

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0151812
(43) 공개일자 2024년10월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/725 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)

(52) CPC특허분류
C07K 14/7051 (2013.01)
A61K 39/4611 (2023.05)

(21) 출원번호 10-2024-7030921
(22) 출원일자(국제) 2023년02월13일
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2024년09월13일
(86) 국제출원번호 PCT/US2023/062475
(87) 국제공개번호 WO 2023/158978
국제공개일자 2023년08월24일

(30) 우선권주장
63/310,355 2022년02월15일 미국(US)

(71) 출원인
더 트러스티스 오브 더 유니버시티 오브 펜실바니아
미국, 19104 펜실바니아주, 필라델피아, 9층, 씨빅 센터 볼러바드 3600

(72) 발명자
준, 칼 에이치.
미국 19066 펜실베이니아 메리온 스테이션 베어드 로드 409
영, 리자이나 엠.
미국 19010 펜실베이니아 브린 마워 올드 걸프 로드 407
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
양영준, 이상남

전체 청구항 수 : 총 80 항

(54) 발명의 명칭 혈액 중 키메라 항원 수용체 세포의 부스팅

(57) 요약

본 개시내용은 변형된 세포(들), 즉 면역 세포(들) 또는 그의 전구체 세포(들)를 제공하며, 여기서 세포(들)는 (a) CD19에 대해 친화도를 갖는 제1 키메라 항원 수용체 (CAR) 및 (b) CD19가 아닌 종양 항원에 대해 친화도를 갖는 제2 CAR을 발현하도록 조작된 것이다. 또한, 예를 들어 대상체에서 암의 적어도 1종의 징후 및/또는 증상을 치료하기 위한 변형된 세포의 방법 및 용도가 제공된다. 변형된 세포는 대상체의 말초 혈액에서 확장된다. 관련 핵산, 벡터, 및 제약 조성물이 또한 제공된다.

대표도

pTRPE-hCD19/28z-M5BBZ



pTRPE-M5BBZ-hCD19/28z



(52) CPC특허분류

A61K 39/4631 (2023.05)
A61K 39/464412 (2023.05)
A61K 39/464468 (2023.05)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 16/2803 (2013.01)
C07K 16/2818 (2013.01)
C07K 16/30 (2013.01)
C12N 5/0636 (2023.05)
C07K 2319/02 (2013.01)

(72) 발명자

왕, 지밍

미국 19143 펜실베이니아 필라델피아 아파트먼트
404 체스터 애비뉴 4618

시우랄라, 미코

미국 19104 펜실베이니아 필라델피아 9층 씨빅 센
터 블러바드 3600 더 트러스터스 오브 더 유니버시
티 오브 펜실바니아 내

핑크, 아만다

미국 19104 펜실베이니아 필라델피아 아파트먼트
2004 체스트넛 스트리트 2116

명세서

청구범위

청구항 1

하기를 포함하는 단리된 핵산:

- a. (i) CD19에 대해 친화도를 갖는 제1 세포의 항원 결합 도메인,
(ii) 제1 막횡단 도메인, 및
(iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인을 포함하는 제1 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 제1 뉴클레오타이드 서열; 및
- b. (i) CD19가 아닌 종양 항원에 대해 친화도를 갖는 제2 세포의 항원 결합 도메인,
(ii) 제2 막횡단 도메인, 및
(iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인을 포함하는 제2 CAR을 코딩하는 제2 뉴클레오타이드 서열.

청구항 2

제1항에 있어서, 제1 뉴클레오타이드 서열이 제2 뉴클레오타이드 서열의 5'에 위치하거나, 또는 제1 뉴클레오타이드 서열이 제2 뉴클레오타이드 서열의 3'에 위치하는 것인 단리된 핵산.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 제1 뉴클레오타이드 서열과 제2 뉴클레오타이드 서열 사이에 위치한 링커 뉴클레오타이드 서열을 추가로 포함하며, 여기서 링커 뉴클레오타이드 서열은 P2A, T2A, E2A 및 F2A로 이루어진 군으로부터 선택된 리보솜 슬립 서열을 포함하는 것인 단리된 핵산.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 뉴클레오타이드 서열 및/또는 제2 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 추가로 포함하는 단리된 핵산.

청구항 5

제4항에 있어서, 프로모터가 EF1 α 프로모터인 단리된 핵산.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 전사후 조절 요소를 추가로 포함하는 단리된 핵산.

청구항 7

제6항에 있어서, 전사후 조절 요소가 우드척 간염 바이러스 (WHV) 전사후 조절 요소 (WPRE)인 단리된 핵산.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 항원이 알파 태아-단백질 (AFP)/HLA-A2, AXL, B7-H3, BCMA, CA-1X, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD20, CD22, CD30, CD33, CD38, CD44v6, CD70, CD79a, CD79b, CD80, CD86, CD117, CD123, CD133, CD147, CD171, CD276, CEA, 클라우딘 18.2, c-Met, DLL3, DR5, 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), EGFRvIII, EpCAM, EphA2, 섬유모세포 활성화 단백질 (FAP), 플레이트 수용체 알파 (FRa)/플레이트 결합 단백질 (FBP), GD-2, 당지질 F77, 글리피칸 2 (GPC2), 글리피칸-3 (GPC3), 글리코실-포스파티딜이노시톨 (GPI)-연결된 GDNF 패밀리 a-수용체 4 (GFR α 4; GFR알파4), HER2, HLA-A2, ICAM1, 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 (IL3R α), 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 1 (IL13R α 1), 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 2

(IL13R α 2), LAGE-1, 루이스 Y, LMP1 (EBV), MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, 멜란 A, 메소텔린, MG7 (글리코실화 CEA), MMP, MUC1, 넥틴4/FAP, NKG2D-리간드 (MIC-A, MIC-B, 및 ULBP 1 내지 6), 뉴욕 식도 편평 세포 암종-1 (NY-ESO-1), P16, PD-L1, 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA), 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), ROR1, ROR2, TIM-3, TM4SF1, MUC1의 Tn-당형태 (TnMUC1), VEGFR2, 및 그의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 핵산.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 항원이 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), MUC1, MUC1의 Tn-당형태 (TnMUC1), 글리코실-포스파티딜이노시톨 (GPI)-연결된 GDNF 패밀리 α -수용체 4 (GFR α 4; GFR알파4), 폴레이트 수용체 알파 (FR α), 메소텔린, 뉴욕 식도 편평 세포 암종-1 (NY-ESO-1), 글리피칸 2 (GPC2), 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA), 섬유모세포 활성화 단백질 (FAP), 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 1 (IL13R α 1), 및 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 2 (IL13R α 2)로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 단리된 핵산.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 세포의 항원 결합 도메인 및 제2 세포의 항원 결합 도메인이 각각 독립적으로 단일쇄 가변 단편 (scFv) 및 Fab로부터 선택된 것인 단리된 핵산.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 또는 제2 세포내 도메인의 적어도 1개의 공동자극 도메인이 4-1BB, CD2, CD28, 및 ICOS로부터 독립적으로 선택된 단백질의 공동자극 도메인을 포함하는 것인 단리된 핵산.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 신호전달 도메인이 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 것인 단리된 핵산.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및/또는 제2 막횡단 도메인이 CD8, CD28, 및 4-1BB로부터 독립적으로 선택된 단백질의 막횡단 도메인을 포함하는 것인 단리된 핵산.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및/또는 제2 CAR이 힌지 도메인을 추가로 포함하는 것인 단리된 핵산.

청구항 15

제14항에 있어서, 힌지 도메인이 CD8 힌지도메인을 포함하는 것인 단리된 핵산.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

a. 제1 CAR이

(i) 항-CD19 scFv를 포함하는 제1 세포의 항원 결합 도메인,

(ii) 제1 막횡단 도메인, 및

(iii) CD28 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인을 포함하고;

b. 제2 CAR이

(i) 항종양 항원 scFv를 포함하는 제2 세포의 항원 결합 도메인 (여기서 종양 항원은 CD19가 아님),

(ii) 제2 막횡단 도메인, 및

(iii) 4-1BB 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인을 포함하는 것인 단리된 핵산.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

a. 제1 CAR이

(i) CD8 리더 서열;

(ii) 항-CD19 scFv를 포함하는 제1 세포외 항원 결합 도메인,

(iii) CD8 힌지;

(iv) CD28 막횡단 도메인, 및

(v) CD28 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인으로 본질적으로 이루어진 것;

b. 제2 CAR이

(i) CD8 리더 서열;

(ii) 항-메소텔린 scFv를 포함하는 제2 세포외 항원 결합 도메인,

(iii) CD8 힌지;

(iv) CD8 막횡단 도메인, 및

(v) 4-1BB 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인으로 본질적으로 이루어진 것인

단리된 핵산.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 스위치 수용체를 코딩하는 제3 뉴클레오타이드 서열을 추가로 포함하며, 여기서 스위치 수용체는 제1 수용체의 세포외 도메인 및 제2 수용체의 세포내 도메인을 포함하고, 여기서 제1 수용체 및 제2 수용체는 각각 TGF β R 및 IL12R, TGF β R 및 CD28, TGF β R 및 OX40, TGF β R 및 CD27, TGF β R 및 4-1BB, TGF β R 및 IL-2R, TGF β R 및 IL-9R, PD1 및 IL12R, PD1 및 CD28, PD1 및 ICOS, PD1 및 CD27, PD1 및 4-1BB, PD1 및 IL-2R, PD1 및 IL-9R, BTLA 및 CD28, BTLA 및 ICOS, BTLA 및 CD27, CTLA4 및 CD28, TIM3 및 IL12R, TIM3 및 CD28, TIM3 및 CD28, TIM3 및 OX40, TIM3 및 4-1BB, TIM3 및 IL-2R, TIM3 및 IL-9R, VSIG3 및 CD28, VSIG3-IL12R β 2, VSIG3 및 CD27, VSIG3 및 4-1BB, VSIG3 및 ICOS, VSIG3-IL12R β 1, VSIG8-IL12R β 1, VSIG8 및 CD28, VSIG8-IL12R β 2, VSIG8 및 CD27, VSIG8 및 4-1BB, VSIG8-ICOS, VISTA 및 IL-9R, TIGIT 및 IL-9R, IFN γ 및 CD28, IFN γ 및 OX40, IFN γ 및 IL2R, 및 IFN γ 및 IL12R로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 단리된 핵산.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 우성 음성 수용체를 코딩하는 제4 뉴클레오타이드 서열을 추가로 포함하며, 여기서 우성 음성 수용체는 dnTGF β R인 단리된 핵산.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항의 단리된 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 21

제26항에 있어서, 렌티바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터인 벡터.

청구항 22

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항의 단리된 핵산 또는 제20항 또는 제21항의 벡터를 포함하는 변형된 세포.

청구항 23

제22항에 있어서, 세포가 박테리아 세포, 진균 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 동물 세포, 포유동물 세포 및 인간 세포로부터 선택된 것인 변형된 세포.

청구항 24

제23항에 있어서, 세포가 포유동물 세포 또는 인간 세포이고, 추가로 세포가 면역 세포 또는 그의 전구체 세포인 변형된 세포.

청구항 25

제24항에 있어서, 면역 세포가 T 세포인 변형된 세포.

청구항 26

변형된 세포로서, 여기서 세포는 면역 세포 또는 그의 전구체 세포이고, 세포는 하기를 발현하도록 조작된 것인 변형된 세포:

- a. (i) CD19에 대해 친화도를 갖는 제1 세포의 항원 결합 도메인,
 - (ii) 제1 막횡단 도메인, 및
 - (iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인을 포함하는 제1 키메라 항원 수용체 (CAR); 및
- b. (i) CD19가 아닌 종양 항원에 대해 친화도를 갖는 제2 세포의 항원 결합 도메인,
 - (ii) 제2 막횡단 도메인, 및
 - (iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인을 포함하는 제2 CAR.

청구항 27

제26항에 있어서, 종양 항원이 알파 태아-단백질 (AFP)/HLA-A2, AXL, B7-H3, BCMA, CA-1X, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD20, CD22, CD30, CD33, CD38, CD44v6, CD70, CD79a, CD79b, CD80, CD86, CD117, CD123, CD133, CD147, CD171, CD276, CEA, 클라우딘 18.2, c-Met, DLL3, DR5, 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), EGFRvIII, EpCAM, EphA2, 섬유모세포 활성화 단백질 (FAP), 플레이트 수용체 알파 (FR α)/플레이트 결합 단백질 (FBP), GD-2, 당지질 F77, 글리피칸 2 (GPC2), 글리피칸-3 (GPC3), HER2, HLA-A2, ICAM1, 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 (IL3R α), 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 1 (IL13R α 1), 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 2 (IL13R α 2), LAGE-1, 루이스 Y, LMP1 (EBV), MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, 멜란 A, 메소텔린, MG7 (글리코실화 CEA), MMP, MUC1, 넥틴4/FAP, NKG2D-리간드 (MIC-A, MIC-B, 및 ULBP 1 내지 6), 뉴욕 식도 편평 세포 암종-1 (NY-ESO-1), P16, PD-L1, 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA), 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), ROR1, ROR2, TIM-3, TM4SF1, MUC1의 Tn-당형태 (TnMUC1), 글리코실-포스파티딜이노시톨 (GPI)-연결된 GDNF 패밀리의 α -수용체 4 (GFR α 4; GFR알파4), VEGFR2, 및 그의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 변형된 세포.

청구항 28

제26항 또는 제27항에 있어서, 종양 항원이 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), MUC1, MUC1의 Tn-당형태 (TnMUC1), 플레이트 수용체 알파 (FR α), 메소텔린, 뉴욕 식도 편평 세포 암종-1 (NY-ESO-1), 글리피칸 2 (GPC2), 글리코실-포스파티딜이노시톨 (GPI)-연결된 GDNF 패밀리의 α -수용체 4 (GFR α 4; GFR알파4), 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA), 섬유모세포 활성화 단백질 (FAP), 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), 및 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 2 (IL13R α 2)로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 변형된 세포.

청구항 29

제22항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 세포의 항원 결합 도메인 및 제2 세포의 항원 결합 도메인이 각각 독립적으로 단일쇄 가변 단편 (scFv) 및 Fab로부터 선택된 것인 변형된 세포.

청구항 30

제22항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 또는 제2 세포내 도메인의 적어도 1개의 공동자극 도메인이 4-1BB, CD2, CD28, 및 ICOS로부터 독립적으로 선택된 단백질의 공동자극 도메인을 포함하는 것인 변형된 세포.

청구항 31

제22항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 신호전달 도메인이 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 것인 변형된 세포.

청구항 32

제22항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및/또는 제2 막횡단 도메인이 CD8, CD28, 및 4-1BB로부터 독립적으로 선택된 단백질의 막횡단 도메인을 포함하는 것인 변형된 세포.

청구항 33

제22항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및/또는 제2 CAR이 힌지 도메인을 추가로 포함하는 것인 변형된 세포.

청구항 34

제33항에 있어서, 힌지 도메인이 CD8 힌지 도메인을 포함하는 것인 변형된 세포.

청구항 35

제22항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서,

a. 제1 CAR이

(i) 항-CD19 scFv를 포함하는 제1 세포의 항원 결합 도메인,

(ii) 제1 막횡단 도메인, 및

(iii) CD28 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인을 포함하고;

b. 제2 CAR이

(i) 항종양 항원 scFv를 포함하는 제2 세포의 항원 결합 도메인 (여기서 종양 항원은 CD19가 아님),

(ii) 제2 막횡단 도메인, 및

(iii) 4-1BB 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인을 포함하는 것인 변형된 세포.

청구항 36

제22항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서,

a. 제1 CAR이

(i) CD8 리더 서열;

(ii) 항-CD19 scFv를 포함하는 제1 세포의 항원 결합 도메인,

(iii) CD8 힌지;

(iv) CD28 막횡단 도메인, 및

(v) CD28 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인으로 본질적으로 이루어지고;

b. 제2 CAR이

(i) CD8 리더 서열;

(ii) 항-메소텔린 scFv를 포함하는 제2 세포의 항원 결합 도메인,

(iii) CD8 힌지;

(iv) CD8 막횡단 도메인, 및

(v) 4-1BB 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인으로 본질적으로 이루어진 것인

변형된 세포.

청구항 37

제22항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 스위치 수용체를 발현하도록 추가로 조작되고, 여기서 스위치 수용체는 제1 수용체의 세포외 도메인 및 제2 수용체의 세포내 도메인을 포함하고, 여기서 제1 수용체 및 제2 수용체는 각각 TGF β R 및 IL12R, TGF β R 및 CD28, TGF β R 및 OX40, TGF β R 및 CD27, TGF β R 및 4-1BB, TGF β R 및 IL-2R, TGF β R 및 IL-9R, PD1 및 IL12R, PD1 및 CD28, PD1 및 ICOS, PD1 및 CD27, PD1 및 4-1BB, PD1 및 IL-2R, PD1 및 IL-9R, BTLA 및 CD28, BTLA 및 ICOS, BTLA 및 CD27, CTLA4 및 CD28, TIM3 및 IL12R, TIM3 및 CD28, TIM3 및 CD28, TIM3 및 OX40, TIM3 및 4-1BB, TIM3 및 IL-2R, TIM3 및 IL-9R, VSIG3 및 CD28, VSIG3-IL12R β 2, VSIG3 및 CD27, VSIG3 및 4-1BB, VSIG3 및 ICOS, VSIG3-IL12R β 1, VSIG8-IL12R β 1, VSIG8 및 CD28, VSIG8-IL12R β 2, VSIG8 및 CD27, VSIG8 및 4-1BB, VSIG8-ICOS, VISTA 및 IL-9R, TIGIT 및 IL-9R, IFN γ 및 CD28, IFN γ 및 OX40, IFN γ 및 IL2R, 및 IFN γ 및 IL12R로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 변형된 세포.

청구항 38

제22항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 우성 음성 수용체를 발현하도록 추가로 조작되고, 여기서 우성 음성 수용체는 dnTGF β R인 변형된 세포.

청구항 39

제22항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 제1 CAR 및 제2 CAR을 코딩하는 벡터를 포함하는 것인 변형된 세포.

청구항 40

제39항에 있어서, 벡터가 렌티바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터인 변형된 세포.

청구항 41

제39항 또는 제40항에 있어서, 벡터가 제37항의 스위치 수용체 및/또는 제38항의 우성 음성 수용체를 추가로 코딩하는 것인 변형된 세포.

청구항 42

제22항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 마우스 세포 또는 인간 세포인 변형된 세포.

청구항 43

제22항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 T 세포인 변형된 세포.

청구항 44

제22항 내지 제43항 중 어느 한 항의 변형된 세포의 집단 및 적어도 1종의 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물.

청구항 45

암의 치료를 필요로 하는 대상체에게 제43항의 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 암을

치료하는 방법.

청구항 46

암의 치료를 필요로 하는 대상체에게 변형된 세포의 집단을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, 여기서 세포는 면역 세포 또는 그의 전구체 세포이고, 세포는 하기를 발현하도록 조작된 것인 방법:

- a. (i) CD19에 대해 친화도를 갖는 제1 세포의 항원 결합 도메인,
(ii) 제1 막횡단 도메인, 및
(iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인을 포함하는 제1 키메라 항원 수용체 (CAR); 및
- b. (i) CD19가 아닌 종양 항원에 대해 친화도를 갖는 제2 세포의 항원 결합 도메인,
(ii) 제2 막횡단 도메인, 및
(iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인을 포함하는 제2 CAR.

청구항 47

제46항에 있어서, 종양 항원이 알파 태아-단백질 (AFP)/HLA-A2, AXL, B7-H3, BCMA, CA-1X, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD20, CD22, CD30, CD33, CD38, CD44v6, CD70, CD79a, CD79b, CD80, CD86, CD117, CD123, CD133, CD147, CD171, CD276, CEA, 클라우딘 18.2, c-Met, DLL3, DR5, 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), EGFRvIII, EphA2, 섬유모세포 활성화 단백질 (FAP), 플레이트 수용체 알파 (FR α)/플레이트 결합 단백질 (FBP), GD-2, 당지질 F77, 글리피칸 2 (GPC2), 글리피칸-3 (GPC3), HER2, HLA-A2, ICAM1, 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 (IL3R α), 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 2 (IL13R α 2), LAGE-1, 루이스 Y, LMP1 (EBV), MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, 멜란 A, 메소텔린, MG7 (글리코실화 CEA), MMP, MUC1, 넥틴4/FAP, NKG2D-리간드 (MIC-A, MIC-B, 및 ULBP 1 내지 6), 뉴욕 식도 편평 세포 암종-1 (NY-ESO-1), P16, PD-L1, 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA), 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), ROR1, ROR2, TIM-3, TM4SF1, MUC1의 Tn-당형태 (TnMUC1), 글리코실-포스파티딜이노시톨 (GPI)-연결된 GDNF 패밀리 α -수용체 4 (GFR α 4; GFR α 4), VEGFR2, 및 그의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 48

제46항 또는 제47항에 있어서, 종양 항원이 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), MUC1, MUC1의 Tn-당형태 (TnMUC1), 플레이트 수용체 알파 (FR α), 메소텔린, 뉴욕 식도 편평 세포 암종-1 (NY-ESO-1), 글리피칸 2 (GPC2), 글리코실-포스파티딜이노시톨 (GPI)-연결된 GDNF 패밀리 α -수용체 4 (GFR α 4; GFR α 4), 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA), 섬유모세포 활성화 단백질 (FAP), 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 1 (IL13R α 1), 및 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 2 (IL13R α 2)로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 49

제45항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 세포의 항원 결합 도메인 및 제2 세포의 항원 결합 도메인이 각각 독립적으로 단일쇄 가변 단편 (scFv) 및 Fab로부터 선택된 것인 방법.

청구항 50

제45항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 또는 제2 세포내 도메인의 적어도 1개의 공동자극 도메인이 4-1BB, CD2, CD28, 및 ICOS로부터 독립적으로 선택된 단백질의 공동자극 도메인을 포함하는 것인 방법.

청구항 51

제45항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 신호전달 도메인이 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 것인 방법.

청구항 52

제45항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및/또는 제2 막횡단 도메인이 CD8, CD28, 및 4-1BB로부터 독립적으로 선택된 단백질의 막횡단 도메인을 포함하는 것인 방법.

청구항 53

제45항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및/또는 제2 CAR이 힌지 도메인을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 54

제53항에 있어서, 힌지 도메인이 CD8 힌지 도메인을 포함하는 것인 방법.

청구항 55

제45항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서,

a. 제1 CAR이

(i) 항-CD19 scFv를 포함하는 제1 세포외 항원 결합 도메인,

(ii) 제1 막횡단 도메인, 및

(iii) CD28 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인을 포함하고;

b. 제2 CAR이

(i) 항종양 항원 scFv를 포함하는 제2 세포외 항원 결합 도메인 (여기서 종양 항원은 CD19가 아님),

(ii) 제2 막횡단 도메인, 및

(iii) 4-1BB 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인을 포함하는 것인 방법.

청구항 56

제45항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서,

a. 제1 CAR이

(i) CD8 리더 서열;

(ii) 항-CD19 scFv를 포함하는 제1 세포외 항원 결합 도메인,

(iii) CD8 힌지;

(iv) CD28 막횡단 도메인, 및

(v) CD28 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인으로 본질적으로 이루어지고;

b. 제2 CAR이

(i) CD8 리더 서열;

(ii) 항-메소텔린 scFv를 포함하는 제2 세포외 항원 결합 도메인,

(iii) CD8 힌지;

(iv) CD8 막횡단 도메인, 및

(v) 4-1BB 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인으로 본질적으로 이루어진 것인 방법.

청구항 57

제45항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 세포가 스위치 수용체를 발현하도록 추가로 조작되고, 여기서 스위치 수용체는 제1 수용체의 세포외 도메인 및 제2 수용체의 세포내 도메인을 포함하고, 여기서 제1 수용체 및 제2 수용체는 각각 TGF β R 및 IL12R, TGF β R 및 CD28, TGF β R 및 OX40, TGF β R 및 CD27, TGF β R 및 4-1BB, TGF β R 및 IL-2R, TGF β R 및 IL-9R, PD1 및 IL12R, PD1 및 CD28, PD1 및 ICOS, PD1 및 CD27, PD1 및 4-1BB, PD1 및 IL-2R, PD1 및 IL-9R, BTLA 및 CD28, BTLA 및 ICOS, BTLA 및 CD27, CTLA4 및 CD28, TIM3 및 IL12R, TIM3 및 CD28, TIM3 및 CD28, TIM3 및 OX40, TIM3 및 4-1BB, TIM3 및 IL-2R, TIM3 및 IL-9R, VSIG3 및 CD28, VSIG3-IL12R β 2, VSIG3 및 CD27, VSIG3 및 4-1BB, VSIG3 및 ICOS, VSIG3-IL12R β 1, VSIG8-IL12R β 1, VSIG8 및 CD28, VSIG8-IL12R β 2, VSIG8 및 CD27, VSIG8 및 4-1BB, VSIG8-ICOS, VISTA 및 IL-9R, TIGIT 및 IL-9R, IFN γ 및 CD28, IFN γ 및 OX40, IFN γ 및 IL2R, 및 IFN γ 및 IL12R로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 58

제45항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 세포가 우성 음성 수용체를 발현하도록 추가로 조작되고, 여기서 우성 음성 수용체는 dnTGF β R인 방법.

청구항 59

제45항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 세포가 제1 CAR 및 제2 CAR을 코딩하는 벡터를 포함하는 것인 방법.

청구항 60

제59항에 있어서, 벡터가 렌티바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터인 방법.

청구항 61

제59항 또는 제60항에 있어서, 벡터가 제57항의 스위치 수용체 및/또는 제58항의 우성 음성 수용체를 추가로 코딩하는 것인 방법.

청구항 62

제45항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 세포가 마우스 세포 또는 인간 세포인 방법.

청구항 63

제45항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 세포의 집단이 T 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 64

제45항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 세포가 대상체에 대해 자가인 방법.

청구항 65

제45항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 세포가 대상체에 대해 동종인 방법.

청구항 66

제45항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 세포의 집단이 변형된 세포의 집단 및 적어도 1종의 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물로서 투여되는 것인 방법.

청구항 67

제45항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 세포의 집단이 약 1×10^6 내지 약 1×10^9 개의 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 68

제45항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 세포가 대상체의 말초 혈액에서 확장을 나타내는 것인 방법.

청구항 69

제68항에 있어서, 확장이 적어도 10-배, 적어도 100-배 또는 적어도 1000-배인 방법.

청구항 70

제45항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 세포가 세포를 투여한 후 적어도 24개월 동안 검출가능한 것인 방법.

청구항 71

제45항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 인간인 방법.

청구항 72

제45항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 유방암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 피부암, 전립선암, 췌장암, 결장직장암, 신암, 간암, 뇌암, 림프종, 백혈병, 폐암, 및 갑상선암으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 73

제45항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 세포의 집단이 T 세포를 포함하고, 투여 후 제7일 또는 그 이후에 변형된 세포의 집단의 적어도 30% 또는 적어도 40%가 표현형상 중심 기억 T 세포인 방법.

청구항 74

제45항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에게 CD19 항원을 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 75

제74항에 있어서, CD19 항원을 투여하는 것이 CD19 항원을 코딩하는 벡터 또는 CD19 항원을 발현하도록 조작된 세포를 투여하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 76

제74항 또는 제75항에 있어서, CD19 항원이 CD19 세포의 도메인 또는 그의 항원 단편을 포함하는 것인 방법.

청구항 77

제74항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, CD19 항원이 변형된 세포의 집단의 투여 전에, 그와 공동으로 또는 그 후에 투여되는 것인 방법.

청구항 78

제75항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터가 아데노바이러스 벡터인 방법.

청구항 79

제74항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에게 항-PD1 면역요법을 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 80

제79항에 있어서, 항-PD1 면역요법이 항-PD1 항체인 방법.

발명의 설명

기술 분야

관련 출원에 대한 상호 참조

[0001]

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에 2022년 2월 15일에 출원된 미국 특허 가출원 번호 63/310,355를 우선권 주장하며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

배경 기술

[0003] 키메라 항원 수용체 T-세포 (CART) 면역요법은 재발성/불응성 (r/r) 림프종 및 백혈병을 포함한 B 세포 악성종양을 갖는 환자의 임상 결과에서 유의한 개선을 보여주었다 (Lee, et al., The Lancet (2015) 385(9967):517-28; Maude et al., New England Journal of Medicine (2018) 378(5):439-48; Park et al., New England Journal of Medicine (2018) 378(5):449-59; Schuster, et al., New England Journal of Medicine (2019) 380(1):45-56; Turtle et al., Science Translational Medicine (2016) 8(355):355ra116-355ra116). 항-CD19 CART (CART19)의 주목할 만한 임상 결과에도 불구하고, 현재 승인된 CART 제품으로 치료받은 대다수의 환자는 이들 치료에 실패하였다. 이들 시험으로부터의 급성 림프모구성 백혈병 (ALL) 및 만성 림프모구성 백혈병 (CLL) 환자 샘플의 분석은 CART19 요법에 대한 반응의 정도가 혈액에서의 높은 수준의 CAR T 확장, 및 B 세포 무형성증의 획득 및 유지와 상관된다는 것을 밝혀내었다. 불행하게도, 고형 종양을 치료하도록 설계된 CAR T 세포 요법에 대한 환자 반응은 덜 효과적이었다. 고형 종양 표적에 대해 지시된 CAR T 세포는 전형적으로 혈액에서 그의 동족 표적과 마주치지 않지만, 대신에 혈액에서 제한된 항상성 CAR T 세포 확장을 겪고 종양 부위로 수송된다. 종양에 도달하는 CAR T 세포의 수는 질환을 근절하기에 불충분하다. 또한 CAR T 세포의 주입 용량을 증가시키는 것은 온-타겟 오프-종양 독성을 밝혀내었다. 환자의 임상 결과를 개선시키기 위해 CAR 임상 세포 요법의 항종양 효능을 증진시키는 것에 대한 관련 기술분야의 필요가 존재한다. 본 발명은 이러한 필요를 다룬다.

발명의 내용

[0004] 본 발명은, 예를 들어 대상체에서 암의 적어도 1종의 징후 및/또는 증상을 치료하기 위한, 변형된 세포를 포함하는 조성물 및 방법을 포함한다. 변형된 세포는 대상체의 말초 혈액에서 확장된다. 관련 핵산, 벡터, 및 제약 조성물이 또한 제공된다.

[0005] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은

[0006] a. (i) CD19에 대해 친화도를 갖는 제1 세포의 항원 결합 도메인,

[0007] (ii) 제1 막횡단 도메인, 및

[0008] (iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인

[0009] 을 포함하는 제1 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 제1 뉴클레오타이드 서열; 및

[0010] b. (i) CD19가 아닌 종양 항원에 대해 친화도를 갖는 제2 세포의 항원 결합 도메인,

[0011] (ii) 제2 막횡단 도메인, 및

[0012] (iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인

[0013] 을 포함하는 제2 CAR을 코딩하는 제2 뉴클레오타이드 서열

[0014] 을 포함하는 단리된 핵산을 제공한다.

[0015] 특정 실시양태에서, 제1 뉴클레오타이드 서열은 제2 뉴클레오타이드 서열에 대해 5'에 위치한다.

[0016] 특정 실시양태에서, 제1 뉴클레오타이드 서열은 제2 뉴클레오타이드 서열에 대해 3'에 위치한다.

[0017] 특정 실시양태에서, 단리된 핵산은 제1 뉴클레오타이드 서열과 제2 뉴클레오타이드 서열 사이에 위치한 링커 뉴클레오타이드 서열을 추가로 포함하며, 여기서 링커 뉴클레오타이드 서열은 P2A, T2A, E2A 및 F2A로 이루어진 군으로부터 선택된 리보솜 슬립 서열을 포함한다.

[0018] 특정 실시양태에서, 단리된 핵산은 제1 뉴클레오타이드 서열 및/또는 제2 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 추가로 포함한다.

[0019] 특정 실시양태에서, 프로모터는 EF1 α 프로모터이다.

[0020] 특정 실시양태에서, 단리된 핵산은 전사후 조절 요소를 추가로 포함한다.

- [0021] 특정 실시양태에서, 전사후 조절 요소는 우드척 간염 바이러스 (WHV) 전사후 조절 요소 (WPRE)이다.
- [0022] 특정 실시양태에서, 종양 항원은 알파 태아-단백질 (AFP)/HLA-A2, AXL, B7-H3, BCMA, CA-1X, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD20, CD22, CD30, CD33, CD38, CD44v6, CD70, CD79a, CD79b, CD80, CD86, CD117, CD123, CD133, CD147, CD171, CD276, CEA, 클라우딘 18.2, c-Met, DLL3, DR5, 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), EGFRvIII, EpCAM, EphA2, 섬유모세포 활성화 단백질 (FAP), 플레이트 수용체 알파 (FRa)/플레이트 결합 단백질 (FBP), GD-2, 당지질 F77, 글리피칸 2 (GPC2), 글리피칸-3 (GPC3), 글리코실-포스파티딜이노시톨 (GPI)-연결된 GDNF 패밀리 α -수용체 4 (GFR α 4; GFR알파4), HER2, HLA-A2, ICAM1, 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 (IL3R α), 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 1 (IL13R α 1), 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 2 (IL13R α 2), LAGE-1, 루이스 Y, LMP1 (EBV), MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, 멜란 A, 메소텔린, MG7 (글리코실화 CEA), MMP, MUC1, 넥틴4/FAP, NKG2D-리간드 (MIC-A, MIC-B, 및 ULBP 1 내지 6), 뉴욕 식도 편평 세포 암종-1 (NY-ESO-1), P16, PD-L1, 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA), 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), ROR1, ROR2, TIM-3, TM4SF1, MUC1의 Tn-당형태 (TnMUC1), VEGFR2, 및 그의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0023] 특정 실시양태에서, 종양 항원은 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), MUC1, MUC1의 Tn-당형태 (TnMUC1), 글리코실-포스파티딜이노시톨 (GPI)-연결된 GDNF 패밀리 α -수용체 4 (GFR α 4; GFR알파4), 플레이트 수용체 알파 (FR α), 메소텔린, 뉴욕 식도 편평 세포 암종-1 (NY-ESO-1), 글리피칸 2 (GPC2), 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA), 섬유모세포 활성화 단백질 (FAP), 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 1 (IL13R α 1), 및 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 2 (IL13R α 2)로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0024] 특정 실시양태에서, 제1 세포의 항원 결합 도메인 및 제2 세포의 항원 결합 도메인은 각각 독립적으로 단일쇄 가변 단편 (scFv) 및 Fab로부터 선택된다.
- [0025] 특정 실시양태에서, 제1 또는 제2 세포내 도메인의 적어도 1개의 공동자극 도메인은 4-1BB, CD2, CD28, 및 ICOS로부터 독립적으로 선택된 단백질의 공동자극 도메인을 포함한다.
- [0026] 특정 실시양태에서, 신호전달 도메인은 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0027] 특정 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 막형단 도메인은 CD8, CD28, 및 4-1BB로부터 독립적으로 선택된 단백질의 막형단 도메인을 포함한다.
- [0028] 특정 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 CAR은 힌지 도메인을 추가로 포함한다.
- [0029] 특정 실시양태에서, 힌지 도메인은 CD8 힌지 도메인을 포함한다.
- [0030] 특정 실시양태에서, 본 발명은 본원에 개시된 단리된 핵산을 제공하며, 여기서:
- [0031] a. 제1 CAR은
- [0032] (i) 항-CD19 scFv를 포함하는 제1 세포의 항원 결합 도메인,
- [0033] (ii) 제1 막형단 도메인, 및
- [0034] (iii) CD28 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인을 포함하고;
- [0035] b. 제2 CAR은
- [0036] (i) 항종양 항원 scFv를 포함하는 제2 세포의 항원 결합 도메인 (여기서 종양 항원은 CD19가 아님),
- [0037] (ii) 제2 막형단 도메인, 및
- [0038] (iii) 4-1BB 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인을 포함한다.
- [0039] 특정 실시양태에서, 본 발명은 본원에 개시된 단리된 핵산을 제공하며, 여기서:
- [0040] a. 제1 CAR은
- [0041] (i) CD8 리더 서열;
- [0042] (ii) 항-CD19 scFv를 포함하는 제1 세포의 항원 결합 도메인,
- [0043] (iii) CD8 힌지;
- [0044] (iv) CD28 막형단 도메인, 및

- [0045] (v) CD28 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인으로 본질적으로 이루어지고;
- [0046] b. 제2 CAR은
- [0047] (i) CD8 리더 서열;
- [0048] (ii) 항-메소텔린 scFv를 포함하는 제2 세포외 항원 결합 도메인,
- [0049] (iii) CD8 힌지;
- [0050] (iv) CD8 막횡단 도메인, 및
- [0051] (v) 4-1BB 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인으로 본질적으로 이루어진다.
- [0052] 특정 실시양태에서, 단리된 핵산은 스위치 수용체를 코딩하는 제3 뉴클레오타이드 서열을 추가로 포함하며, 여기서 스위치 수용체는 제1 수용체의 세포외 도메인 및 제2 수용체의 세포내 도메인을 포함하고, 여기서 제1 수용체 및 제2 수용체는 각각 TGF β R 및 IL12R, TGF β R 및 CD28, TGF β R 및 OX40, TGF β R 및 CD27, TGF β R 및 4-1BB, TGF β R 및 IL-2R, TGF β R 및 IL-9R, PD1 및 IL12R, PD1 및 CD28, PD1 및 ICOS, PD1 및 CD27, PD1 및 4-1BB, PD1 및 IL-2R, PD1 및 IL-9R, BTLA 및 CD28, BTLA 및 ICOS, BTLA 및 CD27, CTLA4 및 CD28, TIM3 및 IL12R, TIM3 및 CD28, TIM3 및 CD28, TIM3 및 OX40, TIM3 및 4-1BB, TIM3 및 IL-2R, TIM3 및 IL-9R, VSIG3 및 CD28, VSIG3-IL12R β 2, VSIG3 및 CD27, VSIG3 및 4-1BB, VSIG3 및 ICOS, VSIG3-IL12R β 1, VSIG8-IL12R β 1, VSIG8 및 CD28, VSIG8-IL12R β 2, VSIG8 및 CD27, VSIG8 및 4-1BB, VSIG8-ICOS, VISTA 및 IL-9R, TIGIT 및 IL-9R, IFN γ 및 CD28, IFN γ 및 OX40, IFN γ 및 IL2R, 및 IFN γ 및 IL12R로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0053] 특정 실시양태에서, 단리된 핵산은 우성 음성 수용체를 코딩하는 제4 뉴클레오타이드 서열을 추가로 포함하며, 여기서 우성 음성 수용체는 dnTGF β R이다.
- [0054] 한 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 단리된 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0055] 특정 실시양태에서, 벡터는 렌티바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터이다.
- [0056] 한 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 단리된 핵산 또는 본원에 개시된 벡터를 포함하는 변형된 세포를 제공한다.
- [0057] 특정 실시양태에서, 세포는 박테리아 세포, 진균 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 동물 세포, 포유동물 세포 및 인간 세포로부터 선택된다.
- [0058] 특정 실시양태에서, 세포는 포유동물 세포 또는 인간 세포이고, 세포는 면역 세포 또는 그의 전구체 세포이다.
- [0059] 특정 실시양태에서, 면역 세포는 T 세포이다.
- [0060] 특정 실시양태에서, 세포는 면역 세포 또는 그의 전구체 세포이고, 세포는
- [0061] a. (i) CD19에 대해 친화도를 갖는 제1 세포외 항원 결합 도메인,
- [0062] (ii) 제1 막횡단 도메인, 및
- [0063] (iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인
- [0064] 을 포함하는 제1 키메라 항원 수용체 (CAR); 및
- [0065] b. (i) CD19가 아닌 종양 항원에 대해 친화도를 갖는 제2 세포외 항원 결합 도메인,
- [0066] (ii) 제2 막횡단 도메인, 및
- [0067] (iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인
- [0068] 을 포함하는 제2 CAR
- [0069] 을 발현하도록 조작된다.
- [0070] 특정 실시양태에서, 종양 항원은 알파 태아-단백질 (AFP)/HLA-A2, AXL, B7-H3, BCMA, CA-1X, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD20, CD22, CD30, CD33, CD38, CD44v6, CD70, CD79a, CD79b, CD80, CD86, CD117, CD123,

CD133, CD147, CD171, CD276, CEA, 클라우딘 18.2, c-Met, DLL3, DR5, 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), EGFRvIII, EpCAM, EphA2, 섬유모세포 활성화 단백질 (FAP), 플레이트 수용체 알파 (FRa)/플레이트 결합 단백질 (FBP), GD-2, 당지질 F77, 글리피칸 2 (GPC2), 글리피칸-3 (GPC3), HER2, HLA-A2, ICAM1, 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 (IL3R α), 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 1 (IL13R α 1), 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 2 (IL13R α 2), LAGE-1, 루이스 Y, LMP1 (EBV), MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, 멜란 A, 메소텔린, MG7 (글리코실화 CEA), MMP, MUC1, 넥틴4/FAP, NKG2D-리간드 (MIC-A, MIC-B, 및 ULBP 1 내지 6), 뉴욕 식도 편평 세포 암종-1 (NY-ESO-1), P16, PD-L1, 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA), 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), ROR1, ROR2, TIM-3, TM4SF1, MUC1의 Tn-당형태 (TnMUC1), 글리코실-포스파티딜이노시톨 (GPI)-연결된 GDNF 패밀리 α -수용체 4 (GFR α 4; GFR알파4), VEGFR2, 및 그의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0071] 특정 실시양태에서, 종양 항원은 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), MUC1, MUC1의 Tn-당형태 (TnMUC1), 플레이트 수용체 알파 (FR α), 메소텔린, 뉴욕 식도 편평 세포 암종-1 (NY-ESO-1), 글리피칸 2 (GPC2), 글리코실-포스파티딜이노시톨 (GPI)-연결된 GDNF 패밀리 α -수용체 4 (GFR α 4; GFR알파4), 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA), 섬유모세포 활성화 단백질 (FAP), 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), 및 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 2 (IL13R α 2)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0072] 특정 실시양태에서, 제1 세포의 항원 결합 도메인 및 제2 세포의 항원 결합 도메인은 각각 독립적으로 단일쇄 가변 단편 (scFv) 및 Fab로부터 선택된다.

[0073] 특정 실시양태에서, 제1 또는 제2 세포내 도메인의 적어도 1개의 공동자극 도메인은 4-1BB, CD2, CD28, 및 ICOS로부터 독립적으로 선택된 단백질의 공동자극 도메인을 포함한다.

[0074] 특정 실시양태에서, 신호전달 도메인은 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함한다.

[0075] 특정 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 막횡단 도메인은 CD8, CD28, 및 4-1BB로부터 독립적으로 선택된 단백질의 막횡단 도메인을 포함한다.

[0076] 특정 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 CAR은 힌지 도메인을 추가로 포함한다.

[0077] 특정 실시양태에서, 힌지 도메인은 CD8 힌지 도메인을 포함한다.

[0078] 특정 실시양태에서, 본 발명은 본원에 개시된 변형된 세포를 제공하며, 여기서:

[0079] a. 제1 CAR은

[0080] (i) 항-CD19 scFv를 포함하는 제1 세포의 항원 결합 도메인,

[0081] (ii) 제1 막횡단 도메인, 및

[0082] (iii) CD28 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인을 포함하고;

[0083] b. 제2 CAR은

[0084] (i) 항종양 항원 scFv를 포함하는 제2 세포의 항원 결합 도메인 (여기서 종양 항원은 CD19가 아님),

[0085] (ii) 제2 막횡단 도메인, 및

[0086] (iii) 4-1BB 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인을 포함한다.

[0087] 특정 실시양태에서, 본 발명은 본원에 개시된 변형된 세포를 제공하며, 여기서:

[0088] a. 제1 CAR은

[0089] (i) CD8 리더 서열;

[0090] (ii) 항-CD19 scFv를 포함하는 제1 세포의 항원 결합 도메인,

[0091] (iii) CD8 힌지;

[0092] (iv) CD28 막횡단 도메인, 및

[0093] (v) CD28 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인으로 본질적으로 이루어지고;

- [0094] b. 제2 CAR은
- [0095] (i) CD8 리더 서열;
- [0096] (ii) 항-메소텔린 scFv를 포함하는 제2 세포의 항원 결합 도메인,
- [0097] (iii) CD8 힌지;
- [0098] (iv) CD8 막횡단 도메인, 및
- [0099] (v) 4-1BB 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인으로 본질적으로 이루어진다.
- [0100] 특정 실시양태에서, 세포는 스위치 수용체를 발현하도록 추가로 조작되고, 여기서 스위치 수용체는 제1 수용체의 세포외 도메인 및 제2 수용체의 세포내 도메인을 포함하고, 여기서 제1 수용체 및 제2 수용체는 각각 TGF β R 및 IL12R, TGF β R 및 CD28, TGF β R 및 OX40, TGF β R 및 CD27, TGF β R 및 4-1BB, TGF β R 및 IL-2R, TGF β R 및 IL-9R, PD1 및 IL12R, PD1 및 CD28, PD1 및 ICOS, PD1 및 CD27, PD1 및 4-1BB, PD1 및 IL-2R, PD1 및 IL-9R, BTLA 및 CD28, BTLA 및 ICOS, BTLA 및 CD27, CTLA4 및 CD28, TIM3 및 IL12R, TIM3 및 CD28, TIM3 및 CD28, TIM3 및 OX40, TIM3 및 4-1BB, TIM3 및 IL-2R, TIM3 및 IL-9R, VSIG3 및 CD28, VSIG3-IL12R β 2, VSIG3 및 CD27, VSIG3 및 4-1BB, VSIG3 및 ICOS, VSIG3-IL12R β 1, VSIG8-IL12R β 1, VSIG8 및 CD28, VSIG8-IL12R β 2, VSIG8 및 CD27, VSIG8 및 4-1BB, VSIG8-ICOS, VISTA 및 IL-9R, TIGIT 및 IL-9R, IFN γ 및 CD28, IFN γ 및 OX40, IFN γ 및 IL2R, 및 IFN γ 및 IL12R로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0101] 특정 실시양태에서, 세포는 우성 음성 수용체를 발현하도록 추가로 조작되며, 여기서 우성 음성 수용체는 dnTGF β R이다.
- [0102] 특정 실시양태에서, 세포는 제1 CAR 및 제2 CAR을 코딩하는 벡터를 포함한다.
- [0103] 특정 실시양태에서, 벡터는 렌티바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터이다.
- [0104] 특정 실시양태에서, 벡터는 본원에 개시된 스위치 수용체 및/또는 본원에 개시된 우성 음성 수용체를 추가로 코딩한다.
- [0105] 특정 실시양태에서, 세포는 마우스 세포 또는 인간 세포이다.
- [0106] 특정 실시양태에서, 세포는 T 세포이다.
- [0107] 한 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 변형된 세포의 집단 및 적어도 1종의 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.
- [0108] 한 측면에서, 본 발명은 암의 치료를 필요로 하는 대상체에게 본원에 개시된 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0109] 한 측면에서, 본 발명은 암의 치료를 필요로 하는 대상체에게 변형된 세포의 집단을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 세포는 면역 세포 또는 그의 전구체 세포이고, 세포는
- [0110] a. (i) CD19에 대해 친화도를 갖는 제1 세포의 항원 결합 도메인,
- [0111] (ii) 제1 막횡단 도메인, 및
- [0112] (iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인
- [0113] 을 포함하는 제1 키메라 항원 수용체 (CAR); 및
- [0114] b. (i) CD19가 아닌 종양 항원에 대해 친화도를 갖는 제2 세포의 항원 결합 도메인,
- [0115] (ii) 제2 막횡단 도메인, 및
- [0116] (iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인
- [0117] 을 포함하는 제2 CAR을 발현하도록 조작된다.
- [0118] 특정 실시양태에서, 종양 항원은 알파 태아-단백질 (AFP)/HLA-A2, AXL, B7-H3, BCMA, CA-1X, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD20, CD22, CD30, CD33, CD38, CD44v6, CD70, CD79a, CD79b, CD80, CD86, CD117, CD123, CD133, CD147, CD171, CD276, CEA, 클라우딘 18.2, c-Met, DLL3, DR5, 표피 성장 인자 수용체 (EGFR),

EGFRvIII, EphA2, 섬유모세포 활성화 단백질 (FAP), 폴레이트 수용체 알파 (FR α)/폴레이트 결합 단백질 (FBP), GD-2, 당지질 F77, 글리피칸 2 (GPC2), 글리피칸-3 (GPC3), HER2, HLA-A2, ICAM1, 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 (IL3R α), 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 2 (IL13R α 2), LAGE-1, 루이스 Y, LMP1 (EBV), MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, 멜란 A, 메소텔린, MG7 (글리코실화 CEA), MMP, MUC1, 넥틴4/FAP, NKG2D-리간드 (MIC-A, MIC-B, 및 ULBP 1 내지 6), 뉴욕 식도 편평 세포 암종-1 (NY-ESO-1), P16, PD-L1, 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA), 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), ROR1, ROR2, TIM-3, TM4SF1, MUC1의 Tn-당형태 (TnMUC1), 글리코실-포스파티딜이노시톨 (GPI)-연결된 GDNF 패밀리의 α -수용체 4 (GFR α 4; GFR알파4), VEGFR2, 및 그의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

- [0119] 특정 실시양태에서, 종양 항원은 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), MUC1, MUC1의 Tn-당형태 (TnMUC1), 폴레이트 수용체 알파 (FR α), 메소텔린, 뉴욕 식도 편평 세포 암종-1 (NY-ESO-1), 글리피칸 2 (GPC2), 글리코실-포스파티딜이노시톨 (GPI)-연결된 GDNF 패밀리의 α -수용체 4 (GFR α 4; GFR알파4), 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA), 섬유모세포 활성화 단백질 (FAP), 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 1 (IL13R α 1), 및 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 2 (IL13R α 2)로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0120] 특정 실시양태에서, 제1 세포의 항원 결합 도메인 및 제2 세포의 항원 결합 도메인은 각각 독립적으로 단일쇄 가변 단편 (scFv) 및 Fab로부터 선택된다.
- [0121] 특정 실시양태에서, 제1 또는 제2 세포내 도메인의 적어도 1개의 공동자극 도메인은 4-1BB, CD2, CD28, 및 ICOS로부터 독립적으로 선택된 단백질의 공동자극 도메인을 포함한다.
- [0122] 특정 실시양태에서, 신호전달 도메인은 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0123] 특정 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 막횡단 도메인은 CD8, CD28, 및 4-1BB로부터 독립적으로 선택된 단백질의 막횡단 도메인을 포함한다.
- [0124] 특정 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 CAR은 힌지 도메인을 추가로 포함한다.
- [0125] 특정 실시양태에서, 힌지 도메인은 CD8 힌지 도메인을 포함한다.
- [0126] 특정 실시양태에서, 본 발명은 본원에 개시된 방법을 제공하며, 여기서:
- [0127] a. 제1 CAR은
- [0128] (i) 항-CD19 scFv를 포함하는 제1 세포의 항원 결합 도메인,
- [0129] (ii) 제1 막횡단 도메인, 및
- [0130] (iii) CD28 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인을 포함하고;
- [0131] b. 제2 CAR은
- [0132] (i) 항종양 항원 scFv를 포함하는 제2 세포의 항원 결합 도메인 (여기서 종양 항원은 CD19가 아님),
- [0133] (ii) 제2 막횡단 도메인, 및
- [0134] (iii) 4-1BB 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인을 포함한다.
- [0135] 특정 실시양태에서, 본 발명은 본원에 개시된 방법을 제공하며, 여기서:
- [0136] a. 제1 CAR은
- [0137] (i) CD8 리더 서열;
- [0138] (ii) 항-CD19 scFv를 포함하는 제1 세포의 항원 결합 도메인,
- [0139] (iii) CD8 힌지;
- [0140] (iv) CD28 막횡단 도메인, 및
- [0141] (v) CD28 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인으로 본질적으로 이루어지고;
- [0142] b. 제2 CAR은

- [0143] (i) CD8 리더 서열;
- [0144] (ii) 항-메소텔린 scFv를 포함하는 제2 세포의 항원 결합 도메인,
- [0145] (iii) CD8 힌지;
- [0146] (iv) CD8 막횡단 도메인, 및
- [0147] (v) 4-1BB 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인으로 본질적으로 이루어진다.
- [0148] 특정 실시양태에서, 변형된 세포는 스위치 수용체를 발현하도록 추가로 조작되고, 여기서 스위치 수용체는 제1 수용체의 세포외 도메인 및 제2 수용체의 세포내 도메인을 포함하고, 여기서 제1 수용체 및 제2 수용체는 각각 TGF β R 및 IL12R, TGF β R 및 CD28, TGF β R 및 OX40, TGF β R 및 CD27, TGF β R 및 4-1BB, TGF β R 및 IL-2R, TGF β R 및 IL-9R, PD1 및 IL12R, PD1 및 CD28, PD1 및 ICOS, PD1 및 CD27, PD1 및 4-1BB, PD1 및 IL-2R, PD1 및 IL-9R, BTLA 및 CD28, BTLA 및 ICOS, BTLA 및 CD27, CTLA4 및 CD28, TIM3 및 IL12R, TIM3 및 CD28, TIM3 및 CD28, TIM3 및 OX40, TIM3 및 4-1BB, TIM3 및 IL-2R, TIM3 및 IL-9R, VSIG3 및 CD28, VSIG3-IL12R β 2, VSIG3 및 CD27, VSIG3 및 4-1BB, VSIG3 및 ICOS, VSIG3-IL12R β 1, VSIG8-IL12R β 1, VSIG8 및 CD28, VSIG8-IL12R β 2, VSIG8 및 CD27, VSIG8 및 4-1BB, VSIG8-ICOS, VISTA 및 IL-9R, TIGIT 및 IL-9R, IFN γ 및 CD28, IFN γ 및 OX40, IFN γ 및 IL2R, 및 IFN γ 및 IL12R로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0149] 특정 실시양태에서, 변형된 세포는 우성 음성 수용체를 발현하도록 추가로 조작되며, 여기서 우성 음성 수용체는 dnTGF β R이다.
- [0150] 특정 실시양태에서, 변형된 세포는 제1 CAR 및 제2 CAR을 코딩하는 벡터를 포함한다.
- [0151] 특정 실시양태에서, 벡터는 렌티바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터이다.
- [0152] 특정 실시양태에서, 벡터는 실시양태 57의 스위치 수용체 및/또는 실시양태 58의 우성 음성 수용체를 추가로 코딩한다.
- [0153] 특정 실시양태에서, 변형된 세포는 마우스 세포 또는 인간 세포이다.
- [0154] 특정 실시양태에서, 변형된 세포의 집단은 T 세포를 포함한다.
- [0155] 특정 실시양태에서, 변형된 세포는 대상체에 대해 자가이다.
- [0156] 특정 실시양태에서, 변형된 세포는 대상체에 대해 동종이다.
- [0157] 특정 실시양태에서, 변형된 세포의 집단은 변형된 세포의 집단 및 적어도 1종의 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물로서 투여된다.
- [0158] 특정 실시양태에서, 변형된 세포의 집단은 약 1×10^6 내지 약 1×10^9 개의 세포를 포함한다.
- [0159] 특정 실시양태에서, 변형된 세포는 대상체의 말초 혈액에서 확장을 나타낸다.
- [0160] 특정 실시양태에서, 확장은 적어도 10-배, 적어도 100-배, 또는 적어도 1000-배이다.
- [0161] 특정 실시양태에서, 변형된 세포는 세포를 투여한 후 적어도 24개월 동안 검출가능하다.
- [0162] 특정 실시양태에서, 대상체는 인간이다.
- [0163] 특정 실시양태에서, 암은 유방암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 피부암, 전립선암, 췌장암, 결장직장암, 신암, 간암, 뇌암, 림프종, 백혈병, 폐암, 및 갑상선암으로부터 선택된다.
- [0164] 특정 실시양태에서, 변형된 세포의 집단은 T 세포를 포함하고, 투여 후 제7일 또는 그 이후에 변형된 세포의 집단의 적어도 30% 또는 적어도 40%는 표현형상 중심 기억 T 세포이다.
- [0165] 특정 실시양태에서, 방법은 대상체에게 CD19 항원을 투여하는 것을 추가로 포함한다.
- [0166] 특정 실시양태에서, CD19 항원을 투여하는 것은 CD19 항원을 코딩하는 벡터 또는 CD19 항원을 발현하도록 조작된 세포를 투여하는 것을 포함한다.
- [0167] 특정 실시양태에서, CD19 항원은 CD19 세포외 도메인 또는 그의 항원 단편을 포함한다.

- [0168] 특정 실시양태에서, CD19 항원은 변형된 세포의 집단의 투여 전에, 그와 공동으로 또는 그 후에 투여된다.
- [0169] 특정 실시양태에서, CD19 항원을 코딩하는 벡터는 아데노바이러스 벡터이다.
- [0170] 특정 실시양태에서, 방법은 대상체에게 항-PD1 면역요법을 투여하는 것을 추가로 포함한다.
- [0171] 특정 실시양태에서, 항-PD1 면역요법은 항-PD1 항체이다.

도면의 간단한 설명

- [0172] 본 발명의 상기 및 다른 특색 및 이점은 첨부 도면과 함께 하기 예시적 실시양태의 상세한 설명으로부터 보다 완전히 이해될 것이다.

도 1a - 도 1b는 동일한 세포에서의 이중 부스트 CAR의 발현을 위한 2개의 pTRPE 렌티바이러스 구축물의 설계 및 발현을 예시한다. 하나의 CAR은 말초 혈액 (PB)에서 CAR T 세포를 부스팅하기 위해 항-인간 CD19 scFv, CD28 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인 (hCD19/28z)을 포함한다. 다른 CAR은 종양 항원을 표적화하는 scFv (여기서, 예는 M5, 항-인간 메소텔린 (MSLN) scFv임)를 포함하고, 추가로 4-1BB 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인 (M5BBZ)을 포함한다. 도 1a는 pTRPE-hCD19/28z-M5BBZ 및 pTRPE-M5BBZ-hCD19/28z 이중 CAR 구축물의 개략도를 제공한다. 도 1b는 렌티바이러스 구축물로부터 T 세포에서의 hCD19/28z 및 M5BBZ CAR의 발현을 예시하는 유동 세포측정 데이터를 제공한다.

