



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0083554
(43) 공개일자 2020년07월08일

| | |
|---|---|
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 15/65 (2006.01) A61K 35/17 (2014.01) A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01) C12N 15/85 (2006.01) | (71) 출원인 오토러스 리미티드 영국 더블유12 7알제트 런던 우드 레인 58 포레스 트 하우스 |
| (52) CPC특허분류 C12N 15/65 (2013.01) A61K 35/17 (2013.01) | (72) 발명자 토마스 사이먼 영국 더블유12 7알제트 런던 우드 레인 58 포레스 트 하우스 오토러스 리미티드 내 |
| (21) 출원번호 10-2020-7015705 | 오누오하 시모비 영국 더블유12 7알제트 런던 우드 레인 58 포레스 트 하우스 오토러스 리미티드 내 |
| (22) 출원일자(국제) 2018년10월31일 심사청구일자 없음 | 코르도바 손 영국 더블유12 7알제트 런던 우드 레인 58 포레스 트 하우스 오토러스 리미티드 내 |
| (85) 번역문제출일자 2020년06월01일 | (74) 대리인 김진희, 김태홍 |
| (86) 국제출원번호 PCT/GB2018/053149 | |
| (87) 국제공개번호 WO 2019/086865 국제공개일자 2019년05월09일 | |
| (30) 우선권주장 1718088.6 2017년11월01일 영국(GB) | |

전체 청구항 수 : 총 31 항

(54) 발명의 명칭 **벡터**

(57) 요약

본 발명은 벡터의 키트로서, (i) 제1 마커 성분을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 제1 벡터; 및 (ii) 제2 마커 성분을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 제2 벡터를 포함하며, 세포가 제1 및 제2 벡터 둘 다로 형질도입되는 경우, 제1 및 제2 마커 성분은 그 세포에 의해 발현되고 회합되어, 세포 분류 시약에 의해 인식되는 이중다량체 마커를 형성하며, 반면에, 세포가 제1 또는 제2 벡터 단독으로 형질도입되는 경우, 제1 또는 제2 마커 성분 단독의 발현이 세포 분류 시약에 의해 인식되지 않는 것인 벡터의 키트를 제공한다.

(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 14/47 (2013.01)

C12N 15/85 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

백터의 키트로서,

(i) 제1 마커 성분을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 제1 백터; 및

(ii) 제2 마커 성분을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 제2 백터

를 포함하며, 세포가 제1 및 제2 백터 둘 다로 형질도입되는 경우, 제1 및 제2 마커 성분은 그 세포에 의해 발현되고 회합되어, 세포 분류 시약에 의해 인식되는 이중다량체 마커를 형성하며,

반면에, 세포가 제1 또는 제2 백터 단독으로 형질도입되는 경우, 제1 또는 제2 마커 성분 단독의 발현이 세포 분류 시약에 의해 인식되지 않는 것인 백터의 키트.

청구항 2

제1항에 있어서, 제1 마커 성분은 제2 마커 성분과 회합되지 않은 경우에 불안정하고, 세포 분류 시약은 제1 마커 성분을 인식하는 것인 키트.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 제1 및 제2 마커 성분 둘 다는 회합되지 않은 경우에 불안정하고, 세포 분류 시약은 제1 또는 제2 마커 성분을 인식하는 것인 키트.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 마커 성분은 막 결합되어 있고, 제2 마커 성분은 제1 마커 성분의 부재하에 분비되며, 세포 분류 시약은 제2 마커 성분을 인식하는 것인 키트.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 한 마커 성분은 카파 불변 도메인을 포함하고, 다른 마커 성분은 IgG1로부터의 CH1 도메인을 포함하는 것인 키트.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 한 마커 성분은 CD79a 엑토도메인을 포함하고, 다른 마커 성분은 CD79b 엑토도메인을 포함하는 것인 키트.

청구항 7

제1항에 있어서, 키트는 제3 마커 성분을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 제3 백터를 포함하며,

세포가 제1, 제2 및 제3 백터로 형질도입되는 경우, 제1, 제2 및 제3 마커 성분은 그 세포에 의해 발현되고 회합되어, 세포 분류 시약에 의해 인식되는 이중다량체 마커를 형성하며,

반면에, 세포가 제1, 제2 또는 제3 백터(들) 중 하나 또는 둘로 형질도입되는 경우, 제1, 제2 또는 제3 마커 성분(들) 중 하나 또는 둘의 발현이 세포 분류 시약에 의해 인식되지 않는 것인 키트.

청구항 8

제7항에 있어서, 제1, 제2 및/또는 제3 마커 성분은 이중다량체 마커로서 회합되지 않은 경우에 불안정한 것인 키트.

청구항 9

제8항에 있어서, 제1 마커 성분은 막 결합되어 있고; 제2 마커 성분은 제1 마커 성분의 부재하에 분비되며; 제3 마커 성분은 제1 및 제2 마커 성분이 또한 발현되지 않으면 분비되고; 세포 분류 시약은 제3 마커 성분을 인식

하는 것인 키트.

청구항 10

제9항에 있어서, 제1 마커 성분은 막 결합된 CD79a 엑토도메인을 포함하고, 제2 마커는 IgG1로부터의 CH1 도메인 및 CD79a 엑토도메인을 포함하며, 제3 마커는 카파 불변 도메인을 포함하는 것인 키트.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터 중 적어도 하나는 키메라 항원 수용체를 코딩하는 핵산 서열을 추가로 포함하는 것인 벡터의 키트.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 한 마커 성분의 세포에서의 발현 수준이, 다른 마커 성분의 세포에서의 발현 수준과 상이한 것인 키트.

청구항 13

제12항에 있어서, 두 마커 성분을 코딩하는 벡터는 상이한 신호 서열을 포함하는 것인 키트.

청구항 14

형질도입된 세포 집단을 검출하는 데 사용하기 위한 세포 표면 이종다량체 마커로서, 이종다량체 마커는 2 이상의 마커 성분을 포함하며, 제1 마커 성분은 제1 벡터 중 핵산 서열에 의해 코딩되고, 제2 마커 성분은 제2 벡터 중 핵산 서열에 의해 코딩되며, 제1 마커 및 제2 마커 성분은 회합하는 것인 세포 표면 이종다량체 마커.

청구항 15

제14항에 있어서, 제1 마커 및/또는 제2 마커 성분은 회합되지 않은 경우에 불안정한 것인 이종다량체 마커.

청구항 16

제14항에 있어서, 제2 마커 성분은 제1 마커 성분의 부재하에 세포에 의해 분비되는 것인 이종다량체 마커.

청구항 17

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 이종다량체 마커를 포함하는 세포.

청구항 18

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 벡터의 키트로 형질도입된 세포.

청구항 19

제17항 또는 제18항에 있어서, 면역 세포인 세포.

청구항 20

제19항에 있어서, T 세포 또는 자연 살해(NK) 세포인 세포.

청구항 21

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 벡터의 키트로 세포를 형질도입 또는 형질감염시키는 단계를 포함하는, 제17항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 세포의 제조 방법.

청구항 22

- (i) 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 벡터의 키트로 세포 샘플을 형질도입 또는 형질감염시키는 단계;
- (ii) 세포 분류 시약을 사용하여 이종다량체 마커의 발현을 검출하는 단계; 및
- (iii) 검출된 세포를 선택 또는 분류하여, 이종다량체 마커를 발현하는 세포의 조성물을 제조하는 단계

를 포함하는, 제17항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 세포의 조성물의 제조 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 세포 분류 시약은 가용성 재조합 단백질이고, 세포는 가용성 재조합 단백질을 인식하는 매트릭스를 사용하여 단계 (iii)에서 선택 또는 분류되는 것인 제조 방법.

청구항 24

제22항에 있어서, 세포 분류 시약은 형광 표지된 가용성 재조합 단백질이고, 세포는 유세포 분석에 의해 단계 (iii)에서 선택 또는 분류되는 것인 제조 방법.

청구항 25

제22항에 있어서, 세포 분류 시약은 비드에 부착된 가용성 재조합 단백질이고, 세포는 형질도입된/형질감염된 세포 샘플로부터의 비드의 분리에 의해 단계 (iii)에서 선택 또는 분류되는 것인 제조 방법.

청구항 26

제17항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 복수의 세포를 포함하는 약학 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서, 질환의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 약학 조성물.

청구항 28

제26항에 따른 약학 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 질환을 치료 및/또는 예방하는 방법.

청구항 29

제28항에 있어서,

- I. 대상체로부터 세포 함유 샘플을 분리하는 단계,
- II. 세포 함유 샘플을 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 벡터의 키트로 형질도입 또는 형질감염시키는 단계,
- III. 세포 분류 시약을 사용하여 이중다량체 마커의 발현을 검출함으로써, 샘플로부터 형질도입된/형질감염된 세포 집단을 식별하는 단계,
- IV. (III)의 세포 집단을 선택 또는 분류하여, 형질도입된/형질감염된 세포의 정제된 하위 집단을 얻는 단계; 및
- V. 이중다량체 마커를 발현하는 (IV)의 하위 집단을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 30

질환의 치료 및/또는 예방을 위한 의약의 제조에서의 제26항에 따른 약학 조성물의 용도.

청구항 31

질환은 암인, 제30항에 따른 약학 조성물의 용도 또는 제28항 또는 제29항에 따른 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 벡터의 키트, 예를 들어 세포의 형질도입을 위한 레트로 바이러스 벡터의 키트에 관한 것이다.

[0002] 특히, 본 발명은 제1 마커 성분을 코딩하는 핵산을 포함하는 제1 벡터 및 제2 마커 성분을 코딩하는 핵산을 포함하는 제2 벡터를 포함하는 키트에 관한 것이다. 세포가 두 벡터 모두로 형질도입되는 경우, 두 마커 성분이

세포에서 발현되고, 이들은 회합하여 검출 가능한 이중다량체 마커를 형성한다.

[0003] 본 발명은 또한 이러한 벡터로 형질도입된 세포를 제조하고 검출하는 방법, 그리고 이러한 세포의 조성물을 투여하는 것을 포함하는 질환의 치료/예방을 위한 약학적 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0004] 수십년 동안, 바이러스 벡터는 T 세포를 형질도입시켜 관심의 폴리펩티드를 발현시키는 데 사용되어 왔다. 이들 벡터는 바이러스 내에서 진화된 특수한 분자 메커니즘을 이용하여, 그들이 감염시킨 세포내에서 그들의 계놈을 효율적으로 전달한다. 그러나, 이들은 일반적으로 약 8~10 킬로베이스(kb)인 것으로 여겨지는 한정된 전달 용량을 갖는다. 이 한계는, 패키징 효율이 삽입물 크기에 반비례한다는 것에 기인한다.

[0005] 높은 삽입물 용량을 갖는 T 세포 기반 유전자 요법의 다른 잠재적 비-바이러스 메커니즘들이 공지되어 있으나, 이들은 낮은 T 세포 수를 초래하는 낮은 형질도입 효율 및/또는 독성 작용에 의해 저해되는 경우가 많다.

[0006] 높은 효율을 유지하면서 큰 삽입물 크기를 T 세포내로 형질도입시키기 위해, 바이러스 벡터 상에 코딩된 유전자는 2 이상의 개별 벡터로 분할될 수 있다. 각 벡터는 바이러스를 만드는 데 사용되며, 이어서 모든 벡터는 풀링되어 세포를 형질도입시킨다. 그러나, 이 다중 형질도입 접근법은 종종, 원하는 벡터 전부가 아닌 일부로 형질도입된 세포를 생성한다. 이는 상이한 벡터 구성분을 포함하는 불균일한 세포 집단을 초래하고, 이것은 원하는 유전자 전부를 발현하지는 않을 것이다.

[0007] 큰 삽입물 크기로 T 세포를 형질도입 및 형질감염시키는 개선된 방법을 제공 할 필요가 있다.

발명의 내용

도면의 설명

[0009] **도 1** - 이중이량체 마커를 도시하는 개략도. 제1 마커 성분은 CD79a 엑토도메인(ectodomain)이고, 제2 마커 성분은 CD79b 엑토도메인과, CD19로부터의 막관통 도메인 및 절단 엔도도메인(endodomain) 사이의 융합체이다. 제1 및 제2 마커 성분은 이황화 결합을 통해 회합된다.

[0010] **도 2** - 다른 이중이량체 마커를 도시하는 개략도. 제1 마커 성분은 카파 불변 도메인이고, 제2 마커 성분은 IgG1로부터의 CH1 도메인과, CD19로부터의 막관통 도메인 및 절단 엔도도메인 사이의 융합체이다. 제1 및 제2 마커는 이황화 결합을 통해 회합된다.

[0011] **도 3** - 이중삼량체 마커를 도시하는 개략도. 제1 마커 성분은 카파 불변 도메인이고; 제2 마커 성분은 CD79b 엑토도메인과, CD19로부터의 막관통 도메인 및 절단 엔도도메인 사이의 융합체이며; 제3 마커는 CD79a 엑토도메인과 IgG1로부터의 CH1 도메인 사이의 융합체이다. 제1, 제2 및 제3 마커 성분은 2개의 이황화 결합을 통해 회합하여 이중삼량체 마커를 형성한다.

[0012] **도 4** - 키트의 제1 및 제2 벡터에 의해 코딩된 아미노산 서열. 벡터는 제1 및 제2 마커 성분을 코딩하며, 이들 성분은 회합하여 도 2에 도시된 바와 같은 이중이량체 마커를 형성한다.

[0013] **도 5** - 키트의 제1, 제2 및 제3 벡터로 코딩된 아미노산 서열. 벡터는 제1, 제2 및 제3 마커 성분을 코딩하며, 이들 성분은 회합하여 도 3에 도시된 바와 같은 이중삼량체 마커를 형성한다.

