(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0091177
(43) 공개일자 2023년06월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6886 (2018.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *G16H 20/10* (2018.01)
G16H 50/30 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2022.01)
A61K 39/001112 (2023.05)
(21) 출원번호 10-2023-7018339
(22) 출원일자(국제) 2021년11월04일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년05월31일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/058102
(87) 국제공개번호 WO 2022/098903
국제공개일자 2022년05월12일
(30) 우선권주장
63/109,611 2020년11월04일 미국(US)

(71) 출원인
더 보드 어브 트러스티스 어브 더 리랜드 스탠포드 주니어 유니버시티
미국 94305-2038 캘리포니아주 스탠포드 피오 박스 20386 메인 퀴드 빌딩 170 3층 오피스 오브 더 제너럴 카운셀
(72) 발명자
마즈너, 로비
미국 94306 캘리포니아 팰로 알토 엘 카미노 리얼 3000 빌딩 5 스위트 300 더 보드 오브 트러스티스 오브 더 리랜드 스탠포드 주니어 유니버시티 (내)
맥콜, 크리스탈, 엘.
미국 94306 캘리포니아 팰로 알토 엘 카미노 리얼 3000 빌딩 5 스위트 300 더 보드 오브 트러스티스 오브 더 리랜드 스탠포드 주니어 유니버시티 (내)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 남앤남

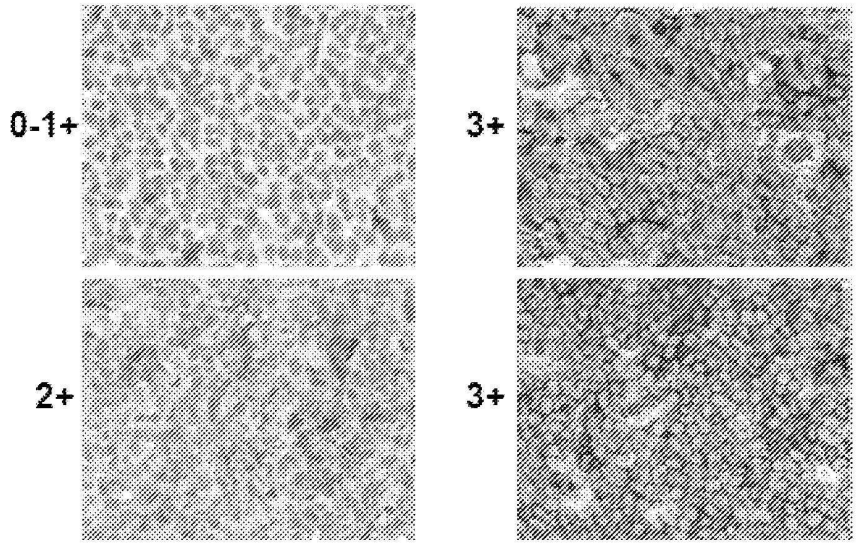
전체 청구항 수 : 총 63 항

(54) 발명의 명칭 **건강 상태를 진단 또는 치료하거나 CAR-T 세포 요법의 치료 효능을 최적화하기 위한 방법**

(57) 요 약

본 개시는 일반적으로, 특히, CD58 발현의 수준 감소 또는 손실 또는 CD58 활성에서 분자 변경과 관련된 다양한 건강 상태, 예를 들어, 증식성 장애(예를 들어, 암)를 진단 및/또는 치료하기 위한 방법, 키트 및 시스템에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
G16H 20/10 (2021.08)
G16H 50/30 (2018.01)
A61K 2039/5156 (2023.05)
A61K 2039/5158 (2023.05)
A61K 2039/804 (2018.08)
C12Q 2600/156 (2013.01)
(72) 발명자
마운트, 크리스토퍼
미국 94306 캘리포니아 팰로 알토 엘 카미노 리얼 3000 빌딩 5 스위트 300 더 보드 오브 트러스티스 오브 더 리랜드 스탠포드 주니어 유니버시티 (내)
몬제-다이세로스, 미셸
미국 94306 캘리포니아 팰로 알토 엘 카미노 리얼 3000 빌딩 5 스위트 300 더 보드 오브 트러스티스 오브 더 리랜드 스탠포드 주니어 유니버시티 (내)
마이클로스, 데이비드, 비.
미국 94306 캘리포니아 팰로 알토 엘 카미노 리얼 3000 빌딩 5 스위트 300 더 보드 오브 트러스티스 오브 더 리랜드 스탠포드 주니어 유니버시티 (내)
프랭크, 매튜
미국 94306 캘리포니아 팰로 알토 엘 카미노 리얼 3000 빌딩 5 스위트 300 더 보드 오브 트러스티스 오브 더 리랜드 스탠포드 주니어 유니버시티 (내)
나트쿠남, 야소다
미국 94306 캘리포니아 팰로 알토 엘 카미노 리얼 3000 빌딩 5 스위트 300 더 보드 오브 트러스티스 오브 더 리랜드 스탠포드 주니어 유니버시티 (내)
알리자데, 아래쉬 애쉬
미국 94306 캘리포니아 팰로 알토 엘 카미노 리얼 3000 빌딩 5 스위트 300 더 보드 오브 트러스티스 오브 더 리랜드 스탠포드 주니어 유니버시티 (내)
소더, 브라이언
미국 94306 캘리포니아 팰로 알토 엘 카미노 리얼 3000 빌딩 5 스위트 300 더 보드 오브 트러스티스 오브 더 리랜드 스탠포드 주니어 유니버시티 (내)
쿠르츠, 데이비드, 엠.
미국 94306 캘리포니아 팰로 알토 엘 카미노 리얼 3000 빌딩 5 스위트 300 더 보드 오브 트러스티스 오브 더 리랜드 스탠포드 주니어 유니버시티 (내)

명 세 서

청구범위

청구항 1

개체의 건강 상태의 진단 및/또는 치료를 위한 키트로서, 상기 키트가 (i) CD58의 발현 수준 또는 개체로부터의 생물학적 샘플에서 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물의 하나 이상의 분자 변경의 존재 및/또는 부재를 평가하기 위한 시약, 및 (ii) 이의 사용 설명서를 포함하는, 키트.

청구항 2

제1항에 있어서, 키트가 CAR-T 세포 요법에 대한 개체의 반응성을 결정하기 위해 추가로 구성되고, 여기서 결정이

a) CD58의 발현 수준이 감소 또는 손실되었는지 또는 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물에서 하나 이상의 분자 변경이 개체로부터 수득된 생물학적 샘플에 존재하는지를 검출하는 단계로서, 상기 검출이 생물학적 샘플을 검출 시약과 접촉시키고 검출 시약과 샘플 내의 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 상호작용을 검출하는 것을 포함하는, 단계; 및

b) CD58의 발현 수준이 CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 감소되거나 손실되거나 CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경 중 적어도 하나가 샘플에서 검출되는 경우 개체가 CAR-T 세포 요법을 사용한 치료에 대해 감소된 반응성을 갖는 것으로 확인하는 단계를 포함하는, 키트.

청구항 3

제1항에 있어서, 키트가 CAR-T 세포 요법에 대해 증가된 무반응성을 갖는 개체를 확인하기 위해 추가로 구성되고, 여기서 확인이

a) CD58의 발현 수준이 감소 또는 손실되었는지 또는 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물에서 하나 이상의 분자 변경이 개체로부터 수득된 생물학적 샘플에 존재하는지를 검출하는 단계로서, 상기 검출이 생물학적 샘플을 검출 시약과 접촉시키고 검출 시약과 샘플 내의 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 상호작용을 검출하는 것을 포함하는, 단계; 및

b) CD58의 발현 수준이 CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 감소되거나 손실되거나 CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경 중 적어도 하나가 샘플에서 검출되는 경우 개체가 CAR-T 세포 요법을 사용한 치료에 대해 증가된 무반응성을 갖는 것으로 선택하거나;

CD58의 발현 수준이 CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 감소 또는 손실되지 않거나 CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경이 샘플에서 검출되지 않는 경우 개체가 CAR-T 세포 요법을 사용한 치료에 대해 증가된 무반응성을 갖지 않는 것으로 선택하는 단계를 포함하는, 키트.

청구항 4

제1항에 있어서, 키트가 개체에서 CAR-T 세포 요법의 치료 효능을 최적화하기 위해 추가로 구성되고, 여기서 최적화가

a) CD58의 발현 수준이 CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 감소 또는 손실되었는지 또는 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물에서 하나 이상의 분자 변경이 개체로부터 수득된 생물학적 샘플에 존재하는지를 검출하는 단계로서, 상기 검출이 생물학적 샘플을 검출 시약과 접촉시키고 검출 시약과 샘플 내의 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 상호작용을 검출하는 것을 포함하는, 단계; 및

b) 검출 시약과 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 검출된 상호작용에 기초하여 치료적 유효량의 CAR-T 세포 요법을 확인하는 단계를 포함하는, 키트.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 개체가 CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 CD58 발현의 감소된 수준

또는 손실 또는 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물에서 하나 이상의 분자 변경과 관련된 건강 상태를 갖거나 갖는 것으로 의심되는 키트.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 건강 상태가 고형 종양 암, 비-고형 종양 암 및 혈액 악성종양으로 구성된 군으로부터 선택되는 증식성 장애인 키트.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 건강 상태가 암, 선택적으로 비호지킨 림프종, 버킷 림프종, 소림프구성 림프종, 거대 B-세포 림프종(LBCL), 원발성 삼출 림프종, 미만성 거대 B-세포 림프종, 비장 변연부 림프종, MALT(점막-관련 림프양 조직) 림프종, 털세포 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, B-세포 전림프구성 백혈병, B 세포 림프종, 호지킨병, B 세포 비호지킨 림프종(NHL), 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), B-세포 만성 림프구성 백혈병(B-CLL), 털세포 백혈병, 만성 근모세포 백혈병 또는 골수종인 키트.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물에서 하나 이상의 분자 변경이 증가된 RNA/단백질 발현, 감소된 RNA/단백질 발현, 발현 손실, 이상 RNA/단백질 발현, 단일 뉴클레오티드 점 돌연변이(SNP), 단일-뉴클레오티드 변이(SNV), 유전자 증폭, 유전자 재배열, 유전자 융합, 결실, 프레임시프트 결실, 삽입, InDel 돌연변이, 후성적 변경, 아미노산 치환 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 키트.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 분자 변경이 CD58 발현의 손실, CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 CD58의 감소된 발현, 또는 CD58의 돌연변이된 형태의 발현을 포함하는 키트.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 분자 변경이 SEQ ID NO: 1의 K60에 상응하는 위치에서 아미노산 치환을 포함하는 키트.

청구항 11

제10항에 있어서, 아미노산 치환이 Lys에서 Glu로의 치환(K60E)인 키트.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 분자 변경이 SEQ ID NO: 1의 C187에 상응하는 위치에서 아미노산 치환을 포함하는 키트.

청구항 13

제12항에 있어서, 아미노산 치환이 Cys에서 Arg로의 치환(C187R)인 키트.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물에서 하나 이상의 분자 변경이 CD58 단백질 생성물의 이의 리간드 CD2에 대한 감소된 결합 친화성을 포함하는 키트.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물의 하나 이상의 분자 변경의 존재 및/또는 부재에 대한 상기 평가가 딥 시퀀싱에 의한 암 개인화 프로파일링(CAPP-seq), 핵산 시퀀싱, 순환 종양 핵산 평가, 차세대 시퀀싱(NGS), 핵산 증폭-기반 검정, 루프-매개 등온 증폭(LAMP), 롤링 서클 증폭(RCA), 중합효소 연쇄 반응(PCR), 실시간 PCR, 정량적 역전사 PCR(qRT-PCR), PCR-RFLP 검정, HPLC, 질량-분광 유전형 분석, 핵산 하이브리드화 검정, 비교 게놈 하이브리드화, 형광 인-시츄 하이브리드화(FISH), 제한 분해, 모세관

전기영동 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 핵산-기반 분석 검정을 사용하는 것을 포함하는 키트.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물의 하나 이상의 분자 변경의 존재 및/또는 부재에 대한 상기 평가가 면역조직화학(IHC), 단백질-마이크로어레이, 웨스턴 블롯팅, 질량 분광분석, 유세포 분석, 효소-결합 면역흡착 검정(ELISA), 면역형광 염색, 다중 검출 검정 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 단백질-기반 분석 검정을 사용하는 것을 포함하는 키트.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 건강 상태의 치료를 위해 추가로 구성되는 키트.

청구항 18

제2항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, CAR-T 세포 요법이 단일 요법으로서 또는 하나 이상의 추가 요법과 조합하여 개체에게 투여되는 키트.

청구항 19

제18항에 있어서, CAR-T 세포 요법 및/또는 적어도 하나의 추가 요법이 CD2 신호전달 도메인을 포함하는 CAR 작제물을 포함하는 키트.

청구항 20

제2항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, CAR-T 세포 요법이 야생형 세포에서의 밀도와 비교하여 낮은 밀도로 발현되는 항원을 표적화하는 키트.

청구항 21

건강 상태의 진단 및/또는 치료를 위한 유전자-기반 시스템으로서,

a) 로직 프로세서;

b) 프로세서에 의해 실행될 때 다음 중 하나 이상을 수행하기 위한 동작들을 제공하는, 로직 프로세서에 의해 실행 가능한 저장된 프로그램 코드를 포함하는, 유전자-기반 시스템:

i) CAR-T 세포 요법에 대한 개체의 반응성 결정;

ii) 개체가 CAR-T 세포 요법을 사용한 치료에 대해 증가된 무반응성을 갖는 것으로 확인;

(iii) 개체에서 CAR-T 세포 요법의 치료 효능의 최적화; 및

(iv) 치료적 유효량의 CAR-T 세포 요법을 계산하거나 개체에게 투여.

청구항 22

제21항에 있어서, 로직 프로세서에 통신 가능하게 커플링된 보고서 엔진을 추가로 포함하고, 여기서 보고서 엔진에 의해 생성된 보고서는 프로그램 코드의 실행으로부터의 결과에 의존하고, 프로그램 코드는 미리 선택된 데이터 입력 세트에 적어도 부분적으로 기초하여 CAR-T 세포 요법에 대한 개체의 반응성에 대한 상대적 성능 점수를 할당하기 위해 CD58의 발현 수준 또는 개체로부터 수득된 생물학적 물질에서 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물의 하나 이상의 분자 변경의 존재 및/또는 부재에 관한 미리 선택된 데이터 입력 세트를 수신하도록 로직 프로세서를 구성하고, 선택적으로

a) CAR-T 세포 요법에 대한 개체의 반응성을 결정하고/거나;

b) 개체가 CAR-T 세포 요법을 사용한 치료에 대해 증가된 무반응성을 갖는 것으로 확인하고/거나;

c) 개체에서 CAR-T 세포 요법의 치료 효능을 최적화하고/거나;

d) 치료적 유효량의 CAR-T 세포 요법을 계산하거나 개체에게 투여하는, 시스템.

청구항 23

제21항 또는 제22항에 있어서, CAR-T 세포 요법에 대해 증가된 무반응성을 갖는 것으로 확인된 개체와 관련된 및/또는 건강 상태의 치료에 효과적인 것으로 확인된 CAR-T 세포 요법과 관련된 정보를 포함하는 보고서를 생성하는 것을 추가로 포함하는 시스템.

청구항 24

제23항에 있어서, 프로파일 보고서가 ".doc"; ".pdf"; ".xml"; ".html"; ".jpg"; ".aspx"; ".php" 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 인코딩을 갖는 것으로 특성화되는 시스템.

청구항 25

실행될 때 프로세서가 다음을 포함하는 동작들을 수행하도록 하는 기계 실행 가능 명령어를 포함하는 비일시적 컴퓨터 판독 가능 매체:

미리 선택된 데이터 입력 세트를 포함하는 프로파일의 수신;

프로파일에 적어도 부분적으로 기초하여, 확인된 CAR-T 세포 요법에 상대적 성능 점수의 할당; 및

할당된 성능 점수에 기초하여 CAR-T 세포 요법에 대한 보고서 출력.

청구항 26

실행될 때 프로세서가 다음을 포함하는 동작들을 수행하도록 하는 기계 실행 가능 명령어를 포함하는 비일시적 컴퓨터 판독 가능 매체:

미리 선택된 데이터 입력 세트를 포함하는 프로파일의 수신;

프로파일에 적어도 부분적으로 기초하여, 확인된 개체에 상대적 무반응 점수를 할당; 및

할당된 무반응 점수에 기초하여 개체에 대한 보고서 출력.

청구항 27

제23항 내지 제26항 중 어느 한 항의 시스템 또는 매체에 의해 생성된 보고서.

청구항 28

CAR-T 세포 요법에 대한 개체의 반응성을 결정하기 위한 방법으로서, 상기 방법이

a) CD58의 발현 수준이 CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 감소 또는 손실되었는지 또는 CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경이 개체로부터 수득된 생물학적 샘플에 존재하는지를 검출하는 단계로서, 상기 검출이 생물학적 샘플을 검출 시약과 접촉시키고 검출 시약과 샘플 내의 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 상호작용을 검출하는 것을 포함하는, 단계; 및

b) CD58의 발현 수준이 CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 감소되거나 손실되거나 CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경 중 적어도 하나가 샘플에서 검출되는 경우 개체가 CAR-T 세포 요법을 사용한 치료에 대해 감소된 반응성을 갖는 것으로 확인하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 29

CAR-T 세포 요법에 대해 증가된 무반응성을 갖는 개체를 확인하기 위한 방법으로서, 상기 방법이

a) CD58의 발현 수준이 CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 감소 또는 손실되었는지 또는 CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경이 개체로부터 수득된 생물학적 샘플에 존재하는지를 검출하는 단계로서, 상기 검출이 생물학적 샘플을 검출 시약과 접촉시키고 검출 시약과 샘플 내의 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 상호작용을 검출하는 것을 포함하는, 단계; 및

b) CD58의 발현 수준이 CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 감소되거나 손실되거나 CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경 중 적어도 하나가 샘플에서 검출되는 경우 개체가 CAR-T 세포 요법을 사용한 치료에 대해 증가된 무반응성을 갖는 것으로 선택하거나;

CD58의 발현 수준이 CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 감소 또는 손실되지 않거나 CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경이 샘플에서 검출되지 않는 경우 개체가 CAR-T 세포 요법을 사용한 치료에 대해 증가된 무반응성을 갖지 않는 것으로 선택하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 30

개체에서 CAR-T 세포 요법의 치료 효능을 최적화하기 위한 방법으로서, 상기 방법이

a) CD58의 발현 수준이 CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 감소 또는 손실되었는지 또는 CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경이 개체로부터 수득된 생물학적 샘플에 존재하는지를 검출하는 단계로서, 상기 검출이 생물학적 샘플을 검출 시약과 접촉시키고 검출 시약과 샘플 내의 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 상호작용을 검출하는 것을 포함하는, 단계; 및

b) 검출 시약과 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 검출된 상호작용에 기초하여 치료적 유효량의 CAR-T 세포 요법을 확인하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 31

CAR-T 세포 요법을 개체에게 투여하기 위한 방법으로서, 상기 방법이

a) CD58의 발현 수준이 CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 감소 또는 손실되었는지 또는 CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경이 개체로부터 수득된 생물학적 샘플에 존재하는지를 검출하는 단계로서, 상기 검출이 생물학적 샘플을 검출 시약과 접촉시키고 검출 시약과 샘플 내의 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 상호작용을 검출하는 것을 포함하는, 단계; 및

b) 검출 시약과 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 검출된 상호작용에 기초하여 치료적 유효량의 CAR-T 세포 요법을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 32

제28항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 개체가 CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 CD58 발현의 감소된 수준 또는 손실 또는 CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경과 관련된 건강 상태를 갖거나 갖는 것으로 의심되는 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 건강 상태를 치료하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 34

제28항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 건강 상태가 고형 종양 암, 비-고형 종양 암 및 혈액 악성종양으로 구성된 군으로부터 선택되는 증식성 장애인 방법.

청구항 35

제28항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 건강 상태가 암, 선택적으로 비호지킨 림프종, 버킷 림프종, 소림프구성 림프종, 거대 B-세포 림프종(LBCL), 원발성 삼출 림프종, 미만성 거대 B-세포 림프종, 비장 변연부 림프종, MALT(점막-관련 림프양 조직) 림프종, 털세포 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, B-세포 전림프구성 백혈병, B 세포 림프종, 호지킨병, B 세포 비호지킨 림프종(NHL), 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), B-세포 만성 림프구성 백혈병(B-CLL), 털세포 백혈병, 만성 근모세포 백혈병 또는 골수종인 방법.

청구항 36

제28항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경이 증가된 RNA/단백질 발현, 감소된 RNA/단백질 발현, 발현 손실, 이상 RNA/단백질 발현, 단일 뉴클레오티드 점 돌연변이(SNP), 단일-뉴클레오티드 변이(SNV), 유전자 증폭, 유전자 재배열, 유전자 융합, 결실, 프레임시프트 결실, 삽입, InDel 돌연변이, 후성적 변경, 아미노산 치환 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 37

제28항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 분자 변경이 CD58 발현의 손실, CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 CD58의 감소된 발현, 또는 CD58의 돌연변이된 형태의 발현을 포함하는 방법.

청구항 38

제28항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 분자 변경이 SEQ ID NO: 1의 K60에 상응하는 위치에서 아미노산 치환을 포함하는 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, 아미노산 치환이 Lys에서 Glu로의 치환(K60E)인 방법.

청구항 40

제28항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 분자 변경이 SEQ ID NO: 1의 C187에 상응하는 위치에서 아미노산 치환을 포함하는 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 아미노산 치환이 Cys에서 Arg로의 치환(C187R)인 방법.

청구항 42

제28항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물에서 하나 이상의 분자 변경이 CD58 단백질 생성물의 이의 리간드 CD2에 대한 감소된 결합 친화성을 포함하는 방법.

청구항 43

제28항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 검출 시약과 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 상호작용의 상기 검출이 핵산 시퀀싱, 순환 종양 핵산 평가, 차세대 시퀀싱(NGS), 핵산 증폭-기반 검정, 루프-매개 등온 증폭(LAMP), 롤링 서클 증폭(RCA), 중합효소 연쇄 반응(PCR), 실시간 PCR, 정량적 역전사 PCR(qRT-PCR), PCR-RFLP 검정, HPLC, 질량-분광 유전형 분석, 핵산 하이브리드화 검정, 비교 게놈 하이브리드화, 형광 인-시츄 하이브리드화(FISH), 제한 분해, 모세관 전기영동 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 핵산-기반 분석 검정을 포함하는 방법.

청구항 44

제28항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 검출 시약과 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 상호작용의 상기 검출이 면역조직화학(IHC), 단백질-마이크로어레이, 웨스턴 블롯팅, 질량 분광분석, 유세포 분석, 효소-결합 면역흡착 검정(ELISA), 면역형광 염색, 다중 검출 검정 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 단백질-기반 분석 검정을 포함하는 방법.

청구항 45

제28항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, CAR-T 세포 요법을 개체에게 투여하는 단계를 추가로 포함하고, 여기서 CAR-T 세포 요법이 단일 요법으로서 또는 하나 이상의 추가 요법과 조합하여 개체에게 투여되는 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, CAR-T 세포 요법 및/또는 적어도 하나의 추가 요법이 CD2 신호전달 도메인을 포함하는 CAR 작제물을 포함하는 방법.

청구항 47

제28항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, CAR-T 세포 요법이 야생형 세포에서의 밀도와 비교하여 낮은 밀도로 발현되는 항원을 표적화하는 방법.

청구항 48

CD58의 발현 감소 또는 손실 또는 CD58-인코딩 유전자에서 하나 이상의 분자 변경 중 적어도 하나를 특징으로

하는 건강 상태를 갖는 개체를 치료하는 방법으로서, 상기 방법이

a) CD58의 발현 수준이 CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 감소 또는 손실되었는지 또는 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물에서 하나 이상의 분자 변경이 개체로부터 수득된 생물학적 샘플에 존재하는지를 검출하는 단계로서, 상기 검출이 생물학적 샘플을 검출 시약과 접촉시키고 검출 시약과 샘플 내의 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 상호작용을 검출하는 것을 포함하는, 단계;

b) CD58의 발현 수준이 CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 감소되거나 손실되거나 CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경 중 적어도 하나가 샘플에서 검출되는 경우 개체가 CD2 신호전달 도메인을 포함하는 CAR 작제물을 사용한 치료에 반응할 가능성이 있는 것으로 확인하는 단계, 및

c) 단계 (b)에서 CD2를 포함하는 CAR 작제물을 사용한 치료에 반응할 가능성이 있는 것으로 확인된 개체에게 CD2 신호전달 도메인을 포함하는 CAR 작제물을 사용한 치료를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 49

개체의 건강 상태를 치료하는 방법으로서, 상기 방법이

a) CD58의 발현 수준이 CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 감소 또는 손실되었는지 또는 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물에서 하나 이상의 분자 변경이 개체로부터 수득된 생물학적 샘플에 존재하는지를 검출하는 단계로서, 상기 검출이 생물학적 샘플을 검출 시약과 접촉시키고 검출 시약과 샘플 내의 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 상호작용을 검출하는 것을 포함하는, 단계; 및

b) 단계 (a)에서 CD58의 발현 수준 감소 또는 손실 또는 CD58-인코딩 유전자에서 하나 이상의 분자 변경의 검출에 기초하여 CD2 신호전달 도메인을 포함하는 CAR 작제물을 사용한 치료를 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 50

제48항 또는 제49항에 있어서, CD2 신호전달 도메인을 포함하는 CAR 작제물이 항-CD19 scFv 도메인을 추가로 포함하는 방법.

청구항 51

제48항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, CD2 신호전달 도메인을 포함하는 CAR 작제물이 SEQ ID NO: 4의 아미노산 서열을 포함하는 방법.

청구항 52

제48항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 건강 상태가 고형 종양 암, 비-고형 종양 암 및 혈액 악성종양으로 구성된 군으로부터 선택되는 증식성 장애인 방법.

청구항 53

제48항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 건강 상태가 암인 방법.

청구항 54

제53항에 있어서, 암이 비호지킨 림프종, 버킷 림프종, 소림프구성 림프종, 거대 B-세포 림프종(LBCL), 원발성 삼출 림프종, 미만성 거대 B-세포 림프종, 비장 변연부 림프종, MALT(점막-관련 림프양 조직) 림프종, 털세포 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, B-세포 전림프구성 백혈병, B 세포 림프종, 호지킨병, B 세포 비호지킨 림프종(NHL), 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), B-세포 만성 림프구성 백혈병(B-CLL), 털세포 백혈병, 만성 근모세포 백혈병 및 골수종으로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 55

제48항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경이 증가된 RNA/단백질 발현, 감소된 RNA/단백질 발현, 발현 손실, 이상 RNA/단백질 발현, 단일 뉴클레오티드 점 돌연변이(SNP), 단일-뉴클레오티드 변이(SNV), 유전자 증폭, 유전자 재배열, 유전자 융합, 결실, 프레임시프트 결실, 삽입, InDel 돌연변이, 후성적 변경, 아미노산 치환 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 56

제48항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 분자 변경이 CD58 발현의 손실, CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 CD58의 감소된 발현, 또는 CD58의 돌연변이된 형태의 발현을 포함하는 방법.

청구항 57

제48항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 분자 변경이 SEQ ID NO: 1의 K60에 상응하는 위치에서 아미노산 치환을 포함하는 방법.

청구항 58

제57항에 있어서, 아미노산 치환이 Lys에서 Glu로의 치환(K60E)인 방법.

청구항 59

제48항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 분자 변경이 SEQ ID NO: 1의 C187에 상응하는 위치에서 아미노산 치환을 포함하는 방법.

청구항 60

제59항에 있어서, 아미노산 치환이 Cys에서 Arg로의 치환(C187R)인 방법.

청구항 61

제48항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물에서 하나 이상의 분자 변경이 CD58 단백질 생성물의 이의 리간드 CD2에 대한 감소된 결합 친화성을 포함하는 방법.

청구항 62

제48항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 검출 시약과 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 상호작용의 상기 검출이 핵산 시퀀싱, 순환 종양 핵산 평가, 차세대 시퀀싱(NGS), 핵산 증폭-기반 검정, 루프-매개 등온 증폭(LAMP), 롤링 서클 증폭(RCA), 중합효소 연쇄 반응(PCR), 실시간 PCR, 정량적 역전사 PCR(qRT-PCR), PCR-RFLP 검정, HPLC, 질량-분광 유전형 분석, 핵산 하이브리드화 검정, 비교 게놈 하이브리드화, 형광 인-시츄 하이브리드화(FISH), 제한 분해, 모세관 전기영동 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 핵산-기반 분석 검정을 포함하는 방법.

청구항 63

제48항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 검출 시약과 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 상호작용의 상기 검출이 면역조직화학(IHC), 단백질-마이크로어레이, 웨스턴 블롯팅, 질량 분광분석, 유세포 분석, 효소-결합 면역흡착 검정(ELISA), 면역형광 염색, 다중 검출 검정 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 단백질-기반 분석 검정을 포함하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

배 경 기 술

발명의 내용

[0001] 연방 후원 연구 및 개발에 관한 진술

[0002] [0001] 본 발명은 국립 보건원에 의해 수여된 계약 CA241076 및 CA049605 하에 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명에 대해 특정 권리를 갖는다.

[0003] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0004] [0002] 본 출원은 2020년 11월 4일에 출원된 미국 가특허 출원 일련 번호 63/109,611을 우선권으로 주장하며, 이의 개시는 모든 도면을 포함하여 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0005] 서열 목록의 포함

[0006] [0003] 본 출원은 그 전체가 본원에 참조로 포함된 서열 목록을 포함한다. "Sequence Listing_078430-525001WO_SequenceListing_ST25.txt"라는 명칭의 첨부된 서열 목록 text 파일은 2021년 10월 25일에 생성되었고 5 KB이다.

[0007] 분야

[0008] [0004] 본 개시는 일반적으로, 특히, CD58 발현의 수준 감소 또는 손실 또는 CD58 활성에서 분자 변경과 관련된 건강 상태, 예를 들어, 증식성 장애(예를 들어, 암)를 진단 및/또는 치료하기 위한 방법, 키트 및 시스템에 관한 것이다.

[0009] 배경

[0010] [0005] 유전적으로 변형된 면역 세포의 입양 전달은 다양한 악성종양에 대한 강력한 요법으로 등장하였다. 예를 들어, 입양 T 세포 요법의 현재 양상은 키메라 항원 수용체(CAR) 및 고친화성 T 세포 수용체(TCR)와 같은 암 항원에 특이적인 수용체를 발현하도록 변형된 세포를 포함한다. 입양 T 세포 요법에서, 변형된 T 세포는 시험관내 또는 생체 외에서 인지체 항원에 대한 노출에 의해 활성화되고, 확장된 다음, 개체에게 투여될 수 있으며, 여기서 이들은 증식하여 세포용해 활성을 나타내고/거나 암에 대한 면역 반응을 개시하기 위한 신호를 보낸다.

[0011] [0006] B 세포 악성종양과 같은 암 세포에서 T 세포를 적합한 세포-표면 분자로 재지정하는 것에 의존하는 키메라 항원 수용체(CAR) 변형된 자가 T 세포(CART) 요법을 사용한 최근 발달은 B 세포 악성종양 및 다른 암을 치료하기 위해 면역 시스템의 파워를 활용함에 있어서 유망한 결과를 보여주었다. 예를 들어, B-세포 악성종양에 대한 CD19 분자에 특이적인 CAR-T 세포를 사용한 최근 임상 시험은 진행된 암을 갖는 환자의 서브세트에서 현저한 질병 퇴행을 입증하였다. 단일 용량의 CD19 CAR-T 세포는 거대 B-세포 림프종(LBCL) 환자의 약 50%에서 완전 관해를 초래한다. 이러한 성공으로 인해 LBCL 및 B-세포 급성 림프모구성 백혈병(B-ALL)의 치료를 위한 약물의 임상 개발에서 다른 것들과 함께 2개의 CD19-CAR T 세포 치료제, 액시캅타진 실로류셀(axicabtagene ciloleucel)(YESCARTA®) 및 티사젠렉류셀(tisagenlecleucel)(KYMRIAH®)의 FDA 승인이 이루어졌다. 특히, 완전한 반응은 대부분의 LBCL 환자에서 지속된다.