도 2a - 도 2b는 시험관내에서 방사선조사된 Nalm6 인간 종양 세포주 (CD19를 발현함)와 공동-배양한 경우의 이중 CAR T 세포의 확장을 예시하는 데이터를 제공한다. 도 2a는 표시된 구축물로 형질도입된 T 세포에 대한, 방사선조사된 CD19+ Nalm6의 존재 하에 4일 공동-배양한 후의 살아있는 세포의 수를 방사선조사된 Nalm6의 부재 하의 것과 비교하여 예시하는 그래프를 제공한다. UTD, 비형질도입됨. 도 2b는 어느 하나의 이중 CAR 구축물 (pTRPE-M5BBZ-hCD19/28z 또는 pTRPE-hCD19/28z-M5BBZ) 또는 단일 항-CD19 CAR 구축물 (pNVS-hCD19BBZ)로 형질도입된 T 세포의 경우 CD4+ 및 CD8+ 세포에서 유사한 CAR T 확장을 예시하지만 단일 M5 CAR로 형질도입된 T 세포 또는 비형질도입된 (UTD) T 세포의 경우에는 그렇지 않음을 예시하는 CSFE 염색 데이터를 제공한다.

도 3a - 도 3b는 시험관내 메소텔린-양성 췌장 종양 AsPC1 세포에 대한 CAR T 세포의 세포독성과 관련된 데이터를 제공한다. 도 3a는 pTRPE-hCD19/28z-M5BBZ 구축물 또는 pTRPE-M5BBZ-hCD19/28z 구축물로 형질도입된 T 세포가 AsPC1 세포를 사멸시킨다는 발견을 예시한다. 도 3b는 이중 CART 세포와 방사선조사된 Nalm6 세포의 공동-배양이 이중 CART 세포에 의한 AsPC1 세포 사멸을 가속화시킨다는 발견을 예시한다. AsPC1 세포 사멸의 증진은 pTRPE-M5BBZ-hCD19/28z로 형질도입된 T 세포와 비교하여 pTRPE-hCD19/28z-M5BBZ 구축물로 형질도입된 T 세포의 경우에 더 높았다.

도 4a - 도 4d는 폐 조직에서 잠재적인 온-타겟 오프-종양 독성을 측정하기 위한 모델로서의 역할을 하는 제2형 폐포세포로부터 유래된 메소텔린-양성 A549 세포에 대한 CART 세포의 세포독성과 관련된 데이터를 제공한다. 도 4a 및 도 4b는 각각 pTRPE-hCD19/28z-M5BBZ 이중 CAR 구축물을 포함하는 T 세포가 pTRPE-M5BBZ 단일 CAR 구축물 또는 pTRPE-M5BBZ-hCD19/28z 이중 CAR 구축물로 형질도입된 T 세포와 비교하여 A549 세포의 감소된 세포독성을 나타낸다는 발견을 예시하는 그래프를 제공한다. 도 4c는 방사선조사된 Nalm6 세포와의 공동-배양 후에, pTRPE-hCD19/28z-M5BBZ 이중 CAR 구축물로 형질도입된 T 세포가 pTRPE-M5BBZ-hCD19/28z 이중 CAR 구축물을 포함하는 T 세포와 비교하여 A549 세포의 감소된 세포독성을 나타낸다는 발견을 예시한다. 도 4d는 pTRPE-hCD19/28z-M5BBZ 이중 CAR 구축물로 형질도입된 T 세포가 pTRPE-M5BBZ-hCD19/28z 이중 CAR 구축물로 형질도입된 T 세포와 비교하여 보다 낮은 수준의 M5BBZ CAR을 발현한다는 발견을 예시하는 데이터를 제공한다.

도 5a - 도 5f는 방사선조사된 NALM6이 무종양 NSG 마우스 생체내에서 이중 CAR T 세포 확장을 자극한다는 발견을 예시하는 데이터를 제공한다. 도 5a는 실험의 개략도이다. 도 5b는 pTRPE-hCD19/28z-M5BBZ 이중 CAR 구축물 또는 pTRPE-M5BBZ-hCD19/28z 이중 CAR 구축물로 형질도입된 T 세포의 생체내 확장을 예시하는 데이터를 제공한다. 도 5c는 pTRPE-M5BBZ 구축물로 형질도입된 T 세포가 확장되지 않았다는 것을 예시하는 데이터를 제공한다. 도 5d는 다양한 기관에서의 이중 CAR T 확장을 예시하는 데이터를 제공한다. 도 5e는 혈청에서 세포독성 시토킨 (인터페론 생산 조절제 (IFN γ), 퍼포린, 그랜자임 A 및 그라눌리신)의 분비의 유의한 증가를 예시하는 데이터를 제공한다. 도 5f는 제20일에 수거된 T 세포의 표현형과 관련된 데이터를 제공한다.

도 6a - 도 6d는 방사선조사된 NALM6이 NSG 마우스 생체내에서 AsPC1 췌장 종양의 이중 CAR T 세포 사멸을 증진시킨다는 발견을 예시하는 데이터를 제공한다. 도 6a는 방사선조사된 Nalm6이 투여되지 않은 마우스에 대한 실험의 개략도이다. 도 6b는 pTRPE-hCD19/28z-M5BBZ 이중 CAR 구축물로 형질도입된 T 세포가 pTRPE-M5BBZ 단일

CAR 구축물로 형질도입된 T 세포와 비교하여 유의하게 증진된 체장 종양 사멸을 나타낸다는 발견을 예시하는, T 세포 주사 후 일수 대비 종양 크기를 플롯팅한 그래프를 제공한다. 도 6c는 방사선조사된 NALM6이 NSG 마우스 생체내에서 AsPC1 체장 종양의 이중 CAR T 세포 사멸을 증진시키고 가속화시킨다는 발견을 예시하는, T 세포 주사 후 일수 대비 종양 크기를 플롯팅한 그래프를 제공한다. 도 6d는 pTRPE-M5BBZ 단일 CAR 구축물과 비교하여 pTRPE-hCD19/28z-M5BBZ 이중 CAR 구축물로 형질도입된 T 세포의 경우 생체내 체장 종양 사멸의 증진이, 이중 CAR 구축물로 형질도입된 T 세포의 경우 종양 내의 보다 높은 CAR T 수 및 CAR T 세포의 CD4+ 세포로의 변경과 상관관계가 있다는 것을 예시하는 데이터를 제공한다.

도 7a - 도 7e는 동계 마우스에서의 무린 이중 CAR 세포독성과 관련된 데이터를 제공한다. 도 7a는 표시된 구축물로 형질도입된 무린 T 세포의 경우의 시험관내 메소텔린-양성 PDA7940bWT 세포주의 CAR T 세포 사멸을 예시하는 그래프를 제공한다. 도 7b는 림프-고갈의 부재 하에, 무린 이중 CAR 구축물로 형질도입된 무린 T 세포가 투여된 마우스에서는 CD19+ 세포의 감소 및 CD45.1+ 세포의 증가를 예시하지만, 어느 하나의 단일 CAR 구축물의 경우에는 그렇지 않았음을 예시하는 데이터를 제공한다. 도 7c는 확장된 이중 CAR T 세포가 간과 비교하여 주로 비장 내에 있음을 예시하는 데이터를 제공한다. 도 7d는 제7일에 수거된 혈액 내의 T 세포의 표현형과 관련된 데이터를 제공한다. 도 7e는 제7일에 수거된 비장 내의 T 세포의 표현형과 관련된 데이터를 제공한다.

도 8은 실험 설계 개략도이다. C57BL/6 동계 마우스에게 제-7일에 PDA (체장) 종양을 이식하였다. 제0일에, 1e6개의 CD45.1+ CAR T 세포 (MSGV-항-moCD19-MuCD28z-항-moMeso-A03-3-MuBBz 이중 CAR 구축물 또는 MSGV-항-moMeso-A03-3-MuBBz 단일 CAR 구축물로 형질도입됨)를 마우스 내로 주입하였다. 이어서, 마우스에게 CD19 항원 (1e9 pfu Ad-CMV-mCD19t-P2A-eGFP로서) 제5일부터 제11일까지 격일로 종양내로 제공하였다.

도 9는 종양 샘플에 대한 CAR-T 주입 후 제11일의 유동 세포측정법에 의한 CD45.1 발현을 예시하는 데이터를 제공한다.

도 10은 종양 샘플에 대한 CAR-T 주입 후 제11일의 유동 세포측정법에 의한 CD45.1 발현을 예시하는 데이터를 제공한다. 넓은 PBS 대조군을 지칭한다.

도 11은 종양 샘플에 대한 CAR-T 주입 후 제11일의 유동 세포측정법에 의한 CD8+CD45.1+ 세포 상에서의 PD-1 발현을 예시하는 데이터를 제공한다.

도 12는 CAR-T 주입 후 일수 대비 종양 크기를 플롯팅한 그래프를 제공한다.

도 13a-13b는 종양 샘플에 대한 CAR-T 주입 후 제11일의 유동 세포측정법에 의한 CD8+CD45.1+ 세포 상에서의 CD45.1 발현 (도 13a) 및 PD-1 발현 (도 13b)을 예시하는 데이터를 제공한다.

도 14a - 14d는 이중 표적화된 CAR T 세포가 생체내 "핫" PDA 종양에서 증가된 종양 부담 제어 및 전체 생존을 나타낸다는 발견과 관련된 데이터를 제공한다. 도 14a는 실험 설계 개략도이다. mCAR T 세포를 "핫" PDA 종양 생착 7일 후에 주사하였다. 마우스를 말단절단된 CD19를 코딩하는 아테노바이러스 (AAV)로 간헐적으로 처리하였다. 도 14b는 종양 부담을 보여주는 그래프이다 (n=10/군, N=2). P 값은 반복 측정 이원 ANOVA와 터키 다중 비교 검정을 사용하여 결정하였다. A03과 비교하여 *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. A03-AAV와 비교하여 [†]p < 0.05, ^{††}p < 0.01, ^{†††}p < 0.001, ^{††††}p < 0.0001. 도 14c는 AAV가 투여되지 않은 마우스에 대한 전체 생존을 보여주는 그래프이다. P 값은 로그 순위 (만텔-콕스) 검정에 의해 결정하였다. 도 14d는 AAV가 투여된 마우스에 대한 전체 생존을 보여주는 그래프이다. P 값은 로그 순위 (만텔-콕스) 검정에 의해 결정하였다.

도 15a - 15b는 이중 표적화된 CAR T 세포가 "콜드" PDA 모델에서 증가된 증식 및 이펙터 표현형을 갖고, 비장에서 B 세포 무형성증을 유도한다는 발견과 관련된 데이터를 제공한다. 도 14a에 제시된 실험 계획을 "콜드" 종양 PDA 모델에 사용하기 위해 개조하였다. 비장으로부터의 CD45.1+ CAR T 세포를 CAR T 주입 6일 후에 벌크 RNA-seq를 통해 특징화하였다 (n=5/반복). 도 15a는 DESeq2를 사용하여 정규화하고 분석한 데이터로부터의 상위 차등 발현 유전자의 플롯이다. 도 15b는 fGSEA 패키지를 사용하여 제조한 유전자 세트 풍부화 분석을 보여주는 차트이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

CAR-T 세포 요법이 혈액 악성종양을 치료하는 데 성공적이었지만, 이는 고형 종양을 치료하는 데에는 아직 효과적이지 않다. 액상 대 고형 종양을 치료하는 데 주요 차이가 존재한다. 혈액 악성종양과 비교하여, 정맥내로

[0173]

투여된 CAR T 세포는 고형 종양 부위를 발견하기 위해 신체 전반에 걸쳐 수송되어야 한다. T 세포 트래픽킹은 고형 종양에서, 및 또한 뇌 종양의 경우 혈액-뇌 장벽에 의해 제한된다. 추가적으로, 종양 이질성은 암의 근본적인 특성이다. 따라서, 하나의 단일 항원 (Ag)을 표적화하는 것은 CAR T 세포 요법에 의해 유도된 그러한 Ag의 상실과 연관된 재발을 초래할 것이다. 한편, CAR-T 세포는 내인성 및 외인성 인자 둘 다에 의해 기능장애가 될 수 있다. 내인성 기능장애는 높은 항원 로드 및/또는 긴장성 신호전달에 의해 구동되는 T 세포 소진으로 인해 주로 발생한다. CAR T 세포 기능은 또한 외인성 인자, 예컨대 시토카인 (예를 들어, TGF- β), 억제 수용체를 통해 신호전달하는 리간드 (예를 들어, PD-L1) 또는 종양 미세환경 (TME) 내의 영양소에 대한 경쟁에 의해 억제될 수 있다. 따라서, CAR T 세포의 불량한 생착 및 제한된 확장은 CAR T 요법이 고형 종양을 제거하는 데 실패하는 2가지 주요 원인이다.

[0174] 또한, 인간 환자에서 CAR T 세포의 전형적인 치료 용량은 약 10^7 내지 10^9 개 세포 범위인 반면에, 전임상 마우스 모델에서 사용되는 CAR T 세포의 전형적인 치료 용량은 10^6 내지 10^7 개 세포 범위이며, 이는 인간 환자에서 10^{10} 내지 10^{11} 개의 세포와 등가일 것이다. 그러나, 단지 인간 환자에게 투여되는 CAR T 세포의 치료 용량을 증가시키는 것은 온-타겟-오프-종양 독성의 위험을 증가시키는 것으로 공지되어 있다. 예를 들어, 최근의 임상 시험은 메소텔린 (MSLN)-양성 난소암 및 췌장암 환자를 항-MSLN scFv ("M5")를 포함하는 CAR을 발현하는 T 세포로 치료하였다. MSLN 발현은 환자의 종양에서 높았다. 그러나, MSLN은 또한 일부 정상 조직, 예컨대 폐내 제2형 폐포세포에서도 보다 낮은 수준으로 발현되었다. 이러한 시험으로부터의 결과는 저용량 (3×10^7)의 M5 CAR-T 세포는 환자에 의해 잘 허용되었지만 항종양 효과를 제공하지 않은 반면, 보다 고용량 ($1-3 \times 10^8$)의 M5 CAR-T 세포는 중증 호흡기 문제를 유발하였고 (잠재적으로 온-타겟, 오프-종양 독성으로 인한), 여전히 치료 효과를 갖지 않았음을 보여주었다. 종양 부위의 CAR-T 세포의 국부 투여가 가능하지만, 이러한 전략은 전이성 암에 대한 치료 잠재력을 제한한다. 전반적으로, 이러한 시험은 저용량의 CAR-T 세포는 전형적으로 암을 제거할 수 없고, 보다 고용량의 CAR-T 세포는 어떠한 치료 효과도 없이 온-타겟-오프-종양 독성을 유발한다는 것을 보여주었다. 따라서, 독성을 감소시키면서 고형 종양에 치료 유효 용량의 CAR-T 세포를 전달하는 전략에 대한 필요가 존재한다.

[0175] 본 발명은 고형 종양을 표적화하는 입양 세포 요법의 치료 지수를 안전하게 증가시키는, 환자의 말초 혈액 (PB)에서의 CAR-발현 면역 세포 (예를 들어, CAR T 세포)의 CD19 항원-구동된 확장의 사용을 포함한다. 이는 이중 CAR 접근법을 사용하여 달성되며, 여기서 대상체는 CD19 항원을 표적화하는 제1 CAR 및 CD19 이외의 종양 항원을 표적화하는 제2 CAR을 발현하도록 조작된 면역 세포 (즉, 복수의 면역 세포, 예를 들어 복수의 T 세포) (즉, 이중 CAR T 세포; 이중 CAR 면역 세포)를 제공한다. 대상체에서 CD19 항원은 이중 CAR T 세포 확장을 구동한다. CD19 항원은 대상체에서 내인성으로, 예를 들어 CD19-발현 B 세포 상에 존재하고/거나, 외인성으로, 예를 들어 CD19 항원 단백질로서, CD19 항원을 발현하는 세포로서, 또는 CD19 항원을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산으로서 제공된다. 종양 항원을 표적화하는 단일 CAR을 발현하는 세포와 비교하여, 본 발명의 이중 CAR T 세포 접근법은 놀랍게도 대상체의 말초 혈액 및 기관 둘 다에서 생체내 CAR T 세포 확장을 증진시키고, 시험관내 및 생체내 종양 세포 사멸 (예를 들어, 고형 종양 세포 사멸 및 종양 크기 감소)을 증진 및 가속화시키고, 세포독성 시토카인 발현을 증가시키고, 온-타겟 오프-종양 세포독성을 저하시킨다. 중요하게는, 부스팅 및 항종양 효능은 림프구고갈을 필요로 하지 않는다. 추가적으로, 본 발명의 부스팅된 이중 CAR T 세포는 주로 이펙터 기억 또는 중심 기억 표현형이고, 단지 1 또는 2종의 소진 마커만을 발현한다. 중요하게는, 이들 예상외의 효과는 2종의 CAR을 조합하는 것의 단지 상가적 효과가 아니며, 본 발명은 입양 세포 요법으로 고형 종양을 치료하는 것에 대한 오랜 미충족 필요를 다룬다.

[0176] 한 측면에서, 본 발명은 (a) (i) CD19에 대해 친화도를 갖는 제1 세포외 항원 결합 도메인, (ii) 제1 막횡단 도메인, 및 (iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인을 포함하는 제1 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 제1 뉴클레오티드 서열; 및 (b) (i) CD19가 아닌 종양 항원에 대해 친화도를 갖는 제2 세포외 항원 결합 도메인, (ii) 제2 막횡단 도메인, 및 (iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인을 포함하는 제2 CAR을 코딩하는 제2 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산을 제공한다.

[0177] 또 다른 측면에서, 본 발명은 변형된 세포를 제공하며, 여기서 세포는 면역 세포 또는 그의 전구체 세포이고, 세포는 (a) (i) CD19에 대해 친화도를 갖는 제1 세포외 항원 결합 도메인, (ii) 제1 막횡단 도메인, 및 (iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인을 포함하는 제1 키메라 항원

수용체 (CAR); 및 (b) (i) CD19가 아닌 종양 항원에 대해 친화도를 갖는 제2 세포의 항원 결합 도메인, (ii) 제2 막횡단 도메인, 및 (iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인을 포함하는 제2 CAR을 발현하도록 조작된다.

[0178] 또 다른 측면에서, 본 발명은 암의 치료를 필요로 하는 대상체에게 변형된 세포의 집단을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 세포는 면역 세포 또는 그의 전구체 세포이고, 세포는 (a) (i) CD19에 대해 친화도를 갖는 제1 세포의 항원 결합 도메인, (ii) 제1 막횡단 도메인, 및 (iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인을 포함하는 제1 키메라 항원 수용체 (CAR); 및 (b) (i) CD19가 아닌 종양 항원에 대해 친화도를 갖는 제2 세포의 항원 결합 도메인, (ii) 제2 막횡단 도메인, 및 (iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인을 포함하는 제2 CAR을 발현하도록 조작된다.

[0179] 다른 측면에서, 관련 벡터, 조성물 (예를 들어, 제약 조성물) 및 키트가 본원에 제공된다.

[0180] 본 개시내용에 기재된 방법은 본원에 개시된 특정한 방법 및 실험 조건에 제한되지 않는 것으로 이해되어야 하며, 이는 이러한 방법 및 조건이 달라질 수 있기 때문이다. 또한, 본원에 사용된 용어는 단지 특정한 실시양태를 기재하기 위한 것이며, 제한하는 것으로 의도되지 않는다는 것이 이해되어야 한다.

[0181] 또한, 본원에 기재된 실험은, 달리 나타내지 않는 한, 관련 기술분야의 기술 내의 통상적인 분자 및 세포 생물학적 및 면역학적 기술을 사용한다. 이러한 기술은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있고, 문헌에 충분히 설명되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, N.Y. (1987-2008) (모든 보충서 포함), Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition) by MR Green and J. Sambrook and Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Chapter 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (2013, 2nd edition)]을 참조한다.

[0182] 키메라 항원 수용체를 갖는 T 세포 (CAR T 세포)를 사용하는 방법 및 기술은, 예를 들어 문헌 [Ruehlla, et al., J. Clin. Invest., 126(10):3814-3826 (2016) 및 Kalos, et al., 3 (95), 95ra73:1-11 (2011)]에 기재되어 있으며, 그의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0183] A. 정의

[0184] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 과학 기술 용어는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 의미를 갖는다. 임의의 잠재적 모호성의 경우에, 본원에 제공된 정의는 임의의 사전 또는 외인 정의보다 우선한다. 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단수 용어는 복수를 포함할 것이고, 복수 용어는 단수를 포함할 것이다. "또는"의 사용은 달리 언급되지 않는 한 "및/또는"을 의미한다. 용어 "포함하는" 뿐만 아니라 다른 형태, 예컨대 "포함하다" 및 "포함된"의 사용은 제한적이지 않다.

[0185] 일반적으로, 본원에 기재된 세포 및 조직 배양, 분자 생물학, 면역학, 미생물학, 유전학 및 단백질 및 핵산 화학 및 혼성화와 관련하여 사용되는 명명법은 널리 공지되어 있고, 관련 기술분야에서 통상적으로 사용된다. 본원에 제공된 방법 및 기술은 일반적으로 관련 기술분야에 널리 공지된 통상적인 방법에 따라, 및 달리 나타내지 않는 한 본 명세서 전반에 걸쳐 인용되고 논의된 다양한 일반적이고 보다 구체적인 참고문헌에 기재된 바와 같이 수행된다. 효소적 반응 및 정제 기술은 제조업체의 설명서에 따라, 관련 기술분야에서 통상적으로 달성되는 바와 같이 또는 본원에 기재된 바와 같이 수행된다. 본원에 기재된 분석 화학, 합성 유기 화학, 및 의약 및 제약 화학과 관련하여 사용되는 명명법, 및 그의 실험실 절차 및 기술은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고 통상적으로 사용된다. 화학적 합성, 화학적 분석, 제약 제조, 제제화, 및 전달, 및 환자의 치료를 위해 표준 기술이 사용된다.

[0186] 본 개시내용이 보다 용이하게 이해될 수 있도록, 선택 용어가 하기 정의된다.

[0187] 단수 용어는 그의 문법적 대상의 하나 또는 하나 초과 (즉, 적어도 하나)를 지칭하기 위해 본원에 사용된다. 예로서, "요소"는 하나의 요소 또는 하나 초과의 요소를 의미한다.

[0188] 측정가능한 값, 예컨대 양, 시간 기간 등을 언급하는 경우에 본원에 사용된 "약"은 명시된 값으로부터 $\pm 20\%$ 또는 $\pm 10\%$, 보다 바람직하게는 $\pm 5\%$, 보다 더 바람직하게는 $\pm 1\%$, 보다 더 바람직하게는 $\pm 0.1\%$ 의 변동을 포괄하는 것으로 의도되며, 이는 이러한 변동이 개시된 방법을 수행하는 데 적절하기 때문이다.

[0189] 본원에 사용된 "활성화"는 검출가능한 세포 증식을 유도하기에 충분히 자극된 T 세포의 상태를 지칭한다. 활성

화는 또한 유도된 시토카인 생산 및 검출가능한 이펙터 기능과 연관될 수 있다. 용어 "활성화된 T 세포"는 특 히 세포 분열이 진행 중인 T 세포를 지칭한다.

- [0190] 본원에 사용된 질환을 "완화시키는" 것은 질환의 1종 이상의 증상의 중증도를 감소시키는 것을 의미한다.
- [0191] 본원에 사용된 용어 "항원"은 면역 반응을 유발하는 분자로서 정의된다. 이러한 면역 반응은 항체 생산 또는 특이적 면역-적격 세포의 활성화 또는 둘 다를 수반할 수 있다. 통상의 기술자는 실질적으로 모든 단백질 또는 펩티드를 포함한 임의의 거대분자가 항원으로서 작용할 수 있음을 이해할 것이다.
- [0192] 또한, 항원은 재조합 또는 게놈 DNA로부터 유래될 수 있다. 따라서, 통상의 기술자는 면역 반응을 도출하는 단백질질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 또는 부분 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 임의의 DNA가 본원에 사용된 용어 "항원"을 코딩한다는 것을 이해할 것이다. 또한, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 항원이 유전자의 전장 뉴클레오타이드 서열에 의해서만 코딩될 필요는 없음을 이해할 것이다. 본 발명이 1개 초과 유전자의 부분 뉴클레오타이드 서열의 사용을 포함하나 이에 제한되지는 않고, 이들 뉴클레오타이드 서열이 목적하는 면역 반응을 도출하기 위해 다양한 조합으로 배열된다는 것은 용이하게 명백하다. 또한, 통상의 기술자는 항원이 "유전자"에 의해 전혀 코딩될 필요가 없음을 이해할 것이다. 항원이 합성되어 생성될 수 있거나 또는 생물학적 샘플로부터 유래될 수 있다는 것은 용이하게 명백하다. 이러한 생물학적 샘플은 조직 샘플, 종양 샘플, 세포 또는 생물학적 유체를 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.
- [0193] 본원에 사용된 용어 "자가"는 이후에 개체 내로 재도입될 동일한 개체로부터 유래된 임의의 물질을 지칭하는 것으로 의도된다.
- [0194] "공동-자극 분자"는 공동-자극 리간드와 특이적으로 결합하여 T 세포에 의한 공동-자극 반응, 예컨대 비제한적으로 증식을 매개하는 T 세포 상의 동족 결합 파트너를 지칭한다. 공동-자극 분자는 MHC 부류 I 분자, BTLA 및 톨 리간드 수용체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0195] 본원에 사용된 "공동-자극 신호"는 1차 신호, 예컨대 TCR/CD3 라이게이션과 조합되어 T 세포 증식 및/또는 주요 분자의 상향조절 또는 하향조절을 유발하는 신호를 지칭한다.
- [0196] "질환"은 동물이 항상성을 유지할 수 없고, 질환이 호전되지 않으면 동물의 건강이 계속 악화되는 동물의 건강 상태이다. 대조적으로, 동물의 "장애"는 동물이 항상성을 유지할 수 있지만 동물의 건강 상태가 장애가 없는 경우보다는 덜 유리한 건강 상태이다. 치료하지 않고 방치할 경우, 장애가 반드시 동물의 건강 상태의 추가 저하를 유발하는 것은 아니다.
- [0197] 본원에 사용된 용어 "하향조절"은 1종 이상의 유전자의 유전자 발현의 감소 또는 제거를 지칭한다.
- [0198] "유효량" 또는 "치료 유효량"은 본원에서 상호교환가능하게 사용되고, 특정한 생물학적 결과를 달성하거나 치료적 또는 예방적 이익을 제공하는 데 효과적인 본원에 기재된 바와 같은 화합물, 제제, 물질 또는 조성물의 양을 지칭한다. 이러한 결과는 포유동물에게 투여되는 경우에 본 발명의 조성물의 부재 하에 검출된 면역 반응과 비교하여 검출가능한 수준의 면역 억제 또는 반응을 유발하는 양을 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 면역 반응은 관련 기술분야에서 인식되는 다수의 방법에 의해 용이하게 평가될 수 있다. 통상의 기술자는 본원에서 투여되는 조성물의 양이 다양하며, 다수의 인자, 예컨대 치료되는 질환 또는 상태, 치료되는 포유동물의 연령 및 건강 및 신체 상태, 질환의 중증도, 투여되는 특정한 화합물 등에 기초하여 용이하게 결정될 수 있음을 이해할 것이다.
- [0199] "코딩하는"은 규정된 뉴클레오타이드 서열 (즉, rRNA, tRNA 및 mRNA) 또는 규정된 아미노산 서열 및 그로부터 생성되는 생물학적 특성을 갖는, 생물학적 과정에서 다른 중합체 및 거대분자의 합성을 위한 주형으로서의 역할을 하는, 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 유전자, cDNA, 또는 mRNA 내의 뉴클레오타이드의 특정 서열의 내재적 특성을 지칭한다. 따라서, 유전자는 그러한 유전자에 상응하는 mRNA의 전사 및 번역이 세포 또는 다른 생물학적 시스템에서 단백질을 생산하는 경우에 단백질을 코딩한다. 뉴클레오타이드 서열이 mRNA 서열과 동일하고 통상적으로 서열 목록에 제공되는 코딩 가닥, 및 유전자 또는 cDNA의 전사를 위한 주형으로서 사용되는 비-코딩 가닥 둘 다는 그러한 유전자 또는 cDNA의 단백질 또는 다른 생성물을 코딩하는 것으로 지칭될 수 있다.
- [0200] 본원에 사용된 "내인성"은 유기체, 세포, 조직 또는 시스템으로부터의, 또는 그 내부에서 생산된 임의의 물질을 지칭한다.
- [0201] 본원에 사용된 용어 "에피토프"는 면역 반응을 도출하여 B 및/또는 T 세포 반응을 유도할 수 있는 항원 상의 작은 화학적 분자로서 정의된다. 항원은 1개 이상의 에피토프를 가질 수 있다. 대부분의 항원은 많은 에피토프

를 가지며; 즉, 다가이다. 일반적으로, 에피토프는 크기가 대략 약 10개의 아미노산 및/또는 당이다. 바람직하게는, 에피토프는 약 4-18개의 아미노산, 보다 바람직하게는 약 5-16개의 아미노산, 보다 더 가장 바람직하게는 6-14개의 아미노산, 보다 바람직하게는 약 7-12, 가장 바람직하게는 약 8-10개의 아미노산이다. 관련 기술 분야의 통상의 기술자는 일반적으로 분자의 특이적 선형 서열보다는 전반적인 3차원 구조가 항원 특이성의 주요 기준이고, 따라서 하나의 에피토프를 또 다른 에피토프와 구별함을 이해한다. 본 개시내용에 기초하여, 본 발명에 사용되는 펩티드는 에피토프일 수 있다.

[0202] 본원에 사용된 용어 "외인성"은 유기체, 세포, 조직 또는 시스템의 외부로부터 도입되거나 또는 외부에서 생산된 임의의 물질을 지칭한다.

[0203] 본원에 사용된 용어 "확장시키다"는 T 세포의 수의 증가에서와 같이 수를 증가시키는 것을 지칭한다. 한 실시양태에서, 생체의 확장된 T 세포는 배양물에 원래 존재하는 수에 비해 수가 증가한다. 또 다른 실시양태에서, 생체의 확장된 T 세포는 배양물 중 다른 세포 유형에 비해 수가 증가한다. 본원에 사용된 용어 "생체외"는 살아있는 유기체 (예를 들어, 인간)로부터 제거되고 유기체 외부에서 (예를 들어, 배양 접시, 시험 튜브 또는 생물반응기에서) 증식된 세포를 지칭한다.

[0204] 본원에 사용된 용어 "발현"은 그의 프로모터에 의해 구동되는 특정한 뉴클레오티드 서열의 전사 및/또는 번역으로서 정의된다.

[0205] "발현 벡터"는 발현시킬 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 발현 제어 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 지칭한다. 발현 벡터는 발현을 위한 충분한 시스-작용 요소를 포함하고; 발현을 위한 다른 요소는 숙주 세포에 의해 또는 시험관내 발현 시스템에서 공급될 수 있다. 발현 벡터는 관련 기술분야에 공지된 모든 것, 예컨대 재조합 폴리뉴클레오티드를 혼입시키는 코스미드, 플라스미드 (예를 들어, 네이키드이거나 또는 리포솜에 함유됨) 및 바이러스 (예를 들어, 쉼다 바이러스, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-연관 바이러스)를 포함한다.

[0206] 본원에 사용된 "동일성"은 2개의 중합체 분자 사이의, 특히 2개의 아미노산 분자 사이의, 예컨대 2개의 폴리펩티드 분자 사이의 서브유닛 서열 동일성을 지칭한다. 2개의 아미노산 서열이 동일한 위치에서 동일한 잔기를 가질 때; 예를 들어, 각각의 2개의 폴리펩티드 분자 내의 위치가 아르기닌에 의해 점유된 경우에, 이들은 그 위치에서 동일하다. 2개의 아미노산 서열이 정렬 시 동일한 위치에서 동일한 잔기를 갖는 동일성 또는 정도는 종종 백분율로 표현된다. 2개의 아미노산 서열 사이의 동일성은 매칭되거나 동일한 위치의 수의 직접 함수이고; 예를 들어, 2개의 서열에서 위치의 절반 (예를 들어, 중합체 10개의 아미노산 길이에서 5개 위치)이 동일한 경우에, 2개의 서열은 50% 동일하고; 위치의 90% (예를 들어, 10개 중 9개)가 매칭되거나 동일한 경우에, 2개의 아미노산 서열은 90% 동일하다.

[0207] 본원에 사용된 용어 "면역 반응"은 림프구가 항원 분자를 외래로서 확인하고 항체의 형성을 유도하고/거나 림프구를 활성화시켜 항원을 제거하는 경우에 이루어지는 항원에 대한 세포성 반응으로서 정의된다.

[0208] 용어 "면역억제"는 전반적 면역 반응을 감소시키는 것을 지칭하는 것으로 본원에 사용된다.

[0209] "단리된"은 천연 상태에서부터 변경 또는 제거된 것을 의미한다. 예를 들어, 살아있는 동물에 자연적으로 존재하는 핵산 또는 펩티드는 "단리된" 것이 아니지만, 그의 자연 상태의 공존 물질로부터 부분적으로 또는 완전히 분리된 동일한 핵산 또는 펩티드는 "단리된" 것이다. 단리된 핵산 또는 단백질은 실질적으로 정제된 형태로 존재할 수 있거나, 또는 비-천연 환경, 예컨대 예를 들어 숙주 세포에 존재할 수 있다.

[0210] 본원에 사용된 "렌티바이러스"는 레트로비리다에 패밀리의 속을 지칭한다. 렌티바이러스는 비-분열 세포를 감염시킬 수 있다는 점에서 레트로바이러스 중에서 고유하고; 유의한 양의 유전자 정보를 숙주 세포의 DNA 내로 전달할 수 있어서, 유전자 전달 벡터의 가장 효율적인 방법 중 하나이다. HIV, SIV 및 FIV는 모두 렌티바이러스의 예이다. 렌티바이러스로부터 유래된 벡터는 생체내에서 유의한 수준의 유전자 전달을 달성하는 수단을 제공한다.

[0211] 본원에 사용된 용어 "변형된"은 본 발명의 분자 또는 세포의 변화된 상태 또는 구조를 의미한다. 분자는 화학적으로, 구조적으로, 및 기능적으로 포함 많은 방식으로 변형될 수 있다. 세포는 핵산의 도입을 통해 변형될 수 있다.

[0212] 본원에 사용된 용어 "조정하는"은 치료 또는 화합물의 부제 하의 대상체에서의 반응 수준과 비교하여, 및/또는 달리 동일하지만 비치료된 대상체에서의 반응 수준과 비교하여 대상체에서 반응 수준의 검출가능한 증가 또는

감소를 매개하는 것을 의미한다. 상기 용어는 천연 신호 또는 반응을 교란시키고/거나 이에 영향을 미침으로써 대상체, 바람직하게는 인간에서 유의한 치료 반응을 매개하는 것을 포괄한다.

- [0213] 본 발명의 문맥에서, 통상적으로 발생하는 핵산 염기에 대해 하기 약어가 사용된다. "A"는 아데노신을 지칭하고, "C"는 시토신을 지칭하고, "G"는 구아노신을 지칭하고, "T"는 티미딘을 지칭하고, "U"는 우리딘을 지칭한다.
- [0214] 용어 "올리고뉴클레오타이드"는 전형적으로 짧은 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 뉴클레오타이드 서열이 DNA 서열 (즉, A, T, C, G)로 표시되는 경우, 이는 또한 "U"가 "T"를 대체한 RNA 서열 (즉, A, U, C, G)을 포함하는 것으로 이해될 것이다.
- [0215] 달리 명시되지 않는 한, "아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열"은 서로 축중성 버전이고 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 모든 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 어구 단백질 또는 RNA를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 또한 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 일부 버전에서 인트론(들)을 함유할 수 있는 정도로 인트론을 포함할 수 있다.
- [0216] 면역원성 조성물의 "비경구" 투여는, 예를 들어 피하 (s.c.), 정맥내 (i.v.), 근육내 (i.m.), 또는 흉골내 주사, 또는 주입 기술을 포함한다.
- [0217] 본원에 사용된 용어 "폴리뉴클레오타이드"는 뉴클레오타이드의 쇄로서 정의된다. 또한, 핵산은 뉴클레오타이드의 중합체이다. 따라서, 본원에 사용된 "핵산" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 상호교환가능하다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 핵산이 단량체 "뉴클레오타이드"로 가수분해될 수 있고 1개 이상의 "뉴클레오타이드 서열(들)"을 포함하는 폴리뉴클레오타이드라는 일반적인 지식을 갖고 있다. 단량체 뉴클레오타이드는 뉴클레오시드로 가수분해될 수 있다. 본원에 사용된 폴리뉴클레오타이드는 재조합 수단, 즉 통상의 클로닝 기술 및 PCR 등을 사용하는 재조합 라이브러리 또는 세포 계능으로부터의 핵산 서열의 클로닝을 포함하나 이에 제한되지는 않는 관련 기술분야에서 이용가능한 임의의 수단에 의해, 및 합성 수단에 의해 수득되는 모든 핵산 서열 (즉, "뉴클레오타이드 서열")을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0218] 본원에 사용된 용어 "펩티드", "폴리펩티드" 및 "단백질"은 상호교환가능하게 사용되고, 펩티드 결합에 의해 공유 연결된 아미노산 잔기로 구성된 화합물을 지칭한다. 단백질 또는 펩티드는 적어도 2개의 아미노산을 함유해야 하고, 단백질 또는 펩티드의 서열을 구성할 수 있는 아미노산의 최대 수에 대해서는 제한이 없다. 폴리펩티드는 펩티드 결합에 의해 서로 연결된 2개 이상의 아미노산을 포함하는 임의의 펩티드 또는 단백질을 포함한다. 본원에 사용된 상기 용어는 관련 기술분야에서 예를 들어 펩티드, 올리고펩티드 및 올리고머로도 통상적으로 지칭되는 단쇄, 및 관련 기술분야에서 많은 종류가 존재하는 단백질로 일반적으로 지칭되는 장쇄 둘 다를 지칭한다. "폴리펩티드"는 특히, 예를 들어 생물학적 활성 단편, 실질적으로 상동인 폴리펩티드, 올리고펩티드, 동종 이량체, 이종이량체, 폴리펩티드의 변이체, 변형된 폴리펩티드, 유도체, 유사체, 융합 단백질을 포함한다. 폴리펩티드는 천연 펩티드, 재조합 펩티드, 합성 펩티드, 또는 그의 조합을 포함한다.
- [0219] 항체와 관련하여 본원에 사용된 용어 "특이적으로 결합한다"는 특이적 항원을 인식하지만, 샘플 내의 다른 분자는 실질적으로 인식하거나 결합하지 않는 항체를 의미한다. 예를 들어, 하나의 종으로부터의 항원에 특이적으로 결합하는 항체는 또한 하나 이상의 종으로부터의 그러한 항원에 결합할 수 있다. 그러나, 이러한 교차-종 반응성은 그 자체가 항체의 분류를 특이적인 것으로 변경시키지 않는다. 또 다른 예에서, 항원에 특이적으로 결합하는 항체는 또한 항원의 상이한 대립유전자 형태에도 결합할 수 있다. 그러나, 이러한 교차 반응성은 그 자체가 항체의 분류를 특이적인 것으로 변경시키지 않는다. 일부 경우에, 용어 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합하는"은 항체, 단백질 또는 펩티드와 제2 화학 종의 상호작용과 관련하여 상호작용이 화학 종 상의 특정한 구조 (예를 들어, 항원 결정기 또는 에피토프)의 존재에 의존한다는 것을 의미하는 것으로 사용될 수 있으며; 예를 들어, 항체는 일반적으로 단백질보다는 특이적 단백질 구조를 인식하고 결합한다. 항체가 에피토프 "A"에 특이적인 경우에, 표지된 "A" 및 항체를 함유하는 반응에서 에피토프 A (또는 유리, 비표지된 A)를 함유하는 분자의 존재는 항체에 결합된 표지된 A의 양을 감소시킬 것이다.
- [0220] 용어 "자극"은 자극 분자 (예를 들어, TCR/CD3 복합체)가 그의 동족 리간드와 결합하여 신호 전달 사건, 예컨대 비제한적으로 TCR/CD3 복합체를 통한 신호 전달을 매개함으로써 유도되는 1차 반응을 의미한다. 자극은 특정 분자의 변경된 발현, 예컨대 TGF-베타의 하향조절, 및/또는 세포골격 구조의 재조직화 등을 매개할 수 있다.
- [0221] 본원에 사용된 용어 "자극 분자"는 항원 제시 세포 상에 존재하는 동족 자극 리간드와 특이적으로 결합하는 T 세포 상의 분자를 의미한다.

- [0222] 본원에 사용된 "자극 리간드"는 항원 제시 세포 (예를 들어, aAPC, 수지상 세포, B-세포 등) 상에 존재하는 경우에 T 세포 상의 동족 결합 파트너 (본원에서 "자극 분자"로 지칭됨)와 특이적으로 결합하여, 활성화, 면역 반응의 개시, 증식 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 T 세포에 의한 1차 반응을 매개할 수 있는 리간드를 의미한다. 자극 리간드는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 특히 펩티드, 항-CD3 항체, 초효능제 항-CD28 항체, 및 초효능제 항-CD2 항체가 로딩된 MHC 부류 I 분자를 포괄한다.
- [0223] 용어 "대상체"는 면역 반응이 도출될 수 있는 살아있는 유기체 (예를 들어, 포유동물)를 포함하는 것으로 의도된다. 본원에 사용된 "대상체" 또는 "환자"는 인간 또는 비-인간 포유동물일 수 있다. 비-인간 포유동물은, 예를 들어 가축 및 애완동물, 예컨대 양, 소, 돼지, 개, 고양이 및 무린 포유동물, 뿐만 아니라 원숭이 및 비-인간 영장류 포유동물을 포함한다. 바람직하게는, 대상체는 인간이다.
- [0224] "표적 부위" 또는 "표적 서열"은 결합이 일어나기에 충분한 조건 하에 결합 분자가 특이적으로 결합할 수 있는 핵산의 부분을 규정하는 핵산 서열을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 표적 서열은 결합이 일어나기에 충분한 조건 하에 결합 분자가 특이적으로 결합할 수 있는 핵산의 부분을 규정하는 게놈 핵산 서열을 지칭한다.
- [0225] 본원에 사용된 용어 "T 세포 수용체" 또는 "TCR"은 항원의 제시에 반응하여 T 세포의 활성화에 참여하는 막 단백질의 복합체를 지칭한다. TCR은 주요 조직적합성 복합체 분자에 결합된 항원을 인식하는 것을 담당한다. TCR은 알파 (α) 및 베타 (β) 쇄의 이중이량체로 구성되지만, 일부 세포에서 TCR은 감마 및 델타 (γ/δ) 쇄로 이루어진다. TCR은 구조적으로 유사하지만 별개의 해부학적 위치 및 기능을 갖는 알파/베타 및 감마/델타 형태로 존재할 수 있다. 각각의 쇄는 2개의 세포외 도메인, 가변 및 불변 도메인으로 구성된다. 일부 실시양태에서, TCR은 예를 들어 헬퍼 T 세포, 세포독성 T 세포, 기억 T 세포, 조절 T 세포, 자연 킬러 T 세포 및 감마 델타 T 세포를 비롯한, TCR을 포함하는 임의의 세포 상에서 변형될 수 있다.
- [0226] 본원에 사용된 용어 "치료적"은 치료 및/또는 예방을 의미한다. 치료 효과는 질환 상태의 억제, 완화 또는 근절에 의해 수득된다.
- [0227] 본원에 사용된 용어 "형질감염된" 또는 "형질전환된" 또는 "형질도입된"은 외인성 핵산이 숙주 세포 내로 전달되거나 도입되는 과정을 지칭한다. "형질감염된" 또는 "형질전환된" 또는 "형질도입된" 세포는 외인성 핵산으로 형질감염, 형질전환 또는 형질도입된 세포이다. 세포는 1차 대상체 세포 및 그의 자손을 포함한다.
- [0228] 본원에 사용된 용어 질환을 "치료하는" 것은 대상체가 겪는 질환 또는 장애의 적어도 1종의 징후 또는 증상의 빈도 또는 중증도를 감소시키는 것을 의미한다.
- [0229] "백터"는 단리된 핵산을 포함하고 단리된 핵산을 세포의 내부로 전달하는 데 사용될 수 있는 물질의 조성물이다. 선형 폴리뉴클레오티드, 이온성 또는 친양쪽성 화합물과 회합된 폴리뉴클레오티드, 플라스미드 및 바이러스를 포함하나 이에 제한되지는 않는 수많은 백터가 관련 기술분야에 공지되어 있다. 따라서, 용어 "백터"는 자율 복제 플라스미드 또는 바이러스를 포함한다. 상기 용어는 또한 핵산의 세포 내로의 전달을 용이하게 하는 비-플라스미드 및 비-바이러스 화합물, 예컨대 예를 들어 폴리리신 화합물, 리포솜 등을 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 바이러스 백터의 예는 센다이 바이러스 백터, 아데노바이러스 백터, 아데노-연관 바이러스 백터, 레트로바이러스 백터, 렌티바이러스 백터 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0230] 범위: 본 개시내용 전반에 걸쳐, 본 발명의 다양한 측면은 범위 포맷으로 제시될 수 있다. 범위 포맷의 기재는 단지 편의성 및 간결성을 위한 것이며, 본 발명의 범주에 대한 융통성 없는 제한으로 해석되어서는 안된다는 것이 이해되어야 한다. 따라서, 범위의 기재는 구체적으로 개시된 모든 가능한 하위범위뿐만 아니라 그러한 범위 내의 개별 수치 값을 갖는 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어, 범위, 예컨대 1 내지 6의 기재는 구체적으로 개시된 하위범위, 예컨대 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 6, 3 내지 6 등, 뿐만 아니라 그러한 범위 내의 개별 숫자, 예를 들어 1, 2, 2.7, 3, 4, 5, 5.3 및 6을 갖는 것으로 간주되어야 한다. 이는 범위의 폭과 상관없이 적용된다.
- [0231] B. 키메라 항원 수용체
- [0232] 본 발명은 (a) (i) CD19에 대해 친화도를 갖는 제1 세포의 항원 결합 도메인, (ii) 제1 막횡단 도메인, 및 (iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인을 포함하는 제1 키메라 항원 수용체 (CAR); 및 (b) (i) CD19가 아닌 종양 항원에 대해 친화도를 갖는 제2 세포의 항원 결합 도메인, (ii) 제2 막횡단 도메인, 및 (iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인을 포함하는 제2 CAR을 발현하도록 조작된, 변형된 면역 세포 또는 그의 전구체 세포 (예를 들어, 변형된

T 세포)를 제공한다. 제1 및 제2 CAR을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산, 핵산을 포함하는 벡터, 및 제1 및 제2 CAR, 벡터, 및/또는 핵산을 포함하는 변형된 세포 (예를 들어 변형된 T 세포)가 또한 제공된다. 제1 또는 제2 CAR의 항원 결합 도메인은 세포에서의 발현을 위해 CAR의 또 다른 도메인, 예컨대 힌지, 막횡단 도메인 또는 세포내 도메인에 작동가능하게 연결되며, 각각은 본원의 다른 곳에 기재된다. 한 실시양태에서, 항원 결합 도메인을 코딩하는 제1 뉴클레오타이드 서열은 힌지 및/또는 막횡단 도메인을 코딩하는 제2 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결되고, 추가로 세포내 도메인을 코딩하는 제3 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된다.

[0233] 본원에 기재된 항원 결합 도메인은 본 발명의 CAR에 포함될 수 있는 본원에 기재된 막횡단 도메인 중 임의의 것, 본원에 기재된 세포내 도메인 또는 세포질 도메인 중 임의의 것, 또는 본원에 기재된 다른 도메인 중 임의의 것, 예컨대 힌지 도메인 또는 스페이스 서열과 조합될 수 있다. 본 발명의 CAR은 또한 리더 서열을 포함할 수 있다. 본 발명의 CAR은 또한 CAR의 하나의 도메인을 다음 도메인에 연결시키는 역할을 할 수 있는 본원에 기재된 바와 같은 1개 이상의 스페이스 도메인 또는 링커를 포함할 수 있다.

[0234] 항원 결합 도메인

[0235] CAR의 세포외 항원 결합 도메인은 특이적 표적 항원을 인식하는 (즉, 그에 결합하는) 역할을 하며, 항원은 단백질, 탄수화물 및 당지질을 포함할 수 있다. 본 발명의 제1 CAR은 CD19에 대해 친화도를 갖는 세포외 항원 결합 도메인을 포함한다. 제1 CAR은 막횡단 도메인, 및 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같은 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 CAR은 CD28 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함한다.

[0236] CD19는 B 세포 상에서 자연 발현되며, (i) 입양 전달된 세포는 환자의 순환에 진입 시 즉시 CD19와 마주칠 것이고, (ii) 신체 내에 다량의 천연 CD19가 존재하고 (Morbach, et al., Clinical and Experimental Immunology, 2010), (iii) CD19는 B 세포로 분화되는 조혈 줄기 세포 (HSC)로부터 자기-재생될 수 있기 때문에, 말초 혈액에서 CAR T 세포 확장을 "부스팅"하기 위해 제1 CAR에 의해 인식되는 항원으로서 선택되었다. 이는 환자가 건강한 HSC를 갖는 한, 환자에서 CAR-T 세포의 지속적인 존재를 잠재적으로 유지시킬 수 있다. 추가적으로, 대체 이뮤노글로불린 주입에 의한 치료는 환자가 항-CD19 (예를 들어, CTL019) CAR-T 세포를 제공받은 후 B 세포 무형성증을 경험하더라도 환자의 이뮤노글로불린 수준을 정상으로 회복시킬 수 있다. 추가로, 대규모 현실 세계 분석은 CTL019로 치료된 환자에서 유의한 감염 위험을 밝혀내지 못했다 (Schultz, et al., J. Clin. Oncol., 2021:JCO. 20.03585). 항-CD19 항원 결합 도메인은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 항-CD19 "FMC63" scFv. 제1 CAR은 막횡단 도메인, 및 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 CAR은 CD28 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함한다.

[0237] 본 발명의 제2 CAR은 CD19가 아닌 종양 항원에 대해 친화도를 갖는 세포외 항원 결합 도메인을 포함한다. 제2 CAR은 막횡단 도메인, 및 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같은 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 CAR은 4-1BB 공동자극 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 CAR은 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 CAR은 4-1BB 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 포함한다. 본 발명의 제2 CAR은 CD19 이외의 임의의 종양 항원을 표적화하며, 그의 예는 TnMuc1 (예를 들어, WO2020198413A1 참조), GFR α4 (WO2016025880A1 참조), PSMA (예를 들어, WO2020181094A1 참조), EGFR (예를 들어, WO2021041725A1 및 WO2020210768A1 참조), IL13R α2 (예를 들어, WO2021041725A1 및 WO2020210768A1 참조), 및 메소텔린 (예를 들어, WO2017/112741 참조)을 표적화하는 CAR을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0238] 제2 CAR이 표적화하는 (즉, 그에 결합하는) 적합한 종양 항원은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 알파 태아-단백질 (AFP)/HLA-A2, AXL, B7-H3, BCMA, CA-1X, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD20, CD22, CD30, CD33, CD38, CD44v6, CD70, CD79a, CD79b, CD80, CD86, CD117, CD123, CD133, CD147, CD171, CD276, CEA, 클라우딘 18.2, c-Met, DLL3, DR5, 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), EGFRvIII, EpCAM, EphA2, 섬유모세포 활성화 단백질 (FAP), 플레이트 수용체 알파 (FRA)/플레이트 결합 단백질 (FBP), GD-2, 당지질 F77, 글리피칸 2 (GPC2), 글리피칸-3 (GPC3), 글리코실-포스파티딜이노시톨 (GPI)-연결된 GDNF 패밀리 α-수용체 4 (GFR α4; GFR알파4), HER2, HLA-A2, ICAM1, 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 (IL3R α), 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 1 (IL13R α1), 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 2 (IL13R α2), LAGE-1, 루이스 Y, LMP1 (EBV), MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, 멜란 A, 메소텔린, MG7 (글리코실화 CEA), MMP, MUC1, 넥틴4/FAP, NKG2D-리간드 (MIC-A, MIC-B,

및 ULBP 1 내지 6), 뉴욕 식도 편평 세포 암종-1 (NY-ESO-1), P16, PD-L1, 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA), 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), ROR1, ROR2, TIM-3, TM4SF1, MUC1의 Tn-당형태 (TnMUC1), VEGFR2, 및 그의 임의의 조합을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 종양 항원은 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), MUC1, MUC1의 Tn-당형태 (TnMUC1), 글리코실-포스파티딜이노시톨 (GPI)-연결된 GDNF 패밀리의 α -수용체 4 (GFR α 4; GFR α 4), 플레이트 수용체 알파 (FR α), 메소텔린, 뉴욕 식도 편평 세포 암종-1 (NY-ESO-1), 글리피칸 2 (GPC2), 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA), 섬유모세포 활성화 단백질 (FAP), 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 1 (IL13R α 1), 및 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 2 (IL13R α 2)로부터 선택된다.

[0239] 한 실시양태에서, 변형된 면역 세포 또는 그의 전구체 세포 (예를 들어, 변형된 T 세포)는 (a) (i) CD19에 대해 친화도를 갖는 제1 세포의 항원 결합 도메인, (ii) 제1 막횡단 도메인, 및 (iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인을 포함하는 제1 키메라 항원 수용체 (CAR); 및 (b) (i) 적어도 1개의 종양 항원에 대해 친화도를 갖는 제2 세포의 항원 결합 도메인, (ii) 제2 막횡단 도메인, 및 (iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인을 포함하는 제2 CAR을 발현하도록 조작되며; 여기서 적어도 1개의 종양 항원은 알파 태아-단백질 (AFP)/HLA-A2, AXL, B7-H3, BCMA, CA-1X, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD20, CD22, CD30, CD33, CD38, CD44v6, CD70, CD79a, CD79b, CD80, CD86, CD117, CD123, CD133, CD147, CD171, CD276, CEA, 클라우딘 18.2, c-Met, DLL3, DR5, 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), EGFRvIII, EphA2, 섬유모세포 활성화 단백질 (FAP), 플레이트 수용체 알파 (FR α)/플레이트 결합 단백질 (FBP), GD-2, 당지질 F77, 글리피칸 2 (GPC2), 글리피칸-3 (GPC3), 글리코실-포스파티딜이노시톨 (GPI)-연결된 GDNF 패밀리의 α -수용체 4 (GFR α 4; GFR α 4), HER2, HLA-A2, ICAM1, 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 (IL13R α), 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 1 (IL13R α 1), 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 2 (IL13R α 2), LAGE-1, 루이스 Y, LMP1 (EBV), MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, 멜란 A, 메소텔린, MG7 (글리코실화 CEA), MMP, MUC1, 넥틴4/FAP, NKG2D-리간드 (MIC-A, MIC-B, 및 ULBP 1 내지 6), 뉴욕 식도 편평 세포 암종-1 (NY-ESO-1), P16, PD-L1, 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA), 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), ROR1, ROR2, TIM-3, TM4SF1, MUC1의 Tn-당형태 (TnMUC1), VEGFR2, 및 그의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 종양 항원은 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), MUC1, MUC1의 Tn-당형태 (TnMUC1), 글리코실-포스파티딜이노시톨 (GPI)-연결된 GDNF 패밀리의 α -수용체 4 (GFR α 4; GFR α 4), 플레이트 수용체 알파 (FR α), 메소텔린, 뉴욕 식도 편평 세포 암종-1 (NY-ESO-1), 글리피칸 2 (GPC2), 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA), 섬유모세포 활성화 단백질 (FAP), 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 1 (IL13R α 1), 및 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 2 (IL13R α 2)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0240] 한 실시양태에서, 변형된 면역 세포 또는 그의 전구체 세포 (예를 들어, 변형된 T 세포)는 (a) (i) CD19에 대해 친화도를 갖는 제1 세포의 항원 결합 도메인, (ii) 제1 막횡단 도메인, 및 (iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인을 포함하는 제1 키메라 항원 수용체 (CAR); 및 (b) (i) 종양 항원에 대해 친화도를 갖는 제2 세포의 항원 결합 도메인, (ii) 제2 막횡단 도메인, 및 (iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인을 포함하는 제2 CAR을 발현하도록 조작되며; 여기서 종양 항원은 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), MUC1, MUC1의 Tn-당형태 (TnMUC1), 글리코실-포스파티딜이노시톨 (GPI)-연결된 GDNF 패밀리의 α -수용체 4 (GFR α 4; GFR α 4), 플레이트 수용체 알파 (FR α), 메소텔린, 뉴욕 식도 편평 세포 암종-1 (NY-ESO-1), 글리피칸 2 (GPC2), 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA), 섬유모세포 활성화 단백질 (FAP), 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 1 (IL13R α 1), 및 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 2 (IL13R α 2)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0241] CAR의 항원 결합 도메인은 항원에 결합하는 임의의 도메인을 포함할 수 있고, 모노클로날 항체 (mAb), 폴리클로날 항체, 합성 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 비-인간 항체, 단일-도메인 항체, 전장 항체 또는 그의 임의의 항원-결합 단편, Fab, 및 단일-쇄 가변 단편 (scFv)을 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 비-글리코실화된 항체 또는 그의 단편 또는 그의 scFv를 포함한다.

[0242] 본원에 사용된 용어 "단일-쇄 가변 단편" 또는 "scFv"는 공유 연결되어 VH::VL 이중이량체를 형성하는 이뮤노글로불린 (예를 들어, 마우스 또는 인간)의 중쇄 (VH) 및 경쇄 (VL)의 가변 영역의 융합 단백질이다. 가변 중쇄 (VH) 및 경쇄 (VL)는 직접적으로 연결되거나, 또는 VH의 N-말단을 VL의 C-말단과 잇거나, 또는 VH의 C-말단을 VL의 N-말단과 잇는 펩티드 링커에 의해 연결된다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인 (예를 들어, 종양 항원 결합 도메인)은 N-말단에서 C-말단으로 VH - 링커 - VL의 배위를 갖는 scFv를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 N-말단에서 C-말단으로 VL - 링커 - VH 또는 VH - 링커 - VL의 배위를 갖는

scFv를 포함한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본 발명에 사용하기에 적절한 배위를 선택할 수 있을 것이다.

