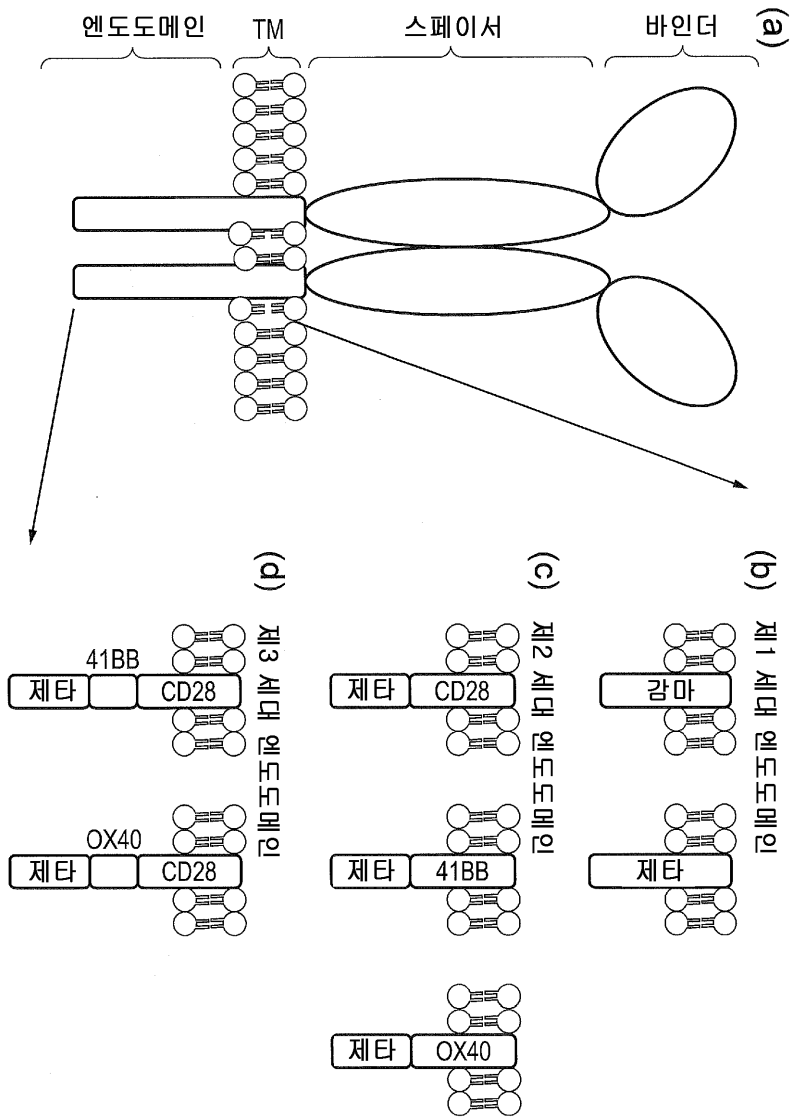
[0263] 실시예 4 - 표적 세포의 사멸

[0264] 실시예 3에 기재된 인터페론-감마 방출 연구에 이어, 크롬 방출 어세이를 이용하여 표적 세포의 사멸을 입증하였다. SupT1 및 SupT1.CD19 세포에 ⁵¹Cr을 로딩하고, 테트라사이클린 존재 또는 부재 하에 대조군 및 Tet-CAR T 세포와 함께 4시간 동안 인큐베이션하였다. 표적 세포의 용해를, 상청액 중의 ⁵¹Cr을 카운팅함으로써 측정하였다. 결과는 도 14에 도시되어 있다. Tet-CAR T 세포가 테트라사이클린 부재 하에서만 SupT1.CD19 표적 세포를 용해하였음이 확인되었다.

[0265] 상기 상세한 설명에서 언급된 모든 간행물은 본원에 참고문헌으로 포함된다. 본 발명의 범위 및 사상으로부터 벗어나지 않는 본 발명에 개시된 방법 및 시스템의 다양한 변형 및 변경이 당업자에게 명백할 것이다. 본 발명이 특정한 바람직한 실시형태와 관련하여 기술되었지만, 본 발명은 그러한 특정한 실시형태에 부당하게 한정되는 것이 아님이 이해되어야 한다. 실제로, 분자 생물학, 세포 면역학 또는 관련 분야의 당업자에게 명백한, 본 발명을 수행하기 위한 개시된 양태의 다양한 변형이 후술하는 청구범위에 속하는 것을 의도한다.