[0012] [0007] 그러나, CAR-T 세포가 표적화된 세포를 인지하고 파괴하는 능력 외에도, 성공적인 치료적 T 세포 요법은 증식하고, 시간이 지남에 따라 지속되고, 백혈병 세포 탈출을 추가로 모니터링하는 능력을 가질 필요가 있다. T 세포의 가변 표현형 상태는, 이것이 아네르기, 억제 또는 고갈 상태에 있든지 간에, CAR-T 세포의 효능에 다양한 효과를 갖는 것으로 보고되었다. 효과적이기 위해, CAR-T 세포는 CAR의 항원에 반응하여 증식하는 능력을 지속하고 유지해야 한다.

[0013] [0008] 또한, 질병 진행의 원인을 확인하고, 기존의 CAR-T 요법에 내성이 발달한 환자를 치료하기 위한 긴급한 치료적 필요가 존재한다. 특히, CD19 손실은 B-ALL에 대한 CAR-T 세포 요법 후 재발의 가장 흔한 원인으로 보이며, 이는 한 시리즈에서 재발의 90% 초과를 차지하고, 또한 LBCL 사례의 최대 30%에서 발생하는 것으로 보고되었다. 이러한 내성은 치료 후 생검이 치료 내성을 유발하는 환자 특이적 인자를 결정하기 위한 표준이 됨에 따라 최근에야 관찰되었다.

[0014] [0009] 따라서, 입양 T 세포 요법을 위한 개선된 치료 세포를 생성하기 위한 새로운 조성물 및 전략이 필요하다. 본원에 개시된 양태 및 구현예는 이러한 요구를 해결하고 다른 관련 이점을 제공한다.

[0015] 개요

[0016] [0010] 특히, CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경과 관련된 증식성 장애(예를 들어, 암)와 같은 다양한 건강 상태의 진단 및/또는 치료를 위한 방법, 키트 및 시스템이 본원에 제공된다. 특히, 본 개시의 일부 구현예는 CAR-T 세포 요법에 대한 개체의 반응성을 결정하기 위한 방법에 관한 것이다. 다른 구현예는 CAR-T 세포 요법에 대해 증가된 무반응성을 갖는 개체를 확인하기 위한 방법에 관한 것이다. 또한, 일부 구현예에서, 이를 필요로 하는 개체에서 CAR-T 세포 요법의 치료 효능을 최적화하기 위한 방법이 제공된다. 본 개시의 추가 구현예는 CAR-T 세포 요법을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하기 위한 방법에 관한 것이다. 또한, 이를 필요로 하는 개체에서

건강 상태의 예방 및/또는 치료를 위한 키트 및 시스템이 제공된다.

[0017] [0011] 일 양태에서, 개체의 건강 상태의 진단 및/또는 치료를 위한 키트가 본원에 제공되며, 상기 키트는 (i) CD58의 발현 수준 또는 생물학적 샘플에서 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물의 하나 이상의 분자 변경의 존재 및/또는 부재를 평가하기 위한 시약, 및 (ii) 이의 사용 설명서를 포함한다.

[0018] [0012] 개시된 키트의 비제한적인 예시적인 구현예는 하기 특징 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시의 키트는 CAR-T 세포 요법에 대한 개체의 반응성을 결정하기 위해 추가로 구성되며, 여기서 결정은 (a) CD58의 발현 수준이 감소 또는 손실되었는지 또는 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물에서 하나 이상의 분자 변경이 개체로부터 수득된 생물학적 샘플에 존재하는지를 검출하는 단계로서, 상기 검출이 생물학적 샘플을 검출 시약과 접촉시키고 검출 시약과 샘플 내의 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 상호작용을 검출하는 것을 포함하는, 단계; 및 (b) CD58의 발현 수준이 CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 감소되거나 손실되거나 CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경 중 적어도 하나가 샘플에서 검출되는 경우 개체가 CAR-T 세포 요법을 사용한 치료에 대해 감소된 반응성을 갖는 것으로 확인하는 단계를 포함한다.

[0019] [0013] 일부 구현예에서, 본 개시의 키트는 CAR-T 세포 요법에 대해 증가된 무반응성을 갖는 개체를 확인하기 위해 추가로 구성되며, 여기서 확인은 (a) CD58의 발현 수준이 감소 또는 손실되었는지 또는 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물에서 하나 이상의 분자 변경이 개체로부터 수득된 생물학적 샘플에 존재하는지를 검출하는 단계로서, 상기 검출이 생물학적 샘플을 검출 시약과 접촉시키고 검출 시약과 샘플 내의 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 상호작용을 검출하는 것을 포함하는, 단계; 및 (b) CD58의 발현 수준이 CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 감소되거나 손실되거나 CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경 중 적어도 하나가 샘플에서 검출되는 경우 개체가 CAR-T 세포 요법을 사용한 치료에 대해 증가된 무반응성을 갖는 것으로 선택하거나; CD58의 발현 수준이 CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 감소 또는 손실되지 않거나 CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경이 샘플에서 검출되지 않는 경우 개체가 CAR-T 세포 요법을 사용한 치료에 대해 증가된 무반응성을 갖지 않는 것으로 선택하는 단계를 포함한다.

[0020] [0014] 일부 구현예에서, 본 개시의 키트는 개체에서 CAR-T 세포 요법의 치료 효능을 최적화하기 위해 추가로 구성되며, 여기서 최적화는 (a) CD58의 발현 수준이 CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 감소 또는 손실되었는지 또는 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물에서 하나 이상의 분자 변경이 개체로부터 수득된 생물학적 샘플에 존재하는지를 검출하는 단계로서, 상기 검출이 생물학적 샘플을 검출 시약과 접촉시키고 검출 시약과 샘플 내의 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 상호작용을 검출하는 것을 포함하는, 단계; 및 (b) 검출 시약과 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 검출된 상호작용에 기초하여 치료적 유효량의 CAR-T 세포 요법을 확인하는 단계를 포함한다.

[0021] [0015] 일부 구현예에서, 개체는 CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 CD58 발현의 감소된 수준 또는 손실 또는 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물에서 하나 이상의 분자 변경과 관련된 건강 상태를 갖거나 갖는 것으로 의심된다. 일부 구현예에서, 건강 상태는 고형 종양 암, 비-고형 종양 암 및 혈액 악성종양으로 구성된 군으로부터 선택된 증식성 장애이다. 일부 구현예에서, 건강 상태는 암, 선택적으로 비호지킨 림프종, 버킷 림프종, 소림프구성 림프종, 거대 B-세포 림프종(LBCL), 원발성 삼출 림프종, 미만성 거대 B-세포 림프종, 비장 변연부 림프종, MALT(점막-관련 림프양 조직) 림프종, 털세포 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, B-세포 전림프구성 백혈병, B 세포 림프종, 호지킨병, B 세포 비호지킨 림프종(NHL), 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), B-세포 만성 림프구성 백혈병(B-CLL), 털세포 백혈병, 만성 근모세포 백혈병 또는 골수종이다.

[0022] [0016] 일부 구현예에서, CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물에서 하나 이상의 분자 변경은 증가된 RNA/단백질 발현, 감소된 RNA/단백질 발현, 발현 손실, 이상 RNA/단백질 발현, 단일 뉴클레오티드 점 돌연변이(SNP), 단일-뉴클레오티드 변이(SNV), 유전자 증폭, 유전자 재배열, 유전자 융합, 결실, 프레임시프트 결실, 삽입, InDel 돌연변이, 후성적 변경, 아미노산 치환 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 분자 변경은 CD58 발현의 손실, CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 CD58의 감소된 발현, 또는 CD58의 돌연변이된 형태의 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 분자 변경은 SEQ ID NO: 1의 K60에 상응하는 위치에서 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 아미노산 치환은 Lys에서 Glu로의 치환(K60E)이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 분자 변경은 SEQ ID NO: 1의 C187에 상응하는 위치에서 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 아미노산 치환은 Cys에서 Arg로의 치환(C187R)이다. 일부 구현예에서, CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물에서 하나 이상의 분자 변경은 CD58 단백질 생성물의 이의 리간드 CD2에 대한 감소된 결합 친화성을 포함한다.

[0023] [0017] 일부 구현예에서, 평가는 딥 시퀀싱에 의한 암 개인화 프로파일링(CAPP-seq), 핵산 시퀀싱, 순환 종양 핵산 평가, 차세대 시퀀싱(NGS), 핵산 증폭-기반 검정, 루프-매개 등온 증폭(LAMP), 롤링 서클 증폭(RCA), 중합효소 연쇄 반응(PCR), 실시간 PCR, 정량적 역전사 PCR(qRT-PCR), PCR-RFLP 검정, HPLC, 질량-분광 유전형 분석, 핵산 하이브리드화 검정, 비교 게놈 하이브리드화, 형광 인-시츄 하이브리드화(FISH), 제한 분해, 모세관 전기영동 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 핵산-기반 분석 검정을 사용하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 평가는 면역조직화학(IHC), 단백질-마이크로어레이, 웨스턴 블롯팅, 질량 분광분석, 유세포 분석, 효소-결합 면역흡착 검정(ELISA), 면역형광 염색, 다중 검출 검정 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 단백질-기반 분석 검정을 사용하는 것을 포함한다.

[0024] [0018] 일부 구현예에서, 본 개시의 키트는 건강 상태의 치료를 위해 추가로 구성된다. 일부 구현예에서, CAR-T 세포 요법은 단일 요법으로서 또는 하나 이상의 추가 요법과 조합하여 개체에게 투여된다. 일부 구현예에서, CAR-T 세포 요법 및/또는 적어도 하나의 추가 요법은 CD2 신호전달 도메인을 포함하는 CAR 작제물을 포함한다. 일부 구현예에서, CAR-T 세포 요법은 야생형 세포에서의 밀도와 비교하여 낮은 밀도로 발현되는 항원을 표적화한다.

[0025] [0019] 또 다른 양태에서, 건강 상태의 진단 및 치료를 위한 유전자-기반 시스템이 본원에 제공되며, 상기 시스템은 a) 로직 프로세서; 및 b) 프로세서에 의해 실행될 때 본 개시에 따른 방법을 수행하기 위한 동작들을 제공하는, 로직 프로세서에 의해 실행 가능한 저장된 프로그램 코드를 포함한다. 일부 구현예에서, 시스템은 (a) 로직 프로세서; 및 (b) 프로세서에 의해 실행될 때 다음 중 하나 이상을 수행하기 위한 동작들을 제공하는, 로직 프로세서에 의해 실행 가능한 저장된 프로그램 코드를 포함한다: (i) CAR-T 세포 요법에 대한 개체의 반응성 결정; (ii) 개체가 CAR-T 세포 요법을 사용한 치료에 대해 증가된 무반응성을 갖는 것으로 확인; (iii) 개체에서 CAR-T 세포 요법의 치료 효능의 최적화; 및 (iv) 치료적 유효량의 CAR-T 세포 요법을 계산하거나 개체에게 투여.

[0026] [0020] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 시스템은 로직 프로세서에 통신 가능하게 커플링된 보고서 엔진을 추가로 포함하고, 여기서 보고서 엔진에 의해 생성된 보고서는 프로그램 코드의 실행으로부터의 결과에 의존하고, 프로그램 코드는 미리 선택된 데이터 입력 세트에 적어도 부분적으로 기초하여 CAR-T 세포 요법에 대한 개체의 반응성에 대한 상대적 성능 점수를 할당하기 위해 CD58의 발현 수준 또는 개체로부터 수득된 생물학적 물질에서 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물의 하나 이상의 분자 변경의 존재 및/또는 부재에 관한 미리 선택된 데이터 입력 세트를 유전자 스캐너로부터 수신하도록 로직 프로세서를 구성하고, 선택적으로 (a) CAR-T 세포 요법에 대한 개체의 반응성을 결정하고/거나; (b) 개체가 CAR-T 세포 요법을 사용한 치료에 대해 증가된 무반응성을 갖는 것으로 확인하고/거나; (c) 개체에서 CAR-T 세포 요법의 치료 효능을 최적화하고/거나; (d) 치료적 유효량의 CAR-T 세포 요법을 계산하거나 개체에게 투여한다.

[0027] [0021] 일부 구현예에서, 본 개시의 시스템은 CAR-T 세포 요법에 대해 증가된 무반응성을 갖는 것으로 확인된 개체와 관련된 및/또는 건강 상태의 치료에 효과적인 것으로 확인된 CAR-T 세포 요법과 관련된 정보를 포함하는 보고서를 생성하는 것을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 프로파일 보고서는 ".doc"; ".pdf"; ".xml"; ".html"; ".jpg"; ".aspx"; ".php" 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 인코딩을 갖는 것으로 특성화된다.

[0028] [0022] 또 다른 양태에서, 실행될 때 프로세서가 미리 선택된 데이터 입력 세트를 포함하는 보고서의 수신; 보고서에 적어도 부분적으로 기초하여, 확인된 CAR-T 세포 요법에 상대적 성능 점수의 할당; 및 할당된 성능 점수에 기초하여 CAR-T 세포 요법에 대한 보고서 출력을 포함하는 동작들을 수행하도록 하는 기계 실행 가능 명령어를 포함하는 비일시적 컴퓨터 판독 가능 매체가 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 실행될 때 프로세서가 미리 선택된 데이터 입력 세트를 포함하는 보고서의 수신; 보고서에 적어도 부분적으로 기초하여, 확인된 개체에 상대적 무반응 점수의 할당; 및 할당된 무반응 점수에 기초하여 개체에 대한 보고서 출력을 포함하는 동작들을 수행하도록 하는 기계 실행 가능 명령어를 포함하는 비일시적 컴퓨터 판독 가능 매체가 본원에 제공된다. 따라서, 본 개시의 시스템에 의해 생성된 CAR-T 세포 요법 보고서 및 개체 보고서가 또한 본 개시의 범위에 포함된다.

[0029] [0023] 일 양태에서, CAR-T 세포 요법에 대한 개체의 반응성을 결정하기 위한 방법이 본원에 제공되고, 상기 방법은 (a) CD58의 발현 수준이 CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 감소 또는 손실되었는지 또는 CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경이 개체로부터 수득된 생물학적 샘플에 존재하는지를 검출하는 단계로서, 상기 검출이 생물학적 샘플을 검출 시약과 접촉시키고 검출 시약과 샘플 내의 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 상호작용을 검출하는 것을 포함하는, 단계; 및 (b) CD58의 발현 수준이 CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 감소되거

나 손실되거나 CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경 중 적어도 하나가 샘플에서 검출되는 경우 개체가 CAR-T 세포 요법을 사용한 치료에 대해 감소된 반응성을 갖는 것으로 확인하는 단계를 포함한다.

[0030] [0024] 또 다른 양태에서, CAR-T 세포 요법에 대해 증가된 무반응성을 갖는 개체를 확인하기 위한 방법이 본원에 제공되고, 상기 방법은 (a) CD58의 발현 수준이 CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 감소 또는 손실되었는지 또는 CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경이 개체로부터 수득된 생물학적 샘플에 존재하는지를 검출하는 단계로서, 상기 검출이 생물학적 샘플을 검출 시약과 접촉시키고 검출 시약과 샘플 내의 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 상호작용을 검출하는 것을 포함하는, 단계; 및 (b) CD58의 발현 수준이 감소되거나 손실되거나 CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경 중 적어도 하나가 샘플에서 검출되는 경우 개체가 CAR-T 세포 요법을 사용한 치료에 대해 증가된 무반응성을 갖는 것으로 선택하거나; CD58의 발현 수준이 감소 또는 손실되지 않거나 CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경이 샘플에서 검출되지 않는 경우 개체가 CAR-T 세포 요법을 사용한 치료에 대해 증가된 무반응성을 갖지 않는 것으로 선택하는 단계를 포함한다.

[0031] [0025] 또 다른 양태에서, 개체에서 CAR-T 세포 요법의 치료 효능을 최적화하기 위한 방법이 본원에 제공되고, 상기 방법은 (a) CD58의 발현 수준이 CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 감소 또는 손실되었는지 또는 CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경이 개체로부터 수득된 생물학적 샘플에 존재하는지를 검출하는 단계로서, 상기 검출이 생물학적 샘플을 검출 시약과 접촉시키고 검출 시약과 샘플 내의 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 상호작용을 검출하는 것을 포함하는, 단계; 및 (b) 검출 시약과 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 검출된 상호작용에 기초하여 치료적 유효량의 CAR-T 세포 요법을 확인하는 단계를 포함한다.

[0032] [0026] 또 다른 양태에서, CAR-T 세포 요법을 개체에게 투여하기 위한 방법이 본원에 제공되고, 상기 방법은 (a) CD58의 발현 수준이 CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 감소 또는 손실되었는지 또는 CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경이 개체로부터 수득된 생물학적 샘플에 존재하는지를 검출하는 단계로서, 상기 검출이 생물학적 샘플을 검출 시약과 접촉시키고 검출 시약과 샘플 내의 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 상호작용을 검출하는 것을 포함하는, 단계; 및 (b) 검출 시약과 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 검출된 상호작용에 기초하여 치료적 유효량의 CAR-T 세포 요법을 투여하는 단계를 포함한다.

[0033] [0027] 개시된 방법의 비제한적인 예시적인 구현예는 하기 특징 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 개체는 CD58 발현의 감소된 수준 또는 손실 또는 CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경과 관련된 건강 상태를 갖거나 갖는 것으로 의심된다. 일부 구현예에서, 본 개시의 방법은 건강 상태를 치료하는 것을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 건강 상태는 고형 종양 암, 비-고형 종양 암 및 혈액 악성종양으로 구성된 군으로부터 선택된 증식성 장애이다. 일부 구현예에서, 건강 상태는 암, 선택적으로 비호지킨 림프종, 버킷 림프종, 소림프구성 림프종, 거대 B-세포 림프종(LBCL), 원발성 삼출 림프종, 미만성 거대 B-세포 림프종, 비장 변연부 림프종, MALT(점막-관련 림프양 조직) 림프종, 털세포 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, B-세포 전림프구성 백혈병, B 세포 림프종, 호지킨병, B 세포 비호지킨 림프종(NHL), 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), B 세포 만성 림프구성 백혈병(BCLL), 털세포 백혈병, 만성 근모세포 백혈병 또는 골수종이다.

[0034] [0028] 일부 구현예에서, CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경은 증가된 RNA/단백질 발현, 감소된 RNA/단백질 발현, 발현 손실, 이상 RNA/단백질 발현, 단일 뉴클레오티드 점 돌연변이(SNP), 단일-뉴클레오티드 변이(SNV), 유전자 증폭, 유전자 재배열, 유전자 융합, 결실, 프레임시프트 결실, 삽입, InDel 돌연변이, 후성적 변경, 아미노산 치환 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 분자 변경은 CD58 발현의 손실, CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 CD58의 감소된 발현, 또는 CD58의 돌연변이된 형태의 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 분자 변경은 SEQ ID NO: 1의 K60에 상응하는 위치에서 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 아미노산 치환은 Lys에서 Glu로의 치환(K60E)이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 분자 변경은 SEQ ID NO: 1의 C187에 상응하는 위치에서 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 아미노산 치환은 Cys에서 Arg로의 치환(C187R)이다. 일부 구현예에서, CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물에서 하나 이상의 분자 변경은 CD58 단백질 생성물의 이의 리간드 CD2에 대한 감소된 결합 친화성을 포함한다.

[0035] [0029] 일부 구현예에서, 검출 시약과 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 상호작용의 검출은 딥 시퀀싱에 의한 암 개인화 프로파일링(CAPP-seq), 핵산 시퀀싱, 순환 종양 핵산 평가, 차세대 시퀀싱(NGS), 핵산 증폭-기반 검정, 루프-매개 등온 증폭(LAMP), 롤링 서클 증폭(RCA), 중합효소 연쇄 반응(PCR), 실시간 PCR, 정량적 역전사 PCR(qRT-PCR), PCR-RFLP 검정, HPLC, 질량-분광 유전형 분석, 핵산 하이브리드화 검정, 비교 게놈 하이브리드화, 형광 인-시츄 하이브리드화(FISH), 제한 분해, 모세관 전기영동 및 이들의 임의의 조합으로 구성된

군으로부터 선택된 핵산-기반 분석 검정을 사용하는 것을 포함한다.

[0036] [0030] 일부 구현예에서, 검출 시약과 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 상호작용의 검출은 면역조직화학(IHC), 단백질-마이크로어레이, 웨스턴 블롯팅, 질량 분광분석, 유세포 분석, 효소-결합 면역흡착 검정(ELISA), 면역형광 염색, 다중 검출 검정 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 단백질-기반 분석 검정을 사용하는 것을 포함한다.

[0037] [0031] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 방법은 CAR-T 세포 요법을 개체에게 투여하는 것을 추가로 포함하고, 여기서 CAR-T 세포 요법은 단일 요법으로서 또는 하나 이상의 추가 요법과 조합하여 개체에게 투여된다. 일부 구현예에서, CAR-T 세포 요법 및/또는 적어도 하나의 추가 요법은 CD2 신호전달 도메인을 포함하는 CAR 작제물을 포함한다. 일부 구현예에서, CAR-T 세포 요법은 야생형 세포에서의 밀도와 비교하여 낮은 밀도로 발현되는 항원을 표적화한다.

[0038] [0032] 전술한 개요는 단지 예시적인 것이며 어떤 방식으로든 제한하려는 것이 아니다. 본원에 기재된 예시적인 구현예 및 특징에 더하여, 본 개시의 추가 양태, 구현예, 목적 및 특징은 도면 및 상세한 설명 및 청구범위로부터 충분히 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0040] [0033] **도 1a-1e**는 액시캅타진 실로류셀을 투여받은 LBCL 환자에서의 지속적인 관해가 CD58의 변경을 필요로 하지 않음을 입증하기 위해 수행된 실험의 결과를 그래프로 요약한다. CD58에 돌연변이가 있거나 면역조직화학(IHC)에 의해 CD58의 발현 손실이 있는 환자는 좋지 않은 결과를 갖는다. CR: 완전한 반응; PR: 부분 반응; SD: 안정적인 반응; PD: 진행성 질환.

[0041] [0034] **도 2a-2j**는 CD58 발현의 손실이 시험관 내 및 이종이식편 모델에서 CAR-T 세포의 효능을 감소시킴을 예시하기 위해 수행된 실험의 결과를 그래프로 요약한다.

[0042] [0035] **도 3a-3j**는 CD58-CD2 상호작용이 향상된 CAR-T 세포 활성을 담당함을 예시하기 위해 수행된 실험의 결과를 그래프로 요약한다.

[0043] [0036] **도 4a-4j**는 CAR-T 세포가 B 세포 악성종양에서 CD58 손실을 극복하도록 조작될 수 있음을 예시하기 위해 수행된 실험의 결과를 그래프로 요약한다.

[0044] [0037] **도 5a-5b**는 면역조직화학(IHC)에 의해 발현 손실이 있거나(**도 5a**) CD58에 돌연변이가 있는(**도 5b**) 환자가 CAR-T 세포 요법 후 좋지 않은 결과를 갖는다는 것을 예시하기 위해 수행된 실험의 결과를 그래프로 요약한다.

[0045] [0038] **도 6a-6b**는 CD58 녹아웃이 있거나 없는 DIPG 세포주와 함께 인큐베이션될 때 GD2-4-1BBζ CAR에 의한 사이토카인 생산의 감소를 예시하기 위해 수행된 실험의 결과를 그래프로 요약한다.

[0046] [0039] **도 7a-7c**는 CD58-야생형 또는 CD58-녹아웃 주에 대한 CD19-CD28ζ 또는 CD19-4-1BBζ의 시험관 내 CAR 효능뿐만 아니라 CD58-녹아웃 이종이식편 및 야생형 이종이식편에 대한 생체 내 CAR 효능을 평가하기 위해 수행된 실험의 결과를 그래프로 요약한다.

[0047] [0040] **도 8a-8b**는 액틴 세포골격 재구성에 관여하는 단백질 및 예를 들어, VASP 및 WAS가 CD2 자극된 세포에서 상승되었음을 예시하기 위해 수행된 실험의 결과를 그래프로 요약한다.

[0048] 본 개시의 상세한 설명

[0049] [0041] 본 개시는 일반적으로, 특히, CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경과 관련된 증식성 장애(예를 들어, 암)와 같은 다양한 건강 상태의 진단 및/또는 치료를 위한 방법, 키트 및 시스템에 관한 것이다. 특히, 본 개시의 일부 구현예는 CAR-T 세포 요법에 대한 개체의 반응성을 결정하기 위한 방법에 관한 것이다. 본 개시의 일부 구현예는 CAR-T 세포 요법에 대해 증가된 무반응성을 갖는 개체를 확인하기 위한 방법에 관한 것이다. 본 개시의 다른 구현예는 이를 필요로 하는 개체에서 CAR-T 세포 요법의 치료 효능을 최적화하기 위한 방법에 관한 것이다. 본 개시의 추가 구현예는 CAR-T 세포 요법을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하기 위한 방법에 관한 것이다. 또한, 이를 필요로 하는 개체에서 건강 상태의 예방 및/또는 치료를 위한 키트 및 시스템이 제공된다.

[0050] [0042] 상기 논의된 바와 같이, B 세포 악성종양과 같은 암 세포에서 T 세포를 적합한 세포-표면 분자로 재지정

하는 것에 의존하는 CAR 변형된 자가 T 세포(CART) 요법을 사용한 최근 발달은 B 세포 악성종양 및 다른 암을 치료하기 위해 면역 시스템의 파워를 활용함에 있어서 유망한 결과를 보여준다. 특히, CD19 CAR-T 세포는 거대 B 세포 림프종(LBCL)을 포함하는 B 세포 악성종양의 치료에 대변혁을 일으켰다. 예를 들어, 단일 용량의 CD19 CAR-T 세포는 LBCL 환자의 약 50%에서 완전 관해를 초래한다. 이러한 성공은 2개 제제(액시캅타진 실로류셀 및 티사젠렉류셀)의 FDA 승인으로 이어졌으며, 나머지는 임상 개발 중이다. 특히, 완전한 반응은 대부분의 LBCL 환자에서 지속된다.

[0051] [0043] 2상 시험은 거대 B-세포 림프종(LBCL)에서 CD19 CAR에 대한 최대 40%의 지속적인 완전한 반응(CR) 비율을 입증하였으며, 이는 이전 표준 치료에 비해 유의한 개선이다. 이러한 결과 및 액시캅타진 실로류셀(YESTARTA®)의 실제-세계적인 연구에 기초하여, 2개 라인의 화학요법에 실패한 후 CD19-CAR-T 세포 요법은 이제 LBCL에 대한 표준 치료가 되었다. 진행 중인 임상 시험은 CD19 CAR T 요법이 불응성 또는 조기-재발 LBCL에 대한 새로운 표준이 될 것인지 결정할 것이다(NCT03391466, NCT03575351 및 NCT03570892).

[0052] [0044] 그러나, 질병 진행의 원인을 확인하고, 기존의 CAR-T 요법에 내성이 발달한 환자를 치료하기 위한 긴급한 치료적 필요가 존재한다. 특히, CD19 손실은 B-세포 급성 림프모구성 백혈병(B-ALL)에 대한 CAR-T 세포 요법 후 재발의 가장 흔한 원인으로 보이며, 이는 한 시리즈에서 재발의 90% 초과를 차지하고, 또한 LBCL 사례의 최대 30%에서 발생한다. 이러한 내성은 치료 후 생검이 치료 내성을 유발하는 환자 특이적 인자를 결정하기 위한 표준이 됨에 따라 최근에야 관찰되었다. CAR 내성의 메커니즘에 대한 철저한 이해는 어느 환자가 CAR-T 세포로부터 이익을 얻을 가능성이 가장 높은지를 결정하고 더 많은 수의 환자에게 이익을 확대할 수 있는 신규한 작제물을 생성하는데 도움이 될 것이다. 임의의 특정 이론에 얽매이지 않고, LBCL에서 CD19 CAR에 대한 높은 비율의 완전한 반응이 지속되기 때문에, CR 비율의 증가는 이러한 질병의 더 많은 환자를 치료하는 것으로 해석될 것으로 고려된다.

[0053] [0045] CAR-T 세포 효능의 메커니즘은 잘 알려져 있지 않다. 일반적으로 공동자극 도메인의 2세대 작제물로의 통합이 CD19 CAR에서 관찰된 임상적 성공을 가져온 것으로 생각된다. 그러나, 최근 연구에 따르면 전임상 모델에서 2세대 CAR의 인식된 이점 중 일부는 실제로 CAR 아키텍처의 다른 요소에 의해 유도되었을 수 있다. 하기에 더 상세히 기재된 바와 같이, 본원에 제시된 실험 결과는 이들이 고도로 기능적인 공동자극 도메인을 함유하더라도, FDA-승인된 CD19-CAR-T 세포 치료제인 액시캅타진 실로류셀 및 티사젠렉류셀 둘 모두는 T 세포가 종양 세포에 대한 천연 리간드인 CD58을 통한 CD2에 의한 추가 공동자극을 박탈당할 때 궁극적으로 실패한다는 것을 입증한다. 그러나, 본원에 기재된 실험 데이터는 또한 CD58 돌연변이 또는 손실의 유해한 효과가 종양 세포에 의해 발현되는 표적 항원 밀도에 의존적인 상황일 수 있음을 나타낸다.

[0054] [0046] CD2는 천연 TCR에 대한 중요한 공동자극 도메인이며, CD58과의 상호작용은 TCR 라이게이션 후 및 또한 시험관 내 1세대 CAR에 의해 사이토카인 생산을 지원하는 것으로 이전에 나타났다. 하기에 더 상세히 기재된 바와 같이, CAR-T 세포의 맥락에서 CD2 라이게이션의 역할을 조사하기 위해 본원에 기재된 여러 실험을 수행하였고, 천연 TCR과 매우 유사하게, CD58에 의한 CD2 라이게이션이 근위 TCR 분자의 인산화를 향상시켰지만, 또한 T 세포 활성에 중요한 세포골격 및 부착 분자를 변화시킨다는 것을 발견하였다. 본원에 제시된 데이터는 CD2를 통해 활성화된 세포독성 T 림프구의 포스포펩티돔(phosphopeptidome)에 대한 최근 공개된 작업과 일치하며, 여기서 CD2는 종양 세포 용해를 초래하는 세포골격 재배열을 유도하는 것으로 결정되었다. 또한, CARD11-BCL10-MALT1(CBM) 시그날로솜(signalosome)의 인산화는 CD58을 발현하는 표적 세포를 향한 지속적인 항종양 활성을 설명하는 잠재적인 메커니즘을 제공한다.

