



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년05월15일
(11) 등록번호 10-2805915
(24) 등록일자 2025년05월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/63 (2006.01) A61K 35/17 (2025.01)
C07K 14/725 (2006.01) C07K 16/30 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01) C12N 5/0783 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/63 (2013.01)
A61K 35/17 (2025.01)
- (21) 출원번호 10-2021-7036928(분할)
(22) 출원일자(국제) 2019년01월10일
심사청구일자 2021년12월29일
(85) 번역문제출일자 2021년11월11일
(65) 공개번호 10-2021-0141768
(43) 공개일자 2021년11월23일
(62) 원출원 특허 10-2020-7023221
원출원일자(국제) 2019년01월10일
심사청구일자 2021년03월31일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2019/050194
(87) 국제공개번호 WO 2019/138354
국제공개일자 2019년07월18일
(30) 우선권주장
1020180004238 2018년01월12일 대한민국(KR)
- (56) 선행기술조사문헌
J Clin Invest. 2015, 125(5):2046-2058.*
J Clin Invest. 2016, 126(8):3130-3144.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
주식회사 큐로셀
대전광역시 유성구 국제과학16로 11(구룡동)
한국과학기술원
대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)
- (72) 발명자
김찬혁
대한민국 대전시 유성구 대학로 291
이영호
대한민국 대전시 유성구 도안동로 523 빌딩 208
유닛 2003
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인 광장리앤코

전체 청구항 수 : 총 22 항

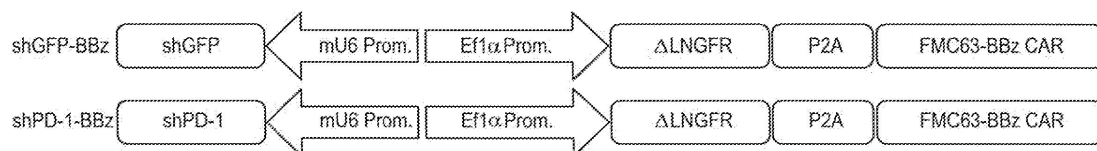
심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 이원 SHRNA를 이용한 향상된 면역 세포 및 이를 포함하는 조성물

(57) 요약

본 개시내용은 암 면역요법 분야에 광범위하게 관련된다. 예를 들어, 본 발명은 일반적으로 표적 항원에 특이적으로 결합하는 유전적으로 조작된 항원 수용체 및 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자의 면역 세포에서의 발현을 감소시키거나 감소시킬 수 있는 유전자 파괴제를 포함하는 면역 세포에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

C07K 14/7051 (2013.01)

C07K 16/30 (2013.01)

C12N 15/113 (2013.01)

C12N 5/0636 (2025.01)

C12N 5/0646 (2025.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2319/03 (2013.01)

C12N 2510/00 (2013.01)

C12Q 2525/301 (2013.01)

(72) 발명자

이유진

대한민국 대전시 유성구 지족북로 33 노은 한화 드
림 & 그린 에이피티에스. 빌딩 101 유닛 602

이형지

대한민국 대전시 유성구 봉명동 445-4 리베라 아이
누리 5유닛 1216

이상훈

대전광역시 유성구 신성로84번길 69, 유닛 302호
(신성동)

명세서

청구범위

청구항 1

암과 관련된 표적 항원에 특이적으로 결합하는 세포 외 항원 인식 도메인, 막관통 도메인, 및 세포 내 신호 전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 유전자; 및

유전자 파괴제로서, 여기서 유전자 파괴제, 또는 이의 발현이 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자의 면역 세포에서의 발현을 감소시키거나 감소시킬 수 있고, 유전자 파괴제는 두 가지 유형의 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)를 코딩하며, 제1 shRNA가 프로그램화된 세포 사멸 단백질 1 (PD-1)의 발현을 표적으로 하고, 제2 shRNA가 Ig 및 ITIM 도메인을 포함하는 T 세포 면역수용체 (TIGIT)의 발현을 표적으로 하며, 제1 shRNA의 발현은 제1 프로모터에 의해 제어되고 제2 shRNA의 발현은 제2 프로모터에 의해 제어되는 것인, 유전자 파괴제

를 동시에 또는 임의의 순서로 순차적으로 면역 세포 내로 도입함으로써, CAR이 발현되고 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자의 발현이 감소된 면역 세포를 생산하는 단계를 포함하는, 면역 세포의 생체 외(in vitro) 생산 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서, CAR의 세포 내 신호 전달 도메인이

- a) CD3 제타 (CD3 ζ) 사슬의 세포 내 도메인을 포함하거나
- b) CD3 제타 (CD3 ζ) 사슬의 세포 내 도메인 및 공동자극 분자를 포함하는 것인, 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 공동자극 분자가 ICOS, OX40, CD137 (4-1BB), CD27, 및 CD28로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항, 제5항 및 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 표적 항원이 암 세포, 암 조직 및 종양 미세환경으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 안에서 또는 표면 상에서 발현되는 것인, 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 표적 항원이 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법:

5T4 (영양막 당단백질), 707-AP, 9D7, AFP (α -태아단백질), A1bZIP (안드로젠-유도된 bZIP), HPG1 (인간 전립선 특이적 유전자-1), $\alpha 5\beta 1$ -인테그린, $\alpha 5\beta 6$ -인테그린, α -메틸아실-코엔자임 A 라세마제, ART-4 (ADP리보실트랜스퍼라제-4), B7H4 (v-세트 도메인-함유 T-세포 활성화 억제제 1), BAGE-1 (B 흑색종 항원-1), BCL-2 (B-세

포 CLL/림프종-2), BING-4 (WD 반복 도메인 46), CA 15-3/CA 27-29 (뮤신 1), CA 19-9 (암 항원 19-9), CA 72-4 (암 항원 72-4), CA125 (암 항원 125), 칼레티쿨린, CAMEL (흑색종에서 CTL-인식된 항원), CASP-8 (카스파제 8), 카텝신 B, 카텝신 L, CD19 (분화클러스터 19), CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD4, CD52, CD55, CD56, CD80, CEA (암배아 항원 SG8), CLCA2 (클로라이드 채널 보조 2), CML28 (만성 골수성 백혈병 종양 항원 28), 코엑토신-유사 단백질, 콜라겐 XXIII, COX-2 (사이클로옥시게나제-2), CT-9/BRD6 (암/고환 항원 9), Cten (c-말단 텐신-유사 단백질), 사이클린 B1, 사이클린 D1, cyp-B, CYPB1 (시토크롬 p450 패밀리의 1 서브패밀리 b 멤버 1), DAM-10/MAGE-B1 (흑색종-연관 항원 B1), DAM-6/MAGE-B2, EGFR/Her1 (표피 성장 인자 수용체), EMMPRIN (바시긴), EpCam, EphA2 (EPH 수용체 A2), EphA3, ErbB3 (Erb-B2 수용체 티로신 키나아제 3), EZH2 (제스트 2 폴리콤 억제 복합체 2 서브유닛의 인핸서), FGF-5 (섬유아세포 성장 인자 5), FN (피브로넥틴), Fra-1 (Fos관련 항원-1), G250/CAIX (탄산 무수화효소 9), GAGE-1 (G 항원-1), GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7b, GAGE-8, GDEP (전립선에서 상이하게 발현된 유전자), GnT-V (글루코네이트 키나아제), gp100 (멜라노사이트 계통-특이적 항원 GP100), GPC3 (글리피칸3), HAGE (나선형 항원), HAST-2 (설포트랜스퍼라제 패밀리의 1A 멤버 1), 헵신, Her2/neu/ErbB2 (Erb-B2 수용체 티로신 키나아제 2), HERV-K-MEL, HNE (메둘라신), 호메오박스 NKX 3.1, HOM-TES-14/SCP-1, HOM-TES-85, HPV-E6, HPVE7, HST-2 (시르투인-2), hTERT, iCE (카스파제 1), IGF-1R (인슐린 유사 성장 인자-1 수용체), IL-13Ra2 (인터류킨-13 수용체 서브유닛 α 2), IL-2R (인터류킨-2 수용체), IL-5 (인터류킨-5), 미성숙 라미닌 수용체, 칼리크레인 2, 칼리크레인 4, Ki67, KIAA0205 (리소포스와 티달글리세롤 아실트랜스퍼라제 1), KK-LC-1 (키타큐슈 폐 암 항원-1), KM-HN-1, LAGE-1 (L 항원 패밀리의 멤버-1), 리빈, MAGE-A1, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGEA2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A9, MAGE-B1, MAGE-B10, MAGE-B16, MAGEB17, MAGE-B2, MAGE-B3, MAGE-B4, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-D1, MAGE-D2, MAGE-D4, MAGE-E1, MAGE-E2, MAGE-F1, MAGE-H1, MAGEL2 (흑색종 항원 패밀리의 L2), 맘마글로빈 A, MART-1/Melan-A (T-세포-1에 의해 인식된 흑색종 항원), MART-2, 매트릭스 단백질 22, MC1R (멜라노코르틴 1 수용체), M-CSF (대식세포 콜로니-자극 인자), 메소텔린, MG50/PXDN (퍼옥시다신), MMP 11 (매트릭스 메탈로프로테아제 11), MN/CA IX-항원 (탄산 무수화효소 9), MRP-3 (다중약물 내성-연관 단백질-3), MUC1 (뮤신 1), MUC2, NA88-A (VENT-유사 호메오박스 2 위유전자 1), N-아세틸글루코사-아미닐트랜스퍼라제-V, 네오-PAP (네오-폴리 (A) 폴리머라제), NGEP (전립선에서 발현된 새로운 유전자), NMP22 (핵 매트릭스 단백질 22), NPM/ALK (뉴클레오포스민), NSE (뉴런-특이적 에놀라아제), NY-ESO-1, NY-ESO-B, OA1 (골관절염 QTL 1), OFA-iLRP (종양태아성 항원 미성숙 라미닌 수용체 단백질), OGT (O-GlcNAc 트랜스퍼라제), OS-9 (소포체 렉틴), 오스테오칼신, 오스테오폰틴, p15 (CDK 억제제 2B), p53, PAGE-4 (P 항원 패밀리의 멤버-4), PAI-1 (플라스미노겐 활성화제 억제제-1), PAI-2, PAP (전립선 산성 포스파타아제), PART-1 (전립선 안드로젠-제어된 전사물 1), PATE (전립선 및 고환 발현된 1), PDEF (전립선-유래 Ets 인자), Pim-1-키나아제 (프로바이러스성 통합 부위 1), Pin1 (펩티달-프롤릴 시스-트랜스 아이소머라제 NIMA-상호작용 1), POTE (전립선, 난소, 고환 및 태반에서 발현됨), PRAME (흑색종에서 우선적으로 발현된 항원), 프로스테인, 프로테이나제-3, PSA (전립선-특이적 항원), PSCA (전립선 스템 세포 항원), PSGR (전립선-특이적 G-단백질 커플링된 수용체), PSM, PSMA (전립선 특이적 막 항원), RAGE-1 (신장 종양 암종 항원), RHAMM/CD168, RU1 (신장 산재 단백질 1), RU2, SAGE (육종 항원), SART-1(T-세포-1에 의해 인식되는 편평 세포 암종 항원), SART-2, SART-3, Sp17 (정자 단백질 17), SSX-1 (SSX 패밀리의 멤버 1), SSX-2/HOM-MEL-40, SSX-4, STAMP-1 (STEAP2 메탈로리덕테이즈), STEAP, 서바이빈, 서바이빈-213, TA-90 (종양 연관 항원-90), TAG-72 (종양 연관 당단백질-72), TARP (TCR γ 대안 리딩프레임 단백질), TGF β (형질전환 성장 인자 β), TGF β R11 (형질전환 성장 인자 β 수용체 11), TGM-4 (트랜스글루타미나제 4), TRAG-3 (텍솔 내성 연관 유전자 3), TRG (T-세포 수용체 γ 유전자좌), TRP-1 (일시적 수용체 전위-1), TRP-2/6b, TRP-2/INT2, Trp-p8, 티로시나제, UPA (U-플라스미노겐 활성화제), VEGF (혈관 내피 성장 인자 A), VEGFR-2/FLK-1, 및 WT1 (빌름스 종양 1).

청구항 10

제8항에 있어서, 표적 항원이 하기로 이루어진 군으로부터 선택되고:

α -액티닌-4/m, ARTC1/m, bcr/abl, 베타-카테닌/m, BRCA1/m, BRCA2/m, CASP-5/m, CASP-8/m, CDC27/m, CDK4/m, CDKN2A/m, CML66, COA-1/m, DEK-CAN, EFTUD2/m, ELF2/m, ETV6-AML1, FN1/m, GPNMB/m, HLA-A*0201-R170I, HLA-A11/m, HLA-A2/m, HSP70-2M, KIAA0205/m, K-Ras/m, LDLR-FUT, MART2/m, ME1/m, MUM-1/m, MUM-2/m, MUM-3/m, 미오신 클래스 1/m, 네오-PAP/m, NFYC/m, N-Ras/m, OGT/m, OS-9/m, p53/m, Pml/RAR α , PRDX5/m, PTPRX/m, RBAF600/m, SIRT2/m, SYTSSX-1, SYT-SSX-2, TEL-AML1, TGF β R11, 및 TPI/m;

표적 항원이 암 항원이며, 암 항원이 암 세포, 암 조직 및 종양 미세환경으로 이루어진 군에서 선택되는 하나

이상의 안에서 또는 표면 상에서 발현된 항원의 돌연변이된 형태인 것인, 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자의 발현이 하기 중 하나 이상을 야기하는 것인, 방법:

- i) 면역 세포의 증식 억제;
- ii) 면역 세포의 세포 사멸 유도;
- iii) 표적 항원을 인식하고/하거나 활성화시키는 면역 세포의 능력의 억제;
- iv) 표적 항원에 대한 면역 반응을 유도하지 않는 세포로 면역 세포의 분화 유도;
- v) 면역 세포의 면역 반응을 촉진시키는 분자에 대한 면역 세포의 감소된 반응; 또는
- vi) 면역 세포의 면역 반응을 억압하는 분자에 대한 면역 세포의 증가된 반응.

청구항 12

제1항에 있어서, 유전자 파괴제가

유전자 파괴제(들)의 부재 하에서의 면역 세포와 비교하여 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 95% 이상으로 면역 세포의 기능을 약화시키는 면역 세포에서의 유전자의 발현을 감소시키는 것인, 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, shRNA(들)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이

- (a) 서열번호 2-12, 70-75 및 238-243으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하거나,
- (b) 벡터 상에 존재하는 것인, 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 서열번호 2-12, 70-75 및 238-243으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열이 상이한 shRNA를 코딩하는 것인, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 2 개의 상이한 shRNA의 발현이 2 개의 상이한 프로모터에 의해 각각 제어되는 것인, 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 2 개의 상이한 프로모터가 RNA 폴리머라제 III 프로모터인 것인, 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 2 개의 프로모터가 U6 프로모터이고, 선택적으로 U6 프로모터가 상이한 종으로부터 유래되는 것인, 방법.

청구항 18

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 2 개의 프로모터가 서로 상이한 방향으로 배향되는 것인, 방법.

청구항 19

제1항에 있어서, CAR 및 유전자 파괴제(들)가

- (a) 벡터로부터 각각 발현되는 것이거나;
- (b) 동일한 벡터로부터 발현되는 것인, 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 벡터가 플라스미드 벡터 또는 바이러스성 벡터이고, 선택적으로 바이러스성 벡터가 렌티바이

러스 백터, 아데노바이러스 백터 또는 아데노-연관 바이러스성 백터인 것인, 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 렌티바이러스 백터가 레트로바이러스 백터인 것인, 방법.

청구항 22

제1항에 있어서, 면역 세포가 T 세포 및 자연살해 (NK) 세포로 이루어진 군으로부터 선택되고, 선택적으로 면역 세포가 T 세포인 것인, 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, T 세포가 CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포인 것인, 방법.

청구항 24

제22항에 있어서, 면역 세포가 동일한 백터 상에서 2 개의 shRNA 및 CAR을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인, 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 2 개의 shRNA가 서로 상이한 방향으로 배향된 2 개의 상이한 RNA 폴리머라제 III 프로모터에 의해 각각 제어되는 것인, 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, CAR이 CD19를 표적으로 하고, 제1 shRNA가 PD-1을 표적으로 하고, 제2 shRNA가 TIGIT를 표적으로 하는 것인, 방법.

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

삭제

청구항 123

삭제

청구항 124

삭제

청구항 125

삭제

청구항 126

삭제

청구항 127

삭제

청구항 128

삭제

청구항 129

삭제

청구항 130

삭제

청구항 131

삭제

청구항 132

삭제

청구항 133

삭제

청구항 134

삭제

청구항 135

삭제

청구항 136

삭제

청구항 137

삭제

청구항 138

삭제

청구항 139

삭제

청구항 140

삭제

청구항 141

삭제

청구항 142

삭제

청구항 143

삭제

청구항 144

삭제

청구항 145

삭제

청구항 146

삭제

청구항 147

삭제

청구항 148

삭제

청구항 149

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원

[0002]

본 출원은 2018년 1월 12일에 출원된 한국 특허 출원 제10-2018-0004238호를 우선권으로 주장하며, 그 개시내용은 그 전문이 본원에 참고로 원용된다.

[0003]

전자적으로 제출된 서열 목록에 대한 참고

[0004]

본 출원은 2019년 1월 5일에 생성되고 88,751 바이트 크기인 14570-001-228_SEQ_LISTING.txt 제목의 텍스트 파일로서 본 출원과 함께 제출된 서열 목록을 참고로 원용한다.

[0005]

발명의 분야

[0006]

본 개시내용은 암 면역요법 분야에 광범위하게 관련된다. 예를 들어, 본 발명은 일반적으로 표적 항원에 특이적으로 결합하는 유전적으로 조작된 항원 수용체 및 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자의 면역 세포에서의 발현을 감소시키거나 감소시킬 수 있는 유전자 파괴제를 포함하는 면역 세포에 관한 것이다.

배경 기술

[0007]

환자 또는 공여자의 신체로부터 T 세포 또는 NK 세포 (자연살해 세포)를 분리하고, 이들 세포를 생체 외에서 배양한 다음, 환자의 신체 내로 다시 도입함으로써 면역 세포를 사용하는 항암 요법은 현재 암 요법의 새로운 방법으로서 많은 관심을 받고 있다. 특히, 생체 외 배양 과정에서 배양에 이어 바이러스 등을 사용하여 새로운 유전자 정보를 주입하는 과정을 거친 면역 세포는 그렇지 않은 세포에 비해 항암 효과가 더 큰 것으로 보고되었다. 여기서, T 세포 내로 주입된 유전자 정보는 일반적으로 표적 항원에 높은 친화도를 갖도록 변형된 키메라 항원 수용체 (이하 CAR) 또는 모노클로날 T 세포 수용체 (이하 mTCR)이다. 이들 변형된 면역 세포는 고유 항원 특이성에 의해 제한되지 않으면서 표적 항원을 발현하고 세포 사멸을 유도하는 암 세포를 인식하고 공격한다. CAR을 사용하여 T 세포를 유전자 변형시키는 방법은 1989에 Eshhar 등에 의해 처음 제안되었고 “T-바디”라는 명칭으로 지칭되었다.

[0008]

상기 지적된 통상적인 병행 면역 세포 요법의 문제점을 해결하는 면역 세포 조성물 및 방법이 본원에 제공되며, 여기서 상기 문제점은 고비용으로 인해 환자에게 큰 경제적 부담을 주고 CAR-T 이외의 T 세포에 작용하고, 자가 면역 증상 및 사이토카인 방출 증후군의 위험이 있다. 간단히, 예를 들어, 높은 수율 및 낮은 생산 비용을 갖는 제조 방법이 본원에 개시된다. 더욱이, 높은 개연성 및 유효성로 면역 세포의 기능을 억제하는 분자를 억제함으로써, 본원의 개시는 효과적인 세포 요법을 제공하기 위한 기술의 필요성을 충족시킨다. 본 개시가 해결하고자 하는 기술적 문제는 상기 언급한 기술적 문제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 다른 기술적 문제는 당업자에게 다음 사항으로부터 명백해야 한다.

발명의 내용

[0009]

요약

[0010]

본원은 벡터, 면역 세포, 면역 세포를 포함하는 약학 조성물 및 면역 세포를 포함하는 조성물을 제공한다. 또한 본원은 면역 세포를 생산하는 방법, 및 면역 세포의 치료 및 사용 방법을 제공한다.

[0011]

일 양태에서, 본원은 벡터를 제공한다. 일부 실시양태에서, 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자의 발현을 억제하는 두 가지 유형의 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)를 코딩하는 염기 서열, 및 키메라 항원 수용체 (CAR) 또는 T 세포 수용체 (TCR), 예컨대, 모노클로날 T 세포 수용체 (mTCR)를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 벡터를 제공한다

다. 일부 실시양태에서, CAR 또는 TCR, 예컨대, mTCR의 표적은 암에서 증가된 발현을 보이는 증가된 항원 중으로부터 또는 암, 예를 들어, 암 세포, 암 조직 및/또는 종양 미세환경에서 발견되는 항원의 돌연변이된 형태로부터 선택된 인간 종양 항원이다.

- [0012] 일부 실시양태에서, 두 가지 유형의 shRNA의 발현은 이들이 2 개의 상이한 프로모터에 의해 각각 제어되는 것을 특징으로 한다.
- [0013] 일부 실시양태에서, 두 프로모터는 RNA 폴리머라제 III 프로모터이다. 일부 실시양태에서, 두 프로모터는 U6 프로모터, 예를 들어, 상이한 종으로부터 유래된 U6 프로모터이다. 일부 실시양태에서, 두 프로모터는 벡터 상에서 서로에 대해 동일한 방향으로 배향된다. 일부 실시양태에서, 두 프로모터는 벡터 상에서 서로 상이한 방향으로 배향된다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 프로모터는 머리에서 머리 배향으로 배향된다. 다른 실시양태에서, 프로모터는 꼬리에서 꼬리 배향으로 배향된다.
- [0014] 일부 실시양태에서, 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자는 면역 체크포인트 수용체 또는 리간드이다.
- [0015] 일부 실시양태에서, 면역 체크포인트 수용체 또는 리간드는 PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (CEACAM-1, CEACAM-3 또는 CEACAM-5), LAG 3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, CD96, MerTK 및 2B4로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0016] 일부 실시양태에서, 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자는 FAS, CD45, PP2A, SHIP1, SHIP2, DGK 알파, DGK 제타, Cbl-b, CD147, LRR1, TGFBR1, IL10R 알파, KLGR1, DNMT3A 및 A2aR로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0017] 일부 실시양태에서, 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자 또는 유전자들을 표적으로 하는 두 가지 유형의 shRNA가 이용된다. 일부 실시양태에서, 두 가지 유형의 shRNA는 면역 세포의 기능을 약화시키는 단일 유전자를 표적으로 하거나, 면역 세포의 기능을 약화시키는 상이한 유전자를 표적으로 한다. 일부 실시양태에서, 두 가지 유형의 shRNA는 PD-1을 표적으로 한다. 두 가지 유형의 shRNA를 포함하는 일부 실시양태에서, 하나의 shRNA는 PD-1을 표적으로 하고 제2 shRNA는 TIM-3을 표적으로 한다. 두 가지 유형의 shRNA를 포함하는 일부 실시양태에서, 하나의 shRNA는 PD-1을 표적으로 하고 제2 shRNA는 TIGIT를 표적으로 한다.
- [0018] shRNA는 센스 shRNA 서열 및 안티-센스 shRNA 서열을 포함하는 헤어핀 구조를 형성한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 shRNA를 코딩하는 염기 서열은 서열번호 2-219로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 shRNA를 코딩하는 염기 서열은 서열번호 2-219로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하며, 여기서 상기 서열은 센스 shRNA 서열을 코딩한다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 shRNA를 코딩하는 염기 서열은 서열번호 2-219로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하며, 여기서 상기 서열은 안티-센스 shRNA 서열을 코딩한다.
- [0019] 일부 실시양태에서, 벡터는 염기 서열 서열번호 220 또는 221 중 어느 하나를 포함한다. 일부 실시양태에서, 벡터는 플라스미드 벡터 또는 바이러스성 벡터, 예를 들어, 렌티바이러스 벡터, 예컨대, 레트로바이러스성 벡터, 아데노바이러스 벡터 또는 아데노-연관 바이러스성 벡터이다.
- [0020] 다른 양태에서, 본원은 CAR 또는 TCR, 예를 들어, mTCR을 발현하는 벡터를 포함하는 면역 세포를 제공하며, 여기서 두 가지 유형의 shRNA의 표적 유전자의 발현은 표적 유전자에 대한 shRNA를 발현하지 않는 대조군의 것보다 40% 이하로 감소된다. 일부 실시양태에서, 면역 세포는 인간-유래 T 세포와 NK 세포 사이에서 선택된다.
- [0021] 다른 양태에서, 본원은 상기 기재된 면역 세포를 포함하는 인간 환자의 면역 요법을 위한 약학 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 면역 세포는 원래 환자로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 환자는 세포에서 발현된 CAR 또는 TCR, 예를 들어, mTCR에 의해 표적된 암 항원 수준의 증가 또는 변경이 검출되는 종양 또는 암을 갖는다.
- [0022] 다른 양태에서, 본원은 표적 항원에 특이적으로 결합하는 유전적으로 조작된 항원 수용체 및 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자의 면역 세포에서의 발현을 감소시키거나 감소시킬 수 있는 유전자 파괴체를 포함하는 면역 세포를 제공한다.
- [0023] 다른 양태에서, 본원은 표적 항원에 특이적으로 결합하는 유전적으로 조작된 항원 수용체 및 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자의 면역 세포에서의 발현을 감소시키거나 감소시킬 수 있는 유전자 파괴체를 포함하는 면역 세포를 제공한다.
- [0024] 일부 실시양태에서, 유전적으로 조작된 항원 수용체는 키메라 항원 수용체 (CAR) 또는 T 세포 수용체

(TCR)이다.

- [0025] 일부 실시양태에서, 유전적으로 조작된 항원 수용체는 CAR이다. 일부 실시양태에서, CAR은 세포 외 항원 인식 도메인, 막관통 도메인, 및 세포 내 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, CAR의 세포 외 항원 인식 도메인은 표적 항원에 특이적으로 결합한다.
- [0026] 일부 실시양태에서, CAR의 세포 내 신호 전달 도메인은 CD3 제타 (CD3 ζ) 사슬의 세포 내 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, CAR의 세포 내 신호 전달 도메인은 공동자극성 분자를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 공동자극성 분자는 ICOS, OX40, CD137 (4-1BB), CD27, 및 CD28로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 공동자극성 분자는 CD137 (4-1BB)이다. 일부 실시양태에서, 공동자극성 분자는 CD28이다.
- [0027] 일부 실시양태에서, 유전적으로 조작된 항원 수용체는 TCR이다. 일부 실시양태에서, TCR은 모노클로날 TCR (mTCR)이다.
- [0028] 일부 실시양태에서, 표적 항원은 암 세포, 암 조직 및/또는 종양 미세환경 내에서 또는 표면 상에서 발현된다.
- [0029] 일부 실시양태에서, 표적 항원은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다: 5T4 (영양막 당단백질), 707-AP, 9D7, AFP (α -태아단백질), AlbZIP (안드로젠-유도된 bZIP), HPG1 (인간 전립선 특이적 유전자-1), $\alpha 5\beta 1$ -인테그린, $\alpha 5\beta 6$ -인테그린, α -메틸아실-코엔자임 A 라세마제, ART-4 (ADP리보실트랜스퍼라제-4), B7H4 (v-세트 도메인-함유 T-세포 활성화 억제제 1), BAGE-1 (B 흑색종 항원-1), BCL-2 (B-세포 CLL/림프종-2), BING-4 (WD 반복 도메인 46), CA 15-3/CA 27-29 (뮤신 1), CA 19-9 (암 항원 19-9), CA 72-4 (암 항원 72-4), CA125 (암 항원 125), 칼레티쿨린, CAMEL (흑색종에서 CTL-인식된 항원), CASP-8 (카스파제 8), 카텝신 B, 카텝신 L, CD19 (분화클러스터 19), CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD4, CD52, CD55, CD56, CD80, CEA (암배아 항원 SG8), CLCA2 (클로라이드 채널 보조(accessory) 2), CML28 (만성 골수성 백혈병 종양 항원 28), 코엑토신-유사 단백질, 콜라겐 XXIII, COX-2 (사이클로옥시게나제-2), CT-9/BRD6 (암/고환 항원 9), Cten (c-말단 텐신-유사 단백질), 사이클린 B1, 사이클린 D1, cyp-B, CYPB1 (시토크롬 p450 패밀리 1 서브패밀리 b 멤버 1), DAM-10/MAGE-B1 (흑색종-연관 항원 B1), DAM-6/MAGE-B2, EGFR/Her1 (표피 성장 인자 수용체), EMMPRIN (바시긴 (basigin)), EpCam, EphA2 (EPH 수용체 A2), EphA3, ErbB3 (Erb-B2 수용체 티로신 키나아제 3), EZH2 (제스트 2 폴리콤 억제 복합체 2 서브유닛의 인핸서(enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit)), FGF-5 (섬유아세포 성장 인자 5), FN (피브로넥틴), Fra-1 (Fos관련 항원-1), G250/CAIX (탄산 무수화효소 9), GAGE-1 (G 항원-1), GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7b, GAGE-8, GDEP (전립선에서 상이하게 발현된 유전자), GnT-V (글루코네이트 키나아제), gp100 (멜라노사이트 계통-특이적 항원 GP100), GPC3 (글리피칸3), HAGE (나선형 항원), HAST-2 (설포트랜스퍼라제 패밀리 1A 멤버 1), 헵신, Her2/neu/ErbB2 (Erb-B2 수용체 티로신 키나아제 2), HERV-K-MEL, HNE (메둘라신), 호메오박스 NKX 3.1, HOM-TES-14/SCP-1, HOM-TES-85, HPV-E6, HPVE7, HST-2 (시르투인-2), hTERT, iCE (카스파제 1), IGF-1R (인슐린 유사 성장 인자-1 수용체), IL-13Ra2 (인터류킨-13 수용체 서브유닛 α 2), IL-2R (인터류킨-2 수용체), IL-5 (인터류킨-5), 미성숙 라미닌 수용체, 칼리크레인 2, 칼리크레인 4, Ki67, KIAA0205 (리소포스파티딜글리세롤 아실트랜스퍼라제 1), KK-LC-1 (키타큐슈 폐 암 항원-1), KM-HN-1, LAGE-1 (L 항원 패밀리 멤버-1), 리빈, MAGE-A1, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGEA2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A9, MAGE-B1, MAGE-B10, MAGE-B16, MAGEB17, MAGE-B2, MAGE-B3, MAGE-B4, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-D1, MAGE-D2, MAGE-D4, MAGE-E1, MAGE-E2, MAGE-F1, MAGE-H1, MAGEL2 (흑색종 항원 패밀리 L2), 맘마글로빈 A, MART-1/Melan-A (T-세포-1에 의해 인식된 흑색종 항원), MART-2, 매트릭스 단백질 22, MC1R (멜라노코르틴 1 수용체), M-CSF (대식세포 콜로니-자극 인자), 메소텔린, MG50/PXDN (퍼옥시다신), MMP 11 (매트릭스 메탈로프로테아제 11), MN/CA IX-항원 (탄산 무수화효소 9), MRP-3 (다중약물 내성-연관 단백질-3), MUC1 (뮤신 1), MUC2, NA88-A (VENT-유사 호메오박스 2 위유전자(pseudogene) 1), N-아세틸글루코스-아미닐트랜스퍼라제-V, 네오-PAP (네오-폴리 (A) 폴리머라제), NGEF (전립선에서 발현된 새로운 유전자), NMP22 (핵 매트릭스 단백질 22), NPM/ALK (뉴클레오포스민), NSE (뉴런-특이적 에놀라아제), NY-ESO-1, NY-ESO-B, OA1 (골관절염 QTL 1), OFA-iLRP (종양태아성 항원 미성숙 라미닌 수용체 단백질), OGT (O-GlcNAc 트랜스퍼라제), OS-9 (소포체 렉틴), 오스테오칼신, 오스테오폰틴, p15 (CDK 억제제 2B), p53, PAGE-4 (P 항원 패밀리 멤버-4), PAI-1 (플라스미노겐 활성화제 억제제-1), PAI-2, PAP (전립선 산성 포스파타아제), PART-1 (전립선 안드로젠-제어된 전사물 1), PATE (전립선 및 고환 발현된 1), PDEF (전립선-유래 Ets 인자), Pim-1-키나아제 (프로바이러스성 통합 부위 1), Pin1 (펩티달-포스포릴 시스-트랜스 아이소머라제 NIMA-상호작용 1(Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1)), POTE (전립선, 난소, 고환 및 태반에서 발현됨), PRAME (흑색종에서 우선적으로 발현된 항원), 프로스테인(prostein), 프로테

이나제-3, PSA(전립선-특이적 항원), PSCA (전립선 스템(stem) 세포 항원), PSGR (전립선-특이적 G-단백질 커플링된(coupled) 수용체), PSM, PSMA (전립선 특이적 막 항원), RAGE-1 (신장 종양 암종 항원), RHAMM/CD168, RU1 (신장 산재 단백질 1(renal ubiquitous protein 1)), RU2, SAGE(육종 항원), SART-1 (T-세포-1에 의해 인식되는 편평 세포 암종 항원), SART-2, SART-3, Sp17 (정자 단백질 17), SSX-1 (SSX 패밀리의 멤버 1), SSX-2/HOM-MEL-40, SSX-4, STAMP-1 (STEAP2 메탈로리덕테이즈(metalloreductase)), STEAP, 서바이빈, 서바이빈-213, TA-90 (종양 연관 항원-90), TAG-72 (종양 연관 당단백질-72), TARP(TCR γ 대안 리딩프레임 단백질), TGF β (형질전환 성장 인자 β), TGF β R11 (형질전환 성장 인자 β 수용체 11), TGM-4 (트랜스글루타미나제 4), TRAG-3(텍솔 내성 연관 유전자 3), TRG (T-세포 수용체 γ 유전자좌), TRP-1 (일시적 수용체 전위-1), TRP-2/6b, TRP-2/INT2, Trp-p8, 티로시나제, E^{F} PA (E^{F} -플라스미노젠 활성화제), VEGF (혈관 내피 성장 인자 A), VEGFR-2/FLK-1, 및 WT1 (빌름스 종양 1). 일부 실시양태에서, 표적 항원은 CD19 또는 CD22이다. 일부 실시양태에서, 표적 항원은 CD19이다.

- [0030] 일부 실시양태에서, 표적 항원은 암 세포, 암 조직 및/또는 종양 미세환경 내에서 또는 표면 상에서 발현이 증가된 암 항원이다.
- [0031] 일부 실시양태에서, 표적 항원은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되며: a-액티닌-4/m, ARTC1/m, bcr/abl, 베타-카테닌/m, BRCA1/m, BRCA2/m, CASP-5/m, CASP-8/m, CDC27/m, CDK4/m, CDKN2A/m, CML66, COA-1/m, DEK-CAN, EFTUD2/m, ELF2/m, ETV6-AML1, FN1/m, GPNMB/m, HLA-A*0201-R170I, HLA-A11/m, HLA-A2/m, HSP70-2M, KIAA0205/m, K-Ras/m, LDLR-FUT, MART2/m, ME1/m, MUM-1/m, MUM-2/m, MUM-3/m, 미오신 클래스 1/m, 네오-PAP/m, NFYC/m, N-Ras/m, OGT/m, OS-9/m, p53/m, Pml/RAR α , PRDX5/m, PTPRX/m, RBAF600/m, SIRT2/m, SYTSSX-1, SYT-SSX-2, TEL-AML1, TGF β R11, 및 TPE μ ; 여기서 표적 항원은 암 세포, 암 조직 및/또는 종양 미세환경 내에서 또는 표면 상에서 발현된 암 항원의 돌연변이된 형태이다.
- [0032] 일부 실시양태에서, 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자의 발현은 다음 중 하나 이상을 야기한다:
- [0033] i) 면역 세포의 증식 억제;
- [0034] ii) 면역 세포의 세포 사멸 유도;
- [0035] iii) 표적 항원을 인식하고/하거나 활성화시키는 면역 세포의 능력의 억제;
- [0036] iv) 표적 항원에 대한 면역 반응을 유도하지 않는 세포로 면역 세포의 분화 유도;
- [0037] v) 면역 세포의 면역 반응을 촉진시키는 분자에 대한 면역 세포의 감소된 반응; 또는
- [0038] vi) 면역 세포의 면역 반응을 억압하는 분자에 대한 면역 세포의 증가된 반응.
- [0039] 일부 실시양태에서, 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다: PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (CEACAM-1, CEACAM-3 또는 CEACAM-5), LAG 3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, CD96, MerTK, 2B4, FAS, CD45, PP2A, SHP1, SHP2, DGK 알파, DGK 제타, Cbl-b, Cbl-c, CD148, LRR1, TGFBR1, IL10RA, KLGR1, DNMT3A, 및 A2aR.
- [0040] 일부 실시양태에서, 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자는 면역 세포의 면역 반응을 억압하는 분자에 대한 면역 세포의 반응을 증가시킨다.
- [0041] 일부 실시양태에서, 면역 세포의 면역 반응을 억압하는 분자에 대한 면역 세포의 반응을 증가시키는 유전자는 면역 체크포인트 수용체 또는 리간드를 코딩한다.
- [0042] 일부 실시양태에서, 면역 체크포인트 수용체 또는 리간드는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다: PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (CEACAM-1, CEACAM-3 또는 CEACAM-5), LAG 3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, CD96, MerTK, 및 2B4.
- [0043] 일부 실시양태에서, 유전자 파괴제는 유전자 파괴제의 부재 하의 면역 세포와 비교하여 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 95% 이상으로 면역 세포의 기능을 약화시키는 면역 세포에서의 유전자의 발현을 감소시킨다.
- [0044] 일부 실시양태에서, 유전자 파괴제는 면역 세포의 면역 반응을 억압하는 분자에 대한 면역 세포의 반응을 증가시키는 유전자의 발현을 감소시킨다.
- [0045] 일부 실시양태에서, 유전자 파괴제는 면역 체크포인트 수용체 또는 리간드를 코딩하는 유전자의 발현을 감소시

킨다.

- [0046] 일부 실시양태에서, 유전자 파괴제는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 유전자의 발현을 감소시킨다: PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (CEACAM-1, CEACAM-3 또는 CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, CD96, MerTK, 및 2B4.
- [0047] 일부 실시양태에서, 유전자 파괴제는 RNA 간섭 (RNAi)에 의해 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자의 발현을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 하나 초과 유전자 파괴제는 RNAi에 의해 면역 세포에서 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자의 발현을 감소시킨다.
- [0048] 일부 실시양태에서, 유전자 파괴제는 면역 세포의 기능을 약화시키는 단일 유전자를 표적으로 하거나, 면역 세포의 기능을 약화시키는 상이한 유전자를 표적으로 하며, 여기서 제1 유전자 파괴제는 제1 유전자를 표적으로 하고 제2 유전자 파괴제는 제2 유전자를 표적으로 하거나, 이들의 임의의 조합을 표적으로 한다.
- [0049] 일부 실시양태에서, RNAi는 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)에 의해 매개된다. 일부 실시양태에서, RNAi는 하나 초과 shRNA에 의해 매개된다. 일부 실시양태에서, RNAi는 2 개의 shRNA에 의해 매개된다.
- [0050] 일부 실시양태에서, 2 개의 shRNA는 PD-1을 표적으로 한다. 일부 실시양태에서, 제1 shRNA는 PD-1을 표적으로 하고 제2 shRNA는 TIM-3을 표적으로 한다. 일부 실시양태에서, 제1 shRNA는 PD-1을 표적으로 하고 제2 shRNA는 CTLA-4를 표적으로 한다. 일부 실시양태에서, 제1 shRNA는 PD-1을 표적으로 하고 제2 shRNA는 LAG-3을 표적으로 한다. 일부 실시양태에서, 제1 shRNA는 PD-1을 표적으로 하고 제2 shRNA는 TIGIT를 표적으로 한다.
- [0051] 일부 실시양태에서, 면역 세포는 shRNA를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역 세포는 하나 초과 shRNA를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역 세포는 2 개의 shRNA를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 달리 언급되지 않는 한, 본원에 사용된 용어 "염기 서열" 뉴클레오티드 서열"은 상호교환가능하다.
- [0052] 일부 실시양태에서, shRNA를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 2-219 및 238-267로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함한다.
- [0053] 일부 실시양태에서, shRNA를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 벡터 상에 있다.
- [0054] 일부 실시양태에서, 상이한 shRNA의 발현은 상이한 프로모터에 의해 각각 제어된다. 일부 실시양태에서, 2 개의 상이한 shRNA의 발현은 2 개의 상이한 프로모터에 의해 각각 제어된다. 일부 실시양태에서, 2 개의 상이한 프로모터는 RNA 폴리머라제 III 프로모터이다. 일부 실시양태에서, 2 개의 프로모터는 U6 프로모터이다. 일부 실시양태에서, U6 프로모터는 상이한 종으로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 2 개의 프로모터는 서로 상이한 방향으로 배향된다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 프로모터는 머리에서 머리 배향으로 배향된다. 다른 실시양태에서, 프로모터는 꼬리에서 꼬리 배향으로 배향된다.
- [0055] 일부 실시양태에서, 유전적으로 조작된 항원 수용체 및 유전자 파괴제는 벡터로부터 각각 발현된다. 일부 실시양태에서, 유전적으로 조작된 항원 수용체 및 유전자 파괴제는 동일한 벡터로부터 발현된다.
- [0056] 일부 실시양태에서, 벡터는 플라스미드 벡터 또는 바이러스성 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스성 벡터는 렌티바이러스 벡터 또는 아데노바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 렌티바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터이다.
- [0057] 일부 실시양태에서, 면역 세포는 T 세포 및 자연살해 (NK) 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 면역 세포는 T 세포이다. 일부 실시양태에서, T 세포는 CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포이다.
- [0058] 일부 실시양태에서, 면역 세포는 동일한 벡터 상에서 2 개의 shRNA 및 CAR을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 2 개의 shRNA는 서로 상이한 방향으로 배향된 2 개의 상이한 RNA 폴리머라제 III 프로모터에 의해 각각 제어된다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 프로모터는 머리에서 머리 배향으로 배향된다. 다른 실시양태에서, 프로모터는 꼬리에서 꼬리 배향으로 배향된다. 일부 실시양태에서, CAR은 CD19를 표적으로 하고, 제1 shRNA는 PD-1을 표적으로 하고, 제2 shRNA는 TIGIT를 표적으로 한다.
- [0059] 다른 양태에서, 본원은 다음을 동시에 또는 임의의 순서로 순차적으로 면역 세포 내로 도입함으로써:
- [0060] (1) 표적 항원에 특이적으로 결합하는 유전적으로 조작된 항원 수용체를 코딩하는 유전자; 및
- [0061] (2) 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자의 면역 세포에서의 발현을 감소시키거나 감소시킬 수 있는 유전자

파괴제,

- [0062] 유전적으로 조작된 항원 수용체가 발현되고 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자의 발현이 감소된 면역 세포를 생산하는 단계를 포함하는 면역 세포의 생산 방법을 제공한다.
- [0063] 일부 실시양태에서, 유전적으로 조작된 항원 수용체는 키메라 항원 수용체 (CAR) 또는 T 세포 수용체 (TCR)이다.
- [0064] 일부 실시양태에서, 유전적으로 조작된 항원 수용체는 CAR이다. 일부 실시양태에서, CAR은 세포 외 항원 인식 도메인, 막관통 도메인, 및 세포 내 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, CAR의 세포 외 항원 인식 도메인은 표적 항원에 특이적으로 결합한다.
- [0065] 일부 실시양태에서, CAR의 세포 내 신호 전달 도메인은 CD3 제타 (CD3 ζ) 사슬의 세포 내 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, CAR의 세포 내 신호 전달 도메인은 공동자극성 분자를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 공동자극성 분자는 ICOS, OX40, CD137 (4-1BB), CD27, 및 CD28로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 공동자극성 분자는 CD137 (4-1BB)이다. 일부 실시양태에서, 공동자극성 분자는 CD28이다.
- [0066] 일부 실시양태에서, 유전적으로 조작된 항원 수용체는 TCR이다. 일부 실시양태에서, TCR은 모노클로날 TCR (mTCR)이다.
- [0067] 일부 실시 양태에서, 표적 항원은 암 세포, 암 조직 및/또는 종양 미세환경 내에서 또는 표면 상에서 발현된다.
- [0068] 일부 실시양태에서, 표적 항원은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다: 5T4 (영양막 당단백질), 707-AP, 9D7, AFP (α -태아단백질), A1bZIP (안드로젠-유도된 bZIP), HPG1 (인간 전립선 특이적 유전자-1), α 5 β 1-인테그린, α 5p6-인테그린, α -메틸아실-코엔자임 A 라세마제, ART-4 (ADP리보실트랜스퍼라제-4), B7H4 (v-세트 도메인-함유 T-세포 활성화 억제제 1), BAGE-1 (B 흑색종 항원-1), BCL-2 (B-세포 CLL/림프종-2), BING-4 (WD 반복 도메인 46), CA 15-3/CA 27-29 (뮤신 1), CA 19-9 (암 항원 19-9), CA 72-4 (암 항원 72-4), CA125 (암 항원 125), 칼레티쿨린, CAMEL (흑색종에서 CTL-인식된 항원), CASP-8 (카스파제 8), 카텝신 B, 카텝신 L, CD19 (분화 클러스터 19), CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD4, CD52, CD55, CD56, CD80, CEA (암배아 항원 SG8), CLCA2 (클로라이드 채널 보조 2), CML28 (만성 골수성 백혈병 종양 항원 28), 코엑토신-유사 단백질, 콜라겐 XXIII, COX-2 (사이클로옥시게나제-2), CT-9/BRD6 (암/고환 항원 9), Cten (c-말단 텐신-유사 단백질), 사이클린 B1, 사이클린 D1, cyp-B, CYPB1 (시토크롬 p450 패밀리의 1 서브패밀리 b 멤버 1), DAM-10/MAGE-B1 (흑색종-연관 항원 B1), DAM-6/MAGE-B2, EGFR/Her1 (표피 성장 인자 수용체), EMMPRIN (바시긴), EpCam, EphA2 (EPH 수용체 A2), EphA3, ErbB3 (Erb-B2 수용체 티로신 키나아제 3), EZH2 (제스트 2 폴리콤 억제 복합체 2 서브유닛의 인헨서), FGF-5 (섬유아세포 성장 인자 5), FN (피브로넥틴), Fra-1 (Fos관련 항원-1), G250/CAIX (탄산 무수화효소 9), GAGE-1 (G 항원-1), GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7b, GAGE-8, GDEP (전립선에서 상이하게 발현된 유전자), GnT-V (글루코네이트 키나아제), gp100 (멜라노사이트 계통-특이적 항원 GP100), GPC3 (글리피칸3), HAGE (나선형 항원), HAST-2 (설폰트랜스퍼라제 패밀리의 1A 멤버 1), 헤핀, Her2/neu/ErbB2 (Erb-B2 수용체 티로신 키나아제 2), HERV-K-MEL, HNE (메둘라신), 호메오박스 NKX 3.1, HOM-TES-14/SCP-1, HOM-TES-85, HPV-E6, HPVE7, HST-2 (시르투인-2), hTERT, iCE (카스파제 1), IGF-1R (인슐린 유사 성장 인자-1 수용체), IL-13Ra2 (인터류킨-13 수용체 서브유닛 α 2), IL-2R (인터류킨-2 수용체), IL-5 (인터류킨-5), 미성숙 라미닌 수용체, 칼리크레인 2, 칼리크레인 4, Ki67, KIAA0205 (리소포스파티딜글리세롤 아실트랜스퍼라제 1), KK-LC-1 (키타큐슈 폐 암 항원-1), KM-HN-1, LAGE-1 (L 항원 패밀리의 멤버-1), 리빈, MAGE-A1, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGEA2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A9, MAGE-B1, MAGE-B10, MAGE-B16, MAGEB17, MAGE-B2, MAGE-B3, MAGE-B4, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-D1, MAGE-D2, MAGE-D4, MAGE-E1, MAGE-E2, MAGE-F1, MAGE-H1, MAGEL2 (흑색종 항원 패밀리의 L2), 맘마글로빈 A, MART-1/Melan-A (T-세포-1에 의해 인식된 흑색종 항원), MART-2, 매트릭스 단백질 22, MC1R (멜라노코르틴 1 수용체), M-CSF (대식세포 콜로니-자극 인자), 메소텔린, MG50/PXDN (피옥시다신), MMP 11 (매트릭스 메탈로프로테아제 11), MN/CA IX-항원 (탄산 무수화효소 9), MRP-3 (다중약물 내성-연관 단백질-3), MUC1 (뮤신 1), MUC2, NA88-A (VENT-유사 호메오박스 2 위유전자 1), N-아세틸글루코스-아미닐트랜스퍼라제-V, 네오-PAP (네오-폴리 (A) 폴리머라제), NGEP (전립선에서 발현된 새로운 유전자), NMP22 (핵 매트릭스 단백질 22), NPM/ALK (뉴클레오포스민), NSE (뉴런-특이적 에놀라아제), NY-ESO-1, NY-ESO-B, OA1 (골관절염 QTL 1), OFA-iLRP (종양태아성 항원 미성숙 라미닌 수용체 단백질), OGT (O-GlcNAc 트랜스퍼라제), OS-9 (소포체 렉틴), 오스테오칼신, 오스테오폰틴, p15 (CDK 억제제 2B), p53, PAGE-4 (P 항원 패밀리의 멤버-4), PAI-1 (플라스미노겐 활성화제 억

제제-1), PAI-2, PAP (전립선 산성 포스파타아제), PART-1 (전립선 안드로젠-제어된 전사물 1), PATE (전립선 및 고환 발현된 1), PDEF (전립선-유래 Ets 인자), Pim-1-키나아제 (프로바이러스성 통합 부위 1), Pin1 (펩티딜-프롤릴 시스-트랜스 아이소머라제 NIMA-상호작용 1), POTE (전립선, 난소, 고환 및 태반에서 발현됨), PRAME (흑색종에서 우선적으로 발현된 항원), 프로스테인, 프로테이나제-3, PSA(전립선-특이적 항원), PSCA (전립선 스템 세포 항원), PSGR(전립선-특이적 G-단백질 커플링된 수용체), PSM, PSMA (전립선 특이적 막 항원), RAGE-1 (신장 종양 암종 항원), RHAMM/CD168, RU1 (신장 산재 단백질 1), RU2, SAGE(육종 항원), SART-1 (T-세포-1에 의해 인식되는 편평 세포 암종 항원), SART-2, SART-3, Sp17(정자 단백질 17), SSX-1 (SSX 패밀리의 멤버 1), SSX-2/HOM-MEL-40, SSX-4, STAMP-1 (STEAP2 메탈로리덕테이즈), STEAP, 서바이빈, 서바이빈-213, TA-90 (종양 연관 항원-90), TAG-72 (종양 연관 당단백질-72), TARP (TCR γ 대안 리딩프레임 단백질), TGFb (형질전환 성장 인자 β), TGFbR11 (형질전환 성장 인자 β 수용체 11), TGM-4 (트랜스글루타미나제 4), TRAG-3 (텍솔 내성 연관 유전자 3), TRG (T-세포 수용체 γ 유전자좌), TRP-1 (일시적 수용체 전위-1), TRP-2/6b, TRP-2/INT2, Trp-p8, 티로시나제, $E\Gamma$ PA ($E\Gamma$ -플라스미노겐 활성화제), VEGF (혈관 내피 성장 인자 A), VEGFR-2/FLK-1, 및 WT1 (빌름스 종양 1). 일부 실시양태에서, 표적 항원은 CD19 또는 CD22이다. 일부 실시양태에서, 표적 항원은 CD19이다.

