(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년04월16일
(11) 등록번호 10-2795692
(24) 등록일자 2025년04월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) *A61K 35/12* (2020.01)
A61K 35/17 (2025.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 29/00 (2023.01) *A61P 37/08* (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01) *C07K 16/44* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0637 (2025.01)
A61K 35/17 (2025.01)
(21) 출원번호 10-2020-7022067
(22) 출원일자(국제) 2019년01월17일
심사청구일자 2022년01월14일
(85) 번역문제출일자 2020년07월29일
(65) 공개번호 10-2020-0113211
(43) 공개일자 2020년10월06일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2019/051143
(87) 국제공개번호 WO 2019/141774
국제공개일자 2019년07월25일
(30) 우선권주장
18152631.0 2018년01월19일
유럽특허청(EPO)(EP)
(56) 선행기술조사문헌
McGovern JL et al. Frontiers in Immunology (2017) 8:1517
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
밀테니 비오텍 비.브이. & 씨오. 케이지
독일 베르기쉬 글라드바흐 51429 프리드리히 에베르트 스트라쎄 68
샤리떼 우니베지테츠메디친 베를린
독일 10117 베를린 샤리떼플라츠 1
(72) 발명자
노박 안나
독일, 베를린 13347, 암스테르담 스트라세 13
로크 도미니트
독일, 쾰른 51103, 아이트 스트라세 55
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김애라

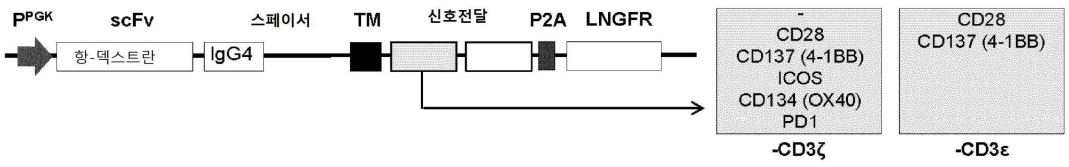
전체 청구항 수 : 총 14 항 심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 **키메라 항원 수용체를 발현하는 조절 T 세포**

(57) 요 약

본 발명은 항원 키메라 수용체 (CAR)를 발현하는 조절 T (Treg) 세포를 제공하며, CAR은 a) 적어도 하나의 항원 결합 도메인, b) 막횡단 도메인, 및 c) 적어도 하나의 일차 세포질 신호전달 도메인 및 적어도 CD137의 공동-자극 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 신호전달 도메인을 포함하고, 여기서 상기 항원 결합 도메인은 표적 세포의 표면에서 발현되는 항원 또는 표적 세포의 표면에서 발현되는 항원에 결합하는 태그 부착된 폴리펩티드의 태그 또는 가용성 항원에 특이적으로 결합한다. 또한 상기 Treg 세포를 포함하는 조성물, 및 상기 CAR을 발현하는 활성화된 Treg의 농축 및 분석 방법이 개시된다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61P 29/00 (2023.02)
A61P 37/08 (2018.01)
C07K 14/705 (2013.01)
C07K 16/44 (2013.01)
A61K 2035/122 (2013.01)
A61K 2039/5156 (2025.01)
C07K 2319/02 (2013.01)
C07K 2319/03 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)

(72) 발명자
카이저 안드류
독일, 뢰스라트 51503, 샤렌브로이허 스트라쎄 65
쉐폴드 알렉산더
독일, 베를린 10627, 제젠하이머 스트라세 7

(56) 선행기술조사문헌
MacDonald KG et al. Journal of Clinical Investigation (2016) 126(4):1413-1424
Boardman DA. et al., American Journal of Transplantation (2017) 17(4):931-943
WO2017100428 A1
EP02306191 A1

명 세 서

청구범위

청구항 1

항원 키메라 수용체 (CAR)를 발현하는 조절 T (Treg) 세포로서, CAR은

a) 적어도 하나의 항원 결합 도메인,

b) 막횡단 도메인,

c) 적어도 하나의 일차 세포질 신호전달 도메인 및 적어도 CD137의 공동-자극 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 신호전달 도메인

을 포함하고,

여기서 상기 항원 결합 도메인은 표적 세포의 표면에서 발현되는 항원 또는 표적 세포의 표면에서 발현되는 항원에 결합하는 태그 부착된 폴리펩티드의 태그 또는 가용성 항원에 특이적으로 결합하는, Treg 세포.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 적어도 하나의 일차 세포질 신호전달 도메인이 CD3zeta인 것인, Treg 세포.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 CAR의 상기 항원 결합 도메인이 가용성 항원에 특이적이어서, 상기 가용성 항원이 상기 CAR의 상기 항원 결합 도메인에 결합 시 상기 Treg 세포의 활성화를 허용하는 것인, Treg 세포.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 가용성 항원이 상기 Treg 세포가 적용되는 대상체의 혈액 또는 조직에 자연적으로 존재하지 않는 외인성 항원인 것인, Treg 세포.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 가용성 항원이 덱스트란인 것인, Treg 세포.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 CAR의 상기 항원 결합 도메인이 서열 번호 1 및 서열 번호 2의 서열을 포함하는 것인, Treg 세포.

청구항 7

제1항에 있어서, 자가면역 질환, 알레르기, 이식 거부, 이식편대숙주 질환, 만성 염증 질환, 또는 대상체의 바이러스, 박테리아, 기생생물에 의한 만성 감염의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 CAR을 발현하는 것인, Treg 세포.

청구항 8

제1항에 따른 CAR을 발현하는 Treg 세포의 집단을 포함하는 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

a) 약제학적으로 허용 가능한 담체와 함께 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 CAR을 발현하는 Treg 세포의 집단, 및

b) 가용성 항원

을 포함하는 약제학적 조성물의 배합물로서,

상기 CAR의 항원 결합 도메인은 가용성 항원에 특이적인 것인, 배합물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 가용성 항원이 덱스트란인 것인, 배합물.

청구항 12

제10항에 있어서, 자가면역 질환, 알레르기, 이식 거부, 이식편대숙주 질환, 만성 염증 질환, 또는 대상체의 바이러스, 박테리아, 기생생물에 의한 만성 감염의 치료 또는 예방을 위한 것인, 배합물.

청구항 13

CAR을 발현하는 활성화된 Treg 세포의 농축 방법으로서, 여기서 상기 CAR은

i) 적어도 하나의 항원 결합 도메인

ii) 막횡단 도메인

iii) 적어도 하나의 일차 세포질 신호전달 도메인 및 적어도 CD137의 공동-자극 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 신호전달 도메인

을 포함하고, 여기서 상기 항원 결합 도메인은 표적 세포의 표면에서 발현되는 항원 또는 표적 세포의 표면에서 발현되는 항원에 결합하는 태그 부착된 폴리펩티드의 태그 또는 가용성 항원에 특이적으로 결합하고, 방법은

a) 조절 T 세포를 포함하는 샘플을 제공하는 단계

b) 상기 샘플의 상기 조절 T 세포를 상기 CAR을 발현하도록 유전자조작으로 변형시키는 단계

c) 상기 유전자조작으로 변형된 조절 T 세포를 6-16시간 동안 상기 CAR의 항원 결합 도메인에 의해 결합되는 항원과의 접촉을 통해 활성화시키는 단계

d) 단계 c)의 활성화된 Treg 세포를 단리하는 단계로서,

α) 단계 c)의 세포를

I) CD154에 결합하는 분자와 접촉시키고 CD154+ T-세포를 고갈시키거나:

II) 조절 T-세포 또는 활성화된 조절 T 세포에 대한 마커에 결합하는 분자와 접촉시키고 상기 결합 분자에 결합하는 세포를 양성 선별하고,

β)

I) 단계 α)I)의 세포를 조절 T-세포 또는 활성화된 조절 T-세포에 대한 마커에 결합하는 분자와 접촉시키고 상기 결합 분자에 결합하는 세포를 양성 선별함으로써 상기 CAR를 발현하는 활성화된 조절 T-세포의 집단을 수득하거나;

II) 단계 α)II)의 세포를 CD154에 결합하는 분자와 접촉시키고 CD154+ T-세포를 고갈시킴으로써 상기 CAR을 발현하는 활성화된 조절 T-세포의 집단을 수득함으로써 단계 c)의 활성화된 Treg 세포를 단리하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 CAR의 상기 항원 결합 도메인이 가용성 항원에 특이적이고, 상기 가용성 항원이 덱스트란인 것인, 방법.

청구항 15

제8항에 있어서, 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 CAR를 발현하는 Treg 세포의 상기 집단이 제13항 또는 제14항에 따른 방법으로 수득 가능한 활성화된 Treg의 집단인 것인, 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 면역 세포에서 발현되는, 특히 조절 T 세포에서 발현되는 키메라 항원 수용체의 분야에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 통상적인 T 세포 (Tcon)는 병원체 또는 종양의 인식 및 파괴를 개선하기 위해 조작될 수 있다. 조절 T 세포 (Treg)는 면역억제 기능을 갖는 T 세포의 서브세트를 포함한다. Treg는 자가면역, 이식 거부, 알레르기 및 만성 염증 질환을 예방 또는 치료하기 위해 조작될 수 있다.

[0003] 키메라 항원 수용체 (CAR)는 항원-특이적 조절 T 세포 (Treg)의 생성을 위한 유망한 대안으로 떠오른다. TCR 이외에, CAR는 MHC와 독립적인 표면 항원에 결합할 수 있는 항체-유형 특이성을 갖는 인공 수용체이다. CAR-T 세포에 의한 특정 항원의 특이적 인식은 막횡단 영역을 통해 세포내 TCR-유래된 신호전달 도메인에 커플링된 세포외 스페이서 도메인을 갖는 항체-유래된 단일쇄 가변 단편 (scFv)에 의해 매개된다 (Gross et al. 1989; Kuwana et al. 1987). 뮤린 모델에서, 미엘린 염기성 단백질에 대해 반응성인 재지시된 CAR-Treg는 EAE를 개선할 수 있었으며 (Mekala and Geiger 2005), 또한 2,4,6-트리니트로페놀 (TNP) 또는 암배아 항원 (CEA)에 특이적인 CAR-Treg는 결장으로 성공적으로 재지시되었으며 여기서 그들은 결장염 및 그의 연관된 결장직장암의 발달을 억제하는데 매우 강력하였다 (Blat et al. 2014; Elinav et al. 2009; Elinav et al. 2008). 보다 최근에, 인간 CAR-Treg는 이식에서 일반적으로 미스매칭된 항원으로서의 HLA-A2에 대해 재지시되었으며, 이종발생성 GvHD를 억제하는 것으로 밝혀졌다 (MacDonald et al. 2016; Noyan et al. 2017; Boardman et al. 2017). 또한, CAR-Treg는 알레르기 기도 염증을 개선하고 (Skuljec et al. 2017) 마우스에서 인자 VIII에 대한 중화 면역 반응을 방지하는 (Yoon et al. 2017) 가능성을 갖는다는 것이 입증되었다. 문헌 (McGovern et al., 2017, Frontiers in Immunology, Vol. 8, Art. 1517 pp:1-6)은 CAR을 발현하는 Treg에 대한 최신 기술을 검토한다.

[0004] 우리가 아는 한, Treg에서 지금껏 사용되어온 CAR 구축물은 CD28 공동-자극 도메인을 갖는다.

[0005] 항원-특이적 Treg의 시험관내 생성을 위한 필요 조건으로서 질환-관련된 표적 항원의 확인은 주요한 도전으로 남아 있다. 또한, CAR-Treg 효능의 분석을 위한 기능 검정은 Treg를 특이적으로 확인하고 그들의 특이적 활성화 요건을 시험할 수 있는 마커의 결여로 인해 제한된다. 이는 최적의 Treg CAR 구축물의 생성 및 최적화된 Treg 이식물의 생성, 즉 최대 CAR-관련된 Treg 기능적 활성 및 이펙터 T 세포로의 최소의 오염에 중요하다. 따라서, Tcon과 상당히 상이할 수 있는 CAR-Treg의 활성화 및 확장을 위한 요건은 여전히 잘 이해되지 않고 있다.

[0006] 다양한 면역-관련된 장애, 예컨대 자가면역, 이식 거부, 알레르기 또는 만성 염증 질환을 예방 또는 치료하기 위해 대상체의 처치에 사용될 수 있는 CAR을 발현하는 조절 T 세포가 당업계에 필요하다.

[0007] 또한, 상기 면역-관련된 장애를 예방 또는 치료하기 위해 대상체의 처치에 사용될 수 있는 CAR을 발현하는 고도로 정제되고 기능적으로 최적화된 조절 T 세포의 생성이 당업계에 필요하다.

발명의 내용

[0008] 치료 적용을 위한 Treg 세포의 순수한 집단을 갖고 Tcon의 요건과 상이할 수 있는 Treg 기능에 대한 CAR 구축물의 효과를 평가할 수 있는 것이 중요하다. 그러나, 시험관내 Treg 집단은 일반적으로 Tcon 세포로 오염되며, 두 집단은 서로로부터 쉽게 분리되지 않는다. 활성화된 조절 T 세포 및 활성화된 통상적인 T 세포를 포함하는 샘플로부터 진정한 활성화된 Treg를 확인 및 단리하는 것은 시험관내에서 Treg에 대한 특정한 CAR 구축물의 효과 및 이어서 생체내에서 그들의 기능성을 분석하기 위한 요건이다. 따라서, Treg 기능 활성의 최적 CAR-매개된 활성화를 위한 조건을 정의하고 최적화된 CAR Treg를 생성하는 작업은 지금까지 해결되지 않았다.

[0009] 이러한 확인 및 분리는 EP2306191B1에 개시된 방법에 의해 수행될 수 있다.

[0010] 여기서, 우리는 통상적인 T 세포 (Tcon)를 활성화시키는 것으로 공지된 상이한 신호전달 도메인을 비교함으로써, 놀랍게도 CD137 (4-1BB) 공동-자극 도메인의 사용이 인간 조절 T 세포를 자극하고 확장하는 데 선택적인 이점을 갖는다는 것을 입증한다. 이는 입양 Treg 요법을 위해 Treg 기능을 최적화하는 데 중요하다.

[0011] 도 4는, 놀랍게도, CAR가 CD137 (4-1BB) 공동-자극 신호전달 도메인을 함유하는 경우 (본원에서 또한 "CD137

CAR"로 지칭됨), CD28 공동-자극 신호전달 도메인을 갖는 CAR (본원에서 또한 "CD28 CAR"로 지칭됨)과 비교하여, 시험관내에서 Treg가 (CD137의 CAR-리간드 (항원) 유도된 발현 및 확장에 의해 나타난 바와 같이) CAR를 통해 보다 잘 활성화되는 반면, Tcon에서는 그 반대라는 것을 도시한다. 따라서, CD137 CAR의 사용은 Treg의 최적 자극을 허용하며, 이는 CAR-리간드 (항원) 자극 후 활성화된 Treg의 시험관내 선별에 이용되어 고도로 정제된 CAR-리간드 (항원) 반응적 Treg를 생성할 수 있다. 또한, 생체내에서 Treg 기능은 CAR 구축물에 의해 모방되는 기능적 항원-수용체 활성화에 엄격하게 의존적이기 때문에, 생체내에서 CD137 CAR은 CD28 CAR을 갖는 Treg보다 CAR 리간드 (항원)에 의해 더 잘 활성화되고 확장될 것으로 예상된다.

[0012] 본원에 개시된 CAR (CD137 공동-자극 도메인을 갖는 CDR)을 갖는 Treg의 형질도입 또는 형질감염은 CAR을 통한 상기 조작된 Treg 세포의 효율적인 시험관내 활성화를 허용하고 CAR을 발현하는 활성화된 Treg의 후속 분류를 위한 수단을 제공한다. 이는 생체내에서 더 적은 오염물에 기인한 더 우수한 안전성 및 더 우수한 CAR-리간드 (항원) 유도된 활성화 및 확장에 기인한 개선된 치료 활성을 제공할 것이므로, 이를 필요로 하는 대상체에서 치료적 사용을 위한 이점과 함께 순수하고 기능적인 Treg CAR 집단을 생성할 수 있게 한다. 또한, 본 발명의 특정 실시양태에서, CD137 CAR은 CD28 CAR 또는 외부 자극과 반응하지 않는 다른 신호전달 도메인을 갖는 CAR과 비교하여 대상체에게 외부 자극으로 적용되는 가용성 항원, 예컨대 덱스트란에 반응하여 Treg의 개선된 생체내 활성을 제공하며, 이는 또한 Treg의 확장을 유도하고 증가된 Treg 활성은 또한 내인성 TCR 또는 Treg에 대한 개선된 반응성을 초래할 것이므로 전달된 Treg의 생체내 활성을 증진시킨다. 이러한 방식으로, CAR 활성화는 특정한 Treg 항원 표적을 알 필요 없이 내인성 Treg 항원에 대한 Treg의 자연적 조절 또는 억제 활성을 부스팅하는 데 사용될 수 있다.

[0013] 본원에 개시된 Treg는 면역-매개된 질환, 예컨대 자가면역, 이식 거부, 알레르기 또는 만성 염증 질환을 앓는 대상체의 예방 또는 치료에 적합하다.

[0014] 본 발명의 한 실시양태에서, Treg에서 발현되는 CD137 CAR은 외인성의 가용성 항원 덱스트란에 특이적이다. 덱스트란에 특이적인 상기 CAR로 치료될 필요가 있는 대상체에게 덱스트란의 투여는 자가면역, 이식 거부, 알레르기 또는 만성 염증 질환에 대한 예방 또는 치료를 위해 상기 CAR을 발현하는 Treg 세포의 제어되고 지속되는 면역 반응을 허용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1: 상이한 세포내 신호전달 도메인을 갖는 덱스트란-특이적 CAR-Treg의 생성. (a) 상이한 신호전달 도메인을 갖는 CAR 구축물의 개략도. (b) 렌티바이러스 형질도입 후 CD25-농축된 Treg에서의 LNGFR 발현을 도시한다 (3-6개의 상이한 실험으로부터 n=10-19). (c) 가용성 FITC 덱스트란의 결합을 도시한다 (2-7개의 독립적인 실험으로부터 n=7-21).

도 2: 상이한 세포내 신호전달 도메인을 갖는 덱스트란-특이적 CAR-Treg의 활성화. (a) CD137 발현을 비드-결합된 덱스트란으로 6시간 재자극 후 분석하였으며, 비자극된 샘플의 CD137 발현을 차감하였다 (n=7-26, 2-8개의 상이한 실험을 수행함). (b) LNGFR+ 및 LNGFR- Treg에서 ZAP70의 인산화를 가용성 덱스트란과 5분 인큐베이션 후 분석하였다 (n=7, 2개의 독립적인 실험을 수행함).