[0243] 링커는 통상적으로 가요성을 위해 글리신이 풍부하고, 뿐만 아니라 용해도를 위해 세린 또는 트레오닌이 풍부하다. 링커는 세포의 항원-결합 도메인의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 연결할 수 있다. 링커의 비제한적 예는 문헌 [Shen et al., Anal. Chem. 80(6):1910-1917 (2008)] 및 WO 2014/087010에 개시되어 있으며, 그의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 글리신 세린 (GS) 링커를 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 링커 서열이 관련 기술분야에 공지되어 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본 발명에 사용하기에 적절한 링커 서열을 선택할 수 있을 것이다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항원 결합 도메인은 중쇄 가변 영역 (VH) 및 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하며, 여기서 VH 및 VL은 링커 서열에 의해 분리된다.

[0244] 불변 영역의 제거 및 링커의 도입에도 불구하고, scFv 단백질은 원래의 이뮤노글로불린의 특이성을 유지한다. 단일쇄 Fv 폴리펩티드 항체는 문헌 [Huston, et al., (Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883, 1988)]에 기재된 바와 같이 VH- 및 VL-코딩 서열을 포함하는 핵산으로부터 발현될 수 있다. 또한, 미국 특허 번호 5,091,513, 5,132,405 및 4,956,778; 및 미국 특허 공개 번호 20050196754 및 20050196754를 참조한다. 억제 활성을 갖는 길항작용 scFv가 기재되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Zhao et al., Hybridoma (Larchmt) 2008 27(6):455-51; Peter et al., J Cachexia Sarcopenia Muscle 2012 August 12; Shieh et al., J Immunol 2009 183(4):2277-85; Giomarelli et al., Thromb Haemost 2007 97(6):955-63; Fife et al., J Clin Invest 2006 116(8):2252-61; Brocks et al., Immunotechnology 1997 3(3):173-84; Moosmayer et al., Ther Immunol 1995 2(10):31-40] 참조). 자극 활성을 갖는 효능작용 scFv가 기재되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Peter et al., J Biochem 2003 25278(38):36740-7; Xie et al., Nat Biotech 1997 15(8):768-71; Ledbetter et al., Crit Rev Immunol 1997 17(5-6):427-55; Ho et al., Biochim Biophys Acta 2003 1638(3):257-66] 참조).

[0245] 본원에 사용된 "Fab"는 항원에 결합하지만 1가이고 Fc 부분을 갖지 않는 항체 구조의 단편을 지칭하며, 예를 들어 효소 파괴인에 의해 소화된 항체는 2개의 Fab 단편 및 Fc 단편 (예를 들어, 중쇄 (H) 불변 영역; 항원에 결합하지 않는 Fc 영역)을 생성한다.

[0246] 본원에 사용된 "F(ab')₂"는 전체 IgG 항체의 펩신 소화에 의해 생성된 항체 단편을 지칭하며, 여기서 이러한 단편은 2개의 항원 결합 (ab') (2가) 영역을 갖고, 여기서 각각의 (ab') 영역은 2개의 별개의 아미노산쇄, 즉 항원에 결합하기 위해 S-S 결합에 의해 연결된 일부의 H쇄 및 경쇄 (L)를 포함하고, 나머지 H쇄 부분은 함께 연결된다. "F(ab')₂" 단편은 2개의 개별 Fab' 단편으로 분할될 수 있다.

[0247] 다른 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 항체 모방체 단백질, 예컨대, 예를 들어, 설계된 안키린 반복 단백질 (DARPin), 아피바디, 모노바디 (즉, 애드넥틴), 아필린, 아피머, 아피틴, 알파바디, 아비머, 쿠니즈 도메인 펩티드, 또는 안티칼린을 포함한다. 특이적 결합 친화도를 갖는 구축물은, 예를 들어 문헌 [Seeger, et al., Protein Sci., 22:1239-1257 (2013)]에 기재된 바와 같은 DARPin 라이브러리를 사용하여 생성될 수 있다.

[0248] 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 CAR이 궁극적으로 사용될 동일한 종으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 인간에서 사용하기 위해, CAR의 항원 결합 도메인은 인간 항체 또는 그의 단편을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 CAR이 궁극적으로 사용될 것과 상이한 종으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 인간에서 사용하기 위해, CAR의 항원 결합 도메인은 무린 항체 또는 그의 단편, 또는 인간화 무린 항체 또는 그의 단편을 포함할 수 있다.

[0249] 특정 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 3개의 중쇄 상보성 결정 영역 (HCDR)을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 3개의 경쇄 상보성 결정 영역 (LCDR)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 링커를 포함한다.

[0250] 막횡단 도메인

[0251] 본 발명의 CAR은 CAR의 항원 결합 도메인을 CAR의 세포내 도메인에 연결하는 막횡단 도메인을 포함한다. CAR의 막횡단 도메인은 세포 (예를 들어, 면역 세포 또는 그의 전구체)의 형질 막을 관통할 수 있는 영역이다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 CAR의 항원 결합 도메인과 세포내 도메인 사이에 개재된다.

[0252] 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 CAR 내의 도메인 중 1개 이상과 자연적으로 회합된다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 이러한 도메인이 동일하거나 상이한 표면 막 단백질의 막횡단 도메인에 결합하는 것을 회피하여 수용체 복합체의 다른 구성원과 상호작용하는 것을 최소화하기 위해 선택될 수 있거나 또는 1

개 이상의 아미노산 치환에 의해 변형될 수 있다.

- [0253] 막횡단 도메인은 천연 또는 합성 공급원으로부터 유래될 수 있다. 공급원이 천연인 경우에, 도메인은 임의의 막-결합 또는 막횡단 단백질, 예를 들어 유형 I 막횡단 단백질로부터 유래될 수 있다. 공급원이 합성인 경우에, 막횡단 도메인은 CAR의 세포막 내로의 삽입을 용이하게 하는 임의의 인공 서열, 예를 들어 인공 소수성 서열일 수 있다. 본 발명에서 특히 유용한 막횡단 도메인의 예는, 비제한적으로, T 세포 수용체, CD28, CD3 앵글론, CD45, CD4, CD5, CD7, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134 (OX-40), CD137 (4-1BB), CD154 (CD40L), ICOS, CD278, 톨-유사 수용체 1 (TLR1), TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9의 알파, 베타 또는 제타쇄로부터 유래된 (즉, 적어도 그의 막횡단 영역(들)을 포함하는) 막횡단 도메인 또는 킬러 이뮤노글로불린-유사 수용체 (KIR)로부터 유래된 막횡단 도메인을 포함한다.
- [0254] 특정 실시양태에서, 막횡단 도메인은 CD8의 막횡단 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, CD8의 막횡단 도메인은 CD8 α 의 막횡단 도메인이다.
- [0255] 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 합성일 수 있으며, 이 경우에 이는 소수성 잔기, 예컨대 류신 및 발린을 우세하게 포함할 것이다. 바람직하게는, 페닐알라닌, 트립토판 및 발린의 트리플렛이 합성 막횡단 도메인의 각각의 단부에서 발견될 것이다.
- [0256] 본원에 기재된 막횡단 도메인은 CAR에 포함될 수 있는 본원에 기재된 항원 결합 도메인 중 임의의 것, 본원에 기재된 세포내 도메인 중 임의의 것, 또는 본원에 기재된 다른 도메인 중 임의의 것, 예컨대 힌지 도메인 또는 영역과 조합될 수 있다.
- [0257] 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 힌지 영역을 추가로 포함한다. 본 발명의 CAR은 또한 힌지 영역을 포함할 수 있다. CAR의 힌지 영역은 항원 결합 도메인과 막횡단 도메인 사이에 위치하는 친수성 영역이다. 일부 실시양태에서, 이 도메인은 CAR에 대해 적절한 단백질 폴딩을 용이하게 한다. 힌지 영역은 CAR에 대한 임의적인 성분이다. 힌지 영역은 항체의 Fc 단편, 항체의 힌지 영역, 항체의 CH2 영역, 항체의 CH3 영역, 인공 힌지 서열 또는 그의 조합으로부터 선택된 도메인을 포함할 수 있다. 힌지 영역의 예는 비제한적으로 CD8a 힌지, 3개의 글리신 (Gly)만큼 작을 수 있는 폴리펩티드로 만들어진 인공 힌지, 뿐만 아니라 IgG (예컨대 인간 IgG4)의 CH1 및 CH3 도메인을 포함한다.
- [0258] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 CAR은 항원 결합 도메인을 막횡단 도메인과 연결하고, 차례로 세포내 도메인에 연결하는 힌지 영역을 포함한다. 힌지 영역은 바람직하게는 표적 세포 상의 표적 항원을 인식하고 그에 결합하도록 항원 결합 도메인을 지지할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Hudecek et al., Cancer Immunol. Res. (2015) 3(2): 125-135] 참조). 일부 실시양태에서, 힌지 영역은 가요성 도메인이고, 따라서 항원 결합 도메인이 세포, 예컨대 종양 세포 상의 표적 항원의 특이적 구조 및 밀도를 최적으로 인식하는 구조를 갖게 한다 (Hudecek et al., 상기 문헌). 힌지 영역의 가요성은 힌지 영역이 많은 상이한 입체형태를 채택하도록 한다.
- [0259] 일부 실시양태에서, 힌지 영역은 이뮤노글로불린 중쇄 힌지 영역이다. 일부 실시양태에서, 힌지 영역은 수용체로부터 유래된 힌지 영역 폴리펩티드 (예를 들어, CD8-유래 힌지 영역)이다.
- [0260] 힌지 영역은 약 4개 아미노산 내지 약 50개 아미노산, 예를 들어 약 4개 aa 내지 약 10개 aa, 약 10개 aa 내지 약 15개 aa, 약 15개 aa 내지 약 20개 aa, 약 20개 aa 내지 약 25개 aa, 약 25개 aa 내지 약 30개 aa, 약 30개 aa 내지 약 40개 aa, 또는 약 40개 aa 내지 약 50개 aa의 길이를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 힌지 영역은 5개 aa 초과, 10개 aa 초과, 15개 aa 초과, 20개 aa 초과, 25개 aa 초과, 30개 aa 초과, 35개 aa 초과, 40개 aa 초과, 45개 aa 초과, 50개 aa 초과, 55개 aa 초과, 또는 그 초과를 가질 수 있다.
- [0261] 적합한 힌지 영역은 용이하게 선택될 수 있고, 다수의 적합한 길이 중 임의의 길이, 예컨대 1개 아미노산 (예를 들어, Gly) 내지 20개 아미노산, 2개 아미노산 내지 15개 아미노산, 3개 아미노산 내지 12개 아미노산, 예컨대 4개 아미노산 내지 10개 아미노산, 5개 아미노산 내지 9개 아미노산, 6개 아미노산 내지 8개 아미노산, 또는 7개 아미노산 내지 8개 아미노산일 수 있고, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7개 아미노산일 수 있다. 적합한 힌지 영역은 20개 초과인 아미노산 (예를 들어, 30, 40, 50, 60개 또는 그 초과인 아미노산)의 길이를 가질 수 있다.
- [0262] 예를 들어, 힌지 영역은 글리신 중합체 (G)_n, 글리신-세린 중합체, 글리신-알라닌 중합체, 알라닌-세린 중합체, 및 관련 기술분야에 공지된 다른 가요성 링커를 포함한다. 글리신 및 글리신-세린 중합체가 사용될 수 있고; Gly 및 Ser 둘 다는 비교적 비구조화되며, 따라서 성분 사이의 중성 테더로서 역할을 할 수 있다. 글리신 중합체가 사용될 수 있고; 글리신은 심지어 알라닌보다 유의하게 더 많은 phi-psi 공간에 접근하고, 보다 긴 측쇄를

갖는 잔기보다 훨씬 덜 제한된다 (예를 들어, 문헌 [Scheraga, Rev. Computational. Chem. (1992) 2: 73-142] 참조). 힌지 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 힌지 영역의 아미노산 서열을 포함할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Yan et al., J. Biol. Chem. (2012) 287: 5891-5897] 참조). 한 실시양태에서, 힌지 영역은 인간 CD8로부터 유래된 아미노산 서열 또는 그의 변이체를 포함할 수 있다.

[0263] 세포내 신호전달 도메인

[0264] 본 발명의 CAR은 또한 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 용어 "세포내 신호전달 도메인", "신호전달 도메인", "세포내 도메인" 및 "ICD"는 본원에서 상호교환가능하게 사용된다. CAR의 세포내 신호전달 도메인은 CAR이 발현되는 세포 (예를 들어, 면역 세포)의 이펙터 기능 중 적어도 1종의 활성화를 담당한다. 세포내 신호전달 도메인은 이펙터 기능 신호를 전달하고, 세포 (예를 들어, 면역 세포)가 그의 특화된 기능, 예를 들어 표적 세포에 해를 끼치고/거나 그를 파괴하는 기능을 수행하도록 지시한다.

[0265] 본 발명에 사용하기 위한 세포내 도메인의 예는 표면 수용체의 세포질 부분, 공동-자극 분자, 및 면역 세포 (즉, T 세포)에서 신호 전달을 개시하기 위해 협력하여 작용하는 임의의 분자, 뿐만 아니라 이들 요소의 임의의 유도체 또는 변이체 및 동일한 기능적 능력을 갖는 임의의 합성 서열을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0266] 세포내 신호전달 도메인의 예는 비제한적으로 T 세포 수용체 복합체의 ζ 쇄 또는 그의 상동체 중 임의의 것, 예를 들어 η 쇄, Fc γ RI γ 및 β 쇄, MB 1 (Ig α)쇄, B29 (Ig)쇄 등, 인간 CD3 제타쇄, CD3 폴리펩티드 (Δ , δ 및 ϵ), syk 패밀리의 티로신 키나제 (Syk, ZAP 70 등), src 패밀리의 티로신 키나제 (Lck, Fyn, Lyn 등), 및 T 세포 형질도입에 수반되는 다른 분자, 예컨대 CD2, CD5 및 CD28을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 인간 CD3 제타쇄, Fc γ RIII, Fc γ RI, DAP10, DAP12, Fc 수용체의 세포질 꼬리, 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 (ITAM) 보유 세포질 수용체, 및 그의 조합으로부터 선택된 단백질의 세포내 신호전달 도메인 (즉, "ICD")을 포함할 수 있다.

[0267] 한 실시양태에서, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 1종 이상의 공동-자극 분자의 임의의 부분, 예컨대 CD2, CD3, CD8, CD27, CD28, ICOS, 4-1BB, PD-1로부터의 적어도 1개의 신호전달 도메인, 그의 임의의 유도체 또는 변이체, 예컨대 동일한 기능적 능력을 갖는 그의 임의의 합성 서열, 및 그의 임의의 조합을 포함한다.

[0268] 세포내 도메인의 다른 예는 TCR, CD3 제타, CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD86, 공통 Fc γ R 감마, Fc γ R 베타 (Fc 엡실론 RIb), CD79a, CD79b, Fc γ RIIIa, DAP10, DAP12, T 세포 수용체 (TCR), CD8, CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX9, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, KIR 패밀리의 단백질, 림프구 기능-연관 항원-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, CD83과 특이적으로 결합하는 리간드, CDS, ICAM-1, GITR, BAFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), CD127, CD160, CD19, CD4, CD8알파, CD8베타, IL2R 베타, IL2R 감마, IL7R 알파, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D, 톨-유사 수용체 1 (TLR1), TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, 본원에 기재된 다른 공동-자극 분자, 그의 임의의 유도체, 변이체 또는 단편, 동일한 기능적 능력을 갖는 공동-자극 분자의 임의의 합성 서열, 및 그의 임의의 조합을 포함하나 이에 제한되지는 않는 1종 이상의 분자 또는 수용체로부터의 단편 또는 도메인을 포함한다.

[0269] 세포내 도메인의 추가의 예는 비제한적으로 CD3, B7 패밀리의 공동자극, 및 종양 괴사 인자 수용체 (TNFR) 슈퍼패밀리의 수용체를 포함한 제1, 제2 및 제3 세대 T 세포 신호전달 단백질을 포함하나 이에 제한되지는 않는 여러 유형의 다양한 다른 면역 신호전달 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 포함한다 (예를 들어, 문헌 [Park and Brentjens, J. Clin. Oncol. (2015) 33(6): 651-653] 참조). 추가적으로, 세포내 신호전달 도메인은 NK 및 NKT 세포에 의해 사용되는 신호전달 도메인 (예를 들어, 문헌 [Hermanson and Kaufman, Front. Immunol. (2015) 6: 195] 참조), 예컨대 NKp30 (B7-H6) (예를 들어, 문헌 [Zhang et al., J. Immunol. (2012) 189(5): 2290-2299] 참조), 및 DAP 12 (예를 들어, 문헌 [Topfer et al., J. Immunol. (2015) 194(7): 3201-3212] 참조), NKG2D, NKp44, NKp46, DAP10, 및 CD3z의 신호전달 도메인을 포함할 수 있다.

[0270] 본 발명의 CAR에 사용하기에 적합한 세포내 신호전달 도메인은 CAR의 활성화 (즉, 항원 및 이량체화제에 의해 활성화됨)에 반응하여 별개의 검출가능한 신호 (예를 들어, 세포에 의한 1종 이상의 시토킨의 증가된 생산; 표적 유전자의 전사의 변화; 단백질의 활성의 변화; 세포 거동, 예를 들어 세포 사멸의 변화; 세포 증식; 세포

분화; 세포 생존; 세포 신호전달 반응의 조정 등)를 제공하는 임의의 목적하는 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 적어도 1개 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6개 등)의 하기 기재된 바와 같은 ITAM 모티프를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 DAP10/CD28 유형 신호전달쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 막 결합된 CAR에 공유 부착되지 않지만, 대신에 세포질에 확산된다.

[0271] 본 발명의 CAR에 사용하기에 적합한 세포내 신호전달 도메인은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 (ITAM)-함유 세포내 신호전달 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, ITAM 모티프는 세포내 신호전달 도메인에서 2회 반복되고, 여기서 ITAM 모티프의 제1 및 제2 예는 6 내지 8개의 아미노산에 의해 서로 분리된다. 한 실시양태에서, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 3개의 ITAM 모티프를 포함한다.

[0272] 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 면역수용체 티로신 기반 활성화 모티프 (ITAM), 예컨대 비제한적으로 Fc감마RI, Fc감마RIIA, Fc감마RIIC, Fc감마RIIIA, FcRL5를 함유하는 인간 이뮤노글로불린 수용체의 신호전달 도메인을 포함한다 (예를 들어, 문헌 [Gillis et al., Front. Immunol. (2014) 5:254] 참조).

[0273] 적합한 세포내 신호전달 도메인은 ITAM 모티프를 함유하는 폴리펩티드로부터 유래된 ITAM 모티프-함유 부분일 수 있다. 예를 들어, 적합한 세포내 신호전달 도메인은 임의의 ITAM 모티프-함유 단백질로부터의 ITAM 모티프-함유 도메인일 수 있다. 따라서, 적합한 세포내 신호전달 도메인은 그것이 유래된 전체 단백질의 전체 서열을 함유할 필요는 없다. 적합한 ITAM 모티프-함유 폴리펩티드의 예는 DAP12, FCER1G (Fc 엡실론 수용체 I 감마쇄), CD3D (CD3 델타), CD3E (CD3 엡실론), CD3G (CD3 감마), CD3Z (CD3 제타), 및 CD79A (항원 수용체 복합체-연관 단백질 알파쇄)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0274] 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 DAP12 (또한 TYROBP; TYRO 단백질 티로신 키나제 결합 단백질; KARAP; PLOSL; DNAX-활성화 단백질 12; KAR-연관 단백질; TYRO 단백질 티로신 키나제-결합 단백질; 킬러 활성화 수용체 연관 단백질; 킬러-활성화 수용체-연관 단백질 등으로도 공지됨)로부터 유래된다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 FCER1G (또한 FCRG; Fc 엡실론 수용체 I 감마쇄; Fc 수용체 감마-쇄; fc-엡실론 RI-감마; fcr감마; fceRI 감마; 고친화도 이뮤노글로불린 엡실론 수용체 서브유닛 감마; 이뮤노글로불린 E 수용체, 고친화도, 감마쇄 등으로도 공지됨)로부터 유래된다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 T-세포 표면 당단백질 CD3 델타쇄 (또한 CD3D; CD3-델타; T3D; CD3 항원, 델타 서브유닛; CD3 델타; CD3d 항원, 델타 폴리펩티드 (TiT3 복합체); OKT3, 델타쇄; T-세포 수용체 T3 델타쇄; T-세포 표면 당단백질 CD3 델타쇄 등으로도 공지됨)로부터 유래된다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 T-세포 표면 당단백질 CD3 엡실론쇄 (또한 CD3e, T-세포 표면 항원 T3/Leu-4 엡실론쇄, T-세포 표면 당단백질 CD3 엡실론쇄, AI504783, CD3, CD3엡실론, T3e 등으로도 공지됨)로부터 유래된다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 T-세포 표면 당단백질 CD3 감마쇄 (또한 CD3G, T-세포 수용체 T3 감마쇄, CD3-감마, T3G, 감마 폴리펩티드 (TiT3 복합체) 등으로도 공지됨)로부터 유래된다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 T-세포 표면 당단백질 CD3 제타쇄 (또한 CD3Z, T-세포 수용체 T3 제타쇄, CD247, CD3-제타, CD3H, CD3Q, T3Z, TCRZ 등으로도 공지됨)로부터 유래된다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD79A (또한 B-세포 항원 수용체 복합체-연관 단백질 알파쇄; CD79a 항원 (이뮤노글로불린-연관 알파); MB-1 막 당단백질; ig-알파; 막-결합된 이뮤노글로불린-연관 단백질; 표면 IgM-연관 단백질 등으로도 공지됨)로부터 유래된다. 한 실시양태에서, 본 개시내용의 FN3 CAR에 사용하기에 적합한 세포내 신호전달 도메인은 DAP10/CD28 유형 신호전달쇄를 포함한다. 한 실시양태에서, 본 개시내용의 FN3 CAR에 사용하기에 적합한 세포내 신호전달 도메인은 ZAP70 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 TCR 제타, FcR 감마, FcR 베타, CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD5, CD22, CD79a, CD79b 또는 CD66d의 세포질 신호전달 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 인간 CD3 제타의 세포질 신호전달 도메인을 포함한다.

[0275] 통상적으로 전체 세포내 신호전달 도메인이 사용될 수 있지만, 많은 경우에 전체 분자를 사용할 필요는 없다. 세포내 신호전달 도메인의 말단절단된 부분이 사용되는 정도로, 이러한 말단절단된 부분은 이펙터 기능 신호를 전달하는 한 무손상쇄 대신 사용될 수 있다. 세포내 신호전달 도메인은 이펙터 기능 신호를 전달하기에 충분한 세포내 신호전달 도메인의 임의의 말단절단된 부분을 포함한다.

[0276] 본원에 기재된 세포내 도메인은 CAR에 포함될 수 있는 본원에 기재된 항원 결합 도메인 중 임의의 것, 본원에 기재된 막횡단 도메인 중 임의의 것, 또는 본원에 기재된 다른 도메인 중 임의의 것과 조합될 수 있다.

[0277] 특정 실시양태에서, 세포내 도메인은 4-1BB의 공동자극 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 세포내 도메인은 CD3ζ의 세포내 도메인 또는 그의 변이체를 포함한다. 특정 실시양태에서, 세포내 도메인은 4-1BB의 공동자

극 도메인 및 CD3ζ의 세포내 도메인을 포함한다.

[0278] 개별 CAR 도메인 서열 (리더, 항원 결합 도메인, 힌지, 막횡단 및/또는 세포내 도메인)의 허용되는 변경은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지될 것이다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, CAR 도메인은 임의의 자연 발생 또는 공지된 서열에 대해 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0279] 본원에 개시된 제1 및 제2 CAR에 대한 예시적인 아미노산 및 뉴클레오타이드 서열은 하기와 같다:

뮤린 항-CD19 CARAA 서열 (SEQ ID NO: 1)

MASPLRFLSLNLLLLGESIILGSGEADIQMTQSPASLSTSLGETVTIQCQASEDIYSGL
AWYQQKPGKSPQLLIYGASDLQDGVPSRFSGSGSGTQYSLKITSMTQTEDEGVYFCQQ
GLTYPRTFGGGKLELKGSGSGSGSGSGSGSEVQLQQSGAELVRPGTSVKLSCKV
SGDTITFYMHFVKRPGQGLEWIGRIDPEDESTKYSEKFNKATLTADTSSNTAYL
KLSSLTSEDTATYFCIYGGYFDYWGQGMVTVSSLQKVNSTTTKPVLRTPSPVHPT
GTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFACDIYFWALVVVAGVLCYGLLVTVALCVIWT
NSRRNRLLQSDYMNMTPRRPLTRKPYQPYAPARDFAAAYRPFKFSRSAETAANLQDP
NQLYNELNLGRREEYDVLEKKRRARPEMGGKQQRNRNPQEGVYNALQKDKMAEA
YSEIGTKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQTLAPR

뮤린 항-CD19 CARNT 서열 (SEQ ID NO: 2)

ATGGCCTCACCCCTGACCAGATTCCTGTCACTGAACCTGCTGCTGCTGGGCGAGT
CAATCATCTGGGCTCAGGCGAGGCCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCTGCCA
GCCTGTCTACCAGCCTGGGCGAGACAGTGACCATCCAGTGTGAGGCCAGCGAGG
ACATCTACTCTGGCCTGGCTTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGAGCCCTCAGCT
GCTGATCTACGGCGCCAGCGACCTGCAGGACGGCGTGCCTAGCAGATTACGCGG
CAGCGGCTCCGGAACCCAGTACAGCCTGAAGATCACCAGCATGCAGACCGAGGA
CGAGGGCGTGTACTTCTGCCAGCAAGGCCTGACCTACCCTAGAACCTTCGGAGG
AGGCACCAAGCTGGAAGTGAAGGGCGAGGCGGAAGTGGAGGCGGAGGATCTG
GCGGGCGGAGGCTCTGAAGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCTGAAGTGGTCCGGC
CTGGCACTAGCGTGAAGTGTCTGCAAGGTGTCCGGCGACACCATCACCTTCTA
CTACATGCACTTCGTGAAGCAGAGGCCAGGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCAG
AATCGACCTGAGGACGAGAGCACCAAGTACAGCGAGAAGTTCAAGAACAAGG
CCACCCTGACCGCCGACACCAAGCAGCAACACCGCCTACCTGAAGCTGTCTAGCCT
GACCTCCGAGGACACCGCCACCTACTTTTGCATCTACGGCGGCTACTACTTCGAC
TACTGGGGCCAGGGCGTGTGGTCAACGTGTCCAGCCTGCAGAAAGGTGAAGTCA
ACCACCACCAAGCCCGTGTGAGAACCCCTCACCCGTGCACCCACCGGCACCT
CACAGCCCCAGAGACCCGAGGACTGCAGACCCAGAGGCTCAGTGAAGGGCACCC
GGCCTGGACTTCGCCTGCGACATCTACTTTTGGGCACTGGTCTGTGTTGCTGGAG
TCCTGTTTTTTATGGCTTGTAGTGACAGTGGCTCTTTGTGTTATCTGGACAAAT
AGTAGAAGGAACAGACTCCTCAAAGTGAAGTACATGAACATGACTCCCCGGAGG
CCTGGGCTCACTCGAAAGCCTTACCAGCCCTACGCCCTGCCAGAGACTTTGCAG
CGTACCGCCCCAAGTTCTCAAGATCAGCCGAGACCGCCGCCAACCTGCAGGACC
CCAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGAAGAGAGGAGTACGACGTGC
TGGAGAAGAAGAGAGCCAGAGACCCCGAGATGGGCGGCAAGCAGCAGAGAAGA
AGAAACCCCCAGGAGGGCGTGTACAACGCCCTGCAGAAAGGACAAGATGGCCGA
GGCCTACTCAGAGATCGGCACCAAGGGCGAGAGAAGAAGAGGCAAGGGCCACG
ACGGCCTGTACCAGGGCCTGTCAACCGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTGC
ACATGCAGACCTGGCCCCCAGA

인간 항-CD19 CARAA 서열 (SEQ ID NO: 3)

MALPVTALLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWY
QQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLP
YTFGQGTLEIKGGGSGGGGSGGGGSGVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLP
DYGVSWIRQPPGKLEWIGVIWGSETTYYSLSLKSRTISKDNQSKNQVSLKLSSVTA
ADTAVYYCAKHYYGGSYAMDYWGQGLVTVSSITTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWVVLVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRL
LHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLY

[0280]

NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM
KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

인간 항-*CD19 CAR NT* 서열 (SEQ ID NO: 4)

ATGGCCTTACCAAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCG
CCAGGCCGGAATTTGTGATGACCCAGTCACCCGCCACTCTTAGCCTTTACCCGG
TGAGCGCGCAACCTGTCTTGACAGAGCTCCCAAGACATCTCAAAATACCTTAAT
TGGTATCAACAGAAGCCCGGACAGGCTCCTCGCCTTCTGATCTACCACACCAGCC
GGCTCCATTCTGGAATCCCTGCCAGGTTACGCGGTAGCGGATCTGGGACCGACTA
CACCTCACTATCAGCTCACTGCAGCCAGAGGACTTCGCTGTCTATTTCTGTCTAG
CAAGGGAACACCTGCCCACCTTTGGACAGGGCACCAAGCTCGAGATTAAA
GGTGGAGGTGGCAGCGGAGGAGGTGGGTCCGGCGGTGGAGGAAGCCAGGTCCA
ACTCCAAGAAAGCGGACCGGGTCTTGTAAGCCATCAGAACTCTTTCAGTACT
TGTAAGTGTGAGCGGAGTGTCTCTCCCGATTACGGGGTGTCTTGGATCAGACAGC
CACCGGGAAGGGTCTGGAATGGATTGGAGTGATTGGGGCTCTGAGACTACTT
ACTACCAATCATCCCTCAAGTCACGCGTACCATCTCAAAGGACAACCTAAGAA
TCAGGTGTCACTGAACTGTCATCTGTGACCGCAGCCGACACCGCGTGTACTAT
TGCGCTAAGCATTACTATTATGGCGGGAGCTACGCAATGGATTACTGGGGACAG
GGTACTCTGGTCACCGTGTCCAGCACACGACGCCAGCGCCGCGACCAACA
CCGGCGCCACCATCGCGTCCGACGCCCTGTCCCTGCGGCCAGAGGCGTGGCGGC
CAGCGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATTTTT
GGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGT
GGCCTTTATTATTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGAC
TACATGAACATGACTCCCCGCCCGCCCGGCCACCCGCAGCATTACAGCCCT
ATGCCCCACACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGA
GCGCAGACGCCCCCGCTACAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCA
ATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACC
CTGAGATGGGGGGAAGCCGAGAGGAAGAAACCTCAGGAAGGCCTGTACAAT
GAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGG
CGAGCGCCGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACAGGGTCTCAGTACAGC
CACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

뮤린 항-*MSLN CAR AA* 서열 (SEQ ID NO: 5)

MASPLTRFLSLNLLLLGESIILSGEAAQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISS
GGYYWSWIRQHPGKLEWIGYIYSGSTYYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVT
AADTAVYYCARFDYGDYDAFDIWGQGMVTVSSGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQ
SPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQQKPKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGS
GSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQFNSTPITFGQGTREIKRLQKVNSTTTKPVLRTP
SPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFACDIYIWAPLAGICVALLSLIITLIKWIR
KKFPHIFKQPFKKTGAAQEEDACSCRCPEEEGGGGYELKFSRSAETAANLQDPN
QLYNELNLGRREEYDVLKKRRARDPEMGGKQRRRNPEGVYNALQKDKMAEAY
SEIGTKERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQTLAPR

뮤린 항-*MSLN CAR NT* 서열 (SEQ ID NO: 6)

ATGGCCAGCCCCCTGACCAGATTCTGAGCCTGAACCTGCTGCTGGGCGAGA
GCATCATCCTGGGCAGCGGCAGGCCGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCC
CAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGG
CTCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAA

[0281]

GGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTACTACAACCC
GTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCC
CTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAT
TTGACTACGGTGACTTCTATGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAAATGGT
CACCGTCTCTTCAGGTGGTGGTGGTAGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGG
ATCCGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGAC
AGAGTCAACATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGT
ATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTT
GGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTAC
TCTCAACATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTGCAACTTATTACTGTCAACAG
TTTAATAGTTACCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAACGTC
TGCAGAAGGTGAACAGCACCACCACCAAGCCCGTGCTGAGAACCCCCAGCCCCG
TGCACCCACCGGCACCAGCCAGCCCCAGAGACCCGAGGACTGCAGACCCAGAG
GCAGCGTGAAGGGCACC GGCTGGACTTCGCCTGCGACATCTACATCTGGGCCC
CCCTGGCGGCATCTGCGTGGCCCTGCTGCTGAGCCTGATCATCACCTGATCAA
GTGGATCAGAAAGAAGTTCCCCCACATCTTCAAGCAGCCCTTCAAGAAGACCAC
CGGCGCCGCCAGGAGGAGGACGCCTGCAGCTGCAGATGCCCCAGGAGGAGG
AGGGCGGCGGCGGCGGCTACGAGCTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGAGACCGCC
GCCAACCTGCAGGACCCCAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGAAGA
GAGGAGTACGACGTGCTGGAGAAGAAGAGAGCCAGAGACCCGAGATGGGCGG
CAAGCAGCAGAGAAGAAGAAACCCCAAGGAGGGCGTGTACAACGCCCTGCAGA
AGGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCACCAAGGGCGAGAGAAGA
AGAGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGA
CACCTACGACGCCCTGCACATGCAGACCCTGGCCCCAGA

인간 항-*MSLN CARAA* 서열 (SEQ ID NO: 7)

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVEKPGASVKVSKASGYTFTDYIM
HWVRQAPGQGLEWMGWNPNSGGTNYAQKFQGRVTMTDRDTSISTAYMELSLRSD
DTAVYYCASGWDFDYWGQGLTVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSDIVMTQSPS
SLSASVGDRTTICRASQSIRYYLSWYQQKPKAPKLLIYTASILQNGVPSRFSGSGS
GTDFTLTISLQPEDFATYYCLQYTTPDFGPGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTASQPLS
LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLY
IFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNEL
NLGRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE
RRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

인간 항-*MSLN CAR NT* 서열 (SEQ ID NO: 8)

ATGGCCCTCCCTGTACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGC
TCGGCCCCAAGTCCAACCTCGTTCAATCAGGCGCAGAAGTCGAAAAGCCCGGAGC
ATCAGTCAAAGTCTCTTGCAAGGCTTCCGGCTACACCTTCACGGACTACTACATG
CACTGGGTGCGCCAGGCTCCAGGCCAGGGACTGGAGTGGATGGGATGGATCAAC
CCGAATTCGGGGGGAACCTAATACGCCCCAGAAGTTTCAGGGCCGGGTGACTATG
ACTCGCGATACCTCGATCTCGACTGCGTACATGGAGCTCAGCCGCCTCCGGTCGG
ACGATACCGCGGTGACTATTGTGCGTGGGATGGGACTTCGACTACTGGGGGCA
GGGCACTCTGGTCACTGTGTCAAGCGGAGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGAAG
CGGGGGAGGAGGTTCCGGCGGCGGAGGATCAGATATCGTGATGACGCAATCGCC
TTCTCTGTTGTCCGCATCCGTGGGAGACAGGGTGACCATTACTTGACAGAGCGTCC
CAGTCCATTCCGTACTACCTGTGCTGGTACCAGCAGAAGCCGGGGAAAGCCCCA

[0282]

AAACTGCTTATCTATACTGCCTCGATCCTCCAAAACGGCGTGCCATCAAGATTCA
GCGGTTTCGGGACGCGGGACCGACTTTACCCTGACTATCAGCAGCCTGCAGCCGG
AAGATTTTCGCCACGTACTACTGCCTGCAAACCTACACCACCCCGACTTCGGACC
TGGAACCAAGGTGGAGATCAAGACCACTACCCAGCAGCCGAGGCCACCCACCC
GGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCC
GCAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATCTACA
TTTGGGCCCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCTCTGCTGCTTTCACTCGTGACTACT
CTTTACTGTAAGCGCGGTCCGAAGAAGCTGCTGTACATCTTAAGCAACCCCTCA
TGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTCATGCCGGTTCCTCAG
AGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAAATTCAGCCGCAGCGCAGAT
GCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCAGAACCAGCTCTACAACGAACCTCAATCTTGGT
CGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAAT
GGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCC
AAAAGGATAAAGATGGCAGAAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGC
AGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCGCCACCAA
GGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG

A03 무린 항-MSLN scFv 뉴클레오타이드 서열 (SEQ ID NO: 9)

GCCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACC
CTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTG
GAGCTGGATCCGCCAGCACCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTA
TTACAGTGGGAGCCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCA
GTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGG
ACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGATTTGACTACGGTGACTTCTATGATGCTTTT
GATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAGGTGGTGGTGGTAGC
GGCGGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAT
CCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCA
GGGCATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAA
GCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTACAG
GGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCCTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCTGAA
GATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCGATCACCTTCGGCCA
AGGGACACGACTGGAGATTAAACGT

A03 무린 항-MSLN scFv 아미노산 서열 (SEQ ID NO: 10)

AQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPKGLEWIGYIYY
GSTYYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARFDYGFYDAFDIWW
QGTMVTVSSGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALA
WYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQFN
SYPIITFGQGRLEIKR

M5 인간 항-MSLN scFv 뉴클레오타이드 서열 (SEQ ID NO: 11)

CAAGTCCAACCTCGTTCAATCAGGCGCAGAAGTCGAAAAGCCCGGAGCATCAGTC
AAAGTCTCTTGCAAGGCTTCCGGCTACACCTTCACGGACTACTACATGCACTGGG
TGCGCCAGGCTCCAGGCCAGGACTGGAGTGGATGGGATGGATCAACCCGAATT

CCGGGGGAACTAACTACGCCAGAAGTTTCAGGGCCGGGTGACTATGACTCGCG
ATACCTCGATCTCGACTGCGTACATGGAGCTCAGCCGCTCCGGTCCGACGATAC
CGCCGTGTACTATTGTGCGTCCGGATGGGACTTCGACTACTGGGGGCAGGGCACT
CTGGTCACTGTGTCAAGCGGAGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGAAGCGGGGG
AGGAGGTTCCGGCGCGCGGAGGATCAGATATCGTGATGACGCAATCGCCTTCCTC
GTTGTCCGCATCCGTGGGAGACAGGGTGACCATTACTTGACAGAGCGTCCCAGTCC
ATTCGGTACTACCTGTGCTGGTACCAGCAGAAGCCGGGGAAGCCCAAACTG
CTTATCTATACTGCCTCGATCCTCCAAAACGGCGTGCCATCAAGATTACAGCGGT
CGGGCAGCGGGACCGACTTTACCCTGACTATCAGCAGCCTGCAGCCGGAAGATT
TCGCCACGTACTACTGCCTGCAAACCTACACCACCCCGGACTTCGGACCTGGAAC
CAAGGTGGAGATCAAG

M5 인간 항-MSLN scFv 아미노산 서열 (SEQ ID NO: 12)

QVQLVQSGAEVEKPGASVKVSKCASGYTFDYMHVVRQAPGQGLEWMGWINPN
SGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSLRSDDTAVYYCASGWDFDYWGQGT
LVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIRY
YLSWYQQKPGKAPKLLIYTASILQNGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCL
QYTTTPDFGPGTKVEIK

항-MSLN scFv는 CD19가 아닌 종양 항원에 대해 친화도를 갖는 제2 세포의 항원 결합 도메인의 한 예이다. 일부 실시양태에서, CD19가 아닌 종양 항원은 메소텔린이다. 일부 실시양태에서, 항-MSLN scFv는 M5 인간 항-MSLN-scFv의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동 일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-MSLN scFv는 M11 인간 항-MSLN scFv이다.

[0286]

중양 항원에 대해 친화도를 갖는 추가의 예시적인 제2 세포의 항원 결합 도메인에 대한 아미노산 및 뉴클레오티드 서열은 하기를 포함하나 이에 제한되지는 않는다:

항-GD2 scFv 뉴클레오티드 서열 (SEQ ID NO: 13)

ATGGCCTTACCACTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCC
GGGATCCGATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCTGCCTGTGAGTCTTGGAGATCAAG
CCTCCATCTCTTGAGATCTAGTCAGAGTCTGTACACCGTAACGGAAACACCTATTTACAT
TGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATTCACAAAGTTTCCAACCGATT
TTCTGGGGTCCCAGACAGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCA
GCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGTTCTCAAAGTACACAGTTCTCTCG
CTCACGTTCCGTTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAAGGAGGTGGCGGGTCAGGGGGTGGCGG
AAGCGGAGGCGGCGGTTTCAGGCGGAGGAGGCTCGGAGGTGCAGCTTCTGCAGTCTGGACCTG
AGCTGGAGAAGCCTTCCGTTTCAGTGATGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTCTCTCTTCACT
GGCTACAACATGAAGCTGGGTGAGGCAGAATATTGAAAGAGCCTTGAATGGATTGGAGCTAT
TGATCCTTACTACGGTGGAAGTAGCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAGGGCCACATTGACTG

[0287]

TAGACAAATCGTCCAGCACAGCCTACATGCACCTCAAGAGCCTGACATCTGAGGACTCTGTCT
TATTACTGTGTAAGCGGAATGGAGTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCATC
CGGA

항-GD2 scFv 아미노산 서열 (SEQ ID NO: 14)

MALPVTALLPLALLLHAARPGSDVMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHRNG
NTYLHWY LQKPQSPKLLIHKVSNRFSGVPRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VYFCSQS
THVPLTFGAGTKLELKGSGSGGGSGGGSGGGSEVQLLQSGPELEKPSASVMISCKAS
GSSFTGYNMNVWRQNIKGSLEWIGAIDPYYGGTSYNQKFKGRATLTVDKSSSTAYMHLKSLT
SEDSVYYCVSGMEYWQGTSTTVSSSG

항-HER2 scFv (고친화도) 뉴클레오티드 서열 (SEQ ID NO: 15)

ATGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGCTTCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATAATGTCCAG
AGGAGATATCCAGATGACCCAGTCCCGAGCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGATAGGGTCA
CCATCACCTGCCGTGCCAGTCAGGATGTGAATACTGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCA
GGAAAAGCTCCGAACTACTGATTTACTCGGCATCCTTCTTTATTTCTGGAGTCCCTTCTCG
CTTCTCTGGATCTAGATCTGGGACGAGTTTCACTCTGACCATCAGCAGTCTGCAGCCGGAAG
ACTTCGCAACTTATTACTGTGCAACATTATATACTACTCTCCACGTTCCGACAGGGTACC
AAGTGGAGATCAAACGCACTGGGTCTACATCTGGATCTGGGAAGCCGGGTTCTGGTGAGGG
TTCTGAGGTTCACTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGGGGCTCACTCCGTT
TGTCCTGTGAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACACCTATATACACTGGGTGCGTCAGGCC
CCGGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGCAAGGATTTATCCTACGAATGGTTATACTAGATATGC
CGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAACACAGCCTACCTGC
AGATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTTCTAGATGGGGAGGGGAC
GGCTTCTATGCTATGGACGTGTGGGGTCAAGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCG

항-HER2 scFv (고친화도) 아미노산 서열 (SEQ ID NO: 16)

MDFVQVQIFSLISASVIMSRGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKP
GKAPKLLIYASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGT
KVEIKRTGTS GSGKPGSGEGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA
PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGD
GFYAMDVWQGQTLTVSS

항-HER2 scFv (저친화도) 뉴클레오티드 서열 (SEQ ID NO: 17)

ATGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGCTTCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATAATGTCCAG
AGGAGATATCCAGATGACCCAGTCCCGAGCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGATAGGGTCA
CCATCACCTGCCGTGCCAGTCAGGATGTGAATACTGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCA
GGAAAAGCTCCGAACTACTGATTTACTCGGCATCCTTCTTGAAGTCTGGAGTCCCTTCTCG
CTTCTCTGGATCTAGATCTGGGACGAGTTTCACTCTGACCATCAGCAGTCTGCAGCCGGAAG
ACTTCGCAACTTATTACTGTGCAACATTATATACTACTCTCCACGTTCCGACAGGGTACC
AAGTGGAGATCAAACGCACTGGGTCTACATCTGGATCTGGGAAGCCGGGTTCTGGTGAGGG
TTCTGAGGTTCACTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGGGGCTCACTCCGTT
TGTCCTGTGAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACACCTATATACACTGGGTGCGTCAGGCC
CCGGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGCAAGGATTTATCCTACGAATGGTTATACTAGATATGC
CGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAACACAGCCTACCTGC

[0288]

AGATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTTCTAGATGGGGAGGGGAC
GGCTTCGTTGCTATGGACGTGTGGGGTCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCG

항-HER2 scFv (저친화도) 아미노산 서열 (SEQ ID NO: 18)

MDFQVQIFSFLLISASVIMSRGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPG
GKAPKLLIYSASFLESGVPSRFSGRSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGT
KVEIKRTGTSVSGSGKPGSGEGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA
PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCSRWGGD
GFVAMDVWGQGLTVTVSS

항-TnMuc1 scFv 뉴클레오타이드 서열 (SEQ ID NO: 19)

CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGATGCCGAGCTCGTGAAGCCTGGCAGCAGCGTGAAGATCAG
CTGCAAGGCCAGCGGTACACCTTCACCGACCACGCCATCCACTGGGTCAAGCAGAAGCCTG
AGCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCCACTTCAGCCCCGGCAACACCGACATCAAGTACAACGAC
AAGTTCAAGGGCAAGGCCACCCTGACCGTGGACAGAAGCAGCAGCACCCTACATGCAGCT
GAACAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTTCTGCAAGACCAGCAGCTTCTTTTCG
ACTACTGGGGCCAGGGCACAAACCCTGACAGTGTCTAGCGGAGGGCGAGGATCTGGCGGGGA
GGAAGTGGCGGAGGGGGATCTGAACCTCGTGATGACCCAGAGCCCCAGCTCTCTGACAGTGAC
AGCCGGCGAGAAAGTGACCATGATCTGCAAGTCTCCAGAGCCTGCTGAACTCCGGCGACC
AGAAGAAGTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAACCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTTT
TGGGCCAGCACCCGGGAAAGCGGCGTGCCCGATAGATTACAGGCAGCGGCTCCGGCACCGA
CTTTACCCTGACCATCAGCTCCGTGCAGGCCGAGGACCTGGCCGTATTACTGCCAGAACG
ACTACAGCTACCCCTGACCTTCGGAGCCGGCACCAAGCTGGAAGTGAAG

항-TnMuc1 scFv 아미노산 서열 (SEQ ID NO: 20)

QVQLQQSDAELVKGSSSVKISKASGYTFTHAIHWVKQKPEQGLEWIGHFSPGNTDIKYND
KFKGKATLTVDSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCKTSTFFFDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGG
SGGGGGSELVMTQSPSSSLTVTAGEKVTMICKSSQSLNSGDQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIF
WASTRESGVDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLELK

항-PSMA scFv 뉴클레오타이드 서열 (SEQ ID NO: 21)

ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCACGCCGCCAGACC
TGGATCTGACATTGTGATGACCCAGTCTCACAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGG
TCAGCATCATCTGTAAGGCCAGTCAAGATGTGGGTACTGCTGTAGACTGGTATCAACAGAAA
CCAGGACAATCTCCTAAACTACTGATTTATTGGGCATCCACTCGGCACACTGGAGTCCCTGA
TCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATTACTAACGTTCACTCTG
AAGACTTGGCAGATTATTTCTGTGACCAATATAACAGCTATCCTCTCACGTTCCGTGCTGGG
ACCATGCTGGACCTGAAAGGAGGCGGAGGATCTGGCGGCGGAGGAAGTTCTGGCGGAGGCAG
CGAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGACCCGAGCTCGTGAAGCCTGGAACAAGCGTGCAGATCA
GCTGCAAGACCAGCGGCTACACCTTCACCGAGTACACCATCCACTGGGTCAAGCAGTCCCAC
GGCAAGAGCCTGGAGTGGATCGGCAATATCAACCCCAACAACGGCGGCACCACTACAACCA
GAAGTTCGAGGACAAGGCCACCCTGACCGTGGACAAGAGCAGCAGCACCCTACATGGAAC
TGCGGAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTATTGTGCCGCGGTTGGAAGTTCGAC
TACTGGGGCCAGGGCACAAACCCTGACAGTGTCTAGCGCTAGCTCCGGA

[0289]

항-PSMA scFv 아미노산 서열 (SEQ ID NO: 22)

MALPVTALLLPLALLLHAARPGSDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSIICKASQDVGTAVDWYQQK
PGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSEDLADYFCQQYNSYPLTFGAG
TMLDLKGGGGSGGGSSGGGSEVQLQQSGPELVKPGTSVRISCKTSGYTFTEYTIHWVKQSH
GKSLIEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAAGWNFD
YWQGQTTLTVSSASSG

항-EGFRvIII scFv 뉴클레오타이드 서열 (SEQ ID NO: 23)

ATGGCCCTCCCTGTACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC
CGAGATTCAGCTCGTGCAATCGGGAGCGGAAGTCAAGAAGCCAGGAGAGTCCCTTGGCGATCT
CATGCAAGGGTAGCGGCTTTAACATCGAGGATTACTACATCCACTGGGTGAGGCAGATGCCG
GGGAAGGGACTCGAATGGATGGGACGGATCGACCCAGAAAACGACGAAACTAAGTACGGTCC
GATCTTCCAAGGCCATGTGACTATTAGCGCCGATACTTCAATCAATACCGTGTATCTGCAAT
GGTCCTCATTGAAAGCCTCAGATACCGCGATGTACTACTGTGCTTTCAGAGGAGGGGTCTAC
TGGGGACAGGGAATACCGTGACTGTCTCGTCCGGCGGAGCGGGTCAGGAGGTGGCGGCAG
CGGAGGAGGAGGGTCCGGCGGAGGTGGGTCCGACGTCGTGATGACCCAGAGCCCTGACAGCC
TGGCAGTGAGCCTGGGCGAAAGAGCTACCATTAAGTCAATCGTCGAGAGCCTGCTGGAC
TCGGACGGAAAAACGTACCTCAATTGGCTGCAGCAAAAGCCTGGCCAGCCACCGAAGCGCCT
TATCTCACTGGTGTCGAAGTGGATTCGGGAGTGCCCGATCGCTTCTCGGCTCGGGATCGG
GTACTGACTTCACCTCACTATCTCTCGCTTCAAGCAGAGGACGTGGCCGTCTACTACTGC
TGGCAGGGAACCCACTTTCGGGAACCTTCGGCGGAGGGACGAAAGTGGAGATCAAG

항-EGFRvIII scFv 아미노산 서열 (SEQ ID NO: 24)

MALPVTALLLPLALLLHAARPEIQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGFNIEDYYIHWVRQMP
GKGLEWMGRIDPENDETKYGPFIQGHVTISADTSINTVYLQWSSSLKASDTAMYYCAFRGGVY
WQGTTVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSDVVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLD
SDGKTYLNLWQKQKPGPPKRLISLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC
WQGTTFPGTFGGGTVKEIK

항-FAP scFv 뉴클레오타이드 서열 (SEQ ID NO: 25)

CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCGCTCATGTCTGCTTCTCCAGGGGAGAAGG
TCACCATGACCTGCACTGCCAGCTCAAGTGTTAGTTACATGTACTGGTACCAGCA
GAAGCCACGATCCTCCCCAAACCCTGGATTTTCTCACCTCCAACCTGGCTTCT
GGAGTCCCTGCTCGCTTCACTGGCCGTGGGTCTGGGACCTCTTCTCTCTCAAT
CAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTGG
TTACCCACCCATCACATTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAATAAAAAGGTGGAGG
TGGCAGCGGAGGAGGTGGGTCCGGCGGTGGAGGAAGCCAGGTCCAACCTGCAGC
AGCCTGGGGCTGAAGTGGTAAAGCCTGGGGCTTCACTGAAGTTGCTCTGCAAGG
CGTCTGGCTACACCATCACCAGCTACTCTCTGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGG
ACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTAATCCTGCCAATGGTGATCATAACTTC
AGTGAGAAGTTGAGATCAAGGCCACACTGACTGTAGACAGCTCCTCCAACACA
GCATTCATGCAACTCAGCAGGCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTA
CAAGATTGGACGATAGTAGGTTCCACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGA
CCACGGTCACCGTCTCCTCA

항-FAP scFv 아미노산 서열 (SEQ ID NO: 26)

QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCTASSSVSYMYWYQQKPRSSPKPWIFLTSLNLSGV
PARFSGRSGTSFSLTISSMEAEDAATYYCQQWSGYPPIFGSGTKLEIKGGGGSGGG
GSGGGGSQVQLQQPFGAELVKPGASVKLSCKASGYTITSYSLHWVKQRPQGLEWIG
EINPANGDHNFEKFEIKATLTVDSSNTAFMQLSRLTSEDSAVYYCTRLDDSRFWH
YFDVWGAGTTVTSS

[0290]

[0291]

[0292]

추가 CAR 도메인 서열은 다음을 포함한다:

마우스 *CD8 리터* (SEQ ID NO: 27)

MASPLTRFLSLNLLLLGESILGSGEA

마우스 *CD8 리터* (SEQ ID NO: 28)

ATGGCCTCACCCCTGACCAGATTCTGTCACTGAACCTGCTGCTGGGCGAGT
CAATCATCCTGGGCTCAGGCGAGGCC

마우스 항-*mCD19 scFv* (SEQ ID NO: 29)

DIQMTQSPASLSTSLGETVTIQCASEDIIYSGLAWYQQKPGKSPQLLIYGASDLQDGV
PSRFSGSGSGTQYSLKITSMTQTEDEGVYFCQQGLTYPRTFGGGKLELKGGGSGGG
GSGGGGSEVQLQQSGAELVRPGTSVKLSCKVSGDTITFYMHFVKQRPGGLEWIG
RIDPEDESTKYSEKFKNKATLTADTSSNTAYLKLSSLTSEDATYFCIYGGYFDYW
GQGVMTVSS

마우스 항-*CD19 scFv* (SEQ ID NO: 30)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTGCCAGCCTGTCTACCAGCCTGGGCGAGACA
GTGACCATCCAGTGTCAAGGCCAGCGAGGACATCTACTCTGGCCTGGCTTGGTATC
AGCAGAAGCCCCGCAAGAGCCCTCAGCTGCTGATCTACGGCGCCAGCGACCTGC
AGGACGGCGTGCTAGCAGATTCAGCGGCAGCGGCTCCGGAACCCAGTACAGCC
TGAAGATCACCAGCATGCAGACCGAGGACGAGGGCGTGTACTTCTGCCAGCAAG
GCCTGACCTACCCTAGAACCTTCGGAGGAGGCACCAAGCTGGAACTGAAGGGCG
GAGGCGGAAGTGGAGGCGGAGGATCTGGCGGCGGAGGCTCTGAAGTGCAGCTG
CAGCAGTCTGGCGCTGAAGTGGTCCGGCCTGGCACTAGCGTGAAGCTGTCTGCA
AGGTGTCCGGCGACACCATCACCTTCTACTACATGCACTTCGTGAAGCAGAGGCC
AGGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCAGAATCGACCCTGAGGACGAGAGCACC
AGTACAGCGAGAAGTTCAAGAACAAGGCCACCCTGACCGCCGACACCAGCAGCA
ACACCGCCTACCTGAAGCTGTCTAGCCTGACCTCCGAGGACACCGCCACCTACTT
TTGCATCTACGGCGGCTACTACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCGTGATGGTCACC
GTGTCCAGC

마우스 *CD8 힌지* (SEQ ID NO: 31)

LQKVNSTTTKPVLRTPSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFACDIY

마우스 *CD8 힌지* (SEQ ID NO: 32)

CTGCAGAAGGTGAAGTCAACCACCAAGCCCGTGCTGAGAACCCCTCACCC
GTGCACCCACCGGCACCTCACAGCCCAGAGACCCGAGGACTGCAGACCCAGA
GGCTCAGTGAAGGGCACCGGCCTGGACTTCGCCTGCGACATCTAC

마우스 *CD28 TM* (SEQ ID NO: 33)

FWALVVVAGVLFYGLLVTVALCVIWT

[0293]

마우스 *CD28 TM* (SEQ ID NO: 34)

TTTTGGGCACTGGTCGTGGTTGCTGGAGTCCTGTTTTGTTATGGCTTGCTAGTGAC
AGTGGCTCTTTGTGTTATCTGGACA

마우스 *CD28 ICD* (SEQ ID NO: 35)

NSRRNRLLQSDYMNMTPRRPGLTRKPYQPYAPARDFAAAYRP

마우스 *CD28 ICD* (SEQ ID NO: 36)

AATAGTAGAAGGAACAGACTCCTTCAAAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGG
AGGCCTGGGCTCACTCGAAAGCCTTACCAGCCCTACGCCCTGCCAGAGACTTTG
CAGCGTACCGCCCC

마우스 *CD3ζ* (SEQ ID NO: 37)

KFSRSAETAANLQDPNQLYNELNLGRREEYDVLEKKRARDPEMGGKQRRRNQPE
GVYNALQKDKMAEAYSEIGTKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQTLAP
R

마우스 *CD3ζ* (SEQ ID NO: 38)

AAGTTCTCAAGATCAGCCGAGACCGCCGCCAACCTGCAGGACCCCAACCAGCTG
TACAACGAGCTGAACCTGGGCAGAAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGAGAAGAA
GAGAGCCAGAGACCCCGAGATGGGCGGCAAGCAGCAGAGAAGAAGAAACCCCC
AGGAGGGCGTGTACAACGCCCTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACTCAG
AGATCGGCACCAAGGGCGAGAGAAGAAGAGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTAC
CAGGGCCTGTCAACCGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTGCACATGCAGACC
CTGGCCCCCAGA

인간 *CD8 리더* (SEQ ID NO: 39)

MALPVTALLLPLALLHAARP

인간 *CD8 리더* (SEQ ID NO: 40)

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCG
CCAGGCCG

인간 항-*CD19 scFv* (SEQ ID NO: 41)