- [0069] 일부 실시양태에서, 표적 항원은 암 세포, 암 조직 및/또는 종양 미세환경 내에서 또는 표면 상에서 발현이 증가된 암 항원이다.
- [0070] 일부 실시양태에서, 표적 항원은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되며: a-액티닌-4/m, ARTC1/m, bcr/abl, 베타-카테닌/m, BRCA1/m, BRCA2/m, CASP-5/m, CASP-8/m, CDC27/m, CDK4/m, CDKN2A/m, CML66, COA-1/m, DEK-CAN, EFTUD2/m, ELF2/m, ETV6-AML1, FN1/m, GPNMB/m, HLA-A*0201-R170I, HLA-A11/m, HLA-A2/m, HSP70-2M, KIAA0205/m, K-Ras/m, LDLR-FUT, MART2/m, ME1/m, MUM-1/m, MUM-2/m, MUM-3/m, 미오신 클래스 1/m, 네오-PAP/m, NFYC/m, N-Ras/m, OGT/m, OS-9/m, p53/m, Pml/RARa, PRDX5/m, PTPRX/m, RBAF600/m, SIRT2/m, SYTSSX-1, SYT-SSX-2, TEL-AML1, TGFbRII, 및 TPI/m; 여기서 표적 항원은 암 세포, 암 조직 및/또는 종양 미세환경 내에서 또는 표면 상에서 발현된 암 항원의 돌연변이된 형태이다.
- [0071] 일부 실시양태에서, 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자의 발현은 다음 중 하나 이상을 야기한다:
- [0072] i) 면역 세포의 증식 억제;
- [0073] ii) 면역 세포의 세포 사멸 유도;
- [0074] iii) 표적 항원을 인식하고/하거나 활성화시키는 면역 세포의 능력의 억제;
- [0075] iv) 표적 항원에 대한 면역 반응을 유도하지 않는 세포로 면역 세포의 분화 유도;
- [0076] v) 면역 세포의 면역 반응을 촉진시키는 분자에 대한 면역 세포의 감소된 반응; 또는
- [0077] vi) 면역 세포의 면역 반응을 억압하는 분자에 대한 면역 세포의 증가된 반응.
- [0078] 일부 실시양태에서, 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다: PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (CEACAM-1, CEACAM-3 또는 CEACAM-5), LAG 3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, CD96, MerTK, 2B4, FAS, CD45, PP2A, SHP1, SHP2, DGK 알파, DGK 베타, Cbl-b, Cbl-c, CD148, LRR1, TGFBR1, IL10RA, KLGR1, DNMT3A, 및 A2aR.
- [0079] 일부 실시양태에서, 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자는 면역 세포의 면역 반응을 억압하는 분자에 대한 면역 세포의 반응을 증가시킨다.
- [0080] 일부 실시양태에서, 면역 세포의 면역 반응을 억압하는 분자에 대한 면역 세포의 반응을 증가시키는 유전자는 면역 체크포인트 수용체 또는 리간드를 코딩한다.
- [0081] 일부 실시양태에서, 면역 체크포인트 수용체 또는 리간드는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다: PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (CEACAM-1, CEACAM-3 또는 CEACAM-5), LAG 3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, CD96, MerTK, 및 2B4.
- [0082] 일부 실시양태에서, 유전자 파괴체는 유전자 파괴체의 부재 하의 면역 세포와 비교하여 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 95% 이상으로 면역 세포의 기능을 약화시키는 면역 세포에서의 유전자의 발현을 감소시킨다.
- [0083] 일부 실시양태에서, 유전자 파괴체는 면역 세포의 면역 반응을 억압하는 분자에 대한 면역 세포의 반응을 증가

시키는 유전자의 발현을 감소시킨다.

- [0084] 일부 실시양태에서, 유전자 파괴제는 면역 체크포인트 수용체 또는 리간드를 코딩하는 유전자의 발현을 감소시킨다.
- [0085] 일부 실시양태에서, 유전자 파괴제는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 유전자의 발현을 감소시킨다: PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (CEACAM-1, CEACAM-3 또는 CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, CD96, MerTK, 및 2B4.
- [0086] 일부 실시양태에서, 유전자 파괴제는 RNA 간섭 (RNAi)에 의해 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자의 발현을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 하나 초과 유전자 파괴제는 RNAi에 의해 면역 세포에서 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자의 발현을 감소시킨다.
- [0087] 일부 실시양태에서, 유전자 파괴제는 면역 세포의 기능을 약화시키는 단일 유전자를 표적으로 하거나, 면역 세포의 기능을 약화시키는 상이한 유전자를 표적으로 하며, 여기서 제1 유전자 파괴제는 제1 유전자를 표적으로 하고 제2 유전자 파괴제는 제2 유전자를 표적으로 하거나, 이들의 임의의 조합을 표적으로 한다.
- [0088] 일부 실시양태에서, RNAi는 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)에 의해 매개된다. 일부 실시양태에서, RNAi는 하나 초과 shRNA에 의해 매개된다. 일부 실시양태에서, RNAi는 2 개의 shRNA에 의해 매개된다.
- [0089] 일부 실시양태에서, 2 개의 shRNA는 PD-1을 표적으로 한다. 일부 실시양태에서, 제1 shRNA는 PD-1을 표적으로 하고 제2 shRNA는 TIM-3을 표적으로 한다. 일부 실시양태에서, 제1 shRNA는 PD-1을 표적으로 하고 제2 shRNA는 CTLA-4를 표적으로 한다. 일부 실시양태에서, 제1 shRNA는 PD-1을 표적으로 하고 제2 shRNA는 LAG-3을 표적으로 한다. 일부 실시양태에서, 제1 shRNA는 PD-1을 표적으로 하고 제2 shRNA는 TIGIT를 표적으로 한다.
- [0090] 일부 실시양태에서, 면역 세포는 shRNA를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역 세포는 하나 초과 shRNA를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역 세포는 2 개의 shRNA를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0091] 일부 실시양태에서, shRNA를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 2-219 및 238-267로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함한다.
- [0092] 일부 실시양태에서, shRNA를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 벡터 상에 있다.
- [0093] 일부 실시양태에서, 상이한 shRNA의 발현은 상이한 프로모터에 의해 각각 제어된다. 일부 실시양태에서, 2 개의 상이한 shRNA의 발현은 2 개의 상이한 프로모터에 의해 각각 제어된다. 일부 실시양태에서, 2 개의 상이한 프로모터는 RNA 폴리머라제 III 프로모터이다. 일부 실시양태에서, 2 개의 프로모터는 U6 프로모터이다. 일부 실시양태에서, U6 프로모터는 상이한 종으로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 2 개의 프로모터는 서로 상이한 방향으로 배향된다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 프로모터는 머리에서 머리 배향으로 배향된다. 다른 실시양태에서, 프로모터는 꼬리에서 꼬리 배향으로 배향된다.
- [0094] 일부 실시양태에서, 유전적으로 조작된 항원 수용체 및 유전자 파괴제는 벡터로부터 각각 발현된다. 일부 실시양태에서, 유전적으로 조작된 항원 수용체 및 유전자 파괴제는 동일한 벡터로부터 발현된다.
- [0095] 일부 실시양태에서, 벡터는 플라스미드 벡터 또는 바이러스성 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스성 벡터는 렌티바이러스 벡터 또는 아데노바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 렌티바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터이다.
- [0096] 일부 실시양태에서, 면역 세포는 T 세포 및 자연살해 (NK) 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 면역 세포는 T 세포이다. 일부 실시양태에서, T 세포는 CD4⁺ T 세포 또는 CD8⁺ T 세포이다.
- [0097] 일부 실시양태에서, 면역 세포는 동일한 벡터 상에서 2 개의 shRNA 및 CAR을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 2 개의 shRNA는 서로 상이한 방향으로 배향된 2 개의 상이한 RNA 폴리머라제 III 프로모터에 의해 각각 제어된다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 프로모터는 머리에서 머리 배향으로 배향된다. 다른 실시양태에서, 프로모터는 꼬리에서 꼬리 배향으로 배향된다. 일부 실시양태에서, CAR은 CD19를 표적으로 하고, 제1 shRNA는 PD-1을 표적으로 하고, 제2 shRNA는 TIGIT를 표적으로 한다.
- [0098] 다른 양태에서, 본원은 조작된 면역 세포를 포함하는 조성물을 제공한다. 다른 양태에서, 본원은 면역 세포 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

- [0099] 다른 양태에서, 본원은 면역 세포 또는 조성물을 질환 또는 병태를 갖는 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 치료 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 유전적으로 조작된 항원 수용체는 질환 또는 병태와 연관된 항원에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 병태는 암 또는 종양이다.
- [0100] 다른 양태에서, 본원은 질환 또는 병태를 치료하는데 사용하기 위한 면역 세포 또는 조성물을 제공한다. 다른 실시양태에서, 본원은 질환 또는 병태를 치료하기 위한 의학의 제조에서 면역 세포 또는 조성물의 용도를 제공한다. 일부 실시양태에서, 유전적으로 조작된 항원 수용체는 질환 또는 병태와 연관된 항원에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 병태는 암 또는 종양이다.
- [0101] 추가의 비-제한적인 실시양태가 하기에 제시된다.
- [0102] 1. 다음을 포함하는 벡터:
- [0103] 면역 세포의 기능을 약화시키는 하나 이상의 유전자의 발현을 억제하는 두 가지 유형의 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)를 코딩하는 염기 서열, 및
- [0104] 키메라 항원 수용체 (CAR) 또는 모노클로날 T 세포 수용체 (mTCR)를 코딩하는 염기 서열.
- [0105] 2. 실시양태 1에 있어서, 두 가지 유형의 shRNA의 발현은 이들이 2 개의 상이한 프로모터에 의해 각각 제어되는 것을 특징으로 하는, 벡터.
- [0106] 3. 실시양태 2에 있어서, 2 개의 프로모터가 RNA 폴리머라제 III 프로모터인, 벡터.
- [0107] 4. 실시양태 2에 있어서, 2 개의 프로모터가 상이한 종으로부터 유래된 E16 프로모터인, 벡터.
- [0108] 5. 실시양태 2에 있어서, 2 개의 프로모터가 벡터 상에서 서로 상이한 방향으로 배향된, 벡터.
- [0109] 6. 실시양태 1에 있어서, 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자가 면역 체크포인트 수용체 또는 리간드인, 벡터.
- [0110] 7. 실시양태 6에 있어서, 면역 체크포인트 수용체 또는 리간드가 PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (CEACAM-1, CEACAM-3 또는 CEACAM-5), LAG 3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, CD96, MerTK 및 2B4로 이루어진 군으로부터 선택된, 벡터.
- [0111] 8. 실시양태 1에 있어서, 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자가 FAS, CD45, PP2A, SHIP1, SHIP2, DGK 알파, DGK 제타, Cbl-b, CD147, LRR1, TGFBR1, IL10R 알파, KLGR1, DNMT3A 및 A2aR로 이루어진 군으로부터 선택된, 벡터.
- [0112] 9. 실시양태 1에 있어서, 두 가지 유형의 shRNA가 면역 세포의 기능을 약화시키는 단일 유전자를 표적으로 하거나, 두 가지 유형의 shRNA가 면역 세포의 기능을 약화시키는 상이한 유전자를 표적으로 하는, 벡터.
- [0113] 10. 실시양태 1에 있어서, 두 가지 유형의 shRNA는 PD-1을 표적으로 하는, 벡터.
- [0114] 11. 실시양태 1에 있어서, 두 가지 유형의 shRNA 중에서, i) 하나의 shRNA가 PD-1을 표적으로 하고 제2 shRNA가 TIM-3을 표적으로 하거나, ii) 하나의 shRNA가 PD-1을 표적으로 하고 제2 shRNA가 TIGIT를 표적으로 하는, 벡터.
- [0115] 12. 실시양태 1에 있어서, 두 가지 유형의 shRNA 중에서, 하나의 shRNA를 코딩하는 염기 서열이 서열번호 2-219로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하고, 제2 shRNA를 코딩하는 염기 서열이 서열번호 2-219로 이루어진 군으로부터 선택된 상이한 서열을 포함하는, 벡터.
- [0116] 13. 실시양태 1에 있어서, CAR 또는 mTCR의 표적이 암 세포, 암 조직 및/또는 종양 미세환경에서 증가된 발현을 보이는 인간 종양 항원이거나, 암 세포, 암 조직 및/또는 종양 미세환경에서 발견되는 항원의 돌연변이된 형태인, 벡터.
- [0117] 14. 실시양태 1에 있어서, 벡터가 서열번호 220 또는 221의 염기 서열을 포함하는지 여부에 상관없는 것인, 벡터.
- [0118] 15. 실시양태 1에 있어서, 벡터가 플라스미드 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 벡터 또는 레트로바이러스 벡터인 것인, 벡터.
- [0119] 16. 실시양태 1에 따른 벡터를 포함하는 면역 세포로서, 하나 이상의 유전자의 발현이 shRNA의 부재 하에서 발

현의 것보다 40% 이하로 감소된, 면역 세포.

- [0120] 17. 실시양태 16에 있어서, 면역 세포가 인간-유래 T 세포 또는 자연살해 (NK) 세포인, 면역 세포.
- [0121] 18. 실시양태 1-17 중 어느 하나에 따른 면역 세포를 포함하는 약학 조성물.
- [0122] 19. 실시양태 18에 있어서, 면역 트레피(threapy)를 필요로 하는 환자의 치료를 위해, 면역 세포가 원래 환자로 부터 획득되는, 약학 조성물.
- [0123] 20. 실시양태 19에 있어서, 환자가 면역 세포에서 발현된 CAR 또는 mTCR의 표적 및/또는 표적 수준의 증가 또는 변경이 검출되는 종양 또는 암을 갖는, 약학 조성물.
- [0124] 21. 표적 항원에 특이적으로 결합하는 유전적으로 조작된 항원 수용체 및 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자의 면역 세포에서의 발현을 감소시키거나 감소시킬 수 있는 유전자 파괴제를 포함하는 면역 세포.
- [0125] 22. 실시양태 21에 있어서, 유전적으로 조작된 항원 수용체가 키메라 항원 수용체 (CAR) 또는 T 세포 수용체 (TCR)인, 면역 세포.
- [0126] 23. 실시양태 22에 있어서, 유전적으로 조작된 항원 수용체가 CAR인, 면역 세포.
- [0127] 24. 실시양태 23에 있어서, CAR이 세포 외 항원 인식 도메인, 막관통 도메인, 및 세포 내 신호 전달 도메인을 포함하는, 면역 세포.
- [0128] 25. 실시양태 24에 있어서, CAR의 세포 외 항원 인식 도메인이 표적 항원에 특이적으로 결합하는, 면역 세포.
- [0129] 26. 실시양태 24에 있어서, CAR의 세포 내 신호 전달 도메인이 CD3 제타 (CD3 ζ) 사슬의 세포 내 도메인을 포함하는, 면역 세포.
- [0130] 27. 실시양태 26에 있어서, CAR의 세포 내 신호 전달 도메인이 공동자극성 분자를 추가로 포함하는, 면역 세포.
- [0131] 28. 실시양태 27에 있어서, 공동자극성 분자가 ICOS, OX40, CD137 (4-1BB), CD27, 및 CD28로 이루어진 군으로부터 선택되는, 면역 세포.
- [0132] 29. 실시양태 28에 있어서, 공동자극성 분자가 CD137 (4-1BB)인, 면역 세포.
- [0133] 30. 실시양태 28에 있어서, 공동자극성 분자가 CD28인, 면역 세포.
- [0134] 31. 실시양태 22에 있어서, 유전적으로 조작된 항원 수용체가 TCR인, 면역 세포.
- [0135] 32. 실시양태 31에 있어서, TCR이 모노클로날 TCR (mTCR)인, 면역 세포.
- [0136] 33. 실시양태 31 또는 32에 있어서, 표적 항원이 암 세포, 암 조직 및/또는 종양 미세환경 내에서 또는 표면 상에서 발현되는, 면역 세포.
- [0137] 34. 실시양태 33에 있어서, 표적 항원이 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 면역 세포:
- [0138] 5T4 (영양막 당단백질), 707-AP, 9D7, AFP (α -태아단백질), A1bZIP (안드로젠-유도된 bZIP), HPG1 (인간 전립선 특이적 유전자-1), α 5 β 1-인테그린, α 5p6-인테그린, α -메틸아실-코엔자임 A 라세마제, ART-4 (ADP리보실트랜스퍼라제-4), B7H4 (v-세트 도메인-함유 T-세포 활성화 억제제 1), BAGE-1 (B 흑색종 항원-1), BCL-2 (B-세포 CLL/림프종-2), BING-4 (WD 반복 도메인 46), CA 15-3/CA 27-29 (뮤신 1), CA 19-9 (암 항원 19-9), CA 72-4 (암 항원 72-4), CA125 (암 항원 125), 칼레티쿨린, CAMEL (흑색종에서 CTL-인식된 항원), CASP-8 (카스파제 8), 카텝신 B, 카텝신 L, CD19 (분화클러스터 19), CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD4, CD52, CD55, CD56, CD80, CEA (암배아 항원 SG8), CLCA2 (클로라이드 채널 보조 2), CML28 (만성 골수성 백혈병 종양 항원 28), 코액토신-유사 단백질, 콜라겐 XXIII, COX-2 (사이클로옥시게나제-2), CT-9/BRD6 (암/고환 항원 9), Cten (c-말단 텐신-유사 단백질), 사이클린 B1, 사이클린 D1, cyp-B, CYPB1 (시토크롬 p450 패밀리 1 서브패밀리 b 멤버 1), DAM-10/MAGE-B1 (흑색종-연관 항원 B1), DAM-6/MAGE-B2, EGFR/Her1 (표피 성장 인자 수용체), EMMPRIN (바시긴), EpCam, EphA2 (EPH 수용체 A2), EphA3, ErbB3 (Erb-B2 수용체 티로신 키나아제 3), EZH2 (제스트 2 폴리콤 억제 복합체 2 서브유닛의 인핸서), FGF-5 (섬유아세포 성장 인자 5), FN (피브로넥틴), Fra-1 (Fos관련 항원-1), G250/CAIX (탄산 무수화효소 9), GAGE-1 (G 항원-1), GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7b, GAGE-8, GDEP (전립선에서 상이하게 발현된 유전자), GnT-V (글루코네이트 키나아제), gp100 (멜라노사이트 계통-특이적 항원 GP100), GPC3 (글리피칸3), HAGE (나선형 항원), HAST-2 (설폰트랜스퍼라제 패밀리 1A 멤버 1), 헵신, Her2/neu/ErbB2 (Erb-B2 수용체 티로신 키나아제 2), HERV-K-MEL, HNE (메들라신), 호메오박스

NKX 3.1, HOM-TES-14/SCP-1, HOM-TES-85, HPV-E6, HPV-E7, HST-2 (시르투인-2), hTERT, iCE (카스파제 1), IGF-1R (인슐린 유사 성장 인자-1 수용체), IL-13Ra2 (인터류킨-13 수용체 서브유닛 α 2), IL-2R (인터류킨-2 수용체), IL-5 (인터류킨-5), 미성숙 라미닌 수용체, 칼리크레인 2, 칼리크레인 4, Ki67, KIAA0205 (리소포스파티딜글리세롤 아실트랜스퍼라제 1), KK-LC-1 (키타큐슈 폐 암 항원-1), KM-HN-1, LAGE-1 (L 항원 패밀리 멤버-1), 리빈, MAGE-A1, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGEA2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A9, MAGE-B1, MAGE-B10, MAGE-B16, MAGEB17, MAGE-B2, MAGE-B3, MAGE-B4, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-D1, MAGE-D2, MAGE-D4, MAGE-E1, MAGE-E2, MAGE-F1, MAGE-H1, MAGEL2 (흑색종 항원 패밀리 L2), 맘마글로빈 A, MART-1/Melan-A (T-세포-1에 의해 인식된 흑색종 항원), MART-2, 매트릭스 단백질 22, MC1R (멜라노코르틴 1 수용체), M-CSF (대식세포 콜로니-자극 인자), 메소텔린, MG50/PXDN (퍼옥시다신), MMP 11 (매트릭스 메탈로프로테아제 11), MN/CA IX-항원 (탄산 무수화효소 9), MRP-3 (다중약물 내성-연관 단백질-3), MUC1 (뮤신 1), MUC2, NA88-A (VENT-유사 호메오박스 2 위유전자 1), N-아세틸글루코사-아미닐트랜스퍼라제-V, 네오-PAP (네오-폴리 (A) 폴리머라제), NGEF (전립선에서 발현된 새로운 유전자), NMP22 (핵 매트릭스 단백질 22), NPM/ALK (뉴클레오포스민), NSE (뉴런-특이적 에놀라아제), NY-ESO-1, NY-ESO-B, OA1 (골관절염 QTL 1), OFA-iLRP (종양태아성 항원 미성숙 라미닌 수용체 단백질), OGT (O-GlcNAc 트랜스퍼라제), OS-9 (소포체 렉틴), 오스테오칼신, 오스테오펀틴, p15 (CDK 억제제 2B), p53, PAGE-4 (P 항원 패밀리 멤버-4), PAI-1 (플라스미노겐 활성화제 억제제-1), PAI-2, PAP (전립선 산성 포스파타아제), PART-1 (전립선 안드로젠-제어된 전사물 1), PATE (전립선 및 고환 발현된 1), PDEF (전립선-유래 Ets 인자), Pim-1-키나아제 (프로바이러스성 통합 부위 1), Pin1 (펩티딜-프롤릴 시스-트랜스 아이소머라제 NIMA-상호작용 1), POTE (전립선, 난소, 고환 및 태반에서 발현됨), PRAME (흑색종에서 우선적으로 발현된 항원), 프로스테인, 프로테이나제-3, PSA (전립선-특이적 항원), PSCA (전립선 스템 세포 항원), PSGR (전립선-특이적 G-단백질 커플링된 수용체), PSM, PSMA (전립선 특이적 막 항원), RAGE-1 (신장 종양 암종 항원), RHAMM/CD168, RET1 (신장 산재 단백질 1), RET2, SAGE (육종 항원), SART-1 (T-세포-1에 의해 인식되는 편평 세포 암종 항원), SART-2, SART-3, Sp17 (정자 단백질 17), SSX-1 (SSX 패밀리 멤버 1), SSX-2/HOM-MEL-40, SSX-4, STAMP-1 (STEAP2 메탈로리덕테이즈), STEAP, 서바이빈, 서바이빈-213, TA-90 (종양 연관 항원-90), TAG-72 (종양 연관 당단백질-72), TARP (TCR γ 대안 리딩프레임 단백질), TGFb (형질전환 성장 인자 β), TGFbR11 (형질전환 성장 인자 β 수용체 11), TGM-4 (트랜스글루타미나제 4), TRAG-3 (텍솔 내성 연관 유전자 3), TRG (T-세포 수용체 γ 유전자좌), TRP-1 (일시적 수용체 전위-1), TRP-2/6b, TRP-2/INT2, Trp-p8, 티로시나제, E!PA(Ei-플라스미노겐 활성화제), VEGF (혈관 내피 성장 인자 A), VEGFR-2/FLK-1, 및 WT1 (빌름스 종양 1).

- [0139] 35. 실시양태 35에 있어서, 표적 항원이 CD19 또는 CD22인, 면역 세포.
- [0140] 36. 실시양태 36에 있어서, 표적 항원이 CD19인, 면역 세포.
- [0141] 37. 실시양태 34-36 중 어느 것에 있어서, 표적 항원이 암 세포, 암 조직 및/또는 종양 미세환경 내에서 또는 표면 상에서 발현이 증가된 암 항원인, 면역 세포.
- [0142] 38. 실시양태 33에 있어서, 표적 항원이 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되며:
- [0143] a-액티닌-4/m, ARTC1/m, bcr/abl, 베타-카테닌/m, BRCA1/m, BRCA2/m, CASP-5/m, CASP-8/m, CDC27/m, CDK4/m, CDKN2A/m, CML66, COA-1/m, DEK-CAN, EFTUD2/m, ELF2/m, ETV6-AML1, FN1/m, GPNMB/m, HLA-A*0201-R170I, HLA-A11/m, HLA-A2/m, HSP70-2M, KIAA0205/m, K-Ras/m, LDLR-FUT, MART2/m, ME1/m, MUM-1/m, MUM-2/m, MUM-3/m, 미오신 클래스 1/m, 네오-PAP/m, NFYC/m, N-Ras/m, OGT/m, OS-9/m, p53/m, Pml/RARa, PRDX5/m, PTPRX/m, RBAF600/m, SIRT2/m, SYTSSX-1, SYT-SSX-2, TEL-AML1, TGFbRII, 및 TPI/m;
- [0144] 여기서 표적 항원이 암 세포, 암 조직 및/또는 종양 미세환경 내에서 또는 표면 상에서 발현된 암 항원의 돌연변이된 형태인, 면역 세포.
- [0145] 39. 실시양태 21-38 중 어느 것에 있어서, 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자의 발현이 다음 중 하나 이상을 야기하는, 면역 세포:
 - [0146] i) 면역 세포의 증식 억제;
 - [0147] ii) 면역 세포의 세포 사멸 유도;
 - [0148] iii) 표적 항원을 인식하고/하거나 활성화시키는 면역 세포의 능력의 억제;
 - [0149] iv) 표적 항원에 대한 면역 반응을 유도하지 않는 세포로 면역 세포의 분화 유도;

- [0150] v) 면역 세포의 면역 반응을 촉진시키는 분자에 대한 면역 세포의 감소된 반응; 또는
- [0151] vi) 면역 세포의 면역 반응을 억압하는 분자에 대한 면역 세포의 증가된 반응.
- [0152] 40. 실시양태 39에 있어서, 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자가 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 면역 세포: PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (CEACAM-1, CEACAM-3 또는 CEACAM-5), LAG 3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, CD96, MerTK, 2B4, FAS, CD45, PP2A, SHP1, SHP2, DGK 알파, DGK 제타, Cbl-b, Cbl-c, CD148, LRR1, TGFBR1, IL10RA, KLGR1, DNMT3A, 및 A2aR.
- [0153] 41. 실시양태 39에 있어서, 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자가 면역 세포의 면역 반응을 억압하는 분자에 대한 면역 세포의 반응을 증가시키는, 면역 세포.
- [0154] 42. 실시양태 41에 있어서, 면역 세포의 면역 반응을 억압하는 분자에 대한 면역 세포의 반응을 증가시키는 유전자가 면역 체크포인트 수용체 또는 리간드를 코딩하는, 면역 세포.
- [0155] 43. 실시양태 42에 있어서, 면역 체크포인트 수용체 또는 리간드가 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 면역 세포: PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (CEACAM-1, CEACAM-3 또는 CEACAM-5), LAG 3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, CD96, MerTK, 및 2B4.
- [0156] 44. 실시양태 21-43 중 어느 것에 있어서, 유전자 파괴제가 유전자 파괴제의 부재 하의 면역 세포와 비교하여 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 95% 이상으로 면역 세포의 기능을 약화시키는 면역 세포에서의 유전자의 발현을 감소시키는, 면역 세포.
- [0157] 45. 실시양태 44에 있어서, 유전자 파괴제가 면역 세포의 면역 반응을 억압하는 분자에 대한 면역 세포의 반응을 증가시키는 유전자의 발현을 감소시키는, 면역 세포.
- [0158] 46. 실시양태 45에 있어서, 유전자 파괴제가 면역 체크포인트 수용체 또는 리간드를 코딩하는 유전자의 발현을 감소시키는, 면역 세포.
- [0159] 47. 실시양태 46에 있어서, 유전자 파괴제가 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 유전자의 발현을 감소시키는, 면역 세포: PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (CEACAM-1, CEACAM-3 또는 CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, CD96, MerTK, 및 2B4.
- [0160] 48. 실시양태 45-47 중 어느 것에 있어서, 유전자 파괴제가 RNA 간섭 (RNAi)에 의해 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자의 발현을 감소시키는, 면역 세포.
- [0161] 49. 실시양태 48에 있어서, 하나 초과 유전자 파괴제가 RNAi에 의해 면역 세포에서 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자의 발현을 감소시키는, 면역 세포.
- [0162] 50. 실시양태 49에 있어서, 유전자 파괴제가 면역 세포의 기능을 약화시키는 단일 유전자를 표적으로 하거나, 상이한 유전자 파괴제가 면역 세포의 기능을 약화시키는 상이한 유전자를 표적으로 하며, 예를 들어, 제1 유전자 파괴제가 제1 유전자를 표적으로 하고 제2 유전자 파괴제가 제2 유전자를 표적으로 하는, 면역 세포.
- [0163] 51. 실시양태 48-50 중 어느 것에 있어서, RNAi가 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)에 의해 매개되는, 면역 세포.
- [0164] 52. 실시양태 51에 있어서, RNAi가 하나 초과 shRNA에 의해 매개되는, 면역 세포.
- [0165] 53. 실시양태 52에 있어서, RNAi가 2 개의 shRNA에 의해 매개되는, 면역 세포.
- [0166] 54. 실시양태 52-53 중 어느 것에 있어서, 2 개의 shRNA가 PD-1을 표적으로 하는, 면역 세포.
- [0167] 55. 실시양태 52-53 중 어느 것에 있어서, 제1 shRNA가 PD-1을 표적으로 하고 제2 shRNA가 TIM-3을 표적으로 하는, 면역 세포.
- [0168] 56. 실시양태 52-53 중 어느 것에 있어서, 제1 shRNA가 PD-1을 표적으로 하고 제2 shRNA가 CTLA-4를 표적으로 하는, 면역 세포.
- [0169] 57. 실시양태 52-53 중 어느 것에 있어서, 제1 shRNA가 PD-1을 표적으로 하고 제2 shRNA가 LAG-3을 표적으로 하는, 면역 세포.
- [0170] 58. 실시양태 52-53 중 어느 것에 있어서, 제1 shRNA가 PD-1을 표적으로 하고 제2 shRNA가 TIGIT를 표적으로 하는, 면역 세포.

- [0171] 59. 실시양태 51-58 중 어느 것에 있어서, 면역 세포가 shRNA를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 면역 세포.
- [0172] 60. 실시양태 59에 있어서, 면역 세포가 하나 초과 shRNA를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 면역 세포.
- [0173] 61. 실시양태 59에 있어서, 면역 세포가 2 개의 shRNA를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 면역 세포.
- [0174] 62. 실시양태 59-61 중 어느 것에 있어서, shRNA(들)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 서열번호 2-219 및 238-267로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 면역 세포.
- [0175] 63. 실시양태 59-62 중 어느 것에 있어서, shRNA(들)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 벡터 상에 존재하는, 면역 세포.
- [0176] 64. 실시양태 63의 어느 것에 있어서, 상이한 shRNA의 발현이 상이한 프로모터에 의해 제어되는, 면역 세포.
- [0177] 65. 실시양태 64에 있어서, 2 개의 상이한 shRNA의 발현이 2 개의 상이한 프로모터에 의해 제어되는, 면역 세포.
- [0178] 66. 실시양태 65에 있어서, 2 개의 상이한 프로모터가 RNA 폴리머라제 III 프로모터인, 면역 세포.
- [0179] 67. 실시양태 66에 있어서, 2 개의 프로모터가 U6 프로모터인, 면역 세포.
- [0180] 68. 실시양태 67에 있어서, U6 프로모터가 상이한 종으로부터 유래된, 면역 세포.
- [0181] 69. 실시양태 65-68 중 어느 것에 있어서, 2 개의 프로모터가 서로 상이한 방향으로 배향된, 면역 세포.
- [0182] 70. 실시양태 21-69 중 어느 것에 있어서, 유전적으로 조작된 항원 수용체 및 유전자 파괴제(들)가 벡터로부터 각각 발현되는, 면역 세포.
- [0183] 71. 실시양태 70에 있어서, 유전적으로 조작된 항원 수용체 및 유전자 파괴제(들)가 동일한 벡터로부터 발현되는, 면역 세포.
- [0184] 72. 실시양태 70-71 중 어느 것에 있어서, 벡터가 플라스미드 벡터 또는 바이러스성 벡터인, 면역 세포.
- [0185] 73. 실시양태 72에 있어서, 바이러스성 벡터가 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 또는 아데노-연관 바이러스성 벡터인, 면역 세포.
- [0186] 74. 실시양태 73에 있어서, 렌티바이러스 벡터가 레트로바이러스 벡터인, 면역 세포.
- [0187] 75. 실시양태 21-74 중 어느 것에 있어서, 면역 세포가 T 세포 및 자연살해(NK) 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는, 면역 세포.
- [0188] 76. 실시양태 75에 있어서, 면역 세포가 T 세포인, 면역 세포.
- [0189] 77. 실시양태 76에 있어서, T 세포가 CD4⁺ T 세포 또는 CD8⁺ T 세포인, 면역 세포.
- [0190] 78. 실시양태 76 또는 77 중 어느 것에 있어서, 면역 세포가 동일한 벡터 상에서 2 개의 shRNA 및 CAR 또는 mTCR을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인, 면역 세포.
- [0191] 79. 실시양태 78에 있어서, 2 개의 shRNA가 서로 상이한 방향으로 배향된 2 개의 상이한 RNA 폴리머라제 III 프로모터에 의해 각각 제어되는, 면역 세포.
- [0192] 80. 실시양태 79에 있어서, CAR이 CD19를 표적으로 하고, 제1 shRNA가 PD-1을 표적으로 하고, 제2 shRNA가 TIGIT를 표적으로 하는, 면역 세포.
- [0193] 81. 다음을 동시에 또는 임의의 순서로 순차적으로 면역 세포 내로 도입함으로써:
- [0194] (1) 표적 항원에 특이적으로 결합하는 유전적으로 조작된 항원 수용체를 코딩하는 유전자; 및
- [0195] (2) 유전자 파괴제로서, 여기서 유전자 파괴제, 또는 이의 발현이 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자의 면역 세포에서의 발현을 감소시키거나 감소시킬 수 있는, 유전자 파괴제,
- [0196] 유전적으로 조작된 항원 수용체가 발현되고 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자의 발현이 감소된 면역 세포를 생산하는 단계를 포함하는 면역 세포의 생산 방법.

- [0197] 82. 실시양태 81에 있어서, 유전적으로 조작된 항원 수용체가 키메라 항원 수용체 (CAR) 또는 T 세포 수용체 (TCR)인 것인, 방법.
- [0198] 83. 실시양태 82에 있어서, 유전적으로 조작된 항원 수용체가 CAR인 것인, 방법.
- [0199] 84. 실시양태 83에 있어서, CAR이 세포 외 항원 인식 도메인, 막관통 도메인, 및 세포 내 신호 전달 도메인을 포함하는 것인, 방법.
- [0200] 85. 실시양태 84에 있어서, CAR의 세포 외 항원 인식 도메인이 표적 항원에 특이적으로 결합하는 것인, 방법.
- [0201] 86. 실시양태 84에 있어서, CAR의 세포 내 신호 전달 도메인이 CD3 제타 (CD3 ζ) 사슬의 세포 내 도메인을 포함하는 것인, 방법.
- [0202] 87. 실시양태 86에 있어서, CAR의 세포 내 신호 전달 도메인이 공동자극 분자를 추가로 포함하는 것인, 방법.
- [0203] 88. 실시양태 87에 있어서, 공동자극 분자가 ICOS, OX40, CD137 (4-1BB), CD27, 및 CD28로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.
- [0204] 89. 실시양태 88에 있어서, 공동자극 분자가 CD137 (4-1BB)인 것인, 방법.
- [0205] 90. 실시양태 88에 있어서, 공동자극 분자가 CD28인 것인, 방법.
- [0206] 91. 실시양태 82에 있어서, 유전적으로 조작된 항원 수용체가 TCR인 것인, 방법.
- [0207] 92. 실시양태 91에 있어서, TCR이 모노클로날 TCR (mTCR)인 것인, 방법.
- [0208] 93. 실시양태 81-92 중 어느 것에 있어서, 표적 항원이 암 세포, 암 조직 및/또는 종양 미세환경 내에서 또는 표면 상에서 발현되는 것인, 방법.
- [0209] 94. 실시양태 93에 있어서, 표적 항원이 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법:
- [0210] 5T4 (영양막 당단백질), 707-AP, 9D7, AFP (α -태아단백질), A1bZIP (안드로젠-유도된 bZIP), HPG1 (인간 전립선 특이적 유전자-1), α 5 β 1-인테그린, a5p6-인테그린, α -메틸아실-코엔자임 A 라세마제, ART-4 (ADP리보실트랜스퍼라제-4), B7H4 (v-세트 도메인-함유 T-세포 활성화 억제제 1), BAGE-1 (B 흑색종 항원-1), BCL-2 (B-세포 CLL/림프종-2), BING-4 (WD 반복 도메인 46), CA 15-3/CA 27-29 (뮤신 1), CA 19-9 (암 항원 19-9), CA 72-4 (암 항원 72-4), CA125 (암 항원 125), 칼레티쿨린, CAMEL (흑색종에서 CTL-인식된 항원), CASP-8 (카스파제 8), 카텝신 B, 카텝신 L, CD19 (분화클러스터 19), CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD4, CD52, CD55, CD56, CD80, CEA (암배아 항원 SG8), CLCA2 (클로라이드 채널 보조 2), CML28 (만성 골수성 백혈병 종양 항원 28), 코엑토신-유사 단백질, 콜라겐 XXIII, COX-2 (사이클로옥시게나제-2), CT-9/BRD6 (암/고환 항원 9), Cten (c-말단 텐신-유사 단백질), 사이클린 B1, 사이클린 D1, cyp-B, CYPB1 (시토크롬 p450 패밀리의 1 서브패밀리 b 멤버 1), DAM-10/MAGE-B1 (흑색종-연관 항원 B1), DAM-6/MAGE-B2, EGFR/Her1 (표피 성장 인자 수용체), EMMPRIN (바시긴), EpCam, EphA2 (EPH 수용체 A2), EphA3, ErbB3 (Erb-B2 수용체 티로신 키나아제 3), EZH2 (제스트 2 폴리콤 억제 복합체 2 서브유닛의 인핸서), FGF-5 (섬유아세포 성장 인자 5), FN (피브로넥틴), Fra-1 (Fos관련 항원-1), G250/CAIX (탄산 무수화효소 9), GAGE-1 (G 항원-1), GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7b, GAGE-8, GDEP (전립선에서 상이하게 발현된 유전자), GnT-V (글루코네이트 키나아제), gp100 (멜라노사이트 계통-특이적 항원 GP100), GPC3 (글리피칸3), HAGE (나선형 항원), HAST-2 (설포트랜스퍼라제 패밀리의 1A 멤버 1), 헵신, Her2/neu/ErbB2 (Erb-B2 수용체 티로신 키나아제 2), HERV-K-MEL, HNE (메둘라신), 호메오박스 NKX 3.1, HOM-TES-14/SCP-1, HOM-TES-85, HPV-E6, HPV-E7, HST-2 (시르투인-2), hTERT, iCE (카스파제 1), IGF-1R (인슐린 유사 성장 인자-1 수용체), IL-13Ra2 (인터류킨-13 수용체 서브유닛 α 2), IL-2R (인터류킨-2 수용체), IL-5 (인터류킨-5), 미성숙 라미닌 수용체, 칼리크레인 2, 칼리크레인 4, Ki67, KIAA0205 (리소포스파티딜글리세롤 아실트랜스퍼라제 1), KK-LC-1 (키타큐슈 폐 암 항원-1), KM-HN-1, LAGE-1 (L 항원 패밀리의 멤버-1), 리빈, MAGE-A1, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGEA2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A9, MAGE-B1, MAGE-B10, MAGE-B16, MAGEB17, MAGE-B2, MAGE-B3, MAGE-B4, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-D1, MAGE-D2, MAGE-D4, MAGE-E1, MAGE-E2, MAGE-F1, MAGE-H1, MAGEL2 (흑색종 항원 패밀리의 L2), 맘마글로빈 A, MART-1/Melan-A (T-세포-1에 의해 인식된 흑색종 항원), MART-2, 매트릭스 단백질 22, MC1R (멜라노코르틴 1 수용체), M-CSF (대식세포 콜로니-자극 인자), 메소텔린, MG50/PXDN (퍼옥시다신), MMP 11 (매트릭스 메탈로프로테아제 11), MN/CA IX-항원 (탄산 무수화효소 9), MRP-3 (다중약물 내성-연관 단백질-3), MUC1 (뮤신 1), MUC2, NA88-A (VENT-유사 호메오박스 2 위유전자 1), N-아세틸글루코스-아미닐트랜스퍼라제-V, 네오-PAP (네오-

폴리 (A) 폴리머라제), NGEF (전립선에서 발현된 새로운 유전자), NMP22 (핵 매트릭스 단백질 22), NPM/ALK (뉴클레오포스민), NSE (뉴런-특이적 에놀라아제), NY-ESO-1, NY-ESO-B, OA1 (골관절염 QTL 1), OFA-iLRP (종양태아성 항원 미성숙 라미닌 수용체 단백질), OGT (O-GlcNAc 트랜스퍼라제), OS-9 (소포체 렉틴), 오스테오칼신, 오스테오폰틴, p15 (CDK 억제제 2B), p53, PAGE-4 (P 항원 패밀리 멤버-4), PAI-1 (플라스미노겐 활성화제 억제제-1), PAI-2, PAP (전립선 산성 포스포타아제), PART-1 (전립선 안드로젠-제어된 전사물 1), PATE (전립선 및 고환 발현된 1), PDEF (전립선-유래 Ets 인자), Pim-1-키나아제 (프로바이러스성 통합 부위 1), Pin1 (펩티딜-프롤릴 시스-트랜스 아이소머라제 NIMA-상호작용 1), POTE (전립선, 난소, 고환 및 태반에서 발현됨), PRAME (흑색종에서 우선적으로 발현된 항원), 프로스테인, 프로테이나제-3, PSA (전립선-특이적 항원), PSCA (전립선 스템 세포 항원), PSGR (전립선-특이적 G-단백질 커플링된 수용체), PSM, PSMA (전립선 특이적 막 항원), RAGE-1 (신장 종양 암종 항원), RHAMM/CD168, RU1 (신장 산재 단백질 1), RU2, SAGE (육종 항원), SART-1(T-세포-1에 의해 인식되는 편평 세포 암종 항원), SART-2, SART-3, Sp17 (정자 단백질 17), SSX-1 (SSX 패밀리 멤버 1), SSX-2/HOM-MEL-40, SSX-4, STAMP-1 (STEAP2 메탈로리덕테이즈), STEAP, 서바이빈, 서바이빈-213, TA-90 (종양 연관 항원-90), TAG-72 (종양 연관 당단백질-72), TARP (TCR γ 대안 리딩프레임 단백질), TGFb (형질전환 성장 인자 β), TGFbR11 (형질전환 성장 인자 β 수용체 11), TGM-4 (트랜스글루타미나제 4), TRAG-3 (텍슬 내성 연관 유전자 3), TRG (T-세포 수용체 γ 유전자좌), TRP-1 (일시적 수용체 전위-1), TRP-2/6b, TRP-2/INT2, Trp-p8, 티로시나제, UPA (U-플라스미노겐 활성화제), VEGF (혈관 내피 성장 인자 A), VEGFR-2/FLK-1, 및 WT1 (빌름스 종양 1).