도 3: 상이한 세포내 신호전달 도메인을 갖는 덱스트란-특이적 CAR-Treg의 확장. Treg는 (a,c) 항-CD3/-CD28 또는 (b,d) 비드-결합된 덱스트란의 존재 하에서 확장되었다. (a,b) d17에서의 LNGFR+ 세포의 농축은 d0에서의 LNGFR-/LNGFR+ Treg의 비 x d17에서의 LNGFR+/LNGFR- Treg의 비로 계산되었다 (4-6개의 독립적 실험으로부터 n=13-18). (c, d) 상이한 신호전달 도메인을 갖는 Treg를 모으고, 상이한 신호전달 도메인의 상대적 발현을 qPCR로 정량하였다 (n=7, 3개의 상이한 실험을 수행함).

도 4: Treg 및 Tcon에서 상이한 세포내 신호전달 도메인의 비교. (a) CAR-Treg 및 CAR-Tcon의 덱스트란 결합을 도시한다. (b) 비드-결합된 덱스트란으로 6시간 자극 후 CAR-Treg (CD137 발현) 및 CAR-Tcon (CD154 발현)의 활성화 분석; LNGFR- Treg에서의 발현을 배경으로 각각의 샘플로부터 차감하고, CD137 및 CD154 발현을 각각의 배양물에서 덱스트란+ 세포의 퍼센트에 대해 정규화하였다.

도 5: 활성화-유도된 CD137 발현에 의한 CAR-Treg의 단리. 비자극된 LNGFR+ Treg 또는 비드-결합된 덱스트란으로 6시간 자극 후의 CD137+LNGFR+ Treg를 (a) LNGFR, (b) 덱스트란 및 (c) 비드-결합된 덱스트란으로 재자극 후 CD137 발현의 염색 전 14일 동안 항-CD3/-28을 사용하여 (LNGFR+ 분류됨) 또는 추가의 자극 없이 (CD137+ 분류됨) 분류하고 확장하였다 (n=12, LNGFR 분류에 대해 4개의 독립적인 실험; n=15, CD137 분류에 대해 5개의

상이한 실험).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 제1 측면에서, 본 발명은 항원 키메라 수용체 (CAR)를 발현하는 조절 T (Treg) 세포를 제공하며, CAR은

[0017] a) 적어도 하나의 항원 결합 도메인,

[0018] b) 막횡단 도메인, 및

[0019] c) 적어도 하나의 일차 세포질 신호전달 도메인 및 적어도 CD137의 공동-자극 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 신호전달 도메인을 포함하고,

[0020] 여기서 상기 항원 결합 도메인은 표적 세포의 표면에서 발현되는 항원 또는 표적 세포의 표면에서 발현되는 항원에 결합하는 태그 부착된 폴리펩티드의 태그 또는 가용성 항원에 특이적으로 결합한다.

[0021] 상기 CAR에서, 상기 적어도 하나의 일차 세포질 신호전달 도메인은 CD3zeta일 수 있다.

[0022] 상기 CAR에서, 상기 항원 결합 도메인은 표적 세포의 세포 표면에서 발현되는 항원에 직접적으로 결합할 수 있다. 상기 표적 세포는 질환 관련된 자가 또는 동종이형 항원을 발현하는 질환 상태의 세포일 수 있다. 질환은 자가면역 질환, 만성 염증 질환, 알레르기, 이식 거부, GvHD 또는 대상체의 바이러스, 박테리아, 기생생물에 의한 감염일 수 있다.

[0023] 대안적으로, 상기 CAR의 상기 항원 결합 도메인은 표적 세포의 표면에서 발현되는 항원에 결합하는 태그 부착된 폴리펩티드의 태그에 결합할 수 있다. 이 경우, CAR의 상기 항원 결합 도메인은 표적 세포의 표면에서 발현되는 항원에 간접적으로 결합한다. 이러한 어댑터 CAR 접근법은, 예컨대 US9,233,125B2에 개시되어 있다. 태그는 합텐(hapten), 예컨대 비오틴 또는 FITC일 수 있다. 세포의 표면에서 발현되는 항원에 결합하는 태그 부착된 폴리펩티드는 항체 또는 그의 항원 결합 단편일 수 있다.

[0024] 대안적으로, 바람직하게는, 상기 CAR의 항원 결합 도메인은 가용성 항원에 특이적이어서 상기 가용성 항원이 상기 CAR의 상기 항원 결합 도메인에 결합 시, 우선적으로는 상기 Treg 세포의 또 다른 세포에 대한 결합 없이, 상기 Treg 세포의 활성화를 허용할 수 있다.

[0025] 상기 가용성 항원은 상기 CAR을 발현하는 상기 Treg 세포가 적용되는 대상체, 우선적으로 인간의 혈액 또는 조직에 자연적으로 존재하지 않는 외인성 항원일 수 있다. 더욱 우선적으로, 상기 CAR을 발현하는 상기 Treg 세포가 적용되는 대상체의 혈액 또는 조직에 자연적으로 존재하지 않는 상기 외인성 항원은 상기 CAR의 항원 결합 도메인보다 대상체의 또 다른 표적에 결합하는 것을 선호하지 않는다.

[0026] 상기 외인성의 가용성 항원은 상기 대상체에 적용 시 대상체에게 어떠한 해도 끼치지 않는 비-질환 유발 항원일 수 있다.

[0027] 상기 (외인성의) 가용성 항원은 덱스트란일 수 있다.

[0028] 상기 CAR의 상기 항원 결합 도메인은 서열 번호 1 및 서열 번호 2의 서열을 포함할 수 있다. 서열 번호 1은 면역글로불린의 중쇄의 가변 도메인 (VH)를 나타내고, 서열 번호 2는 면역글로불린의 경쇄의 가변 영역 (VL)을 나타낸다.

[0029] 대안적으로, 항원 (일가 또는 다가)은 특정 부착 분자를 사용하여 생물학적 표면, 예컨대 세포의 표면에 또는 조직 기질 화합물에 부착될 수 있다. 이러한 방식으로, 항원은 생체내에서 특정 표면, 세포 유형 또는 기관으로 지시될 수 있고, 표면에 대한 부착은 또한 CAR의 가교결합을 개선한다. 이는 국소화되고 개선된 Treg 활성화를 초래한다.

[0030] 한 측면에서, 본 발명은

[0031] i) 항원 키메라 수용체 (CAR)를 발현하는 조절 T (Treg) 세포로서, CAR은

[0032] a) 적어도 하나의 항원 결합 도메인,

[0033] b) 막횡단 도메인,

[0034] c) 적어도 하나의 일차 세포질 신호전달 도메인 및 적어도 CD137의 공동-자극 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 신호전달 도메인

[0035] 을 포함하고, 여기서 상기 항원 결합 도메인은 표적 세포의 표면에서 발현되는 항원에 결합하는 태그 부착된 폴리펩티드의 태그 또는 가용성 항원에 특이적으로 결합하는 Treg 세포,

[0036] ii) 상기 태그 폴리펩티드

[0037] 를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0038] 추가의 측면에서, 본 발명은 자가면역 질환, 알레르기, 이식 거부, 이식편대숙주 질환, 만성 염증 질환, 예컨대 염증성 장 질환 또는 대상체의 바이러스, 박테리아, 기생생물에 의한 만성 감염의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 본원에 개시된 CAR을 발현하는 Treg 세포를 제공한다.

[0039] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 CAR을 발현하는 Treg 세포의 집단을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0040] 본원에 개시된 CAR을 발현하는 Treg 세포의 집단의 상기 조성물은 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99%의 Treg 세포를 포함할 수 있다. 상기 Treg 세포는, 예컨대 항-CD3/항-CD28 분자 또는 약리학적 T 세포 활성화제, 예컨대 PMA/이노마이신을 사용한 폴리클로날 자극 5-7시간 후 CD25+CD127-FoxP3+ 표현형 및/또는 >80% 탈메틸화된 TSDR (Treg 특이적인 탈메틸화된 영역) 및/또는 CD137의 발현 및 CD154 발현의 결여로 특징지어질 수 있다.

[0041] 상기 조성물에서, 본원에 개시된 CAR을 발현하는 Treg 세포의 상기 집단은 본원에 개시된 CAR을 발현하는 활성화된 Treg 세포의 농축 방법에 의해 수득 가능한 활성화된 Treg의 집단일 수 있다.

[0042] 상기 조성물은 임의적으로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물일 수 있다.

[0043] 추가의 측면에서, 본 발명은

[0044] a) 약제학적으로 허용 가능한 담체와 함께 본원에 개시된 CAR을 발현하는 Treg 세포의 집단, 및

[0045] b) 본원에 개시된 가용성 항원

[0046] 을 포함하는 약제학적 조성물의 배합물을 제공한다.

[0047] 본원에 개시된 CAR을 발현하는 Treg 세포의 상기 집단은 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99%의 Treg 세포를 포함할 수 있다. 상기 Treg 세포는, 예컨대 항-CD3/항-CD28 분자 또는 약리학적 T 세포 활성화제, 예컨대 PMA/이노마이신을 사용한 폴리클로날 자극 5-7시간 후 CD25+CD127-FoxP3+ 표현형 및/또는 >80% 탈메틸화된 TSDR 및/또는 CD137의 발현 및 CD154 발현의 결여로 특징지어질 수 있다.

[0048] 약제학적 조성물의 상기 배합물은 자가면역 질환, 알레르기, 이식 거부, 이식편대숙주 질환, 만성 염증 질환, 예컨대 염증성 장 질환 또는 대상체의 바이러스, 박테리아, 기생생물에 의한 만성 감염의 치료 또는 예방을 위한 것이다.

[0049] 상기 가용성 항원은 덱스트란일 수 있다.

[0050] 약제학적 조성물의 상기 배합물에서, 본원에 개시된 CAR을 발현하는 Treg 세포의 상기 집단은 본원에 개시된 CAR을 발현하는 활성화된 Treg 세포의 농축 방법에 의해 수득 가능한 활성화된 Treg의 집단일 수 있다.

[0051] 또 다른 측면에서, 본 발명은 CAR을 발현하는 활성화된 Treg 세포의 농축 방법을 제공하며, 여기서 상기 CAR은

[0052] i) 적어도 하나의 항원 결합 도메인

[0053] ii) 막횡단 도메인

[0054] iii) 적어도 하나의 일차 세포질 신호전달 도메인 및 적어도 CD137의 공동-자극 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 신호전달 도메인을 포함하고, 여기서 상기 항원 결합 도메인은 표적 세포의 표면에서 발현되는 항원 또는 표적 세포의 표면에서 발현되는 항원에 결합하는 태그 부착된 폴리펩티드의 태그 또는 가용성 항원에 특이적으로 결합하고, 방법은

[0055] a) 조절 T 세포를 포함하는 샘플을 제공하는 단계

[0056] b) 상기 샘플의 상기 조절 T 세포를 상기 CAR을 발현하도록 유전자조작으로 변형시키는 단계

[0057] c) 상기 유전자조작으로 변형된 조절 T 세포를 6-16시간 동안 상기 CAR의 항원 결합 도메인에 의해 결합되는 항원과의 접촉을 통해 활성화시키는 단계

[0058] d) 단계 c)의 활성화된 Treg 세포를 단리하는 단계로서,

[0059] α) 단계 c)의 세포를

[0060] I) CD154에 결합하는 분자와 접촉시키고 CD154+ T-세포를 고갈시키거나:

[0061] II) 조절 T-세포 또는 활성화된 조절 T 세포에 대한 마커에 결합하는 분자와 접촉시키고 상기 결합 분자에 결합하는 세포를 양성 선별하고,

[0062] β)

[0063] I) 단계 α)I)의 세포를 조절 T-세포 또는 활성화된 조절 T-세포에 대한 마커에 결합하는 분자와 접촉시키고 상기 결합 분자에 결합하는 세포를 양성 선별함으로써 상기 CAR를 발현하는 활성화된 조절 T-세포의 집단을 수득하거나;

[0064] II) 단계 α)II)의 세포를 CD154에 결합하는 분자와 접촉시키고 CD154+ T-세포를 고갈시킴으로써 상기 CAR을 발현하는 활성화된 조절 T-세포의 집단을 수득함으로써 단계 c)의 활성화된 Treg 세포를 단리하는 단계

[0065] 를 포함한다.

[0066] 임의적으로, 상기 방법은 또한 단계 b) 후 및 단계 c) 전에 유전자조작으로 변형된 조절 T 세포를 확장시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0067] 상기 방법의 상기 CAR 및 상기 항원(들)은 상기에 이미 기재되고 본원에 개시된 CAR 및 항원(들)의 특질 및 특징을 가질 수 있다. 본원에 개시된 CAR 및 항원에 대한 상기 개시된 모든 변이체 및 실시양태가 또한 상기 방법에 적용될 수 있다.

[0068] 상기 방법에서, 조절 T-세포를 위한 마커는 마커 CD25 및 GITR의 군으로부터 선택되고; 활성화된 조절 T-세포를 위한 마커는 마커 CD137, 잠재 TGF-beta (LAP), GARP (LRRC32) 및 CD121a/b의 군으로부터 선택된다.

[0069] 상기 방법에서, CD154 또는 조절 T 세포 또는 활성화된 조절 T-세포에 대한 마커에 결합하는 분자는 항체 또는 그의 항원 결합 단편일 수 있다.

[0070] 상기 방법에서, 상기 유전자조작으로 변형된 조절 T 세포 (단계 c)는 항-CD3/-CD28 및/또는 본원에 개시된 CAR의 항원 결합 도메인에 결합하는 항원의 존재 및 적합한 성장 인자, 예컨대 IL-2의 첨가 하에서 확장된다.

[0071] 상기 방법에서, 단리 (분리)는 유세포 분석 또는 자기 세포 분류(magnetic cell sorting)를 이용하여 수행된다.

[0072] 상기 방법에서, CD154 및/또는 조절 T-세포 또는 활성화된 조절 T-세포에 대한 마커에 결합하는 분자는 형광 염료, 합텐 및/또는 자기 입자에 커플링된다.

[0073] 상기 방법에서, (단계 a)에서 제공되는 샘플은 전혈, PBMC, 제대혈, 림프절 조직, 골수, 또는 백혈구성분채집으로부터 유래된다.

[0074] 상기 방법에서, 상기 CAR을 발현하기 위한 상기 샘플의 상기 조절 T 세포의 유전자 변형 (단계 b)은 당업계에 널리 공지된 방법 (예컨대, 바이러스-기반 시스템, 물리적 방법, 생물학적 방법, 화학적 방법)에 의해 수행될 수 있다.

[0075] Treg 세포의 상기 유전자 변형은 형질도입, 형질감염 또는 전기천공에 의해 수행될 수 있다. 바람직하게는, 형질도입은 렌티바이러스, 감마-, 알파-레트로바이러스 또는 아데노바이러스로 또는 핵산 (DNA, mRNA, miRNA, 안타고미르, ODN), 단백질, 부위-특이적 뉴클레아제 (아연 핑거 뉴클레아제, TALEN, CRISP/R), 자가 복제 RNA 바이러스 (예컨대, 말 뇌병증 바이러스, equine encephalopathy virus) 또는 통합-결핍 렌티바이러스 벡터에 의한 전기천공 또는 형질감염으로 수행된다. 더욱 우선적으로, Treg 세포의 상기 유전자 변형은 상기 세포를 렌티바이러스 벡터로 형질도입함으로써 수행될 수 있다.

[0076] 상기 방법에서, 상기 CAR을 발현하는 활성화된 Treg 세포의 농축된 집단은 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99%의 Treg 세포를 포함한다. 상기 Treg 세포는, 예컨대 항-CD3/항-CD28 분자 또는 약리학적 T 세포 활성화제, 예컨대 PMA/이노마이신을 사용한 폴리클로날 자극 5-7시간 후 CD25+CD127-FoxP3+ 표현형 및/또는 >80% 탈메틸화된 TSDR 및/또는 CD137의 발현 및 CD154 발현의 결여로 특징지어진다.

[0077] 상기 방법에서, 방법은 폐쇄 시스템에서 수행될 수 있다.

[0078] 상기 방법에서, 방법은 폐쇄 시스템에서의 자동화된 방법이다.

[0079] 본 발명은 또한 다양한 CAR (적어도 2개)로부터 CD137 신호전달 도메인 (CD137 CAR)을 포함하지만 CAR의 적어도 하나의 다른 성분이 상이한 적어도 2개의 CAR을 사용하고, 예컨대 Treg를 발현하는 CAR을 CAR 리간드 (항원)와 접촉시키고 CD137 표면 발현 또는 Treg 세포의 활성화 후 발현되는 것으로 공지된 또 다른 Treg 활성화 마커의 유도 정도를 측정 및 비교함으로써 상기 CAR을 발현하는 Treg를 활성화시키는 그들의 능력을 비교함으로써 Treg의 최상의 활성화를 허용하는 CAR를 선택하기 위한 Treg 세포에서 발현되는 CD137 CAR의 용도를 제공한다.

[0080] 따라서, 추가의 측면에서, 본 발명은 Treg 세포의 활성화 효율을 분석하기 위한 조절 T (Treg) 세포에서 발현되는 CAR의 용도를 제공하며, 여기서 상기 CAR은

[0081] a) 적어도 하나의 항원 결합 도메인,

[0082] b) 막횡단 도메인,

[0083] c) 적어도 하나의 일차 세포질 신호전달 도메인 및 적어도 CD137의 공동-자극 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 신호전달 도메인

[0084] 을 포함하고,

[0085] 여기서 상기 항원 결합 도메인은 표적 세포의 표면에서 발현되는 항원 또는 표적 세포의 표면에서 발현되는 항원에 결합하는 태그 부착된 폴리펩티드의 태그 또는 가용성 항원에 특이적으로 결합한다.

