



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0075689
(43) 공개일자 2018년07월04일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C07K 14/725</i> (2006.01) <i>A61K 35/17</i> (2014.01)
 <i>C07K 14/47</i> (2006.01) <i>C07K 16/18</i> (2006.01)
 <i>C07K 16/32</i> (2006.01) <i>C12N 5/0783</i> (2010.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>C07K 14/7051</i> (2013.01)
 <i>A61K 35/17</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2018-7017328
 (22) 출원일자(국제) 2016년11월22일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2018년06월19일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2016/063257
 (87) 국제공개번호 WO 2017/091546
 국제공개일자 2017년06월01일
 (30) 우선권주장
 62/258,712 2015년11월23일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
 트르스티스 오브 보스턴 유니버시티
 미국 매사추세츠 02215 보스턴 원 실버 웨이</p> <p>(72) 발명자
 윙 윌슨
 미국 매사추세츠주 02445 브루클라인 유닛 4 린덴 스트리트 6</p> <p>조 장환
 미국 매사추세츠주 02472 워터타운 화이트 애비뉴 #23 16</p> <p>(74) 대리인
 문두현</p> |
|--|---|

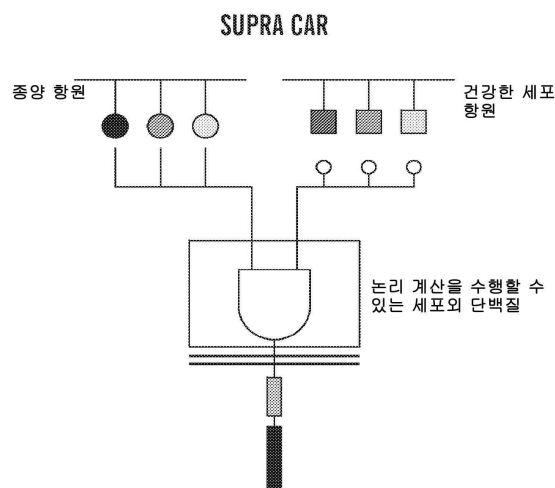
전체 청구항 수 : 총 99 항

(54) 발명의 명칭 **키메라 항원 수용체에 관한 방법 및 조성물**

(57) 요약

본원에 기재된 것은 (a) ON/OFF 스위치로서 작용하는 능력(유지가능성/적정가능성을 위한 능력을 갖는)을 갖고/갖거나, (b) 다중 항원을 감지하고 논리 계산을 수행하는 능력을 갖고/갖거나, (c) 다중 신호 전달 경로를 독립적으로 조절하는 능력을 갖는 키메라 항원 수용체 (CAR) 플랫폼이다. 본원에 제공된 조성물은 CAR T 세포 치료 요법을 최적화하는데 필요한 제어 및 식별 정도를 허용한다. 또한 본원에 기재된 것은 상기 조성물을 포함하는 세포 및 암의 치료에서 이들 조성물 및/또는 세포의 용도이다.

대표도



(52) CPC특허분류

C07K 14/4738 (2013.01)

C07K 16/18 (2013.01)

C07K 16/32 (2013.01)

C12N 5/0636 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2319/03 (2013.01)

C07K 2319/70 (2013.01)

C07K 2319/73 (2013.01)

C12N 2510/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

다성분 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함하는 조성물로서; 상기 다성분 CAR이:

- a. 1) 제1 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 단백질 상호작용 도메인을 포함하는 제1 인지 폴리펩타이드; 및
- b. 1) 상기 제1 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인과 함께 특이적으로 결합할 수 있는 세포의 단백질 상호작용 도메인 및 2) 세포내 T 세포 수용체 (TCR) 신호 전달 도메인을 포함하는 신호 전달 폴리펩타이드를 포함하는, 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단백질 상호작용 도메인이 류신 지퍼 도메인인, 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 하나의 류신 지퍼 도메인이 BZip (RR)이고 제2 류신 지퍼 도메인이 AZip (EE)인, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 단백질 상호작용 도메인이 PSD95-Dlg1-zo-1 (PDZ) 도메인인, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 하나의 단백질 상호작용 도메인이 스트렙타비딘이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 스트렙타비딘 결합 단백질 (SBP)인, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

- a. 하나의 단백질 상호작용 도메인이 mTOR의 FKBP-결합 도메인 (FRB)이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 FK506 결합 단백질 (FKBP)이거나;
- b. 하나의 단백질 상호작용 도메인이 사이클로필린-Fas 융합 단백질 (CyP-Fas)이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 FK506 결합 단백질 (FKBP)이거나;
- c. 하나의 단백질 상호작용 도메인이 칼시뉴린 A (CNA)이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 FK506 결합 단백질 (FKBP)이거나;
- d. 하나의 단백질 상호작용 도메인이 지베렐린 불감성 (GIA)이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 지베렐린 불감성 드워프1 (GID1)이거나;
- e. 하나의 단백질 상호작용 도메인이 스냅-태그이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 할로 (Halo) 태그이거나;
- f. 하나의 단백질 상호작용 도메인이 T14-3-3-cdeltaC이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 PMA2의 C-말단 펩타이드 (CT52)인, 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 하나의 단백질 상호작용 도메인이 PYL이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 ABI인, 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 하나의 단백질 상호작용 도메인이 뉴클레오타이드 태그이고 상기 제2 단백질 상호작용 도메인이 아연 핑거 도메인인, 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인이 뉴클레오타이드 태그이고 상기 신호 전달 폴리펩타이드의 세포외 단백질 상호작용 도메인이 아연 핑거 도메인인, 조성물.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 태그가 DNA 태그인, 조성물.

청구항 11

제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 DNA 태그가 dsDNA 태그인, 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 1) 제2 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 상기 제1 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인에 결합하는 것에 대해 상기 신호 전달 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인과 경쟁하는 단백질 상호작용 도메인을 포함하는 제2 인지 폴리펩타이드를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 제2 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인 및 상기 제1 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인이 상기 신호 전달 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인 및 상기 제1 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인 보다 큰 친화성을 갖는, 조성물.

청구항 14

제12항 또는 제13항에 있어서, 상기 제2 인지 폴리펩타이드에 의해 인지되는 표적 리간드가 건강한 및/또는 비-표적 세포 상에서 발견되고 병든 및/또는 표적 세포 상에서는 발견되지 않는, 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 1) 제2 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 단백질 상호작용 도메인을 포함하는 제2 인지 폴리펩타이드를 추가로 포함하고;

상기 신호 전달 폴리펩타이드가 상기 제2 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인과 함께 특이적으로 결합하는 2차 단백질 상호작용 도메인을 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 신호 전달 폴리펩타이드의 2차 단백질 상호작용 도메인, 및 상기 제2 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인의 친화성이 상기 신호 전달 폴리펩타이드의 제1 단백질 상호작용 도메인, 및 상기 제1 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인의 친화성 보다 약한, 조성물.

청구항 17

제15항 또는 제16항에 있어서, 상기 제1 및 제2 인지 폴리펩타이드가 각각 2차 단백질 상호작용 도메인을 포함하고;

상기 2차 단백질 상호작용 도메인이 서로 특이적으로 결합하는, 조성물.

청구항 18

다성분 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함하는 조성물로서; 상기 다성분 CAR이:

- a. 1) 제1 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 뉴클레오타이드 태그의 제1 부분을 포함하는 제1 인지 폴리펩타이드;
- b. 1) 제2 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 상기 뉴클레오타이드 태그의 제2 부분을 포함하는 제2 인지 폴리펩타이드; 및
- c. 1) 상기 뉴클레오타이드 태그의 개별 부분들의 연결에 의해 형성된 완전한 뉴클레오타이드 태그와 함께 특이

적으로 결합할 수 있는 세포의 아연 핑거 도메인 및 2) 세포내 T 세포 수용체 (TCR) 신호 전달 도메인을 포함하는 신호 전달 폴리펩타이드를 포함하고;

상기 뉴클레오타이드 태그의 개별 부분들이 이들이 서로 연결되지 않는 경우 상기 아연 핑거 도메인에 의해 특이적으로 결합될 수 없는, 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 태그의 제1 부분이 ssDNA이고 상기 뉴클레오타이드 태그의 제2 부분이 상보적 ssDNA인, 조성물.

청구항 20

제18항 또는 제19항에 있어서, 1) 제3 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 상기 뉴클레오타이드 태그의 제3 부분을 암호화하는 제3 인지 폴리펩타이드를 추가로 포함하고;

상기 뉴클레오타이드 태그의 상기 개별 부분들 또는 개별 부분들의 쌍 형성 조합이 상기 아연 핑거 도메인에 의해 특이적으로 결합될 수 없지만 모든 3개의 부분들이 서로 연결되는 경우 수득한 복합체는 상기 아연 핑거 도메인에 의해 특이적으로 결합될 수 있는, 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 1) 상기 뉴클레오타이드 태그의 제1 부분이 ssDNA이고; 2) 상기 뉴클레오타이드 태그의 제2 및 제3 부분이 ssDNA이고, 이의 각각은 제1 부분에 상보적이며, 3) 상기 뉴클레오타이드 태그의 제2 및 제3 부분은 서로 중첩되지 않는 서열을 갖는, 조성물.

청구항 22

다성분 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함하는 조성물로서; 상기 다성분 CAR이:

- a. 1) 제1 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 제1 뉴클레오타이드 태그를 포함하는 제1 인지 폴리펩타이드;
- b. 1) 제2 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 제2 뉴클레오타이드 태그를 포함하는 제2 인지 폴리펩타이드; 및
- c. 1) 상기 제1 뉴클레오타이드 태그와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 세포의 아연 핑거 도메인 및 2) 세포내 T 세포 수용체 (TCR) 신호 전달 도메인을 포함하는 신호 전달 폴리펩타이드를 포함하고;

상기 뉴클레오타이드 태그가 이들이 서로 연결되는 경우 상기 아연 핑거 도메인에 의해 특이적으로 결합될 수 없는, 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 제1 뉴클레오타이드 태그가 헤어핀-루프 구조를 형성하고 상기 제2 뉴클레오타이드 태그가 상기 헤어핀-루프의 하나의 레그 부분 및 상기 헤어핀-루프의 루프의 부분을 포함하는 제1 뉴클레오타이드 태그 부분에 상보적인, 조성물.

청구항 24

제22항 또는 제23항에 있어서, 상기 제2 표적 리간드가 건강한 및/또는 비-표적 세포 상에서 발견되고 병든 및/또는 표적 세포 상에서는 발견되지 않는, 조성물.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 표적 리간드가 병든 및/또는 표적 세포 상에서 발견되는 리간드인, 조성물.

청구항 26

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 신호 전달 폴리펩타이드와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 인지

폴리펩타이드에 의해 특이적으로 결합된 표적 리간드가 병든 및/또는 표적 세포 상에서 발견되는 리간드인, 조성물.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 신호 전달 폴리펩타이드와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 인지 폴리펩타이드에 의해 특이적으로 결합된 표적 리간드가 병든 및/또는 표적 세포 상에서 발견되고 건강한 및/또는 비-표적 세포상에서는 발견되지 않는 리간드인, 조성물.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 병든 세포가 암성 세포인, 조성물.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 시약이:

면역글로불린 분자, 모노클로날 항체, 키메라 항체, CDR-접목 항체, 인간 항체, 인간화된 항체, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, 디설파이드 연결된 Fv, scFv, 단일 도메인 항체, 디아바디, 다중특이적 항체, 이원 특이적 항체, 항-유전자형 항체, 및 이특이적 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포내 TCR 신호 전달 도메인이:

TCR ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b, CD66d, CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM, ZAP70, 및 41BB로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질 기원의 신호 전달 도메인인, 조성물.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 따른 제2 다성분 CAR을 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 제2 다성분 CAR의 항체 시약이 상기 제1 다성분 CAR의 항체 시약에 의해 결합된 것들과는 상이한 표적 리간드에 특이적으로 결합하는, 조성물.

청구항 33

제30항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 다성분 CAR의 세포내 T 세포 수용체 (TCR) 신호 전달 도메인이 T 세포 활성을 억제하는, 조성물.

청구항 34

제33항에 있어서, T 세포 활성을 억제하는 상기 제2 다성분 CAR의 세포내 T 세포 수용체 (TCR) 신호 전달 도메인이:

PD1; CTLA4; BTLA; KIR; LAG-3; TIM-3; A2aR; LAIR-1; 및 TGIT로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리펩타이드의 신호 전달 도메인을 포함하는, 조성물.

청구항 35

제33항 또는 제34항에 있어서, 상기 제2 다성분 CAR의 신호 전달 폴리펩타이드와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 인지 폴리펩타이드에 의해 특이적으로 결합된 표적 리간드가 건강한 및/또는 비-표적 세포 상에서 발견되는 리간드인, 조성물.

청구항 36

제33항 또는 제34항에 있어서, 상기 제2 다성분 CAR의 신호 전달 폴리펩타이드와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 인지 폴리펩타이드에 의해 특이적으로 결합된 표적 리간드가 건강한 및/또는 비-표적 세포상에서 발견되고 병든 및/또는 표적 세포 상에서는 발견되지 않는 리간드인, 조성물.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신호 전달 폴리펩타이드가 세포의 막 상에 존재하는, 조성물.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 하나 이상의 인지 폴리펩타이드가 세포외 공간에 존재하는, 조성물.

청구항 39

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 발현하는 가공된 세포.

청구항 40

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 T 세포, NK 세포, 또는 NKT 세포인, 세포 또는 조성물.

청구항 41

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 T 세포인, 세포 또는 조성물.

청구항 42

표적 세포를 사멸시키는 방법으로서, 상기 세포를 제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 따른 조성물 또는 세포와 접촉시킴을 포함하는 방법.

청구항 43

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 따른 조성물 또는 세포를 이의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여함을 포함하는, 질환을 치료하는 방법.

청구항 44

제42항에 있어서, 상기 질환이:

암; 고형암; 유방암; 폐암; 급성 림프구성 백혈병; 다발성 골수종; 및 난치성 다발성 골수종으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 45

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 따른 조성물 또는 세포를 이의 치료를 필요로 하는 대상체에 투여함을 포함하는, 암을 치료하는 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 세포가 대상체에 자가성인, 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 투여된 세포가 대상체로부터 수득된 세포로부터 유래되고/되거나 기원하고 적어도 하나의 다성분 CAR을 포함하도록 생체의 변형되는, 방법.

청구항 48

다성분 키메라 항원 수용체 (CAR) 신호 전달 폴리펩타이드를 포함하는 가공된 세포로서, 상기 신호 전달 폴리펩타이드가 1) 세포외 단백질 상호작용 도메인 및 2) 세포내 T 세포 수용체 (TCR) 신호 전달 도메인을 포함하는, 가공된 세포.

청구항 49

제48항에 있어서, 상기 단백질 상호작용 도메인이 류신 지퍼 도메인인, 세포.

청구항 50

제49항에 있어서, 상기 류신 지퍼 도메인이 BZip (RR) 또는 AZip (EE)인, 세포.

청구항 51

제48항에 있어서, 상기 단백질 상호작용 도메인이 PSD95-Dlg1-zo-1 (PDZ) 도메인인, 세포.

청구항 52

제48항에 있어서, 상기 단백질 상호작용 도메인이 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 결합 단백질 (SBP)인, 세포.

청구항 53

제48항에 있어서, 상기 단백질 상호작용 도메인이 mTOR의 FKBP-결합 도메인 (FRB) 또는 FK506 결합 단백질 (FKBP)인, 세포.

청구항 54

제48항에 있어서, 상기 단백질 상호작용 도메인이 PYL 또는 ABI인, 세포.

청구항 55

제48항에 있어서, 상기 단백질 상호작용 도메인이 뉴클레오타이드 태그 또는 아연 핑거 도메인인, 세포.

청구항 56

제55항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 태그가 DNA 태그인, 세포.

청구항 57

제56항에 있어서, 상기 DNA 태그가 dsDNA 태그인, 세포.

청구항 58

제55항에 있어서, 상기 단백질 상호작용 도메인이 아연 핑거 도메인인, 세포.

청구항 59

제48항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신호 전달 폴리펩타이드가 상기 세포의 막 상에 존재하는, 세포.

청구항 60

제48항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 T 세포, NK 세포, 또는 NKT 세포인, 세포.

청구항 61

제48항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 T 세포인, 세포.

청구항 62

제48항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포내 TCR 신호 전달 도메인이:

TCR ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b, CD66d, CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM, ZAP70, 및 41BB로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질 기원의 신호 전달 도메인인, 세포.

청구항 63

제48항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신호 전달 폴리펩타이드가 상기 제2 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인과 함께 특이적으로 결합하는 2차 단백질 상호작용 도메인을 추가로 포함하는, 세포.

청구항 64

제48항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 제48항 내지 제62항 중 어느 한 항에 따른 제2 다성분 CAR 신호 전달 펩타이드를 추가로 포함하는, 세포.

청구항 65

질환을 치료하는 방법으로서, 상기 방법이:

제48항 내지 제64항 중 어느 한 항의 세포; 및

1) 제1 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 상기 신호 전달 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인과 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 상호작용 도메인을 포함하는 제1 인지 폴리펩타이드를

이에 대한 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여함을 포함하는 방법.

청구항 66

제65항에 있어서, 상기 항체 시약이:

면역글로불린 분자, 모노클로날 항체, 키메라 항체, CDR-접목 항체, 인간 항체, 인간화된 항체, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, 디설파이드 연결된 Fv, scFv, 단일 도메인 항체, 디아바디, 다중특이적 항체, 이원 특이적 항체, 항-유전자형 항체, 및 이특이적 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 67

제65항 또는 제66항에 있어서, 상기 세포가 상기 대상체에 자가성인, 방법.

청구항 68

제65항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여된 세포가 상기 대상체로부터 수득된 세포로부터 유래되고/되거나 기원하고 적어도 하나의 다성분 CAR을 포함하도록 생체의 변형된, 방법.

청구항 69

제65항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질 상호작용 도메인이 류신 지퍼 도메인인, 방법.

청구항 70

제69항에 있어서, 하나의 류신 지퍼 도메인이 BZip (RR)이고 상기 제2 류신 지퍼 도메인이 AZip (EE)인, 방법.

청구항 71

제65항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질 상호작용 도메인이 PSD95-Dlg1-zo-1 (PDZ) 도메인인, 방법.

청구항 72

제65항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 단백질 상호작용 도메인이 스트렙트아비딘이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 스트렙트아비딘 결합 단백질 (SBP)인, 방법.

청구항 73

제65항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서,

a. 하나의 단백질 상호작용 도메인이 mTOR의 FKBP-결합 도메인 (FRB)이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 FK506 결합 단백질 (FKBP)이거나;

- b. 하나의 단백질 상호작용 도메인이 사이클로필린-Fas 융합 단백질 (CyP-Fas)이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 FK506 결합 단백질 (FKBP)이거나;
- c. 하나의 단백질 상호작용 도메인이 칼시뉴린 A (CNA)이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 Fk506 결합 단백질 (FKBP)이거나;
- d. 하나의 단백질 상호작용 도메인이 지베렐린 불감성 (GIA)이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 지베렐린 불감성 드워프1 (GID1)이거나;
- e. 하나의 단백질 상호작용 도메인이 스냅-태그이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 할로 태그이거나;
- f. 하나의 단백질 상호작용 도메인이 T14-3-3-cdeltaC이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 PMA2의 C-말단 펩타이드 (CT52)인, 방법.

청구항 74

제74항에 있어서,

- a. 하나의 단백질 상호작용 도메인이 mTOR의 FKBP-결합 도메인 (FRB)이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 FK506 결합 단백질 (FKBP)인 경우, 상기 방법이 타크롤리무스, 라파로그 또는 에버롤리무스를 투여함을 추가로 포함하거나;
- b. 하나의 단백질 상호작용 도메인이 사이클로필린-Fas 융합 단백질 (CyP-Fas)이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 FK506 결합 단백질 (FKBP)인 경우, 상기 방법이 FKCsA를 투여함을 추가로 포함하거나;
- c. 하나의 단백질 상호작용 도메인이 칼시뉴린 A (CNA)이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 FK506 결합 단백질 (FKBP)인 경우, 상기 방법이 FK506을 투여함을 추가로 포함하거나;
- d. 하나의 단백질 상호작용 도메인이 지베렐린 불감성 (GIA)이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 지베렐린 불감성 드워프1 (GID1)인 경우, 상기 방법이 지베렐린을 투여함을 추가로 포함하거나;
- e. 하나의 단백질 상호작용 도메인이 스냅-태그이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 할로 태그인 경우, 상기 방법이 HaXS를 투여함을 추가로 포함하거나;
- f. 하나의 단백질 상호작용 도메인이 T14-3-3-cdeltaC이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 PMA2의 C-말단 펩타이드 (CT52)인 경우, 상기 방법이 푸시코신을 투여함을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 75

제65항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 단백질 상호작용 도메인이 PYL이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 ABI인, 방법.

청구항 76

제65항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인이 뉴클레오타이드 태그이고 상기 신호 전달 폴리펩타이드의 세포외 단백질 상호작용 도메인이 아연 핑거 도메인인, 방법.

청구항 77

제76항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 태그가 DNA 태그인, 방법.

청구항 78

제77항에 있어서, 상기 DNA 태그가 dsDNA 태그인, 방법.

청구항 79

제65항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서,

- 1) 제2 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 상기 제1 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인에 결합하는 것에 대해 상기 신호 전달 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인과 경쟁하는 단백질 상호작용 도메인을 포함하는 제2 인지 폴리펩타이드를 투여함을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 80

제79항에 있어서, 상기 제2 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인 및 상기 제1 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인이 상기 신호 전달 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인 및 상기 제1 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인 보다 큰 친화성을 갖는, 방법.

청구항 81

제79항 또는 제80항에 있어서, 상기 제2 인지 폴리펩타이드에 의해 인지되는 표적 리간드가 건강한 및/또는 비-표적 세포 상에서 발견되고 병든 및/또는 표적 세포 상에서는 발견되지 않는, 방법.

청구항 82

제65항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 1) 제2 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 단백질 상호작용 도메인을 포함하는 제2 인지 폴리펩타이드를 추가로 포함하고;

상기 신호 전달 폴리펩타이드가 상기 제2 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인과 함께 특이적으로 결합하는 2차 단백질 상호작용 도메인을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 83

제82항에 있어서, 상기 신호 전달 폴리펩타이드의 2차 단백질 상호작용 도메인, 및 상기 제2 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인의 친화성이 상기 신호 전달 폴리펩타이드의 제1 단백질 상호작용 도메인, 및 상기 제1 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인의 친화성 보다 약한, 방법.

청구항 84

제82항 또는 제83항에 있어서, 상기 제1 및 제2 인지 폴리펩타이드 각각이 2차 단백질 상호작용 도메인을 포함하고;

상기 2차 단백질 상호작용 도메인이 서로 특이적으로 결합하는, 방법.

청구항 85

제65항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서,

a. 1) 제1 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 뉴클레오타이드 태그의 제1 부분을 포함하는 제1 인지 폴리펩타이드;

b. 1) 제2 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 상기 뉴클레오타이드 태그의 제2 부분을 포함하는 제2 인지 폴리펩타이드를 투여함을 추가로 포함하고;

상기 신호 전달 폴리펩타이드가 1) 상기 뉴클레오타이드 태그의 개별 부분들의 연결에 의해 형성된 완전한 뉴클레오타이드 태그와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 세포의 아연 핑거 도메인을 포함하고;

상기 뉴클레오타이드 태그의 개별 부분들이 이들이 서로 연결되지 않는 경우 상기 아연 핑거 도메인에 의해 특이적으로 결합될 수 없는, 방법.

청구항 86

제85항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 태그의 제1 부분이 ssDNA이고 상기 뉴클레오타이드 태그의 제2 부분이 상보적 ssDNA인, 방법.

청구항 87

제85항 또는 제86항에 있어서, 1) 제3 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 상기 뉴클레오타이드 태그의 제3 부분을 암호화하는 제3 인지 폴리펩타이드를 투여함을 추가로 포함하고;

상기 뉴클레오타이드 태그의 상기 개별 부분들 또는 개별 부분들의 쌍 형성 조합이 상기 아연 핑거 도메인에 의해 특이적으로 결합될 수 없지만 모든 3개의 부분들이 서로 연결되는 경우 수득한 복합체는 상기 아연 핑거 도메인에 의해 특이적으로 결합될 수 있는, 방법.

청구항 88

제87항에 있어서, 1) 상기 뉴클레오타이드 태그의 제1 부분이 ssDNA이고; 2) 상기 뉴클레오타이드 태그의 제2 및 제3 부분이 ssDNA이고, 이의 각각은 상기 제1 부분에 상보적이며 3) 상기 뉴클레오타이드 태그의 제2 및 제3 부분이 서로 중첩되지 않는 서열을 갖는, 방법.

청구항 89

제65항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서,

a. 1) 제1 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 제1 뉴클레오타이드 태그를 포함하는 제1 인지 폴리펩타이드;

b. 1) 제2 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 제2 뉴클레오타이드 태그를 포함하는 제2 인지 폴리펩타이드를 투여함을 포함하고;

상기 신호 전달 폴리펩타이드가 1) 상기 제1 뉴클레오타이드 태그와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 세포의 아연 핑거 도메인을 포함하고;

상기 뉴클레오타이드 태그가 이들이 서로 연결되는 경우 상기 아연 핑거 도메인에 의해 특이적으로 결합될 수 없는, 방법.

청구항 90

제89항에 있어서, 상기 제1 뉴클레오타이드 태그가 헤어핀-루프 구조를 형성하고 상기 제2 뉴클레오타이드 태그가 상기 헤어핀-루프의 하나의 레그 부분 및 상기 헤어핀-루프의 루프의 부분을 포함하는 상기 제1 뉴클레오타이드 태그 부분에 상보적인, 방법.

청구항 91

제89항 또는 제90항에 있어서, 상기 제2 표적 리간드가 건강한 및/또는 비-표적 세포 상에서 발견되고 병든 및/또는 표적 세포 상에서는 발견되지 않는, 방법.

청구항 92

제65항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, 표적 리간드가 병든 및/또는 표적 세포상에서 발견되는 리간드인, 방법.

청구항 93

제65항 내지 제92항 중 어느 한 항에 있어서, 신호 전달 폴리펩타이드와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 인지 폴리펩타이드에 의해 특이적으로 결합된 상기 표적 리간드가 병든 및/또는 표적 세포 상에서 발견되는 리간드인, 방법.

청구항 94

제65항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, 신호 전달 폴리펩타이드와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 인지 폴리펩타이드에 의해 특이적으로 결합된 상기 표적 리간드가 병든 및/또는 표적 세포 상에서 발견되고 건강한 및/또는 비-표적 세포상에서는 발견되지 않는 리간드인, 방법.

청구항 95

제65항 내지 제94항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 병든 세포가 암성 세포인, 방법.

청구항 96

제65항 내지 제95항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 제64항의 세포이고 상기 대상체에 추가로 1) 제2 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 상기 제2 신호 전달 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인과 함께 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 상호작용 도메인을 포함하는 제2 인지 폴리펩타이드가 투여되는, 방법.

청구항 97

제96항에 있어서, 상기 제2 다성분 CAR 신호 전달 폴리펩타이드의 세포내 T 세포 수용체 (TCR) 신호 전달 도메인이 T 세포 활성을 억제하는, 방법.

청구항 98

제96항에 있어서, 상기 제2 신호 전달 폴리펩타이드와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 인지 폴리펩타이드에 의해 특이적으로 결합된 상기 표적 리간드가 건강한 및/또는 비-표적 세포 상에서 발견되는 리간드인, 방법.

청구항 99

제96항 내지 제98항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 신호 전달 폴리펩타이드와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 인지 폴리펩타이드에 의해 특이적으로 결합된 상기 표적 리간드가 건강한 및/또는 비-표적 세포상에서는 발견되지만 병든 및/또는 표적 세포 상에서는 발견되지 않는 리간드인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e)하에 2015년 11월 23일자로 출원된 미국 가출원 번호 제62/258,712호의 우선권을 주장하고 이의 내용은 이들의 전문이 본원에 참조로 인용된다.

[0003] 정부 지원

[0004] 본 발명은 국립보건원에 의해 부여된 계약 번호 186574 하의 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명에 대해 특정 권리를 갖는다.

[0005] 서열 목록

[0006] 본 출원은 ASCII 포맷으로 전자 출원된 서열 목록을 포함하고 이의 전문이 본원에 참조로 인용된다. 상기 ASCII 사본은 2016년 11월 17일자로 작성되었고 파일명은 701586-082751-PCT_SL.txt 이고 크기는 1,780 바이트이다.

[0007] 기술 분야

[0008] 본원에 기재된 기술은 키메라 항원 수용체 (CAR), 예를 들어, 다성분 CAR에 관한 것이다.

배경 기술

[0009] 암을 치료하기 위한 한가지 방법은 면역치료요법이고, 이러한 치료요법은 암 세포에 독성인 약물을 제공하는 것 대신 자신의 신체 면역계가 암 자체를 보다 효과적으로 공격하도록 고무시키는 치료요법이 환자에게 제공된다. T 세포는 신체에서 외래 또는 병든 세포의 존재를 인지하고 병든 세포를 사멸시키거나 상기 목표를 달성하기 위해 다른 면역 세포의 원조를 결집시키는데 관여하는 면역계의 일부이다.

[0010] T 세포는 T 세포 수용체 (TCR)로 불리는 이들의 세포 표면 상의 수용체를 사용함에 의해 이들의 표적 세포를 인지한다. TCR은 인지 부분 및 신호 전달 부분을 갖는다. 인지 부분이 병든 세포의 존재하에 신체에서 형성되는 천연 복합체에 결합하는 경우, 신호 전달 부분은 활성화되고 이는 T 세포가 병든 세포를 파괴하기 위해 활성을 사멸시키거나 다른 면역 세포를 결집시키는데 관여하도록 한다.

[0011] "CAR-T"로 불리는 치료요법은 T 세포가 암 세포를 인지하도록 도와주는 것을 모색한다. 이것은 T 세포를 유전학적으로 변형시켜 이것이 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하도록 함에 의해 성취된다. CAR는 변형된 TCR이고, 여기서, 천연 인지 부분은 제거되고 암 세포에 고유한 분자 (예를 들어, 암 세포 마커)의 존재를 매우 특이적으로 검출함에 의해 암 세포를 보다 효과적으로 인지하도록 디자인된 합성 인지 부분으로 대체된다. 이들 CAR-T 세포는 이어서 암 환자에게 주어진다. 환자 내부에서, 이들의 합성 CAR 분자는 마커를 발현하는 암 세포에 결합하고 상기 결합으로 T 세포를 활성화시켜 암 세포를 공격하는 환자 자신의 면역계를 유도한다.

발명의 내용

- [0012] 통상의 CAR-T는 강력한 도구이고 이것은 유의적으로 유연성이 부재이다. 예를 들어, CAR-T 세포가 투여되는 경우, 이것은 이것이 암세포를 발견하는 즉시 면역계를 활성화시키고 상기 활성화는 암이 박멸되거나 T 세포가 죽을 때까지 계속된다. 일부 환자에서, 예를 들어, 면역계 활성화가 부작용을 유발하거나 또 다른 치료요법이 적용되어야만 하는 경우 면역계 활성화를 지연시키거나 중단하는 것이 요구될 수 있다. 추가로, CAR-T는 암 세포 상에 단일 마커의 인지로 제한된다. 다중 마커의 사용은 다중의 상이한 CAR을 요구하고 세포가 변형되고 환자에게 주어지는 경우 이것이 어느 마커를 인지하고 얼마나 많은 마커를 인지할 것인지를 변화시킬 수 없다.
- [0013] 본원에 기재된 것은 다성분 CAR에 관한 CAR-T 기술의 개선이다. 다성분 CAR에서, CAR의 신호 전달 및 인지 부분은 분리되어 있고 2개의 상이한 폴리펩타이드로서 존재한다. 다성분 CAR의 인지 부분은 이 자체가 암 세포 마커를 결합시킬 수 있지만 T 세포를 활성화시키지 않는다. 다성분 CAR의 신호 전달 부분은 이 자체가 가동될 수 없고 따라서 T 세포를 활성화시키지 않는다. 그러나, 인지 폴리펩타이드 및 신호 전달 폴리펩타이드가 함께 존재하는 경우, 이들은 서로 결합할 수 있고 이어서 완전한 CAR로서 기능할 수 있다.
- [0014] CAR의 구조에서 상기 변화는 CAR이 보다 더 유연할 수 있게 한다. 예를 들어, T 세포가 다성분 CAR의 단지 신호 전달 부분을 갖도록 변형되고 이어서 대상체에 주어지는 경우, 담당의는 별도의 약물로서 다성분 CAR의 인지 부분을 제공할 수 있고 담당의는 면역계를 언제 활성화시킬 것인지 그리고 얼마나 오랫동안 활성화시킬지를 제어할 수 있도록 한다. 추가로, 특정 암 세포 마커의 사용이 비효과적이거나 역효과를 나타내는 것으로 밝혀진 경우, 담당의는 단순히 새로운 인지 폴리펩타이드를 투여함에 의해 제2 인지 폴리펩타이드의 사용으로 전환시킬 수 있다. 이것은 전체적으로 새로운 CAR-T 세포가 가공되고/되거나 환자가 본래의 CAR-T 세포에 의해 유발되는 부작용이 종료될 때까지 대기하도록 하는 통상의 CAR-T와는 대조적이다.
- [0015] 추가로, 본원에 기재된 것은 매우 진전된 치료요법이 가능하도록 하는 다성분 CAR이다. 예를 들어, 다중 인지 분자를 사용함에 의한 본원에 기재된 기술은 이들이 마커 1 또는 마커 2를 인지하는 경우 활성화하도록 하는 지시를 갖는 면역계를 제공할 수 있다. 대안적으로, 마커 1 (암 세포 상에서 발견되는)이 인지되는 경우 활성화하지만 마커 3 (건강한 세포 상에서 발견되는)이 동일한 위치에서 인지되는 경우에는 활성화하지 않는 지시가 면역계에 제공될 수 있다. 논리적 계산을 수행하는 상기 능력은 CAR-T 치료요법이 보다 저렴한 비용으로 그리고 통상의 CAR-T 치료요법으로는 가능하지 않은 방식으로 신속하게 개별 환자의 요구에 조정될 수 있게 해준다.
- [0016] 임의의 구현예의 하나의 양상에서, 본원에 기재된 것은 다성분 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함하는 조성물이고; 상기 다성분 CAR은: a) 1) 제1 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 단백질 상호작용 도메인을 포함하는 제1 인지 폴리펩타이드; 및 b) 1) 제1 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인과 함께 특이적으로 결합할 수 있는 세포의 단백질 상호작용 도메인 및 2) 세포내 T 세포 수용체 (TCR) 신호 전달 도메인을 포함하는 신호 전달 폴리펩타이드를 포함한다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 단백질 상호작용 도메인은 류신 지퍼 도메인이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 하나의 류신 지퍼 도메인은 BZip (RR)이고 제2 류신 지퍼 도메인은 AZip (EE)이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 단백질 상호작용 도메인은 PSD95-Dlg1-zo-1 (PDZ) 도메인이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 하나의 단백질 상호작용 도메인은 스트렙타비딘이고 제2 단백질 상호작용 도메인은 스트렙타비딘 결합 단백질 (SBP)이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 하나의 단백질 상호작용 도메인은 mTOR의 FKBP-결합 도메인 (FRB)이고 제2 단백질 상호작용 도메인은 FK506 결합 단백질 (FKBP)이고; 하나의 단백질 상호작용 도메인은 사이클로필린-Fas 융합 단백질 (CyP-Fas)이고 제2 단백질 상호작용 도메인은 FK506 결합 단백질 (FKBP)이고; 하나의 단백질 상호작용 도메인은 칼시뉴린 A (CNA)이고 제2 단백질 상호작용 도메인은 FK506 결합 단백질 (FKBP)이고; 하나의 단백질 상호작용 도메인은 지베렐린 불감성 (GIA)이고 제2 단백질 상호작용 도메인은 지베렐린 불감성 드워프1 (dwarf1)(GID1)이고; 하나의 단백질 상호작용 도메인은 스냅-태그 (Snap-tag)이고 제2 단백질 상호작용 도메인은 할로 태그이고; 또는 하나의 단백질 상호작용 도메인은 T14-3-3-cdeltaC이고 제2 단백질 상호작용 도메인은 PMA2의 C-말단 펩타이드 (CT52)이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 하나의 단백질 상호작용 도메인은 PYL이고 제2 단백질 상호작용 도메인은 ABI이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 하나의 단백질 상호작용 도메인은 뉴클레오타이드 태그이고 제2 단백질 상호작용 도메인은 아연 핑거 도메인이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인은 뉴클레오타이드 태그이고 신호 전달 폴리펩타이드의 세포의 단백질 상호작용 도메인은 아연 핑거 도메인이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 뉴클레오타이드 태그는 DNA 태그이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, DNA 태그는 dsDNA 태그이다.
- [0017] 임의의 양상의 일부 구현예에서, 상기 조성물은 추가로 1) 제2 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 제1 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인에 결합하는 것에 대해 신호 전달 폴리펩타이드의 단백질 상호작용

도메인과 경쟁하는 단백질 상호작용 도메인을 포함하는 제2 인지 폴리펩타이드를 포함한다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 제2 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인 및 제1 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인은 신호 전달 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인 및 제1 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인 보다 큰 친화성을 갖는다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 제2 인지 폴리펩타이드에 의해 인지되는 표적 리간드는 건강한 및/또는 비-표적 세포 상에서 발견되고 병든 및/또는 표적 세포 상에서는 발견되지 않는다.

[0018] 임의의 양상의 일부 구현예에서, 상기 조성물은 추가로 1) 제2 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 단백질 상호작용 도메인을 포함하고; 상기 신호 전달 폴리펩타이드는 제2 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인과 함께 특이적으로 결합하는 2차 단백질 상호작용 도메인을 추가로 포함한다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 신호 전달 폴리펩타이드의 2차 단백질 상호작용 도메인, 및 제2 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인의 친화성은 신호 전달 폴리펩타이드의 제1 단백질 상호작용 도메인, 및 제1 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인의 친화성 보다 약하다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 제1 및 제2 인지 폴리펩타이드는 각각 2차 단백질 상호작용 도메인을 포함하고; 상기 2차 단백질 상호작용 도메인은 서로 특이적으로 결합한다.

[0019] 임의의 구현예의 하나의 양상에서, 본원에 기재된 것은 다성분 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함하는 조성물이고; 상기 다성분 CAR은: a) 1) 제1 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 뉴클레오타이드 태그의 제1 부분을 포함하는 제1 인지 폴리펩타이드; b) 1) 제2 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 뉴클레오타이드 태그의 제2 부분을 포함하는 제2 인지 폴리펩타이드; 및 c) 1) 뉴클레오타이드 태그의 개별 부분들의 연결에 의해 형성된 완전한 뉴클레오타이드 태그와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 세포의 아연 핑거 도메인 및 2) 세포내 T 세포 수용체 (TCR) 신호 전달 도메인을 포함하는 신호 전달 폴리펩타이드를 포함하고; 여기서, 상기 뉴클레오타이드 태그의 개별 부분들은 이들이 서로 연결되지 않는 경우 아연 핑거 도메인에 의해 특이적으로 결합될 수 없다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 뉴클레오타이드 태그의 제1 부분은 ssDNA이고 뉴클레오타이드 태그의 제2 부분은 상보적 ssDNA이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 조성물은 1) 제3 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 뉴클레오타이드 태그의 제3 부분을 암호화하는 제3 인지 폴리펩타이드를 추가로 포함하고; 여기서, 뉴클레오타이드 태그의 개별 부분들 또는 개별 부분들의 쌍 형성 조합은 아연 핑거 도메인에 의해 특이적으로 결합될 수 없지만, 모든 3개의 부분들이 서로 연결되는 경우, 수득한 복합체는 아연 핑거 도메인에 의해 특이적으로 결합될 수 있다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 1) 뉴클레오타이드 태그의 제1 부분은 ssDNA이고; 2) 뉴클레오타이드 태그의 제2 및 제3 부분은 ssDNA이고, 이의 각각은 제1 부분에 상보적이며 3) 뉴클레오타이드 태그의 제2 및 제3 부분은 서로 중첩되지 않는 서열을 갖는다.

[0020] 임의의 구현예의 하나의 양상에서, 본원에 기재된 것은 다성분 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함하는 조성물이고; 상기 다성분 CAR은: a) 1) 제1 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 제1 뉴클레오타이드 태그를 포함하는 제1 인지 폴리펩타이드; b) 1) 제2 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 제2 뉴클레오타이드 태그를 포함하는 제2 인지 폴리펩타이드; 및 c) 1) 제1 뉴클레오타이드 태그와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 세포의 아연 핑거 도메인 및 2) 세포내 T 세포 수용체 (TCR) 신호 전달 도메인을 포함하는 신호 전달 폴리펩타이드를 포함하고; 여기서, 상기 뉴클레오타이드 태그는 이들이 서로 연결되는 경우 아연 핑거 도메인에 의해 특이적으로 결합될 수 없다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 제1 뉴클레오타이드 태그는 헤어핀-루프 구조를 형성하고 제2 뉴클레오타이드 태그는 헤어핀-루프의 하나의 레그 부분 및 헤어핀-루프의 루프의 일부를 포함하는 제1 뉴클레오타이드 태그 부분에 상보적이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 제2 표적 리간드는 건강한 및/또는 비-표적 세포 상에서 발견되고 병든 및/또는 표적 세포 상에서는 발견되지 않는다.

[0021] 임의의 양상의 일부 구현예에서, 표적 리간드는 병든 및/또는 표적 세포 상에서 발견되는 리간드이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 신호 전달 폴리펩타이드와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 인지 폴리펩타이드에 의해 특이적으로 결합된 표적 리간드는 병든 및/또는 표적 세포 상에서 발견되는 리간드이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 신호 전달 폴리펩타이드와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 인지 폴리펩타이드에 의해 특이적으로 결합된 표적 리간드는 병든 및/또는 표적 세포 상에서 발견되고 건강한 및/또는 비-표적 세포 상에서는 발견되지 않는 리간드이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 병든 세포는 암성 세포이다.

[0022] 임의의 양상의 일부 구현예에서, 항체 시약은 면역글로불린 분자, 모노클로날 항체, 키메라 항체, CDR-접목 항체, 인간 항체, 인간화된 항체, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, 디설파이드 연결된 Fv, scFv, 단일 도메인 항체, 디아바디, 다중특이적 항체, 이원 특이적 항체, 항-유전자형 항체, 및 이특이적 항체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 세포내 TCR 신호 전달 도메인은 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질 기원의 신호 전달 도메인이다: TCR ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a,

CD79b, CD66d, CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM, ZAP70, 및 41BB.

- [0023] 임의의 양상의 일부 구현예에서, 상기 조성물은 임의의 구현예에 따라 제2 다성분 CAR을 추가로 포함한다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 제2 다성분 CAR의 항체 시약은 제1 다성분 CAR의 항체 시약에 의해 결합된 것들과는 상이한 표적 리간드에 특이적으로 결합한다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 제2 다성분 CAR의 세포내 T 세포 수용체 (TCR) 신호 전달 도메인은 T 세포 활성을 억제한다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, T 세포 활성을 억제하는 제2 다성분 CAR의 세포내 T 세포 수용체 (TCR) 신호 전달 도메인은 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리펩타이드의 신호 전달 도메인을 포함한다: PD1; CTLA4; BTLA; KIR; LAG-3; TIM-3; A2aR; LAIR-1; 및 TGIT. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 제2 다성분 CAR의 신호 전달 폴리펩타이드와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 인지 폴리펩타이드에 의해 특이적으로 결합된 표적 리간드는 건강한 및/또는 비-표적 세포 상에서 발견되는 리간드이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 제2 다성분 CAR의 신호 전달 폴리펩타이드와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 인지 폴리펩타이드에 의해 특이적으로 결합된 표적 리간드는 건강한 및/또는 비-표적 세포 상에서 발견되고 병든 및/또는 표적 세포 상에서는 발견되지 않는 리간드이다.
- [0024] 임의의 양상의 일부 구현예에서, 신호 전달 폴리펩타이드는 세포의 막 상에 존재한다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 하나 이상의 인지 폴리펩타이드는 세포의 공간에 존재한다.
- [0025] 임의의 구현예의 하나의 양상에서, 본원에 기재된 것은 이전의 임의의 구현예의 조성물을 발현하는 가공된 세포이다. 임의의 구현예의 하나의 양상에서, 본원에 기재된 것은 이전의 임의의 구현예의 조성물을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 가공된 세포이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 상기 세포는 T 세포, NK 세포, 또는 NKT 세포이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 세포는 T 세포이다.
- [0026] 임의의 구현예의 하나의 양상에서, 본원에 기재된 것은 표적 세포를 사멸시키는 방법이고, 상기 방법은 상기 세포를 이전의 임의의 구현예의 조성물 또는 세포와 접촉시킴을 포함한다. 임의의 구현예의 하나의 양상에서, 본원에 기재된 것은 이의 치료를 필요로 하는 대상체에 이전의 임의의 구현예의 조성물 또는 세포를 투여함을 포함하는, 질환을 치료하는 방법이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 질환은 암; 고형암; 유방암; 폐암; 급성 림프구성 백혈병; 다발성 골수종; 및 난치성 다발성 골수종으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 임의의 구현예의 하나의 양상에서, 본원에 기재된 것은 이의 치료를 필요로 하는 대상체에 이전의 임의의 구현예의 조성물 또는 세포를 투여함을 포함하는, 암을 치료하는 방법이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 세포는 대상체에 자가성이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 투여된 세포는 대상체로부터 수득된 세포로부터 유래되고/되거나 기원하고 적어도 하나의 다성분 CAR을 포함하도록 생체의 변형되었다.
- [0027] 임의의 구현예의 하나의 양상에서, 본원에 기재된 것은 다성분 키메라 항원 수용체 (CAR) 신호 전달 폴리펩타이드를 포함하는 가공된 세포이고, 상기 신호 전달 폴리펩타이드는 1) 세포의 단백질 상호작용 도메인 및 2) 세포내 T 세포 수용체 (TCR) 신호 전달 도메인을 포함한다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 단백질 상호작용 도메인은 류신 지퍼 도메인이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 류신 지퍼 도메인은 BZip (RR) 또는 AZip (EE)이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 단백질 상호작용 도메인은 PSD95-Dlg1-zo-1 (PDZ) 도메인이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 단백질 상호작용 도메인은 스트렙트아비딘 또는 스트렙트아비딘 결합 단백질 (SBP)이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 단백질 상호작용 도메인은 mTOR의 FKBP-결합 도메인 (FRB) 또는 FK506 결합 단백질 (FKBP)이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 단백질 상호작용 도메인은 PYL 또는 ABI이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 단백질 상호작용 도메인은 뉴클레오타이드 태그 또는 아연 핑거 도메인이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 뉴클레오타이드 태그는 DNA 태그이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, DNA 태그는 dsDNA 태그이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 단백질 상호작용 도메인은 아연 핑거 도메인이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 신호 전달 폴리펩타이드는 세포의 막 상에 존재한다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 상기 세포는 T 세포, NK 세포, 또는 NKT 세포이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 상기 세포는 T 세포이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 세포내 TCR 신호 전달 도메인은 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질 기원의 신호 전달 도메인이다: TCR ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b, CD66d, CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM, ZAP70, 및 41BB. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 신호 전달 폴리펩타이드는 제2 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인과 함께 특이적으로 결합하는 2차 단백질 상호작용 도메인을 추가로 포함한다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 세포는 임의의 구현예에 따라 제2 다성분

CAR 신호 전달 펩타이드를 추가로 포함한다.

[0028]

임의의 구현예의 하나의 양상에서, 본원에 기재된 것은 질환을 치료하는 방법이고, 상기 방법은 다성분 키메라 항원 수용체 (CAR) 신호 전달 폴리펩타이드를 포함하는 세포; 및 1) 제1 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 신호 전달 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인과 함께 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 상호작용 도메인을 포함하는 제1 인지 폴리펩타이드를 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여함을 포함한다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 항체 시약은 면역글로불린 분자, 모노클로날 항체, 키메라 항체, CDR-접목 항체, 인간 항체, 인간화된 항체, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, 디설파이드 연결된 Fv, scFv, 단일 도메인 항체, 디아바디, 다중특이적 항체, 이원 특이적 항체, 항-유전자형 항체, 및 이특이적 항체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 세포는 대상체에 자가성이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 투여된 세포는 대상체로부터 수득된 세포로부터 유래되고/되거나 기원하고 적어도 하나의 다성분 CAR을 포함하도록 생체와 변형되었다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 단백질 상호작용 도메인은 류신 지퍼 도메인이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 하나의 류신 지퍼 도메인은 BZip (RR)이고 제2 류신 지퍼 도메인은 AZip (EE)이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 단백질 상호작용 도메인은 PSD95-Dlg1-zo-1 (PDZ) 도메인이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 하나의 단백질 상호작용 도메인은 스트렙타비딘이고 제2 단백질 상호작용 도메인은 스트렙타비딘 결합 단백질 (SBP)이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 하나의 단백질 상호작용 도메인은 mTOR의 FKBP-결합 도메인 (FRB)이고 제2 단백질 상호작용 도메인은 FK506 결합 단백질 (FKBP)이고; 하나의 단백질 상호작용 도메인은 사이클로필린-Fas 융합 단백질 (CyP-Fas)이고 제2 단백질 상호작용 도메인은 FK506 결합 단백질 (FKBP)이고; 하나의 단백질 상호작용 도메인은 칼시뉴린 A (CNA)이고 제2 단백질 상호작용 도메인은 FK506 결합 단백질 (FKBP)이고; 하나의 단백질 상호작용 도메인은 지베렐린 불감성 (GIA)이고 제2 단백질 상호작용 도메인은 지베렐린 불감성 드워프1 (dwarf1) (GID1)이고; 하나의 단백질 상호작용 도메인은 스냅-태그 (Snap-tag)이고 제2 단백질 상호작용 도메인은 할로 태그이고; 또는 하나의 단백질 상호작용 도메인은 T14-3-3-cdeltaC이고 제2 단백질 상호작용 도메인은 PMA2의 C-말단 펩타이드 (CT52)이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 하나의 단백질 상호작용 도메인이 mTOR의 FKBP-결합 도메인 (FRB)이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 FK506 결합 단백질 (FKBP)인 경우, 상기 방법은 타코롤리무스, 라팔로그 또는 에버롤리무스를 투여함을 추가로 포함하고; 하나의 단백질 상호작용 도메인이 사이클로필린-Fas 융합 단백질 (CyP-Fas)이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 FK506 결합 단백질 (FKBP)인 경우, 상기 방법은 FKCsA를 추가로 투여함을 포함하고; 하나의 단백질 상호작용 도메인이 칼시뉴린 A (CNA)이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 FK506 결합 단백질 (FKBP)인 경우, 상기 방법은 FK506을 투여함을 추가로 포함하고; 하나의 단백질 상호작용 도메인이 지베렐린 불감성 (GIA)이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 지베렐린 불감성 드워프1 (dwarf1) (GID1)인 경우, 상기 방법은 지베렐린을 투여함을 추가로 포함하고; 하나의 단백질 상호작용 도메인이 스냅-태그 (Snap-tag)이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 할로 태그인 경우, 상기 방법은 HaXS를 투여함을 추가로 포함하고; 또는 하나의 단백질 상호작용 도메인이 T14-3-3-cdeltaC이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 PMA2의 C-말단 펩타이드 (CT52)인 경우, 상기 방법은 푸시코신을 투여함을 추가로 포함한다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 하나의 단백질 상호작용 도메인은 PYL이고 제2 단백질 상호작용 도메인은 ABI이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인은 뉴클레오타이드 태그이고 신호 전달 폴리펩타이드의 세포와 단백질 상호작용 도메인은 아연 핑거 도메인이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 뉴클레오타이드 태그는 DNA 태그이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, DNA 태그는 dsDNA 태그이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 상기 방법은 추가로 1) 제2 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 제1 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인에 결합하는 것에 대해 신호 전달 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인과 경쟁하는 단백질 상호작용 도메인을 포함하는 제2 인지 폴리펩타이드를 투여함을 포함한다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 제2 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인 및 제1 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인은 신호 전달 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인 및 제1 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인 보다 큰 친화성을 갖는다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 제2 인지 폴리펩타이드에 의해 인지되는 표적 리간드는 건강한 및/또는 비-표적 세포 상에서 발견되고 병든 및/또는 표적 세포 상에서는 발견되지 않는다.

