(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년11월18일
(11) 등록번호 10-2730900
(24) 등록일자 2024년11월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/705 (2006.01) *A61K 35/17* (2015.01)
A61K 38/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/705 (2013.01)
A61K 35/17 (2023.05)
(21) 출원번호 10-2020-7014799
(22) 출원일자(국제) 2018년11월14일
심사청구일자 2021년11월09일
(85) 번역문제출일자 2020년05월22일
(65) 공개번호 10-2020-0121783
(43) 공개일자 2020년10월26일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/081273
(87) 국제공개번호 WO 2019/101604
국제공개일자 2019년05월31일
(30) 우선권주장
17306630.9 2017년11월23일
유럽특허청(EPO)(EP)
(56) 선행기술조사문헌
CN106831998 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
에따블리스망 프랑세 뒤 상
프랑스 93210 라 플랜 생 데니스 20 아브뉘 뒤 스타드 드 프랑스
인스티튜트 내셔널 드 라 싼테 에 드 라 리셰르셰 메디칼르 (인쎄름)
프랑스 파리 세덱스 13 에프-75654 101 뤼 드 톨비악
(뒷면에 계속)
(72) 발명자
페랑 크리스토프
프랑스, 39700 담피에레, 8 루트 드 브쟝숑
데샹 마리나
프랑스, 25410 안토르페, 뤼 두 파로우
라로사 파브리스
프랑스, 21370 베라스 수르 오우쉐, 1 슈망 드 프랑스
(74) 대리인
특허법인한얼

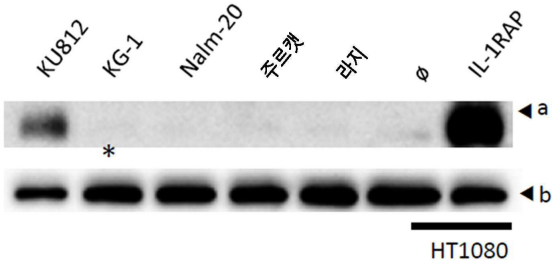
전체 청구항 수 : 총 26 항 심사관 : 강덕희

(54) 발명의 명칭 **ＩＬ-1ＲＡＰ를 표적화하는 ＣＡＲ-Ｔ 세포 및 그의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 단리된 핵산 분자(여기에서 CAR은 항-IL-1RAP 결합 도메인을 포함하는 항체 또는 항체 단편을 포함한다), 상기 핵산 분자에 의해 암호화된 폴리펩티드, 상기와 같은 항체 또는 항체 단편을 포함하는 단리된 키메라 항원 수용체(CAR) 분자, CAR을 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 벡터뿐만 아니라 상기 벡터를 포함하는 T 세포에 관한 것이다. 본 발명은 또한 포유동물에서 증식성 질병을 치료하기 위한, CAR 분자를 발현하는 상기 T 세포(자기유래 또는 동종이계)의 용도에 관한 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 38/00 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 16/2866 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
C07K 2319/03 (2013.01)
(73) 특허권자
쌍트르 오스삐딸리에 레지오날 위니베르시떼르 드 브쟝쏭
프랑스공화국, 에프-25000 브쟝쏭, 쁠라스 쌩-쟈끄 2
위니베르시테 드 프랑슈 콩테
프랑스 에프-25030 브장송 뤼 클로드 구디멜 1

명 세 서

청구범위

청구항 1

키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 단리된 핵산 분자(isolated nucleic acid molecule)로서, 상기 CAR이 항-IL-1RAP 결합 도메인을 포함하는 항체 또는 항체 단편; 막관통 도메인(transmembrane domain); 및 적어도 자극 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하고, 상기 항-IL-1RAP 결합 도메인이

(i) 아미노산 서열 서열번호 6으로 이루어지는 상보성 결정 영역 1(CDR1), 아미노산 서열 서열번호 7로 이루어지는 상보성 결정 영역 2(CDR2), 및 아미노산 서열 서열번호 8로 이루어지는 상보성 결정 영역 3(CDR3)을 포함하는 경쇄, 및

(ii) 아미노산 서열 서열번호 12로 이루어지는 상보성 결정 영역 1(CDR1), 아미노산 서열 서열번호 13으로 이루어지는 상보성 결정 영역 2(CDR2), 및 아미노산 서열 서열번호 14로 이루어지는 상보성 결정 영역 3(CDR3)을 포함하는 중쇄

를 포함하는 단리된 핵산 분자.

청구항 2

제1항에 있어서,

IL-1RAP 결합 도메인이 항체, Fv, scFv, Fab, 또는 또 다른 항체 단편으로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는 단리된 핵산 분자.

청구항 3

제2항에 있어서,

IL-1RAP 결합 도메인이 scFV인 단리된 핵산 분자.

청구항 4

제1항에 있어서,

막관통 도메인이 T-세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 쇄, CD28, CD3 입실론(epsilon), CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 및 CD154로 이루어지는 그룹 중에서 선택된 단백질의 막관통 도메인인 단리된 핵산 분자.

청구항 5

제4항에 있어서,

막관통 도메인이 CD28의 막관통 도메인인 단리된 핵산 분자.

청구항 6

제1항에 있어서,

항-IL-1RAP 결합 도메인이 힌지 영역(hinge region)에 의해 막관통 도메인에 연결되는 단리된 핵산 분자.

청구항 7

제6항에 있어서,

힌지 영역이 IgG1의 힌지 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 세포내 신호전달 도메인이 적어도 하나의 보조자극 도메인(costimulatory domain)을 포함하는 단리된 핵산 분자.

청구항 9

제8항에 있어서,

기능성 세포내 신호전달 도메인의 보조자극 도메인이 OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, CD3 제타, ICAM-1, LFA-1(CD11a/CD18), ICOS(CD278), 및 4-1BB(CD137)로 이루어지는 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 단백질로부터 획득되는 단리된 핵산 분자.

청구항 10

제9항에 있어서,

기능성 세포내 신호전달 도메인의 보조자극 도메인이 4-1BB(CD137)로부터 획득되고/되거나 CD3 제타로부터 획득되는 단리된 핵산 분자.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 핵산 분자에 의해 암호화된 단리된 폴리펩티드 분자.

청구항 12

항-IL-1RAP 결합 도메인을 포함하는 항체 또는 항체 단편; 막관통 도메인; 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 단리된 키메라 항원 수용체(CAR) 분자로서, 상기 항-IL-1RAP 결합 도메인이

(i) 아미노산 서열 서열번호 6으로 이루어지는 상보성 결정 영역 1(CDR1), 아미노산 서열 서열번호 7로 이루어지는 상보성 결정 영역 2(CDR2), 및 아미노산 서열 서열번호 8로 이루어지는 상보성 결정 영역 3(CDR3)을 포함하는 경쇄, 및

(ii) 아미노산 서열 서열번호 12로 이루어지는 상보성 결정 영역 1(CDR1), 아미노산 서열 서열번호 13로 이루어지는 상보성 결정 영역 2(CDR2), 및 아미노산 서열 서열번호 14로 이루어지는 상보성 결정 영역 3(CDR3)을 포함하는 중쇄

를 포함하는 단리된 CAR 분자.

청구항 13

제12항에 있어서,

(a) 상기 IL-1RAP 결합 도메인이 항체, Fv, scFv, Fab, 또는 또 다른 항체 단편으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되거나;

(b) 상기 막관통 도메인이 T-세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 쇄, CD28, CD3 입실론(epsilon), CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 및 CD154로 이루어지는 그룹으로부터 선택된 단백질의 막관통 도메인이거나;

(c) 상기 항-IL-1RAP 결합 도메인이 힌지 영역(hinge region)에 의해 막관통 도메인에 연결되거나;

(d) 상기 세포내 신호전달 도메인이 적어도 하나의 보조자극 도메인을 포함하는, 단리된 CAR 분자.

청구항 14

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 핵산 분자를 포함하는 벡터로서,

DNA, RNA, 플라스미드, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 또는 레트로바이러스 벡터로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 벡터.

청구항 15

제14항에 있어서, 렌티바이러스 벡터인 벡터.

청구항 16

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 핵산 분자 또는 상기 핵산 분자를 포함하는 렌티바이러스 벡터를 포함하는 단리된 세포로서, T 세포인 세포.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 세포는 CD8+ T세포인 세포.

청구항 18

제16항에 있어서, 막에서 상기 핵산 분자에 의해 암호화되는 CAR을 발현하는 세포.

청구항 19

제16항에 따른 세포를 포함하는 포유동물에서 증식성 질병의 치료에 사용하기 위한 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 인간에서 증식성 질병의 치료에 사용하기 위한 조성물.

청구항 21

제19항에 있어서, 증식성 질병이 IL-1RAP 발현과 관련된 질병인 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서, IL-1RAP 발현과 관련된 질병이 암, 또는 악성 또는 전암성 질환(precancerous condition)이거나, 골수이형성증(myelodysplasia), 골수이형성 증후군(myelodysplastic syndrome) 또는 전백혈병(preleukemia)인 조성물.

청구항 23

제21항에 있어서, IL-1RAP 발현과 관련된 질병이

B-세포 급성 림프양 백혈병("BALL"), T-세포 급성 림프양 백혈병("TALL") 또는 급성 림프양 백혈병(ALL)을 포함하는 하나 이상의 급성 백혈병; 및

만성 골수성 백혈병(CML) 또는 만성 림프구성 백혈병(CLL)을 포함하는 하나 이상의 만성 백혈병

으로 이루어지는 그룹으로부터 선택된 혈액암인 조성물.

청구항 24

제19항에 있어서,

CAR이 항원 결합 도메인, CD28 단백질의 막관통 도메인, 보조자극 4-1BB 신호전달 도메인, 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하고, 상기 항원 결합 도메인이

(i) 아미노산 서열 서열번호 6으로 이루어지는 상보성 결정 영역 1(CDR1), 아미노산 서열 서열번호 7로 이루어지는 상보성 결정 영역 2(CDR2), 및 아미노산 서열 서열번호 8로 이루어지는 상보성 결정 영역 3(CDR3)을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 경쇄, 및

(ii) 아미노산 서열 서열번호 12로 이루어지는 상보성 결정 영역 1(CDR1), 아미노산 서열 서열번호 13으로 이루어지는 상보성 결정 영역 2(CDR2), 및 아미노산 서열 서열번호 14로 이루어지는 상보성 결정 영역 3(CDR3)을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 중쇄

를 포함하는 항-IL-1RAP scFv인 조성물.

청구항 25

제19항에 있어서,

적어도 하나의 티로신 키나제 억제제(TKI)와 함께 사용하기 위한 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서,

TKI는 이마티닙, 다사티닙, 닐로티닙, 보수티닙 및 포나티닙 중에서 선택되는 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 단리된 핵산 분자(여기에서 CAR은 인간화된 항-IL-1RAP 결합 도메인을 포함하는 항체 또는 항체 단편, 막관통 도메인(transmembrane domain), 및 적어도 자극 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함한다), 상기 핵산 분자에 의해 암호화된 폴리펩티드, 및 상기와 같은 항체 또는 항체 단편을 포함하는 단리된 키메라 항원 수용체(CAR) 분자에 관한 것이다.

[0002] 본 발명은 또한 CAR을 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 벡터뿐만 아니라 상기 벡터를 포함하는 T 세포에 관한 것이다.

[0003] 본 발명은 또한 포유동물에서 증식성 질병을 치료하기 위한, CAR 분자를 발현하는 상기 T 세포의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0004] 만성 골수성 백혈병(CML)(또한 만성 골수양 백혈병으로서 공지됨)은 분화 능력의 상실 없이 과립구 세포주의 증가된 증식을 특징으로 하는 골수증식성 질환이다.

[0005] CML은, 필라델피아 염색체, 22q-로서 표시되는 단축된 염색체 22를 갖는, t(9;22)(q34;q11)의 전좌(translocation)로부터 발생하는 조혈모세포의 질병이다. 전좌는 염색체 9로부터의 *ABL1* 유전자 및 염색체 22로부터의 *BCR* 유전자의 병치를 유도하여, 높은 티로신 키나제 활성을 갖는 BCR-ABL1 전사물 및 융합 단백질을 암호화하는 *BCR-ABL1* 융합 유전자를 생성시킨다. CML의 분자 병인이 충분히 이해되고 있다하더라도, 유전자 전좌에 이르는 기전은 알려져 있지 않다.

[0006] CML의 발생률 범위는 어떠한 주요한 지리적 또는 민족적 차이 없이 10 내지 15 사례/10^6/년이다. 평균 진단 연령은 유럽에서 60 내지 65세의 범위이나, 보다 어린 집단에서는 여러나라에서 상당히 더 낮다. 소아 CML은 드물다.

[0007] CML의 진단은 일반적으로 간단하다. 대부분의 경우에, 진단은 특징적인 혈구계수를 근거로 이루어질 수 있다. 말초 혈액이나 골수 세포 중 필라델피아 염색체, 22q- 또는 BCR-ABL1 전사물, 또는 이 둘 모두의 식별에 의해 확진이 이루어진다.

[0008] 2000년대 초 이전에는 인터페론 알파(IFNα) 및 조혈모세포 이식이 CML의 유일한 유효 치료였다. 적합한 HLA 공여자를 구할 수 있는 경우 적격 환자에게 유일한 잠재적으로 치유가능한 치료는 조혈모세포 동종이계 이식인 것으로 간주되었다. 상기 동종이계 이식은 대다수의 공격적인 혈액병의 치료에 사용되는 입양 면역요법 접근법이다. 원리는 특이적인 T-수용체를 통한 세포독성 T 효과기의 활성에 따른 면역성 전달이다. 그러나, 이들 림프구에 특이적인 세포독성 활성은 인간 백혈구 항원(HLA)계의 분자에 의한 종양 항원의 표출에 의해 제한된다. 이러한 유형의 이식 시술의 사망률 및 동종이식후 재발 위험성은 상기 면역요법의 큰 방해물로 남아있다.

[0009] 이식편-대-백혈병, 동종이계 줄기세포 이식의 면역학적 효과뿐만 아니라 공여자 림프구 주입술(DLI)의 효능이, 치유되지 않는다 하더라도, 이식-관련 사망률 독성효과에도 불구하고 지속적인 질병 관해를 성취할 수 있게 하는 유일한 치료법으로 남아있음은 주지되어 있다.

[0010] 2000년대 초반 이래로, 만성기 CML의 치료에서 티로신 키나제 억제제(TKI)의 발견 및 광범위한 사용은 90% 초과의 생존을 성취함과 함께 상기 혈액병의 예후를 상당히 바꾸어놓았다. 현재 CML에서 TKI에 불내성/내성인 환자

및 진행된 단계의 CML(가속기 또는 급성 전환기) 환자에 대해서 조혈모세포의 동종이식편의 지시가 예약된다.

[0011] 2017년에, 제1선 치료법의 경우, 선택 치료는 여전히 티로신 키나제 억제제(TKI)의 사용이지만, 다른 치료학적 대안을 사용할 수도 있다. TKI 치료시, 대부분의 환자는 정상적인 조혈작용을 회복한다. 그러나, 이마티닙, 다사티닙, 닐로티닙, 보수티닙 또는 포나티닙과 같은 TKI는 CML 환자의 전체적인 생존 및 삶의 질에 관하여 많은 것을 제공하였지만, CML을 치유하는 이들 작용제의 능력은 제한적이다.

[0012] 더욱이, 불내성 및 독성, 잠재적인 임신 가능성, 또는 의료-경제 목적의 보건 투자 당국과 같은 고려사항들은 TKI의 중단을 고려하게 한다.

[0013] 다기관 이마티닙 연구에서, 이마티닙 치료(2년을 초과하여)는 분자에 의해 검출할 수 없는 백혈병을 갖는 CML 환자에서 중단되었다. 69명의 환자 등록시, 상기 69명의 환자 중 42명(61%)이 재발하였다. 12개월째에, 이들 69명의 환자에 대해서 지속적인 분자 불검출 백혈병의 확률은 41%였다. 이러한 실패는 침묵성 CML 줄기세포를 근절하지 못하는 TKI의 무능으로부터 발생한다.

[0014] 완전한 분자 반응을 갖는 환자에서 이마티닙을 중단하고자 하는 프랑스 연구 STIM 1(n = 100 환자)이 최근 2017년에 업데이트되었다. TKI 중단후 분자 재발률은 평균 2.5 개월의 시간에서 61%이며, 이는 상기 재발 환자에서 상기 질병의 수질 저장의 지속성을 입증한다.

[0015] 실제로, 현행 TKI는 치유적 치료라기보다는 오히려 억제성인데, 이는 TKI의 연속적인 장기 투여를 요하며, 뜻밖의 미지의 부작용을 발생시킬 잠재성을 갖는다. 더욱이, 어린 CML 환자에의 장기적인 TKI 투여는 장차 도전이 될 수도 있다.

[0016] 따라서, TKI 내성 CML 침묵성 전구체의 지속은 제거되어야 할 필요가 있다. 유전적 접근법은 암세포의 면역 인식 및 제거를 증대시키는 잠재적인 수단을 제공한다. 한 가지 유망한 전략은 종양 세포를 향해 세포독성을 재-유도하는 키메라 항원 수용체를 발현하도록 면역 효과기 세포를 유전자 조작하는 것이다.

[0017] 최근에, 종양 탈출 기전을 우회할 수 있게하는 세포 공학의 진보 덕분에 가장 최근 세대의 CAR(키메라 항원 수용체)-T 세포가 대두되고 있다. CAR-T 세포는 면역글로불린 가변 단편과 융합된 TCR의 불변 부분으로 구성된 키메라 TCR을 발현하는 T 림프구이다. 표적의 인식은 HLA에 의해 제한되지 않으며 따라서 모든 종류의 종양 마커의 표적화를 허용한다.

[0018] 새로운 면역요법 가운데, 세포 표면 종양 관련 항원에 대한 상기 CAR-T 세포가 불응성/재발성 ALL(급성 림프양 백혈병)(CD19) 또는 CLL(만성 림프구성 백혈병)(CD19) 환자에서뿐만 아니라, 고형 종양 및 혈액학 분야의 전임상 연구에서, 즉 MM(다발성 골수종)(CD38, BCMA(B 세포 성숙 항원), CD44v6 또는 CS1), AML(급성 골수성 백혈병)(CD33 또는 CD123), T 세포 암(CD5) 또는 림프종(CD30)에서 뜻밖의 성공을 나타내었다.

[0019] CML에서, 유전자 발현 프로파일링 연구는, 백혈병에 의해서는 발현되지만 정상적인 $CD34^{+}/CD38^{-}$ 조혈모세포에서는 발현되지 않는 세포 표면 생물마커(IL-1RAP 또는 IL-1R3)를 밝혀내었다. 더욱이, IL-1RAP 발현은 CML 질병의 임상 단계뿐만 아니라 종양 부담과 상관있다.

[0020] IL-1RAP(인터류킨-1 수용체 보조 단백질, Genbank 수납 번호 AAB4059)는 MAP 키나제, p38, NF-κB 및 염증 및 증식에 내재된 다른 유전자를 포함하여, 상이한 신호전달 경로를 활성화하는, IL-1 신호전달에 관련된 IL-1 및 IL33 수용체의 공-수용체이다. 상기 단백질은 종양 세포 표면에서 발현된다. 따라서 IL-1RAP는 유망한 종양-관련 항원이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0021] 본 출원인은 상기 IL-1RAP 항원을 사용함으로써, 유전자 변형된 CAR T 세포를 생성시켜 암 또는 종양, 특히 CML이 있는 환자에게 투여하는 것이 가능함을 발견하였다.

과제의 해결 수단

[0022] 표적 IL-1RAP와 함께, CML의 원인인 조혈모세포 Phi+를 표적화하는 세포 CAR-T의 개발은 혈액병의 전구체를 본질적으로 표적화하는 TKI 외에 또는 상기 TKI 대신에 혈액병의 원인을 근절하는 수단이다.

[0023] 상기 신규의 치료학적 무기를

[0024] - TKI 중단후 재발 환자,

[0025] - 동종이식-후(이식편-대-백혈병, 동종이계 줄기세포 이식, 공여자 림프구 주입술(DLI)) 재발된 환자,

[0026] - TKI하에서 최적이 아닌 반응을 갖는 비-적격 환자 또는

[0027] - 재발 위험이 큰 가속기/급성 전환기 CML을 나타내는 환자,

[0028] - 어린 또는 소아 CML 환자

[0029] 에게 적용할 수 있다.

[0030] 하나의 실시태양에서, CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공하며, 상기 CAR은 표적 항원에 결합하는 세포외 도메인, 막관통 도메인, 및 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 하나의 실시태양에서, CAR을 포함하는 벡터로 유전자 변형된 T 세포가 본 명세서에서 고려된다. CAR을 발현하는 T 세포를 본 명세서에서 CAR T 세포 또는 CAR 변형된 T 세포라 칭한다.

[0031] 본 발명은 특정한 실시태양에서, 암 치료에 사용하기 위한, 본 명세서에서 고려되는 CAR을 발현하도록 유전자 변형된 세포를 고려한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "유전자 조작된" 또는 "유전자 변형된"이란 용어는 DNA 또는 RNA 형태의 외부 유전 물질의, 세포 중 전체 유전 물질내로의 첨가를 지칭한다.

[0032] "#E3C3" 및 "#A3C3"이란 용어는 동일한 것으로 이해된다: #E3C3은 #A3C3을 지칭하는데 자유롭게 사용될 수 있으며 이와 역도 마찬가지이다.

도면의 간단한 설명

[0033] 본 발명의 다른 목적, 특징, 태양 및 장점은 하기의 설명, 도면 및 실시예의 판독시 보다 명백하게 나타날 것이다:

도 1: 웨스턴 블럿에서 #E3C3 mAb의 용도. 백혈병 세포주 KU812, KG-1, Nalm-20, 주르캣(Jurkat), 및 라지(Raji)가 사용된다. IL-1RAP cDNA 변체로 형질감염된 HT1080 세포주가 대조용으로서 사용되었다. 액틴은 단백질 부하 대조용으로서 사용되었다. 라인 a: IL-1RAP(72 kDA)의 검출, 라인 b: 대조용 액틴(43 kDA)의 검출, *: 약한 신호.

도 2: ELISA 기법에 의한 #E3C3 mAb를 갖는 IL-1RAP 재조합 단백질의 인식(b). BSA는 음성 대조용이다(a).

도 3: 진단시(Diag) 또는 이마티닙(IM) 치료후 2명의 CML 양성 환자의 말초 혈액(PM) 또는 골수(BM)에 대한 면역표현형검사. IL-1RAP(#E3C3)가 CD34+ 및 CD38- 형광 염색과 함께 사용되었다. 상이한 mAb로부터의 형광색소-접합된 아이소타입 대조용 mAb가 전신적으로 사용되었다.

도 4: 형광 mAb로 염색된 KU812(a) 및 라지 세포주(b)[(좌측 패널: 항 쥐 Fc-IgG; 중간 패널: IL-1RAP(#E3C3)]. 대조염색을 핵 착색제 DAPI에 의해 수행하고 형광 염색에 겹쳐놓았다(우측 패널, 합쳐놓음).

도 5: 동결된 조직 배열을 사용하는 특정한 조직 결합. 고 IL-1RAP(KU812)(a) 또는 음성(라지)(b) 발현 세포주가 각각 양성 또는 음성 대조용으로서 사용되었다. 하기의 조직이 시험되었다: a: 림프절, b: 결장, c: 소장, d: 태반, e: 위, f: 폐, g: 비장 및 h: 전립선.

도 6: 안전 카세트 iCASP9, #E3C3 mAb의 단쇄 가변 단편(scFv) 및 세포 표면 발현된 마커 △CD19를 갖는 SIN 렌티바이러스 구조물의 설계. 3개의 트랜스유전자가 2A 펩티드 절단 서열에 의해 분리되고 EF1 프로모터 + SP163 인헨서 서열의 조절하에 있다.

도 7: IL-1RAP 형질도입된 T 세포의 세포하 분획상의 웨스턴 블럿팅. a: 전체 용해물, b: 세포막, c: 세포질, d: 핵, (1) CAR 관련된 CD3제타(55 kDa), (2) 내인성 CD3제타(16 kDa), (3) CD45(147 kDa), (4) 라민(68 kDa), (5) GAPDH(35 kDa).

도 8: IL-1RAP CAR 형질도입된 CEM T 세포주 또는 1차 T-세포의 FACS 분석 검출. 비오틴+/CD19+ CEM 또는 T-세포의 백분율(a)을 표지된 비오틴 재조합 단백질의 양(b)에 대해 플롯팅하였다.

도 9: 화학적 유도인자 이량화제(10 nM CID) 노출후 iCASP9/AP1903 자살 시스템 카세트의 안전 스위치. (a) 293T 세포, (b) IL-1RAP CAR 293T 세포.

도 10: 형질도입되지 않은 T 세포(C0)에 비해 24h 또는 48h CID 노출후의 IL-1RAP CART 세포의 제거(*** p<0.001, n=3).

도 11: 동형 1(v1) 및 동형 3(v5)의 유식 세포측정(11A) 및 웨스턴 블럿(11B). (a) 액틴, (b) IL-1RAP-v1 또는 v5(72 kDa), (1) 전체 세포 K562 단백질, (2) K562 배양물로부터의 중간 상등액.

도 12: K562(a), K562-v1(b), -v5(c) 또는 KU812(d) 세포주의 존재하에서 CFSE 염색된 C0, 모의 또는 IL-1RAP CART 세포의 공-배양에 의해 IL-1RAP 표적 발현 세포에 의해 촉발된 IL-1RAP CART 세포의 증식 능력. (p<0,001, n=4)

도 13: C0(a), 모의 T 세포(b) 또는 CART 세포(c)와의 공배양후 상등액 중의 Th1/Th2/Th17 사이토카인의 양.

도 14: IL-1RAP+(K532-V1, KU812) 발현 표적 세포에 대한, 공배양된 IL-1RAP CART 세포에 적용된 CD107a&b 탈과립화 분석. 효과기를 모넨신으로 처리하고 37℃에서 CD107a 및 CD107b mAb로 1h 염색하였다. 5h 후에, CD3+/CD19+/CD8+ 세포를 CD107a 및 CD107b 염색에 대해서 유식 세포측정에 의해 분석하였다. PMA/Iono 활성화가 대조용으로서 사용되었다. (p<0.001, n=4).

도 15: 형광(eFluor) 및 7-AAD 염색에 의한 시험관내 IL-1RAP CAR 발현 T 세포의 IL-1RAP 의존적인 세포용해 효능. 형질도입되지 않은 또는 모의-형질도입된 T 세포가 대조용으로서 사용되었다. (p<0.001, n=4).

도 16: 쥐 실험. A/NSG 마우스 K562 이종이식편 모델. B/2일에서부터 28일까지 상이한 그룹의 마우스의 BLI 분석. (ⓧ): 죽은 마우스. 좌측 패널: 처리되지 않은, 중간: 모의 T 세포, 우측 패널: IL-1RAP CART 세포.

도 17: CML 환자로부터의 1차 IL-1RAP+ 순환 세포에 대한 시험관내 독성. 좌측, 유럽 암 대항(EAC) 방법 및 권고에 따른 BCR-ABL1 전사물 비(국제 규모 기준 %)의 동적인 정량분석. RM3.0, RM4.0, RM4.5 및 RM5.0은 각각 3, 4, 4.5 및 5 로그의 감소에 상응하는 분자 반응 수준을 나타낸다. IM400: 이마티닙 400 mg/일, DAS100: 다사티닙 100 mg/일, BOS400: 보수티닙 400 mg/일, NIL600: 닐로티닙 600 mg/일. 우측, CML 환자로부터의 PBMC의 형질도입 효율의 CD3+/CD19+ 염색 및 유식 세포측정 분석.