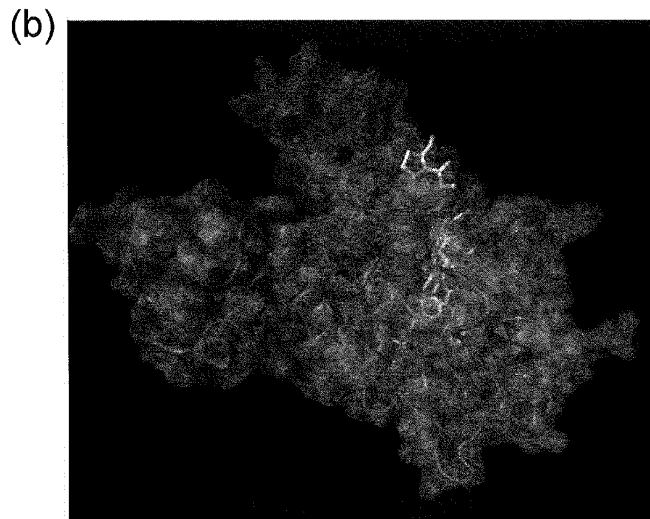
도면

도면1

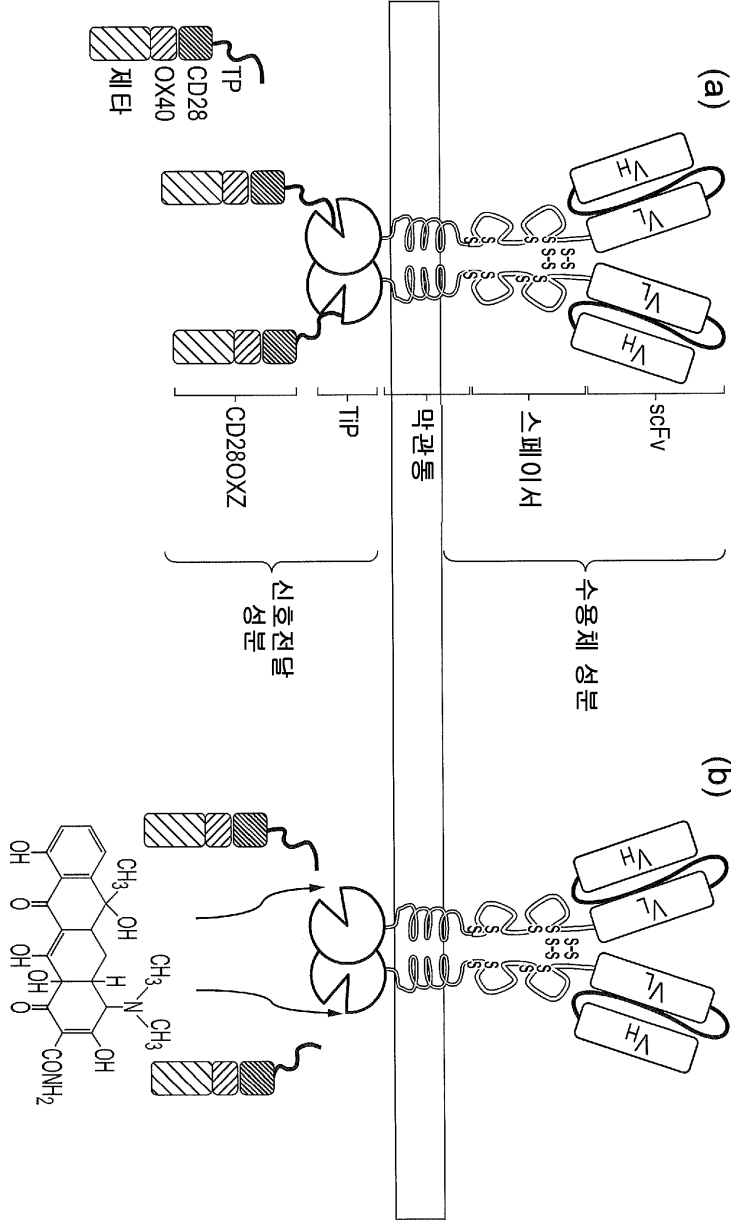


도면2

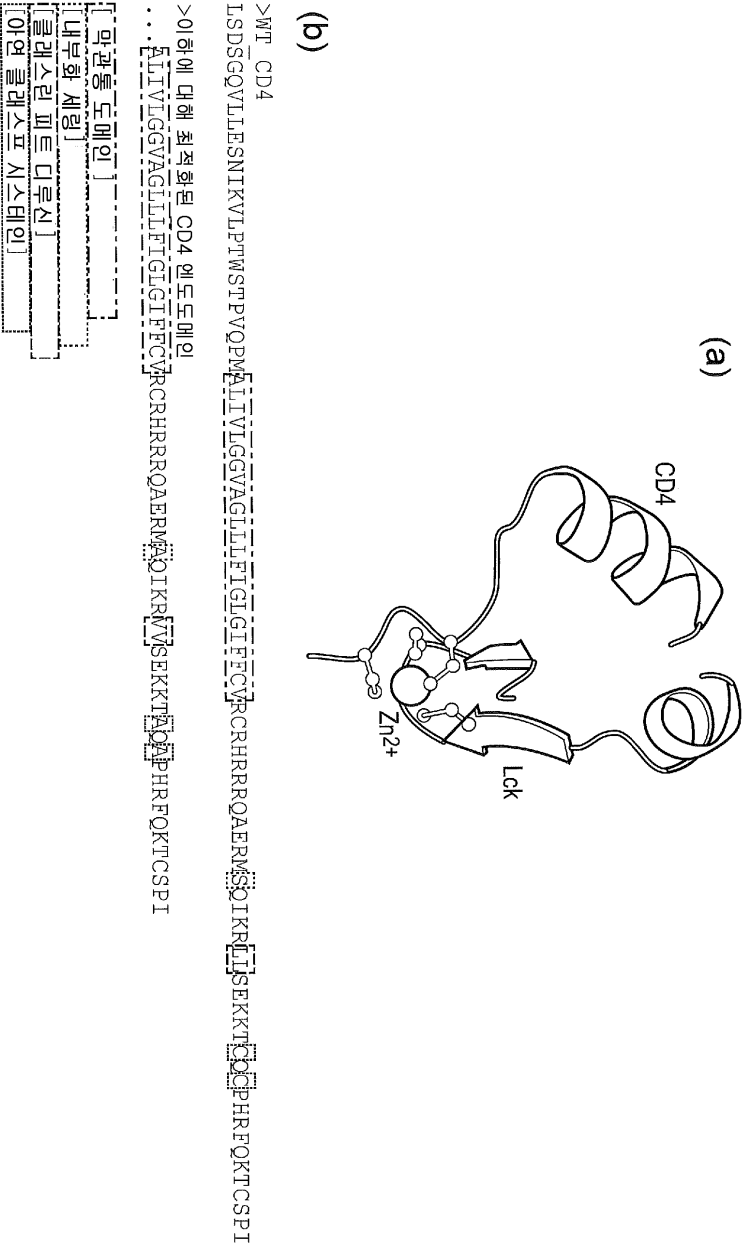
(a) WTNAYAFAPS-GGGS- 단백질



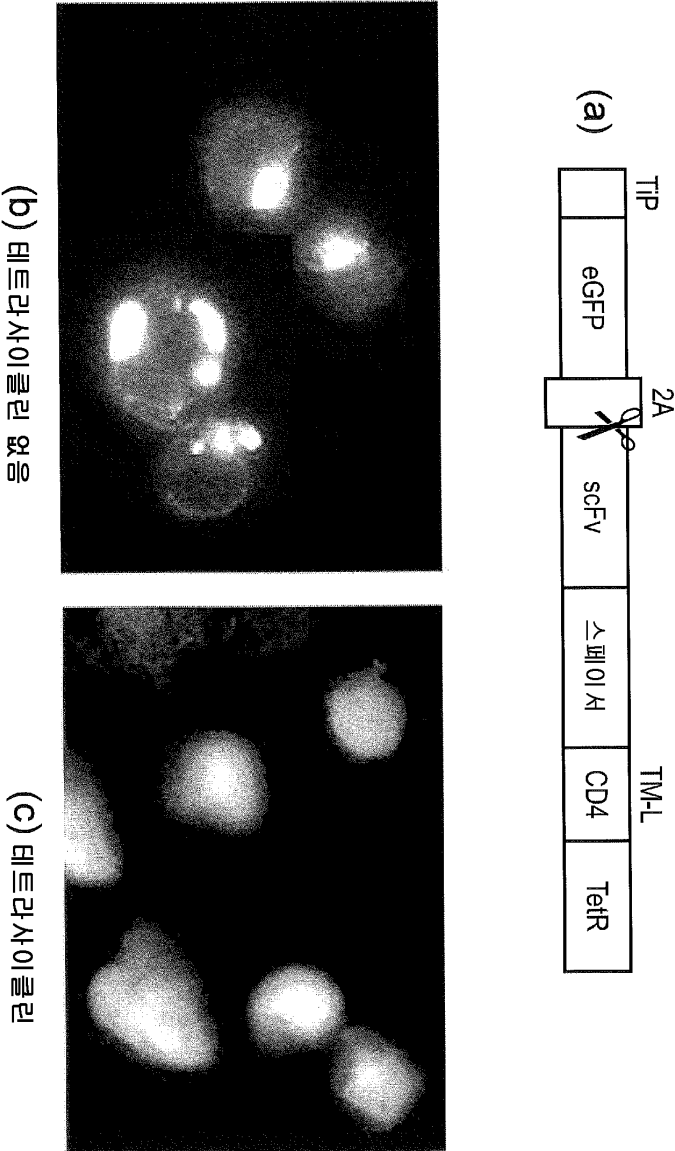
도면3

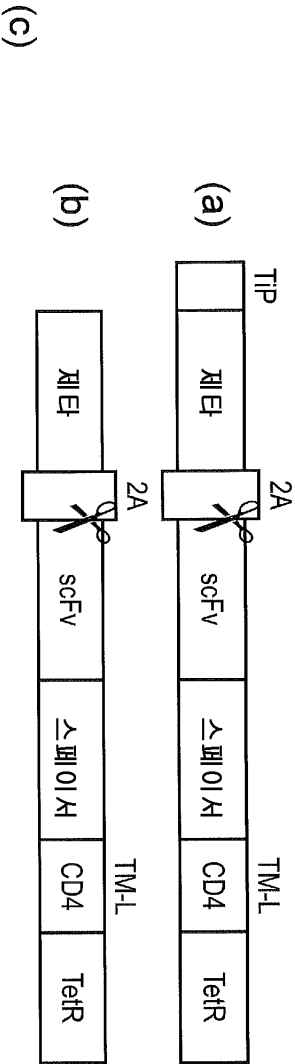


도면4



도면5



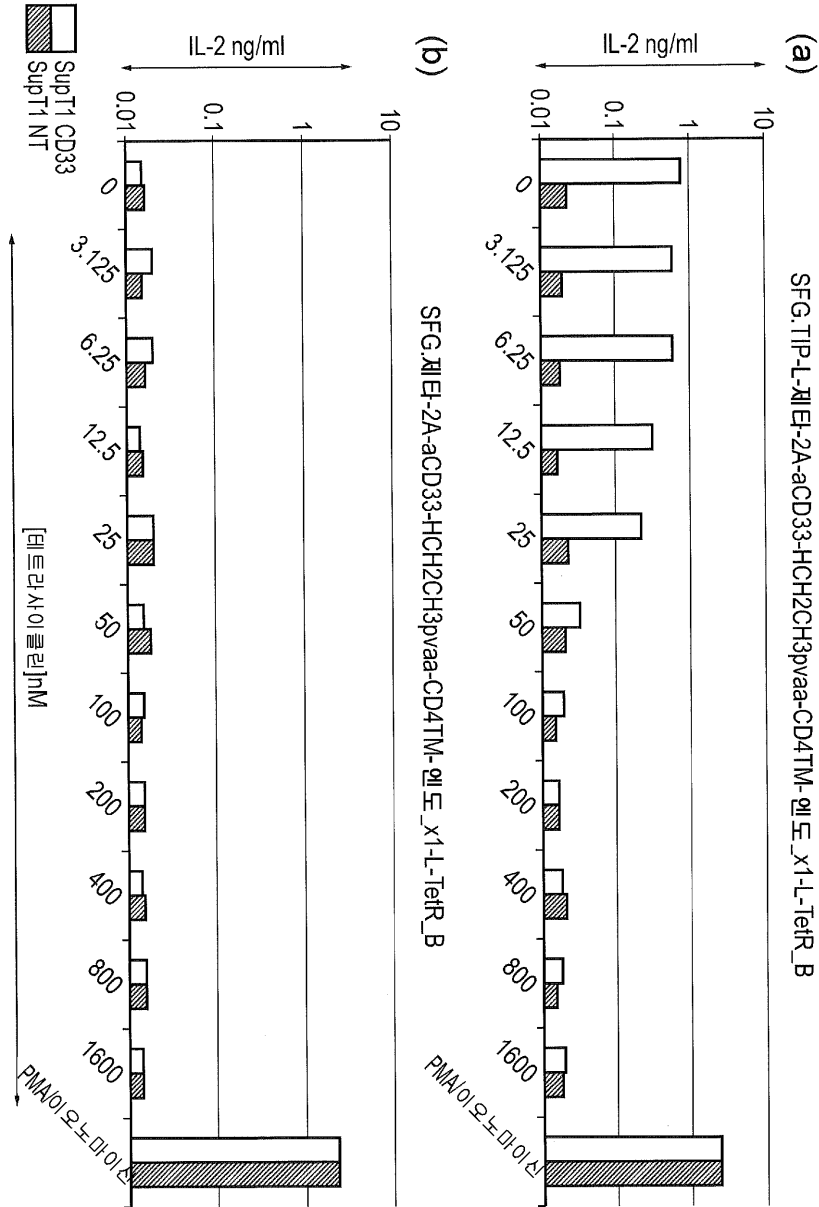


(c)

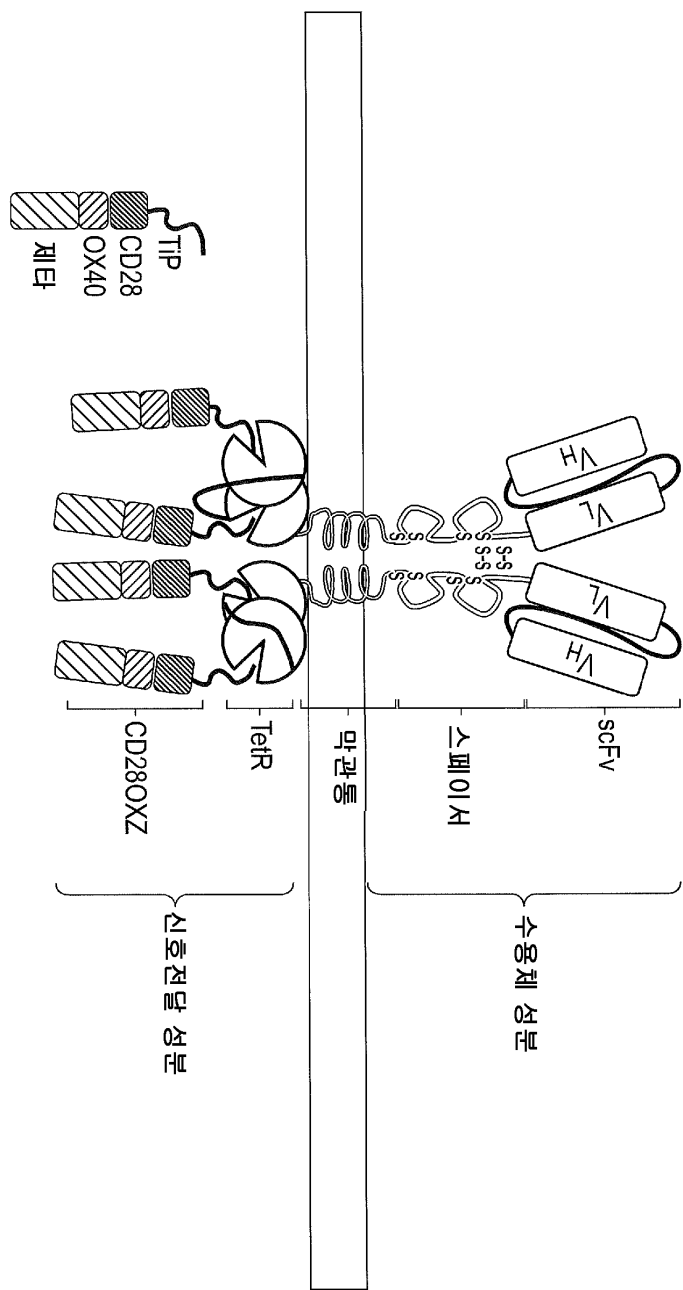
MTWNA YAFAPSGGSLADAPAYQOGQNLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGKPRRKNPOEGL
YNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHGDL YQGLSTATKDTYDALHMOALPPRAEGRGSLTTCGDV
EENPGMAVPTQVLGILLMLTDARCDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDIYENLVWYQOKPGK
APKLIYDTNRLADGVPSPRSFGSGGTQYTLTISLQPEDFATYQCQHKNPLETEGQTKLEIKRSG
GGSGGGGGSGGGSGGSRSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYGMHWIROAPGKLEW
VSSISINGSTYRDSVKGRETTISRDNASTLYLQMSLRAEDTAVYYCAQADAYTGGYFDYWGQGTIL
VTVSSMDPAEPKSPDKTHTCPCPAPPVAGPSVFLFPKPKDTIMARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NMVYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTPLVHODWLNKKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQF
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFELYSKLT
VDKSRWQOGNVEFSCSYMHEALHNHYTQKSLSLSPGK KDPMALIVLGVAGLLFIGLGIFCVRCRHR
RROAERMAQIKRVVSEKKTAAQAPHRFQKTCSPISGGGGSMSRLDKSKVINSALFLINEVGIEGLTRK
LAQKLGEQPTLLYWHVKNKRALDALAIEMLDRHHTHECPLEGEWQDFLRNNAKSFRCALLSHRDGA
KVHIGTRPTEKQYETLENQLAFLCQQGFSLENALYALSAVGHFTLGCVLEDEQEHQVAKEEREETPTTDS
MPPLRQAIELFDHQAEPAFLGLELIICGLEKQKCESGS

