



등록특허 10-2417657



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년07월07일
(11) 등록번호 10-2417657
(24) 등록일자 2022년07월01일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) **A61K 48/00** (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01) **C07K 14/71** (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01) **C07K 16/40** (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0636 (2013.01)
A61K 48/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7024323
- (22) 출원일자(국제) 2014년02월06일
심사청구일자 2019년02월01일
- (85) 번역문제출일자 2015년09월07일
- (65) 공개번호 10-2015-0118977
- (43) 공개일자 2015년10월23일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/015113
- (87) 국제공개번호 WO 2014/124143
국제공개일자 2014년08월14일
- (30) 우선권주장
61/761,548 2013년02월06일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문현
JP2004113062 A*
- *는 심사관에 의하여 인용된 문현

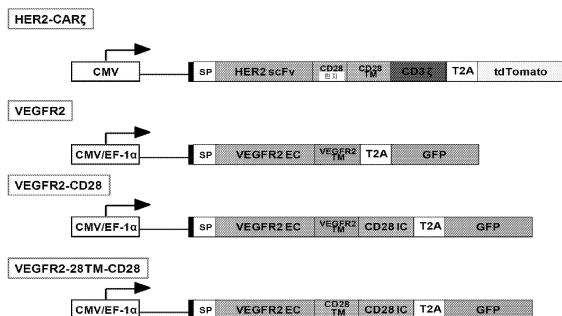
전체 청구항 수 : 총 13 항

심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 개선된 특이성을 갖는 변경된 T 림프구

(57) 요 약

본원은 키메라 수용체를 포함하는 변경된 T 림프구 및 이의 사용 방법을 제공한다.

대 표 도

(52) CPC특허분류

C07K 14/7051 (2013.01)

C07K 14/70521 (2013.01)

C07K 14/71 (2013.01)

C07K 16/40 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

C12N 2510/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

- a) 제1 항원에 결합하는 제1 세포외 항원 결합 도메인 및 제1 세포내 신호전달 도메인을 포함하되, 보조자극 도메인을 포함하지 않는 제1 키메라 항원 수용체(CAR); 및
- b) 제2 항원에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인 및 하나 이상의 보조자극 도메인을 포함하는 제2 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제2 CAR

를 포함하고, 상기 제1 세포내 신호전달 도메인 및 상기 제2 세포내 신호전달 도메인 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 최대 세포독성을 갖게 되는 변경된 T 림프구로서,

상기 제1 항원이 종양 세포 상의 항원이고, 상기 제2 항원이 혈관 내피 성장인자(VEGF)이고,

상기 하나 이상의 보조자극 도메인이 보조자극 CD27 폴리펩티드 서열, 보조자극 CD28 폴리펩티드 서열, 보조자극 OX40(CD134) 폴리펩티드 서열, 보조자극 4-1BB(CD137) 폴리펩티드 서열 및 보조자극 유도성 T 세포 보조자극(ICOS) 폴리펩티드 서열 중 하나 이상을 포함하는, 변경된 T 림프구.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 제1 항원 결합 도메인 또는 상기 제2 항원 결합 도메인 중 하나 또는 둘 모두가 scFv 항체 단편인, 변경된 T 림프구.

청구항 3

제1항에 있어서,

종양 세포가 고형 종양 내의 세포인, 변경된 T 림프구.

청구항 4

제1항에 있어서,

종양 세포 상의 항원이 Her2, 전립선 줄기 세포 항원(PSCA), 전립선 특이적 막 항원(PSMA), B 세포 성숙 항원(BCMA), 알파-태아단백질(AFP), 암배아 항원(CEA), 암 항원-125(CA-125), CA19-9, 칼레티닌(calretinin), MUC-1, 상피 막 단백질(EMA), 상피 종양 항원(ETA), 티로시나제(tyrosinase), 흑색종 관련 항원(MAGE), CD34, CD45, CD99, CD117, 크로모그라닌(chromogranin), 사이토케라틴(cytokeratin), 데스민(desmin), 신경아교 원섬유 산성 단백질(GFAP), 육안 낭성 질환 유체 단백질(GCDFP-15), HMB-45 항원, 단백질 멜란(melan)-A(T 림프구에 의해 인식되는 흑색종 항원; MART-1), myo-D1, 근육 특이적 액틴(MSA), 신경필라멘트, 신경 특이적 에놀라제(enolase)(NSE), 태반 알칼리성 포스파타제(phosphatase), 시냅토파이시스(synaptophysis), 티로글로불린, 갑상선 전사 인자-1, 피루베이트 키나제(kinase) 동종효소 M2형의 이량체 형태(종양 M2-PK), CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, 강글리오사이드 G2(GD2), 표피 성장인자 변이체 III(EGFRvIII), 정자 단백질 17(Sp17), 메소텔린(mesothelin), 전립선 산 포스파타제(PAP), 프로스테인(prostein), T 세포 수용체 γ 대안적 판독 프레임 단백질(TARP), Trp-p8, 전립선의 6-경막 상피 항원 1(STEAP1), 비정상적인 ras 단백질 또는 비정상적인 p53 단백질의 세포 표면 상의 형태인, 변경된 T 림프구.

청구항 5

제4항에 있어서,

종양 세포 상의 항원이 Her2인, 변경된 T 림프구.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

제1 세포내 신호전달 도메인이 CD3 ζ 신호전달 도메인이거나 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하는, 변경된 T 림프구.

청구항 7

a) 제1 항원에 결합하는 제1 세포외 항원 결합 도메인 및 하나 이상의 보조자극 도메인을 포함하는 제1 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제1 키메라 항원 수용체(CAR); 및

b) 제2 항원에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인 및 제2 세포내 신호전달 도메인을 포함하되, 보조자극 도메인을 포함하지 않는 제2 CAR

를 포함하고, 상기 제1 세포내 신호전달 도메인 및 상기 제2 세포내 신호전달 도메인 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 최대 세포독성을 갖게 되는 변경된 T 림프구로서,

상기 제1 항원이 종양 세포 상의 항원이고, 상기 제2 항원이 혈관 내피 성장인자(VEGF)이고,

상기 하나 이상의 보조자극 도메인이 보조자극 CD27 폴리펩티드 서열, 보조자극 CD28 폴리펩티드 서열, 보조자극 OX40(CD134) 폴리펩티드 서열, 보조자극 4-1BB(CD137) 폴리펩티드 서열 및 보조자극 유도성 T 세포 보조자극 (ICOS) 폴리펩티드 서열 중 하나 이상을 포함하는, 변경된 T 림프구.

청구항 8

제7항에 있어서,

제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인 중 어느 하나 또는 둘다가 scFv 항체 단편인, 변경된 T 림프구.

청구항 9

제7항에 있어서,

종양 세포가 고형 종양 내의 세포인, 변경된 T 림프구.

청구항 10

제7항에 있어서,

종양 세포 상의 항원이 Her2, 전립선 줄기 세포 항원(PSCA), PSMA, BCMA, 알파-태아단백질(AFP), 암배아 항원 (CEA), 암 항원-125(CA-125), CA19-9, 칼레티닌, MUC-1, 상피 막 단백질(EMA), 상피 종양 항원(ETA), 티로시나제, 흑색종 관련 항원(MAGE), CD34, CD45, CD99, CD117, 크로모그라닌, 사이토케라틴, 데스민, 신경아교 원섬유 산성 단백질(GFAP), 육안 낭성 질환 유체 단백질(GCDFP-15), HMB-45 항원, 단백질 멜란-A(T 림프구에 의해 인식 되는 흑색종 항원; MART-1), myo-D1, 근육 특이적 액틴(MSA), 신경필라멘트, 신경 특이적 애놀라제(NSE), 태반 알칼리성 포스파타제, 시냅토파이시스, 티로글로불린, 갑상선 전사 인자-1, 피루베이트 키나제 동종효소 M2형의 이량체 형태(종양 M2-PK), CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, 강글리오사이드 G2(GD2), 표피 성장인자 변이체 III(EGFRvIII), 정자 단백질 17(Sp17), 메소텔린, 전립선 산 포스파타제(PAP), 프로스테인, T 세포 수용체 8 대안적 관독 프레임 단백질(TARP), Trp-p8, 전립선의 6-경막 상피 항원 1(STEAP1), 비정상적인 ras 단백질 또는 비정상적인 p53 단백질의 세포 표면 상의 형태인, 변경된 T 림프구.

청구항 11

제10항에 있어서,

종양 세포 상의 항원이 Her2인, 변경된 T 림프구.

청구항 12

제7항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

제2 세포내 신호전달 도메인이 CD3 ζ 신호전달 도메인이거나 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하는, 변경된 T 림프구.

청구항 13

제7항에 있어서,

상기 제2 항원이 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)인, 변경된 T 림프구.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본원은 2013년 2월 6일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/761,548호(이의 개시내용은 전체로서 본원에 참고로 도입됨)를 우선권 주장한다.
- [0002] 본원의 개시내용은 면역학 분야, 보다 구체적으로 T 림프구 또는 다른 면역 세포의 변경에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 면역 시스템의 세포, 예컨대, T 림프구(T 세포로서도 지칭됨)는 특이적 항원을 인식하거나 이러한 항원과 상호 작용할 때 세포의 활성화를 야기하는 수용체 또는 수용체 복합체를 통해 특이적 항원을 인식하고 이러한 항원과 상호 작용한다. 이러한 수용체의 일례는 8개의 단백질들의 복합체인 항원 특이적 T 림프구 수용체 복합체(TCR/CD3)이다. T 세포 수용체(TCR)는 T 림프구의 표면 상에서 발현된다. 불변 구조를 갖는 한 성분인 CD3은 리간드에 의한 TCR의 점유 후 세포내 신호전달을 담당한다. 항원에 대한 T 림프구 수용체-CD3 복합체(TCR/CD3)는 주조직적합성 복합체(MHC)의 단백질에 의해 그에게 제시되는 항원성 펩티드를 인식한다. MHC와 펩티드로 구성된 복합체는 항원 제시 세포 및 다른 T 림프구 표적의 표면 상에서 발현된다. TCR/CD3 복합체의 자극은 T 림프구의 활성화 및 이에 따른 항원 특이적 면역 반응을 유발한다. TCR/CD3 복합체는 이펙터 기능 및 면역 시스템의 조절에 있어서 중추적인 역할을 수행한다.

- [0004] T 림프구는 완전히 활성 상태가 되기 위해 제2 보조자극 신호를 필요로 한다. 이러한 신호가 없는 경우 T 림프구는 TCR에 결합하는 항원에 반응하지 않거나 무반응(anergy) 상태가 된다. 이러한 보조자극 신호는 예를 들면, 항원 생성 세포 상의 CD80 및 CD86과 상호 작용하는 T 림프구 단백질인 CD28에 의해 제공된다. 또 다른 T 림프구 단백질인 ICOS(유도성 보조자극제)는 ICOS 리간드에 결합될 때 보조자극 신호를 제공한다.

- [0005] TCR 복합체의 본질적인 항원 결합, 신호 전달 및 자극 기능은 일반적으로 키메라 항원 수용체(CAR)로서 지칭되는 단일 폴리펩티드 쇄까지 유전적 재조합 방법에 의해 감소되었다. 예를 들면, 미국 특히 제7,741,465호(Eshhar), 및 미국 특허출원 공개 제2012/0093842호(Eshhar)를 참조한다. 이러한 CAR을 보유하는 T 림프구는 일반적으로 CAR-T 림프구로서 지칭된다. 그러나, 이러한 CAR이 T 림프구를 특이적 종양 관련 항원 또는 종양 특이적 항원으로 효과적으로 표적화하고 이러한 항원을 발현하는 종양 세포를 사멸시키도록 T 림프구를 효과적으로 표적화할 수 있지만, 이러한 디자인은 T 림프구가 이러한 항원을 발현하는 건강한 정상 세포를 사멸시키게 유도한다는 심각한 부작용을 겪는다. 따라서, 이러한 CAR-T 림프구의 사용은 일반적으로 체내의 임의의 다른 세포에 의해 발현되지 않는 항원을 발현하는 종양(상대적으로 드문 환경)으로 제한된다.

- [0006] 현재의 CAR 디자인의 이 단점을 극복하는 키메라 수용체를 포함하는 변경된 T 림프구가 본원에 기재되어 있다.

발명의 내용

- [0007] 제1 양태에서, 본원은 변경된 림프구, 예를 들면, 2개 이상의 상이한 폴리펩티드들, 예를 들면, 키메라 수용체들을 포함하는 변경된 T 림프구를 제공하는데, 이때 제1 폴리펩티드, 예를 들면, 키메라 수용체와 제1 항원의 결합으로부터 유도된 면역 신호는 제2 폴리펩티드, 예를 들면, 키메라 수용체에 의해 생성된 보조자극 신호로부터 분리되고, 보조자극 신호는 제2 키메라 수용체에 의한 제2 항원의 항원 결합에 의해 좌우된다. 본원 전체에서 사용된 바와 같이, "제1 폴리펩티드"는 일차 항원 결합 면역 신호를 생성하는 폴리펩티드를 표시하고, "제2

"폴리펩티드"는 보조자극 면역 신호를 생성하는 폴리펩티드이다. 일부 실시양태에서, 2개의 폴리펩티드들(예를 들면, 키메라 수용체들)은 단일 CAR 구축물의 사용을 통해 변경된 T 림프구 내로 도입되고, 이때 상기 폴리펩티드들은 2개의 상이한 폴리펩티드들이 단일 ORF로부터 (본질적으로 동등한 양으로) 발현되게 하는 절단가능한 서열(T2A 또는 P2A)에 의해 분리된다.

[0008] 한 실시양태에서, 본원은 제1 항원에 결합하는 제1 세포외 항원 결합 도메인 및 제1 세포내 신호전달 도메인을 포함하되, 보조자극 도메인을 포함하지 않는 제1 폴리펩티드; 및 제2 항원에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인 또는 상기 제2 항원에 결합하는 수용체, 및 제2 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구(CAR-T 림프구)를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 제1 신호전달 도메인 및 상기 제2 신호전달 도메인 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 최대 세포독성을 갖게 된다. 구체적인 실시양태에서, 제2 항원과 제2 항원 결합 도메인의 결합의 부재 하에서 제1 항원과 제1 항원 결합 도메인의 결합, 또는 제1 항원과 제1 항원 결합 도메인의 결합의 부재 하에서 제2 항원과 제2 항원 결합 도메인의 결합은 상기 변경된 T 림프구의 무반응 또는 제1 항원 또는 제2 항원에 대한 상기 T 림프구의 비반응을 유도한다.

[0009] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인은 독립적으로 수용체의 항원 결합 부분, 항체의 항원 결합 부분, 또는 다른 웨티드-기초 거대분자 항원 결합체이다. 일부 구체적인 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인 중 어느 하나 또는 둘다가 scFv 항체 단편이다. 구체적인 실시양태에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드 중 어느 하나 또는 둘다가 경막 도메인을 추가로 포함한다. 다른 구체적인 실시양태에서, 제1 폴리펩티드 또는 제2 폴리펩티드는 T 세포 생존 모티프를 포함한다. 구체적인 실시양태에서, T 세포 생존 모티프는 CD28 T 세포 생존 모티프이다. 다른 구체적인 실시양태에서, T 세포 생존 모티프는 IL-7 수용체(IL-7R)의 세포내 신호전달 도메인, IL-12 수용체의 세포내 신호전달 도메인, IL-15 수용체의 세포내 신호전달 도메인, IL-21 수용체의 세포내 신호전달 도메인, 또는 형질전환 성장인자 β (TGF β) 수용체의 세포내 신호전달 도메인이다. 또 다른 보다 더 구체적인 실시양태에서, 제1 폴리펩티드 또는 제2 폴리펩티드는 T 세포 생존 모티프를 포함하는 CD28 분자의 부분을 포함한다. 보다 더 구체적인 실시양태에서, 제1 폴리펩티드 또는 제2 폴리펩티드는 T 세포 생존 모티프를 포함하는 CD28 분자를 포함한다. 일부 구체적인 실시양태에서, 제1 세포내 신호전달 도메인은 면역수용체 티로신-기초 활성화 모티프(ITAM)를 포함하는 폴리펩티드 서열을 포함한다. 보다 더 구체적인 실시양태에서, 상기 폴리펩티드 서열은 CD3 ζ 신호전달 도메인이다.

[0010] 일부 구체적인 실시양태에서, 제1 항원은 종양 세포 상의 항원이다. 보다 더 구체적인 실시양태에서, 상기 종양 세포는 고형 종양 내의 세포이다. 또 다른 보다 더 구체적인 실시양태에서, 상기 종양 세포는 혈액암 세포이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 항원은 종양 관련 항원 또는 종양 특이적 항원이다. 보다 더 구체적인 실시양태에서, 상기 종양 관련 항원 또는 종양 특이적 항원은 Her2, 전립선 줄기 세포 항원(PSCA), PSMA(전립선 특이적 막 항원), B 세포 성숙 항원(BCMA), 알파-태아단백질(AFP), 암배아 항원(CEA), 암 항원-125(CA-125), CA19-9, 칼레티닌(calretinin), MUC-1, 상피 막 단백질(EMA), 상피 종양 항원(ETA), 티로시나제(tyrosinase), 흑색종 관련 항원(MAGE), CD34, CD45, CD99, CD117, 크로모그라닌(chromogranin), 사이토케라틴(cytokeratin), 데스민(desmin), 신경아교 원섬유 산성 단백질(GFAP), 육안 낭성 질환 유체 단백질(GCDFP-15), HMB-45 항원, 단백질 멜란(melan)-A(T 림프구에 의해 인식되는 흑색종 항원; MART-1), myo-D1, 근육 특이적 액틴(MSA), 신경필라멘트, 신경 특이적 에놀라제(enolase)(NSE), 태반 알칼리성 포스파타제(phosphatase), 시냅토파이신(synaptophysin), 티로글로불린, 갑상선 전사 인자-1, 피루베이트 키나제(kinase) 동종효소 M2형의 이량체 형태(종양 M2-PK), CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2(강글리오사이드 G2), EphA2, CSPG4, CD138, FAP(섬유모세포 활성화 단백질), CD171, 카파, 람다, 5T4, $\alpha_v\beta_6$ 인테그린(integrin), B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD123, EGFR, EGP2, EGP40, EpCAM, 태아 AchR, FR α , GD3, HLA-A1+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, 루이스(Lewis)-Y, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, ROR1, 서비빈(Survivin), TAG72, TEMs, VEGFR2, EGFRvIII(표피 성장인자 변이체 III), 정자 단백질 17(Sp17), 메소텔린(mesothelin), PAP(전립선 산 포스파타제), 프로스테인(prostein), TARP(T 세포 수용체 γ 대안적 판독 프레임 단백질), Trp-p8, STEAP1(전립선의 6-경막 상피 항원 1), 비정상적인 ras 단백질 또는 비정상적인 p53 단백질이다. 구체적인 실시양태에서, 제1 항원은 PSCA이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 제1 항원은 PSMA이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 제1 항원은 BCMA이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인이 HER2에 대한 특이성을 가질 때, 변경된 T 세포의 제2 폴리펩티드의 항원 결합 도메인은 MUC-1에 대한 특이성을 갖지 않는다.

[0011] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 제1 항원은 인테그린 $\alpha_v\beta_3$ (CD61), 갈락틴(galactin), K-Ras(V-Ki-ras2 키르

스텐(Kirsten) 래트 육종 바이러스 발암유전자) 또는 Ral-B이다.

[0012] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 제2 항원은 성장인자, 사이토카인 또는 인터류킨이다. 구체적인 실시양태에서, 제2 항원은 혈관신생 또는 혈관형성과 관련된 분자, 예를 들면, 성장인자, 사이토카인 또는 인터류킨이다. 보다 더 구체적인 실시양태에서, 제2 항원은 혈관 내피 성장인자(VEGF), 염기성 섬유모세포 성장인자(bFGF), 혈소판 유래의 성장인자(PDGF), 간세포 성장인자(HGF), 인슐린 유사 성장인자(IGF) 또는 인터류킨-8(IL-8)이다. 따라서, 제2 항원 결합 도메인은 예를 들면, VEGF, bFGF, PDGF, HGF, IGF 또는 IL-8에 대한 특이성을 갖는 항체(또는 이의 단편, 예를 들면, scFv); 또는 VEGF, bFGF, PDGF, HGF, IGF 또는 IL-8에 대한 수용체일 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 제2 항원 결합 도메인은 VEGF, bFGF, PDGF, HGF, IGF, TGF β , IL-4, IL-10, IL-13 또는 IL-8에 대한 수용체이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 제2 항원 결합 도메인은 VEGF에 대한 수용체이고, 이때 VEGF에 대한 상기 수용체는 VEGFR, 예를 들면, VEGFR1, VEGFR2 또는 VEGFR3이다.

[0013] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 제2 항원에 의해 제공된 신호 전달도입 활성화는 항원성을 갖지 않으나, 저산소증과 관련되어 있다. 보다 더 구체적인 실시양태에서, 상기 자극은 저산소증 유도성 인자-1 α (HIF-1 α), HIF-1 β , HIF-2 α , HIF-2 β , HIF-3 α 또는 HIF-3 β 의 활성화에 의해 유도된다.

[0014] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 제2 항원은 인터류킨이다.