[0014] **도 6의 A:** 제1 벡터 및 제2 벡터를 도시하는 개략도. 여기서 제1 벡터는 제1 키메라 항원 수용체(CAR), 2A 펩티드 절단 부위 및 제1 마커(CAR1-2A-M α)를 코딩하고; 제2 벡터는 제2 CAR, 2A 펩티드 절단 부위 및 제2 마커(CAR2-2A-M β)를 코딩한다. 2A 펩티드 절단 부위는 각각의 벡터 상에서 마커와 CAR 사이에 위치한다.

[0015] **도 6의 B:** 도 6의 A에 도시된 벡터 중 하나 또는 둘 모두로 세포를 형질도입시키는 작용을 도시하는 개략도. 세포가 제1 또는 제2 벡터 단독으로 형질도입되는 경우, 형질도입 유전자는 발현되지만(CAR1 또는 CAR2), 검출 가능한 마커는 세포 표면에 발현되지 않는다. 세포가 제1 및 제2 벡터 둘 다로 형질도입되는 경우, 두 CAR 모두가 발현되고 제1 및 제2 마커 성분의 회합은 안정한 이중이량체 마커를 형성하며, 이것은 세포 표면에서도 발현된다.

[0016] **도 7의 A:** 제1 벡터, 제2 벡터 및 제3 벡터의 개략도. 제1 벡터는 제1 CAR, a2A 펩티드 절단 부위 및 제1 마커(CAR1-2A-M α)를 코딩하고; 제2 벡터는 제2 CAR, 2A 펩티드 절단 부위 및 제2 마커(CAR2-2A-M β)를 코딩하며; 제3 벡터는 제3 CAR, 2A 펩티드 절단 부위 및 제3 마커(CAR3-2A-M γ)를 코딩한다. 2A 펩티드 절단 부위는 각각

의 벡터 상에서 마커와 CAR 사이에 위치한다.

- [0017] **도 7의 B:** 도 7의 A에 도시된 1개, 2개 또는 3개 모두의 벡터로 세포를 형질도입시키는 작용을 도시하는 개략도. 세포가 1개 또는 2개의 벡터로 형질도입되는 경우, 관련 형질도입 유전자(즉, CAR)는 발현되지만, 검출 가능한 마커는 세포 표면에서 발현되지 않는다. 마커 발현을 위해서는 3개의 벡터 모두가 형질도입되어야 한다. 제1, 제2 및 제3 벡터의 형질도입시, 3개의 CAR 모두가 발현되고, 제1, 제2 및 제3 마커 성분의 회합은 세포 표면에서 발현되는 안정한 이중삼량체 마커를 형성한다.
- [0018] **도 8 -** 키트에서 마커 성분들의 발현의 상대성을 변경하는 데 사용하기에 적합한 야생형 및 돌연변이된 신호 서열. 한 벡터는 야생형 신호 펩티드 서열을 코딩할 수 있고, 다른 벡터는 "돌연변이 1" 내지 "돌연변이 7"로 도시되어 있는 변경된 서열들 중 하나를 코딩할 수 있다. 변경된 서열은 덜 효율적인 신호 펩티드이기 때문에, 변경된 신호 펩티드를 갖는 벡터에 의해 코딩된 마커 성분은, 야생형 신호 펩티드를 갖는 벡터에 의해 코딩된 마커 성분보다, 세포에서 낮은 수준으로 발현될 것이다. 마커와 동일한 구축물 상의 다른 형질도입 유전자(들)의 상대적 발현은 유사하게 영향을 받을 것이기 때문에, 변경된 신호 펩티드를 갖는 벡터에 의해 코딩된 관심의 폴리펩티드(들)는, 야생형 신호 펩티드를 갖는 벡터에 의해 코딩된 관심의 폴리펩티드보다, 세포에서 보다 낮은 수준으로 발현될 것이다.
- [0019] **도 9(도 9a 및 도 9b) -** 293 T 세포(도 9a) 및 1차 인간 T 세포(도 9b)에서의 이중이량체 마커 및 293T 세포(도 9c)에서의 이중삼량체 마커의 표면 발현.
- [0020] **도 9a 및 9b:** 293T 세포는 이중이량체 마커(벡터 1 및 벡터 2)의 각각의 사슬로 단일 형질감염되거나, 또는 둘 모두(벡터 1 + 벡터 2)로 이중 형질감염되었다. 이중 형질감염된 세포에서의 이중이량체 마커의 성공적인 조립은 항-인간 카파 사슬 항체, 항-인간 Fab 항체로 염색하고 가용성 CD19를 사용함으로써 유세포 분석에 의해 평가하였다. 이중이량체 마커의 두 사슬 모두에 대한 플라스미드 코딩을 양성 대조군으로 이용하였다. 293K T 세포 및 1차 인간 T 세포 형질도입 모두의 결과(4개의 건강한 공여자 샘플을 사용함)는, 이중이량체 마커의 선택적 발현은 단일 형질도입된 T 세포에서 검출된 최소 배경을 갖는 이중 형질도입된 T 세포에서만 발생한다는 것을 입증한다.
- [0021] **도 9c:** 293T 세포는 이중삼량체 마커(벡터 1, 벡터 2 및 벡터 3)의 각각의 사슬로 단일 형질감염되거나, 벡터 1 및 벡터 2(벡터 1 + 벡터 2)로 이중 형질감염되거나, 또는 이중삼량체 마커(벡터 1 + 벡터 2 + 벡터 3)의 3개 사슬 모두로 삼중 형질감염되었다. 이중삼량체 마커의 성공적인 조립은 유세포 분석을 이용하여 가용성 CD19에 대한 염색에 의해 평가되었다. 그 결과는, 세포가 1개 또는 2개의 벡터로 형질도입되는 경우, 검출 가능한 마커가 세포 표면에서 발현되지 않음을 보여준다. 마커 발현을 위해서는 3개의 벡터 모두가 형질도입되어야 한다.
- [0022] 발명의 개요
- [0023] 본 발명자들은, 각각이 마커 성분을 코딩하는, 핵산 서열을 포함하는 벡터의 키트를 개발하였다. 마커 성분들은 회합시 안정화되고, 검출 가능한 이중다량체 마커를 형성한다.
- [0024] 따라서, 제1 양태에서, 본 발명은 벡터의 키트로써,
- [0025] (i) 제1 마커 성분을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 제1 벡터; 및
- [0026] (ii) 제2 마커 성분을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 제2 벡터
- [0027] 를 포함하는 벡터의 키트를 제공한다.
- [0028] 세포가 제1 및 제2 벡터 둘 다로 형질도입되는 경우, 제1 및 제2 마커 성분은 그 세포에 의해 발현되고 회합되어, 세포 분류 시약에 의해 인식되는 이중다량체 마커를 형성한다.
- [0029] 세포가 제1 또는 제2 벡터 단독으로 형질도입되는 경우, 제1 또는 제2 마커 성분 단독의 발현이 세포 분류 시약에 의해 인식되지 않는다.
- [0030] 제1 마커 성분은 제2 마커 성분과 회합되지 않은 경우에 불안정할 수 있다. 이 배열에서, 작용제 또는 세포 분류 시약은 제1 마커 성분을 인식할 수 있다.
- [0031] 대안적으로, 제1 및 제2 마커 성분 둘 다는 회합되지 않은 경우에 불안정할 수 있다. 이 배열에서, 작용제 또는 세포 분류 시약은 제1 또는 제2 마커 성분을 인식할 수 있다.
- [0032] 제1 마커 성분은 막 결합되어 있을 수 있고, 제2 마커 성분은 제1 마커 성분의 부재하에 분비될 수 있다. 이러

한 배열에서, 작용제 또는 세포 분류 시약은 제2 마커 성분을 인식할 수 있다.

- [0033] 한 마커 성분은 카파 불변 도메인을 포함할 수 있고, 다른 마커 성분은 IgG1로부터의 CH1 도메인을 포함할 수 있다.
- [0034] 한 마커 성분은 CD79a 엑토도메인을 포함할 수 있고, 다른 마커 성분은 CD79b 엑토도메인을 포함할 수 있다.
- [0035] 키트는 제3 마커를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 제3 벡터를 포함할 수 있다.
- [0036] 세포가 제1, 제2 및 제3 벡터로 형질도입되는 경우, 제1, 제2 및 제3 마커 성분은 그 세포에 의해 발현되고 회합되어, 세포 분류 시약에 의해 인식되는 이종다량체 마커를 형성할 수 있으며;
- [0037] 세포가 제1, 제2 또는 제3 벡터(들) 중 하나 또는 둘로 형질도입되는 경우, 제1, 제2 또는 제3 마커 성분(들) 중 하나 또는 둘의 발현이 세포 분류 시약에 의해 인식되지 않을 수 있다.
- [0038] 제1, 제2 및/또는 제3 마커 성분은 이종다량체 마커로서 회합되지 않은 경우에 불안정할 수 있다.
- [0039] 제1 마커 성분은 막 결합되어 있을 수 있고; 제2 마커 성분은 제1 마커 성분의 부재하에 분비될 수 있으며; 제3 마커 성분은 제1 및 제2 마커 성분이 또한 발현되지 않으면 분비될 수 있다. 이 배열에서, 작용제 또는 세포 분류 시약은 제3 마커 성분을 인식할 수 있다.
- [0040] 제1 마커 성분은 막 결합된 CD79a 엑토도메인을 포함할 수 있고; 제2 마커는 IgG1로부터의 CH1 도메인 및 CD79a 엑토도메인을 포함할 수 있으며; 제3 마커는 카파 불변 도메인을 포함할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 제1 양태의 키트에서 벡터 중 적어도 하나는 키메라 항원 수용체 또는 T 세포 수용체를 코딩하는 핵산 서열을 또한 포함할 수 있다.
- [0042] 키트 중 벡터가 세포내에서 발현되는 경우, 한 마커 성분의 발현 수준은 다른 마커 성분의 세포에서의 발현 수준과 상이할 수 있다.
- [0043] 두 마커 성분을 코딩하는 벡터는 상이한 신호 서열을 포함할 수 있다.
- [0044] 제2 양태에서, 본 발명은 형질도입된 세포 집단을 검출하는 데 사용하기 위한 세포 표면 이종다량체 마커로서, 이종다량체 마커는 2 이상의 마커 성분을 포함하며, 제1 마커 성분은 제1 벡터 중 핵산 서열에 의해 코딩되고, 제2 마커 성분은 제2 벡터 중 핵산 서열에 의해 코딩되며, 제1 마커 및 제2 마커 성분은 회합하는 것인 세포 표면 이종다량체 마커를 또한 제공한다.
- [0045] 제1 및/또는 제2 마커 성분(들)은 회합되지 않은 경우에 불안정할 수 있다.
- [0046] 제2 마커 성분은 제1 마커 성분의 부재하에 세포에 의해 분비될 수 있다.
- [0047] 제3 양태에서, 본 발명은 본 발명의 제2 양태에 따른 이종다량체 마커를 포함하는 세포, 및/또는 본 발명의 제1 양태에 따른 벡터의 키트로 형질도입된 세포를 제공한다.
- [0048] 상기 세포는 면역 세포, 예컨대 T 세포 또는 자연 살해(NK) 세포일 수 있다.
- [0049] 제4 양태에서, 본 발명은 본 발명의 제1 양태에 따른 벡터의 키트로 세포를 형질도입 또는 형질감염시키는 단계를 포함하는, 본 발명의 제3 양태에 따른 세포의 제조 방법을 제공한다.
- [0050] 제5 양태에서, 본 발명은
- [0051] (i) 본 발명의 제1 양태에 따른 벡터의 키트로 세포 샘플을 형질도입 또는 형질감염시키는 단계;
- [0052] (ii) 작용제, 예컨대 세포 분류 시약을 사용하여 이종다량체 마커의 발현을 검출하는 단계; 및
- [0053] (iii) 검출된 세포를 선택 또는 분류하여, 이종다량체 마커를 발현하는 세포의 조성물을 제조하는 단계
- [0054] 를 포함하는, 본 발명의 제3 양태에 따른 세포의 조성물의 제조 방법을 제공한다.
- [0055] 세포 분류 시약은 가용성 재조합 단백질일 수 있고, 세포는 가용성 재조합 단백질을 인식하는 매트릭스를 사용하여 단계 (iii)에서 선택 또는 분류될 수 있다.
- [0056] 세포 분류 시약은 형광 표지된 가용성 재조합 단백질일 수 있고, 세포는 유세포 분석에 의해 단계 (iii)에서 선택 또는 분류될 수 있다.