- [0211] 95. 실시양태 95에 있어서, 표적 항원이 CD19 또는 CD22인 것인, 방법.
- [0212] 96. 실시양태 96, 표적 항원이 CD19인 것인, 방법.
- [0213] 97. 실시양태 94-96 중 어느 것에 있어서, 표적 항원이 암 항원이며, 암 항원이 암 세포, 암 조직 및/또는 종양 미세환경 내에서 또는 표면 상에서 발현이 증가된 항원인 것인, 방법.
- [0214] 98. 실시양태 93에 있어서, 표적 항원이 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되며:
- [0215] a-액티닌-4/m, ARTC1/m, bcr/abl, 베타-카테닌/m, BRCA1/m, BRCA2/m, CASP-5/m, CASP-8/m, CDC27/m, CDK4/m, CDKN2A/m, CML66, COA-1/m, DEK-CAN, EFTUD2/m, ELF2/m, ETV6-AML1, FN1/m, GPNMB/m, HLA-A*0201-R170I, HLA-A11/m, HLA-A2/m, HSP70-2M, KIAA0205/m, K-Ras/m, LDLR-FUT, MART2/m, ME1/m, MUM-1/m, MUM-2/m, MUM-3/m, 미오신 클래스 1/m, 네오-PAP/m, NFYC/m, N-Ras/m, OGT/m, OS-9/m, p53/m, Pml/RARa, PRDX5/m, PTPRX/m, RBAF600/m, SIRT2/m, SYTSSX-1, SYT-SSX-2, TEL-AML1, TGFbRII, 및 TPI/m;
- [0216] 여기서 표적 항원이 암 항원이며, 암 항원이 암 세포, 암 조직 및/또는 종양 미세환경 내에서 또는 표면 상에서 발현된 항원의 돌연변이된 형태인 것인, 방법.
- [0217] 99. 실시양태 81-98 중 어느 것에 있어서, 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자의 발현이 다음 중 하나 이상을 야기하는 것인, 방법:
- [0218] i) 면역 세포의 증식 억제;
- [0219] ii) 면역 세포의 세포 사멸 유도;
- [0220] iii) 표적 항원을 인식하고/하거나 활성화시키는 면역 세포의 능력의 억제;
- [0221] iv) 표적 항원에 대한 면역 반응을 유도하지 않는 세포로 면역 세포의 분화 유도;
- [0222] v) 면역 세포의 면역 반응을 촉진시키는 분자에 대한 면역 세포의 감소된 반응; 또는
- [0223] vi) 면역 세포의 면역 반응을 억압하는 분자에 대한 면역 세포의 증가된 반응.
- [0224] 100. 실시양태 99에 있어서, 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자가 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법: PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (CEACAM-1, CEACAM-3 또는 CEACAM-5), LAG 3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, CD96, MerTK, 2B4, FAS, CD45, PP2A, SHP1, SHP2, DGK 알파, DGK 제타, Cbl-b, Cbl-c, CD148, LRR1, TGFBR1, IL10RA, KLGR1, DNMT3A, 및 A2aR.
- [0225] 101. 실시양태 99에 있어서, 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자가 면역 세포의 면역 반응을 억압하는 분자에 대한 면역 세포의 반응을 증가시키는 것인, 방법.
- [0226] 102. 실시양태 101에 있어서, 면역 세포의 면역 반응을 억압하는 분자에 대한 면역 세포의 반응을 증가시키는

유전자가 면역 체크포인트 수용체 또는 리간드를 코딩하는 것인, 방법.

- [0227] 103. 실시양태 102에 있어서, 면역 체크포인트 수용체 또는 리간드가 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법: PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (CEACAM-1, CEACAM-3 또는 CEACAM-5), LAG 3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, CD96, MerTK, 및 2B4.
- [0228] 104. 실시양태 81-103 중 어느 것에 있어서, 유전자 파괴제가 유전자 파괴제(들)의 부재 하에서의 면역 세포와 비교하여 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 95% 이상으로 면역 세포의 기능을 약화시키는 면역 세포에서의 유전자의 발현을 감소시키는 것인, 방법.
- [0229] 105. 실시양태 104에 있어서, 유전자 파괴제가 면역 세포의 면역 반응을 억압하는 분자에 대한 면역 세포의 반응을 증가시키는 유전자의 발현을 감소시키는 것인, 방법.
- [0230] 106. 실시양태 105에 있어서, 유전자 파괴제가 면역 체크포인트 수용체 또는 리간드를 코딩하는 유전자의 발현을 감소시키는 것인, 방법.
- [0231] 107. 실시양태 106에 있어서, 유전자 파괴제가 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 유전자의 발현을 감소시키는 것인, 방법: PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (CEACAM-1, CEACAM-3 또는 CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, CD96, MerTK, 및 2B4.
- [0232] 108. 실시양태 105-107 중 어느 것에 있어서, 유전자 파괴제가 RNA 간섭 (RNAi)에 의해 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자의 발현을 감소시키는 것인, 방법.
- [0233] 109. 실시양태 108에 있어서, 하나 초과 유전자 파괴제가 RNAi에 의해 면역 세포에서 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자의 발현을 감소시키는 것인, 방법.
- [0234] 110. 실시양태 109에 있어서, 유전자 파괴제가 면역 세포의 기능을 약화시키는 단일 유전자를 표적으로 하거나, 면역 세포의 기능을 약화시키는 상이한 유전자를 표적으로 하며, 여기서 제1 유전자 파괴제가 제1 유전자를 표적으로 하고 제2 유전자 파괴제가 제2 유전자를 표적으로 하거나, 이들의 임의의 조합을 표적으로 하는 것인, 방법.
- [0235] 111. 실시양태 108-110 중 어느 것에 있어서, RNAi가 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)에 의해 매개되는 것인, 방법.
- [0236] 112. 실시양태 111에 있어서, RNAi가 하나 초과 shRNA에 의해 매개되는 것인, 방법.
- [0237] 113. 실시양태 112에 있어서, RNAi가 2 개의 shRNA에 의해 매개되는 것인, 방법.
- [0238] 114. 실시양태 112 또는 113에 있어서, 2 개의 shRNA가 PD-1을 표적으로 하는 것인, 방법.
- [0239] 115. 실시양태 112 또는 113에 있어서, 제1 shRNA가 PD-1을 표적으로 하고 제2 shRNA가 TIM-3을 표적으로 하는 것인, 방법.
- [0240] 116. 실시양태 112 또는 113에 있어서, 제1 shRNA가 PD-1을 표적으로 하고 제2 shRNA가 CTLA-4를 표적으로 하는 것인, 방법.
- [0241] 117. 실시양태 112 또는 113에 있어서, 제1 shRNA가 PD-1을 표적으로 하고 제2 shRNA가 LAG-3을 표적으로 하는 것인, 방법.
- [0242] 118. 실시양태 112 또는 113에 있어서, 제1 shRNA가 PD-1을 표적으로 하고 제2 shRNA가 TIGIT를 표적으로 하는 것인, 방법.
- [0243] 119. 실시양태 111-118 중 어느 것에 있어서, 면역 세포가 shRNA를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인, 방법.
- [0244] 120. 실시양태 119에 있어서, 면역 세포가 하나 초과 shRNA를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인, 방법.
- [0245] 121. 실시양태 119에 있어서, 면역 세포가 2 개의 shRNA를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인, 방법.
- [0246] 122. 실시양태 119-121 중 어느 것에 있어서, shRNA(들)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 서열번호 2-219 및 238-267로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 것인, 방법.
- [0247] 123. 실시양태 119-122 중 어느 것에 있어서, shRNA를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 벡터 상에 존재하는 것인,

방법.

- [0248] 124. 실시양태 123에 있어서, 상이한 shRNA의 발현이 상이한 프로모터에 의해 각각 제어되는 것인, 방법.
- [0249] 125. 실시양태 124에 있어서, 2 개의 상이한 shRNA의 발현이 2 개의 상이한 프로모터에 의해 각각 제어되는 것인, 방법.
- [0250] 126. 실시양태 125에 있어서, 2 개의 상이한 프로모터가 RNA 폴리머라제 III 프로모터인 것인, 방법.
- [0251] 127. 실시양태 126에 있어서, 2 개의 프로모터가 U6 프로모터인 것인, 방법.
- [0252] 128. 실시양태 127에 있어서, U6 프로모터가 상이한 종으로부터 유래되는 것인, 방법.
- [0253] 129. 실시양태 125-128 중 어느 것에 있어서, 2 개의 프로모터가 서로 상이한 방향으로 배향되는 것인, 방법.
- [0254] 130. 실시양태 81-129 중 어느 것에 있어서, 유전적으로 조작된 항원 수용체 및 유전자 파괴제(들)가 벡터로부터 각각 발현되는 것인, 방법.
- [0255] 131. 실시양태 130에 있어서, 유전적으로 조작된 항원 수용체 및 유전자 파괴제(들)가 동일한 벡터로부터 발현되는 것인, 방법.
- [0256] 132. 실시양태 130-131 중 어느 것에 있어서, 벡터가 플라스미드 벡터 또는 바이러스성 벡터인 것인, 방법.
- [0257] 133. 실시양태 132에 있어서, 바이러스성 벡터가 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 오프(off) 아데노-연관 바이러스성 벡터인 것인, 방법.
- [0258] 134. 실시양태 133에 있어서, 렌티바이러스 벡터가 레트로바이러스 벡터인 것인, 방법.
- [0259] 135. 실시양태 81-134 중 어느 것에 있어서, 면역 세포가 T 세포 및 자연살해(NK) 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.
- [0260] 136. 실시양태 135에 있어서, 면역 세포가 T 세포인 것인, 방법.
- [0261] 137. 실시양태 136에 있어서, T 세포가 CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포인 것인, 방법.
- [0262] 138. 실시양태 136 또는 137에 있어서, 면역 세포가 동일한 벡터 상에서 2 개의 shRNA 및 CAR을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인, 방법.
- [0263] 139. 실시양태 138에 있어서, 2 개의 shRNA가 서로 상이한 방향으로 배향된 2 개의 상이한 RNA 폴리머라제 III 프로모터에 의해 각각 제어되는 것인, 방법.
- [0264] 140. 실시양태 139에 있어서, CAR이 CD19를 표적으로 하고, 제1 shRNA가 PD-1을 표적으로 하고, 제2 shRNA가 TIGIT를 표적으로 하는 것인, 방법.
- [0265] 141. 실시양태 21-80 중 어느 것의 면역 세포를 포함하는 조성물.
- [0266] 142. 실시양태 21-80 중 어느 것의 면역 세포 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물.
- [0267] 143. 실시양태 21-80 중 어느 것의 면역 세포 또는 실시양태 141 또는 142의 조성물을 면역 요법을 필요로 하는 질환 또는 병태를 갖는 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 치료 방법.
- [0268] 144. 실시양태 143에 있어서, 유전적으로 조작된 항원 수용체가 질환 또는 병태와 연관된 항원에 특이적으로 결합하는 것인, 방법.
- [0269] 145. 실시양태 143 또는 144에 있어서, 질환 또는 병태가 암, 예컨대, 종양인 것인, 방법.
- [0270] 146. 질환 또는 병태를 치료하는데 사용하기 위한 실시양태 21-80 중 어느 것의 면역 세포 또는 실시양태 141-142의 조성물.
- [0271] 147. 질환 또는 병태를 치료하기 위한 의학의 제조에서 실시양태 21-80 중 어느 것의 면역 세포 또는 실시양태 121-122의 조성물의 용도.
- [0272] 148. 실시양태 146 또는 실시양태 147에 있어서, 유전적으로 조작된 항원 수용체가 질환 또는 병태와 연관된 항원에 특이적으로 결합하는, 실시양태 146의 면역 세포 또는 조성물 또는 실시양태 147의 용도.
- [0273] 149. 실시양태 147 또는 실시양태 148에 있어서, 질환 또는 병태가 암, 예컨대, 종양인, 실시양태 147 또는 실

시양태 148의 용도, 조성물 또는 면역 세포.

도면의 간단한 설명

[0274]

도 1a-1f. 세포 내재성 PD-1 차단 CAR-T 세포의 생성. (도 1a) 투인원(two-in-one) CAR 벡터의 도식 표현. (도 1b-c) LNGFR 및 CAR 발현은 형질도입 후 4 일에 분석되었다. (도 1d) CAR-T 세포를 LNGFR 자성 비드를 사용하여 분류하고 2×10^5 /ml로 시딩하였다. 트리판 블루 염색에 의해 누적 CAR T 세포 계수를 평가하였다. (도 1e) LNGFR+ CAR T 세포를 외인성 사이토카인없이 γ -조사된 NALM-6과 혼합하였다. (도 1f) 대조군 CAR-T 세포에 비해 세포 내재성 PD-1 차단 (shPD-1 #1) CAR-T 세포의 분화 상태 및 CD4/CD8 구성을 결정하였다.

도 2. 세포 내재성 PD-1 차단에 대한 Pol III 프로모터 유형의 효과.

도 3a-3c. PD-1 차단과 함께 CD19 및 PD-L1 자극 하의 생체 외 세포독성 및 증식. (도 3a) LNGFR+ CAR T 세포는 1:1, 0.3:1, 0.1:1의 E:T 비(ratio)로 생존 NALM-6 또는 NALM-6-PDL1과 혼합된다. (도 3b) LNGFR+ CAR T 세포를 외인성 사이토카인없이 1:1의 E:T 비로 γ -조사된 NALM-6-PDL1, NALM-6-PDL1-CD80 또는 K562-CD19-PDL1과 혼합하였다. (도 3c) NALM-6 세포에 비해 K562-CD19 세포에서 대표적인 공동자극성 신호인 CD80의 발현이 결정되었다.

도 4. 세포-내재성 PD-1 차단과 함께 생체 내 CAR-T 세포의 항-종양 기능.

도 5a. CAR-T 세포의 세포-내재성 PD-1 파괴에서 감소된 생체 내 사이토카인 생산. 도 5b는 세포-내재성 PD-1 파괴와 함께 CAR-T 세포의 지연된 생체 내 확장을 나타낸다.

도 6a-6b. 세포-내재성 PD-1 파괴에서 CD28/CD3C 또는 4-1BB/CD3C CAR-T 세포의 기능. (도 6a) G28z, GBBz, P28z 및 PBBz 벡터의 도식 표현. (도 6b) 형질도입 후 4 일에 형질도입된 T 세포의 LNGFR 발현을 보여주는 유세포 분석.

도 7a-7b. CD28 또는 4-1BB로 공동자극할 때 PD-1 발현 수준. (도 7a) LNGFR+ CAR T 세포를 외인성 사이토카인없이 γ -조사된 NALM-6 또는 K562-CD19와 함께 항온처리하였다. 항온처리 후 3 일에 LNGFR+ CAR T 세포의 PD-1 발현을 분석하였다. (도 7b) PD-1 프라이머로 수행된 정량적 실시간 PCR 결과.

도 8a-8b. NFAT 또는 NF- κ B 리포터 시스템 확립. (도 8a) NFAT-RE 3x-eGFP 및 NF- κ B-RE 5x-eGFR 리포터 벡터의 도식 표현. (도 8b) LNGFR+ CAR T 세포의 eGFP gMFI를 사용하여 계산된 리포터 활성의 배수 변화.

도 9a-9b. NFAT 시그널링(signaling)은 CD28 공동자극에서는 활성화되었지만 4-1BB 공동자극에서는 활성화되지 않았다. (도 9a) 리포터 형질도입된 T 세포는 G28z 또는 GBBz를 사용하여 재-자극 및 형질도입되었다. (도 9b) CAR T 세포에서 NFAT 표적 유전자의 mRNA 수준을 qPCR에 의해 평가하였다.

도 10. CD28 및 4-1BB 공동자극 모두에서 활성화된 NF- κ B 시그널링.

도 11a-11c. G28z CART의 TGF- β 시그널링 강도는 BBz CART보다 약간 더 높다. (도 11a) CAR-T 세포에서 인산화된 SMAD2/3를 4 hr 또는 24 hr 동안 1:1의 비의 E:T 세포로 NALM-6과 함께 항온처리한 다음 세포 내 유세포 측정법에 의해 분석하였다. (도 11b) 10 ng/ml의 재조합 인간 TGF- β 1을 갖는 G28z 및 GBBz CAR T 세포에서 PD-1 발현을 나타내는 유세포 분석. (도 11c) CAR T 세포에서 TGF- β 1, TGFBR1 및 TGFBR2의 mRNA 수준은 qPCR에 의해 평가되었다.

도 12a-12b. 반복 CD19 및 PD-L1 자극 하에서 PBBz CAR T 세포의 생체 외 세포독성 및 증식 성능을 보유했다. (도 12a) 세포 독성. 상단, LNGFR 자성 분류 후, 12 일 1 차 LNGFR+ CAR T 세포를 1:1, 0.3:1, 0.1:1의 E:T 비로 NALM-6-PDL1과 혼합하였다. 하단, LNGFR+ CAR T 세포를 1:1의 E:T 비로 γ -조사된 K562-CD19-PDL1로 자극하였다. (도 12b) 외인성 사이토카인없이 1:1의 E:T 비로 γ -조사된 NALM-6-PDL1-CD80 또는 K562-CD19-PDL1과 혼합하여 LNGFR + CAR T 세포를 반복적으로 자극 하였다.

도 13a-13c. PBBz CAR T 세포에서 TGF-베타 매개 기능이상(dysfunction)에 덜 민감하고, 생체 외 CAR-유래 조절성(regulatory) T 세포에서 저 생성된다. (도 13a) CAR-T 증식의 TGF-베타 매개 억압. (도 13b) Treg 유도에 대한 TGF-베타 민감도. (도 13c) Treg 유도에 대한 PDL1/PD-1의 효과.

도 14. PBBz CAR T 세포에 의한 백혈병 진행의 지속적인 억제.

도 15. 하나는 PD-1의 발현을 억제하고 제2의 것은 TIM-3의 발현을 억제하는 shRNA의 두 가지 유형 및 CD19 CAR

발현 카세트를 코딩하는 벡터의 두 가지 유형의 구성의 다이어그램.

도 16. ALNGFR-CART19/mU6-shTIM-3→←shPD-1-hU6 세포 및 ALNGFR-CART19/shTIM-3-mU6←→hU6-shPD-1 세포가 본원에 기재된 바와 같이 제조되고 단리된, CAR-T 세포 제조 공정의 다이어그램.

도 17. 도 15에 예시된 벡터를 포함하는 CAR-T 세포로부터의 유세포 측정법 데이터 (ALNGFR-CART19/mU6-shTIM-3→←shPD-1-hU6 세포 및 ALNGFR-CART19/shTIM-3-mU6←→hU6-shPD-1 세포).

도 18a-18b. 도 18a. 실시예 8의 방법을 사용하여 생산된 ALNGFR-CART19/mU6-shTIM-3→←shPD-1-hU6 세포 및 ALNGFR-CART19/shTIM-3-mU6←→hU6-shPD-1 세포에 대한 유세포 측정법 데이터. 도 18b. CAR-T 세포에서 PD-1 및 TIM-3의 발현.

도 19. CAR-T 세포가 표적 세포를 사용하여 반복적으로 자극된 유세포 측정법 데이터 후, CD45RA 및 CCR7 항체를 사용하여 세포 분화 정도를 확인하였다.

도 20a-20c. 실시예 8의 방법을 사용하여 생산된 CAR-T 세포의 평가. 도 20a: 형질도입 효율. 도 20b: 증식 능력. 도 20c: 생존율.

도 21a-21c. CTLA-4, LAG-3, TIGIT 및 TIM-3 표적화 shRNA의 선택. 도 21a: 2 일자 CD3/CD28 자극된 T 세포는 21-mer siRNA를 표적으로 하는 CTLA-4, LAG-3, TIGIT 및 TIM-3과 함께 전기천공된다. siRNA-매개 녹다운 효율은 형질주입 후 2 일에 확인되었다. 음영: 선택된 siRNA의 서열에 기초하여, CAR 및 shRNA를 발현하는 투인원 벡터를 구축하였다. 음영은 처음 선택된 siRNA를 나타낸다. 도 21b: T 세포를 CTLA-4, LAG-3, TIGIT 또는 TIM-3 shRNA를 함유하는 투인원 벡터로 형질도입하고 LNGFR 자성 비드로 분류하였다. LNGFR+ CAR T 세포 계수는 2×10^5 /ml로 시딩한 후 3 일마다 측정되었다. 도 21c: Tim3 발현(%).

도 22a-22e. 이원(dual) 면역 체크포인트-파괴된 CAR T 세포의 생성. (도 22a) 이원 투인원 벡터의 도식 표현. 도 22b: 이원 투인원 형질도입 후 4 일에 LNGFR+ T 세포%를 분석하였다. (도 22c) 이원 KD (녹다운) CAR-T 세포를 분류하고 2×10^5 /ml로 시딩하였다. 트리판 블루 염색에 의해 누적 CAR T 세포 계수를 측정하였다. (도 22d-22e) LNGFR+ CAR T 세포의 LAG-4, PD-1, TIGIT 또는 TIM-3 발현을 γ-조사된 NALM-6 또는 K562-CD19 공동배양 후 3 일에 분석하였다. CTLA-4 발현을 세포 내 유세포 측정법에 의해 분석하였다.

도 23. 2 개의 면역 체크포인트를 표적으로 하는 이원 KD CAR-T 세포를 이용한 생체 내 CD19+ 혈액 암의 치료.

도 24. PD-1 및 TIGIT을 표적으로 하는 이원 KD CAR-T 세포를 이용한 고형 종양 모델에서의 암 치료.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0275] 본 개시내용의 특징은 첨부된 청구 범위에 구체적으로 제시된다. 본 개시내용의 특징 및 이점에 대한 더 나은 이해는 개시내용의 원리가 이용되는 예시적인 실시양태를 제시하는 다음의 상세한 설명을 참고하여 달성될 것이다. 본원에 제시된 개시내용의 완전한 이해를 용이하게하기 위해, 다수의 용어가 하기에 정의된다.

[0276] 간략히 말해서, 일 양태에서, 본원은 다음을 포함하는 벡터를 개시한다: 면역 체크포인트 수용체 및 리간드를 포함하여, 면역 세포의 기능을 약화시키는 하나 이상의 유전자의 발현을 억제하는 두 가지 유형의 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)를 코딩하는 염기 서열, 및 항원 수용체, 예컨대, 키메라 항원 수용체 (CAR) 또는 T 세포 수용체 (TCR), 예를 들어, 모노클로날 T 세포 수용체 (mTCR)를 코딩하는 염기 서열; 표적 항원에 특이적으로 결합하는 유전적으로 조작된 항원 수용체 및 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자 또는 유전자들의 면역 세포에서의 발현을 감소시키거나 감소시킬 수 있는 하나 이상의 유전자 파괴제를 포함하는 면역 세포; 면역 세포의 생산 방법; 예컨대, 인간 환자의 면역 요법을 위한 면역 세포를 포함하는 조성물 또는 약학 조성물; 및 면역 세포를 질환 또는 병태를 갖는 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 치료 방법.

[0277] 면역 세포, 조성물 또는 약학 조성물은 하나 이상의 유전자 파괴제를 포함하기 때문에, 예컨대, 면역 세포의 기능을 약화시키기 위해 암 세포에 의해 활성화될 수 있는 2 개의 면역 체크포인트 분자 유전자의 발현을 감소시키는 2 개의 shRNA를 코딩하기 때문에, 이러한 유전자에 대한 별도의 억제제를 사용함으로써 발생할 수 있는 중증 및 전신적인 이상 반응, 예컨대, 사이토카인 방출 증후군 또는 자가면역 증상의 제거가 가능하며, 뿐만 아니라 고가의 병행 요법으로 인해 증가된 치료 비용으로 인한 부담을 줄이는 동시에 단 하나의 shRNA만 발현되는 경우보다 세포 요법을 더 효과적으로 제공한다.

[0278] 1. 일반적인 기술

[0279] 본원에 기재되거나 참조된 기술 및 절차는, 예를 들어, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (4th ed. 2012); Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.* eds., 2003); Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic (An ed. 2009); Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols (Albitar ed. 2010); and Antibody Engineering Vols 1 and 2 (Kontermann and Diibel eds., 2nd ed. 2010). Molecular Biology of the Cell (6th Ed., 2014)에 기재된 널리 이용되는 방법론과 같이 당업자에 의해 통상적인 방법론을 사용하여 일반적으로 잘 이해되고/되거나 흔히 이용되는 것을 포함한다.

[0280] 2. 정의

[0281] 달리 기재되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업자가 흔히 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서를 해석하기 위해, 다음의 용어 설명이 적용될 것이며, 적절한 경우, 단수형으로 사용된 용어는 복수를 또한 포함할 것이며 그 반대도 마찬가지이다. 모든 특허, 출원, 공개된 출원 및 기타 공개물은 그 전문이 참고로 인용된다. 제시된 용어의 임의의 설명이 본원에 참고로 인용된 임의의 문서와 상충되는 경우, 하기에 제시된 용어의 설명이 우선한다.

[0282] 본 개시내용에서 사용된 용어는 단지 특이적 실시양태를 설명하기 위해 사용된 것이며, 본 발명의 범위를 제한하려는 의도가 아니다. 단수형 표현은 문맥 상 명백하게 달리 표시하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 발명은 본원에 기재된 특정 방법론, 프로토콜 및 시약 등에 제한되지 않으며, 이에 따라 다양할 수 있음을 이해해야 한다. 본원에 사용된 용어법은 단지 특정 실시양태를 기재하기 위해 사용된 것이고, 본 발명의 범위를 제한하려는 의도가 아니며, 이는 청구 범위에 의해서만 정의된다.

[0283] 본원에 사용된 관사 "a", "an," 및 "the"는 문서의 문법적 대상 중 하나 이상 (즉, 하나 이상)을 지칭하기 위해 사용된다. 예로서, "요소"는 하나의 요소 또는 하나 초과 요소의 요소를 의미한다.

[0284] 대안 (예컨대, "또는")의 사용은 대안의 하나, 둘 다 또는 이들의 임의의 조합을 의미하는 것으로 이해되어야 한다.

[0285] 용어 "및/또는"은 대안 중 하나 또는 둘 다를 의미하는 것으로 이해되어야 한다.

[0286] 본원에 사용된 용어 "약" 또는 "대략"은 기준 수량, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 무게 또는 길이와 비교하여 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 또는 1% 만큼 변하는 수량, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이를 지칭한다. 일 실시양태에서, 용어 "약" 또는 "대략"은 기준 수량, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 무게 또는 길이에 대해 수량, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 무게 또는 길이 $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 9\%$, $\pm 8\%$, $\pm 7\%$, $\pm 6\%$, $\pm 5\%$, $\pm 4\%$, $\pm 3\%$, $\pm 2\%$, 또는 $\pm 1\%$ 의 범위를 지칭한다.

[0287] 본 명세서 전체에 걸쳐 "일 실시양태", "실시양태", "특정 실시양태", "관련 실시양태", "특정 실시양태", "추가적인 실시양태" 또는 "추가 실시양태" 또는 이들의 조합 등에 대한 언급은 실시양태와 관련하여 기재된 특정 특징, 구조 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 실시양태에 포함된다는 것을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체의 다양한 곳에서 전술한 문구의 출현이 반드시 모두 동일한 실시양태를 언급하는 것은 아니다. 또한, 특정 특징, 구조 또는 특성은 하나 이상의 실시양태에서 임의의 적절한 방식으로 결합될 수 있다.

[0288] "작제물"은 생체 외 또는 생체 내에서 표적 세포로 전달될 폴리뉴클레오티드를 포함하는 거대분자 또는 분자의 복합체를 지칭한다. 본원에 사용된 "벡터"는 외부 유전자 물질의 표적 세포로의 전달 또는 전이를 지시할 수 있는 임의의 핵산 작제물을 지칭하며, 여기서 복제 및/또는 발현될 수 있다. 본원에 사용된 용어 "벡터"는 전달될 작제물을 포함한다. 벡터는 선형 또는 원형 분자일 수 있다. 벡터는 통합 또는 비-통합일 수 있다. 주요 유형의 벡터는 플라스미드, 에피솜 벡터, 바이러스성 벡터, 코스미드 및 인공 염색체를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 바이러스성 벡터는 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 및 센다이 바이러스 벡터 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0289] 본원에 기재된 "투인원 벡터"는 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자 또는 유전자들의 발현을 억제하는 하나 이상의 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)를 코딩하는 염기 서열 및 키메라 항원 수용체 (CAR) 또는 T 세포 수용체, 예컨대, 모노클로날 T 세포 수용체 (mTCR)를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 벡터이다. 본원에 기재된 "이원 투인원 벡터"는 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자의 발현을 억제하는 두 가지 유형의 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)를 코딩하는 염기 서열, 및 키메라 항원 수용체 (CAR) 및 T 세포 수용체, 예컨대, 모노클로날 T 세포 수용체

(mTCR) 중 어느 하나를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 벡터이다. 본원에 기재된 이원 투인원 벡터는 투인원 벡터의 형태이다.

[0290] "RNAi" (또한 전사 후 유전자 침묵 (PTGS), 진정 (quelling), 또는 공동-억압 (co-suppression)으로서 알려짐)는 서열 특이적 방식으로 RNA 분자가 전형적으로 특이적 mRNA 분자의 해체(destruction)를 유발함으로써 유전자 발현을 억제하는 전사 후 유전자 침묵 과정이다. RNAi의 활성 성분은 전형적으로 15-30 개의 뉴클레오티드 (예컨대, 19 내지 25, 19 내지 24 또는 19-21 개의 뉴클레오티드) 및 2 개의 뉴클레오티드 3' 돌출부(overhang)를 함유하고 표적 유전자의 핵산 서열과 매칭하는 작은 간섭 RNA (siRNA)라고 불리는 짧은/작은 이중가닥 RNA (dsRNA)이다. 이들 짧은 RNA 중은 더 큰 dsRNA의 다이스(Dicer)-매개 절단에 의해 생체 내에서 자연적으로 생산될 수 있으며, 이들은 포유동물 세포에서 기능적이다. DNA 발현 플라스미드는 세포에서 본 개시내용의 siRNA 듀플렉스(duplex) 또는 dsRNA를 안정적으로 발현하고 표적 유전자 발현의 장기 억제를 달성하는데 사용될 수 있다. 일 양태에서, siRNA 듀플렉스의 센스 및 안티센스 가닥은 전형적으로 짧은 스페이스(spacer) 서열에 의해 연결되어 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)로 칭하는 스템-루프(stem-loop) 구조의 발현을 유도한다. 헤어핀은 다이스에 의해 인식되고 절단되어 성숙한 siRNA 분자를 생성한다.

[0291] 용어 "shRNA"는 일부 자기-상보적 서열이 이의 스템과 함께 단단한 헤어핀 구조를 생성하는 RNA 분자를 지칭한다. RNA 분자는 대략 80 bp의 길이를 가질 수 있다. shRNA가 세포에서 발현될 때, 이는 일련의 단계를 통해 가공되어 유전자 침묵에 대한 가이드 역할을 하는 작은 간섭 RNA (siRNA)가 된다. 간단히 말하면, shRNA가 발현될 때, 이는 세포 내의 드로샤(Drosha) 복합체에 의해 가공되어 전-shRNA가 되고, 이는 이후 핵 외부로 운반되어 다이스에 의해 추가 가공을 거쳐 siRNA가 된 후, RISC (RNA-유도 침묵 복합체) 복합체에 의해 단일 가닥이 되고 로딩된다. 여기서, siRNA의 안티센스 가닥은 표적 유전자의 mRNA에 부착하기 위한 RISC 복합체에 대한 가이드 역할을 하고, 이러한 방식으로 부착된 RISC 복합체가 mRNA를 자를 때 유전자 침묵이 발생한다. 표적 유전자의 shRNA는 특정 유전자에 대해 지속적이고 특이적인 유전자 침묵을 허용하므로, 표적 유전자를 억제하기 위해 벡터에 포함된다.

[0292] 용어 "프로모터"는 유전자의 전사 개시에 관여하는 유전자의 상류(upstream) 영역을 지칭한다. 상기 기재된 두 가지 유형의 shRNA는 또한 프로모터가 발현을 제어하게 한다. 여기서, 두 가지 유형의 shRNA의 발현은 이들이 2 개의 상이한 프로모터에 의해 각각 제어되는 것을 특징으로 할 수 있다. 클로닝이 반복 삽입물을 사용하여 동일한 염기 서열로 발생하는 경우, 이들 동일한 염기 서열 사이의 결합으로 인해 적절한 클로닝이 일어나지 않아 재조합 또는 결실이 발생할 가능성이 높다고 판단된다. 프로모터는 RNA 폴리머라제가 프로모터에 부착하고 전사를 시작하는 것에 따라 RNA 폴리머라제 I 프로모터, RNA 폴리머라제 II 프로모터 또는 RNA 폴리머라제 III 프로모터일 수 있다. 상기 2 개의 프로모터는 이들이 RNA 폴리머라제 III 프로모터 (이하 pol III 프로모터)인 것을 특징으로 할 수 있다. Pol III 프로모터는 프로모터에 의한 제어로 전사되는 RNA의 5' 말단의 캡 또는 3' 말단의 폴리 (A) 꼬리를 부착함없이 5' 말단에서 3' 말단으로 정확하게 전사되도록 할 수 있다. pol III 프로모터의 유형은 U6 프로모터, H1 프로모터 및 7SK 프로모터 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0293] 본원에 사용된 용어 "G28z"는 shGFP 발현 카세트, CD28 공동자극 도메인 및 CD3 ζ 도메인을 포함하는 작제물을 지칭한다 (도 6a). 보다 구체적으로, 용어 "G28z"에서, "G"는 shGFP를 나타내고; "28"은 CD28을 나타내고; "z"는 CD3 ζ를 나타낸다. 동일한 패턴에 따라, 본원에 사용된 용어 "P28z"는 shPD-1 발현 카세트, CD28 공동자극 도메인 및 CD3 ζ 도메인을 포함하는 작제물을 지칭하며 (도 6a), 여기서 "P"는 shPD-1을 나타내고, "28"은 "CD28"을 나타내고, "z"는 CD3 ζ를 나타낸다. 본원에 사용된 용어 "GBBz"는 shGFP 발현 카세트, 4-1BB 공동자극 도메인 및 C_ü 3ζ 도메인을 포함하는 작제물을 지칭하며 (도 6a), 여기서 "G"는 shGFP를 나타내고; "BB"는 4-1BB를 나타내고; "z"는 C_ü 3ζ를 나타낸다. 본원에 사용된 용어 "PBBz"는 shPD-1 발현 카세트, 4-1BB 공동자극 도메인 및 C_ü 3ζ 도메인을 포함하는 작제물을 지칭하며 (도 6a), 여기서 "P"는 shPD-1을 나타내고; "BB"는 4-1BB를 나타내고; "z"는 C_ü 3ζ를 나타낸다.

[0294] "CAR"은 일반적으로 면역 세포 상에 존재할 때 면역 세포가 표적 세포 (보통 암 세포)에 특이성을 가지면서 세포에서 신호 전달을 유발하는 폴리펩티드 세트이다. CAR은 최소한 하기 기재될 표적 항원, 막관통 도메인 및 세포 내 신호 전달 도메인을 인식하는 세포 외 항원 인식 도메인을 포함하며, 여기서 세포 내 신호 전달 도메인은 하기 기재될 촉진 분자 또는 공동자극 분자로부터 유래된다. 폴리펩티드를 포함하는 세트는 부착될 수 있거나, 자극을 통해 이량체화된 스위치를 통해 부착되는 형태일 수 있다. 촉진 분자는 상기 기재된 TCR의 제타 사슬일

수 있다. "CD19 CAR"은 CD19 암 항원을 표적으로 하는 CAR이다.

- [0295] 본원에 사용된 용어 "T-세포 수용체 (TCR)"는 알파 (α) 및 베타 (β) 사슬의 이종이량체로 구성되는 T 세포 상의 단백질 수용체를 지칭하지만, 일부 세포에서 TCR은 감마 및 델타 (γ/δ) 사슬로 이루어진다. 특정 실시양태에서, TCR은 예를 들어, 헬퍼 T 세포, 세포독성 T 세포, 기억 T 세포, 조절 T 세포, 자연살해 T 세포 및 감마 델타 T 세포를 비롯한 TCR을 포함하는 임의의 세포에서 변형될 수 있다.
- [0296] 본원에 사용된 용어 "모노클로날 T 세포 수용체 (mTCR)"는 특정 항원을 특이적으로 표적으로 하도록 유전적으로 변형된 T-세포 수용체 (TCR)를 지칭한다. 이는 또한 항원-특이적 TCR으로서 지칭될 수 있다. mTCR을 갖는 T 세포는 바이러스성 감염 및 암에 대한 입양 T-세포 요법과 같은 면역요법에 사용되는 것으로 보고된다. 일부 양태에서, 키메라 단일 사슬 항체 작제물 (scFv)의 레트로바이러스성 전이는 정의된 항원-특이성을 갖는 T 세포를 생산하기 위한 전략으로서 사용되어 왔다. 대부분의 경우, 키메라 scFv 작제물은 FcR- 감마 또는 CD3 제타의 세포 내 시그널링 도메인에 연결되어 T-세포 효과기 기능을 유발시켰다. CD3 제타 도메인은 공동-자극성 분자, 예컨대, CD28, 4-1BB 또는 OX40의 시그널링 도메인과 결합된다. 모노클로날 T 세포 수용체 (mTCR) 및 암 요법에서의 이들의 적용은 Stauss et al., 2007, Molecular Therapy, 15(10):1744-50, Zhang and Morgan, 2012, Advanced Drug Delivery Reviews, 64(8): 756-762, and Liddy et al., 2012, Nature Medicine, 18(6):980-7에 기재되며, 이들 각각의 내용은 그 전문이 본원에 참고로 원용된다.
- [0297] 본원에 사용된 용어 "ALNGFR"은 상기 기재된 삽입이 발생한 세포의 정제에 사용된 세포질 도메인이 없는 LNGFR (저-친화도 신경 성장 인자 수용체)을 지칭한다.
- [0298] "면역 세포"는 림프구, 예컨대, 살해 T 세포, 헬퍼 T 세포, 감마 델타 T 세포 및 B 세포, 자연살해 세포, 비만 세포, 호산구, 호염기구로부터 선택된 것으로서 본원에 특징될 수 있으나, 이에 제한되지 않으며; 식세포는 대식세포, 호중구 및 수지상 세포를 포함한다. T 세포는 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포를 포함한다.
- [0299] 본원에 사용된 용어 "T 림프구" 및 "T 세포"는 상호교환적으로 사용되며, 흉선에서의 성숙을 완료하고, 신체의 특이적 외래 항원의 식별 및 다른 면역 세포의 활성화 및 비활성화를 포함하여 면역계에서 다양한 역할을 하는 주요 유형의 백혈구를 지칭한다. T 세포는 임의의 T 세포, 예컨대, 배양된 T 세포, 예컨대, 1 차 T 세포, 또는 배양된 T 세포주, 예컨대, Jurkat, SupT1으로부터의 T 세포, 또는 포유류로부터 수득된 T 세포일 수 있다. T 세포는 CD3+ 세포일 수 있다. T 세포는 임의의 유형의 T 세포일 수 있고, CD4+/CD8+ 이중 양성 T 세포, CD4+ 헬퍼 T 세포 (예컨대, Th1 및 Th2 세포), CD8+ T 세포 (예컨대, 세포독성 T 세포), 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 말초 혈액 백혈구 (PBL), 중앙 침윤성 림프구 (TIL), 기억 T 세포, 나이브(naive) T 세포, 조절인자 T 세포 및 감마 델타 T 세포 (γ/δ T 세포) 등을 비제한적으로 포함하는 임의의 발달 단계의 것일 수 있다. 추가적인 유형의 헬퍼 T 세포는 세포, 예컨대, Th3 (Treg), Th17, Th9 또는 Tfh 세포를 포함한다. 추가적인 유형의 기억 T 세포는 세포, 예컨대, 중심 기억 T 세포 (Tcm 세포), 효과기 기억 T 세포 (Tem 세포 및 TEMRA 세포)를 포함한다. T 세포는 또한 유전적으로 조작된 T 세포, 예컨대, T 세포 수용체 (TCR) 또는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하도록 변형된 T 세포를 지칭할 수 있다. T 세포는 또한 스템 세포 또는 전구 세포로부터 분화될 수 있다.
- [0300] "CD4+ T 세포"는 표면 상에서 CD4를 발현하고 세포-매개 면역 반응과 연관된 T 세포의 서브세트를 지칭한다. 이들은 자극 후 분비 프로파일을 특징으로 하며, 이는 사이토카인, 예컨대, IFN-감마, TNF-알파, IL2, IL4 및 IL10의 분비를 포함할 수 있다. "CD4"는 원래 T-림프구에서 분화 항원으로서 정의된 55-kD 당단백질이지만, 단핵구/대식세포를 포함하는 다른 세포에서도 또한 발견된다. CD4 항원은 면역글로불린 슈퍼유전자 패밀리의 멤버이며 MHC (주요 조직적합성 복합체) 클래스 II- 제한된 면역 반응에서 연합 인식 요소로서 관련된다. T-림프구에서 이들은 헬퍼/유도인자 서브세트를 정의한다.
- [0301] "CD8+ T 세포"는 표면에서 CD8을 발현하고 MHC 클래스 I-제한되고, 세포독성 T 세포로서 기능하는 T 세포의 서브세트를 지칭한다. "CD8" 분자는 흉선 세포 및 세포독성 및 억압인자 T- 림프구에서 발견되는 분화 항원이다. CD8 항원은 면역글로불린 슈퍼유전자 패밀리의 멤버이며, 주요 조직적합성 복합체 클래스 I-제한된 상호작용에서 연합 인식 요소이다.
- [0302] 본원에 사용된 용어 "NK 세포" 또는 "자연살해 세포"는 CD56 또는 CD16의 발현 및 T 세포 수용체 (CD3)의 부재에 의해 정의된 말초 혈액 림프구의 서브세트를 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "적응 NK 세포" 및 "기억 NK 세포"는 상호교환가능하며 표현형적으로 CD3- 및 CD56+이고 NKG2C 및 CD57 중 하나 이상 및 임의적으로 CD16을 발현하나, 다음 중 하나 이상의 발현이 결여된 NK 세포의 서브세트를 지칭한다: PLZF, SYK, FcεR, 및 EAT-2. 일부 실시양태에서, CD56+ NK 세포의 단리된 서브집단은 CD16, NKG2C, CD57, NKG2D, NCR 리간드, NKp30, NKp40,

NKp46, 활성화 및 억제성 KIR, NKG2A 및/또는 DNAM-1의 발현을 포함한다. CD56+는 흐릿하거나 선명한 발현일 수 있다.

[0303] 본원에 사용된 용어 "면역 체크포인트"는 면역계에 존재하며 면역 반응을 온(on) 또는 오프(off)할 수 있는 분자를 지칭한다. 원래, 이들은 면역 세포의 과도한 활성화를 제어하여 세포 사멸 또는 자가면역 반응을 유발하는 안전 장치이다. 이들 면역 체크포인트 분자는 면역 반응을 증가시키는 자극성 면역 체크포인트 분자 및 면역 반응을 억제하는 억제성 면역 체크포인트 분자로 크게 분류될 수 있다. 예를 들어, 면역 체크포인트 수용체 및 리간드는 PD1 (프로그램화된 세포 사멸 단백질 1), PD-L1 (프로그램화된 사멸-리간드 1), CTLA4 (세포독성 T-림프구 연관 단백질 4), TIM-3 (T-세포 면역글로불린 및 뮤신-도메인 함유-3), CEACAM (암배아 항원-관련된 세포 부착 분자, 3 개의 서브유형 CEACAM-1, CEACAM-3 또는 CEACAM-5를 포함함), LAG3 (림프구-활성화 유전자 3), VISTA (T 세포 활성화의 V-도메인 Ig 억압인자), BTLA (B- 및 T-림프구 약화인자), TIGIT (Ig 및 ITIM 도메인을 포함하는 T 세포 면역수용체), LAIR1 (백혈구-연관 면역글로불린-유사 수용체 1), CD160 (분화클러스터 160), CD96 (분화클러스터 96), MerTK (원종양 유전자 티로신-단백질 키나아제 MER) 및 2B4 (NK 세포 활성화-유도성 리간드)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고, 예를 들어, PD1 및 TIM3 사이에서 선택될 수 있다.

[0304] 용어 "배양" 또는 "세포 배양"은 생체 외 환경에서 세포의 유지, 성장 및/또는 분화를 지칭한다. "세포 배양 배지", "배양 배지" (각각의 경우 단순형 "배지"), "보충물" 및 "배지 보충물"은 세포 배양을 번식하는 영양 조성물을 지칭한다. 용어 "번식하다" 또는 "유지하다"는 예를 들어, 멸균 플라스틱 (또는 코팅된 플라스틱) 세포 배양 접시 또는 플라스크에서 조직 또는 신체 외부의 세포의 지속, 전파 (성장) 및/또는 분화를 지칭한다. "번식" 또는 "유지"는 배양 배지를 영양소, 호르몬 및/또는 세포의 전파시키고/시키거나 지속시키는데 도움이 되는 다른 인자의 공급원으로서 이용할 수 있다.

[0305] 본원에 기재된 인간 환자에서 면역 요법을 위한 "약학 조성물"은 면역 세포를 포함한다. 세포 이외에 면역 반응을 추가로 개선시킬 수 있는 다른 약학적으로 허용가능한 염, 담체, 부형제, 비히클 및 기타 첨가제 등이 약학 조성물에 첨가될 수 있다는 것이 자명하므로, 이의 상세한 설명은 생략한다.

[0306] 용어 "대상체"는 인간, 비-인간 영장류, 개과, 고양이과, 설치류 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 임의의 동물 (예컨대, 포유류)을 지칭하며, 이는 특정 치료의 수령인이어야 한다. 전형적으로, 용어 "대상체" 및 "환자"는 인간 대상체와 관련하여 본원에 상호교환적으로 사용된다.

[0307] 용어 "치료하는" 또는 "치료하기 위한"은 증상, 증상의 중증도 및/또는 치료될 질환의 증상의 빈도의 억압, 제거, 감소 및/또는 완화를 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료하는"은 또한 하나 이상의 요법의 투여로 인한 질환 또는 병태의 진행, 중증도 및/또는 지속 기간의 감소 또는 완화를 지칭한다.

[0308] "유효량" 또는 "치료적 유효량"은 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 특정 생물학적 결과를 달성하는데 효과적인 본원에 기재된 바와 같은 화합물, 제제, 재료 또는 조성물, 예컨대, T 세포의 양을 지칭한다. 이러한 결과는 당업계에 적합한 임의의 수단에 의해 결정된 암의 억제를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0309] "투여하다" 또는 "투여"는 예컨대, 점막, 피내, 정맥 내, 근육 내 전달 및/또는 본원에 기재되거나 당업계에 공지된 물리적 전달의 임의의 다른 방법에 의해 신체 외부에 존재하는 물질을 환자에 주사하거나 물리적으로 전달하는 행위를 지칭한다.

[0310] 3. 하나 이상의 면역 체크포인트를 표적으로 하는 투인원 벡터

[0311] 종양 세포는 다양한 면역 체크포인트, *e.g.i* 체크포인트 리간드를 발현한다. 따라서, 하나의 면역 체크포인트가 억제되더라도, 다른 면역 체크포인트의 활성화를 통해 CAR-T의 지속적인 효과를 기대하기 어려울 수 있다. 모노클로날 항체의 조합은 다중 면역 체크포인트를 억제하기 위해 주로 사용되었으며 항종양 효과는 계속적으로 보고되었다 (J Clin Invest., 2015, Chauvin JM; PNAS, 2010, Curran MA; Blood, 2018, Wierz M; Cancer cell. 2014, Johnston RJ). 그러나, 치료적 항체가 전신적으로 과도한 면역 반응을 유도할 수 있는 것으로 알려져 있다. 또한, CAR-T 세포 요법은 생명을 위협하는 사이토카인-방출 증후군 (CRS) 및 신경독성과 연관이 있으며 (Nat Rev Clin Oncol, 2017, Neelapu SS), 이는 CAR-T 및 항체 요법의 병용이 부작용의 가능성을 최대화할 수 있음을 시사한다. 또한, 종래의 병행 면역 세포 요법은 고비용이고 CAR-T 이외의 T 세포에 또한 작용하고 자가면역 증상 및 사이토카인 방출 증후군의 위험을 초래하는 것으로 인해 환자에게 훨씬 더 큰 경제적 부담을 준다. 본 발명은 상기 문제점을 해결하기 위해 고안되었다.

