



등록특허 10-2613109



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년12월13일
(11) 등록번호 10-2613109
(24) 등록일자 2023년12월08일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/725 (2006.01) *A61K 35/17* (2015.01)
A61K 38/17 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 14/705* (2006.01)
C07K 14/72 (2006.01) *C12N 5/0783* (2010.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/7051 (2013.01)
A61K 35/17 (2023.05)
- (21) 출원번호 10-2019-7009375
- (22) 출원일자(국제) 2017년08월11일
심사청구일자 2020년07월31일
- (85) 번역문제출일자 2019년04월01일
- (65) 공개번호 10-2019-0057072
- (43) 공개일자 2019년05월27일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2017/046630
- (87) 국제공개번호 WO 2018/052594
국제공개일자 2018년03월22일
- (30) 우선권주장
62/383,139 2016년09월02일 미국(US)
62/419,817 2016년11월09일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
US20140242701 A1*
US20150139943 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 9 항

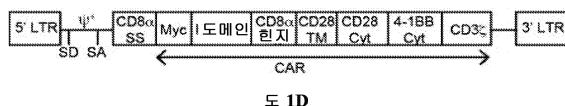
심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 ICAM-1 특이적 I 도메인 키메라 항원 수용체

(57) 요약

본 발명은 인간 림프구 기능-연관 항원 1 (LFA-1)의 α_L 서브유닛의 I 도메인을 포함하는 세포내 부착 분자-1 (ICAM-1)에 특이적인 키메라 항원 수용체 (CAR)에 관한 것이다. 본 발명은 특히 ICAM-1에 대해 상이한 친화성 (1 mM 내지 1 nM Kd)을 갖는 인간 I 도메인을 포함하는 CAR에 관한 것이다. ICAM-1에 대해 낮은 친화성 (1 내지 200 μ M Kd)을 갖는 인간 I 도메인을 포함하는 CAR-T 세포는 기본 ICAM-1 발현을 갖는 건강한 조직의 표적화를 피할 수 있는 한편 동시에 높은 ICAM-1 발현을 갖는 종양 조직에 대해 증가된 역가 및 장기간 효능을 나타낸다. 본 발명은 또한 암을 앓는 대상체에게 인간 I 도메인을 포함하는 CAR-T 세포를 투여하고, 그리하여 CAR-T 세포가 ICAM-1을 과발현하는 암 세포에 결합하여 암 세포를 사멸시킴으로써 암을 치료하기 위한 양자 세포 요법 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1d



(52) CPC특허분류

A61K 38/1796 (2013.01)
A61K 39/001111 (2023.05)
A61K 51/083 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/70521 (2013.01)
C07K 14/70553 (2013.01)
C07K 14/723 (2013.01)
C12N 5/0636 (2023.05)
C07K 2319/03 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

N-말단에서 C-말단으로,

- (i) 인간 램프구 기능-연관 항원-1의 α_L 서브유닛의 I 도메인,
- (ii) 경막 도메인,
- (iii) 적어도 하나의 공자극성 도메인, 및
- (iv) 활성화 도메인

을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)로서,

I 도메인은 SEQ ID NO: 1의 130-310 아미노산의 서열을 포함하는 야생형 I 도메인에, F292A, F292S, L289G, F265S 및 F292G로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 돌연변이를 갖는 것인, 키메라 항원 수용체 (CAR).

청구항 2

제1항에 있어서, I 도메인은 야생형 I 도메인에 F292G 돌연변이를 포함하는 것인, 키메라 항원 수용체 (CAR).

청구항 3

N-말단에서 C-말단으로,

- (i) 인간 램프구 기능-연관 항원-1의 α_L 서브유닛의 I 도메인,
- (ii) 경막 도메인,
- (iii) 적어도 하나의 공자극성 도메인, 및
- (iv) 활성화 도메인

을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)로서,

I 도메인은 SEQ ID NO: 1의 130-310 아미노산의 서열을 포함하는 야생형 I 도메인에, 세 돌연변이 F265S/F292G/G311C를 갖는 야생형 I 도메인인, 키메라 항원 수용체 (CAR).

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 공자극성 도메인은 CD28, 4-1BB, ICOS-1, CD27, OX-40, GITR 및 DAP10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 키메라 항원 수용체 (CAR).

청구항 5

제4항에 있어서, 활성화 도메인은 CD3 제타인 키메라 항원 수용체 (CAR).

청구항 6

제5항의 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 단리된 핵산 서열.

청구항 7

제1항 또는 제2항의 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하도록 변형된 T 세포 또는 자연 살해 세포.

청구항 8

암을 앓고 있는 대상체에서 암을 치료하기 위한 약학 조성물로서, 제7항의 CAR-T 세포를 포함하고, 대상체의 암 세포는 ICAM-1을 과발현하고, CAR-T 세포는 암 세포에 결합하여 암 세포를 사멸시키는 것인 약학 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 암은 갑상선암, 위암, 췌장암 또는 유방암인 약학 조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

서열 목록, 표 또는 컴퓨터 프로그램에 대한 참조

[0002]

서열 목록은 2017년 7월 17일에 생성된 크기가 9.89 킬로바이트인 Sequence Listing.txt의 파일 명칭으로 EFS-웹을 통해 ASCII 형식 텍스트 파일로서 본 명세서와 함께 제출되었다. EFS-웹을 통해 제출된 서열 목록은 명세서의 일부분이며 본 명세서에 그 전문이 참조로 편입된다.

[0003]

발명의 분야

[0004]

본 발명은 인간 I 도메인을 포함하는 ICAM-1에 특이적인 키메라 항원 수용체에 관한 것이다. 본 발명은 특히 ICAM-1에 대해 상이한 친화성 (1 mM 내지 1 nM)을 갖는 인간 I 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체에 관한 것이다.

배경 기술

[0005]

면역요법은 암의 치료를 위한 매우 유망한 접근법으로서 출현되었다.

[0006]

CAR로 유전자 변형된 T 세포는 종양-특이적 T 세포를 디자인하는 일반적인 접근법이다. CAR (키메라 항원 수용체)-T 세포 표적화 종양-연관 항원은 환자에게 주입 (양자 세포 전달 또는 ACT)될 수 있어서 효율적인 면역 요법 접근법을 의미한다. 화학요법 또는 항체와 비교하여 CAR-T 기술의 장점은 재프로그래드된 조작된 T 세포가 환자 내에서 증식될 수 있고 지속될 수 있어서 생존 약물처럼 작용할 수 있다는 것이다.

[0007]

CAR 분자는 TCR 제타 사슬 및 공자극성 분자 예컨대 CD28 및/또는 4-1BB로 구성된 세포내 신호전달 도메인에 융합된, 합성 결합 모이어티, 전형적으로 항체-유래 단일 사슬 단편 가변체 (svFv) 또는 임의의 천연 항원-감지 엘리먼트로 구성된다.^{1, 2} CAR 매개 표적화의 장점은 1) 천연, 비통합적 TCR 및 공자극성 신호전달과 비교하여, 단일 결합 사건을 통해서 시스 작용으로 활성화, 증식 및 생존 신호의 제공; 2) MHC-독립적 항원 인식을 통해서 종양 세포에 의한 MHC의 하향조절을 우회하는 능력; 및 3) CAR 및 항원 간 고친화성 상호작용에 의해 가능해진 저항원 밀도의 종양 세포의 인식을 비롯하여 감소된 활성화 한계치를 포함한다.^{3, 4}

[0008]

이상적인 CAR 표적 항원은 건강한 조직에서는 검출불가능하고, 고도로 발현되는 천연, 표면-노출 종양 네오탕원이다. 그러나, 이러한 항원의 절대적인 희귀성에 기인하여, 많은 일반적으로 표적화되는 고형 종양 항원은 낮은 수준이지만 비종양 조직에 의해서도 또한 발현된다. 이러한 항원에 대해 높은 친화성을 갖는 CAR 분자는 건강한 조직의 부차적인 표적화를 초래할 수 있어서 그 결과로 지금까지 CAR T 세포 요법 진보의 주요한 제

한 인자인 표적-적중, 종양-외 독성을 야기할 수 있다.

[0009] 통상의 CAR은 단일-사슬 항체 형태를 사용하여 구축되고, 표적 항원에 대해 나노몰 이하 내지 저 나노몰의 친화성을 보유하도록 선택적으로 조작된다. 그러나, 증가된 CAR T 세포 감도는 최고 수준의 제약을 갖는 것들 또는 진짜 종양 항원을 표적화할 때에만 유리할 수 있다.^{17, 36} 그렇지 않으면, 증가된 감도는 대체로 항원 밀도에 둔감한 방식으로 표적-발현 세포의 용해에 따른 감소된 선택성의 대가를 치르게 된다¹⁸.

[0010] 개선된 치료 지수를 갖는 CAR, 즉 전신 독성을 최소화하면서 종양을 사멸시킬 수 있는 CAR에 대한 요구가 존재한다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1A-1G는 계단식, 10⁶-배 편차의 친화성을 갖는 ICAM-1 특이적 CAR의 구축 및 그들의 시험관내 결과를 도시한다.

도 1A: ICAM-1와의 복합체로서 LFA-1의 개략도. LFA-1 인테그린의 α 및 β 사슬, 및 모듈식 도메인이 표지되어 있다. LFA-1 및 ICAM-1 상호작용에 필요한 금속 이온은 원형으로 도시되어 있다.

도 1B: LFA-1 I 도메인 및 ICAM-1 (D1)의 N-말단 도메인의 구조 모델이 리본 다이아그램으로 도시되어 있다. N 및 C-말단, 및 돌연변이 핫 스팟이 표시되어 있다.

도 1C: 마우스 ICAM-1의 위를 흐르는, F265S/F292G*를 제외한 고정된 인간 ICAM-1과 결합하는 I 도메인 변이체의 SPR 센소그램 (Jin 등⁵⁴의 도 2 및 Wong 등⁵⁵의 도 1로부터 적합화됨).

도 1D: I 도메인 CAR을 코딩하는 렌티바이러스 벡터의 개략도. LTR = 긴 말단 반복부; SD = 스팔라이스 도너; SA = 스팔라이스 억셉터; ψ⁺ = 패키징 신호; SS = 신호 서열; TM = 경막; Cyt = 세포액 도메인.

도 1E: Myc-태그화 CAR (TM, F292G, F292A, 및 WT I 도메인)이 형질도입된 Jurkat T 세포에 결합된 항-Myc 항체. NT (non-transduced) = 비형질도입.

도 1F: HEK 293T 세포에서 발현된 CAR에 결합된 재조합 ICAM-1-Fc.

도 1G: Jurkat T 세포에서 발현된 I 도메인 CAR 및 가용성 인간 (상부) 및 마우스 (하부) ICAM-1 (CD54) 코팅된 표면 사이의 상대적 결합 친화성을 측정한 V-바닥 부착 어세이. n=3; 두네트 (Dunnett)의 다중 비교 검정에 의한 NT 대비 *의 경우에 p < 0.01.

도 2A-2D는 시험관 내 초대 CAR T 세포의 친화성 및 항원-밀도 의존적 활성화를 도시한다.

도 2A: 상이한 I 도메인 CAR이 형질도입된 초대 T 세포에 의한 표적 사멸화를 측정하기 위한 이펙터 대 표적 (E:T) 어세이. 각각의 표적은 TM, F292G, F292A 또는 WT CAR T 세포와 5:1의 E:T 비율로 개별적으로 인큐베이션되었다. 생존율 백분율은 NT T 세포와 인큐베이션된 표적 세포 유래의 발광도에 대해 정규화되었다 (n=3, ± 표준 편차 (SD)). 변수 슬로프 시그모이드 곡선 방정식을 사용하여 데이터를 적합화시켰다. 두네트의 다중 비교 검정에 의한 NT 대비 * 경우에 p < 0.01. 도 2B: 시그모이드 방정식의 헐 슬로프 및 50% 사멸화의 최고 적합도 값을 I 도메인 CAR의 친화성에 대해 그래프화하였다. r-스퀘어 값이 0.85보다 높은 최고 적합도 값을 그래프화하였다.

도 2C: HeLa 세포와 비교하여 초대 T 세포에서 ICAM-1 발현. 회색 및 검정색 히스토그램은 각각 미표지된 세포 및 R6.5 항체-표지된 세포에 해당된다.

도 2D: IFN-γ 방출은 24 시간 동안 상이한 표적 세포와 공동-인큐베이션 이후에 각각의 CAR T 변이체에 대한 ELISA를 통해 측정되었다 (n=3). 두네트의 다중 비교 검정에 의해 8505C/-ICAM-1 대비 *의 경우에 p < 0.01.

도 3A-3C는 마이크로볼 친화성 CAR T 세포가 우수한 종양 근절성, 종양 재발 억제성 및 생존 이득을 제공한다는 것을 보여준다.

도 3A: 전신 발광 이미지화를 사용하여 종양 이식 후 8일에 상이한 CAR T 세포 변이체가 주입된 마우스에서 종양 부담량을 추산하였다. No T = T 세포를 수용하지 않은 마우스.

도 3B: 마우스는 종양 이식 후 10일에 CAR T 세포로 치치되었다. NT = 비형질도입된 T 세포.

도 3C: 상이한 치치를 수용한 마우스의 생존 그래프. NT 대비 Log-순위 (만델-콕스) 검정 P 값은 No T 및 TM의 경우 유의하지 않았고, F292G의 경우 $p = 0.008$ 이고, R6.5의 경우 $p = 0.025$ 이고, F292A의 경우에 $p = 0.0016$ 이다.

도 4A-4D는 종양 부담량, T 세포 분포 및 사이토카인 방출의 종단, 동시발생적 측정을 도시한다.

도 4A: SSTR2-I 도메인 벡터의 개략도.

도 4B: PET/CT에 의한 NOTAOCT 흡수율 (각 패널의 상부 절반), 및 전신 발광 이미지화에 의한 종양 부담량 (각 패널의 하부 절반)의 종단 측정. 이미지는 각 코호트의 4마리 마우스의 대표도이다. 최대 추적자 흡수 일자에 찍은 전신 PET/CT 이미지는 최우측에 도시되어 있다. 이미지화 시점은 하부 패널 아래에 표시되어 있다. 예를 들어, 15는 종양 이종이식 후 15일 (및 T 세포 주입 후 7일)을 나타낸다.

도 4C: 표시된 대로 치치된 마우스 폐에서 발광도 및 추적자 흡수율의 정량. 상부 패널: NT (비형질도입된) T 세포. 하부 수준: CAR-F292A.

도 4D: 'b' 및 'c'에서와 동일한 마우스로부터 다양한 시점에 채혈된 혈액에서 측정된 사이토카인 수준을 그래프화하였다 (평균 ± SD, 중복 측정). 상부 패널: NT (비형질도입된) T 세포. 하부 패널: CAR-F292A.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 정의

본 명세서에서 사용시, "약"은 인용된 값의 ± 10%를 의미한다.

본 명세서에서 사용되는 "양자 T 세포 요법"은 백신접종 단독으로 수득할 수 있는 것보다 더 많은 수의 T 세포를 획득하기 위한 종양 특이적 T 세포의 단리 및 생체외 확장을 포함한다. 다음으로 종양 특이적 T 세포는 암을 공격하여 사멸시킬 수 있는 T 세포를 통해서 잔존하는 종양을 제압하는 능력을 그들 면역계에 제공하려는 시도로 암을 갖는 환자에게 주입된다.

본 명세서에서 사용되는 "친화성"은 그 리간드 (예를 들어, ICAM-1)에 대한 단일 문자 (예를 들어, I 도메인)의 결합 강도이다. 친화성은 전형적으로 측정되어 평형 해리 상수 (K_D 또는 K_d)로 보고되고, 이것은 2분자 상호작용의 강도 순서를 평가하여 순위매기는데 사용된다.

본 명세서에서 사용되는 "키메라 항원 수용체 (CAR)"는 항원에 결합할 수 있는 세포외 도메인, 세포외 도메인이 유래된 폴리펩티드와 상이한 폴리펩티드로부터 유래된 경막 도메인, 및 적어도 하나의 세포내 도메인을 포함하는 융합된 단백질을 의미한다. "항원에 결합할 수 있는 세포외 도메인"은 일정한 항원에 결합할 수 있는 임의의 올리고펩티드 또는 폴리펩티드를 의미한다. "세포내 도메인"은 세포 내에서 생물학적 프로세스의 활성화 또는 억제를 야기하는 신호를 전달하는 도메인으로서 기능하는 것으로 알려진 임의의 올리고펩티드 또는 폴리펩티드를 의미한다.

본 명세서에서 사용되는 "도메인"은 다른 영역과 독립적으로 특정한 구조로 접히는 폴리펩티드의 한 영역을 의미한다.