[0015] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 제2 항원은 손상 관련 분자 패턴 분자(DAMP; 알라민(alarmin)으로서도 공지되어 있음)이다. 보다 더 구체적인 실시양태에서, 상기 DAMP는 열 충격 단백질, 염색질 관련 단백질 고이동성 군박스 1(HMGB1), S100A8(MRP8 또는 칼그래눌린(calgranulin) A로서도 공지되어 있음), S100A9(MRP14 또는 칼그래눌린 B로서도 공지되어 있음), 혈청 아밀로이드 A(SAA), 테옥시리보핵산, 아데노신 트라이포스페이트, 요산 또는 헤파린 셀페이트이다.

[0016] 일부 구체적인 실시양태에서, 제2 항원은 종양 세포에 의해 제시된 항원에 결합하는 항체 상의 항원이다.

[0017] 구체적인 실시양태에서, 본원은 제1 항원에 결합하는 제1 세포외 항원 결합 도메인 및 제1 세포내 신호전달 도메인을 포함하되, 보조자극 도메인을 포함하지 않는 제1 폴리펩티드; 및 VEGF에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인 및 제2 세포내 신호전달 도메인(보조자극 도메인)을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구(CAR-T 림프구)를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 제1 신호전달 도메인 및 상기 제2 신호전달 도메인 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때 최대 세포독성을 갖게 된다. 구체적인 실시양태에서, 제1 항원은 PSCA, PSMA 또는 BCMA이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 제1 세포외 항원 결합 도메인은 항체 또는 이의 단편(예를 들면, scFv), 예를 들면, PSCA, PSMA 또는 BCMA에 대한 특이성을 갖는 항체 또는 이의 단편을 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, VEGF에 결합하는 상기 항원 결합 도메인은 VEGF에 대한 수용체, 즉 VEGFR이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 VEGFR은 VEGFR1, VEGFR2 또는 VEGFR3이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 VEGFR은 VEGFR2이다.

[0018] 본원의 실시양태들 중 임의의 실시양태의 구체적인 실시양태에서, 제2 폴리펩티드는 하나 이상의 보조자극 도메인을 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 하나 이상의 보조자극 도메인은 보조자극 CD27 폴리펩티드 서열, 보조자극 CD28 폴리펩티드 서열, 보조자극 OX40(CD134) 폴리펩티드 서열, 보조자극 4-1BB(CD137) 폴리펩티드 서열, TILR2, TILR4, TILR7, TILR9, Fc 수용체 γ 쇄, Fc 수용체 ϵ 쇄 및 보조자극 유도성 T 세포 보조자극 (ICOS) 폴리펩티드 서열 중 하나 이상을 포함한다.

[0019] 본원에서 제공된 변경된 T 림프구의 구체적인 실시양태에서, 제1 폴리펩티드는 세포외 종양 항원 결합 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 항원 결합 도메인 및 하나 이상의 보조자극 분자 신호전달 도메인을 포함하는데, 이때 상기 항원은 혈관신생 또는 혈관형성 인자이다. 상기 혈관신생 인자는 예를 들면, VEGF일 수 있다. 상기 하나 이상의 보조자극 분자 신호전달 모티프는 예를 들면, CD27, CD28, OX40, ICOS 및 4-1BB 각각으로부터의 보조자극 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 보다 더 구체적인 실시양태에서, 제1 폴리펩티드는 세포외 종양 항원 결합 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 항원 결합 도메인, 및 CD27, CD28, OX40, ICOS 및 4-1BB 각각으로부터의 보조자극 신호전달 도메인을 포함하는데, 이때 상기 항원은 VEGF이다. 보다 더 구체적인 실시양태에서, 제1 폴리펩티드 또는 제2 폴리펩티드는 T 세포 생존 모티프를 포함한다. 보다 더 구체적인 실시양태에서, 상기 T 세포 생존 모티프는 IL-7 수용체(IL-7R)의 세포내 신호전달 도메인, IL-12 수용체의 세포내 신호전달 도메인, IL-15 수용체의 세포내 신호전달 도메인, IL-21 수용체의 세포내 신호전달 도메인, 또는 형질전환 성장인자 β (TGF β) 수용체의 세포내 신호전달 도메인이나 이러한 도메인으로부터 유래된다. 따라서, 상기 변경된 T 림프구의 보다 더 구체적인 실시양태에서, 제1 폴

리펩티드는 세포외 종양 항원 결합 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 항원 결합 도메인, IL-7 수용체 세포내 T 세포 생존 모티프, 및 CD27, CD28, OX40, ICOS 및 4-1BB 각각으로부터의 보조자극 신호전달 도메인을 포함하는데, 이때 상기 항원은 VEGF이다.

[0020] 변경된 T 림프구의 또 다른 구체적인 실시양태에서, 제1 항원은 종양 특이적 항원 또는 종양 관련 항원이고, 제1 세포내 신호전달 도메인은 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하고; 제2 폴리펩티드는 제2 항원에 결합하는 항원 결합 도메인, 및 CD27, CD28, OX40, ICOS 및 4-1BB 각각으로부터의 보조자극 신호전달 도메인을 포함한다. 보다 더 구체적인 실시양태에서, 제2 폴리펩티드는 세포내 T 세포 생존 모티프, 예를 들면, IL-7 수용체(IL-7R)의 세포내 신호전달 도메인, IL-12 수용체의 세포내 신호전달 도메인, IL-15 수용체의 세포내 신호전달 도메인, IL-21 수용체의 세포내 신호전달 도메인, 또는 형질전환 성장인자 β (TGF β) 수용체의 세포내 신호전달 도메인 이거나 이러한 도메인으로부터 유래된 T 세포 생존 모티프를 추가로 포함한다.

[0021] 본원에서 제공된 변경된 T 림프구들 중 임의의 변경된 T 림프구의 구체적인 실시양태에서, 제2 항원은 VEGF 또는 IL-4이다.

[0022] 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인 또는 제2 항원 결합 도메인만이 종양 관련 항원 또는 종양 특이적 항원에 결합하고, 나머지 제1 항원 결합 도메인 또는 제2 항원 결합 도메인은 종양 특이적 항원 또는 종양 관련 항원이 아닌 항원에 결합한다. 이러한 실시양태에서, 제1 자극 신호 및 제2 자극 신호 중 하나만이 종양 특이적 항원 또는 종양 관련 항원에 의해 생성되고, 나머지 제1 또는 제2 자극 신호는 또 다른 유형의 항원, 예를 들면, 종양 환경과 관련된 항원(예를 들면, 단백질 또는 다른 생체분자)에 의해 생성된다.

[0023] 일부 실시양태에서, 본원은 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드 및 하나 이상의 추가 폴리펩티드, 예를 들면, 항원 결합 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 하나 이상의 추가 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구도 제공한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 폴리펩티드들 중 하나만(예를 들면, 상기 제1 폴리펩티드, 상기 제2 폴리펩티드 및 상기 하나 이상의 추가 폴리펩티드 중 하나만)이 종양 관련 항원 또는 종양 특이적 항원에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하고, 상기 폴리펩티드들 중 나머지 폴리펩티드들은 종양 관련 항원 또는 종양 특이적 항원이 아닌 항원에 결합하는 항원 결합 도메인을 각각 포함한다. 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 제1 폴리펩티드, 상기 제2 폴리펩티드 및 상기 하나 이상의 추가 폴리펩티드 중 2개 이상의 폴리펩티드들은 하나 이상의 종양 관련 항원 또는 종양 특이적 항원에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는데, 이때 상기 폴리펩티드들 중 하나 이상의 폴리펩티드는 종양 관련 항원 또는 종양 특이적 항원에 결합하지 않는 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0024] 또 다른 양태에서, 본원은 제1 항원에 결합하는 제1 세포외 항원 결합 도메인 및 제1 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드; 및 제2 항원에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인 또는 상기 제2 항원에 결합하는 수용체, 및 제2 세포내 신호전달 도메인을 포함하되, 보조자극 도메인을 포함하지 않는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 제1 신호전달 도메인 및 상기 제2 신호전달 도메인 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 최대 세포독성을 갖게 된다. 구체적인 실시양태에서, 제2 항원과 제2 항원 결합 도메인의 결합의 부재 하에서 제1 항원과 제1 항원 결합 도메인의 결합, 또는 제1 항원과 제1 항원 결합 도메인의 결합의 부재 하에서 제2 항원과 제2 항원 결합 도메인의 결합은 상기 변경된 T 림프구의 무반응, 또는 제1 항원에 대한 상기 변경된 T 림프구의 비-반응을 유도한다. 구체적인 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인은 독립적으로 수용체의 항원 결합 부분 또는 항체의 항원 결합 부분이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인 중 어느 하나 또는 둘다가 scFv 항체 단편이다. 구체적인 실시양태에서, 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드는 경막 도메인을 추가로 포함한다. 보다 더 구체적인 실시양태에서, 제1 폴리펩티드 또는 제2 폴리펩티드는 T 세포 생존 모티프, 예를 들면, 본원에 기재된 T 세포 생존 모티프들 중 임의의 T 세포 생존 모티프를 포함한다.

[0025] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 제1 항원은 종양 세포, 예를 들면, 고형 종양 내의 세포 또는 혈액암 세포 상의 항원이다. 구체적인 실시양태에서, 제1 항원은 종양 관련 항원 또는 종양 특이적 항원, 예를 들면, Her2, 전립선 줄기 세포 항원(PSCA), PSMA(전립선 특이적 막 항원), B 세포 성숙 항원(BCMA), 알파-태아단백질(AFP), 암배아 항원(CEA), 암 항원-125(CA-125), CA19-9, 칼레티닌, MUC-1, 상피 막 단백질(EMA), 상피 종양 항원(ETA), 티로시나제, 흑색종 관련 항원(MAGE), CD34, CD45, CD99, CD117, 크로모그라닌, 사이토케라틴, 테스민, 신경아교 원섬유 산성 단백질(GFAP), 육안 낭성 질환 유체 단백질(GCDFP-15), HMB-45 항원, 단백질 멜란-A(T 림프구에 의해 인식되는 흑색종 항원; MART-1), myo-D1, 근육 특이적 액틴(MSA), 신경필라멘트, 신경 특이적 애놀

라제(NSE), 태반 알칼리성 포스파타제, 시냅토파이신, 티로글로불린, 갑상선 전사 인자-1, 피루베이트 키나제 동종효소 M2형의 이량체 형태(종양 M2-PK), 비정상적인 ras 단백질 또는 비정상적인 p53 단백질이다. 일부 실시양태에서, 종양 관련 항원은 CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2(강글리오사이드 G2), EGFRvIII(표피 성장인자 변이체 III), 정자 단백질 17(Sp17), 메소텔린, PAP(전립선 산 포스파타제), 프로스테인, TARP(T 세포 수용체 γ 대안적 판독 프레임 단백질), Trp-p8 또는 STEAP1(전립선의 6-경막 상피 항원 1)이다.

[0026] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 제1 항원은 인테그린 α_vβ₃(CD61), 갈락틴, K-Ras(V-Ki-ras2 키르스텐 래트 육종 바이러스 발암유전자) 또는 Ral-B이다.

[0027] 일부 구체적인 실시양태에서, 제2 세포내 신호전달 도메인은 면역수용체 티로신-기초 활성화 모티프(ITAM), 예를 들면, CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하는 폴리펩티드 서열을 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 제2 항원은 성장인자, 사이토카인 또는 인터류킨이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 제2 항원은 혈관신생 또는 혈관형성과 관련된 성장인자, 사이토카인 또는 인터류킨, 예를 들면, VEGF, bFGF, PDGF, HGF, IGF 또는 IL-8이다. 다른 보다 더 구체적인 실시양태에서, 제2 키메라 수용체에 의한 신호 전달도입은 저산소증 관련 인자, 예를 들면, HIF-1 α, HIF-1 β, HIF-2 α, HIF-2 β, HIF-3 α 또는 HIF-3 β의 활성화에 의해 유도된다. 다른 구체적인 실시양태에서, 제2 항원은 인터류킨이다. 다른 구체적인 실시양태에서, 제2 항원은 DAMP, 예를 들면, 열 충격 단백질, HMGB1, S100A8, S100A9, SAA, DNA, ATP, 요산 또는 헤파린 설페이트이다. 다른 구체적인 실시양태에서, 제2 항원은 투여된 펩티드, 예를 들면, 항체 또는 합성 폴리펩티드이다. 다른 구체적인 실시양태에서, 제2 항원은 종양 세포에 의해 제시된 항원에 결합하는 항체 상의 항원이다. 일부 구체적인 실시양태에서, 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드는 하나 이상의 보조자극 도메인, 예를 들면, 보조자극 CD27 폴리펩티드 서열, 보조자극 CD28 폴리펩티드 서열, 보조자극 OX40(CD134) 폴리펩티드 서열, 보조자극 4-1BB(CD137) 폴리펩티드 서열, TILR2, TILR4, TILR7, TILR9, Fc 수용체 γ 쇄, Fc 수용체 ε 쇄 및 보조자극 유도성 T 세포 보조자극 (ICOS) 폴리펩티드 서열 중 하나 이상을 포함한다. 상기 실시양태들 중 임의의 구체적인 실시양태에서, 제1 폴리펩티드 또는 제2 폴리펩티드는 T 세포 생존 모티프를 포함하고, 예를 들면, 상기 T 세포 생존 모티프는 IL-7 수용체(IL-7R)의 세포내 신호전달 도메인, IL-12 수용체의 세포내 신호전달 도메인, IL-15 수용체의 세포내 신호전달 도메인, IL-21 수용체의 세포내 신호전달 도메인 또는 형질전환 성장인자 β(TGF β) 수용체의 세포내 신호전달 도메인이거나 이러한 도메인으로부터 유래된다.

[0028] 또 다른 양태에서, 본원은 제1 항원을 특징으로 하거나 특징으로 할 수 있고 제2 항원과 관련되어 있는 질환 또는 장애를 갖는 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 제1 항원은 종양 관련 항원 또는 종양 특이적 항원이다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 4개의 CAR들을 도시적으로 보여준다. SP: 신호 웨პ티드; EC: 세포외; TM: 경막; IC: 세포내.

도 2는 4개의 CAR들을 도시적으로 보여준다. SP: 신호 웨პ티드; EC: 세포외; TM: 경막; IC: 세포내.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 본원은 원하는 항원을 디스플레이하는 세포에 대해 유도되고 이러한 세포에 대해 기존 T 림프구-기초 치료제보다 더 높은 특이성을 갖는 유전적으로 변경된 면역 시스템 세포, 예를 들면, T 림프구(T 림프구)를 제공한다. 일반적으로, 기존 변경된 T 림프구는 키메라 항원 수용체 또는 CAR로서 공지되어 있는 폴리펩티드를 발현하도록 변경되어 있다. 예를 들면, 미국 특허 제7,741,465호(Eshhar)를 참조한다. CAR을 발현하는 T 림프구는 CAR-T 림프구로서 공지되어 있다. CAR의 일반 구조는 세포외 부분 및 세포내 부분을 포함하는 단일 폴리펩티드 쇄를 포함하고, 경막 부분은 CAR을 T 림프구의 세포 막에 고착시키기 위해 임의적으로 추가된다. 세포외 부분은 관심있는 항원, 예를 들면, 세포 상의 항원, 예를 들면, 종양 특이적 항원 또는 종양 관련 항원에 결합할 수 있는 도메인 또는 모티프를 포함한다. 세포내 부분은 항원과 CAR의 세포외 부분의 결합에 반응하여 T 림프구를 활성화시키기 위해 필요한 일차 항원 결합 신호를 전달할 수 있는 도메인 또는 모티프를 포함한다. 전형적으로, 이 도메인 또는 모티프는 ITAM(면역수용체 티로신-기초 활성화 모티프)을 포함하거나 ITAM이다. CAR에 적합한 ITAM 함유 폴리펩티드는 예를 들면, 제타 CD3 쇄(CD3 ζ) 또는 이의 ITAM 함유 부분을 포함한다. T 림프구가 완전한 활성화를 위해 제2 보조자극 신호를 요구한다는 점을 고려하여, 보다 더 최근의 CAR 디자인의 반복에서 세포내 부분은 하나 이상의 보조자극 모티프, 전형적으로 CD27, CD28 또는 CD137(4-1BB)의 보조자극 부분을 추가

로 포함한다. 이러한 디자인은 CAR을 발현하는 T 림프구가 관심있는 항원과 CAR의 세포외 도메인의 결합 시 완전히 활성화되게 하여 CAR-T 림프구가 항원 보유 세포를 사멸시킬 수 있게 한다.

[0031] 이러한 변경된 T 림프구는 특정 항원을 보유하는 바람직하지 않은 세포를 사멸시키는 데에 매우 효과적일 수 있지만, 낮으나 검출가능한 양의 이러한 항원을 발현하는 정상 세포를 사멸시키는 데에도 효과적이다. 변경된 T 림프구의 이러한 오프(off)-종양 활성은 수용자의 정상 조직에 대한 심각한 손상 및 심지어 사망을 초래할 수 있다. 예를 들면, *ERBB2* 과다발현 종양에 대해 유도된 10¹⁰개의 CAR-T 림프구를 투여받은 전이성 결장암 환자는 투여 후 15분 이내에 폐 곤란을 경험한 후 다발성 장기 부전 및 출혈로 사망하였다. 문헌(Morgan et al., "Case Report of a Serious Adverse Event Following the Administration of T lymphocytes Transfected with a Chimeric Antigen Receptor Recognizing *ERBB2*," Molecular Therapy 18(4):843-851 (2010))을 참조한다. 이러한 유해한 오프-종양 효과는 단일 쇄 CAR 및 이를 발현하는 T 림프구의 적용가능성을 심각하게 제한한다.

[0032] 그러나, CAR에 의해 매개된 이러한 오프-종양 효과는 항원 결합 단독이 변경된 T 림프구를 활성화시키기에 충분하지 않도록 보조자극으로부터 일차 항원 결합 신호 전달도입을 분리함으로써 감소되거나 제거될 것이다(예를 들면, 이때 일차 신호 및 이차 신호 둘다가 종양 보유 조직 내에서 확인해 분명할 것이나 정상 조직 내에서는 분명하지 않을 것으로 예상된다). 본원에 개시된 바와 같이, 이 분리는 보조자극 폴리펩티드, 예를 들면 키메라 수용체를 발현하도록 변경된, 또는 2개 이상의 인공 폴리펩티드들, 예를 들면, 키메라 수용체들(이들 중 하나 이상은 일차 항원 결합 신호 전달도입 도메인을 포함하되, 보조자극 모티프를 포함하지 않고, 이들 중 하나 이상은 보조자극 도메인 또는 모티프를 포함하되, 일차 항원 결합 신호 전달도입 도메인을 포함하지 않음)을 발현하도록 변경된 T 림프구의 사용을 통해 달성되고, 이때 상기 2개 이상의 키메라 수용체들은 동일한 항원에 결합하지 않는다. (천연 TCR이든 아니면 인공 폴리펩티드이든 관계없이) 일차 신호 전달도입 폴리펩티드 이외의 보조자극 폴리펩티드의 비-결합은 변경된 T 림프구의 비-반응, 무반응 또는 아폽토시스를 초래한다.

1. 이중특이적 변경된 T 림프구

1.1. 제1 구성

[0035] 일부 실시양태에서, 본원은 특정 항원에 반응하여 보조자극 신호를 제공하는(그러나, 일차 항원 결합 신호는 천연 T 세포 수용체 단백질을 통해 전달됨) 단일 인공 보조자극 폴리펩티드, 예를 들면, 키메라 수용체를 포함하는 변경된 T 림프구를 제공한다. 이 단일 폴리펩티드는 예를 들면, 제1 항원에 결합하는 항원 결합 도메인 및 하나 이상의 보조자극 도메인을 포함하나, 일차 항원 결합 신호 생성 도메인, 예컨대, ITAM 또는 CD3ζ를 결여한다. 이 구성에서 변경된 T 세포는 일차 항원 결합 신호전달을 위해 천연 T 세포 수용체 및 CD3ζ 신호전달 단백질에 의존한다. 보조자극 폴리펩티드는 특정 항원에 대한 T 림프구의 반응을 향상시키는 보조자극 신호를 제공한다. 일부 실시양태에서, T 세포는 제1 항원, 예를 들면, 종양 특이적 항원(TSA) 또는 종양 관련 항원(TAA)을 천연적으로 인식하고, 인공 폴리펩티드(예를 들면, 키메라 수용체) 및 보조자극 폴리펩티드의 항원 결합 도메인도 상기 제1 항원에 결합한다. 다른 실시양태에서, T 세포는 제1 항원, 예를 들면, 종양 특이적 항원(TSA) 또는 종양 관련 항원(TAA)을 천연적으로 인식하고, 인공 폴리펩티드(예를 들면, 키메라 수용체) 및 보조자극 폴리펩티드의 항원 결합 도메인은 TSA 또는 TAA가 아닌 제2 항원에 결합한다.