[0312] 일 실시양태에서, 본원은 투인원 벡터, 다음을 포함하는 벡터를 제공한다: 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자의 발현을 억제하는 하나 이상의 유형의 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)를 코딩하는 염기 서열, 및 키메라 항원 수

용체 (CAR) T 세포 수용체, 예컨대, 모노클로날 T 세포 수용체 (mTCR)를 코딩하는 염기 서열.

- [0313] 벡터는 DNA, RNA, 플라스미드, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 및 레트로바이러스 벡터 중으로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 렌티바이러스 벡터 및 레트로바이러스 벡터스캔은 유전자를 세포의 게놈 DNA에 삽입하여 유전자의 안정적인 발현을 가능하게 한다. 일부 실시양태에서, 예를 들어, 투인원 렌티바이러스 벡터, 예를 들어, 이원 투인원 벡터는 벡터를 세포의 게놈 내로 유전자로 사용하는데 사용될 수 있다.
- [0314] 일부 실시양태에서, 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자의 발현을 억제하는 두 가지 유형의 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)를 코딩하는 염기 서열, 및 키메라 항원 수용체 (CAR) 및 T 세포 수용체, 예를 들어, 모노클로날 T 세포 수용체 (mTCR)를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0315] 일부 실시양태에서, 두 가지 유형의 shRNA의 발현은 이들이 2 개의 상이한 프로모터에 의해 각각 제어되는 것을 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, 두 프로모터는 RNA 폴리머라제 III 프로모터이다. 일부 실시양태에서, 두 프로모터는 상이한 종으로부터 유래된 U6 프로모터이다. 일부 실시양태에서, 두 프로모터는 벡터 상에서 서로 상이한 방향으로 배향된다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 프로모터는 머리에서 머리 배향으로 배향된다. 다른 실시양태에서, 프로모터는 꼬리에서 꼬리 배향으로 배향된다. 일부 실시양태에서, 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자는 면역 체크포인트 수용체 또는 리간드이다.
- [0316] 일부 실시양태에서, 면역 체크포인트 수용체 또는 리간드는 PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (CEACAM-1, CEACAM-3 또는 CEACAM-5), LAG 3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, CD96, MerTK 및 2B4로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자는 FAS, CD45, PP2A, SHIP1, SHIP2, DGK 알파, DGK 제타, Cbl-b, CD147, LRR1, TGFBR1, IL10R 알파, KLGR1, DNMT3A 및 A2aR로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0317] 일부 실시양태에서, 두 가지 유형의 shRNA는 면역 세포의 기능을 약화시키는 단일 유전자의 상이한 부분을 표적으로 하거나, 이들은 면역 세포의 기능을 약화시키는 상이한 유전자를 표적으로 한다. 일부 실시양태에서, 두 가지 유형의 shRNA는 PD-1의 상이한 부분을 표적으로 한다. 일부 실시양태에서, 두 가지 유형의 shRNA는 각각 PD-1 및 TIM-3을 표적으로 한다. 일부 실시양태에서, 두 가지 유형의 shRNA를 코딩하는 염기 서열은 서열번호 2-219로 이루어진 군으로부터 선택된 상이한 서열을 포함한다.
- [0318] 일부 실시양태에서, CAR 또는 TCR, 예를 들어, mTCR의 표적은 암에서 증가된 암 항원 중에서 또는 암에서 발견된 암 항원의 돌연변이된 형태로부터 선택된 인간 종양 항원이다.
- [0319] 일부 실시양태에서, 벡터는 염기 서열 서열번호 220 또는 221 중 어느 하나를 포함한다. 일부 실시양태에서, 벡터는 DNA, RNA, 플라스미드, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 및 레트로바이러스 벡터 중에서 선택된다.
- [0320] **3.1 RNA 간섭 및 짧은 헤어핀 RNA**
- [0321] "RNAi" (또한 전사 후 유전자 침묵 (PTGS), 진정 (quelling), 또는 공동-억압 (co-suppression)으로서 알려짐)는 서열 특이적 방식으로 RNA 분자가 전형적으로 특이적 mRNA 분자의 해체를 유발함으로써 유전자 발현을 억제하는 전사 후 유전자 침묵 과정이다. RNAi의 활성 성분은 전형적으로 15-30 개의 뉴클레오타이드 (예컨대, 19 내지 25, 19 내지 24 또는 19-21 개의 뉴클레오타이드) 및 2 개의 뉴클레오타이드 3' 돌출부를 함유하고 표적 유전자의 핵산 서열과 매칭하는 작은 간섭 RNA (siRNA)라고 불리는 짧은/작은 이중 가닥 RNA (dsRNA)이다. 이들 짧은 RNA 종은 더 큰 dsRNA의 다이스-매개 절단에 의해 생체 내에서 자연적으로 생산될 수 있으며, 이들은 포유동물 세포에서 기능적이다. DNA 발현 플라스미드는 세포에서 본원에 기재된 siRNA 듀플렉스 또는 dsRNA를 안정적으로 발현하고 표적 유전자 발현의 장기 억제를 달성하는데 사용될 수 있다. 일 양태에서, siRNA 듀플렉스의 센스 및 안티센스 가닥은 전형적으로 짧은 스페이서 서열에 의해 연결되어 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)로 칭하는 스템-루프 구조의 발현을 유도한다. 헤어핀은 다이스에 의해 인식되고 절단되어 성숙한 siRNA 분자를 생성한다.
- [0322] 본원에 사용된 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)는 RNA 분자이며, 여기서 일부 자기-상보적 서열은 이의 스템과 함께 단단한 헤어핀 구조를 생성한다. 본원에 기재된 shRNA 분자는 약 40 내지 120 개의 뉴클레오타이드 길이, *e.g.i.*, 약 70 내지 90 개의 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 예시적인 실시양태에서, shRNA는 80 개의 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. shRNA는 RNAi 경로의 내인성 트리거(trigger)인 마이크로 간섭 RNA (miRNA)로 모델링된다 (Lu et al., 2005, *Advances in Genetics* 54: 117-142, Fewell et al., 2006, *Drug Discovery Today* 11: 975-982). shRNA가 세포에서 발현될 때, 이는 일련의 단계를 통해 가공되어 유전자 침묵에 대한 가이드 역할을 하는 작은 간섭 RNA (siRNA)가 된다. 간단히 말하면, shRNA가 발현될 때, 이는 세포 내의 드로샤 복합체에 의해 가공되어 전-

shRNA가 되고, 이는 이후 핵 외부로 운반되어 다이스에 의해 추가 가공을 거쳐 siRNA가 된 후, RISC (RNA-유도 침묵 복합체) 복합체에 의해 단일 가닥이 되고 로딩된다. 여기서, siRNA의 안티센스 가닥은 표적 유전자의 mRNA에 부착하기 위한 RISC 복합체에 대한 가이드 역할을 하고, 이러한 방식으로 부착된 RISC 복합체가 mRNA를 자를 때 유전자 침묵이 발생한다. 표적 유전자의 shRNA는 특정 유전자에 대해 지속적이고 특이적인 유전자 침묵을 허용하므로, 표적 유전자를 억제하기 위해 벡터에 포함된다.

[0323] 마이크로RNA (miRNA)라 불리는 자연적으로 발현된 작은 RNA 분자는 mRNA의 발현을 제어함으로써 유전자 침묵을 유발한다. RISC를 함유하는 miRNA는 시드 영역으로 불리는 miRNA의 5' 영역에서 뉴클레오티드 2-7 개와의 완전한 서열 상보성을 나타내는 mRNA 및 이의 3' 영역을 포함하는 상이한 염기쌍을 표적으로 한다. 유전자 발현의 miRNA 매개된 하향 제어는 표적 mRNA의 절단, 표적 mRNA의 번역 억제 또는 mRNA 붕괴에 의해 야기될 수 있다. miRNA 표적화 서열은 보통 표적 mRNA의 3'-UTR에 위치한다. 단일 miRNA는 다양한 유전자로부터 100 개 초과와 전사물을 표적으로 할 수 있으며, 하나의 mRNA는 상이한 miRNA에 의해 표적으로 될 수 있다.

[0324] 특이적 mRNA를 표적으로 하는 siRNA 듀플렉스 또는 dsRNA는 생체 외에서 설계 및 합성될 수 있고 RNAi 공정을 활성화시키기 위해 세포 내로 도입될 수 있다. Elbashir et al.은 21개의-뉴클레오티드 siRNA 듀플렉스 (작은 간섭 RNA로 지칭됨)가 포유동물 세포에서 면역 반응을 유도하지 않으면서 강력하고 특이적인 유전자 녹다운에 영향을 줄 수 있음을 입증하였다 (Elbashir SM et al., *Nature*, 2001, 4 11, 494-498). 이 초기 보고서 이후, siRNA에 의한 전사 후 유전자 침묵은 포유동물 세포에서 유전자 분석을 위한 강력한 도구로서 빠르게 등장하여 신규 치료법을 생산하는데 가능성이 있다.

[0325] 폴리-글루타민 확장 질환, 예컨대, 헌팅턴 질환을 유발하는 폴리-글루타민 반복 단백질을 코딩하는 핵산 서열에 대해 표적하도록 설계된 RNAi 분자는 미국 특허 번호 9,169,483 및 9,181,544 및 국제 특허 공개공보 번호 WO2015179525에 기재되어있으며, 이들 각각의 내용은 그 전문이 본원에 참고로 원용된다. 미국 특허 번호 9,169,483 및 9,181,544 및 국제 특허 공개공보 번호 WO2015179525는 각각 RNA의 제1 가닥 (예컨대, 15 개의 인접 뉴클레오티드) 및 RNA의 제2 가닥 (예컨대, 제1 가닥의 12 개 이상의 인접 뉴클레오티드에 상보적임)을 포함하는 단리된 RNA 듀플렉스를 제공하며, 여기서 RNA 듀플렉스는 약 15 내지 30 개의 염기쌍 길이이다. RNA의 제1 가닥 및 RNA의 제2 가닥은 RNA 루프 (~ 4 내지 50 개의 뉴클레오티드)에 의해 작동가능하게 연결되어 발현 카세트에 삽입될 수 있는 헤어핀 구조를 형성할 수 있다. 루프 부분의 비-제한적 예는 미국 특허 번호 9,169,483의 서열번호 9-14를 포함하며, 이의 내용은 그 전문이 본원에 참고로 원용된다. RNA 듀플렉스를 형성하기 위해 전체 서열 또는 서열의 일부로 사용될 수 있는 RNA 가닥의 비-제한적인 예는 미국 특허 번호 9,169,483의 서열번호 1-8 및 미국 특허 번호 9,181,544의 서열번호 1-11, 33-59, 208-210, 213-215 및 218-221를 포함하며, 이들 각각의 내용은 그 전문이 본원에 참고로 원용된다. RNAi 분자의 비-제한적인 예는 미국 특허 번호 9,169,483의 서열번호 1-8, 미국 특허 번호 9,181,544의 1-11, 33-59, 208-210, 213-215 및 218-221 및 국제 특허 공개공보 번호 WO2015179525의 서열번호 1, 6, 7 및 35-38을 포함하며, 이들 각각의 내용은 그 전문이 본원에 참고로 원용된다.

[0326] 생체 외에서 합성된 siRNA 분자는 RNAi를 활성화시키기 위해 세포 내로 도입될 수 있다. 외인성 siRNA 듀플렉스는, 내인성 dsRNA와 유사하게 세포 내로 도입될 때, siRNA 듀플렉스의 2 개의 가닥 중 하나에 상보적인 RNA 서열 (즉, 안티센스 가닥)과 상호 작용하는 다중유닛 복합체인 RNA 유도 침묵 복합체 (RISC)를 형성하도록 조립될 수 있다. 이 과정 동안에, siRNA의 센스 가닥 (또는 패신저(passenger) 가닥)은 복합체에서 손실되는 반면 siRNA의 안티센스 가닥 (또는 가이드 가닥)은 상보적 RNA와 매칭된다. 특히, RISC 복합체를 함유하는 siRNA의 표적은 완벽한 서열 상보성을 나타내는 mRNA이다. 이어서, siRNA 매개 유전자 침묵은 표적을 절단, 방출 및 분해함으로써 발생한다.

[0327] 표적 mRNA에 상동성인 센스 가닥 및 표적 mRNA에 상보적인 안티센스 가닥을 포함하는 siRNA 듀플렉스는 단일 가닥 (ss)-siRNA (예컨대, 안티센스 가닥 RNA 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드)의 사용과 비교하여 표적 RNA 해체에 대한 효율 측면에서 훨씬 더 유리하다. 많은 경우에, 상응하는 듀플렉스의 효과적인 유전자 침묵 효능을 달성하기 위해 ss-siRNA의 더 높은 농도가 필요하다.

[0328] siRNA를 설계하기 위한 지침은 당업계에 존재한다. 이들 지침은 일반적으로 침묵할 유전자의 영역을 표적으로 하는 19 개의-뉴클레오티드 듀플렉스화된 영역, 대칭적인 2-3 개의 뉴클레오티드 3' 돌출부, 5-포스페이트 및 3-하이드록실 기를 생성하는 것을 권장한다. siRNA 서열 선호도를 지배할 수 있는 다른 규칙은 (i) 안티센스 가닥의 5' 단부에서의 A/U; (ii) 센스 가닥의 5' 단부에서의 G/C; (iii) 안티센스 가닥의 5' 말단 3 분의 1에서의 5 개 이상의 A/U 잔기; 및 (iv) 9 개 초과와 뉴클레오티드 길이의 임의의 GC 스트레치(stretch)의 부재를 포함

하나, 이에 제한되지 않는다. 이러한 고려에 따라, 표적 유전자의 특이적 서열과 함께, 포유동물 표적 유전자 발현을 억압하는데 필수적인 매우 효과적인 siRNA 분자가 손쉽게 설계될 수 있다.

- [0329] 본원에 제공된 바와 같이, 투인원 벡터는 면역 세포의 기능을 약화시키는 하나 이상의 유전자의 발현을 억제하는 하나 이상의 유형의 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)를 코딩하는 염기 서열 및 키메라 항원 수용체 (CAR) 또는 T 세포 수용체, 예를 들어, 모노클로날 T 세포 수용체 (mTCR) 중 어느 하나를 코딩하는 염기 서열을 포함한다.
- [0330] 일부 실시양태에서, 염기 서열은 한 유형의 shRNA를 코딩하며, 이는 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자의 발현을 억제한다. 일부 실시양태에서, 염기 서열은 두 가지 유형의 shRNA를 코딩하며, 이는 면역 세포의 기능을 약화시키는 2 개의 유전자의 발현을 억제하고, 여기서 벡터는 "이원 투인원 벡터"로서 지칭될 수 있다. 다른 실시양태에서, 염기 서열은 두 가지 초과 유형의 shRNA를 코딩하며, 이는 면역 세포의 기능을 약화시키는 2 개 초과 유전자의 발현을 억제한다.
- [0331] 일부 실시양태에서, 두 가지 이상의 유형의 shRNA는 이들이 면역 세포의 기능을 약화시키는 단일 유전자, 예를 들어, 단일 유전자의 상이한 부분을 표적으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다. 예를 들어, 두 가지 이상의 유형의 shRNA는 PD-1, 예를 들어, PD-1의 상이한 부분을 표적으로 할 수 있다. 다른 실시양태에서, 예를 들어 PD-1 및 TIM-3을 표적으로 하는 두 가지 이상의 유형의 shRNA는 이들이 면역 세포의 기능을 약화시키는 상이한 유전자를 표적으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0332] 예시적인 실시양태에서, 두 가지 이상의 유형의 shRNA를 코딩하는 염기 서열은 이들이 서열번호 2 내지 219 및 238 내지 267로 이루어진 군으로부터 선택된 상이한 서열을 포함하는 것, 예를 들어, 이들이 서열번호 2 내지 117 및 238 내지 267로 이루어진 군으로부터 선택된 상이한 서열을 포함할 수 있는 것, 예컨대, 이들이 서열번호 2 내지 12, 70 내지 75 및 266 내지 267로 이루어진 군으로부터 선택된 상이한 서열을 포함할 수 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0333] 일부 실시양태에서, 두 가지 유형의 shRNA의 발현은 이들이 클로닝 동안 재조합 또는 결실 인공물(artifact)을 최소화하기 위해 각각 2 개의 상이한 프로모터에 의해 제어되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0334] 일부 실시양태에서, 프로모터는 RNA 폴리머라제가 프로모터에 부착하고 전사를 시작하는 것에 따라 RNA 폴리머라제 I 프로모터, RNA 폴리머라제 II 프로모터 또는 RNA 폴리머라제 III 프로모터일 수 있다. 상기 2 개의 프로모터는 이들이 RNA 폴리머라제 III 프로모터 (이하 pol III 프로모터)인 것을 특징으로 할 수 있다. Pol III 프로모터는 프로모터에 의한 제어로 전사되는 RNA의 5' 말단의 캡 또는 3' 말단의 폴리 (A) 꼬리를 부착함없이 5' 말단에서 3' 말단으로 정확하게 전사되도록 할 수 있다. pol III 프로모터의 유형은 U6 프로모터, H1 프로모터 및 7SK 프로모터 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 벡터에 포함된 2 개의 프로모터는 상이하고, 상기 언급된 3 가지 유형을 포함하는 pol III 프로모터 중에서 선택될 수 있으며, 동일한 유형의 프로모터가 선택되는 경우 이들은 상이한 종으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 2 개의 프로모터는 U6 프로모터, 예컨대, 상이한 종으로부터 유래된 U6 프로모터, 예컨대, 인간 및 마우스로부터 유래된 U6 프로모터일 수 있다. U6 프로모터에 의해 생성된 전사물이 핵 내에 남아 있기 때문에, 이는 핵 내에 존재하는 드로사 복합체가 shRNA가 전-shRNA로 가공되는 과정을 촉진하게 할 수 있다고 판단된다.
- [0335] 일부 실시양태에서, 2 개 이상의 프로모터는 벡터 상에서 서로 상이한 방향으로 배향된다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 프로모터는 머리에서 머리($\rightarrow\leftarrow$) 방향으로 배향된다. 다른 실시양태에서, 프로모터는 꼬리에서 꼬리($\leftarrow\rightarrow$) 방향으로 배향된다. 이원 투인원 벡터에서, 벡터 상에서 상이한 방향으로 배향되는 것은 발현이 2 개의 프로모터에 의해 제어되는 각각의 shRNA가 전사될 때, RNA 폴리머라제가 이동하는 방향이 단일 핵산 분자와 상이한 방향으로 배향됨을 의미한다. 예시적인 실시양태에서, 두 프로모터는 $\rightarrow\leftarrow$ 방향일 수 있다 (도 15의 패널 a)). 다른 예시적인 실시양태에서, 두 프로모터는 $\leftarrow\rightarrow$ 방향일 수 있다 (도 15의 패널 b)). 예를 들어, 두 프로모터는 벡터 상에서 $\rightarrow\leftarrow$ 방향을 가정할 수 있다.
- [0336] 일부 실시양태에서 하나 이상의 유형의 shRNA의 표적 유전자의 발현은 대조군의 것의 약 90% 이하로 감소되고, 예를 들어, 표적 유전자의 발현은 대조군 것의 약 80% 이하, 약 70% 이하, 약 60% 이하, 약 50% 이하, 약 40% 이하, 약 30% 이하, 약 20% 이하 및 약 10% 이하로 감소된다.
- [0337] 일반적으로, shRNA는 표적 유전자의 mRNA 서열의 일부와 높은 상동성을 갖는 서열 (이하 센스 shRNA 염기 서열), 뚜렷한 헤어핀을 생산할 수 있는 서열, 및 높은 상동성을 갖는 서열에 상보적인 서열 (이하 안티센스 shRNA 염기 서열)을 갖도록 설계된다. 자기-상보적인 부분들 사이의 비-공유 결합은 스템 구조를 형성하고, shRNA가 세포에서 발현되고 가공될 때, 안티-센스 shRNA 염기 서열은 유전자 침묵 과정에서 표적 유전자의 mRNA

에 대한 가이드 역할을 한다. 예를 들어, shRNA의 발현을 위해 본원에 사용된 카세트의 염기 서열은 NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN (21 개의 염기)-루프 서열-NNNNNNNNNNNNNNNNNNN (19 개의 염기) 구조를 포함할 수 있다. 일 실시양태에서, 21 개의 염기 스트레치는 센스 shRNA 염기 서열을 코딩하고 19 개의 염기 스트레치는 21 개의 염기 스트레치에 대해 상보적이거나 실질적으로 상보적이며 안티-센스 shRNA 염기 서열을 코딩한다. 다른 실시양태에서, 19 개의 염기 스트레치는 센스 shRNA 염기 서열을 코딩하고 21 개의 염기 스트레치는 19 개의 염기 스트레치에 상보적이거나 실질적으로 상보적이며 안티-센스 shRNA 염기 서열을 코딩한다. 따라서, 발현될 때, 생성된 RNA는 스템 및 루프 구조를 형성한다. 특정 실시양태에서, 카세트에 포함될 수 있는 표적 유전자 (인간 유래됨)에 대한 이러한 센스 또는 안티-센스 shRNA 염기 서열은 서열번호 1-219로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특이적 실시양태에서, shRNA의 발현을 위해 본원에 사용된 카세트의 염기 서열은 서열번호 220-224로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0338] 일부 실시양태에서, 전체 shRNA 염기 서열은 마우스 또는 인간 E16 프로모터의 3' 말단에 위치할 수 있고, E16 프로모터에 의한 전사를 종결시키는 데 필요한 TTTT는 모든 shRNA 염기 서열의 3' 말단에 위치할 수 있다.

[0339] 일부 실시양태에서, 각각의 shRNA의 핵산 서열은 본원에 기재된 서열 이외에도 이들 서열과 50% 이상, 구체적으로 70% 이상, 더 구체적으로 80% 이상, 보다 더 구체적으로 90% 이상, 및 가장 구체적으로 95% 이상의 서열 상동성을 나타내는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 이는, 특히 siRNA가 되도록 세포 내에서 가공되는 siRNA (작은 간섭 RNA) 및 shRNA의 경우, 어느 정도의 돌연변이, 특히 5' 말단에서의 돌연변이가 용인가능하여 표적 유전자의 정상적인 녹다운을 야기하고, siRNA 및 shRNA의 돌연변이가 표적 유전자의 녹다운을 보다 효과적으로 유도하는 유전자 침묵에서 역할을 하는 miRNA의 것과 유사한 구조를 갖도록 만들어지는 것으로 보고되기 때문이다. 또한, 벡터의 사용에서, 당업자에게 자명한 것은 벡터 내의 변경, 즉, 벡터에 특정 서열을 도입하기 위한 클로닝 과정에서 발생할 수 있는 염기 서열의 첨가, 변형 또는 결실, 또는 의도된 유전자가 발현되는 정도의 벡터 사용의 용이성을 개선시키기 위한 성분의 변화 또는 도입이다.

[0340] 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자에 대한 다양한 작용 방식이 존재한다. 예는 면역 세포의 증식을 억제하거나 세포 사멸을 야기하는 것, 면역 세포가 활성화되기 위해 반응해야 하는 분자와의 반응을 감소시키는 것, 면역 세포가 반응 표적을 인식하는 데 필요한 유전자의 발현을 억제하는 것 및 상이한 유형의 면역 세포로의 분화를 유발하여 특정 표적에 대한 면역 반응을 유발하는 대신에 상이한 기능을 하는 것을 포함한다. 대표적인 예는 하기에 설명될 면역 체크포인트와 연관된 분자를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0341] 일부 실시양태에서, 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자는 면역 체크포인트 수용체 또는 리간드인 것을 특징으로 할 수 있다. 면역 체크포인트는 면역계에 존재하며 면역 반응을 온 또는 오프할 수 있는 분자이다. 이들은 면역 세포의 과도한 활성화를 제어하여 세포 사멸 또는 자가면역 반응을 유발하는 안전 장치로서 간주 될 수 있다. 이들 면역 체크포인트 분자는 면역 반응을 증가시키는 자극성 면역 체크포인트 분자 및 면역 반응을 억제하는 억제성 면역 체크포인트 분자로 크게 분류될 수 있다. 이는 많은 암 세포가 억제성 면역 체크포인트 신호, 특히, 면역 세포의 억제성 면역 체크포인트 수용체 및 리간드를 활성화함으로써 면역계를 탈출하는 것으로 보고된다. 따라서, 암의 이러한 회피 작용을 비효율적으로함으로써 특정 암을 표적으로 하는 면역 세포 요법이 효과적일 수 있고, 이는 억제성 면역 체크포인트 수용체 및 이들의 리간드의 활성화를 억제하거나 이들의 발현을 감소시킴으로써 달성될 수 있다. 예를 들어, 면역 체크포인트 수용체 및 리간드는 PD1 (프로그래밍된 세포 사멸 단백질 1), PD-L1 (프로그래밍된 사멸-리간드 1), CTLA4 (세포독성 T-림프구 연관 단백질 4), TIM-3 (T-세포 면역글로불린 및 뮤신-도메인 함유-3), CEACAM (암배아 항원-관련된 세포 부착 분자, 3 개의 서브유형 CEACAM-1, CEACAM-3 또는 CEACAM-5를 포함함), LAG3 (림프구-활성화 유전자 3), VISTA (T 세포 활성화의 V-도메인 Ig 억압인자), BTLA (B- 및 T-림프구 약화인자), TIGIT (Ig 및 ITIM 도메인을 포함하는 T 세포 면역수용체), LAIR1 (백혈구-연관 면역글로불린-유사 수용체 1), CD160 (분화클러스터 160), CD96 (분화클러스터 96), MerTK (원종양 유전자 티로신-단백질 키나아제 MER) 및 2B4 (NK 세포 활성화-유도성 리간드)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고, 예를 들어, PD1, TIM3 및 TIGIT 중에서 선택될 수 있다.

[0342] 다른 실시양태에서, 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자는 TCR에 의한 반복된 자극에 의해 활성화된 T 림프구에 대한 음성 조절인자로서 작용하는 AICD (활성화-유도된 세포 사멸)를 촉진할 수 있는 수용체, 예를 들어, FAS (또한 CD95, APO-1 또는 아포토시스 항원-1으로서 지칭됨)를 코딩하는 것을 특징으로 할 수 있다.. 일부 실시양태에서, 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자는 TCR의 신호 활성화를 억압하는 인자, 예를 들어, CD45, PP2A, SHP1, SHP2, DGK 알파, DGK 제타, Cbl-b, Cbl-c 및 CD148로부터 선택될 수 있는 인자를 코딩하는 것을 특징으로 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자는 4-1BB의 신호 억압을 통해

CAR 및/또는 TCR, 예를 들어, mTCR의 효능을 억압하는 단백질, 예를 들어, LRR1 (류신 풍부 반복 단백질 1)을 코딩하며, 여기서 4-1BB는 TCR의 본원에 기재된 공동자극성 분자인 것을 특징으로 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자는 리간드가 사이토카인인, T 세포를 억압하는 수용체, 예를 들어, TGFBR1 (형질전환 성장 인자 베타 수용체 1) 및 IL10R 알파 (IL-10R 서브유닛 알파)를 코딩하는 것을 특징으로 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자는 T 세포 및 NK 세포의 증식 능력 및 세포독성을 억제하는 수용체, 예를 들어, KLGR1 (살해 세포 렉틴 유사 수용체 G1)을 코딩하는 것을 특징으로 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자는 녹아웃(KO)될 때 T 세포 고갈 (KO)의 고갈을 억압하는 것으로 보고된 새로운 DNA의 메틸화와 연관된 조절인자, 예를 들어, DNMT3a (DNA 메틸트랜스퍼라제 3 알파)를 코딩하는 것을 특징으로 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자는 종양 미세환경에서 과량으로 존재하는 아데노신의 수용체, 예를 들어, A2aR (아데노신 수용체 서브유형 A2a)를 코딩하며, 이는 활성화될 때 T 세포의 세포 독성 및 사이토카인 생산 능력을 억제할 수 있는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0343] 일부 실시양태에서, 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자는 FAS, CD45, PP2A, SHP1, SHP2, DGK 알파, DGK 제타, Cbl-b, Cbl-c, CD148, LRR1, TGFBR1, IL10RA, KLGR1, DNMT3A 및 A2aR로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0344] **3.2 키메라 항원 수용체 (CAR) 및 T 세포 수용체, 예를 들어, 모노클로날 T 세포 수용체 (mTCR).**

[0345] 본원에 제공된 바와 같이, 투인원 백터는 면역 세포의 기능을 약화시키는 하나 이상의 유전자의 발현을 억제하는 하나 이상의 유형의 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)를 코딩하는 염기 서열 및 키메라 항원 수용체 (CAR) 또는 T 세포 수용체, 예를 들어, 모노클로날 T 세포 수용체 (mTCR) 중 어느 하나를 코딩하는 염기 서열을 포함한다.

[0346] CAR은 일반적으로 면역 세포 상에 존재할 때 면역 세포가 표적 세포 (보통 암 세포)에 특이성을 가지면서 세포에서 신호 전달을 유발하는 폴리펩티드 세트이다. CAR은 최소한 하기 기재된 표적 항원, 막관통 도메인 및 세포 내 신호 전달 도메인을 인식하는 세포 외 항원 인식 도메인을 포함하며, 여기서 세포 내 신호 전달 도메인은 촉진 분자 또는 공동자극 분자로부터 유래된다.

[0347] 오늘날 임상 적용에 흔히 사용되는 CAR의 구조는 항원, scFv와 세포막 사이의 거리를 제어하기 위한 스페이스 도메인, 막관통 도메인 및 세포 내 시그널링 도메인 (이하 ISD)에 특이성을 부여하는 단일 사슬 가변 단편 도메인 (이하 scFv)을 포함한다. ISD는 차례로 하나 또는 다중 T 세포의 생체 내 증식 및 긴 수명에 기여하는 공동자극 도메인 (CD28, CD137 또는 OX40) 및 T 세포 활성화에 기여하는 TCR 시그널링 도메인 (CD3 제타, CD3 ζ)을 포함한다. 이러한 방식으로 제조된 CAR을 발현하도록 변형된 T-세포는 높은 특이성으로 표적 항원을 발현하는 암 세포를 인식함으로써 활성화되고, 이러한 암 세포의 사멸을 효과적으로 유도하며, 동시에 신체에서 기하급수적으로 증식하고, 생존을 긴 시간동안 유지할 수 있다. 예를 들어, B 세포-특이적 항원인 CD19를 표적으로 하기 위해 제조된 CAR-T 세포 (CART-19)가 B-세포 백혈병 환자에 투여되었을 때, 세포가 1,000 내지 10,000 배로 증식하여 신체에서 몇 년 동안 생존한 것으로 보고되었다. 결과적으로, CART-19는 통상적인 화학요법 등이 효과적이지 않았던 말기 급성 림프아구성 백혈병 (B-ALL) 환자에 대해 수행된 임상 시험에서 90% 완전 반응을 나타냈으며, 이는 초기 조사자-개시된 임상 시험 단계에서 글로벌 제약 회사에 라이선스를 부여하는 드문 경우를 유발하였다. 이는 2017년에 미국 FDA 승인을 받은 제1 CAR-T 세포 요법 약제가 되었으며, 그 후 제2 CAR-T도 또한 승인되었다.

[0348] 면역 세포, 예를 들어, T 세포의 표면에는 면역 체크포인트 수용체, 예컨대, CTLA-4 (세포독성 T-림프구 연관 단백질-4) 또는 PD-1 (프로그램화된 세포 사멸 단백질-1)이 존재한다. 이들 수용체는 본래 T 세포의 과도한 활성화 및 세포 사멸 또는 자가면역 반응의 유발을 제어하는 안전 장치이다. 그러나, 암 세포, 특히, 고형 암은 T 세포에 의한 면역감시를 피하기 위해 이것을 사용하는 것으로 보고된다. 예를 들어, 암 세포가 표면에서 PD-L1 (프로그램화된 사멸-리간드 1)을 발현하는 경우, 이를 위한 수용체인 PD-1을 발현하는 T 세포는 암 세포를 인식하고 활성화되나 PD-1로부터의 활성화 억제 신호에 의해 곧 고갈될 것이다. 이들 면역 체크포인트 수용체로부터의 신호에 의한 T 세포 활성화의 억제를 방지하기 위해, 표적 면역 체크포인트 수용체에 의한 신호 투과를 억제하는 CTLA4 또는 PD-1 등에 대한 모노클로날 항체가 개발되었다. 이러한 면역 체크포인트 수용체 억제제를 사용함으로써 면역 체크포인트의 차단을 통해 T 세포의 전반적인 면역 기능을 개선시키는 요법은 또한 다양한 고형 암에 대한 효능을 나타낸다.

[0349] CAR-T 세포는 궁극적으로 활성화된 T 세포의 세포독성에 의존하는 요법이므로, CAR-T 세포 주위의 면역억압 환경의 존재는 이들의 치료적 효과에 대한 주요 방해물로서 작용한다. 실제로, B-세포 백혈병에서 나타난 이들의

치료적 효과와 달리, 고형 종양을 표적으로 하기 위해 제조된 CAR-T는 희망적인 치료적 효과를 거의 나타내지 않았다. 이는 혈액 암과 달리 고형 종양이 CAR-T 세포의 활성화 및 증식을 억압하기 위한 면역-억압적 종양 미세환경을 생성하기 때문인 것으로 생각된다. 또한, 심지어 B 세포 혈액 암 중에서도, CART-19를 사용한 요법에 거의 90%가 반응성인 급성 림프아구성 백혈병 (ALL) 환자와는 달리, 치료적 효과는 림프종 환자 (20 내지 50% 반응) 또는 만성 림프아구성 백혈병 환자 (CLL, 약 20% 반응)에서 상대적으로 적은 것으로 보고된다.

[0350] 또한, PD-L1 및 다른 면역억압 리간드가 림프종에 의해 형성된 종양 미세환경에서 발현되며, 이에 따라 암성 조직 내에서 T 세포의 기능이 고갈된다는 것이 보고되었다. 또한, CLL 환자로부터 수득된 T 세포는 면역 체크포인트 수용체, 예컨대, PD-1, CD160 및 CD244의 높은 정도의 발현으로 이미 실질적으로 고갈된 것으로 보고된다.

[0351] CAR-T 세포의 이러한 낮아진 활성을 회복시키기 위해 CAR-T 세포와 함께 항-CTLA 또는 항-PD-1 억제성 항체의 동시 사용이 항-암 효과를 개선시키는 것을 보여주는 전-임상 시험 결과가 보고되었으며, 이러한 병용을 사용한 임상 시험이 현재 진행 중이다. 그러나, 항체 및 CAR-T 세포의 이러한 병행 요법의 문제점은, 신체 전체로 퍼진 항체가 CAR-T 세포뿐만 아니라 신체에 존재하는 다른 모든 T 세포에 영향을 미쳐 잠재적으로 중증이고 전신적 이상 반응, 예컨대, 사이토카인 방출 증후군 및 자가면역 증상을 초래한다는 것이다. 지적된 또 다른 문제점은 세포 요법과 함께 고가의 항체 요법의 병행 사용에 의해 발생하는 증가된 치료 비용이다.

[0352] 따라서, 최근 CAR-T 세포의 면역 체크포인트의 억압을 허용하기 위해 세포 내에서 유전자 발현을 제어하려는 시도가 있다. 국제 특허 출원 공개공보 WO20 16/069282는 표적 세포 상의 표면 항원에 대한 친화도를 포함하는 변형된 T 세포 수용체 (TCR)를 코딩하는 핵산 또는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 전기전공된 핵산을 추가로 포함하는, TCR α 사슬, TCR β 사슬, β -2 마이크로글로불린 및 FAS로 이루어진 군으로부터 선택된, 내인성 유전자 발현을 하향조절할 수 있는 핵산으로 변형된 T 세포를 생성하기 위한 조성물 및 방법을 개시한다. 공개 공보는 유전자 가위, 예컨대, CRISPR/Cas9를 사용하여 내인성 유전자의 발현을 녹-아웃할 수 있다는 것을 언급하나, 특허 공개공보에 개시된 CAR-T 세포의 제조 방법은 다소 복잡하고 낮은 생산 수율 및 높은 생산 비용의 문제점이 있다.

[0353] 한편, 국제 특허 공개공보 WO2015/090230은 T 세포의 기능을 추가적으로 억압하는 분자를 억제하는 하나의 단일 유형의 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)가 CAR을 발현하는 세포에 사용될 수 있음을 개시한다. 세포 요법의 비용 부담이 높기 때문에, 환자는 실패의 경우에 많은 부담에 직면하게 된다. 그러나, 단일 유형의 shRNA는 이러한 표적 분자의 활성을 효과적으로 억제하지 못할 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드를 포함하는 세트가 부착될 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드를 포함하는 세트는 자극을 통해 이량체화되는 스위치를 통해 부착하는 형태일 수 있다. 일부 실시양태에서, CAR은 세포 외 항원 인식 도메인, 막관통 도메인 및 세포 내 신호 전달 도메인을 포함하는 융합 단백질일 수 있다. 추가의 실시양태에서, CAR 융합 단백질은 N 말단에서 리더 서열을 추가적으로 포함할 수 있고, 리더 서열은 CAR이 세포막에서 발현되고 고정되는 과정에서 잘릴 수 있다.

[0354] 본원에 기재된 TCR, 예를 들어, mTCR은 α , β , γ 및 δ 사슬 중에서 선택된 사슬을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 사슬은 하기에 기재될 표적 항원, CD3 및 제타 사슬, 및 추가적으로 공동자극성 분자를 인식할 수 있으며, 여기서 공동자극성 분자는 ICOS, OX40, CD137 (4-1BB), CD27 또는 CD28 중에서 선택될 수 있다.

[0355] 일부 실시양태에서, 키메라 단일 사슬 항체 작제물 (scFv)의 레트로바이러스성 전이는 TCR, 예를 들어, 정의된 항원-특이성을 갖는 mTCR을 생산하는데 사용될 수 있다. 추가의 실시양태에서, 키메라 scFv 작제물은 FcR-감마 또는 $\text{C}\bar{\text{U}}_3\zeta$ 의 세포 내 시그널링 도메인에 연결되어 T-세포 효과기 기능을 유발할 수 있다. CD3에서 ζ 도메인은 공동자극성 분자의 시그널링 도메인과 조합될 수 있으며, 여기서 항체 참여는 효과기 T-세포 기능을 유발할 수 있고 또한 공동-자극성 신호를 전달할 수 있다. 추가의 실시양태에서, 공동자극성 분자는 CD28, 4-1BB 및 OX40으로부터 선택될 수 있다.

[0356] 일부 실시양태에서, 투인원 벡터는 $\text{C}\bar{\text{U}}_3\zeta$ 도메인을 포함할 수 있으며, 여기서 TCR, 예를 들어, mTCR의 사슬은 CD3 및 제타 (ζ) 사슬과의 비공유 결합을 통해 복합체를 형성할 수 있다. 항원이 사슬의 항원 인식 부위를 통해 인식될 때, CD3 및 제타 사슬은 이러한 TCR 복합체가 발현되는 면역 세포의 세포질로 신호를 보내서 기능적 활성화를 유도한다.

[0357] 일부 실시양태에서, 세포 내 신호 전달 도메인은 공동자극성 분자로부터 유래된 하나 이상의 기능적 신호 전달 도메인을 추가적으로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 촉진 분자는 상기 기재된 TCR의 제타 사슬일 수 있다.

[0358] CAR 및 TCR, 예를 들어, mTCR은 세포 표면 수용체이다. 일부 실시양태에서, CAR 또는 TCR, 예를 들어, mTCR의 표적은 암에서 발현이 특이적으로 증가된 암 항원인 것을 특징으로 할 수 있다. 일부 실시양태에서, CAR 또는 TCR, 예를 들어, mTCR의 표적은 암에서 돌연변이된 형태로 존재하는 암 항원인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0359] 일부 실시양태에서, CAR 또는 TCR, 예를 들어, mTCR의 표적은 치료될 암에서 발현이 증가된 인간 종양 항원일 수 있다. 예를 들어, 표적은 5T4 (영양막 당단백질), 707-AP, 9D7, AFP (α -태아단백질), A1bZIP (안드로젠-유도된 bZIP), HPG1 (인간 전립선 특이적 유전자-1), $\alpha 5\beta 1$ -인테그린, $\alpha 5\beta 6$ -인테그린, α -메틸아실-코엔자임 A 라세마제, ART-4 (ADP리보실트랜스퍼라제-4), B7H4 (v-세트 도메인-함유 T-세포 활성화 억제제 1), BAGE-1 (B 흑색종 항원-1), BCL-2 (B-세포 CLL/림프종-2), BING-4 (WD 반복 도메인 46), CA 15-3/CA 27-29 (뮤신 1), CA 19-9 (암 항원 19-9), CA 72-4 (암 항원 72-4), CA125 (암 항원 125), 칼레티쿨린, CAMEL (흑색종에서 CTL-인식된 항원), CASP-8 (카스파제 8), 카텝신 B, 카텝신 L, CD19 (분화클러스터 19), CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD4, CD52, CD55, CD56, CD80, CEA (암배아 항원 SG8), CLCA2 (클로라이드 채널 보조 2), CML28 (만성 골수성 백혈병 종양 항원 28), 코액토신-유사 단백질, 콜라겐 XXIII, COX-2 (사이클로옥시게나제-2), CT-9/BRD6 (암/고환 항원 9), Cten (c-말단 텐신-유사 단백질), 사이클린 B1, 사이클린 D1, cyp-B, CYPB1 (시토크롬 p450 패밀리 1 서브패밀리 b 멤버 1), DAM-10/MAGE-B1 (흑색종-연관 항원 B1), DAM-6/MAGE-B2, EGFR/Her1 (표피 성장 인자 수용체), EMMPRIN (바시긴), EpCam, EphA2 (EPH 수용체 A2), EphA3, ErbB3 (Erb-B2 수용체 티로신 키나아제 3), EZH2 (제스트 2 폴리콤 억제 복합체 2 서브유닛의 인핸서), FGF-5 (섬유아세포 성장 인자 5), FN (피브로넥틴), Fra-1 (Fos관련 항원-1), G250/CAIX (탄산 무수화효소 9), GAGE-1 (G 항원-1), GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7b, GAGE-8, GDEP (전립선에서 상이하게 발현된 유전자), GnT-V (글루코네이트 키나아제), gp100 (멜라노사이트 계통-특이적 항원 GP100), GPC3 (글리피칸3), HAGE (나선형 항원), HAST-2 (설포트랜스퍼라제 패밀리 1A 멤버 1), 헵신, Her2/neu/ErbB2 (Erb-B2 수용체 티로신 키나아제 2), HERV-K-MEL, HNE (메둘라신), 호메오박스 NKX 3.1, HOM-TES-14/SCP-1, HOM-TES-85, HPV-E6, HPV-E7, HST-2 (시르투인-2), hTERT, iCE (카스파제 1), IGF-1R (인슐린 유사 성장 인자-1 수용체), IL-13Ra2 (인터류킨-13 수용체 서브유닛 α 2), IL-2R (인터류킨-2 수용체), IL-5 (인터류킨-5), 미성숙 라미닌 수용체, 칼리크레인 2, 칼리크레인 4, Ki67, KIAA0205 (리소포스파티딜글리세롤 아실트랜스퍼라제 1), KK-LC-1 (키타큐슈 폐 암 항원-1), KM-HN-1, LAGE-1 (L 항원 패밀리 멤버-1), 리빈, MAGE-A1, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGEA2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A9, MAGE-B1, MAGE-B10, MAGE-B16, MAGEB17, MAGE-B2, MAGE-B3, MAGE-B4, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-D1, MAGE-D2, MAGE-D4, MAGE-E1, MAGE-E2, MAGE-F1, MAGE-H1, MAGEL2 (흑색종 항원 패밀리 L2), 맘마글로빈 A, MART-1/Melan-A (T-세포-1에 의해 인식된 흑색종 항원), MART-2, 매트릭스 단백질 22, MC1R (멜라노코르틴 1 수용체), M-CSF (대식세포 콜로니-자극 인자), 메소텔린, MG50/PXDN (퍼옥시다신), MMP 11 (매트릭스 메탈로프로테아제 11), MN/CA IX-항원 (탄산 무수화효소 9), MRP-3 (다중약물 내성-연관 단백질-3), MUC1 (뮤신 1), MUC2, NA88-A (VENT-유사 호메오박스 2 위유전자 1), N-아세틸글루코스-아미닐트랜스퍼라제-V, 네오-PAP (네오-폴리 (A) 폴리머라제), NGEP (전립선에서 발현된 새로운 유전자), NMP22 (핵 매트릭스 단백질 22), NPM/ALK (뉴클레오포스민), NSE (뉴런-특이적 에놀라아제), NY-ESO-1, NY-ESO-B, OA1 (골관절염 QTL 1), OFA-iLRP (종양태아성 항원 미성숙 라미닌 수용체 단백질), OGT (O-GlcNAc 트랜스퍼라제), OS-9 (소포체 렉틴), 오스테오칼신, 오스테오펀틴, p15 (CDK 억제제 2B), p53, PAGE-4 (P 항원 패밀리 멤버-4), PAI-1 (플라스미노겐 활성화제 억제제-1), PAI-2, PAP (전립선 산성 포스파타아제), PART-1 (전립선 안드로젠-제어된 전사물 1), PATE (전립선 및 고환 발현된 1), PDEF (전립선-유래 Ets 인자), Pim-1-키나아제 (프로바이러스성 통합 부위 1), Pin1 (헵타딘-프롤릴 시스-트랜스 아이소머라제 NIMA-상호작용 1), POTE (전립선, 난소, 고환 및 태반에서 발현됨), PRAME (흑색종에서 우선적으로 발현된 항원), 프로스테인, 프로테이나제-3, PSA (전립선-특이적 항원), PSCA (전립선 스템 세포 항원), PSGR (전립선-특이적 G-단백질 커플링된 수용체), PSM, PSMA (전립선 특이적 막 항원), RAGE-1 (신장 종양 암종 항원), RHAMM/CD168, RET1 (신장 산재 단백질 1), RET2, SAGE (육종 항원), SART-1 (T-세포-1에 의해 인식되는 편평 세포 암종 항원), SART-2, SART-3, Sp17 (정자 단백질 17), SSX-1 (SSX 패밀리 멤버 1), SSX-2/HOM-MEL-40, SSX-4, STAMP-1 (STEAP2 메탈로리덕테이즈), STEAP, 서바이빈, 서바이빈-213, TA-90 (종양 연관 항원-90), TAG-72 (종양 연관 당단백질-72), TARP (TCR γ 대안 리딩프레임 단백질), TGF β (형질전환 성장 인자 β), TGF β R11 (형질전환 성장 인자 β 수용체 11), TGM-4 (트랜스글루타미나제 4), TRAG-3 (택솔 내성 연관 유전자 3), TRG (T-세포 수용체 γ 유전자좌), TRP-1 (일시적 수용체 전위-1), TRP-2/6b, TRP-2/INT2, Trp-p8, 티로시나제, UPA (U-플라스미노겐 활성화제), VEGF (혈관 내피 성장 인자 A), VEGFR-2/FLK-1 및 WT1 (빌름스 종양 1)로부터 선택될 수 있거나, α -액티닌-4/m, ARTC1/m, bcr/abl, 베타-카테닌/m, BRCA1/m, BRCA2/m, CASP-5/m, CASP-8/m, CDC27/m, CDK4/m, CDKN2A/m, CML66, COA-1/m, DEK-CAN, EFTUD2/m, ELF2/m, ETV6-AML1, FN1/m, GPNMB/m, HLA-A*0201-R170I, HLA-A11/m, HLA-A2/m,

HSP70-2M, KIAA0205/m, K-Ras/m, LDLR-FUT, MART2/m, ME1/m, MUM-1/m, MUM-2/m, MUM-3/m, 미오신 클래스 1/m, 네오-PAP/m, NFYC/m, N-Ras/m, OGT/m, OS-9/m, p53/m, Pml/RARa, PRDX5/m, PTPRX/m, RBAF600/m, SIRT2/m, SYTSSX-1, SYT-SSX-2, TEL-AML1, TGFbRII 및 TPI/m 중에서 선택된, 치료될 암에서 발견된 인간 종양 항원의 돌연변이된 형태일 수 있다. 예를 들어, 표적 항원은 CD19 또는 CD22 사이에서 선택될 수 있다.