본 명세서에서 사용되는 "인테그린" 또는 "인테그린 수용체" (상호교환적으로 사용됨)는 임의의 많은 세포 표면 수용체 단백질을 의미하고, 또한 세포외 매트릭스 리간드 또는 다른 세포 부착 단백질 리간드에 결합하고 그리하여 세포-세포 및 세포-매트릭스 부착 프로세스를 매개하는 부착 수용체를 의미한다. 그들 리간드에 대한 인테그린의 결합 친화성은 인테그린의 입체형태 변화를 통해 조절된다. 인테그린은 생리학적 프로세스 예컨대, 예를 들어, 배아형성, 항상성, 상처 치유, 면역 반응 및 조직 아키텍처의 형성/유지에 관여된다. 인테그린 서브페밀리는 상이한 특이성을 갖는 부착 단백질 수용체를 형성하기 위해 상이한 알파-서브유닛과 조합된 베타-서브유닛을 함유한다.

"세포내 부착 분자-1 (Intercellular adhesion molecule-1)" 또는 "ICAM-1", 즉 유전자은행 수탁 번호 NM_000201, NP_000192는 $\alpha_L\beta_2$ 인테그린의 리간드이고, 이의 N-말단 도메인 (D1)은 MIDAS 금속에 대한 ICAM-1 잔기 Glu-34의 배위를 통해서 α_L I 도메인에 결합된다. 전형적으로 ICAM1은 면역계의 세포 및 내피 세포 상에서 발현된다. ICAM1은 $\alpha_L\beta_2$ 및 $\alpha_M\beta_2$ 유형의 인테그린에 결합된다. ICAM-1은 몇몇 암종 및 연관 기

질²⁴ 을 비롯하여, 염증성 병태²⁵에서 상향조절된다. 질환 조직이외에도, ICAM-1은 내피 세포, 면역 세포, 및 일부 상피 세포를 포함한 몇몇 유형의 세포에서 기본적으로 발현된다.²⁵

[0020] "림프구 기능-연관 항원-1 (Lymphocyte function-associated antigen-1)", "LFA-1", " $\alpha_L\beta_2$ 인테그린" 또는 "CD18/CD11a"는 백혈구 인테그린 서브페밀리의 구성원을 의미한다. LFA-1은 모든 T-세포 및 또한 B-세포, 마크로파지, 호중구 및 NK 세포 상에서 발견되며, 감염 부위로의 동원에 관여된다. 이것은 항원-제시 세포상의 ICAM-1에 결합하여 부착 분자로서 기능한다.

[0021] 본 명세서에서 사용되는 "I 도메인"은 삽입되거나 또는 LFA-1의 α_L 서브유닛의 I 도메인을 의미하고, LFA-1의 리간드 결합의 알로스테릭 매개인자이다. I 도메인은 ICAM-1의 천연 리간드이다. 금속 이온-의존적 부착 부위 (MIDAS)로 알려진, I 도메인의 리간드 결합 부위는 C-말단 α_7 헬릭스에 의해 알로스테릭하게 조절되는 2개의 상이한 입체형태로서 존재한다. 야생형 (WT) I 도메인은 1145개 아미노산 길이의 성숙한 α_L 인테그린 서브유닛 단백질 (SEQ ID NO: 1로서, 이것은 유전자은행 수탁 번호 NP_002200의 아미노산 잔기 26-1170임)의 아미노산 잔기 130-310을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 아미노산 잔기의 모든 번호매김은 성숙한 α_L 인테그린의 아미노산 서열 (SEQ ID NO: 1)을 의미하고, SEQ ID NO: 1의 잔기 1은 유전자은행 수탁 번호 NP_002200의 서열의 잔기 26에 상응한다.

[0022] 본 명세서에서 사용되는 "종양 항원"은 이의 발현이 암을 야기하는, 항원성을 갖는 생물학적 분자를 의미한다.

설명

[0024] 본 발명은 이의 생리학적 리간드인 LFA-1을 사용하는 광범위한 종양 생물마커인 ICAM-1을 표적으로 하는 키메라 항원 수용체를 제공한다. 발명자는 인간 I 도메인을 포함하는 친화성-변이체 CAR의 패널을 구축하였고, CAR은 ICAM-1에 대해 1 mM 내지 1 nM의 친화성을 갖는다. 본 발명은 광범위한 항-종양 적용가능성을 갖는 ICAM-1-특이적 CAR을 제공한다. ICAM-1을 표적으로 하는 마이크로몰 친화성을 갖는 I 도메인을 포함하는 CAR T 세포는 그들이 밀도가 훨씬 낮은 정상 세포는 피하면서 표적 항원을 과발현하는 세포를 용해시킬 수 있으므로, 통상의 CAR에 비해 개선된 효능 및 안전성을 갖는다.

[0025] 본 발명은 N-말단에서 C-말단으로, (i) 림프구 기능-연관 항원-1의 α_L 서브유닛의 인간 I 도메인, (ii) 경막 도메인, (iii) 적어도 하나의 공자극성 도메인, 및 (iv) 활성화 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체 융합 단백질에 관한 것이다.

[0026] 본 발명의 CAR은 (i) ICAM-1에 특이적으로 결합하는 인간 I 도메인을 포함한다. ICAM-1에 특이적인 I 도메인은 LFA-1로부터 유래된 I 도메인을 사용하여 만들어 질 수 있다 (도 1A 및 1B). I 도메인의 다양한 활성화 점 돌연변이는 금속-이온 의존적 부착 부위 (MIDAS)로 알려진 영역을 포함하는 결합 계면의 외부에 위치된다 (도 1B). 1 mM에서 1 nM 까지의 ICAM-1에 대한 I 도메인 친화성의 계단식 상승을 함유하는 돌연변이는 ICAM-1 코팅된 표면, 비드 또는 세포에 대한 그들의 더 높은 결합성에 대해 돌연변이체 라이브러리를 스크리닝하여 수득될 수 있다. 예를 들어, 상이한 친화성 돌연변이체는 효모 디스플레이 시스템을 사용하여 단리될 수 있다 (Jin et al.²⁷ 참조). 친화성은 먼저 I 도메인 및 ICAM-1 사이의 1:1 결합 친화성을 평가하기 위해 표면 플라스몬 공명 (예를 들어, Biacore)을 통해 측정된다. 세포 상에 발현된 CAR에 대한 ICAM-1의 친화성은 유세포측정법을 통해서 그리고 랑무르 (Langmuir) 등온 방정식을 사용하여 측정될 수 있다. 유사하게, 스캐차드 (Scatchard) 분석은 자유 및 세포-표면 결합 리간드 (이 경우에, 방사성-표지 또는 형광-표지 ICAM-1)의 양을 측정하여 CAR 친화성을 추산하기 위해 수행될 수 있다.

[0027] 표 1은 ICAM-1에 대한 야생형 및 돌연변이체 LFA-1 I 도메인의 측정된 친화성을 보여준다. 대부분의 돌연변이는 소수성의 부피가 큰 측쇄 (F, L, I)가 보다 친수성 (A, S, T)으로 변화된 것이고, 그리하여 더 조밀한 저친화성 I 도메인의 입체형태 구조가 파괴된다. 예를 들어, C-말단 α_7 -헬릭스에 위치된 Phe-292의 Ala (F292A) 및 Gly (F292G)으로의 치환은 각각 ~20 μ M 및 0.1 μ M의 친화성 (K_D)을 제공한다 (표 1). Phe-265에서 다른 동등하게 활성화된 돌연변이와 F292G의 조합 (F265S/F292G)은 야생형 (WT) I 도메인 (K_D = 1.5 mM) 보다 대략 200,000배 높은 6 nM의 친화성을 제공한다 (도 1C). 개방 위치로 F265S/F292G의 C-말단 α_7 -헬릭스를 고정시키기 위해서 (도 1A), 천연적으로 쌍형성하지 않는 Cys-125와 디술피드 결합을 형성하도록 Gly-311이 F265S/F292G 돌연변이체에서 Cys (G311C)로 치환될 수 있다 (F265S/F292G/G311C, 더빙된 삼중 돌연

변이체 또는 TM) (표 1). 그러므로, ICAM-1에 대한 개별 I 도메인 변이체의 1가 친화성을 보면 플라스몬 공명 (SPR)으로 측정되거나 또는 유세포 측정법으로 추산하여, 대략 6자릿수 ($K_d \sim 1 \text{ nM}$ 내지 1 mM)를 포함하도록 디자인될 수 있다 (도 1C, 표 1). 표 1의 돌연변이체는 오직 예시 목적이고, 본 발명의 CAR이 특별한 이들 돌연변이체에 한정되는 것이 아니다. 다른 돌연변이를 갖고 1 mM 내지 1 nM 사이의 ICAM-1에 대한 친화성을 갖는 돌연변이체가 당업자에게 공지된 방법에 따라서 제조되어, 시험되고 선택될 수 있다.

표 1

명칭	SEQ ID NO: 1의 서열	친화성
야생형 (WT)	G128-G311	1.5 mM^*
I288N	G128-G311	$202 \mu\text{M}^{**}$
I309T	G128-G311	$127 \mu\text{M}^{**}$
L295A	G128-G311	$37 \mu\text{M}^{**}$
F292A	G128-G311	$20 \mu\text{M}^*$
F292S	G128-G311	$1.24 \mu\text{M}^{**}$
L289G	G128-G311	196 nM^{**}
F292G	G128-G311	119 nM^*
F265S	G128-G311	145 nM^*
F265S/F292G (DM)	G128-G311	6 nM^*
F265S/F292G/G311C (TM)	E124-S313	$\sim 1 \text{ nM}^*$
R6.5	scFv	10 nM^{***}

*SPR 측정; ** I 도메인 변이체를 발현하는 효모 세포에 대한 ICAM-1-Fc 결합성의 유세포측정 평균 형광 강도 (MFI) 값으로부터 추산⁵. 사용된 방정식은 $K_d (\text{M}) = 0.00175 * \exp(-0.1542 * \text{MFI})$ 임; ***HeLa 세포에 대해 적정된 R6.5 항체 결합성으로부터 추산³⁴.

[0028]

[0029] 일 구체예에서, 본 발명의 CAR은 1 mM 또는 그보다 강력한 인간 ICAM-1에 대한 결합 친화성을 갖는, 야생형 인간 I 도메인, 1 내지 3개 아미노산 돌연변이를 갖는 야생형 인간 I 도메인의 돌연변이체, 또는 야생형 I 도메인 또는 돌연변이체의 서열과 적어도 95%, 또는 적어도 96% 동일성 또는 적어도 97% 동일성 또는 적어도 98% 동일성 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 서열인 I 도메인을 포함한다. 일 구체예에서, 돌연변이체는 야생형 I 돌연변이의 아미노산 잔기 265, 288, 289, 292, 295, 309 또는 311에 하나 이상의 돌연변이를 가질 수 있다. 예를 들어, 돌연변이체는 야생형 I 도메인의 I288N, I309T, L295A, F292A, F292S, L289G, F292G, F265S, F265S/F292G 또는 F265S/F292G/G311C의 하나 이상의 돌연변이를 가질 수 있다. 일 구체예에서, 2종의 I 도메인 돌연변이의 조합은 각 부모 돌연변이체의 것보다 더 높은 친화성을 갖는 돌연변이체를 생성시킨다. 예를 들어, 각각 약 $100 \mu\text{M} K_d$ 를 갖는 2종 돌연변이체의 조합은 전형적으로 약 1 내지 약 $10 \mu\text{M} K_d$ 범위를 갖는 돌연변이체를 생성시킨다. F292G는 매우 강력한 점 돌연변이이고, 다른 돌연변이와 F292G의 조합은 $100 \text{ nM} K_d$ 보다 더 강력하게 ICAM-1에 대한 I 도메인 친화성을 증가시킨다. 아미노산 잔기에 대한 상기의 번호매김은 SEQ ID NO: 1의 성숙한 아미노산 서열을 참조로 하며, 잔기 번호 1은 유전자은행 수탁 번호 NP_002200의 아미노산 잔기 26에 상응한다.

[0030] 일 구체예에서, 본 발명의 CAR은 1 mM 내지 $1 \text{ nM} K_d$, 바람직하게는 1 내지 $200 \mu\text{M} K_d$ 또는 1 내지 $20 \mu\text{M} K_d$ 의 친화성으로 ICAM-1에 결합하는 I 도메인을 포함한다.

[0031] 일 구체예에서, 본 발명의 CAR은 약 120 nM 내지 약 $1 \text{ nM} K_d$ 의 친화성으로 ICAM-1에 결합하는 I 도메인, 예를 들어 F292G, F265S, F265S/F292G 및 F265S/F292G/G311C를 포함한다.

[0032] 일 구체예에서, 본 발명의 CAR은 약 $20 \mu\text{M}$ 내지 약 $120 \text{ nM} K_d$ 의 친화성으로 ICAM-1에 결합하는 I 도메인, 예를

들어 F292A, F292S 및 I289G를 포함한다.

[0033] 일 구체예에서, 본 발명의 CAR은 약 200 μM 내지 약 20 μM Kd의 친화성으로 ICAM-1에 결합하는 I 도메인, 예를 들어 I288N, I309T, L295A 및 F292A를 포함한다.

[0034] 일 구체예에서, 본 발명의 CAR은 약 1 μM 내지 약 100 μM Kd의 친화성으로 ICAM-1에 결합하는 I 도메인, 예를 들어, L296A, F292A 및 F292S를 포함한다.

[0035] 일 구체예에서, 본 발명의 CAR은 약 1 mM 내지 약 200 μM Kd의 친화성으로 ICAM-1에 결합하는 I 도메인, 예를 들어, 야생형 및 I288N을 포함한다.

[0036] 일 구체예에서, 본 발명의 CAR은 약 1 mM 내지 약 100 μM Kd의 친화성으로 ICAM-1에 결합하는 I 도메인, 예를 들어, 야생형, I288N 및 I309T를 포함한다. 상기 구체예에서 친화성은 용액 중 I 도메인 및 ICAM-1 간 상호 작용을 의미한다.

[0037] CAR 구축 시 인간 I 도메인 사용의 한가지 장점은 인간 I 도메인이 인간 ICAM-1에 대한 친화성과 비슷하게 마우스 ICAM-1에 결합한다는 것이다 (각각 2 nM 대 6 nM). 이의 마우스 상동체와의 교차-반응성은 인간 종양 이종이식편을 갖는 전임상 마우스 모델에서 표적-적중, 종양-적중 효능과 동시에 I 도메인 CAR T 세포의 표적-적중, 종양-외 독성의 검사를 가능하게 한다. 이것은 전임상 모델에서 임상 독성을 예측하는데 있어서 인간 I 도메인의 장점이다. 비교하여, R6.5 scFv (마우스 하이브리도마 클론, R6.533으로부터 유래)는 인간 ICAM-1에 대해 10 nM의 Kd를 갖지만 (표 1) 마우스 ICAM-1과 교차-반응하지 않는다.

[0038] 본 발명의 CAR은 막을 관통하는 (ii) 경막 도메인을 포함한다. 경막 도메인은 천연 폴리펩티드로부터 유래될 수 있거나, 또는 인공적으로 디자인될 수 있다. 천연 폴리펩티드로부터 유래된 경막 도메인은 임의의 막-결합 또는 경막 단백질로부터 수득될 수 있다. 예를 들어, T 세포 수용체 α 또는 β 사슬, CD3 제타 사슬, CD28, CD3-엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, ICOS, CD154 또는 GITR의 경막 도메인이 사용될 수 있다. 인공적으로 디자인된 경막 도메인은 소수 성 잔기 예컨대 류신 및 발린을 주로 포함하는 폴리펩티드이다. 바람직한 구체예에서, 경막 도메인은 양호한 수용체 안정성을 제공하는, CD28 또는 CD8로부터 유래된다.

[0039] 본 발명의 CAR은 (iii) 인간 CD28, 4-1BB (CD137), ICOS-1, CD27, OX 40 (CD137), DAP10 및 GITR (AITR)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 공자극성 도메인을 포함한다. 구체예에서, CAR은 CD28 및 4-1BB의 2개 공자극성 도메인을 포함한다.

[0040] 엔도 도메인 (활성화 도메인)은 CAR의 신호-전달 부분이다. 항원 인식 이후에, 수용체 클러스터 및 신호가 세포로 전달된다. 가장 일반적으로 사용되는 엔도도메인 성분은 3개 ITAM을 함유하는, CD3-제타 (CD3 Z 또는 CD3 ζ)의 것이다. 이것은 항원이 결합된 후에 T 세포로 활성화 신호를 전달한다. CD3-제타는 완전하게 적격한 활성화 신호를 제공할 수 없어서, 추가적인 공자극성 신호전달을 필요로 할 수 있다. 예를 들어, 증식/생존 신호를 전달하기 위해서 하나 이상의 공자극성 도메인이 CD3-제타와 함께 사용될 수 있다.