[0055] [0047] 다수의 연구는 추가 공동자극 및 사이토카인 신호를 CAR 작제물에 통합함으로써 보다 기능적인 CAR을 생성하는데 초점을 맞추었다. 그러나, 이 작업은 환자에서 진정한 내성 메커니즘을 포착하지 못할 수 있는 전임상 모델링에 의해 주로 안내되었다. CAR이 고형 종양을 포함하는 추가 적응증을 갖는 더 많은 환자에 대해 배치됨에 따라, 연구자가 CAR 실패의 메커니즘을 이해할 수 있도록 하는 심층적인 상관 작업이 수행되는 것이 필수적일 수 있다. CD58 이상이 있는 환자 및 CD58이 녹아웃된 전임상 모델에서 CD19 CAR의 제한된 활성을 관찰한 후, CD2 신호전달의 통합을 통해 이러한 신규한 내성 메커니즘을 극복할 수 있는 CAR-T 세포를 생성하기 위해 추가 실험을 수행하였다. CD2 공동자극이 전통적인 CAR에 트랜스로 제공되는 CAR-T 세포는 생체 내에서 CD58 손실을 극복하는데 성공적이었음이 밝혀졌다. 본원에 제시된 실험 결과는 또한 천연 TCR 설정에서 발생하고 대안적인 공동자극 도메인을 갖는 CAR에 대해 이전에 보고된 바와 같이, 공동자극이 트랜스로 CAR 작제물에 가장 잘 제공될 수 있음을 나타낸다.

[0056] [0048] CD58 돌연변이 및 발현의 변화는 호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병, 다발성 골수종, 및 심지어 결장

암을 포함하는 다른 암에서 흔하다. 따라서, 이 축은 다른 질병에 대한 CAR-T 세포 결과에서 중요한 결정 요인이 될 것이며, 또한 체크포인트 억제제, 이중특이적 항체 및 트랜스제닉 TCR을 포함하는 다른 면역요법 양식에 대한 반응을 예측할 수 있을 것이다. 추가로, CD2 라이게이션은 또한 자연 살해(NK) 세포 기능에 중요하며, 이는 CD58 돌연변이가 B 세포 악성종양의 치료를 위한 유망한 방식으로 최근 입증된 CAR-NK 세포의 효능을 제한할 수 있음을 나타낸다. 또한, CAR 기능을 또한 조절할 수 있고, CD58과 같이, CAR-T 세포 요법에 대한 반응을 예측하는데 중요한 인자로서 나타날 추가적인 공동-수용체가 종양 세포 상에 있을 가능성이 있다.

[0057] 정의

[0058] [0049] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 용어, 표기법 및 다른 과학 용어 또는 용어학은 본 개시가 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 갖는 것으로 의도된다. 일부 경우에, 일반적으로 이해되는 의미를 갖는 용어는 명확성을 위해 및/또는 용이한 참조를 위해 본원에서 정의되며, 본원에 이러한 정의를 포함하는 것이 반드시 당업계에서 일반적으로 이해되는 것과 실질적인 차이를 나타내는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본원에 기술되거나 언급된 많은 기술 및 절차는 당업자에 의해 잘 이해되고 통상적인 방법을 사용하여 일반적으로 사용된다.

[0059] [0050] 단수 형태는 문맥에서 달리 명백하게 달리 지시하지 않는 한 복수의 언급을 포함한다. 예를 들어, 용어 "세포"는 이들의 혼합물을 포함하는 하나 이상의 세포를 포함한다. "A 및/또는 B"는 하기 대안 모두를 포함하기 위해 본원에서 사용된다: "A", "B", "A 또는 B", 및 "A 및 B".

[0060] [0051] 특정 범위는 본원에서 용어 "약"이 선행하는 수치 값으로 제시된다. 용어 "약"은 용어가 선행되는 정확한 숫자뿐만 아니라 용어가 선행되는 숫자에 가깝거나 근사한 숫자에 대한 문자적 지원을 제공하기 위해 본원에서 사용된다. 어떤 숫자가 구체적으로 언급된 숫자에 가깝거나 근사인지 여부를 결정할 때, 언급되지 않은 숫자에 가깝거나 근사한 숫자는 제시된 맥락에서 구체적으로 언급된 숫자와 실질적으로 등가물을 제공하는 숫자일 수 있다. 근사의 정도가 문맥상 달리 명확하지 않은 경우, "약"은 제공된 값을 포함하는 모든 경우에, 제공된 값의 플러스 또는 마이너스 10% 이내, 또는 가장 가까운 유효 숫자로 반올림됨을 의미한다. 일부 구현예에서, 용어 "약"은 지정된 값 ± 최대 10%, 최대 ± 5% 또는 최대 ± 1%를 나타낸다.

[0061] [0052] 본원에서 사용되는 용어 "투여" 및 "투여하는"은 경구, 정맥내, 동맥내, 근육내, 복강내, 피하, 근육내 및 국소 투여, 또는 이들의 조합을 포함하나 이에 제한되지 않는 투여 경로에 의한 생물활성 조성물 또는 제형의 전달을 지칭한다. 상기 용어는 의료 전문가에 의한 투여 및 자가 투여를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0062] [0053] "암"은 제어되지 않은 증식, 불멸성, 전이 가능성, 빠른 성장 및 증식 속도, 및 특정 특징적인 형태적 특징과 같은 암-유발 세포의 전형적인 여러 특징을 갖는 세포의 존재를 지칭한다. 암 세포는 종양과 같은 덩어리로 응집될 수 있거나, 개체 내에 단독으로 존재할 수 있다. 종양은 고형 종양, 연조직 종양 또는 전이성 병변일 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "암"은 또한 다른 유형의 비종양 암을 포함한다. 비제한적인 예는 혈액암 또는 혈액학적 암, 예를 들어, 백혈병을 포함한다. 암은 전암뿐만 아니라 악성 암을 포함할 수 있다.

[0063] [0054] 용어 "세포", "세포 배양물" 및 "세포주"는 특정 대상체 세포, 세포 배양물 또는 세포주뿐만 아니라 전이 횟수 또는 배양 계대 수에 관계 없이 이러한 세포, 세포 배양물 또는 세포주의 자손 또는 잠재적 자손을 지칭한다. 모든 자손이 모 세포와 정확히 동일하지는 않다는 것을 이해해야 한다. 이는 돌연변이(예를 들어, 유도 또는 우발 돌연변이) 또는 환경적 영향(예를 들어, 메틸화 또는 다른 후성적 변형)으로 인해 후속 세대에서 특정 변형이 발생할 수 있기 때문이며, 따라서 자손은 실제로 모 세포와 동일하지 않을 수 있지만 자손이 원래의 세포, 세포 배양물 또는 세포주와 동일한 기능을 유지하는 한, 여전히 본원에서 사용되는 용어의 범위 내에 포함된다.

[0064] [0055] 본원에서 사용되는 용어 "조작된" 또는 "재조합" 핵산 분자, 폴리펩티드 또는 세포는 인간 개입을 통해 변경된 핵산 분자, 폴리펩티드 또는 세포를 지칭한다.

[0065] [0056] 본원에 사용된 바와 같이, 달리 명시되지 않는 한, 제제의 "치료적 유효량" 또는 "치료적으로 유효한 수"는 질병, 예를 들어, 암의 치료 또는 관리에서 치료적 이익을 제공하거나 질병과 관련된 하나 이상의 증상을 지연 또는 최소화하기에 충분한 양 또는 수이다. 화합물의 치료적 유효량 또는 수는 질병의 치료 또는 관리에서 치료적 이익을 제공하는. 단독으로 또는 다른 치료제와 조합된 치료제의 양 또는 수를 의미한다. 용어 "치료적 유효량"은 질병의 전반적인 요법을 개선하거나, 질병의 증상 또는 원인을 감소 또는 회피하거나, 다른 치료제의 치료 효능을 향상시키는 양 또는 수를 포함할 수 있다. "유효량"의 예는 "치료적 유효량"으로도 지칭될 수 있는 질병의 증상 또는 증상들의 치료, 예방 또는 감소에 기여하기에 충분한 양이다. 증상의 "감소"는 증상(들)의 중

증도 또는 빈도의 감소 또는 증상(들)의 제거를 의미한다. "치료적 유효량"을 포함하는 조성물의 정확한 양은 치료 목적에 따라 달라지며, 공지된 기술을 사용하여 당업자에 의해 확인될 수 있을 것이다(예를 들어, 문헌 [Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 2010); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (2016); Pickar, *Dosage Calculations* (2012); and *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 22nd Edition, 2012, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins] 참조).

[0066] [0057] 본원에서 사용되는 "대상체" 또는 "개체"는 인간(예를 들어, 인간 대상체) 및 비인간 동물과 같은 동물을 포함한다. 일부 구현예에서, "대상체" 또는 "개체"는 의사의 치료를 받는 환자이다. 따라서, 대상체는 관심 질환(예를 들어, 암) 및/또는 질환의 하나 이상의 증상을 갖거나 가질 위험이 있거나 가질 것으로 의심되는 인간 환자 또는 개체일 수 있다. 대상체는 또한 진단 시 또는 그 이후에 관심 질환의 위험이 있는 것으로 진단된 개체일 수 있다. 용어 "비인간 동물"은 모든 척추동물, 예를 들어, 포유동물, 예를 들어, 설치류, 예를 들어, 마우스, 비인간 영장류, 및 다른 포유동물, 예를 들어, 이를 테면, 양, 개, 소, 닭, 및 비포유동물, 예를 들어, 양서류, 파충류 등을 포함한다.

[0067] [0058] 값의 범위가 제공되는 경우, 각각의 중간 값은, 문맥에서 달리 명확하게 언급하지 않는 한, 그 범위의 상한과 하한 및 그 언급된 범위 내의 임의의 다른 언급된 또는 중간 값 사이에 있는 하한 단위의 10분의 1까지 본 개시 내에 포함되는 것으로 이해된다. 이러한 더 작은 범위의 상한 및 하한은 언급된 범위 내에서 구체적으로 배제된 임의의 한계에 따라, 독립적으로 더 작은 범위에 포함될 수 있고, 또한 본 개시 내에 포함된다. 언급된 범위가 한계들 중 하나 또는 둘 모두를 포함하는 경우, 포함된 한계들 중 어느 하나 또는 둘 모두를 배제시킨 범위도 본 개시에 포함된다.

[0068] [0059] 본원에 기재된 개시의 양태 및 구현예는 양태 및 구현예를 "포함하는", "구성되는" 및 "필수적 요소로 하여 구성되는(consisting essentially of)"을 포함하는 것으로 이해된다. 본원에서 사용되는 "포함하는"은 "포함하는", "함유하는" 또는 "특징으로 하는"과 동의어이며, 포괄적이거나 개방적이며 추가의 인용되지 않은 요소 또는 방법 단계를 배제하지 않는다. 본원에서 사용되는 "구성된"은 청구된 조성물 또는 방법에 명시되지 않은 임의의 요소, 단계 또는 성분을 배제한다. 본원에서 사용되는 "필수적 요소로 하여 구성되는"은 청구된 조성물 또는 방법의 기본적이고 신규한 특성에 실질적으로 영향을 미치지 않는 물질 또는 단계를 배제하지 않는다. 본원에서, 특히 조성물의 성분의 설명 또는 방법의 단계의 설명에서, 용어 "포함하는"의 모든 언급은 인용된 성분 또는 단계로 구성되고 필수적 요소로 하여 구성되는 그러한 조성물 및 방법을 포함하는 것으로 이해된다.

[0069] [0060] (a), (b), (i) 등과 같은 제목은 단지 명세서 및 청구 범위를 쉽게 읽을 수 있도록 제공된다. 명세서 또는 청구 범위에서 제목의 사용은 단계 또는 요소가 알파벳 또는 숫자 순서 또는 제시된 순서로 수행될 것을 요구하지 않는다.

[0070] [0061] 명확성을 위해 별도의 구현예의 맥락에서 기술된 본 개시의 특정 특징은 또한 단일 구현예에서 조합하여 제공될 수 있음이 이해된다. 반대로, 간결함을 위해 단일 구현예의 맥락에서 기술된 본 개시의 다양한 특징은 또한 개별적으로 또는 임의의 적합한 하위조합으로 제공될 수 있다. 본 개시에 속하는 구현예의 모든 조합은 본 개시에 의해 구체적으로 포함되며, 각각의 모든 조합이 개별적이고 명시적으로 개시된 것처럼 본원에 개시된다. 또한, 다양한 구현예 및 이의 요소의 모든 하위조합이 또한 본 개시에 의해 구체적으로 포함되며, 각각의 모든 이러한 하위조합이 개별적이고 명시적으로 본원에 개시된 것처럼 본원에 개시된다.

[0071] CD58

[0072] [0062] 림프구 기능-관련 항원-3(LFA-3)으로도 알려진 CD58은 1980년대에 인간(Homo sapiens)으로부터 부착 분자로서 처음 확인되었다. 이는 세포외 영역이 단일 V-세트 및 C2-세트 Ig 슈퍼패밀리(IgSF) 도메인을 함유하는 심하게 글리코실화된 단백질이다. CD58은 막횡단 및 글리코실포스파티딜이노시톨(GPI)-고정된 형태의 수지상 세포, 대식세포, 내피 세포 및 적혈구를 포함하는 인간 조혈 및 비-조혈 계통의 표면에서 발현되었다. CD58은 또한 돼지(*Sus scrofa*) 및 양(*Ovis aries*)을 포함하는 여러 다른 포유동물로부터 확인되었다. 인간에 대한 이전의 여러 연구는 T-세포 사이토카인 생산, IL-12에 대한 T-세포 반응성, 단핵구로부터 TNF-α 및 IL-1β의 유도, 및 B 세포에 의한 IgE 생산에 CD58이 관련되어 있음을 보여주었다. 항-CD58 모노클로날 항체 및 CD58-Ig 융합 단백질에 의한 CD58의 차단은 염증 반응을 감소시키고 세포독성 T 림프구 및 NK 세포에 의한 표적 세포의 인식 및 세포용해를 감소시킬 수 있다. 이러한 발견은 CD58이 이펙터 및 표적 세포 수준에서 특히 조절 역할과 함께, 선천성 및 후천성 면역 둘 모두에서 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다.

[0073] [0063] CD58 및 CD2는 다양한 세포 유형, 예를 들어, CD8+ T 세포 및 NK 세포에서 면역 조절에 관여하는 한 쌍

의 상호 부착 분자로서 공지되었다. 특히, CD2 경로는 CD3-독립적 T 세포 활성화를 직접 매개할 수 있고 다양한 면역 세포 유형, 예를 들어, CD8+ T 세포 및 NK 세포에서 공동자극 역할을 가지며, 따라서 이러한 부착 분자 쌍은 인간 및 여러 다른 포유동물에서 CD8+ T 세포 및 NK 세포-매개 세포 면역의 면역 조절에 관여한다. 대부분의 경우, 림프구 기능-관련 항원-2(LFA-2)로도 알려진 CD58은 이의 수용체 CD2와의 상호작용을 통해 기능을 발휘한다. 거의 모든 성숙한 말초 T 세포, 흉선세포, NK 세포 및 흉선 B 세포의 표면에서 발현되는 CD2는 또한 면역글로불린 슈퍼패밀리의 구성원이다. CD58과 CD2의 상호작용은 CD8+ 세포독성 T 림프구 및 NK 세포-매개 세포독성 반응과 같은 세포 면역의 활성화에 필수적인 것으로 밝혀질 수 있다.

[0074] [0064] 인간에서, CD58은 대안적인 스플라이싱 및 당 사슬 첨가에 따라 55,000 내지 75,000 da 크기 범위의 다수의 아이소형을 갖는다. CD58은 2개의 세포외 도메인 및 1개의 막횡단 도메인으로 구성되며, 거의 모든 세포, 특히 항원 제시 세포, 특히 대식세포 및 B-세포를 포함하는 조혈 세포의 표면에서 발현된다. CD58 발현은 사이토카인 자극에 의해 증가된다. 이는 세포 부착을 매개하고 이의 리간드인 CD2(LFA-2)에 결합할 때 신호 전달에 참여한다. CD58/CD2 축에 의해 조절되는 세포 상호작용은 항원-독립적 부착 경로 및 세포독성 T 림프구(CTL) 활성에 관여한다. CD58은 2개의 아이소형을 갖는다. 하나의 아이소형은 글리코포스파티딜 이노시톨 꼬리에 의해 세포막에 고정되고, 다른 하나는 12개의 아미노산으로 구성된 막횡단 소수성 세그먼트 및 세포질 세그먼트를 갖는다. 또한, 2개의 세포외 도메인 중 제1 도메인만이 T 림프구의 표면 상의 CD2에 결합하여, T 림프구와 항원 제시 세포를 함께 가깝게 배치하여, T 림프구가 면역 반응을 일으킬 수 있도록 한다. CD58 아이소형 1(긴 아이소형으로도 공지됨)의 아미노산 서열은 하기에 제시되어 있다.

[0075] [0065] 인간 CD58 아이소형 1 (SEQ ID NO: 1):

MVAGSDAGRA LGVLSVVCLL HCFGFISCFS QQIYGVVYGN VTFHVPSNVP
LKEVLWKKQ**K** DKVAELENSE FRAFSSFKNR VYLDTVSGSL TIYNLTSSDE
DEYEMESPNI TDTMKFFLYV LESLPSPTLT CALTNGSIEV QCMIPEHYNS
HRGLIMYSWD CPMEQCKRNS TSIYFKMEND LPQKIQ**C**TLS NPLFNTTSSI
ILTTCIPSSG HSRHRYALIP IPLAVITTCI VLYMN**GI**LKC DRKPDRTNSN

[0076]

[0077] [0066] 인간 CD58 아이소형 2의 아미노산 서열(짧은 아이소형으로도 공지됨; SEQ ID NO: 2)은 아미노산 잔기 236-237이 VL(GI 대신)이고 아미노산 잔기 238-250가 누락된 것을 제외하고는 상기 SEQ ID NO: 1과 유사하다. 이러한 CD58 아이소형 2는 프레임시프트를 유발하는 변이체 1(아이소형 1을 인코딩함)과 비교하여 3' 코딩 영역에 대안적인 세그먼트를 포함하는 전사체 변이체의 번역 생성물이다. 생성된 단백질(아이소형 2)은 아이소형 1과 비교하여 별개의 C-말단을 갖는다. 이 전사체 변이체 (2)는 또한 전사체 변이체 1과 비교하여 독특한 3' UTR을 함유한다.

[0078] [0067] 인간 CD58 아이소형 2 (SEQ ID NO: 2):

MVAGSDAGRA LGVLSVVCLL HCFGFISCFS QQIYGVVYGN VTFHVPSNVP
LKEVLWKKQ**K** DKVAELENSE FRAFSSFKNR VYLDTVSGSL TIYNLTSSDE
DEYEMESPNI TDTMKFFLYV LESLPSPTLT CALTNGSIEV QCMIPEHYNS
HRGLIMYSWD CPMEQCKRNS TSIYFKMEND LPQKIQ**C**TLS NPLFNTTSSI
ILTTCIPSSG HSRHRYALIP IPLAVITTCI VLYMN**VL**

[0079]

[0080] [0068] CD58은 CD2(LFA-2)에 결합함으로써 세포독성 활성 발현 또는 항원 제시 반응에 관여하는 것으로 공지되어 있다. 특히, 예를 들어, T 세포 상의 CD2에 대한 CD58의 결합은 T 세포와 전문 항원 제시 세포(APC) 사이의 부착을 강화시키는데 중요하다. 이러한 부착은 T 세포가 T-세포 수용체가 반응하는 펩티드:MHC 복합체에 대해 APC의 표면을 바라보며 림프절을 배회할 때 T 세포 활성화 전에 T 세포와 APC 사이의 일시적인 초기 만남의 일부로서 발생한다.

[0081] [0069] CD58의 돌연변이는 일부 림프종에서 관찰된 면역 회피와 관련이 있으며, 이의 관련이 고전적 호지킨 림프종에 어떻게 직접 영향을 미치는지 분석하기 위한 연구가 진행 중이다. CD58 유전자의 다형성은 다발성 경화증의 위험 증가와 관련이 있다. 예를 들어, 다발성 경화증의 높은 위험과 관련된 단일-뉴클레오티드 다형성 rs1335532를 함유하는 게놈 영역은 인핸서 특성을 가지며 림프모구 세포에서 CD58 프로모터 활성을 유의하게 부스팅할 수 있다. 보호성 (C) rs1335532 대립유전자는 Wnt 신호전달 경로의 표적인 ASCL2 전사 인자에 대한 기능

적 결합 부위를 생성한다. 또한, CD58은 결장직장 종양-개시 세포의 조절에서 역할을 한다. 따라서, CD58을 발현하는 세포는 종양형성에서 흥미로워졌다.

[0082] [0070] CD58은 B-ALL에서 고도로 발현되고 해당 질환에서 유세포 분석에 의해 미세 잔존 질환의 중요한 마커로서 작용하지만, LBCL에서 자주 돌연변이되거나, 하향 조절되거나, 결실되거나 침묵된다. 또한, CD58 손실은 이전에 재발된 LBCL에서 면역 회피와 관련이 있었다.

[0083] [0071] CD19 CAR-T 세포 요법에 대한 반응을 결정하는데 있어서 LBCL에 대한 CD58 발현의 역할은 하기에 더 상세히 기재된다. 특히, CD58 발현의 손실 또는 CD58 돌연변이를 갖는 환자가 액시캅타진 실로류셀에 대한 지속적인 반응을 달성하지 못함을 입증하기 위한 실험이 설계 및 수행되었다. 또한, 시험관 내 시스템 및 뮤린 이종이식편을 사용하여, CAR 작제물 및 궁극적으로 LBCL에서 CD58 손실을 극복할 수 있는 CAR-T 세포를 생성함으로써 CD58 라이게이션의 기능적 중요성을 조사하였다. LBCL에서 내성 메커니즘을 분석함으로써, 본원에 기재된 실험 결과는 더 많은 수의 환자에게 지속적인 관해를 연장할 수 있는 신규한 치료제의 생성을 예시한다.

[0084] [0072] 림프구 기능-관련 항원-3(LFA-3)으로도 알려진 CD58은 세포 부착을 매개하고, 이의 리간드인 CD2에 결합할 때 신호 전달에 참여한다. CD58/CD2 항원에 의해 조절되는 세포 상호작용은 항원-독립적 부착 경로 및 세포독성 T 림프구(CTL) 활성에 관여한다. CD58은 2개의 아이소형을 갖는다. 하나의 아이소형은 글리코포스파티딜이노시톨 꼬리에 의해 세포막에 고정되고, 다른 하나는 12개의 아미노산으로 구성된 막횡단 소수성 세그먼트 및 세포질 세그먼트를 갖는다.

[0085] 본 개시의 방법.

[0086] [0073] 본원에 더 상세히 기재된 바와 같이, 본 개시의 일부 구현예는 CAR-T 세포 요법에 대한 개체의 반응성을 결정하기 위한 다양한 방법을 제공하고, 상기 방법은 (a) CD58의 발현 수준이 CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 감소 또는 손실되었는지 또는 CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경이 개체로부터 수득된 생물학적 샘플에 존재하는지를 검출하는 단계로서, 상기 검출이 생물학적 샘플을 검출 시약과 접촉시키고 검출 시약과 샘플 내의 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 상호작용을 검출하는 것을 포함하는, 단계; 및 (b) CD58의 발현 수준이 감소되거나 손실되거나 CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경 중 적어도 하나가 샘플에서 검출되는 경우 개체가 CAR-T 세포 요법을 사용한 치료에 대해 감소된 반응성을 갖는 것으로 확인하는 단계를 포함한다.

[0087] [0074] 또 다른 양태에서, CAR-T 세포 요법에 대해 증가된 무반응성을 갖는 개체를 확인하기 위한 방법이 본원에 제공되고, 상기 방법은 (a) CD58의 발현 수준이 CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 감소 또는 손실되었는지 또는 CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경이 개체로부터 수득된 생물학적 샘플에 존재하는지를 검출하는 단계로서, 상기 검출이 생물학적 샘플을 검출 시약과 접촉시키고 검출 시약과 샘플 내의 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 상호작용을 검출하는 것을 포함하는, 단계; 및 (b) CD58의 발현 수준이 감소되거나 손실되거나 CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경 중 적어도 하나가 샘플에서 검출되는 경우 개체가 CAR-T 세포 요법을 사용한 치료에 대해 증가된 무반응성을 갖는 것으로 선택하거나; CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경이 샘플에서 검출되지 않는 경우 개체가 CAR-T 세포 요법을 사용한 치료에 대해 증가된 무반응성을 갖지 않는 것으로 선택하는 단계를 포함한다.

[0088] [0075] 또 다른 양태에서, 개체에서 CAR-T 세포 요법의 치료 효능을 최적화하기 위한 방법이 본원에 제공되고, 상기 방법은 (a) CD58의 발현 수준이 CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 감소 또는 손실되었는지 또는 CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경이 개체로부터 수득된 생물학적 샘플에 존재하는지를 검출하는 단계로서, 상기 검출이 생물학적 샘플을 검출 시약과 접촉시키고 검출 시약과 샘플 내의 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 상호작용을 검출하는 것을 포함하는, 단계; 및 (b) 검출 시약과 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 검출된 상호작용에 기초하여 치료적 유효량의 CAR-T 세포 요법을 확인하는 단계를 포함한다.

[0089] [0076] 또 다른 양태에서, CAR-T 세포 요법을 개체에게 투여하기 위한 방법이 본원에 제공되고, 상기 방법은 (a) CD58의 발현 수준이 CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 감소 또는 손실되었는지 또는 CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경이 개체로부터 수득된 생물학적 샘플에 존재하는지를 검출하는 단계로서, 상기 검출이 생물학적 샘플을 검출 시약과 접촉시키고 검출 시약과 샘플 내의 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 상호작용을 검출하는 것을 포함하는, 단계; 및 (b) 검출 시약과 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 검출된 상호작용에 기초하여 치료적 유효량의 CAR-T 세포 요법을 투여하는 단계를 포함한다.

[0090] [0077] 일 양태는 CD58의 발현 감소 또는 손실 또는 CD58-인코딩 유전자에서 하나 이상의 분자 변경 중 적어도 하나를 특징으로 하는 건강 상태를 갖는 개체를 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 CD58의 발현 수준이

CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 감소 또는 손실되었는지 또는 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물에서 하나 이상의 분자 변경이 개체로부터 수득된 생물학적 샘플에 존재하는지를 검출하는 단계로서, 상기 검출이 생물학적 샘플을 검출 시약과 접촉시키고 검출 시약과 샘플 내의 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 상호작용을 검출하는 것을 포함하는, 단계; CD58의 발현 수준이 CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 감소되거나 손실되거나 CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경 중 적어도 하나가 샘플에서 검출되는 경우 개체가 CD2 신호전달 도메인을 포함하는 CAR-T 세포 요법을 사용한 치료에 반응할 가능성이 있는 것으로 확인하는 단계; 및 단계 (b)에서 CD2를 포함하는 CAR 작제물을 사용한 치료에 반응할 가능성이 있는 것으로 확인된 개체에게 CD2 신호전달 도메인을 포함하는 CAR 작제물을 사용한 치료를 투여하는 단계를 포함한다.

[0091] [0078] 또 다른 양태에서, 개체의 건강 상태를 치료하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 CD58의 발현 수준이 CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 감소 또는 손실되었는지 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물에서 하나 이상의 분자 변경이 개체로부터 수득된 생물학적 샘플에 존재하는지를 검출하는 단계로서, 상기 검출이 생물학적 샘플을 검출 시약과 접촉시키고 검출 시약과 샘플 내의 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 상호작용을 검출하는 것을 포함하는, 단계; 및 단계 (a)에서 CD58의 발현 수준 감소 또는 손실 또는 CD58-인코딩 유전자에서 하나 이상의 분자 변경의 검출에 기초하여 CD2 신호전달 도메인을 포함하는 CAR 작제물을 사용한 치료를 개체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0092] [0079] 일부 구현예에서, CD58의 참조 발현 수준은 환자의 그룹/집단으로부터의 샘플에서 CD58의 중간 발현 수준을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 환자의 그룹/집단은 CAR-T 세포 요법에 대한 반응성에 대해 시험되고 있다. 일부 구현예에서, 참조 발현 수준은 이전에 개체로부터 사전에 수득된 샘플에서의 수준일 수 있다. 일부 구현예에서, 참조 발현 수준은 CAR-T 요법으로 이전에 치료를 받았지만 건강 상태가 재발(예를 들어, LBCL의 재발)한 환자로부터의 샘플에서의 수준일 수 있다. 일부 구현예에서, 참조 발현 수준은 CAR-T 요법으로 이전에 치료를 받고 건강 상태(예를 들어, LBCL)가 재발하지 않은 환자로부터의 샘플에서의 수준일 수 있다. 일부 구현예에서, 참조 발현 수준은 건강한 개체로부터의 샘플에서의 수준일 수 있다. 일부 구현예에서, 참조 발현 수준, 예를 들어, 상기 기재된 바와 같은 그룹으로부터의 샘플에서의 참조 발현 수준 미만인 CD58 발현 수준을 갖는 개체는 본원에 기재된 바와 같은 트랜스 CAR 작제물, 예를 들어, 막횡단 도메인 및 CD2 세포내 도메인에 융합된 항-CD19 단일 사슬 가변 단편(scFv) FMC63을 포함하는 트랜스 CAR 작제물을 포함하지 않는 CAR-T 요법을 사용한 치료에 덜 반응할 가능성이 있는 대상체/환자로서 확인될 수 있다. 예를 들어, 이러한 대상체/환자는 참조 CD58 발현 수준(예를 들어, 상기 언급된 중간 수준)에 비해 약 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% 또는 5% 낮은 CD58 발현 수준을 나타내거나, CD58의 발현이 완전히 손실되거나, 본원에 기재된 바와 같은 트랜스 CAR 작제물, 예를 들어, 막횡단 도메인 및 CD2 세포내 도메인에 융합된 항-CD19 단일 사슬 가변 단편(scFv) FMC63을 포함하는 트랜스 CAR 작제물을 사용한 치료에 반응할 가능성이 있는 대상체/환자로서 확인될 수 있다.

[0093] [0080] 본원에서 사용되는 어구 "하나 이상의 분자 변경"은 상응하는 야생형 유전자 또는 단백질과 비교하여 개체의 하나 이상의 세포에서 유전적 또는 단백질 서열의 임의의 변이를 지칭한다. 하나 이상의 분자 변경은 유전자 돌연변이, 유전자 증폭, 스플라이스 변이체, 결실, 삽입/결실(In/Del), 유전자 재배열, 단일-뉴클레오티드 변이(SNV), 삽입, 및 이상 RNA/단백질 발현을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 일부 구현예에서, CD58 활성의 분자 변경은 증가된 RNA/단백질 발현, 감소된 RNA/단백질 발현, 발현 손실, 이상 RNA/단백질 발현, 단일 뉴클레오티드 점 돌연변이(SNP), 단일-뉴클레오티드 변이(SNV), 유전자 증폭, 유전자 재배열, 유전자 융합, 결실, 프레임시프트 결실, 삽입, InDel 돌연변이, 후성적 변경, 아미노산 치환 및 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 분자 변경은 CD58 발현의 손실, CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 CD58의 감소된 발현, 또는 CD58의 돌연변이된 형태의 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 분자 변경 중 적어도 하나는 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 K60에 상응하는 위치에서 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 분자 변경 중 적어도 하나는 SEQ ID NO: 1의 K60에 상응하는 위치에서 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 분자 변경 중 적어도 하나는 SEQ ID NO: 2의 K60에 상응하는 위치에서 아미노산 치환을 포함한다.

[0094] [0081] 개시된 방법의 비제한적인 예시적인 구현예는 하기 특징 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 CD58 발현의 감소된 수준 또는 손실 또는 CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경과 관련된 증식성 질환(예를 들어, 암)과 같은 하나 이상의 건강 상태를 갖거나, 가질 것으로 의심되거나, 발병 위험이 높을 수 있는 개체에게 치료적 유효량의 CAR-T 세포 요법을 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 개체는 의사의 진료를 받는 환자이다. 예시적인 증식성 질환은 혈관형성 질환, 전이성 질환, 종양형성 질환, 신생물 질환 및

암을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 증식성 질환은 암이다. 일부 구현예에서, 암은 소아암이다. 일부 구현예에서, 암은 췌장암, 결장암, 난소암, 전립선암, 폐암, 중피종, 유방암, 요로상피암, 간암, 두경부암, 육종, 자궁경부암, 위암, 위암, 흑색종, 포도막 흑색종, 담관암종, 다발성 골수종, 백혈병, 림프종 및 교모세포종이다.