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIP
ARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGSGGGGS
GGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIW
GSETYYQSSLSKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYGGSYAMD
YWGQGLVTVSS

인간 항-*CD19 scFv* (SEQ ID NO: 42)

GAAATTGTGATGACCCAGTCACCCGCCACTCTTAGCCTTTACCCGGTGAGCGCG
CAACCCTGTCTTGACAGAGCCTCCAAGACATCTCAAAATACCTTAATTGGTATCA
ACAGAAAGCCCGACAGGCTCCTCGCCTTCTGATCTACACACACAGCCGGCTCCAT
TCTGGAATCCCTGCCAGGTTACAGCGGTAGCGGATCTGGGACCGACTACACCCTCA
CTATCAGCTCACTGCAGCCAGAGGACTTCGCTGTCTATTTCTGTCAGCAAGGGAA
CACCTGCCCTACACCTTTGGACAGGGCACCAAGCTCGAGATTAAAGGTGGAGG

[0294]

TGGCAGCGGAGGAGGTGGGTCCGGCGGTGGAGGAAGCCAGGTCCAACCTCCAAG
AAAGCGGACCGGGTCTTGTGAAGCCATCAGAACTCTTTCACTGACTTGTACTGT
GAGCGGAGTGTCTCTCCCGATTACGGGGTGTCTTGGATCAGACAGCCACCGGG
GAAGGGTCTGGAATGGATTGGAGTGATTTGGGGCTCTGAGACTACTTACTACCAA
TCATCCCTCAAGTCACGCGTCACCATCTCAAAGGACAACCTAAGAATCAGGTGT
CACTGAAACTGTCTGTGACCGCAGCCGACACCGCGTGTACTATTGCGCTAA
GCATTACTATTATGGCGGGAGCTACGCAATGGATTACTGGGGACAGGGTACTCT
GGTCACCGTGTCCAGC

인간 CD8 힌지 (SEQ ID NO: 43)
TTTTAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

인간 CD8 힌지 (SEQ ID NO: 44)
ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAG
CCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGCGGGGGGCGCAGTGCAC
ACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT

인간 CD28 TM (SEQ ID NO: 45)
FWVLVVVGVLACYLLVTVAFIIFWV

인간 CD28 TM (SEQ ID NO: 46)
TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAA
CAGTGGCCTTTATTATTTCTGGGTG

인간 CD28 ICD (SEQ ID NO: 47)
RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS

인간 CD28 ICD (SEQ ID NO: 48)
AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGC
CGCCCCGGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCG
CAGCCTATCGCTCC

인간 CD3ζ ICD (SEQ ID NO: 49)
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ
EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL
PPR

인간 CD3ζ ICD (SEQ ID NO: 50)
AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAA
CCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGA
CAAGAGACGTGGCCGGGACCCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACC
CTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACA
GTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTT
TACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAG
GCCCTGCCCCCTCGC

마우스 CD8 리더 (SEQ ID NO: 51)
MASPLTRFLSLNLLLLGESIILGSGEA

[0295]

마우스 *CD8 리터* (SEQ ID NO: 52)

ATGGCCAGCCCCCTGACCAGATTCTGAGCCTGAACCTGCTGCTGCTGGGCGAGA
GCATCATCTTGGGCAGCGGCGAGGCC

A03 마우스 *항-Meso scFv* (SEQ ID NO: 53)

AQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKLEWIGYIYY
GSTYYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARFDYGDFYDAFDIWG
QGTMTVTSSGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGISSALA
WYQQKPGKAPKLLIYDASSLESVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFN
SYPIITFGQGRLEIKR

A03 마우스 *항-Meso scFv* (SEQ ID NO: 54)

GGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACC
CTGTCCCTCACCTGCACCTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTG
GAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTA
TTACAGTGGGAGCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCA
GTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGG
ACACGGCCGTATTACTGTGCGAGATTTGACTACGGTGACTTCTATGATGCTTTT
GATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAGGTGGTGGTGGTAGC
GGCGGGCGGGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAT
CCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCA
GGGCATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGCTCCTAA
GCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTACAGC
GGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAA
GATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCGATCACCTTCGGCCA
AGGGACACGACTGGAGATTAAACGT

마우스 *CD8 힌지* (SEQ ID NO: 55)

LQKVNSTTTKPVLRTPSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFACDIY

마우스 *CD8 힌지* (SEQ ID NO: 56)

CTGCAGAAAGGTGAACAGCACCAACCAAGCCCGTGCTGAGAACCCCCAGCCCC
GTGCACCCACCGGCACCAAGCCAGCCCCAGAGACCCGAGGACTGCAGACCCAGA
GGCAGCGTGAAGGGCACCGGCCTGGACTTCGCTGCGACATCTAC

마우스 *CD8 TM* (SEQ ID NO: 57)

IWAPLAGICVALLSLIITLI

마우스 *CD8 TM* (SEQ ID NO: 58)

ATCTGGGCCCCCTGGCCGGCATCTGCGTGGCCCTGCTGCTGAGCCTGATCATCA
CCCTGATC

마우스 *4-1BB ICD* (SEQ ID NO: 59)

KWIRKKFPHIFKQPFKTTGAAQEEDACSCRCPQEEEGGGGGYEL

마우스 *4-1BB ICD* (SEQ ID NO: 60)

AAGTGGATCAGAAAGAAGTTCCCCACATCTTCAAGCAGCCCTTCAAGAAGACC
ACCGGCGCCGCCAGGAGGAGGACGCCTGCAGCTGCAGATGCCCCAGGAGGA
GGAGGGCGGCGGCGGCTACGAGCTG

마우스 *CD3 ζ* *ICD* (SEQ ID NO: 61)

KFSRSAETAANLQDPNQLYNELNLGRREEYDVLEKKRARDPEMGGKQQRNPNQE
GVYNALQKDKMAEAYSEIGTKGERRRGKGHDLGYQLSTATKDTYDALHMQTLAP
R

마우스 *CD3 ζ* *ICD* (SEQ ID NO: 62)

AAGTTCAGCAGAAGCGCCGAGACCGCCGCCAACCTGCAGGACCCCAACCAGCTG
TACAACGAGCTGAACCTGGGCAGAAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGAGAAGAA
GAGAGCCAGAGACCCCGAGATGGGCGGCAAGCAGCAGAGAAGAAGAAACCCCG
AGGAGGGCGTGTACAACGCCCTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGC
GAGATCGGCACCAAGGGCGAGAGAAGAAGAGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTA
CCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTGCACATGCAGAC
CCTGGCCCCCAGA

인간 *CD8* *리터* (SEQ ID NO: 63)

MALPVTALLPLALLHAARP

인간 *CD8* *리터* (SEQ ID NO: 64)

ATGGCCCTCCCTGTACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCG
TCGGCC

인간 *M5 scFv* (SEQ ID NO: 65)

QVQLVQSGAEVEKPGASVKVSKASGYTFTDYMHWRQAPGQGLEWMGWINPN
SGGTNYAQKFQGRVTMTDRDTSISTAYMELSLRSDDTAVYYCASGWDFDYWGQGT
LTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIVMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIRY
YLSWYQQKPKAPKLLIYTASILQNGVPSRFSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCL
QTYTTPDFGPGTKVEIK

인간 *M5 scFv* (SEQ ID NO: 66)

CAAGTCCAACTCGTTCAATCAGGCGCAGAAGTCGAAAAGCCCGGAGCATCAGTC
AAAGTCTCTTGCAAGGCTTCCGGCTACACCTTACGGACTACTACATGCACTGGG
TGCGCCAGGCTCCAGGCCAGGACTGGAGTGGATGGGATGGATCAACCCGAATT
CCGGGGGAACTAACTACGCCAGAACGTTTCAGGGCCGGGTGACTATGACTCGCG
ATACCTCGATCTCGACTGCGTACATGGAGCTCAGCCGCCTCCGGTCGGACGATAC
CGCCGTGTACTATTGTGCGTGGGATGGGACTTCTGACTACTGGGGGCAGGGCACT
CTGGTCACTGTGTCAAGCGGAGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGAAGCGGGGG
AGGAGGTTCCGGCGGCGGAGGATCAGATATCGTGATGACGCAATCGCCTTCCTC
GTTGTCCGCATCCGTGGGAGACAGGGTGACCATTACTTGCAGAGCGTCCCAGTCC
ATTTCGTACTACCTGTCTGTTGACAGCAGAAGCCGGGGAAAGCCCCAAACTG
CTTATCTATACTGCCTCGATCCTCCAAAACGGCGTGCCATCAAGATTCAGCGGTT
CGGGCAGCGGGACCGACTTACCCTGACTATCAGCAGCCTGCAGCCGGAAGATT
TCGCCACGTACTACTGCCTGCAAACCTACACCACCCCGGACTTCGGACCTGGAAC
CAAGGTGGAGATCAAG

인간 *CD8* *힌지* (SEQ ID NO: 67)

[0297]

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

인간 *CD8* *헐지* (SEQ ID NO: 68)

ACCACTACCCAGCACCAGAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCAGC
CTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGAGCTGGTGGGGCCGTGCATAC
CCGGGGTCTTGACTTCGCCTGCGAT

인간 *CD8 TM* (SEQ ID NO: 69)

IYIWAPLAGTCGVLLLSLITLYC

인간 *CD8 TM* (SEQ ID NO: 70)

ATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGCAGGGTCTGCTGCTTTCACTCGT
GATCACTCTTTACTGT

인간 *4-1BB ICD* (SEQ ID NO: 71)

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

인간 *4-1BB ICD* (SEQ ID NO: 72)

AAGCGCGGTGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCCTTCATGAGGCCT
GTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGGTTCCCAGAGGAGGAG
GAAGGCGGTGCGAACTG

인간 *CD3ζ ICD* (SEQ ID NO: 73)

RVKFSRSADAPAYKQGQNLNLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ
EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL
PPR

인간 *CD3ζ ICD* (SEQ ID NO: 74)

CGCGTGAAATTCAGCCGCAGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCAGAAC
CAGCTCTACAACGAACCTCAATCTTGGTCCGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGAC
AAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCC
CCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAAGCCTATAG
CGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAGGCCACGACGGACTGT
ACCAGGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGG
CCCTGCCGCTCGG

[0298]

[0299]

C. 핵산 및 발현 벡터

[0300]

본 개시내용은 본원에 기재된 바와 같은 제1 CAR을 코딩하는 제1 뉴클레오타이드 서열 및 제2 CAR을 코딩하는 제2 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 단리된 핵산을 제공한다. 즉, 본 발명은 (a) (i) CD19에 대해 친화도를 갖는 제1 세포의 항원 결합 도메인, (ii) 제1 막횡단 도메인, 및 (iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인을 포함하는 제1 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 제1 뉴클레오타이드 서열; 및 (b) (i) CD19가 아닌 종양 항원에 대해 친화도를 갖는 제2 세포의 항원 결합 도메인, (ii) 제2 막횡단 도메인, 및 (iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인을 포함하는 제2 CAR을 코딩하는 제2 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 단리된 핵산을 제공한다.

[0301]

한 실시양태에서, 단리된 핵산은 (a) (i) CD19에 대해 친화도를 갖는 제1 세포의 항원 결합 도메인, (ii) 제1 막횡단 도메인, 및 (iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인을 포함하는 제1 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 제1 뉴클레오타이드 서열; 및 (b) (i) 종양 항원에 대해 친화도를 갖는 제2 세포의 항원 결합 도메인, (ii) 제2 막횡단 도메인, 및 (iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인을 포함하는 제2 CAR을 코딩하는 제2 뉴클레오타이드 서열을 포함하며; 여기서 종양 항원은 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), MUC1, MUC1의 Tn-당형태 (TnMUC1), 글리코실-포스파티딜이노시톨 (GPI)-연결된 GDNF 패밀리의 α-수용체 4 (GFRα4; GFRα4), 플레이트 수용체 알파 (FRα), 메소텔린, 뉴욕 식도 편평 세포 암종-1 (NY-ESO-1), 글리피칸 2 (GPC2), 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA), 섬유모세포 활성화 단백질 (FAP), 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 1 (IL13Rα1), 및 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 2 (IL13Rα2)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0302]

특정 실시양태에서, 제1 뉴클레오타이드 서열은 제2 뉴클레오타이드 서열에 대해 5'에 위치한다. 특정 실시양태에서, 제1 뉴클레오타이드 서열은 제2 뉴클레오타이드 서열에 대해 3'에 위치한다. 특정 실시양태에서, 단리된 핵산은 제1 뉴클레오타이드 서열과 제2 뉴클레오타이드 서열 사이에 위치한 링커 뉴클레오타이드 서열을 추가로 포함한다. 본 개시내용에서 사용하기 위한 링커는 다중 단백질이 동일한 핵산에 의해 코딩되도록 하고 (예를 들어, 멀티시스트론 또는 비시스트론 서열), 이는 별개의 단백질 성분으로 해리되는 폴리단백질로서 번역된다. 특정 실시양태에서, 핵산은 5'에서 3'로 제1 뉴클레오타이드 서열, 링커 및 제2 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 핵산은 5'에서 3'로 제2 뉴클레오타이드 서열, 링커 및 제1 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

- [0303] 일부 실시양태에서, 링커는 내부 리보솜 진입 부위 (IRES)를 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 본원에 사용된 "내부 리보솜 진입 부위" 또는 "IRES"는 단백질 코딩 영역의 개시 코돈, 예컨대 ATG로의 직접 내부 리보솜 진입을 촉진하여 유전자의 캡-비의존성 번역을 유도하는 요소를 지칭한다. 바이러스 또는 세포 mRNA 공급원, 예를 들어 이뮤노글로불린 중쇄 결합 단백질 (BiP)로부터 수득가능한 IRES; 혈관 내피 성장 인자 (VEGF); 섬유모세포 성장 인자 2; 인슐린-유사 성장 인자; 번역 개시 인자 eIF4G; 효모 전사 인자 TFIID 및 HAP4; 및 예를 들어 카르디오바이러스, 리노바이러스, 아프토바이러스, HCV, 프렌드 류린 백혈병 바이러스 (FrMLV) 및 몰로니 류린 백혈병 바이러스 (MoMLV)로부터 수득가능한 IRES를 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 내부 리보솜 진입 부위가 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본 발명에 사용하기에 적절한 IRES를 선택할 수 있을 것이다.
- [0304] 일부 실시양태에서, 링커는, 또한 관련 기술분야에서 자기-절단 펩티드를 코딩하는 서열로서 공지된 리보솜 슬립 서열을 포함한다. 본원에 사용된 "자기-절단 펩티드" 또는 "2A 펩티드"는 다중 단백질이 폴리단백질로서 코딩되도록 하는 서열을 지칭하며, 이는 번역 시 성분 단백질로 해리된다. 용어 "자기-절단"의 사용은 단백질분해적 절단 반응을 의미하는 것으로 의도되지 않는다. 피코르나비리다에(Picornaviridae) 바이러스 패밀리의 구성원, 예를 들어, 구제역 바이러스 (FMDV), 말 비염 A 바이러스 (ERAV), 토세아 아시그나(Thosea asigna) 바이러스 (TaV), 및 돼지 테스코 바이러스-1 (PTV-1); 및 카리오바이러스 예컨대 테일로바이러스 및 뇌심근염 바이러스에서 발견되는 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 리보솜 슬립 서열, 즉 자기-절단 또는 2A 펩티드가 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. FMDV, ERAV, PTV-1, 및 TaV로부터 유래된 2A 펩티드는 본원에서 각각 "F2A", "E2A", "P2A", 및 "T2A"로 지칭된다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본 발명에 사용하기에 적절한 리보솜 슬립 서열을 선택할 수 있을 것이다.
- [0305] 일부 실시양태에서, 구축물은 임의로 푸린 절단 부위를 코딩하는 핵산 서열을 추가로 포함하는 링커를 포함한다. 푸린은 트랜스-골지에 존재하며 단백질 전구체를 그의 분비 전에 가공하는, 편재적으로 발현되는 프로테아제이다. 푸린은 그의 컨센서스 인식 서열의 COOH- 말단에서 절단한다. 다양한 푸린 컨센서스 인식 서열 (또는 "푸린 절단 부위")은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본 발명에 사용하기에 적절한 푸린 절단 부위를 선택할 수 있을 것이다.
- [0306] 일부 실시양태에서, 링커는 푸린 절단 부위 및 2A 펩티드의 조합을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 예는 비제한적으로 푸린 절단 부위 및 F2A를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 링커, 푸린 절단 부위 및 E2A를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 링커, 푸린 절단 부위 및 P2A를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 링커, 푸린 절단 부위 및 T2A를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 링커를 포함한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본 발명에 사용하기에 적절한 조합을 선택할 수 있을 것이다. 이러한 실시양태에서, 링커는 푸린 절단 부위와 2A 펩티드 사이에 스페이서 서열을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는 2A 펩티드에 대해 5'의 푸린 절단 부위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 푸린 절단 부위의 5'에 2A 펩티드를 포함한다. 글리신 세린 (GS) 스페이서 (또한 GS 링커로도 공지됨)를 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 스페이서 서열이 관련 기술분야에 공지되어 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본 발명에 사용하기에 적절한 스페이서 서열을 선택할 수 있을 것이다.
- [0307] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 핵산은 전사 제어 요소, 예를 들어 프로모터 및 인핸서 등에 작동가능하게 연결될 수 있다. 적합한 프로모터 및 인핸서 요소는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다.
- [0308] 특정 실시양태에서, 외인성 CAR을 코딩하는 핵산은 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 특정 실시양태에서, 프로모터는 포스포글리세레이트 키나제-1 (PGK) 프로모터이다.
- [0309] 박테리아 세포에서의 발현을 위해, 적합한 프로모터는 lacI, lacZ, T3, T7, gpt, 람다 P 및 trc를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 진핵 세포에서의 발현을 위해, 적합한 프로모터는 경쇄 및/또는 중쇄 이뮤노글로불린 유전자 프로모터 및 인핸서 요소; 시토메갈로바이러스 극초기 프로모터; 단순 포진 바이러스 티미딘 키나제 프로모터; 초기 및 후기 SV40 프로모터; 레트로바이러스로부터의 긴 말단 반복부에 존재하는 프로모터; 마우스 메탈로티오네인-I 프로모터; 및 다양한 관련 기술분야에 공지된 조직 특이적 프로모터를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 가역적 유도성 프로모터를 비롯한 적합한 가역적 프로모터는 관련 기술분야에 공지되어 있다. 이러한 가역적 프로모터는 많은 유기체, 예를 들어 진핵생물 및 원핵생물로부터 단리되고 유래될 수 있다. 예를 들어 제1 원핵생물 및 제2 진핵생물, 제1 진핵생물 및 제2 원핵생물 등에서와 같이, 제2 유기체에서 사용하기 위한 제1 유기체로부터 유래된 가역적 프로모터의 변형은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 이러한 가역적 프로모터, 및 이러한 가역적 프로모터에 기초하지만 또한 추가의 제어 단백질을 포함하는 시스템은 알콜 조절

프로모터 (예를 들어, 알콜 데히드로게나제 I (alcA) 유전자 프로모터, 알콜 전사활성인자 단백질 (A1cR)에 반응성인 프로모터 등), 테트라시클린 조절 프로모터 (예를 들어, Tet액티베이터, Tet온, Tet오프 등을 포함하는 프로모터 시스템), 스테로이드 조절 프로모터 (예를 들어, 래트 글루코코르티코이드 수용체 프로모터 시스템, 인간 에스트로겐 수용체 프로모터 시스템, 레티노이드 프로모터 시스템, 갑상선 프로모터 시스템, 엑디손 프로모터 시스템, 미페프리스톤 프로모터 시스템 등), 금속 조절 프로모터 (예를 들어, 메탈로티오네인 프로모터 시스템 등), 발병기전-관련 조절 프로모터 (예를 들어, 살리실산 조절 프로모터, 에틸렌 조절 프로모터, 벤조티아디아졸 조절 프로모터 등), 온도 조절 프로모터 (예를 들어, 열 쇼크 유도성 프로모터 (예를 들어, HSP-70, HSP-90, 대두 열 쇼크 프로모터 등), 광 조절 프로모터, 합성 유도성 프로모터 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0310] 일부 실시양태에서, 프로모터는 CD8 세포-특이적 프로모터, CD4 세포-특이적 프로모터, 호중구-특이적 프로모터, 또는 NK-특이적 프로모터이다. 예를 들어, CD4 유전자 프로모터가 사용될 수 있고; 예를 들어, 문헌 [Salmon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90:7739; 및 Marodon et al., (2003) Blood 101:3416]을 참조한다. 또 다른 예로서, CD8 유전자 프로모터가 사용될 수 있다. NK 세포-특이적 발현은 Ncr1 (p46) 프로모터의 사용에 의해 달성될 수 있고; 예를 들어, 문헌 [Eckelhart et al., Blood (2011) 117:1565]을 참조한다.

[0311] 효모 세포에서의 발현을 위해, 적합한 프로모터는 구성적 프로모터, 예컨대 ADHI 프로모터, PGK1 프로모터, ENO 프로모터, PYK1 프로모터 등; 또는 조절성 프로모터, 예컨대 GAL1 프로모터, GAL10 프로모터, ADH2 프로모터, PHOS 프로모터, CUP1 프로모터, GALT 프로모터, MET25 프로모터, MET3 프로모터, CYC1 프로모터, HIS3 프로모터, ADHI 프로모터, PGK 프로모터, GAPDH 프로모터, ADC1 프로모터, TRP1 프로모터, URA3 프로모터, LEU2 프로모터, ENO 프로모터, TP1 프로모터, 및 AOX1 (예를 들어, 피키아(Pichia)에 사용하기 위함)이다. 적절한 벡터 및 프로모터의 선택은 관련 기술분야의 통상의 기술자의 수준 내에 있다. 원핵 숙주 세포에 사용하기에 적합한 프로모터는 박테리오파지 T7 RNA 폴리머라제 프로모터; trp 프로모터; lac 오페론 프로모터; 하이브리드 프로모터, 예를 들어 lac/tac 하이브리드 프로모터, tac/trc 하이브리드 프로모터, trp/lac 프로모터, T7/lac 프로모터; trc 프로모터; tac 프로모터 등; araBAD 프로모터; 생체내 조절 프로모터, 예컨대 ssaG 프로모터 또는 관련 프로모터 (예를 들어, 미국 특허 공개 번호 20040131637 참조), pagC 프로모터 (Pulkkinen and Miller, J. Bacteriol. (1991) 173(1): 86-93; Alpuche-Aranda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89(21): 10079-83), nirB 프로모터 (Harborne et al., Mol. Micro. (1992) 6:2805-2813) 등 (예를 들어, 문헌 [Dunstan et al., Infect. Immun. (1999) 67:5133-5141; McKelvie et al., Vaccine (2004) 22:3243-3255; 및 Chatfield et al., Biotechnol. (1992) 10:888-892] 참조); 시그마70 프로모터, 예를 들어, 컨센서스 시그마70 프로모터 (예를 들어, 진뱅크 수탁 번호 AX798980, AX798961, 및 AX798183 참조); 정지기 프로모터, 예를 들어, dps 프로모터, spv 프로모터 등; 병원성 섬 SPI-2로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, WO96/17951 참조); actA 프로모터 (예를 들어, 문헌 [Shetron-Rama et al., Infect. Immun. (2002) 70:1087-1096] 참조); rpsM 프로모터 (예를 들어, 문헌 [Valdivia and Falkow Mol. Microbiol. (1996). 22:367] 참조); tet 프로모터 (예를 들어, 문헌 [Hillen, W. and Wissmann, A. (1989) In Saenger, W. and Heinemann, U. (eds), Topics in Molecular and Structural Biology, Protein--Nucleic Acid Interaction. Macmillan, London, UK, Vol. 10, pp. 143-162] 참조); SP6 프로모터 (예를 들어, 문헌 [Melton et al., Nucl. Acids Res. (1984) 12:7035] 참조) 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 원핵생물, 예컨대 에스케리키아 콜라이(Escherichia coli)에 사용하기에 적합한 강력한 프로모터는 Trc, Tac, T5, T7, 및 P람다를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 박테리아 숙주 세포에서 사용하기 위한 오퍼레이터의 비제한적 예는 락토스 프로모터 오퍼레이터 (LacI 리프레서 단백질은 락토스와 접촉될 경우 입체형태를 변화시켜, Lad 리프레서 단백질이 오퍼레이터에 결합하는 것을 방지함), 트립토판 프로모터 오퍼레이터 (트립토판과 복합체화될 경우, TrpR 리프레서 단백질은 오퍼레이터에 결합하는 입체형태를 갖고; 트립토판의 부재 하에, TrpR 리프레서 단백질은 오퍼레이터에 결합하지 않는 입체형태를 가짐), 및 tac 프로모터 오퍼레이터 (예를 들어, 문헌 [deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1983) 80:21-25] 참조)를 포함한다.

[0312] 적합한 프로모터의 다른 예는 극초기 시토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터 서열을 포함한다. 이러한 프로모터 서열은 그에 작동가능하게 연결된 임의의 폴리뉴클레오타이드 서열의 높은 수준의 발현을 구동할 수 있는 강력한 구성적 프로모터 서열이다. 원숭이 바이러스 40 (SV40) 초기 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스 (MMTV) 또는 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 긴 말단 반복부 (LTR) 프로모터, MoMuLV 프로모터, 조류 백혈병 바이러스 프로모터, 엡스타인-바르 바이러스 극초기 프로모터, 라우스 육종 바이러스 프로모터, EF-1 알파 (일명 EF-1α 또는 EF1α) 프로모터, 뿐만 아니라 인간 유전자 프로모터, 예컨대 비제한적으로 액틴 프로모터, 미오신

프로모터, 헤모글로빈 프로모터 및 크레아틴 키나제 프로모터를 포함하나 이에 제한되지는 않는 다른 구성적 프로모터 서열이 또한 사용될 수 있다. 추가로, 본 발명은 구성적 프로모터의 사용으로 제한되지 않아야 한다. 유도성 프로모터가 또한 본 발명의 일부로서 고려된다. 유도성 프로모터의 사용은 발현이 바람직할 때 작동가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 켜거나, 발현이 바람직하지 않을 때 발현을 끄는 것이 가능한 분자 스위치를 제공한다. 유도성 프로모터의 예는 메탈로티오닌 프로모터, 글루코코르티코이드 프로모터, 프로게스테론 프로모터 및 테트라시클린 프로모터를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0313] 일부 실시양태에서, 적합한 프로모터를 함유하는 유전자좌 또는 구축물 또는 트랜스진은 유도성 시스템의 유도를 통해 비가역적으로 스위칭된다. 비가역적 스위치의 유도에 적합한 시스템은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있으며, 예를 들어 비가역적 스위치의 유도는 Cre-lox-매개된 재조합을 이용할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Fuhrmann-Benzakein, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 28:e99] 참조, 그의 개시내용은 본원에 참조로 포함됨). 관련 기술분야에 공지된 레콤비나제, 엔도뉴클레아제, 리가제, 재조합 부위 등의 임의의 적합한 조합이 비가역적으로 스위칭가능한 프로모터를 생성하는 데 사용될 수 있다. 본원의 다른 곳에 기재된 부위-특이적 재조합을 수행하기 위한 방법, 메카니즘 및 요건은 비가역적으로 스위칭되는 프로모터를 생성하는 데 있어서 용도가 확인되며, 이는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Grindley et al., Annual Review of Biochemistry (2006) 567-605; 및 Tropp, Molecular Biology (2012) (Jones & Bartlett Publishers, Sudbury, Mass.)]을 참조하고, 그의 개시내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0314] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 핵산은 CAR 유도성 발현 카세트를 코딩하는 핵산 서열을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, CAR 유도성 발현 카세트는 CAR 신호전달 시 방출되는 트랜스제닉 폴리펩티드 산물의 생산을 위해 사용된다. 예를 들어, 문헌 [Chmielewski and Abken, Expert Opin. Biol. Ther. (2015) 15(8): 1145-1154; 및 Abken, Immunotherapy (2015) 7(5): 535-544]을 참조한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 핵산은 T-세포 활성화 반응성 프로모터에 작동가능하게 연결된 시토카인을 코딩하는 핵산 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, T-세포 활성화 반응성 프로모터에 작동가능하게 연결된 시토카인은 별개의 핵산 서열 상에 존재한다. 한 실시양태에서, 시토카인은 IL-12이다.

[0315] 본 개시내용의 핵산은 발현 벡터 및/또는 클로닝 벡터 내에 존재할 수 있다. 발현 벡터는 선택 마커, 복제 기점, 및 벡터의 복제 및/또는 유지를 제공하는 다른 특색을 포함할 수 있다. 적합한 발현 벡터는 예를 들어 플라스미드, 바이러스 벡터 등을 포함한다. 다수의 적합한 벡터 및 프로모터가 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있고; 많은 것은 대상 재조합 구축물의 생성을 위해 상업적으로 입수가능하다. 하기 벡터가 예로서 제공되며, 이는 어떠한 방식으로든 제한적인 것으로 해석되어서는 안된다: pBs, 파지스크립트, PsiX174, p블루스크립트 SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (스트라타진(Stratagene), 미국 캘리포니아주 라호야); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, 및 pRIT5 (파마시아(Pharmacia), 스웨덴 옘살라). 진핵 생물: pWLneo, pSV2cat, pOG44, PXR1, pSG (스트라타진) pSVK3, pBPV, pMSG 및 pSVL (파마시아).

[0316] 발현 벡터는 일반적으로 이중 단백질을 코딩하는 핵산 서열의 삽입을 제공하기 위해 프로모터 서열 근처에 위치한 편리한 제한 부위를 갖는다. 발현 숙주에서 작동가능한 선택 마커가 존재할 수 있다. 적합한 발현 벡터는 바이러스 벡터 (예를 들어, 백시니아 바이러스; 폴리오바이러스; 아데노바이러스 (예를 들어, 문헌 [Li et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. (1994) 35: 2543-2549; Borrás et al., Gene Ther. (1999) 6: 515-524; Li and Davidson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92: 7700-7704; Sakamoto et al., H. Gene Ther. (1999) 5: 1088-1097]; WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 및 WO 95/00655 참조); 아데노-연관 바이러스 (예를 들어, 문헌 [Ali et al., Hum. Gene Ther. (1998) 9: 81-86, Flannery et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94: 6916-6921; Bennett et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. (1997) 38: 2857-2863; Jomary et al., Gene Ther. (1997) 4:683 690, Rolling et al., Hum. Gene Ther. (1999) 10: 641-648; Ali et al., Hum. Mol. Genet. (1996) 5: 591-594; Srivastava in WO 93/09239, Samulski et al., J. Vir. (1989) 63: 3822-3828; Mendelson et al., Virol. (1988) 166: 154-165; 및 Flotte et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90: 10613-10617] 참조); SV40; 단순 포진 바이러스; 인간 면역결핍 바이러스 (예를 들어, 문헌 [Miyoshi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94: 10319-23; Takahashi et al., J. Virol. (1999) 73: 7812-7816] 참조)에 기초한 바이러스 벡터); 레트로바이러스 벡터 (예를 들어, 무린 백혈병 바이러스, 비장 괴사 바이러스, 및 레트로바이러스 예컨대 라우스 육종 바이러스, 하비 육종 바이러스, 조류 백혈증 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스, 골수증식성 육종 바이러스, 및 유방 종양 바이러스로부터 유래된 벡터); 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0317] 사용하기에 적합한 추가의 발현 벡터는, 예를 들어 비제한적으로, 렌티바이러스 벡터, 감마 레트로바이러스 벡

터, 포말 바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 폭스 바이러스 벡터, 포진 바이러스 벡터, 조작된 하이브리드 바이러스 벡터, 트랜스포손 매개 벡터 등이다. 바이러스 벡터 기술은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Sambrook et al., 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY], 및 다른 바이러스학 및 분자 생물학 매뉴얼에 기재되어 있다. 벡터로서 유용한 바이러스는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 포진 바이러스 및 렌티바이러스를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0318] 일반적으로 적합한 벡터는 적어도 1종의 유기체에서 기능적인 복제 기점, 프로모터 서열, 편리한 제한 엔도뉴클레아제 부위, 및 1개 이상의 선택 마커를 함유한다 (예를 들어, WO 01/96584; WO 01/29058; 및 미국 특허 번호 6,326,193).

[0319] 일부 실시양태에서, 발현 벡터 (예를 들어, 렌티바이러스 벡터)는 CAR을 면역 세포 또는 그의 전구체 (예를 들어, T 세포) 내로 도입하는 데 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 발현 벡터 (예를 들어, 렌티바이러스 벡터)는 CAR을 코딩하는 핵산을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 발현 벡터 (예를 들어, 렌티바이러스 벡터)는 그 안에 코딩된 CAR의 기능적 발현을 보조할 추가의 요소를 포함할 것이다. 일부 실시양태에서, CAR을 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 벡터는 포유동물 프로모터를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 벡터는 신장 인자-1-알파 프로모터 (EF-1 α 프로모터)를 추가로 포함한다. EF-1 α 프로모터의 사용은 하류 트랜스진 (예를 들어, CAR 코딩 핵산 서열)의 발현 효율을 증가시킬 수 있다. 생리학적 프로모터 (예를 들어, EF-1 α 프로모터)는 통합 매개 유전자독성을 유도할 가능성이 적을 수 있고, 레트로바이러스 벡터가 줄기 세포를 형질 전환시키는 능력을 제거할 수 있다. 벡터 (예를 들어, 렌티바이러스 벡터)에 사용하기에 적합한 다른 생리학적 프로모터는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있고, 본 발명의 벡터 내로 혼입될 수 있다. 일부 실시양태에서, 벡터 (예를 들어, 렌티바이러스 벡터)는 역가 및 유전자 발현을 개선시킬 수 있는 비-필수 시스 작용 서열을 추가로 포함한다. 비-필수 시스 작용 서열의 하나의 비제한적 예는 효율적인 역전사 및 핵 유입에 중요한 중심 폴리퓨린 트랙 및 중심 종결 서열 (cPPT/CTS)이다. 다른 비-필수 시스 작용 서열은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있고, 본 발명의 벡터 (예를 들어, 렌티바이러스 벡터) 내로 혼입될 수 있다. 일부 실시양태에서, 벡터는 전사후 조절 요소를 추가로 포함한다. 전사후 조절 요소는 RNA 번역을 개선시킬 수 있고, 트랜스진 발현을 개선시킬 수 있고, RNA 전사체를 안정화시킬 수 있다. 전사후 조절 요소의 한 예는 우드척 간염 바이러스 전사후 조절 요소 (WPRE)이다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본 발명의 벡터는 WPRE 서열을 추가로 포함한다. 다양한 전사후 조절 요소가 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있고, 본 발명의 벡터 (예를 들어, 렌티바이러스 벡터) 내로 혼입될 수 있다. 본 발명의 벡터는 추가의 요소, 예컨대 RNA 수송을 위한 rev 반응 요소 (RRE), 패키징 서열, 및 5' 및 3' 긴 말단 반복부 (LTR)를 추가로 포함할 수 있다. 용어 "긴 말단 반복부" 또는 "LTR"은 U3, R 및 U5 영역을 포함하는 레트로바이러스 DNA의 단부에 위치한 염기 쌍의 도메인을 지칭한다. LTR은 일반적으로 레트로바이러스 유전자의 발현 (예를 들어, 유전자 전사체의 촉진, 개시 및 폴리아데닐화) 및 바이러스 복제에 요구되는 기능을 제공한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 벡터 (예를 들어, 렌티바이러스 벡터)는 3' U3 결실된 LTR을 포함한다. 따라서, 본 발명의 벡터 (예를 들어, 렌티바이러스 벡터)는 트랜스진의 기능적 발현의 효율을 증진시키기 위해 본원에 기재된 요소의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 벡터 (예를 들어, 렌티바이러스 벡터)는 CAR을 코딩하는 핵산에 더하여 WPRE 서열, cPPT 서열, RRE 서열, 5'LTR, 3' U3 결실된 LTR'를 포함할 수 있다.

[0320] 본 발명의 벡터는 자기-불활성화 벡터일 수 있다. 본원에 사용된 용어 "자기-불활성화 벡터"는 3' LTR 인핸서 프로모터 영역 (U3 영역)이 (예를 들어, 결실 또는 치환에 의해) 변형된 벡터를 지칭한다. 자기-불활성화 벡터는 바이러스 복제의 제1 라운드 이후의 바이러스 전사를 방지할 수 있다. 결과적으로, 자기-불활성화 벡터는 숙주 계능 (예를 들어, 포유동물 계능)을 1회만 감염시킨 다음 이에 통합할 수 있고, 추가로 통과할 수 없다. 따라서, 자기-불활성화 벡터는 복제-적격 바이러스를 생성할 위험을 크게 감소시킬 수 있다.

[0321] 일부 실시양태에서, 본 발명의 핵산은 RNA, 예를 들어 시험관내 합성된 RNA일 수 있다. RNA의 시험관내 합성 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있고; 임의의 공지된 방법이 본 개시내용의 CAR을 코딩하는 서열을 포함하는 RNA를 합성하는 데 사용될 수 있다. RNA를 숙주 세포 내로 도입하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Zhao et al., Cancer Res. (2010) 15: 9053]을 참조한다. 본 개시내용의 CAR을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 RNA를 숙주 세포 내로 도입하는 것은 시험관내, 생체의 또는 생체내에서 수행될 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포 (예를 들어, NK 세포, 세포독성 T 림프구 등)는 본 개시내용의 CAR을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 RNA로 시험관내 또는 생체외에서 전기천공될 수 있다.

[0322] 폴리펩티드 또는 그의 부분의 발현을 평가하기 위해, 세포 내로 도입될 발현 벡터는 또한 바이러스 벡터를 통해

형질감염 또는 감염시키고자 하는 세포의 집단으로부터 발현 세포의 확인 및 선택을 용이하게 하는 선택 마커 유전자 또는 리포터 유전자, 또는 둘 다를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 선택 마커는 DNA의 별개의 조각 상에서 운반되고 공동-형질감염 절차에 사용될 수 있다. 선택 마커 및 리포터 유전자 둘 다는 숙주 세포에서의 발현을 가능하게 하는 적절한 조절 서열과 플랜킹될 수 있다. 유용한 선택 마커는 비제한적으로 항생제-저항성 유전자를 포함한다.

[0323] 리포터 유전자는 잠재적으로 형질감염된 세포를 확인하고 조절 서열의 기능성을 평가하는 데 사용된다. 일반적으로, 리포터 유전자는 수용자 유기체 또는 조직에 존재하지 않거나 그에 의해 발현되지 않고, 그의 발현이 일부 용이하게 검출가능한 특성, 예를 들어 효소적 활성에 의해 나타나는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자이다. 리포터 유전자의 발현은 DNA가 수용자 세포 내로 도입된 후 적절한 시간에 평가된다. 적합한 리포터 유전자는 비제한적으로 루시페라제, 베타-갈락토시다제, 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제, 분비된 알칼리성 포스파타제, 또는 녹색 형광 단백질 유전자를 코딩하는 유전자를 포함할 수 있다 (예를 들어, Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82).

[0324] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 핵산은 예를 들어 포유동물 세포에서 본원에 기재된 바와 같은 CAR의 생산을 위해 제공된다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 핵산은 CAR-코딩 핵산 및/또는 벡터의 증폭을 제공한다. 일부 실시양태에서, 단리된 핵산 및/또는 벡터를 포함하는 세포가 제공되며, 여기서 세포는 박테리아 세포, 진균 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 동물 세포, 포유동물 세포 및 인간 세포로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 세포는 포유동물 또는 인간 세포이고, 면역 세포 또는 그의 전구체 세포, 예컨대 T 세포이다.

[0325] D. 변형된 면역 세포

[0326] 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 본 발명의 제1 CAR 및 제2 CAR을 발현하도록 조작된 변형된 면역 세포 또는 그의 전구체 세포를 추가로 제공한다. 즉, 변형된 세포는 (a) (i) CD19에 대해 친화도를 갖는 제1 세포의 항원 결합 도메인, (ii) 제1 막형단 도메인, 및 (iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인을 포함하는 제1 키메라 항원 수용체 (CAR); 및 (b) (i) CD19가 아닌 종양 항원에 대해 친화도를 갖는 제2 세포의 항원 결합 도메인, (ii) 제2 막형단 도메인, 및 (iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인을 포함하는 제2 CAR을 발현하도록 조작된 면역 세포 또는 그의 전구체 세포이다.

[0327] 한 측면에서, 변형된 세포는 (a) (i) CD19에 대해 친화도를 갖는 제1 세포의 항원 결합 도메인, (ii) 제1 막형단 도메인, 및 (iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인을 포함하는 제1 키메라 항원 수용체 (CAR); 및 (b) (i) CD19가 아닌 종양 항원에 대해 친화도를 갖는 제2 세포의 항원 결합 도메인, (ii) 제2 막형단 도메인, 및 (iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인을 포함하는 제2 CAR을 발현하도록 조작된 면역 세포 또는 그의 전구체 세포이다.

[0328] 특정 실시양태에서, 변형된 면역 세포 또는 그의 전구체 세포는 T 세포 (예를 들어, 자연 킬러 T (NKT) 세포 및 감마-델타 T 세포를 포함하나 이에 제한되지는 않음), 자연 킬러 (NK) 세포, 및 대식세포로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 변형된 세포는 자가 세포이다. 특정 실시양태에서, 변형된 세포는 인간 대상체로부터 획득된 자가 세포이다. 특정 실시양태에서, 변형된 세포는 T 세포이다.

[0329] 특정 실시양태에서, 본 발명의 변형된 세포는 1개 이상의 추가의 수용체를 발현하도록 추가로 조작된다. 일부 실시양태에서, 변형된 세포는 스위치 수용체를 발현하도록 추가로 조작된다. 특정 실시양태에서, 변형된 세포는 양성 음성 수용체를 발현하도록 추가로 조작된다. 일부 실시양태에서, 변형된 세포는 스위치 수용체 및 양성 음성 수용체를 발현하도록 추가로 조작된다. 본원에 사용된 "스위치 수용체"는 면역 반응의 증진을 위해 음성 신호를 양성 신호로 스위칭할 수 있는 키메라 분자이다. 예를 들어, W02013019615A2 및 W02016122738A1을 참조한다. 스위치 수용체는 음성 신호와 연관된 제1 단백질 또는 그의 단편의 세포의 도메인, 및 양성 신호와 연관된 제2 단백질 또는 그의 단편의 세포내 도메인을 포함하는 키메라 단백질이다. 세포에서 발현되는 경우에, 스위치 수용체는 면역억제 리간드의 결합에 의해 생성된 음성 신호를 공동자극 분자의 세포내 신호전달 도메인에 의해 생성된 양성 신호로 전환시킨다. 음성 신호와 연관된 단백질의 예는 CTLA-4, TGF β RII, PD-1, VSIG8, VSIG3, BTLA 및 TIM-3을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 양성 신호와 연관된 단백질의 예는 CD28, 4-1BB, IL12R β 1, IL12R β 2, IL2, IL19, CD2, ICOS, CD27 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0330] 스위치 수용체는 막형단 도메인에 의해 연결된, 제1 수용체의 세포의 도메인 및 제2 수용체의 세포내 도메인을 포함한다. 스위치 수용체의 막형단 도메인은 전형적으로 제1 수용체 또는 제2 수용체로부터 유래되지만, 임의

의 적합한 막형단 도메인일 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 수용체 및 제2 수용체는 TGF β R 및 IL12R, TGF β R 및 CD28, TGF β R 및 OX40, TGF β R 및 CD27, TGF β R 및 4-1BB, TGF β R 및 IL-2R, TGF β R 및 IL-9R, PD1 및 IL12R, PD1 및 CD28, PD1 및 ICOS, PD1 및 CD27, PD1 및 4-1BB, PD1 및 IL-2R, PD1 및 IL-9R, BTLA 및 CD28, BTLA 및 ICOS, BTLA 및 CD27, CTLA4 및 CD28, TIM3 및 IL12R, TIM3 및 CD28, TIM3 및 CD28, TIM3 및 OX40, TIM3 및 4-1BB, TIM3 및 IL-2R, TIM3 및 IL-9R, VSIG3 및 CD28, VSIG3-IL12R β 2, VSIG3 및 CD27, VSIG3 및 4-1BB, VSIG3 및 ICOS, VSIG3-IL12R β 1, VSIG8-IL12R β 1, VSIG8 및 CD28, VSIG8-IL12R β 2, VSIG8 및 CD27, VSIG8 및 4-1BB, VSIG8-ICOS, VISTA 및 IL-9R, TIGIT 및 IL-9R, IFN γ 및 CD28, IFN γ 및 OX40, IFN γ 및 IL12R, 및 IFN γ 및 IL12R로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 스위치 수용체는 TGF β R-IL12R 수용체, TGF β R-CD28 수용체, TGF β R-OX40 수용체, PD1-IL12R 수용체, PD1-CD28 수용체, PD1-ICOS 수용체, PD1-CD27 수용체, BTLA-CD28 수용체, BTLA-ICOS 수용체, BTLA-CD27 수용체, IFN γ -CD28 수용체, IFN γ -OX40 수용체, 또는 IFN γ -IL12R 수용체이다.

[0331] 일부 실시양태에서, 스위치 수용체는 TGF β R/IL12R, TGF β R/CD28, TGF β R/OX40, PD1/IL12R, PD1/CD28, PD1/ICOS, PD1/CD27, BTLA/CD28, BTLA/ICOS 및 BTLA/CD27, IFN γ /CD28, IFN γ /OX40, 및 IFN γ /IL12R로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 스위치 수용체는 PD-1^{A132L}-CD28, PD-1^{A132L}-CD27, PD-1^{A132L}-CD27, PD-1^{A132L}-4-1BB, PD-1^{A132L}-4-1BB, PD-1^{A132L}-ICOS, PD-1^{A132L}-ICOS, PD-1^{A132L}-IL12R β 1, PD-1^{A132L}-IL12R β 1, PD-1^{A132L}-IL12R β 2, PD-1^{A132L}-IL12R β 2, VSIG3-CD28, VSIG8-CD28, VSIG3-CD27, VSIG8-CD27, VSIG3-4-1BB, VSIG8-4-1BB, VSIG3-ICOS, VSIG8-ICOS, VSIG3-IL12R β 1, VSIG8-IL12R β 1, VSIG3-IL12R β 2, VSIG8-IL12R β 2, VISTA-IL-9R, TIGIT-IL-9R, TGF β R II-CD27, TGF β R II-CD28, TGF β R II-4-1BB, TGF β R II-ICOS, TGF β R II-IL12R β 1, 및 TGF β R II-IL12R β 2로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 스위치 수용체는 음성 신호와 연관된 신호 전달 단백질의 세포외 도메인, 막형단 도메인, 및 양성 신호와 연관된 신호전달 단백질의 세포내 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 스위치 수용체의 막형단 도메인은 음성 신호와 연관된 단백질의 막형단 도메인 또는 음성 신호와 연관된 단백질의 막형단 도메인으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 스위치 수용체의 막형단 도메인은 CTLA4, PD-1, TGF β R II, VSIG8, VSIG3, BTLA, VISTA, TIGIT, IL-9R, IL-2R, TIM-3, CD28, 4-1BB, IL12R β 1, IL12R β 2, CD2, ICOS 및 CD27로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질의 막형단 도메인으로부터 선택된다.

[0332] 우성-음성 (DN) 돌연변이체는 DN 돌연변이체 수용체가 수용체의 야생형 (WT) 버전의 기능을 방해하는 중요한 부류의 돌연변이를 나타낸다. 본원에 사용된 우성 음성 수용체는 (a) 야생형 수용체의 말단절단된 변이체, (b) 세포외 도메인, 막형단 도메인을 포함하고 세포내 신호전달 도메인이 실질적으로 결여된 야생형 단백질의 변이체; 또는 (c) 음성 신호와 연관된 신호전달 단백질의 세포외 도메인, 및 막형단 도메인이다. 일부 실시양태에서, 우성 음성 수용체는 음성 신호와 연관된 단백질의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 우성 음성 수용체는 CTLA-4, TGF β R II, PD-1, VSIG8, VSIG3, BTLA, 및 TIM-3 우성 음성 수용체로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 우성 음성 수용체는 우성 음성 TGF- β 수용체 (dnTGF β R)이다. 예를 들어, W02016122738A1을 참조한다.

[0333] 일부 실시양태에서, 변형된 세포는 제1 CAR 및 제2 CAR을 코딩하는 벡터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 세포는 제1 CAR, 제2 CAR, 스위치 수용체 및 우성 음성 수용체를 코딩하는 벡터를 포함한다. 특정 실시양태에서, 벡터는 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터이다.

[0334] 본 발명의 변형된 세포는 변형된 세포의 집단으로서 대상체에게 투여될 수 있다. 대상체, 예컨대 포유동물 또는 인간에게 투여 시, 변형된 세포는 대상체의 말초 혈액에서 확장을 나타낸다. 특정 실시양태에서, 확장은 적어도 10-배, 적어도 100-배, 또는 적어도 1000-배이다. 특정 실시양태에서, 변형된 세포는 세포가 투여된 후 적어도 24개월 동안 검출가능하다. 특정 실시양태에서, 변형된 세포의 집단은 T 세포를 포함하고, 투여 후 제7일 또는 그 이후에 변형된 세포의 집단의 적어도 30% 또는 적어도 40%는 표현형상 중심 기억 T 세포이다.

[0335] E. 치료 방법

[0336] 본 발명은 고형 종양을 표적화하는 입양 세포 요법의 치료 지수를 안전하게 증가시키는, 환자의 말초 혈액 (P B)에서의 CAR-발현 면역 세포 (예를 들어, CAR T 세포)의 CD19 항원-구동된 확장의 사용을 포함한다. 이는 이중 CAR 접근법을 사용하여 달성되며, 여기서 대상체는 CD19 항원을 표적화하는 제1 CAR 및 CD19 이외의 종양 항원을 표적화하는 제2 CAR을 발현하도록 조작된 면역 세포 (즉, 복수의 면역 세포, 예를 들어 복수의 T 세포) (즉, 이중 CAR T 세포; 이중 CAR 면역 세포)를 제공받는다. 대상체에서 CD19 항원은 이중 CAR T 세포 확장 (또는 CAR 면역 세포 확장)을 구동한다. CD19 항원은 대상체에서 내인성으로, 예를 들어 CD19-발현 B 세포 상에

존재하고/거나, 외인성으로, 예를 들어 CD19 항원 단백질로서, CD19 항원을 발현하는 세포로서, 또는 CD19 항원을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산으로서 제공된다. 종양 항원을 표적화하는 단일 CAR을 발현하는 세포와 비교하여, 본 발명의 이중 CAR T 세포 접근법 (이중 CAR 면역 세포)은 놀랍게도 대상체의 말초 혈액 및 기관 둘 다에서 생체내 CAR T 세포 확장을 증진시키고, 시험관내 및 생체내 종양 세포 사멸 (예를 들어, 고형 종양 세포 사멸 및 종양 크기 감소)을 증진 및 가속화시키고, 세포독성 시토카인 발현을 증가시키고, 온-타겟 오프-종양 세포독성을 저하시킨다. 중요하게는, 부스팅 및 항종양 효능은 림프구고갈을 필요로 하지 않는다. 추가적으로, 본 발명의 부스팅된 이중 CAR T 세포는 우세하게 이펙터 기억 또는 중심 기억 표현형이고, 단지 1 또는 2종의 소진 마커만을 발현한다. 중요하게는, 이들 예상외의 효과는 2종의 CAR을 조합하는 것의 단지 상가적 효과가 아니며, 본 발명은 입양 세포 요법으로 고형 종양을 치료하는 것에 대한 오랜 미충족 필요를 다룬다.

[0337] 본원에 기재된 변형된 세포 (예를 들어, T 세포)는 면역요법을 위한 조성물에 포함될 수 있다. 조성물은 제약 조성물을 포함할 수 있고, 제약상 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 변형된 T 세포를 포함하는 제약 조성물의 치료 유효량이 투여될 수 있다.

[0338] 한 측면에서, 본 발명은 입양 세포 전달 요법을 필요로 하는 대상체에게 본 발명의 변형된 세포 집단을 투여하는 것을 포함하는 입양 세포 전달 요법을 위한 방법을 포함하며, 여기서 세포는 면역 세포 또는 그의 전구체 세포 (예를 들어, T 세포)이다. 한 측면에서, 본 발명은 암의 치료를 필요로 하는 대상체에게 변형된 세포의 집단을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 세포는 면역 세포 또는 그의 전구체 세포이고, 세포는 (a) (i) CD19에 대해 친화도를 갖는 제1 세포의 항원 결합 도메인, (ii) 제1 막 횡단 도메인, 및 (iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인을 포함하는 제1 키메라 항원 수용체 (CAR); 및 (b) (i) CD19가 아닌 종양 항원에 대해 친화도를 갖는 제2 세포의 항원 결합 도메인, (ii) 제2 막 횡단 도메인, 및 (iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인을 포함하는 제2 CAR을 발현하도록 조작된다.

[0339] 한 실시양태에서, 본 발명은 암의 치료를 필요로 하는 대상체에게 변형된 세포의 집단을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 세포는 면역 세포 또는 그의 전구체 세포이고, 세포는 (a) (i) CD19에 대해 친화도를 갖는 제1 세포의 항원 결합 도메인, (ii) 제1 막 횡단 도메인, 및 (iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인을 포함하는 제1 키메라 항원 수용체 (CAR); 및 (b) (i) 종양 항원에 대해 친화도를 갖는 제2 세포의 항원 결합 도메인, (ii) 제2 막 횡단 도메인, 및 (iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인을 포함하는 제2 CAR을 발현하도록 조작되고; 여기서 종양 항원은 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), MUC1, MUC1의 Tn-당형태 (TnMUC1), 글리코실-포스파티딜이노시톨 (GPI)-연결된 GDNF 패밀리의 a-수용체 4 (GFR α 4; GFR α 4), 폴레이트 수용체 알파 (FR α), 메소텔린, 뉴욕 식도 편평 세포 암종-1 (NY-ESO-1), 글리피칸 2 (GPC2), 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA), 섬유모세포 활성화 단백질 (FAP), 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 1 (IL13R α 1), 및 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 2 (IL13R α 2)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0340] 일부 실시양태에서, 변형된 세포는 본원에 기재된 스위치 수용체, 본원에 기재된 우성 음성 수용체, 또는 둘 다를 발현하도록 추가로 조작된다.

[0341] 일부 실시양태에서, 변형된 세포는 제1 CAR 및 제2 CAR을 코딩하는 벡터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 세포는 제1 CAR, 제2 CAR, 스위치 수용체 및 우성 음성 수용체를 코딩하는 벡터를 포함한다. 특정 실시양태에서, 벡터는 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터이다.

[0342] 일부 실시양태에서, 변형된 세포의 집단은 약 1×10^6 내지 약 1×10^9 개의 세포를 포함한다. 대상체, 예컨대 포유 동물 또는 인간에게 투여 시, 변형된 세포는 대상체의 말초 혈액에서 확장을 나타낸다. 특정 실시양태에서, 확장은 적어도 10-배, 적어도 100-배, 또는 적어도 1000-배이다. 특정 실시양태에서, 변형된 세포는 세포가 투여된 후 적어도 24개월 동안 검출가능하다. 특정 실시양태에서, 변형된 세포의 집단은 T 세포를 포함하고, 투여 후 제7일 또는 그 이후에 변형된 세포의 집단의 적어도 30% 또는 적어도 40%는 표현형상 중심 기억 T 세포이다.

[0343] 특정 실시양태에서, 방법은 대상체에게 CD19 항원을 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, CD19 항원을 투여하는 것은 CD19 항원 단백질, CD19 항원을 발현하는 세포, 또는 CD19 항원을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, CD19 항원을 투여하는 것은 CD19 항원을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터 또는 CD19 항원을 발현하도록 조작된 세포를 투여하는 것을 포함한다. CD19 항원은 CD19 세포의 도메인 또는 그의 항원 단편을 포함한다. CD19 항원은 변형된 세포의 집단의

투여 전에, 그와 공동으로, 또는 그 후에 투여된다. 일부 실시양태에서, CD19 항원을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 벡터는 아데노바이러스 벡터이다. 임의의 CD19 항원 (즉, 전장 CD19 또는 그의 세포외 항원 단편)이 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, CD19 항원은 하기 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩될 수 있으며, 하기 아미노산 서열을 포함한다:

CD19 항원 뉴클레오타이드 서열 (SEQ ID NO: 75)

AGGCCCCAGAAAGTCCTTACTGGTGGAGGTAGAAGAGGGAGGCAATGTTGTGCTG
CCATGCCTCCCGGACTCCTCACCTGTCTCTCTGAGAAGCTGGCTTGGTATCGAG
GTAACCAAGTCAACACCCTTCCTGGAGCTGAGCCCGGGTCCCCTGGCCTGGGATT
GCACGTGGGGTCCCTGGGCATCTTGCTAGTGATTGTCAATGTCTCAGACCATATG
GGGGGCTTCTACCTGTGCCAGAAGAGGCCCTTTCAAGGACATCTGGCAGCCTG
CCTGGACAGTGAACGTGGAGGATAGTGGGGAGATGTTCCGGTGGAAATGCTTCAG
ACGTCAGGGACCTGGACTGTGACCTAAGGAACAGGTCCTCTGGGAGCCACAGGT
CCACTTCTGGTTCACAGCTGTATGTGTGGGCTAAAGACCATCCTAAGGTCTGGGG
AACAAAGCCTGTATGTCCCCTCGGGGAGCAGTTTGAATCAGAGTCTAATCAA
CCAAGATCTCACTGTGGCACCCGGCTCCACACTTTGGCTGTCTGTGGGGTACCC
CCTGTCCCAGTGGCCAAAGGCTCCATCTCCTGGACCATGTGCATCCTAGGAGAC
CTAATGTTTCACTACTGAGCCTAAGCCTTGGGGGAGAGCACCCGGTCAGAGAGA
TGTGGGTTTGGGGGTCTCTTCTGCTTCTGCCCAAGCCACAGCTTTAGATGAAGG
CACCTATTATTGTCTCCGAGGAAACCTGACCATCGAGAGGCACGTGAAGGTCATT
GCAAGGTCAGCAGTGTGGCTCTGGCTGTTGAGAACTGGTGGATGGATAGTCCCA
GTGGTGACTTTAGTATATGTCATCTTCTGTATGGTTTCTCTGGTGGCTTTTCTCTAT
TGTCAAAGA

CD19 항원 아미노산 서열 (SEQ ID NO: 76)

RPQKSLLEVEEGNVVLPCLPDSSPVSSEKLAWYRGNQSTPFLELSPGSPGLGLHV
GSLGILLVIVNVSDHMGFFYLCQKRPFKDIWQPAWTVNVEDSGEMFRWNASDVR
DLDCDLNRNRSSGSHRSTSGSGLYVWAKDHPKVWGTPKPCAPRGSSLNQSLINQDLT
VAPGSTLWLCGVPVPVAKGSISWTHVHPRPNVSLSLSLGGEHPVREMWWVGS
LLLLPQATALDEGTYCYCLRGNLTIERHVKVIARSANVWLLRTGGWIVPVVTLVYVI
FCMVSLVAFLYCQR

[0344]

[0345]

특정 실시양태에서, 방법은 대상체에게 항-PD1 면역요법을 투여하는 것을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-PD1 면역요법은 항-PD1 항체, 예컨대 모노클로날 항-PD1 항체이며, 그의 예는 램브롤리주맵, 니볼루맵, 세미플리맵 및 도스타를리맵을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 항-PD1 면역요법은 변형된 세포의 집단의 투여 전에, 그와 공동으로, 또는 그 후에 투여된다.