[0041] 본 발명의 CAR은 CAR이 세포, 예컨대 T-세포 내부에서 발현될 때, 신생 단백질이 세포질 망상구조로 유도되고 후속하여 그것이 발현되는 세포 표면으로 유도되도록 I 도메인의 N-말단에 신호 웨პ티드를 포함할 수 있다. 신호 웨პ티드의 코어는 단일 알파-헬릭스를 형성하는 경향을 갖는 소수성 아미노산의 긴 스트레치를 함유할 수 있다. 신호 웨პ티드는 전좌 동안 폴리펩티드의 적절한 토플로지를 강화시키는데 도움이 되는, 양으로 하전된 아미노산의 짧은 스트레치로 시작될 수 있다. 신호 웨პ티드의 말단에는 전형적으로 신호 웨პ티다제에 의해 인식되어 절단되는 아미노산의 스트레치가 존재한다. 신호 웨პ티다제는 전좌의 완료 동안 또는 그 이후에 절단되어 자유 신호 웨პ티드 및 성숙한 단백질을 생성시킬 수 있다. 이어서, 자유 신호 웨პ티드는 특이적 프로테아제에 의해 분해된다. 예로서, 신호 웨პ티드는 CD8 또는 GM-CSF로부터 유래될 수 있거나, 또는 여전히 CAR의 세포 표면 발현을 야기하는 기능을 하는 한 1 또는 2개 아미노산 돌연변이를 갖는 이의 변이체일 수 있다.

[0042] 본 발명의 CAR은 I 도메인을 경막 도메인과 연결시키고 항원 결합 도메인을 엔도도메인으로부터 공간적으로 분리시키도록 헌지로서 스페이서 서열을 포함할 수 있다. 탄성 스페이서는 결합 도메인이 종양 항원과 이의 결합이 가능하도록 상이한 방향으로 배향될 수 있게 한다. 예를 들어, 스페이서 서열은 IgG1 Fc 영역, IgG1 헌지 또는 CD8 줄기부, 또는 이의 조합을 포함할 수 있다. 인간 CD28 또는 CD8 줄기부가 바람직하다.

[0043] 본 발명은 상기 기술된 CAR을 코딩하는 핵산을 제공한다. CAR을 코딩하는 핵산은 통상의 방법에 의해서 특정한 CAR의 아미노산 서열로부터 제조될 수 있다. 아미노산 서열을 코딩하는 베이스 서열은 각 도메인의 아

미노산 서열에 대한 상기에 언급된 NCBI RefSeq ID 또는 유전자은행의 수탁 번호로부터 수득될 수 있고, 본 발명의 핵산은 표준 문자 생물학 및/또는 화학 절차를 사용해 제조될 수 있다. 예를 들어, 베이스 서열을 기반으로, 핵산이 합성될 수 있고, 본 발명의 핵산은 중합효소 연쇄 반응 (PCR)을 사용해 cDNA 라이브러리로부터 수득되는 DNA 단편의 조합에 의해 제조될 수 있다.

[0044] 본 발명의 CAR을 코딩하는 핵산은 백터에 삽입될 수 있고, 그 백터는 세포에 유입될 수 있다. 예를 들어, 바이러스 백터 예컨대 레트로바이러스 백터 (온코레트로바이러스 백터, 렌티바이러스 백터, 슈도 유형 백터 포함), 아데노바이러스 백터, 아데노-연합 바이러스 (AAV) 백터, 원숭이 바이러스 백터, 백시니아 바이러스 백터 또는 센다이 바이러스 백터, 엑스타인-바 바이러스 (EBV) 백터 및 HSV 백터가 사용될 수 있다. 바이러스 백터로서, 감염된 세포에서 자가-복제하지 않도록 복제 능력이 결여된 바이러스 백터가 바람직하게 사용된다.

[0045] 예를 들어, 레트로바이러스 백터가 사용될 때, 본 발명의 프로세스는 백터가 보유한 LTR 서열 및 패키징 신호서열을 기반으로 적합한 패키징 세포를 선택하고 그 패키징 세포를 사용하여 레트로바이러스 입자를 제조하여 수행될 수 있다. 패키징 세포의 예는 PG13 (ATCC CRL-10686), PA317 (ATCC CRL-9078), GP+E-86 및 GP+envAm-12, 및 Psi-Crip을 포함한다. 레트로바이러스 입자는 또한 높은 형질감염 효율성을 갖는 293 세포 또는 293T 세포를 사용하여 제조될 수도 있다. 레트로바이러스 백터의 패키징에 사용될 수 있는 패키징 세포 및 레트로바이러스를 기반으로 생성된 많은 종류의 레트로바이러스 백터가 많은 회사로부터 광범위하게 상업적으로 입수 가능하다.

[0046] 본 발명은 상기 기술된 바와 같이 CAR을 발현하도록 변형된 T 세포 또는 자연 살해 세포 (NK 세포)를 제공한다. 본 발명의 CAR-T 세포 또는 CAR-NK 세포는 CAR의 I 도메인을 통해서 ICAM-1에 결합하고, 그리하여 신호가 세포로 전달되며, 그 결과로서 세포가 활성화된다. CAR을 발현하는 세포의 활성화는 CAR의 세포내 도메인 및 숙주 세포의 종류에 따라서 다양하며, 예를 들어, 지표로서 사이토카인의 방출, 세포 증식 속도의 개선, 세포 표면 분자의 변화, 표적 세포의 사멸 등을 기반으로 확인할 수 있다.

[0047] I 도메인-CAR을 발현하도록 변형된 T 세포 또는 NK 세포는 질환에 대한 치료제로서 사용될 수 있다. 치료제는 활성 성분으로서 I 도메인-CAR을 발현하는 T 세포를 포함하고, 적합한 부형체를 더 포함할 수 있다. 부형체의 예는 당업자에게 공지된 약학적으로 허용 가능한 부형체를 포함한다.

[0048] 본 발명은 암을 치료하기 위한 양자 세포 요법 방법을 더 제공한다. 이 방법은 본 발명의 CAR-T 세포 또는 CAR-NK 세포를 암을 앓고 있는 대상체에게 투여하는 단계로서, 대상체의 암 세포는 ICAM-1을 과발현하고, CAR-T 세포 또는 CAR-NK 세포는 암 세포에 결합하여 암 세포를 사멸시키는 것인 단계를 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 "과발현하다"는 암 세포가 세포 당 적어도 10^5 분자의 ICAM-1의 표면 발현을 갖는 것을 의미한다. 일 구체예에서, CAR은 약 1 내지 약 1000 μM , 바람직하게 약 1 내지 약 200 μM 또는 약 1 내지 약 20 μM 의 ICAM-1에 대한 친화성을 갖는 I 도메인을 포함한다. 본 발명에 의해 치료하는데 적합한 암은 제한없이 갑상선암, 위암, 췌장암 및 유방암을 포함한다.

[0049] 항원 발현 수준이 다양한 표적 세포와 함께, 10^6 -배의 범위에 걸쳐 계단식으로 포괄된 CAR 친화성을 기능적으로 연구함으로써, 발명자는 시험관내 및 생체내에서 T 세포 효능에 대한 CAR 친화성 및 항원 밀도의 영향을 체계적으로 조사하였다. CD25, 사이토카인 방출 및 세포독성으로 시험관내에서 측정된 T 세포 활성화 상태는 친화성 및 표적 항원 밀도에 의존적이었고, 그 결과로서 CAR 친화성 및 항원 밀도가 증가함에 따라 더 강력한 T 세포 활성화 및 표적 사멸이 일어났다. 나노몰 친화성 CAR T 세포 (TM, F292G)의 활성화 한계치는 마이크로몰 친화성 CAR T 세포 (F292A)와 비교하여 항원 밀도에 덜 의존적이었고, 10^4 분자/세포 정도로 낮은 항원 밀도와 반응하였다. 대조적으로, F292A CAR T 세포는 10^5 분자/세포 미만으로 표적 항원을 발현하는 세포를 용해시키는 능력을 신속하게 상실하였다. 밀리몰 친화성 CAR T 세포 (야생형, WT)는 낮은 수준 내지 중간 수준의 항원을 갖는 표적 세포에 대해 대체로 미반응성이었고, 검출 가능한 활성화, 사이토카인 방출 및 표적 용해가 일어나기 위해 10^6 분자/세포의 한계치 항원 밀도가 요구되었다.

[0050] 표 2는 특정한 ICAM-1 항원 밀도를 갖는 세포를 표적으로 하기 위한, ICAM-1에 대한 I 도메인-포함 CAR T 세포의 바람직한 친화성 범위를 보여준다.

표 2

I CAM-1 밀도 (분자/세포)	적합한 I 도메인 친화성
< 10^4	약 120 nM-1 nM (예, TM, F292G)
$10^4 - 10^5$	약 20 μ M - 120 nM (예, F292S, F265S)
$10^5 - 10^6$	약 200 μ M - 20 μ M (예, F292A)
$\geq 10^6$	약 1.5mM-200 μ M (예, WT)

[0051]

[0052] 시험관내에서 CAR 친화성과 항종양 역가 사이의 양적 조화는 생체내 관찰된 양과 조화롭지 않고, 그리하여 종양 부위에서의 확장 속도, 종양 근절 속도, 종양 재발 빈도, 및 표적-적중, 종양-외 독성 수준으로 측정하였을 때 마이크로몰 친화성 ($1 - 200 \mu$ M 또는 $1 - 20 \mu$ M) CAR-T 세포 또는 CAR-NK 세포가 더 높은 친화성 CAR-T 세포 또는 CAR-NK 세포보다 우수하다.

[0053] 마우스 ICAM-1과 교차-반응하는 I 도메인 CAR-T 세포 또는 CAR-NK 세포의 능력은 인간 종양 세포에 대한 CAR-T 세포 또는 CAR-NK의 효능 및 건강한 조직 상의 마우스 ICAM-1에 대한 표적-적중, 종양-외 독성에 관한 철저한 동시 평가를 가능하게 한다. 보고된 유전자, 인간 소마토스타틴 수용체 2 (SSTR2), 및 I 도메인 CAR의 T 세포 상에서 동시 발현시키고 나서 종단 양전자 방출 단층촬영 (longitudinal positron emission tomography) (PET) 이미지화를 통해서, 양자적으로 전달된 T 세포의 생체내 시공간적 맵핑을 획득할 수 있다.

[0054] 독성의 개시는 최고 친화성 (TM) CAR T 세포로 처치된 마우스에서 균일한 폐사율, 보다 큰 종양 부담량을 갖는 F292G CAR-처치된 마우스에서 관찰된 높은 독성율, 및 마이크로몰 친화성 F292A CAR T 세포로 처치 후 검출 가능한 독성의 부재에 의해 입증된 바와 같이 CAR 친화성 및 종양-부담량에 의존적인 것으로 보인다.

[0055] 고친화성 돌연변이체를 포함하는 CAR (약 120 nM - 1 nM)은 높은 역가를 갖고 그들은 세포 당 10^4 미만의 낮은 ICAM 밀도로 T 세포에 결합할 수 있다.

[0056] 마이크로몰 범위 (예를 들어, 약 $1 - 200 \mu$ M Kd)의 친화성을 보유하는 CAR은 나노몰 범위 (예를 들어, 약 $1 - 200 \text{ nM Kd}$)의 친화성을 갖는 CAR과 비교하여, 정상 조직에서 기본적으로 발현되는 항원에 대한 종양-외 독성을 최소화시키고, 또한 치료 지수를 증가시킨다. 마이크로몰 범위의 표적 친화성을 갖는 CAR T 세포는 표적 발현이 높은 종양 조직에 대해 증가된 역가 및 장기간 효능을 나타내는 동시에 기본 항원 발현을 갖는 건강한 조직의 표적화는 피할 수 있다. 마이크로몰 친화성 CAR (예컨대 F292A-I 도메인)은 T 세포가 10^5 분자/세포 미만으로 발현하는 조직은 무시할 수 있게 하며, 이 한계치는 역형성 갑상선 종양은 능가하는 것이지만 전형적으로 건강한 조직은 그러하지 않다. 나노몰 친화성 CAR T 세포 (예를 들어, TM, F292G 및 R6.5 CAR)에 의한 표적 항원의 개입은 부자연스럽게 오프 속도를 지체시킬 수 있어서, TCR 및 pMHC 간에 자연적으로 존재하는 상호작용의 일시적이고 역동적인 성질을 벗어난다.⁴⁸ CAR에 의한 높은 친화성 및 화합성 상호작용은 순차적 사멸에 대한 T 세포의 경향을 감소시킬 수 있어서, 잠재적으로 활성화-유도된 세포 사멸에 대한 증가된 감수성 또는 고갈을 야기할 수 있다.⁴⁹ ICAM-1에 대한 나노몰 친화성을 갖는 CAR T 세포가 작용할 수 있지만, 그들은 최적 이하로 가동될 수 있고 고갈 및 과도한 사이토카인 방출 경향이 더 있어서, 궁극적으로 종양-외 독성 또는 종양 재발을 촉진할 수 있다.

[0057] 하기 실시예는 본 발명을 더욱 예시한다. 이들 실시예는 단지 본 발명의 예시를 위한 것이고 제한하는 것으로 해석해서는 안된다.

[0058] 실시예

[0059] 재료 및 방법

[0060]

실시예 1. 세포주 및 초대 인간 림프구

[0061]

인간 피부 미세혈관 내피 세포 (HMEC-1)를 질병 통제 센터로부터 수득하였고 10% (v/v) 태아 소 혈청 (FBS, Atlanta Biologicals), 10 mM L-알라닐-L-글루타민 디펩티드 (Gibco), 100 unit/mL 페니실린-스트렙토마이신 (Pen-strep), 1 μ g/mL 하이드로코르티손 (MP Biomedicals), 및 10 ng/mL 재조합 인간 상피 성장 인자 (Invitrogen)가 보충된 MCDB 131 배지 (Invitrogen)에서 배양하였다. 마우스 뇌 미세혈관 내피 세포 (bEnd.3, ATCC)는 4 mM L-글루타민, 100 unit/mL Pen-strep 및 10% FBS가 보충된 고급 둘레코 변형 이글 배지 (Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium) (ADMEM, Invitrogen)에 유지시켰다. HeLa 세포 (ATCC)는 10% FBS, 2 mM L-글루타민 및 100 unit/mL Pen-strep을 함유하는 ADMEM에서 배양하였다. 8505C 세포 (DSMZ)는 10% FBS, 2 mM L-글루타민 및 100 unit/mL Pen-strep이 함유된 RPMI-1640 배지 (Invitrogen)에서 배양시켰다. HMEC-1, bEnd.3, HeLa 및 8505c 세포는 반딧불이 루시퍼라제-F2A-GFP를 코딩하는 렌티바이러스 (Biosettia)를 형질도입시켰고 형광도를 기반으로 분류하였다.

[0062]

인간 말초 혈액은 정맥천자를 통해서 건강한 자원 공혈자로부터 수득하였다. 말초 혈액 단핵 세포는 Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare)를 사용하여 단리하였고 5% 인간 AB 혈청 (Sigma), 2 mM L-알라닐-L-글루타민 디펩티드 및 30 IU/mL 인간 IL-2 (Cell Sciences)가 보충된 옵티마이저 CTS T-세포 확장 SFM (Thermo) (T 세포 배양 배지)에서 배양하였다. 비부착 세포는 24시간 후에 제거하였고 Dynabeads CD3/CD28 T 세포 확장기 (Thermo)를 사용하여 2:1의 비드 대 T 세포 비율로 T 세포에 대해 농후화시켰다. Dynabead-결합된 T 세포를 이후에 1×10^6 세포/mL의 밀도로 IL-2 함유 배지에서 배양하였다. 모든 세포는 37°C에 5% CO₂ 가습 인큐베이터 중에서 인큐베이션시켰다.

[0063]

실시예 2. I 도메인 CAR 벡터의 구축

[0064]

ICAM-1에 대한 다양한 친화성의 LFA-1 I 도메인을 코딩하는 유전자 서열은 이전 연구로부터 유래되었다.²⁷ I 도메인 변이체는 CD28, CD137 및 CD3 ζ 의 세포질 도메인을 도입시킨 3세대 CAR 아키텍처의 CD8 헌자, CD28 경막 도메인 및 세포내 부분과 직접적으로 C-말단에서 융합시켰다. 이어서, 완전한 CAR 삽입부를 pLenti 골격에 서브클로닝하였다.²⁹ CAR T 세포 이미지화를 위한 리포터 유전자, SSTR2는 동일한 mRNA로부터 CAR 및 SSTR2의 비슷한 생산을 보장하기 위해서 '리보솜 스킵핑' 돼지 테스코바이러스-1 2A (P2A) 서열을 사용하여 N-말단에서 I 도메인과 연결되었다.