[0029]

임의의 양상의 일부 구현예에서, 상기 방법은 1) 제2 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 단백질 상호작용 도메인을 포함하는 제2 인지 폴리펩타이드를 투여함을 추가로 포함하고; 상기 신호 전달 폴리펩타이드는 제2 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인과 함께 특이적으로 결합하는 2차 단백질 상호작용 도메인을 추가로 포함한다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 신호 전달 폴리펩타이드의 2차 단백질 상호작용 도메인, 및 제2 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인의 친화성은 신호 전달 폴리펩타이드의 제1 단백질 상호작용 도메인, 및 제1 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인 보다 약하다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 제1 및 제

2 인지 폴리펩타이드는 각각 2차 단백질 상호작용 도메인을 포함하고; 여기서, 상기 2차 단백질 상호작용 도메인은 서로 특이적으로 결합한다.

[0030] 임의의 구현예의 하나의 양상에서, 상기 방법은 a) 1) 제1 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 뉴클레오타이드 태그의 제1 부분을 포함하는 제1 인지 폴리펩타이드; b) 1) 제2 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 뉴클레오타이드 태그의 제2 부분을 포함하는 제2 인지 폴리펩타이드를 투여함을 포함하고; 여기서, 상기 신호 전달 폴리펩타이드는 1) 뉴클레오타이드 태그의 개별 부분들의 연결에 의해 형성된 완전한 뉴클레오타이드 태그와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 세포의 아연 핑거 도메인을 포함하고; 여기서, 상기 뉴클레오타이드 태그의 개별 부분들은 이들이 서로 연결되지 않는 경우 아연 핑거 도메인에 의해 특이적으로 결합될 수 없다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 뉴클레오타이드 태그의 제1 부분은 ssDNA이고 뉴클레오타이드 태그의 제2 부분은 상보적 ssDNA이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 상기 방법은 1) 제3 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 뉴클레오타이드 태그의 제3 부분을 암호화하는 제3 인지 폴리펩타이드를 투여함을 추가로 포함하고; 여기서, 뉴클레오타이드 태그의 개별 부분들 또는 개별 부분들의 쌍 형성 조합은 아연 핑거 도메인에 의해 특이적으로 결합될 수 없지만, 모든 3개의 부분들이 서로 연결되는 경우, 수득한 복합체는 아연 핑거 도메인에 의해 특이적으로 결합될 수 있다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 1) 뉴클레오타이드 태그의 제1 부분은 ssDNA이고; 2) 뉴클레오타이드 태그의 제2 및 제3 부분은 ssDNA이고, 이의 각각은 제1 부분에 상보적이며 3) 뉴클레오타이드 태그의 제2 및 제3 부분은 서로 중첩되지 않는 서열을 갖는다.

[0031] 임의의 양상의 일부 구현예에서, 상기 방법은 다음을 투여함을 포함한다: a) 1) 제1 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 제1 뉴클레오타이드 태그를 포함하는 제1 인지 폴리펩타이드; b) 1) 제2 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 제2 뉴클레오타이드 태그를 포함하는 제2 인지 폴리펩타이드 (여기서, 상기 신호 전달 폴리펩타이드는 1) 제1 뉴클레오타이드 태그와 특이적으로 결합할 수 있는 세포의 아연 핑거 도메인을 포함하고; 상기 뉴클레오타이드 태그는 이들이 서로 연결되지 않는 경우 아연 핑거 도메인에 의해 특이적으로 결합될 수 없다). 임의의 양상의 일부 구현예에서, 제1 뉴클레오타이드 태그는 헤어핀-루프 구조를 형성하고 여기서, 제2 뉴클레오타이드 태그는 헤어핀-루프의 하나의 레그 부분 및 헤어핀-루프의 루프 부분을 포함하는 제1 뉴클레오타이드 태그 부분에 상보적이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 제2 표적 리간드는 건강한 및/또는 비-표적 세포 상에서 발견되고 병든 및/또는 표적 세포 상에서는 발견되지 않는다.

[0032] 임의의 양상의 일부 구현예에서, 표적 리간드는 병든 및/또는 표적 세포 상에서 발견되는 리간드이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 신호 전달 폴리펩타이드와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 인지 폴리펩타이드에 의해 특이적으로 결합된 표적 리간드는 병든 및/또는 표적 세포 상에서 발견되는 리간드이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 신호 전달 폴리펩타이드와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 인지 폴리펩타이드에 의해 특이적으로 결합된 표적 리간드는 병든 및/또는 표적 세포 상에서 발견되고 건강한 및/또는 비-표적 세포 상에서는 발견되지 않는 리간드이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 병든 세포는 암성 세포이다.

[0033] 임의의 양상의 일부 구현예에서, 상기 세포는 제2 다성분 CAR 신호 전달 폴리펩타이드를 포함하고 상기 대상체에 추가로 1) 제2 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 제2 신호 전달 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인과 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 상호작용 도메인을 포함하는 제2 인지 폴리펩타이드가 투여된다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 제2 다성분 CAR 신호 전달 폴리펩타이드의 세포내 T 세포 수용체 (TCR) 신호 전달 도메인은 T 세포 활성을 억제한다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 제2 신호 전달 폴리펩타이드와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 인지 폴리펩타이드에 의해 특이적으로 결합된 표적 리간드는 건강한 및/또는 비-표적 세포 상에서 발견되는 리간드이다. 임의의 양상의 일부 구현예에서, 제2 신호 전달 폴리펩타이드와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 인지 폴리펩타이드에 의해 특이적으로 결합된 표적 리간드는 건강한 및/또는 비-표적 세포 상에서는 발견되지만 병든 및/또는 표적 세포 상에서는 발견되지 않는 리간드이다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1a-1b는 다양한 CAR 디자인에 대한 도식을 도시한다. 도 1a는 클리닉에서 CAR을 사용하는 임상 면역치료요법을 도시한다. 도 1b는 다양한 기존의 CAR 디자인, scFv, 단일쇄 항체, CD3 ζ, CD3 ζ-ζ 체 기원의 T 세포 수용체 신호 전달 도메인의 비교를 도시한다.

도 2a-2b는 SUPRA CAR 플랫폼 디자인의 도식을 도시한다. 도 2a는 SUPRA가 다중 항원 신호의 통합을 어떻게 가능하게 하는지를 도시한다. 도 2b는 SUPRA가 프로그램가능한 상호작용 도메인으로서 류신 지퍼 또는 아연-핑거를 사용하여 실현될 수 있음을 입증한다.

도 3a-3c는 류신 지퍼 CAR 디자인, 논리 계산 및 T 세포 신호 전달의 직교 제어를 도시한다. 도 3a는 류신 지퍼 CAR 디자인의 도식을 도시한다. 본 프로젝트에 사용될 류신 지퍼는 산성 (AZip) 및 염기성 (BZip) 도메인으로 이루어져 있다. BZip에 대해 상이한 친화성을 갖는 AZips가 가용하다. 도 3b는 NOT 게이트와 같은 논리 계산이 zipCAR을 사용하여 생성될 수 있음을 입증한다. 도 3c는 zipCAR이 직교 지퍼에 결합하도록 만들어질 수 있어 다양한 T 세포 신호 전달 경로의 독립적 제어를 가능하게 함을 입증한다.

도 4는 zipCAR에 의한 1차 CD4 T 세포의 활성화를 입증한다. RR 또는 EE 지퍼를 발현하는 세포와 혼합되는 경우 BZip (RR) CAR을 발현하는 CD4 T 세포에 의한 IFN- γ 및 IL-2 분비. EE 지퍼 (RR로의 상보적 쌍)를 발현하는 세포만이 BZip CAR을 활성화시킨다.

도 5는 항체-지퍼 융합 및 표적 종양 세포에 의한 1차 CD4 T 세포 활성화를 입증한다. 항-Her2-지퍼 융합 단백질은 RR-CAR 및 Her2를 발현하는 종양 세포로 변형된 CD4 T 세포를 함유하는 배지에 첨가한다. EE 지퍼를 함유하는 항체-지퍼 융합 단백질은 1차 T 세포에서 IFN- γ 의 생성을 활성화시킬 수 있다.

도 6a-6d는 SUPRA CAR 디자인에서 37 류신 지퍼의 교차-반응성을 보여주는 히트맵을 도시한다. 도 6a는 각각의 류신 지퍼가 다른 류신 지퍼 뿐만 아니라 이 자신의 결합에 시험되었음을 입증한다. 지퍼는 다른 지퍼와의 광범위한 친화성 및 특이성을 커버하기 위해 선택되었다. CAR에서 류신 지퍼 쌍 간의 상호작용은 NFAT 전사 활성화에 의해 측정되었다. 1 내지 37의 넘버링은 이전의 문헌에 기재된 상이한 류신 지퍼를 언급한다 [Reinke et al, (2010)]. 상위 번호는 이펙터 세포 상에서 발현되는 류신 지퍼를 나타내고 측면 번호는 표적 세포 상에서 발현되는 류신 지퍼를 나타낸다. 도 6b는 도 6a에 나타난 데이터로부터 3개의 직교 쌍이 동정되었음을 입증한다. 도 6c는 직교 지퍼의 4개의 보다 잠재적 쌍은 동일한 데이터 세트로부터 동정되었음을 입증한다. 어떠한 NFAT 활성화도 이펙터 세포가 류신 지퍼 11을 발현하고 표적 세포가 류신 지퍼 33을 발현하는 경우 관찰되지 않았음을 주지한다. 그러나, 류신 지퍼 33을 발현하는 이펙터 세포 및 류신 지퍼 11을 발현하는 표적 세포가 함께 동시 배양되는 경우, 높은 NFAT 전사 활성을 측정하였다. 잠재적으로, 류신 지퍼 33을 사용하여 이펙터 세포 상에서 발현될 수 있고 류신 지퍼 11을 사용하여 암 세포를 표적화할 수 있는 scFv와 융합될 수 있다. 도 6d는 BZIP와 AZIP 간의 상이한 결합 친화성이 상이한 NFAT 전사 활성을 유도함을 입증한다. 2개의 류신 지퍼 쌍 간의 결합 친화성은 이전에 보고된 데이터로부터 수득되었다.

도 7은 소분자 유도제를 사용한 FKBP CAR을 발현하는 Jurkat T 세포의 활성화를 입증한다. 상기 가공된 T 세포가 표면 상에 FRB를 발현하는 표적 세포와 혼합되는 경우, 소분자 Rapalog의 첨가가 NFAT 전사 반응의 활성화를 유도한다.

도 8a-8c는 아연-핑거 CAR 디자인, 논리 계산 및 T 세포 신호 전달의 직교 제어를 도시한다. 도 8a는 아연-핑거 CAR 디자인의 도식을 도시한다. 도 8b는 AND 및 NOT 게이트와 같은 논리 계산이 zfCAR을 사용하여 생성될 수 있음을 입증한다. 도 8c는 zfCAR이 직교 이중 가닥 (ds) DNA에 결합하도록 용이하게 만들어질 수 있어 다양한 T 세포 신호 전달 경로의 독립적 제어를 가능하게 함을 입증한다.

도 9는 아연-핑거 CAR 활성화를 도시한다. 아연-핑거 도메인 (zf15 11)은 CAR의 세포외 도메인으로서 작용한다. 상기 CAR은 이중 가닥 zf15 특이적 DNA 서열 (CCCATGGGTGGCAtAAAATGGGTGGCAtAAAATGGGTGGCAtAAAATGGGTGGCAtAAAATGGGTGGCAtAAAATGGGTGGCAtAAA) (서열번호 1)를, 표면 상에 zf15를 또한 발현하는 또 다른 세포와 혼합함에 의해 활성화될 수 있다. NFAT 전사 활성은 Jurkat T 세포에서 활성화의 리포터로서 사용된다.

도 10a-10b는 활성화 도메인에 태그된 dCas9를 통한 유전자의 (도 10a) 표적화된 활성화 및 Csy4를 사용한 (도 10b) 가이드 RNA 사이에 절단 부위 (CS)를 발현하는 단일 전사체로부터 다중 가이드 RNA를 생성하기 위해 멀티플렉스 활성화를 위한 CRISPR 시스템의 사용에 대한 도식을 도시한다.

도 11은 프로모터 및 dCas9-VP64를 향해 표적화된 sgRNA를 사용하여 TetO-결합 부위 (좌측 패널) 및 Gal4 결합 부위 (우측 패널)를 함유하는 프로모터의 활성화를 입증한다.

도 12는 본원에 기재된 양상의 예시적 구현예의 도식을 도시한다.

도 13a-13c는 인간 1차 CD4 및 CD8 T 세포에서 SUPRA CAR 플랫폼의 결과를 입증한다. 도 13a는 실험적 셋업의 도식을 도시한다. 도 13b에서 ZipCAR은 CD4+ T 세포로 도입하였다. 활성화 zipFv (항-Her2-AZIP)의 부가는 Her2를 발현하는 K562 세포에 노출되는 경우 IFN- γ 의 생성을 유도한다. 도 13c는 zipCAR+ CD8 T 세포가 용량-의존적 방식으로 표적 K562 Her2+ 세포의 용해를 유도함을 입증한다. 가공된 T 세포 없이 단독의 zipFv는 세포

사멸을 유도하지 않았다.

도 14a-14c는 SUPRA CAR 성질에 영향을 줄 수 있는 파라미터의 특징 분석을 입증한다. 도 14a는 SUPRA 플랫폼의 특징 분석을 위해 시스템적으로 조절된 파라미터 및 구성요소의 도식적 다이어그램을 도시한다. 도 14b는 항-Her2-AZIP zipFvs 상에 지퍼 친화성을 다양화하여 상응하는 zipCAR을 발현하는 1차 CD8 T 세포에 의한 종양 세포 사멸을 조정할 수 있음을 입증한다. 도 14c는 항-Her2-AZIP zipFvs 상에 항-Her2 scFv 친화성을 다양화하여 zipCAR 발현 CD8 T 세포의 세포 사멸 효능을 조정할 수 있음을 입증한다.

도 15a-15b는 SUPRA CAR 플랫폼에 의한 생체내 확립된 종양의 사멸을 입증한다. 도 15a는 종양 이식 42일 후 통상적인 CAR 또는 SUPRA CAR로 변형된 T 세포로 처리된 마우스에서의 종양 루시페라제 발현을 도시한다. 항상성으로 루시페라제를 발현하는 Her2+ 종양 세포는 15마리 마우스에 복강내 이식하였다. 12일 후에, CAR T 세포를 마우스에 주사하고 항-HER2 zipFv는 1일 후에 첨가하였다. IVIS를 통한 종양 이미징화는 주기적으로 수행하였다. 도 15b는 12일 내지 40일에 SUPRA T 세포 또는 대조군으로 처리된 마우스에서 Her2+ 종양 크기의 그래프를 도시한다.

도 16은 논리 연산을 위한 SUPRA CAR 플랫폼의 디자인, 불린 논리연산을 생성하기 위해 사용될 수 있는 zipCARs 및 zipFvs 디자인을 도시한다. 널(null) 상태(항원 또는 투입 부재)가 어떠한 산출을 생성하지 않는 경우 8개의 가능한 2-투입 불린 논리 거동이 있다. 도식적 다이어그램은 SUPRA 시스템이 어떻게 가공되어 OR, NIMPLY, AND, 및 XOR 논리를 나타낼 수 있는지를 입증하기 위해 제공된다.

도 17은 Ax1에 대한 신규 CAR의 디자인 및 특징 분석을 도시한다. IL-2 생성에 의한 측정시 인간 1차 CD4+ T 세포에서 Ax1 CAR의 투입 반응 활성.

도 18은 경쟁적으로 결합하는 류신 지퍼를 통한 억제제 zipFv의 디자인을 입증한다. 좌측 상에 억제성 zipFv 디자인의 예의 도식이 제공되고, 상기 디자인에서 BZIP는 scFv에 부착되고 이의 활성화를 억제하기 위해 활성화 zipFv에 대해 zipCAR과 경쟁할 수 있다. 우측 상에 NFAT 전사 활성화에 의한 측정시 zipCAR 및 활성화 항-Her2-AZIP zipFv에 의한 Jurkat 활성화의 그래프가 있다. 나타낸 바와 같이, 활성화는 항-Her2-BZIP zipFvs와 경쟁시킴에 의해 감소될 수 있다. 지퍼 친화성을 변화시켜 감소 수준을 조정할 수 있다. 비-경쟁 BZIP (syn 6)는 zipCAR 활성화를 감소시키지 않았다.

도 19a-19c는 SUPRA CAR 플랫폼에서 직교 류신 지퍼 및 PD-1 신호 전달 도메인의 용도를 입증한다. 도 19c는 세포내 신호 전달 도메인으로서 CD3 ζ , CD28, 및 4-1BB를 갖는 zipCAR을 생성하기 위해 사용되는 37 지퍼 (AZIP 및 BZIP 둘 다)의 히트맵을 도시한다. zipCAR 각각은 NFAT 전사 리포터 (pNFAT-GFP)를 함유하는 Jurkat T 세포로의 렌티바이러스 형질도입을 통해 형질도입하였다. zipCAR이 활성화되는 경우, pNFAT-GFP 리포터가 활성화되고 GFP 발현을 생성한다. GFP 발현은 유동 세포측정을 사용하여 정량하였다. 각각의 지퍼는 임의의 신호 전달 도메인과 융합되지 않은, "죽은" 버전의 또 다른 지퍼를 발현하는 Jurkat 표적 세포주와의 동시 배양에 의해 분석하였다. 모든 zipCAR은 모든 다른 지퍼에 대한 표적 세포주에 대해 시험하여 SUPRA CAR 플랫폼에서 사용될 수 있는 직교 지퍼 쌍을 동정하였다. 도 19b는 지퍼의 3개의 직교 쌍이 Jurkat T 세포에서 NFAT 전사 활성을 기준으로 동정되었음을 입증한다. 도 19c는 PD-1 세포내 신호 전달 도메인이 항-메소텔린 scFv (zipCAR이 아님)에 융합되었음을 입증하고, PD-1이 Jurkat T 세포에서 항-HER2 CAR 활성을 억제할 수 있음을 보여준다.

도 20은 상이한 경로를 제어하는 SUPRA CAR로부터의 예시적 거동을 도시한다.

도 21은 인간 T 세포로 멀티플렉스된 PiggyBAC 통합을 도시한다. 각각 GFP, mCherry, 또는 BFP를 발현하고 별도로 3개의 상이한 항생제 내성 유전자를 발현하는 3개의 piggyBAC 벡터는 동시에 Jurkat T 세포에 통합하였다. 3개의 항생제에 대해 선택 후, 85 % 초과 세포는 모두 3개의 형광성 리포터 단백질을 발현한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 본원에 기재된 것은 키메라 항원 수용체 (CAR)이고, 여기서, CAR의 인지 및 신호 전달 부분은 별도의 폴리펩타이드이다. 완전한 CAR을 구성하는 2개의 별도의 폴리펩타이드는 상호작용할 수 있고 단백질 상호작용 도메인에 의해 완전한 CAR을 형성할 수 있다. 이것은 융통성 있는 모듈러 CAR-T 치료요법을 가능하게 하고 이는 복잡한 논리 계산을 할 수 있게 하여 면역치료요법에 대해 보다 정확하고 효과적인 접근점을 제공한다.

[0036] 임의의 구현예의 하나의 양상에서 다성분 키메라 항원 수용체 (CAR) 및/또는 다성분 CAR을 포함하는 조성물이 있다. 다성분 CAR은 또한 본원에서 다양하게 SMART CAR 또는 SUPRA로서 언급된다.

- [0037] 본원에 사용된 바와 같은 "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR"은 세포 신호전달 및/또는 세포 활성화 도메인에 연결된 항원-결합 도메인 (예를 들어, 항체의 항원-결합부 (예를 들어, scFV))을 포함하는 인공적으로 작제된 하이브리드 폴리펩타이드를 언급한다. 일부 구현예에서, 세포-신호 전달 도메인은 T-세포 신호 전달 도메인일 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 활성화 도메인은 T-세포 활성화 도메인일 수 있다. CAR은 비-MHC-제한 방식으로 선택된 표적을 향해 T 세포 및 다른 면역 세포의 특이성 및 반응성을 재지시하는 능력을 갖고, 모노클로날 항체의 항원-결합 성질을 활용한다. 상기 비-MHC-제한 항원 인지는 CAR을 발현하는 T-세포에게 항원 프로세싱과 무관하게 항원을 인지하는 능력을 부여함에 따라서 중앙 회피의 주요 기작을 우회한다. 더욱이, T-세포에서 발현되는 경우, CAR은 유리하게 내인성 T-세포 수용체 (TCR) 알파 및 베타쇄와 이량체화하지 않는다. 대부분 통상적으로, CAR의 세포외 결합 도메인은 무린의 가변 중쇄 및 경쇄 영역을 융합시키는 것으로부터 유래된 단일쇄 가변 단편 (scFv) 또는 인간화된 모노클로날 항체로 구성된다. 대안적으로, scFv가 사용될 수 있고 Fab (대신, 예를 들어, Fab 라이브러리로부터 수득된 항체로부터)로부터 유래되고, 다양한 구현예에서, 상기 scFv는 막관통 도메인에 융합되고 이어서 세포내 신호 전달 도메인에 융합된다. "제1-세대" CAR은 유일하게 항원 결합시 CD3zeta 신호를 제공하는 것들을 포함하고, "제2-세대" CAR은 동시자극 (예를 들어, CD28 또는 CD137) 및 활성화 (CD3Q) 둘 다를 제공하는 것들을 포함한다. "제3-세대" CAR은 다중 동시자극 (예를 들어, CD28 및 CD137) 및 활성화 (CD3Q)를 제공하는 것들을 포함한다. 다양한 구현예에서, CAR은 항원에 대해 높은 친화성 또는 결합가를 갖도록 선택된다. CAR의 추가의 논의는 예를 들어, 문헌[Maus et al. Blood 2014 123:2624-35; Reardon et al. Neuro-Oncology 2014 16:1441-1458; Hoyos et al. Haematologica 2012 97:1622; Byrd et al. J Clin Oncol 2014 32:3039-47; Maher et al. Cancer Res 2009 69:4559-4562; and Tamada et al. Clin Cancer Res 2012 18:6436-6445; 이들 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용된다]에서 찾을 수 있다.
- [0038] 본원에 사용된 바와 같은 "다성분 CAR"은 적어도 2개의 별도의 폴리펩타이드를 포함하는 CAR을 언급하고 상기 폴리펩타이드 중 어느 것도 이들 자체로서 리간드 인지 및 신호 전달 활성화 둘 다를 할 수 없다. 일부 구현예에서, 적어도 2개의 별도의 폴리펩타이드 각각은 상호작용, 예를 들어, 별도의 폴리펩타이드의 결합을 가능하게 하는 단백질 상호작용 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 2개의 별도의 폴리펩타이드 중 하나는 세포내 T 세포 수용체 (TCR) 신호 전달 도메인을 갖는 막관통 폴리펩타이드이고, 적어도 2개의 별도의 폴리펩타이드 중 2번째 것은 리간드-결합 도메인을 갖는 세포외 폴리펩타이드이다. 일부 구현예에서, 다성분 CAR은 2개, 3개, 4개, 5개 이상의 별도의 폴리펩타이드를 포함할 수 있다.
- [0039] 구현예의 하나의 양상에서, 본원에 기재된 것은 다성분 키메라 항원 수용체 (CAR)이고; 상기 다성분 CAR은: a) 1) 제1 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 단백질 상호작용 도메인을 포함하는 제1 인지 폴리펩타이드 및 b) 1) 제1 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인과 함께 특이적으로 결합할 수 있는 세포외 단백질 상호작용 도메인 및 2) 세포내 T 세포 수용체 (TCR) 신호 전달 도메인을 포함하는 신호 전달 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0040] 본원에 사용된 바와 같은 "인지 폴리펩타이드"는 리간드-결합 도메인을 갖는 세포외 폴리펩타이드를 언급한다. 일부 구현예에서, 리간드-결합 도메인은 항체 시약일 수 있다. 일부 구현예에서, 인지 폴리펩타이드는 추가로 단백질 상호작용 도메인을 포함할 수 있다.
- [0041] 본원에 사용된 바와 같은 "신호 전달 폴리펩타이드"는 세포내 T 세포 수용체 (TCR) 신호 전달 도메인을 갖는 막관통 폴리펩타이드를 언급한다. 일부 구현예에서, 신호 전달 폴리펩타이드는 추가로 단백질 상호작용 도메인을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 신호 전달 폴리펩타이드는 추가로 세포외 단백질 상호작용 도메인을 포함할 수 있다.
- [0042] 본원에 사용된 바와 같은 "단백질 상호작용 도메인"은 2개의 별도의 폴리펩타이드의 서로에 대한 특이적 결합을 가능하게 하는 도메인을 언급한다. 단백질 상호작용 도메인의 쌍 뿐 만 아니라 다수의 예시적 단백질 상호작용 도메인은 본원에서 그밖의 다른 곳에 제공된다. 일부 구현예에서, 다성분 CAR의 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인은 특이적으로 결합할 수 있고, 예를 들어, 단백질 상호작용 도메인 중 하나는 다성분 CAR의 제2 단백질 상호작용 도메인에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 특이적 결합은 2개의 별도의 단백질 상호작용 도메인이 존재하는 경우 일어날 수 있다. 일부 구현예에서, 특이적 결합은 3개 이상의 별도의 단백질 상호작용 도메인이 존재하는 경우 일어날 수 있다. 예시적 단백질 상호작용 도메인은 당업계에 공지되어 있고 본원에 기재된 양상의 구현예에 사용될 수 있다.
- [0043] 본원에 기재된 임의의 양상의 일부 구현예에서, 단백질 상호작용 도메인은 류신 지퍼 도메인일 수 있다. 류신 지퍼 도메인은 α -나선구조를 통해 균등하게 공간에 분포된 류신 잔기를 특징으로 하는 전사 인자에서 통상적으

로 발견되는 일종의 단백질-단백질 상호작용 도메인이다. 류신 지퍼는 이중이량체 또는 동종이량체를 형성할 수 있다. 서로 결합하는 이들의 능력 뿐만 아니라 다수의 류신 지퍼 도메인은 당업계에 공지되어 있고 추가로 예를 들어, 문헌 (Reinke et al. JACS 2010 132:6025-31 및 Thomposon et al. ACS Synth Biol 2012 1:118-129; 이들 각각은 본원에 이의 전문이 참조로 인용된다)에서 논의되었다. 일부 구현예에서, 하나의 류신 지퍼 도메인은 BZip (RR)이고 제2 류신 지퍼 도메인은 AZip (EE)이다. 일부 구현예에서, BZip (RR) 류신 지퍼 도메인의 서열은 MDPDLIRAAFLRQRNTALRTEVALEQEVQRLENEVSQYETRYGPLGGGK (서열번호 2)이다. 일부 구현예에서, AZip (EE) 류신 지퍼 도메인의 서열은 MDPDLIEAAFLERENTALETRVAELRQRVQRLNRVSQYRTRYGPLGGGK (서열번호 3)이다. 추가로 예시적 류신 지퍼 도메인은 문헌(Reinke et al. JACS 2010 132:6025-31; 이는 본원에서 이의 전문이 참조로 인용된다)에 기재되어 있다. 예를 들어, 적합한 류신 지퍼 도메인은 SYNZIP 1 내지 SYNZIP 48, 및 BATF, FOS, ATF4, ATF3, BACH1, JUND, NFE2L3, 및 HEPTAD를 포함할 수 있다. 이들 도메인의 다양한 조합의 결합 친화성은 예를 들어, 문헌 (Reinke et al.)의 도 1에 기재되어 있다. 일부 구현예에서, 적합한 쌍의 류신 지퍼 도메인은 1000 nM 이하의 해리 상수 (Kd)를 갖는다. 일부 구현예에서, 적합한 쌍의 류신 지퍼 도메인은 100 nM 이하의 해리 상수 (Kd)를 갖는다. 일부 구현예에서, 적합한 쌍의 류신 지퍼 도메인은 10 nM 이하의 해리 상수 (Kd)를 갖는다. 일부 구현예에서, 적합한 쌍의 류신 지퍼 도메인은 1 nM 이하의 해리 상수 (Kd)를 갖는다.

[0044] 추가로, 예시적 쌍의 단백질 상호작용 도메인은 a) PSD95-Dlg1-zo-1 (PDZ) 도메인; b) 스트렙타아비딘 도메인 및 스트렙타아비딘 결합 단백질 (SBP) 도메인; 및 c) PYL 도메인 및 ABI 도메인을 포함할 수 있다.

[0045] 본원에 기재된 임의의 양상의 일부 구현예에서, 단백질 상호작용 도메인은 화학적으로 유도된 단백질 상호작용 도메인, 예를 들어, 제3 분자, 예를 들어, 소분자 또는 약물의 존재하에 단지 특이적으로 결합하는 도메인일 수 있다. 예시적 쌍의 화학적으로 유도된 단백질 상호작용 도메인은 다음을 포함할 수 있다: mTOR 의 FKBP-결합 도메인 (FRB) 및 FK506 결합 단백질 (FKBP)(이의 결합은 타크롤리무스, 에베롤리무스 또는 라팔로그에 의해 활성화된다); 사이클로필린-Fas 융합 단백질 (CyP-Fas) 및 FK506 결합 단백질 (FKBP) (이의 결합은 FKCsA에 의해 활성화된다); 칼시뉴린A (CNA) 및 FK506 결합 단백질 (FKBP) (이의 결합은 Fk506에 의해 활성화된다); 지베렐린 불감성 (GIA) 및 지베렐린 불감성 드워프1 (GID1) (이의 결합은 지베렐린에 의해 활성화된다); 스냅-태그 및 할로 태그 (이의 결합은 HaXS에 의해 활성화된다); 및 T14-3-3-cdeltaC 및 PMA2의 C-말단 펩타이드 (CT52) (이의 결합은 푸시코신에 의해 활성화된다). 화학적으로-유도된 단백질 상호작용 도메인의 추가의 기재는 당업계에, 예를 들어, 문헌 (Miyamoto et al. Nat Chem Biol. 2012 Mar 25; 8(5): 465-470 및 Belshaw et al. PNAS 1996 93:4604-4607; 이들 각각은 본원에서 이의 전문이 참조로 인용된다)에서 찾을 수 있다.

[0046] 본원에 기재된 임의의 양상의 일부 구현예에서, 단백질 상호작용 도메인은 적어도 하나의 뉴클레오타이드 태그 및 적어도 하나의 아연 핑거 도메인을 포함할 수 있다. 아연 핑거 도메인은 이들의 3차 구조를 안정화시키기 위한 아연 이온의 구성을 특징으로 한다. 아연 핑거에 나타나는 특정 폴드는 다양할 수 있다. 일부 구현예에서, 아연 핑거 도메인은 뉴클레오타이드-결합 아연 핑거 도메인일 수 있다. 일부 구현예에서, 아연 핑거 도메인은 DNA-결합 아연 핑거 도메인일 수 있다. 일부 구현예에서, 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인은 뉴클레오타이드 태그이고 신호 전달 폴리펩타이드의 세포의 단백질 상호작용 도메인은 아연 핑거 도메인이다. 일부 구현예에서, 뉴클레오타이드 태그는 DNA 태그일 수 있다. 일부 구현예에서, 뉴클레오타이드 태그는 사용되는 아연 핑거 도메인에 대해 전체 인지 서열을 포함하는 dsDNA 태그일 수 있다. 예시적 아연 핑거 도메인 및 이들의 동족 뉴클레오타이드 태그는 당업계에, 예를 들어, 문헌 (Mali et al. Nature Methods 2013 10:403-406; 이는 이의 전문이 본원에 참조로 인용된다)에 기재되어 있다. 일부 구현예에서, 아연 핑거 도메인은 문헌 (Mali et al. Nature Methods 2013 10:403-406)에 기재된 바와 같은 sZF15일 수 있다.

[0047] 제3 폴리펩타이드 없이 특이적으로 결합할 수 있는 단일 인지 폴리펩타이드 및 단일 신호 전달 폴리펩타이드를 갖는 양상에서, 본원에 기재된 다성분 CAR은 표적 리간드의 존재하에 활성화됨으로써 표적 리간드의 인접 부위에서 T 세포 활성을 유도한다. 추가로 본원에 기재된 것은 논리 계산할 수 있는 다성분 CAR, 예를 들어, AND, OR, 또는 NOT 논리 게이트로서 작용하는 다성분 CAR이다.

[0048] 일부 양상에서, 본원에 기재된 것은 AND 게이트 논리를 허용하는 다성분 CAR이다. 이들 양상에서, 다성분 CAR의 활성화는 단지 2개의 표적 리간드의 존재하에서만 일어난다: 단일 표적 리간드의 인지는 활성화를 위해 충분하지 않다. 상기 다성분 CAR은 보다 큰 특이성을 허용할 수 있고 오프-표적 효과를 감소시킬 수 있다. 표적 세포 또는 조직에 대한 양호한 마커인 임의의 단일 리간드는 대상체에서 다른 곳에 위치하여 오프-표적 효과를 유도할 수 있다. 그러나, 2개의 별도의 마커 리간드의 인지를 요구하는 것은 오프-표적 활성화의 가능성을 감소시킨다. 임의의 구현예의 하나의 양상에서, 본원에 기재된 것은 다성분 키메라 항원 수용체 (CAR)이고; 상기

다성분 CAR은: a) 1) 제1 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 뉴클레오타이드 태그의 제1 부분을 포함하는 제1 인지 폴리펩타이드; b) 1) 제2 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 뉴클레오타이드 태그의 제2 부분을 포함하는 제2 인지 폴리펩타이드; 및 c) 1) 뉴클레오타이드 태그의 개별 부분들의 연결에 의해 형성된 완전한 뉴클레오타이드 태그와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 세포의 아연 핑거 도메인 및 2) 세포내 T 세포 수용체 (TCR) 신호 전달 도메인을 포함하는 신호 전달 폴리펩타이드를 포함하고; 여기서, 상기 뉴클레오타이드 태그의 개별 부분들은 이들이 서로 연결되지 않는 경우 아연 핑거 도메인에 의해 특이적으로 결합될 수 없다. 일부 구현예에서, 뉴클레오타이드 태그의 제1 부분은 ssDNA이고 뉴클레오타이드 태그의 제2 부분은 상보적 ssDNA이어서 2개의 태그가 하이브리드화하는 경우 이들은 아연 핑거 도메인에 의해 특이적으로 결합될 수 있는 dsDNA를 형성한다. 일부 구현예에서, 뉴클레오타이드 태그의 제1 부분은 제1 오버행을 갖는 dsDNA이고 뉴클레오타이드 태그의 제2 부분은 상보적 오버행을 갖는 dsDNA에 이어서 dsDNA는 아연 핑거 결합을 위해 요구되는 전체 인지 서열을 포함하지 않고 오버행이 하이브리드화하는 경우 아연 핑거 결합을 위해 요구되는 전체 인지 서열을 포함하는 단일 dsDNA가 형성된다. 도 8a-8c는 아연 핑거 도메인을 포함하는 예시적 다성분 CAR을 도시한다.

[0049] 임의의 구현예에서, 본원에 기재된 것은 다성분 키메라 항원 수용체 (CAR)이고; 상기 다성분 CAR은: a) 1) 제1 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 뉴클레오타이드 태그의 제1 부분을 포함하는 제1 인지 폴리펩타이드; b) 1) 제2 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 뉴클레오타이드 태그의 제2 부분을 포함하는 제2 인지 폴리펩타이드; 및 c) 1) 제3 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 뉴클레오타이드 태그의 제3 부분을 암호화하는, 제3 표적 인지 폴리펩타이드; 및 d) 1) 뉴클레오타이드 태그의 개별 부분들의 연결에 의해 형성된 완전한 뉴클레오타이드 태그와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 세포의 아연 핑거 도메인 및 2) 세포내 T 세포 수용체 (TCR) 신호 전달 도메인을 포함하는, 신호 전달 폴리펩타이드를 포함하고; 여기서, 상기 뉴클레오타이드 태그의 개별 부분들은 이들이 서로 연결되지 않는 경우 아연 핑거 도메인에 의해 특이적으로 결합될 수 없다. 예를 들어, 뉴클레오타이드 태그의 개별 부분들 또는 개별 부분들의 쌍 형성 조합은 아연 핑거 도메인에 의해 특이적으로 결합될 수 없지만 모든 3개의 부분들이 서로 연결되는 경우, 수득한 복합체는 아연 핑거 도메인에 의해 특이적으로 결합될 수 있다. 일부 구현예에서, 1) 뉴클레오타이드 태그의 제1 부분은 ssDNA이고; 2) 뉴클레오타이드 태그의 제2 및 제3 부분은 ssDNA이고, 이들 각각은 제1 부분에 상보적이며 3) 뉴클레오타이드 태그의 제2 및 제3 부분은 서로 중첩되지 않는 서열을 갖는다. 아연 핑거 도메인 결합을 조절하기 위한 3개의 뉴클레오타이드 태그의 추가의 정렬은 예를 들어, DNA 오리가미를 사용하여 본원에서 고려된다. 상기 정렬은 당업계에 기재되어 있고, 예를 들어, 문헌 (Wei et al. Nature 2012 485:623-626; Ke et al. Science 2012 338:1177-1183; 및 Douglas et al. Nature 2009 459:414-418; 이들 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용된다)을 참조한다.

[0050] AND 논리 게이트 다성분 CAR의 추가의 구현예는 본원에 기재된다. 하나의 양상에서, 단백질 상호작용 도메인을 포함하는 인지 폴리펩타이드 및 단백질 상호작용 도메인을 포함하는 신호 전달 폴리펩타이드를 포함하는 다성분 CAR은 추가로 1) 제2 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 단백질 상호작용 도메인을 포함하는 제2 인지 폴리펩타이드를 포함할 수 있고; 여기서, 상기 신호 전달 폴리펩타이드는 제2 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인과 함께 특이적으로 결합하는 2차 단백질 상호작용 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 신호 전달 폴리펩타이드의 2차 단백질 상호작용 도메인, 및 제2 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인의 친화성은 신호 전달 폴리펩타이드의 제1 단백질 상호작용 도메인, 및 제1 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인의 친화성 보다 약하다. 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같이, 단백질 상호작용 도메인의 상대적 친화성은 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있고 다수의 특이적 단백질 상호작용 도메인에 대해 당업계에 공지되어 있다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 인지 폴리펩타이드는 각각 2차 단백질 상호작용 도메인을 포함하고; 상기 2차 단백질 상호작용 도메인은 서로 특이적으로 결합한다.

[0051] 본원에 기재된 임의의 양상의 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 다성분 CAR은 NOT 논리 게이트를 포함할 수 있다 (예를 들어, 도 8b 참조). 예를 들어, 제2 인지 폴리펩타이드에 의한 제2 표적 리간드의 인지는 신호 전달 폴리펩타이드 및 제1 인지 폴리펩타이드의 상호작용 (예를 들어, 특이적 결합)을 차단시킬 수 있다. 상기 구현예는 부적당하고/하거나 오프-표적 조직에서 T 세포 활성의 억제를 허용할 수 있다. 예를 들어, 제2 표적 리간드는 특히 T 세포 활성화에 민감한 조직의 마커일 수 있고 오프-표적 활성의 금지된 영역이고/이거나 목적하는 표적 조직과 마커를 공유한다. 일부 구현예에서, NOT 게이트 다성분 CAR에서, 제2 표적 리간드는 표적 조직 및/또는 세포, 예를 들어, 암 세포에서 또는 암 세포 상에서 발견되는 리간드가 아니다. 일부 구현예에서, NOT 논리 게이트 다성분 CAR의 제2 표적 리간드는 건강한 및/또는 비-표적 세포 상에서 발견되고 병든 및/또는 표적 세포 상에서는 발견되지 않는다. 하나의 양상에서, 본원에 기재된 것은 a) 1) 제1 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 제1 뉴클레오타이드 태그를 포함하는 인지 폴리펩타이드; b) 1) 제2 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 제2 뉴클레오타이드 태그를 포함하는 제2 인지 폴리펩타이드; 및 c) 1) 제1

뉴클레오타이드 태그와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 세포의 아연 핑거 도메인 및 2) 세포내 T 세포 수용체 (TCR) 신호 전달 도메인을 포함하는 신호 전달 폴리펩타이드이고; 여기서, 상기 뉴클레오타이드 태그는 이들이 서로 연결되는 경우 아연 핑거 도메인에 의해 특이적으로 결합될 수 없다. 뉴클레오타이드 쌍의 상기 쌍의 다양한 2- 및 3-차원 구성은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어, 본원의 다른 곳의 DNA 오리가미의 논의를 참조한다. 예시적 구현예에서, 제1 뉴클레오타이드 태그는 헤어핀-루프 구조를 형성하고 상기 제2 뉴클레오타이드 태그는 헤어핀-루프의 하나의 레그 부분 및 헤어핀-루프의 루프의 부분을 포함하는 제1 뉴클레오타이드 태그 부분에 상보적이다. 따라서, 제2 뉴클레오타이드 태그의 부재하에, 제1 뉴클레오타이드 태그는 동족 아연 핑거에 의해 결합될 수 있는 dsDNA 부분을 포함한다. 제2 뉴클레오타이드 태그의 존재하에, 상기 태그는 하이드리드화하여 제1 뉴클레오타이드 태그가 헤어핀-루프 구조로부터 강제로 탈폴딩되도록 하여 동일한 동족 아연 핑거의 필요한 인지 서열이 없는 dsDNA 분자를 수득한다. 상기 정렬은 예를 들어, 도 8b에서 그래프로 도시한다.

[0052] 본원에 기재된 것은 NOT 논리 게이트 다성분 CAR의 다른 구현예이다. 하나의 양상에서, 본원에 기재된 바와 같은 다성분 CAR, 예를 들어, 단백질 상호작용 도메인을 갖는 제1 인지 폴리펩타이드를 포함하는 것은 추가로 1) 제2 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 제1 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인에 결합하는 것에 대해 신호 전달 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인과 경쟁하는 단백질 상호작용 도메인을 포함하는 제2 인지 폴리펩타이드를 포함한다. 하나의 양상에서, 본원에 기재된 것은 NOT 논리 게이트 다성분 키메라 항원 수용체 (CAR)이고; 상기 다성분 CAR은: a) 1) 제1 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 단백질 상호작용 도메인을 포함하는 제1 인지 폴리펩타이드; b) 1) 제1 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인과 함께 특이적으로 결합할 수 있는 세포의 단백질 상호작용 도메인 및 2) 세포내 T 세포 수용체 (TCR) 신호 전달 도메인을 포함하는 신호 전달 폴리펩타이드; 및 c) 1) 제2 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 제1 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인에 결합하는 것에 대해 신호 전달 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인과 경쟁하는 단백질 상호작용 도메인을 포함하는 제2 인지 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 인지 폴리펩타이드에 의해 인지되는 표적 리간드는 건강한 및/또는 비-표적 세포 상에서 발견되고 병든 및/또는 표적 세포 상에서는 발견되지 않는다. 일부 구현예에서, 제2 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인 및 제1 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인은 신호 전달 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인 및 제1 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인 보다 큰 친화성을 갖는다. 상대적 결합 친화성은 예를 들어, 당업계에 공지된 결합 친화성 검정에 의해 실험적으로 결정될 수 있고 상대적 결합 친화성은 본원에 기재된 단백질 상호작용 도메인의 다수의 조합에 대해 공지되어 있고, 예를 들어, 문헌(Reinke et al. JACS 2010 132:6025-31)을 참조하고 이는 본원에서 이의 전문이 참조로 인용된다. 일부 구현예에서, 인지 폴리펩타이드 단백질 상호작용 도메인의 결합 친화성은 제1 인지 폴리펩타이드 단백질 상호작용 도메인 및 신호 전달 폴리펩타이드 상호작용 도메인의 결합 친화성 보다 적어도 2배 클 수 있다. 일부 구현예에서, 인지 폴리펩타이드 단백질 상호작용 도메인의 결합 친화성은 제1 인지 폴리펩타이드 단백질 상호작용 도메인 및 신호 전달 폴리펩타이드 상호작용 도메인의 결합 친화성 보다 적어도 5배 클 수 있다. 일부 구현예에서, 인지 폴리펩타이드 단백질 상호작용 도메인의 결합 친화성은 제1 인지 폴리펩타이드 단백질 상호작용 도메인 및 신호 전달 폴리펩타이드 상호작용 도메인의 결합 친화성 보다 적어도 10배 클 수 있다.

[0053] 본원에 사용된 바와 같은 "표적 리간드"는 리간드-결합 도메인에 의해 결합될 수 있는 세포에서 또는 세포 상에서의 분자를 언급한다. 상기 분자의 비제한적인 예는 폴리펩타이드, 지질, 사카라이드 등을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 리간드는 세포의 분자일 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 리간드는 세포 표면 분자일 수 있다.

[0054] 일부 구현예에서, 예를 들어, 단일 인지 폴리펩타이드를 갖는 다성분 CAR 또는 AND 게이트 다성분 CAR에 관한 것들에서, 표적 리간드 (예를 들어, 제1 및/또는 제2 표적 리간드)는 표적 조직에서 발현되는 리간드일 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 리간드는 표적 조직 및/또는 세포에서 항상성으로 발현될 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 리간드는 표적 조직 및/또는 세포에서 배타적으로 발현될 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 리간드는 표적 조직 및/또는 세포에서 다른 조직 및/또는 세포에서 보다 높은 수준으로 발현될 수 있다. 단일 인지 폴리펩타이드를 갖는 다성분 CAR 또는 AND 게이트 다성분 CAR에 관한 구현예에서 표적 리간드의 인지가 T 세포 활성화 (예를 들어, 표적 리간드를 포함하는 세포의 세포 사멸 활성)를 유도할 수 있기 때문에, 표적 리간드는 예를 들어, 암 세포를 표적화함에 의해 목적하고/하거나 치료학적 방식으로 T 세포 활성을 표적화하도록 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 리간드는 병든 및/또는 표적 세포에서/상에서 발견되는 리간드이다. 일부 구현예에서, 신호 전달 폴리펩타이드와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 인지 폴리펩타이드에 의해 특이적으로 결합된 표적 리간드는 AND 게이트 다성분 CAR의 일부이고 병든 및/또는 표적 세포에서/상에서 발견되는 리간드이다. 일부 구현예에서, 신호 전달 폴리펩타이드와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 인지 폴리펩타이드에 의해

특이적으로 결합된 표적 리간드는 AND 게이트 다성분 CAR의 일부이고 병든 및/또는 표적 세포 상에서 발견되고 건강한 및/또는 비-표적 세포 상에서는 발견되지 않는 리간드이다. 일부 구현예에서, 병든 세포는 암성 세포이다. 일부 구현예에서, 신호 전달 폴리펩타이드와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 인지 폴리펩타이드에 의해 특이적으로 결합된 표적 리간드는 AND 게이트 다성분 CAR의 일부이고 암 세포의 표면 상에서 발견된다. 일부 구현예에서, 신호 전달 폴리펩타이드와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 인지 폴리펩타이드는 AND 게이트 다성분 CAR의 일부이고 이는 예를 들어, 정상 세포에 결합하는 것과 비교하여 암 세포의 표면 상의 표적 리간드에 특이적으로 결합한다.

[0055] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 조성물 및/또는 세포는 제1 다성분 CAR에 대해 본원에 기재된 임의의 양상 및 구현예에 따라 제2 다성분 CAR을 추가로 포함할 수 있다. 비-제한적인 예에 의해, 제2 CAR은 제1 다성분 CAR이 특이적으로 결합하는 (및 예를 들어, 이에 의해 활성화되거나 억제되는) 것들과는 상이한 표적 리간드에 특이적으로 결합하도록 (및 예를 들어, 이에 의해 활성화되거나 억제되는) 디자인될 수 있다. 이것은 증가된 특이성, 감소된 오프-표적 효과 및/또는 본원에 기재된 방법에 대해 감소된 유효 용량을 제공할 수 있다. 일부 구현예에서, 제2 다성분 CAR의 항체 시약은 제1 다성분 CAR의 항체 시약에 의해 결합된 것들과는 상이한 표적 리간드에 특이적으로 결합한다.

[0056] 일부 구현예에서, 제2 다성분 CAR은 억제 세포내 T 세포 수용체 (TCR) 신호전달 도메인, 예를 들어, T 세포 활성을 억제하는 도메인을 포함할 수 있다. 상기 구현예에서, 제2 다성분은 따라서 제1 다성분 CAR과는 반대로 작동하도록, 예를 들어, 제1 다성분 CAR이 T 세포 활성의 활성화를 허용하면서 T 세포 활성화의 억제를 허용하도록 디자인될 수 있다. 억제 세포내 TCR 신호 전달 도메인은 당업계에 공지되어 있고 비제한적인 예로서, PD1; CTLA4; BTLA; KIR; LAG-3; TIM-3; A2aR; LAIR-1; 및 TGIT를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 억제 세포내 TCR 신호 전달 도메인을 포함하는 제2 다성분 CAR의 신호 전달 폴리펩타이드와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 인지 폴리펩타이드에 의해 특이적으로 결합된 표적 리간드는 건강한 및/또는 비-표적 세포 상에서 발견되는 리간드이다. 일부 구현예에서, 억제 세포내 TCR 신호 전달 도메인을 포함하는 제2 다성분 CAR의 신호 전달 폴리펩타이드와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 인지 폴리펩타이드에 의해 특이적으로 결합되는 표적 리간드는 건강한 및/또는 비-표적 세포 상에서 발견되고 병든 및/또는 표적 세포 상에서는 발견되지 않는 리간드이다. 일부 구현예에서, 억제 세포내 TCR 신호 전달 도메인을 포함하는 제2 다성분 CAR은 본원에 기재된 임의의 구현예 중 임의의 것에 따라 OR 논리 게이트일 수 있고 제2 표적 리간드는 환부 (예를 들어, 암) 세포에서/상에서 발견되는 리간드 또는 이에 특이적인 리간드일 수 있다.