[0346]

입양 세포 요법을 위한 면역 세포의 투여 방법은 공지되어 있고, 제공된 방법 및 조성물과 관련하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 입양 면역 세포 요법 방법은, 예를 들어 미국 특허 출원 공개 번호 2003/0170238 (Gruenberg et al.); 미국 특허 번호 4,690,915 (Rosenberg); 문헌 [Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol. 8(10):577-85]에 기재되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Themeli et al., (2013) Nat Biotechnol. 31(10): 928-933; Tsukahara et al., (2013) Biochem Biophys Res Commun 438(1): 84-9; Davila et al., (2013) PLoS ONE 8(4): e61338; Lee et al., Int J. Mol Sci. (2021) 22(9):4590; Banerjee et al., JCO Clin Cancer Inform. (2021) 5:668-678; Robbins et al., Stem Cell Res Ther. (2021) 12(1):350; Wrona et al., Int J Mol Sci. (2021) 22(11):5899; Atrash and Moyo, Onco Targets Ther. (2021) 14:2185-2201; Martinez Bedoya et al., Front Immunol. (2021) 12:640082; Morgan et al., Front Immunol. (2020) 11:1965; Chicaybam et al., Cancers (Basel) (2020) 12(9):2360; 및 Rafiq et al., Nat Rev Clin Oncol. (2020) 17(3):147-167]을 참조한다. 일부 실시양태에서, 세포 요법, 예를 들어 입양 T 세포 요법은 자가 전달에 의해 수행되며, 여기서 세포는 세포 요법을 받을 대상체로부터, 또는 이러한 대상체로부터 유래된 샘플로부터 단리되고/거나 달리 제조된다. 따라서, 일부 측면에서, 세포는 치료를 필요로 하는 대상체, 예를 들어 환자로부터 유래되고, 세포는 단리 및 가공 후에 동일한 대상체에게 투여된다.

[0347]

일부 실시양태에서, 세포 요법, 예를 들어 입양 T 세포 요법은 동종 전달에 의해 수행되며, 여기서 세포는 세포 요법을 받을 대상체 또는 궁극적으로 받는 대상체, 예를 들어 제1 대상체 이외의 대상체로부터 단리되고/거나 달리 제조된다. 이러한 실시양태에서, 세포는 이어서 동일한 종의 상이한 대상체, 예를 들어 제2 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 대상체는 유전자적으로 동일하다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 대상체는 유전자적으로 유사하다. 일부 실시양태에서, 제2 대상체는 제1 대상체와 동일한 HLA 부류 또는 상위 유형을 발현한다.

[0348]

일부 실시양태에서, 대상체는 세포 또는 세포를 함유하는 조성물의 투여 전에 질환 또는 상태, 예를 들어 종양을 표적화하는 치료제로 치료받았다. 일부 측면에서, 대상체는 다른 치료제에 대해 불응성 또는

비-반응성이다. 일부 실시양태에서, 대상체는, 예를 들어 화학요법, 방사선 및/또는 조혈 줄기 세포 이식 (HSCT), 예를 들어 동종 HSCT를 포함한 또 다른 치료적 개입을 사용한 치료 후에 지속성 또는 재발성 질환을 갖는다. 일부 실시양태에서, 투여는 대상체가 또 다른 요법에 대해 저항성이 되었음에도 불구하고 대상체를 효과적으로 치료한다.

[0349] 일부 실시양태에서, 대상체는 다른 치료제에 반응성이고, 치료제를 사용한 치료는 질환 부담을 감소시킨다. 일부 측면에서, 대상체는 초기에 치료제에 반응성이지만, 시간 경과에 따라 질환 또는 상태의 재발을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 대상체는 재발되지 않았다. 일부 이러한 실시양태에서, 대상체는 재발 위험이 있는 것으로, 예컨대 재발 위험이 높은 것으로 결정되고, 따라서 세포는, 예를 들어 재발 가능성을 감소시키거나 또는 재발을 방지하기 위해 예방적으로 투여된다. 일부 측면에서, 대상체는 또 다른 치료제를 사용한 선행 치료를 받지 않았다.

[0350] 일부 실시양태에서, 대상체는, 예를 들어 화학요법, 방사선 및/또는 조혈 줄기 세포 이식 (HSCT), 예를 들어 동종 HSCT를 포함한 또 다른 치료적 개입을 사용한 치료 후에 지속성 또는 재발성 질환을 갖는다. 일부 실시양태에서, 투여는 대상체가 또 다른 요법에 대해 저항성이 되었음에도 불구하고 대상체를 효과적으로 치료한다.

[0351] 본 발명의 변형된 면역 세포는 암을 치료하기 위해 동물, 바람직하게는 포유동물, 보다 더 바람직하게는 인간에게 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 세포는 암과 관련된 임의의 상태의 치료, 특히 종양 세포(들)에 대한 세포-매개 면역 반응에 사용될 수 있으며, 여기서 질환을 치료 또는 완화시키는 것이 바람직하다. 본 발명의 변형된 세포 또는 제약 조성물로 치료될 암의 유형은 특정 백혈병 또는 림프성 악성종양, 양성 및 악성 종양, 및 악성종양, 예를 들어 육종, 암종 및 흑색종을 포함한다. 예시적인 암은 B-세포 악성종양 예컨대 B-세포 림프종 및 백혈병 등, 뿐만 아니라 결장직장암, 유방암, 난소암, 신암, 비소세포 폐암, 흑색종, 림프종, 및 간세포성암을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 암은 비-고형 종양 (예컨대 혈액 종양) 또는 고형 종양일 수 있다. 성인 종양/암 및 소아 종양/암이 또한 포함된다. 한 실시양태에서, 암은 고형 종양 또는 혈액 종양이다. 특정 실시양태에서, 암은 백혈병 및/또는 림프종이다. 특정 실시양태에서, 암 세포는 CD19를 발현한다.

[0352] 투여될 세포는 요법을 받고 있는 대상체에 대해 자가일 수 있다.

[0353] 본 발명의 세포의 투여는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 임의의 편리한 방식으로 수행될 수 있다. 본 발명의 세포는 에어로졸 흡입, 주사, 섭취, 수혈, 착상 또는 이식에 의해 대상체에게 투여될 수 있다. 본원에 기재된 조성물은 환자에게 경동맥으로, 피하로, 피내로, 종양내로, 결절내로, 수질내로, 근육내로, 정맥내 (i.v.) 주사에 의해, 또는 복강내로 투여될 수 있다. 다른 예에서, 본 발명의 세포는 대상체의 염증 부위, 대상체의 국부 질환 부위, 림프절, 기관, 종양 등에 직접 주사된다.

[0354] 일부 실시양태에서, 세포는 일부 측면에서 목적하는 용량 또는 수의 세포 또는 세포 유형(들) 및/또는 목적하는 비의 세포 유형을 포함하는 목적하는 투여량으로 투여된다. 따라서, 일부 실시양태에서 세포의 투여량은 세포의 총수 (또는 kg 체중당 수) 및 개별 집단 또는 하위-유형의 목적하는 비, 예컨대 CD4+ 대 CD8+ 비를 기초로 한다. 일부 실시양태에서, 세포의 투여량은 개별 집단 또는 개별 세포 유형에서의 세포의 목적하는 총수 (또는 체중 kg당 수)를 기초로 한다. 일부 실시양태에서, 투여량은 이러한 특색, 예컨대 개별 집단 내의 총 세포의 목적하는 수, 목적하는 비, 및 세포의 목적하는 총수의 조합을 기초로 한다.

[0355] 일부 실시양태에서, 세포의 집단 또는 하위-유형, 예컨대 CD8⁺ 및 CD4⁺ T 세포는 총 세포의 목적하는 용량, 예컨대 T 세포의 목적하는 용량의 허용되는 차이 하에 또는 허용되는 차이 내로 투여된다. 일부 측면에서, 목적하는 용량은 세포의 목적하는 수 또는 세포가 투여되는 대상체의 단위 체중당 세포의 목적하는 수, 예를 들어 세포/kg이다. 일부 측면에서, 목적하는 용량은 세포의 최소 수 또는 단위 체중당 세포의 최소 수 또는 그 초과이다. 일부 측면에서, 목적하는 용량으로 투여되는 총 세포 중에서, 개별 집단 또는 하위-유형은 목적하는 산출 비 (예컨대 CD4⁺ 대 CD8⁺ 비)로 또는 그 근처로, 예를 들어 이러한 비의 특정 허용되는 차이 또는 오차 내로 존재한다.

[0356] 일부 실시양태에서, 세포는 세포의 개별 집단 또는 하위유형 중 1종 이상의 목적하는 용량, 예컨대 CD4+ 세포의 목적하는 용량 및/또는 CD8+ 세포의 목적하는 용량의 허용되는 차이 하에 또는 허용되는 차이 내로 투여된다. 일부 측면에서, 목적하는 용량은 하위유형 또는 집단의 세포의 목적하는 수, 또는 세포가 투여되는 대상체의 단위 체중당 이러한 세포의 목적하는 수, 예를 들어 세포/kg이다. 일부 측면에서, 목적하는 용량은 집단 또는 하위유형의 세포의 최소 수 또는 단위 체중당 집단 또는 하위유형의 세포의 최소 수 또는 그 초과이다. 따라서, 일부 실시양태에서, 투여량은 총 세포의 목적하는 고정 용량 및 목적하는 비를 기초로 하고/거나, 1종 이상, 예

를 들어 각각의 개별 하위유형 또는 하위집단의 목적하는 고정 용량을 기초로 한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 투여량은 T 세포의 목적하는 고정 또는 최소 용량 및 $CD4^+$ 대 $CD8^+$ 세포의 목적하는 비를 기초로 하고/거나, $CD4^+$ 및/또는 $CD8^+$ 세포의 목적하는 고정 또는 최소 용량을 기초로 한다.

[0357] 특정 실시양태에서, 세포, 또는 세포의 하위-유형의 개별 집단은 대상체에게 약 1백만 내지 약 1000억개 세포, 예컨대, 예를 들어, 1백만 내지 약 500억개 세포 (예를 들어, 약 5백만개 세포, 약 25백만개 세포, 약 500백만개 세포, 약 10억개 세포, 약 50억개 세포, 약 200억개 세포, 약 300억개 세포, 약 400억개 세포, 또는 상기 값 중 임의의 2개에 의해 정의되는 범위), 예컨대 약 10백만개 내지 약 1000억개 세포 (예를 들어, 약 20백만개 세포, 약 30백만개 세포, 약 40백만개 세포, 약 60백만개 세포, 약 70백만개 세포, 약 80백만개 세포, 약 90백만개 세포, 약 100억개 세포, 약 250억개 세포, 약 500억개 세포, 약 750억개 세포, 약 900억개 세포, 또는 상기 값 중 임의의 2개에 의해 정의되는 범위), 및 일부 경우에 약 100백만개 세포 내지 약 500억개 세포 (예를 들어, 약 120백만개 세포, 약 250백만개 세포, 약 350백만개 세포, 약 450백만개 세포, 약 650백만개 세포, 약 800백만개 세포, 약 900백만개 세포, 약 30억개 세포, 약 300억개 세포, 약 450억개 세포)의 범위 또는 이들 범위 사이의 임의의 값으로 투여된다.

[0358] 일부 실시양태에서, 총 세포의 용량 및/또는 세포의 개별 하위집단의 용량은 정확히 또는 약 1×10^5 개 세포/kg 내지 약 1×10^{11} 개 세포/kg 10^4 내지 정확히 또는 약 10^{11} 개 세포/킬로그램 (kg) 체중, 예컨대 10^5 내지 10^6 개 세포/kg 체중, 예를 들어 정확히 또는 약 1×10^5 개 세포/kg, 1.5×10^5 개 세포/kg, 2×10^5 개 세포/kg, 또는 1×10^6 개 세포/kg 체중의 범위 내이다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 세포는 정확히 또는 약 10^4 내지 정확히 또는 약 10^9 개 T 세포/킬로그램 (kg) 체중, 예컨대 10^5 내지 10^6 개 T 세포/kg 체중, 예를 들어, 정확히 또는 약 1×10^5 개 T 세포/kg, 1.5×10^5 개 T 세포/kg, 2×10^5 개 T 세포/kg, 또는 1×10^6 개 T 세포/kg 체중으로 또는 그의 특정 오차 범위 내로 투여된다. 다른 예시적 실시양태에서, 본 개시내용의 방법에 사용하기 위한 변형된 세포의 적합한 투여량 범위는, 비제한적으로, 약 1×10^5 개 세포/kg 내지 약 1×10^6 개 세포/kg, 약 1×10^6 개 세포/kg 내지 약 1×10^7 개 세포/kg, 약 1×10^7 개 세포/kg 내지 약 1×10^8 개 세포/kg, 약 1×10^8 개 세포/kg 내지 약 1×10^9 개 세포/kg, 약 1×10^9 개 세포/kg 내지 약 1×10^{10} 개 세포/kg, 약 1×10^{10} 개 세포/kg 내지 약 1×10^{11} 개 세포/kg을 포함한다. 예시적 실시양태에서, 본 개시내용의 방법에 사용하기 위한 적합한 투여량은 약 1×10^8 개 세포/kg이다. 예시적 실시양태에서, 본 개시내용의 방법에 사용하기 위한 적합한 투여량은 약 1×10^7 개 세포/kg이다. 다른 실시양태에서, 적합한 투여량은 약 1×10^7 개 총 세포 내지 약 5×10^7 개 총 세포이다. 일부 실시양태에서, 적합한 투여량은 약 1×10^8 개 총 세포 내지 약 5×10^8 개 총 세포이다. 일부 실시양태에서, 적합한 투여량은 약 1.4×10^7 개 총 세포 내지 약 1.1×10^9 개 총 세포이다. 예시적 실시양태에서, 본 개시내용의 방법에 사용하기 위한 적합한 투여량은 약 7×10^9 개 총 세포이다.

[0359] 일부 실시양태에서, 세포는 정확히 또는 약 10^4 내지 정확히 또는 약 10^9 개 $CD4^+$ 및/또는 $CD8^+$ 세포/킬로그램 (kg) 체중, 예컨대 10^5 내지 10^6 개 $CD4^+$ 및/또는 $CD8^+$ 세포/kg 체중, 예를 들어, 정확히 또는 약 1×10^5 개 $CD4^+$ 및/또는 $CD8^+$ 세포/kg, 1.5×10^5 개 $CD4^+$ 및/또는 $CD8^+$ 세포/kg, 2×10^5 개 $CD4^+$ 및/또는 $CD8^+$ 세포/kg, 또는 1×10^6 개 $CD4^+$ 및/또는 $CD8^+$ 세포/kg 체중으로 또는 그의 특정 오차 범위 내로 투여된다. 일부 실시양태에서, 세포는 적어도 약 1×10^6 , 약 2.5×10^6 , 약 5×10^6 , 약 7.5×10^6 , 또는 약 9×10^6 개 $CD4^+$ 세포, 및/또는 적어도 약 1×10^6 , 약 2.5×10^6 , 약 5×10^6 , 약 7.5×10^6 , 또는 약 9×10^6 개 $CD8^+$ 세포, 및/또는 적어도 약 1×10^6 , 약 2.5×10^6 , 약 5×10^6 , 약 7.5×10^6 , 또는 약 9×10^6 개 T 세포 및/또는 그 초과로 또는 그의 특정 오차 범위 내로 투여된다. 일부 실시양태에서, 세포는 약 10^8 내지 10^{12} 개 또는 약 10^{10} 내지 10^{11} 개 T 세포, 약 10^8 내지 10^{12} 개 또는 약 10^{10} 내지 10^{11} 개 $CD4^+$ 세포, 및/또는 약 10^8 내지 10^{12} 개 또는 약 10^{10} 내지 10^{11} 개 $CD8^+$ 세포로 또는 그의 특정 오차 범위 내로 투여된다.

[0360] 일부 실시양태에서, 세포는 다중 세포 집단 또는 하위유형, 예컨대 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ 세포 또는 하위유형의 목적하

는 산출 비의 허용되는 범위로 또는 허용되는 범위 내로 투여된다. 일부 측면에서, 목적하는 비는 구체적 비일 수 있거나 또는 비의 범위일 수 있고, 예를 들어, 일부 실시양태에서, 목적하는 비 (예를 들어, $CD4^+$ 대 $CD8^+$ 세포의 비)는 정확히 또는 약 5: 1 내지 정확히 또는 약 5: 1 (또는 약 1:5 초과 및 약 5: 1 미만), 또는 정확히 또는 약 1:3 내지 정확히 또는 약 3: 1 (또는 약 1:3 초과 및 약 3: 1 미만), 예컨대 정확히 또는 약 2: 1 내지 정확히 또는 약 1:5 (또는 약 1:5 초과 및 약 2: 1 미만, 예컨대 정확히 또는 약 5: 1, 4.5: 1, 4: 1, 3.5: 1, 3: 1, 2.5: 1, 2: 1, 1.9: 1, 1.8: 1, 1.7: 1, 1.6: 1, 1.5: 1, 1.4: 1, 1.3: 1, 1.2: 1, 1.1: 1, 1: 1, 1: 1.1, 1: 1.2, 1: 1.3, 1:1.4, 1: 1.5, 1: 1.6, 1: 1.7, 1: 1.8, 1: 1.9: 1:2, 1:2.5, 1:3, 1:3.5, 1:4, 1:4.5, 또는 1:5)이다. 일부 측면에서, 허용되는 차이는 목적하는 비의 약 1%, 약 2%, 약 3%, 약 4%, 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50% 내이고, 이들 범위 사이의 임의의 값을 포함한다.

[0361] 일부 실시양태에서, 변형된 세포의 용량은 그를 필요로 하는 대상체에게 단일 용량 또는 다중 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 변형된 세포의 용량은 다중 용량으로, 예를 들어 1주 또는 7일마다 1회, 2주마다 또는 14일마다 1회, 3주마다 또는 21일마다 1회, 4주마다 또는 28일마다 1회 투여된다. 예시적 실시양태에서, 변형된 세포의 단일 용량이 그를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 예시적 실시양태에서, 변형된 세포의 단일 용량이 그를 필요로 하는 대상체에게 신속한 정맥내 주입에 의해 투여된다.

[0362] 질환의 예방 또는 치료를 위해, 적절한 투여량은 치료될 질환의 유형, 세포 또는 재조합 수용체의 유형, 질환의 중증도 및 경과, 세포가 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지 여부, 선행 요법, 대상체의 임상 병력 및 세포에 대한 반응, 및 담당 의사의 판단에 좌우될 수 있다. 조성물 및 세포는 일부 실시양태에서 대상체에게 1회 또는 일련의 치료에 걸쳐 적합하게 투여된다.

[0363] 일부 실시양태에서, 세포는 조합 치료의 일부로서, 예컨대 또 다른 치료적 개입, 예컨대 항체 또는 조작된 세포 또는 수용체 또는 작용제, 예컨대 세포독성제 또는 치료제와 동시에 또는 순차적으로, 임의의 순서로 투여된다. 일부 실시양태에서 세포는 1종 이상의 추가의 치료제와 함께 또는 또 다른 치료적 개입과 관련하여 동시에 또는 순차적으로 임의의 순서로 공-투여된다. 일부 문맥에서, 세포는 세포 집단이 1종 이상의 추가의 치료제의 효과를 증진시키거나 또는 그 반대가 되도록 시간상 충분히 가깝게 또 다른 요법과 공-투여된다. 일부 실시양태에서, 세포는 1종 이상의 추가의 치료제 전에 투여된다. 일부 실시양태에서, 세포는 1종 이상의 추가의 치료제 후에 투여된다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 추가의 작용제는, 예를 들어 지속성을 증진시키기 위해 시토키인, 예컨대 IL-2를 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 화학요법제의 투여를 포함한다.

[0364] 특정 실시양태에서, 본 발명의 변형된 세포 (예를 들어, CAR을 포함하는 변형된 세포)는 면역 체크포인트 항체 (예를 들어, 항-PD1, 항-CTLA-4, 또는 항-PDL1 항체)와 조합되어 대상체에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 변형된 세포는 예를 들어 PD-1 (프로그래밍된 사멸 1 단백질)을 표적화하는 항체 또는 항체 단편과 조합되어 투여될 수 있다. 항-PD-1 항체의 예는 펙트롤리주맙 (키트루다(KEYTRUDA)®, 이전에는 람브롤리주맙, 또한 MK-3475로도 공지됨), 및 니볼루맙 (BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538, 오피디바(OPDIVA)®) 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 변형된 세포는 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 조합되어 투여될 수 있다. 항-PD-L1 항체의 예는 BMS-936559, MPDL3280A (테센트릭(TECENTRIQ)®, 아테졸리주맙), 및 MEDI4736 (두르발루맙, 임핀지)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 변형된 세포는 항-CTLA-4 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 조합되어 투여될 수 있다. 항-CTLA-4 항체의 예는 이필리무맙 (상표명 예르보이(Yervoy))을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 소분자, siRNA, miRNA, 및 CRISPR 시스템을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다른 유형의 면역 체크포인트 조절제가 또한 사용될 수 있다. 면역 체크포인트 조절제는 CAR을 포함하는 변형된 세포 전에, 그 후에, 또는 그와 공동으로 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 면역 체크포인트 조절제를 포함하는 조합 치료는 본 발명의 변형된 세포를 포함하는 요법의 치료 효능을 증가시킬 수 있다.

[0365] 세포의 투여 후에, 일부 실시양태에서 조작된 세포 집단의 생물학적 활성은, 예를 들어 다수의 공지된 방법 중 임의의 것에 의해 측정된다. 평가할 파라미터는, 예를 들어 영상화에 의한 생체내에서의 또는 예를 들어 ELISA 또는 유동 세포측정법에 의한 생체외에서의, 항원에 대한 조작된 또는 천연 T 세포 또는 다른 면역 세포의 특이적 결합을 포함한다. 특정 실시양태에서, 표적 세포를 파괴하는 조작된 세포의 능력은 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 방법, 예컨대 예를 들어 문헌 [Kochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009); Herman et al., J. Immunological Methods, 285(1): 25-40 (2004); Kiesgen et al., Nat Protoc. (2021) 16(3):1331-1342; 및 Maldini et al., J Immunol Methods (2020) 484-485:112830]에 기재된 세포독성

검정을 사용하여 측정될 수 있다. 특정 실시양태에서, 세포의 생물학적 활성은 1종 이상의 시토카인, 예컨대 CD 107a, IFN γ , IL-2 및 TNF의 발현 및/또는 분비를 검정함으로써 측정된다. 일부 측면에서, 생물학적 활성은 임상 결과, 예컨대 종양 부담 또는 부하의 감소를 평가함으로써 측정된다.

- [0366] 특정 실시양태에서, 대상체에게 2차 치료가 제공된다. 2차 치료는 화학요법, 방사선, 수술 및 의약을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0367] 일부 실시양태에서, 대상체에게 CAR T 세포 요법 전에 조건화 요법이 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 조건화 요법은 대상체에게 유효량의 시클로포스파미드를 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조건화 요법은 유효량의 플루다라빈을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 조건화 요법은 유효량의 시클로포스파미드 및 플루다라빈의 조합물을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. CAR T 세포 요법 전에 조건화 요법을 투여하는 것은 CAR T 세포 요법의 효능을 증가시킬 수 있다. T 세포 요법을 위해 환자를 조건화하는 방법은 미국 특허 번호 9,855,298에 기재되어 있고, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0368] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 구체적 투여 요법은 변형된 T 세포의 투여 전 림프구고갈 단계를 포함한다. 예시적 실시양태에서, 림프구고갈 단계는 시클로포스파미드 및/또는 플루다라빈의 투여를 포함한다.
- [0369] 일부 실시양태에서, 림프구고갈 단계는 시클로포스파미드를 약 $200 \text{ mg/m}^2/\text{일}$ 내지 약 $2000 \text{ mg/m}^2/\text{일}$ (예를 들어, $200 \text{ mg/m}^2/\text{일}$, $300 \text{ mg/m}^2/\text{일}$, 또는 $500 \text{ mg/m}^2/\text{일}$)의 용량으로 투여하는 것을 포함한다. 예시적 실시양태에서, 시클로포스파미드의 용량은 약 $300 \text{ mg/m}^2/\text{일}$ 이다. 일부 실시양태에서, 림프구고갈 단계는 플루다라빈을 약 $20 \text{ mg/m}^2/\text{일}$ 내지 약 $900 \text{ mg/m}^2/\text{일}$ (예를 들어, $20 \text{ mg/m}^2/\text{일}$, $25 \text{ mg/m}^2/\text{일}$, $30 \text{ mg/m}^2/\text{일}$, 또는 $60 \text{ mg/m}^2/\text{일}$)의 용량으로 투여하는 것을 포함한다. 예시적 실시양태에서, 플루다라빈의 용량은 약 $30 \text{ mg/m}^2/\text{일}$ 이다.
- [0370] 일부 실시양태에서, 림프구고갈 단계는 시클로포스파미드를 약 $200 \text{ mg/m}^2/\text{일}$ 내지 약 $2000 \text{ mg/m}^2/\text{일}$ (예를 들어, $200 \text{ mg/m}^2/\text{일}$, $300 \text{ mg/m}^2/\text{일}$, 또는 $500 \text{ mg/m}^2/\text{일}$)의 용량으로, 및 플루다라빈을 약 $20 \text{ mg/m}^2/\text{일}$ 내지 약 $900 \text{ mg/m}^2/\text{일}$ (예를 들어, $20 \text{ mg/m}^2/\text{일}$, $25 \text{ mg/m}^2/\text{일}$, $30 \text{ mg/m}^2/\text{일}$, 또는 $60 \text{ mg/m}^2/\text{일}$)의 용량으로 투여하는 것을 포함한다. 예시적 실시양태에서, 림프구고갈 단계는 시클로포스파미드를 약 $300 \text{ mg/m}^2/\text{일}$ 의 용량으로, 및 플루다라빈을 약 $30 \text{ mg/m}^2/\text{일}$ 의 용량으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0371] 예시적 실시양태에서, 시클로포스파미드의 투여는 3일에 걸쳐 $300 \text{ mg/m}^2/\text{일}$ 이고, 플루다라빈의 투여는 3일에 걸쳐 $30 \text{ mg/m}^2/\text{일}$ 이다.
- [0372] 림프구고갈 화학요법의 투여는 제0일의 T 세포 (예를 들어, CAR-T, TCR-T, 변형된 T 세포 등) 주입 대비 제-6일 내지 제-4일로 스케줄링될 수 있다 (-1일 윈도우로, 즉 제-7일 내지 제-5일에 투여).
- [0373] 예시적 실시양태에서, 암을 갖는 대상체의 경우, 대상체는 변형된 T 세포의 투여 3일 전에 300 mg/m^2 의 시클로포스파미드를 포함하는 림프구고갈 화학요법을 정맥내 주입에 의해 제공받는다. 예시적 실시양태에서, 암을 갖는 대상체의 경우, 대상체는 변형된 T 세포의 투여 전 3일 동안 300 mg/m^2 의 시클로포스파미드를 포함하는 림프구고갈 화학요법을 정맥내 주입에 의해 제공받는다.
- [0374] 예시적 실시양태에서, 암을 갖는 대상체의 경우, 대상체는 플루다라빈을 포함하는 림프구고갈 화학요법을 약 $20 \text{ mg/m}^2/\text{일}$ 내지 약 $900 \text{ mg/m}^2/\text{일}$ (예를 들어, $20 \text{ mg/m}^2/\text{일}$, $25 \text{ mg/m}^2/\text{일}$, $30 \text{ mg/m}^2/\text{일}$, 또는 $60 \text{ mg/m}^2/\text{일}$)의 용량으로 제공받는다. 예시적 실시양태에서, 암을 갖는 대상체의 경우, 대상체는 플루다라빈을 포함하는 림프구고갈 화학요법을 3일 동안 30 mg/m^2 의 용량으로 제공받는다.
- [0375] 예시적 실시양태에서, 암을 갖는 대상체의 경우, 대상체는 시클로포스파미드를 약 $200 \text{ mg/m}^2/\text{일}$ 내지 약 $2000 \text{ mg/m}^2/\text{일}$ (예를 들어, $200 \text{ mg/m}^2/\text{일}$, $300 \text{ mg/m}^2/\text{일}$, 또는 $500 \text{ mg/m}^2/\text{일}$)의 용량으로, 및 플루다라빈을 약 $20 \text{ mg/m}^2/\text{일}$ 내지 약 $900 \text{ mg/m}^2/\text{일}$ (예를 들어, $20 \text{ mg/m}^2/\text{일}$, $25 \text{ mg/m}^2/\text{일}$, $30 \text{ mg/m}^2/\text{일}$, 또는 $60 \text{ mg/m}^2/\text{일}$)의 용량으로 포함하는 림프구고갈 화학요법을 제공받는다. 예시적 실시양태에서, 암을 갖는 대상체의 경우, 대상체는

시클로포스파미드를 약 300 mg/m²/일의 용량으로, 및 플루다라빈을 30 mg/m²의 용량으로 포함하는 림프구고갈 화학요법을 3일 동안 제공한다.

[0376] 본 발명의 세포는 적절한 전임상 및 임상 실험 및 시험에서 결정될 투여량 및 경로 및 시점에 투여될 수 있다. 세포 조성물은 이들 범위 내의 투여량으로 다수회 투여될 수 있다. 본 발명의 세포의 투여는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 결정된 바와 같은 목적하는 질환 또는 상태를 치료하는 데 유용한 다른 방법과 조합될 수 있다.

[0377] CAR T 세포의 주입 후의 유해 효과 중 하나는 시토카인 방출 증후군 (CRS)으로 공지되어 있는 면역 활성화의 개시라는 것이 관련 기술분야에 공지되어 있다. CRS는 염증 시토카인 상승을 유발하는 면역 활성화이다. CRS는 공지된 온-타겟 독성이며, 그의 발생은 효능과 상관관계가 있을 가능성이 있다. 임상 및 실험실 척도는 경도 CRS (체질 증상 및/또는 등급-2 기관 독성) 내지 중증 CRS (sCRS; 등급 ≥3 기관 독성, 공격적 임상 개입, 및/또는 잠재적 생명 위협)의 범위이다. 임상 특색은 고열, 권태감, 피로, 근육통, 오심, 식욕부진, 빈맥/저혈압, 모세혈관 누출, 심장 기능장애, 신장애, 간부전, 및 파종성 혈관내 응고를 포함한다. CAR T-세포 주입 후에 인터페론-감마, 과립구 대식세포 콜로니-자극 인자, IL-10 및 IL-6을 비롯한 시토카인의 극적인 상승이 나타났다. 하나의 CRS 서명은 IL-6 (중증 상승), IFN-감마, TNF-알파 (중등도) 및 IL-2 (경도)를 포함한 시토카인의 상승이다. 페리틴 및 C-반응성 단백질 (CRP)을 비롯한 임상적으로 이용가능한 염증 마커의 상승도 또한 CRS 증후군과 상관관계가 있는 것으로 관찰되었다. CRS의 존재는 일반적으로 입양 전달된 세포의 확장 및 진행성 면역 활성화와 상관관계가 있다. 높은 종양 부담을 갖는 환자가 보다 많은 sCRS를 경험하기 때문에, CRS 중증도의 정도는 주입 시점의 질환 부담에 의해 좌우된다는 것이 입증되었다.

[0378] 따라서, 본 발명은 CRS의 진단 후에, 조작된 세포 (예를 들어, CAR T 세포)의 항종양 효능을 약화시키지 않으면서 비제어된 염증의 생리학적 증상을 완화시키는 적절한 CRS 관리 전략을 제공한다. CRS 관리 전략은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 전신 코르티코스테로이드는 초기 항종양 반응을 손상시키지 않으면서 sCRS (예를 들어, 등급 3 CRS)의 증상을 신속하게 역전시키기 위해 투여될 수 있다.

[0379] 일부 실시양태에서, 항-IL-6R 항체가 투여될 수 있다. 항-IL-6R 항체의 예는 아틀리주맵 (악템라(Actemra) 또는 로악템라(RoActemra)로 시판됨)으로도 공지되어 있는, 미국 식품 의약품국의 승인을 받은 모노클로날 항체 토실리주맵이다. 토실리주맵은 인터류킨-6 수용체 (IL-6R)에 대한 인간화 모노클로날 항체이다. 토실리주맵의 투여는 CRS의 거의 즉각적인 역전을 입증하였다.

[0380] CRS는 일반적으로 관찰된 증후군의 중증도에 기초하여 관리되고, 개입은 이에 따라 조정된다. CRS 관리 결정은 실험실 값 단독만이 아니라, 임상 징후 및 증상 및 개입에 대한 반응에 기초할 수 있다.

[0381] 경도 내지 중등도 사례는 일반적으로 적절한 증상 완화를 위해 필요에 따라 유체 요법, 비-스테로이드성 항염증 약물 (NSAID) 및 항히스타민제를 사용한 증상 관리에 의해 치료된다. 보다 중증인 사례는 임의의 정도의 혈류 역학 불안정성을 갖는 환자를 포함하고; 임의의 혈류역학 불안정성이 있으면 토실리주맵의 투여가 권장된다. CRS의 1차 관리, 일부 실시양태에서, 60분에 걸친 IV의 8 mg/kg의 표지된 용량 (800 mg/용량을 초과하지 않아야 함)의 토실리주맵일 수 있고; 토실리주맵은 Q8시간 반복될 수 있다. 토실리주맵의 제1 용량에 대해 준최적 반응인 경우, 추가 용량의 토실리주맵이 고려될 수 있다. 토실리주맵은 단독으로 또는 코르티코스테로이드 요법과 조합되어 투여될 수 있다. 지속적 또는 진행성 CRS 증상, 12-18시간 내 불충분한 임상 개선 또는 토실리주맵에 대한 불량한 반응을 갖는 환자는 고-용량 코르티코스테로이드 요법, 일반적으로 히드로코르티손 100 mg IV 또는 메틸프레드니솔론 1-2 mg/kg으로 치료될 수 있다. 보다 중증의 혈류역학 불안정성 또는 보다 중증의 호흡기 증상을 갖는 환자에서, 환자는 CRS 과정의 초기에 고용량 코르티코스테로이드 요법을 투여받을 수 있다. CRS 관리 지침은 공개된 표준서를 기초로 할 수 있다 (Lee et al., (2019) Biol Blood Marrow Transplant, doi.org/10.1016/j.bbmt.2018.12.758; Neelapu et al., (2018) Nat Rev Clin Oncology, 15:47; Teachey et al., (2016) Cancer Discov, 6(6):664-679).

[0382] 대식세포 활성화 증후군 (MAS) 또는 혈구포식성 림프조직구증식증 (HLH)과 일치하는 특색이 CAR-T 요법으로 치료받은 환자에서 관찰되었으며 (Henter, 2007), 이는 CRS의 임상 징후에 부합된다. MAS는 CRS로부터 발생하는 면역 활성화에 대한 반응인 것으로 보이고, 따라서 CRS의 징후로 간주되어야 한다. MAS는 HLH (또한 면역 자극에 대한 반응)와 유사하다. MAS의 임상 증후군은 고등급 비-완화형 열, 3종의 계열 중 적어도 2종에 영향을 미치는 혈구감소증, 및 간비장비대를 특징으로 한다. 이는 높은 혈청 페리틴, 가용성 인터류킨-2 수용체 및 트리글리세리드, 및 순환 자연 킬러 (NK) 활성의 감소와 연관된다.

- [0383] 한 측면에서, 본 발명은 암의 치료를 필요로 하는 대상체에게 본원에 개시된 변형된 면역 또는 전구체 세포 중 어느 하나를 투여하는 것을 포함하는, 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법을 포함한다. 본 발명의 또 다른 측면은 암의 치료를 필요로 하는 대상체에게 본원에 개시된 방법 중 어느 하나에 의해 생성된 변형된 면역 또는 전구체 세포를 투여하는 것을 포함하는, 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법을 포함한다.
- [0384] F. 면역 세포의 공급원
- [0385] 특정 실시양태에서, 면역 세포 (예를 들어 T 세포)의 공급원은 생체의 조작 및/또는 생체내 형질도입을 위해 대상체로부터 획득된다. 생체의 조작을 위한 표적 세포의 공급원은 또한 예를 들어 자가 또는 이종 공여자 혈액, 체대혈 또는 골수를 포함할 수 있다. 예를 들어, 면역 세포의 공급원은 본 발명의 변형된 면역 세포로 치료될 대상체로부터의 것, 예를 들어, 대상체의 혈액, 대상체의 체대혈, 또는 대상체의 골수일 수 있다. 대상체의 비제한적 예는 인간, 개, 고양이, 마우스, 래트 및 그의 트랜스제닉 종을 포함한다. 바람직하게는, 대상체는 인간이다. CAR 발현을 위한 면역 세포의 생체내 형질도입을 위한 방법은, 예를 들어 문헌 [Pfeiffer et al., EMBO Mol Med. (2018) 10(11):e9158; Weidner et al., Nat Protoc. (2021) 16(7):3210-3240; Frank et al., Blood Advances (2020) 4(22):5702-5715; Nawaz et al., Blood Cancer J. (2021) 11(6):119]에 기재되어 있다.
- [0386] 면역 세포는 혈액, 말초 혈액 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 비장 조직, 체대, 림프 또는 림프 기관을 비롯한 다수의 공급원으로부터 획득될 수 있다. 면역 세포는 면역계의 세포, 예컨대 선천성 또는 적응성 면역의 세포, 예를 들어 골수성 또는 림프성 세포, 예컨대 림프구, 전형적으로 T 세포 및/또는 NK 세포이다. 다른 예시적인 세포는 줄기 세포, 예컨대 다능 및 만능 줄기 세포, 예컨대 유도된 만능 줄기 세포 (iPSC)를 포함한다. 일부 측면에서, 세포는 인간 세포이다. 치료될 대상체에 관하여, 세포는 동종 및/또는 자가일 수 있다. 세포는 전형적으로 1차 세포, 예컨대 대상체로부터 직접 분리되고/거나 대상체로부터 분리되고 동결된 것이다.
- [0387] 특정 실시양태에서, 면역 세포는 T 세포, 예를 들어 CD8+ T 세포 (예를 들어, CD8+ 나이브 T 세포, 중심 기억 T 세포 또는 이펙터 기억 T 세포), CD4+ T 세포, 자연 킬러 T 세포 (NKT 세포), 조절 T 세포 (Treg), 줄기 세포 기억 T 세포, 림프성 전구 세포, 조혈 줄기 세포, 자연 킬러 세포 (NK 세포), 대식세포 또는 수지상 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 단핵구 또는 과립구, 예를 들어 골수 세포, 대식세포, 호중구, 수지상 세포, 비만 세포, 호산구 및/또는 호염기구이다. 한 실시양태에서, 표적 세포는 유도된 만능 줄기 (iPS) 세포 또는 iPS 세포로부터 유래된 세포, 예를 들어 대상체로부터 생성되고, 1개 이상의 표적 유전자의 발현을 변경 (예를 들어, 돌연변이 유도) 또는 조작하도록 조작되고, 예를 들어 T 세포, 예를 들어 CD8+ T 세포 (예를 들어, CD8+ 나이브 T 세포, 중심 기억 T 세포, 또는 이펙터 기억 T 세포), CD4+ T 세포, 줄기 세포 기억 T 세포, 림프성 전구 세포, 또는 조혈 줄기 세포로 분화된 iPS 세포이다.
- [0388] 일부 실시양태에서, 세포는 T 세포 또는 다른 세포 유형, 예컨대 전체 T 세포 집단, CD4+ 세포, CD8+ 세포의 1종 이상의 하위세트, 및 그의 하위집단, 예컨대 기능, 활성화 상태, 성숙, 분화 잠재력, 확장, 재순환, 국제화 및/또는 지속 능력, 항원-특이성, 항원 수용체의 유형, 특정한 기관 또는 구획에의 존재, 마커 또는 시토카인 분비 프로파일, 및/또는 분화 정도에 의해 정의되는 것을 포함한다. T 세포 및/또는 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포의 하위유형 및 하위집단 중에는 나이브 T (TN) 세포, 이펙터 T 세포 (TEFF), 기억 T 세포 및 그의 하위유형, 예컨대 줄기 세포 기억 T (TSCM), 중심 기억 T (TCM), 이펙터 기억 T (TEM), 또는 말단 분화 이펙터 기억 T 세포, 종양-침윤 림프구 (TIL), 미성숙 T 세포, 성숙 T 세포, 헬퍼 T 세포, 세포독성 T 세포, 점막-연관 불변 T (MAIT) 세포, 자연 발생 및 적응 조절 T (Treg) 세포, 헬퍼 T 세포, 예컨대 TH1 세포, TH2 세포, TH3 세포, TH17 세포, TH9 세포, TH22 세포, 여포성 헬퍼 T 세포, 알파/베타 T 세포, 및 델타/감마 T 세포가 있다. 특정 실시양태에서, 관련 기술분야에서 이용가능한 임의의 수의 T 세포주가 사용될 수 있다.
- [0389] 일부 실시양태에서, 방법은 대상체로부터 면역 세포를 분리하고/거나, 그를 제조하고/거나, 가공하고/거나, 배양하고/거나 조작하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 세포의 제조는 1회 이상의 배양 및/또는 제조 단계를 포함한다. 기재된 바와 같은 조작을 위한 세포는 샘플, 예컨대 생물학적 샘플, 예를 들어 대상체로부터 획득되거나 유래된 것으로부터 분리될 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포가 분리되는 대상체는 질환 또는 상태를 갖거나 또는 세포 요법을 필요로 하거나 또는 세포 요법이 투여될 대상체이다. 일부 실시양태에서 대상체는 특정한 치료적 개입, 예컨대 세포가 분리, 가공 및/또는 조작되는 입양 세포 요법을 필요로 하는 인간이다. 따라서, 일부 실시양태에서 세포는 1차 세포, 예를 들어 1차 인간 세포이다. 샘플은 대상체로부터 직접 채취한 조직, 유체, 및 다른 샘플, 뿐만 아니라 1종 이상의 가공 단계, 예컨대 분리, 원심분리, 유전자 조

작 (예를 들어, 바이러스 벡터로의 형질도입), 세척, 및/또는 인큐베이션으로부터 생성된 샘플을 포함한다. 생물학적 샘플은 생물학적 공급원으로부터 직접 수득된 샘플 또는 가공되는 샘플일 수 있다. 생물학적 샘플은 체액, 예컨대 혈액, 혈장, 혈청, 뇌척수액, 활액, 소변 및 땀, 조직 및 기관 샘플, 예컨대 그로부터 유래된 가공된 샘플을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0390] 일부 측면에서, 세포가 유래되거나 단리되는 샘플은 혈액 또는 혈액-유래 샘플이거나, 또는 분리반출술 또는 백혈구분리반출술 산물이거나 또는 그로부터 유래된 것이다. 예시적인 샘플은 전혈, 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 백혈구, 골수, 흉선, 조직 생검, 종양, 백혈병, 림프종, 림프절, 장 연관 림프성 조직, 점막 연관 림프성 조직, 비장, 다른 림프성 조직, 간, 폐, 위, 장, 결장, 신장, 췌장, 유방, 골, 전립선, 자궁경부, 고환, 난소, 편도, 또는 다른 기관, 및/또는 그로부터 유래된 세포를 포함한다. 샘플은 세포 요법, 예를 들어 입양 세포 요법과 관련하여 자가 및 동종 공급원으로부터의 샘플을 포함한다.

[0391] 일부 실시양태에서, 세포는 세포주, 예를 들어 T 세포주로부터 유래된다. 일부 실시양태에서 세포는 이중 공급원, 예를 들어 마우스, 래트, 비-인간 영장류 및 돼지로부터 수득된다. 일부 실시양태에서, 세포의 단리는 1회 이상의 제조 및/또는 비-친화도 기반 세포 분리 단계를 포함한다. 일부 예에서, 예를 들어, 원치 않는 성분을 제거하거나, 목적하는 성분을 풍부화하거나, 특정한 시약에 대해 감수성인 세포를 용해 또는 제거하기 위해, 세포는 1종 이상의 시약의 존재 하에 세척, 원심분리 및/또는 인큐베이션된다. 일부 예에서, 세포는 1종 이상의 특성, 예컨대 밀도, 부착 특성, 크기, 특정한 성분에 대한 감수성 및/또는 저항성에 기초하여 분리된다.

[0392] 일부 예에서, 대상체의 순환 혈액으로부터의 세포는, 예를 들어 분리반출술 또는 백혈구분리반출술에 의해 수득된다. 샘플은 일부 측면에서 림프구, 예컨대 T 세포, 단핵구, 과립구, B 세포, 다른 유핵 백혈구, 적혈구 및/또는 혈소판을 함유하고, 일부 측면에서 적혈구 및 혈소판 이외의 세포를 함유한다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수집된 혈액 세포는, 예를 들어 혈장 분획을 제거하고 후속 가공 단계를 위해 세포를 적절한 완충제 또는 배지에 넣기 위해 세척된다. 일부 실시양태에서, 세포는 포스페이트 완충 염수 (PBS)로 세척된다. 일부 측면에서, 세척 단계는 제조업체의 지침에 따라 겔전 흐름 여과 (TFF)에 의해 달성된다. 일부 실시양태에서, 세포는 세척 후에 다양한 생체적합성 완충제 중에 재현탁된다. 특정 실시양태에서, 혈액 세포 샘플의 성분이 제거되고, 세포는 배양 배지에 직접 재현탁된다. 일부 실시양태에서, 방법은 밀도-기반 세포 분리 방법, 예컨대 적혈구를 용해시키고 퍼콜 또는 퍼콜 구배를 통해 원심분리함으로써 말초 혈액으로부터 백혈구를 제조하는 것을 포함한다.

[0393] 한 실시양태에서, 면역은 분리반출술 또는 백혈구분리반출술에 의해 수득되는, 개체의 순환 혈액으로부터 수득된 세포이다. 분리반출술 산물은 전형적으로 림프구, 예컨대 T 세포, 단핵구, 과립구, B 세포, 다른 유핵 백혈구, 적혈구 및 혈소판을 함유한다. 분리반출술에 의해 수집된 세포는 혈장 분획을 제거하고 후속 가공 단계를 위해 세포를 적절한 완충제 또는 배지, 예컨대 칼슘이 결여되고 마그네슘이 결여될 수 있거나 또는 전부는 아니지만 많은 2가 양이온이 결여될 수 있는 포스페이트 완충 염수 (PBS) 또는 세척 용액에 넣기 위해 세척될 수 있다. 세척 후에, 세포는 다양한 생체적합성 완충제, 예컨대 예를 들어 Ca-무함유, Mg-무함유 PBS 중에 재현탁될 수 있다. 대안적으로, 분리반출술 샘플의 바람직하지 않은 성분을 제거하고, 세포를 배양 배지 중에 직접 재현탁시킬 수 있다.

[0394] 일부 실시양태에서, 단리 방법은 세포 내 1종 이상의 특이적 분자, 예컨대 표면 마커, 예를 들어 표면 단백질, 세포내 마커 또는 핵산의 발현 또는 존재에 기초하여 상이한 세포 유형을 분리하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 마커에 기초한 분리를 위한 임의의 공지된 방법이 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 분리는 친화도- 또는 면역친화도-기반 분리이다. 예를 들어, 단리는 일부 측면에서 예를 들어 이러한 마커에 특이적으로 결합하는 항체 또는 결합 파트너와의 인큐베이션, 이어서 일반적으로 세척 단계, 및 항체 또는 결합 파트너에 결합되지 않은 세포로부터 항체 또는 결합 파트너에 결합된 세포의 분리에 의한, 세포의 발현 또는 1종 이상의 마커, 전형적으로 세포 표면 마커의 발현 수준에 기초한 세포 및 세포 집단의 분리를 포함한다.

[0395] 이러한 분리 단계는 시약에 결합된 세포가 추가의 사용을 위해 유지되는 양성 선택, 및/또는 항체 또는 결합 파트너에 결합되지 않은 세포가 유지되는 음성 선택에 기초할 수 있다. 일부 예에서, 둘 다의 분획이 추가의 사용을 위해 유지된다. 일부 측면에서, 음성 선택은 이중 집단에서 세포 유형을 특이적으로 확인하는 항체가 이용가능하지 않아서, 분리가 목적하는 집단 이외의 세포에 의해 발현된 마커에 기초하여 최상으로 수행되는 경우에 특히 유용할 수 있다. 분리는 특정한 세포 집단 또는 특정한 마커를 발현하는 세포의 100% 풍부화 또는 제거를 유발할 필요는 없다. 예를 들어, 특정한 유형의 세포, 예컨대 마커를 발현하는 세포의 양성 선택 또는 그의 풍부화는 이러한 세포의 수 또는 백분율을 증가시키는 것을 지칭하지만, 마커를 발현하지 않는 세포의 완전

한 부재를 유발할 필요는 없다. 마찬가지로, 특정한 유형의 세포, 예컨대 마커를 발현하는 세포의 음성 선택, 제거 또는 고갈은 이러한 세포의 수 또는 백분율을 감소시키는 것을 지칭하지만, 모든 이러한 세포의 완전한 제거를 유발할 필요는 없다.

[0396] 일부 예에서, 다중 라운드의 분리 단계가 수행되며, 여기서 하나의 단계로부터의 양성 또는 음성 선택된 분획은 또 다른 분리 단계, 예컨대 후속 양성 또는 음성 선택에 적용된다. 일부 예에서, 단일 분리 단계는 예컨대 세포를 각각 음성 선택을 위해 표적화된 마커에 특이적인 복수의 항체 또는 결합 파트너와 함께 인큐베이션함으로써 다중 마커를 발현하는 세포를 동시에 고갈시킬 수 있다. 마찬가지로, 다중 세포 유형은 세포를 다양한 세포 유형 상에서 발현된 복수의 항체 또는 결합 파트너와 함께 인큐베이션함으로써 동시에 양성 선택될 수 있다.

[0397] 일부 실시양태에서, T 세포 집단 중 1종 이상은 1종 이상의 특정한 마커, 예컨대 표면 마커에 대해 양성 (마커+)이거나 또는 높은 수준 (마커^고)을 발현하거나, 또는 1종 이상의 마커에 대해 음성 (마커-)이거나 또는 비교적 낮은 수준 (마커^저)을 발현하는 세포에 대해 풍부화되거나 또는 고갈된다. 예를 들어, 일부 측면에서, T 세포의 특정 하위집단, 예컨대 1종 이상의 표면 마커에 대해 양성이거나 그의 높은 수준을 발현하는 세포, 예를 들어 CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+, 및/또는 CD45RO+ T 세포는 양성 또는 음성 선택 기술에 의해 분리된다. 일부 경우에, 이러한 마커는 특정 T 세포 집단 (예컨대 비-기억 세포)에서는 부재하거나 또는 비교적 낮은 수준으로 발현되지만 특정 다른 T 세포 집단 (예컨대 기억 세포)에서는 존재하거나 또는 비교적 더 높은 수준으로 발현되는 것이다. 한 실시양태에서, 세포 (예컨대, CD8+ 세포 또는 T 세포, 예를 들어, CD3+ 세포)는 높은 표면 수준의 CD45RO, CCR7, CD28, CD27, CD44, CD 127 및/또는 CD62L에 대해 양성이거나 이를 발현하는 세포가 풍부하고/거나 (즉, 이에 대해 양성으로 선택됨), 높은 표면 수준의 CD45RA에 대해 양성이거나 이를 발현하는 세포가 고갈된다 (예를 들어, 이에 대해 음성으로 선택됨). 일부 실시양태에서, 세포는 CD122, CD95, CD25, CD27 및/또는 IL7-Ra (CD127)의 높은 표면 수준을 발현하거나 그에 대해 양성인 세포에 대해 풍부화되거나 또는 고갈된다. 일부 예에서, CD8+ T 세포는 CD62L 및 CD45RO에 대해 양성인 (또는 CD45RA에 대해 음성인) 세포에 대해 풍부화된다. 예를 들어, CD3+, CD28+ T 세포는 CD3/CD28 집합된 자기 비드 (예를 들어, 디나비즈(DYNABEADS)® M-450 CD3/CD28 T 세포 확장제)를 사용하여 양성 선택될 수 있다.

[0398] 일부 실시양태에서, T 세포는 비-T 세포, 예컨대 B 세포, 단핵구, 또는 다른 백혈구, 예컨대 CD14 상에서 발현된 마커의 음성 선택에 의해 PBMC 샘플로부터 분리된다. 일부 측면에서, CD4+ 또는 CD8+ 선택 단계는 CD4+ 헬퍼 및 CD8+ 세포독성 T 세포를 분리하는 데 사용된다. 이러한 CD4+ 및 CD8+ 집단은 1종 이상의 나이브, 기억, 및/또는 이펙터 T 세포 하위집단에서 발현되거나 비교적 더 높은 정도로 발현된 마커에 대한 양성 또는 음성 선택에 의해 하위집단으로 추가로 분류될 수 있다. 일부 실시양태에서, CD8+ 세포는 예컨대 각각의 하위집단과 연관된 표면 항원에 기초한 양성 또는 음성 선택에 의해 나이브, 중심 기억, 이펙터 기억, 및/또는 중심 기억 줄기 세포에 대해 추가로 풍부화되거나 또는 고갈된다. 일부 실시양태에서, 중심 기억 T (TCM) 세포에 대한 풍부화는 효능을 증가시키기 위해, 예컨대 투여 후 장기간 생존, 확장 및/또는 생착을 개선시키기 위해 수행되며, 이는 일부 측면에서 이러한 하위-집단에서 특히 강건하다. 일부 실시양태에서, TCM-풍부화된 CD8+ T 세포 및 CD4+ T 세포를 조합하는 것은 효능을 추가로 증진시킨다.

[0399] 일부 실시양태에서, 기억 T 세포는 CD8+ 말초 혈액 림프구의 CD62L+ 및 CD62L- 하위세트 둘 다에 존재한다. PBMC는 예컨대 항-CD8 및 항-CD62L 항체를 사용하여 CD62L-CD8+ 및/또는 CD62L+CD8+ 분획에 대해 풍부화되거나 또는 고갈될 수 있다. 일부 실시양태에서, CD4+ T 세포 집단 및 CD8+ T 세포 하위집단, 예를 들어, 중심 기억 (TCM) 세포에 대해 풍부화된 하위집단. 일부 실시양태에서, 중심 기억 T (TCM) 세포에 대한 풍부화는 CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 및/또는 CD 127 양성 또는 그의 높은 표면 발현에 기초하고; 일부 측면에서, 이는 CD45RA 및/또는 그랜자임 B를 발현하거나 또는 고도로 발현하는 세포에 대한 음성 선택에 기초한다. 일부 측면에서, TCM 세포에 대해 풍부화된 CD8+ 집단의 단리는 CD4, CD14, CD45RA를 발현하는 세포의 고갈, 및 CD62L을 발현하는 세포에 대한 양성 선택 또는 풍부화에 의해 수행된다. 한 측면에서, 중심 기억 T (TCM) 세포에 대한 풍부화는 CD4 발현에 기초하여 선택된 세포의 음성 분획으로 시작하여 수행되며, CD14 및 CD45RA의 발현에 기초한 음성 선택 및 CD62L에 기초한 양성 선택이 적용된다. 이러한 선택은 일부 측면에서 동시에 수행되고, 다른 측면에서 순차적으로 임의의 순서로 수행된다. 일부 측면에서, CD8+ 세포 집단 또는 하위집단을 제조하는 데 사용되는 동일한 CD4 발현-기반 선택 단계는 또한 CD4+ 세포 집단 또는 하위집단을 생성하는 데 사용되어, CD4-기반 분리로부터 양성 및 음성 분획 둘 다가 보유하고, 이는 임의로 1회 이상의 추가의 양성 또는 음성 선택 단계 후에 방법의 후속 단계에 사용된다.

[0400] CD4+ T 헬퍼 세포는 세포 표면 항원을 갖는 세포 집단을 확인하는 것에 의해 나이브, 중심 기억, 및 이펙터 세

포로 분류된다. CD4⁺ 림프구는 표준 방법에 의해 수득될 수 있다. 일부 실시양태에서, 나이트 CD4⁺ T 림프구는 CD45RO⁻, CD45RA⁺, CD62L⁺, CD4⁺ T 세포이다. 일부 실시양태에서, 중심 기억 CD4⁺ 세포는 CD62L⁺ 및 CD45RO⁺이다. 일부 실시양태에서, 이펙터 CD4⁺ 세포는 CD62L⁻ 및 CD45RO⁺이다. 한 예에서, 음성 선택에 의해 CD4⁺ 세포를 풍부화하기 위해, 모노클로날 항체 콕테일은 전형적으로 CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR, 및 CD8에 대한 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 결합 파트너는 양성 및/또는 음성 선택을 위한 세포의 분리를 가능하게 하기 위해 고체 지지체 또는 매트릭스, 예컨대 자기 비드 또는 상자성 비드에 결합된다.