[TIP] [CD3 제타] [2A] [scFv] [HCH2CH3pvaa] [CD4tm- 엔도] [링커] [TeIR]

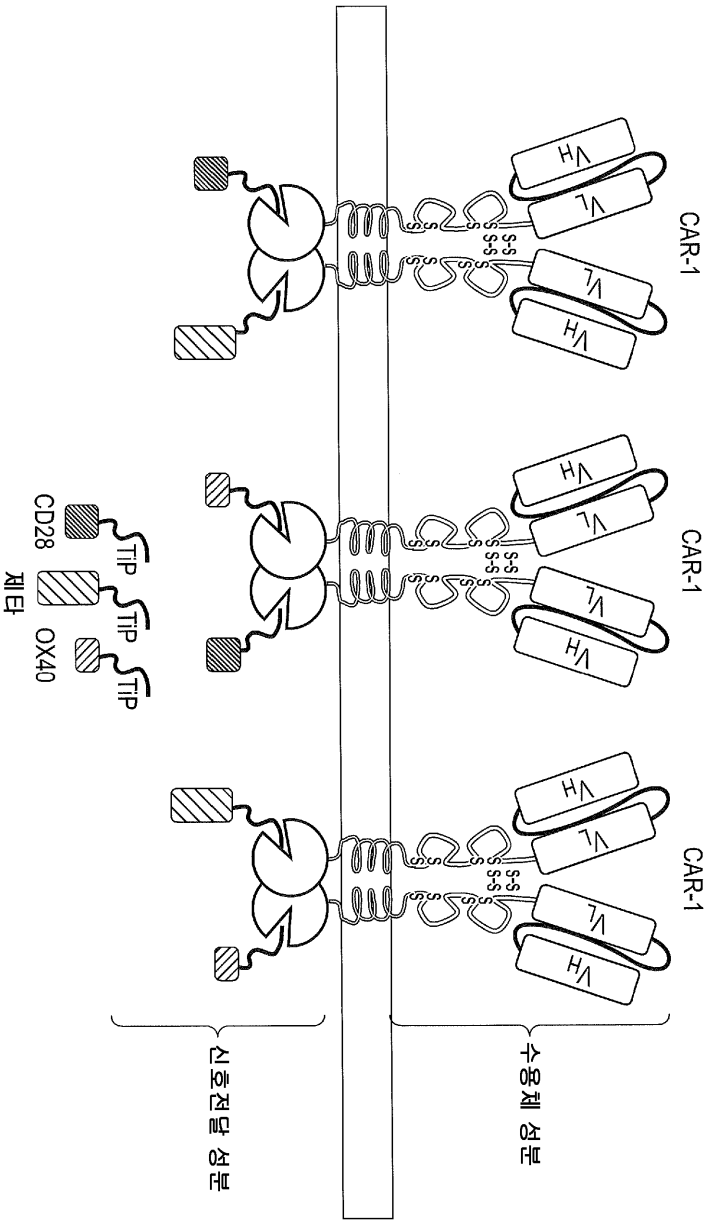
도면7



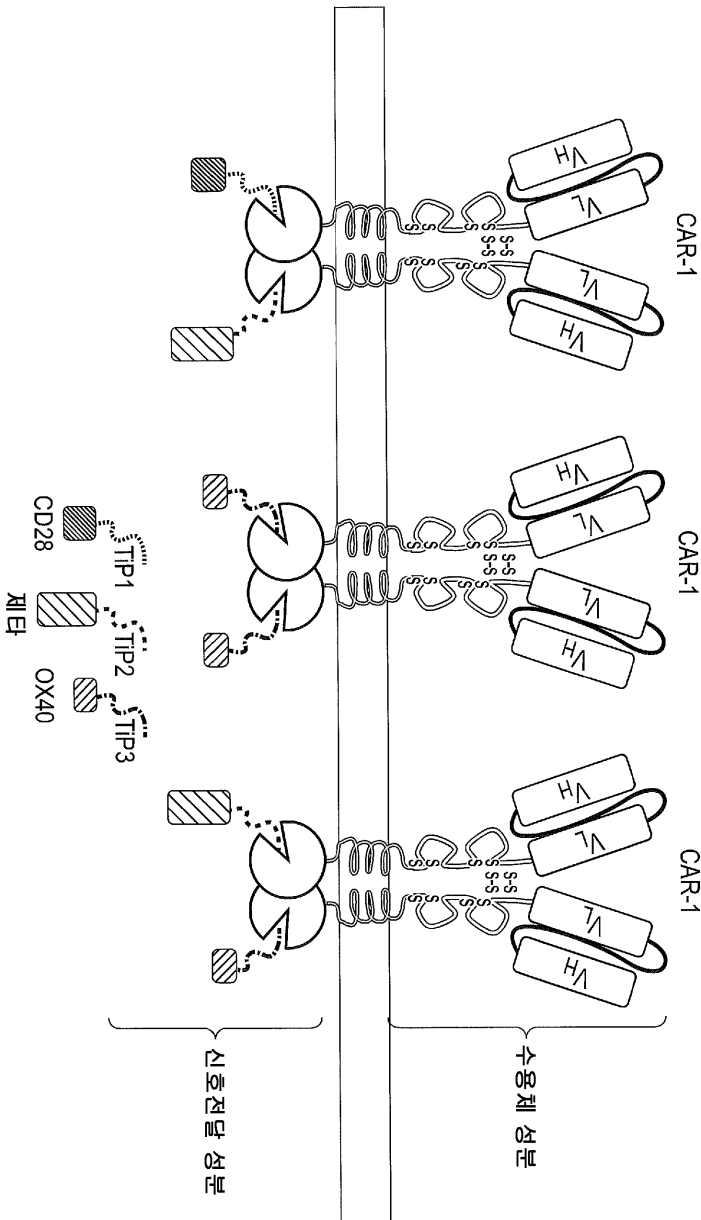
도면8



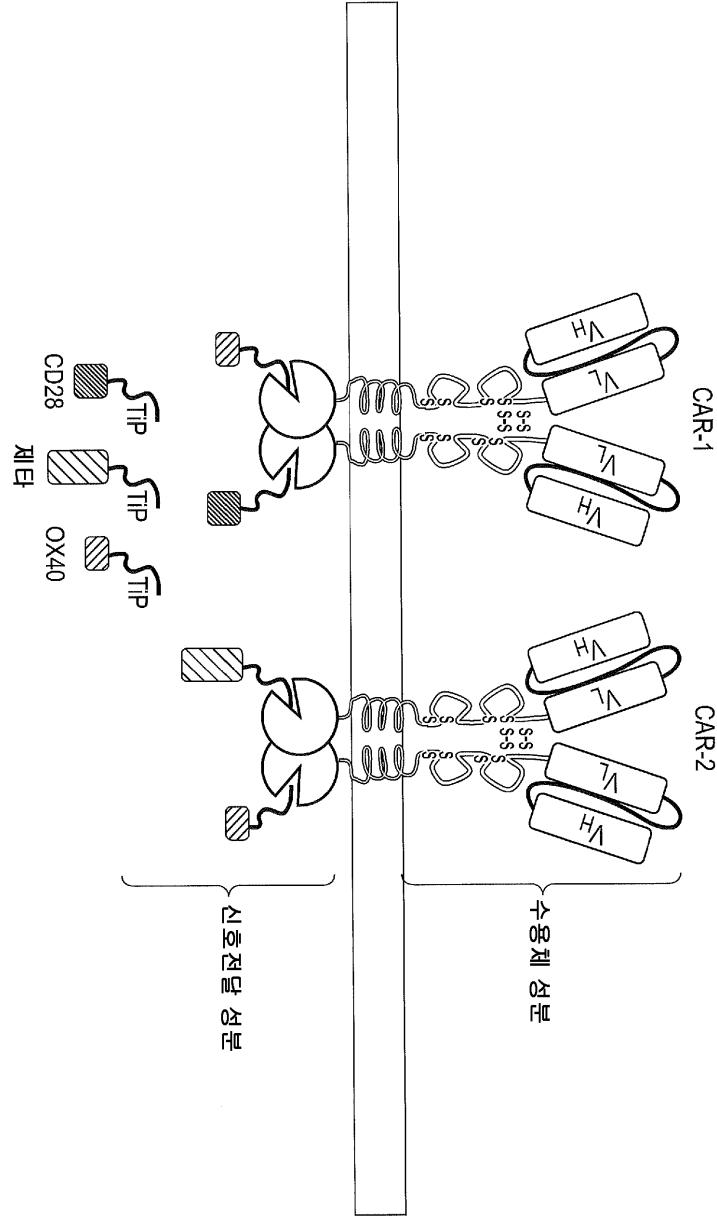
도면9



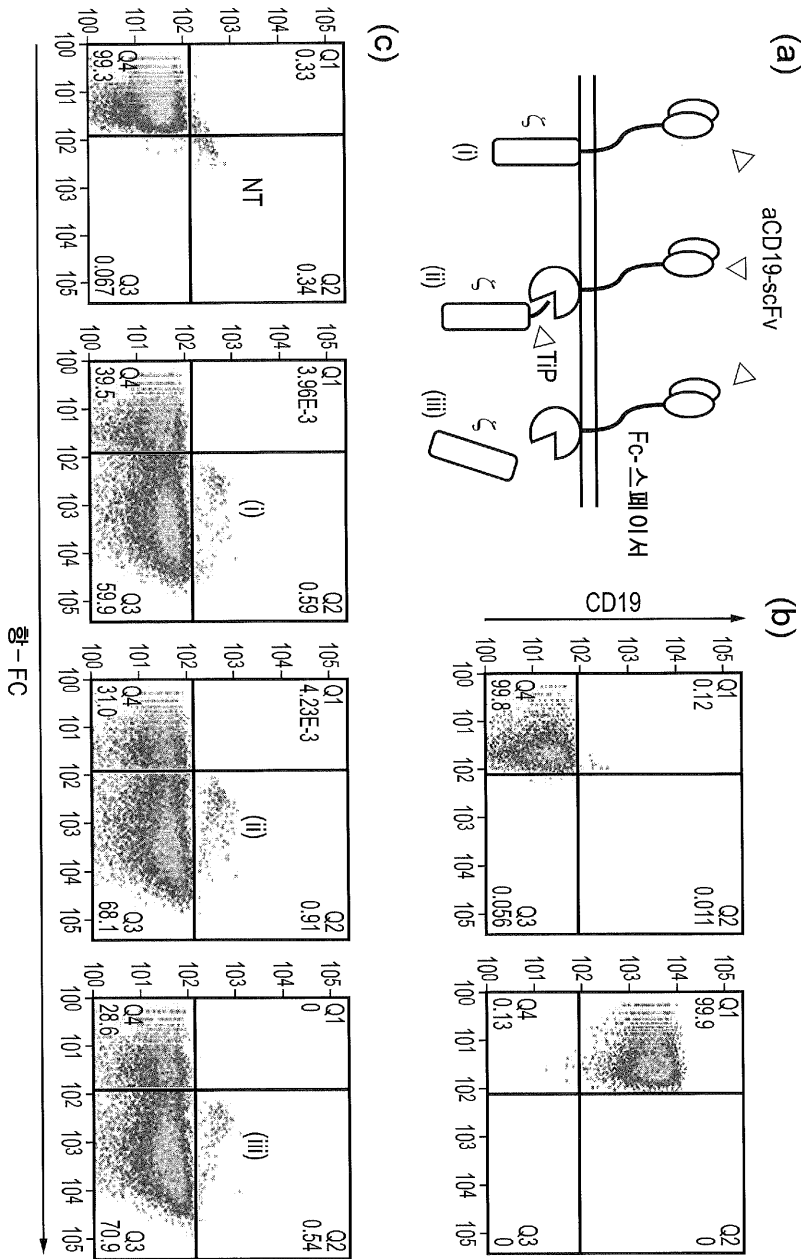
도면10



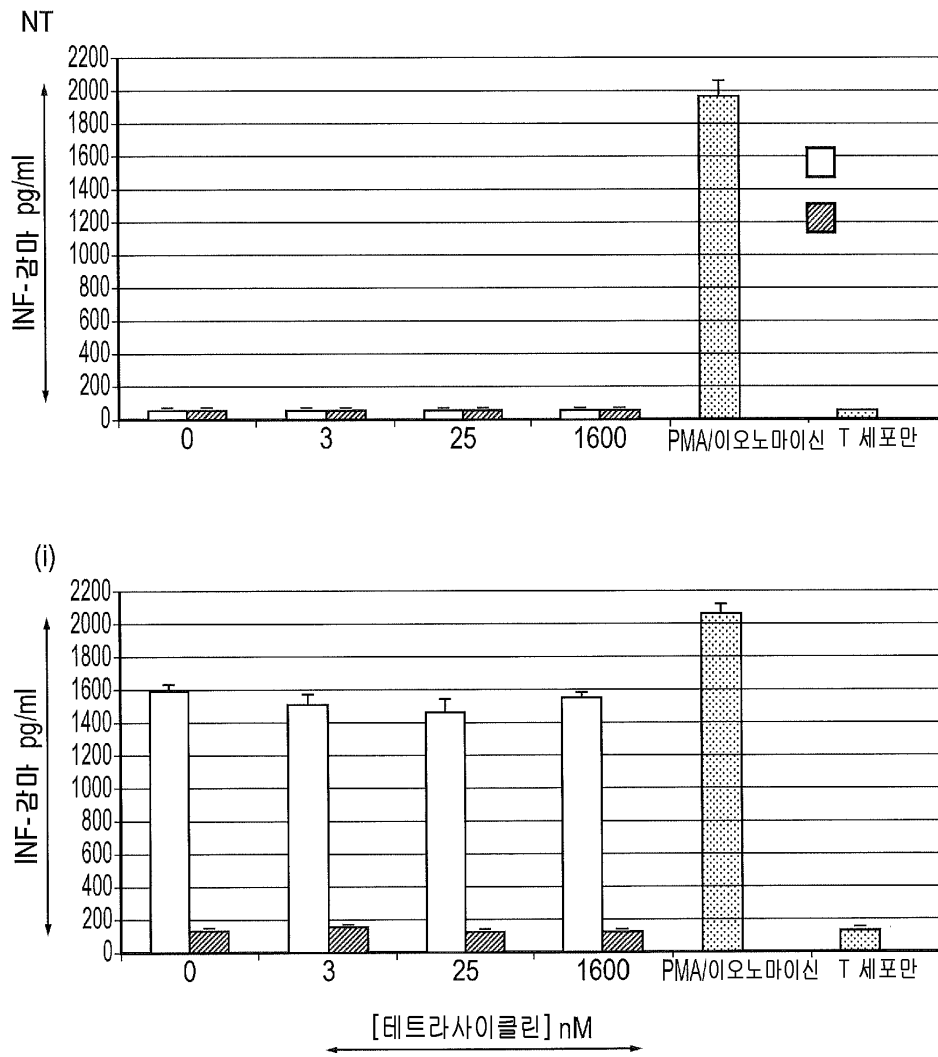
도면11



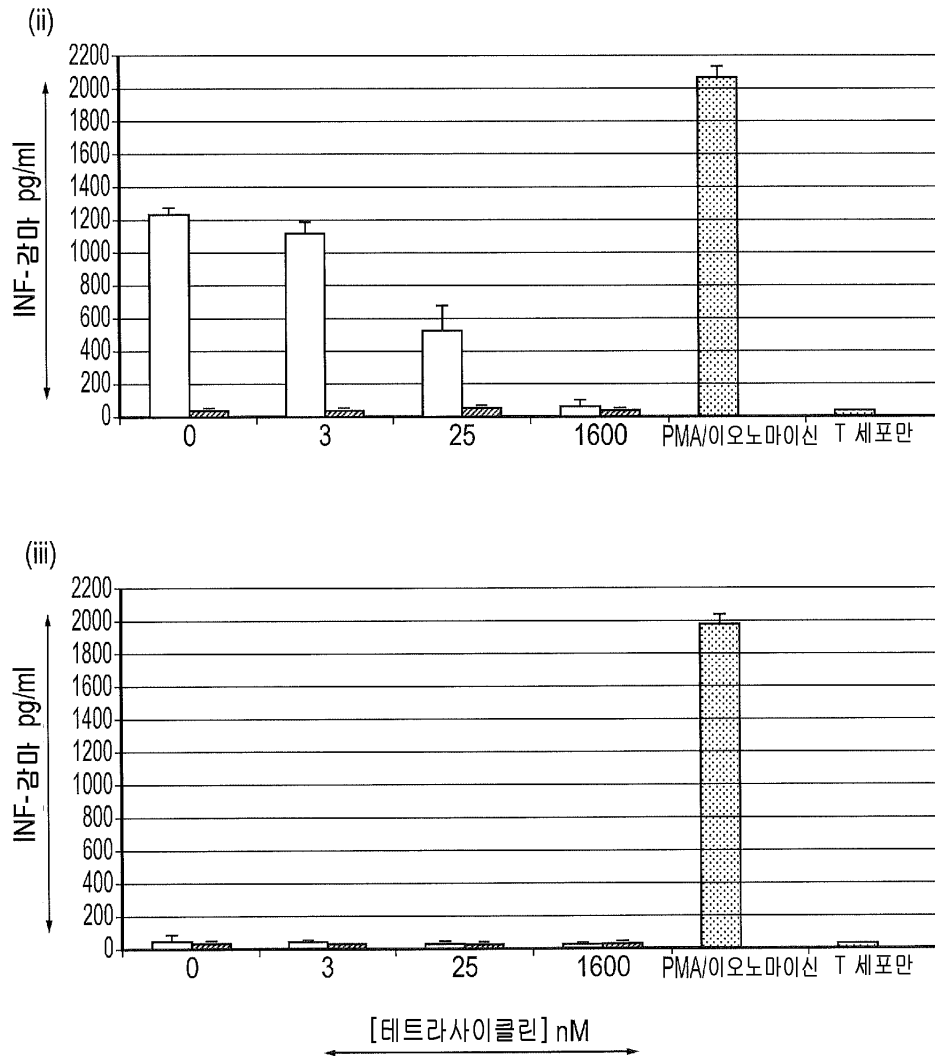
도면12



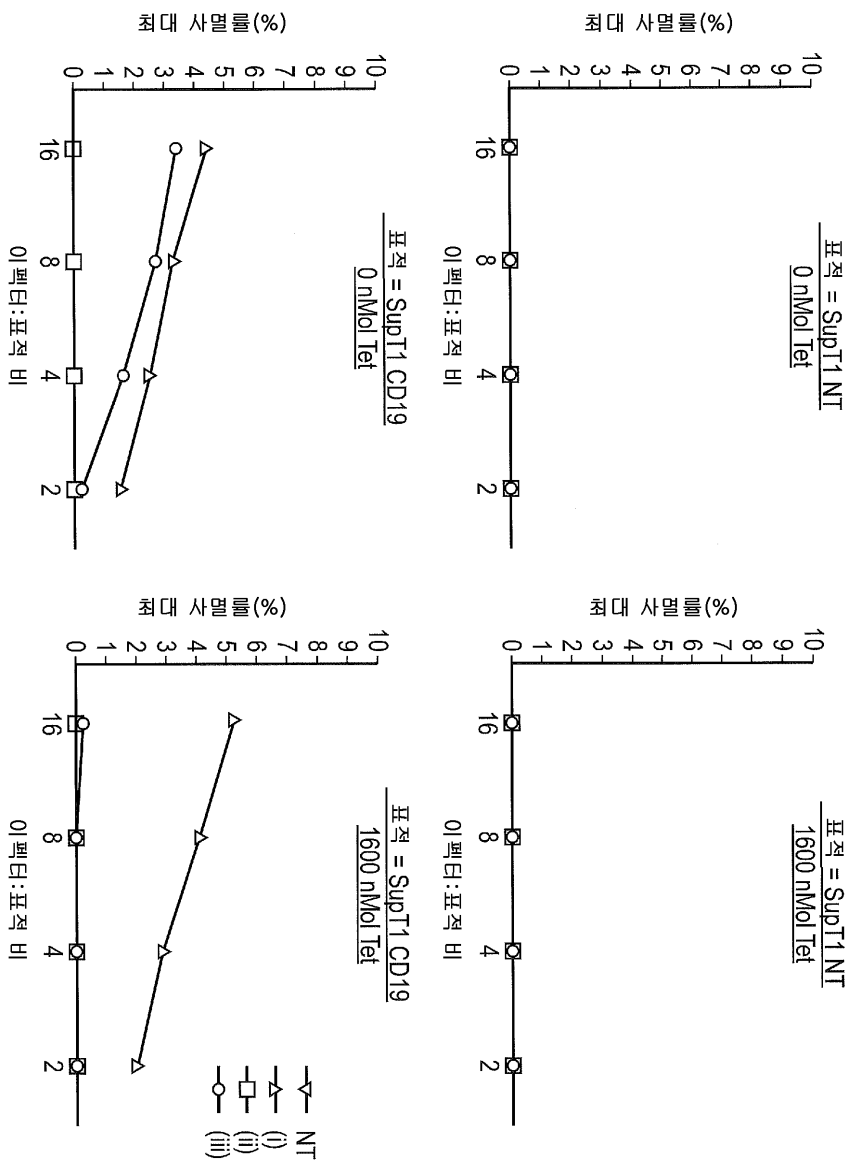
도면13a



도면13b



도면14



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> UCL Business PLC
- <120> Signalling system
- <130> P105610PCT
- <150> GB1415347.2