[0057] 임의의 양상의 일부 구현예에서, 리간드-결합 도메인은 항체 시약을 포함하거나 필수적으로 이것으로 이루어질 수 있다. 일부 구현예에서, 항체 시약은 면역글로불린 분자, 모노클로날 항체, 키메라 항체, CDR-접목 항체, 인간 항체, 인간화된 항체, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, 디설파이드 연결된 Fv, scFv, 단일 도메인 항체, 디아바디, 다중특이적 항체, 이원 특이적 항체, 항-유전자형 항체, 및/또는 이특이적 항체일 수 있다.

[0058] 일부 구현예에서, 세포내 TCR 신호 전달 도메인은 T-세포 활성화 도메인일 수 있다. 일부 구현예에서, 세포내 TCR 신호 전달 도메인은 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질 기원의 신호 전달 도메인이다: TCR ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b, CD66d, CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM, ZAP70, 및 41BB.

[0059] 본원에 기재된 다성분 CAR은 세포 활성, 예를 들어, T, NK, 또는 NKT 세포 활성, 예를 들어, 상기 세포에 의해 매개되고/되거나 수행되는 세포-사멸 활성의 조절을 허용할 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 다성분 CAR은 세포에서/상에서 존재할 수 있다. 일부 구현예에서, 신호 전달 폴리펩타이드는 세포의 막 상에 존재한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 인지 폴리펩타이드는 세포외 공간에 존재하고, 예를 들어, 인지 폴리펩타이드(들)는 세포에 의해 발현되고 분비될 수 있거나, 세포는 또 다른 공급원(예를 들어, 합성적으로 생성되거나 또 다른 세포에 의해 생성되고 임의의 접촉 단계 전에 정제되거나 프로세싱되는)으로부터 제공되는 인지 폴리펩타이드에 의해 접촉될 수 있다.

[0060] 하나의 양상에서, 본원에 기재된 것은 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 다성분 CAR, 예를 들어, 적어도 하나의 신호 전달 폴리펩타이드 및 적어도 하나의 인지 폴리펩타이드를 발현하고/하거나 포함하는 가공된 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 T 세포, NK 세포, 또는 NKT 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 T 세포이다. 다성분 CAR의 신호 전달 폴리펩타이드 및 적어도 하나의 인지 폴리펩타이드 둘 다를 발현하고/하거나 포함

하는 상기 세포는 본원에서 "완전한 다성분 CAR" 세포로서 언급된다. 일부 구현예에서, 완전한 다성분 CAR 세포는 다성분 CAR의 신호 전달 폴리펩타이드 및 적어도 하나의 인지 폴리펩타이드 둘 다를 발현한다. 일부 구현예에서, 완전한 다성분 CAR 세포는 다성분 CAR의 신호 전달 폴리펩타이드 및 적어도 하나의 인지 폴리펩타이드 둘 다를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.

[0061] 본원에 기재된 임의의 양상에서, 예를 들어, 완전하거나 부분적 다성분 CAR 세포에 관한 것들에서, 인지 및/또는 신호 전달 폴리펩타이드는 유도성 및/또는 억제성 프로모터의 제어하에 있을 수 있다. 상기 프로모터는 폴리펩타이드의 발현이 목적하는 바와 같이 증가되거나 감소되도록 하고 항상성 프로모터와는 대조적이다. 용어 "항상성 활성 프로모터"는 소정의 세포 내에서 항상 발현되는 유전자의 프로모터를 언급한다. 포유동물 세포에 사용하기 위한 예시적 프로모터는 사이토메갈로바이러스 (CMV) 등을 포함한다. 용어 "유도성 프로모터"는 소정의 신호, 예를 들어, 제제의 부가 또는 감소에 응답하여 발현될 수 있는 유전자의 프로모터를 언급한다. 유도성 프로모터의 비-제한적인 예는 특정 조직 유형에서 조절되는 프로모터, 스테로이드 호르몬에 의해, 폴리펩타이드 호르몬에 의해 (예를 들어, 단일 신호 전달 경로에 의해) 또는 이중성 폴리펩타이드에 의해 (예를 들어, 테트라사이클린-유도성 시스템, "Tet-On" 및 "Tet-Off", 예를 들어, 하기 문헌을 참조한다: Clontech Inc., CA, Gossen and Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547, 1992, 및 Paillard, Human Gene Therapy 9:983, 1989; 이들 각각은 본원에서 이의 전문이 참조로 인용된다) 조절된 프로모터이다. 일부 구현예에서, 폴리펩타이드의 발현은 예를 들어, 특정 생리학적 조절제, 예를 들어, 순환 글루코스 수준, 또는 호르몬에 민감한 유도성 조절 서열을 사용함에 의해 정확하게 조절될 수 있다 (Docherty *et al.*, 1994, FASEB J. 8:20-24). 세포 또는 포유동물에서 발현의 제어를 위해 적합한 상기 유도성 발현 시스템은 예를 들어, 엑디손에 의한, 에스트로겐, 프로게스테론, 테트라사이클린, 이량체화의 화학적 유도제 및 이소프로필-베타-D1-티오갈락토피라노사이드 (IPTG)에 의한 조절을 포함한다. 당업자는 폴리펩타이드의 의도된 용도를 기준으로 적당한 조절/프로모터 서열을 선택할 수 있다.

[0062] 일부 구현예에서, 인지 또는 신호 전달 폴리펩타이드의 하나 이상의 발현은 항상성일 수 있다. 일부 구현예에서, 인지 또는 신호 전달 폴리펩타이드의 하나 이상의 발현은 일시적일 수 있다. 일시적 발현은 예를 들어, 일시적 및/또는 유도성 발현 프로모터의 사용에 의해 또는 일시적 벡터, 예를 들어, 게놈에 혼입되지 않은 것들 및/또는 표적 세포에 지속하지 않는 것들을 사용함에 의해 성취될 수 있다. 비-제한적인 예로서, 소 파필로마 바이러스 (BPV-1) 또는 엡슈타인-바르 바이러스 (pHEBo, pREP-유래된 및 p205)와 같은 바이러스 유도체는 진핵 세포에서 핵산의 일시적 발현을 위해 사용될 수 있다. 다른 적합한 발현 시스템, 및 일반적인 제조법 과정은 문헌 (Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989) Chapters 16 and 17; 이는 이의 전문이 본원에 참조로 인용된다)을 참조한다. 일부 구현예에서, 다성분 CAR의 신호 전달 폴리펩타이드는 항상성으로 발현될 수 있고 인지 폴리펩타이드는 일시적으로 발현될 수 있다. 일부 구현예에서, 다성분 CAR의 인지 폴리펩타이드는 항상성으로 발현될 수 있고 신호 전달 폴리펩타이드는 일시적으로 발현될 수 있다.

[0063] 하나의 양상에서, 본원에 기재된 것은 표적 세포를 사멸시키는 방법이고, 상기 방법은 상기 세포를 본원에 기재된 임의의 구현예에 따른 완전한 다성분 CAR 세포와 접촉시킴을 포함한다. 일부 구현예에서, 표적 세포는 병든 세포, 예를 들어, 암 세포일 수 있다. 하나의 양상에서, 본원에 기재된 것은 질환을 치료하는 방법이고, 상기 방법은 본원에 기재된 임의의 구현예에 따른 완전한 다성분 CAR 세포를 투여함을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 질환은 암; 고형암; 유방암; 폐암; 급성 림프구성 백혈병; 다발성 골수종; 및 난치성 다발성 골수종일 수 있다. 하나의 양상에서, 본원에 기재된 것은 암을 치료하는 방법이고, 상기 방법은 본원에 기재된 임의의 구현예에 따른 완전한 다성분 CAR 세포를 투여함을 포함한다. 일부 구현예에서, 완전한 다성분 CAR 세포는 대상체에 자가성일 수 있다. 일부 구현예에서, 완전한 다성분 CAR 세포는 대상체로부터 획득된 세포로부터 유래되고/되거나 기원할 수 있고 적어도 하나의 다성분 CAR을 포함하도록 생체의 변형되고, 예를 들어, 다성분 CAR의 신호 전달 폴리펩타이드 및 적어도 하나의 인지 폴리펩타이드 둘 다를 암호화하는 핵산 서열을 포함하도록 유전학적으로 가공되었다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 대상체로부터 세포 (예를 들어, T, NK, 또는 NKT 세포 또는 이의 선조체)를 획득하는 단계, 다성분 CAR의 신호 전달 폴리펩타이드와 적어도 하나의 인지 폴리펩타이드 둘 다를 암호화하는 핵산 서열을 포함하도록 세포를 변형시키는 단계, 및 이어서 상기 세포를 대상체에 투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0064] 하나의 양상에서, 본원에 기재된 것은 본원에 기재된 임의의 구현예에 따른 하나 이상의 다성분 CAR 신호 전달 폴리펩타이드를 발현하고/하거나 이를 포함하는 가공된 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 T 세포, NK 세포, 또는 NKT 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 T 세포이다. 다성분 CAR 신호 전달 폴리펩타이드를

발현하고/하거나 이를 포함하는 상기 세포는 본원에서 "부분 다성분 CAR" 세포로서 언급된다. 일부 구현예에서, 부분 다성분 CAR 세포는 다성분 CAR 인지 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 서열을 발현하지 않고, 예를 들어, 이를 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 부분 다성분 CAR 세포는 적어도 하나의 다성분 CAR 신호 전달 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 다성분 CAR 신호 전달 폴리펩타이드는 세포의 막 상에 존재하고, 예를 들어, 검출가능한 수준으로 막관통 단백질을 발현된다. 일부 구현예에서, 신호 전달 폴리펩타이드는 제2 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인과 함께 특이적으로 결합하는 2차 단백질 상호작용 도메인을 추가로 포함하고, 예를 들어, 상기 신호 전달 폴리펩타이드는 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같은 AND 게이트 다성분 CAR의 일부이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 제2 다성분 CAR 신호 전달 폴리펩타이드, 예를 들어, 본원에 기재된 임의의 구현예에 따른 제2 다성분 CAR의 일부인 신호 전달 폴리펩타이드를 추가로 포함할 수 있다.

[0065] 하나의 양상에서, 본원에 기재된 것은 표적 세포를 사멸시키는 방법이고, 상기 방법은 상기 표적 세포를 본원에 기재된 임의의 구현예에 따른 부분적인 다성분 CAR 세포와 접촉시키고 상기 표적 세포를 다성분 CAR의 적어도 하나의 인지 폴리펩타이드와 접촉시킴을 포함한다. 일부 구현예에서, 표적 세포는 병든 세포, 예를 들어, 암 세포일 수 있다. 하나의 양상에서, 본원에 기재된 것은 질환을 치료하는 방법이고, 상기 방법은 치료를 필요로 하는 대상체에게 부분 다성분 CAR 세포 및 1) 제1 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 상기 부분 다성분 CAR의 신호 전달 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인과 함께 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 상호작용 도메인을 포함하는 제1 인지 폴리펩타이드를 투여함을 포함한다. 일부 구현예에서, 부분 다성분 CAR 세포는 대상체에 자가일 수 있다. 일부 구현예에서, 부분 다성분 CAR 세포는 대상체로부터 수득한 세포로부터 유래되고/되거나 기원할 수 있고 적어도 하나의 부분 다성분 CAR을 포함하도록 생체의 변형되고, 예를 들어, 다성분 CAR의 신호 전달 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 서열을 포함하도록 유전학적으로 가공되었다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 대상체로부터 세포 (예를 들어, T, NK, 또는 NKT 세포 또는 이의 선조체)를 수득하는 단계, 다성분 CAR의 신호 전달 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 서열을 포함하도록 세포를 변형시키는 단계, 및 이어서 상기 세포를 대상체에 투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0066] 일부 구현예에서, 부분 다성분 CAR 세포는 본원에 기재된 임의의 구현예에 따른 NOT 게이트 다성분 CAR을 포함한다. 일부 구현예에서, 부분 다성분 CAR 세포 및 제1 인지 폴리펩타이드를 투여받은 대상체에 추가로 1) 제2 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 제1 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인에 결합하는 것에 대해 신호 전달 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인과 경쟁하는 단백질 상호작용 도메인을 포함하는 제2 인지 폴리펩타이드를 투여한다. 일부 구현예에서, 제2 인지 폴리펩타이드에 의해 인지되는 표적 리간드는 건강한 및/또는 비-표적 세포 상에서 발견되고 병든 및/또는 표적 세포 상에서는 발견되지 않는다. 일부 구현예에서, 제2 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인 및 제1 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인은 신호 전달 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인 및 제1 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인 보다 큰 친화성을 갖는다. 일부 구현예에서, 1) 제1 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 제1 뉴클레오타이드 태그를 포함하는 제1 인지 폴리펩타이드; 및 1) 제2 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 제2 뉴클레오타이드 태그를 포함하는 제2 인지 폴리펩타이드 (여기서, 상기 신호 전달 폴리펩타이드는 1) 제1 뉴클레오타이드 태그와 특이적으로 결합할 수 있는 세포의 아연 핑거 도메인을 포함하고; 상기 뉴클레오타이드 태그는 이들이 서로 연결되지 않는 경우 아연 핑거 도메인에 의해 특이적으로 결합될 수 없다). 일부 구현예에서, 제1 뉴클레오타이드 태그는 헤어핀-루프 구조를 형성하고 상기 제2 뉴클레오타이드 태그는 헤어핀-루프의 하나의 레그 부분 및 헤어핀-루프의 루프의 부분을 포함하는 제1 뉴클레오타이드 태그 부분에 상보적이다. 일부 구현예에서, 제2 표적 리간드는 건강한 및/또는 비-표적 세포 상에서 발견되고 병든 및/또는 표적 세포 상에서는 발견되지 않는다.

[0067] 일부 구현예에서, 부분 다성분 CAR 세포는 본원에 기재된 임의의 구현예에 따른 AND 게이트 다성분 CAR을 포함한다. 일부 구현예에서, 부분 다성분 CAR 세포 및 제1 인지 폴리펩타이드를 투여받은 대상체에는 추가로 1) 제2 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 단백질 상호작용 도메인을 포함하는 제2 인지 폴리펩타이드를 투여할 수 있고; 여기서, 상기 신호 전달 폴리펩타이드는 제2 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인과 함께 특이적으로 결합하는 2차 단백질 상호작용 도메인을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 인지 폴리펩타이드는 각각 2차 단백질 상호작용 도메인을 포함하고; 상기 2차 단백질 상호작용 도메인은 서로 특이적으로 결합한다. 일부 구현예에서, 신호 전달 폴리펩타이드의 2차 단백질 상호작용 도메인, 및 제2 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인의 친화성은 신호 전달 폴리펩타이드의 제1 단백질 상호작용 도메인, 및 제1 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인 보다 약하다. 일부 구현예에서, 제1 인지 폴리펩타이드는 1) 제1 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 뉴클레오타이드 태그의 제1 부분을 포함하고, 제2 인지 폴리펩타이드는 1) 제2 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 뉴클레오타이드 태그의 제2 부분을 포함하고; 여기서, 상기

신호 전달 폴리펩타이드는 1) 뉴클레오타이드 태그의 개별 부분들의 연결에 의해 형성된 완전한 뉴클레오타이드 태그와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 세포의 아연 핑거 도메인을 포함하고; 여기서, 상기 뉴클레오타이드 태그의 개별 부분들은 이들이 서로 연결되지 않는 경우 아연 핑거 도메인에 의해 특이적으로 결합될 수 없다. 일부 구현예에서, 뉴클레오타이드 태그의 제1 부분은 ssDNA이고 뉴클레오타이드 태그의 제2 부분은 상보적 ssDNA이다. 일부 구현예에서, 방법은 1) 제3 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 뉴클레오타이드 태그의 제3 부분을 암호화하는 제3 인지 폴리펩타이드를 투여함을 포함할 수 있고; 여기서, 뉴클레오타이드 태그의 개별 부분들 또는 개별 부분들의 쌍 형성 조합은 아연 핑거 도메인에 의해 특이적으로 결합될 수 없지만, 모든 3개의 부분들이 서로 연결되는 경우, 수득한 복합체는 아연 핑거 도메인에 의해 특이적으로 결합될 수 있다. 일부 구현예에서, 1) 뉴클레오타이드 태그의 제1 부분은 ssDNA이고; 2) 뉴클레오타이드 태그의 제2 및 제3 부분은 ssDNA이고, 이들 각각은 제1 부분에 상보적이며 3) 뉴클레오타이드 태그의 제2 및 제3 부분은 서로 중첩되지 않는 서열을 갖는다.

[0068] 일부 구현예에서, 부분 다성분 CAR 세포는 본원에 기재된 임의의 구현예에 따른 제2 다성분 CAR의 일부인 제2 신호 전달 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 대상체에는 추가로 1) 제2 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 제2 신호 전달 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인과 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 상호작용 도메인을 포함하는 제2 인지 폴리펩타이드가 투여된다. 일부 구현예에서, 제2 다성분 CAR 신호 전달 폴리펩타이드의 세포내 T 세포 수용체 (TCR) 신호 전달 도메인은 T 세포 활성을 억제한다. 일부 구현예에서, 제2 신호 전달 폴리펩타이드와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 인지 폴리펩타이드에 의해 특이적으로 결합된 표적 리간드는 건강한 및/또는 비-표적 세포 상에서 발견되는 리간드이다. 일부 구현예에서, 제2 신호 전달 폴리펩타이드와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 인지 폴리펩타이드에 의해 특이적으로 결합된 표적 리간드는 건강한 및/또는 비-표적 세포 상에서 발견되지만 병든 및/또는 표적 세포 상에서는 발견되지 않는 리간드이다.

[0069] 본원에 기재된 임의의 방법의 일부 구현예에서, 다성분 CAR의 한쌍의 단백질 상호작용 도메인은 화학적으로 유도된 결합 도메인을 포함할 수 있고 상기 방법은 도메인의 결합을 유도하는 화합물을 투여함을 추가로 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 하나의 단백질 상호작용 도메인이 mTOR의 FKBP-결합 도메인 (FRB)이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 FK506 결합 단백질 (FKBP)인 경우, 상기 방법은 타크롤리무스, 라파로그 또는 에버롤리무스를 투여함을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 하나의 단백질 상호작용 도메인이 사이클로필린-Fas 융합 단백질 (CyP-Fas)이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 FK506 결합 단백질 (FKBP)인 경우, 상기 방법은 FKCsA를 투여함을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 하나의 단백질 상호작용 도메인이 칼시뉴린 A (CNA)이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 FK506 결합 단백질 (FKBP)인 경우, 상기 방법은 FK506을 투여함을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 하나의 단백질 상호작용 도메인이 지베렐린 불감성 (GIA)이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 지베렐린 불감성 드워프1 (GID1)인 경우, 상기 방법은 지베렐린을 투여함을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 하나의 단백질 상호작용 도메인이 스냅-태그이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 할로 (Halo) 태그인 경우, 상기 방법은 HaxS를 투여함을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 하나의 단백질 상호작용 도메인이 T14-3-3-cdeltaC이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 PMA2의 C-말단 펩타이드 (CT52)인 경우, 상기 방법은 푸시코신을 투여함을 추가로 포함한다.

[0070] 본원에 기재된 임의의 양상의 일부 구현예에서, 다성분 CAR의 인지 및/또는 신호 전달 폴리펩타이드는 가공될 수 있다. 본원에 기재된 임의의 양상의 일부 구현예에서, 다성분 CAR의 인지 및/또는 신호 전달 폴리펩타이드는 유전자전이될 수 있다. 본원에 기재된 임의의 양상의 일부 구현예에서, 다성분 CAR의 인지 및/또는 신호 전달 폴리펩타이드는 재조합될 수 있다. 본원에 기재된 임의의 양상의 일부 구현예에서, 다성분 CAR의 인지 및/또는 신호 전달 폴리펩타이드는 세포에 이종성일 수 있다. 본원에 기재된 임의의 양상의 일부 구현예에서, 다성분 CAR의 인지 및/또는 신호 전달 폴리펩타이드는 T-세포에 이종성일 수 있다. 본원에 기재된 임의의 양상의 일부 구현예에서, 다성분 CAR의 인지 및/또는 신호 전달 폴리펩타이드는 인간 T 세포에 이종성일 수 있다. 본원에 기재된 임의의 양상의 일부 구현예에서, 다성분 CAR의 인지 및/또는 신호 전달 폴리펩타이드는 세포에 외인성일 수 있다. 본원에 기재된 임의의 양상의 일부 구현예에서, 다성분 CAR의 인지 및/또는 신호 전달 폴리펩타이드는 T 세포에 외인성일 수 있다. 본원에 기재된 임의의 양상의 일부 구현예에서, 다성분 CAR의 인지 및/또는 신호 전달 폴리펩타이드는 인간 T 세포에 외인성일 수 있다.

[0071] 본원에 구체적으로 본원에 기재된 개별 구현예의 각각이 예를 들어, 단일 세포에서 조합될 수 있는 것으로 고려된다. 비제한적인 예로서, 단일 세포는 제1 완전한 다성분 CAR 및 제2 부분 다성분 CAR을 포함할 수 있고, 각각의 다성분 CAR은 본원에 기재된 임의의 구현예에 따른 것일 수 있다.

- [0072] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 방법은 CAR-T 치료요법과 같은 CAR-면역 세포 치료요법에 관한 것이다. 표준 CAR-T 및 관련 치료요법은 대상체를 치료하기 위해 표적 세포 유형 (예를 들어, 암 세포)에 특이적으로 결합하는 CAR을 발현하는 면역 세포 (예를 들어, T 세포)의 입양 세포 전달에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 치료요법의 일부로서 투여된 세포는 대상체에 자가일 수 있다. 일부 구현예에서, 치료요법의 일부로서 투여된 세포는 대상체에 자가가 아닐 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 가공되고/되거나 본원에 기재된 바와 같이 다성분 CAR 또는 이의 일부를 발현하도록 유전학적으로 변형된다. CAR-T 치료요법의 추가의 논의는 예를 들어, 문헌 (Maus et al. Blood 2014 123:2624-35; Reardon et al. Neuro-Oncology 2014 16:1441-1458; Hoyos et al. Haematologica 2012 97:1622; Byrd et al. J Clin Oncol 2014 32:3039-47; Maher et al. Cancer Res 2009 69:4559-4562; and Tamada et al. Clin Cancer Res 2012 18:6436-6445; 이들 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용된다)에서 찾을 수 있다.
- [0073] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 기술은 본원에 기재된 치료학적 유효량의 조성물을 포함하는, 기관-특이적 카테터 (예를 들어, 신장 카테터, 담즙 카테터, 심장 카테터 등)를 포함하는 시린지 또는 카테터에 관한 것이다.
- [0074] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 방법은 암을 갖거나 갖는 것으로 진단된 대상체를 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 다성분 CAR로 치료하는 것에 관한 것이다. 암을 갖는 대상체는 암을 진단하는 현재 방법을 사용하여 담당의에 의해 동정될 수 있다. 이들 병태를 특징으로 하고 진단을 도와주는 암의 증상 및/또는 합병증은 당업계에 널리 공지되어 있고 종양의 존재, 기관 기능 손상 또는 부전증, 비정상적 혈액 계수, 체중 손실 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 암의 진단을 도와줄 수 있는 시험은 혈액 계수, X-선 및 CT 스캔을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 암의 가족력 또는 암에 대한 위험 인자 (예를 들어, 흡연 또는 방사선 노출)로의 노출은 또한 대상체가 암을 가질 가능성이 있는지의 결정 또는 암의 진단을 도와줄 수 있다.
- [0075] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "암"은 일반적으로 비정상적 세포가 제어 없이 분열하고 인근 조직을 침범할 수 있는 질환 또는 병태의 부류에 관한 것이다. 암 세포는 또한 혈액 및 림프계를 통해 신체의 다른 부분으로 전이될 수 있다. 여러 주요 유형의 암이 있다. 암종은 내부 기관을 따라 존재하거나 덮고 있는 피부에서 또는 조직에서 개시하는 암이다. 육종은 골, 연골, 지방, 근육, 혈관, 또는 다른 연결 또는 지지 조직에서 개시하는 암이다. 백혈병은 골수와 같은 혈액 형성 조직에서 개시하고 다수의 비정상적 혈액 세포가 생성되고 혈액에 진입하도록 하는 암이다. 림프종 및 다발성 골수종은 면역계의 세포에서 개시하는 암이다. 중추 신경계 암은 뇌 및 척수의 조직에서 개시하는 암이다.
- [0076] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "악성"은 종양 세포 그룹이 비제어된 성장 (즉, 정상 한계치를 넘어서는 분열), 침범 (즉, 인접 조직 상에 침입 및 파괴) 및 전이 (즉, 림프 또는 혈액을 통한 신체 중 다른 위치로 전이) 중 하나 이상을 나타내는 암을 언급한다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "전이한다"는 신체의 하나의 부위로부터 또 다른 부위로 암의 전이를 언급한다. 전이를 갖는 세포에 의해 형성된 종양은 "전이성 종양" 또는 "전이"로 불리운다. 전이성 종양은 본래의 (1차) 종양에서의 것들과 같은 세포를 함유한다.
- [0077] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "양성" 또는 "비-악성"은 보다 크게 성장할 수 있지만 신체의 다른 부위로 전이하지 않는 종양을 언급한다. 양성 종양은 자가 제한되고 전형적으로 침범하지 않거나 전이하지 않는다.
- [0078] "암 세포" 또는 "종양 세포"는 암성 성장 또는 조직의 개별 세포를 언급한다. 종양은 일반적으로 양성, 전-악성 또는 악성일 수 있는 세포의 비정상적 성장에 의해 형성되는 부종 또는 병변에 관한 것이다. 대부분의 암 세포는 종양을 형성하지만 일부, 예를 들어, 백혈병은 필연적으로 종양을 형성하지 않는다. 종양을 형성하는 암 세포에 대해, 용어 암(세포) 및 종양 (세포)은 상호 교환적으로 사용된다.
- [0079] 암 또는 종양을 갖는 대상체는 대상체의 신체에 존재하는 객관적으로 측정 가능한 암 세포를 갖는 대상체이다. 상기 정의에 포함되는 것은 악성, 활발하게 증식하는 암, 및 잠재적 휴면 종양 또는 미세전이이다. 이들의 본래의 위치로부터 이동하고 다른 주요 기관을 씨앗하는 암은 궁극적으로 환부 기관의 기능 악화를 통해 대상체의 사망을 유도할 수 있다. 백혈병과 같은 조혈 암은 대상체에서 정상 조혈 격실을 능가할 수 있어 조혈 부전을 유도하여 (빈혈, 혈소판감소증 및 호중구감소증 형태로) 궁극적으로 사망을 유도한다.
- [0080] 본원에 기재된 조성물 및 방법은 암을 갖거나 암을 갖는 것으로 진단된 대상체에 적용될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 방법은 본원에 기재된 유효량의 조성물을 대상체에 투여하여 암의 증상을 완화시킴을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, "암의 증상을 완화시키는 것"은 암과 연관된 임의의 병태 또는 증상을 개선하는 것이다. 균등하게 비처리된 대조군과 비교하여, 상기 감소는 임의의 표준 기술에 의한 측정시 적어도 5 %, 10 %, 20 %, 40 %, 50 %, 60 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % 이상 까지이다. 본원에 기재된 조성물을 대상체에게

투여하기 위한 다양한 수단이 당업자에게 공지되어 있다. 상기 방법은 경구, 비경구, 정맥내, 근육내, 피하, 경피, 기도 (에어로졸), 폐, 피부, 국소, 주사, 또는 종양내 투여를 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 투여는 국소 또는 전신일 수 있다.

[0081] 본원에서 고려되는 조성물의 투여는 에어로졸 흡입, 주사, 섭취, 수혈, 이식 (implantation) 또는 이식 (transplantation)에 의한 것을 포함하는 임의의 간편한 방식으로 수행될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 조성물은 비경구로 투여된다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "비경구 투여" 및 "비경구적으로 투여된"은 장 및 국소 투여 이외의 다른 투여 방식, 일반적으로, 주사에 의한 투여 방식을 언급하고, 제한 없이 혈관내, 정맥내, 근육내, 동맥내, 척추강내, 캡슐내, 안와내, 종양내, 심장내, 피내, 복강내, 경기관, 피하, 표피하, 관절내, 캡슐하, 지주막하, 척수내 및 흉골내 주사 및 주입을 포함한다. 하나의 구현예에서, 본원에서 고려되는 조성물은 종양, 림프절 또는 감염 부위의 직접적인 주사에 의해 대상체에 투여된다.

[0082] 일반적으로, 세포, 예를 들어, 본원에 기재된 T 세포 또는 다성분 CAR 세포를 포함하는 약제학적 조성물이 범위 내 모든 정수 값을 포함하는, 10^2 내지 10^{10} 세포/kg 체중, 바람직하게 10^5 내지 10^6 세포/kg 체중의 용량을 투여될 수 있는 것으로 진술될 수 있다. 세포의 수는 여기에 포함되는 세포의 유형과 조성물이 의도되는 궁극적인 용도에 의존한다. 본원에 제공된 용도를 위해, 세포는 일반적으로 1 리터 이하의 용적이거나, 500 mL 이하, 심지어 250 mL 또는 100 mL 이하일 수 있다. 따라서, 목적하는 세포의 밀도는 전형적으로 10^6 세포/mL 초과 및 일반적으로 10^7 세포/mL 초과, 일반적으로 10^8 세포/mL 이상이다. 면역 세포의 임상적 관련 수는 누적적으로 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 또는 10^{12} 세포와 동일하거나 초과하는 다중 주입으로 배분될 수 있다. 본 발명의 일부 양상에서, 특히, 모든 주입된 세포는 특정 표적 항원으로 재지시되기 때문에, 10^6 /킬로그램 (환자 당 10^6 - 10^{11}) 범위의 보다 낮은 세포의 수가 투여될 수 있다. 다성분 CAR 발현 세포 조성물은 이들 범위 내 용량으로 수회 투여될 수 있다. 세포는 치료요법을 진행하는 환자에 동종이계, 동계, 이종이계 또는 자가성일 수 있다. 경우에 따라, 치료는 또한 본원에 기재된 바와 같이 면역 반응의 유도를 증진시키기 위한 미토겐 (예를 들어, PHA) 또는 림포킨, 사이토킨 및/또는 케모킨 (예를 들어, IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF-알파, IL-18, 및 TNF-베타, GM-CSF, IL-4, IL-13, Flt3-L, RANTES, MIP1 α , 등)의 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, 용량은 체중 kg 당 약 1×10^5 세포 내지 약 1×10^8 세포일 수 있다. 일부 구현예에서, 용량은 체중 kg 당 약 1×10^6 세포 내지 약 1×10^7 세포일 수 있다. 일부 구현예에서, 용량은 체중 kg 당 약 1×10^6 세포일 수 있다. 일부 구현예에서, 1회 투여의 세포가 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 투여는 예를 들어, 1회, 2회 이상 반복될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 투여는, 예를 들어, 매일, 매주 또는 매월 기준으로 투여될 수 있다.

[0083] 제제에 대한 용량 범위는 잠재능에 의존하고 목적하는 효과, 예를 들어, 종양 성장을 느리게 하거나 종양 크기를 감소시키는 효과를 생성하기 위해 충분히 큰 양을 포함한다. 용량은 허용될 수 없는 부작용을 유발할 정도로 크지 않아야 한다. 일반적으로, 용량은 환자의 연령, 병태 및 성별에 따라 다양하고 당업자에 의해 결정될 수 있다. 용량은 또한 임의의 합병증의 경우에 개별 담당의에 의해 조정될 수 있다. 일부 구현예에서, 용량은 0.001 mg/kg 체중 내지 0.5 mg/kg 체중 범위이다. 일부 구현예에서, 용량 범위는 5 μ g/kg 체중 내지 100 μ g/kg 체중이다. 대안적으로, 용량 범위는 1 μ g/mL 내지 1000 μ g/mL의 혈청 수준을 유지하도록 적정될 수 있다. 전신 투여를 위해, 대상체에 예를 들어, 0.1 mg/kg, 0.5 mg/kg, 1.0 mg/kg, 2.0 mg/kg, 2.5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg, 50 mg/kg 이상과 같은 치료학적 양을 투여할 수 있다.

[0084] 상기된 용량의 투여는 반복될 수 있다. 일부 구현예에서, 투여는 하루 1회, 하루 수회 주어지고 예를 들어, 하루 3회로 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 상기된 용량은 몇 주 또는 몇 개월 동안 매일 투여된다. 치료의 지속 기간은 대상체의 임상 진행 및 치료요법에 대한 응답에 의존한다.

[0085] 일부 구현예에서, 용량은 약 2 mg/kg 내지 약 15 mg/kg일 수 있다. 일부 구현예에서, 용량은 약 2 mg/kg일 수 있다. 일부 구현예에서, 용량은 약 4 mg/kg일 수 있다. 일부 구현예에서, 용량은 약 5 mg/kg일 수 있다. 일부 구현예에서, 용량은 약 6 mg/kg일 수 있다. 일부 구현예에서, 용량은 약 8 mg/kg일 수 있다. 일부 구현예에서, 용량은 약 10 mg/kg일 수 있다. 일부 구현예에서, 용량은 약 15 mg/kg일 수 있다. 일부 구현예에서, 용량은 약 100 mg/m² 내지 약 700 mg/m²일 수 있다. 일부 구현예에서, 용량은 약 250 mg/m²일 수 있다. 일부 구

현예에서, 용량은 약 375 mg/m^2 일 수 있다. 일부 구현예에서, 용량은 약 400 mg/m^2 일 수 있다. 일부 구현예에서, 용량은 약 500 mg/m^2 일 수 있다.

[0086] 일부 구현예에서, 용량은 정맥내로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 정맥내 투여는 약 10분 내지 약 3시간의 기간 동안 일어나는 주입일 수 있다. 일부 구현예에서, 정맥내 투여는 약 30분 내지 약 90분의 기간 동안 일어나는 주입일 수 있다.

[0087] 일부 구현예에서, 용량은 약 매주 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 용량은 매주 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 용량은 약 12주 내지 약 18주 동안 매주 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 용량은 약 2주 마다 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 용량은 약 3주 마다 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 용량은 약 2주 마다 투여되는 약 2 mg/kg 내지 약 15 mg/kg 일 수 있다. 일부 구현예에서, 용량은 약 3주 마다 투여되는 약 2 mg/kg 내지 약 15 mg/kg 일 수 있다. 일부 구현예에서, 용량은 약 2주 마다 정맥내로 투여되는 약 2 mg/kg 내지 약 15 mg/kg 일 수 있다. 일부 구현예에서, 용량은 약 3주 마다 정맥내로 투여되는 약 2 mg/kg 내지 약 15 mg/kg 일 수 있다. 일부 구현예에서, 용량은 약 매주 정맥내로 투여되는 약 200 mg/m^2 내지 약 400 mg/m^2 일 수 있다. 일부 구현예에서, 용량은 약 2주 마다 정맥내로 투여되는 약 200 mg/m^2 내지 약 400 mg/m^2 일 수 있다. 일부 구현예에서, 용량은 약 3주 마다 정맥내로 투여되는 약 200 mg/m^2 내지 약 400 mg/m^2 일 수 있다. 일부 구현예에서, 총 약 2 내지 약 10회 용량이 투여된다. 일부 구현예에서, 총 4회 용량이 투여된다. 일부 구현예에서, 총 5회 용량이 투여된다. 일부 구현예에서, 총 6회 용량이 투여된다. 일부 구현예에서, 총 7회 용량이 투여된다. 일부 구현예에서, 총 8회 용량이 투여된다. 일부 구현예에서, 투여는 약 4주 내지 약 12주 동안 일어난다. 일부 구현예에서, 투여는 총 약 6주 동안 일어난다. 일부 구현예에서, 투여는 총 약 8주 동안 일어난다. 일부 구현예에서, 투여는 총 약 12주 동안 일어난다. 일부 구현예에서, 초기 용량은 후속적 용량 보다 약 1.5 내지 약 2.5배 클 수 있다.

[0088] 일부 구현예에서, 용량은 약 1 mg 내지 약 2000 mg 일 수 있다. 일부 구현예에서, 용량은 약 3 mg 일 수 있다. 일부 구현예에서, 용량은 약 10 mg 일 수 있다. 일부 구현예에서, 용량은 약 30 mg 일 수 있다. 일부 구현예에서, 용량은 약 1000 mg 일 수 있다. 일부 구현예에서, 용량은 약 2000 mg 일 수 있다. 일부 구현예에서, 용량은 매일 정맥내 주입에 의해 투여되는 약 3 mg 일 수 있다. 일부 구현예에서, 용량은 매일 정맥내 주입에 의해 투여되는 약 10 mg 일 수 있다. 일부 구현예에서, 용량은 주마다 3회 정맥내 주입에 의해 투여되는 약 30 mg 일 수 있다.

[0089] 치료학적 유효량은 종양 크기, 종양 성장 등에서 통계학적으로 유의적인 측정가능한 변화를 생성하기에 충분한 제제의 양이다 (효능 측정은 본원에서 하기에 기재되어 있다). 상기 유효량은 동물 연구 뿐만 아니라 임상 시험에서 게이지될 수 있다.

[0090] 제제는 주사에 의해 또는 시간 경과에 따른 점진적 주입에 의해 정맥내 투여될 수 있다. 소정의 경로를 위한 적당한 제형이 주어지는 경우, 예를 들어, 본원에 기재된 방법 및 조성물에 유용한 제제가 정맥내, 비강내, 흡입에 의해, 복강내, 근육내, 피하내, 강내 투여될 수 있고 연동 수단에 의해, 목적하는 경우 또는 당업자에게 공지된 다른 수단에 의해 전달될 수 있다. 본원에 사용된 화합물은 경구로, 정맥내로 또는 근육내로 암을 갖는 환자에게 투여되는 것이 바람직하다. 종양 매스로의 직접적인 국소 투여가 또한 구체적으로 고려된다.

[0091] 적어도 하나의 제제를 함유하는 치료학적 조성물은 예를 들어, 통상적으로 단위 용량으로 투여될 수 있다. 치료학적 조성물을 참조로 사용되는 경우 용어 "단위 용량"은 대상체에 대한 통합 용량으로서 적합한 물리적으로 별개의 단위를 언급하고, 각각의 단위는 요구되는 생리학적으로 허용되는 희석제, 즉, 담체 또는 비히클과 연계하여 목적하는 치료학적 효과를 생성하도록 계산된 미리 결정된 양의 활성 물질을 함유한다.

[0092] 조성물은 용량 제형과 상용성인 방식으로 그리고 치료학적 유효량으로 투여된다. 투여되는 양 및 타이밍은 치료될 대상체, 활성 성분을 활용하는 대상체 시스템의 능력 및 목적하는 치료학적 효과의 정도에 의존한다.

[0093] 부분 다성분 CAR 세포 및 인지 폴리펩타이드가 대상체에 투여되는 구현예에서, 상기 부분 다성분 CAR 세포 및 인지 폴리펩타이드가 함께 또는 별도로 투여될 수 있다. 부분 다성분 CAR 세포 및 인지 폴리펩타이드가 별도로 대상체에게 투여되는 구현예에서, 조성물의 각각은 본원에 기재된 임의의 용량, 및 투여 경로/통상의 방법에 따라 별도로 투여될 수 있다.

[0094] 투여될 필요가 있는 활성 성분의 정확한 양은 의사의 판단에 의존하고 각각의 개체에 특정된다. 그러나, 전신

적용을 위해 적합한 용량 범위가 본원에 기재되어 있고 투여 경로에 의존한다. 투여를 위해 적합한 용법은 또한 가변적일 수 있지만 초기 투여에 이어서 후속적 주사 또는 다른 투여에 의해 1시간 이상의 간격으로 반복적인 투여에 의해 전형화된다. 대안적으로, 생체내 치료요법을 위해 특정된 범위에서 혈중 농도를 유지하기에 충분한 연속 정맥내 주입이 고려된다.

[0095] 일부 구현예에서, 상기 방법은 하나 이상의 추가의 화학치료학적 제제, 생물학적 제제, 약물 또는 병용 치료요법의 일부로서의 치료와 함께 본원에 기재된 약제학적 조성물을 투여함을 추가로 포함한다. 일부 상기 구현예에서, 화학치료학적 제제, 생물학적 제제, 약물 또는 치료는 방사선 치료요법, 수술, 항체 시약 및/또는 소분자로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0096] 본원에 기재된 방법의 일부 구현예에서, 방법은 본원에 기재된 약제학적 조성물이 투여되는 대상체에 하나 이상의 화학치료학적 제제를 투여함을 추가로 포함한다. 화학치료학적 제제의 비제한적인 예는 알킬화제, 예를 들어 티오테파 및 CYTOXAN® 사이클로포스파미드; 알킬 설포네이트, 예를 들어, 부설판, 임프로셀판 및 피포셀판; 아지리딘, 예를 들어, 벤조도파, 카보쿠온, 메투레도파, 및 우레도파; 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스르아미드, 및 트리메틸올로멜라민을 포함하는 에틸렌이민 및 메틸아멜라민; 아세토제닌 (특히 불라타신 및 불라타시논); 캄프토테신 (합성 유사체 토포테칸을 포함하는); 브리오스타틴; 칼리스트아틴; CC-1065 (이의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체를 포함하는); 크립토포신 (특히 크립토포신 1 및 크립토포신 8); 둘라스타틴; 듀오카마이신 (합성 유사체, KW-2189 및 CB1-TM1을 포함하는); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; 사코딕틴; 스폰지스타틴; 질소 머스타드, 예를 들어, 클로람부실, 클로르나파진, 콜로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노벤비킨, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예를 들어, 카무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 및 라님누스틴; 항생제, 예를 들어, 에네디인 항생제 (예를 들어, 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마II 및 칼리케아미신 오메가II (참조: 예를 들어, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); 디네미신 A를 포함하는 디네미신; 비스포스포네이트, 예를 들어, 클로드로네이트; 에스페라미신; 및 네오카지노스타틴 발색단 및 관련 크로모단백질 에네디인 항생제 발색단), 아클라시노미신, 액티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 카라비신, 카미노마이신, 카지노필린, 크로모마이시니스, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, ADRIAMYCIN® 독소루비신 (모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 테옥시독소루비신을 포함하는), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예를 들어, 미토마이신 C, 마이코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투버시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항-대사물, 예를 들어, 메토크세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 폴산 유사체, 예를 들어, 데노프테린, 메토크세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 푸린 유사체, 예를 들어, 플루다라빈, 6-머캅토프린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예를 들어, 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 사이타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록스우리딘; 안드로젠, 예를 들어, 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스톨락톤; 항-부신제, 예를 들어, 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 폴산 레플레니셔, 예를 들어, 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르미딘; 엘리프티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 메이탄시노이드, 예를 들어, 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단물; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 이오숙산트론; 포도필린산; 2-에틸하이드라지드; 프로카바진; PSK® 폴리사카라이드 복합체 (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); 라족산; 리족신; 시조푸란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센 (특히 T-2 독신, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈테신; 다카바진; 마노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 사이클로포스파미드; 티오테파; 탁소이드, 예를 들어, TAXOL® 파클리탁셀 (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE® 크레모포르-부재, 파클리탁셀의 알부민-가공된 나노입자 제형 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.), 및 TAXOTERE® 독세탁셀 (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); 클로란부실; GEMZAR® 겐시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토프린; 메토크세이트; 백금 유사체, 예를 들어, 시스플라틴, 옥살리플라틴 및 카보플라틴; 빈블라стин; 백금; 에토포사이드 (VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빈크리스틴; NAVELBINE® 비노렐빈; 노반트론; 테니포시드; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반트로네이트; 이리노테칸 (캄프토테칸, CPT-11) (5-FU 및 류코볼린과 함께 이리노테칸의 치료 용법을 포함하는); 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸로미틴

(DMFO); 레티노이드, 예를 들어, 레티노산; 카페시타빈; 콤레타스타틴; 류코보린 (LV); 옥살리플라틴, 옥살리플라틴 치료요법 (FOLFOX)을 포함함; 라파티닙 (Tykerb®); PKC-알파의 억제제, Raf, H-Ras, EGFR (예를 들어, 에를로티닙 (Tarceva®)) 및 세포 증식을 감소시키는 VEGF-A 및 상기 중 어느 하나의 약제학적으로 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함할 수 있다.

[0097] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "세포독성제"는 세포 기능을 억제 또는 차단하고/하거나 세포의 파괴를 유발하는 물질을 언급한다. 상기 용어는 방사능활성 동위원소 (예를 들어, ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P 및 Lu의 방사능활성 동위원소), 화학치료학적 제제, 및 독소, 예를 들어, 세균, 진균류, 식물 또는 동물 기원의 소분자 독소 또는 효소적 활성 독소 (이의 단편 및/또는 변이체를 포함하는)를 포함하는 것으로 의도된다.

[0098] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "화학치료요법" 또는 "화학치료학적 제제"는 비정상적 세포 성장을 특징으로 하는 질환의 치료에서 치료학적 유용성을 갖는 임의의 화학적 제제를 언급한다. 상기 질환은 과다형성 성장을 특징으로 하는 질환 뿐만 아니라 종양, 신생물 및 암을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같은 화학치료학적 제제는 화학적 제제와 생물학적 제제 둘 다를 포함한다. 이들 제제는 암 세포가 연속적 생존을 위해 의존하는 세포 활성을 억제하는 기능을 한다. 화학치료학적 제제의 카테고리는 알킬화/알칼로이드 제제, 항대사물, 호르몬 또는 호르몬 유사체, 및 다양한 항신생물 약물을 포함한다. 대부분은 그렇지 않지만 이들 제제는 암 세포에 직접적으로 독성이고 면역 자극을 요구하지 않는다. 하나의 구현예에서, 화학치료학적 제제는 고형 종양과 같은 신생물을 치료하는데 사용되는 제제이다. 하나의 구현예에서, 화학치료학적 제제는 방사능활성 분자이다. 당업자는 사용될 화학치료학적 제제를 용이하게 동정할 수 있다 (참조: 예를 들어, Slapak and Kufe, Principles of Cancer Therapy, Chapter 86 in Harrison's Principles of Internal Medicine, 14th edition; Perry *et al.*, Chemotherapy, Ch. 17 in Abeloff, Clinical Oncology 2nd Edition, 2000 Churchill Livingstone, Inc; Baltzer L, Berkery R (eds): Oncology Pocket Guide to Chemotherapy, 2nd ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1995; Fischer D S, Knobf M F, Durivage H J (eds): The Cancer Chemotherapy Handbook, 4th ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1993). 본원에 기재된 이특이적 및 다중특이적 폴리펩타이드 제제는 추가의 화학치료학적 제제와 연계하여 사용될 수 있다.

[0099] "방사선 치료요법"이란 세포에 충분한 손상을 유도하여 정상적으로 기능하는 이의 능력을 제한하거나 세포를 모두 파괴하기 위한 지시된 감마선 또는 베타선의 사용을 의미한다. 치료의 용량 및 지속 기간을 결정하기 위해 당업계에 공지된 많은 방식이 있는 것으로 인지된다. 전형적인 치료는 1회 투여로서 주어지고 전형적인 용량은 하루 10 내지 200 유니트 (회색) 범위이다.

[0100] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 방법은 추가의 면역치료요법을 대상체에게 적용함을 추가로 포함할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 "면역치료요법"은 환자 자신의 면역계가 종양과 싸우도록 디자인된 다양한 세트의 치료학적 전략을 언급하고 표피 방광암에 대한 방광내 BCG 면역치료요법, 예를 들어, 악성 흑색종 및 신장 세포암종에 대한 특이적 면역 반응을 생성하기 위한 백신, 전립선암에 대한 시플레우셀-T의 사용 (여기서, 환자 기원의 수지상 세포에 전립선 산 포스파타제 펩타이드가 로딩되어 전립선-유래된 세포에 대해 특이적 면역 반응을 유도한다), 하나 이상의 면역 세포 유형을 자극하는 사이토킨, 성장 인자 및/또는 신호 전달 분자(예를 들어, 인터류킨)의 투여, 환자에게 재도입하기 전 종양 항원에 특이적인 림프구 및/또는 수지상 세포의 생체외 증식 및/또는 자극, 이미쿠이모드, 입양 세포 전달, 및/또는 문헌 (International Patent Publication WO 2003/063792 and US Patent No. 8,329,660)에 기재된 방법을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 면역치료요법은 NK 반응을 자극한다. 일부 구현예에서, 면역치료요법은 입양 세포 전달 접근법, 즉, 입양 면역치료요법이다.

[0101] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 방법은 추가의 항체, 이의 항원-결합 부분, 또는 CAR을 포함하는 T 세포를 대상체에게 투여함을 추가로 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 방법은 사이토킨을 대상체에게 투여함을 추가로 포함할 수 있다. 항체- 및 사이토킨-기반 치료요법은 당업계에 공지되어 있고 비제한적인 예로서 알렘투주맙; 베바시주맙; 브렌투시맙 베도틴; 세톡시맙; 겐투주맙; 이브리투모맙 티옥세탄; 이필리무맙; 오파투무맙; 판티부무맙; 리톡시맙; 토시투모맙; 트라스투주맙; 인터류킨-2, 및 인터페론-알파를 포함할 수 있다.

[0102] 암에 대한 소정의 치료 효능은 담당의에 의해 결정될 수 있다. 그러나, 치료는 "유효 치료"로 고려되고, 상기 용어가 본원에 사용된 바와 같이, 예를 들어, 종양의 징후 또는 증상 중 어느 하나 또는 모두가 이로운 방식으로 변화되거나 다른 임상적으로 허용되는 증상이 개선되거나 심지어 완화되는 경우, 예를 들어, 본원에 기재된

바와 같은 제제를 사용한 치료 후 적어도 10 %까지 완화시킨다. 효능은 또한 입원 또는 의학적 중재를 필요로 함에 의해 평가되는 바와 같이 개체의 악화 실패 (즉, 질환의 진행이 중단된다)에 의해 측정될 수 있다. 이들 지표를 측정하는 방법은 당업자에게 공지되어 있고/있거나 본원에 기재되어 있다.

[0103] 질환의 치료를 위한 유효량은 이를 필요로 하는 포유동물에게 투여되는 경우 상기 질환에 대해 상기 용어가 본원에 정의된 바와 같이 유효 치료를 유도하기에 충분한 양을 의미한다. 제제의 효능은 예를 들어, 암의 물리적 지표, 예를 들어, 종양 크기, 종양 매스, 종양 밀도, 혈관형성, 종양 성장을 등을 평가함에 의해 결정될 수 있다.