도 18: 다양한 E:T 비에서 KU812 세포와, eFlour로 표지된 효과기 C0, 모의-T 또는 CAR T 세포와의 공배양 후 FSC+/7-AAD- 게이트내에서 지속적으로 생육성인 KU812 세포의 그래프 표현. FSC+/7-AAD- 게이트내에서 지속적으로 생육성인 KU812 세포의 그래프 표현.

도 19: CML 환자로부터의 1차 IL-1RAP+ 순환 세포에 대한 시험관내 독성. 중복 실험으로부터 산출된 전체 사멸된 표적의 백분율. 결과는 평균±SD로서 표현된다.

도 20: 다양한 효과기:표적(E:T) 비에서 각각의 CML 동종이식편에 대한 IL-1RAP CAR 또는 모의 T 세포의 세포독성. 3명의 상이한 CML 환자로부터의 3개의 독립적인 실험의 합산 결과. 대조용 세포(C0)로부터 산출된 나머지 생육성 CD34+/IL-1RAP+ 세포의 백분율을 제공한다. **p<0.01.

도 21: 20년 넘게[min: 16y - max: 21y] 상이한 TKI 치료하에서 또는 치료 없이 여전히 실제로 살아있는 CML 환자(n=3)의 PBMC로부터 생성된 자기유래 IL-1RAP CART-세포를 시험관내에서 그들 각각의 저온보존된 자기유래 말초 혈액 줄기세포 이식편(PBSC, 진단시 수확되었음, 20년보다 더 과거)과 공-배양하였다. CML 환자, 말초 혈액 줄기세포 자가이식편 특징. Ø: 치료 없음; IFNɣ: 인터페론ɣ; IM: 이마티닙; DAS: 다사티닙: NIL: 닐로티닙; PON: 포나티닙; BOS: 포수티닙.

도 22: (A) 조직 미세배열. 장기 당 3명의 개별적인 공여자의 90개 조직 코어(30개 장기)(US Biomax, 미국 메릴랜드주 록빌 소재)를 포함한, 미국 식품의약품 안전청의 표준 동결 조직 배열의 전형적인 #A3C3 염색. 면역염색을 울트라뷰 유니버셜(UltraView Universal) DAB 검출 키트(Ventana, 미국 소재)를 사용하여 검출하였다. 상들을 포착하고 NDP.view 2.0 소프트웨어로 분석하였다. 분석된 3명 중 적어도 한 명에서 어느 정도의 #A3C3 mAb 염색을 나타낸 조직을 나타낸다. (스케일 바, 100 ㎛). 고 IL-1RAP(KU812)- 또는 음성(라지)-발현 세포주가 각각 양성 또는 음성 대조용으로서 사용되었다. (B) HMEC-1 피부 내피 세포주의 IL-1RAP R&D(적색) 또는 #A3C3(청색) 염색. 아이소타입 IgG1(회색)이 오버레이로서 묘사된다. 상기 두 염색 모두에 대한 FRI가 제공된다.

도 23: 건강한 조혈세포에 대한 IL-1RAP CAR T 세포의 영향 및 안전 자살 유전자 iCASP9 카세트의 효율. (A) 건강한 공여자(n=5)로부터의 말초 혈액(좌측) 또는 골수(우측) 세포상에서의 IL-1RAP 세포 표면 발현. SSC-A/CD45+는 림프구(SSC-A 저), 단핵세포(CD33+), 과립구(SSC-A 고), 또는 HSC(CD33-/CD34+)로서 아집단의 구별을 허용하였다. RFI를 아이소타입 염색으로부터 산출하고 각각의 창에 제공하였다. (B) 완전한 인간 제대혈 세

포의 전형적인(셋 중 하나) IL-1RAP 염색. IL-1RAP 염색이 완전 CD34+, CD34+/CD38- 및 CD34+/CD38+ HSC 제대혈 아집단에 대해 제공된다. (C) CML 환자로부터의 BM(n=10) 또는 말초 혈액(PB, n=10)으로부터의 CD34+ 세포와 비교된, 건강한 공여자(n=5)로부터의 제대혈(CB, n=5) 또는 골수(BM) 중의 CD34+ 세포 중 IL-1RAP-양성 세포. (D) 좌측, 상이한 효과기:표적(E:T) 비의 자기유래 형질도입되지 않은 T 세포 또는 모의 또는 IL-1RAP CAR T 세포의 존재하에서 배양된 SSC-A/CD45+ 과립구(G), 단핵세포(M), 및 림프구(L) 아집단의 도트 플롯. 우측, 자기유래 모의 T 세포(점선) 또는 IL-1RAP CAR T 세포(실선)와 24h 공-배양된, 형질도입되지 않은 자기유래 T 세포(C0)에 대해 표준화된, 림프구(사각형), 단핵세포(원) 및 과립구(삼각형) 중에서 살아있는 세포의 상대적인 백분율. (E) 상이한 E:T 비의 모의(검은색, 점선) 또는 IL-1RAP CAR T 세포(흰색, 실선)의 존재하에서 단핵세포(사각형), KU812(원), 또는 K562(삼각형) 아집단 중에서 살아있는 세포의 상대적인 백분율. 5000 형광-비드 세포측정 획득에 근거하여 트루카운트(Trucount) 튜브를 사용하여 측정된 절대 세포수를 사용하여 백분율을 계산하였다. (F) 좌측, CID AP1903-유발된 세포사의 절대계수에 대한 게이팅 전략 및 분석. 형질도입되지 않은(C0) 또는 IL-1RAP CAR T 세포를 배지 단독 또는 배지 +CID(20 nM, 24h)에 노출시켰다. 5000 형광 비드 획득 후에 정량분석을 수행하였다. 사멸 효율을 대조용 세포(처리되지 않은 세포)에 표준화하였다. 세포 사멸을 하기와 같이 계산하였다: 죽은 세포% = [1 - (AP1903-처리된 세포 중 생육성 세포의 절대수/처리되지 않은 세포 중 생육성 세포의 절대수)] x 100. (D) 사망률의 절대 백분율. 24h 또는 48h C0 또는 IL-1RAP CAR(CD3+/CD19+상에서 게이팅) T 세포 CID 노출. 우측, 결과는 3개의 독립적인 실험으로부터의 평균이다. **p<0.001. (G) i.p. AP1903(백색 막대) 처리(n=3 마우스/그룹) 후 24h째에 종양(CML KU812, i.v.) 이종이식편 NSG 모델에 주사된 IL-1RAP CAR T 세포의 절대 정량분석. 대조용 T 세포(C0)가 주입된 마우스가 대조용으로서 사용되었다(n=2 마우스/그룹). **p<0.01. 세포수를 말초 혈액 ㎖당 제공한다.

도 24: 인간-CD34+ 제대혈 세포 생착된/NOG 쥐 모델(hu-NOG)에서 HSC 및/또는 면역세포에 대한 자기유래 IL-1RAP CART-세포의 비(specific) 독성을 조사하기 위한 실험적 면역안전 인간 CD34+ 생착된 NOG 쥐 모델. 간단히, 10.10E6 자기유래 CART-세포 또는 대조용 T-세포(C0)(쥐 PBMC, 비장 또는 골수로부터 세포-분류된 인간 CD45+로부터 생성됨)를 주입하였다. 성숙한 면역세포(hCD3+, hCD19+, hCD56+, hCD14+, hCD11b+)의 모니터링이 세포측정에 의해 주입후(5, 8 및 15일째) 다양한 시간에서 평가되었다. CART-세포 주입에 앞서 -7일째에 획득된 면역표현형검사 참조로부터 변화 배수를 계산하였다. 말초 혈액 수확시(-9일째)와 비교한다. 말초 혈액 수확시(-9일째)와 비교한, 형질도입되지 않은(C0, 흰색 막대) 또는 IL-1RAP CART-세포(검은색 막대) 주입 후 3, 8 및 15일째의 상이한 면역능력 세포 아집단의 변화 배수. 세포계수를 후-안와 샘플에 의해 수확된 말초 혈액으로부터 수행하고 변화 배수를 -7일째 참조에 대해 산출하였다. n.s: 유의수준 아님.

도 25: 3개의 상이한 제대혈로부터 수확되고 단독으로 배양되거나(흰색 막대) 또는 그들 각각의 자기유래의 형질도입되지 않은 세포(C0, 회색 막대) 또는 IL-1RAP CART-세포(검은색 막대)와 공-배양된, CD34+ HSC로부터의 콜로니 형성 단위(CFU-GM) 실험{Giavridis, 2018 #1861}.

도 26: 상부 패널: 형질도입된 293T 세포에 대한 CID 효과의 광학 현미경검사에 의한 평가. 하부 패널: CID AP1903 노출후 IL-1RAP CART 세포의 유식 세포측정 분석. 형질도입되지 않은 T 세포(C0), 및 IL-1RAP CAR을 발현하거나 발현하지 않는 GMTC 혼합물에 대한 CID 노출후(20 nM, 24h, 짙은 회색) 또는 비노출시(밝은 회색)의 유식 세포측정 분석. CD3+/CD19+ 염색은 CAR을 발현하는 GMTC의 구별을 허용하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] 하기의 표는 서열 식별자를 요약한다.

[0035] [표 1] 서열 목록

서열번호	명칭	서열
서열번호 1	쥐 scFv 항-IL-1RAP의 쇄 H(VH)를 암호화하는 뉴클레오티드 서열(회색의 리더 서열을 갖는다)	atgggatggagctgtatcatcctcttcttggtagcaacagctacaggtgtcaactcccaggtccaactgcagcagcctggggctgagcttatgatgcctggggcttcagtgaaagtgtcctgcgaggcttctggctacacattcactgactcctggatgcactgggtgaagcagaggcctggacaaggccttgagtggatcggagcgattgatccttctgatagttatactacctataatcaaaaattcacgggcaaggccacattgagtgtagacgaatcctccaacacagcctacatgcagctcagcagcctgacatctgaggactctgcggtctattactgtgcaaggtattactccggtagtaactacatatcgccctttccttactggggccaagggactctggtcactgtctctgca
서열번호 2	쥐 scFv 항-IL-1RAP의 쇄 H(VH)의 아미노산 서열(회색의 리더 서열을 갖는다)	MGWSCIILFLVATATGVNSQVQLQQPGAELMMPGASVKVSCEASGYTFTDSWMHWVKQRPGQGLEWIGAIDPSDSYTTYNQKFTGKATLSVDESSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYSGSNYISPFPYWGQGTLVTVSA
서열번호 3	쥐 scFv 항-IL-1RAP의 쇄 K(VL)를 암호화하는 뉴클레오티드 서열	atggagtcacagattcaggtctttgtattcgtgtttctctggttgtctggtgttgacggagacattgtgatgacccagtctcacaaattcatgtccacatcagtaggagacagggtcaccatcacctgcaaggccagtctggatgtgagtactgctgtggcctggtatcaacagaaaccaggacaatctcctaaactactgatttactcggcatcctaccggtacactggagtccctgatcgcttcactggcagtggatctgggacggatttcactttcaccatcagcagtgtgcaggctgaagacctggcagtttattactgtcagcaacattatagtcctccattcacgttcggctcggggacaaacttggagataaaac

[0036]

서열번호 4	쥐 scFv 항-IL-1RAP 의 쇄 K(VL)의 아미노산 서열	MESQIQVFVFVFLWLSGVDGDIVMTQSHKFMSTSVGDRVTITCKASLDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSPPFTFGSGTNLEIK
서열번호 5	VH 및 VL 도메인간의 링커(aa)	GGSGGGGSGGGGSVD
서열번호 6	경쇄의 CDR1(aa)	LDVSTA
서열번호 7	경쇄의 CDR2(aa)	SAS
서열번호 8	경쇄의 CDR3(aa)	QQHYSPPFT
서열번호 9	경쇄의 CDR1(뉴클레오티드)	ctggatgtgagtactgct
서열번호 10	경쇄의 CDR2(뉴클레오티드)	tcggcatcc
서열번호 11	경쇄의 CDR3(뉴클레오티드)	cagcaacattatagtcctccattcacg
서열번호 12	중쇄의 CDR1(aa)	GYTFTDSW
서열번호 13	중쇄의 CDR2(aa)	IDPSDSYT
서열번호 14	중쇄의 CDR3(aa)	ARYYSGSNYISPFPY

[0037]

서열번호 15	중쇄의 CDR1(뉴클레오티드)	ggctacacattcactgactcctgg
서열번호 16	중쇄의CDR2(뉴클레오티드)	attgatccttctgatagttatact
서열번호 17	중쇄의CDR3(뉴클레오티드)	gcaaggtattactccggtagtaactacatatcgccctttccttac
서열번호 18	쥐 scFv 항-IL-1RAP의 아미노산 서열(즉, #A3C3 CAR로부터)	MGWSCIILFLVATATGVNSQVQLQQPGAELMMPGASVKVSCEASGYTFTDSWMHWVKQRPGQGLEWIGAIDPSDSYTTYNQKFTGKATLSVDESSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYSGSNYISPFPYWGQGTLVTVSAGGSGGGGSGGGGSVDMESQIQVFVFVFLWLSGVDGDIVMTQSHKFMSTSVGDRVTITCKASLDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSPPFTFGSGTNLEIK

[0038]

[0039] IgG1, IgG4, CD8알파, 4-1BB, CD3 제타, CD28 및 ICasp9 유전자의 힌지 영역(hinge region)의 서열을 Genbank에서 찾을 수 있다.

[0040] 본 발명의 실시는 달리 구체적으로 반대되지 않는 한, 당해 분야의 기술내에 있는 화학, 생화학, 유기화학, 분자 생물학, 미생물학, 재조합 DNA 기법, 유전학, 면역학, 및 세포 생물학의 통상적인 방법을 사용할 것이며, 이들 중 다수를 예시를 목적으로 하기에 기재한다. 상기와 같은 기법은 문헌에 충분히 설명되어 있다. 예를 들어, 하기의 문헌: Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Edition, 2001); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989); Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, updated July 2008); Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Glover, DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I & II (IRL Press, Oxford, 1985); Anand, Techniques for the Analysis of Complex Genomes, (Academic Press, New York, 1992); Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); Harlow and Lane, Antibodies, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998); Current Protocols in Immunology, Q. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach 및 W. Strober, eds., 1991); 면역학의 연간 보고뿐만 아니라 Advances in Immunology와 같은 학술지의 논문을 참조하시오.

[0041] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술과학 용어는 본 발명이 속하는 분야의 통상적인 숙련가에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 기재된 바와 유사하거나 균등한 임의의 방법 및 물질을 본 발명의 실시나 시험에 사용할 수 있지만, 조성물, 방법 및 물질의 바람직한 실시태양을 본 명세서에 기재한다.

[0042] 숙련가에 의해 이해되는 바와 같고 본 명세서의 달리 어딘가에 기재된 바와 같이, 완전 항체는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함한다. 각각의 중쇄는 가변 영역 및 제1, 제2 및 제3 불변 영역으로 이루어지는 반면, 각각의 경쇄는 가변 영역 및 불변 영역으로 이루어진다. 포유동물 중쇄는 α, δ, ε, γ, 및 μ로서 분류되고, 포유동물 경쇄는 λ 또는 κ로서 분류된다. 상기 α, δ, ε, γ, 및 μ 중쇄를 포함하는 면역글로불린은 면역글로불린 (Ig)A, IgD, IgE, IgG, 및 IgM으로서 분류된다. 상기 완전 항체는 "Y" 모양을 형성한다. 상기 Y의 줄기는 함께 결합된 2개의 중쇄의 제2 및 제3 불변 영역(및 IgE 및 IgM의 경우, 제4 불변 영역)으로 이루어지며 디설파이

드 결합(쇄-간)이 힌지 중에 형성된다. 중쇄 γ, α 및 δ는 3개의 나란한(한 줄로 된) Ig 도메인으로 구성된 불변 영역, 및 가요성의 부가를 위한 힌지 영역을 가지며; 중쇄 μ 및 ε는 4개의 면역글로불린 도메인으로 구성된 불변 영역을 갖는다. 제2 및 제3 불변 영역을 각각 "CH2 도메인" 및 "CH3 도메인"이라 칭한다. 상기 Y의 각 가지는 단일 경쇄의 가변 및 불변 영역에 결합된 단일 중쇄의 가변 영역 및 제1 불변 영역을 포함한다. 상기 경쇄 및 중쇄의 가변 영역은 항원 결합을 담당한다.

[0043] 경쇄 및 중쇄 가변 영역은 3개의 고가변 영역(또한 "상보성-결정 영역" 또는 "CDR"이라 칭한다)에 의해 중단되는 "프레임워크" 영역을 함유한다. 상기 CDR을 통상적인 방법에 의해, 예를 들어 카밧(Kabat) 등에 따른 서열에 의해(Wu, TT and Kabat, E. A., J Exp Med. 132(2):211-50, (1970); Borden, P. and Kabat E. A., PNAS, 84: 2440-2443 (1987); (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991), 또는 코티아(Chothia) 등에 따른 구조에 의해(Choithia, C. and Lesk, A.M., J Mol. Biol., 196(4): 901-917 (1987), Choithia, C. et al, Nature, 342: 877 - 883 (1989)) 한정하거나 식별할 수 있다.

[0044] 상이한 경쇄 또는 중쇄의 프레임워크 영역의 서열은 하나의 종, 예를 들어 인간내에서 비교적 보존된다. 항체의 프레임워크 영역, 즉 구성 경쇄 및 중쇄의 결합된 프레임워크 영역은 CDR을 3차원 공간 중에 위치시키고 정렬시키는 작용을 한다. 상기 CDR은 주로 항원의 에피토프에의 결합을 담당한다. 각 쇄의 CDR은 전형적으로 CDR1, CDR2 및 CDR3로서 지칭되며, N-말단에서부터 출발하여 연속해서 넘버링되고, 또한 전형적으로는 특정 CDR이 위치하는 쇄에 의해 식별된다. 따라서, 항체의 중쇄의 가변 도메인 중에 위치한 CDR을 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3라 지칭하는 반면, 항체의 경쇄의 가변 도메인 중에 위치한 CDR은 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3라 지칭한다. 상이한 특이성(즉 상이한 항원에 대한 상이한 결합 부위)을 갖는 항체는 상이한 CDR을 갖는다.

[0045] "VH" 또는 "V_H"에 대한 언급은 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체, Fv, scFv, Fab 또는 다른 항체 단편의 경우를 포함하는, 면역글로불린 중쇄의 가변 영역을 지칭한다.

[0046] "VL" 또는 "V_L"에 대한 언급은 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체, Fv, scFv, dsFv, Fab 또는 다른 항체 단편의 경우를 포함하는, 면역글로불린 경쇄의 가변 영역을 지칭한다.

[0047] "단클론 항체"는 B 림프구의 단일 클론에 의해, 또는 단일 항체의 경쇄 및 중쇄 유전자로 형질감염된 세포에 의해 생산되는 항체이다. 단클론 항체는 당해 분야의 숙련가에게 공지된 방법에 의해, 예를 들어 골수종 세포와 면역 비장 세포와의 융합으로부터 하이브리드 항체-형성 세포를 제조함으로써 생성된다. 단클론 항체는 인간화된 단클론 항체를 포함한다.

[0048] 관사 "하나" 및 "상기"는 본 명세서에서 상기 관사의 문법적 목적어 중 하나 또는 하나 초과(즉 하나 이상)를 지칭하는데 사용된다.

[0049] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "약" 또는 "대략적으로"란 용어는 참조 양, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이에 대해 30, 25, 20, 25, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1%만큼 변하는 양, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이를 지칭한다. 특정 실시태양에서, "약" 또는 "대략적으로"란 용어는 수치에 선행할 때 + 또는 - 15%, 10%, 5%, 또는 1% 범위의 값을 가리킨다.

[0050] 본 명세서 전체를 통해, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, "포함하다", 및 "포함하는"이란 단어는 서술된 단계 또는 요소 또는 단계들 또는 요소들의 그룹을 포함하지만 임의의 다른 단계 또는 요소 또는 단계들 또는 요소들의 그룹을 제외하지 않음을 의미하는 것으로 이해될 것이다.

[0051] 본 명세서 전체를 통해 "하나의 실시태양", "실시태양", "특정 실시태양", "몇몇 실시태양", "추가적인 실시태양" 또는 "추가의 실시태양" 또는 이들의 조합에 대한 언급은 상기 실시태양과 관련하여 기재된 특정한 특징, 구조 또는 특성이 본 발명의 적어도 하나의 실시태양에 포함됨을 의미한다.

[0052] 본 발명의 목적을 위해서, "동일성" 또는 "상동성"은 비교창에서 2개의 정렬된 서열을 비교함으로써 산출된다. 서열의 정렬은 상기 비교창에서 상기 2개의 서열에 공통적인 위치(뉴클레오티드 또는 아미노산)의 수를 측정할 수 있게 한다. 이어서 공통적인 위치의 수를 상기 비교창 중의 총 위치의 수로 나누고 100을 곱하여 상동성의 백분율을 획득한다. 서열 동일성의 백분율 측정을 수동으로 또는 주지된 컴퓨터 프로그램을 사용하여 수행할 수 있다.

[0053] 본 발명은 세포독성이 종양 세포를 향하게 하는 키메라 항원 수용체를 발현하도록 설계된 벡터에 의해 유전자 조작된 면역 효과기 세포를 제공한다. 상기 유전자 조작된 수용체를 본 명세서에서 키메라 항원 수용체(CAR)라

칭한다. CAR은 표적 항원(예를 들어 종양 항원)에 대한 항체-기반 특이성을 T 세포 수용체-활성화 세포내 도메인과 조합하여 특이적인 항-종양 세포 면역 활성을 나타내는 키메라 단백질을 생성시키는 분자이다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "키메라"란 용어는 상이한 기원으로부터의 상이한 단백질 또는 DNA의 부분들로 구성됨을 기술한다.

[0054] 본 발명은 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이며, 여기에서 상기 CAR은 항-IL-1RAP 결합 도메인을 포함하는 항체 또는 항체 단편, 막관통 도메인, 및 적어도 자극 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하며, 여기에서 상기 항-IL-1RAP 결합 도메인은

[0055] (i) 아미노산 서열 서열번호 6과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 상보성 결정 영역 1(CDR1), 아미노산 서열 서열번호 7과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 상보성 결정 영역 2(CDR2), 및 아미노산 서열 서열번호 8과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 상보성 결정 영역 3(CDR3)을 포함하는 경쇄, 및

[0056] (ii) 아미노산 서열 서열번호 12와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 상보성 결정 영역 1(CDR1), 아미노산 서열 서열번호 13과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 상보성 결정 영역 2(CDR2), 및 아미노산 서열 서열번호 14와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 상보성 결정 영역 3(CDR3)을 포함하는 중쇄

[0057] 를 포함한다.

[0058] CAR의 주요 특징은 면역 효과기 세포 특이성을 재유도하여, 증식, 사이토카인 생성, 식균작용 또는 주 조직적합성(MHC) 독립적인 방식으로 표적 항원 발현 세포의 세포사를 매개할 수 있는 분자의 생성을 촉발시키고, 단클론 항체, 용해성 리간드 또는 세포 특이성 공-수용체의 세포 특이성 표적화 능력을 이용하는 그의 능력이다.

[0059] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "결합 도메인", "세포외 결합 도메인", "항원-특이성 결합 도메인", 및 "세포외 항원 특이성 결합 도메인"이란 용어는 호환 가능하게 사용되며 CAR에, 관심 표적 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 제공한다. 결합 도메인은 생물 분자(예를 들어, 세포 표면 수용체 또는 종양 단백질, 지질, 폴리사카라이드, 또는 다른 세포 표면 표적 분자, 또는 그의 성분)을 특이적으로 인식하고 상기 분자에 결합하는 능력을 갖는 임의의 단백질, 폴리펩티드, 올리고펩티드, 또는 펩티드를 포함할 수 있다. 결합 도메인은 관심 생물 분자에 대한 임의의 천연, 합성, 반-합성, 또는 재조합적으로 생성된 결합 상대를 포함한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "특이적인 결합 친화성" 또는 "특이적으로 결합하는" 또는 "특이적으로 결합된" 또는 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 표적화하는"이란 용어는 하나의 분자가 배경 결합보다 더 큰 결합 친화성으로 또 다른 분자에 결합함을 기술한다. 결합 도메인(또는 결합 도메인을 포함하는 CAR 또는 결합 도메인을 함유하는 융합 단백질)은 표적 분자와, 예를 들어 약 10^5 M^{-1} 이상의 친화성 또는 Ka(즉 1/M의 단위를 갖는 특정 결합 상호작용의 평형 결합 상수)로 표적 분자에 결합하거나 상기 분자와 회합하는 경우 상기 분자에 "특이적으로 결합한다". 본 개시에 따른 결합 도메인 폴리펩티드 및 CAR 단백질의 친화성을 경쟁 ELISA(효소-연계된 면역흡수 분석)와 같은 통상적인 기법을 사용하여 쉽게 측정할 수 있다.

[0060] 항체는 인간 항체, 쥐 항체 또는 인간화된 항체이다.

[0061] 몇몇 바람직한 실시태양에서, 항체는 종양 세포상의 표면 단백질에 특이적으로 결합하는 인간화된 항체(예를 들어 인간화된 단클론 항체)이다. "인간화된" 항체는 인간 프레임워크 영역 및 비-인간(예를 들어 마우스, 래트 또는 합성) 면역글로불린으로부터의 하나 이상의 CDR을 포함하는 면역글로불린이다. 따라서, 인간화된 면역글로불린의 모든 부분은, 가능하게는 CDR을 제외하고, 천연 인간 면역글로불린 서열의 상응하는 부분에 실질적으로 일치한다. 인간화된 또는 다른 단클론 항체는 추가적인 보존적 아미노산 치환을 가질 수 있으며, 상기 치환은 항원 결합 또는 다른 면역글로불린 기능에 실질적으로 영향이 없다. 인간화된 항체를 유전자 조작에 의해 구성할 수 있다(예를 들어 미국특허 제 5,585,089 호를 참조하시오).

[0062] 항체는 그의 항원 결합 단편, 예를 들어 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab)'2 단편, F(ab)'3 단편, Fv, 단쇄 Fv 단백질("scFv") 및 항원 결합을 담당하는 완전 길이 항체의 부분을 포함한다. 상기 용어는 또한 유전자 조작된 형태, 예를 들어 키메라 항체(예를 들어 인간화된 쥐 항체), 이종접합 항체(예를 들어 이중특이성 항체) 및 그의 항원 결합 단편을 포함한다.

[0063] "단쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하며, 여기에서 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 쇄 중에 둘 중 어느 한 배향으로 존재한다(예를 들어 VL-VH 또는 VH-VL).

[0064] 단쇄 항체를 목적하는 표적에 특이적인 하이브리도마의 V 영역 유전자로부터 클로닝할 수 있다. 상기와 같은 하이브리도마의 생성은 통상적이 되었다. 상기 가변 영역 중쇄(VH) 및 가변 영역 경쇄(VL)의 클로닝에 사용될 수 있는 기법은 예를 들어 문헌[Orlandi et al, PNAS, 1989; 86: 3833-3837]에 기재되었다.

[0065] 일반적으로, scFv 폴리펩티드는 VH 및 VL 도메인 사이에 상기 scFv가 항원 결합을 위해 목적하는 구조를 형성할 수 있게 하는 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다.

[0066] 본 명세서에서 고려되는 CAR은 1, 2, 3, 4 또는 5개 또는 그 이상의 링커를 포함할 수 있다. 특정한 실시태양에서, 링커의 길이는 약 1 내지 약 25 아미노산, 약 5 내지 약 20 아미노산, 또는 약 10 내지 약 20 아미노산, 또는 임의의 이들 사이의 길이의 아미노산이다. 일부 실시태양에서, 상기 링커는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 또는 그 이상의 아미노산 길이이다.