[0036] 인공 폴리펩티드(예를 들면, 키메라 수용체)의 항원 결합 부분은 항원에 결합하는 임의의 폴리펩티드 도메인, 모티프 또는 서열일 수 있다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 수용체의 항원 결합 부분 또는 항체의 항원 결합 부분이다. 예를 들면, 항원 결합 도메인은 수용체 또는 이의 항원 결합 부분, 예를 들면, 종양 세포에 의해 생성된 리간드에 대한 수용체, 항체, 항체 쇄 또는 이의 항원 결합 부분, Fc 도메인, 글리코포스파티딜 이노시톨 고착제 도메인 등일 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 scFv 항체 단편이다. 일부 다른 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 또 다른 형태의 웨პ티드-기초 거대분자 항원 결합체, 예를 들면, 파지 디스플레이 단백질이다. 일부 다른 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 항원에 직접적으로 결합하지 않으나, 항원에 결합하는 변경된 단백질에 결합한다. 구체적인 실시양태에서, 예를 들면, 항원 결합 도메인은 항원 결합 폴리펩티드 또는 거대분자 상의 리간드, 예를 들면, 아비딘에 결합하는 리간드, 예를 들면, 바이오틴을 포함한다. 다양한 실시양태에서, 항원 결합 도메인에 의한 항원 결합은 주조직적합성 복합체(MHC)와 관련된 항원 제시로 제한될 수 있거나, MHC에 의해 제한되지 않을 수 있다.

[0037] 일부 실시양태에서, 인공 폴리펩티드(키메라 수용체) 내의 하나 이상의 보조자극 도메인은 보조자극 CD27 폴리

펩티드 서열, 보조자극 CD28 폴리펩티드 서열, 보조자극 OX40(CD134) 폴리펩티드 서열, 보조자극 4-1BB(CD137) 폴리펩티드 서열 및 보조자극 유도성 T 세포 보조자극(ICOS) 폴리펩티드 서열 중 하나 이상을 포함한다.

[0038] 제1 항원은 임의의 관심있는 항원, 예를 들면, 세포의 표면 상에서 발현되는 항원일 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 상기 제1 항원은 종양 세포 상의 항원, 예를 들면, TAA 또는 TSA이다. 종양 세포는 예를 들면, 고형 종양 또는 혈액암의 세포일 수 있다. 일부 구체적인 실시양태에서, 상기 항원은 종양 관련 항원 또는 종양 특이적 항원, 예를 들면, Her2, 전립선 줄기 세포 항원(PSCA), PSMA(전립선 특이적 막 항원), B 세포 성숙 항원(BCMA), ERK5, 알파-태아단백질(AFP), 암배아 항원(CEA), 암 항원-125(CA-125), CA19-9, 칼레티닌, MUC-1, 상피 막 단백질(EMA), 상피 종양 항원(ETA), 티로시나제, 흑색종 관련 항원(MAGE), CD34, CD45, CD99, CD117, 크로모그라닌, 사이토케라틴, 데스민, 신경아교 원섬유 산성 단백질(GFAP), 육안 낭성 질환 유체 단백질(GCDFP-15), HMB-45 항원, 단백질 멜란-AT 램프구에 의해 인식되는 흑색종 항원; MART-1), myo-D1, 근육 특이적 액틴(MSA), 신경필라멘트, 신경 특이적 에놀라제(NSE), 태반 알칼리성 포스파타제, 시냅토파이신, 티로글로불린, 갑상선 전사 인자-1, 피루베이트 키나제 동종효소 M2형의 이량체 형태(종양 M2-PK), 비정상적인 ras 단백질 또는 비정상적인 p53 단백질이다. 일부 실시양태에서, 종양 관련 항원은 CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2(강글리오사이드 G2), EGFRvIII(표피 성장인자 변이체 III), 정자 단백질 17(Sp17), 메소텔린, PAP(전립선 산 포스파타제), 프로스테인, TARP(T 세포 수용체 γ 대안적 판독 프레임 단백질), Trp-p8 또는 STEAP1(전립선의 6-경막 상피 항원 1)이다.

[0039] 일부 실시양태에서, TAA 또는 TSA는 암/정소(CT) 항원, 예를 들면, BAGE, CAGE, CTAGE, FATE, GAGE, HCA661, HOM-TES-85, MAGEA, MAGEB, MAGEC, NA88, NY-ESO-1, NY-SAR-35, NY-TES-1, SPANXB1, SPA17, SSX, SYCP1 또는 TPTE이다.

[0040] 일부 다른 실시양태에서, TAA 또는 TSA는 탄수화물 또는 강글리오사이드, 예를 들면, fuc-GM1, GM2(종양태아 항원 면역원성-1; OFA-I-1), GD2(OFA-I-2), GM3, GD3 등이다.

[0041] 일부 다른 실시양태에서, TAA 또는 TSA는 알파-액티닌(actinin)-4, Bage-1, BCR-ABL, Bcr-Abl 융합 단백질, 베타-카테닌(catelin), CA 125, CA 15-3 (CA 27.29\BCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, Casp-8, cdc27, cdk4, cdkn2a, CEA, coa-1, dek-can 융합 단백질, EBNA, EF2, 엡스테인 바 바이러스 항원, ETV6-AML1 융합 단백질, HLA-A2, HLA-A11, hsp70-2, KIAAO205, Mart2, Mum-1, Mum-2, Mum-3, neo-PAP, 미요신 클래스 I, OS-9, pml-RAR α 융합 단백질, PTPRK, K-ras, N-ras, 트라이오스포스페이트 이소머라제(isomerase), Gage 3,4,5,6,7, GnTV, Herv-K-mel, Lage-1, NA-88, NY-Eso-1/Lage-2, SP17, SSX-2, TRP2-Int2, gp100(Pmel 17), 티로시나제, TRP-1, TRP-2, MAGE-1, MAGE-3, RAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15(58), RAGE, SCP-1, Hom/Mel-40, PRAME, p53, H-Ras, HER-2/neu, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, 인간 유두종바이러스(HPV) 항원 E6 및 E7, TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72-4, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, 13-카테닌, Mum-1, p16, TAGE, PSMA(전립선 특이적 막 항원), B 세포 성숙 항원(BCMA), CT7, 텔로머라제(telomerase), 43-9F, 5T4, 791Tgp72, 13HCG, BCA225, BTAA, CD68\KP1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733(EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB\70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90, TAAL6, TAG72, TLP 또는 TPS이다.

[0042] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 제1 항원은 인테그린 αvβ3(CD61), 갈락틴, K-Ras(V-Ki-ras2 키르스텐 래트 육종 바이러스 발암유전자) 또는 Ral-B이다.

[0043] 다른 종양 관련 항원 및 종양 특이적 항원은 당업자에게 공지되어 있고 본원에서 제공된 변경된 T 램프구에 의해 표적화될 수 있다.

[0044] 인공 폴리펩티드의 항원 결합 도메인에 의해 결합되는 제2 항원이 TSA 또는 TAA가 아닌 일부 실시양태에서, 항원은 예를 들면, 성장인자, 사이토카인 또는 인터류킨, 예를 들면, 혈관신생 또는 혈관형성과 관련된 성장인자, 사이토카인 또는 인터류킨일 수 있다. 이러한 성장인자, 사이토카인 또는 인터류킨은 예를 들면, 혈관 내피 성장인자(VEGF), 염기성 섬유모세포 성장인자(bFGF), 혈소판 유래의 성장인자(PDGF), 간세포 성장인자(HGF), 인슐린 유사 성장인자(IGF) 또는 인터류킨-8(IL-8)을 포함할 수 있다.

[0045] 종양은 종양에 국한된 저산소성 환경을 생성할 수도 있다. 따라서, 다른 보다 더 구체적인 실시양태에서, 상기 인공 폴리펩티드(예를 들면, 키메라 수용체)에 의한 신호 전달도입은 저산소증 관련 인자, 예를 들면, HIF-1 α, HIF-1 β, HIF-2 α, HIF-2 β, HIF-3 α 또는 HIF-3 β의 활성화에 의해 유도되거나, 저산소성 반응 요소 활성화에 의해 유도된다.

[0046] 종양은 정상 조직에 대한 국한된 손상을 야기하여 손상 관련 분자 패턴 분자(DAMP; 알라민으로서도 공지되어 있음)로서 공지되어 있는 분자의 방출을 야기할 수도 있다. 일부 실시양태에서, 제2 항원은 DAMP, 예를 들면, 열 충격 단백질, 염색질 관련 단백질 고이동성 군 박스 1(HMGB1), S100A8(MRP8, 칼그래놀린 A), S100A9(MRP14, 칼그래놀린 B), 혈청 아밀로이드 A(SAA), 테옥시리보핵산, 아데노신 트라이포스페이트, 요산 또는 해파린 셀페이트이다.

1.2. 제2 구성, 기본 구조

[0048] 한 양태에서, 본원은 제1 항원에 결합하는 제1 세포외 항원 결합 도메인 및 제1 세포내 신호전달 도메인을 포함하되, 보조자극 도메인을 포함하지 않는 제1 폴리펩티드; 및 제2 항원에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인 또는 상기 제2 항원에 결합하는 수용체, 및 제2 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 제1 신호전달 도메인 및 상기 제2 신호전달 도메인 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 최대 세포독성을 갖게 된다. 전형적으로, 상기 2개의 폴리펩티드들은 둘다 키메라 수용체이다. 제2 항원과 제2 항원 결합 도메인의 결합의 부재 하에서 제1 항원과 제1 항원 결합 도메인의 결합, 또는 제1 항원과 제1 항원 결합 도메인의 결합의 부재 하에서 제2 항원과 제2 항원 결합 도메인의 결합은 상기 변경된 T 림프구의 무반응을 유도하거나 변경된 T 림프구가 제1 항원과 제1 항원 결합 도메인의 결합에 반응하지 않게 만든다.

[0049] 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드의 항원 결합 부분들은 독립적으로 항원에 결합하는 임의의 폴리펩티드 도메인, 모티프 또는 서열일 수 있다. 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인은 독립적으로 수용체의 항원 결합 부분 또는 항체의 항원 결합 부분이다. 예를 들면, 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인은 수용체 또는 이의 항원 결합 부분, 예를 들면, 종양 세포에 의해 생성된 리간드에 대한 수용체, 항체, 항체 쇄 또는 이의 항원 결합 부분, Fc 도메인, 글리코포스파티딜이노시톨 고착제 도메인 등일 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인 중 어느 하나 또는 둘다가 scFv 항체 단편이다. 일부 다른 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인은 또 다른 형태의 펩티드-기초 거대분자 항원 결합체, 예를 들면, 파지 디스플레이 단백질일 수 있다. 다양한 실시양태에서, 항원 결합 도메인에 의한 항원 결합은 주조직적합성 복합체(MHC)와 관련된 항원 제시로 제한될 수 있거나, MHC에 의해 제한되지 않을 수 있다.

[0050] 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드는 세포외 부분 및 세포내 부분 이외에 바람직하게는 경막 도메인을 추가로 포함한다. 경막 도메인은 임의의 경막 단백질의 경막 도메인으로부터 수득될 수 있거나 유래될 수 있고, 이러한 경막 도메인의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 경막 도메인은 예를 들면, CD16, 사이토카인 수용체 및 인터류킨 수용체, 또는 성장인자 수용체 등으로부터 수득될 수 있거나 유래될 수 있다.

[0051] 제1 폴리펩티드 또는 제2 폴리펩티드는 T 세포 생존 모티프도 포함할 수 있다. T 세포 생존 모티프는 항원에 의한 자극 후 T 림프구의 생존을 용이하게 하는 임의의 폴리펩티드 서열 또는 모티프일 수 있다. 일부 실시양태에서, T 세포 생존 모티프는 CD3, CD28, IL-7 수용체(IL-7R)의 세포내 신호전달 도메인, IL-12 수용체의 세포내 신호전달 도메인, IL-15 수용체의 세포내 신호전달 도메인, IL-21 수용체의 세포내 신호전달 도메인 또는 형질전환 성장인자 β (TGF β) 수용체의 세포내 신호전달 도메인이거나 이러한 도메인으로부터 유래된다.

[0052] 제1 폴리펩티드의 제1 세포내 신호전달 도메인은 예를 들면, 천연 T 림프구 수용체의 CD3 ζ (CD3 제타) 쇄와 유사한 방식으로 제1 폴리펩티드의 제1 항원 결합 도메인으로부터 항원 결합 신호를 전달할 수 있는 임의의 폴리펩티드일 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 세포내 신호전달 도메인은 면역수용체 티로신-기초 활성화 모티프 (ITAM)를 포함하는 폴리펩티드 서열을 포함한다. 바람직하게는, 폴리펩티드 서열은 CD3 ζ 신호전달 도메인 또는 이의 신호 전달도입 변이체이다.

[0053] 제2 폴리펩티드는 제2 항원이 제2 폴리펩티드의 제2 항원 결합 도메인에 결합할 때 제2 폴리펩티드가 보조자극을 제공할 수 있게 하는 하나 이상의 보조자극 도메인을 포함한다. 임의의 보조자극 모티프 또는 이의 기능성 부분이 사용될 수 있다. 일부 구체적인 실시양태에서, 하나 이상의 보조자극 도메인은 보조자극 CD27 폴리펩티드 서열, 보조자극 CD28 폴리펩티드 서열, 보조자극 OX40(CD134) 폴리펩티드 서열, 보조자극 4-1BB(CD137) 폴리펩티드 서열 및 보조자극 유도성 T 세포 보조자극(ICOS) 폴리펩티드 서열 중 하나 이상을 포함한다.

[0054] 제1 항원은 임의의 관심있는 항원, 예를 들면, 세포의 표면 상에서 발현되는 항원일 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 상기 제1 항원은 종양 세포 상의 항원, 예를 들면, TSA 또는 TAA, 예를 들면, 상기 단락 1.1에 개시된

TSA들 또는 TAA들 중 임의의 TSA 또는 TAA이다. 종양 세포는 예를 들면, 고형 종양 또는 혈액암의 세포일 수 있다.

[0055] 항원은 임의의 유형의 종양 또는 암의 세포, 예를 들면, 림프종, 폐암, 유방암, 전립선암, 부신피질암종, 갑상선암종, 코인두암종, 흑색종, 예를 들면, 악성 흑색종, 피부암종, 대장암종, 데스모이드(desmoid) 종양, 섬유조직형성 환형 소세포 종양, 내분비 종양, 에왕 육종, 말초 원시 신경외배엽 종양, 고형 생식 세포 종양, 간모세포종, 신경모세포종, 비-횡문근육종 연조직 육종, 골육종, 망막모세포종, 횡문근육종, 월름스 종양, 신경아교모세포종, 점액종, 섬유종, 지방종 등의 세포 상에서 발현되는 임의의 항원일 수 있다. 보다 더 구체적인 실시양태에서, 상기 림프종은 만성 림프구성 백혈병(소림프구성 림프종), B 세포 전구림프구성 백혈병, 림프형질세포성 림프종, 발렌스트롬 마크로글로불린혈증, 비장 변연부 림프종, 형질세포 골수종, 형질세포종, 림프절외 변연부 B 세포 림프종, MALT 림프종, 림프절 변연부 B 세포 림프종, 소포성 림프종, 맨틀 세포 림프종, 미만성 B 대세포 림프종, 종격(흉선) B 대세포 림프종, 혈관내 B 대세포 림프종, 일차 삼출 림프종, 베킷 림프종, T 림프구 전구림프구성 백혈병, T 림프구 대파립 림프구성 백혈병, 공격성 NK 세포 백혈병, 성인 T 림프구 백혈병/림프종, 림프절외 NK/T 림프구 림프종, 코-유형 또는 장병증-유형 T 림프구 림프종, 간비장 T 림프구 림프종, 모세포성 NK 세포 림프종, 균상식육종, 세자리 중후군, 일차 피부 역형성 대세포 림프종, 림프종모양 구진증, 혈관면역모세포성 T 림프구 림프종, 말초 T 림프구 림프종(비특정됨), 역형성 대세포 림프종, 호지킨 림프종 또는 비-호지킨 림프종일 수 있다.

[0056] 제2 항원은 제1 항원과 상이한 임의의 항원일 수 있으나, 바람직하게는 제1 항원과 관련되어 있다. 예를 들면, 제1 항원 및 제2 항원 둘다가 동일한 유형의 종양 세포 상에 존재하는 종양 관련 항원 또는 종양 특이적 항원일 수 있다. 바람직하게는, 제1 항원은 종양 관련 항원 또는 종양 특이적 항원이고, 제2 항원은 종양 관련 항원 또는 종양 특이적 항원이 아니다. 이러한 실시양태에서, 제2 항원은 일부 실시양태에서 종양, 예를 들면, 종양 환경의 양태와 관련되어 있다. 예를 들면, 종양은 종양을 둘러싸는 조직에서 염증 상태를 유도할 수 있고, 종양 내에서 및 종양 주변에서 혈관 신생을 촉진하는 혈관신생 성장인자, 인터류킨 및/또는 사이토카인을 방출할 수 있다. 따라서, 구체적인 실시양태에서, 제2 항원은 성장인자, 사이토카인 또는 인터류킨, 예를 들면, 혈관신생 또는 혈관형성과 관련된 성장인자, 사이토카인 또는 인터류킨이다. 이러한 성장인자, 사이토카인 또는 인터류킨은 예를 들면, 혈관 내피 성장인자(VEGF), 염기성 섬유모세포 성장인자(bFGF), 혈소판 유래의 성장인자(PDG), 간세포 성장인자(HGF), 인슐린 유사 성장인자(IGF) 또는 인터류킨-8(IL-8)을 포함할 수 있다.

[0057] 종양은 종양에 국한된 저산소성 환경을 생성할 수도 있다. 따라서, 다른 보다 더 구체적인 실시양태에서, 제2 키메라 수용체에 의한 신호 전달도입은 저산소증 관련 인자, 예를 들면, HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α , HIF-2 β , HIF-3 α 또는 HIF-3 β 의 활성화에 의해 유도되거나, 저산소성 반응 요소 활성화에 의해 유도된다.

[0058] 종양은 정상 조직에 대한 국한된 손상을 야기하여 손상 관련 분자 패턴 분자(DAMP; 알라민으로서도 공지되어 있음)로서 공지되어 있는 분자의 방출을 야기할 수도 있다. 일부 실시양태에서, 제2 항원은 DAMP, 예를 들면, 염증 단백질, 염색질 관련 단백질 고이동성 군 박스 1(HMGB1), S100A8(MRP8, 칼그래놀린 A), S100A9(MRP14, 칼그래놀린 B), 혈청 아밀로이드 A(SAA), 데옥시리보핵산, 아데노신 트라이포스페이트, 요산 또는 헤파린 셀레이트이다.

[0059] 항원 또는 주변 조직에 대한 천연 항원이 아닌 항원에 대한 키메라 수용체, 예를 들면, 제2 키메라 수용체 폴리펩티드를 유도할 수 있다. 예를 들면, 종양 세포 또는 주변 정상 조직의 세포는 이 세포 상의 하나 이상의 항원에 결합하는 항체와 접촉할 수 있다. 이 경우, 상기 항체 상의 임의의 항원 그 자체가 제2 키메라 수용체 폴리펩티드의 제2 항원 결합 부분에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 폴리펩티드의 제1 항원 결합 부분에 결합하는 제1 항원은 종양 세포에 의해 제시된 항원에 결합하는 항체 상의 항원이다. 일부 실시양태에서, 제2 폴리펩티드의 제2 항원 결합 부분에 결합하는 제2 항원은 종양 세포에 의해 제시된 항원에 결합하는 항체 상의 항원이다. 일부 실시양태에서, 제1 항원은 제1 항체 상의 항원이고, 제2 항원은 제2 항체 상의 항원이다. 이러한 실시양태에서, 제1 항체는 예를 들면, 종양 관련 항원 또는 종양 특이적 항원에 결합하는 항체일 수 있고, 제2 항체는 사이토카인, 인터류킨, 성장인자, DAMP, 또는 종양과 관련된 다른 비-TAA 또는 비-TSA 단백질에 대한 항체이다.

1.3. 구체적인 실시양태

[0060] 따라서, 한 구성에서, 본원은 a) 제1 항원에 결합하는 제1 세포외 항원 결합 도메인 및 세포내 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하되, 보조자극 도메인을 포함하지 않는 제1 폴리펩티드; 및 b) 혈관신생 또는 혈관형성 인자에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인 및 제2 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는

변경된 T 림프구를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 제1 신호전달 도메인 및 상기 제2 신호전달 도메인 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 최대 세포독성을 갖게 된다.

[0062] 또 다른 구성에서, 본원은 a) 제1 항원에 결합하는 scFv 또는 이의 항원 결합 부분 및 세포내 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하되, 보조자극 도메인을 포함하지 않는 제1 폴리펩티드; 및 b) 혈관신생 또는 혈관형성 인자에 결합하는 세포외 항원 결합 도메인 및 제2 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 제1 신호전달 도메인 및 상기 제2 신호전달 도메인 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 최대 세포독성을 갖게 된다.

[0063] 보다 더 구체적인 구성에서, 본원은 a) 종양 관련 항원(TAA) 또는 종양 특이적 항원(TSA)인 제1 항원에 결합하는 제1 세포외 항원 결합 도메인 및 세포내 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하되, 보조자극 도메인을 포함하지 않는 제1 폴리펩티드; 및 b) VEGF, bFGF, PDGF, HGF, IGF 또는 IL-8인 제2 항원에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인 및 제2 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 제1 신호전달 도메인 및 상기 제2 신호전달 도메인 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 최대 세포독성을 갖게 된다.