- <151> 2014-08-29
- <160> 29
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 139

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TetR binding domain

<400> 1

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

1 5 10 15

Leu Asn Glu Val Gly Ile Glu Gly Leu Thr Thr Arg Lys Leu Ala Gln

20 25 30

Lys Leu Gly Val Glu Gln Pro Thr Leu Tyr Trp His Val Lys Asn Lys

35 40 45

Arg Ala Leu Leu Asp Ala Leu Ala Ile Glu Met Leu Asp Arg His His

50 55 60

Thr His Phe Cys Pro Leu Glu Gly Glu Ser Trp Gln Asp Phe Leu Arg

65 70 75 80

Asn Asn Ala Lys Ser Phe Arg Cys Ala Leu Leu Ser His Arg Asp Gly

85 90 95

Ala Lys Val His Leu Gly Thr Arg Pro Thr Glu Lys Gln Tyr Glu Thr

100 105 110

Leu Glu Asn Gln Leu Ala Phe Leu Cys Gln Gln Gly Phe Ser Leu Glu

115 120 125

Asn Ala Leu Tyr Ala Leu Ser Ala Val Gly His

130 135

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TiP binding domain

<400> 2

Met Trp Thr Trp Asn Ala Tyr Ala Phe Ala Ala Pro Ser Gly Gly Gly

1 5 10 15

Ser

<210> 3

<211> 61

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modified CD4 endodomain linker