3.3 투인원 벡터의 성분

본원에 제공된 바와 같이, 투인원 벡터는 면역 세포의 기능을 약화시키는 하나 이상의 유전자의 발현을 억제하는 하나 이상의 유형의 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)를 코딩하는 염기 서열 및 키메라 항원 수용체 (CAR) 또는 T 세포 수용체 (TCR), 예를 들어, 모노클로날 T 세포 수용체 (mTCR)를 코딩하는 염기 서열을 포함한다.

일부 실시양태에서, 투인원 벡터는 숙주 세포 계능으로의 서열의 삽입을 촉진하는 인자를 코딩하는 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 서열은 벡터 유전자의 한쪽 또는 양쪽 단부(들)에 위치한다. 일부 실시양태에서, 서열은 LTR (긴 말단 서열)이다.

일부 실시양태에서, 투인원 벡터는 상기 기재된 삽입이 발생한 세포의 정제에 사용되는 단백질을 코딩하는 도메인을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 도메인은 ALNGFR 도메인이며, 여기서 ALNGFR은 상기 기재된 삽입이 발생한 세포의 정제에 사용된 세포질 도메인이 없는 LNGFR (저-친화도 신경 성장 인자 수용체)이다.

일부 실시양태에서, 투인원 벡터는 지속된 발현을 특징으로 하는 ALNGFR 및 CAR 둘 다의 발현을 유도하는 프로모터, 예를 들어, 도 22a에 도시된 바와 같이 ALNGFR 및 CD19 CAR 둘 다의 발현을 유도하는 EF1a 프로모터를 포함할 수 있다. 추가의 실시양태에서, ΔLNGFR 및 CD19 CAR은 이들이 단일 mRNA 상에 존재하는 형태로 먼저 전사된다. 둘 이상의 시스트론이 동일한 mRNA 상에 존재하는 이러한 실시양태에서, IRES (내부 리보솜 진입 부위)가 그 사이에 삽입되어 시스트론 둘 다의 발현을 야기할 수 있다. 그러나, IRES는 지나치게 길며, 하류(downstream) 시스트론의 발현 효율이 감소되는 것으로 보고된다. 일부 실시양태에서, IRES 이외의 성분, 예를 들어, P2A (2a 펩티드)는 이러한 단점을 극복하기 위해 사용될 수 있으며, 여기서 번역 동안 리보솜은 P2A의 C 말단에 펩티드 결합을 형성하지 않고 통과하여 하류 유전자가 나중에 발현될 것을 허용한다.

일부 예시적인 투인원 벡터는 도 1a, 6a, 14 및 22a에 도시된 투인원 벡터이며, 이 벡터는 염기 서열 서열번호 220 또는 221 중 어느 하나를 포함한다. 서열번호 220 및 221의 염기 서열을 포함하는 예시적인 벡터는 도 1a 및 1b에 도시된 구조를 가질 수 있다. 일부 예시적인 플라스미드가 표 1에 열거된다.

표 1. 예시적인 플라스미드.

번호	예시적인 플라스미드
1	pLV (lentivirus)-ΔLNGFR_P2A_CD19-CAR_mU6-shGFP
2	pLV-ΔLNGFR_P2A_CD19-CAR_mU6-shPD-1
3	pLV-ΔLNGFR_P2A_CD19-CAR_mU6-shTIM-3
4	pLV-ΔLNGFR_P2A_CD19-CAR_mU6-shPD-1_MCS
5	pLV-ΔLNGFR_P2A_CD19-CAR_hU6-shPD-1_MCS
6	pLV-ΔLNGFR_P2A_CD19-CAR_mU6-shTIM-3→←shPD-1-hU6
7	pLV-ΔLNGFR_P2A_CD19-CAR_shPD-1-hU6_MCS
8	pLV-ΔLNGFR_P2A_CD19-CAR_shTIM-3-mU6←→hU6-shPD-1

일부 실시양태에서, 상기 기재된 벡터에 포함된 염기 서열 및 각각의 shRNA의 핵산 서열은 본원에 기재된 서열 이외에도 이들 서열과 50% 이상, 구체적으로 70% 이상, 더 구체적으로 80% 이상, 보다 더 구체적으로 90% 이상, 및 가장 구체적으로 95% 이상의 서열 상동성을 나타내는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 이는, 특히 siRNA가 되도록 세포 내에서 가공되는 siRNA (작은 간섭 RNA) 및 shRNA의 경우, 어느 정도의 돌연변이, 특히 5' 말단에서의 돌연변이가 용인가능하여 표적 유전자의 정상적인 녹다운을 야기하고, siRNA 및 shRNA의 돌연변이가 표적 유전자의 녹다운을 보다 효과적으로 유도하는 유전자 침묵에서 역할을 하는 miRNA의 것과 유사한 구조를 갖도록 만들어지는 것으로 보고되기 때문이다. 또한, 벡터의 사용에서, 당업자에게 자명한 것은 벡터 내의 변경, 즉, 벡터에 특정 서열을 도입하기 위한 클로닝 과정에서 발생할 수 있는 염기 서열의 첨가, 변형 또는 결실, 또는 의

도된 유전자가 발현되는 정도의 벡터 사용의 용이성을 개선시키기 위한 성분의 변화 또는 도입이다.

[0369] **4. 하나 이상의 면역 체크포인트를 표적으로 하는 CAR-T 세포의 생산 및 평가**

[0370] 본원에 제공된 바와 같이, 투인원 벡터는 면역 세포의 기능을 약화시키는 하나 이상의 유전자의 발현을 억제하는 하나 이상의 유형의 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)를 코딩하는 염기 서열, 및 키메라 항원 수용체 (CAR) 및 T 세포 수용체 (TCR), 예를 들어, 모노클로날 T 세포 수용체 (mTCR) 중 어느 하나를 코딩하는 염기 서열을 포함한다. 벡터는 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자의 억제된 발현을 갖는 면역 세포의 생산을 위해 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 벡터는 DNA, RNA, 플라스미드, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 및 레트로바이러스 벡터로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0371] 일 양태에서, 본원에 기재된 면역 세포는 이것이 상기 벡터를 포함하고 CAR 또는 TCR, 예를 들어, mTCR을 발현하는 것, 및 하나 이상의 유형의 shRNA의 표적 유전자의 발현이 감소된 것을 특징으로 한다. 일부 실시양태에서 하나 이상의 유형의 shRNA의 표적 유전자의 발현은 대조군의 것의 약 90% 이하로 감소되고, 예를 들어, 표적 유전자의 발현은 대조군 것의 약 80% 이하, 약 70% 이하, 약 60% 이하, 약 50% 이하, 약 40% 이하, 약 30% 이하, 약 20% 이하 및 약 10% 이하로 감소된다. 일부 실시양태에서, 면역 세포는 인간-유래 T 세포와 NK 세포 사이에서 선택된다.

[0372] 다른 양태에서, 본원은 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 다음을 동시에 또는 임의의 순서로 순차적으로 면역 세포 내로 도입함으로써: (1) 표적 항원에 특이적으로 결합하는 유전적으로 조작된 항원 수용체를 코딩하는 유전자; 및 (2) 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자의 면역 세포에서의 발현을 감소시키거나 감소시킬 수 있는 유전자 파괴제, 유전적으로 조작된 항원 수용체가 발현되고 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자의 발현이 감소된 면역 세포를 생산하는 단계를 포함하는 면역 세포의 생산 방법을 제공한다.

[0373] 일부 실시양태에서, 유전적으로 조작된 항원 수용체는 키메라 항원 수용체 (CAR) 또는 T 세포 수용체 (TCR)이다. 일부 실시양태에서, 유전적으로 조작된 항원 수용체는 CAR이다. 일부 실시양태에서, CAR은 세포 외 항원 인식 도메인, 막관통 도메인, 및 세포 내 신호 전달 도메인을 포함한다.

[0374] 일부 실시양태에서, CAR의 세포 외 항원 인식 도메인은 표적 항원에 특이적으로 결합한다.

[0375] 일부 실시양태에서, CAR의 세포 내 신호 전달 도메인은 CD3 제타 (CD3 ζ) 사슬의 세포 내 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, CAR의 세포 내 신호 전달 도메인은 공동자극성 분자를 추가로 포함한다.

[0376] 일부 실시양태에서, 공동자극성 분자는 ICOS, OX40, CD137 (4-1BB), CD27, 및 CD28로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 공동자극성 분자는 CD137 (4-1BB)이다. 일부 실시양태에서 공동자극성 분자는 CD28이다.

[0377] 일부 실시양태에서, 표적 항원은 암 세포, 암 조직 및/또는 종양 미세환경의 세포 표면 상에서 발현된다. 일부 실시양태에서, 표적 항원은 암 세포, 암 조직 및/또는 종양 미세환경에서, 발현이 증가된 암 항원 또는 암 항원의 돌연변이된 형태이다.

[0378] 일부 실시양태에서, 암 세포, 암 조직 및/또는 종양 미세환경에서 발현이 증가된 암 항원은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다: 5T4 (영양막 당단백질), 707-AP, 9D7, AFP (α -태아단백질), A1bZIP (안드로겐-유도된 bZIP), HPG1 (인간 전립선 특이적 유전자-1), α 5p1-인테그린, α 5 β 6-인테그린, α -메틸아실-코엔자임 A 라세마제, ART-4 (ADP리보실트랜스퍼라제-4), B7H4 (v-세트 도메인-함유 T-세포 활성화 억제제 1), BAGE-1 (B 흑색종 항원-1), BCL-2 (B-세포 CLL/림프종-2), BING-4 (WD 반복 도메인 46), CA 15-3/CA 27-29 (뮤신 1), CA 19-9 (암 항원 19-9), CA 72-4 (암 항원 72-4), CA125 (암 항원 125), 칼레티쿨린, CAMEL (흑색종에서 CTL-인식된 항원), CASP-8 (카스파제 8), 카텝신 B, 카텝신 L, CD19 (분화클러스터 19), CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD4, CD52, CD55, CD56, CD80, CEA (암배아 항원 SG8), CLCA2 (클로라이드 채널 보조 2), CML28 (만성 골수성 백혈병 종양 항원 28), 코엑토신-유사 단백질, 콜라겐 XXIII, COX-2 (사이클로옥시게나제-2), CT-9/BRD6 (암/고환 항원 9), Cten (c-말단 텐신-유사 단백질), 사이클린 B1, 사이클린 D1, cyp-B, CYPB1 (시토크롬 p450 패밀리 1 서브패밀리 b 멤버 1), DAM-10/MAGE-B1 (흑색종-연관 항원 B1), DAM-6/MAGE-B2, EGFR/Her1 (표피 성장 인자 수용체), EMMPRIN (바시긴), EpCam, EphA2 (EPH 수용체 A2), EphA3, ErbB3 (Erb-B2 수용체 티로신 키나아제 3), EZH2 (체스트 2 폴리콤 억제 복합체 2 서브유닛의 인헨서), FGF-5 (섬유아세포 성장 인자 5), FN (피브로넥틴), Fra-1 (Fos관련 항원-1), G250/CAIX (탄산 무수화효소 9), GAGE-1 (G 항원-1), GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7b, GAGE-8, GDEP (전립선에서 상이하게 발현된 유전자), GnT-V (글루코네이트 키나아제), gp100 (멜라노사이트 계통-특이적 항원 GP100), GPC3 (글리피칸3), HAGE (나선형 항원), HAST-2

(설포트랜스퍼라제 패밀리 1A 멤버 1), 헵신, Her2/neu/ErbB2 (Erb-B2 수용체 티로신 키나아제 2), HERV-K-MEL, HNE (메둘라신), 호메오박스 NKX 3.1, HOM-TES-14/SCP-1, HOM-TES-85, HPV-E6, HPV-E7, HST-2 (시르투인-2), hTERT, iCE (카스파제 1), IGF-1R (인슐린 유사 성장 인자-1 수용체), IL-13Ra2 (인터류킨-13 수용체 서브 유닛 α 2), IL-2R (인터류킨-2 수용체), IL-5 (인터류킨-5), 미성숙 라미닌 수용체, 칼리크레인 2, 칼리크레인 4, Ki67, KIAA0205 (리소포스파티딜글리세롤 아실트랜스퍼라제 1), KK-LC-1 (키타큐슈 폐 암 항원-1), KM-HN-1, LAGE-1 (L 항원 패밀리 멤버-1), 리빈, MAGE-A1, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGEA2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A9, MAGE-B1, MAGE-B10, MAGE-B16, MAGEB17, MAGE-B2, MAGE-B3, MAGE-B4, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-D1, MAGE-D2, MAGE-D4, MAGE-E1, MAGE-E2, MAGE-F1, MAGE-H1, MAGEL2 (흑색종 항원 패밀리 L2), 맘마글로빈 A, MART-1/Melan-A (T-세포-1에 의해 인식된 흑색종 항원), MART-2, 매트릭스 단백질 22, MC1R (멜라노코르틴 1 수용체), M-CSF (대식세포 콜로니-자극 인자), 메소텔린, MG50/PXD (퍼옥시다신), MMP 11 (매트릭스 메탈로프로테아제 11), MN/CA IX-항원 (탄산 무수화효소 9), MRP-3 (다중약물 내성-연관 단백질-3), MUC1 (뮤신 1), METC2, NA88-A (VENT-유사 호메오박스 2 위유전자 1), N-아세틸글루코스-아미닐트랜스퍼라제-V, 네오-PAP (네오-폴리 (A) 폴리머라제), NGEP (전립선에서 발현된 새로운 유전자), NMP22 (핵 매트릭스 단백질 22), NPM/ALK (뉴클레오포스민), NSE (뉴런-특이적 에놀라아제), NY-ESO-1, NY-ESO-B, OA1 (골관절염 QTL 1), OFA-iLRP (종양태아성 항원 미성숙 라미닌 수용체 단백질), OGT (O-GlcNAc 트랜스퍼라제), OS-9 (소포체 렉틴), 오스테오칼신, 오스테오폰틴, p15 (CDK 억제제 2B), p53, PAGE-4 (P 항원 패밀리 멤버-4), PAI-1 (플라스미노겐 활성화제 억제제-1), PAI-2, PAP (전립선 산성 포스파타아제), PART-1 (전립선 안드로젠-제어된 전사물 1), PATE (전립선 및 고환 발현된 1), PDEF (전립선-유래 Ets 인자), Pim-1-키나아제 (프로바이러스성 통합 부위 1), Pin1 (펩티드-프롤릴 시스-트랜스 아이소머라제 NIMA-상호작용 1), POTE (전립선, 난소, 고환 및 태반에서 발현됨), PRAME (흑색종에서 우선적으로 발현된 항원), 프로스테인, 프로테이나제-3, PSA (전립선-특이적 항원), PSCA (전립선 스템 세포 항원), PSGR (전립선-특이적 G-단백질 커플링된 수용체), PSM, PSMA (전립선 특이적 막 항원), RAGE-1 (신장 종양 암종 항원), RHAMM/CD168, RU1 (신장 산재 단백질 1), RU2, SAGE (육종 항원), SART-1 (T-세포-1에 의해 인식되는 편평 세포 암종 항원), SART-2, SART-3, Sp17 (정자 단백질 17), SSX-1 (SSX 패밀리 멤버 1), SSX-2/HOM-MEL-40, SSX-4, STAMP-1 (STEAP2 메탈로리덕테이즈), STEAP, 서바이빈, 서바이빈-213, TA-90 (종양 연관 항원-90), TAG-72 (종양 연관 당단백질-72), TARP (TCR γ 대안 리딩프레임 단백질), TGF β (형질전환 성장 인자 β), TGF β R11 (형질전환 성장 인자 β 수용체 11), TGM-4 (트랜스글루타미나제 4), TRAG-3 (텍슬 내성 연관 유전자 3), TRG (T-세포 수용체 γ 유전자좌), TRP-1 (일시적 수용체 전위-1), TRP-2/6b, TRP-2/INT2, Trp-p8, 티로시나제, ~~ETPA~~ (E-플라스미노겐 활성화제), VEGF (혈관 내피 성장 인자 A), VEGFR-2/FLK-1, 및 WT1 (빌름스 종양 1).

[0379] 일부 실시양태에서, 표적 항원은 CD19 또는 CD22이다. 일부 실시양태에서, 표적 항원은 CD19이다.

[0380] 일부 실시양태에서, 종양 항원의 돌연변이된 형태는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다: a-액티닌-4/m, ARTC1/m, bcr/abl, 베타-카테닌/m, BRCA1/m, BRCA2/m, CASP-5/m, CASP-8/m, CDC27/m, CDK4/m, CDKN2A/m, CML66, COA-1/m, DEK-CAN, EFTUD2/m, ELF2/m, ETV6-AML1, FN1/m, GPNMB/m, HLA-A*0201-R170I, HLA-A11/m, HLA-A2/m, HSP70-2M, KIAA0205/m, K-Ras/m, LDLR-FUT, MART2/m, ME1/m, MUM-1/m, MUM-2/m, MUM-3/m, 미오신 클래스 1/m, 네오-PAP/m, NFYC/m, N-Ras/m, OGT/m, OS-9/m, p53/m, Pml/RAR α , PRDX5/m, PTPRX/m, RBAF600/m, SIRT2/m, SYTSSX-1, SYT-SSX-2, TEL-AML1, TGF β RII, 및 TPI/m.

[0381] 일부 실시양태에서, 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자의 발현은 다음 중 하나 이상을 야기한다: i) 면역 세포의 증식을 억제하거나; ii) 면역 세포의 세포 사멸을 유도하거나; iii) 면역 세포가 표적 항원을 인식하고/하거나 활성화시키는 데 필요한 분자의 기능을 억제하거나; iv) 표적 항원에 대한 면역 반응을 일으키는 대신에 상이한 기능을 하는 상이한 유형으로의 면역 세포의 분화를 유도하거나; v) 면역 세포의 면역 반응을 촉진시키는 분자와 면역 세포의 반응을 감소시키거나; 또는 vi) 면역 세포의 면역 반응을 억압하는 분자와 면역 세포의 반응을 증가시킨다.

[0382] 일부 실시양태에서, 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다: PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (CEACAM-1, CEACAM-3 또는 CEACAM-5), LAG 3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, CD96, MerTK, 2B4, FAS, CD45, PP2A, SHP1, SHP2, DGK 알파, DGK 제타, Cbl-b, Cbl-c, CD148, LRR1, TGFBR1, IL10RA, KLGR1, DNMT3A, 및 A2aR. 일부 실시양태에서, 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자는 면역 세포의 면역 반응을 억압하는 분자와 면역 세포의 반응을 증가시킨다. 일부 실시양태에서, 면역 세포의 면역 반응을 억압하는 분자와 면역 세포의 반응을 증가시키는 유전자는 면역 체크포인트 수용체 또는 리간드를 코딩한

다.

- [0383] 일부 실시양태에서, 면역 체크포인트 수용체 또는 리간드는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다: PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (CEACAM-1, CEACAM-3 또는 CEACAM-5), LAG 3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, CD96, MerTK, 및 2B4.
- [0384] 일부 실시양태에서, 유전자 파괴제는 유전자 파괴제의 부재 하의 면역 세포와 비교하여 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 95% 이상으로 면역 세포의 기능을 약화시키는 면역 세포에서의 유전자의 발현을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 유전자 파괴제는 면역 세포의 면역 반응을 억압하는 분자와 면역 세포의 반응을 증가시키는 유전자의 발현을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 유전자 파괴제는 면역 체크포인트 수용체 또는 리간드를 코딩하는 유전자의 발현을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 유전자 파괴제는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 유전자의 발현을 감소시킨다: PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (CEACAM-1, CEACAM-3 또는 CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD 160, CD96, MerTK, 및 2B4.
- [0385] 일부 실시양태에서, 유전자 파괴제는 RNA 간섭 (RNAi)에 의해 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자의 발현을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 하나 초과와 유전자 파괴제는 RNAi에 의해 면역 세포에서 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자의 발현을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 유전자 파괴제는 면역 세포의 기능을 약화시키는 단일 유전자의 상이한 부분을 표적으로 하거나, 면역 세포의 기능을 약화시키는 상이한 유전자를 표적으로 하거나, 이들의 임의의 조합을 표적으로 한다. 일부 실시양태에서, RNAi는 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)에 의해 매개된다. 일부 실시양태에서, RNAi는 하나 초과와 shRNA에 의해 매개된다.
- [0386] 일부 실시양태에서, RNAi는 2 개의 shRNA에 의해 매개된다. 일부 실시양태에서, 2 개의 shRNA는 PD-1의 상이한 부분을 표적으로 한다. 일부 실시양태에서, 2 개의 shRNA는 각각 PD-1 및 TIM-3을 표적으로 한다. 일부 실시양태에서, 2 개의 shRNA는 각각 PD-1 및 CTLA-4를 표적으로 한다. 일부 실시양태에서, 2 개의 shRNA는 각각 PD-1 및 LAG-3을 표적으로 한다. 일부 실시양태에서, 2 개의 shRNA는 각각 PD-1 및 TIGIT를 표적으로 한다.
- [0387] 일부 실시양태에서, shRNA를 코딩하는 염기 서열은 서열번호 1-219 및 238-267로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함한다.
- [0388] 일부 실시양태에서, 상이한 shRNA의 발현은 상이한 프로모터에 의해 각각 제어된다. 일부 실시양태에서, 2 개의 상이한 shRNA의 발현은 2 개의 상이한 프로모터에 의해 각각 제어된다. 일부 실시양태에서, 2 개의 상이한 프로모터는 RNA 폴리머라제 III 프로모터이다. 일부 실시양태에서, 2 개의 프로모터는 상이한 종으로부터 유래된 U6 프로모터이다. 일부 실시양태에서, 2 개의 프로모터는 서로 상이한 방향으로 배향된다.
- [0389] 일부 실시양태에서, 유전적으로 조작된 항원 수용체 및 유전자 파괴제는 벡터로부터 각각 발현된다. 일부 실시양태에서, 유전적으로 조작된 항원 수용체 및 유전자 파괴제는 동일한 벡터로부터 발현된다. 일부 실시양태에서, 벡터는 DNA, RNA, 플라스미드, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 및 레트로바이러스 벡터로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 벡터는 렌티바이러스 벡터이다.
- [0390] 면역 세포는 림프구, 예컨대, 살해 T 세포, 헬퍼 T 세포, 감마 델타 T 세포 및 B 세포, 자연살해 세포, 비만 세포, 호산구, 호염기구로부터 선택된 것을 특징으로 할 수 있으며; 식세포는 대식세포, 호중구 및 수지상 세포를 포함한다. T 세포는 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, B-세포 림프종은 미만성 거대 B 세포 림프종 (DLBCL), 원발성 종격동 B-세포 림프종 (PMBL), 호지킨 림프종 (HL), 비-호지킨 림프종, 종격동 회색 존 림프종 (mediastinal gray zone lymphoma), 또는 결절 경화 HL이다. 일부 실시양태에서, T-세포 림프종은 역형성 대세포 림프종 (ALCL), 달리 특정되지 않은 말초 T 세포 림프종 (PTCL-NOS), 또는 혈관면역모세포성 T 세포 림프종 (AITL)이다. 바람직한 실시양태에서, 면역 세포는 인간-유래 T 세포 또는 T 림프구 및 자연살해 (NK) 세포로부터 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, 면역 세포는 T 세포이다. 일부 실시양태에서, T 세포는 CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포이다.
- [0391] 일부 실시양태에서, 면역 세포는 대상체로부터 원래 유래된 세포로부터 생산된다. 일부 실시양태에서, 대상은 인간일 수 있다. 일부 실시양태에서, 인간은 건강한 공여자일 수 있다. 다른 실시양태에서, 대상체는 종양 또는 암을 갖는 것을 특징으로 할 수 있으며, 여기서 CAR 또는 TCR, 예를 들어, 세포에서 발현된 mTCR에 의해 표적된 암 항원 수준의 증가 또는 변경이 검출된다. 일부 실시양태에서, 세포는 예를 들어, 미국 특허 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041; 및 미국 특허 출원 공개공보 번호 20060121005에 기재된 바와 같은 방법을 사용하여 생산되고 일반적으로 확장될 수 있다.

- [0392] 일부 실시양태에서, CAR-T 세포가 생산된다. 추가의 실시양태에서, CAR-T 세포의 생산은 말초 혈액 모노클로날 세포를 제공하는 단계를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 말초 혈액 모노클로날 세포는 전혈 샘플로부터 분리될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR-T 세포의 생산은 항체를 사용하여 말초 혈액 모노클로날 세포의 자극 단계를 포함한다. 예로서, 1 차 자극 신호를 제공하는 약제는 항-CD3 항체 또는 이의 항원-결합 단편이고, 공동자극성 신호를 제공하는 약제는 항-CD28 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR-T 세포의 생산은 CAR의 형질도입 단계를 포함하고, 여기서 CAR은 본원에 기재된 임의의 표적 및 CAR의 임의의 다른 공지된 표적을 표적으로 할 수 있으며, 예를 들어 CAR은 CD19를 표적으로 하는 CD19 CAR일 수 있다. 추가의 실시양태에서, 생산된 CAR-T 세포는 단리된다.
- [0393] T 세포 배양에 적절한 조건은 혈청 (예컨대, 태아 소 또는 인간 혈청) 인터류킨-2 (IL-2), 인슐린, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGFP, 및 TNF- α 또는 당업자에 공지된 세포의 성장을 위한 임의의 다른 첨가제를 포함하는, 증식 및 생존능력에 필요한 인자를 함유할 수 있는 적절한 배지 (예컨대, Minimal Essential Media 또는 RPMI Media 1640 또는, X-vivo 15, (Lonza))를 포함한다. 세포 성장을 위한 다른 첨가제는 계면활성제, 플라스마네이트 및 환원제, 예컨대, N-아세틸-시스테인 및 2-머캅토에탄올을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 배지는 아미노산, 소듐 피루베이트 및 비타민이 첨가된, 혈청-프리(free) 또는 혈청 (또는 혈장) 또는 정의된 호르몬 세트의 적절한 양 및/또는 T 세포의 성장 및 확장을 위해 충분한 사이토카인(들)의 양이 보충된, RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 15 및 X-Vivo 20, Optimizer를 포함할 수 있다. 항생제, 예컨대, 페니실린 및 스트렙토마이신은 실험적 배양물에만 포함되며, 대상체 내에 주입될 세포 배양물에는 포함되지 않는다. 표적 세포는 성장을 지지하는데 필요한 조건, 예를 들어, 적절한 온도 (예컨대, 37 °C) 및 대기 (예컨대, 공기 + 5% CO₂)하에서 유지된다. T 세포의 배양 시간이 60 일 이상일 수 있도록 여러 주기의 자극이 또한 바람직할 수 있다.
- [0394] 다양한 자극 시간에 노출된 T 세포는 상이한 특성을 나타낼 수 있다. 예를 들어, 전형적인 혈액 또는 apheresed(어페레스된) 말초 혈액 단핵 세포 생산물은 세포독성 또는 억압인자 T 세포 집단 (TC, CD8+)보다 큰 헬퍼 T 세포 집단 (TH, CD4+)을 갖는다. CD3 및 CD28 수용체를 자극함으로써 T 세포의 엑스 비보 확장은 약 8 - 9 일 전에 주로 TH 세포로 이루어진 T 세포 집단을 생산하는 반면, 약 8 - 9 일 후에 T 세포 집단은 점점 더 큰 TC 세포의 집단을 포함한다. 따라서, 치료 목적에 따라, 주로 TH 세포를 포함하는 T 세포 집단으로 대상체를 주입하는 것이 이점일 수 있다. 유사하게, TC 세포의 항원-특이적 서브세트가 단리된 경우 이 서브세트를 더 큰 정도로 확장하는 것이 유리할 수 있다. 또한, CD4 및 CD8 마커 이외에도, 다른 표현형 마커는 세포 확장 과정 동안 유의하게 변하지만 큰 부분에서는 재현성있게 변한다. 따라서, 이러한 재현성은 특이적 목적을 위해 활성화된 T 세포 생산물을 조정하는 능력을 가능하게 한다.
- [0395] 예컨대, 항원 자극 후 확장하는 능력, 재-자극의 부재 하에 T 세포 확장을 지속하는 능력, 및 적절한 생체 외 및 동물 모델에서 항-암 활성을 갖는 능력에 제한되지 않는, 다양한 검정이 CAR-T 세포를 평가하기 위해 사용될 수 있다. 검정은 하기에 더 상세히 설명된다.
- [0396] 일부 실시양태에서, 1 차 T 세포에서의 CAR 발현의 웨스턴블롯 분석이 단량체 및 이량체의 존재를 검출하기 위해 사용될 수 있다. 예컨대, Milone et al, Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009) 참고.
- [0397] 일부 실시양태에서, 항원 자극 후 CAR+ T 세포의 생체 외 확장은 유세포 측정법에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, CD4+ 및 CD8+ T 세포의 혼합물은 aCD3/aCD28 aAPC로 자극된 후 분석될 프로모터의 조절 하에서 GFP를 발현하는 렌티바이러스성 벡터로 형질도입된다. 예시적인 프로모터는 CMV IE 유전자, EF-1 α , 유비퀴틴 C 또는 포스포글리세로키나아제 (PGK) 프로모터를 포함한다. GFP 형광은 유세포 측정법에 의해 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포 서브세트에서 배양 6 일에 평가된다. 예컨대, Milone et al, Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009) 참고. 대안적으로, CD4+ 및 CD8+ T 세포의 혼합물은 0 일에 aCD3/aCD28 코팅된 자성 비드로 자극되고, 2A 리보솜 스킵 서열을 사용하여 eGFP와 함께 CAR을 발현하는 비시스트로닉 렌티바이러스성 벡터를 사용하여 1 일에 CAR로 형질도입된다. 배양물은, 예컨대, 세척 후 항-CD3 및 항-CD28 항체 (K562-BBL-3/28)의 존재 하에 hCD32 및 4-1BBL을 발현하는 K562 세포로 재-자극된다. 외인성 IL-2는 100 IU/ml로 격일로 배양물에 첨가된다. GFP+ T 세포는 비드-기반 계수를 사용하는 유세포 측정법에 의해 열거된다. 예컨대, Milone et al, Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009) 참고. 재-자극의 부재 하에서 지속된 CAR+ T 세포 확장이 또한 측정될 수 있다.
- [0398] 세포 증식 및 사이토카인 생산의 평가는 예컨대, Milone et al, Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)에서 이전에 기재되었다. 간략히 말해서, CAR-매개 증식의 평가는 1:1의 최종 T-세포:표적 세포 비로 세척된 T 세포를 표적 세포, 예컨대, K562-Meso, Ovc4r3, Ovc4r8, SW1990, Panc02.03 세포 또는 CD32 및 CD137 (KT32-

BBL)와 혼합함으로써 마이크로타이터 플레이트에서 수행된다. 항-CD3 (클론 OKT3) 및 항-CD28 (클론 9.3) 모노클로날 항체는 이들 신호가 엑스 비보에서 장기간 CD8+ T 세포 확장을 지지하기 때문에 KT32-BBL 세포를 포함하는 배양물에 첨가되어 T-세포 증식을 자극하기 위한 양성 대조군으로서 역할을 한다. T 세포는 CountBright™ 형광 비드 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 및 제조자에 의해 기재된 유세포 측정법을 사용하여 배양물에서 열거된다. CAR+ T 세포는 eGFP-2A 연결된 CAR-발현 렌티바이러스성 벡터로 조작된 T 세포를 사용한 GFP 발현에 의해 식별된다. T 세포에서 CD4+ 및 CD8+ 발현은 또한 특이적 모노클로날 항체 (BD Biosciences)로 동시에 검출된다. 사이토카인 측정은 제조사의 지시에 따라 인간 TH1/TH2 사이토카인 세포계량 비드 어레이 키트 (BD Biosciences, San Diego, CA)를 사용하여 재-자극 후 24 시간에 수집된 상청액에 대해 수행된다. FACScalibur 유세포 분석기를 사용하여 형광을 평가하고, 제조사의 지시에 따라 데이터를 분석한다.

[0399] 세포독성은 본원에, 예컨대, 실시예에서 기재된 방법, 또는 표준 ⁵¹Cr-방출 검정 (Milone *et al*, Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009))에 의해 평가될 수 있다. 간략하게, 표적 세포 (예컨대, BHK 또는 CHO 세포)를 37 °C에서 2 시간 동안 빈번하게 교반하면서 51 Cr (NaCrO₄, New England Nuclear, Boston, MA)을 로딩하고, 완전한 RPMI에서 2 회 세척하고 마이크로타이터 플레이트에 플레이팅하였다. 효과기 T 세포를 다양한 비의 효과기 세포 표적 세포 (E:T)로 완전한 RPMI의 웰에서 표적 세포와 혼합하였다. 배지만을 함유하는 추가적인 웰 (자발적 방출, SR) 또는 1% 트리톤-X 100 세정제 용액 (총 방출, TR)을 또한 제조하였다. 37 °C에서 항온처리 4 시간 후, 각각의 웰로부터 상청액을 수확하였다. 이어서 방출된 ⁵¹Cr은 감마 입자 계수기 (Packard Instrument Co., Waltham, MA)를 사용하여 측정하였다. 각각의 조건은 적어도 3 회 반복(triplicate) 수행되었고, 용해 백분율은 다음 공식을 사용하여 계산하였으며, 여기서 ER은 각각의 실험적 조건에 대해 방출된 평균 ⁵¹Cr을 나타낸다: % 용해 = (ERSR) / (TR - SR). 유동 기반 세포독성 검정과 같은 대안적인 세포독성 검정이 또한 사용될 수 있다.

[0400] 본원의 실시예 섹션에 기재된 것들뿐만 아니라 당업계에 공지된 것들을 포함하여 다른 검정이 또한 본원에 생산된 CAR-T 세포를 평가하는데 사용될 수 있다.

[0401] 일부 실시양태에서, 본원에 생산된 면역 세포는 두 가지 유형의 shRNA 및 CAR 또는 TCR, 예를 들어, mTCR에 의해 표적된 항원이 발현되는 질환에 대한 면역 반응에 관여할 수 있다. 추가의 실시양태에서, 면역 세포는 인간 환자의 면역 요법을 위한 약학 조성물을 제공하는데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 약학 조성물은 중증 이상 반응을 유발하고 환자에게 추가적으로 고비용으로 부담을 줄 수 있는 면역 체크포인트 억제제가 필요없이 표적 병에 대한 치료적 효과를 나타낼 수 있다.

[0402] 일부 실시양태에서, 면역 세포는 면역 세포 치료제로서 사용될 수 있으며; 이러한 면역 세포는 보통 암 치료에 사용되지만 이에 제한되지 않는다. 추가의 실시양태에서, 이들 면역 세포가 암을 인식하게 하기 위해, 이들은 암 항원을 표적으로 하는 세포 표면 수용체를 발현하도록 변형된다.

[0403] 다른 양태에서, 본원은 상기 기재된 조작된 면역 세포를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0404] 5. 하나 이상의 면역 체크포인트를 표적으로 하는 CAR-T 세포를 사용한 치료

[0405] 본원에 제공된 바와 같이, 투인원 벡터는 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자의 발현을 억제하는 하나 이상의 유형의 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)를 코딩하는 염기 서열, 및 임의의 것을 암호화하는 염기 서열을 포함한다. 키메라 항원 수용체 (CAR) 및 T 세포 수용체 (TCR), 예를 들어, 모노클로날 T 세포 수용체 (mTCR) 중 어느 하나를 코딩하는 염기 서열을 포함한다. 일 실시양태에 따른 벡터를 사용하여, 면역 세포가 생산될 수 있으며, 여기서 면역 세포는 면역 체크포인트 수용체 발현이 감소되고 CAR 또는 TCR, 예를 들어, 표적 분자에 특이적인 mTCR을 발현한다. 상기 면역 세포는 면역 요법을 위한 약학 조성물을 제공하는데 사용될 수 있다.

[0406] 본원에 기재된 바와 같은 면역 세포를 입양 면역 요법에 적합한 대상체에 도입함으로써 다양한 질환이 완화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제공된 바와 같이 생산된 CAR-T 세포는 동종이계 입양 세포 요법을 위한 것이다. 본원은 추가적으로 조성물을 입양 세포 요법에 적합한 대상체에 도입하는 것을 포함하여 본원에 기재된 조성물의 치료적 용도를 제공하며, 여기서 대상체는 자가면역 장애; 혈액학적 악성; 고형 종양; 또는 HIV, RSV, EBV, CMV, 아데노바이러스 또는 BK 폴리오마바이러스와 연관된 감염을 갖는다.

[0407] 혈액학적 악성의 예는 급성 및 만성 백혈병 (급성 골수형성 백혈병 (AML), 급성 림프아구성 백혈병 (ALL), 만성 골수형성 백혈병 (CML), 림프종, 비-호지킨 림프종 (NHL), 호지킨 질환, 다발성 골수종 및 골수이형성 증후군을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 고형 암의 예는 뇌, 전립선, 유방, 폐, 결장, 자궁, 피부, 간, 췌장, 난

소, 고환, 방광, 신장, 머리, 목, 위, 자궁 경부, 직장, 후두 및 식도의 암을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 다양한 자가면역 장애의 예는 원형 탈모증, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 간염, 피부근염, 당뇨병 (타입 1), 일부 형태의 소아 특발성 관절염, 사구체신염, 그레이브스 질환, 길랭-바레 증후군, 특발성 혈소판감소성 자반증, 중증 근무력증, 일부 형태의 심근염, 다발성 경화증, 친포창/유사친포창, 악성 빈혈, 결절성 다발동맥염, 다발성근염, 원발성 담즙성 경변증, 건선, 류머티즘성 관절염, 피부경화증/경피증, 쇼그렌 증후군, 전신성 루푸스, 홍반성, 일부 형태의 갑상선염, 일부 형태의 포도막염, 백반증, 다발혈관염을 갖는 육아종증 (베게너)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 바이러스성 감염의 예는 HIV- (인간 면역결핍 바이러스), HSV- (단순 헤르페스 바이러스), KSHV- (카포시 육종-연관 헤르페스바이러스), RSV- (호흡기 세포융합 바이러스), EBV- (엡스타인-바 바이러스), CMV- (사이토메갈로바이러스), VZV (바리셀라 조스터 바이러스), 아데노바이러스-, 렌티바이러스-, BK 폴리오마바이러스-연관 장애를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0408] 급성 백혈병은 미성숙 혈액 세포의 급속한 증식을 특징으로 한다. 이 밀집은 골수가 건강한 혈액 세포를 생산할 수 없게 만든다. 어린이와 청소년에게 급성 형태의 백혈병이 발생할 수 있다. 사실, 이는 임의의 다른 유형의 악성 질환보다 미국에서 더 흔한 어린이의 사망 원인이다. 이후 혈류로 흘러 나와 신체의 다른 기관으로 퍼지는 악성 세포의 급속한 진행 및 축적으로 인해 급성 백혈병에서는 즉각적인 치료가 필요하다. 중추 신경계 (CNS) 관련은 드물지만 이 질환은 가끔 두개골 신경 마비를 일으킬 수 있다. 만성 백혈병은 상대적으로 성숙하지만 여전히 비정상적인 혈액 세포의 과도한 축적으로 구별된다. 전형적으로 진행에 수개월에서 수년이 걸리면, 세포는 정상 세포보다 훨씬 더 높은 속도로 생산되어 혈액에 많은 비정상적인 백혈구를 야기한다. 만성 백혈병은 대부분 노인에서 발생하지만 이론적으로는 임의의 연령대에서 발생할 수 있다. 급성 백혈병은 즉시 치료되어야 하지만, 요법의 유효성을 최대화하기 위해 치료 전에 얼마 동안 만성 형태를 때때로 모니터링한다. 또한, 질환은 일반적으로 림프구를 형성하기 위해 진행되는 골수 세포 유형에서 암성 변화가 발생했음을 나타내는, 림프구성 또는 림프아구성, 및 일반적으로 적혈구, 일부 유형의 백혈구 및 혈소판을 형성하기 위해 진행되는 골수 세포의 유형에서 암성 변화가 발생했음을 나타내는, 골수형성 또는 골수성으로 분류된다(림프성 세포 대 골수성 세포 참고).

[0409] 급성 림프구성 백혈병 (또한 급성 림프아구성 백혈병 또는 ALL로서 알려짐)은 어린 아이들에게 가장 흔한 유형의 백혈병이다. 이 질환은 또한 성인, 특히, 65 세 이상에게도 영향을 미친다. 만성 림프구성 백혈병 (CLL)은 55 세 초과의 성인에게 가장 자주 영향을 미친다. 때로는 젊은 성인에게서 발생하지만 어린이에게는 거의 영향을 미치지 않는다. 급성 골수형성 백혈병 (또한 급성 골수성 백혈병 또는 AML로서 알려짐)은 어린이보다 성인에서 더 흔하게 발생한다. 이 유형의 백혈병은 이전에 "급성 비림프성 백혈병"으로 칭해졌다. 만성 골수형성 백혈병 (CML)은 주로 성인에서 발생한다. 아주 적은 수의 어린이들도 또한 이 질환을 앓는다.

[0410] 림프종은 림프구(척추동물 면역계의 백혈구 유형)에서 기원하는 암 유형이다. 많은 유형의 림프종이 있다. 미국 국립 보건원 (National Institutes of Health)에 따르면 림프종은 미국의 모든 암 사례의 약 5%를 차지하고, 특히 호지킨 림프종은 미국의 모든 암 사례의 1 % 미만을 차지한다. 림프계는 신체 면역계의 일부이기 때문에 예컨대, HIV 감염이나 특정 약물이나 약 치료로부터 면역계가 약화된 환자도 또한 높은 림프종 발병률을 갖는다.

[0411] 19th 및 20th 세기에 고통은 1832년 토마스 호지킨 (Thomas Hodgkin)에 의해 발견되었기 때문에 호지킨 질환으로 칭해졌다. 구어적으로 림프종은 호지킨 림프종 및 비-호지킨 림프종 (다른 모든 유형의 림프종)으로 크게 분류된다. 림프종 유형의 과학적 분류가 보다 상세하다. 이전 분류는 조직구 림프종을 지칭하지만, 이들은 B, T 또는 NK 세포 계통의 새로운 분류로 인식된다.

[0412] CAR 또는 TCR, 예를 들어, mTCR의 표적 분자가 발현되는 암을 갖는 환자에 약학 조성물이 투여될 때, 약학 조성물은 암을 인식하며, 암세포와 관련하여 면역 세포의 기능을 약화시키는 유전자의 활성화없이 및 문제점, 예컨대, 이에 의해 유발된 활성화-억제 시그널링으로 인한 고갈없이 면역 활성을 가질 수 있다.

[0413] 일부 실시양태에서, 면역 세포를 포함하는 상기 약학 조성물은 면역 체크포인트 수용체의 발현을 보다 효과적으로 억압하면서 동시에 키메라 항원 수용체가 기능할 수 있는 항-암 면역 세포 요법의 유효성을 최대화할 수 있다. 추가의 실시양태에서, 상기 기재된 바와 같이 면역 체크포인트 수용체의 발현이 억압된 세포가 약학 조성물에 사용되므로, 면역 체크포인트 수용체에 대한 별도의 억제제의 사용으로 인해 발생할 수 있는 중증이고 전신적 이상 반응, 예컨대, 사이토카인 방출 증후군 및 자가면역 증상, 및 세포 요법과 함께 고가의 항체 요법의 병행 사용으로 인해 증가된 치료 비용으로 인한 부담을 제거하는 것이 가능하다.

[0414] 세포 이외에 면역 반응을 추가로 개선시킬 수 있는 다른 약학적으로 허용가능한 염, 담체, 부형제, 비히클 및

기타 첨가제 등이 약학 조성물에 첨가될 수 있다는 것이 자명하므로, 이의 상세한 설명은 생략한다.

[0415] 일부 실시양태에서, 약학 조성물은 본원에 기재된 바와 같은 2 개의 면역 체크포인트를 표적으로 하는 이원 CAR-T 세포를 포함한다. 예를 들어 이원 면역 체크포인트는 PD1 (프로그램화된 세포 사멸 단백질 1), PD-L1 (프로그램화된 사멸-리간드 1), CTLA4 (세포독성 T-림프구 연관 단백질 4), TIM-3 (T-세포 면역글로불린 및 뮤신-도메인 함유-3), CEACAM (암배아 항원-관련된 세포 부착 분자, 3 개의 서브유형 CEACAM-1, CEACAM-3 또는 CEACAM-5를 포함함), LAG3 (림프구-활성화 유전자 3), VISTA (T 세포 활성화의 V-도메인 Ig 억압인자), BTLA (B- 및 T-림프구 약화인자), TIGIT (Ig 및 ITIM 도메인을 포함하는 T 세포 면역수용체), LAIR1 (백혈구-연관 면역글로불린-유사 수용체 1), CD160 (분화클러스터 160), CD96 (분화클러스터 96), MerTK (원종양 유전자 티로신-단백질 키나아제 MER) 및 2B4 (NK 세포 활성화-유도성 리간드)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으며, 예를 들어, PD1 및 TIM3 사이에서 선택될 수 있다.

[0416] 일부 실시양태에서, 표적된 면역 체크의 유형은 약학 조성물의 항-종양 효과에 영향을 미친다. 예를 들어, PD-1 및 TIM3을 표적으로 하는 약학 조성물은 PD-1 및 TIGIT를 표적으로 하는 약학 조성물의 것과 상이한 수준의 항-종양 효과를 나타낼 수 있다. 추가의 실시양태에서, 상기 항-종양 효과의 차이는 동일한 면역 체크포인트를 표적으로 하는 다른 약물의 항-종양 효과에 대한 공지된 지식으로부터 예측가능하지 않으며, 예를 들어, 다른 약물은 면역 체크포인트를 표적으로 하는 항체를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 특정 2 개의 면역 체크포인트를 표적으로 하는 것은 놀랍게도 높은 항-종양 효과를 생산할 수 있다. 예시적인 실시양태 (실시예 10)에서, PD-1 및 TIGIT를 표적으로 하는 CAR-T 세포는 PD-1 및 CTLA-4, PD-1 및 LAG-3, 및 PD-1 및 TIM-3의 조합을 표적으로 하는 다른 이원 KD CAR-T 세포와 비교하여 놀랍게도 우수한 항종양 효과를 나타낸다.

[0417] 일 양태에서, 본원에 기재된 조성물은 각각의 투여량 유닛, 예컨대, 주사가 단독으로 또는 다른 활성제와의 적절한 병용으로 미리결정된 양의 조성물을 함유하는 유닛 투여량 형태로 제공될 수 있다. 본원에 사용된 용어 유닛 투여량 형태는 인간 및 동물 대상체에 대한 일원화된(unitary) 투여량으로서 적합한 물리적 이산 유닛을 지칭하며, 각각의 유닛은 단독으로 또는 다른 활성제와 병용하여 본원에 기재된 미리결정된 수량의 조성물을 함유하며, 적절한 경우 약학적으로 허용가능한 희석제, 담체 또는 비히클과 연관하여 원하는 효과를 생산하기에 충분한 양으로 계산된다. 본원에 기재된 세포 또는 조성물의 신규한 유닛 투여량 형태에 대한 사양은 특정 대상체에서 약학 조성물과 연관된 특정 약력학에 따라 달라진다.