- [0057] 세포 분류 시약은 비드에 부착된 가용성 제조합 단백질을 수 있고, 세포는 형질도입된/형질감염된 세포 샘플로부터의 비드의 분리에 의해 단계 (iii)에서 선택 또는 분류된다.
- [0058] 제6 양태에서, 본 발명은 본 발명의 제3 양태에 따른 복수의 세포를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0059] 제7 양태에서, 본 발명은 질환의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 본 발명의 제6 양태에 따른 약학 조성물을 제공한다.
- [0060] 제8 양태에서, 본 발명은 본 발명의 제6 양태에 따른 약학 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 질환을 치료 및/또는 예방하는 방법을 제공한다.
- [0061] 상기 방법은,
- [0062] I. 대상체로부터 세포 함유 샘플을 분리하는 단계,
- [0063] II. 세포 함유 샘플을 본 발명의 제1 양태에 따른 벡터의 키트로 형질도입 또는 형질감염시키는 단계,
- [0064] III. 세포 분류 시약을 사용하여 이중다량체 마커의 발현을 검출함으로써, 샘플로부터 형질도입된/형질감염된 세포 집단을 식별하는 단계,
- [0065] IV. (III)의 세포 집단을 선택 또는 분류하여, 형질도입된/형질감염된 세포의 정제된 하위 집단을 얻는 단계, 및
- [0066] V. 이중다량체 마커를 발현하는 (IV)의 하위 집단을 대상체에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0067] 제9 양태에서, 본 발명은 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 의학의 제조에서의 본 발명의 제6 양태에 따른 약학 조성물의 용도를 제공한다.
- [0069] 상기 질환은 암일 수 있다.
- [0070] 본 발명은, 회합시 안정화되는 마커 성분들을 코딩하여, 세포 표면 발현을 할 수 있는 검출 가능한 이중다량체 마커를 형성하는, 벡터의 키트를 제공한다. 세포가 키트의 둘 또는 전부의 벡터로 형질도입되는 경우, 이중다량체 마커는 작용제, 예컨대 세포 분류 시약으로 검출될 수 있는 세포 표면에서 발현된다. 그러나, 세포가 벡터의 서브세트(예를 들어, 하나의 벡터 단독, 또는 3개의 벡터 중 2개)로 형질도입되는 경우, 작용제에 의해 검출될 수 있는 세포 표면에서 마커가 발현되지 않는다.
- [0071] 따라서, 세포 표면에서 단일 마커의 발현을 검출함으로써, 키트 중 모든 벡터로 형질도입된 세포를 식별하는 것이 가능하다. 이는 세포 분류 후 세포의 수율 향상 및 복잡성 감소라는 점에서 다중 마커(즉, 각 벡터마다 하나)의 검출과 관련된 방법에 비해 상당한 이점을 제공한다.
- [0072] 단일 이중다량체 마커의 검출을 포함하는 본 발명의 원리를 이용하여, 다수의 벡터들 사이에서 큰 삽입물을 분할하고, 모든 벡터로 형질도입된 세포를 선택하는 것이 가능하다. 따라서, 모든 삽입물을 함유하는 세포를 식별하고 분류하는 방법의 복잡성을 증가시키지 않으면서, 세포로 형질도입될 수 있는 총 삽입물 크기를 증가시키는 것이 가능하다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0073] 벡터의 키트
- [0074] 본 발명의 제1 양태는 벡터의 키트를 제공한다. 벡터의 키트는 하나 초과와 벡터를 포함한다. 벡터의 키트는 적어도 제1 및 제2 벡터를 포함하고, 한 실시양태에서 벡터의 키트는 제1, 제2 및 제3 벡터를 포함한다. 키트는 2, 3, 4 또는 5 개의 벡터를 함유할 수 있다. 본 발명의 키트에서 벡터의 수는 숙주 세포내로 형질도입하고자 하는 삽입물의 총 크기와 관련되며, 총 삽입물 크기가 큰 경우, 보다 많은 수의 벡터로 분할될 수 있다.
- [0075] 본 발명의 키트의 개별 벡터들은, 세포가 키트의 모든 벡터로 형질도입되는 경우에 숙주 세포내로 개별 핵산 서열을 전달함으로써, 원하는 관심의 폴리펩티드(POI)가 세포에 의해 발현되도록 한다. 예를 들어, 키트는 숙주 세포에서 3개의 POI, 예컨대 제1 CAR, 제2 CAR 및 자살 유전자를 발현할 수 있다.
- [0076] 다수의 벡터들 사이에 완전한 삽입물을 분할하는 것은, 동일한 카세트 내에서 다수의 관심 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터에 비해 이점을 제공한다. 단일 벡터 배열은, 예를 들어 하나의 프로모터가 제2

프로모터를 지배하고 침묵시키는 "프로모터 간섭"으로 인해, 번역 및 전사 효율에 문제가 발생한다. 또한, 상이한 프로모터는 상이한 세포 환경에서 다르게 작동하며, 이는 각각의 형질도입 유전자의 상대적 발현의 일관된 "튜닝"을 달성하기 어렵게 한다.

[0077] 백터

[0078] 백터는 바이러스 백터, 예를 들어 레트로 바이러스 백터 또는 렌티 바이러스 백터일 수 있다.

[0079] 백터는 플라스미드일 수 있다.

[0080] 백터는 또한 트랜스포손 기반의 백터 또는 합성 mRNA일 수 있다. 백터는 면역 세포, 예컨대 T 세포 또는 NK 세포를 형질감염 또는 형질도입시킬 수 있다.

[0081] 레트로 바이러스 백터

[0082] 레트로 바이러스 및 렌티 바이러스는 관심 폴리펩티드(POI) 또는 복수의 POI를 표적 세포내로 전달하기 위한 백터 또는 전달 시스템으로서 사용될 수 있다. 전달은 시험관내, 생체외 또는 생체내에서 일어날 수 있다. 이 방식으로 사용될 때, 바이러스는 일반적으로 바이러스 백터라고 불린다.

[0083] POI는, 예를 들어 T 세포 수용체 또는 키메라 항원 수용체(CAR) 및/또는 자살 유전자를 코딩할 수 있다.

[0084] 통상 레트로 바이러스 백터로 명시되는 감마-레트로 바이러스 백터는 1990년에 유전자 치료 임상 시험에 사용된 최초의 바이러스 백터였으며, 여전히 가장 많이 사용되는 것 중 하나이다.

[0085] 보다 최근에, 복잡한 레트로 바이러스, 예컨대 인간 면역 결핍 바이러스(HIV)로부터 유래된 렌티 바이러스 백터에 대한 관심이, 비분열 세포를 형질도입시키는 그들의 능력으로 인해 커지고 있다.

[0086] 유전자 전달 도구로서 레트로 바이러스 및 렌티 바이러스 백터의 가장 매력적인 특징은, 큰 유전자 페이로드(최대 약 8~10 kb), 최소 환자 면역 반응, 생체내 및 시험관내에서의 높은 형질도입 효율, 및 전달된 유전자의 장기 발현을 지속시키면서 표적 세포의 유전자 내용물을 영구적으로 변형시키는 능력을 포함한다.

[0087] 레트로 바이러스 백터는, 유전자 정보를 진핵 세포에 전달할 수 있는 임의의 적합한 레트로 바이러스를 기초로 할 수 있다. 예를 들어, 레트로 바이러스 백터는 알파 레트로 바이러스 백터, 감마 레트로 바이러스 백터, 렌티 바이러스 백터 또는 스푸마 레트로 바이러스 백터일 수 있다. 이러한 백터는 유전자 요법 치료 및 다른 유전자 전달 적용에 광범위하게 사용되어 왔다.

[0088] 본 발명의 바이러스 백터는 레트로 바이러스 백터, 예컨대 감마-레트로 바이러스 백터일 수 있다. 바이러스 백터는 인간 면역 결핍 바이러스에 기초할 수 있다.

[0089] 본 발명의 바이러스 백터는 렌티 바이러스 백터일 수 있다. 백터는 비영장류 렌티 바이러스, 예컨대 말 전염성 빈혈 바이러스(EIAV)에 기초할 수 있다.

[0090] 마커 성분 및 이중이량체 마커

[0091] 본 발명의 키트의 각각의 백터는 마커 성분을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 제1 백터는 제1 마커 성분을 코딩하는 핵산 서열을 포함하고, 제2 백터는 제2 마커 성분을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다.

[0092] 마커 성분은, 별개의 백터로부터 발현된 제2 상호 마커 성분에 대한 회합이 없이는, 불안정하고 형질도입된 숙주 세포에 의해 세포 표면에서 발현될 수 없다. 상호 마커 성분도 회합 없이는 불안정할 수 있다.

[0093] 회합시, 제1 및 제2 마커 성분(제1 마커에 상호적)은 숙주 세포의 세포 표면에서 발현되는 안정한 이중다량체 복합체를 형성한다.

[0094] 하기는 세포 표면 발현을 할 수 있는 안정하고 검출 가능한 이중이량체 마커를 형성하도록 회합하는 제1 및 제2 마커 성분의 예이다. 회합의 부재하에서는, 제1 및 제2 마커 성분이 불안정하고 세포의 표면에서 발현되지 않는다.

[0095] *CD79a/CD79b*

[0096] CD79(분화 79의 클러스터)는 B 세포 수용체와 복합체를 형성하고 항원 인식 후에 신호를 발생하는 단백질이다.

[0097] CD79는 CD79a 및 CD79b(이전에 Ig-알파 및 Ig-베타로 공지됨)라고 하는 2개의 별개 사슬로 구성되며; 이들은 이황화 결합에 의해 안정화된 B 세포의 표면 상에 이중이량체를 형성한다. CD79a(UniProt: P11912)와

CD79b(UniProt: P40259)는 모두 면역글로불린 슈퍼패밀리의 구성원이다.

- [0098] 두 CD79 사슬 모두는, T 세포 상의 T 세포 수용체 활성화 동안에 관찰되는 CD3에 의해 생성되는 신호 전달과 유사한 방식으로, B 세포에서 신호를 전파하는 데 사용되는 세포내 꼬리에, 면역 수용체 티로신 기반 활성화 모티프(ITAM)를 함유한다.
- [0099] 마커 성분은 CD79a 또는 CD79b로부터의 엑토도메인을 포함할 수 있다. 이들 도메인에 대한 아미노산 서열은 도 5에 제시된다. 벡터의 키트는, CD79a의 엑토도메인을 포함하는 마커 성분을 코딩하는 하나의 벡터, 및 CD79b의 엑토도메인을 포함하는 마커 성분을 코딩하는 다른 벡터를 포함할 수 있다. 하나 또는 다른 마커는, 예를 들어 막관통 서열을 가짐으로써 막 결합되어 있을 수 있다.
- [0100] 이종이량체 마커 배열이 도 1에 도시되어 있으며, 여기서 제1 마커 성분은 CD79a 엑토도메인을 포함하고, 제2 마커 성분은 막관통 도메인에 융합된 CD79b 엑토도메인을 포함한다.
- [0101] 두 벡터 모두에 의한 세포 형질도입이 성공적으로 이루어지면, CD79a 엑토도메인 마커 성분 및 CD79b 엑토도메인 마커 성분(CD19 막관통 도메인을 포함함) 마커가 발현되고 회합되어, 세포의 표면 상에 발현되는 안정한 이종이량체 마커를 형성한다.
- [0102] CD79a 마커 성분 또는 CD79b 마커 성분이 세포에서 단독으로 발현되는 경우, 이들은 불안정하고 세포 표면에서 발현되지 않는다.
- [0103] *IgG1로부터의 CH1/카파 불변 도메인 IgG1*
- [0104] IgG 항체는 복잡한 도메인간 상호 작용이 있는 다중 도메인 단백질이다. 인간 IgG 중쇄는 경쇄와 회합하여, 항원에 결합할 수 있는 성숙한 항체를 형성한다. 경쇄는 카파 또는 감마 이소타입일 수 있다.
- [0105] 중쇄 및 경쇄 불변 도메인의 회합은 안정한 이종이량체를 형성한다. 마커 성분은 중쇄 또는 경쇄 불변 영역을 포함할 수 있다. 카파 사슬 불변 영역 및 IgG1로부터의 CH1 영역에 대한 아미노산 서열은 도 4에 제시되어 있으나, 다른 항체들로부터의 다수의 다른 적합한 서열이 공지되어 있다.
- [0106] 벡터의 키트는, 중쇄 불변 영역을 포함하는 마커 성분을 코딩하는 하나의 벡터, 및 경쇄 불변 영역을 포함하는 마커 성분을 코딩하는 다른 벡터를 포함할 수 있다. 하나 또는 다른 마커는, 예를 들어 막관통 서열을 가짐으로써 막 결합되어 있을 수 있다.
- [0107] 이종이량체 마커 배열이 도 2에 도시되어 있으며, 여기서 제1 마커 성분은 카파 불변 도메인을 포함하고, 제2 마커 성분은 막관통 도메인에 융합된 IgG1로부터의 CH1 도메인을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다.
- [0108] 두 벡터 모두에 의한 세포 형질도입이 성공적으로 이루어지면, 카파 불변 도메인 마커 성분 및 CH1 마커 성분(CD19 막관통 도메인을 포함함) 마커가 발현되고 회합되어, 세포의 표면 상에 발현되는 안정한 이종이량체 마커를 형성한다.
- [0109] 카파 불변 도메인 마커 성분 또는 CH1 마커 성분이 세포에서 단독으로 발현되는 경우, 이들은 불안정하고 세포 표면에서 발현되지 않는다.
- [0110] 표 1은 상기에 기술하지 않은 추가의 마커 쌍을 포함하는, 제1 및 제2 마커 성분의 비제한적 목록을 제시한다. 하기의 제1 및 제2 마커 성분 쌍은 자발적으로 회합하여, 본 발명의 이종이량체 마커를 형성한다.

