



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0030724

(43) 공개일자 2015년03월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/48 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2015-7000921

(22) 출원일자(국제) 2013년07월12일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2015년01월14일

(86) 국제출원번호 PCT/US2013/050272

(87) 국제공개번호 WO 2014/011987

국제공개일자 2014년01월16일

(30) 우선권주장

61/671,518 2012년07월13일 미국(US)

(71) 출원인

더 트러스티스 오브 더 유니버시티 오브 펜실베이니아

미국 19104 펜실베이니아주 필라델피아 슈트 200 케스트너트 스트리트 3160

(72) 발명자

준, 칼 에이치.

미국, 펜실베이니아 19066, 메리언 스테이션, 409 베어드 로드

레빈, 브루스 엘.

미국, 뉴저지 08003, 체리 힐, 1258 리버티 벨 드라이브

칼로스, 마이클 디.

미국, 펜실베이니아 19119, 필라델피아, 716 카펜터 레인

(74) 대리인

손민

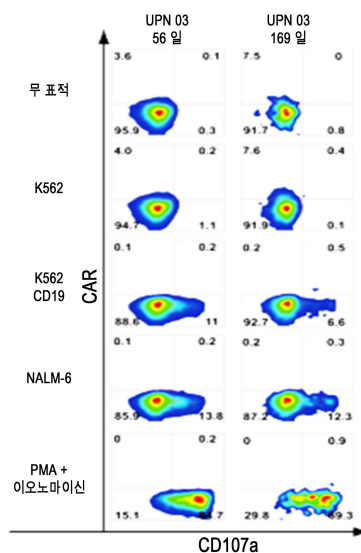
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 CAR T 세포를 조절하기 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

본 발명은, 약물과, T 세포 표면 상에서 발현된 CAR에 결합하는 분자를 포함하는 약물-분자 접합체를 CAR T 세포 치료가 제공되는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, CAR T 세포 치료 동안 건강한 조직의 고갈을 억제시키는 방법을 제공한다. 본 발명은 세포 내로 접합체의 내재화 및 세포의 약물-매개된 사멸을 제공하는 CAR에 대한 접합체의 결합에 관한 것이다.

대표도 - 도1



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

약물과, 세포 표면 상에서 발현된 CAR에 결합하는 분자를 포함하는, 약물-분자 접합체.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 CAR에 대한 접합체의 결합이 세포 내로 접합체의 내재화 (internalization)를 제공하는, 약물-분자 접합체.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 CAR에 대한 접합체의 결합이 세포의 약물-매개 사멸을 제공하는, 약물-분자 접합체.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 세포가 T 세포이고, CAR에 대한 접합체의 결합이 T 세포 활성화의 약물-매개된 억제를 제공하는, 약물-분자 접합체.

### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 분자가 항체, 단백질, 펩티드, 뉴클레오티드, 소분자 및 이의 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 약물-분자 접합체.

### 청구항 6

약물과, T 세포 표면 상에서 발현된 CAR에 결합하는 분자를 포함하는 약물-분자 접합체를, CAR T 세포 치료가 제공되는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, CAR T 세포 치료 동안 건강한 조직의 고갈을 억제시키는 방법.

### 청구항 7

제6항에 있어서, 상기 CAR에 대한 접합체의 결합이 세포 내로 접합체의 내재화를 제공하는, 방법.

### 청구항 8

제6항에 있어서, 상기 CAR에 대한 접합체의 결합이 세포의 약물-매개된 사멸을 제공하는, 방법.

### 청구항 9

제6항에 있어서, 상기 CAR에 대한 접합체의 결합이 T 세포 활성화의 약물-매개된 억제를 제공하는, 방법.

### 청구항 10

제6항에 있어서, 상기 분자가 항체, 단백질, 펩티드, 뉴클레오티드, 소분자 및 이의 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

## 명세서

### 기술분야

관련 출원의 상호 참조

본 출원은 2012년 7월 13일자로 출원된 미국 가출원 제61/671,518호를 우선권으로 주장하며, 이의 내용은 전체가 본원에서 참조로서 도입된다.

## 배경 기술

- [0003] 정상 T 세포는 특정 세포 표면 표적에 대한 키메라 항원 수용체(CAR)를 사용한 형질도입에 의해 종양을 공격하도록 재유도될 수 있다. 한 가지 경우, CAR은 만성 백혈병을 갖는 환자에서 현저한 항-종양 효과를 나타냈다 [참조: Porter et al., 2011, New Engl J Med, 365(8): 725-733; Kalos et al, 2011, Sci Tr Med, 3(95): 95ra73].
- [0004] 상기 모델에서, T 세포는 CD19, 만성 림프구성 백혈병(CLL) 등의 B-세포 악성종양의 표면 상에서 발현되는 항원에 대해 항체 단편("scFv"라 불림)을 발현하도록 유전자 조작되었다. 그러나, 동일한 분자는 또한 정상 B 림프구 상에서 발현된다. B 림프구의 정상 기능은 항체를 생성하고 T 세포가 감염을 조절하는 것을 돕는 것이다. 현재까지, 유전자 변형된 항-CD19 T 세포("CART-19 세포")로 치료된 환자에서 B 세포 고갈과 특이적으로 관련된 감염성 합병증은 없었지만, 연장된 극심한 B 세포 고갈의 영향은 아직까지 알려져 있지 않다. 추가로, 새로운 특이성을 갖는 다수의 기타 CAR T 세포 생성물은 현재 개발중에 있다. 이들 새로운 CAR T 세포 생성물은, 연구하의 특정 암 형태에서 표적화된 항원의 발현을 공유하는 방관자(bystander) 세포의 선택적 고갈과 관련된 고유 독성과 연관될 수 있다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0005] 따라서, CAR T 세포 치료 동안 간강한 방관자 세포의 불필요한 고갈을 방지하기 위해 이들의 표면 상에서 CAR을 발현하는 세포를 특이적으로 항상 표적화할 수 있는 조성물 및 방법을 개발할 필요성이 당해 기술분야에 존재한다. 본 발명은 이러한 충족되지 않은 필요성을 만족시킨다.

### 과제의 해결 수단

- [0006] 본 발명은 약물과, 세포 표면 상에서 발현된 CAR에 결합하는 분자를 포함하는 약물-분자 접합체를 제공한다.
- [0007] 한 가지 실시형태에서, CAR에 대한 접합체의 결합은 세포 내로 접합체의 내재화 (internalization)를 제공한다.
- [0008] 한 가지 실시형태에서, CAR에 대한 접합체의 결합은 세포의 약물-매개 사멸을 제공한다.
- [0009] 한 가지 실시형태에서, 세포는 T 세포이고, CAR에 대한 접합체의 결합은 T 세포 활성화의 약물-매개된 억제를 제공한다.
- [0010] 한 가지 실시형태에서, 분자는 항체, 단백질, 펩티드, 뉴클레오티드, 소분자 및 이의 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0011] 본 발명은, 약물과, T 세포 표면 상에서 발현된 CAR에 결합하는 분자를 포함하는 약물-분자 접합체를 CAR T 세포 치료가 제공되는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, CAR T 세포 치료 동안 건강한 조직의 고갈을 억제하는 방법을 제공한다.
- [0012] 한 가지 실시형태에서, CAR에 대한 접합체의 결합은 세포 내로 접합체의 내재화를 제공한다.
- [0013] 한 가지 실시형태에서, CAR에 대한 접합체의 결합은 세포의 약물-매개된 사멸을 제공한다.
- [0014] 한 가지 실시형태에서, CAR에 대한 접합체의 결합은 T 세포 활성화의 약물-매개된 억제를 제공한다.
- [0015] 한 가지 실시형태에서, 분자는 항체, 단백질, 펩티드, 뉴클레오티드, 소분자 및 이의 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

### 도면의 간단한 설명

- [0016] 본 발명의 바람직한 실시양태의 하기 상세한 설명은 첨부된 도면과 관련하여 읽을 때에 보다 잘 이해될 것이다. 본 발명을 설명할 목적으로, 현재 바람직한 실시양태가 도면에 제시되어 있다. 그러나, 본 발명은 도

면에 제시된 실시양태의 정확한 배열 및 수단으로 한정되지 않는 것으로 이해되어야 한다.

도 1은 CD19 발현 표적(K562-CD19 및 Nalm6)과의 항원처리시에 항-CD19 키메라 항원 수용체의 표면 발현의 손실을 입증하는 실험 결과를 나타내는 한쌍의 그래프이다.

도 2는 항원 표적에 대한 노출시에 CAR의 표면 및 세포내 염색을 입증하는 실험 결과를 나타내는 한쌍의 그래프이다. 상부 열: 무관계 표적(좌측) 또는 CD19 발현 표적(우측)에 대한 항-CD19 키메라-항원 형질도입 T 세포의 노출은 수용체의 표면 발현이 동족 표적의 조우시에 소실되는 것을 나타낸다. 하부 열: 세포내 염색은 수용체가 세포 내에서 발견될 수 있음을 입증한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017]

본 발명은, 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 변형된 T 세포의 활성을 조절하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. CAR를 발현하도록 유전적으로 변형된 T 세포는 CAR이 변형된 T 세포를 재유도하여 종양 항원을 인식하는 암의 치료에 사용되어 왔다. 몇몇 예에서, 이들이 정상 방관자 세포에 영향을 미치지 않으면서 종양 세포를 사멸하도록 CAR T 세포를 효과적으로 제어하고 조절하는 것이 유리할 수 있다. 따라서, 한 가지 실시형태에서, 본 발명은 또한 정상 비-암성 세포의 고갈을 최소화하면서 암 세포를 사멸시키는 방법을 제공한다.

[0018]

한 가지 실시형태에서, 본 발명은, 이들의 표적 항원에 대한 복수 유형의 CAR의 결합이 CAR T 세포 활성화에 요구되는, 세포 상에서 발현된 복수 유형의 CAR를 제공한다. 한 가지 실시형태에서, 본 발명의 방법은 T 세포를 유전적으로 변형시켜 복수 유형의 CAR을 발현시키는 것을 포함하고, 여기서 T 세포 활성화는 이들의 표적 항원에 대한 복수 유형의 CAR의 결합에 의존한다. 예를 들면, 한 가지 실시형태에서 T 세포는 제1 목적 항원에 대해 표적화된 제1 CAR, 및 제2 목적 항원에 대해 표적화된 제2 CAR을 발현할 수 있다. 한 가지 실시형태에서, 변형된 T 세포의 활성화는 제1 CAR이 제1 목적 항원에 결합하고, 제2 CAR은 제2 목적 항원에 결합한다. 한 가지 실시형태에서, 복수의 상이한 CAR의 결합 의존성은 CAR T 세포 치료의 특이성을 개선시킨다.

[0019]

한 가지 실시형태에서, 본 발명은, 정상 세포에 대한 억제 CAR의 결합이 CAR T 세포 활성화의 억제를 야기하는 억제 CAR을 제공한다. 한 가지 실시형태에서, 억제 CAR은 치료 종양 지향 CAR과 동일한 T 세포에서 공-발현된다. 한 가지 실시형태에서, 억제 CAR은 정상 비-암성 세포 및 세포질 도메인과 연관된 항원을 인식하는 항원 결합 도메인을 포함한다. 한 가지 실시형태에서, 상기 방법은 T 세포를 유전적으로 변형시켜 적어도 하나의 억제 CAR 및 적어도 하나의 치료학적 종양 지향 CAR을 발현시키는 것을 포함한다. 한 가지 실시형태에서, 비-암성 세포와 연관된 항원에 대한 억제 CAR의 결합은 CAR T 세포의 사멸을 야기한다. 한 가지 실시형태에서, 암성 세포 상의 종양 항원에 대한 치료학적 종양 지향 CAR의 결합은 암성 세포의 T 세포 활성화 및 T 세포-매개된 사멸을 야기한다.

[0020]

한 가지 실시형태에서, 본 발명은 세포 표면 상에서 발현된 CAR에 결합하는 약물-분자 접합체를 제공한다. 한 가지 실시형태에서, CAR에 대한 접합체의 결합은 상기 접합체의 내재화를 유도하고, 이는 상기 약물이 CAR T 세포를 사멸시키는 것을 가능하게 한다. 본 발명은 또한, CAR의 내재화 및 CAR T 세포의 사멸을 유도하는 약물-분자 접합체를 투여함으로써 CAR T 세포 활성을 조절하는 방법을 제공한다.

[0021]

정의

[0022]

본원에서 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 당해 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에서 기재된 방법 및 재료와 유사하거나 균등한 임의의 방법 및 재료가 본 발명의 시험을 위한 실시예에 사용될 수 있지만, 바람직한 재료 및 방법은 본원에 개시되어 있다. 본 발명을 기재하고 청구할 때 하기 용어가 사용될 것이다.

[0023]

또한, 본원에 사용된 용어는 특정 실시양태를 기재하기 위한 것이며, 제한을 의도하는 것이 아닌 것으로 이해되어야 한다.

[0024]

관사 "하나(a, an)"는 관사의 문법상 목적어의 하나 또는 복수(즉, 적어도 하나)를 지칭하기 위해 본원에서 사용된다. 예를 들면, "요소"는 하나의 요소 또는 복수의 요소를 의미한다.

[0025]

양, 시간적 지속 등과 같은 측정가능한 값을 언급하는 경우에 본원에서 사용되는 "약"은, 이러한 변형이 본원에 개시된 방법을 수행하기에 적절하도록, 명시된 값으로부터  $\pm 20\%$  또는  $\pm 10\%$ , 몇몇 경우에  $\pm 5\%$ , 몇몇 경우에  $\pm 1\%$  및 몇몇 경우에  $\pm 0.1\%$ 의 변동을 포함한다는 것을 의미한다.

- [0026] "활성화"는, 본원에 사용된 바와 같이, 검출가능한 세포 증식을 유도하도록 충분히 자극된 T 세포의 상태를 지칭한다. 활성화는 또한 유도된 사이토킨 생성 및 검출가능한 효과기 기능과 연관될 수 있다. 용어 "활성화된 T 세포"는 그 중에서도 세포 분열을 받은 T 세포를 지칭한다.
- [0027] 본원에서 사용되는 용어 "항체"는 항원과 특이적으로 결합하는 면역글로불린 분자를 지칭한다. 항체는 천연 공급원 또는 재조합 공급원에서 유래한 완전한 면역글로불린일 수 있으며, 완전한 면역글로불린의 면역반응성 부분일 수 있다. 항체는 종종 면역글로불린 분자의 것이다. 본 발명에서의 항체는, 예를 들면, 단일 사슬 항체 및 인간화된 항체 뿐만 아니라 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, Fv, Fab 및 F(ab)<sub>2</sub>를 포함하는 다양한 형태로 존재할 수 있다[참조: Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426].
- [0028] 용어 "항체 단편"은 완전한 항체의 일부를 지칭하고, 완전한 항체의 항원성 결정 가변 영역을 지칭한다. 항체 단편의 예는, 이로써 한정되지 않지만, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> 및 Fv 단편, 선형 항체, scFv 항체, 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.
- [0029] "항체 중쇄"는, 본원에 사용된 바와 같이, 이들의 천연 발생 형태로 모든 항체 분자에 존재하는 보다 큰 2종의 폴리펩티드 쇄를 지칭한다.
- [0030] "항체 경쇄"는, 본원에 사용된 바와 같이, 이들의 천연 발생 형태로 모든 항체 분자에 존재하는 보다 작은 2종의 폴리펩티드 쇄를 지칭한다.  $\kappa$  및  $\lambda$  경쇄는 2개의 주요 항체 경쇄 이소형을 지칭한다.
- [0031] 본원에 사용된 용어 "합성 항체"란, 재조합 DNA 기술을 사용하여 생성되는 항체, 예를 들면, 본원에 기재된 박테리오파지에 의해 발현된 항체를 의미한다. 상기 용어는 또한, 상기 항체를 코딩하는 DNA 분자의 합성에 의해 생성되고 DNA 분자가 항체 단백질 또는 상기 항체를 특징하는 아미노산 서열을 발현하는 항체를 의미하는 것으로 해석되어야 하고, 여기서 DNA 또는 아미노산 서열은 당해 기술분야에서 이용가능하고 공지된 합성 DNA 또는 아미노산 서열 기술을 사용하여 수득된다.
- [0032] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "항원" 또는 "Ag"는 면역 반응을 유발하는 분자로서 정의된다. 이러한 면역 반응은 항체 생성, 또는 특정 면역학적 적격 세포의 활성화, 또는 이들 둘 모두를 포함할 수 있다. 당업자는 실질적으로 모든 단백질 또는 펩티드를 포함한 임의의 거대분자가 항원으로 작용할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 더욱이, 항원은 재조합 DNA 또는 게놈 DNA로부터 유래할 수 있다. 따라서, 당업자는 면역 반응을 유도하는 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 부분 뉴클레오티드 서열을 포함하는 임의의 DNA가, 이러한 용어가 본원에서 사용됨에 따라, "항원"을 코딩한다는 것을 이해할 것이다. 더욱이, 당해 기술분야의 숙련자는 항원이 유전자의 전장 뉴클레오티드 서열에 의해서만 코딩될 필요가 없다는 것을 이해할 것이다. 본 발명은, 이로써 한정되지 않지만, 하나 또는 하나 이상의 유전자의 부분 뉴클레오티드 서열의 용도를 포함하며, 이들 뉴클레오티드 서열은 목적 면역 반응을 유도하기 위해 다양한 조합으로 정렬된다는 것이 매우 자명하다. 게다가, 당업자는 항원이 전적으로 "유전자"에 의해 코딩될 필요가 없다는 것을 이해할 것이다. 항원은 생성되거나 합성될 수 있거나, 생물학적 샘플로부터 유래할 수 있다는 것은 매우 자명하다. 이러한 생물학적 샘플로는, 이로써 한정되지 않지만, 조직 샘플, 중앙 샘플, 세포 또는 생물학적 유체를 들 수 있다.
- [0033] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "항-종양 효과"는 종양 용적의 감소, 종양 세포수의 감소, 전이수의 감소, 예상 수명의 증가, 또는 암 상태와 연관된 다양한 생리학적 증상의 개선에 의해 명백해질 수 있는 생물학적 효과를 지칭한다. "항-종양 효과"는 또한 최초의 장소에서 종양 발생의 예방에 있어서 본 발명의 펩티드, 폴리뉴클레오티드, 세포 및 항체의 능력에 의해 명백해질 수 있다.
- [0034] 용어 "자가-항원"은, 본 발명에 따라서, 외래인 경우와 같이 면역계에 의해 인식되는 임의의 자기-항원을 의미한다. 자가-항원은, 이로써 한정되지 않지만, 세포 단백질, 인단백질, 세포 표면 단백질, 세포 지질, 핵산, 세포 표면 수용체를 포함하는 당단백질을 포함한다.
- [0035] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "자가면역 질환"은 자가면역 반응에 기인하는 질환으로 정의된다. 자가면역 질환은 자기-항원에 대한 부적절하고 과다한 반응의 결과이다. 자가면역 질환의 예는, 이로써 한정되지 않지만, 그 중에서도 에디슨 질환, 원형 탈모증, 강직성 척추염, 자가면역 간염, 자가면역 이하선염, 크론병, 당뇨병(I형), 이영양성 수포성 포피박리증, 정소상체염, 사구체신염, 그레이브병, 길랑-바레 증후군, 하시모토 병, 용혈성 빈혈, 전신 홍반 루푸스, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 심상성 천포창, 건선, 류마티스 열, 류마



티스 관절염, 유육종증, 강피증, 소그렌 증후군, 척추 관절염, 갑상선염, 혈관염, 백반증, 점액수종, 악성빈혈, 폐양성 대장염을 포함한다.