[0086] 추가의 측면에서, 본 발명은 적어도 2개의 Treg 세포의 활성화 효율을 분석 (비교)하는 방법을 제공하며,

[0087] 여기서 적어도 제1 Treg 세포는

[0088] a) 적어도 하나의 항원 결합 도메인,

[0089] b) 막횡단 도메인,

[0090] c) 적어도 하나의 일차 세포질 신호전달 도메인 및 적어도 CD137의 공동-자극 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 신호전달 도메인

[0091] 를 포함하는 제1 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하고,

[0092] 여기서 적어도 제2 Treg 세포는 제1 CAR의 적어도 하나의 도메인에서 상기 제1 CAR과 상이한 제2 CAR을 발현하지만 CD137의 공동-자극 신호전달 도메인을 발현하고,

[0093] 여기서 상기 적어도 제1 CAR 및 상기 적어도 제2 CAR의 상기 항원 결합 도메인은 표적 세포의 표면에서 발현되는 항원 또는 표적 세포의 표면에서 발현되는 항원에 결합하는 태그 부착된 폴리펩티드의 태그 또는 가용성 항원에 특이적으로 결합하고,

[0094] 상기 방법은

[0095] a) 조절 T 세포를 포함하는 샘플을 제공하는 단계

[0096] b) 상기 적어도 제1 CAR을 발현하도록 상기 적어도 제1 Treg 세포를 유전자조작으로 변형시키고 상기 적어도 제2 CAR을 발현하도록 상기 적어도 제2 Treg 세포를 유전자조작으로 변형시키는 단계

[0097] c) 상기 유전자조작으로 변형된 적어도 제1 Treg 세포 및 적어도 제2 Treg 세포를 6-16시간 동안 상기 적어도 제1 CAR 및 상기 적어도 제2 CAR의 항원 결합 도메인에 의해 결합되는 항원과의 접촉을 통해 활성화시키는 단계

[0098] d) 상기 적어도 제1 Treg 세포 및 상기 적어도 제2 Treg 세포의 Treg 활성화 마커의 발현 수준을 측정하는 단계로서, 여기서 상이한 발현 수준은 Treg 세포에서 상기 적어도 제1 CAR 및 상기 적어도 제2 CAR의 상이한 활성화 효율을 나타내는 것인 단계

[0099] 를 포함한다.

[0100] CAR을 그들의 리간드 (항원)와 접촉시킴으로써 유도되는 활성화 강도의 비교는 가장 강력한 활성화 능력을 갖는 CAR을 선별함으로써 Treg에 사용하기 위한 CAR의 최적화를 허용한다.

[0101] Treg 세포에서 적어도 2개의 CAR의 활성화 효율을 비교하는 것과 관련하여 본원에서 사용된 용어 "CAR의 도메인"은 기능적 CAR에서 사용될 수 있는 임의의 도메인을 지칭하며, 이러한 도메인은, 예컨대 CAR의 세포외

도메인, 막횡단 도메인 및 세포내 도메인일 수 있다. 세포외 도메인은 적어도 하나의 항원 결합 도메인, 링커, 예컨대 (G4/S)3 및/또는 스페이서/힌지, 예컨대 CD8 힌지일 수 있다. 세포내 도메인은 적어도 하나의 자극 신호전달 도메인, 및/또는 적어도 하나의 공동-자극 신호전달 도메인일 수 있다. 서로 비교되는 적어도 2개의 CAR 사이에 존재할 수 있는 차이는 CAR에서 기능적으로 관련될 수 있는, 즉 안정성, 발현 수준, 항원-결합 또는 리간드 (항원) 유도된 CAR-매개된 신호전달 케스케이드에 영향을 주어 궁극적으로 CAR-매개된 Treg 활성화에 영향을 끼칠 수 있는 도메인의 변형을 포함할 수 있다. 용어 "변형"은, 예컨대 이러한 도메인의 완전한 또는 불완전한 치환 또는 결실, CAR 내에 도메인의 위치 설정 또는 단지 도메인의 아미노산 서열의 변형, 즉 이러한 도메인의 적어도 하나의 아미노산의 교환, 삽입, 제거 등을 포함한다.

[0102] 용어 "Treg 활성화" 또는 "Treg 세포에서 활성화 효율"은 항원 수용체 트리거링에 의해 유도되는 Treg 유전자 발현 패턴의 변화 또는 기능적 변화를 의미한다. Treg 활성화는 Treg가 그들의 생리학적 기능, 예컨대 부적합한 또는 병리학적 면역 반응, 예컨대 알레르기, 자가면역, 이식편대숙주 질환 및 이식 거부, IBD 및 다른 만성 염증 질환의 억제를 발휘할 수 있도록 생체내에서 요구된다. Treg 활성화, 예컨대 활성화 마커의 발현을 측정하기 위한 당업계에 공지된 다양한 파라미터 및 방법이 있다. 상기 Treg 활성화 마커는 마커 CD137, 잠재 TGF-beta (LAP), GARP (LRRC32), CD121a/b, 또는 IL-10의 군으로부터 선택될 수 있다. 또는 기능 검정, 예컨대 활성화된 Treg와의 공동배양에 의한 반응자 T 세포 증식의 억제. Treg 활성화의 하나의 특정 파라미터는 4-7시간 자극 후 CD137은 유도되지만 CD154는 동시 부재하는 것이며, 이는 매우 특이적인 Treg 활성화의 시그너처이다. 이는 당업자에게 공지된 표준 기술, 예컨대 형광 항체 염색 및 유세포 분석에 의해 측정될 수 있다. Treg 활성화의 정량적 차이는 단일 세포에서 발현되는 CD137의 양 또는 마커를 발현하도록 유도되는 세포의 수 또는 비율일 수 있다.

[0103] 상기 방법의 상기 제1 CAR 및 상기 항원(들)은 상기에 이미 기재되고 본원에 개시된 CAR 및 항원(들)의 특질 및 특징을 가질 수 있다. 본원에 개시된 CAR 및 항원에 대한 상기 개시된 모든 변이체 및 실시양태가 또한 상기 방법에 적용될 수 있다.

[0104] 상기 제2 CAR은 상기 제1 CAR와 비교하여 적어도 하나의 변형을 갖는 제1 CAR의 변이체일 수 있으며, 예컨대 항원 결합 특징 및/또는 신호 전달 능력에 영향을 끼쳐 상기 제1 CAR과 비교하여 상기 제2 CAR의 변경된 Treg 세포 활성화 특징을 초래할 수 있다.

[0105] 상기 제1 CAR과 비교하여 상기 제2 CAR의 변형은, 예컨대 상이한 스페이서, 동일한 항원에 특이적인 상이한 항원 결합 도메인, 상이한 막횡단 도메인 및/또는 상이한 신호전달 도메인일 수 있다.

[0106] 상기 방법에서, 제공되는 샘플 (단계 a)은 전혈, PBMC, 제대혈, 림프절 조직, 골수, 또는 백혈구성분채집으로부터 유래될 수 있다.

[0107] 상기 방법에서, 상기 CAR을 발현하기 위한 상기 샘플의 상기 조절 T 세포의 유전자 변형 (단계 b)은 당업계에 널리 공지된 방법 (예컨대, 바이러스-기반 시스템, 물리적 방법, 생물학적 방법, 화학적 방법)에 의해 수행될 수 있다.

[0108] Treg 세포의 상기 유전자 변형은 형질도입, 형질감염 또는 전기천공에 의해 수행될 수 있다. 바람직하게는, 형질도입은 렌티바이러스, 감마-, 알파-레트로바이러스 또는 아데노바이러스로 또는 핵산 (DNA, mRNA, miRNA, 안타고미르, ODN), 단백질, 부위-특이적 뉴클레아제 (아연 핑거 뉴클레아제, TALEN, CRISP/R), 자가 복제 RNA 바이러스 (예컨대, 말 뇌병증 바이러스) 또는 통합-결핍 렌티바이러스 벡터에 의한 전기천공 또는 형질감염으로 수행된다. 더욱 우선적으로, Treg 세포의 상기 유전자 변형은 상기 세포를 렌티바이러스 벡터로 형질도입함으로써 수행될 수 있다.

[0109] 본 발명은 또한 상기 항원을 CD137 CAR과 접촉시키는 것을 통해 Treg 활성화를 유도하기 위한 다양한 항원 제형을 시험하는 방법을 제공한다. 예컨대, 항원 샘플을 항원 결합 도메인을 갖는 CAR을 발현하는 Treg와 접촉시키고 상기 다양한 항원 샘플에 의해 유도되는 Treg 활성화를 비교하는 것을 통해, CD137 CAR 발현 Treg를 활성화시키기 위한 제1 항원 샘플의 능력을 제1 항원 샘플과 상이한 적어도 제2 항원 샘플과 비교.

[0110] 따라서, 추가의 측면에서, 본 발명은 Treg 세포에서 발현되는 CAR을 활성화시키기 위해 제1 항원 샘플의 활성화 효율을 제1 항원 샘플과 상이한 제2 항원 샘플과 분석 (비교)하는 방법을 제공하며, CAR은

[0111] a) 적어도 하나의 항원 결합 도메인,

[0112] b) 막횡단 도메인,

[0113] c) 적어도 하나의 일차 세포질 신호전달 도메인 및 적어도 CD137의 공동-자극 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 신호전달 도메인

[0114] 을 포함하고,

[0115] 여기서 상기 항원 결합 도메인은 표적 세포의 표면에서 발현되는 상기 제1 항원 샘플 또는 표적 세포의 표면에서 발현되는 항원에 결합하는 태그 부착된 폴리펩티드의 태그 또는 가용성 항원에 특이적으로 결합하고,

[0116] 상기 방법은

[0117] a) 조절 T 세포를 포함하는 샘플을 제공하는 단계

[0118] b) 상기 CAR을 발현하도록 상기 Treg 세포를 유전자조작으로 변형시키는 단계

[0119] c) 상기 CAR의 항원 결합 도메인을 6-16시간 동안 상기 제1 항원 샘플과의 접촉을 통해 상기 유전자조작으로 변형된 Treg 세포를 활성화시키고, 상기 CAR의 항원 결합 도메인을 6-16시간 동안 상기 제2 항원 샘플과의 접촉을 통해 상기 유전자조작으로 변형된 Treg 세포를 활성화시키는 단계

[0120] d) 상기 제1 항원 샘플과 접촉된 상기 Treg 세포 및 제2 항원 샘플과 접촉된 상기 Treg 세포의 Treg 활성화를 측정하는 단계로서, 여기서 상이한 활성화 수준은 Treg 세포에서 발현되는 상기 CAR의 기능적 활성을 활성화시키기 위한 상기 제1 항원 샘플 및 상기 제2 항원 샘플의 상이한 효율을 나타내는 것인 단계

[0121] 를 포함한다.

[0122] 상기 제1 항원 샘플 및 상기 제2 항원 샘플은, 예컨대 항원 제형, 예컨대 가용성 형태, 단량체 대 다량체된 항원, 다양한 캐리어, 예컨대 큰 표면, 예컨대 배양 접시, 다양한 크기, 예컨대 50 nm-50 μm이지만 이에 제한되지 않는 마이크로비드, 또는 생체적합성 마크로분자 매트릭스, 예컨대 덱스트란, 또는 다른 다당류에 부착된 항원, 또는 CAR의 동일한 항원 결합 도메인에 의해 그러나 예컨대 상이한 친화도 또는 CAR 등에서 유도되는 상이한 입체형태 변화로 결합될 수 있는 상이한 항원에서 상이할 수 있다.

[0123] 본원에 개시된 CAR을 코딩하는 DNA 또는 RNA 구축물(들) (핵산 분자(들))은 당업계에 널리 공지된 방법(예컨대, 레트로바이러스 및 렌티바이러스를 포함하는 바이러스-기반 시스템, 전기천공을 포함하는 물리적 방법, 생물학적 방법, 화학적 방법)에 의해 숙주 세포로 형질감염 또는 형질도입될 수 있다. 숙주 세포에서 본원에 개시된 CAR을 코딩하는 DNA를 통합, 우선적으로 안정하게 통합하는 데 이용되는 방법에 관계 없이, 결과적으로 숙주 세포는 본원에 개시된 CAR을 발현한다.

[0124] 대안적으로, 핵산 서열은 합성적으로 생성될 수 있다.

[0125] 본원에 개시된 항원 결합 수용체를 발현하는 조작된 세포는 형질감염/형질도입 공정 후 당업계에 널리 공지된 방법, 예컨대 형광 기반 분리 기술, 예컨대 FACS® 또는 자기 세포 분리 방법, 예컨대 MACS® (Miltenyi Biotec GmbH)에 의해 비-형질감염/형질도입된 세포로부터 이러한 조작된 세포를 생성하기 위해 단리(농축 또는 분리)될 수 있다.

[0126] 일반적으로, 본원에 개시된 항원 결합 수용체를 발현하는 조작된 세포를 생성하기 위한 세포, 예컨대 면역세포, 우선적으로 T 세포는 대상체로부터 수득될 수 있다. 세포, 예컨대 면역 세포, 우선적으로 T 세포는 다양한 공급원, 예컨대 전혈, 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직 또는 T 세포를 함유하는 다른 조직으로부터 수득될 수 있다. 이들 세포의 농축을 위해 당업계에 널리 공지된 방법, 예컨대 Ficoll™ 또는 PERCOLL™ 구배를 통한 원심분리 또는 양성/음성 선별 기술, 예컨대 형광 분류 (예컨대, FACSsort) 또는 자기 분류 (예컨대, MACS®)가 이용될 수 있다.

[0127] 예컨대, 대상체의 혈액 또는 조직 샘플의 Treg는, 예컨대 CD25에 특이적인 항체에 커플링된 자기 비드로 자기적으로 표지되고, 세척되고, 자기적으로 농축되고, 수집된다. 이어서, 이들 Treg는 그들의 세포 표면에서 본원에 개시된 항원 결합 수용체를 발현하도록 조작될 수 있다.

[0128] 본 발명의 한 실시양태에서, 본원에 개시된 항원 결합 수용체를 발현하는 단리된/농축된 조작된 세포, 예컨대 면역 세포, 우선적으로 Treg 세포는 유전자 변형 전 또는 후에 활성화되고 당업계에 널리 공지된 방법, 예컨대 적합한 성장 인자, 예컨대 IL-2의 존재 하에서 CD3 및 CD28 결합 항체에 컨주게이션된 마이크로-크기 입자로 이루어진 Treg 확장 키트 (Miltenyi Biotec)로 Treg의 폴리클로날 자극을 이용하여 다수의 조작된 세포를 증가시

키기 위해 확장될 수 있다. 우선적으로, 다수의 조작된 세포, 예컨대 면역 세포, 예컨대 T 세포의 상기 수는 치료 유효량으로 증가될 수 있다.

[0129] 본원에 개시된 CAR을 발현하는 유전자조작으로 변형된 Treg 세포는 폐쇄 시스템에서 자동화된 공정으로 생성될 수 있다. 본 발명의 한 실시양태에서, 본원에 개시된 CAR을 발현하는 유전자조작으로 변형된 Treg의 생성 방법은, 예컨대

[0130] a) 조절 T 세포를 포함하는 샘플을 제공하는 단계

[0131] b) 상기 샘플의 상기 조절 T 세포를 상기 CAR을 발현하도록 유전자조작으로 변형시키는 단계

[0132] c) 임의적으로 유전자조작으로 변형된 조절 T 세포를 확장시키는 단계

[0133] d) 상기 확장된 유전자조작으로 변형된 조절 T 세포를 6-16시간 동안 CAR 리간드와의 접촉을 통해 활성화시키는 단계

[0134] e) 단계 d)의 활성화된 Treg 세포를 단리하는 단계로서,

[0135] α) 단계 d)의 세포를

[0136] I) CD154에 결합하는 분자와 접촉시키고 CD154+ T-세포를 고갈시키거나:

[0137] II) 조절 T-세포 또는 활성화된 조절 T 세포에 대한 마커, 예컨대 CD137에 결합하는 분자와 접촉시키고 상기 결합 분자에 결합하는 세포를 양성 선별하고,

[0138] β)

[0139] I) 단계 α)I)의 세포를 조절 T-세포 또는 활성화된 조절 T-세포에 대한 마커, 예컨대 CD137에 결합하는 분자와 접촉시키고 상기 결합 분자에 결합하는 세포를 양성 선별함으로써 상기 CAR를 발현하는 활성화된 조절 T-세포의 집단을 수득하거나;

[0140] II) 단계 α)II)의 세포를 CD154에 결합하는 분자와 접촉시키고 CD154+ T-세포를 고갈시킴으로써 상기 CAR을 발현하는 활성화된 조절 T-세포의 집단을 수득함으로써 단계 c)의 활성화된 Treg 세포를 단리하는 단계

[0141] 를 포함할 수 있다.

[0142] 모든 또는 일부 이들 단계는 폐쇄 시스템에서, 우선적으로 폐쇄 및 멸균 시스템에서 자동으로 수행될 수 있다.

[0143] 상기 방법은 특히 유전자 변형된 Treg 세포를 제조하는 데 적합하며, 여기서 농축된 Treg 세포는 바이러스 및/또는 비-바이러스 벡터를 사용하여 유전자-변형된다.

[0144] 이들 단계 중 임의의 단계는 반복되거나 빠지거나 상이한 순서로 발생할 수 있다.

[0145] 세포 변형을 위한 폐쇄 시스템으로서, 완전 자동화된 세포 처리 장치 CliniMACS Prodigy® 및 관련 튜빙 세트(Miltenyi Biotec GmbH, 독일)가 사용될 수 있다 (WO2009/072003). 이 폐쇄 시스템은 거의 모든 종류의 세포 제품에 대한 GMP-등급 처리 요건을 충족하며, 클린 룸 요건을 줄이고 기술 이전 및 세포 제조 공정의 조화를 향상시킬 수 있다.

[0146] 본 발명의 한 실시양태에서, 본원에 개시된 CAR을 발현하는 조작된 Treg는 장애, 예컨대 자가면역, 이식 거부, 알레르기 또는 만성 염증 질환을 앓는 대상체에서의 치료에 사용하기 위한 것일 수 있다.

[0147] Treg는 대상체, 우선적으로 인간로부터 단리될 수 있거나 확립된 면역 세포주가 사용될 수 있다. 대상체는 상기 장애를 앓거나 건강한 대상체일 수 있다. 이들 Treg 세포는 본원에 개시된 CAR을 발현하도록 시험관내에서 유전자조작으로 변형된다. 이들 조작된 Treg 세포는 활성화되고 본원에 개시된 CAR을 발현하는 세포의 치료적으로 효과적인 집단으로 시험관내에서 확장될 수 있으며, 본원에 개시된 방법에 의해 더 높은 순도로 변형하기 전 또는 후에 추가로 농축될 수 있다. 세포 요법에서, 이들 조작된 Treg 세포는, 제2 약제학적 조성물인 Treg 세포의 외부 자극 기능을 갖는 가용성 항원 이외에, 약제학적 조성물 (또는 본원에 개시된 CAR을 발현하는 세포의 치료 유효 집단의 제형)로서 이를 필요로 하는 수용자에게 주입될 수 있다. 수용자에서 주입된 Treg 세포는 대상체의 염증성 면역 반응을 억제하거나 적어도 치료 중인 상기 장애의 효과 및/또는 증상을 감소시킬 수 있다. 수용자는 세포를 얻은 동일한 대상체이거나 (자가 세포 요법) 동일한 종의 또 다른 대상체일 수 있다 (동종이형 세포 요법).