[0067] 링커의 예시적인 예는 글리신 중합체 (G)n; 글리신-세린 중합체(Gi_sSi_5)n(여기에서, n은 적어도 1, 2, 3, 4, 또는 5의 정수이다); 글리신-알라닌 중합체; 알라닌-세린 중합체; 및 당해 분야에 공지된 다른 가요성 링커를 포함한다. 글리신 및 글리신-세린 중합체는 비교적 구조화되지 않으며, 따라서 본 명세서에 기재된 CAR과 같은 융합 단백질의 도메인간에 중성 밧줄로서 작용할 수 있다. 글리신은 심지어 알라닌보다 더 현저하게 파이-사이 공간에 접근하며, 보다 긴 측쇄를 갖는 잔기보다 훨씬 덜 제한된다(문헌[Scheraga, Rev. Computational Chem. 1 1173-142 (1992)]을 참조하시오). 통상적인 숙련가는 특정 실시태양에서 CAR의 설계가 완전히 또는 부분적으로 가요성인 링커를 포함할 수 있고, 따라서 상기 링커가 목적하는 CAR 구조를 제공하기 위해 가요성 링커뿐만 아니라 덜 가요성인 구조를 부여하는 하나 이상의 부분을 포함할 수 있음을 알 것이다.

[0068] 특정한 실시태양에서, 상기 링커는 VH 및 VL 도메인 사이에 있다.

[0069] 특정한 실시태양에서, 상기 링커는 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 상기 서열이다.

[0070] 하나의 실시태양에서, IL-1RAP 결합 도메인은 서열번호 4의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열의 적어도 1, 2 또는 3개의 변형 및 30, 20 또는 10 개 이하의 변형을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 및 서열번호 2의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열의 적어도 1, 2 또는 3개의 변형 및 30, 20 또는 10 개 이하의 변형을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 scFv이다.

[0071] 바람직하게, IL-1RAP 결합 도메인은 (i) 아미노산 서열 서열번호 6과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 상보성 결정 영역 1(CDR1), 아미노산 서열 서열번호 7과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 상보성 결정 영역 2(CDR2), 및 아미노산 서열 서열번호 8과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 상보성 결정 영역 3(CDR3)을 포함하는 경쇄 가변 영역, 및 (ii) 아미노산 서열 서열번호 12와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 상보성 결정 영역 1(CDR1), 아미노산 서열 서열번호 13과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 상보성 결정 영역 2(CDR2), 및 아미노산 서열 서열번호 14와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 상보성 결정 영역 3(CDR3)을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 scFv이다.

[0072] CAR의 결합 도메인에 이어서, 일반적으로 하나 이상의 "힌지 영역"이 이어지며, 상기 영역은 항원 결합 도메인을 효과기 세포 표면으로부터 떨어져 위치시켜 적합한 세포/세포 접촉, 항원 결합 및 활성화를 가능하게 하는 역할을 한다. CAR은 일반적으로 결합 도메인과 막관통 도메인 사이에 하나 이상의 힌지 영역을 포함한다. 상기 힌지 영역은 천연, 합성, 반-합성 또는 재조합 공급원으로부터 유래될 수 있다.

[0073] 바람직하게, 항-IL-1RAP 결합 도메인은 힌지 영역에 의해 막관통 도메인에 연결된다.

[0074] 하나의 실시태양에서, 힌지 영역은 IgG1의 힌지 서열 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0075] 추가의 실시태양에서, 힌지 영역은 IgG4의 힌지 서열 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 추가의 실시태양에서, 힌지 영역은 또한 IgG1 또는 IgG4의 CH2-CH3 영역 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함할 수 있다.

[0076] 추가의 실시태양에서, 힌지 영역은 CD8알파 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0077] "막관통 도메인"은 세포외 결합 부분 및 세포내 신호전달 도메인을 융합시키는 CAR의 부분이며 상기 CAR을 면역효과기 세포의 원형질막에 고정시킨다. 상기 막관통 도메인은 천연, 합성, 반-합성, 또는 재조합 공급원으로부터 유래될 수 있다.

[0078] 바람직하게, 암호화된 CAR은 T-세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 쇄, CD28, CD3 입실론(epsilon), CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 및 CD154, 보다 바람직하게는 CD28로 이루어지는 그룹 중에서 선택된 단백질의 막관통 도메인을 포함한다.

[0079] 특정 실시태양에서, 본 명세서에서 고려되는 CAR은 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. "세포내 신호전달 도메인"은 표적 항원에 결합하는 유효 CAR의 메시지를 면역 효과기 세포의 내부로 전달하여 효과기 세포 기능, 예를 들어 활성화, 사이코카인 생성, 증식 및 세포독성 활성, 예를 들어 CAR-결합된 표적 세포로의 세포독성 인자의 방출, 또는 세포외 CAR 도메인에 결합하는 항원에 의해 유도되는 다른 세포 반응을 유도하는데 참여하는 CAR의 부분을 지칭한다.

[0080] "효과기 기능(effector function)"이란 용어는 세포의 특수 기능을 지칭한다. 예를 들어 T 세포의 효과기 기능은 세포용해 활성 또는 도움이거나 또는 사이토카인 분비를 포함한 활성일 수 있다. 따라서, "세포내 신호전달 도메인"이란 용어는, 효과기 기능 신호를 전달하고 세포가 특수 기능을 수행하도록 유도하는 단백질 부분을 지칭한다. 대개는 전체 세포내 신호전달 도메인이 사용될 수 있지만, 다수의 경우에 전체 도메인을 사용할 필요는 없다. 세포내 신호전달 도메인의 절두된 부분이 사용되는 경우에, 상기와 같은 절두된 부분이, 효과기 기능 신호를 전달하는 한, 전체 도메인 대신에 사용될 수 있다. "세포내 신호전달 도메인"이란 용어는 효과기 기능 신호를 전달하기에 충분한 세포내 신호전달 도메인의 임의의 절두된 부분을 포함함을 의미한다.

[0081] TCR 단독을 통해 발생된 신호는 T 세포의 완전한 활성화에 불충분하며 2차 또는 보조-자극 신호가 또한 요구되는 것으로 알려져 있다. 따라서, T 세포 활성화는 2개의 별개 부류의 세포내 신호전달 도메인, 즉 TCR을 통해 항원-의존적인 1차 활성화를 매개하는 1차 신호전달 도메인(예를 들어 TCR/CD3 복합체) 및 2차 또는 보조-자극 신호를 제공하도록 항원-의존적인 방식으로 작용하는 보조-자극 신호전달 도메인에 의해 매개된다고 할 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 본 명세서에서 고려되는 CAR은 하나 이상의 "보조-자극 신호전달 도메인"을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.

[0082] 하나의 실시태양에서, 단리된 핵산 분자는 적어도 하나의 보조자극 도메인(costimulatory domain)을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 암호화할 수 있다. 따라서, 상기 실시태양에서, 세포내 신호전달 도메인은 적어도 하나의 보조자극 도메인을 포함한다.

[0083] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "보조-자극 신호전달 도메인(co-stimulatory signaling doamin)" 또는 "보조-자극 도메인(co-stimulatory doamin)"이란 용어는 보조-자극 분자의 세포내 신호전달 도메인을 지칭한다. 보조-자극 분자는, 항원에 결합시 T-림프구의 효율적인 활성화 및 기능에 필요한 2차 신호를 제공하는 항원 수용체 또는 Fc 수용체 이외의 세포 표면 분자이다.

[0084] 바람직하게, 기능성 세포내 신호전달 도메인의 적어도 하나의 보조자극 도메인은 OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, CD3 제타, ICAM-1, LFA-1(CD11a/CD18), ICOS(CD278), 및 4-1BB(CD137)로 이루어지는 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 단백질로부터 획득된다.

[0085] 보다 바람직하게, 4-1BB(CD137)로부터 획득된 보조자극 도메인은 4-1BB의 보조자극 도메인의 아미노산 서열과 95-99% 동일성을 갖는 서열을 갖는다.

[0086] 보다 바람직하게, CD3 제타로부터 획득된 보조자극 도메인은 CD3 제타의 보조자극 도메인의 아미노산 서열과 95-99% 동일성을 갖는 서열을 갖는다.

[0087] 또 다른 실시태양에서, 세포내 신호전달 도메인은 4-1BB로부터 획득된 보조자극 도메인 및/또는 CD3 제타로부터 획득된 보조자극 도메인을 포함한다.

[0088] 특정한 바람직한 실시태양에서, CAR은 CD3ζ, 1차 신호전달 도메인 및 하나 이상의 보조-자극 신호전달 도메인을 포함한다. 상기 세포내 1차 신호전달 및 보조-자극 신호전달 도메인은 막관통 도메인의 카복시 말단에 임의의 순서로 나란히 연결될 수 있다.

[0089] 본 발명의 핵산 분자에 의해 암호화된 단리된 폴리펩티드 분자뿐만 아니라, 항-IL-1RAP 결합 도메인을 포함하는 항체 또는 항체 단편, 막관통 도메인, 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 단리된 CAR 분자가 또한 고려되며, 여기에서 상기 항-IL-1RAP 결합 도메인은

[0090] (i) 아미노산 서열 서열번호 6과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 상보성 결정 영역 1(CDR1), 아미노산 서열 서열번호 7과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 상보성 결정 영역 2(CDR2), 및 아미노산 서열 서열번호 8과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%,

96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 상보성 결정 영역 3(CDR3)을 포함하는 경쇄, 및

[0091] (ii) 아미노산 서열 서열번호 12와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 상보성 결정 영역 1(CDR1), 아미노산 서열 서열번호 13과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 상보성 결정 영역 2(CDR2), 및 아미노산 서열 서열번호 14와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 상보성 결정 영역 3(CDR3)을 포함하는 중쇄

[0092] 를 포함한다.

[0093] "폴리펩티드", "폴리펩티드 단편", "펩티드" 및 "단백질"은 반대로 명시되지 않는 한, 통상적인 의미에 따라, 즉 아미노산의 서열로서, 호환 가능하게 사용된다. 폴리펩티드는 특정한 길이로 제한되지 않는다, 예를 들어 상기는 완전길이 단백질 서열 또는 완전길이 단백질의 단편을 포함할 수 있으며, 폴리펩티드의 번역-후 변형, 예를 들어 글리코실화, 아세틸화, 인산화 등뿐만 아니라, 당해 분야에 공지된 다른 변형을 포함할 수 있고, 이들은 천연 및 비천연 모두를 포함한다.

[0094] 폴리펩티드를 임의의 다양한 주지된 재조합 및/또는 합성 기법을 사용하여 제조할 수 있다. 본 명세서에서 고려되는 폴리펩티드는 본 개시의 CAR, 또는 본 명세서에 개시된 CAR의 하나 이상의 아미노산으로부터의 결실, 상기 아미노산에의 부가, 및/또는 상기 아미노산의 치환을 갖는 서열을 포함한다.

[0095] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "단리된 펩티드" 또는 "단리된 폴리펩티드" 등은 세포 환경으로부터, 및 세포의 다른 성분과의 회합으로부터 펩티드 또는 폴리펩티드 분자의 시험관내 단리 및/또는 정제를 지칭한다. 유사하게, "단리된 세포"는 생체내 조직 또는 장기로부터 수득되었고 세포외 기질이 실질적으로 없는 세포를 지칭한다.

[0096] "벡터"란 용어는 본 명세서에서 또 다른 핵산 분자를 전달하거나 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭하는데 사용된다. 전달된 핵산은 일반적으로 벡터 핵산 분자에 연결된다, 예를 들어 상기 분자내에 삽입된다. 벡터는 세포에서 자율 복제를 유도하는 서열을 포함하거나, 또는 숙주 세포 DNA내로의 통합을 허용하기에 충분한 서열을 포함할 수 있다.

[0097] 본 발명은 또한 본 발명의 CAR을 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 벡터를 제공하며, 상기 벡터는 DNA, RNA, 플라스미드, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 또는 레트로바이러스 벡터, 바람직하게는 렌티바이러스 벡터 중에서 선택된다.

[0098] 일부 실시태양에서, 본 발명의 벡터는 프로모터, 바람직하게는 EF-1 알파 프로모터를 포함한다.

[0099] 레트로바이러스는 통상적인 유전자 전달 도구이다. 특정 실시태양에서, 레트로바이러스는 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 세포에 전달하는데 사용된다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "레트로바이러스"란 용어는 게놈 RNA를 선형 이중-가닥 DNA 사본에 역전사하고 후속적으로 그의 게놈 DNA를 숙주 게놈에 공유적으로 통합시키는 RNA 바이러스를 지칭한다. 일단 상기 바이러스가 숙주 게놈내에 통합되면, 이를 "프로바이러스"라 칭한다. 상기 프로바이러스는 RNA 폴리머라제 II에 대한 주형으로서 작용하며 새로운 바이러스 입자를 생성시키는데 필요한 구조 단백질 및 효소를 암호화하는 RNA 분자의 발현을 유도한다.

[0100] 따라서, 본 발명의 벡터로 형질도입된 T 세포는, 안정하고 장기적이며 지속적인 CAR-매개된 T-세포 반응을 이끌어낼 수 있다.

[0101] 특정 실시태양에서, T 세포를 본 발명에 따른 CAR을 암호화하는 레트로바이러스 벡터, 예를 들어 렌티바이러스 벡터로 형질도입시킨다.

[0102] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "렌티바이러스"란 용어는 복합 레트로바이러스의 그룹(또는 속)을 지칭한다. 예시적인 렌티바이러스는 비제한적으로 HIV(인간 면역결핍 바이러스; 1형 HIV 및 2형 HIV 포함); 비스나-메디 바이러스(VMV); 염소 관절염-뇌염 바이러스(CAEV); 말 감염성 빈혈 바이러스(EIAV); 고양이 면역결핍 바이러스(FIV); 소 면역결핍 바이러스(BIV); 및 원숭이 면역결핍 바이러스(SIV)를 포함한다.

[0103] "렌티바이러스 벡터"란 용어는 주로 렌티바이러스로부터 유래되는 LTR을 포함하여, 구조 및 기능 유전 요소 또는 그의 일부를 함유하는 바이러스 벡터 또는 플라스미드를 지칭한다.

[0104] "자기-불활성화"(SIN) 벡터는, 우측(3') LTR 인헨서-프로모터 영역(U3 영역으로서 공지됨)이 첫 번째 라운드의 바이러스 복제를 벗어난 바이러스 전사를 방지하도록 변형된 복제-결함 벡터, 예를 들어 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터를 지칭한다.

[0105] 하나의 실시태양에서, SIN 벡터 주쇄가 바람직하다.

[0106] 바람직하게, 사용되는 벡터는 프로모터, 예를 들어 EF-1 알파 프로모터를 추가로 포함한다.

[0107] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "프로모터"란 용어는 RNA 폴리머라제가 결합하는 폴리뉴클레오티드(DNA 또는 RNA)의 인식 부위를 지칭한다. RNA 폴리머라제는 상기 프로모터에 작동적으로 연결된 폴리뉴클레오티드를 개시시키고 전사한다. 특정한 실시태양에서, T 세포에서, 상기 T 세포를 표적 항원을 발현하는 세포로 재유도하기에 충분한 수준으로 안정하고 장기적인 CAR 발현을 제공하는 프로모터로부터의 CAR을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 것이 바람직할 수 있다.

[0108] 본 발명은 또한 본 발명의 CAR을 암호화하는 핵산 분자 또는 본 발명의 벡터를 포함하는 세포를 제공하며, 상기 세포는 바람직하게는 T 세포, 예를 들어 인간 T 세포, 보다 바람직하게는 CD8+ T 세포, 예를 들어 인간 CD8+ T 세포이다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 세포(예를 들어 T 세포)는 본 발명의 CAR을 그의 막에서 발현한다.

[0109] 특정한 실시태양에서, 본 명세서에 기재된 면역 효과기 세포의 시험관내 조작 또는 유전자 변형에 앞서, 세포의 공급원을 피실험자로부터 수득한다. 특정한 실시태양에서, 본 발명의 CAR을 막에서 발현하는 면역 효과기 세포는 T 세포를 포함한다. T 세포를 다수의 공급원, 예를 들어 비제한적으로 말초 혈액 단핵세포, 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직, 감염 부위로부터의 조직, 복수, 흉수, 비장 조직 및 종양으로부터 수득할 수 있다. 몇몇 실시태양에서, T 세포를 숙련가에게 공지된 임의의 수의 기법, 예를 들어 침강, 예를 들어 피콜(FICOLL)™ 분리를 사용하여 피실험자로부터 수집된 혈액의 단위로부터 수득할 수 있다. 하나의 실시태양에서, 개인의 순환 혈액으로부터의 세포를 성분채집술에 의해 수득한다. 상기 성분채집술 생성물은 전형적으로 림프구, 예를 들어 T 세포, 단핵세포, 과립구, B 세포, 다른 유핵 백혈구, 적혈구, 및 혈소판을 함유한다. 하나의 실시태양에서, 상기 성분채집술에 의해 수집된 세포를 세척하여 혈장 분획을 제거하고 상기 세포를 후속 가공을 위해 적합한 완충제 또는 매질에 놓을 수 있다.

[0110] 몇몇 실시태양에서, T 세포를, 예를 들어 퍼콜(PERCOLL)™ 구배를 통한 원심분리에 의한 적혈구 용해 및 단핵세포 고갈에 의해 말초 혈액 단핵세포로부터 단리한다. CD4 또는 CD8과 같은 하나 또는 다수의 마커를 발현하는 T 세포의 특정한 아집단을 양성 또는 음성 선택 기법에 의해 추가로 단리할 수 있다. 예를 들어, 음성 선택에 의한 T 세포 집단의 농축은 음성적으로 선택된 세포 특유의 표면 마커에 대한 항체 조합으로 수행될 수 있다.

[0111] 본 발명의 일부 실시태양에서, 폴리뉴클레오티드 또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 갖는 세포는 직접적인 독성의 위험성(즉 동종이계 투여 환경에서 이식편 대 숙주병) 및/또는 유전자 변형된 세포의 조절되지 않는 증식을 감소시키기 위해, 유도성 자살 유전자를 포함한 자살 유전자를 사용한다. 특정한 태양에서, 상기 자살 유전자는 상기 폴리뉴클레오티드 또는 세포를 갖는 숙주에 면역원성이 아니다. 사용될 수 있는 자살 유전자의 몇몇 예는 유도성 카스파제-9(iCASP9), 헤르페스 단순 티미딘 키나제(HSV-tk), CD20, 절두된 EGFR, 카스파제-8 또는 시토신 데아미나제이다. 카스파제-9는 특정한 화학적 이량체화 유도인자(CID)를 사용하여 활성화될 수 있다. 전구약물 대사(강시클로비어)에 의해 또는 항체 결합(리툭시맙, 시툭시맙)에 의해 다른 시스템을 활성화시킬 수 있다.

[0112] T 세포를 CAR을 발현하도록 생체내에서 유전자 변형시키고 상기 CAR T 세포를 치료가 필요한 수용자에게 주입하는 한 가지 유형의 세포 요법을 본 명세서에 개시한다. 상기 주입된 세포는 상기 수용자, 바람직하게는 인간에서 종양 세포를 사멸시킬 수 있다. 항체 요법과 달리, CAR T 세포는 생체내에서 복제하여 장기간 지속성을 생성시킬 수 있으며, 이는 지속적인 종양 억제를 도출할 수 있다.

[0113] 더욱이, CAR은 항체 유래된 수용체에 의해 결합시 효과기 T 세포의, 임의의 세포 표면 분자를 향한 재유도 및 활성화를 허용하며, MHC 제한과 무관하다.

[0114] 본 발명의 유전자-변형된 T 세포는 환자 자신의 T 세포로부터 출발하여 구성되지만(자기유래), 상기 세포는 또한 다른 동종이계 공여자로부터 기원하여 골수 또는 말초 조혈모세포 동종이식편 상황에서 동종이계 유전자-변형된 T 세포를 제공할 수 있다(공여자 림프구 주입술). 본 발명에 따른 CAR 분자를 발현하는 상기 T 세포는 포유동물, 바람직하게는 인간에서 증식성 질병을 치료하는데 유용하며, 상기 질병은 세포 표면 IL-1RAP 발현과 관련된다.

[0115] 바람직하게, 상기 T 세포는 항-IL-1RAP 결합 도메인을 포함하는 항-IL-1RAP scFv인 항원 결합 도메인, CD28 단백질의 막관통 도메인, 보조자극 4-1BB 신호전달 도메인, 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 CAR 분자를

발현하며, 여기에서 상기 항-IL-1RAP 결합 도메인은

[0116] (i) 아미노산 서열 서열번호 6과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 상보성 결정 영역 1(CDR1), 아미노산 서열 서열번호 7과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 상보성 결정 영역 2(CDR2), 및 아미노산 서열 서열번호 8과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 상보성 결정 영역 3(CDR3)을 포함하는 경쇄, 및

[0117] (ii) 아미노산 서열 서열번호 12와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 상보성 결정 영역 1(CDR1), 아미노산 서열 서열번호 13과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 상보성 결정 영역 2(CDR2), 및 아미노산 서열 서열번호 14와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 상보성 결정 영역 3(CDR3)을 포함하는 중쇄

[0118] 를 포함한다.

[0119] 본 발명은 또한 약제로서 사용하기 위한 본 발명에 따른 세포(예를 들어 T 세포)를 제공한다.

[0120] 본 발명은 또한 포유동물, 바람직하게는 인간에서 증식성 질병의 치료에 사용하기 위한 본 발명에 따른 세포(예를 들어 T 세포)를 제공한다.

[0121] 일부 실시태양에서 증식성 질병은 IL-1RAP 발현과 관련된 질병이다.

[0122] IL-1RAP 발현과 관련된 질병은 바람직하게는 암 또는 악성 또는 전암성 질환(precancerous condition), 예를 들어 골수이형성증(myelodysplasia), 골수이형성 증후군(myelodysplastic syndrome) 또는 전백혈병(preleukemia) 중에서 선택된다.

[0123] 성인 종양/암 및 소아 종양/암이 또한 포함된다.

[0124] 보다 바람직하게, 상기 질병은 B-세포 급성 림프양 백혈병("BALL"), T-세포 급성 림프양 백혈병("TALL"), 급성 림프양 백혈병(ALL)을 포함하는 하나 이상의 급성 백혈병; 만성 골수성 백혈병(CML) 및 만성 림프구성 백혈병(CLL)을 포함하는 하나 이상의 만성 백혈병으로 이루어지는 그룹 중에서 선택된 혈액암이다.

[0125] 보다 바람직한 실시태양에서, 상기 질병은 만성 골수성 백혈병이다.

[0126] CML의 제1선 치료는 TKI의 사용을 수반한다. 그러나, 일단 치료가 멈추면, 환자의 절반 이상이 재발하며, 이는 TKI의 사용이 상기 질병을 치유하지 못함을 나타낸다.

[0127] 따라서 IL-1RAP 특이적인 CAR 분자를 발현하는 T 세포가 인간에서 CML을 치료하는 방법에 유용하며, 여기에서 상기 인간은 이미 적어도 하나의 티로신 키나제 억제제(TKI)에 의해 치료된 적이 있다.

[0128] 따라서, 바람직하게는 IL-1RAP 특이적인 CAR 분자를 발현하는 T 세포가 적어도 하나의 티로신 키나제 억제제(TKI)와 함께 포유동물에서 증식성 질병을 치료하는 방법에 유용하다.

[0129] 사용되는 TKI는 이마티닙, 다사티닙, 닐로티닙, 보수티닙 및 포나티닙일 수 있다.

[0130] 따라서 IL-1RAP 특이적인 CAR 분자를 발현하는 T 세포가 인간에서 CML을 치료하는 방법에 유용하며, 여기에서 상기 인간은 이미 이식편-대-백혈병, 동종이계 줄기세포 이식 또는 공여자 림프구 주입술(DLI)을 받은 적이 있다.

[0131] 본 명세서에 사용되는 바와 같이 "치료" 또는 "치료하는"은 질병 또는 병적인 상태의 증상 또는 병리에 대한 임의의 이로운 또는 바람직한 효과를 포함하며, 심지어 치료하고자 하는 질병 또는 질환, 예를 들어 암의 하나 이상의 측정 가능한 마커의 최소의 감소를 포함할 수도 있다. 치료는 임의로 상기 질병 또는 질환의 증상의 감소 또는 개선, 또는 상기 질병 또는 질환의 진행의 지연을 수반할 수 있다. "치료"는 반드시 상기 질병 또는 질환, 또는 그의 관련 증상의 완전한 근절 또는 치유를 가리키는 것은 아니다.

[0132] 따라서, 본 개시는 CML의 치료 또는 예방이 필요한 피실험자에게 치료 유효량의 본 발명의 T 세포를 투여함을 포함하는 상기 치료 또는 예방을 제공한다.

[0133] 본 명세서에 기재된 T 세포를 단독으로 또는 희석제 및/또는 다른 성분, 예를 들어 IL-2 또는 다른 사이토카인 또는 세포 집단과 함께 약학 조성물로서 투여할 수 있다. 간단히, 약학 조성물은 본 명세서에 기재된 바와 같은 표적 세포 집단을 하나 이상의 약학적으로 또는 생리학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제와 함께 포함할 수 있다. 상기와 같은 조성물은 완충제, 예를 들어 중성 완충 염수, 포스페이트 완충 염수 등; 탄수화물,

예를 들어 글루코스, 만노스, 슈크로스 또는 덱스트란, 만니톨; 단백질; 폴리펩티드 또는 아미노산, 예를 들어 글리신; 산화방지제; 킬레이트제, 예를 들어 EDTA 또는 글루타치온; 항원보강제(예를 들어 수산화 알루미늄); 및 보존제를 포함할 수 있다. "약학적으로 허용 가능한"이란 어구는 본 명세서에서 건전한 의학적 판단의 범위 내에서, 과도한 독성, 자극, 알러지 반응, 또는 다른 문제나 합병증 없이, 합리적인 이익/위험비에 비례하여, 인간 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합한 화합물, 물질, 조성물 및/또는 투여형을 지칭하는데 사용된다.

[0134] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 세포, 예를 들어 T 세포를 포함하는 조성물, 예를 들어 약학 조성물을 제공한다.

[0135] 본 발명의 조성물을 바람직하게는 비경구 투여, 예를 들어 혈관내(정맥내 또는 동맥내), 복강내 또는 근육내 투여를 위해 제형화한다.

[0136] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "비경구적으로 투여된"은 경장 및 국소 투여 이외의 투여 방식, 대개는 주사에 의한 투여를 지칭하며, 비제한적으로 혈관내, 정맥내, 근육내, 동맥내, 경막내, 낭내, 안와내, 종양내, 심내, 피내, 복강내, 경기관, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내 및 흉골하 주사 및 주입을 포함한다.

[0137] 하나의 실시태양에서, 본 명세서에서 고려되는 CAR-변형된 T 세포 또는 조성물을 피실험자에게 종양, 림프절, 전신 순환, 또는 주사 부위에 직접 주사에 의해 투여한다.

[0138] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 암으로 진단된 피실험자를, 상기 피실험자로부터 면역 효과기 세포를 제거하고, 상기 면역 효과기 세포를 본 명세서에서 고려된 바와 같은 CAR을 암호화하는 핵산을 포함하는 벡터로 유전자 변형시켜, 변형된 면역 효과기 세포의 집단을 생성시키고, 상기 변형된 면역 효과기 세포의 집단을 동일한 피실험자에게 투여함으로써 치료하는데 유용하다. 바람직한 실시태양에서, 상기 면역 효과기 세포는 T 세포를 포함한다.