<400> 3

Ala Leu Ile Val Leu Gly Gly Val Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile Gly

1 5 10 15

Leu Gly Ile Phe Phe Cys Val Arg Cys Arg His Arg Arg Arg Gln Ala

20 25 30

Glu Arg Met Ala Gln Ile Lys Arg Val Val Ser Glu Lys Lys Thr Ala

35 40 45

Gln Ala Pro His Arg Phe Gln Lys Thr Cys Ser Pro Ile

50 55 60

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Biotin mimicking peptide, long nanotag

<400> 4

Asp Val Glu Ala Trp Leu Asp Glu Arg Val Pro Leu Val Glu Thr

1 5 10 15

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Biotin mimicking peptide, short nanotag

<400> 5

Asp Val Glu Ala Trp Leu Gly Ala Arg

1 5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Biotin mimicking peptide, streptag

<400> 6

Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly

1 5

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Biotin mimicking peptide, streptagII

<400> 7

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

1 5

<210> 8

<211> 38

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

<220><223> Biotin mimicking peptide, SBP-tag

<400> 8

Met Asp Glu Lys Thr Thr Gly Trp Arg Gly Gly His Val Val Glu Gly

1 5 10 15

Leu Ala Gly Glu Leu Glu Gln Leu Arg Ala Arg Leu Glu His His Pro

20 25 30

Gln Gly Gln Arg Glu Pro

35

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Biotin mimicking peptide, ccstreptag

<400> 9

Cys His Pro Gln Gly Pro Pro Cys

1 5

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Biotin mimicking peptide, flankedccstreptag

<400> 10

Ala Glu Cys His Pro Gln Gly Pro Pro Cys Ile Glu Gly Arg Lys

1 5 10 15

<210> 11

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Core streptavidin sequence

<400> 11

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe

1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Glu Ser

20 25 30

Ala Val Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp

35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val

50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser

65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu

85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val

100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser

115 120 125

<210> 12

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> signal peptide

<400> 12

Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala

1 5 10 15

Asp His Ala Asp Gly

20

<210> 13

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> signal peptide

<400> 13

Met Ser Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro

20

<210> 14

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> signal peptide

<400> 14

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

1 5 10 15

Asp Ala Arg Cys

20

<210> 15

<211> 234

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> spacer sequence, hinge-CH₂CH₃ of human IgG1

<400> 15

Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp
225 230

<210> 16

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> spacer sequence, human CD8 stalk

<400> 16

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala

1 5 10 15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly

20 25 30

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile

35 40 45

<210> 17

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> spacer sequence, human IgG1 hinge

<400> 17

Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

Lys Asp Pro Lys

20

<210> 18

<211> 185

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> spacer sequence, CD2 ectodomain

<400> 18

Lys Glu Ile Thr Asn Ala Leu Glu Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp

1 5 10 15

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

20 25 30

Ile Lys Trp Glu Lys Thr Ser Asp Lys Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg

35 40 45

Lys Glu Lys Glu Thr Phe Lys Glu Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys

50

55

60

Asn Gly Thr Leu Lys Ile Lys His Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile

65

70

75

80

Tyr Lys Val Ser Ile Tyr Asp Thr Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys

85

90

95

Ile Phe Asp Leu Lys Ile Gln Glu Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser

100

105

110

Trp Thr Cys Ile Asn Thr Thr Leu Thr Cys Glu Val Met Asn Gly Thr

115

120

125

Asp Pro Glu Leu Asn Leu Tyr Gln Asp Gly Lys His Leu Lys Leu Ser

130

135

140

Gln Arg Val Ile Thr His Lys Trp Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe

145

150

155

160

Lys Cys Thr Ala Gly Asn Lys Val Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro

165

170

175

Val Ser Cys Pro Glu Lys Gly Leu Asp

180

185

<210> 19

<211> 259

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> spacer sequence, CD34 ectodomain

<400> 19

Ser Leu Asp Asn Asn Gly Thr Ala Thr Pro Glu Leu Pro Thr Gln Gly

1

5

10

15

Thr Phe Ser Asn Val Ser Thr Asn Val Ser Tyr Gln Glu Thr Thr Thr

20

25

30

Pro Ser Thr Leu Gly Ser Thr Ser Leu His Pro Val Ser Gln His Gly

35

40

45

Asn Glu Ala Thr Thr Asn Ile Thr Glu Thr Thr Val Lys Phe Thr Ser

50 55 60
 Thr Ser Val Ile Thr Ser Val Tyr Gly Asn Thr Asn Ser Ser Val Gln
 65 70 75 80
 Ser Gln Thr Ser Val Ile Ser Thr Val Phe Thr Thr Pro Ala Asn Val
 85 90 95
 Ser Thr Pro Glu Thr Thr Leu Lys Pro Ser Leu Ser Pro Gly Asn Val
 100 105 110

 Ser Asp Leu Ser Thr Thr Ser Thr Ser Leu Ala Thr Ser Pro Thr Lys
 115 120 125
 Pro Tyr Thr Ser Ser Ser Pro Ile Leu Ser Asp Ile Lys Ala Glu Ile
 130 135 140
 Lys Cys Ser Gly Ile Arg Glu Val Lys Leu Thr Gln Gly Ile Cys Leu
 145 150 155 160
 Glu Gln Asn Lys Thr Ser Ser Cys Ala Glu Phe Lys Lys Asp Arg Gly
 165 170 175

 Glu Gly Leu Ala Arg Val Leu Cys Gly Glu Glu Gln Ala Asp Ala Asp
 180 185 190
 Ala Gly Ala Gln Val Cys Ser Leu Leu Leu Ala Gln Ser Glu Val Arg
 195 200 205
 Pro Gln Cys Leu Leu Leu Val Leu Ala Asn Arg Thr Glu Ile Ser Ser
 210 215 220
 Lys Leu Gln Leu Met Lys Lys His Gln Ser Asp Leu Lys Lys Leu Gly
 225 230 235 240

 Ile Leu Asp Phe Thr Glu Gln Asp Val Ala Ser His Gln Ser Tyr Ser
 245 250 255
 Gln Lys Thr

<210> 20

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> signalling component, CD3 Z endodomain

<400> 20

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> 21

<211> 152

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> signalling component, CD28 and CD3 Zeta endodomains

<400> 21

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

145 150

<210> 22

<211> 188

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> signalling component, CD28, OX40 and CD3 Zeta endodomains

<400> 22

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu

50 55 60

Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile Arg Val Lys Phe

65 70 75 80

Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu

85 90 95

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

100 105 110

Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys

115 120 125

Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala
 130 135 140
 Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys
 145 150 155 160
 Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr
 165 170 175
 Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

180 185
 <210> 23
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> self-cleaving site, 2a self-cleaving peptide
 <400> 23

Arg Ala Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu
 1 5 10 15
 Asn Pro Gly Pro
 20

<210> 24
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> self-cleaving site, 2a self-cleaving peptide
 <400> 24

Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser
 1 5 10 15
 Asn Pro Gly Pro
 20

<210> 25
 <211> 652
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> chimeric antigen receptor (CAR) sequence