[0065]

실시예 3. T 세포의 렌티바이러스 생산 및 형질도입

[0066]

렌티바이러스는 칼슘 포스페이트를 사용하여 HEK 293T 세포를 일시적으로 형질감염시켜서 생산되었다. 간략하게, 10 μ g의 수송 유전자, 7.5 μ g의 pCMV-dR8.2 (Addgene) 및 5 μ g의 pCMV-VSVG (Addgene)를 혼합하였고 2 M CaCl₂ 및 후속하여 2x HBSS와 인큐베이션시켰다. 얻어진 용액을 24시간 이전에 10 mL DMEM 중 3.2×10^6 HEK 293T 세포가 파종된 10 cm² 세포 배양 디ッシュ에 적가하였다. 형질감염 배지는 6시간 후에 교체되었다. 렌티바이러스를 함유하는 배지를 형질감염 후 48시간 및 72시간에 수확하였고, 0.45 μ m 필터를 통해 여과시켰으며 75,000 \times g로 2시간 동안 4°C에서 초원심분리를 통해 농축시켰다. 다음으로 렌티바이러스를 혈청 함유 배지에 재현탁시켜서 -80°C에 냉동시켰다. 인간 T 세포는 스핀팩션 (1,000 g, 1 h, 32°C) 또는 렌티바이러스와 밤샘 인큐베이션에 의해 항-CD3/CD28 Dynabead로 활성화 후 24시간 내지 72시간에 형질도입되었다. T 세포는 최초 형질도입 후 24시간에 1회 더 형질도입되었다. 형질도입 동안 및 그 이후에, IL-2를 함유하는 배지는 인간 IL-7 (10 ng/mL) 및 IL-15 (5 ng/mL)를 함유하는 배지 (Peprotech)로 교체되었다. Jurkat T 세포는 렌티바이러스와 1회 밤샘 인큐베이션에 의해 형질도입되었다.

[0067]

실시예 4. 시험관내 표적 세포 사멸 어세이

[0068]

GFP 및 반딧불이 루시퍼라제를 발현하도록 안정하게 형질도입된 2×10^5 표적 세포 (HMEC-1, bEnd.3, HeLa 및 8505c)는 다양한 이펙터 대 표적 비율 (E:T)로 I 도메인 CAR T 세포 또는 비형질도입된 세포와 공동 배양되었다. 일정한 조건에서, ICAM-1 유전자는 CRISPR/Cas9 (Santa Cruz, #sc-400098; 8505C/-ICAM-1로 표시됨)를 사용하여 8505C 세포에서 파괴되었거나, 또는 대안적으로, 8505C 세포는 1 μ g/mL 리포폴리사카라이드 (LPS; 에스케리치아 콜라이 (*Escherichia coli*) 026:B6, Sigma)에 12시간 동안 노출시켜 ICAM-1의 과발현을 유도시켰다 (8505C/LPS로 표시). 공동 배양은 150 μ g/mL D-루시페린 (Gold Biotechnology)을 함유하지만 사이토카인은 보충하지 않은 T 세포 배양 배지에서 수행되었다. 발광성은 플레이트 판독기 (TECAN infinite

M1000 PRO)를 사용하여 측정하였고 각각의 E:T 조건의 판독치는 비형질도입된 T 세포:표적 공동배양 대조군에 대해 정규화되었다.

[0069] 실시예 5. 8505C 마우스 모델, 전신 종양 이미지화 및 혈청 사이토카인 분석

[0070] 7.5×10^5 8505C 세포를 꼬리 정맥을 통해서 NSG 마우스에게 주사하였다. $1 \sim 3 \times 10^6$ T 세포를 종양 세포 주사 이후 8-10일에 꼬리 정맥에 주사하였다. 주사 시기는 이종이식 후 최대 10일까지 유사한 CAR 용량을 사용하여 종양 제거가 입증된 R6.5 CAR T 세포를 사용한 이전 연구들을 기반으로 선택하였다²⁹. 살아있는 마우스에서 종양 이종이식편의 발광 이미지화는 전신 광학 이미저 (In-Vivo Extreme, Bruker)를 사용하여 수행하였다. 마우스는 2 L/분 O_2 중 2% 이소플루란으로 마취시켰다. 종양 부담량은 흉부강 및 마우스 전신에 걸쳐 발광성의 집적을 통해 정량되었다. 혈청 사이토카인 분석을 위해서, 50-100 μL 의 혈액을 꼬리 정맥을 통해 얼음 상의 에펜도르프 튜브에 채혈하였다. 2,000 g로 10분간 4°C에서 원심분리를 통해 세포 펠렛을 제거한 후에 즉시 혈장을 단리하여, -80°C에 보관하였다. 인간 사이토카인 (GM-CSF, IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α , CXCL10)은 제조사의 지시서에 따라서 Bio-Plex MAGPIX (Bio Rad)를 사용해 이중으로 측정하였다.

[0071] 실시예 6. 생체외 세포 분석

[0072] 종양 이종이식편은 적절한 시점에 마우스로부터 절제하였다. 절제된 종양을 주사위꼴로 자르고 80 μm 세포 스퍼레이너를 통해 통과시켜서 단일 세포 혼탁액을 산출시켰다. 적혈 세포는 1x RBC 용해 완충액 (eBiosciences)과 인큐베이션시켜서 용해시켰다. 잔류 세포를 세척하여, 2% 정상 염소 혈청을 함유하는 1x HBSS에 재현탁시켰고, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 마우스 IgG로 10분간 차단시켰다. 이후에 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 프로파이드 아이오다이드 (Invitrogen)와 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 마우스 항-인간 CD3-Alexa Fluor 647 (Biolegend) 또는 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 토끼 항-c-myc-Alexa Fluor 647 (Biolegend)을 배합하여 염색을 후속하였다. 최종 세포는 Gallios 유세포측정기 (Beckman Coulter) 상에서 획득하였다. 초기 유세포측정 게이트는 생존 세포 게이팅 (프로파이드 아이오다이드 음성)을 기반으로 결정되었다.

[0073] 실시예 7. ICAM-1 및 CAR 발현 정량

[0074] 다양한 세포주 상에서 ICAM-1 발현은 하이브리도마 (ATCC)로부터 수득된 마우스 항-인간 R6.5 단일클론 항체 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 사용하여 결정하였다. T 세포 상에서 I 도메인 CAR 발현은 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 토끼 항-c-myc-Alexa Fluor 647 (Biolegend)을 사용해 검출하였다. I 도메인 Jurkat T 세포 변이체는 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 인간 Fc γ 에 융합된 재조합 인간 ICAM-1 (R&D Systems)과 인큐베이션시켰다. 다음으로 유세포측정 분석 전에 세포를 세척하고 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 토끼 항-인간 PE (Santa Cruz Biotechnology)에 재현탁시켰다.

[0075] 실시예 8. IFN- γ 의 시험판내 측정

[0076] 표적 세포를 세척하였고 사이토카인이 없는 T 세포 배양 배지 중에 1×10^6 세포/ mL 로 혼탁시켰다. 100 μL 의 각각의 표적 세포를 삼중으로 96웰 둥근 바닥 플레이트 (Corning)에 첨가하였다. T 세포 배양 배지 중에 5×10^6 세포/ mL 로 재현탁된 T 세포는 적절한 웰에서 표적 세포와 배합되었다. 플레이트를 37°C에서 24 내지 48시간 동안 인큐베이션시켰다. 인큐베이션 후에, 상청액을 ELISA로 IFN- γ 를 검출하기 위해 채취하였다 (Biolegend).

[0077] 실시예 9. CD25 및 CD69 염색

[0078] I 도메인 CAR로 변형된 Jurkat 세포는 96웰 중에서 1:1의 이펙터 대 표적 비율 (1×10^5 이펙터: 1×10^5 표적)로 표적 세포와 공동-배양되었다. 플레이트는 37°C에서 6시간 동안 인큐베이션시켰다. 인큐베이션 후에, 세포를 세척하고 나서 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 항-인간 CD25-알로파이코사이아닌 (APC; Biolegend)으로 30분 동안 얼음 상에서 표지되었다. 인큐베이션 이후에, 샘플을 세척하였고 유세포측정으로 분석하였다. ICAM-1 발현 세포의 대안으로서, 우리는 또한 ICAM-1의 기지량으로 코팅된 마이크로비드를 사용하였다. 1×10^6 술페이트 라텍스 마이크로비드 (8 $\square\text{m}$, ThermoFisher Scientific)는 Cy5.5 (술포-사이아닌5.5 NHS 에스테르, Lumiprobe)에 접합된 표시량의 인간 또는 마우스 재조합 ICAM-1-Fc γ (R&D Systems)를 함유하는 100 μL 의 PBS 와 약하게 혼합하면서 실온에서 밤새 재현탁시켰다. 단백질-표지된 입자를 펠렛화시켰고 0.1 M 글리신 pH 7.4을 함유하는 신선한 PBS에 1시간 동안 재현탁시킨 한편, 상청액을 사용하여 형광도에 의해 비드 흡착 효율을 측정하였다 (TECAN infinite M1000 PRO). 글리신으로 비드 표면을 포화시킨 후에, 비드를 펠렛화시켰고, 5

5mM MgCl_2 를 함유하는 PBS에 재현탁시켰다. 각각의 I 도메인 CAR 변이체로 변형된 Jurkat 세포는 ICAM-1-결합된 라텍스 비드와 1:3 (세포:비드) 비율로 밤새 37°C에서 인큐베이션되었다. 다음으로, 세포를 수집하였고, 유세포측정에 의한 분석을 위해서 2 $\mu\text{g/mL}$ 항-인간 CD69-APC (Biolegend)로 표지되었다.

[0079] 실시예 10. V-바닥 부착 어세이

V-바닥 96-웰 플레이트 (Corning)는 마우스 또는 인간 ICAM-1-Fc γ (PBS, pH 7.4 중 10 $\mu\text{g/mL}$) 또는 2% BSA로 4°C에서 밤새 코팅하였다. 다음으로, 플레이트는 2% BSA로 1시간 동안 37°C에서 차단시켰다. I 도메인 CAR T кл론은 먼저 제조사의 프로토콜에 따라서 CellTracker Orange로 염색하였고 다음으로 5 mM MgCl_2 및 1% BSA를 함유하는 50 μl 의 PBS 중 ICAM-1-코팅 웰에 첨가하였다. 플레이트는 200 g로 15분 동안 실온에서 즉시 원심분리하였다. V-바닥 플레이트의 바닥에 축적된 미부착 세포는 형광 플레이트 판독기 (TECAN infinite M1000 PRO)를 통해 정량하였다. ICAM-1에 결합된 세포는 실험적 측정의 형광 강도 값 (F_{CAR} 및 F_{NT})으로 계산하였고 BSA 단독으로 코팅된 웰의 형광도 (F_{BSA})에 대해 정규화시켰다: $100 \times ((F_{\text{BSA}} - F_{\text{CAR}})/F_{\text{BSA}})/((F_{\text{BSA}} - F_{\text{NT}})/F_{\text{BSA}})$.

[0081] 실시예 11. $^{18}\text{F-NOTA}-\text{옥트레오티드 (NOTAOct)}\text{의 표지화}$

NOTAOct (1,4,7-트리아자사이클로노난-1,4,7-트리아세트산-옥트레오티드³⁰, GMP 등급)는 1 mg의 동결건조 분말로서 수득하였다 (cat #9762, ABX Pharmaceuticals). NOTAOct 바이알 내용물은 18 MW 물을 사용해 200 μl (5 mg/mL 용액)로 희석하였고 스톡 용액으로서 4°C에 보관하였다. 불소-18로 NOTA의 칠레이트화를 위해서³¹, 5 μl 의 NOTAOct를 10 μl 의 0.1 M 소듐 아세테이트, pH 4, 6 μl 의 2 mM AlCl₃, 및 ~30 mCi ^{18}F 를 함유하는 100 μl 에 첨가하였다. 용액을 100°C의 써모믹서 (Eppendorf)에 즉시 위치시켰고 15분 동안 인큐베이션한 후 실온으로 냉각시키고 15 mL의 ddH₂O에 희석하였다. Sep-Pak light C18 컬럼을 3 mL의 100% 에탄올로 재생시켰고 5 mL ddH₂O로 2회 세척하였으며 관찰된 유속은 분당 10액적이었다. 다음으로, NOTAOct를 Sep-Pak 컬럼에 적재시켰고, 이후에 15 mL의 18 MW 물로 세척하여 임의의 잔류하는 자유 ^{18}F 를 제거하였다. 포획된 NOTAOct는 300 μl 의 에탄올을 사용하여 컬럼으로부터 용리되었고 주사를 위해 PBS를 사용해 1.5 mL로 희석시켜서, ~15% 에탄올 등장성, 주사용 용액 중 최종 생성물이 제공되었다. 용리액은 0.2 μm 필터를 통해서 통과시켰다. 최종 생성물의 순도는 역상 HPLC로 점검하였다.

[0083] 실시예 12. PET/CT 이미지화

등록된 CT 이미지는 NOTAOct 주사 후 1 내지 2시간에 마이크로-PET/CT 스캐너 (Inveon, Siemens)를 사용해 획득하였다. 투사 데이터는 대략 1초 스텝과 1°의 각도 중분에서 콘-빔 기하학으로 수득하였다. 250 내지 750 keV의 에너지창 및 6 ns의 시간창을 사용하여 실험 당 PET에 대해 적어도 천만개의 병발 이벤트를 획득하였다. 기준 튜브는 생체내에서 NOTATOC 흡수율의 정량을 위해 100 μl 의 10 %ID/cm³ 등몰 용량을 함유한다. 마우스 폐 내에서 NOTAOct 흡수율을 계산하기 위해서, 대부분의 그들 끽프린트를 동봉하기 위해서 폐의 좌측 및 우측에서 개별적으로 타원체를 채취하였다. 기준 튜브에서 수득된 계측치에 대해 계산된, %ID/cm³ 값은 100%의 주사 효율 및 25 g의 체중으로 추정하여, 4로 %ID/cm³를 나누어서 표준 흡수율 값 (SUV³²)에 가까워졌다. PET/CT 이미지의 가시화 및 분석은 AMIDE 소프트웨어 (<http://amide.sourceforge.net>)를 사용해 수행하였다.

[0085] 실시예 12. 조직학

안락사 이후에, 마우스 폐는 4% 파라포름알데히드를 사용해 기도를 통해 관류시켰고, 각각의 5개 폐엽은 고정 후에 분리하여 파라핀에 포매시켰다. 조직을 5 μm 절개부가 생성되도록 잘랐다 (마이크로톰, Leica). 파라핀 포매된 절개부는 CD3 및 GFP 면역염색 (HistoWiz, Inc.가 수행)을 위해서 혜마톡실린 및 에오신 (H&E) 또는 혜마톡실린 단독으로 염색하였다. 조직학적 분석은 숙련된 병리학자가 수행하였다.

[0087] 결과

[0088] 통계 분석

단측 ANOVA, 두네트 다중 비교 검정 및 비대응 스튜던트 t-검정은 표시된 데이터에 대해 Prism (GraphPad)을 사

용해 수행하였다.

[0090] 실시예 13. 10^6 -배, 계단식 친화성 변동의 ICAM-1 특이적 CAR T 세포

[0091] ICAM-1에 특이적인 CAR 컨스트럭트는 Jin 등²⁷ 및 미국 특허 제8,021,668호에 따라서, LFA-1 (도 1A-B; 표 1)로부터 유래된 I 도메인을 사용해 구축하였다.

