



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0132577
(43) 공개일자 2022년09월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/17 (2014.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 47/64 (2017.01) A61K 47/68 (2017.01)
C07K 16/28 (2006.01) C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/17 (2013.01)
A61K 47/64 (2017.08)

(21) 출원번호 10-2022-7029186

(22) 출원일자(국제) 2022년01월23일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2022년08월23일

(86) 국제출원번호 PCT/US2021/014811

(87) 국제공개번호 WO 2021/151038

국제공개일자 2021년07월29일

(30) 우선권주장

62/965,593 2020년01월24일 미국(US)

(71) 출원인

더 트러스티스 오브 더 유니버시티 오브 펜실베이니아

미국 19104 펜실베이니아주 필라델피아 9층 씨빅 센터
볼러바드 3600

(72) 발명자

파월, 다니엘 제이., 주니어

미국 19004 펜실베이니아 발라 신위드 아베르달레
로드 36

췌르카스, 앤드류

미국 19010 펜실베이니아 브린 마 스톤 크릭 레인
19

미누톨로, 니콜라스

미국 19125 펜실베이니아 필라델피아 이. 버크스 스트리트
1139

(74) 대리인

특허법인필앤은지

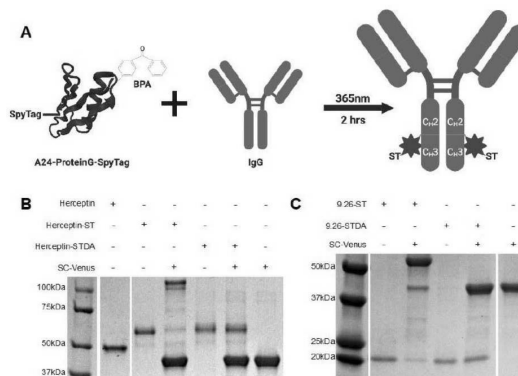
전체 청구항 수 : 총 78 항

(54) 발명의 명칭 범용 면역 수용체를 발현하는 조작된 세포 활성의 양적 제어

(57) 요약

본 발명은 스파이캐처 또는 스파이태그 모이어티와 같은 어댑터 분자, 막횡단 도메인 및 T 세포 활성화를 위한 세포내 도메인을 포함하는 범용 면역 수용체를 발현하도록 조작된 세포를 사용하여 포유동물 내에서 범용 면역 수용체-매개된 반응을 자극하는 방법을 제공한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 47/6849 (2017.08)
A61K 47/6851 (2017.08)
A61K 47/6855 (2017.08)
A61K 47/6891 (2017.08)
C07K 16/2863 (2013.01)
C07K 16/2887 (2013.01)
C07K 16/30 (2013.01)
C07K 16/32 (2013.01)
C12N 5/0636 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

포유동물 내 종양에 대한 범용 면역 수용체-매개된 면역 반응을 자극하는 방법으로서, 여기서 종양은 적어도 2개의 상이한 항원을 공동-발현하고, 상기 방법은 다음을 포함하는 것인 방법:

- (a) T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 세포를 포유동물에게 투여하는 것,
- (b) 상호 어댑터 분자에 연결된 제1 제제를 포유동물에게 투여하는 것, 여기서 제1 제제는 종양에 의해 발현되는 제1 항원에 특이적으로 결합함, 그리고
- (c) 상호 어댑터 분자에 연결된 제2 제제를 포유동물에게 투여하는 것, 여기서 제2 제제는 종양에 의해 발현되는 제2 항원에 특이적으로 결합하고, 그리고 여기서 제1 항원 및 제2 항원은 상이한 항원임.

청구항 2

암 치료를 필요로 하는 포유동물 내 암을 치료하는 방법으로서, 상기 암은 적어도 2개의 상이한 항원을 공동-발현하고, 상기 방법은 다음을 포함하는 것인 방법:

- (a) T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 세포의 유효량을 포유동물에게 투여하는 것,
- (b) 상호 어댑터 분자에 연결된 제1 제제의 유효량을 포유동물에게 투여하는 것, 여기서 제1 제제는 암에 의해 발현되는 제1 항원에 특이적으로 결합함, 그리고
- (c) 상호 어댑터 분자에 연결된 제2 제제의 유효량을 포유동물에게 투여하는 것, 여기서 제2 제제는 암에 의해 발현되는 제2 항원에 특이적으로 결합하고, 그리고 여기서 제1 항원 및 제2 항원은 상이한 항원임.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 세포의 도메인이 스파이캐처(SpyCatcher) 또는 스파이태그(SpyTag)를 포함하는 것인 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및/또는 제2 제제가 스파이태그 또는 스파이캐처에 연결되는 것인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및/또는 제2 제제가 항체, 항체 단편, scFv, 또는 DARP인 것인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및/또는 제2 제제가 항체이고 그리고 인간 IgG인 것인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상호 어댑터 분자, 스파이태그, 또는 스파이캐처가 광 활성화 사이트-특이적 컨쥬게이션(light activated site-specific conjugation; LASIC)을 통해 제1 및/또는 제2 제제에 연결되는 것인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 세포독성 T 림프구(CTL), 대식

세포, 줄기 세포, 또는 조절 T 세포인 것인 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 자가(autoologous) 세포인 것인 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 수용체가 공동자극 분자의 세포내 도메인을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 공동자극 분자가 4-1BB, CD28, CD27, CD2, CD3, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능-관련 항원-1(LFA-1), CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 또는 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드인 것인 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 예비-무장된 세포를 생성하기 위해 포유동물에 투여하기에 앞서 세포를 제1 및/또는 제2 제제와 접촉시키고, 예비-무장된 세포를 후속적으로 포유동물에게 투여하는 것인 방법.

청구항 13

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 포유동물에게 제1 및/또는 제2 제제를 투여하기에 앞서 세포가 포유동물에게 투여되는 것인 방법.

청구항 14

종양에 대한 용해 활성 레벨을 생성하는 방법으로서, 다음을 포함하는 것인 방법:

(a) 세포의 양을 상호 어댑터 분자에 연결된 제제의 양과 접촉시키는 것, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형되고, 여기서 세포외 도메인은 어댑터 분자를 포함하고, 여기서 제제는 종양에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고, 그리고 여기서 제제의 양 및/또는 세포의 양은 종양에 대한 용해 활성 레벨을 생성하도록 선택됨.

청구항 15

암의 치료를 필요로 하는 포유동물 내 암을 치료하는 방법으로서, 다음을 포함하는 것인 방법:

(a) T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 세포의 양을 포유동물에게 투여하는 것, 및

(b) 상호 어댑터 분자에 연결된 제제의 양을 포유동물에게 투여하는 것, 여기서 제제는 암에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고, 여기서 세포의 양 및/또는 제제의 양은 암에 대한 용해 활성 레벨을 제공하도록 선택됨.

청구항 16

제14항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 세포의 양에 비해 제제의 양을 증가시키는 것은 용해 활성의 레벨을 증가시키고 세포의 양에 비해 제제의 양을 감소시키는 것은 용해 활성의 레벨을 감소시키는 것인 방법.

청구항 17

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 세포의 도메인은 스파이캐처 또는 스파이태그를 포함하는 것인 방법.

청구항 18

제14항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 제제는 스파이태그 또는 스파이캐처에 연결되는 것인 방법.

청구항 19

제14항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 제제는 항체, 항체 단편, scFv, 또는 DARPin인 것인 방법.

청구항 20

제14항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 제제는 항체이고 그리고 인간 IgG인 것인 방법.

청구항 21

제14항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상호 어댑터 분자, 스파이태그 또는 스파이캐처가 광 활성화 사이트-특이적 컨쥬게이션(LASIC)을 통해 제제에 연결되는 것인 방법.

청구항 22

제14항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 세포는 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 세포독성 T 림프구(CTL), 대식세포, 줄기 세포, 또는 조절 T 세포인 것인 방법.

청구항 23

제14항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 세포는 자가 세포인 것인 방법.

청구항 24

제14항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 수용체는 공동자극 분자의 세포내 도메인을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 25

제14항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 공동자극 분자가 4-1BB, CD28, CD27, CD2, CD3, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능-관련 항원-1(LFA-1), CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 또는 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드인 것인 방법.

청구항 26

제15항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 예비-무장된 세포를 생성하기 위해 포유동물에 투여하기 전에 세포를 제제와 접촉시키고, 예비-무장된 세포를 포유동물에 후속적으로 투여하는 것인 방법.

청구항 27

제15항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 포유동물에게 제제를 투여하기에 전에, 세포를 포유동물에게 투여하는 것인 방법.

청구항 28

이를 필요로 하는 포유동물 내 종양에 대한 범용 면역 수용체-매개된 면역 반응을 자극하는 방법으로서, 다음을 포함하는 것인 방법:

- (a) T 세포 수용체 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 세포를 포유동물에게 투여하는 것, 및
- (b) 상호 어댑터 분자에 연결된 제제를 포유동물에게 후속적으로 투여하는 것, 여기서 제제는 종양에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합함.

청구항 29

암의 치료를 필요로 하는 포유동물 내 암을 치료하는 방법으로서, 다음을 포함하는 것인 방법:

- (a) T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 T 세포의 유효량을 포유동물에게 투여하는 것, 및
- (b) 상호 어댑터 분자에 연결된 제제의 유효량을 포유동물에게 후속적으로 투여하는 것, 여기서 제제는 암에 의

해 발현되는 항원에 특이적으로 결합함.

청구항 30

제28항 또는 제29항에 있어서, 세포외 도메인은 스파이크처 또는 스파이태그를 포함하는 것인 방법.

청구항 31

제28항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 제제는 스파이태그 또는 스파이크처에 연결되는 것인 방법.

청구항 32

제28항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 제제는 항체, 항체 단편, scFv, 또는 DARP인 것인 방법.

청구항 33

제28항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 제제는 항체이고 그리고 인간 IgG인 것인 방법.

청구항 34

제28항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상호 어댑터 분자, 스파이태그 또는 스파이크처가 광 활성화 사이트-특이적 컨쥬게이션(LASIC)을 통해 제제에 연결된 것인 방법.

청구항 35

제28항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 세포는 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 세포독성 T 림프구(CTL), 대식세포, 줄기 세포, 또는 조절 T 세포인 것인 방법.

청구항 36

제28항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 세포는 자가 세포인 것인 방법.

청구항 37

제28항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 수용체는 공동자극 분자의 세포내 도메인을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 38

제28항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 공동자극 분자는 4-1BB, CD28, CD27, CD2, CD3, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능-관련 항원-1(LFA-1), CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 또는 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드인 것인 방법.

청구항 39

세포 표면 상의 범용 면역 수용체의 턴오버를 정량화하는 방법으로서, 다음을 포함하는 것인 방법:

(a) T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 세포를 상호 어댑터 분자에 연결된 제제와 접촉시키는 것; 및

(b) 참조량(reference amount)에 대하여 무장된 수용체의 양을 결정하는 것.

청구항 40

제39항에 있어서, 참조량은 앞선 시점의 무장된 수용체의 양인 것인 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 무장된 수용체의 양은 제제를 표지하고 표지된 제제를 검출함으로써 결정되는 것인 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 제제는 다음을 포함하는 표지 분자를 갖는 제제와 연결 또는 접촉하는 것에 의해 표지된 것인 방법: myc-태그, FLAG-태그, His-태그, HA-태그, 형광 단백질(예컨대, 녹색 형광 단백질(GFP)), 형광단(예컨대, 테트라메틸로다민(TRITC)), 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 디니트로페놀, 페리딘 클로로필 단백질 복합체, 피코에리트린(PE), 히스티딘, 비오틴, 스트렙타비딘, 아비딘, 호스 래디시 페록시다제, 팔미토일화, 니트로실화, 알칼라인 포스파타제, 글루코스 옥시다제, 글루타티온 S-트랜스퍼라제(GST), 말토스 결합 단백질, 방사성 동위원소, 중금속, 초자성 나노입자, 및 1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산(DOTA), 디에틸렌 트리아민 펜타아세트산(DTPA), 1,4,7-트리아자사이클로노난-1,4,7-트리아세트산(NOTA) 또는 알로피코시아닌(APC)을 포함하는 방사성 동위원소 표지에 사용되는 임의의 유형의 화합물.

청구항 43

제39항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, (c) 세포 및 제제를 종양 세포와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 44

제39항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 세포의 도메인은 스파이캐처를 포함하는 것인 방법.

청구항 45

제39항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 제제는 스파이태그에 연결되는 것인 방법.

청구항 46

제39항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 제제는 항체, 항체 단편, scFv, 또는 DARP인 것인 방법.

청구항 47

제39항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 제제는 항체이고 그리고 인간 IgG인 것인 방법.

청구항 48

제39항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 세포는 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 세포독성 T 림프구(CTL), 대식세포, 줄기 세포, 또는 조절 T 세포인 것인 방법.

청구항 49

제39항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 수용체는 공동자극 분자의 세포내 도메인을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 50

제39항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 공동자극 분자는 4-1BB, CD28, CD27, CD2, CD3, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능-관련 항원-1(LFA-1), CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 또는 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드인 것인 방법.

청구항 51

이를 필요로 하는 포유동물 내 종양에 대한 범용 면역 수용체-매개된 면역 반응을 자극하는 방법으로서, 다음을 포함하는 것인 방법:

(a) T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 4-1BB의 세포내 도메인, 막형단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 세포의 유효량을 포유동물에게 투여하는 것, 및

(b) 상호 어댑터 분자에 연결된 제제의 유효량을 포유동물에게 투여하는 것, 여기서 제제는 종양에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고,

여기서 종양은 참조 레벨에 비해 증가된 레벨로 항원을 발현하도록 미리-결정된 것임.

청구항 52

이를 필요로 하는 포유동물 내 암을 치료하는 방법으로서, 다음을 포함하는 것인 방법:

(a) T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 4-1BB의 세포내 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 세포의 양을 포유동물에게 투여하는 것, 및

(b) 상호 어댑터 분자에 연결된 제제의 양을 포유동물에게 투여하는 것, 여기서 제제는 암에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고,

여기서 암은 참조 레벨에 비해 증가된 레벨로 항원을 발현하도록 미리-결정된 것임.

청구항 53

제51항 또는 제52항에 있어서, 참조 레벨은 건강한 조직 상의 항원의 발현 레벨인 것인 방법.

청구항 54

제51항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 세포의 도메인은 스파이캐처 또는 스파이태그를 포함하는 것인 방법.

청구항 55

제51항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 제제는 스파이태그 또는 스파이캐처에 연결되는 것인 방법.

청구항 56

제51항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 제제는 항체, 항체 단편, scFv, 또는 DARPIn인 것인 방법.

청구항 57

제51항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 제제는 항체이고 그리고 인간 IgG인 것인 방법.

청구항 58

제51항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 스파이태그 또는 스파이캐처는 광 활성화 사이트-특이적 컨쥬게이션(LASIC)을 통해 제제에 연결되는 것인 방법.

청구항 59

제51항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 세포는 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 세포독성 T 림프구(CTL), 대식세포, 줄기 세포, 또는 조절 T 세포인 것인 방법.

청구항 60

제51항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 세포는 자가 세포인 것인 방법.

청구항 61

제51항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 예비-무장된 세포를 생성하기 위해 포유동물에 투여하기에 앞서 세포를 제제와 접촉시키고, 예비-무장된 세포를 포유동물에 후속적으로 투여하는 것인 방법.

청구항 62

제51항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 포유동물에게 제제를 투여하기에 앞서 세포를 포유동물에게 투여하는 것인 방법.

청구항 63

이를 필요로 하는 포유동물 내 종양에 대한 범용 면역 수용체-매개된 면역 반응을 자극하는 데 사용하기 위한, 유전적으로 변형된 세포, 제1 제제, 및 제2 제제, 여기서 종양은 적어도 2개의 상이한 항원을 공동-발현하고,

여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형되고,

여기서 제1 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제1 제제는 종양에 의해 발현되는 제1 항원에 특이적으로 결합하고;

여기서 제2 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제2 제제는 종양에 의해 발현되는 제2 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 제1 항원 및 제2 항원은 상이한 항원이고, 그리고

여기서 면역 수용체, 제1 제제 및 제2 제제는 포유동물에게 투여됨.

청구항 64

이를 필요로 하는 포유동물 내 암을 치료하는데 사용하기 위한, 유전적으로 변형된 세포, 제1 제제, 및 제2 제제, 여기서 암은 적어도 2개의 상이한 항원을 공동-발현하고,

여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형되고,

여기서 제1 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제1 제제는 암에 의해 발현되는 제1 항원에 특이적으로 결합하고;

여기서 제2 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제2 제제는 암에 의해 발현되는 제2 항원에 특이적으로 결합하고; 그리고 여기서 제1 항원 및 제2 항원은 상이한 항원임.

청구항 65

종양에 대한 용해 활성 레벨을 생성하는 데 사용하기 위한, 유전적으로 변형된 세포 및 제제, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 여기서 제제는 종양에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 세포의 양은 제제의 양과 접촉되고, 여기서 세포의 양에 대한 제제의 양은 종양에 대한 용해 활성 레벨을 생성하도록 선택됨.

청구항 66

이를 필요로 하는 포유동물 내 암을 치료하는데 사용하기 위한, 유전적으로 변형된 세포 및 제제, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제제는 암에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 세포의 양 및 제제의 양은 포유동물에게 투여되고, 여기서 세포의 양 및/또는 제제의 양은 암에 대한 용해 활성 레벨을 제공하도록 선택됨.

청구항 67

이를 필요로 하는 포유동물 내 종양에 대한 범용 면역 수용체-매개된 면역 반응을 자극하는 데 사용하기 위한, 유전적으로 변형된 세포 및 제제, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 여기서 제제는 종양에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 세포의 양은 포유동물에게 투여되고 제제의 양은 후속적으로 포유동물에게 투여됨.

청구항 68

이를 필요로 하는 포유동물 내 암을 치료하는데 사용하기 위한, 유전적으로 변형된 세포 및 제제, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제제는 암에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하는 것이고; 여기서 세포의 양은 포유동물에게 투여되고 제제의 양은 후속적으로 포유동물에게 투여됨.

청구항 69

이를 필요로 하는 포유동물 내 종양에 대한 범용 면역 수용체-매개된 면역 반응을 자극하는 데 사용하기 위한, 유전적으로 변형된 세포 및 제제,

여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 4-1BB의 세포내 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고,

여기서, 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고,

여기서 제제는 종양에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고;

여기서 세포의 유효량은 포유동물에게 투여되고 제제의 유효량은 포유동물에게 투여되고, 그리고

여기서 종양은 참조 레벨에 비해 증가된 레벨로 항원을 발현하도록 미리-결정된 것임.

청구항 70

이를 필요로 하는 포유동물 내 암을 치료하는데 사용하기 위한, 유전적으로 변형된 세포 및 제제, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 4-1BB의 세포내 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제제는 종양에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 세포의 유효량은 포유동물에게 투여되고 제제의 유효량은 포유동물에게 투여되고, 그리고 여기서 종양은 참조 레벨에 비해 증가된 레벨로 항원을 발현하도록 미리-결정된 것임.

청구항 71

이를 필요로 하는 포유동물 내 종양에 대한 범용 면역 수용체-매개된 면역 반응을 자극하는데 있어서, 유전적으로 변형된 세포, 제1 제제, 및 제2 제제의 용도, 여기서 종양은 적어도 2개의 상이한 항원을 공동-발현하고,

여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고,

여기서 제1 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제1 제제는 종양에 의해 발현되는 제1 항원에 특이적으로 결합하고;

여기서 제2 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제2 제제는 종양에 의해 발현되는 제2 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 제1 항원 및 제2 항원은 상이한 항원이고, 그리고

여기서 면역 수용체, 제1 제제 및 제2 제제는 포유동물에게 투여됨.

청구항 72

이를 필요로 하는 포유동물 내 암의 치료에 있어서, 유전적으로 변형된 세포, 제1 제제, 및 제2 제제의 용도, 여기서 암은 적어도 2개의 상이한 항원을 공동-발현하고,

여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고,

여기서 제1 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제1 제제는 암에 의해 발현되는 제1 항원에 특이적으로 결합하고;

여기서 제2 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제2 제제는 암에 의해 발현되는 제2 항원에 특이적으로 결합하고; 그리고 여기서 제1 항원 및 제2 항원은 상이한 항원임.

청구항 73

종양에 대한 용해 활성 레벨을 생성하는데 있어서, 유전적으로 변형된 세포 및 제제의 용도, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제제는 종양에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 세포의 양은 제제의 양과 접촉되고, 그리고 여기서 세포의 양에 대한 제제의 양은 종양에 대한 용해 활성 레벨을 생성하도록 선택된 것임.

청구항 74

이를 필요로 하는 포유동물 내 암의 치료에 있어서, 유전적으로 변형된 세포 및 제제의 용도, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제제는 암에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 세포의 양 및 제제의 양은 포유동물에게 투여되고, 여기서 세포의 양 및/또는 제제의 양은 암에 대한 용해 활성 레벨을 제공하도록 선택된 것임.

청구항 75

이를 필요로 하는 포유동물 내 종양에 대한 범용 면역 수용체-매개된 면역 반응을 자극하는데 있어서, 유전적으로 변형된 세포 및 제제의 용도, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제제는 종양에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 세포의 양은 포유동물에게 투여되고, 제제 양은 후속적으로 포유동물에게 투여됨.

청구항 76

이를 필요로 하는 포유동물 내 암의 치료에 있어서, 유전적으로 변형된 세포의 용도, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제제는 암에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 세포의 양은 포유동물에게 투여되고 제제의 양은 후속적으로 포유동물에게 투여됨.

청구항 77

이를 필요로 하는 포유동물 내 종양에 대한 범용 면역 수용체-매개된 면역 반응을 자극하는데 있어서, 유전적으로 변형된 세포 및 제제의 용도, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 4-1BB의 세포내 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제제는 종양에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 세포의 유효량은 포유동물에게 투여되고 제제의 유효량은 포유동물에게 투여되고, 그리고 여기서 종양은 참조 레벨에 비해 증가된 레벨로 항원을 발현하도록 미리-결정된 것임.

청구항 78

이를 필요로 하는 포유동물 내 암의 치료에 있어서, 유전적으로 변형된 세포 및 제제의 용도, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 4-1BB의 세포내 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제제는 종양에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 세포의 유효량은 포유동물에게 투여되고 제제의 유효량은 포유동물에게 투여되고, 그리고 여기서 종양은 참조 레벨에 비해 증가된 레벨로 항원을 발현하도록 미리-결정된 것임.

발명의 설명**기술 분야**

[0001]

관련 출원에 대한 상호 참조

[0002]

본 출원은 35 U.S.C. § 119(e)하에서 2020년 1월 24일자로 출원된 미국 가특허출원 번호 제62/965,593호에 대한 우선권을 수여받으며, 이는 그 전체가 본 명세서에 참조에 의하여 통합된다.

[0003]

연방 후원에 관한 진술

[0004]

연구 또는 개발

[0005] 이 발명은 국립 보건원에서 수여한 CA168900 및 CA016520 하의 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 발명에 대한 특정 권리를 가지고 있다.

배경 기술

[0006] 키메라 항원 수용체(CAR) T 세포는 특정 혈액 악성종양(hematological malignancies)의 치료에서 극적인 반응을 매개할 수 있어, 두 가지 CD19-표적 CAR T 세포 제품에 대한 FDA 승인을 이끌어 냈는데, 이는 재발/불응성(relapse/refractory; r/r) B 세포 급성 림프모구성 백혈병(B cell acute lymphoblastic leukemia; B-ALL) 및 미만성 거대 B-세포 림프종(diffuse large B-cell lymphoma; DLBCL)의 치료를 위한 티사젠레클레이셀(tisagenlecleucel) 및 (r/r) 거대 B 세포 림프종의 치료를 위한 액시캅타진 실로류셀(axicabtagene ciloleucel)이다. CD19 CAR T 세포 치료된 환자의 높은 관해율과 종양 없는 연장된 생존으로 인해, 이 분야는 다른 악성종양으로의 그들의 사용을 확대했다. BCMA, CD20 및 CD22와 같은 다른 B 세포 특이적 항원을 표적으로 하는 CAR T 세포의 임상 시험은 고무적인 결과를 낳았지만, CAR T 세포 요법의 광범위한 성공이 혈액 악성종양 및 고형 종양에서 달성되기 전에, 고유한 독성 및 후속 재발과 관련된 것들을 포함하여 여러 문제를 해결할 필요가 있다.

[0007] CAR은 세포내 T 세포 신호전달 및 공동자극 도메인(예: CD3 ζ 과 함께 41BB 및/또는 CD28)에 부착된 scFv와 같은 세포외 항원 표적화 도메인으로 구성되어, 항원-특이적, MHC-비의존적 T 세포 표적화를 가능하게 한다. 이 디자인은 단일 항원 표적화에 사용되기에 효과적이기는 하지만, 여러 종양 유형에 걸쳐 CAR T 세포의 사용을 확대하는 데 고유한 한계가 있으며, 그 뿐만 아니라 심각한 부작용 및 독성 가능성이 있다.

[0008] 대부분의 약물은 용량 조절을 허용하고 예측 가능한 약동학(pharmacokinetics) 및 약력학(pharmacodynamics)을 따르는 반면, 기존의 CAR T 세포 요법은 그들의 인퓨전(infusion) 후 쉽게 제어할 수 없는 살아있는 약물이다. 표적 항원이 인식되면 투여된 CAR T 세포는 수용자에서 빠르게 많은 수로 증식하고 전염증성 사이토카인을 방출할 수 있으며, 경우에 따라 의료적 관리가 필요한 사이토카인 방출 증후군(CRS), 신경 독성 또는 뇌수종(cerebral edema)과 같은 심각하고 때로는 치명적인 부작용을 유발할 수 있다. 어떤 경우에는 CAR T 세포가 표적 항원을 또한 발현하는 비-악성 조직을 표적으로 삼고 파괴하여, 잠재적으로 치명적인 표적-상(on-target) 종양-외(off-tumor) 독성을 유발한다.

[0009] 이러한 문제 외에도, 경직된 CAR 아키텍처는 또한 단일 종양 관련된 항원(TAA)에 대한 표적화도 제한한다. 비록 이 접근법은 CD19와 같은 유비쿼터스 범(pan)-B 세포 마커를 표적화할 때 효과적일 수 있지만, 이질적인 TAA 발현을 갖는 종양을 표적화하거나 재발된 항원-음성 종양의 설정에서 그 효과가 손상된다. 티사젠레클레이셀(tisagenlecleucel) CD19 CAR T 세포 수용자의 약 35%가 치료 후 재발하고, 재발된 질병의 절반 이상이 비기능적이거나 막항단 도메인이 없는 단백질 절단으로 인한 CD19 항원 손실의 유전적 메커니즘과 관련이 있다. 항원 손실의 대체 메커니즘에는 표적 항원 에피토프가 결여된 항원 스플라이스 변이체의 출현, 종양 세포 계통 전환, CD19 항원의 트로고사이토시스(trogocytosis) 및 드문 경우이지만 백혈병 B 세포 속으로의 CAR 유전자의 우발적인 도입이 포함된다. 단일 항원 표적화는 또한 다양한 항원 발현 패턴을 갖는 종양 세포로 종종 구성되는 고형 종양의 치료에서 문제가 된다. 이 경우 단일 항원의 선택적 표적화는 EGFRvIII의 표적화에서 보고된 바와 같이, 불완전한 제거 및 적응 내성을 유발할 수 있다.

[0010] 부작용 및 종양-외(off-tumor) 독성을 최소화하는 종양을 표적화하기 위한 면역 요법을 위한 조성물 및 방법이 당업계에 분명히 필요하다. 본 발명은 당업계에서 이러한 충족되지 않은 요구를 다룬다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 명세서에 기재된 바와 같이, 본 발명은 스파이캐처(SpyCatcher) 또는 스파이태그(SpyTag) 모이어티, 막항단 도메인, 및 T 세포 활성화를 위한 세포내 도메인과 같은, 어댑터 분자를 포함하는 범용(universal) 면역 수용체를 발현하도록 조작된 세포를 사용하여 포유동물에서 범용 면역 수용체-매개된 반응을 자극하는 방법에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 한 측면에서, 본 발명은 포유동물 내 종양에 대한 범용 면역 수용체-매개된 면역 반응을 자극하는 방법을 제공하며, 여기서 종양은 적어도 2개의 상이한 항원을 공동-발현하고, 상기 방법은 다음을 포함한다: (a) T 세포 수

용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 세포를 포유동물에게 투여하는 것, (b) 상호 어댑터 분자에 연결된 제1 제제를 포유동물에게 투여하는 것, 여기서 제1 제제는 종양에 의해 발현되는 제1 항원에 특이적으로 결합한다, 그리고 (c) 상호 어댑터 분자에 연결된 제2 제제를 포유동물에게 투여하는 것, 여기서 제2 제제는 종양에 의해 발현되는 제2 항원에 특이적으로 결합하고, 그리고 여기서 제1 항원 및 제2 항원 서로 다른 항원이다.

[0013] 다른 측면에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 포유동물에서 암을 치료하는 방법을 제공하는데, 여기서 암은 적어도 2개의 상이한 항원을 공동-발현하는 것이고, 상기 방법은 다음을 포함한다: (a) T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 세포의 유효량을 포유동물에게 투여하는 것, (b) 상호 어댑터 분자에 연결된 제1 제제의 유효량을 포유동물에게 투여하는 것, 여기서 제1 제제는 암에 의해 발현되는 제1 항원에 특이적으로 결합한다, 그리고 (c) 상호 어댑터 분자에 연결된 제2 제제의 유효량을 포유동물에게 투여하는 것, 여기서 제2 제제는 암에 의해 발현되는 제2 항원에 특이적으로 결합하고, 그리고 여기서 제1 항원 및 제2 항원 서로 다른 항원이다.

[0014] 특정 구현예에서, 세포외 도메인은 스파이캐처 또는 스파이태그를 포함한다.

[0015] 특정 구현예에서, 제1 및/또는 제2 제제는 스파이태그 또는 스파이캐처에 연결된다.

[0016] 특정 구현예에서, 제1 및/또는 제2 제제는 항체, 항체 단편, scFv, 또는 DARP인이다.

[0017] 특정 구현예에서, 제1 및/또는 제2 제제는 항체이고 인간 IgG이다.

[0018] 특정 구현예에서, 상호 어댑터 분자, 스파이태그, 또는 스파이캐처는 광 활성화 사이트-특이적 컨주게이션(light activated site-specific conjugation; LASIC)을 통해 제1 및/또는 제2 제제에 연결된다.

[0019] 특정 구현예에서, 세포는 T 세포, 자연 살해(Natural Killer; NK) 세포, 세포독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocyte; CTL), 대식세포, 줄기 세포, 또는 조절 T 세포이다.

[0020] 특정 구현예에서, 세포는 자가 세포이다.

[0021] 특정 구현예에서, 면역 수용체는 공동자극 분자의 세포내 도메인을 추가로 포함한다.

[0022] 특정 구현예에서, 공동자극 분자는 4-1BB, CD28, CD27, CD2, CD3, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능 관련 항원-1(lymphocyte function-associated antigen-1; LFA-1), CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 또는 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드이다.

[0023] 특정 구현예에서, 세포는 예비-무장된 세포를 생성하기 위해 포유동물에 투여되기 전에 제1 및/또는 제2 제제와 접촉되고 예비-무장된 세포는 후속적으로 포유동물에게 투여된다.

[0024] 특정 구현예에서, 포유동물에게 제1 및/또는 제2 제제를 투여하기 전에 세포를 포유동물에게 투여한다.

[0025] 다른 측면에서, 본 발명은 종양에 대한 용해 활성 레벨을 생성하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 다음을 포함한다: (a) 세포 양을 상호 어댑터 분자에 연결된 제제의 양과 접촉시키는 것, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형되고, 여기서 세포외 도메인은 어댑터 분자를 포함하고, 여기서 제제는 종양에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고, 그리고 여기서 제제의 양 및/또는 세포의 양은 종양에 대한 용해 활성 레벨을 생성하도록 선택된다.

[0026] 다른 측면에서, 본 발명은 암의 치료를 필요로 하는 포유동물 내 암을 치료하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 다음을 포함하는 것이다: (a) T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 세포의 양을 포유동물에게 투여하는 것, 및 (b) 상호 어댑터 분자에 연결된 제제의 양을 포유동물에게 투여하는 것, 여기서 제제는 암에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고, 여기서 세포의 양 및/또는 제제의 양은 암에 대한 용해 활성 레벨을 제공하도록 선택된다.

[0027] 특정 구현예에서, 세포의 양에 비해 제제의 양을 증가시키는 것은 용해 활성 레벨을 증가시키고 세포의 양에 비해 제제의 양을 감소시키는 것은 용해 활성 레벨을 감소시킨다.

[0028] 특정 구현예에서, 세포외 도메인은 스파이캐처 또는 스파이태그를 포함한다.

- [0029] 특정 구현예에서, 제제는 스파이태그 또는 스파이캐처에 연결된다.
- [0030] 특정 구현예에서, 제제는 항체, 항체 단편, scFv, 또는 DARPIn이다.
- [0031] 특정 구현예에서, 제제는 항체이고 인간 IgG이다.
- [0032] 특정 구현예에서, 상호 어댑터 분자, 스파이태그 또는 스파이캐처는 광 활성화 사이트-특이적 컨쥬게이션(LASIC)을 통해 제제에 연결된다.
- [0033] 특정 구현예에서, 세포는 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 세포독성 T 림프구(CTL), 대식세포, 줄기 세포, 또는 조절 T 세포이다.
- [0034] 특정 구현예에서, 세포는 자가 세포이다.
- [0035] 특정 구현예에서, 면역 수용체는 공동자극 분자의 세포내 도메인을 추가로 포함한다.
- [0036] 특정 구현예에서, 공동자극 분자는 4-1BB, CD28, CD27, CD2, CD3, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능 관련 항원-1(LFA-1), CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 또는 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드이다.
- [0037] 특정 구현예에서, 예비-무장된 세포를 생성하기 위해 포유동물에 투여하기 전에 세포를 제제와 접촉시키고 예비-무장된 세포를 포유동물에 후속적으로 투여한다.
- [0038] 특정 구현예에서, 포유동물에게 제제를 투여하기 전에 세포를 포유동물에게 투여한다.
- [0039] 다른 측면에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 포유동물 내 종양에 대한 범용 면역 수용체-매개된 면역 반응을 자극하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 다음을 포함한다: (a) T 세포 수용체 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 세포를 포유동물에게 투여하는 것, 및 (b) 상호 어댑터 분자에 연결된 제제를 포유동물에게 후속적으로 투여하는 것, 여기서 제제는 종양에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합한다.
- [0040] 다른 측면에서, 본 발명은 암의 치료를 필요로 하는 포유동물 내 암을 치료하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 다음을 포함한다: (a) T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 T 세포의 유효량을 포유동물에게 투여하는 것, 및 (b) 상호 어댑터 분자에 연결된 제제의 유효량을 포유동물에게 후속적으로 투여하는 것, 여기서 제제는 암에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합한다.
- [0041] 특정 구현예에서, 세포외 도메인은 스파이캐처 또는 스파이태그를 포함한다.
- [0042] 특정 구현예에서, 제제는 스파이태그 또는 스파이캐처에 연결된다.
- [0043] 특정 구현예에서, 제제는 항체, 항체 단편, scFv, 또는 DARPIn이다.
- [0044] 특정 구현예에서, 제제는 항체이고 인간 IgG이다.
- [0045] 특정 구현예에서, 상호 어댑터 분자, 스파이태그 또는 스파이캐처는 광 활성화 사이트-특이적 컨쥬게이션(LASIC)을 통해 제제에 연결된다.
- [0046] 특정 구현예에서, 세포는 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 세포독성 T 림프구(CTL), 대식세포, 줄기 세포, 또는 조절 T 세포이다.
- [0047] 특정 구현예에서, 세포는 자가 세포이다.
- [0048] 특정 구현예에서, 면역 수용체는 공동자극 분자의 세포내 도메인을 추가로 포함한다.
- [0049] 특정 구현예에서, 공동자극 분자는 4-1BB, CD28, CD27, CD2, CD3, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능 관련 항원-1(LFA-1), CD7, 라이트(LIGHT), NKG2C, B7-H3, 또는 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드이다.
- [0050] 다른 측면에서, 본 발명은 세포 표면 상의 범용 면역 수용체의 턴오버를 정량화하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 다음을 포함한다: (a) T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 세포를 상호 어댑터 분자에 연결된 제제와 접촉시키고, 이에 의하여 무장된 수용체를 생성시키는 것; 및 (b) 참조량(reference amount)에 대하여 무장된 수용체의 양을 결정하는 것.

- [0051] 특정 구현예에서, 참조량은 앞선 시점에서의 무장된 수용체의 양이다.
- [0052] 특정 구현예에서, 무장된 수용체의 양은 제제를 표지하고 표지된 제제를 검출함으로써 결정된다.
- [0053] 특정 구현예에서, 제제는 다음을 포함하는 표지 분자를 갖는 제제와 연결 또는 접촉하는 것에 의해 표지된다: myc-태그, FLAG-태그, His-태그, HA-태그, 형광 단백질(예컨대, 녹색 형광 단백질(GFP)), 형광단(예컨대, 테트라메틸로다민(TRITC)), 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 디니트로페놀, 페리딘 클로로필 단백질 복합체, 피코에리트린(PE), 히스티딘, 비오틴, 스트렙타비딘, 아비딘, 호스 래디시 페록시다제, 팔미토일화, 니트로실화, 알칼라닌 포스파타제, 글루코스 옥시다제, 글루타티온 S-트랜스퍼라제(GST), 말토스 결합 단백질, 방사성 동위원소, 중금속, 초자성 나노입자, 및 1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산(DOTA), 디에틸렌 트리아민 펜타아세트산(DTPA), 1,4,7-트리아자사이클로노난-1,4,7-트리아세트산(NOTA) 또는 알로피코시아닌(APC)을 포함하는 방사성 동위원소 표지에 사용되는 임의의 유형의 화합물.
- [0054] 특정 구현예에서, 방법은 (c) 세포 및 제제를 중앙 세포와 접촉시키는 단계 를 추가로 포함한다.
- [0055] 특정 구현예에서, 세포의 도메인은 스파이캐처를 포함한다.
- [0056] 특정 구현예에서, 제제는 스파이태그에 연결된다.
- [0057] 특정 구현예에서, 제제는 항체, 항체 단편, scFv, 또는 DARPIn이다.
- [0058] 특정 구현예에서, 제제는 항체이고 인간 IgG이다.
- [0059] 특정 구현예에서, 세포는 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 세포독성 T 림프구(CTL), 대식세포, 줄기 세포, 또는 조절 T 세포이다.
- [0060] 특정 구현예에서, 면역 수용체는 공동자극 분자의 세포내 도메인을 추가로 포함한다.
- [0061] 특정 구현예에서, 공동자극 분자는 4-1BB, CD28, CD27, CD2, CD3, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능 관련 항원-1(LFA-1), CD7, 라이트(LIGHT), NKG2C, B7-H3, 또는 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드이다.
- [0062] 다른 측면에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 포유동물 내 종양에 대한 범용 면역 수용체-매개된 면역 반응을 자극하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 다음을 포함한다: (a) T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 4-1BB의 세포내 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 세포의 유효량을 포유동물에게 투여하는 것, 및 (b) 상호 어댑터 분자에 연결된 제제의 유효량을 포유동물에게 투여하는 것, 여기서 제제는 종양에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고, 여기서 종양은 참조 레벨에 비해 증가된 레벨로 항원을 발현하도록 미리-결정된 것이다.
- [0063] 다른 측면에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 포유동물 내 암을 치료하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 다음을 포함한다: (a) T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 4-1BB의 세포내 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 세포의 양을 포유동물에게 투여하는 것, 및 (b) 상호 어댑터 분자에 연결된 제제의 양을 포유동물에게 투여하는 것, 여기서 제제는 암에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고, 여기서 암은 참조 레벨에 비해 증가된 레벨로 항원을 발현하도록 미리-결정된 것이다.
- [0064] 특정 구현예에서, 참조 레벨은 건강한 조직 상에서 항원의 발현 레벨이다.
- [0065] 특정 구현예에서, 세포외 도메인은 스파이캐처 또는 스파이태그를 포함한다.
- [0066] 특정 구현예에서, 제제는 스파이태그 또는 스파이캐처에 연결된다.
- [0067] 특정 구현예에서, 제제는 항체, 항체 단편, scFv, 또는 DARPIn이다.
- [0068] 특정 구현예에서, 제제는 항체이고 인간 IgG이다.
- [0069] 특정 구현예에서, 스파이태그 또는 스파이캐처는 광 활성화 사이트-특이적 컨쥬게이션(LASIC)을 통해 제제에 연결된다.
- [0070] 특정 구현예에서, 세포는 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 세포독성 T 림프구(CTL), 대식세포, 줄기 세포, 또는 조절 T 세포이다.
- [0071] 특정 구현예에서, 세포는 자가 세포이다.

- [0072] 특정 구현예에서, 예비-무장된 세포를 생성하기 위해 포유동물에 투여하기 전에 세포를 제제와 접촉시키고 예비-무장된 세포를 포유동물에 후속적으로 투여한다.
- [0073] 특정 구현예에서, 세포는 포유동물에게 제제를 투여하기 전에 포유동물에게 투여된다.
- [0074] 다른 측면에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 포유동물 내 종양에 대한 범용 면역 수용체-매개된 면역 반응을 자극하는 데 사용하기 위한, 유전적으로 변형된 세포, 제1 제제, 및 제2 제제를 제공하는데, 여기서 종양은 적어도 2개의 상이한 항원을 공동-발현하고, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형되고, 여기서 제1 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제1 제제는 제제는 종양에 의해 발현되는 제1 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 제2 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제2 제제는 종양에 의해 발현되는 제2 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 제1 항원 및 제2 항원은 상이한 항원이고, 그리고 여기서 면역 수용체, 제1 제제 및 제2 제제는 포유동물에게 투여된다.
- [0075] 다른 측면에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 포유동물 내 암을 치료하는데 사용하기 위한, 유전적으로 변형된 세포, 제1 제제, 및 제2 제제를 제공하는데, 여기서 암은 적어도 2개의 상이한 항원을 공동-발현하고, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형되고, 여기서 제1 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제1 제제는 암에 의해 발현되는 제1 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 제2 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제2 제제는 암에 의해 발현되는 제2 항원에 특이적으로 결합하고; 그리고 여기서 제1 항원 및 제2 항원은 상이한 항원이다.
- [0076] 다른 측면에서, 본 발명은 종양에 대한 용해 활성 레벨을 생성하는 데 사용하기 위한, 유전적으로 변형된 세포 및 제제를 제공하는데, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 여기서 제제는 종양에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 세포의 양은 제제의 양과 접촉되고, 그리고 여기서 세포의 양에 대한 제제의 양은 종양에 대한 용해 활성 레벨을 생성하도록 선택된다.
- [0077] 다른 측면에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 포유동물 내 암을 치료하는데 사용하기 위한, 유전적으로 변형된 세포 및 제제를 제공하는데, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제제는 암에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 세포의 양 및 제제의 양은 포유동물에게 투여되고, 여기서 세포의 양 및/또는 제제의 양은 암에 대한 용해 활성 레벨을 제공하도록 선택된다.
- [0078] 다른 측면에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 포유동물 내 종양에 대한 범용 면역 수용체-매개된 면역 반응을 자극하는 데 사용하기 위한, 유전적으로 변형된 세포 및 제제를 제공하는데, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 여기서 제제는 종양에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 세포의 양은 포유동물에게 투여되고 제제의 양은 후속적으로 포유동물에게 투여된다.
- [0079] 다른 측면에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 포유동물 내 암을 치료하는데 사용하기 위한, 유전적으로 변형된 세포 및 제제를 제공하는데, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제제는 암에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 세포의 양은 포유동물에게 투여되고 제제의 양은 후속적으로 포유동물에게 투여된다.
- [0080] 다른 측면에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 포유동물 내 종양에 대한 범용 면역 수용체-매개된 면역 반응을 자극하는 데 사용하기 위한, 유전적으로 변형된 세포 및 제제를 제공하는데, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 4-1BB의 세포내 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서, 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 여기서 제제는 종양에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 세포의 유효량은 포유동물에게 투여되고 제제의 유효량은 포유동물에게 투여되고, 그리고 여기서 종양은 참조 레벨에 비해 증가된 레벨로 항원을 발현하

록 미리-결정된 것이다.

- [0081] 다른 측면에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 포유동물 내 암을 치료하는데 사용하기 위한, 유전적으로 변형된 세포 및 제제를 제공하는데, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 4-1BB의 세포내 도메인, 막 횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제제는 종양에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 세포의 유효량은 포유동물에게 투여되고 제제의 유효량은 포유동물에게 투여되고, 그리고 여기서 종양은 참조 레벨에 비해 증가된 레벨로 항원을 발현하도록 미리-결정된 것이다.
- [0082] 다른 측면에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 포유동물 내 종양에 대한 범용 면역 수용체-매개된 면역 반응을 자극하는데 있어서, 유전적으로 변형된 세포, 제1 제제, 및 제2 제제의 용도를 제공하는데, 여기서 종양은 적어도 2개의 상이한 항원을 공동-발현하고, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제1 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제1 제제는 종양에 의해 발현되는 제1 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 제2 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제2 제제는 종양에 의해 발현되는 제2 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 제1 항원 및 제2 항원은 상이한 항원이고, 그리고 여기서 면역 수용체, 제1 제제 및 제2 제제는 포유동물에게 투여된다.
- [0083] 다른 측면에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 포유동물 내 암의 치료에 있어서, 유전적으로 변형된 세포, 제1 제제, 및 제2 제제의 용도를 제공하는데, 여기서 암은 적어도 2개의 상이한 항원을 공동-발현하고, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제1 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제1 제제는 암에 의해 발현되는 제1 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 제2 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제2 제제는 암에 의해 발현되는 제2 항원에 특이적으로 결합하고; 그리고 여기서 제1 항원 및 제2 항원은 상이한 항원이다.
- [0084] 다른 측면에서, 본 발명은 종양에 대한 용해 활성 레벨을 생성하는데 있어서, 유전적으로 변형된 세포 및 제제의 용도를 제공하는데, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제제는 종양에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 세포의 양은 제제의 양과 접촉되고, 그리고 여기서 세포의 양에 대한 제제의 양은 종양에 대한 용해 활성 레벨을 생성하도록 선택된 것이다.
- [0085] 다른 측면에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 포유동물 내 암의 치료에 있어서, 유전적으로 변형된 세포 및 제제의 용도를 제공하는데, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제제는 암에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 세포의 양 및 제제의 양은 포유동물에게 투여되고, 여기서 세포의 양 및/또는 제제의 양은 암에 대한 용해 활성 레벨을 제공하도록 선택된 것이다.
- [0086] 다른 측면에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 포유동물에서 종양에 대한 범용 면역 수용체-매개된 면역 반응을 자극하는데 있어서, 유전적으로 변형된 세포 및 제제의 용도를 제공하는데, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제제는 종양에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 세포의 양은 포유동물에게 투여되고, 제제 양은 후속적으로 포유동물에게 투여된다.
- [0087] 다른 측면에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 포유동물 내 암의 치료에 있어서, 유전적으로 변형된 세포의 용도를 제공하는데, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제제는 암에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 세포의 양은 포유동물에게 투여되고 제제의 양은 후속적으로 포유동물에게 투여된다.
- [0088] 다른 측면에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 포유동물 내 종양에 대한 범용 면역 수용체-매개된 면역 반응을 자극하는데 있어서, 유전적으로 변형된 세포 및 제제의 용도를 제공하는데, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내

신호전달 도메인, 4-1BB의 세포내 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제제는 종양에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 세포의 유효량은 포유동물에게 투여되고 제제의 유효량은 포유동물에게 투여되고, 그리고 여기서 종양은 참조 레벨에 비해 증가된 레벨로 항원을 발현하도록 미리-결정된 것이다.

[0089]

다른 측면에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 포유동물 내 암의 치료에 있어서, 유전적으로 변형된 세포 및 제제의 용도를 제공하는데, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 4-1BB의 세포내 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제제는 종양에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 세포의 유효량은 포유동물에게 투여되고 제제의 유효량은 포유동물에게 투여되고, 그리고 여기서 종양은 참조 레벨에 비해 증가된 레벨로 항원을 발현하도록 미리-결정된 것이다.

도면의 간단한 설명

[0090]

본 발명의 바람직한 구현예에 대한 다음의 상세한 설명은 첨부된 도면과 함께 읽을 때 더 잘 이해될 것이다. 본 발명을 기술할 목적으로, 현재 바람직한 구현예가 도면에 도시되어 있다. 그러나, 본 발명은 도면에 도시된 구현예의 정확한 배열 및 수단으로 제한되지 않는다는 것을 이해해야 할 것이다.

도 1A-도 1C는 스파이캐처(SpyCatcher) 면역 수용체 표적화 리간드의 개발을 보여주는 일련의 도식도 및 이미지이다. 도 1A: 임상-등급 인간 IgG에 대한 단백질 G-ST 교차결합의 도식도. 도 1B: 헤르셉틴과 단백질 G-ST 또는 단백질 G-STDA의 교차결합, 그 이후 쿠마시(Coomassie) 염색 환원 조건 하에 SDS-페이지 겔에 의해 분석되는 스파이캐처-비너스(SpyCatcher-Venus)와의 반응이 후속적으로 수행됨. 도 1C: 쿠마시 염색을 구비한 SDS-페이지 겔에 의해 분석된 스파이캐처-비너스와 반응한 DARPIn9.26-ST 및 DARPIn9.26-STDA.

도 2A-도 2E는 스파이캐처 면역 수용체가 발현되고 스파이태그-표지된 리간드와 공유적으로 로딩할 능력이 있음을 보여주는 일련의 도식도, 이미지 및 그래프이다. 도 2A: 렌티바이러스 스파이캐처(lentiviral SpyCatcher) 면역 수용체 컨스트럭트의 도식도. 도 2B: SKOV3 세포를 발현하는 스파이캐처 면역 수용체를 2000nM RFP-ST 또는 RFP-STDA를 함유하는 배양 배지에서 배양하였다. 두 성분 사이의 공유 결합 형성은 환원 조건 하에서 SDS-페이지 겔과 총 CD3ζ 단백질에 대한 웨스턴 블롯 염색을 통해 감지되었다. 도 2C: 스파이캐처 T세포는 37°C에서 1시간 동안 다양한 양의 헤르셉틴(Herceptin)-ST로 무장시켰다. 스파이캐처 면역 수용체에 대한 헤르셉틴-ST 로딩은 APC 폴리클로날 항-인간 IgG로 염색하고 유세포 분석을 통해 검출되었다. 도 2D: 다양한 농도에서 스파이캐처 면역 수용체의 공유적(DARPIn9.26-ST) 대 비-공유적(DARPIn9.26-ST) 최대 로딩의 비교. 도 2E: 스파이캐처 T 세포를 다양한 양의 고정된 헤르셉틴-ST를 함유하는 웰에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. 상청액을 수거하고 ELISA로 IFNγ를 분석했다. 오차 막대는 평균 +/- 표준 편차를 나타낸다. 데이터 포인트는 3회 반복의 평균이다. 대표적인 T 세포 기증자가 표시된다. *P < .05; **P < .01; ***P < .001.

도 3A-도 3G는 스파이캐처 T 세포가 다양한 항원-발현 종양 라인의 숙주에 대해 시험관내 용해 기능의 능력이 있음을 보여주는 일련의 도식도 및 그래프이다. 도 3A: 무장된 스파이캐처 면역 수용체 용해(왼쪽) 및 주문형(on-demand) 용해(오른쪽)의 도식도. 도 3B: 스파이캐처 또는 형질도입되지 않은(unt) T 세포는 다양한 농도의 헤르셉틴-ST로 무장하고 SKOV3(Her2+) 종양 세포의 존재 하에 공동 배양했다. 도 3C: 스파이캐처 T 세포는 항원-특이적 및 비-특이적 IgG로 무장되었고, MDA-MB-468(EGFR+/Her2-) 또는 라모스(CD20+/EGFR-) 종양 세포와 공동-배양되었다. 도 3D: 항원 특이적 DARPIn으로 무장된 스파이캐처 T 세포는 루시페라제를 발현하는 SKOV3, MDA-MB-468 또는 A1847(EpCAM+) 종양 세포와 공동-배양되었다. 도 3E: DARPIn9.26-ST 무장된 스파이캐처 T 세포를 SKOV3 종양 세포(E:T = 3:1)와 함께 또는 없이 24시간 동안 배양하고, 배양물로부터 제거하고, +/- 2000nM DARPIn9.26-ST 배지에서 배양했다. 수용체 무장은 항-myc 염색 및 유세포 분석을 통해 분석되었다. 도 3F: 비-무장된 스파이캐처 T 세포를 SKOV3 종양 세포와 함께 4시간 동안 배양한 후, 그 다음 헤르셉틴-ST 또는 헤르셉틴-STDA를 첨가했다(시간 = 0). 도 3G: 스파이캐처 T 세포는 다양한 농도의 DARPIn9.26-ST 또는 DARPIn9.26-STDA로 무장되었고, 루시페라제를 발현하는 SKOV3 종양 세포와 공동 배양되었다. 도 3B 및 3F: 실시간 세포 분석을 이용하여 용해를 측정하였다. 도 3C, 3D 및 3G: 20시간 후의 잔여 루시페라제 발현을 계산했다. 모든 공동-배양은 7:1 E:T 비율을 사용하여 수행되었다. 오차 막대는 평균 +/- 표준 편차를 나타낸다. 데이터 포인트는 3회 반복의 평균이다. 대표적인 T 세포 기증자가 표시된다. *P < .05; **P < .01; ***P < .001.

도 4A-도 4C는 2개의 표적화 리간드를 사용한 스파이캐처 T 세포의 동시 무장이 이중 항원 표적화가 가능한 단일 세포 산물을 생성함을 보여주는 일련의 개략도 및 그래프이다. 도 4A: 단일 대 이중 표적화 리간드 로딩의

도식도. 도 4B: 스파이캐처 T 세포는 1000nM myc-9.26-ST(α Her2; 적색), 1000nM 플레그-Eo1-ST(α EGFR; 청색) 중 어느 하나 또는 동시에 각각 1000nM인 둘 모두(녹색)로 무장되었다. 수용체 로딩은 형광 컨쥬게이트드 항-myc 및 항-플레그 항체의 조합으로 검출되었고 유세포 분석을 통해 평가되었다. 도 4C: 단일 또는 이중 무장된 스파이캐처 T 세포를 Her2 또는 EGFR 및 루시페라제를 발현하는 라모스(Ramos) 세포와 공동 배양했다. 20시간 후에 잔여 루시페라제 발현을 계산하였다. 모든 공동-배양은 7:1 E:T 비율을 사용하여 수행되었다. 데이터 포인트는 3회 반복의 평균이다. 대표적인 T 세포 기증자가 표시된다.