[0148] 본원에 개시된 CAR을 발현하는 Treg 세포의 집단은 당업자에게 공지된 기술을 이용하여 대상체에게 투여되도록 제형화될 수 있다.

[0149] 본원에 개시된 CAR을 발현하는 Treg 세포의 치료 유효 집단(들)을 포함하는 제형은 약제학적으로 허용 가능한 부형제(들) (담체 또는 희석제)를 포함할 수 있다. 제형에 포함되는 부형제는, 예컨대 본원에 개시된 CAR의 항원 결합 도메인의 특성 따라 상이한 목적을 가질 것이다. 일반적으로 사용되는 부형제의 예는, 제한 없이, 식염수, 완충 식염수, 덱스트로스, 주사용수, 글리세롤, 에탄올 및 그의 조합, 안정화제, 가용화제 및 계면활성제, 완충제 및 보존제, 강성 조절제, 증량제 및 윤활제를 포함한다.

[0150] 본원에 개시된 CAR을 발현하는 Treg 세포의 치료 유효 집단(들)의 제형은 본원에 개시된 CAR을 발현하는 Treg 세포의 하나의 집단 또는 본원에 개시된 CAR을 발현하는 하나 초과의 집단을 포함할 수 있다. 본원에 개시된 CAR을 발현하는 Treg 세포의 상이한 집단은, 예컨대 항원 결합 도메인의 동일성 및/또는 사용된 CAR의 활성화 도메인의 동일성에 기반하여 변할 수 있다.

[0151] 본원에 개시된 CAR을 발현하는 Treg 세포의 치료 유효 집단(들)을 포함하는 제형은 당업자에게 공지된 방식 및 기술을 이용하여 대상체에게 투여될 수 있다. 예시적인 방식은 정맥내 주사를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 다른 방식은, 제한 없이, 종양내, 피내, 피하 (s.c, s.q., sub-Q, Hypo), 근육내 (i.m.), 복강내 (i.p.), 동맥내, 골수내, 심장내, 관절내 (관절), 활액내 (관절액 부위), 두개내, 척수강내 및 수막강내 (척수액)를 포함한다.

[0152] 대상체에게 투여되는 본원에 개시된 CAR을 발현하는 Treg 세포의 치료 유효 집단(들)을 포함하는 제형은 특정 적응증 또는 장애의 치료에 효과적인 본원에 개시된 CAR을 발현하는 다수의 Treg 세포를 포함한다.

[0153] 일반적으로, 본원에 개시된 CAR을 발현하는 약 1×10^4 내지 약 1×10^{10}개의 Treg 세포를 포함하는 제형이 투여될 수 있다. 대부분의 경우, 제형은 본원에 개시된 CAR을 발현하는 약 1×10^5 내지 약 1×10^9개의 Treg 세포, 본원에 개시된 CAR을 발현하는 약 5×10^5 내지 약 5×10^8개의 Treg 세포, 또는 본원에 개시된 CAR을 발현하는 약 1×10^6 내지 약 1×10^7개의 Treg 세포를 포함할 수 있다. 그러나, 대상체에게 투여되는 본원에 개시된 CAR을 발현하는 Treg 세포의 수는 장애의 위치, 공급원, 정체, 정도 및 중증도, 치료될 개체의 나이 및 상태에 따라 넓은 한계 사이에서 변할 수 있다. 의사는 궁극적으로 사용될 적절한 용량을 결정할 수 있다.

[0154] 가용성 항원, 예컨대 덱스트란은 당업자에게 공지된 기술을 이용하여 대상체에게 투여되도록 제형화될 수 있다. 가용성 항원, 예컨대 덱스트란의 제형은 약제학적으로 허용 가능한 부형제(들) (담체 또는 희석제)를 포함할 수 있다. 제형에 포함되는 부형제는, 예컨대 가용성 항원의 특성 및 투여 방식에 따라 상이한 목적을 가질 것이다. 일반적으로 사용되는 부형제의 예는, 제한 없이, 식염수, 완충 식염수, 덱스트로스, 주사용수, 글리세롤, 에탄올 및 그의 조합, 안정화제, 가용화제 및 계면활성제, 완충제 및 보존제, 강성 조절제, 증량제 및 윤활제를 포함한다.

[0155] 가용성 항원의 제형은 하나의 유형의 가용성 항원, 또는 하나 초과의 유형의 가용성 항원을 포함할 수 있다.

[0156] 가용성 항원(들), 예컨대 덱스트란은 당업자에게 공지된 방식 및 기술을 이용하여 대상체에게 투여될 수 있다. 예시적인 방식은 정맥내, 복강내, 및 종양내 주사를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 다른 방식은, 제한 없이, 피내, 피하 (s.c, s.q., sub-Q, Hypo), 근육내 (i.m.), 동맥내, 골수내, 심장내, 관절내 (관절), 활액내 (관절액 부위), 두개내, 척수강내 및 수막강내 (척수액)를 포함한다.

[0157] 가용성 항원(들), 예컨대 덱스트란을 포함하는 제형은 특정 적응증 또는 장애의 치료에 효과적인 양으로 대상체에게 투여된다. 일반적으로, 약 1 μg/kg 내지 약 100 mg/kg 체중의 가용성 항원, 예컨대 덱스트란을 포함하는 제형이 치료를 필요로 하는 대상에게 투여될 수 있다. 대부분의 경우, 용량은 투여 경로, 증상 등을 고려하여, 매일 또는 매주 또는 매월의 약 100 μg/kg 내지 약 10 mg/kg 체중의 가용성 항원, 예컨대 덱스트란일 수 있다. 그러나, 대상체에게 투여되는 제형 중의 가용성 항원(들), 예컨대 덱스트란의 양은 장애의 위치, 공급원, 실체, 정도 및 중증도, 치료될 개체의 나이 및 상태 등에 따라 광범위하게 달라질 수 있다. 의사는 궁극적으로 사용될 적절한 용량을 결정할 수 있다.

[0158] 본 발명의 측면과 관련하여 본원에 정의된 모든 정의, 특징 및 실시양태, 예컨대 본 발명의 제1 측면은 본원에 개시된 본 발명의 다른 측면과 관련하여 준용된다.

[0159] 정의

[0160] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다.

[0161] 일반적으로, CAR은 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인 (세포외 부분), 막횡단 도메인 및 세포질 신호전달 도메인 (세포내 신호전달 도메인)을 포함할 수 있다. 세포외 도메인은 링커에 의해 막횡단 도메인에 연결될 수 있다. 세포외 도메인은 또한 신호 펩티드를 포함할 수 있다. 본 발명의 일부 실시양태에서, CAR의 항원 결합 도메인은 폴리펩티드에 커플링된 합텐 ("합텐화된"또는 "태그 부착된" 폴리펩티드)에 결합하며, 여기서 폴리펩티드는 질환-연관된 항원, 예컨대 자가 항원 또는 무해한 외인성 물질로부터 유래되는 항원, 예컨대 미생물총, 공기 중의 입자, 예컨대 식물 꽃가루, 곰팡이 포자에 결합될 수 있다. 이러한 CAR은 또한, 예컨대 US9233125B2에 개시된 바와 같이 "항-태그" CAR로 명명될 수 있다. 본 발명의 다른 실시양태에서, CAR의 세포외 부분은 TCBM의 일부인 링커/라벨 에피토프 (LLE)에 결합하는 항원 결합 도메인으로서 링커/라벨 에피토프 (LLE) 결합 도메인을 포함할 수 있다. 이러한 CAR은 유럽 특허 출원 번호 EP16196487.9에 개시된 바와 같이 항-LLE CAR로 명명될 수 있다. 두 유형의 CAR 모두 범용 및/또는 적용 가능한 CAR이다. 합텐(들) 및 LLE는 둘 다 폴리펩티드 (태그 부착된 폴리펩티드)에 직접적으로 또는 간접적으로 커플링된 "태그"이며, 여기서 폴리펩티드는 표적 세포의 (세포) 표면에서 발현되는 질환 연관된 항원, 예컨대 자가항원 또는 무해한 외인성 물질로부터 유래되는 항원, 예컨대 미생물총, 공기 중의 입자, 예컨대 식물 꽃가루, 곰팡이 포자에 결합될 수 있다. 본 발명의 또 다른 실시양태에서, CAR의 항원 결합 도메인은 본원에 개시된 가용성 항원에 결합한다.

[0162] "신호 펩티드"는 세포 내에서 단백질의, 예컨대 특정 세포 소기관 (예컨대, 소포체) 및/또는 세포 표면으로의 수송 및 국소화를 지시하는 펩티드 서열을 지칭한다.

[0163] 일반적으로, "항원 결합 도메인"은 항원, 예컨대 가용성 항원에 특이적으로 결합하는 CAR의 영역을 지칭한다. 본 발명의 CAR은 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다. 일반적으로, CAR 상의 표적화 영역은 세포외성이다. 항원 결합 도메인은 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함할 수 있다. 항원 결합 도메인은, 예컨대 전장 중쇄, Fab 단편, 단일쇄 Fv (scFv) 단편, 이가 단일쇄 항체 또는 디아바디를 포함할 수 있다. 주어진 항원에 특이적으로 결합하는 임의의 분자, 예컨대 아피바디 또는 자연 발생 수용체로부터의 리간드 결합 도메인이 항원 결합 도메인으로서 사용될 수 있다. 종종 항원 결합 도메인은 scFv이다. 일반적으로, scFv에서 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 유연한 링커에 의해 융합되어 scFv를 형성한다. 이러한 링커는, 예컨대 "$(G_4/S)_3$-링커"일 수 있다.

[0164] 일부 경우에, 항원 결합 도메인은 CAR이 사용될 동일한 종으로부터 유래되는 것이 유리하다. 예컨대, 인간에서 치료적으로 사용하려는 경우, CAR의 항원 결합 도메인은 인간 또는 인간화된 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 것이 유리할 수 있다. 인간 또는 인간화된 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 당업계에 널리 공지된 다양한 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0165] 본원에 사용된 "스페이서"또는 "힌지"는 항원 결합 도메인과 막횡단 도메인 사이에 있는 친수성 영역을 지칭한다. 본 발명의 CAR은 세포외 스페이서 도메인을 포함할 수 있지만, 이러한 스페이서를 생략하는 것도 가능하다. 스페이서는, 예컨대 항체 또는 그의 단편의 Fc 단편, 항체 또는 그의 단편의 힌지 영역, 항체의 CH2 또는 CH3 영역, 보조 단백질, 인공 스페이서 서열 또는 그의 조합을 포함할 수 있다. 스페이서의 두드러진 예는 CD8alpha 힌지이다.

[0166] CAR의 막횡단 도메인은 이러한 도메인에 대한 임의의 원하는 천연 또는 합성 공급원으로부터 유래될 수 있다. 공급원이 천연인 경우, 도메인은 임의의 막-결합 또는 막횡단 단백질로부터 유래될 수 있다. 막횡단 도메인은, 예컨대 CD8alpha 또는 CD28로부터 유래될 수 있다. 주요 신호전달 및 항원 인식 모듈 (도메인)이 2개 (또는 그 이상)의 폴리펩티드 상에 있는 경우, CAR은 2개 (또는 그 이상)의 막횡단 도메인을 가질 수 있다. 분리된 주요 신호전달 및 항원 인식 모듈은 CAR의 각각의 폴리펩티드에서 소분자-의존적 이종이량체화 도메인으로 인해 CAR 세포 발현에 대한 소분자-의존적이고 적정 가능하고 가역적인 제어를 가능하게 한다 (Wu et al, 2015, Science 350: 293-303).

[0167] CAR의 세포질 신호전달 도메인 (또는 세포내 신호전달 도메인)은 CAR이 발현되는 면역 세포의 정상 이펙터 기능 중 적어도 하나의 활성화를 담당한다. "이펙터 기능"은 세포의 특수 기능을 의미하며, 예컨대 Treg에서 이펙터 기능은 면역억제성 시토카인, 예컨대 IL-10, IL-35, TGF-beta의 분비 또는 억제 분자, 예컨대 TIGIT, CTLA4, 경쟁적 시토카인 수용체, 예컨대 IL 수용체의 발현을 포함하는 억제 활성 또는 조절 활성일 수 있다. 세포내

신호전달 도메인은 이펙터 기능 신호를 변환시키고 CAR을 발현하는 세포가 특수 기능을 수행하도록 지시하는 단백질의 부분을 지칭한다. 세포내 신호전달 도메인은 면역 세포 이펙터 기능을 개시 또는 차단하는 신호를 변환시키기에 충분한 주어진 단백질의 세포내 신호전달 도메인의 임의의 완전한, 돌연변이된 또는 절두된 부분을 포함할 수 있다.

[0168] CAR에 사용하기 위한 세포내 신호전달 도메인의 두드러진 예는 항원 수용체 인게이지먼트 (engagement) 후 신호 변환을 개시하는 T 세포 수용체 (TCR) 및 공동-수용체의 세포질 신호전달 서열을 포함한다.

[0169] 일반적으로, T 세포 활성화는 2개의 상이한 부류의 세포질 신호전달 서열, 첫 번째로 TCR을 통해 항원-의존적 일차 활성화를 개시하는 것 (일차 세포질 신호전달 서열, 일차 세포질 신호전달 도메인) 및 두 번째로 이차 또는 공동-자극 신호를 제공하도록 항원-독립적으로 작용하는 것 (이차 세포질 신호전달 서열, 공동-자극 신호전달 도메인)에 의해 매개될 수 있다. 따라서, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 하나 이상의 일차 세포질 신호전달 도메인 및/또는 하나 이상의 이차 세포질 신호전달 도메인을 포함할 수 있다.

[0170] 자극 방식으로 작용하는 일차 세포질 신호전달 도메인은 ITAM (면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프)을 함유할 수 있다.

[0171] CAR에 종종 사용되는 일차 세포질 신호전달 도메인을 함유하는 ITAM의 예는 TCRζ (CD3ζ), FcRgamma, FcRbeta, CD3gamma, CD3delta, CD3epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b, 및 CD66d로부터 유래되는 것들이다. CD3ζ으로부터 유래되는 서열이 가장 두드러진다.

[0172] CAR의 세포질 도메인은 자체적으로 CD3ζ 신호전달 도메인을 포함하거나 임의의 다른 원하는 세포질 도메인(들)과 조합되도록 설계될 수 있다. CAR의 세포질 도메인은 CD3ζ 쇄 부분 및 공동-자극 신호전달 영역 (도메인)을 포함할 수 있다. 공동 자극 신호전달 영역은 공동 자극 분자의 세포내 도메인을 포함하는 CAR의 부분을 지칭한다. 공동-자극 분자는 항원에 대한 림프구의 효율적인 반응에 필요한 항원 수용체 또는 그의 리간드 이외의 세포 표면 분자이다. 공동자극 분자의 예는 CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능-연관된 항원-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3이다.

[0173] CAR의 세포질 신호전달 부분 내의 세포질 신호전달 서열은 무작위로 또는 특정 순서로 링커를 사용하여 또는 링커 없이 서로 연결될 수 있다. 바람직하게는 2 내지 10개의 아미노산 길이인 짧은 올리고- 또는 폴리펩티드 링커가 연결을 형성할 수 있다. 두드러진 링커는 글리신-세린 더블릿이다.

[0174] 예로서, 세포질 도메인은 CD3ζ의 신호전달 도메인 및 CD28의 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 세포질 도메인은 CD3ζ의 신호전달 도메인 및 CD137의 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 추가의 예에서, 세포질 도메인은 CD3ζ의 신호전달 도메인, CD28의 신호전달 도메인 및 CD137의 신호전달 도메인을 포함할 수 있다.

[0175] 본원에 사용된 용어 "CD137 CAR"은 CAR이 적어도 일차 세포질 신호전달 도메인 이외에 적어도 CD137 공동자극 신호전달 도메인을 포함함을 의미한다.

[0176] 본원에 사용된 용어 "CD28 CAR"은 CAR이 적어도 일차 세포질 신호전달 도메인 이외에 적어도 CD28 공동자극 신호전달 도메인을 포함함을 의미한다.

[0177] 전술한 바와 같이, CAR의 세포외 부분 또는 막횡단 도메인 또는 세포질 도메인은 또한 CAR의 분리된 주요 신호전달 및 항원 인식 모듈을 목적으로 이종이량체화 도메인을 포함할 수 있다.

[0178] CAR은 자살 스위치에 의해 CAR-T 세포 또는 Treg 세포를 제거하기 위해 CAR을 코딩하는 핵산의 수준에 하나 이상의 작동 요소를 포함하도록 추가로 변형될 수 있다. 자살 스위치는, 예컨대 아폽토시스 유도 신호전달 캐스케이드 또는 세포 사멸을 유도하는 약물을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, CAR을 발현하고 코딩하는 핵산은 효소, 예컨대 티미딘 키나제 (TK) 또는 시토신 데아미나제 (CD)를 발현하도록 추가로 변형될 수 있다.

[0179] 본 발명의 CAR은 기능적 CAR, 즉 CAR을 발현하는 면역 이펙터 세포의 면역 이펙터 반응을 매개하지만 적어도 CD137 공동-자극 도메인을 포함하는 CAR을 초래하는 임의의 순서 및/또는 조합으로 본원에 기재된 상기 언급된 도메인의 임의의 부분 또는 일부를 포함하도록 설계될 수 있다.

[0180] 본원에 사용된 용어 "항체"는 표적 항원을 특이적으로 인식 (즉, 결합)하는 모노클로날 및 폴리클로날 항체 (전장 항체 포함), 다중특이적 항체 (예컨대, 이중특이적 항체), 항체 단편, 즉 항체의 항원 결합 단편, 면역아드헤신 및 항체-면역아드헤신 키메라를 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 형태의 항체 구조물을 포함하는 광

범위한 의미로 사용된다. "항체 단편"은 전장 항체의 일부, 바람직하게는 그의 가변 도메인, 또는 적어도 그의 항원 결합 부위 ("항체의 항원 결합 단편")를 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab (항원 결합 단편), scFv (가변부의 단일쇄 단편), 단일 도메인 항체, 디아바디, dsFv, Fab', 디아바디, 단일쇄 항체 분자 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.