[0139] TKI를 포함하는, 통상적인 CML 치료와 가능하게 관련되는 양, 투여 빈도 및 순서는 환자의 상태 및 환자 질병의 유형 및 중증도와 같은 인자에 의해 결정될 것이지만, 적합한 투여량은 동물 모델에 의해서 및 최종적으로 임상 시험에 의해서 결정될 수 있다.

[0140] 유전자 변형된 치료학적 세포의 "치료 유효량"은 질병 상태, 개인의 연령, 성별 및 체중, 및 상기 개인에서 목적하는 반응을 이끌어내는 줄기세포 및 전구세포의 능력과 같은 인자에 따라 변할 수 있다. 치료 유효량은 또한, 바이러스 또는 형질도입된 치료학적 세포의 임의의 독성 또는 유해 효과보다 치료학적으로 이로운 효과가 더 큰 것이다. 일반적으로, 이는 본 명세서에 기재된 T 세포를 포함하는 약학 조성물을 10^4 내지 10^9 세포/체중 kg, 바람직하게는 10^5 내지 10^6 세포/체중 kg, 및 상기 범위내의 모든 정수값의 투여량으로 투여할 수 있는 것으로 서술될 수 있다.

[0141] 본 발명을 하기의 실험 실시예를 참조하여 추가로 상세히 기재한다. 이들 실시예는 단지 예시를 목적으로 제공되며, 달리 명시되지 않는 한 제한을 의도하지 않는다.

[0142] **실시예 1: 환자의 샘플, 건강한 공여자의 혈액 샘플, 세포주**

[0143] CML 샘플 수집을 진단시 및 TKI 치료후 추적조사에서 환자로부터 확립시켰다. 말초 혈액 단핵세포를, 프랑스 혈액 센터(프랑스 브장송 소재)에서 수집된 익명의 건강한 공여자의 혈액 샘플로부터 피콜 파크(Ficoll-Paque)(프랑스 벨리지 빌라쿠블레 소재)를 사용하여 피콜 구배 밀도 원심분리에 의해 단리하였다. 인간 종양 KU812(CRL-2099), K562(CCL-243) 또는 상피 239T(CRL-3216), HT1080(CCL-121) 세포주는 ATCC® 콜렉션(LGC Standards, 프랑스 몰샤임 소재)으로부터 기원한다.

[0144] **실시예 2: 단클론 항체 생성**

[0145] 마우스 항-hIL-1RAP 단클론 항체를 표준 하이브리도마 기법에 의해 생성시켰다.

[0146] 간단히, BALB/c 마우스(5주, Charles River)를 IL-1RAP(NM_002182.2, NCBI)의 세포외 부분 및 인간 IgG1(R&D Systems, 프랑스 릴 소재)의 Fc-부분으로 이루어지는 재조합 융합 단백질로 발바닥에(n=3) 또는 복강내로(n=5) 면역시켰다. 림프절 또는 비장 세포 및 혈액 샘플을 수확하고 세포를 마우스 골수종 세포주와 융합시키고, 이어서 IL-1RAP-양성(KU812) 및 -음성(라지, KG1) 세포주에 대해 FACS 분석(Becton Dickinson)에 의해 선별하였다.

[0147] 하이브리도마의 선별로 5개의 단클론 항체 서브클론을 선택하였으며 이는 IL-1RAP 양성(KU812 또는 KG-1, 각각

AML 또는 Phi^{+}p^{210} CML)과 음성 세포주(Tom-1, NALM-20, 주르캣 또는 라지, 각각 Phi+ p^{190} B-ALL, Phi^{-}B-ALL, T-ALL 또는 버킷 림프종)로 구별된다.

[0148] - 항체의 분자 특성화

[0149] 분자 특성화를 문헌[Wang. Z., et al., J. Immunol. Methods, 2000; 233, pp 167-77]의 프로토콜에 따라 중쇄 및 경쇄의 FR1 및 불변 영역 특이적인 변성된 프라이머로 획득된 클로닝된 PCR 생성물 증폭의 상거(Sanger) 서열분석에 의해 수행하였다. V-D-J-C 유전자 재배열 및 CDR3 영역의 식별을, 문헌[Brochet X., et al., Nucleic Acids Res., 2008, 36, pp 503-8]에 따른 V-QUEST 온라인 도구를 사용하여 IMGT® 데이터베이스에 대한 공통 뉴클레오티드 서열의 정렬 후에 획득하였다. 분자 상거 서열분석은 5개의 단클론 항체가 모두 동일하며 동일한 CDR3 뉴클레오티드 서열을 공유함을 입증하였다. 단클론 항체 서브클론(#E3C3)을 선택하였는데, 이는 상기가 세포측정에 의해 최고의 상대 형광 강도(RFI)를 제공하였기 때문이다.

[0150] 선택된 항체(클론 #E3C3)를 정상 조직(FDA 정상 인간 장기 조직 배열, 99 코어/33 부위/75 사례) 및 CML 환자의 1차 샘플로부터 웨스턴 블럿팅, 재조합 IL-1RAP 단백질에 대한 ELISA, 면역조직화학, 공초점 현미경검사, 조직 미세배열(TMA)에 의해 특성화하였다.

[0151] - 세포하 분획의 웨스턴 블럿팅

[0152] 실시예 1에 나열된 세포의 전-세포, 세포하 또는 분비된 단백질 분획을 초음파처리 후에 수득하였으며 프로테아제 억제제 칵테일(완전한 Mini 무-EDTA; Roche, 스위스 소재)이 보충된 RIPA 용해 및 추출 완충제(ThermoFisher Scientific)에 현탁시켰다. IL-1RAP cDNA 변체 1(NM_002182.2, NCBI)에 의해 형질감염된 HT1080 세포주가 대조용으로서 사용되었다. 액틴은 단백질 부하 대조용으로서 사용되었다. PDVF 멤브레인상에 이동된 단백질을 각각 IL-1RAP, CAR 또는 β-액틴 발현을 위해 1차 IL-1RAP #E3C3(1:10^{3}으로 희석됨), CD3제타(BD Pharmigen, 클론 #8D3) 또는 β-액틴(1:10^{3}, 클론 AC15, #A5441, Sigma-Aldrich)으로 밤새 탐침조사하였다. 면역검출 염색을 2차 다중클론 항체 양 항-마우스 IgG(#515-035-062, Jackson, 미국 소재)로 수행하였다. 검출을 카메라 및 Bio-1D 소프트웨어(Vilber-Lourmat, 프랑스 꼴레지앙 소재)로 수행하였다. 웨스턴 블럿에서 #E3C3 단클론 항체의 사용은 KU812를 드러낸다(도 1).

[0153] - ELISA를 통한 재조합 IL-1RAP 단백질의 시험관내 검출

[0154] 항-인간 Fc 항체를 플라스틱 ELISA 플레이트의 바닥에 코팅하였다. 인간 항체상에 부하된 IL-1RAP 단백질을 쥐 및 인간 IL-1RAP(#E3C3) 항체로 탐침조사하였으며, 이는 양고추냉이 페록시다제(HRP)로 코팅된 항-마우스 FC 항체에 의해 드러났다.

[0155] ELISA는 #E3C3 단클론 항체가 IL-1RAP 재조합 단백질을 인식함을 입증한다(도 2).

[0156] - CML 환자로부터의 1차 세포에 대한 유식 세포측정 분석

[0157] CML 환자로부터의 조혈 모세포를, 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 488 표지된 IL-1RAP 항체 클론 #E3C3을 포함하는 CD45, CD34, CD38, CD33, CD133, CD117의 패널을 사용하여 추적하였다. 형질도입된 세포를 헬퍼 또는 세포독성 GMTC의 구분을 위해 CD3, CD4, CD8 및 CD19를 포함하는 항체 패널을 사용하여 염색하였다. 미경험, 중심 또는 기억 T 세포 부분집합을 CD45RA, CD62L, CD95, CCR7 단클론 항체의 패널을 사용하여 분석하였다. 세포를 CANTO II 세포계((BD Biosciences, 프랑스 르 퐁 드 클레 소재)를 사용하여 수집하고 DIVA 6.1 소프트웨어(BD Biosciences, 프랑스 르 퐁 드 클레 소재)를 사용하여 분석하였다.

[0158] 2명의 CML-양성 환자의 말초 혈액 또는 골수에 대한 면역표현형검사를 이마티닙(TKI) 치료 없이 또는 상기 치료 후에 수행하였다. IL-1RAP(#E3C3)를 CD34^{+} 및 CD38^{-} 형광 염색과 함께 사용하였다. 상이한 단클론 항체로부터의 형광색소-접합된 아이소타입 대조용 단클론 항체를 전신적으로 사용하였다.

[0159] 항체의 패널 중 #E3C3 단클론 항체의 통합은 진단시 또는 12개월의 이마티닙 후 환자의 골수 또는 말초 혈액에서 줄기세포 CD34^{+}CD38^{+} 또는 CD34^{+}CD38^{-} 아집단을 발현하는 IL-1RAP^{+} 백혈병을 구별하게 하였다(도 3).

[0160] -공초점 현미경검사

[0161] 공초점 현미경검사를 사이토스핀(Cytospin)에 의해 슬라이드(슈퍼프로스트(Superfrost)TM 플러스, 4951PLUS4, ThermoFisher Scientific)상에 농축된 KU812 및 라지 세포주상에서 평가하였다. 간단히, 상기 세포를 형광 단클

론 항체: 항 쥐 Fc-IgG; IL-1RAP(#E3C3)로 염색하고 QImaging Retiga 2000R 카메라가 구비된 올림푸스(Olympus) BX51 현미경으로 분석하였다. 디지털 상을 40x 대물렌즈를 사용하여 포착하고 이미지 프로 플러스(Image-Pro Plus)(버전 6.0, Media Cybernetics)로 디지털화하였다. 대조염색을 핵 착색제 DAPI(2-(4-아미디노페닐)-6-인돌카바미딘 디하이드로클로라이드, Sigma-Aldrich - 프랑스 소재)에 의해 수행하고 형광 염색에 겹쳐 놓았다.

[0162] 공초점 현미경검사는 IL-1RAP 발현에 상응하는 세포막 염색을 명백하게 나타낸다(도 4).

[0163] - 원위치 검출

[0164] 특이적인 또는 비-표적 조직 결합을 연구하기 위해서, 장기 당 3명의 개별적인 공여자의 90개 조직 코어(30개 장기)(US Biomax, 미국 메릴랜드주 록빌 소재)를 포함하는, FDA 표준 동결 조직 배열을 앞서 기재된 바와 같이 배양하였다. 면역염색을 울트라뷰 유니버셜 DAB 검출 키트(Ventana, 미국 소재)를 사용하여 검출하였다. 상들을 포착하고 NDP.view 2.0 소프트웨어로 분석하였다. 고 IL-1RAP(KU812) 또는 음성(라지) 발현 세포주를 각각 양성 또는 음성 대조용으로서 사용하였다. 염색 강도를 하기와 같이 등급화하였다: 음성(0), 약한 염색(1+), 보통 염색(2+) 또는 강한 염색(+3). 고 IL-1RAP(KU812) 또는 음성(라지) 발현 세포주를 각각 양성 또는 음성 대조용으로서 사용하였다.

[0165] IL-1RAP 발현을 #E3C3 단클론 항체를 사용하여 조사하였다. 염색은 림프절, 결장, 소장, 태반, 위 및 전립선의 단지 6개의 조직에서, 주로 상피 또는 내피 세포에서 다양한 강도로 검출되었다(도 5).

[0166] **실시예 3: 렌티바이러스 구조물**

[0167] VDJ 또는 VJ 재배열의 분자 서열분석 및 CDR3 뉴클레오티드 서열 결정에 기반하여, CAR 렌티바이러스 구조물(pSDY-iC9-IL-1RAPCAR-dCD19)을, 실시예 1의 #E3C3 IL-1RAP 하이브리도마로부터 유래된 합성적으로 생성된 단쇄 가변 단편(scFv)을 SIN-pSDY 주쇄에 클로닝함으로써 제조하였다(Rossolillo P, Winter F, Simon-Loriere E, Gallois-Montbrun S, Negroni M. Retrovolution: HIV-driven evolution of cellular genes and improvement of anticancer drug activation. PLoS Genet. 2012; 8(8):e1002904).

[0168] 간단히, 모니터링 및 잠재적인 세포 선택을 위해 안전 카세트 iCASP9, #E3C3 단클론 항체의 단쇄 가변 단편 및 세포 표면 발현된 마커 ΔCD19를 갖는 SIN 렌티바이러스 구조물을 구성하였다. 이들 3개의 트랜스유전자는 모두 2A 펩티드 절단 서열에 의해 EF1 프로모터 및 SP163 인헨서 서열(마우스 VEGF 유전자의 5'UTR의 부분, GenBank 수납 #U41383)의 조절하에서 분리된다.

[0169] 도 6에서 보이는 바와 같이, 상기 구조물은 자살 안전 카세트 iCASP9(화학적 유도성 카스파제 9), IL-1RAP CAR 및 ΔCD19(신호전달을 피하는, 세포내 부분의 절두된 CD19)로서 세포 표면 및 선택 마커의 3개의 상이한 부분을 가지며, 이들은 SP163 인헨서와 EF1a(연장 인자 1 프로모터 알파) 프로모터의 조절 하에 있고 2개의 상이한 2A 리보솜 스킵 서열(P2A 및 T2A)에 의해 분리된다. #E3C3 면역글로불린의 중쇄(VH) 및 경쇄(VL) 서열 가변 영역으로 구성된 scFv는 EF1a 프로모터 및 SP163 인헨서의 조절하에 CD28-4.1BB-CD3z 신호전달 쇄와 인프레임 클로닝된다. IL-1RAP CAR은 리더 서열(L)과 회합되고, 인간 인플루엔자 헤마글루티닌(HA)이 태그되고, 2개의 보조-자극 도메인(변형된 막관통 및 세포내 신호전달 CD28 및 4-1BB) 및 CD3z 세포내 신호전달 도메인으로 이루어지는 T 세포 활성화 도메인에 힌지 영역을 통해 연결되는 단쇄 가변 단편(scFv)을 함유한다. 모의 T는 IL-1RAP scFv 없이 동일한 구조물로 이루어진다.

[0170] **실시예 4: IL-1RAP CART 세포의 생성**

[0171] 건강한 공여자 말초 혈액 단핵세포로부터 수득된 CD3+ T 림프구를 제조사의 설명에 따라 항-CD3/CD28 비드(Life Technologies, 프랑스 소재)로 활성화시키고, 이어서 자기 컬럼(MACS, Miltenyi Biotec, 프랑스 파리 소재) 상에서 단리하였다. 2일째에, 활성화된 T 세포를 10℃에서 90분 동안 2000g에서 상등액(SN)과 접촉하여, 스핀접종에 의해 형질도입시켰다. 형질도입 효율을, 유식 세포측정 분석을 수행함으로써 측정하여 ΔCD19 세포 표면 마커 발현을 식별하였다. 형질도입후 4일째에, CD19 미세비드(Miltenyi Biotec, 프랑스 파리 소재)로 표지된 CD19 양성 세포를 MACS 컬럼을 사용하여 자기에 의해 분리시켰다. 단리된 CD19 발현 세포를 8% 인간 혈청이 보충된, 500 UI/㎖ rhIL-2(Proleukin; Novartis)를 함유하는 완전한 생체외 배지(Lonza, 스위스 발레 소재)에서 확대시키고 저온보존하였다. 실험적으로, 우리는 TransAct T 세포 시약 및 인간 IL-2; IL-7, IL-15 또는 IL-7+IL-15가 보충된 TexMACS 배지(Miltenyi Biotec, 프랑스 파리 소재)를 사용하였다.

[0172] **실시예 5: 공여자 T 세포의 렌티바이러스 형질도입**

[0173] 렌티바이러스 벡터 상등액 모액을, 수포성 구내염 바이러스(VSV) 외막을 암호화하는 헬퍼 플라스미드(pMDG), 및 GAG/POL(psPAX2) 패키징 플라스미드(Addgene, 각각 #12259 및 #12260, Trono et al, 스위스 로잔 소재)와 함께 CaCl2 방법을 사용하여 융합이하 293T 세포의 일시적인 동시-형질감염에 의해 생성하였다. 바이러스 상등액을 48 및 72시간 후에 수확하고, PEG 및 저속 원심분리(3000 g, 밤새)를 사용하여 원심분리시키고, 이어서 사용시까지 -80℃에서 보관하였다. IL-1RAP scFv가 없는 동일한 렌티바이러스 구조물(모의)을 대조용으로서 사용하였다. 상기 렌티바이러스 상등액의 적정을 SN의 연속 희석을 사용하여 293T 허용 세포 형질도입에 의해 확립시켰다.

[0174] 형질도입 효율을 유식 세포측정에 의해 측정하였다. 감염 다중도(MOI)를 출발 세포수에 따른 상등액 적정으로부터 제하였다.

[0175] 렌티바이러스 상등액에 의한 시험관내 생성 공정은 1차 T 세포를 각각 모의 또는 CAR IL-1RAP 상등액에 대해서 2의 MOI로 형질도입시킨다.

[0176] - IL-1RAP 발현의 웨스턴 블럿 분석.

[0177] 전체 단백질 용해물 또는 IL-1RAP 형질도입된 T 세포의 세포막 또는 세포질 세포 하위분획(한외원심분리후에 수득됨)으로부터 추출된 단백질을 마우스 항-인간 CD3z 항체로 탐침조사하였다. 세포하 분획에 대한 웨스턴 블럿팅은 IL-1RAP CAR이 CD3z 신호전달(16 KDa의 예상된 내인성 CD3z 신호에 비해 55 KDa의 신호)과 연관됨을 입증하였다(도 7).

[0178] - 유식 세포측정에 의한 분석

[0179] T 세포 표면에서의 CAR 발현을 재조합 IL-1RAP 비오틴화된 단백질을 사용하여 분석하였으며 2차 항-비오틴 항체(Miltenyi Biotec Clone #Bio3-18E7)를 사용하여 유식 세포측정에 의해 밝혀내었다. CEM 세포주 또는 1차 T 세포를 모의 또는 CAR IL-1RAP로 형질도입시켰다. 이어서 세포를 비오틴으로 표지된, 증가하는 양의 재조합 IL-1RAP의 존재하에서 배양하였다. 염색을 항-비오틴 형광 항체로 수행하고 유식 세포측정에 의해 분석하였다. 비오틴+/CD19+ CEM 또는 T-세포의 백분율을 표지된 비오틴 재조합 단백질의 양에 대해 플롯팅하였다. 최대를 포함하여, 전형적인 염색에 대한 세포측정 분석의 도트 플롯을 제공하였다. 형질도입되지 않은 세포(CO) 또는 모의 T 세포가 대조용으로서 사용된다.

[0180] 비오틴화된 IL-1RAP 단백질(20 ng 내지 2.4 pg/㎖)의 연속 희석물을 사용하는 추가적인 분석 및 FACS 분석으로 IL-1RAP CAR 형질도입된 CEM T 세포주 또는 1차 T-세포를 검출한다. 단일 실험으로, 1.25 ng 및 0.15 ng과 같은 상이한 양의 재조합 단백질이 각각 최대의 CEM(85.5%) 또는 1차(68.5%) GMTC를 보충하는데 요구됨을 입증한다(도 8).

[0181] 보다 많은 CAR이 1차 T 세포에서보다 CEM의 세포 표면에서 발현된다. 더욱이, E:T 공배양에서 다량(1000 배 > 혈장 농도)의 저온 재조합 IL-1RAP 단백질의 첨가는 효과기 세포독성의 현저한 억제를 유도한다.

[0182] 이들 실험은 CAR이 세포 표면에 주소를 두며 IL-1RAP 단백질의 CAR 특이성 인식 및 결합이 존재함을 입증한다.

[0183] **실시예 6: 안전 자살 유전자 iCASP9 카세트의 효율**

[0184] 형질도입된(IL-1RAP CAR 293T) 또는 형질도입되지 않은(293T) 세포를 배지 단독(-화학적 유도인자 이량화제(CID)) 또는 20 nM의 CID AP1903을 함유하는 배지에서 24h 동안 배양하였다. 광학 현미경검사로 배양물 중의 살아있는 또는 죽은 세포의 존재 및 구조를 영상화한다(x40).

[0185] 광학 현미경검사에 의해, IL-1RAP CAR에 의해 형질도입된 293T 세포 배양물이 CID에 민감함을 입증할 수 있다(도 9).

[0186] 형질도입되지 않은 T 세포(CO) 및 IL-1RAP CAR을 발현하거나 발현하지 않는 GMTC 세포 혼합물에 대한 CID 노출후(20 nM, 24h) 또는 비노출시(밝은 회색)의 유식 세포측정 분석. $CD3^+/CD19^+$ 염색은 CAR을 발현하는 GMTC를 다른 것들과 구별할 수 있게 한다.

[0187] 형질도입되지 않은(CO) 또는 IL-1RAP CART 세포를 모두 배지 단독 또는 배지 +CID(20 nM, 24h)에 노출시켰다.

[0188] 정확한 세포사를 먼저 제조사의 설명에 따라 애넥신(Annexin)-V/7-AAD 게이팅 후에 유식 세포측정에 의해 평가하였다(Beckman Coulter, IM3614). 형광 분석을 $CD3^+/CD19^+$ 양성 세포상에서 게이팅하였다. 5000 형광 비드의 획득 후에 정량분석을 측정하였다. 사멸 효율을 대조용 세포(처리되지 않은 세포)에 대해 표준화하였다. 세포

사멸을 하기와 같이 산출하였다: 죽은 세포% = [1-(AP1903-처리된 세포 중의 생육성 세포의 절대수/처리되지 않은 세포 중의 생육성 세포의 절대수)] x 100. 24h 또는 48h CO 또는 IL-1RAP CART(CD3+/CD19+상에서 게이팅된) 세포 CID 노출. 결과를 3개의 독립적인 실험으로부터 평균±SD로서 나타낸다. ***: p<0,001(도 10).

[0189] 세포측정 분석은 IL-1RAP CAR을 발현하는($CD19^+$) 또는 발현하지 않는($CD19^-$) T 세포 혼합 집단의 24h CID 노출 후에 오직 $CD19^-$ CD3+ 세포만이 지속됨을 보인다. 보다 정확하게, 세포사멸의 정량적인 AnnV/7AAD 분석을 사용하여, 우리는 IL-1RAP CART 세포의 84.11% 및 88.93%가, 형질도입되지 않은 T 세포(CO)(24h 또는 48h째에 각각 1.28% 및 6.13%)에 비해 각각 24h 또는 48h CID 노출 후에 제거됨을 입증하였다(p<0.001, n=3).

[0190] **실시예 7: IL-1RAP 의존적인 증식 및 IL-1RAP CAR 발현 T-세포의 사이토카인 분비**

[0191] IL-1RAP CART 세포의 증식 및 보다 광범위하게는 기능 성질을 분석하기 위해서, 자연적으로 IL-1RAP를 발현하는 세포주 KU812 외에, 각각 변형 1(v1) 또는 5(v5) 전사물로부터 번역된 막(동형 1) 또는 용해성(동형 3)의 IL-1RAP를 발현하는 결함성 MHC 부류 I 세포주 K562를 생성시켰다. 막(mb) 또는 용해성(s) IL-1RAP 발현 세포주를 생성시키기 위해서, K562 세포를 각각 변형 1(동형 1, NM_002182.2) 또는 변형 5(동형 2, NM_001167930) ORF 클론(pCMV6-AC-GFP 벡터, Origen 또는 pEZ-M61, GeneCopoeia)으로 형질감염시켰다. 이어서 안정한 mb- 또는 s-IL-1RAP 발현 K562 세포를 pLenti CMV V5-LUC Blast(Addgene, 플라스미드 #21474)로 형질도입시켰다.

[0192] 웨스턴 블럿팅 분석을 이들 세포상에서 수행하였다. 간단히, 전-세포(전체 세포) 또는 분비된 단백질(중간 상등액) 분획을 형질감염된 K562 세포주로부터 수득하고, 그 후에 프로테아제 억제제 칵테일(완전 Mini 무-EDTA; Roche, 스위스 발레 소재)이 보충된 RIPA 완충제 중에서 초음파 처리하였다. 20 ㎍의 단백질을 SDS-PAGE 전기영동시키고, 이어서 PVDF 멤브레인상으로 전기이동시켰다. 멤브레인을 IL-1RAP 발현을 위해 1차 IL-1RAP #E3C3($1:10^3$으로 희석됨)으로 밤새 탐침조사하였다. β-액틴 mAb 염색($1:10^3$, 클론 AC15, #A5441, Sigma-Aldrich)을 단백질 부하 평가로서 사용하였다. 면역검출 염색을 2차 다중클론 항체 양 항-마우스 IgG(#515-035-062, Jackson)로 수행하였다. 화학발광 검출을 카메라 및 Bio-1D 소프트웨어(Vilber-Lourmat, 프랑스 꼴레지앙 소재)로 평가하였다.

[0193] 유식 세포측정 및 웨스턴 블럿팅에 의해, 이들 실험은 동형 1(v1)이 세포 표면에서 잘 발현되고 동형 3(v5)은 K562-v5의 배양 상등액에서 검출되지만 -v1에서는 검출되지 않음을 입증한다(도 11A 및 B).

[0194] K562-v1(어두운) 및 KU812(밝은)를 IL-1RAP 항체(붉은색 막대그래프)로 염색하고 표지되지 않은 세포(청색 막대그래프)와 비교하였다. 상기 소프트웨어에 의해 제공된 상대적인 형광 강도를 보고한다.

[0195] 흥미롭게, 형질감염된 K562-v1의 IL-1RAP 발현은 자연적으로 IL-1RAP를 발현하는 KU812 세포주에서보다 더 높다[형광 강도비(RFI) = 10.57 대 33.46](도 11A 및 B).

[0196] **실시예 8: IL-1RAP CART 세포의 증식 능력**

[0197] IL-1RAP 표적 발현 세포에 의해 촉발되는 IL-1RAP CART 세포의 증식 능력을 측정하기 위해서, 우리는 K562, K562-v1, -v5 또는 KU812 세포주의 존재하에서 CFSE 염색된 CO, 모의 또는 IL-1RAP CART 세포의 공-배양(효과기-표적비, E:T = 1:1)을 수행하였다.

[0198] CO 또는 모의 세포에 비해, 효과기 IL-1RAP CART 세포는 IL-1RAP 세포 표면 발현 K562-v1(76.1%±10.9) 및 KU812 세포(81.6%±6.16)의 존재에 대한 반응에서만 현저하게 분열되었고, K562-v5(27.3%±9.03) 또는 단지 배지(18.8%±7.02)에 대해서는 최저 수준이었다. (p<0,001, n=4)

[0199] 동일한 방식으로, 그러나 E:T = 1:5의 비에서, 우리는 세포내 IFNγ 생성 염색에 의해, CART 세포가 $IL\text{-}1RAP^+$ 표적 세포의 존재하에서 어떻게 IFNγ을 생성시킬 수 있는지를 평가하였다.

[0200] IL-1RAP CART $CD8^+$ 또는 $CD8^-$ 세포(그러나, CO 또는 모의 세포는 아닌)는 오직 IL-1RAP 발현 표적 세포 K562-v1($CD8^+$: 23.7±0.71% 및 $CD8^-$: 14.8±3.58%) 및 KU812($CD8^+$: 22.3±2.39% 및 $CD8^-$: 13.1±2.79%)에 대해서만 IFNγ을 생성시켰다(p<0,001, n=4)(도 12).