도 5A-도 5D는 스파이캐처-BB ζ T 세포가 생체내에서 종양 성장을 방지함을 보여주는 일련의 그래프 및 이미지이다. NSG 마우스(그룹당 n=4)는 0일에 루시페라제를 발현하는 1×10^6 SKOV3 종양 세포를 복강 내 주입한 다음, 7일에 12.5×10^6 헤르셉틴-ST 무장된 스파이캐처-BB ζ T 세포에 의해 후속 처리했다. 헤르셉틴-ST를 8일에 투여한 후, 투여 기간 동안 매 3일마다 주입하였다(도 5A. 주황색 상자; 도 5B. 점선). 주입량은 마우스당 투여량을 나타낸다. 도 5A: 종양 성장을 발광에 의해 모니터링하고 각각의 개별 마우스에 대한 평균 광도로 플롯팅하였다. 도 5B: 처리된 마우스의 발광 이미지. 도 5C: 도 5A에서 처리된 마우스에 대한 생존 곡선. 도 5D: T 세포 주입 후 7일 및 21일에 총 인간 T 세포(CD3+/CD45+)의 트루카운트(TruCount) 분석. 오차 막대는 도 5D의 평균 $\pm$ SEM(A) 또는 평균 $\pm$ 표준 편차를 나타낸다. *P < .05; **P < .01; ***P < .001.

도 6A-도 6B는 스파이태그-표지된 표적화 리간드의 생산을 보여주는 일련의 이미지이다. 도 6A: 리톡시맵 또는 설텍시맵과 단백질 G-ST의 교차결합, 이어서 쿠마시 염색을 사용한 환원 조건 하에 SDS-페이지 겔로 분석한 스파이캐처-비너스(SpyCatcher-Venus)와의 후속 반응. 도 6B: 스파이캐처-비너스와 반응된 DARPins Ec1-ST 및 Eo1-ST는 쿠마시 염색을 구비한 SDS-페이지 겔로 분석되었다.

도 7A-도 7B는 렌티바이러스 형질도입을 통한 안정한 세포주 내에서 단백질의 발현을 보여주는 일련의 그래프이다. 도 7A: SKOV3-GFP 및 SKOV3-GFP-스파이캐처-BB ζ 세포를 2000nM myc-RFP-ST를 함유하는 배양 배지에서 배양하였다. 세포를 항-myc 항체를 통해 수용체 무장에 대해 염색하고 유세포 분석을 통해 분석했다. 도 7B: 라모스-Her2 및 라모스-EGFR 세포는 항-Her2 및 항-EGFR 단일클론 항체로 공동 염색되었다.

도 8A-도 8D는 스파이캐처 T 세포 용해 기능에 대한 항원 발현 수준 및 이중 무장의 영향을 보여주는 일련의 그래프이다. 도 8A: Her2 발현에 대해 염색된 SKOV3, MDA-MB-361, CRL5803 및 MDA-MB-468 세포주. 도 8B: 도 8A의 세포주에 대한 1000nM 또는 100nM 헤르셉틴-ST로 무장된 스파이캐처 T 세포의 용해 기능. 도 8C: 동형 대조군(회색)에 비해 Her2(적색) 및 EGFR(청색) 발현에 대해 염색된 SKOV3 세포. 도 8D: 50nM myc-9.26-ST(α Her2; 청색), 50nM 플레그-Eo1-ST(α EGFR; 적색) 중 어느 하나 또는 각각 50nM에서 동시에 둘 모두(녹색)로 무장되고, SKOV3 종양 세포와 공동 배양된 스파이캐처-BB ζ T 세포. 20시간 후에 잔여 루시페라제 발현을 계산하였다. 모든 공동-배양은 7:1 E:T 비율을 사용하여 수행되었다. 도 8에 대한 통계적 의미는 터키(Tukey) 사후 테스트와 함께 원-웨이 아노바(ANOVA)를 사용하여 계산되었다. 오차 막대는 평균 $\pm$ 표준 편차를 나타낸다. 데이터 포인트는 3회 반복의 평균이다. 대표적인 T 세포 기증자가 표시된다. *P < .05; **P < .01; ***P < .001.

도 9는 스파이캐처 T 세포와 CAR T 세포 용해 기능의 비교를 보여주는 플롯이다. 1000nM 헤르셉틴-ST 또는 4D5 CAR T 세포로 무장된 스파이캐처 T 세포를 다양한 E:T 비율로 SKOV3(Her2+) 종양 세포의 존재 하에 공동 배양했다. 잔여 루시페라제 발현은 20시간 후에 계산되었고 각각의 E:T 비율에서 형질도입되지 않은 T 세포로 정규화되었다. 오차 막대는 평균 $\pm$ 표준 편차를 나타낸다. 데이터 포인트는 3회 반복의 평균이다. 대표적인 T 세포 기증자가 표시된다.

도 10은 무장된 스파이캐처 수용체 턴오버의 기저율을 보여주는 일련의 히스토그램이다. 휴지된 스파이캐처 T 세포는 헤르셉틴-ST로 최대한 무장되었고, 세포 표면으로부터 로딩된 수용체 손실의 비율을 결정하기 위해 매 24시간마다 로딩된 수용체에 대해 분석했다. 무장되지 않은 스파이캐처 T 세포는 음성 대조군으로 염색되었다(회색 히스토그램).

도 11은 스파이캐처-BB ζ T 세포 처리가 체중 변화를 일으키지 않음을 보여주는 플롯이다. NSG 마우스(그룹당 n=4)는 0일에 1×10^6 SKOV3 종양 세포를 복강 내 주입하였고, 7일에 12.5×10^6 헤르셉틴-ST 무장된 스파이캐처-BB ζ T 세포를 후속처리했다. 헤르셉틴-ST를 8일에 투여하였고, 매 3일마다 후속 주입을 했다. 주입량은 마우스당 투여량을 나타낸다. (A) 치료 과정 동안 각 마우스의 무게를 모니터링했다. 체중 변화는 처리군에서 관찰되지 않은 반면, 대조군에서는 복수 형성으로 인해 체중 변화의 증가가 발생했다. 오차 막대는 평균 $\pm$ 표준 편차를 나타낸다.

도 12는 공격적인 S.C. 종양 모델에서 스파이캐처 T 세포가 종양 성장 속도를 늦추는 것을 보여주는 일련의 플롯이다. NSG 마우스(그룹당 n = 5)는 0일에 1×10^6 SKOV3 종양 세포를 피하 주입(injection)하였고, 6일에 헤르셉틴-ST로 무장된 12.5×10^6 스파이캐처-BBζ T 세포를 후속 처리했다. 50 μg 헤르셉틴-ST 표적화 리간드를 T세포 인퓨전(infusion) 후 1일에 투여하였고, 전체 연구를 위하여 매 3일마다 후속 주입(injections)을 수행했다. 종양 부피는 캘리퍼스 측정에 의해 모니터링되었다(A). 후색 선은 개별 마우스를 나타내고, 적색 선은 평균 종양 부피를 나타낸다. 스파이캐처-BBζ 단독 그룹에 비해 종양 성장이 유의하게 감소한 시점은 별표(*)로 표시된다. *P < .05; **P < .01; ***P < .001.

도 13은 GFP 및 수용체 상류의 T2A 부위를 포함하는 표시된 스파이캐처 수용체의 형질도입 효율을 도시한다.

도 14는 스파이캐처 면역 수용체가 발현되고 스파이태그-표지된 리간드와 공유 로딩이 가능함을 기술한다. 구체적으로, myc-Her2 DARPin-스파이태그003과 함께 GFP를 포함하는 스파이캐처003-BBζ의 로딩을 나타내는 플롯이 표시된다. T 세포를 발현하는 스파이캐처003-BBζ를 myc-Her-2 DARPin-스파이태그003(1000nM)과 함께 30분 동안 인큐베이션했다. 수용체 로딩은 Alexa647 형광 컨쥬게이트된 항-myc 항체를 사용하여 검출되었고 유세포 분석을 통해 평가되었다.

도 15A-도 15B는 스파이캐처003-발현 T 세포에 대한 스파이태그003의 적정을 기술한다. 스파이캐처003-Δζ T 세포를 5분 또는 30분 동안 증가하는 농도의 myc-TL-스파이태그003과 함께 인큐베이션했다. Myc 발현은 수용체 로딩을 정량화하기 위해 유세포 분석에 의해 측정되었다. 피크 로딩은 100-200nM이며 더 높은 농도에서 감소하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0091] 상세한 설명

본 발명은 범용 면역 수용체를 발현하도록 조작된 세포를 사용하는, 다중-항원 표적화, 제어가능한 세포 활성화, 및 종양의 선택적 표적화에 관한 것이다. 범용 면역 수용체는 기존의 키메라 항원 수용체(CAR) T 세포 요법이 직면한 안전성 및 항원 탈출 문제를 극복할 수 있는 잠재력을 지닌 빠르게 출현하는 입양(adoptive) T 세포 요법의 형태를 나타낸다. 이중기능 항원-특이적 표적화 리간드를 통해 항원 인식 및 T 세포 신호전달 도메인을 분리함으로써, 범용 면역 수용체는 T 세포 효과기 기능을 조절하고 단일 수용체로 다중 항원을 표적화할 수 있다. 본 명세서에는 스파이캐처-스파이태그(SpyCatcher-SpyTag) 화학의 적용을 통해 T 세포 표면에서 표적화 리간드의 번역 후 공유적 부착을 허용하는 최초의 범용 면역 수용체인 스파이캐처 면역 수용체의 개발이 설명되어 있다. 스파이캐처 면역 수용체는 시험관 내 및 생체 내 모두에서 스파이태그-표지된 표적화 리간드의 추가를 통해 다양한 종양 항원에 대해 일차 인간 T 세포를 리디렉션했다. 스파이캐처(SpyCatcher) T 세포 활성화는 표적 항원과 스파이태그-표지된 표적화 리간드의 존재에 의존하여, 기능을 용량-의존적으로 제어하는 것을 허용한다. 수용체와 표적 리간드 사이의 공유 결합 형성의 돌연변이 파괴는 여전히 리디렉션된 T 세포 기능을 허용하지만 항종양 기능을 상당히 손상시켰다. 따라서 스파이캐처 면역 수용체는 신속한 항원-특이적 수용체 조립, 다중-항원 표적화 및 제어 가능한 T 세포 활성을 허용한다.

본 발명은 암, 감염 및 자가면역 장애를 비롯한 다양한 장애를 치료하는데 유용한 입양 세포 요법을 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 본 발명은 본 명세서에서 스파이태그 및 스파이캐처 범용 면역 수용체로 지칭되는 범용 면역 수용체를 발현하도록 변형된 T 세포의 입양 세포 전달 전략에 관한 것이다. 본 발명의 수용체는 원하는 항원에 대한 특이성을 T 세포 수용체-활성화 세포내 도메인과 조합하여 특이적 면역 활성을 나타내는 키메라 단백질을 생성하는 분자이다. 일 구현예에서, 본 발명의 스파이태그 및 스파이캐처 범용 면역 수용체는 세포외 표지 결합 도메인, 막횡단 도메인 및 세포질 도메인 또는 그렇지 않으면 세포내 도메인을 포함한다.

본 발명은 T 세포 활성화를 위한 세포내 신호전달 성분, 막횡단 영역, 및 펩타이드 태그가 융합된 세포외 힌지 영역을 포함하는 면역 수용체 컨스트럭트 속으로 짧은 뉴클레오타이드 서열을 통합함으로써 범용 면역 수용체 전략을 제공한다. 일 구현예에서, T 세포는 스파이태그 모이어티를 포함하는 임의의 분자에 의해 결합될 수 있는 그의 표면 상에 스파이캐처(SpyCatcher)를 발현하도록 조작된다. 다른 구현예에서, T 세포는 스파이캐처 모이어티를 통합하는 임의의 분자에 의해 결합될 수 있는 그의 표면 상에 스파이태그 면역 수용체를 발현하도록 조작된다. 결합될 수 있는 분자에는 표면 항원(예컨대, 항체, scFv, 수용체, 리간드, 앵타머 등) 또는 생체내 T 세포 추적을 위한 라벨링 제제에 대해 T 세포를 리디렉션할 수 있는 분자가 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 또한, 리디렉팅 분자(예컨대 항체) 상의 상호 태그는 접합, 융합 또는 결합을 통하는 것과 같은 결합에 의해,

라벨링 제제로 표지될 수 있으며, 진단에 사용되는 항원 특이적 라벨링 제제로서 활용되어, 임상 시험에 대한 환자 적격성을 결정할 수 있고, 표적 조직 내 항원에 대한 최대 결합 시간을 결정할 수 있고(건강한 조직 내 잔류 물질 없이), 그리고 치료에 대한 반응을 모니터링하는 수단으로서 사용된다.

[0095] 정의

[0096] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 등가인 임의의 방법 및 재료가 본 발명의 시험을 위한 실시예에 사용될 수 있지만, 바람직한 재료 및 방법이 본 명세서에 기재되어 있다. 본 발명을 설명하고 청구함에 있어 다음과 같은 용어가 사용될 것이다.

[0097] 또한, 본 명세서에서 사용된 용어는 단지 특정한 구현예를 설명하기 위한 것이며, 한정하려는 의도가 아님을 이해해야 한다.

[0098] 관사 "하나(a)" 및 "하나(an)"는 본 명세서에서 관사의 문법적 대상 중 하나 또는 하나 이상(즉, 적어도 하나)을 지칭하는 데 사용된다. 예로서, "하나의 요소(an element)"는 하나의 요소 또는 하나 이상의 요소를 의미한다.

[0099] 본 명세서에서 양, 시간적 지속 등과 같은 측정 가능한 값을 지칭할 때 사용되는 "약"은 특정된 값으로부터 $\pm 20\%$ 또는 $\pm 10\%$, 더 바람직하게는 $\pm 5\%$, 보다 더 바람직하게는 $\pm 1\%$ 및 더욱 더 바람직하게는 $\pm 0.1\%$ 의 변동을 포괄하는 것을 의미하며, 그와 같은 변형은 개시된 방법들을 수행하는 데 적절하다.

[0100] 본 명세서에서 사용되는 "활성화(activation)"는 검출 가능한 세포 증식을 유도하기 위해 충분히 자극된 T 세포의 상태를 의미한다. 활성화는 또한 유도된 사이토카인 생산 및 검출 가능한 이펙터 기능과도 연관될 수 있다. 용어 "활성화된 T 세포(activated T cells)"는 무엇보다도 세포 분열을 겪고 있는 T 세포를 가리킨다.

[0101] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항체(antibody)"는 항원과 특이적으로 결합하는 면역글로불린 분자를 의미한다. 항체는 천연 공급원으로부터 또는 재조합 공급원으로부터 유래된 온전한 면역글로불린일 수 있고, 온전한 면역글로불린의 면역반응성 부분일 수 있다. 항체는 일반적으로 면역글로불린 분자의 사량체이다. 본 발명에서 항체는 예를 들어 다클론 항체, 단클론 항체, Fv, Fab 및 $F(ab)_2$ 뿐만 아니라 단일 사슬 항체 및 인간화 항체를 포함하는 다양한 형태로 존재할 수 있다(Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426).

[0102] 용어 "항체 단편(antibody fragment)"은 온전한 항체의 일부를 지칭하고 온전한 항체의 항원 결정 가변 영역을 지칭한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', $F(ab')_2$, 및 Fv 단편, 선형 항체, scFv 항체, 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0103] 본 명세서에 사용된 "항체 중쇄(antibody heavy chain)"는 그들의 자연 발생 형태(conformations) 내 모든 항체 분자에 존재하는 2가지 유형의 폴리펩타이드 사슬 중 더 큰 것을 지칭한다.

[0104] 본 명세서에 사용된 "항체 경쇄(antibody light chain)"는 그들의 자연 발생 형태(conformations) 내 모든 항체 분자에 존재하는 2가지 유형의 폴리펩타이드 사슬 중 더 작은 것을 지칭한다. κ 및 λ 경쇄는 두 가지 주요 항체 경쇄 동형(isotypes)을 나타낸다.

[0105] 본 명세서에 사용된 용어 "합성 항체(synthetic antibody)"는 재조합 DNA 기술을 사용하여 생성된 항체, 예를 들어 본 명세서에 기재된 박테리오파지에 의해 발현되는 항체와 같은 것을 의미한다. 이 용어는 또한 항체를 코딩하는 DNA 분자의 합성에 의해 생성되고 DNA 분자가 항체 단백질, 또는 항체를 특정하는 아미노산 서열을 발현하는 항체를 의미하는 것으로 해석되어야 하며, 여기서 DNA 또는 아미노산 서열은 당업계에서 이용가능하고 잘 알려진 합성 DNA 또는 아미노산 서열 기술을 사용하여 수득된다.

[0106] 본 명세서에 사용된 용어 "항원(antigen)" 또는 "Ag"는 면역 반응을 유발하는 분자로 정의된다. 이 면역 반응은 항체 생산, 또는 특이적 면역학적으로-적합한 세포의 활성화 중 어느 하나 또는 둘 다를 수반할 수 있다. 숙련된 기술자는 사실상 모든 단백질 또는 펩타이드를 포함하는 임의의 거대분자가 항원으로 작용할 수 있음을 이해할 것이다. 또한, 항원은 재조합 또는 게놈 DNA로부터 유래될 수 있다. 숙련된 기술자는 면역 반응을 유발하는 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 또는 부분 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 임의의 DNA가, 그러므로 본 명

세서에서 사용되는 용어 "항원"을 코딩한다는 것을 이해할 것이다. 또한, 숙련된 기술자는 항원이 유전자의 전장 뉴클레오티드 서열에 의해서만 코딩될 필요는 없다는 것을 이해할 것이다. 본 발명이 하나 이상의 유전자의 부분 뉴클레오티드 서열의 사용을 포함하지만 이에 제한되지 않는 것과 이러한 뉴클레오티드 서열은 원하는 면역 반응을 유도하기 위해 다양한 조합으로 배열된다는 것이 쉽게 명백하다. 더욱이, 숙련된 기술자는 항원이 "유전자"에 의해 코딩될 필요가 전혀 없다는 것을 이해할 것이다. 항원이 합성되어 생성될 수 있거나 생물학적 샘플로부터 유래될 수 있다는 것은 쉽게 명백하다. 이러한 생물학적 샘플은 조직 샘플, 종양 샘플, 세포 또는 생물학적 유체를 포함할 수 있지만 이에 국한되지 않는다.

[0107] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항-종양 효과(anti-tumor effect)"는 종양 부피의 감소, 종양 세포의 수의 감소, 전이 수의 감소, 기대 수명의 증가 또는 암 상태와 관련된 다양한 생리학적 증상의 개선으로 나타날 수 있는 생물학적 효과를 의미한다. "항-종양 효과"는 또한 본 발명의 펩타이드, 폴리뉴클레오티드, 세포 및 항체가 종양의 발생을 우선 예방하는 능력에 의해 나타날 수 있다.

[0108] 용어 "자가-항원(auto-antigen)"은 본 발명에 따라 면역계에 의해 외래인 것으로 잘못 인식되는 임의의 자가-항원을 의미한다. 자가-항원은 세포 표면 수용체를 포함하는 세포 단백질, 포스포단백질, 세포 표면 단백질, 세포 지질, 핵산, 당단백질을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0109] 본 명세서에 사용된 용어 "자가면역 질환(autoimmune disease)"은 자가면역 반응으로부터 야기된 장애로 정의된다. 자가면역 질환은 자가-항원에 대한 부적절하고 과도한 반응의 결과이다. 자가면역 질환의 예에는 아디시온 병(Addison's disease), 거대 탈모증(alopecia greata), 강직성 척추염(ankylosing spondylitis), 자가면역 간염(autoimmune hepatitis), 자가면역 이하선염(autoimmune parotitis), 크론병(Crohn's disease), 당뇨병(I형), 수포이영양증(dystrophic epidermolysis bullosa), 부고환염(epididymitis), 사구체신염(glomerulonephritis), 그레이브스바병(Graves' disease), 길라 증후군(Guillain-Barr syndrome), 하시모토병(Hashimoto's disease), 용혈성 빈혈(hemolytic anemia), 전신성 홍반성 루푸스(systemic lupus erythematosus), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 중증 근무력증(myasthenia gravis), 심상성 천포창(pemphigus vulgaris), 건선(psoriasis), 류마티스열(rheumatic fever), 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 육육종증(sarcoidosis), 경피증(scleroderma), 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 척추관절병증(spondyloarthropathies), 갑상선염(thyroiditis), 혈관염(vasculitis), 백반증(vitiligo), 점액수종(myxedema), 악성빈혈(pernicious anemia), 궤양성 대장염(ulcerative colitis) 및 기타 다른 것들이 있다.

[0110] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "자가(autologous)"는 동일한 개체로부터 유래된 임의의 물질을 의미하며, 이는 나중에 개체 속으로 재-도입된다.

[0111] "동종(Allogeneic)"은 같은 종의 다른 동물에서 파생된 이식편을 나타낸다.

[0112] "이종(Xenogeneic)"은 다른 종의 동물에서 파생된 이식편을 의미한다.

[0113] 본 명세서에 사용된 용어 "암(cancer)"은 비정상적인 세포의 빠르고 제어되지 않는 성장을 특징으로 하는 질병으로 정의된다. 암세포는 국소적으로 또는 혈류와 림프계를 통해 신체의 다른 부분으로 퍼질 수 있다. 다양한 암의 예는 유방암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 피부암, 췌장암, 결장직장암, 신장암, 간암, 뇌암, 림프종, 백혈병, 폐암 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. .

[0114] 본 명세서에 사용된 용어 "공동-자극 리간드(co-stimulatory ligand)"는 T 상의 동족 공동-자극 분자에 특이적으로 결합하는 항원 제시 세포 (예를 들어, aAPC, 수지상 세포, B 세포 등) 상의 분자를 포함하는데, 예를 들어 TCR/CD3 복합체와 펩타이드가 로딩된 MHC 분자의 결합에 의해 제공되는 1차 신호에 더하여, 이에 의하여 증식, 활성화, 분화 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 T 세포 반응을 매개하는 신호를 제공한다. 공동-자극 리간드는 CD7, B7-1(CD80), B7-2(CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, 유도성 공동자극 리간드(ICOS-L), 세포간 접촉 분자(ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, 림프독소 베타 수용체, 3/TR6, ILT3, ILT4, HVEM, 톨(Toll) 리간드에 결합하는 작용제(agonist) 또는 항체 수용체 및 B7-H3와 특이적으로 결합하는 리간드를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 공동-자극 리간드는 또한 그 중에서도 T 세포 상에 존재하는 공동-자극 분자, 예를 들어, 이에 제한되지 않지만 CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능 관련 항원-1(LFA-1), CD2, CD3, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 및 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드와 같은 것과 특이적으로 결합하는 항체를 포함한다.

[0115] "공동-자극 분자(co-stimulatory molecule)"는 공동-자극 리간드와 특이적으로 결합하는 T 세포 상의 동족 결합 파트너를 지칭하는데, 이에 의하여 이에 제한되지는 않지만 증식과 같은, T 세포에 의한 공동-자극 반응을 매개

한다. 공동-자극 분자에는 MHC 클래스 I 분자, BTLA 및 톨(Toll) 리간드 수용체가 포함되지만 이에 제한되지는 않는다.

- [0116] 본 명세서에 사용된 "공동-자극 신호(co-stimulatory signal)"는 TCR/CD3 결찰과 같은 일차 신호와 조합하여 T 세포 증식 및/또는 주요 분자의 상향조절 또는 하향조절을 이끄는 신호를 지칭한다.
- [0117] "질병(disease)"은 동물이 항상성을 유지할 수 없는 동물의 건강 상태이며, 여기서 질병이 개선되지 않으면 동물의 건강이 계속 악화된다. 대조적으로, 동물의 "장애(disorder)"는 동물이 항상성을 유지할 수 있는 건강 상태이지만 동물의 건강 상태가 장애가 없을 때보다 덜 유리한 상태이다. 치료하지 않고 방치 시, 장애는 반드시 동물의 건강 상태를 추가로 악화시키는 것은 아니다.
- [0118] 본 명세서에 사용된 "유효량(effective amount)"은 치료적 또는 예방적 이점을 제공하는 양을 의미한다.
- [0119] "암호화(encoding)"는 정의된 뉴클레오타이드 서열(즉, rRNA, tRNA 및 mRNA), 또는 정의된 아미노산 서열을 갖는 생물학적 과정에서 다른 중합체 및 거대분자의 합성을 위한 주형 역할을 하는, 유전자, cDNA 또는 mRNA와 같은 폴리뉴클레오타이드 내 특정 뉴클레오타이드 서열의 고유한 특성 및 그로부터 생성되는 생물학적 특성을 나타낸다. 따라서 그 유전자에 상응하는 mRNA의 전사 및 번역이 세포 또는 다른 생물학적 시스템에서 단백질을 생성하는 경우, 유전자는 단백질을 암호화한다. 뉴클레오타이드 서열이 mRNA 서열과 동일하고 일반적으로 서열 목록에 제공되는 코딩 가닥 및 유전자 또는 cDNA의 전사를 위한 주형으로서 사용되는, 논-코딩 가닥 둘 모두, 단백질 또는 그 유전자 또는 cDNA의 다른 산물을 암호화하는 것으로서 지칭될 수 있다.
- [0120] 본 명세서에 사용된 "내인성(endogenous)"은 유기체, 세포, 조직 또는 시스템 내부로부터 유래한 또는 생성된 임의의 물질을 지칭한다.
- [0121] 본 명세서에 사용된 용어 "외인성(exogenous)"은 유기체, 세포, 조직 또는 시스템 외부로부터 유래한 또는 생성된 임의의 물질을 지칭한다.
- [0122] 본 명세서에 사용된 용어 "발현(expression)"은 그의 프로모터에 의해 구동되는 특정 뉴클레오타이드 서열의 전사 및/또는 번역으로 정의된다.
- [0123] "발현 벡터(expression vector)"는 발현될 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결된 발현 조절 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 지칭한다. 발현 벡터는 발현을 위한 충분한 시스-작용 요소를 포함하고; 발현을 위한 다른 요소는 숙주 세포에 의해 또는 시험관내 발현 시스템에서 공급될 수 있다. 발현 벡터는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 통합하는 코스미드, 플라스미드(예컨대 네이키드 또는 리포솜에 함유된 것) 및 바이러스(예컨대 렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-관련된 바이러스)와 같은 당업계에 공지된 모든 것을 포함한다.
- [0124] "상동성(homologous)"은 2개의 폴리펩타이드 사이 또는 2개의 핵산 분자 사이의 서열 유사성 또는 서열 동일성을 지칭한다. 2개의 비교된 서열 둘 모두의 위치가 동일한 염기 또는 아미노산 단량체 서브유닛에 의해 점유될 때, 예를 들어 2개의 DNA 분자 각각의 위치가 아데닌에 의해 점유되는 경우, 분자는 그 위치에서 상동성이다. 두 서열 사이의 상동성 백분율은 두 서열이 공유하는 일치하거나 상동인 위치의 수를 비교한 위치의 수로 나눈 함수 $\times 100$ 이다. 예를 들어, 두 서열의 위치 중 10개 중 6개가 일치하거나 또는 상동이면 두 서열은 60% 상동이다. 예를 들어, DNA 서열 ATGCGC 및 TATGCGC는 50% 상동성을 공유한다. 일반적으로 두 서열이 최대 상동성을 제공하도록 정렬될 때 비교가 이루어진다.
- [0125] 본 명세서에 사용된 용어 "면역글로불린(immunoglobulin)" 또는 "Ig"는 항체로서 기능하는 단백질 부류로 정의된다. B 세포에 의해 발현되는 항체는 때때로 BCR(B 세포 수용체) 또는 항원 수용체로 지칭된다. 이 부류의 단백질에 포함된 5가지 구성원은 IgA, IgG, IgM, IgD 및 IgE이다. IgA는 타액, 눈물, 모유, 위장관 분비물 및 호흡기 및 비뇨생식기의 점액 분비물과 같은 신체 분비물에 존재하는 일차 항체이다. IgG는 가장 흔한 순환 항체이다. IgM은 대부분의 대상체 내에서 일차 면역 반응에서 생성되는 주요 면역글로불린이다. 그것은 응집, 보체 고정 및 기타 항체 반응에서 가장 효율적인 면역글로불린이며 박테리아 및 바이러스에 대한 방어에 중요하다. IgD는 알려진 항체 기능이 없지만 항원 수용체 역할을 할 수도 있는 면역글로불린이다. IgE는 알레르겐에 노출되면 비만 세포와 호염기구로부터 매개체의 방출을 야기하는 것에 의하여 즉각적인 과민반응을 매개하는 면역글로불린이다.
- [0126] 본 명세서에서 사용되는 "지시 물질"은 본 발명의 조성물 및 방법의 유용성을 전달하기 위해 사용될 수 있는 출판물, 기록물, 다이어그램 또는 다른 표현 매체를 포함한다. 본 발명의 키트의 지시 물질은, 예를 들어, 본 발

명의 핵산, 펩타이드 및/또는 조성물을 포함하는 용기에 부착되거나, 핵산, 펩타이드 및/또는 조성물을 포함하는 용기와 함께 선적될 수 있다. 또는, 지시 물질과 화합물이 수취인에 의해 협력적으로 사용되도록 하는 의도로 지시 물질을 컨테이너와 별도로 운송할 수도 있다.

- [0127] "단리된(isolated)"은 자연 상태에서 변경되거나 제거된 것을 의미한다. 예를 들어, 살아있는 동물에 자연적으로 존재하는 핵산 또는 펩타이드는 "단리"되지 않은 것이지만, 자연 상태의 공존 물질로부터 부분적으로 또는 완전히 분리된 동일한 핵산 또는 펩타이드는 "단리"된 것이다. 단리된 핵산 또는 단백질은 실질적으로 정제된 형태로 존재할 수 있거나, 예를 들어 숙주 세포와 같은 비-천연 환경 내에 존재할 수 있다.
- [0128] 본 발명의 맥락에서, 일반적으로 발생하는 핵산 염기에 대해 하기 약어가 사용된다. "A"는 아데노신, "C"는 시토신, "G"는 구아노신, "T"는 티미딘, "U"는 우리딘을 나타낸다.
- [0129] 달리 명시되지 않는 한, "아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열"은 서로의 축퇴 버전이고 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 모든 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 단백질 또는 RNA를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이라는 어구는 또한 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 일부 버전에서 인트론(들)을 포함할 수 있는 정도로 인트론을 포함할 수 있다.
- [0130] 본 명세서에 사용된 "렌티바이러스(lentivirus)"는 레트로비리데 과(Retroviridae family)의 속(genus)을 지칭한다. 렌티바이러스는 비-분열 세포를 감염시킬 수 있다는 점에서 레트로바이러스 중에서 독특하다; 그들은 숙주 세포의 DNA에 상당한 양의 유전 정보를 전달할 수 있으므로, 유전자 전달 벡터의 가장 효율적인 방법 중 하나이다. HIV, SIV 및 FIV는 모두 렌티바이러스의 예이다. 렌티바이러스에서 파생된 벡터는 생체 내에서 상당한 수준의 유전자 전달을 달성하는 수단을 제공한다.
- [0131] 본 명세서에 사용된 용어 "조절(modulating)"은 치료 또는 화합물의 부재 하에 대상체 내에서의 반응 레벨, 및/또는 동일하지만 치료를 받지 않은 대상체 내에서의 반응 레벨과 비교하여 대상체에서의 반응 수준의 검출가능한 증가 또는 감소를 매개하는 것을 의미한다. 이 용어는 고유 신호 또는 반응을 교란 및/또는 영향을 주어, 이에 의하여 대상체, 바람직하게는 인간에서 유익한 치료 반응을 매개하는 것을 포함한다.
- [0132] 달리 명시되지 않는 한, "아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열"은 서로의 축퇴 버전이고 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 모든 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 단백질 및 RNA를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 인트론을 포함할 수 있다.
- [0133] "작동가능하게 연결된(operably linked)"이라는 용어는 조절 서열과 이중 핵산 서열 사이의 기능적 연결을 지칭하며 이는 후자의 발현을 초래한다. 예를 들어, 제1 핵산 서열은 제2 핵산 서열과 기능적 관계에 위치할 때 제2 핵산 서열과 작동가능하게 연결된다. 예를 들어, 프로모터가 코딩 서열의 전사 또는 발현에 영향을 미치는 경우 프로모터는 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, 작동 가능하게 연결된 DNA 서열은 연속적이며, 여기서 필요한 경우 동일한 판독 프레임에서 2개의 단백질 코딩 영역을 연결한다.
- [0134] 용어 "과발현된(overexpressed)" 종양 항원 또는 종양 항원의 "과발현"은, 해당 조직이나 기관의 정상 세포 내에서 발현되는 레벨과 비교하여, 환자의 특정 조직 또는 기관 내의 고형 종양과 같은 질병 영역으로부터의 세포 내에서 종양 항원의 비정상적인 발현 레벨을 나타내는 것으로 의도된다. 고형 종양 또는 종양 항원의 과발현을 특징으로 하는 혈액 악성종양을 갖는 환자는 당업계에 공지된 표준 검정에 의해 결정될 수 있다.
- [0135] 면역원성 조성물의 "비경구(parenteral)" 투여는 예를 들어, 피하(s.c.), 정맥내(i.v.), 근육내(i.m.), 또는 흉골내(intrasternal) 주입(injection), 또는 인퓨전(infusion) 기술을 포함한다.
- [0136] 용어 "환자(patient)", "대상체(subject)", "개체(individual)" 등은 본 명세서에서 상호교환가능하게 사용되며, 본 명세서에 기재된 방법에 따를 수 있는 임의의 동물 또는 시험관내 또는 현장내 그의 세포를 지칭한다. 특정 비제한적 구현예에서, 환자, 대상체 또는 개체는 인간이다.
- [0137] 본 명세서에 사용된 용어 "폴리뉴클레오타이드(polynucleotide)"는 뉴클레오타이드의 사슬로 정의된다. 또한 핵산은 뉴클레오타이드의 중합체이다. 따라서, 본 명세서에 사용된 핵산 및 폴리뉴클레오타이드는 상호교환가능하다. 당업자는 핵산이 단량체 "뉴클레오타이드(nucleotides)"로 가수분해될 수 있는 폴리뉴클레오타이드라는 일반적인 지식을 가지고 있다. 단량체 뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드로 가수분해될 수 있다. 본 명세서에 사용된 폴리뉴클레오타이드는, 재조합적 수단, 즉 일반적인 클로닝 기술과 PCR™ 등을 사용하는, 그리고 합성 수단에 의한, 재조합 라이브러리 또는 세포 계능으로부터 유래한 핵산 서열의 클로닝을 포함하지만 이에 제한되지 아니하는 본 분야에서 사용가능한 임의의 수단에 의해 획득된 모든 핵산 서열을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

- [0138] 본 명세서에서 사용된 용어 "펩타이드(peptide)", "폴리펩타이드(polypeptide)" 및 "단백질(protein)"은 상호 교환적으로 사용되며, 펩타이드 결합에 의해 공유적으로 연결된 아미노산 잔기가 포함된 화합물을 의미한다. 단백질 또는 펩타이드는 적어도 2개의 아미노산을 포함해야 하며, 단백질 또는 펩타이드의 서열을 포함할 수 있는 최대 아미노산 수에는 제한이 없다. 폴리펩타이드는 펩타이드 결합에 의해 서로 연결된 2개 이상의 아미노산을 포함하는 임의의 펩타이드 또는 단백질을 포함한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 이 용어는 예를 들어 당업계에서 일반적으로 펩타이드, 올리고펩타이드 및 올리고머로 지칭되는 단쇄 및 당업계에서 일반적으로 단백질로 지칭되는 보다 긴 사슬 둘 모두를 지칭하며, 이들 중에는 많은 유형이 있다. "폴리펩타이드(Polypeptides)"는 예를 들어 생물학적으로 활성인 단편, 실질적으로 상동인 폴리펩타이드, 올리고펩타이드, 동종이량체, 이종이량체, 폴리펩타이드의 변이체, 변형된 폴리펩타이드, 유도체, 유사체, 융합 단백질, 기타 다른 것들을 포함한다. 폴리펩타이드는 천연 펩타이드, 재조합 펩타이드, 합성 펩타이드, 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0139] 본 명세서에 사용된 용어 "프로모터(promoter)"는 폴리뉴클레오티드 서열의 특이적 전사를 개시하는데 필요한, 세포의 합성 머시너리(machinery) 또는 도입된 합성 머시너리에 의해 인식되는 DNA 서열로 정의된다.
- [0140] 본 명세서에 사용된 용어 "프로모터/조절 서열(promoter/regulatory sequence)"은 프로모터/조절 서열에 작동 가능하게 연결된 유전자 산물의 발현에 필요한 핵산 서열을 의미한다. 일부 경우에, 이 서열은 코어 프로모터 서열일 수 있고, 다른 경우에, 이 서열은 또한 유전자 산물의 발현에 필요한 인핸서 서열 및 기타 조절 요소를 포함할 수 있다. 프로모터/조절 서열은 예를 들어 조직 특이적 방식으로 유전자 산물을 발현하는 것일 수 있다.
- [0141] "구성적(constitutive)" 프로모터는, 유전자 산물을 암호화하거나 특정하는 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하게 연결될 때, 세포의 대부분 또는 모든 생리학적 조건 하에서 유전자 산물이 세포 내에서 생성되도록 야기하는 뉴클레오티드 서열이다.
- [0142] "유도성(inducible)" 프로모터는, 유전자 산물을 암호화하거나 특정하는 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하게 연결될 때, 프로모터에 상응하는 유도자가 세포에 존재할 때만 실질적으로 세포 내에서 유전자 산물이 생산되도록 야기하는 뉴클레오티드 서열이다.
- [0143] "조직-특이적(tissue-specific)" 프로모터는, 폴리뉴클레오티드 인코드(encodes)와 작동 가능하게 연결되거나 또는 유전자에 의해 지정될 때, 세포가 프로모터에 상응하는 조직 유형의 세포일 경우에만 실질적으로 세포 내에서 유전자 산물이 생성되도록 야기하는 뉴클레오티드 서열이다.
- [0144] 항체와 관련하여 본 명세서에 사용된 용어 "특이적으로 결합하는(specifically binds)"은 특정 항원을 인식하지만 샘플 내의 다른 분자를 실질적으로 인식하거나 결합하지 않는 항체를 의미한다. 예를 들어, 한 종의 항원에 특이적으로 결합하는 항체는 또한 하나 이상의 종으로부터 유래한 항원에 결합할 수 있다. 그러나 이러한 종-간 반응성 자체가 항체의 특이적 분류를 변경하지는 않는다. 또 다른 예에서, 항원에 특이적으로 결합하는 항체는 또한 항원의 상이한 대립형질(allelic) 형태에 결합할 수도 있다. 그러나 이러한 교차 반응성 자체가 항체의 특이적 분류를 변경하지는 않는다. 일부 경우에, "특이적 결합(specific binding)" 또는 "특이적으로 결합(specifically binding)"이라는 용어는 두 번째 화학종과 항체, 단백질 또는 펩타이드의 상호 작용을 참조하여 사용될 수 있는데, 이는 상호 작용은 화학종 상의 특정 구조(예컨대 항원 결정인자 또는 에피토프)의 존재에 의존한다는 것을 의미한다; 예를 들어, 항체는 일반적으로 단백질보다는 특정한 단백질 구조를 인식하고 결합한다. 만일 항체가 에피토프 "A"에 특이적인 경우, 표지된 "A"와 항체를 포함하는 반응에서, 에피토프 A(또는 유리, 표지되지 않은 A)를 포함하는 분자의 존재는 항체에 결합된 표지된 A의 양을 감소시킬 것이다.
- [0145] "스파이태그(SpyTag)" 및 "스파이캐처(SpyCatcher)"라는 용어는 일반적으로 약한 단백질-단백질 상호작용을 극복하는 편리한 단백질 결합 도구를 나타낸다("Spy"는 박테리아 *Streptococcus pyogenes*를 나타냄). 스파이태그/스파이캐처(SpyTag/SpyCatcher) 시스템은 비가역적인 펩타이드 결합(ligations)을 생성하므로 단백질을 결합, 라벨링 또는 고정화하는 데 이상적이다. 스파이태그(SpyTag)는 그의 유전적으로 인코딩된 파트너 스파이캐처(SpyCatcher)와 결합할 때 자발적인 아미드 결합을 형성하는 유전적으로 인코딩된 펩타이드이다. 스파이태그(SpyTag)는 다양한 조건 하에서 스파이캐처(SpyCatcher)와 반응하며, 반응 후 산물은 매우 안정적이다(Zachari et al., 2012, PNAS vol. 109:12, pp.690-697).
- [0146] "자극(stimulation)"이라는 용어는 자극 분자(예를 들어, TCR/CD3 복합체)와 동족 리간드의 결합에 의해 유도된 일차 반응을 의미하며, 이에 의하여 예컨대 이에 제한되는 것은 아니지만 TCR/CD3 복합체를 통한 신호 전달과 같은, 신호 전달 이벤트를 매개한다.
- [0147] 본 명세서에 사용된 용어 "자극 분자(stimulatory molecule)"는 항원 제시 세포 상에 존재하는 동족 자극 리간

드와 특이적으로 결합하는 T 세포 상의 분자를 의미한다.

- [0148] 본 명세서에 사용된 "자극 리간드(stimulatory ligand)"는 항원 제시 세포(예를 들어, aAPC, 수지상 세포, B-세포 등) 상에 존재할 때, T 세포 상의 동족 결합 파트너(본 명세서에서 "자극 분자"로 지칭됨)와 특이적으로 결합할 수 있는 리간드를 의미하는데, 이에 의해 활성화, 면역 반응의 개시, 증식 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 T 세포에 의한 일차 반응을 매개한다. 자극 리간드는 당업계에 잘 알려져 있으며, 그 중에서도 펩타이드가 로딩된 MHC 클래스 I 분자, 항-CD3 항체, 초작용제(superagonist) 항-CD28 항체, 및 초작용제(superagonist) 항-CD2 항체를 포괄한다.
- [0149] 본 명세서에 사용된 "실질적으로 정제된(substantially purified)" 세포는 본질적으로 다른 세포 유형이 없는 세포이다. 실질적으로 정제된 세포는 또한 자연 발생 상태에서 정상적으로 결합되는 다른 세포 유형으로부터 분리된 세포를 지칭한다. 일부 경우에, 실질적으로 정제된 세포의 집단은 세포의 균질한 집단을 지칭한다. 다른 경우에, 이 용어는 단순히 그들의 자연 상태에서 그들이 자연적으로 결합된 세포에서 분리된 세포를 나타낸다. 몇몇 구현예에서, 세포는 시험관내에서 배양된다. 다른 구현예에서, 세포는 시험관내에서 배양되지 않는다.
- [0150] 본 명세서에 사용된 용어 "치료적(therapeutic)"은 치료 및/또는 예방을 의미한다. 치료 효과는 질병 상태의 억제, 완화 또는 근절에 의해 얻어진다.
- [0151] 용어 "치료적 유효량(therapeutically effective amount)"은 연구자, 의사, 의사 또는 기타 임상 의에 의하여 추구되는 조직, 시스템 또는 대상체의 생물학적 또는 의학적인 반응을 이끌어낼 대상 화합물의 양을 의미한다. 용어 "치료적 유효량(therapeutically effective amount)"은 투여되는 경우 치료되는 장애 또는 질환의 징후 또는 증상 중 하나 이상의 발병을 예방하거나 어느 정도 완화하기에 충분한 화합물의 양을 포함한다. 치료적 유효량은 화합물, 질병 및 그의 중증도 및 치료될 대상체의 연령, 체중 등에 따라 달라질 것이다.
- [0152] 본 명세서에 사용된 용어로 질병을 "치료(treat)"한다는 것은 대상체가 경험하는 질병 또는 장애의 적어도 하나의 징후 또는 증상의 빈도 또는 중증도를 감소시키는 것을 의미한다.
- [0153] 본 명세서에 사용된 용어 "형질감염된(transfected)" 또는 "형질전환된(transduced)" 또는 "형질도입된(transduced)"은 외인성 핵산이 숙주 세포 내로 전달되거나 도입되는 과정을 지칭한다. "형질감염된(transfected)" 또는 "형질전환된(transformed)" 또는 "형질도입된(transduced)" 세포는 외인성 핵산으로 형질 감염, 형질전환 또는 형질도입된 세포이다. 세포에는 일차 대상 세포와 그 자손이 포함된다.
- [0154] 본 명세서에 사용된 "전사 제어하에(under transcriptional control)" 또는 "작동적으로 연결된(operatively linked)"이라는 문구는 프로모터가 RNA 폴리머라제에 의한 전사의 개시 및 폴리뉴클레오타이드의 발현을 제어하기 위해 폴리뉴클레오타이드와 관련하여 정확한 위치 및 배향에 있다는 것을 의미한다.
- [0155] 본 명세서에 사용된 "범용 면역 수용체(universal immune receptor)"는 2개의 분할되지만 상호작용하는 부분, 즉 (i) 세포의 어댑터 분자에 부착된 하나 이상의 세포내 T 세포 신호전달 도메인 및 (ii) 상호 어댑터 분자를 통해 어댑터 분자에 결합할 수 있고 또한 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 표적화 리간드(예를 들어, 종양 세포에 의해 발현되는 항원과 같은 표적 세포 상의 항원)를 갖는 수용체이다. 따라서 표적화 리간드는 면역학적 가교 역할을 하여, 표적과 수용체 상의 세포의 어댑터 분자 둘 모두에 결합하여, 항원-특이적 T 세포 효과기 기능을 유도한다.
- [0156] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "어댑터 분자(adaptor molecule)" 및 "상호 어댑터 분자(reciprocal adaptor)"(또는 "태그" 및 "상호 태그")는 결합 쌍 시스템에서 한 쌍의 구성요소를 나타내며, 여기서 쌍 각각은 다른 쌍에 특이적으로 결합한다. 결합 쌍 시스템의 예에는 스파이캐처/스파이태그(Spycatcher/SpyTag) 및 비오틴/아비딘이 포함되지만 이에 국한되지는 않는다. 결합은 공유 또는 비공유 결합일 수 있다. "어댑터 분자"는 쌍 중 하나를 나타내고 "상호 어댑터 분자"는 어댑터 분자의 결합 파트너를 나타낸다. 따라서 스파이캐처/스파이태그(Spycatcher/SpyTag) 시스템에서 어댑터 분자는 예를 들어 스파이캐처(SpyCatcher)일 수 있고 상호 어댑터 분자는 스파이태그(SpyTag)일 수 있으며, 그 반대의 경우도 마찬가지인데, 여기서 어댑터 분자는 스파이태그(SpyTag)일 수 있고 상호 어댑터 분자는 스파이캐처(SpyCatcher)일 수 있다.
- [0157] 본 명세서에 사용된 용어 "무장된 수용체(armed receptor)" 또는 "무장된 범용 면역 수용체(armed universal immune receptor)"는 그의 2개의 상호작용 부분이 서로 연결되거나 결합된 범용 면역 수용체, 즉 세포내 T 세포 신호전달 도메인(들)을 함유하는 부분을 지칭하는 것을 의미하고, 세포의 어댑터 분자는 상호 어댑터 분자를 통해 어댑터 분자에 결합할 능력이 있고, 표적(예컨대, 종양 세포와 같은 세포에 의해 발현되는 항원)에 특이적으로 결합할 수 있는 능력이 있는, 표적화 리간드에 연결되거나 결합되고, 따라서 표적에 결합하고 항원-특이적 T

세포 효과기 기능을 유도할 능력이 있는 "무장된 수용체" 또는 "무장된 범용 면역 수용체"를 제공한다. 대조적으로, "비무장된 수용체" 또는 "비무장된 범용 면역 수용체"는 그것의 2개의 상호작용 부분이 서로 연결 또는 결합되지 않은 범용 면역 수용체, 즉 세포내 T 세포 신호전달 도메인(들)을 함유하는 부분을 지칭하는 것을 의미하고, 세포의 어댑터 분자는 상호 어댑터 분자를 통해 어댑터 분자에 결합할 능력이 있고, 표적(예컨대, 종양 세포와 같은 세포에 의해 발현되는 항원)에 특이적으로 결합할 수 있는 능력이 있는, 표적화 리간드에 연결 또는 결합되지 않은 것이다.

[0158] "백터"는 단리된 핵산을 포함하고 단리된 핵산을 세포 내부로 전달하는 데 사용될 수 있는 물질의 조성물이다. 선형 폴리뉴클레오타이드, 이온성 또는 양친매성 화합물과 관련된 폴리뉴클레오타이드, 플라스미드, 및 바이러스를 포함하나 이에 제한되지 않는 수많은 백터가 당업계에 공지되어 있다. 따라서, 용어 "백터"는 자가 복제 플라스미드 또는 바이러스를 포함한다. 이 용어는 또한 예를 들어 폴리리신 화합물, 리포솜 등과 같은 핵산의 세포 내로의 전달을 촉진하는 비-플라스미드 및 비-바이러스성 화합물을 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 바이러스 백터의 예는 아데노바이러스 백터, 아데노-연관된 바이러스 백터, 레트로바이러스 백터 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0159] 범위: 본 개시 전반에 걸쳐, 본 발명의 다양한 측면이 범위 형식으로 제시될 수 있다. 범위 형식의 설명은 단지편의와 간결함을 위한 것이며 본 발명의 범위에 대한 융통성 없는 제한으로 해석되어서는 안 된다는 것을 이해해야 한다. 따라서 범위에 대한 설명은 가능한 모든 하위 범위뿐만 아니라, 해당 범위 내의 개별 수치들을 구체적으로 공개한 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어, 1 내지 6과 같은 범위의 설명은 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 6, 3 내지 6, 기타와 같은 하위 범위들 뿐만 아니라, 해당 범위 내의 개별 숫자들, 예컨대 1, 2, 2.7, 3, 4, 5, 5.3 및 6도 구체적으로 공개한 것으로 간주되어야 한다. 이는 범위의 폭에 관계없이 적용된다.

[0160] 설명

[0161] 현재 유전자-조작된 세포 요법은 항원 특이성, 환자 접근성 및 종양 또는 세포 유형에서 제한적이다. 항원 특이성이 고정된 CAR을 만드는 것의 대안은, T 세포 수용체의 특이성을 요구에 따라 변경하는 것을 허용하는 범용 T 세포 수용체를 만드는 것이다. 이는 독특한 펩타이드 또는 단백질 태그를 발현하는 T 세포를 엔지니어링하여 달성되며, 이는 표적 리간드(예: 항체, 항체 결합 도메인, 단백질 스캐폴드, 앵타머, 수용체 등), 이미징 체제, 합텐(hapten), 효소 등에 융합 또는 부착되는 상보적 결합 파트너와 함께 번역-후 표지될 수 있다. 임이의 표적화 리간드로 후속적으로 표지될 수 있는 단일 공학적 범용 T 세포를 만드는 이점은, T세포의 큰 패널을 매우 빠르고 쉽게 만들고, 여러 특이성을 가진 개별 T 세포를 준비하며, 시간이 지남에 따라 T 세포 특이성을 변화시키는 능력을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0162] 프로토타입 CAR 아키텍처를 확장하여 T 세포 이펙터 기능의 시간적(temporal) 및 정량적(quantitative) 제어를 허용하기 위해, 비오틴과 아비딘 간의 상호작용을 활용하는 태그-특이적 수용체가 생성되어 문헌(Urbanska et al., *Cancer Research* 2012, 72 (7), 1844-1852)에 개시되었다. 비오틴-결합 면역 수용체로 불리우는 이 수용체는 범용 면역 수용체(UIRs)라고 하는 빠르게 확장되는 직교 수용체 부류에 속한다(Minutolo et al., *Frontiers in Oncology* 2019, 9, 176; 25-35; Clemenceau et al., *Blood* 2006, 107 (12), 4669-4677. Tamada et al., *lin Cancer Res* 2012, 18 (23), 6436-6445 ; Kudo et al., *Cancer Research* 2013, 74 (1); Urbanska et al., *Journal of Translational Medicine* 2014, 12 (1), 347; Ochi et al., *Cancer Immunology* 2014, 2 (3), 249-262 ; Feldmann et al., *Oncotarget* 2014, 5 (0). ; Kim et al., *J Am Chem Soc* 2015, 137 (8), 2832-2835 ; Rodgers et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2016, 113 (4). ; Ma et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2016, 113 (4), E450-E458; Cho et al., *Cell* 2018, No. Mol. Ther. Oncolytics 3 2016). UIRs은 (i) 세포의 어댑터 단백질에 부착된 표준 세포내 T 세포 신호전달 도메인 및 (ii) 어댑터 단백질에 결합할 수 있는 표적화 리간드의, 분할되지만 상호작용하는 2개의 부분을 포함한다. 표적화 리간드는, 면역학적 가교 역할을 하여 표적 세포 상의 TAA와 수용체 상의 세포의 어댑터 둘 모두에 결합하여, 항원-특이적 T 세포 효과기 기능을 유도한다.

[0163] T 세포 신호로부터 TAA 인식을 분리함으로써, UIRs은 현재 CAR T 세포가 직면한 여러 문제를 해결할 수 있다. UIRs은 T 세포 이펙터 기능을 구동하기 위해 항원 특이적 표적화 리간드의 존재에 의존하고 그러므로 T 세포 이펙터 기능의 용량- 의존적 제어(Minutolo et al., *Frontiers in Oncology* 2019, 9, 176), 및 CRS와 같은 빠른 활성화 및 확장으로 인한 CAR T 세포에서 보이는 독성 완화(Rodgers et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2016, 113(4))를 허용한다. 또한 UIRs은 다중 표적화 리간드 사용을 통한 단일 세포 산물로 다중 TAAs를 표적화

할 능력이 있는 모듈식 플랫폼을 제공하여, 단일 항원-손실과 관련된 TAA 이질성 및 재발 문제를 다룬다.