[0064] 또 다른 보다 더 구체적인 구성에서, 본원은 a) TAA 또는 TSA인 제1 항원에 결합하는 제1 세포외 항원 결합 도메인 및 제1 세포내 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하되, 보조자극 도메인을 포함하지 않는 제1 폴리펩티드; 및 b) VEGF, bFGF, PDGF, HGF, IGF 또는 IL-8인 제2 항원에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인, 및 CD27, CD28, OX40, ICOS 및 4-1BB 중 하나 이상으로부터의 보조자극 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 제1 신호전달 도메인 및 상기 제2 신호전달 도메인 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 최대 세포독성을 갖게 된다.

[0065] 또 다른 보다 더 구체적인 구성에서, 본원은 a) Her2, PSCA, PSMA, BCMA, ERK5, AFP, CEA, CA-125, CA19-9, 칼레티닌, MUC-1, EMA, ETA, 티로시나제, MAGE, CD34, CD45, CD99, CD117, 크로모그라닌, 사이토케라틴, 데스민, GFAP, GCDFP-15, HMB-45 항원, MART-1, myo-D1, MSA, 신경필라멘트, NSE, 태반 알칼리성 포스파타제, 시냅토파이신, 티로글로불린, 갑상선 전사 인자-1, 종양 M2-PK, CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2(강글리오사이드 G2), EGFRvIII(표피 성장인자 변이체 III), 정자 단백질 17(Sp17), 메소텔린, PAP(전립선 산 포스파타제), 프로스테인, TARP(T 세포 수용체 γ 대안적 판독 프레임 단백질), Trp-p8, STEAP1(전립선의 6-경막 상피 항원 1), 비정상적인 ras 단백질 또는 비정상적인 p53 단백질인 제1 항원에 결합하는 세포외 항원 결합 도메인 및 세포내 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하되, 보조자극 도메인을 포함하지 않는 제1 폴리펩티드; 및 b) VEGF, bFGF, PDGF, HGF, IGF 또는 IL-8인 제2 항원에 결합하는 세포외 항원 결합 도메인, 및 CD27, CD28, OX40, ICOS 및 4-1BB 중 하나 이상으로부터의 보조자극 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 제1 신호전달 도메인 및 상기 제2 신호전달 도메인 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 최대 세포독성을 갖게 된다.

[0066] 또 다른 보다 더 구체적인 구성에서, 본원은 a) Her2, PSCA, PSMA, BCMA, ERK5, AFP, CEA, CA-125, CA19-9, 칼레티닌, MUC-1, EMA, ETA, 티로시나제, MAGE, CD34, CD45, CD99, CD117, 크로모그라닌, 사이토케라틴, 데스민, GFAP, GCDFP-15, HMB-45 항원, MART-1, myo-D1, MSA, 신경필라멘트, NSE, 태반 알칼리성 포스파타제, 시냅토파이신, 티로글로불린, 갑상선 전사 인자-1, 종양 M2-PK, CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2(강글리오사이드 G2), EGFRvIII(표피 성장인자 변이체 III), 정자 단백질 17(Sp17), 메소텔린, PAP(전립선 산 포스파타제), 프로스테인, TARP(T 세포 수용체 γ 대안적 판독 프레임 단백질), Trp-p8, STEAP1(전립선의 6-경막 상피 항원 1), 비정상적인 ras 단백질 또는 비정상적인 p53 단백질인 제1 항원에 결합하는 제1 세포외 항원 결합 도메인 및 세포내 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하되, 보조자극 도메인을 포함하지 않는 제1 폴리펩티드; 및 b) VEGF, bFGF, PDGF, HGF, IGF 또는 IL-8인 제2 항원에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인, 및 CD27, CD28, OX40, ICOS 및 4-1BB 각각으로부터의 보조자극 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 제1 신호전달 도메인 및 상기 제2 신호전달 도메인 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 최대 세포독성을 갖게 된다.

[0067] 또 다른 보다 더 구체적인 구성에서, 본원은 a) Her2, PSCA, PSMA, BCMA, ERK5, AFP, CEA, CA-125, CA19-9, 칼레티닌, MUC-1, EMA, ETA, 티로시나제, MAGE, CD34, CD45, CD99, CD117, 크로모그라닌, 사이토케라틴, 데스민,

GFAP, GCDFP-15, HMB-45 항원, MART-1, myo-D1, MSA, 신경필라멘트, NSE, 태반 알칼리성 포스파타제, 시냅토파이신, 티로글로불린, 갑상선 전사 인자-1, 종양 M2-PK, CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2(강글리오사이드 G2), EGFRvIII(표피 성장인자 변이체 III), 정자 단백질 17(Sp17), 메소텔린, PAP(전립선 산 포스파타제), 프로스테인, TARP(T 세포 수용체 γ 대안적 판독 프레임 단백질), Trp-p8, STEAP1(전립선의 6-경막 상피 항원 1), 비정상적인 ras 단백질 또는 비정상적인 p53 단백질인 제1 항원에 결합하는 scFv 또는 이의 항원 결합 부분 및 세포내 CD3ζ 신호전달 도메인을 포함하되, 보조자극 도메인을 포함하지 않는 제1 폴리펩티드; 및 b) VEGF, bFGF, PDGF, HGF, IGF 또는 IL-8인 제2 항원에 결합하는 세포외 항원 결합 도메인, 및 CD27, CD28, OX40, ICOS 및 4-1BB 각각으로부터의 보조자극 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 제1 신호전달 도메인 및 상기 제2 신호전달 도메인 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 최대 세포독성을 갖게 된다.

[0068] 상기 구체적인 구성들 중 임의의 구체적인 구성에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드 중 어느 하나 또는 둘다가 T 세포 생존 모티프, 예를 들면, CD28, IL-7R, IL-12R, IL-15R, IL-21R 또는 TGFβR로부터의 T 세포 생존 모티프를 포함한다.

1.4. 제3 구성, 기본 구조

[0069] 변경된 T 림프구 내에 포함되는 2개의 폴리펩티드들(예를 들면, 키메라 수용체들)은 제1 항원, 예를 들면, TAA 또는 TSA와 제1 폴리펩티드의 제1 항원 결합 도메인의 결합이 일차 항원 결합 신호가 아니라 보조자극 신호를 생성하고, 제2 항원의 결합이 일차 항원 결합 신호를 생성하도록 구축될 수 있다. 이러한 구성은 T 림프구를 완전히 활성화시키기 위해 2개의 항원 결합 사건이 일어나야 한다는 점에서 상기 제1 구성과 동일한 장점을 가질 것이다.

[0070] 따라서, 본원은 a) 제1 항원에 결합하는 제1 세포외 항원 결합 도메인 및 제1 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드; 및 b) 제2 항원에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인 및 제2 세포내 신호전달 도메인을 포함하되, 보조자극 도메인을 포함하지 않는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구를 제공하고, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 제1 신호전달 도메인 및 상기 제2 신호전달 도메인 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 최대 세포독성을 갖게 된다. 전술된 바와 같이, 제1 항원 및 제2 항원은 상이한 항원이다. 구체적인 실시양태에서, 제2 항원과 제2 항원 결합 도메인의 결합의 부재 하에서 제1 항원과 제1 항원 결합 도메인의 결합, 또는 제1 항원과 제1 항원 결합 도메인의 결합의 부재 하에서 제2 항원과 제2 항원 결합 도메인의 결합은 상기 변경된 T 림프구의 무반응을 유도한다.

[0071] 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인은 독립적으로 임의의 항원 결합 도메인, 예를 들면, 상기 단락 1.2에 개시된 항원 결합 도메인들 중 임의의 항원 결합 도메인, 예를 들면, 수용체의 항원 결합 부분 또는 항체의 항원 결합 부분이다. 보다 더 구체적인 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인 중 어느 하나 또는 둘다가 scFv 항체 단편이다.

[0072] 제1 폴리펩티드는 제1 항원이 제1 폴리펩티드의 제1 항원 결합 도메인에 결합할 때 제1 폴리펩티드가 보조자극을 제공할 수 있게 하는 하나 이상의 보조자극 도메인을 포함한다. 임의의 보조자극 모티프 또는 이의 기능성 부분이 사용될 수 있다. 일부 구체적인 실시양태에서, 하나 이상의 보조자극 도메인은 보조자극 CD27 폴리펩티드 서열, 보조자극 CD28 폴리펩티드 서열, 보조자극 OX40(CD134) 폴리펩티드 서열, 보조자극 4-1BB(CD137) 폴리펩티드 서열 및 보조자극 유도성 T 세포 보조자극(ICOS) 폴리펩티드 서열 중 하나 이상을 포함한다.

[0073] 제2 폴리펩티드의 제2 세포내 신호전달 도메인은 예를 들면, 천연 T 림프구 수용체의 CD3ζ (CD3 제타) 쇄와 유사한 방식으로 제2 폴리펩티드의 제2 항원 결합 도메인으로부터 항원 결합 신호를 전달할 수 있는 임의의 폴리펩티드일 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 세포내 신호전달 도메인은 면역수용체 티로신-기초 활성화 모티프 (ITAM)를 포함하는 폴리펩티드 서열을 포함한다. 바람직하게는, 폴리펩티드 서열은 CD3ζ 신호전달 도메인 또는 이의 신호 전달도입 변이체이다.

[0074] 일부 실시양태에서, 제1 폴리펩티드 또는 제2 폴리펩티드는 경막 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 폴리펩티드는 제1 항원이 제1 폴리펩티드의 제1 항원 결합 도메인에 결합할 때 제1 폴리펩티드가 보조자극을 제공할 수 있게 하는 하나 이상의 보조자극 도메인을 포함한다. 임의의 보조자극 도메인 또는 이의 기능성 부분, 예를 들면, CD27, CD28, OX40, ICOS 및 4-1BB 각각으로부터의 보조자극 신호전달 도메인이 사용될 수 있다. 일부 다른 실시양태에서, 제1 폴리펩티드 또는 제2 폴리펩티드는 T 세포 생존 모티프를 포함한다.

[0076]

이 구성에서, 제1 항원은 임의의 관심있는 항원, 예를 들면, 세포의 표면 상에서 발현되는 항원일 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 상기 제1 항원은 종양 세포 상의 항원이다. 종양 세포는 예를 들면, 고형 종양 또는 혈액암, 예를 들면, 상기 단락 1.2에 개시된 유형의 암들 또는 종양들 중 임의의 암 또는 종양의 세포일 수 있다. 일부 구체적인 실시양태에서, 상기 항원은 TAA 또는 TSA, 예를 들면, 상기 단락 1.1에 개시된 TAA들 또는 TSA들 중 임의의 TAA 또는 TSA이다.

[0077]

제2 항원은 제1 항원과 상이한 임의의 항원일 수 있으나, 바람직하게는 제1 항원과 관련되어 있다. 예를 들면, 제1 항원 및 제2 항원 둘다가 동일한 유형의 종양 세포 상에 존재하는 종양 관련 항원 또는 종양 특이적 항원일 수 있다. 바람직하게는, 제1 항원은 TAA 또는 TSA이고, 제2 항원은 TAA 또는 TSA가 아니다. 이러한 실시양태에서, 제2 항원은 일부 실시양태에서 종양, 예를 들면, 종양 환경의 양태와 관련되어 있다. 예를 들면, 종양은 종양을 둘러싸는 조직에서 염증 상태를 유도할 수 있고, 종양 내에서 및 종양 주변에서 혈관신생을 촉진하는 혈관신생 성장인자, 인터류킨 및/또는 사이토카인을 방출할 수 있다. 따라서, 특정 실시양태에서, 제2 항원은 성장인자, 사이토카인 또는 인터류킨, 예를 들면, 혈관신생 또는 혈관형성과 관련된 성장인자, 사이토카인 또는 인터류킨, 예를 들면, VEGF, bFGF, PDGF, HGF, IGF 또는 IL-8이다. 다른 보다 더 구체적인 실시양태에서, 제2 키메라 수용체에 의한 신호 전달도입은 저산소증 관련 인자, 예를 들면, HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α , HIF-2 β , HIF-3 α 또는 HIF-3 β 의 활성화에 의해 유도된다. 일부 다른 실시양태에서, 제2 항원은 DAMP, 예를 들면, 열 충격 단백질, HMGB1, S100A8(MRP8, 칼그래놀린 A), S100A9(MRP14, 칼그래놀린 B), SAA, 데옥시리보핵산, 아데노신 트라이포스페이트, 요산 또는 헤파린 셀페이트이다.

[0078]

1.5. 구체적인 실시양태

[0079]

따라서, 한 구성에서, 본원은 a) 제1 항원에 결합하는 제1 세포의 항원 결합 도메인 및 제1 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드; 및 b) 혈관신생 또는 혈관형성 인자에 결합하는 제2 세포의 항원 결합 도메인 및 세포내 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하되, 보조자극 도메인을 포함하지 않는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 제1 신호전달 도메인 및 상기 제2 신호전달 도메인 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 최대 세포독성을 갖게 된다.

[0080]

또 다른 구성에서, 본원은 a) 제1 항원에 결합하는 scFv 또는 이의 항원 결합 부분 및 제1 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드; 및 b) 혈관신생 또는 혈관형성 인자에 결합하는 제2 세포의 항원 결합 도메인 및 세포내 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하되, 보조자극 도메인을 포함하지 않는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 제1 신호전달 도메인 및 상기 제2 신호전달 도메인 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 최대 세포독성을 갖게 된다.

[0081]

보다 더 구체적인 구성에서, 본원은 a) 종양 관련 항원(TAA) 또는 종양 특이적 항원(TSA)인 제1 항원에 결합하는 제1 세포의 항원 결합 도메인 및 제1 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드; 및 b) VEGF, bFGF, PDGF, HGF, IGF 또는 IL-8인 제2 항원에 결합하는 제2 세포의 항원 결합 도메인 및 세포내 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하되, 보조자극 도메인을 포함하지 않는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 제1 신호전달 도메인 및 상기 제2 신호전달 도메인 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 최대 세포독성을 갖게 된다.

[0082]

또 다른 보다 더 구체적인 구성에서, 본원은 a) TAA 또는 TSA인 제1 항원에 결합하는 제1 세포의 항원 결합 도메인, 및 CD27, CD28, OX40, ICOS 및 4-1BB 중 하나 이상으로부터의 보조자극 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드; 및 b) VEGF, bFGF, PDGF, HGF, IGF 또는 IL-8인 제2 항원에 결합하는 제2 세포의 항원 결합 도메인 및 세포내 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하되, 보조자극 도메인을 포함하지 않는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 제1 신호전달 도메인 및 상기 제2 신호전달 도메인 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 최대 세포독성을 갖게 된다.

[0083]

또 다른 보다 더 구체적인 구성에서, 본원은 a) Her2, PSCA, PSMA, BCMA, ERK5, AFP, CEA, CA-125, CA19-9, 칼레티닌, MUC-1, EMA, ETA, 티로시나제, MAGE, CD34, CD45, CD99, CD117, 크로모그라닌, 사이토케라틴, 데스민, GFAP, GCDFP-15, HMB-45 항원, MART-1, myo-D1, MSA, 신경필라멘트, NSE, 태반 알칼리성 포스파타제, 시냅토파이신, 티로글로불린, 갑상선 전사 인자-1, 종양 M2-PK, CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2(강글리오사이드 G2), EGFRvIII(표피 성장인자 변이체 III), 정자 단백질 17(Sp17), 메소텔린, PAP(전립선 산 포스파타제), 프로스테인, TARP(T 세포 수용체 γ 대안적 판독 프레임 단백질), Trp-p8, STEAP1(전립선의 6-경막 상피 항원 1), 비정상적인 ras 단백질 또는 비정상적인 p53 단백질인 제1 항원에 결합하는 세포의 항원 결합 도메인, 및 CD27,

CD28, OX40, ICOS 및 4-1BB 중 하나 이상으로부터의 보조자극 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드; 및 b) VEGF, bFGF, PDGF, HGF, IGF 또는 IL-8인 제2 항원에 결합하는 세포외 항원 결합 도메인 및 세포내 CD3ζ 신호전달 도메인을 포함하되, 보조자극 도메인을 포함하지 않는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 제1 신호전달 도메인 및 상기 제2 신호전달 도메인 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 최대 세포독성을 갖게 된다.

[0084] 또 다른 보다 더 구체적인 구성에서, 본원은 a) Her2, PSCA, PSMA, BCMA, ERK5, AFP, CEA, CA-125, CA19-9, 칼레티닌, MUC-1, EMA, ETA, 티로시나제, MAGE, CD34, CD45, CD99, CD117, 크로모그라닌, 사이토케라틴, 테스민, GFAP, GCDFP-15, HMB-45 항원, MART-1, myo-D1, MSA, 신경필라멘트, NSE, 태반 알칼리성 포스파타제, 시냅토파이신, 티로글로불린, 갑상선 전사 인자-1, 종양 M2-PK, CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2(강글리오사이드 G2), EGFRvIII(표피 성장인자 변이체 III), 정자 단백질 17(Sp17), 메소텔린, PAP(전립선 산 포스파타제), 프로스테인, TARP(T 세포 수용체 γ 대안적 판독 프레임 단백질), Trp-p8, STEAP1(전립선의 6-경막 상피 항원 1), 비정상적인 ras 단백질 또는 비정상적인 p53 단백질인 제1 항원에 결합하는 제1 세포외 항원 결합 도메인, 및 CD27, CD28, OX40, ICOS 및 4-1BB 각각으로부터의 보조자극 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드; 및 b) VEGF, bFGF, PDGF, HGF, IGF 또는 IL-8인 제2 항원에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인 및 세포내 CD3ζ 신호전달 도메인을 포함하되, 보조자극 도메인을 포함하지 않는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 제1 신호전달 도메인 및 상기 제2 신호전달 도메인 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 최대 세포독성을 갖게 된다.

[0085] 또 다른 보다 더 구체적인 구성에서, 본원은 a) Her2, PSCA, PSMA, BCMA, ERK5, AFP, CEA, CA-125, CA19-9, 칼레티닌, MUC-1, EMA, ETA, 티로시나제, MAGE, CD34, CD45, CD99, CD117, 크로모그라닌, 사이토케라틴, 테스민, GFAP, GCDFP-15, HMB-45 항원, MART-1, myo-D1, MSA, 신경필라멘트, NSE, 태반 알칼리성 포스파타제, 시냅토파이신, 티로글로불린, 갑상선 전사 인자-1, 종양 M2-PK, CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2(강글리오사이드 G2), EGFRvIII(표피 성장인자 변이체 III), 정자 단백질 17(Sp17), 메소텔린, PAP(전립선 산 포스파타제), 프로스테인, TARP(T 세포 수용체 γ 대안적 판독 프레임 단백질), Trp-p8, STEAP1(전립선의 6-경막 상피 항원 1), 비정상적인 ras 단백질 또는 비정상적인 p53 단백질인 제1 항원에 결합하는 scFv 또는 이의 항원 결합 부분인 제1 세포외 항원 결합 도메인, 및 CD27, CD28, OX40, ICOS 및 4-1BB 각각으로부터의 보조자극 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하되, 보조자극 도메인을 포함하지 않는 제1 폴리펩티드; 및 b) VEGF, bFGF, PDGF, HGF, IGF 또는 IL-8인 제2 항원에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인 및 세포내 CD3ζ 신호전달 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 제1 신호전달 도메인 및 상기 제2 신호전달 도메인 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 최대 세포독성을 갖게 된다.

[0086] 상기 구체적인 구성들 중 임의의 구체적인 구성에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드 중 어느 하나 또는 둘다가 T 세포 생존 모티프, 예를 들면, CD28, IL-7R, IL-12R, IL-15R, IL-21R 또는 TGFβR로부터의 T 세포 생존 모티프를 포함한다.

1.6. 제4 구성, 기본 구조

[0087] 제4 구성에서, 변경된 T 림프구 내에 함유되는 2개의 키메라 수용체들은 제1 항원에 대해 유도된 제1 키메라 수용체가 일차 항원 결합 신호전달 도메인 및 보조자극 도메인 둘다를 포함하되, T 세포 생존 모티프를 포함하는 폴리펩티드 서열을 포함하지 않는 반면, 제2 항원에 대해 유도된 제2 키메라 수용체가 T 세포 생존 모티프를 포함하는 폴리펩티드 서열을 포함하도록 구축될 수 있다. 이 구성에서, T 림프구는 원하는 항원을 발현하는 세포에 대해 유도되고, 항원과의 결합 시 항원 결합 신호 및 보조자극 신호가 생성되나, 제2 키메라 수용체와 제2 항원의 결합의 부재 하에서 T 림프구는 생존하도록 유도되지 않는다. 따라서, 오프-종양 효과도 제거되거나 감소된다.

[0088] 따라서, 본원은 a) 제1 항원에 결합하는 제1 세포외 항원 결합 도메인, 신호전달 도메인 및 하나 이상의 보조자극 모티프를 포함하는 제1 폴리펩티드; 및 b) 제2 항원에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인 및 T 세포 생존 모티프를 포함하되, 보조자극 모티프를 포함하지 않는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 신호전달 도메인 및 상기 T 세포 생존 모티프 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 생존한다. 일부 실시양태에서, T 세포 생존 모티프는 IL-7 수용

체 세포내 T 세포 생존 모티프이다. 일부 실시양태에서, T 세포 생존 모티프는 CD28, IL-7R, IL-12R, IL-15R, IL-21R 또는 TGF β R로부터 유래된 T 세포 생존 모티프이다. 일부 실시양태에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드 중 어느 하나 또는 둘다가 경막 도메인을 포함한다. 보다 더 구체적인 실시양태에서, 제2 폴리펩티드는 T 세포 생존 모티프를 포함하는 CD27, CD28, IL-7R, IL-12R, IL-15R, IL-21R 또는 TGF β R의 도메인을 포함한다.