[0095] [0082] 일부 구현예에서, 건강 상태는 고형 종양 암, 비-고형 종양 암 및 혈액 악성종양으로 구성된 군으로부터 선택된 증식성 장애이다. 예시적인 암은 거대 B-세포 림프종(LBCL), B-세포 급성 림프구성 백혈병(B-ALL), T-세포 급성 림프구성 백혈병(T-ALL), 급성 림프구성 백혈병(ALL), 만성 골수성 백혈병(CML), 만성 림프구성 백혈병(CLL), B 세포 전골수구성 백혈병, 모세포 형질세포양 수지상 세포 신생물, 버킷 림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종, 소포 림프종, 털세포 백혈병, 소세포- 또는 대세포-소포 림프종, 악성 림프증식성 질환, MALT 림프종, 외투 세포 림프종(MCL), 변연부 림프종, 다발성 골수종, 골수이형성 및 골수이형성 증후군, B 세포 비호지킨 림프종(NHL), 호지킨 림프종(HL), 형질모세포 림프종, 형질세포양 수지상 세포 신생물, 및 발덴스트롬 마크로글로불린혈증을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 일 구현예에서, 암은 ALL이다. 또 다른 구현예에서, 암은 CLL이다. 구현예에서, 암은 CD19 발현과 관련이 있다.

[0096] [0083] 일부 구현예에서, 암은 비호지킨 림프종, 버킷 림프종, 소림프구성 림프종, 거대 B-세포 림프종(LBCL), 원발성 삼출 림프종, 미만성 거대 B-세포 림프종, 비장 변연부 림프종, MALT(점막-관련 림프양 조직) 림프종, 털세포 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, B-세포 전림프구성 백혈병, B 세포 림프종(예를 들어, 다양한 형태의 호지킨병), B 세포 비호지킨 림프종(NHL), 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), B 세포 만성 림프구성 백혈병(BCLL), 털세포 백혈병, 만성 근모세포 백혈병 및 골수종으로 구성된 군으로부터 선택되는 B-세포 악성종양이다.

[0097] [0084] 일부 구현예에서, CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경은 증가된 RNA/단백질 발현, 감소된 RNA/단백질 발현, 발현 손실, 이상 RNA/단백질 발현, 단일 뉴클레오티드 점 돌연변이(SNP), 단일-뉴클레오티드 변이(SNV), 유전자 증폭, 유전자 재배열, 유전자 융합, 결실, 프레임시프트 결실, 삽입, InDel 돌연변이, 후성적 변경, 아미노산 치환 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 분자 변경은 CD58 발현의 손실, CD58의 참조 발현 수준과 비교하여 CD58의 감소된 발현, 또는 CD58의 돌연변이된 형태의 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 분자 변경은 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 K60에 상응하는 위치에서 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 분자 변경은 SEQ ID NO: 1의 K60에 상응하는 위치에서 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 분자 변경은 SEQ ID NO: 2의 K60에 상응하는 위치에서 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 아미노산 치환은 Lys에서 Glu로의 치환(K60E)이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 분자 변경은 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 C187에 상응하는 위치에서 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 분자 변경은 SEQ ID NO: 1의 C187에 상응하는 위치에서 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 분자 변경은 SEQ ID NO: 2의 C187에 상응하는 위치에서 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 아미노산 치환은 Cys에서 Arg로의 치환(C187R)이다.

[0098] [0085] 원칙적으로, 본원에 기재된 방법에 사용하기에 적합한 생물학적 샘플의 유형과 관련하여 특별한 제한은 없다. 일부 구현예에서, 생물학적 샘플은 가래, 기관지폐포 세척, 흉막 삼출액, 조직, 전혈, 혈청, 혈장, 협측 스크레이프(scrape), 타액, 뇌척수액, 소변, 대변, 순환 종양 세포, 순환 핵산, 골수 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 생물학적 샘플은 세포 또는 조직을 포함한다. 예를 들어, 생물학적 샘플은 조직 샘플, 예를 들어, 생검, 코어 생검, 바늘 흡인물, 또는 미세 바늘 흡인물일 수 있다. 일부 구현예에서, 생물학적 샘플은 혈액 샘플, 소변 샘플 또는 타액 샘플과 같은 유체 샘플일 수 있다. 일부 구현예에서, 생물학적 샘플은 피부 샘플일 수 있다. 일부 구현예에서, 생물학적 샘플은 볼 면봉채취물일 수 있다. 일부 구현예에서, 생물학적 샘플은 전혈 및 혈액 성분을 포함한다. 일부 구현예에서, 혈액 성분은 혈장을 포함한다. 일부 구현예에서, 생물학적 샘플은 혈장 샘플 또는 혈청 샘플일 수 있다. 일부 구현예에서, 조직은 종양 조직 또는 암 조직이다. 일부 구현예에서, 생물학적 샘플은 종양 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 생물학적 샘플은 고형 종양, 연조직 종양, 비-고형 종양, 전이성 병변, 순환 종양 세포(CTC) 집단으로부터 유래된다. 생물학적 샘플은 온전한 조직 샘플을 포함할 수 있다. 생물학적 샘플은 종양 세포주이거나 이종이식편 모델 또는 환자 유래 이종이식편(PDX)으로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 종양 샘플은 상이한 대상체로부터 유래된다.

[0099] [0086] 검출 시약과 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 상호작용은 하나 이상의 핵산-기반 분석 검정, 단백질-기반 분석 검정 또는 이들의 조합을 사용하여 검출될 수 있다. 본 개시의 방법 및 시스템에 적합한 검출 시약의 비제한적인 예는 이중-가닥 핵산, 단일-가닥 핵산(예를 들어, 프라이머, 프로브), 비형광 및 형

광 핵산-특이적 염료, 효소 및 항체를 포함한다.

[0100] [0087] 일부 구현예에서, CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물의 하나 이상의 분자 변경의 존재 및/또는 부재의 평가 및/또는 검출 시약과 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 상호작용의 검출은 딥 시퀀싱에 의한 암 개인화 프로파일링(CAPP-seq), 핵산 시퀀싱, 순환 종양 핵산 평가, 차세대 시퀀싱(NGS), 핵산 증폭-기반 검정, 루프-매개 등온 증폭(LAMP), 롤링 서클 증폭(RCA), 중합효소 연쇄 반응(PCR), 실시간 PCR, 정량적 역전사 PCR(qRT-PCR), PCR-RFLP 검정, HPLC, 질량-분광 유전형 분석, 핵산 하이브리드화 검정, 비교 게놈 하이브리드화, 형광 인-시츄 하이브리드화(FISH), 제한 분해, 모세관 전기영동 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 핵산-기반 분석 검정을 포함한다.

[0101] [0088] 일부 구현예에서, CD58-인코딩 유전자의 하나 이상의 분자 변경의 존재 및/또는 부재의 평가는 딥 시퀀싱에 의한 암 개인화 프로파일링(CAPP-seq)을 포함한다(예를 들어, 실시예 1 참조). CAPP-seq는 암에서 순환 종양 DNA(ctDNA)를 분석 및/또는 정량화하는데 사용되는 차세대 시퀀싱 기반 방법이다. 이 방법은 재발성 돌연변이를 갖는 것으로 알려진 임의의 암 유형에 사용될 수 있다. CAPP-Seq는 10,000개 분자의 건강한 DNA에서 돌연변이체 DNA의 1개 분자를 검출할 수 있다. 이 기술에서 ctDNA의 사용은 순환 종양 세포(CTC)와 혼동되어서는 안 된다.

[0102] [0089] 일부 구현예에서, 전기영동 이동성 검정은 개체로부터 수득된 생물학적 샘플에 존재하는 CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경의 지식을 획득하는데 사용된다. 예를 들어, 돌연변이를 인코딩하는 핵산 서열은 CD58 유전자에서 하나 이상의 변경에 상응하는 핵산 영역을 증폭하고 증폭된 핵산의 전기영동 이동성을 야생형 CD58 유전자의 상응하는 영역의 전기영동 이동성과 비교함으로써 검출될 수 있다.

[0103] [0090] 일부 구현예에서, 생물학적 샘플에 존재하는 CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경의 지식을 획득하는데 사용되는 분석 검정은 생물학적 샘플로부터 유래된 핵산을 1) 하나 이상의 돌연변이를 인코딩하는 핵산 서열에 상보적인 핵산 서열을 포함하고 (2) 검출 가능한 표지를 추가로 포함하는 핵산 프로브와 접촉시키는 것을 포함하는 핵산 하이브리드화 검정을 포함한다.

[0104] [0091] 일부 구현예에서, 생물학적 샘플에 존재하는 CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경의 지식을 획득하는데 사용되는 분석 검정은 중합효소 연쇄 반응(PCR) 또는 핵산 증폭-기반 검정을 포함한다. 당업계에 공지된 다수의 PCR-기반 분석 검정이 본원에 개시된 방법에 적합하며, 이는 실시간 PCR, 정량적 역전사 PCR(qRT-PCR), PCR-RFLP 검정, 루프-매개 등온 증폭(LAMP) 및 롤링 서클 증폭(RCA)을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0105] [0092] 일부 구현예에서, 생물학적 샘플에 존재하는 CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경의 지식을 획득하는데 사용되는 분석 검정은 하나 이상의 분자 변경을 포함하는 핵산 서열 및/또는 아미노산 서열을 결정하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 암 환자로부터의 하나 이상의 분자 변경을 포함하는 핵산 서열이 시퀀싱된다. 일부 구현예에서, 서열은 차세대 시퀀싱 절차에 의해 결정된다. 본원에서 사용되는 "차세대 시퀀싱"은 수천 내지 수백만 개의 시퀀싱 반응을 병렬로 수행하고 판독하기 때문에, 통상적인 시퀀싱 방법(예를 들어, Sanger 시퀀싱)으로 가능한 속도보다 빠른 속도로 올리고뉴클레오티드를 시퀀싱하는 능력을 갖는 올리고뉴클레오티드 시퀀싱 기술을 지칭한다. 차세대 시퀀싱 방법/플랫폼의 비제한적인 예는 Massively Parallel Signature Sequencing(Lynx Therapeutics); 고체-상, 가역적 염료-종결자 시퀀싱(Solexa/Illumina); DNA 나노볼 시퀀싱(Complete Genomics); SOLiD 기술(Applied Biosystems); 454 피로-시퀀싱(454 Life Sciences/Roche Diagnostics); 이온 반도체 시퀀싱(ION Torrent); 및 Pacific Biosciences, Intelligen Bio-systems, Oxford Nanopore Technologies 및 Helicos Biosciences로부터 이용 가능한 기술을 포함한다.

[0106] [0093] 따라서, 일부 구현예에서, 본원에 개시된 방법에 사용되는 NGS 절차는 피로시퀀싱, 합성에 의한 시퀀싱, 라이게이션에 의한 시퀀싱 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, NGS 절차는 Illumina, Ion Torrent, Qiagen, Invitrogen, Applied Biosystem, Helicos, Oxford Nanopore, Pacific Biosciences 및 Complete Genomics로부터 선택된 NGS 플랫폼에 의해 수행된다.

[0107] [0094] 일부 구현예에서, FISH 분석은 본원에 기재된 바와 같은 돌연변이된 유전자 또는 돌연변이된 유전자 생성물(즉, CD58 폴리펩티드)과 같은 하나 이상의 분자 변경을 초래하는 염색체 돌연변이를 확인하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, FISH를 수행하기 위해, 제1 검출 가능한 표지로 태깅된 적어도 제1 프로브는 돌연변이된 폴리펩티드의 돌연변이된 유전자를 표적화하도록 설계될 수 있고, 제2 검출 가능한 표지로 태깅된 적어도 제2 프로브는 프로브를 관찰하는 당업자가 관련 유전자 또는 유전자 생성물이 샘플에 존재하는지를 결정할 수 있도록 상응하는 야생형 유전자 또는 야생형 폴리펩티드를 표적화하도록 설계될 수 있다. 일반적으로, FISH 검정은 슬라

이드에 배치된 포르말린-고정, 파라핀-포매된 조직 섹션을 사용하여 수행된다. 예를 들어, 생물학적 샘플로부터의 DNA는 단일-가닥 형태로 변성되고, 후속하여 당업자에게 공지된 방법 및 기술을 사용하여 설계 및 제조될 수 있는 적절한 DNA 프로브와 하이브리드화될 수 있다. 하이브리드화 후, 임의의 결합되지 않은 프로브는 일련의 세척에 의해 제거될 수 있고, 세포의 핵은 청색 형광을 내는 DNA-특이적 염색인 DAPI(4',6 디아미디노-2-페닐인돌)로 대조-염색된다. 프로브 또는 프로브들의 하이브리드화는 형광 신호의 시각화를 가능하게 하는 적절한 여기 및 방출 필터가 장착된 형광 현미경을 사용하여 관찰된다. 당업계에 공지된 FISH 방법의 다른 변형은 또한 본원에 개시된 방법에 따라 선택된 개체를 평가하기에 적합하다.

[0108] [0095] 일부 구현예에서, CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물의 하나 이상의 분자 변경의 존재 및/또는 부재의 평가 및/또는 검출 시약과 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 상호작용의 검출은 면역조직화학(IHC), 단백질-마이크로어레이, 웨스턴 블롯팅, 질량 분광분석, 유세포 분석, 효소-결합 면역흡착 검정(ELISA), 면역형광 염색, 다중 검출 검정 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 단백질-기반 분석 검정을 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질-기반 검정은 야생형 CD58 또는 돌연변이된 CD58 폴리펩티드 중 하나 이상에 선택적으로 결합하는 하나 이상의 항체의 사용을 포함한다. 단백질-기반 분석 검정에 유용한 예시적인 CD58 모노클로날 및 폴리클로날 항체는 Abcam(Cat # ab196648, ab275392, ab281201 및 ab91058), LSBio(Cat #LS-C819068-50), 및 Thermo Fischer Scientific (Cat #MA5800, MA5-29120, and MA5-29121)에 의해 상업적으로 이용 가능한 것들을 포함한다. 일부 구현예에서, CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물의 하나 이상의 분자 변경의 존재 및/또는 부재의 평가는 면역조직화학(IHC)을 포함한다(예를 들어, 실시예 1 참조).

[0109] [0096] 일부 구현예에서, CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물에서 하나 이상의 분자 변경은 CD58 단백질 생성물의 이의 리간드 CD2에 대한 결합 친화성을 감소시킨다.

[0110] [0097] 용어 "결합 친화성"은 2개의 분자, 예를 들어, 폴리펩티드와 이의 리간드 사이의 비공유 상호작용의 강도의 척도로서 본원에서 사용된다. 용어 "결합 친화성"은 1가 상호작용(고유 활성)을 기술하는데 사용된다. 2개의 분자 사이의 결합 친화성은 해리 상수(K_D)의 결정에 의해 정량화될 수 있다. 차례로, K_D는, 예를 들어, 표면 플라스몬 공명(SPR) 방법(Biacore)을 사용하여 복합체 형성 및 해리의 동역학의 측정에 의해 결정될 수 있다. 1가 복합체의 회합 및 해리에 상응하는 속도 상수는 각각 회합 속도 상수 k_a(또는 k_{on}) 및 해리 속도 상수 k_d(또는 k_{off})로 지칭된다. K_D는 방정식 $K_D = k_d / k_a$를 통해 k_a 및 k_d와 관련이 있다. 해리 상수의 값은 잘 알려진 방법에 의해 직접 결정될 수 있고, 문헌[Caceci *et al*. (1984, Byte 9: 340-362)]에 제시된 것과 같은 방법에 의해 복잡한 혼합물에 대해서도 계산될 수 있다. 예를 들어, K_D는 문헌[Wong & Lohman (1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5428-5432)]에 개시된 것과 같은 이중-필터 니트로셀룰로스 필터 결합 검정을 사용하여 확립될 수 있다. 표적 항원에 대한 본 개시의 항체 또는 폴리펩티드의 결합 능력을 평가하기 위한 다른 표준 검정은, 예를 들어, ELISA, 웨스턴 블롯, RIA 및 유세포 분석, 및 본원의 다른 곳에 예시된 다른 검정을 포함하여 당업계에 공지되어 있다. 폴리펩티드의 이의 리간드에 대한 결합 동역학 및 결합 친화성은 또한, 예를 들어, Biacore™ 시스템 또는 KinExA를 사용하여 표면 플라스몬 공명(SPR)과 같은 당업계에 공지된 표준 검정에 의해 평가될 수 있다.

[0111] [0098] 일부 구현예에서, 본 개시의 방법은 CAR-T 세포 요법으로 건강 상태를 치료하는 것을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, CAR-T 세포 요법은 단일 요법으로서 또는 하나 이상의 추가 요법과 조합하여 개체에게 투여된다. 일부 구현예에서, CAR-T 세포 요법 및/또는 적어도 하나의 추가 요법은 CD2 공동자극 도메인을 포함하는 CAR 작제물을 포함한다. 일부 구현예에서, CD2 공동자극 도메인을 포함하는 CAR 작제물은 SEQ ID NO: 4의 아미노산 서열을 포함한다.

[0112] [0099] 일부 구현예에서, CAR-T 세포 요법은 표적 세포에서 저밀도로 발현되는 항원, 예를 들어, 세포 당 약 6,000개 미만의 분자의 표적 항원을 표적화한다. 일부 구현예에서, 항원은 세포 당 약 5,000개 미만의 분자, 약 4,000개 미만의 분자, 약 3,000개 미만의 분자, 약 2,000개 미만의 분자, 약 1,000개 미만의 분자 또는 약 500개 미만의 분자의 표적 항원의 밀도로 발현된다. 일부 구현예에서, 항원은 세포 당 약 2,000개 미만의 분자, 예를 들어, 이를 테면, 약 1,800개 미만의 분자, 약 1,600개 미만의 분자, 약 1,400개 미만의 분자, 약 1,200개 미만의 분자, 약 1,000개 미만의 분자, 약 800개 미만의 분자, 약 600개 미만의 분자, 약 400개 미만의 분자, 약 200개 미만의 분자 또는 약 100개 미만의 분자의 표적 항원의 밀도로 발현된다. 일부 구현예에서, 항원은 세포 당 약 1,000개 미만의 분자, 예를 들어, 이를 테면, 약 900개 미만의 분자, 약 800개 미만의 분자, 약 700개 미만의 분자, 약 600개 미만의 분자, 약 500개 미만의 분자, 약 400개 미만의 분자, 약 300개 미만의 분자, 약 200개 미만의 분자 또는 약 100개 미만의 분자의 표적 항원의 밀도로 발현된다. 일부 구현예에서, 항원은 세포

당 약 5,000 내지 약 100개 분자의 표적 항원, 예를 들어, 이를 테면, 세포 당 약 5,000 내지 약 1,000개 분자, 약 4,000 내지 약 2,000개 분자, 약 3,000 내지 약 2,000개 분자, 약 4,000 내지 약 3,000개 분자, 약 3,000 내지 약 1,000개 분자, 약 2,000 내지 약 1,000개 분자, 약 1,000 내지 약 500개 분자, 약 500 내지 약 100개 분자의 표적 항원의 밀도로 발현된다.

[0113] [0100] 본원에 기재된 CAR-T 세포 요법 중 어느 하나, 예를 들어, 조작된 CAR-T 세포의 투여는 관련 건강 상태, 예를 들어, 증식성 질환(예를 들어, 암), 자가면역 질환 및 미생물 감염(예를 들어, 바이러스 감염)의 치료에서 환자를 치료하는데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 조작된 CAR-T 세포는 증식성 질환(예를 들어, 암), 자가면역 질환 및 만성 감염과 같은 하나 이상의 건강 상태를 갖거나, 가질 것으로 의심되거나, 발병 위험이 높을 수 있는 개체를 치료하는 방법에 사용하기 위해 치료제에 혼입될 수 있다. 일부 구현예에서, 개체는 의사의 진료를 받는 환자이다.

[0114] [0101] 일부 구현예에서, 방법은 치료적 유효량의 CAR-T 세포 요법을 계산하거나 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 것을 포함한다. 조작된 CAR-T 세포의 "유효량", "치료적 유효량" 또는 "약학적 유효량"이라는 용어는 일반적으로 조작된 CAR-T 세포의 집단 또는 약학적 조성물이 조작된 세포 집단 또는 약학적 조성물의 부재에 비해 언급된 목적(예를 들어, 이것이 투여된 효과 달성, 질병 치료, 신호전달 경로 감소, 또는 질병 또는 건강 상태의 하나 이상의 증상 감소)을 달성하기에 충분한 양 또는 수를 지칭한다. "유효량"의 예는 "치료적 유효량"으로도 지칭될 수 있는 질병의 증상 또는 증상들의 치료, 예방 또는 감소에 기여하기에 충분한 양이다. 증상의 "감소"는 증상(들)의 중증도 또는 빈도의 감소 또는 증상(들)의 제거를 의미한다. "치료적 유효량"을 포함하는 T-세포 집단 또는 조성물의 정확한 양은 치료 목적에 따라 달라지며, 공지된 기술을 사용하여 당업자에 의해 확인될 수 있을 것이다(예를 들어, 문헌[Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Pickar, *Dosage Calculations* (1999); and Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins] 참조).

[0115] [0102] 예시적인 증식성 질환은 혈관형성 질환, 전이성 질환, 종양형성 질환, 신생물 질환 및 암을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 증식성 질환은 암이다. 일부 구현예에서, 암은 소아암이다. 일부 구현예에서, 암은 췌장암, 결장암, 난소암, 전립선암, 폐암, 중피종, 유방암, 요로상피암, 간암, 두경부암, 육종, 자궁경부암, 위암, 위암, 흑색종, 포도막 흑색종, 담관암종, 다발성 골수종, 백혈병, 림프종 및 교모세포종이다.

[0116] [0103] 일부 구현예에서, 건강 상태는 고형 종양 암, 비-고형 종양 암 및 혈액 악성종양으로 구성된 군으로부터 선택된 증식성 장애이다. 예시적인 암은 거대 B-세포 림프종(LBCL), B-세포 급성 림프구성 백혈병(B-ALL), T-세포 급성 림프구성 백혈병(T-ALL), 급성 림프구성 백혈병(ALL), 만성 골수성 백혈병(CML), 만성 림프구성 백혈병(CLL), B 세포 전골수구성 백혈병, 모세포 형질세포양 수지상 세포 신생물, 버킷 림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종, 소포 림프종, 털세포 백혈병, 소세포- 또는 대세포-소포 림프종, 악성 림프증식성 질환, MALT 림프종, 외투 세포 림프종(MCL), 변연부 림프종, 다발성 골수종, 골수이형성 및 골수이형성 증후군, B 세포 비호지킨 림프종(NHL), 호지킨 림프종(HL), 형질모세포 림프종, 형질세포양 수지상 세포 신생물, 및 발덴스트롬 마크로글로불린혈증을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 일 구현예에서, 암은 ALL이다. 또 다른 구현예에서, 암은 CLL이다. 구현예에서, 암은 CD19 발현과 관련이 있다.

[0117] [0104] 일부 구현예에서, 암은 비호지킨 림프종, 버킷 림프종, 소림프구성 림프종, 거대 B-세포 림프종(LBCL), 원발성 삼출 림프종, 미만성 거대 B-세포 림프종, 비장 변연부 림프종, MALT(점막-관련 림프양 조직) 림프종, 털세포 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, B-세포 전림프구성 백혈병, B 세포 림프종(예를 들어, 다양한 형태의 호지킨병), B 세포 비호지킨 림프종(NHL), 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), B 세포 만성 림프구성 백혈병(BCLL), 털세포 백혈병, 만성 근모세포 백혈병 및 골수종으로 구성된 군으로부터 선택되는 B-세포 악성종양이다.

[0118] [0105] 일부 구현예에서, 암은 다중 약물 내성 암 또는 재발성 암이다. 본원에 개시된 조성물 및 방법은 비-전이성 암 및 전이성 암 둘 모두에 적합한 것으로 고려된다. 따라서, 일부 구현예에서, 암은 비-전이성 암이다. 일부 다른 구현예에서, 암은 전이성 암이다. 일부 구현예에서, 개체에 투여되는 조성물은 개체에서 암의 전이를 억제한다. 일부 구현예에서, 투여된 CAR-T 세포 요법은 개체에서 종양 성장을 억제한다.

[0119] [0106] 예를 들어, 일부 구현예에서, 개체에게 투여되는 CAR-T 세포 요법은 개체에서 전이성 결절을 감소시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 투여된 CAR-T 세포 요법은 개체에서 종양 성장을 억제한다.

[0120] [0107] 일부 구현예에서, 투여된 CAR-T 세포는 표적 암 세포의 증식을 억제하고/거나 개체에서 암의 종양 성장을 억제한다. 예를 들어, 표적 세포의 증식이 감소하거나, 병리학적 또는 병원성 거동이 감소하거나, 파괴되거나 사멸되는 등의 경우에, 표적 세포가 억제될 수 있다. 억제는 적어도 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90% 또는 약 95%의 측정된 병리학적 또는 병원성 거동의 감소를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 개체에게 본원에 기재된 유효 수의 CAR-T 세포를 투여하는 것을 포함하며, 여기서 투여된 CAR-T 세포는 CAR-T 세포 요법이 투여되지 않은 대상체에서의 표적 세포의 증식 및/또는 표적 암의 종양 성장과 비교하여 개체에서 표적 세포의 증식을 억제하고/거나 표적 암의 종양 성장을 억제한다.

[0121] [0108] 본원에 기재된 CAR-T 세포 요법, 예를 들어, 조작된 CAR-T 세포의 투여는 면역 반응의 자극에 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 조작된 CAR-T 세포 중 하나 이상은 화학요법에 의한 암의 관해 유도 후, 또는 자가 또는 동종이계 조혈 줄기 세포 이식 후 개체에게 투여된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 조성물은 본원에 기재된 치료 조성물 중 하나가 투여되지 않은 대상체에서의 분자의 생산에 비해 치료되는 대상체에서 인터페론 감마(IFNɣ), 종양-괴사 인자 알파(TNFα) 및/또는 인터루킨-2(IL-2)의 생산을 증가시킬 필요가 있는 개체에게 투여된다.

[0122] [0109] 본원에 기재된 CAR-T 세포 요법, 예를 들어, 조작된 CAR-T 세포의 유효량은 의도된 목표, 예를 들어, 암 퇴행에 기초하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 기존 암을 치료하는 경우, 투여될 본원에 기재된 조성물의 양은 조성물의 투여가 암의 예방을 위한 경우보다 클 수 있다. 당업자는 본 개시를 고려하여 투여될 조성물의 양 및 투여 빈도를 결정할 수 있을 것이다. 치료 횟수 및 용량 둘 모두에 따라, 투여되는 양은 또한 치료되는 개체, 개체의 상태 및 원하는 보호에 따라 달라진다. 조성물의 정확한 양은 또한 의사의 판단에 의존하며 각 대상체에 고유하다. 투여 빈도는 의사의 판단에 따라 1-2일 내지 2-6시간, 6-10시간, 1-2주 또는 그 이상의 범위일 수 있다.

[0123] [0110] 투여될 조성물의 양의 결정은 당업자에 의해 이루어질 것이고, 부분적으로 암의 정도 및 중증도, 및 조작된 CAR-T 세포가 기존 암의 치료 또는 암의 예방을 위해 투여되고 있는지 여부에 의존적일 것이다. 예를 들어, 목적이 예방인 경우, 투여 사이에 더 긴 간격 및 더 적은 양의 조성물이 사용될 수 있다. 예를 들어, 용량 당 투여되는 조성물의 양은 활성 질환의 치료에서 투여되는 용량의 50%일 수 있고, 투여는 매주 간격일 수 있다. 당업자는 본 개시에 비추어, 조성물의 유효량 및 투여 빈도를 결정할 수 있을 것이다. 이러한 결정은 부분적으로 존재하는 특정 임상 상황(예를 들어, 암의 유형, 암의 중증도)에 의존할 것이다.

[0124] [0111] 일부 구현예에서, 치료되는 개체, 예를 들어, 환자에게 본원에 개시된 조성물의 연속 공급을 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 일부 구현예에서, 관심 영역(예를 들어, 종양)의 연속 관류가 적합할 수 있다. 관류를 위한 기간은 특정 대상체 및 상황에 대해 임상의가 선택할 것이나, 시간은 약 1-2 시간 내지 2-6시간, 약 6-10시간, 약 10-24시간, 약 1-2일, 약 1-2주 또는 그 이상의 범위일 수 있다. 일반적으로, 연속 관류를 통한 조성물의 용량은 그 용량이 투여되는 기간 동안 조정된 단일 또는 다중 주사에 의해 제공되는 용량과 동일할 것이다.

[0125] [0112] 일부 구현예에서, 투여는 정맥내 주입에 의한 것이다. 본원에 기재된 조작된 CAR-T 세포의 유효량은 의도된 목표, 예를 들어, 종양 퇴행에 기초하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 기존 암을 치료하는 경우, 투여될 세포의 수는 본원에 기재된 조작된 CAR-T 세포의 투여가 암의 예방을 위한 경우보다 클 수 있다. 당업자는 본 개시를 고려하여 투여될 세포의 수 및 투여 빈도를 결정할 수 있을 것이다. 치료 횟수 및 용량 둘 모두에 따라, 투여되는 양은 또한 치료되는 개체, 개체의 상태 및 원하는 보호에 따라 달라진다. 치료 조성물의 정확한 양은 또한 의사의 판단에 의존하며 각 개체에 고유하다. 투여 빈도는 의사의 판단에 따라 1-2일 내지 2-6시간, 6-10시간, 1-2주 또는 그 이상의 범위일 수 있다. 일반적으로, 연속 관류를 통한 치료 조성물의 용량은 그 용량이 투여되는 기간 동안 조정된 단일 또는 다중 주사에 의해 제공되는 용량과 동일할 것이다.

[0126] 추가 요법

[0127] [0113] 상기 논의된 바와 같이, 본원에 기재된 바와 같은 CAR-T 세포 요법 중 임의의 하나는, 예를 들어, 단일 요법(예를 들어, 단일요법)으로서 이를 필요로 하는 개체에게 투여될 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, 본 개시의 일부 구현예에서, 본원에 기재된 CAR-T 세포 요법 중 하나 이상은 하나 이상의 추가 요법, 예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4 또는 5개의 추가 요법과 조합하여 개체에게 투여될 수 있다. 본원에 기재된 CAR-T 세포 요법과 조합하여 투여되는 적합한 요법은 화학요법, 방사선요법, 면역요법, 호르몬 요법, 독소 요법, 표적 요법 및 수술을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 다른 적합한 요법은 치료제, 예를 들어, 화학요법제, 항암제 및 항암 요

법을 포함한다.

[0128] [0114] 면역 반응, 종양형성 및 다른 질병 상태와 관련된 세포 과정에서 CD2/CD58 경로의 관여로 인해, 본원에 기재된 바와 같은 CAR-T 세포 요법 중 임의의 하나는, 예를 들어, 이 경로를 표적화하는 하나 이상의 치료제와 함께 이를 필요로 하는 개체에게 투여될 수 있다. 예를 들어, CD2 활성을 조절하는 분자는 (1) 자가면역 장애, 예를 들어, 다발성 경화증; (2) 다양한 형태의 관절염; 동종이식 거부; 천식; 크론병을 포함하는 장의 염증성 질환; 건선과 같은 다양한 피부병 상태; 기타 등등과 같은 염증성 또는 T 세포-매개 성분을 갖는 다양한 염증성 질환 또는 장애; 및 (3) 다양한 암 및 종양에 대한 활성을 갖는 면역억제제 및/또는 항염증제 및/또는 항암제일 수 있다.