[0201] **실시예 9: 사이토카인의 프로파일**

[0202] CART 세포에 의해 생성된 사이토카인의 프로파일을 측정하기 위해서, 인간 IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-a, IFN-γ, 및 IL-17A 분비의 정량분석을 허용하는 인간 Th1/Th2/Th17 사이토카인 비드 배열(CBA) 키트(BD

Biosciences)를 제조사의 설명에 따라 사용하였다. 간단히, 표적 세포(비 1:1)의 존재 또는 부재하에(대조용) 1.10^5 CART 세포의 밤샘 배양물의 상등액을 비드 및 PE- 접합된 항-사이토카인 항체와 함께 3h 배양하였다. 비드를 세척하고 표준화된 유식 세포측정 분석에 의해 수득하였다. 데이터를 FCAP 배열 소프트웨어 버전 3.0(BD Biosciences)을 사용하여 분석하였다. 단지 표적 세포만으로부터 수집한 상등액을 대조용으로서 사용하였다. IL-1RAP를 발현하거나(K562-IL-1RAP$^+$ v1, KU812) 또는 발현하지 않는(K562) 표적의 존재 또는 부재(배지, PMA/Iono)하에서 형질도입되지 않은, 모의- 또는 CAR IL-1RAP T 세포의 배양 상등액의 전형적인 포착 비드 형광 분석. 효과기와의 IL-1RAP 양성 세포 배양 상등액의 공-배양을 위해서, 상등액을 1/3으로 희석하였다. 배지 및 PMA/Iono를 각각 음성 및 양성 대조용으로서 사용한다.

[0203] 최종적으로, IL-1RAP CART 세포의 자극이 Th1-유사 사이토카인 프로파일 분비를 나타냄을 입증하는 것 외에, CO, 모의 또는 CART 세포와의 공-배양(E:T = 1:1) 후 상등액 중의 Th1/Th2/Th17 사이토카인을 측정하였다.

[0204] 오직 IL-1RAP 세포 표면 발현 K562-v1 및 KU812 세포만이, 확고한 IFNg 및 IL-2 분비, 보통의 TNFa, 및 낮은 IL-4, IL-6 및 IL-10 분비(그러나 IL-17 분비는 아님(이는 오히려 특정한 Th1 프로파일을 향한다))와 함께 사이토카인 분비를 촉발할 수 있다(도 13).

[0205] **실시예 10: IL-1RAP-의존적인 CAR 세포독성 및 IL-1RAP 발현 종양 표적 세포주의 용해**

[0206] T-세포 매개된 세포독성 활성을 CD107 탈과립화 분석으로 분석하였다. 살아있는 종양 세포에 대한 CAR-T 세포의 세포 세포독성을 20-24h 동안 상이한 E:T 세포비에서 배양에 의해 평가하였다. IL-1RAP$^+$(K532-V1, KU812) 발현 표적 세포에 대한, E:T 비 = 1:5로 공배양된 IL-1RAP CART 세포상에 적용된 CD107a&b 탈과립화 분석은 IL-1RAP-특이적 T 세포의 CD8$^-$(주로 CD4$^+$) 및 CD8$^+$ 구획 모두에서 CD107a&b의 현저한 세포 표면 동원을 보이지만, 세포 표면 IL-1RAP$^-$(K562, K562-v5) 발현 세포에 대해서는 그렇지 않은 반면, 세포 공여자로부터의 모의 또는 형질도입되지 않은(CO) 세포는 인식할만한 탈과립화를 보이지 않았다($p<0.001$, n=4)(도 14).

[0207] 시험관내에서 IL-1RAP CAR 발현 T 세포의 IL-1RAP 의존적인 세포용해 효능을 측정하기 위해서, 우리는 각각 CART 세포 및 살아있는 세포를 구별하기 위해 형광(eFlour) 및 7-AAD 염색을 사용하였다.

[0208] IL-1RAP$^+$(K562-v1 및 KU812) 표적 세포 및 IL-1RAP$^-$(K562, K562-v5) 표적 세포간의, 게이트 7-AAD$^-$/eFluor$^-$에서의 세포의 소실을 특징으로 하는 통계학적 유의수준의 용해 활성($p<0.001$, n=4)을 나타낼 수 있다. 형질도입되지 않은 또는 모의-형질도입된 T 세포를 대조용으로서 사용하였다(도 15).

[0209] **실시예 11: 이종이식편 쥐 모델 - 생체내 연구(도 16)**

[0210] NSG(NOD.Cg-Prkdcscid I12rgtm1WjI/SzJ) 마우스(Charles River, 프랑스 소재)에게 효과기 CAR T 세포의 주사와 함께 또는 상기 주사 없이, Luc+, IL-1RAP+ 종양 세포주를 이식하였다. 마우스 생존 외에, 순환하는 CART 세포 및 종양 부담을 세포측정 또는 생물발광 분석에 의해 매주 분석하였다.

[0211] 간단히, 마우스를 이식 24시간 전에 치사량 이하의 3.5 Gy 용량으로 방사선조사하였다(n=5/그룹). 이어서 $2x10^6$ K562-v1, IL-1RAP$^+$, 루시페라제$^+$, GFP$^+$ 발현 세포주(K562-v1 $^{IL-1RAP+/GFP+/Luc+}$)를 꼬리-정맥내(i.v) 주사를 사용하여 6-8주 된 NOD.Cg-Prkdcscid I12rgtm1Wjl/SzJ(NSG) 마우스(The Jackson Laboratory, 미국 메인주 바하버 소재) 내에 이식하였다. $1x10^{E6}$ 내지 $5x10^{E6}$ 모의T 또는 IL-1RAP CART 세포를 종양 주사후 4일째에 1회 i.v. 주사하였다. K562-v1 $^{IL-1RAP+/GFP+/Luc+}$ 주사된, 그러나 T 세포에 의해 처리되지 않은 마우스의 그룹을 또한 대조용으로서 사용하였다. K562-v1 $^{IL-1RAP+/GFP+/Luc+}$ 종양 부담을 추적하기 위해서, 마우스를 아이소플루란 마취하에 NightOwl(Berthold Technologies, 프랑스 뚜와리 소재)상에서 영상화 10분전에 50 mg/g D-루시페린(Promega, 프랑스 리옹 소재)으로 매주 복강내 주사하였다. 생체내에서 IL-1RAP 발현 세포를 제거하는 IL-1RAP CART-세포의 능력을 평가하였다.

[0212] 결과는 종양 생착(D4)에 이어서, 완전한 제거(>D9)로 크기의 감소가 주목될 때까지(D4에서 D9) IL-1RAP CART-세포(E:T = 1:1)가 K562-v1 $^{IL-1RAP+/Luc+}$ 종양을 표적화함을 입증한다.

[0213] 대조적으로, 처리되지 않은 또는 모의 T-세포 처리된 마우스에서 종양이 진행되어 마우스의 사망(각각 D28에서 상기 두 그룹 모두에서 2/3)에 이르는 것이 주목된 반면, CART 세포 처리된 그룹에서는 마우스가 죽지 않는다.

흥미롭게도, 처리되지 않은 또는 모의 T-세포 처리된 그룹의 생존 마우스에서 CART-세포의 부재하에서 종양이 계속 자란다.

[0214] **실시예 12: CML 환자로부터의 1차 IL-1RAP-발현 세포에 대한 시험관내 세포독성**

[0215] 4년의 기간 동안 1차 TKI-내성 CML 환자(항상 BCR-ALB(IS) 비 >10%를 갖는다)에서부터 4개의 TKI에 의한 5개의 치료선(도 17 상부)까지, 우리는 95.5%의 형질도입 효율로 CART 세포를 생성시킬 수 있었다(도 17 하부). IL-1RAP CART 세포는 CO 또는 모의 T 세포의 경우 각각 18% 및 21%의 동종-반응성 세포독성에 비해 3:1의 E:T 비에서 95% 효율로 IL-1RAP+ KU812 세포에 대한 용량-의존적인 세포독성 활성을 나타내었으며(도 18), 이는 건강한 공여자로부터 생성된 IL-1RAP CART 세포에 필적하였다. 더욱이, CML 환자 PBMC에 대한 자기유래 IL-1RAP CART 세포의 공-배양은 24h 후에 IL-1RAP+/CD34+ 세포의 비용해(각각 CO 또는 모의 T 세포의 경우 4.16±4.3% 및 2.78±1.72%에 비해 IL-1RAP CART 세포의 경우 76.65±9.2%)를 나타내었다.

[0216] 더욱이, 자기유래 IL-1RAP CART 세포가, TKI를 포함하는 장기 치료하의 또는 치료 부재의 CML 환자(n=3)로부터 생성되었고(형질도입 효율: 85.33±8.8%)(도 21), 각각의 초기의 장기간 저온보존된(>20년) 말초 혈액 줄기세포 자가이식편에 대해 유도되었으며, CD34+/IL-1RAP+ 세포를 79.78%±10.7%의 효율로 사멸시켰다(도 20).

[0217] **실시예 13: iCASP9 안전 스위치에 의해 고정된 IL-1RAP-CART 세포는 건강한 조혈세포에 대해 큰 유해 효과를 갖지 않는다.**

[0218] 표적-외 독성을 예측하기 위해서, 우리는 #A3C3 mAb를 사용하여, 30개의 정상 인간 조직의 조직 거대배열(TMA)로 IL-1RAP 발현을 조사하였다. 단지 6개의 조직: 림프절, 전립선, 골격근, 위, 결장 및 소장, 및 췌장에서 염증 또는 괴사 요소를 제외하고 다양한 강도 수준으로 염색이 검출되었다(도 22A 및 표 2). 흥미롭게도, 미세혈관 HMEC-1 내피 세포주는 우리의 #A3C3 IL-1RAP mAb에 의해 인식되지 않은 반면(도 22B), R&D IL-1RAP mAb(R&D Systems - Ref #89412)는 세포 표면 발현을 명백히 검출하며, 이는 상이한 에피토프의 인식을 암시한다.

[0219] 건강한 조혈계의 표적화에 관하여, mAb #A3C3이 건강한 공여자의 골수(RFI<1.2, n=5)(도 23A, C) 또는 정상 제대혈(도 23B, C)에서 HSC를 검출하지 않은 경우, 우리는 건강한 공여자로부터의 2/5 말초 혈액 및 3/5 골수에서 단핵세포 아집단의 약한 염색(RFI<2)에 주목하였다(도 23A). 이어서, 우리는 다양한 E:T 비의 PBMC 및 자기유래 CART 세포의 공-배양에 의해 단핵세포의 시험관내 감도를 연구하였다. 1:1의 E:T 비에서, 단핵세포 중 단지 일부만이 표적화되었으며, 단핵세포의 41.45%가 살아남은 반면(도 23D, 우측, 표 3), 림프구, 과립구, 및 K562 IL-1RAP-음성 세포주는 상위 E:T 비에서조차 영향을 받지 않았다(도 22D). 흥미롭게도, 상기 E:T 비에서, 백혈병 세포의 94.77%가 사멸하였다(도 23E).

[0220] [표 2]

[0221] 정상 조직의 IL-1RAP(mAb#A3C3) 면역염색

조직 (복제물)	염색 강도 (0 내지 3+)	설명
림프절 1	2+	내피세포의 ~30%
림프절 2		
림프절 3	1+	내피세포의 ~30%
골격근 1	1+	내피세포의 ~10%
골격근 2	0	
골격근 3	0	
전립선 1	1+	내피세포의 ~10%
전립선 2	1+	내피세포의 ~10%
전립선 3	0	
전립선 4	0	
전립선 5	0	
전립선 6	0	
신장 1	0	
신장 2	0	
신장 3	0	
간 1	0	

[0222]

간 2	0	
간 3	0	
폐 1	2+	
폐 2	2+	약간의 염증 요소
폐 3	2+	
위 1	1+	약간의 위점막 세포(~10%); 약간의 상피세포 <10%
위 2	0	
위 3	0	
식도 1	0	
식도 2	0	
식도 3	0	
심장 1	0	
심장 2	0	
심장 3	0	
결장 1	3+	
결장 2	3+	상피세포 (~30%); 염증 요소(100%)
결장 3	3+	
소장 1	2+	상피세포 (~30%); 염증 요소(100%)

[0223]

소장 2	0	
소장 3	1+	상피세포 (~30%); 염증 요소(100%)
말초 신경 1	0	
말초 신경 2	0	
말초 신경 3	0	
평활근 1	0	
평활근 2	0	
평활근 3	0	
소뇌 조직 1	0	
소뇌 조직 2	0	
소뇌 조직 3	0	
난소 1	0	
난소 2	0	
난소 3	0	
췌장 1	1+	
췌장 2	1+	영양막세포층(~10%)
췌장 3	1+	
침샘 1	0	

[0224]

침샘 2	0	
침샘 3	0	
뇌하수체 1	0	
뇌하수체 2	0	
뇌하수체 3	0	
태반 1	0	
태반 2	0	
태반 3	0	
피부 1	0	
피부 2	0	
피부 3	0	
척수 1	0	
척수 2	0	
척수 3	0	
비장 1	3+	
비장 2	3+	괴사 요소
비장 3	3+	
골격근 1	0	

[0225]

골격근 2	0	
골격근 3	0	
고환 1	0	
고환 2	0	
고환 3	0	
부신 1	0	
부신 2	0	
부신 3	0	
갑상선 1	0	
갑상선 2	0	
갑상선 3	0	
요관 1	0	
요관 2	0	
자궁경부 1	0	
자궁경부 2	0	
자궁경부 3	0	

[0226]

[0227] [표 3]

[0228] 상이한 E(모의T-세포 또는 IL-1RAP CART-세포):T의 비를 갖는 공-배양에 따른 상이한 아집단 중 살아있는 세포의 백분율

E:T	아집단	모의 T-세포	IL-1RAP CART-세포
[1:1]	림프구 (%)	90.79	75.43
	단핵세포 (%)	**98.71**	**41.45**
	과립구 (%)	93.27	89.31
[3:1]	림프구 (%)	84.98	94.31
	단핵세포 (%)	**79.19**	**19.94**
	과립구 (%)	79.32	96.14
[5:1]	림프구 (%)	89.1	97.51
	단핵세포 (%)	**72.31**	**13.93**
	과립구 (%)	77.15	90.19
[10:1]	림프구 (%)	96.13	98.61
	단핵세포 (%)	**82.03**	**13.05**
	과립구 (%)	82.87	98.46

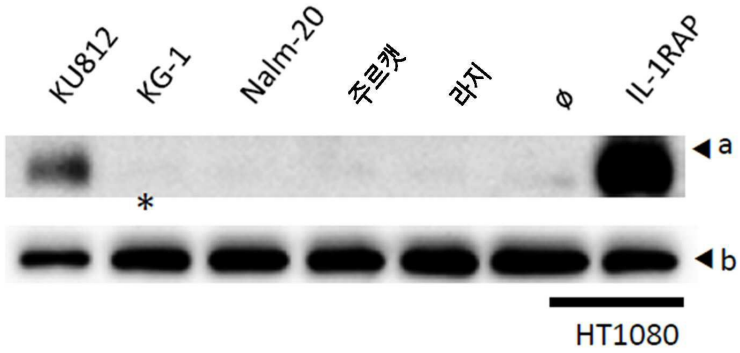
[0229]

[0230] 이들 결과는 hCD34-생착된 쥐 모델(hu-NOG)에서 생체내에서 확인되었으며, 여기에서 우리는 단핵세포가 15일째에 감소하지만(41±25%, n=3, p=n.s), hCD34+ 세포로부터 유래된 다른 인간 면역능력 세포는 CART 세포에 의해 영향을 받지 않음을 입증하였다(도 24). 건강한 CD34+ 제대혈 HSC와 자기유래 CART 세포와의 시험관내 공-배양 후 조혈모세포 배양 분석(n=3)은 HSC가 영향을 받지 않음을 입증하였다(도 25). 이들 결과는 조혈계에 대한 약간의 부작용과 연관되는 IL-1RAP CART 세포 면역요법과 일치한다.

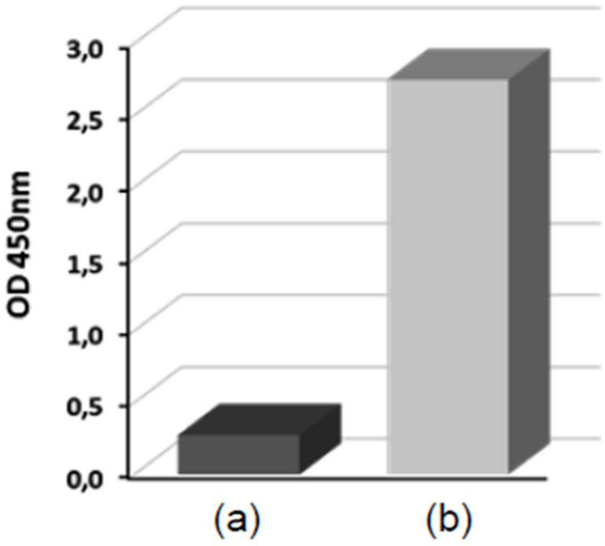
[0231] 잠재적인 독성을 제한하기 위해서, 우리는 화학적 유도인자 이량화제(CID; 10 nM)에 노출후 iCASP9/AP1903 자살 시스템 카세트의 안전 스위치 기능을 평가하였다. 먼저, 광학 현미경검사를 사용하여, 우리는 IL-1RAP CAR에 의해 형질도입된 293T 세포 배양물이 CID에 민감함에 주목하였다(도 26, 상부). 세포측정 분석은 CD19+ 및 CD19- IL-1RAP CART 세포의 혼합 집단에서, 오직 상기 CD19-CD3+ 세포만이 24시간의 CID 노출 후에 지속됨을 입증하였다(도 26, 하부). 보다 정확하게, 세포사멸의 정량분석에서, 형질도입되지 않은 T 세포(C0)에 비해(24 또는 48 시간째에 각각 1.28% 및 6.13%; $p<0.001$, n=3; 도 23F), 각각 24시간 또는 48시간의 CID 노출 후에 IL-1RAP CART 세포의 84.11% 및 88.93%가 제거되었다. 마지막으로, NSG 쥐 모델에서 상기 안전 스위치의 생체내 평가는 i.p. AP1903 투여후에 IL-1RAP CART 세포의 87±7.32%($p<0.01$, n=3)가 제거될 수 있지만, PBS 투여후에는 영향을 받지 않는 반면, 대조용 T 세포(C0)는 어느 처리에 의해서도 영향을 받지 않음을 입증하였다(도 23G).

도면

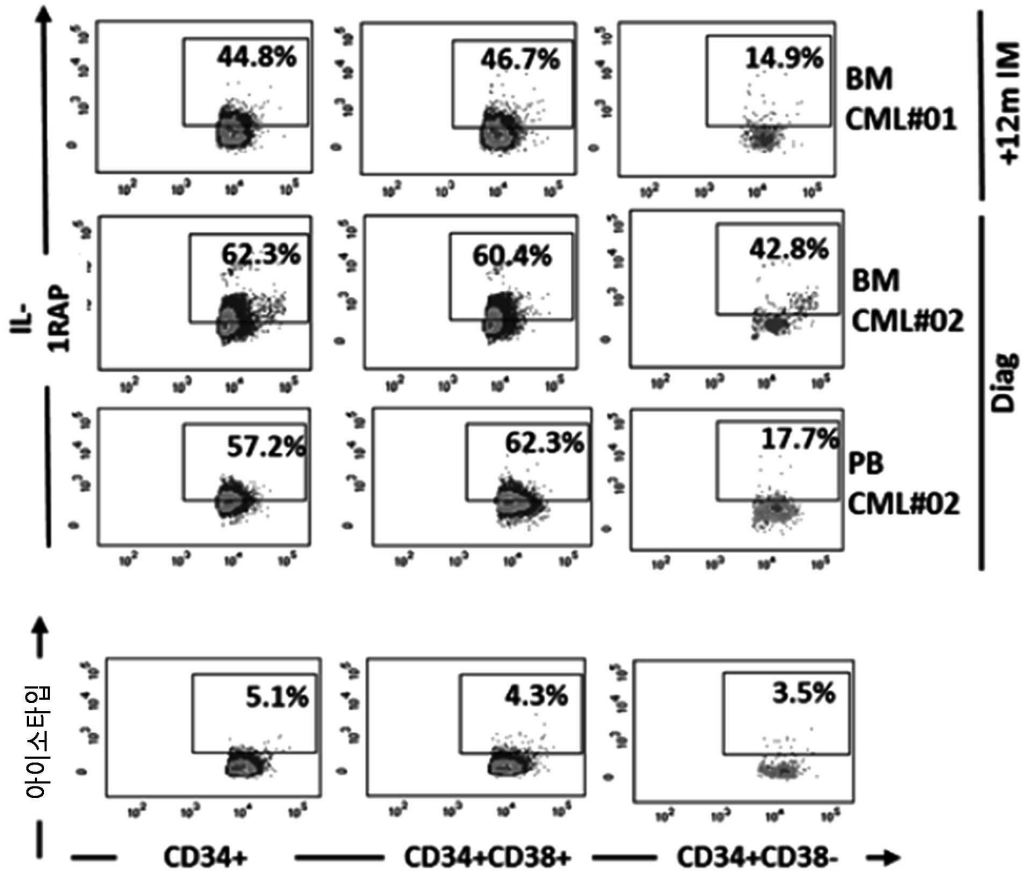
도면1


KU812
KG-1
Nalm-20
주르캣
라지
ø
IL-1RAP
a
b
*
HT1080

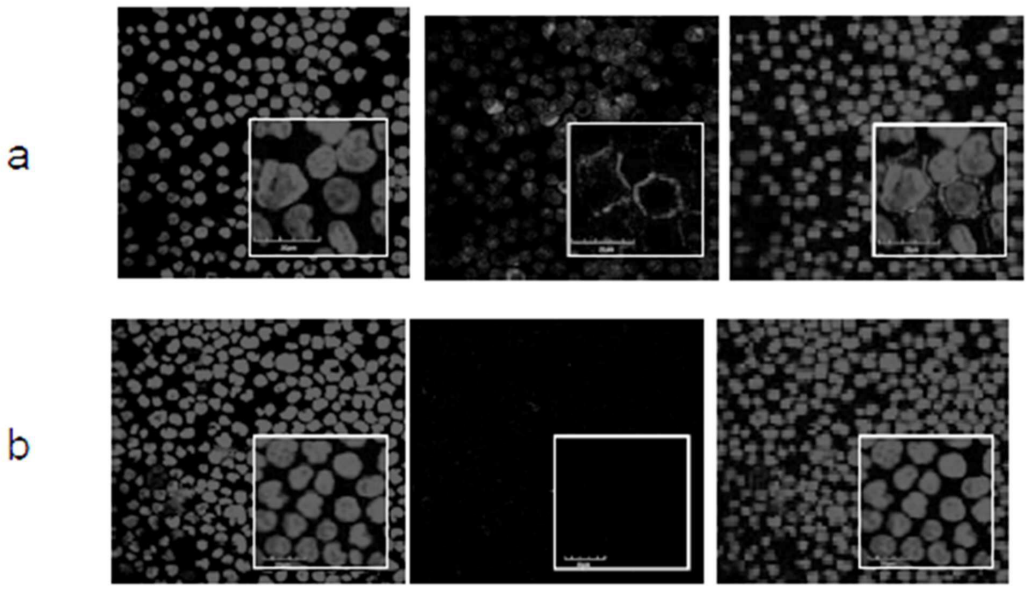
도면2


OD 450nm
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
(a)
(b)

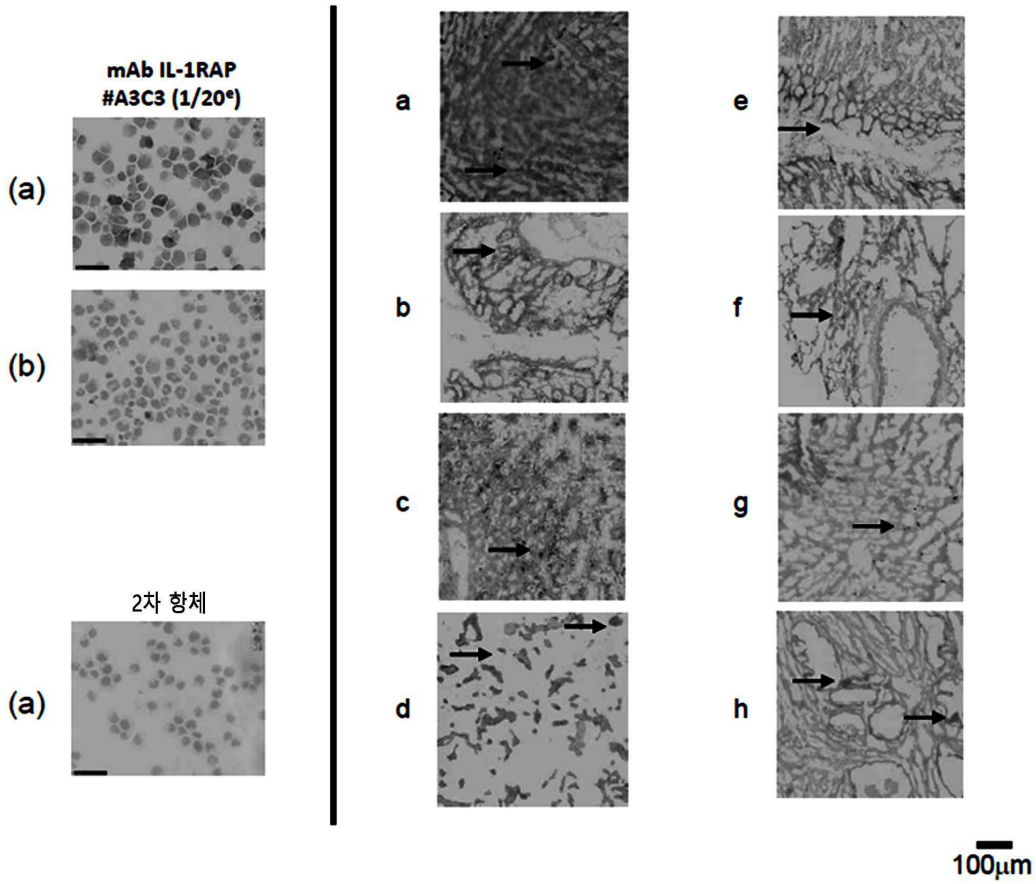
도면3


44.8%
46.7%
14.9%
BM
CML#01
+12m IM
62.3%
60.4%
42.8%
BM
CML#02
Diag
IL-1RAP
57.2%
62.3%
17.7%
PB
CML#02
5.1%
4.3%
3.5%
아이소타입
CD34+
CD34+CD38+
CD34+CD38-