[0181] 본원에 사용된 용어 "항원"은 하나 이상의 항체에 결합하거나 그의 생성을 유발하는 물질을 포함하는 것으로 의도되며, 단백질, 펩티드, 폴리펩티드, 올리고 펩티드, 지질, 탄수화물, 예컨대 덱스트란, 합텐 및 그의 조합, 예컨대 당화된 단백질 또는 당지질을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0182] 용어 항원은 표적 세포의 세포 표면에서 발현되는 항원을 지칭할 수 있다. 그러나, 상기 용어는 또한, 예컨대 본원에 개시된 CAR을 발현하는 조작된 Treg로 치료될 수 있는 대상체에서, 세포 표면에서 발현되거나 존재하지 않는 항원을 지칭할 수 있다. 이 경우, 항원은 본원에서 "가용성 항원"으로 지칭된다. 본원에 사용된 용어 "가용성 항원" 및 "유리 항원"은 상호교환적으로 사용될 수 있으며, 본원에 개시된 CAR의 항원 결합 도메인에 의해 결합될 수 있는 가용성 항원이, 상기 CAR을 발현하는 Treg가 상기 대상체에 적용될 때, 대상체, 우선적으로 인간의 세포의 표면에서 자연적으로 발현되거나 표면에 존재하지 않음을 의미한다. 우선적으로, 가용성 항원은 상기 CAR을 발현하는 상기 Treg 세포가 적용되는 대상체의 혈액 또는 조직에 존재하지 않는다. 더욱 우선적으로, 상기 CAR의 항원 결합 도메인 이이의 대상체의 또 다른 분자에 결합하는 특정한 친화도 또는 선호도를 갖지 않는다. 우선적으로 상기 가용성 항원은 외인성 항원일 수 있다. 상기 외인성 항원은 본원에 개시된 장애의 치료를 위해 또한 상기 CAR을 발현하는 Treg를 받거나 받았던 대상체에 적용될 수 있으며, 이는 본원에 개시된 CAR의 항원 결합 도메인에 결합하는 외부 자극제 (외부 자극)이며 후속적으로 상기 CAR을 발현하는 Treg 세포를 활성화시킬 수 있다.

[0183] 상기 외인성의 가용성 항원은 상기 대상체에 적용될 때 대상체에 해를 끼치지 않는 비-질병 유발 항원일 수 있다. 외인성의 가용성 항원은, 우선적으로 본원에 개시된 바와 같이 치료될 대상체에서 자연적으로 발생하지 않는 마크로분자, 예컨대 폴리펩티드 또는 다당류일 수 있다.

[0184] 가용성 항원, 우선적으로 외인성의 가용성 항원은 마크로분자, 예컨대 단백질, 다당류, 올리고- 또는 폴리뉴클레오티드, 폴리에틸렌-글리콜 또는 인간에 적용될 수 있는 임의의 다른 생체적합성 중합체 분자 또는 상기 분자의 유도체, 예컨대 보다 큰 마크로분자에 결합된 소분자 "합텐"으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 가용성 항원은 전형적으로 가교-결합을 통해 달성되는 CAR의 활성화를 허용하는 형태로 적용될 수 있으며, 즉 사용되는 마크로분자는 CAR의 항원 결합 도메인에 의해 결합되는 실제 도메인의 하나 초과의 카피, 이상적으로는 수개의 카피를 함유할 수 있다. 이러한 다가 분자는 가교결합 및 CAR 활성화를 유도할 수 있다. 우선적으로, (외인성의) 가용성 항원에 대한 유일한 요건은 본원에 개시된 바와 같이 치료되는 대상체의 순환계, 예컨대 혈액계 또는 림프계 및/또는 조직에서 순환할 수 있고 상기 대상체의 세포의 표면의 일부가 아니라는 것이며, 결과적으로 (외인성의) 가용성 항원은 상기 Treg 세포가 상기 대상체에 적용될 때 Treg 세포에 의해 발현되는 본원에 개시된 CAR의 항원 결합 도메인에 의해서만 결합될 수 있다. 따라서, (외인성의) 가용성 항원은 또한 상기 대상체의 순환계, 예컨대 혈액계에서 구조물에 고정된 항원의 순환을 허용하는 구조물, 예컨대 비드 (나노비드, 마이크로비드)에 고정될 수 있다. 이들도 본 발명의 의미에서 (외인성의) 가용성 항원일 수 있다.

[0185] 바람직한 가용성 항원은 덱스트란 (덱스트란 분자)이다. 상기 덱스트란은 상기 Treg로 치료될 필요가 있는 대상체에게 상기 CAR을 발현하는 상기 Treg와 함께 유리 덱스트란 분자로 또는 입자, 예컨대 마이크로비드 또는 나노비드에 고정되어 적용될 수 있다.

[0186] 덱스트란은 다양한 길이의 쇄 (3 내지 2000 킬로달톤)로 구성된 복잡한 분지형 글루칸 (많은 글루코스 분자로 이루어진 다당류)이다. 임의의 길이의 덱스트란, 예컨대, 3 내지 2000 kDa가 본원에 개시된 적용에 사용될 수 있다. 우선적으로, 사용되는 덱스트란은 5, 10, 20, 100 또는 200 kDa를 초과할 수 있다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 사용되는 덱스트란은 60 내지 200 kDa의 덱스트란일 수 있다. 본원에 사용되는 가용성 덱스트란은 본원에 개시된 바와 같이 덱스트란에 결합하는 CAR에 대한 많은 항원을 제시할 수 있다. 덱스트란은 항-덱스트란 CAR에 대한 모노-항원 대신 폴리-항원일 수 있다.

[0187] 상기 덱스트란은 결합되지 않은 덱스트란, 즉 유리 덱스트란, 가용성 덱스트란 또는 콜로이드성 나노- 또는 마이크로입자에 컨주게이션된 덱스트란일 수 있다. 상기 덱스트란은 제어 가능한 조건 하에서 상기 Treg 세포를 활성화시키기 위해 본원에 개시된 바와 같이 Treg 세포를 보유하는 이를 필요로 하는 환자에게 투여될 수 있다.

[0188] 상기 덱스트란은 또한 약제학적 조성물의 일부로서 대상체에게 적용될 수 있다 (예컨대, 델타덱스; 덱스트란 40

10%, NaCl 중; 체중 kg당, 예컨대 덱스트란 1,5 g 이하 주입).

[0189] 대안적으로, 덱스트란은 항체 또는 또 다른 부착 구조물에 컨주게이션될 수 있으며, 이는 덱스트란을 생체 내에서 세포 또는 조직 기질 표면, 예컨대 세포외 기질 부착 펩티드에 특이적으로 표적하는 것을 허용한다.

[0190] Treg (본원에서 "조절 T 세포"또는 "Treg 세포"로도 지칭됨)는 본원에서 전형적으로 CD25를 발현하고 CD127의 발현이 결여된 $Foxp3^{+}CD4^{+}$ T 세포로 정의된다. Treg는 활성화 시 CD137의 선별적 발현, CD154 발현의 결여 뿐만 아니라 4-8시간의 활성화의 시간 범위 내에서 이펙터 시토카인 발현, 예컨대 IL-2-IFN-gamma, IL-17, IL-4 등의 결여로 추가로 특징지어진다. Treg는 또한, 예컨대 foxp3 유전자 영역내 (Treg 특이적 탈메틸화 영역, TSDR; 문헌 (Huehn, J., et al, 2009, Nat Rev Immunol 9, 83-9) 참조)의 특정 DNA 영역의 선별적 탈메틸화 뿐만 아니라 다른 영역, 예컨대 CD25, CTLA4, FANK1, CD137, CD154 유전자 영역에서의 다른 특정한 메틸화 패턴으로 특징지어진다. 그들은 자가-항원 및 무해한 외래 항원에 대해 관용을 유지하는 데 필요한 고도의 면역억제 기능을 갖는 별도의 T 세포 계통을 나타낸다. 본원에 정의된 Tcon 세포는 Treg가 아닌 모든 CD4+ T 세포를 포함한다.

[0191] 본원에 사용된 용어 "표적 세포"는 본원에 개시된 CAR에 의해 직접적으로 또는 간접적으로 (예컨대, 태그 부착된 폴리펩티드를 통해) 인식 (결합)되어야 하는 세포 표면에서 항원을 발현할 수 있는 세포를 지칭한다.

[0192] 상기 표적 세포는 대상체에서 자가면역, 이식 거부, 알레르기 및 만성 염증 질환을 유발하는 질환 상태의 세포일 수 있다.

[0193] 자가면역은 면역 세포가 자기에 대해 향하여 내인성 구조물에 대한 면역 반응을 일으킴으로써 자가면역 질환을 유발할 수 있는 상태를 의미한다.

[0194] 이식 거부는 숙주의 면역계에 의해 외래로 인식되어 이식된 조직을 거부하는 이식된 조직에 대한 면역 반응의 생성을 의미한다.

[0195] 알레르기는, 예컨대 환경 또는 음식으로부터 유도될 수 있는 흡입, 섭취 또는 피부 접촉 시 대상체와 접촉되는 무해한 외래 항원에 대한 부적절한 면역 반응의 생성을 의미한다.

[0196] 만성 염증 질환은 시스템에 남아있는 항원에 대한 면역 반응의 생성을 의미한다. 예는, 예컨대 염증성 장 질환 동안 박테리아, 만성 감염 동안 바이러스 또는 자가면역 반응 동안 내인성 구조물에 대한 면역 반응을 포함한다. 예는 또한 외래 항원에 대한 알레르기 반응의 결과로서 만성 염증을 포함할 수 있다. 자가면역 질환은 자가면역으로 인해 발생하는 병태로, 다수의 상이한 기관계에 영향을 끼칠 수 있는 병리가 발생한다. 예는 류마티스 관절염, 다발성 경화증, 시각신경척수염, 전신성 홍반성 루푸스, 1형 당뇨병 또는 질병-유발제, 예컨대 바이러스, 박테리아 또는 기생생물에 의한 대상체의 침입 후 그들의 복제를 의미하는 대상체의 바이러스, 박테리아, 기생생물에 의한 만성 감염을 포함한다.

[0197] 본원에 개시된 바와 같은 CAR (폴리펩티드(들)), CAR을 코딩하는 핵산 분자(들), 재조합 발현 벡터, CAR을 발현하는 세포 및 CAR을 발현하는 세포 집단은 단리 및/또는 정제될 수 있다. 용어 "단리된"은 자연 상태로부터 변경되거나 제거된 것을 의미한다. 예컨대, 단리된 세포 집단은 그러한 세포의 농축 및 자연 발생 상태에서는 상기 단리된 세포와 정상적으로 연관된 다른 세포로부터의 분리를 의미한다. 단리된 세포 집단은 자연에서 발견되는 것보다 더욱 균일한 세포 집단인 실질적으로 정제된 세포 집단을 의미한다. 바람직하게는 농축 세포 집단은 적어도 약 90%의 선별된 세포 유형을 포함한다. 특정 측면에서, 세포 집단은 적어도 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 심지어 100%의 선별된 세포 유형을 포함한다.

[0198] 예컨대, 살아있는 동물에 자연적으로 존재하는 핵산 또는 펩티드는 "단리"되지 않지만, 자연 상태의 공존 물질로부터 부분적으로 또는 완전히 분리된 동일한 핵산 또는 펩티드는 "단리"된다. 단리된 핵산 또는 단백질은 또한 비-천연 환경, 예컨대 숙주 세포에서 존재할 수 있다.

[0199] 본원에 사용된 용어 "대상체"는 포유동물, 예컨대 마우스, 래트, 소, 돼지, 염소, 닭, 개, 원숭이 또는 인간을 지칭한다. 우선적으로, 대상체는 인간이다. 대상체는 장애, 예컨대 자가면역 질환, 알레르기, 이식 거부 또는 만성 염증을 앓는 대상체 (환자)일 수 있지만, 대상체는 또한 건강한 대상체일 수 있다.

[0200] 본원에 사용된 용어 "자가"는 물질이 나중에 재-도입되는 동일한 대상체로부터 유래되는 임의의 물질을 지칭한다.

[0201] 본원에 사용된 용어 "동종이형"은 물질이 재-도입되는 대상체와 동일한 종의 상이한 대상체로부터 유래된 임의

의 물질을 지칭한다.

[0202] 용어 "치료 유효량"또는 "치료 유효 집단"은 대상체에서 치료 이점을 제공하는 세포 집단의 양을 의미한다.

[0203] 예컨대 본원에 개시된 CAR에서 사용된 항체, 그의 항원 결합 단편의 항원 결합 도메인과 관련하여 용어 "특이적으로 결합한다" 또는 "에 특이적인"은 특정 항원은 인식하고 그에 결합하나 샘플 중의 다른 분자는 실질적으로 인식하거나 그에 결합하지 않는 항원 결합 도메인을 지칭한다. 하나의 종으로부터의 항원에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인은 또 다른 종으로부터의 항원에도 결합할 수 있다. 이러한 종간 반응성은 많은 항체에 대해 전형적이며 따라서 특정 항원 결합 도메인의 정의와 상반되지는 않는다. 항원에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인은 항원의 상이한 대립유전자 형태 (대립유전자 변이체, 스플라이스 변이체, 이소형 등) 또는 동일한 유전자 계열의 이 항원의 상동성 변이체에도 결합할 수 있다. 이러한 교차 반응성은 많은 항체에 대해 전형적이며 따라서 특정 항원 결합 도메인의 정의와 상반되지는 않는다.

[0204] 본원에 사용된 용어 "조작된 세포" 및 "유전자조작으로 변형된 세포"는 상호교환적으로 사용될 수 있다. 상기 용어는 외래 유전자 또는 핵산 서열을 함유 및/또는 발현하고 그 다음 세포 또는 그의 자손의 유전자형 및/또는 표현형을 변형시키는 것을 의미한다. 특히, 상기 용어는, 세포, 우선적으로 면역 세포가 당업계에 널리 공지된 재조합 방법에 의해 조작되어 자연 상태에서 이들 세포에서 발현되지 않는 펩티드 또는 단백질을 안정적으로 또는 일시적으로 발현할 수 있다는 사실을 의미한다. 예컨대, 면역 세포가 그들의 세포 표면에 인공 구축물, 예컨대 키메라 항원 수용체를 발현하도록 조작된다.

[0205] 용어 "장애"는 대상체에서 기능적 이상 또는 교란, 예컨대 암, 자가면역 장애, 또는 바이러스, 박테리아, 기생생물 등에 의한 감염을 의미한다.

[0206] 본원에 사용된 장애의 "치료"라는 용어는 대상체에 의해 경험되는 질환 또는 장애의 적어도 하나의 징후 또는 증상의 빈도 또는 중증도를 감소시키는 것을 의미한다.

[0207] 면역요법은 "면역 반응의 유도, 증진 또는 억제에 의한 질환의 치료"로 정의되는 의학적 용어이다. 면역 반응을 유발하거나 증폭시키도록 설계된 면역요법은 활성화 면역요법으로 분류되고, 감소 또는 억제하는 면역요법은 억제 면역요법으로 분류된다. 활성화 면역요법으로서의 암 면역요법은 면역계를 자극하여 종양을 거부 및 파괴하는 것을 시도한다. 입양 세포 전달은 암 세포를 공격하기 위해 세포-기반 세포독성 반응을 사용한다. 환자의 암에 대해 자연적 또는 유전자조작된 반응성을 갖는 면역 세포, 예컨대 T 세포는 시험관내에서 생성된 후 암 환자에게 다시 전달된다.

[0208] 본원에 사용된 용어 "발현"은 세포에서 프로모터에 의해 주도되는 특정 뉴클레오티드 서열의 전사 및/또는 해독으로 정의된다.

[0209] 서열 목록 프로토콜에 제시된 서열 번호 1 및 서열 번호 2의 아미노산 서열은 본원에 개시된 CAR의 부분 서열이다. 서열 번호 1 및 서열 번호 2의 상기 서열은 또한 본원에 기재된 의도된 기능을 유지하면서 일부 아미노산이 결실, 첨가 또는 대체된 이러한 서열의 변이체를 포함할 수 있다. 따라서, 이 정의에는 서열 번호 1 및 서열 번호 2의 아미노산 서열의 변이체, 예컨대 각각 아미노산 서열 수준에서 적어도 70%, 또는 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 서열 번호 1 및 서열 번호 2와 본질적으로 유사한 아미노산 서열이 포함된다. 일반적으로, 서열 번호 1 및 서열 번호 2의 의도된 기능을 의도적으로 변화시키지 않는 모든 아미노산 변이체가 이 정의에 포함된다. 본 발명의 맥락에서, "서열 동일성"은 당업계에 널리 공지된 아미노산 서열에 대한 정렬 프로그램을 사용하여 쌍별 정렬을 이용하여 결정될 수 있다.

[0210] "순환계"는 혈액이 영양소 (예컨대, 아미노산 및 전해질), 산소, 이산화탄소, 호르몬 및 혈액 세포를 신체의 세포로 및 세포로부터 순환 및 수송시켜 영양을 공급하고 질환 퇴치를 돕고 온도 및 pH를 안정화시키고 항상성을 유지시키게 하는 대상체의 기관계이다. 순환계는 혈액을 분배하는 심혈관계 및 림프를 순환시키는 림프계의 2개의 분리된 시스템을 포함한다.

[0211] 본원에 사용된 용어 "자동화된 방법"또는 "자동화된 공정"는 장치 및/또는 컴퓨터 및 컴퓨터 소프트웨어의 사용을 통해 자동화되는 임의의 공정을 지칭하고 그렇지 않으면 조작자에 의해 수동으로 수행되거나 수행될 수 있다. 자동화된 방법 (공정)은 인간의 개입을 줄이고 전달 시간을 줄인다. 일부 경우에, 방법의 적어도 하나의 단계가 어떠한 인간의 지원이나 개입 없이 수행되는 경우, 방법은 자동화된다. 우선적으로, 방법의 모든 단계가 인간의 지원이나 개입 없이 수행되는 경우, 방법은 자동화된다.

[0212] 본원에 사용된 용어 "입자"는 고체상, 예컨대 콜로이드성 입자, 마이크로구, 나노입자 또는 비드를 지칭한다.

이러한 입자의 생성 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다. 입자는 자기 입자일 수 있다. 입자는 용액 또는 현탁액으로 존재할 수 있거나 본 발명에 사용하기 전에 동결건조된 상태일 수 있다. 이런 경우, 동결 건조된 입자는 본 발명과 관련하여 처리될 샘플과 접촉하기 전에 편리한 완충액에 재구성된다.

[0213] 특히 강력한 분류 기술은 자기 세포 분류이다. 세포를 자기적으로 분리하는 방법은 여러 공급자로부터 상업적으로 입수할 수 있다. 세포, 예컨대 Treg 세포 및 다른 (면역) 세포를 포함하는 생물학적 샘플에서 세포를 농축, 분류 및/또는 검출하기 위한 바람직한 실시양태에서, 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합 단편은, 예컨대 다당류에 의한 유기 코팅을 갖는 콜로이드성 초상자성 마이크로입자와 함께 사용된다 (자기-활성화된 세포 분류 (MACS®) 기술 (Miltenyi Biotec, 독일 베르기쉬 글라드바흐)).