[0129] [0115] 하나 이상의 추가 요법과 "조합하여" 투여하는 것은 동시(공존) 및 임의의 순서로 연속 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가 요법은 화학요법, 방사선요법, 면역요법, 호르몬 요법, 독소 요법 및 수술로 구성된 군으로부터 선택된다. 본원에서 사용되는 용어 화학요법은 항암제를 포함한다. 다양한 부류의 항암제가 본원에 개시된 방법에 적합하게 사용될 수 있다. 항암제의 비제한적인 예는 알킬화제, 항대사물질, 안트라사이클린, 식물 알칼로이드, 토포이소머라제 억제제, 포도필로톡신, 항체(예를 들어, 모노클로날 또는 폴리클로날), 티로신 키나제 억제제(예를 들어, 이마티닙 메실레이트(Gleevec® 또는 Glivec®)), 호르몬 치료, 가용성 수용체 및 다른 항신생물제를 포함한다.

[0130] [0116] 토포이소머라제 억제제는 또한 본원에서 사용될 수 있는 또 다른 부류의 항암제이다. 토포이소머라제는 DNA의 토폴로지를 유지하는 필수 효소일 수 있다. 타입 I 또는 타입 II 토포이소머라제의 억제는 적절한 DNA 수퍼코일링을 뒤집음으로써 DNA의 전사 및 복제 둘 모두를 방해한다. 일부 타입 I 토포이소머라제 억제제는 캄프토테신, 예를 들어, 이리노테칸 및 토포테칸을 포함한다. 타입 II 억제제의 예는 암사크린, 에토포시드, 에토포시드 포스페이트 및 테니포시드를 포함한다. 이들은 어메리칸 메이애플(American Mayapple)(포도필룸 펠타툼(*Podophyllum peltatum*))의 뿌리에서 자연적으로 발생하는 알칼로이드인 에피포도필로톡신의 반합성 유도체이다.

[0131] [0117] 항신생물제는 면역억제제 닥티노마이신, 독소루비신, 에피루비신, 블레오마이신, 메클로레타민, 사이클로포스파미드, 클로람부실, 이포스파미드를 포함한다. 항신생물 화합물은 일반적으로 세포의 DNA를 화학적으로 변형시킴으로써 작동한다.

[0132] [0118] 알킬화제는 세포에 존재하는 조건 하에 많은 친핵성 작용기를 알킬화할 수 있다. 시스플라틴 및 카보플라틴 및 옥살리플라틴은 알킬화제이다. 이들은 생물학적으로 중요한 분자에서 아미노, 카르복실, 설프하이드릴 및 포스페이트 기와 공유 결합을 형성함으로써 세포 기능을 손상시킨다.

[0133] [0119] 빈카 알칼로이드는 튜불린의 특정 부위에 결합하여 튜불린이 미세소관으로 조립되는 것을 억제한다(세포 주기의 M 단계). 빈카 알칼로이드는 빈크리스틴, 빈블라스틴, 비노렐빈 및 빈데신을 포함한다.

[0134] [0120] 항대사산물은 퓨린(아자티오프린, 메르캅토퓨린) 또는 피리미딘과 유사하며 이러한 물질이 세포 주기의 "S" 단계 동안 DNA에 혼입되는 것을 방지하여 정상적인 발달 및 분열을 중단시킨다. 항대사산물은 또한 RNA 합성에 영향을 미친다.

[0135] [0121] 식물 알칼로이드 및 테르페노이드는 식물로부터 얻어지며 미세소관 기능을 방지함으로써 세포 분열을 차단한다. 미세소관은 세포 분열에 필수적이기 때문에, 이들 없이는 세포 분열이 일부 경우에 일어날 수 없다. 주요 예는 빈카 알칼로이드 및 탁산이다.

[0136] [0122] 포도필로톡신은 소화를 돕고 두 가지 다른 세포 증식 억제제인 에토포시드 및 테니포시드를 생산하는데 사용되는 것으로 보고된 식물 유래 화합물이다. 이들은 세포가 G1 단계(DNA 복제 시작) 및 DNA 복제(S 단계)로 들어가는 것을 막는다.

[0137] [0123] 그룹으로서의 탁산은 파클리탁셀 및 도세탁셀을 포함한다. 파클리탁셀은 원래 탁솔로 알려진 천연 생성물이며 태평양 주목(Pacific Yew tree)의 껍질에서 처음 유래되었다. 도세탁셀은 파클리탁셀의 반합성 유사체이다. 탁산은 미세소관의 안정성을 향상시켜 후기 동안 염색체의 분리를 방지한다.

[0138] [0124] 일부 구현예에서, 항암제는 레미케이드, 도세탁셀, 셀레콕시브, 멜팔란, 덱사메타손(Decadron®), 스테로이드, 젬시타빈, 시스플라티넘, 테모졸로미드, 에토포시드, 사이클로포스파미드, 테모다르, 카보플라틴, 프로카바진, 글리아델, 타목시펜, 토포테칸, 메토트렉세이트, 게피티닙(Iressa®), 탁솔, 탁소테레, 플루오로우라실, 류코보린, 이리노테칸, 젤로다, CPT-11, 인터페론 알파, 페길화된 인터페론 알파(예를 들어,

PEG INTRON-A), 카페시타빈, 시스플라틴, 티오테파, 플루다라빈, 카보플라틴, 리포솜 다우노루비신, 시타라빈, 독세탁솔, 파클리탁셀, 빈블라스틴, IL-2, GM-CSF, 다카르바진, 비노렐빈, 졸레드론산, 팔미트로네이트, 바이악신, 부술판, 프레드니손, 보르테조밉(Velcade®), 비스포스포네이트, 비소 트리옥사이드, 빈크리스틴, 독소루비신(Doxil®), 파클리탁셀, 간시클로버, 아드리아마이신, 에스트라이누스틴 소듐 포스페이트(Emcyt®), 술린닥, 에토포시드, 및 이들의 임의의 조합으로부터 선택될 수 있다.

[0139] [0125] 다른 구현예에서, 항암제는 보르테조밉, 사이클로포스파미드, 덱사메타손, 독소루비신, 인터페론-알파, 레날리도미드, 멜팔란, 페길화된 인터페론-알파, 프레드니손, 탈리도미드 또는 빈크리스틴으로부터 선택될 수 있다.

[0140] [0126] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 치료 방법은 면역요법을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 면역요법은 하나 이상의 체크포인트 억제제의 투여를 포함한다. 따라서, 본원에 기재된 치료 방법의 일부 구현예는 하나 이상의 면역 체크포인트 분자를 억제하는 화합물의 투여를 추가로 포함한다. 면역 체크포인트 분자의 비제한적인 예는 CTLA4, PD-1, PD-L1, A2AR, B7-H3, B7-H4, TIM3 및 이들의 임의의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 면역 체크포인트 분자를 억제하는 화합물은 길항 항체를 포함한다. 본원에 개시된 조성물 및 방법에 적합한 길항 항체의 예는 이필리무맙, 니볼루맙, 펨브롤리주맙, 두르발루맙, 아테졸리주맙, 트레멜리무맙 및 아벨루맙을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0141] [0127] 일부 양태에서, 하나 이상의 항암 요법은 방사선 요법이다. 일부 구현예에서, 방사선 요법은 암 세포를 죽이기 위한 방사선의 투여를 포함할 수 있다. 방사선은 DNA와 같은 세포의 분자와 상호작용하여 세포 사멸을 유도한다. 방사선은 또한 세포막과 핵막 및 다른 소기관을 손상시킬 수 있다. 방사선 유형에 따라, DNA 손상 메커니즘은 상대적인 생물학적 효과와 마찬가지로 다양할 수 있다. 예를 들어, 무거운 입자(즉, 양성자 및 중성자)는 DNA를 직접 손상시키고 더 큰 상대적인 생물학적 효과를 갖는다. 전자기 방사선은 주로 세포 수의 이온화에 의해 생성되는 수명이 짧은 하이드록실 자유 라디칼을 통해 작용하는 간접 이온화를 초래한다. 방사선의 임상적 적용은 (외부 공급원으로부터의) 외부 빔 방사선 및 (환자에게 이식되거나 삽입된 방사선 공급원을 사용하는) 근접치료로 구성된다. 외부 빔 방사선은 X-선 및/또는 감마선으로 구성되는 반면, 근접치료는 감마선과 함께 알파 입자 또는 베타 입자를 붕괴 및 방출하는 방사성 핵을 사용한다. 본원에서 또한 고려되는 방사선은, 예를 들어, 암 세포로의 방사성 동위 원소의 지시된 전달을 포함한다. 마이크로파 및 UV 조사와 같은 다른 형태의 DNA 손상 인자도 본원에서 고려된다.

[0142] [0128] 방사선은 단일 선량으로 또는 선량-분할 일정에 따라 일련의 소량 선량으로 제공될 수 있다. 본원에서 고려되는 방사선의 양은, 예를 들어, 약 5 내지 약 80, 약 10 내지 약 50 Gy 또는 약 10 Gy를 포함하는 약 1 내지 약 100 Gy의 범위이다. 총 선량은 분할된 요법으로 적용될 수 있다. 예를 들어, 요법은 2 Gy의 분할된 개별 선량을 포함할 수 있다. 방사성 동위 원소의 투여량 범위는 매우 다양하며 동위 원소의 반감기와 방출되는 방사선의 강도 및 유형에 좌우된다. 방사선이 방사성 동위 원소의 사용을 포함하는 경우, 동위 원소는 표적 조직(예를 들어, 종양 조직)으로 방사성뉴클레오티드를 운반하는 치료 항체와 같은 표적화제에 컨쥬게이션될 수 있다.

[0143] [0129] 본원에 기재된 수술은 암성 조직의 전부 또는 일부가 물리적으로 제거, 적출 및/또는 파괴되는 절제를 포함한다. 종양 절제는 종양의 적어도 일부를 물리적으로 제거하는 것을 의미한다. 종양 절제 외에도, 수술에 의한 치료는 레이저 수술, 냉동외과수술, 전기수술 및 현미경 제어 수술(Mohs 수술)을 포함한다. 전암 또는 정상 조직의 제거도 본원에서 고려된다.

[0144] [0130] 따라서, 일부 구현예에서, 본 개시의 방법은 본원에 기재된 CAR-T 세포 요법을 단일 요법(예를 들어, 단일요법)으로서 대상체에게 개별적으로 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 개시의 CAR-T 세포 요법은 제2 요법과 조합된 제1 요법으로서 개체에게 투여된다. 일부 구현예에서, 제2 요법은 화학요법, 방사선요법, 면역요법, 호르몬 요법, 독소 요법 및 수술로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 제1 요법 및 제2 요법은 동시에 투여된다. 일부 구현예에서, 제1 요법은 제2 요법과 동시에 투여된다. 일부 구현예에서, 제1 요법 및 제2 요법은 순차적으로 투여된다. 일부 구현예에서, 제1 요법은 제2 요법 전에 투여된다. 일부 구현예에서, 제1 요법은 제2 요법 후에 투여된다. 일부 구현예에서, 제1 요법은 제2 요법 전 및/또는 후에 투여된다. 일부 구현예에서, 제1 요법 및 제2 요법은 교대로 투여된다. 일부 구현예에서, 제1 요법 및 제2 요법은 단일 제형으로 함께 투여된다.

[0145] *개체에게 CAR-T 세포의 투여*

[0146] [0131] 일부 구현예에서, 본 개시의 방법은 본원에 기재된 유효량 또는 수의 조작된 CAR-T 세포를 이를 필요로

하는 개체에게 투여하는 것을 포함한다. 이 투여 단계는 당업계의 임의의 이식 전달 방법을 사용하여 달성될 수 있다. 예를 들어, 조작된 CAR-T 세포는 개체의 혈류에 직접 주입되거나 달리 개체에게 투여될 수 있다.

[0147] [0132] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 방법은 원하는 효과(들)가 생성되도록 원하는 부위에서 도입된 세포의 적어도 부분적인 국소화를 초래하는 방법 또는 경로에 의해, 조작된 CAR-T 세포를 개체에게 투여하는 것을 포함하며, 이 용어는 "도입하는", 삽입하는" 및 "이식하는"이라는 용어와 상호교환적으로 사용된다. 조작된 CAR-T 세포 또는 이들의 분화된 자손은 개체에서 원하는 위치로 전달되는 임의의 적절한 경로에 의해 투여될 수 있으며 여기서 투여된 세포 또는 세포의 성분의 적어도 일부는 생존 가능한 상태로 유지된다. 개체에 투여된 후 세포의 생존 기간은 수 시간, 예를 들어, 24시간 내지 수일만큼 짧거나, 수년만큼 길거나 또는 심지어 개체의 평생, 예를 들어, 장기적 생착일 수 있다.

[0148] [0133] 예방적으로 제공되는 경우, 본원에 기재된 조작된 CAR-T 세포는 치료되는 질병 또는 건강 상태의 임의의 증상 전에 개체에게 투여될 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 조작된 CAR-T 세포 집단의 예방적 투여는 질병 또는 건강 상태의 증상의 발생을 예방한다.

[0149] [0134] 일부 구현예에서 치료적으로 제공되는 경우, 조작된 CAR-T 세포는 질병 또는 건강 상태의 증상 또는 징후의 발병 시에(또는 그 후에), 예를 들어, 질병 또는 건강 상태의 발병 시에 제공된다.

[0150] [0135] 본원에 기재된 다양한 구현예에서 사용하기 위해, 본원에 기재된 바와 같은 조작된 CAR-T 세포의 유효량은 적어도 10^2개 세포, 적어도 5 × 10^2개 세포, 적어도 10^3개 세포, 적어도 5 × 10^3개 세포, 적어도 10^4개 세포, 적어도 5 × 10^4개 세포, 적어도 10^5개 세포, 적어도 2 × 10^5개 세포, 적어도 3 × 10^5개 세포, 적어도 4 × 10^5개 세포, 적어도 5 × 10^5개 세포, 적어도 6 × 10^5개 세포, 적어도 7 × 10^5개 세포, 적어도 8 × 10^5개 세포, 적어도 9 × 10^5개 세포, 적어도 1 × 10^6개 세포, 적어도 2 × 10^6개 세포, 적어도 3 × 10^6개 세포, 적어도 4 × 10^6개 세포, 적어도 5 × 10^6개 세포, 적어도 6 × 10^6개 세포, 적어도 7 × 10^6개 세포, 적어도 8 × 10^6개 세포, 적어도 9 × 10^6개 세포 또는 이들의 배수일 수 있다.

[0151] [0136] 일부 구현예에서, 조작된 CAR-T 세포는 치료를 필요로 하는 개체에 대해 비-자가 세포이다. 일부 구현예에서, 입양 세포 요법은 동종이계 입양 세포 요법이다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 조작된 CAR-T 세포는 치료를 필요로 하는 개체에 대해 동종이계 세포이다. 동종이계 입양 세포 요법에서, 조작된 CAR-T 세포는 입양 세포 요법을 받는 개체로부터 유래되지 않는다. 동종이계 세포 요법은 일반적으로 T 세포를 제공하는 개체(공여자)가 세포 요법을 받는 개체와 상이한 개체(동일 종의)인 요법을 지칭한다. 예를 들어, 개체에게 투여되는 조작된 CAR-T 세포의 집단은 1명 이상의 혈연이 아닌 공여자, 또는 1명 이상의 동일하지 않은 형제자매로부터 유래된다. 따라서, 조작된 CAR-T 세포는 1명 이상의 공여자로부터 유래될 수 있거나 자가 공급원으로부터 수득될 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된 CAR-T 세포는 이를 필요로 하는 개체에 투여하기 전에 배양액에서 확장된다.

[0152] [0137] 일부 구현예에서, 방법 또는 경로에 의해 개체로의 세포 조성물(예를 들어, 본원에 기재된 복수의 조작된 CAR-T 세포를 포함하는 조성물)의 전달은 원하는 부위에서 세포 조성물의 적어도 부분적인 국소화를 초래한다. 조작된 CAR-T 세포를 포함하는 조성물은 개체에서 효과적인 치료를 초래하는 임의의 적절한 경로에 의해 투여될 수 있으며, 예를 들어, 투여는 개체의 원하는 위치로의 전달을 초래하며, 여기서 전달된 조성물의 적어도 일부, 예를 들어, 적어도 1 × 10^4개 세포가 일정 기간 동안 원하는 부위로 전달된다. 투여 방식은 주사, 주입, 점적을 포함한다. 주사는 비제한적으로 정맥내, 근육내, 동맥내, 척수강내, 심실내, 관절낭내, 안와내, 심장내, 피내, 복강내, 경기관내, 피하, 피부밑, 관절내, 피막하, 지주막하, 척추내, 뇌척수내 및 흉골내 주사 및 주입을 포함한다. 일부 구현예에서, 경로는 정맥내이다. 세포의 전달을 위해, 주사 또는 주입에 의한 전달은 종종 표준 투여 방식으로 간주된다.

[0153] [0138] 일부 구현예에서, 조작된 CAR-T 세포는, 예를 들어, 주입 또는 주사를 통해 전신 투여된다. 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 조작된 CAR-T 세포의 집단은 표적 부위, 조직 또는 기관에 직접 투여되는 것이 아니라 개체의 순환계로 들어가고, 이에 따라 대사 및 다른 유사한 생물학적 과정을 거치게 된다.

[0154] [0139] 질병 또는 건강 상태의 예방 또는 치료를 위해 본원에 제공된 임의의 조성물을 포함하는 치료의 효능은 숙련된 임상의에 의해 결정될 수 있다. 그러나, 당업자는 질병의 징후 또는 증상 또는 마커 중 임의의 하나 또는 전부가 나아지거나 개선되는 경우 예방 또는 치료가 효과적인 것으로 간주된다는 것을 이해할 것이다. 효능

은 또한 감소된 입원 또는 의학적 개입의 필요성(예를 들어, 질병의 진행이 중단되거나 적어도 느려짐)에 의해 평가되는 바와 같이 개체가 악화되지 않는 것으로 측정될 수 있다. 이들 지표를 측정하는 방법은 당업자에게 공지되어 있고/있거나 본원에 기재된다. 치료는 개체 또는 동물(일부 비제한적인 예는 인간 또는 포유동물을 포함함)에서 질병의 임의의 치료를 포함하고, (1) 질병 억제, 예를 들어, 증상의 진행을 정지시키거나 늦추는 것; 또는 (2) 질병 경감, 예를 들어, 증상의 퇴행을 야기하는 것; 및 (3) 증상 발생의 가능성을 예방하거나 감소시키는 것을 포함한다.

[0155] [0140] 효능 정도의 측정은 치료되는 질환 및 경험되는 증상과 관련하여 선택된 파라미터에 기초한다. 일반적으로, 의료계에서 허용되거나 사용되는 파라미터와 같이 질병의 정도 또는 중증도와 상관관계가 있는 것으로 알려져 있거나 허용되는 파라미터가 선택된다. 예를 들어, 고형암의 치료에서, 적합한 파라미터는 전이의 수 및/또는 크기의 감소, 무진행 생존의 개월 수, 전체 생존, 질병의 단계 또는 등급, 질병 진행 속도, 진단용 바이오마커의 감소(예를 들어, 비제한적으로, 순환 종양 DNA 또는 RNA의 감소, 순환 무세포 종양 DNA 또는 RNA의 감소 등) 및 이들의 조합을 포함할 수 있다. 유효 용량 및 효능의 정도는 일반적으로 단일 대상체 및/또는 대상체의 그룹 또는 집단과 관련하여 결정될 것임이 이해될 것이다. 본 개시의 치료 방법은 증상 및/또는 질병 중증도 및/또는 질병 바이오마커를 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%만큼 감소시킨다.

[0156] [0141] 상기 논의된 바와 같이, 약학적 조성물의 치료적 유효량은 질병 또는 건강 상태를 갖거나, 가질 것으로 의심되거나, 가질 위험이 있는 개체와 같은 개체에게 투여될 때 특정 유리한 효과를 촉진시키기에 충분한 약학적 조성물의 양일 수 있다. 일부 구현예에서, 유효량은 질병 또는 건강 상태의 증상 발생을 예방 또는 지연시키거나, 질병 또는 건강 상태의 증상 진행을 변경시키거나(예를 들어, 비제한적으로, 질병의 증상 진행을 늦추는 것), 질병 또는 건강 상태의 증상을 역전시키기에 충분한 양을 포함한다. 임의의 주어진 경우에 대해, 적절한 유효량은 일상적인 실험을 사용하여 당업자에 의해 결정될 수 있음이 이해된다.

[0157] 키트

[0158] [0142] 또한, 개체에서 건강 상태의 진단 및/또는 치료를 위한 방법을 포함하는, 본원에 기재된 하나 이상의 방법의 실시를 위한 키트가 본원에 제공된다. 일반적으로, 본 개시의 키트는 (i) 생물학적 샘플에서 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물의 하나 이상의 분자 변경의 존재 및/또는 부재를 평가하기 위한 시약, 및 (ii) 키트를 사용하기 위한 설명서를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 개시의 일부 구현예는 CAR-T 세포 요법에 대한 개체의 반응성을 결정하기 위한 키트를 제공한다. 본 개시의 일부 구현예는 CAR-T 세포 요법에 대해 증가된 무반응성을 갖는 개체를 확인하기 위한 키트를 제공한다. 본 개시의 일부 구현예는 개체에서 CAR-T 세포 요법의 치료 효능을 최적화하기 위한 키트를 제공한다. 본 개시의 일부 구현예는 CAR-T 세포 요법을 개체에게 투여하기 위한 키트를 제공한다.

[0159] [0143] 일부 구현예에서, 키트는 검출 시약과 개체로부터의 생물학적 샘플의 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 상호작용을 검출하기 위한 검출 시약을 포함한다.

[0160] [0144] 일부 구현예에서, 사용 설명서는 CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경 중 적어도 하나가 샘플에서 검출되는 경우, 개체가 CAR-T 세포 요법을 사용한 치료에 대해 감소된 반응성을 갖는 것으로 확인하는 것을 제공한다. 일부 구현예에서, 사용 설명서는 (i) CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경 중 적어도 하나가 샘플에서 검출되는 경우, 개체가 CAR-T 세포 요법을 사용한 치료에 대해 증가된 무반응성을 갖는 것으로 선택하거나; (ii) CD58 활성의 하나 이상의 분자 변경 중 어느 것도 샘플에서 검출되지 않는 경우, 개체가 CAR-T 세포 요법을 사용한 치료에 대해 증가된 무반응성을 갖지 않는 것으로 선택하는 것을 제공한다. 일부 구현예에서, 사용 설명서는 검출 시약과 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 검출된 상호작용에 기반하여 치료적 유효량의 CAR-T 세포 요법을 확인하기 위한 설명서를 포함한다. 일부 구현예에서, 사용 설명서는 검출 시약과 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물 사이의 검출된 상호작용에 기반하여 치료적 유효량의 CAR-T 세포 요법을 투여하기 위한 설명서를 포함한다.

[0161] [0145] 일부 구현예에서, 키트는 추출 완충제/시약 및 프로토콜, 증폭 완충제/시약 및 프로토콜, 하이브리드화 완충제/시약 및 프로토콜, 및 표지화 완충제/시약 및 프로토콜 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다.

[0162] [0146] 예를 들어, 임의의 상기 기재된 키트는 하나 이상의 추가 시약을 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 이러한 추가 시약은 희석 완충제; 재구성 용액, 세척 완충제, 대조군 시약, 대조군 발현 벡터, 음성 대조군 T-세포 집단, 양성 대조군 T-세포 집단, T-세포 집단의 생체 외 생산을 위한 시약으로부터 선택될 수 있다.

[0163] [0147] 일부 구현예에서, 본 개시의 키트는 CAR-T 세포 요법을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는데 사용되는 하나 이상의 주사기(미리 충전된 주사기 포함) 및/또는 카테터(미리 충전된 주사기 포함)를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 원하는 목적을 위해, 예를 들어, 표적 암 세포를 억제하거나, 이를 필요로 하는 개체에서 건강 상태를 치료하기 위해 다른 키트 성분과 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있는 하나 이상의 추가 치료제를 가질 수 있다.

[0164] [0148] 일부 구현예에서, 키트의 성분은 별도의 용기에 있을 수 있다. 일부 다른 구현예에서, 키트의 성분은 단일 용기에서 조합될 수 있다.

[0165] [0149] 일부 구현예에서, 키트는 상기 방법을 실시하기 위해 키트의 성분을 사용하기 위한 설명서를 추가로 포함할 수 있다. 상기 방법을 실시하기 위한 설명서는 일반적으로 적합한 기록 매체에 기록된다. 예를 들어, 설명서는 종이 또는 플라스틱 등과 같은 기재 상에 인쇄될 수 있다. 설명서는 패키지 삽입물로서 키트에, 키트의 용기 또는 이의 구성요소의 라벨링(예를 들어, 패키징 또는 서브-패키징과 관련됨) 등에 존재할 수 있다. 설명서는 적합한 컴퓨터 판독 가능 저장 매체, 예를 들어, CD-ROM, 디스켓, 플래시 드라이브 등에 존재하는 전자 저장 데이터 파일로서 존재할 수 있다. 일부 경우에, 실제 설명서는 키트에 존재하지 않지만, 원격 소스(예를 들어, 인터넷을 통해)로부터 설명서를 얻기 위한 수단이 제공될 수 있다. 이 구현예의 예는 설명서를 볼 수 있고/있거나 설명서를 다운로드할 수 있는 웹 주소를 포함하는 키트이다. 설명서와 마찬가지로, 설명서를 얻기 위한 이러한 수단은 적합한 기재에 기록될 수 있다.

[0166] 유전자-기반 시스템

[0167] [0150] 본원에 기재된 바와 같은 건강 상태의 진단 및 치료를 위한 방법은 다양한 하드웨어 구성요소를 사용하여 구현될 수 있다. 이 섹션에서, 이러한 구성요소의 예가 설명된다. 그러나, 일반적으로, 본원에 논의된 다양한 단계 및 기술은 다양한 상이한 장치 및 시스템 구성요소를 사용하여 수행될 수 있으며, 이들 모두가 명시적으로 기재된 것은 아님이 이해되어야 한다.

[0168] [0151] 또 다른 양태에서, 본 개시의 일부 구현예는 건강 상태의 진단 및/또는 치료를 위한 시스템에 관한 것이고, 상기 시스템은 a) 로직 프로세서; 및 b) 프로세서에 의해 실행될 때 본 개시에 따른 건강 상태의 진단 및/또는 치료 방법을 수행하기 위한 동작들을 제공하는, 로직 프로세서에 의해 실행 가능한 저장된 프로그램 코드를 포함한다. 일부 구현예에서, 시스템은 (a) 로직 프로세서; 및 (b) 프로세서에 의해 실행될 때 다음 중 하나 이상을 수행하기 위한 동작들을 제공하는, 로직 프로세서에 의해 실행 가능한 저장된 프로그램 코드를 포함한다: (i) CAR-T 세포 요법에 대한 개체의 반응성 결정; (ii) 개체가 CAR-T 세포 요법을 사용한 치료에 대해 증가된 무반응성을 갖는 것으로 확인; (iii) 개체에서 CAR-T 세포 요법의 치료 효능의 최적화; 및 (iv) 치료적 유효량의 CAR-T 세포 요법을 계산하거나 개체에게 투여.

[0169] [0152] 본 개시의 시스템의 비제한적인 예시적인 구현예는 하기 특징 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 시스템은 로직 프로세서에 통신 가능하게 커플링된 보고서 엔진을 추가로 포함하고, 여기서 보고서 엔진에 의해 생성된 보고서는 프로그램 코드의 실행으로부터의 결과에 의존하고, 프로그램 코드는 미리 선택된 데이터 입력 세트에 적어도 부분적으로 기초하여 CAR-T 세포 요법에 대한 개체의 반응성에 대한 상대적 점수를 할당하기 위해 개체로부터 수득된 생물학적 물질에서 CD58-인코딩 유전자 또는 이의 생성물의 하나 이상의 분자 변경의 존재 및/또는 부재에 관한 미리 선택된 데이터 입력 세트를 수신하도록 로직 프로세서를 구성하고, 선택적으로 (a) CAR-T 세포 요법에 대한 개체의 반응성을 결정하고/거나; (b) 개체가 CAR-T 세포 요법을 사용한 치료에 대해 증가된 무반응성을 갖는 것으로 확인하고/거나; (c) 개체에서 CAR-T 세포 요법의 치료 효능을 최적화한다.

[0170] [0153] 일부 구현예에서, 본 개시의 시스템은 CAR-T 세포 요법에 대해 증가된 무반응성을 갖는 것으로 확인된 개체와 관련된 및/또는 건강 상태의 치료에 효과적인 것으로 확인된 CAR-T 세포 요법과 관련된 정보를 포함하는 보고서를 생성하는 것을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 프로파일 보고서는 ".doc"; ".pdf"; ".xml"; ".html"; ".jpg"; ".aspx"; ".php" 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 인코딩을 갖는 것으로 특성화된다.

[0171] [0154] 또 다른 양태에서, 실행될 때 프로세서가 미리 선택된 데이터 입력 세트를 포함하는 보고서의 수신; 보고서에 적어도 부분적으로 기초하여, 확인된 CAR-T 세포 요법에 상대적 성능 점수의 할당; 및 할당된 성능 점수에 기초하여 CAR-T 세포 요법에 대한 보고서 출력을 포함하는 동작들을 수행하도록 하는 기계 실행 가능 명령어를 포함하는 비일시적 컴퓨터 판독 가능 매체가 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 실행될 때 프로세서가 미리

선택된 데이터 입력 세트를 포함하는 보고서의 수신; 보고서에 적어도 부분적으로 기초하여, 확인된 개체에 상대적 무반응 점수의 할당; 및 할당된 무반응 점수에 기초하여 개체에 대한 보고서 출력을 포함하는 동작들을 수행하도록 하는 기계 실행 가능 명령어를 포함하는 비일시적 컴퓨터 판독 가능 매체가 본원에 제공된다. 따라서, 본 개시의 시스템에 의해 생성된 CAR-T 세포 요법 보고서 및 개체 보고서가 또한 본 개시의 범위에 포함된다.

[0172] [0155] 본원에 기술된 양태 및 구현예는 각각 구현예 또는 양태의 문맥으로부터 명확하게 또는 명백하게 배제되지 않는 한, 함께 사용될 수 있다.

[0173] [0156] 본 개시에 언급된 모든 간행물 및 특허 출원은 각각의 개별적 간행물 또는 특허 출원이 참조로 포함되는 것으로 구체적이고 개별적으로 지시된 것과 동일한 정도로 본원에 참조로 포함된다.

[0174] [0157] 본원에 인용된 어떠한 참고문헌도 선행 기술을 구성하는 것으로 인정하는 것은 아니다. 참고문헌에 대한 논의는 저자가 주장하는 바를 나타내며, 본 출원인은 인용된 문서의 정확성과 적절성에 대해 이의를 제기할 권리를 지닌다. 비록 과학 저널 기사, 특허 문서 및 텍스트북을 포함하는 다수의 정보 소스가 본원에서 언급되지만, 이러한 언급이 임의의 이러한 문서가 당업계의 보통의 일반 지식의 일부를 형성한다고 인정하는 것은 아님이 명확하게 이해될 것이다.

[0175] [0158] 본원에 제공된 일반적인 방법에 대한 논의는 단지 예시를 위한 것이다. 다른 대안적인 방법 및 대안은 본 개시의 검토시 당업자에게 명백할 것이며, 본 출원의 사상 및 범위 내에 포함되어야 한다.