[0090] 전술된 바와 같이, 구조적으로 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인은 독립적으로 임의의 항원 결합 도메인, 예를 들면, 상기 단락 1.2에 개시된 항원 결합 도메인들 중 임의의 항원 결합 도메인, 예를 들면, 수용체의 항원 결합 부분 또는 항체의 항원 결합 부분이다. 보다 더 구체적인 실시양태에서, 상기 제1 항원 결합 도메인 및 상기 제2 항원 결합 도메인 중 어느 하나 또는 둘다가 scFv 항체 단편이다. 제1 항원은 임의의 관심 있는 항원, 예를 들면, 세포의 표면 상에서 발현되는 항원일 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 제1 항원은 종양 세포 상의 항원이다. 종양 세포는 예를 들면, 고형 종양 또는 혈액암, 예를 들면, 상기 단락 1.2에 개시된 유형의 암들 또는 종양들 중 임의의 암 또는 종양의 세포일 수 있다. 일부 구체적인 실시양태에서, 상기 항원은 TAA 또는 TSA, 예를 들면, 상기 단락 1.1에 개시된 TAA들 또는 TSA들 중 임의의 TAA 또는 TSA이다. 제1 항원과 상이한 제2 항원은 혈관신생 또는 혈관형성 인자, 예를 들면, 상기 단락 1.1에 개시된 혈관신생 또는 혈관형성 인자들 중 임의의 혈관신생 또는 혈관형성 인자; 또는 임의의 DAMP, 예를 들면, 상기 단락 1.1에 개시된 DAMP들 중 임의의 DAMP일 수 있다. 다른 구체적인 실시양태에서, 제2 키메라 수용체에 의한 신호 전달도입은 저산소증 관련 인자, 예를 들면, HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α , HIF-2 β , HIF-3 α 또는 HIF-3 β 의 활성화에 의해 유도된다.

[0091] 제1 폴리펩티드의 제1 세포내 신호전달 도메인은 예를 들면, 천연 T 림프구 수용체의 CD3 ζ (CD3 제타) 쇄와 유사한 방식으로 제1 폴리펩티드의 제1 항원 결합 도메인으로부터 항원 결합 신호를 전달할 수 있는 임의의 폴리펩티드일 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 세포내 신호전달 도메인은 면역수용체 티로신-기초 활성화 모티프 (ITAM)를 포함하는 폴리펩티드 서열을 포함한다. 바람직하게는, 상기 폴리펩티드 서열은 CD3 ζ 신호전달 도메인 또는 이의 신호 전달도입 변이체이다. 제1 폴리펩티드는 하나 이상의 보조자극 도메인, 예를 들면, 임의의 보조자극 모티프 또는 이의 기능성 부분, 예를 들면, 보조자극 CD27, CD28, OX40(CD134), 4-1BB(CD137) 또는 ICOS 폴리펩티드 서열을 추가로 포함한다.

1.7. 구체적인 실시양태

[0093] 한 구성에서, 본원은 a) 제1 항원에 결합하는 제1 세포외 항원 결합 도메인, 세포내 CD3 ζ 신호전달 도메인 및 하나 이상의 보조자극 모티프를 포함하는 제1 폴리펩티드; 및 b) 제2 항원에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인 및 T 세포 생존 모티프를 포함하되, 보조자극 모티프를 포함하지 않는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 신호전달 도메인 및 상기 T 세포 생존 모티프 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 생존한다.

[0094] 또 다른 구성에서, 본원은 a) 제1 항원에 결합하는 제1 세포외 항원 결합 도메인, 세포내 CD3 ζ 신호전달 도메인, 및 CD27, CD28, OX40(CD134), 4-1BB(CD137) 또는 ICOS로부터의 보조자극 폴리펩티드 서열을 포함하는 제1 폴리펩티드; 및 b) 제2 항원에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인 및 T 세포 생존 모티프를 포함하되, 보조자극 모티프를 포함하지 않는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 신호전달 도메인 및 상기 T 세포 생존 모티프 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 생존한다.

[0095] 또 다른 구성에서, 본원은 a) 제1 항원에 결합하는 제1 세포외 항원 결합 도메인, 세포내 CD3 ζ 신호전달 도메인, 및 CD27, CD28, OX40(CD134), 4-1BB(CD137) 또는 ICOS로부터의 보조자극 폴리펩티드 서열을 포함하는 제1 폴리펩티드; 및 b) 혈관신생 또는 혈관형성 인자 또는 DAMP인 제2 항원에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인 및 T 세포 생존 모티프를 포함하되, 보조자극 모티프를 포함하지 않는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 신호전달 도메인 및 상기 T 세포 생존 모티프 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 생존한다. 다른 보다 더 구체적인 실시양태에서, 제2 키메라 수용체에 의한 신호 전달도입은 저산소증 관련 인자, 예를 들면, HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α , HIF-2 β , HIF-3 α 또는 HIF-3 β 의 활성화에 의해 유도된다.

[0096] 또 다른 구성에서, 본원은 a) 제1 항원에 결합하는 제1 세포외 항원 결합 도메인, 세포내 CD3 ζ 신호전달 도메인, 및 CD27, CD28, OX40(CD134), 4-1BB(CD137) 또는 ICOS로부터의 보조자극 폴리펩티드 서열을 포함하는 제1 폴리펩티드; 및 b) VEGF, bFGF, PDGF, HGF, IGF 또는 IL-8인 제2 항원에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인 및 T 세포 생존 모티프를 포함하되, 보조자극 모티프를 포함하지 않는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T

림프구를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 신호전달 도메인 및 상기 T 세포 생존 모티프 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 생존한다.

[0097] 또 다른 구성에서, 본원은 a) 제1 항원에 결합하는 제1 세포외 항원 결합 도메인, 세포내 CD3 ζ 신호전달 도메인, 및 CD28, OX40 및 4-1BB로부터의 보조자극 폴리펩티드 서열을 포함하는 제1 폴리펩티드; 및 b) 제2 항원에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인 및 T 세포 생존 모티프를 포함하되, 보조자극 모티프를 포함하지 않는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 신호전달 도메인 및 상기 T 세포 생존 모티프 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 생존한다.

[0098] 또 다른 구성에서, 본원은 a) TAA 또는 TSA인 제1 항원에 결합하는 제1 세포외 항원 결합 도메인, 세포내 CD3 ζ 신호전달 도메인, 및 CD27, CD28, OX40(CD134), 4-1BB(CD137) 또는 ICOS로부터의 보조자극 폴리펩티드 서열을 포함하는 제1 폴리펩티드; 및 b) 제2 항원에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인 및 T 세포 생존 모티프를 포함하되, 보조자극 모티프를 포함하지 않는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 신호전달 도메인 및 상기 T 세포 생존 모티프 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 생존한다.

[0099] 또 다른 구성에서, 본원은 a) TAA 또는 TSA인 제1 항원에 결합하는 제1 세포외 항원 결합 도메인, 세포내 CD3 ζ 신호전달 도메인, 및 CD27, CD28, OX40(CD134), 4-1BB(CD137) 또는 ICOS로부터의 보조자극 폴리펩티드 서열을 포함하는 제1 폴리펩티드; 및 b) VEGF, bFGF, PDGF, HGF, IGF 또는 IL-8인 제2 항원에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인 및 T 세포 생존 모티프를 포함하되, 보조자극 모티프를 포함하지 않는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 신호전달 도메인 및 상기 T 세포 생존 모티프 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 생존한다.

[0100] 또 다른 구성에서, 본원은 a) Her2, PSCA, PSMA, BCMA, ERK5, AFP, CEA, CA-125, CA19-9, 칼레티닌, MUC-1, EMA, ETA, 티로시나제, MAGE, CD34, CD45, CD99, CD117, 크로모그라닌, 사이토케라틴, 데스민, GFAP, GCDFP-15, HMB-45 항원, MART-1, myo-D1, MSA, 신경필라멘트, NSE, 태반 알칼리성 포스파타제, 시냅토파이신, 티로글로불린, 갑상선 전사 인자-1, 종양 M2-PK, CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2(강글리오사이드 G2), EGFRvIII (표피 성장인자 변이체 III), 정자 단백질 17(Sp17), 메소텔린, PAP(전립선 산 포스파타제), 프로스테인, TARP(T 세포 수용체 γ 대안적 판독 프레임 단백질), Trp-p8, STEAP1(전립선의 6-경막 상피 항원 1), 비정상적인 ras 단백질 또는 비정상적인 p53 단백질인 제1 항원에 결합하는 제1 세포외 항원 결합 도메인, 세포내 CD3 ζ 신호전달 도메인, 및 CD27, CD28, OX40(CD134), 4-1BB(CD137) 또는 ICOS로부터의 보조자극 폴리펩티드 서열을 포함하는 제1 폴리펩티드; 및 b) 제2 항원에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인 및 T 세포 생존 모티프를 포함하되, 보조자극 모티프를 포함하지 않는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 신호전달 도메인 및 상기 T 세포 생존 모티프 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 생존한다.

[0101] 또 다른 구성에서, 본원은 a) Her2, PSCA, PSMA, BCMA, ERK5, AFP, CEA, CA-125, CA19-9, 칼레티닌, MUC-1, EMA, ETA, 티로시나제, MAGE, CD34, CD45, CD99, CD117, 크로모그라닌, 사이토케라틴, 데스민, GFAP, GCDFP-15, HMB-45 항원, MART-1, myo-D1, MSA, 신경필라멘트, NSE, 태반 알칼리성 포스파타제, 시냅토파이신, 티로글로불린, 갑상선 전사 인자-1, 종양 M2-PK, CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2(강글리오사이드 G2), EGFRvIII (표피 성장인자 변이체 III), 정자 단백질 17(Sp17), 메소텔린, PAP(전립선 산 포스파타제), 프로스테인, TARP(T 세포 수용체 γ 대안적 판독 프레임 단백질), Trp-p8, STEAP1(전립선의 6-경막 상피 항원 1), 비정상적인 ras 단백질 또는 비정상적인 p53 단백질인 제1 항원에 결합하는 제1 세포외 항원 결합 도메인, 세포내 CD3 ζ 신호전달 도메인, 및 CD27, CD28, OX40 및 4-1BB 각각으로부터의 보조자극 폴리펩티드 서열을 포함하는 제1 폴리펩티드; 및 b) VEGF, bFGF, PDGF, HGF, IGF 또는 IL-8인 제2 항원에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인 및 T 세포 생존 모티프를 포함하되, 보조자극 모티프를 포함하지 않는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 신호전달 도메인 및 상기 T 세포 생존 모티프 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 생존한다.

[0102] 또 다른 구성에서, 본원은 a) Her2, PSCA, PSMA, BCMA, ERK5, AFP, CEA, CA-125, CA19-9, 칼레티닌, MUC-1, EMA, ETA, 티로시나제, MAGE, CD34, CD45, CD99, CD117, 크로모그라닌, 사이토케라틴, 데스민, GFAP, GCDFP-15, HMB-45 항원, MART-1, myo-D1, MSA, 신경필라멘트, NSE, 태반 알칼리성 포스파타제, 시냅토파이신, 티로글로불린, 갑상선 전사 인자-1, 종양 M2-PK, CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2(강글리오사이드 G2), EGFRvIII (표피 성장인자 변이체 III), 정자 단백질 17(Sp17), 메소텔린, PAP(전립선 산 포스파타제), 프로스테인,

TARP(T 세포 수용체 γ 대안적 판독 프레임 단백질), Trp-p8, STEAP1(전립선의 6-경막 상피 항원 1), 비정상적인 ras 단백질 또는 비정상적인 p53 단백질에 결합하는 제1 세포외 항원 결합 도메인, 세포내 CD3 ζ 신호전달 도메인, 및 CD27, CD28, OX40 및 4-1BB 각각으로부터의 보조자극 폴리펩티드 서열을 포함하는 제1 폴리펩티드; 및 b) VEGF에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인을 포함하되, 보조자극 모티프를 포함하지 않는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 신호전달 도메인 및 상기 T 세포 생존 모티프 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 생존한다.

[0103] 1.8. 제5 구성, 기본 구조

[0104] 제5 구성에서, 변경된 T 림프구 내에 함유되는 2개의 키메라 수용체들은 제1 항원에 대해 유도된 제1 키메라 수용체가 제1 세포외 항원 결합 도메인 및 T 세포 생존 모티프, 예를 들면, 세포내 T 세포 생존 모티프를 포함하되, 일차 항원 결합 신호전달 도메인(예를 들면, CD3 ζ) 및 보조자극 도메인을 포함하지 않는 반면, 제2 항원에 대해 유도된 제2 키메라 수용체가 일차 항원 결합 신호전달 도메인(예를 들면, CD3 ζ) 및 하나 이상의 보조자극 도메인을 포함하는 폴리펩티드 서열을 포함하도록 구축될 수 있다. 이 구성에서, T 림프구는 원하는 항원을 발현하는 세포에 대해 유도되고, 항원과의 결합 시 T 림프구 생존 신호가 생성되나, 제2 키메라 수용체와 제2 항원의 결합의 부재 하에서 항원 결합 신호 및 보조자극 신호가 생성되지 않기 때문에, T 림프구는 활성화되지 않는다. 따라서, 오프-종양 효과도 제거되거나 감소된다.

[0105] 따라서, 본원은 a) 제1 항원에 결합하는 제1 세포외 항원 결합 도메인 및 T 세포 생존 모티프를 포함하되, 일차 항원 결합 신호전달 도메인 또는 보조자극 모티프를 포함하지 않는 제1 폴리펩티드; 및 b) 제2 항원에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인 및 하나 이상의 보조자극 모티프를 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 제1 신호전달 도메인 및 상기 제2 신호전달 도메인 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 생존하고 활성화된다. 일부 실시양태에서, T 세포 생존 모티프는 IL-7 수용체 세포내 T 세포 생존 모티프이다. 일부 실시양태에서, T 세포 생존 모티프는 CD28, IL-7R, IL-12R, IL-15R, IL-21R 또는 TGFβR로부터의 T 세포 생존 모티프이다. 일부 실시양태에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드 중 어느 하나 또는 둘다가 경막 도메인을 포함한다. 보다 더 구체적인 실시양태에서, 제1 폴리펩티드는 T 세포 생존 모티프를 포함하는 CD27, CD28, IL-7R, IL-12R, IL-15R, IL-21R 또는 TGFβR의 도메인을 포함한다.

[0106] 전술된 바와 같이, 구조적으로 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인은 독립적으로 임의의 항원 결합 도메인, 예를 들면, 상기 단락 1.2에 개시된 유형의 항원 결합 도메인들 중 임의의 항원 결합 도메인, 예를 들면, 수용체의 항원 결합 부분 또는 항체의 항원 결합 부분이다. 보다 더 구체적인 실시양태에서, 상기 제1 항원 결합 도메인 및 상기 제2 항원 결합 도메인 중 어느 하나 또는 둘다가 scFv 항체 단편이다. 제1 항원은 임의의 관심있는 항원, 예를 들면, 세포의 표면 상에서 발현되는 항원일 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 제1 항원은 종양 세포 상의 항원이다. 종양 세포는 예를 들면, 고형 종양 또는 혈액암, 예를 들면, 상기 단락 1.2에 개시된 유형의 암들 또는 종양들 중 임의의 암 또는 종양의 세포일 수 있다. 일부 구체적인 실시양태에서, 상기 항원은 TAA 또는 TSA, 예를 들면, 상기 단락 1.1에 개시된 TAA들 또는 TSA들 중 임의의 TAA 또는 TSA이다. 제1 항원과 상이한 제2 항원은 혈관신생 또는 혈관형성 인자, 예를 들면, 상기 단락 1.1에 개시된 혈관신생 또는 혈관형성 인자들 중 임의의 혈관신생 또는 혈관형성 인자; 또는 임의의 DAMP, 예를 들면, 상기 단락 1.1에 개시된 DAMP들 중 임의의 DAMP일 수 있다. 다른 보다 더 구체적인 실시양태에서, 제2 키메라 수용체에 의한 신호 전달도입은 저산소증 관련 인자, 예를 들면, HIF-1α, HIF-1β, HIF-2α, HIF-2β, HIF-3α 또는 HIF-3β의 활성화에 의해 유도된다.

[0107] 제2 폴리펩티드의 세포내 신호전달 도메인은 예를 들면, 천연 T 림프구 수용체의 CD3 ζ(CD3 제타) 쇄와 유사한 방식으로 제2 폴리펩티드의 항원 결합 도메인으로부터 항원 결합 신호를 전달할 수 있는 임의의 폴리펩티드일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 세포내 신호전달 도메인은 면역수용체 티로신-기초 활성화 모티프(ITAM)를 포함하는 폴리펩티드 서열을 포함한다. 바람직하게는, 상기 폴리펩티드 서열은 CD3 ζ 신호전달 도메인 또는 이의 신호 전달도입 변이체이다. 제2 폴리펩티드는 하나 이상의 보조자극 도메인, 예를 들면, 임의의 보조자극 모티프 또는 이의 기능성 부분, 예를 들면, 보조자극 CD27, CD28, OX40(CD134), 4-1BB(CD137) 또는 ICOS 폴리펩티드 서열을 추가로 포함한다.

[0108] 1.9. 구체적인 실시양태

[0109] 한 구성에서, 본원은 a) 제1 항원에 결합하는 제1 세포외 항원 결합 도메인 및 T 세포 생존 모티프를 포함하되, 일차 항원 결합 신호전달 도메인을 포함하지 않고 보조자극 모티프를 포함하지 않는 제1 폴리펩티드; 및 b) 제2

항원에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인, 세포내 CD3 ζ 신호전달 도메인 및 하나 이상의 보조자극 모티프를 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 신호전달 도메인 및 상기 T 세포 생존 모티프가 각각 상기 제2 항원 및 상기 제1 항원에 의해 활성화될 때에만 활성화되고 생존한다.

[0110] 또 다른 구성에서, 본원은 a) 제1 항원에 결합하는 제1 세포외 항원 결합 도메인 및 T 세포 생존 모티프를 포함하되, 일차 항원 결합 신호전달 도메인을 포함하지 않고 보조자극 모티프를 포함하지 않는 제1 폴리펩티드; 및 b) 제2 항원에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인, 세포내 CD3 ζ 신호전달 도메인, 및 CD27, CD28, OX40(CD134), 4-1BB(CD137) 또는 ICOS로부터의 보조자극 폴리펩티드 서열을 포함하는 변경된 T 림프구를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 T 세포 생존 모티프 및 상기 신호전달 도메인 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 활성화되고 생존한다.

[0111] 또 다른 구성에서, 본원은 a) 제1 항원에 결합하는 제1 세포외 항원 결합 도메인 및 T 세포 생존 모티프를 포함하되, 일차 항원 결합 신호전달 도메인을 포함하지 않고 보조자극 모티프를 포함하지 않는 제1 폴리펩티드; 및 b) 혈관신생 또는 혈관형성 인자 또는 DAMP인 제2 항원에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인, 세포내 CD3 ζ 신호전달 도메인, 및 CD27, CD28, OX40(CD134), 4-1BB(CD137) 또는 ICOS로부터의 보조자극 폴리펩티드 서열을 포함하되, 일차 항원 결합 신호전달 도메인을 포함하지 않고 보조자극 모티프를 포함하지 않는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 T 세포 생존 모티프 및 상기 신호전달 도메인 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 생존한다.

[0112] 또 다른 구성에서, 본원은 a) 제1 항원에 결합하는 제1 세포외 항원 결합 도메인 및 T 세포 생존 모티프를 포함하되, 일차 항원 결합 신호전달 도메인을 포함하지 않고 보조자극 모티프를 포함하지 않는 제1 폴리펩티드; 및 b) VEGF, bFGF, PDGF, HGF, IGF 또는 IL-8인 제2 항원에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인, 세포내 CD3 ζ 신호전달 도메인, 및 CD27, CD28, OX40(CD134), 4-1BB(CD137) 또는 ICOS로부터의 보조자극 폴리펩티드 서열을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 T 세포 생존 모티프 및 상기 신호전달 도메인 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 생존한다.

[0113] 또 다른 구성에서, 본원은 a) 제1 항원에 결합하는 제1 세포외 항원 결합 도메인 및 T 세포 생존 모티프를 포함하되, 일차 항원 결합 신호전달 도메인을 포함하지 않고 보조자극 모티프를 포함하지 않는 제1 폴리펩티드; 및 b) 제2 항원에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인, 세포내 CD3 ζ 신호전달 도메인, 및 CD28, OX40 및 4-1BB로부터의 보조자극 폴리펩티드 서열을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 T 세포 생존 모티프 및 상기 신호전달 도메인 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 생존한다.