[0104] 유효량, 독성 및 치료학적 효능은 세포 배양물 또는 실험 동물에서, 예를 들어, LD50 (집단의 50 %에 치사량) 및 ED50 (집단의 50 %에 유효한 치료학적 용량)을 결정하기 위한 표준 약제학적 과정에 의해 결정될 수 있다. 용량은 사용되는 투여 형태 및 사용되는 투여 경로에 의해 의존하여 다양할 수 있다. 독성 및 치료학적 효과 간의 용량 비율은 치료학적 지수이고 비율 LD50/ED50으로서 표현될 수 있다. 큰 치료학적 지수를 나타내는 조성물 및 방법이 바람직하다. 치료학적 유효량은 처음에 세포 배양 검정으로부터 평가될 수 있다. 또한 용량은 세포 배양물 또는 적당한 동물 모델에서 결정된 바와 같이 IC50 (즉, 증상의 절반-최대 억제제를 성취하는 활성 성분의 농도)을 포함하는 순환 혈장 농도 범위를 성취하기 위해 동물 모델에서 제형화될 수 있다. 혈장 중 수준은 예를 들어, 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 측정될 수 있다. 임의의 특정 용량의 효과는 적합한 생검 정, 예를 들어, 무엇보다도 종양 크기 또는 성장에 대한 검정에 의해 모니터링될 수 있다. 용량은 담당의에 의해 결정될 수 있고 관찰된 치료 효과에 맞게 필요한 만큼 조정될 수 있다.

[0105] 효능은 또한 입원 또는 의학적 중재를 필요로 함에 의해 평가되는 바와 같이 개체의 악화 실패 (즉, 질환의 진행이 중단된다)에 의해 측정될 수 있다. 이들 지표를 측정하는 방법은 당업자에게 공지되어 있고/있거나 본원에 기재되어 있다. 치료는 개체 또는 동물 (일부 비제한적인 예는 인간 또는 동물을 포함한다)에서 질환의 임의의 치료를 포함하고 (1) 질환을 억제하거나, 예를 들어, 증상 (통증 또는 염증)의 악화를 예방하거나; (2) 질환의 중증도를 경감시키는, 예를 들어, 증상의 퇴보를 유도함을 포함한다. 질환의 치료를 위한 유효량은 이를 필요로 하는 대상체에게 투여되는 경우 상기 질환에 대해 상기 용어가 본원에 정의된 바와 같이 유효 치료를 유도하기에 충분한 양을 의미한다. 제제의 효능은 병태 또는 목적하는 반응 (예를 들어, 종양 성장의 억제)의 물리적 지표를 평가함에 의해 결정될 수 있다. 상기 파라미터 중 어느 하나 또는 임의의 조합의 파라미터를 측정함에 의해 투여 및/또는 치료의 효능을 모니터링하는 것은 당업자의 능력 범위내에 있다. 효능은 동물 모델에서 본원에 기재된 병태에 대해, 예를 들어, 암의 치료에 대해 평가될 수 있다. 실험 동물 모델을 사용하는 경우, 치료 효능은 마커, 예를 들어, 종양 크기에서 통계학적 유의적 변화가 관찰되는 경우 입증된다.

[0106] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 기술은 본원에 기재된 바와 같이 다성분 CAR (또는 이의 일부, 또는 다성분 CAR을 포함하는 세포), 및 임의의 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물의 활성 성분은 본원에 기재된 바와 같이 다성분 CAR (또는 이의 일부, 또는 다성분 CAR을 포함하는 세포)을 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물의 활성 성분은 본원에 기재된 바와 같이 다성분 CAR (또는 이의 일부, 또는 다성분 CAR을 포함하는 세포)로 필수적으로 이루어진다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물의 활성 성분은 본원에 기재된 바와 같이 다성분 CAR (또는 이의 일부, 또는 다성분 CAR을 포함하는 세포)로 이루어진다. 약제학적으로 허용되는 담체 및 희석제는 식염수, 수성 완충액, 용매 및/또는 분산 매질을 포함한다. 상기 담체 및 희석제의 사용은 당업계에 널리 공지되어 있다. 약제학적으로 허용되는 담체로서 작용할 수 있는 물질의 일부 비제한적인 예는 다음을 포함한다: (1) 당, 예를 들어, 락토스, 글루코스 및 슈크로스; (2) 전분, 예를 들어, 옥수수 전분 및 감자 전분; (3) 셀룰로스, 및 이의 유도체, 예를 들어, 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 메틸셀룰로스, 에틸 셀룰로스, 미세결정 셀룰로스 및 셀룰로스 아세테이트; (4) 분말화된 트라카칸트; (5) 맥아; (6) 젤라틴; (7) 윤활제, 예를 들어, 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 라우릴 설페이트 및 탈크; (8) 부형제, 예를 들어, 코코아 버터 및 좌제 왁스; (9) 오일, 예를 들어, 땅콩유, 면화씨유, 해바라기유, 참깨유, 올리브유, 옥수수유 및 대두유; (10) 글리콜, 예를 들어, 프로필렌 글리콜; (11) 폴리올, 예를 들어, 글리세린, 소르비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜 (PEG); (12) 에스테르, 예를 들어, 에틸 올레에이트 및 에틸 라우레이트; (13) 한천; (14) 완충제, 예를 들어, 수산화마그네슘 및 수산화알루미늄; (15) 알긴산; (16) 발열원-부재 물; (17) 등장성 식염수; (18) 링거액; (19) 에틸 알콜; (20) pH 완충액; (21) 폴리에스테르, 폴리카보네이트 및/또는 폴리언하이드라이드; (22) 벌크제, 예를 들어, 폴리펩타이드 및 아미노산 (23) 혈청 성분, 예를 들어, 혈청 알부민, HDL 및 LDL; (22) C₂-C₁₂ 알콜, 예를 들어, 에탄올; 및 (23) 약제학적 제형에 사용되는 다른 비-독성 상용성 물질. 습윤화제, 착색제, 이형제, 코팅제, 감미제, 향제, 향료, 방부제 및 항산화제가 또한 상기 제형 중에 존재할 수 있다. "부형제", "담체", "약제학적으로 허용되는 담체" 등과

같은 용어는 본원에서 상호교환적으로 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 담체는 본원에 기재된 바와 같은 활성제의 분해를 억제한다.

[0107] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같이 다성분 CAR (또는 이의 일부, 또는 다성분 CAR을 포함하는 세포)을 포함하는 약제학적 조성물은 비경구 투여 형태일 수 있다. 비경구 투여 형태의 투여가 전형적으로 오염물에 대한 환자의 고유 방어를 우회하기 때문에, 비경구 투여 형태는 바람직하게 멸균성이거나 환자에게 투여 전 멸균화될 수 있다. 비경구 투여 형태의 예는 즉시 주사될 수 있는 용액, 즉시 주사용으로 약제학적으로 허용되는 비히클 중에 용해되거나 현탁될 수 있는 건조 제품, 즉시 주사될 수 있는 현탁제 및 에멀전을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 추가로, 조절된-방출 비경구 투여 형태는 환자의 투여용으로 제조될 수 있고 DUROS[®]-형 투여 형태 및 투여-덤핑을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0108] 본원에 기재된 바와 같은 다성분 CAR (또는 이의 일부 또는 다성분 CAR을 포함하는 세포)의 비경구 투여 형태를 제공하기 위해 사용될 수 있는 적합한 비히클은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 이의 예는 제한 없이 멸균수; 주사 USP용 수; 식염 용액; 글루코스 용액; 수성 비히클, 예를 들어, 이에 제한되지 않지만 염화나트륨 주사, 링거 주사, 텍스트로스 주사, 텍스트로스 및 염화나트륨 주사, 및 락테이트화된 링거 주사; 수산화성 비히클, 예를 들어, 이에 제한되지 않지만, 에틸 알콜, 폴리에틸렌 글리콜, 및 프로필렌 글리콜; 및 비-수성 비히클, 예를 들어, 이에 제한되지 않지만 옥수수유, 면화씨유, 땅콩유, 참깨유, 에틸 올레에이트, 이소프로필 미리스테이트, 및 벤질 벤조에이트를 포함한다. 활성 성분의 약제학적으로 허용되는 염의 용해도를 변화시키거나 변형시키는 화합물은 또한 통상적이고 조절-방출 비경구 투여 형태를 포함하는, 본원의 개시내용의 비경구 투여 형태 내로 혼입될 수 있다.

[0109] 약제학적 조성물은 또한 경구 투여에 적합한, 예를 들어, 별개의 투여 형태로서, 예를 들어, 이에 제한되지 않지만, 정제 (제한 없이 스코어링되거나 코팅된 정제를 포함하는), 환제, 카플릿제, 캡슐제, 저작할 수 있는 정제, 분말 팩킷, 카세트, 트로키제, 웨이퍼, 에어로졸 분무 또는 액체, 예를 들어, 이에 제한되지 않지만, 시럽, 엘릭시르제, 용액 또는 수성 액체 중 현탁액, 비-수성 액체, 수중유 에멀전 또는 유중수 에멀전으로 제형화될 수 있다. 상기 조성물은 기재된 화합물의 소정량의 약제학적으로 허용되는 염을 함유하고 당업자에게 널리 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Ed., Lippincott, Williams, and Wilkins, Philadelphia PA. (2005)]을 참조한다.

[0110] 통상의 투여 형태는 일반적으로 제형으로부터 신속하거나 즉각적인 약물 방출을 제공한다. 약물의 약리학 및 약동학에 의존하여, 통상의 투여 형태의 사용은 환자의 혈액 및 다른 조직에서 약물의 농도의 광범위한 변동을 유도할 수 있다. 이들 변동은 다수의 파라미터, 예를 들어, 투여 횟수, 작용 개시, 효능 지속 기간, 치료학적 혈액 수준의 유지, 독성, 부작용 등에 영향을 미칠 수 있다. 유리하게, 조절-방출 제형을 사용하여 약물의 작용 개시, 작용 지속 기간, 치료학적 윈도우내 혈장 수준 및 피크 혈액 수준을 조절할 수 있다. 특히, 조절- 또는 연장-방출 투여 형태 또는 제형을 사용하여 약물의 독성 수준을 초과하는 것 뿐만 아니라 약물의 용량 미만 투여 (즉, 최소 치료학적 수준 미만으로 향하는) 둘 다에서 일어날 수 있는 잠재적 부작용 및 안전성 문제를 최소화하면서 약물의 최대 효과가 성취되는 것을 보장한다. 일부 구현예에서, 조성물은 지연 방출 제형으로 투여될 수 있다.

[0111] 조절-방출 약품은 이들의 비-조절 방출 대응물에 의해 성취되는 것 보다 약물 치료요법을 개선시키는 통상의 목표를 갖는다. 이상적으로, 의학적 치료에서 최적으로 디자인된 조절-방출 제제의 사용은 최소량의 시간에서 병태를 치유하거나 억제하기 위해 사용되는 최소 약물을 특징으로 한다. 조절-방출 제형의 이점은 다음을 포함한다: 1) 약물의 연장된 활성; 2) 감소된 투여 횟수; 3) 증가된 환자 순응; 4) 적은 총 약물의 사용; 5) 국소 또는 전신 부작용에서의 감소; 6) 약물 축적의 최소화; 7) 혈액 수준 변동에서의 감소; 8) 치료 효능의 개선; 9) 약물 활성 강화 또는 상실의 감소; 및 10) 질환 또는 병태의 억제 속도에서의 개선. Kim, Chongng-ju, 조절 방출 투여 형태 디자인, 2 (Technomic Publishing, Lancaster, Pa.: 2000).

[0112] 대부분의 조절-방출 제형은 초기에 목적하는 치료학적 효과를 즉각적으로 나타내는 약물 (활성 성분)의 양을 방출하고, 점진적으로 및 연속적으로 다른 양의 약물을 방출하여 연장된 기간 동안 치료학적 또는 예방학적 효과 수준을 유지하도록 디자인된다. 신체에서 약물의 상기 일정한 수준을 유지하기 위해, 약물은 신체로부터 대사되고 분비되는 약물의 양을 대체하는 비율로 투여 형태로부터 방출되어야만 한다. 활성 성분의 조절 방출은 pH, 이온 강도, 삼투압, 온도, 효소, 물, 및 다른 생리학적 병태 또는 화합물을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 조건에 의해 자극될 수 있다.

[0113] 다양한 공지된 조절- 또는 연장-방출 투여 형태, 제형 및 장치는 본 개시내용의 염 및 조성물과 함께 사용하기

위에 적응될 수 있다. 예는 하기 문헌에 기재된 것들을 포함하지만 이에 제한되지 않는다: 미국 특허 번호 제 3,845,770호; 제3,916,899호; 제3,536,809호; 제3,598,123호; 제4,008,719호; 제5674,533호; 제5,059,595호; 제5,591,767호; 제5,120,548호; 제5,073,543호; 제5,639,476호; 제5,354,556호; 제5,733,566호; 및 제 6,365,185 B1호; 이들 각각은 본원에 참조로 인용됨. 이들 투여 형태를 사용하여 하나 이상의 활성 성분의 서 방출 또는 조절-방출을 제공할 수 있고 이는 예를 들어, 하이드록시프로필메틸 셀룰로스, 다른 중합체 매트릭스, 겔, 투과성 막, 삼투압 시스템 (예를 들어, OROS[®] (Alza Corporation, Mountain View, Calif. USA)), 또는 다양한 비율의 목적하는 방출 프로필을 제공하기 위한 이들의 조합을 제공할 수 있다.

[0114] 편의를 위해, 본원 명세서, 실시예 및 첨부된 청구항에 사용된 일부 용어 및 문장의 의미하는 하기에 제공된다. 달리 진술되지 않거나 내용으로부터 묵시적인 경우, 하기의 용어 및 문장은 하기에 제공된 의미를 포함한다. 정의는 특정 구현예를 기술하는 것을 도와주기 위해 제공되고 발명의 범위가 단지 청구항에 의해 제한되기 때문에 청구된 발명을 제한하고자 하는 것은 아니다. 달리 정의되지 않는 경우, 본원에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 당업계의 용어 및 본원에 제공된 이의 정의 간에 명백한 모순이 있는 경우, 본 명세서에 제공된 정의가 우선한다.

[0115] 편의를 위해, 명세서, 실시예 및 첨부된 청구항에서 본원에 사용된 특정 용어는 여기에 수집되어 있다.

[0116] 용어 "하락하다", "감소된", "감소" 또는 "억제한다"는 모두 본원에서 통계학적으로 유의적인 양으로의 감소를 의미하는 것으로 사용된다. 일부 구현예에서, "감소한다", "감소", 또는 "하락하다" 또는 "억제한다"는 전형적으로 참조 수준 (예를 들어, 소정의 처리 부재)과 비교하여 적어도 10 %까지의 감소를 의미하고 예를 들어, 적어도 약 10 %, 적어도 약 20 %, 적어도 약 25 %, 적어도 약 30 %, 적어도 약 35 %, 적어도 약 40 %, 적어도 약 45 %, 적어도 약 50 %, 적어도 약 55 %, 적어도 약 60 %, 적어도 약 65 %, 적어도 약 70 %, 적어도 약 75 %, 적어도 약 80 %, 적어도 약 85 %, 적어도 약 90 %, 적어도 약 95 %, 적어도 약 98 %, 적어도 약 99 % 이상까지의 감소를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 "감소" 또는 "억제"는 참조 수준과 비교하여 완전한 억제 또는 감소를 포함하지 않는다. "완전한 억제"는 참조 수준과 비교하여 100 % 억제이다. 하락은 소정의 장애 없이 개체에 대한 정상적인 범위 내에서와 같이 허용되는 수준으로의 하강일 수 있다.

[0117] 용어 "증가된", "증가한다", "증진시킨다" 또는 "활성화시킨다"는 모두 본원에서 통계학적으로 유의적인 양으로의 증가를 의미하는 것으로 사용된다. 일부 구현예에서, 용어 "증가된", "증가한다", "증진시킨다", 또는 "활성화시킨다"는 참조 수준과 비교하여 적어도 10 %의 증가, 예를 들어, 적어도 약 20 %, 또는 적어도 약 30 %, 또는 적어도 약 40 %, 또는 적어도 약 50 %, 또는 적어도 약 60 %, 또는 적어도 약 70 %, 또는 적어도 약 80 %, 또는 적어도 약 90 % 이상의 증가를 의미할 수 있고 참조 수준과 비교하여 100 % 증가 또는 10 내지 100 %의 임의의 증가를 포함하거나 참조 수준과 비교하여 적어도 약 2-배, 또는 적어도 약 3-배, 또는 적어도 약 4-배, 또는 적어도 약 5-배 또는 적어도 약 10-배 증가, 또는 2-배 내지 10-배 이상의 임의의 증가를 포함한다. 마커 또는 증상과 관련하여, "증가"는 상기 수준에서 통계학적으로 유의적인 증가이다.

[0118] 본원에 사용된 바와 같은 "대상체"는 인간 또는 동물을 의미한다. 일반적으로, 동물은 척추동물, 예를 들어, 영장류, 설치류, 가축 또는 게임 동물이다. 영장류는 침팬지, 시노몰로구스 몽키, 스파이더 몽키 및 마카크, 예를 들어, 레서스를 포함한다. 설치류는 마우스, 래트, 마멋, 흰담비, 토끼 및 햄스터를 포함한다. 가축 및 게임 동물은 소, 말, 돼지, 사슴, 들소, 버팔로, 고양이 중, 예를 들어, 집고양이, 개 중, 예를 들어, 개, 여우, 늑대, 조류 중, 예를 들어, 닭, 예뮈, 타조 및 어류, 예를 들어, 송어, 메기 및 연어를 포함한다. 일부 구현예에서, 대상체는 포유동물, 예를 들어, 인간이다. 용어 "개체", "환자" 및 "대상체"는 본원에서 상호교환 적으로 사용된다.

[0119] 바람직하게, 대상체는 포유동물이다. 포유동물은 인간, 비-인간 영장류, 마우스, 래트, 개, 고양이, 말 또는 소일 수 있지만 이들 예로 제한되지 않는다. 인간 이외의 포유동물은 암의 동물 모델을 나타내는 대상체로서 유리하게 사용될 수 있다. 대상체는 수컷 또는 암컷일 수 있다.

[0120] 대상체는 이전에 치료를 필요로 하는 병태 (예를 들어, 암) 또는 상기 병태와 관련된 하나 이상의 합병증을 앓거나 이들을 갖는 것으로 진단되거나 동정된 대상체이고 임의로 암 또는 암과 관련된 하나 이상의 합병증에 대한 이의 치료를 받고 있는 대상체일 수 있다. 대안적으로, 대상체는 또한 암 또는 암과 관련된 하나 이상의 합병증을 갖는 것으로서 이전에 진단된 적 없는 대상체일 수 있다. 예를 들어, 대상체는 암 또는 암과 관련된 하나 이상의 합병증에 대한 하나 이상의 위험 인자를 나타내는 대상체 또는 위험 인자를 나타내지 않는 대상체일

수 있다.

- [0121] 특정 병태에 대해 치료를 "필요로 하는 대상체"는 상기 병태를 갖거나, 상기 병태를 갖는 것으로서 진단되거나 상기 병태를 발병할 위험에 처한 대상체일 수 있다.
- [0122] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 다성분 CAR 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산은 벡터에 의해 포함된다. 본원에 기재된 일부 양상에서, 본원에 기재된 바와 같은 다성분 CAR 또는 이의 일부, 또는 이의 임의의 모듈을 암호화하는 핵산 서열은 벡터에 작동적으로 연결된다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "벡터"는 숙주 세포로의 전달을 위해 또는 상이한 숙주 세포 간의 전달을 위해 디자인된 핵산 작제물을 언급한다. 본원에 사용된 바와 같은 벡터는 바이러스 또는 비-바이러스성일 수 있다. 용어 "벡터"는 적당한 조절 요소와 연결된 경우 복제할 수 있고 유전자 서열을 세포로 전달할 수 있는 임의의 유전학적 요소를 포함한다. 벡터는 클로닝 벡터, 발현 벡터, 플라스미드, 파아지, 트랜스포존, 코스미드, 염색체, 바이러스, 비리온 등을 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다.
- [0123] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "발현 벡터"는 벡터 상에 전사 조절 서열에 연결된 서열로부터 RNA 또는 폴리펩타이드의 발현을 지시하는 벡터를 언급한다. 발현된 서열은 흔히 세포에 이종성일 수 있지만 필연적인 것은 아니다. 발현 벡터는 추가의 요소들을 포함할 수 있고, 예를 들어, 발현 벡터는 2개의 복제 시스템을 가져 이것이 2개의 유기체, 예를 들어, 발현을 위해 인간 세포에서 및 클로닝 및 증폭을 위해 원핵 세포 숙주에 유지되도록 할 수 있다. 용어 "발현"은 RNA 및 단백질을 생산하는데 그리고 적절히 단백질을 분비하는데 관여하는 세포 공정을 언급하고, 적용될 수 있는 경우 이에 제한되지 않지만 예를 들어, 전사, 전사체 프로세싱, 해독 및 단백질 폴딩, 변형 및 프로세싱을 포함한다. "발현 생성물"은 유전자로부터 전사된 RNA, 및 유전자로부터 전사된 mRNA의 해독에 의해 수득된 폴리펩타이드를 포함한다. 용어 "유전자"는 적당한 조절 서열에 작동적으로 연결되는 경우 시험관내 또는 생체내에서 RNA로 전사되는 (DNA) 핵산 서열을 의미한다. 유전자는 암호화 영역의 선행 및 이후 영역, 예를 들어, 5' 비해독 (5' UTR) 또는 "리더" 서열 및 3' UTR 또는 "트레일러" 서열 및 개별 암호화 분절 (엑손)사이의 중재 서열 (인트론)을 포함할 수 있거나 포함하지 않을 수 있다.
- [0124] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "바이러스 벡터"는 바이러스 오리진의 적어도 하나의 요소를 포함하고 바이러스 벡터 입자로 패키징되는 능력을 갖는 핵산 벡터 작제물을 언급한다. 바이러스 벡터는 비-필수 바이러스 유전자 위치에 본원에 기재된 바와 같은 다성분 CAR 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산을 함유할 수 있다. 벡터 및/또는 입자는 임의의 핵산을 시험관내 또는 생체내에서 세포로 전달할 목적을 위해 사용될 수 있다. 다수의 형태의 바이러스 벡터는 당업계에 공지되어 있다.
- [0125] "재조합 벡터"란 이종성 핵산 서열을 포함하는 벡터, 또는 생체내에서 발현할 수 있는 "전이유전자"를 의미한다. 본원에 기재된 벡터는 일부 구현예에서 다른 적합한 조성물 및 치료요법과 조합될 수 있는 것으로 이해되어야만 한다. 일부 구현예에서, 벡터는 에피솜성이다. 적합한 에피솜성 벡터의 사용은 대상체에서 목적하는 뉴클레오타이드를 높은 카피수의 염색체의 DNA에 유지시켜 염색체 통합의 잠재적 효과를 제거하는 수단을 제공한다.
- [0126] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "핵산" 또는 "핵산 서열"은 임의의 분자, 바람직하게 중합체성 분자, 리보핵산, 데옥시리보핵산 또는 이의 유사체의 혼입 유닛을 언급한다. 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 단일 가닥 핵산은 변성된 이중 가닥 DNA의 하나의 핵산 가닥일 수 있다. 대안적으로, 이것은 임의의 이중 가닥 DNA로부터 유래되지 않는 단일 가닥 핵산일 수 있다. 하나의 양상에서, 핵산은 DNA일 수 있다. 또 다른 양상에서, 핵산은 RNA일 수 있다. 적합한 핵산 분자는 게놈 DNA 또는 cDNA를 포함하는 DNA이다. 다른 적합한 핵산 분자는 mRNA를 포함하는 RNA이다.
- [0127] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "단백질" 및 "폴리펩타이드"는 본원에서 인접한 잔기들의 알파-아미노와 카복시 그룹 간의 펩타이드 결합에 의해 서로 연결된, 일련의 아미노산 잔기를 지정하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 용어 "단백질", 및 "폴리펩타이드"는 이의 크기 또는 기능과 상관 없이 변형된 아미노산 (예를 들어, 인산화, 당화, 글리코실화 등) 및 아미노산 유사체를 포함하는, 아미노산의 중합체를 언급한다. "단백질" 및 "폴리펩타이드"는 흔히 비교적 큰 폴리펩타이드를 언급하기 위해 사용되는 반면, 용어 "펩타이드"는 흔히 작은 폴리펩타이드를 언급하기 위해 사용되지만 당업계에서 이들 용어의 사용은 중복이다. 용어 "단백질" 및 "폴리펩타이드"는 유전자 생성물 및 이의 단편을 언급하는 경우 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 따라서, 예시적 폴리펩타이드 또는 단백질은 유전자 생성물, 천연적으로 존재하는 단백질, 동족체, 오톨로그, 파라로그, 단편 및 다른 등가물, 변이체, 단편 및 이전 것들의 유사체를 포함한다.

- [0128] 본원에 사용된 바와 같은 "항체"는 IgG, IgM, IgA, IgD 또는 IgE 분자 또는 이의 항원-특이적 항체 단편 (Fab, F(ab')₂, Fv, 디설파이드-연결된 Fv, scFv, 단일 도메인 항체, 폐쇄된 형태의 다중특이적 항체, 디설파이드 연결된 scfv, 디아바디를 포함하지만 이에 제한되지 않는)을 언급하고, 이는 천연적으로 항체를 생산하는 임의의 종으로부터 유래된 것이든 또는 재조합 DNA 기술에 의해 생성된 것이든 상관 없고; 혈청, B-세포, 하이브리도마, 형질감염체, 효모 또는 세균으로부터 단리되든 상관없다.
- [0129] 본원에 사용된 바와 같은 "항원"은 항체 제제 상의 결합 부위에 의해 결합되는 분자이다. 전형적으로, 항원은 항체 리간드에 의해 결합되고 생체내 항체 반응을 생성시킬 수 있다. 항원은 폴리펩타이드, 단백질, 핵산 또는 다른 분자 또는 이의 부분일 수 있다. 용어 "항원 결정인자"는 항원-결합 분자에 의해서 및 보다 특히 상기 분자의 항원-결합 부위에 의해 인지되는 항원 상의 에피토프를 언급한다.
- [0130] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "항체 시약"은 적어도 하나의 면역글로불린 가변 도메인 또는 면역글로불린 가변 도메인 서열을 포함하고 소정의 항원에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드를 언급한다. 항체 시약은 항체 또는 항체의 항원-결합 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 항체 시약은 모노클로날 항체 또는 모노클로날 항체의 항원-결합 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 항체는 중(H)쇄 가변 영역 (본원에서 VH로서 약칭됨), 및 경(L)쇄 가변 영역 (본원에서 VL로서 약칭됨)을 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 항체는 2개의 중(H)쇄 가변 영역 및 2개의 경(L)쇄 가변 영역을 포함한다. 용어 "항체 시약"은 항체의 항원-결합 단편 항체 (예를 들어, 단일쇄 항체, Fab 및 sFab 단편, F(ab')₂, Fd 단편, Fv 단편, scFv, 및 도메인 항체 (dAb) 단편 (참조: 예를 들어, de Wildt et al., Eur J. Immunol. 1996; 26(3):629-39; 이의 전문이 본원에 참조로 인용된다) 및 완전한 항체를 포함한다. 항체는 IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (서브타입 및 이의 조합 뿐만 아니라)의 구조적 특징을 가질 수 있다. 항체는 마우스, 토끼, 돼지, 래트 및 영장류 (인간 및 비-인간 영장류) 및 영장류화된 항체를 포함하는 임의의 공급원으로부터 기원할 수 있다. 항체는 또한 미디바디, 인간화된 항체, 키메라 항체 등을 포함한다.
- [0131] VH 및 VL 영역은 "골격 영역" ("FR")으로 호칭되는 보다 보존된 영역이 산재되어 있는, "상보성 결정 영역" ("CDR")으로 호칭되는 추가변성 영역으로 추가로 세분될 수 있다. 골격 영역 및 CDR 정도는 정확하게 한정되었다 (참조: Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, and Chothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; 이들의 전문이 본원에 참조로 인용된다). 각각의 VH 및 VL은 전형적으로 아미노 말단으로부터 카복시 말단까지 하기의 순서로 배열되는, 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.
- [0132] 본원에서 상호교환적으로 사용되는 용어 "항원-결합 단편" 또는 "항원-결합 도메인"은 목적하는 표적에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 전장 항체의 하나 이상의 단편을 언급하기 위해 사용된다, 전장 항체의 용어 "항원-결합 단편" 내에 포함되는 결합 단편의 예는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 디설파이드 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')₂ 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 아암의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편, (v) VH 또는 VL 도메인으로 이루어진 dAb 단편 (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546; 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨); 및 (vi) 특이적 항원-결합 기능성을 보유하는 단리된 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함한다.
- [0133] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "특이적 결합"은 2개의 분자, 화합물, 세포 및/또는 입자 간의 화학적 상호작용을 언급하고, 여기서, 제1 실체는 이것이 비-표적인 제3 실체에 결합하는 것 보다 큰 특이성 및 친화성을 갖는 제2 표적 실체에 결합한다. 일부 구현예에서, 특이적 결합은 제3 비표적 실체에 대한 친화성 보다 적어도 10배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 500배, 적어도 1000 배 이상인, 제2 표적 실체에 대한 제1 실체의 친화성을 언급할 수 있다. 소정의 표적에 특이적인 시약은 사용되는 검정의 조건하에서 상기 표적에 대해 특이적 결합을 나타내는 시약이다.
- [0134] 추가로, 및 본원에 기재된 바와 같이, 재조합 인간화된 항체는 인간에서 치료요법에 대한 기능적 활성을 유지하면서, 잠재적 면역원성을 감소시키기 위해 추가로 최적화될 수 있다. 이와 관련하여, 기능적 활성은 본원에 기재된 재조합 항체 또는 이의 항체 시약과 연관된 하나 이상의 공지된 기능적 활성을 나타낼 수 있는 폴리펩타이드를 의미한다. 상기 기능적 활성은 예를 들어, 표적에 결합하는 능력을 포함한다.
- [0135] "암 세포"는 생체내, 생체외 또는 조직 배양에서 양성, 전암성 또는 형질전환된 세포이고, 이는 필연적으로 새

로운 유전학적 물질의 취득을 포함하지 않는 자발적 또는 유도된 표현형 변화를 갖는다. 형질전환은 형질전환 바이러스로의 감염 및 새로운 게놈 핵산의 혼입, 또는 외인성 핵산의 취득으로부터 발생할 수 있지만 이것은 또한 자발적으로 또는 발암 물질로의 노출 후 내인성 유전자가 돌연변이되어 발생할 수 있다. 형질전환/암은 예를 들어, 누드 마우스와 같은 적합한 동물 숙주에서 형태적 변화, 세포의 불멸화, 비정상적 성장 조절, 병소 형성, 앵커리지 무관, 악성, 접촉 억제 상실 및 성장 밀도 제한, 성장 인자 또는 혈청 무관, 종양 특이적 마커, 침습성 또는 전이 및 종양 성장과 연관된다. 예를 들어, 문헌 (Freshney, Culture Animal Cells: Manual Basic Tech. (3rd ed., 1994))을 참조한다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "암"은 신체 기관 및 시스템의 정상적 기능을 방해하는 세포의 비조절된 성장을 언급한다. 암 또는 종양을 갖는 대상체는 대상체의 신체에 존재하는 객관적으로 측정 가능한 암 세포를 갖는 대상체이다. 상기 정의에 포함되는 것은 양성 및 악성 암, 및 휴면 종양 또는 미세전이이다. 이들의 본래의 위치로부터 이동하고 주요 기관을 씨앗하는 암은 궁극적으로 환부 기관의 기능 악화를 통해 대상체의 사망을 유도할 수 있다.

[0136] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "종양"은 신체 기관 및 시스템의 정상적 기능을 방해하는 세포 종양의 비조절된 성장을 언급한다. 용어 "암" 및 "악성"은 전이성인 종양을 언급하고, 즉 이는 침습성이 되고 본래의 종양 위치로부터 원거리에서 조직에서 종양 성장을 씨앗한다. 암 또는 종양을 갖는 대상체는 대상체의 신체에 존재하는 객관적으로 측정 가능한 암 세포를 갖는 대상체이다. 상기 정의에 포함되는 것은 양성 종양 및 악성 암, 및 잠재적 휴면 종양 또는 미세전이이다. 이들의 본래의 위치로부터 이동하고 다른 주요 기관을 씨앗하는 암은 궁극적으로 환부 기관의 기능 악화를 통해 대상체의 사망을 유도할 수 있다. 백혈병과 같은 조혈 암은 대상체에서 정상 조혈 격실을 능가할 수 있어 조혈 부전을 유도하여 (빈혈, 혈소판감소증 및 호중구감소증 형태로) 궁극적으로 사망을 유도한다.

[0137] 암의 예는 암종, 림프종, 아세포종, 육종, 백혈병, 기저 세포 암종, 담즙관 암; 방광암; 골암; 뇌 및 CNS 암; 유방암; 복막암; 자궁암; 용모막암; 결장 및 직장암; 연결 조직암; 소화기의 암; 자궁내막암; 식도암; 안암; 두경부암; 위암 (위장암을 포함하는); 교모세포종 (GBM); 간암종; 간암종; 상피내 신생물; 콩팥 또는 신장암; 후두암; 백혈병; 간암; 폐암 (예를 들어, 소-세포 폐암, 비-소 세포 폐암, 폐의 선암종 및 폐의 편평 암종); 호지킨 및 비-호지킨 림프종을 포함하는 림프종; 흑색종; 골수종; 신경모세포종; 구강암 (예를 들어, 입술, 혀, 입, 및 인두); 난소암; 췌장암; 전립선암; 망막아세포종; 횡문근육종; 직장암; 호흡기의 암; 침샘 암종; 육종; 피부암; 편평 세포암; 위암; 고환암; 갑상선암; 자궁암 또는 자궁내막암; 비뇨기관의 암; 음문암; 및 다른 암종 및 육종; 및 B-세포 림프종(저등급/여포성 비-호지킨 림프종 (NHL); 작은 림프구성 (SL) NHL; 중간 등급/여포성 NHL; 중간 등급 확산 NHL; 고등급 면역모세포 NHL; 고등급 림프구아세포 NHL; 고등급 작은 비-절단된 세포 NHL; 벌크 질환 NHL; 맨틀 세포 림프종; AIDS-관련 림프종; 및 발덴스트롬 거대글로불린혈증을 포함하는); 만성 림프구성 백혈병 (CLL); 급성 림프구성모세포 백혈병 (ALL); 모발 세포 백혈병; 만성 골수아구성 백혈병; 및 이식 후 림프구성증상 장애 (PTLD), 및 모반증, 부종 (뇌 종양과 연관된 것과 같은), 및 메이그 증후군과 관련된 비정상 혈관 증식을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0138] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "치료한다", "치료", "치료하는" 또는 "개선"은 치료학적 치료를 언급하고, 여기서, 상기 목적은 질환 또는 장애, 예를 들어 암과 연관된 병태의 진행 또는 중증도를 역전시키거나, 완화시키거나, 개선하거나, 억제하거나, 서행시키거나 중지시키는 것이다. 용어 "치료하는"은 예를 들어, 암과 연관된 병태, 질환 또는 장애의 적어도 하나의 부작용 또는 증상을 감소시키거나 완화시킴을 포함한다. 치료는 일반적으로 하나 이상의 증상 또는 임상적 마커가 감소된 경우 "효과적"이다. 대안적으로, 치료는 질환의 진행이 감소되거나 중지된 경우 "효과적"이다. 즉, "치료"는 증상 또는 마커의 개선 뿐만 아니라 치료의 부재하에 예상되는 것과 비교하여 증상의 진행 또는 악화의 중단, 또는 적어도 서행을 포함한다. 이롭거나 목적하는 임상 결과는 하나 이상의 증상(들)의 완화, 질환 정도의 감소, 질환의 안정화된 (즉, 악화되지 않는) 상태, 질환 진행의 지연 또는 서행, 질환 상태의 개선 또는 완화, 차도 (부분적이든 전체적이든) 및/또는 검출될 수 있거나 검출될 수 없든간에 상관없이 감소된 사망율을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 질환의 용어 "치료"는 또한 질환의 증상 또는 부작용으로부터의 경감 (일시적 치료를 포함하는)을 제공함을 포함한다.

[0139] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "약제학적 조성물"은 약제학적으로 허용되는 담체, 예를 들어, 약제 산업에서 통상적으로 사용되는 담체와 배합된 활성제를 언급한다. 용어 "약제학적으로 허용되는"은 본원에서 완전한 의학 적 판단 범위내에서 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 다른 문제 또는 합병증 없이 합리적 이득/위험 비율에 맞게 인간 및 동물의 조직과의 접촉시 사용하기 위해 적합한 화합물, 물질, 조성물 및/또는 투여 형태를 언급하기 위해 사용된다.

[0140] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "투여하는"은 본원에 기재된 바와 같은 화합물을 목적하는 부위에서 제제의 적어

도 부분적 전달을 유도하는 방법 및 경로에 의해 대상체에 위치시킴을 언급한다. 본원에 기재된 화합물을 포함하는 약제학적 조성물은 대상체에서 효과적인 치료를 유도하는 임의의 적당한 경로에 의해 투여될 수 있다.

- [0141] 용어 "통계학적으로 유의적" 또는 "유의적으로"는 통계학적 유의성을 언급하고 일반적으로 2개의 표준 편차 (2SD) 또는 보다 큰 차이를 의미한다.
- [0142] 작동 실시예에서와는 다르게 또는 다르게 지적되는 경우, 본원에 사용된 성분 또는 반응 조건들의 양을 나타내는 모든 수치는 모든 경우에 용어 "약"에 의해 변형되는 것으로서 이해되어야만 한다. 용어 "약"은 백분율과 연계하여 사용되는 경우 $\pm 1\%$ 를 의미할 수 있다.
- [0143] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "포함하는" 또는 "포함한다"는 방법 또는 조성물에 필수적이고 필수적인지의 여부에 상관없이 비특정 요소들의 내포에 개방적인 조성물, 방법 및 이의 각각의 성분(들)을 언급하는데 사용된다.
- [0144] 용어 "로 이루어진"은 구현예의 상기 기재에 언급되지 않은 임의의 요소에는 배타적인, 본원에 기재된 바와 같은 조성물, 방법 및 이의 각각의 성분들을 언급한다.
- [0145] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "필수적으로 이루어진"은 소정의 구현예를 위해 요구되는 요소들을 언급한다. 용어는 상기 구현예의 기본 및 신규하거나 기능적 특징(들)에 실질적으로 영향을 주지 않는 요소들의 존재를 허용한다.
- [0146] 단수 용어 "a", "an" 및 "the"는 달리 명백하게 지적되지 않는 경우 복수의 지시사항을 포함한다. 유사하게, 용어 "또는"은 달리 명백하게 지적되지 않는 경우 "및"을 포함하는 것으로 의도된다. 본원에 기재된 것들과 유사하거나 동등한 방법 및 물질이 본원의 개시내용의 실시 또는 시험에서 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 물질이 하기에 기재된다. 약어 "예를 들어(e.g.)"는 라틴어 (예컨대 (exempli gratia))로부터 유래하고, 본원에서 비-제한적 예를 지적하기 위해 사용된다. 따라서, 약어 "예를 들어 (e.g.)"는 용어 "예를 들어(for example)"와 동의어이다.
- [0147] 본원에서 달리 정의되지 않는 경우, 본원과 연계하여 사용되는 과학적 및 기술적 용어는 본원의 개시내용이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 의미를 갖는다. 본 발명은 본원에 기재된 특정 방법, 프로토콜 및 시약에 제한되지 않고 이와 같이 다양할 수 있는 것으로 이해되어야만 한다. 본원에 사용된 용어는 단지 특정 구현예를 기재하기 위한 것이고 유일하게 청구항에 의해서 한정되는 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 면역학 및 분자 생물학에서 통상의 용어의 정의는 하기의 문헌에서 찾을 수 있다: The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 19th Edition, published by Merck Sharp & Dohme Corp., 2011 (ISBN 978-0-911910-19-3); Robert S. Porter *et al.* (eds.), The Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine, published by Blackwell Science Ltd., 1999-2012 (ISBN 9783527600908); and Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8); Immunology by Werner Luttmann, published by Elsevier, 2006; Janeway's Immunobiology, Kenneth Murphy, Allan Mowat, Casey Weaver (eds.), Taylor & Francis Limited, 2014 (ISBN 0815345305, 9780815345305); Lewin's Genes XI, published by Jones & Bartlett Publishers, 2014 (ISBN-1449659055); Michael Richard Green and Joseph Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA (2012) (ISBN 1936113414); Davis *et al.*, Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (2012) (ISBN 044460149X); Laboratory Methods in Enzymology: DNA, Jon Lorsch (ed.) Elsevier, 2013 (ISBN 0124199542); Current Protocols in Molecular Biology (CPMB), Frederick M. Ausubel (ed.), John Wiley and Sons, 2014 (ISBN 047150338X, 9780471503385), Current Protocols in Protein Science (CPPS), John E. Coligan (ed.), John Wiley and Sons, Inc., 2005; and Current Protocols in Immunology (CPI) (John E. Coligan, ADA M Kruisbeek, David H Margulies, Ethan M Shevach, Warren Strobe, (eds.) John Wiley and Sons, Inc., 2003 (ISBN 0471142735, 9780471142737), 이의 내용은 모두 이들의 전문이 참조로 인용됨.
- [0148] 당업자는 사용할 화학치료학적 제제를 용이하게 동정할 수 있다 (참조: 예를 들어, Physicians' Cancer Chemotherapy Drug Manual 2014, Edward Chu, Vincent T. DeVita Jr., Jones & Bartlett Learning; Principles of Cancer Therapy, Chapter 85 in Harrison's Principles of Internal Medicine, 18th edition; Therapeutic Targeting of Cancer Cells: Era of Molecularly Targeted Agents and Cancer Pharmacology,

Chs. 28-29 in Abelloff's Clinical Oncology, 2013 Elsevier; and Fischer D S (ed): The Cancer Chemotherapy Handbook, 4th ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 2003).

- [0149] 다른 용어는 본 발명의 다양한 양상의 기재 내에서 본원에 정의된다.
- [0150] 본 출원 전체에 인용된 문헌 참조서류, 허여된 특허, 공개된 특허 출원 및 공개류 특허 출원을 포함하는 모든 특허 및 다른 공보는, 예를 들어, 본원에서 명백히 본원에 기재된 기술과 연계하여 사용될 수 있는 상기 공보에 기재된 방법을 기술하고 기재할 목적으로 본원에 참조로 인용된다. 이들 공보는 유일하게 본 출원의 제출일 전 이들의 기재를 위해 제공된다. 이와 관련하여 어떠한 것도 본 발명자가 선행 발명에 의해 또는 임의의 다른 목적을 위해 상기 기재내용 보다 선행할 자격이 없음을 인정하는 것으로서 해석되지 말아야 한다. 날짜에 대한 모든 진술 또는 이들 참조문헌의 내용에 관한 제공은 출원인에게 가용한 정보를 기반으로 하고 이들 참조문헌의 날짜 또는 내용의 정확성을 인정하는 것이 아니다.
- [0151] 본원의 개시내용의 구현예의 기재는 철저하게 또는 기재된 정확한 형태로 개시내용을 제한하려고 하는 것은 아니다. 개시내용의 특정 구현예 및 이에 대한 예시가 설명을 목적으로 기재되지만, 다양한 동등한 변형이 관련 기술 분야에서 당업자가 인지하는 바와 같이 본원의 개시내용의 범위내에서 가능하다. 예를 들어, 방법 단계 또는 기능이 소정의 순서로 제공되지만, 대안적 구현예는 상이한 순서로 기능을 수행할 수 있거나 기능은 실질적으로 동시에 수행될 수 있다. 본원에 제공된 개시내용의 교시는 적절하게 다른 과정 또는 방법에 적용될 수 있다. 본원에 기재된 다양한 양태를 조합하여 추가의 양태를 제공할 수 있다. 개시내용의 양상은 필요하다면 본원의 개시내용의 추가의 양태를 여전히 제공하는 상기 참조자료 및 출원의 조성물, 기능 및 개념을 사용하기 위해 변형될 수 있다. 더욱이, 생물학적 기능적 동등성 고려로 인해, 일부 변화는 종류 또는 양으로 생물학적 또는 화학적 작용에 영향을 주는 것 없이 단백질 구조에 가해질 수 있다. 이들 및 다른 변화는 상세한 설명의 관점에서 이의 개시내용에 가해질 수 있다. 모든 상기 변형은 첨부된 청구항의 범위 내에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0152] 이전의 임의의 구현예의 특정 요소들은 조합되거나 다른 구현예에서의 요소들을 대체할 수 있다. 추가로, 본원의 개시내용의 특정 구현예와 연관된 이점이 이들 구현예와 관련하여 기재되었지만, 다른 구현예는 또한 상기 이점을 나타낼 수 있고 모든 양태가 개시내용의 범위 내에 있는 상기 이점을 필연적으로 나타낼 필요는 없다.
- [0153] 단일쇄 가변 단편 (scFv) 및 수용체 신호 전달 도메인의 융합체인 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하는 T 세포는 B 세포 악성에 대한 임상 시험에서 경이로운 성공을 보여주었다^{1,2}. CAR T 세포는 그러나 오프-표적화 및 과-활성화로 인해 독성을 가질 수 있다. 본원에 개시된 것은 다중 T 세포 신호 전달 경로의 조합적, 일시적 및 논리적 제어를 위한 범용 접근법을 제공함에 의해 CAR T 세포의 개선된 안정성 및 효능을 제공하는 방법 및 조성물이다.
- [0154] 하나의 구현예에서, 특이성은 2개의 항원을 검출할 수 있는 것으로 개발된 CAR을 사용함에 의해 증진될 수 있다³⁻⁶. 2개 초과 항원을 감지하는 능력은 추가로 종양 특이성을 개선시킬 수 있다. 추가로, CAR T 세포가 표적 상에 있는 경우에도, T 세포의 과-활성화가 사이토킨 방출 증후군을 유도하는 경우 부작용이 여전히 일어날 수 있다. 킬 (Kil) 및 온(ON) 스위치는 일부 이들 부작용을 완화시키도록 개발되었다. 여전히, 이들 스위치는 대부분 마스터 스위치로서 작용하고 결론적으로 미세한 제어가 없다. 천연 T 세포 활성화의 제어가 다중 동시-자극 및 동시-억제 신호 전달 경로의 발란스를 통해 성취되기 때문에⁷, 상기 신호 전달 경로에 대한 조정가능하고 일시적 제어를 제공하는 전략이 CAR T 세포 수행을 최적화하기 위해 중요하다. 이들 챌린지는 T 세포 반응의 기능적 제어를 위한 필요성을 설명한다.
- [0155] 본원에 기재된 것은 (a) ON/OFF 스위치로서 작용하고, (b) 다중 항원을 감지하고 논리적 계산을 수행하고, (c) 다중 신호 전달 경로를 독립적으로 조절하는 능력을 갖는 범용 CAR 플랫폼이 CAR T 세포 치료요법을 최적화하기 위해 필요한 제어를 제공한다는 것이다. 본원에 기재된 스플릿 범용 프로그램 가능하고 재구성 가능한 (SUPRA) CAR 플랫폼이 상기 목적을 위해 사용된다. 중요하게 SUPRA CAR 플랫폼은 환자의 T 세포에 대한 추가의 조작 없이 새로운 표적을 수용할 수 있다. SUPRA CAR 플랫폼은 T 세포 상에서 발현된 범용 수용체 및 종양-표적화 scFv 어댑터로 구성된 2-성분 수용체 시스템이다 (도 12). 범용 수용체는 세포내 신호 전달 도메인, 및 세포외 도메인으로서 류신 지퍼 (zipCAR)의 융합으로부터 생성된다. 어댑터 분자는 동족 류신 지퍼와 scFv (zipFv)의 융합으로부터 생성된다. zipFv 상의 scFv는 항원에 결합하고 류신 지퍼는 T 세포 상의 zipCAR에 결합하고 이를 활성화시킨다. 본 시스템은 또한 적절한 유도제로서 zipFv로 조정가능한 스위치로서 작용하다. 그러나, 다른

기존의 스플릿 CAR 시스템과 같지 않게⁸⁻¹¹, 본원에 기재된 것은 직교 zipCAR/zipFv 쌍이고, 이는 다중 신호 전달 경로의 독립적인 제어 및 논리적 작동의 수행을 가능하게 한다.

[0156] 본원에 기재된 것은 다음과 같다:

[0157] ON/OFF 스위치로서 SUPRA CAR 플랫폼의 특징 분석. SUPRA CAR의 디자인 법칙은 다양한 디자인 파라미터가 T 세포 활성화에 얼마나 영향을 미치는지의 관점에서 제공된다.

[0158] SUPRA CAR 플랫폼을 사용한 조합적 논리 연산의 개발. 단백질 가공 방법은 단일 수용체에서 2-투입 불린 논리 게이트의 패널을 생성하기 위해 류신 지퍼 결합에서 협력 및 경쟁을 발현하기 위해 사용된다.

[0159] 다중 신호 전달 경로 (신호 전달 믹서)를 별도로 제어하기 위한 SUPRA CAR의 개발. 직교 zipCAR은 CD3 ζ , 및 조합적 및 일시적 조절을 위해 독립적으로 동시 자극 (예를 들어, CD28 및 4-1BB) 및 동시 억제 (예를 들어, PD-1) 신호 전달 경로를 제어하기 위해 작제되었다.

[0160] SUPRA CAR 플랫폼은 시험관내 및 마우스 모델에서 시험되었다. 모듈 디자인은 세포 암 면역치료요법의 안전성 및 효능성을 개선시키기 위한 도구를 제공하는 것 뿐만 아니라 고수준의 특이성, 유연성 및 정확성을 제공한다.

[0161] CAR T 세포 치료요법. 환자로의 종양-표적화 T 세포의 전달은 암 면역치료요법을 위해 전망있는 방법이다^{1,2}. 특히, CAR-변형된 T 세포는 임상 시험에서 약 90 %의 완전한 차도가 관찰됨과 함께 급성 림프구성 백혈병에 대해 전례없는 효능을 입증하였다^{1,2}. 이들 고무적인 결과에도 불구하고, CAR T 세포 치료요법이 상기 암 및 다른 암에 대해 광범위하게 채택되도록 개선될 수 있다. 특히, 효능에 손상 없이 CAR T 세포의 특이성을 개선하고 이의 독성을 제한한다.