[0036] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "자가"는, 동일한 개체로부터 유래하고, 이후에 다시 상기 개체에게 재도입될 수 있는 임의의 물질을 지칭하는 것을 의미한다.

[0037] "동종성"은 동일한 종의 다른 동물에서 유래한 이식편을 지칭한다.

[0038] "이종성"은 상이한 종의 동물에서 유래한 이식편을 지칭한다.

[0039] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "암"은 변종 세포의 신속하고 제어되지 않는 성장을 특징으로 하는 질환으로서 정의된다. 암 세포는 국부적으로 또는 혈류 및 림프계를 통해 체내의 기타 부분으로 확산할 수 있다. 다양한 암의 예로는, 이로써 한정되지 않지만, 유방암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 피부암, 췌장암, 결장직장암, 신장암, 간암, 뇌암, 림프종, 백혈병, 폐암 등을 들 수 있다.

[0040] "공자극 리간드"는, 당해 용어가 본원에서 사용되는 바와 같이, 특히 T 세포 상의 동족 공자극 분자에 결합하여, 예를 들면, 펩티드가 적재된 MHC 분자와 TCR/CD3 복합체의 결합에 의해 제공된 주요 신호 이외에, 이로써 한정되지 않지만, 증식, 활성화, 분화 등을 포함하는 T 세포 반응을 매개하는 신호를 제공하는, 항원 제시 세포(예: aAPC, 수지상 세포, B 세포 등) 상에 분자를 포함한다. 공자극 리간드는, 이로써 한정되지 않지만, CD7, B7-1(CD80), B7-2(CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, 유도성 공자극 리간드(ICOS-L), 세포간 접촉 분자(ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, 림포톡신 베타 수용체, 3/TR6, ILT3, ILT4, HVEM, 툴 리간드에 결합하는 작용제 또는 항체, 및 B7-H3에 특이적으로 결합하는 리간드를 포함한다. 또한, 공자극 리간드는 또한 특히 T 세포 상에 존재하는 공자극 분자에 특이적으로 결합하는 항체, 예를 들면, 이로써 한정되지 않지만, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림파구 기능 연관된 항원-1(LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 및 CD83에 특이적으로 결합하는 리간드를 포함한다.

[0041] "공자극 분자"는 공자극 리간드와 특이적으로 결합하여 T 세포에 의한 공자극 반응, 예를 들면, 이로써 한정되지 않지만, 증식을 매개하는 T 세포 상의 동종 결합 파트너를 지칭한다. 공자극 분자는, 이로써 한정되지 않지만, MHC 부류 I 분자, BTLA 및 툴 (Toll) 리간드 수용체를 포함한다.

[0042] 본원에서 사용된 바와 같이, "공자극 신호"는 TCR/CD3 연결과 같은 일차 신호와 함께 T 세포 증식 및/또는 주요 분자의 상향조절 또는 하향조절을 유도하는 신호를 지칭한다.

[0043] "질환"은 동물의 건강 상태이고, 여기서 상기 동물은 항상성을 유지할 수 없으며, 상기 질병이 개선되지 않는 경우에 동물의 건강은 계속해서 악화된다. 대조적으로, 동물에서의 "장애"는 동물이 항상성을 유지할 수 있지만, 동물의 건강 상태가 장애가 없을 때와 비교하여 덜 유리한 건강 상태이다. 치료하지 않은 상태로 방치하는 경우, 장애는 필연적으로 동물의 건강 상태의 추가적인 저하를 유발하지는 않는다.

[0044] 본원에서 사용된 바와 같은 "유효량"은 치료적 또는 예방적 이익을 제공하는 양을 의미한다.

[0045] "코딩"이란 뉴클레오타이드(즉, rRNA, tRNA 및 mRNA)의 제한된 서열 또는 아미노산의 제한된 서열 중 하나를 갖는 생물학적 공정에서 기타 고분자 및 거대분자의 합성을 위한 주형으로 작용하기 위해 유전자, cDNA 또는 mRNA와 같은 폴리뉴클레오타이드 중의 뉴클레오타이드의 특정 서열의 고유 특성, 및 이들로부터 유래한 생물학적 특성을 지칭한다. 따라서, 유전자는 이러한 유전자에 상응하는 mRNA의 전사 및 번역이 세포 또는 기타 생물학적 시스템에서 단백질을 생성하는 경우에 단백질을 코딩한다. mRNA 서열과 동일하고 일반적으로는 서열 목록으로 제공되는 뉴클레오타이드 서열인 코딩 가닥, 및 유전자 또는 cDNA의 전사를 위한 주형으로 사용되는 비코딩 가닥 둘 모두는 이러한 유전자 또는 cDNA의 단백질 또는 기타 생성물을 코딩하는 것으로 지칭될 수 있다.

[0046] 본원에서 사용된 바와 같이, "내인성"은 생물, 세포, 조직 또는 시스템으로부터의 임의의 재료 또는 이의 내부에서 생성되는 임의의 재료를 지칭한다.

[0047] 본원에서 사용된 바와 같이, "외인성"이란 용어는 유기체, 세포, 조직 또는 시스템으로부터 도입되거나 외부에서 생성되는 임의의 재료를 지칭한다.

[0048] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "발현"은 특정 뉴클레오타이드 서열의 전사 및/또는 번역으로서 정의된다.

[0049] "발현 벡터"는 뉴클레오타이드 서열이 발현되도록 작동적으로 연결된 발현 조절 서열을 포함하는 제조할 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 벡터를 지칭한다. 발현 벡터는 발현을 위해 충분한 시스템 작용 요소를 포함하지만, 발현을 위한 기타 요소는 숙주 세포에 의해 공급되거나, 시험관 내(*in vitro*) 발현 시스템에서 공급될 수 있다. 발현

백터는 당해 기술분야에 공지된 모든 백터, 예를 들면, 코스미드, 플라스미드(예를 들면, 네이키드(naked) 또는 리포좀에 함유됨), 및 재조합 폴리뉴클레오티드를 혼입하는 바이러스(예를 들면, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노 연관 바이러스)를 포함한다.

[0050] "상동성"은 2개의 폴리펩티드 또는 2개의 핵산 분자 사이의 서열 유사성 또는 서열 동일성을 지칭한다. 2개의 비교된 서열 둘 모두에서의 위치는 동일한 염기 또는 아미노산 단량체 서브유닛에 의해 점유되는 경우, 예를 들면, 2개의 DNA 분자 각각에서의 위치가 아데닌에 의해 점유되는 경우, 상기 분자는 그 위치에서 상동성이다. 2개의 서열 사이의 상동성의 비율(%)은  $X/100$ 과 비교한 위치의 개수로 나눈 2개의 서열이 공유하는 정합 또는 상동성 위치의 개수의 함수이다. 예를 들면, 2개의 서열 내의 10개의 위치 중 6개가 정합하거나 상동성인 경우, 상기 2개의 서열은 상동성이 60%이다. 예를 들면, ATGGC 및 TATGGC의 DNA 서열은 50%의 상동성을 공유한다. 일반적으로, 2개의 서열이 최대 상동성을 제공하기 위해 정렬되는 경우에 비교가 수행된다.

[0051] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "면역글로불린" 또는 "Ig"은 항체로서 기능하는 단백질의 부류로서 정의된다. B 세포에 의해 발현되는 항체는 종종 BCR(B 세포 수용체) 또는 항원 수용체로서 지칭된다. 이러한 단백질의 부류에 포함된 5개의 멤버는 IgA, IgG, IgM, IgD 및 IgE이다. IgA는 체내 분비물, 예를 들면, 타액, 눈물, 모유, 위장관 분비물, 및 호흡관 및 비뇨생식관의 점액 분비물에 존재하는 일차 항체이다. IgG는 가장 일반적인 순환 항체이다. IgM은 대부분의 대상체에서 일차 면역 반응에서 생성되는 주요 면역글로불린이다. 이는 응집, 보체 고정 및 기타 항체 반응에서 가장 효율적인 면역글로불린이며, 박테리아 및 바이러스에 대한 방어에서 중요하다. IgD는, 알려져 있지 않은 항체 기능을 갖지만 항원 수용체로서 작용할 수 있는 면역글로불린이다. IgE는 알러겐에 노출시에 비만 세포 및 호염기성 세포로부터의 매개체의 방출을 야기함으로써 즉시형 과민증을 매개하는 면역글로불린이다.

[0052] 본원에서 사용된 바와 같이, "교육용 재료"는 간행물, 기록물, 도면, 또는 본 발명의 조성물 및 방법의 유용성을 전달하기 위해 사용될 수 있는 임의의 기타 표현 매체를 포함한다. 본 발명의 키트의 교육용 재료는, 예를 들면, 본 발명의 핵산, 펩티드 및/또는 조성물을 함유하는 용기에 고정될 수 있거나, 상기 핵산, 펩티드 및/또는 조성물을 함유하는 용기와 함께 선적될 수 있다. 대안적으로는, 상기 교육용 재료는 상기 교육용 재료 및 화합물이 수령인에 의해 협조적으로 사용될 수 있도록 본 발명에 따라 상기 용기와는 별도로 선적될 수 있다.

[0053] "단리"는 천연 상태에서부터 변경되거나 제거된 것을 의미한다. 예를 들면, 살아있는 동물에 자연적으로 존재하는 핵산 또는 펩티드는 "단리"된 것이 아니지만, 이의 자연 상태의 공존하는 물질로부터 부분적으로 또는 완전하게 분리된 동일한 핵산 또는 펩티드는 "단리"된 것이다. 단리된 핵산 또는 단백질은 실질적으로 정제된 형태로 존재할 수 있거나, 예를 들면, 숙주 세포와 같이 비-천연 환경에 존재할 수 있다.

[0054] 본 발명의 문맥에서, 일반적으로 나타나는 핵산 염기에 대한 하기 약어가 사용된다. "A"는 아데노신을 지칭하고, "C"는 시토신을 지칭하고, "G"는 구아닌을 지칭하고, "T"는 티미딘을 지칭하며, "U"는 우리딘을 지칭한다.

[0055] 달리 특정하지 않는 한, "아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열"은 서로에 대한 축퇴 버전이고 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 모든 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 단백질 또는 RNA를 코딩하는 뉴클레오티드 서열이란 문구는 몇몇 버전에서 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 인트론(들)을 함유하는 정도로 인트론을 또한 포함할 수 있다.

[0056] 본원에서 사용된 바와 같은 "렌티바이러스"는 레트로바이러스(Retroviridae)과의 속을 지칭한다. 렌티바이러스는 비-분열성 세포를 감염시킬 수 있는 레트로바이러스 중에서도 특이하지만; 이들은 숙주 세포의 DNA 내로 유의한 양의 유전자 정보를 전달할 수 있고, 따라서 이들은 유전자 전달 백터의 가장 효율적인 방법 중 하나이다. HIV, SIV 및 FIV는 모두 렌티바이러스의 일레이다. 렌티바이러스에서 유래한 백터는 생체내에서 유의한 수준의 유전자 전달을 달성하기 위한 수단을 제공한다.

[0057] 본원에서 사용된 바와 같이, "조절"이란 용어는 처리 또는 화합물의 부재하에 대상체에서의 반응 수준, 및/또는 달리 동일하지만 처리되지 않은 대상체에서의 반응 수준과 비교해서 대상체에서의 반응 수준의 검출가능한 증가 또는 감소를 매개하는 것을 의미한다. 상기 용어는 교유의 신호 또는 반응을 방해하고/하거나 상기 교유의 신호 또는 반응에 영향을 주어 대상체, 바람직하게는 인간에서 유의한 치료 반응을 매개하는 것을 포함한다.

[0058] 달리 특정하지 않는 한, "아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열"은 서로에 대한 축퇴 버전이고 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 모든 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 단백질 및 RNA를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 인트론을 포함할 수 있다.

[0059] 용어 "작동적으로 연결된"은 이중성 핵산 서열의 발현을 야기하는 조절 서열과 이중성 핵산 서열 사이의 기능적

인 연결을 지칭한다. 예를 들면, 제1 핵산 서열이 제2 핵산 서열과 기능적 관계하에 위치한 경우에 상기 제1 핵산 서열은 상기 제2 핵산 서열과 작동적으로 연결되어 있다. 예를 들면, 프로모터가 코딩 서열의 전사 또는 발현에 영향을 미치는 경우에 상기 프로모터는 코딩 서열에 작동적으로 연결되어 있다. 일반적으로, 작동적으로 연결된 DNA 서열은 연속되어 있으며, 2개의 단백질 코딩 영역을 연결하는데 필요한 경우에는 동일한 리딩 프레임 내에 있다.

[0060] 용어 "과발현된" 종양 항원 또는 종양 항원의 "과발현"은 환자의 특정 조직 또는 기관의 정상 세포에서의 발현 수준과 비교하여 이러한 조직 또는 기관 내의 고형 종양과 같은 질환 부분의 세포에서의 종양 항원의 비정상적 발현 수준을 나타내는 것으로 의도된다. 종양 항원의 과발현을 특징으로 하는 고형 종양 또는 혈액학적 악성 종양을 갖는 환자는 당해 기술분야에 공지된 표준 검정에 의해 결정될 수 있다.

[0061] 면역원성 조성물의 "비경구" 투여는, 예를 들면, 피하(s.c.), 정맥 내(i.v.), 근육내(i.m.) 또는 흉골내 주사 또는 주입 기술을 포함한다.

[0062] 용어 "환자", "대상체", "개체" 등은 본원에서 상호 교환적으로 사용되며, 시험관내 또는 원위치(*in situ*)에서 본원에 기재된 방법에 적용가능한 임의의 동물 또는 이의 세포를 지칭한다. 특정의 비제한적인 양태에서, 환자, 대상체 또는 개체는 인간이다.

[0063] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "폴리뉴클레오티드"는 뉴클레오티드의 채로서 정의된다. 더욱이, 핵산은 뉴클레오티드의 고분자이다. 따라서, 본원에서 사용된 바와 같은 핵산 및 폴리뉴클레오티드는 상호 교환적이다. 당해 기술분야의 숙련자는 핵산이 단량체성 "뉴클레오티드"로 가수분해될 수 있는 폴리뉴클레오티드라는 일반 지식을 갖는다. 단량체성 뉴클레오티드는 뉴클레오시드로 가수분해될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 폴리뉴클레오티드는, 이로써 한정되지 않지만, 재조합 수단, 즉 통상적인 클로닝 기술 및 PCR 등을 사용하여 재조합 라이브러리 또는 세포 계능으로부터의 핵산 서열의 클로닝을 포함하는, 당해 기술분야에서 이용가능한 임의의 수단, 및 합성 수단에 의해 수득되는 모든 핵산 서열을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0064] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "펩티드", "폴리펩티드" 및 "단백질"은 상호 교환적으로 사용되며, 펩티드 결합에 의해 공유 결합된 아미노산 잔기로 구성된 화합물을 지칭한다. 단백질 또는 펩티드는 적어도 2개의 아미노산을 함유해야 하며, 단백질 또는 펩티드의 서열을 포함할 수 있는 아미노산의 최대 개수에는 어떠한 제한도 없다. 폴리펩티드는 펩티드 결합에 의해 서로 연결된 2개 이상의 아미노산을 포함하는 임의의 펩티드 또는 단백질을 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 상기 용어는 당해 기술분야에서 펩티드, 올리고펩티드 및 올리고머로서 일반적으로 지칭되는 단쇄, 및 다수의 유형이 존재하는 단백질로서 당해 기술분야에서 일반적으로 지칭되는 장쇄 둘 모두를 지칭한다. 기타 펩티드 중에서, "폴리펩티드"는, 예를 들면, 생물학적 활성 단편, 실질적으로 상동성 폴리펩티드, 올리고펩티드, 호모이량체, 헤테로이량체, 폴리펩티드의 변이체, 변형된 폴리펩티드, 유도체, 유사체 및 융합 단백질을 포함한다. 상기 폴리펩티드는 천연 펩티드, 재조합 펩티드, 합성 펩티드 또는 이의 조합을 포함한다.