표 1

| 제 1 마커 성분 | 제 2 마커 성분 |
|-------------------------|--|
| CD79a (UniProt: P11912) | CD79b (UniProt: P40259) |
| 카파 불변 도메인 | IgG1 로부터의 CH1 |
| TRDC (UniProt: B7Z8K6) | TRGC (UniProt: P03986 또는 P03986) |
| CD1A (UniProt: P06126) | Beta-2-microglobulin (UniProt: P61760) |
| TRBC | TRAC |

[0111]

- [0112] 이중삼량체 마커
- [0113] 벡터의 키트는 각각 제1, 제2 및 제3 마커 성분을 코딩하는 제1, 제2 및 제3 벡터를 포함할 수 있다.
- [0114] 마커 성분들 중 하나는, 예를 들어 막관통 도메인을 가짐으로써 막 결합되어 있을 수 있다.
- [0115] 이중삼량체 마커 배열이 도 3에 도시되어 있다. 이 배열에서, 제1 마커 성분은 카파 불변 도메인을 포함하고, 제2 마커 성분은 CD19 막관통 도메인을 갖는 CD79b 엑토도메인을 포함하며, 제3 마커 성분은 IgG1 도메인으로부터의 CH1 도메인에 융합된 CD79a 엑토도메인을 포함한다.
- [0116] 제1 마커 성분 상의 카파 불변 도메인 마커는 제3 마커 성분 상의 IgG1로부터의 CH1 도메인과 회합한다. 제3 마커 성분의 CD79a 엑토도메인은 제2 마커 성분상의 CD79b 엑토도메인과 회합한다. 3개의 모든 마커 성분이 세포에서 발현되는 경우, 카파 불변 도메인을 인식하는 작용제로 세포 표면에서 검출될 수 있는 안정한 이중삼량체 복합체가 형성된다. 마커 성분들 중 단지 하나 또는 임의의 2개가 세포에서 발현되는 경우, 카파 불변 도메인을 인식하는 작용제로 검출될 수 있는 복합체가 세포 표면에 형성되지 않는다.
- [0117] 이중삼량체 마커는 임의의 2개의 자발적으로 회합하는 마커 쌍, 예컨대 표 1에 기재된 마커로부터 형성될 수 있다. 이중삼량체 마커의 형성은 상기 기재된 쌍으로 한정되지 않으며, 다른 자발적으로 회합하는 마커가 구상된다.
- [0118] 이 배열은, 단일 이중삼량체 마커의 검출에 의한, 3개의 별개 벡터 상에서의 3개의 마커 성분의 검출을 효과적으로 가능하게 한다.
- [0119] 3개 초과와 마커 성분을 갖는 이중다량체 마커에 대해 유사한 배열이 가능하다. 예를 들어, 이중다량체 마커는 4개, 5개 또는 그 이상의 마커 성분을 포함할 수 있다. 이중다량체 마커는, 모든 마커 성분이 세포에서 발현될 때, 이중다량체 마커의 일부만을 형성하는 한 마커 성분을 인식하는 작용제에 의해 검출될 수 있다.
- [0120] 가용성, 분비성 및 막 결합형 마커
- [0121] 마커 성분은, 세포의 시토솔에서 자유롭게 확산될 수 있다는 맥락에서, 단독으로 발현될 때 가용성일 수 있다.
- [0122] 마커 성분은, 다른 마커 성분의 부재하에서 세포에 의해 발현될 때에 그 세포에 의해 분비된다는 맥락에서, 분비될 수 있다.
- [0123] 마커 성분은 막에 효과적으로 고정된다는 맥락에서 막 결합되어 있을 수 있다.
- [0124] 막 결합된 마커는, 예를 들어 막관통 도메인, 중지 전달 서열, GPI 앵커 또는 미리스토일화/프레닐화/팔미토일화 부위를 포함할 수 있다.
- [0125] 막관통 도메인은 마커 성분 중 단백질로부터 유래될 수 있거나(예를 들어, CD79a 또는 CD79b의 막관통 도메인), 막관통 도메인을 코딩하는 서열이, 마커 성분을 코딩하는 벡터로 유전자 조작될 수 있다.
- [0126] 탐지 가능한 이중다량체 마커
- [0127] 제1 양태에서, 본 발명은, 각각이 마커 성분을 코딩하는 벡터의 키트를 제공한다. 세포가 키트의 모든 벡터로 형질도입되는 경우, 발현된 마커 성분은 회합되어, 검출 가능한 이중다량체 마커를 형성한다.
- [0128] 제2 양태에서, 본 발명은 형질도입된 세포 집단을 검출하는 데 사용하기 위한 검출 가능한 이중다량체 마커를 제공하며, 여기서 이중다량체 마커는 회합하는 2 이상의 마커 성분을 포함한다.
- [0129] 이중다량체 마커는 2 이상의 마커 성분을 포함하나, 함께 회합하여 안정하고 검출 가능한 이중다량체 마커를 형성하는 3개, 4개 또는 그 이상의 마커 성분을 포함할 수 있다. 이중다량체 마커를 형성하는 1 이상의 마커 성분은 서로 회합되지 않는 경우에 불안정할 수 있다. 예를 들어, CD79a의 엑토도메인을 포함하는 마커 성분 및 CD79b의 엑토도메인을 포함하는 마커 성분은, CD79a 및 CD79b 도메인이 서로 회합되지 않은 경우에 불안정할 수 있다.
- [0130] 용어 '회합하다' 또는 '회합' 또는 '회합된'은 '이량체화하다', '이량체화' 또는 '이량체화된' 및/또는 '결합하다', '결합' 또는 '결합된'과 동의어이다. 회합은 한 마커와 다른 마커 사이의 공유 결합, 예를 들어 이황화 결합을 형성할 수 있다.

- [0131] 이종다량체 마커는 다수의 마커 성분을 포함할 수 있으며, 이들은 이종다량체 마커의 모든 나머지 다른 마커 성분과 회합되지 않는 한, 세포 표면 발현이 불가능하다.
- [0132] 대안적으로, 키트에 의해 코딩된 마커 성분(들) 중 하나 또는 몇몇은 세포 표면 발현 단독이 가능할 수 있는 반면에, 한 마커 성분은 오직 다른 마커(들)와 회합될 때에, 세포 표면에서 발현된다. 이 경우에, 이 후자의 마커 성분을 특이적으로 인식하는 작용제를 사용하여, 세포가 키트의 모든 벡터로 형질도입되었음을 확인한다.
- [0133] 검출 가능한 이종다량체 마커는 마커 성분 중 어느 하나에 특이적인 작용제를 사용하여 검출 가능하다. 상기 작용제는 오직 키트의 다른 마커 성분(들)과 공동 발현되는 경우에 세포 표면에서 발현되는 마커 성분에 특이적이며, 즉, 오직 세포 표면에서 이종다량체 복합체의 일부로서 발현된다.
- [0134] 작용제
- [0135] 본 발명의 이종다량체 마커는, 세포 검출제 또는 세포 분류제와 같은 작용제를 사용하여 검출 가능하다. 본 발명의 목적상, 용어 "세포 분류 시약"은 이종다량체 마커를 발현하는 세포를 식별할 수 있는 작용제를 포함하며, 이는 이종다량체 마커를 발현하는 세포를 식별하고 분류할 수 있는 작용제에 한정되지 않는다.
- [0136] 작용제는, 예를 들어 리간드, 소분자 또는 항체로부터 유래될 수 있다.
- [0137] 작용제는 이종다량체 마커의 마커 성분 중 어느 하나에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0138] 작용제는 가용성인 또는 분비된 마커 성분에 결합할 수 있다. 작용제는, 안정한 세포 표면 발현을 위해 각각 다른 마커 성분의 존재에 의존하는 경우에, 막관통 마커 성분에 결합할 수 있다.
- [0139] 작용제는 CD79a 엑토도메인에 특이적으로 결합할 수 있다(도 1에 도시된 배열을 참조).
- [0140] 작용제는 카파 불변 도메인에 특이적으로 결합할 수 있다(도 2 및 3에 도시된 배열을 참조).
- [0141] 본 발명의 이종다량체 마커를 검출하기 위한 소분자 작용제의 예는 스트렙타비딘이다. 이 경우에, 검출되는 마커 성분은 StrepTag 펩티드를 포함하도록 유전자 조작될 수 있다. StrepTag는 검출되는 마커 성분에 부착될 수 있는 8개의 아미노산(YSHPQFEK - 서열 번호 1)으로 이루어진 합성 펩티드이다. 이 펩티드 서열은 스트렙타비딘에 대해 고유한 친화성을 보인다.
- [0142] StepTag 펩티드의 검출은 친화성 크로마토그래피에 의한 검출을 가능하게 하는 Strep-tag® 시스템을 포함할 수 있다.
- [0143] 이종다량체 마커를 검출하기 위한 작용제의 다른 예는 다음을 포함한다:
- [0144] 1. 검출 가능한 마커 상에서 CH2-CH2를 검출하는 단백질 A;
- [0145] 2. 검출 가능한 마커 상에서 글루타티온 S-트랜스퍼라제(GST)를 검출하는 글루타티온; 또는
- [0146] 3. 검출 가능한 마커 상에서 His 태그를 감지하는 니켈 NTA.
- [0147] 형질도입된 세포 집단의 세포 분류 및 정제
- [0148] 상기 작용제는 형질도입된 세포 집단을 선택 또는 분류하는 데 사용될 수 있다. 이것은, 예를 들어 병태 또는 질환의 치료를 위해 대상체에게 투여하기 전에, 형질도입된 세포를 정제하는 맥락에서 사용될 수 있다.
- [0149] 상기 기술된 바와 같은 작용제, 예컨대 항체, 리간드 또는 소분자에 접합된 자성 나노입자는, 작용제가 결합하는 마커를 발현하는 세포가 강한 자기장에 부착되게 한다. 이 단계에서, 나노입자에 부착된 세포는 컬럼 상에 머무르고, 다른 세포(마커를 발현하지 않는 것)는 통과한다. 이 방식으로, 세포는 특정 마커에 대해 양성 또는 음성으로 분리될 수 있다.
- [0150] 대안적으로, 관심 마커에 대한 형광 표지제가, 이종다량체 마커를 발현하는 세포에 대해서 세포 분리를 위해 제공될 수 있다.
- [0151] 막관통 도메인
- [0152] 막관통 도메인은 막에 걸쳐있는 폴리펩티드의 도메인이다. 본 발명의 마커 성분은 이종다량체 마커가 막 결합되어 있도록 막관통 도메인을 포함할 수 있다.
- [0153] 막관통 도메인은 막에서 열역학적으로 안정한 임의의 단백질 구조일 수 있다. 이것은 일반적으로 몇몇 소수성

잔기로 구성된 알파 나선이다. 막관통 단백질의 막관통 도메인은 본 발명의 막관통 부분을 공급하는 데 사용될 수 있다. 단백질의 막관통 도메인의 존재 및 범위는, TMHMM 알고리즘(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)을 사용하여 당업자에 의해 결정될 수 있다. 인공적으로 설계된 TM 도메인이 또한 사용될 수 있다.

[0154] 막관통 도메인은, 예를 들어 CD19 또는 CD28로부터 유래될 수 있다.

[0155] 신호 서열

[0156] 본 발명의 핵산 서열에 의해 코딩된 마커는, 마커가 세포내에서 회합되고 발현될 때에 발생기의 단백질이 소포체(ER)로 향하도록, 신호 서열을 포함할 수 있다.

[0157] 용어 "신호 서열"은 "신호 펩티드"와 동의어이다.

[0158] 신호 서열은, 분비 경로를 따르도록 정해진 대부분의 새로 합성된 단백질의 N-말단에 존재하는 짧은 펩티드(일반적으로 5~30개 아미노산 길이)이다. 이들 단백질은 특정 소기관(예를 들어, 소포체, 골지 또는 엔도솜) 내에 존재하는 것들을 포함하고, 세포로부터 분비되며, 막관통 단백질이다.

[0159] 신호 서열은 일반적으로 단일 알파-나선을 형성하는 경향이 있는 소수성 아미노산의 긴 스트레치인 코어 서열을 함유한다. 신호 서열은 짧고 양으로 하전된 아미노산 스트레치로 시작될 수 있으며, 이는 전위 동안에 폴리펩티드의 적절한 토폴로지를 강화시키는 것을 돕는다. 신호 서열의 말단에는, 일반적으로 신호 펩티다아제에 의해 인식되고 절단되는 아미노산의 스트레치가 있다. 신호 펩티다아제는 전위의 완료 동안에 또는 완료 후에 절단되어, 유리 신호 서열 및 성숙 단백질을 생성할 수 있다. 이어서, 자유 신호 서열은 특정 프로테아제에 의해 소화된다.

[0160] 일부 카르복시-말단 신호 펩티드가 공지되어 있으나, 신호 서열은 분자의 아미노 말단에 위치하는 것이 일반적이다.

[0161] 신호 서열은 n-영역과 c-영역이 측면에 있는 소수성 코어 영역(h-영역)으로 이루어진 3중 구조를 갖는다. 후자는 신호 펩티다아제(SPase) 컨센서스 절단 부위를 함유한다. 일반적으로, 신호 서열은 동시 번역으로 절단되고, 생성된 절단 신호 서열은 신호 펩티드로 지칭된다.

[0162] 무린 Ig 카파 사슬 V-III 영역으로부터의 신호 펩티드(METD**TLILWV**LLLLVPGSTG의 서열을 가짐)에서, n-영역은 서열 METD를 갖고; h-영역(볼드체로 나타냄)은 서열 **TLILWV**LLLV를 가지며; c-영역은 서열 PGSTG를 갖는다.

[0163] 돌연변이된 신호 서열

[0164] 돌연변이된 신호 서열은 그의 h-영역이 야생형 신호 서열과 상이할 수 있다. 한 폴리펩티드(상대 발현이 더 높은 것)는 h-영역에서 다른 폴리펩티드(상대 발현이 더 낮은 것)보다 많은 소수성 아미노산을 갖는다. 상대 발현을 더 낮은 폴리펩티드의 신호 펩티드는, 상대 발현이 더 낮은 폴리펩티드의 신호 펩티드보다 h-영역에서 소수성 아미노산의 하나 이상의 아미노산 돌연변이, 예컨대 치환 또는 결실을 포함할 수 있다.

[0165] 제1 신호 펩티드 및 제2 신호 펩티드는 실질적으로 동일한 n-영역 및 c-영역을 가질 수 있으나, 상기 설명된 바와 같이 h-영역이 상이할 수 있다. "실질적으로 동일한"은 n-영역과 c-영역이 제1 및 제2 신호 펩티드 사이에서 동일할 수 있거나, 또는 신호 펩티드의 기능에 영향을 미치는 일 없이 n-사슬 또는 c-사슬에서 1, 2 또는 3 개의 아미노산이 상이할 수 있음을 나타낸다.

[0166] 코어 중 소수성 아미노산은, 예를 들어 알라닌(A); 발린(V); 이소류신(I); 류신(L); 메티오닌(M); 페닐알라닌(P); 티로신(Y); 또는 트립토판(W)일 수 있다.

[0167] 신호 펩티드 효율을 변경시키기 위해 돌연변이된 소수성 산은, 상기 목록으로부터의 임의의 것, 특히 발린(V); 이소류신(I); 류신(L); 및 트립토판(W)일 수 있다.