- [0164] 현재 모든 UIRs은 표적화 리간드와 UIR 사이의 비공유적 상호작용에 의존한다. 여기서, 우리는 스파이캐처-스파이태그(SpyCatcher-SpyTag) 화학의 사용을 통해 수용체에 표적화 도메인의 번역-후 공유적 부착을 허용하는 차세대 UIR 시스템의 개발을 자세히 설명한다. 자케리 등(Zakeri *et al.*)에 의해 개발된 단백질 스파이캐처와 그의 동족 펩타이드 스파이태그 간의 상호 작용은 공유 아마이드 결합의 빠르고 자발적인 형성을 유도한다(Zakeri *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012, 109(12), E690-7). 펩타이드-단백질 쌍 사이의 반응은 생리학적 으로 관련된 온도 및 pH 수준의 범위에 걸쳐서 발생하여, 이는 그것을 생체 내 사용을 위한 잠재적 후보로 만든다(Zakeri *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012, 109 (12), E690-7).
- [0165] 스파이캐처-스파이태그는 또한 스파이캐처 및 스파이태그 도메인을 포함하는 단백질을 내인적으로 발현하는 형질전환 예쁜꼬마선충(*C. elegans*)뿐만 아니라 살아있는 포유동물 세포 배양에서 막 상주 수용체를 표지하는 데 사용되었다(Bedbrook *et al.*, *Chem. Biol.* 2015, 22 (8), 1108-1121). 종합하면, 포유동물 세포와 살아있는 유기체 둘 모두에서의 그것의 사용과 결합된 강력한 반응성 조건의 넓은 범위는, 스파이캐처-스파이태그 시스템을 CAR을 모방하는 UIR 아키텍처의 새로운 조립을 위한 유리한 선택으로 만든다.
- [0166] 표준 2-세대 CAR 세포내 신호전달 도메인에 부착된 세포의 도메인으로서 스파이캐처 단백질을 포함하는 개발된 스파이캐처 면역 수용체가 본 명세서에 설명되어 있다. 스파이태그로 표지된 TAA-특이적 표적 리간드의 추가는, 자발적인 자가촉매 이소펩타이드 결합 형성을 통해 CAR-유사 수용체의 주문형(on-demand) 형성을 허용한다. 스파이캐처 면역 수용체를 발현하는 일차 인간 T 세포는, 표적화 리간드로 정량적으로 로딩될 수 있어, 리디렉션된 T 세포 효과기 기능 및 종양 세포 용해의 용량-적정 제어가 가능하다. 단일 세포 제품인 경우에도, 스파이캐처 면역 수용체 T 세포는 스파이태그로 사이트-특이적으로 표지된 임상-등급 항체 뿐만 아니라, 스파이태그가 유전적으로 융합된 표적화 리간드의 추가를 통해 일련의 종양 항원을 인식할 수 있다. 여기에 설명된 결과는 스파이캐처 면역 수용체 시스템의 유연성과 효능을 보여준다.
- [0167] 다중 항원 표적화
- [0168] 본 발명은 다중 항원, 특히 종양에 의해 발현되는 2개 이상의 별개의 항원을 표적화하기 위한, 범용 면역 수용체를 발현하도록 조작된 세포의 용도에 관한 것이다. 본 명세서에 추가로 기재된 바와 같이, 이중 무장된 스파이캐처-BB ζ T는 단일 무장된 세포 단독에 비해 증가된 종양 용해를 달성하는 것으로 밝혀졌다(도 8D). 스파이캐처 T 세포를 별개의 특이성의 2개의 항체로 (특정 용량에서) 무장시키면 2개의 별개의 항원을 공동-발현하는 암 세포에 대한 활성이 향상된다는 것이 입증되었다.
- [0169] 따라서, 한 측면에서, 포유동물에서 종양에 대한 범용 면역 수용체-매개된 면역 반응을 자극하는 방법이 제공되며, 여기서 종양은 적어도 2개의 상이한 항원을 공동 발현한다. 또 다른 측면에서, 암이 적어도 2개의 상이한 항원을 공동-발현하는 것인, 이를 필요로 하는 포유동물에서 암을 치료하는 방법이 제공된다. 일 구현예에서, 상기 방법은 다음을 포함한다: (a) T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 세포를 포유동물에게 투여하는 것, (b) 스파이캐처 또는 스파이태그에 연결된 제1 제제를 포유동물에게 투여하는 것, 여기서 제1 제제는 종양에 의해 발현되는 제1 항원에 특이적으로 결합한다, (c) 포유동물에게 상호 어댑터 분자에 연결된 제2 제제를 투여하는 것, 여기서 제2 제제는 종양에 의해 발현되는 제2 항원에 특이적으로 결합하고, 여기서 제1 항원 및 제2 항원은 상이한 항원이다.
- [0170] 일부 측면에서, 이를 필요로 하는 포유동물 내 종양에 대한 범용 면역 수용체-매개된 면역 반응을 자극하는데 있어서, 유전적으로 변형된 세포, 제1 제제, 및 제2 제제의 용도가 제공되는데, 여기서 종양은 적어도 2개의 상이한 항원을 공동-발현하고, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제1 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제1 제제는 제제는 종양에 의해 발현되는 제1 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 제2 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제2 제제는 종양에 의해 발현되는 제2 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 제1 항원 및 제2 항원은 상이한 항원이고, 그리고 여기서 면역 수용체, 제1 제제 및 제2 제제는 포유동물에게 투여된다.
- [0171] 다른 측면에서, 이를 필요로 하는 포유동물 내 종양에 대한 범용 면역 수용체-매개된 면역 반응을 자극하거나 또는 이를 필요로 하는 포유동물 내 암을 치료하는데 있어서, 유전적으로 변형된 세포, 제1 제제, 및 제2 제제의 용도가 제공되는데, 여기서 종양은 적어도 2개의 상이한 항원을 공동-발현하고, 여기서 세포는 T 세포 수용체

세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제1 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제1 제제는 제제는 종양 또는 암에 의해 발현되는 제1 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 제2 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제2 제제는 종양 또는 암에 의해 발현되는 제2 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 제1 항원 및 제2 항원은 상이한 항원이고, 그리고 여기서 면역 수용체, 제1 제제 및 제2 제제는 포유동물에게 투여된다.

[0172] 일부 구현예에서, 어댑터 분자는 스파이캐처이고 상호 어댑터 분자는 스파이태그이다. 일부 구현예에서, 어댑터 분자는 스파이태그이고 상호 어댑터 분자는 스파이캐처이다.

[0173] 일부 구현예에서, 제1 제제 및 제2 제제 둘 모두의 투여는 제1 제제 단독 또는 제2 제제 단독 투여와 비교하여 향상된 항종양 활성을 초래한다. 일부 구현예에서, 제1 제제 단독 또는 제2 제제 단독을 투여했을 때 달성되는 항종양 활성의 레벨에 비해, 서로 조합된 더 적은 양의 제1 제제 및/또는 제2 제제를 투여할 때, 유사하거나 동일한 레벨의 항-종양 활성이 달성된다.

[0174] 일부 구현예에서, 어댑터 분자는 스파이캐처이고 상호 어댑터 분자는 스파이태그이다. 일부 구현예에서, 어댑터 분자는 스파이태그이고 상호 어댑터 분자는 스파이캐처이다.

[0175] 일부 구현예에서, 세포의 도메인은 스파이캐처 또는 스파이태그를 포함한다. 일 구현예에서, 일 구현예에서, 세포의 도메인은 스파이캐처를 포함한다.

[0176] 일부 구현예에서, 제제는 스파이태그 또는 스파이캐처에 연결된다. 일 구현예에서, 제제는 스파이태그에 연결된다. 다른 구현예에서, 제제는 항체, 항체 단편, scFv, 또는 DARPIn이다. 다른 구현예에서, 제제는 항체이다. 일 구현예에서, 제제는 인간 IgG이다.

[0177] 일 구현예에서, 스파이태그 또는 스파이캐처는 광 활성화 사이트-특이적 컨주게이션(LASIC)을 통해 제제에 연결된다. 일 구현예에서, 세포는 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 세포독성 T 림프구(CTL), 대식세포, 줄기 세포, 또는 조절 T 세포이다. 일 구현예에서, 세포는 T 세포이다. 다른 구현예에서, 세포는 자가 세포이다.

[0178] 다른 구현예에서, 범용 면역 수용체는 공동자극 분자의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 공동자극 분자는 4-1BB, CD28, CD27, CD2, CD3, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능-관련 항원-1(LFA-1), CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 또는 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드이다. 일 구현예에서, 항원은 HER2, EGFR, EpCAM, 또는 CD20이다.

[0179] 한 구현예에서, 예비-무장된 세포를 생성하기 위해 포유동물에 투여하기 전에 세포를 제제와 접촉시키고 예비-무장된 세포를 포유동물에 후속적으로 투여한다. 다른 구현예에서, 세포는 포유동물에게 제제를 투여하기 전에 포유동물에게 투여된다. 일부 구현예에서, 투여되는 제제의 양 및/또는 수 또는 양은 원하는 레벨의 용해 활성을 생성하도록 선택되거나 조정된다.

[0180] 용해 활성의 제어

[0181] 다른 측면에서, 종양에 대한 용해 활성 레벨을 생성하는 방법이 제공된다. 또 다른 측면에서, 대상체(예를 들어, 포유동물)에서 암을 치료하는 방법이 제공되며, 여기서 상기 방법은 암에 대한 용해 활성 레벨의 제어를 제공한다. 대부분의 약물은 용량 조절이 가능하고 예측 가능한 약동학 및 약력학을 따르지만, 기존 CAR T 세포 요법은 인퓨전(infusion) 후 쉽게 제어할 수 없는 살아있는 약물이다. 표적 항원이 인식되면, 투여된 CAR T 세포는 수용자 내에서 다수로 빠르게 증식하고 전염증성 사이토카인을 방출하여, 경우에 따라, 심각하고 때로는 치명적인 부작용을 일으킬 수 있다. 본 명세서의 다른 곳에서 기술된 바와 같이, 스파이캐처 면역 수용체를 발현하는 일차 인간 T 세포는 표적화 리간드로 정량적으로 로딩될 수 있으며, 이는 리디렉션된 T 세포 효과기 기능 및 종양 세포 용해의 용량-적정 제어를 허용한다는 것이 기술되었다.

[0182] 일 구현예에서, 방법은 세포의 양을 상호 어댑터 분자에 연결된 제제의 양과 접촉시키는 단계를 포함하며, 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형되고, 여기서 세포의 도메인은 어댑터 분자를 포함하고, 여기서 제제는 종양에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고, 그리고 여기서 제제의 양 및/또는 세포의 수는 종양에 대한 용해 활성 레벨을 생성하도록 선택된다. 다른 구현예에서, 방법은 다음의 단계들을 포함한다: (a) T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 세포의 양을 포유동물에게 투여하는 것, 및 (b) 상호 어댑터 분자에 연결된 제제의 양을 포

유동물에게 투여하는 것, 여기서 제제는 암에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고, 여기서 세포의 양 및/또는 제제의 양은 암에 대한 용해 활성 레벨을 제공하도록 선택된다.

- [0183] 한 측면에서, 종양에 대한 용해 활성 레벨을 생성하는 데 사용하기 위한, 또는 이를 필요로 하는 포유동물 내 암을 치료하는데 사용하기 위한, 유전적으로 변형된 세포 및 제제가 제공되는데, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제제는 종양 또는 암에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 세포의 양은 제제의 양과 접촉되고, 그리고 여기서 세포의 양에 대한 제제의 양은 종양 또는 암에 대한 용해 활성 레벨을 생성하도록 선택된다.
- [0184] 다른 측면에서, 종양에 대한 용해 활성 레벨을 생성하는데 있어서, 또는 이를 필요로 하는 포유동물 내 암의 치료에 있어서, 유전적으로 변형된 세포 및 제제의 용도가 제공되는데, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제제는 종양 또는 암에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 세포의 양은 제제의 양과 접촉되고, 그리고 여기서 세포의 양에 대한 제제의 양은 종양 또는 암에 대한 용해 활성 레벨을 생성하도록 선택된다.
- [0185] 용해 활성 레벨은 선택된 임의의 레벨, 예를 들어, 종양 세포를 효과적으로 용해시키고 포유동물에서 바람직하지 않은 부작용을 최소화하는 용해 활성 레벨일 수 있다. 용해 활성 레벨은 미리-결정된 용해 활성 레벨일 수 있다. 일부 구현예에서, 용해 활성의 레벨은 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90%의 세포독성이다. 일 구현예에서, 세포의 양에 비해 제제의 양을 증가시키는 것(예를 들어, 무장된 용량 증가)은 용해 활성의 레벨을 증가시킨다. 다른 구현예에서, 세포의 양에 비해 제제의 양을 감소시키는 것(예를 들어, 무장된 용량 감소)은 용해 활성의 레벨을 감소시킨다.
- [0186] 일 구현예에서, 방법은 포유동물의 종양 부하 또는 암 부하를 결정하고, 종양 부하 또는 암 부하에 기초하여 종양 또는 암에 대한 용해 활성 레벨을 생성하기 위해 세포의 양에 대한 약제의 양을 선택하는 것을 포함한다. 종양 부하 또는 암 부하는 고체 종양에 대한 종양(들) 크기, 순환하는 암세포의 수(예를 들어 백혈병 환자의 경우)를 측정하는 것 또는 암 마커 레벨을 결정하는 것과 같은 표준 기술에 의해 결정될 수 있다.
- [0187] 일 구현예에서, 방법은 포유동물에게 세포의 용량 및/또는 제제의 양을 투여하고, 치료가 효과적인지 여부 및 세포의 용량 및/또는 제제의 양을 증가시키지 않는지 여부를 결정하는 것을 포함한다. 일 구현예에서, 포유동물은 더 많은 제제를 투여받는다. 대안적인 구현예에서, 포유동물은 본 명세서에 정의된 제2(또는 추가) 제제를 함께 투여받는다.
- [0188] 일부 구현예에서, 어댑터 분자는 스파이캐처이고 상호 어댑터 분자는 스파이태그이다. 일부 구현예에서, 어댑터 분자는 스파이태그이고 상호 어댑터 분자는 스파이캐처이다.
- [0189] 일부 구현예에서, 세포의 도메인은 스파이캐처 또는 스파이태그를 포함한다. 일 구현예에서, 세포의 도메인은 스파이캐처를 포함한다.
- [0190] 일부 구현예에서, 제제는 스파이태그 또는 스파이캐처에 연결된다. 일 구현예에서, 제제는 스파이태그에 연결된다. 다른 구현예에서, 제제는 항체, 항체 단편, scFv, 또는 DARPin이다. 다른 구현예에서, 제제는 항체이다. 일 구현예에서, 제제는 인간 IgG이다.
- [0191] 일 구현예에서, 어댑터 분자 또는 상호 어댑터 분자는 광 활성화 사이트-특이적 컨쥬게이션(LASIC)을 통해 제제에 연결된다. 일 구현예에서, 스파이태그 또는 스파이캐처는 광 활성화 사이트-특이적 컨쥬게이션(LASIC)을 통해 제제에 연결된다. 일 구현예에서, 세포는 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 세포독성 T 림프구(CTL), 대식세포, 줄기 세포, 또는 조절 T 세포이다. 일 구현예에서, 세포는 T 세포이다. 다른 구현예에서, 세포는 자가 세포이다.
- [0192] 다른 구현예에서, 범용 면역 수용체는 공동자극 분자의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 공동자극 분자는 4-1BB, CD28, CD27, CD2, CD3, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능 관련 항원-1(LFA-1), CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 또는 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드이다.
- [0193] 일 구현예에서, 항원은 HER2, EGFR, EpCAM, 또는 CD20이다.
- [0194] 일 구현예에서, 예비-무장된 세포를 생성하기 위해 포유동물에 투여하기 전에 세포를 제제와 접촉시키고 예비-무장된 세포를 포유동물에 후속적으로 투여한다. 다른 구현예에서, 세포는 포유동물에게 제제를 투여하기 전에

포유동물에게 투여된다. 일부 구현예에서, 투여되는 제제의 양 및/또는 투여되는 세포의 수 또는 양은 원하는 레벨의 용해 활성을 생성하도록 선택되거나 조정된다.

[0195]

[0196]

"주문형(On-Demand)" 표적화

[0197]

다른 측면에서, 본 발명은 포유동물에서 종양에 대한 범용 면역 수용체-매개된 면역 반응을 자극하는 방법, 및 종양의 "주문형(on-demand)" 표적화를 사용하는, 이를 필요로 하는 포유동물에서 암을 치료하는 방법을 제공한다. 본 명세서의 다른 곳에서 설명된 바와 같이 무장된, 비무장된 것이 아닌, 스파이캐처 T 세포는 항원 발현 종양 세포를 표적으로 삼고 죽일 능력이 있음이 발견되었고, 그리고 비무장된 스파이캐처 T 세포 이펙터 기능은 비-무장된 스파이캐처 T 세포에 대한 리간드 표적화를 나중에 추가할 때, 일시적으로 촉발될 수 있음이 추가로 기술되었다. 따라서 비무장된 스파이캐처 T 세포를 피험자에게 투여할 수 있으며, 여기서 비무장된 세포는 대상체 내의 암세포가 있는 상태에서 불활성이고, 표적화 리간드는 나중에 스파이캐처 T 세포를 무장시키고 종양 용해를 촉발하기 위해 투여될 수 있으며, 이는 암 사멸 능력이 "주문형"으로 트리거되도록 한다.

[0198]

따라서, 일 구현예에서, 방법은 다음의 단계를 포함한다: (a) T 세포 수용체 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 세포를 포유동물에게 투여하는 것, 및 (b) 상호 어댑터 분자에 연결된 제제를 포유동물에게 후속적으로 투여하는 것, 여기서 제제는 종양에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합한다.

[0199]

다른 측면에서, 이를 필요로 하는 포유동물 내 종양에 대한 범용 면역 수용체-매개된 면역 반응을 자극하는 데 사용하기 위한, 또는 이를 필요로 하는 포유동물 내 암을 치료하는데 사용하기 위한, 유전적으로 변형된 세포 및 제제가 제공되는데, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제제는 종양에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 세포의 양은 포유동물에게 투여되고 제제의 양은 후속적으로 포유동물에게 투여된다.

[0200]

다른 측면에서, 이를 필요로 하는 포유동물에서 종양에 대한 범용 면역 수용체-매개된 면역 반응을 자극하는데 있어서, 또는 이를 필요로 하는 포유동물 내 암의 치료에 있어서, 유전적으로 변형된 세포 및 제제의 용도가 제공되는데, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제제는 종양에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 세포의 양은 포유동물에게 투여되고, 제제 양은 후속적으로 포유동물에게 투여된다.

[0201]

일부 구현예에서, 어댑터 분자는 스파이캐처이고 상호 어댑터 분자는 스파이태그이다. 일부 구현예에서, 어댑터 분자는 스파이태그이고 상호 어댑터 분자는 스파이캐처이다.

[0202]

일부 구현예에서, 세포의 도메인은 스파이캐처 또는 스파이태그를 포함한다. 일 구현예에서, 세포의 도메인은 스파이캐처를 포함한다.

[0203]

일부 구현예에서, 제제는 스파이태그 또는 스파이캐처에 연결된다. 일 구현예에서, 제제는 스파이태그에 연결된다. 다른 구현예에서, 제제는 항체, 항체 단편, scFv, 또는 DARPIn이다. 다른 구현예에서, 제제는 항체이다. 일 구현예에서, 제제는 인간 IgG이다.

[0204]

일 구현예에서, 어댑터 분자 또는 상호 어댑터 분자는 광 활성화 사이트-특이적 컨쥬게이션(LASIC)을 통해 제제에 연결된다. 일 구현예에서, 스파이태그 또는 스파이캐처는 광 활성화 사이트-특이적 컨쥬게이션(LASIC)을 통해 제제에 연결된다. 일 구현예에서, 세포는 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 세포독성 T 림프구(CTL), 대식세포, 줄기 세포, 또는 조절 T 세포이다. 일 구현예에서, 세포는 T 세포이다. 다른 구현예에서, 세포는 자가 세포이다.

[0205]

다른 구현예에서, 범용 면역 수용체는 공동자극 분자의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 공동자극 분자는 4-1BB, CD28, CD27, CD2, CD3, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능 관련 항원-1(LFA-1), CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 또는 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드이다.

[0206]

일 구현예에서, 항원은 HER2, EGFR, EpCAM, 또는 CD20이다.

[0207]

일부 구현예에서, 투여되는 제제의 양 및/또는 투여되는 세포의 수 또는 양은 원하는 레벨의 용해 활성을 생성

하도록 선택되거나 조정된다.

[0208] 항원 발현 레벨에 기반한 종양 표적화

[0209] 놀랍게도 고농도 항체로 무장된 스파이캐처-BB ζ T 세포, 그러나 스파이캐처-28 ζ T 세포가 아닌 것은, 높은 항원 발현 표적 세포에 민감하지만 낮은 항원 발현 표적 세포에는 민감하지 않다는 것이 발견되었다. 이 발견은 건강한 조직 상에서 발현되는 고위험 항원을 표적으로 하는 항체와 함께 적용될 때 T 세포의 안전성에 중요한 의미를 갖는다.

[0210] 따라서, 다른 측면에서, 4-1BB의 세포내 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 조작된 세포를 사용하는, 이를 필요로 하는 포유동물 내 종양에 대한 범용 면역 수용체-매개된 면역 반응을 자극하는 방법 및 이를 필요로 하는 포유동물 내 암을 치료하는 방법이 제공된다. 일 구현예에서, 방법은 다음의 단계들을 포함한다: (a) T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 4-1BB의 세포내 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 세포의 양을 포유동물에게 투여하는 것, 및 (b) 상호 어댑터 분자에 연결된 제제의 양을 포유동물에게 투여하는 것, 여기서 제제는 종양에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고, 여기서 종양은 참조 레벨에 비해 증가된 레벨로 항원을 발현하도록 미리-결정된 것이다. 종양에서 항원 발현 레벨을 결정하는 방법은 당업계에 잘 알려진 임의의 방법, 예를 들어 면역조직화학적 방법일 수 있다.

[0211] 일부 측면에서, 이를 필요로 하는 포유동물 내 종양에 대한 범용 면역 수용체-매개된 면역 반응을 자극하는데 있어서, 또는 이를 필요로 하는 포유동물 내 암의 치료에 있어서, 유전적으로 변형된 세포 및 제제의 용도가 제공되는데, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 4-1BB의 세포내 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제제는 종양 또는 암에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 세포의 유효량은 포유동물에게 투여되고 제제의 유효량은 포유동물에게 투여되고, 그리고 여기서 종양은 참조 레벨에 비해 증가된 레벨로 항원을 발현하도록 미리-결정된 것이다.

[0212] 다른 측면에서, 이를 필요로 하는 포유동물에서 종양에 대한 범용 면역 수용체-매개된 면역 반응을 자극하거나 또는 이를 필요로 하는 포유동물에서 암을 치료하는데 있어서, 유전적으로 변형된 세포 및 제제의 용도가 제공되는데, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 4-1BB의 세포내 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형되고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제제는 종양 또는 암에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 세포의 유효량은 포유동물에게 투여되고 제제의 유효량은 포유동물에게 투여되고, 그리고 여기서 종양 또는 암은 참조 레벨에 비해 증가된 레벨로 항원을 발현하도록 미리 결정된다.

[0213] 일부 구현예에서, 어댑터 분자는 스파이캐처이고 상호 어댑터 분자는 스파이태그이다. 일부 구현예에서, 어댑터 분자는 스파이태그이고 상호 어댑터 분자는 스파이캐처이다.

[0214] 일부 구현예에서, 세포의 도메인은 스파이캐처 또는 스파이태그를 포함한다. 일 구현예에서, 세포의 도메인은 스파이캐처를 포함한다.

[0215] 일부 구현예에서, 제제는 스파이태그 또는 스파이캐처에 연결된다. 일 구현예에서, 제제는 스파이태그에 연결된다. 다른 구현예에서, 제제는 항체, 항체 단편, scFv, 또는 DARPIn이다. 다른 구현예에서, 제제는 항체이다. 일 구현예에서, 제제는 인간 IgG이다.

[0216] 일 구현예에서, 어댑터 분자 또는 상호 어댑터 분자는 광 활성화 사이트-특이적 컨쥬게이션(LASIC)을 통해 제제에 연결된다. 일 구현예에서, 스파이태그 또는 스파이캐처는 광 활성화 사이트-특이적 컨쥬게이션(LASIC)을 통해 제제에 연결된다. 일 구현예에서, 세포는 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 세포독성 T 림프구(CTL), 대식세포, 줄기 세포, 또는 조절 T 세포이다. 일 구현예에서, 세포는 T 세포이다. 다른 구현예에서, 세포는 자가 세포이다.

[0217] 일 구현예에서, 항원은 HER2, EGFR, EpCAM, 또는 CD20이다.

[0218] 일 구현예에서, 예비-무장된 세포를 생성하기 위해 포유동물에 투여하기 전에 세포를 제제와 접촉시키고 예비-무장된 세포를 포유동물에 후속적으로 투여한다. 다른 구현예에서, 세포는 포유동물에게 제제를 투여하기 전에 포유동물에게 투여된다. 일부 구현예에서, 투여되는 제제의 양 및/또는 투여되는 세포의 수 또는 양은 원하는 레벨의 용해 활성을 생성하도록 선택되거나 조정된다.

- [0219] 조성물
- [0220] 본 발명은 세포의 및 세포내 도메인을 포함하는 일종의 범용 면역 수용체를 제공한다. 세포의 도메인은 달리 세포의 결합 도메인으로 지칭되는 독특한 결합 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 도메인은 또한 힌지 영역을 포함한다. 세포내 도메인 또는 그렇지 않으면 세포질 도메인은 공동자극 신호전달 영역 및 제타 사슬 부분을 포함한다. 공동자극 신호전달 영역은 공동자극 분자의 세포내 도메인을 포함하는 범용 면역 수용체의 일부를 지칭한다. 공동자극 분자는 항원에 대한 림프구의 효율적인 반응에 필요한 항원 수용체 또는 그들의 리간드 이외의 세포 표면 분자이다.
- [0221] 범용 면역 수용체의 세포의 도메인과 막횡단 도메인 사이, 또는 보편적 면역 수용체의 세포질 도메인과 막횡단 도메인 사이에 스페이스 도메인이 혼입될 수 있다. 본 명세서에 사용된 용어 "스페이스 도메인"은 일반적으로 막횡단 도메인을 폴리펩타이드 사슬의 세포의 도메인 또는 세포질 도메인에 연결하는 기능을 하는 임의의 올리고- 또는 폴리펩타이드를 의미한다. 스페이스 도메인은 최대 300개의 아미노산, 바람직하게는 10 내지 100개의 아미노산, 가장 바람직하게는 25 내지 50개의 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0222] 본 발명은 세포 내로 직접 형질도입될 수 있는 범용 면역 수용체를 발현할 수 있는 레트로바이러스 및 렌티바이러스 벡터 컨스트럭트를 포함한다. 본 발명은 또한 세포 내로 직접 형질감염될 수 있는 RNA 또는 DNA 컨스트럭트를 포함한다. 형질감염에 사용하기 위해 mRNA를 생성하는 방법은, 특별히 설계된 프라이머로 주형을 시험관 내 전사(IVT)한 후, 폴리A를 첨가하여 3' 및 5' 비번역 서열("UTR"), 5' 캡 및/또는 내부 리보솜 진입 부위(IRES), 발현될 유전자 및 폴리A 꼬리를 포함하는 일반적으로 길이가 50-2000 염기인 컨스트럭트를 생성하는 것을 수반한다. 그렇게 생산된 RNA는 다른 종류의 세포를 효율적으로 형질감염시킬 수 있다. 일 구현예에서, 주형은 범용 면역 수용체에 대한 서열을 포함한다.
- [0223] 범용 면역 수용체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 벡터가 제조될 수 있다. 이어서, 세포주는 범용 면역 수용체를 발현하도록 조작될 수 있고, 범용 면역 수용체를 발현하는 세포는 단리되어 본 명세서에 개시된 방법에서 사용될 수 있다.
- [0224] 범용 면역 수용체를 발현하는 세포는 당업자에게 공지된 기술을 사용하여 대상체에 투여하기 위해 제형화될 수 있다. 범용 면역 수용체를 발현하는 세포의 제형은 약학적으로 허용되는 부형제(들)를 포함할 수 있다. 제형에 포함된 부형제는 예를 들어 표지의 성질, 세포 조성 및 투여 방식에 따라 다른 목적을 가질 것이다. 일반적으로 사용되는 부형제의 예시는 다음을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다: 염수, 완충 식염수, 텍스트로스, 감염용물, 글리세롤, 에탄올 및 이들의 조합, 안정화제, 가용화제 및 계면활성제, 완충제 및 보존제, 등장화제, 증량제, 및 윤활제.
- [0225] 바람직하게는, 범용 면역 수용체는 세포의 도메인, 막횡단 도메인 및 세포질 도메인을 포함한다. 세포의 도메인 및 막횡단 도메인은 이러한 도메인의 임의의 원하는 공급원으로부터 유래될 수 있다.
- [0226] 세포의 표지 결합 도메인
- [0227] 본 발명의 범용 면역 수용체의 세포의 도메인은 어댑터 분자(예를 들어, 스파이태그 또는 스파이캐처)를 포함한다. 일 구현예에서, 스파이태그 또는 스파이캐처는 임의의 관심 분자에 결합될 수 있는, 상호 태그, 즉 스파이캐처 또는 스파이태그 각각과 연관된다. 일 구현예에서, 세포의 도메인 또는 상호 태그는 CH1 및 힌지 영역의 존재에 의해 Ig 경쇄와 차례로 공유 결합될 수 있는, 또는 힌지, CH2 및 CH3 도메인의 존재에 의해 다른 Ig 중쇄/경쇄 복합체와 공유적으로 결합될 수 있는 Ig 중쇄로 이루어질 수 있다. 후자의 경우, 키메라 컨스트럭트에 결합되는 중/경쇄 복합체는 키메라 컨스트럭트의 항체 특이성과 구별되는 특이성을 갖는 항체를 구성할 수 있다. 상기 항체의 기능, 소망하는 구조 및 신호 전달에 따라, 사슬 전체를 사용하거나, 또는 절단 사슬을 사용할 수 있으며, 여기서 CH1, CH2 또는 CH3 도메인의 전부 또는 일부가 제거되거나 힌지 영역의 전부 또는 일부가 제거될 수 있다.
- [0228] 본 발명은 상호 태그인 스파이태그 또는 스파이캐처 각각을 포함하는 임의의 분자에 결합하는 스파이캐처 또는 스파이태그 시스템을 사용하는 입양 T 세포 요법의 보편적인 전략에 기초한다. 스파이태그 또는 스파이캐처 모이어티와 융합, 컨주게이트, 결합 또는 표지되는 것과 같이 결합될 수 있는 임의의 분자가 본 발명에 포함된다. 예를 들어, 본 발명의 분자는 단백질(항체, 항체 단편, scFv, 단백질 스캐폴드, 수용체, 리간드), 펩타이드, 올리고뉴클레오티드, 영상화/표지 제제 등을 포함한다. 본 발명에 유용한 다른 유형의 표지의 예시는 다음을 포함한다: myc-태그, FLAG-태그, His-태그, HA-태그, 형광 단백질(예컨대, 녹색 형광 단백질(GFP)), 형광단(예컨대, 테트라메틸로다민(TRITC)), 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 디니트로페놀, 페리딘 클로로필 단백질 복

합체, 녹색 형광 단백질, 비오틴, 피코에리트린(PE), 히스티딘, 스트렙타비딘, 아비딘, 호스 래디시 페록시다제, 팔미토일화, 니트로실화, 알칼라닌 포스포타제, 글루코스 옥시다제, 글루타티온 S-트랜스퍼라제(GST), 말토스 결합 단백질, 플루오레신 및 양자점 나노 결정을 포함한 임의의 유형의 형광 물질, 방사성 동위원소, 및 1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산(DOTA), 디에틸렌 트리아민 펜타아세트산(DTPA), 및 1,4,7-트리아자사이클로노난-1,4,7-트리아세트산(NOTA)을 포함하는 방사성 동위원소 표지에 사용되는 임의의 유형의 화합물.

[0229] 일 구현예에서, 본 발명의 범용 면역 수용체는 항원 결합 도메인으로 달리 지칭되는 표적-특이적 결합 요소를 포함한다. 모이어티의 선택은 표적 세포의 표면을 정의하는 리간드의 유형과 수에 의존한다. 예를 들어, 항원 결합 도메인은 특정 질병 상태와 관련된 표적 세포 상에서 세포 표면 마커로 작용하는 리간드를 인식하도록 선택될 수 있다. 따라서, 본 발명의 범용 면역 수용체에서 항원 모이어티 도메인에 대한 리간드로서 작용할 수 있는 세포 표면 마커의 예시는 바이러스, 박테리아 및 기생충 감염, 자가면역 질환 및 암세포와 관련된 것들을 포함한다.

[0230] 일 구현예에서, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터는 각각 스파이태그 또는 스파이캐처 모이어티를 통합하는 임의의 분자에 결합될 수 있는, T 세포 표면 상에서 스파이태그 또는 스파이캐처를 발현하도록 설계된 범용 면역 수용체를 포함한다. 일 구현예에서, 분자는 표적- 또는 항원-특이적 결합 요소를 포함한다. 결합 도메인은 특정 질병 또는 장애와 관련된 표적 세포 상의 세포 표면 마커로서 작용하는 표적, 리간드 또는 항원을 인식하도록 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 항원은 특정 과증식성 장애와 연관될 수 있다. 특정 측면에서, 본 발명의 과증식성 장애 항원은 원발성 또는 전이성 흑색종(melanoma), 중피종(mesothelioma), 흉선종(thymoma), 림프종(lymphoma), 육종(sarcoma), 폐암(lung cancer), 간암(liver cancer), 비호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma), 호지킨 림프종(Hodgkin's lymphoma), 백혈병(leukemias), 자궁암(uterine cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 방광암(bladder cancer), 신장암(kidney cancer) 및 유방암(breast cancer)과 같은 선암종(adenocarcinomas), 전립선암(prostate cancer), 난소암(ovarian cancer), 췌장암(pancreatic cancer) 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 암으로부터 유래된다. 일반적으로, 암성 종양이 현재 스파이태그/스파이캐처 범용 면역 수용체 시스템에 의해 인식될 수 있는 세포 표면 항원을 갖는 한, 암은 임의의 유형의 암일 수 있다.

[0231] 본 발명은 종양 항원에 대한 범용 면역 수용체에 제한되지 않는다. 오히려 질병 또는 장애와 관련된 임의의 표적, 리간드 또는 항원은 본 발명의 범용 면역 수용체에 의해 표적화될 수 있다. 예를 들어, 일 구현예에서, 본 발명의 범용 면역 수용체는 바이러스 항원을 표적으로 한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 범용 면역 수용체는 자가-항원을 표적으로 한다. 자가-항원은 건강한 대상체에 의하여 일반적으로 용인되는 항원이지만, 자가면역 장애에서 적응 면역 반응을 유도한다. 예를 들어, 포피 카드헤린(cadherin)은 심상성 천포창(pemphigus vulgaris)에서 자가-면역 반응을 유도하는 자가 항원이다. 본 발명의 조성물에 의해 표적화되기에 유용한 다른 비-제한적인 자가-항원(그들의 관련된 자가면역 장애와 함께 나열됨)은 췌장 β -세포 항원(인슐린-의존성 당뇨병; insulin-dependent diabetes mellitus), 아세틸콜린 수용체(중증 근무력증; Myasthenia gravis), 갑상선-자극 호르몬 수용체(그라예브스병), 인슐린 수용체(저혈당; hypoglycemia), 당단백질 IIb/IIIa(면역 혈소판 감소성 자반병; immune thrombocytopenic purpura), Rh 혈액형 항원(자가면역 용혈성 빈혈; autoimmune hemolytic anemia), 류마티스 인자 IgG 복합체(류마티스 관절염), 및 수초 염기성 단백질(실험적 자가면역 뇌척수염, 다발성 경화증; experimental autoimmune encephalomyelitis, multiple sclerosis)을 포함한다.

[0232] 막형단 도메인

[0233] 막형단 도메인과 관련하여, 본 발명의 스파이태그/스파이캐처 범용 면역 수용체는 스파이태그/스파이캐처 시스템에 결합된 세포의 도메인에 융합된 막형단 도메인을 포함하도록 설계될 수 있다. 일 구현예에서, 범용 면역 수용체의 또 다른 도메인과 자연적으로 회합된 막형단 도메인이 사용된다. 일부 경우에, 막형단 도메인은 수용체 복합체의 다른 구성원과의 상호작용을 최소화하기 위해 동일하거나 상이한 표면 막 단백질의 막형단 도메인에 대한 이러한 도메인의 결합을 피하기 위해 아미노산 치환에 의해 선택되거나 변형될 수 있다.

[0234] 막형단 도메인은 천연 또는 합성 공급원으로부터 유래될 수 있다. 공급원이 천연인 경우, 도메인은 임의의 막-결합 또는 막형단 단백질로부터 유래될 수 있다. 본 발명에서 특히 사용되는 막형단 영역은 T-세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 체, CD28, CD3 입실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154로부터 유래될 수 있다(즉 이들의 적어도 막형단 영역을 포함). 대안적으로, 막형단 도메인은 합성일 수 있으며, 이 경우 류신 및 발린과 같은 소수성 잔기를 주로 포함할 것이다. 바람직하게는 페닐알라닌, 트립토판 및 발린의 삼중체(triplet)가 합성 막형단 도메인의 각 말단에서 발견될 것이다. 선택적으

로, 짧은 올리고- 또는 폴리펩타이드 링커, 바람직하게는 2 내지 10개 아미노산 길이는 범용 면역 수용체의 막 횡단 도메인과 세포질 신호전달 도메인 사이의 연결을 형성할 수 있다. 글리신-세린 이중체(doublet)는 특히 적합한 링커를 제공한다.

[0235]

[0236] 세포질 도메인

[0237] 본 발명의 스파이태그/스파이크처 범용 면역 수용체의 세포질 도메인 또는 그렇지 않으면 세포내 신호전달 도메인은 범용 면역 수용체가 위치하는 면역 세포의 정상 효과기 기능 중 적어도 하나의 활성화를 담당한다. 용어 "효과기 기능(effector function)"은 세포의 특수화된 기능을 의미한다. 예를 들어, T 세포의 효과기 기능은 세포용해 활성 또는 사이토카인의 분비를 포함하는 헬퍼 활성일 수 있다. 따라서 "세포내 신호전달 도메인 (intracellular signaling domain)"이라는 용어는 효과기 기능 신호를 변환하고 세포가 특수화된 기능을 수행하도록 지시하는 단백질의 부분을 의미한다. 일반적으로 전체 세포내 신호전달 도메인이 채택될 수 있지만 많은 경우에 전체 사슬을 사용할 필요는 없다. 세포내 신호전달 도메인의 절단된 부분이 사용되는 정도까지, 이러한 절단된 부분은 효과기 기능 신호를 전달하는 한 온전한 사슬을 대신하여 사용될 수 있다. 따라서, 용어 세포내 신호전달 도메인은 효과기 기능 신호를 전달하기에 충분한 세포내 신호전달 도메인의 임의의 절단된 부분을 포함하는 것을 의미한다.

[0238] 본 발명의 범용 면역 수용체에 사용하기 위한 세포내 신호전달 도메인의 바람직한 예는 항원 수용체 결합 (engagement)을 따르는 신호 전달을 개시하기 위해 협력하여 작용하는 T 세포 수용체(TCR) 및 공-수용체의 세포질 서열 뿐만 아니라 이들 서열의 임의의 유도체 또는 변이체 및 동일한 기능적 능력을 갖는 임의의 합성 서열을 포함한다.

[0239] TCR을 통해 생성된 신호 단독으로는 T 세포의 완전한 활성화에 충분하지 않으며 2차 또는 공동-자극 신호가 또한 필요하다고 알려져 있다. 따라서, T 세포 활성화는 세포질 신호전달 서열의 두 가지 별개의 부류에 의해 매개된다고 말할 수 있다: TCR을 통해 항원-의존성 1차 활성화를 개시하는 것들(1차 세포질 신호전달 서열) 및 2차 또는 공동-자극 신호를 제공하기 위하여 항원-독립적 방식으로 작용하는 것들(2차 세포질 신호 전달 서열).

[0240] 1차 세포질 신호전달 서열은 TCR 복합체의 1차 활성화를 자극 방식 또는 억제 방식으로 조절한다. 자극 방식으로 작용하는 1차 세포질 신호전달 서열은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAMs으로 알려진 신호 모티프를 포함할 수 있다.

[0241] 본 발명에서 특히 사용되는 1차 세포질 신호전달 서열을 함유하는 ITAM의 예는 TCR 제타, FcR 감마, FcR 베타, CD3 감마, CD3 델타, CD3 입실론, CD5, CD22, CD79a, CD79b, 및 CD66d로부터 유래된 것들을 포함한다. 본 발명의 범용 면역 수용체에서 세포질 신호전달 분자가 CD3 제타로부터 유래된 세포질 신호전달 서열을 포함하는 것이 특히 바람직하다.

[0242] 바람직한 구현예에서, 범용 면역 수용체의 세포질 도메인은 그 자체로 CD3-제타 신호전달 도메인을 포함하도록 설계되거나 또는 본 발명의 범용 면역 수용체의 맥락에서 유용한 임의의 다른 원하는 세포질 도메인(들)과 조합될 수 있다. 예를 들어, 범용 면역 수용체의 세포질 도메인은 CD3 제타 사슬 부분 및 공동자극 신호전달 영역을 포함할 수 있다. 공동자극 신호전달 영역은 공동자극 분자의 세포내 도메인을 포함하는 범용 면역 수용체의 일부를 지칭한다. 공동자극 분자는 항원에 대한 림프구의 효율적인 반응에 필요한 항원 수용체 또는 그들의 리간드 이외의 세포 표면 분자이다. 이러한 분자의 예는 CD27, CD28, 4-1BB(CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능 관련 항원-1(LFA-1), CD2, CD3, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 및 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드 등을 포함한다. 따라서, 본 발명은 주로 공동-자극 신호전달 요소로서 CD28 및 4-1BB로 예시되지만, 다른 공동자극 요소도 본 발명의 범위 내에 있다.

[0243] 본 발명의 범용 면역 수용체의 세포질 신호전달 부분 내의 세포질 신호전달 서열은 무작위 또는 특정 순서로 서로 연결될 수 있다. 선택적으로, 짧은 올리고- 또는 폴리펩타이드 링커, 바람직하게는 2 내지 10개 아미노산 길이가 연결을 형성할 수 있다. 글리신-세린 이중체는 특히 적합한 링커를 제공한다.

[0244] 일 구현예에서, 세포질 도메인은 CD3-제타의 신호전달 도메인을 포함하도록 설계된다. 다른 구현예에서, 세포질 도메인은 CD3-제타, CD28, 4-1BB 등의 임의의 조합을 포함하도록 설계된다.

[0245] 일 구현예에서, 스파이태그/스파이크처 범용 면역 수용체는 세포질 도메인이 실질적으로 결여될 수 있거나 또는 세포질 도메인은 신호전달 능력이 실질적으로 결여될 수 있다. 이러한 구현예에서, 스파이태그/스파이크처 범용

면역 수용체는 T 세포 표면에 항체, 사이토카인 및 영상화 모이어티를 포함하지만 이에 제한되지 않는 태그된 단백질을 부착하기 위한 고정 분자의 역할을 할 수 있다.

[0246] 분자의 라벨링

[0247] 본 발명은 상호 스파이태그/스파이캐처 모이어티를 갖는 표지된 분자에 대한 스파이태그/스파이캐처 범용 면역 수용체를 포괄한다. 관심 분자는 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 표지될 수 있다. 예를 들어, 일 구현예에서, 표지된 분자를 포함하는 조성물은 범용 면역 수용체에 결합된다. 상기 분자는 예를 들어 항체, 항체 단편 및 scFv, 펩타이드, 단백질 스캐폴드, 핵산, 앵타머, 리보자임, 소분자 등과 같은 항원 결합 도메인 또는 그 단편을 포함하는 임의의 분자일 수 있다. 일부 측면에서, 관심 분자는 표지가 없지만 여전히 범용 면역 수용체와 상호작용한다. 예를 들어, 일 구현예에서, 관심 분자를 포함하는 조성물은 표지가 없는 반면, 범용 면역 수용체를 포함하는 제2 조성물은 표지를 포함한다.

[0248] 한 측면에서, 범용 면역 수용체 표적 리간드를 생성하는 방법이 제공되며, 여기서 상기 방법은 표적 리간드에 대한 어댑터 분자 또는 상호 어댑터 분자의 광활성 사이트-특이적 컨쥬게이션(LASIC)을 통해 표적화 리간드에 어댑터 분자 또는 상호 어댑터 분자를 연결하는 것을 포함한다. 또 다른 측면에서, 표적화 리간드를 포함하는 조성물이 제공되며, 여기서 표적화 리간드는 광 활성화 사이트-특이적 컨쥬게이션(LASIC)을 통해 어댑터 분자 또는 상호 어댑터에 연결된다. 일부 구현예에서, 어댑터 분자는 스파이캐처 또는 스파이태그이다. 일부 구현예에서, 상호 어댑터 분자는 스파이캐처 또는 스파이태그이다. 일부 다른 구현예에서, 표적화 리간드는 항체, 항체 단편, scFv, 또는 DARPin이다. 일부 구현예에서, 표적화 리간드는 인간 IgG이다. 일부 구현예에서, 표적화 리간드는 임상-등급 항체이다.

[0249] 임의의 알려진 분자 세트를 사용하여 스파이태그/스파이캐처 범용 면역 수용체를 관심 항원에 표적화할 수 있다. 분자의 비-제한적인 예는 항원 결합 도메인 또는 이의 단편, 예컨대 항체, 항체 단편, 및 scFv, 펩타이드, 단백질 스캐폴드, 올리고뉴클레오타이드, 소분자 및 리간드를 포함하는 임의의 분자를 포함한다. 융합, 컨쥬게이션, 또는 결합과 같이 결합되거나 분자에 부착될 수 있는 표지의 잘 알려진 예는 myc-태그, FLAG-태그, His-태그, HA-태그, 형광 단백질(예컨대, 녹색 형광 단백질(GFP)), 형광단(예컨대, 테트라메틸로다민(TRITC)), 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 디니트로페놀, 페리딘 클로로필 단백질 복합체, 녹색 형광 단백질, 비오틴, 피코에리트린(PE), 히스티딘, 스트렙타비딘, 아비딘, 호스 래디시 페록시다제, 팔미토일화, 니트로실화, 알칼라닌 포스파타제, 글루코스 옥시다제, 글루타티온 S-트랜스퍼라제(GST), 말토스 결합 단백질, 양자점 나노 결정을 포함한 임의의 유형의 형광 물질, 방사성 동위원소, 및 1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산(DOTA), 디에틸렌 트리아민 펜타아세트산(DTPA), 및 1,4,7-트리아자사이클로노난-1,4,7-트리아세트산(NOTA)을 포함하는 방사성 동위원소 표지에 사용되는 임의의 유형의 화합물을 포함한다.

[0250] 이러한 표지 중 임의의 것으로 분자를 표지하는 것은 직접 또는 간접적으로 수행될 수 있다. 라벨은 화학적 커플링 및 화학적 가교-링커와 같은 기술을 사용하여 분자에 컨쥬게이션될 수 있다. 대안적으로, 융합 단백질로서 표지된 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 백터가 제조될 수 있다. 그 다음, 세포주는 표지된 분자를 발현하도록 조작될 수 있고, 표지된 분자는 배양 배지로부터 단리되고, 정제되고 본 명세서에 개시된 방법에서 사용될 수 있다. 표지된 아미노산, 표지된 펩타이드, 표지된 단백질 또는 분자 리포터는 또한 발현된 단백질 결합(예를 들어, 소르타제, 인테인 등을 사용)을 통해 분자에 결합될 수 있다.

[0251] 표지된 분자는 당업자에게 공지된 기술을 사용하여 대상체에 투여하기 위해 제형화될 수 있다. 표지된 분자의 제형은 약제학적으로 허용되는 부형제(들)를 포함할 수 있다. 제형에 포함된 부형제는 예를 들어 표지의 성질, 항원 결합 조성물 및 투여 방식에 따라 다른 목적을 가질 것이다. 일반적으로 사용되는 부형제의 예는 이에 제한됨 없이 다음을 포함한다: 염수, 완충 식염수, 텍스트로스, 감염용 물, 글리세롤, 에탄올 및 이들의 조합, 안정화제, 가용화제 및 계면활성제, 완충제 및 보존제, 등장화제, 증량제, 및 윤활제.

[0252] 다른 구현예에서, 범용 면역 수용체는 비표지된 중간체에 결합하는 세포외 도메인을 포함하고, 이는 차례로 분자 또는 표지된 분자에 결합한다.

[0253] 백터

[0254] 본 발명은 스파이태그/스파이캐처 범용 면역 수용체의 서열을 포함하는 DNA 컨스트럭트를 포괄하며, 여기서 서열은 세포내 도메인의 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 세포외 도메인의 핵산 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 세포외 도메인은 스파이태그 도메인을 포함한다. 다른 구현예에서, 세포외 도메인은 스파이캐처 도메인을 포함한다. 본 발명의 범용 면역 수용체에서 사용될 수 있는 예시적인 세포내 도메인은 CD3-제타, CD28,

4-1BB 등의 세포내 도메인을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 예에서, 보편적 면역 수용체는 CD3-제타, CD28, 4-1BB 등의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0255] 일 구현예에서, 스파이캐처/스파이태그 면역 수용체 컨스트럭트는 서열 번호: 1, 서열 번호: 2, 서열 번호: 3, 서열 번호: 4, 서열 번호: 5, 서열 번호: 6, 서열 번호: 7, 서열 번호: 8, 서열 번호: 9, 서열 번호: 10, 서열 번호: 11, 서열 번호: 12, 서열 번호: 13, 서열 번호: 14, 서열 번호: 15, 서열 번호: 16, 서열 번호: 17, 서열 번호: 18, 서열 번호: 19, 서열 번호: 20, 서열 번호: 21, 서열 번호: 22, 서열 번호: 23, 서열 번호: 24, 서열 번호: 25, 서열 번호: 26, 서열 번호: 27, 서열 번호: 28, 서열 번호: 29, 또는 서열 번호: 30을 포함한다. 아래 표 1은 스파이캐처/스파이태그 면역 수용체 컨스트럭트의 서열 식별자를 요약한다:

[0256] 표 1: 현재 스파이캐처/스파이태그 컨스트럭트에 대한 서열 식별자

표 1

서열 번호:	IDENTITY
서열 번호: 1	pELNS(SpeI)-GFP-스파이태그-CD28-제타, 핵산서열
서열 번호: 2	pELNS(SpeI)-GFP-스파이태그-CD28-제타, 아미노산 서열
서열 번호: 3	pELNS(SpeI)-GFP-스파이태그-GGS-CD28-제타, 핵산서열
서열 번호: 4	pELNS(SpeI)-GFP-스파이태그-GGS-CD28-제타, 아미노산 서열
서열 번호: 5	pELNS(SpeI)-스파이캐처-CD28-제타, 핵산서열
서열 번호: 6	pELNS(SpeI)-스파이캐처-CD28-제타, 아미노산 서열
서열 번호: 7	pELNS(SpeI)-스파이캐처-GGS-CD28-제타, 핵산서열
서열 번호: 8	pELNS(SpeI)-스파이캐처-GGS-CD28-제타, 아미노산 서열
서열 번호: 9	pELNS(SpeI)-스파이태그-CD28-제타, 핵산서열
서열 번호: 10	pELNS(SpeI)-스파이태그-CD28-제타, 아미노산 서열
서열 번호: 11	pELNS(SpeI)-스파이태그-GGS-CD28-제타, 핵산서열
서열 번호: 12	pELNS(SpeI)-스파이태그-GGS-CD28-제타, 아미노산 서열
서열 번호: 13	pELNS(SpeI)-GFP-스파이캐처-CD28-제타, 핵산서열
서열 번호: 14	pELNS(SpeI)-GFP-스파이캐처-CD28-제타 아미노산 서열
서열 번호: 15	pELNS(SpeI)-GFP-스파이캐처-GGS-CD28-제타, 핵산서열
서열 번호: 16	pELNS(SpeI)-GFP-스파이캐처-GGS-CD28-제타, 아미노산 서열
서열 번호: 17	Myc 태그-DARPin9.26-스파이태그- His 태그, 핵산서열
서열 번호: 18	Myc 태그-DARPin9.26-스파이태그- His 태그, 아미노산 서열
서열 번호: 19	스파이태그003 EGFR DARPIN, 핵산서열
서열 번호: 20	스파이태그003 EGFR DARPIN, 아미노산 서열
서열 번호: 21	스파이태그003 HER2 DARPIN, 핵산서열
서열 번호: 22	스파이태그003 HER2 DARPIN, 아미노산 서열
서열 번호: 23	스파이태그003 Protein G, 핵산서열
서열 번호: 24	스파이태그003 Protein G, 아미노산 서열
서열 번호: 25	스파이캐처003 BBz, 핵산서열
서열 번호: 26	스파이캐처003 BBz, 아미노산 서열
서열 번호: 27	스파이캐처003 28z, 핵산서열
서열 번호: 28	스파이캐처003 28z, 아미노산 서열
서열 번호: 29	스파이캐처003 델타 제타, 핵산서열
서열 번호: 30	스파이캐처003 델타 제타, 아미노산 서열

[0258] 일 구현예에서, 본 발명의 범용 면역 수용체는 스파이캐처 또는 스파이태그 도메인, 인간 CD8 알파 힌지 및 막 횡단 도메인, 및 CD28 및 CD3-제타 신호전달 도메인을 포함한다.

[0259] 원하는 분자를 코딩하는 핵산 서열은 표준 기술을 사용하여 당업계에 공지된 재조합 방법을 사용하여 얻을 수 있다. 대안적으로, 관심 유전자는 합성적으로 생성될 수 있다.

[0260] 본 발명은 또한 본 발명의 DNA(예를 들어, 스파이태그 또는 스파이캐처 도메인을 인코딩하는 DNA)가 삽입된 벡터를 제공한다. 렌티바이러스와 같은 레트로바이러스에서 파생된 벡터는, 딸 세포에서 이식유전자의 장기적이고 안정적인 통합 및 그의 전파를 허용하기 때문에, 장기 유전자 전달을 달성하는 데 적합한 도구이다. 렌티바이러스 벡터는 간세포와 같은 비-증식성 세포를 형질도입할 수 있다는 점에서 무린 백혈병 바이러스와 같은 종양-레트로바이러스에서 유래된 벡터에 비해 추가적인 이점이 있다. 그들은 또한 낮은 면역원성의 추가 이점을 가지고

있다.