[0162] 현재 임상 시험에서 발견되는 CAR 디자인은 T 세포 수용체 (TCR) 및 다른 동시-자극 수용체, 예를 들어, CD28 및 4-1BB로부터 유래된 세포내 신호 전달 도메인에 융합된 고정된 항원-특이적 scFv로 구성된다. 이들 CAR은 단지 하나의 항원을 검출할 수 있고 따라서 건강한 조직으로부터 종양을 분화시키는 이들의 능력에서 제한된다. 사실, 치명성은 T 세포가 건강한 폐 상피 세포 상의 낮은 수준의 Her2를 인지하기 때문에 항-Her2 CAR을 발현하는 T 세포로 처리된 전이성 결장 암을 갖는 환자에 대해서 관찰되었다¹². 상당한 효과가 종양-특이적 바이오마커를 동정하기 위해 진행 중이지만 아직 큰 도전적 목표로 남아있다. 추가로, 현재 CAR의 고정된 디자인은 환자가 표적 항원을 발현하지 않는 클론의 모반으로 인해 재발하는 경우 표적을 스위치하도록 하는 것이 과제가 되게 한다. 추가로, 단일 항원을 표적화하는 CAR은 또한 이중성 종양에 대해 제한된 효능을 가질 수 있다. 따라서, 다중 항원을 감지할 수 있고, 건강한 조직으로부터 암을 지적으로 식별하고 종양 성장의 역학적 및 이중성 특징에 순응된 시스템이 매우 바람직할 수 있다.

[0163] 현재 CAR 디자인은 또한 T 세포 활성화의 강도 및 타이밍과 관련하여 융통성이 없다. 추가로, 상기 디자인으로 치료 과정 동안에 신호 전달 도메인을 추가하거나 제거하기가 어려울 수 있다. 상기 고정된 디자인은 따라서 T 세포 기능이 조절될 수 있는 정도를 엄격하게 제한한다. CD28 또는 4-1BB를 함유하는 CAR이 임상 시험에서 성공을 입증하였지만, 신호 전달 도메인의 현재 선택이 이상적인지는 불특정하게 남아있다. 예를 들어, CD28 도메인을 갖는 CAR을 발현하는 T 세포는 보다 신속하고 보다 강한 살종양 활성을 갖지만 보다 짧은 생체내 지속성을 갖는다. 대조적으로, 4-1BB 도메인을 함유하는 CAR을 갖는 T 세포는 보다 느린 살종양 동력학을 갖지만 생체내에서 보다 양호하게 증식하고 생존한다^{13,14}. 추가로, 고정된 CAR 디자인은 또한 동시에 동일한 수준에서 CAR에 대한 모든 신호 전달 경로를 유발한다. 그러나, 하나의 구현예에서, 최적의 CAR T 세포 반응은 다양한 수준 및 타임스케일에서 활성화되는 상이한 경로를 포함한다. 예를 들어, 인플루엔자 감염 동안에서와 같은 천연 T 세포 활성화 조건에서, 4-1BB 신호 전달은 TCR 및 CD28 경로의 초기 유도 후 48 내지 72시간 때까지 활성화되지 않는다¹⁵⁻¹⁷. 상기 구현예에서, CAR T 세포 반응은 상이한 시점에서 상이한 신호 전달 경로를 활성화함을 포함한다. 천연 T 세포 활성화가 많은 동시자극 신호 전달 경로를 포함하는 동력학적 공정인 경우, T 세포 신호 전달을 위한 뮤직 믹서와 많이 유사한 T 세포 신호 전달 동력학적 방식의 별도의 동시자극 (또는 동시 억제) 경로의 튜닝을 가능하게 하는 CAR 시스템은 T 세포 반응의 최적화를 크게 촉진시킨다.

[0164] CAR T 세포가 종양을 적당히 표적화할 수 있고 완전한 차도를 성취할 수 있는 경우에도 부작용 (ASE)이 관찰될 수 있다. CAR T 세포 치료요법의 가장 통상적인 부작용은 사이토킨 방출 증후군 (CRS)이고 이는 과도한 T 세포 활성화 및 증식과 연관된 사이토킨 상승으로부터 비롯되는 염증성 증상의 조합이다. CRS의 관리가 개선되었지

만², CRS는 여전히 도전적이고 위험한 문제가 남아있다. 실제로, 항-CD19 CAR T 세포를 사용한 최근 시험에서, 환자는 CRS-관련된 합병증으로 인해 사망하였다¹⁸. CRS에 추가로, 신경독성이 또한 CAR T 세포로 처리된 많은 환자에서 관찰되었고^{1,2}, 4명의 환자가 최근 시험에서 뇌 부종으로 인해 사망하였다. 이들 생명을 위협하는 부작용의 다양하고 복잡한 특성이 주어지는 경우, 이들을 관리하는 것과는 반대로 이들을 예방하는 것이 중요하다. ASE 발병을 최소화하기 위한 한가지 방법은 CAR T 세포 활성화의 타이밍, 수준 및 지속성에 대한 제어를 부여하는 것이다. 이것은 환자에게 주사되는 T 세포의 양을 조절함에 의해 성취될 수 있다. 그러나, T 세포는 여전히 증식할 수 있기 때문에, 이것은 CRS를 제거하는 것 보다는 차라리 지연시킬 수 있다. 상보적 전략은 스위치를 T 세포에 도입하여 이들의 활성이 ON/OFF 스위치와 유사한 분자의 투여와 함께 적정될 수 있도록 하는 것이다. 하나의 구현예에서, "사멸" 스위치를 도입할 수 있다.

[0165] 조합적 항원 감지는 CAR T 세포 치료요법의 종양 특이성을 개선시키기 위한 하나의 전략이다. 여러 기술은 가공된 T 세포에서 단순한 논리적 계산을 수행하기 위해 존재한다. 예를 들어, 2개의 상이한 항원-특이적 scFv는 함께 하나의 CAR로 융합됨에 따라서 항원이 T 세포 활성화를 유발하도록 한다^{3,4}. 이들 시스템은 OR 논리 게이트의 개요를 설명하고, 종양에 의한 2개의 항원에 대한 돌연변이가 CAR T 세포에 의한 검출을 피해야할 필요가 있기 때문에 종양 회피의 기회를 감소시킬 수 있다. 그러나, 이러한 탠덤 scFv CAR 디자인은 단지 OR 논리를 수행할 수 있다. OR 게이트에 추가로, AND 논리 조합 CAR 시스템이 또한 제조되었고^{5,6}, 이에 의해 T 세포에는 하나의 항원에 대해 지시된 특이성을 갖는 활성화-결핍 CAR, 및 제2 항원에 대해 특이성을 갖는 키메라 공동 자극 수용체가 형질도입되었다. 더욱이, 동시자극 신호 전달 도메인은 PD-119와 같은 억제성 수용체 기원의 도메인으로 대체될 수 있다. 이들 전략은 성공적이지만 기껏해야 2개의 CAR이 함께 첨가되도록 하고 보다 많은 항원을 포함하도록 연장될 수 없다.

[0166] 현재 조합 CAR 시스템의 대부분은 1개 또는 2개의 특이적 항원을 나타내는 세포를 탐색하고 공격하도록 디자인되었다. 그러나, 일부 암 세포는 항원의 존재와는 반대로 부재에 의해 분류될 수 있다. 예를 들어, 많은 암 세포는 HLA 발현을 하향 조절하여 T 세포 반응을 회피한다²². NK 세포는 HLA이 소실된 세포를 검출하고 사멸시킬 수 있다²³. 상기 면역 기작은 HLA가 대부분의 세포 유형에서 광범위하게 발현되기 때문에 막강하고 따라서 HLA의 부재는 통상적이지 않고 악성인 것으로 해석될 수 있다. 그러나, 일부 암에서 하향 조절된 표면 마커²⁴는 단지 조직의 서브세트에서 발현된다. 이와 같이, 비-편재 항원이 소실된 암 세포를 정확하게 검출하기 위해서는 또한 목적하는 세포 유형을 특정하거나 배제하는 항원을 검출할 수 있어야만 한다. 이것은 A BUT NOT B (A NIMPLY B) 또는 배타적 OR (XOR)의 논리를 나타낸다. 이들 계산을 수행할 수 있는 CAR 플랫폼은 신규 기작을 사용하여 연장된 범위의 종양을 검출할 수 있다. 상기 시스템은 또한 CAR T 세포에 의해 표적화될 수 있는 항원 세트를 확장함에 따라서 신규하고 충분한 종양 항원에 대한 필요성을 개선시킨다.

[0167] 종양 특이성을 개선시키는 것 뿐만 아니라, CAR T 세포 활성화 수준의 타이밍 및 강도를 조절하는 것은 가공된 T 세포 면역치료요법의 안전성 프로필을 증진시키기 위해 중요하다. 약물-유도성 자살 유전자 (즉, 사멸 스위치), 예를 들어, 유도성 카스파제 9²⁵ 또는 인간 심플렉스 바이러스 티미딘 키나제²⁶는 소분자 유도제의 첨가가 자살 유전자를 유도하고 이들을 발현하는 가공된 T 세포를 사멸시킨다. 이들 특징은 임상의가, CRS가 발병하여 생명에 위협이 되는 경우 CAR T 세포를 사멸시키도록 한다. 그러나, CRS가 발병된 후 CAR T 세포를 사멸시키는 것이 ASE를 완화시킬 수 있는지가 불특정하게 남아있다. 대안적으로, 접근법은 약물 조절가능한 CAR이 사용될 수 있음을 활용함으로써 소분자의 첨가는 CAR이 신호를 전달하도록 한다^{27,28}. 상기 ON 스위치 시스템은 용량의 존적 방식으로 T 세포 활성화를 조절하는 일시적 제어를 제공할 수 있다.

[0168] 또한 ON 스위치로서 작용할 수 있는 또 다른 CAR 디자인은 스플릿 수용체 구성이고, 여기서, 항원 인지 모티프, 일반적으로 종양 특이적 scFv는 CAR의 신호 전달 모티프로부터 해리되고; 상기 구성으로, 상기 스플릿 수용체 도메인은 생분자 상호작용을 통해 서로 결합될 수 있다. 상기 스플릿 CAR 구성은 또한 큰 패널의 항원이 면역 세포를 재가공하는 것 없이 표적화되도록 하고 이것은 모든 상호작용을 위한 통상의 기준으로서 범용 수용체를 사용하기 때문이다. 다른 구현예는 항원 인지 모티프를 가공된 T 세포 상의 신호 전달 모티프로 결합시키기 위해 가용하다. 가장 단순한 버전의 상기 스플릿 CAR 디자인은 CD16 세포의 도메인과 세포내 TCR 신호 전달 도메인의 융합을 통해 성취된다. CD16은 인간 IgG 항체의 불변 영역에 결합하는 낮은 친화성 Fc 수용체이다. 적당한 항체의 첨가는 CD16 CAR T 세포의 활성화를 유도하고 따라서 또한 ON 스위치로서 작용한다¹¹. 간편하지만, 상기

CD16 CAR은 환자에 의해 생성되는 내인성 항체와의 결합을 통해 많은 잠재적 오프-표적 효과를 가질 수 있다. 따라서, 추가의 예방 조치가 바람직하게 CD16 및 Fc 쌍에 추가로 사용되고, 다른 이중이량체화 도메인, 예를 들어, 스트렙타아비딘 및 비오틴¹⁰, FITC 및 항-FITC scFv⁸, 또는 펩타이드 및 항-펩타이드 scFv⁹가 또한 스플릿 CAR을 생성하기 위해 사용되었다. 이들 디자인에서, 스트렙타아비딘 또는 scFv는 TCR 신호 전달 도메인에 융합되고 T 세포 표면 상에 디스플레이된다. 비오틴, FITC 또는 합성 펩타이드로 변형된 종양-특이적 항체는 암 세포와 스플릿 CAR을 발현하는 T 세포 간의 어댑터로서 작용하고 T 세포 반응을 유도하기 위해 사용되었다. 지금까지, 이들 시스템은 단지 일시에 하나의 CAR을 제어하기 위해 사용되었다. 직교 결집 쌍은 동시에 다중 신호 전달 경로의 제어를 가능하게 함에 따라서 상이한 경로 활성화의 조합 감지 및 미세-균형을 가능하게 한다.

- [0169] 스플릿, 범용, 프로그램가능하고 재구성가능한 (SUPRA) CAR 플랫폼
- [0170] 상기 작업을 위해, 하기의 기능 장비들이 본원에 기재된 SUPRA CAR 플랫폼에 포함된다:
- [0171] ON/OFF 스위치,
- [0172] 항원의 검출을 기준으로 논리적 결정, 및
- [0173] 상이한 신호 전달 경로의 독립적 및 멀티플렉스 튜닝
- [0174] SUPRA 플랫폼은 CAR의 세포의 부분으로서 류신 지퍼를 사용하고 세포내 도메인으로서 다양한 신호 전달 단백질을 사용한다 (도 12). 동족 류신 지퍼는 항원 특이적 scFv 항체에 융합된다. 항체/지퍼 융합체의 투여는 T 세포를 활성화하고 따라서 용량 의존적 방식으로 ON 스위치로서 작용한다. 류신 지퍼는 전하 상호작용을 통해 이중성 구조를 형성할 수 있는 일종의 단백질이다²⁹. 류신 지퍼는 류신 지퍼의 많은 직교 쌍이 가용하기 때문에 SUPRA 플랫폼을 위해 이롭고 따라서 디자인 노력을 위해 대형 풀의 후보물을 제공한다²⁸. 류신 지퍼 도메인은 또한 동일한 결합 파트너에 대해 서로 경쟁하도록 가공되어 따라서 억제 및 "NOT" 기능을 가능하게 한다 (도 12). 더욱이, 본원 발명자는 OR, NIMPLY, AND, XOR과 같은 복잡한 기능을 가능하게 하기 위해 류신 지퍼 쌍 간의 상이한 친화성을 사용할 수 있다 (도 12). 항상성으로 활성이 아닌 8개의 가능한 2-투입 불린 논리 거동이 있다 (16개의 가능한 2-투입 불린 논리 게이트가 있다. 그러나, 이들 (FALSE, A, B, OR, AND, A NIMPLY B, B NIMPLY A, 및 XOR) 중 8개 만이 어떠한 투입도 존재하지 않는 경우 불활성이다).
- [0175] 추가로, 다중성 직교 쌍은 스플릿 신호 전달 도메인 (예를 들어, CD3 ζ , CD28, 4-1BB, PD-1)을 갖는 CAR을 가능하게 하고, 따라서, 이들 경로의 독립적 및 조정가능한 제어를 가능하게 한다 (도 12). 각각의 개별 CAR은 상이한 항원을 표적화하는 scFv와 용이하게 쌍을 형성할 수 있고 따라서 조합 및 논리적 항원 감지를 가능하게 한다. 시험관내 특징 분석은 SUPRA CAR 플랫폼 반응 (예를 들어, 세포독성, 사이토킨 생성, 및 기억 T 세포 형성)을 맵핑하여 파라미터 (예를 들어, zipCAR 발현 수준, zipFv 농도, scFv 친화성, 및 지퍼 친화성)를 디자인할 수 있다. 본원에 기재된 기능은 또한 마우스 이중이식 종양 모델에서 생체내 시험될 수 있다.
- [0176] 현재 CAR 디자인은 제한된 제어 및 계산 능력을 갖는다. 이들 결핍은 현재 CAR이 위험한 과-활성화에 민감해지도록 하고 종양 세포를 건강한 조직과 구분하는 CAR의 능력을 감소시킨다. 본원에 기재된 것은 논리적 및 신호 전달 믹서 기능을 부여하는, T 세포에서 다중 신호 전달 경로를 독립적으로 조절하기 위해 예를 들어, SUPRA CAR을 사용함에 의해 제어 및 계산 능력을 해결하기 위한 방법 및 조성물이다.
- [0177] 방법 및 조성물은 이점을 제공하고, 예를 들어, 이들은 제1 기능성 풍부한 ON/OFF 스위치를 특징으로 하는 범용 CAR 플랫폼, 논리적 검출 및 통합, >2 항원의 프로세싱, 및 상이한 신호 전달 경로의 독립적 조절을 제공한다. 이들 특징은 단일 시스템에서 함께 결코 입증되지 않았다. 특히, 본원에 제공된 것은 CAR을 사용하는 T 세포에서 다중 신호 경로의 제1 독립적 튜닝이다. 본원에 기재된 것은 상이한 파라미터가 스플릿, 범용 CAR 시스템에 얼마나 영향을 줄 수 있는지이고 이는 적정가능한 ON/OFF CAR 스위치를 디자인하기 위해 유용하다. 추가로 본원에 기재된 것은 OR, NIMPLY, AND 및 XOR 논리 게이트를 포함하는, CAR을 갖는 2-투입 불린 논리 게이트의 제1 완전한 세트의 생성이다. 상기 논리 거동은 종양 회피를 방지하기 위해서 뿐만 아니라 암 세포에 대한 CAR T 세포의 특이성을 개선시키기 위해 매우 유용하다. 추가로, 논리 거동의 일부는 이들이 가공하기 어렵기 때문에 합성 생물학 관점에서 흥미롭다. 예를 들어, XOR 논리 게이트는 투입 신호 각각이 다른 투입의 존재에 의존하여, 산출을 활성화시키고 서프레싱할 수 있기 때문에 가공하기가 가장 어려운 것 중 하나이다. 추가로, 본원에 기재된 것은 다중 신호 전달 경로를 제어하기 위해 암성 세포 및 건강한 세포로부터 >2 항원을 통합할 수 있는 제1 CAR 시스템의 개발이다. CAR T 세포 시스템에서 처음으로, CD3 ζ , CD28, 4-1BB 및 PD-1 신호 전달을 별도로 제어할 수 있고 각각의 경로에 대한 활성화의 타이밍 및 강도가 CAR T 세포 반응 및 기억 T 세포 형성에 일

마나 영향을 주는지를 연구한다.

- [0178] 시약 및 DNA 작제물: 많은 zipCAR 및 zipFv는 친화성 간의 상호관계, 수용체의 발현 수준 및 SUPRA CAP 플랫폼의 성질을 전신적으로 맵핑하기 위해 개발될 수 있다. 이와 같이 상기 결과로부터 이끌어낸 결론은 다른 연구에서 통상적으로 발견되는 수개의 시약과는 반대로 광범위 세트의 시약 및 조건의 총액으로부터 유도된다. 이것은 일부 시약으로부터의 변형은 완전히 SUPRA CAR의 기능을 완전히 차폐시키지 않음을 보장하는 것을 도와준다.
- [0179] 1차 T 세포: 일부 구현예에서, 1차 T 세포는 많은 익명의 공여자로부터 단리된다. 하나의 공여자의 T 세포로부터 유래된 결과는 반대 성별의 또 다른 공여자로부터의 T 세포와 함께 입증된다.
- [0180] 동물: 수컷 및 암컷 마우스 둘 다를 사용하여 마우스의 성별로 인한 편향을 감소시킨다.
- [0181] 메트릭: 신규한 비편향 메트릭은 본원에서 논리 거동의 기능적 타당성을 결정하기 위해 기재된다 (보다 세부 사항에 대해서는 하기를 참조한다). 투명성을 보장하고 데이터 공유를 촉진시키기 위해, 웹-기반 데이터시트에서 유전학적 회로의 주요 사항 및 수행능을 나타내는 혁신적인 방법이 또한 개발되었다 (datasheets.synbiotools.org/의 월드 와이드 웹상에서 가용함).
- [0182] *ON/OFF 스위치로서 SUPRA CAR 플랫폼의 특징 분석*
- [0183] 주요 의문: SUPRA 플랫폼과 T 세포 반응의 디자인 파라미터 간의 관계는 무엇인가? 본원에 기재된 것은 (1) zipCAR 발현 수준, (2) 류신 지퍼 친화성, (3) scFv 친화성, 및 (4) zipFv 농도가 항원-발현 세포에 대한 시험관내 및 종양에 대한 생체내 T 세포 활성화에 궁극적으로 어떻게 영향을 주는지의 체계적 특징 분석이다 (도 14a).
- [0184] *디자인 법칙을 통찰하기 위한 시험관내 SUPRA CAR의 체계적 특징 분석.* 하기의 파라미터의 변화가 SUPRA CAR T 세포 활성화에 어떻게 영향을 주는지를 결정할 수 있다.
- [0185] (1) ZipCAR 발현 수준: zipCAR은 3개의 별도의 zipCAR 발현 수준으로 이루어진 T 세포를 생성하기 위해 다양한 감염 다중도로 렌티바이러스 형질도입을 통해 1차 인간 T 세포에 도입될 수 있다. zipCAR의 발현은 mCherry 또는 myc 염색 측정으로 입증될 수 있다.
- [0186] (2) 류신 지퍼 친화성: 다양한 친화성으로 zipCAR BZIP에 결합할 수 있는 적어도 3개의 상이한 류신 지퍼 (AZIP)가 동정되었고, zipFv는 이들 AZIP를 사용하여 작제될 수 있다 (도 14b).
- [0187] (3) scFv 친화성: zipFv를 생성하기 위해 사용될 수 있는 적어도 3개의 항-Her2 scFv가 상이한 친화성으로 가용하다 (도 14c). 3개의 류신 지퍼 쌍과 함께, 적어도 9개의 독특한 zipFv가 정제될 수 있다. 단백질은 HEK293T 세포에서 발현될 수 있고 배지로 분비될 수 있다. 상기 zipFv는 세포 배양 상등액으로부터 FPLC로 정제될 수 있다.
- [0188] (4) ZipFv 농도: SUPRA CAR 플랫폼의 용량-의존성 성질을 연구하기 위해, 다양한 양의 zipFv (예를 들어, 5 μ g/ml, 0.5 μ g/mL 또는 50 ng/mL)가 사용될 수 있다.
- [0189] 상기 명시된 각각의 조건은 표적 (E:T) 비율 (1:1, 10:1, 1:10)에 대해 3개의 이펙터로 시험될 수 있다. 본 실험을 위해 선택된 표적 암 세포주는 이것이 이종이식 종양 모델 36에 사용되는 표준 유방암 세포주이기 때문에 SK-BR-3으로 불리우는 Her2+ 유방암 세포주이다. SK-BR-3 주는 루시페라제로 변형시켜 시험관내 세포독성 검정 및 생체내 이미지화를 촉진시킨다. 본 실험을 위해, 상이한 수의 SK-BR-3 세포가 96-웰 플레이트 상에 분주될 수 있고 밤새 성장시킨다. 가공된 T 세포 및 zipFv는 다음 날 SK-BR-3 세포를 함유하는 96-웰 플레이트에 첨가될 수 있다. T 세포의 수 및 첨가될 zipFv의 수는 조건에 따라 다양할 수 있다. T 세포 활성화는 예를 들어, 표준 ELISA 검정을 사용하여 배지 내 IL-2 및 IFN- γ 의 사이토킨 생성을 측정함을 통해 정량될 수 있다. SK-BR-3 세포에 대한 세포독성은 루시페라제 검정을 통해 잔류하는 생존 세포 (즉, T 세포에 의해 사멸되지 않은 세포)를 정량함에 의해 측정될 수 있다¹⁴. T 세포 표면 상에 CD69 발현은 활성화된 T 세포의 백분율을 결정하기 위해 측정될 수 있다.
- [0190] *생체내 활성 및 파라미터 상호관계를 입증하기 위한 마우스 연구.* 다양한 파라미터가 SUPRA 플랫폼의 항-종양 활성에 어떻게 영향을 미치는지는 마우스 이종이식 종양 모델에서 조사될 수 있다. 마우스 이종이식 종양 모델에서 SUPRA 플랫폼의 수행능을 시험하기 위해, 루시페라제를 발현하는 SK-BR-3 세포는 면역결핍 마우스 (NOD scid 감마 (NSG), 4-6 주령, Jackson Laboratory)에 이식될 수 있다. 500만 암 세포는 복강내 (ip)로 이식될

수 있다. 종양 확립 14 내지 20일 후, zipCAR을 발현하는 500만의 CD8+ T 세포는 ip 주사를 통해 도입될 수 있다. 상이한 지퍼 및 scFv 친화성을 갖는 항체는 1일 후 ip 주사를 통해 도입될 수 있다. 6마리의 마우스는 마우스의 성별로 인한 편향을 감소시키기 위해 각각의 조건에 대해 함께 분류 (3마리의 수컷 및 3마리의 암컷 마우스)될 수 있다. 종양 성장은 루시페라제 및 IVIS 이미징화를 통해 측정될 수 있다. 3주 후, 마우스를 희생시키고 골수 및 비장 세포를 수거하여 유동 세포측정을 통해 총 T 세포 및 다른 T 세포 서브세트 (예를 들어, 중추 기억 세포)의 수를 결정할 수 있다. 상기된 실험 조건을 기준으로, SUPRA 시스템이 실제로 마우스 종양 모델에서 종양 하중을 완화시킬 수 있음이 입증되었다 (도 15a 및 15b). SUPRA 플랫폼의 효능은 전장 Her2 CAR을 발현하는 T 세포와 비교할 수 있다. 추가로, zipCAR을 발현하는 T 세포는 상응하는 zipFv 없이 종양 크기를 유의적으로 감소시키지 않았다.

[0191] 본원에 기재된 것은 시험관내 및 생체내 둘 다에서 가공된 T 세포의 SUPRA CAR 디자인 파라미터와 항-종양 활성 간의 관계의 맵핑이다. 이것은 향후 임상전 및 임상 연구에서 SUPRA 시스템을 효과적으로 사용하는 법에 대한 디자인 법칙을 제공할 수 있다.

[0192] SUPRA CAR 플랫폼을 사용한 조합적 논리연산의 개발

[0193] 투입 부재 상태 (0.0)가 산출 부재를 생성하는 경우 8개의 가능한 2-투입-1-산출 논리 게이트가 있다 (도 16). 이들 논리 게이트는 항상성으로 활성인 T 세포를 생성하지 못하고 이는 안전하고 효과적인 T 세포 치료요법의 요건이다. 이론에 국한되는 것 없이, 본원에서 scFv 및 류신 지퍼의 친화성이 일부 논리 거동 (예를 들어, XOR, NIMPLY, 및 AND 게이트)에 대한 결과를 결정하는데 중요한 역할을 수행할 수 있다. 너무 강하거나 너무 약한 친화성은 시스템의 수행능을 손상시킬 수 있다. 따라서, 이들 논리 연산을 zipCAR로 디자인하기 위해, 류신 지퍼 및 단백질 가공 방법의 라이브러리를 사용하여 논리 계산을 성취하기 위해 협력적으로 완결시키거나 결합할 수 있는 zipCAR 및d zipFv를 생성할 수 있다. 암 세포의 지퍼/scFv 친화성과 CAR T 논리적 검출 간의 관계가 결정될 수 있다. 모든 디자인에서, 단지 하나의 zipCAR이 T 세포로 도입된다. 논리 거동을 입증하기 위해, 본원 발명자는 Her2 또는 Axl을 표적화하는 zipFv를 디자인할 수 있다. Axl은 많은 암에서 과발현된 수용체 티로신 키나제이다³⁷. Axl에 대한 신규한 CAR (도 17)이 개발되었고 Axl에 대한 scFv를 사용하여 zipFv를 생성시킬 수 있다.

[0194] 제안된 수용체 게이트의 3개, 거짓 (FALSE), A만, 및 B만이 다른 논리 디자인을 위한 대조군으로서 작용할 수 있다. OR 게이트는 2개의 항원 중 하나 또는 둘 다가 T 세포 반응을 유발하도록 한다. 따라서, OR 게이트는 2개의 항원에 대한 돌연변이가 종양이 가공된 T 세포에 의한 검출을 회피하도록 요구되기 때문에 종양 회피를 방지하기 위해 유용할 수 있다. AND 게이트는 2개의 항원이 동일한 종양에 존재하도록 하여 T 세포 반응을 활성화시킴에 의해 종양 표적화 특이성을 개선시킬 수 있다. NIMPLY 게이트는 항원 중 하나를 상실시킴에 의해 나타나는 종양을 검출하기 위해 유용하다. 유사하게, XOR 게이트는 이의 표면 프로파일의 2개의 항원 중 어느 하나의 상실에 의해 구분되는 종양 세포를 검출할 수 있다. 이러한 유형의 역제는 하기된 억제성 CAR (iCAR) 디자인으로부터 구분됨을 주지하고 여기서, 상기 리간드 결합은 PD-1 신호 전달 경로를 유발한다. 상기 디자인은 iCAR에 대한 대안적 전략을 나타내고 T 세포를 아네르기 상태로 밀어낼 위험이 없다.

[0195] zipCAR 수용체 디자인에서 논리연산의 디자인 및 특징 분석:

[0196] FALSE, A만, 및 B만의 게이트 (도 16): 이들 논리 거동은 다른 논리 디자인을 위한 대조군으로서 작용하고 상기 본 실시예에서 상기 기재되었다.

[0197] OR 게이트 (도 16): OR 게이트는 SUPRA 플랫폼으로 성취될 수 있는 가장 단순한 논리 중 하나이다. 2개의 투입 신호 중 하나 또는 둘 다의 존재는 T 세포 반응을 유발할 수 있다. SUPRA를 사용한 상기 논리 거동을 성취하기 위해, zipCAR은 먼저 렌티바이러스 형질도입을 통해 1차 T 세포에 도입될 수 있다. 동일한 류신 지퍼를 갖지만 Her2 또는 Axl을 표적화하는 scFv를 갖는 2개의 zipFv가 사용될 수 있다. 상기 OR 게이트 디자인은 추가의 T 세포 가공 없이 보다 많은 항원 투입을 수용하기 위해 용이하게 스케일화될 수 있음을 주지한다.

[0198] NIMPLY B 및 B NIMPLY A 게이트 (도 16): NIMPLY 논리 게이트에서, 단지 하나의 투입은 산출을 유도할 수 있고 제2 투입의 존재는 시스템을 중단시킨다. 예를 들어, A NIMPLY B는 항원 A를 갖는 암 세포만이 반응을 유도함을 의미한다. 어떠한 항원도 발현하지 않거나, 항원 B만을 발현하거나, 항원 A 및 B를 발현하는 세포는 SUPRA CAR을 활성화시키지 않는다. SUPRA와 함께 상기 논리 거동을 성취하기 위해, 상이한 류신 지퍼 (예를 들어, Her2-AZIP 및 Axl-BZIP-약한)를 갖는 2개의 zipFv가 디자인될 수 있다. Axl zipFv 상의 약한 BZIP는 Her2-AZIP zipFv에 결합할 수 있지만, zipCAR 상의 BZIP 보다는 약한 친화성을 갖는다. Her2만이 세포상에 존재하는

경우, Her2-AZIP는 수용체에 결합하고 T 세포 활성화를 유발한다. 그러나, Her2 및 Ax1 둘 다가 동일한 세포 상에 존재하는 경우, scFv-항원 결합은 약한 Ax1-BZIP로 Her2-AZIP를 경쟁적으로 포화시키기 위해 요구되는 근접 협력을 제공할 수 있고 T 세포가 활성화될 수 없다. 본원에서 경쟁 지퍼 결합이 zipCAR 활성화를 차단시키는데 효과적일 수 있음이 입증된다. 4개의 항-Her2 zipFv, AZIP를 갖는 하나 (활성화) 및 AZIP와 강하게 또는 약하게 결합하는 BZIP를 갖는 다른 3개가 생성되었다. 항-Her2-AZIP zipFv는 zipCAR을 활성화시킬 수 있고 항-Her2-BZIP는 용량-의존적 방식으로 항-Her2-AZIP에 의해 유발되는 활성화를 강하게 억제할 수 있다 (도 18).

[0199] 2개의 Ax1 scFv 및 5 Her2 scFvs38은 다양한 친화성을 갖는 것으로 가용하다. scFv 및 BZIP 친화성 변이체의 조합을 사용한 NIMPLY 게이트에 대한 억제성 scFv의 변이체가 작제될 수 있다. 활성화 zipFv 상의 AZIP의 실체는 변화되지 않은 상태로 남아있다. zipCAR 상의 BZIP는 또한 일정하게 남아있다. 지퍼는 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같이 시험된 지퍼의 라이브러리로부터 유래될 수 있다. 보다 많은 지퍼 변이체는 지퍼 상에 상호 작용 잔기를 변형시킴에 의해 문헌³⁰에 기재된 단백질 가공 원리를 기준으로 생성될 수 있다.

[0200] AND 게이트 (도 16): AND 게이트를 생성하기 위해, zipCAR에 약하게 결합하지만 2개의 zipFv가 동일한 세포상의 항원에 결합되는 2개의 zipFv가 생성될 수 경우, 2개의 zipFv 간의 협력적 상호작용 때문에 동일한 세포 상에 항원에 결합되는 경우, zipCAR에 보다 강하게 결합할 수 있다. 2개의 직교 BZIP 지퍼는 zipCAR 상에 부착될 수 있다. 2개의 상응하는 AZIP는 zipFv 각각에 부착될 수 있다. 마지막으로, 직교 이중이량체 상호작용 도메인은 또한 각각의 zipFv에 부착되어 2개의 zipFv 간에 약한 상호작용을 가능하게 한다. zipFv와 zipCAR 간의 약한 상호작용의 이러한 조합은 zipCAR T 세포가 zipFv 둘 다의 존재하에서만 활성화되도록 보장하기 위해 요구되는 협력을 제공할 수 있다. DZ 도메인 및 이들의 상응하는 리간드는 많은 약하게 상호작용하는 PDZ/리간드 쌍이 가용하고³⁹ 신호 전달 단백질 또는 전사 인자⁴⁰⁻⁴²에서 협력을 가공하기 위해 사용되어 왔기 때문에 zipFv 상에 직교 이중이량체 상호작용 도메인으로 사용될 수 있다. PDZ 및 지퍼 도메인으로 구성된 zipCAR 및 zipFv의 작은 라이브러리는 AND 게이트로서 작용할 수 있는 도메인 세트를 동정하기 위해 생성될 수 있다.

[0201] XOR (도 16): XOR 게이트를 생성하기 위해, 2개의 직교 BZIP 지퍼가 AND 게이트와 유사하게 zipCAR 상으로 부착될 수 있다. 상응하는 직교 AZIP 지퍼는 zipFv 상으로 부착되어 각각은 상이한 BZIP 상의 수용체에 결합할 수 있다. 추가로, 각각의 zipFv는 또한 BZIP-약한 다른 zipFv로 장착되어 zipFv 둘 다의 존재가 수용체를 활성화시키지 못하도록 할 수 있다. 그러나, BZIP-약한의 친화성은 충분히 낮아 이것은 항원을 통한 협력적 결합을 요구하고 zipFv가 용액 중에서 결합하지 못하도록 할 수 있다. 따라서, 2개의 zipFv는 단지 이들이 이들의 scFv를 통해 동일한 세포로 결합되는 경우 서로를 억제함에 따라서 zipFv 둘 다가 zipCAR을 활성화시키지 못하도록 한다. 다른 논리 게이트와 유사하게, AZIP에 대해 다양한 BZIP 친화성을 갖는 일련의 zipFv는 최적의 디자인을 동정하기 위해 생성될 수 있다.

[0202] 수용체 특징 분석

[0203] ZipCAR은 렌티바이러스 형질도입을 통해 1차 T 세포 (즉, CD4 및 Cd8)에 도입될 수 있다. zipCAR의 발현은 myc 염색 및 유동 세포측정으로 정량될 수 있다. ZipFv는 HEK293T 세포에서 생성될 수 있고 FPLC로 정제될 수 있다. 시험관내 SUPRA 시스템의 논리 거동을 결정하기 위해, 시스템은 가공된 T 세포 및 zipFv를 (a) 리간드를 발현하지 않거나, (b) Her2만을 발현하거나, (c) Ax1만을 발현하거나 (d) Her2 및 Ax1을 발현하는 SK-BR-3 세포를 혼합함에 의해 활성화될 수 있다. 리간드 부재 SK-BR-3 주는 Her2의 CRISPR-Cas9 녹아웃으로 생성될 수 있다. Ax1은 렌티바이러스 형질도입을 통해 SK-BR-3으로 도입될 수 있다. 이들 4 SK-BR-3 주는 상기 목적을 위해 4개의 가능한 불린 논리 투입을 나타낸다. 각각의 시스템은 3 E:T 비율로 시험될 수 있다. 지퍼 및 scFv 친화성 뿐만 아니라 zipFv 농도 및 zipCAR 발현은 다양할 수 있다. T 세포 활성화는 사이토킨 생성 (즉, IL-2 및 IFN- γ), 종양 세포에 대한 세포 독성, 및 T 세포 상의 CD69 발현을 측정함에 의해 모니터링될 수 있다.

[0204] 편향 없이 이들 수용체의 논리 수행능을 정량적으로 결정하기 위해, 벡터 근접 (VP)으로 불리우는 메트릭이 개발되었다. VP는 서킷 생물학적 수행과 이의 의도된 참 테이블로부터 이상적인 수행 간에 잘못된 정렬을 측정한다. 참 테이블 및 수득된 실험 결과는 각각 4차원 벡터 공간에서 벡터로서, 참 테이블 및 신호 벡터로서 나타낸다. 이들 2개의 벡터 (VP 각도 메트릭) 간의 각도 오차는 0°로 계산되고 이는 데이터가 의도된 참 테이블을 나타냄을 의미하고 90°는 데이터가 완전하게 부정확한 산출 (의도된 참 테이블에 대한 역위 반응)을 입증함을 의미한다. 임의의 수행된 서킷에 대해, 이의 VP 각도는 모든 16개의 가능한 2-투입 불린 논리 참 테이블 및 상승 순서로 분류된 결과로부터 측정된다. 상기 분류된 목록에서 의도된 참 테이블의 순위는 서킷의 VP 글로벌 순위로서 정의된다. 각각의 산출 측정 (예를 들어, 세포 독성, 사이토킨, CD69)이 이 자신의 VP 각도 및 범용 순위를 가짐을 주지한다. 서킷은 이것이 모든 산출에 대해 최상 (즉, 최저)의 VP 글로벌 순위를 갖는 경우 상

기 측정하에 기능적으로 타당한 것으로서 호칭된다. 최상의 수용체는 기능적으로 타당하고 ON 및 OFF 상태 (역학적 범위) 간의 최대 차이를 갖는 수용체이다.

- [0205] *마우스 이종이식체 종양 모델에서 zipCAR의 논리 거동의 특징 분석.* 상당한 표준 생체내 종양 모델은 상기된 4 SK-BR-3 암 세포주가 별도의 마우스 그룹에서 ip 주사를 통해 도입되는 경우 사용될 수 있다. 이들 세포주는 NSG 마우스로 이식되고 종양은 2주 동안 성장하도록 하였다. zipCAR을 함유하는 500만의 T 세포는 ip 주사를 통해 마우스로 도입된다. zipFv는 또한 1일 후 ip 주사를 통해 주사된다. zipFv의 여러 기능성 세트를 갖는 일부 게이트에 대해, 세트 중 적어도 2개가 어느 것이 생체내에서 더 양호하게 작용하는지를 결정하기 위해 시험한다. 5마리의 마우스는 조합 각각에 대해 함께 분류된다. 종양 성장은 루시페라제 및 IVIS 이미징화기를 통해 측정된다. 3주 후, 마우스를 희생시키고 골수 및 비장 세포를 수거하여 유동 세포측정을 통해 독특한 T 세포 서브세트의 수를 결정한다. 6마리의 마우스는 마우스의 성별로 인한 편향을 감소시키기 위해 각각의 조건에 대해 함께 분류 (3마리의 수컷 및 3마리의 암컷 마우스)된다. 8개 가능한 2-투입 논리 수용체를 시험하고 VP 메트릭을 사용하여 생체내 수용체의 논리 수행능을 객관적으로 결정한다.
- [0206] 본원에 기재된 것은 임의의 현재 CAR 디자인에 의해 매치되지 않는 논리 연산을 수행하여 암 환자에 대한 정확한 의약을 제공하기 위해 지능적 플랫폼을 전달하기 위한 zipCAR 및 zipFv 세트의 디자인 및 특징 분석이다.
- [0207] 지퍼와 정렬된 지퍼 간의 링커 길이와 같은 파라미터는 최상의 zipCAR 디자인을 동정하기 위해 다양하게 할 수 있다.
- [0208] 디자인은 또한 3개 지퍼를 포함하도록 변형시켜 3개 투입이 동일한 수용체에 의해 프로세싱될 수 있고 보다 복잡한 논리가 성취될 수 있도록 할 수 있다. 추가로, 다양한 친화성을 갖는 류신 지퍼와 PDZ-리간드 쌍의 라이브러리는 이들이 보다 복잡한 SUPRA CAR 디자인에 대해 사용될 수 있도록 제공된다.
- [0209] *다중 신호 전달 경로를 제어하기 위한 SUPRA CAR의 개발*
- [0210] CD28 및 4-1BB와 같은 동시-자극 경로의 유발은 신속한 살종양 활성 및 보다 집중적 T 세포 형성 둘 다를 유도할 수 있다. 가공된 T 세포에 대해서만 PD-1 신호 전달 경로를 활성화시키는 것은 과활성 CAR T 세포를 완화시키고 부작용의 발생 위험을 저하시킬 수 있다. 상이한 세포내 신호 전달 도메인 및 류신 지퍼를 갖는 직교 zipCAR은 각각의 경로의 강도 및 활성화 타이밍이 전체 T 세포 반응, T 세포 분화 및 항종양 효과에 어떻게 기여하는지를 밝히기 위해 조사될 수 있다.
- [0211] *상이한 신호 전달 도메인을 갖는 직교 zipCAR을 디자인하고, 제조하고, 특징 분석한다.*
- [0212] 40개 류신 지퍼 쌍⁴³은 Jurkat T 세포에서 SUPRA CAR 플랫폼 내에서 스크리닝되었고 (도 19a) SUPRA 플랫폼과 상용성인 3개 직교 지퍼 쌍 (도 19b)이 동정되었다. 이들 지퍼를 사용하여 CD3 γ , CD28, 4-1BB 및 PD-1 신호 전달 도메인을 갖는 직교 zipCAR을 생성시킬 수 있다. 이들 zipCAR은 상기된 바와 같은 렌티바이러스 벡터를 사용하여 T 세포로 형질도입된다. 예를 들어, 본원에서 입증된 것은 Jurkat T 세포에서 상이한 CAR의 활성화를 억제하는 PD-1 세포내 신호 전달 도메인을 갖는 억제성 CAR의 생성이다. (도 19c).
- [0213] *CD3 γ , CD28, 및 4-1BB zipCAR의 시험:* 상이한 신호 전달 도메인을 갖는 zipCAR이 T 세포에서 어떻게 기능하는지를 입증하기 위해, 인간 CD4 및 CD8 1차 T 세포 둘 다는 렌티바이러스 형질도입을 통해 zipCAR로 형질도입한다. 세포는 특징 분석 실험을 개시하기 전 휴지기 상태 (~12일)에 도달하도록 하였다. zipCAR CD28 및 4-1BB 도메인의 기능성을 시험하기 위해, 이들 도메인을 함유하는 zipCAR은 단지 CD3 ζ 신호 전달 도메인을 함유하는 항-Her2 CAR을 이미 안정하게 발현하는 T 세포에 별도로 도입한다. 이들 zipCAR의 거동은 이미 각각의 신호 전달 도메인을 함유하는 전장 (통상적) Her2-CAR과 비교한다. zipCAR의 발현은 항-myc 염색 및 유동 세포측정으로 입증된다. 사멸 검정에서, Her2 및 루시페라제를 발현하는 K562 세포는 항원 제공 세포로서 사용된다. 상응하는 항-Her2 zipFv를 첨가하여 zipCAR을 활성화시킨다. 추가로, 항체 농도는 다양하게 할 수 있고, 상이한 지퍼 친화성을 갖는 zipFv는 이들 파라미터가 T 세포 반응에 어떻게 영향을 미치는지를 결정하기 위해 생성시켰다. T 세포의 IL-2 생산 및 CD69 발현은 활성화 수준을 결정하기 위해 측정된다. T 세포 증식은 세포 계수를 통해 모니터링한다. CD28의 활성화는 4-1BB의 활성화와 비교하여 보다 높은 백분율의 중추 기억 T 세포를 유도한다^{13,14}. 따라서, CCR7 및 CD45RO와 같은 표면 마커는 유동 세포측정을 통해 모니터링하여 자극 유무 하에 중추 기억 또는 이펙터 기억 T 세포의 상대적 수준을 결정한다.
- [0214] *PD-1 zipCAR 시험:* PD-1 신호 전달 도메인을 갖는 zipCAR이 T 세포 활성화를 억제할 수 있는지를 입증하기 위해, zipCAR은 렌티바이러스 형질도입을 통해 항-Her2 CAR을 이미 함유하는 1차 T 세포로 도입한다. T 세포는

Her2+ K562 세포로 활성화되고 zipFv로 억제된다. 항체 농도 및 지퍼 친화성은 다양하게 할 수 있고 이들 파라미터를 사용하여 T 세포 반응의 억제에 영향을 줄 수 있다. 억제는 IL-2 생성, CD69 발현, 및 증식을 측정함에 의해 모니터링된다.

[0215] *시험관내 zipCAR의 멀티플렉스 대조군의 특징 분석.* zipCAR을 사용한 상이한 신호 전달 경로의 조합적 제어: 동일한 T 세포에서 신호 전달 경로의 별도의 제어를 입증하기 위해, 다양한 신호 전달 도메인을 갖는 3개 zipCAR은 2개의 후속적 렌티바이러스 형질도입을 통해 1차 T 세포에 도입한다. 각각의 zipCAR은 또한 직교 지퍼 및 에피토프 태그를 갖는다. zipCAR의 2개 세트는 도 20에 도시한다. zipCAR의 상기 수거는 각각의 scFv에 부착된 zipFv에 의존하는 광범위한 거동을 나타낸다. 도 20에서, 논리연산 및 표현형은 모든 3개의 zipFv가 3-투입 논리 거동을 생성하기 위해 상이한 항원을 표적화함을 추정함에 의해 유래한다. 그러나, 이들 zipCAR은 소수의 항원을 표적화하기 위해 용이하게 적응될 수 있다. 추가로, 모든 zipCAR이 동시에 활성화될 필요는 없다.

[0216] Her2, Ax1, 및 메소텔린에 대한 zipFv가 생성될 수 있다. 3개의 상이한 투입 리간드와 함께 8개의 가능한 조합이 있다: (1) 리간드 부재, (2) 유일하게 Her2, (3) 유일하게 Ax1, (4) 유일하게 메소텔린, (5) Her2 + Ax1, (6) Her2 + 메소텔린, (7) Ax1 + 메소텔린, (8) 또는 Her2 + Ax1 + 메소텔린. 모든 8개의 가능한 표적 세포주는 K562 세포주에서 Her2, Ax1 및/또는 메소텔린의 세포외 부분을 안정하게 과발현시킴에 의해 생성될 수 있다. 새로운 K562 주의 상기 세트는 또한 루시퍼라제 및 mCherry 유전자를 항상성으로 발현한다. 루시퍼라제는 시험관내 세포독성 검정 및 생체내 이미지화를 위해 사용될 수 있고, mCherry는 유동 세포측정 분석을 위해 세포를 마킹한다. 암 세포주에 대한 세포 독성 뿐만 아니라 중추 기억 T 세포 표면 마커 및 사이토킨 생성이 모니터링된다.

[0217] *개별 경로의 멀티플렉스 용량 반응 프로파일:* 상이한 신호 전달 경로가 장착된 직교 zipCAR은 상이한 수준에서 각각의 경로를 활성화시키기 위한 유일한 기회를 제공하고 이는 현재 고정된 CAR 디자인을 사용해서는 성취될 수 없는 없는 성질이다. 도 20에 명시된 zipCAR의 2개의 세트에 대해, 각각의 경로에 대한 시험관내 용량-반응 분석은 모두 3개의 zipCAR 및 각각의 zipCAR에 대한 5개의 상이한 zipFv 농도를 함유하는 T 세포를 사용하여 수행할 수 있다. 본 실험에서, 각각의 zipFv는 동일한 항-Her2 scFv를 갖는다. 표적 세포는 Her2+ K562 세포이다. 사이토킨 생성 (즉, IL-2 및 IFN- γ)은 ELISA를 통해서 및 K562 세포의 세포독성을 통해서 측정한다. 또한 CCR7 및 CD45RO와 같은 표면 마커는 자극 유무 하에 중추 및 이펙터 기억 T 세포의 상대적 수준을 결정하기 위해 측정한다.

[0218] *개별 경로의 일시적 제어:* 상이한 수준의 활성화에 추가로, 직교 zipCAR에 의해 지배되는 각각의 경로는 상이한 시점에서 유발될 수 있다. CD28 및 4-1BB 활성화의 상대적 타이밍은 CAR T 세포 반응 및 기억 T 세포 형성에 영향을 줄 수 있다. CD3 ζ 및 CD28을 제어하는 zipCAR은 실험 개시 시점에 동시에 활성화될 수 있다. 4-1BB를 제어하는 zipCAR은 이어서 Her2+ K562 세포 및 항-Her2 zipFv를 사용한 CD3 ζ 및 CD28의 초기 활성화 후 0h, 8h, 16h, 24h, 48h, 72h, 또는 96h에 활성화된다. 다시, 사이토킨 생성은 ELISA 및 세포독성을 통해 측정한다. 또한 CCR7 및 CD45RO와 같은 표면 마커는 중추 및 이펙터 기억 T 세포의 상대적 수준을 결정하기 위해 측정한다.

[0219] *마우스 이종이식체 종양 모델에서 zipCAR의 멀티플렉스 제어의 특징 분석.* T 세포 신호 전달의 멀티플렉스 제어는 생체내 직교 zipCAR 세트로 성취될 수 있다. zipCAR은 myc, FLAG, 또는 HA 에피토프 태그를 함유하고 2개 렌티바이러스 벡터에 클로닝한다. zipCAR의 2개 세트를 분석하기 위해, 렌티바이러스를 2개의 연속 형질도입을 통해 인간 1차 T 세포에 도입한다. zipCAR의 발현은 항-에피토프 태그 염색 및 유동 세포측정으로 입증된다. 8개의 가공된 K562 세포주는 NSG 마우스로 피하 이식되고 2주 동안 성장하도록 하였다. zipCAP를 함유하는 T 세포를 이어서 ip 주사를 통해 마우스로 도입한다. 모든 3개의 zipFv는 1일 후 꼬리-정맥 주사를 통해 주사한다. 6마리의 마우스는 마우스의 성별로 인한 편향을 감소시키기 위해 각각의 조건에 대해 함께 분류 (3마리의 수컷 및 3마리의 암컷 마우스)된다. 종양 성장은 루시퍼라제 검정 및 IVIS 이미지화를 통해 측정된다. 3주 후, 마우스를 희생시키고 골수 및 비장 세포를 수거하여 유동 세포측정을 통해 독특한 T 세포 서브세트의 수를 결정한다.

[0220] 생체내 SUPRA 시스템의 멀티플렉스 용량-반응 프로파일을 평가하기 위해, 상기된 T 세포의 동일 세트를 사용하지만 3개의 zipFv는 상이한 용량으로 마우스에 주사한다. 종양 세포는 Her2만을 발현하는 K562이다. 실험 후 나머지는 상기된 것과 동일하다.