[0092] 돌연변이체 I 도메인 친화성이 CAR 친화성과 상관되는지 여부를 시험하기 위해서, HEK 293T 및 Jurkat T 세포를 TM, F292G, F292A, 또는 WT I 도메인을 함유하는 3세대 CAR을 코딩하는 렌티바이러스로 형질도입시켰고, ICAM-1 결합성을 분석하였다. myc 태그를 각각의 I 도메인 변이체의 N-말단에 부착하여 CAR 발현의 측정을 보조하였다 (도 1D-E). Jurkat T 세포에서 내생성 LFA-1에 결합하는 백그라운드 ICAM-1 결합을 피하기 위해서, ICAM-1에 대한 CAR 친화성은 I 도메인 CAR-형질도입된 HEK 293T 세포를 사용하여 추산하였다. I 도메인 CAR-발현 HEK 293T 세포에 결합하는 재조합 인간 ICAM-1 결합 수준은 용액 친화성 측정과 상관있었으며, 비형질도입 (NT) T 세포와 비교하여 TM이 가장 강한 결합성을 나타내었고, 그 다음으로는 F292G 및 F292A가 뒤따랐고, WT에 대해서는 결합성이 검출가능하지 않았다 (도 1F). ICAM-1에 대한 차등적 CAR 친화성 및 마우스 ICAM-1과의 교차-반응성은 또한 재조합 인간 또는 마우스 ICAM-1로 코팅된 V-바닥 플레이트와의 세포 부착성을 측정하여 조사하였다 (도 1G). TM 및 F292G CAR이 형질도입된 Jurkat 세포는 비형질도입된 세포와 비교하여 인간 및 마우스 둘 모두의 ICAM-1에 대한 더 높은 수준의 결합성을 입증하였다. 그러나, 그들의 WT I 도메인-발현 대응물과 비교하여 F292A CAR-발현 HEK 293T 세포에 대한 재조합 ICAM-1의 결합성의 증가에도 불구하고 (도 1F), F292A CAR-Jurkat 세포는 NT 또는 WT I 도메인-발현 세포와 비교해 플레이트-결합된 ICAM-1에 대한 임의의 추가적인 결합성이 결여되었다 (도 1G). F292G와 비슷한 가용성 ICAM-1-결합성이 입증된 F265S I 도메인의 경우에 (145 대 119 nM, 표 1), F265S CAR T 세포는 플레이트-결합된 인간 ICAM-1에 대한 임의의 추가적 결합성을 입증하는데 실패한데 반해서 마우스 ICAM-1에 대해서는 상승된 결합성이 보다 분명하였다. 예상한 바와 같이, 인간 ICAM-1에만 특이적인 R6.5 CAR을 발현하도록 형질도입된 T 세포는 인간의 것에 대해서는 상승된 결합성을 보였지만 마우스 ICAM-1에 대해서는 결합성을 보이지 않았다 (도 1G).

[0093] 실시예 14. 시험관내 CAR T 세포 활성화에 대한 CAR 친화성 및 표적 항원 밀도의 영향

[0094] I 도메인 CAR을 발현하는 Jurkat T 세포는 CAR T 세포 활성화가 표적 세포에서 CAR 친화성 및 ICAM-1 항원 밀도에 의해 영향받은 정도를 조사하는데 사용되었다. Jurkat T 세포는 ICAM-1 발현 수준이 상이한 다양한 표적 세포주와 인큐베이션시켰다. 표적 세포주의 ICAM-1 표면 밀도는 먼저 그들에 결합하는 항-ICAM-1 항체의 수준을 어세이하고 그들 신호를 cy5.5에 접합된 기지량의 R6.5 항체와 커플링된 $8 \mu\text{m}$ 라텍스 비드 (비드 당 10^3 - 10^7 항체)를 사용해 수득된 것과 비교하여 추산하였다. R6.5와 인큐베이션 후 (검정색) 비표지 (회색)로부터 이동도를 사용하여 각각의 표시된 표적 세포주에서 ICAM-1 밀도를 추산하였다.

[0095] 표적 세포 패널은 ICAM-1이 생리학적 수준 (세포 당 $\sim 10^4$ 분자)인 각각 건강한 인간 및 마우스 세포를 대표하는 HMEC-1 및 bEnd.3; 중간 수준 (세포 당 $\sim 10^5$)을 발현하는 역형성 갑상선 암종 (8505C); 및 고수준의 ICAM-1 (세포 당 $\sim 10^6$)을 발현하는 자궁경부암 (HeLa) 세포주를 포함한다. 추가적인 비교를 위해서, 우리는 CRISPR/Cas9-매개된 ICAM-1 유전자 불활성화의 8505C (8505C/-ICAM-1) 및 ICAM-1 발현이 상향조절되도록 LPS가 처리된 8505C (8505C/LPS)를 포함시켰다. 표 3은 본 명세서에서 사용된 표적 세포에서 ICAM-1 부위 밀도를 요약한다.

표 3

표적 세포	ICAM-1 밀도 (분자/세포)
bEND.3	$<10^4$
HMEC-1	$<10^4$
8505C	10^5
8505C/LPS	10^5 - 10^6
8505C/-ICAM-1	검출불가
HeLa	10^6

[0097]

표적 세포와 상호작용 시 CAR T 세포의 활성화는 CD25 (IL-2 수용체 α) 및 CD69 발현을 측정하여 조사하였다. Jurkat CAR T 세포 (WT, F292A, F292G 및 TM)에서 CD25 발현은 24시간 동안 상이한 표적 세포주 ($n = 3-4$)와 공동-인큐베이션 이후에 조사하였다. CD69는 10^6 재조합 인간 ICAM-1-Fc 분자로 코팅된 라텍스 비드와 인큐베이션 이후에 유도되었다. CD25의 상승된 수준이 LPS-자극된 8505C와 인큐베이션 후에 WT I 도메인 CAR T 세포에서 관찰되었지만 ICAM-1을 낮은 수준으로 발현하는 다른 세포주로는 관찰되지 않았다. 대조적으로, 증가된 CD25 발현은 고친화성 TM CAR T 세포를, 고 ICAM-1 발현 세포를 비롯하여 기본 수준으로 ICAM-1을 발현하는 HMEC-1 및 bEnd.3 세포와 인큐베이션시켰을 때 확인되었다. ICAM-1 발현이 결여된 표적 세포 (8505C/-ICAM-1)와 인큐베이션 후에 TM CAR T 세포 상에서 저수준의 CD25 발현이 검출되었는데, 아마도 Jurkat 세포 상에서 ICAM-1의 기본 발현 ($\sim 10^4$ 분자/세포) 및 TM CAR 사이의 분자적 상호작용에 의해 매개된 동형성 세포 접촉에 기인하는 듯 하다. F292G를 발현하는 T 세포는 CD25 발현이 8505C/-ICAM-1과 공동-인큐베이션 후에 백그라운드 수준에 가까웠다는 것을 제외하고, TM과 유사하게 거동하였다. 마이크로몰 친화성 F292A T 세포는 8505C 및 8505C/LPS 세포와의 인큐베이션시에만 상승된 CD25 발현을 나타내는 선택적 활성화를 입증하였다. 이것은 세포 당 $>10^5$ ICAM-1 분자의 한계치 표적 항원 밀도가 F292A CAR T 세포 활성화에 요구되었다는 것을 의미한다. CD25의 ICAM-1 밀도-의존적 활성화와 대조적으로, 증가된 CD69 발현은 표적 세포의 부재 하에서도 관찰되었고, 발현 수준이 ICAM-1에 대한 CAR 친화성과 비슷하게 조정되어, ICAM-1 코팅된 라텍스 비드와의 인큐베이션에 의해 더 증강되지 않았다. CD25와 비교하여, CD69 유도는 CAR T 세포 간 동형성 상호작용에 의해 제공되는, 활성화에 대한 항원 밀도의 저수준 한계치를 요구하는 것으로 나타났다.

[0098]

실시예 15. 시험관내 CAR T 세포의 세포독성에 대한 CAR 친화성 및 표적 항원 밀도의 영향

[0099]

CAR-변형된 Jurkat T 세포의 친화성 및 항원-의존적 활성화를 입증한 후, 우리는 시험관내에서 초대 T 세포 활성화 및 세포독성에 대한 CAR 친화성 및 항원 밀도의 영향을 조사하고자 하였다. 초대 T 세포는 TM, F292A, F292G 및 WT I 도메인 CAR을 형질도입시켰고, 다양한 표적 세포에 첨가하여 시험관내에서 그들의 세포독성 효능을 결정하였다. 전반적으로, 모든 I 도메인 변이체 CAR T 세포에 걸쳐서 표적 세포 용해 속도 및 ICAM-1 발현 간에 양성 상관성이 존재하였다 (HeLa > 8505C/LPS > 8505C > HMEC-1 > bEND.3) (도 2A). 사멸 속도도 역시 T 세포가 ICAM-1에 대해 더 높은 친화성을 보유하는 CAR을 발현했을 때 더 빨랐다 (TM > F292G > F292A > WT).

[0100]

친화성 변이체 CAR T 세포에 의한 사멸 효율을 양적으로 비교하기 위해서, 변수 슬로프 시그모이드 그래프 (생존율% = $100/[1+10^{(t-\tau_{-50\%}) * \text{슬로프}}]$)가 50% 사멸율 ($\tau_{-50\%}$) 및 힐 슬로프 (도 2B)를 획득하는데 요구되는 시간을 설명하는 최고 적합도 값을 찾는데 사용되었다. 50% 표적 사멸까지의 시간은 동일한 CAR T 세포의 경우에 더 낮은 친화성 CAR T 세포 또는 더 낮은 항원 밀도의 경우에 더 길었다. CAR T 세포에 의한 표적 사멸 속도에 상응하는 힐 슬로프는 동일한 표적 세포의 경우에 친화성이 증가하면 (더 낮은 Kd) 더 높았다. 또한 힐 슬로프는 동일한 CAR T 세포에 대해서 항원 밀도의 증가에 따라 더 커졌다. 표적 세포의 CAR T 세포 사멸은 TM을 제외하고 모든 I 도메인 변이체 CAR에 의한 ICAM-1 음성 8505C 세포에서 관찰된 사멸의 결여로 증명된 바와 같이 특이적이었다. TM T 세포에 의한 8505C/-ICAM-1의 낮지만 점진적인 사멸은 아마도 T 세포에서 ICAM-1과 TM 상호작용에 의해 매개된 동형성 세포 접촉으로 초래된 세포독성 활성화에 기인하는 듯 하다. 표 4는 변수 슬로프 시그모이드 그래프에 대해 데이터를 적합화시켜 결정된 50% 사멸율까지의 시간 (시)을 요약한다.

표 4

CAR T	HMEC	bEND3	8505C/- ICAM-1	8505C	8505C/ LPS	HeLa
WT	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	30.23
F292A	n.d.	n.d.	n.d.	41.55	30.81	18.66
F292G	21.05	16.23	n.d.	27.32	23.98	14.93
TM	13.45	13.03	32.63	17.12	15.05	10.84

0.85 보다 높은 r-스퀘어 값을 갖는 최고 적합도 값만 도시함; 그렇지 않으면 결정 불가, n.d.로 표시함.

[0101]

[0102] 표 5는 변수 슬로프 시그모이드 그래프에 대해 데이터를 적합화시켜 결정된 힐 슬로프 값을 보여준다.

표 5

CAR T	HMEC	bEND3	8505C/- ICAM-1		8505C/LP	
			8505C	S	HeLa	
WT	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.09894
F292A	n.d.	n.d.	n.d.	0.04424	0.04976	0.1096
F292G	0.07538	0.05292	n.d.	0.06098	0.05872	0.1059
TM	0.08384	0.05793	0.05493	0.08686	0.08695	0.1099

0.85 보다 높은 r-스퀘어 값을 갖는 최고 적합도 값만 도시함; 그렇지 않으면 결정 불가, n.d.로 표시함.

[0103]

[0104] 초대 T 세포에서 ICAM-1 발현은 예컨대 CD3/CD28 비드 ($\sim 10^5$ 분자/세포)와의 인큐베이션에 의한 T 세포 활성화 후에 유도될 수 있다. 비교하여, 밀리몰 친화성 ($K_d = 1.5 \text{ mM}$)을 보유하는 WT CAR T 세포는 오직 HeLa 세포 만을 특이적으로 용해시킬 수 있어서, $\sim 1 \text{ mM } K_d$ CAR T 세포의 경우에 세포 당 대략 10^6 분자의 한계치 항원 밀도를 의미하였다. 중요하게도, F292A 및 WT I 도메인 CAR T 세포 ($K_d > 10 \mu\text{M}$)는 인간 및 마우스의 건강한 대조군 세포인 HMEC-1 및 b.END3와는 비반응성이었다 (세포 당 $\sim 10^4$; 도 2A).

[0105] CAR T 세포에 의한 IFN- γ 방출은 표적 세포 사멸 속도와 비슷하게 맞춰 조정되었고, 여기서 증가된 수준이 더 높은 친화성 CAR T 세포 및/또는 더 높은 수준의 표적 항원 발현을 함유하는 공동-배양물에서 확인되었다 (도 2D). 표적 항원 밀도-의존적 IFN- γ 방출의 예외는 TM 및 F292G였는데, 표적 분자의 부재 하에서 (8505C/-ICAM-1) 상당량의 IFN- γ 방출 ($> 1 \text{ ng/mL}$)이 확인되었다. 이것도 역시 아마도 T 세포 간 동형성 상호작용에 기인하는 듯 하고, 또한 특히 CAR 발현 수준이 높을 때, TM CAR T 세포의 확장 어려움이 관찰된 것으로 이를 뒷받침한다. 마이크로몰 친화성 CAR T 세포 (F292A)에 의한 IFN- γ 의 방출은 표적 세포에서 ICAM-1 밀도에 비례하였고, 8505C/-ICAM-1과의 인큐베이션시 방출의 결여, 및 순서대로 HMEC-1, 8505C, 8505C/LPS 및 HeLa와의 인큐베이션에 의한 점진적인 증가를 통해 입증되었다 (도 2D). HeLa 세포에 대한 WT I 도메인의 세포독성과 일관되게, HeLa와의 인큐베이션시 IFN- γ 방출은 다른 더 높은 친화성 CAR T 세포에 의해 분비된 수준과 비슷하였다.

[0106] 실시예 16. 친화성-조율된 I 도메인 CAR T 세포의 생체내 효능

[0107]

우리는 시험관내 친화성-의존적 CAR T 세포의 세포독성 패턴이 생체내 종양 이식 모델에서 어떻게 변역되는지 조사하였다. 고형 종양에서, CAR T 세포 효능은 종양 부위로 수송되어, 종양 세포를 침투하고, 연속적으로 용해시키는 능력에 의해 영향받고, 종양 부담량에 따라서 확장 및 축소를 겪는다. 여기서, 마우스는 0.75×10^6 의 8505C-FLuc⁺GFP⁺ 세포의 전신 i.v. 주사를 통해 이종이식되었고 그 다음으로 이종이식 후 8일 내지 10일에 $\sim 1-3 \times 10^6$ 의 I 도메인 CAR T 세포 (WT, F292A, F265S, F292G 및 TM), SSTR2-R6.5 CAR²⁹, NT (비형질도 입) T 세포, 및 T 세포 무함유로 처리되었다 (5-20% CAR 발현). 종양 부담량은 반딧불이 루시퍼라제 활성의 전신 형광도 이미지화를 통해 평가하였다. 원발성 종양이 폐 및 간에 국재하였고 전신에 원격 전이성 병소가 눈에 띄었다 (도 3A). T 세포 무함유이거나 또는 NT T 세포를 수용한 코호트는 종양 접종의 3 내지 4주 이내에 종양 부담량으로 폐사하였다. TM CAR T 세포가 처치된 마우스는 종양 부담량의 신속한 초기 감소가 나타났지만, T 세포 주사 후 대략 7일에, 마우스가 무기력증 및 체중 감량으로 나타나는 전신 독성 증상을 보이기 시작하였고, 결국 처치 후 15일에 폐사되었다 (도 3A - B). F292G CAR T 세포는 독성 발생과 비일관적으로 종양 제거를 할 수 있었고, 이것은 CAR T 세포 처치 시점에 종양 부담량에 부분적으로 의존적인 것으로 보였다. 예를 들어, F292G (119 nM 친화성) CAR T 세포의 지연된 주입 (10일) 또는 처치 시 더 높은 종양 부담량은 보다 빈번한 사멸을 초래하였다. F265S를 발현하는 T 세포 (145 nM Kd) CAR은 관찰가능한 독성없이 종양을 제거하였다. 이것은 ~ 100 nM Kd의 I 도메인 CAR 친화성이 대략적인 한계치 친화성을 한정하고, 그 이상 (100 nM 미만의 Kd 예컨대 1-10 nM)에서 처치는 높은 항원 밀도 및 낮은 항원 밀도 간 구별의 감소 및 표적-적중, 종양-외 독성이 가능성을 증가를 초래한다는 것을 시사한다. 시험관내에서 WT CAR T 세포에 의한 8505C 사멸의 결여 또는 제한과 일관되게, 생체내에서 종양 진행성은 NT T 세포와 유사하게, WT CAR T 세포의 처치에 의해 방해받지 않았다 (도 3B). 대조적으로, 이의 더 높은 친화성 대응물과 비교하여 훨씬 더 지체된 시험관내 8505C 사멸 속도를 나타내는 F292A CAR T 세포는 처치 시점과 무관하게 분명한 독성없이 종양 부담량의 신속한 감소를 달성하였다 (도 3A-3B). 게다가, F292A CAR T 생체내 효능은 더 빠른 종양 제거 속도 및 견고한 종양 재발 억제로 증명된 바와 같이, ICAM-1에 대해 $> 1,000$ 배 더 낮은 친화성 (10 nM 대 20 μM)에도 불구하고 scFv-기반 R6.5 CAR 보다 우수하였다 (도 3A).