[0065] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "프로모터"는 세포의 합성 기구, 또는 폴리뉴클레오티드 서열의 특정 전사를 개시하기 위해 요구되는 도입된 합성 기구에 의해 인식되는 DNA 서열로서 정의된다.

[0066] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "프로모터/조절 서열"은 프로모터/조절 서열에 작동적으로 연결된 유전자 산물의 발현에 요구되는 핵산 서열을 의미한다. 몇몇 경우에, 이러한 서열은 코어 프로모터 서열일 수 있으며, 기타 예에서 이러한 서열은 또한 유전자 산물의 발현에 요구되는 인핸서 서열 및 기타 조절 요소를 포함할 수 있다. 프로모터/조절 서열은, 예를 들면, 조직 특이적 방식으로 유전자 산물을 발현하는 것일 수 있다.

[0067] "구성" 프로모터는 유전자 산물을 코딩하거나 특정하는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결되는 경우에 유전자 산물이 세포의 대부분 또는 모든 생리학적 조건하에 세포에서 생성되도록 하는 뉴클레오티드 서열이다.

[0068] "유도" 프로모터는 유전자 산물을 코딩하거나 특정하는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결되는 경우에 상기 프로모터에 상응하는 유도인자(inducer)가 세포에 존재할 때에만 유전자 산물이 실질적으로 세포에서 생성되도록 하는 뉴클레오티드 서열이다.

[0069] "조직 특이적" 프로모터는 유전자에 의해 코딩되거나 특정된 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결되는 경우에 세포가 프로모터에 상응하는 조직 유형의 세포일 때에만 실질적으로 세포에서 생성되도록 하는 뉴클레오티드 서열이다.

[0070] 항체와 관련하여 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "특이적 결합"이란, 특정 항원을 인식하지만, 샘플 중에서 기



타 분자를 실질적으로 인식하거나 결합하지 못하는 항체를 의미한다. 예를 들면, 하나의 종으로부터의 항원에 특이적으로 결합하는 항체는 또한 하나 이상의 종으로부터의 이러한 항원에도 결합할 수 있다. 그러나, 이러한 종간 반응성은 그 자체가 항체의 분류를 특이적인 것으로 변경하지는 않는다. 또 다른 예에서, 항원에 특이적으로 결합하는 항체는 또한 항원의 상이한 대립유전자 형태에 결합할 수 있다. 그러나, 이러한 교차 반응성은 그 자체가 항체의 분류를 특이적인 것으로 변경하지는 않는다. 몇몇 경우, 용어 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합하는"은 제2 화학종과 항체, 단백질 또는 펩티드의 상호작용과 관련하여 상기 상호작용이 상기 화학종 상의 특정한 구조(예를 들면, 항원성 결정인자 또는 에피토프)의 존재에 의존한다는 것을 의미하기 위해 사용될 수 있지만, 예를 들면, 항체는 일반적으로 단백질이 아닌 특정 단백질 구조를 인식하고 이에 결합한다. 항체가 에피토프 "A"에 특이적인 경우, 표지된 "A" 및 항체를 포함하는 반응에서 에피토프 A(또는 유리의 비표지 A)를 함유하는 분자의 존재는 항체에 결합한 표지된 A의 양을 감소시킬 것이다.

- [0071] 용어 "자극"이란 자극 분자(예를 들면, a TCR/CD3 복합체)와 이의 동종 리간드가 결합하여, 이로써 한정되지 않지만, TCR/CD3 복합체를 통한 신호 형질도입 등의 신호 형질도입 사건(event)을 매개함으로써 유도된 일차 반응을 의미한다. 자극은 TGF- $\beta$ 의 하향조절, 및/또는 세포골격 구조의 재구성 등과 같이 특정 분자의 변경된 발현을 매개할 수 있다.
- [0072] "자극 분자"는, 용어가 본원에서 사용되는 경우, 항원 제시 세포에 존재하는 동종 자극 리간드와 특이적으로 결합하는 T 세포 상의 분자를 의미한다.
- [0073] "자극 리간드"는, 본원에서 사용된 바와 같이, 항원 제시 세포(예를 들면, aAPC, 수지상 세포, B 세포 등) 상에 존재하는 경우에 T 세포 상의 동종 결합 파트너(본원에서 "자극 분자"로서 지칭됨)와 특이적으로 결합하여, 이로써 한정되지 않지만, 활성화, 면역 반응의 개시, 증식 등을 포함하는 T 세포에 의한 일차 반응을 매개할 수 있는 리간드를 의미한다. 자극 리간드는 당해 기술분야에 공지되어 있으며, 그 중에서도 펩티드가 적재된 MHC 부류 I 분자, 항-CD3 항체, 과작동제 항-CD28 항체, 및 과작동제 항-CD2 항체를 포함한다.
- [0074] 용어 "대상체", "환자" 및 "개체"는 본원에서 상호 교환적으로 사용되고, 면역 반응이 유도될 수 있는 살아 있는 생물(예를 들면, 포유동물)를 포함하는 것으로 의도된다. 대상체의 예로는 인간, 개, 고양이, 마우스, 랫트 및 이의 유전자 도입 종을 들 수 있다.
- [0075] 본원에서 사용된 바와 같이, "실질적으로 정제된" 세포는 기타 세포 유형을 본질적으로 포함하지 않는 세포이다. 실질적으로 정제된 세포는 또한 이의 자연적으로 발생하는 상태에서 세포가 통상 연관되어 있는 기타 세포 유형과는 분리되어 있는 세포를 지칭한다. 몇몇 경우, 실질적으로 정제된 세포의 모집단은 세포의 상동성 모집단을 지칭한다. 기타 예에서, 이러한 용어는 단순히 이들의 자연 상태에서 이들이 자연적으로 연관되어 있는 세포와는 분리되어 있던 세포를 지칭한다. 몇몇 실시형태에서, 상기 세포는 시험관 내에서 배양된다. 기타 실시형태에서, 상기 세포는 시험관 내에서 배양되지 않는다.
- [0076] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "치료"는 처치 및/또는 예방을 의미한다. 치료 효과는 질병 상태의 억제, 완화 또는 소거에 의해 수득된다.
- [0077] 용어 "치료 유효량"은 연구원, 의사, 또는 기타 임상가에 의해 탐구되고 있는 조직, 시스템 또는 대상체의 생물학적 반응 또는 의학적 반응을 유도할 대상 화합물의 양을 지칭한다. 용어 "치료 유효량"은 화합물이 투여되는 경우에 치료될 장애 또는 질환의 하나 이상의 징후 또는 증상의 발생을 어느 정도 예방하거나 완화하기에 충분한 화합물의 양을 포함한다. 치료 유효량은 화합물, 질병 및 이의 중증도, 및 치료될 개체의 연령, 체중 등에 따라 달라질 수 있다.
- [0078] 본원에서 당해 용어가 사용되는 경우 질병의 "치료"는 대상체가 경험한 질환 또는 장애의 적어도 하나의 징후 또는 증상의 빈도 또는 중증도를 감소시키는 것을 의미한다.
- [0079] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "형질감염" 또는 "형질전환" 또는 "형질도입"은 숙주 세포 내로 외인성 핵산이 전달되거나 도입되는 프로세스를 지칭한다. "형질감염" 또는 "형질전환" 또는 "형질도입"된 세포는 외인성 핵산으로 형질감염, 형질전환 또는 형질도입되어 있는 것이다. 상기 세포는 일차 대상 세포 및 이의 자손을 포함한다.
- [0080] 본원에서 사용된 바와 같은 문구 "전사 조절하" 또는 "작동적으로 연결된"은 RNA 폴리머라아제에 의한 전사의 개시 및 폴리뉴클레오타이드의 발현을 조절하기 위해 프로모터가 폴리뉴클레오타이드에 대해 정확한 위치 및 배향으로 존재한다는 것을 의미한다.

- [0081] "백터"는 단리된 핵산을 포함하고 단리된 핵산을 세포의 내부로 전달하기 위해 사용될 수 있는 물질의 조성물이다. 이로써 한정되지 않지만, 선형 폴리뉴클레오티드, 이온성 또는 양친매성 화합물과 연관된 폴리뉴클레오티드, 플라스미드 및 바이러스를 포함하는 다수의 백터는 당해 기술분야에 공지되어 있다. 따라서, 용어 "백터"는 자가 복제 플라스미드 또는 바이러스를 포함한다. 상기 용어는 또한, 예를 들면, 폴리리신 화합물, 리포솜 등과 같이 세포 내로 핵산의 전달을 촉진하는 비-플라스미드 및 비-바이러스성 화합물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 바이러스 백터의 예로는, 이로써 한정되지 않지만, 아데노바이러스 백터, 아데노-연관 바이러스 백터, 레트로바이러스 백터 등을 들 수 있다.
- [0082] 범위: 본원의 개시내용 전반에 걸쳐, 본 발명의 다양한 양태가 범위 형식으로 제시될 수 있다. 범위 형식의 기재는 단지 편의 및 간결성을 위한 것으로 이해되어야 하며, 본 발명의 범주에 대한 유연성 없는 제한으로 해석되어서는 안된다. 따라서, 범위에 대한 기재는 이러한 범위 내의 각각 수치 뿐만 아니라 가능한 부분범위 모두를 구체적으로 개시하고 있는 것으로 간주되어야 한다. 예를 들면, 1 내지 6과 같은 범위의 기재는 이러한 범위의 개개 수치, 예를 들면, 1, 2, 2.7, 3, 4, 5, 5.3 및 6 뿐만 아니라 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 6, 3 내지 6 등과 같이 부분범위를 구체적으로 개시하고 있는 것으로 간주되어야 한다. 이는 상기 범위의 너비와는 무관하게 적용된다.
- [0083] 기재
- [0084] 본 발명은 CAR T 세포 치료에 의해 비-암성 세포의 고갈을 제한하는 조성물 및 방법을 제공한다. 본원에 개시된 바와 같이, 치료 CAR T 세포는 이의 표적에 결합되는 경우에 항종양 특성을 나타내고, 억제 CAR은 상기 억제 CAR이 이의 표적에 결합되는 경우에 CAR T 세포 활성화의 억제를 야기한다.
- [0085] CAR의 유형과 관계없이, CAR은 세포질 도메인과 융합된 항원 결합 도메인을 갖는 세포의 도메인을 포함하도록 조작된다. 한 가지 실시형태에서, CAR은, T 세포에서 발현되는 경우, 항원 특이성에 기반하여 항원 인식을 재유도할 수 있다. 예시적 항원은 CD19인데, 이는 이 항원이 B 세포 림프종 상에서 발현되기 때문이다. 그러나, CD19는 또한 정상 B 세포 상에서 발현되고, 따라서 항-CD19 도메인을 포함하는 CAR은 정상 B 세포의 고갈을 야기할 수 있다. 정상 B 세포의 고갈은, B 세포가 감염의 조절에서 T 세포를 통상 보조하기 때문에 치료된 대상체가 감염에 감수성으로 되도록 할 수 있다. 본 발명은 CAR T 세포 치료 동안 정상 조직의 고갈을 제한하는 조성물 및 방법을 제공한다. 한 가지 실시형태에서, 본 발명은 건강한 방관자 세포의 고갈을 제한하면서 CAR T 세포 치료를 사용하여 암 및 기타 장애를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0086] 한 가지 실시형태에서, 본 발명은 CAR T 세포 활성을 제어 또는 조절하는 것을 포함한다. 한 가지 실시형태에서, 본 발명은 복수 유형의 CAR을 발현하도록 T 세포를 유전적으로 변형시키는 것과 관련된 조성물 및 방법을 포함하고, 여기서 CAR T 세포는 이들의 표적 수용체에 대한 복수 유형의 CAR의 결합에 의존한다. 복수 유형의 CAR의 결합에 대한 의존성은 CAR T 세포의 용해 활성화의 특이성을 개선시킨다.
- [0087] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 T 세포를 억제 CAR로 유전자 변형시키는 것과 관련된 조성물 및 방법을 포함한다. 한 가지 실시형태에서, 억제 CAR은 정상의 비-암성 세포와 연관된 항원을 인식하는 세포의 항원 결합 도메인, 및 억제 세포질 도메인을 포함한다.
- [0088] 한 가지 실시형태에서, 본 발명은 T 세포가 억제 CAR 및 치료 종양 지향된 CAR을 발현하도록 유전적으로 변형되는 이중 CAR을 제공한다. 한 가지 실시형태에서, 정상의 비-암성 세포에 대한 억제 CAR의 결합은 CAR T 세포의 억제를 야기한다. 예를 들면, 한 가지 실시형태에서, 억제 CAR의 결합은 CAR T 세포의 사멸을 야기한다. 또 다른 실시형태에서, 억제 CAR의 결합은 치료 종양 지향된 CAR의 신호 형질도입의 억제를 야기한다. 또 다른 실시형태에서, 억제 CAR의 결합은 변형된 T 세포가 이의 항-종양 활성을 나타내지 않도록 하는 신호 형질도입 신호의 유도를 야기한다. 따라서, 본 발명의 이중 CAR은 CAR T 세포의 활성을 조절하는 기구를 제공한다.
- [0089] 한 가지 실시형태에서, 본 발명은 치료 종양 지향된 CAR에 결합하는 약물-분자 접합체와 관련된 조성물 및 방법을 포함한다. 한 가지 실시형태에서, 치료 종양 지향된 CAR에 대한 접합체의 결합은 CAR 및 약물-분자 접합체의 내재화를 야기한다. 한 가지 실시형태에서, CAR에 대한 접합체의 결합은 CAR T 세포의 사멸을 야기한다. 또 다른 실시형태에서, CAR에 대한 접합체의 결합은 치료 종양 지향된 CAR의 신호 형질도입의 억제를 야기한다. 또 다른 실시형태에서, CAR에 대한 접합체의 결합은 변형된 T 세포가 이의 항-종양 활성을 나타내지 않도록 하는 신호 형질도입 신호의 유도를 야기한다. 따라서, 본 발명은 CAR T 세포의 활성을 조절하는 기구를 제공한다.