[0401] 일부 실시양태에서, 세포는 유전자 조작 전에 또는 그와 함께 인큐베이션 및/또는 배양된다. 인큐베이션 단계는 배양, 양식, 자극, 활성화 및/또는 증식을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물 또는 세포는 자극 조건 또는 자극제의 존재 하에 인큐베이션된다. 이러한 조건은 집단 내 세포의 증식, 확장, 활성화 및/또는 생존을 유도하고/거나, 항원 노출을 모방하고/거나, 유전자 조작, 예컨대 재조합 항원 수용체의 도입을 위해 세포를 프라이밍하도록 설계된 것을 포함한다. 조건은 특정한 배지, 온도, 산소 함량, 이산화탄소 함량, 시간, 작용제, 예를 들어 영양소, 아미노산, 항생제, 이온, 및/또는 자극 인자, 예컨대 시토카인, 케모카인, 항원, 결합 파트너, 융합 단백질, 재조합 가용성 수용체, 및 세포를 활성화시키도록 설계된 임의의 다른 작용제 중 1종 이상을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 자극 조건 또는 작용제는 TCR 복합체의 세포내 신호전달 도메인을 활성화시킬 수 있는 1종 이상의 작용제, 예를 들어 리간드를 포함한다. 일부 측면에서, 작용제는 T 세포에서 TCR/CD3 세포내 신호전달 캐스케이드를 켜거나 개시한다. 이러한 작용제는 항체, 예컨대 TCR 성분 및/또는 공동자극 수용체에 특이적인 것, 예를 들어 고체 지지체, 예컨대 비드에 결합된 예를 들어 항-CD3, 항-CD28, 및/또는 1종 이상의 시토카인을 포함할 수 있다. 임의로, 확장 방법은 항-CD3 및/또는 항 CD28 항체를 배양 배지에 (예를 들어, 적어도 약 0.5 ng/ml의 농도로) 첨가하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 자극제는 IL-2 및/또는 IL-15, 예를 들어 적어도 약 10 유닛/mL의 IL-2 농도를 포함한다.

[0402] 또 다른 실시양태에서, T 세포는 적혈구를 용해시키고, 예를 들어 퍼콜TM 구배를 통한 원심분리에 의해 단핵구를 고갈시킴으로써 말초 혈액으로부터 분리된다. 대안적으로, T 세포는 체대로부터 분리될 수 있다. 임의의 경우에, T 세포의 특이적 하위집단은 양성 또는 음성 선택 기술에 의해 추가로 분리될 수 있다.

[0403] 이렇게 분리된 체대혈 단핵 세포에서 CD34, CD8, CD14, CD19, 및 CD56을 포함하나 이에 제한되지는 않는 특정 항원을 발현하는 세포가 고갈될 수 있다. 이들 세포의 고갈은 분리된 항체, 항체를 포함하는 생물학적 샘플, 예컨대 복수, 물리적 지지체에 결합된 항체, 및 세포 결합된 항체를 사용하여 달성될 수 있다.

[0404] 음성 선택에 의한 T 세포 집단의 풍부화는 음성 선택된 세포에 고유한 표면 마커에 대해 지시된 항체의 조합을 사용하여 달성될 수 있다. 바람직한 방법은 음성 선택된 세포 상에 존재하는 세포 표면 마커에 대해 지시된 모노클로날 항체의 콕테일을 사용하는 음성 자기 면역부착 또는 유동 세포측정법을 통한 세포 분류 및/또는 선택이다. 예를 들어, 음성 선택에 의해 CD4⁺ 세포를 풍부화하기 위해, 모노클로날 항체 콕테일은 전형적으로 CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR 및 CD8에 대한 항체를 포함한다.

[0405] 양성 또는 음성 선택에 의해 목적하는 세포 집단을 분리하기 위해, 세포의 농도 및 표면 (예를 들어, 입자, 예컨대 비드)는 달라질 수 있다. 특정 실시양태에서, 세포 및 비드의 최대 접촉을 보장하기 위해 비드 및 세포가 함께 혼합되는 부피를 유의하게 감소시키는 (즉, 세포의 농도를 증가시키는) 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 20억개 세포/mL의 농도가 사용된다. 한 실시양태에서, 10억개 세포/mL의 농도가 사용된다. 추가 실시양태에서, 100백만개 초과 세포/mL가 사용된다. 추가 실시양태에서, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 50백만개 세포/mL의 세포 농도가 사용된다. 또 다른 실시양태에서, 75, 80, 85, 90, 95, 또는 100백만개 세포/mL의 세포 농도가 사용된다. 추가 실시양태에서, 125 또는 150백만개 세포/mL의 농도가 사용될 수 있다. 고농도의 사용은 증가된 세포 수율, 세포 활성화 및 세포 확장을 발생시킬 수 있다.

[0406] T 세포는 또한 세척 단계 후에 동결될 수 있으며, 이는 단핵구-제거 단계를 필요로 하지 않는다. 이론에 얽매이지는 것을 원하지는 않지만, 동결 및 후속 해동 단계는 세포 집단에서 과립구 및 어느 정도의 단핵구를 제거함으로써 보다 균일한 생성물을 제공한다. 혈장 및 혈소판을 제거하는 세척 단계 후에, 세포는 동결 용액 중에 현탁될 수 있다. 많은 동결 용액 및 파라미터가 관련 기술분야에 공지되어 있고 본 문맥에서 유용할 것이지만, 비제한적 예에서, 하나의 방법은 20% DMSO 및 8% 인간 혈청 알부민을 함유하는 PBS, 또는 다른 적합한 세포 동결 배지를 사용하는 것을 수반한다. 이어서, 세포는 분당 1°C의 속도로 -80°C로 동결되고, 액체 질소 저장 탱크의 증기 상에 저장된다. 다른 제어 동결 방법뿐만 아니라 즉시 비제어 동결이 -20°C에서 또는 액체 질소에서 사용될 수 있다.

[0407] 한 실시양태에서, T 세포의 집단은 말초 혈액 단핵 세포, 체대혈 세포, 정제된 T 세포의 집단, 및 T 세포주와

같은 세포 내에 포함된다. 또 다른 실시양태에서, 말초 혈액 단핵 세포는 T 세포의 집단을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 정제된 T 세포는 T 세포의 집단을 포함한다.

[0408] 특정 실시양태에서, T 조절 세포 (Treg)는 샘플로부터 분리될 수 있다. 샘플은 제대혈 또는 말초 혈액을 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, Treg는 유동 세포측정 분류에 의해 분리된다. 샘플은 관련 기술분야에 공지된 임의의 수단에 의해 분리 전에 Treg에 대해 풍부화될 수 있다. 분리된 Treg는 사용 전에 동결보존 및/또는 확장될 수 있다. Treg를 분리하는 방법은 미국 특허 번호 7,754,482, 8,722,400, 및 9,555,105, 및 미국 특허 출원 번호 13/639,927에 기재되어 있으며, 그의 내용은 그 전문이 본원에 포함된다.

[0409] G. 면역 세포의 확장

[0410] CAR을 발현하도록 세포를 변형하기 전 또는 후에, 세포는 예를 들어 미국 특허 번호 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041; 및 미국 공개 번호 20060121005에 기재된 바와 같은 방법을 사용하여 활성화되고 수적으로 확장될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 T 세포는 CD3/TCR 복합체 연관 신호를 자극하는 작용제 및 T 세포의 표면 상의 공동-자극 분자를 자극하는 리간드가 부착된 표면과의 접촉에 의해 확장될 수 있다. 특히, T 세포 집단은 표면 상에 고정된 항-CD3 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 항-CD2 항체와의 접촉에 의해, 또는 칼슘 이오노포어와 함께 단백질 키나제 C 활성화제 (예를 들어, 브리오스타틴)와의 접촉에 의해 자극될 수 있다. T 세포의 표면 상의 보조 분자의 공동-자극을 위해, 보조 분자에 결합하는 리간드가 사용된다. 예를 들어, T 세포는 T 세포의 증식을 자극하기에 적절한 조건 하에 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체와 접촉될 수 있다. 항-CD28 항체의 예는 9.3, B-T3, XR-CD28 (디아클론(Diaclone), 프랑스 브장송)을 포함하고, 이들은 관련 기술분야에 공지된 다른 방법 및 시약과 같이 본 발명에서 사용될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [ten Berge et al., Transplant Proc. (1998) 30(8): 3975-3977; Haanen et al., J. Exp. Med. (1999) 190(9): 1319-1328; 및 Garland et al., J. Immunol. Methods (1999) 227(1-2): 53-63] 참조).

[0411] 본원에 개시된 방법에 의해 T 세포를 확장시키는 것은 약 10배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배, 200배, 300배, 400배, 500배, 600배, 700배, 800배, 900배, 1000배, 2000배, 3000배, 4000배, 5000배, 6000배, 7000배, 8000배, 9000배, 10,000배, 100,000배, 1,000,000배, 10,000,000배, 또는 그 초과, 및 그 사이의 임의의 및 모든 전체 정수 또는 부분 정수만큼 증대될 수 있다. 한 실시양태에서, T 세포는 약 20배 내지 약 50배의 범위로 확장된다.

[0412] 배양 후에, T 세포는 소정의 기간 동안 또는 세포를 또 다른 배양 장치로 통과시키기 전에 세포가 최적 계대를 위해 전면생장물 또는 높은 세포 밀도에 도달할 때까지 배양 장치 내의 세포 배지에서 인큐베이션될 수 있다. 배양 장치는 시험관내 세포 배양에 통상적으로 사용되는 임의의 배양 장치일 수 있다. 바람직하게는, 전면생장물 수준은 세포를 또 다른 배양 장치로 통과시키기 전에 70% 이상이다. 보다 바람직하게는, 전면생장물 수준은 90% 이상이다. 소정의 기간은 시험관내 세포 배양에 적합한 임의의 시간일 수 있다. T 세포 배지는 T 세포의 배양 동안 임의의 시점에 교체될 수 있다. 바람직하게는, T 세포 배지는 약 2 내지 3일마다 교체된다. 이어서, T 세포는 배양 장치로부터 수거되고, 이때 T 세포는 즉시 사용될 수 있거나 또는 이후에 사용하기 위해 동결보존되어 저장될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명은 확장된 T 세포를 동결보존하는 것을 포함한다. 동결보존된 T 세포는 핵산을 T 세포 내로 도입하기 전에 해동된다.

[0413] 또 다른 실시양태에서, 방법은 T 세포를 분리하고 T 세포를 확장시키는 것을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 확장 전에 T 세포를 동결보존하는 것을 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 동결보존된 T 세포는 키메라 막 단백질을 코딩하는 RNA에 의한 전기천공을 위해 해동된다.

[0414] 세포의 생체의 확장을 위한 또 다른 절차는 미국 특허 번호 5,199,942 (본원에 참조로 포함됨)에 기재되어 있다. 미국 특허 번호 5,199,942에 기재된 바와 같은 확장은 본원에 기재된 다른 확장 방법에 대한 대안 또는 부가일 수 있다. 간략하게, T 세포의 생체의 배양 및 확장은 세포 성장 인자, 예컨대 미국 특허 번호 5,199,942에 기재된 것, 또는 다른 인자, 예컨대 flt3-L, IL-1, IL-3 및 c-kit 리간드와의 첨가를 포함한다. 한 실시양태에서, T 세포를 확장시키는 것은 T 세포를 flt3-L, IL-1, IL-3 및 c-kit 리간드로 이루어진 군으로부터 선택된 인자와 함께 배양하는 것을 포함한다.

[0415] 본원에 기재된 바와 같은 배양 단계 (본원에 기재된 바와 같은 작용제와의 접촉, 또는 전기천공 후)는 매우 짧을 수 있고, 예를 들어 24시간 미만, 예컨대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 또는 23시간일 수 있다. 본원에 추가로 기재된 바와 같은 배양 단계 (본원에 기재된 바와

같은 작용제와의 접촉)는 보다 길 수 있고, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14일 또는 그 초과일 수 있다.

[0416] 다양한 용어가 배양물 중의 세포를 기재하는 데 사용된다. 세포 배양물은 일반적으로 살아있는 유기체로부터 채취하고 제어된 조건 하에 성장시킨 세포를 지칭한다. 1차 세포 배양물은 유기체로부터 직접 채취한, 제1 계대배양 전의 세포, 조직 또는 기관 배양물이다. 세포가 세포 성장 및/또는 분열을 용이하게 하는 조건 하에 성장 배지 내에 놓이는 경우 세포는 배양물에서 확장되어, 보다 큰 세포 집단을 생성한다. 세포가 배양물에서 확장되는 경우에, 세포 증식 속도는 전형적으로, 달리 배가 시간으로 공지되어 있는, 세포가 개수 상 두 배로 되는 데 필요한 시간의 양에 의해 측정된다.

[0417] 각각의 계대배양 라운드는 계대로 지칭된다. 세포가 계대배양되는 경우, 이는 계대된 것으로 지칭된다. 특정 세포 집단 또는 세포주는 때때로 계대된 횟수로 지칭되거나 또는 특징화된다. 예를 들어, 10회 계대된 배양된 세포 집단은 P10 배양물로 지칭될 수 있다. 1차 배양물, 즉 조직으로부터 세포의 단리 후의 제1 배양물은 P0으로 지정된다. 제1 계대배양 후에, 세포는 2차 배양물 (P1 또는 계대 1)로서 기재된다. 제2 계대배양 후, 세포는 3차 배양물 (P2 또는 계대 2)이 되는 등이다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 계대 기간 동안 다수의 집단 배가가 있을 수 있고; 따라서 배양물의 집단 배가의 수는 계대 수보다 더 크다는 것을 이해할 것이다. 계대 사이의 기간 동안 세포의 확장 (즉, 집단 배가의 수)은 시딩 밀도, 기질, 배지, 및 계대 사이의 시간을 포함하나 이에 제한되지는 않는 많은 인자에 좌우된다.

[0418] 한 실시양태에서, 세포는 수시간 (약 3시간) 내지 약 14일 또는 그 사이의 임의의 시간 단위 정수 값 동안 배양될 수 있다. T 세포 배양에 적절한 조건은 혈청 (예를 들어, 소 태아 또는 인간 혈청), 인터류킨-2 (IL-2), 인슐린, IFN-감마, IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF-베타, 및 TNF- α 또는 통상의 기술자에게 공지된 세포의 성장을 위한 임의의 다른 첨가제를 비롯한, 증식 및 생존에 필요한 인자를 함유할 수 있는 적절한 배지 (예를 들어, 최소 필수 배지 또는 RPMI 배지 1640 또는 엑스-비보 15 (론자(Lonza)))를 포함한다. 세포의 성장을 위한 다른 첨가제는 계면활성제, 플라스마네이트, 및 환원제, 예컨대 N-아세틸-시스테인 및 2-메르캅토에탄올을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 배지는 아미노산, 피루브산나트륨, 및 비타민이 첨가된, 무혈청 이거나 또는 적절한 양의 혈청 (또는 혈장) 또는 규정된 세트의 호르몬, 및/또는 T 세포의 성장 및 확장에 충분한 양의 시토카인(들)이 보충된, RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, 엑스-비보 15, 및 엑스-비보 20, 옵티마이저를 포함할 수 있다. 항생제, 예를 들어 페니실린 및 스트렙토마이신은 대상체 내로 주입될 세포의 배양물이 아닌, 실험 배양물에만 포함된다. 표적 세포는 성장을 지지하는 데 필요한 조건, 예를 들어 적절한 온도 (예를 들어, 37°C) 및 분위기 (예를 들어, 공기 플러스 5% CO₂) 하에 유지된다.

[0419] T 세포를 배양하는 데 사용되는 배지는 T 세포를 공동-자극할 수 있는 작용제를 포함할 수 있다. 예를 들어, CD3을 자극할 수 있는 작용제는 CD3에 대한 항체이고, CD28을 자극할 수 있는 작용제는 CD28에 대한 항체이다. 본원에 개시된 방법에 의해 단리된 세포는 대략 10배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배, 200배, 300배, 400배, 500배, 600배, 700배, 800배, 900배, 1000배, 2000배, 3000배, 4000배, 5000배, 6000배, 7000배, 8000배, 9000배, 10,000배, 100,000배, 1,000,000배, 10,000,000배, 또는 그 초과로 확장될 수 있다. 한 실시양태에서, T 세포는 약 20배 내지 약 50배, 또는 그 초과로 확장이 가능하다. 한 실시양태에서, 인간 T 조절 세포는 항-CD3 항체 코팅된 KT64.86 인공 항원 제시 세포 (aAPC)를 통해 확장된다. T 세포를 확장 및 활성화시키는 방법은 미국 특허 번호 7,754,482, 8,722,400, 및 9,555,105에서 확인할 수 있고, 그 내용은 그 전문이 본원에 포함된다.

[0420] 한 실시양태에서, T 세포를 확장시키는 방법은 확장된 T 세포를 추가의 적용을 위해 단리하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 확장시키는 방법은 확장된 T 세포의 후속 전기천공에 이어 배양하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 후속 전기천공은 T 세포의 확장된 집단 내로 작용제를 코딩하는 핵산을 도입하는 것, 예컨대 확장된 T 세포를 형질도입하는 것, 확장된 T 세포를 형질감염시키는 것, 또는 확장된 T 세포를 핵산으로 전기천공하는 것을 포함할 수 있으며, 여기서 작용제는 T 세포를 추가로 자극한다. 작용제는 예컨대 추가의 확장, 이펙터 기능 또는 또 다른 T 세포 기능을 자극함으로써 T 세포를 자극할 수 있다.

[0421] H. 제약 조성물 및 제제

[0422] 또한, 본 발명의 면역 세포의 집단, 이러한 세포를 함유하고/거나 이러한 세포에 대해 풍부화된 조성물, 예컨대 CAR을 발현하는 세포가 조성물 내의 총 세포 또는 특정 유형의 세포, 예컨대 T 세포 또는 CD8+ 또는 CD4+ 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 초과를 구성하는 것인 조성물이 제공된다. 조성물 중에는, 예컨대 입양 세포 요법을 위한 투여를 위한 제약 조성물 및 제제가

있다. 또한, 세포 및 조성물을 대상체, 예를 들어 환자에게 투여하는 치료 방법이 제공된다.

[0423] 또한, 제약 조성물 및 제제를 비롯한, 투여를 위한 세포를 포함하는 조성물, 예컨대 주어진 용량 또는 그의 분획으로 투여하기 위한 세포의 수를 포함하는 단위 투여 형태 조성물이 제공된다. 제약 조성물 및 제제는 일반적으로 1종 이상의 임의적인 제약상 허용되는 담체 또는 부형제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 적어도 1종의 추가의 치료제를 포함한다.

[0424] 용어 "제약 제제" 또는 "제약 조성물"은 그 안에 함유된 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적일도록 하는 형태로 존재하고, 제제가 투여될 대상체에게 허용되지 않는 독성인 추가의 성분은 함유하지 않는 제조물을 지칭한다. "제약상 허용되는 담체"는 대상체에게 비독성인, 활성 성분 이외의 제약 제제 내의 성분을 지칭한다. 제약상 허용되는 담체는 완충제, 부형제, 안정화제 또는 보존제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 측면에서, 담체의 선택은 부분적으로 특정한 세포에 의해 및/또는 투여 방법에 의해 결정된다. 따라서, 다양한 적합한 제제가 존재한다. 예를 들어, 제약 조성물은 보존제를 함유할 수 있다. 적합한 보존제는, 예를 들어 메틸파라벤, 프로필파라벤, 벤조산나트륨 및 벤즈알코늄 클로라이드를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 2종 이상의 보존제의 혼합물이 사용된다. 보존제 또는 그의 혼합물은 전형적으로 전체 조성물의 약 0.0001 중량% 내지 약 2 중량%의 양으로 존재한다. 담체는, 예를 들어 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 기재되어 있다. 제약상 허용되는 담체는 일반적으로 사용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 완충제 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기 산; 항산화제, 예컨대 아스코르브산 및 메티오닌; 보존제 (예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드; 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드, 및 다른 탄수화물, 예컨대 글루코스, 만노스, 또는 텍스트린; 킬레이트화제 예컨대 EDTA; 당 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 반대-이온 예컨대 나트륨; 금속 착물 (예를 들어 Zn-단백질 복합체); 및/또는 비-이온성 계면활성제 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0425] 일부 측면에서 완충제가 조성물에 포함된다. 적합한 완충제는, 예를 들어 시트르산, 시트르산나트륨, 인산, 인산칼륨, 및 다양한 다른 산 및 염을 포함한다. 일부 측면에서, 2종 이상의 완충제의 혼합물이 사용된다. 완충제 또는 그의 혼합물은 전형적으로 전체 조성물의 약 0.001 중량% 내지 약 4 중량%의 양으로 존재한다. 투여가 능한 제약 조성물의 제조 방법은 공지되어 있다. 예시적인 방법은, 예를 들어 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005)]에 보다 상세하게 기재되어 있다.

[0426] 제제는 수용액을 포함할 수 있다. 제제 또는 조성물은 또한 세포로 치료될 특정한 적응증, 질환 또는 상태에 유용한 1종 초과 활성 성분, 바람직하게는 세포에 상보적인 활성을 갖는 것을 함유할 수 있으며, 여기서 각각의 활성은 서로 유해한 영향을 미치지 않는다. 이러한 활성 성분은 의도된 목적에 유효한 양으로 조합되어 적합하게 존재한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 다른 제약 활성제 또는 약물, 예컨대 화학요법제, 예를 들어, 아스파라기나제, 부술판, 카르보플라틴, 시스플라틴, 다우노루비신, 독소루비신, 플루오로우라실, 겐티아민, 히드록시우레아, 메토타렉세이트, 파클리탁셀, 리톡시마, 빈블라스틴, 및/또는 빈크리스틴을 추가로 포함한다. 제약 조성물은 일부 실시양태에서 세포를 질환 또는 상태를 치료 또는 예방하는 데 효과적인 양, 예컨대 치료 유효량 또는 예방 유효량으로 함유한다. 일부 실시양태에서 치료 또는 예방 효능은 치료받은 대상체의 주기적 평가에 의해 모니터링된다. 목적하는 투여량은 세포의 단일 볼루스 투여에 의해, 세포의 다중 볼루스 투여에 의해, 또는 세포의 연속 주입 투여에 의해 전달될 수 있다.

[0427] 제제는 경구, 정맥내, 복강내, 피하, 폐, 경피, 근육내, 비강내, 협측, 설하 또는 좌제 투여를 위한 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 집단은 비경구로 투여된다. 본원에 사용된 용어 "비경구"는 정맥내, 근육내, 피하, 직장, 질 및 복강내 투여를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포는 정맥내, 복강내 또는 피하 주사에 의한 말초 전신 전달을 사용하여 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서 조성물은 멸균 액체 제제, 예를 들어 등장성 수용액, 현탁액, 에멀전, 분산액 또는 점성 조성물로서 제공되며, 이는 일부 측면에서 선택된 pH로 완충될 수 있다. 액체 제제는 통상적으로 겔, 다른 점성 조성물 및 고체 조성물보다 제조하기가 더 용이하다. 추가적으로, 액체 조성물은 특히 주사에 의해 투여하기에 더 편리하다. 다른 한편으로는, 점성 조성물은 특정 조직과의 보다 긴 접촉 기간을 제공하도록 적절한 점도 범위 내에서 제제화될 수 있다. 액체 또는 점성 조성물은, 예를 들어 물, 염수, 포스페이트 완충 염수, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체

폴리에틸렌 글리콜) 및 그의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있는 담체를 포함할 수 있다.

- [0428] 멸균 주사가 가능한 용액은 세포를 용매 중에, 예컨대 적합한 담체, 희석제 또는 부형제, 예컨대 멸균수, 생리 염수, 글루코스, 텍스트로스 등과 혼합하여 혼입시킴으로써 제조될 수 있다. 조성물은 투여 경로 및 목적하는 제제에 따라 보조 물질, 예컨대 습윤제, 분산제 또는 유화제 (예를 들어, 메틸셀룰로스), pH 완충제, 겔화제 또는 점도 증진 첨가제, 보존제, 향미제 및/또는 착색제를 함유할 수 있다. 표준 교제는 일부 측면에서 적합한 제제를 제조하기 위해 참고될 수 있다.
- [0429] 향미생물 보존제, 항산화제, 킬레이트화제 및 완충제를 비롯한, 조성물의 안정성 및 멸균성을 증진시키는 다양한 첨가제가 첨가될 수 있다. 미생물 작용의 방지는 다양한 항박테리아제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 및 소르브산에 의해 보장될 수 있다. 주사가 가능한 제약 형태의 지속 흡수는 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 사용에 의해 이루어질 수 있다.
- [0430] 생체내 투여에 사용되는 제제는 일반적으로 멸균된다. 멸균은, 예를 들어 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성될 수 있다.
- [0431] 본원에 언급되거나 인용된 논문, 특허, 및 특허 출원, 및 모든 다른 문헌 및 전자적으로 입수가 가능한 정보의 내용은 각각의 개별 공개 내용이 구체적이고 개별적으로 참조로 포함되는 것으로 표시된 것과 동일한 정도로 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 출원인은 임의의 이러한 논문, 특허, 특허 출원, 또는 다른 물리적 및 전자적 문서로부터의 임의의 및 모든 자료 및 정보를 본 출원에 물리적으로 포함시킬 권리를 갖는다.
- [0432] 본 발명이 그의 구체적 실시양태와 관련하여 기재되었지만, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본 발명의 진정한 취지 및 범주로부터 벗어나지 않으면서 다양한 변화가 이루어질 수 있고 등가물이 치환될 수 있음을 이해하여야 한다. 본원에 기재된 방법의 다른 적합한 변형 및 적합화는 본원에 개시된 실시양태의 범주로부터 벗어나지 않으면서 적합한 등가물을 사용하여 이루어질 수 있다는 것이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 용이하게 명백할 것이다. 또한, 특정한 상황, 물질, 물질의 조성, 공정, 공정 단계 또는 단계들을 본 발명의 목적, 취지 및 범주에 적합화시키기 위해 많은 변형이 이루어질 수 있다. 모든 이러한 변형은 본원에 첨부된 청구범위의 범주 내에 있는 것으로 의도된다. 본 발명에 이르러 특정 실시양태를 상세히 기재하였고, 이는 하기 실시예를 참조하여 보다 명확히 이해될 것이며, 이는 단지 예시의 목적을 위해 포함되고 제한적인 것으로 의도되지 않는다.
- [0433] 실험 실시예
- [0434] 본 발명은 이제 하기 실시예를 참조하여 기재된다. 이들 실시예는 단지 예시의 목적으로 제공되며, 본 발명은 이들 실시예에 제한되지 않고, 오히려 본원에 제공된 교시의 결과로서 명백한 모든 변형을 포괄한다.
- [0435] 물질 및 방법
- [0436] 마우스
- [0437] 마우스를 특정 병원체가 없는 조건 하에 펜실베이니아 대학교 (Upenn)의 AAALAC-인증 동물 시설에 수용하였다. 프로토콜은 Upenn IACUC에 의해 승인되었고, 연구는 윤리적 규정 및 인도적 중점을 준수하였다. 8주령의 수컷 C57BL/6NTac를 타코닉 팜즈(Taconic Farms)로부터 구입하였고, 8-12주령의 수컷 NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl} (NSG) 마우스를 Upenn 줄기 세포 및 이종이식편 코어에 의해 공급받았다.
- [0438] 종양 세포주 및 처리
- [0439] 인간 급성 림프모구성 백혈병 세포주 NALM6 및 췌장 선암종 AsPC1을 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection)으로부터 입수하고, 아리조나 대학교 유전학 코어에 의해 인증받았다. Kras^{LSL.G12D/+} p53^{R172H/+} (KPC) 마우스 췌장 종양 모델로부터 확립된 뮌헨 췌장 PDA7940b 세포주를 그레고리 비티(Gregory Beatty) (Upenn)에 의해 제공받았다.
- [0440] NALM6 종양 세포를 X선에 의해 10,000cGy 방사선조사하였다. 1e7개의 방사선조사된 NALM6 (IR NALM6) 세포를 총 6회 용량으로 4일마다 NSG 마우스에 정맥내로 주사하였다. C57BL/6 마우스에게 100 μL PBS 중 1e6개의 PDA7940b 종양 세포를 등 위에 피하로 주사하였다. NSG 마우스에게 100 μl 1x 매트릭셀 중 1e6개의 AsPC1 종양 세포를 등 위에 피하로 주사하였다. 종양 성장을 매주 모니터링하였다. 종양 부피를 길이 (mm) x 폭 (mm) x 0.5로서 결정하였다. C57BL/6 종양-보유 마우스에게 종양 접종 7일 후에 1e6개의 마우스 CAR-T 세포를 주입하였다. PDA7940b 보유 C57BL/6 마우스를 CAR-T 주입 후 제5일부터 격일로 1e9 pfu Ad-MCV-mCD19t-eGFP로 종양 내로, 및 200 μl PBS 중 200 μg αPD-1 (클론 29F.1A12) 모노클로날 항체로 복강내로 처리하였다. NSG 종양-

보유 마우스에게 종양 접종 21일 후에 3×10^5 또는 1×10^5 개의 CAR-T 세포를 주입하였다. 제-1일로부터 CAR-T 주입 후 4일마다 1×10^7 개의 IR NALM6 세포를 주입하였다.

[0441] 유동 세포측정법

[0442] 단일-세포 현탁액을 간, 종양, 비장으로부터 제조하였다. 세포를 Fc 블록 (항-CD16/32 클론 93, 바이오레전드 (BioLegend), 또는 인간 트루스테인 FcX™)과 함께 인큐베이션하고, 하기 열거된 형광색소-접합된 모노클로날 항체로 염색하였다. FMO를 음성 염색 대조군으로서 사용하여 게이트를 설정하였다. 좀비(Zombie) NIR 고정가능 생존을 키트 및 하기 형광색소-접합된 모노클로날 항체를 바이오레전드로부터는: 1) 인간에 대한 항체: BV605-항-CD45 (2D1), BV421-항-PD1 (EH12.2H7), BV510-항-CD8 (HITa), BV11-항-CD4 (RPA-T4), BV785-항-CD3 (OKT3), PE-Cy7-항-CD27 (M-T271), APC-Cy7-항-CD39 (A1), 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 488-항-CD45RA (HI100), ; 2) 마우스에 대한 항체: 알렉사 플루오르 700-항-CD45 (30-F11), BV421-항-PD1 (29F.1A12, RMP1-30), PE-Cy7-항-CD44 (IM7), BV510-항-CD45.1 (A20), BV711-항-CD4 (RM4-5), BV785-항-CD19 (6D5), BV605-항-CD8a (53-6.7), PerCP/Cy5.5-항-Tim3 (B8.2C12), 알렉사 플루오르 647-항-CD39 (Duha59), FITC-항-CD62L (MEL-14), PE/다즐(Dazzle)™ 594-항-Lag3 (C9B7W)을 구입하고; 써모피셔(ThermoFisher)로부터는: 인간에 대한 항체: PE-이플루오르 610-항-Lag3을 구입하고; BD 바이오사이언시스(BD Biosciences)로부터는: 인간에 대한 항체: 알렉사 플루오르 700-항-CD197 (150503)을 구입하였다. 유동 세포측정 데이터를 LSR 포르테사(Fortessa) 유동 세포측정기 (BD 바이오사이언시스) 상에서 획득하고, 플로우조(FlowJo) 소프트웨어 (트리 스타(Tree Star))를 사용하여 분석하였다.

[0443] 실험 결과를 이하에 기재한다:

[0444] 실시예 1: 이중 CAR 설계 및 발현

[0445] 2개의 이중 CAR 구축물을 도 1a에 제시된 바와 같이 설계하고, 각각 pTRPE 렌티바이러스 벡터 내로 클로닝하였다. "pTRPE-hCD19/28z-M5BBZ" 이중 CAR 구축물은 항-인간 CD19 scFv ("hCD19"), 및 인간 CD28 공동자극 도메인 ("28") 및 인간 CD3 제타 신호전달 도메인 ("z")을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 제1 CAR, 이어서 P2A 링커, 이어서 항-인간 메소텔린 (MSLN) scFv ("M5"), 및 인간 4-1BB 공동자극 도메인 및 인간 CD3 제타 신호전달 도메인 ("BBZ")을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 제2 CAR, 이어서 우드척 간염 바이러스 (WHP) 전사후 조절 요소 (WPPE)를 코딩한다. 따라서, pTRPE-hCD19/28z-M5BBZ 이중 CAR 구축물은 M5BBZ CAR로부터 상류 (즉, 5')에 hCD19/28z CAR을 코딩한다. "pTRPE-M5BBZ-hCD19/28z" 이중 CAR 구축물은 hCD19/28z CAR로부터 상류 (즉, 5')에 M5BBZ CAR을 코딩하고, 2개의 CAR 사이에 P2A 링커 및 hCD19/28z CAR 다음에 WPPE를 갖는다. 둘 다의 이중 CAR 구축물에서, 발현은 구성적 EF1 α 프로모터에 의해 제어된다.

[0446] 본원에 기재된 실험에서 대조군으로서 사용된 단일 CAR을 코딩하는 추가의 구축물은 항-인간 CD19 scFv, 인간 4-1BB 공동자극 도메인 및 인간 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 단일 CAR을 코딩하는 pNVS 렌티바이러스 구축물 ("pNVS-hCD19BBZ"), 및 항-인간 메소텔린 (MSLN) scFv ("M5"), 및 인간 4-1BB 공동자극 도메인 및 인간 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 단일 CAR을 코딩하는 pTRPE 렌티바이러스 구축물 ("pTRPE-M5BBZ")을 포함하였다.

[0447] 2개의 이중 CAR 구축물을 각각 T 세포 내로 형질도입하고, hCD19/28z CAR 및 M5BBZ CAR의 발현을 유동 세포측정법을 통해 평가하였다. 도 1b에 제시된 바와 같이, 어느 하나의 이중 CAR 구축물을 포함하는 T 세포는 둘 다의 CAR을 발현하였지만, pTRPE-hCD19/28z-M5BBZ 이중 CAR 구축물이 pTRPE-M5BBZ-hCD19/28z 이중 CAR 구축물과 비교하여 둘 다의 CAR의 더 높은 발현을 제공하였다.

[0448] pTRPE-hCD19/28z-M5BBZ 이중 CAR 구축물의 뮤린 버전을 또한 설계하여, MSGV 레트로바이러스 벡터 내로 클로닝하였다. 이러한 뮤린 이중 CAR 구축물 ("MSGV-항-moCD19-MuCD28z-항-moMeso-A03-3-MuBBz")은 항-뮤린 CD19 scFv, 및 뮤린 CD28 공동자극 도메인 및 뮤린 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 제1 CAR, 및 항-뮤린 메소텔린 scFv ("A03"), 뮤린 4-1BB 공동자극 도메인, 및 뮤린 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 제2 CAR을 코딩한다. 대조군 뮤린 CAR 구축물은 항-뮤린 CD19 scFv, 뮤린 4-1BB 공동자극 도메인, 및 뮤린 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 단일 CAR을 코딩하는 "MSGV-항-moCD19-MuBBz", 및 항-뮤린 메소텔린 scFv ("A03"), 뮤린 4-1BB 공동자극 도메인, 및 뮤린 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 단일 CAR을 코딩하는 "MSGV-항-moMeso-A03-3-MuBBz"를 포함한다.

[0449] 실시예 2: 시험관내 이중 CAR T 세포 확장

[0450] T 세포를 어느 하나의 이중 CAR 구축물 (pTRPE-hCD19/28z-M5BBZ 또는 pTRPE-M5BBZ-hCD19/28z), 또는 대조군으

로서 pNVS-hCD19BBZ 또는 pTRPE-M5BBZ 단일 CAR 구축물로 형질도입하였다. T 세포를 방사선조사된 Nalm6 인간 종양 세포주의 존재 및 부재 하에 4일 동안 시험관내 공동-배양하였다. 인간 CD19를 발현하는 방사선조사된 Nalm6은 내인성 CD19+ B 세포를 모의한다. 둘 다의 이중 CAR 구축물 및 pNVS-hCD19BBZ는 방사선조사된 NALM6 세포로 "부스팅"된 경우에 CAR T 세포의 증가된 세포 수를 나타내었다 (도 2a). 그러나, pTRPE-hCD19/28z-P2A-M5BBZ 이중 CAR은 이러한 CD19 항원 부스팅의 부재 하에 덜 긴장성 신호전달 (즉, 덜 리간드-비의존적인 구성적 신호전달)을 보여주었다. 예상된 바와 같이, pTRPE-M5BBz CAR T 세포의 수는 NALM6 세포와의 공동-배양 시 부스팅되지 않았다 (도 2a).

[0451] CAR T 세포 확장을 추가로 평가하기 위해, 형질도입된 CAR T 세포를 셀 트래이스 바이올렛 (CTV)으로 표지하고, 방사선조사된 Nalm6과 4일 동안 공동-배양하였다. CD8+ 및 CD4+ T 세포를 분열 피크에 의해 증식에 대해 분석하였다. CFSE 염색은 pNVS-hCD19BBZ 단일 CAR 구축물, pTRPE-M5BBZ-hCD19/28z 이중 CAR 구축물, 또는 pTRPE-hCD19/28z-M5BBZ 이중 CAR 구축물로 형질도입된 CD4+ 및 CD8+ T 세포에 대해 유사한 CAR T 확장을 예시하였지만, pTRPE-M5BBz CAR T 세포에 대해서는 그렇지 않았다 (도 2b).

[0452] 실시예 3: CD19 항원으로서의 이중 CAR T 세포의 부스팅은 시험관내 종양 세포 사멸을 가속화시킨다

[0453] 시험관내 메소텔린-양성 AsPC-1 종양 세포의 CAR T 세포 사멸을 엑스셀리젠스(xCelligence) 임피던스 검정을 사용하여 측정하였다. 세포를 방사선조사된 CD19+ NALM6 종양 세포 (내인성 CD19+ B 세포를 모의함)와의 공동-배양 전 및 후에 0.1:1 이펙터 대 표적 비 (E:T 비)로 시딩하였다. CD19+ 방사선조사된 NALM6 종양 세포로 부스팅하기 전에, 어느 하나의 이중 CAR 구축물 또는 pTRPE-M5BBZ 단일 CAR 구축물로 형질도입된 T 세포는 시험관내에서 AsPC1-GFP 세포를 동등하게 잘 사멸시켰다 (도 3a). 놀랍게도, 방사선조사된 CD19+ NALM6 종양 세포와의 공동-배양 후에, 어느 하나의 이중 CAR 구축물로 형질도입된 T 세포는 증진되고 가속화된 종양 세포 사멸을 나타내었다 (도 3b). 흥미롭게도, pTRPE-hCD19/28z-M5BBZ 이중 CAR-T 세포는 CD19+ 방사선조사된 NALM6 세포와의 공동-배양 후에 pTRPE-M5BBZ-hCD19/28z 이중 CAR T 세포와 비교하여 뛰어난 (즉, 가속화된) 종양 세포 사멸을 보여주었다 (도 3b).

[0454] 실시예 4: 이중 CAR T 세포는 시험관내에서 보다 낮은 온-타겟 오프-종양 세포독성을 나타낸다

[0455] 이중 CAR 구축물로 형질도입된 T 세포의 폐 조직에서의 잠재적인 온-타겟 오프-종양 독성을 평가하기 위한 모델로서 엑스셀리젠스 임피던스 검정을 사용하여 시험관내 메소텔린-양성 A549 세포의 CAR T 세포 사멸을 측정하였다. A549 세포에 대한 CAR T 세포의 세포독성을 E:T = 0.1:1에서 시간 경과에 따른 A549-GFP 세포의 사멸 백분율에 의해 측정하였다. pTRPE-hCD19/28z-M5BBZ 이중 CAR 구축물로 형질도입된 T 세포는 pTRPE-M5BBZ-hCD19/28z 이중 CAR 또는 pTRPE-M5BBZ 단일 CAR 구축물로 형질도입된 T 세포와 비교하여 A549 세포의 감소된 세포독성을 보여주었다 (도 4a 및 도 4b).

[0456] 놀랍게도, 이중 CART 세포와 CD19+ 방사선조사된 Nalm6 세포 (내인성 CD19+ B 세포를 모의함)의 공동-배양은 방사선조사된 Nalm6과 공동-배양되지 않은 T 세포와 비교하여 어느 하나의 이중 CAR 구축물로 형질도입된 T 세포의 A549 세포 세포독성을 감소시켰다 (도 4c). 그러나, pTRPE-hCD19/28z-M5BBZ 이중 CAR 구축물로 형질도입된 T 세포는 pTRPE-M5BBZ-hCD19/28z 이중 CAR 구축물로 형질도입된 T 세포와 비교하여 방사선조사된 NALM6 세포와의 공동배양 후에 A549 세포의 세포독성에서 더 큰 감소를 나타내었다 (도 4c). pTRPE-hCD19/28z-M5BBZ 이중 CAR 구축물로 형질도입된 T 세포의 치료 지수 증가는, 이들 세포에 대한 M5BBZ CAR 염색의 보다 낮은 MFI에 의해 표시되는 바와 같이, 이들 T 세포가 pTRPE-M5BBZ-hCD19/28z 이중 CAR 구축물로 형질도입된 T 세포와 비교하여 보다 낮은 수준의 M5BBZ CAR을 발현하기 때문일 수 있다 (도 4d).

[0457] 실시예 5: CD19 항원으로서의 이중 CAR T 세포의 부스팅은 무종양 NSG 마우스에서 CAR T 확장을 자극한다

[0458] 무종양 NSG 마우스에서 이중 CAR 구축물로 형질도입된 T 세포의 확장을 평가하기 위해, 마우스에게 제-1일에 먼저 10^7 개의 방사선조사된 Nalm6 세포 (내인성 CD19+ B 세포를 모의함)를 투여한 후, 제0일에 10^5 개의 CAR T 세포를 투여하였다 (도 5a). 방사선조사된 Nalm6의 투여를 제3일, 제7일, 제11일, 제15일 및 제19일에 반복하고, 마우스를 제3일, 제11일 및 제19일에 채혈하고, 세포를 제20일에 수거하였다 (도 5a). CAR T 세포 확장을 제3일, 제11일 및 제19일에 수집한 혈액 샘플에서 평가하였다. pTRPE-hCD19/28z-M5BBZ 이중 CAR 구축물 또는 pTRPE-M5BBZ-hCD19/28z 이중 CAR 구축물로 형질도입된 T 세포는 생체내 확장되었고, 여기서 pTRPE-hCD19/28z-M5BBZ 이중 CAR 구축물은 pTRPE-M5BBZ-hCD19/28z 이중 CAR 구축물과 비교하여 T 세포에 뛰어난 증식 능력을 부여하였다 (도 5b). 대조적으로, pTRPE-M5BBZ로 형질도입된 T 세포는 확장되지 않았으며 (도 5c), 이는 자극-촉발된 확장 (즉, "부스팅")이 CD19 항원 구동된다는 것을 예시한다.

- [0459] 다음으로, 혈액과 비교하여 비장 및 간에서 CAR T 세포 확장을 평가하였고, 이는 pTRPE-hCD19/28z-M5BBZ 이중 CAR 구축물이 pTRPE-M5BBZ 단일 CAR 구축물로 형질도입된 T 세포와 비교하여 T 세포 확장을 유의하게 증진시켰음을 보여주었다 (도 5d). 추가적으로, pTRPE-M5BBZ 단일 CAR 구축물과 비교하여 pTRPE-hCD19/28z-M5BBZ 이중 CAR 구축물로 형질도입된 T 세포에 대해 혈청 내 세포독성 시토카인 (인터페론 생산 조절제 (IFN γ), 퍼포린, 그랜자임 A, 및 그레놀리신)의 분비의 유의한 증가가 검출되었다 (도 5e). 간은, 아마도 CAR T 확장을 부스팅하기 위한 방사선조사된 NALM6 종양 세포주의 사용으로 인해, 이러한 마우스 모델에서 대부분의 확장된 CAR T 세포가 축적되는 기관이다. 이러한 발견을 기초로, 인간 환자에서 이전에 항-CD19 CAR T 세포 요법에서 관찰된 바와 같이, 인간 환자에서 이중 CAR T 세포 수가 환자 자신의 CD19+ B 세포에 의해 부스팅될 것이고, 따라서 혈액에서 확장되어 B-세포 무형성증을 유도할 것으로 예상된다.
- [0460] 제20일에 수거한 세포의 표현형을 또한 평가하였다 (도 5f). 중요하게는, pTRPE-hCD19/28z-M5BBZ로 형질도입된 T 세포의 CD19+ 방사선조사된 Nalm6에 의한 연속 자극은 소진되고 말단 분화된 표현형을 생성하지 않았다. 대부분의 pTRPE-hCD19/28z-M5BBZ CAR T 세포는 여전히 이펙터 기억 세포 표현형을 유지하였고, 이는 pTRPE-M5BBZ 단일 CAR 구축물로 형질도입된 T 세포와 유사하다. 추가로, pTRPE-hCD19/28z-M5BBZ 이중 CAR 구축물로 형질도입된 대부분의 T 세포는 단지 1 또는 2종의 소진 마커 (PD-1 및/또는 CD39, Tim3 또는 Lag3은 아님)만을 발현한다. 따라서, 관찰된 T 세포 확장은 활성화로 간주될 수 있지만, 소진으로 간주되지는 않는다.
- [0461] 실시예 6: 이중 CAR T 세포는 생체내 종양 세포 사멸을 증진시킨다
- [0462] 이중 CAR 구축물로 형질도입된 T 세포의 생체내 종양 세포독성을 평가하기 위해, NSG 마우스에게 먼저 10^6 개의 AsPC1 췌장 종양 세포를 투여하여 AsPC1 종양 마우스 모델을 생성한 후, 제0일에 3×10^5 개의 CAR T 세포를 투여하였다 (도 6a). T 세포 주사 후 43일 동안 주기적으로 종양 크기를 평가하였다 (도 6b 및 도 6c). 방사선조사된 Nalm6을 마우스에 투여하지 않은 경우에도, pTRPE-hCD19/28z-M5BBZ 이중 CAR 구축물로 형질도입된 T 세포는 pTRPE-M5BBZ 단일 CAR 구축물로 형질도입된 T 세포와 비교하여 유의하게 증진된 생체내 췌장 종양 사멸을 나타내었다 (도 6b). 방사선조사된 Nalm6 (내인성 CD19+ B 세포를 모의함)의 투여는 pTRPE-hCD19/28z-M5BBZ 이중 CAR로 형질도입된 T 세포가 생체내 췌장 종양 세포를 사멸시키는 능력을 추가로 증진시키고 가속화하였다 (도 6c). AsPC1 종양 마우스 모델에서 pTRPE-M5BBZ 단일 CAR 구축물로 형질도입된 T 세포와 비교하여 pTRPE-hCD19/28z-M5BBZ 이중 CAR 구축물로 형질도입된 T 세포의 증진된 항종양 효과는, pTRPE-hCD19/28z-M5BBZ 이중 CAR 구축물로 형질도입된 T 세포의 경우 종양 내의 보다 높은 CAR T 세포 수 및 CAR T 세포의 CD4+ T 세포로의 변경과 상관관계가 있다 (도 6d). 이들 데이터는 CD19 항원이 pTRPE-hCD19/28z-M5BBZ 이중 CAR T 세포를 부스팅하고 이들 세포의 항종양 효과를 촉진한다는 것을 입증한다.
- [0463] 실시예 7: 무린 이중 CAR T 세포는 인간 이중 CAR T 세포와 유사하다
- [0464] 시험관내 메소텔린-양성 PDA7940bWT 세포주의 CAR T 세포 사멸을 엑스셀리젠스 임피던스 검정을 사용하여 측정하였다. 무린 T 세포를 무린 이중 CAR 구축물 (MSGV-항-moCD19-MuCD28z-항-moMeso-A03-3-MuBBz) 또는 대조군으로서 무린 항-CD19 단일 CAR 구축물 또는 무린 항-MSLN 단일 CAR 구축물로 형질도입하였다. 무린 이중 CAR 구축물로 형질도입된 T 세포는 항-MSLN 단일 CAR 구축물로 형질도입된 T 세포와 비교하여 MSLN+ PDA7940bWT 세포의 증진된 사멸을 보여주었다 (도 7a).
- [0465] 다음으로, 무린 이중 CAR T 세포를 무종양 동계 마우스 모델에서 평가하였다. 무린 이중 CAR 구축물로 형질도입된 무린 T 세포는 림프구고갈의 부재 하에, CD19 양성 B 세포가 고갈된 무종양 동계 마우스에서 생착/확장될 수 있었지만, 단일 무린 CAR 구축물의 경우에는 그렇지 않았다 (도 7b). 확장된 이중 CAR T 세포는 간과 비교하여 주로 비장 내에 존재하였다 (도 7c). 제7일에 수거한 혈액 (도 7d) 또는 비장 (도 7e) 내의 T 세포의 표현형을 분석하였고, 이는 서로 유사하였다. 내인성 CD19+ B 세포에 의한 이중 CAR T 세포의 연속 자극은 소진되고 말단 분화된 표현형을 생성하지 않았다. 무린 이중 CAR-T 세포의 약 40-50%는 표현형상 중심 기억 세포였고, 이는 2가지의 무린 단일 CAR-T 세포 둘 다와 유사하였다. 동계 모델에서 전체 CAR T 세포는 방사선조사된 Nalm6의 존재 하의 NSG 모델에서의 CAR T 세포보다 더 많은 중심 기억 세포를 가졌다. 추가적으로, 대부분의 이중 CAR T 세포는 단지 1 또는 2종의 소진 마커 (PD-1 및/또는 CD39, Tim3 또는 Lag3은 아님)만을 발현한다. 따라서, T 세포 확장은 활성화로 간주될 수 있지만, 소진으로 간주되지는 않는다.
- [0466] 실시예 8: CD19 항원의 아데노바이러스 전달은 이중 CAR T 세포 종양 침윤을 증진시킨다
- [0467] CAR T 세포 트래킹 및 종양 침윤을 증가시키기 위해, eGFP에 융합된 말단절단된 CD19 항원을 코딩하는 복제-결핍 E1/E3-결실된 아데노바이러스 벡터 (즉, Ad-CMV-mCD19t-P2A-eGFP)를 C57BL/6 동계 마우스에게 이중 CAR T

세포의 투여 후 종양내로 (IT) 투여하였다 (도 8). 간략하게, C57BL/6 동계 마우스에게 제-7일에 PDA (췌장) 종양을 이식하였다. 제0일에, 1e6개의 CD45.1+ CAR T 세포 (MSGV-항-moCD19-MuCD28z-항-moMeso-A03-3-MuBBz 이중 CAR 구축물 ("19/28z-A03") 또는 MSGV-항-moMeso-A03-3-MuBBz 단일 CAR 구축물 ("A03")로 형질도입됨)를 마우스 내로 주입하였다. 마우스는 제5일부터 제11일까지 격일로 1e9 pfu Ad-CMV-mCD19t-P2A-eGFP를 제공받았다. 음성 대조군은 단일 항-뮤린 메소텔린 (A03) CAR로 형질도입된 CAR T 세포를 제공받은 마우스, 널 아데노바이러스 벡터를 제공받은 마우스, 어떠한 아데노바이러스 벡터도 제공받지 않은 마우스, 및 그의 조합을 포함하였다. CAR-T 주입 후 제11일에, 종양을 제거하고, 유동 세포측정법에 의해 CD45.1+ 발현에 대해 특징화하였다 (도 9 및 도 10). 종양 내로의 CAR T 세포 침윤의 유의한 증가가 CD19 항원을 코딩하는 아데노바이러스 벡터를 제공받은 마우스에서는 관찰되었지만 (도 9), 대조군 마우스에서는 그렇지 않았다 (도 9 및 도 10). 아데노바이러스-발현된 CD19 항원의 투여는 아마도 2가지 메카니즘: 종양 염증의 유도 및 CD19 항원의 공급에 의해 TIL 침윤을 증가시켰을 것이다. 실제로, Ad 단독 (Ad-널)의 투여는 동일한 효과를 달성하기에 충분하지 않았다 (도 10). Ad-CMV-mCD19t-P2A-eGFP의 IT 주사가 CAR-T 침윤을 유의하게 증가시켰지만, CAR T 세포는 종양 제어를 나타내지 않았고, 증가된 수준의 PD-1을 발현하였다 (도 11). 동계 PDA 모델에서 재현된 면역-억제 종양 미세환경 (TME)은 고품질 암에서 효과적인 CAR T 세포 요법에 대한 공인된 장벽이다. 따라서, 치료 요법을 이어서 항-PD1 체크포인트 차단과 조합하였다. CD19 항원 (Ad-CMV-mCD19t-P2A-eGFP로서)과 함께 항-PD1 항체의 투여는 단일 A03 CAR만을 발현하는 CAR T 세포를 제공받은 마우스와 비교하여 이중 CAR T 세포를 제공받은 마우스에 대해 종양 크기의 감소 및 종양 TIL 침윤의 증가를 발생시켰다 (도 12 및 도 13a). 예상된 바와 같이, 항-PD1 항체는 이중 CAR T 세포 및 CD19 항원을 제공받은 마우스에서 PD-1-발현의 백분율 및 MFI를 감소시켰다 (도 13b).

[0468] 다음으로, "핫" PDA 종양 생착 7일 후에 마우스에게 mCAR T 세포를 주사하고, 말단절단된 CD19를 코딩하는 아데노바이러스로 간헐적으로 처리하였다 (도 14a). 이중 mCAR T 세포는 종양간 말단절단된 CD19 아데노바이러스 처리의 존재 및 부재 하에 단일 CAR T 세포와 비교하여 면역학적 "핫" 췌장관 선암종 (PDA), 2838c3에 대해 증진된 종양 부담 제어 (도 14b) 및 전체 생존 (도 14c-14d)을 입증한다.

[0469] "콜드" PDA 종양 켈린지 후의 비장의 컴퓨터 분석은 비장에서의 부스팅을 밝혀내었다 (도 15a-15b). 상기 기재되고 도 14a에 제시된 동일한 실험 레이아웃을 "콜드" 종양 PDA 모델로 개조하여, 비장으로부터의 CD45.1+ CAR T 세포를 CAR T 주입 6일 후에 벌크 RNA-seq를 통해 특징화하였다. 데이터를 정규화하고, DESeq2를 사용하여 분석하고, 상위 차등 발현된 유전자를 플롯팅하였다 (도 15a). fGSEA 패키지를 이용하여 유전자 세트 풍부화 분석을 실행하였다 (도 15b). 관찰된 전사 변화는 이중 표적화된 CAR T 세포 코호트에서 비장 내 T 세포의 증가된 활성화 및 B 세포 무형성증, 예컨대 B 세포 유전자, 및 CD4+ T 세포 및 GC B 세포 상호작용과 연관된 유전자의 하향조절과 일치하였다. 이중 CAR T 세포는 또한 T 세포 활성화와 연관된 유전자, 예컨대 CD28, Tigit 및 PD1의 상향조절에 의해 입증된 바와 같이 높은 활성화 점수를 입증한다 (도 15a). 이는 또한 소진 서명의 상향조절 없이, 증식, 대사, 활성화 및 IFN γ 신호전달과 연관된 경로의 상향조절에 의해 보완된다 (도 15b).

[0470] 열거된 실시양태

[0471] 하기 열거된 실시양태가 제공되며, 그의 넘버링은 중요성의 수준을 나타내는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0472] 실시양태 1은 하기를 포함하는 단리된 핵산을 제공한다:

- [0473] a. (i) CD19에 대해 친화도를 갖는 제1 세포외 항원 결합 도메인,
- [0474] (ii) 제1 막횡단 도메인, 및
- [0475] (iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인
- [0476] 을 포함하는 제1 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 제1 뉴클레오타이드 서열; 및
- [0477] b. (i) CD19가 아닌 종양 항원에 대해 친화도를 갖는 제2 세포외 항원 결합 도메인,
- [0478] (ii) 제2 막횡단 도메인, 및
- [0479] (iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인
- [0480] 을 포함하는 제2 CAR을 코딩하는 제2 뉴클레오타이드 서열.

[0481] 실시양태 2는 제1 뉴클레오타이드 서열이 제2 뉴클레오타이드 서열의 5'에 위치하거나, 또는 제1 뉴클레오타이드 서열이 제2 뉴클레오타이드 서열의 3'에 위치하는 것인, 실시양태 1의 단리된 핵산을 제공한다.