[0114] 또 다른 구성에서, 본원은 a) TAA 또는 TSA인 제1 항원에 결합하는 제1 세포외 항원 결합 도메인 및 T 세포 생존 모티프를 포함하되, 일차 항원 결합 신호전달 도메인을 포함하지 않고 보조자극 모티프를 포함하지 않는 제1 폴리펩티드; 및 b) 제2 항원에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인, 세포내 CD3 ζ 신호전달 도메인, 및 CD27, CD28, OX40(CD134), 4-1BB(CD137) 또는 ICOS로부터의 보조자극 폴리펩티드 서열을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 T 세포 생존 모티프 및 상기 신호전달 도메인 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 생존한다.

[0115] 또 다른 구성에서, 본원은 a) TAA 또는 TSA인 제1 항원에 결합하는 제1 세포외 항원 결합 도메인 및 T 세포 생존 모티프를 포함하되, 일차 항원 결합 신호전달 도메인을 포함하지 않고 보조자극 모티프를 포함하지 않는 제1 폴리펩티드; 및 b) VEGF, bFGF, PDGF, HGF, IGF 또는 IL-8에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인, 세포내 CD3 ζ 신호전달 도메인, 및 CD27, CD28, OX40(CD134), 4-1BB(CD137) 또는 ICOS로부터의 보조자극 폴리펩티드 서열을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 T 세포 생존 모티프 및 상기 신호전달 도메인 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 생존한다.

[0116] 또 다른 구성에서, 본원은 a) Her2, PSCA, PSMA, BCMA, ERK5, AFP, CEA, CA-125, CA19-9, 칼레티닌, MUC-1, EMA, ETA, 티로시나제, MAGE, CD34, CD45, CD99, CD117, 크로모그라닌, 사이토케라틴, 데스민, GFAP, GCDFP-15, HMB-45 항원, MART-1, myo-D1, MSA, 신경필라멘트, NSE, 태반 알칼리성 포스파타제, 시냅토파이신, 티로글로불린, 갑상선 전사 인자-1, 종양 M2-PK, CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2(강글리오사이드 G2), EGFRvIII (표피 성장인자 변이체 III), 정자 단백질 17(Sp17), 메소텔린, PAP(전립선 산 포스파타제), 프로스테인,

TARP(T 세포 수용체 γ 대안적 판독 프레임 단백질), Trp-p8, STEAP1(전립선의 6-경막 상피 항원 1), 비정상적인 ras 단백질 또는 비정상적인 p53 단백질인 제1 항원에 결합하는 제1 세포외 항원 결합 도메인, 및 T 세포 생존 모티프를 포함하되, 일차 항원 결합 신호전달 도메인을 포함하지 않고 보조자극 모티프를 포함하지 않는 제1 폴리펩티드; 및 b) 제2 항원에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인, 세포내 CD3 ζ 신호전달 도메인, 및 CD27, CD28, OX40(CD134), 4-1BB(CD137) 또는 ICOS로부터의 보조자극 폴리펩티드 서열을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 T 세포 생존 모티프 및 상기 신호전달 도메인 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 생존한다.

[0117] 또 다른 구성에서, 본원은 a) Her2, PSCA, PSMA, BCMA, ERK5, AFP, CEA, CA-125, CA19-9, 칼레티닌, MUC-1, EMA, ETA, 티로시나제, MAGE, CD34, CD45, CD99, CD117, 크로모그라닌, 사이토케라틴, 데스민, GFAP, GCDFP-15, HMB-45 항원, MART-1, myo-D1, MSA, 신경필라멘트, NSE, 태반 알칼리성 포스파타제, 시냅토파이신, 티로글로불린, 갑상선 전사 인자-1, 종양 M2-PK, CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2(강글리오사이드 G2), EGFRvIII(표피 성장인자 변이체 III), 정자 단백질 17(Sp17), 메소텔린, PAP(전립선 산 포스파타제), 프로스테인, TARP(T 세포 수용체 γ 대안적 판독 프레임 단백질), Trp-p8, STEAP1(전립선의 6-경막 상피 항원 1), 비정상적인 ras 단백질 또는 비정상적인 p53 단백질인 제1 항원에 결합하는 제1 세포외 항원 결합 도메인, 및 T 세포 생존 모티프를 포함하되, 일차 항원 결합 신호전달 도메인을 포함하지 않고 보조자극 모티프를 포함하지 않는 제1 폴리펩티드; 및 b) VEGF, bFGF, PDGF, HGF, IGF 또는 IL-8인 제2 항원에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인, 세포내 CD3 ζ 신호전달 도메인, 및 CD27, CD28, OX40 및 4-1BB 각각으로부터의 보조자극 폴리펩티드 서열을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 T 세포 생존 모티프 및 상기 신호전달 도메인 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 생존한다.

[0118] 또 다른 구성에서, 본원은 a) Her2, PSCA, PSMA, BCMA, ERK5, AFP, CEA, CA-125, CA19-9, 칼레티닌, MUC-1, EMA, ETA, 티로시나제, MAGE, CD34, CD45, CD99, CD117, 크로모그라닌, 사이토케라틴, 데스민, GFAP, GCDFP-15, HMB-45 항원, MART-1, myo-D1, MSA, 신경필라멘트, NSE, 태반 알칼리성 포스파타제, 시냅토파이신, 티로글로불린, 갑상선 전사 인자-1, 종양 M2-PK, CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2(강글리오사이드 G2), EGFRvIII(표피 성장인자 변이체 III), 정자 단백질 17(Sp17), 메소텔린, PAP(전립선 산 포스파타제), 프로스테인, TARP(T 세포 수용체 γ 대안적 판독 프레임 단백질), Trp-p8, STEAP1(전립선의 6-경막 상피 항원 1), 비정상적인 ras 단백질 또는 비정상적인 p53 단백질에 결합하는 제1 세포외 항원 결합 도메인, 및 T 세포 생존 모티프를 포함하되, 일차 항원 결합 신호전달 도메인을 포함하지 않고 보조자극 모티프를 포함하지 않는 제1 폴리펩티드; 및 b) VEGF인 제2 항원에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인, 세포내 CD3 ζ 신호전달 도메인, 및 CD27, CD28, OX40 및 4-1BB 각각으로부터의 보조자극 폴리펩티드 서열을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 변경된 T 림프구를 제공하는데, 이때 상기 변경된 림프구는 상기 T 세포 생존 모티프 및 상기 신호전달 도메인 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 생존한다.

1.10. 다른 구성

[0120] 일부 실시양태에서, 변경된 T 림프구는 제1 폴리펩티드로서 변경된 TCR을 포함하고 보조자극 신호를 생성하는 인공 제2 폴리펩티드를 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 변경된 TCR은 예를 들면, 특이적 항원에 결합하는 도메인에 의한 천연 항원 결합 도메인의 교체에 의해 변경된다. 구체적인 실시양태에서, T 림프구는 항-MART-1 TCR의 알파 쇄 및 베타 쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 형질전환된다. T 림프구는 알파 TCR 서브유닛 및 베타 TCR 서브유닛을 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 유사하게 형질전환되고, 이때 상기 TCR은 항원, 예를 들면, TSA 또는 TAA에 대해 유도된다. 바람직한 실시양태에서, 변경된 T 림프구는 인공 보조자극 폴리펩티드, 예를 들면, 상기 단락 1.1에 개시된 보조자극 폴리펩티드, 또는 상기 단락 1.2에 개시된 제2 폴리펩티드들 중 하나를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 추가로 형질전환된다.

[0121] 변경된 T 림프구가 2개의 폴리펩티드들, 예를 들면, 키메라 수용체들을 포함하는 일부 실시양태에서, 제1 폴리펩티드는 제1 항원 결합 도메인, 일차 항원 결합 신호 전달도입 도메인(예를 들면, CD3 ζ) 및 단일 보조자극 도메인(예를 들면, CD28 또는 이로부터의 보조자극 폴리펩티드 서열)을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 제2 항원 결합 도메인 및 하나 이상의 보조자극 도메인, 예를 들면, CD27, 4-1BB, OX40, IL-7R 등으로부터의 보조자극 도메인을 포함한다. 보다 더 구체적인 실시양태에서, 제2 폴리펩티드는 2개 이상의 또는 3개 이상의 보조자극 도메인들을 포함한다.

[0122] 일부 다른 실시양태에서, 본원에서 제공된 변경된 T 림프구는 제1 항원 결합 도메인 및 일차 항원 결합 신호 전

달도입 도메인(예를 들면, CD3 ζ)을 포함하되, 보조자극 도메인(예를 들면, CD28 또는 이로부터의 보조자극 폴리펩티드 서열)을 포함하지 않는 제1 폴리펩티드(예를 들면, 키메라 수용체); 제2 항원 결합 도메인 및 하나 이상의 보조자극 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드(키메라 수용체); 및 항원 결합 도메인 및 하나 이상의 다른 보조자극 도메인을 포함하는 제3 폴리펩티드를 포함한다. 이 실시양태에서, 보조자극 도메인의 총 수는 2개 이상의 별개의 키메라 수용체들 사이에 나누어진다. 2개 이상의 상이한 키메라 수용체들은 동일한 항원 또는 상이한 항원에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다.

[0123] 2. 단리된 폴리펩티드(키메라 항원 수용체)

본원에서 제공된 변경된 T 림프구를 제조하는 데에 유용한, 본원에서 제공된 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 예를 들면, 아실화, 아미드화, 글리코실화, 메틸화, 인산화, 황화, 수모일화, 유비퀴틸화 등에 의해 변경될 수 있다. 상기 폴리펩티드들은 검출가능한 신호를 제공할 수 있는 표지, 예를 들면, 방사성동위원소 및 형광화합물로 표지될 수 있다. 제1 폴리펩티드 또는 제2 폴리펩티드의 하나 이상의 측쇄는 예를 들면, 석신산 또는 다른 카복실산 무수물에 의한 라이시닐 및 아미노 말단 잔기의 유도체화, 또는 예를 들면, 이미도에스터, 예컨대, 메틸 피콜린이미데이트, 피리독살 포스페이트, 피리독살, 클로로보로하이드라이드, 트라이니트로벤젠설폰산, 0-메틸이소우레아 또는 2,4-펜탄디온에 의한 유도체화; 및 글리옥실레이트와의 트랜스 아미나제(transaminase)-촉진된 반응에 의해 유도체화될 수 있다. 카복실 측쇄, 아스파르틸 또는 글루타밀은 카보다이이미드(R-N=C=N-R'), 예컨대, 1-사이클로헥실-3-(2-모르폴리닐-(4-에틸)카보다이이미드 또는 1-에틸-3-(4-아조니아-4,4-다이메틸펜틸)카보다이이미드와의 반응에 의해 선택적으로 변경될 수 있다.

[0125] 3. 단리된 핵산

개시된 폴리펩티드(예를 들면, 키메라 수용체)는 당분야에서 잘 공지되어 있는 방법에 따라 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 코딩될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 면역 세포, 예를 들면, T 림프구의 형질전환에 적합한 임의의 폴리뉴클레오티드 벡터 내에 함유될 수 있다. 예를 들면, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드(예를 들면, 키메라 수용체)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 합성 벡터, 렌티바이러스 또는 레트로바이러스 벡터, 자가 복제 플라스미드, 바이러스(예를 들면, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스 또는 헤르페스 바이러스) 등을 사용하여 T 림프구를 형질전환시킬 수 있다. T 림프구의 형질전환에 적합한 렌티바이러스 벡터는 예를 들면, 미국 특허 제5,994,136호, 제6,165,782호, 제6,428,953호, 제7,083,981호 및 제7,250,299호에 기재된 렌티바이러스 벡터들을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. T 림프구의 형질전환에 적합한 HIV 벡터는 미국 특허 제5,665,577호에 기재된 렌티바이러스 벡터들을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

예를 들면, 변경된 T 림프구 내의 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드의 제조에 유용한 핵산은 DNA, RNA 또는 핵산 유사체를 포함한다. 핵산 유사체는 염기 모이어티, 당 모이어티 또는 포스페이트 골격에서 변경될 수 있고, 데옥시타이미딘 대신에 데옥시유리딘 치환, 또는 데옥시사이티딘 대신에 5-메틸-2'-데옥시사이티딘 또는 5-브로모-2'-데옥시사이티딘 치환을 포함할 수 있다. 당 모이어티의 변경은 2'-0-메틸 또는 2'-0-알릴 당을 형성하기 위한 리보스 당의 2' 하이드록실의 변경을 포함할 수 있다. 데옥시리보스 포스페이트 골격은 각각의 염기 모이어티가 6원 모르폴리노 고리에 연결되어 있는 모르폴리노 핵산, 또는 데옥시포스페이트 골격이 슈도펩티드 골격에 의해 교체되어 있고 4개의 염기들이 보유되어 있는 웨პ티드 핵산을 생성하도록 변경될 수 있다. 예를 들면, 문현(Summerton and Weller (1997) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7:187-195; and Hyrup et al. (1996) *Bioorgan. Med. Chain.* 4:5-23)을 참조한다. 또한, 데옥시포스페이트 골격은 예를 들면, 포스포로티오에이트 또는 포스포로다이티오에이트 골격, 포스포로아미다이트 또는 알킬 포스포트라이에스터 골격으로 교체될 수 있다.

[0128] 4. T 림프구

본원에서 제공된 조성물 및 방법에서 사용되는 T 림프구는 무자극 T 림프구 또는 MHC-제한된 T 림프구일 수 있다. 일부 실시양태에서, T 림프구는 종양 침윤 림프구(TIL)이다. 일부 실시양태에서, T 림프구는 종양 생검으로부터 단리되거나, 종양 생검으로부터 단리된 T 림프구로부터 증폭된다. 일부 다른 실시양태에서, T 세포는 말초혈, 제대혈 또는 림프로부터 단리되거나, 말초혈, 제대혈 또는 림프로부터 증폭된 T 림프구로부터 증폭된다.

본 방법에서 사용되는 면역 세포, 예를 들면, 변경된 T 림프구는 바람직하게는 변경된 T 림프구가 투여될 개체로부터 자가유래된다. 일부 다른 실시양태에서, 변경된 T 림프구는 변경된 T 림프구가 투여될 개체에 대한 동종이계성(allogeneic)을 갖는다. 동종이계 T 림프구가 변경된 T 림프구의 제조에 사용되는 경우, 개체에서 이

식편-대-숙주 질환(GVHD)의 가능성을 감소시킬 T 림프구를 선택하는 것이 바람직하다. 예를 들면, 일부 실시양태에서, 바이러스 특이적 T 림프구가 변경된 T 림프구의 제조를 위해 선택되고, 이러한 림프구는 임의의 수용자 항원에 결합하여 이 수용자 항원에 의해 활성화되는 천연 성능이 크게 감소되어 있을 것으로 예상될 것이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 면역억제제, 예를 들면, 사이클로스포린, 타크롤리무스, 시룰리무스, 사이클로포스포아미드 등을 숙주에게 동시투여함으로써 동종이계 T 림프구의 수용자 매개 거부를 감소시킬 수 있다.

[0131] 한 실시양태에서, T 림프구를 개체로부터 수득한 후 임의적으로 증폭한 후, 제1 폴리펩티드를 코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드 및 제2 폴리펩티드를 코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드로 형질전환시킨 후 임의적으로 증폭한다. 예를 들면, 각각의 벡터에 독특한 선택 마커를 사용하여 이중 형질전환체를 선택할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, T 림프구를 개체로부터 수득한 후 임의적으로 증폭한 후, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 형질전환시킨 후 임의적으로 증폭한다. 선택 마커를 사용하여 상기 폴리뉴클레오티드를 함유하는 세포를 선택한다.

[0132] 일부 실시양태에서, 변경된 T 림프구는 (단일 보조자극 폴리펩티드가 사용되는 실시양태에서) 인공 보조자극 폴리펩티드 이외에, 또는 (변경된 T 림프구가 항원 결합 신호전달과 보조자극 신호전달을 분리하는 폴리펩티드를 포함하는 실시양태에서) 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드 이외에 천연 TCR 복합체를 형성할 수 있는 천연 TCR 단백질, 예를 들면, TCR- α 및 TCR- β 를 포함한다. 일부 다른 실시양태에서, 변경된 T 림프구에서 TCR- α 를 코딩하는 천연 유전자 및 TCR- β 를 코딩하는 천연 유전자 중 어느 하나 또는 둘다가 작용하지 않도록 변경된다(예를 들면, 일부 또는 전부가 결실되거나, 돌연변이가 삽입된다).

[0133] 일부 실시양태에서, T 림프구는 종양 병변으로부터 단리되고(예를 들면, 종양 침윤 림프구이고), 이러한 T 림프구는 TSA 또는 TAA에 대한 특이성을 가질 것으로 예상된다.

[0134] 일부 실시양태에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드의 신호전달 모티프를 사용하여 변경된 T 림프구의 증식 및 증폭을 촉진할 수 있다. 예를 들면, CD3에 대한 항체 및 CD28에 대한 항체, 예를 들면, 비드에 부착된 항체를 사용하여 비변경된 T 림프구, 및 CD3 ζ 신호전달 도메인 및 CD28 보조자극 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 T 림프구를 증폭할 수 있다(예를 들면, 미국 특허 제5,948,893호, 제6,534,055호, 제6,352,694호, 제6,692,964호, 제6,887,466호 및 제6,905,681호 참조). 유사하게, 제1 폴리펩티드 상의 신호전달 모티프에 대한 항체 및 제2 폴리펩티드 상의 신호전달 모티프에 대한 항체를 사용하여 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드 둘다를 포함하는 T 림프구의 증식을 자극할 수 있다.

[0135] 일부 실시양태에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드가 T 림프구에 의해 단일 벡터로부터 발현되는지 아니면 2개의 별개의 벡터들로부터 발현되는지 관계없이, 각각 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드가 결합하는 제1 항원 및 제2 항원을 사용하여 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드 둘다를 발현하는 T 림프구의 선택적 증폭을 촉진할 수 있다. 예를 들면, 제1 폴리펩티드가 결합하는 제1 항원이 TSA이고 제2 폴리펩티드가 결합하는 제2 항원이 혈관신생 인자인 한 실시양태에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하는 T 림프구를 TSA 및 혈관신생 인자의 존재 하에서 배양함으로써 제1 항원 또는 제2 항원의 존재 하에서 또는 이들 항원들 중 어느 하나의 부재 하에서의 배양에 비해 증식을 증가시킨다.

[0136] 일부 다른 실시양태에서, 제2 폴리펩티드에 의해 결합될 수 있는 항원과 커플링된 제1 폴리펩티드 상의 신호전달 도메인에 결합하는 항체를 사용하여 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하는 T 림프구를 증식하도록 자극한다. 예를 들면, 제1 폴리펩티드의 신호전달 도메인이 CD3 ζ 이고 제2 폴리펩티드에 결합하는 항원이 VEGF인 실시양태에서, CD3 ζ 에 결합하는 항체와 함께 VEGF의 존재 하에서 세포를 배양함으로써 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하는 T 림프구를 증식하도록 자극한다. 다른 실시양태에서, 제1 폴리펩티드에 의해 결합될 수 있는 항원 및 제2 펩티드 상의 보조자극 모티프를 사용하여 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하는 T 림프구를 증식하도록 자극한다. 예를 들면, 제1 폴리펩티드에 결합하는 항원이 HER2이고 제2 폴리펩티드 상의 보조자극 모티프가 CD28로부터 수득되는 실시양태에서, HER2 단백질, 및 CD28에 결합하는 항체의 존재 하에서 세포를 배양함으로써 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하는 T 림프구를 증식하도록 자극한다.

[0137] 상기 실시양태들 중 임의의 실시양태에서, 항원 및/또는 항체는 T 림프구가 배양되는 배지에서 자유로운 상태로 존재할 수 있거나, 이를 중 어느 하나 또는 둘다가 고체 지지체, 예를 들면, 조직 배양 플라스틱 표면, 비드 등에 부착될 수 있다.

[0138] 변경된 T 림프구는 원하는 경우 실질적으로 모든 변경된 T 림프구들의 사멸을 가능하게 하는 "자살 유전자" 또는 "안전 스위치"를 임의적으로 포함할 수 있다. 예를 들면, 일부 실시양태에서, 변경된 T 림프구는 간사이클

로비어(gancyclovir)와의 접촉 시 변경된 T 림프구의 사멸을 야기하는 HSV 타이미딘 키나제 유전자(HSV-TK)를 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 변경된 T 림프구는 유도성 캐스파제(caspase), 예를 들면, 유도성 캐스파제 9(icaspase9), 예를 들면, 캐스파제 9와, 특정 소분자 약제를 사용한 이량체화를 허용하는 인간 FK506 결합 단백질 사이의 융합 단백질을 포함한다. 문현(Straathof et al., Blood 105(11):4247-4254 (2005))을 참조한다.