- [0090] 한 가지 실시형태에서, 본 발명은 정상의 건강한 조직의 고갈을 최소화하면서 CAR T 세포 치료를 사용하여 암 및 기타 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 암은 혈액학적 악성종양, 고형 종양, 원발성 또는 전이성 종양일 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법을 사용하여 치료될 수 있는 기타 질환은 바이러스, 박테리아 및 기생충 감염 및 자가면역 질환을 포함한다.
- [0091] 1. 다중 CAR 전략
- [0092] 한 가지 실시형태에서, 본 발명은 복수 유형의 CAR을 발현시키기 위해 T 세포를 유전자 변형시킴으로써 CAR T 세포 치료 특이성을 증가시키고 정상의 건강한 조직의 고갈을 제한하는 조성물 및 방법을 제공하며, 여기서 T 세포의 활성화는 복수 유형의 CAR의 결합에 의존한다. 복수 유형의 CAR의 결합의 의존성은 치료의 특이성을 증가시키고, 따라서 정상의 건강한 조직의 고갈의 양을 제한한다. 본원의 다른 개소에서 기재된 바와 같이, 복수 유형의 CAR을 발현시키도록 변형된 T 세포는 렌티바이러스 벡터, 시험관내 전사된 RNA 및 이들의 조합을 세포에 투여함으로써 생성될 수 있다.
- [0093] 키메라 항원 수용체
- [0094] 본 발명은 세포외 및 세포내 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 제공한다. CAR을 제조하는 조성물 및 방법은 국제특허출원 제PCT/US11/64191호에 기재되어 있으며, 이는 이의 전체가 본원에서 참조로서 도입된다.
- [0095] 상기 세포외 도메인은 달리는 항원 결합 도메인으로 지칭되는 표적 특이적 결합 요소를 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포외 도메인은 또한 힌지 도메인을 포함한다. 한 가지 실시형태에서, 세포내 도메인 또는 달리는 세포질 도메인은 공자극 신호전달 영역 및 제타 쇄 부분을 포함한다. 상기 공자극 신호전달 영역은 공자극 분자의 세포내 도메인을 포함하는 CAR의 일부를 지칭한다. 공자극 분자는 항원에 대한 림프구의 효율적인 반응에 요구되는 항원 수용체 또는 이들의 리간드가 아닌 세포 표면 분자이다.
- [0096] 상기 CAR의 세포외 도메인과 막관통 도메인 사이, 또는 상기 CAR의 세포질 도메인과 막관통 도메인 사이에는 스페이서 도메인이 혼입되어 있을 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "스페이서 도메인"은 일반적으로 폴리펩티드 쇄에서 막관통 도메인을 세포외 도메인 및 세포질 도메인 중 하나에 연결시키는 기능을 갖는 임의의 올리고펩티드 또는 폴리펩티드를 의미한다. 스페이서 도메인은 최대 300개 아미노산, 바람직하게는 10 내지 100개 아미노산 및 가장 바람직하게는 25 내지 50개 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0097] 본 발명은 직접 세포 내로 형질도입될 수 있는 CAR을 발현하는 레트로바이러스 및 렌티바이러스 벡터 작제물을 포함한다. 본 발명은 또한 세포 내로 형질감염될 수 있는 RNA 작제물을 포함한다. 형질감염에 사용되는 mRNA를 생성하는 방법은, 3' 및 5' 비번역 서열("UTR"), 5' 캡 및/또는 내부 리보솜 도입 부위(IRES), 발현되는 유전자 및 통상 50 내지 2000개 염기 길이의 폴리A 테일을 함유하는 작제물을 생성하기 위해, 특별하게 설계된 프라임어를 사용한 주형의 시험관내 전사(IVT) 및 이어서 폴리A 부가를 수반한다. 이렇게 생성된 RNA는 상이한 종류의 세포를 효율적으로 형질감염시킬 수 있다. 한 가지 실시형태에서, 주형은 CAR을 위한 서열을 포함한다.
- [0098] 바람직하게는, CAR은 세포외 도메인, 막관통 도메인 및 세포질 도메인을 포함한다. 세포외 도메인 및 막관통 도메인은 이러한 도메인의 임의의 목적 공급원으로부터 유래할 수 있다. 몇몇 예에서, 본 발명의 CAR의 힌지 도메인은 CD8 $\alpha$  힌지 도메인을 포함한다.
- [0099] 한 가지 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 달리는 항원 결합 도메인으로 지칭되는 표적-특이적 결합 요소를 포함한다. 잔기의 선택은 표적 세포의 표면을 한정하는 리간드의 유형 및 개수에 의존한다. 예를 들면, 항원 결합 도메인은 특정한 질환 상태와 연관된 표적 세포 상의 세포 표면 마커로서 작용하는 리간드를 인식하도록 선택될 수 있다. 따라서, 본 발명의 CAR에서 항원 잔기 도메인을 위한 리간드로서 작용할 수 있는 세포 표면 마커의 예로는 바이러스 감염, 박테리아 감염, 기생충 감염, 자가면역 질환 및 암 세포와 연관된 것들을 포함한다.
- [0100] 한 가지 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 종양 세포 상의 항원에 특이적으로 결합하는 목적 항원 결합 도메인을 조작하는 방식으로 목적 종양 항원을 표적화하도록 조작될 수 있다. 본 발명의 맥락에서, "종양 항원" 또는 "과증식성 질환 항원" 또는 "과증식성 질환과 연관된 항원"은 암과 같은 특정 과증식성 질환에 일반적인 항원을 지칭한다. 본원에서 설명된 항원은 단순히 예로서 포함된다. 상기 목록은 제한적인 것으로 의도되지 않으며,

추가예들은 당해 기술분야의 숙련자에게 매우 자명할 것이다.

- [0101] 종양 항원은 면역 반응, 특히 T-세포 매개 면역 반응을 유도하는 종양 세포에 의해 생성된 단백질이다. 본 발명의 항원 결합 도메인의 선택은 치료될 암의 특정한 유형에 의존한 것이다. 종양 항원은 당해 기술분야에 널리 공지되어 있으며, 예를 들면, 신경교종 연관 항원, 암태아 항원(CEA),  $\beta$ -인간 융모성 고나도트로핀, 알파-페토프로테인( $\alpha$ -fetoprotein, AFP), 렉틴 반응성 AFP, 타이로글로블린(thyroglobulin), RAGE-1, MN-CA IX, 인간 텔로머라제 역전사 효소, RU1, RU2(AS), 장내 카복실 에스테라아제, mut hsp70-2, M-CSF, 프로스타제, 전립선 특이적 항원(PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53, 프로스테인, PSMA, Her2/neu, 서바이빈 및 텔로머라제, 전립선-암종 종양 항원-1(PCTA-1), MAGE, ELF2M, 호중구 엘라스타제, 에프린B2, CD22, 인슐린 성장 인자(IGF)-I, IGF-II, IGF-I 수용체 및 메소텔린을 포함한다.
- [0102] 하나의 실시형태에서, 상기 종양 항원은 악성 종양과 연관된 하나 이상의 항원성 암 에피토프를 포함한다. 악성 종양은 면역 공격을 위한 표적 항원으로서 작용할 수 있는 다수의 단백질을 발현시킨다. 이들 분자로는, 이로써 한정되지 않지만, 흑색종의 경우에 MART-1, 티로시나아제 및 GP 100, 및 전립선암의 경우에 전립선 산 포스파타제(PAP) 및 전립선 특이적 항원(PSA)과 같은 조직 특이적 항원을 들 수 있다. 기타 표적 분자는 종양유전자 HER-2/Neu/ErbB-2와 같은 형질전환 관련 분자의 그룹에 속한다. 또 다른 표적 항원의 그룹은 암태아 항원(CEA)과 같은 종양-태아 항원이다. B-세포 림프종에서, 상기 종양 특이적 유전자형 면역글로블린은 개별 종양에 특이적인 진정한 종양 특이적 면역글로블린 항원을 구성한다. CD19, CD20 및 CD37과 같은 B-세포 분화 항원은 B-세포 림프종에서 표적 항원의 기타 후보물질이다. 몇몇 이들 항원(CEA, HER-2, CD19, CD20, 유전자형)은 모노클로날 항체를 이용한 수동 면역요법을 위한 표적으로서 사용되어 왔지만, 제한적으로 성공하였다.
- [0103] 본 발명에서 지칭된 종양 항원의 유형은 또한 종양 특이적 항원(TSA) 또는 종양 연관 항원(TAA)일 수 있다. TSA는 종양 세포에 대해 특이적이며, 체내의 기타 세포 상에 발생하지 않는다. TAA 연관 항원은 종양 세포에 대해 특이하지 않으며, 대신에 항원에 대한 면역학적 내성 상태를 유도하지 못하는 조건하에서 정상 세포 상에서 발현된다. 종양 상에서 항원의 발현은 면역 시스템이 항원에 반응하도록 할 수 있는 조건하에서 발생할 수 있다. TAA는, 면역 시스템이 성숙하지 않아서 반응할 수 없거나, 이들이 정상적으로는 정상 세포 상에서 극도로 낮은 수준으로 통상 존재하지만 종양 세포 상에서는 훨씬 높은 수준으로 발현되는 경우에 태아 발생 도중에 정상 세포 상에서 발현되는 항원일 수 있다.
- [0104] TSA 또는 TAA 항원의 비제한적인 예로는 하기와 같다: MART-1/MelanA(MART-I), gp100(Pmel 17), 티로시나제, TRP-1 및 TRP-2와 같은 분화 항원; MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2 및 p15와 같은 종양 특이적 다중 계통 항원; CEA와 같은 과발현된 태아 항원; p53, Ras, HER-2/neu와 같은 과발현된 종양유전자 및 돌연변이된 종양-억제 유전자; BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR와 같이 염색체 전좌로부터 유래된 독특한 종양 항원; 및 엡스타인-바(Epstein Barr) 바이러스 항원 EBVA 및 인간 파필로마바이러스(HPV) 항원 E6 및 E7과 같은 바이러스성 항원. 기타 거대 단백질-기반 항원으로는 TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, 베타-카테닌, CDK4, Mum-1, p 15, p 16, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, 알파-페토프로테인, 베타-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3/CA 27.29/BCAA, CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68/P1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733/EpCAM, HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90/Mac-2 결합 단백질/사이클로필린 C-연관 단백질, TAAL6, TAG72, TLP 및 TPS를 들 수 있다.
- [0105] 바람직한 실시형태에서, 상기 CAR의 항원 결합 도메인 부분은, 이로써 한정되지 않지만, CD19, CD20, CD22, ROR1, 메소텔린, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, 당지질 F77, EGFRvIII, GD-2, MY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR 등을 포함하는 항원을 표적화한다.
- [0106] 표적화된 목적 항원에 의존하여, 본 발명의 CAR은 목적 항원 표적에 특이적인 적절한 항원 결합 잔기를 포함하도록 조작될 수 있다.
- [0107] 항원 결합 도메인은, 이로써 한정되지 않지만, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 합성 항체, 인간 항체, 인간화된 항체 및 이의 단편을 포함하는 항원에 결합하는 임의의 도메인일 수 있다. 몇몇 예에서, 항원 결합 도메인은 CAR이 궁극적으로 사용될 동일한 종으로부터 유래하는 것이 유리하다. 예를 들면, 인간에서 사용하기 위해, CAR의 항원 결합 도메인은 인간 항체 또는 이의 단편을 포함하는 것이 유리할 수 있다. 따라서, 한 가지 실시형태에서, 항원 결합 도메인 부분은 인간 항체 또는 이의 단편을 포함한다. 또는, 몇몇 실시형태에서, 비-인간 항체는 인간화되고, 여기서 항체의 특정 서열 및 영역은 인간에서 자연적으로 생성되는 항체와의 유사성이 증가하도록 변형된다.



- [0108] 본 발명의 한 가지 실시형태에서, 복수 유형의 CAR은 T 세포의 표면 상에서 발현된다. 상이한 유형의 CAR은 이들의 항원 결합 도메인이 상이할 수 있다. 즉, 한 가지 실시형태에서, 상이한 유형의 CAR은 각각 상이한 항원에 결합한다. 한 가지 실시형태에서, 상이한 항원은 특정 종양을 위한 마커이다. 예를 들면, 한 가지 실시형태에서, 상이한 유형의 CAR은 각각 상이한 항원에 결합하고, 여기서 각각의 항원은 특정 유형의 종양 상에서 발현된다. 이러한 항원의 예는 본원의 다른 개소에서 논의되어 있다.
- [0109] 막관통 도메인과 관련하여, CAR은 상기 CAR의 세포의 도메인에 융합되어 있는 막관통 도메인을 포함하도록 설계될 수 있다. 한 가지 실시형태에서, 상기 CAR의 도메인 중 하나와 자연적으로 연관되어 있는 막관통 도메인이 사용된다. 몇몇 경우, 상기 막관통 도메인은 수용체 복합체의 기타 멤버와의 상호작용을 최소화하기 위해 동일하거나 상이한 표면 막 단백질의 막관통 도메인에 대한 이러한 도메인의 결합을 피하기 위해 선택되거나 아미노산 치환에 의해 변형될 수 있다.
- [0110] 막관통 도메인은 천연 및 합성 공급원 중 하나로부터 유래할 수 있다. 상기 공급원이 천연인 경우, 상기 도메인은 임의의 막-결합된 단백질 또는 막관통 단백질로부터 유래할 수 있다. 본 발명에서 특별히 사용되는 막관통 영역은 T-세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 쇠(즉, 적어도 이들의 막관통 영역(들)을 포함), CD28, CD3, 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 및 CD154, ICOS로부터 유래할 수 있다. 대안적으로는, 상기 막관통 도메인은 합성된 것일 수 있으며, 이러한 경우에 이는 류신 및 발린과 같이 주로 소수성 잔기를 포함할 것이다. 바람직하게는, 페닐알라닌, 트립토판 및 발린의 트리플릿은 합성 막관통 도메인의 각 말단에서 발견될 것이다. 임의로, 짧은 올리고펩티드 또는 폴리펩티드 링커, 바람직하게는 2 내지 10개 아미노산 길이를 갖는 링커는 막관통 도메인과 CAR의 세포질 신호전달 도메인 사이의 연결을 형성할 수 있다. 글리신-세린 더블릿은 특히 적합한 링커를 제공한다.
- [0111] 본 발명의 CAR의 세포질 도메인 또는 달리는 세포내 신호전달 도메인은 CAR이 위치하고 있었던 면역 세포의 정상 효과기 기능들 중 적어도 하나의 활성화에 관여한다. 용어 "효과기 기능"은 세포의 특수한 기능을 지칭한다. T 세포의 효과기 기능은, 예를 들면, 사이토킨의 분비를 포함한 세포용해 활성 또는 헬퍼 활성일 수 있다. 따라서, 용어 "세포내 신호전달 도메인"은 효과기 기능 신호를 전달하고 세포가 특수한 기능을 수행하도록 지시하는 단백질의 부분을 지칭한다. 일반적으로, 전체 세포내 신호전달 도메인이 이용될 수 있는 반면, 많은 경우에 쇠 전체를 사용할 필요가 없다. 세포내 신호전달 도메인의 절단된 부분이 사용되는 한, 이러한 절단된 부분은 효과기 기능 신호를 전달하도록 완전한 쇠를 대신하여 사용될 수 있다. 따라서, 용어 세포내 신호전달 도메인은 효과기 기능 신호를 전달하기에 충분한 세포내 신호전달 도메인의 임의의 절단된 부분을 포함하는 것을 의미한다.
- [0112] 본 발명의 한 가지 실시형태에서, 세포의 효과기 기능은 이들의 표적화된 항원에 대한 복수 유형의 CAR의 결합에 의존한다. 예를 들면, 한 가지 실시형태에서, 이의 표적에 대한 한 유형의 CAR의 결합은 세포의 효과기 기능을 유도하기에 충분하지 않다.
- [0113] 본 발명의 CAR에 사용하기 위한 세포내 신호전달 도메인의 예로는 항원 수용체 관여 이후에 신호 형질도입을 개시하도록 협조적으로 작용하는 T 세포 수용체(TCR) 및 공수용체의 세포질 서열 뿐만 아니라, 이들 서열의 임의의 유도체 또는 변이체, 및 동일한 기능적 능력을 갖는 임의의 합성 서열을 들 수 있다.
- [0114] 단독으로 TCR을 통해 생성된 신호는 T 세포의 완전한 활성화에 불충분하고, 이차 또는 공자극 신호가 또한 요구된다는 것이 공지되어 있다. 따라서, T 세포 활성화는 세포질 신호전달 서열의 2개 상이한 부류에 의해 매개되는 것으로 언급될 수 있으며, 상기 2개 부류에는 TCR을 통한 항원 의존성 일차 활성화를 개시하는 신호전달 서열(일차 세포질 신호전달 서열) 및 이차 또는 공자극 신호를 제공하기 위해 항원 의존성 방식으로 작용하는 신호전달 서열(이차 세포질 신호전달 서열)이 있다.
- [0115] 일차 세포질 신호전달 서열은 자극 방식 또는 억제 방식 중 하나로 TCR 복합체의 일차 활성화를 조절한다. 자극 방식으로 작용하는 일차 세포질 신호전달 서열은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로 공지되어 있는 신호전달 모티프를 함유할 수 있다.
- [0116] 본 발명에서 특별히 사용되는 일차 세포질 신호전달 서열을 함유하는 ITAM의 예로는 TCR 제타, FcR 감마, FcR 베타, CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD5, CD22, CD79a, CD79b 및 CD66d로부터 유래한 ITAM을 들 수 있다. 본 발명의 CAR 내의 세포질 신호전달 분자는 CD3 제타에서 유래한 세포질 신호전달 서열을 포함하는 것이 특히 바람직하다.
- [0117] 한 가지 실시형태에서, 상기 CAR의 세포질 도메인은 CD3-제타 신호전달 도메인 자체를 포함하거나 본 발명의



CAR의 문맥에서 유용한 임의의 기타 목적 세포질 도메인(들)과 조합된 CD3-제타 신호전달 도메인을 포함하도록 설계될 수 있다. 예를 들면, 상기 CAR의 세포질 도메인은 CD3 제타쇄 부분 및 공자극 신호전달 영역을 포함할 수 있다. 상기 공자극 신호전달 영역은 공자극 분자의 세포내 도메인을 포함하는 CAR의 일부를 지칭한다. 공자극 분자는 항원에 대한 림프구의 효율적 반응에 요구되는 항원 수용체 또는 이들의 리간드가 아닌 세포 표면 분자이다. 이러한 분자의 예로는 CD27, CD28, 4-1BB(CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능 연관 항원-1(LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 및 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드 등을 들 수 있다.

[0118] 본 발명의 CAR의 세포질 신호전달 부분 내의 세포질 신호전달 서열은 랜덤 또는 지정된 순서로 서로 연결될 수 있다. 임의로, 짧은 올리고펩티드 또는 폴리펩티드 링커, 바람직하게는 2 내지 10개 아미노산 길이를 갖는 링커는 연결을 형성할 수 있다. 글리신-세린 더블릿은 특히 적합한 링커를 제공한다.

[0119] 한 가지 실시형태에서, 상기 세포질 도메인은 CD3-제타의 신호전달 도메인을 포함하도록 설계되었다. 다른 실시형태에서, 상기 세포질 도메인은 CD3-제타의 신호전달 도메인 및 4-1BB의 신호전달 도메인을 포함하도록 설계된다. 본 발명의 또 다른 실시형태에서, 복수 유형의 CAR은 세포 상에 발현되고, 여기서 상이한 유형의 CAR은 이들의 세포질 도메인이 상이할 수 있다. 한 가지 실시형태에서, 적어도 한 유형의 CAR은 CD3 제타 도메인을 포함하고, 적어도 한 유형의 CAR은 공자극 도메인, 예를 들면, 4-1BB 도메인을 포함한다. 그러나, 상이한 유형의 CAR은 임의의 특정 세포질 도메인에 의해 제한되지 않는다. 예를 들면, 각 유형의 CAR은, 각각의 개개 유형의 CAR의 결합이 효과기 기능을 유도하기에 불충분하지만 복수 유형의 CAR의 결합이 효과기 기능을 유도할 수 있도록, 임의의 ITAM 함유 서열, 공자극 도메인 또는 이의 조합을 포함할 수 있다. 즉, 각 유형의 CAR의 도메인은 효과기 기능을 유도하도록 함께 작용한다.