[0418] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 세포 또는 조성물에 대한 바람직한 약학 투여량 형태는 본 개시내용의 내용 및 제제화 기술에 대한 일반적인 지식에 기반하여 및 의도된 투여 경로, 전달 방법 및 표적 용량에 따라 결정될 수 있다. 투여 방법에도 불구하고, 유효량은 환자의 체중, 표면적 또는 기관 크기에 따라 계산될 수 있다. 본 명세서에 언급된 각각의 투여 형태 및 추가적인 정제를 사용한 요법을 위한 적절한 투여 용량을 결정하기 위한 계산은 당업계에서 매일 수행되며, 당업계에서 매일 수행되는 작업 범위 내에 포함된다. 적절한 투여 용량은 적절한 용량-반응 데이터의 사용을 통해 식별될 수 있다.

[0419] 본원에 기재된 약학 조성물은 단독으로 또는 암 치료에 유용한 다른 공지된 약제와 병용하여 사용될 수 있다. 단독으로 전달되거나 다른 약제와 병용하여 전달되든지에 관계없이, 본원에 기재된 약학 조성물은 다양한 경로를 통해 및 포유동물, 특히 인간 신체의 다양한 부위로 전달되어 특정 효과를 달성할 수 있다. 당업자는, 하나 초과와 경로의 투여에 사용될 수 있지만, 특정 경로는 다른 경로보다 더 즉각적이고 더 효과적인 반응을 제공할 수 있음을 인식할 것이다. 예를 들어, 피내 전달은 흑색종의 치료를 위해 흡입보다 유리하게 사용될 수 있다. 국소 또는 전신적 전달은 체제를 체강 내로의 적용 또는 점적, 에어로졸의 흡입 또는 통기를 포함하는 투여에 의해, 또는 근육 내, 정맥 내, 문맥내, 간내, 복막 내, 피하 또는 피내 투여를 포함하는 비경구 도입에 의해 달성될 수 있다. 대상체에 대한 예시적인 투여 경로는 정맥 내 (IV) 주사, 및 국부 (종양 내, 복강 내) 투여를 포함한다. 일부 실시양태에서, 약학 조성물은 고형 종양으로의 주입을 통해 투여될 수 있다.

[0420] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 게놈적으로 조작된 면역 세포에 추가하여, 병태, 질환 또는 징후와 연관된 항원을 표적으로 하는 항체, 또는 항체 단편을 포함하는 추가적인 치료제가 병용 요법에서 이들 효과기 세포와 함께 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간화 항체, 인간화 모노클로날 항체 또는 키메라 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 바이러스성 항원에 특이적으로 결합한다. 다른 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 종양 항원에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 투여된 게놈적으로 조작된 면역 세포에 대한 추가적인 치료제로서 병용 치료에 적합한 항체는 항-CD20 (리툰시맙, 벨투주맙, 오파투무맙, 우블리투시맙, 오키라투주맙, 오비누투주맙), 항-HER2 (트라스투주맙, 퍼투주맙), 항-CD52 (아렘투주맙), 항-EGFR (세르투시맙), 항-GD2 (디누투시맙), 항-PDL1 (아벨루맙), 항-CD38

(다라투무맙, 이사특시맙, MOR202), 항-CD123 (7G3, CSL362), 항-SLAMF7 (엘로투주맙); 및 이들의 인간화 또는 Fc 변형된 변이체 또는 단편, 또는 이들의 기능적 등가물 및 바이오시밀러를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

- [0421] 바람직하게는 유효량 또는 충분한 수의 단리된 형질도입된 T 세포는 조성물에 존재하고, 이러한 치료의 부재를 초래하는 것보다 종양의 크기를 감소시키거나 종양 성장 또는 재성장을 제거하기 위해 장기간의 특이적인 항-종양 반응이 확립되도록 대상체에게 도입된다. 바람직하게는, 대상체로 재도입된 형질도입된 T 세포의 양은 형질도입된 T 세포가 존재하지 않는 달리 동일한 조건과 비교할 때 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 100%의 종양 크기의 감소를 야기한다.
- [0422] 따라서, 투여된 형질도입된 T 세포의 양은 투여 경로를 고려해야 하고, 원하는 치료적 반응을 달성하기 위해 충분한 수의 형질도입된 T 세포가 도입될 정도로되어야 한다. 또한, 본원에 기재된 조성물에 포함된 각각의 활성제의 양 (예컨대, 접촉될 각각의 세포 당 양 또는 특정 체중 당 양)은 상이한 적용에서 달라질 수 있다. 일반적으로, 형질도입된 T 세포의 농도는 바람직하게는 최소한 약 1×10^6 내지 약 1×10^9 개의 형질도입된 T 세포, 보다 더 바람직하게는, 약 1×10^7 내지 약 5×10^8 개의 형질도입된 T 세포로 치료되는 대상체에 제공하기에 충분해야하나, 임의의 적합한 양은 초과 예컨대, 5×10^8 개 초과와 세포, 또는 미만, 예컨대, 1×10^7 개 미만의 세포가 이용될 수 있다. 투여 스케줄은 잘-확립된 세포-기반 요법에 기반할 수 있거나 (예컨대, Topalian and Rosenberg, 1987; 미국 특허 번호 4,690,915 참고), 대안적인 연속 주입 전략이 이용될 수 있다.
- [0423] 이들 값은 본원에 기재된 방법을 최적화할 때 의사에 의해 사용될 형질도입된 T 세포의 범위의 일반적인 지침을 제공한다. 이러한 범위의 본원에서의 언급이 특정 적용에서 보증될 수 있는, 더 많거나 더 적은 양의 성분의 사용을 배제하는 것은 결코 아니다. 예를 들어, 실제 용량 및 스케줄은 조성물이 다른 약학 조성물과 병용하여 투여되는지의 여부 또는 약동학, 약물 배치(disposition) 및 물질대사에서의 개체 간 상이함에 따라 달라질 수 있다. 당업자는 특정 상황의 긴급성에 따라 임의의 필요한 조정을 쉽게할 수 있다.
- [0424] 본원에 기재된 임의의 조성물은 키트에 포함될 수 있다. 일부 실시양태에서, CAR T-세포는 키트에 제공되며, 이는 배지, APC, 성장 인자, 항체 (예컨대, CAR T-세포의 분류 또는 특성화를 위한)와 같이 세포를 확장시키기에 적합한 시약 및/또는 CAR 또는 트랜스포사제를 코딩하는 플라스미드를 포함할 수 있다.
- [0425] 비-제한적인 예에서, 키메라 수용체 발현 작제물, 키메라 수용체 발현 작제물을 생성하기 위한 하나 이상의 시약, 발현 작제물의 형질주입을 위한 세포 및/또는 발현 작제물의 형질주입을 위한 동종이계 세포를 수득하기 위한 하나 이상의 기구 (이러한 기구는 주사기(syringe), 피펫, 포셉(forcep) 및/또는 의학적으로 승인된 임의의 이러한 장치일 수 있음).
- [0426] 일부 실시양태에서, 내인성 TCR α/β 발현을 제거하기 위한 발현 작제물, 작제물을 생성하기 위한 하나 이상의 시약, 및/또는 CAR+ T 세포가 키트에 제공된다. 일부 실시양태에서, 이들은 징크 핑거 뉴클레아제(들)를 코딩하는 발현 작제물을 포함한다. 일부 양태에서, 키트는 세포의 전기전공을 위한 시약 또는 장치를 포함한다.
- [0427] 키트는 본원에 기재된 하나 이상의 적합하게 분취된 조성물 또는 본원에 기재된 바와 같은 조성물을 생성하기 위한 시약을 포함할 수 있다. 키트의 성분은 수성 매체 또는 동결건조된 형태로 포장될 수 있다. 키트의 용기 수단은 하나 이상의 바이알, 시험관, 플라스크, 병, 주사기 또는 다른 용기 수단을 포함할 수 있으며, 여기에는 성분이 배치될 수 있고, 특정 실시양태에서는, 적합하게 분취될 수 있다. 키트에 하나 초과와 성분이 있는 경우, 키트는 또한 일반적으로 추가적인 성분이 별도로 배치될 수 있는 제2, 제3 또는 다른 추가적인 용기를 함유할 것이다. 그러나, 다양한 성분의 조합이 바이알에 포함될 수 있다. 본원에 기재된 키트는 또한 통상적으로 키메라 수용체 작제물을 함유하기 위한 수단 및 상업적인 판매를 위해 밀폐된 임의의 다른 시약 용기를 포함할 것이다. 이러한 용기는 예를 들어 원하는 바이알이 유지되는 주사 또는 블로우 성형된 플라스틱 용기를 포함할 수 있다.
- [0428] 일 양태에서, 본원은 상기 기재된 면역 세포 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 다른 양태에서, 본원은 상기 기재된 면역 세포를 포함하는 인간 환자의 면역 요법을 위한 약학 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 면역 세포는 원래 환자로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 환자는 세포에서 발현된, CAR 또는 TCR, 예를 들어, mTCR에 의해 표적된 암 항원 수준의 증가 또는 변경이 검출되는 종양 또는 암을 갖는다.
- [0429] 다른 양태에서, 본원은 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 상기 기재된 면역 세포 또는 상기 기재된 조성물을 질환 또는 병태를 갖는 대상체에 투여하는 것을 포함하는 치료 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 유전적

으로 조작된 항원 수용체는 질환 또는 병태와 연관된 항원에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 병태는 암 또는 종양이다.

[0430] 다른 양태에서, 본원은 면역 세포 및 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 병태의 치료에 사용하기 위한 상기 기재된 면역 세포 및 조성물을 제공한다.

[0431] 다른 양태에서, 본원은 면역 세포 또는 조성물의 용도를 제공한다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 병태를 치료하는 방법에 사용하기 위한 의학의 제조에서 상기 기재된 면역 세포 또는 조성물의 용도를 제공한다. 일부 실시양태에서, 유전적으로 조작된 항원 수용체는 질환 또는 병태와 연관된 항원에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 병태는 암 또는 종양이다.

[0432] 본 발명의 상기 설명은 예시적인 것으로 의도되며, 당업자는 본 발명의 기술적 사상 또는 본질적인 특성을 변화시키지 않고 본 발명이 특정 다른 형태로 용이하게 변형될 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 상기 기재된 실시양태는 예시적인 것이며 모든 양태에서 제한적이지 않은 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 통합된 것으로 기재된 각각의 성분 요소는 개별적으로 수행될 수 있고, 마찬가지로 개별적으로 수행된 것으로 기재된 구성 요소는 통합된 방식으로 수행될 수 있다.

[0433] 본 발명의 범위는 첨부된 청구 범위에 의해 나타내지며, 청구 범위 및 이와 동등한 개념의 의미 및 범위로부터 유래된 모든 변형 또는 변화된 형태는 본 발명의 범위 내에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[0434] **서열 목록**

서열번호	서열
1.	tctcgcatggacgagctgta
2.	tggaaccattcctgaaatta
3.	ggaaccattcctgaaattat
4.	gaaccattcctgaaattatt
5.	accattcctgaaattattta
6.	ccattcctgaaattatttaa
7.	cctccctgtggttctattat
8.	ctccctgtggttctattata
9.	ttccctgtggttctattatat
10.	tcctgtggttctattatatt
11.	ccctgtggttctattatatta
12.	cctgtggttctattatattat
13.	gatgaaagggatggaattat
14.	gggagcctccctgatataaat
15.	ggaattcgtcagaagaaa
16.	ggaccaaactgaagctatatt
17.	agaacttggtttcctttaat
18.	atgaaagggatggaattatt
19.	tcttatcttcggcgctttaat
20.	cttatcttcggcgctttaatt
21.	ttatcttcggcgctttaattt
22.	gaggagcccaatgagtattat
23.	aggagcccaatgagtattatt
24.	atagatcaaccacctattt
25.	atgtcattgectctgtattta
26.	tgtcattgcctctgtatttaa
27.	accaccatgccagctaattt

[0435]

28.	tgttgagatttaggcttatt
29.	gaccaaactgaagctatatt
30.	aggccttcagcaatctatatt
31.	ggccttcagcaatctatatta
32.	gagtgggccctaaacttaaatt
33.	agtgggccctaaacttaaatt
34.	gtgggccctaaacttaaatt
35.	ctaacacaaatatccacat
36.	tcagcagcccagtcacaataa
37.	cagcagcccagtcacaataa
38.	tcaacgtctccatcatgtata
39.	caacgtctccatcatgtataa
40.	ctggagacaatggcgacttta
41.	ctcagcagcccagtcacaata
42.	agcagcccagtcacaataaac
43.	gggatcaaagctatctatata
44.	ggatcaaagctatctatataa
45.	ggcaacgggaaccagatttat
46.	tgaagaagagagtcataatt
47.	ttggatgcggaacccaattta
48.	agcatcacttgggattaatat
49.	tgatgtgggtcaaggaaattaa
50.	agcgaggaggagaagactatatt
51.	tttacgtatgagacgtttata
52.	gctcctgtatagtttacttcc
53.	ggaaattaacctggttgatgc
54.	gcaccaacagaatatgcatcc
55.	gctcaacaggatgtcaataa
56.	gcattctgctgttcttcttac
57.	gcatttgggacaacttatgt

[0436]

58.	ggaacgcgactaaacttaac
59.	gatgttcaccataagccaagt
60.	gcaagatgagtctgactatgg
61.	ggcacagagaagaatgcaaca
62.	gggaagagatgctaaatatac
63.	gcaaatcagtgtaatccttga
64.	gcaacttctccatcacatgc
65.	gcaaatgacacacccaact
66.	gcggatggacagcaacattca
67.	ggacacttctgagtatgaagc
68.	gggaaccacaatgcacgaaag
69.	ggtgcttccaacacacttc
70.	gcttctggccatttgaatgc
71.	gggagtacttctgcatctatc
72.	gctgcatgactactcaatgt
73.	taacgtggatcttgatcataa
74.	ggagacatacacagccctca
75.	gcatttgggccttgatctacc
76.	gacaggttgcaaggcagttct
77.	gggagtgcccttcagttaca
78.	ggacgaggaggttgacattaa
79.	gaggagaaaagggaaggagaa
80.	gcccttcttcaatagcacta
81.	ggttgactgcatttctagact
82.	gcatttgctgaacgcatttac
83.	gctgcactaattgtctattgg
84.	ggatccagtcacctetgaaca
85.	gcacatcctccaaatgaaagg
86.	ggattetcaacctgtgttta
87.	ggtgcttgggtcctctataa

[0437]

88.	gcacagtactcctggcttate
89.	gcaacaggaccacagtcaaga
90.	gcaacaccacctcagcataa
91.	gcctgttcagagcactcattc
92.	gcagtaatgccttcctatt
93.	gcacctgggtgcttagctaga
94.	gcttccatctatgaggaattg
95.	gccagagaaccagctataagt
96.	gggtccctgatgaatatctgg
97.	ggcttgccaggaaagtgaatg
98.	gcttgccaggaaagtgaatgg
99.	agcttccatctatgaggaatt
100.	ggaatccagaacgaattaagt
101.	ggctgattgatgggaacatcc
102.	ggactacagtcaagacaatca
103.	ggaccctcactctattcaatg
104.	gctactggccgcaataattcc
105.	gctctttgtatgacagaatac
106.	ggccaaggtcaccaataaga
107.	gcaaccatacgatagaataag
108.	ggtttctgaaatttctcaaca
109.	gcaagatatccagctacatct
110.	gcaactcaccctcttccatct
111.	gctgcattccctaagataatt
112.	gggacagtagatccacataca
113.	ggacaacagtcacaatgagca
114.	ggctgttgatgttctagagag
115.	gcagacaaggccacagtcaat
116.	ggagggttctaaccagcatcc
117.	gccttgagactgtgtatataca

[0438]

118.	ccaagcccagaatgactatgg
119.	gccttctgttcttgccttgt
120.	gcttctgactgcagttcttct
121.	gctggatgaaatatggaacc
122.	ggaaatgagcctgctccaagt
123.	ggattggcttgaggacaatt
124.	gccagaagggaaggagtaca
125.	gccaatccactaattgtttg
126.	ggttctcatgaatctccaact
127.	gctggagtcacactaagt
128.	gcctggttggagatactaac
129.	ggaaccacctaagaactcc
130.	ccgcggtgatttaaagaaaga
131.	gcctgatacatatcagcattt
132.	gcggaattggaatttcttagc
133.	gcacgactacagaaatatagc
134.	ttccggttaagttgactcg
135.	gcctggatctaattcagaaag
136.	gaaagccactgttcggttaa
137.	tcctgtggatatctgtctaag
138.	ggctcatagaggctgtaatgt
139.	gggcttgccgagttgatatg
140.	aagatttgataccgcaaaaa
141.	gtggtactgaagcacctatta
142.	gcttgttcagagaacaattgc
143.	ggagattgttggtaccaagg
144.	gcagctaggcttacagcattg
145.	ggtcctttctgtgactatga
146.	ggtggtagctaagaacattc
147.	ggacctgtctacaggtgatct

[0439]

148.	gccaaagtcattgcaggaatg
149.	gcagaacaagcccatgattga
150.	cccaaggtcaaggagattatt
151.	gcagaagtgccggaacattga
152.	gcgtcacacagaagcatatcc
153.	ccggctcttctttgagtteta
154.	cagaacgtcaccaactacttt
155.	ccatgctaggttgaacaact
156.	ccaagtggcctgtctctttga
157.	ggtgtctatttgcggatcttc
158.	agaccttcgcaagatcatc
159.	tccttagccatgagctcaagg
160.	gaaagtactgtggacacatgt
161.	gcacgtgtccatcttcgagtt
162.	ggccaacactcctcaagaact
163.	ggcttctacctctaccagat
164.	ggccatggactccacattga
165.	ggccgtgagtatctaccagtt
166.	gccagaagacaagttagaatt
167.	gctctggaagtccagtatat
168.	ggaaatgatctggctcgatgc
169.	gcaaagatcctcaaggattta
170.	ggatgcctctattgctcatcg
171.	gctatgggtacttgaatttgc
172.	ggaagggtattccagcagaagt
173.	gcaaggagattgtgccatca
174.	gggcatccttcaagaggaagt
175.	gcaaagatcatccagtctttc
176.	gctggagatgtaccgcaaagt
177.	gcacaggatgagatttatatc

[0440]

178.	ggaagaccacatacaggaaac
179.	gcattgggtgttcctgcatga
180.	gcacacgggtgggtagattat
181.	gggtctgtaatggaaggaaat
182.	gcatgttgcgagatgacatga
183.	gcagaccgagctctacacaagt
184.	gcaccatcatccacctcaagt
185.	ggcaccacatcaaggtcat
186.	gggcaagaaccgctacaagaa
187.	ggaacaaatgcgtccatact
188.	gcctggactgtgacattgaca
189.	gaacctgcacactaagaacaa
190.	gcagatcctacctctgaaagg
191.	gcaatgacggcaagtctaaag
192.	ggaactgaaatacgacgttgg
193.	gcgtgttaggaacgtcaaaga
194.	gctcatgactatacgtaaga
195.	ggagagaacggtctggcaata
196.	gcagctgaacgagaaccaagt
197.	ggagactgtgactcttcttgt
198.	ggaatgccaacgtttggaat
199.	ggatcgtttacaggaagtcc
200.	gcctttgtatgtggaagtata
201.	gcctgctgtattatagtaac
202.	gctgcacatcaaggagtaatt
203.	gctggaaatactctggttaga
204.	ggagctgttgaaagggatga
205.	gcagaatactgccgtcaatg
206.	ggttatgtgtcaagctaagg
207.	gcagaaccaaggaattaatc

[0441]

208.	gggtgaacatcacaggcttac
209.	gccatagagttcaggacaaat
210.	gcaattctcgggtagaaataa
211.	gctggcttcaccaacattacc
212.	gggagcaaatcatctgcattc
213.	gcgactcaaatatcacctga
214.	gctcctgaggtatggaataga
215.	gcaaatgacacatatgaaagc
216.	ggctaaagaggagtgcattc
217.	gggctatttgaacaggatcc
218.	gctgtagggaatggaagctca
219.	gcttgtgtttgctgctaattg
220.	gftaacaaggctgggcagggaagaggccctatttcccatgattcctcatatttgcataacgatacaaggctgttaga gagataattagaattaattgactgtaaacacaaagatattagtacaaaatcgtgacgtagaagaataatttcttg ggtagtttgcagttttaaattatgttttaaaatggactatcatatgcttaccgtaacttgaaagtatttcgatttcttggct ttatatatcttgggaaggacgaaacaccgcctgtggttcatttatatttcaagagaataataatagaaccaca ggtttttgactagtcaaaaagggaattcgctcagaagaatctcttgaatttcttctgagcgaattcacaagaagccttt ctccaagggaatttatagtctcaaaacacacaattactttacagttagggtgagtttcttttgtgctgttttttaaata ataatttagtatttgtatctctatagaaatccaagcctatcatgtaaaatgtagctagtattaaaaagaacagattatct gtctttatcgcacattaagcctctatagttaggaaatattatgcaaatfaaccgggcaggggagtagccga gcttctccacaagtctgtgcgagggggccggcgccgctagagatggcggtcggatcgctagccatatgt ctagagtatac

[0442]

[illegible]

[0443]

225.	<p>QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEW LGRITYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVY YCAREVTGDLEDAFDIWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRTITCRASQTIWSYLNWYQQRPGKAPNLLIYAASSL QSGVPSRFSGRGSGTDFTLTISSLQAEDFATYYCQQSYSPQTFGQGTKL EITTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYW APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS CRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR</p>
226.	<p>MALPVTALLLPLALLHAARPDQMTQTTSSLASLGDRVTISCRASQDI SKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNL EQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKL QESGGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIW GSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYY GGSYAMDYWGQTSVTVSSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYI FKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQG QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL PPR</p>

[0444]

227.	MGAGATGRAMDGPRLLLLLLVSLGGAKEACPTGLYTHSGECCKAC NLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTECVGLQSM SAPCVEADDAVCRCAYGYQDETTGRCEACRVCEAGSLVFSCQDKQ NTVCEECPDGTYSDEANHVDPCLPCTVCEDTERQLRECTRWADAECEE IPGRWITRSTPEGSDSTAPSTQEPEAPPEQDLIASTVAGVVTVMGSSQ PVVTRGTTDNLPVYCSILAAVVVGLVAYIAFKRWGSGATNFSLLKQA GDVEENPGPALPVTALLPLALLHAARPDQMTQTSSLSASLGDRVTI SCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTD YSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGSGG GGSEVKLQESGPLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLE WLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYC AKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRP EACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRG RKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADA PAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQUALPPR
228.	gggtatactctagacatatggctagcactagtagcaaaaacctgtgggttc
229.	ttgtaccgttaacgatccgacgccgc
230.	tgactagtcaaaaacctgtggttctattatattctcttgaataataatagaaccacagcggtgttcgctctt ccacaagatatataagccaa
231.	gtaccgttaacaaggtcgggcagggaagggcctatttcccatgattct
232.	aggactagtcaaaaaggaattcgctcagaagaaatctct
233.	ctagctagcgatccgacgccgccatct
234.	atgftaaccaaaaacctgtggttctattatattctcttg
235.	tcactagtaaggtcgggcagggaagggcctatt
236.	taggccctcactagtgatccgacgccgc
237.	ctagctagccaaaaaggaattcgctcagaagaaatctc
238.	gcttctggccatttgaatgc
239.	gggagtacttctgcattatc

[0445]

240.	gctgcatgactactcaatgt
241.	taacgtggatcttgatcataa
242.	ggagacatacacaggccttca
243.	gcatttgggccttgatctacc
244.	ccagctttccagctttctct
245.	gatctcagccttctgcgaaga
246.	gcttcaacgtctccatcatgt
247.	ggtctttctcactgccaagt
248.	ctggagacaatggcgacttta
249.	gccactgtcacattggcaatc
250.	tccagtatctggacaagaacg
251.	gcagcagtgtaactcacagag
252.	gctgtttctcatccttggtgt
253.	gcctttggctttcaccttgg
254.	tcagcagcccagtcctaaataa
255.	ggtggagctcatgtaccacc
256.	cccaaattacgtgtactacaa
257.	gcatcacttgggattaatatg
258.	gcgagggagaagactatattg
259.	gccagtgatgctaaaggttgt
260.	ggtgggtatctgagttgacttg
261.	gatgaaagggatgtgaattat
262.	gggagcctccctgatataaat
263.	ggaattcgtcagaagaaa
264.	ggaccaaactgaagctatatt
265.	cctgtggttctattatattat
266.	gcctagagaagtttcaggga
267.	cattgtcttctagcggaat
268.	gattaagtcctgcccttgg
269.	gttcacctacggaaaccttg

[0446]

270.	cctccacctttacacatgcc
271.	cttactgcctcagcttccct
272.	ccaagaaggccacagaactga
273.	gttgtttcagatccctttagttccag
274.	actttgaacagcctcacagag
275.	ccgagttgaccgtaacagacat
276.	caaccgatccacctcacctt
277.	ggcactttgcctcccagat
278.	cacaagctctgccactcggaa
279.	tgcagtgacctggaaggctc
280.	ctacctgggcataggcaacg
281.	ccccgaactaactgctgcaa
282.	gaaacagcacattcccagagttc
283.	atggcccagcggatgag
284.	cccagcatctgcaaagctc
285.	gtccttgccggaagtcaatgt
286.	acatgattcagccacagatacc
287.	gcatagatgtcagcacgtttg
288.	acgtgttgagagatcgagg
289.	cccagcactcagtcacgctc

[0447]

[0448]

실시예

[0449]

이하에 본 발명에 관한 실시예를 기재한다. 대부분의 경우에, 대안적인 기술이 사용될 수 있다. 실시예는 예시적인 것으로 의도되며 본 발명의 범위를 제한하거나 한정하지 않는다.

[0450]

일반적인 방법

[0451]

세포주 및 배양. Nalm-6, Nalm-6GL (GFP 및 반딧불 루시퍼라제 발현함), K562, K562-CD19, IM-9, Raji, Daudi 세포주를 37 °C에서 5% CO₂로 가습된 항온처리기에서 10% 열-불활성화된 태아 소 혈청 및 2 mM의 L-글루타민 및 1% 페니실린! 스트렙토마이신이 보충된 RPMI-1640에서 배양하였다. Lenti-X™ 293T 세포주는 Takara에서 구입하였으며, 10% 열-불활성화된 태아 소 혈청 (FBS), 2 mM의 L-글루타민, 0.1 mM의 비필수 아미노산, 1 mM의 소듐 피루베이트 및 1% 페니실린! 스트렙토마이신이 보충된 DMEM에서 유지되었다. CD19⁺PD-L1⁺ 세포주를 생성하기 위해, K562-CD19 또는 NALM-6-GL 세포를 인간 PD-L1 (NM_014143.3)을 코딩하는 렌티바이러스로 형질도입하였다. Nalm-6-PDL1-CD80 세포주를 인간 CD80 (NM_005191.3)을 코딩하는 렌티바이러스를 이용한 Nalm-6-PDL1 세포의 형질도입에 의해 생성하였다.

[0452]

플라스미드 구축. 항-CD 19 scFv (FMC63), CD8a 힌지 및 막관통 영역, 및 4-1BB (CD137) 및 의 세포질 도메인을 함유하는 pLV-CD19-BBz 벡터의 구축은 이전에 기술되었다 (PNAS, 2016, Ma JSY). pLV-CD19-28z를 생성하기 위해, 4-1BB의 세포질 도메인을 인간 CD28 공동자극성 도메인의 서열로 대체하였다. 형질도입된 CAR-T 세포의 검출 및 정제를 위해, ALNGFR (세포질 도메인 절단된 CD271) 서열을 pMACS-ALNGFR (Milteny Biotec) 벡터로부터 증폭시키고, P2A 서열을 통해 CAR-트랜스진(transgene) 앞에 삽입하여 pLV-ALNGFR-CD19-28z 또는 pLV-ALNGFR-CD19-BBz를 생산하였다.

[0453]

CAR 및 shRNA 발현 카세트 둘 다를 코딩하는 투인원 LV 벡터를 생성하기 위해, shRNA를 함유하는 shRNA 발현 카세트 (링크 서열; TTCAAGAGA, 종결 서열; TTTT) 및 PolIII 프로모터 (mU6, hU6 또는 hH1)를 합성하고 중앙 폴리퓨린 트랙트 (cPPT)의 CAR-코딩 LV 벡터 상류에 서브클로닝하였다. 상이한 프로모터 (mU6 및 hU6)에 의해 2 개의 shRNA를 발현하는 이원 투인원 벡터의 생성을 위해, BstZ171-Xba1-Nde1-Bmt1-Spe1 MCS 서열을 hU6 프로모터의 pLV-hU6-shPD-1-ALNGFR-CD19-BBz 벡터 하류에 삽입하였다. 제2 mU6-shRNA 카세트 단편을 MCS에 서브클로닝하였다.

- [0454] 리포터 벡터의 확립을 위해, pGL2_NFAT-Lucreporter (addgene #10959)로부터 유래된 NFATRE x3 서열을 PCR에 의해 증폭시켰다. NF-kB-RE 5x (5'-GGGAATTTC-3') 및 miniP 서열을 합성하였다 (IDT Technologies). pLV-NFAT-RE3x-eGFP 또는 pLV-NF-kB-RE 5x-eGFP 리포터 벡터를 생산하기 위해 pLV-eGFP 벡터의 EF-1a 프로모터를 이들 리포터 단편으로 대체하였다.
- [0455] **siRNA 또는 shRNA 서열 선택.** 억제성 면역 체크포인트 (CTLA-4, LAG-3, TIGIT 및 TIM-3)에 특이적인 21-mer siRNA의 후보 서열을 합성 전에 BLOCK-iT™ RNAi Designer 또는 Sfold 프로그램을 사용하여 설계하였다. RNA 올리고머, CTLA-4를 표적으로 하는 siRNA를 서열번호 255-260으로 이루어진 군으로부터 선택하였다. LAG-3을 표적으로 하는 siRNA를 서열번호 244-254로 이루어진 군으로부터 선택하였다. TIGIT를 표적으로 하는 siRNA를 서열번호 238-243으로 이루어진 군으로부터 선택하였다. TIM-3을 표적으로 하는 siRNA를 서열번호 261-264로 이루어진 군으로부터 선택하였다.) (IDT Technologies). 면역 체크포인트의 발현 동역학을 분석하기 위해, 인간 재조합 IL-2의 존재 하에서 PBMC를 Dynabeads 인간 T-활성화제 CD3/CD28 (ThermoFisher) 또는 4 pg/ml의 항-CD3 항체 및 2 µg/ml의 항-CD28 항체로 자극하였다. 면역 체크포인트의 발현 수준을 12 일 (3 일, 6 일 및 12 일) 동안 분석하였다. 자극 2 일 후 최적의 siRNA 서열의 선택을 위해, Neon® 형질주입 시스템 (ThermoFisher)을 사용하여 PBMC를 siRNA 올리고머로 전기천공시켰다. siRNA의 녹다운 효율을 유세포 측정법에 의해 형질주입 후 2 일에 측정하였다. 이들의 효율에 기반하여 각각의 면역 체크포인트에 대해 2-3 개의 siRNA 서열을 선택하고, 이원 투인원 렌티바이러스성 벡터를 생성하기 위해 shRNA 포맷으로 전환시켰다. shRNA-매개 녹다운 효능을 검증하기 위해, 렌티바이러스-형질도입된 T 세포를 3 일 동안 1:1 비로 γ-조사된 K562-CD19 세포로 자극하고, 유세포 측정법에 의해 이들의 면역 체크포인트의 발현 수준에 대해 분석하였다.
- [0456] **유세포 측정법.** 항-CD19 CAR의 발현 수준을 AF647-접합된 항-마우스 F(ab')₂ 항체 (115-606-072, Jackson ImmunoResearch) 또는 AF647-접합된 스트렙타비딘 (405237, Biolegend)과 커플링된 비오틴-접합된 rhCD19-Fc (CD9-H5259, ACRO Biosystems)에 의해 분석하였다. ALNGFR 발현을 APC- 또는 FITC-접합된 항-CD271 항체 (ME20.4-1.H4; Mitenyi Biotec)에 의해 분석하였다. CAR-T 세포에서 면역 체크포인트의 발현을 다음 항체를 사용한 통상적인 유세포 측정법에 의해 측정하였다: PD-1 (PE, 클론 J105; ThermoFisher), TIM-3 (PE, 클론 344823; R & D 시스템), LAG-3 (PE, 클론 7H2C65; Biolegend), TIGIT (PE, 클론 MBSA43; ThermoFisher).
- [0457] CAR-T 세포에서의 CTLA-4 발현을 3 일 동안 1:1의 E:T 비로 조사된 NALM-6 또는 K562-CD19 세포와 함께 항온처리한 후 세포 내 유세포 측정법에 의해 분석하였다. 세포를 Cytofix/Cytoperm™ 용액 (BD Bioscience)으로 고정/투과화시킨 후, 항-인간 CD152 (CTLA-4) 항체 (PE, 클론 BNI3; Biolegend)로 염색하였다.
- [0458] 종양 세포에서 자극성 또는 억제성 면역 체크포인트 리간드의 발현을 다음의 항체를 사용하여 분석하였다: CD80 (PE, 클론 2D10; Biolegend), CD86 (BV421, 클론 2331 (FUN-1); BD Bioscience), PD-L1 (APC, 클론 29E.2A3; Biolegend), HLA-DR (PE, 클론 L243; Biolegend), CD112 (PE, 클론 TX31; Biolegend), CD155 (PE, 클론 SKII.4; Biolegend).
- [0459] PD-1의 발현에 대한 TGF-β의 효과의 분석을 위해, 유세포 측정법에 의해 PD-1 발현을 측정하기 전에 CAR-T 세포를 10 ng/ml의 재조합 인간 TGF-β I (R & D 시스템)의 존재 하에 3 일 동안 조사된 NALM-6 세포로 자극하였다.
- [0460] **세포 내 유세포 측정법에 의한 SMAD2/3의 인산화 상태 분석.** SMAD2/3의 인산화 상태를 결정하기 위해, CAR-T 세포를 4 hr 또는 24 hr 동안 1:1의 E:T 세포 비로 NALM-6 세포와 항온처리하였다. 세포를 Lyse/Fix 완충액 (BD Bioscience)로 고정한 후 Perm 완충액 III (BD Bioscience)로 투과화시켰다. LNGFR⁺CAR-T 세포의 인산화 상태를 항-인간 Smad2 (pS465/pS467)/Smad3 (pS423/pS425) 항체 (PE, 클론 072-670; BD Bioscience)로 측정하였다.
- [0461] **유도된 조절성 T 세포의 검출.** CAR-T 세포로부터 생성된 조절성 T 세포 (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺)의 유도를 3 일 동안 NALM-6 세포와의 공동-배양 후 세포 내 염색에 의해 분석하였다. Foxp3/전사 인자 염색 완충액 (ThermoFisher)으로 고정되고 투과화된 세포를 다음 항체로 염색하였다: 항-CD4 (BV605, 클론 OKT4; Biolegend), 항-CD25 (FITC, 클론 VT-072; Biolegend), 항-FOXP3 (APC, 클론 236A/E7; ThermoFisher).
- [0462] **CAR-T 증식 검정.** ALNGFR 표면 마커를 발현하는 CAR-T 세포를 자성 비드 (Mitenyi Biotec)로 분류하였다. 사이토카인 부재 하에 6 일마다 γ-조사된 K562-CD19-PDL1 세포 (1 x 10⁶ 개)로 LNGFR⁺CAR-T 세포 (1 x 10⁶; > 95% 순도)를 자극하였다. CAR-T 세포의 배수-확장을 트리판 블루 배제를 사용하여 6, 12 및 18 일에 세포 계수에 의해 계산하였다.

- [0463] **CAR-T 세포의 생체 외 세포독성.** CAR-T 세포의 세포독성을 Incucyte S3 생존 세포 분석 시스템을 사용하여 결정하였다. GFP를 구성적으로 발현하는 NALM-6 또는 NALM-6-PDL1 표적 세포를 3 번 반복하여 웰 당 1×10^5 개의 세포의 밀도로 96-웰 플레이트에 플레이트하였다. LNGFR⁺ CAR-T 세포를 1:1, 0.3:1, 0.1:1의 E:T 비로 각각의 웰에 첨가하였다. 각각의 웰의 GFP 강도의 실시간 변화를 2 시간마다 녹색 물체 통합 강도 (Avg. 평균 GFP 강도 $\times \mu m^2$ /웰)로서 기록하였다. 상대적 녹색 물체 통합 강도의 백분율을 다음 공식에 의해 계산하였다: (각각의 시점에서의 총 통합 GFP 강도/시작 시점에서의 총 통합 GFP 강도) * 100.
- [0464] **NFAT 및 NF- κ B 리포터 검정.** CAR-T 세포에서 NFAT 전사 인자의 특이적 활성을 결정하기 위해, 2 일 동안 인간 재조합 IL-2 (300 FU/mL)의 존재 하에 4 pg/ml의 항-CD3 및 2 pg/ml의 항-CD28 항체로 자극된 PBMC를 NFAT-RE x3-eGFP 리포터 유전자를 코딩하는 렌티바이러스로 먼저 형질도입시켰다. 형질도입 8 일 후, 총 세포를 2 일 동안 인간 재조합 IL-2 (300 IU/mL)의 존재 하에 항-CD3 및 항-CD28 항체로 재-자극하였다. 활성화된 세포를 2 개의 분리된 웰로 분할하고 상이한 CAR-코딩 렌티바이러스 (CD19-28z 또는 CD19-BBz)로 형질도입시켰다. 6 일 후, 각각의 웰의 총 세포를 1:1 비로 NALM-6 세포와 공동-항온처리하였다. CAR-T 세포의 NFAT의 리포터 활성을 24- 및 48-시간 시점에서 LNGFR⁺ CAR-T 집단 (총 CD3⁺ 세포에서 20-25%) 내의 eGFP 신호의 gMFI 값에 의해 결정하였다. CAR-T 세포에서 NF- κ B 전사 인자의 특이적 활성을 유사한 절차에 따라 그러나 NF-KB-RE x5-eGFP 리포터 유전자를 코딩하는 렌티바이러스를 사용하여 측정하였다.
- [0465] **정량적 실시간 PCR.** 3×10^6 LNGFR⁺ G28z 또는 GBBz CAR-T 세포를 1:1 비로 CD19⁺ NALM-6 표적 세포와 공동-배양하였다. 공동-배양의 4 및 48 시간 후, LNGFR⁺ CAR-T 세포를 MoFlo Astrios 분류기 (Beckman Coulter)를 사용하여 분류하였다. LNGFR⁺ CAR-T 세포로부터의 mRNA를 RNeasy 미니 키트 (Qiagen)에 의해 추출하고 QuantiTect 역 전사 키트 (Qiagen)를 사용하여 cDNA로 역전사시켰다. CFX96 실시간 PCR 검출 시스템 (Biorad) 및 SYBR 녹색 실시간 PCR 마스터 믹스 (TOYOBO)를 사용하여 SYBR 프로토콜로 정량적 실시간 PCR을 수행하였다. 18s rRNA의 검출을 위한 프라이머 서열은 서열번호 268 및 269를 포함한다. PDCD1의 검출을 위한 프라이머 서열은 서열번호 270 및 271를 포함한다. IL2의 검출을 위한 프라이머 서열은 서열번호 272 및 273를 포함한다. IL4의 검출을 위한 프라이머 서열은 서열번호 274 및 275를 포함한다. IL17A의 검출을 위한 프라이머 서열은 서열번호 276 및 277를 포함한다. CD25의 검출을 위한 프라이머 서열은 서열번호 278 및 279를 포함한다. CTLA4의 검출을 위한 프라이머 서열은 서열번호 280 및 281를 포함한다. FOXP3의 검출을 위한 프라이머 서열은 서열번호 282 및 283를 포함한다. TGF-베타1의 검출을 위한 프라이머 서열은 서열번호 284 및 285를 포함한다. TGFBR1의 검출을 위한 프라이머 서열은 서열번호 286 및 287를 포함한다. TGFBR2의 검출을 위한 프라이머 서열은 서열번호 288 및 289를 포함한다.
- [0466] 표적 mRNA의 양을 내인성 기준 18s rRNA: ΔCt (샘플) = Ct (표적 유전자) - Ct (18s rRNA)에 정규화하였다. 비교를 통한 Ct 방법을 적용하여 다음 방정식에 기반하여 자극되지 않은 조건과 비교하여 표적 mRNA의 상대적인 배수 변화를 분석하였다: $2^{-\Delta \Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct [자극된] - \Delta Ct [자극되지 않은])}$.
- [0467] **동물 실험.** 본원에 기재된 모든 절차는 KAIST에서 기관 동물 관리 및 사용 위원회의 승인을 받았다. CD19⁺ 혈액 암 모델을 확립하기 위해, NSG 마우스 (4 내지 6 주령)에 EGFP-융합된 반딧불 루시페라제뿐만 아니라 인간 PDL1 (NALM6-GL-PDL1 세포)을 발현하도록 조작된 1×10^6 개의 CD19⁺ NALM-6 백혈병 세포를 정맥 내 주사하였다. CAR-T 세포를 상기 기재된 절차에 따라 건강한 공여자의 전혈 샘플로부터 제조하였다. 형질도입 후 4 일에, CAR-T 세포를 분류하고 마우스에 주사하기 전에 6 일 동안 추가로 확장시켰다. NALM6-GL-PDL1 세포 주사 후 5 일에, 2.5 또는 1×10^6 개의 CAR-T 세포를 마우스에 정맥 내 주입하였다. 마우스 내 NALM6-GL-PDL1의 생물발광 이미징을 Xenogen IVIS 스펙트럼으로 모니터링하고 신호를 Living 이미지 소프트웨어 (Perkin Elmer)를 사용하여 관심 영역에서 복사량(radiance)(광자/초)으로서 정량화하였다. 고정 종양 모델의 경우, NSG 마우스에 5×10^6 개의 IM-9 세포 (CD19⁺PD-L1⁺CD155⁺)를 피하 주사하였다. LNGFR⁺ CAR-T 세포를 종양 세포 주사 후 14 일에 마우스에 정맥 내로 주입하였다 (대략 $150 \sim 300 mm^3$ 종양 부피). 캘리퍼 측정에 의해 매주 종양을 모니터링하고 부피를 (길이 $\times$ 너비²)/2로 추정하였다.
- [0468] **실시예 1: PD-1을 표적으로 하는 CART19 및 shRNA를 발현하는 투인원 벡터의 생산 및 평가 방법**

- [0469] 이 실시예는 PD-1 발현을 억제하는 CART19 및 shRNA를 발현하는 투인원 벡터의 생산 및 평가 방법을 기재한다.
- [0470] CAR 및 shRNA 발현 카세트 둘 다를 코딩하는 투인원 렌티바이러스성 벡터를 생성하기 위해, shRNA (링크 서열; TTCAAGAGA, 종결 서열; TTTT) 및 PolIII 프로모터 (mU6, hU6 또는 hH1)를 함유하는 shRNA 발현 카세트를 합성하고 중앙 폴리퓨린 트랙트 (cPPT)의 CAR-코딩 LV 벡터에 서브클로닝하였다. EF-1a 프로모터에 의해 4-1BB-기반 CART19를 자발적으로 발현하고 mU6 프로모터에 의해 PD-1 표적화 shRNA를 자발적으로 발현하는 렌티바이러스성 벡터를 구축하였다 (도 1a 및 1b).
- [0471] PD-1-표적화 shRNA를 선택하기 위해, 3 개의 shRNA 후보를 사용하였다. shPD-1 #1은 CAR 발현 (도 1c), 항상성 확장 (도 1d), 분화 상태 및 CD4/CD8 구성(도 1f)에 영향을 미치지 않으면서 PD-1의 발현에 놀랍게도 효과적인 억제성 효과를 나타냈다 (도 1e). shRNA 발현 수준은 Pol III 프로모터의 유형에 따라 상이할 수 있는 것으로 보고된다 (Mol Ther., 2006, Irvin S.Y. Chen). 따라서, PD-1 발현에 대한 mU6, liU6 또는 hH1 프로모터의 효과를 평가하였다. mU6 및 hu6은 유사한 KD 효능을 갖지만, hH1은 낮았다 (도 2).
- [0472] 본원에서 생산된 투인원 렌티바이러스성 벡터는 PD-1의 발현에 대해 놀랍게도 효과적인 억제를 나타내므로, 다음 실시예에서 PD-1 KD 변형된 CAR-T 세포의 생산에 사용될 수 있다.
- [0473] **실시예 2: PD-1 KD CAR-T 세포의 생산 및 생체 외 평가 방법**
- [0474] 이 실시예는 PD-1 KD 변형된 CAR-T 세포의 생산 및 생체 외 평가 방법을 기재한다.
- [0475] 말초 혈액 단핵 세포를 피콜-파그 Plus (GE Healthcare) 밀도 구배 원심분리 방법에 의해 건강한 공여자의 전혈 샘플로부터 분리하였다. 이들 세포를 300 IU/ml의 인간 재조합 IL-2 (BBIKOREA)의 존재 하에 4 µg/ml의 플레이트-결합된 항-CD3 항체 (클론 OKT3; Bio X 세포) 및 2 pg/ml의 가용성 항-CD28 항체 (클론 CD28.2; Bio X 세포)로 자극하였다. 재조합 렌티바이러스 생산을 위해, 2.5 mL의 성장 배지 (10% FBS, 2 mM의 L-글루타민, 0.1 mM의 비필수 아미노산 및 1 mM의 소듐 피루베이트가 보충된 DMEM) 중 6×10^5 개의 293T 세포를 형질주입 24 시간 전에 6-웰 플레이트에 시딩하였다. 세포를 패키징 벡터 (pMDL, pRev, pMDG.1) 및 10 pL의 리포펙타민 2000 (ThermoFisher)을 이용한 전이 벡터의 혼합물로 형질주입시켰다. 형질주입 후 2 일에, 렌티바이러스를 함유하는 배양 상청액을 수집하고 1800 rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 활성화된 T 세포를 프로타민 설페이트 (1 pg/ml)의 존재 하에 바이러스성 상청액과 혼합하고, 1000 × g에서 90 분 동안 원심 분리하고, 37 °C에서 밤새 항온처리하였다. 다음날, 배양 상청액을 흡인하고 10% FBS, 2 mM의 L-글루타민, 0.1 mM의 비필수 아미노산, 1 mM의 소듐 피루베이트 및 55 pM의 β-머캅토에탄올이 보충된 신선한 RPMI-1640으로 대체하였다. 형질도입된 T 세포를 10% 열-불활성화된 FBS 및 2 mM의 L-글루타민으로 보충된 RPMI-1640 및 인간 재조합 IL-2 (300 IU/mL)를 함유하는 1% 페니실린/스트렙토마이신 T 세포 배지에서 1×10^6 개의 세포/mL 미만의 밀도로 배양하였으며, 이는 2-3 일마다 다시채웠다.
- [0476] shPD-1 CAR-T 세포의 생체 외 용해성 및 증식성 활성을 조사하였다. NaIm-6-PDL1 또는 K562-CD19-PDL1을 CD19⁺PDL1⁺ 표적 세포로서 사용하였다. 먼저, IncuCyte 실시간 이미징 시스템을 사용한 장기간 용해성 활성을 조사하였다. CAR-T 세포가 NALM-6 세포와 혼합될 때, WT (shGFP) CART 및 PD-1 KD (shPD-1) CAR-T 세포는 유사한 용해성 활성을 가졌다. 그러나, CAR-T 세포가 NALM-6-PDL1 세포와 함께 배양될 때 shPD-1 CAR-T 세포는 shGFP CAR의 것보다 놀랍게도 보다 효과적인 용해성 활성을 나타냈다 (도 3a). 또한, 예상치 못하게 BBz w/o shRNA 카세트 CAR-T 세포 및 shGFP CAR-T 세포가 유사한 세포독성을 유지하는 것이 발견되었으며, 이는 shRNA 발현 자체가 CAR-T 세포의 활성화에 거의 영향을 미치지 않는다는 것을 시사하였다.
- [0477] 다음으로, CD19 항원 및 PD-L1에 반복적으로 노출된 CAR-T 세포의 증식 활성을 평가하였다. shPD-1 CAR-T 세포는 외인성 IL-2의 부재 하에 shGFP CAR-T 세포보다 K562-CD19-PDL1 표적에 대해 4- 내지 5-배수 더 큰 T 세포 증식 활성을 달성하였다 (도 3b). 공동자극성 리간드는 최적의 T 세포 확장을 용이하게하고 중앙 세포에서 드물게 발현되지 않는 것으로 알려져있다. 표적 세포에서의 공동자극성 리간드의 발현이 반복 자극시 세포 증식에 영향을 미치는지 여부를 조사하기 위해, 대표적인 공동자극성 리간드인 CD80이 표적 세포에서 발현되는지 여부를 조사하였다. K562-CD19는 CD80을 발현하지만 NaIm-6은 발현하지 않았다 (도 3c). CD80-과발현 NALM-6-PDL1 (NALM-6-PDL1-CD80)은 CAR-T 세포가 반복 자극 하에서 증식을 가능하게 한다는 것을 발견하였다. CD80은 반복된 생체 외 자극 하에서 CART 증식을 용이하게할 수 있다 (도 3b). 종합적으로, 세포-내재성 PD-1 파괴가 반복적인 CAR & PDL1 자극 시 CD19 특이적 CAR-T 세포의 생체 외 기능 개선에 놀랍게도 효과적으로 기여한다는 것이 입증

되었다.