[0176] [0159] 추가 구현예는 예시의 방식으로 제공되고 본 개시 또는 청구 범위를 어떤 방식으로든 제한하지 않도록 의도된 하기 실시예에서 더욱 상세하게 개시된다.

[0177] 실시예

[0178] [0160] 본 발명의 실시는 달리 지시되지 않는 한, 당업자에게 잘 알려진 분자 생물학, 미생물학, 세포 생물학, 생화학, 핵산 화학 및 면역학의 통상적인 기술을 사용할 것이며, 이는 당업자에게 잘 알려져 있다. 이러한 기술은 문헌[Sambrook, J., & Russell, D. W. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4th ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory and Sambrook, J., & Russel, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory (jointly referred to herein as "Sambrook"); Ausubel, F. M. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York, NY: Wiley (including supplements through 2014); Bollag, D. M. et al. (1996). *Protein Methods*. New York, NY: Wiley-Liss; Huang, L. *et al*. (2005). *Nonviral Vectors for Gene Therapy*. San Diego: Academic Press; Kaplitt, M. G. *et al*. (1995). *Viral Vectors: Gene Therapy and Neuroscience Applications*. San Diego, CA: Academic Press; Lefkovits, I. (1997). *The Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques*. San Diego, CA: Academic Press; Doyle, A. *et al*. (1998). *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology*. New York, NY: Wiley; Mullis, K. B., Ferre, F. & Gibbs, R. (1994). *PCR: The Polymerase Chain Reaction*. Boston: Birkhauser Publisher; Greenfield, E. A. (2014). *Antibodies: A Laboratory Manual* (2nd ed.). New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; Beaucage, S. L. *et al*. (2000). *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*. New York, NY: Wiley, (including supplements through 2014); and Makrides, S. C. (2003). *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*. Amsterdam, NL: Elsevier Sciences B.V.]와 같은 문헌에 충분히 설명되어 있고, 이들의 개시는 본원에 참조로 포함된다.

[0179] [0161] 하기에 기재된 실험 결과는 CD58의 발현이 돌연변이되거나 손실된 종양을 갖는 LBCL 환자가 CD19 CAR-T 세포 요법으로부터 지속적인 이익을 얻을 가능성이 없음을 입증한다. 특히, CD58 돌연변이 및 단백질 손실은 이전에 LBCL에서 기술되었으며 면역 탈출 및 좋지 않은 환자 결과 둘 모두와 관련이 있었다. 하기 기재된 일부 실험에서, 종양 마이크로어레이를 IHC에 의해 염색한 후, CD58 상태를 확인하기 위해 순환 종양 DNA의 딥 시퀀싱 분석을 수행하였다. 어떤 방법도 CD58 변경의 모든 경우를 검출할 수 없으며, 이는 또한 특정 환자에서 이질적일 가능성이 있다. 종양 샘플로부터 CD58에 대한 게놈 DNA 및 RNA의 직접 시퀀싱은 환자 결과와 상관관계가 있는 추가 데이터를 제공할 수 있으며, 이는 이러한 연구에서 시험된 환자 시리즈에서 사용할 수 없었다. 이러한 연구에서 CD58 변경을 갖는 환자는 또한 더 젊고, 높은 저밀도 지단백질(LDH)을 갖는 거대 종양(bulky disease)을 가질 가능성이 더 높았다. 이러한 추가 위험 요소로부터 경쟁 기여도를 분리하기 위해 대규모의 예상 시리즈에 대한 추가 실험이 계획되고 있다. 또한, CD58이 반응과 상관관계가 있다는 실험적 발견은 단일 기관에서 치료된 환자로부터의 후향적 발견이다. 본원에 기재된 실험 결과는 CAR 기능성에 대한 CD58 발현의 중요성에 대

한 이종이식편 모델로부터 설득력 있는 증거를 제공하지만, 이 결과는 CD19 CAR 요법을 받는 LBCL 환자의 더 큰 전향적 시험으로부터 이익을 얻을 수 있다.

[0180] 실시예 1

[0181] CD58은 액시캅타진 실로류셀로 치료를 받는 LBCL 환자에서 지속적인 관해를 위해 필요할 수 있다

[0182] [0162] 본 실시예는 FDA-승인된 약물인 액시캅타진 실로류셀(YESCARTA®) 치료를 받는 LBCL 환자에서의 지속적인 관해가 CD58 발현을 필요로 함을 예시하기 위해 수행된 연구의 결과를 설명한다.

[0183] [0163] 이러한 연구에서, 70명의 LBCL 환자를 상업적으로 입수한 액시캅타진 실로류셀로 치료하였다. 이러한 연구에서의 반응률은 다른 연구 그룹의 데이터 뿐만 아니라 약물의 승인으로 이어지는 초기 임상 시험의 데이터와 현저하게 일치하였다. CD58 환자 상태가 환자 결과에 영향을 미칠 수 있는지 여부를 조사하기 위해, 액시캅타진 실로류셀을 투여받은 임의의 이용 가능한 종양 샘플에 대해 보관 중인 종양 조직에서 CD58 발현을 평가하기 위한 실험을 수행하였다(N=36, 요법 전만 31, 요법 후 진행만 2, 및 요법 전 및 후/진행 3 포함). CAR 전 및 후 종양 조직으로 구성된 종양 마이크로어레이를 구축한 후 면역조직화학(IHC) 기술에 의해 CD58 발현에 대해 염색하였다(예를 들어, **도 1a** 참조). CD58 단백질 발현의 손실을 나타내는 환자(n=7)는 거의 모두 CAR 주입 3.5개월 이내에 재발한 것으로 관찰되었다(예를 들어, **도 5a** 참조). 유일한 예외는 림프고갈 및 CAR 주입 전에 브릿징 방사선요법을 받은 낮은 질병 부담(예를 들어, 하나의 단일 질병 부위)을 갖는 환자였다. 또한, 본 연구에서 액시캅타진 실로류셀에 반응하여 긴급한 CD58 손실의 사례가 관찰되었으며, 한 명의 환자는 요법 후 생검에서만 CD58 발현의 손실을 나타내었다(예를 들어, **도 1b** 참조).

[0184] [0164] CD58 돌연변이는 또한 LBCL 환자에서 이전에 기술되었기 때문에, 치료 전 및 후 혈장이 이용 가능한 동일한 시리즈의 환자에서 CD58 돌연변이 상태의 평가는 순환 종양 DNA(ctDNA)에서 딥 시퀀싱에 의한 암 개인화 프로파일링(CAPP-seq)을 사용하여 수행되었다. 34명의 환자 중에서, CD58 변경을 갖는 5명의 환자(2명의 단일 뉴클레오티드 변이체, K60E 및 C187R; 2명의 프레임시프트 결실; 및 1명의 융합)가 확인되었고, 이들 모두는 궁극적으로 지속적인 관해를 달성하지 못했다. 확인된 돌연변이 중 하나(C187R)는 질병 진행 시에만 발생하였다. 확인된 단일 뉴클레오티드 변이체 둘 모두는 이전에 단백질 폴딩 및 기능에 영향을 미칠 것으로 예측되었다. CD58과 T 세포 상의 이의 리간드인 CD2와의 상호작용의 공개된 결정 구조에 따르면, K60E 돌연변이는 특이적으로 이들이 상호작용하는 염 브릿지를 제거하는 것으로 여겨진다(예를 들어, **도 1c** 참조).

[0185] [0165] CD58 이상(예를 들어, IHC에 의한 단백질 발현의 손실 또는 CAPP-seq에 의해 발견된 돌연변이(들))이 있거나 없는 환자에 대한 CAR 후 무진행 생존(PFS)의 비율을 평가하기 위해 추가 연구를 수행하였다(예를 들어, 표 1 참조). 이러한 연구에서, CD58 이상을 갖는 환자는 이러한 이상이 없는 환자보다 유의하게 더 짧은 PFS를 갖는 것으로 관찰되었다(CD58 이상의 경우 중간 PFS 3개월 vs. CD58 온전한 경우 도달하지 않음, $p<0.0001$. 예를 들어, **도 1d** 참조). 이러한 차이는 이용 가능한 IHC 데이터(CD58 비-발현자의 경우 중간 PFS 3개월 vs. CD58 발현자의 경우 11.7개월, $p=0.0049$. 예를 들어, **도 5a** 참조) 또는 CAPP-seq 데이터(CD58 돌연변이의 경우 중간 PFS 3개월 vs. CD58 야생형의 경우 도달하지 않음, $p=0.0027$. 예를 들어, **도 5b** 참조)가 있는 환자만을 평가할 때 유지되었다. 또한, CD58 변경을 갖는 환자는 또한 완전한 반응을 달성할 가능성이 훨씬 적고(25% vs 82%, $p=0.0005$) 부분 반응을 달성할 가능성이 더 큰 것으로 관찰되었다(58% vs 10%, $p=0.0015$)(예를 들어, **도 1e** 참조). 따라서, 야생형 CD58의 발현에서의 변경은 액시타진 실로류셀(YESCARTA®)로 치료된 LBCL 환자에서 지속적인 반응과 높은 상관관계가 있는 것으로 결론지었다.

[0186] 표 1: CD58 상태에 따른 환자 특성 및 결과. (CR: 완전한 반응; PR: 부분 반응; SD: 안정적인 반응; PD: 진행성 질환; IPI: 국제 예후 지수; WNL: 정상 한계 이내; DLBCL: 미만성 거대 B-세포 림프종; TFL: 형질전환된 소포 림프종; 및 PBMCL: 원발성 종격동 B-세포 림프종.

	CD58 WNL (n=39)	CD58 이상 (n=12)
서브타입		
DLBCL	(n=27) 69%	(n=7) 58%
TFL	(n=11) 28%	(n=3) 25%
PBMCL	(n=1) 3%	(n=2) 17%
연령		
중간, 범위	61 (30-76)	51 (21-66)
>65	(n=15) 38%	(n=1) 8%
남성 %	(n=25) 64%	(n=6) 50%
단계 III/IV %	(n=29) 75%	(n=11) 92%
상승된 LDH %	(n=15) 38%	(n=9) 75%
IPI=>3%	(n=16) 41%	(n=7) 58%
거대 %	(n=4) 10%	(n=5) 42%
더블 힛 %*	(n=7) 20%	(n=3) 27%
치료 라인		
중간 (범위)	3 (2-7)	3(2-6)
3 이상	(n=21) 54%	(n=7) 58%
자동, yes %	(n=11) 28%	(n=1) 8%
최고의 반응		
CR	(n=32) 82%	(n=3) 25%
PR	(n=4) 10%	(n=7) 58%
SD	(n=1) 3%	(n=1) 8%
PD	(n=2) 5%	(n=1) 8%

[0187]

[0188] 실시예 2

[0189] CD58 손실은 시험관 내 및 이종이식편 모델에서 CAR-T 세포의 효능을 감소시킨다

[0190] [0166] 본 실시예는 CD58 발현의 손실이 시험관 내 및 이종이식편 모델에서 CAR-T 세포의 효능을 감소시킨다는 것을 예시하기 위해 수행된 연구의 결과를 설명한다.

[0191] [0167] CAR-T 세포 효능에 대한 CD58 발현의 역할을 탐구하기 위해, CRISPR-Cas9 접근법을 사용하여 잘 설명된 Nalm6 세포주로부터 CD58 발현을 녹아웃시켰다(**도 2a**). 이러한 연구에서, 액시캅타진 실로류셀(CD19-CD28ζ), 티사젠렉류셀(CD19-4-1BBζ)에 함유된 CD19 CAR뿐만 아니라 m971-기반 CD22 CAR(CD22-4-1BBζ) 둘 모두는 야생형 종양 세포에 비해 CD58 녹아웃 종양 세포에 반응하여 유의하게 감소된 IL-2 및 IFN-γ를 생성한 것으로 관찰되었다(예를 들어, **도 2c** 참조). m971은 막 근위 결합 항-CD22 scFv임에 유의한다. GD2-4-1BBζ CAR에 의한 사이토카인 생산의 동일한 감소는 또한 CD58 녹아웃이 있거나 없는 DIPG 세포주와 함께 인큐베이션될 때 관찰되었다(예를 들어, **도 7a** 참조).

[0192] [0168] 후속하여, 세포독성을 평가하기 위해 수일에 걸쳐 종양 사멸을 측정한 Incucyte 검정을 수행하였다. 야생형 Nalm6 주에서와 같이 CD19 밀도가 적절할 때, CD58-야생형 또는 CD58-녹아웃 주에 대한 CD19-CD28ζ CAR 또는 CD19-4-1BBζ CAR에 대해 사멸의 차이는 관찰되지 않았다(예를 들어, **도 7a** 참조). 그러나, CAR-T 세포가 감소된 CD19 발현을 갖는 세포주에 대해 시험되었을 때, CD19 CAR T 세포에서 나타난 상당한 차이는 야생형 세포주에 비해 CD58-녹아웃에 대한 감소된 세포독성을 입증하였다(예를 들어, **도 2c-2d** 참조). Nalm6 세포주에서 CD22 밀도가 더 낮기 때문에, CD22-4-1BBζ CAR에 의한 CD58-녹아웃 대 야생형 세포의 사멸 차이는 천연 항원 밀도 범위에서 관찰되었다(예를 들어, **도 2e** 참조).

[0193] [0169] CAR 기능에 대한 CD19 항원 밀도 및 CD58 발현의 상호작용을 추가로 조사하기 위해, 다양한 수준의 CD19 및 CD58 둘 모두를 발현하는 Nalm6 클론을 녹아웃, 과발현, FACS 분류, 및 단일 세포 클로닝을 통해 생성하였다(예를 들어, **도 7b** 참조). 종양에 반응하여 CAR-T 세포에 의한 사이토카인 생산은 종양 세포에 대한 표적 항원 밀도(예를 들어, CD19) 및 CD58 밀도 둘 모두에 의존적인 것으로 관찰되었다(**도 2f-2g**). Nalm6 야생형 주에서와 같이 둘 모두가 충분히 높을 때에만 최대 사이토카인 생산이 달성된다.

[0194] [0170] CD58-녹아웃 이종이식편 및 야생형 이종이식편에 대한 생체 내 CAR 효능을 평가하기 위해 추가 연구를 수행하였다. 이러한 연구에서, CD19-CD28ζ 및 CD19-4-1BBζ CAR 둘 모두는 CD58-녹아웃 Nalm6을 보유하는 마우스에서 초기 효능을 나타내었지만, 이들은 질병을 제거할 수 없었고, 결과적으로 대부분의 환자가 최종 진행 전에 부분 반응(PR)을 달성한 인간 환자에 대한 경험을 반영하여, 최종 종양 증식을 초래하였다(예를 들어, **도 2h-2i** 참조). CD22-4-1BBζ CAR에서 유사한 경향이 관찰되었다(예를 들어, **도 7c** 참조). 둘 모두의 CD19 CAR은 CD58-야생형 이종이식편을 보유하는 마우스에서 장기간 치료를 초래했지만, 어떤 것도 CD58-녹아웃 종양을 갖는 마우스를 치료할 수 없었다(예를 들어, **도 2j** 참조).

[0195] 실시예 3

[0196] CD58-CD2 상호작용은 향상된 CAR-T 세포 활성을 담당한다

[0197] [0171] 본 실시예는 CD58과 CD2의 상호작용이 향상된 CAR-T 세포 활성을 담당함을 입증하기 위해 수행된 실험의 결과를 설명한다.

[0198] [0172] 상기 기재된 바와 같이, CD58에 대한 천연 리간드는 대부분의 T 세포에 의해 고도로 발현되는 공동자극 분자인 CD2이다. CD2 발현 및 신호전달의 중요성을 시험하기 위해, CD2가 녹아웃된 CD19 CAR을 발현하는 T 세포주(Jurkat)를 생성하였다(CD2KO, **도 3a-3b**). CD2KO CAR 세포는 CD2 WT CAR 세포보다 항원 만남에 반응하여 IL-2를 상당히 더 적게 생성하는 것으로 관찰되었다(**도 3c**). CAR 효능에 대한 CD2의 세포내 신호전달 도메인의 기여도를 시험하기 위해, CD2의 세포외 도메인만을 발현하는 CD2의 변이체(CD2-ECD)를 이들 세포에서 재발현시켰고(**도 3a-3b**), 이 CD2 변이체가 CAR 기능을 구제하지 못했음을 발견하였다(예를 들어, **도 3c** 참조). 따라서, CD2 세포내 도메인에 의한 신호전달은 효율적인 CAR-T 세포 기능에 필요할 수 있다.

[0199] [0173] CAR-T 세포 하류 신호전달에 대한 CD2 라이게이션의 기여도를 조사하기 위해 추가 연구를 수행하였다. 이러한 연구에서, CD19 CAR-T 세포를 이디오타입 항체, CD58 단백질, 또는 이디오타입 + CD58과 가교시키면 CAR 및 CD2 둘 모두가 라이게이션되었을 때 CD19-CD28ζ 및 CD19-4-1BBζ CAR-T 세포 둘 모두에 의한 IL-2 생산이 유의하게 향상된다는 것이 밝혀졌다(**도 3d**). 또한, 5분 자극 후, 이디오타입 항체 및 CD58 둘 모두로 활성화된 CAR-T 세포에서 CD3ζ-CAR 및 하류 ERK 둘 모두의 상당히 더 높은 인산화가 관찰되었다(**도 3e**). 이러한 관찰은 CD2가 근위 T 세포 수용체 기구에 의한 신호전달을 향상시킨다는 것을 입증하는 이전 발견과 일치한다.

[0200] [0174] CAR-T 세포에서 CD2 신호전달의 역할을 더 완전히 탐구하기 위해, 상기 기재된 실험으로부터 단백질 용해물을 취하고, 질량 분광법을 사용하여 3372개의 단백질에 맵핑되는 15,993개의 포스포펩티드를 측정하였다. 포스포프로테옴(phosphoproteome)의 주요 성분 분석은 함께 클러스터링된 생물학적 복제물을 보여주었으며, 이는 공여자 사이의 재현성을 입증하는 것으로 나타났다. 이러한 연구에서, 주요 성분 1(PC1)은 변이의 58%를 포착하였고, 항-이디오타입으로의 치료에 기반하여 샘플을 분리하여, 가장 큰 차이가 CAR을 통한 자극으로 인한 것임을 나타낸다. 주요 성분 2(PC2)는 변이의 17%를 차지하였고, 가용성 CD58로의 처리에 기반하여 샘플을 분리하였다(**도 3f**).

[0201] [0175] **도 3g**에 도시된 바와 같이, 차별적으로 풍부한 펩티드의 감독되지 않은 클러스터링은 대부분의 펩티드(클러스터 1, 2, 4 및 8)가 둘 모두의 이디오타입 처리된 조건에서 상승하였고, 따라서 CAR을 통한 신호전달에 기인할 수 있음을 보여주었다. 클러스터 7의 포스포펩티드는 CD58로 처리된 조건에서만 상승하였고, 이는 CD2 신호전달이 이러한 변화의 원인임을 나타낸다. 특히, 클러스터 7은 액틴 세포골격의 조절제로서 기술되고 T 세포 분극에서 역할을 하는 것으로 알려진 SH3KBP1 및 DBNL을 포함하는 여러 SH3 도메인 펩티드를 함유하였다. 클러스터 3은 이디오타입 및 CD58 둘 모두로 자극된 조건에서 가장 풍부하고 LCK, CD3ε 및 CD247(CD3ζ)과 같은 TCR 신호전달 경로의 많은 핵심 구성요소를 포함하는 포스포펩티드를 함유하였다. 이러한 결과는 CD2 공동자극이 CAR 신호전달과 상승작용하여 공통 TCR 경로를 통한 활성화를 증가시킨다는 것을 보여준다. 또한, 클러스터 3은 CD2 및 이의 신호전달 어댑터 단백질 CD2AP를 포함하였고, 이는 CAR을 통한 신호전달이 CD2 경로의 활성화를 증가시킨다는 것을 나타낸다. CD2 공동자극은 단독으로 157개의 포스포펩티드의 차등적 풍부함을 초래한 반면, CD2 공동자극은 CAR 활성화에 더하여 236개의 차등적으로 풍부한 펩티드를 초래하였고(**도 3h**), 이는 이러한 2개의 경로를 통한 신호전달의 효과가 별개라는 개념을 추가로 뒷받침한다.

[0202] [0176] CAR 신호전달의 존재 하에 CD2 자극에 의해 조절되는 포스포펩티드의 생물정보학 분석은 "*세포-세포 부착*" 및 "*면역학적 시냅스*"를 포함하는 Gene Ontology(GO) 용어의 상당한 농축을 나타내었다(**도 3i**). 이러한 결과는 CD2가 표적 세포를 향한 세포골격 분극에 필수적일 수 있다는 이전 보고서와 일치한다. TCR 신호전달을 강화하는데 있어서 CD2의 역할을 추가로 조사하기 위해, Reactome TCR 신호전달 유전자 세트에서 유전자에 상응하

는 포스포펩티드를 조사하기 위해 추가 연구를 수행하였다. CD58에 의한 CD2 라이게이션은 인산화된 LCK, CD3δ, CD3ε 및 GRAP2의 증가와 함께 향상된 TCR 경로 신호전달을 초래하는 것으로 밝혀졌다. 또한, 혈관확장제-자극된 인단백질(VASP) 및 Wiskott-Aldrich 증후군(WAS) 단백질과 같은 액틴 세포골격 재구성에 관여하는 단백질은 CD2 자극된 세포에서 상승하였다(**도 3j** 및 **도 8**). 특히, CARD11-BCL10-MALT1(CBM) 시그날로솜 복합체의 주요 구성요소인 MALT1 및 CARD11에 상응하는 포스포펩티드는 또한 CD2 라이게이션에 의해 증가하였다. CBM 시그널날솜은 T 세포 표면 신호전달과 NF-kB 활성화 사이의 중요한 분자 연결일 수 있으며, 이는 T 세포 증식, 생존 및 이펙터 기능에 필요할 수 있다.

[0203] 실시예 4

[0204] CAR-T 세포는 B 세포 악성종양에서 CD58 손실을 극복하도록 조작될 수 있다

[0205] [0177] 본 실시예는 CAR-T 세포가 B 세포 악성종양에서 CD58 손실을 극복하도록 조작될 수 있음을 예시하기 위해 수행된 실험의 결과를 설명한다.

[0206] [0178] CD58 라이게이션으로 인한 CD2 신호전달이 CAR-T 세포 기능을 향상시키기 때문에, CD2 공동자극 도메인을 CAR 분자에 통합함으로써 2세대 및 3세대 CAR-T 세포를 생성하였다. **도 4a**에서 CD22-CD2ζ 및 CD22-4-1BB-CD2ζ를 참조한다. CD22-4-1BBζ CAR는 CD58 녹아웃의 효과가 시험관 내에서 더 명백하여 다중 작제물의 보다 철저한 시험을 용이하게 하는 것으로 밝혀졌기 때문에 이러한 실험을 위해 선택되었다. CD22-4-1BBζ CAR에 대한 이러한 CAR 작제물(CD22-CD2ζ 및 CD22-4-1BB-CD2ζ)에 대한 비교를 수행하였고, 이들은 4-1BBζ CAR이 실패할 때 CD58-녹아웃 Nalm6 세포를 사멸시킬 수 있다는 것이 밝혀졌다(**도 4b**). 또한, 이들은 CD58 야생형 및 CD58 녹아웃 Nalm6 주 둘 모두와의 공동-배양에 반응하여 추가의 IL-2를 생성하였다(**도 4c**). 그러나, 생체 내에서, CD2-함유 CAR은 초기에 CD58 녹아웃 이종이식편의 종양 제어를 향상시켰지만(**도 4d**), 종양은 결국 모든 마우스에서 성장하여 생존에서 임의의 이점을 없앴다(**도 4e**).

[0207] [0179] 천연 T 세포에서, CD2 신호전달은 T 세포 수용체에 트랜스로 발생한다. TCR에 대한 CD2의 관계를 더 잘 모방하기 위해, 항-CD19 단일 사슬 가변 단편(scFv) FMC63이 막횡단 도메인 및 CD2 세포내 도메인에 융합된 트랜스 CAR 작제물을 생성하였다(**도 4f**). 이러한 실험에서, 2개의 작제물은 2개의 바이러스 벡터를 사용하여 하나의 세포에서 또는 단일 바이시스트론 벡터에서 발현될 수 있다. 바이시스트론 벡터가 사용된 일부 실험에서, 커넥터 서열이 2개의 CAR에 대한 서열 사이에 삽입되었다. 하기는 이러한 실험에 사용된 예시적인 커넥터 서열이다:

[0208] [0180] RKRREFATNFSLLKQAGDVEENPGPLE (SEQ ID NO: 11).

[0209] [0181] 상기 커넥터 서열에 대한 코딩 서열은 하기와 같았다:

[0210] [0182] CGCAAGAGAAGAGAATTCgcaacaaacttctctctgctgaaacaagccggagatgtcgaagaga atcctggaccgCTCGAG (SEQ ID NO: 12).

[0211] [0183] 여기서 **RKRR**(SEQ ID NO: 13)은 제1 CAR 서열의 하류에 첨가된 푸린 절단 서열에 상응한다.

[0212] [0184] **EF**는 *Eco*RI 절단 부위에 상응하고;

[0213] [0185] **ATNFSLLKQAGDVEENPGP**(SEQ ID NO: 14)는 돼지 테스코바이러스-1 2A(P2A)로부터의 단백질분해(auproteolytic) 펩티드 서열에 상응한다.

[0214] [0186] **LE**는 XhoI 절단 부위에 상응한다.

[0215] [0187] 세포독성 검정에서, 트랜스로 CD22-4-1BBζ 및 CD19-CD2 수용체 둘 모두를 발현하는 T 세포는 CD58-녹아웃 종양 세포를 사멸시킬 수 있었던 반면, 2세대 및 3세대 CAR은 실패하였다(**도 4g**). CD58-녹아웃 주에 대해 가장 많은 IL-2를 생성하는 트랜스 구성에서, 사이토카인 생산에 대해 동일한 경향이 관찰되었다(**도 4h**). 특히, 세포내 CD2 신호전달 도메인 없이 CD22-4-1BBζ CAR 및 CD19 scFv-막횡단 도메인을 발현하는 대조군 T 세포는 CD58 녹아웃 세포를 사멸시키거나 사이토카인을 생성하는 능력을 회복하지 못했고, 이는 CD2 신호전달이 CAR/종양 세포 상호작용에 필수적일 수 있음을 나타낸다(**도 4g-4h**). 실제로, 생체 내에서, 트랜스로 CD22-4-1BBζ 및 CD19-CD2 수용체를 발현하는 T 세포는 대조군 작제물과 비교하여 CD58-녹아웃 종양 성장을 효과적으로 제어하였고(**도 4i**), 유의하게 개선된 생존을 초래하였다(**도 4j**). 따라서, 트랜스 접근법에서 CD2 신호전달을 통합하는 림프종에 대한 차세대 CAR은 CD58 손실을 극복하는데 효과적인 것으로 결론지었고, 이는 본원에 기재된 연구에 의해 밝혀진 CAR 내성의 일반적이지만 신규한 메커니즘이다.

[0216] [0188] 본 개시의 특정 대안이 개시되었지만, 다양한 변형 및 조합이 가능하고 첨부된 청구 범위의 진정한 사상 및 범위 내에서 고려된다는 것이 이해되어야 한다. 따라서, 본원에 제시된 정확한 요약 및 개시를 제한하려는 의도는 없다.

[0217] **참고문헌**

1 Majzner, R. G. & Mackall, C. L. Clinical lessons learned from the first leg of the CAR T cell journey. *Nat Med* **25**, 1341-1355, doi:10.1038/s41591-019-0564-6 (2019).

2 Neelapu, S. S. *et al.* Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* **377**, 2531-2544, doi:10.1056/NEJMoa1707447 (2017).

3 Schuster, S. J. *et al.* Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* **380**, 45-56, doi:10.1056/NEJMoa1804980 (2019).

4 Locke, F. L. *et al.* Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1-2 trial. *Lancet Oncol* **20**, 31-42, doi:10.1016/S1470-2045(18)30864-7 (2019).

5 Nastoupil, L. J. *et al.* Standard-of-Care Axicabtagene Ciloleucel for Relapsed or Refractory Large B-Cell Lymphoma: Results From the US Lymphoma CAR T Consortium. *J Clin Oncol*, JCO1902104, doi:10.1200/JCO.19.02104 (2020).

6 Brudno, J. N. & Kochenderfer, J. N. Chimeric antigen receptor T-cell therapies for lymphoma. *Nat Rev Clin Oncol* **15**, 31-46, doi:10.1038/nrclinonc.2017.128 (2018).

7 June, C. H. & Sadelain, M. Chimeric Antigen Receptor Therapy. *N Engl J Med* **379**, 64-73, doi:10.1056/NEJMra1706169 (2018).

8 Abramson, J. S. *et al.* Pivotal Safety and Efficacy Results from Transcend NHL 001, a Multicenter Phase 1 Study of Lisocabtagene Maraleucel (liso-cel) in Relapsed/Refractory (R/R) Large B Cell Lymphomas. *Blood* **134**, 241-241, doi:10.1182/blood-2019-127508 (2019).

9 Chow, V. A., Shadman, M. & Gopal, A. K. Translating anti-CD19 CAR T-cell therapy into clinical practice for relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **132**, 777-781, doi:10.1182/blood-2018-04-839217 (2018).

10 Brudno, J. N. *et al.* Safety and feasibility of anti-CD19 CAR T cells with fully human binding domains in patients with B-cell lymphoma. *Nat Med* **26**, 270-280, doi:10.1038/s41591-019-0737-3 (2020).

11 Shah, N. N. & Fry, T. J. Mechanisms of resistance to CAR T cell therapy. *Nat Rev Clin Oncol* **16**, 372-385, doi:10.1038/s41571-019-0184-6 (2019).

12 Majzner, R. G. & Mackall, C. L. Tumor Antigen Escape from CAR T-cell Therapy. *Cancer Discov* **8**, 1219-1226, doi:10.1158/2159-8290.CD-18-0442 (2018).

13 Shalabi, H. *et al.* Sequential loss of tumor surface antigens following chimeric antigen receptor T-cell therapies in diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica*, doi:10.3324/haematol.2017.183459 (2018).

[0218]

14 Fry, T. J. *et al.* CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy. *Nat Med* **24**, 20-28, doi:10.1038/nm.4441 (2018).

15 Neelapu, S. S. *et al.* CD19-Loss with Preservation of Other B Cell Lineage Features in Patients with Large B Cell Lymphoma Who Relapsed Post-Axi-Cel. *Blood* **134**, 203-203, doi:10.1182/blood-2019-126218 (2019).

16 Fraietta, J. A. *et al.* Determinants of response and resistance to CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med* **24**, 563-571, doi:10.1038/s41591-018-0010-1 (2018).

17 Finney, O. C. *et al.* CD19 CAR T cell product and disease attributes predict leukemia remission durability. *J Clin Invest* **129**, 2123-2132, doi:10.1172/JCI125423 (2019).

18 Maude, S. L. *et al.* Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* **378**, 439-448, doi:10.1056/NEJMoa1709866 (2018).

19 Majzner, R. G. *et al.* Tuning the Antigen Density Requirement for CAR T-cell Activity. *Cancer Discov* **10**, 702-723, doi:10.1158/2159-8290.CD-19-0945 (2020).

20 Gardner, R. A. *et al.* Intent-to-treat leukemia remission by CD19 CAR T cells of defined formulation and dose in children and young adults. *Blood* **129**, 3322-3331, doi:10.1182/blood-2017-02-769208 (2017).

21 Lee, D. W. *et al.* T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* **385**, 517-528, doi:10.1016/S0140-6736(14)61403-3 (2015).

22 Turtle, C. J. *et al.* CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *J Clin Invest* **126**, 2123-2138, doi:10.1172/JCI85309 (2016).