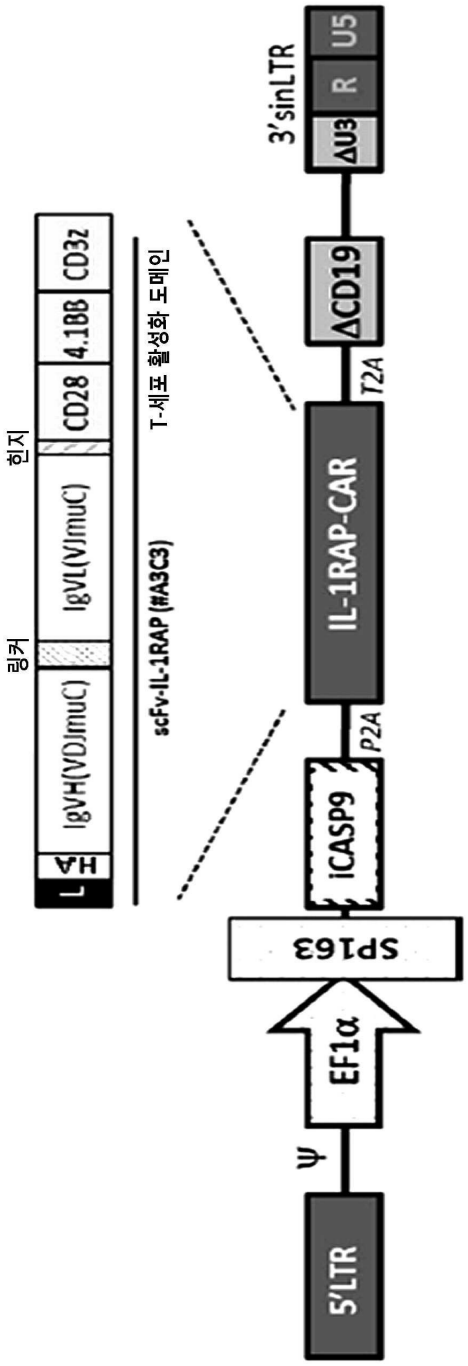
도면4


a
b

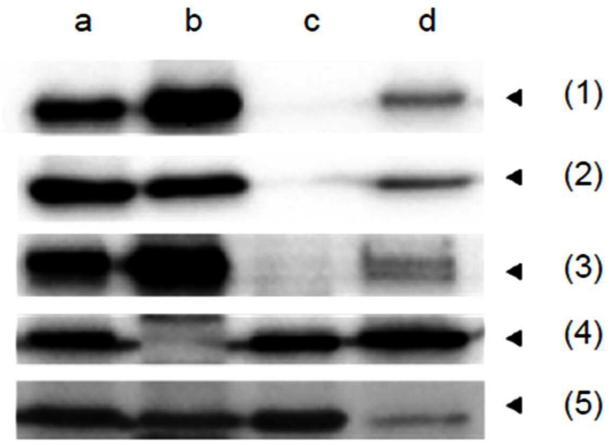
도면5



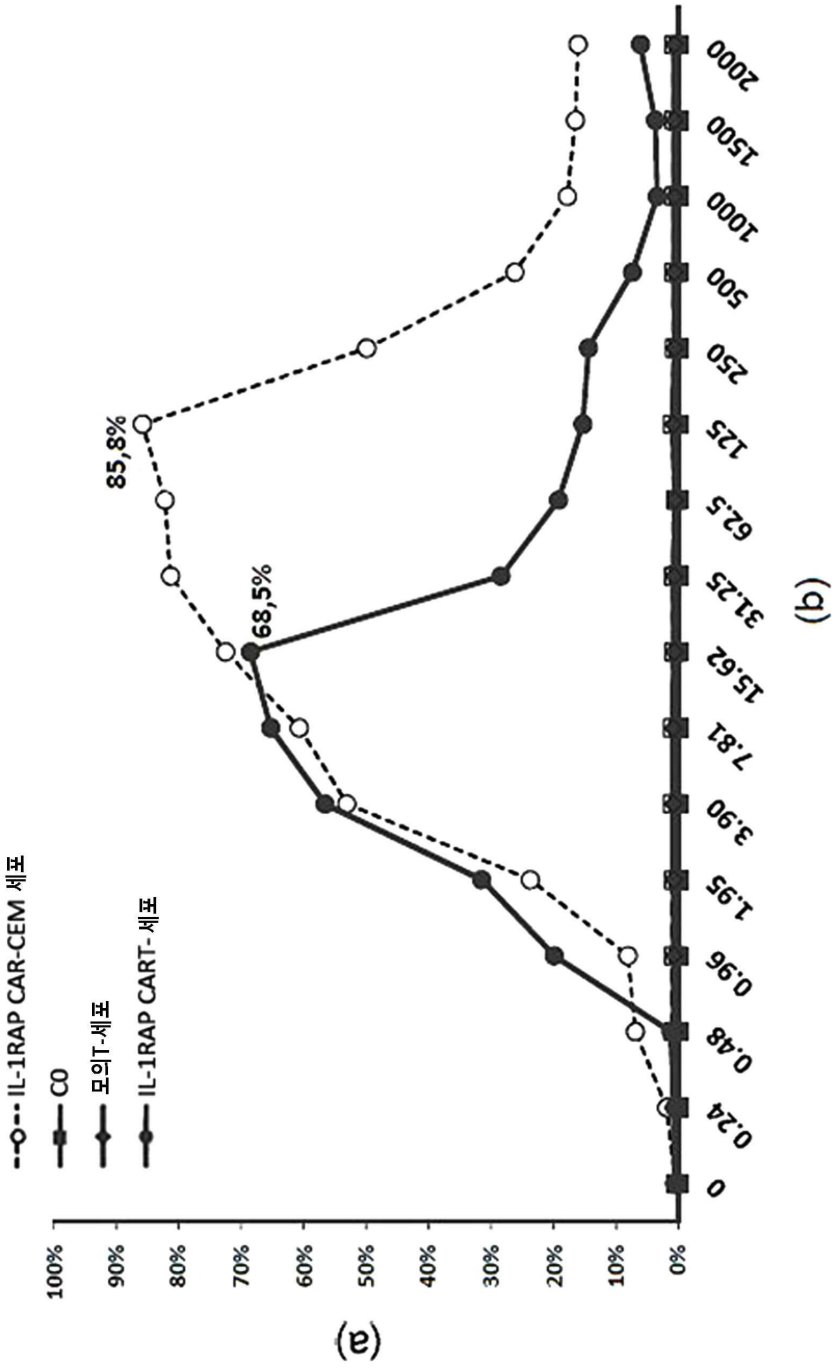
도면6


5'LTR
Ψ
EF1α
SP163
iCASP9
P2A
IL-1RAP-CAR
T2A
ΔCD19
ΔU3
R
U5
3'sinLTR
scFv-IL-1RAP (#A3C3)
T-세포 활성화 도메인
L
IgVH(VDJmuC)
링커
IgVL(VJmuC)
힌지
CD28
4.1BB
CD3ζ

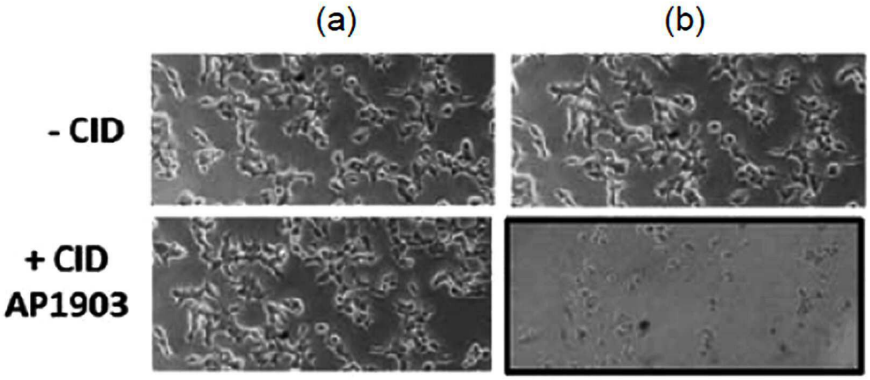
도면7



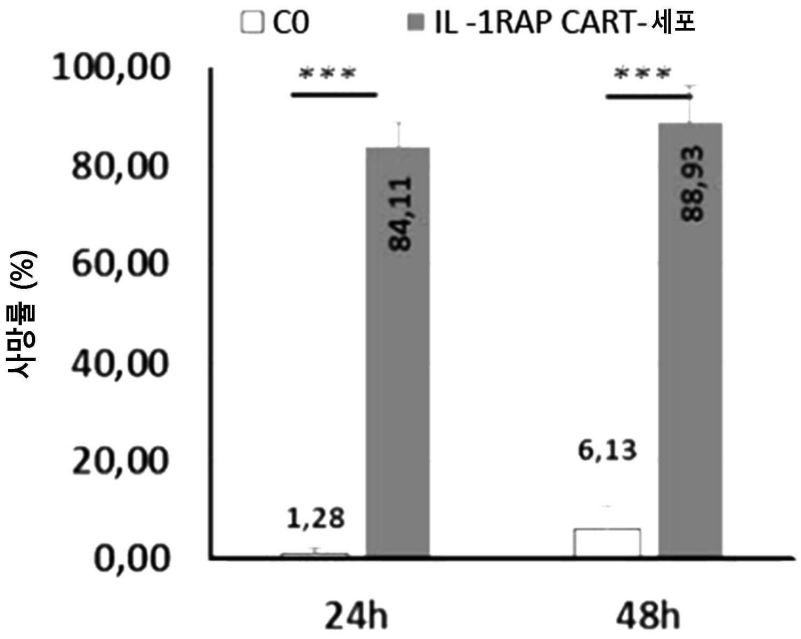
도면8


IL-1RAP CAR-CEM 세포
C0
모의T-세포
IL-1RAP CART- 세포
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
85,8%
68,5%
0
0,24
0,48
0,96
1,95
3,90
7,81
15,62
31,25
62,5
125
250
500
1000
1500
2000
(a)
(b)

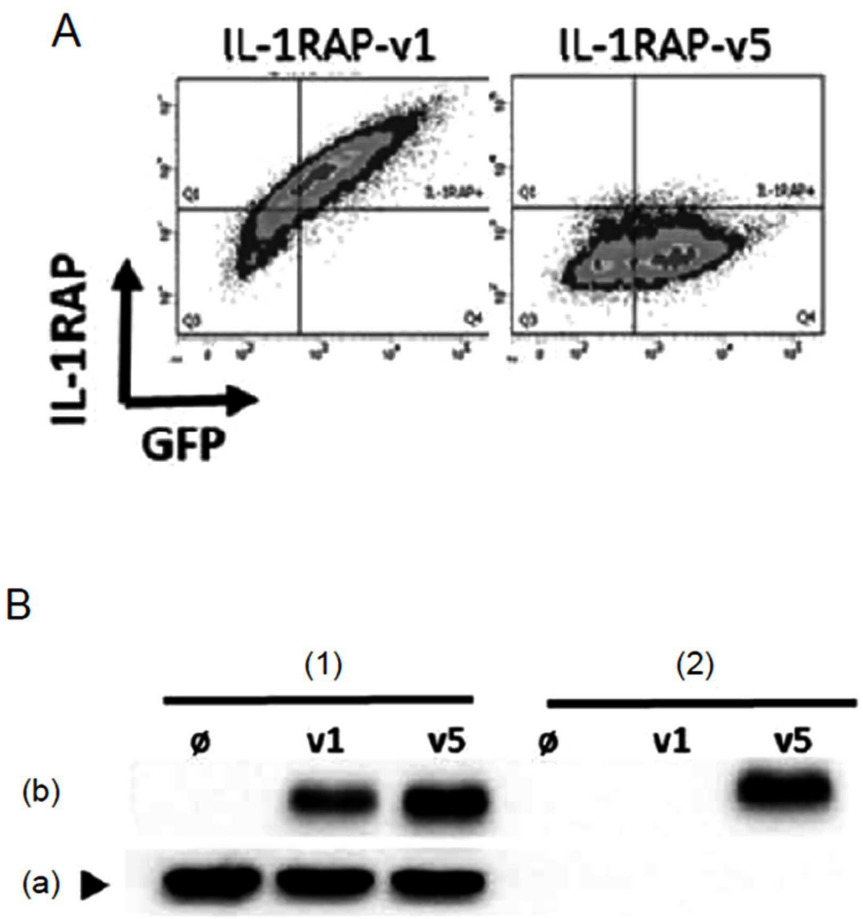
도면9


(a)
(b)
- CID
+ CID
AP1903

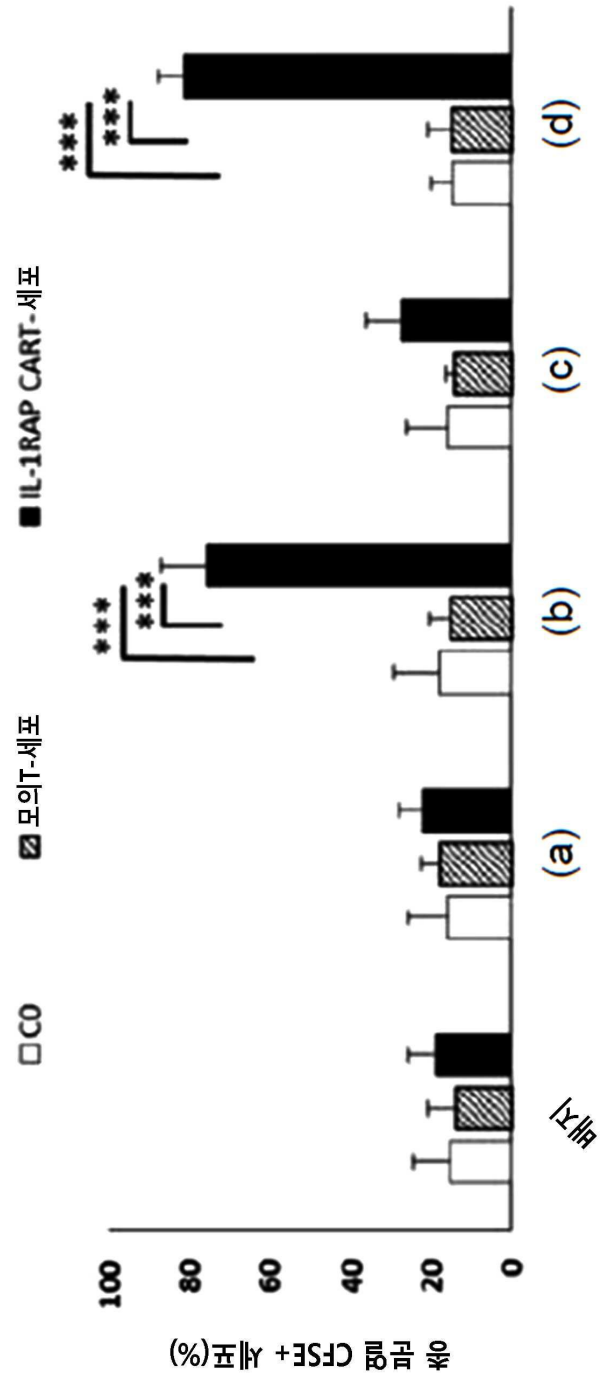
도면10


C0
IL -1RAP CART-세포
100,00
80,00
60,00
40,00
20,00
0,00
사망률 (%)
***
***
84,11
88,93
1,28
6,13
24h
48h

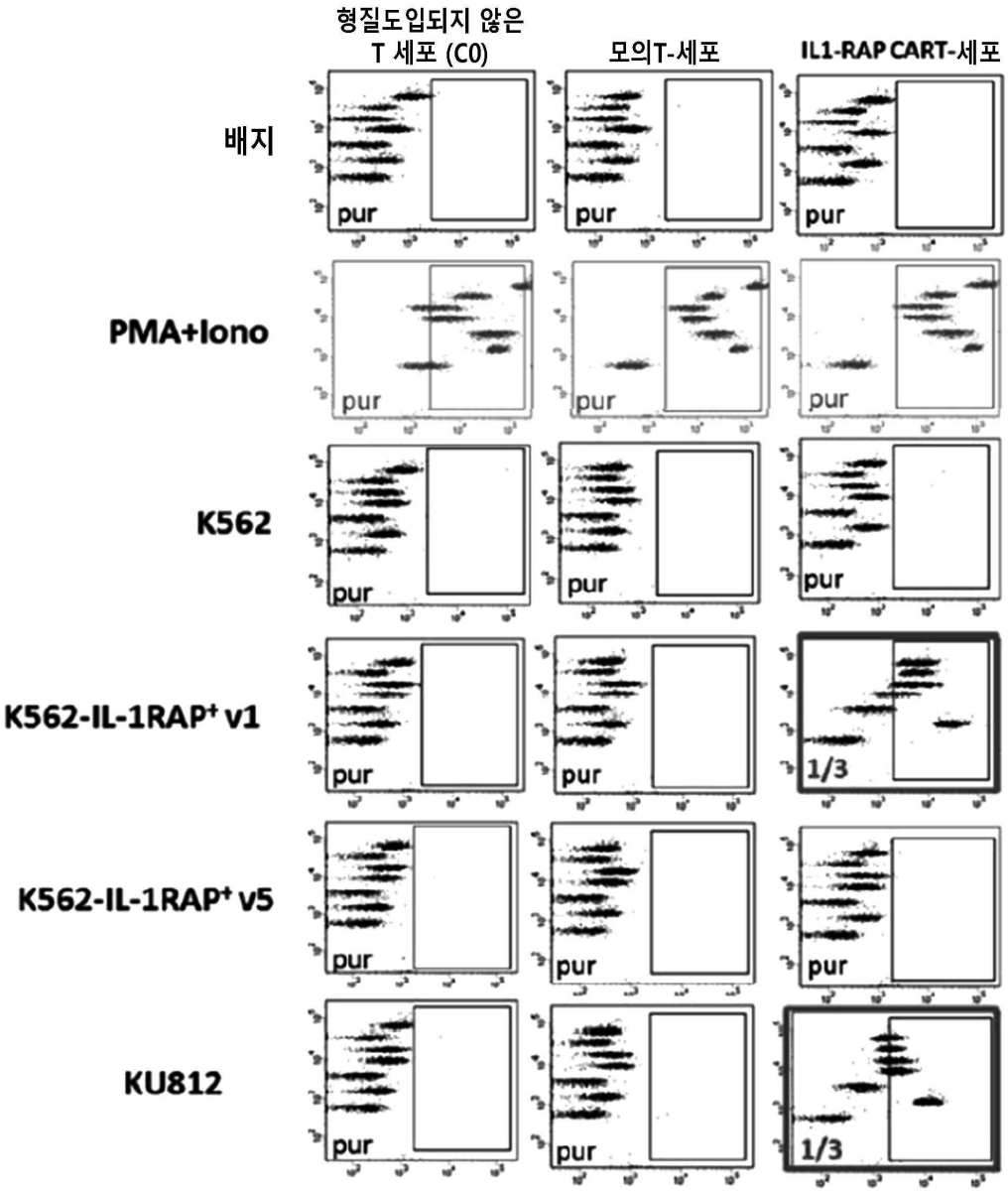
도면11



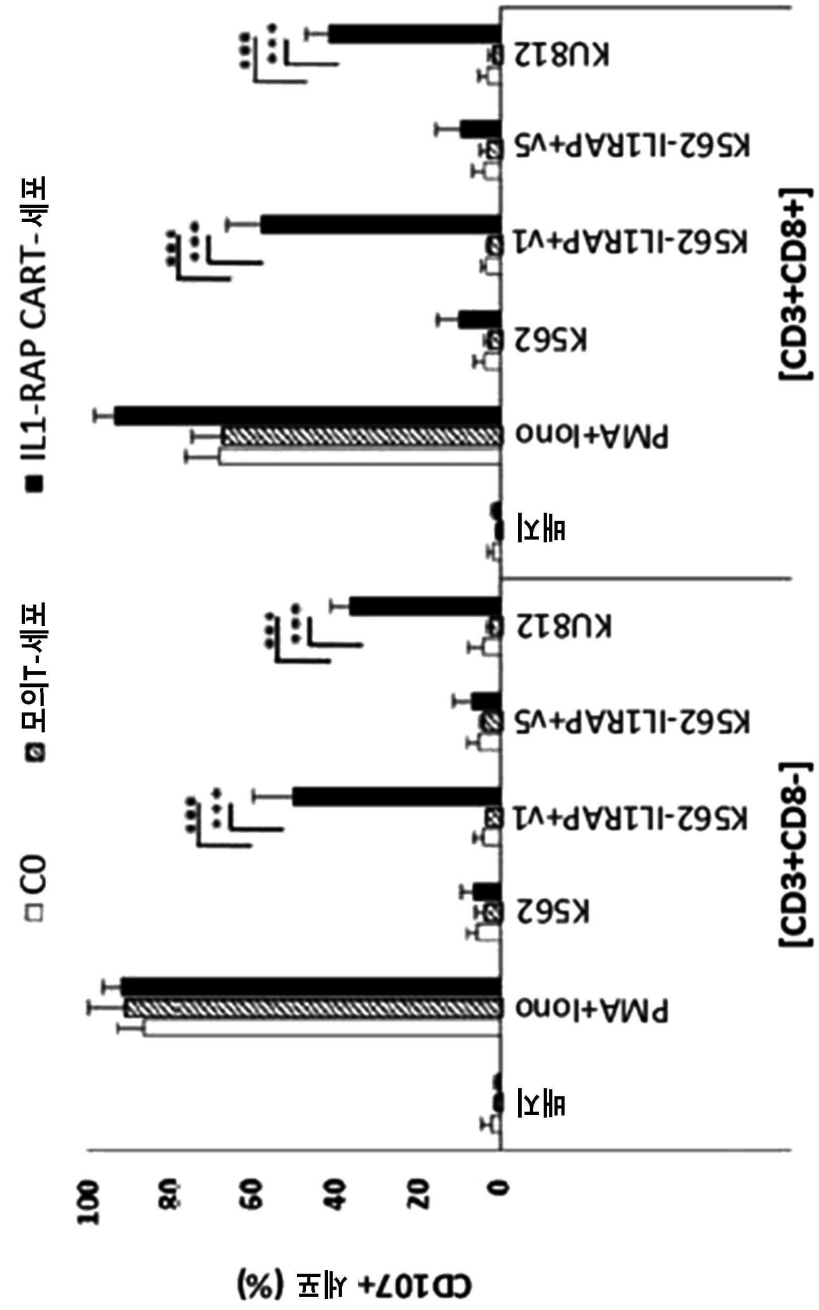
도면12



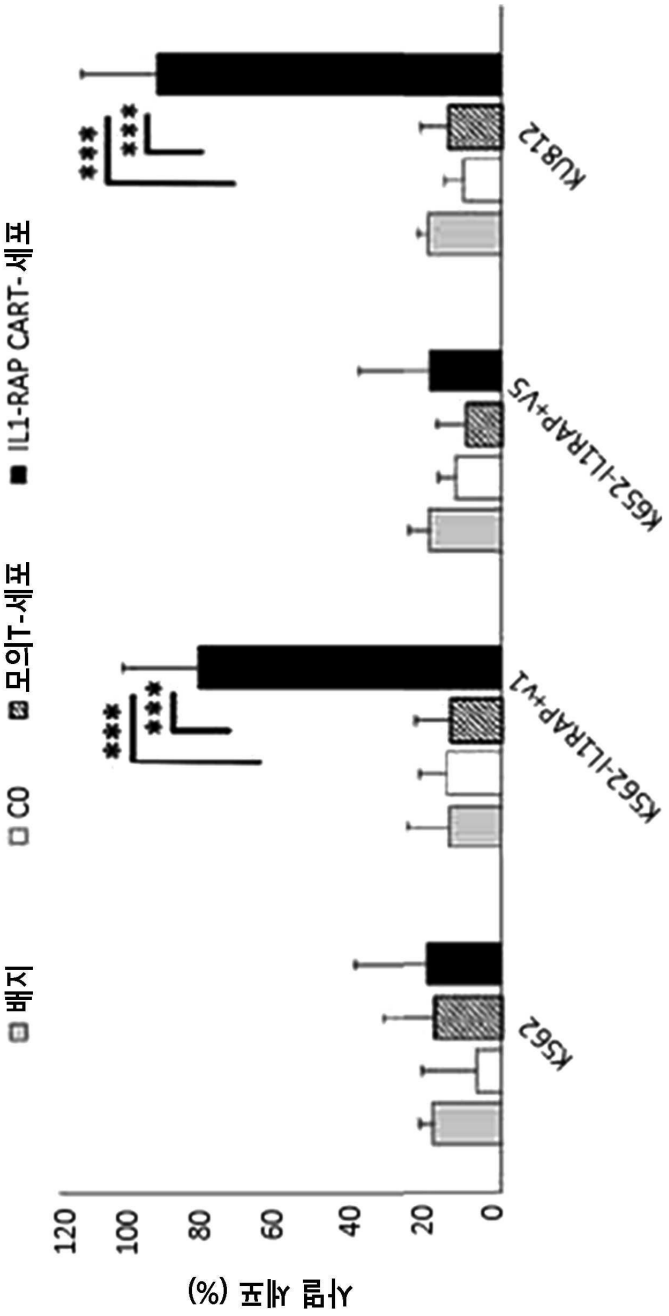
도면13


형질도입되지 않은
T 세포 (C0)
모의T-세포
IL1-RAP CART-세포
배지
PMA+Iono
K562
K562-IL-1RAP+ v1
K562-IL-1RAP+ v5
KU812
pur
1/3

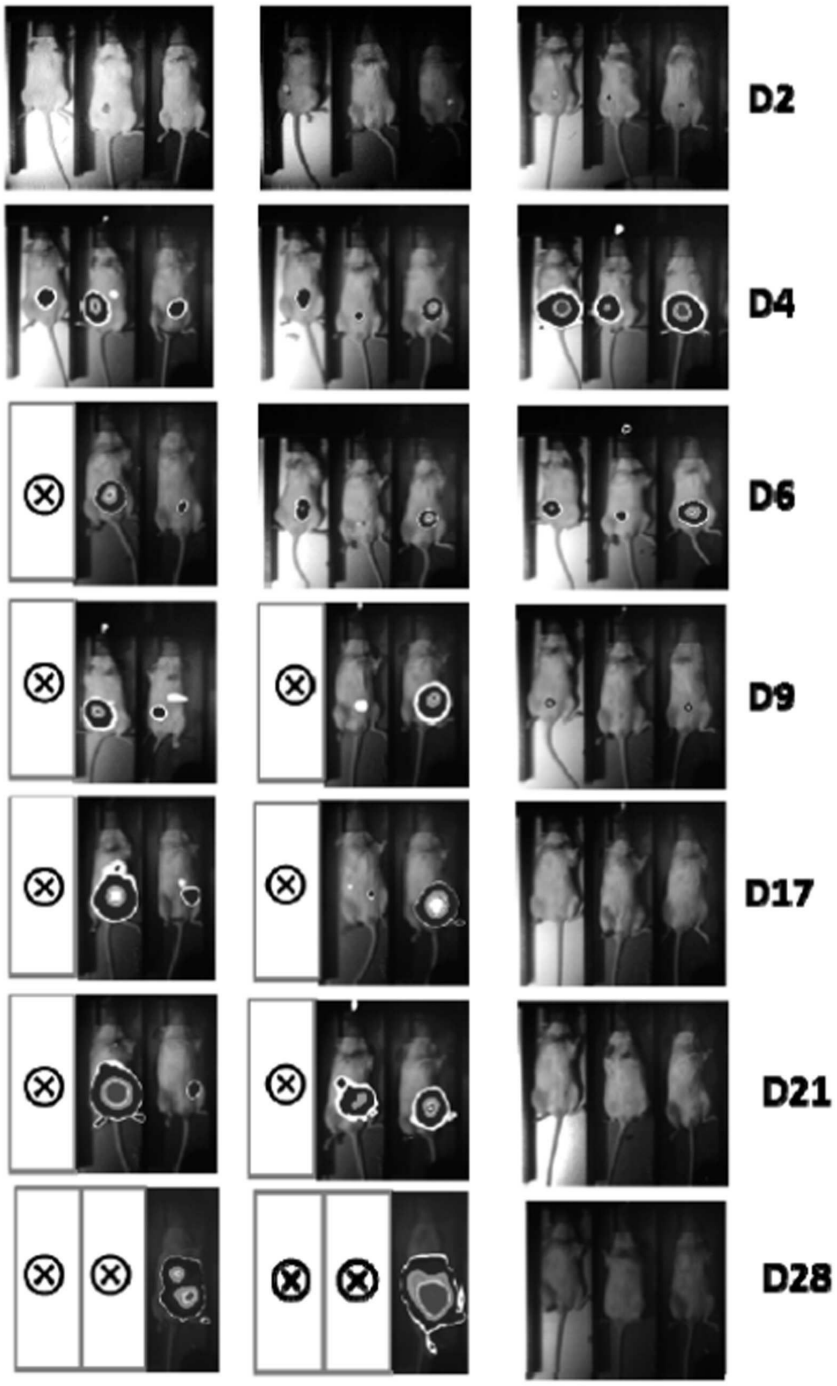
도면14


CD107+ 세포 (%)
100
80
60
40
20
0
[CD3+CD8-]
[CD3+CD8+]
대조
PMA+iono
K562
K562-IL1RAP+V1
K562-IL1RAP+V5
KU812
□ CO
▨ 모의T-세포
■ IL1-RAP CART-세포