[0108]

전반적으로, I 도메인 CAR T 세포의 항종양 효능은 T 세포 미처치 또는 NT T 세포 처치 마우스와 비교하여 코호트 생존성을 통계적으로 유의하게 증가시켰다 (도 3C). 그러나, 종양 부담량이 전혀 없거나 적은 CAR T 세포-처치 마우스이더라도 T 세포 주사 후 ~ 10 주에 결국 빈번한 폐사를 초래하는 독성 징후 (예를 들어, 체중 감량, 텔 손실)를 보이기 시작하였다. 이것은 유사한 독성이 오직 인간 ICAM-1을 표적으로 하는 R6.5 CAR T 세포 처치된 마우스에서 관찰되었기 때문에 표적-적중, 종양-외 독성이 아니라, 이식편-대-숙주 질환³⁴ 과 관련된 것으로 의심되었다.

[0109]

실시예 17. CAR T 세포 동력학, 효능 및 독성의 실시간 이미지화

[0110]

PET/CT를 통해 실시간으로 T 세포 분포를 시공간적으로 모니터링하기 위해서, 우리는 T 세포의 표면 상에서 CAR 및 리포터의 균등한 발현을 보장하기 위해 리보솜 스킵핑 P2A 서열을 사용해 I 도메인 CAR 벡터에 이미지화 리포터 유전자, SSTR2를 도입시켰다 (도 4A). SSTR2의 발현은 주입된, 양전자-방출, SSTR2-특이적 방사성추적자, ¹⁸F-NOTA-옥트레오티드³⁰의 결합 및 세포내 축적을 가능하게 하였다. 이어서, 방출된 신호는 마이크로 PET 스캐너를 통해서 조직 침투 문제없이 고해상도로 검출되었다. SSTR2 리포터 유전자 및 Myc-태그 발현의 유세포분석 측정은 초대 인간 T 세포의 표면 상에서 CAR을 의미한다. SSTR2 및 Myc 태그화된 I 도메인의 발현은 초대 인간 T 세포 표면 상의 CAR을 의미하는 SSTR2 리포터 유전자 및 Myc-태그 발현의 유세포분석 측정을 통하여 항체 염색에 의해 확인하였다.

[0111]

마우스는 이전에 8505C 종양으로 이종이식되었고, NT 또는 F292A CAR T 세포가 처치되었다. 전신 발광도 이미지화를 수행하여 종양 부담량을 추산하는 한편 PET/CT 이미지화를 동일자에 수행하여 CAR T 세포 분포를 추적하였다 (도 4B). 각 시점에, 혈액을 채혈하여 T 세포 역학과의 상관성을 위해 인간 사이토카인을 측정하였다. 마우스의 PET/CT 이미지는 방사성추적자 배출로 야기된 담낭, 신장 및 방광내에서의 예상되는 백그라운드 수준을 나타내었다 (도 4B; 최우측). NT 처치된 대조군 코호트에서, 비특이적 추적자 흡수가 적지만 점진적으로 증가되는 것이 관찰되었는데, 이것은 증가된 종양 부담량 및 혈액 풀링 시 연관된 증가에 기인한 것이다 (도 4B). 대조적으로, 특이적 추적자 흡수가 SSTR2-F292A CAR T 세포 처치된 마우스에서 관찰되어, 폐에서 확장 및 축소 시기가 입증되었고, 피크 CAR T 세포 신호는 이종이식 후 대략 22일에 발생되었는데, 이것은 피크 종양 부담량 이후 4일 째 (이종이식 후 18일)이고, 점진적으로 백그라운드 수준으로 감소되었다 (도 4B-

4C). 이것은 2상성 T 세포 확장 및 축소 현상을 보여준다.

[0112] 처치된 마우스로부터 수득된 혈청의 사이토카인 분석은 피크 T 세포 확장 전에 IFN- γ , IL-6 및 CXCL10 농도의 급등을 입증하였고, 이것은 또한 종양 제거 후에 백그라운드 수준으로 복귀되었고 폐에서 T 세포 밀도의 축소 후에 백그라운드 수준으로 복귀되었다 (도 4D).

참조문헌

- [0114] 1. Maher J, Brentjens RJ, Gunset G, Riviere I, Sadelain M. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor. *Nat Biotechnol* **20**, 70-75 (2002).
- [0115] 2. Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 10024-10028 (1989).
- [0116] 3. Hudecek M, et al. Receptor affinity and extracellular domain modifications affect tumor recognition by ROR1-specific chimeric antigen receptor T cells. *Clin Cancer Res* **19**, 3153-3164 (2013).
- [0117] 4. Watanabe K, et al. Target antigen density governs the efficacy of anti-CD20-CD28-CD3 zeta chimeric antigen receptor-modified effector CD8+ T cells. *J Immunol* **194**, 911-920 (2015).
- [0118] 5. Kochenderfer JN, et al. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood* **116**, 4099-4102 (2010).
- [0119] 6. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *New England Journal of Medicine* **365**, 725-733 (2011).
- [0120] 7. Grupp SA, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med* **368**, 1509-1518 (2013).
- [0121] 8. Brentjens RJ, et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med* **5**, 177ra138 (2013).
- [0122] 9. Brudno JN, Kochenderfer JN. Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: recognition and management. *Blood* **127**, 3321-3330 (2016).
- [0123] 10. Cheever MA, et al. The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin Cancer Res* **15**, 5323-5337 (2009).
- [0124] 11. Kakarla S, Gottschalk S. CAR T cells for solid tumors: armed and ready to go? *Cancer J* **20**, 151-155 (2014).
- [0125] 12. Lamers CH, et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience. *J Clin Oncol* **24**, e20-22 (2006).
- [0126] 13. Parkhurst MR, et al. T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis. *Mol Ther* **19**, 620-626 (2011).
- [0127] 14. Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther* **18**, 843-851 (2010).
- [0128] 15. Tian S, Maile R, Collins EJ, Frelinger JA. CD8+ T cell activation is governed by TCR-peptide/MHC affinity, not dissociation rate. *J Immunol* **179**, 2952-2960 (2007).
- [0129] 16. Hebeisen M, Allard M, Gannon PO, Schmidt J, Speiser DE, Rufer N. Identifying Individual T Cell Receptors of Optimal Avidity for Tumor Antigens. *Front Immunol* **6**, 582 (2015).
- [0130] 17. Zhong S, et al. T-cell receptor affinity and avidity defines antitumor response and autoimmunity in T-cell immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 6973-6978 (2013).
- [0131] 18. Liu X, et al. Affinity-Tuned ErbB2 or EGFR Chimeric Antigen Receptor T Cells Exhibit an Increased

Therapeutic Index against Tumors in Mice. *Cancer Res* **75**, 3596–3607 (2015).

[0132] 19. Caruso HG, et al. Tuning Sensitivity of CAR to EGFR Density Limits Recognition of Normal Tissue While Maintaining Potent Antitumor Activity. *Cancer Res* **75**, 3505–3518 (2015).

[0133] 20. Arcangeli S, et al. Balance of Anti-CD123 Chimeric Antigen Receptor Binding Affinity and Density for the Targeting of Acute Myeloid Leukemia. *Mol Ther*, (2017).

[0134] 21. Chmielewski M, Hombach A, Heuser C, Adams GP, Abken H. T cell activation by antibody-like immunoreceptors: increase in affinity of the single-chain fragment domain above threshold does not increase T cell activation against antigen-positive target cells but decreases selectivity. *J Immunol* **173**, 7647–7653 (2004).

[0135] 22. Schmid DA, et al. Evidence for a TCR affinity threshold delimiting maximal CD8 T cell function. *J Immunol* **184**, 4936–4946 (2010).

[0136] 23. Corse E, Gottschalk RA, Krogsgaard M, Allison JP. Attenuated T cell responses to a high-potency ligand in vivo. *PLoS Biol* **8**, (2010).

[0137] 24. Park S, et al. Tumor suppression via paclitaxel-loaded drug carriers that target inflammation marker upregulated in tumor vasculature and macrophages. *Biomaterials* **34**, 598–605 (2013).

[0138] 25. Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* **137**, 245–254 (1986).

[0139] 26. Shimaoka M, et al. Reversibly locking a protein fold in an active conformation with a disulfide bond: integrin alpha₁ domains with high affinity and antagonist activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6009–6014 (2001).

[0140] 27. Jin M, et al. Directed evolution to probe protein allostery and integrin I domains of 200,000-fold higher affinity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 5758–5763 (2006).

[0141] 28. Wong R, Chen X, Wang Y, Hu X, Jin MM. Visualizing and Quantifying Acute Inflammation Using ICAM-1 Specific Nanoparticles and MRI Quantitative Susceptibility Mapping. *Ann Biomed Eng* **40**, 1328–1338 (2011).

[0142] 29. Vedvyas Y, et al. Longitudinal PET imaging demonstrates biphasic CAR T cell responses in survivors. *JCI Insight* **1**, e90064 (2016).

[0143] 30. Laverman P, et al. A novel facile method of labeling octreotide with (18)F-fluorine. *J Nucl Med* **51**, 454–461 (2010).

[0144] 31. McBride WJ, et al. A novel method of 18F radiolabeling for PET. *J Nucl Med* **50**, 991–998 (2009).

[0145] 32. Kinahan PE, Fletcher JW. Positron emission tomography-computed tomography standardized uptake values in clinical practice and assessing response to therapy. *Semin Ultrasound CT MR* **31**, 496–505 (2010).

[0146] 33. Leelawattanachai J, Kwon KW, Michael P, Ting R, Kim JY, Jin MM. Side-by-Side Comparison of Commonly Used Biomolecules That Differ in Size and Affinity on Tumor Uptake and Internalization. *PLoS One* **10**, e0124440 (2015).

[0147] 34. Poirot L, et al. Multiplex Genome-Edited T-cell Manufacturing Platform for "Off-the-Shelf" Adoptive T-cell Immunotherapies. *Cancer Res* **75**, 3853–3864 (2015).

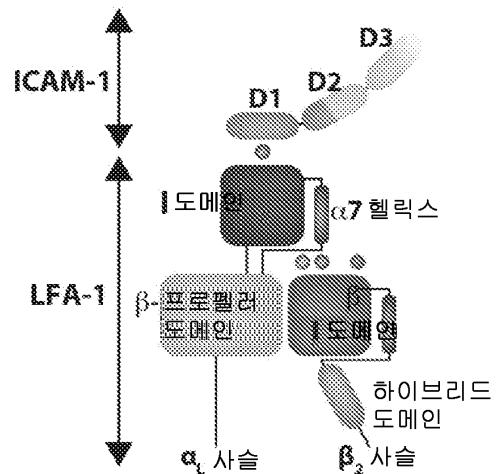
[0148] 35. Kang S, et al. Virus-mimetic polyplex particles for systemic and inflammation-specific targeted delivery of large genetic contents. *Gene Ther* **20**, 1042–1052 (2013).

[0149] 36. Hinrichs CS, Restifo NP. Reassessing target antigens for adoptive T-cell therapy. *Nat Biotechnol* **31**, 999–1008 (2013).

- [0150] 37. Newick K, O'Brien S, Moon E, Albelda SM. CAR T Cell Therapy for Solid Tumors. *Annu Rev Med* **68**, 139–152 (2017).
- [0151] 38. Ledebur HC, Parks TP. Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule-1 gene by inflammatory cytokines in human endothelial cells. Essential roles of a variant NF-kappa B site and p65 homodimers. *J Biol Chem* **270**, 933–943 (1995).
- [0152] 39. Usami Y, et al. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression correlates with oral cancer progression and induces macrophage/cancer cell adhesion. *Int J Cancer* **133**, 568–578 (2013).
- [0153] 40. Roland CL, Harken AH, Sarr MG, Barnett CC, Jr. ICAM-1 expression determines malignant potential of cancer. *Surgery* **141**, 705–707 (2007).
- [0154] 41. Guo P, et al. ICAM-1 as a molecular target for triple negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 14710–14715 (2014).
- [0155] 42. Carman CV, Springer TA. Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Curr Opin Cell Biol* **15**, 547–556 (2003).
- [0156] 43. Boissonnas A, Fetler L, Zeelenberg IS, Hugues S, Amigorena S. In vivo imaging of cytotoxic T cell infiltration and elimination of a solid tumor. *J Exp Med* **204**, 345–356 (2007).
- [0157] 44. Porter BB, Harty JT. The onset of CD8+T-cell contraction is influenced by the peak of Listeria monocytogenes infection and antigen display. *Infect Immun* **74**, 1528–1536 (2006).
- [0158] 45. Keu KV, et al. Reporter gene imaging of targeted T cell immunotherapy in recurrent glioma. *Sci Transl Med* **9**, (2017).
- [0159] 46. Yaghoubi SS, et al. Noninvasive detection of therapeutic cytolytic T cells with 18F-FHBG PET in a patient with glioma. *Nat Clin Pract Oncol* **6**, 53–58 (2009).
- [0160] 47. Drent E, et al. A Rational Strategy for Reducing On-Target Off-Tumor Effects of CD38-Chimeric Antigen Receptors by Affinity Optimization. *Mol Ther*, (2017).
- [0161] 48. Kalergis AM, et al. Efficient T cell activation requires an optimal dwell-time of interaction between the TCR and the pMHC complex. *Nat Immunol* **2**, 229–234 (2001).
- [0162] 49. Valitutti S. The Serial Engagement Model 17 Years After: From TCR Triggering to Immunotherapy. *Front Immunol* **3**, 272 (2012).
- [0163] 50. McMahan RH, McWilliams JA, Jordan KR, Dow SW, Wilson DB, Slansky JE. Relating TCR-peptide-MHC affinity to immunogenicity for the design of tumor vaccines. *The Journal of clinical investigation* **116**, 2543–2551 (2006).
- [0164] 51. Robbins PF, et al. Single and dual amino acid substitutions in TCR CDRs can enhance antigen-specific T cell functions. *J Immunol* **180**, 6116–6131 (2008).
- [0165] 52. Co MS, Deschamps M, Whitley RJ, Queen C. Humanized antibodies for antiviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2869–2873 (1991).
- [0166] 53. Leelawattanachai J, Kwon K-W, Michael P, Ting R, Kim J-Y, Jin MM. Side-by-Side Comparison of Commonly Used Biomolecules That Differ in Size and Affinity on Tumor Uptake and Internalization. *PLoS One* **10**, e0124440 (2015).
- [0167] 54. Jin M, et al. Directed evolution to probe protein allostery and integrin I domains of 200,000-fold higher affinity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 5758–5763 (2006).
- [0168] 55. Wong R, Chen X, Wang Y, Hu X, Jin MM. Visualizing and quantifying acute inflammation using ICAM-1 specific nanoparticles and MRI quantitative susceptibility mapping. *Ann Biomed Eng* **40**, 1328–1338 (2012).