- [0261] 간략하게 요약하면, 범용 면역 수용체를 인코딩하는 자연 또는 합성 핵산의 발현은 일반적으로 범용 면역 수용체(예: 스파이태그/스파이캐처(SpyTag/SpyCatcher)) 폴리펩타이드 또는 그 일부를 프로모터에 인코딩하는 핵산을 작동 가능하게 연결하고 발현 벡터에 컨스트럭트를 통합함으로써 달성된다. 벡터는 진핵생물에서 복제 및 통합에 적합할 수 있다. 전형적인 클로닝 벡터는 원하는 핵산 서열의 발현 조절에 유용한 전사 및 번역 종결자, 개시 서열 및 프로모터를 함유한다.
- [0262] 본 발명의 발현 컨스트럭트는 또한 표준 유전자 전달 프로토콜을 사용하여 핵산 면역화 및 유전자 치료에 사용될 수 있다. 유전자 전달 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,399,346호, 제5,580,859호, 제5,589,466호에 기술되어 있으며, 그 전체 내용이 참조에 의해 본 명세서에 통합된다. 다른 구현예에서, 본 발명은 유전자 치료 벡터를 제공한다.
- [0263] 핵산은 여러 유형의 벡터로 클로닝될 수 있다. 예를 들어, 핵산은 플라스미드, 파지미드, 파지 유도체, 동물 바이러스 및 코스미드를 포함하지만 이에 제한되지 않는 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 특히 관심 있는 벡터에는 발현 벡터, 복제 벡터, 프로브 생성 벡터 및 시퀀싱 벡터가 포함된다.
- [0264] 또한, 발현 벡터는 바이러스 벡터의 형태로 세포에 제공될 수 있다. 바이러스 벡터 기술은 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 삼브룩 등(Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)과 다른 바이러스학 및 분자생물학 매뉴얼에 설명되어 있다. 벡터로서 유용한 바이러스는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관된 바이러스, 헤르페스 바이러스 및 렌티바이러스를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일반적으로, 적합한 벡터는 적어도 하나의 유기체에서 기능적인 복제 기점, 프로모터 서열, 편리한 제한 엔도뉴클레아제 부위, 및 하나 이상의 선택가능한 마커를 함유한다(예를 들어, WO 01/96584; WO 01/29058; 및 미국특허 제6,326,193호).
- [0265] 포유류 세포로의 유전자 전달을 위해 다수의 바이러스 기반 시스템이 개발되었다. 예를 들어, 레트로바이러스는 유전자 전달 시스템을 위한 편리한 플랫폼을 제공한다. 선택된 유전자는 당업계에 공지된 기술을 사용하여 벡터에 삽입되고 레트로바이러스 입자에 패키징될 수 있다. 그 다음, 재조합 바이러스는 단리되어 생체내 또는 생체외에서 대상체의 세포에 전달될 수 있다. 다수의 레트로바이러스 시스템이 당업계에 공지되어 있다. 일부 구현예에서, 아데노바이러스 벡터가 사용된다. 다수의 아데노바이러스 벡터가 당업계에 공지되어 있다. 한 실시양태에서, 렌티바이러스 벡터가 사용된다.
- [0266] 추가 프로모터 요소, 예를 들어 인핸서는 전사 개시의 빈도를 조절한다. 최근에 많은 프로모터가 시작 부위의 다운스트림에도 또한 기능적 요소를 포함하는 것으로 나타났음에도 불구하고, 일반적으로 이들은 시작 부위의 업스트림 30-110 bp 영역에 위치한다. 프로모터 요소 사이의 간격은 종종 유연하므로 요소가 서로에 대해 반전되거나 이동할 때 프로모터 기능이 보존된다. 티미딘 키나제(tk) 프로모터에서 프로모터 요소 사이의 간격은 활성이 감소하기 시작하기 전에 50bp까지 증가할 수 있다. 프로모터에 따라 개별 요소가 협력적으로 또는 독립적으로 기능하여 전사를 활성화할 수 있는 것으로 보인다.
- [0267] 적합한 프로모터의 한 예는 즉시 초기 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터 서열이다. 이 프로모터 서열은 이에 작동적으로 연결된 임의의 폴리뉴클레오티드 서열의 높은 수준의 발현을 유도할 수 있는 강력한 구성적 프로모터 서열이다. 적합한 프로모터의 또 다른 예는 신장 성장 인자-1α(Elongation Growth Factor -1α; EF-1α)이다. 그러나 다른 구성적 프로모터 서열도 또한 사용될 수 있으며, 여기에는 액틴 프로모터, 미오신 프로모터, 헤모글로빈 프로모터, 및 크레아틴 키나아제 프로모터와 같은, 그러나 이에 제한되지는 않는 인간 유전자 프로모터뿐만 아니라, 시미안 바이러스 40(simian virus 40; SV40) 초기 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스(mouse mammary tumor virus; MMTV), 인간 면역결핍 바이러스(human immunodeficiency virus; HIV) 장기 말단 반복(long terminal repeat; LTR) 프로모터, MoMuLV 프로모터, 조류 백혈병 바이러스 프로모터(avian leukemia virus promoter), 엡스타인-바 바이러스 초기 프로모터(Epstein-Barr virus immediate early promoter), 라우스 육종 바이러스 프로모터(Rous sarcoma virus promoter)가 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 또한, 본 발명은 구성적 프로모터의 사용으로 제한되어서는 안 된다. 유도성 프로모터가 또한 본 발명의 일부로 고려된다. 유도성 프로모터의 사용은 그러한 발현이 바람직할 때 작동적으로 연결된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 켜거나 발현이 바람직하지 않을 때 발현을 끌 수 있는 분자 스위치를 제공한다. 유도성 프로모터의 예는 메탈로티오닌 프로모터(metallothioneine promoter), 글루코코르티코이드 프로모터(glucocorticoid promoter), 프로게스테론 프로모터(progesterone promoter) 및 테트라사이클린 프로모터(tetracycline promoter)를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

- [0268] 범용 면역 수용체 폴리펩타이드 또는 이의 부분의 발현을 평가하기 위해, 세포 내로 도입될 발현 벡터는 또한 바이러스 벡터를 통해 형질감염 또는 감염시키려는 세포 집단으로부터 발현 세포의 식별 및 선택을 용이하게 하기 위한 선별가능한 마커 유전자 또는 리포터 유전자 중 어느 하나 또는 둘 모두를 함유할 수 있다. 다른 측면에서, 선택 가능한 마커는 DNA의 별도 조각 상에 운반될 수 있고 공동-형질감염 절차에 사용될 수 있다. 선택 가능한 마커 및 리포터 유전자는 모두 숙주 세포에서 발현을 가능하게 하는 적절한 조절 서열과 인접할 수 있다. 유용한 선택 가능한 마커는 예를 들어 네오(neo) 등과 같은 항생제-저항성 유전자를 포함한다.
- [0269] 리포터 유전자는 잠재적으로 형질감염된 세포를 식별하고 조절 서열의 기능을 평가하는 데 사용된다. 일반적으로, 리포터 유전자는 수용 유기체 또는 조직에 존재하지 않거나 이에 의해 발현되지 않고, 발현이 일부 용이하게 검출가능한 특성, 예를 들어, 효소 활성에 의해 그 발현이 나타나는 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자이다. 리포터 유전자의 발현은 DNA가 수용 세포에 도입된 후 적절한 시간에 분석된다. 적합한 리포터 유전자는 루시페라제, 베타-갈락토시다제, 클로로암페니콜 아세틸 트랜스퍼라제, 분비된 알칼리 포스파타제, 또는 녹색 형광 단백질 유전자를 코딩하는 유전자를 포함할 수 있다(예를 들어, Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82). 적합한 발현 시스템은 잘 알려져 있으며 공지된 기술을 사용하여 제조하거나 상업적으로 얻을 수 있다. 일반적으로 리포터 유전자의 발현 레벨이 가장 높은 최소 5' 플랭킹 영역을 갖는 컨스트럭트가 프로모터로 확인된다. 이러한 프로모터 영역은 리포터 유전자에 연결될 수 있고 프로모터-구동 전사를 조절하는 능력에 대하여 체제를 평가하는 데 사용될 수 있다.
- [0270] 유전자를 세포 내로 도입하고 발현시키는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 발현 벡터의 맥락에서, 벡터는 당업계의 임의의 방법에 의해 숙주 세포, 예를 들어 포유동물, 박테리아, 효모 또는 곤충 세포 내로 용이하게 도입될 수 있다. 예를 들어, 발현 벡터는 물리적, 화학적 또는 생물학적 수단에 의해 숙주 세포로 전달될 수 있다.
- [0271] 폴리뉴클레오타이드를 숙주 세포에 도입하기 위한 물리적 방법은 인산칼슘 침전, 리포펙션, 입자 충격, 미세주입, 전기천공법 등을 포함한다. 벡터 및/또는 외인성 핵산을 포함하는 세포를 생산하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어 삼브룩 등을 참조하라(Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York). 폴리뉴클레오타이드를 숙주 세포에 도입하기 위한 바람직한 방법은 인산칼슘 형질감염이다.
- [0272] 관심 폴리뉴클레오타이드를 숙주 세포에 도입하기 위한 생물학적 방법에는 DNA 및 RNA 벡터의 사용이 포함된다. 바이러스 벡터, 특히 레트로바이러스 벡터는 유전자를 포유동물, 예를 들어 인간 세포에 삽입하기 위해 가장 널리 사용되는 방법이 되었다. 다른 바이러스 벡터는 렌티바이러스, 포스바이러스, 단순 헤르페스 바이러스 I, 아데노바이러스 및 아데노-관련 바이러스 등으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 미국특허 제5,350,674호 및 제5,585,362호를 참조하라.
- [0273] 폴리뉴클레오타이드를 숙주 세포에 도입하기 위한 화학적 수단은 거대분자 복합체, 나노캡슐, 미소구체, 비드와 같은 콜로이드 분산 시스템 및 수중유 에멀전, 미셀, 혼합 미셀 및 리포솜을 포함하는 지질-기반 시스템을 포함한다. 시험관내 및 생체내 전달 비히클로서 사용하기 위한 예시적인 콜로이드 시스템은 리포솜(예를 들어, 인공 막 소포)이다.
- [0274] 비-바이러스 전달 시스템이 사용되는 경우, 예시적인 전달 비히클은 리포솜이다. 핵산을 숙주 세포로 도입하기 위해 지질 제형의 사용이 고려된다(시험관내, 생체외 또는 생체내). 다른 측면에서, 핵산은 지질과 연관될 수 있다. 지질과 관련된 핵산은 리포솜의 수성 내부에 캡슐화된 것, 리포솜의 지질 이중층 내에 산재된 것, 리포솜 및 올리고뉴클레오타이드 둘 모두와 관련된 연결 분자를 통해 리포솜에 부착된 것, 리포솜 내에 포획된 것, 리포솜과 복합된 것, 지질을 함유한 용액 내에 분산된 것, 지질과 혼합된 것, 지질과 결합된 것, 지질 내에 현탁액으로서 함유된 것, 미셀과 함유되거나 복합된 것, 또는 지질과 그와 달리 연합된 것일 수 있다. 지질, 지질/DNA 또는 지질/발현 벡터 관련된 조성물은 용액 내 임의의 특정 구조로 제한되지 않는다. 예를 들어, 그들은 이중층 구조, 미셀 또는 "붕괴된" 구조로 존재할 수 있다. 또한 그들은 용액 내에 단순히 산재되어, 크기나 모양이 균일하지 않은 응집체를 형성할 수도 있다. 지질은 자연적으로 발생하거나 합성 지질일 수 있는 지방 물질이다. 예를 들어, 지질에는 세포질에서 자연적으로 발생하는 지방 방울뿐만 아니라, 지방산, 알코올, 아민, 아미노 알코올 및 알데하이드와 같은 장-쇄 지방족 탄화수소 및 그 유도체를 포함하는 화합물 부류가 포함된다.
- [0275] 사용에 적합한 지질은 상업적 출처에서 얻을 수 있다. 예를 들어, 디미리스틸 포스파티딜콜린("DMPC")은 미주리주 세인트루이스 소재의 시그마로부터 입수할 수 있고; 디세틸 포스페이트("DCP")는 K & K 라보라토리스(Plainview, NY)로부터 입수할 수 있고; 콜레스테롤("Choi")은 칼바이오캡-베링(Calbiochem-Behring)에서 얻을 수 있고; 디미리스틸 포스파티딜글리세롤("DMPG") 및 기타 지질은 아반티 폴라 리피드 인크(anti Polar Lipids,

Inc., Birmingham, AL)로부터 입수할 수 있다. 클로로포름 또는 클로로포름/메탄올의 지질 스톱 용액은 약 -20 °C에서 보관할 수 있다. 클로로포름은 메탄올보다 쉽게 증발하기 때문에 유일한 용매로 사용된다. "리포솜 (liposome)"은 봉입된 지질 이중층 또는 응집체의 생성에 의해 형성되는 다양한 단일 및 다중층 지질 비히클을 포괄하는 일반적인 용어이다. 리포솜은 인지질 이중층 막과 내부 수성 매질을 갖는 소포 구조를 갖는 것을 특징으로 할 수 있다. 멀티라멜라 리포솜은 수성 매질로 분리된 여러 지질층을 가지고 있다. 인지질이 과량의 수용액 내에 현탁되면 자발적으로 형성된다. 지질 성분은 닫힌 구조가 형성되기 전에 자가-재배열을 거치고, 지질 이중층 사이에 물과 용해된 용질을 가둔다(Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5: 505-10). 그러나, 용액 내에서 정상적인 소포 구조와 다른 구조를 갖는 조성물도 포괄된다. 예를 들어, 지질은 미셀 구조를 가정하거나 또는 단순히 지질 분자의 불균일한 응집체로 존재할 수 있다. 또한 리포펙타민-핵산 복합체가 고려된다.

[0276] 외인성 핵산을 숙주 세포에 도입하거나 달리 세포를 본 발명의 억제제에 노출시키는 데 사용되는 방법에 관계없이, 숙주 세포에서 재조합 DNA 서열의 존재를 확인하기 위해, 다양한 분석이 수행될 수 있다. 이러한 분석은 예를 들어 서던 및 노던 블롯팅, RT-PCR 및 PCR과 같은 당업자에게 잘 알려진 "분자 생물학적" 분석법; 예를 들어 면역학적 수단(ELISAs 및 웨스턴 블롯)에 의하여 또는 본 발명의 범위에 속하는 제제를 확인하기 위해 본 명세서에 기재된 분석법에 의하여 특정 펩타이드의 존재 또는 부존재를 검출하는 것과 같은 "생화학적" 분석법을 포함한다.

[0277] RNA 형질감염

[0278] 일 구현예에서, 본 발명의 유전적으로 변형된 T 세포는 RNA의 도입을 통해 변형된다. 일 구현예에서, 시험관내 전사된 스파이태그 또는 스파이캐처 범용 면역 수용체 RNA는 일시적 형질감염의 형태로서 세포에 도입될 수 있다. RNA는 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)-생성 템플릿을 사용하여 시험관 내 전사에 의해 생성된다. 임의의 소스의 관심 DNA는 적절한 프라이머 및 RNA 폴리머라제를 사용하여 시험관내 mRNA 합성을 위한 템플릿으로 PCR에 의해 직접 변환될 수 있다. DNA의 소스는 예를 들어 게놈 DNA, 플라스미드 DNA, 파지 DNA, cDNA, 합성 DNA 서열 또는 임의의 다른 적절한 DNA 소스일 수 있다. 시험관내 전사를 위한 원하는 주형은 본 발명의 범용 면역 수용체이다. 예를 들어, 보편적 면역 수용체의 RNA에 대한 주형은 표지 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인; CD8a의 힌지 및 막횡단 도메인을 포함하는 막횡단 도메인; 및 CD3-제타의 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인을 포함한다.

[0279] 일 구현예에서, PCR에 사용되는 DNA는 오픈 리딩 프레임 포함한다. DNA는 유기체의 게놈에서 자연적으로 발생하는 DNA 서열에서 유래할 수 있다. 일 구현예에서, DNA는 유전자의 일부의 관심 대상 전장 유전자이다. 유전자는 5' 및/또는 3' 비번역 영역(UTR)의 일부 또는 전부를 포함할 수 있다. 유전자는 엑손 및 인트론을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, PCR에 사용되는 DNA는 인간 유전자이다. 다른 구현예에서, PCR에 사용되는 DNA는 5' 및 3' UTR을 포함하는 인간 유전자이다. DNA는 대안적으로 자연 발생 유기체에서 정상적으로 발현되지 않는 인공 DNA 서열일 수 있다. 예시적인 인공 DNA 서열은 융합 단백질을 코딩하는 오픈 리딩 프레임을 형성하기 위해 함께 결합되는 유전자 부분을 포함하는 것이다. 함께 결합된 DNA 부분은 단일 유기체로부터 또는 하나 이상의 유기체로부터 유래할 수 있다.

[0280] PCR은 형질감염에 사용되는 mRNA의 시험관내 전사를 위한 주형을 생성하는 데 사용된다. PCR을 수행하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. PCR에 사용하기 위한 프라이머는 PCR을 위한 주형으로 사용되는 DNA 영역에 실질적으로 상보적인 영역을 갖도록 설계된다. 본 명세서에 사용된 "실질적으로 상보적인"은 프라이머 서열 내의 대부분 또는 모든 염기가 상보적이거나, 하나 이상의 염기가 비-상보적이거나, 또는 불일치하는 뉴클레오타이드의 서열을 지칭한다. 실질적으로 상보적인 서열은 PCR에 사용되는 어닐링 조건 하에서 의도된 DNA 표적과 어닐링 또는 혼성화할 수 있다. 프라이머는 DNA 주형의 임의의 부분에 실질적으로 상보적이라도 설계될 수 있다. 예를 들어, 프라이머는 5' 및 3' UTR을 포함하여 세포(개방 판독 프레임)에서 정상적으로 전사되는 유전자 부분을 증폭하도록 설계될 수 있다. 프라이머는 또한 특정 관심 도메인을 코딩하는 유전자의 일부를 증폭하도록 설계될 수 있다. 일 구현예에서, 프라이머는 5' 및 3' UTR의 전부 또는 일부를 포함하는, 인간 cDNA의 코딩 영역을 증폭하도록 설계된다. PCR에 유용한 프라이머는 당업계에 잘 알려진 합성 방법에 의해 생성된다. "정방향 프라이머(forward primers)"는 증폭될 DNA 서열의 상류에 있는 DNA 주형 상의 뉴클레오타이드에 실질적으로 상보적인 뉴클레오타이드 영역을 포함하는 프라이머이다. "상류(upstream)"는 코딩 가닥에 대해 증폭될 DNA 서열에 대한 위치 5를 지칭하기 위해 본 명세서에서 사용된다. "역방향 프라이머(reverse primers)"는 증폭될 DNA 서열의 하류에 있는 이중-가닥 DNA 주형에 실질적으로 상보적인 뉴클레오타이드 영역을 포함하는 프라이머이다. "하류(downstream)"는 코딩 가닥에 비해 증폭될 DNA 서열의 3' 위치를 지칭하기 위해 본 명세서에서 사용된다.

- [0281] PCR에 유용한 임의의 DNA 폴리머라제가 본 명세서에 개시된 방법에 사용될 수 있다. 시약 및 폴리머라제는 여러 출처에서 상업적으로 입수할 수 있다.
- [0282] 안정성 및/또는 번역 효율을 촉진하는 능력을 가진 화학 구조가 또한 사용될 수 있다. RNA는 바람직하게는 5' 및 3' UTRs를 갖는다. 일 구현예에서, 5' UTR은 길이가 0 내지 3000개 뉴클레오타이드이다. 코딩 영역에 추가될 5' 및 3' UTR 서열의 길이는 UTRs의 상이한 영역에 어닐링하는 PCR용 프라이머를 설계하는 것을 포함하지만 이에 제한되지 않는 상이한 방법에 의해 변경될 수 있다. 이 접근법을 사용하여, 당업자는 전사된 RNA의 형질감염 후 최적의 번역 효율을 달성하는 데 필요한 5' 및 3' UTR 길이를 수정할 수 있다.
- [0283] 5' 및 3' UTRs는 관심 유전자에 대한 자연 발생, 내인성 5' 및 3' UTRs일 수 있다. 대안적으로, 관심 유전자에 내인성이 아닌 UTR 서열은 UTR 서열을 정방향 및 역방향 프라이머에 통합함으로써 또는 주형의 임의의 다른 변형에 의해 추가될 수 있다. 관심 유전자에 내인성이 아닌 UTR 서열의 사용은 RNA의 안정성 및/또는 번역 효율을 수정하는 데 유용할 수 있다. 예를 들어, 3' UTR 서열의 AU-풍부 요소는 mRNA의 안정성을 감소시킬 수 있는 것으로 알려져 있다. 따라서, 3' UTRs는 당업계에 잘 알려진 UTRs의 특성에 기초하여 전사된 RNA의 안정성을 증가시키도록 선택되거나 설계될 수 있다.
- [0284] 일 구현예에서, 5' UTR은 내인성 유전자의 코작(Kozak) 서열을 함유할 수 있다. 대안적으로, 관심 유전자에 내인성이 아닌 5' UTR이 상기 기재된 바와 같이 PCR에 의해 추가되는 경우, 5' UTR 서열을 추가함으로써 공통 코작(Kozak) 서열을 재설계할 수 있다. 코작(Kozak) 서열은 일부 RNA 전사체의 번역 효율을 증가시킬 수 있지만 모든 RNA가 효율적인 번역을 가능하게 하는 데 필요한 것으로 보이지는 않는다. 많은 mRNA에 대한 코작(Kozak) 서열에 대한 요건은 당업계에 공지되어 있다. 다른 구현예에서, 5' UTR은 RNA 게놈이 세포에서 안정한 RNA 바이러스로부터 유래될 수 있다. 다른 구현예에서, mRNA의 엑소뉴클레아제 분해를 방해하기 위해 다양한 뉴클레오타이드 유사체가 3' 또는 5' UTR에 사용될 수 있다.
- [0285] 유전자 클로닝의 필요 없이 DNA 주형으로부터 RNA 합성을 가능하게 하기 위해, 전사 프로모터는 전사될 서열의 상류에 있는 DNA 주형에 부착되어야 한다. RNA 폴리머라제의 프로모터 역할을 하는 서열이 정방향 프라이머의 5' 말단에 추가되면 RNA 폴리머라제 프로모터는 전사될 오픈 리딩 프레임의 상류에 있는 PCR 산물에 통합된다. 바람직한 일 구현예에서, 프로모터는 본 명세서의 다른 곳에서 기재된 바와 같은 T7 폴리머라제 프로모터이다. 다른 유용한 프로모터는 T3 및 SP6 RNA 폴리머라제 프로모터를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. T7, T3 및 SP6 프로모터에 대한 컨센서스 뉴클레오타이드 서열은 당업계에 공지되어 있다.
- [0286] 바람직한 구현예에서, mRNA는 세포에서 리보솜 결합, 번역 개시 및 안정성 mRNA를 결정하는 5' 말단 및 3' 폴리(A) 꼬리에 캡을 모두 갖는다. 원형 DNA 주형, 예를 들어 플라스미드 DNA에서 RNA 폴리머라제는 진핵 세포에서 발현하기에 적합하지 않은 긴 연쇄체 산물을 생성한다. 3' UTR의 말단에 선형화된 플라스미드 DNA의 전사는 전사 후에 폴리아데닐화되더라도 진핵생물 형질감염에 효과적이지 않은 정상 크기의 mRNA를 초래한다.
- [0287] 선형 DNA 주형에서 파지 T7 RNA 폴리머라제는 주형의 마지막 염기 너머로 전사체의 3' 말단을 확장할 수 있다 (Schenborn and Mierendorf, Nuc Acids Res., 13:6223-36 (1985); Nacheva and Berzal-Herranz, Eur. J. Biochem., 270:1485-65 (2003)).
- [0288] 폴리A/T 스트레치를 DNA 주형으로 통합하는 기존의 방법은 분자 복제이다. 그러나 플라스미드 DNA에 통합된 폴리A/T 서열은 플라스미드 불안정성을 유발할 수 있으며, 이것이 박테리아 세포로부터 얻은 플라스미드 DNA 주형이 종종 결실 및 기타 이상으로 심하게 오염되는 이유이다. 이로 인해 복제 절차가 힘들고 시간이 많이 소요될 뿐만 아니라 종종 신뢰할 수 없다. 이것이 클로닝 없이 폴리A/T 3' 스트레치로 DNA 주형을 구성할 수 있는 방법이 매우 바람직한 이유이다.
- [0289] 전사 DNA 주형의 폴리A/T 분절은, 100T 꼬리(크기는 50-5000 T일 수 있음)와 같은 폴리T 꼬리를 포함하는 역방향 프라이머를 사용하여 PCR 동안, 또는 DNA 결찰 또는 시험관 내 재조합을 포함하지만 이에 제한되지는 않는 임의의 다른 방법으로 PCR 후에 생성될 수 있다. 폴리(A) 꼬리는 또한 RNAs에 안정성을 제공하고 그들의 분해를 줄인다. 일반적으로 폴리(A) 꼬리의 길이는 전사된 RNA의 안정성과 양의 상관관계가 있다. 일 구현예에서, 폴리(A) 꼬리는 100 내지 5000개의 아데노신이다.
- [0290] RNA의 폴리(A) 꼬리는 대장균 폴리A 폴리머라제(E. coli polyA polymerase; E-PAP)와 같은 폴리(A) 폴리머라제를 사용하여 시험관 내 전사 후 추가로 확장될 수 있다. 일 구현예에서, 폴리(A) 꼬리의 길이를 100개 뉴클레오타이드에서 300개 내지 400개 뉴클레오타이드로 증가시키면 RNA의 번역 효율이 약 2배 증가한다. 또한, 3' 말단에 다른 화학 그룹을 부착하면 mRNA 안정성이 증가할 수 있다. 이러한 부착은 변형/인공 뉴클레오타이드, 앵타머 및

기타 화합물을 포함할 수 있다. 예를 들어, ATP 유사체는 폴리(A) 폴리머라제를 사용하여 폴리(A) 꼬리에 통합될 수 있다. ATP 유사체는 RNA의 안정성을 더욱 증가시킬 수 있다.

[0291] 5' 캡은 또한 RNA 분자에 안정성을 제공한다. 바람직한 실시양태에서, 본 명세서에 개시된 방법에 의해 생성된 RNA는 5' 캡을 포함한다. 5' 캡은 당업계에 알려져 있고 여기에 설명된 기술을 사용하여 제공된다(Cougot, et al., Trends in Biochem. Sci., 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., RNA, 7:1468-95 (2001); Elango, et al., Biochim. Biophys. Res. Commun., 330:958-966 (2005)).

[0292] 본 명세서에 개시된 방법에 의해 생성된 RNA는 또한 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 서열을 함유할 수 있다. IRES 서열은 mRNA에 캡-독립적 리보솜 결합을 개시하고 번역 개시를 촉진하는 임의의 바이러스, 염색체 또는 인공적으로 설계된 서열일 수 있다. 당, 펩타이드, 지질, 단백질, 항산화제 및 계면활성제와 같이 세포 투과성 및 생존을 촉진하는 인자를 함유할 수 있는 세포 전기천공에 적합한 모든 용질이 포함될 수 있다.

[0293] RNA는 여러개의 상이한 방법들, 예를 들어 전기천공(Amaxa Nucleofector-II(Amaxa Biosystems, Cologne, Germany)), (ECM 830 (BTX)(Harvard Instruments, Boston, MA) 또는 유전자 펄서 II(Gene Pulser II; BioRad, Denver, Colo.), 멀티플레이터(Multiporator; Eppendorf, Hamburg Germany), 리포펙션을 사용한 양이온성 리포솜 매개된 형질감염, 폴리머 캡슐화, 펩타이드 매개된 형질감염, 또는 "유전자 총"과 같은 바이올리스틱 입자 전달 시스템(예를 들어, Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12(8):861-70 (2001) 참조)을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 상업적으로 이용가능한 방법들을 사용하여 표적 세포에 도입할 수 있다.

[0294] 유전자 변형된 T 세포

[0295] 일부 구현예에서, 스파이태그 또는 스파이캐처 범용 면역 수용체 서열은 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터를 사용하여 세포 내로 전달된다. 범용 면역 수용체-발현 레트로바이러스 및 렌티바이러스 벡터는, 운반체로서 형질도입된 세포를 사용하거나 또는 캡슐화, 결합된 또는 네이키드된 벡터의 세포-프리 국소 또는 전신 전달을 사용하여 조직 및 전체 유기체 속으로 뿐만 아니라, 다양한 유형의 진핵 세포 속으로 전달될 수 있다. 사용되는 방법은 안정적인 표현이 필요하거나 또는 충분한 경우 모든 목적에 사용할 수 있다.

[0296] 다른 구현예에서, 스파이태그 또는 스파이캐처 범용 면역 수용체 서열은 시험관내 전사된 mRNA를 사용하여 세포 내로 전달된다. 시험관 내 전사된 mRNA 범용 면역 수용체는, 운반체로서 형질도입된 세포를 사용하거나 또는 캡슐화, 결합된 또는 네이키드된 벡터의 세포-프리 국소 또는 전신 전달을 사용하여 조직 및 전체 유기체 속으로 뿐만 아니라, 다양한 유형의 진핵 세포 속으로 전달될 수 있다. 사용되는 방법은 일시적인 표현이 필요하거나 또는 충분한 경우 모든 목적에 사용할 수 있다.

[0297] 개시된 방법은 암, 줄기 세포, 급성 및 만성 감염, 및 자가면역 질환 분야의 기초 연구 및 치료에서 T 세포 활성의 조절에 적용될 수 있고, 표적 암세포를 죽이는 유전자 변형된 T 세포의 능력 평가를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형된 T 세포는 표지되고 일단 대상체에게 전달되면 생체내에서 추적될 수 있다.

[0298] 상기 방법은 또한 예를 들어 프로모터 또는 입력 RNA의 양을 변경함으로써 넓은 범위에 걸쳐 발현 레벨을 제어하는 능력을 제공하여, 발현 레벨을 개별적으로 조절할 수 있게 한다. 또한, mRNA 생산의 PCR-기반 기술은 그들의 도메인의 구조와 조합이 상이한 범용 면역 수용체 mRNAs의 설계를 크게 촉진한다. 예를 들어, 동일한 세포의 다중 보편적 면역 수용체에 대한 상이한 세포내 효과기/공자극기 도메인을 변경하는 것은, 범용 면역 수용체가 항원-결합 요소에 부착된 상호 태그와 결합된 후, 그리고 정상 세포에 대한 세포 독성이 가장 낮은 동일한 순간에, 다중-항원-표적에 대한 최고 레벨의 세포독성을 평가하는 수용체 조합의 구조를 결정하는 것을 허용한다.

[0299] 본 발명의 RNA 형질감염 방법의 한 가지 이점은 RNA 형질감염이 본질적으로 일시적이고 벡터-프리라는 것이다: RNA 이식유전자는 추가 바이러스 서열의 필요 없이, 최소 발현 카세트로서, 간단한 시험관내 세포 활성화 후에 림프구에 전달되고 그 안에서 발현될 수 있다. 이러한 조건하에서 이식유전자가 숙주 세포 계층 속으로 통합될 가능성은 거의 없다. RNA의 형질감염의 효율성과 전체 림프구 집단을 균일하게 변형하는 능력 때문에 세포의 복제가 필요하지 않다.

[0300] 시험관내-전사된 RNA(in vitro-transcribed RNA; IVT-RNA)를 사용한 T 세포의 유전적 변형은 다양한 동물 모델에서 연속적으로 테스트된 두 가지 다른 전략을 사용한다. 세포는 리포펙션 또는 전기천공법에 의해 시험관내-전사된 RNA로 형질감염된다. 바람직하게는, 전달된 IVT-RNA의 연장된 발현을 달성하기 위해 다양한 변형을 사용하여 IVT-RNA를 안정화시키는 것이 바람직하다.

[0301] 시험관내 전사를 위한 주형으로서 표준화된 방식으로 이용되고 안정화된 RNA 전사체가 생성되는 방식으로 유전

적으로 변형된 몇몇 IVT 벡터는 문헌에 알려져 있다. 현재 당업계에서 사용되는 프로토콜은 다음과 같은 구조의 플라스미드 벡터를 기반으로 한다: RNA 전사를 가능하게 하는 5' RNA 폴리머라제 프로모터, 그 다음에 비번역 영역(UTR)에 의해 3' 및/또는 5' 측면에 있는 관심 유전자, 및 50-70 A 뉴클레오타이드를 함유하는 3' 폴리아데닐 카세트. 시험관내 전사 전에 원형 플라스미드는 II형 제한 효소에 의해 폴리아데닐 카세트의 하류에서 선형화된다(인식 서열은 절단 부위에 해당함). 따라서 폴리아데닐 카세트는 전사체에서 나중의 폴리(A) 서열에 해당한다. 이 절차의 결과로 일부 뉴클레오타이드는 선형화 후 효소 절단 부위의 일부로 남아 있고, 3' 말단에서 폴리(A) 서열을 확장하거나 마스킹한다. 이 비생리학적 돌출부가 그러한 컨스트럭트로부터 세포내로 생산되는 단백질의 양에 영향을 미치는지 여부는 분명하지 않다.

[0302] RNA는 보다 전통적인 플라스미드 또는 바이러스 접근 방식에 비해 몇 가지 장점이 있다. RNA 소스로부터의 유전자 발현은 전사를 필요로 하지 않으며 단백질 생성물은 형질감염 후 빠르게 생성된다. 또한, RNA는 핵이 아닌 세포질에만 접근해야 하기 때문에, 그러므로 일반적인 형질감염 방법은 매우 높은 형질감염 속도를 초래한다. 또한 플라스미드 기반 접근 방식은 관심 유전자의 발현을 유도하는 프로모터가 연구 중인 세포 내에서 활성화되어야 한다.

[0303] 다른 측면에서, RNA 컨스트럭트는 전기천공에 의해 세포 내로 전달될 수 있다. 예를 들어, US 2004/0014645, US 2005/0052630A1, US 2005/0070841A1, US 2004/0059285A1, US 2004/0092907A1에서 가르친 대로 포유동물 세포 속으로 핵산 컨스트럭트의 전기천공의 포물레이션 및 방법론을 참조하라. 임의의 알려진 세포 유형의 전기천공에 필요한 전기장 강도를 포함하여 다양한 매개변수는 관련 연구 문헌뿐만 아니라 해당 분야의 수많은 특허 및 출원에 일반적으로 알려져 있다. 예를 들어, 미국특허 제6,678,556호, 미국특허 제7,171,264호, 및 미국특허 제7,173,116호를 참조하라. 전기천공의 치료적 적용을 위한 장치는 상업적으로 입수가 가능하며, 예를 들어 메드펄서(MedPulser)TM DNA 전기천공 치료 시스템(Inovio/Genetronics, San Diego, CA)이 있으며, 미국특허 제6,567,694호; 미국특허 제6,516,223호, 미국특허 제5,993,434호, 미국특허 제6,181,964호, 미국특허 제6,241,701호, 및 미국특허 제6,233,482호와 같은 특허에 설명되어 있다; 전기천공은 또한 예컨대 US20070128708A1에서 설명된 것과 같이, 시험관 내 세포의 이송을 위해 사용될 수 있다. 전기천공법은 또한 시험관 내에서 핵산을 세포로 전달하는 데 사용될 수 있다. 따라서, 당업자에게 공지된 많은 이용가능한 장치 및 전기천공 시스템 중 임의의 것을 이용하는 발현 컨스트럭트를 포함하는 핵산의 세포 속으로의 전기천공-매개된 투여는, 관심 RNA를 표적 세포로 전달하기 위한 흥미로운 새로운 수단을 제시한다.

[0304] T 세포의 근원

[0305] 본 발명의 T 세포의 확장 및 유전적 변형 전에, T 세포의 공급원이 대상체로부터 획득된다. T 세포는 말초 혈액 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직, 감염 부위의 조직, 복수, 흉막 삼출, 비장 조직 및 종양을 포함하는 여러 출처로부터 얻을 수 있다. 본 발명의 특정 구현예에서, 당업계에서 이용가능한 임의의 수의 T 세포주가 사용될 수 있다. 본 발명의 특정 구현예에서, T 세포는 피콜(Ficoll)TM 분리와 같은 당업자에게 공지된 임의의 수의 기술을 사용하여 대상체로부터 수집된 혈액 단위로부터 획득될 수 있다. 한 바람직한 구현예에서, 개체의 순환 혈액으로부터의 세포는 성분채집(apheresis)에 의해 획득된다. 성분채집 제품은 일반적으로 T 세포, 단핵구, 과립구, B 세포, 기타 유핵 백혈구, 적혈구 및 혈소판을 포함한 림프구를 포함한다. 일 구현예에서, 성분채집에 의해 수집된 세포는 혈장 분획을 제거하고 후속 처리 단계를 위한 적절한 완충액 또는 배지에 세포를 배치하기 위해 세척될 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서, 세포는 인산염 완충 식염수(PBS)로 세척된다. 대안적인 구현예에서, 세척 용액은 칼슘이 부족하고 마그네슘이 부족하거나 또는 2가 양이온이 전부는 아니지만 많이 부족할 수 있다. 다시 말하지만, 놀랍게도 칼슘이 없는 초기 활성화 단계는 활성화를 확대한다. 당업자들이 쉽게 이해할 수 있듯이, 세척 단계는 제조업체의 지침에 따라 반-자동화된 "흐름-스루" 원심분리기(예를 들어, Cobe 2991 cell processor, Baxter CytoMate, 또는 Haemonetics Cell Saver 5)를 사용하는 것과 같은 당업자에게 알려진 방법으로 수행될 수 있다. 세척 후, 세포는 다양한 생체적합성 완충액, 예를 들어 Ca^{2+} -프리, Mg^{2+} -프리 PBS, 프라스마라이트 에이(PlasmaLyte A), 또는 완충액이 있거나 없는 기타 염수 용액 내에 재현탁될 수 있다. 대안적으로, 성분채집 샘플의 바람직하지 않은 성분을 제거하고 세포를 배양 배지에 직접 재현탁할 수 있다.

[0306] 다른 구현예에서, T 세포는 적혈구를 용해시키고 단핵구를 고갈시킴으로써, 예를 들어 퍼콜(PERCOLL)TM 구배를 통한 원심분리 또는 역류 원심 분리에 의해 말초 혈액 림프구로부터 분리된다. $CD3^{+}$, $CD28^{+}$, $CD4^{+}$, $CD8^{+}$, $CD45RA^{+}$ 및 $CD45RO^{+}$ T 세포와 같은 T 세포의 특정 하위집단은 양성 또는 음성 선택 기술에 의해 추가로 분리될 수 있다.

예를 들어, 일 구현예에서, T 세포는 원하는 T 세포의 양성 선택에 충분한 기간 동안 항-CD3/항-CD28(즉, 3x28)-컨쥬게이트된 비드, 예컨대 다이나비즈(DYNABEADS)® M-450 CD3/CD28 T와 함께 인큐베이션함으로써 분리된다. 일 구현예에서, 시간 기간은 약 30분이다. 추가 구현예에서, 시간 기간은 30분 내지 36시간 또는 그 이상의 범위이고 그 사이의 모든 정수 값이다. 추가 구현예에서, 시간 기간은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6시간이다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 시간 기간은 10 내지 24시간이다. 한 바람직한 구현예에서, 인큐베이션 시간 기간은 24시간이다. 백혈병 환자로부터 T 세포를 분리하기 위해 24시간과 같이 더 긴 배양 시간을 사용하면 세포 수율이 증가할 수 있다. 더 긴 배양 시간은 종양 조직으로부터 또는 면역-손상된 개인으로부터 종양 침윤 림프구(TIL)를 분리하는 것과 같이, 다른 세포 유형에 비해 T 세포가 거의 없는 모든 상황에서 T 세포를 분리하는 데 사용할 수 있다. 또한, 더 긴 배양 시간을 사용하면 CD8⁺ T 세포의 포획 효율을 높일 수 있다. 따라서, T 세포가 CD3/CD28 비드에 결합하도록 허용되는 시간을 단순히 단축 또는 연장함으로써 및/또는 T 세포에 대한 비드의 비율을 증가 또는 감소시킴으로써(여기에 추가로 기재된 바와 같이), T 세포의 하위집단이 배양 개시시 또는 프로세스 중 다른 시점에서 이를 위해 또는 이에 대하여 바람직하게 선택될 수 있다. 추가로, 비드 또는 다른 표면 상의 항-CD3 및/또는 항-CD28 항체의 비율을 증가 또는 감소시킴으로써, T 세포의 하위집단은 배양 개시시 또는 다른 원하는 시점에서 이를 위해 또는 이에 대하여 바람직하게 선택될 수 있다. 숙련된 기술자는 본 발명의 맥락에서 다중 선택 라운드가 또한 사용될 수 있음을 인식할 것이다. 특정 구현예에서, 선택 절차를 수행하고 활성화 및 확장 과정에서 "선택되지 않은(unselected)" 세포를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. "선택되지 않은(unselected)" 셀은 추가로 선택될 수도 있다.

[0307] 음성 선택에 의한 T 세포 집단의 농축은 음성적으로 선택된 세포에 대한 고유한 표면 마커에 대한 항체의 조합으로 달성할 수 있다. 한 가지 방법은 음성적으로 선택된 세포 상에 존재하는 세포 표면 마커에 대한 단일클론 항체의 각테일을 사용하는 음성 자기 면역부착 또는 유세포 분석을 통한 세포 분류 및/또는 선택이다. 예를 들어, 음성 선택에 의해 CD4⁺ 세포를 농축하기 위한, 단일클론 항체 각테일은 일반적으로 CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR 및 CD8에 대한 항체를 포함한다. 특정 구현예에서, 전형적으로 CD4⁺, CD25⁺, CD62L^{hi}, GITR⁺, 및 FoxP3⁺를 발현하는 조절 T 세포를 풍부하게 하거나 양성으로 선택하는 것이 바람직할 수 있다. 대안적으로, 특정 구현예에서, T 조절 세포는 항-CD25 컨쥬게이트된 비드 또는 다른 유사한 선택 방법에 의해 고갈된다.

[0308] 양성 또는 음성 선택에 의한 원하는 세포 집단의 분리를 위해 세포 및 표면(예: 비드와 같은 입자)의 농도를 변경할 수 있다. 특정 구현예에서, 세포와 비드의 최대 접촉을 보장하기 위해, 비드 및 세포가 함께 혼합되는 부피를 상당히 감소시키는 것이(즉, 세포의 농도를 증가시키는 것이) 바람직할 수 있다. 예를 들어, 일 구현예에서, 20억 세포/ml의 농도가 사용된다. 일 구현예에서, 10억 세포/ml의 농도가 사용된다. 추가 구현예에서, 1억 세포/ml 초과가 사용된다. 추가 구현예에서, 1천만, 1천500만, 2천만, 2천5백만, 3천만, 3천5백만, 4천만, 4천5백만, 또는 5천만 세포/ml의 세포 농도가 사용된다. 또 다른 구현예에서, 7천5백만, 8천만, 8천5백만, 9천만, 9천5백만, 또는 1억 세포/ml의 세포 농도가 사용된다. 추가 구현예에서, 1억 2천5백만 또는 1억 5천만 세포/ml의 농도가 사용될 수 있다. 고농도를 사용하면 세포 수율, 세포 활성화 및 세포 확장이 증가할 수 있다. 또한, 높은 세포 농도를 사용하면, CD28-음성 T 세포와 같이 관심 표적 항원을 약하게 발현할 수 있는 세포 또는 많은 종양 세포가 존재하는 샘플(즉, 백혈병 혈액, 종양 조직 등)로부터 보다 효율적으로 포획할 수 있다. 그러한 세포 집단은 치료적 가치를 가질 수 있고 획득하는 것이 바람직할 것이다. 예를 들어, 고농도의 세포를 사용하면 일반적으로 더 약한 CD28 발현을 갖는 CD8⁺ T 세포를 보다 효율적으로 선택할 수 있다.

[0309] 관련된 구현예에서, 더 낮은 농도의 세포를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. T 세포와 표면(예: 비드와 같은 입자)의 혼합물을 상당히 희석함으로써 입자와 세포 사이의 상호작용이 최소화된다. 이것은 입자에 결합할 원하는 항원을 다량으로 발현하는 세포를 선택한다. 예를 들어, CD4⁺ T 세포는 더 높은 레벨의 CD28을 발현하고 희석 농도의 CD8⁺ T 세포보다 더 효율적으로 포획된다. 일 구현예에서, 사용되는 세포의 농도는 5×10^6 /ml이다. 다른 구현예에서, 사용되는 농도는 약 1×10^5 /ml 내지 1×10^6 /ml이고, 그 사이의 임의의 정수 값일 수 있다.

[0310] 다른 구현예에서, 세포는 2-10℃ 또는 실온에서 다양한 속도로 다양한 시간 길이 동안 회전자 상에서 인큐베이션될 수 있다.

[0311] 자극을 위한 T 세포는 또한 세척 단계 후에 동결될 수도 있다. 이론에 구속되지 않기를 바라면서, 동결 및 후속적인 해동 단계는 세포 집단에서 과립구 및 어느 정도 단핵구를 제거함으로써 보다 균일한 생성물을 제공한다. 혈장과 혈소판을 제거하는 세척 단계 후, 세포는 동결 용액 내에 현탁될 수 있다. 많은 동결 용액 및 매개변수

가 당업계에 알려져 있고 이러한 맥락에서 유용할 것이지만, 한 방법은 20% DMSO 및 8% 인간 혈청 알부민을 함유하는 PBS, 또는 10% 텍스트란 40 및 5% 텍스트로스, 20% 인간 혈청 알부민 및 7.5% DMSO를, 또는 31.25% 플라스마라이트(Plasmalyte)-A, 31.25% 텍스트로스 5%, 0.45% NaCl, 10% 텍스트란 40 및 5% 텍스트로스, 20% 인간 혈청 알부민 및 7.5% DMSO를 함유하는 배양 배지, 또는 예를 들어 헤스판(Hespan) 및 플라스마라이트(PlasmaLyte) A를 포함하는 기타 적절한 세포 동결 배지를 사용하는 것을 포함하는데, 그 다음 세포는 분당 1°의 속도로 -80℃까지 동결되고 액체 질소 저장 탱크의 증기 상 내에 저장된다. -20℃ 또는 액체 질소 내에서 즉시 제어되지 않는 동결뿐만 아니라 제어되는 동결의 다른 방법을 사용할 수도 있다.

[0312] 특정 구현예에서, 동결보존된 세포를 본 명세서에 기재된 바와 같이 해동 및 세척하고, 본 발명의 방법을 사용하여 활성화하기 전에 실온에서 1시간 동안 휴지시킨다.

[0313] 또한 본 발명의 맥락에서, 본 명세서에 기술된 바와 같은 확장된 세포가 필요할 수 있는 시기 이전의 기간에 대상체로부터 혈액 샘플 또는 성분채집 산물의 수집이 고려된다. 이와 같이, 확장된 세포의 공급원은 필요한 임의의 시점에서 수집될 수 있으며, T 세포와 같은 원하는 세포는, 본 명세서에 기재된 것과 같은, T 세포 요법으로부터 혜택을 받을 수 있는 임의의 수의 질병 또는 상태에 대한 T 세포 요법에서 나중에 사용하기 위해 분리 및 동결될 수 있다. 일 구현예에서 혈액 샘플 또는 성분채집물(apheresis)은 일반적으로 건강한 대상체로부터 채취된다. 특정 구현예에서, 혈액 샘플 또는 성분채집물은 질병이 발병할 위험이 있지만 아직 질병이 발병하지 않은 일반적으로 건강한 대상체로부터 채취되고, 관심 세포는 추후 사용을 위해 분리되고 동결된다. 특정 구현예에서, T 세포는 확장되고, 동결되고, 나중에 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 샘플은 본 명세서에 기재된 바와 같은 특정 질환의 진단 직후 그러나 임의의 치료 전에 환자로부터 수집된다. 추가 구현예에서, 세포는 나탈리주맙(natalizumab), 에팔리주맙(efalizumab), 항바이러스제, 화학요법, 방사선(radiation)와 같은 제제들, 시클로스포린(cyclosporin), 아자티오프린(azathioprine), 메토크세이트(methotrexate), 미코페놀레이트(mycophenolate) 및 FK506과 같은 면역억제 제제들(immunosuppressive agents), 항체, 또는 CAMPATH, 항-CD3 항체, 사이토잔(cytozan), 플루다라빈(fludarabine), 시클로스포린(cyclosporin), FK506, 라파마이신(rapamycin), 미코페놀산(mycophenolic acid), 스테로이드, FR901228, 및 조사(irradiation)와 같은 기타 면역절제 제제들(immunoablative agents)을 사용한 치료를 포함하나 이에 제한되지 않는, 임의의 수의 관련 치료 양식 전에 대상체로부터 유래한 혈액 샘플 또는 성분채집물로부터 단리된다. 이러한 약물은 칼슘 의존성 포스파타제 칼시뉴린(사이클로스포린 및 FK506)을 억제하거나 또는 성장 인자 유도된 신호전달에 중요한 p70S6 키나아제(라파마이신)를 억제한다(Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993). 추가 구현예에서, 세포는 환자를 위해 단리되고, 골수 또는 줄기 세포 이식, 플루다라빈과 같은 화학요법제를 사용하는 T 세포 절제 요법, 외부-빔 방사선 요법(XRT), 사이클로포스파미드, 또는 OKT3 또는 CAMPATH와 같은 항체를 가지고(예를 들어, 전, 동시에 또는 후에) 조합되어 추후 사용을 위해 동결된다. 다른 구현예에서, 세포는 CD20과 반응하는 제제, 예를 들어, 리툭산(Rituxan)과 같은 B-세포 절제 요법 이후의 치료를 위해 이전에 단리되고 이후 사용을 위해 동결될 수 있다.

[0314] 본 발명의 추가 구현예에서, T 세포는 치료 직후 환자로부터 수득된다. 이와 관련하여 후속하는 특정 암 치료, 특히 면역 시스템을 손상시키는 약물을 사용하는 치료, 환자가 치료로부터 정상적으로 회복되는 기간 동안의 치료 직후에, 얻어진 T 세포의 품질이 최적일 수 있거나 또는 생체의(ex vivo)에서 확장하는 그들의 능력이 향상될 수 있음이 관찰되었다. 마찬가지로, 본 명세서에 기재된 방법을 사용한 생체의 조작 후, 이들 세포는 향상된 생착 및 생체내 확장을 위해 바람직한 상태에 있을 수 있다. 따라서, 이러한 회복 단계 동안 T 세포, 수지상 세포, 또는 조혈 계통의 다른 세포를 포함하는 혈액 세포를 수집하는 것이 본 발명의 맥락 내에서 고려된다. 또한, 특정 실시예에서, 특히 치료 후 정의된 시간의 창 동안, 특정 세포 유형의 재군집(repopulation), 재순환(recirculation), 재생(regeneration) 및/또는 확장(expansion)이 바람직한 대상체 내의 상태를 만들기 위해, 가동화(mobilization)(예: GM-CSF와의 가동화) 및 컨디셔닝 요법이 사용될 수 있다. 예시적인 세포 유형은 T 세포, B 세포, 수지상 세포, 및 면역계의 다른 세포를 포함한다.

[0315] T 세포의 활성화 및 확장

[0316] 바람직한 범용 면역 수용체를 발현하기 위한 T 세포의 유전적 변형 전 또는 후에, T 세포는 예를 들어, 미국 특허 제6,352,694호; 제6,534,055호; 제6,905,680호; 제6,692,964호; 제5,858,358호; 제6,887,466호; 제6,905,681호; 제7,144,575호; 제7,067,318호; 제7,172,869호; 제7,232,566호; 제7,175,843호; 제5,883,223호; 제6,905,874호; 제6,797,514호; 제6,867,041호; 및 미국 특허 출원 공개 번호 제20060121005호 내에 기재된 바와 같은 방법들을 사용하여 일반적으로 활성화 및 확장될 수 있다.