[0478] 이 실시예에서, 실시예 1에 기재된 투인원 벡터를 사용하여 생성된 PD-1 KD 변형된 CAR-T 세포는 WT CAR-T 세포와 비교할 때 생체 외 용해성 및 증식성 활성에서 놀라운 수준의 향상을 나타내었으므로, 이들의 치료적 가능성을 하기 실시예에서 CD19⁺PDL1⁺ 혈액 종양을 갖는 마우스 모델에서 생체 내 모델에서 추가로 평가하였다.

[0479] **실시예 3: PD-1 KD CAR-T 세포를 이용한 생체 내 CD19⁺ 혈액 암의 치료 방법**

[0480] 이 실시예는 PD-1 KD CAR-T 세포를 이용하여 생체 내 CD19⁺ 혈액 암을 치료하는 방법을 기재한다.

[0481] CD19⁺ 혈액 암 모델을 확립하기 위해, NSG 마우스 (4 내지 6 주령)에 EGFP- 융합된 반딧불 루시페라제뿐만 아니라 인간 PDL1를 발현하도록 조작된 1×10^6 개의 CD19⁺NALM-6 백혈병 세포 (NALM6-GL-PDL1 세포)를 정맥 내 주사하였다. CAR-T 세포를 상기 기재된 절차에 따라 건강한 공여자의 전혈 샘플로부터 제조하였다. 형질도입 후 4 일에, CAR-T 세포를 분류하고 마우스에 주사하기 전에 6 일 동안 추가로 확장하였다. NALM6-GL-PDL1 세포 주사 후 5 일에, 1×10^6 개의 CAR-T 세포를 마우스에 정맥 내 주입하였다. 마우스 내 NALM6-GL-PDL1의 생물발광 이미징을 Xenogen IVIS 스펙트럼으로 모니터링하고 신호를 Living 이미지 소프트웨어 (Perkin Elmer)를 사용하여 관심 영역에서 복사량(광자/초)으로서 정량화하였다. *shPD-1* CAR-T 세포로 처리된 마우스는 *shGFP* CAR-T 세포와 비교하여 놀랍게도 균일한 종양 부하 감소를 나타냈다 (도 4). 또한, 두 가지 유형의 shRNA 발현 프로모터가 유사한 항-종양 효과를 가지며 *shRNA* 발현 자체가 놀랍게도 항종양 효과에 영향을 미치지 않는 것으로 밝혀졌다.

[0482] 생체 내 사이토카인 생산에 대한 CAR-T 세포의 세포-내재성 PD-1 파괴의 효과를 조사하기 위해, CAR-T 주사 후 24 및 72 시간에 개별 마우스의 말초 혈액을 수득하였다. 실온에서 300 x g에서 5 분 동안 원심분리하여 말초 혈액으로부터 혈장을 수확하였다. 생체 내 사이토카인 수준을 제조사의 지시에 따라 인간 Th1/Th2 사이토카인 키트 (BD Bioscience)로 분석한다. CAR-T 세포의 세포-내재성 PD-1 파괴는 예상치 못하게 생체 내 사이토카인 생산을 감소시켰다 (도 5a).

[0483] CAR-T 세포의 생체 내 확장에 대한 CAR-T 세포의 세포-내재성 PD-1 파괴의 효과를 조사하기 위해, CAR-T 주사 후 3 또는 20 일에 개별 마우스의 비장을 수득하였다. CAR-T 세포 (Live/Dead⁻CD3⁺) 또는 NALM-6-PDL1 (Live/Dead⁻GFP⁺)의 백분율을 유세포 측정법으로 평가하였다. 세포-내재성 PD-1 파괴는 CAR-T 세포의 생체 내 확장을 예상치 못하게 지연시켰다 (도 5b).

[0484] 본원에 기재된 투인원 벡터 시스템에 의해 획득된 CAR-T 세포-내재성 PD-1 파괴는 CD19⁺PDL1⁺ 종양에 대한 CD19 특이적 CAR-T 세포의 생체 내 항-종양 효과의 예상치 못하게 높은 수준의 증가를 보여주었다. 따라서, PD-1 KD CAR-T 세포를 다음의 실시예의 방법에 추가로 사용하였다.

[0485] **실시예 4: PD-1 시그널링에서 공동자극성 분자의 환경 평가**

[0486] 이 실시예는 PD-1 시그널링에서 CD28 및 4-1BB를 포함하는 공동자극성 분자의 환경의 평가를 기재한다.

[0487] 세포-내재성 PD-1 파괴가 CD28/^{Cü} 3ζ 또는 4-1BB/^{Cü} 3ζ CAR-T 세포의 기능에 어떻게 영향을 미치는지를 조사하였다 (도 6a). G28z GBBz, P28z 및 PBBz CAR-T 세포를 먼저 생성하였다. 이들 CAR-T 세포를 유사하게 형질도입시켰다 (도 6b). PD-1 발현 수준은 GBBz CAR-T 세포보다 G28z CAR-T 세포에서 더 높았으며, P28z의 PD-1 수준은 PBBz의 것보다 높았다 (도 7a). 또한, 이 상이한 PD-1 단백질 수준은 전사 수준에서 기인한 것으로 밝혀졌다 (도 7b). 각각의 공동자극성 도메인은 PD-1 전사에 관여하는 인자의 활성화에 대해 상이한 강도를 나타낸다는 가설을 세웠다. PD-1 전사에 관여하는 전사 인자 중에서, NFAT 및 NF-KB는 PD-1 전사에 유의하게 관여하였고, SMAD2/3은 종양 미세환경의 주요 면역억압 인자인 외인성 TGF-β의 존재 하에서 PD-1 전사에 관여하였다 (Cancer Discov., 2016, Benjamin V. Park). CAR 자극 동안 NFAT 또는 NF-kB 활성을 조사하였다. NFAT 반응 요소 (NFAT-RE x3)-eGFP 또는 전통적인 NF-KB 반응 요소 (NF-KB RE x5)-eGFP 리포터 렌티바이러스성 벡터를 구축하였다. NFAT 또는 NF-kB RE-매개 eGFP 유도인 것으로 나타났다 (도 8a 및 8b). 리포터-형질도입된 T 세포를 G28z 또는 GBBz로 재-자극하고 추가적으로 형질도입시켰다. G28z 형질도입된 NFAT 리포터 CAR-T 세포 (G28z-NFAT)가 GBBz-NFAT와 비교하여 약간 높은 수준의 NFAT 활성을 가지며 (도 9a), NFAT 표적 유전자의 mRNA 수준이 또한 G28z에서 더 높은 것으로 밝혀졌다 (도 9b). 그러나, G28z 형질도입된 NF-KB 리포터 CAR-T 세포 (G28z-NF-KB)는 GBB-NF-KB와 비교하여 NFAT 활성이 유사하다 (도 10). 각각의 CAR-T 세포의 SMAD2/3의 활성을

조사하기 위해, CAR 자극 동안 TGF- β 를 G28z 또는 GBBz CAR-T 세포에 처리하였다. G28z CART의 SMAD2/3 인산화는 BBz CART가 약간 더 높았으며 (도 11a), TGF- β 처리에 의한 PD-1 발현의 증가 정도는 GBBz보다 G28z에 대해 더 크다 (G28z의 배수 변화 2.39 ± 0.031 , GBBz 1.61 ± 0.034)는 것을 발견하였다 (도 11b). 이 차이가 TGF- β 시그널링 요소의 발현 수준의 차이로 인한 것인지 여부를 조사하였다. TGF- β 및 TGF- β 수용체 1 (TGFBRI)은 두 CART 간에 유의하게 상이하지 않았지만, TGF- β 수용체 2 (TGFBRII)는 CD28에서 더 높은 수준으로 발현되었다는 것을 발견하였다 (도 11c).

[0488] 이 실시예에서, PD-1 시그널링에서 CD28 및 4-1BB를 포함하는 공동자극성 분자의 환경을 평가하였다. CD28 공동 자극은 PD-1 전사와 연관된 시그널링을 강력하게 유도하고, 유도는 NFAT 및 TGF- β 시그널링의 활성화와 관련될 수 있다. CD28 공동자극의 유도는 4-1BB 공동자극보다 강력했다.

[0489] **실시예 5: PD-1 KD CAR-T 세포의 조작 및 평가 방법**

[0490] 이 실시예는 PD-1 KD CAR-T 세포의 조작 및 평가 방법을 기재한다.

[0491] 다중 순차적 항원 및 면역 체크포인트 리간드 엔카운터(encounter)와 함께 CAR-T 세포의 생체 내 조건을 모방하기 위해, CAR-T 세포를 외인성 사이토카인없이 CD19⁺ PDL1⁺ 표적 세포와 공동-배양하였다. 1 차 CAR-T 세포에서, PD-1 KD CAR-T 군은 WT CAR-T 군보다 놀랍게도 높은 용해성 활성을 나타내었지만, CD28-기반 및 4-1BB-기반 CAR-T 군 사이에는 용해성 활성에 차이가 없었다 (도 12a). 2nd CAR-T 세포 재자극 후, G28z CAR-T 세포는 제2 자극 후에 확장하는 능력을 상실하였으므로, 따라서 3 개의 CAR-T 세포의 용해성 활성을 분석하였다. PBBz 및 P28z CAR-T 세포는 GBBz CAR-T 세포보다 반복된 항원 및 PD-L1 노출시 놀랍게도 더 높은 용해성 활성을 가졌다. PBBz CAR-T 세포는 P28z CAR-T 세포보다 용해성 기능을 유지하는 데 예상치 못하게 더 높은 용량을 나타냈다 (도 12a). 이러한 경향은 또한 세포 증식 검정에서 관찰되었다 (도 12b). 종합적으로, PD-1 KD CART에 4-1BB 공동자극성 도메인의 적용은 CD28 공동자극성 도메인과 비교하여 생체 외에서 유지된 세포독성 및 증식 용량에 기여한다. PBBz CAR-T 세포는 반복된 CD19 및 PD-L1 노출시 지연된 고갈을 나타낸다.

[0492] BBz CAR-T 세포에 대한 면역억압 메커니즘의 가능한 효과를 조사하였다. CD28 CAR-T 세포는 BBz CART보다 TGF- β 에 더 민감하였고 (도 11b), 따라서 GBBz CAR-T 세포를 이들의 항원 특이적 증식이 TGF- β 에 의해 얼마나 억압되는지에 대해 G28z CAR-T 세포와 비교하였다. TGF- β 가 없는 CAR 자극 동안 2 개의 CAR-T 세포 간에 유의한 증식 차이가 관찰되지 않았지만, G28z CAR-T 세포의 증식은 GBBz CAR-T 세포보다 의미있게 감소되었다 (도 13a).

[0493] TGF- β 는 증식을 억제할뿐만 아니라 조절성 T 세포의 유도에 또한 깊이 관여한다고 보고되었다 (JEM, 2003, WanJun Chen; Science, 2003, Shohei Hori; Blood, 2007, Dat Q. Tran). 외인성 TGF- β , G28z 및 BBz CAR-T 세포의 부재 하에 Treg 유도가 G28z 및 BBz CAR-T 세포 간에 상이한지 여부를 조사하기 위해 세포를 3 일 동안 NALM-6 표적 세포와 함께 배양하였다. G28z CAR-T 세포는 GBBz CAR-T 세포와 비교하여 생체 외 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg %의 2 내지 3 배를 가졌다 (도 13b). 이 결과는 Treg-관련 유전자, 예컨대, CD25 및 FOXP3의 발현 증가와 일치한다 (도 9b). 다음으로, TGF- β 처리 후 Treg %의 변화를 관찰하고 비교하였다. TGF- β 는 28z CAR-T 세포에서 Treg %를 유의하게 개선시키지만 BBz CAR-T 세포에서는 Treg %에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다 (도 13b). CD28 공동자극은 4-1BB 공동자극보다 Treg를 유도할 가능성이 더 높으며, TGF- β 가 존재하는 경우 그 잠재력이 추가로 폭발적으로 증가한다고 결론지었다. 세포 내재성 PD-1 파괴가 Treg의 유도에 영향을 미치는지 여부를 조사하였다. P28z 및 PBBz CAR-T 세포는 각각 G28z 및 GBBz와 비교하여 2 내지 3 배 더 낮은 Treg의 %를 가졌다. 특히, PBBz는 Treg %가 가장 낮았다 (도 13c). 마지막으로, PD-1/PD-L1 시그널링이 활성화된 상태에서 Treg의 백분율을 조사하였다. NALM-6 또는 NALM-6-PDL1 공동-배양 후 Treg % 변화를 조사하였다. PD-1/PDL1 시그널링이 CAR-T-유래 Treg의 유도에 유의하게 영향을 미치지 않는 것으로 밝혀졌으며 (도 13c), 이는 세포 내 PD-1 발현 수준이 Treg의 형성과 관련이 있음을 시사한다. PBBz CAR-T 세포는 놀랍게도 면역억압 메커니즘에 둔감할 수 있다고 결론 지었다.

[0494] 이 실시예에서, PBBz CAR-T 세포가 생산되었고, 반복된 CD19 및 PD-L1 노출시 지연된 고갈이 나타났다. PBBz CAR-T 세포는 또한 예기치 않게 면역억압 메커니즘을 회피한다. 따라서, 이들 세포를 생체 내 항종양 효과에 대해 추가로 평가하였다.

[0495] **실시예 6: PBBz CAR-T 세포를 이용한 생체 내 CD19+ 혈액 암의 치료 방법**

[0496] 이 실시예는 PBBz CAR-T 세포를 이용한 생체 내 CD19+ 혈액 암의 치료 방법을 기재한다.

- [0497] CD19⁺ 혈액 종양 모델은 실시예 3에 기재된 바와 같이 확립되었다. 생체 내 CD19⁺ B-ALL 세포에 대한 G28z, GBBz, P28z 및 PBBz CAR-T 세포의 항종양 효과를 비교하였다. 표적 세포 주입 후 4 일에 2.5×10^6 개의 단일 용량으로 CAR-T 세포를 투여하였다. NALM6-GL-PDL1 보유 마우스의 생체 내 이미징을 Xenogen IVIS 스펙트럼으로 획득하고 관심 영역에서 방사량(광자/초)으로서 정량화하였다. 도 14에 도시된 바와 같이, PD-1 KD CART 세포 (PBBz 또는 P28z)는 WT CAR-T 세포 (GBBz 또는 G28z)에 대해 우수한 항종양 효과를 나타낸다. 특히, PBBz CAR-T 세포는 다른 3 개의 CAR-T 세포보다 더 오랜 기간 동안 백혈병 진행을 억제하였다. WT CAR-T 세포는 강한 항종양 반응을 보였지만, 항종양 반응이 지속되지 않았다. 한편, PD-1 KD CAR-T는 초기 기간에 약한 반응을 보였으나, 지속적인 항종양 반응을 보였으며, 이는 CAR-T 세포에서의 PD-1 파괴가 CRS에 대한 위험을 잠재적으로 감소시킬 수 있음을 시사한다. PBBz CAR-T 세포는 P28z의 것보다 예상치 못하게 우수한 생체 내 항종양 효과를 부여하였다.
- [0498] 실시예 7: $\rightarrow\leftarrow$ 또는 $\leftrightarrow$ 방향으로 입력된 2 개의 유형의 shRNA 카세트를 갖는 이원 투인원 벡터의 제조 방법
- [0499] 이 실시예는 2 개의 유형의 shRNA 카세트가 $\rightarrow\leftarrow$ 방향 (shTIM-3-mU6 $\leftrightarrow$ hU6-shPD-1) 또는 $\leftrightarrow$ 방향 (mU6-shTIM-3 $\leftrightarrow$ shPD-1-hU6)으로 입력되고, shPD-1, shTIM-3 및 CD19-CAR을 동시에 발현하는 이원 투인원 벡터의 생산 방법을 기재한다.
- [0500] PD-1에 대한 shRNA (이하 shPD-1), TIM-3에 대한 shRNA (이하 shTIM-3) 및 CD19-CAR의 발현이 각각 인간 U6 프로모터 (이하 hU6), 마우스 U6 프로모터 (이하 mU6) 및 EF1- α 프로모터에 의해 제어되는 렌티바이러스를 구축하기 위해. 두 유형의 shRNA가 동시에 발현되는 플라스미드를 제조하여 각각의 shRNA 카세트가 $\rightarrow\leftarrow$ 방향 (mU6-shTIM-3 $\leftrightarrow$ shPD-1-hU6) 및 $\leftrightarrow$ 방향 (shTIM-3-mU6 $\leftrightarrow$ hU6-shPD-1)으로 배치되도록 한다 (각각 도 15의 패널 a) 및 b)). 이를 위해, (1) 다중 클로닝 부위 (MCS)의 삽입, (2) shPD-1의 마우스 U6 프로모터의 인간 U6 프로모터로의 전환, (3) shTIM-3의 삽입 및 (4) 클로닝, 예컨대, shTIM-3 및 shPD-1의 스위칭 위치를 수행하였다.
- [0501] mU6-shPD-1에 MCS를 삽입하기 위해 pLV-ALNGFR_P2A_CD19-CAR_mU6-shPD-1 (플라스미드 ID #2)의 3' 부분, 및 서열번호 228 및 229를 포함하는 프라이머를 사용하여 mU6-shPD-1 3'의 HpaI 제한 효소 인식 부위가 BsgZ171-Xba1-Nde1-Bmt1-Spe1 다중 클로닝 부위로 변형된 PCR 산물 (416 bp)을 만들었다. 그 후, PCR 산물을 BstZ17y 및 HpaI 제한 효소로 처리하고 플라스미드 ID #2를 HpaI 제한 효소 및 CIP로 처리한 후, 평할 말단 결찰을 사용하여 shPD-1-mU6-MCS 염기 서열 (shRNA 카세트 서열번호 223)를 포함하는 pLV-ALNGFR-P2A-CD 19-CAR-mU6-shPD-1 MCS (플라스미드 ID #4)를 제조하였다.
- [0502] 그 후, 마우스 E β 6 프로모터 대신에 인간 E β 6 프로모터에 의해 shPD-1이 발현되도록 플라스미드를 구축하였다. 렌티CRISPR V2 플라스미드를 서열번호 230 및 231을 포함하는 프라이머와 함께 사용하여 인간 U6 프로모터를 포함하는 PCR 산물을 수득하였다. PCR 산물을 HpaI 및 SpeI 제한 효소로 처리한 후, HpaI 및 SpeI 제한 효소로 처리된 플라스미드 ID #4에 결찰하여 hU6-shPD-1 염기 서열 (서열번호 224)을 포함하는 pLV-ALNGFR_P2A_CD19-CAR_hU6-shPD-1_MSC (플라스미드 ID #5)를 제조하였다. mU6-shTIM-3 카세트를 플라스미드 ID #5에 삽입하여 shTIM-3 및 shPd-1을 동시에 발현하는 플라스미드를 구축하고자 하였다.
- [0503] mU6-shTIM-3 카세트를 포함하는 PCR 산물을 플라스미드 ID #3 및 서열번호 232 및 233을 포함하는 프라이머를 사용하여 수득하였다. PCR 산물을 Bmt1 및 SpeI 제한 효소로 처리한 후, Bmt1 및 SpeI 제한 효소로 처리된 플라스미드 ID #5에 결찰하여 $\rightarrow\leftarrow$ 방향 (mU6-shTIM-3 $\leftrightarrow$ shPD-1-hU6) 염기 서열 (서열번호 220)을 포함하는 pLV-ALNGFR_P2A_CD19-CAR mU6-shTIM-3 $\leftrightarrow$ shPD-1-hU6 (플라스미드 ID #6)을 제조하였다.
- [0504] 두 가지 유형의 shRNA 카세트가 $\leftrightarrow$ 방향 (shTIM-3-mU6 $\leftrightarrow$ hU6-shPD-1)으로 배열된 플라스미드를 구축하기 위해, 플라스미드 ID #6 및 서열번호 234 및 235를 포함하는 프라이머를 사용하여 PCR 산물을 수득하였다. SpeI 및 HpaI 제한 효소로 처리한 후, 동일한 제한 효소로 처리된 플라스미드 ID #4에 삽입시켜 pLV-ALNGFR-P2A-CD19-CAR-shPD-1-hU6-MCS (플라스미드 ID #7)를 생산하였다. 그 후, 플라스미드 ID #6 및 서열번호 236 및 237을 포함하는 프라이머를 사용하여 PCR 산물을 수득하였다. Bmt1 및 SpeI 제한 효소로 처리한 후, 동일한 제한 효소로 처리된 플라스미드 ID #7에 결찰시켜 궁극적으로 $\leftrightarrow$ 방향 (shTIM-3-mU6 $\leftrightarrow$ hU6-shPD-1) 염기 서열 (서열번호 221)을 포함하는 pLY-ALNGFR-P2A-CD19-CAR_shTIM-3-mU6 $\leftrightarrow$ hU6-shPD-1 (플라스미드 ID #8)을 제조하였다.

- [0505] 본원에서 생산된  또는 $\rightarrow\leftarrow$ 방향으로 2 개의 유형의 shRNA 카세트가 입력되는 투인원 렌티바이러스성 벡터는 다음의 실시예에서 PD-1 KD 변형된 CAR-T 세포의 생산에 사용될 수 있다.
- [0506] **실시예 8: PD-1 KD CAR-T 세포의 생산 및 생체 외 평가 방법**
- [0507] 이 실시예는 shPD-1, shTIM-3 및 CD19-CAR이 동시에 발현되는 이원 KD CAR-T 세포의 생산 및 생체 외 평가 방법을 기재한다.
- [0508] 표 1의 플라스미드 ID #1 (pLV-ALNGFR_P2A_CD19-CAR_mU6-shGFP), #6 (pLV-ALNGFR_P2A_CD19-CAR_mU6-shTIM-3 $\rightarrow\leftarrow$ shPD-1-hU6) 및 #8 (pLV-ALNGFR_P2A_CD19-CAR_shTIM-3-mU6 $\leftarrow\rightarrow$ hU6-shPD-1), 및 패키징 플라스미드 pMDL g/p, pRSVrev 및 pMDG.1을 리포펙타민을 사용하여 HEK293 T 세포에 형질주입시키고, 48 시간이 지난 후에 렌티바이러스를 포함하는 세포 배양액을 수득하였다. 피콜-파그(피콜-파그) 용액을 사용하여, 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 인간 혈액으로부터 분리하고, 인간 CD3 및 CD28 표적 항체를 사용하여 T 세포를 특이적으로 활성화시켰다. T 세포의 초기 활성화 후 1 내지 2 일 후에, 이들을 이전에 수득된 바이러스를 사용하여 형질도입시켰다. 그 후, 제조된 CAR-T 세포를 5% 인간 혈장 및 인간 IL-2를 포함하는 AIM-V 배양액을 사용하여 배양하였다. 형질도입 후 6 일째에, MACSelect LNGFR 시스템 (miltenyibiotec, Germany)을 사용하여 순수한 CAR-T 세포를 수득하고, LNGFR 표적 항체를 사용하여 유세포 분석기로 LNGFR+ CAR-T 세포를 분리하였다. 다음에서, 플라스미드 ID #1, #6 및 #8을 사용하여 제조된 세포는 각각 ALNGFRCART 19/shGFP (또는 shGFP/CART19), ALNGFR-CART19/mU6-shTIM-3 $\rightarrow\leftarrow$ shPD-1-hU6 (또는 shPD-1_shTIM-3/CART19) 및 ALNGFR-CART19/shTIM-3-mU6 $\leftarrow\rightarrow$ hU6-shPD-1로서 표시된다 (도 16).
- [0509] mU6-shPD-1, mU6-TIM-3 및 shPD-1-hU6 카세트를 각각 포함하는 대조군 CAR-T 세포를 제조하기 위해, 표 1의 플라스미드 ID #2 (pLV-ALNGFR_P2A_CD19-CAR_mU6-shPD-1), #3 (pLV-ALNGFR_P2A_CD19-CAR_mU6-shTIM-3) 및 #7 (pLV-ALNGFR_P2A_CD19-CAR_shPD-1-hU6_MCS) 및 패키징 플라스미드 pMDL g/p, pRSVrev 및 pMDG.1을 리포펙타민을 사용하여 HEK293 T 세포에 형질주입시켰다. 48 시간이 지난 후, 렌티바이러스를 포함하는 세포 배양액을 수득하였다. 피콜-파그 용액을 사용하여, 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 인간 혈액으로부터 분리하고, 인간 CD3 및 CD28 표적 항체를 사용하여 T 세포를 특이적으로 활성화시켰다. T 세포의 초기 활성화 후 1 내지 2 일 후에, 이들을 이전에 수득된 빔스(vims)를 사용하여 형질도입시켰다. 그 후, 제조된 CAR-T 세포를 5% 인간 혈장 및 인간 IL-2를 포함하는 AIM-V 배양액을 사용하여 배양하였다. 형질도입 후 6 일째에, MACSelect LNGFR 시스템 (miltenyibiotec, Germany)을 사용하여 순수한 CAR-T 세포를 수득하고, LNGFR 표적 항체를 사용하여 유세포 분석기로 LNGFR+ CAR-T 세포를 분리하였다. 다음에서, 플라스미드 ID #2, #3 및 #7을 사용하여 제조된 세포는 각각 ALNGFR-CART19/shPD-1 (또는 shPD-1/CART19), ALNGFR-CART19/shTIM-3 (또는 shTIM-3/CART19) 및 ALNGFRCART19/shPD-1-hU6으로 표시된다.
- [0510] 본원에서 생산된 이원 KD CAR-T 세포의 순도를 측정하기 위해, 유세포 측정법을 상기 제조된 세포에 대한 LNGFR 표적 항체를 사용하여 수행하였다. 도 17에 도시된 바와 같이, LNGFR+ CAR-T 세포의 약 80%를 수득하였다.
- [0511] 본원에서 생산된 이원 KD CAR-T 세포에서 PD-1 및 TIM-3의 감소된 발현을 측정하고, 이의 발현 감소를 유지시켰다. 이원 KD CAR-T 세포를 인간 CD3 및 CD28 표적 항체로 3 일 동안 자극하여 PD-1 및 TIM-3의 발현을 유도하였다. 그 후, 이원 KD CAR-T 세포의 PD-1 및 TIM-3 발현을 CAR, PD-1 및 TIM-3 표적 항체를 사용한 유세포 측정법을 통해 분석하였다. 도 18a 및 18b에 도시된 바와 같이, PD-1 및 TIM-3의 발현 감소에 대한 2 개의 동시 발현된 shRNA 유형의 효과의 분석은, shPD-1 및 shTIM-3을 동시에 발현하는 CD19-CAR T 세포에서 관찰된 PD-1 및 TIM-3 발현의 감소 정도가 shPD-1 또는 shTIM-3 만이 발현되는 CD19-CAR T 세포에서의 감소 정도와 유사하다는 것을 보여주었다.
- [0512] 분화에 대한 본원에서 생산된 이원 KD CAR-T 세포의 영향을 측정하였다. 이원 KD CAR-T 세포의 PD-1 및 TIM-3 분화 정도를 관찰하기 위해, CD45RA 및 CCR7 표적 항체를 사용하여 유세포 측정법을 수행하였다. 도 19에 도시된 바와 같이, 반복된 항원 자극을 받는 ALNGFR-CART19/shPD-1 세포에서, ALNGFR-CART19/shGFP와 비교하여 말단 분화된 TEMRA (CCR7-CD45RA+) T 세포에서 증가가 존재한다. 한편, shTIM-3이 첨가된 ALNGFR-CART19/mU6-shTIM-3 $\rightarrow\leftarrow$ shPD-1-hU6은 ALNGFR-CART19/shPD-1보다 더 많은 TN (CCR7+CD45RA+) T 세포, TCM (CCR7+CD45RA-) T 세포 및 TEM (CCR7-CD45RA-) T 세포 서브유형을 포함한다. ALNGFR-CART19/shTIM-3 세포에서도 유사한 결과가 관찰되므로, ALNGFR-CART19/mU6-shTIM-3 $\rightarrow\leftarrow$ shPD-1-hU6 세포의 감소된 분화 능력은 TIM-3 발현의 억압으로 인해 발생한다고 말할 수 있고, shTIM-3의 효과는 세포 분화에 대한 영향의 관점에서 shPD-1의 효과보다 우선 순위가 있다고 말할 수 있다. 덜 분화된 T 세포 서브유형이 T 세포의 개선된 암 치료적 능력을 촉진할 수 있는 것으로

알려져 있으므로, ALNGFR-CART19/mU6-shTIM-3→←shPD-1-hU6 세포는 ALNGFR-CART19/shPD-1 세포보다 보다 나은 생체 내 항-암 효율을 나타낼 것으로 예상된다.

[0513] 상이한 배향을 갖는 shRNA 카세트를 포함하는 CD19-CAR 벡터가 도입된 이원 KD CAR-T 세포의 형질도입 효율, 증식 능력 및 생존율을 비교하였다. 본원에서 생산된 CAR-T 세포 중에서, →← 방향 (mU6-shTIM-3→←shPD-1-hU6) 및 ←→ 방향 (shTIM-3-mU6←→hU6-shPD-1) 카세트를 포함하는 플라스미드를 사용하는 세포에 대해 LNTFR 항체를 사용하여 유세포 측정법을 수행하였다. 세포 생존율 분석을 위해, 트립판 블루 염색을 수행하였고, 염색되지 않은 세포의 비를 발견하였다. 도 20a-20c에 도시된 바와 같이, →← 방향 카세트를 사용하는 세포 (ALNGFR-CART19/mU6-shTIM-3→←shPD-1-hU6)와 비교하여, ←→* 방향 카세트를 사용하는 세포 (ALNGFR-CART19/shTIM-3-mU6←→hU6-shPD-1)는 형질도입된 세포를 형성하는데 예상치 못한 문제가 있었고, 형질도입된 T 세포는 증식 능력 및 생존율이 낮았다.

[0514] 이 실시예는 shPD-1, shTIM-3 및 CD19-CAR이 동시에 발현되는 이원 KD CAR-T 세포의 생산 방법을 기재한다. 이원 KD CAR-T 세포를 →← 또는 ←→* 방향으로 진입하는 2 개의 유형의 shRNA 카세트를 갖는 본원에서 생산된 투인원 렌티바이러스성 벡터를 사용하여 생산하였다. ←→* 방향 카세트를 사용하는 세포와 비교할 때, →← 방향 카세트를 사용하는 세포 (ALNGFR-CART19/mU6-shTIM-3→←shPD-1-hU6)는 놀랍게도 높은 증식 능력 및 생존율을 나타내었으므로, 다음의 실시예에서 사용되었다.

[0515] **실시예 9: 이원 투인원 벡터 및 이원 KD CAR-T 세포의 생산 방법**

[0516] 이 실시예는 이원 투인원 벡터 및 이원 KD CAR-T 세포를 생산하는 방법을 기재한다.

[0517] 상이한 프로모터 (mU6 및 hU6)에 의해 2 개의 shRNA를 발현하는 이원 투인원 벡터의 생성을 위해, BstZ171-Xba1-Nde1-Bmt1-Spe1 다중 클로닝 부위 (MCS)를 hU6 프로모터의 pLV-hU6-shPD-1-ALNGFR-CD19-BBz 벡터 하류에 삽입하였다. 제2 mU6-shRNA 카세트 단편을 MCS에 서브클로닝하였다. CAR-T 세포만에 대한 다중 면역 체크포인트의 차단을 제한하기 위해, CAR-T 세포의 2 개의 면역 체크포인트의 발현을 억제하기 위하여 mU6 및 hU6 Pol III 프로모터에 의해 2 개의 shRNA를 발현하도록 이원 투인원 벡터를 고안하였다. 효과적인 CTLA-4, LAG-3, TIGIT 또는 TIM-3 표적화 siRNA를 찾기 위해, siRNA를 CD3/CD28-자극된 T 세포에 전기천공시켰다. 2 개 이상의 효과적인 siRNA를 선택하였다 (도 21a). CTLA-4, LAG-3, TIGIT 또는 TIM-3 KD CAR-T 세포를 위한 투인원 벡터는 21-mer siRNA의 shRNA 포맷으로의 형질전환을 통해 구축되었고, 최종적으로 발현을 유의하게 억제하고 CAR-T 확장에 덜 영향을 미치는 각각의 면역 체크포인트 표적화 shRNA (shCTLA-4: #1; shLAG-3: #1278; shTIGIT: #739; shTIM-3: #3)를 선택하였다 (도 21b-21c). 마지막으로, PD-1-CTLA-4, PD-1-LAG-3, PD-1-TIGIT 또는 PD-1-TIM-3 CAR-T 세포는 이원 투인원 벡터에 의해 구축되었다 (도 22a-22e). 모든 이원 KD CAR-T 세포는 단일 PD-1 KD CAR-T 세포와 비교하여 덜 확장되었다 (도 22c). 이러한 결과는 또한 단일 KD CAR-T 세포에서도 관찰되었다 (도 21b).

[0518] 이 실시예에서, 이원 투인원 벡터를 생성하였다. 이원 투인원 벡터를 사용하여 이원 KD CAR-T 세포를 제조하고, 이들의 치료적 잠재력을 CD19⁺PDL1⁺ 혈액 종양을 갖는 생체 내 마우스 모델 및 하기 실시예의 고형 종양 모델에서 추가로 평가하였다.

[0519] **실시예 10: PD-1 및 TIGIT을 표적으로하는 이원 KD CAR-T 세포를 이용한 생체 내 CD19+ 혈액 암의 치료 방법**

[0520] 이 실시예는 다음 조합, PD-1 및 CTLA-4, PD-1 및 LAG-3, PD-1 및 TIGIT, 및 PD-1 및 TIM-3를 포함하는 2 개의 면역 체크포인트를 표적으로 하는 이원 KD CAR-T 세포를 사용하여 생체 내 CD19+ 혈액 암의 치료 방법을 기재한다.

[0521] CD19⁺ 혈액 종양 모델을 실시예 3에 기재된 바와 같이 확립하였다. 혈액 CD19⁺ B-ALL 모델에 대한 PD-1-CTLA-4, PD-1-LAG-3, PD-1-TIGIT 또는 PD-1-TIM-3 KD CAR-T 세포의 항종양 효과를 평가하였다. 각각의 CAR-T 세포를 표적 세포 주입 후 5 일에 1×10^6 개의 단일 용량으로 주사하였다. PD-1-TIGIT KD CAR-T 세포는 다른 이원 KD CAR-T 세포와 비교하여 놀랍게도 우수한 항종양 효과를 나타내는 것으로 밝혀졌다 (도 23). 따라서, 고형 종양 모델에서 PD-1-TIGIT KD CAR-T 세포를 다음의 실시예에서 추가로 평가하였다.

[0522] **실시예 11: PD-1 및 TIGIT을 표적으로 하는 이원 KD CAR-T 세포를 이용한 고형 종양 모델에서의 치료 방법**

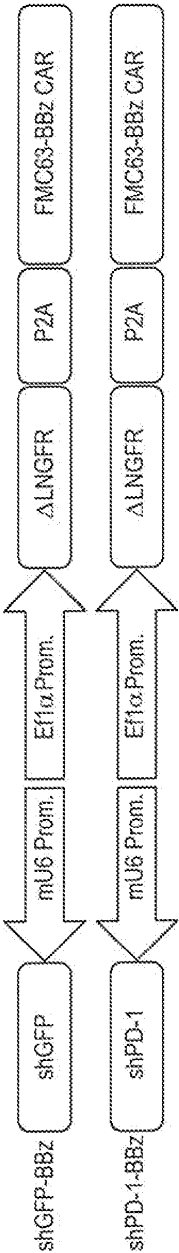
[0523] 이 실시예는 PD-1 및 TIGIT을 표적으로 하는 이원 KD CAR-T 세포를 이용한 고형 종양 모델에서의 암의 치료 방

법을 기재한다.

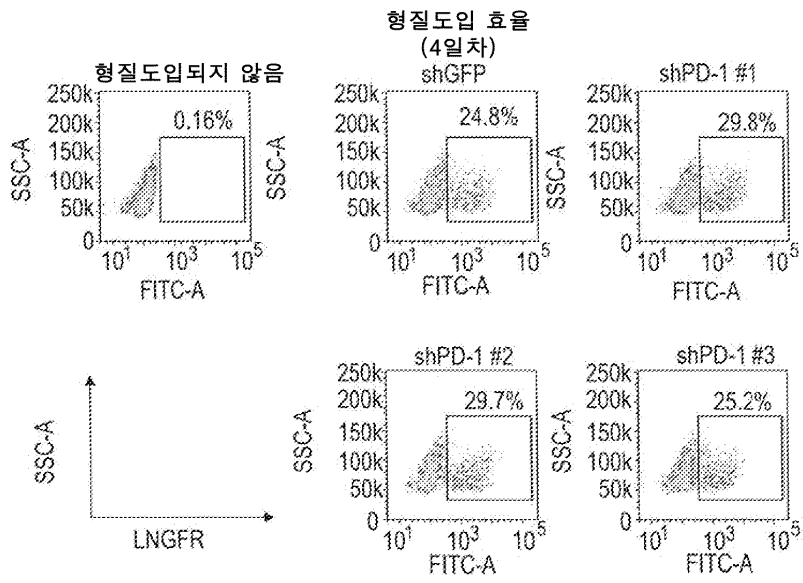
[0524] 고형 종양 모델을 확립하기 위해, 4 내지 6 주령의 NSG 마우스에 5×10^6 개의 IM-9 세포 ($CD19^+$ $PD-L1^+$ $CD155^+$)를 피하 주사하였다. 종양이 $150 \sim 250 \text{ mm}^3$ 의 부피에 도달하면, CAR-T 세포에 3×10^6 개의 단일 용량으로 정맥 내 주사한다. 캘리퍼 측정에 의해 매주 종양을 모니터링하고 부피를 (길이 x 너비²)/2로 추정하였다. 혈액 종양 모델 (Na1m-6-PDL1)에 도식된 바와 같이, PD-1_TIGIT KD CAR-T 세포는 또한 고형 종양 모델 (IM-9)에 대해 놀랍게도 가장 효과적이었다 (도 24). 세포 내재성 PD-1_TIGIT 차단은 PD-1 차단보다 예기치 않게 더 높은 수준의 항종양 효과를 갖는다.

도면

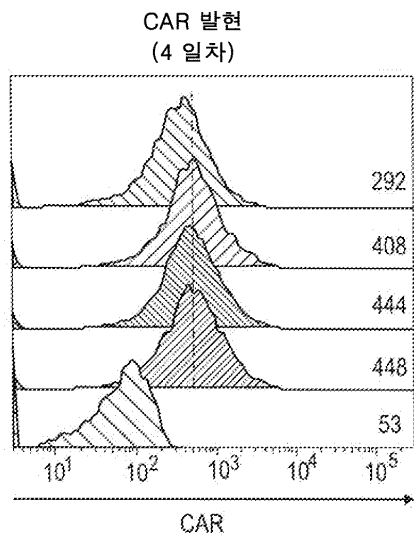
도면1a



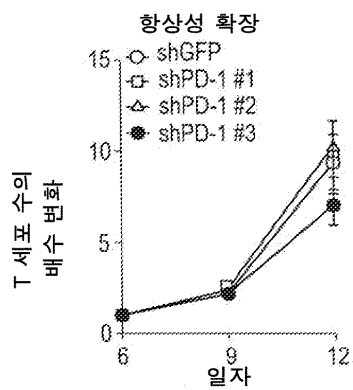
도면1b



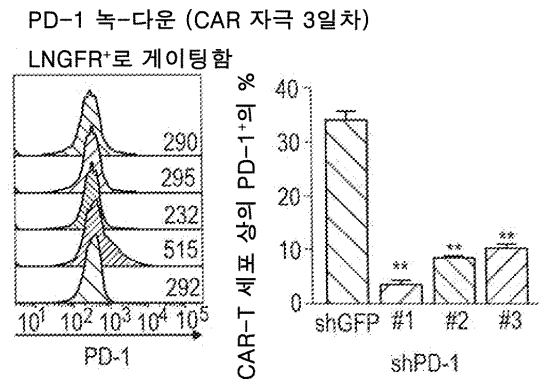
도면1c



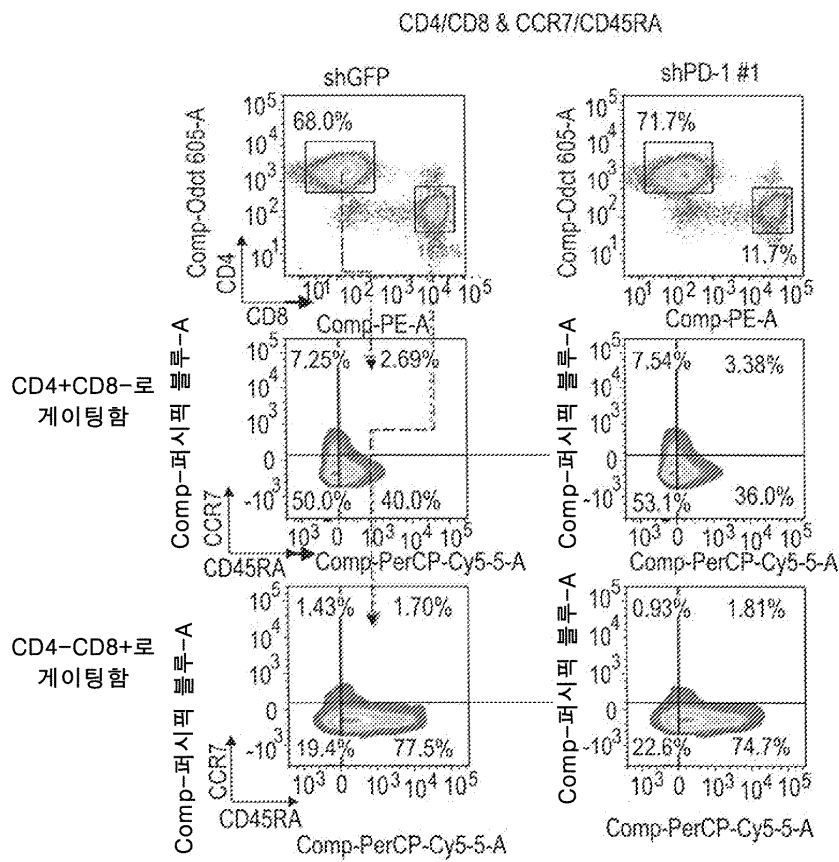
도면1d



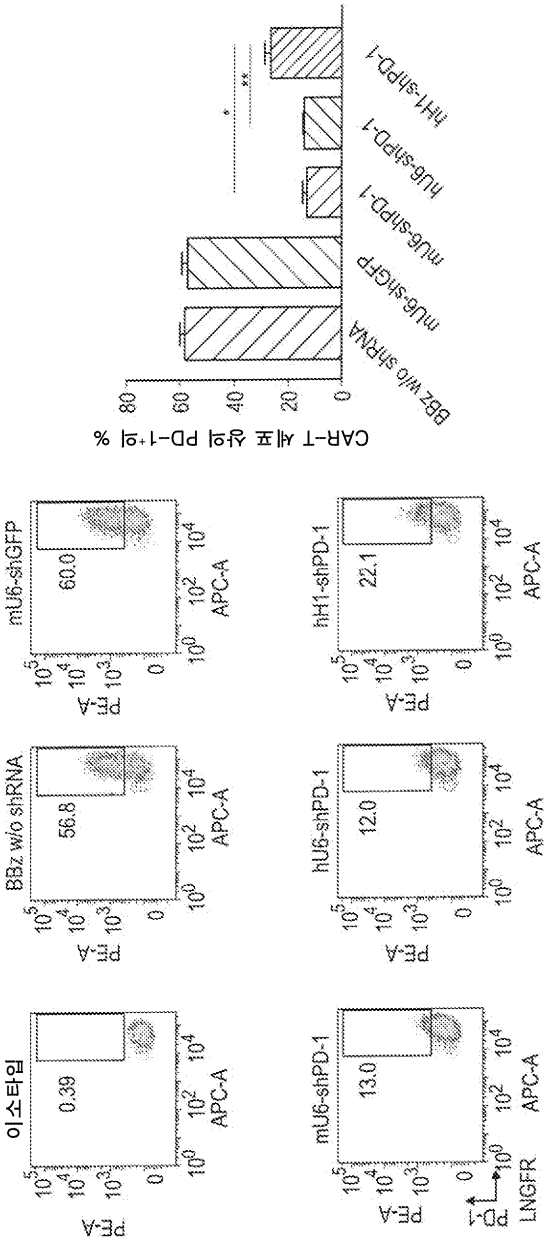
도면1e



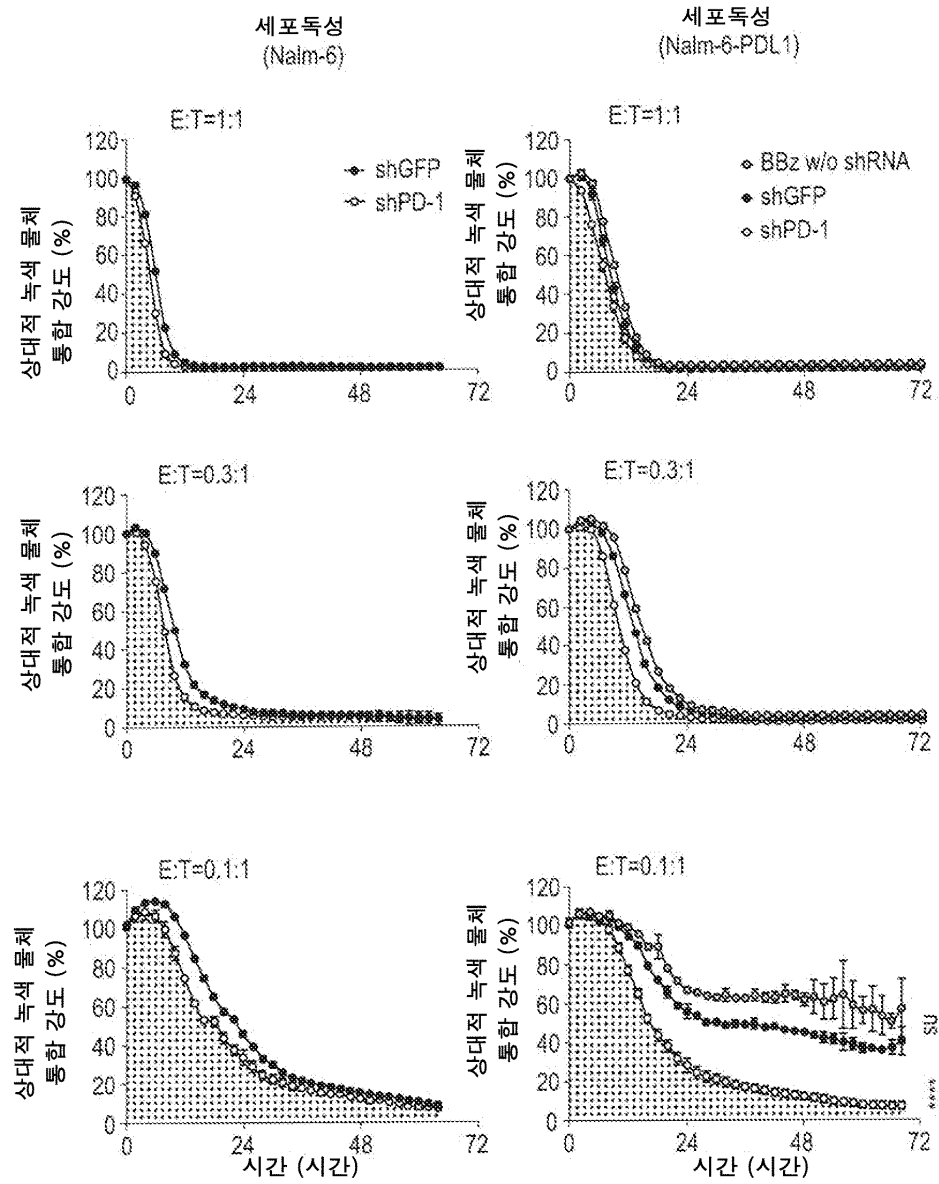
도면1f



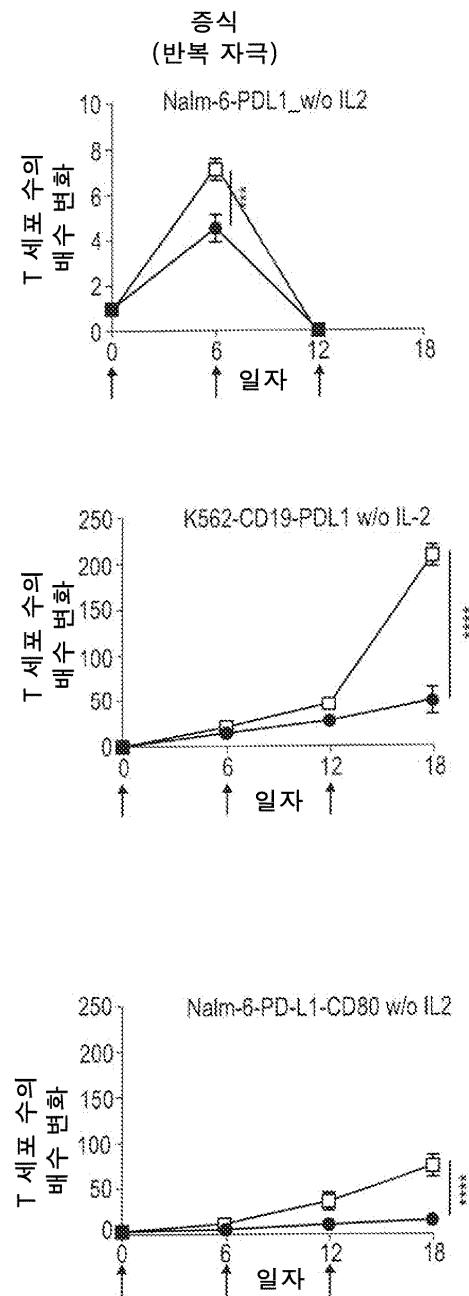
도면2



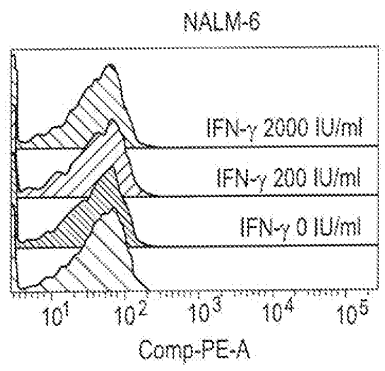
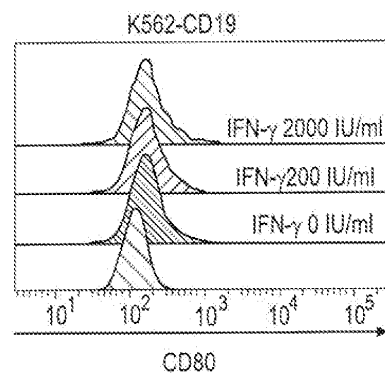
도면3a