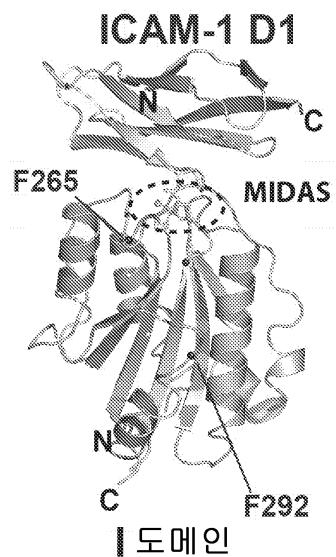
도면

도면 1a



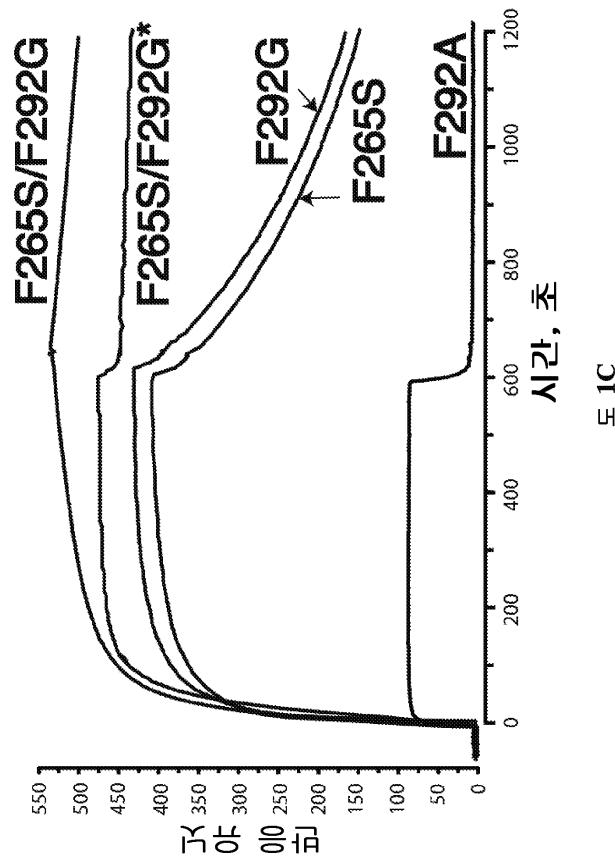
도 1A

도면 1b



도 1B

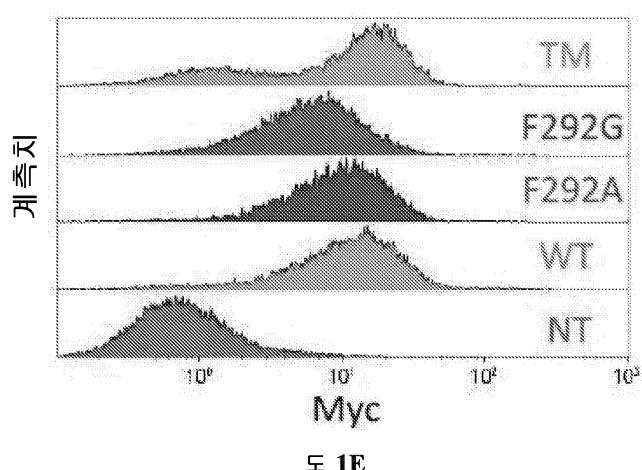
도면 1c



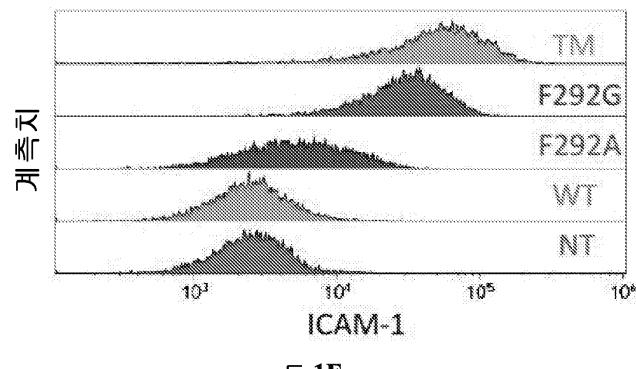
도면 1d



도면 1e

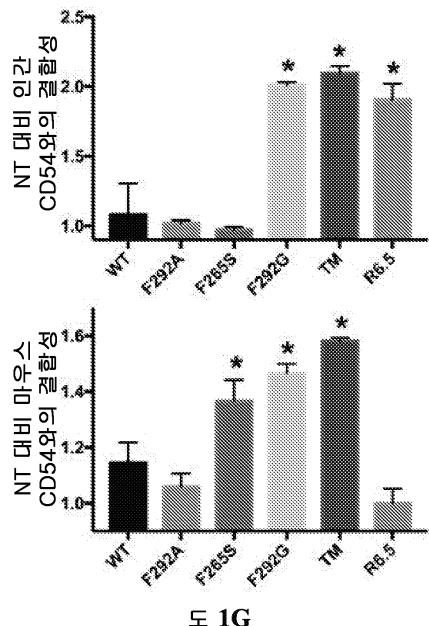


도면 1f



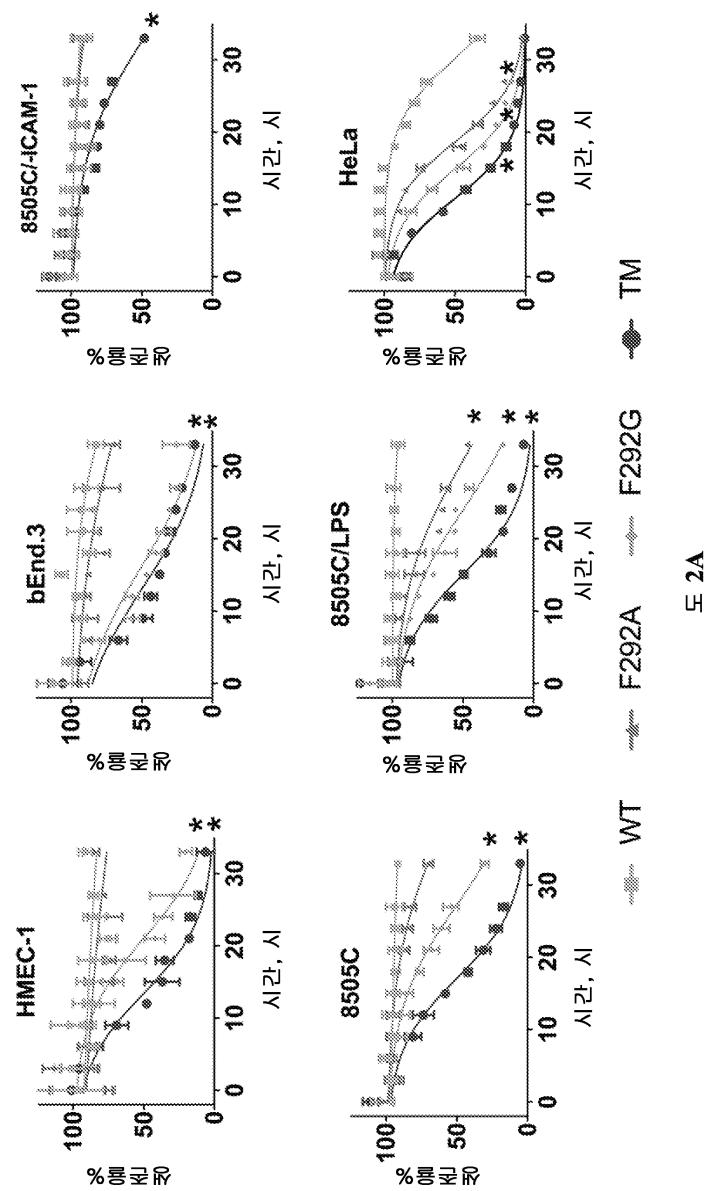
도면 1F

도면 1g

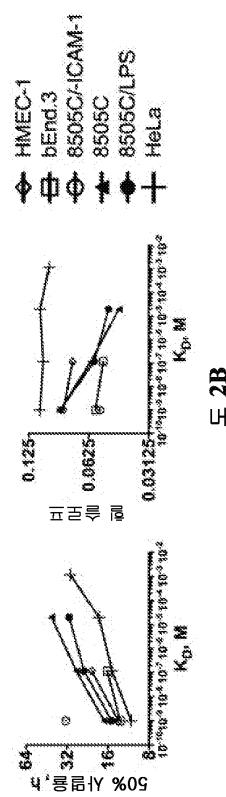


도면 1G

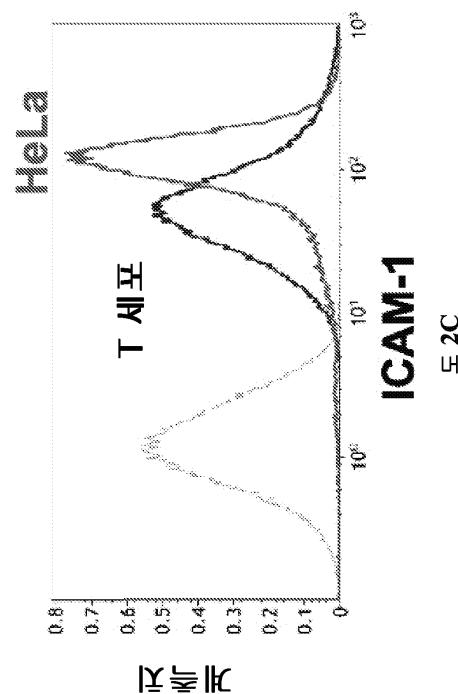
도면 2a



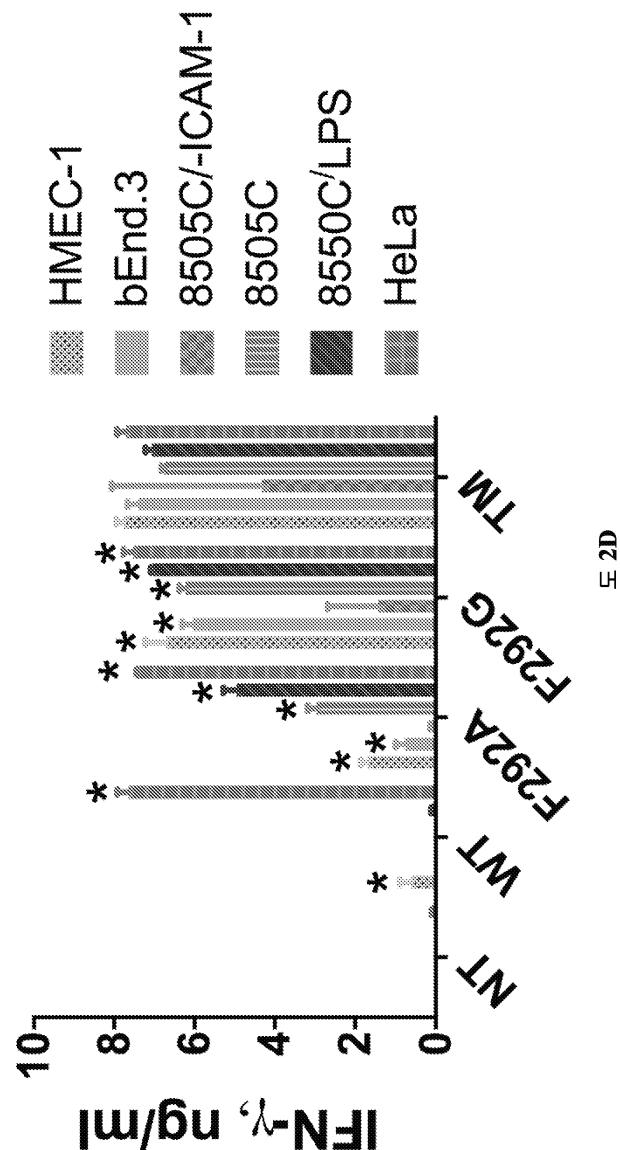
도면2b



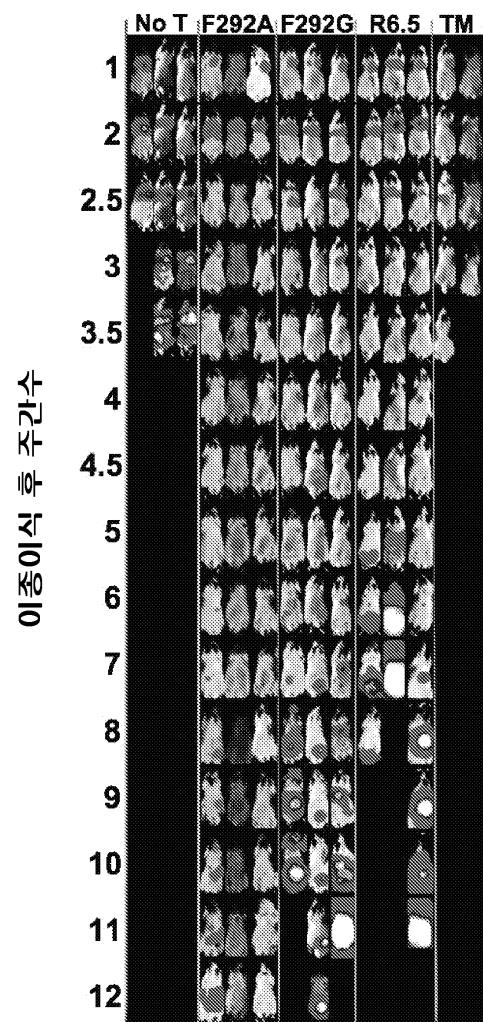
도면2c



도면2d

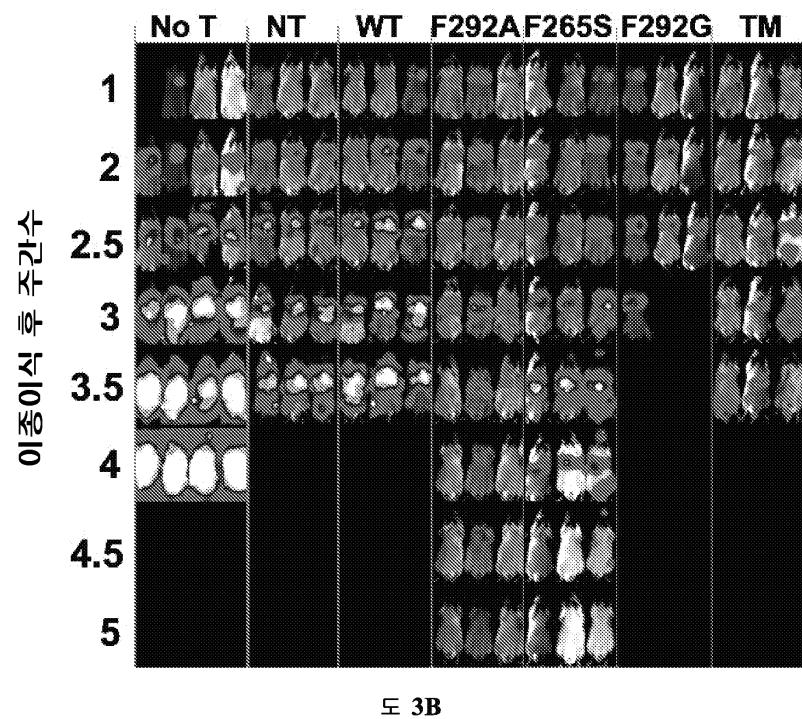


도면3a



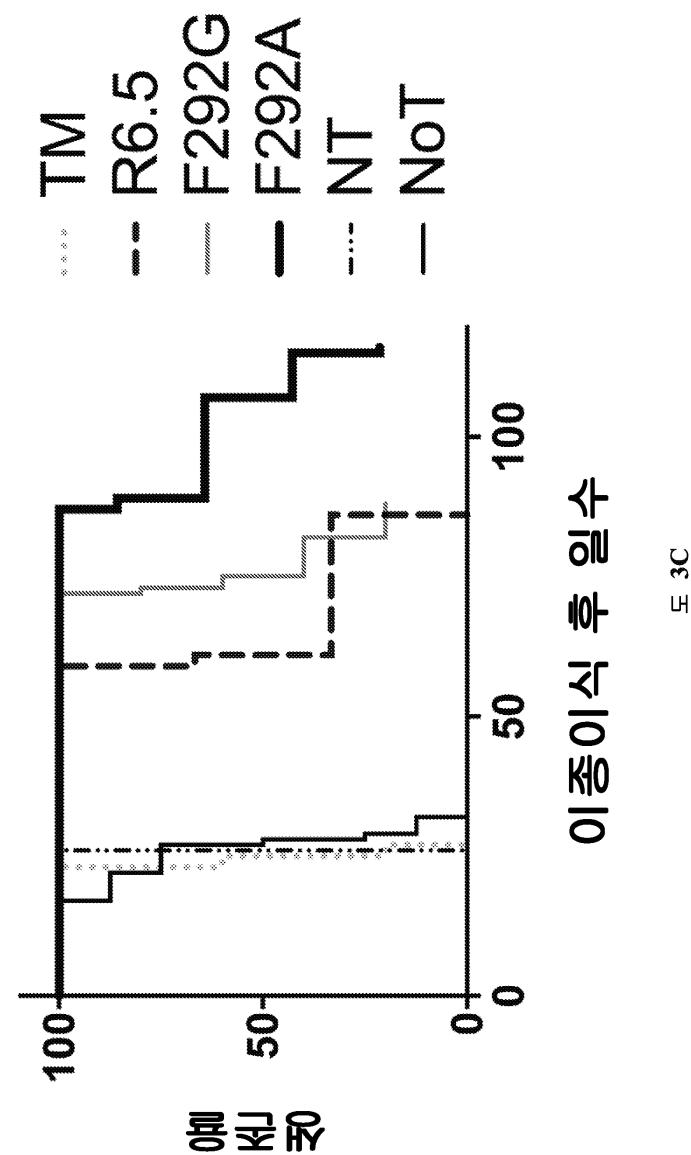
도 3A

도면3b



도 3B

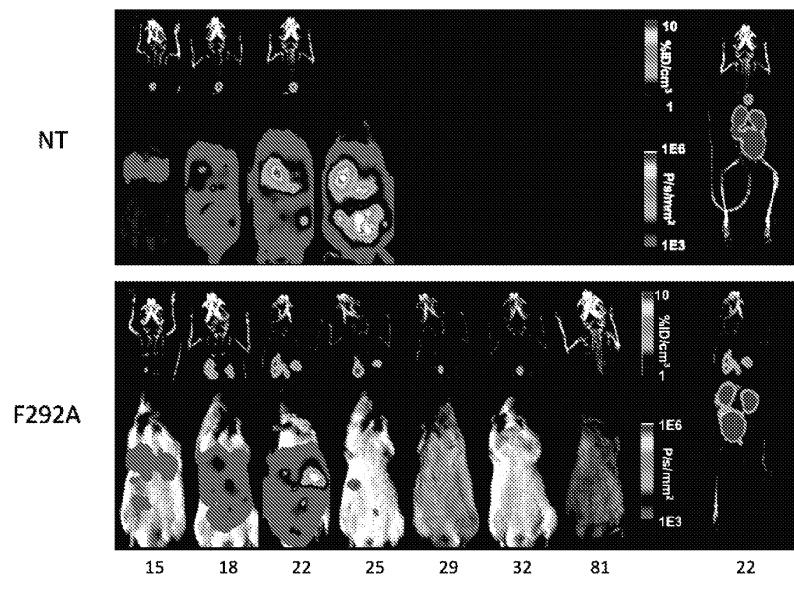
도면3c



도면4a

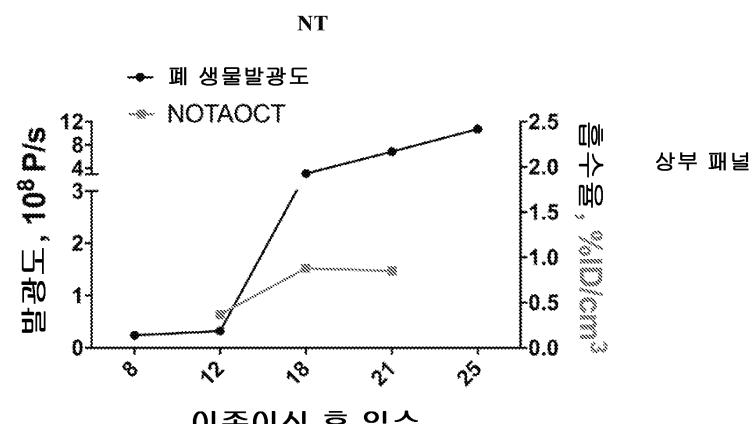


도면4b

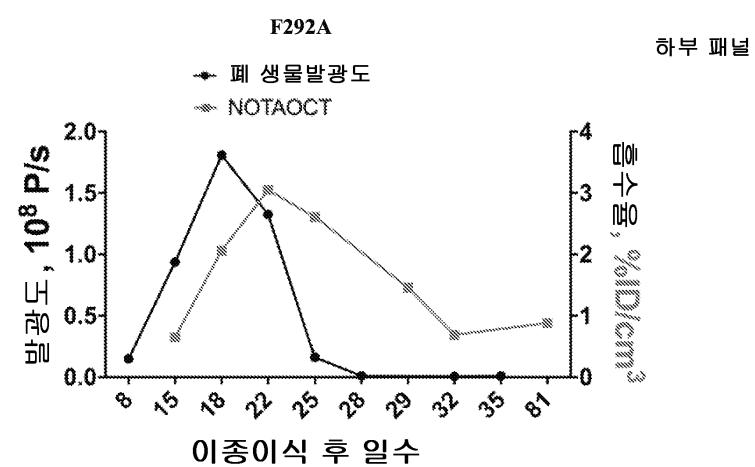


도 4B

도면4c



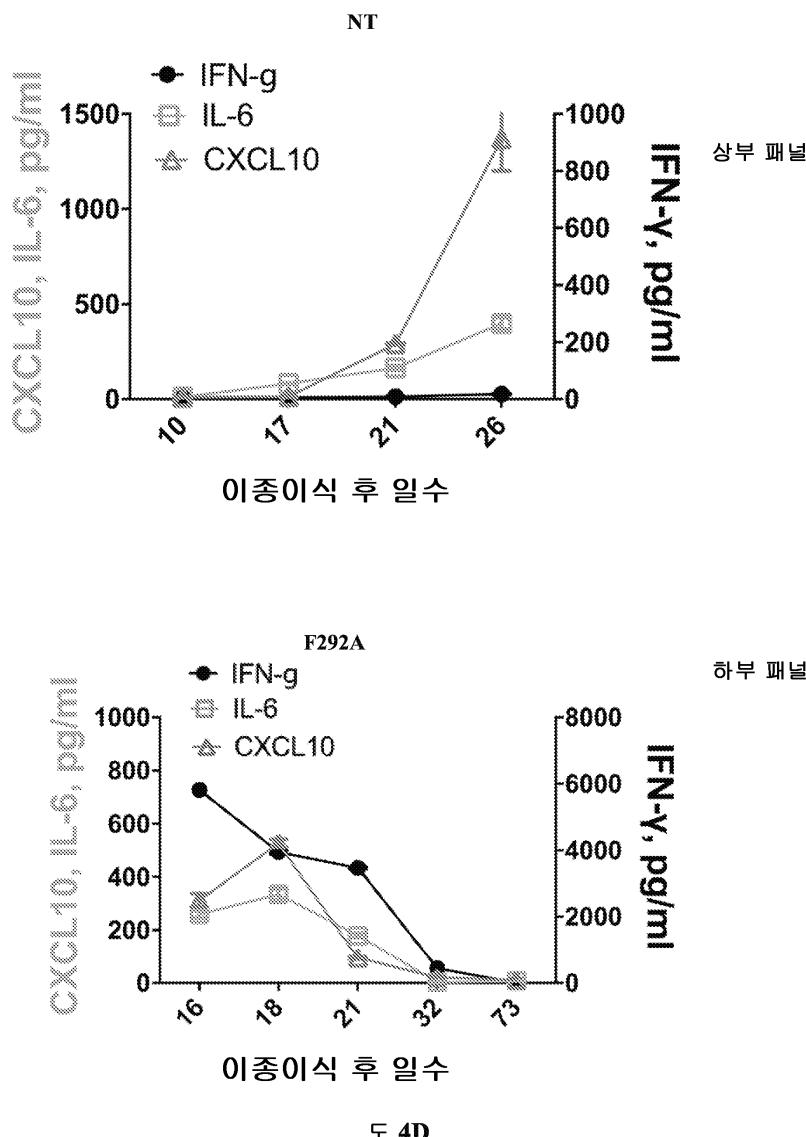
상부 패널



하부 패널

도 4C

도면4d



도 4D

서 열 목 록

- <110> Cornell University
- <120> I DOMAIN CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR SPECIFIC TO ICAM-1
- <130> 078554-8201.W001
- <150> US 62/383,139
- <151> 2016-09-02
- <150> US 62/419,817
- <151> 2016-11-09
- <160> 1
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 1145

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Tyr Asn Leu Asp Val Arg Gly Ala Arg Ser Phe Ser Pro Pro Arg Ala

1 5 10 15

Gly Arg His Phe Gly Tyr Arg Val Leu Gln Val Gly Asn Gly Val Ile

20 25 30

Val Gly Ala Pro Gly Glu Gly Asn Ser Thr Gly Ser Leu Tyr Gln Cys

35 40 45

Gln Ser Gly Thr Gly His Cys Leu Pro Val Thr Leu Arg Gly Ser Asn

50 55 60

Tyr Thr Ser Lys Tyr Leu Gly Met Thr Leu Ala Thr Asp Pro Thr Asp

65 70 75 80

Gly Ser Ile Leu Ala Cys Asp Pro Gly Leu Ser Arg Thr Cys Asp Gln

85 90 95

Asn Thr Tyr Leu Ser Gly Leu Cys Tyr Leu Phe Arg Gln Asn Leu Gln

100 105 110

Gly Pro Met Leu Gln Gly Arg Pro Gly Phe Gln Glu Cys Ile Lys Gly

115 120 125

Asn Val Asp Leu Val Phe Leu Phe Asp Gly Ser Met Ser Leu Gln Pro

130 135 140

Asp Glu Phe Gln Lys Ile Leu Asp Phe Met Lys Asp Val Met Lys Lys

145 150 155 160

Leu Ser Asn Thr Ser Tyr Gln Phe Ala Ala Val Gln Phe Ser Thr Ser

165 170 175

Tyr Lys Thr Glu Phe Asp Phe Ser Asp Tyr Val Lys Trp Lys Asp Pro

180 185 190

Asp Ala Leu Leu Lys His Val Lys His Met Leu Leu Leu Thr Asn Thr

195 200 205

Phe Gly Ala Ile Asn Tyr Val Ala Thr Glu Val Phe Arg Glu Glu Leu

210 215 220

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

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Glu Ala Thr Asp Ser Gly Asn Ile Asp Ala Ala Lys Asp Ile Ile Arg

245	250	255	
-----	-----	-----	--

Tyr Ile Ile Gly Ile Gly Lys His Phe Gln Thr Lys Glu Ser Gln Glu

260	265	270	
-----	-----	-----	--

Thr Leu His Lys Phe Ala Ser Lys Pro Ala Ser Glu Phe Val Lys Ile

275	280	285	
-----	-----	-----	--

Leu Asp Thr Phe Glu Lys Leu Lys Asp Leu Phe Thr Glu Leu Gln Lys

290	295	300	
-----	-----	-----	--

Lys Ile Tyr Val Ile Glu Gly Thr Ser Lys Gln Asp Leu Thr Ser Phe

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

Asn Met Glu Leu Ser Ser Ser Gly Ile Ser Ala Asp Leu Ser Arg Gly

325	330	335	
-----	-----	-----	--

His Ala Val Val Gly Ala Val Gly Ala Lys Asp Trp Ala Gly Gly Phe

340	345	350	
-----	-----	-----	--

Leu Asp Leu Lys Ala Asp Leu Gln Asp Asp Thr Phe Ile Gly Asn Glu

355	360	365	
-----	-----	-----	--

Pro Leu Thr Pro Glu Val Arg Ala Gly Tyr Leu Gly Tyr Thr Val Thr

370	375	380	
-----	-----	-----	--

Trp Leu Pro Ser Arg Gln Lys Thr Ser Leu Leu Ala Ser Gly Ala Pro

385	390	395	400
-----	-----	-----	-----

Arg Tyr Gln His Met Gly Arg Val Leu Leu Phe Gln Glu Pro Gln Gly

405	410	415	
-----	-----	-----	--

Gly Gly His Trp Ser Gln Val Gln Thr Ile His Gly Thr Gln Ile Gly