[0168] h-영역의 잔기 중, 하나의 신호 펩티드(예를 들어, 변경된 신호 펩티드)는 다른 신호 펩티드(예를 들어, 변경되지 않은 신호 펩티드)보다 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50% 적은 소수성 아미노산을 포함할 수 있다.

[0169] h-영역이 5~15 개의 아미노산을 포함하는 경우, 하나의 신호 펩티드는 다른 신호 펩티드보다 1, 2, 3, 4 또는 5 개 많은 소수성 아미노산을 포함할 수 있다.

[0170] 변경된 신호 펩티드는 1, 2, 3, 4 또는 5 개의 아미노산 결실 또는 소수성 아미노산의 치환을 포함할 수 있다. 소수성 아미노산은 비소수성 아미노산, 예컨대 친수성 또는 중성 아미노산으로 치환될 수 있다.

- [0171] 류린 Ig 카파 사슬 V-III 영역으로부터의 신호 펩티드에 기초한 마커 성분에 대한 적절한 돌연변이된 신호 서열의 예는 도 8에 열거되어 있다.
- [0172] 소프트웨어 기술을 사용하여 신호 서열을 검출하거나 예측할 수 있다(예를 들어, <http://www.predisi.de/> 참조).
- [0173] 매우 많은 수의 신호 서열이 공지되어 있으며, 데이터베이스에서 입수 가능하다. 예를 들어, <http://www.signalpeptide.de>는 그의 데이터베이스에 2109개의 검증된 포유류 신호 펩티드를 열거하고 있다.
- [0174] 제1 마커의 발현 수준 및 제2 마커의 발현 수준
- [0175] 한 마커 성분의 발현 수준은 다른 마커 성분의 발현 수준과 상이할 수 있다. 이는 W02016/174408에 기재된 바와 같은 하나 이상의 세포내 체류 신호(들)를 사용하거나, 본원 및 W02016/174409에 기재된 바와 같은 대안적인 신호 펩티드를 사용함으로써 얻을 수 있다.
- [0176] 벡터의 키트가 가용성이거나 분비성인 하나 이상의 마커 성분(들) 및 막 결합된 마커 성분을 코딩하는 경우, 막 결합된 마커 성분이 용해성/분비성 마커 성분(들)보다 낮은 수준으로 발현되도록 상대적 발현이 조정될 수 있다.
- [0177] 상이한 신호 펩티드는, 제1 벡터 중의 하나의 관심 폴리펩티드의 발현 수준을 제2 벡터 중의 또 다른 관심 폴리펩티드와 비교하여 조절하는 방법을 제공하며, 여기서 관심 폴리펩티드는 상이한 수준으로 세포에서 발현되는 것이 바람직하다. 관심의 하나의 폴리펩티드 서열의 발현이 다른 것보다 높은 형질도입된 세포 집단을 선택하는 것이 유리할 수 있다.
- [0178] 세포에서 발현된 2개의 폴리펩티드의 차등 발현이 유용한 경우의 예는, 관심의 하나의 폴리펩티드가 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 유전자 조작된 T 세포 수용체(TCR)이고, 관심의 다른 폴리펩티드가 자살 유전자인 경우이다. 자살 유전자는, 예를 들어 독성에 대항하여, CAR- 또는 TCR-발현 세포를 사멸시키기 위한 메커니즘을 제공하는 "오프-스위치"로서 작용한다. 자살 유전자는 세포를 사멸시키는 데 더욱 효과적일 수 있으며, 이때 이것은 형질도입된 세포에서 CAR 또는 TCR 보다 높은 수준으로 존재하는 경우에 발현된다.
- [0179] 관심의 폴리펩티드와 동일한 구축물에서 발현되는 마커 성분의 발현 수준을 변경함으로써, 동일한 구축물로부터 발현되는 보다 높은 수준의 POI의 발현의 척도인, 보다 높은 수준의 마커 성분을 발현하는 형질도입된 세포에 대한 세포 식별 및 분류를 왜곡시킬 수 있다.
- [0180] 관심 폴리펩티드(POI)
- [0181] 본 발명의 POI는, 형질도입된 세포 집단에서 발현되는 것이 바람직한 임의의 폴리펩티드일 수 있다. POI는, 예를 들어 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 유전자 조작된 T 세포 수용체(TCR)일 수 있다. POI는 자살 유전자를 코딩하는 폴리펩티드일 수 있다.
- [0182] 세포
- [0183] 본 발명의 벡터의 키트로 형질도입 또는 형질감염된 세포가 제공된다.
- [0184] 세포는 세포 용해 면역 세포, 예컨대 T 세포 또는 NK 세포일 수 있다.
- [0185] T 세포 또는 T 림프구는 세포 매개 면역에서 중심적인 역할을 하는 림프구의 유형이다. 이들은, 세포 표면 상의 T 세포 수용체(TCR)의 존재에 의해, 다른 림프구, 예컨대 B 세포 및 자연 살해 세포(NK 세포)와 구별될 수 있다. 이하에 요약된 바와 같이 다양한 유형의 T 세포가 있다.
- [0186] 헬퍼 T 헬퍼 세포(TH 세포)는, B 세포로부터 형질 세포 및 기억 B 세포로의 성숙, 및 세포 독성 T 세포 및 대식 세포의 활성화를 포함하는 면역학적 과정에서 다른 백혈구들을 보조한다. TH 세포는 그의 표면에서 CD4를 발현한다. TH 세포는, 항원 제시 세포(APC)의 표면에 MHC 클래스 II 분자에 의해 펩티드 항원이 제시될 때 활성화된다. 이들 세포는 TH1, TH2, TH3, TH17, Th9 또는 TFH를 비롯한 여러 하위 유형 중 하나로 분화될 수 있으며, 이들은 상이한 사이토카인을 분비하여 상이한 유형의 면역 반응을 촉진한다.
- [0187] 세포 용해성 T 세포(TC 세포 또는 CTL)는 바이러스 감염된 세포 및 종양 세포를 파괴하고, 또는 이식 거부에 연관된다. CTL은 그의 표면에서 CD8을 발현한다. 이들 세포는 모든 핵 세포의 표면에 존재하는 MHC 클래스 I과 관련된 항원에 결합함으로써 그들의 표적을 인식한다. 조절 T 세포에 의해 분비되는 IL-10, 아데노신 및 다른 분자를 통해, CD8+ 세포는 무력적인 상태로 불활성화될 수 있으며, 이는 자가 면역 질환, 예컨대 실험적 자가 면

역 뇌척수염을 예방한다.

- [0188] 기억 T 세포는 감염이 해결된 후에 장기간 지속되는 항원 특이적 T 세포의 서브세트이다. 이들은 관련 항원에 재노출될 때에 다수의 이펙터 T 세포로 신속히 증식되어, 과거 감염에 대한 "기억"을 면역 시스템에 제공한다. 기억 T 세포는 3가지 하위 유형, 즉, 중앙 기억 T 세포(TCM 세포) 및 2가지 유형의 이펙터 기억 T 세포(TEM 세포 및 TEMRA 세포)를 포함한다. 메모리 셀은 CD4+ 또는 CD8+일 수 있다. 기억 T 세포는 일반적으로 세포 표면 단백질 CD45RO를 발현한다.
- [0189] 이전에 억제 T 세포로 공지된 조절 T 세포(Treg 세포)는 면역학적 내성을 유지하는 데 중요하다. 그들의 주요 역할은 면역 반응의 말기에 대하여 T 세포 매개 면역을 차단하고, 흉선에서 음성 선택의 과정을 벗어나는 자동 반응성 T 세포를 억제하는 것이다.
- [0190] CD4+ Treg 세포의 2가지 주요 부류, 즉, 자연 발생 Treg 세포 및 적응성 Treg 세포가 기술되었다.
- [0191] 자연 발생 Treg 세포(CD4+CD25+FoxP3+ Treg 세포로도 공지됨)는 흉선에서 발생하며, TLP가 TSLP로 활성화된 골수성(CD11c+) 및 형질 세포질(CD123+) 수지상 세포 모두와 T 세포를 발달시키는 것 사이의 상호 작용과 관련이 있다. 자연 발생 Treg 세포는 FoxP3이라는 세포내 분자의 존재에 의해 다른 T 세포와 구별될 수 있다. FOXP3 유전자의 돌연변이는 조절 T 세포 발달을 방지하여, 치명적인 자가 면역 질환 IPEX를 유발할 수 있다.
- [0192] 적응성 Treg 세포(Tr1 세포 또는 Th3 세포로도 공지되어 있음)는 정상적인 면역 반응 동안에 발생할 수 있다.
- [0193] 세포는 자연 살해 세포(또는 NK 세포)일 수 있다. NK 세포는 선천적 면역계의 일부를 형성한다. NK 세포는 MHC 독립적 방식으로 바이러스 감염된 세포로부터의 선천적 신호에 대해 신속한 반응을 제공한다.
- [0194] NK 세포(선천성 림프구의 군에 속함)는 큰 과립 림프구(LGL)로 정의되며, B 및 T 림프구를 생성하는 일반적인 림프구 전구체로부터 분화된 3가지 종류의 세포를 구성한다. NK 세포는 골수, 림프절, 비장, 편도선 및 흉선에서 분화되고 성숙한 다음, 순환계로 유입되는 것으로 공지되어 있다.
- [0195] 본 발명의 세포는 상기 언급된 임의의 세포 유형일 수 있다.
- [0196] 형질도입된 세포는 생체외에서 환자 자신의 말초 혈액(제1 파티)으로부터, 또는 공여자 말초 혈액(제2 파티)으로부터의 조혈 줄기 세포 이식의 셋팅에서, 또는 연관되지 않은 공여자로부터의 말초 혈액(제3 파티)으로부터 생성될 수 있다.
- [0197] 대안적으로, 세포는 유도성 전구 세포 또는 배아 전구 세포의, 예를 들어 T 또는 NK 세포로의 생체외 분화로 부터 유래될 수 있다. 대안적으로, 그의 용해 기능을 유지하고 치료제로서 작용할 수 있는 불멸화된 T 세포주가 사용될 수 있다.
- [0198] 이들 모든 실시양태에서, 마커 및 POI 발현 세포는, 바이러스 벡터에 의한 형질도입, DNA 또는 RNA에 의한 형질 감염을 포함하는 많은 수단 중 하나에 의해, 마커 및 POI에 대해 DNA 또는 RNA 코딩을 도입함으로써 생성된다.
- [0199] 본 발명의 세포는 대상체로부터의 생체외 세포일 수 있다. 세포는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 샘플로부터 유래될 수 있다. 이러한 세포는, 예를 들어 항-CD3 단일 클론 항체로 처리함으로써, 본 발명의 제1 양태에 따른 벡터의 키트를 제공하는 분자를 코딩하는 핵산으로 형질도입되기 전에 활성화 및/또는 증식될 수 있다.
- [0200] 본 발명의 세포는,
- [0201] (i) 상기 열거된 대상체 또는 다른 공급원으로부터 세포 함유 샘플을 단리하는 것; 및
- [0202] (ii) 본 발명의 제1 양태에 따른 벡터의 키트로 세포를 형질도입 또는 형질감염시키는 것
- [0203] 에 의해 제조될 수 있다.
- [0204] 약학적 조성물
- [0205] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 복수의 세포를 함유하는 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0206] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 추가로 포함할 수 있다. 약학적 조성물은 임의로 하나 이상의 추가의 약학적 활성 폴리펩티드 및/또는 화합물을 포함할 수 있다. 이러한 제제는, 예를 들어 정맥내 주입에 적합한 형태일 수 있다.
- [0207] 치료 방법