## [0120] 2. 억제 CAR 전략

[0121] 본 발명은 억제 CAR을 발현시키기 위해 T 세포를 유전자 변형시킴으로써 정상의 건강한 조직의 고갈을 제한하는 조성물 및 방법을 제공한다. 한 가지 실시형태에서, 본 발명의 억제 CAR은 세포외 도메인 및 세포내 도메인을 포함한다. 세포외 도메인은 항원 결합 도메인으로 지칭되는 표적-특이적 결합 요소를 포함한다. 한 가지 실시형태에서, 억제 CAR은, 정상의 건강한 조직과 연관된 항원에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함한다. 예를 들면, 한 가지 실시형태에서, 억제 CAR의 항원 결합 도메인은 비-암성 세포에서 특히 발견되는 항원에 결합한다. 본원의 다른 개소에 기재된 바와 같이, 항원 결합 도메인은, 이로써 한정되지 않지만, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 합성 항체, 인간 항체, 인간화된 항체 및 이의 단편을 포함하는 항원에 결합하는 임의의 도메인일 수 있다.

[0122] 본 발명의 억제 CAR은 막관통 도메인을 포함할 수 있다. 본원의 다른 개소에 기재된 바와 같이, 막관통 도메인은 임의의 막-결합된 또는 막관통 단백질로부터 유래할 수 있다. 또는, 막관통 도메인은 합성의 것일 수 있다.

[0123] 본 발명의 억제 CAR은 CAR T 세포의 활성의 억제에 관여하는 세포질 도메인을 포함한다. 본 발명의 한 가지 실시형태에서, 억제 CAR은 본원의 다른 개소에 기재된 바와 같은 하나 이상의 치료적 항-종양 CAR과 동일한 T 세포에서 발현된다. 한 가지 실시형태에서, 억제 CAR의 세포질 도메인은 T 세포의 활성화를 방지하고, T 세포의 세포용해 활성을 억제하거나, T 세포의 헬퍼 활성을 억제한다.

[0124] 본 발명의 억제 CAR은 CAR T 세포 활성을 억제하는 임의의 특정 기능으로 제한되지 않는다. 예를 들면, 억제 CAR은, 이의 표적 항원에 결합하면, 치료 CAR의 내재화를 유도하고 CAR T 세포의 활성화를 방지하거나 CAR T 세포가 사멸하는 것을 유도하는 세포질 도메인을 포함한다.

[0125] 한 가지 실시형태에서, 억제 CAR의 세포질 도메인은 억제 ITAM 함유 서열을 포함한다.

[0126] 한 가지 실시형태에서, 억제 CAR의 세포질 도메인은 사멸 도메인(DD)을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, DD는 TNFR1, Fas, DR3, DR4/TrailR1, DR5/TrailR2, DR6, FADD, MyD88, Raidd, IRAK, IRAK-2, IRAK-M, p75NTR, Tradd, DAP 키나제, RIP, NMP84 및 안키린과 같은 DD 단백질의 DD 도메인과 서열 상동성을 공유하는 영역을 지칭하고, 기타 공지된 DD 단백질의 특성과 유사한 결합 특성을 갖는 것으로 본원에서 밝혀졌다.

[0127] 종양 괴사 인자(TNF) 수용체 계열의 아홉토시스-유도 멤버는 어댑터 단백질과 이들의 세포내 사멸 도메인(DD)의 상호작용을 통해 리간드화 수용체 복합체에 대한 카스파제-계열 세포 사멸 프로테아제의 프리폼을 모집한다[참조: Ashkenazi and Dixit, Science 281 : 1305-1308 (1998); Wallach et al, Annu. Rev. Immunol. 17:331-367 (1999)]. 몇몇 카스파제 계열 멤버는 공지되어 있고, 예를 들면, 카스파제-1, 카스파제-2, 카스파제-3, 카스파

제-4, 카스파제-5, 카스파제-6, 카스파제-7, 카스파제-8, 카스파제-9, 카스파제-10, 카스파제-11, 카스파제-12, 카스파제-13 및 카스파제-14가 있다[참조: Grutter, Curr. Opin. Struct. Biol. 10:649-655 (2000)].

[0128] TNF-R1 및 Fas와 같은 사멸 수용체는 이들의 세포내 DD를 통해 신호전달하기 위해 올리고머화한다. 이 신호는 세포질 어댑터에 의해 카스파제로 전송된다. Fas에 대한 사멸 유도 신호전달 복합체(DISC)는 Fas 삼량체, Fadd 및 카스파제-8을 최소한으로 포함하는 것으로 밝혀졌다. 유사한 DISC 복합체는 DR4 및 DR5의 경우에 발견되었다. TRAIL 수용체의 경우에, 혼합된 복합체, 예를 들면, 삼량체를 형성하기 위해 2개의 DR4 + 1개의 DR5는 기능성인 것으로 생각된다. 사멸 도메인이 없거나 불완전한 사멸 도메인을 갖는 데코이 수용체, 예를 들면, DcR1, DcR2 및 DcR3은 DISC 형성을 간섭함으로써 가능하게는 아포토시스를 억제할 수 있다.

[0129] 몇몇 TNFR-계열 멤버의 세포내 영역(TNFR1; p75NTR, p75NGFR로서도 불리우는 뉴로트로핀, 신경성장인자 수용체; Fas; DR3; DR4/TrailR1; DR5/TrailR2; DR6)은 "사멸 도메인"(DD)로서 공지된 구조를 함유하고, 리간드에 의해 결합되는 경우에 아포토시스를 유도한다[참조: Ashkenazi and Dixit, Science 281 : 1305-1308 (1998), Wallach et al, Annu. Rev. Immunol. 17:331-367 (1999)]. 이러한 "사멸 수용체"에 의한 아포토시스 유도의 메카니즘은, 특정 카스파제-계열 세포 사멸 프로테아제의 프로도메인에 결합하는 어댑터 단백질의 수용체 복합체로의 동원을 수반한다. 카스파제는, 전형적으로 이들의 활성화를 위해 단백질분해 프로세싱을 필요로 하는 지모젠(zymogen)으로서 살아있는 세포에 존재한다. 그러나, 카스파제의 프리폼은 약한 프로테아제 활성을 보유하기 때문에, 이들의 수용체-매개된 클러스터링은 "유도된 근접" 메카니즘을 통해 트랜스-단백질분해를 야기한다[참조: Salvesen et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 10964-10967 (1999)].

[0130] 한 가지 실시형태에서, 억제 CAR은 정상의 비-암성 세포와 연관된 항원에 결합하는 세포의 항원 결합 도메인, 및 사멸 도메인 또는 이의 부분을 포함하는 세포질 도메인을 포함한다. 한 가지 실시형태에서, 이의 표적 항원에 대한 억제 CAR의 결합은 CAR T 세포의 아포토시스 사멸을 야기하고, 이에 의해 CAR T 세포의 활성화를 방지하고 정상의 건강한 조직의 고갈을 감소시킨다. 한 가지 실시형태에서, T 세포는 유전자 변형되어, 본원의 다른 개소에 기재된 바와 같이 억제 CAR 및 하나 이상의 치료적 종양-표적화된 CAR을 발현시킨다. 종양 항원에 대한 CAR T 세포 결합은 CAR T 세포의 활성화 및 종양의 제거를 야기하고, 비-암성 조직과 연관된 항원에 대한 CAR T 세포 결합은 CAR T 세포 활성화의 억제를 야기한다(예를 들면, 활성화의 억제, 아포토시스 세포 사멸 등). 본원의 다른 개소에 기재된 바와 같이, 억제 CAR 및 적어도 하나의 종양-지향된 CAR을 발현하도록 변형된 T 세포는 렌티바이러스 벡터, 시험관내 전사된 RNA 또는 이들의 조합을 세포에 투여함으로써 생성할 수 있다.

### [0131] 3. 약물-분자 접합체

[0132] 본 발명은 약물-분자 접합체를 CAR T 세포 치료가 제공되는 대상체에게 투여함으로써 정상의 건강한 조직의 고갈을 제한하기 위해 CAR T 세포 치료를 조절하는 조성물 및 방법을 제공한다. 한 가지 실시형태에서, 약물-분자 접합체는 CAR에 결합하여, CAR 및 약물-분자 접합체의 내재화를 야기한다. 본 발명은 CAR이 표적 인식 후에 일시적으로 내재화된다는 관찰에 기반한다. 따라서, 이러한 거동은 CAR T 세포 활성을 적극적이고 제어가능하게 조절하는 방법에서 이용될 수 있다. 추가로, 본원에 기재된 약물-분자 접합체의 투여를 통한 CAR T 세포 활성화의 조절은 CAR T 세포의 유전자 변형을 추가로 필요로 하지 않고, 이에 의해 세포의 추가의 유전자 조작에 요구되는 과도한 기술적 복잡성 및 증가된 비용의 필요성을 배제한다.

### [0133] 분자

[0134] 한 가지 실시형태에서, 약물-분자 접합체의 분자는 유전자 변형된 세포 상에서 발현된 CAR에 결합하는 분자를 포함한다. 상기 분자는 CAR의 임의의 부분에 결합할 수 있다. 예를 들면, 상기 분자는 CAR의 항원 결합 영역 또는 링커 영역에 결합할 수 있다. 상기 분자는 CAR의 영역에 결합할 수 있는 임의 유형의 것일 수 있다. 예를 들면, 상기 분자는 펩티드, 뉴클레오티드, 항체, 소분자 등일 수 있다.

[0135] 한 가지 실시형태에서, 상기 분자는 CAR의 세포외 도메인에 결합하도록 표적화되는 항체 또는 이의 단편을 포함한다. 한 가지 실시형태에서, 항체는 항원에 결합하고, 항원은 CAR 또는 CAR의 영역이다. 항체를 제조 및 사용하는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들면, 본 발명에 유용한 모노클로날 항체는 당해 기술분야에 공지된 표준 면역학적 기술에 따라 래빗을 면역화함으로써 생성된다[참조: Harlow et al, 1988, In: Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y.].

- [0136] 그러나, 본 발명은 이들 항체 또는 상기 항원의 이들 부분을 포함하는 방법 및 조성물로 단지 한정되는 것으로 이해되지 않아야 한다. 오히려, 본 발명은 당해 용어가 본원의 다른 개소에 정의된 바와 같은 다른 항체, 항원 또는 이의 부분을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 당해 기술분야의 숙련가는, 본원에서 제공된 개시에 기반하여, 상기 항체가 CAR의 임의의 부분과 특이적으로 결합할 수 있고 CAR의 전장 또는 임의의 부분이 이에 특이적인 항체를 생성하기 위해 사용될 수 있는 것으로 이해할 것이다. 그러나, 본 발명은 면역원으로서 전장 단백질을 사용하는 것으로 한정되지 않는다. 오히려, 본 발명은 특정 항원과 특이적으로 결합하는 항체를 생성하기 위해 단백질의 면역원성 부분을 사용하는 것을 포함한다. 즉, 본 발명은 항원의 면역원성 부분 또는 항원성 결정기를 사용하여 동물을 면역화하는 것을 포함한다.
- [0137] 추가로, 당해 기술분야의 숙련가는, 본원에 제공된 개시에 기반하여, 비-보존된 면역원성 부분을 사용하여 비-보존된 영역에 특이적인 항체를 생성하고, 이에 의해 하나 이상의 보존된 부분을 공유할 수 있는 다른 단백질과 교차 반응하지 않는 항체를 생성할 수 있음을 이해할 수 있다. 따라서, 당해 기술분야의 숙련가는, 본원에 제공된 개시에 기반하여, 목적 항원의 비-보존된 영역을 사용하여, 당해 항원에만 특이적이고 CAR의 다른 유형을 포함하는 다른 단백질과 비-특이적으로 교차 반응하지 않는 항체를 생성할 수 있다.
- [0138] 당해 기술분야의 숙련가는, 본원에 제공된 개시에 기반하여, 본 발명이 단일 항원성 에피토프를 인식하는 단일 항체의 사용을 포함하지만 본 발명이 단일 항체의 사용으로 한정되지 않음을 이해할 것이다. 대신에, 본 발명은, 상기 항체가 동일하거나 상이한 항원성 단백질 에피토프로 지향할 수 있는 적어도 하나의 항체의 사용을 포함한다.
- [0139] 폴리클로날 항체의 생성은 목적 동물을 항원으로 접종시키고, 예를 들면, 문헌[참조: Harlow et al., 1988, In: Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y.]에 기재된 것들과 같은 표준 항체 생성 방법을 사용하여 상기 항원을 이로부터 특이적으로 결합하는 항체를 분리함으로써 달성된다.
- [0140] 단백질 또는 펩티드의 전장 또는 펩티드 단편에 대해 지향된 모노클로날 항체는 임의의 공지된 모노클로날 항체 제조 공정, 예를 들면, 문헌[참조: Harlow et al., 1988, In: Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y. 및 Tuszynski et al., 1988, Blood, 72: 109-115]에 기재된 것들을 사용하여 제조할 수 있다. 목적 펩티드의 양은 또한 화학적 합성 기술을 사용하여 합성할 수 있다. 또는, 목적 펩티드를 코딩하는 DNA는 클로닝되고, 대량의 펩티드의 생성에 적합한 세포에서 적절한 프로모터 서열로부터 발현될 수 있다. 상기 펩티드에 대해 지향된 모노클로날 항체는 본원에서 참조된 표준 공정을 사용하여 상기 펩티드로 면역화시킨 마우스로부터 생성된다.
- [0141] 본원에 기재된 공정을 사용하여 수득한 모노클로날 항체를 코딩하는 핵산은 클로닝되고, 당해 기술분야에서 이용가능하고, 예를 들면, 문헌[참조: Wright et al., 1992, Critical Rev. Immunol. 12: 125-168] 및 본원에 인용된 참조문헌에 기재되어 있는 기술을 사용하여 서열분석될 수 있다. 추가로, 본 발명의 항체는, 예를 들면, 문헌[참조: Gu et al.], 본원에 인용된 참조문헌 및 문헌[참조: Gu et al., 1997, Thrombosis and Hematocyst 77:755-759]에 기재된 기술 및 당해 기술분야에 공지되거나 개발될 항체를 인간화시키는 기타 방법을 사용하여 "인간화"될 수 있다.
- [0142] 본 발명은 또한 목적 항원의 에피토프와 특이적으로 반응하는 인간화된 항체의 사용을 포함한다. 본 발명의 인간화된 항체는 인간 프레임워크를 갖고, 목적 항원과 특이적으로 반응하는 항체, 통상적으로 마우스 항체로부터 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR)을 갖는다. 본 발명에 사용된 항체가 인간화된 경우, 상기 항체는 문헌[참조: Queen, et al., U.S. Pat. No. 6,180,370, Wright et al, (supra)] 및 본원에 인용된 참조문헌 또는 문헌[참조: Gu et al., 1997, Thrombosis and Hematocyst 77(4):755-759]에 기재된 바와 같이 생성될 수 있다. 문헌(Queen et al.)에 개시된 방법은 부분적으로, 수용체 인간 프레임워크 영역을 코딩하는 DNA 세그먼트에 부착된 목적 항원 상의 에피토프와 같이 목적 항원에 결합할 수 있는 공여체 면역글로불린으로부터 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 영역(CDR)을 코딩하는 재조합 DNA 세그먼트를 발현시킴으로써 생성되는 인간화된 면역글로불린의 설계에 관한 것이다. 일반적으로 말하면, 퀸(Queen) 특허의 발명은 실질적으로 모든 인간화된 면역글로불린의 설계에 대한 적용성을 갖는다. 퀸은 DNA 세그먼트가 전형적으로 천연-연관 또는 이중성 프로모터 영역을 포함하는 인간화된 면역글로불린 코딩 서열에 작동적으로 연결된 발현 조절 DNA 서열을 포함할 것이라고 설명한다. 발현 조절 서열은 진핵생물 숙주 세포를 형질전환 또는 형질감염시킬 수 있는 벡터에서 진핵생물 프로모터 시스템일 수 있거나, 발현 조절 서열은 원핵생물 숙주 세포를 형질전환 또는 형질감염시킬 수 있는 벡터에서 원핵생물 프로모터 시스템일 수 있다. 상기 벡터가 적절한 숙주 내로 도입되는 경우, 상기 숙주는 도입된 뉴클레오타이드 서열의 고도 발현에 적합한 조건하에 유지되고, 필요한 경우, 인간화된 경쇄, 중쇄, 경쇄/중쇄 이량체 또는

완전한 항체, 결합 단편 또는 기타 면역글로불린 형태의 수집 및 정제가 수반될 수 있다[참조: Beychok, Cells of Immunoglobulin Synthesis, Academic Press, New York, (1979), 이는 본원에서 참조로서 도입됨].

[0143] 본 발명의 한 가지 실시형태에서, 파지 항체 라이브러리는 본원의 다른 개소에서 상세히 기재된 바와 같이 생성될 수 있다. 파지 항체 라이브러리를 생성하기 위해, cDNA 라이브러리는, 세포, 예를 들면, 파지 표면 상에서 발현되는 목적 단백질, 예를 들면, 목적 항체를 발현하는 말초혈 림프구로부터 단리되는 mRNA로부터 먼저 수득한다. mRNA의 cDNA는 역전사 효소를 사용하여 생성된다. 면역글로불린 단편을 특정하는 cDNA는 PCR에 의해 수득되고, 생성 DNA는 적합한 박테리오파지 벡터 내로 클로닝되어, 면역글로불린 유전자를 특정하는 DNA를 포함하는 박테리오파지 DNA 라이브러리를 생성한다. 이중성 DNA를 포함하는 박테리오파지 라이브러리를 제조하는 공정은 당해 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들면, 문헌[참조: Sambrook et al., 상기 참조]에 기재되어 있다.