[0221] 생체내 SUPRA 시스템의 일시적 제어를 평가하기 위해, T 세포의 동일 세트를 다시 사용하지만 4-1BB를 CD3 ζ 및

CD28에 대한 zipFv의 첨가 후 0h, 24h, 48h, 72h, 또는 96h에 첨가한다. 이식된 종양 세포는 Her2만을 발현하는 K562이다. 실험의 나머지는 상기된 것과 동일하다.

[0222] 본원에 기재된 것은 인간 T 세포에서 다중 신호 전달 경로를 유연하게 제어할 수 있는 직교 zipCAR의 수거물이다. 이들 zipCAR은 정확한 종양의 치료가 필요한 경우 (예를 들어, 하나의 항원은 종양을 한정하기에 충분하지 않다) 새로운 부류의 CAR의 기반이다. 상기 명시된 수용체 디자인과 커플링되는 경우, 증가된 수의 가용한 논리 연산은 종양 세포의 효율적 동정을 허용한다.

[0223] CAR과 같은 전이유전자의 렌티바이러스 형질도입 효율을 증진시키기 위해, T 세포 수용체 (TCR)의 활성화는 흔히 형질도입 과정 전에 수행된다. TCR의 활성화는 활성화 단계가 상이한 기억 세포로 T 세포 분화를 구동할 수 있기 때문에 기억 T 세포 형성의 분석을 복잡하게 할 수 있다. 전이유전자를 형질도입하기 위한 대안적 방법은 전이유전자를 암호화하는 시험관내 전사된 RNA의 일시적 형질감염을 통해서이다. 본원에서 zipCAR은 시험관내 RNA 전사를 위해 특이적으로 디자인된 벡터에 클로닝되는 것으로 고려된다⁴⁴. zipCAR RNA는 시판되는 키트를 사용하여 생성되고 핵감염을 통해 휴지기 1차 CD4 또는 CD8 T 세포에 형질감염시켰다.

[0224] 추가로 zipCAR은 PiggyBAC45 또는 슬립핑 뷰티⁴⁶와 같은 트랜스포사제에 의해 전달될 수 있는 것으로 고려된다. 이들 시스템은 훨씬 보다 높은 유전자 전달 능력을 갖고 본원에서 3개의 별도의 플라스미드가 PiigyBAC를 사용하여 인간 T 세포로 동시에 통합될 수 있음이 입증된다 (도 21)

[0225] 참조문헌

1. Maude, S.L. et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med* **371**, 1507-1517 (2014).

[0226]

2. Davila, M.L. et al. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med* **6**, 224ra225 (2014).
3. Zah, E., Lin, M.Y., Silva-Benedict, A., Jensen, M.C. & Chen, Y.Y. T Cells Expressing CD19/CD20 Bispecific Chimeric Antigen Receptors Prevent Antigen Escape by Malignant B Cells. *Cancer Immunol Res* **4**, 498-508 (2016).
4. Grada, Z. et al. TanCAR: A Novel Bispecific Chimeric Antigen Receptor for Cancer Immunotherapy. *Mol Ther Nucleic Acids* **2**, e105 (2013).
5. Kloss, C.C., Condomines, M., Cartellieri, M., Bachmann, M. & Sadelain, M. Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells. *Nat Biotechnol* **31**, 71-75 (2013).
6. Lanitis, E. et al. Chimeric antigen receptor T Cells with dissociated signaling domains exhibit focused antitumor activity with reduced potential for toxicity in vivo. *Cancer Immunol Res* **1**, 43-53 (2013).
7. Chen, L. & Flies, D.B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* **13**, 227-242 (2013).
8. Ma, J.S. et al. Versatile strategy for controlling the specificity and activity of engineered T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E450-458 (2016).
9. Rodgers, D.T. et al. Switch-mediated activation and retargeting of CAR-T cells for B-cell malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E459-468 (2016).
10. Urbanska, K. et al. A universal strategy for adoptive immunotherapy of cancer through use of a novel T-cell antigen receptor. *Cancer Res* **72**, 1844-1852 (2012).
11. Kudo, K. et al. T lymphocytes expressing a CD16 signaling receptor exert antibody-dependent cancer cell killing. *Cancer Res* **74**, 93-103 (2014).
12. Morgan, R.A. et al. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther* **18**, 843-851 (2010).
13. Kawalekar, O.U. et al. Distinct Signaling of Coreceptors Regulates Specific Metabolism Pathways and Impacts Memory Development in CAR T Cells. *Immunity* **44**, 380-390 (2016).
14. Zhao, Z. et al. Structural Design of Engineered Costimulation Determines Tumor Rejection Kinetics and Persistence of CAR T Cells. *Cancer Cell* **28**, 415-428 (2015).
15. Bertram, E.M., Lau, P. & Watts, T.H. Temporal segregation of 4-1BB versus CD28-mediated costimulation: 4-1BB ligand influences T cell numbers late in the primary response and regulates the size of the T cell memory response following influenza infection. *J Immunol* **168**, 3777-3785 (2002).
16. Vinay, D.S. & Kwon, B.S. Role of 4-1BB in immune responses. *Semin Immunol* **10**, 481-489 (1998).

[0227]

17. Weinberg, A.D., Vella, A.T. & Croft, M. OX-40: life beyond the effector T cell stage. *Semin Immunol* **10**, 471-480 (1998).
18. Turtle, C.J. et al. Therapy of B Cell Malignancies with CD19-Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells of Defined Subset Composition. *Blood* **124**, 384-384 (2014).
19. Fedorov, V.D., Themeli, M. & Sadelain, M. PD-1- and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses. *Sci Transl Med* **5**, 215ra172 (2013).
20. Morsut, L. et al. Engineering Customized Cell Sensing and Response Behaviors Using Synthetic Notch Receptors. *Cell* **164**, 780-791 (2016).
21. Roybal, K.T. et al. Precision Tumor Recognition by T Cells With Combinatorial Antigen-Sensing Circuits. *Cell* **164**, 770-779 (2016).
22. Hicklin, D.J., Marincola, F.M. & Ferrone, S. HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. *Mol Med Today* **5**, 178-186 (1999).
23. Waldhauer, I. & Steinle, A. NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene* **27**, 5932-5943 (2008).
24. Bourseau-Guilmain, E. et al. Hypoxia regulates global membrane protein endocytosis through caveolin-1 in cancer cells. *Nat Commun* **7**, 11371 (2016).
25. Di Stasi, A. et al. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med* **365**, 1673-1683 (2011).
26. Bonini, C. et al. HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* **276**, 1719-1724 (1997).
27. Wu, C.Y., Roybal, K.T., Puchner, E.M., Onuffer, J. & Lim, W.A. Remote control of therapeutic T cells through a small molecule-gated chimeric receptor. *Science* **350**, aab4077 (2015).
28. Juillerat, A. et al. Design of chimeric antigen receptors with integrated controllable transient functions. *Sci Rep* **6**, 18950 (2016).
29. Vinson, C., Acharya, A. & Taparowsky, E.J. Deciphering B-ZIP transcription factor interactions in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta* **1759**, 4-12 (2006).
30. Moll, J.R., Ruvinov, S.B., Pastan, I. & Vinson, C. Designed heterodimerizing leucine zippers with a range of pIs and stabilities up to 10(-15) M. *Protein Sci* **10**, 649-655 (2001).
31. Bashor, C.J., Helman, N.C., Yan, S. & Lim, W.A. Using engineered scaffold interactions to reshape MAP kinase pathway signaling dynamics. *Science* **319**, 1539-1543 (2008).
32. Siuti, P., Yazbek, J. & Lu, T.K. Synthetic circuits integrating logic and memory in living cells. *Nat Biotechnol* **31**, 448-452 (2013).
33. Bonnet, J., Yin, P., Ortiz, M.E., Subsoontorn, P. & Endy, D. Amplifying Genetic Logic Gates. *Science* (2013).

[0228]

34. Auslander, S., Auslander, D., Muller, M., Wieland, M. & Fussenegger, M. Programmable single-cell mammalian biocomputers. *Nature* **487**, 123-127 (2012).
35. Gaber, R. et al. Designable DNA-binding domains enable construction of logic circuits in mammalian cells. *Nat Chem Biol* **10**, 203-208 (2014).
36. Cho, H.M. et al. Enhanced inhibition of murine tumor and human breast tumor xenografts using targeted delivery of an antibody-endostatin fusion protein. *Mol Cancer Ther* **4**, 956-967 (2005).
37. Wu, X. et al. AXL kinase as a novel target for cancer therapy. *Oncotarget* **5**, 9546-9563 (2014).
38. Schier, R. et al. Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site. *J Mol Biol* **263**, 551-567 (1996).
39. Stiffler, M.A. et al. PDZ domain binding selectivity is optimized across the mouse proteome. *Science* **317**, 364-369 (2007).
40. Dueber, J.E., Mirsky, E.A. & Lim, W.A. Engineering synthetic signaling proteins with ultrasensitive input/output control. *Nature biotechnology* **25**, 660-662 (2007).
41. Dueber, J.E., Yeh, B.J., Chak, K. & Lim, W.A. Reprogramming control of an allosteric signaling switch through modular recombination. *Science* **301**, 1904-1908 (2003).
42. Khalil, A.S. et al. A synthetic biology framework for programming eukaryotic transcription functions. *Cell* **150**, 647-658 (2012).
43. Reinke, A.W., Grant, R.A. & Keating, A.E. A synthetic coiled-coil interactome provides heterospecific modules for molecular engineering. *J Am Chem Soc* **132**, 6025-6031 (2010).
44. Zhao, Y. et al. Multiple injections of electroporated autologous T cells expressing a chimeric antigen receptor mediate regression of human disseminated tumor. *Cancer Res* **70**, 9053-9061 (2010).
45. Wilson, M.H., Coates, C.J. & George, A.L., Jr. PiggyBac transposon-mediated gene transfer in human cells. *Mol Ther* **15**, 139-145 (2007).
46. Hackett, P.B., Largaespada, D.A. & Cooper, L.J. A transposon and transposase system for human application. *Mol Ther* **18**, 674-683 (2010).

[0229]

[0230] 본원에 기재된 기술은 추가로 하기의 실시예에 의해 설명되고 이는 어떠한 방식으로든지 추가로 제한하는 것으로 해석되지 말아야 한다.

[0231] 본원에 기재된 기술의 일부 구현에는 임의의 하기 번호의 문단에 따라 정의될 수 있다:

[0232] 1. 다성분 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함하는 조성물로서; 상기 다성분 CAR이:

[0233] a. 1) 제1 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 단백질 상호작용 도메인을 포함하는 제1 인지 폴리펩타이드; 및

[0234] b. 1) 상기 제1 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인과 함께 특이적으로 결합할 수 있는 세포외 단백질 상호작용 도메인 및 2) 세포내 T 세포 수용체 (TCR) 신호 전달 도메인을 포함하는 신호 전달 폴리펩타이드를 포함하는, 조성물.

[0235] 2. 문단 1에 있어서, 상기 단백질 상호작용 도메인이 류신 지퍼 도메인인, 조성물.

[0236] 3. 문단 2에 있어서, 하나의 류신 지퍼 도메인이 BZip (RR)이고 제2 류신 지퍼 도메인이 AZip (EE)인, 조성물.

[0237] 4. 문단 1에 있어서, 상기 단백질 상호작용 도메인이 PSD95-Dlg1-zo-1 (PDZ) 도메인인, 조성물.

[0238] 5. 문단 1에 있어서, 하나의 단백질 상호작용 도메인이 스트렙타비딘이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 스트렙타비딘 결합 단백질 (SBP)인, 조성물.

- [0239] 6. 문단 1에 있어서,
- [0240] a. 하나의 단백질 상호작용 도메인이 mTOR의 FKBP-결합 도메인 (FRB)이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 FK506 결합 단백질 (FKBP)이거나;
- [0241] b. 하나의 단백질 상호작용 도메인이 사이클로필린-Fas 융합 단백질 (CyP-Fas)이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 FK506 결합 단백질 (FKBP)이거나;
- [0242] c. 하나의 단백질 상호작용 도메인이 칼시뉴린 A (CNA)이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 FK506 결합 단백질 (FKBP)이거나;
- [0243] d. 하나의 단백질 상호작용 도메인이 지베렐린 불감성 (GIA)이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 지베렐린 불감성 드워프1 (GID1)이거나;
- [0244] e. 하나의 단백질 상호작용 도메인이 스냅-태그이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 할로 (Halo) 태그이거나;
- [0245] f. 하나의 단백질 상호작용 도메인이 T14-3-3-cdeltaC이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 PMA2의 C-말단 펩타이드 (CT52)인, 조성물.
- [0246] 7. 문단 1에 있어서, 하나의 단백질 상호작용 도메인이 PYL이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 ABI인, 조성물.
- [0247] 8. 문단 1에 있어서, 하나의 단백질 상호작용 도메인이 뉴클레오타이드 태그이고 상기 제2 단백질 상호작용 도메인이 아연 핑거 도메인인, 조성물.
- [0248] 9. 문단 8에 있어서, 상기 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인이 뉴클레오타이드 태그이고 상기 신호 전달 폴리펩타이드의 세포외 단백질 상호작용 도메인이 아연 핑거 도메인인, 조성물.
- [0249] 10. 문단 8 또는 9에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 태그가 DNA 태그인, 조성물.
- [0250] 11. 문단 8 내지 10 중 어느 한 문단에 있어서, 상기 DNA 태그가 dsDNA 태그인, 조성물.
- [0251] 12. 문단 1 내지 11 중 어느 한 문단에 있어서,
- [0252] 추가로 1) 제2 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 상기 제1 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인에 결합하는 것에 대해 상기 신호 전달 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인과 경쟁하는 단백질 상호작용 도메인을 포함하는 제2 인지 폴리펩타이드를 포함하는, 조성물.
- [0253] 13. 문단 12에 있어서, 상기 제2 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인 및 상기 제1 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인이 상기 신호 전달 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인 및 상기 제1 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인 보다 큰 친화성을 갖는, 조성물.
- [0254] 14. 문단 12 또는 13에 있어서, 상기 제2 인지 폴리펩타이드에 의해 인지되는 표적 리간드가 건강한 및/또는 비-표적 세포 상에서 발견되고 병든 및/또는 표적 세포 상에서는 발견되지 않는, 조성물.
- [0255] 15. 문단 1 내지 11 중 어느 한 문단에 있어서, 1) 제2 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 단백질 상호작용 도메인을 포함하는 제2 인지 폴리펩타이드를 추가로 포함하고;
- [0256] 상기 신호 전달 폴리펩타이드가 상기 제2 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인과 함께 특이적으로 결합하는 2차 단백질 상호작용 도메인을 추가로 포함하는, 조성물.
- [0257] 16. 문단 15에 있어서, 상기 신호 전달 폴리펩타이드의 2차 단백질 상호작용 도메인, 및 상기 제2 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인의 친화성이 상기 신호 전달 폴리펩타이드의 제1 단백질 상호작용 도메인, 및 상기 제1 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인의 친화성 보다 약한, 조성물.
- [0258] 17. 문단 15 또는 16에 있어서, 상기 제1 및 제2 인지 폴리펩타이드가 각각 2차 단백질 상호작용 도메인을 포함하고;
- [0259] 상기 2차 단백질 상호작용 도메인이 서로 특이적으로 결합하는, 조성물.
- [0260] 18. 다성분 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함하는 조성물로서; 상기 다성분 CAR이:
- [0261] a. 1) 제1 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 뉴클레오타이드 태그의 제1 부분을 포함하는 제1 인지 폴리

펩타이드;

- [0262] b. 1) 제2 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 상기 뉴클레오타이드 태그의 제2 부분을 포함하는 제2 인지 폴리펩타이드; 및
- [0263] c. 1) 상기 뉴클레오타이드 태그의 개별 부분들의 연결에 의해 형성된 완전한 뉴클레오타이드 태그와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 세포외 아연 핑거 도메인 및 2) 세포내 T 세포 수용체 (TCR) 신호 전달 도메인을 포함하는 신호 전달 폴리펩타이드를 포함하고;
- [0264] 상기 뉴클레오타이드 태그의 개별 부분들이 이들이 서로 연결되지 않는 경우 상기 아연 핑거 도메인에 의해 특이적으로 결합될 수 없는, 조성물.
- [0265] 19. 문단 18에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 태그의 제1 부분이 ssDNA이고 상기 뉴클레오타이드 태그의 제2 부분이 상보적 ssDNA인, 조성물.
- [0266] 20. 문단 18 또는 19에 있어서, 1) 제3 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 상기 뉴클레오타이드 태그의 제3 부분을 암호화하는 제3 인지 폴리펩타이드를 추가로 포함하고;
- [0267] 상기 뉴클레오타이드 태그의 상기 개별 부분들 또는 개별 부분들의 쌍 형성 조합이 상기 아연 핑거 도메인에 의해 특이적으로 결합될 수 없지만 모든 3개의 부분들이 서로 연결되는 경우 수득한 복합체는 상기 아연 핑거 도메인에 의해 특이적으로 결합될 수 있는, 조성물.
- [0268] 21. 문단 20에 있어서, 1) 상기 뉴클레오타이드 태그의 제1 부분이 ssDNA이고; 2) 상기 뉴클레오타이드 태그의 제2 및 제3 부분이 ssDNA이고, 이의 각각은 제1 부분에 상보적이며, 3) 상기 뉴클레오타이드 태그의 제2 및 제3 부분은 서로 중첩되지 않는 서열을 갖는, 조성물.
- [0269] 22. 다성분 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함하는 조성물로서; 상기 다성분 CAR이:
- [0270] a. 1) 제1 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 제1 뉴클레오타이드 태그를 포함하는 제1 인지 폴리펩타이드;
- [0271] b. 1) 제2 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 제2 뉴클레오타이드 태그를 포함하는 제2 인지 폴리펩타이드; 및
- [0272] c. 1) 상기 제1 뉴클레오타이드 태그와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 세포외 아연 핑거 도메인 및 2) 세포내 T 세포 수용체 (TCR) 신호 전달 도메인을 포함하는 신호 전달 폴리펩타이드를 포함하고;
- [0273] 상기 뉴클레오타이드 태그가 이들이 서로 연결되는 경우 상기 아연 핑거 도메인에 의해 특이적으로 결합될 수 없는, 조성물.
- [0274] 23. 문단 22에 있어서, 상기 제1 뉴클레오타이드 태그가 헤어핀-루프 구조를 형성하고 상기 제2 뉴클레오타이드 태그가 상기 헤어핀-루프의 하나의 레그 부분 및 상기 헤어핀-루프의 루프의 부분을 포함하는 제1 뉴클레오타이드 태그 부분에 상보적인, 조성물.
- [0275] 24. 문단 22 또는 23에 있어서, 상기 제2 표적 리간드가 건강한 및/또는 비-표적 세포 상에서 발견되고 병든 및/또는 표적 세포 상에서는 발견되지 않는, 조성물.
- [0276] 25. 문단 1 내지 24 중 어느 문단에 있어서, 표적 리간드가 병든 및/또는 표적 세포 상에서 발견되는 리간드인, 조성물.
- [0277] 26. 문단 1 내지 24 중 어느 한 문단에 있어서, 신호 전달 폴리펩타이드와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 인지 폴리펩타이드에 의해 특이적으로 결합된 표적 리간드가 병든 및/또는 표적 세포 상에서 발견되는 리간드인, 조성물.
- [0278] 27. 문단 1 내지 26 중 어느 한 문단에 있어서, 신호 전달 폴리펩타이드와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 인지 폴리펩타이드에 의해 특이적으로 결합된 표적 리간드가 병든 및/또는 표적 세포 상에서 발견되고 건강한 및/또는 비-표적 세포상에서는 발견되지 않는 리간드인, 조성물.
- [0279] 28. 문단 1 내지 27 중 어느 한 문단에 있어서, 상기 병든 세포가 암성 세포인, 조성물.
- [0280] 29. 문단 1 내지 28 중 어느 한 문단에 있어서, 상기 항체 시약이:

- [0281] 면역글로불린 분자, 모노클로날 항체, 키메라 항체, CDR-접목 항체, 인간 항체, 인간화된 항체, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, 디설파이드 연결된 Fv, scFv, 단일 도메인 항체, 디아바디, 다중특이적 항체, 이원 특이적 항체, 항-유전자형 항체, 및 이특이적 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는, 조성물.
- [0282] 30. 문단 1 내지 29 중 어느 한 문단에 있어서, 상기 세포내 TCR 신호 전달 도메인이:
- [0283] TCR ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b, CD66d, CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM, ZAP70, 및 41BB로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질 기원의 신호 전달 도메인인, 조성물.
- [0284] 31. 문단 1 내지 30 중 어느 한 문단에 있어서, 문단 1 내지 30 중 어느 한 문단에 따른 제2 다성분 CAR을 추가로 포함하는, 조성물.
- [0285] 32. 문단 31에 있어서, 상기 제2 다성분 CAR의 항체 시약이 상기 제1 다성분 CAR의 항체 시약에 의해 결합된 것들과는 상이한 표적 리간드에 특이적으로 결합하는, 조성물.
- [0286] 33. 문단 30 내지 32 중 어느 한 문단에 있어서, 상기 제2 다성분 CAR의 세포내 T 세포 수용체 (TCR) 신호 전달 도메인이 T 세포 활성을 억제하는, 조성물.
- [0287] 34. 문단 33에 있어서, T 세포 활성을 억제하는 상기 제2 다성분 CAR의 세포내 T 세포 수용체 (TCR) 신호 전달 도메인이:
- [0288] PD1; CTLA4; BTLA; KIR; LAG-3; TIM-3; A2aR; LAIR-1; 및 TGIT로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리펩타이드의 신호 전달 도메인을 포함하는, 조성물.
- [0289] 35. 단 33 또는 34에 있어서, 상기 제2 다성분 CAR의 신호 전달 폴리펩타이드와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 인지 폴리펩타이드에 의해 특이적으로 결합된 표적 리간드가 건강한 및/또는 비-표적 세포 상에서 발견되는 리간드인, 조성물.
- [0290] 36. 문단 33 또는 34에 있어서, 상기 제2 다성분 CAR의 신호 전달 폴리펩타이드와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 인지 폴리펩타이드에 의해 특이적으로 결합된 표적 리간드가 건강한 및/또는 비-표적 세포상에서 발견되고 병든 및/또는 표적 세포 상에서는 발견되지 않는 리간드인, 조성물.
- [0291] 37. 문단 1 내지 36 중 어느 한 문단에 있어서, 상기 신호 전달 폴리펩타이드가 세포의 막 상에 존재하는, 조성물.
- [0292] 38. 문단 37에 있어서, 상기 하나 이상의 인지 폴리펩타이드가 세포외 공간에 존재하는, 조성물.
- [0293] 39. 문단 1 내지 38 중 어느 한 문단에 따른 조성물을 발현하는 가공된 세포.
- [0294] 40. 문단 1 내지 39 중 어느 한 문단에 있어서, 상기 세포가 T 세포, NK 세포, 또는 NKT 세포인, 세포 또는 조성물.
- [0295] 41. 문단 1 내지 40 중 어느 한 문단에 있어서, 상기 세포가 T 세포인, 세포 또는 조성물.
- [0296] 42. 표적 세포를 사멸시키는 방법으로서, 상기 세포를 문단 1 내지 41 중 어느 한 문단에 따른 조성물 또는 세포와 접촉시킴을 포함하는 방법.
- [0297] 43. 문단 1 내지 41 중 어느 한 문단에 따른 조성물 또는 세포를 이의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여함을 포함하는, 질환을 치료하는 방법.
- [0298] 44. 문단 42에 있어서, 상기 질환이:
- [0299] 암; 고형암; 유방암; 폐암; 급성 림프구성 백혈병; 다발성 골수종; 및 난치성 다발성 골수종으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.
- [0300] 45. 문단 1 내지 41 중 어느 한 문단에 따른 조성물 또는 세포를 이의 치료를 필요로 하는 대상체에 투여함을 포함하는, 암을 치료하는 방법.
- [0301] 46. 문단 45에 있어서, 상기 세포가 대상체에 자가성인, 방법.
- [0302] 47. 문단 46에 있어서, 상기 투여된 세포가 대상체로부터 수득된 세포로부터 유래되고/되거나 기원하고 적어도

하나의 다성분 CAR을 포함하도록 생체의 변형되는, 방법.

- [0303] 48. 다성분 키메라 항원 수용체 (CAR) 신호 전달 폴리펩타이드를 포함하는 가공된 세포로서, 상기 신호 전달 폴리펩타이드가 1) 세포외 단백질 상호작용 도메인 및 2) 세포내 T 세포 수용체 (TCR) 신호 전달 도메인을 포함하는, 가공된 세포.
- [0304] 49. 문단 48에 있어서, 상기 단백질 상호작용 도메인이 류신 지퍼 도메인인, 세포.
- [0305] 50. 문단 49에 있어서, 상기 류신 지퍼 도메인이 BZip (RR) 또는 AZip (EE)인, 세포.
- [0306] 51. 문단 48에 있어서, 상기 단백질 상호작용 도메인이 PSD95-Dlg1-zo-1 (PDZ) 도메인인, 세포.
- [0307] 52. 문단 48에 있어서, 상기 단백질 상호작용 도메인이 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 결합 단백질 (SBP)인, 세포.
- [0308] 53. 문단 48에 있어서, 상기 단백질 상호작용 도메인이 mTOR의 FKBP-결합 도메인 (FRB) 또는 FK506 결합 단백질 (FKBP)인, 세포.
- [0309] 54. 문단 48에 있어서, 상기 단백질 상호작용 도메인이 PYL 또는 ABI인, 세포.
- [0310] 55. 문단 48에 있어서, 상기 단백질 상호작용 도메인이 뉴클레오타이드 태그 또는 아연 핑거 도메인인, 세포.
- [0311] 56. 문단 55에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 태그가 DNA 태그인, 세포.
- [0312] 57. 문단 56에 있어서, 상기 DNA 태그가 dsDNA 태그인, 세포.
- [0313] 58. 문단 55에 있어서, 상기 단백질 상호작용 도메인이 아연 핑거 도메인인, 세포.
- [0314] 59. 문단 48 내지 58 중 어느 한 문단에 있어서, 상기 신호 전달 폴리펩타이드가 상기 세포의 막 상에 존재하는, 세포.
- [0315] 60. 문단 48 내지 59 중 어느 한 문단에 있어서, 상기 세포가 T 세포, NK 세포, 또는 NKT 세포인, 세포.
- [0316] 61. 문단 48 내지 60 중 어느 한 문단에 있어서, 상기 세포가 T 세포인, 세포.
- [0317] 62. 문단 48 내지 61 중 어느 한 문단에 있어서, 상기 세포내 TCR 신호 전달 도메인이:
- [0318] TCR ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b, CD66d, CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM, ZAP70, 및 41BB로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질 기원의 신호 전달 도메인인, 세포.
- [0319] 63. 문단 48 내지 62 중 어느 한 문단에 있어서, 상기 신호 전달 폴리펩타이드가 상기 제2 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인과 함께 특이적으로 결합하는 2차 단백질 상호작용 도메인을 추가로 포함하는, 세포.
- [0320] 64. 문단 48 내지 62 중 어느 한 문단에 있어서, 문단 48 내지 62 중 어느 한 문단에 따른 제2 다성분 CAR 신호 전달 펩타이드를 추가로 포함하는, 세포.
- [0321] 65. 질환을 치료하는 방법으로서, 상기 방법이:
- [0322] 문단 48 내지 64 중 어느 한 문단의 세포; 및
- [0323] 1) 제1 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 상기 신호 전달 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인과 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 상호작용 도메인을 포함하는 제1 인지 폴리펩타이드를
- [0324] 이에 대한 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여함을 포함하는 방법.
- [0325] 66. 문단 65에 있어서, 상기 항체 시약이:
- [0326] 면역글로불린 분자, 모노클로날 항체, 키메라 항체, CDR-접목 항체, 인간 항체, 인간화된 항체, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, 디설파이드 연결된 Fv, scFv, 단일 도메인 항체, 디아바디, 다중특이적 항체, 이원 특이적 항체, 항-유전자형 항체, 및 이특이적 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.
- [0327] 67. 문단 65 또는 66에 있어서, 상기 세포가 상기 대상체에 자가성인, 방법.

- [0328] 68. 문단 65 내지 67 중 어느 한 문단에 있어서, 상기 투여된 세포가 상기 대상체로부터 수득된 세포로부터 유래되고/되거나 기원하고 적어도 하나의 다성분 CAR을 포함하도록 생체의 변형된, 방법.
- [0329] 69. 문단 65 내지 68 중 어느 한 문단에 있어서, 상기 단백질 상호작용 도메인이 류신 지퍼 도메인인, 방법.
- [0330] 70. 문단 69에 있어서, 하나의 류신 지퍼 도메인이 BZip (RR)이고 상기 제2 류신 지퍼 도메인이 AZip (EE)인, 방법.
- [0331] 71. 문단 65 내지 68 중 어느 한 문단에 있어서, 상기 단백질 상호작용 도메인이 PSD95-Dlg1-zo-1 (PDZ) 도메인인, 방법.
- [0332] 72. 문단 65 내지 68 중 어느 한 문단에 있어서, 하나의 단백질 상호작용 도메인이 스트렙트아비딘이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 스트렙트아비딘 결합 단백질 (SBP)인, 방법.
- [0333] 73. 문단 65 내지 68 중 어느 한 문단에 있어서,
- [0334] a. 하나의 단백질 상호작용 도메인이 mTOR의 FKBP-결합 도메인 (FRB)이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 FK506 결합 단백질 (FKBP)이거나;
- [0335] b. 하나의 단백질 상호작용 도메인이 사이클로필린-Fas 융합 단백질 (CyP-Fas)이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 FK506 결합 단백질 (FKBP)이거나;
- [0336] c. 하나의 단백질 상호작용 도메인이 칼시뉴린 A (CNA)이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 FK506 결합 단백질 (FKBP)이거나;
- [0337] d. 하나의 단백질 상호작용 도메인이 지베렐린 불감성 (GIA)이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 지베렐린 불감성 드워프1 (GID1)이거나;
- [0338] e. 하나의 단백질 상호작용 도메인이 스냅-태그이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 할로 태그이거나;
- [0339] f. 하나의 단백질 상호작용 도메인이 T14-3-3-cdeltaC이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 PMA2의 C-말단 펩타이드 (CT52)인, 방법.
- [0340] 74. 문단 74에 있어서,
- [0341] a. 하나의 단백질 상호작용 도메인이 mTOR의 FKBP-결합 도메인 (FRB)이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 FK506 결합 단백질 (FKBP)인 경우, 상기 방법이 타크롤리무스, 라파로그 또는 에버롤리무스를 투여함을 추가로 포함하거나;
- [0342] b. 하나의 단백질 상호작용 도메인이 사이클로필린-Fas 융합 단백질 (CyP-Fas)이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 FK506 결합 단백질 (FKBP)인 경우, 상기 방법이 FKCsA를 투여함을 추가로 포함하거나;
- [0343] c. 하나의 단백질 상호작용 도메인이 칼시뉴린 A (CNA)이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 FK506 결합 단백질 (FKBP)인 경우, 상기 방법이 FK506을 투여함을 추가로 포함하거나;
- [0344] d. 하나의 단백질 상호작용 도메인이 지베렐린 불감성 (GIA)이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 지베렐린 불감성 드워프1 (GID1)인 경우, 상기 방법이 지베렐린을 투여함을 추가로 포함하거나;
- [0345] e. 하나의 단백질 상호작용 도메인이 스냅-태그이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 할로 태그인 경우, 상기 방법이 HaXS를 투여함을 추가로 포함하거나;
- [0346] f. 하나의 단백질 상호작용 도메인이 T14-3-3-cdeltaC이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 PMA2의 C-말단 펩타이드 (CT52)인 경우, 상기 방법이 푸시코신을 투여함을 추가로 포함하는, 방법.
- [0347] 75. 문단 65 내지 68 중 어느 한 문단에 있어서, 하나의 단백질 상호작용 도메인이 PYL이고 제2 단백질 상호작용 도메인이 ABI인, 방법.
- [0348] 76. 문단 65 내지 68 중 어느 한 문단에 있어서, 상기 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인이 뉴클레오타이드 태그이고 상기 신호 전달 폴리펩타이드의 세포외 단백질 상호작용 도메인이 아연 핑거 도메인인, 방법.
- [0349] 77. 문단 76에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 태그가 DNA 태그인, 방법.
- [0350] 78. 문단 77에 있어서, 상기 DNA 태그가 dsDNA 태그인, 방법.

- [0351] 79. 문단 65 내지 78 중 어느 한 문단에 있어서,
- [0352] 1) 제2 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 상기 제1 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인에 결합하는 것에 대해 상기 신호 전달 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인과 경쟁하는 단백질 상호작용 도메인을 포함하는 제2 인지 폴리펩타이드를 투여함을 추가로 포함하는, 방법.
- [0353] 80. 문단 79에 있어서, 상기 제2 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인 및 상기 제1 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인이 상기 신호 전달 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인 및 상기 제1 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인 보다 큰 친화성을 갖는, 방법.
- [0354] 81. 문단 79 또는 80에 있어서, 상기 제2 인지 폴리펩타이드에 의해 인지되는 표적 리간드가 건강한 및/또는 비-표적 세포 상에서 발견되고 병든 및/또는 표적 세포 상에서는 발견되지 않는, 방법.
- [0355] 82. 문단 65 내지 78 중 어느 한 문단에 있어서, 1) 제2 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 단백질 상호작용 도메인을 포함하는 제2 인지 폴리펩타이드를 투여함을 추가로 포함하고;
- [0356] 상기 신호 전달 폴리펩타이드가 상기 제2 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인과 함께 특이적으로 결합하는 2차 단백질 상호작용 도메인을 추가로 포함하는, 방법.
- [0357] 83. 문단 82에 있어서, 상기 신호 전달 폴리펩타이드의 2차 단백질 상호작용 도메인, 및 상기 제2 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인의 친화성이 상기 신호 전달 폴리펩타이드의 제1 단백질 상호작용 도메인, 및 상기 제1 인지 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인의 친화성 보다 약한, 방법.
- [0358] 84. 문단 82 또는 83에 있어서, 상기 제1 및 제2 인지 폴리펩타이드 각각이 2차 단백질 상호작용 도메인을 포함하고;
- [0359] 상기 2차 단백질 상호작용 도메인이 서로 특이적으로 결합하는, 방법.
- [0360] 85. 문단 65 내지 78 중 어느 한 문단에 있어서,
- [0361] a. 1) 제1 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 뉴클레오타이드 태그의 제1 부분을 포함하는 제1 인지 폴리펩타이드;
- [0362] b. 1) 제2 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 상기 뉴클레오타이드 태그의 제2 부분을 포함하는 제2 인지 폴리펩타이드를 투여함을 추가로 포함하고;
- [0363] 상기 신호 전달 폴리펩타이드가 1) 상기 뉴클레오타이드 태그의 개별 부분들의 연결에 의해 형성된 완전한 뉴클레오타이드 태그와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 세포의 아연 핑거 도메인을 포함하고;
- [0364] 상기 뉴클레오타이드 태그의 개별 부분들이 이들이 서로 연결되지 않는 경우 상기 아연 핑거 도메인에 의해 특이적으로 결합될 수 없는, 방법.
- [0365] 86. 문단 85에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 태그의 제1 부분이 ssDNA이고 상기 뉴클레오타이드 태그의 제2 부분이 상보적 ssDNA인, 방법.
- [0366] 87. 문단 85 또는 86에 있어서, 1) 제3 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 상기 뉴클레오타이드 태그의 제3 부분을 암호화하는 제3 인지 폴리펩타이드를 투여함을 추가로 포함하고;
- [0367] 상기 뉴클레오타이드 태그의 상기 개별 부분들 또는 개별 부분들의 쌍 형성 조합이 상기 아연 핑거 도메인에 의해 특이적으로 결합될 수 없지만 모든 3개의 부분들이 서로 연결되는 경우 수득한 복합체는 상기 아연 핑거 도메인에 의해 특이적으로 결합될 수 있는, 방법.
- [0368] 88. 문단 87에 있어서, 1) 상기 뉴클레오타이드 태그의 제1 부분이 ssDNA이고; 2) 상기 뉴클레오타이드 태그의 제2 및 제3 부분이 ssDNA이고, 이의 각각은 상기 제1 부분에 상보적이며 3) 상기 뉴클레오타이드 태그의 제2 및 제3 부분이 서로 중첩되지 않는 서열을 갖는, 방법.
- [0369] 89. 문단 65 내지 78 중 어느 한 문단에 있어서,
- [0370] a. 1) 제1 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 제1 뉴클레오타이드 태그를 포함하는 제1 인지 폴리펩타이드;
- [0371] b. 1) 제2 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 제2 뉴클레오타이드 태그를 포함하는 제2 인지 폴리펩타이드

드를 투여함을 포함하고;

- [0372] 상기 신호 전달 폴리펩타이드가 1) 상기 제1 뉴클레오타이드 태그와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 세포의 아연 핑거 도메인을 포함하고;
- [0373] 상기 뉴클레오타이드 태그가 이들이 서로 연결되는 경우 상기 아연 핑거 도메인에 의해 특이적으로 결합될 수 없는, 방법.
- [0374] 90. 문단 89에 있어서, 상기 제1 뉴클레오타이드 태그가 헤어핀-루프 구조를 형성하고 상기 제2 뉴클레오타이드 태그가 상기 헤어핀-루프의 하나의 레그 부분 및 상기 헤어핀-루프의 루프의 부분을 포함하는 상기 제1 뉴클레오타이드 태그 부분에 상보적인, 방법.
- [0375] 91. 문단 89 또는 90에 있어서, 상기 제2 표적 리간드가 건강한 및/또는 비-표적 세포 상에서 발견되고 병든 및/또는 표적 세포 상에서는 발견되지 않는, 방법.
- [0376] 92. 문단 65 내지 91 중 어느 한 문단에 있어서, 표적 리간드가 병든 및/또는 표적 세포상에서 발견되는 리간드인, 방법.
- [0377] 93. 문단 65 내지 92 중 어느 한 문단에 있어서, 신호 전달 폴리펩타이드와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 인지 폴리펩타이드에 의해 특이적으로 결합된 상기 표적 리간드가 병든 및/또는 표적 세포 상에서 발견되는 리간드인, 방법.
- [0378] 94. 문단 65 내지 93 중 어느 한 문단에 있어서, 신호 전달 폴리펩타이드와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 인지 폴리펩타이드에 의해 특이적으로 결합된 상기 표적 리간드가 병든 및/또는 표적 세포 상에서 발견되고 건강한 및/또는 비-표적 세포상에서는 발견되지 않는 리간드인, 방법.
- [0379] 95. 문단 65 내지 94 중 어느 한 문단에 있어서, 상기 병든 세포가 암성 세포인, 방법.
- [0380] 96. 문단 65 내지 95 중 어느 한 문단에 있어서, 상기 세포가 문단 64의 세포이고 상기 대상체에 추가로 1) 제2 표적 리간드에 특이적인 항체 시약 및 2) 상기 제2 신호 전달 폴리펩타이드의 단백질 상호작용 도메인과 함께 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 상호작용 도메인을 포함하는 제2 인지 폴리펩타이드가 투여되는, 방법.
- [0381] 97. 문단 96에 있어서, 상기 제2 다성분 CAR 신호 전달 폴리펩타이드의 세포내 T 세포 수용체 (TCR) 신호 전달 도메인이 T 세포 활성을 억제하는, 방법.
- [0382] 98. 문단 96에 있어서, 상기 제2 신호 전달 폴리펩타이드와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 인지 폴리펩타이드에 의해 특이적으로 결합된 상기 표적 리간드가 건강한 및/또는 비-표적 세포 상에서 발견되는 리간드인, 방법.
- [0383] 99. 문단 96 내지 98 중 어느 한 문단에 있어서, 상기 제2 신호 전달 폴리펩타이드와 함께 특이적으로 결합할 수 있는 인지 폴리펩타이드에 의해 특이적으로 결합된 표적 리간드가 건강한 및/또는 비-표적 세포상에서는 발견되지만 병든 및/또는 표적 세포 상에서는 발견되지 않는 리간드인, 방법.

[0384] 실시예

[0385] 실시예 1:

- [0386] 입양 T 세포 치료요법은 암 치료요법에 대한 패러다임 전환 기술이 되고 있다. 키메라 항원 수용체 (CAR)-발현 T 세포의 환자로의 전달은 B 세포 악성에 대한 임상 시험에서 경이로운 성공을 입증하였고 최근해에 일부 주요 상업 투자 거래를 유도하였다. 전망은 있지만 암 특이성은 단일 종양 연관 바이오마커를 동정해야되는 의존성 때문에 주요 한계로 남아있다. 기존의 CAR 시스템은 단지 2개의 항원을 통합할 수 있고 추가의 증진을 위한 능력을 갖고 있지 않다. 본원에 제공된 것은 다수의 암 표적을 감지할 수 있고, 복잡한 논리 계산을 수행하고 암 세포 사멸을 실행할 수 있는 신규한 CAR 플랫폼 (본원에서 다성분 CAR 또는 SMART CAR로서 언급된다)이다.
- [0387] 추가로, 본원에 기재된 CAR은 새로운 표적이 환자의 T 세포의 추가로 유전자 조작 없이 생체내에 수용될 수 있도록 하는 모듈러이도록 디자인된다. 이러한 고도의 모듈러 디자인은 비할데 없는 특이성 및 유연성을 제공하고 암에 대한 세포-기반 치료요법에 변형 영향을 갖는다. 본원에 기재된 기술은 입양 T-세포 치료요법이 이것이 환자 자신의 필요에 맞게 조정될 수 있게 함에 의해 보다 강력해지도록 한다. 기존의 CAR을 사용한 치료요법은 일단 이것이 적용되면 치료요법에 변화를 만들기가 어렵기 때문에 선택된 환자 그룹에 대해 실행 가능하다. 본원에 기재된 다성분 CAR을 사용한 치료요법은 침대면에서 치료요법의 활성을 변화시키는 수단을 허용하여 의사에게 입양 T-세포 치료요법을 제어하기 위한 단순하고 효과적인 수단을 제공한다.

- [0388] 환자로의 키메라 항원 수용체 (CAR)-발현 T 세포의 전달은 암 면역치료요법을 위해 전망있는 방법이다. 상기 치료학적 접근법은 T 세포가 악성 세포를 파괴하도록 지시하는 합성 면역 수용체로 T 세포의 유전학적 재프로그래밍을 기반으로 한다. CAR은 전형적으로 T 세포 활성화를 유도하기 위한 세포의 항원-인지 도메인 및 신호 전달 세포질 도메인으로 단일쇄 가변 단편 (scFv) 항체로 이루어진다 (도 1a). CD19에 표적화된 CAR 발현 T 세포는 임상 시험에서 백혈병을 성공적으로 치유하는 것으로 나타났고 여기서, 환자의 92 %까지는 치료 후 지속적인 완전한 차도에 진입하였다. 전망은 있지만 상기 기술은 또한 결점을 갖는다. 치명적 사건은 CAR-함유 T-세포가 낮은 수준의 표적화된 종양 항원을 발현하는 정상 숙주 조직에 응답하는 임상 시험으로부터 나타났다. 항-CD19 CAR이 다른 CAR 보다 더 성공적인 이유는 CD19 CAR에 대한 오프-표적 효과가 예상되고 처리하기가 용이하기 때문이다. CD19 발현은 대부분 B 세포로 제한된다. CD19 CAR을 발현하는 T 세포가 건강하고 악성인 B 세포 둘 다를 파괴하지만, 장기 B 세포 결핍은 면역글로불린 대체 치료요법으로 처리하기가 용이하다.
- [0389] 불행하게도, 이것은 암 항원이 단지 매우 국한된 세트의 조직에서만 발견되는 대부분의 다른 종양에 대한 경우가 아니다. 위험한 오프-표적 문제에 대항하기 위해, 조합적 수용체 접근법이 개발되었고, 여기서, 2개의 상이한 항원 인지 항체는 별도로 TCR과 동시-자극 도메인에 융합되어 항원 둘 다를 갖는 종양 만이 완전한 T 세포 활성화 프로그램을 유발한다. 그러나, 상기 접근법은 단지 2개의 항원이 동시 인지될 수 있도록 함에 따라서 상기 접근법의 잠재력을 심하게 제한한다.
- [0390] 또한 본원에서 SMART CAR로서 언급되는, 본원에 기재된 CAR 플랫폼은 T 세포가 다중 바이오마커를 사용하여 암 세포를 검출하도록 하고 이들 마커를 기준으로 복잡한 조합 논리 계산을 수행하도록 한다. 상기 계산 능력은 임의의 다른 형태의 치료학적 체제 (예를 들어, 생물학적 분자 및 소분자)로는 성취하기가 불가능하고 극히 높은 종양 특이성을 가능하게 한다.
- [0391] 주지할만하게, 기존의 CAR 기술은 극히 도전 과제인 것으로 입증된 암을 건강한 세포로부터 특이적으로 구분하는 단일 바이오마커 또는 "매직 볼렛"의 발견에 의존한다. 사실, CAR 기술을 다른 암으로 채택하기 위한 주요 병목 현상은 적당한 표적을 발견하는 것이다. 본원에 기재된 기술은 표적화될 수 있는 암 항원의 수를 크게 증가시킴에 따라서 임상 면역치료요법 분야를 변화시킨다.
- [0392] 키메라 항원 수용체는 T 세포 수용체 (TCR) 및/또는 다른 동시-자극 경로로부터의 세포내 신호 전달 도메인과 암 항원-특이적 단일쇄 항체의 융합이다. 기존의 CAR 기술은 이들의 특이성을 제한하는 단일쇄 항체에 의한 하나의 항원의 인지에만 의존한다. 특이성은 보다 많은 암 항원이 동시에 검출될 수 있다면 크게 개선될 수 있다. 본원에 기재된 기술은 다중 항원의 인지를 허용한다. 더욱이, 정상 조직의 동정을 도와주는 항원은 또한 본원에 기재된 T 세포에 의해 검출되어 건강한 세포 상에 이들 항원의 존재가 T 세포 활성화를 억제할 수 있도록 한다. 따라서, 본원에 기재된 기술은 항원 암 및 정상 세포 둘 다로부터 항원을 검출할 수 있고 복잡한 조합 논리 계산을 수행하여 특이성을 크게 개선시킨다.
- [0393] 본원에 기재된 것은 분자 계산을 수행하기 위해 프로그램 가능한 상호작용을 사용하는 다성분 CAR이다. 일부 구현예에서, 전하 상호작용을 통해 이중성 구조체를 형성할 수 있는 단백질 도메인인 류신 지퍼는 본 수용체 디자인에 사용된다. 상기 새로운 CAR 디자인에서, 류신 지퍼는 CAR 상의 세포의 도메인을 대체하고 동족 류신 지퍼는 항체에 융합된다. 동족 류신 지퍼가 서로 결합되는 경우, 이들은 CAR의 신호 전달 활성을 활성화시킬 수 있다. 류신 지퍼 도메인은 또한 동일한 결합 파트너에 대해 서로 경쟁하도록 가공되어 따라서 억제 및 "OFF" 기능을 가능하게 한다. 더욱이, 다중 직교 쌍은 독립적으로 상이한 신호 전달 도메인 (예를 들어, PD-1, CTLA-4)의 제어를 가능하게 한다. 또한, 류신 지퍼 쌍 간의 상이한 친화성은 복잡한 기능의 가공을 허용한다. 예를 들어, zipCAR의 산출 신호의 강도는 조정될 수 있고 류신 지퍼 쌍 간의 약한 상호작용은 협력적 거동의 사용을 가능하게 하여 "AND" 기능을 허용한다.
- [0394] 예를 들어, 2개의 jurkat 세포주에 2개의 상이한 렌티바이러스 벡터를 형질도입하였다. 하나의 jurkat 세포주는 mCherry에 융합된 신호 전달 도메인 (CD3 zeta)을 갖는 zipCAR을 발현하였다. 다른 jurkat 세포주는 동족 류신 지퍼를 갖는 zipCAR을 발현하였고 이들은 신호 전달 도메인 (CD3 zeta)을 갖지 않고 mCherry에 융합되지 않았다. 신호 전달 도메인을 갖는 zipCAR을 발현하는 Jurkat T 세포는 동족 zipCAR을 발현하는 세포와 상호작용함에 의해 신호 전달 경로를 활성화하고 개시할 수 있는 것으로 관찰되었다. 이것은 1차 T 세포에서 zipCAR의 기능을 입증한다 (데이터는 나타내지 않음).
- [0395] 추가의 예에서, zipCAR에 결합할 수 있는 류신 지퍼에 연결된 HER2를 표적화하는 단일쇄 가변 단편 (scFv)을 함유하는 항체들을 정제하였다. zipCAR은 Jurkat 세포주 (측정된 NFAT 프로모터 활성화)에서 뿐만 아니라 1차 CD4+ T 세포 (측정된 분비된 사이토킨)에서 정제된 항체에 의해 활성화될 수 있는 것으로 입증되었다 (데이터는 나타

내지 않음).

[0396] 더욱이, 본원에 기재된 것은 상이한 신호 전달 도메인 (예를 들어, 동시-자극, 동시-억제 신호 전달 도메인)을 제어하기 위해 사용될 수 있는 류신 지퍼 쌍의 여러 직교 쌍이 있다.

[0397] 세포의 도메인으로서 항체, 스트렙트아비딘 또는 CD16을 사용하는 기존의 기술과는 대조적으로, 본원의 류신 지퍼의 사용은 정교한 분자 계산을 허용한다.

[0398] 많은 류신-지퍼 도메인은 다중 투입의 감지를 허용하도록 선택될 수 있다. 신호 전달 도메인은 또한 상이한 경로가 제어될 수 있도록 조작되고/되거나 선택될 수 있다. 추가로, 류신 지퍼 상호작용의 친화성에서의 변화는 활성화 강도의 제어를 허용한다. 마지막으로, 본원에서 임의의 단백질-단백질 상호작용 도메인이 PDZ 도메인과 같은 류신 지퍼 도메인, SBP (스트렙트아비딘 결합 단백질)-스트렙트아비딘 또는 약물 유도성 FKBP-FRB 쌍 또는 PYL-ABI 쌍을 대체할 수 있는 것으로 고려된다.