- [0208] 본 발명은 본 발명의 세포를 (예를 들어, 상기 기재된 바와 같은 약학 조성물로) 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 질환을 치료 및/또는 예방하는 방법을 제공한다.
- [0209] 질환을 치료하는 방법은 본 발명의 세포의 치료적 용도에 관한 것이다. 본원에서, 세포는 질환과 관련된 적어도 하나의 증상을 완화, 감소 또는 개선시키고/시키거나, 질환의 진행을 늦추거나, 감소시키거나, 차단하기 위해서 기존 질환 또는 병태를 갖는 대상체에게 투여될 수 있다.
- [0210] 질환을 예방하는 방법은 본 발명의 세포의 예방적 용도에 관한 것이다. 본원에서, 이러한 세포는 질환에 아직 걸리지 않았고/않았거나 질환의 어떠한 증상도 나타내지 않는 대상체에게, 질환의 원인을 예방 또는 저해하기 위해 또는 질환과 관련된 적어도 하나의 증상의 발생을 감소시키거나 예방하기 위해 투여될 수 있다. 대상체는 질환의 소인이 있거나, 질환의 발병 위험이 있는 것으로 생각될 수 있다.
- [0211] 상기 방법은,
- [0212] I. 대상체로부터 세포 함유 샘플을 분리하는 단계,
- [0213] II. 세포 함유 샘플을 본 발명의 벡터의 키트로 형질도입 또는 형질감염시키는 단계,
- [0214] III. 작용제를 사용하여 이종다량체 마커의 발현을 검출함으로써, 샘플로부터 형질도입된 세포 집단을 식별하는 단계,
- [0215] IV. (III)의 세포 집단을 선택 또는 분류하여, 정제된 하위 집단을 얻는 단계, 및
- [0216] V. 이종다량체 마커를 발현하는 (IV)의 하위 집단을 대상체에게 투여하는 단계
- [0217] 를 포함할 수 있다.
- [0218] 본 발명은 질환의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 세포 조성물을 제공한다.
- [0219] 본 발명은 또한 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 약제의 제조에서의, 상기 기술된 바와 같은 형질도입된 세포의 집단을 포함하는 약학적 조성물의 용도에 관한 것이다.
- [0220] 본 발명의 방법에 의해 치료 및/또는 예방되는 질환은 암성 질환, 예컨대 급성 림프모구성 백혈병(ALL), 만성 림프모구성 백혈병(CLL), 방광암, 유방암, 대장암, 자궁내막암, 신장암(신장 세포), 백혈병, 폐암, 흑색종, 비호지킨 림프종, 췌장암, 전립선암 및 갑상선암일 수 있다.
- [0221] 본 발명의 세포는 표적 세포, 예컨대 암 세포를 사멸시킬 수 있다. 표적 세포는 표적 세포 부근의 종양 분비 리간드 또는 케모카인 리간드의 존재를 특징으로 할 수 있다. 표적 세포는 표적 세포 표면에서 종양 연관 항원(TAA)의 발현과 함께 가용성 리간드의 존재를 특징으로 할 수 있다.
- [0222] 본 발명의 세포 및 약학 조성물은 상기 기술된 질환의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 것일 수 있다.
- [0223] 본 발명의 세포 및 약학 조성물은 상기 기재된 방법 중 임의의 방법에서 사용하기 위한 것일 수 있다.
- [0224] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 더 설명할 것이며, 실시예는 본 발명을 수행하는 데 있어서 당업자에게 도움을 주기 위한 것이고 본 발명의 범위를 어떠한 방식으로든 제한하려는 것은 아니다.
- [0225] [실시예]
- [0226] **실시예 1: 이중 형질도입된 T 세포 상의 이종이량체 마커의 표면 발현**
- [0227] 카파 불변 도메인 마커 성분을 코딩하는 제1 벡터, 2A 펩티드 절단 부위 및 증강된 녹색 형광 단백질(Kappa-2A-eGFP)을, IgG1로부터의 CH1 도메인과 CD19 막관통 도메인과의 융합체인 마커 성분을 코딩하는 제2 벡터, 2A 펩티드 절단 부위 및 mTagBFP2 유전자(CH1CD19TM-2A-mTagBFP2)와 1:1 비로 혼합하여, T 세포를 형질도입시키는 데 사용한다. 생성된 형질도입된 T 세포는 제1 벡터 단독(eGFP 양성) 또는 제2 벡터 단독(mTagBFP2 양성)으로 형질도입되거나 두 벡터 모두(eGFP 및 mTagBFP2에 양성)로 이중 형질도입된 세포의 혼합물이다.
- [0228] 그 세포 혼합물을 APC에 접합된 항-카파 항체로 염색하며, 그 결과, 이종이량체 마커의 표면 발현은 이중 형질도입된 T 세포(예를 들어, eGFP 및 mTagBFP2에 대해 이중 양성인 세포)에만 존재함이 나타난다. 생성된 안정한 이종이량체 마커는 도 2에 도시된 바와 같다.
- [0229] 이중 형질도입된 세포를 항-카파 자기 비드를 사용하여 정제하고, 유세포 분석(FAC 분석)에 의해 eGFP 및 mTagBFP2에 대해 이중 양성인 세포의 백분율을 관찰함으로써 순도를 분석한다.

- [0230] 음성 대조군으로서, T 세포를 단지 하나의 벡터(제1 또는 제2 벡터)로 형질도입시키고, APC에 접합된 항-카파 항체로 염색한다. T 세포 중 어느 것도 불안정한 카파 마커를 발현 할 수 없는데, 단일 벡터의 마커는 회합 및 안정화될 수 없기 때문이다. 대조 실험에서, APC에 접합된 항-카파 항체는 세포 중 어느 것과도 결합할 수 없는데, 이들이 마커를 발현 할 수 없기 때문이다.
- [0231] **실시예 2: 삼중 형질도입된 T 세포 상의 이중삼량체 마커의 표면 발현**
- [0232] 제1 벡터, 제2 벡터 및 제3 벡터를 1:1:1 비로 함께 혼합하고, T 세포를 형질도입시키는 데 사용한다. 제1 벡터는 Kappa 불변 도메인과 IgG1로부터의 CH1 도메인과의 융합체인 마커 성분, 2A 절단 부위, 및 eGFP(Kappa-2A-eGFP)를 코딩한다. 제2 벡터는 IgG1로부터의 CH1 도메인과 CD19 막관통 도메인의 융합체인 마커 성분, 2A 절단 부위 및 mTagBFP2 유전자(CD79b-CD19TM-2A-mTagBFP2)를 코딩한다. 제3 벡터는 af 카파 불변 도메인인 마커 성분, 2A 펩티드 절단 부위 및 mKate2(CH1-CD79a-2A-mKate2)를 코딩한다.
- [0233] 생성된 형질도입된 T 세포는 제1 벡터 단독(eGFP 양성), 제2 벡터 단독(mTagBFP2 양성), 제3 벡터 단독(mKate2), 또는 3개의 이용 가능한 벡터 중 2개(예를 들어, eGFP 및 mTagBFP2에 양성; 또는 mKate2 및 mTagBFP2에 양성)로 형질도입된 세포의 혼합물이다.
- [0234] T 세포의 혼합물을 APC에 접합된 항-카파 항체로 염색하며, 그 결과, 이중삼량체 마커의 표면 발현은 삼중 형질도입된 T 세포(예를 들어, eGFP, mTagBFP2 및 mKate2에 삼중 양성인 세포)에만 존재함이 나타난다. 생성된 안정한 이중삼량체 마커는 도 3에 도시된 마커이다.
- [0235] 이어서, 삼중 형질도입된 세포 집단을, 항-카파 자성 비드를 사용하여 정제함으로써 세포의 하위 집단을 형성하고, 유세포 분석(FACS 분석)에 의해 eGFP, mTagBFP2 및 mKate2에 삼중 양성인 세포의 백분율을 관찰함으로써 순도를 분석한다.
- [0236] 음성 대조군으로서, T 세포를 상기 벡터 중 하나 또는 둘로 형질도입한다. 이것은 제1 벡터 또는 제2 벡터, 또는 제1 벡터와 제2 벡터 중 하나일 수 있으나, 그에 한정되지는 않는다. 대조군 혼합물은 APC에 접합된 항-카파 항체로 염색한다.
- [0237] 삼중 형질도입된 세포와 대조적으로, T 세포 중 어느 것도 불안정한 카파 마커를 발현할 수 없는데, 단일 또는 이중 벡터(들)의 마커가 완전히 회합할 수 없어서 세포에서 안정화되거나 발현할 수 없기 때문이다. 대조 실험에서, APC에 접합된 항-카파 항체는 세포 중 어느 것과도 결합할 수 없다.
- [0238] **실시예 3: 한 폴리펩티드 서열이 다른 폴리펩티드 서열에 대해 차등 발현 수준을 갖는 세포의 우선적 선택.**
- [0239] 마커 성분 및 키메라 항원 수용체(Kappa-2A-CAR)를 코딩하는 제1 벡터와, 마커 성분 및 자살 유전자 RapCasp9(CH1CD19TM-2A-RapCasp9)를 코딩하는 제2 벡터를 갖는 키트로 세포 샘플을 형질도입한다. RapCasp9 자살 유전자는 WO2016/151315에 기술되어 있다. 제2 벡터는 마커 성분 서열의 상류에서 돌연변이된 신호 서열, 예를 들어 CH1CD19TM을 포함한다. 돌연변이된 신호 서열은 도 8에 열거된 차선의 신호 서열 중 어느 하나일 수 있다.
- [0240] 돌연변이된 신호 서열은, 세포에서 제1 벡터에 의해 코딩된 카파 마커의 발현 수준과 비교하여, 제2 벡터에 의해 코딩된 다운스트림 CH1CD19TM 마커의 발현 수준을 감소시킨다. 제1 및 제2 마커의 회합은 1:1 비여야 하므로, CAR의 발현 수준과 비교하여 높은 수준의 자살 유전자 RapCasp9를 발현하는 세포에 대해 선택이 왜곡된다. 이는, RapCasp9와 같은 자살 유전자가, 그들의 발현 수준이 CAR의 발현 수준보다 세포에서 높은 경우에 더욱 효과적일 수 있기 때문에 유용하다.
- [0241] **실시예 4: 293T 세포 및 1차 인간 T 세포에서의 이중이량체 및 이중삼량체 마커의 표면 발현.**

표 2

| 사슬 | 구축물 |
|--------|---|
| 벡터 1 | SFGmR.aCD19_HD37_LC-2A-RQR8 |
| 벡터 2 | SFGmR.eGFP-2A-aCD19_HD37_Fab_H-CD28TM-41BBz |
| 벡터 3 | SGF.V5-full_human_CD19ecto-9xHis.I.eBFP |
| 양성 대조군 | SFGmR.aCD19_HD37_Fab_H-CD28TM-41BBz-2A-RQR8 |

[0242]

[0243]

293T 세포를 이중이량체 마커의 각각의 사슬(벡터 1 또는 벡터 2)로 단독으로 형질감염시키고, 둘 다(벡터 1과 벡터 2)로 이중 형질감염시켰다. 벡터 구축물에 대해서는 표 2를 참조한다.

[0244]

gag-pol에 대한 플라스미드 코딩(pEQ-Pam3-E36), RD114 외피에 대한 플라스미드 코딩(RDF37), 및 원하는 레트로 바이러스 전이 벡터 플라스미드와 함께, GeneJuice(Millipore)를 사용하여 293T 세포의 일시적 형질감염을 수행하였다. 바이러스 상청액을 48시간 및 72시간에 수집하고, 293T 세포를 형질감염 효율을 위해 염색하였다. 공배양을 설정한 경우, 293T 세포를 형질감염 48시간 후에 계수하고, 이중이량체 마커에 대한 염색 전에 다른 24 시간 동안 1:1 비로 플레이팅하였다.

[0245]

이중 형질감염된 세포에서 이중이량체 마커의 성공적인 조립을, 항-인간 카파 사슬 항체, 항-인간 Fab 항체로 염색하고, 도 9a에 도시된 가용성 CD19를 사용하며, 표준 표면 염색 프로토콜을 이용하여, 유세포 분석에 의해 평가하였다. 1×10^5 세포를 둥근 바닥 96웰 플레이트에서 염색하였다. 표면 항체를 염색 완충액(PBS 중 1% FBS)으로 희석하고, 샘플당 100 μ l로 세포에 첨가하였다. 다음의 항체들을 제조사의 프로토콜에 따라 사용하였다: 항-CD34 APC 또는 PE(클론 QBEnd10, R&D 시스템), 항-Kappa APC(BD Biosciences), 항-인간 Fab APC(Jackson ImmunoResearch), 항-His PE(Abcam).

[0246]

이중이량체 마커의 두 사슬을 모두에 대한 플라스미드 코딩을 양성 대조군으로 사용하였다.

[0247]

마찬가지로, 1차 인간 T 세포 형질도입 실험(4개의 건강한 공여자 샘플을 사용함)에서, 이중이량체 마커의 선택적 발현은 단일 형질도입된 T 세포에서 검출된 최소 배경을 갖는 이중 형질도입된 T 세포에서만 발생한다는 것이 입증되었다. 도 9b를 참조한다.

[0248]

말초 혈액 단핵 세포를 Ficoll(GE Healthcare) 구매 원심분리에 의해 분리하고, 항-CD3/28 항체에 의해 50 ng/mL로 자극하였다. 인터루킨-2(IL-2) 보충물(100 IU/mL)을 하룻밤 동안의 자극 후에 첨가하였다. 3일째에, T 세포를 회수하고, 레트로벡터 및 레트로 바이러스 상청액에 플레이팅하고, 1000 g에서 40분 동안 원심분리하였다. 형질도입 효율은 상기 기술한 바와 같이 유세포 분석을 이용하여 5일 후에 평가하였다.

[0249]

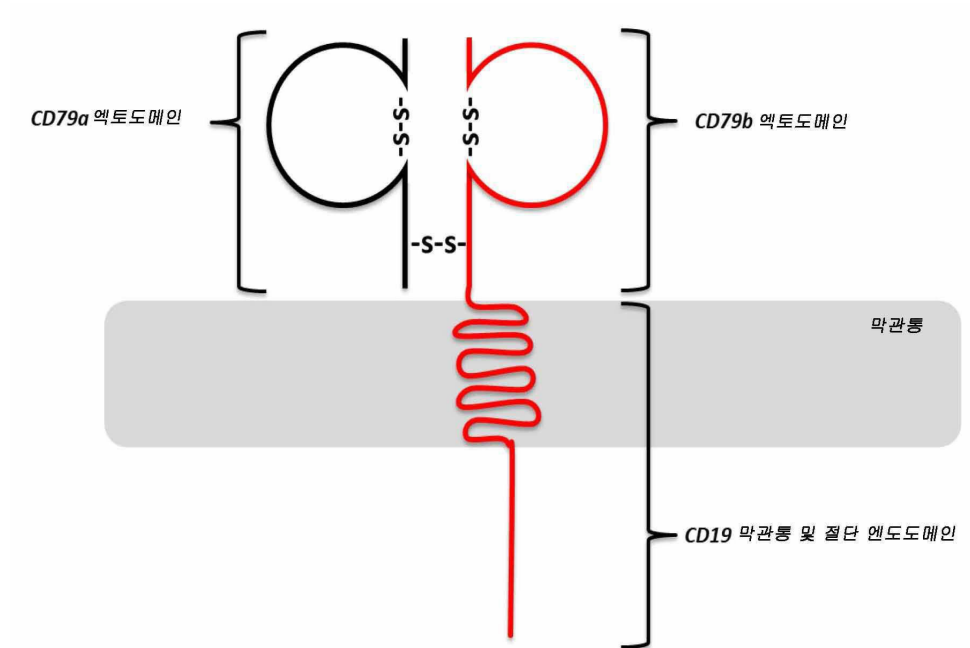
도 9c는, 상기 기술한 형질감염 방법을 이용하여, 이중삼량체 마커(벡터 1, 벡터 2 및 벡터 3)의 각각의 사슬로 단독으로 형질감염된 293T 세포, 이중 형질감염(벡터 1 및 벡터 2)된 293T 세포, 및 이중삼량체 마커의 세 모든 사슬(벡터 1 및 벡터 2 및 벡터 3)로 삼중 형질감염된 293T 세포를 도시한다. 표 2에 제시한 바와 같은 벡터 1, 벡터 2 및 벡터 3 구축물을 사용하였다. 이중삼량체 마커의 성공적인 조립은, 상기 기술한 바와 같이 유세포 분석을 이용하여 가용성 CD19에 대한 염색에 의해 평가하였다.