[0214] 또 다른 분류 기술은 유세포 분석을 이용한다. 유세포 분석은, 예컨대 세포를 유체 스트림에 현탁시키고 그들을 전자 검출 장치에 통과시킴으로써, 예컨대 세포 분류 및 바이오마커 검출에 사용되는 레이저- 또는 임피던스-기반의 생물물리학적 기술이다. 초당 최대 수천개의 입자의 물리적 및 화학적 특징을 동시에 다중파라미터 분석할 수 있다. 형광-활성화된 세포 분류 (FACS)는 특수한 유형의 유세포 분석이다. 이는 각각의 세포의 특정 광 산란 및 형광 특징에 기반하여 생물학적 세포의 이종 혼합물을 한 번에 하나의 세포씩 2개 이상의 용기로 분류하는 방법을 제공한다.

[0215] 세포 단리, 정제 또는 농축과 관련하여, 본원에 사용된 용어 "고갈", "고갈시키는" 등은 당업계에서의 일반적인 의미를 가지며, Treg 또는 다른 (면역) 세포를 포함하는 샘플로부터 특정 세포 (예컨대, CD154+ 세포)를 제거하는 것을 지칭한다. 고갈 방법은 당업계에 널리 공지되어 있고 본원에 기재되어 있으며, 예컨대 집단에서 특정 세포 (예컨대, CD154+ 세포)가 표지되고 세포의 집단으로부터 제거되어 특정 세포가 부재하거나 출발 집단에서보다 더 낮은 비율로 존재하는 새로운 집단을 초래하는 FACS 또는 MACS 분류를 포함한다. "고갈"은 특정 세포가 완전히 제거되거나 새로운 집단에 특정 세포가 완전히 없는 것을 요구하지 않는다는 것을 인식할 것이다. 전형적으로, 집단으로부터 특정 세포를 고갈시키는 것은 이러한 세포의 표현 (집단 내의 모든 세포에 대한 퍼센트로 측정됨)을 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 감소시키는 것을 의미한다.

[0216] 세포의 단리, 정제 또는 농축과 관련하여 본원에 사용된 용어 "양성 선별"은 당업계에서의 일반적인 의미를 가지며, Treg 및 임의적으로 다른 (면역) 세포를 포함하는 샘플로부터 특정 세포 (예컨대, CD137+ 세포)의 농축을 지칭한다. 양성 선별 방법은 당업계에 널리 공지되어 있고 본원에 기재되어 있으며, 예컨대 집단 내의 특정 세포 (예컨대, CD137+ 세포)가 표지되고 세포 집단으로부터 단리되어 단리된 세포가 특정 세포가 출발 집단보다 높은 비율로 존재하는 새로운 집단을 초래하는 FACS 또는 MACS 분류를 포함한다.

[0217] 실시양태

[0218] 본 발명의 한 실시양태에서, CD3zeta 및 CD137 신호전달 도메인 및 외인성 항원, 예컨대 덱스트란에 특이적인 항원 결합 도메인을 포함하는 CAR을 발현하는 Treg가 생성된다. CAR을 코딩하는 DNA 구축물은 당업계에 널리 공지된 방법 (예컨대, 바이러스-기반 시스템, 물리적 방법, 생물학적 방법, 화학적 방법)에 의해 Treg 세포로 형질감염 또는 형질도입될 수 있다. Treg 세포에서 CAR을 코딩하는 핵산을 통합, 우선적으로 안정하게 통합하는 데 이용되는 방법에 관계 없이, 결과적으로 Treg 세포는 CAR을 발현한다. 이들 Treg 세포는 세포 배양물에 존재하거나 적용되는 대상체의 혈액에서 순환하는 세포로 덱스트란의 첨가에 의해 시험관내 및 생체내에서 활성화될 수 있다.

[0219] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 CAR을 발현하는 Treg는 각각의 항원, 예컨대 덱스트란으로 항원-특이적 활성화 후 CD154와 조합하여 또는 없이 CD137을 발현하는 세포의 분리에 의해 또는 자기 또는 형광 분류에 의해 단리된다.

[0220] 본 발명의 실시양태에서, Treg는 다양한 공급원, 예컨대 말초 혈액 단핵 세포 (PMBC), 골수, 림프절 조직, 제대혈 또는 흉선 조직으로부터 수득될 수 있다. 이들 세포의 농축을 위해, 당업계에 널리 공지된 방법, 예컨대 Ficoll™ 또는 PERCOLL™ 구배를 통한 원심분리 또는 양성/음성 선별 기술, 예컨대 형광 분류 (예컨대, FACSsort) 또는 자기 분류 (예컨대, MACS®)가 이용될 수 있다.

[0221] 한 실시양태에서, 대상체의 주어진 공급원의 Treg는, 예컨대 CD4 및/또는 CD25 및/또는 CD127 및/또는 CD154 및/또는 CD137에 특이적인 항체에 커플링된 자기 비드로 자기적으로 표지되고, 세척되고, 자기적으로 농축되고, 수집된다. 이어서, 이들 Treg는 그들의 세포 표면에서 CD137-CD3ζ-CAR을 발현하도록 조작될 수 있다.

[0222] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 CAR을 발현하는 조작된 Treg는 당업계에 널리 공지된 방법, 예컨대 형광 기반 분리 기술, 예컨대 FACS® 또는 자기 세포 분리 방법, 예컨대 MACS®에 의해 형질감염/형질도입 후 단리된다.

[0223] 본 발명의 한 실시양태에서, CD137-CD3ζ-CAR을 발현하는 조작된 Treg는 외인성 항원 (예컨대, 덱스트란) 또는 항-CD3/항-CD28로의 폴리클로날 자극의 존재 하에서 조작된 Treg의 수를 증가시키고 CD137-CD3ζ-CAR을 발현하는 Treg의 순도를 증가시키기 위해 확장된다. 우선적으로, 조작된 Treg의 상기 양은 치료 유효량으로 증가된다.

[0224] 본 발명의 한 실시양태에서, 고순도 (예컨대, >80% FoxP3 발현)를 갖는 Treg는 CD137-CD3ζ-CAR을 발현하도록 유전자 조작된다.

[0225] 본 발명의 한 실시양태에서, 고순도 (예컨대, >80% FoxP3 발현)를 갖는 Treg는 다른 마커, 예컨대 CD25, CD127, CD154과 조합하여 CD137의 발현에 의해 단리된다.

[0226] 본 발명의 한 실시양태에서, CD137-CD3ζ-CAR은 염증 질환 또는 자가면역 질환, 예컨대 염증성 장 질환, 류마티스 관절염, 다발성 경화증, 또는 이식 거부 또는 이식편대숙주 질환 (GvHD)을 갖는 대상체에서 치료에 사용된다.

[0227] 본 발명의 한 실시양태에서, CD137-CD3ζ-CAR은, 우선적으로 염증 질환 또는 자가면역 질환, 예컨대 IBD, 류마티스 관절염, MS, 이식 거부, GvHD를 갖는 환자에서 국소 부위에서 또는 전신적으로 가용성 또는 비드-고정된 형태의 외인성 항원 (예컨대, 덱스트란)의 적용에 의해 활성화된다.

[0228] 실시예

[0229] *실시예 1: 상이한 세포내 신호전달 도메인을 갖는 덱스트란-특이적 CAR-Treg의 생성*

[0230] CAR 구축물은 외인성 항원 (예컨대, 덱스트란)에 특이적인 항체로부터 유래되는 특이적 결합 단편을 함유한다. 힌지 영역은, 예컨대 IgG 도메인, CD8a CD8a 또는 CD28로부터 유도될 수 있고 CAR의 검출을 허용하는 에피토프/태그를 포함할 수 있다. 막횡단 도메인은, 예컨대 도 1a에 도시된 바와 같이 CD8a 또는 CD28에 이어 CD3ζ 및 CD137을 함유하는 1 내지 3개의 신호전달 도메인으로부터 유래될 수 있다. Treg는 LNGFR의 발현에 의해 결정될 수 있는 CD137-CD3ζ-CAR을 발현하도록 유전자 조작된다 (도 1b). CD137-CD3ζ-CAR의 항원-결합은 도 1c에서 덱스트란에 대해 도시된 바와 같이 (예컨대, 형광으로) 표지될 수 있는 각각의 항원과의 인큐베이션에 의해 결정될 수 있다.

[0231] *실시예 2: 상이한 세포내 신호전달 도메인을 갖는 CAR-Treg의 활성화*

[0232] 외인성 항원 (예컨대, 덱스트란)에 특이적인 CAR-Treg는 각각의 항원에 의해 활성화될 수 있고 활성화는 CD137 발현에 의해 분석될 수 있다. 비드-결합된 덱스트란으로 자극 후 CAR-Treg 활성화가 도 2a에 도시되어 있다. CD137-CD3ζ-CAR은 CAR-Treg에서 CD137 발현을 유도하는 데 더욱 강력하였다 (도 2a). 동일한 특이성을 갖는 다른 시험된 CAR-구축물의 기능성이 ZAP70의 인산화에 의해 분석되었다. 인산화된 ZAP70가, 예컨대 CD28-CD3ζ 신호전달을 갖는 CAR-Treg에서 검출되었으나 (도 2b), CD137-CD3ζ-CAR만이 Treg 활성화를 유도하였다 (도 2a).

[0233] *실시예 3: 상이한 세포내 신호전달 도메인을 갖는 덱스트란-특이적 CAR-Treg의 확장*

[0234] 외인성 항원 (예컨대, 덱스트란)에 특이적인 CAR-Treg는 항-CD3/-CD28 (도 3a, 3c) 또는 그들의 각각의 항원, 예컨대 비드-결합된 덱스트란 (도 3b, 3d)의 존재 하에서 확장될 수 있다. CD137-CD3ζ-CAR의 우수한 기능성을 나타내는 CD137-CD3ζ-CAR을 갖는 CAR-Treg만이 확장되었다.

[0235] *실시예 4: Treg 및 Tcon에서 상이한 세포내 신호전달 도메인의 비교*

[0236] CD3z와 조합하여 상이한 공동-자극 도메인을 갖는 항-덱스트란 CAR을 발현하는 CAR-Treg 및 CAR-Tcon이 생성되었다. 덱스트란-결합은 구축물들 사이에서 유사하였지만 (도 4a), 상이한 신호전달 도메인은 Treg 및 Tcon 활성화에 상이한 영향을 끼쳤다. Treg 활성화는 CD137 발현에 의해 분석되고, Tcon 활성화는 CD154에 의해 분석되었다. CAR-Treg는 CD137-CD3z로 가장 효율적으로 활성화되고, CAR-Tcon은 CD28-CD3z으로 가장 효율적으로 활성화되었다 (도 4b).

[0237] *실시예 5: 항원-특이적 CAR-Treg의 단리*

[0238] CD137-CD3z CAR을 갖는 CAR-Treg는 덱스트란으로 6시간 자극 후 LNGFR 발현 또는 CD137 발현에 의해 단리되었다. 트렌스진 (도 5a) 및 수용체 발현 (도 5b)은 두 분류 전략 사이에서 유사하지만, 항원-특이적 재자극은 CAR-Treg가 CD137 발현에 의해 분류될 때 매우 효율적이었다 (도 5c).

[0239] 방법

[0240] *CAR 구축물*

[0241] 모든 CAR-구축물은 AC146-유래된 scFv, CD8 막횡단 도메인, XS IgG4 힌지 및 형질감염된 및 형질도입된 세포의 검출을 위한 P2A-연결된 ΔLNGFR을 함유하였다. 렌티바이러스 상청액은 발현 벡터 및 패키징 플라스미드로 HEK293T 세포를 공동-형질감염시켜 생성되었다. 형질감염 하루 전, 3 x 10^6개의 HEK293T 세포를 DMEM (Gibco®), + 10% FCS + 100 U/ml 페니실린, 100 µg/ml 스트렙토마이신 + 50 µM 2-메르캅토에탄올 (모두 Thermo Fisher Scientific, 독일 쉬베르테)로 이루어진 완전한 DMEM (cDMEM)에서 10 cm 세포 배양 접시에 접종하였다. 세포를 2,5 M CaCl2로 보충된 ddH2O에 희석된 0,84 µg pMDG-2.VSV-G, 5,16 µg pCMV△R8.74 및 3,35 µg 덱스트란-CAR 플라스미드로 일시적으로 형질감염시켰다. 통기하면서, 2 ml의 2x HBS 완충액 (136,89 mM NaCl, 4,96 mM KCl, 1,76 mM Na2HPO4, 20,98 mM HEPES, ddH2O 중, pH = 6,75-6,76)을 용액에 천천히 첨가하고 2 ml의 형질감염 용액을 세포에 적가하였다. 형질감염 용액을 함유하는 배지를 4시간 후에 제거하고, 새로운 cDMEM을 첨가하기 전에 세포를 예열된 PBS로 2회 세척하였다. 48시간 후, 렌티바이러스 상청액을 수거하고, 여과하고 (0,45 µm), 직접 사용하거나 -80℃에서 최대 6개월 동안 저장하였다.

[0242] *Treg 단리 및 형질도입*

[0243] 건강한 공여자로부터의 백혈구성분채집 생성물은 윤리적인 지침에 따라 사전 동의와 함께 샤리테 대학 병원 (Charite University hospital, 독일 베를린)에서 입수되었다. PBMC는 Ficoll-Paque (E Healthcare Life Sciences, 독일 프라이부르그) 구배 원심분리에 의해 수득되었다. CD25+ Treg는 CD25 마이크로비드 (Miltenyi Biotec, 독일 베르기쉬 글라드바흐)를 사용하여 제조사 권장 사항에 따라 PBMC로부터 단리되었다. Treg를 4:1의 비드-대-세포 비의 Treg 확장 비드 (Miltenyi Biotec, 독일 베르기쉬 글라드바흐)의 존재 하에서 TexMACS 배지 (Miltenyi Biotec, 독일 베르기쉬 글라드바흐) + 5% (v/v) 인간 AB-혈청 (Sigma-Aldrich, 독일 쉬넬도르프) + 100 U/ml IL-2 + 100 nmol 라파마이신 (둘 다 Miltenyi Biotec, 독일 베르기쉬 글라드바흐) 및 100 U/ml 페니실린/100 µg/ml 스트렙토마이신 (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, 독일 쉬베르테)으로 이루어진 "Treg 확장 배지" 에서 배양하였다. CD4+ Tcon을 30 ng/ml 항-CD3 및 1 µg/ml 항-CD28의 존재 하에서 TexMACS 배지 (Miltenyi Biotec, 독일 베르기쉬 글라드바흐) + 5% (v/v) 인간 AB-혈청 (Sigma-Aldrich, 독일 쉬넬도르프) + 200 U/ml IL-2에서 활성화시켰다. d3에, 배양 배지를 4 µg/ml 프로타민술페이트로 보충된 각각의 렌티바이러스 상청액으로 교체하고, 세포를 800 g 및 32℃에서 90분 동안 레트로넥틴-코팅된 96 웰 플레이트 상에 스피노쿨레이트 (spinoculate)하였다. 원심분리 후, 바이러스 상청액을 제거하고 새로운 배양 배지를 세포에 첨가하였다. 형질도입 후 d2 또는 d3에 세포 표면의 LNGFR을 염색하여 형질도입 효율을 평가하였다. Treg 및 Tcon은 10-12일 동안 확장되었고 배지는 2-3일마다 교체되었다. 세포를 Treg 확장 비드 (4:1 비드-대-세포 비, Miltenyi Biotec, 독일 베르기쉬 글라드바흐), 가용성 FITC 덱스트란 (MW: 2,000,000, 2 µg/ml, Sigma-Aldrich, 독일 쉬넬도르프), 비드-결합된 덱스트란 (1:100; 덱스트란-코팅된 마이크로비드, PBS 중, Miltenyi Biotec, 독일 베르기쉬 글라드바흐) 또는 10 ng/ml PMA 및 500 ng/ml 이노마이신 (Sigma-Aldrich, 독일 쉬넬도르프)으로 6시간 재자극하기 전에 RPMI-1640 (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, 독일 쉬베르테) + 5% (v/v) 인간 AB-혈청 (Sigma-Aldrich, 독일 쉬넬도르프) + 100 U/ml 페니실린/100 µg/ml 스트렙토마이신 (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, 독일 쉬베르테)에 자극 없이 2일 동안 유지하였다.

[0244] *유세포 분석*

[0245] 세포를 제조사의 권장 사항에 따라 하기 항체와의 상이한 조합으로 염색하였다: CD4-PE-Vio770, CD4-APC-Vio-770, CD4-FITC, CD4-VioBlue (VIT4), CD25-VioBright FITC (4E3), CD127-FITC, CD127-PE-Vio770 (MB15-18C9), CD271 (LNGFR)-PE, CD271 (LNGFR)-PE-Vio770 (ME20.4-1.H4), CD137-PE (4B4-1), CD154-APC, CD154-VioBlue (5C8) (모두 Miltenyi Biotech, 독일 베르기쉬 글라드바흐). 비오빌리티 405/520 고정 염료 (Viobility 405/520 Fixable Dye) (Miltenyi Biotech, 독일 베르기쉬 글라드바흐) 또는 프로피듐 요오다이드 (Sigma-Aldrich, 독일 쉬넬도르프)를 죽은 세포를 배제시키는 데 사용하였다. CAR 표면 발현 염색을 위해, Treg를 다른 표면 분자의 표지화와 함께 4℃에서 2 µg/ml FITC-표지된 덱스트란 (MW: 2,000,000, Sigma-Aldrich, 독일 쉬넬도르프)과 10분 동안 인큐베이션하였다. 모든 데이터는 FACS Canto/LSRII (BD, 독일 하이델베르그) 또는

MACS 퀀트 분석기 (MACS Quant Analyzer) (Miltenyi Biotec, 독일 베르기쉬 글라드바흐)에서 수집되었으며, FACS 분류는 아리아 (Aria) I, Aria II 또는 인플럭스 세포 분류기 (Influx Cell Sorter) (BD, 독일 하이델베르그)에서 수행되었다. 플로우조 (FlowJo) (TreeStar, Inc, 미국 오레곤주 애쉬랜드)는 데이터 분석에 사용되었다.

[0246] *유전자 발현의 정량화*

[0247] 상이한 신호전달 도메인을 갖는 Dex-CAR 구축물의 경쟁적 확장은 정량적 실시간 PCR에 의해 분석되었다. DNA는 제조사의 지침에 따라 Zymo Research Quick-DNA™ 미니프렙 키트 (Zymo Research, 독일 프라이부르그)에 의해 단리되었으며, 유전자 발현은 각각 1x SYBR® 그린 PCR 매스터 믹스 (Thermo Fisher Scientific, 독일 쉬베르테) 및 500 nMol 전방 및 후방 프라이머 (TIB MOLBIOL, 베를린)를 사용하여 분석되었다. 유전자 발현은 StepOneTM 실시간 PCR 시스템 (Thermo Fisher Scientific, 쉬베르테)에서 분석되고 GAPDH의 발현에 대해 정규화되었다.