- [0482] 실시양태 3은 제1 뉴클레오타이드 서열과 제2 뉴클레오타이드 서열 사이에 위치한 링커 뉴클레오타이드 서열을 추가로 포함하며, 여기서 링커 뉴클레오타이드 서열은 P2A, T2A, E2A 및 F2A로 이루어진 군으로부터 선택된 리보솜 슬립 서열을 포함하는 것인, 실시양태 1 또는 실시양태 2의 단리된 핵산을 제공한다.
- [0483] 실시양태 4는 제1 뉴클레오타이드 서열 및/또는 제2 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 추가로 포함하는, 상기 실시양태 중 어느 하나의 단리된 핵산을 제공한다.
- [0484] 실시양태 5는 프로모터가 EF1 α 프로모터인, 실시양태 4의 단리된 핵산을 제공한다.
- [0485] 실시양태 6은 전사후 조절 요소를 추가로 포함하는, 상기 실시양태 중 어느 하나의 단리된 핵산을 제공한다.
- [0486] 실시양태 7은 전사후 조절 요소가 우드척 간염 바이러스 (WHV) 전사후 조절 요소 (WPRE)인, 실시양태 6의 단리된 핵산을 제공한다.
- [0487] 실시양태 8은 종양 항원이 알파 태아-단백질 (AFP)/HLA-A2, AXL, B7-H3, BCMA, CA-1X, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD20, CD22, CD30, CD33, CD38, CD44v6, CD70, CD79a, CD79b, CD80, CD86, CD117, CD123, CD133, CD147, CD171, CD276, CEA, 클라우딘 18.2, c-Met, DLL3, DR5, 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), EGFRvIII, EpCAM, EphA2, 섬유모세포 활성화 단백질 (FAP), 플레이트 수용체 알파 (FR α)/플레이트 결합 단백질 (FBP), GD-2, 당지질 F77, 글리피칸 2 (GPC2), 글리피칸-3 (GPC3), 글리코실-포스파티딜이노시톨 (GPI)-연결된 GDNF 패밀리에 a-수용체 4 (GFR α 4; GFR알파4), HER2, HLA-A2, ICAM1, 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 (IL3R α 1), 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 1 (IL13R α 1), 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 2 (IL13R α 2), LAGE-1, 루이스 Y, LMP1 (EBV), MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, 멜란 A, 메소텔린, MG7 (글리코실화 CEA), MMP, MUC1, 넵틴4/FAP, NKG2D-리간드 (MIC-A, MIC-B, 및 ULBP 1 내지 6), 뉴욕 식도 편평 세포 암종-1 (NY-ESO-1), P16, PD-L1, 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA), 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), ROR1, ROR2, TIM-3, TM4SF1, MUC1의 Tn-당 형태 (TnMUC1), VEGFR2, 및 그의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 상기 실시양태 중 어느 하나의 단리된 핵산을 제공한다.
- [0488] 실시양태 9는 종양 항원이 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), MUC1, MUC1의 Tn-당형태 (TnMUC1), 글리코실-포스파티딜이노시톨 (GPI)-연결된 GDNF 패밀리에 a-수용체 4 (GFR α 4; GFR알파4), 플레이트 수용체 알파 (FR α), 메소텔린, 뉴욕 식도 편평 세포 암종-1 (NY-ESO-1), 글리피칸 2 (GPC2), 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA), 섬유모세포 활성화 단백질 (FAP), 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 1 (IL13R α 1), 및 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 2 (IL13R α 2)로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 상기 실시양태 중 어느 하나의 단리된 핵산을 제공한다.
- [0489] 실시양태 10은 제1 세포외 항원 결합 도메인 및 제2 세포외 항원 결합 도메인이 각각 독립적으로 단일쇄 가변 단편 (scFv) 및 Fab로부터 선택된 것인, 상기 실시양태 중 어느 하나의 단리된 핵산을 제공한다.
- [0490] 실시양태 11은 제1 또는 제2 세포내 도메인의 적어도 1개의 공동자극 도메인이 4-1BB, CD2, CD28, 및 ICOS로부터 독립적으로 선택된 단백질의 공동자극 도메인을 포함하는 것인, 상기 실시양태 중 어느 하나의 단리된 핵산을 제공한다.
- [0491] 실시양태 12는 신호전달 도메인이 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 것인, 상기 실시양태 중 어느 하나의 단리된 핵산을 제공한다.
- [0492] 실시양태 13은 제1 및/또는 제2 막횡단 도메인이 CD8, CD28, 및 4-1BB로부터 독립적으로 선택된 단백질의 막횡단 도메인을 포함하는 것인, 상기 실시양태 중 어느 하나의 단리된 핵산을 제공한다.
- [0493] 실시양태 14는 제1 및/또는 제2 CAR이 힌지 도메인을 추가로 포함하는 것인, 상기 실시양태 중 어느 하나의 단리된 핵산을 제공한다.
- [0494] 실시양태 15는 힌지 도메인이 CD8 힌지 도메인을 포함하는 것인, 실시양태 14의 단리된 핵산을 제공한다.
- [0495] 실시양태 16은
- [0496] a. 제1 CAR이
- [0497] (i) 항-CD19 scFv를 포함하는 제1 세포외 항원 결합 도메인,
- [0498] (ii) 제1 막횡단 도메인, 및

- [0499] (iii) CD28 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인을 포함하고;
- [0500] b. 제2 CAR이
- [0501] (i) 항종양 항원 scFv를 포함하는 제2 세포외 항원 결합 도메인 (여기서 종양 항원은 CD19가 아님),
- [0502] (ii) 제2 막횡단 도메인, 및
- [0503] (iii) 4-1BB 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인을 포함하는 것인
- [0504] 상기 실시양태 중 어느 하나의 단리된 핵산을 제공한다.
- [0505] 실시양태 17은
- [0506] a. 제1 CAR이
- [0507] (i) CD8 리더 서열;
- [0508] (ii) 항-CD19 scFv를 포함하는 제1 세포외 항원 결합 도메인,
- [0509] (iii) CD8 힌지;
- [0510] (iv) CD28 막횡단 도메인, 및
- [0511] (v) CD28 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인으로 본질적으로 이루어 지고;
- [0512] b. 제2 CAR이
- [0513] (i) CD8 리더 서열;
- [0514] (ii) 항-메소텔린 scFv를 포함하는 제2 세포외 항원 결합 도메인,
- [0515] (iii) CD8 힌지;
- [0516] (iv) CD8 막횡단 도메인, 및
- [0517] (v) 4-1BB 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인으로 본질적으로 이루어 진 것인
- [0518] 상기 실시양태 중 어느 하나의 단리된 핵산을 제공한다.
- [0519] 실시양태 18은 스위치 수용체를 코딩하는 제3 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하며, 여기서 스위치 수용체는 제1 수용체의 세포외 도메인 및 제2 수용체의 세포내 도메인을 포함하고, 여기서 제1 수용체 및 제2 수용체는 각각 TGF β R 및 IL12R, TGF β R 및 CD28, TGF β R 및 OX40, TGF β R 및 CD27, TGF β R 및 4-1BB, TGF β R 및 IL-2R, TGF β R 및 IL-9R, PD1 및 IL12R, PD1 및 CD28, PD1 및 ICOS, PD1 및 CD27, PD1 및 4-1BB, PD1 및 IL-2R, PD1 및 IL-9R, BTLA 및 CD28, BTLA 및 ICOS, BTLA 및 CD27, CTLA4 및 CD28, TIM3 및 IL12R, TIM3 및 CD28, TIM3 및 CD28, TIM3 및 OX40, TIM3 및 4-1BB, TIM3 및 IL-2R, TIM3 및 IL-9R, VSIG3 및 CD28, VSIG3-IL12R β 2, VSIG3 및 CD27, VSIG3 및 4-1BB, VSIG3 및 ICOS, VSIG3-IL12R β 1, VSIG8-IL12R β 1, VSIG8 및 CD28, VSIG8-IL12R β 2, VSIG8 및 CD27, VSIG8 및 4-1BB, VSIG8-ICOS, IFN γ 및 CD28, IFN γ 및 OX40, IFN γ 및 IL2R, 및 IFN γ 및 IL12R로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 상기 실시양태 중 어느 하나의 단리된 핵산을 제공한다.
- [0520] 실시양태 19는 음성 수용체를 코딩하는 제4 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하며, 여기서 음성 수용체는 dnTGF β R인, 상기 실시양태 중 어느 하나의 단리된 핵산을 제공한다.
- [0521] 실시양태 20은 상기 실시양태 중 어느 하나의 단리된 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0522] 실시양태 21은 벡터가 렌티바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터인, 실시양태 26의 벡터를 제공한다.
- [0523] 실시양태 22는 실시양태 1-19 중 어느 하나의 단리된 핵산 또는 실시양태 20-21 중 어느 하나의 벡터를 포함하 는 변형된 세포를 제공한다.
- [0524] 실시양태 23은 세포가 박테리아 세포, 진균 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 동물 세포, 포유동물 세포 및 인간 세 포로부터 선택된 것인, 실시양태 22의 변형된 세포를 제공한다.
- [0525] 실시양태 24는 세포가 포유동물 세포 또는 인간 세포이고, 추가로 세포가 면역 세포 또는 그의 전구체 세포인,

실시양태 23의 변형된 세포를 제공한다.

[0526] 실시양태 25는 면역 세포가 T 세포인, 실시양태 24의 변형된 세포를 제공한다.

[0527] 실시양태 26은 변형된 세포를 제공하며, 여기서 세포는 면역 세포 또는 그의 전구체 세포이고, 세포는 하기를 발현하도록 조작된다:

[0528] a. (i) CD19에 대해 친화도를 갖는 제1 세포의 항원 결합 도메인,

[0529] (ii) 제1 막횡단 도메인, 및

[0530] (iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인

[0531] 을 포함하는 제1 키메라 항원 수용체 (CAR); 및

[0532] b. (i) CD19가 아닌 종양 항원에 대해 친화도를 갖는 제2 세포의 항원 결합 도메인,

[0533] (ii) 제2 막횡단 도메인, 및

[0534] (iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인

[0535] 을 포함하는 제2 CAR.

[0536] 실시양태 27은 종양 항원이 알파 태아-단백질 (AFP)/HLA-A2, AXL, B7-H3, BCMA, CA-1X, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD20, CD22, CD30, CD33, CD38, CD44v6, CD70, CD79a, CD79b, CD80, CD86, CD117, CD123, CD133, CD147, CD171, CD276, CEA, 클라우딘 18.2, c-Met, DLL3, DR5, 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), EGFRvIII, EpCAM, EphA2, 섬유모세포 활성화 단백질 (FAP), 플레이트 수용체 알파 (FRa)/플레이트 결합 단백질 (FBP), GD-2, 당지질 F77, 글리피칸 2 (GPC2), 글리피칸-3 (GPC3), HER2, HLA-A2, ICAM1, 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 (IL3R α), 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 1 (IL13R α 1), 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 2 (IL13R α 2), LAGE-1, 루이스 Y, LMP1 (EBV), MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, 멜란 A, 메소텔린, MG7 (글리코실화 CEA), MMP, MUC1, 넥틴4/FAP, NKG2D-리간드 (MIC-A, MIC-B, 및 ULBP 1 내지 6), 뉴욕 식도 편평 세포 암종-1 (NY-ESO-1), P16, PD-L1, 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA), 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), ROR1, ROR2, TIM-3, TM4SF1, MUC1의 Tn-당형태 (TnMUC1), 글리코실-포스파티딜이노시톨 (GPI)-연결된 GDNF 패밀리 α -수용체 4 (GFR α 4; GFR알파4), VEGFR2, 및 그의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 실시양태 26의 변형된 세포를 제공한다.

[0537] 실시양태 28은 종양 항원이 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), MUC1, MUC1의 Tn-당형태 (TnMUC1), 플레이트 수용체 알파 (FR α), 메소텔린, 뉴욕 식도 편평 세포 암종-1 (NY-ESO-1), 글리피칸 2 (GPC2), 글리코실-포스파티딜이노시톨 (GPI)-연결된 GDNF 패밀리 α -수용체 4 (GFR α 4; GFR알파4), 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA), 섬유모세포 활성화 단백질 (FAP), 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), 및 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 2 (IL13R α 2)로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 실시양태 26 또는 실시양태 27의 변형된 세포를 제공한다.

[0538] 실시양태 29는 제1 세포의 항원 결합 도메인 및 제2 세포의 항원 결합 도메인이 각각 독립적으로 단일쇄 가변 단편 (scFv) 및 Fab로부터 선택된 것인, 상기 실시양태 중 어느 하나의 변형된 세포를 제공한다.

[0539] 실시양태 30은 제1 또는 제2 세포내 도메인의 적어도 1개의 공동자극 도메인이 4-1BB, CD2, CD28, 및 ICOS로부터 독립적으로 선택된 단백질의 공동자극 도메인을 포함하는 것인, 상기 실시양태 중 어느 하나의 변형된 세포를 제공한다.

[0540] 실시양태 31은 신호전달 도메인이 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 것인, 상기 실시양태 중 어느 하나의 변형된 세포를 제공한다.

[0541] 실시양태 32는 제1 및/또는 제2 막횡단 도메인이 CD8, CD28, 및 4-1BB로부터 독립적으로 선택된 단백질의 막횡단 도메인을 포함하는 것인, 상기 실시양태 중 어느 하나의 변형된 세포를 제공한다.

[0542] 실시양태 33은 제1 및/또는 제2 CAR이 힌지 도메인을 추가로 포함하는 것인, 상기 실시양태 중 어느 하나의 변형된 세포를 제공한다.

[0543] 실시양태 34는 힌지 도메인이 CD8 힌지 도메인을 포함하는 것인, 실시양태 33의 변형된 세포를 제공한다.

[0544] 실시양태 35는

- [0545] a. 제1 CAR이
- [0546] (i) 항-CD19 scFv를 포함하는 제1 세포외 항원 결합 도메인,
- [0547] (ii) 제1 막횡단 도메인, 및
- [0548] (iii) CD28 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인을 포함하고;
- [0549] b. 제2 CAR이
- [0550] (i) 항종양 항원 scFv를 포함하는 제2 세포외 항원 결합 도메인 (여기서 종양 항원은 CD19가 아님),
- [0551] (ii) 제2 막횡단 도메인, 및
- [0552] (iii) 4-1BB 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인을 포함하는 것인
- [0553] 상기 실시양태 중 어느 하나의 변형된 세포를 제공한다.
- [0554] 실시양태 36은
- [0555] a. 제1 CAR이
- [0556] (i) CD8 리더 서열;
- [0557] (ii) 항-CD19 scFv를 포함하는 제1 세포외 항원 결합 도메인,
- [0558] (iii) CD8 힌지;
- [0559] (iv) CD28 막횡단 도메인, 및
- [0560] (v) CD28 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인으로 본질적으로 이루어 지고;
- [0561] b. 제2 CAR이
- [0562] (i) CD8 리더 서열;
- [0563] (ii) 항-메소텔린 scFv를 포함하는 제2 세포외 항원 결합 도메인,
- [0564] (iii) CD8 힌지;
- [0565] (iv) CD8 막횡단 도메인, 및
- [0566] (v) 4-1BB 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인으로 본질적으로 이루어 진 것인
- [0567] 상기 실시양태 중 어느 하나의 변형된 세포를 제공한다.
- [0568] 실시양태 37은 세포가 스위치 수용체를 발현하도록 추가로 조작되고, 여기서 스위치 수용체는 제1 수용체의 세 포외 도메인 및 제2 수용체의 세포내 도메인을 포함하고, 여기서 제1 수용체 및 제2 수용체는 각각 TGF β R 및 IL12R, TGF β R 및 CD28, TGF β R 및 OX40, TGF β R 및 CD27, TGF β R 및 4-1BB, TGF β R 및 IL-2R, TGF β R 및 IL-9R, PD1 및 IL12R, PD1 및 CD28, PD1 및 ICOS, PD1 및 CD27, PD1 및 4-1BB, PD1 및 IL-2R, PD1 및 IL-9R, BTLA 및 CD28, BTLA 및 ICOS, BTLA 및 CD27, CTLA4 및 CD28, TIM3 및 IL12R, TIM3 및 CD28, TIM3 및 CD28, TIM3 및 OX40, TIM3 및 4-1BB, TIM3 및 IL-2R, TIM3 및 IL-9R, VISTA 및 IL-9R, TIGIT 및 IL-9R, VSIG3 및 CD28, VSIG3-IL12R β 2, VSIG3 및 CD27, VSIG3 및 4-1BB, VSIG3 및 ICOS, VSIG3-IL12R β 1, VSIG8-IL12R β 1, VSIG8 및 CD28, VSIG8-IL12R β 2, VSIG8 및 CD27, VSIG8 및 4-1BB, VSIG8-ICOS, IFN γ 및 CD28, IFN γ 및 OX40, IFN γ 및 IL2R, 및 IFN γ 및 IL12R로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 상기 실시양태 중 어느 하나의 변형된 세포를 제공한다.
- [0569] 실시양태 38은 세포가 우성 음성 수용체를 발현하도록 추가로 조작되고, 여기서 우성 음성 수용체는 dnTGF β R인, 상기 실시양태 중 어느 하나의 변형된 세포를 제공한다.
- [0570] 실시양태 39는 세포가 제1 CAR 및 제2 CAR을 코딩하는 벡터를 포함하는 것인, 상기 실시양태 중 어느 하나의 변형된 세포를 제공한다.

- [0571] 실시양태 40은 백터가 렌티바이러스 백터 또는 레트로바이러스 백터인, 실시양태 39의 변형된 세포를 제공한다.
- [0572] 실시양태 41은 백터가 실시양태 37의 스위치 수용체 및/또는 실시양태 38의 양성 음성 수용체를 추가로 코딩하는 것인, 실시양태 39 또는 실시양태 40의 변형된 세포를 제공한다.
- [0573] 실시양태 42는 세포가 마우스 세포 또는 인간 세포인, 상기 실시양태 중 어느 하나의 변형된 세포를 제공한다.
- [0574] 실시양태 43은 세포가 T 세포인, 상기 실시양태 중 어느 하나의 변형된 세포를 제공한다.
- [0575] 실시양태 44는 상기 실시양태 중 어느 하나의 변형된 세포의 집단 및 적어도 1종의 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.
- [0576] 실시양태 45는 암의 치료를 필요로 하는 대상체에게 실시양태 43의 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0577] 실시양태 46은 암의 치료를 필요로 하는 대상체에게 변형된 세포의 집단을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, 여기서 세포는 면역 세포 또는 그의 전구체 세포이고, 세포는 하기를 발현하도록 조작된 것인 방법을 제공한다:
- [0578] a. (i) CD19에 대해 친화도를 갖는 제1 세포의 항원 결합 도메인,
- [0579] (ii) 제1 막횡단 도메인, 및
- [0580] (iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인
- [0581] 을 포함하는 제1 키메라 항원 수용체 (CAR); 및
- [0582] b. (i) CD19가 아닌 종양 항원에 대해 친화도를 갖는 제2 세포의 항원 결합 도메인,
- [0583] (ii) 제2 막횡단 도메인, 및
- [0584] (iii) 적어도 1개의 공동자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인
- [0585] 을 포함하는 제2 CAR.
- [0586] 실시양태 47은 종양 항원이 알파 태아-단백질 (AFP)/HLA-A2, AXL, B7-H3, BCMA, CA-1X, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD20, CD22, CD30, CD33, CD38, CD44v6, CD70, CD79a, CD79b, CD80, CD86, CD117, CD123, CD133, CD147, CD171, CD276, CEA, 클라우딘 18.2, c-Met, DLL3, DR5, 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), EGFRvIII, EpCAM, EphA2, 섬유모세포 활성화 단백질 (FAP), 플레이트 수용체 알파 (FRa)/플레이트 결합 단백질 (FBP), GD-2, 당지질 F77, 글리피칸 2 (GPC2), 글리피칸-3 (GPC3), HER2, HLA-A2, ICAM1, 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 (IL3Ra), 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 2 (IL13Ra2), LAGE-1, 루이스 Y, LMP1 (EBV), MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, 멜란 A, 메소텔린, MG7 (글리코실화 CEA), MMP, MUC1, 넥틴4/FAP, NKG2D-리간드 (MIC-A, MIC-B, 및 ULBP 1 내지 6), 뉴욕 식도 편평 세포 암종-1 (NY-ESO-1), P16, PD-L1, 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA), 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), ROR1, ROR2, TIM-3, TM4SF1, MUC1의 Tn-당형태 (TnMUC1), 글리코실-포스파티딜이노시톨 (GPI)-연결된 GDNF 패밀리의 α-수용체 4 (GFRα4; GFR알파4), VEGFR2, 및 그의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 실시양태 46의 방법을 제공한다.
- [0587] 실시양태 48은 종양 항원이 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), MUC1, MUC1의 Tn-당형태 (TnMUC1), 플레이트 수용체 알파 (FRα), 메소텔린, 뉴욕 식도 편평 세포 암종-1 (NY-ESO-1), 글리피칸 2 (GPC2), 글리코실-포스파티딜이노시톨 (GPI)-연결된 GDNF 패밀리의 α-수용체 4 (GFRα4; GFR알파4), 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA), 섬유모세포 활성화 단백질 (FAP), 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 1 (IL13Ra1), 및 인터류킨 13 수용체 서브유닛 알파 2 (IL13Ra2)로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 실시양태 46 또는 실시양태 47의 방법을 제공한다.
- [0588] 실시양태 49는 제1 세포의 항원 결합 도메인 및 제2 세포의 항원 결합 도메인이 각각 독립적으로 단일쇄 가변 단편 (scFv) 및 Fab로부터 선택된 것인, 상기 실시양태 중 어느 하나의 방법을 제공한다.
- [0589] 실시양태 50은 제1 또는 제2 세포내 도메인의 적어도 1개의 공동자극 도메인이 4-1BB, CD2, CD28, 및 ICOS로부터 독립적으로 선택된 단백질의 공동자극 도메인을 포함하는 것인, 상기 실시양태 중 어느 하나의 방법을 제공한다.
- [0590] 실시양태 51은 신호전달 도메인이 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 것인, 상기 실시양태 중 어느 하나의

방법을 제공한다.

- [0591] 실시양태 52는 제1 및/또는 제2 막형단 도메인이 CD8, CD28, 및 4-1BB로부터 독립적으로 선택된 단백질의 막형단 도메인을 포함하는 것인, 상기 실시양태 중 어느 하나의 방법을 제공한다.
- [0592] 실시양태 53은 제1 및/또는 제2 CAR이 힌지 도메인을 추가로 포함하는 것인, 상기 실시양태 중 어느 하나의 방법을 제공한다.
- [0593] 실시양태 54는 힌지 도메인이 CD8 힌지 도메인을 포함하는 것인, 실시양태 53의 방법을 제공한다.
- [0594] 실시양태 55는
- [0595] a. 제1 CAR이
- [0596] (i) 항-CD19 scFv를 포함하는 제1 세포외 항원 결합 도메인,
- [0597] (ii) 제1 막형단 도메인, 및
- [0598] (iii) CD28 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인을 포함하고;
- [0599] b. 제2 CAR이
- [0600] (i) 항종양 항원 scFv를 포함하는 제2 세포외 항원 결합 도메인 (여기서 종양 항원은 CD19가 아님),
- [0601] (ii) 제2 막형단 도메인, 및
- [0602] (iii) 4-1BB 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인을 포함하는 것인
- [0603] 상기 실시양태 중 어느 하나의 방법을 제공한다.
- [0604] 실시양태 56은
- [0605] a. 제1 CAR이
- [0606] (i) CD8 리더 서열;
- [0607] (ii) 항-CD19 scFv를 포함하는 제1 세포외 항원 결합 도메인,
- [0608] (iii) CD8 힌지;
- [0609] (iv) CD28 막형단 도메인, 및
- [0610] (v) CD28 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 제1 세포내 도메인으로 본질적으로 이루어지고;
- [0611] b. 제2 CAR이
- [0612] (i) CD8 리더 서열;
- [0613] (ii) 항-메소텔린 scFv를 포함하는 제2 세포외 항원 결합 도메인,
- [0614] (iii) CD8 힌지;
- [0615] (iv) CD8 막형단 도메인, 및
- [0616] (v) 4-1BB 공동자극 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인으로 본질적으로 이루어진 것인
- [0617] 상기 실시양태 중 어느 하나의 방법을 제공한다.
- [0618] 실시양태 57은 변형된 세포가 스위치 수용체를 발현하도록 추가로 조작되고, 여기서 스위치 수용체는 제1 수용체의 세포외 도메인 및 제2 수용체의 세포내 도메인을 포함하고, 여기서 제1 수용체 및 제2 수용체는 각각 TGF β R 및 IL12R, TGF β R 및 CD28, TGF β R 및 OX40, TGF β R 및 CD27, TGF β R 및 4-1BB, TGF β R 및 IL-2R, TGF β R 및 IL-9R, PD1 및 IL12R, PD1 및 CD28, PD1 및 ICOS, PD1 및 CD27, PD1 및 4-1BB, PD1 및 IL-2R, PD1 및 IL-9R, BTLA 및 CD28, BTLA 및 ICOS, BTLA 및 CD27, CTLA4 및 CD28, TIM3 및 IL12R, TIM3 및 CD28, TIM3 및 CD28, TIM3 및 OX40, TIM3 및 4-1BB, TIM3 및 IL-2R, TIM3 및 IL-9R, VISTA 및 IL-9R, TIGIT 및 IL-9R, VSIG3 및 CD28, VSIG3-IL12R β 2, VSIG3 및 CD27, VSIG3 및 4-1BB, VSIG3 및 ICOS, VSIG3-IL12R β 1, VSIG8-IL12R β 1,

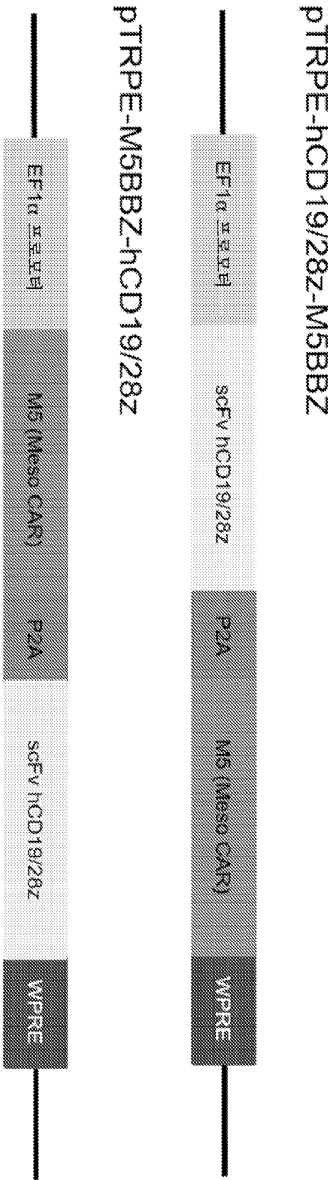
VSIG8 및 CD28, VSIG8-IL12R β 2, VSIG8 및 CD27, VSIG8 및 4-1BB, VSIG8-ICOS, IFN γ 및 CD28, IFN γ 및 OX40, IFN γ 및 IL2R, 및 IFN γ 및 IL12R로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 상기 실시양태 중 어느 하나의 방법을 제공한다.

- [0619] 실시양태 58은 변형된 세포가 우성 음성 수용체를 발현하도록 추가로 조작되고, 여기서 우성 음성 수용체는 dnTGF β R인, 상기 실시양태 중 어느 하나의 방법을 제공한다.
- [0620] 실시양태 59는 변형된 세포가 제1 CAR 및 제2 CAR을 코딩하는 벡터를 포함하는 것인, 상기 실시양태 중 어느 하나의 방법을 제공한다.
- [0621] 실시양태 60은 벡터가 렌티바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터인, 실시양태 59의 방법을 제공한다.
- [0622] 실시양태 61은 벡터가 실시양태 57의 스위치 수용체 및/또는 실시양태 58의 우성 음성 수용체를 추가로 코딩하는 것인, 실시양태 59 또는 실시양태 60의 방법을 제공한다.
- [0623] 실시양태 62는 변형된 세포가 마우스 세포 또는 인간 세포인, 상기 실시양태 중 어느 하나의 방법을 제공한다.
- [0624] 실시양태 63은 변형된 세포의 집단이 T 세포를 포함하는 것인, 상기 실시양태 중 어느 하나의 방법을 제공한다.
- [0625] 실시양태 64는 변형된 세포가 대상체에 대해 자가인, 상기 실시양태 중 어느 하나의 방법을 제공한다.
- [0626] 실시양태 65는 변형된 세포가 대상체에 대해 동종인, 상기 실시양태 중 어느 하나의 방법을 제공한다.
- [0627] 실시양태 66은 변형된 세포의 집단이 변형된 세포의 집단 및 적어도 1종의 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물로서 투여되는 것인, 상기 실시양태 중 어느 하나의 방법을 제공한다.
- [0628] 실시양태 67은 변형된 세포의 집단이 약 1×10^6 내지 약 1×10^9 개의 세포를 포함하는 것인, 상기 실시양태 중 어느 하나의 방법을 제공한다.
- [0629] 실시양태 68은 변형된 세포가 대상체의 말초 혈액에서 확장을 나타내는 것인, 상기 실시양태 중 어느 하나의 방법을 제공한다.
- [0630] 실시양태 69는 확장이 적어도 10-배, 적어도 100-배 또는 적어도 1000-배인, 실시양태 68의 방법을 제공한다.
- [0631] 실시양태 70은 변형된 세포가 세포를 투여한 후 적어도 24개월 동안 검출가능한 것인, 상기 실시양태 중 어느 하나의 방법을 제공한다.
- [0632] 실시양태 71은 대상체가 인간인, 상기 실시양태 중 어느 하나의 방법을 제공한다.
- [0633] 실시양태 72는 암이 유방암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 피부암, 전립선암, 췌장암, 결장직장암, 신암, 간암, 뇌암, 림프종, 백혈병, 폐암, 및 갑상선암으로부터 선택된 것인, 상기 실시양태 중 어느 하나의 방법을 제공한다.
- [0634] 실시양태 73은 변형된 세포의 집단이 T 세포를 포함하고, 투여 후 제7일 또는 그 이후에 변형된 세포의 집단의 적어도 30% 또는 적어도 40%가 표현형상 중심 기억 T 세포인, 상기 실시양태 중 어느 하나의 방법을 제공한다.
- [0635] 실시양태 74는 대상체에게 CD19 항원을 투여하는 것을 추가로 포함하는, 상기 실시양태 중 어느 하나의 방법을 제공한다.
- [0636] 실시양태 75는 CD19 항원을 투여하는 것이 CD19 항원을 코딩하는 벡터 또는 CD19 항원을 발현하도록 조작된 세포를 투여하는 것을 포함하는 것인, 실시양태 74의 방법을 제공한다.
- [0637] 실시양태 76은 CD19 항원이 CD19 세포외 도메인 또는 그의 항원 단편을 포함하는 것인, 실시양태 74 또는 75의 방법을 제공한다.
- [0638] 실시양태 77은 CD19 항원이 변형된 세포의 집단의 투여 전에, 그와 공동으로 또는 그 후에 투여되는 것인, 실시양태 74-76 중 어느 하나의 방법을 제공한다.
- [0639] 실시양태 78은 벡터가 아데노바이러스 벡터인, 실시양태 75-77 중 어느 하나의 방법을 제공한다.
- [0640] 실시양태 79는 대상체에게 항-PD1 면역요법을 투여하는 것을 추가로 포함하는, 실시양태 74-78 중 어느 하나의 방법을 제공한다.

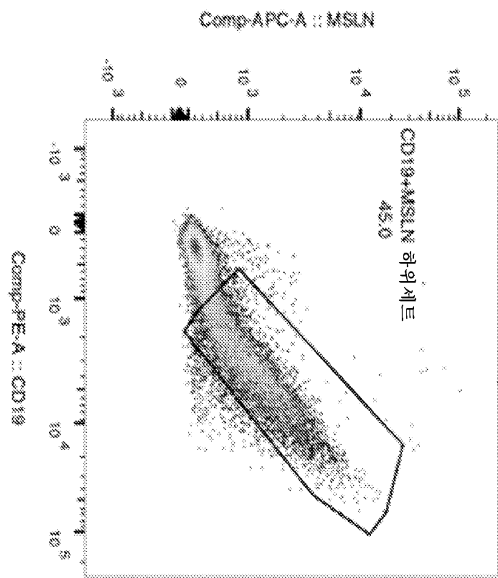
- [0641] 실시양태 80은 항-PD1 면역요법이 항-PD1 항체인, 실시양태 79의 방법을 제공한다.
- [0642] 다른 실시양태
- [0643] 본원에 인용된 각각의 및 모든 특허, 특허 출원 및 공보의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 본 발명이 구체적 실시양태와 관련하여 개시되었지만, 본 발명의 다른 실시양태 및 변형이 본 발명의 진정한 취지 및 범주로부터 벗어나지 않으면서 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 고안될 수 있음이 명백하다. 첨부된 청구범위는 모든 이러한 실시양태 및 등가의 변형을 포함하는 것으로 해석되는 것으로 의도된다.

도면

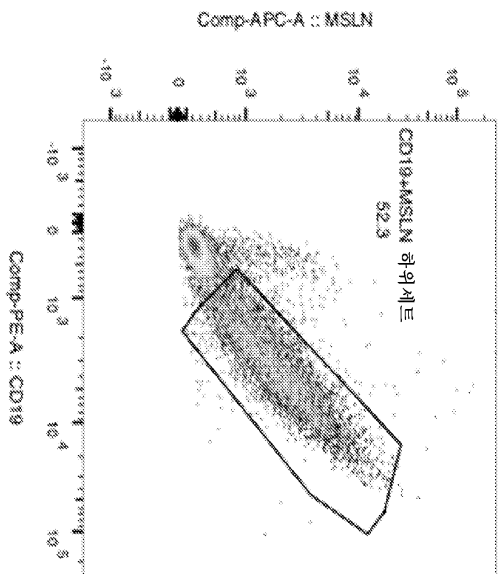
도면1a



도면1b

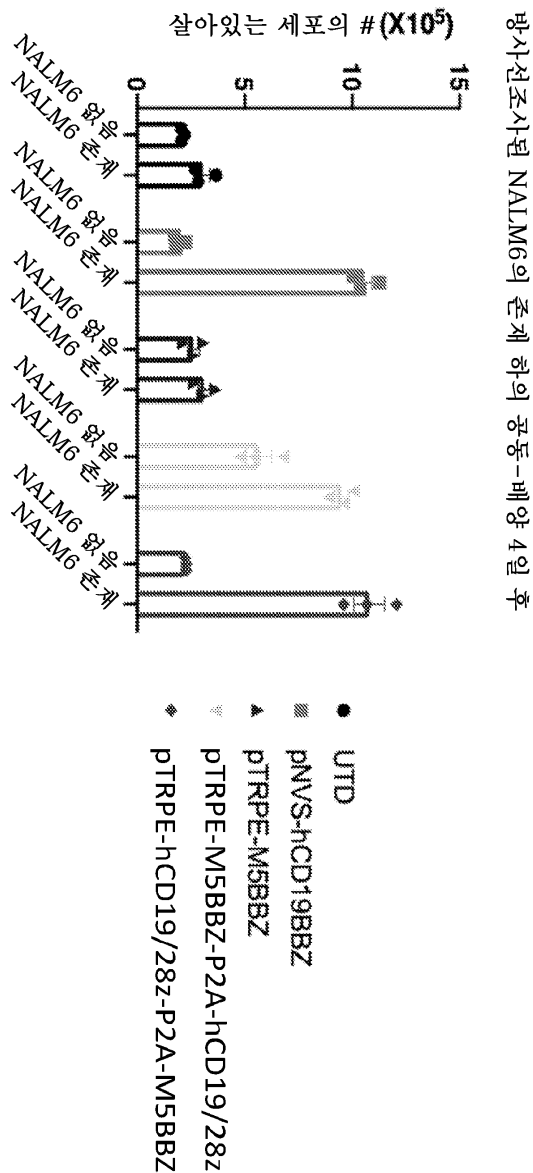


PTRPE-hCD19/28z-P2A-M5BBZ

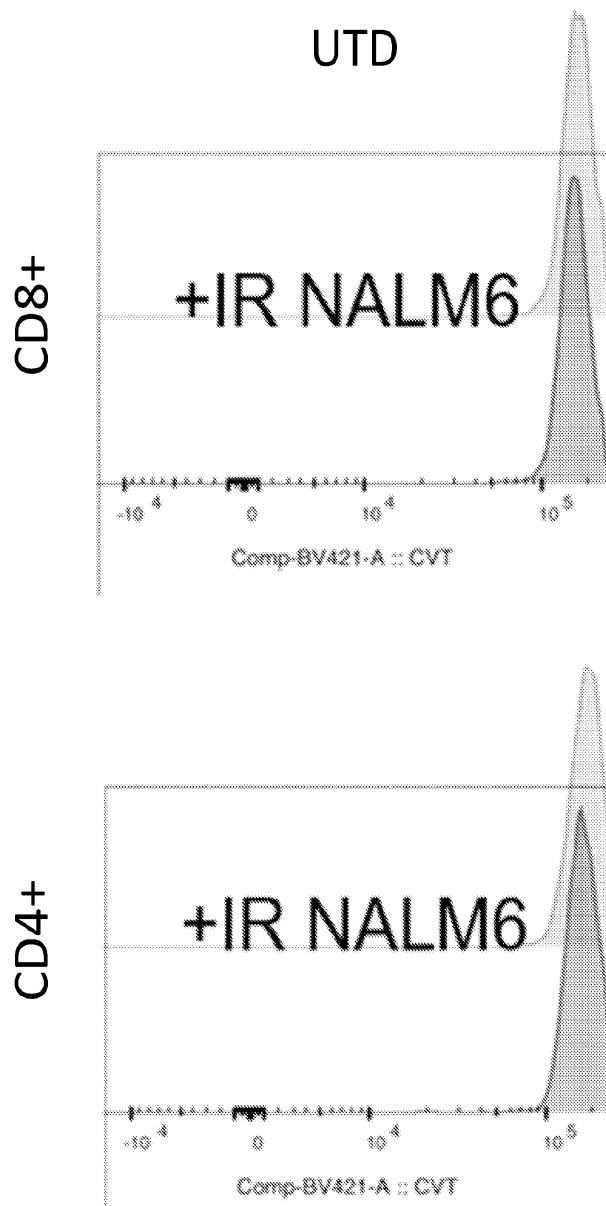


PTRPE-M5BBZ-hCD19/28z

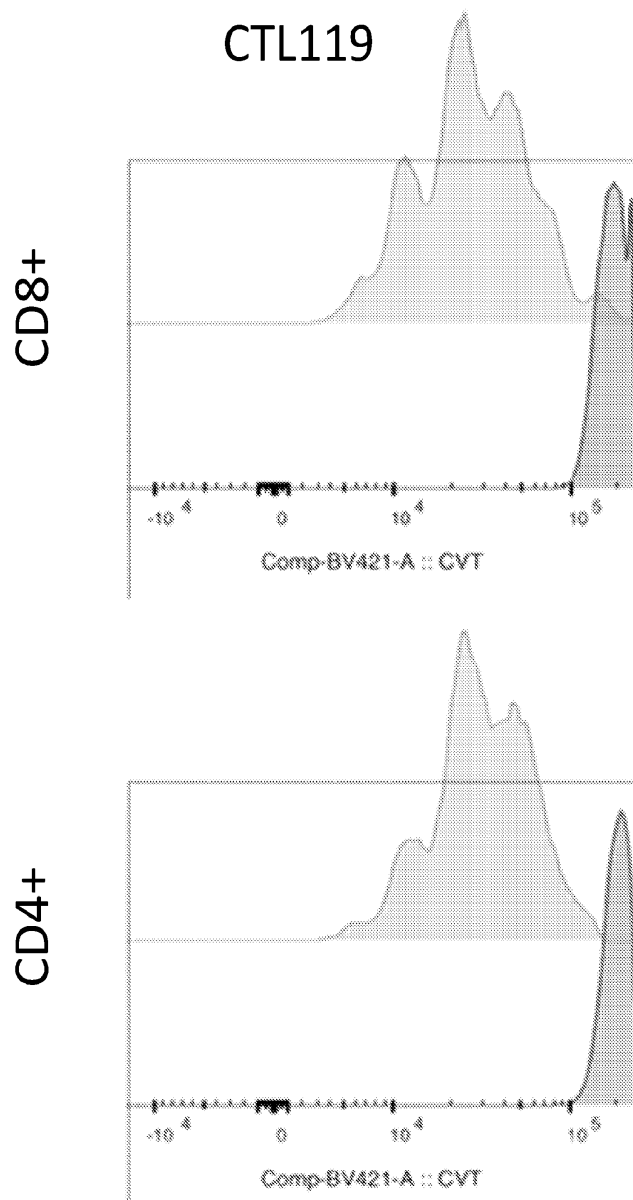
도면2a



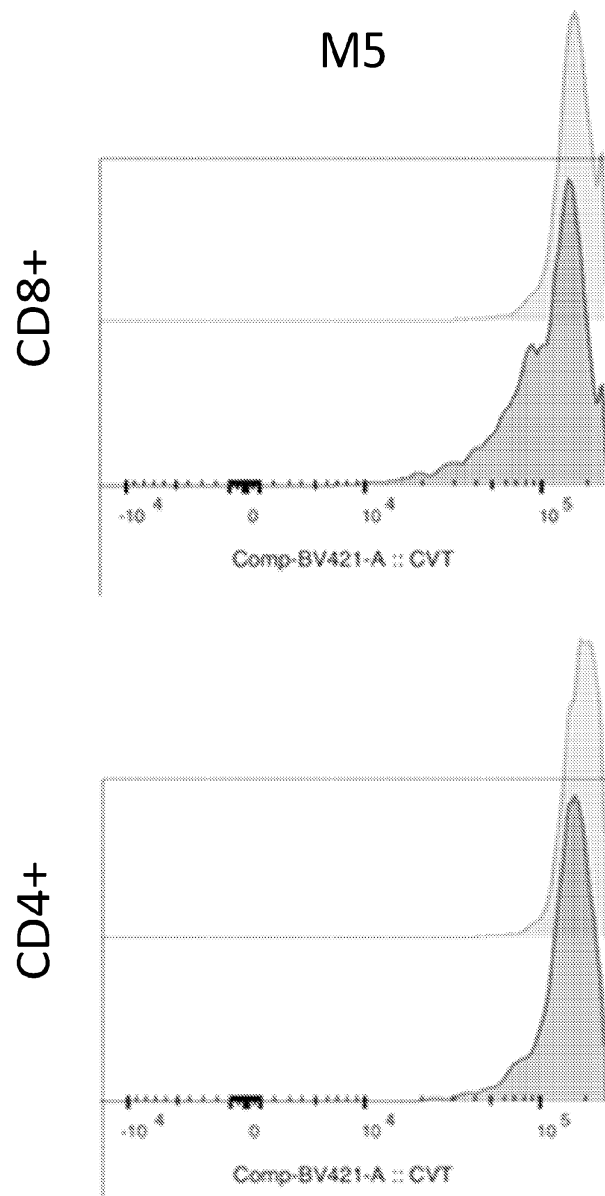
도면2ba



도면2bb



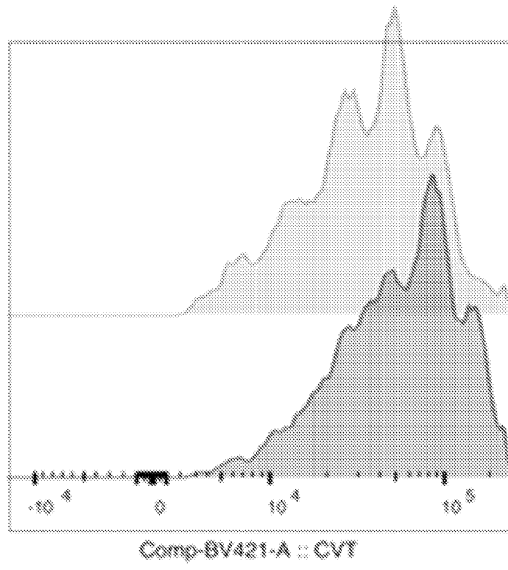
도면2bc



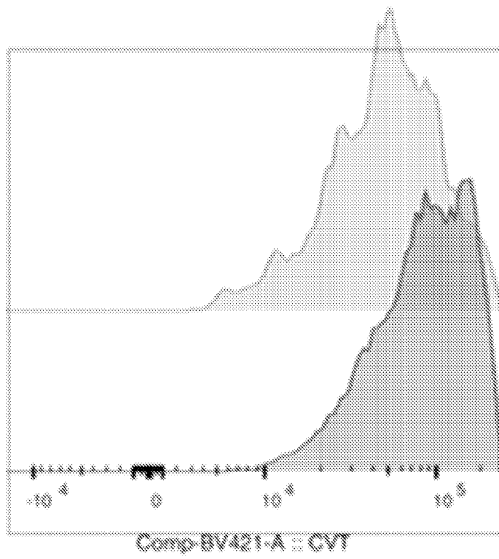
도면2bd

pTRPE-M5BBZ-P2A-hCD19/28z

CD8+



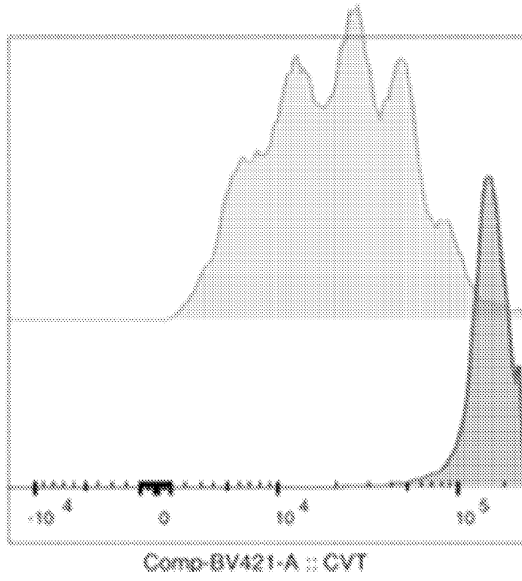
CD4+



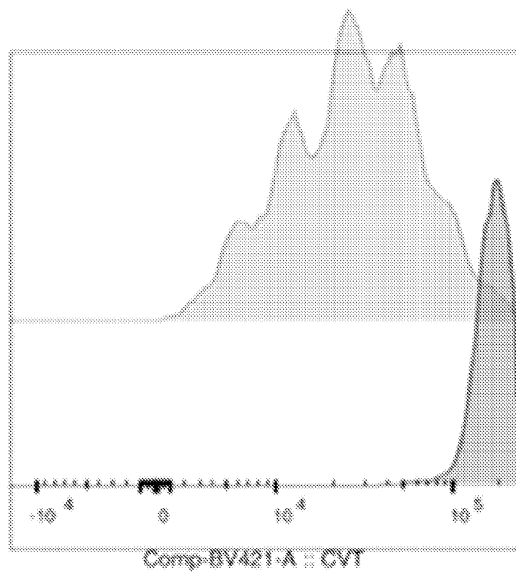
도면2be

pTRPE-hCD19/28z-P2A-M5BBZ

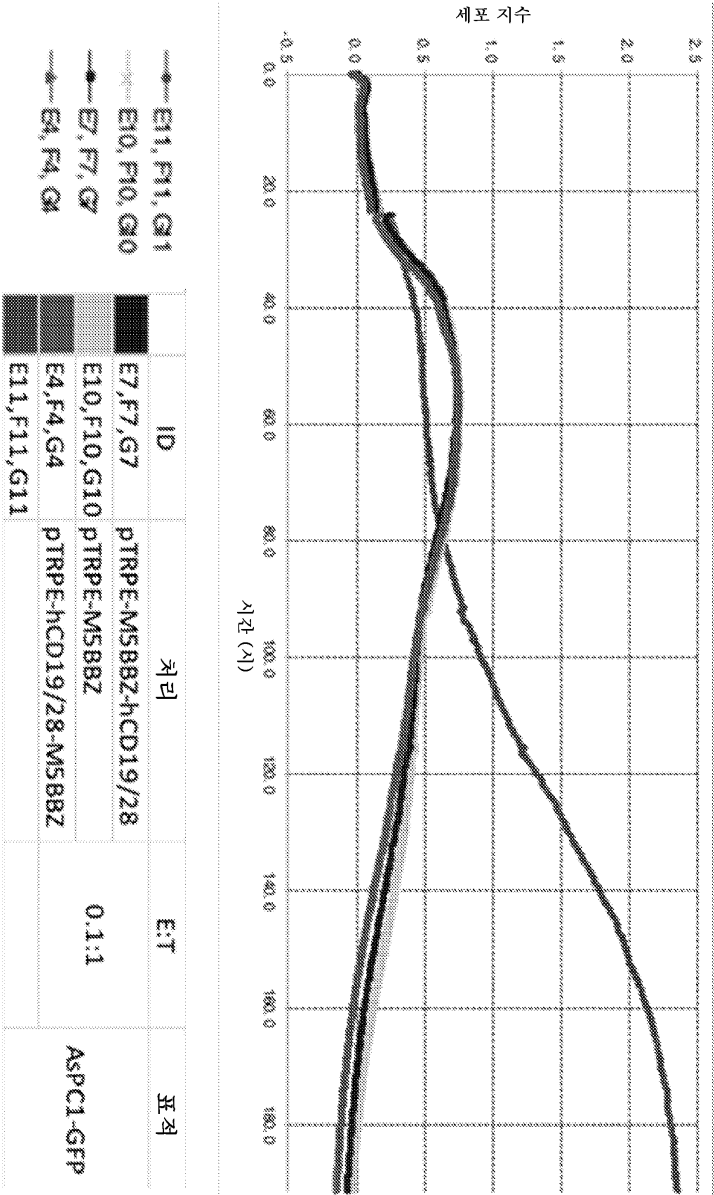
CD8+



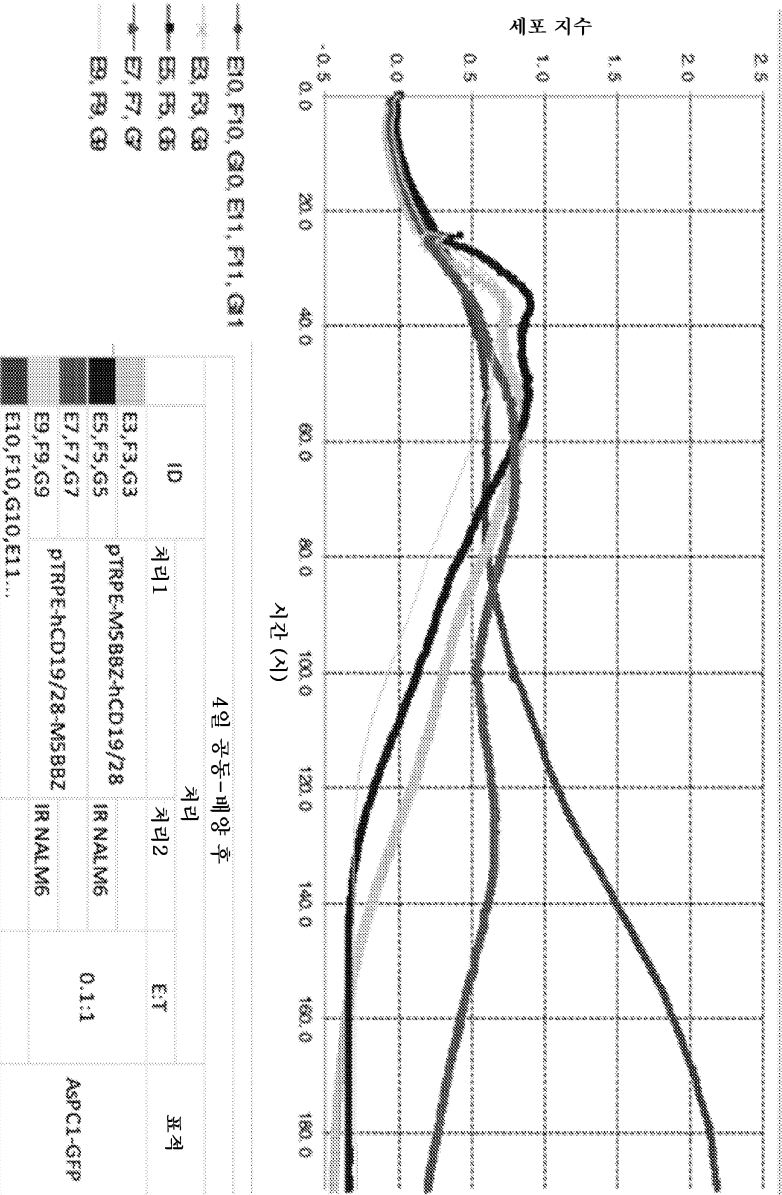
CD4+



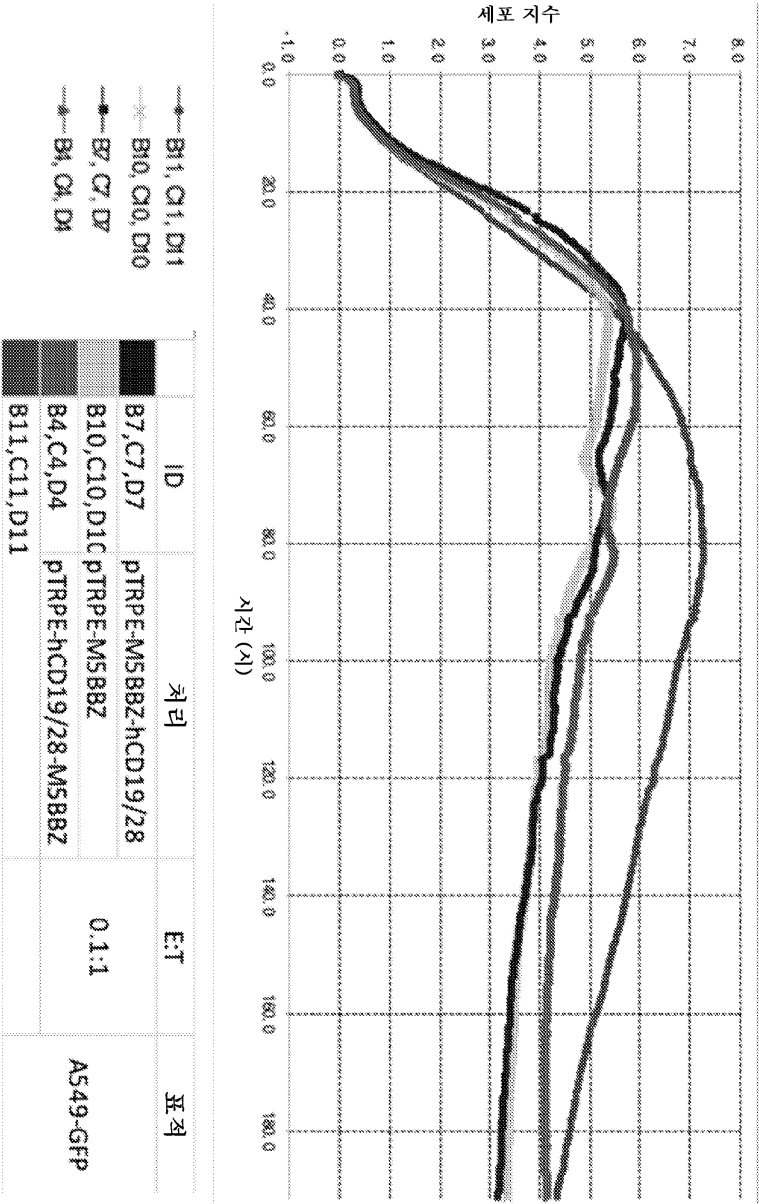
도면3a



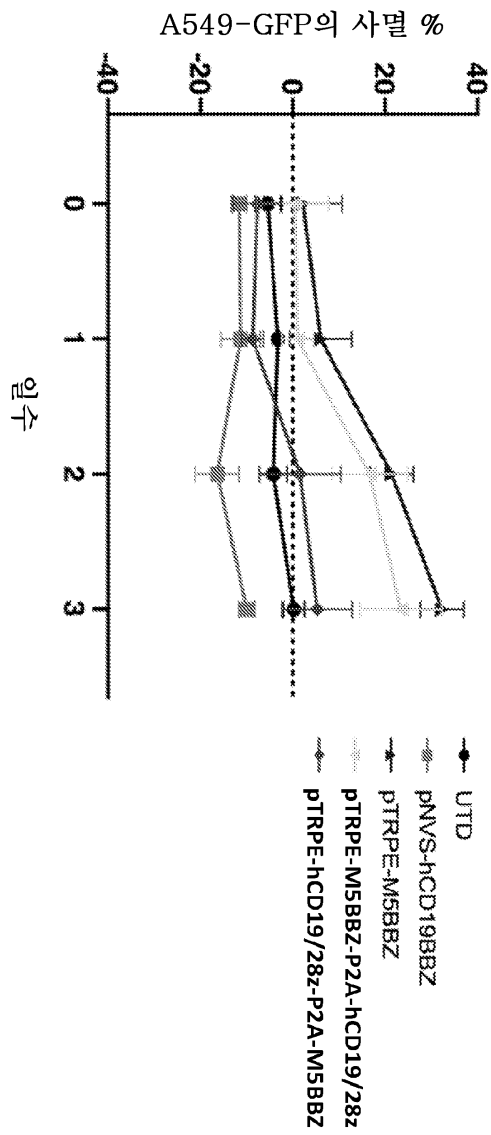
도면3b



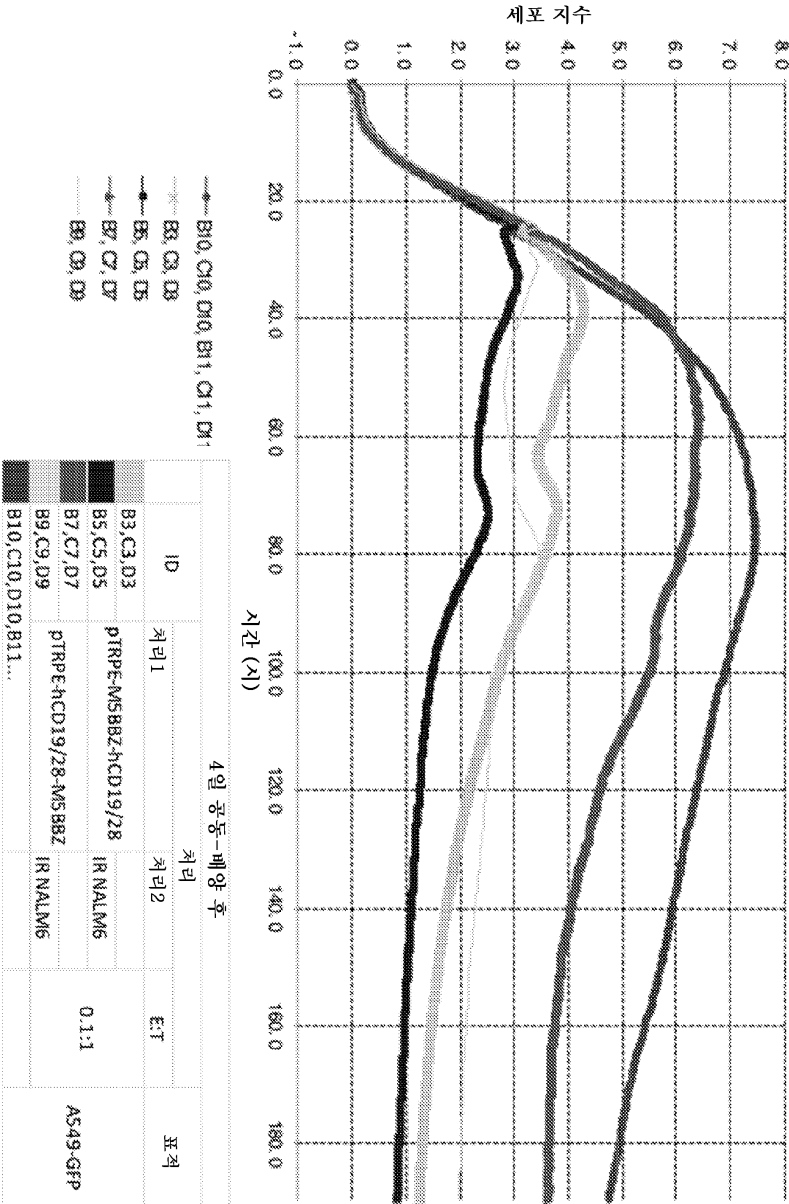
도면4a



도면4b

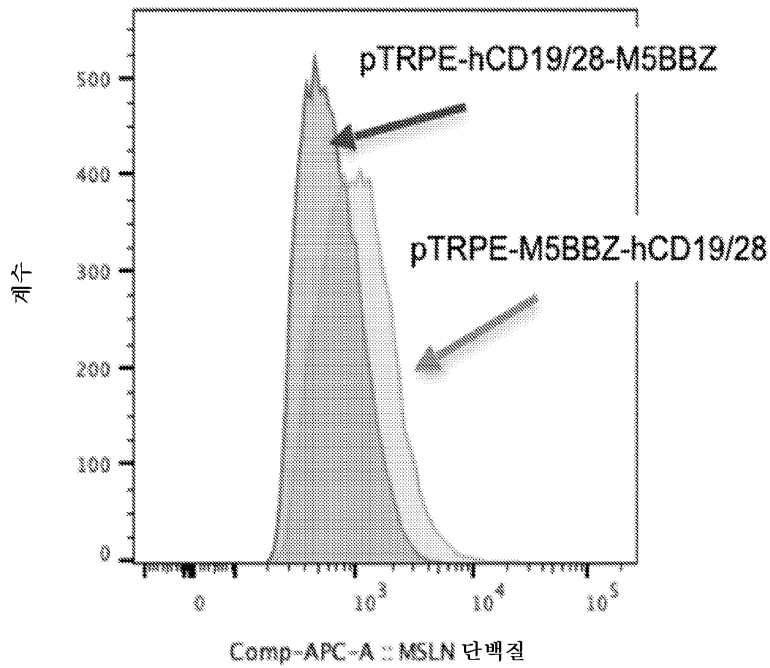


도면4c



도면4da

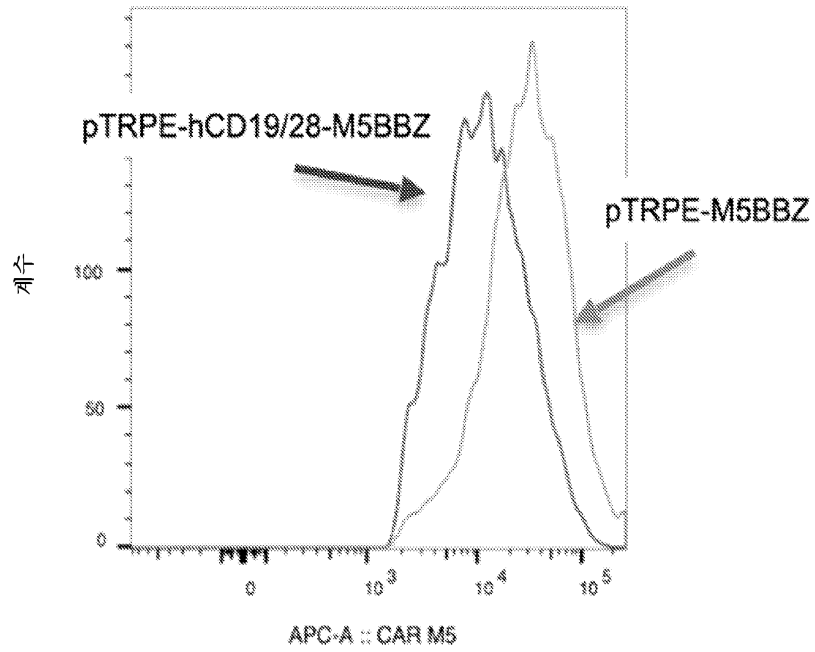
pTRPE-hCD19/28z-P2A-M5BBZ는 M5 염색의 보다 낮은 MFI를 보여준다