- [0317] 일반적으로, 본 발명의 T 세포는 CD3/TCR 복합체 관련된 신호를 자극하는 제제 및 T 세포의 표면 상의 공동-자극 분자를 자극하는 리간드가 부착된 표면과의 접촉에 의해 확장된다. 특히, T 세포 집단은 본 명세서에 설명된 바와 같이, 예를 들어, 항CD3 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 또는 표면 상에 고정화된 항-CD2 항체와의 접촉에 의해, 또는 칼슘 이오노포어와 함께 단백질 키네이스 C 활성제(예, 브리오스타틴)와의 접촉에 의해 자극될 수 있다. T 세포 표면 상의 악세사리 분자의 공동-자극을 위해, 악세사리 분자에 결합하는 리간드가 사용된다. 예를 들어, T 세포의 집단은 T 세포의 증식을 자극하기에 적절한 조건 하에 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체와 접촉될 수 있다. CD4⁺ T 세포 또는 CD8⁺ T 세포의 증식을 자극하기 위해 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체. 항-CD28 항체의 예에는 9.3, B-T3, XR-CD28(Diaclone, Besancon, France)이 포함되며, 당업계에 일반적으로 알려진 다른 방법이 사용될 수 있다(Berg et al., Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9):13191328, 1999; Garland et al., J. Immunol Meth. 227(1-2):53-63, 1999).
- [0318] 특정 구현예에서, T 세포에 대한 일차 자극 신호 및 공동-자극 신호는 상이한 프로토콜에 의해 제공될 수 있다. 예를 들어, 각 신호를 제공하는 제제는 용액 내에 있거나 표면에 결합될 수 있다. 표면에 결합될 때, 제제는 동일한 표면에 결합되거나(즉, "시스" 형성으로) 또는 별도의 표면에 결합될 수 있다(즉, "트랜스" 형성으로). 대안적으로, 하나의 제제는 표면에 결합되고 다른 제제는 용액 내에 있을 수 있다. 일 구현예에서, 공동-자극 신호를 제공하는 제제는 세포 표면에 결합되고 일차 활성화 신호를 제공하는 제제는 용액 내에 있거나 또는 표면에 커플링된다. 특정 구현예에서, 두 제제는 모두 용액 내에 있을 수 있다. 다른 구현예에서, 제제는 가용성 형태일 수 있고, 그리고 이어서 Fc 수용체 또는 제제에 결합할 항체 또는 다른 결합제를 발현하는 세포와 같은 표면에 가교결합될 수 있다. 이와 관련하여, 예를 들어, 본 발명에서 T 세포를 활성화하고 확장하는데 사용하기 위해 고려되는 인공 항원 제시 세포(aAPCs)에 대한 미국 특허 출원 공개 번호 제20040101519호 및 제20060034810호를 참조하라.
- [0319] 일 구현예에서, 2개의 제제는 동일한 비드 상, 즉 "시스"로 또는 별도의 비드에, 즉 "트랜스"로, 비드 상에 고정된다. 예를 들어, 일차 활성화 신호를 제공하는 제제는 항-CD3 항체 또는 그의 항원-결합 단편이고, 공동-자극 신호를 제공하는 제제는 항-CD28 항체 또는 그의 항원-결합 단편이고; 그리고 두 제제는 모두 동일한 분자 양으로 동일한 비드에 공동-고정화된다. 일 구현예에서, CD4⁺ T 세포 확장 및 T 세포 성장을 위해 비드에 결합된 각 항체의 1:1 비율이 사용된다. 본 발명의 특정 측면에서, 비드에 결합된 항 CD3:CD28 항체의 비율은, 1:1의 비율을 사용하여 관찰된 확장과 비교하여 T 세포 확장의 증가가 관찰되도록 사용된다. 한 특정 구현예에서, 1:1의 비를 사용하여 관찰된 팽창과 비교하여 약 1 내지 약 3배의 증가가 관찰된다. 일 구현예에서, 비드에 결합된 CD3:CD28 항체의 비는 100:1 내지 1:100의 범위 및 그 사이의 모든 정수 값이다. 본 발명의 한 측면에서, 항-CD3 항체보다 더 많은 항-CD28 항체가 입자에 결합되며, 즉 CD3:CD28의 비는 1 미만이다. 본 발명의 특정 구현예에서, 비드에 결합된 항 CD28 항체 대 항 CD3 항체의 비는 2:1 초과이다. 한 특정 구현예에서, 비드에 결합된 항체의 1:100 CD3:CD28 비가 사용된다. 다른 구현예에서, 비드에 결합된 항체의 1:75 CD3:CD28 비가 사용된다. 추가 구현예에서, 비드에 결합된 항체의 1:50 CD3:CD28 비가 사용된다. 다른 구현예에서, 비드에 결합된 항체의 1:30 CD3:CD28 비가 사용된다. 한 바람직한 구현예에서, 비드에 결합된 항체의 1:10 CD3:CD28 비가 사용된다. 다른 구현예에서, 비드에 결합된 항체의 1:3 CD3:CD28 비가 사용된다. 또 다른 구현예에서, 비드에 결합된 항체의 3:1 CD3:CD28 비가 사용된다.
- [0320] 1:500에서 500:1 사이의 입자 대 세포 비율과 그 사이의 임의의 정수 값을 사용하여 T 세포 또는 다른 표적 세포를 자극할 수 있다. 당업자가 용이하게 이해할 수 있는 바와 같이, 입자 대 세포의 비율은 표적 세포에 대한 입자 크기에 의존할 수 있다. 예를 들어, 작은 크기의 비드들은 오직 소수의 세포에만 결합할 수 있는 반면 더 큰 비드들은 많은 세포에 결합할 수 있다. 특정 구현예에서 세포 대 입자의 비는 1:100 내지 100:1 범위이고 그 사이의 임의의 정수 값이고, 추가 구현예에서 비는 1:9 내지 9:1 및 그 사이의 임의의 정수 값을 포함하고, 이는 또한 T 세포를 자극하는 데에 사용될 수 있다. T 세포 자극을 초래하는 항-CD3- 및 항-CD28-결합된 입자 대 T 세포의 비율은 상기 언급한 바와 같이 다양할 수 있지만, 특정 바람직한 값은 1:100, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 및 15:1를 포함하고, 하나의 바람직한 비율은 T 세포당 적어도 1:1 입자이다. 일 구현예에서, 1:1 이하의 입자 대 세포의 비가 사용된다. 한 특정 구현예에서, 바람직한 입자:세포 비는 1:5이다. 추가 구현예에서, 입자 대 세포의 비는 자극일에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 일 구현예에서, 입자 대 세포의 비는 첫날 1:1 내지 10:1이고, 이후 10일까지 동안 매일 또는 이틀에 한 번씩 1:1 내지 1:10의 최종 비율로(첨가 당일의 셀 수 기준), 추가 입자를 세포에 첨가한다. 한 특정 구현예에서, 입자 대 세포의 비는 자극 첫째 날에 1:1이고 자극 셋째 날 및 다섯째 날에 1:5로 조정된다. 다른 구현예에서, 입자는 자극의 첫 번째 날에 1:1, 자극의 세 번째

및 다섯 번째 날에 1:5의 최종 비율로 매일 또는 격일로 추가된다. 다른 구현예에서, 입자 대 세포의 비는 자극 첫째 날에 2:1이고 자극 셋째 날 및 다섯째 날에 1:10으로 조정된다. 다른 구현예에서, 입자는 자극의 첫째 날에 1:1, 자극의 세 번째 및 다섯 번째 날에 1:10의 최종 비율로 매일 또는 격일로 추가된다. 당업자는 다양한 기타 비율이 본 발명에 사용하기에 적합할 수 있음을 이해할 것이다. 특히, 비율은 입자 크기와 세포 크기 및 유형에 따라 달라질 것이다.

[0321] 본 발명의 추가 구현예에서, T 세포와 같은 세포를 제제-코팅된 비드와 조합하고, 비드 및 세포를 후속적으로 분리한 다음, 세포를 배양한다. 대안적인 구현예에서, 배양 전에, 제제-코팅된 비드 및 세포는 분리되지 않고 함께 배양된다. 추가 구현예에서, 비드 및 세포는 먼저 자력과 같은 힘의 적용에 의해 농축되어 세포 표면 마커의 결찰의 증가를 야기하고, 이에 의하여 세포 자극을 유도한다.

[0322] 예로서, 세포 표면 단백질은 항-CD3 및 항-CD28이 부착된 상자성 비드(3x28 비드)가 T 세포와 접촉하도록 함으로써 결찰될 수 있다. 일 구현예에서, 세포(예를 들어, 10^4 내지 10^9 T 세포) 및 비드(예를 들어, 1:1 비율의 DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T 상자성 비드)는 완충제, 바람직하게는 PBS(칼슘 및 마그네슘과 같은 2가 양이온 미포함)에서 조합된다. 다시 말하지만, 당업자는 임의의 세포 농도가 사용될 수 있음을 쉽게 이해할 수 있다. 예를 들어, 표적 세포는 샘플에서 매우 드물수 있고, 샘플의 오직 0.01%만 포함하거나 또는 전체 샘플(즉, 100%)이 관심 대상 표적 세포를 포함할 수도 있다. 따라서, 임의의 세포 수는 본 발명의 맥락 내에 있다. 특정 구현예에서, 세포 및 입자의 최대 접촉을 보장하기 위해, 입자 및 세포가 함께 혼합되는 부피를 상당히 감소시키는 것이(즉, 세포의 농도를 증가시키는 것이) 바람직할 수 있다. 예를 들어, 일 구현예에서, 약 20억 세포/ml의 농도가 사용된다. 다른 구현예에서, 1억 세포/ml 초과가 사용된다. 추가 구현예에서, 1천만, 1천5백만, 2천만, 2천5백만, 3천만, 3천5백만, 4천만, 4천5백만, 또는 5천만 세포/ml의 세포 농도가 사용된다. 또 다른 구현예에서, 7천5백만, 8천만, 8천5백만, 9천만, 9천5백만, 또는 1억 세포/ml의 세포 농도가 사용된다. 추가 구현예에서, 1억 2천5백만 또는 1억 5천만 세포/ml의 농도가 사용될 수 있다. 고농도를 사용하면 세포 수율, 세포 활성화 및 세포 확장이 증가할 수 있다. 또한, 높은 세포 농도를 사용하면 CD28-음성 T 세포와 같은 관심 표적 항원을 약하게 발현할 수 있는 세포를 보다 효율적으로 포획할 수 있다. 이러한 세포 집단은 치료적 가치를 가질 수 있고 특정 구현예에서 얻는 것이 바람직할 것이다. 예를 들어, 고농도의 세포를 사용하면 일반적으로 더 약한 CD28 발현을 갖는 CD8+ T 세포를 보다 효율적으로 선택할 수 있다.

[0323] 본 발명의 일 구현예에서, 혼합물은 수 시간(약 3시간) 내지 약 14일 동안 또는 그 사이의 임의의 시간당 정수 값 동안 배양될 수 있다. 다른 구현예에서, 혼합물은 21일 동안 배양될 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서, 비드 및 T 세포는 약 8일 동안 함께 배양된다. 다른 구현예에서, 비드 및 T 세포는 2-3일 동안 함께 배양된다. T 세포의 배양 시간이 60일 이상이 될 수 있도록 여러 주기의 자극이 바람직할 수도 있다. T 세포 배양에 적합한 조건에는 혈청(예: 소태아 또는 인간 혈청), 인터루킨-2(IL-2), 인슐린, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF β 및 TNF- α 또는 당업자에게 공지된 세포 성장을 위한 임의의 기타 첨가제를 포함하는, 증식 및 생존에 필요한 인자를 포함할 수 있는 적절한 배지(예컨대 최소 필수 배지(Minimal Essential Media) 또는 RPMI Media 1640 또는 X-vivo 15, (Lonza))가 포함된다. 세포 성장을 위한 기타 첨가제에는 계면활성제, 플라스마네이트 및 N-아세틸-시스테인 및 2-메르캅토에탄올과 같은 환원제가 포함되지만 이에 국한되지 않는다. 배지는 RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 15 및 X-Vivo 20, 옵티마이저(Optimizer)를 포함할 수 있는데, 아미노산, 피루브산나트륨 및 비타민이 첨가된 것, 혈청-프리이거나 적절한 양의 혈청(또는 혈장), 정의된 호르몬 세트, 및/또는 T 세포의 성장 및 확장에 충분한 양의 사이토카인(들)이 보충된 것일 수 있다. 항생제, 예컨대 페니실린 및 스트렙토마이신은 대상체에게 인퓨전될 세포의 배양물이 아니라, 오직 실험 배양물에만 포함된다. 표적 세포는 성장을 지원하는 데 필요한 조건, 예를 들어 적절한 온도(예: 37°C) 및 대기(예: 공기 + 5% CO₂) 하에서 유지된다.

[0324] 다양한 자극 시간에 노출된 T 세포는 다른 특성을 나타낼 수 있다. 예를 들어, 전형적인 혈액 또는 성분채집된 말초혈 단핵 세포 산물은 세포독성 또는 억제 T 세포 집단(T_C, CD8⁺)보다 더 많은 헬퍼 T 세포 집단(T_H, CD4⁺)을 가지고 있다. CD3 및 CD28 수용체를 자극함으로써 T 세포의 생체의 확장은 약 8-9일 전에 주로 T_H 세포로 구성된 T 세포 집단을 생성하고, 약 8-9일 후 동안, T 세포 집단은 점점 더 많은 T_C 세포 집단을 포함한다. 따라서 치료 목적에 따라 T_H 세포를 주로 포함하는 T 세포 집단을 대상체에 인퓨전하는 것이 유리할 수 있다. 유사하게, T_C 세포의 항원-특이적 하위 집합이 분리된 경우 이 하위 집합을 더 큰 정도로 확장하는 것이 유리할 수 있다.

- [0325] 또한, CD4 및 CD8 마커 외에도 다른 표현형 마커는 크게 다르지만 대부분 세포 확장 과정 동안 재현 가능하다. 따라서, 이러한 재현성은 활성화된 T 세포 생성물을 특정 목적에 맞게 조정할 수 있는 능력을 가능하게 한다.
- [0326] 치료 응용
- [0327] 본 발명은 스파이태그 또는 스파이크처 도메인을 T 세포 수용체의 세포내 도메인과 조합하는 범용 면역 수용체를 발현하도록 변형된 세포(예를 들어, T 세포)를 포괄한다. 일부 경우에, 보편적 면역 수용체는 하나 이상의 공동-자극 분자의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 따라서 어떤 경우에는 변형된 T 세포가 범용 면역 수용체-매개된 T-세포 반응을 유발할 수 있다.
- [0328] 본 발명은 일차 T 세포의 특이성을 스파이태그 또는 스파이크처 모이어티를 통합하는 임의의 주어진 분자로 리디렉트하기 위한 범용 면역 수용체의 용도를 제공한다. 따라서, 본 발명은 또한 포유동물 내 표적 세포 집단 또는 조직에 대한 T 세포-매개된 면역 반응을 자극하는 방법을 제공하는데, 이는 (예를 들어, 스파이태그 또는 스파이크처 모이어티로) 표적 항원을 태깅/라벨링하는 것, 그리고 범용 면역 수용체를 발현하는 T 세포를 포유동물에 투여하는 것을 포함하고, 여기서 범용 면역 수용체는 태깅/라벨링된 표적, TCR의 세포내 도메인(예를 들어, 인간 CD3제타의 세포내 도메인), 및 공동자극 신호전달 영역과 특이적으로 상호작용하는 결합 모이어티를 포함한다.
- [0329] 한 측면에서, 본 발명은 다중 항원, 특히 종양에 의해 발현되는 2개 이상의 별개의 항원을 표적화하기 위해 범용 면역 수용체를 발현하도록 조작된 세포의 용도에 관한 것이다. 본 명세서에 추가로 기재된 바와 같이, 이중(dual) 무장된 스파이크처-BB ζ T는 단일 무장된 세포 단독에 비해 증가된 종양 용해를 달성하는 것으로 밝혀졌다(도 8D). 이는 스파이크처 T 세포를 별개의 특이성을 갖는 2개의 항체로 (특정 용량에서) 무장시키는 것이, 2개의 별개의 항원을 공동-발현하는 암세포에 대한 활성을 향상시킨다는 것을 보여주었다.
- [0330] 다른 측면에서, 종양에 대한 용해 활성 레벨을 생성하는 방법이 제공된다. 또 다른 측면에서, 대상체(예를 들어, 포유동물)에서 암을 치료하는 방법이 제공되며, 여기서 상기 방법은 암에 대한 용해 활성 레벨의 제어를 제공한다. 본 명세서의 다른 곳에서 설명된 바와 같이, 스파이크처 면역 수용체를 발현하는 일차 인간 T 세포는 표적화 리간드로 정량적으로 로딩될 수 있으며, 이는 리디렉션된 T 세포 이펙터 기능 및 종양 세포 용해의 용량-적정 제어를 허용한다는 것이 입증되었다. 기존의 CAR T 세포 요법과 비교해 볼 때, 표적 항원을 인식하면, 투여된 CAR T 세포가 수용체 내에서 많은 수로 빠르게 증식하고 전염증성 사이토카인을 방출할 수 있으며, 환자에 있어 제어 가능한 T 세포 활성 및 용해는 투여된 T 세포의 제어되지 않는 급속한 증식으로부터 유래되는 바람직하지 않은 부작용을 최소화하는 데 도움이 될 수 있다.
- [0331] 또 다른 측면에서, 포유동물에서 종양에 대한 범용 면역 수용체-매개된 면역 반응을 자극하는 방법 및 종양의 "주문 형(on-demand)" 표적화를 사용하는 이를 필요로 하는 포유동물에서 암을 치료하는 방법이 제공된다. 비무장된 스파이크처 T 세포는 대상체에게 투여할 수 있고, 여기서 비무장된 세포는 대상체 내에 암세포가 있을 때 불활성이고, 그리고 표적화 리간드는 나중에 스파이크처 T 세포를 무장시키고 종양 용해를 유발하여, 암 사멸 능력이 "주문 형(on-demand)"으로 촉발될 수 있도록 투여될 수 있다.
- [0332] 또 다른 측면에서, 4-1BB의 세포내 도메인을 함유하는 보편적 면역 수용체를 발현하도록 조작된 세포를 사용하는, 이를 필요로 하는 포유동물에서 종양에 대한 범용 면역 수용체-매개된 면역 반응을 자극하는 방법 및 이를 필요로 하는 포유동물에서 암을 치료하는 방법이 제공된다. 놀랍게도 고농도 항체로 무장된 스파이크처-BB ζ T 세포는, 스파이크처-28 ζ T 세포는 그렇지 않았는데, 표적 세포를 발현하는 고항원에는 민감했지만 표적 세포를 발현하는 저항원에는 민감하지 않은 것으로 발견되었다. 이 발견은 건강한 조직에 발현된 고위험 항원을 표적으로 하는 항체와 함께 적용될 때 T 세포의 안전성에 중요한 의미를 갖는다.
- [0333] 일 구현예에서, 표적 분자의 태깅/표지화는 태그된 및/또는 표지된 분자를 포함하는 조성물을 포유동물에게 투여하는 것을 포함한다. T 세포 및 태그된/표지된 분자의 투여는 임의의 순서로 발생할 수 있다. 예를 들어, 일 구현예에서, 표지된 분자는 T 세포의 투여 전에 포유동물에게 투여된다. 또 다른 구현예에서, T 세포는 태그된/표지된 항원의 투여 전에 포유동물에게 투여된다. 또 다른 구현예에서, 보편적 면역 수용체는 T 세포를 포유동물에 투여하기 전에 태그된/표지된 분자에 결합될 수 있다.
- [0334] 태그된/표지된 분자 또는 태그된/표지된 분자를 포함하는 조성물은 당업자에게 공지된 방식 및 기술을 사용하여 대상체에게 투여될 수 있다. 예시적인 모드는 피하(subcutaneously), 피내(intradermally), 종양내(intratumorally), 결절내(intranodally), 골수내(intramedullary), 근육내(intramuscularly), 정맥내(intravenous; i.v.) 주입, 동맥내(intra-arterial), 심장내(intracardiac), 관절내(intra-articular), 활막내

(intrasynovial), 두개내(intracranial), 척수강내(intraspinal), 척추강내(intrathecal) 또는 복강내(intraperitoneally)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일 구현예에서, 표지된 조성물은 피내 또는 피하 주입에 의해 환자에게 투여된다. 다른 구현예에서, 본 발명의 표지된 조성물은 정맥(*i.v*) 주입에 의해 투여되는 것이 바람직하다. 태그된/표지된 분자 또는 태그된/표지된 분자를 포함하는 조성물은 종양, 림프절 또는 감염 부위 속으로 직접 주입될 수 있다. 태그된/표지된 분자 또는 태그된/표지된 분자를 포함하는 조성물은 표적 항원을 태깅/표지하는 데 유효하고 환자를 치료하는 데 효과적인 양으로 투여된다. 대상체에게 투여되는 특정 양은 장애의 위치, 출처, 정제, 정도 및 중증도, 치료할 개체의 연령 및 상태 등에 따라 넓은 범위에서 다양할 것이다.

[0335] 일 구현예에서, 본 발명은 T 세포가 스파이태그 또는 스파이캐처 범용 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 유형의 세포 요법을 포함한다. 스파이태그 또는 스파이캐처는 상호 태그와 관련이 있다: 스파이태그 또는 스파이캐처는 항원-결합 도메인을 포함하는 분자에 대하여 융합, 표지, 결찰 또는 컨주게이션되는 것과 같이 관련된다. 그런 다음 범용 면역 수용체 시스템이 이를 필요로 하는 수용체에게 투여된다. 다른 구현예에서, 스파이태그- 또는 스파이캐처-결합된 분자는 유전적으로 변형된 세포 이전에 포유동물에게 투여된다. 또 다른 구현예에서, 범용 면역 수용체는 유전적으로 변형된 세포를 포유동물에게 투여하기 전에 스파이태그- 또는 스파이캐처-결합된 분자에 결합된다. 투여된 세포는 수용체의 종양 세포를 죽일 수 있다.

[0336] 인간 CD8 α 힌지 및 막형단 도메인, 그리고 인간 CD28 및 CD3제타 신호전달 도메인과 함께, 스파이캐처 도메인을 인코딩하는 렌티바이러스 벡터가 여기에 구체적으로 개시되어 있지만, 본 발명은 여기의 다른 곳에 설명된 바와 같이 컨스트럭트의 각 구성요소에 대한 임의의 수의 변형을 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

[0337] 본 발명은 또한 2개 이상의 별개의 표적과 같은 다수의 표적을 동시에 표적화하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 일 구현예에서, 다수의 별개의 분자가 스파이캐처/스파이태그로 직접 또는 간접적으로 태그/표지된다. 예를 들어, 일 구현예에서, 별개의 분자가 각 분자에 대해 특이적인 스파이캐처 또는 스파이태그로 각각 표지, 컨주게이션, 결찰 또는 융합되는 것과 같이 결합되고, 이어서 스파이캐처 또는 스파이태그에 결합된 다수의 별개의 분자가 포유동물에게 투여된다. 상호 태그(SpyTag/SpyCatcher)를 포함하는 범용 면역 수용체를 발현하는 유전적으로 변형된 T 세포의 투여는, 변형된 T 세포를 다수의 별개의 상호 태그된 분자 각각에 대한 표적화를 허용한다. 일 구현예에서, 방법은 유전적으로 변형된 세포를 포유동물에 투여하기 전에 포유동물에 다수의 별개의 스파이태그- 또는 스파이캐처-결합된 분자를 투여하는 것을 포함한다. 이러한 구현예에서, 범용 면역 수용체는 다수의 별개의 스파이태그- 또는 스파이캐처-결합된 분자에 결합할 수 있다. 다른 구현예에서, 방법은 유전적으로 변형된 세포를 포유동물에 투여하기 전에 범용 면역 수용체를 다수의 별개의 스파이태그- 또는 스파이캐처-결합된 분자와 결합시키는 것을 포함한다.

[0338] 다른 구현예에서, 다중 별개의 분자는 다중-특이적 T 세포에 의해 표적화된다. 예를 들어, 스파이캐처/스파이태그 범용 면역 수용체를 발현하는 유전적으로 변형된 T 세포는, 각각의 다중 개별 분자에 대해 특이적인, 상호 스파이캐처/스파이태그로 표지, 컨주게이션, 결찰 또는 융합된 것과 같이 결합된 다중 개별 분자와 결합된다. 그런 다음 이러한 다중-특이적 T 세포를 포유동물에게 투여한다. 유전적으로 변형된 다중-특이성 T 세포의 투여는 변형된 T 세포의 다중의 별개의 상호 태그된 분자 각각에 대한 표적화를 허용한다.

[0339] 본 발명은 또한 2개 이상의 별개의 표적(예를 들어, 2개 이상의 별개의 항원)과 같은 다수의 별개의 표적의 순차적 표적화 방법을 제공한다. 예를 들어, 일 구현예에서, 제1 분자는 직접적으로 또는 간접적으로 태그/표지된다. 예를 들어, 일 구현예에서, 제1 항원에 특이적인 제1 스파이태그 또는 스파이캐처 태그된 분자가 포유동물에게 투여된다. 일 구현예에서, 방법은 제1 태그 부착된 분자에 결합하는 상보적 스파이태그 또는 스파이캐처 결합 도메인을 포함하는 범용 면역 수용체를 발현하는 유전적으로 변형된 T 세포를 투여하는 것, 이에 의하여 T 세포를 제1 항원에 표적화하는 것을 포함한다. 일 구현예에서, 방법은 제2 분자를 직접적으로 또는 간접적으로 태그/표지하는 것을 포함한다. 예를 들어, 일 구현예에서, 제2 항원에 대해 특이적인 제2 태그된 분자(예를 들어, 제2 스파이태그 또는 스파이캐처-태그된 분자)가 포유동물에게 투여된다. 스파이태그 또는 스파이캐처 도메인을 포함하는 범용 면역 수용체를 발현하는 유전적으로 변형된 T 세포는 두 번째 태그가 지정된 분자에 결합하고 따라서 두 번째 항원으로 디렉션된다. 일 구현예에서, 방법은 포유동물에 유전적으로 변형된 세포를 투여하기 전에 다수의 별개의 스파이태그- 또는 스파이캐처-결합된 분자를 포유동물에게 순차적으로 투여하는 것을 포함한다. 다른 구현예에서, 방법은 T 세포를 제2 항원으로 디렉션하기 전에 제1 항원을 발현하는 세포의 제거를 허용하도록, 제1 및 제2 태그된 분자의 투여 사이에 충분한 시간이 경과하도록 하여하는 것을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 방법은 유전적으로 변형된 세포를 포유동물에 투여하기 전에, 범용 면역 수용체를 다수의 별개의 스파이태그- 또는 스파이캐처-결합된 분자로 순차적으로 결합시키는 것을 포함한다. 당업자에 의해 이해되는

바와 같이, 본 발명의 방법은 추가적인 별개의 표적 항원의 표적화를 위한 추가 반복을 포괄한다.

[0340] 일 구현예에서, 본 발명은 암을 치료하기 위해 태그된 항원을 표적화하기 위해 범용 면역 수용체를 사용하는 방법을 제공한다. 치료될 수 있는 암은 혈관이 형성되지 않았거나 아직 실질적으로 혈관이 형성되지 않은 종양뿐만 아니라 혈관화된 종양을 포함한다. 암은 비-고형 종양(예: 혈액학적 종양, 예를 들어 백혈병 및 림프종)을 포함하거나 고형 종양을 포함할 수 있다. 본 발명의 스파이태그 또는 스파이캐처 범용 면역 수용체로 치료되는 암의 유형은 암종(carcinoma), 배아종(blastoma) 및 육종(sarcoma), 및 특정 백혈병(leukemia) 또는 림프종 악성종양(lymphoid malignancies), 양성 및 악성 종양, 및 악성종양(malignancies), 예를 들어 육종, 암종 및 흑색종(melanomas)을 포함하나 이에 국한되지는 않는다. 성인 종양/암 및 소아 종양/암도 포함된다.

[0341] 혈액학적 암(Hematologic cancers)은 혈액이나 골수의 암이다. 혈액학적(또는 혈형성) 암의 예는 급성 백혈병(예: 급성 림프구성 백혈병(acute lymphocytic leukemia), 급성 골수성 백혈병(acute myelocytic leukemia), 급성 골수성 백혈병 및 골수아구성(acute myelogenous leukemia and myeloblastic), 전골수구성(promyelocytic), 골수단핵구성(myelomonocytic), 단핵구 및 적혈구백혈병(monocytic and erythroleukemia)), 만성 백혈병(예: 만성 골수성 (과립성) 백혈병(chronic myelocytic (granulocytic) leukemia), 만성골수성백혈병(chronic myelogenous leukemia), 및 만성림프구성백혈병(chronic lymphocytic leukemia))을 포함하는 백혈병, 진성적혈구증가증(polycythemia vera), 림프종(lymphoma), 호지킨병(Hodgkin's disease), 비호지킨 림프종(무통성 및 고급형), 다발성 골수종(multiple myeloma), 발덴스트롬 거대글로불린혈증(Waldenstrom's macroglobulinemia), 중쇄병(heavy chain disease), 골수이형성 증후군(myelodysplastic syndrome), 모세포 백혈병(hairy cell leukemia) 및 골수이형성증(myelodysplasia)을 포함한다.

[0342] 고형 종양은 일반적으로 낭종이나 액체 영역을 포함하지 않는 비정상적인 조직 덩어리이다. 고형 종양은 양성 또는 악성일 수 있다. 다양한 유형의 고형 종양은 이를 형성하는 세포 유형에 따라 명명된다(육종, 암종, 림프종 등). 육종 및 암종과 같은 고형 종양의 예에는, 섬유육종(fibrosarcoma), 점액육종(myxosarcoma), 지방육종(liposarcoma), 연골육종(chondrosarcoma), 골육종(osteosarcoma) 및 기타 육종, 활액종(synovioma), 중피종(mesothelioma), 유잉 종양(Ewing's tumor), 평활근육종(leiomyosarcoma), 횡문근육종(rhabdomyosarcoma), 결장암(colon carcinoma), 림프성 악성종양(lymphoid malignancy), 췌장암(pancreatic cancer), 유방암(breast cancer), 폐암(lung cancers), 난소암(ovarian cancer), 전립선암(prostate cancer), 간세포암종(hepatocellular carcinoma), 편평세포암종(squamous cell carcinoma), 기저세포암종(basal cell carcinoma), 선암종(adenocarcinoma), 땀샘암종(sweat gland carcinoma), 갑상선수질암종(medullary thyroid carcinoma), 유두갑상샘암종(papillary thyroid carcinoma), 갈색세포종 피지선암종(pheochromocytomas sebaceous gland carcinoma), 유두암종(papillary carcinoma), 유두선암종(papillary adenocarcinomas), 수질암종(medullary carcinoma), 기관지 암종(bronchogenic carcinoma), 신세포 암종(renal cell carcinoma), 간암(hepatoma), 담관 암종(bile duct carcinoma), 융모막암종(choriocarcinoma), 윌름 종양(Wilms tumor), 자궁경부암(cervical cancer), 고환 종양(testicular tumor), 정액종(seminoma), 방광 암종(bladder carcinoma), 흑색종(melanoma) 및 CNS 종양(예: 신경교종(뇌간 신경교종 및 혼합 신경교종 등), 교모세포종(또한 다형성 교모세포종으로 알려짐), 성상세포종, CNS 림프종, 생식세포종(germinoma), 수모세포종(medulloblastoma), 신경초종 두개인두종(Schwannoma craniopharyngioma), 뇌실막종(ependymoma), 송과체종(pinealoma), 혈관모세포종(hemangioblastoma), 청각 신경종(acoustic neuroma), 회소돌기아교종(oligodendroglioma), 수막종(menangioma), 신경모세포종(neuroblastoma), 망막모세포종(retinoblastoma) 및 뇌 전이)가 포함된다. 일 구현예에서, 본 발명은 감염을 치료하기 위해 바이러스, 박테리아, 기생충 또는 기타 감염과 관련된 항원을 표적화하기 위해 범용 면역 수용체를 사용하는 방법을 제공한다.

[0343] 일 구현예에서, 본 발명은 자가면역 장애를 치료하기 위해 자가-항원을 표적화하기 위해 스파이태그 또는 스파이캐처 범용 면역 수용체를 사용하는 방법을 제공한다. 일 구현예에서, 방법은 스파이태그 또는 스파이캐처 도메인을 포함하는 범용 면역 수용체를 발현하도록 면역억제성 T 조절 세포를 유전적으로 변형시키는 것을 포함한다. 일 구현예에서, 자가-항원 결합 도메인을 포함하는 분자를 상호 태그(각각 스파이캐처 또는 스파이태그)로 태깅하는 것 및 스파이태그 또는 스파이캐처 도메인을 포함하는 범용 면역 수용체를 발현하도록 변형된 T 조절 세포를 투여하는 것을 포함한다. 일 구현예에서, 자가-항원에 대한 T 조절 세포의 표적화는 자가-항원에 대한 자가면역 반응을 감소시킨다. 예를 들어, 일 구현예에서, 표적화된 자가-항원에 대한 결합을 통한 유전적으로 변형된 T 조절 세포의 활성화는 세포용해성 T 세포 증식을 감소시킨다. 본 발명에 의해 치료될 수 있는 자가면역 장애의 비-제한적인 예는 다발성 경화증(multiple sclerosis), 염증성 장 질환(inflammatory bowel disease), 크론병(Crohn's disease), 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 이식편대숙주병(graft-versus-host

disease), 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 건선(psoriasis), 피부염(dermatitis), 자가면역 I형 당뇨병(autoimmune type I diabetes), 전신 홍반성 루푸스(systemic lupus erythematosus), 하시모토 갑상선염(Hashimoto's thyroiditis), 중증 근무력증(myasthenia gravis), 등을 포함한다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 본 발명은 자가-항원에 대한 자가면역 반응을 특징으로 하는 임의의 자가면역 장애를 치료하는데 유용하다. 본 발명은 자가항원이 현재 알려져 있고 장래에 자가항원이 밝혀질 자가면역 질환의 치료를 포괄한다.

[0344] 그러나, 본 발명은 오직 본 명세서에 개시된 항원 표적 및 질병에만 한정되는 것으로 해석되어서는 안 된다. 오히려, 본 발명은 질병을 치료하기 위해 범용 면역 수용체가 사용될 수 있는 질병과 관련된 임의의 항원 표적을 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

[0345] 본 발명의 범용 면역 수용체-변형된 T 세포는 또한 포유동물에서 생체의 면역화 및/또는 생체내 요법을 위한 일종의 백신으로서 작용할 수 있다. 바람직하게는, 포유동물은 인간이다.

[0346] 생체의 면역화와 관련하여, 다음 중 적어도 하나는 세포를 포유동물에 투여하기 전에 시험관내에서 발생한다: i) 세포의 확장, ii) 범용 면역 수용체를 코딩하는 핵산을 세포에 도입, 및/또는 iii) 세포의 동결보존.

[0347] 생체의 절차는 당업계에 잘 알려져 있으며 아래에서 더 완전하게 논의된다. 간단히 말해서, 세포는 포유동물(바람직하게는 인간)로부터 단리되고 본 명세서에 개시된 범용 면역 수용체를 발현하는 벡터로 유전적으로 변형(즉, 시험관내 형질도입 또는 형질감염)된다. 범용 면역 수용체-변형된 세포는 치료적 이점을 제공하기 위해 포유동물 수용자에게 투여될 수 있다. 포유동물 수용자는 인간일 수 있고 범용 면역 수용체-변형된 세포는 수용자와 관련하여 자가 조직될 수 있다. 대안적으로, 세포는 수용자와 관련하여 동종이계(allogeneic), 동계(syngeneic) 또는 이종(xenogeneic)일 수 있다.

[0348] 조혈 줄기 및 전구 세포의 생체의 확장을 위한 절차는 본 명세서에 참조에 의하여 포함된 미국 특허 제 5,199,942호에 기술되어 있고, 본 발명의 세포에 적용될 수 있다. 다른 적합한 방법이 당업계에 공지되어 있으므로, 본 발명은 세포의 생체의 확장의 임의의 특정 방법으로 제한되지 않는다. 간단히 말해서, T 세포의 생체 외 배양 및 확장은 (1) 말초 혈액 수확 또는 골수 외식편으로부터 포유동물로부터 CD34⁺ 조혈 줄기 및 전구 세포를 수집하는 단계; 및 (2) 이러한 세포를 체외로 확장시키는 단계를 포함한다. 미국 특허 제 5,199,942호에 설명된 세포 성장 요소에 더해 flt3-L, IL-1, IL-3 및 c-kit 리간드와 같은 다른 요소들은 세포의 배양과 팽창에 사용될 수 있다.

[0349] 생체의 면역화의 관점에서 세포-기반 백신을 사용하는 것에 추가하여, 본 발명은 또한 환자의 항원에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 생체내 면역화를 위한 조성물 및 방법을 제공한다.

[0350] 일반적으로, 본 명세서에 기술된 바와 같이 활성화되고 확장된 세포는 면역저하된 개체에서 발생하는 질병의 치료 및 예방에 이용될 수 있다. 특히, 본 발명의 범용 면역 수용체-변형된 T 세포는 암 치료에 사용된다. 특정 구현예에서, 본 발명의 세포는 암 발병 위험이 있는 환자의 치료에 사용된다. 따라서, 본 발명은 치료적 유효량의 본 발명의 범용 면역 수용체-변형된 T 세포를 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는 암의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.

[0351] 본 발명의 스파이태그 또는 스파이캐처 범용 면역 수용체-변형된 T 세포는 단독으로, 또는 희석제 및/또는 IL-2 또는 다른 사이토카인 또는 세포 집단과 같은 다른 성분과 조합하여 약제학적 조성물로서 투여될 수 있다. 간략하게, 본 발명의 약제학적 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 또는 생리학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 조합하여 본 명세서에 기재된 바와 같은 표적 세포 집단을 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 중성 완충 식염수, 인산염 완충 식염수 등과 같은 완충제; 포도당, 만노오스, 수크로오스 또는 텍스트란, 만니톨과 같은 탄수화물; 단백질; 폴리펩타이드 또는 글리신과 같은 아미노산; 항산화제; EDTA와 같은 킬레이트제 또는 글루타티온; 보조제(예: 수산화알루미늄); 및 방부제를 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 바람직하게는 정맥내 투여용으로 제형화된다.

[0352] 본 발명의 약제학적 조성물은 치료(또는 예방)하고자 하는 질병에 적절한 방식으로 투여될 수 있다. 투여의 양과 빈도는 환자의 상태, 환자의 질병의 유형 및 중증도와 같은 요인에 의해 결정되지만 적절한 투여량은 임상 시험에 의해 결정될 수 있다.

[0353] "면역학적 유효량(an immunologically effective amount)", "항종양 유효량(an anti-tumor effective amount)", "종양 억제 유효량(an tumor-inhibiting effective amount)" 또는 "치료량(therapeutic amount)"이 표시될 때, 투여될 본 발명의 조성물의 정확한 양은 연령, 체중, 종양 크기, 감염 또는 전이의 정도, 환자(대상체)의 상태의 개인차를 고려하여 의사에 의해 결정될 수 있다. 일반적으로, 본 명세서에 기재된 T 세포를 포함

하는 약제학적 조성물은 10^4 내지 10^9 개 세포/kg 체중, 바람직하게는 10^5 내지 10^6 개 세포/kg 체중의 용량으로 투여될 수 있으며, 이러한 범위 내의 모든 정수 값을 포함한다고 말할 수 있다. T 세포 조성물은 또한 이러한 용량으로 여러 번 투여될 수 있다. 세포는 면역요법에서 일반적으로 알려진 인퓨전 기술을 사용하여 투여될 수 있다(예를 들어, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988 참조). 특정 환자에 대한 최적의 용량 및 치료 요법은 질병의 징후에 대해 환자를 모니터링하고 그에 따라 치료를 조정함으로써 의학 분야의 숙련자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0354] 특정 구현예에서, 활성화된 T 세포를 대상체에게 투여한 다음, 후속적으로 혈액을 채취하고(또는 성분채집을 수행함), 본 발명에 따라 그로부터 T 세포를 활성화하고, 그리고 이들 활성화된 및 확장된 T 세포를 환자에게 재주입(reinfuse)하는 것이 바람직할 수 있다. 이 프로세스는 몇 주마다 여러 번 수행할 수 있다. 특정 구현예에서, T 세포는 10cc 내지 400cc의 혈액 채취로부터 활성화될 수 있다. 특정 구현예에서, T 세포는 20cc, 30cc, 40cc, 50cc, 60cc, 70cc, 80cc, 90cc, 또는 100cc의 혈액 채취로부터 활성화된다. 이론에 구속되지 않고, 이 다중 채혈/다중 재주입(reinfusion) 프로토콜을 사용하여 특정 T 세포 집단을 선택하는 역할을 할 수 있다.

[0355] 대상 조성물의 투여는 에어로졸 흡입, 주입(injection), 삽취, 수혈, 심기(implantation), 이식(transplantation)을 포함하는 임의의 편리한 방식으로 수행될 수 있다. 본 명세서에 기재된 조성물은 환자에게 피하(subcutaneously), 피내(intradermally), 종양내(intratumorally), 결절내(intranodally), 골수내(intramedullary), 근육내(intramuscularly), 정맥내(intravenous; i.v.) 주입(injection)에 의해, 또는 복강내(intraperitoneally)로 투여될 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명의 T 세포 조성물은 피내 또는 피하 주입에 의해 환자에게 투여된다. 다른 구현예에서, 본 발명의 T 세포 조성물은 정맥내(i.v.) 주입에 의해 투여되는 것이 바람직하다. T 세포의 조성물은 종양, 림프절 또는 감염 부위에 직접주입될 수 있다.

[0356] 본 발명의 특정 구현예에서, 본 명세서에 기재된 방법, 또는 T 세포가 치료 레벨까지 확장되는 당업계에 알려진 다른 방법을 사용하여 활성화된 및 확장된 세포는, 임의의 수의 관련 치료 양식과 함께(예를 들어, 전에, 동시에 또는 이후에) 환자에게 투여되는데, 여기서 관련 치료 양식은 항바이러스 요법, 시도포비르 및 인터류킨-2과 같은 제제를 사용하는 치료, MS 환자를 위한 시타라빈(ARA-C라고도 함) 또는 나탈리주맙 치료 또는 건선 환자를 위한 에팔리주맙 치료 또는 PML 환자를 위한 기타 치료를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 추가 구현예에서, 본 발명의 T 세포는 화학요법, 방사선, 면역억제제, 예컨대 시클로스포린, 아자티오프린, 메토트렉세이트, 미코페놀레이트 및 FK506, 항체들, 또는 기타 면역절제제(immunoablative agents), 예컨대 CAM PATH, 항-CD3 항체 또는 기타 항체 요법들, 사이토신, 플루다리빈, 사이클로스포린, FK506, 라파마이신, 미코페놀산, 스테로이드, FR901228, 사이토카인 및 방사선 조사와 조합하여 사용될 수 있다. 이러한 약물은 칼슘 의존성 포스포타제 칼시뉴린(사이클로스포린 및 FK506)을 억제하거나 또는 성장 인자 유도된 신호전달(라파마이신)에 중요한 p70S6 키나제를 억제한다(Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993). 추가 구현예에서, 본 발명의 세포 조성물은 골수 이식, T 세포 절제 요법과 함께(예를 들어, 이전에, 동시에 또는 이후에) 환자에게 투여되는데, T세포 절제 요법은 플루다리빈, 외부 빔-방사선 요법(XRT), 사이클로포스파미드 또는 OKT3 또는 CAMPATH와 같은 항체와 같은 화학요법 제제를 사용한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 세포 조성물은 CD20과 반응하는 제제, 예를 들어 리툭산(Rituxan)과 같은 B-세포 절제 요법 후에 투여된다. 예를 들어, 일 구현예에서, 대상체는 고용량 화학요법에 이어 말초 혈액 줄기 세포 이식으로 표준 치료를 받을 수 있다. 특정 구현예에서, 이식 후, 대상체는 본 발명의 확장된 면역 세포의 인퓨전(infusion)을 받는다. 추가 구현예에서, 확장된 세포는 수술 전 또는 후에 투여된다.

[0357] 환자에게 투여될 상기 치료의 용량은 치료되는 상태의 정확한 특성 및 치료의 수용자에 따라 달라질 것이다. 인간 투여를 위한 용량의 스케일링은 당업계에서 허용되는 관행에 따라 수행될 수 있다. T 세포 투여 및 일정 계획에 대한 전략이 논의되었다(Ertl et al, 2011, Cancer Res, 71:3175-81; Junghans, 2010, Journal of Translational Medicine, 8:55).

[0358] 스크리닝

[0359] 일 구현예에서, 본 발명은 예를 들어 항체, 펩타이드, 올리고뉴클레오타이드, 리보자임, 앵타머 등을 포함하는 잠재적인 항원 결합 조성물을 스크리닝하는 방법을 제공한다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 스파이태그 또는 스파이캐처 결합 도메인을 포함하는 범용 면역 수용체를 발현하도록 변형된 T 세포는, 표적 항원에 결합하는 조성물의 능력에 대해 상호 태그된 조성물(즉, 스파이캐처 또는 스파이태그 모이어티 각각으로 태그됨)을 스크리닝하는 데 사용된다. 일 구현예에서, 본 발명의 스크리닝 시스템은 진단을 위하여, 임상시험 시 환자 적격성을 결정하기 위하여, 표적 조직(건강한 조직에 잔류 약제 없음) 내의 항원에 대한 최대 결합 시간을 결정하기

위하여, 그리고 치료에 대한 반응 모니터링 수단으로서 사용된다. 일 구현예에서, 보편적 면역 수용체-발현 변형된 T 세포를 포함하는 세포 기반 검정을 사용하여 조성물을 스크리닝한다. 일 구현예에서, 검정은 태그된 조성물을 검정에 투여하고, T 세포에 의해 유도된 검출가능한 반응을 검출하는 것을 포함한다. 예를 들어, 일 구현예에서, 검정은 T 세포의 활성화를 검출하는 것을 포함한다. 다른 구현예에서, 검정은 분비된 사이토카인의 레벨을 검출하는 것을 포함한다. 일 구현예에서, 항원 결합 조성물이 추구되는 표적 항원은 표면, 예를 들어 세포 배양 플레이트 또는 비드 상에 고정화된다. 다른 구현예에서, 검정은 표적 항원을 발현하는 세포를 포함한다.

[0360] 범용 면역 수용체(UIR) 턴오버를 정량화하는 방법

[0361] 한 측면에서, 세포 표면 상의 범용 면역 수용체의 턴오버를 정량화하는 방법이 제공된다. 스파이캐처와 스파이태그의 결합은 공유적이기 때문에, 무장된 범용 면역 수용체가 세포 표면 상에서 얼마나 빨리 전환되는지 평가할 수 있다. 턴오버율(rate)에 대한 지식은 예를 들어 환자를 위한 항체 용량 전략 또는 요법을 정의하는 데 유용할 수 있다.

[0362] 일 구현예에서, 방법은 (a) T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 스파이캐처 또는 스파이태그를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 범용 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 세포를 스파이캐처 또는 스파이태그를 포함하는 제제와 접촉시키고, 이에 의해 무장된 수용체를 생성하는 것; 및 (b) 참조량에 대한 무장된 수용체의 양을 결정하는 것을 포함한다. 일 구현예에서, 참조량은 이전 시점의 무장된 수용체의 양이다.

[0363] 일 구현예에서, 포유동물에 세포 및 제제를 순차적으로 또는 동시에 투여하고, 무장된 수용체의 레벨을 결정하기 위해 포유동물을 모니터링한다. 무장된 수용체의 레벨이 종양 또는 암을 치료하기에 불충분하다고 결정되는 경우, 포유동물에 추가 세포 및/또는 제제를 투여한다.

[0364] 일 구현예에서, 제제는 스파이태그에 연결된다. 또 다른 구현예에서, 제제는 항체, 항체 단편, scFv, 또는 DARPIn이다. 또 다른 구현예에서, 제제는 항체이고 인간 IgG이다.

[0365] 일 구현예에서, 스파이태그 또는 스파이캐처는 광 활성화 사이트-특이적 건주게이션(LASIC)을 통해 제제에 연결된다. 일 구현예에서, 세포는 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 세포독성 T 림프구(CTL), 대식세포, 줄기 세포, 또는 조절 T 세포이다. 일 구현예에서, 세포는 T 세포이다. 다른 구현예에서, 세포는 자가 세포이다. 다른 구현예에서, 범용 면역 수용체는 공동자극 분자의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 공동자극 분자는 4-1BB, CD28, CD27, CD2, CD3, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능 관련 항원-1(LFA-1), CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 또는 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드이다.

[0366] 일 구현예에서, 무장된 수용체의 양은 제제를 표지하고 표지된 제제를 검출함으로써 결정된다. 제제는 제제를 표지 분자와 연결하거나 접촉시킴으로써 표지될 수 있으며, 여기서 표지 분자는 예를 들어 myc-태그, FLAG-태그, His-태그, HA-태그, 형광 단백질(예컨대, 녹색 형광 단백질(GFP)), 형광단(예컨대, 테트라메틸로다민(TRITC)), 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 디니트로페놀, 페리딘 클로로필 단백질 복합체, 녹색 형광 단백질, 비오틴, 피코에리트린(PE), 히스티딘, 스트렙타비딘, 아비딘, 호스 래디시 페록시다제, 팔미토일화, 니트로실화, 알칼라인 포스파타제, 글루코스 옥시다제, 글루타티온 S-트랜스퍼라제(GST), 말토스 결합 단백질, 양자점 나노 결정을 포함한 임의의 유형의 형광 물질, 방사성 동위원소, 중금속, 초자성 나노입자, 및 1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산(DOTA), 디에틸렌 트리아민 펜타아세트산(DTPA), 1,4,7-트리아자사이클로노난-1,4,7-트리아세트산(NOTA) 또는 알로피코시아닌(APC)을 포함하는 방사성 동위원소 표지에 사용되는 임의의 유형의 화합물을 포함한다.

[0367] 이러한 라벨로 제제의 라벨링은 직접 또는 간접적으로 수행될 수 있다. 라벨은 화학적 커플링 및 화학적 가교제와 같은 기술을 사용하여 분자에 접합될 수 있다. 대안적으로, 융합 단백질로서 표지된 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 벡터가 제조될 수 있다. 그 다음, 세포주는 표지된 분자를 발현하도록 조작될 수 있고, 표지된 분자는 배양 배지로부터 분리되고, 정제되고 본 명세서에 개시된 방법에서 사용될 수 있다. 표지된 아미노산, 표지된 펩타이드, 표지된 단백질, 또는 분자 리포터는 또한 발현된 단백질 결합(예를 들어, 소르타제, 인테인 등을 사용)을 통해 분자에 결합될 수 있다.

[0368] 일 구현예에서, 무장된 수용체의 양은 질량 세포계측법에 의해 결정된다.

[0369] 실험예

- [0370] 본 발명은 하기 실험예를 참조하여 더욱 상세하게 설명된다. 이러한 예는 설명의 목적으로만 제공되며 달리 명시되지 않는 한 제한하려는 의도가 아니다. 따라서, 본 발명은 하기 실시예로 제한되는 것으로 해석되어서는 안되며, 오히려 본 명세서에 제공된 교시의 결과로서 명백해지는 임의의 및 모든 변형을 포함하는 것으로 해석되어야 한다.
- [0371] 추가 설명 없이, 당업자는 선행하는 설명 및 하기 기술적인 예시를 사용하여 본 발명의 화합물을 제조 및 활용하고 청구된 방법을 실시할 수 있다고 믿어진다. 따라서, 다음의 실시예는 본 발명의 바람직한 구현예를 구체적으로 지적하고, 본 개시의 나머지 부분을 어떤 식으로든 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.
- [0372] 이 실험에 사용된 재료와 방법이 이제 설명된다.
- [0373] A24-단백질 G-스파이태그(A24-PGST), 스파이캐처 및 DARPin-스파이태그 구조의 클로닝
- [0374] 7xGGS 링커와 SpyTag에 융합된 24번째 아미노산 위치 내에 앰버 코돈(amber codon)을 포함하는 단백질 G의 HTB1 도메인은 이전 연구(Warden-Rothman et al., *Anal Chem* 2013, 85 (22), 11090-11097.; Hui et al., *Bioconjugate Chemistry* 2015, 26 (8), 1456-1460.)에서 자세히 설명한 것처럼 NdeI 및 AgeI 클로닝 사이트를 통해 pSTEPL 벡터 속으로 클로닝되었다. myc-DARPin9.26-스파이태그, myc-Eo1-스파이태그 및 myc-Ec1-스파이태그가 합성되었고(GeneArt), NdeI 및 AgeI 클로닝 사이트를 통해 pSTEPL 벡터 내로 클로닝되었다(Kasaraneni, N., *mBio* 2017, 8 (6), e01860-17; Steiner et al. *Journal of Molecular Biology* 2008, 382 (5), 1211-1227; Stefan et al. *Mol Biol* 2011, 413 (4), 826-843). Flag-Eo1-스파이태그를 생성하기 위해 폴리머라제 연쇄반응(PCR) 확장을 사용하여 Eo1-스파이태그 컨스트럭트의 5' 말단에 NdeI 절단 부위와 Flag-태그를 추가했다. 그런 다음 위에서 설명한 방법에 따라 Flag-Eo1-스파이태그를 pSTEPL 벡터 속으로 클로닝했다. Myc-RFP-스파이태그는 5' 말단에 NdeI 절단 부위와 myc-태그를 추가하고 3' 말단에 XhoI 절단 부위를 추가하기 위해 프라이머를 사용하여 RFP의 PCR 증폭을 통해 생성되었으며, 이어서 추가된 절단 부위를 사용하는 7xGGS-스파이태그의 pSTEPL 벡터 업스트림 속으로 클로닝되었다. 스파이캐처-비너스(SpyCatcher-Venus)는 프라이머를 사용하여 비너스(Venus)의 PCR 증폭을 통해 생성되어 5' 말단에 NheI 절단 부위와 3' 말단에 XhoI 절단 부위를 추가하였고, 후속적으로 추가된 절단 부위를 사용하여 스파이캐처-7xGGS 도메인의 pSTEPL 벡터 속으로 클로닝되었다.
- [0375] 상기 컨스트럭트의 스파이태그(SpyTag)-DA 버전을 생성하기 위해 정방향(5'-GCATATCGTTATGGTCGCTGCTTACAAGCCAACGA-3') 및 역방향(5'-TCGTTGGCTTGTAAGCAGCGACCATAACGATATGC-3') 프라이머와 함께 퀵체인지 사이트-지정된 돌연변이 유발(QuickChange Site-Directed mutagenesis; Agilent)을 사용하여, Asp117을 Ala117로 돌연변이시키는 스파이태그 코딩 영역 내 A에서 C로의 점 돌연변이를 도입하였다(Zakeri et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012, 109(12), E690-7).
- [0376] 모든 플라스미드 서열은 시퀀스 검증되었다.
- [0377] 박테리아적으로 발현된 단백질의 발현 및 정제
- [0378] A24-단백질 G-스파이태그(A24-PGST) 서열 및 pEVOL-pBpF를 함유하는 pSTEPL 플라스미드를 T7 발현 컴피턴트 대장균(T7 Express Competent E. coli; New England Biolabs)으로 공동 형질전환시켰다. 100 mg/ml 암피실린 및 25 mg/ml 클로로암페니콜이 있는 리소제니브로쓰(lysogeny broth; LB) 내 박테리아 스타터 배양물을 진탕 배양기(230 rpm, 37°C)에서 8시간 동안 성장시켰다. 그 다음, 스타터 배양물을 100 µg/ml 암피실린, 25 µg/ml 클로로암페니콜, 500 µM L-벤조일페닐알라닌(Bachem), 0.1% w/v(+)-아라비노스(Sigma-Aldrich), 0.5% v/v 글루코스를 함유한 자동 유도 배지(Formium) 내에서 1:1000으로 희석하고 진탕 배양기(230 rpm, 37°C)에서 16시간 동안 성장시켰다.
- [0379] DARPin 및 RFP 컨스트럭트를 함유하는 모든 pSTEPL 플라스미드를 T7 발현 컴피턴트 대장균(New England Biolabs)속으로 형질전환시켰다. 배양물은 100 mg/ml 암피실린 및 0.5% v/v 포도당을 함유하는 자동 유도 배지(Formedium) 내에서 상기 언급한 대로 성장시켰다.
- [0380] 배양물을 7,000rpm에서 10분 동안 펠렛화했다. 펠렛을 0.4 mg/mL 리소자임, 4 µg/mL DNase 및 EDTA가 없는 완전한 프로테아제 억제제 각테일(Roche)이 보충된 B-PER 용해 완충액 내에 펠렛 0.8-1 그램 당 완충액 5mL의 비율로 재현탁했다. 용해물(Lysate)을 실온에서 1시간 동안 회전시킨 후, -80°C에서 30분 동결을 수행하였다. 그런 다음 세포 용해물을 실온에서 해동한 다음, 4°C에서 10분 동안 15,000xg에서 원심분리했다. 용해물의 수층을 수집하고 탈론(Talon) 50/50 금속 친화성 레진(1ml 50/50 레진/100mL 박테리아 배양물; Clontech)을 함유하는 10mL 폴리-프랩(Poly-Prep) 크로마토그래피 컬럼 내에서 실온에서 1시간 동안 인큐베이션했다. 용해물이 컬럼을

통과하도록 하고 레진 비드를 마그네슘 및 칼슘이 없는 멸균 1xPBS(Corning)의 5 컬럼 부피로 세척했다.