5. 변경된 T 림프구를 사용하는 방법

변경된 면역 세포, 예를 들면, 본원에서 제공된 변경된 T 림프구에 의해 표적화되고자 하는, 예를 들면, 사멸되고자 하는 하나 이상의 유형의 세포를 갖는 개체를 치료하는 데에 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 사멸될 세포는 암세포, 예를 들면, 종양 세포이다. 바람직한 실시양태에서, 암세포는 고형 종양의 세포이다. 구체적인 실시양태에서, 세포는 림프종, 폐암, 유방암, 전립선암, 부신피질암종, 갑상선암종, 코인두암종, 흑색종, 예를 들면, 악성 흑색종, 피부암종, 대장암종, 테스모이드(desmoid) 종양, 섬유조직형성 환형 소세포 종양, 내분비 종양, 애왕 육종, 말초 원시 신경외배엽 종양, 고형 생식 세포 종양, 간모세포종, 신경모세포종, 비-횡문근육종 연조직 육종, 골육종, 망막모세포종, 횡문근육종, 월름스 종양, 신경아교모세포종, 점액종, 섬유종, 지방종 등의 세포이다. 보다 더 구체적인 실시양태에서, 상기 림프종은 만성 림프구성 백혈병(소림프 구성 림프종), B 세포 전구림프구성 백혈병, 림프형질세포성 림프종, 발렌스트롬 마크로글로불린혈증, 비장 변연부 림프종, 형질세포 골수종, 형질세포종, 림프절외 변연부 B 세포 림프종, MALT 림프종, 림프절 변연부 B 세포 림프종, 소포성 림프종, 맨틀 세포 림프종, 미만성 B 대세포 림프종, 종격(흉선) B 대세포 림프종, 혈관내 B 대세포 림프종, 일차 삼출 림프종, 버킷 림프종, T 림프구 전구림프구성 백혈병, T 림프구 대파립 림프구성 백혈병, 공격성 NK 세포 백혈병, 성인 T 림프구 백혈병/림프종, 림프절외 NK/T 림프구 림프종, 코-유형 또는 장병증-유형 T 림프구 림프종, 간비장 T 림프구 림프종, 모세포성 NK 세포 림프종, 균상식육종, 세자리 증후군, 일차 피부 역형성 대세포 림프종, 림프종모양 구진증, 혈관면역모세포성 T 림프구 림프종, 말초 T 림프구 림프종(비특정됨), 역형성 대세포 림프종, 호지킨 림프종 또는 비-호지킨 림프종일 수 있다.

T 림프구에 의해 치료될 수 있는 질환 또는 장애를 갖는 개체, 예를 들면, 암을 갖는 개체에게 투여된 후 변경된 T 림프구의 효능은 당분야에서 통상의 기술을 가진 자에게 공지되어 있는, 특정 질환 또는 장애에 대한 특이성을 갖는 하나 이상의 기준(상기 질환 또는 장애의 진행을 표시함)에 의해 평가될 수 있다. 일반적으로, 이러한 개체에게의 변경된 T 림프구의 투여는 상기 기준 중 하나 이상이 질환 상태 값 또는 범위로부터 정상 값 또는 범위로, 또는 정상 값 또는 범위를 향하여 검출가능하게, 예를 들면, 유의하게 이동할 때 효과적이다.

변경된 T 림프구는 임의의 약학적으로 허용가능한 용액, 바람직하게는 생존 세포의 전달에 적합한 용액, 예를 들면, 식염수 용액(예컨대, 링거 용액), 젤라틴, 탄수화물(예를 들면, 락토스, 아밀로스, 전분 등), 지방산 에스터, 하이드록시메틸셀룰로스, 폴리비닐 피롤리딘 등에서 제제화될 수 있다. 이러한 제제는 바람직하게는 변경된 T 림프구의 첨가 전에 멸균되고, 보조제, 예컨대, 윤활제, 방부제, 안정화제, 에멀젼화제, 삼투압에 영향을 미치기 위한 염, 완충제 및 착색제와 혼합될 수 있다. 변경된 T 림프구의 제제화에 사용되기에 적합한 약학 담체는 당분야에서 공지되어 있고 예를 들면, 국제 특허출원 공개 제WO 96/05309호에 기재되어 있다.

일부 실시양태에서, 변경된 T 림프구는 개별 용량으로 제제화되는데, 이때 상기 개별 용량은 적어도, 최대한 또는 약 1×10^4 개, 5×10^4 개, 1×10^5 개, 5×10^5 개, 1×10^6 개, 5×10^6 개, 1×10^7 개, 5×10^7 개, 1×10^8 개, 5×10^8 개, 1×10^9 개, 5×10^9 개, 1×10^{10} 개, 5×10^{10} 개 또는 1×10^{11} 개의 변경된 T 림프구를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변경된 T 림프구는 정맥내, 동맥내, 비경구, 근육내, 피하, 경막내 또는 안내 투여, 또는 특정 장기 또는 조직 내로의 투여를 위해 제제화된다.

실시예

1. 실시예 1: 전립선암의 치료

개체는 국부 또는 다른 림프절로 퍼지지 않은 T2기 전립선암(N0, M0)을 제시한다. 병리학적 등급은 G2인 것으로 확인된다. 요약하건대, 상기 개체는 II기 전립선암을 갖는 것으로 확인된다. 단일 키메라 수용체를 포함하는 10^9 개 내지 10^{10} 개의 변경된 T 림프구를 함유하는 200 ml 식염수 용액을 30분에 걸쳐 정맥내 주입으로 상기 개체에게 투여한다. 상기 키메라 수용체는 PSCA에 결합하는 세포외 항원 결합 영역, 경막 도메인, 및 CD27, CD28, 4-1BB, 및 OX40 각각으로부터의 세포내 보조자극 도메인을 포함한다. 상기 개체를 전립선암 병기 및 림프절로의 퍼짐에 대해 재평가하고, 생검된 전립선 조직의 조직학적 평가를 투여 후 30일째 날, 60일째 날 및 90

일째 날에 수행한다.

2. 실시예 2: 전립선암의 치료

[0147] 개체는 국부 또는 다른 림프절로 퍼지지 않은 T2기 전립선암(N0, M0)을 제시한다. 병리학적 등급은 G2인 것으로 확인된다. 요약하건대, 상기 개체는 II기 전립선암을 갖는 것으로 확인된다. 제1 키메라 수용체 및 제2 키메라 수용체를 포함하는 10^9 개 내지 10^{10} 개의 변경된 T 림프구를 함유하는 200 ml 식염수 용액을 30분에 걸쳐 정맥내 주입으로 상기 개체에게 투여한다. 제1 키메라 수용체는 PSCA에 결합하는 세포외 항원 결합 영역, 경막 도메인, 및 CD3 ζ로부터 유래된 신호 전달도입 도메인을 포함한다. 제2 키메라 수용체는 단백질 ERK5에 결합하는 항원 결합 도메인, 경막 도메인, 및 CD27, CD28, 4-1BB 및 OX40 각각으로부터의 세포내 보조자극 도메인을 포함한다. 상기 개체를 전립선암 병기 및 림프절로의 퍼짐에 대해 재평가하고, 생검된 전립선 조직의 조직학적 평가를 투여 후 30일째 날, 60일째 날 및 90일째 날에 수행한다.

3. 실시예 3: 유방암의 치료

[0149] 개체는 하나 이상의 국부 림프절로 퍼진 3기 유방암을 제시한다. 암성 조직을 제거하기 위한 수술 후, 제1 키메라 수용체 및 제2 키메라 수용체를 포함하는 10^9 개 내지 10^{10} 개의 변경된 T 림프구를 함유하는 200 ml 식염수 용액을 30분에 걸쳐 정맥내 주입으로 상기 개체에게 투여한다. 제1 키메라 수용체는 HER2에 결합하는 세포외 항원 결합 영역, 경막 도메인, 및 CD3 ζ로부터 유래된 신호 전달도입 도메인을 포함한다. 제2 키메라 수용체는 에스트로겐 수용체(ER)에 결합하는 항원 결합 도메인, 경막 도메인, 및 CD27, CD28, 4-1BB 및 OX40 각각으로부터의 세포내 보조자극 도메인을 포함한다. 투여 후 30일째 날, 60일째 날, 90일째 날 및 180일째 날에 상기 개체를 남은 유방 조직 내의 유방암 및 다른 림프절로의 퍼짐에 대해 평가한다.

4. 실시예 4: 이중 항원 특이성을 갖는 변경된 T 림프구

[0152] 본 실시예에는 2개의 키메라 항원 수용체들(CAR들)을 포함하는 변경된 T 림프구의 생성이 기재되어 있는데, 이 때 제1 CAR은 중양 특이적 항원에 대한 특이성을 갖는 항원 결합 도메인을 포함하고, 제2 CAR은 중양 특이적 항원이 아니지만 종양발생과 관련되어 있는 항원에 대한 특이성을 갖는 항원 결합 도메인을 포함한다.

CAR 구축물

[0154] 표준 방법을 이용하여 도 1에 도시된 CAR들을 제조하였다. CD28 헌지에 연결된 항-HER2 항체의 scFv, CD28 경막(TM) 도메인, CD3 ζ 쇄 및 tdTomato 레포터 유전자로 구성된 항-HER2-기초 CAR인 "HER2-CAR ζ"를 구축하여 렌티바이러스 벡터 내로 클로닝하였다. 이 CAR은 중양 특이적 항원에 대한 특이성을 갖는 항원 결합 도메인 및 자극 도메인을 포함하는 CAR을 대표한다.

[0155] VEGF(종양 특이적 항원이 아닌 항원)에 대한 특이성을 갖는 항원 결합 도메인 및 보조자극 도메인을 포함하는 2 개의 CAR들인 "VEGFR2-CD28" 및 "VEGFR2-28TM-CD28"을 생성하였다. 상기 2개의 CAR들은 VEGF 항원에 대한 수용체, 즉 VEGFR2의 일부로 구성된 항원 결합 도메인을 포함한다. VEGFR2-CD28은 인간 VEGFR2 세포외(EC) 도메인에 이어서 VEGFR2 TM 도메인, CD28 세포내(IC) 도메인, T2A 서열(토시 아시그나(thosea asigna) 바이러스 2A 웹티드) 및 GFP(레포터 유전자로서 사용됨)를 포함한다. VEGFR2-28TM-CD28은 인간 VEGFR2 세포외(EC) 도메인에 이어서 CD28 TM 도메인, CD28 세포내(IC) 도메인, T2A 서열 및 GFP를 포함한다.

[0156] VEGF 인식을 위한 대조군 구축물도 생성하였다. "VEGFR2"로서 명명된 대조군 구축물은 인간 VEGFR2 세포외(EC) 도메인에 이어서 VEGFR2 TM 도메인, T2A 서열 및 GFP를 포함한다. 따라서, 상기 대조군 구축물은 VEGFR2-CD28 및 VEGFR2-28TM-CD28로서 명명된 구축물들에 존재하는 CD28 IC 도메인을 결여한다.

T 세포에서의 CAR 구축물의 발현

[0158] T 세포에 의한 전술된 CAR 구축물의 발현을 조사하였다. T 세포를 단리하기 위해, 피콜-파크 플러스(Ficoll-Paque Plus)™ 밀도 구배 원심분리(지이 헬쓰케어(GE Healthcare), 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재)를 이용하여 건강한 공여자 전혈로부터 유래된 버피 코트(buffy coats)로부터 말초혈 단핵 세포(PBMC)를 분리하였다. 범(Pan) T 단리 키트 II(밀테니이 바이오텍(Miltenyi Biotec), 미국 매사추세츠주 캠브리지 소재)를 제조자의 설명서에 따라 사용하여 PBMC로부터 범 T 세포를 음성적으로 선별하였다.

[0159] HER2-CAR ζ, VEGFR2-CD28, VEGFR2-28TM-CD28 또는 VEGFR2 CAR 구축물을 포함하는 플라스미드를 전기천공으로 일차 T 세포 내로 도입하고, 전기천공된 T 세포를 RPMI-10 배지에서 배양하였다. 전기천공 후 24시간에서 T 세포를 수거하고 HER2-인간 IgG-Fc 키메라 단백질로 염색한 후, APC와 접합된 염소 항-인간 IgG-Fc 다중클론

항체(항-HER2 검출용), 또는 마우스 항-인간 VEGFR2 단일클론 항체(mAb; VEGFR2 검출용)로 염색하였다. 염색된 세포를 유동 세포측정으로 분석하였다. 모든 경우, CAR들의 항원 결합 도메인 및 각각의 CAR의 레포터 유전자(tdTomato 또는 GFP)의 발현이 검출되었는데, 이것은 형질전환유전자에 의한 T 세포의 안정한 형질도입을 확인시켜주었다. 각각의 CAR 구축물에 의한 IL-7 활성화된 T 세포의 형질도입은 HER2-CAR ζ 구축물이 형질감염된 T 세포에서 항-HER2 발현을 매개할 수 있고 VEGFR2-CD28, VEGFR2-28TM-CD28 및 VEGFR2 CAR 구축물이 형질감염된 T 세포에서 양성 VEGFR2 발현을 매개할 수 있다는 것도 확인시켜주었다.

[0160] 활성화된 T 세포에 의한 VEGF 생성 및 VEGFR2 발현

[0161] 내생성 VEGFR2 발현이 VEGF와의 발현에 대해 VEGFR2 EC 도메인 함유 구축물 내의 VEGFR2 세포외 도메인의 발현과 경쟁하지 않는다는 것을 확인하기 위해, 예비 실험을 수행하여 활성화된 T 세포에 의한 VEGF 생성 및 VEGFR2 발현의 수준을 평가하였다.

[0162] 인간 일차 T 세포를 전술된 바와 같이 단리하고 세포 당 3 대 1 비드의 비로 항-CD3/CD28 다이나비드(DynaBead)®로 자극하였다. 상기 세포를 50 IU/ml의 IL-2의 존재 하에서 RPMI-10 배지에서 배양하였다. 자극된 T 세포에 의한 VEGFR2 발현을 자극 후 25일 동안 유동 세포측정을 통해 평가하였다(처음 4일 동안 매일 평가한 후, 첫 주 후 2일마다 평가함). 활성화된 T 세포에 의한 VEGFR2 발현은 자극 후 2일째 날까지 관찰되지 않았고, 그 후 3일째 날까지 발현이 급격히 감소하였고 4일째 날까지 발현이 사라졌다. 4일째 날 후, VEGFR2 발현은 관찰되지 않았다.

[0163] 전술된 다이나비드 활성화 후 T 세포 상청액 중의 VEGF-A를 세포측정 비드 어레이(CBA)를 통해 측정하였다. 최소 VEGF 분비(<10 pg/ml)가 검출되었다.

[0164] 데이터는 활성화된 인간 T 세포가 내생성 VEGF 및 VEGFR2를 최소한으로 발현한다는 것을 암시한다.

[0165] 보조자극 분석

[0166] VEGFR2 EC 도메인을 포함하는 구축물이 보조자극을 매개하는 능력을 평가하기 위해, 인간 일차 범 T 세포를 VEGFR2-CD28, VEGFR2-28TM-CD28 또는 VEGFR2 렌티벡터로 형질감염시킨 후, 고정된 항-인간 CD3 및 항-인간 VEGFR2 mAb 또는 가용성 VEGF로 자극하였다. 항-인간 CD3을 이중 신호전달 시스템에서 제1 "신호"(즉, 종양 항원에 대한 특이성을 갖는 항원 결합 도메인 및 활성화 도메인(예를 들면, CD3 ζ 쇄)을 포함하는 CAR에 의한 종양 항원의 결합)를 유발하기 위한 리간드로서 선택하였다. T 세포를 항-VEGFR2 mAb 또는 가용성 VEGF와 함께 배양한 것은 활성화 마커 CD69 및 4-1BB의 상향조절에 의해 입증된 바와 같이 VEGFR2-CD28 렌티벡터 또는 VEGFR2-28TM-CD28 렌티벡터로 형질감염된 T 세포의 자극을 야기하였으나 VEGFR2 렌티벡터로 형질감염된 T 세포의 자극을 야기하지는 않았다.

[0167] 추가로, VEGFR2-CD28 렌티벡터로 형질감염된 T 세포 및 VEGFR2-28TM-CD28 렌티벡터로 형질감염된 T 세포는 항-VEGFR2 mAb 처리 또는 VEGF 처리 시 상승된 수준의 IL-2, 그랜자임 B 및 IFN- γ 를 분비하나 VEGFR2 렌티벡터로 형질감염된 T 세포는 이들을 분비하지 않는다는 것을 확인하였다. 이와 더불어, 결과는 VEGFR2 EC가 CD28 IC 도메인을 포함하는 CAR의 일부로서 발현될 때 형질감염된 T 세포에서의 VEGFR2 EC 도메인의 발현이 세포내 CD28 신호전달을 매개할 수 있다는 것을 시사한다.

[0168] HER2-CAR ζ 의 기능성 평가

[0169] T 세포를 고정된 HER2-Fc 키메라 단백질로 자극하여 형질감염된 T 세포에서 HER2-CAR ζ 의 기능적 유효성을 확인하였다. CD28 경막(TM) 도메인과 CD3 ζ 쇄 사이에 CD28 세포내 도메인이 포함되어 있다는 점을 제외하고 HER2-CAR ζ 로서 명명된 CAR 구축물과 동일한 또 다른 구축물인 "HER2-CAR28 ζ "를 CD28 보조자극에 대한 양성 대조군으로서 생성하였다.

[0170] HER2-Fc 키메라 단백질에 의한 T 세포의 자극을 확인하기 위해, 자극 후 48시간에서 T 세포 활성화 마커 CD69 및 CD71의 발현을 조사하였다. tdTomato 양성 세포만이 HER2-CAR ζ 로 형질감염된 세포 및 HER2-CAR28 ζ 로 형질감염된 세포 둘다에서 CD69 및 CD71 상향조절을 보였다. HER2-CAR ζ 로 형질감염된 T 세포에 비해 HER2-CAR28 ζ 로 형질감염된 T 세포에서 CD69 및 CD71의 보다 더 높은 빈도 및 평균 형광 강도가 관찰되었는데(HER2-CAR ζ 세포에 의한 25% 발현에 비해 42%의 HER2-CAR28 ζ 세포가 CD69를 발현하였고(모의 형질감염된 세포 = 0.04% 발현); HER2-CAR ζ 세포에 의한 10% 발현에 비해 27%의 HER2-CAR28 ζ 세포가 CD71을 발현하였음(모의 형질감염된 세포 = 0.04% 발현)), 이것은 HER2-CAR28 ζ 구축물의 세포내 CD28 신호전달 도메인의 활성을 시사한다.

- [0171] HER2-CAR ζ 또는 HER2-CAR28 ζ 로 형질감염된 T 세포를 항-VEGFR2 mAb 또는 VEGF와 함께 배양한 효과도 측정하였다. T 세포를 48시간 동안 HER2-Fc 및 VEGFR2 mAb 또는 VEGF로 처리한 후, CD69 및 CD71의 표면 발현을 평가하기 위한 유동 세포측정 분석을 수행하였다. 전술된 CD69 및 CD71 발현에 비해 상대적으로 최소한의 CD69 및 CD71 발현 향상만이 관찰되었다.
- [0172] **이중 신호전달 시스템의 평가**
- [0173] VEGFR2에 의해 매개된 보조자극을 확인한 후, HER2-CAR ζ 및 VEGFR2-CD28IC 이중 신호전달을 평가하였다. 이중 신호전달을 평가하기 위해, T 세포를 전술된 바와 같이 단리하고 (i) 항-HER2 도메인을 포함하는 CAR(즉, HER2-CAR ζ); 및 (ii) VEGFR2 수용체 세포외 도메인을 포함하는 CAR(즉, VEGFR2-CD28, VEGFR2-28TM-CD28 또는 VEGFR2로서 명명된 CAR) 둘다로 형질감염시켰다. 전술된 바와 같이 유동 세포측정을 이용하여 레포터 유전자(즉, tdTomato 또는 GFP) 발현을 측정함으로써 형질감염된 T 세포에 의한 각각의 CAR의 발현을 확인하였다.
- [0174] HER2-CAR ζ 및 상기 3개의 VEGFR2 CAR 구축물들 중 하나(즉, VEGFR2-CD28, VEGFR2-28TM-CD28 또는 VEGFR2로서 명명된 CAR 구축물) 둘다로 형질감염된 T 세포를 HER2-Fc 및 항-VEGFR2 mAb 또는 VEGF로 자극한 후 이 T 세포에 의한 T 세포 활성화 마커 CD69 및 CD71의 발현을 조사하였다.
- [0175] GFP를 발현하는 T 세포(즉, VEGFR2 EC 도메인을 포함하는 CAR 구축물을 발현하는 T 세포)에서 CD69 및 CD71 발현의 용량 반응적 향상이 관찰되었다. VEGF를 사용한 자극도 GFP를 발현하는 T 세포(즉, VEGFR2 EC 도메인을 포함하는 CAR 구축물을 발현하는 T 세포)에서 CD69 및 CD71 발현의 증폭을 보였다. 시험된 가장 높은 용량(1 μ g/ml HER2-Fc/1 μ g/ml 항-VEGFR2 또는 1 μ g/ml HER2-Fc/100 ng/ml 항-VEGF)에서, 대조군 구축물(즉, VEGFR로서 명명된 CAR 구축물)을 포함하는 T 세포에 비해 VEGFR2-28TM-CD28 구축물을 포함하는 T 세포에서 CD69 및 CD71 발현의 강한 증가가 관찰되었으므로, VEGFR2 보조자극을 확인시켜주었다. VEGFR2-CD28 구축물을 포함하는 T 세포에 의한 CD69 및 CD71 발현과 비교하였을 때 유사한 경향이 관찰되었다.
- [0176] 본 실시예는 2개의 CAR들을 포함하여, 제1 CAR에 존재하는 신호전달 도메인 및 제2 CAR에 존재하는 보조자극 도메인을 갖는 기능성 CAR T 세포를 생성할 수 있다는 것을 입증한다. 이러한 CAR T 세포는 질환, 예를 들면, 암의 치료에 유용하고, 이때 2개의 CAR들에 의한 2개의 별개의 항원들의 인식에 의존하는 이중 신호전달 방식을 이용하는 것이 바람직하다.
- [0177] **5. 실시예 5: 이중 항원 특이성을 갖는 변경된 T 림프구**
- [0178] 본 실시예에는 본원에 기재된 이중 신호전달 방식에서 사용될 수 있는 CAR들을 포함하는 변경된 T 림프구의 생성이 기재되어 있다. 상기 변경된 T 림프구는 종양 특이적 항원에 대한 특이성을 갖는 항원 결합 도메인을 포함하는 제1 키메라 항원 수용체, 및 종양 특이적 항원이 아니지만 종양발생과 관련되어 있는 항원에 대한 특이성을 갖는 항원 결합 도메인을 포함하는 제2 키메라 항원 수용체를 포함한다. 본 실시예에서, 2개의 별개의 CAR들이 (본질적으로 동등한 양으로) 단일 ORF로부터 발현될 수 있게 하는 P2A에 의해 분리된 CAR들을 갖는 단일 CAR 구축물을 사용하여 2개의 CAR들을 변경된 T 세포 내로 도입한다.
- [0179] CAR들을 포함하는 구축물은 도 4에 도시되어 있다. 제1 구축물인 "CAR1"은 항-HER2 scFv에 이어서 CD28 헌지, CD28 경막(TM) 도메인, CD3 ζ 쇄, T2A 서열 및 tdTomato 레포터 유전자를 포함한다. "CAR2"는 항-HER2 scFv에 이어서 CD28 헌지, CD28 경막(TM) 도메인, CD28 IC 도메인, CD3 ζ 쇄, T2A 서열 및 tdTomato 레포터 유전자를 포함한다. "CAR3"은 인간 VEGFR2 세포외(EC) 도메인에 이어서 VEGFR2 TM 도메인, P2A 서열, 항-HER2 scFv, CD28 헌지, CD28 경막(TM) 도메인 및 CD3 ζ 쇄를 포함한다. "CAR4"는 인간 VEGFR2 세포외(EC) 도메인에 이어서 CD28 경막(TM) 도메인, CD28 IC 도메인, 항-HER2 scFv, CD28 헌지, CD28 경막(TM) 도메인 및 CD3 ζ 쇄를 포함한다.
- [0180] CAR1은 일차 신호전달 도메인(CD3 ζ 쇄)을 포함하여, 보조자극 도메인을 결여하는 제1 세대 항-HER2 CAR을 대표한다. CAR2는 일차 신호전달 도메인(CD3 ζ 쇄) 및 보조자극 도메인(CD28 IC 도메인) 둘다를 포함하는 제2 세대 항-HER2 CAR을 대표한다. CAR3은 이중 CAR 대조군 구축물이고, HER2 일차 신호전달 부분(HER2 scFv 및 CD3 ζ 쇄)을 포함하고 VEGFR2 이차 신호전달 도메인도 포함하지만, 상기 이차 신호전달 도메인은 보조자극 도메인을 결여한다. CAR4는 이중 CAR 구축물이고, HER2 일차 신호전달 부분(HER2 scFv 및 CD3 ζ 쇄)을 포함하고 보조자극 도메인(CD28 IC)과 함께 VEGFR2 이차 신호전달 도메인도 포함한다.
- [0181] 범 T 세포를 전술된 바와 같이 단리하고 전술된 CAR 구축물들(CAR1-CAR4)로 형질감염시키고 형질도입 후 24시간