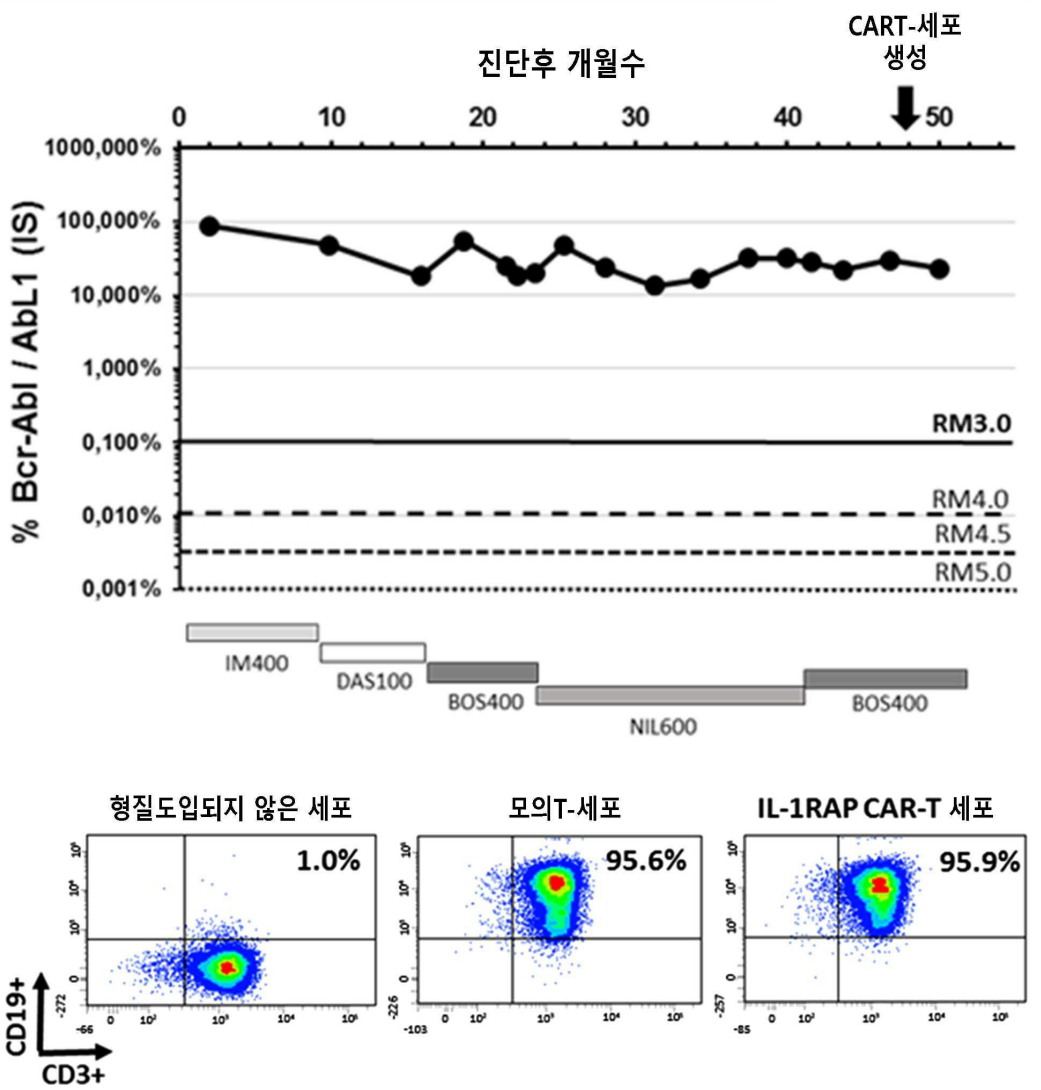
도면15


배지
C0
모의T-세포
IL1-RAP CART-세포
사멸 세포 (%)
0
20
40
60
80
100
120
K562
K562-iLIRAP+V1
K562-iLIRAP+V5
KU812
***
***
***
***

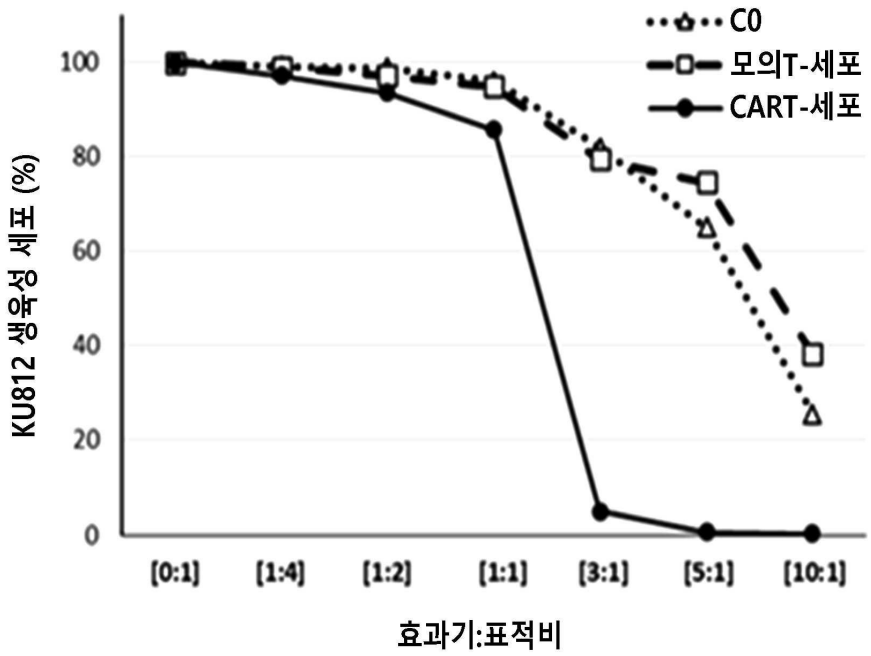
도면16



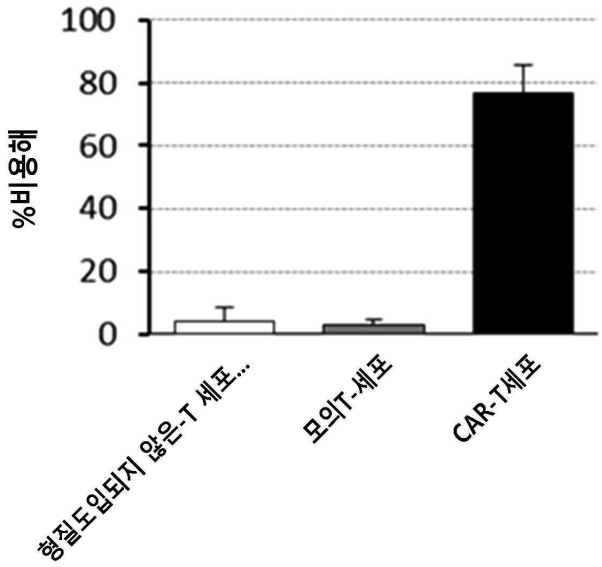
도면17


CART-세포
생성
진단후 개월수
0
10
20
30
40
50
% Bcr-Abl / AbL1 (IS)
1000,000%
100,000%
10,000%
1,000%
0,100%
0,010%
0,001%
RM3.0
RM4.0
RM4.5
RM5.0
IM400
DAS100
BOS400
NIL600
BOS400
형질도입되지 않은 세포
모의T-세포
IL-1RAP CAR-T 세포
1.0%
95.6%
95.9%
CD19+
CD3+

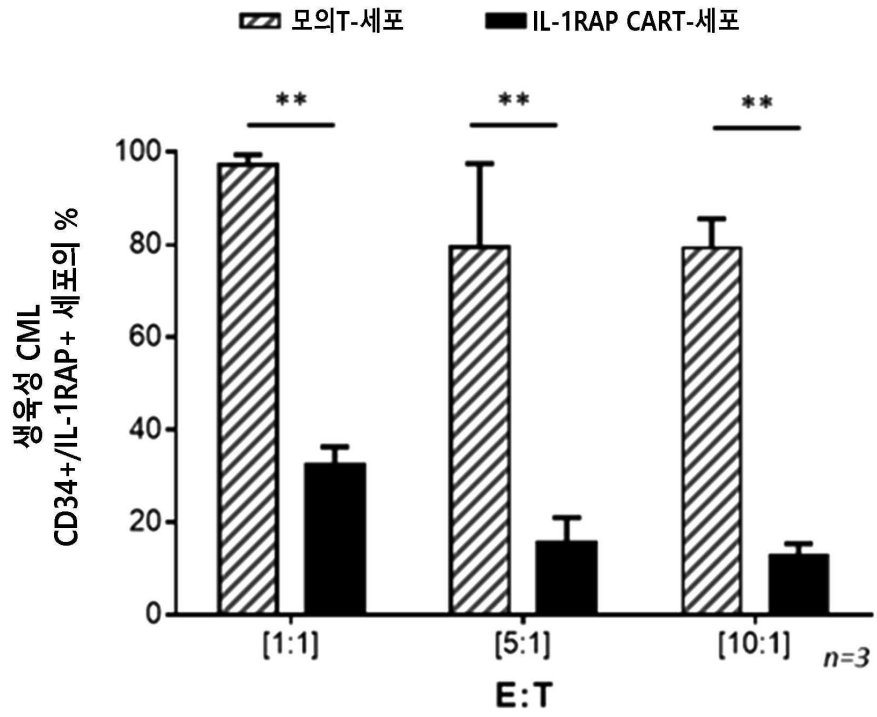
도면18


C0
모의T-세포
CART-세포
KU812 생육성 세포 (%)
100
80
60
40
20
0
[0:1]
[1:4]
[1:2]
[1:1]
[3:1]
[5:1]
[10:1]
효과기:표적비

도면19


%비용해
100
80
60
40
20
0
형질도입되지 않은-T 세포...
모의T-세포
CAR-T세포

도면20

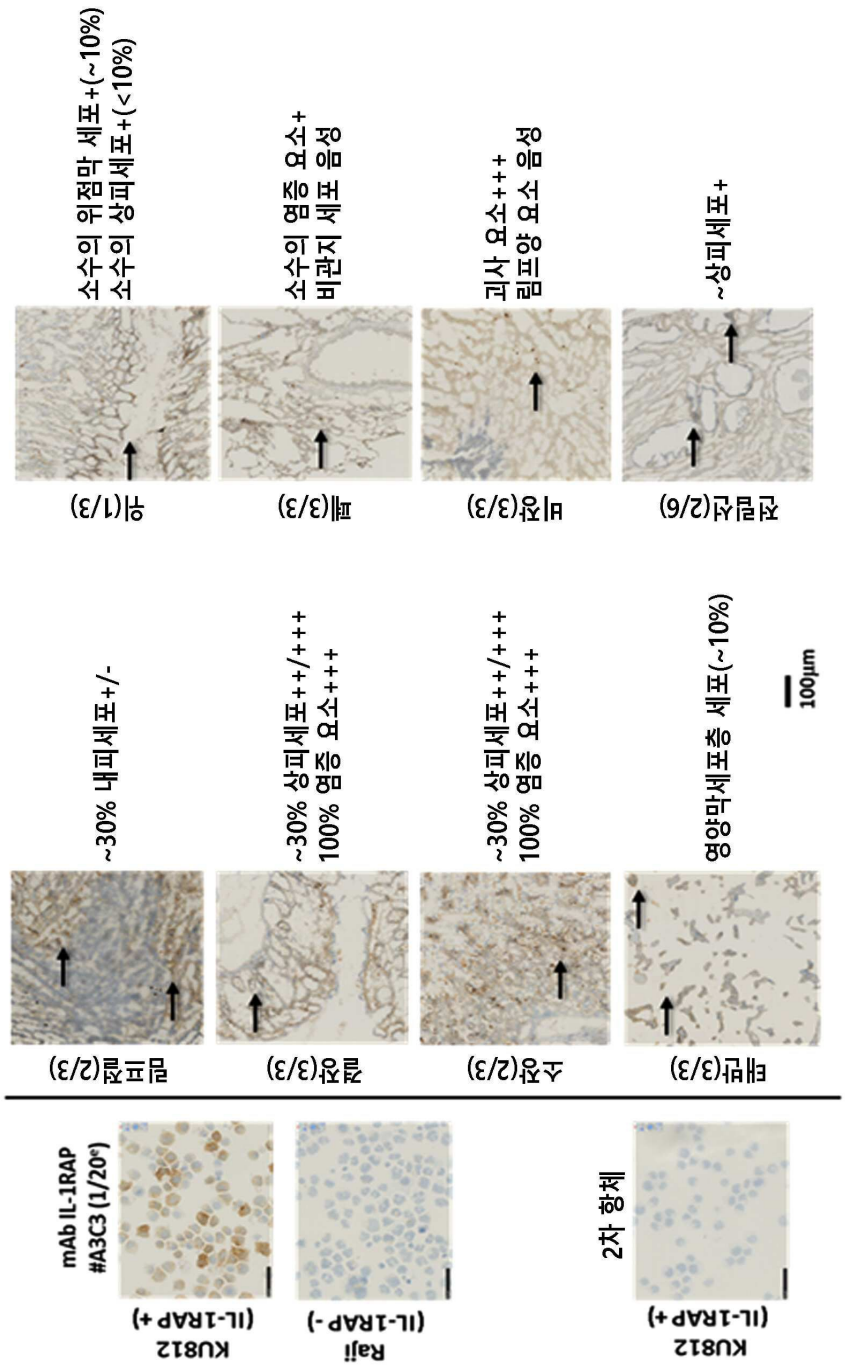

모의T-세포
IL-1RAP CART-세포
**
**
**
100
80
60
40
20
0
생육성 CML
CD34+/IL-1RAP+ 세포의 %
[1:1]
[5:1]
[10:1]
n=3
E:T

환자	서열 치료; [현행 치료]	BCR/ABL (IS)	진단후 시간 [개월]	저온보존된 CML PBSC 자가이식편 [연도/N2 보관]	형질도입 효율[%]	CD34+/IL-1RAP+ 사멸 효율
CML#1	IFNγ-IM-DAS; [NIL]	34%	258	1997; 21y	92%	**67.38%**
CML#2	IM; [∅]	0,0011%	194	2002; 16y	80.9%	**84.41%**
CML#3	INFγ-IM,-NIL-DAS-PON-BOS; [IM]	0,67%	324	2000; 18y	83.1%	**87.12%**

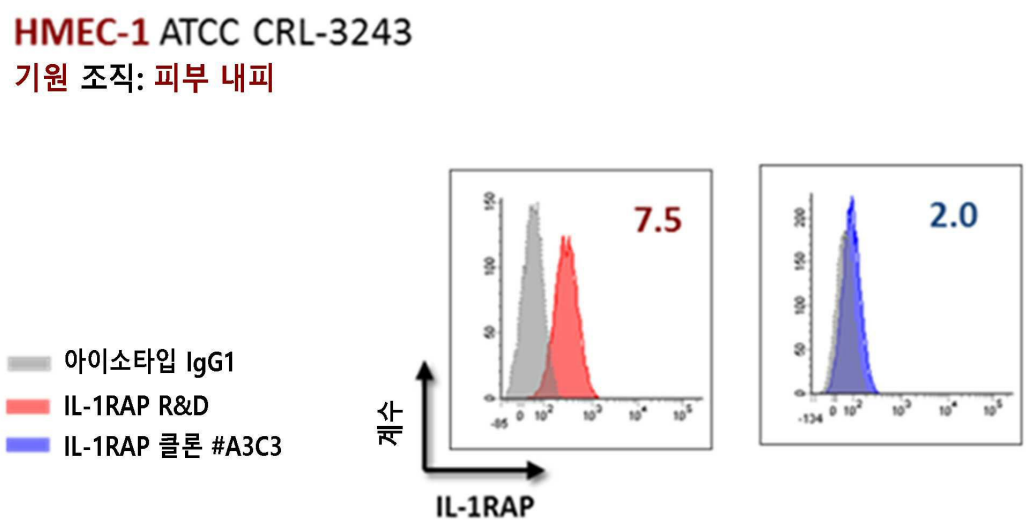
∅ : 치료 부재; IFNγ : 인터페론γ; IM : 이마티닙; DAS : 다사티닙; NIL : 닐로티닙; PON : 포나티닙; BOS : 보수티닙

등록특허 10-2730900

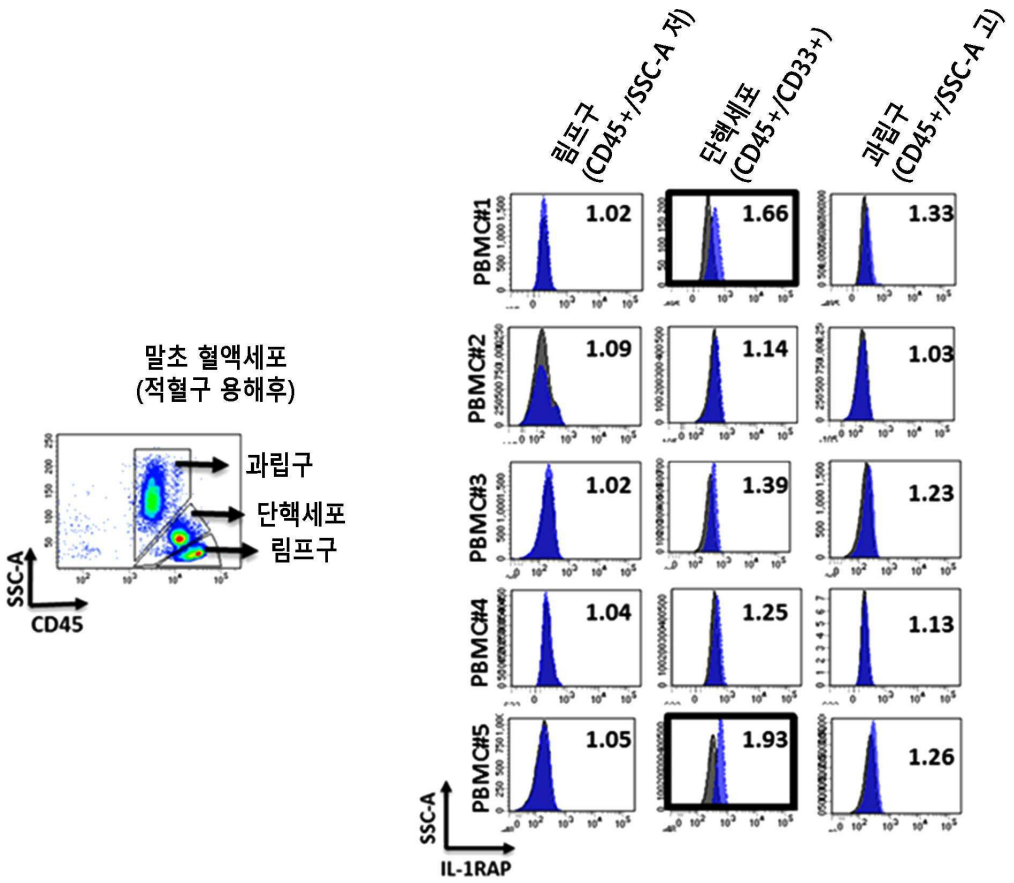
도면22a


mAb IL-1RAP #A3C3 (1/20*)
KU812 (IL-1RAP+)
Raji (IL-1RAP-)
2차 항체
KU812 (IL-1RAP+)
100μm
영양막세포층 세포(~10%)
~30% 상피세포++/+++ 100% 염증 요소+++
~30% 상피세포++/+++ 100% 염증 요소+++
~30% 내피세포+/-
태반(3/3)
소장(2/3)
결장(3/3)
림프절(2/3)
~상피세포+
괴사 요소+++ 림프양 요소 음성
소수의 염증 요소+ 비관지 세포 음성
소수의 위점막 세포+(~10%) 소수의 상피세포+(<10%)
전립선(2/6)
비장(3/3)
폐(3/3)
위(1/3)

도면22b

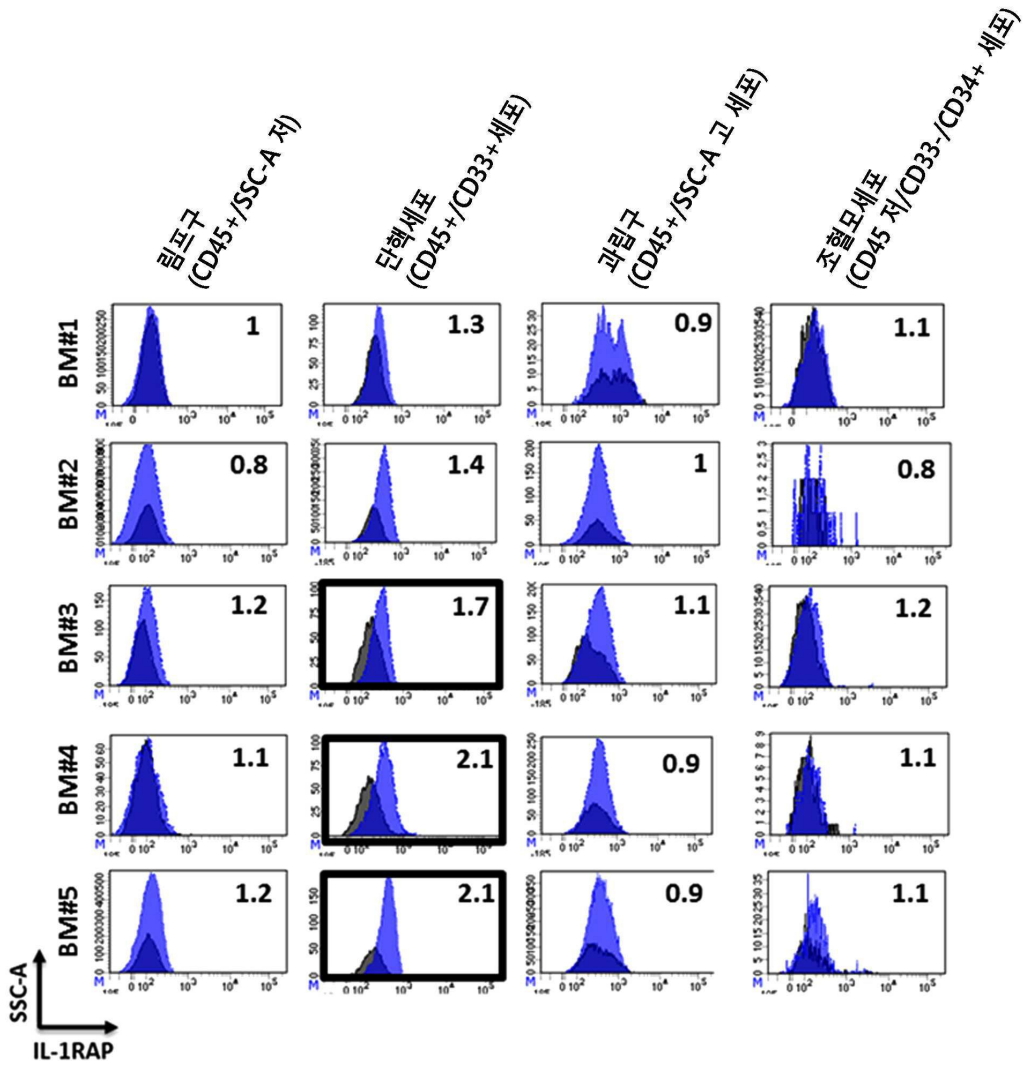

HMEC-1 ATCC CRL-3243
기원 조직: 피부 내피
아이소타입 IgG1
IL-1RAP R&D
IL-1RAP 클론 #A3C3
7.5
2.0
계수
IL-1RAP

도면23a


말초 혈액세포
(적혈구 용해후)
과립구
단핵세포
림프구
SSC-A
CD45
림프구 (CD45+/SSC-A 저)
단핵세포 (CD45+/CD33+)
과립구 (CD45+/SSC-A 고)
PBMC#1
1.02
1.66
1.33
PBMC#2
1.09
1.14
1.03
PBMC#3
1.02
1.39
1.23
PBMC#4
1.04
1.25
1.13
PBMC#5
1.05
1.93
1.26
SSC-A
IL-1RAP

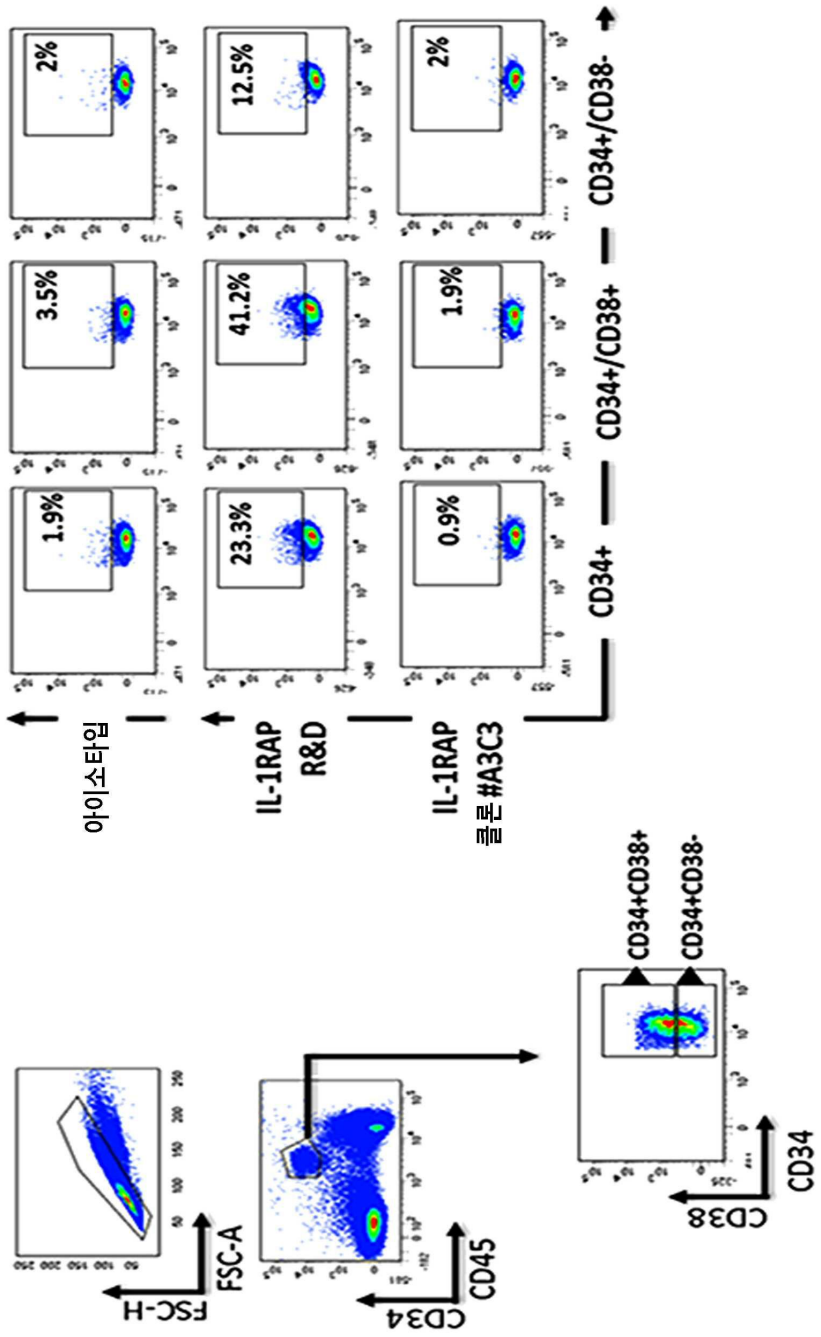
도면23ba

도 23B

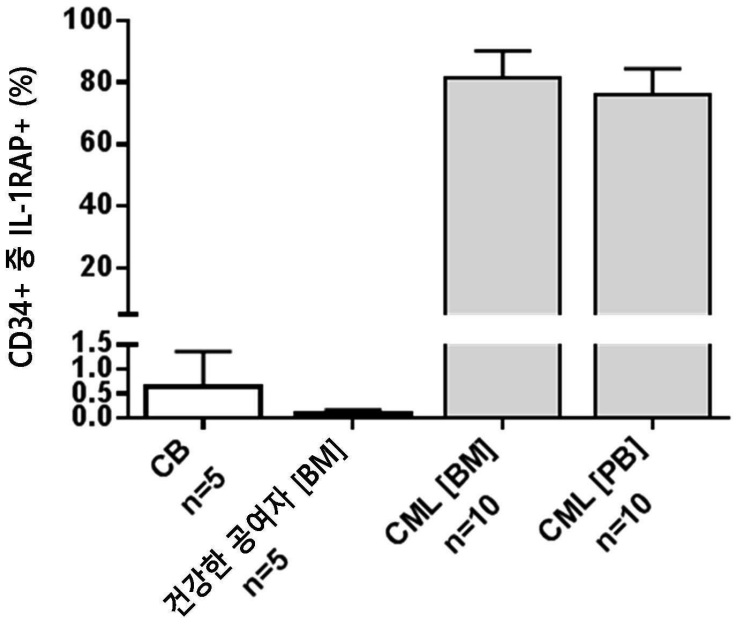

림프구 (CD45+/SSC-A 저)
단핵세포 (CD45+/CD33+세포)
과립구 (CD45+/SSC-A 고 세포)
조혈모세포 (CD45 저/CD33-/CD34+ 세포)
BM#1
BM#2
BM#3
BM#4
BM#5
1
1.3
0.9
1.1
0.8
1.4
1
0.8
1.2
1.7
1.1
1.2
1.1
2.1
0.9
1.1
1.2
2.1
0.9
1.1
SSC-A
IL-1RAP