[0144] 목적 항체를 코딩하는 박테리오파지는, 상기 단백질이 이의 상응하는 결합 단백질, 예를 들면, 목적 항원과 같이 상기 항체가 지향하는 항원에의 결합에 이용가능한 방식으로 이의 표면 상에서 발현되도록 조작될 수 있다. 따라서, 특정 항체를 발현하는 박테리오파지가 상응하는 항원의 존재하에 배양되는 경우, 상기 박테리오파지는 상기 항원에 결합할 것이다. 상기 항체를 발현하지 않는 박테리오파지는 항원에 결합하지 않을 것이다. 이러한 패닝 기술은 당해 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들면, 문헌[참조: Wright et al., 상기 참조]에 기재되어 있다.

[0145] 상기 기재된 것들과 같은 프로세스는 M13 박테리오파지 발현을 사용하는 인간 항체의 생성을 위해 개발되었다[참조: Burton et al, 1994, Adv. Immunol. 57: 191-280]. 본질적으로, cDNA 라이브러리는 항체-생성 세포의 모집단으로부터 수득된 mRNA로부터 생성된다. mRNA는 재배열된 면역글로불린 유전자를 코딩하고, 따라서 cDNA는 이를 코딩한다. 증폭된 cDNA는, 이들의 표면 상에서 인간 Fab 단편을 발현하는 파지 라이브러리를 생성하는 M13 발현 벡터 내로 클로닝된다. 목적 항체를 발현하는 파지는 항원 결합에 의해 선택되고, 가용성 인간 Fab 면역글로불린을 생성하기 위해 박테리아에 전파된다. 따라서, 통상의 모노클로날 항체 합성과는 대조적으로, 이러한 공정은 인간 면역글로불린을 발현하는 세포보다도 인간 면역글로불린을 코딩하는 DNA를 불명하게 한다.

[0146] 상기 제시된 공정은 항체 분자의 Fab 부분을 코딩하는 파지의 생성을 기재한다. 그러나, 본 발명은 Fab 항체를 코딩하는 파지의 생성으로만 제한되는 것으로 해석되어서는 안된다. 오히려, 단쇄 항체(scFv/파지 항체 라이브러리)를 코딩하는 파지는 또한 본 발명에 포함된다. Fab 분자는 전체 Ig 경쇄를 포함하고, 즉 이들은 경쇄의 가변 및 불변 영역 둘 다를 포함하지만 중쇄의 가변 영역 및 제1 불변 영역(CH1)만을 포함한다. 단쇄 항체 분자는 Ig Fv 단편을 포함하는 단백질의 단쇄를 포함한다. Ig Fv 단편은, 내부에 함유된 불변 영역을 갖지 않는 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역만을 단지 포함한다. scFv DNA를 포함하는 파지 라이브러리는 문헌[참조: Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222:581-597]에 기재된 공정에 따라 생성할 수 있다. 목적 항체의 단리를 위해 이렇게 생성된 파지의 패닝은 Fab DNA를 포함하는 파지 라이브러리에 대해 기재된 것과 유사한 방식으로 수행된다.

[0147] 본 발명은 또한 중쇄 및 경쇄 가변 영역이 거의 모든 가능한 특이성을 포함하도록 합성될 수 있는 합성 파지 발현 라이브러리를 포함하는 것으로 해석되어야 한다[참조: Barbas, 1995, Nature Medicine 1 :837-839; de Kruif et al. 1995, J. Mol. Biol. 248:97-105].

[0148] 본 발명의 또 다른 실시형태에서, 면역화된 동물로부터 유래하는 파지-클로닝된 항체는 공지된 기술에 의해 인간화될 수 있다.

[0149] 한 가지 실시형태에서, 본 발명의 약물-분자 접합체의 분자는 CAR에 의해 표적화되는 항원성 에피토프로부터 유래하는 펩티드를 포함한다. 예를 들면, CAR이 CD19에 대해 지향되는 경우, 본 발명의 분자는 CAR에 결합하는 CD19의 에피토프로부터 유래하는 펩티드를 포함할 수 있다. 이와 같이, 상기 펩티드는 전장 단백질 또는 이의 부분을 포함할 수 있다. 따라서, 상기 펩티드는 CAR의 항원 결합 영역에 의해 표적화된 항원을 모방한다.

[0150] 본 발명의 펩티드는 화학적 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들면, 펩티드는 고상 기술[참조: Roberge J Y et al (1995) Science 269: 202-204]에 의해 합성되고, 수지로부터 절단되고, 예비 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다. 자동화 합성은, 예를 들면, 제조업자에 의해 제공된 지침에 따라 ABI 431 A 펩티드 합성기(Perkin Elmer)를 사용하여 달성할 수 있다.

[0151] 약물



- [0152] 본 발명의 약물-분자 접합체는, 한 가지 실시형태에서, CAR T 세포 내로 내재화되는 약물을 포함한다. 본원의 다른 개소에 기재된 바와 같이, 상기 접합체가 CAR에 결합하면, 상기 접합체를 따라 CAR은 내재화된다. 한 가지 실시형태에서, 약물은 CAR T 세포의 활성을 조절한다. 본 발명에 사용된 약물의 유형은 임의의 특정 유형으로 제한되지 않는다. 오히려, CAR T 세포의 활성을 조절하는 임의의 약물이 사용될 수 있다. 예를 들면, 한 가지 실시형태에서, 상기 약물은 CAR T 세포의 사멸을 유발한다.
- [0153] 접합체 생성
- [0154] 본 발명의 약물-분자 접합체는 당해 기술분야에서 이용가능한 임의의 적합한 방식으로 생성될 수 있지만, 특정 실시양태에서, 상기 접합체는 융합 폴리펩티드로서 생성되거나 링커의 사용에 의한 것과 같이 화학적으로 접합된다.
- [0155] 약물-분자 접합체가 화학적 접합 등의 접합 또는 링커의 사용에 의해 생성되는 실시양태에서, 단수형 성분이 제공되거나 수득되고, 이어서 화학적 접합 또는 연결 방법에 의해 결합된다.
- [0156] 예를 들면, 접합체 성분은 생물학적 방출가능한 결합, 예를 들면, 선택적 절단가능한 링커 또는 아미노산 서열에 의해 결합될 수 있다. 예를 들면, 중앙 환경에서 우선적으로 위치되거나 활성인 효소의 절단 부위를 포함하는 펩티드 링커는 고려된다. 이러한 펩티드 링커의 예시적 형태는 유로키나제, 플라스민, 트롬빈, 인자 IXa, 인자 Xa 또는 메탈로프로테이나제, 예를 들면, 콜라게나제, 젤라티나제 또는 스트로멜리신에 의해 절단되는 것들이다. 또는, 펩티드 또는 폴리펩티드는 애주번트에 결합될 수 있다.
- [0157] 추가로, 당해 기술분야의 숙련자에게 공지된 임의의 기타 연결/커플링제 및/또는 메카니즘을 사용하여 본 발명의 성분들, 예를 들면, 항체-항원 상호작용, 아비딘 비오틴 결합, 아미드 결합, 에스테르 결합, 티오에스테르 결합, 에테르 결합, 티오에테르 결합, 포스포에스테르 결합, 포스포르아미드 결합, 무수물 결합, 디설파이드 결합, 이온성 및 소수성 상호작용, 이중특이적 항체 및 항체 단편 또는 이들의 조합을 조합할 수 있다.
- [0158] 혈액에서 상당한 안정성을 갖는 가교결합체가 사용될 수 있는 것으로 의도된다. 표적화 및 치료/예방 제제의 접합에 성공적으로 사용될 수 있는 다수 유형의 디설파이드-결합 함유 링커는 공지되어 있다. 입체적으로 장애되어 있는 디설파이드 결합을 함유하는 링커는 생체내에서 보다 큰 안정성을 제공하여 작용 부위에 도달하기 전에 표적화 펩티드의 방출을 방지하는 것으로 입증될 수 있다. 따라서, 이들 링커는 가교결합체의 한 그룹이다.
- [0159] 또 다른 가교결합 시약은 4-석신이미딜옥시카보닐-메틸-x-[2-피리딜티오]-톨루엔(SMPT)이고, 이는 인접한 벤젠 환 및 메틸 그룹에 의해 "입체적으로 장애"되어 있는 디설파이드 결합을 함유하는 이관능성 가교결합이다. 디설파이드 결합의 입체 장애는 조직 및 혈액에 존재할 수 있는 글루타티온 등의 티올레이트 음이온에 의해 공격으로부터 상기 결합을 보호하는 기능을 발휘하고, 이에 의해 부착된 제제의 표적 부위로의 전달 전에 상기 접합체의 분리를 방지하는 것을 보조하는 것으로 생각된다.
- [0160] SMPT 가교결합 시약은, 다수의 기타 공지된 가교결합 시약과 같이, 시스테인 또는 1급 아민(예를 들면, 리신의 엡실론 아미노 그룹)의 SH 등의 관능성 그룹의 가교결합을 촉진시킨다. 또 다른 유형의 가교결합체는 설포석신이미딜-2-(p-아지도 살리실아미도)에틸-1,3'-디티오프로피오네이트와 같이 절단가능한 디설파이드 결합을 함유하는 헤테로-이관능성 광반응성 페닐아지드를 포함한다. N-하이드록시-석신이미딜 그룹은 1급 아미노 그룹과 반응하고, 페닐아지드(광분해시)는 임의의 아미노산 잔기와 비선택적으로 반응한다.
- [0161] 장애된 가교결합체 이외에, 비-장애된 링커가 또한 본 명세서에 따라 사용될 수 있다. 보호된 디설파이드를 함유하거나 생성하는 것으로 간주되지 않는 다른 유용한 가교결합체는 석신이미딜 아세틸티오아세테이트(SATA), N-석신이미딜 3-(2-피리딜티오)프로피오네이트 SPDP 및 2-아미노티올란(Wawrzynczak & Thorpe, 1987)을 포함한다. 이러한 가교결합체의 사용은 당해 기술분야에서 잘 이해되어 있다.
- [0162] 미국 특허 제4,680,338호는 아민-함유 고분자 및/또는 단백질과 리간드의 접합체를 생성하는데 유용한 이관능성 링커, 특히 킬레이트제, 약물, 효소, 검출가능한 표지 등과 항체 접합체를 형성하는데 유용한 이관능성 링커를 기재한다. 미국 특허 제5,141,648호 및 제5,563,250호는 다양한 온화한 조건하에 절단가능한 불안정한 결합을 함유하는 절단가능한 접합체를 개시한다. 이러한 링커는 목적 제제가 링커에 직접 결합할 수 있고 절단이 활성제의 방출을 야기한다는 점에서 특히 유용하다. 바람직한 사용은 항체 등의 단백질 또는 약물에 유리 아미노 또는 유리 설피드릴 그룹을 첨가하는 것을 포함한다.
- [0163] 미국 특허 제5,856,456호는 융합 단백질, 예를 들면, 단일 사슬 항체를 제조하기 위해 폴리펩티드 구성분의 연



결에 사용하기 위한 펩티드 링커를 제공한다. 링커는 최대 약 50개 아미노산 길이이고, 프롤린이 수반되는 하전된 아미노산(바람직하게는 아르기닌 또는 리신)의 적어도 하나의 존재를 함유하고, 보다 큰 안정성 및 감소된 응집을 특징으로 한다. 미국 특허 제5,880,270호는 다양한 면역진단 및 격리 기술에 유용한 아미노옥시-함유 링커를 개시한다.

[0164] 또 다른 실시형태는 유연한 링커의 사용을 포함한다.

[0165] 키메라 분자의 투여

[0166] 한 가지 실시형태에서, 본 발명은 CAR T 세포 치료 동안 정상의 비-암성 세포의 고갈을 제한하는 방법을 포함한다. 본원의 다른 개소에 기재된 바와 같이, CAR T 세포 치료는 종양 세포를 효과적으로 제거할 수 있고, 이는 종종, 정상 세포를 유지하면서, 종양 세포가 표적화되도록 CAR T 세포 활성을 제한할 필요가 있다. 한 가지 실시형태에서, 상기 방법은, CAR T 세포가 정상 세포를 과도하게 고갈하고 있는 것으로 결정되는 경우에, CAR T 세포 치료가 제공되는 대상체에게 약물-분자 접합체를 투여하는 것을 포함한다. 예를 들면, 항-CD19 CAR T 세포는 안전하지 않은 양의 정상 B 세포를 고갈하고 있다. 이러한 결정은 임의의 훈련된 의사 또는 건강 관리 제공자에 의해 이루어질 수 있다.

[0167] 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 접합체의 유효량이 세포에 투여된다. 다른 실시형태에서, 치료 유효량의 본 발명의 접합체가 질환 또는 상태의 치료를 위해 개체에게 투여된다.

[0168] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "유효량"은 투여되는 세포 또는 조직에서 생리학적 변화를 야기하는데 필요한 본 발명의 접합체의 양으로서 정의된다.

[0169] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "치료 유효량"은 상태의 역효과(즉, CAR T 세포 치료에 의해 유발된 정상 조직의 과다한 고갈)를 제거, 감소, 지연 또는 최소화하는 본 발명의 접합체의 양으로서 정의된다. 당해 기술분야의 숙련가는 다수의 경우에 상기 접합체가 치유를 제공하지 않지만 상기 상태의 적어도 하나의 증상의 완화 또는 개선 등과 같은 부분적 잇점을 제공할 수 있음을 용이하게 인지한다. 몇몇 실시형태에서, 몇몇 잇점을 갖는 생리학적 변화는 또한 치료학적으로 유의한 것으로 간주된다. 따라서, 몇몇 실시형태에서, 생리학적 변화를 제공하는 접합체의 양은 "유효량" 또는 "치료 유효량"으로 간주된다.

[0170] 본 발명의 몇몇 실시형태에서 및 종래 기술의 공지된 방법과 비교한 잇점으로서, 상기 접합체는 단백질로서 전달되고, 목적 폴리펩티드를 생성하기 위해 번역되는 핵산 분자로서 전달되지 않는다. 추가의 잇점으로서, 몇몇 실시형태에서 인간 서열은 외래 폴리펩티드로부터 바람직하지 않은 임의의 면역 반응을 회피하기 위해 본 발명의 접합체에 이용된다.

[0171] 본 발명의 접합체는 대상체에게 자체로 또는 약제학적 조성물 형태로 투여될 수 있다. 본 발명의 단백질을 포함하는 약제학적 조성물은 통상의 혼합, 용해, 과립화, 당의정-제조, 분말화, 유화, 캡슐화, 포집화 또는 동결 건조 프로세스에 의해 제조할 수 있다. 약제학적 조성물은 약제학적으로 사용될 수 있는 제제로 단백질으로 가공을 촉진시키는 하나 이상의 생리학적으로 허용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 보조제를 사용하여 통상의 방식으로 제형화할 수 있다. 적절한 제형은 선택된 투여 경로에 의존한다.

[0172] 국소 투여를 위해, 본 발명의 접합체는 당해 기술분야에 공지된 바와 같이 용액, 젤, 연고, 크림, 현탁액 등으로 제형화될 수 있다.

[0173] 전신 제형은 경피, 경점막, 흡입, 경구 또는 폐 투여를 위해 설계된 것들 뿐만 아니라 주사, 예를 들면, 피하, 정맥내, 근육내, 척수강내 또는 복강내 주사에 의한 투여를 위해 설계된 것들을 포함한다.

[0174] 주사를 위해, 본 발명의 접합체는 탱크 용액, 링거 용액 또는 생리학적 염수 완충제와 같이 바람직하게는 생리학적 혼화성 완충제 중의 수용액으로 제형화될 수 있다. 상기 용액은 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제 등의 제형화 제제를 함유할 수 있다.

[0175] 또는, 상기 접합체는 사용 전에 적합한 비히클, 예를 들면, 멸균 피로젠-비함유 물로 구성하기 위한 분말 형태로 존재할 수 있다.

[0176] 경점막 투여를 위해, 투과되는 장벽에 적절한 침투제가 제형에 사용된다. 이러한 침투제는 일반적으로 당해 기술분야에 공지되어 있다.