에서 분석하였다. 항-HER2의 발현이 모든 CAR 구축물들로 형질감염된 T 세포에서 검출되었다. 항-HER2 및 VEGFR2 둘다의 발현이 CAR3 또는 CAR4로 형질감염된 T 세포에서 검출되었다. 따라서, T 세포에 의한 전술된 CAR 구축물들의 적절한 발현이 확인되었다.

[0182] 일단 CAR 구축물의 발현이 확인되면, 상기 구축물을 발현하는 T 세포를 HER2-Fc(0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 또는 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)와 함께 배양하여 HER2-scFv 함유 구축물의 자극(일차 신호전달)을 유도하거나, 단독으로 또는 항-VEGFR2 항체(0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 또는 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 또는 VEGF(1 ng/mL, 10 ng/mL 또는 100 ng/mL)와 함께 배양하여 VEGFR2 함유 구축물의 자극(보조자극)을 유도하였다. VEGFR2 활성화는 CAR1 또는 CAR2로 형질감염된 T 세포에서 항-HER2 활성화만을 이용하였을 때 관찰된 자극에 비해 표면 마커 발현 T 세포 활성화 마커 CD69 또는 CD71(유동 세포측정에 의해 평가됨)을 변경시키지 않는다는 것을 발견하였다.

[0183] 대조적으로, CAR4로 형질감염된 T 세포에서 HER2-Fc 및 항-VEGFR2 둘다를 사용한 자극은 HER2-Fc만으로 자극된 CAR4 발현 CAR T 세포에서의 CD69 발현에 비해 향상된 CD69 발현을 야기하였다. HER2-Fc 자극 시 VEGFR2에 의해 매개된 이 CD69 발현 상향조절의 증가는 구축물(즉, CAR3)의 VEGFR2 CAR에서 보조자극 도메인을 결여하는 대조군 이중 자극 CAR 구축물(CAR3)로 형질감염된 T 세포에서 관찰되지 않는다. 구체적으로, 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HER2-Fc만으로 자극되었을 때 33.4%의 CD69^+ CAR4 발현 CAR T 세포에 비해 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HER2-Fc/0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 항-VEGFR2 및 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HER2-Fc/1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 항-VEGFR2로 자극되었을 때 각각 73.6% 및 72.9%의 CAR4 발현 CAR T 세포가 CD69를 발현한 반면; 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HER2-Fc만으로 자극되었을 때 4.9%의 CD69^+ CAR3 발현 CAR T 세포에 비해 동일한 용량의 HER2-Fc 및 항-VEGFR2로 자극되었을 때 각각 6.13% 및 3.69%의 CAR3 발현 CAR T 세포만이 CD69를 발현하였다. CD71 발현을 분석하였을 때 유사한 결과가 관찰되었다: 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HER2-Fc만으로 자극되었을 때 22.8%의 CD71^+ CAR4 발현 CAR T 세포에 비해 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HER2-Fc/0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 항-VEGFR2 및 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HER2-Fc/1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 항-VEGFR2로 자극되었을 때 각각 45.2% 및 50.7%의 CAR4 발현 CAR T 세포가 CD71을 발현한 반면; 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HER2-Fc만으로 자극되었을 때 10.3%의 CD71^+ CAR3 발현 CAR T 세포에 비해 동일한 용량의 HER2-Fc 및 항-VEGFR2로 자극되었을 때 각각 7.80% 및 7.89%의 CAR3 발현 CAR T 세포만이 CD71을 발현하였다.

[0184] 마찬가지로, CAR4로 형질도입된 T 세포에서 HER2-Fc 및 VEGF 둘다를 사용한 자극은 구축물(즉, CAR3)의 VEGFR2 CAR에서 보조자극 도메인을 결여하는 대조군 이중 자극 CAR 구축물(CAR3)로 형질도입된 T 세포에서의 CD69 발현 수준에 비해 향상된 CD69 발현을 야기하였다. 구체적으로, 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HER2-Fc만으로 자극되었을 때 33.4%의 CD69^+ CAR4 발현 CAR T 세포에 비해 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HER2-Fc/1 ng/mL VEGF, 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HER2-Fc/10 ng/mL VEGF 및 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HER2-Fc/100 ng/mL VEGF로 자극되었을 때 각각 35.3%, 48.2% 및 48.5%의 CAR4 발현 CAR T 세포가 CD69를 발현한 반면; 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HER2-Fc만으로 자극되었을 때 4.9%의 CD69^+ CAR3 발현 CAR T 세포에 비해 동일한 용량의 HER2-Fc 및 VEGF로 자극되었을 때 각각 3.40%, 2.69% 및 2.55%의 CAR3 발현 CAR T 세포만이 CD69를 발현하였다. CD71 발현의 관점에서, 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HER2-Fc만으로 자극되었을 때 22.8%의 CD71^+ CAR4 발현 CAR T 세포에 비해 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HER2-Fc/1 ng/mL VEGF, 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HER2-Fc/10 ng/mL VEGF 및 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HER2-Fc/100 ng/mL VEGF로 자극되었을 때 각각 30.10%, 42.30% 및 47.30%의 CAR4 발현 CAR T 세포가 CD71을 발현한 반면; 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HER2-Fc만으로 자극되었을 때 10.3%의 CD71^+ CAR3 발현 CAR T 세포에 비해 동일한 용량의 HER2-Fc 및 VEGF로 자극되었을 때 각각 10.70%, 4.81% 및 7.33%의 CAR3 발현 CAR T 세포만이 CD69를 발현하였다는 것을 확인하였다.

[0185] 그랜자임 B는 세포독성 T 림프구 과립에 존재하는 효소이다. CAR1, CAR3 또는 CAR4로 형질감염된 T 세포에 의해 그랜자임 B 분비를 평가하였다. CAR4로 형질감염된 T 세포는 대조군 CAR(CAR1 또는 CAR3)로 형질감염된 T 세포에 비해 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HER2-Fc/0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 항-VEGFR2 및 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HER2-Fc/1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 항-VEGFR2의 용량으로 HER2-Fc 및 항-VEGFR2로 자극되었을 때 증가된 수준의 그랜자임 B를 발현하였다. 마찬가지로, CAR4로 형질감염된 T 세포는 대조군 CAR(CAR1 또는 CAR3)로 형질감염된 T 세포에 비해 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HER2-Fc/1 ng/mL VEGF 및 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HER2-Fc/100 ng/mL VEGF의 용량으로 HER2-Fc 및 VEGF로 자극되었을 때 증가된 수준의 그랜자임 B를 발현하였다.

[0186] 항-VEGFR2 항체 또는 VEGF와 함께 HER2-Fc로 자극한 후, CAR1, CAR3 또는 CAR4로 형질감염된 T 세포의 생존력을 평가하였다. 범 T 세포를 전술된 바와 같이 단리하였다. 24시간의 배양 후, T 세포를 48시간 동안 HER2-Fc(1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 및 항-VEGFR2 항체(0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 또는 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 또는 VEGF(1 ng/mL 또는 100 ng/mL)로 자극하였다. 총 13일의 배양 후, T 세포의 생존력을 측정하였다. 각각의 경우, 이중 자극 CAR(즉, CAR4)로 형질감염된

T 세포는 이중 대조군 CAR(즉, CAR3) 또는 CAR1로서 명명된 대조군 CAR로 형질감염된 T 세포에 비해 증가된 생존력을 보였다.

[0187] 본 실시예는 실시예 4의 결과, 즉 2개의 CAR들을 포함하되, 제1 CAR에 존재하는 신호전달 도메인 및 제2 CAR에 존재하는 보조자극 도메인을 갖는 기능성 CAR T 세포를 생성할 수 있다는 것을 확인시켜주고, 2개의 CAR 구축물들이 상기 CAR T 세포에서 단일 구축물로서 발현될 수 있다는 것(예를 들면, 상기 T 세포는 상기 CAR들 둘다를 포함하는 단일 CAR 구축물로 형질감염될 수 있다는 것)도 입증한다.

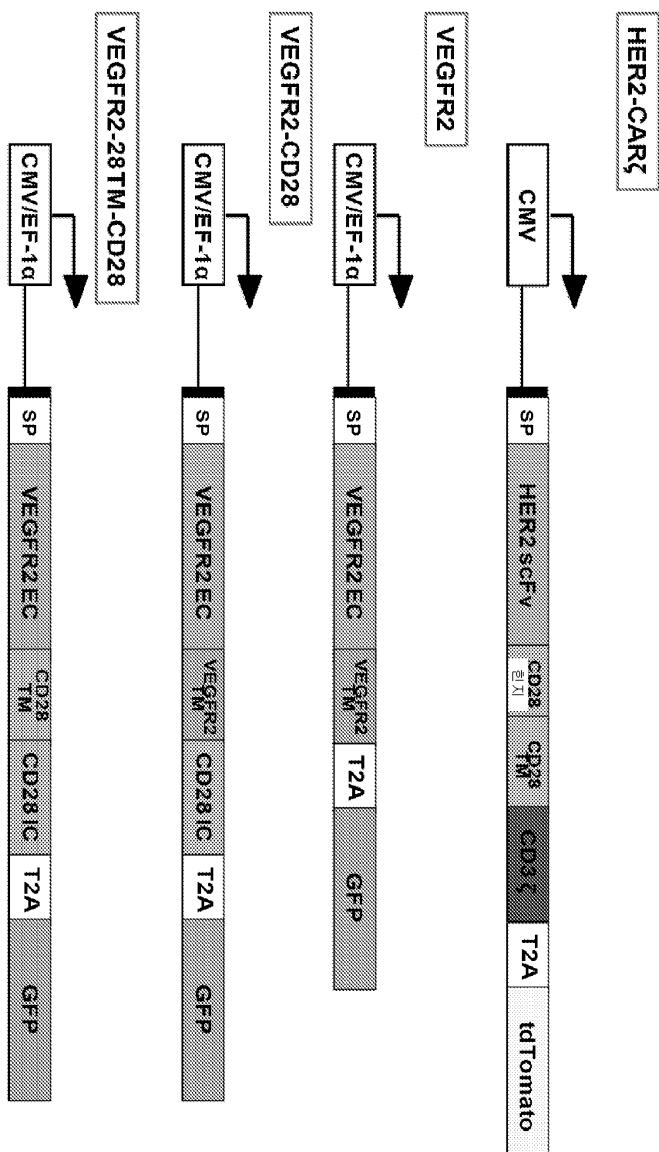
[0188] 균등률

[0189] 본 개시내용은 본원에 기재된 구체적인 실시양태들에 의해 범위 면에서 한정되지 않는다. 실제로, 본원에 기재된 변경 이외에 본원에서 제공된 보호대상의 다양한 변경이 상기 설명으로부터 당업자에게 자명해질 것이다. 이러한 변경은 첨부된 특허청구범위 내에 있다.

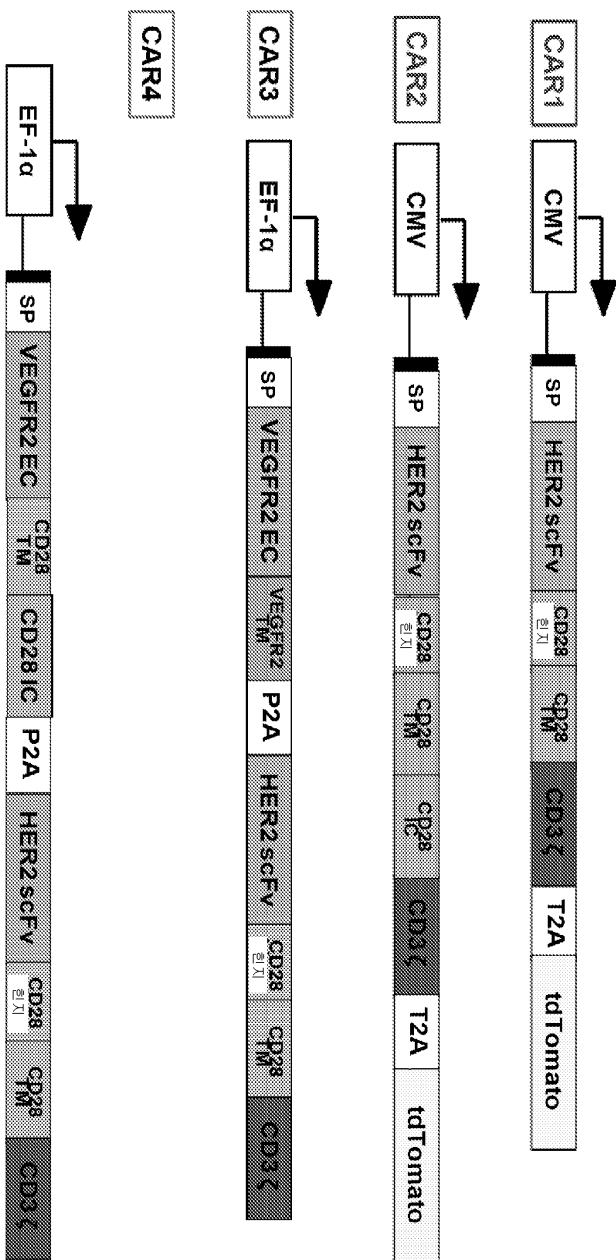
[0190] 다양한 공개문헌들, 특허들 및 특허출원들이 본원에서 인용되어 있고, 이들의 개시내용은 전체로서 참고로 도입된다.

도면

도면1



도면2



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 1

【변경전】

a) 제1 항원에 결합하는 제1 세포외 항원 결합 도메인 및 제1 세포내 신호전달 도메인을 포함하되, 보조자극 도메인을 포함하지 않는 제1 키메라 항원 수용체(CAR); 및

b) 제2 항원에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인 및 하나 이상의 보조자극 도메인을 포함하는 제2 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제2 CAR

를 포함하고, 상기 제1 신호전달 도메인 및 상기 제2 신호전달 도메인 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 최대 세포독성을 갖게 되는 변경된 T 림프구로서,

상기 제1 항원이 종양 세포 상의 항원이고, 상기 제2 항원이 혈관 내피 성장인자(VEGF)이고,

상기 하나 이상의 보조자극 도메인이 보조자극 CD27 폴리펩티드 서열, 보조자극 CD28 폴리펩티드 서열, 보조자극 OX40(CD134) 폴리펩티드 서열, 보조자극 4-1BB(CD137) 폴리펩티드 서열 및 보조자극 유도성 T 세포 보조자극(ICOS) 폴리펩티드 서열 중 하나 이상을 포함하는, 변경된 T 림프구.

【변경후】

- a) 제1 항원에 결합하는 제1 세포외 항원 결합 도메인 및 제1 세포내 신호전달 도메인을 포함하되, 보조자극 도메인을 포함하지 않는 제1 키메라 항원 수용체(CAR); 및
- b) 제2 항원에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인 및 하나 이상의 보조자극 도메인을 포함하는 제2 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제2 CAR

를 포함하고, 상기 제1 세포내 신호전달 도메인 및 상기 제2 세포내 신호전달 도메인 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 최대 세포독성을 갖게 되는 변경된 T 림프구로서,

상기 제1 항원이 종양 세포 상의 항원이고, 상기 제2 항원이 혈관 내피 성장인자(VEGF)이고,

상기 하나 이상의 보조자극 도메인이 보조자극 CD27 폴리펩티드 서열, 보조자극 CD28 폴리펩티드 서열, 보조자극 OX40(CD134) 폴리펩티드 서열, 보조자극 4-1BB(CD137) 폴리펩티드 서열 및 보조자극 유도성 T 세포 보조자극(ICOS) 폴리펩티드 서열 중 하나 이상을 포함하는, 변경된 T 림프구.

【직권보정 2】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 7

【변경전】

- a) 제1 항원에 결합하는 제1 세포외 항원 결합 도메인 및 하나 이상의 보조자극 도메인을 포함하는 제1 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제1 키메라 항원 수용체(CAR); 및
- b) 제2 항원에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인 및 제2 세포내 신호전달 도메인을 포함하되, 보조자극 도메인을 포함하지 않는 제2 CAR

를 포함하고, 상기 제1 신호전달 도메인 및 상기 제2 신호전달 도메인 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 최대 세포독성을 갖게 되는 변경된 T 림프구로서,

상기 제1 항원이 종양 세포 상의 항원이고, 상기 제2 항원이 혈관 내피 성장인자(VEGF)이고,

상기 하나 이상의 보조자극 도메인이 보조자극 CD27 폴리펩티드 서열, 보조자극 CD28 폴리펩티드 서열, 보조자극 OX40(CD134) 폴리펩티드 서열, 보조자극 4-1BB(CD137) 폴리펩티드 서열 및 보조자극 유도성 T 세포 보조자극(ICOS) 폴리펩티드 서열 중 하나 이상을 포함하는, 변경된 T 림프구.

【변경후】

- a) 제1 항원에 결합하는 제1 세포외 항원 결합 도메인 및 하나 이상의 보조자극 도메인을 포함하는 제1 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제1 키메라 항원 수용체(CAR); 및
- b) 제2 항원에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인 및 제2 세포내 신호전달 도메인을 포함하되, 보조자극 도메인을 포함하지 않는 제2 CAR

를 포함하고, 상기 제1 세포내 신호전달 도메인 및 상기 제2 세포내 신호전달 도메인 둘다가 각각 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 의해 활성화될 때에만 최대 세포독성을 갖게 되는 변경된 T 림프구로서,

상기 제1 항원이 종양 세포 상의 항원이고, 상기 제2 항원이 혈관 내피 성장인자(VEGF)이고,

상기 하나 이상의 보조자극 도메인이 보조자극 CD27 폴리펩티드 서열, 보조자극 CD28 폴리펩티드 서열, 보조자극 OX40(CD134) 폴리펩티드 서열, 보조자극 4-1BB(CD137) 폴리펩티드 서열 및 보조자극 유도성 T 세포 보조자극(ICOS) 폴리펩티드 서열 중 하나 이상을 포함하는, 변경된 T 림프구.