23 Veltroni, M. *et al.* Expression of CD58 in normal, regenerating and leukemic bone marrow B cells: implications for the detection of minimal residual disease in acute lymphocytic leukemia. *Haematologica* **88**, 1245-1252 (2003).

24 Chen, J. S. *et al.* Identification of novel markers for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **97**, 2115-2120, doi:10.1182/blood.v97.7.2115 (2001).

25 Jacob, M. C. *et al.* Quantification of cellular adhesion molecules on malignant B cells from non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* **13**, 1428-1433, doi:10.1038/sj.leu.2401517 (1999).

26 Cao, Y. *et al.* Mutations or copy number losses of CD58 and TP53 genes in diffuse large B cell lymphoma are independent unfavorable prognostic factors. *Oncotarget* **7**, 83294-83307, doi:10.18632/oncotarget.13065 (2016).

[0219]

27 Challa-Malladi, M. *et al.* Combined genetic inactivation of beta2-Microglobulin and CD58 reveals frequent escape from immune recognition in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* **20**, 728-740, doi:10.1016/j.ccr.2011.11.006 (2011).

28 Newman, A. M. *et al.* An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med* **20**, 548-554, doi:10.1038/nm.3519 (2014).

29 Adzhubei, I. A. *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* **7**, 248-249, doi:10.1038/nmeth0410-248 (2010).

30 Wang, J. H. *et al.* Structure of a heterophilic adhesion complex between the human CD2 and CD58 (LFA-3) counterreceptors. *Cell* **97**, 791-803, doi:10.1016/s0092-8674(00)80790-4 (1999).

31 Barrett, D. M. *et al.* Noninvasive bioluminescent imaging of primary patient acute lymphoblastic leukemia: a strategy for preclinical modeling. *Blood* **118**, e112-117, doi:10.1182/blood-2011-04-346528 (2011).

32 Haso, W. *et al.* Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **121**, 1165-1174, doi:10.1182/blood-2012-06-438002 (2013).

33 Mount, C. W. *et al.* Potent antitumor efficacy of anti-GD2 CAR T cells in H3-K27M(+) diffuse midline gliomas. *Nat Med* **24**, 572-579, doi:10.1038/s41591-018-0006-x (2018).

34 Shaw, S. *et al.* Two antigen-independent adhesion pathways used by human cytotoxic T-cell clones. *Nature* **323**, 262-264, doi:10.1038/323262a0 (1986).

35 Selvaraj, P. *et al.* The T lymphocyte glycoprotein CD2 binds the cell surface ligand LFA-3. *Nature* **326**, 400-403, doi:10.1038/326400a0 (1987).

36 Demetriou, P. *et al.* CD2 expression acts as a quantitative checkpoint for immunological synapse structure and T-cell activation. *bioRxiv*, 589440, doi:10.1101/589440 (2019).

37 Tibaldi, E. V. & Reinherz, E. L. CD2BP3, CIN85 and the structurally related adaptor protein CMS bind to the same CD2 cytoplasmic segment, but elicit divergent functional activities. *Int Immunol* **15**, 313-329, doi:10.1093/intimm/dxg032 (2003).

38 Le Bras, S. *et al.* Recruitment of the actin-binding protein HIP-55 to the immunological synapse regulates T cell receptor signaling and endocytosis. *J Biol Chem* **279**, 15550-15560, doi:10.1074/jbc.M312659200 (2004).

39 Dustin, M. L. *et al.* A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell* **94**, 667-677, doi:10.1016/s0092-8674(00)81608-6 (1998).

[0220]

40 Zurli, V. *et al.* Phosphoproteomics of CD2 signaling reveals AMPK-dependent regulation of lytic granule polarization in cytotoxic T cells. *Sci Signal* **13**, doi:10.1126/scisignal.aaz1965 (2020).

41 Jassal, B. *et al.* The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res* **48**, D498-D503, doi:10.1093/nar/gkz1031 (2020).

42 Thome, M., Charton, J. E., Pelzer, C. & Hailfinger, S. Antigen receptor signaling to NF-kappaB via CARMA1, BCL10, and MALT1. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a003004, doi:10.1101/cshperspect.a003004 (2010).

43 Crump, M. *et al.* Outcomes in refractory diffuse large B-cell lymphoma: results from the international SCHOLAR-1 study. *Blood* **130**, 1800-1808, doi:10.1182/blood-2017-03-769620 (2017).

44 Neelapu, S. S. *et al.* A Comparison of Two-Year Outcomes in ZUMA-1 (Axicabtagene Ciloleucel) and SCHOLAR-1 in Patients with Refractory Large B Cell Lymphoma. *Blood* **134**, 4095-4095, doi:10.1182/blood-2019-125792 (2019).

45 Bierer, B. E., Peterson, A., Gorga, J. C., Herrmann, S. H. & Burakoff, S. J. Synergistic T cell activation via the physiological ligands for CD2 and the T cell receptor. *J Exp Med* **168**, 1145-1156, doi:10.1084/jem.168.3.1145 (1988).

46 Hahn, W. C., Rosenstein, Y., Calvo, V., Burakoff, S. J. & Bierer, B. E. A distinct cytoplasmic domain of CD2 regulates ligand avidity and T-cell responsiveness to antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 7179-7183, doi:10.1073/pnas.89.15.7179 (1992).

47 Cheadle, E. J. *et al.* Ligation of the CD2 co-stimulatory receptor enhances IL-2 production from first-generation chimeric antigen receptor T cells. *Gene Ther* **19**, 1114-1120, doi:10.1038/gt.2011.192 (2012).

48 Kanner, S. B., Damle, N. K., Blake, J., Aruffo, A. & Ledbetter, J. A. CD2/LFA-3 ligation induces phospholipase-C gamma 1 tyrosine phosphorylation and regulates CD3 signaling. *J Immunol* **148**, 2023-2029 (1992).

49 Espagnolle, N. *et al.* CD2 and TCR synergize for the activation of phospholipase Cgamma1/calcium pathway at the immunological synapse. *Int Immunol* **19**, 239-248, doi:10.1093/intimm/dxl141 (2007).

50 Hubert, P., Debre, P., Boumsell, L. & Bismuth, G. Tyrosine phosphorylation and association with phospholipase C gamma-1 of the GAP-associated 62-kD protein after CD2 stimulation of Jurkat T cell. *J Exp Med* **178**, 1587-1596, doi:10.1084/jem.178.5.1587 (1993).

51 Yang, H. & Reinherz, E. L. Dynamic recruitment of human CD2 into lipid rafts. Linkage to T cell signal transduction. *J Biol Chem* **276**, 18775-18785, doi:10.1074/jbc.M009852200 (2001).

[0221]

52 Li, J., Smolyar, A., Sunder-Plassmann, R. & Reinherz, E. L. Ligand-induced conformational change within the CD2 ectodomain accompanies receptor clustering: implication for molecular lattice formation. *J Mol Biol* **263**, 209-226, doi:10.1006/jmbi.1996.0570 (1996).

53 Kaizuka, Y., Douglass, A. D., Vardhana, S., Dustin, M. L. & Vale, R. D. The coreceptor CD2 uses plasma membrane microdomains to transduce signals in T cells. *J Cell Biol* **185**, 521-534, doi:10.1083/jcb.200809136 (2009).

54 Zhao, Z. *et al.* Structural Design of Engineered Costimulation Determines Tumor Rejection Kinetics and Persistence of CAR T Cells. *Cancer Cell* **28**, 415-428, doi:10.1016/j.ccell.2015.09.004 (2015).

55 Schneider, M. *et al.* Alterations of the CD58 gene in classical Hodgkin lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* **54**, 638-645, doi:10.1002/gcc.22276 (2015).

56 Abdul Razak, F. R., Diepstra, A., Visser, L. & van den Berg, A. CD58 mutations are common in Hodgkin lymphoma cell lines and loss of CD58 expression in tumor cells occurs in Hodgkin lymphoma patients who relapse. *Genes Immun* **17**, 363-366, doi:10.1038/gene.2016.30 (2016).

57 Sembries, S., Pahl, H., Stilgenbauer, S., Döhner, H. & Schriever, F. Reduced Expression of Adhesion Molecules and Cell Signaling Receptors by Chronic Lymphocytic Leukemia Cells With 11q Deletion. *Blood* **93**, 624-631, doi:10.1182/blood.V93.2.624 (1999).

58 Barker, H. F., Hamilton, M. S., Ball, J., Drew, M. & Franklin, I. M. Expression of adhesion molecules LFA-3 and N-CAM on normal and malignant human plasma cells. *Br J Haematol* **81**, 331-335, doi:10.1111/j.1365-2141.1992.tb08236.x (1992).

59 Koretz, K., Schlag, P. & Moller, P. Sporadic loss of leucocyte-function-associated antigen-3 (LFA-3) in colorectal carcinomas. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* **419**, 389-394, doi:10.1007/BF01605072 (1991).

60 Siliciano, R. F., Pratt, J. C., Schmidt, R. E., Ritz, J. & Reinherz, E. L. Activation of cytolytic T lymphocyte and natural killer cell function through the T11 sheep erythrocyte binding protein. *Nature* **317**, 428-430, doi:10.1038/317428a0 (1985).

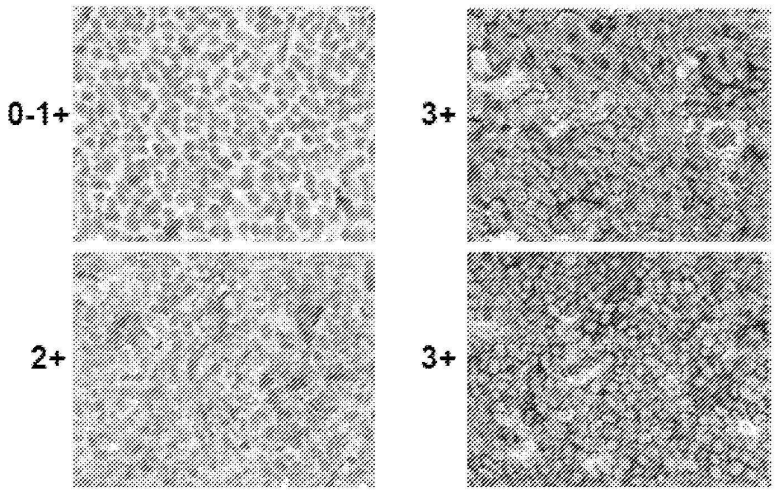
61 Liu, L. L. *et al.* Critical Role of CD2 Co-stimulation in Adaptive Natural Killer Cell Responses Revealed in NKG2C-Deficient Humans. *Cell Rep* **15**, 1088-1099, doi:10.1016/j.celrep.2016.04.005 (2016).

62 Liu, E. *et al.* Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors. *N Engl J Med* **382**, 545-553, doi:10.1056/NEJMoa1910607 (2020).

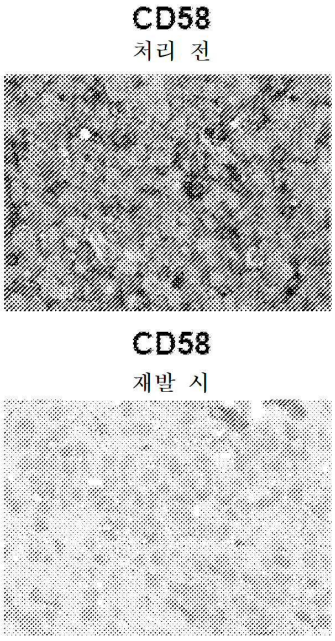
[0222]

도면

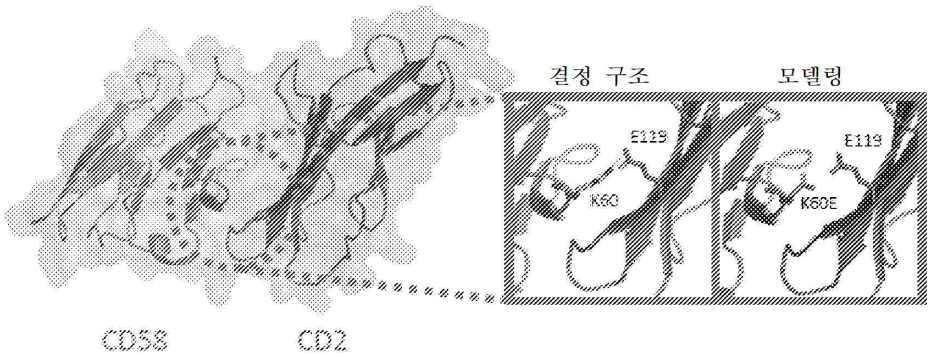
도면1a



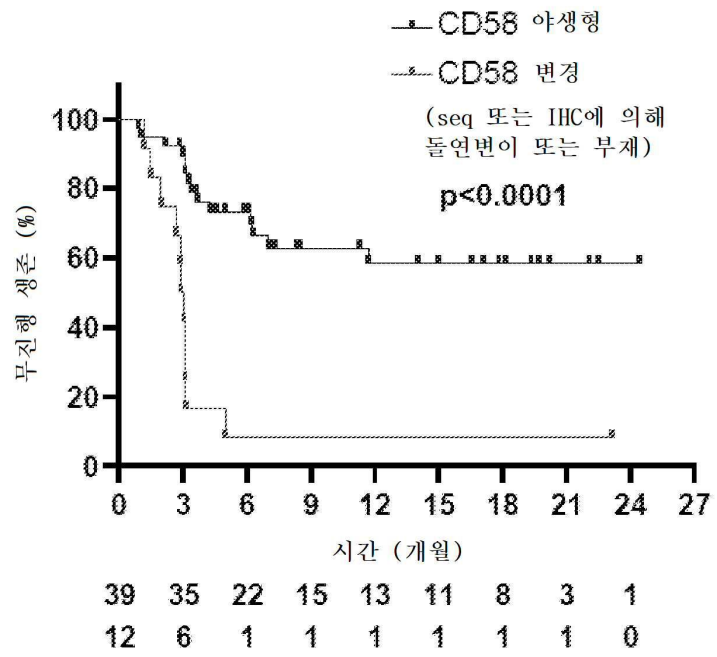
도면1b



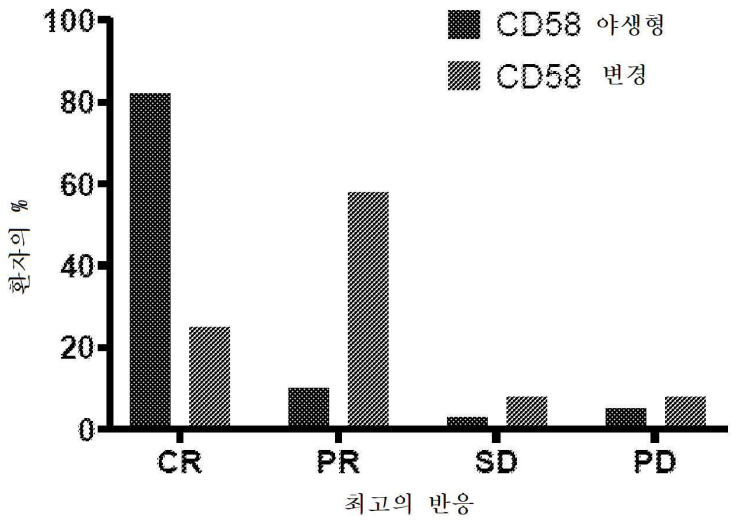
도면1c



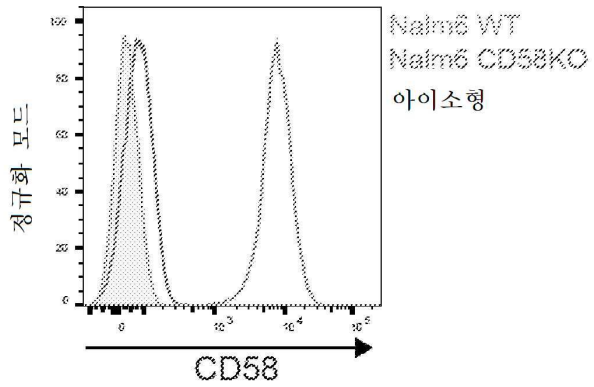
도면1d


CD58 야생형
CD58 변경
(seq 또는 IHC에 의해
돌연변이 또는 부재)
p<0.0001
무진행 생존 (%)
100
80
60
40
20
0
0 3 6 9 12 15 18 21 24 27
시간 (개월)
39 35 22 15 13 11 8 3 1
12 6 1 1 1 1 1 1 0

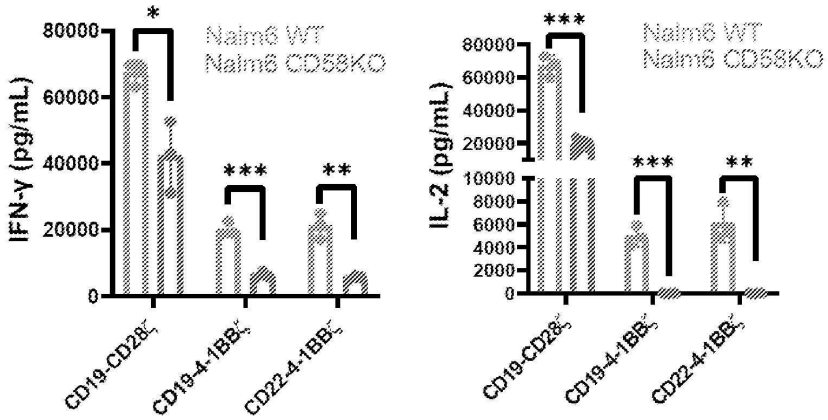
도면1e


CD58 야생형
CD58 변경
환자의 %
100
80
60
40
20
0
CR
PR
SD
PD
최고의 반응

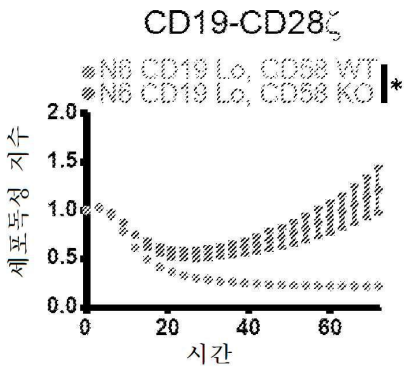
도면2a



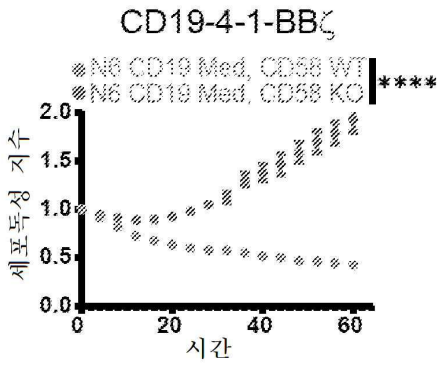
도면2b



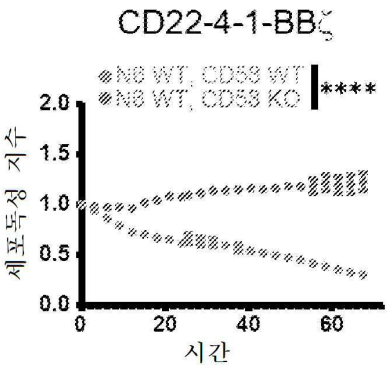
도면2c



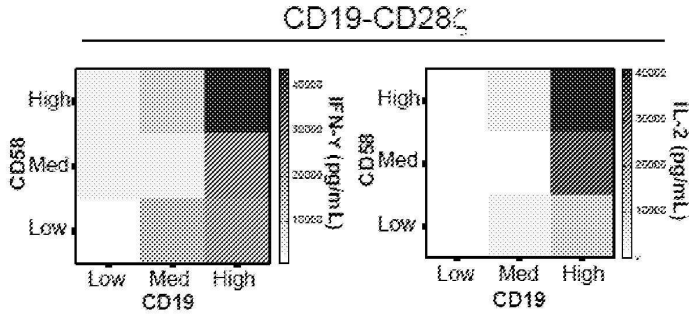
도면2d



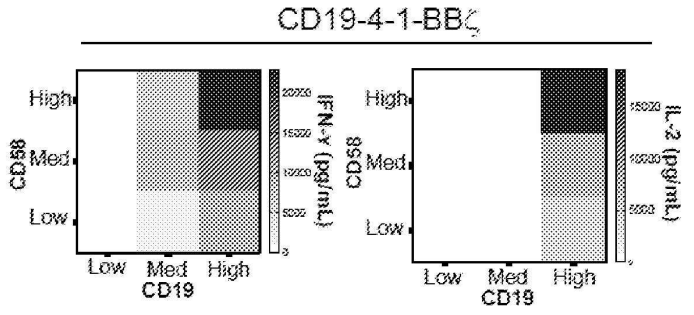
도면2e



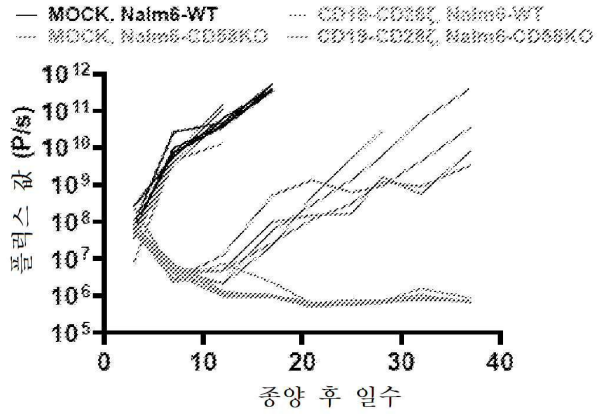
도면2f



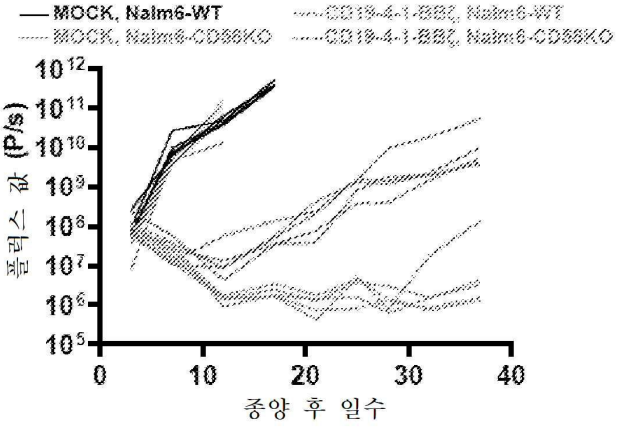
도면2g



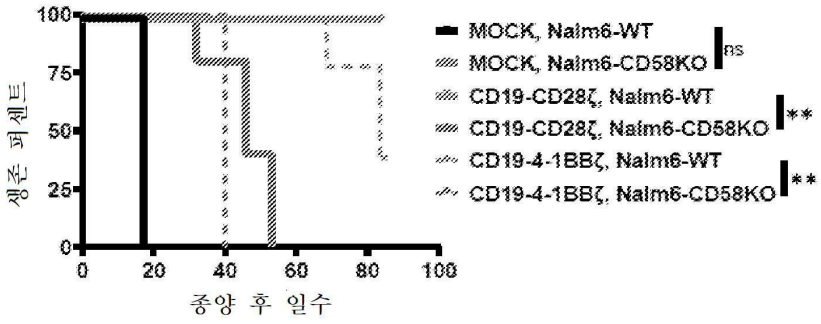
도면2h



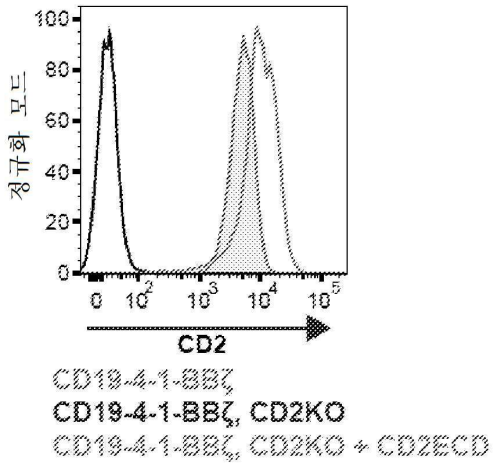
도면2i



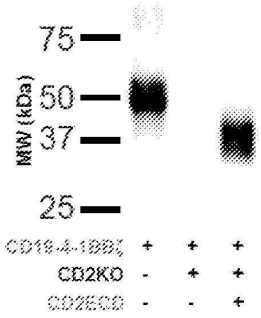
도면2j



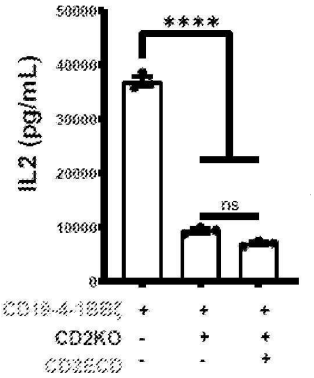
도면3a



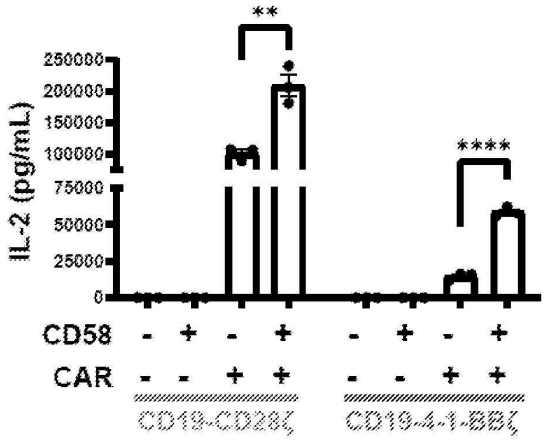
도면3b



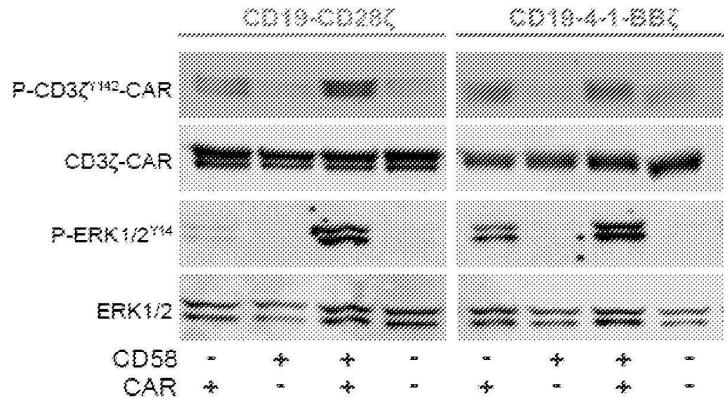
도면3c



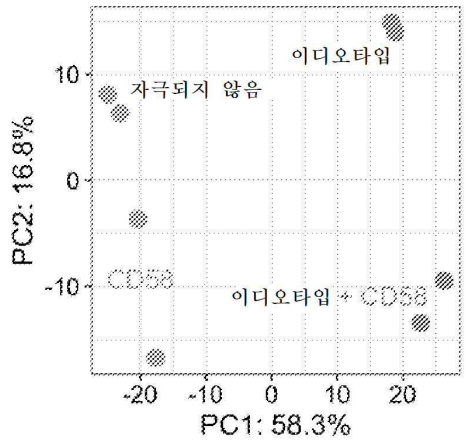
도면3d



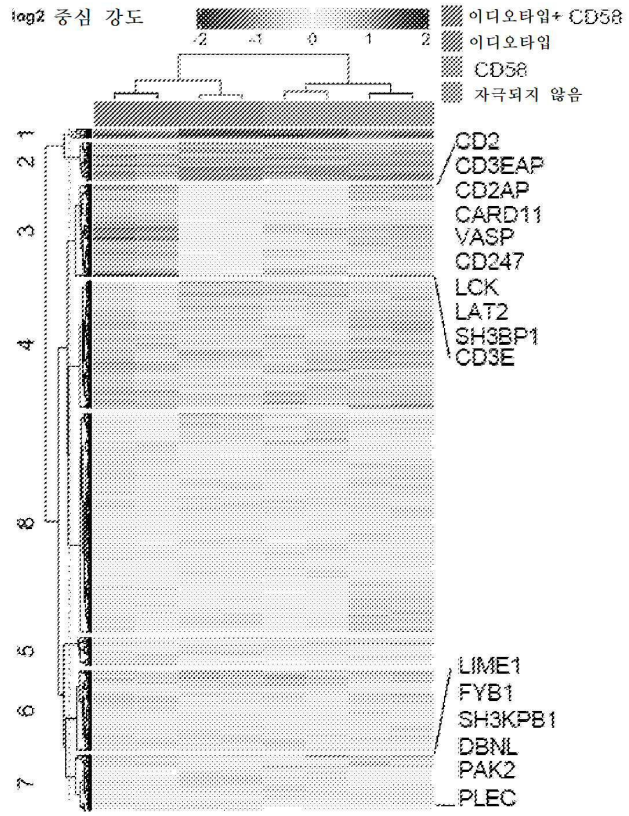
도면3e



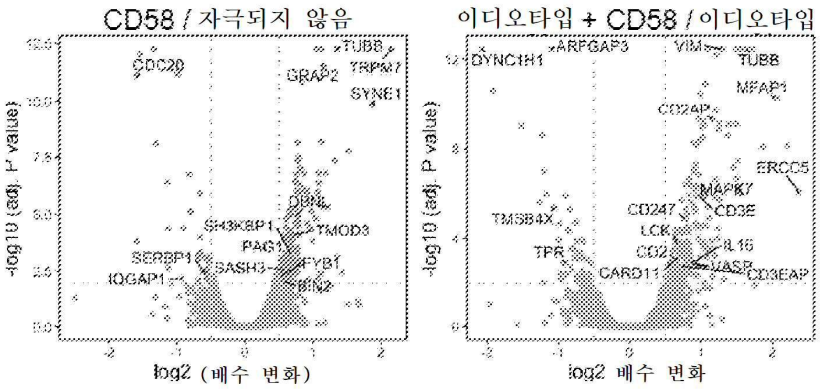
도면3f



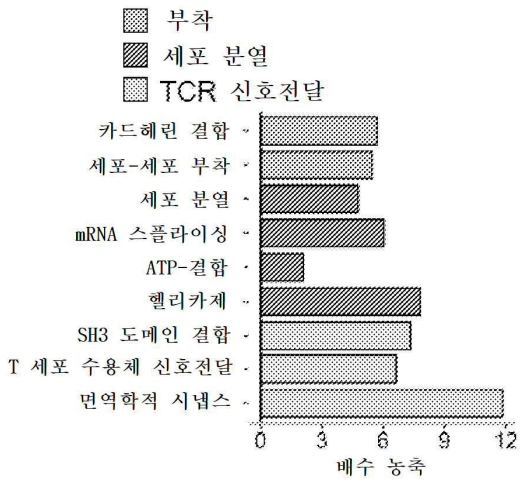
도면3g


log2 중심 강도
-2
-1
0
1
2
이디오타입+ CD58
이디오타입
CD58
자극되지 않음
CD2
CD3EAP
CD2AP
CARD11
VASP
CD247
LCK
LAT2
SH3BP1
CD3E
LIME1
FYB1
SH3KPB1
DBNL
PAK2
PLEC