도면23bb

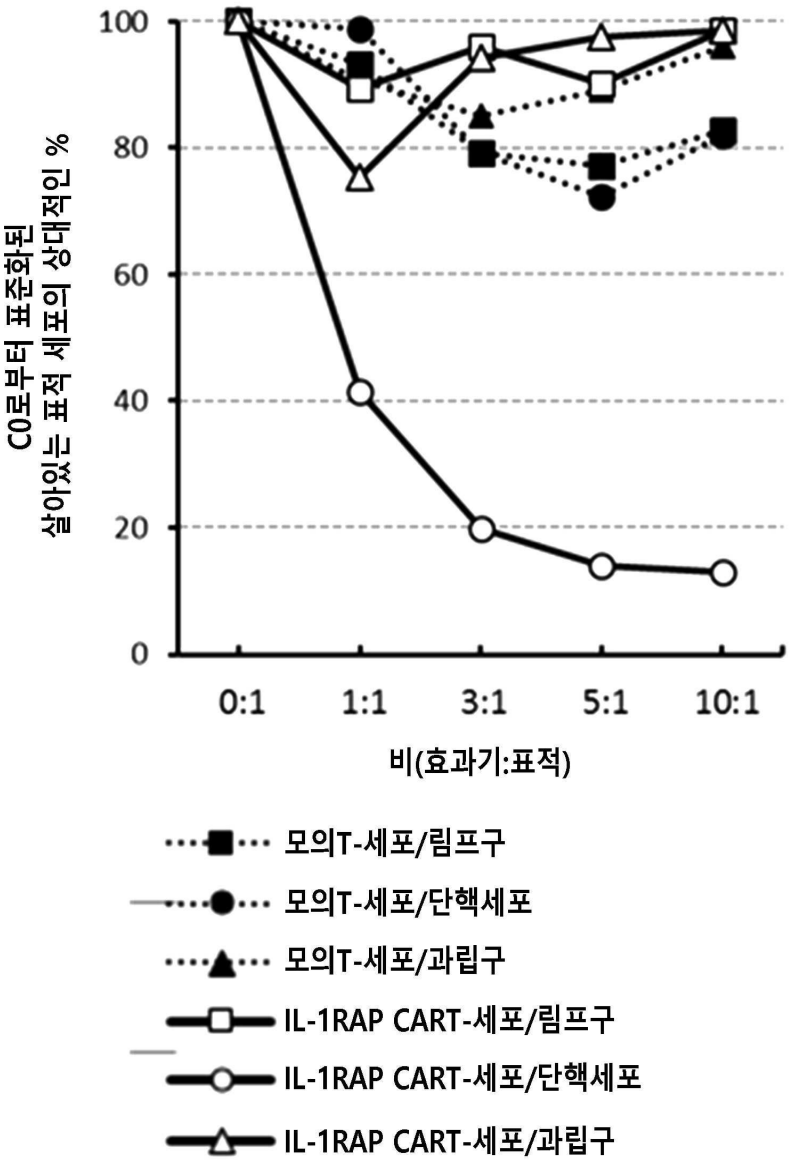
도 23B (계속)



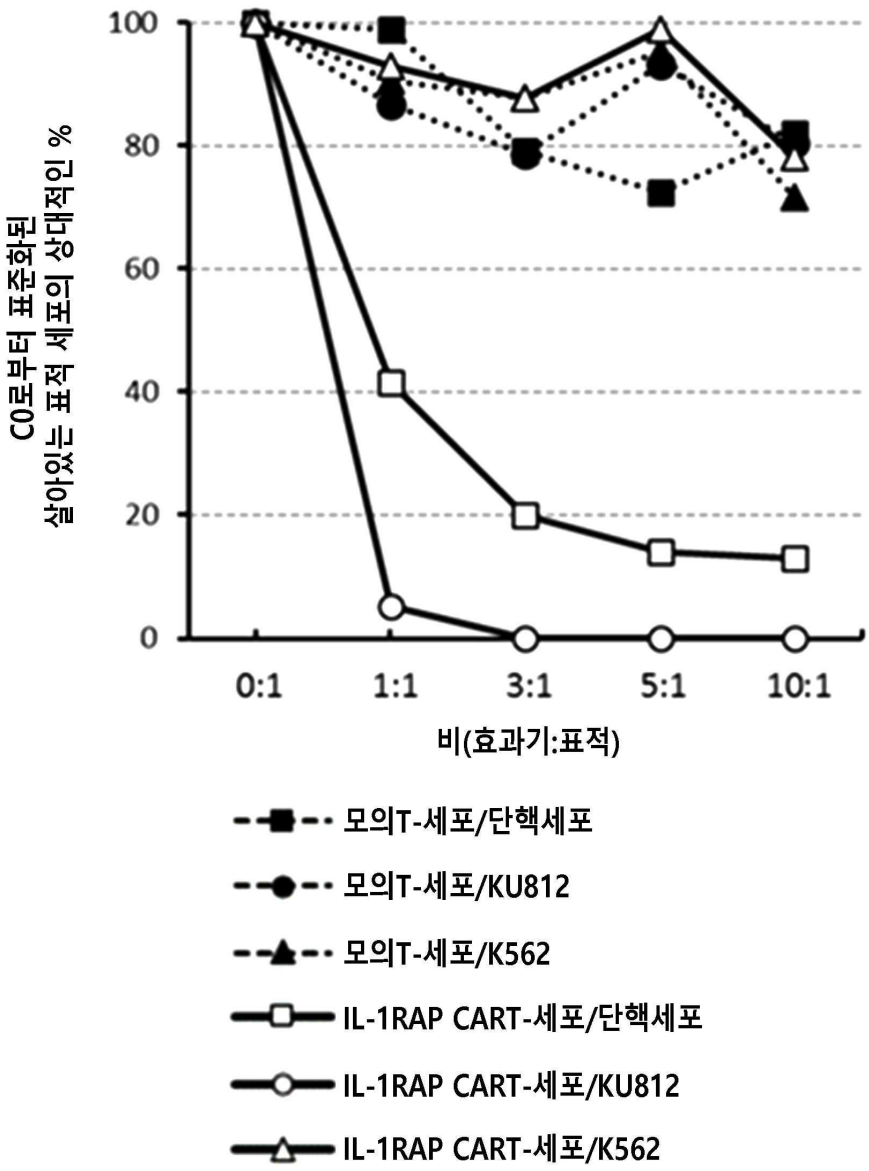
도면23c


CD34+ 중 IL-1RAP+ (%)
100
80
60
40
20
1.5
1.0
0.5
0.0
CB
n=5
건강한 공여자 [BM]
n=5
CML [BM]
n=10
CML [PB]
n=10

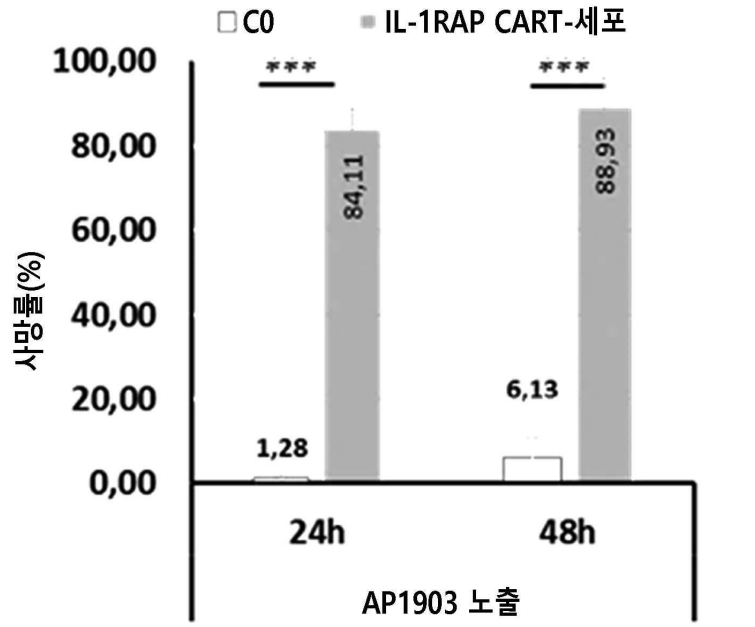
도면23d


100
80
60
40
20
0
C0로부터 표준화된
살아있는 표적 세포의 상대적인 %
0:1
1:1
3:1
5:1
10:1
비(효과기:표적)
모의T-세포/림프구
모의T-세포/단핵세포
모의T-세포/과립구
IL-1RAP CART-세포/림프구
IL-1RAP CART-세포/단핵세포
IL-1RAP CART-세포/과립구

도면23e

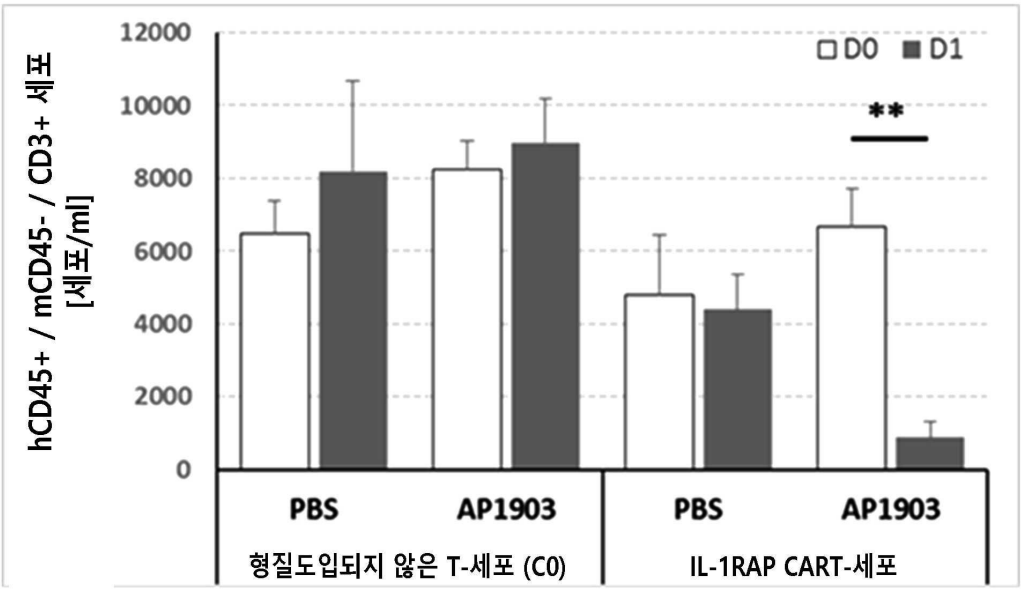

100
80
60
40
20
0
C0로부터 표준화된
살아있는 표적 세포의 상대적인 %
0:1
1:1
3:1
5:1
10:1
비(효과기:표적)
모의T-세포/단핵세포
모의T-세포/KU812
모의T-세포/K562
IL-1RAP CART-세포/단핵세포
IL-1RAP CART-세포/KU812
IL-1RAP CART-세포/K562

도면23f



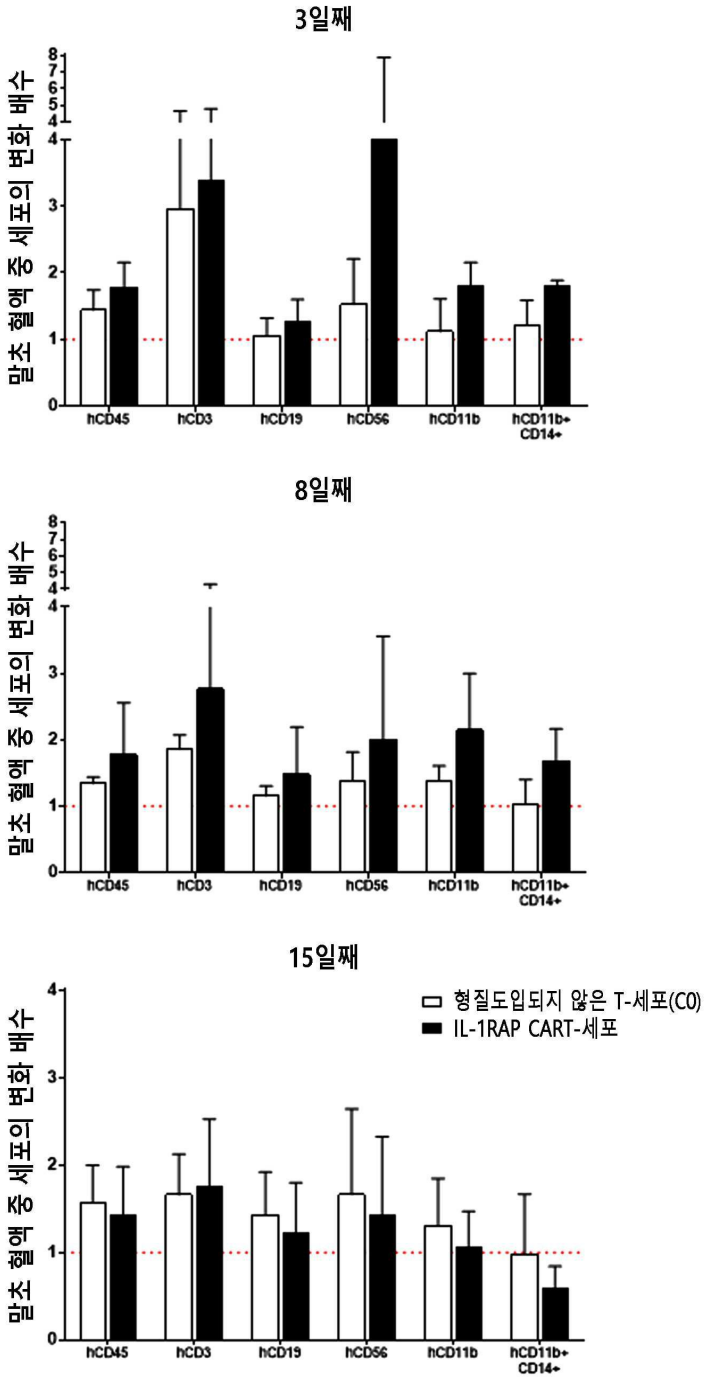
*** : p<0,001, n=3

도면23g

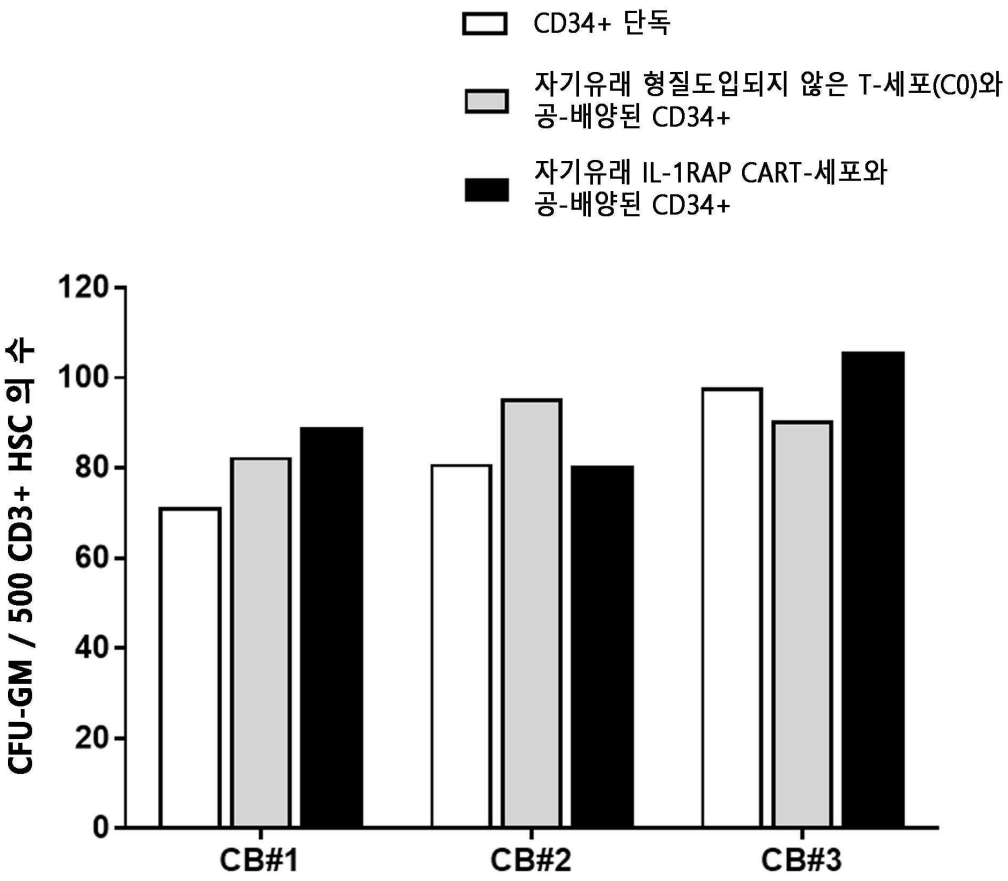


** : p<0,01

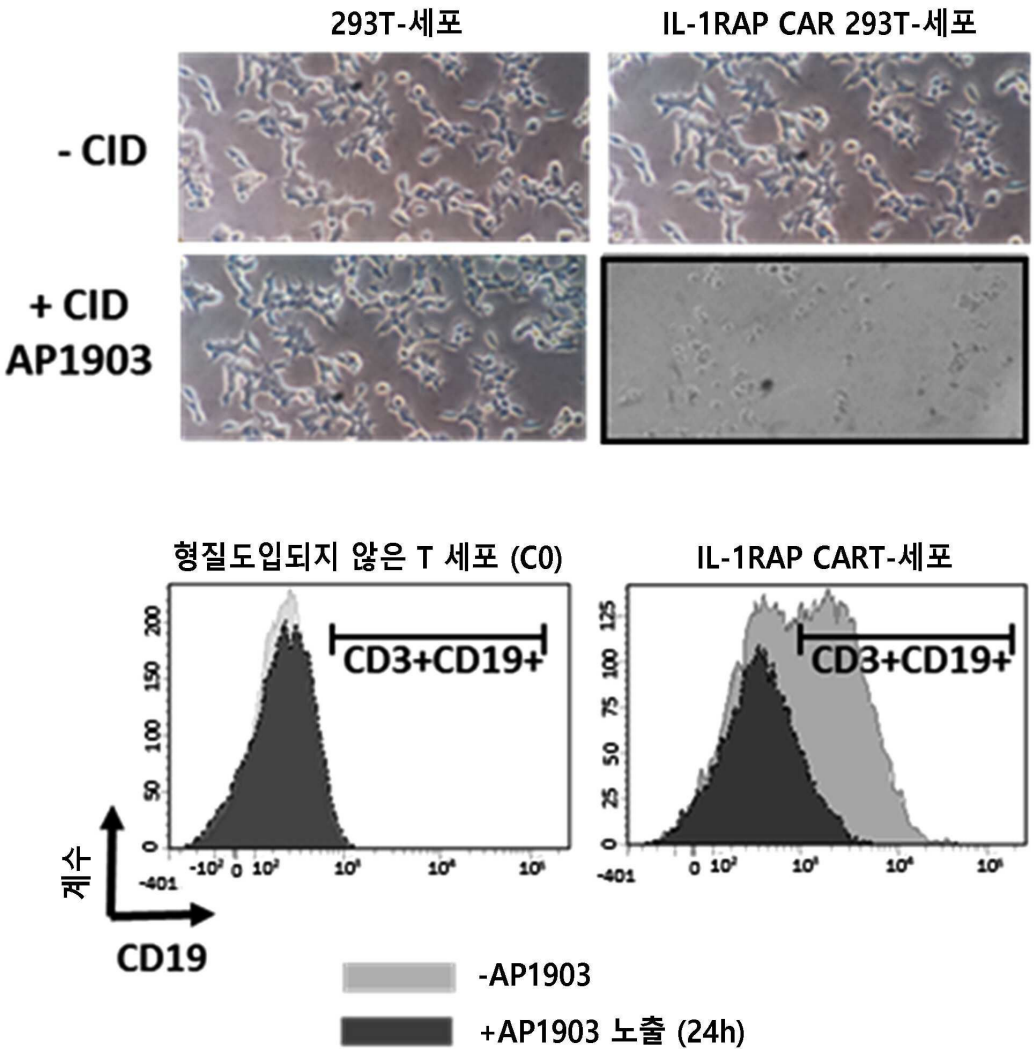
도면24


3일째
말초 혈액 중 세포의 변화 배수
hCD45
hCD3
hCD19
hCD56
hCD11b
hCD11b+ CD14+
8일째
말초 혈액 중 세포의 변화 배수
hCD45
hCD3
hCD19
hCD56
hCD11b
hCD11b+ CD14+
15일째
말초 혈액 중 세포의 변화 배수
형질도입되지 않은 T-세포(C0)
IL-1RAP CART-세포
hCD45
hCD3
hCD19
hCD56
hCD11b
hCD11b+ CD14+

도면25


CD34+ 단독
자기유래 형질도입되지 않은 T-세포(C0)와 공-배양된 CD34+
자기유래 IL-1RAP CART-세포와 공-배양된 CD34+
CFU-GM / 500 CD3+ HSC 의 수
120
100
80
60
40
20
0
CB#1
CB#2
CB#3

도면26



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Etablissement Fran?is du Sang

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE

(INSERM)

CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE BESANCON

UNIVERSITE DE FRANCHE COMTE

<120> CAR-T CELLS TARGETING IL-1RAP AND THEIR USE

<130> 1H318460 - 0004

<160> 18

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 423

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide sequence coding chain H (VH) of murine scFv anti-IL-1RAP

<400> 1

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt caactcccag 60

gtccaactgc agcagcctgg ggctgagctt atgatgcctg gggcttcagt gaaagtgtcc 120

tgcgaggctt ctggctacac attcactgac tcctggatgc actgggtgaa gcagaggcct 180

ggacaaggcc ttgagtggat cggagcgatt gatccttctg atagttatac tacctataat 240

caaaaattca cgggcaaggc cacattgagt gtagacgaat cctccaacac agcctacatg 300

cagctcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag gtattactcc 360

ggtagtaact acatatcgcc ctttccttac tggggccaag ggactctggt cactgtctct 420

gca 423

<210> 2

<211> 141

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of chain H (VH) of murine scFv anti-IL-1RAP

<400> 2

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

1 5 10 15

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Met Met

20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Glu Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

35 40 45

Thr Asp Ser Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Thr Tyr Asn

65 70 75 80

Gln Lys Phe Thr Gly Lys Ala Thr Leu Ser Val Asp Glu Ser Ser Asn

85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Ser Gly Ser Asn Tyr Ile Ser Pro Phe

115 120 125

Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

130 135 140

<210> 3

<211> 382

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide sequence coding chain K (VL) of murine scFv anti-IL-1RAP

<400> 3

atggagtcac agattcaggt ctttgtattc gtgtttctct ggttgtctgg tgttgacgga 60

gacattgtga tgacccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcacc 120

atcacctgca aggccagtct ggatgtgagt actgctgtgg cctggtatca acagaaacca 180

ggacaatctc ctaaactact gatttactcg gcatcctacc ggtacactgg agtccctgat 240

cgcttcactg gcagtggatc tgggacggat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct 300

gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatagtc ctccattcac gttcggctcg 360

gggacaaact tggagataaa ac 382

<210> 4

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of chain K (VL) of murine scFv anti-IL-1RAP

<400> 4

Met Glu Ser Gln Ile Gln Val Phe Val Phe Val Phe Leu Trp Leu Ser

1 5 10 15

Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser

20 25 30

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Leu Asp

35 40 45

Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro

50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp

65 70 75 80

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser

85 90 95

Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr

100 105 110

Ser Pro Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys

115 120 125

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker between the VH and VL domains

<400> 5

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Asp

1 5 10 15

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1 of the light chain

<400> 6

Leu Asp Val Ser Thr Ala

1 5

<210> 7

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2 of the light chain

<400> 7

Ser Ala Ser

1

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3 of the light chain

<400> 8

Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Phe Thr

1 5

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1 of the light chain (nt)

<400> 9

ctggatgtga gtactgct 18

<210> 10

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2 of the light chain (nt)

<400> 10

tcggcatcc 9

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3 of the light chain (nt)

<400> 11

cagcaacatt atagtcctcc attcacg 27

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1 of the heavy chain

<400> 12

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser Trp

1 5

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2 of the heavy chain

<400> 13

Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr

1 5

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3 of the heavy chain

<400> 14

Ala Arg Tyr Tyr Ser Gly Ser Asn Tyr Ile Ser Pro Phe Pro Tyr

1 5 10 15

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1 of the heavy chain (nt)

<400> 15

ggctacacat tcactgactc ctgg 24

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2 of the heavy chain (nt)

<400> 16

attgatcctt ctgatagtta tact 24

<210> 17

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3 of the heavy chain (nt)

<400> 17

gcaaggtatt actccggtag taactacata tcgccctttc cttac 45

<210> 18

<211> 283

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of murine scFv anti-IL-1RAP (i.e. #A3C3 CAR)

<400> 18

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Met Met
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Glu Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asp Ser Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Thr Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Thr Gly Lys Ala Thr Leu Ser Val Asp Glu Ser Ser Asn
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Ser Gly Ser Asn Tyr Ile Ser Pro Phe
115 120 125

Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Ser

130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Asp Met Glu Ser Gln
145 150 155 160
Ile Gln Val Phe Val Phe Val Phe Leu Trp Leu Ser Gly Val Asp Gly
165 170 175

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
180 185 190
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Leu Asp Val Ser Thr Ala
195 200 205
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
210 215 220
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
225 230 235 240

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
245 250 255
Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Phe
260 265 270
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys
275 280