[0250]

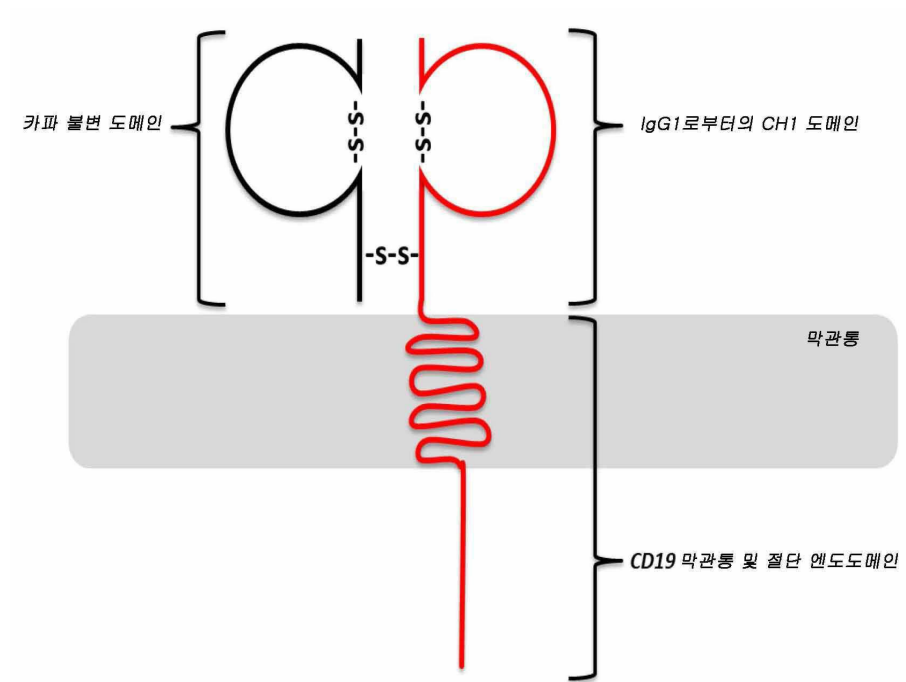
상기 명세서에서 언급된 모든 공보들은 본원에 참고로 인용되어 있다. 기술된 본 발명의 방법 및 시스템의 다양한 변형 및 변경은, 본 발명의 범위 및 사상을 벗어나지 않으면서 당업자에게 명백해질 것이다. 본 발명을 특정의 바람직한 실시양태와 관련하여 설명하였으나, 청구된 본 발명이 이러한 특정 실시양태에 과도하게 한정되어서는 안된다는 것이 이해되어야 한다. 사실은, 분자 생물학 또는 관련 분야의 당업자에게 명백한 본 발명을 수행하기 위한 기술된 모드의 다양한 변형은, 하기 청구범위의 내에 속하는 것으로 의도된다.

도면

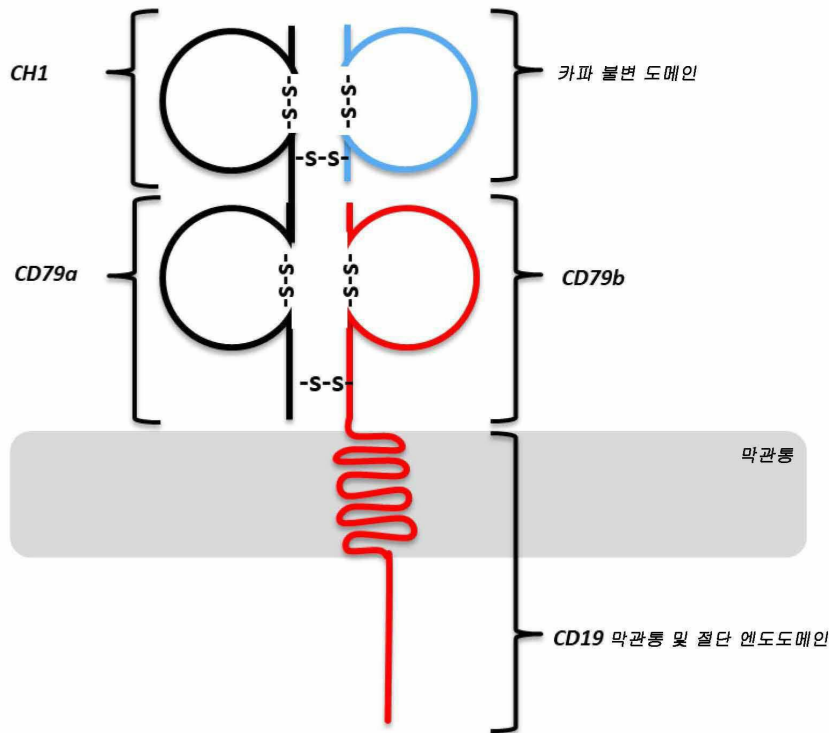
도면1



도면2



도면3



도면4

벡터 1에 의해 코딩된 아미노산 서열

eGFP:

MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKICTTGKLPVPWPTLVTTLT
GVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKE
DGNILGHKLEYNYNHNHNYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDPVLLPDNH
YLSTQSALSADPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYKRA (서열번호 2)

2A: EGRGSLTTCGDVEENPGP (서열번호 3)

신호 펩티드: MSGWSCILFLVATATGVHS (서열번호 4)

카파 사슬:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECRA (서열번호 5)

벡터 2에 의해 코딩된 아미노산 서열

mTagBFP2:

MVSKGEELIKENMHMKLYMEGTVDNHHFKCTSEGEKPYEGTQTMRIKVVVEGGPLPFAFDILATSF
LYGSKTFINHTQGIPDFKQSFPEGFTWERVTYEDGGVLTATQDTSIQDGLIYNVKIRGVNFTSN
GPVMQKKTLGWAEFTETLYPADGGLEGRNDMALKLVGGSHLIANAKTTYRSKPAKNLKMGPVYY
VDYRLERIKEANNETYVEQHEVAVARYCDLPSKLGHLN (서열번호 6)

2A: EGRGSLTTCGDVEENPGP (서열번호 3)

신호 펩티드: METDTLILWVLLLVPGSTG (서열번호 7)

CH1:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSL
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV (서열번호 8)

CD19TM: AVTLAYLIFCLCSLVGILHL (서열번호 9)

dCD19: QRALVLRKRKRMTDPTRR (서열번호 10)

도면5

벡터 1에 의해 코딩된 아미노산 서열

eGFP:

MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLT
GVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKE
DGNILGHKLEYNNSHNHYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNH
YLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYKRA (서열번호 2)

2A:

EGRGSLLTCGDVEENPGP (서열번호 3)

신호 펩티드:

METDTLILWLLLLVPGSTG (서열번호 7)

CH1:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV (서열번호 8)

CD79a:

LWMHKVPASLMVSLGEDAHFQC PHNSSNNANVTWVRVLHGNYTWPEFLGPGEDPNGTLIIQNV
NKSHGGIYVCRVQEGNESYQQSCGTYLVRQPPRPFLDMGEGTKNR (서열번호 11)

벡터 2에 의해 코딩된 아미노산 서열

mTagBFP2:

MVSKGEELIKENMHMKLYMEGTVDNHHFKCTSEGEKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILATSF
LYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTYEDGGVLTATQDTS LQDGCLINVKIRGVNFTSN
GPVMQKKT LGWEAFTETLYPADGGLEGRNDMALKLVGGSHLIANA KTTYRSKKPAKNLKM PGVYY
VDYRLERIKEANNETYVEQHEVA VARYCDLPSKLGHKLN (서열번호 6)

2A:

EGRGSLLTCGDVEENPGP (서열번호 3)

신호 펩티드:

METDTLILWLLLLVPGSTG (서열번호 7)

CD79b:

ARSEDYRNPKGSACSRWQSPRFIARKRGFTVKMHCYMNASGNVSWLWKQEMDENPQQLKL
EKGRMEESQNESLATLIQGI RFEDNGIYFCQQKCNNTSEVYQCGTEL RVMGFSTLAQLKQRNTL
KD (서열번호 12)

CD19TM:

AVTLAYLIFCLCSLVGILHL (서열번호 9)

dCD19:

QRALVLRKRKRMTDPTRR (서열번호 10)

벡터 3에 의해 코딩된 아미노산 서열

mKate2:

SELIKENMHMKLYMEGTVNNHHFKCTSEGEKPYEGTQTMRIKAVEGGPLPFAFDILATSFMYGSK
TFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTYEDGGVLTATQDTS LQDGCLINVKIRGVNFPSNGPVM
QKKT LGWEASTETLYPADGGLEGRADMALKLVGGGHLCNLKTTYRSKKPAKNLKM PGVYYVDRR
LERIKEADKETYVEQHEVA VARYCDLPSKLGHR (서열번호 13)

2A:

EGRGSLLTCGDVEENPGP (서열번호 3)

신호 펩티드:

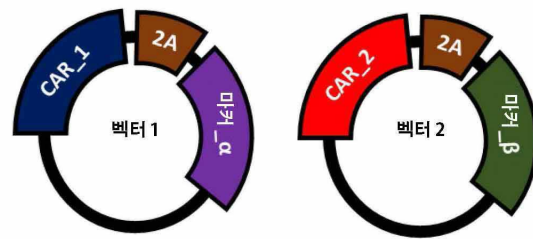
MSGWSCILFLVATATGVHS (서열번호 4)

카파 불변 사슬:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECRA (서열번호 5)

도면6

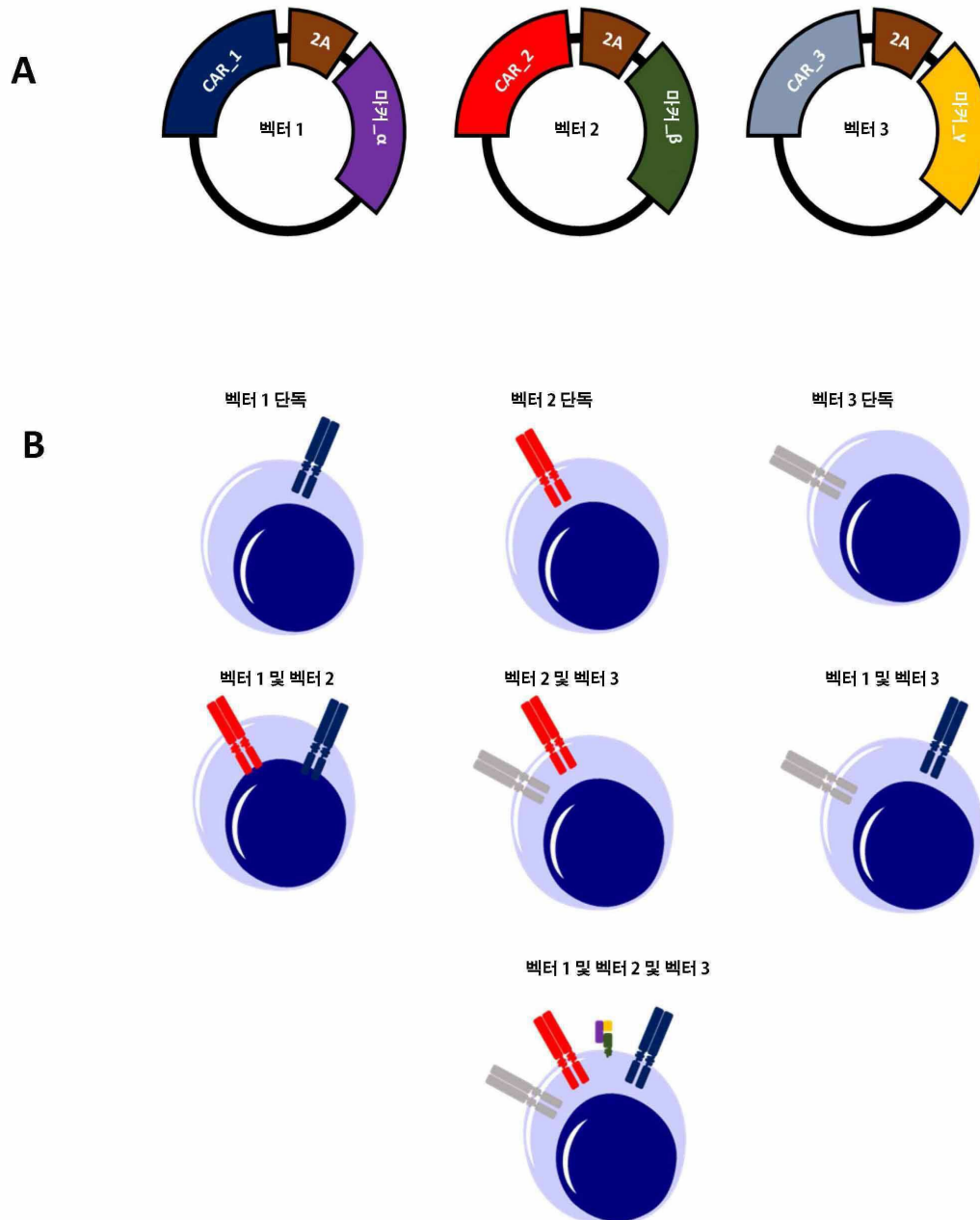
A



B



도면7



도면8

WT: METDTLILWLLLLVPGSTG (서열번호 7)

돌연변이 1: METDTLILWLLLLVPGSTG (서열번호 14)

돌연변이 2: METDTLILWLLVPGSTG (서열번호 15)

돌연변이 3: METDTLILWLVPGSTG (서열번호 15)