	샘플 명칭	중량값 : Comp-APC-A
	시편_001_pTRPE-M5BBZ-P2A-hCD19,28 단백질_010.fc	989
	시편_001_pTRPE-hCD19,28-P2A-M5BBZ 단백질_009.fc	590

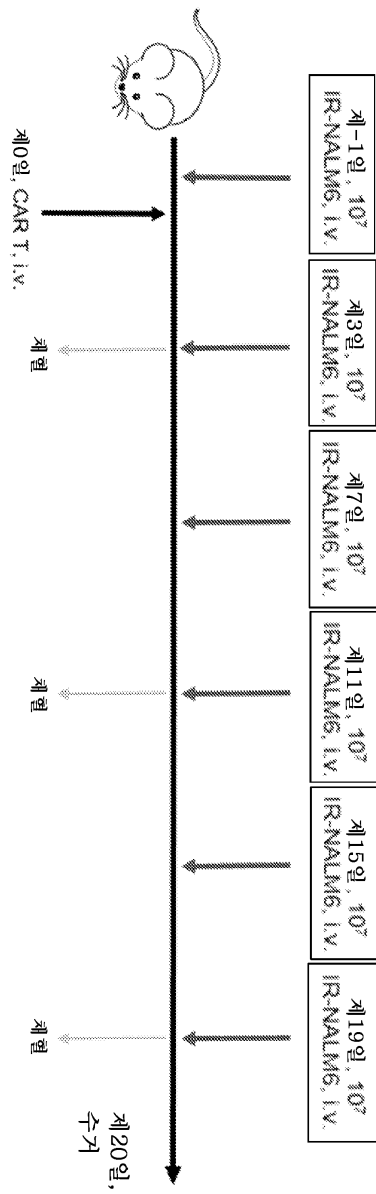
도면4db

pTRPE-hCD19/28z-P2A-M5BBZ 는 M5 염색의 보다 낮은 MFI를 보여준다



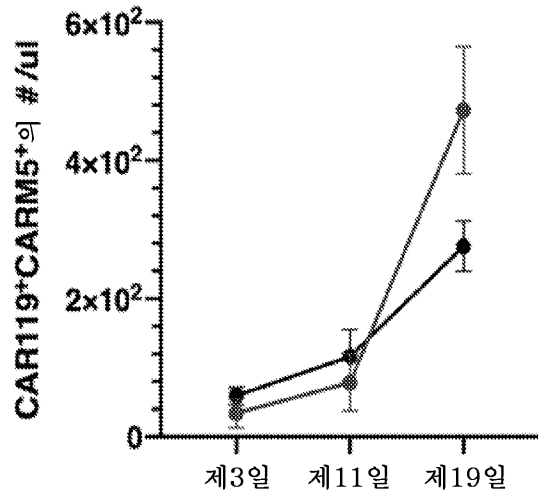
샘플 명칭		중양 값: APC-A
시편_001_pTRPE-M5BBZ ID_002.fcs		30449
시편_001_pTRPE-hCD19,21,28-M5BBZ ID_003.fcs		11221

도면5a



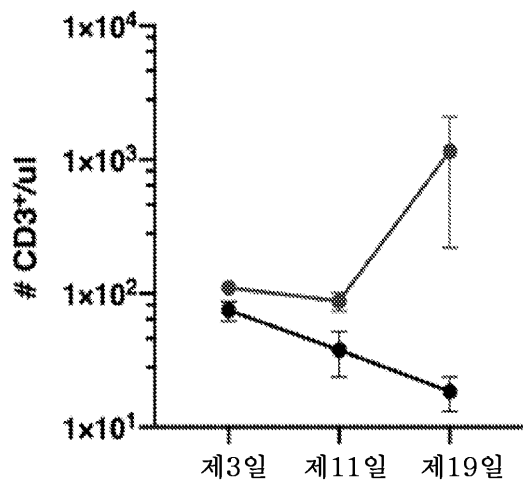
도면5b

- 10^5 pTRPE- M5BBZ-P2A-hCD19/28z+다중 NALM6
- ◆ 10^5 pTRPE- hCD19/28z-P2A-M5BBZ+다중 NALM6



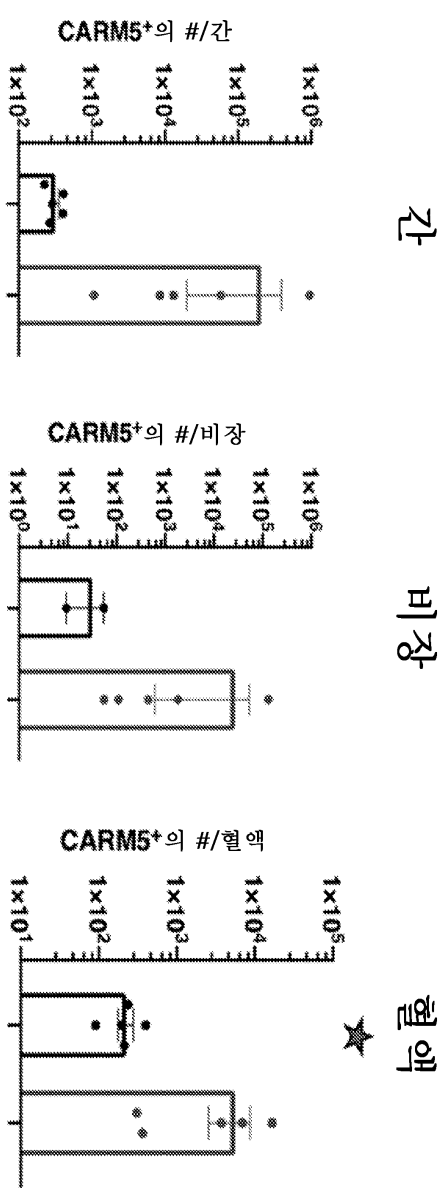
도면5c

- 10^5 pTRPE-M5BBZ+NALM6
- ◆ 10^5 pTRPE- hCD19/28z-P2A-M5BBZ+NALM6



상이한 기관에서의 M5+ 계수

제20일 수거물



★ 400-600 나 혈액/마우스

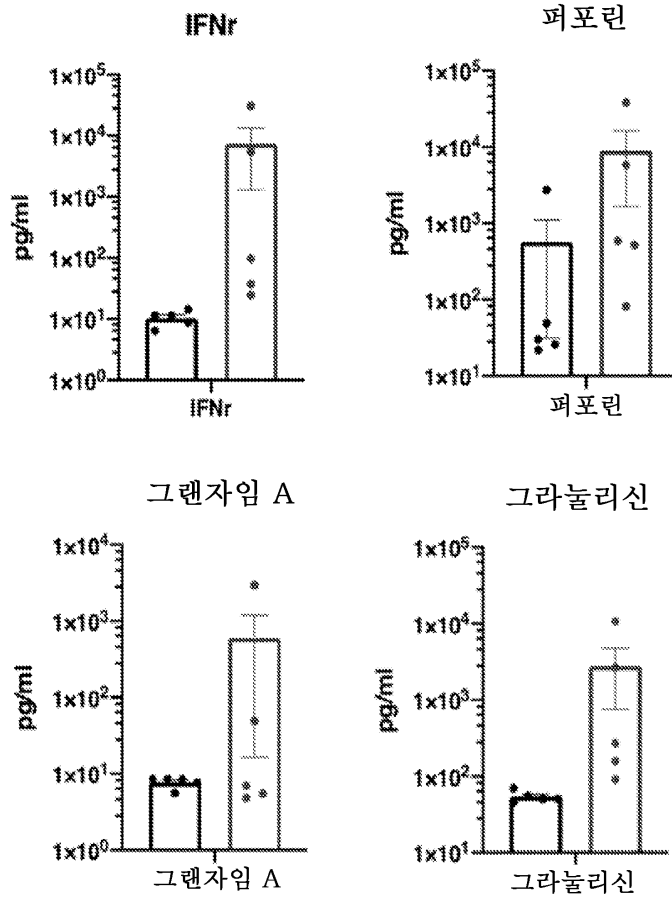
- PTRPE-M5BBZ + IR NALM6
- PTRPE-hCD19/28z-M5BBZ+IR NALM6

도면5d

도면5e

혈장 중 시토카인

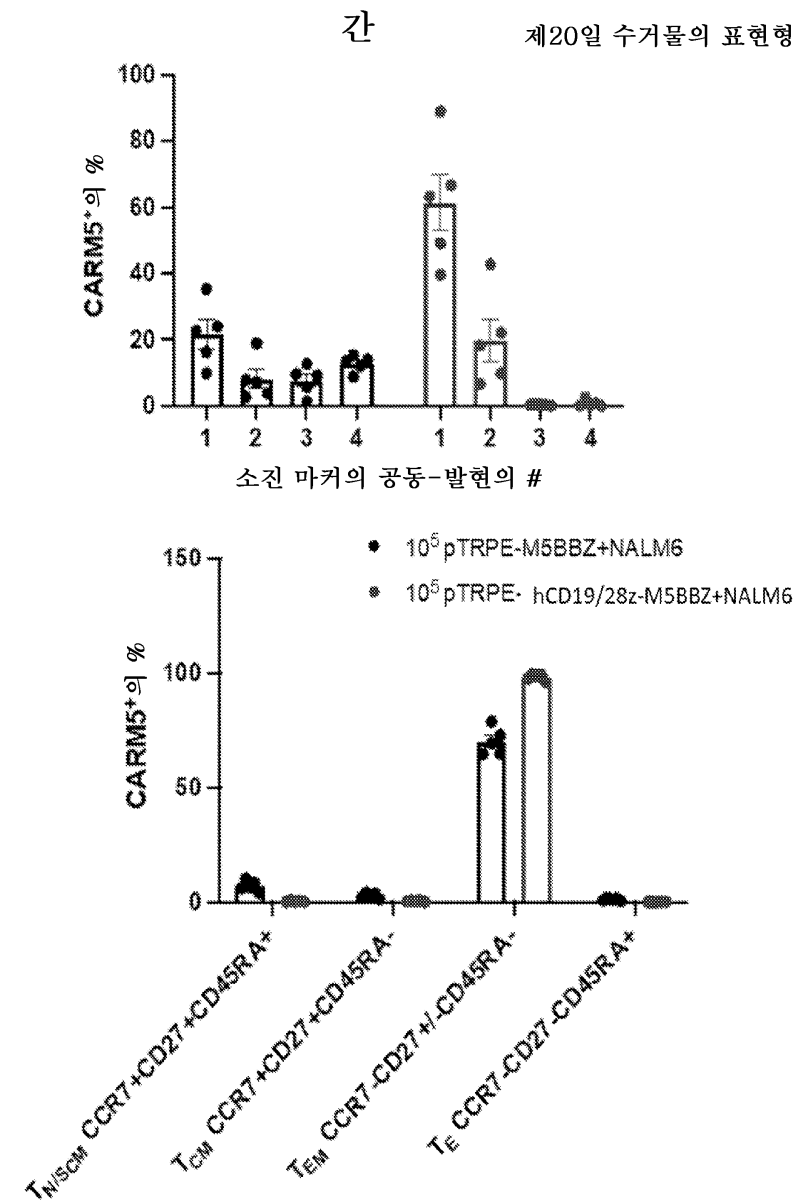
제20일 수거물



★ 400-600 ul 혈액/마우스

- pTRPE-M5BBZ + IR NALM6
- pTRPE-hCD19/28z-M5BBZ+IR NALM6

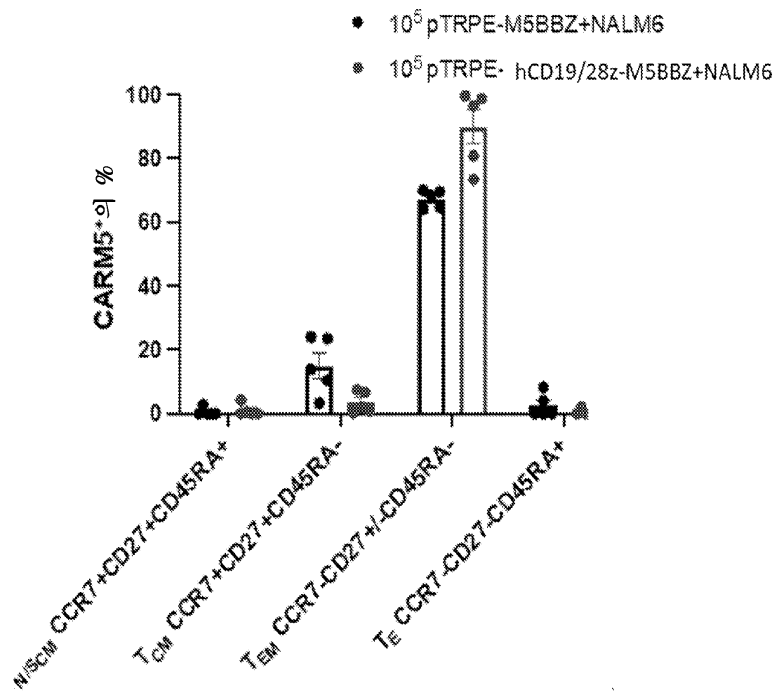
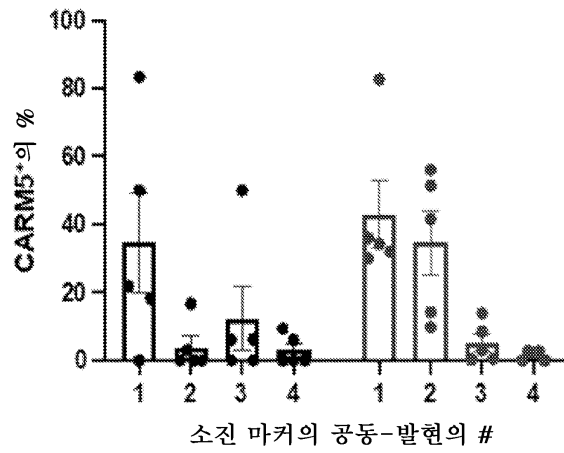
도면5fa



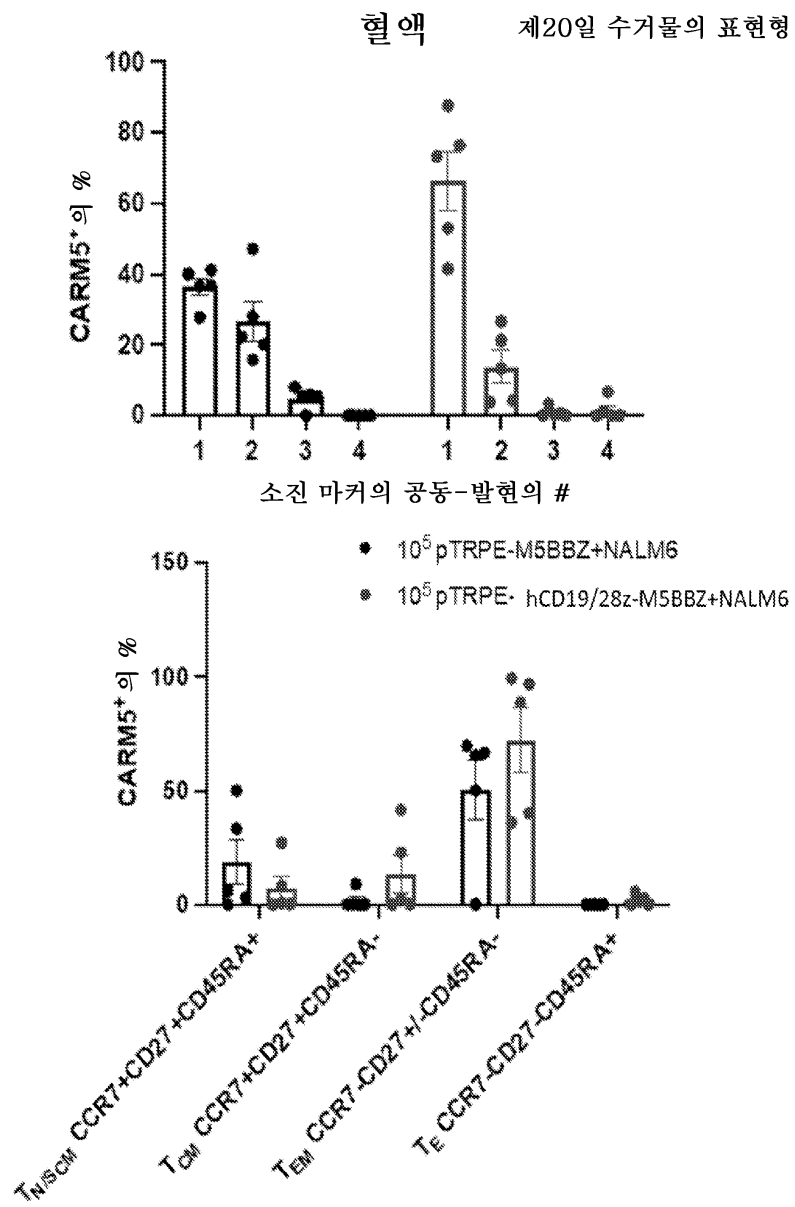
도면5fb

비장

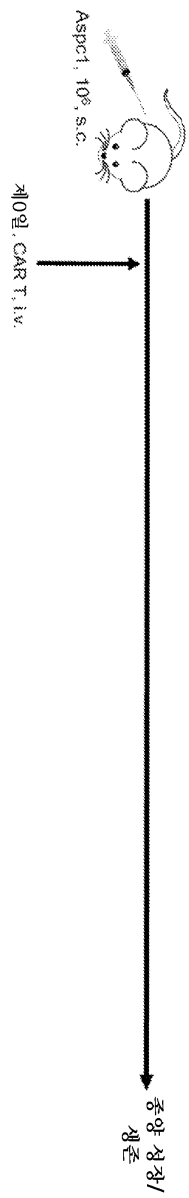
제20일 수거물의 표현형



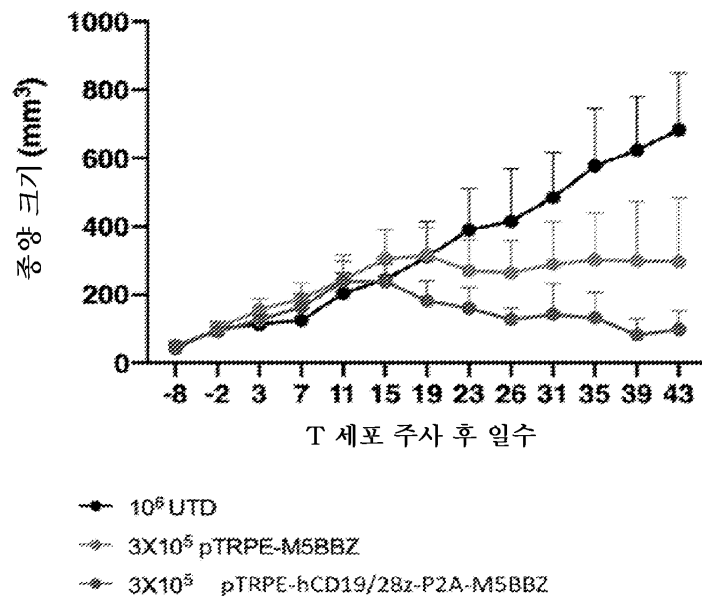
도면5f



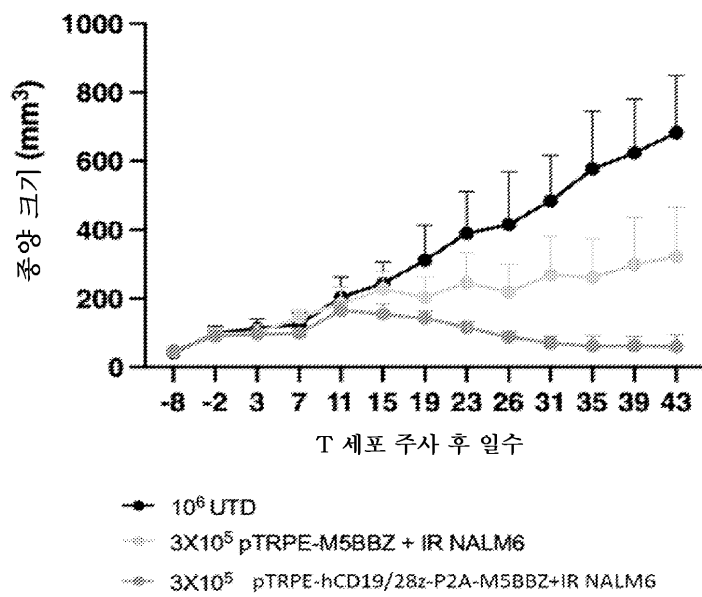
도면6a



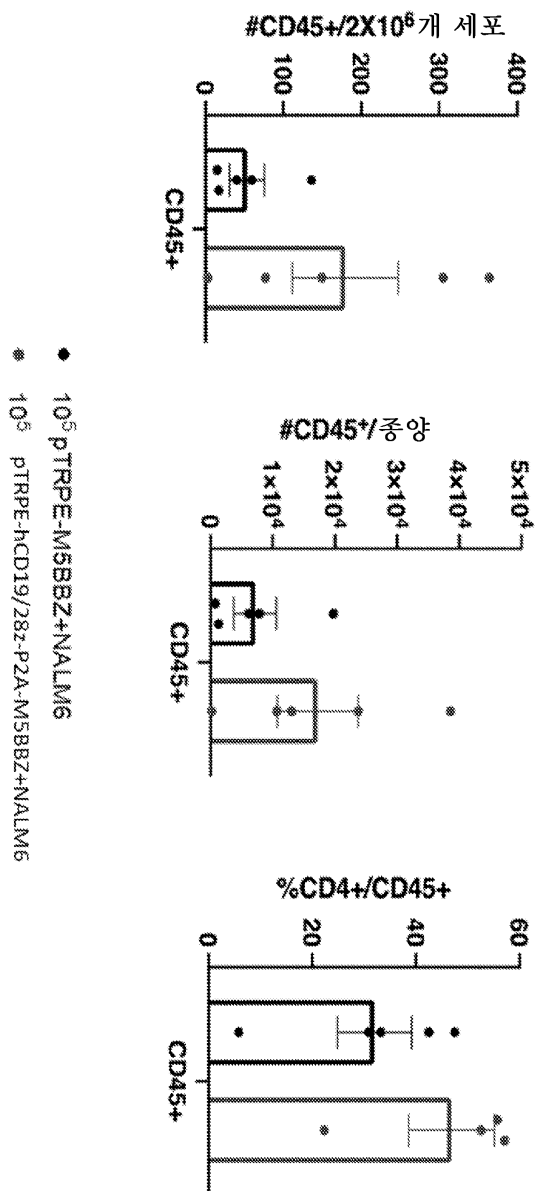
도면6b



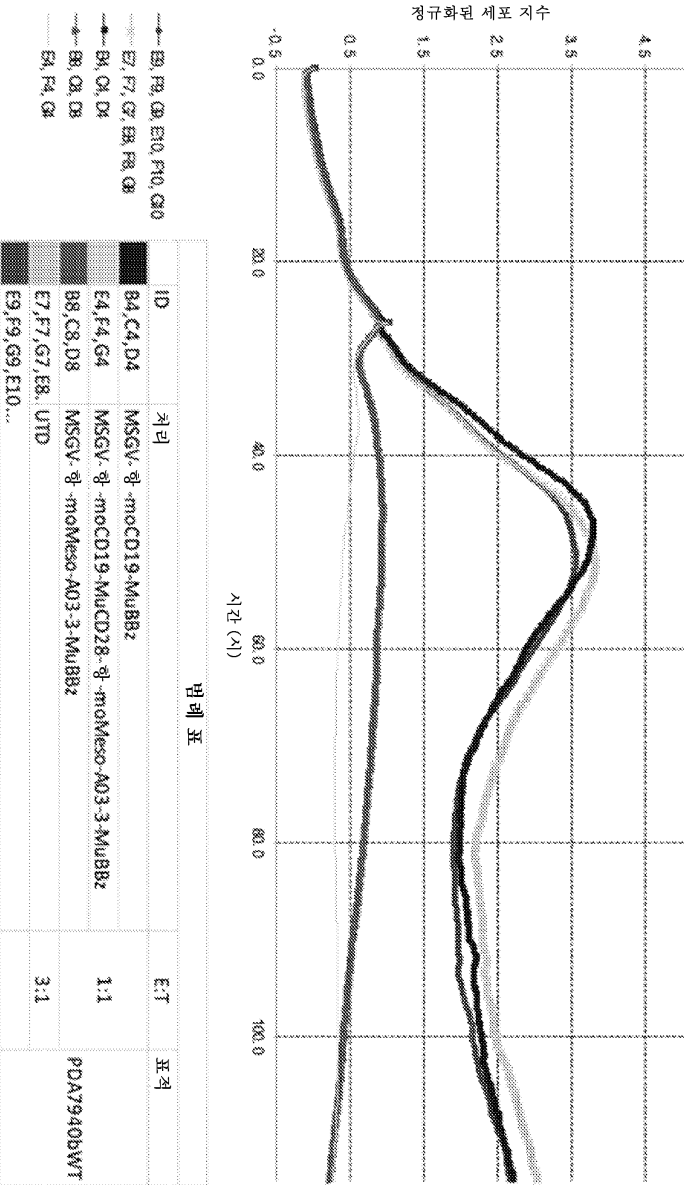
도면6c



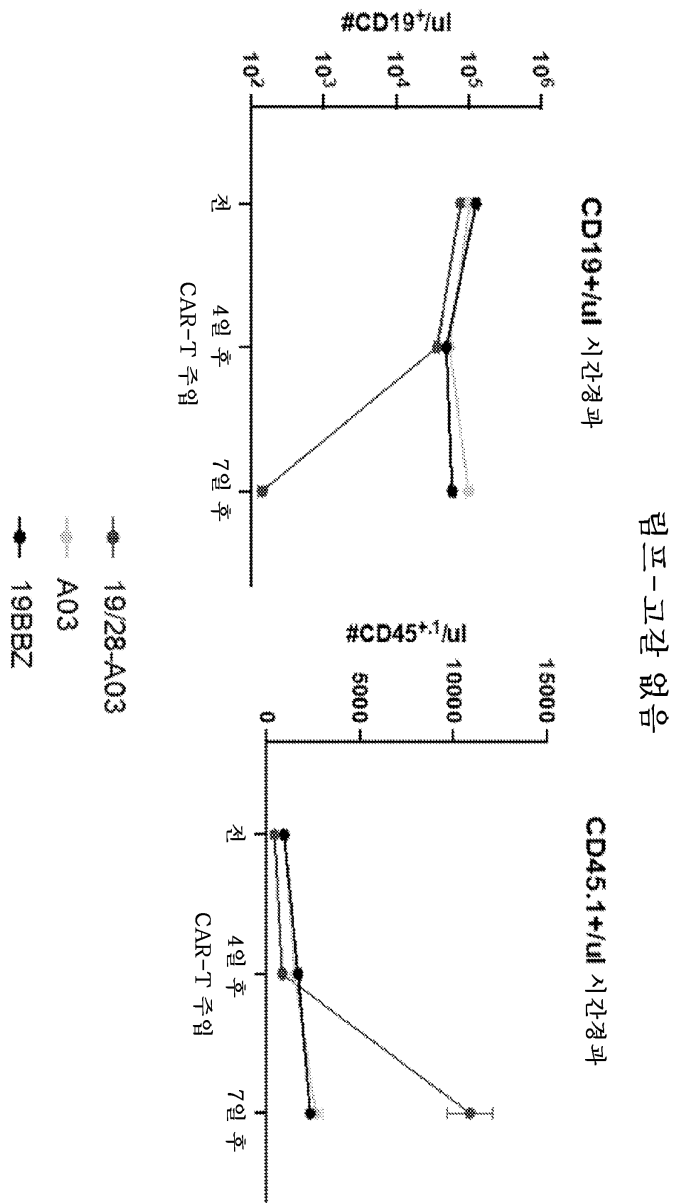
도면6d



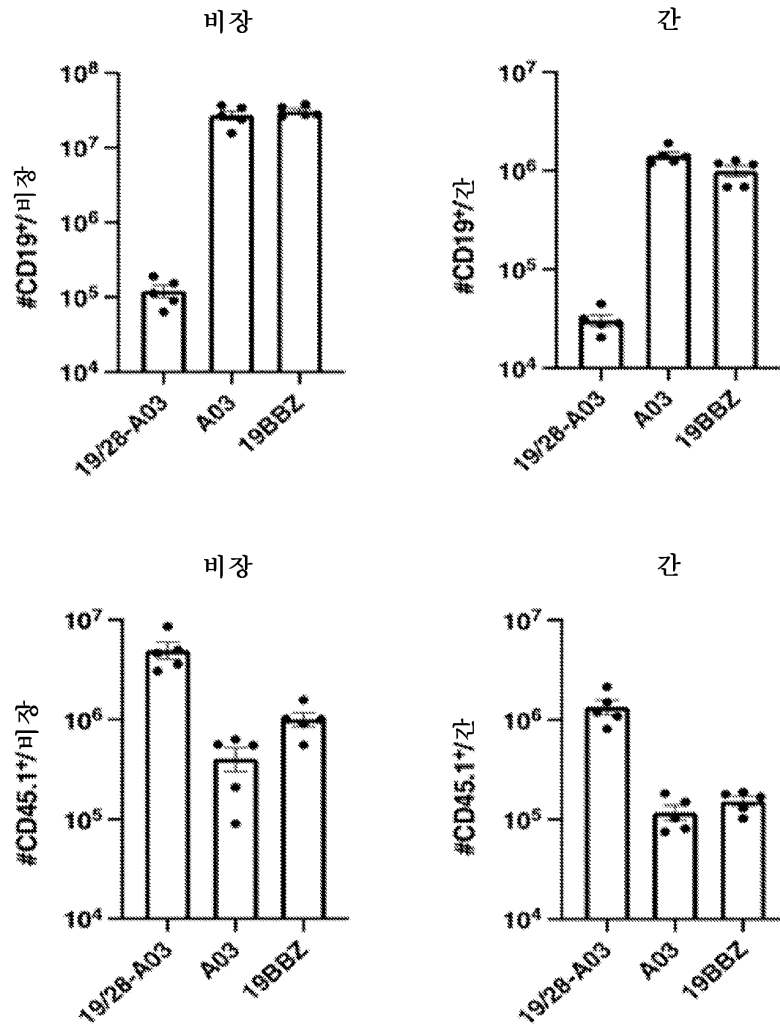
도면7a



도면7b

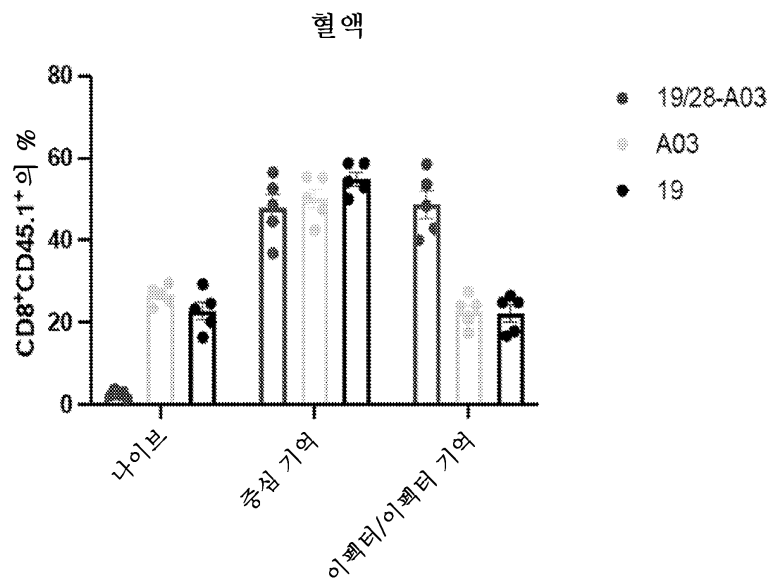
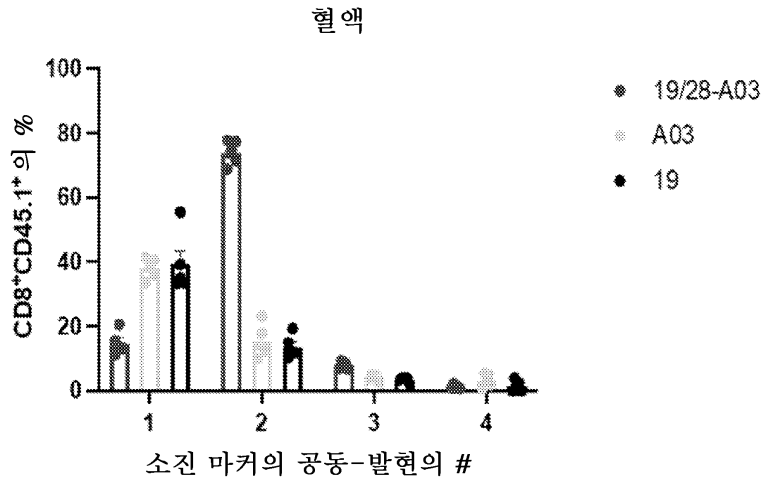


도면7c



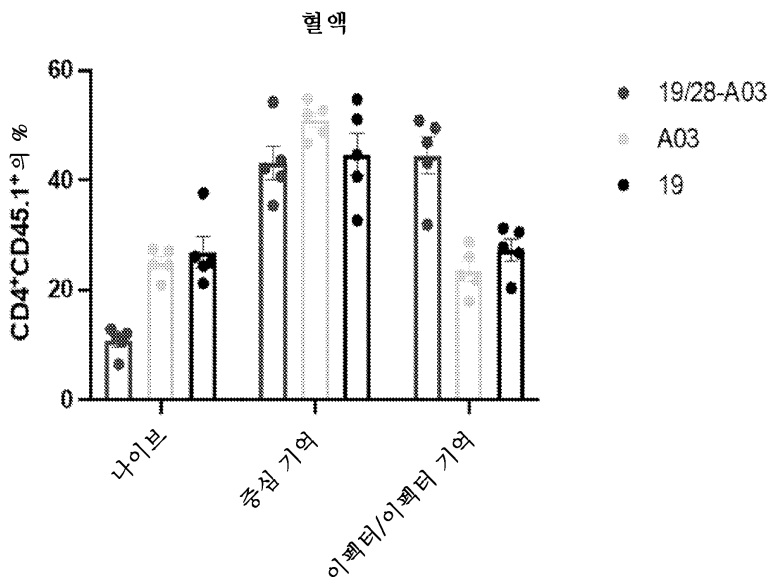
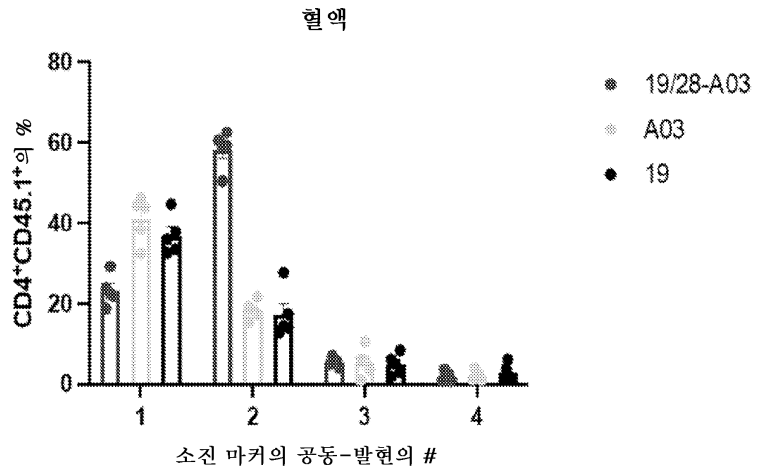
도면7da

제7일 수거물의 표현형



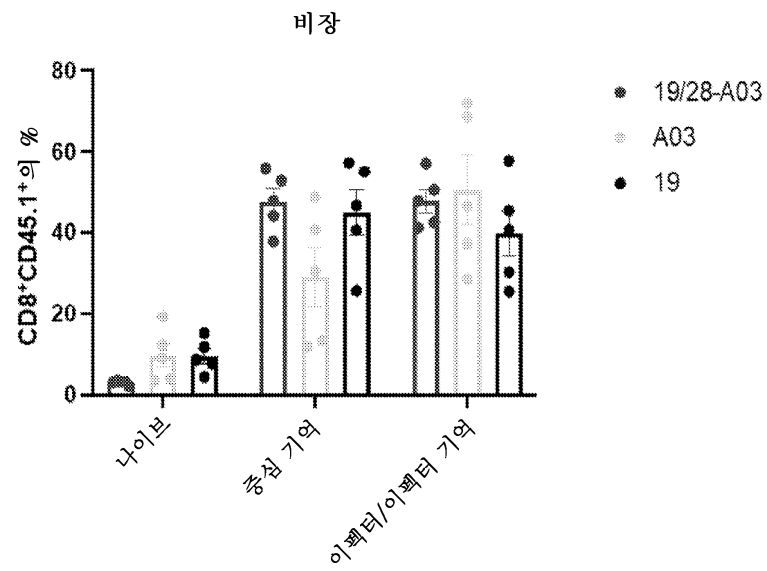
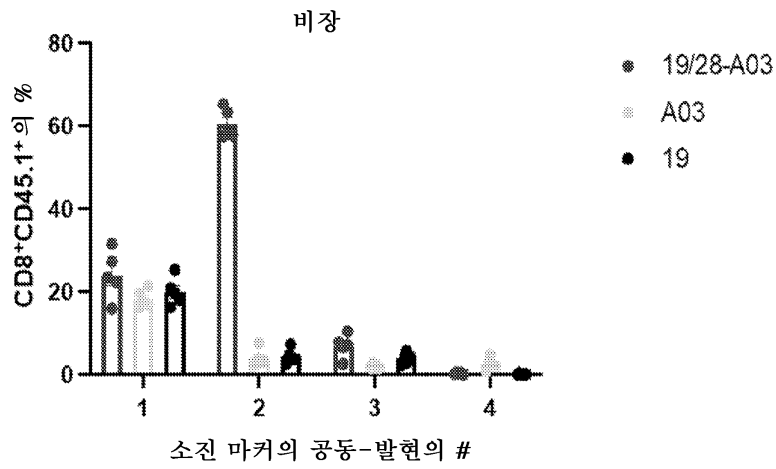
도면7db

제7일 수거물의 표현형



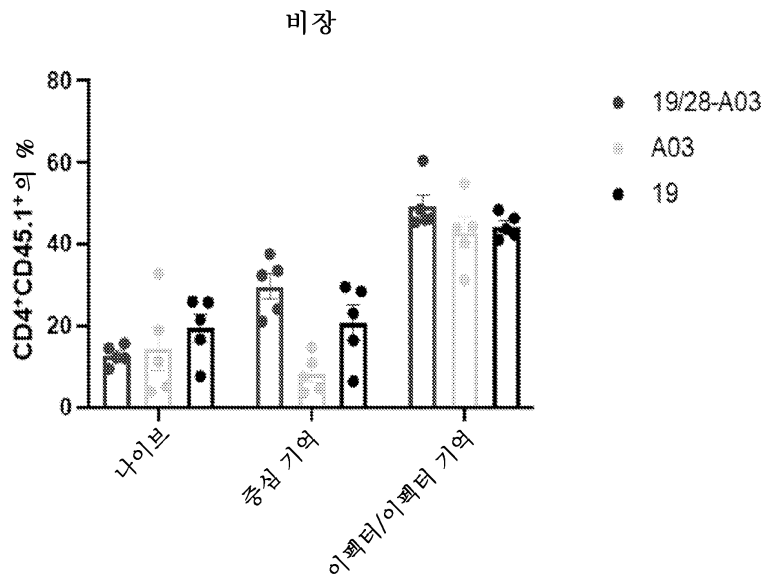
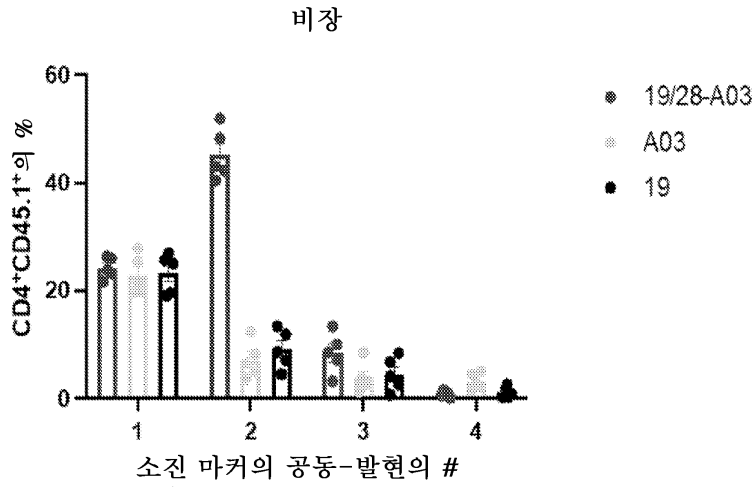
도면7ea

제7일 수거물의 표현형

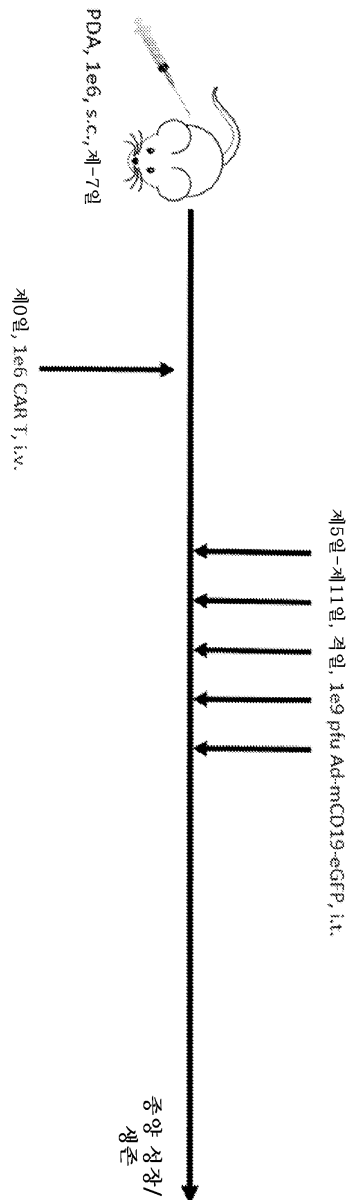


도면7eb

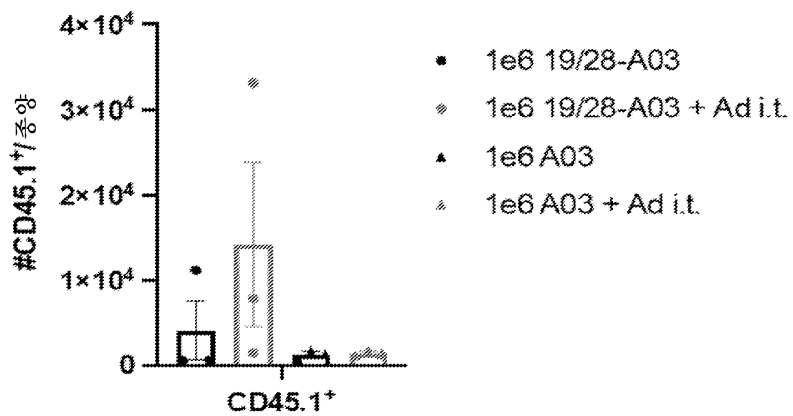
제7일 수거물의 표현형



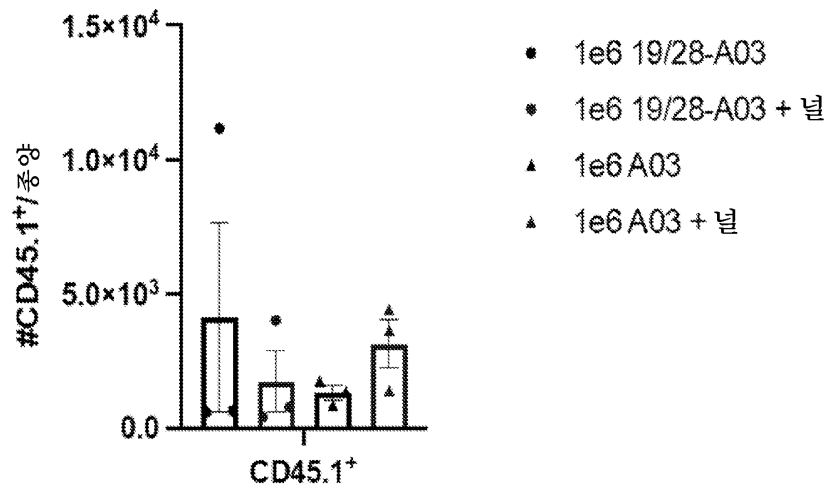
도면8



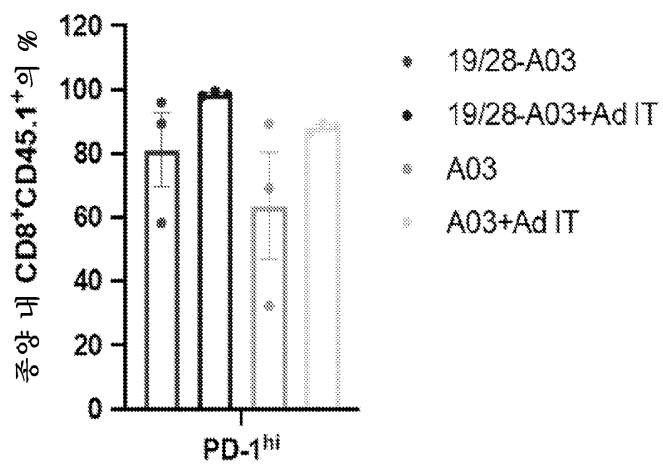
도면9



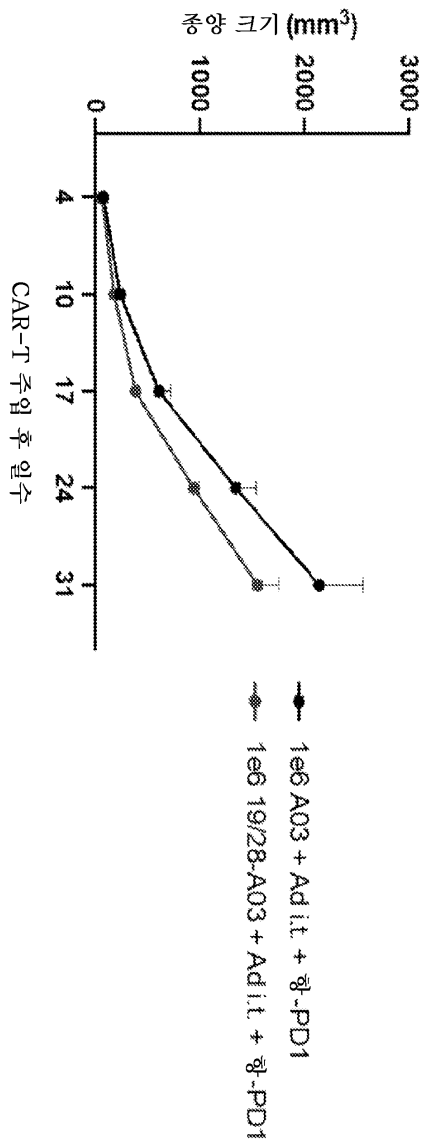
도면10



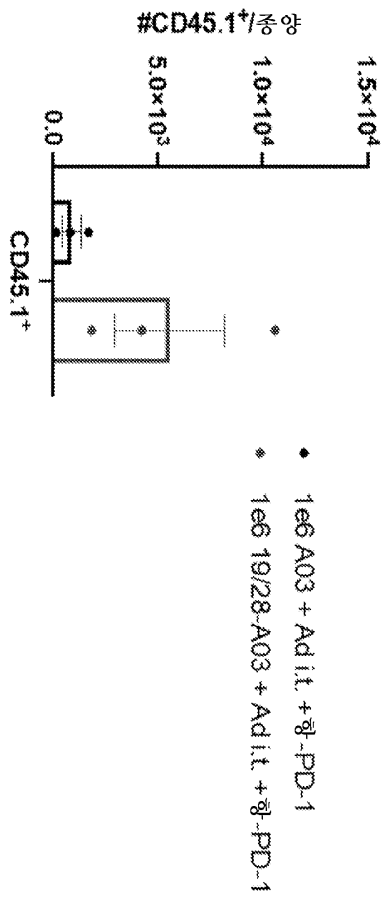
도면11



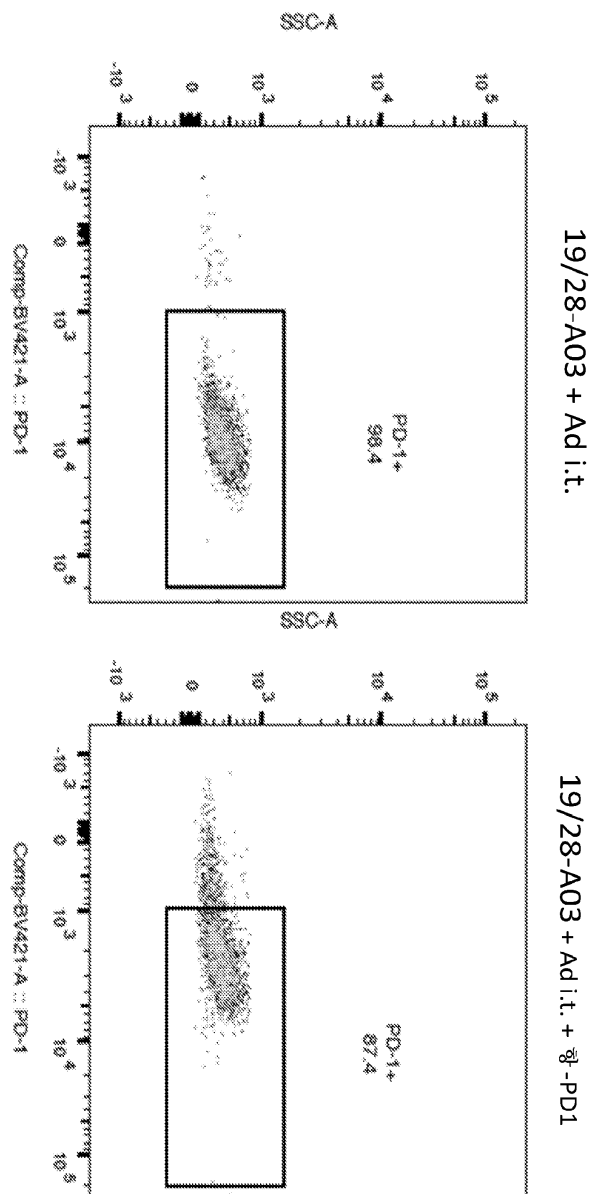
도면12



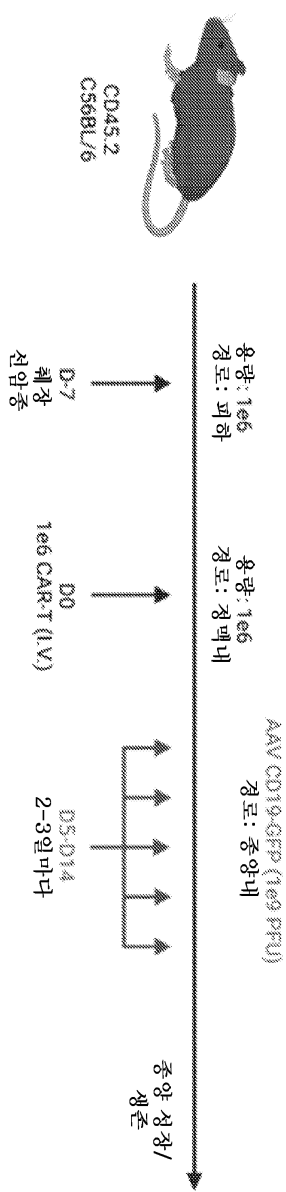
도면13a



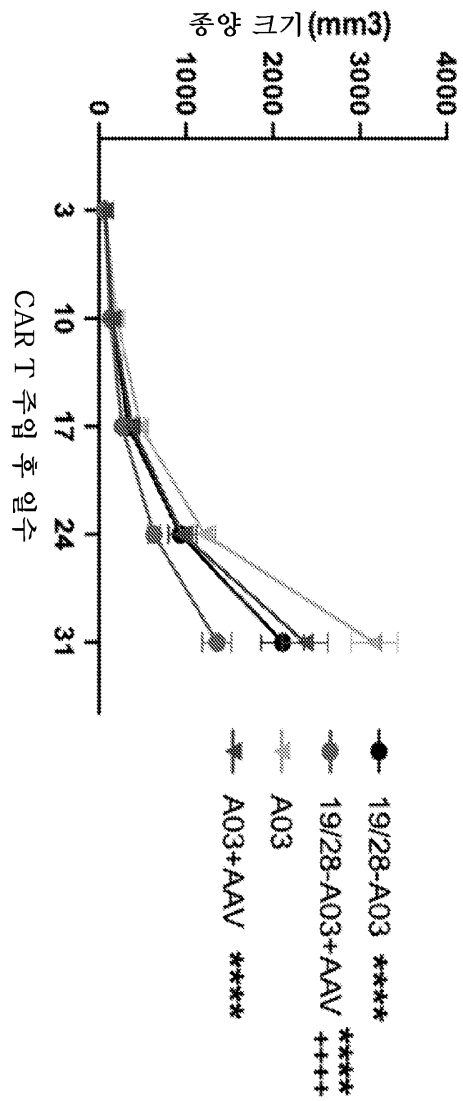
도면13b



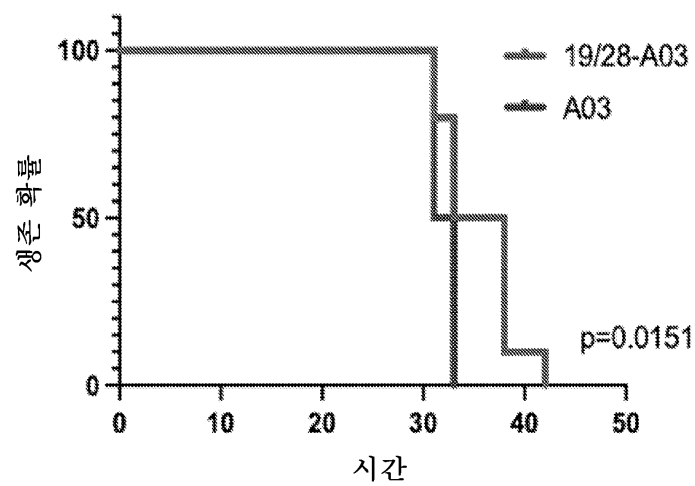
도면14a



도면14b



도면14c



도면15b

GSEA로부터의 홀마크 유전 경로 NES



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.