- [0381] 소르테아제(sortase) 절단 정제는 종전에 기술된 바에 따라 실행되었다(Warden-Rothman et al., *Anal Chem* 2013, 85 (22), 11090-11097). 간단히 말해서, 2mM 트리글리신 및 50 μ M 염화칼슘을 함유하는 1xPBS를 각 컬럼에 첨가하고(1mL 50/50 레진 당 500 μ L 완충액), 37°C에서 2시간 동안 인큐베이션했다. 용출물(Elutions)을 수집하고 필터를 멸균하고 나중에 사용하기 위해 4°C에 보관했다.
- [0382] BCA 분석 키트(Pierce)를 사용하여 단백질 농도를 결정했다. 스파이태그 도메인 단백질의 기능을 테스트하기 위해 과량의 스파이캐처-비너스(SpyCatcher-Venus)와 혼합하고 실온에서 30분 동안 인큐베이션했다. 샘플을 SDS-PAGE 환원 겔(Bio-Rad)에서 실행하여 이소캡타이드 결합 형성을 확인했다. 생체 내 연구를 위해 1% 트리톤 X-114 상 분리 방법을 사용하여 내독소를 제거했다(Liu et al., *Clin Biochem* 1997, 30, 455-463). 엔도세이프(Endosafe)®-PTS 시스템 및 LAL(limulus amoebocyte lysate) 테스트 카트리지(Charles River Laboratories)를 사용하여 내독소 수준이 <10 내독소 단위/mL인 것으로 확인되었다.
- [0383] 임상 등급 IgG에 대한 A24-단백질 G-스파이태그의 광 활성화된 부위 특이적 컨주게이션
- [0384] A24-단백질G-스파이태그(A24-PGST)는 Hui 등(Hui et al., *Bioconjugate Chemistry* 2015, 26 (8), 1456-1460)이 이전에 설명한 방법에 따라 임상 등급 IgGs(trastuzumab, rituximab, cetuximab)에 가교되었다. 간단히 말해서, A24-PGST 정제 후 작은 파일렛 접합 테스트를 수행하여 IgG의 1 μ g을 완전히 가교시키는 데 필요한 A24-PGST의 부피를 결정했다. 컨주게이션은 UV 광 하에 4°C에서 2시간 동안 실행되었고, 샘플은 A24-PGST와 IgG 중쇄의 컨주게이션을 확인하기 위해 SDS-PAGE 환원 겔(Bio-Rad) 상에서 실행되었다. 최대 컨주게이션을 달성하기 위해 결정된 부피/중량 비율은 그 다음 동일한 단계에 따라 대규모 배치 생산에 사용되었다.
- [0385] 과량의 A24-PGST를 제거하기 위해 샘플을 100 kDa MWC0 스핀 여과 컬럼(Millipore Sigma)에서 14,000xg로 원심 분리한 다음, 1xPBS로 5x 컬럼 부피 세척을 수행했다. 단백질 농도는 BCA 분석 키트(Pierce)를 통해 결정되었다. 샘플은 나중에 사용하기 위해 4°C에 보관되었다.
- [0386] SDS-PAGE
- [0387] 소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동은 단백질의 발현, 단백질G-스파이태그(ProteinG-SpyTag) 및 IgG 중쇄의 가교, 그리고 스파이태그(SpyTag)-표지된 표적 리간드와 스파이캐처 시약 사이의 공유 결합 형성을 결정하기 위해 수행되었다. 샘플을 2-메르캅토에탄올의 존재하에 95°C에서 5분 동안 끓이고 4-15% 구배 트리 스/글라이신 겔(Bio-Rad) 상에 로딩했다. 겔을 심플리블루 세이프스테인(SimplyBlue SafeStain; Invitrogen)으로 1시간 동안 염색한 후 물로 밤새 탈색했다.
- [0388] 렌티바이러스 컨스트럭트의 클로닝 및 렌티바이러스 포장
- [0389] 절단된 버전의 스파이캐처(SpyCatcher Δ)(Li et al., *J. Mol. Biol.* 2014, 426 (2), 309-317)를 인코딩하는 유전자 단편을 합성하고(GeneArt) 제한 효소 BamHI 및 NheI로 소화시켰다. 삽입물은 CD28-CD3 ζ , 41BB-CD3 ζ , 또는 기능적 세포내 T 세포 신호전달 도메인이 결여된(Delta-Zeta; $\Delta \zeta$) 세포내 도메인 중 어느 하나를 함유하는 3세대 복제-불능 렌티바이러스 벡터 속으로 라이게이션 되었다. GFP를 인코딩하는 영역 및 T2A 부위가 수용체의 상류에 있어서, GFP를 대리 마커로 사용하여 이식유전자 발현을 검출하는 것을 허용한다(도 2A 및 도 13). CD28-CD3 ζ 또는 41BB-CD3 ζ 세포내 신호전달 도메인 중 어느 하나를 함유하는 헤르셉틴(Herceptin) 유래된 scFv(4D5)(Zhao, 2009)를 사용하여, 항-Her2 키메라 항원 수용체를 클로닝하는 데 동일한 방법론이 사용되었다. 모든 수용체의 발현은 EF1a 프로모터에 의해 유도되었다(Milone et al., *Molecular Therapy* 2009, 17 (8), 1453-1464).
- [0390] HER2 WT는 미엔-치 형(Mien-Chie Hung)의 선물이었다(Addgene plasmid #16257; <http://n2t.net/addgene:16257>; RRID:Addgene_16257) (Li et al., *Cancer Cell* 2004, 6 (5), 459-469). EGFR WT는 매튜 메이어슨(Matthew Meyerson)의 선물이었다(Addgene plasmid #11011; <http://n2t.net/addgene:11011>; RRID:Addgene_11011) (Greulich et al., *Plos Med* 2005, 2 (11), e313). Her2 및 EGFR 서열을 PCR을 통해 증폭하고 제한 효소 XbaI 및 SalI로 분해하였다. 유전자 서열을 EF1a 프로모터의 다운스트림에 있는 3-세대 복제-불능 렌티바이러스 패키징 벡터 속으로 라이게이션 시켰다.
- [0391] 복제-불능 렌티바이러스는 이전에 설명한 대로 HEK293T 세포(Invitrogen)를 사용하여 생산되었다(Smith et al., *Molecular Therapy* 2016, 24 (11), 1987-1999). 간략하게, pELNS 전달 플라스미드 및 렌티바이러스 패키징 플라스미드 pVSV(VSV 당단백질 발현 벡터), pRSV.REV(Rev 발현 벡터), 및 pMDLg/p.RRE(Gag/Pol 발현 플라스미

드)를 리포펙타민(Lipofectamine) 2000(Invitrogen)을 사용하여 HEK293T 세포 속으로 형질감염시켰다. 24시간 및 48시간 상청액(supernatants)을 수거하고 2시간 동안 25,000rpm에서 초원심분리를 통해 바이러스를 펠렛화하였다. 농축된 바이러스는 사용할 때까지 -80℃에서 보관하였다. 바이러스 역가(IU/mL)는 대리 마커 GFP의 측정을 통해 HEK293T 세포의 바이러스 형질도입을 사용하여 결정되었다.

[0392] 세포주

[0393] 확립된 인간 종양 세포주 SKOV3, MDA-MB-468, A1847, CRL5803, MDA-MB-361, 라모스(Ramos) 및 HEK293T는 ATCC(American Type Culture Collection)에서 구입했다. 세포를 37℃ 및 5% CO₂에서 10% FBS(VWR), 100 U/mL의 페니실린 및 100 µg/mL의 스트렙토마이신이 보충된 RPMI 1640(GIBCO)가 포함된 완전 배지(CM)에서 배양했다. 모든 세포주는 마이코플라스마에 대해 일상적으로 테스트되었다.

[0394] 라모스-Her2 및 라모스-EGFR 계통을 생성하기 위해, 라모스 세포는 두 단백질 중 하나의 코딩 서열을 포함하는 렌티바이러스로 형질도입되었다. 그런 다음 세포를 증식시키고 항-Her2(APC; BioLegend) 또는 항-EGFR 항체(PE; BioLegend)로 염색하고 형광 활성화 세포 분류(FACS)를 사용하여 단백질 발현에 대해 분류했다.

[0395] SKOV3-스파이캐처-BBζ를 생성하기 위해, SKOV3 세포는 GFP-T2A-스파이캐처-BBζ에 대한 코딩 서열을 포함하는 렌티바이러스로 형질도입되었다. 세포를 증식시키고 FACS를 사용하여 GFP 발현에 대해 분류하였다.

[0396] 건강한 기증자 1차 인간 T 세포는 인간 면역학 코어(Human Immunology Core; University of Pennsylvania)에서 구입했다. CD4+ 및 CD8+ T 세포를 동일한 양으로 조합하고, 3:1 비율로 항-CD3/CD28 비드(Invitrogen)로 자극했다. 확장 과정 동안 T 세포는 CM에서 37℃ 및 5% CO₂로 유지되었다. 24시간 후, 5-10의 감염 다중도(MOI)로 렌티바이러스를 첨가하였다. 활성화 7일 후, 항-CD3/CD28 비드를 자기 분리를 통해 배양물에서 제거했다. T 세포를 0.5-1x10⁶ 개 세포/mL의 밀도에서 추가로 7일 동안 배양하였다. CM은 렌티바이러스 추가 후 50-100-IU/mL IL-2(Prometheus Therapeutics and Diagnostics)로 보충되었고, 기능 분석에서 T 세포를 사용하기 2일 전까지 유지되었다. T 세포 수 및 부피는 쿨터 카운터(Coulter Counter; Beckman Coulter)를 사용하여 확장 과정 동안 지속적으로 추적되었다. 형질도입 효율은 GFP의 발현을 위한 유세포분석에 의해 검출되었다.

[0397] 스파이캐처 T 세포 무장 및 무장된 수용체 검출

[0398] T 세포를 발현하는 스파이캐처(SpyCatcher)를 다양한 농도의 스파이태그-표지 표적화제를 함유하는 CM 내에 재현탁시켰다. 세포를 37℃ 및 5% CO₂에서 30-60분 동안 인큐베이션한 다음, CM으로 2회 세척하였다. IgG-스파이태그 무장된(armed) T 세포의 염색을 위해 라이트닝링크 APC(LightningLink APC; Expedeon)와 컨쥬게이트된 염소 다클론 항-인간 IgG(Sigma-Aldrich)를 사용했다. myc- 또는 플래그-DARPin-스파이태그 무장된 T 세포의 염색을 위해, 항-Myc-Alexa647(Cell Signaling Technologies) 또는 항-FLAG-BV421(BioLegend)을 사용했다. 염색된 세포를 유세포 분석법으로 분석하였다(도 14 및 도 15).

[0399] 수용체 턴오버 실험을 위해, T 세포를 확장하고 평균 부피 <300fL로 휴지시킨 다음, 상기 설명한 대로 스파이태그-표지된 IgG 또는 스파이태그-표지된 DARPin으로 무장시켰다. 기본 턴오버를 위해, T 세포를 CM 내에서 유지하고 총 96시간 동안 매 24시간마다 로딩된 수용체에 대해 염색하였다. 항원 유도된 턴오버의 경우, T 세포를 3:1 이펙터 대 표적 비율로 조합하고 배양 24시간 후에 염색하였다.

[0400] 웨스턴 블랏

[0401] SKOV3-스파이캐처-BBζ는 37℃에서 1시간 동안 2000nM myc-RFP-스파이태그 또는 myc-RFP-스파이태그-DA와 함께 배양되었다. 세포를 프로테아제 억제제 카테일(Roche, Cat# 5892970001)과 함께 RIPA 용해 완충액을 사용하여 용해시키고 5분 동안 원심분리하였다. 그런 다음 용해물을 수집하고 BCA 분석(Thermo Scientific)을 사용하여 단백질 농도를 정량화했다. 80 µg의 단백질 샘플을 5% β-메르캅토에탄올(BioRad)을 함유하는 로딩 완충액(Lammeli 완충액; BioRad)과 혼합하고 95℃에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 샘플을 4-15% 미니젤 프로틴 TGX(Minigels protean TGX; BioRad)에 로딩하고 150V에서 1시간 동안 실행했다. 단백질 사다리(BioRad)를 샘플과 함께 실행했다. 단백질 샘플을 100V에서 1시간 동안 PVDF 멤브레인(Millipore)으로 옮겼다. 막은 TBST(1% Tween)(BioRad)로 세척되고 정제된 마우스 항-인간 CD3ζ(BD Pharmigen; 1:1,000), 항-인간/마우스/랫트 GAPDH, (R&D; 1:20,000), 퍼옥시다제 아피니퓨어 염소 항-마우스 IgG (Jackson Immunology; 1:10,000)를 포함한 1차 및 2차 항체로 배양되었다. 멤브레인은 1차 및 2차 항체 배양 단계 사이에 3회 세척되었다. 멤브레인은 ECL 프라임 웨스턴 블롯팅 검출 시약(GE Healthcare#RPN2236)을 사용하여 개발되었고 GE 이미지퀀트 LAS 4000

시리즈 이미징 시스템을 사용하여 영상화되었다.

[0402] 스파이캐처 T 세포의 이펙터 기능 테스트

[0403] 사이토카인 분비 분석을 위해, 헤르셉틴-ST(Herceptin-ST) 단백질을 코팅 완충액(BioLegend) 내에 희석하고 평평한 바닥 맥시소프(MaxiSorp) 플레이트(Sigma)에서 밤새 4℃에서 인큐베이션했다. 웰을 PBS로 2회 세척하고 70,000개의 면역 수용체-(+) 세포를 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 통기성 셀로 덮고 37℃ 및 5% CO₂에서 16 시간 동안 인큐베이션했다. 수확된 상층액은 나중에 사용하기 위해 -20℃에 보관되었다. IFN γ 분비 수준은 포함된 프로토콜에 따라 인간 IFN γ ELISA 키트(BioLegend)를 사용하여 평가되었다.

[0404] 용해 기능의 종말점 테스트는 Luc-스크린™ 확장된-글로우 루시페라제 리포터 진 어세이 시스템(Applied Biosystems)을 사용하여 수행되었다. 무장된 스파이캐처 T 세포 용해를 위해, 스파이캐처 T 세포는 상기 설명한 적절한 스파이태그(SpyTag)-표지된 표적화 리간드의 정확한 농도와 함께 인큐베이션되었다. 무장한 스파이캐처 T 세포와 CBG(click beetle green luciferase) 발현 종양 세포를 200 μ L 페놀-프리 CM 내에서 7:1 E:T 비율로 조합하고 37℃ 및 5% CO₂에서 밤새 배양했다. 플레이트를 1,200rpm에서 5분 동안 원심분리하고 각 웰에서 100 μ L의 배지를 제거하고 제조업체의 프로토콜에 따라 루시페라제 완충액을 추가했다. 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 루시페라제 판독값을 얻었다. 주문형(on-demand) 용해를 위해 스파이캐처 T 세포, 표적화 리간드 및 종양 세포를 페놀-프리 CM 내에서 동시에 결합했다. 다른 모든 단계는 무장된 용해와 동일한 방식으로 수행되었다. 세포독성은 다음의 방정식을 사용하여 계산하였다: $[1-(T \text{ 세포} + \text{표적화 리간드} + \text{표적 세포})/(\text{표적 세포 단독}) - 1-(T \text{ 세포} + \text{표적 세포})/(\text{표적 세포 단독})]*100$

[0405] 실시간 용해분석은 xCELLigence 실시간 세포 분석 기기(ACEA Biosciences)를 사용하여 수행되었다. 부착된 종양 세포를 플레이트팅하고 기기 내에서 5% CO₂와 함께 37℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 그런 다음 상기 설명한 대로 무장한 후 스파이캐처 T 세포를 추가했다. 주문형 용해를 위해 스파이캐처 T 세포를 종양 세포에 추가하고 4시간 동안 인큐베이션한 후 표적화 리간드를 추가했다. RTCA 소프트웨어(ACEA Biosciences)를 사용하여 세포독성 계산을 수행했다.

[0406] 이종이식 모델(Xenograft Models)

[0407] NOD-scid IL2R γ null은 줄기세포 및 제노그래프트 코어(Stem Cell and Xenograft Core; University of Pennsylvania)에서 구입했다. 6-12주령 암컷 마우스는 펜실베이니아 대학교 동물 관리 및 사용 위원회(University of Pennsylvania Institutional Animal Care and Use Committee)에서 승인한 프로토콜에 따라 병원체가 없는 환경에서 유지되었다. 복강 내(intraperitoneal; I.P.) 종양 모델을 위하여, 마우스에 SKOV3-CBG+GFP 종양 세포 1x10⁶을 복강 내 주입했다. 7일 후, 12.5x10⁶ 스파이캐처 면역 수용체 T 세포가 1000nM 헤르셉틴-ST로 무장되고 복강 내(I.P.) 주입되었다. 스파이태그 표지된 표적화 리간드는 T 세포 주입 1일 후 복강 내(I.P.) 주입되었고, 치료 중단까지 매 3일마다 후속 주입되었다. 종양의 진행은 상기 기술된 바와 같이 생물발광영상화를 통해 측정되었으며(Lanitis et al., *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2012, 20 (3), 633-643), 앞다리와 뒷다리 사이의 복부에 게이트된 평균 방사광으로 정량화되었다. 복수 형성으로 인해 체중이 20% 증가하면 마우스를 희생시켰다. 종양 주사 후 11일까지 주사 부위에서 촉진 가능한 피하(S.C.) 종양을 형성한 마우스는 모든 그룹에서 제외하였다.

[0408] 혈액 샘플은 줄기세포 및 제노그래프트 코어(펜실베이니아 대학교)에 의해 안와후(retro-orbital) 출혈을 통해 수집되었다. 제공된 프로토콜(BD Biosciences)에 따라 트루카운트(Trucount)™ 튜브를 사용하여 말초 혈액 T 세포를 정량화했다. 염색 패널은 항-인간 CD3(Brilliant Violet 605; BioLegend), 항-인간 CD45(PE; eBiosciences) 및 항-인간 CD8(APC-H7; BD Biosciences)로 구성되었다.

[0409] S.C. 종양 모델을 위하여, 마우스의 옆구리에 SKOV3-CBG+GFP 종양 세포 1x10⁶을 피하 주입했다. 6일 후, 12.5x10⁶ 스파이캐처 면역 수용체 T 세포가 무장되고 복강 내(I.P.) 주입되었다. 스파이태그 표지된 표적화 리간드는 T 세포 인퓨전(infusion) 1일 후 복강 내(I.P.) 주입하고, 치료 중단까지 매 3일마다 후속 주입되었다. 종양 진행은 캘리퍼스 측정을 통해 측정되었고, 다음의 공식을 사용하여 정량화되었다: 부피 = 3.14/6(길이*(너비)²), 여기서 길이는 가장 긴 직경이고 너비는 가장 짧은 직경이다.

[0410] 통계 분석

[0411] 데이터는 달리 명시되지 않는 한 평균 +/- 표준 편차(SD)로 보고된다. 통계 분석은 달리 명시되지 않는 한 쌍을

이루지 않은 2-테일드 t 테스트를 사용하여 수행되었다. 그래프패드 프리즘 8.0 소프트웨어를 통계 분석에 사용하였다. $P < 0.05$ 는 유의미한 것으로 간주되었다.

[0412] 비디오(Videos)

[0413] 1000nM(V1), 100nM(V2), 10nM(V3) 또는 0nM(V4)의 헤르셉틴(Herceptin)-ST로 무장한 GFP-스파이캐처-BB ζ T 세포는 핵 RFP를 발현하는 Her2+ SKOV3 세포의 용량 의존적 용해를 보여준다. 중앙 세포 용해는 1000nM (V5) 헤르셉틴-ST로 무장한 GFP-스파이캐처- $\Delta \zeta$ T 세포에 의해 관찰되지 않았다. Her2+ SKOV3 세포와 공동 배양된 비무장된 GFP-스파이캐처-BB ζ T 세포에 헤르셉틴-ST를 추가하면 용해 기능이 유도된다(V6; 헤르셉틴-ST가 48시간에 추가됨).

[0414] 이제 실험 결과를 설명한다.

[0415] 스파이태그-표지된 중앙 항원 표적화 리간드의 생성

[0416] 스파이캐처 면역 수용체 시스템에는 스파이태그 도메인을 포함하는 표적화 리간드와 스파이캐처 면역 수용체를 발현하는 T 세포의 두 가지 주요 구성요소가 포함된다(도 1A). 우리는 스파이태그(SpyTag)-포함 표적화 리간드를 생성하기 위해 사이트-특이적 컨쥬게이션과 유전적 융합이라는 두 가지 접근 방식을 사용했다. 임상 등급 IgG에 대한 스파이태그의 사이트-특이적 부착은 문헌(Hui et al *Bioconjugate Chemistry* 2015, 26 (8), 1456-1460)에 의해 개발된 광 활성화 사이트-특이적 컨쥬게이션(light activated site-specific conjugation; LASIC) 어댑터 단백질을 사용하여 달성되었다. 이 어댑터 단백질은 CH2-CH3 접합부에서 인간 IgG의 Fc 부분과 상호작용하는 IgG-결합 박테리아 세포벽 단백질인 단백질 G에서 유래한다(Sauer-Eriksson et al., *Struct Lond Engl* 1993 1995, 3 (3), 265-278). 앰버-tRNA 억제인자 아미노아실-신타제 쌍을 사용하여 단백질 G-스파이태그(SpyTag)는 A24 아미노산 위치에 통합된 비천원 아미노산 벤조일페닐알라닌(BPA)과 함께 발현되었다. IgG와 함께 결합되면, A24-단백질 G-스파이태그는 IgG의 Fc 도메인에 비-공유적으로 결합한다. UV 광(365nm)에 노출되면, BPA 분자가 활성화되고 단백질 G-스파이태그 사이트-특이적으로 Fc 도메인에 공유 가교결합된다(도 1A). 따라서 최종 IgG 분자는 Fc 도메인의 각 측면에 하나씩 2개의 공유 연결된 단백질 G-스파이태그 분자를 포함한다(도 1A).

[0417] SDS-페이지 겔을 환원시켜 단백질 G-스파이태그와 가교결합된 임상 등급 항체의 분석은 두 단백질의 조합된 질량(~60kDa 조합된 것)(도 6A)과 동일한 밴드 이동에 의해 기술된 바와 같이 헤르셉틴(도 1B), 세특시맵 및 리톡시맵에 대한 IgG 중쇄의 거의 완전한 가교결합을 보여주었다. UV 노출 후 스파이태그 도메인의 기능 유지를 보여주기 위해 헤르셉틴-스파이태그(Herceptin-SpyTag)를 과량의 스파이캐처-비너스(SpyCatcher-Venus)(38kDa)와 함께 배양했다. 단일 중쇄-단백질 G 밴드의 손실뿐만 아니라, 두 단백질의 대략적인 조합된 질량(100kDa)에서의 비등 및 환원 조건 하에서 유지되는 이동된 밴드의 형성이 관찰되었는데, 이는 두 단백질 사이의 공유 결합 형성을 나타낸다(도 1B). 표적화 리간드 유형의 레퍼토리를 더욱 넓히기 위해, C-말단 스파이태그 도메인을 함유하는 디자인된 안키린(ankyrin) 반복 단백질(DARPin)을 표적화하는, Her2(DARPin9.26; 22.5kDa)(Kasaraneni et al., *mBio* 2017, 8(6), e01860-17)(도 1C), EGFR(E01; 22.4kDa)(Steiner et al., *Journal of Molecular Biology* 2008, 382(5), 1211-1227), 또는 EpCAM(Ec1; 22.8kDa)(Stefan et al., *J Mol Biol* 2011, 413(4), 826-843)(도 6B)은 소르타제-태그 발현된 단백질 라이게이션(sortase-tag expressed protein ligation; STEPL) 시스템을 사용하여 발현되었다(Warden-Rothman et al., *Anal Chem* 2013, 85(22), 11090-11097). 스파이태그 기능은 과량의 비너스-스파이캐처(Venus-SpyCatcher)와의 컨쥬게이션을 통해 다시 검증되었으며, 이는 두 단백질 성분(61kDa)의 대략적인 조합된 분자량에서 비등 및 환원 조건 하에서 분해에 저항하는 이동된 밴드의 형성을 보여준다(도 1C; 도 6A-6B).

[0418] 이전 연구에서는 아스파르트산을 포함하는 스파이태그 변이체의 알라닌 돌연변이(SpyTag-DA)에 대한 반응이 스파이캐처(SpyCatcher)와의 공유 결합 형성을 없애는 반면에, Kd가 200nM인 비공유 복합체의 형성을 여전히 허용한다는 것을 보여주었다(Zakeri et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012, 109 (12), E690-7). 공유 결합 형성에 대한 음성 대조군의 역할을 하기 위해, 헤르셉틴-STDA 및 9.26-STDA 표적화 리간드 또한 생성되었다(도 1B-1C).

[0419] 스파이캐처 면역 수용체의 클로닝, 발현 및 검출

[0420] 절단된 84개의 아미노산 버전의 스파이캐처(SpyCatcher)(Li et al., *J. Mol. Biol.* 2014, 426 (2), 309-317)는 CD3 ζ 와 함께 4-1BB 또는 CD28 동시자극 도메인을 포함하는 이전에 검증된(Lanitis et al., *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2012, 20 (3), 633-643 ; Song et al., *Human gene*

therapy 2013, 24 (3), 295-305) 렌티바이러스 컨스트럭트 속으로 클로닝되어 스파이캐처-BB ζ 와 스파이캐처-28 ζ 면역 수용체를 생산하였다. 세포내 신호전달 도메인이 결여된 스파이캐처 수용체도 음성 대조군으로 작용하도록 생성되었다(SpyCatcher- $\Delta\zeta$; 도 2A). 모든 컨스트럭트는 T2A 자가-절단 펩타이드의 업스트림에 eGFP를 포함하여, GFP 및 수용체의 공동 발현을 허용하고, 일차 인간 T 세포 형질도입을 위한 대리 마커로서 GFP의 사용을 허용한다.

[0421] 스파이태그(SpyTag)가 세포 표면 상에 발현된 스파이캐처 면역 수용체에 공유적으로 연결될 수 있는지 여부를 결정하기 위해, 불멸화된 암 세포주 SKOV3을 형질도입하여 스파이캐처(SpyCatcher)-BB ζ 컨스트럭트(도 7A)를 발현시킨 다음, 가용성 RFP-스파이태그 단백질과 함께 인큐베이션하였다. 인큐베이션은 CD3 ζ 에 대한 웨스턴 블롯 염색을 통해 평가할 때 환원 조건 하에 분해에 내성이 있는 이동된 밴드의 형성을 초래하였고, 이는 두 단백질 사이의 공유 결합 형성을 확인시켜주었다(도 2B). 50kDa-37kDa 사이의 나머지 이동되지 않은 밴드는 전체 세포 용해물이 겔 상으로 로드되었기 때문에 세포내 수용체를 나타낼 가능성이 있다. RFP-스파이태그-DA 단백질과의 인큐베이션은 스파이태그 내 중요한 아스파르트산 잔기의 알라닌으로의 돌연변이가 스파이캐처(SpyCatcher)와 공유 결합을 형성하는 능력을 제거함을 보여주었다(도 2B). 다음으로, 일차 인간 T 세포를 형질도입하여 스파이캐처 면역 수용체를 발현하고 다양한 농도의 헤르셉틴(Herceptin)-ST와 함께 배양하였는데, 이는 APC 항-인간 IgG 폴리클로날 항체로 염색을 통해 검출한 바와 같이(도 2C), 수용체의 용량-의존적 로딩("무장화(arming)")을 초래했다. 또한, 스파이태그(SpyTag)-컨쥬게이트드 표적화 리간드(9.26-ST)와 스파이캐처 수용체 사이의 공유 결합 형성은 특히 낮은 농도에서 최대 표적화 리간드 무장을 달성하는 데 필요했다(도 2D).

[0422] 스파이캐처 T 세포의 시험관 내 효능

[0423] 일차 인간 T 세포 상의 스파이캐처 면역 수용체의 스파이태그 결합이 특이적 활성화를 유도하는지 여부를 결정하기 위해, 고정화된 헤르셉틴(Herceptin)-ST의 다양한 양의 존재 하에 스파이캐처 T 세포를 인큐베이션했다. 스파이캐처-BB ζ 및 스파이캐처-28 ζ T 세포 둘 다, 스파이캐처- $\Delta\zeta$ T 세포는 아니게, 이들은 고정된 헤르셉틴-ST의 존재 하에 IFN γ 을 용량 의존적 방식으로 분비했으며(도 2E), 스파이캐처-28 ζ T 세포는 스파이캐처-BB ζ T 세포보다 더 면역학적으로 민감하다($P < .001$).

[0424] 스파이캐처 면역 수용체는, 그것이 분해될 때까지 수용체에 대한 항원 특이성을 영구적이 부착하면서, 표적화 리간드로 공유적으로 무장할 수 있는 최초의 범용 면역 수용체이기 때문에, 우리는 과량의 표적화 리간드가 없는 상태에서, 사전-무장된 스파이캐처 T 세포의 용해 능력을 평가했다. 항원 인식 시 암세포의 T 세포 용해를 유도하기 위해 충분한 양의 표적화 리간드가 세포 표면의 수용체 상에 공유적으로 무장될 수 있는지를 결정하고자 하였다(도 3A, 왼쪽). 헤르셉틴-ST로 무장한 스파이캐처-BB ζ 및 스파이캐처-28 ζ 는 Her2(+) SKOV3 종양 세포를 용해시킨 반면, 형질도입되지 않은 그리고 헤르셉틴-ST로 무장된 스파이캐처- $\Delta\zeta$ T 세포는 20시간 공동-배양 후 최소 용해 활성을 나타냈다(도 3B). 증가하는 용해 능력과 상관관계가 있는 증가하는 헤르셉틴-ST 무장 농도(도 3B)와 함께, 용해는 용량 의존적 방식으로 발생하였고, 이는 이전에 관찰된 용량-의존적 수용체 로딩(도 2C)에 상응한다. 라이브 세포 이미징을 사용한 용해 기능의 관찰은 이러한 결과를 확인해준 반면에, 또한 무장 용량 의존적 T 세포 클러스터링을 기술하였다(비디오). 종양 세포 용해 및 T 세포 클러스터링은 1000nM 헤르셉틴-ST로 무장한 스파이캐처- $\Delta\zeta$ T 세포에서 관찰되지 않았으며, 이는 용해 및 클러스터링이 활성화 의존적임을 입증한다.

[0425] 또한, 용량-의존적 무장은 다양한 레벨의 표적 항원을 발현하는 종양 세포를 인식하는 스파이캐처 T 세포의 능력에도 영향을 미쳤다. 스파이캐처-BB ζ T 세포는 무장 농도 의존 방식으로 높은 레벨의 항원을 발현하는 종양 세포를 용해할 능력이 있었지만, 더 낮은 수준의 Her2를 발현하는 세포주에 대해 기능을 상실했다(도 8A-8B). 대조적으로, 고도로 무장된 스파이캐처-28 ζ T 세포는 Her2 발현 수준과 상관되는 용해 능력을 가지고, 가변적인 Her2 발현으로 종양 세포를 표적화할 능력이 있었다. 무장 농도가 낮아지면 스파이캐처-28 ζ T 세포는 더 낮은 레벨의 Her2를 발현하는 종양 세포주에 대한 효능을 상실했다(도 8A-8B).

[0426] 28 ζ 또는 BB ζ 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 Her2-표적화 키메라 항원 수용체 T 세포와 비교할 때, 헤르셉틴-ST로 최대로 무장된 스파이캐처 T 세포는 특히 더 낮은 E:T 비율에서 CAR보다 덜 효과적이라는 것이 밝혀졌다(도 9).

[0427] 스파이캐처-BB ζ 및 스파이캐처-28 ζ 는 또한 각각 EGFR-표적화 항체 세특시맵(Cetuximab)-ST 또는 CD20-표적화 항체 리툭시맵(Rituximab)-ST로 무장된 경우, EGFR(+) 또는 CD20(+) 종양 세포를 용해할 수 있었다(도 3C). 기성(off-the-shelf) 임상 등급 항체에 사용된 사이트-특이적 라벨링 방법은 이전에 Hui 등이 보여줬듯이 두 IgG 중쇄 모두에 스파이태그 펩타이드를 추가했고, 나아가 중쇄 밴드 포스트-컨쥬게이션 내 거의 완전한 이동으로

나타났다(도 1B)(Hui et al., *Bioconjugate Chemistry* 2015, 26 (8), 1456-1460). 이 다가 라벨링 방법은 2개의 스파이크캐처 면역 수용체가 동일한 항체 상의 2개의 스파이태그 펩타이드에 의해 가교되거나 2개의 스파이크캐처 T 세포가 동일한 항체 상의 스파이태그 펩타이드에 의해 서로 연결된 경우 항원-독립적인 활성화를 잠재적으로 야기할 수 있다. 그러나, 2개의 스파이태그 펩타이드와 동일하게 컨쥬게이트된 비-표적화 대조군 항체로 무장된 스파이크캐처 T 세포는 유의한 용해를 매개하지 않았으며, 이는 표적화 리간드의 2가 스파이태그 표지가 무장 시 T 세포의 상당한 항원-독립적 활성화를 일으키지 않는다는 것을 기술한다(도 3C). 2가 표지된 항체는 고정될 때 T 세포 활성화를 유도할 수 있었다. 종양 항원 Her2, EGFR 또는 EpCAM을 표적으로 하는 디자인된 안키린 반복 단백질(DARPin)을 포함하는 스파이태그의 공유적 로딩은 또한 항원 발현 종양 세포의 특이적 용해를 유도하고, 이는 스파이크캐처 수용체를 보유하는 T 세포와 함께 다중 표적화 리간드 유형을 사용할 가능성을 보여준다(도 3D).

[0428] 항원 인식 및 CAR T 세포 활성화 시 CAR은 내재화되어, 세포 표면에서 검출 가능한 더 낮은 레벨을 야기한다(Walker et al., *Molecular Therapy* 2017, 25 (9), 2189-2201). 항원성 자극 설정에서 T 세포 표면 상에서 무장된 스파이크캐처 수용체 손실 속도를 평가하기 위해, 스파이크캐처 T 세포를 무장시키고 세척하고 항원 발현 종양 세포와 함께 또는 항원 발현 없이 공동 배양했다. 항원을 발현하는 종양 세포가 없는 경우, 중간 정도의 무장된 수용체 손실이 발생했으며, 스파이크캐처-28 ζ T 세포는 스파이크캐처-BB ζ T 세포에 비해 24시간 이내에 더 빠른 손실을 경험했다. CARs52와 유사하게, 항원 발현 암 세포로 자극될 때, 무장된 수용체 발현은 동일한 시점에서 스파이크캐처-BB ζ 또는 스파이크캐처-28 ζ T 세포 상에서 검출되지 않았다(도 3E). 그러나, 스파이크캐처-BB ζ 및 스파이크캐처-28 ζ T 세포 둘 모두는 재-무장할 수 있었으며, 이는 T 세포에 의한 스파이크캐처 수용체의 발현이 유지되고 새로 도입된 표적화 리간드에 결합할 능력이 있음을 보여준다(도 3E). 비-활성화된 세포의 세포 표면으로부터 무장된 수용체 손실 속도를 결정하기 위해 스파이크캐처 T 세포를 휴지시킨 다음, 헤르셉틴-ST로 무장한 다음, 매 24시간마다 유세포 분석을 통해 검출 가능한 무장된 수용체를 분석했다. 결과는 무장된 수용체 레벨이 시간이 지남에 따라 점차적으로 고갈되고, 무장한 후 약 96시간에 완전한 손실이 발생함을 보여준다(도 10).

[0429] 무장된, 그러나 비무장된 상태가 아닌 스파이크캐처 T 세포가 항원을 발현하는 종양 세포를 표적화하고 죽일 수 있는 능력이 있다는 발견에 기초하여, 비무장된 스파이크캐처 T 세포 효과기 기능은, 항원 발현 종양 세포와의 공동-배양에서 비-무장된 스파이크캐처 T 세포에 표적화 리간드를 나중에 추가할 때 일시적으로 촉발될 수 있다고 가정했다(도 3A, 오른쪽). "주문형(on-demand)" 암세포 용해를 테스트하기 위해, 비무장된 스파이크캐처 T 세포를 표적 리간드 없이 4시간 동안 SKOV3(Her2+/CD20-) 종양 세포와 함께 배양했다. 4시간 후 헤르셉틴-ST의 첨가는 스파이크캐처-BB ζ 또는 스파이크캐처-28 ζ T 세포를 함유하는 배양물에서 신속한 종양 세포 용해를 유도하였다(도 3F). 스파이크캐처-BB ζ T 세포와 비교하여, 스파이크캐처-28 ζ T 세포는 헤르셉틴-ST 첨가 시 더 빠르게 반응하고, 더 낮은 표적화 리간드 농도에서 표적 세포를 용해시켰고, 더 높은 레벨의 최대 용해에 도달했다. 다른 용량의 헤르셉틴-ST에서 스파이크캐처-28 ζ T 세포로 동등한 레벨의 최대 용해가 달성되었음에도 불구하고, 초기 용해 동역학은 용량 의존적 방식으로 발생하였다(도 3F). 스파이크캐처-BB ζ T 세포는 더 낮은 헤르셉틴-ST 용량에서 더 낮은 최대 용해와 함께 더 적정 가능한 반응을 나타냈다.

[0430] 용해 기능에 대한 공유 결합 형성의 효과 테스트

[0431] 공유결합 형성이 수용체 무장과 T세포 활성화에 미치는 영향을 시험하기 위해, 헤르셉틴-ST와 헤르셉틴-STD, 또는 항-Her2 DARPins 9.26-ST와 9.26-STD를 각각 비교한 "무장(arming)" 및 "주문형(on-demand)" 용해 실험이 모두 수행되었다(도 3F와 3G). 9.26-ST로 무장된 스파이크캐처-BB ζ 및 스파이크캐처-28 ζ T 세포는 Her2+ SKOV3 종양 세포를 용해한 반면, 9.26-STD로 무장된 세포는 감소된 용해 또는 용해 없음을 나타내었다(도 3G). 이 결과는 특히 더 낮은 무장 농도에서 공유 결합 형성이 스파이크캐처 수용체의 최대 로딩에 필수적임을 기술한 종전 데이터와 일치한다(도 2D). 공유 결합 형성은 또한 "주문형(on-demand)" 용해에도 영향을 미쳤다. 헤르셉틴-STD 첨가는 등가 용량에서 헤르셉틴-ST와 비교하여 더 느린 용해 동역학 및 더 낮은 최대 용해를 야기하였다(도 3F). 모든 경우에, 스파이크캐처-28 ζ T 세포는 과량의 헤르셉틴-STD로 무장되거나 공동-배양될 때 스파이크캐처-BB ζ T 세포와 비교하여 증가된 효과기 기능을 나타냈다(도 3F 및 3G).

[0432] 동시 수용체 무장 및 이중 항원 표적화

[0433] 공유 보편적 면역 수용체 로딩의 한 가지 이점은 T 세포 표면의 수용체 상에 상이한 특이성을 갖는 다중 표적화 리간드를 부착하여 다중 항원을 동시에 표적화할 수 있는 능력을 갖는 단일 세포 생성물을 생성하는 능력이다(도 4A). 이를 테스트하기 위해 유세포 분석에 의한 검출을 위한 고유한 태그를 포함하는 Her2-표적화(9.26-ST) 및 EGFR-표적화(E0o1-ST) DARPIn을 각각 단독으로 또는 1:1 몰 비율로 조합하여 스파이크캐처 T 세포 상에 로드했

다(도 4B). 태그 염색 및 유세포 분석은 단일 DARPIn이 로드된 스파이캐처 T 세포가 오직 단일 태그에 대해서만 염색된 반면, 두 DARPIn과 공동-배양된 스파이캐처 T 세포는 각 태그에 대해 동등한 염색을 나타내고, 그리하여 동등한 무장을 나타냄을 보여주었다(도 4B). 이러한 이중 무장된 T 세포는 Her2+/EGFR- 및 EGFR+/Her2- 라모스(Ramos) 세포 둘 모두 용해할 수 있는 반면(도 7B), 단일 DARPIn 표적화 리간드로 무장된 스파이캐처 T 세포는 처방된 표적 항원을 발현하는 세포만 용해할 수 있었다. 이중 무장된 T 세포에 의해 매개되는 특이적 세포 용해의 레벨은 그들의 단일-무장된 상대와 유사한데, 이는 이 단일 세포 생성물의 다중 항원을 동시에 표적화하는 능력을 보여주는 것이다(도 4C). 스파이캐처-Δζ T 세포는 무장제(arming agent)와 상관없이 비활성 상태를 유지하였다(도 4C).

[0434] 이중 항원 발현 종양 라인에 대해 스파이캐처 T 세포 기능을 향상시키는 조합된 무장의 능력을 평가하기 위해, 스파이캐처-BBζ T 세포는 9.26-ST 또는 E01-ST의 저용량 또는 둘 모두의 조합으로 무장되었다. Her2+/EGFR+ SKOV3 종양 라인에 공동-배양하는 경우(도 8C), 이중 무장된 스파이캐처-BBζ T 세포는 단일 무장된 세포 단독에 비해 증가된 종양 용해를 달성했다(도 8D).

[0435] 이종이식 종양 모델에서의 생체내 효능

[0436] 다음으로 우리는 비비만 당뇨병(nonobese diabetic; NOD)-scid 감마(NSG) 마우스를 사용하여 이종이식 종양 모델에서 스파이캐처 T 세포 시스템의 효능을 테스트했다. 시험관 내 결과는 스파이캐처-28ζ T 세포가 스파이캐처-BBζ T 세포보다 더 강력한 효과기 기능을 나타내는 것을 보여주었지만, 우리는 스파이캐처-BBζ 수용체를 사용하는 전-임상 모델을 가지고 진행하기로 선택했다.

[0437] 우리는 난소암의 복강 내 모델을 사용하여 스파이캐처-BBζ T 세포의 생체 내 효능을 테스트했다. Her2+ SKOV3 난소암 종양 세포를 복강 속으로(I.P.) 주입하고 7일 동안 확립시켰다. 7일째에 마우스는 1000nM 농도의 헤르셉틴-ST로 무장된 스파이캐처-BBζ T 세포를 복강 내(I.P.) 주입받았다. 한 그룹에는 항원 의존성 T 세포 자극과 무관하게 T 세포 인퓨전(infusion) 또는 표적화 리간드 투여로 인해 야기된 임의의 종양 감소를 제어하기 위해 무장된 스파이캐처-Δζ T 세포가 투여되었다. 8일째 시작하여, 추가 표적화 리간드를 투여한 후 투여 기간 동안 매 3일마다 연속 투여하였다(도 5A; 주황색 박스).

[0438] 25μg 용량의 헤르셉틴-ST와 공동 투여된 스파이캐처-Δζ T 세포를 사용한 처리는 비히클 대조군과 유사하였는데, 이는 종양이 표적 리간드 단독 또는 신호전달 결핍 T 세포의 인퓨전(infusion)에 민감하지 않음을 보여주는 것이다(도 5A-5B). 25μg 용량의 헤르셉틴-ST와 공동-투여된 스파이캐처-BBζ T 세포는 3/4 마우스 내에서 검출 가능한 종양을 제거할 수 있었고, 이는 다른 모든 치료 그룹에 비해 연장된 생존을 초래했다(도 5A-5C). 표적화 리간드 치료 중단 후 30일째 시작하여 한 마우스에서 종양 재발이 관찰되었다. 헤르셉틴-ST의 12.5μg 용량으로 공동-투여된 스파이캐처-BBζ T 세포는 일부 마우스에서 종양 부담의 일시적인 감소를 보였으나 치료 과정에 걸쳐 효과를 유지하지 못하였는데, 이는 종양 제거를 이끌기 위해서는 충분한 레벨의 표적화 리간드가 반드시 제공되어야 함을 보여주는 것이다. 모든 그룹에서 T 세포 인퓨전(infusion) 후 7일째에 피크 말초 혈액 T 세포 레벨이 검출되었으며, 신호 전달이 활성화된 스파이캐처-BBζ T 세포 수는 스파이캐처-Δζ 그룹 내 수를 초과했다(도 5D). 스파이캐처-BBζ T 세포 그룹 내 인간 T 세포 수는 두 표적화 리간드 용량 그룹 간에 유사했으며, 이는 효과적인 치료에 대한 한 가지 제한으로서 표적화 리간드 사용가능성을 의미한다. 또한, 독성으로 인한 체중 감소는 처리군에서 나타나지 않은 반면, 대조군 마우스에서는 종양 진행 동안 복수 형성으로 인해 체중 증가가 관찰되었다(도 11). 스파이캐처 시스템의 전신 전달을 평가하기 위해, 빠르게 성장하고 매우 공격적인 피하 Her2+ SKOV3 종양 모델에서 전임상 테스트를 수행했다. 결과는 헤르셉틴-ST와 병용-투여된 복강 내(I.P.) 주입된 스파이캐처-BBζ T 세포는 스파이캐처-BBζ T 세포 단독과 비교할 때 종양 접종 후 22일째까지 종양 부피 감소로 이어진다는 것을 보여주었다(도 12).

[0439] 범용 면역 수용체는 표준 CAR T 세포 치료법을 개선하고 치료 설계의 한계를 다루기 위한 새로운 기술이다 (Minutolo et al., *Frontiers in Oncology* 2019, 9, 176). 항원을 발현하는 종양 세포에 대해 T 세포를 재지향하기 위한 표적화 리간드의 사용을 통해, UIR은 T 세포 효과기 기능의 용량-의존적 제어를 허용하는 동안에, 단일 수용체, 단일 세포 생성물을 사용하여 다중 종양 항원을 표적화할 수 있다. 현재 UIR 플랫폼은 그들의 세포 외 어댑터 단백질과 표적화 리간드 태그 사이의 비공유 상호작용에 의존하므로, 인퓨전(infusion) 전에 항원 특이성을 공유적으로 로드할 수 없다.

[0440] 여기에서 스파이캐처/스파이태그(SpyCatcher/SpyTag) 화학을 통해 면역 수용체에 표적화 리간드의 번역-후 공유적 부착을 허용하는 새로운 범용 면역 수용체 플랫폼이 개발되어, 여러 종양 관련된 항원에 대한 T 세포의 리디렉션을 중재한다. 세포의 스파이캐처 도메인과 CD28-CD3ζ 또는 4-1BB-CD3ζ 세포내 도메인을 포함하는 2개의

기능적 스파이캐처 면역 수용체 컨스트럭트가 생성되었으며, 일차 인간 T 세포에서의 그들의 발현이 기술되었다. 표적 종양 항원에 대해 T 세포를 발현하는 스파이캐처 면역 수용체를 리디렉션하기 위해, 우리는 리간드 생산을 표적화하는 두 가지 방법을 사용했다. Hui 등이 개발한 LASIC 어댑터 단백질 방법을 사용하여, 우리는 기성품(off-the-shelf) 임상 등급 항체를 스파이태그 모이어티로 사이트-특이적으로 표지할 수 있었다(Hui et al., *Bioconjugate Chemistry* 2015, 26 (8), 1456-1460). 이 방법론을 사용하면, 만일 내성이 항원 손실로 인한 것이 아닌 경우, 항체 단독 요법만으로 혜택을 받지 못하거나 내성이 생긴 환자에서 스파이캐처 T 세포 및 임상 등급 항체의 잠재적으로 유리한 쌍을 이룰 수 있다(Rezvani et al., *Best Practice & Research Clinical Haematology* 2011, 24 (2), 203-216; Karapetis et al., *The New England Journal of Medicine* 2008, 359 (17), 1757-1765). 1가 표적화 리간드는 다양한 설계된 안키린 반복 단백질(DARPin)에 스파이태그의 유전적 융합을 통해 추가로 생성되었다. 이러한 표적 리간드의 사용을 통해, 시험관 내에서 다중 종양 항원을 표적으로 하는 스파이캐처 면역 수용체의 능력이 기술되었다. 스파이태그 표적화 리간드와 함께 스파이캐처 T 세포를 이전하면 공격적인 피하 종양 내에서 파생물을 제어하고 면역결핍 마우스 이중이식 모델 내에서 확립된 복강내 질환을 제거할 수 있다.

[0441] 특히, 스파이캐처(SpyCatcher)와 스파이태그 사이의 공유 결합 형성은 최적의 T 세포 효과기 기능에 중요했다. 스파이태그-DA 돌연변이체와 스파이캐처 수용체(Kd = 200nM) 사이에 형성된 일시적 결합은 수용체 로딩의 실질적인 손실을 초래하였고(도 2D), 이는 차례로 용해 능력의 감소를 야기하였다(도 3G). 표적화 리간드가 배양물에 직접 첨가된 경우, 공유 결합을 형성할 수 없는 능력은 저농도에서 이펙터 기능을 크게 감소시키거나 또는 완전히 폐지하였다(도 3F). 이는 표적화 리간드 농도가 낮은 경우 표적화 리간드와 수용체 사이의 공유 결합 형성이 중요할 수 있음을 나타낸다.

[0442] 스파이캐처 면역 수용체 시스템이 CAR T 세포 요법이 현재 직면한 일부 제한 사항을 다룰 능력이 있음이 본 명세서에 개시되어 있다. 이러한 제한 사항 중 하나는 인퓨전-후(post-infusion) CAR T 세포를 제어할 수 없다는 것이다. 표적 항원에 결합하면 CAR T 세포 활성화 및 증식이 빠른 속도로 발생할 수 있으며 CRS 또는 정상 조직의 표적-상(on-target) 종양 외(off-tumor) 용해와 같은 문제를 유발할 수 있다(Grupp et al., *The New England Journal of Medicine* 2013, 368 (16), 1509-1518 ; Morgan et al., *Molecular Therapy* 2010, 18 (4), 843-851; Lamers et al., *Molecular Therapy* 2013, 21 (4), 904-912). 스파이캐처 T 세포의 이펙터 기능은 종양 노출에 앞서 수용체 상에 공유적으로 로딩되거나 또는 인퓨전-후(post-infusion) 인젝트된(injected) 표적화 리간드의 양에 근거하여 적정 가능하며, 표적화 리간드가 없는 스파이캐처 T 세포는 종양 세포를 표적화 할 수 없다. 표적화 리간드의 차선의(suboptimal) 투여량이 우리의 I.P. 마우스 모델 내에서 종양 돌출 성장을 초래한다는 것이 보여졌으며, 이는 연장된 T 세포 기능을 위해 충분한 레벨에서 표적화 리간드의 지속적인 투여가 필요하다는 것을 나타낸다. 스파이캐처 시스템으로 T 세포 효과기 기능을 약화시키는 수단으로서 표적 리간드 용량을 증가, 감소 또는 철회하는 능력은, 표적-상(on-target) 종양 외(off-tumor) 독성의 완화를 허용할 수 있다. 스파이캐처 T 세포는 DARPin 뿐만 아니라 항체를 사용하여 기능하며, scFvs, Fabs 및 소분자 컨쥬게이트의 사용으로 더 확장될 가능성이 있다. 이것은 짧은 반감기를 가진 표적화 리간드가 스파이캐처 T 세포 효과기 기능의 더욱 신속한 중단으로 이어질 것이기 때문에, 제어의 또 다른 잠재적인 층을 허용할 수 있다. CD19 표적화된 CAR T 세포 요법을 받은 환자는 CD19+ 정상 B 세포의 지속적인 제거로 인해 장기간 B 세포 무형성(aplasia)을 유지한다. 스파이캐처 T 세포는 표적화 리간드가 없을 때 반응성이 없고, 그러므로 표적화 리간드의 중단을 통해 종양 제거 후 정상 B 세포 집단의 재-확립을 허용할 수 있다.

[0443] 항원 음성 종양 집단의 파생물은 T 세포 요법을 표적으로 하는 단일 항원이 직면한 또 다른 문제이다. 이것은 이질적인 종양 항원 발현, 종양 항원의 하향 조절, 트로고사이토시스(trogocytosis) 또는 스플라이스 변이체의 발현을 포함하는 여러 가지 이유로 발생할 수 있다(Bagashev et al., *The Importance of CD19 Exon 2 for Surface Localization: Closing the Ig-like Loop*. 2015; Sotillo et al., *Cancer Discovery* 2015, 5 (12), 1282-1295; Jacoby et al., *Nature Communications* 2016, 7 (1), ncomms12320 ; Gardner et al., *Blood* 2016, 127 (20), 2406-2410; Hamieh et al., *Nature* 2019, 1-5. ; Ruella et al. *Nature Medicine* 2018, 24 (10), 1499-1503). 항원 손실을 통한 종양 탈출을 극복하기 위해 다른 그룹에서는 단일 T 세포 산물 57 내에서 다중 CAR을 발현하거나, 다중 에피토프 결합 도메인이 있는 CAR을 발현하거나(Grada et al., *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 2013, 2 (7), e105 ; Hegde et al., *J Clin Invest* 2016, 126 (8), 3036-3052 ; Schneider et al., *J Immunother Cancer* 2017, 5 (1), 42), 또는 두 개의 구별된 CAR 집단을 포함하는 조합된 T 세포 산물을 만들 것(Ruella et al., *J Clin Invest* 2016, 126 (10), 3814-3826)을 제안했다. 이러한 접근 방식은 항원 손실을 완화하는 데 도움이 될 수 있지만, 안전성 및 독성 문제를 다루지 못하고, 여전히 표적 가능한 총 항원 수를 제한한다. 스파이캐처 T 세포는 Her2, EGFR, EpCAM 및 CD20에 대해 본 명세서에서 확립된 원

리 증명과 함께, 광범위한 범위 또는 종양 항원을 용해할 능력이 있다. 스파이캐처 면역 수용체 T 세포를 다중 표적화 리간드로 동시에 무장시켜 다중 종양 항원을 동시에 표적화할 수 있는 단일 백터 및 단일 세포 산물을 생성할 수 있는 능력이 추가로 기술되었다. T 세포에 의한 새로운 스파이캐처 수용체의 지속적인 발현과 결합된 무장된 수용체의 전환은, 종전에 비오틴 결합 면역 수용체로 기술된 바와 같이(Urbanska et al., *Cancer Research* 2012, 72 (7), 1844-1852), 표적화 리간드(도 3E) 및 순차적 항원 표적화에 대한 잠재력으로 재 무장을 가능하게 한다.