[0248] **참조문헌**

[0249] Blat D, Zigmond E, Alteber Z, Waks T, Eshhar Z (2014) Suppression of murine colitis and its associated cancer by carcinoembryonic antigen-specific regulatory T cells. Mol Ther 22 (5):1018-1028. doi:10.1038/mt.2014.41

[0250] Boardman DA, Philippeos C, Fruhwirth GO, Ibrahim MA, Hannen RF, Cooper D, Marelli-Berg FM, Watt FM, Lechler RI, Maher J, Smyth LA, Lombardi G (2017) Expression of a Chimeric Antigen Receptor Specific for Donor HLA Class I Enhances the Potency of Human Regulatory T Cells in Preventing Human Skin Transplant Rejection. Am J Transplant 17 (4):931-943. doi:10.1111/ajt.14185

[0251] Elinav E, Adam N, Waks T, Eshhar Z (2009) Amelioration of colitis by genetically engineered murine regulatory T cells redirected by antigen-specific chimeric receptor. Gastroenterology 136 (5):1721-1731. doi:10.1053/j.gastro.2009.01.049

[0252] Elinav E, Waks T, Eshhar Z (2008) Redirection of regulatory T cells with predetermined specificity for the treatment of experimental colitis in mice. Gastroenterology 134 (7):2014-2024. doi:10.1053/j.gastro.2008.02.060

[0253] Golshayan D, Jiang S, Tsang J, Garin MI, Mottet C, Lechler RI (2007) In vitro-expanded donor alloantigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells promote experimental transplantation tolerance. Blood 109 (2):827-835. doi:10.1182/blood-2006-05-025460

[0254] Gross G, Waks T, Eshhar Z (1989) Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. Proc Natl Acad Sci U S A 86 (24):10024-10028

[0255] Joffre O, Santolaria T, Calise D, Al Saati T, Hudrisier D, Romagnoli P, van Meerwijk JP (2008) Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes. Nat Med 14 (1):88-92. doi:10.1038/nm1688

[0256] Kuwana Y, Asakura Y, Utsunomiya N, Nakanishi M, Arata Y, Itoh S, Nagase F, Kurosawa Y (1987) Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions. Biochem Biophys Res Commun 149 (3):960-968

[0257] MacDonald KG, Hoeppli RE, Huang Q, Gillies J, Luciani DS, Orban PC, Broady R, Levings MK (2016) Alloantigen-specific regulatory T cells generated with a chimeric antigen receptor. J Clin Invest 126 (4):1413-1424. doi:10.1172/JCI82771

[0258] Masteller EL, Warner MR, Tang Q, Tarbell KV, McDevitt H, Bluestone JA (2005) Expansion of functional endogenous antigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells from nonobese diabetic mice. J Immunol 175 (5):3053-3059

[0259] Mekala DJ, Geiger TL (2005) Immunotherapy of autoimmune encephalomyelitis with redirected CD4+CD25+ T lymphocytes. Blood 105 (5):2090-2092. doi:10.1182/blood-2004-09-3579

[0260] Nishimura E, Sakihama T, Setoguchi R, Tanaka K, Sakaguchi S (2004) Induction of antigen-specific immunologic tolerance by in vivo and in vitro antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells. Int Immunol 16 (8):1189-1201. doi:10.1093/intimm/dxh122

[0261] Noyan F, Zimmermann K, Hardtke-Wolenski M, Knoefel A, Schulde E, Geffers R, Hust M, Huehn J, Galla M, Morgan M, Jokuszies A, Manns MP, Jaeckel E (2017) Prevention of Allograft Rejection by Use of Regulatory T Cells With an MHC-Specific Chimeric Antigen Receptor. Am J Transplant 17 (4):917-930. doi:10.1111/ajt.14175

[0262] Putnam AL, Safinia N, Medvec A, Laszkowska M, Wray M, Mintz MA, Trotta E, Szot GL, Liu W, Lares A, Lee K, Laing A, Lechler RI, Riley JL, Bluestone JA, Lombardi G, Tang Q (2013) Clinical grade manufacturing of human alloantigen-reactive regulatory T cells for use in transplantation. Am J Transplant 13 (11):3010-3020. doi:10.1111/ajt.12433

[0263] Sagoo P, Ali N, Garg G, Nestle FO, Lechler RI, Lombardi G (2011) Human regulatory T cells with alloantigen specificity are more potent inhibitors of alloimmune skin graft damage than polyclonal regulatory T cells. Sci Transl Med 3 (83):83ra42. doi:10.1126/scitranslmed.3002076

[0264] Skuljec J, Chmielewski M, Happle C, Habener A, Busse M, Abken H, Hansen G (2017) Chimeric Antigen Receptor-Redirected Regulatory T Cells Suppress Experimental Allergic Airway Inflammation, a Model of Asthma. Front Immunol 8:1125. doi:10.3389/fimmu.2017.01125

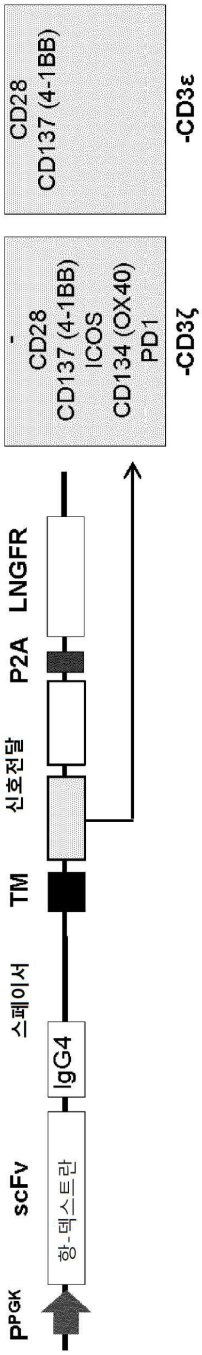
[0265] Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR (2002) The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. Blood 99 (10):3493-3499

[0266] Trenado A, Charlotte F, Fisson S, Yagello M, Klatzmann D, Salomon BL, Cohen JL (2003) Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia. J Clin Invest 112 (11):1688-1696. doi:10.1172/JCI17702

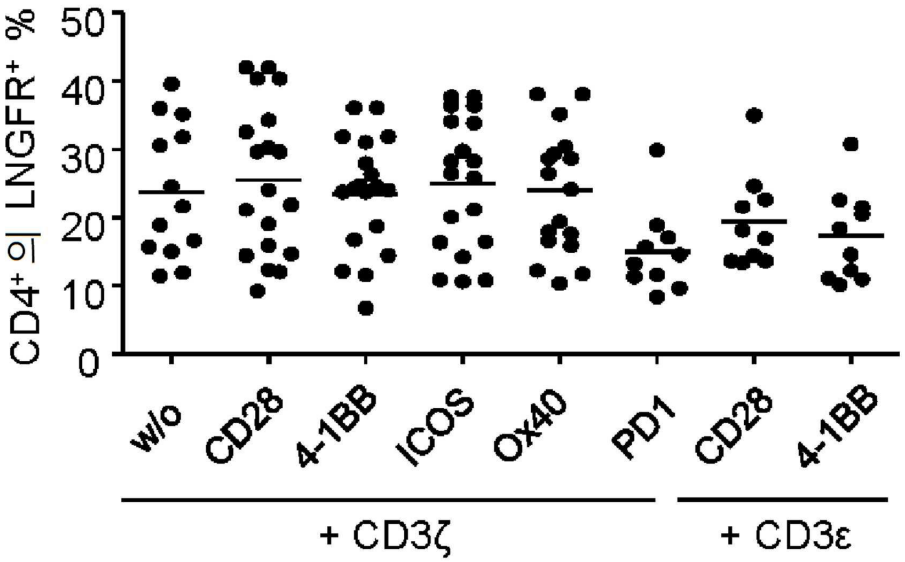
[0267] Yoon J, Schmidt A, Zhang AH, Konigs C, Kim YC, Scott DW (2017) FVIII-specific human chimeric antigen receptor T-regulatory cells suppress T- and B-cell responses to FVIII. Blood 129 (2):238-245. doi:10.1182/blood-2016-07-727834

도면

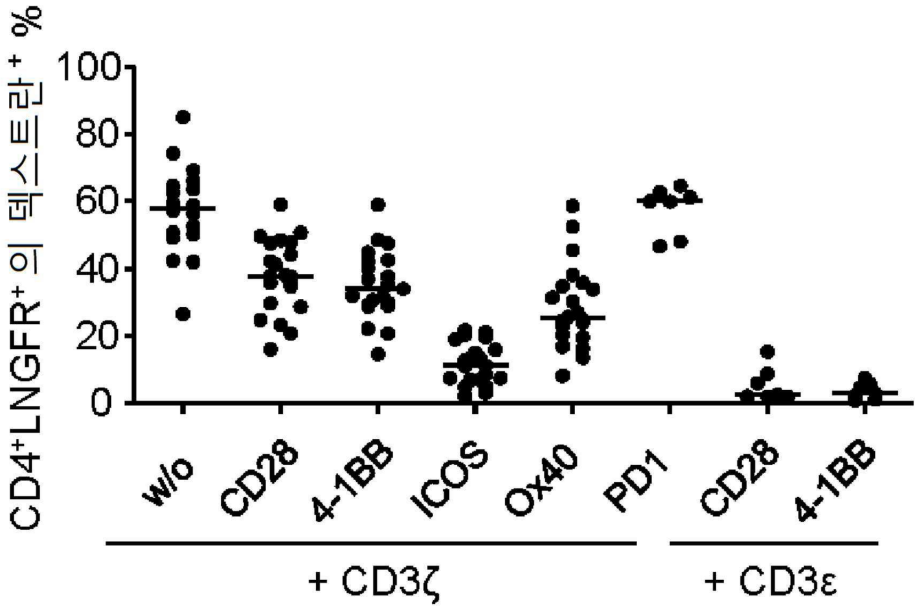
도면1a


PPGK
scFv
항-덱스트란
스페이서
IgG4
TM
신호전달
CD28
CD137 (4-1BB)
ICOS
CD134 (OX40)
PD1
-CD3ζ
P2A
LNGFR
CD28
CD137 (4-1BB)
-CD3ε

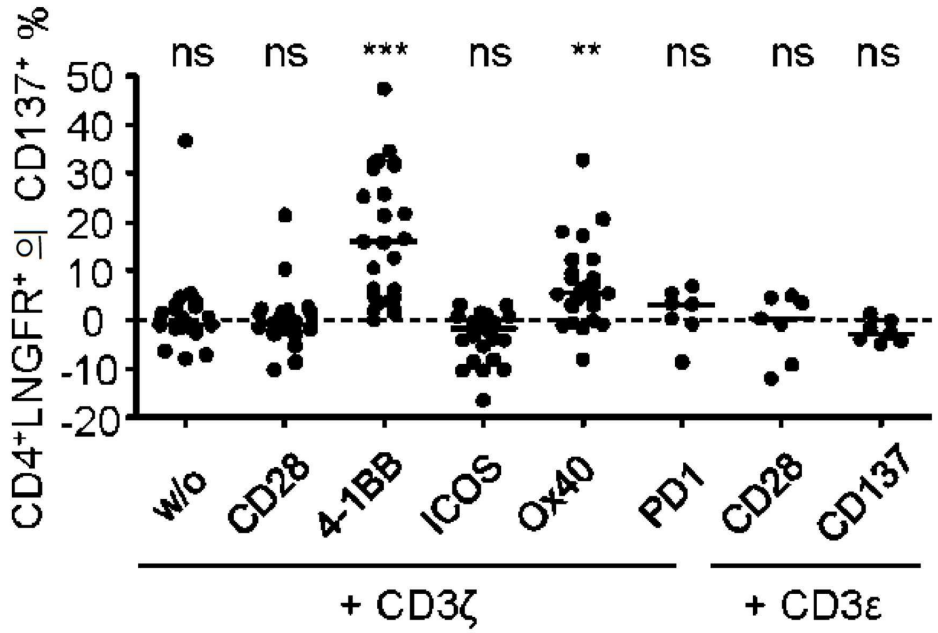
도면1b


CD4+의 LNGFR+ %
50
40
30
20
10
0
w/o
CD28
4-1BB
ICOS
Ox40
PD1
CD28
4-1BB
+ CD3ζ
+ CD3ε

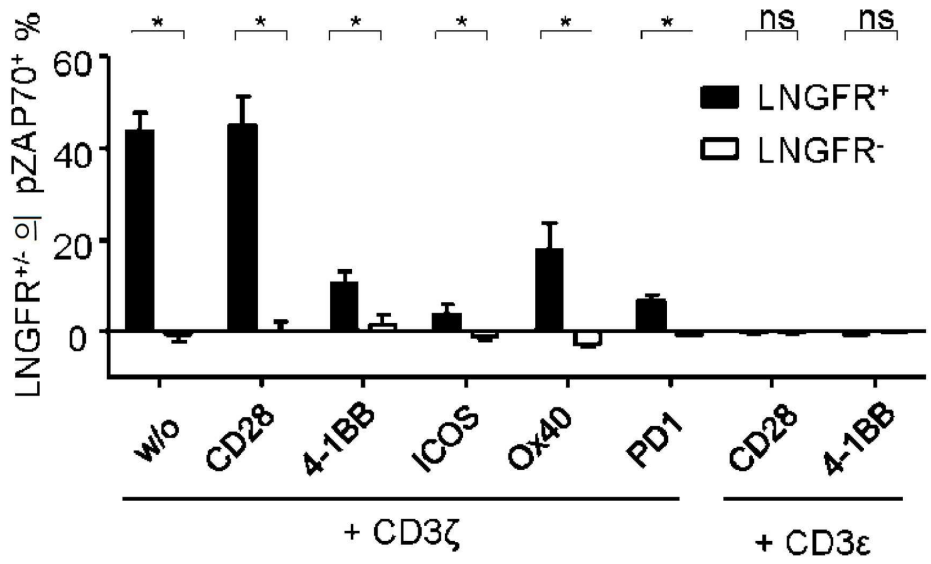
도면1c


CD4+LNGFR+의 텍스트란+ %
100
80
60
40
20
0
w/o
CD28
4-1BB
ICOS
Ox40
PD1
CD28
4-1BB
+ CD3ζ
+ CD3ε

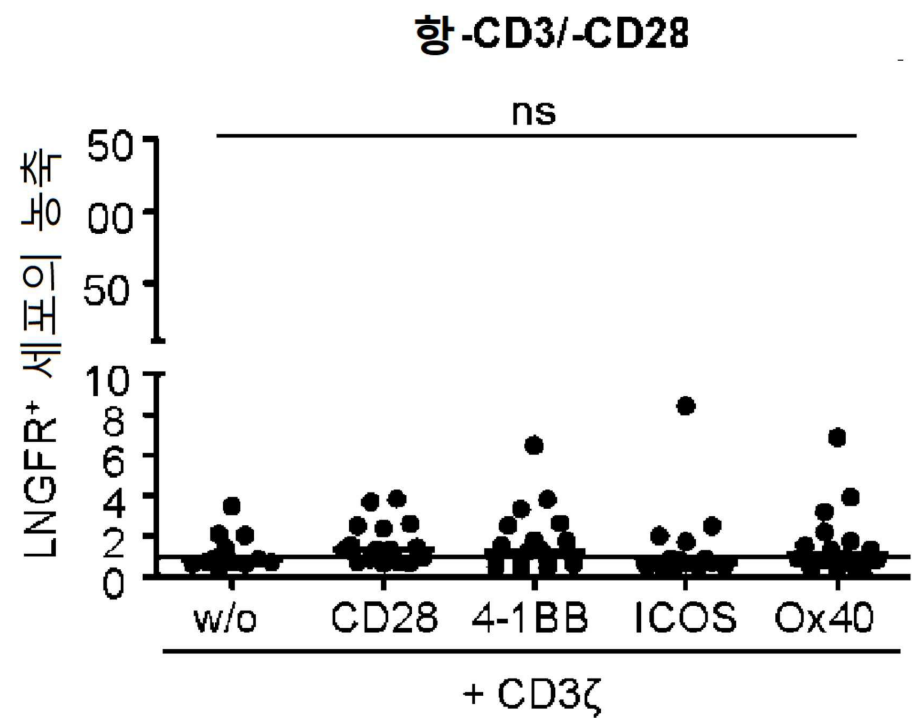
도면2a


CD4+LNGFR+ 의 CD137+ %
50
40
30
20
10
0
-10
-20
ns
ns
***
ns
**
ns
ns
ns
w/o
CD28
4-1BB
ICOS
Ox40
PD1
CD28
CD137
+ CD3ζ
+ CD3ε

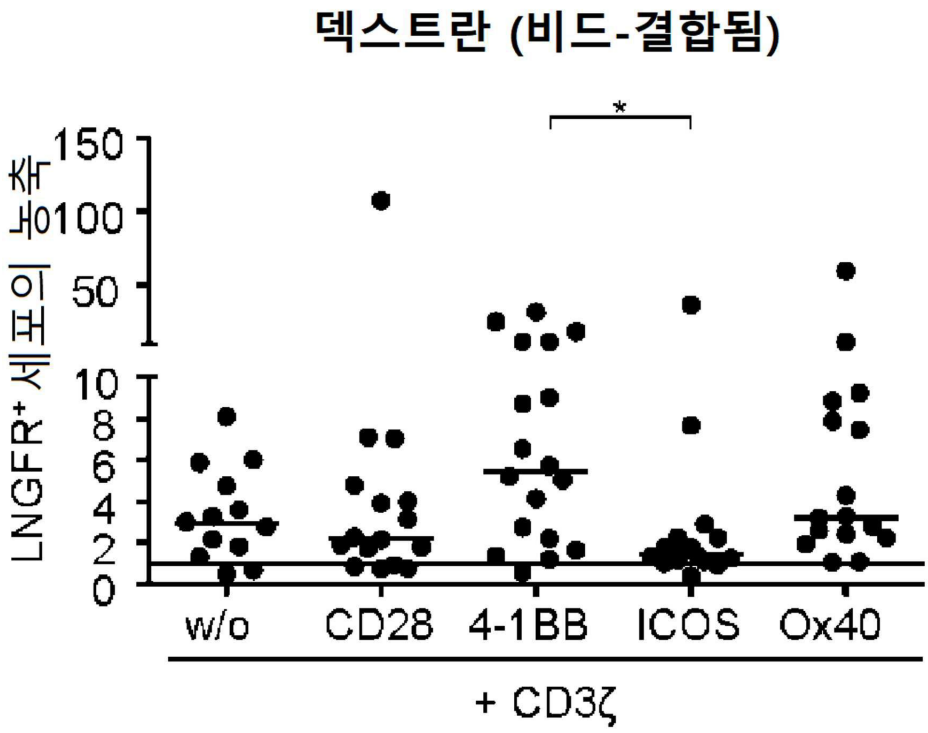
도면2b


LNGFR+/- 의 pZAP70+ %
60
40
20
0
*
*
*
*
*
*
ns
ns
LNGFR+
LNGFR-
w/o
CD28
4-1BB
ICOS
Ox40
PD1
CD28
4-1BB
+ CD3ζ
+ CD3ε