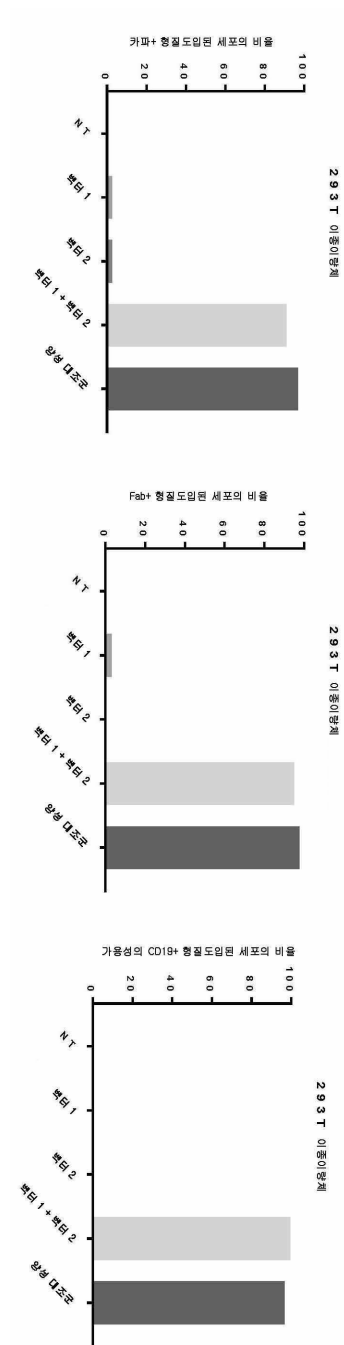
돌연변이 4: METDTLILWLVPSTG (서열번호 17)

돌연변이 5: METDTLILLVPGSTG (서열번호 18)

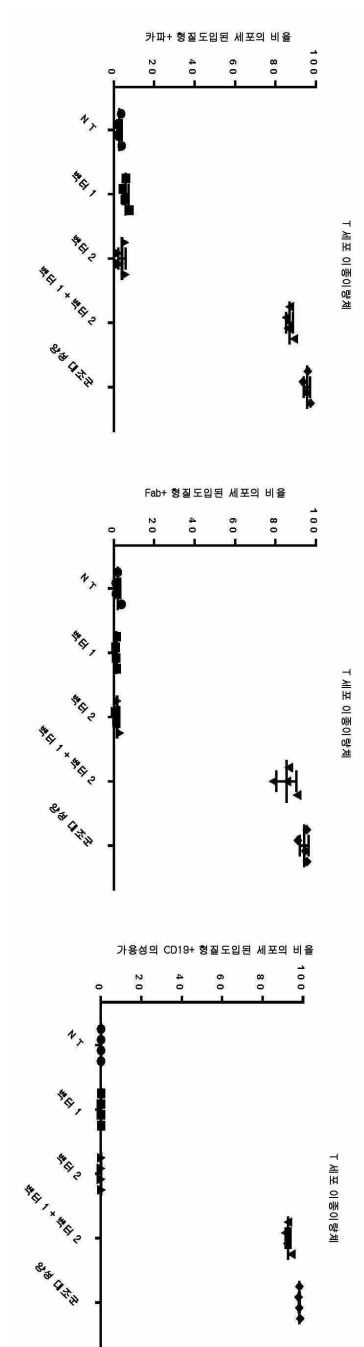
돌연변이 6: METDTLILVPGSTG (서열번호 19)

돌연변이 7: METDTLLVPGSTG (서열번호 20)

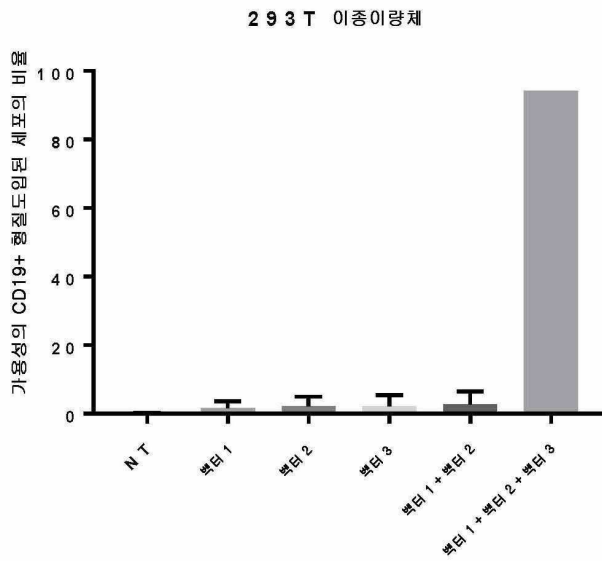
도면9a



도면9b



도면9c



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Autolus Limited

<120> VECTORS

<130> P113572PCT

<150> GB 1718088.6

<151> 2017-11-01

<160> 23

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> StrepTag synthetic peptide

<400> 1

Tyr Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

1 5

<210> 2

<211> 241

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> eGFP sequence encoded by vector 1

<400> 2

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu

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

65 70 75 80
Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95
Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 100 105 110
Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 115 120 125
Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr

130 135 140
Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
145 150 155 160
Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
 165 170 175
Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
 180 185 190
Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu

195 200 205
Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
210 215 220
Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Arg

225 230 235 240

Ala

 $\langle 210 \rangle$ 3

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2A sequence encoded by vector 1

<400> 3

Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro

1 5 10 15

Gly Pro

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> signal peptide sequence encoded by vector 1

<400> 4

Met Ser Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr

1 5 10 15

Gly Val His Ser

20

<210> 5

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Kappa chain sequence encoded by vector 1

<400> 5

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Arg Ala
 100 105

<210> 6

<211> 237

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mTagBFP2 sequence encoded by vector 2

<400> 6

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met His Met Lys

1 5 10 15
 Leu Tyr Met Glu Gly Thr Val Asp Asn His His Phe Lys Cys Thr Ser
 20 25 30
 Glu Gly Glu Gly Lys Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Met Arg Ile Lys
 35 40 45
 Val Val Glu Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Phe Asp Ile Leu Ala Thr
 50 55 60
 Ser Phe Leu Tyr Gly Ser Lys Thr Phe Ile Asn His Thr Gln Gly Ile
 65 70 75 80
 Pro Asp Phe Phe Lys Gln Ser Phe Pro Glu Gly Phe Thr Trp Glu Arg
 85 90 95
 Val Thr Thr Tyr Glu Asp Gly Gly Val Leu Thr Ala Thr Gln Asp Thr
 100 105 110
 Ser Leu Gln Asp Gly Cys Leu Ile Tyr Asn Val Lys Ile Arg Gly Val
 115 120 125

Asn Phe Thr Ser Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Leu Gly Trp

130 135 140

Glu Ala Phe Thr Glu Thr Leu Tyr Pro Ala Asp Gly Gly Leu Glu Gly

145 150 155 160

Arg Asn Asp Met Ala Leu Lys Leu Val Gly Gly Ser His Leu Ile Ala

165 170 175

Asn Ala Lys Thr Thr Tyr Arg Ser Lys Lys Pro Ala Lys Asn Leu Lys

180 185 190

Met Pro Gly Val Tyr Tyr Val Asp Tyr Arg Leu Glu Arg Ile Lys Glu

195 200 205

Ala Asn Asn Glu Thr Tyr Val Glu Gln His Glu Val Ala Val Ala Arg

210 215 220

Tyr Cys Asp Leu Pro Ser Lys Leu Gly His Lys Leu Asn

225 230 235

<210> 7

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> signal peptide sequence encoded by vector 2

<400> 7

Met Glu Thr Asp Thr Leu Ile Leu Trp Val Leu Leu Leu Leu Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly

20

<210> 8

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CH1 sequence encoded by vector 2

<400> 8

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD19TM sequence encoded by vector 2

<400> 9

Ala Val Thr Leu Ala Tyr Leu Ile Phe Cys Leu Cys Ser Leu Val Gly
 1 5 10 15
 Ile Leu His Leu
 20

<210> 10

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> dCD19 sequence encoded by vector 2

<400> 10

Gln Arg Ala Leu Val Leu Arg Arg Lys Arg Lys Arg Met Thr Asp Pro
 1 5 10 15
 Thr Arg Arg

<210> 11

<211> 111

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><223> CD79a sequence encoded by vector 1

<400> 11

Leu Trp Met His Lys Val Pro Ala Ser Leu Met Val Ser Leu Gly Glu

1 5 10 15

Asp Ala His Phe Gln Cys Pro His Asn Ser Ser Asn Asn Ala Asn Val

20 25 30

Thr Trp Trp Arg Val Leu His Gly Asn Tyr Thr Trp Pro Pro Glu Phe

35 40 45

Leu Gly Pro Gly Glu Asp Pro Asn Gly Thr Leu Ile Ile Gln Asn Val

50 55 60

Asn Lys Ser His Gly Gly Ile Tyr Val Cys Arg Val Gln Glu Gly Asn

65 70 75 80

Glu Ser Tyr Gln Gln Ser Cys Gly Thr Tyr Leu Arg Val Arg Gln Pro

85 90 95

Pro Pro Arg Pro Phe Leu Asp Met Gly Glu Gly Thr Lys Asn Arg

100 105 110

<210> 12

<211> 131

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD79b sequence encoded by vector 2

<400> 12

Ala Arg Ser Glu Asp Arg Tyr Arg Asn Pro Lys Gly Ser Ala Cys Ser

1 5 10 15

Arg Ile Trp Gln Ser Pro Arg Phe Ile Ala Arg Lys Arg Gly Phe Thr

20 25 30

Val Lys Met His Cys Tyr Met Asn Ser Ala Ser Gly Asn Val Ser Trp

35 40 45

Leu Trp Lys Gln Glu Met Asp Glu Asn Pro Gln Gln Leu Lys Leu Glu

50

55

60

Lys Gly Arg Met Glu Glu Ser Gln Asn Glu Ser Leu Ala Thr Leu Thr

65

70

75

80

Ile Gln Gly Ile Arg Phe Glu Asp Asn Gly Ile Tyr Phe Cys Gln Gln

85

90

95

Lys Cys Asn Asn Thr Ser Glu Val Tyr Gln Gly Cys Gly Thr Glu Leu

100

105

110

Arg Val Met Gly Phe Ser Thr Leu Ala Gln Leu Lys Gln Arg Asn Thr

115

120

125

Leu Lys Asp

130

<210> 13

<211> 230

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mKate2 sequence encoded by vector 3

<400> 13

Ser Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met His Met Lys Leu Tyr Met Glu Gly

1

5

10

15

Thr Val Asn Asn His His Phe Lys Cys Thr Ser Glu Gly Glu Gly Lys

20

25

30

Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Met Arg Ile Lys Ala Val Glu Gly Gly

35

40

45

Pro Leu Pro Phe Ala Phe Asp Ile Leu Ala Thr Ser Phe Met Tyr Gly

50

55

60

Ser Lys Thr Phe Ile Asn His Thr Gln Gly Ile Pro Asp Phe Phe Lys

65

70

75

80

Gln Ser Phe Pro Glu Gly Phe Thr Trp Glu Arg Val Thr Thr Tyr Glu

85

90

95

Asp Gly Gly Val Leu Thr Ala Thr Gln Asp Thr Ser Leu Gln Asp Gly

100 105 110
 Cys Leu Ile Tyr Asn Val Lys Ile Arg Gly Val Asn Phe Pro Ser Asn
 115 120 125
 Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Leu Gly Trp Glu Ala Ser Thr Glu
 130 135 140
 Thr Leu Tyr Pro Ala Asp Gly Gly Leu Glu Gly Arg Ala Asp Met Ala
 145 150 155 160
 Leu Lys Leu Val Gly Gly Gly His Leu Ile Cys Asn Leu Lys Thr Thr

165 170 175
 Tyr Arg Ser Lys Lys Pro Ala Lys Asn Leu Lys Met Pro Gly Val Tyr
 180 185 190
 Tyr Val Asp Arg Arg Leu Glu Arg Ile Lys Glu Ala Asp Lys Glu Thr
 195 200 205
 Tyr Val Glu Gln His Glu Val Ala Val Ala Arg Tyr Cys Asp Leu Pro
 210 215 220
 Ser Lys Leu Gly His Arg
 225 230

<210> 14

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutated signal sequence, mutation 1

<400> 14

Met Glu Thr Asp Thr Leu Ile Leu Trp Val Leu Leu Leu Val Pro Gly
 1 5 10 15
 Ser Thr Gly

<210> 15

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutated signal sequence, mutation 2

<400> 15

Met Glu Thr Asp Thr Leu Ile Leu Trp Val Leu Leu Val Pro Gly Ser

1 5 10 15

Thr Gly

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutated signal sequence, mutation 3

<400> 16

Met Glu Thr Asp Thr Leu Ile Leu Trp Val Leu Val Pro Gly Ser Thr

1 5 10 15

Gly

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutated signal sequence, mutation 4

<400> 17

Met Glu Thr Asp Thr Leu Ile Leu Trp Leu Val Pro Gly Ser Thr Gly

1 5 10 15

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutated signal sequence, mutation 5

<400> 18

Met Glu Thr Asp Thr Leu Ile Leu Leu Val Pro Gly Ser Thr Gly

1 5 10 15

<210> 19

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutated signal sequence, mutation 6

<400> 19

Met Glu Thr Asp Thr Leu Ile Leu Val Pro Gly Ser Thr Gly

1 5 10

<210> 20

<211

> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutated signal sequence, mutation 7

<400> 20

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Val Pro Gly Ser Thr Gly

1 5 10

<210> 21

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> n-region from the signal peptide sequence

<400> 21

Met Glu Thr Asp

1

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> h-region from the signal peptide sequence

<400> 22

Thr Leu Ile Leu Trp Val Leu Leu Leu Val

1 5 10

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> c-region from the signal peptide sequence

<400> 23

Pro Gly Ser Thr Gly

1 5