[0399] **실시예 2:**

[0400] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 다성분 CAR은 CAR (zfCAR)의 세포의 부분으로서 아연-핑거 단백질 및 세포내 소통 도메인으로서 다양한 신호 전달 단백질을 사용한다. 추가로, 아연-핑거 단백질은 고친화성 및 특이성으로 미리 한정된 이중 나선 DNA 서열에 결합하도록 가공될 수 있다. 항체는 임의의 DNA 서열로 표지될 수 있다. 함께, 항체가 항원에 결합하는 경우, zfCAR은 DNA에 결합하고 T 세포 활성화를 유도한다. 상기 스플릿 시스템은 zfCAR이 상이한 항원에 대해 다시 디자인될 필요가 없기 때문에 매우 유연성이 있다. 추가로, 본원에 기재된 기술은 기존의 시스템에 의해 복제될 수 없는 복잡한 분자 계산을 수행할 수 있다. 예를 들어, 상이한 항체는 상이한 상보적 단일 가닥 DNA 서열과 접합될 수 있고, 여기서, 모든 항체의 존재하에서만 적당한 이중 가닥 DNA가 형성될 수 있고 이는 아연 핑거에 결합하기 위해 요구된다. 상기 구성은 다중-투입 ANA 게이트를 나타낸다. 단지 3개의 항체를 사용함에 의해, 본원에 기재된 시스템은 이미 CAR에 의해 지금까지 입증된 대부분의 항원 인지 (2)를 능가한다. 추가로, DNA 서열은 아연-핑거 도메인에 결합하는 이중 가닥 DNA를 방해하여 NOT 게이트를 형성하도록 제조될 수 있다. 이들 방해하는 DNA 서열들은 정상 세포에 결합하는 항체에 부착되어 T 세포가 건강한 조직을 공격하지 못하도록 할 수 있다. 함께, 고도로 정교한 논리 계산은 처음으로 CAR-기반 치료 요법에서 성취될 수 있다.

[0401] zfCAR의 또 다른 독특한 특징은 아연-핑거 단백질이 상이한 DNA 서열에 결합하도록 용이하게 디자인될 수 있다는 것이다. 이와 같이, 다중 직교 zfCAR은 구분된 신호 전달 경로를 활성화시키는 상이한 세포내 신호 전달 도메인으로 가공될 수 있다. 상기 디자인에는 적어도 2개의 이점이 있다. 1) 이것은 보다 많은 항원이 검출되고 전체 T 세포 반응으로 통합되도록 한다. 2) 상이한 신호 전달 경로는 독립적으로 제어됨에 따라서 T 세포 반응을 조정하는 고도의 맞춤형 방법을 제공한다. 억제 신호 전달 경로가 또한 사용됨에 따라서 안전성 및 특이성을 추가로 개선시킬 수 있는 "OFF" 스위치를 제공할 수 있다. 3개의 신생 분야의 생물과학인 DNA 나노기술, 합성 생물학 및 임상 면역치료요법을 함침에 의해, 본원에 제공된 것은 암 치료요법을 크게 개선시킬 전망이 있는 획기적인 수용체 기술이다.

[0402] 다중 아연-핑거 도메인은 다중 투입의 감지를 허용하도록 사용될 수 있다. 신호 전달 도메인은 상이한 경로가 제어될 수 있도록 다양할 수 있다. 추가로, DNA에 대한 아연-핑거 친화성은 활성화 강도를 제어하도록 다양할 수 있다. 일부 구현예에서, 아연 핑거 도메인은 또 다른 단백질-단백질 상호작용 도메인을 대체할 수 있다.

[0403] **실시예 3: 스플릿(split), 범용(universal), 프로그램 가능한(programmable) 및 재구성 가능한(reconfigurable) (SUPRA) CAR 플랫폼**

[0404] 본원에 기재된 것은 멀티플렉스 항원 표적화를 수행하고, 논리 계산을 수행하고, 암 세포 사멸을 실행할 수 있는 CAR 플랫폼의 개발을 통한 CAR-기반 치료요법의 특이성 및 안전성의 개선이다. 본원에 기재된 예시적 구현예에서, 이중이량체 류신 지퍼 단백질은 범용 수용체를 생성하기 위한 TCR 세포내 신호 전달 도메인에 대한 세포의 도메인으로서 사용되었다. 수용체는 단일쇄 항체 및 동족 류신 지퍼 도메인으로 이루어진 융합 단백질에 의해 활성화될 수 있다. 항체-지퍼 융합은 항원과 가공된 T 세포 사이의 어댑터로서 작용한다. 항체는 항원 특이성을 제공하고 류신 지퍼의 실체는 수용체가 활성화하도록 지시한다. 이러한 CAR 플랫폼은 가공된 T 세포가 T 세포의 추가의 유전학적 조작 없이 생체내 새로운 표적에 표적화하도록 한다. 상기 모듈러 디자인은 특이성, 유연성 및 프로그램 가능성을 제공한다.

[0405] 환자로의 키메라 항원 수용체 (CAR)-발현 T 세포의 전달은 암 면역치료요법을 위해 전망있는 접근법이다. 상기 치료학적 접근법은 T 세포가 악성 세포를 파괴하도록 지시하는 합성 면역 수용체로 T 세포의 유전학적 재프로그

래밍을 기반으로 한다. CAR은 전형적으로 T 세포 활성화를 유도하기 위한 세포의 항원-인지 도메인 및 세포질 신호 전달 도메인으로서 단일쇄 가변 단편 (scFv) 항체로 이루어진다 (도 1a). CD19에 표적화된 CAR 발현 T 세포는 임상 시험에서 백혈병을 성공적으로 치유하는 것으로 나타났고 여기서, 환자의 90 %까지는 치료 후 지속적인 완전한 차도에 진입하였다¹. 전망은 있지만 상기 기술은 또한 결점을 갖는다. 치명적 사건은 CAR-함유 T-세포가 낮은 수준의 표적화된 종양 항원을 발현하는 정상 숙주 조직에 응답하는 임상 시험으로부터 나타났다³. 항-CD19 CAR이 다른 CAR 보다 더 성공적인 이유는 CD19 CAR에 대한 오프-표적 효과가 예상되고 처리하기가 용이하기 때문이다. CD19 발현은 대부분 B 세포로 제한된다. CD19 CAR을 발현하는 T 세포가 건강하고 악성인 B 세포 둘 다를 파괴하지만, 장기 B 세포 결핍은 면역글로불린 대체 치료요법으로 처리하기가 용이하다. 불행하게도, 이것은 암 항원이 단지 매우 국한된 세트의 조직에서만 발견되는 대부분의 다른 종양에 대한 경우가 아니다.

[0406] 위험한 오프-표적 문제에 대항하기 위해, 조합적 수용체 접근법이 개발되었고, 여기서, 2개의 상이한 항원 인지 항체는 별도로 TCR과 동시-자극 도메인에 융합되어 항원 둘 다를 갖는 종양 만이 완전한 T 세포 활성화 프로그램을 유발한다^{4,5} (도 1b). 그러나, 상기 접근법은 단지 2개의 항원이 동시 인지될 수 있도록 함에 따라서 상기 접근법의 잠재력을 심하게 제한한다. 더욱이, 다른 것은 상이한 항원 특이성을 갖는 2개의 scFv가 하나의 CAR로 함께 융합되어 2개 항원 중 하나가 T 세포 활성화를 유발하도록 할 수 있는 것으로 나타났다⁶. 이러한 시스템은 OR 논리의 개요를 설명하고, 2개의 항원에 대한 돌연변이가 요구되기 때문에 종양 회피의 기회를 감소시킬 수 있다. 이 순간에, 그러나, 이러한 탠덤 항체 CAR 디자인은 단지 OR 논리를 수행할 수 있다. 특이성은 보다 많은 암 항원이 동시에 검출될 수 있다면 크게 개선될 수 있다. 더욱이, 정상 조직을 동정하는 항원은 또한 T 세포에 의해 검출되어 건강한 세포 상에 이들 항원의 존재가 T 세포 활성화를 억제할 수 있도록 해야만 한다. 따라서, 다중 투입을 수용하고 복잡한 로직을 수행할 수 있는 전략이 바람직할 수 있다.

[0407] "고정된" CAR 디자인을 사용하는 또 다른 과제는 상이한 항원이 가공된 T 세포에 의해 표적화되어야만 하는 경우 새로운 세트의 수용체는 생성되어야만 하고 환자의 T 세포는 다시 새로운 수용체로 변형될 필요가 있다는 것이다.

[0408] 이와 같이, CAR이 2개 부분인 수용체 부분과 항체 부분으로 스플릿되는 스플릿 또는 범용 CAR 디자인이 사용된다. 수용체 부분은 결합 도메인과 함께 세포 표면 상에 발현된다. 상기 수용체는 항원을 인지할 수 없다. 항체 부분은 세포 상의 수용체가 인지할 수 있는 리간드 또는 동족 결합 도메인으로 변형된다. 항체는 암 세포에 결합하고 항체 상의 리간드는 상응하는 수용체를 발현하는 T 세포를 결합시키고 활성화시킨다. 스플릿 CAR 구성은 다수의 패널의 항원이 수용체 및 면역 세포를 재가공할 필요 없이 표적화되도록 한다. 2개의 상이한 전략은 항원 인지 모티프를 T 세포 상의 신호 전달 모티프로 결합시키기 위해 가용하고 이들은 상기 프로젝트를 위한 영감으로서 작용하였다 (도 1b). 가장 단순한 버전의 상기 스플릿 CAR 디자인은 CD16 세포의 도메인과 세포 내 TCR 신호 전달 도메인의 융합과 함께 성취된다⁷. CD16은 모노클로날 항체의 불변 영역에 결합하는 낮은 친화성 Fc 수용체이다. 따라서, 제약 회사에 의해 제조되는 많은 모노클로날 항체는 변형 없이 입양 면역치료요법을 위해 사용될 수 있다. 간편하지만, 상기 CD16 CAR은 환자에 의해 생성되는 내인성 항체와의 결합을 통해 많은 잠재적 오프-표적 효과를 가질 수 있다.

[0409] 입양 면역치료요법에서 항원 특이성 한계를 해결하기 위해, 본원에서 스플릿, 범용, 프로그램하고, 재구성가능한 (SUPRA) CAR 플랫폼이 개발된다 (도 2a). SUPRA 플랫폼은 CAR의 세포의 부분으로서 프로그램가능한 생분자 상호작용 도메인을 사용하고 세포내 도메인으로서 다양한 신호 전달 단백질을 사용한다 (도 2b). 특히, 전하 상호작용을 통해 이중성 구조체를 형성할 수 있는 단백질 도메인인 류신 지퍼는 본 수용체 디자인에 사용되었다. 상기 새로운 CAR 디자인에서, 류신 지퍼는 CAR 상의 세포의 도메인을 대체하고 동족 류신 지퍼는 항체에 융합된다 (도 3a). 류신 지퍼는 류신 지퍼의 많은 직교 쌍이 가용하기 때문에 SUPRA 플랫폼을 위해 양호한 후보물이고 따라서 디자인 노력을 위해 대형 풀의 후보물을 제공한다. 류신 지퍼 도메인은 또한 동일한 결합 파트너에 대해 서로 경쟁하도록 가공되어 따라서 억제 및 "OFF" 기능을 가능하게 할 수 있다 (도 3b). 더욱이, scFv 및 zipCAR에 융합된 류신 지퍼 간의 약한 상호작용은 AND 게이트 기능이 멀티플렉스 항원 표적화를 수행하도록 한다. 또한, 류신 지퍼 쌍 간의 상이한 친화성은 복잡한 기능의 가공을 허용한다. 더욱이, 다중 직교 쌍은 독립적으로 상이한 신호 전달 도메인 (예를 들어, PD-1, CTLA-4)의 제어를 가능하게 한다 (도 3c).

[0410] SUPRA CAR의 활성화는 1차 CD4 T 세포를, 세포의 도메인으로서 BZip (RR)⁹ 및 세포내 도메인으로서 CD28, 41BB,

및 CD3z 기원의 신호 전달 도메인으로 구성된 CAR로 형질도입함에 의해 시험하였다. 표면 상의 AZip (EE) 또는 BZip (RR) 류신 지퍼 도메인을 발현하는 Jurkat T 세포주가 또한 생성되었다. 세포주가 함께 혼합된 경우, zipCAR을 발현하는 가공된 CD4 T 세포는 표면 상에 AZip(EE) 도메인을 발현하는 Jurkat T 세포와 상호작용함에 의해 신호 전달 경로를 활성화하고 개시할 수 있다 (도 4).

[0411] zipCAR에 결합할 수 있는 류신 지퍼에 연결된 HER2를 표적화하는 단일쇄 가변 단편 (scFv)을 함유하는 정제된 항체들을 제조하였다. BZip CAR (RR)은 Her2를 발현하는 K562 세포와 혼합되는 경우 1차 CD4+ T 세포 (측정된 분비된 사이토킨)에서 정제된 항체에 의해 활성화될 수 있다 (도 5). 더욱이, 상이한 신호 전달 도메인 (예를 들어, 동시-자극, 동시-억제 신호 전달 도메인)을 제어하기 위해 사용될 수 있는 류신 지퍼 쌍의 중 적어도 3개의 직교 쌍이 동정되었다¹⁰ (도 6a). 신호 전달 도메인은 본원에 기재된 수용체에 의해 독립적으로 제어될 수 있도록 치환될 수 있다. 류신 지퍼의 친화성은 활성화 강도를 제어하도록 다양할 수 있다. 실제로, 보다 약한 결합 지퍼 쌍이 T 세포의 보다 약한 활성화를 유도하는 것으로 입증되었다 (도 6b, 6d). 마지막으로, 임의의 단백질-단백질 상호작용 도메인은 PDZ 도메인과 같은 류신 지퍼 도메인, SBP (스트렙타비딘 결합 단백질)-스트렙타비딘 또는 약물 유도성 FKBP-FRB 쌍 또는 PYL-ABI 쌍을 대체할 수 있다. 사실, FKBP 및 FRB가 세포의 결합 도메인으로서 사용될 수 있고 라파마이신 유사체의 첨가로 T 세포를 활성화시키는 것으로 입증되었다 (도 7). FRB 도메인은 항체에 융합될 수 있고 따라서 T 세포의 활성화에 대한 또 다른 제어를 부여한다. 소분자 약물은 덜 안정하고, 따라서 항체 보다 빨리 신체로부터 제거될 수 있어 약물 투여 중단 후 보다 빠른 OFF를 가능하게 한다.

[0412] SUPRA 플랫폼에서 사용될 수 있는 또 다른 프로그램가능한 상호작용 도메인은 아연-핑거 도메인이다. 아연-핑거 도메인은 세포를 DNA로 바코딩하기 위해 세포 표면 상에 발현되었다¹¹. 추가로, 아연-핑거 단백질은 고친화성 및 특이성으로 미리 한정된 이중 나선 DNA 서열에 결합하도록 가공될 수 있다. 추가로, 항체는 시판되는 키트 및 서비스를 사용하는 임의의 DNA 서열로 표지될 수 있다. 함께, DNA-항체 동족체가 암 세포 상의 항원에 결합하는 경우, 아연-핑거 CAR (zfCAR)은 DNA에 결합하고 T 세포 활성화를 유도한다 (도 8 a). 더욱이, DNA 나노기술의 개발을 통해, DNA는 다른 시스템에 의해 복제하기 어려운 복합체 분자 계산을 수행하도록 프로그램화될 수 있다. 예를 들어, 항체는 상이한 상보적 단일 가닥 DNA 서열과 접합될 수 있고, 여기서, 모든 항체의 존재하에서만 적당한 이중 가닥 DNA가 형성될 수 있고 이는 아연-핑거 단백질에 결합하기 위해 요구된다 (도 8b). 상기 구성은 다중-투입 AND 게이트를 나타낸다. 단지 3개의 항체를 사용함에 의해, 이것은 개발된 임의의 CAR 시스템 보다 더 항원을 인지할 수 있다. 추가로, DNA 서열은 아연-핑거 도메인에 결합하는 이중 가닥 DNA를 방해하여 NOT 게이트를 형성하도록 제조될 수 있다. 이들 방해하는 DNA 서열들은 정상 세포로부터의 항원에 결합하는 항체에 부착되어 T 세포가 건강한 조직을 공격하지 못하도록 할 수 있다 (도 8c). 함께, 정교한 논리 계산은 CAR-기반 치료요법에서 성취될 수 있다. 본원에서 zfCAR이 DNA로 활성화될 수 있는 것으로 입증된다 (도 8d).

[0413] 본원에 기재된 CAR 플랫폼은 다른 기술 보다 적어도 2개의 독특한 이점을 제공한다. 첫 번째로, 다수의 직교 결합 쌍은 아연-핑거 및 류신 지퍼로부터 용이하게 가용하다. 이들 직교 쌍은 상이한 신호 전달 경로의 독립적 제어 및 최적의 반응을 성취하기 위한 T 세포 신호 전달의 미세 조절을 가능하게 한다. 두 번째로, 본원에 기재된 CAR 플랫폼은 세포의 프로그램화된 분자 상호작용을 통해 복잡한 논리 계산을 수행할 수 있다. 상기 계산 능력은 임의의 다른 형태의 치료학적 제제(예를 들어, 생물학적 분자 및 소분자)로는 성취하기가 불가능하고 극히 높은 중앙 특이성을 가능하게 한다.

[0414] 참조문헌

- 1 Davila, M. L. *et al.* Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Science translational medicine* **6**, 224ra225, (2014).
- 2 Grupp, S. A. *et al.* Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med* **368**, 1509-1518, (2013).
- 3 Morgan, R. A. *et al.* Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther* **18**, 843-851, (2010).
- 4 Kloss, C. C., Condomines, M., Cartellieri, M., Bachmann, M. & Sadelain, M. Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells. *Nat Biotechnol* **31**, 71-75, (2013).
- 5 Lanitis, E. *et al.* Chimeric antigen receptor T Cells with dissociated signaling domains exhibit focused antitumor activity with reduced potential for toxicity in vivo. *Cancer Immunol Res* **1**, 43-53, (2013).
- 6 Grada, Z. *et al.* TanCAR: A Novel Bispecific Chimeric Antigen Receptor for Cancer Immunotherapy. *Mol Ther Nucleic Acids* **2**, e105, (2013).

[0415]

- 7 Kudo, K. *et al.* T lymphocytes expressing a CD16 signaling receptor exert antibody-dependent cancer cell killing. *Cancer Res* **74**, 93-103, (2014).
- 8 Urbanska, K. *et al.* A universal strategy for adoptive immunotherapy of cancer through use of a novel T-cell antigen receptor. *Cancer Res* **72**, 1844-1852, (2012).
- 9 Moll, J. R., Ruvinov, S. B., Pastan, I. & Vinson, C. Designed heterodimerizing leucine zippers with a ranger of pIs and stabilities up to 10(-15) M. *Protein Sci* **10**, 649-655, (2001).
- 10 Reinke, A. W., Grant, R. A. & Keating, A. E. A synthetic coiled-coil interactome provides heterospecific modules for molecular engineering. *J Am Chem Soc* **132**, 6025-6031, (2010).
- 11 Mali, P. *et al.* Barcoding cells using cell-surface programmable DNA-binding domains. *Nat Methods* **10**, 403-406, (2013).
12. Thompson, KE. *et al.* SYNZIP Protein Interaction Toolbox: in Vitro and in Vivo Specifications of Heterospecific Coiled-Coil Interaction Domains. *ACS Synth. Biol.* **1**, 118-129,(2012)

[0416]

[0417] 실시예 4:

[0418]

표적 유전자의 발현을 활성화시키기 위해 CRISPR을 사용하여, 항상성 프로모터 하에 발현되는 유전자를 함유하는 서열의 렌티바이러스 통합을 통해 유전자를 과발현시킬 수 있다. 그리고 종양에서 T-세포 기능을 촉진시킬 수 있는 1개 또는 2개의 유전자를 과발현하도록 본 디자인을 사용하는 것을 고려할 수 있지만, 종양 미세환경은 T-세포를 제한하는 많은 도전과제에 대항하기 위해 한번에 많은 유전자를 과발현할 수 있는 보다 관여된 시스템을 요구할 수 있다. 다중 유전자를 직접 형질도입하기 위한 렌티바이러스 통합의 사용이 비효율적이게 되고, 유전자가 발현되었음을 확인하기 위한 바이러스 통합, 및 스크리닝에 대한 시간을 필요로 한다. 추가로, 렌티바이러스 통합은 다수의 감염 회수에 대한 효율을 상실시켜, 이것은 대다수의 항상성으로 발현된 유전자를 통합시

키기 위해 덜 이상적인 후보물이 되게 한다.

- [0419] 본원에서 CRISPR이 T-세포에서 멀티플렉스 발현을 위해 사용될 수 있는 것으로 고려된다. II형 CRISPR 시스템은 DNA의 표적화된 서열을 절단하는, Cas9로 불리우는 DNA 뉴클레아제에 의존한다. 이들 표적은 표적화된 DNA 서열에 상보적인 가이드 RNA (sgRNA)에 의해 정의된다. 표적화 요건은 매우 단순하다: 표적 서열은 NGG와 같이 단순할 수 있는 짧은 PAM 서열에 직접 선행해야만 한다. gRNA는 트랜스-활성화 crRNA (tracrRNA)에 결합하여 Cas9를 특정 서열로 가이드할 수 있는 복합체를 형성한다.
- [0420] CRISPR 시스템은 뉴클레아제-결핍 Cas9 (dCas9)를 제조하기 위해 뉴클레아제 능력을 제거하고 이를 VP64와 같은 활성화 도메인에 부착시킴에 의해 유전자 활성화를 위해 재편되었다. 추가로, 단일 가이드 RNA (sgRNA)는 gRNA/tracrRNA 시스템을 모방하도록 디자인하여 단지 하나의 RNA 성분이 목적 서열을 표적화하는데 요구되도록 한다. 상기 sgRNA는 프로모터를 향해 dsCas9를 표적화하도록 디자인될 수 있고, 여기서, VP64는 유전자 발현을 가동시킬 수 있다 (도 10a). 유전자 발현을 조절하기 위해 CRISPR을 사용하는 것에 대해 여러 이점이 있다. 서열이 표적화될 요건은 PAM 서열이 인접하게 존재하는 것이기 때문에 많은 잠재적 표적을 발현하기가 매우 용이하다. 추가로, 이들 가이드 RNA는 28-뉴클레오타이드 길이의 절단 부위(41)에서 RNA를 절단하기 위해 Csy4로 불리우는 효소를 사용하는, III형 CRISPR 시스템을 사용한 멀티플렉스 활성화를 위해 패키징될 수 있다. 상기 시스템에서, 모든 가이드 RNA를 함유하는 단일 전사체는 하나의 프로모터 하에 발현될 수 있다. 가이드 RNA는 절단 부위에 의해 서로 이격되어 위치할 수 있고, Csy4는 단일 전사체를 구분된 가이드 RNA로 절단시킬 수 있다. 가이드 RNA의 소형 크기이기 때문에, 많은 것은 하나의 렌티바이러스 플라스미드에 패키징되어 다중 유전자의 과발현을 유도하는 시스템을 생성할 수 있다.
- [0421] T-세포 활성화, 증식 및 아폽토시스에 영향을 주는 여러 유전자들이 표적화될 수 있다. 증식을 촉진시키기 위해, T-세포의 성장 및 증식에 필요하고 생체의 입양 T-세포 치료요법을 위해 T-세포 집단을 확대하기 위해 사용된 표적 인터루킨-2 (IL-2)(12)이 표적화될 수 있다. 일부 구현예에서, IL-2에 대한 T-세포 친화성을 증가시키는 IL-2 수용체의 α 쇄(42)는 과발현될 수 있다. 또한, T-세포 활성화가 CD8 T-세포를 활성화시키는 Th1 표현형을 향해 CD4 T 세포를 구동시키는, 인터루킨-12(IL-12)를 과발현시킴에 의해 발현될 수 있는 것으로 고려된다(43). 유사하게, 또한 Th1 표현형을 촉진시키고 대식세포(44)를 활성화시키는 인터페론 γ (IFN γ)의 과발현이 고려된다.
- [0422] T-세포에서 아폽토시스를 촉진시키는 종양의 능력과 경쟁하기 위해, 아폽토시스 억제제를 유도하는 인터루킨-15 (IL-15)(45)가 과발현될 수 있다. 이들 인자에 추가로, CD8T-세포 기억을 촉진시키는 IL-7 수용체의 α 쇄, 및 종양형성을 억제하는 사이토킨인 종양 괴사 인자 α (TNF α)(46,47)가 과발현될 수 있다. 각각의 유전자의 발현을 제어하는 내인성 프로모터를 표적화하기 위한 잠재적 sgRNA는 PAM 서열에 인접한 서열을 동정하기 위한 Zifit 웹 도구를 사용함에 의해 디자인될 수 있다. 가이드 RNA는 전체적으로 가이드 RNA가 프로모터의 길이에 걸쳐 있도록 디자인될 수 있다.
- [0423] 가이드 RNA는 예를 들어, 개별 가이드 sgRNA 및 dCas9-VP64가 일시적으로 형질감염된 Jurkat에서 발현될 수 있다. 각각의 유전자의 발현은 ELISA, 항체, 또는 표적에 의존하는 qRT-PCR을 사용하여 모니터링될 수 있다. 내인성 유전자를 표적화하기 위해 sgRNA의 조합을 사용하는 것은 단일 sgRNA를 사용하는 것 보다 효과적이고 프로모터를 활성화시키는 작용을 잘 하는 조합체가 동정될 수 있고 시험될 수 있다.
- [0424] **종양 미세환경의 모의실험** 종양 미세환경에서 T 세포 활성을 증가시키기 위한 이들 sgRNA의 용도를 입증하기 위해, 시험관내 T-세포가 직면한 많은 도전 과제들이 모의실험될 수 있다. 예를 들어, 배지 중에 TGF-베타 및 PD-L의 내포는 T-세포 활성을 하향 조절하는 인자들을 도입한다. 트립토판 및 아르기닌-고갈된 배지는 종양 미세환경에서 영양물의 부재를 자극할 수 있다. 추가로, T-세포 활성을 하향 조절하는 Treg와 같은 다른 세포 또는 미세환경에서 T-세포에 대한 독성에 관여하는, 인돌아민 2,3-디옥시게나제 (IDO)를 분비하는 세포의 도입은 종양 미세환경을 모의실험하는데 유용할 수 있다. 추가로, 저산소의 낮은 pH 시스템이 사용될 수 있다. 상기 모의실험된 미세환경에서 T 세포의 거동이 결정될 수 있고 sgRNA를 발현하는 세포와 비교될 수 있다. 렌티바이러스 통합을 사용하여 유전자를 가장 양호하게 활성화시키는 dCas9-VP64 및 sgRNA 조합체를 발현하는 Jurkat의 안정한 세포주를 생성시킬 수 있다. 이들 T-세포는 T-세포 계수, 생존/죽은 검정을 사용하고 CD69 활성화 마커의 모니터링으로 비교되는 모의실험 종양 미세환경 및 이들의 증식 및 활성화에 노출될 수 있다.
- [0425] **멀티플렉스 활성화 시스템의 디자인 및 시험.** 멀티플렉스 인자의 조합은 Csy4 절단 시스템을 사용하여 작제될 수 있다. 3개의 성분 (dCas9-VP64, Csy4, 및 멀티플렉스 가이드 RNA)은 렌티바이러스 골격으로 발현될 수 있고, 형광 태그를 첨가하여 통합을 추적한다. 이들 작제물은 Jurkat 세포에 통합될 수 있고, 시스템의 성분

모두를 취득하는 세포를 분류하기 위해 형광성 태그를 사용한다. 상기 모의실험 종양 미세환경 및 검정은 T 세포 활성을 측정하도록 개발되었고 증식은 종양 미세환경을 위해 양호한 T-세포를 생성하는 최상의 조합을 결정하기 위해 사용될 수 있다. T-세포 신호 전달이 복잡하고 본원 발명자가 표적화하는 유전자들간의 많은 상호작용에 의존하기 때문에, 특정 인자가 공동상승 작용할 수 있는지 그리고 동시에 2개를 표적화하는데 중첩되는지가 결정된다.

[0426] 1차 세포 및 마우스에서 시험 1차 세포에 멀티플렉스 활성화 시스템이 형질도입될 수 있다. 모의실험 T-세포 미세환경 및 Jurkat 상에 시험된 검정을 사용하여, T-세포 활성화는 모니터링될 수 있다. 추가로, 인위적 항원 제공 세포를 사용하여 고갈된 미세환경에서 1차 CD8 T-세포가 암 세포를 사멸시키는 능력을 시험하기 위해 사용될 수 있다. 상기 시스템은 T-세포의 활성 및 증식 능력을 증가시키는 것이 생체내 종양을 사멸시키는 이들의 능력을 증진시킬 수 있음을 입증하기 위해 마우스에서 추가로 시험될 수 있다.

[0427] 일부 구현예에서, 감소된 형질감염 효율은 CRISPR을 수행하기 위한 또는 다중 유전자의 T 세포(48)로 통합시키기 위한 방법으로서 트랜스포존의 사용에 의해 해결될 수 있다.

[0428] 가이드 RNA가 목적하는 프로모터에 특이적인 것은 중요하다. 특히, 단일 유전자를 활성화시키기 위해 다중 가이드 RNA에 대한 관찰된 필요성은 CRISPR 활성화가 특이적일 수 있음을 시사한다. 오프-표적 활성화가 관찰되는 경우에, 보다 특이적인 sgRNA의 상이한 조합체가 동정될 수 있다. 유전자 활성화 없이 과발현을 가능하게 하는 목적하는 유전자의 트랜스포존-통합이 또한 사용될 수 있다.

[0429] 활성화 및 증식을 촉진시키는 인자의 발현을 증가시키는 것은 종양 미세환경의 세팅에 도움이 될 수 있지만, T 세포의 증가된 활성은 이웃하는 조직에 독성인 높은 면역 반응을 유발할 수 있다. 이것은 마우스 모델에서 상기 사안을 추적하는데 중요하다. 상기 사안을 해결하기 위한 전략은 표적화된 유전자의 활성화가 제어될 수 있도록 dCas9가 유도가능하게 하는 것이다. 본원에서 CRISPR 시스템이 Hek 내 플라스미드 유전자를 활성화시킬 수 있는 것으로 입증되었고, 가이드 RNA가 Tet-특이적 또는 Gal4-특이적 프로모터를 가동시키도록 디자인한다(도 11). 이들 결과는 CRISPR의 사용이 포유동물 세포에서 유전자를 활성화시킴을 확인시켜 주었다.

[0430] 참조 문헌

41. Nissim L, Perli SD, Fridkin A, Perez-Pinera P, Lu T. An integrated RNA and CRISPR/Cas toolkit for multiplexed synthetic circuits and endogenous gene regulation in human cells. 2014 Apr.

42. Willerford DM, Chen J, Ferry JA, Davidson L, Ma A. Interleukin-2 receptor α chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. Immunity. 1995.

43. Melero I, Mazzolini G, Narvaiza I, Qian C, Chen L, Prieto J. IL-12 gene therapy for cancer: in synergy with other immunotherapies. 2001 Mar;22(3):113-5.

44. Windbichler GH, Hausmaninger H, Stummvoll W, Graf AH, Kainz C, Lahodny J, et al. Interferon-gamma in the first-line therapy of ovarian cancer: a randomized phase III trial.

2000 Mar;82(6):1138-44. PMID: PMC2363351.

[0431]

45. Klebanoff CA, Finkelstein SE, Surman DR, Lichtman MK, Gattinoni L, Theoret MR, et al. IL-15 enhances the in vivo antitumor activity of tumor-reactive CD8⁺ T Cells. 2004 Feb 17;101(7):1969-74.

46. Kaeck SM, Tan JT, Wherry EJ, Konieczny BT, Surh CD, Ahmed R. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. 2003 Nov 16;4(12):1191-8.

47. Lejeune FJ, Rüegg C, Liénard D. Clinical applications of TNF- α in cancer. 1998 Oct;10(5):573-80.

48. Kahlig KM, Saridey SK, Kaja A, Daniels MA, George AL, Wilson MH. Multiplexed transposon-mediated stable gene transfer in human cells. 2010 Jan 26;107(4):1343-8.

[0432]

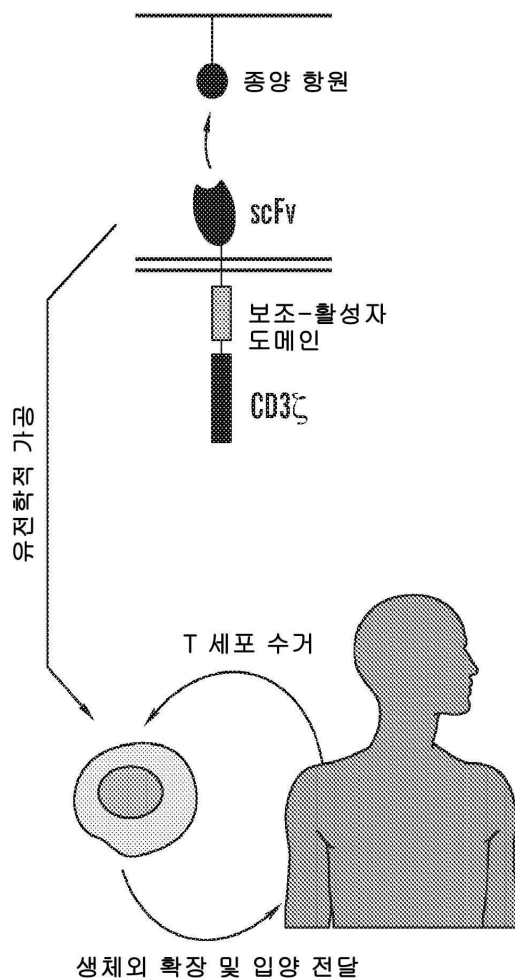
[0433] 실시예 5:

[0434] 세포의 BZIP 류신 지퍼³⁰ 도메인을 세포내 신호 전달 도메인으로서 CD28, 4-1BB, 및 CD3 ζ 으로의 융합에 의한 CAR 플랫폼. mCherry 형광성 단백질 및 myc 에피토프 태그는 또한 BZIP CAR (zipCAR)에 융합시켜 형질도입 효율 측정을 촉진시킨다. 상기 SUPRA CAR의 활성화는 zipCAR을 함유하는 렌티바이러스로 인간 1차 CD4 T 세포를 변형시킴에 의해 시험하였다. AZIP 류신 지퍼에 연결된 항-Her2 scFv를 함유하는 zipF를 정제하였다. 상기 zipFv는 zipCAR 및 Her2에 결합할 수 있다. Zip CAR은 Her2를 발현하는 K562 세포와 혼합되는 경우 1차 CD4+ T 세포 (분비된 사이토킨에 의해 측정된 바와 같이)에서 정제된 항-Her-2 zipFv에 의해 활성화될 수 있다 (도 13a). 대조적으로, BZIP 도메인을 갖는 항-Her2 zipFv는 zipCAR 및 T 세포를 활성화시키지 않았다. 암 세포에 대한 세포독성을 매개하는 SUPRA CAR의 능력을 시험하기 위해, SUPRA CAR은 인간 1차 CD8 T 세포 및 Her2를 발현하는 zipFv 및 K562 세포와 혼합된 SUPRA CAR CD8 T 세포에 형질도입하였다 (도 13b). 결과로서, SUPRA CAR 플랫폼은 본원에서 용량-의존적 방식으로 표적 암 세포의 사멸을 유도하는 것으로 입증된다. 단독의 zipFv는 임의의 유의적 세포 사멸을 유도하지 않았고, 따라서 세포 사멸이 가공된 T 세포 및 zipCAR에 의해 매개됨을 확인시켜 준다.

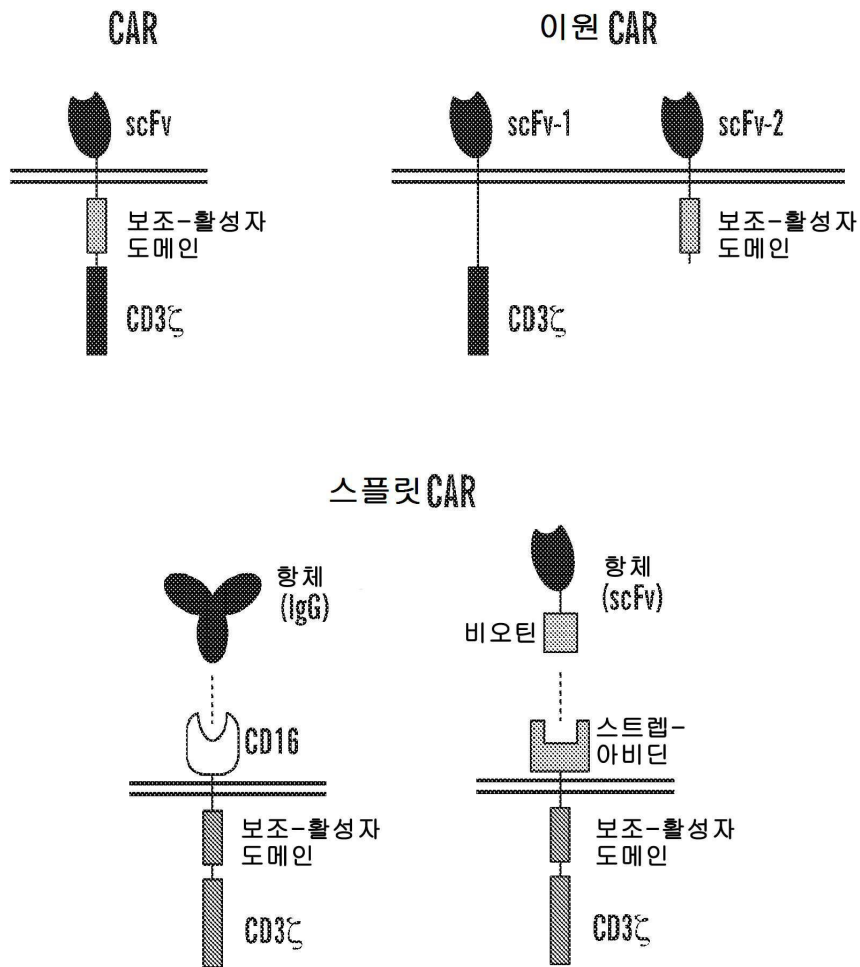
[0435] 류신 지퍼 (도 14b) 및 scFv (도 14c)의 친화성은 zipCAR의 활성화 강도를 제어하기 위해 다양하였다. 지퍼 쌍의 결합 친화성을 다양하게 함에 의해, 암 세포에 대한 zipCAR이 장착된 인간 1차 CD8 T 세포의 반응은 조절될 수 있다. 더욱이, 또한 표적 암 세포에 대한 1차 CD8 T 세포의 사멸이 항원에 대한 scFv 친화성을 다양하게 함에 의해 조절될 수 있는 것으로 입증되었다.