- [0177] 경구 투여를 위해, 상기 접합체는 접합체를 당해 기술분야에 공지된 약제학적으로 허용되는 담체와 배합함으로써 용이하게 제형화할 수 있다. 이러한 담체는 본 발명의 접합체를 치료되는 환자의 경구 섭취를 위한 정제, 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제 등으로 제형화할 수 있게 한다. 예를 들면, 분말, 캡슐 및 정제 등의 경구 고체 제형을 위해, 적합한 부형제는 충전제, 예를 들면, 당, 예를 들면, 락토즈, 슈크로즈, 만니톨 및 솔비톨; 셀룰로즈 제제, 예를 들면, 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 감자 전분, 젤라틴, 검 트라가칸트, 메틸 셀룰로즈, 하이드록시프로필메틸-셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리돈 (PVP); 과립화제; 및 결합제를 포함한다. 필요한 경우, 붕해제, 예를 들면, 가교결합된 폴리비닐피롤리돈, 아가 또는 알긴산 또는 이의 염, 예를 들면, 나트륨 알기네이트를 첨가할 수도 있다.
- [0178] 필요한 경우, 고체 용량형은 표준 기술을 사용하여 당-피복되거나 장-피복될 수 있다.
- [0179] 또는, 기타 약제학적 전달 시스템을 사용할 수 있다. 리포솜 및 에멀전은 본 발명의 접합체의 전달에 사용될 수 있는 전달 비하클의 공지된 예이다. 디메틸설폭사이드 등의 특정 유기 용매는 통상 비록 보다 큰 독성을 회생하여 사용될 수 있다. 추가로, 접합체는 지속-방출 시스템, 예를 들면, 상기 접합체를 함유하는 고체 고분자의 반투과성 매트릭스를 사용하여 전달할 수 있다. 다양한 형태의 지속-방출 물질은 확립되어 있고, 당해 기술분야의 숙련가에게 공지되어 있다. 지속 방출 캡슐은, 이들의 화학적 성질에 따라, 최대 100일에 걸쳐 수주 동안 상기 분자를 방출할 수 있다. 접합체의 화학적 성질 및 생물학적 안정성에 따라, 분자 안정화를 위한 추가의 전략을 사용할 수 있다.
- [0180] 본 발명의 접합체의 단백질 실시형태는 하전된 측쇄 또는 말단을 함유할 수 있다. 따라서, 이들은 유리 산 또는 염기로서 또는 약제학적으로 허용되는 염으로서 상술된 염의 제형에 포함될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 염은 유리 염기의 생물학적 활성을 실질적으로 보유하고 무기 산과의 반응에 의해 제조되는 것들의 염이다. 약제학적 염은 상응하는 유리 염기 형태보다 수성 및 기타 양성자성 용매에서 더욱 가용성인 경향이 있다.
- [0181] 본 발명의 접합체는 일반적으로 의도된 목적을 달성하기에 효과적인 양으로 사용될 수 있다. 질환 상태의 치료 또는 예방에 사용하기 위해, 본 발명의 접합체 또는 이의 약제학적 조성물은 치료 유효량으로 투여되거나 적용된다.
- [0182] 전신 투여를 위해, 치료 유효 용량은 시험관내 검정으로부터 초기에 평가된다. 예를 들면, 용량은 세포 배양물에서 측정된 IC<sub>50</sub>을 포함하는 순환 농도 범위를 달성하기 위해 동물 모델에서 제형화될 수 있다. 이러한 제형은 인간의 유용한 농도를 보다 정확하게 측정하기 위해 사용될 수 있다.
- [0183] 초기 투여량은 또한 당해 기술분야에 공지된 기술을 사용하여 생체내 데이터, 예를 들면, 동물 모델로부터 평가될 수 있다. 당해 기술분야의 숙련가는 동물 데이터에 기반하여 인간에 대한 투여를 용이하게 최적화할 수 있다.
- [0184] 투여량 및 간격은 치료 효과를 유지하기에 충분한 분자의 혈장 수준을 제공하기 위해 개별적으로 조정될 수 있다. 주사에 의한 투여에 유용한 환자 투여량은 약 0.001 내지 100 mg/kg/일, 바람직하게는 약 0.5 내지 1 mg/kg/일 및 이들 범위의 모든 또는 부분 정수 범위이다. 치료학적 유효 혈청 수준은 매일 복수 용량을 투여함으로써 달성될 수 있다.
- [0185] 국소 투여 또는 선택적 흡수의 경우에, 단백질의 유효 국소 농도는 혈장 농도와 관련되지 않을 수 있다. 당해 기술분야의 숙련가는 과도한 실험 없이 치료학적 유효 국소 투여량을 최적화할 수 있을 것이다.
- [0186] 투여된 접합체의 양은 물론 치료되는 대상체, 대상체의 체중, 고통의 중증도, 투여 방식 및 주치의의 판단에 의존할 것이다.
- [0187] 치료는 증상을 검출할 수 있거나 증상을 검출할 수 없는 경우에도 간헐적으로 반복될 수 있다. 치료는 단독으로 또는 다른 약물과 조합하여 제공될 수 있다.
- [0188] RNA 형질감염
- [0189] 한 가지 실시형태에서, 본 발명의 유전자 변형된 T 세포는 RNA의 도입을 통해 변형된다. 한 가지 실시형태에서, 시험관내 전사된 RNA CAR은 일시적 형질감염의 형태로 세포에 도입될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, RNA CAR은 이중특이적 항체를 코딩하는 시험관내 전사된 RNA와 함께 도입된다. RNA는 폴리머라제 연쇄

반응(PCR)-생성된 주형을 사용하여 시험관내 전사에 의해 생성된다. 임의의 공급원으로부터의 목적 DNA는 적절한 프라이머 및 RNA 폴리머라제를 사용한 시험관내 mRNA 합성을 위한 주형 내로 PCR에 의해 직접 전환될 수 있다. RNA의 공급원은, 예를 들면, 게놈 DNA, 플라스미드 DNA, 파지 DNA, cDNA, 합성 DNA 서열 또는 DNA의 임의의 기타 적절한 공급원일 수 있다. 시험관내 전사를 위한 목적 주형은 본 발명의 CAR이다. 한 가지 실시형태에서, RNA CAR을 위한 주형은 항-종양 항체의 단쇄 가변 도메인을 포함하는 세포의 도메인; CD8a의 힌지 및 막관통 도메인을 포함하는 막관통 도메인; 및 CD3-제타의 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인을 포함한다. 또 다른 예로서, 주형은 정상의 건강한 조직과 연관된 항원에 대해 지향된 항체 또는 이의 부분을 포함하는 세포의 도메인을 갖는 억제 CAR을 포함한다. 또 다른 예로서, 상기 주형은 복수 유형의 CAR을 포함한다. 몇몇 예에서, 상기 주형은 억제 CAR 및 적어도 하나의 종양-지향된 CAR을 포함한다.

[0190]

한 가지 실시형태에서, PCR에 사용되는 DNA는 개방 판독 프레임에 함유한다. DNA는 생물의 게놈 유래의 천연 발생 DNA 서열로부터 기원할 수 있다. 한 가지 실시양태에서, DNA는 유전자 일부의 목적 전장 유전자이다. 유전자는 5' 및/또는 3' 비-번역 영역(UTR)의 일부 또는 전부를 포함할 수 있다. 유전자는 엑손과 인트론을 포함할 수 있다. 한 가지 실시양태에서, PCR에 사용되는 DNA는 인간 유전자이다. 또 다른 실시양태에서, PCR에 사용되는 DNA는 5' 및 3' UTR을 포함하는 인간 유전자이다. DNA는 달리는 천연 발생 생물에서 통상 발현되지 않는 인공 DNA 서열일 수 있다. 예시적 인공 DNA 서열은 융합 단백질을 코딩하는 개방 판독 프레임을 형성하기 위해 함께 연결되는 유전자 부분을 함유하는 것이다. 함께 연결되는 DNA 부분은 단일 생물에서 또는 복수의 생물에서 유래할 수 있다.

[0191]

PCR을 위한 DNA의 공급원으로 사용될 수 있는 유전자는, 생물에 치료 효과 또는 예방 효과를 제공하거나 생물에서 질환 또는 장애를 진단하는 데 사용될 수 있는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 포함한다. 바람직한 유전자는 단기간의 치료에 유용한 유전자이거나, 투여량 또는 발현 유전자에 대한 안전성 우려가 있는 유전자이다. 예를 들면, 암, 자가면역 질환, 기생충, 바이러스, 박테리아, 진균 또는 기타 감염의 치료에 있어서, 발현되는 도입유전자(들)는 면역계 세포에 대한 리간드 또는 수용체로서 기능하거나, 생물의 면역계를 자극하거나 억제하도록 기능할 수 있는 폴리펩티드를 코딩할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 이는 새로운 문제를 유발할 수 있으므로, 면역계의 장기간 지속적 자극을 갖는 것은 바람직하지 않고, 또한 성공적인 치료 후에 계속되는 변화를 생성하는 것은 불필요하다. 자가면역 질환의 치료를 위해, 갑작스런 재발 동안 면역계를 억제하거나 억압하는 것이 바람직한 경우가 있지만, 환자가 감염에 대해 과도하게 민감하게 되도록 할 수 있는 장기간은 아니다.

[0192]

PCR은 형질감염에 사용되는 mRNA의 시험관내 전사 주형을 형성하는 데 사용된다. PCR을 실시하는 방법은 당해 기술분야에서 공지되어 있다. PCR에 사용하기 위한 프라이머는 PCR을 위한 주형으로 사용되는 DNA 영역에 실질적으로 상보적인 영역을 갖도록 설계된다. "실질적으로 상보적"은, 본원에서 사용된 바와 같이, 프라이머 서열 중의 염기의 대부분 또는 모두가 상보적이거나 하나 이상의 염기가 비-상보적이거나 부정합되는 뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 실질적으로 상보적 서열은 PCR에 사용된 어닐링 조건하에 의도된 DNA 표적과 어닐링 또는 하이브리드화할 수 있다. 프라이머는 DNA 주형의 임의의 부분과 실질적으로 상보적하도록 설계될 수 있다. 예를 들면, 프라이머는 5' 및 3' UTR을 포함하여 세포에서 통상 전사되는 유전자 부분을 증폭하도록 설계될 수 있다(개방 판독 프레임). 프라이머는 또한 목적 특정 도메인을 코딩하는 유전자 부분을 증폭하도록 설계될 수 있다. 한 가지 실시양태에서, 프라이머는 5' 및 3' UTR의 전부 또는 일부를 포함하여 인간 cDNA의 코딩 영역을 증폭하도록 설계된다. PCR에 유용한 프라이머는 당해 기술분야에서 공지된 합성 방법에 의해 생성된다. "전방향 프라이머"는, 증폭되는 DNA 서열의 상류에 있는 DNA 주형 상의 뉴클레오타이드와 실질적으로 상보적인 뉴클레오타이드 영역을 함유하는 프라이머이다. "상류"는 코딩 채와 관련하여 증폭되는 DNA 서열에 대해 위치 5'를 지칭하기 위해 본원에서 사용된다. "역방향 프라이머"는 증폭되는 DNA 서열의 하류에 있는 이중 사슬 DNA 주형에 실질적으로 상보적인 뉴클레오타이드 영역을 함유하는 프라이머이다. "하류"는 코딩 채와 관련하여 증폭되는 DNA 서열에 대해 위치 3'를 지칭하기 위해 본원에서 사용된다.

[0193]

PCR에 유용한 모든 DNA 폴리머라제는 본원에 개시된 방법에서 사용될 수 있다. 시약 및 폴리머라제는 다수의 공급업체에서 상업적으로 시판되고 있다.

[0194]

안정성 및/또는 번역 효율을 촉진하는 능력을 갖는 화학 구조를 또한 사용할 수 있다. RNA는 바람직하게는 5' 및 3' UTR을 갖는다. 한 가지 실시양태에서, 5' UTR은 길이가 0 내지 3000개 뉴클레오타이드이다. 코딩 영역에 부가되는 5' 및 3' UTR 서열의 길이는, 이로써 한정되지 않지만, UTR의 상이한 영역에 어닐링하는 PCR용 프라이머의 설계를 포함하는 상이한 방법으로 변화시킬 수 있다. 이 방법을 사용하여, 당해 기술분야의 숙련가는 전사된 RNA의 형질감염 후에 최적 번역 효율의 달성에 필요한 5' 및 3' UTR 길이를 변경할 수 있다.

- [0195] 5' 및 3' UTR은 목적 유전자를 위한 천연 발생 내인성 5' 및 3' UTR일 수 있다. 또는, 목적 유전자에 내인성이 아닌 UTR 서열은 전방향 또는 역방향 프라이머 내로 UTR 서열을 도입하거나 주형의 임의의 기타 변형에 의해 부가될 수 있다. 목적 유전자에 내인성이 아닌 UTR 서열의 사용은 RNA의 안정성 및/또는 번역 효율을 변경하는데 유용할 수 있다. 예를 들면, 3' UTR 서열 중의 AU-농후 요소는 mRNA의 안정성을 저하시킬 수 있는 것으로 공지되어 있다. 따라서, 3' UTR을 선택하거나 설계하여, 당해 기술분야에 공지된 UTR의 특성에 기반하여 전사된 RNA의 안정성을 증가시킬 수 있다.
- [0196] 한 가지 실시양태에서, 5' UTR은 내인성 유전자의 코작 서열을 함유할 수 있다. 또는, 목적 유전자에 내인성이 아닌 5' UTR이 상기한 바와 같은 PCR에 의해 부가되는 경우, 콘센서스 코작 서열은 5' UTR 서열을 부가함으로써 재설계될 수 있다. 코작 서열은 일부 RNA 전사체의 번역 효율을 증가시킬 수 있지만, 효율적 번역을 가능하게 하기 위해 모든 RNA에 필요하다고는 생각되지 않는다. 다수의 mRNA에 대한 코작 서열의 필요성은 당해 기술분야에 공지되어 있다. 다른 실시양태에서, 5' UTR은 RNA 바이러스에서 유래할 수 있고, 이의 RNA 게놈은 세포 내에서 안정하다. 다른 실시양태에서, 다양한 뉴클레오타이드 유사체는 mRNA의 엑소뉴클레아제 분해를 방지하기 위해 3' 또는 5' UTR에서 사용할 수 있다.
- [0197] 유전자 클로닝을 필요로 하지 않고서 DNA 주형으로부터 RNA의 합성을 가능하게 하기 위해, 전사 프로모터는 전사되는 서열의 상류에 있는 DNA 주형에 부착되어야 한다. RNA 폴리머라제에 대한 프로모터로서 기능하는 서열이 전방향 프라이머의 5' 말단에 부가되는 경우, RNA 폴리머라제 프로모터는 전사되는 개방 판독 프레임의 상류에 있는 PCR 생성물 내로 도입된다. 한 가지 바람직한 실시양태에서, 프로모터는, 본원의 다른 개소에 기재된 바와 같이, T7 폴리머라제 프로모터이다. 다른 유용한 프로모터는, 이로써 한정되지 않지만, T3 및 SP6 RNA 폴리머라제 프로모터를 포함한다. T7, T3 및 SP6 프로모터의 콘센서스 뉴클레오타이드 서열은 당해 기술분야에 공지되어 있다.
- [0198] 바람직한 실시양태에서, mRNA는 세포에서 리보솜 결합, 번역 개시 및 안정성 mRNA를 결정하는 5' 말단 및 3' 폴리(A) 테일 상의 캡 둘 다를 갖는다. 환상 DNA 주형, 예를 들면, 플라스미드 DNA 상에서, RNA 폴리머라제는 진핵생물 세포에서의 발현에 적합하지 않은 긴 콘카타머 생성물을 생성한다. 3' UTR의 말단에서 선형화된 플라스미드 DNA의 전사는, 전사후 폴리아데닐화되어 있어도, 진핵생물 형질감염에 효과적이지 않은 통상 크기의 mRNA를 제공한다.
- [0199] 선형 DNA 주형 상에서, 파지 T7 RNA 폴리머라제는 전사체의 3' 말단을 주형의 최종 염기 이상까지 연장할 수 있다[참조: Schenborn and Mierendorf, *Nuc Acids Res.*, 13:6223-36 (1985); Nacheva and Berzal-Herranz, *Eur. J. Biochem.*, 270:1485-65 (2003)].
- [0200] DNA 주형 내로 폴리A/T 스트럿치의 종래의 통합 방법은 분자 클로닝이다. 그러나, 플라스미드 DNA에 통합된 폴리A/T 서열은 플라스미드 불안정성을 유발할 수 있고, 이는 박테리아 세포에서 수득된 플라스미드 DNA 주형이 종종 결실 및 기타 변형으로 고도로 오염되는 이유이다. 이는 클로닝 공정을 번거롭고 시간이 걸리게 할 뿐만 아니라 종종 신뢰성 없게 한다. 이는, 클로닝 없이 폴리A/T 3' 스트럿치로 DNA 주형의 작제를 가능하게 하는 방법을 매우 바람직하게 하는 이유이다.
- [0201] 전사 DNA 주형의 폴리A/T 세그먼트는 100T 테일(크기가 50 내지 5000 T일 수 있음) 등의 폴리T 테일을 함유하는 역방향 프라이머를 사용하여 PCR 동안, 또는 이로써 한정되지 않지만, DNA 결찰 또는 시험관내 재조합을 포함하는 임의의 기타 방법에 의해 PCR 후에 생성될 수 있다. 폴리(A) 테일은 또한 RNA에 안정성을 제공하고 이의 분해를 감소시킨다. 일반적으로, 폴리(A) 테일의 길이는 전사된 RNA의 안정성과 적극적으로 상관한다. 한 가지 실시양태에서, 폴리(A) 테일은 100 내지 5000개 아데노신 사이이다.
- [0202] RNA의 폴리(A) 테일은 또한 이.콜라이(*E. coli*) 폴리A 폴리머라제(E-PAP) 등의 폴리(A) 폴리머라제의 사용으로 시험관내 전사 후에 추가로 연장될 수 있다. 한 가지 실시양태에서, 100개 뉴클레오타이드로부터 300 내지 400개 뉴클레오타이드까지 폴리(A) 테일의 길이를 증가시키는 것은 RNA의 번역 효율에 있어서 약 2배 증가를 야기한다. 추가로, 3' 말단에 상이한 화학 그룹의 부착은 mRNA 안정성을 증가시킬 수 있다. 이러한 부착은 변형된/인공 뉴클레오타이드, 압타머 및 기타 화합물을 함유할 수 있다. 예를 들면, ATP 유사체는 폴리(A) 폴리머라제를 사용하여 폴리(A) 테일에 도입될 수 있다. ATP 유사체는 RNA의 안정성을 추가로 증가시킬 수 있다.
- [0203] 5' 캡은 RNA 분자에 안정성을 또한 제공한다. 바람직한 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에 의해 생성된 RNA는 5' 캡을 포함한다. 5' 캡은 당해 기술분야에 공지되어 있고 본원에 기재된 기술을 사용하여 제공된다[참조: Cougot, et al., *Trends in Biochem. Sci.*, 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., *RNA*, 7:1468-95 (2001);



Elango, et al., Biochim. Biophys. Res. Commun., 330:958-966 (2005)].