<400> 25

Met Trp Thr Trp Asn Ala Tyr Ala Phe Ala Ala Pro Ser Gly Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Arg Ala Glu Gly Arg Gly

115 120 125

Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala

130 135 140

Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr Asp Ala

145 150 155 160

Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser

165 170 175

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr

180 185 190

Phe Asn Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

195 200 205

Leu Ile Tyr Asp Thr Asn Arg Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe

210 215 220

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu

225 230 235 240

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Lys Asn Tyr
 245 250 255
 Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser Gly
 260 265 270
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 275 280 285
 Gly Gly Ser Arg Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 290 295 300
 Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 305 310 315 320
 Thr Leu Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 325 330 335
 Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Leu Asn Gly Gly Ser Thr Tyr
 340 345 350
 Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
 355 360 365
 Lys Ser Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 370 375 380
 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gln Asp Ala Tyr Thr Gly Gly Tyr Phe
 385 390 395 400
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Met Asp Pro
 405 410 415
 Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 420 425 430
 Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 435 440 445
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 450 455 460
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 465 470 475 480
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

485 490 495
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 500 505 510
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 515 520 525
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 530 535 540
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr

 545 550 555 560
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 565 570 575
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 580 585 590
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 595 600 605
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe

 610 615 620
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 625 630 635 640
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp Pro Met
 645 650
 <210> 26
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> chimeric antigen receptor (CAR) sequence
 <400> 26
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Ser Arg Leu Asp Lys Ser Lys Val Ile
 1 5 10 15

 Asn Ser Ala Leu Glu Leu Leu Asn Glu Val Gly Ile Glu Gly Leu Thr
 20 25 30
 Thr Arg Lys Leu Ala Gln Lys Leu Gly Val Glu Gln Pro Thr Leu Tyr

35 40 45
Trp His Val Lys Asn Lys Arg Ala Leu Leu Asp Ala Leu Ala Ile Glu
50 55 60
Met Leu Asp Arg His His Thr His Phe Cys Pro Leu Glu Gly Glu Ser
65 70 75 80

Trp Gln Asp Phe Leu Arg Asn Asn Ala Lys Ser Phe Arg Cys Ala Leu
85 90 95
Leu Ser His Arg Asp Gly Ala Lys Val His Leu Gly Thr Arg Pro Thr
100 105 110
Glu Lys Gln Tyr Glu Thr Leu Glu Asn Gln Leu Ala Phe Leu Cys Gln
115 120 125
Gln Gly Phe Ser Leu Glu Asn Ala Leu Tyr Ala Leu Ser Ala Val Gly
130 135 140

His Phe Thr Leu Gly Cys Val Leu Glu Asp Gln Glu His Gln Val Ala
145 150 155 160
Lys Glu Glu Arg Glu Thr Pro Thr Thr Asp Ser Met Pro Pro Leu Leu
165 170 175
Arg Gln Ala Ile Glu Leu Phe Asp His Gln Gly Ala Glu Pro Ala Phe
180 185 190
Leu Phe Gly Leu Glu Leu Ile Ile Cys Gly Leu Glu Lys Gln Leu Lys
195 200 205

Cys Glu Ser Gly Ser

210

<210> 27

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of TiP

<400> 27

Trp Thr Trp Asn Ala Tyr Ala Phe Ala Ala Pro Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 28

<211> 87

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Leu Ser Asp Ser Gly Gln Val Leu Leu Glu Ser Asn Ile Lys Val Leu

1 5 10 15

Pro Thr Trp Ser Thr Pro Val Gln Pro Met Ala Leu Ile Val Leu Gly

20 25 30

Gly Val Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile Gly Leu Gly Ile Phe Phe Cys

35 40 45

Val Arg Cys Arg His Arg Arg Arg Gln Ala Glu Arg Met Ser Gln Ile

50 55 60

Lys Arg Leu Leu Ser Glu Lys Lys Thr Cys Gln Cys Pro His Arg Phe

65 70 75 80

Gln Lys Thr Cys Ser Pro Ile

85

<210> 29

<211> 926

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> basic TetCAR sequence

<400> 29

Met Trp Thr Trp Asn Ala Tyr Ala Phe Ala Ala Pro Ser Gly Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

 Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Arg Ala Glu Gly Arg Gly
 115 120 125
 Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala
 130 135 140
 Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr Asp Ala
 145 150 155 160
 Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
 165 170 175

 Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr
 180 185 190
 Phe Asn Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 195 200 205
 Leu Ile Tyr Asp Thr Asn Arg Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe
 210 215 220
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 225 230 235 240

 Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Lys Asn Tyr
 245 250 255
 Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser Gly
 260 265 270
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 275 280 285
 Gly Gly Ser Arg Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 290 295 300

 Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 305 310 315 320
 Thr Leu Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys

325	330	335	
Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Leu Asn Gly Gly Ser Thr Tyr			
340	345	350	
Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala			
355	360	365	
Lys Ser Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr			
370	375	380	
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gln Asp Ala Tyr Thr Gly Gly Tyr Phe			
385	390	395	400
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Met Asp Pro			
405	410	415	
Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro			
420	425	430	
Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro			
435	440	445	
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val			
450	455	460	
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val			
465	470	475	480
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln			
485	490	495	
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln			
500	505	510	
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala			
515	520	525	
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro			
530	535	540	
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr			
545	550	555	560
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser			
565	570	575	

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 580 585 590
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 595 600 605
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 610 615 620

 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 625 630 635 640
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp Pro Met Ala Leu Ile Val
 645 650 655
 Leu Gly Gly Val Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile Gly Leu Gly Ile Phe
 660 665 670
 Phe Cys Val Arg Cys Arg His Arg Arg Arg Gln Ala Glu Arg Met Ala
 675 680 685

 Gln Ile Lys Arg Val Val Ser Glu Lys Lys Thr Ala Gln Ala Pro His
 690 695 700
 Arg Phe Gln Lys Thr Cys Ser Pro Ile Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met
 705 710 715 720
 Ser Arg Leu Asp Lys Ser Lys Val Ile Asn Ser Ala Leu Glu Leu Leu
 725 730 735
 Asn Glu Val Gly Ile Glu Gly Leu Thr Thr Arg Lys Leu Ala Gln Lys
 740 745 750

 Leu Gly Val Glu Gln Pro Thr Leu Tyr Trp His Val Lys Asn Lys Arg
 755 760 765
 Ala Leu Leu Asp Ala Leu Ala Ile Glu Met Leu Asp Arg His His Thr
 770 775 780
 His Phe Cys Pro Leu Glu Gly Glu Ser Trp Gln Asp Phe Leu Arg Asn
 785 790 795 800
 Asn Ala Lys Ser Phe Arg Cys Ala Leu Leu Ser His Arg Asp Gly Ala
 805 810 815

 Lys Val His Leu Gly Thr Arg Pro Thr Glu Lys Gln Tyr Glu Thr Leu

820	825	830	
Glu Asn Gln Leu Ala Phe Leu Cys Gln Gln Gly Phe Ser Leu Glu Asn			
835	840	845	
Ala Leu Tyr Ala Leu Ser Ala Val Gly His Phe Thr Leu Gly Cys Val			
850	855	860	
Leu Glu Asp Gln Glu His Gln Val Ala Lys Glu Glu Arg Glu Thr Pro			
865	870	875	880
Thr Thr Asp Ser Met Pro Pro Leu Leu Arg Gln Ala Ile Glu Leu Phe			
885	890	895	
Asp His Gln Gly Ala Glu Pro Ala Phe Leu Phe Gly Leu Glu Leu Ile			
900	905	910	
Ile Cys Gly Leu Glu Lys Gln Leu Lys Cys Glu Ser Gly Ser			
915	920	925	