도면

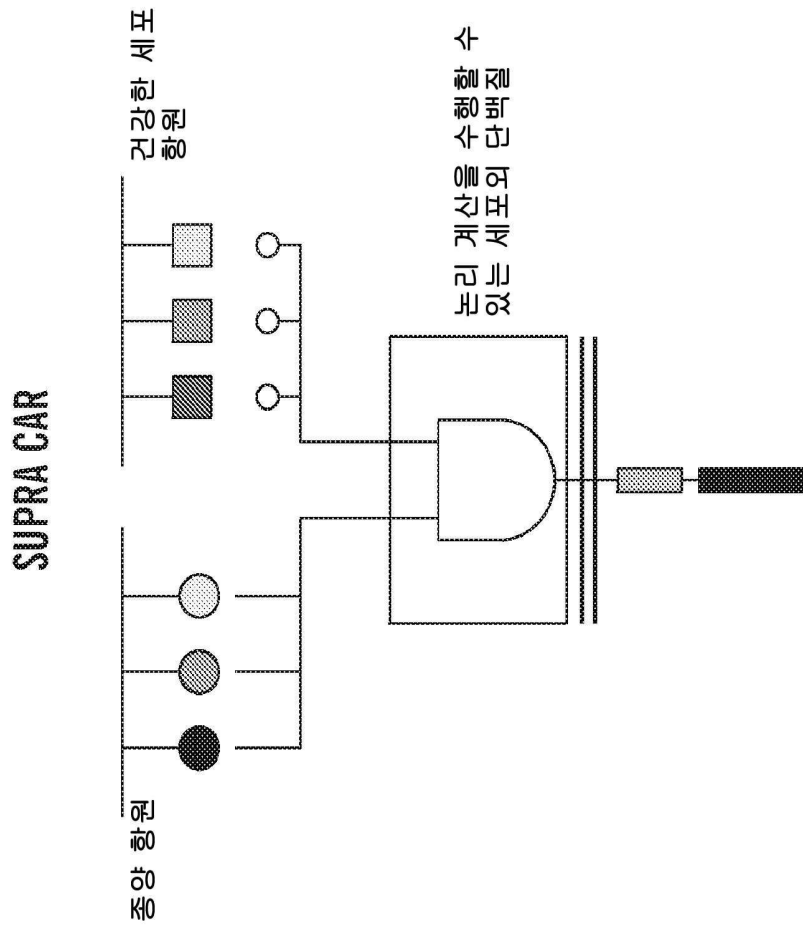
도면1a



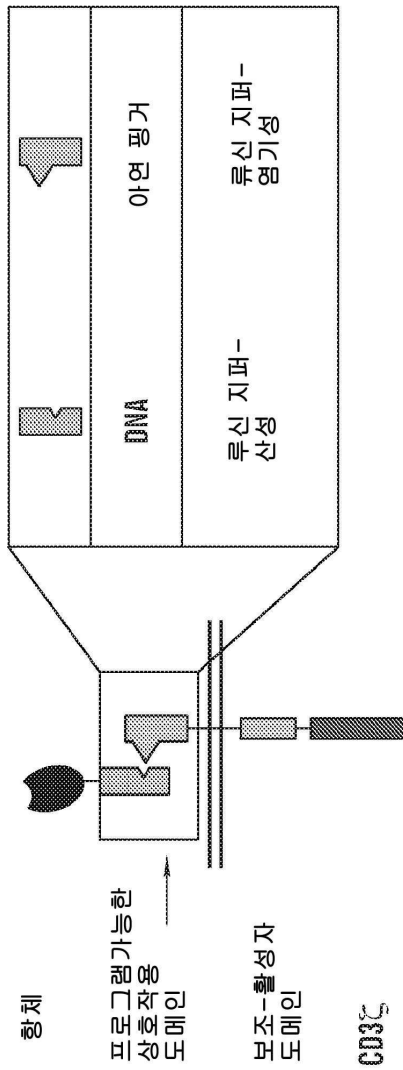
도면1b



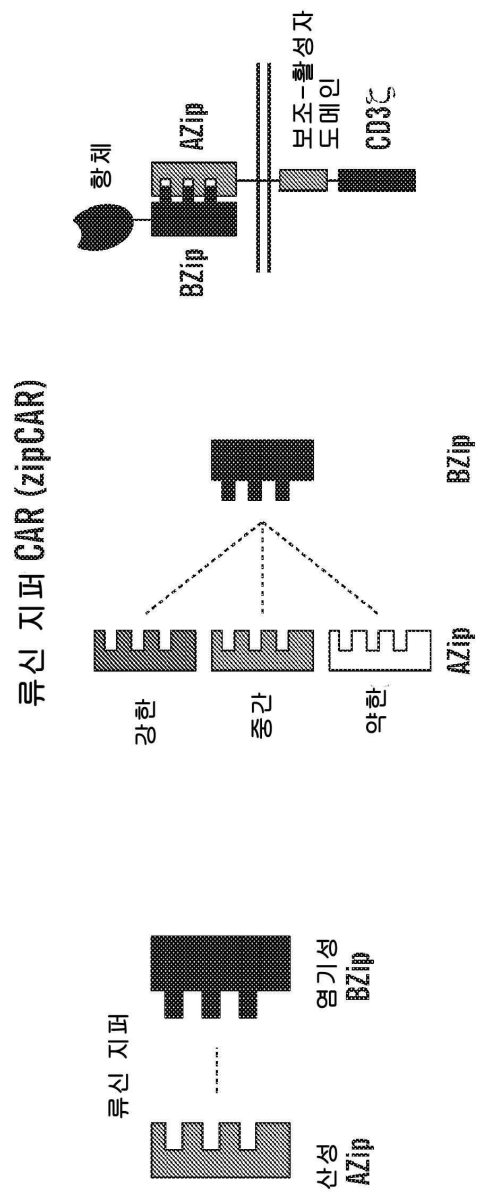
도면2a



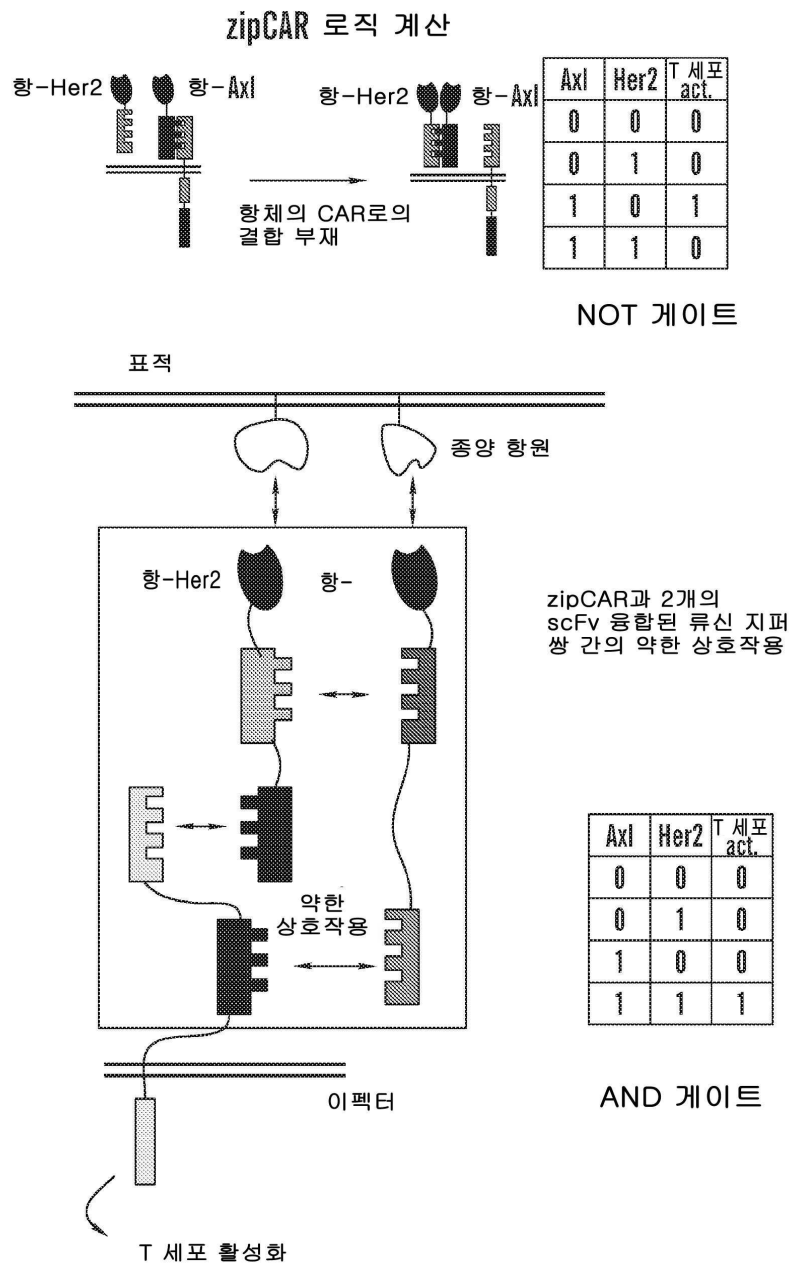
도면2b



도면3a

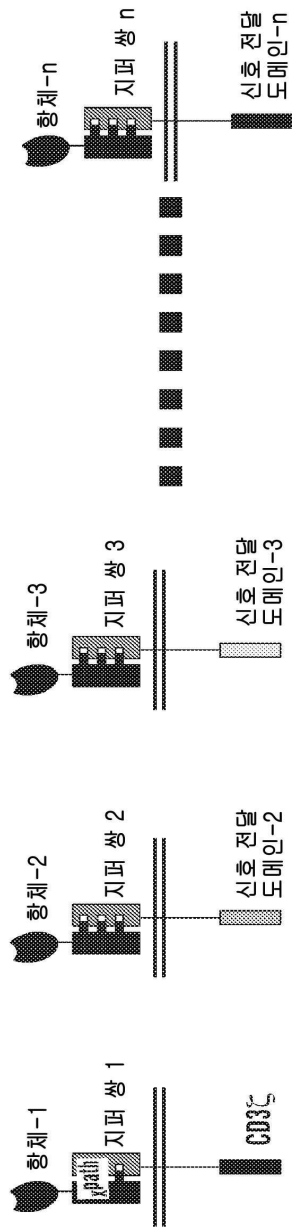


도면3b

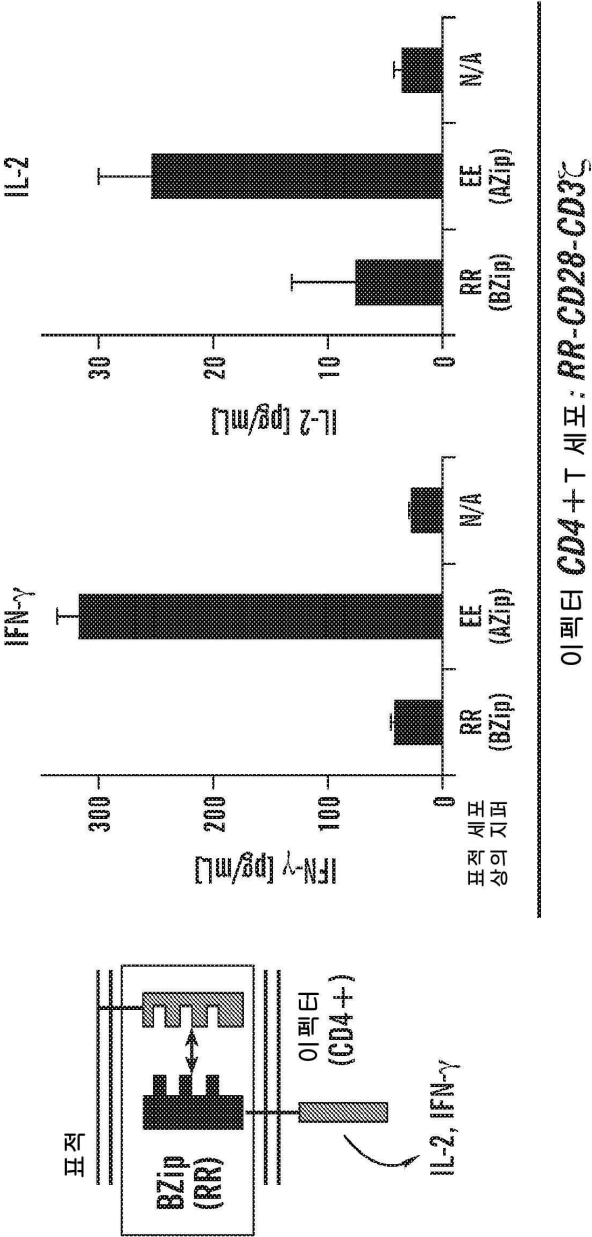


도면3c

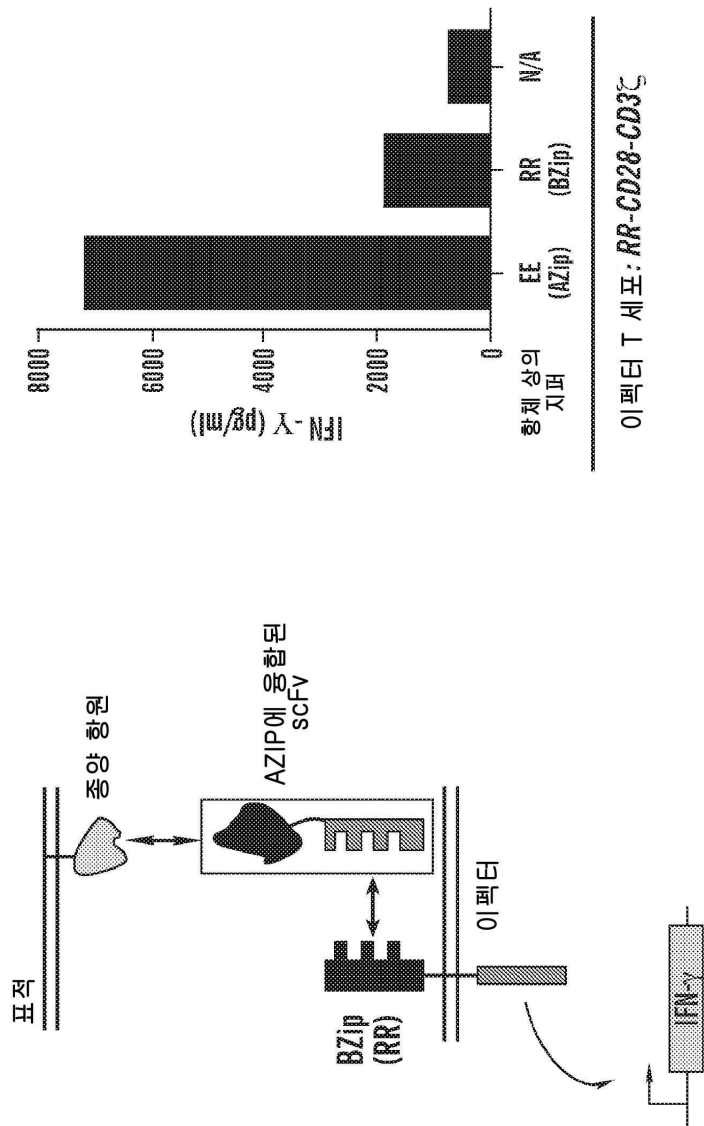
신호 전달의 zipCAR 직교 제어



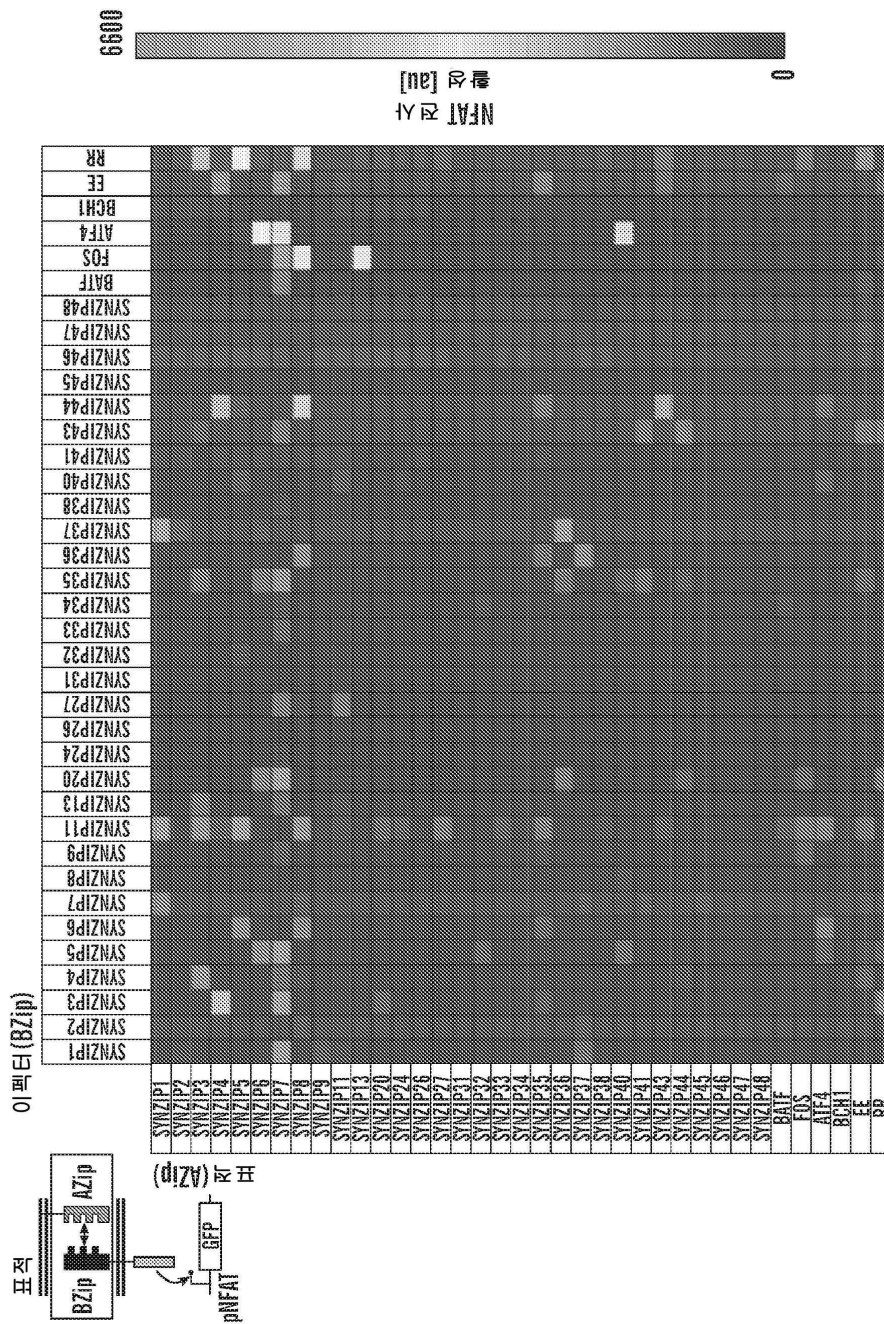
도면4



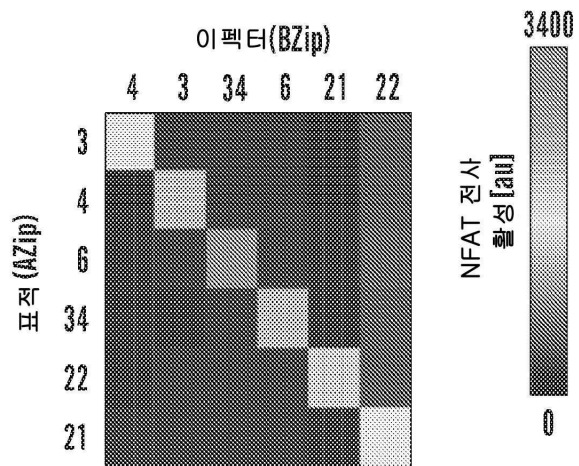
도면5



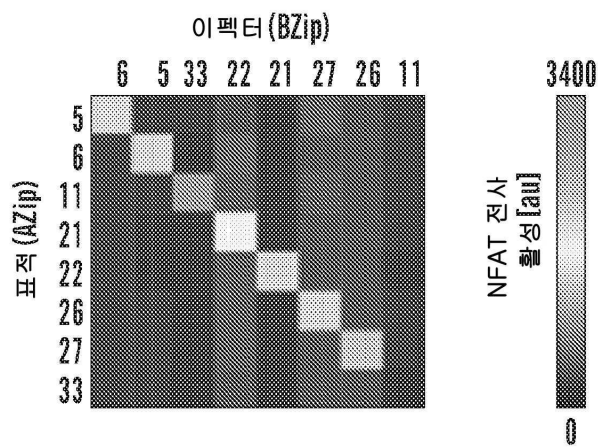
도면6a



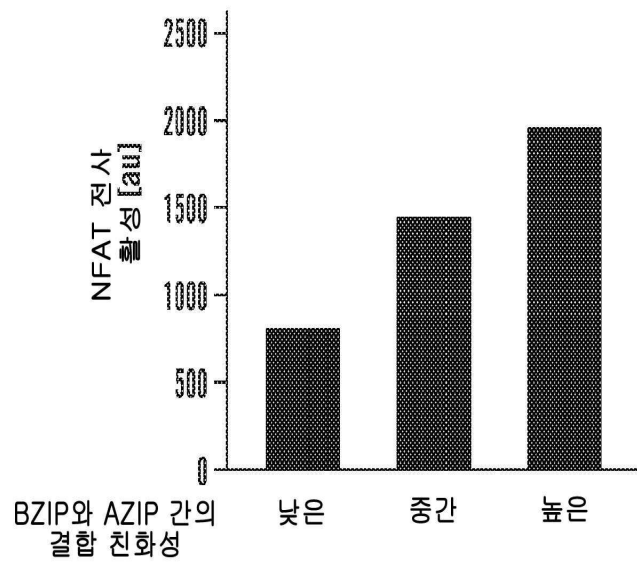
도면6b



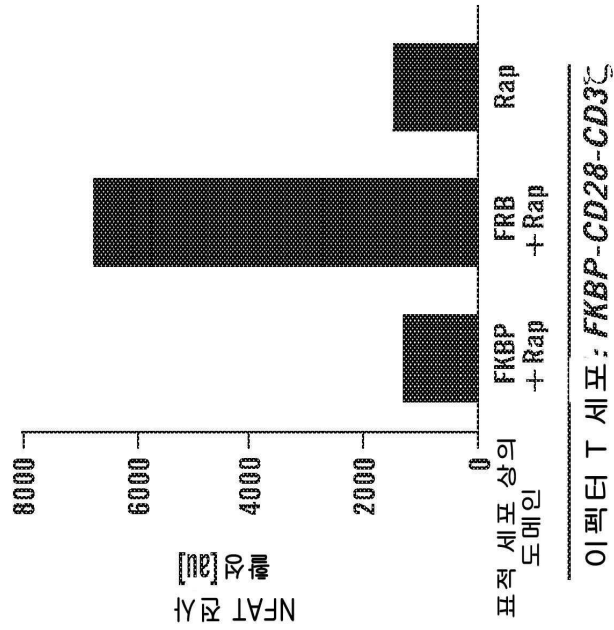
도면6c



도면6d

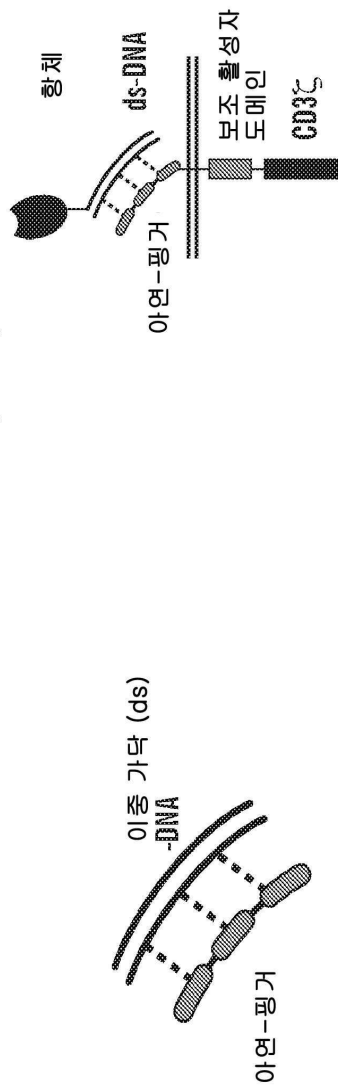


도면7



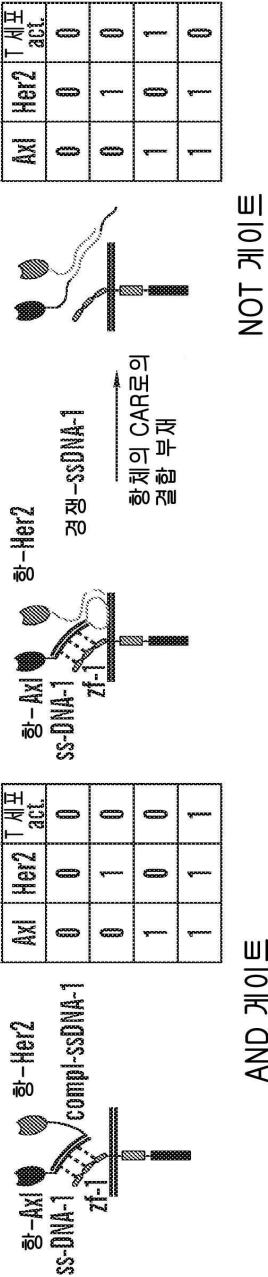
도면8a

아연-핑거 CAR (zCAR)



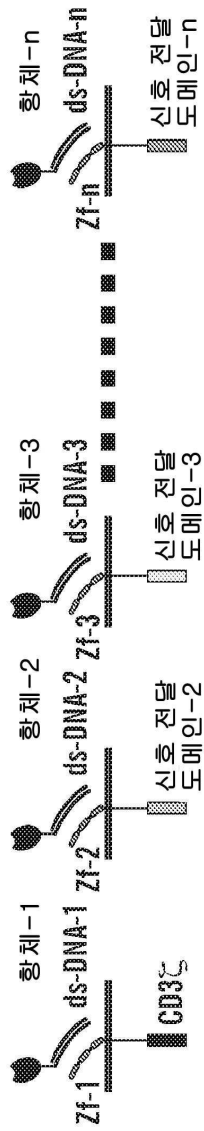
도면8b

zfCAR 논리 계산

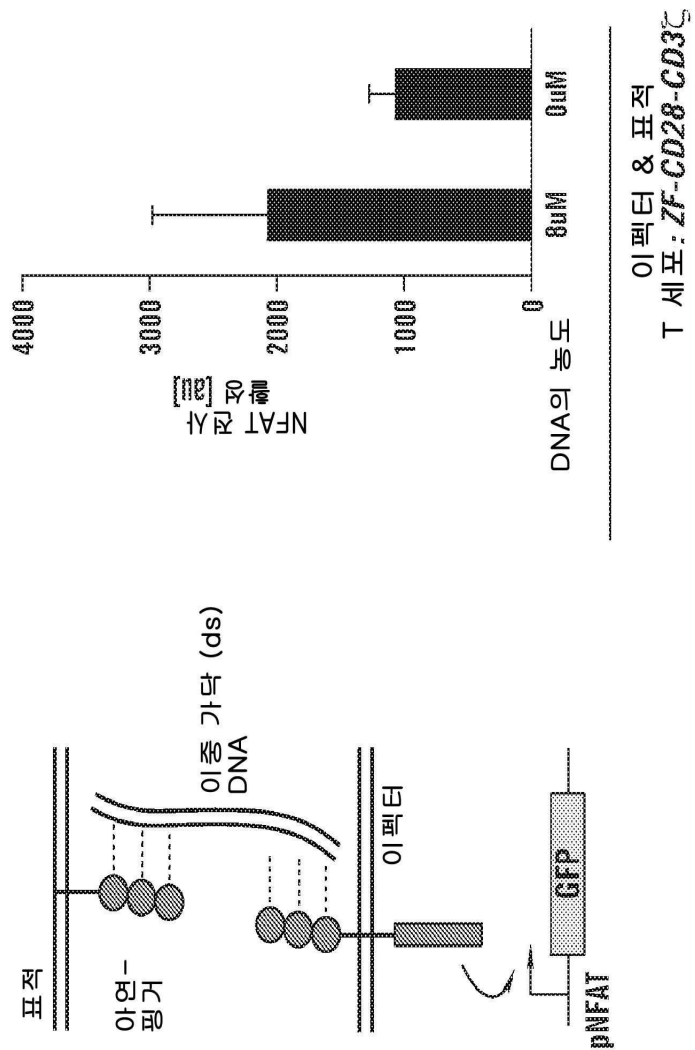


도면8c

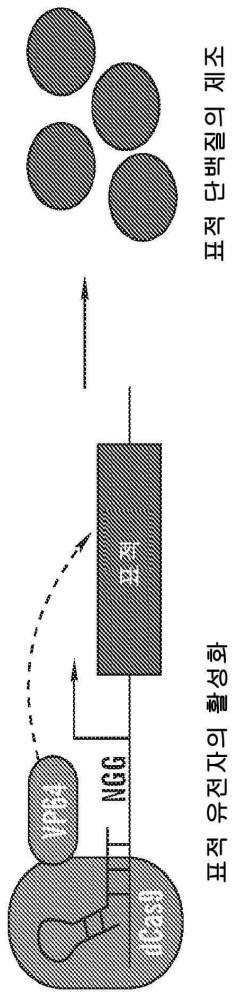
신호 전달의 zfCAR 직교 제어



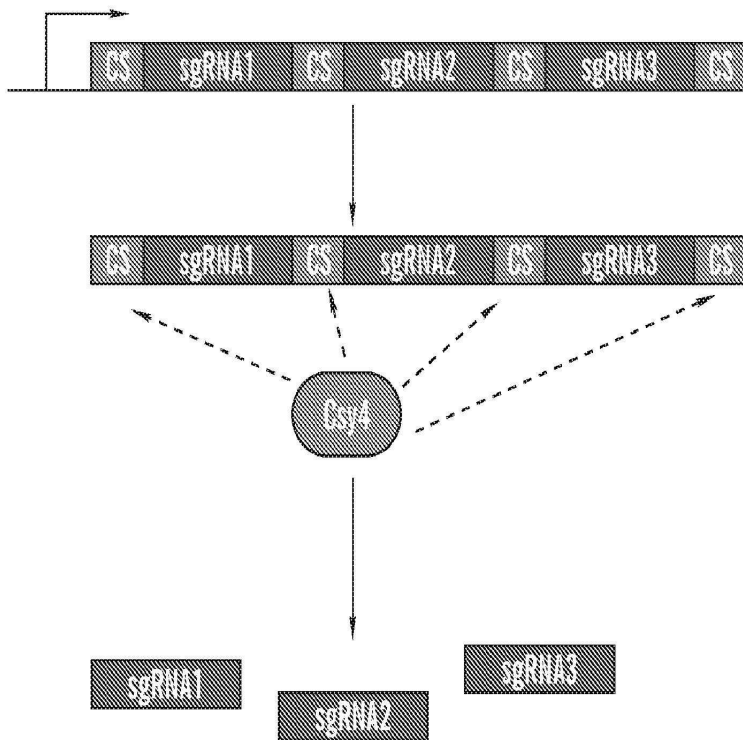
도면9



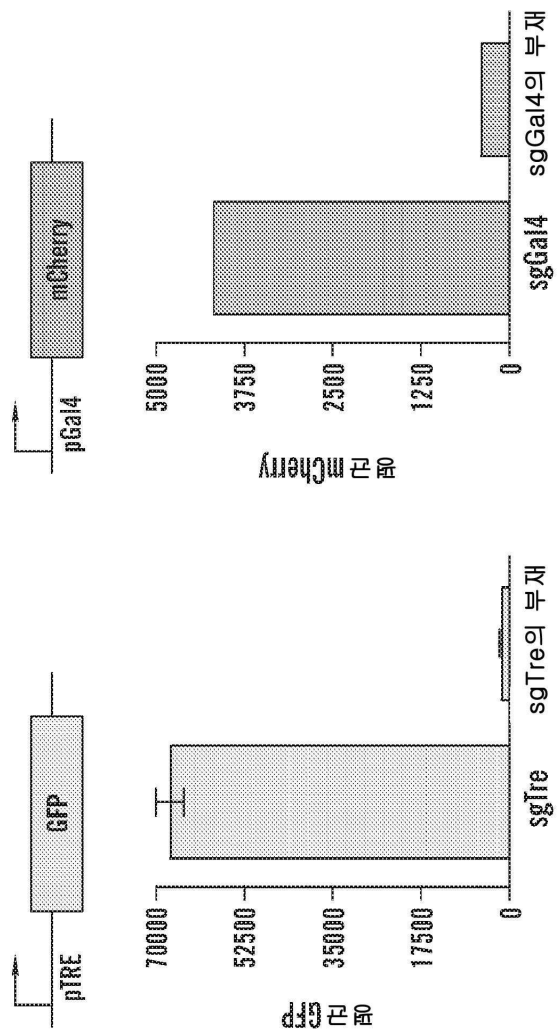
도면10a



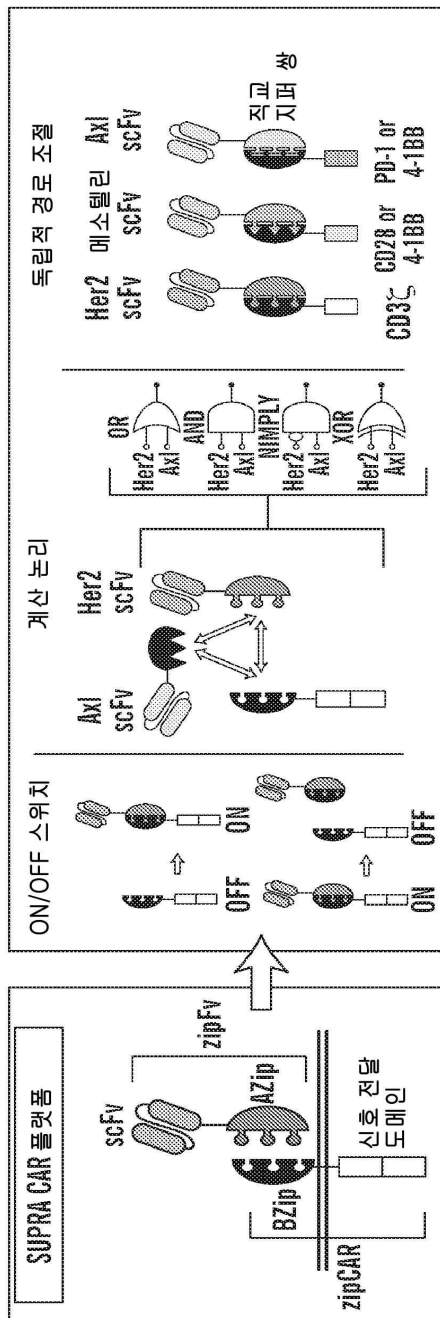
도면10b



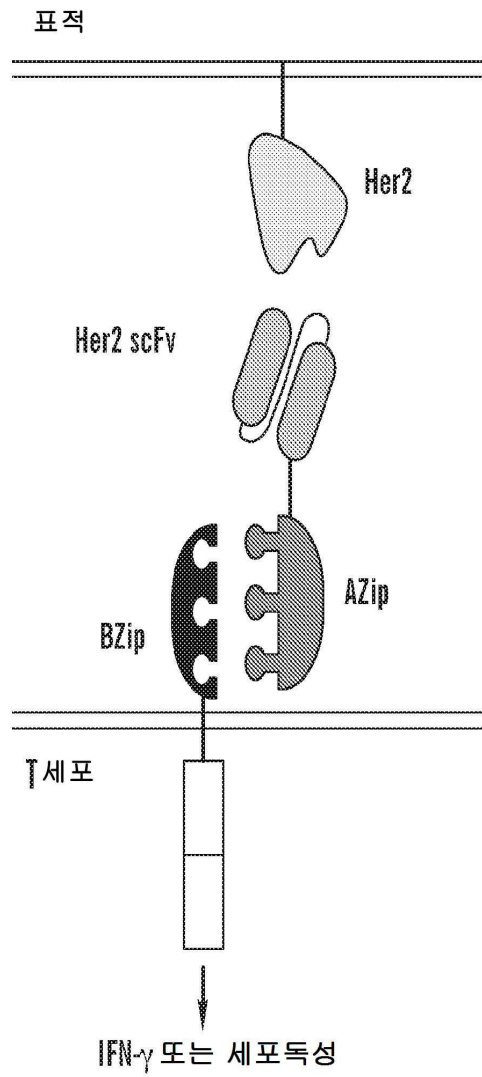
도면11



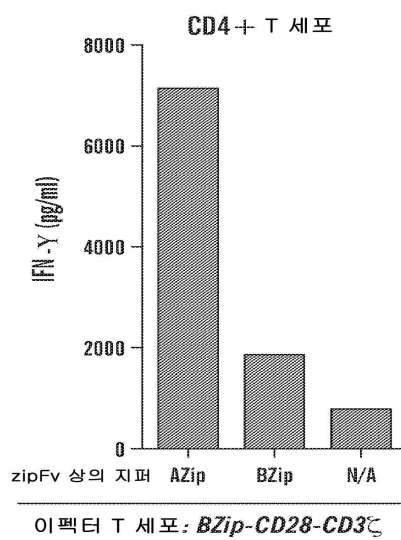
도면12



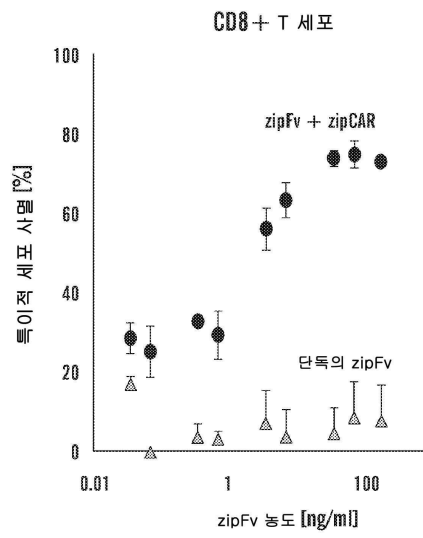
도면13a



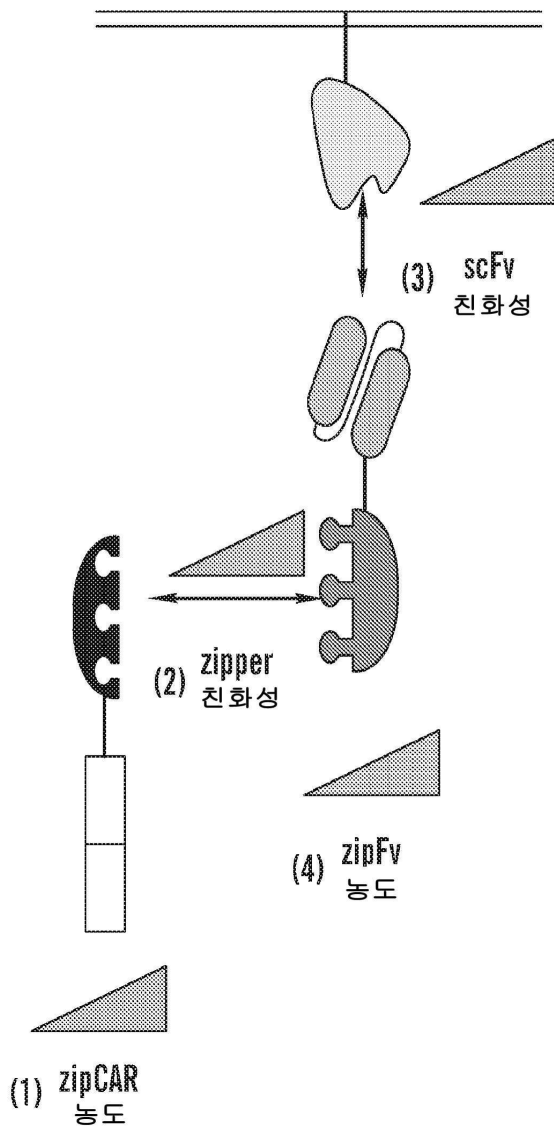
도면13b



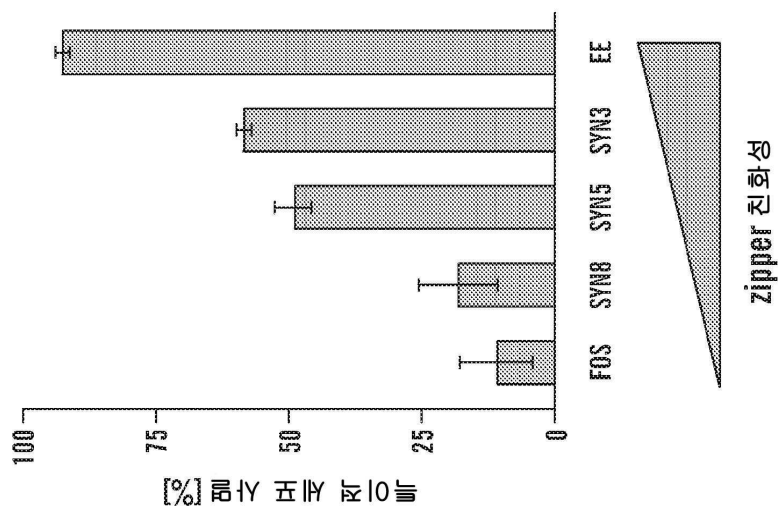
도면13c



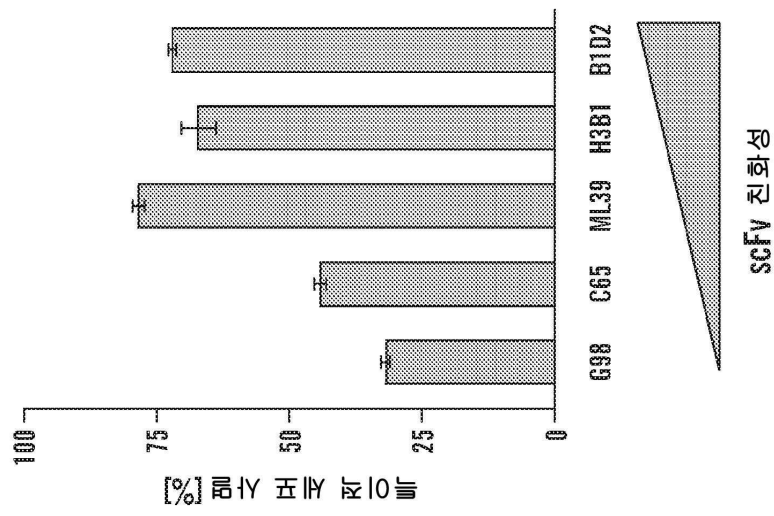
도면14a



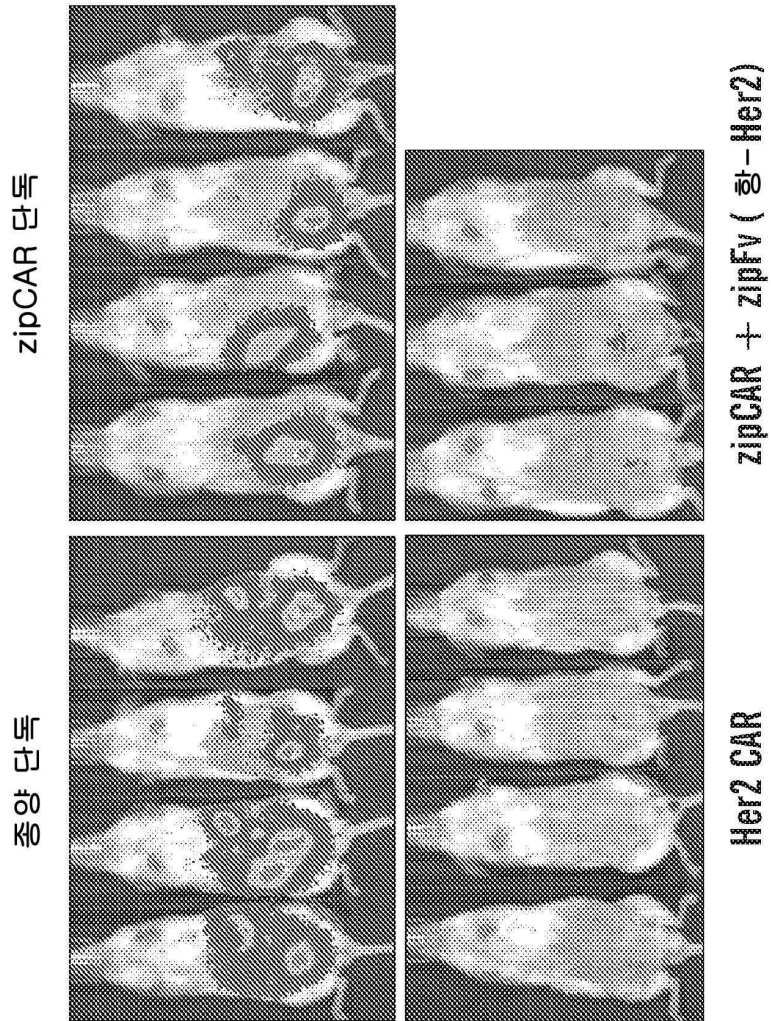
도면14b



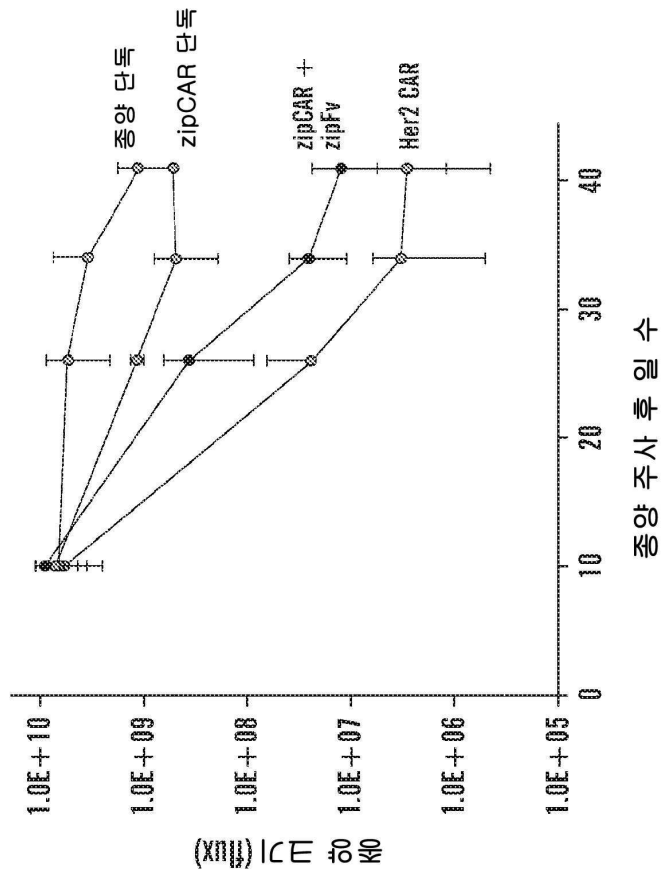
도면14c



도면15a



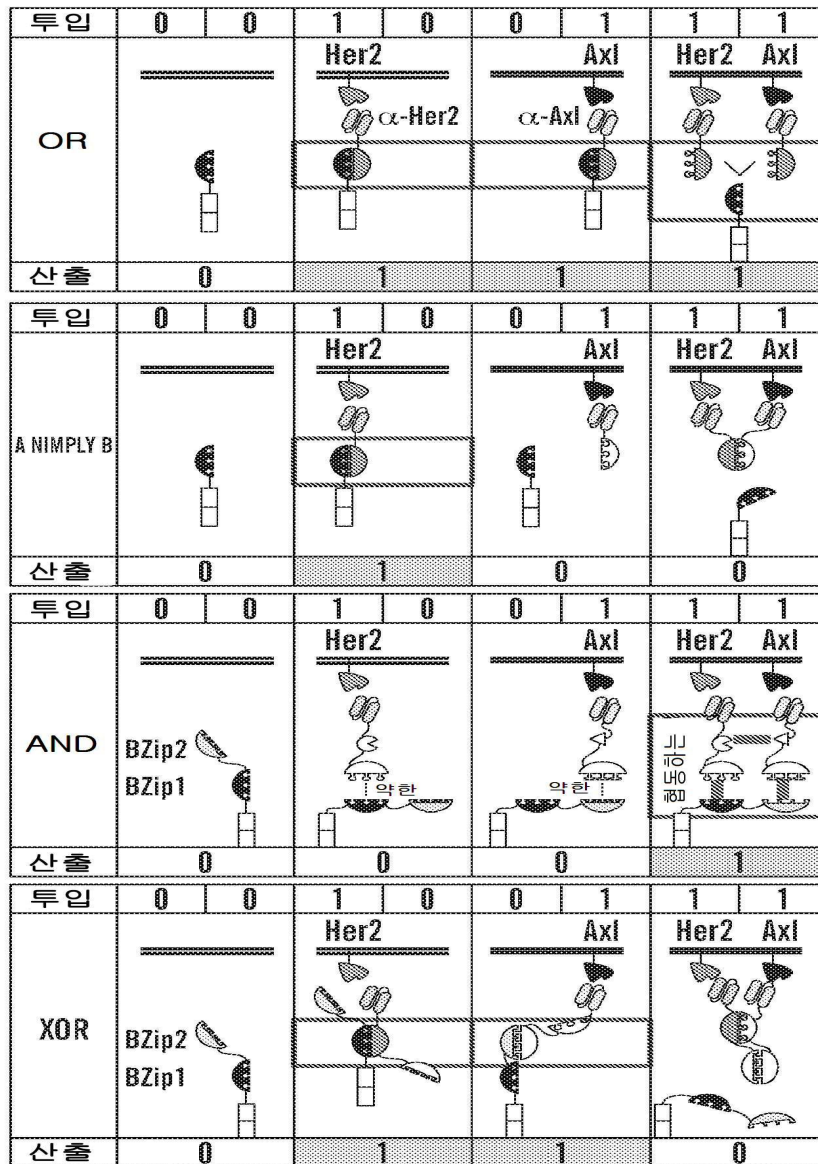
도면15b



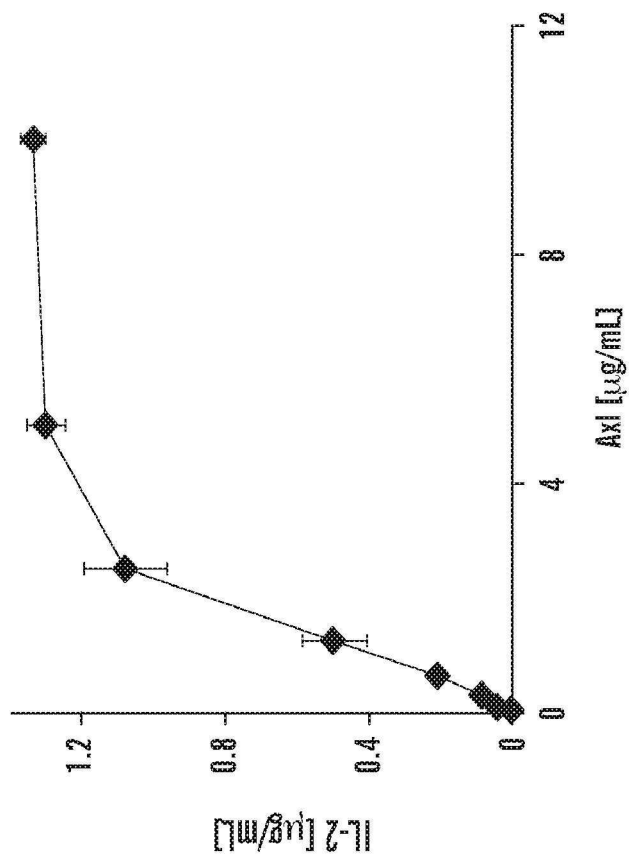
도면16a

논리 게이트		참 테이블			SUPRA디자인		
명칭	상징	A Her2	B Axl	출력 T cell Act.	ZipCAR	α Her2- ZipFv	α Axl- ZipFv
FALSE		0	0	0	BZip1-CAR		
A		0	0	0	BZip1-CAR	α Her2-AZip1	
B		0	0	0	BZip1-CAR		α Axl-AZip1
OR		0	0	0	BZip1-CAR	α Her2-AZip1	α Axl-AZip1
A NIMPLY B		0	0	0	BZip1-CAR	α Her2-AZip1	α Axl-BZip1 -약한
B NIMPLY A		0	0	0	BZip1-CAR	α Her2-BZip1 -약한	α Axl-AZip1
AND		0	0	0	BZip2-BZip1- CAR	α Her2-PDZ- BZip1약한	α Axl-PL- BZip1약한
XOR		0	0	0	BZip2-BZip1- CAR	α Her2-AZip1- BZip2-약한	α Axl-BZip1 -약한-AZip2

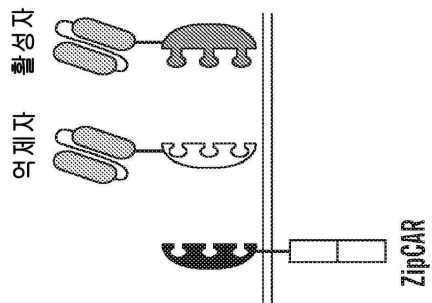
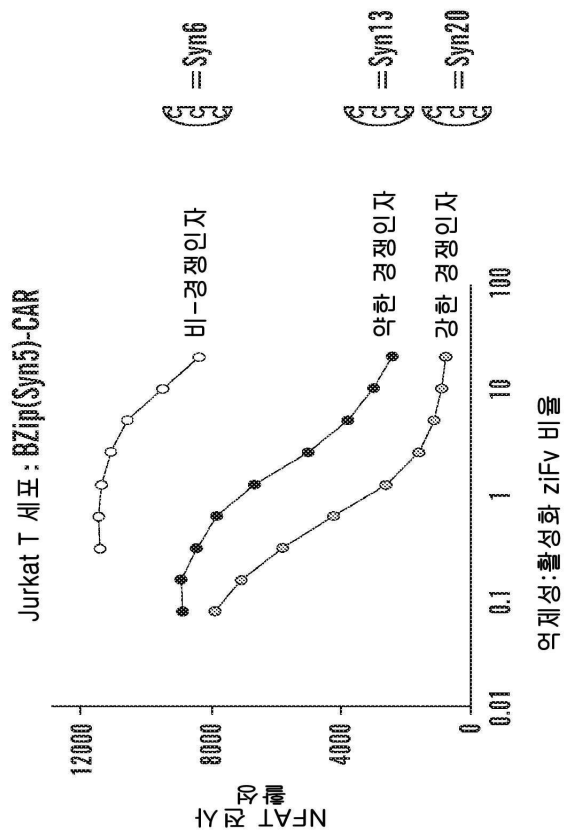
도면16b



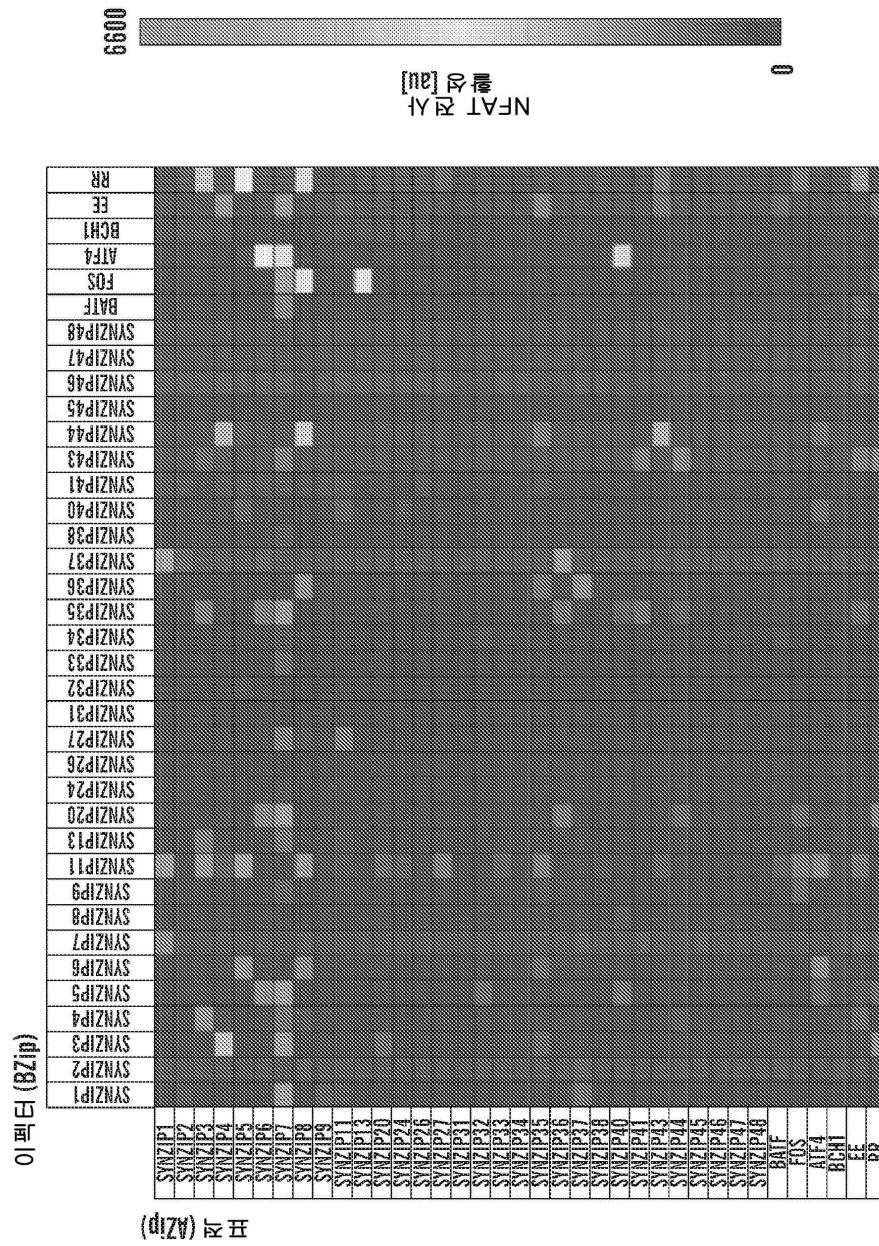
도면17



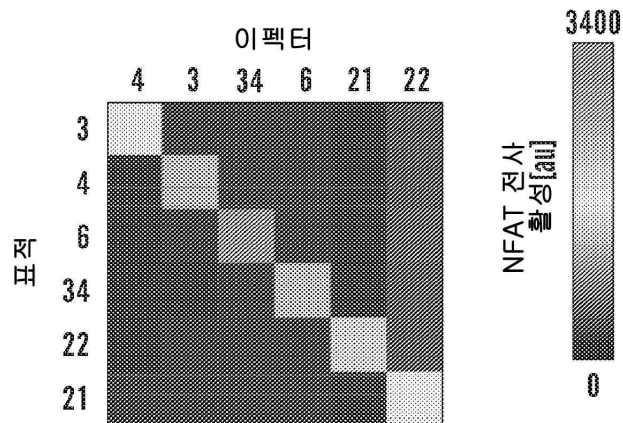
도면18



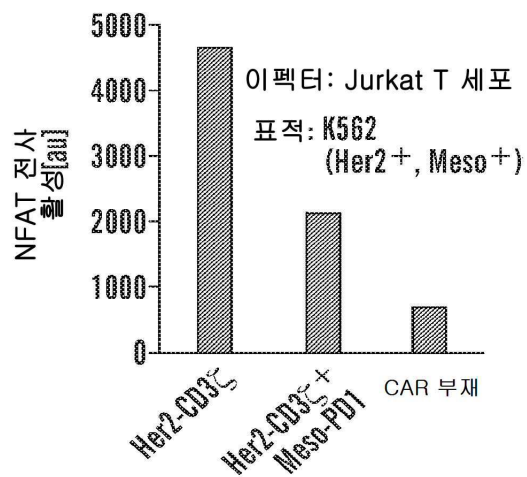
도면19a



도면19b



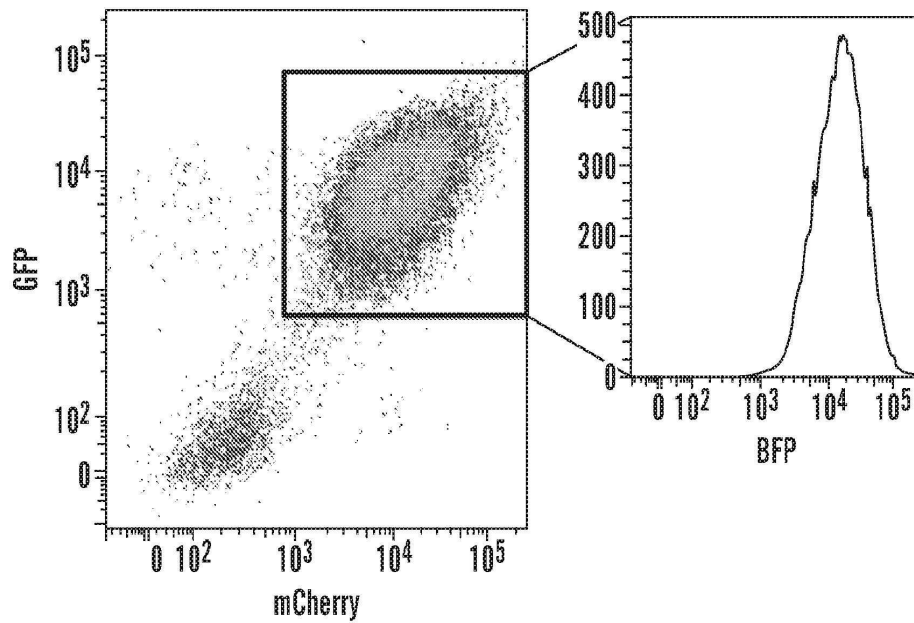
도면19c



도면20

세트	zipCARs			표현형
	A	B	C	
1	CD3z	CD28	4-1BB	(A 및 B)는 보다 신속한 살종양 동력학을 갖는 반면 (A 및 C)는 보다 긴 지속성을 갖는다.
2	CD3z	CD28	PD-1	(A 및 B)는 보다 신속한 살종양 동력학을 갖는 반면 C는 T 세포 활성화를 억제할 수 있다.

도면21



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> TRUSTEES OF BOSTON UNIVERSITY

<120> METHODS AND COMPOSITIONS RELATING TO CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS

<130> 701586-082751-PCT

<140><141><150> 62/258,712

<151> 2015-11-23

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 87

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 1

cccatgggtg gcataaaatg ggtggcataa aatgggtggc ataaaatggg tggcataaaa 60

tgggtggcat aaaatgggtg gcataaa 87

<210> 2

<211> 51

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 2

Met Asp Pro Asp Leu Glu Ile Arg Ala Ala Phe Leu Arg Gln Arg Asn

1 5 10 15

Thr Ala Leu Arg Thr Glu Val Ala Glu Leu Glu Gln Glu Val Gln Arg

20 25 30

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

35 40 45

Gly Gly Lys

50

<210> 3

<211> 51

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 3

Met Asp Pro Asp Leu Glu Ile Glu Ala Ala Phe Leu Glu Arg Glu Asn

1 5 10 15

Thr Ala Leu Glu Thr Arg Val Ala Glu Leu Arg Gln Arg Val Gln Arg

20 25 30

Leu Arg Asn Arg Val Ser Gln Tyr Arg Thr Arg Tyr Gly Pro Leu Gly

35 40 45

Gly Gly Lys

50