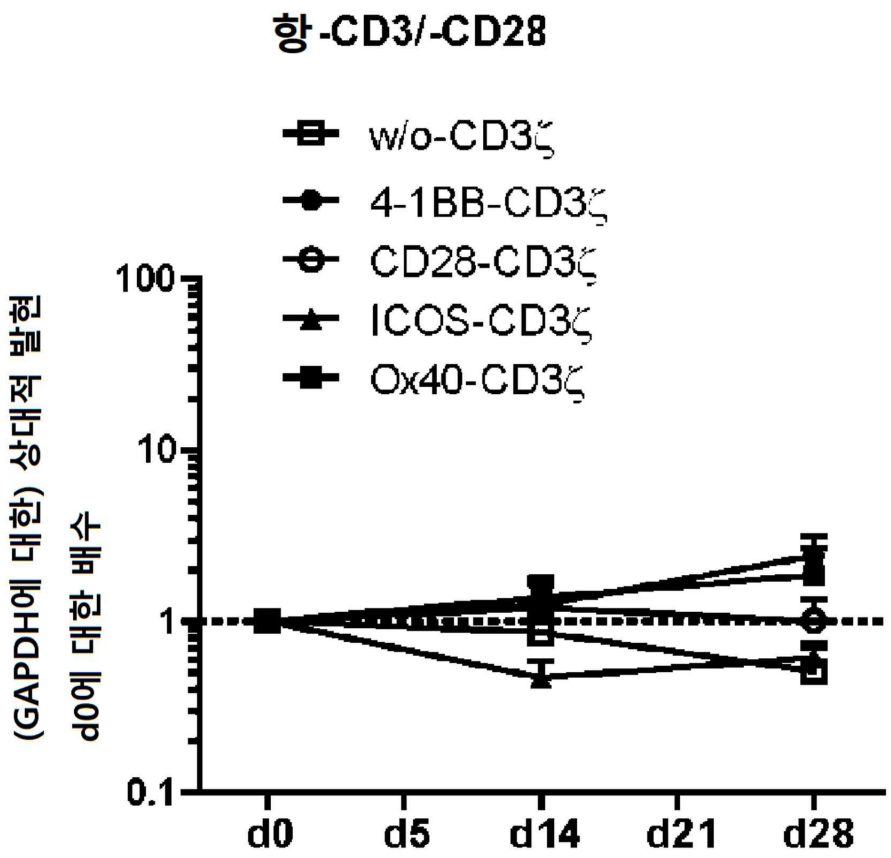
도면3a


항-CD3/-CD28
ns
LNGFR+ 세포의 농축
50
00
50
10
8
6
4
2
0
w/o
CD28
4-1BB
ICOS
Ox40
+ CD3ζ

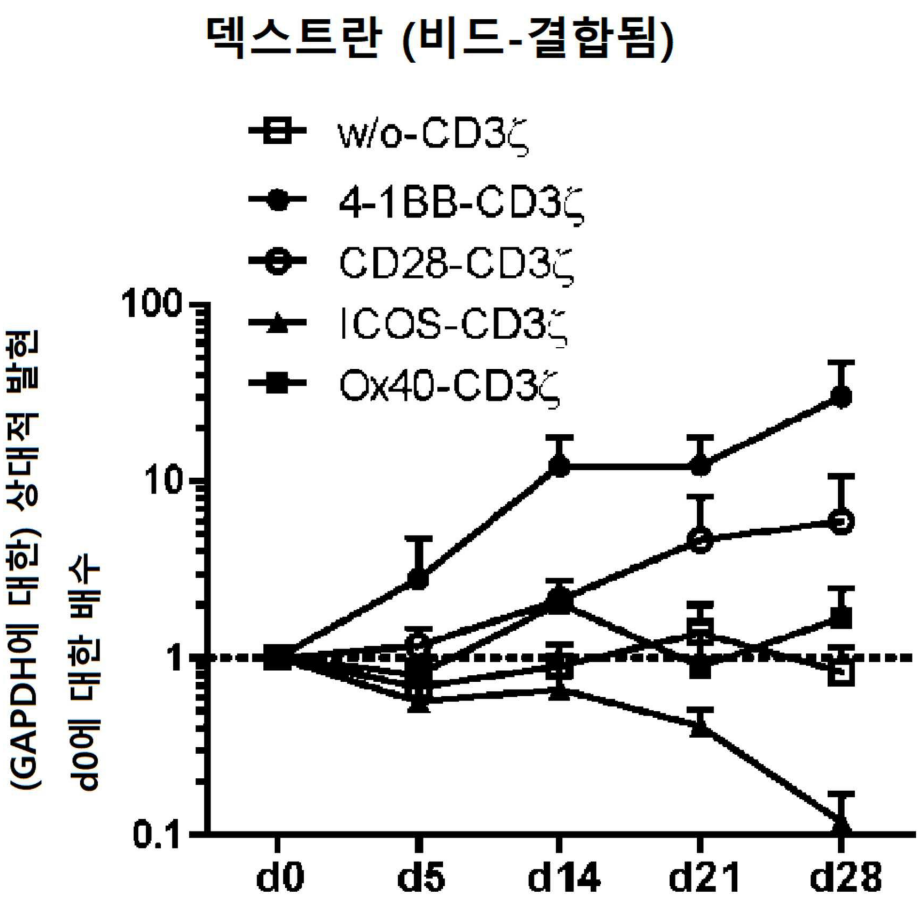
도면3b


덱스트란 (비드-결합됨)
*
LNGFR+ 세포의 농축
150
100
50
10
8
6
4
2
0
w/o
CD28
4-1BB
ICOS
Ox40
+ CD3ζ

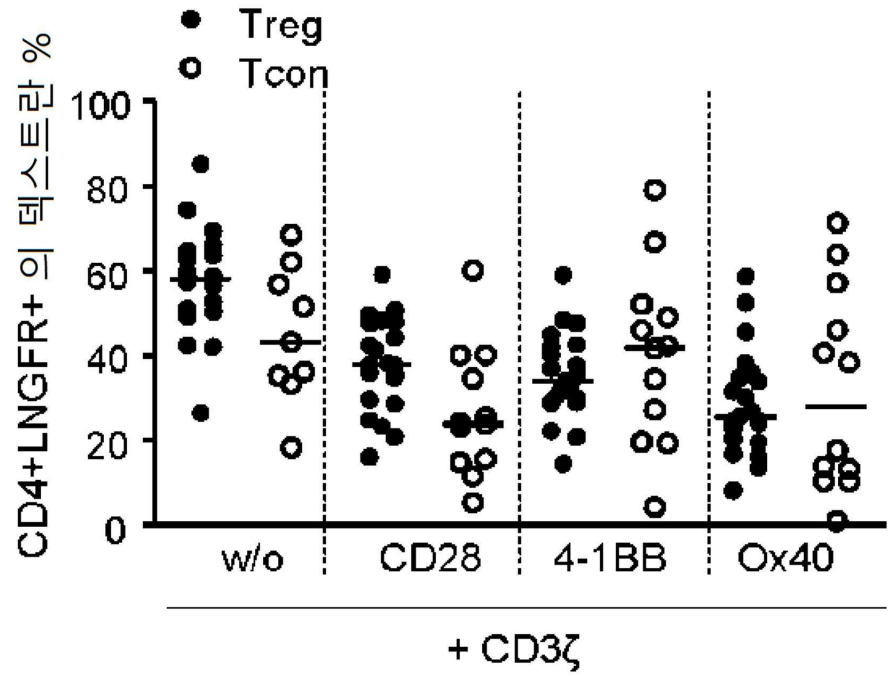
도면3c


항-CD3/-CD28
w/o-CD3ζ
4-1BB-CD3ζ
CD28-CD3ζ
ICOS-CD3ζ
Ox40-CD3ζ
(GAPDH에 대한) 상대적 발현
d0에 대한 배수
100
10
1
0.1
d0
d5
d14
d21
d28

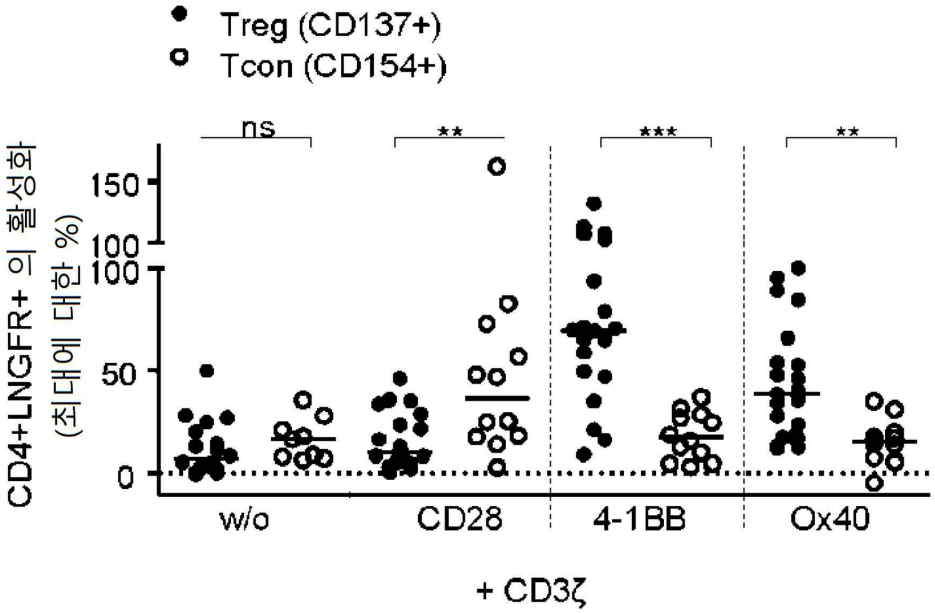
도면3d


덱스트란 (비드-결합됨)
w/o-CD3ζ
4-1BB-CD3ζ
CD28-CD3ζ
ICOS-CD3ζ
Ox40-CD3ζ
(GAPDH에 대한) 상대적 발현
d0에 대한 배수
100
10
1
0.1
d0
d5
d14
d21
d28

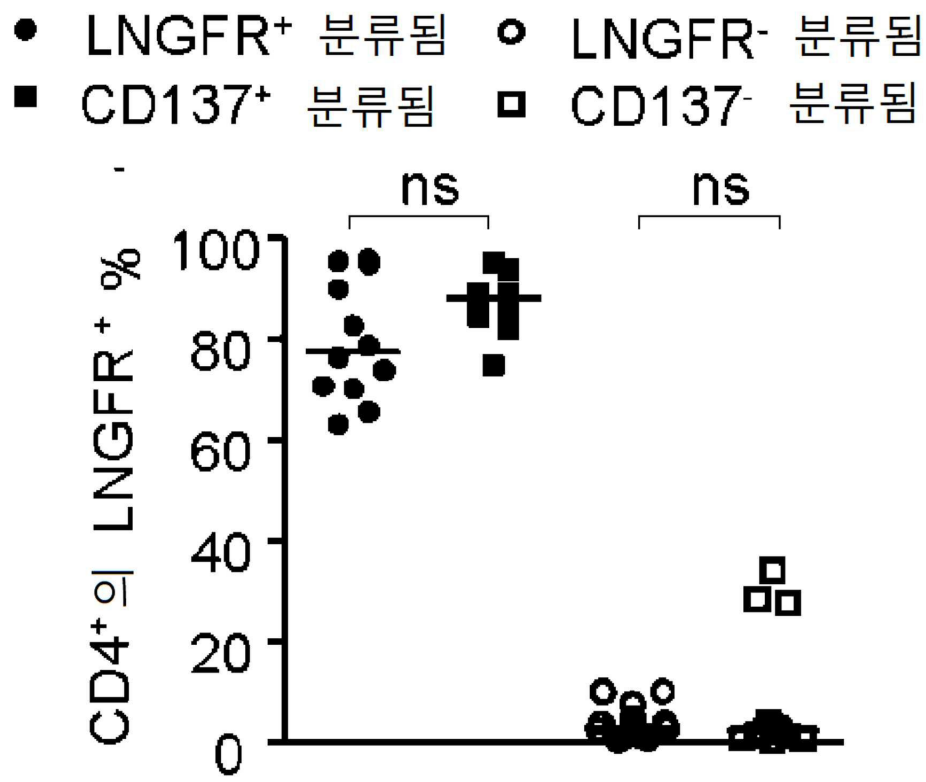
도면4a


Treg
Tcon
CD4+LNGFR+ 의 덱스트란 %
100
80
60
40
20
0
w/o
CD28
4-1BB
Ox40
+ CD3ζ

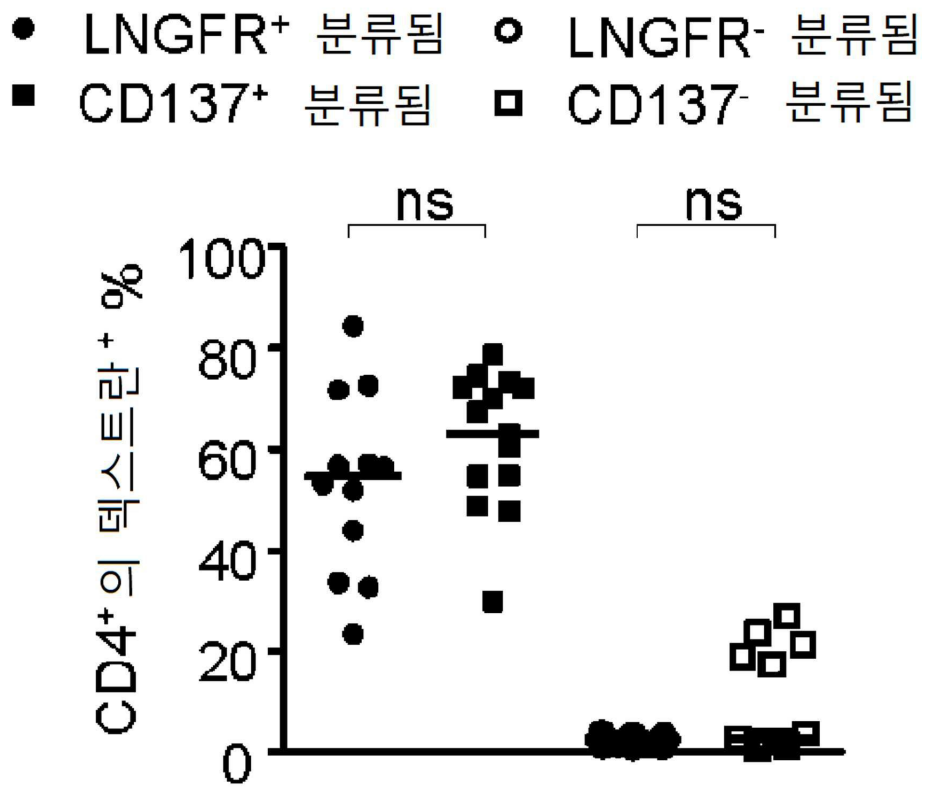
도면4b


Treg (CD137+)
Tcon (CD154+)
ns
**
***
**
CD4+LNGFR+ 의 활성화
(최대에 대한 %)
150
100
100
50
0
w/o
CD28
4-1BB
Ox40
+ CD3ζ

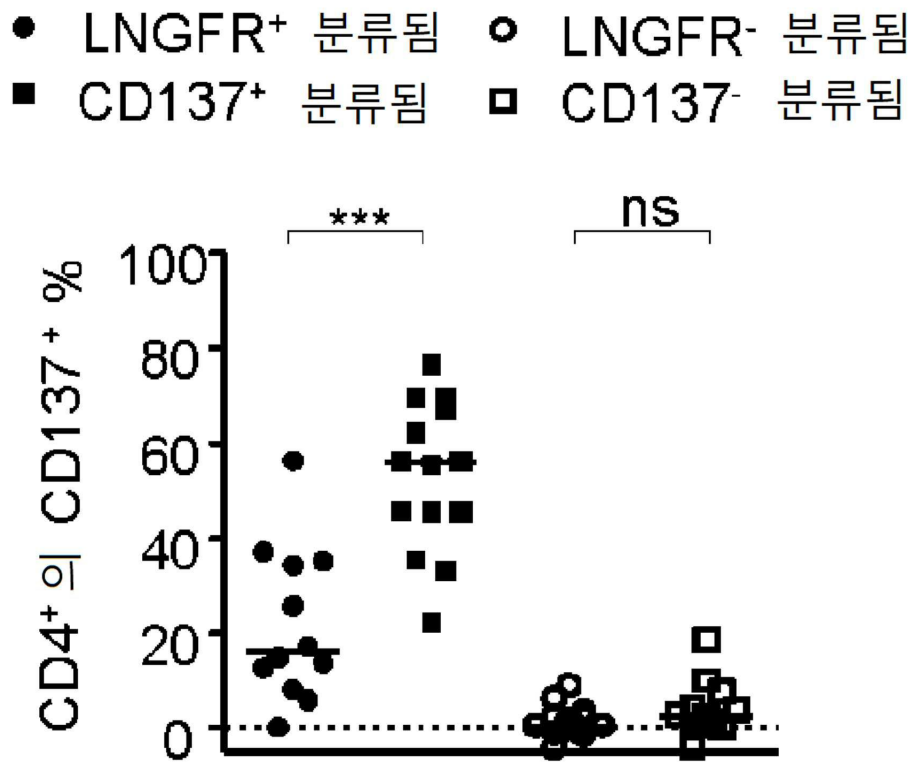
도면5a


LNGFR+ 분류됨
LNGFR- 분류됨
CD137+ 분류됨
CD137- 분류됨
ns
ns
CD4+의 LNGFR+ %
100
80
60
40
20
0

도면5b



도면5c



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> MILTENYI BIOTEC B.V. & CO. KG

<120> Regulatory T cell expressing a chimeric antigen receptor

<130> Mil_117

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> anti-dextran VH

<400> 1

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Pro Tyr Tyr Tyr Thr Ser Ser Ile Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 2

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> anti-dextran VL

<400> 2

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105