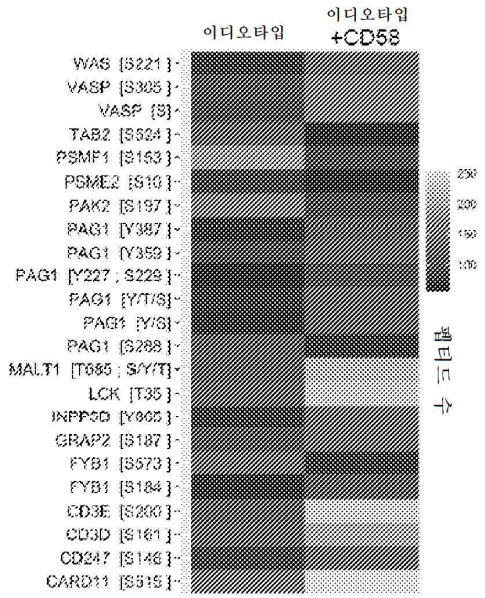
도면3h


CD58 / 자극되지 않음
-log10 (adj. P value)
log2 (배수 변화)
CDC20
TUBB
GRAP2
TRPM7
SYNE1
DBNL
SH3KBP1
TMOD3
PAG1
SERBP1
SASH3
FYB1
IQGAP1
BIN2
이디오타입 + CD58 / 이디오타입
-log10 (adj. P value)
log2 배수 변화
DYNC1H1
ARFGAP3
VIM
TUBB
MFAP1
CD2AP
ERCC5
MAPK7
CD3E
TMSB4X
CD247
LCK
TPR
CD2
IL16
CARD11
VASP
CD3EAP

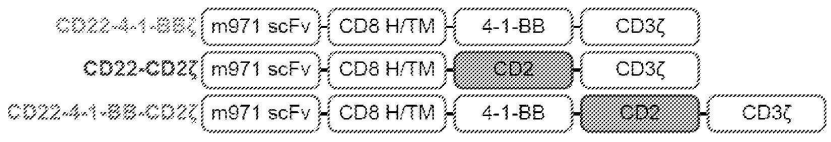
도면3i



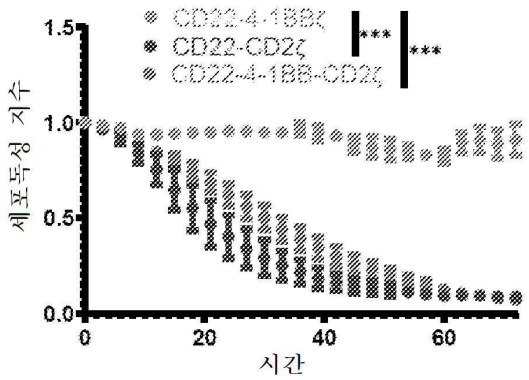
도면3j



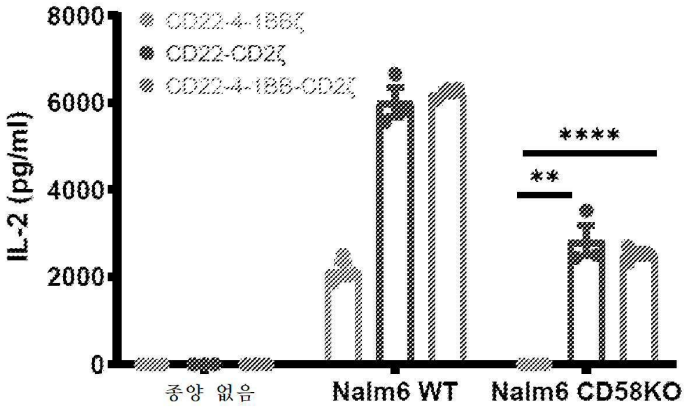
도면4a



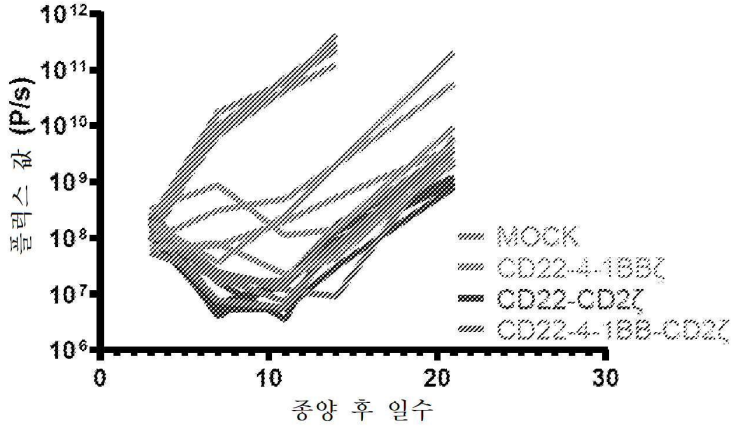
도면4b



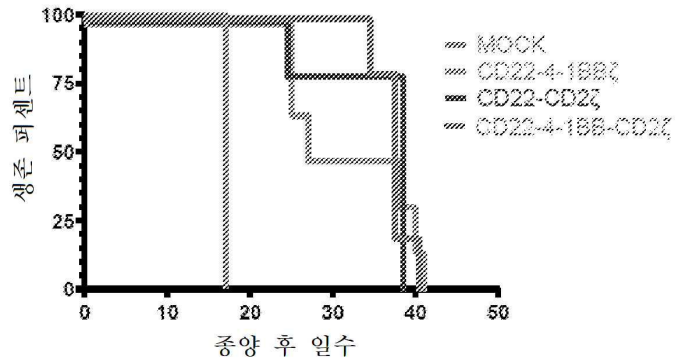
도면4c



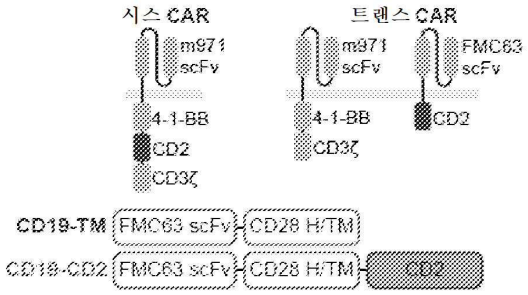
도면4d



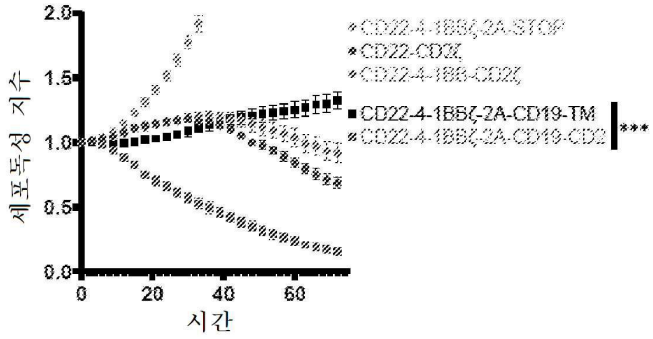
도면4e



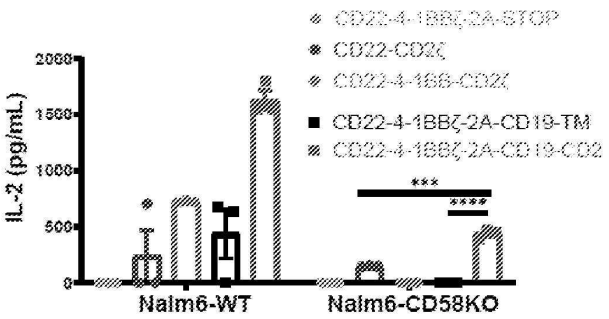
도면4f



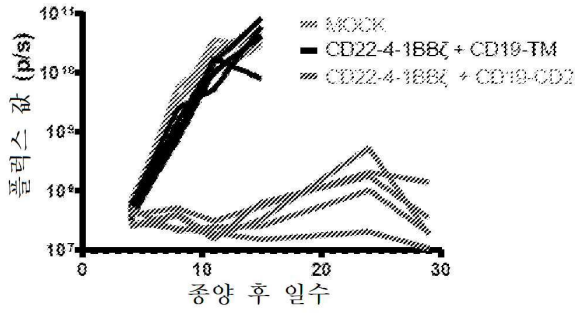
도면4g



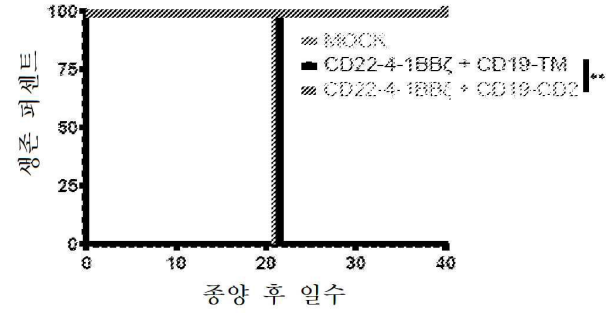
도면4h



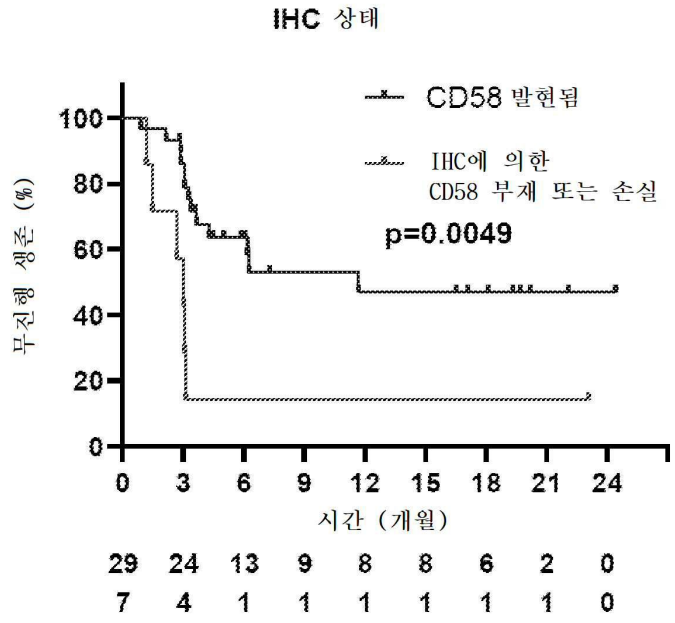
도면4i



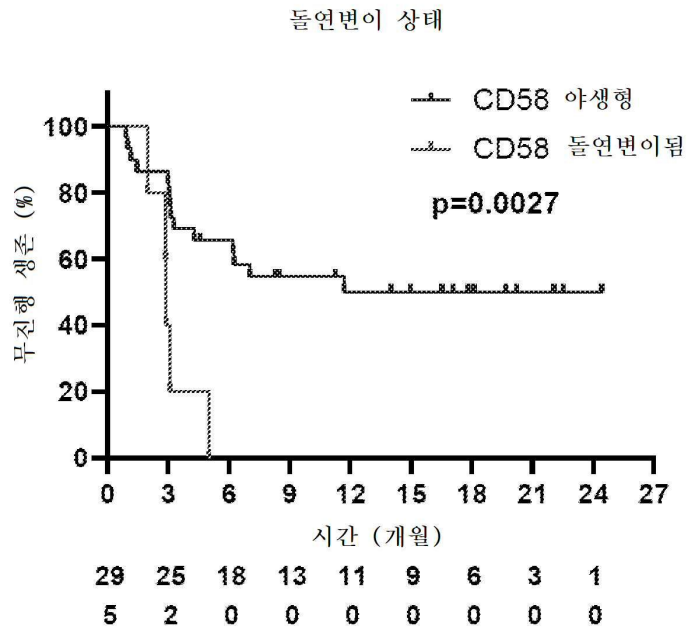
도면4j



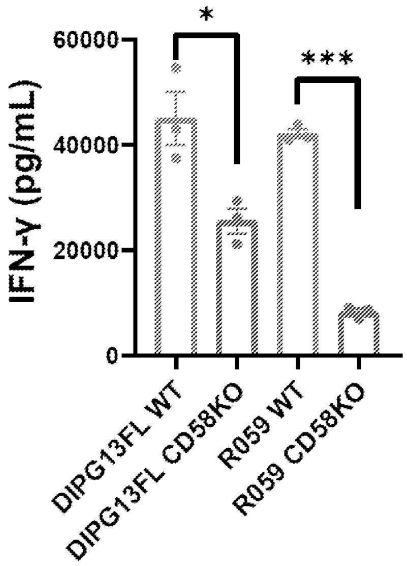
도면5a



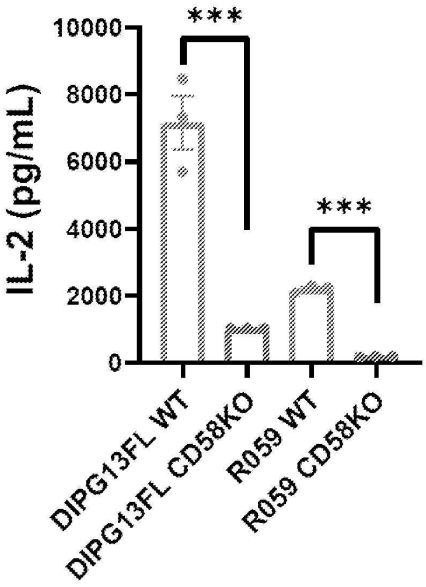
도면5b


돌연변이 상태
CD58 야생형
CD58 돌연변이됨
p=0.0027
무진행 생존 (%)
100
80
60
40
20
0
0 3 6 9 12 15 18 21 24 27
시간 (개월)
29 25 18 13 11 9 6 3 1
5 2 0 0 0 0 0 0 0

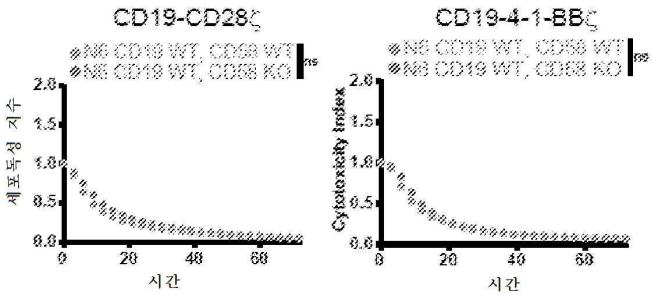
도면6a


*
***
60000
40000
20000
0
IFN-γ (pg/mL)
DIPG13FL WT
DIPG13FL CD58KO
R059 WT
R059 CD58KO

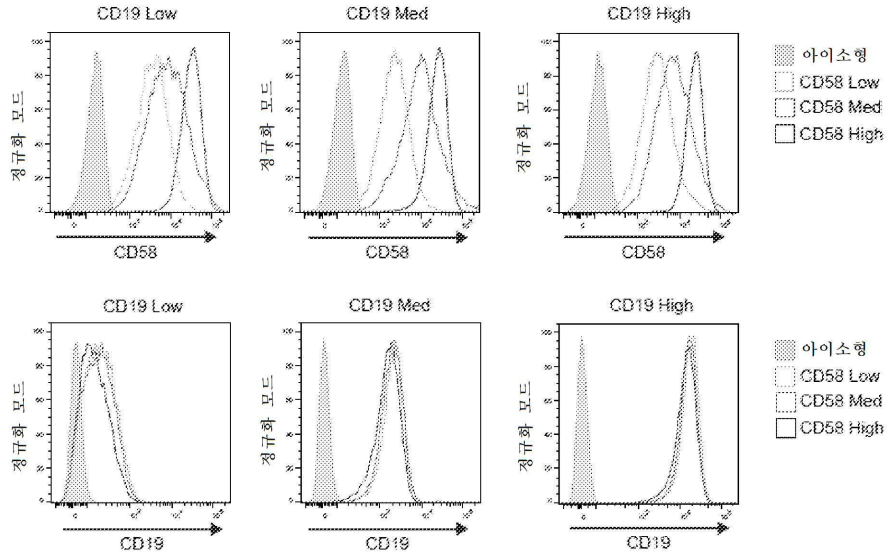
도면6b



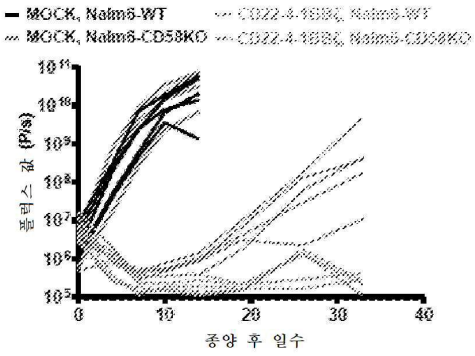
도면7a



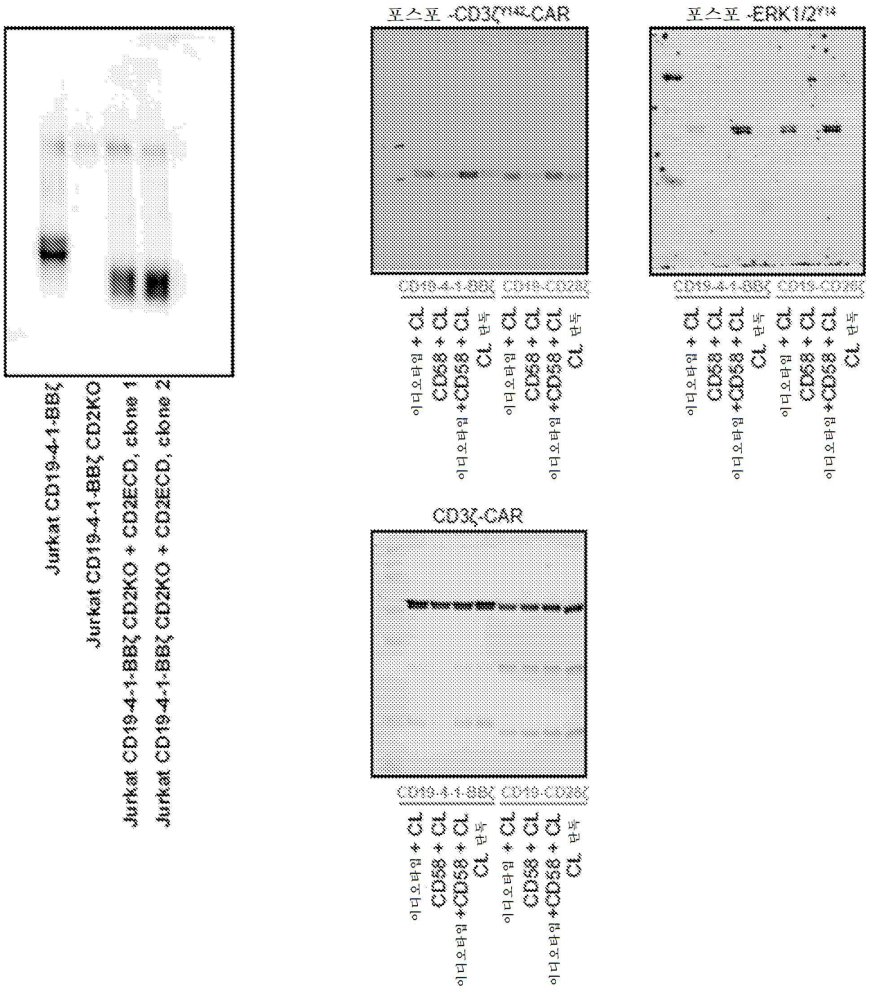
도면7b



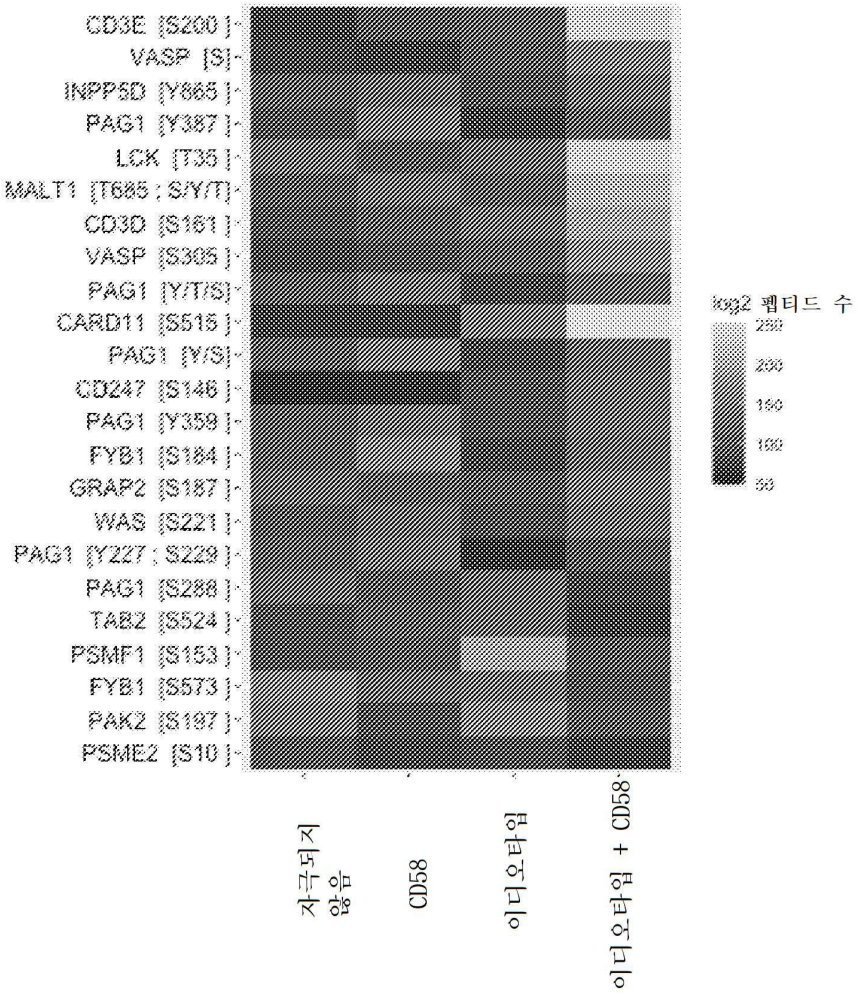
도면7c


MOCK, Nalm6-WT
MOCK, Nalm6-CD58KO
종양 후 일수

도면8a


Jurkat CD19-4-1-BBζ
Jurkat CD19-4-1-BBζ CD2KO
Jurkat CD19-4-1-BBζ CD2KO + CD2ECD, clone 1
Jurkat CD19-4-1-BBζ CD2KO + CD2ECD, clone 2
포스포 -CD3ζ(Y142)-CAR
포스포 -ERK1/2(T202/Y204)
CD3ζ-CAR
CD19-4-1-BBζ
CD19-CD28ζ
아무것도 없음
CL
CD58 + CL
아무것도 없음+CD58 + CL
CL 단독

도면8b



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> The Board of Trustees of the Leland Stanford Junior University

<120> Methods for diagnosing or treating health conditions or optimizing therapeutic efficacy of CAR-T cells therapies

<130> 078430-525001WO

<140> Herewith

<141> Herewith

<150> US 63/109,611

<151> 2020-11-04

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 250

<212> PRT

<213> Human sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Human CD58 isoform 1

<400> 1

Met Val Ala Gly Ser Asp Ala Gly Arg Ala Leu Gly Val Leu Ser Val
1 5 10 15
Val Cys Leu Leu His Cys Phe Gly Phe Ile Ser Cys Phe Ser Gln Gln
20 25 30
Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His Val Pro Ser Asn
35 40 45
Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys Asp Lys Val Ala
50 55 60

Glu Leu Glu Asn Ser Glu Phe Arg Ala Phe Ser Ser Phe Lys Asn Arg
65 70 75 80
Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile Tyr Asn Leu Thr
85 90 95
Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Pro Asn Ile Thr Asp
100 105 110
Thr Met Lys Phe Phe Leu Tyr Val Leu Glu Ser Leu Pro Ser Pro Thr
115 120 125

Leu Thr Cys Ala Leu Thr Asn Gly Ser Ile Glu Val Gln Cys Met Ile
130 135 140
Pro Glu His Tyr Asn Ser His Arg Gly Leu Ile Met Tyr Ser Trp Asp
145 150 155 160
Cys Pro Met Glu Gln Cys Lys Arg Asn Ser Thr Ser Ile Tyr Phe Lys
165 170 175
Met Glu Asn Asp Leu Pro Gln Lys Ile Gln Cys Thr Leu Ser Asn Pro
180 185 190

Leu Phe Asn Thr Thr Ser Ser Ile Ile Leu Thr Thr Cys Ile Pro Ser
195 200 205

Ser Gly His Ser Arg His Arg Tyr Ala Leu Ile Pro Ile Pro Leu Ala
210 215 220

Val Ile Thr Thr Cys Ile Val Leu Tyr Met Asn Gly Ile Leu Lys Cys
225 230 235 240

Asp Arg Lys Pro Asp Arg Thr Asn Ser Asn
245 250

<210> 2

<211> 237

<212> PRT

<213> Hommo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Human CD58 isoform 2

<400> 2

Met Val Ala Gly Ser Asp Ala Gly Arg Ala Leu Gly Val Leu Ser Val
1 5 10 15

Val Cys Leu Leu His Cys Phe Gly Phe Ile Ser Cys Phe Ser Gln Gln
20 25 30

Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His Val Pro Ser Asn
35 40 45

Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys Asp Lys Val Ala
50 55 60

Glu Leu Glu Asn Ser Glu Phe Arg Ala Phe Ser Ser Phe Lys Asn Arg
65 70 75 80

Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile Tyr Asn Leu Thr
85 90 95

Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Pro Asn Ile Thr Asp
100 105 110

Thr Met Lys Phe Phe Leu Tyr Val Leu Glu Ser Leu Pro Ser Pro Thr
115 120 125

Leu Thr Cys Ala Leu Thr Asn Gly Ser Ile Glu Val Gln Cys Met Ile

130 135 140

Pro Glu His Tyr Asn Ser His Arg Gly Leu Ile Met Tyr Ser Trp Asp

145 150 155 160

Cys Pro Met Glu Gln Cys Lys Arg Asn Ser Thr Ser Ile Tyr Phe Lys

165 170 175

Met Glu Asn Asp Leu Pro Gln Lys Ile Gln Cys Thr Leu Ser Asn Pro

180 185 190

Leu Phe Asn Thr Thr Ser Ser Ile Ile Leu Thr Thr Cys Ile Pro Ser

195 200 205

Ser Gly His Ser Arg His Arg Tyr Ala Leu Ile Pro Ile Pro Leu Ala

210 215 220

Val Ile Thr Thr Cys Ile Val Leu Tyr Met Asn Val Leu

225 230 235

<210> 3

<211> 484

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<223> CD22 svFv (M971)-41BB-Z

<400> 3

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly

20 25 30

Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly

35 40 45

Asp Ser Val Ser Ser Asn Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser

50 55 60

Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys

65 70 75 80

Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn

85 90 95

Pro Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr

100 105 110

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Val Thr Gly Asp

115 120 125

Leu Glu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val

130 135 140

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Gln Thr Ile Trp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly

180 185 190

Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly

195 200 205

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu

210 215 220

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln

225 230 235 240

Gln Ser Tyr Ser Ile Pro Gln Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu

245 250 255

Ile Lys Ala Ala Ala Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro

260 265 270

Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys

275 280 285

Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala

290 295 300

Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu

305 310 315 320

Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys

325 330 335

Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr
340 345 350
Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly
355 360 365
Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala

370 375 380
Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg
385 390 395 400
Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu
405 410 415
Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
420 425 430
Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met

435 440 445
Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
450 455 460
Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
465 470 475 480
Leu Pro Pro Arg

<210> 4
<211> 452
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Synthetic construct
<220><221> MISC_FEATURE
<223> CD19 scFv-28tm-CD2

<400> 4
Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15
Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
35 40 45
Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly
50 55 60

Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val
65 70 75 80
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr
85 90 95
Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln
100 105 110
Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
115 120 125

Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
130 135 140
Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
145 150 155 160
Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu
165 170 175
Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu
180 185 190

Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser
195 200 205
Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
210 215 220
Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr
225 230 235 240
Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
245 250 255

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Ile Glu
260 265 270
Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr

275 280 285

Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro

290 295 300

Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu

305 310 315 320

Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val

325 330 335

Lys Arg Lys Lys Gln Arg Ser Arg Arg Asn Asp Glu Glu Leu Glu Thr

340 345 350

Arg Ala His Arg Val Ala Thr Glu Glu Arg Gly Arg Lys Pro His Gln

355 360 365

Ile Pro Ala Ser Thr Pro Gln Asn Pro Ala Thr Ser Gln His Pro Pro

370 375 380

Pro Pro Pro Gly His Arg Ser Gln Ala Pro Ser His Arg Pro Pro Pro

385 390 395 400

Pro Gly His Arg Val Gln His Gln Pro Gln Lys Arg Pro Pro Ala Pro

405 410 415

Ser Gly Thr Gln Val His Gln Gln Lys Gly Pro Pro Leu Pro Arg Pro

420 425 430

Arg Val Gln Pro Lys Pro Pro His Gly Ala Ala Glu Asn Ser Leu Ser

435 440 445

Pro Ser Ser Asn

450

<210> 5

<211> 258

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<223> m971 scFv plus leader of SEQ ID NO: 3

<400> 5

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly

20 25 30

Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly

35 40 45

Asp Ser Val Ser Ser Asn Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser

50 55 60

Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys

65 70 75 80

Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn

85 90 95

Pro Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr

100 105 110

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Val Thr Gly Asp

115 120 125

Leu Glu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val

130 135 140

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Gln Thr Ile Trp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly

180 185 190

Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly

195 200 205

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu

210 215 220

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln

225 230 235 240

Gln Ser Tyr Ser Ile Pro Gln Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu

245 250 255

Ile Lys

<210> 6

<211> 72

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Hinge/TM and restriction enzyme site of SEQ ID NO: 3

<400> 6

Ala Ala Ala Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro
1 5 10 15

Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro
20 25 30

Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
35 40 45

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
50 55 60

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
65 70

<210> 7

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<223> costimulatory domain of SEQ ID NO: 3

<400> 7

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

35 40

<210> 8

<211> 267

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<223> CD19 scFv plus leader of SEQ ID NO: 4

<400> 8

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly
50 55 60

Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln
100 105 110

Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
115 120 125

Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
130 135 140

Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
145 150 155 160

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu
165 170 175

Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu
180 185 190

Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser
195 200 205

Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
210 215 220

Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr
225 230 235 240

Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
245 250 255

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
260 265

<210> 9

<211> 69

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Hinge/TM and restriction enzyme site of SEQ ID NO: 4

<400> 9

Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu
1 5 10 15

Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro
20 25 30

Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val
35 40 45

Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe
50 55 60

Ile Ile Phe Trp Val
65

<210> 10

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220

><223> Synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<223> costimulatory domain of SEQ ID NO: 4

<400> 10

Lys Arg Lys Lys Gln Arg Ser Arg Arg Asn Asp Glu Glu Leu Glu Thr
1 5 10 15

Arg Ala His Arg Val Ala Thr Glu Glu Arg Gly Arg Lys Pro His Gln
20 25 30

Ile Pro Ala Ser Thr Pro Gln Asn Pro Ala Thr Ser Gln His Pro Pro
35 40 45

Pro Pro Pro Gly His Arg Ser Gln Ala Pro Ser His Arg Pro Pro Pro
50 55 60

Pro Gly His Arg Val Gln His Gln Pro Gln Lys Arg Pro Pro Ala Pro
65 70 75 80

Ser Gly Thr Gln Val His Gln Gln Lys Gly Pro Pro Leu Pro Arg Pro
85 90 95

Arg Val Gln Pro Lys Pro Pro His Gly Ala Ala Glu Asn Ser Leu Ser
100 105 110

Pro Ser Ser Asn
115

<210> 11

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<223> connector sequence

<400> 11

Arg Lys Arg Arg Glu Phe Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala
1 5 10 15

Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Leu

20 25

<210> 12

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<223> encodes connector sequence of SEQ ID NO: 11

<400> 12

cgcaagagaa gagaattcgc aacaaacttc tctctgctga aacaagccgg agatgtcgaa 60

gagaatcctg gaccgctcga g 81

<210> 13

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<223> furin cleavage sequence

<400> 13

Arg Lys Arg Arg

1

<210> 14

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<223> auproteolytic peptide sequence P2A

<400> 14

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

1 5 10 15

Pro Gly Pro