[0444] 스파이캐처 면역 수용체 시스템은 시험관 내 및 생체 내 모두에서 가능성을 보여주었지만, 확장된 사용에 대한 잠재적인 한계를 인정하는 것이 중요하다. 스파이캐처/스파이태그 시스템 자체는 스트렙토코쿠스 파이로젠 (*Streptococcus pyogenes*) 피브로넥틴-결합 단백질 FbaB의 두 번째 면역글로불린-유사 콜라겐 접착 도메인 (CnaB2)으로부터 파생되었다. 이 단백질의 박테리아 기원은 그들이 잠재적으로 면역원성이고 따라서 환자의 면역 체계에 의해 억제될 수 있음을 의미한다. 유사한 문제가 무인 유래된 scFv 도메인을 가진 CAR을 괴롭혔으며, 이에 대해 환자는 인간 항-마우스 항체(HAMA)를 개발한다(Beatty et al., *Cancer Immunology Research* 2014, 2 (2), 112-120). 그러나 종전 연구에서는 면역 능력이 있는 마우스에서 스파이캐처 면역원성을 테스트했으며, 본 명세서에서 사용된 것과 유사한 스파이캐처 단백질의 잘린 버전이 상당히 낮은 항체 레벨을 유도했다고 보고했다(Liu et al., *Sci Rep* 2014, 4, 7266).

[0445] 스파이캐처 면역 수용체와 일반적으로 UIR은 치료 연구를 위한 흥미롭고 새로운 길을 제시한다. 그러나 CAR T 세포 치료 분야와 매우 마찬가지로 최적의 임상 번역은 UIR과 관련된 고유한 문제에 직면할 것이다. 예를 들어, 단일 수용체를 가지고 여러 항원을 표적화하는 능력은, 종양 관련된 항원 및 해당 항원에 대한 임상-등급 표적화 리간드의 발견, 검증 및 안전성 프로파일링에 의존한다. 일부 항원을 표적화 하는 경우, 최적의 표적화 리간드 크기 및 수용체 힌지 도메인 간격이 표적화된 항원 에피토프에 따라 달라질 수 있기 때문에, 최적의 범용 면역 수용체 및 그들의 표적화 리간드 쌍을 디자인하는 데에도 문제가 있을 수 있다(Rodgers et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2016, 113 (4); Ma et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2016, 113 (4), E450-E458). 또한, UIR T 세포의 임상 생산은 종종 CAR T 세포 요법과 유사한 출발 소스 세포 물질로서 환자 T 세포에 의존할 것이다. 따라서 UIR 요법은 또한 기존의 T 세포 고갈 및 노화, 인퓨전(infusion) 후 열악한 증식 및 지속성, 그리고 고품 종양 속으로의 T 세포 침윤 부족의 공유된 문제를 다룰 필요가 있을 것인데(Maude et al., *The New England Journal of Medicine* 2014, 371 (16), 1507-1517; Fraietta et al., *Nature Medicine* 2018, 24 (5), 563-571; Lanitis et al., *Ann Oncol* 2017; Mueller et al., *Clinical Cancer Research* 2018, clincanres.0758.2018), 이는 특정 적응증에서 다르게 효과적인 CAR T 세포 치료를 제한할 수 있다.

[0446] 본 명세서에 기술된 스파이캐처 면역 수용체는 시험관내 및 생체내에서 종양 항원 어레이에 대한 T 세포의 후속 리디렉션을 위한 표적화 리간드의 번역후 공유 로딩을 허용하는 최초의 범용 면역 수용체이다. 이 플랫폼 기술은 여러 항원을 동시에 표적화하는 단일 백터, 단일 수용체를 위한 방법을 제공하는 동시에, 시간이 지남에 따라 지속적인 T 세포 반응을 생성, 조절 및 다양화하기 위해 지속적인 재-무장을 허용한다.

[0447] 본 명세서에 인용된 각각의 모든 특허, 특허 출원 및 간행물의 개시 내용은 그 전체가 참고로 본 명세서에 통합된다. 본 발명이 특정 구현예를 참조하여 개시되었지만, 본 발명의 진정한 사상 및 범위를 벗어나지 않으면서 본 발명의 다른 실시예 및 변형이 당업자에 의해 고안될 수 있음이 명백하다. 첨부된 청구범위는 이러한 모든 실시예 및 등가 변형을 포함하는 것으로 해석되도록 의도된다.

[0448] 열거된 구현예

[0449] 다음의 열거된 구현예가 제공되며, 그 번호는 중요도를 지정하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0450] 구현예 1은 포유동물 내 종양에 대한 범용 면역 수용체-매개된 면역 반응을 자극하는 방법을 제공하는데, 여기서 종양은 적어도 2개의 상이한 항원을 공동 발현하며, 상기 방법은 다음을 포함한다: (a) T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 세포를 포유동물에게 투여하는 것, (b) 상호 어댑터 분자에 연결된 제1 제제를 포유동물에게 투여하는 것, 여기서 제1 제제는 종양에 의해 발현되는 제1 항원에 특이적으로 결합한다, 및 (c) 상호 어댑터 분자에 연결된 제2 제제를 포유동물에게 투여하는 것, 여기서 제2 제제는 종양에 의해 발현되는 제2 항원에 특이적으로 결합하고, 그리고 여기서 제1 항원 및 제2 항원은 상이한 항원이다.

[0451] 구현예 2는 암의 치료가 필요한 포유동물 내 암을 치료하는 방법을 제공하는데, 여기서 암은 적어도 2개의 상이한 항원을 공동-발현하며, 상기 방법은 다음을 포함한다: (a) T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메

인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 세포의 유효량을 포유동물에게 투여하는 것, (b) 상호 어댑터 분자에 연결된 제1 제제의 유효량을 포유동물에게 투여하는 것, 여기서 제1 제제는 암에 의해 발현되는 제1 항원에 특이적으로 결합한다, 및 (c) 상호 어댑터 분자에 연결된 제2 제제의 유효량을 포유동물에게 투여하는 것, 여기서 제2 제제는 암에 의해 발현되는 제2 항원에 특이적으로 결합하고, 그리고 여기서 제1 항원 및 제2 항원은 상이한 항원이다.

- [0452] 구현예 3은 구현예 1 또는 2의 방법을 제공하며, 여기서 세포의 도메인은 스파이캐처 또는 스파이태그(SpyTag)를 포함한다.
- [0453] 구현예 4는 구현예 1-3 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 제1 및/또는 제2 제제는 스파이태그 또는 스파이캐처(SpyCatcher)에 연결된다.
- [0454] 구현예 5는 구현예 1-4 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 제1 및/또는 제2 제제는 항체, 항체 단편, scFv, 또는 DARP인이다.
- [0455] 구현예 6은 구현예 1-5 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 제1 및/또는 제2 제제는 항체이고 인간 IgG이다.
- [0456] 구현예 7은 구현예 1 내지 6 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 상호 어댑터 분자, 스파이태그, 또는 스파이캐처(SpyCatcher)는 광 활성화 사이트-특이적 컨쥬게이션(light activated site-specific conjugation; LASIC)을 통해 제1 및/또는 제2 제제에 연결된다.
- [0457] 구현예 8은 구현예 1-7 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 세포는 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 세포독성 T 림프구(CTL), 대식세포, 줄기 세포, 또는 조절 T 세포이다.
- [0458] 구현예 9는 구현예 1-8 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 세포는 자가 세포이다.
- [0459] 구현예 10은 구현예 1-9 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 면역 수용체는 공동자극(costimulatory) 분자의 세포내 도메인을 더 포함한다.
- [0460] 구현예 11은 구현예 10의 방법을 제공하며, 여기서 공동자극 분자는 4-1BB, CD28, CD27, CD2, CD3, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능 관련 항원-1(lymphocyte function-associated antigen-1; LFA-1), CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 또는 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드이다.
- [0461] 구현예 12는 구현예 1-11 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 세포는 예비-무장된 세포를 생성하기 위해 포유동물에 투여되기에 앞서 제1 및/또는 제2 제제와 접촉되고 예비-무장된 세포는 후속적으로 포유동물에게 투여된다.
- [0462] 구현예 13은 구현예 1-11 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 세포는 포유동물에게 제1 및/또는 제2 제제를 투여하기에 앞서 포유동물에게 투여된다.
- [0463] 구현예 14는 종양에 대한 용해 활성 레벨을 생성하는 방법을 제공하며, 이 방법은 다음을 포함한다: (a) 세포 양을 상호 어댑터 분자에 연결된 제제의 양과 접촉시키는 것, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 세포의 도메인(여기서 세포의 도메인은 어댑터 분자를 포함한다)을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형되고, 여기서 제제는 종양에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고, 그리고 여기서 제제의 양 및/또는 세포의 양은 종양에 대한 용해 활성 레벨을 생성하도록 선택된다.
- [0464] 구현예 15는 암의 치료를 필요로 하는 포유동물에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 이 방법은 다음을 포함한다: (a) T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 세포의 양을 포유동물에게 투여하는 것, 및 (b) 상호 어댑터 분자에 연결된 제제의 양을 포유동물에게 투여하는 것, 여기서 제제는 암에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고, 여기서 세포의 양 및/또는 제제의 양은 암에 대한 용해 활성 레벨을 제공하도록 선택된다.
- [0465] 구현예 16은 구현예 14-15 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 세포의 양에 비해 제제의 양을 증가시키는 것은 용해 활성의 레벨을 증가시키고 세포의 양에 비해 제제의 양을 감소시키는 것은 용해 활성의 레벨을 감소시킨다.
- [0466] 구현예 17은 구현예 14-16 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 세포의 도메인은 스파이캐처 또는 스파이태그를 포함한다.

- [0467] 구현예 18은 구현예 14-17 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 제제는 스파이태그 또는 스파이크처에 연결된다.
- [0468] 구현예 19는 구현예 14-18 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 제제는 항체, 항체 단편, scFv, 또는 DARPin이다.
- [0469] 구현예 20은 구현예 14-19 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 제제는 항체이고 인간 IgG이다.
- [0470] 구현예 21은 구현예 14-20 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 상호 어댑터 분자, 스파이태그 또는 스파이크처가 광 활성화 사이트-특이적 컨쥬게이션(LASIC)을 통해 제제에 연결되는 것이다.
- [0471] 구현예 22는 구현예 14-21 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 세포는 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 세포 독성 T 림프구(CTL), 대식세포, 줄기 세포, 또는 조절 T 세포이다.
- [0472] 구현예 23은 구현예 14-22 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 세포는 자가 세포이다.
- [0473] 구현예 24는 구현예 14-23 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 면역 수용체는 공동자극 분자의 세포내 도메인을 추가로 포함한다.
- [0474] 구현예 25는 구현예 14-24 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 공동자극 분자가 4-1BB, CD28, CD27, CD2, CD3, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능 관련 항원-1(LFA-1), CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 또는 CD83 과 특이적으로 결합하는 리간드이다.
- [0475] 구현예 26은 구현예 15-25 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 예비-무장된 세포를 생성하기 위해 포유동물에 투여하기에 앞서 세포를 제제와 접촉시키고, 예비-무장된 세포를 포유동물에 후속적으로 투여한다.
- [0476] 구현예 27은 구현예 15-26 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 포유동물에게 제제를 투여하기 전에 세포가 포유동물에게 투여된다.
- [0477] 구현예 28은 이를 필요로 하는 포유동물 내 종양에 대한 범용 면역 수용체-매개된 면역 반응을 자극하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 다음을 포함한다: (a) T 세포 수용체 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 세포를 포유동물에게 투여하는 것, 및 (b) 상호 어댑터 분자에 연결된 제제를 포유동물에게 후속적으로 투여하는 것, 여기서 제제는 종양에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합한다.
- [0478] 구현예 29는 암의 치료를 필요로 하는 포유동물에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 이 방법은 다음을 포함한다: (a) T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 T 세포의 유효량을 포유동물에게 투여하는 것, 및 (b) 상호 어댑터 분자에 연결된 제제의 유효량을 포유동물에게 후속적으로 투여하는 것, 여기서 제제는 암에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합한다.
- [0479] 구현예 30은 구현예 28 또는 29 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 세포의 도메인은 스파이크처 또는 스파이태그를 포함한다.
- [0480] 구현예 31은 구현예 28-30 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 제제는 스파이태그 또는 스파이크처에 연결된다.
- [0481] 구현예 32는 구현예 28-31 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 제제는 항체, 항체 단편, scFv, 또는 DARPin이다.
- [0482] 구현예 33은 구현예 28-32 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 제제는 항체이고 인간 IgG이다.
- [0483] 구현예 34는 구현예 28-33 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 상호 어댑터 분자, 스파이태그 또는 스파이크처가 광 활성화 사이트-특이적 컨쥬게이션(LASIC)을 통해 제제에 연결된다.
- [0484] 구현예 35는 구현예 28-34 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 세포는 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 세포 독성 T 림프구(CTL), 대식세포, 줄기 세포, 또는 조절 T 세포이다.
- [0485] 구현예 36은 구현예 28-35 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 세포는 자가 세포이다.
- [0486] 구현예 37은 구현예 28-36 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 면역 수용체는 공동자극 분자의 세포내 도

메인을 추가로 포함한다.

- [0487] 구현예 38은 구현예 28-37 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 공동자극 분자는 4-1BB, CD28, CD27, CD2, CD3, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능 관련 항원-1(LFA-1), CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 또는 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드이다.
- [0488] 구현예 39는 세포 표면 상의 범용 면역 수용체의 턴오버를 정량화하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 다음을 포함한다: (a) T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 세포를 상호 어댑터 분자에 연결된 제제와 접촉시키는 것; 및 (b) 기준량에 대한 무장된 수용체의 양을 결정하는 것.
- [0489] 구현예 40은 구현예 39의 방법을 제공하며, 여기서 기준량은 앞선 시점의 무장된 수용체의 양이다.
- [0490] 구현예 41은 구현예 40의 방법을 제공하며, 여기서 무장된 수용체의 양은 제제를 표지하고 표지된 제제를 검출함으로써 결정된다.
- [0491] 구현예 42는 구현예 41의 방법을 제공하며, 여기서 제제는 다음을 포함하는 표지 분자를 갖는 제제와 연결 또는 접촉하는 것에 의해 표지된 것이다: myc-태그, FLAG-태그, His-태그, HA-태그, 형광 단백질(예컨대, 녹색 형광 단백질(GFP)), 형광단(예컨대, 테트라메틸로다민(TRITC)), 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 디니트로페놀, 페리딘 클로로필 단백질 복합체, 피코에리트린(PE), 히스티딘, 비오틴, 스트렙타비딘, 아비딘, 호스 래디시 페록시다제, 팔미토일화, 니트로실화, 알칼라닌 포스포타제, 글루코스 옥시다제, 글루타티온 S-트랜스퍼라제(GST), 말토스 결합 단백질, 방사성 동위원소, 및 1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산(DOTA), 디에틸렌 트리아민 펜타아세트산(DTPA), 1,4,7-트리아자사이클로노난-1,4,7-트리아세트산(NOTA) 또는 알로피코시아닌(APC)을 포함하는 방사성 동위원소 표지에 사용되는 임의의 유형의 화합물.
- [0492] 구현예 43은 구현예 39-42 중 어느 하나의 방법을 제공하는데, 이는 (c) 세포 및 제제를 종양 세포와 접촉시키는 것을 추가로 포함한다.
- [0493] 구현예 44는 구현예 39-43 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 세포의 도메인은 스파이캐처를 포함한다.
- [0494] 구현예 45는 구현예 39-44 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 제제는 스파이태그에 연결된다.
- [0495] 구현예 46은 구현예 39-45 중 어느 하나의 방법을 제공하는데, 여기서 제제는 항체, 항체 단편, scFv, 또는 DARPin이다.
- [0496] 구현예 47은 구현예 39-46 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 제제는 항체이고 인간 IgG이다.
- [0497] 구현예 48은 구현예 39-47 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 세포는 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 세포독성 T 림프구(CTL), 대식세포, 줄기 세포, 또는 조절 T 세포이다.
- [0498] 구현예 49는 구현예 39-48 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 면역 수용체는 공동자극 분자의 세포내 도메인을 추가로 포함한다.
- [0499] 구현예 50은 구현예 39-49 중 어느 하나의 방법을 제공하는데, 여기서 공동자극 분자는 4-1BB, CD28, CD27, CD2, CD3, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능 관련 항원-1(LFA-1), CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 또는 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드이다.
- [0500] 구현예 51은 이를 필요로 하는 포유동물에서 종양에 대한 범용 면역 수용체-매개된 면역 반응을 자극하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 다음을 포함한다: (a) T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 4-1BB의 세포내 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 세포의 유효량을 포유동물에게 투여하는 것, 및 (b) 상호 어댑터 분자에 연결된 제제의 유효량을 포유동물에게 투여하는 것, 여기서 제제는 종양에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고, 여기서 종양은 참조 레벨에 비해 증가된 레벨로 항원을 발현하도록 미리-결정된다.
- [0501] 구현예 52는 이를 필요로 하는 포유동물에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 이 방법은 다음을 포함한다: (a) T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 4-1BB의 세포내 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 세포의 양을 포유동물에게 투여하는 것, 및 (b) 상호 어댑터 분자에 연결된 제제의 양을 포유동물에게 투여하는 것, 여기서 제제는 암에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고, 여기서 암은 참조 레벨에 비해 증가된 레벨로 항원을 발현하도록 미리-결정된다.

- [0502] 구현예 53은 구현예 51 또는 52 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 참조 레벨은 건강한 조직 상에서 항원의 발현 레벨이다.
- [0503] 구현예 54는 구현예 51-53 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 세포의 도메인은 스파이캐처 또는 스파이태그를 포함한다.
- [0504] 구현예 55는 구현예 51-54 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 제제는 스파이태그 또는 스파이캐처에 연결된다.
- [0505] 구현예 56은 구현예 51-55 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 제제는 항체, 항체 단편, scFv, 또는 DARPin이다.
- [0506] 구현예 57은 구현예 51-56 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 제제는 항체이고 인간 IgG이다.
- [0507] 구현예 58은 구현예 51-57 중 어느 하나의 방법을 제공하고, 여기서 스파이태그 또는 스파이캐처는 광 활성화 사이트-특이적 컨쥬게이션(LASIC)을 통해 제제에 연결된다.
- [0508] 구현예 59는 구현예 51-58 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 세포는 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 세포 독성 T 림프구(CTL), 대식세포, 줄기 세포, 또는 조절 T 세포이다.
- [0509] 구현예 60은 구현예 51-59 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 세포는 자가 세포이다.
- [0510] 구현예 61은 구현예 51-60 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 예비-무장된 세포를 생성하기 위해 포유동물에 투여하기에 앞서 세포를 제제와 접촉시키고, 예비-무장된 세포를 포유동물에 후속적으로 투여한다.
- [0511] 구현예 62는 구현예 51-61 중 어느 하나의 방법을 제공하며, 여기서 세포는 포유동물에게 제제를 투여하기에 앞서 포유동물에게 투여된다.
- [0512] 구현예 63은 이를 필요로 하는 포유동물에서 종양에 대한 범용 면역 수용체-매개된 면역 반응을 자극하는 데 사용하기 위한, 유전적으로 변형된 세포, 제1 제제, 및 제2 제제를 제공하며, 여기서 종양은 적어도 2개의 상이한 항원을 공동-발현하고, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형되고, 여기서 제1 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제1 제제는 제제에 종양에 의해 발현되는 제1 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 제2 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제2 제제는 종양에 의해 발현되는 제2 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 제1 항원 및 제2 항원은 상이한 항원이고, 그리고 여기서 면역 수용체, 제1 제제 및 제2 제제는 포유동물에게 투여된다.
- [0513] 구현예 64는 이를 필요로 하는 포유동물에서 암을 치료하는데 사용하기 위한 유전적으로 변형된 세포, 제1 제제, 및 제2 제제를 제공하며, 여기서 암은 적어도 2개의 상이한 항원을 공동-발현하고, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형되고, 여기서 제1 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제1 제제는 암에 의해 발현되는 제1 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 제2 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제2 제제는 암에 의해 발현되는 제2 항원에 특이적으로 결합하고; 그리고 여기서 제1 항원 및 제2 항원은 상이한 항원이다.
- [0514] 구현예 65는 종양에 대한 용해 활성 레벨을 생성하는 데 사용하기 위한 유전적으로 변형된 세포 및 제제를 제공하는데, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 여기서 제제는 종양에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 세포의 양은 제제의 양과 접촉되고, 여기서 세포의 양에 대한 제제의 양은 종양에 대한 용해 활성 레벨을 생성하도록 선택된다.
- [0515] 구현예 66은 이를 필요로 하는 포유동물에서 암을 치료하는데 사용하기 위한 유전적으로 변형된 세포 및 제제를 제공하는데, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제제는 암에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 세포의 양 및 제제의 양은 포유동물에게 투여되고, 여기서 세포의 양 및/또는 제제의 양은 암에 대한 용해 활성 레벨을 제공하도록 선택된다.
- [0516] 구현예 67은 이를 필요로 하는 포유동물에서 종양에 대한 범용 면역 수용체-매개된 면역 반응을 자극하는 데 사

용하기 위한 유전적으로 변형된 세포 및 제제를 제공하며, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 여기서 제제는 종양에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 세포의 양은 포유동물에게 투여되고 제제의 양은 후속적으로 포유동물에게 투여된다.

[0517] 구현예 68은 이를 필요로 하는 포유동물에서 암을 치료하는데 사용하기 위한 유전적으로 변형된 세포 및 제제를 제공하는데, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 제제는 암에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하는 것이고; 여기서 세포의 양은 포유동물에게 투여되고 제제의 양은 후속적으로 포유동물에게 투여된다.

[0518] 구현예 69는 이를 필요로 하는 포유동물에서 종양에 대한 범용 면역 수용체-매개된 면역 반응을 자극하는 데 사용하기 위한 유전적으로 변형된 세포 및 제제를 제공하며, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 4-1BB의 세포내 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서, 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제제는 종양에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 세포의 유효량은 포유동물에게 투여되고 제제의 유효량은 포유동물에게 투여되고, 그리고 여기서 종양은 참조 레벨에 비해 증가된 레벨로 항원을 발현하도록 미리-결정된다.

[0519] 구현예 70은 이를 필요로 하는 포유동물에서 암을 치료하는데 사용하기 위한 유전적으로 변형된 세포 및 제제를 제공하는데, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 4-1BB의 세포내 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제제는 종양에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 세포의 유효량은 포유동물에게 투여되고 제제의 유효량은 포유동물에게 투여되고, 그리고 여기서 종양은 참조 레벨에 비해 증가된 레벨로 항원을 발현하도록 미리-결정된다.

[0520] 구현예 71은 이를 필요로 하는 포유동물에서 종양에 대한 범용 면역 수용체-매개된 면역 반응을 자극하는데 있어서, 유전적으로 변형된 세포, 제1 제제, 및 제2 제제의 용도를 제공하며, 여기서 종양은 적어도 2개의 상이한 항원을 공동- 발현하고, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제1 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제1 제제는 종양에 의해 발현되는 제1 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 제2 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제2 제제는 종양에 의해 발현되는 제2 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 제1 항원 및 제2 항원은 상이한 항원이고, 그리고 여기서 면역 수용체, 제1 제제 및 제2 제제는 포유동물에게 투여된다.

[0521] 구현예 72는 이를 필요로 하는 포유동물에서 암의 치료에 있어서 유전적으로 변형된 세포, 제1 제제, 및 제2 제제의 용도를 제공하며, 여기서 암은 적어도 2개의 상이한 항원을 공동-발현하고, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제1 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제1 제제는 암에 의해 발현되는 제1 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 제2 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제2 제제는 암에 의해 발현되는 제2 항원에 특이적으로 결합하고; 그리고 여기서 제1 항원 및 제2 항원은 상이한 항원이다.

[0522] 구현예 73은 종양에 대한 용해 활성 레벨을 생성하는데 있어서, 유전적으로 변형된 세포 및 제제의 용도를 제공하는데, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제제는 종양에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 세포의 양은 제제의 양과 접촉되고, 그리고 여기서 세포의 양에 대한 제제의 양은 종양에 대한 용해 활성 레벨을 생성하도록 선택된다.

[0523] 구현예 74는 이를 필요로 하는 포유동물 내 암의 치료에 있어서, 유전적으로 변형된 세포 및 제제의 용도를 제공하는데, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제제는 암에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 세포의 양 및 제

제의 양은 포유동물에게 투여되고, 여기서 세포의 양 및/또는 제제의 양은 암에 대한 용해 활성 레벨을 제공하도록 선택된다.

[0524] 구현예 75는 이를 필요로 하는 포유동물에서 종양에 대한 범용 면역 수용체-매개된 면역 반응을 자극하는데 있어서, 유전적으로 변형된 세포 및 제제의 용도를 제공하는데, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제제는 종양에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 세포의 양은 포유동물에게 투여되고, 제제 양은 후속적으로 포유동물에게 투여된다.

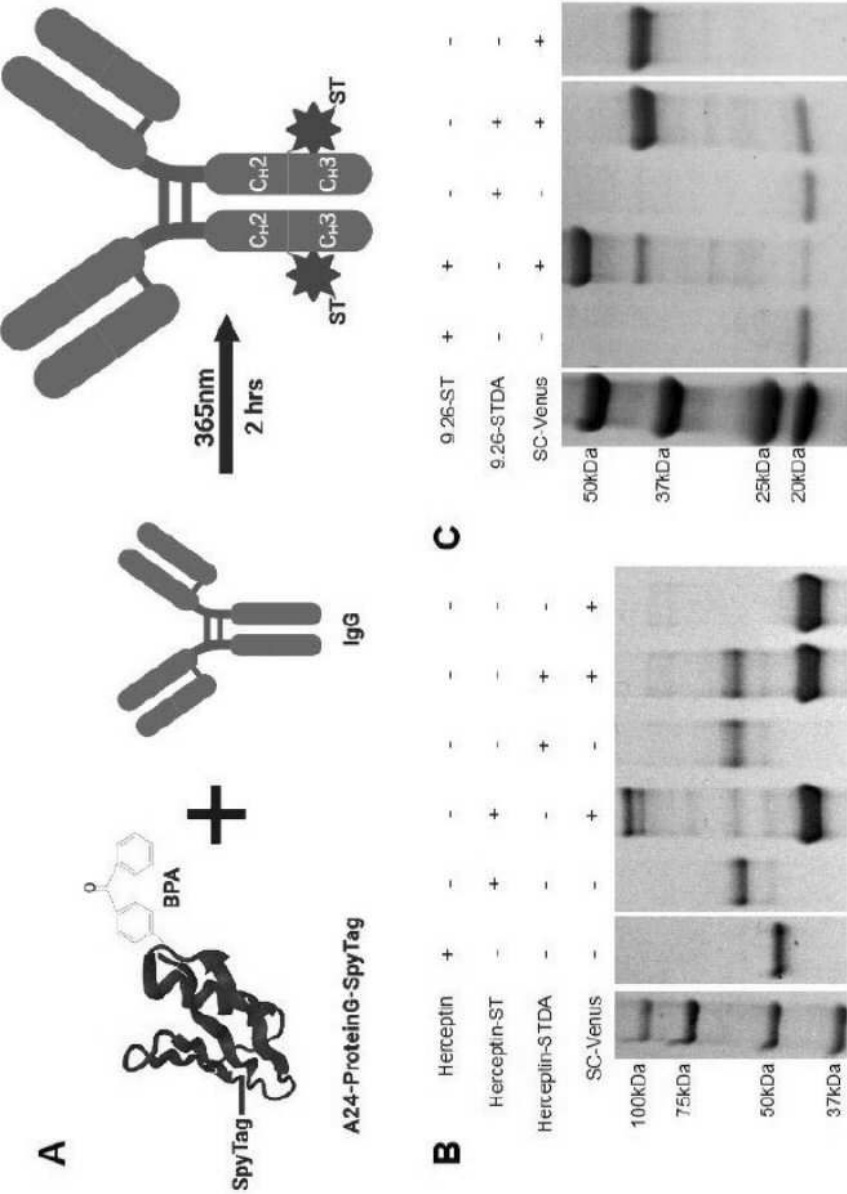
[0525] 구현예 76은 이를 필요로 하는 포유동물 내 암의 치료에 있어서, 유전적으로 변형된 세포의 용도를 제공하는데, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제제는 암에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 세포의 양은 포유동물에게 투여되고 제제의 양은 후속적으로 포유동물에게 투여된다.

[0526] 구현예 77은 이를 필요로 하는 포유동물에서 종양에 대한 범용 면역 수용체-매개된 면역 반응을 자극하는데 있어서 유전적으로 변형된 세포 및 제제의 용도를 제공하며, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 4-1BB의 세포내 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제제는 종양에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 세포의 유효량은 포유동물에게 투여되고 제제의 유효량은 포유동물에게 투여되고, 그리고 여기서 종양은 참조 레벨에 비해 증가된 레벨로 항원을 발현하도록 미리-결정된다.

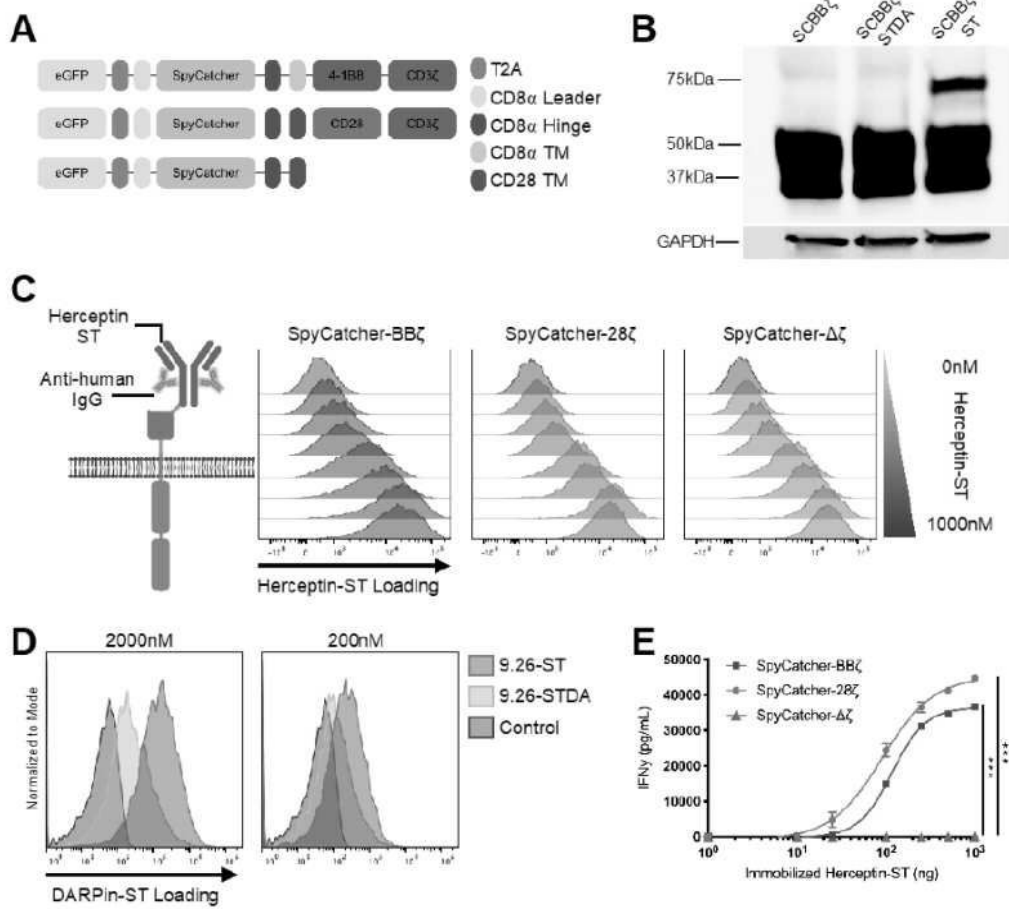
[0527] 구현예 78은 이를 필요로 하는 포유동물 내 암의 치료에 있어서 유전적으로 변형된 세포 및 제제의 용도를 제공하며, 여기서 세포는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인, 4-1BB의 세포내 도메인, 막횡단 도메인, 및 어댑터 분자를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 면역 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것이고, 여기서 제제는 상호 어댑터 분자에 연결되고, 그리고 여기서 제제는 종양에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하고; 여기서 세포의 유효량은 포유동물에게 투여되고 제제의 유효량은 포유동물에게 투여되고, 그리고 여기서 종양은 참조 레벨에 비해 증가된 레벨로 항원을 발현하도록 미리-결정된다.

도면

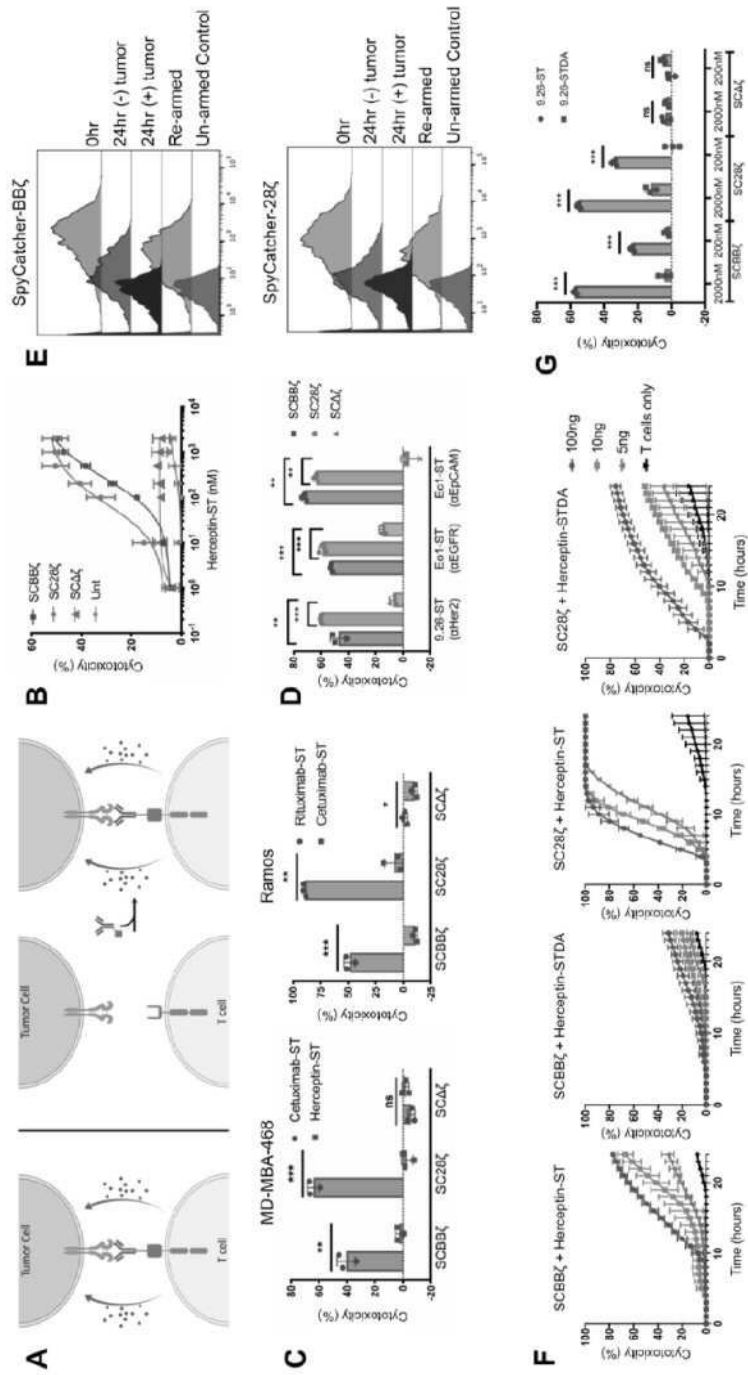
도면1



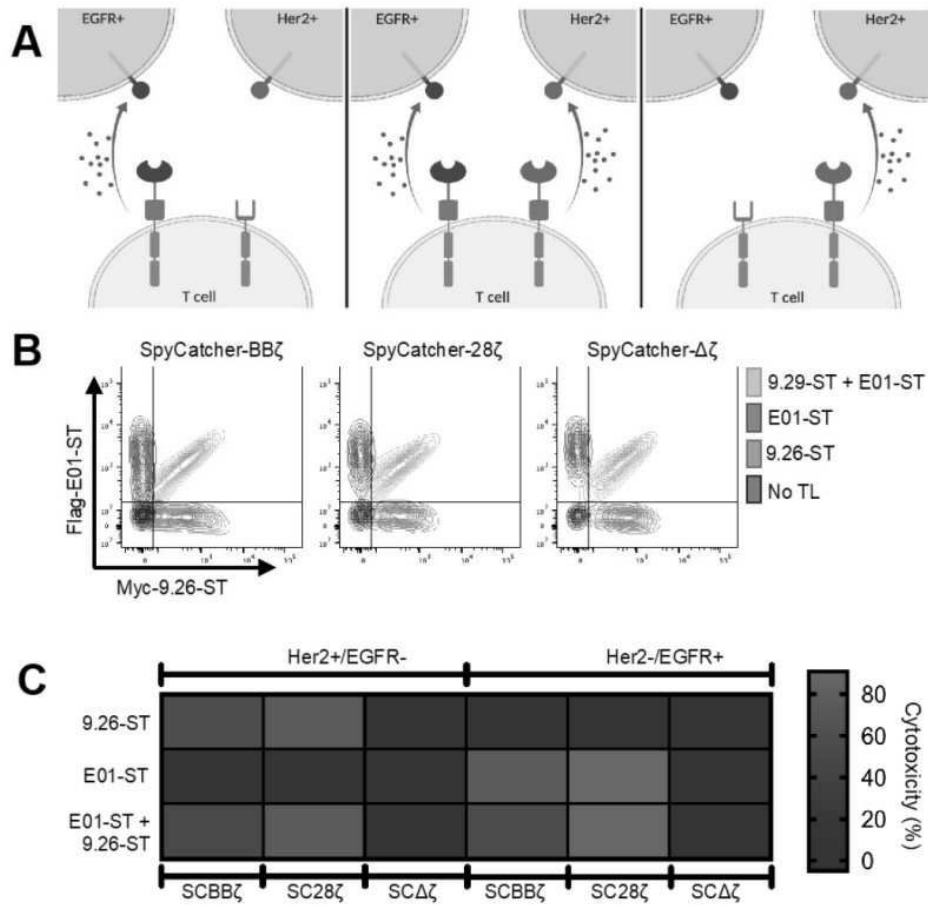
도면2



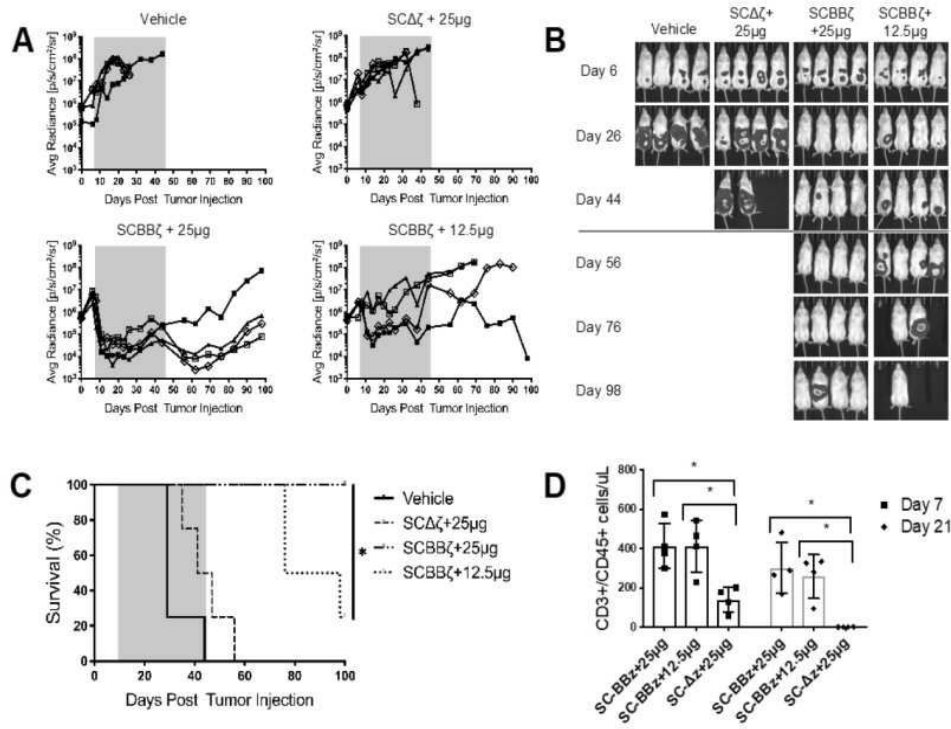
도면3



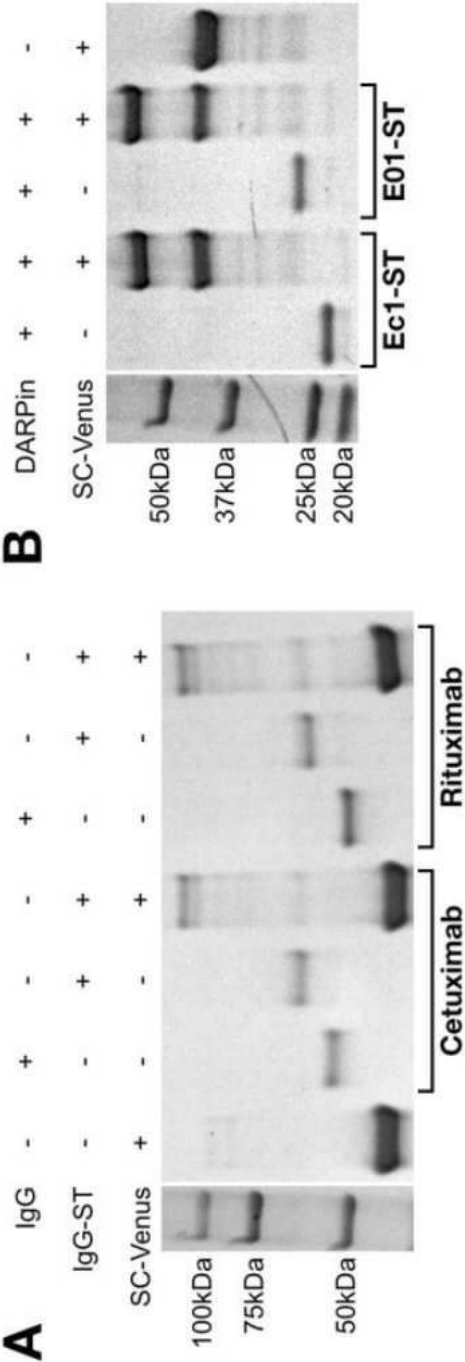
도면4



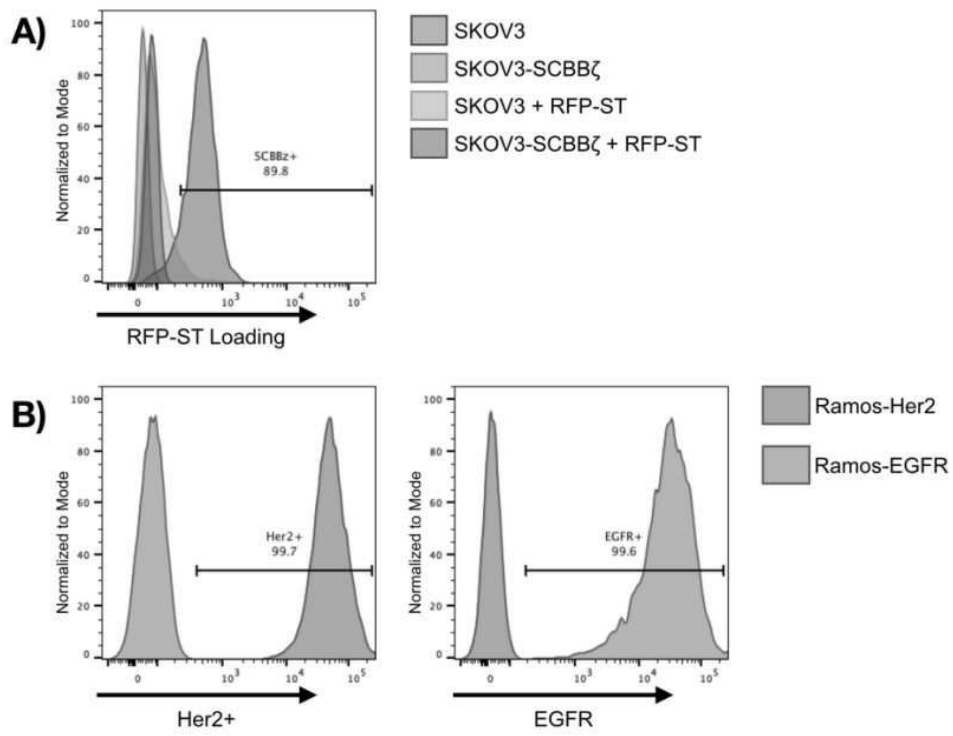
도면5



도면6



도면7



도면8

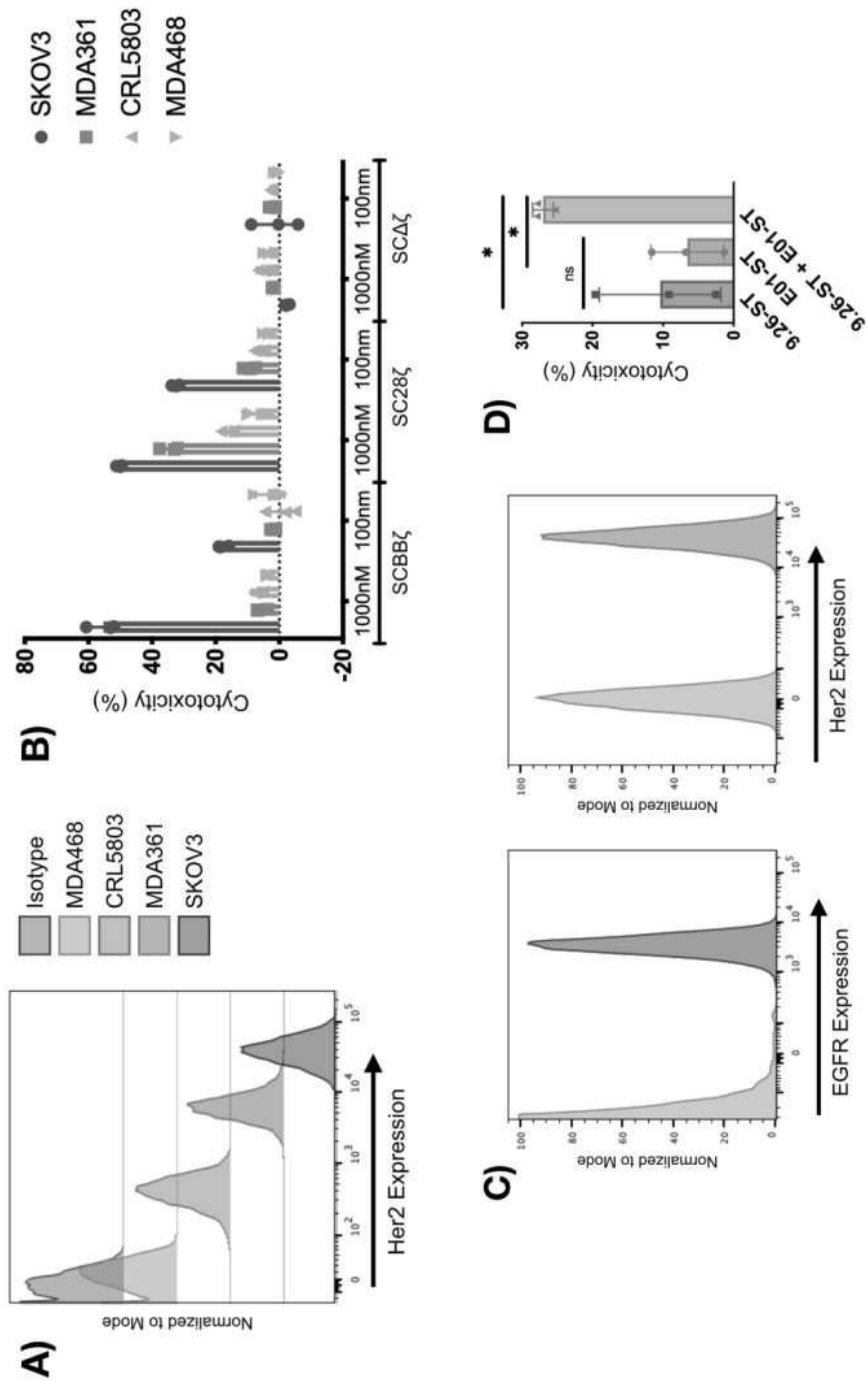
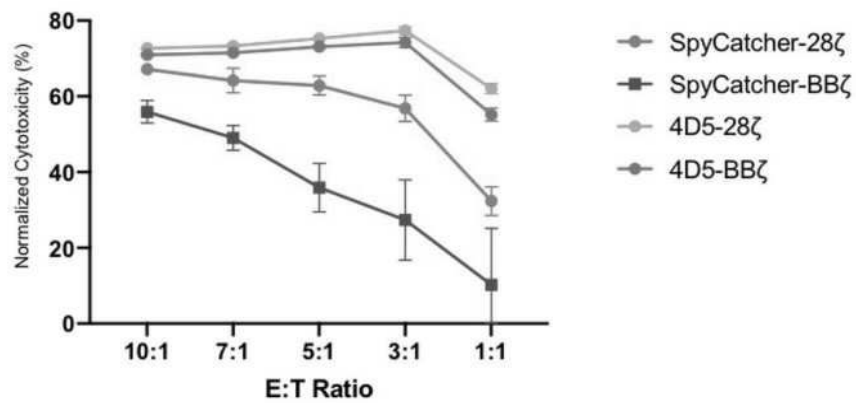
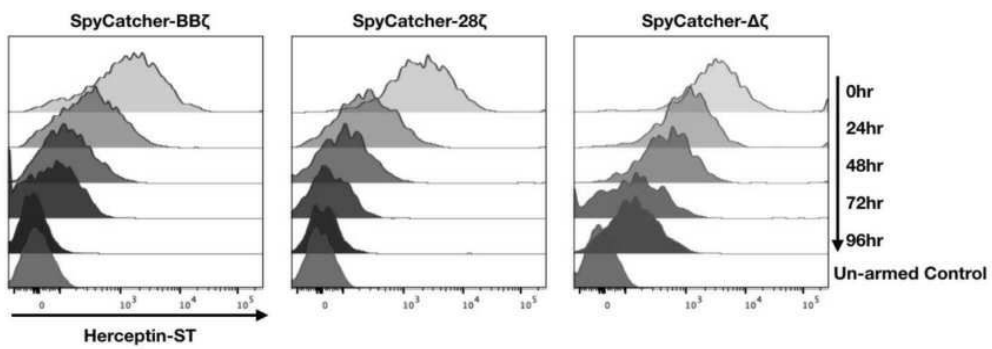