420	425	430	
-----	-----	-----	--

Ser Tyr Phe Gly Gly Glu Leu Cys Gly Val Asp Val Asp Gln Asp Gly

435	440	445	
-----	-----	-----	--

Glu Thr Glu Leu Leu Ile Gly Ala Pro Leu Phe Tyr Gly Glu Gln

450	455	460	
-----	-----	-----	--

Arg Gly Gly Arg Val Phe Ile Tyr Gln Arg Arg Gln Leu Gly Phe Glu

465	470	475	480
-----	-----	-----	-----

Glu Val Ser Glu Leu Gln Gly Asp Pro Gly Tyr Pro Leu Gly Arg Phe
 485 490 495
 Gly Glu Ala Ile Thr Ala Leu Thr Asp Ile Asn Gly Asp Gly Leu Val
 500 505 510
 Asp Val Ala Val Gly Ala Pro Leu Glu Glu Gln Gly Ala Val Tyr Ile
 515 520 525

 Phe Asn Gly Arg His Gly Gly Leu Ser Pro Gln Pro Ser Gln Arg Ile
 530 535 540
 Glu Gly Thr Gln Val Leu Ser Gly Ile Gln Trp Phe Gly Arg Ser Ile
 545 550 555 560
 His Gly Val Lys Asp Leu Glu Gly Asp Gly Leu Ala Asp Val Ala Val
 565 570 575
 Gly Ala Glu Ser Gln Met Ile Val Leu Ser Ser Arg Pro Val Val Asp
 580 585 590
 Met Val Thr Leu Met Ser Phe Ser Pro Ala Glu Ile Pro Val His Glu

 595 600 605
 Val Glu Cys Ser Tyr Ser Thr Ser Asn Lys Met Lys Glu Gly Val Asn
 610 615 620
 Ile Thr Ile Cys Phe Gln Ile Lys Ser Leu Tyr Pro Gln Phe Gln Gly
 625 630 635 640
 Arg Leu Val Ala Asn Leu Thr Tyr Thr Leu Gln Leu Asp Gly His Arg
 645 650 655
 Thr Arg Arg Arg Gly Leu Phe Pro Gly Gly Arg His Glu Leu Arg Arg
 660 665 670

 Asn Ile Ala Val Thr Thr Ser Met Ser Cys Thr Asp Phe Ser Phe His
 675 680 685
 Phe Pro Val Cys Val Gln Asp Leu Ile Ser Pro Ile Asn Val Ser Leu
 690 695 700
 Asn Phe Ser Leu Trp Glu Glu Gly Thr Pro Arg Asp Gln Arg Ala
 705 710 715 720
 Gln Gly Lys Asp Ile Pro Pro Ile Leu Arg Pro Ser Leu His Ser Glu
 725 730 735

Thr Trp Glu Ile Pro Phe Glu Lys Asn Cys Gly Glu Asp Lys Lys Cys

740 745 750

Glu Ala Asn Leu Arg Val Ser Phe Ser Pro Ala Arg Ser Arg Ala Leu

755 760 765

Arg Leu Thr Ala Phe Ala Ser Leu Ser Val Glu Leu Ser Leu Ser Asn

770 775 780

Leu Glu Glu Asp Ala Tyr Trp Val Gln Leu Asp Leu His Phe Pro Pro

785 790 795 800

Gly Leu Ser Phe Arg Lys Val Glu Met Leu Lys Pro His Ser Gln Ile

805 810 815

Pro Val Ser Cys Glu Glu Leu Pro Glu Glu Ser Arg Leu Leu Ser Arg

820 825 830

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

835 840 845

Val Ala Leu Gln Met Met Phe Asn Thr Leu Val Asn Ser Ser Trp Gly

850 855 860

Asp Ser Val Glu Leu His Ala Asn Val Thr Cys Asn Asn Glu Asp Ser

865 870 875 880

Asp Leu Leu Glu Asp Asn Ser Ala Thr Thr Ile Ile Pro Ile Leu Tyr

885 890 895

Pro Ile Asn Ile Leu Ile Gln Asp Gln Glu Asp Ser Thr Leu Tyr Val

900 905 910

Ser Phe Thr Pro Lys Gly Pro Lys Ile His Gln Val Lys His Met Tyr

915 920 925

Gln Val Arg Ile Gln Pro Ser Ile His Asp His Asn Ile Pro Thr Leu

930 935 940

Glu Ala Val Val Gly Val Pro Gln Pro Pro Ser Glu Gly Pro Ile Thr

945 950 955 960

His Gln Trp Ser Val Gln Met Glu Pro Pro Val Pro Cys His Tyr Glu

965 970 975

Asp Leu Glu Arg Leu Pro Asp Ala Ala Glu Pro Cys Leu Pro Gly Ala

980	985	990
Leu Phe Arg Cys Pro Val Val Phe Arg Gln Glu Ile Leu Val Gln Val		
995	1000	1005
Ile Gly Thr Leu Glu Leu Val Gly Glu Ile Glu Ala Ser Ser Met Phe		
1010	1015	1020
Ser Leu Cys Ser Ser Leu Ser Ile Ser Phe Asn Ser Ser Lys His Phe		
1025	1030	1035
His Leu Tyr Gly Ser Asn Ala Ser Leu Ala Gln Val Val Met Lys Val		
1045	1050	1055
Asp Val Val Tyr Glu Lys Gln Met Leu Tyr Leu Tyr Val Leu Ser Gly		
1060	1065	1070
Ile Gly Gly Leu Leu Leu Leu Leu Ile Phe Ile Val Leu Tyr Lys		
1075	1080	1085
Val Gly Phe Phe Lys Arg Asn Leu Lys Glu Lys Met Glu Ala Gly Arg		
1090	1095	1100
Gly Val Pro Asn Gly Ile Pro Ala Glu Asp Ser Glu Gln Leu Ala Ser		
1105	1110	1115
Gly Gln Glu Ala Gly Asp Pro Gly Cys Leu Lys Pro Leu His Glu Lys		
1125	1130	1135
Asp Ser Glu Ser Gly Gly Lys Asp		
1140	1145	