- [0204] 본원에 개시된 방법에 의해 생성된 RNA는 내부 리보솜 도입 부위(IRES) 서열을 또한 함유할 수 있다. IRES 서열은, mRNA에 대한 캡-독립적 리보솜 결합을 개시하고 번역 개시를 촉진하는 임의의 바이러스, 염색체 또는 인공적으로 설계된 서열일 수 있다. 당, 펩티드, 지질, 단백질, 산화방지제 및 계면활성제와 같은 세포 침투성 및 생존성을 촉진하는 인자를 함유할 수 있는, 세포 전기천공에 적합한 임의의 물질이 포함될 수 있다.
- [0205] RNA는 다수의 임의의 상이한 방법, 예를 들면, 이로써 한정되지 않지만, 전기천공(Amaxa Nucleofector-II(Amaxa Biosystems, Cologne, Germany)), (ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.), 또는 Gene Pulser II(BioRad, Denver, Colo.), Multiporator(Eppendorf, Hamburg, Germany), 리포펙션을 사용하는 양이온성 리포좀 매개된 형질감염, 고분자 캡슐화, 펩티드 매개된 형질감염, 또는 "유전자 총" 등의 바이오리스틱 입자 전달 시스템[참조: Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12(8):861-70 (2001)]을 포함하는 상업적으로 이용가능한 방법을 사용하여 표적 세포 내로 도입될 수 있다.
- [0206] 유전자 변형된 T 세포
- [0207] 몇몇 실시형태에서, CAR 서열은 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터를 사용하여 세포 내로 전달된다. CAR-발현 레트로바이러스 및 렌티바이러스 벡터는 담체로서 형질도입된 세포를 사용하거나 캡슐화된, 결합된 또는 네이키드 벡터의 세포-비함유 국소 또는 전신 전달을 사용하여 진핵생물 세포의 상이한 유형에 및 조직 및 전체 생물에 전달될 수 있다. 사용된 방법은 안정한 발현이 요구되거나 충분한 임의의 목적으로 할 수 있다.
- [0208] 다른 실시형태에서, CAR 서열 및 이중특이적 항체 서열은 시험관내 전사된 mRNA를 사용하여 세포 내로 전달된다. 시험관내 전사된 mRNA CAR는 담체로서 형질감염된 세포를 사용하거나 캡슐화된, 결합된 또는 네이키드 mRNA의 세포-비함유 국소 또는 전신 전달을 사용하여 상이한 유형의 진핵생물 세포에 및 조직 및 전체 생물에 전달될 수 있다. 사용된 방법은 일시적 발현이 요구되거나 충분한 임의의 목적으로 할 수 있다.
- [0209] 개시된 방법은, 표적 암 세포를 사멸시키는 유전자 변형된 T 세포의 능력 평가를 포함하여, 암, 줄기 세포, 급성 및 만성 감염 및 자가면역 질환의 분야의 기초 연구 및 치료에서 T 세포 활성화의 조절에 적용될 수 있다.
- [0210] 상기 방법은 또한, 예를 들면, 프로모터 또는 투입 RNA의 양을 변화시킴으로써 발현 수준을 광범위하게 조절하는 능력을 제공하여, 발현 수준을 개별적으로 조절할 수 있게 한다. 추가로, mRNA 생성의 PCR-기반 기술은 상이한 구조를 갖는 키메라 수용체 mRNA의 설계 및 이들 도메인의 조합을 크게 촉진시킨다. 예를 들면, 동일한 세포에서 복수의 키메라 수용체 상에서 상이한 세포내 효과기/공자극인자 도메인의 변화는 복수-항원성 표적에 대해 최고 수준의 세포독성 및 동시에 정상 세포에 대한 최저 세포독성을 평가하는 수용체 조합의 구조를 측정하게 한다.
- [0211] 본 발명의 RNA 형질감염 방법의 한 가지 잇점은 RNA 형질감염이 필수적으로 일시적 및 벡터-비함유라는 점이다. RNA 도입유전자는 림프구에 전달되어, 임의의 추가 바이러스 서열을 필요로 하지 않고서 최소 발현 카세트로서 단시간 시험관내 세포 활성화 후에 그 속에서 발현될 수 있다. 이들 조건하에, 숙주 세포 계능 내로 도입유전자의 통합은 가능성이 없다. 세포의 클로닝은 RNA의 형질감염 효율 및 전체 림프구 모집단을 균일하게 변형시키는 이들의 능력 때문에 필요하지 않다.
- [0212] 시험관내 전사된 RNA(IVT-RNA)를 이용한 T 세포의 유전자 변형은 다양한 동물 모델에서 성공적으로 시험된 2가지 상이한 전략을 이용한다. 세포는 리포펙션 또는 전기천공에 의해 시험관내 전사된 RNA로 형질감염된다. 바람직하게는, 전달된 IVT-RNA의 연장된 발현을 달성하기 위해 다양한 변형을 사용하여 IVT-RNA를 안정화시키는 것이 바람직하다.
- [0213] 일부 IVT 벡터는 문헌에 공지되어 있고, 이는 시험관내 전사를 위한 주형으로 표준 방식으로 사용되고 안정화된 RNA 전사체가 생산되는 방식으로 유전자 변형된다. 당해 기술분야에서 사용되는 현재의 프로토콜은 하기 구조를 갖는 플라스미드 벡터에 기반한다: RNA의 전사를 가능하게 하는 5' RNA 폴리머라제 프로모터, 이어서 비번역된 영역(UTR)에 의해 3' 및/또는 5'에 인접하는 목적 유전자, 및 50 내지 70A 뉴클레오타이드를 함유하는 3' 폴리아데닐 카세트. 시험관내 전사 전에, 환상 플라스미드는 II형 제한 효소에 의해 폴리아데닐 카세트의 하류에서 선형화된다(인식 서열은 절단 부위에 상응한다). 따라서, 폴리아데닐화 카세트는 전사체 중의 후기 폴리(A) 서열에 상응한다. 이러한 공정의 결과로서, 일부 뉴클레오타이드는 선형화 후에 효소 절단 부위의 일부로서 잔류하고, 3' 말단에서 폴리(A) 서열을 연장하거나 마스크한다. 이러한 비생리학적 돌출이 이러한 작제물로부터 세포



내 생산된 단백질의 양에 영향을 미치는지는 명확하지 않다.

[0214] RNA는 보다 전통적 플라스미드 또는 바이러스 방법에 비해 몇몇 잇점을 갖는다. RNA 공급원으로부터 유전자 발현은 전사를 필요로 하지 않고, 단백질 생성물은 형질감염 후에 급속하게 생성된다. 또한, RNA는 핵이 아니라 세포질에만 접근하기 때문에, 통상의 형질감염 방법은 매우 고도의 형질감염을 야기한다. 또한, 플라스미드 기반 접근방식은 목적 유전자의 발현을 유도하는 프로모터가 연구자의 세포에서 활성인 것을 필요로 한다.

[0215] 또 다른 실시양태에서, RNA 작제물은 전기천공에 의해 세포에 전달될 수 있다. 미국 특허 공개공보 제 2004/0014645호, 미국 특허 공개공보 제2005/0052630A1호, 미국 특허 공개공보 제2005/0070841A1호, 미국 특허 공개공보 제2004/0059285A1호, 미국 특허 공개공보 제2004/0092907A1호에 교시된 바와 같이, 예를 들면, 포유동물 세포 내로 핵산 작제물의 전기천공의 제형 및 방법을 참조한다. 임의의 공지된 세포 유형의 전기천공에 요구된 전기 강도를 포함하는 다양한 파라미터는 당해 분야에서 관련 연구 문헌 및 다수의 특허 및 특허원에 일반적으로 공지되어 있다[참조: 미국 특허 제6,678,556호, 미국 특허 제7,171,264호 및 미국 특허 제7,173,116호]. 전기천공의 치료학적 적용을 위한 장치는 상업적으로 시판되고 있고[참조: MedPulser™ DNA 전기천공 치료 시스템(Inovio/Genetronic, San Diego, CA)], 특허[참조: 미국 특허 제6,567,694호, 미국 특허 제6,516,223호, 미국 특허 제5,993,434호, 미국 특허 제6,181,964호, 미국 특허 제6,241,701호 및 미국 특허 제6,233,482호]에 기재되어 있으며; 전기천공은 또한, 예를 들면, 미국 특허 공개공보 제US20070128708A1호에 기재된 바와 같이, 시험관내에서 세포의 형질감염에 사용될 수 있다. 전기천공은 또한 시험관내에서 핵산을 세포 내로 전달하는데 사용될 수 있다. 따라서, 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 임의의 다수 시판 장치 및 전기천공 시스템을 이용하여 발현 작제물을 포함하는 핵산의 세포 내로의 전기천공-매개된 투여는 표적 세포에 목적 RNA를 전달하는 흥미로운 새로운 방법을 제시한다.

[0216] 실험예

[0217] 본 발명은 다음의 실험예를 참조하여 추가로 상세하게 기재한다. 이들 실시예는 단지 예시의 목적으로 제공되며, 달리 명시되지 않는 한 제한하려는 것은 아니다. 따라서, 본 발명은 다음의 실시예로 한정되는 것으로 결코 해석되지 않아야 하며, 오히려 본원에 제공되는 교시의 결과로서 입증되는 임의의 변형 및 모든 변형을 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

[0218] 추가의 기재 없이, 당해 기술분야의 숙련가는 이전의 기재 및 다음의 예시적 실시예를 사용하여, 본 발명의 화합물을 제조하고 사용할 수 있고, 특허청구된 방법을 실시할 수 있다고 생각된다. 따라서, 다음의 실시예는 구체적으로는 본 발명의 바람직한 실시형태를 지적하고, 어떠한 방식으로든 개시의 나머지를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0219] 실시예 1: CAR 형질도입된 T 세포의 활성을 조절 및/또는 제거하는 방식으로 CAR 결합 시약의 내재화

[0220] 지금까지 시험된 모든 CAR 작제물에 대한 공통의 관찰은 CAR 복합체가 표적 항원의 인식 후에 일시적으로 내재화된다는 것이다(도 1, 도 2). 어느 특정 이론에 국한시키고자 하는 것은 아니지만, 이러한 내재화는 최적 CAR-유도된 기능에 필요할 수 있다. CAR의 이러한 특징은 표적 세포와의 결합 후에 T 세포 수용체 복합체의 내재화, 및 또한 동족 항체의 결합 후에 세포 표면 항원에 대해 관찰된 내재화와 유사할 수 있다. 예를 들면, 이는 혈액학적 악성종양의 치료에 사용된 몇몇 임상적으로 이용가능한 약물-항체 접합체[항-CD33 항체 겐투주맵 오조가미신(Mylotarg); 항-CD30 항체 브렌텍시맵 베도틴(Adcetris)]의 작용 메카니즘이다. 종양 세포는 항체-약물 접합체에 결합하고, 상기 접합체를 내재화하고, 약물(Mylotarg의 경우에 칼리키아마이신, Adcetris의 경우에 MMAE)은 세포 내로 방출되어 세포 사멸을 유도한다.

[0221] CAR 분자의 세포의 도메인은 표적 세포의 표면 상에서 발현된 분자에 특이적인 항체로부터 유래하는 결합 도메인으로 통상 이루어지며; 전형적으로 이러한 결합 도메인은 표준 분자 생물학-기반 기술을 사용하여 합성되며, 짧은 링커 펩티드를 통해 연결된 표적 분자를 인식하는 면역글로불린 분자의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역의 융합인 단일 사슬 가변 단편(scFv)으로 이루어지고; 상기 scFv는, 비-인간 종에서 생성되고 몇몇 경우에 면역원성을 최소화하기 위해 "인간화"된 표적 분자를 인식하는 항체로부터 유래한다. 이들 도메인은 CAR의 특이성에 관여한다.

[0222] CAR의 scFv 도메인은 자체로 표적화되고/되거나 다른 분자, 예를 들면, scFv, 표적 항원 자체로부터 유래하는

에피토프, 또는 scFv에 결합하는 형태를 채용한 다른 분자에 의해 결합된다.

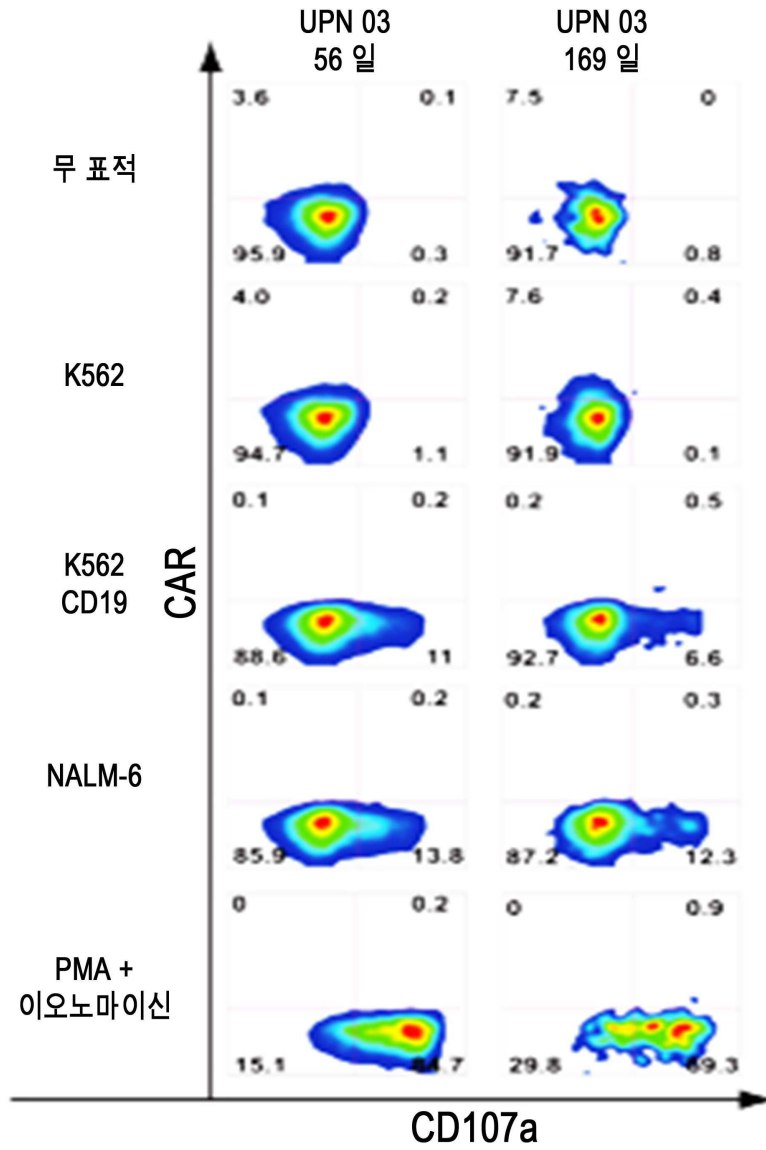
[0223] CAR에 특이적으로 결합하고, 결합시에, 표면 CAR을 발현하는 세포에 의해 내재화되는 분자가 개발되어 있음이 본원에 기재되어 있다. 추가로, CAR 표적화 제제는 세포 기능을 파괴하는 다른 분자에 연결되어, CAR 결합시에, 내재화 CAR-발현 세포는 무효 및/또는 제거된다. 이러한 기술은 표면 CAR을 발현하는 세포의 특정한 임의의 제거 또는 불활성화를 가능하게 한다.

[0224] CAR은 세포 상의 표적 분자와의 결합시에 내재화된다는 것이 입증되었다. 중요하게는, 이러한 현상은 CAR T 세포로 치료된 환자에 있어서 생체내에서 일어난다. 내재화 유도 시약의 개발에 있어서, CAR에 결합하는 항체는 표준 생화학적 공정을 사용하여 링커를 사용한 항유사분열 약물에 연결된다. 이는 CAR-발현 T 세포가 잔류 비-조작된 T 세포에 영향을 미치지 않으면서 약물-항체 접합체의 부가에 의해 특이적으로 용해되는 것을 입증한다.

[0225] 본원에 인용된 각각 및 모든 특허, 특허 출원 및 공보의 개시내용은 이의 전체가 본원에서 참조로 인용된다. 본 발명은 구체적 실시형태를 참조하여 기술되었지만, 본 발명의 기타 실시형태 및 변형이 본 발명의 진정한 취지 및 범주를 벗어나지 않고도 당해 기술분야의 숙련가에 의해 고안될 수 있음이 자명하다. 첨부된 특허청구범위는 이러한 실시형태 및 등가의 변형 모두를 포함하는 것으로 해석되도록 의도된다.

도면

도면1



도면2