FIG. 8

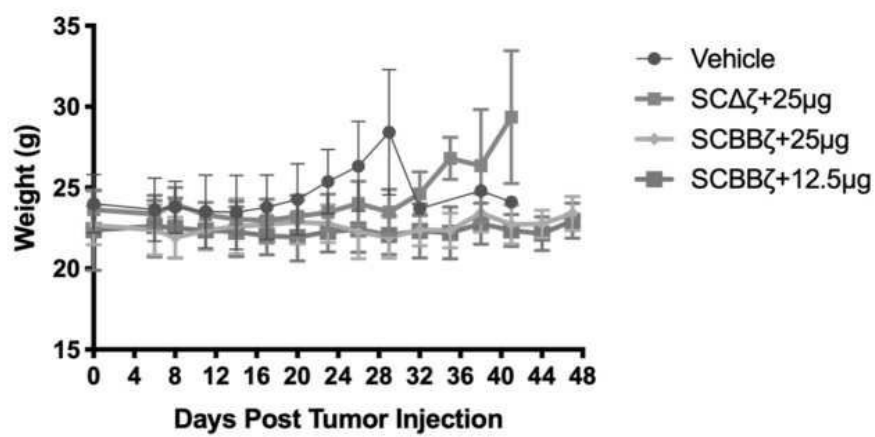
도면9



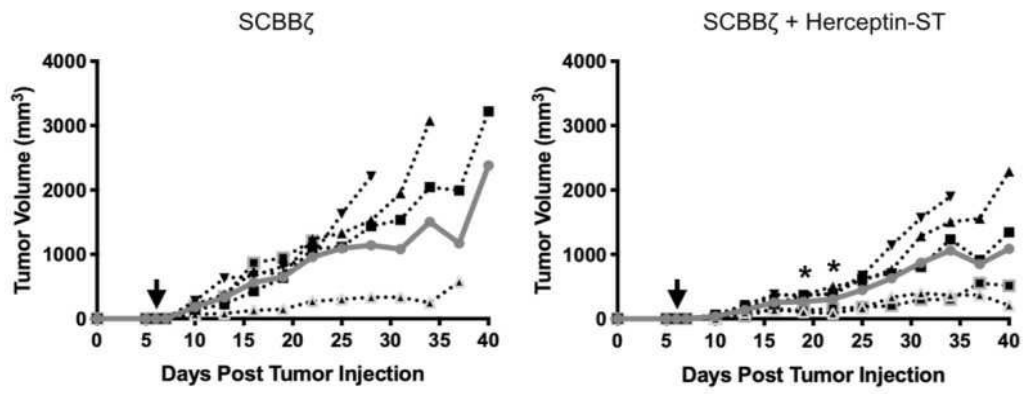
도면10



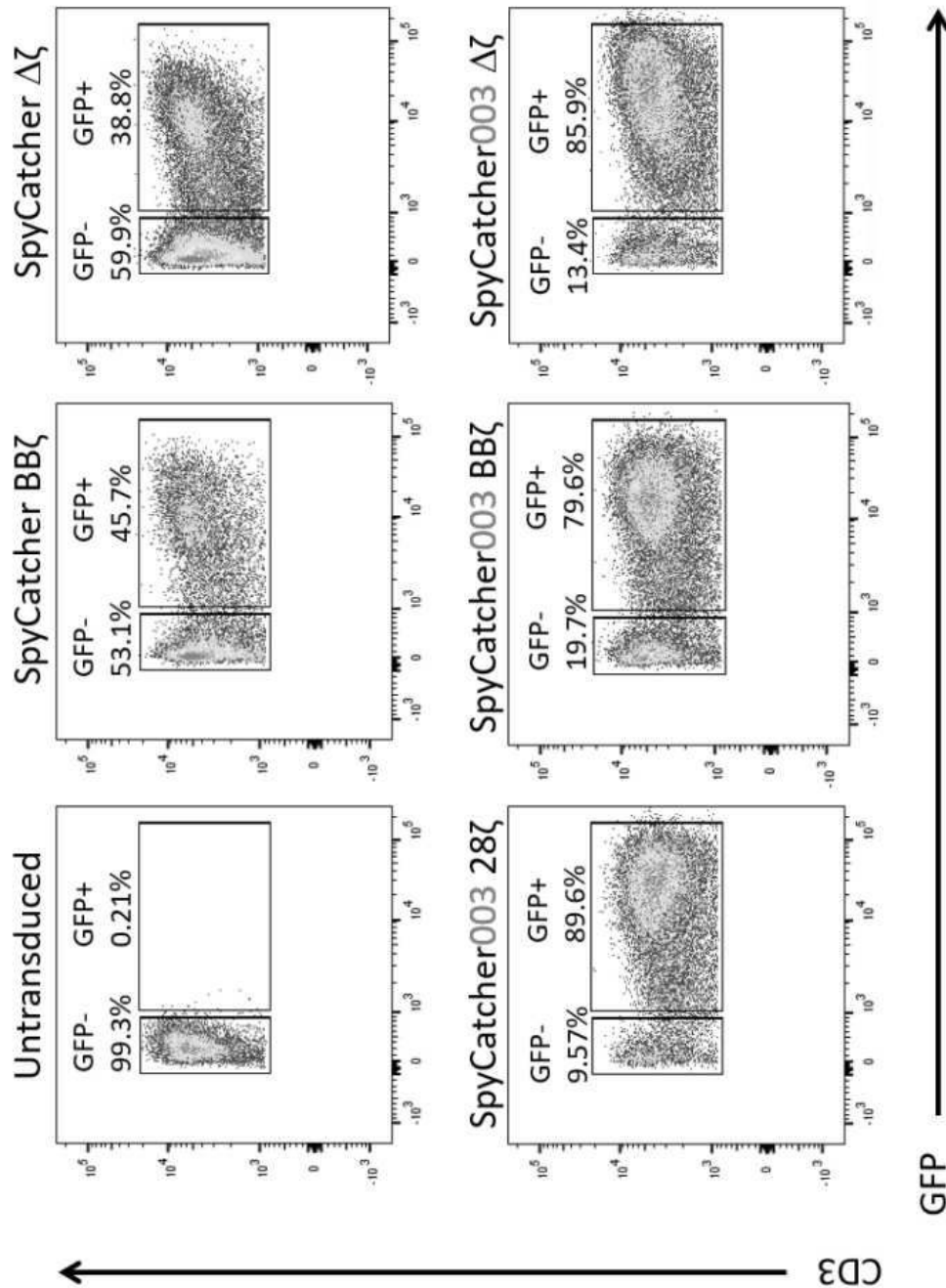
도면11



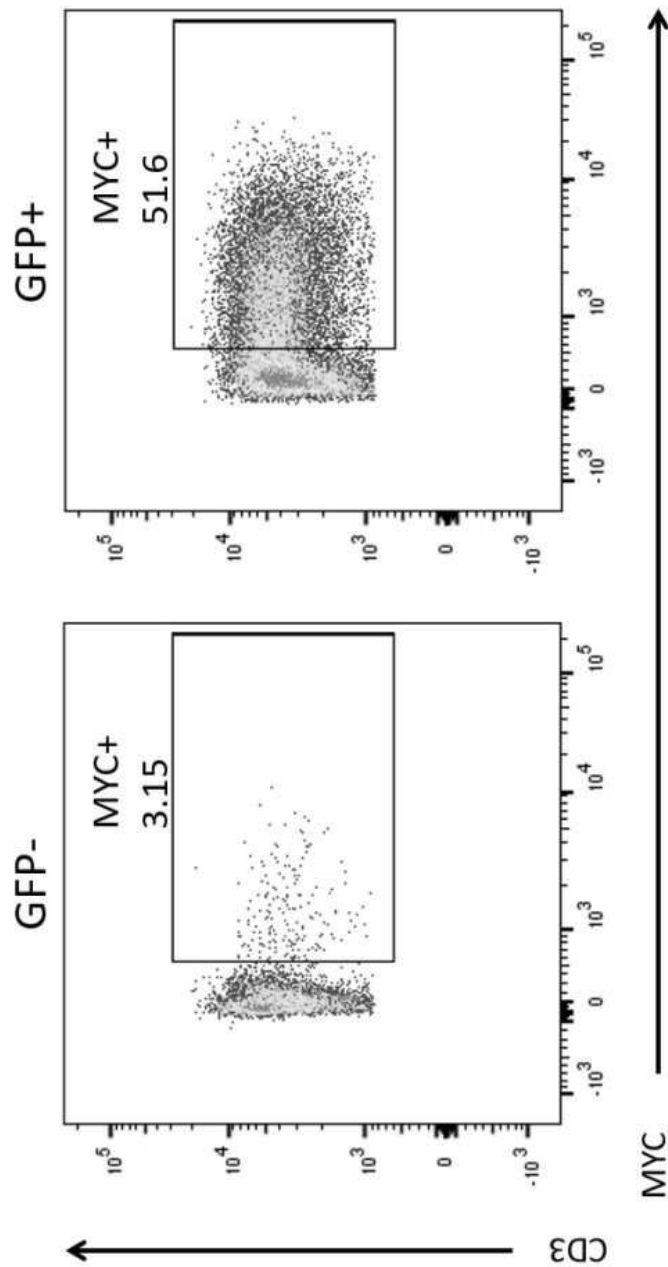
도면12



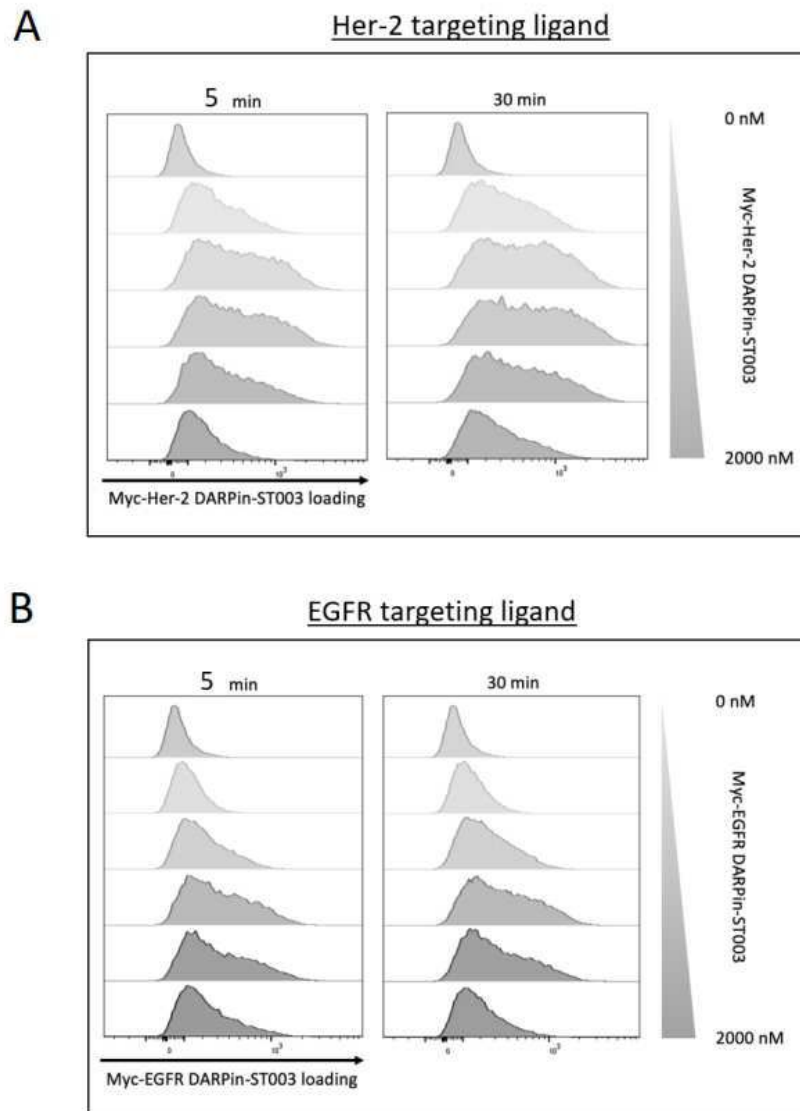
도면13



도면14



도면15



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> The Trustees of The University of Pennsylvania

<120> QUANTITATIVE CONTROL OF ACTIVITY OF ENGINEERED CELLS EXPRESSING UNIVERSAL IMMUNE RECEPTORS

<130> 046483-7294W01(02460)

<150> 62/965,593

<151> 2020-01-24

<160> 30

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1869

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized

<400> 1

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac	60
ggcgacgtaa acggccacaa gttagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac	120
ggcaagctga cctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc	180
ctcgtgacca cctgacctc cggcgtgcag tcttcagcc gctaccccgga ccacatgaag	240
cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc	300
ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg	360
gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac	420
aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac	480
ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc	540
gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac	600
tacctgagca ccagtcgc cctgagcaaa gacccaacg agaagcgga tcacatggtc	660
ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcgga tggacgagct gtacaagaga	720
tctggcagcg gagagggcag aggaagtctt ctaacatgcg gtgacgtgga ggagaatccc	780
ggccctagaa tggccttacc agtgaccgcc ttgctcctgc cgctggcctt gctgctccac	840
gccgccagcg cgggatccgg aagcggcgat agcggcacc acatcaagtt cagcaagcgg	900
gacgaggacg gcaaagagct ggctggcgcc accatggaac tgcgggacag cagcggcaag	960
accatcagca cctggatcag cgacggccag gtcaaagact tctacctgta ccccgcaag	1020
tacaccttcg tggaaacagc cgccctgac ggctacgagg tggccacagc catcaccttc	1080
accgtgaacg agcagggaca ggtcacagt aacggcggcg gcagcggcgg cagcggcggc	1140
agcggcggca gcggcggcag cggcggcagc ggcggcagcg ctagcaccac gacgccagcg	1200
ccgcgaccac caacaccggc gccaccatc gcgtcgagc ccctgtccct gcgcccagag	1260
gcgtgccggc cagcggcggg gggcgagtg cacacgaggg ggctggactt gcctgtgat	1320
ttttgggtgc tgggtggtgt tgggtggagt ctggcttgct atagcttgct agtaacagt	1380
gcctttatta ttttctgggt gaggagtaag aggagcaggc tcctgcacag tgactacatg	1440
aacatgactc cccgccgcc cgggcccacc cgcaagcatt accagcccta tgccccacca	1500
cgcgacttcg cagcctatcg ctccatgat agagtgaagt tcagcaggag cgagacgcc	1560
cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc tataacgagc tcaatctagg acgaagagag	1620

gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga 1680
 aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc 1740
 tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc cggaggggca aggggcacga tggcctttac 1800

cagggtctca gtacagccac caaggacacc tacgacgcc ttcacatgca ggccctgccc 1860
 cctcgctaa 1869

<210> 2

<211> 528

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized

<400> 2

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu

1 5 10 15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly

20 25 30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile

35 40 45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr

50 55 60

Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys

65 70 75 80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu

85 90 95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu

100 105 110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly

115 120 125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr

130 135 140

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn

145 150 155 160

Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
165 170 175

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
180 185 190

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
195 200 205

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
210 215 220

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Arg
225 230 235 240

Ser Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val
245 250 255

Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu
260 265 270

Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His Ala Ala Arg Pro Gly Ser Ala His
275 280 285

Ile Val Met Val Asp Ala Tyr Lys Pro Thr Lys Ala Ser Thr Thr Thr
290 295 300

Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro
305 310 315 320

Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val
325 330 335

His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Phe Trp Val Leu Val Val
340 345 350

Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe
355 360 365

Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp
370 375 380

Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr
385 390 395 400

Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Ile Asp

405 410 415

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly

420 425 430

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr

435 440 445

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys

450 455 460

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys

465 470 475 480

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg

485 490 495

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala

500 505 510

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

515 520 525

<210> 3

<211> 1650

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized

<400> 3

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60

ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120

ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 180

ctcgtgacca cctgacctc cggcgtgcag tgccttcagcc gctaccccga ccacatgaag 240

cagcagcact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300

ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360

gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420

aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480

ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540

gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600

tacctgagca cccagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcgga tcacatggtc 660
ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaagaga 720
tctggcagcg gagagggcag aggaagtctt ctaacatgcg gtgacgtgga ggagaatccc 780
ggccctagaa tggccttacc agtgaccgcc ttgctcctgc cgctggcctt gctgctccac 840

gccgccaggc cgggatccgc ccacatcgtg atggtggacg cctacaagcc caccaagggc 900
ggcagcggcg gcagcggcgg cagcggcggc agcggcggca gcggcggcag cggcggcagc 960
gctagcacca cgacgccagc gccgcgacca ccaacaccgg cgcccacat cgcgtcgag 1020
cccctgtccc tgcgccaga ggcgtgccgg ccagcggcgg ggggcgcagt gcacacgagg 1080
gggctggact tcgcctgtga tttttgggtg ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc 1140
tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg 1200
ctcctgcaca gtgactacat gaacatgact ccccgccgcc ccggggccac ccgaagcat 1260

taccagccct atgccccacc acgcgacttc gcagcctatc gtcctatcga tagagtgaag 1320
ttcagcagga gcgcagacgc ccccgctac cagcagggcc agaaccagct ctataacgag 1380
ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat gttttggaca agagacgtgg ccgggaccct 1440
gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag 1500
aaagataaga tggcggaggc ctacagttag attgggatga aaggcgagcg ccggaggggc 1560
aaggggcacg atggccttta ccagggtctc agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc 1620
cttcacatgc aggccttgc ccctcgctaa 1650

<210> 4

<211> 549

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized

<400> 4

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu

1 5 10 15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly

20 25 30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile

35 40 45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr

50	55	60	
Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys			
65	70	75	80
Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu			
	85	90	95
Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu			
	100	105	110
Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly			
	115	120	125
Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr			
	130	135	140
Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn			
145	150	155	160
Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser			
	165	170	175
Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly			
	180	185	190
Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu			
	195	200	205
Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe			
	210	215	220
Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Arg			
225	230	235	240
Ser Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val			
	245	250	255
Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu			
	260	265	270
Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His Ala Ala Arg Pro Gly Ser Ala His			
	275	280	285
Ile Val Met Val Asp Ala Tyr Lys Pro Thr Lys Gly Gly Ser Gly Gly			
	290	295	300

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
 305 310 315 320
 Ala Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr
 325 330 335
 Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala
 340 345 350
 Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Phe
 355 360 365

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

 Tyr Arg Ser Ile Asp Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro
 435 440 445
 Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
 450 455 460
 Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro
 465 470 475 480
 Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr
 485 490 495

 Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly
 500 505 510
 Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln
 515 520 525
 Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln
 530 535 540
 Ala Leu Pro Pro Arg
 545

<210> 5

<211> 1017

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Artificially Synthesized

<400> 5

atggccttac cagtgaccgc cttgtctctg ccgctggcct tgctgtcca cgccgccagg	60
ccgggatccg gaagcggaga tagcgccacc cacatcaagt tcagcaagcg ggacgaggac	120
ggcaaagagc tggctggcgc caccatggaa ctgcgggata gcagcggcaa gaccatcagc	180
acctggatca gcgacggcca ggtcaaagac ttctacctgt acccggcaa gtacaccttc	240
gtggaacag ccgcccctga cggctatgag gtggccacag ccatcacctt caccgtgaac	300
gagcaggac aggtcacagt gaacggcgt agcaccacga cgccagcgcc gcgaccacca	360
acaccggcgc ccaccatcgc gtgcagccc ctgtccctgc gccagaggc gtgccggcca	420

gcggcggggg gcgcagtga cagcggggg ctggacttcg cctgtgattt ttgggtgctg	480
gtggtggttg gtggagtct ggcttgctat agcttgctag taacagtggc ctttattatt	540
ttctgggtga ggagtaagag gagcaggctc ctgcacagt actacatgaa catgactccc	600
cgccgccccg ggcccacccg caagcattac cagccctatg ccccaccag cgacttcga	660
gcctatcgct ccatcgatag agtgaagtgc agcaggagcg cagacgccc cgcgtaccag	720
cagggccaga accagctcta taacagctc aatctaggac gaagagagga gtacgatgtt	780
ttggacaaga gacgtggcgc ggacctgag atggggggaa agccgagaag gaagaaccct	840

caggaaggcc tgtacaatga actgcagaaa gataagatgg cggaggccta cagttagatt	900
gggatgaaag gcgagcgccg gaggggcaag gggcacgatg gcctttacca ggggtctcagt	960
acagccacca aggacaccta cgacgccctt cacatgcagg ccctgcccc tcgctaa	1017

<210> 6

<211> 338

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized

<400> 6

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1	5	10	15
---	---	----	----

His Ala Ala Arg Pro Gly Ser Gly Ser Gly Asp Ser Ala Thr His Ile

20 25 30

Lys Phe Ser Lys Arg Asp Glu Asp Gly Lys Glu Leu Ala Gly Ala Thr

35 40 45

Met Glu Leu Arg Asp Ser Ser Gly Lys Thr Ile Ser Thr Trp Ile Ser

50 55 60

Asp Gly Gln Val Lys Asp Phe Tyr Leu Tyr Pro Gly Lys Tyr Thr Phe

65 70 75 80

Val Glu Thr Ala Ala Pro Asp Gly Tyr Glu Val Ala Thr Ala Ile Thr

85 90 95

Phe Thr Val Asn Glu Gln Gly Gln Val Thr Val Asn Gly Ala Ser Thr

100 105 110

Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser

115 120 125

Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly

130 135 140

Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Phe Trp Val Leu

145 150 155 160

Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val

165 170 175

Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His

180 185 190

Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys

195 200 205

His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

210 215 220

Ile Asp Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln

225 230 235 240

Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu

245 250 255

Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly

260 265 270
Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu

275 280 285
Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly

290 295 300
Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser

305 310 315 320
Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro

325 330 335
Pro Arg

<210> 7

<211> 1080

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized

<400> 7

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60
ccgggatccg gaagcggcga tagcggccacc cacatcaagt tcagcaagcg ggacgaggac 120
ggcaaagagc tggctggcgc caccatggaa ctgcgggaca gcagcggcaa gaccatcagc 180
acctggatca gcagcggcca ggtcaaagac ttctacctgt acccggcaa gtacaccttc 240
gtggaaacag ccgccctga cggctacgag gtggccacag ccatcacctt caccgtgaac 300
gagcagggac aggtcacagt gaacggcggc ggagcggcg gcagcggcgg cagcggcggc 360

agcggcggca gcggcggcag gcggcggcagc gctagcacca cgacgccagc gccgcgacca 420
ccaacaccgg cgcccaccat cgcgtcgcag ccctgtccc tgcgcccaga ggcgtgccgg 480
ccagcggcgg ggggcgcagt gcacacgagg gggtggact tcgctgtga ttttgggtg 540
ctggtggtgg ttggtggagt cctggttgc tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt 600
atcttctggg tgaggagtaa gaggagcagg ctctgcaca gtgactacat gaacatgact 660
ccccgccgc ccggggccac ccgcaagcat taccagcct atgccccacc acgcgacttc 720
gcagcctatc gtcctatga tagagtgaag ttcagcagga gcgcagacgc ccccgctac 780

cagcagggcc agaaccagct ctataacgag ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat 840

gttttgaca agagacgtgg ccgggaccct gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac 900
 cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag aaagataaga tggcggaggc ctacagttag 960
 attgggatga aaggcgagcg ccggaggggc aaggggcacg atggccttta ccagggtctc 1020
 agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc cttcacatgc aggcctgcc ccctcgctaa 1080

<210> 8

<211> 359

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized

<400> 8

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

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

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

130 135 140
 Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
 145 150 155 160
 Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
 165 170 175

Asp Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser

180 185 190

Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg

195 200 205

Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro

210 215 220

Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe

225 230 235 240

Ala Ala Tyr Arg Ser Ile Asp Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp

245 250 255

Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn

260 265 270

Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg

275 280 285

Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly

290 295 300

Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu

305 310 315 320

Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu

325 330 335

Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His

340 345 350

Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

355

<210> 9

<211> 798

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized

<400> 9

atggccttac cagtgaccgc cttgtccttg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg

60

ccgggatccg cccacattgt gatggtggac gcctacaagc ccaccaaggc tagcaccacg 120

acgccagcgc cgcgaccacc aacaccggcg cccaccatcg cgtcgcagcc cctgtccctg 180

cgcccagagg cgtgccggcc agcggcgggg ggcgcagtgc acacgagggg gctggacttc 240

gcctgtgatt ttigggtgct ggtggtggtt ggtggagtcc tggcttgcta tagcttgcta 300

gtaacagtgg cctttattat tttctgggtg aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt 360

gactacatga acatgactcc ccgccgcccc gggccccacc gcaagcatta ccagccctat 420

gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc tccatcgata gagtgaagtt cagcaggagc 480

gcagacgccc ccgcgtacca gcagggccag aaccagctct ataacgagct caatctagga 540

cgaagagagg agtacgatgt ttggacaag agacgtggcc gggaccctga gatgggggga 600

aagccgagaa ggaagaaccc tcaggaaggc ctgtacaatg aactgcagaa agataagatg 660

gcggaggcct acagtgagat tgggatgaaa ggcgagcgcc ggagggggcaa ggggcacgat 720

ggcctttacc aggttctcag tacagccacc aaggacacct acgacgccct tcacatgcag 780

gcctgcccc ctcgctaa 798

<210> 10

<211> 265

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized

<400> 10

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gly Ser Ala His Ile Val Met Val Asp Ala Tyr

20 25 30

Lys Pro Thr Lys Ala Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ala Cys Asp Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys

85 90 95

Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser
 100 105 110
 Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg
 115 120 125
 Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg
 130 135 140
 Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Ile Asp Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser
 145 150 155 160
 Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu
 165 170 175
 Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg
 180 185 190
 Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln
 195 200 205
 Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
 210 215 220
 Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp
 225 230 235 240
 Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
 245 250 255
 Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 260 265

<210> 11

<211> 861

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized

<400> 11

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg	60
ccgggatccg cccacatcgt gatggtggac gcctacaagc ccaccaaggg cggcagcggc	120
ggcagcggcg gcagcggcgg cagcggcggc agcggcggca gcggcggcag cgctagcacc	180
acgacgccag cgccgcgacc accaacaccg gcgcccacca tcgctcgca gccctgtcc	240

ctgcgccag aggcgtgccg gccagcggcg gggggcgag tgcacacgag ggggctggac 300
 ttcgcctgtg atttttgggt gctggtggtg gttggtggag tcctggcttg ctatagcttg 360

ctagtaacag tggcctttat tattttctgg gtgaggagta agaggagcag gctcctgcac 420
 agtgactaca tgaacatgac tccccgccg cccgggcca cccgcaagca ttaccagccc 480
 tatgccccac cagcgcactt cgcagcctat cgtccatcg atagagtga gttcagcagg 540
 agcgcagacg cccccgcta ccagcaggc cagaaccagc tctataacga gctcaatcta 600
 ggacgaagag aggagtacga tgttttggac aagagacgtg gccgggaccc tgagatgggg 660
 ggaaagccga gaaggaagaa ccttcaggaa ggcctgtaca atgaactgca gaaagataag 720
 atggcggagg cctacagtga gattgggatg aaaggcgagc gccggagggg caaggggcac 780

gatggccttt accagggtct cagtacagcc accaaggaca cctacgacgc cttcacatg 840
 caggccctgc ccctcgtta a 861

<210> 12
 <211> 286
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificially Synthesized
 <400> 12

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Gly Ser Ala His Ile Val Met Val Asp Ala Tyr
 20 25 30

Lys Pro Thr Lys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
 35 40 45
 Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ala Ser Thr Thr Thr Pro Ala
 50 55 60
 Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser
 65 70 75 80
 Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
 85 90 95

Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly
 100 105 110

Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile
 115 120 125
 Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met
 130 135 140
 Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro
 145 150 155 160

Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Ile Asp Arg Val
 165 170 175
 Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn
 180 185 190
 Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
 195 200 205
 Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
 210 215 220

Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
 225 230 235 240
 Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
 245 250 255
 Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
 260 265 270
 Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 275 280 285

<210> 13

<211> 1806

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized

<400> 13

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60
 ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120
 ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 180
 ctctgacca ccctgacctc cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccgga ccacatgaag 240

cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300
 ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360

gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420
 aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480
 ggcatcaagg tgaacttcaa gatccggcac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540
 gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600
 tacctgagca ccagtcgc cctgagcaaa gacccaacg agaagcgcga tcacatggtc 660
 ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcgga tggacgagct gtacaagaga 720
 tctggcagcg gagagggcag aggaagtctt ctaacatgcg gtgacgtgga ggagaatccc 780

ggccctagaa tggccttacc agtgaccgcc ttgctcctgc cgctggcctt gctgctccac 840
 gccgccaggc cgggatccgg aagcggagat agcggcacc acatcaagtt cagcaagcgg 900
 gacgaggacg gcaagagct ggctggcgcc accatggaac tgcgggatag cagcggcaag 960
 accatcagca cctggatcag cgacggccag gtcaaagact tctacctgta ccccgcaag 1020
 tacaccttcg tggaacacgc cgccctgac ggtatgagg tggccacagc catcaccttc 1080
 accgtgaacg agcagggaca ggtcacagt aacggcgcta gcaccagac gccagcgccg 1140
 cgaccaccaa caccggcgcc caccatcgcg tcgcagcccc tgtccctgcg cccagaggcg 1200

tgccggccag cggcgggggg cgcagtgcac acgagggggc tggacttcgc ctgtgatttt 1260
 tgggtgctgg tgggtgttgg tggagtcctg gcttgctata gcttgctagt aacagtggcc 1320
 ttattatttt tctgggtgag gagtaagagg agcaggtccc tgcacagtga ctacatgaac 1380
 atgactcccc gccgccccgg gccacccgc aagcattacc agccctatgc cccaccacgc 1440
 gacttcgag cctatcgctc catcgataga gtgaagtca gcaggagcgc agacgcccc 1500
 gcgtaccagc agggccagaa ccagctctat aacgagctca atctaggacg aagagaggag 1560
 tacgatgttt tggacaagag acgtggccgg gacctgaga tggggggaaa gccgagaagg 1620

aagaaccctc aggaaggcct gtacaatgaa ctgcagaaag ataagatggc ggaggcctac 1680
 agtgagattg ggatgaaagg cgagcgccgg aggggcaagg ggcacgatgg cctttaccag 1740
 ggtctcagta cagccacaa ggacacctac gacgccttc acatgcagc cctgccccct 1800
 cgctaa 1806

<210> 14
 <211> 601
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized

<400> 14

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
1 5 10 15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
20 25 30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
35 40 45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
50 55 60

Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
65 70 75 80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
85 90 95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
100 105 110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
115 120 125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
130 135 140

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
145 150 155 160

Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
165 170 175

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
180 185 190

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
195 200 205

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
210 215 220

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Arg

225 230 235 240
 Ser Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val
 245 250 255
 Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu
 260 265 270

 Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His Ala Ala Arg Pro Gly Ser Gly Ser
 275 280 285
 Gly Asp Ser Ala Thr His Ile Lys Phe Ser Lys Arg Asp Glu Asp Gly
 290 295 300
 Lys Glu Leu Ala Gly Ala Thr Met Glu Leu Arg Asp Ser Ser Gly Lys
 305 310 315 320
 Thr Ile Ser Thr Trp Ile Ser Asp Gly Gln Val Lys Asp Phe Tyr Leu
 325 330 335

 Tyr Pro Gly Lys Tyr Thr Phe Val Glu Thr Ala Ala Pro Asp Gly Tyr
 340 345 350
 Glu Val Ala Thr Ala Ile Thr Phe Thr Val Asn Glu Gln Gly Gln Val
 355 360 365
 Thr Val Asn Gly Ala Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr
 370 375 380
 Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala
 385 390 395 400

 Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe
 405 410 415
 Ala Cys Asp Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys
 420 425 430
 Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser
 435 440 445
 Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg
 450 455 460

 Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg
 465 470 475 480

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

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

Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 595 600

<210> 15

<211> 1869

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized

<400> 15

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60
 ggcgacgtaa acggccacaa gttagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120
 ggcaagctga cctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 180
 ctctgacca cctgaccta cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag 240
 cagcacgact tttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300

 ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360
 gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420
 aagctggagt acaactaaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480
 ggcatacaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540
 gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600

tacctgagca cccagtcgc cctgagcaaa gacccaacg agaagcgcga tcacatggtc 660
ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaagaga 720

tctggcagcg gagagggcag aggaagtctt ctaacatgcg gtgacgtgga ggagaatccc 780
ggccctagaa tggccttacc agtgaccgcc ttgctcctgc cgctggcctt gctgctccac 840
ggcggcagcg cgggatccgg aagcggcgat agcgccaccc acatcaagtt cagcaagcgg 900
gacgaggacg gcaaagagct ggctggcgcc accatggaac tgcgggacag cagcggcaag 960
accatcagca cctggatcag cgacggccag gtcaaagact tctacctgta ccccggaag 1020
tacaccttcg tggaacacgc cgccctgac ggctacgagg tggccacagc catcaccttc 1080
accgtgaacg agcagggaca ggtcacagtg aacggcggcg gcagcggcgg cagcggcggc 1140

agcggcggca gcggcggcag cggcggcagc ggcggcagcg ctagcaccac gacgccagcg 1200
ccgcgaccac caacaccgcg gccaccatc gcgtcgcagc cctgtccct gcgcccagag 1260
gcgtgccggc cagcggcggg gggcgagtg cacacgaggg ggctggactt cgcctgtgat 1320
ttttgggtgc tgggtgggtg tgggtggagtc ctggcttgct atagcttgct agtaacagtg 1380
gcctttatta ttttctgggt gaggagtaag aggagcagcg tcctgcacag tgactacatg 1440
aacatgactc cccgcccgc cgggcccacc cgcaagcatt accagcccta tgccccacca 1500
cgcgacttcg cagcctatcg ctccatcgat agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc 1560

cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc tataacgagc tcaatctagg acgaagagag 1620
gagtacgatg ttttgacaa gagacgtggc cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga 1680
aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat gaactgcaga aagataagat ggcgagggcc 1740
tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc cgagggggca aggggcacga tggcctttac 1800
caggggtctca gtacagccac caaggacacc tacgacgccc ttcacatgca ggccctgccc 1860
cctcgtctaa 1869

<210> 16

<211> 622

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized

<400> 16

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu

1 5 10 15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly

20 25 30
 Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
 35 40 45
 Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr

 50 55 60
 Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65 70 75 80
 Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95
 Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 100 105 110
 Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly

 115 120 125
 Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
 130 135 140
 Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
 145 150 155 160
 Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
 165 170 175
 Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly

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

 245 250 255
 Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu
 260 265 270

Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His Ala Ala Arg Pro Gly Ser Gly Ser
 275 280 285
 Gly Asp Ser Ala Thr His Ile Lys Phe Ser Lys Arg Asp Glu Asp Gly
 290 295 300
 Lys Glu Leu Ala Gly Ala Thr Met Glu Leu Arg Asp Ser Ser Gly Lys

 305 310 315 320
 Thr Ile Ser Thr Trp Ile Ser Asp Gly Gln Val Lys Asp Phe Tyr Leu
 325 330 335
 Tyr Pro Gly Lys Tyr Thr Phe Val Glu Thr Ala Ala Pro Asp Gly Tyr
 340 345 350
 Glu Val Ala Thr Ala Ile Thr Phe Thr Val Asn Glu Gln Gly Gln Val
 355 360 365
 Thr Val Asn Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser

 370 375 380
 Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ala Ser Thr Thr Thr Pro Ala
 385 390 395 400
 Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser
 405 410 415
 Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
 420 425 430
 Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly

 435 440 445
 Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile
 450 455 460
 Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met
 465 470 475 480
 Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro
 485 490 495
 Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Ile Asp Arg Val

 500 505 510
 Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn

515 520 525
Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
530 535 540
Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
545 550 555 560
Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys

565 570 575
Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
580 585 590
Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
595 600 605
Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
610 615 620

<210> 17

<211> 609

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized

<400> 17

atggaacaga aactgattag cgaagaggat ctgggttctg atctgggtaa aaaactgctg 60
gaagcagcac gtgcaggta ggcagtgtaa gttcgtattc tgatggcaaa tggcgcagat 120
gttaacgcca aagattttta tgggtattaca ccgctgcac tggcagcagc ctatggtcat 180
ctggaaattg ttgaagttct gctgaaacat ggtgccgatg tgaatgcaca tgattggaat 240
ggttggaacc cggtacacct ggcagcaaaa tatggccatt tagaaatcgt ggaagtgtg 300
ttaaacaatg gcgcagacgt taatgcaatt gataatgcag gtaaaacccc tctgcattta 360

gcagccgcac atggccacct ggaaatcgta gaggttttac tgaaatacgg tgcggatgta 420
aacgcgcagg ataaatttgg taaaaccgcc ttcgatatta gcatcgataa tggtaatgag 480
gacctggcag aaattctgca agaggcatgc ggtgggtgtg gtagtgggtg cgggtggttca 540
gcaagcgcac atattgttat ggttgatgca tataaaccga ccaaactgga acatcatcat 600
caccattaa 609

<210> 18

<211> 202

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized

<400> 18

Met Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ser Asp Leu Gly

1 5 10 15

Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg

20 25 30

Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Phe Tyr Gly

35 40 45

Ile Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala Tyr Gly His Leu Glu Ile Val

50 55 60

Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val Asn Ala His Asp Trp Asn

65 70 75 80

Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Lys Tyr Gly His Leu Glu Ile

85 90 95

Val Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val Asn Ala Ile Asp Asn

100 105 110

Ala Gly Lys Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala His Gly His Leu Glu

115 120 125

Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp

130 135 140

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

145 150 155 160

Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Glu Ala Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly

165 170 175

Gly Gly Gly Ser Ala Ser Ala His Ile Val Met Val Asp Ala Tyr Lys

180 185 190

Pro Thr Lys Leu Glu His His His His His

195 200

<210> 19

<211> 1164

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized

<400> 19

atggaacaga aactgatcag cgaagaagat ctgggttctg atctgggtaa aaaactgctg	60
gaagcagcac gtgcaggta ggatgatgaa gtctgtattc tgatggcaaa tggcgcagat	120
gttaatgcag atgataacct gggttggaca ccgctgcac tggcagcata tcagggtcat	180
ctggaaattg ttgaagtgt gctgaaaaac ggtgccgatg tgaatgccta tgattatatt	240
ggttggaccc ctctgcactt agcagcagat ggccatttag aaatcgtgga agttttactg	300
aaaaatggcg cagacgtgaa cgcaagcgat tatatcggtg ataccccggt acacctggca	360
gcacataatg gccacctgga aatcgtagag gttctgttaa aacatggtgc ggacgtgaat	420
gcacaggata aatttggtaa aaccgccttc gatatcagca ttgataatgg caatgaggat	480
ctggcagaaa ttctgcaaga agcatgtctc gaggggtgta gtggtggctc tggcggttct	540
ggtggcagtg gcggtagcgg tggtagtggt ggtagtagag gcgtgccaca catcgtgatg	600
gtggacgcct acaagcggt caagggcgg tctggtggca gtctgccga aaccgtggt	660
ggtagtgggt gctctggcgg ttctggtggc agtggcggt gccaagctaa acctcaaatt	720
ccgaaagata aatcaaaagt ggcaggctat attgaaattc cagatgctga tattaagaa	780
ccagtatatc caggaccagc aacacctgaa caattaaata gaggtgtaag ctttgcagaa	840
gaaaatgaat cactagatga tcaaaatatt tcaattgcag gacacacttt cattgaccgt	900
ccgaactatc aatttacaac tcttaagca gccaaaaag gtagtatggt gtactttaaa	960
gttggtaatg aaacacgtaa gtataaaatg acaagtataa gagatgttaa gccaacagat	1020
gtagaagttc tagatgaaca aaaaggtaaa gataaacaat taacattaat tacttgtgat	1080
gattacaatg aaaagacagg cgtttgggaa aaacgtaaaa tctttgtagc tacagaagtc	1140
aaacatcacc accatcatca ctaa	1164

<210> 20

<211> 387

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized

<400> 20

Met Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ser Asp Leu Gly

1 5 10 15
 Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg
 20 25 30
 Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Asp Asp Thr Trp Gly
 35 40 45

 Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Tyr Gln Gly His Leu Glu Ile Val
 50 55 60
 Glu Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Tyr Asp Tyr Ile
 65 70 75 80
 Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Asp Gly His Leu Glu Ile Val
 85 90 95
 Glu Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Ser Asp Tyr Ile
 100 105 110

 Gly Asp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala His Asn Gly His Leu Glu Ile
 115 120 125
 Val Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Lys
 130 135 140
 Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Asp Asn Gly Asn Glu Asp
 145 150 155 160
 Leu Ala Glu Ile Leu Gln Glu Ala Cys Leu Glu Gly Gly Ser Gly Gly
 165 170 175

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

 Pro Lys Asp Lys Ser Lys Val Ala Gly Tyr Ile Glu Ile Pro Asp Ala
 245 250 255

Asp Ile Lys Glu Pro Val Tyr Pro Gly Pro Ala Thr Pro Glu Gln Leu
 260 265 270
 Asn Arg Gly Val Ser Phe Ala Glu Glu Asn Glu Ser Leu Asp Asp Gln
 275 280 285
 Asn Ile Ser Ile Ala Gly His Thr Phe Ile Asp Arg Pro Asn Tyr Gln
 290 295 300

Phe Thr Asn Leu Lys Ala Ala Lys Lys Gly Ser Met Val Tyr Phe Lys
 305 310 315 320
 Val Gly Asn Glu Thr Arg Lys Tyr Lys Met Thr Ser Ile Arg Asp Val
 325 330 335
 Lys Pro Thr Asp Val Glu Val Leu Asp Glu Gln Lys Gly Lys Asp Lys
 340 345 350
 Gln Leu Thr Leu Ile Thr Cys Asp Asp Tyr Asn Glu Lys Thr Gly Val
 355 360 365

Trp Glu Lys Arg Lys Ile Phe Val Ala Thr Glu Val Lys His His His
 370 375 380

His His His

385

<210> 21

<211> 1164

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized

<400> 21

atggaacaga aactgatcag cgaagaagat ctgggttctg atctgggtaa aaaactgctg 60
 gaagcagcac gtgcaggta ggaatgatgaa gtctgtattc tgatggcaaa tggatgcagat 120
 gttaacgcca aagattttta tgggtattaca ccgctgcac tggcagcagc ctatggatcat 180
 ctggaaattg ttgaagtct gctgaacat ggtgccgatg tgaatgcaca tgattggaat 240

ggttggaccc cggtacacct ggcagcaaaa tatggccatt tagaaatcgt ggaagtgtg 300
 ttaaaacatg gcgcagacgt taatgaatt gataatgcag gtaaaacccc tctgcattta 360
 gcagccgcac atggccacct ggaatcgta gaggttttac tgaaatacgg tgccgatgta 420
 aacgcgcagg ataaatttgg taaaaccgcc ttcgatatta gcatcgataa tggtaatgag 480

gacctggcag aaattctgca agaggcactc gaggggtgga gtggtggctc tggcggttct 540
 ggtggcagtg gcggtagcgg tggtagtggg ggtagtagag gcgtgccaca catcgtgatg 600
 gtggacgcct acaagcggta caagggcggg tctggtggca gtctgccgga aaccggtggg 660

ggtagtggg gctctggcgg ttctggtggc agtggcggta gccaagctaa acctcaaatt 720
 ccgaaagata aatcaaaagt ggcaggctat attgaaattc cagatgctga tattaaagaa 780
 ccagtatatc caggaccagc aacacctgaa caattaaata gaggtgtaag ctttgcagaa 840
 gaaaatgaat cactagatga tcaaaatatt tcaattgcag gacacacttt cattgaccgt 900
 ccgaactatc aatttacaaa tcttaaagca gccaaaaaag gtagtatggg gtactttaaa 960
 gtggtaatg aaacacgtaa gtataaaatg acaagtataa gagatgttaa gccaacagat 1020
 gtagaagttc tagatgaaca aaaaggtaaa gataaacaat taacattaat tacttgtgat 1080

gattacaatg aaaagacagg cgtttgggaa aaacgtaaaa tctttgtagc tacagaagtc 1140
 aaacatcacc accatcatca ctaa 1164

<210> 22

<211> 387

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized

<400> 22

Met Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ser Asp Leu Gly

1 5 10 15

Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg

20 25 30

Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Phe Tyr Gly

35 40 45

Ile Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Tyr Gly His Leu Glu Ile Val

50 55 60

Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val Asn Ala His Asp Trp Asn

65 70 75 80

Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Lys Tyr Gly His Leu Glu Ile

85 90 95

Val Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val Asn Ala Ile Asp Asn

100	105	110	
Ala Gly Lys Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala His Gly His Leu Glu			
115	120	125	
Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp			
130	135	140	
Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Asp Asn Gly Asn Glu			
145	150	155	160
Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Glu Ala Leu Glu Gly Gly Ser Gly Gly			
165	170	175	
Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser			
180	185	190	
Arg Gly Val Pro His Ile Val Met Val Asp Ala Tyr Lys Arg Tyr Lys			
195	200	205	
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Leu Pro Glu Thr Gly Gly Gly Ser Gly Gly			
210	215	220	
Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gln Ala Lys Pro Gln Ile			
225	230	235	240
Pro Lys Asp Lys Ser Lys Val Ala Gly Tyr Ile Glu Ile Pro Asp Ala			
245	250	255	
Asp Ile Lys Glu Pro Val Tyr Pro Gly Pro Ala Thr Pro Glu Gln Leu			
260	265	270	
Asn Arg Gly Val Ser Phe Ala Glu Glu Asn Glu Ser Leu Asp Asp Gln			
275	280	285	
Asn Ile Ser Ile Ala Gly His Thr Phe Ile Asp Arg Pro Asn Tyr Gln			
290	295	300	
Phe Thr Asn Leu Lys Ala Ala Lys Lys Gly Ser Met Val Tyr Phe Lys			
305	310	315	320
Val Gly Asn Glu Thr Arg Lys Tyr Lys Met Thr Ser Ile Arg Asp Val			
325	330	335	
Lys Pro Thr Asp Val Glu Val Leu Asp Glu Gln Lys Gly Lys Asp Lys			
340	345	350	

Gln Leu Thr Leu Ile Thr Cys Asp Asp Tyr Asn Glu Lys Thr Gly Val

355 360 365

Trp Glu Lys Arg Lys Ile Phe Val Ala Thr Glu Val Lys His His His

370 375 380

His His His

385

<210> 23

<211> 825

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized

<400> 23

atgaccttta aactgattat taacggcaaa accctgaaag gcgaaattac cattgaagcg 60

gtggatgcgt aggaagcgga aaaaattttt aaacagtatg cgaacgatta tggcattgat 120

ggcgaatgga cctatgatga tgcgacaaa acctttaccg tgaccgaact cgagggtggt 180

agtgggtggct ctggcggttc tggtagcagt ggcggtagcg gtgtagtggt tggcagtaga 240

ggcgtgccac acatcgtgat ggtggacgcc tacaagcggg acaagggcgg ttctgtgtggc 300

agtctgccgg aaaccggtgg tggtagtggt ggctctggcg gttctgtgtg cagtggcggg 360

agccaagcta aacctcaat tccgaaagat aaatcaaaag tggcaggcta tattgaaatt 420

ccagatgctg atattaaaga accagtatat ccaggaccag caacacctga acaattaaat 480

agagggtgtaa gctttgcaga agaaaatgaa tcactagatg atcaaaatat ttcaattgca 540

ggacacactt tcattgaccg tccgaactat caatttacia atcttaaagc agccaaaaaa 600

ggtagtatgg tgiactttaa agtttggtat gaaacacgta agtataaaat gacaagtata 660

agagatgtta agccaacaga tgtagaagtt ctatgatgaac aaaaaggtaa agataaacia 720

ttaacattaa ttacttgtga tgattacaat gaaaagacag gcgtttggga aaaacgtaaa 780

atctttgtag ctacagaagt caaacatcac caccatcatc actaa 825

<210> 24

<211> 273

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized

<400> 24

Met Thr Phe Lys Leu Ile Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Ile

1 5 10 15

Thr Ile Glu Ala Val Asp Ala Glu Ala Glu Lys Ile Phe Lys Gln Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Leu Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly

50 55 60

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Arg Gly

65 70 75 80

Val Pro His Ile Val Met Val Asp Ala Tyr Lys Arg Tyr Lys Gly Gly

85 90 95

Ser Gly Gly Ser Leu Pro Glu Thr Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly

100 105 110

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gln Ala Lys Pro Gln Ile Pro Lys

115 120 125

Asp Lys Ser Lys Val Ala Gly Tyr Ile Glu Ile Pro Asp Ala Asp Ile

130 135 140

Lys Glu Pro Val Tyr Pro Gly Pro Ala Thr Pro Glu Gln Leu Asn Arg

145 150 155 160

Gly Val Ser Phe Ala Glu Glu Asn Glu Ser Leu Asp Asp Gln Asn Ile

165 170 175

Ser Ile Ala Gly His Thr Phe Ile Asp Arg Pro Asn Tyr Gln Phe Thr

180 185 190

Asn Leu Lys Ala Ala Lys Lys Gly Ser Met Val Tyr Phe Lys Val Gly

195 200 205

Asn Glu Thr Arg Lys Tyr Lys Met Thr Ser Ile Arg Asp Val Lys Pro

210 215 220

Thr Asp Val Glu Val Leu Asp Glu Gln Lys Gly Lys Asp Lys Gln Leu

225 230 235 240

Thr Leu Ile Thr Cys Asp Asp Tyr Asn Glu Lys Thr Gly Val Trp Glu

245	250	255
Lys Arg Lys Ile Phe Val Ala Thr Glu Val Lys His His His His His		
260	265	270
His		
<210> 25		
<211> 1086		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Artificially Synthesized		
<400> 25		
atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg	60	
ccgggatccg tgacaacact gageggactg tctggcgagc aaggcccttc tggcgatatg	120	
accaccgaag aggatagcgc cacacacatc aagttcagca agcgcgacga ggacggcaga	180	
gaacttgctg gcgtaccat ggaactgaga gacagcagcg gcaagacat cagcacctgg	240	
atctctgacg gccacgtgaa ggacttctat ctgtaccccg gcaagtacac cttcgtggaa	300	
accgccgctc ctgacggcta cgaagtggcc acacctatcg agttcacctg gaacgaggat	360	
ggccaagtga ccgtggatgg cgaagctaca gaaggcgacg ccataacagc tagcaccacg	420	
acgccagcgc cgcgaccacc aacaccggcg ccacccatcg cgtcgagcc cctgtccctg	480	
cgcccagagg cgtgccggcc agcggcgggg ggcgagtgac acacgagggg gctggacttc	540	
gcctgtgata tctacatctg ggccgccttg gccgggactt gtggggctct tctcctgtca	600	
ctggttatca cctttactg caaacggggc agaaagaaac tcctgtatat attcaaaca	660	
ccatttatga gaccagtaca aactactcaa gaggaagatg gctgtagctg ccgatttcca	720	
gaagaagaag aaggaggatg tgaactgaga gtgaagtcca gcaggagcgc agacgcccc	780	
gcgtacaagc agggccagaa ccagctctat aacgagctca atctaggacg aagagaggag	840	
tacgatgttt tggacaagag acgtggcccg gaccctgaga tggggggaaa gccgagaagg	900	
aagaaccctc aggaaggcct gtacaatgaa ctgcagaaag ataagatggc ggaggcctac	960	
agtgagattg ggatgaaagg cgagcgcccg aggggcaagg ggcacgatgg cctttaccag	1020	
ggtctcagta cagccaccaa ggacacctac gacgccttc acatgcaggc cctgccccct	1080	
cgctaa	1086	

<210> 26

<211> 361

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized

<400> 26

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gly Ser Val Thr Thr Leu Ser Gly Leu Ser Gly

20 25 30

Glu Gln Gly Pro Ser Gly Asp Met Thr Thr Glu Glu Asp Ser Ala Thr

35 40 45

His Ile Lys Phe Ser Lys Arg Asp Glu Asp Gly Arg Glu Leu Ala Gly

50 55 60

Ala Thr Met Glu Leu Arg Asp Ser Ser Gly Lys Thr Ile Ser Thr Trp

65 70 75 80

Ile Ser Asp Gly His Val Lys Asp Phe Tyr Leu Tyr Pro Gly Lys Tyr

85 90 95

Thr Phe Val Glu Thr Ala Ala Pro Asp Gly Tyr Glu Val Ala Thr Pro

100 105 110

Ile Glu Phe Thr Val Asn Glu Asp Gly Gln Val Thr Val Asp Gly Glu

115 120 125

Ala Thr Glu Gly Asp Ala His Thr Ala Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro

130 135 140

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

145 150 155 160

Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg

165 170 175

Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly

180 185 190

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

195 200 205

Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg

210 215 220
 Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro
 225 230 235 240
 Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser
 245 250 255
 Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu
 260 265 270
 Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg
 275 280 285
 Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln
 290 295 300

Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
 305 310 315 320
 Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp
 325 330 335
 Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
 340 345 350
 Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 355 360

<210> 27

<211> 1098

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized

<400> 27

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg	60
ccgggatccg tgacaacact gagcggactg tctggcgagc aaggcccttc tggcgatatg	120
accaccgaag aggatagcgc cacacacatc aagttcagca agcgcgacga ggacggcaga	180
gaacttgctg gcgctaccat ggaactgaga gacagcagcg gcaagaccat cagcacctgg	240
atctctgacg gccacgtgaa ggacttctat ctgtaccccg gcaagtacac ctctgtggaa	300
accgccgctc ctgacggcta cgaagtggcc acacctatcg agttcaccgt gaacgaggat	360

ggccaagtga ccgtggatgg cgaagctaca gaaggcgacg cccatacagc tagcaccacg 420
acgccagcgc cgcgaccacc aacaccggcg cccaccatcg cgtcgagcc cctgtccctg 480
cgcccagagg cgtgccggcc agcggcgggg ggcgagtgac acacgagggg gctggacttc 540
gcctgtgatt ttgggtgct ggtgggtggtt ggtggagtcc tggcttgcta tagcttgcta 600
gtaacagtgg cttttattat tttctgggtg aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt 660
gactacatga acatgactcc ccgccgcccc ggccccaccc gcaagcatta ccagccctat 720
gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc tccatcgata gagtgaagtt cagcaggagc 780

gcagacgccc ccgcgtacaa gcagggccag aaccagctct ataacgagct caatctagga 840
cgaagagagg agtacgatgt ttggacaag agacgtggcc gggaccctga gatgggggga 900
aagccgagaa ggaagaaccc tcaggaaggc ctgtacaatg aactgcagaa agataagatg 960
gcggaggcct acagtgaatg tgggatgaaa ggcgagcgcc ggagggggcaa ggggcacgat 1020
ggcctttacc aggtgtctcag tacagccacc aaggacacct acgacgcct tcacatgcag 1080
gccctgcccc ctcgctaa 1098

<210> 28

<211> 365

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized

<400> 28

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gly Ser Val Thr Thr Leu Ser Gly Leu Ser Gly

20 25 30

Glu Gln Gly Pro Ser Gly Asp Met Thr Thr Glu Glu Asp Ser Ala Thr

35 40 45

His Ile Lys Phe Ser Lys Arg Asp Glu Asp Gly Arg Glu Leu Ala Gly

50 55 60

Ala Thr Met Glu Leu Arg Asp Ser Ser Gly Lys Thr Ile Ser Thr Trp

65 70 75 80

Ile Ser Asp Gly His Val Lys Asp Phe Tyr Leu Tyr Pro Gly Lys Tyr

85 90 95

Thr Phe Val Glu Thr Ala Ala Pro Asp Gly Tyr Glu Val Ala Thr Pro

100 105 110
Ile Glu Phe Thr Val Asn Glu Asp Gly Gln Val Thr Val Asp Gly Glu

115 120 125
Ala Thr Glu Gly Asp Ala His Thr Ala Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro

130 135 140
Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu

145 150 155 160
Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg

165 170 175
Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly

180 185 190
Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe

195 200 205
Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn

210 215 220
Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr

225 230 235 240
Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Ile Asp Arg Val Lys

245 250 255
Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln

260 265 270
Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu

275 280 285
Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg

290 295 300
Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met

305 310 315 320
Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly

325 330 335
Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp

340 345 350

Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

355 360 365

<210> 29

<211> 648

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Artificially Synthesized

<400> 29

atggccttac cagtgaccgc cttgtcctcg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60
ccgggatccg tgacaacact gagcggactg tctggcgagc aaggcccttc tggcgatatg 120
accaccgaag aggatagcgc cacacacatc aagttcagca agcgcgcagc ggacggcaga 180
gaacttgctg gcgctacat ggaactgaga gacagcagcg gcaagacat cagcacctgg 240
atctctgacg gccacgtgaa ggacttctat ctgtaccccg gcaagtacac cttcgtggaa 300
accgccgctc ctgacggcta cgaagtggcc acacctatcg agttaccgt gaacaggat 360
ggccaagtga ccgtggatgg cgaagctaca gaaggcgacg ccatacagc tagcaccacg 420

acgccagcgc cgcgaccacc aacaccggcg ccacacatcg cgtcgcagcc cctgtccctg 480
cgcccagagg cgtgccggcc agcggcgggg ggcgagtgac acacgagggg gctggacttc 540
gcctgtgatt ttgggtgct ggtggtggtt ggtggagtcc tggcttgcta tagcttgcta 600
gtaacagtgg cttttattat tttctgggtg aggagtaaga ggagctaa 648

<210> 30

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized

<400> 30

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gly Ser Val Thr Thr Leu Ser Gly Leu Ser Gly

20 25 30

Glu Gln Gly Pro Ser Gly Asp Met Thr Thr Glu Glu Asp Ser Ala Thr

35 40 45

His Ile Lys Phe Ser Lys Arg Asp Glu Asp Gly Arg Glu Leu Ala Gly

50 55 60
 Ala Thr Met Glu Leu Arg Asp Ser Ser Gly Lys Thr Ile Ser Thr Trp
 65 70 75 80

 Ile Ser Asp Gly His Val Lys Asp Phe Tyr Leu Tyr Pro Gly Lys Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Val Glu Thr Ala Ala Pro Asp Gly Tyr Glu Val Ala Thr Pro
 100 105 110
 Ile Glu Phe Thr Val Asn Glu Asp Gly Gln Val Thr Val Asp Gly Glu
 115 120 125
 Ala Thr Glu Gly Asp Ala His Thr Ala Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro
 130 135 140

 Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu
 145 150 155 160
 Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg
 165 170 175
 Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly
 180 185 190
 Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe
 195 200 205

 Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser
 210 215