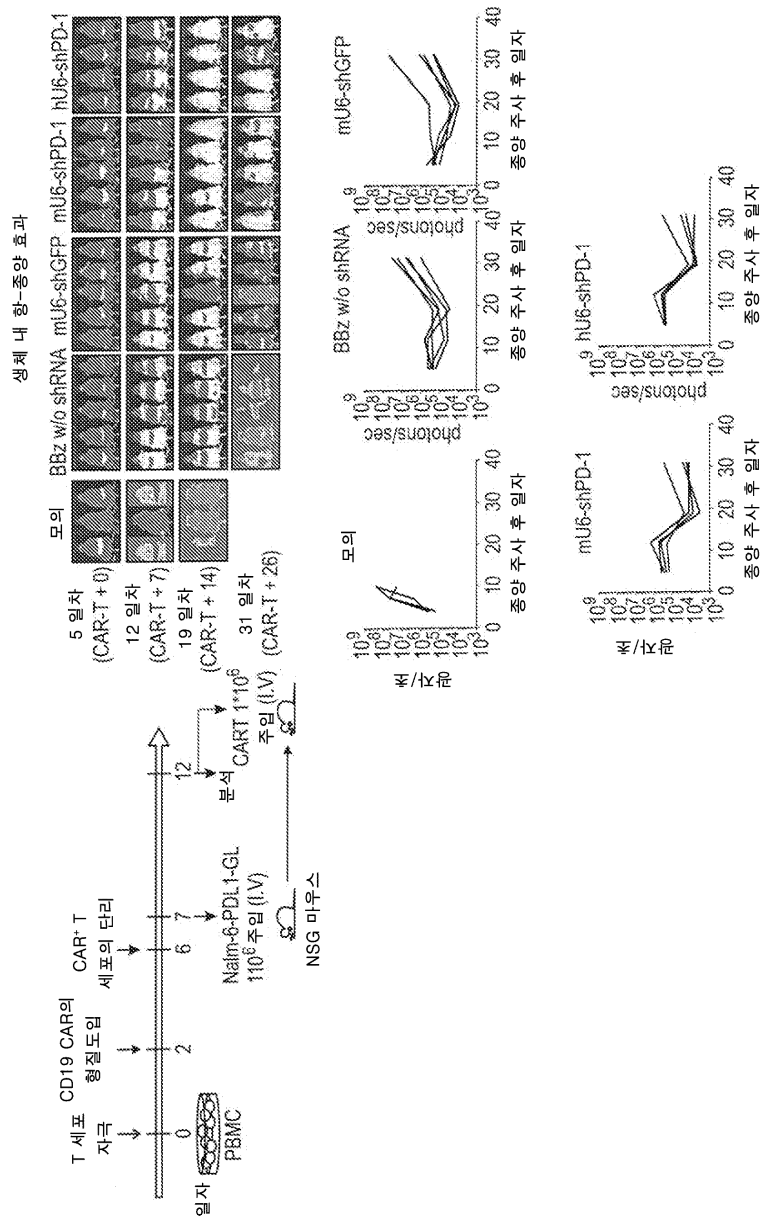
도면3b



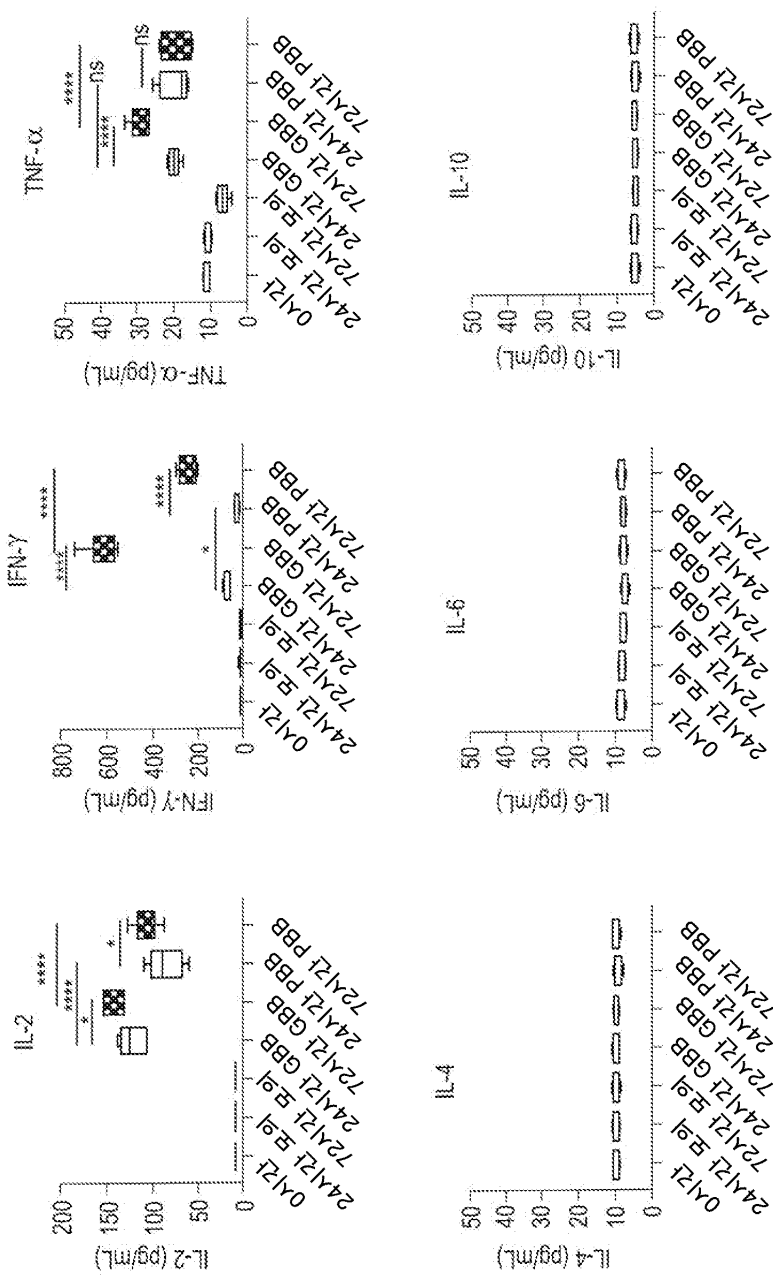
도면3c



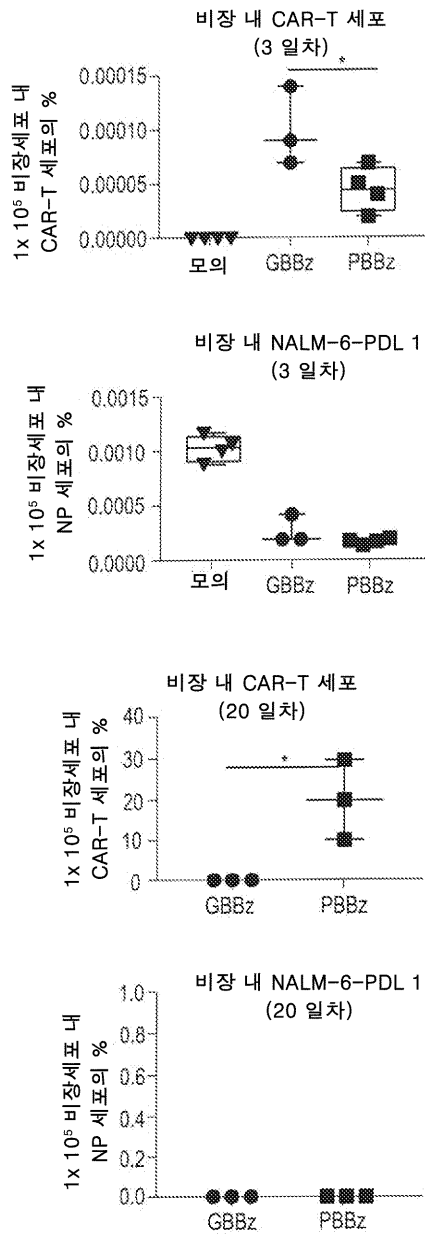
도면4



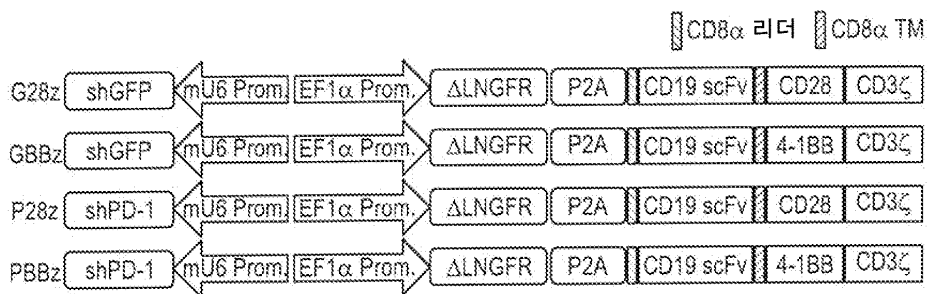
도면5a



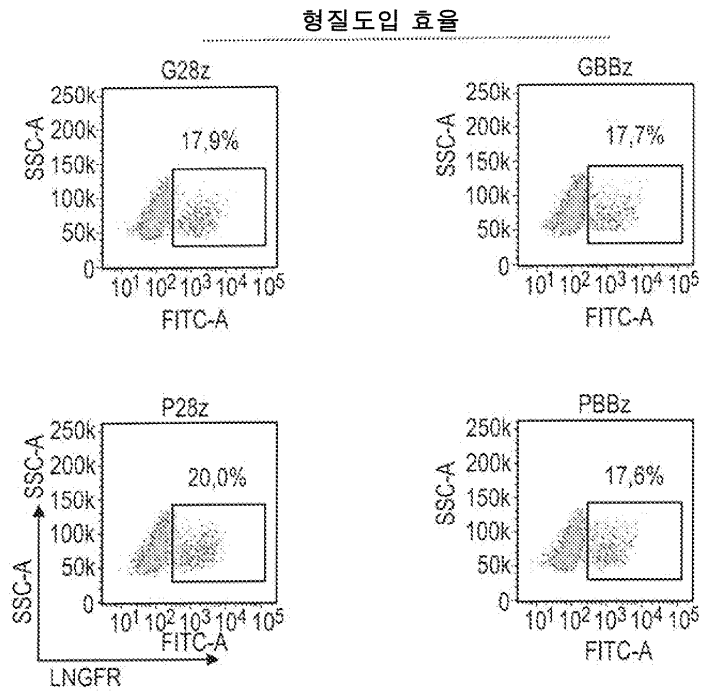
도면5b



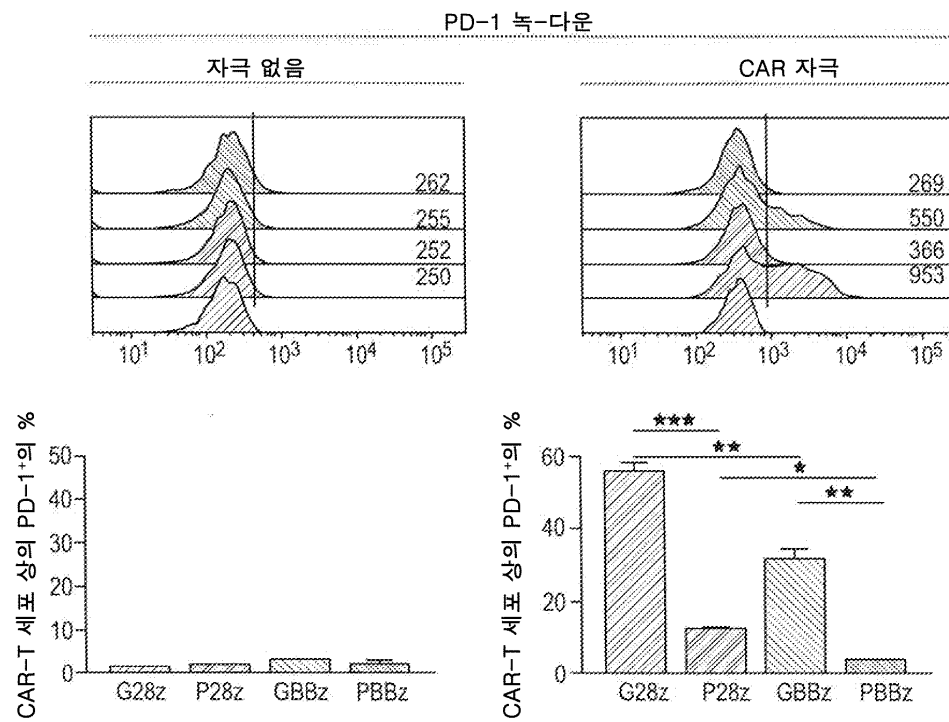
도면6a



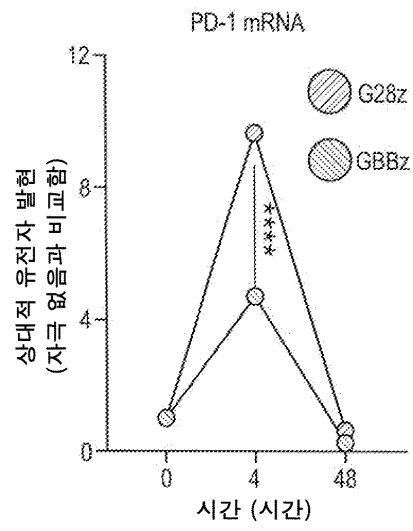
도면6b



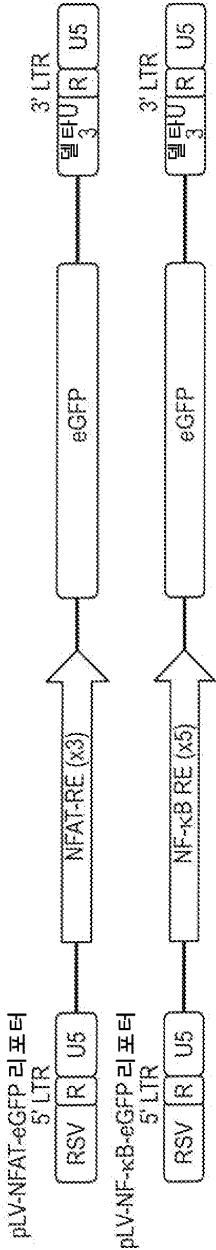
도면7a



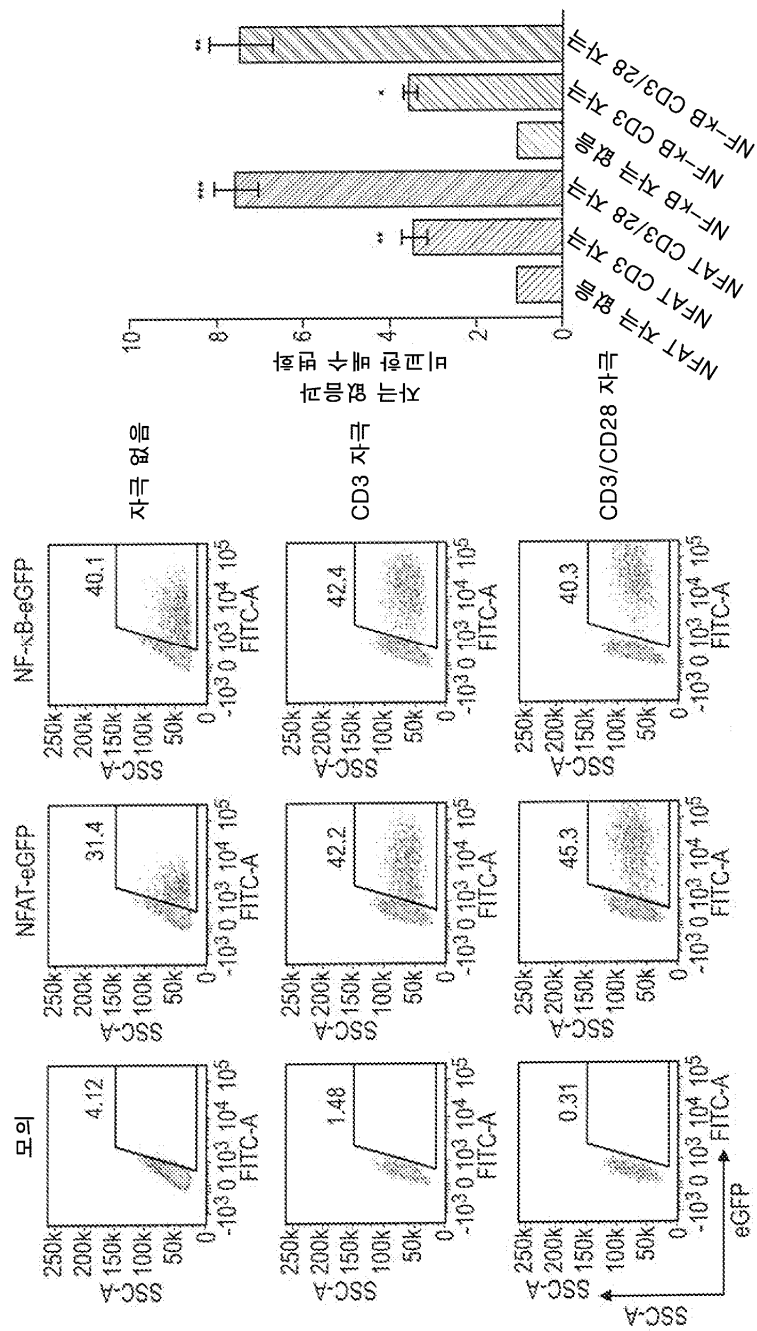
도면7b



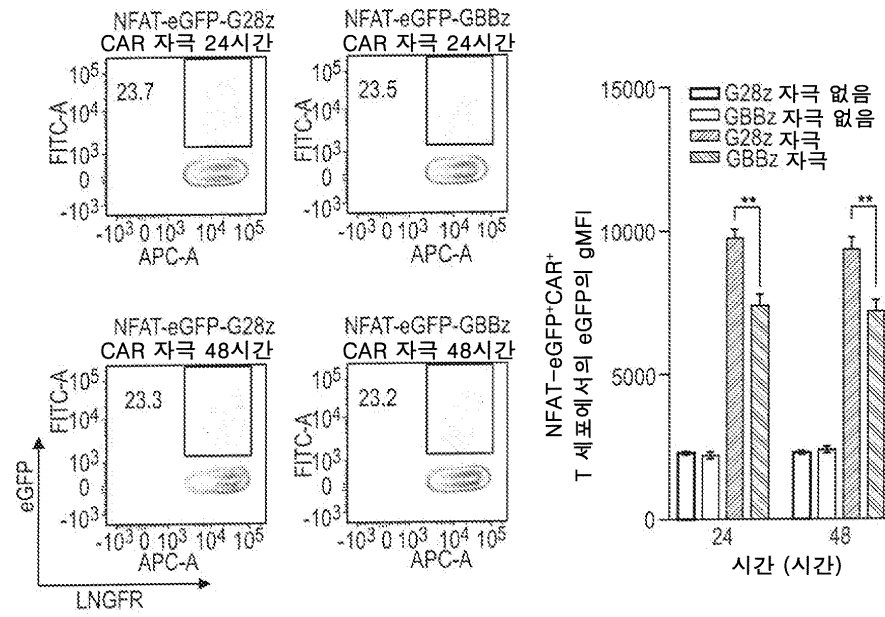
도면8a



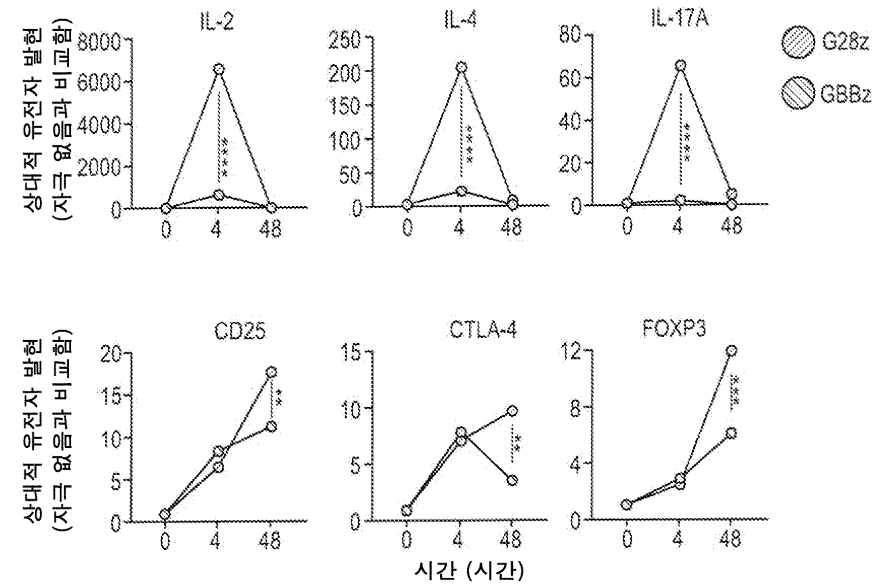
도면8b



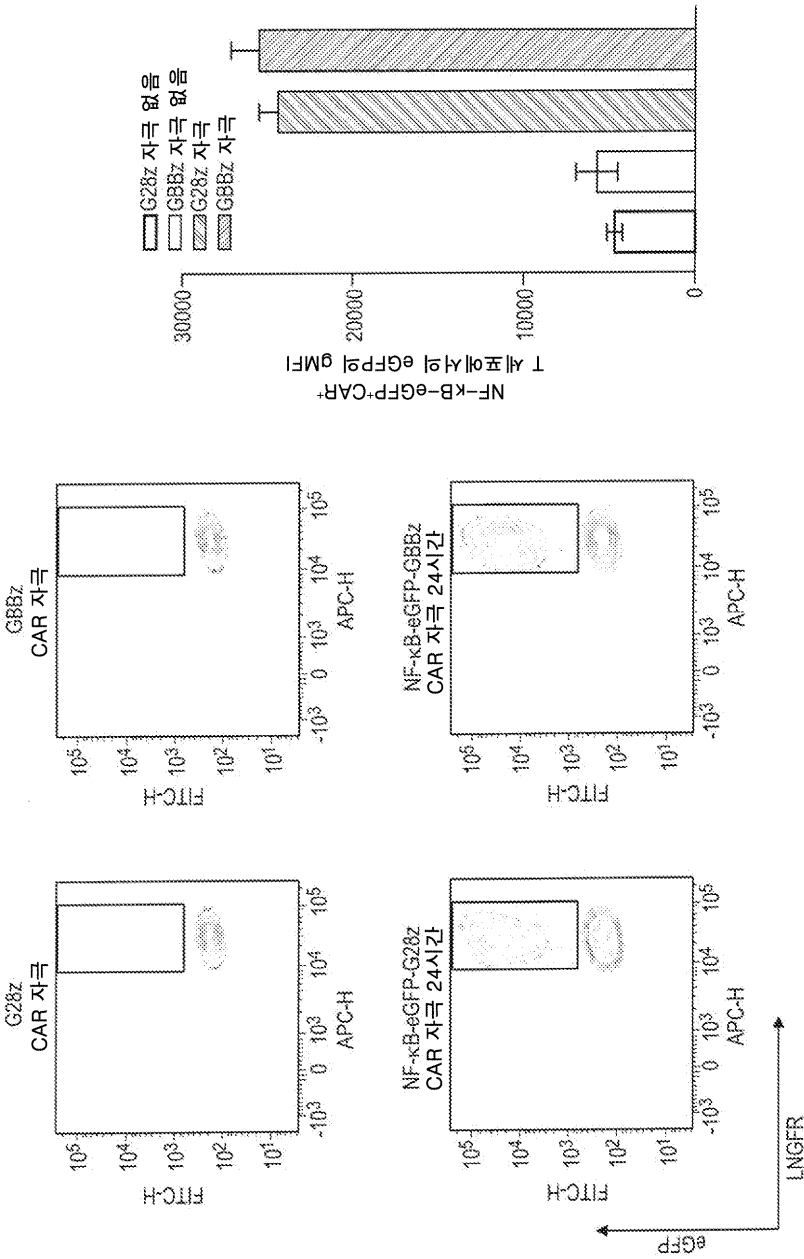
도면9a



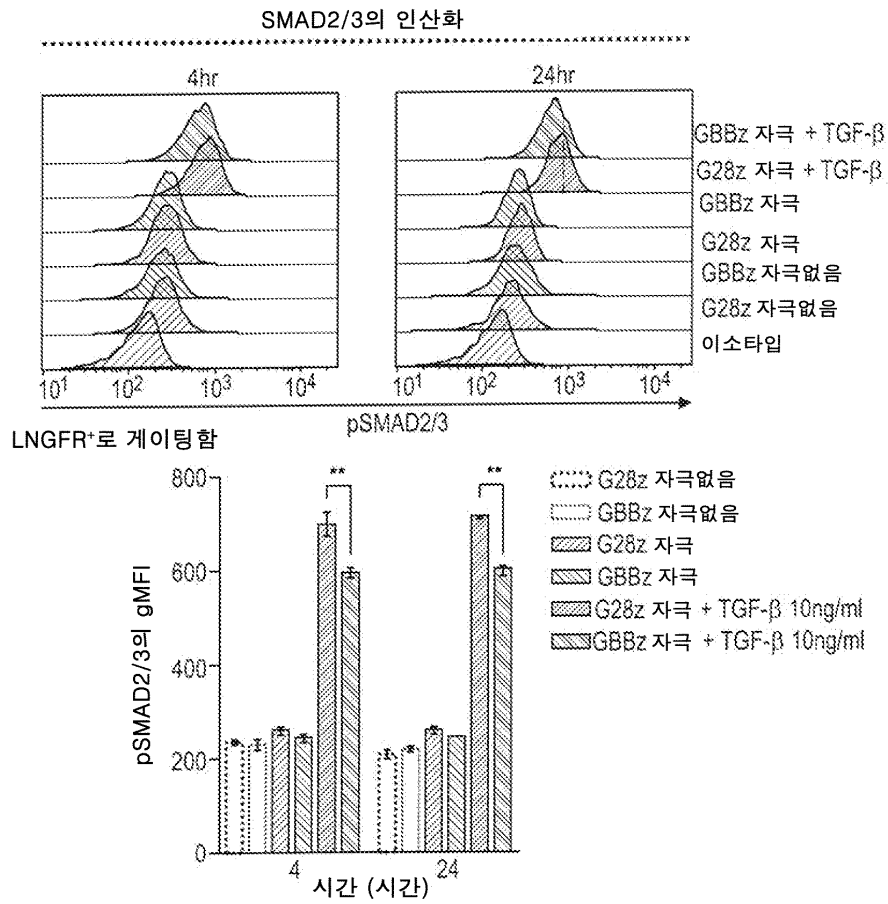
도면9b



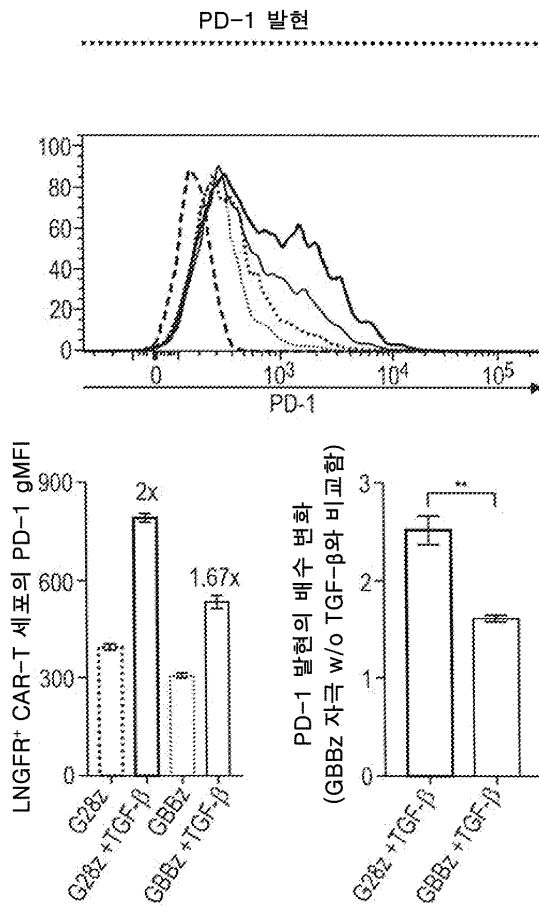
도면10



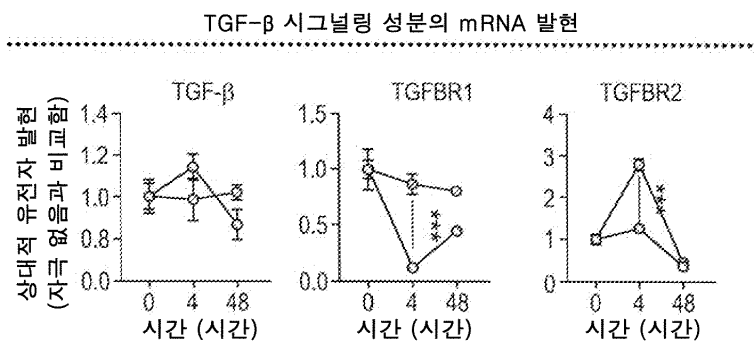
도면11a



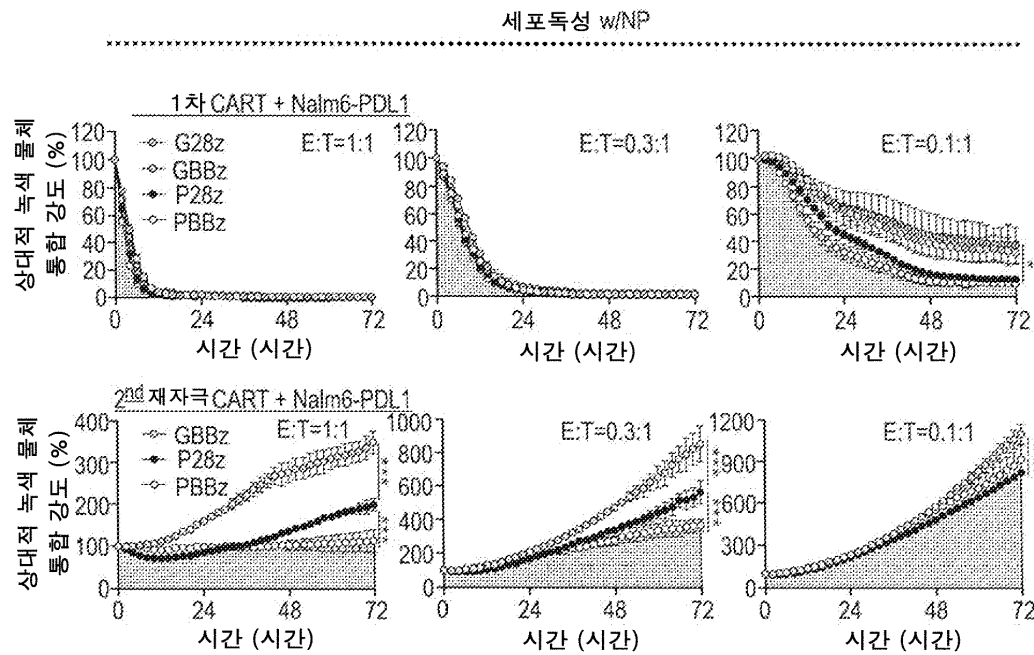
도면11b



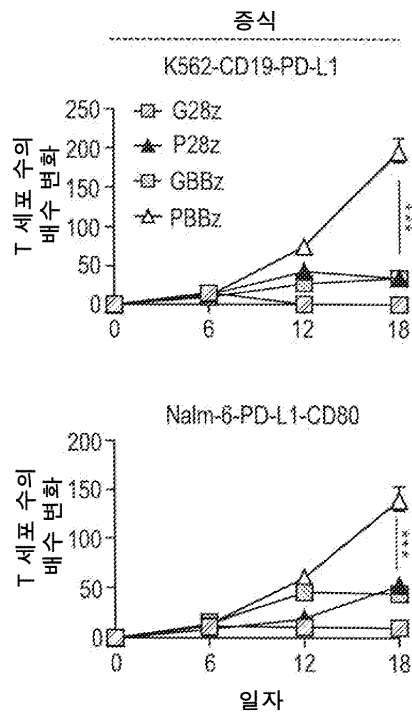
도면11c



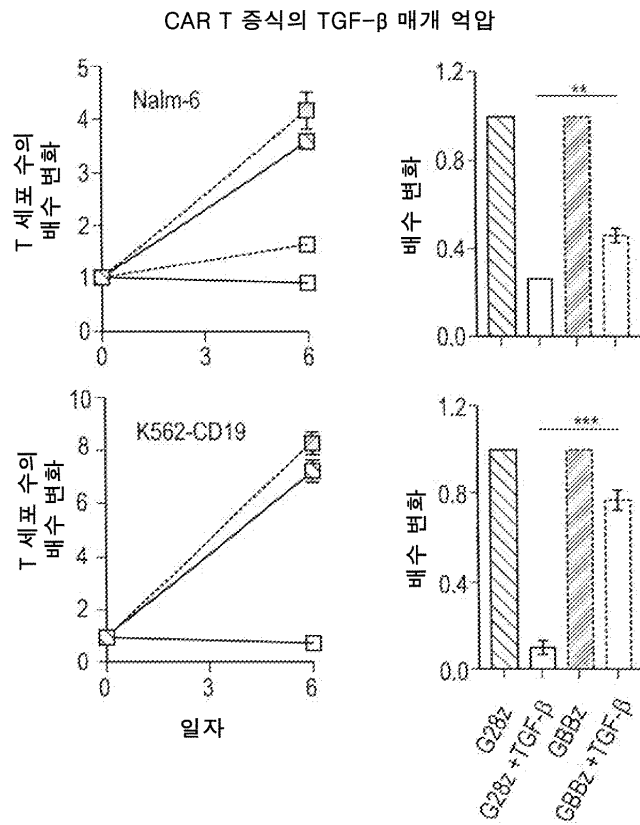
도면12a



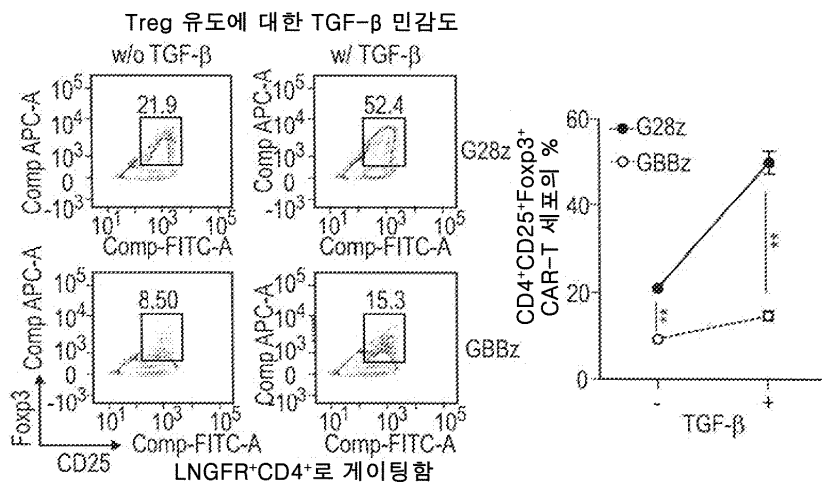
도면12b



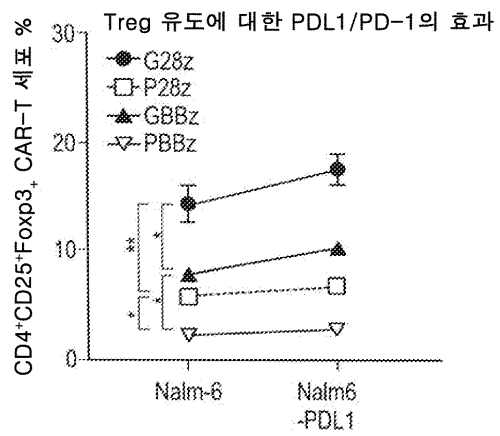
도면13a



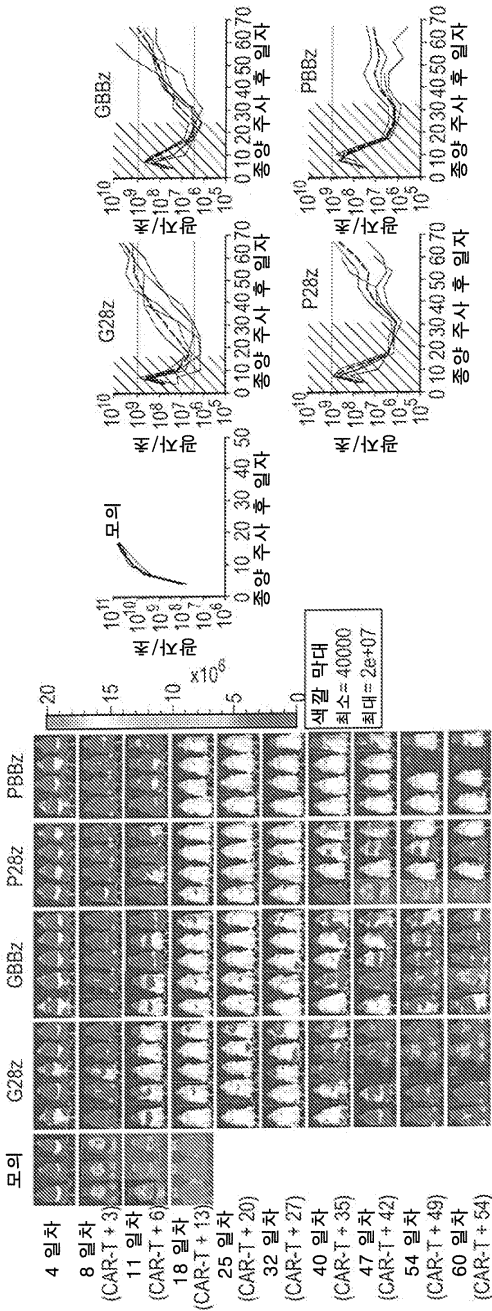
도면13b



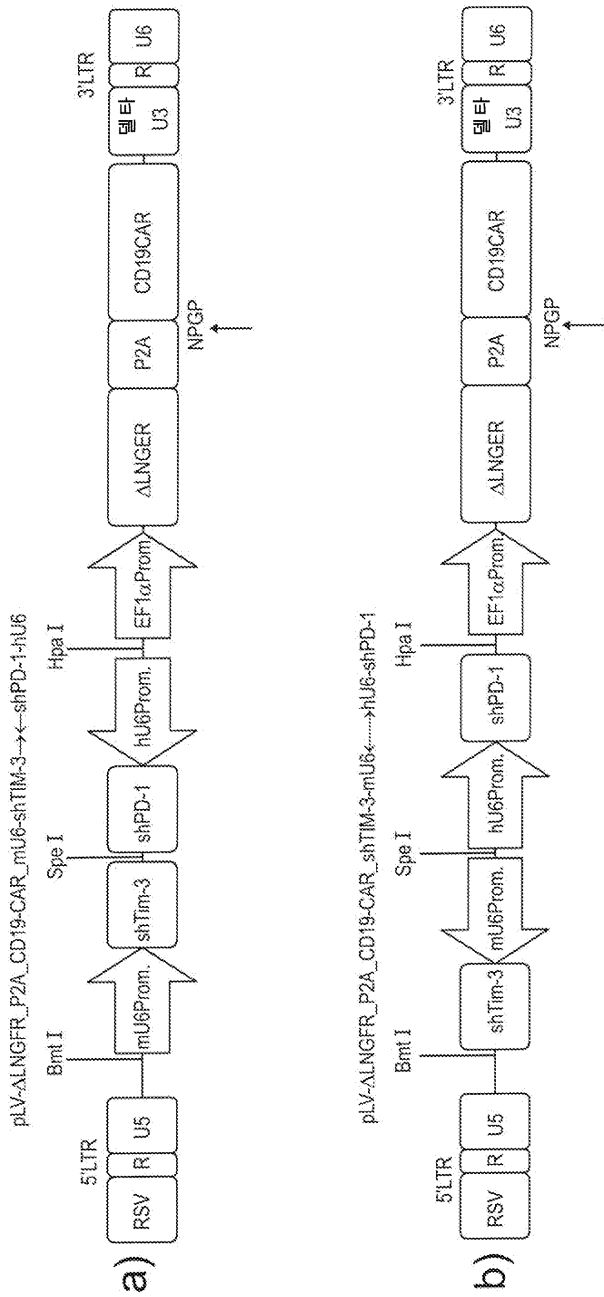
도면13c



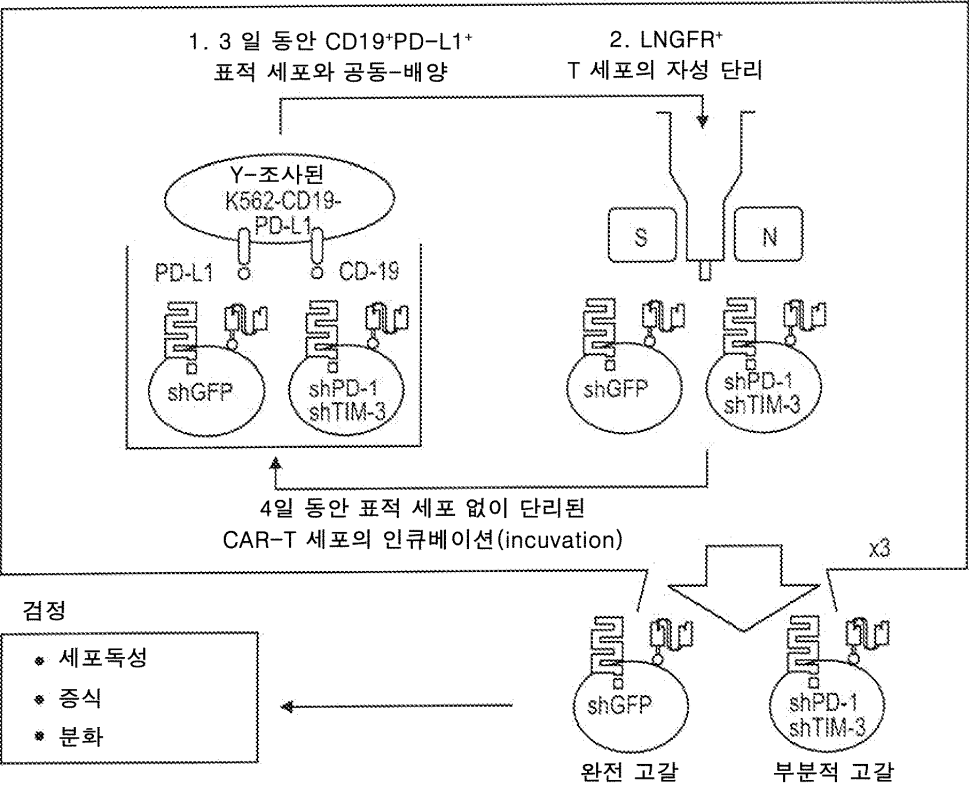
도면14



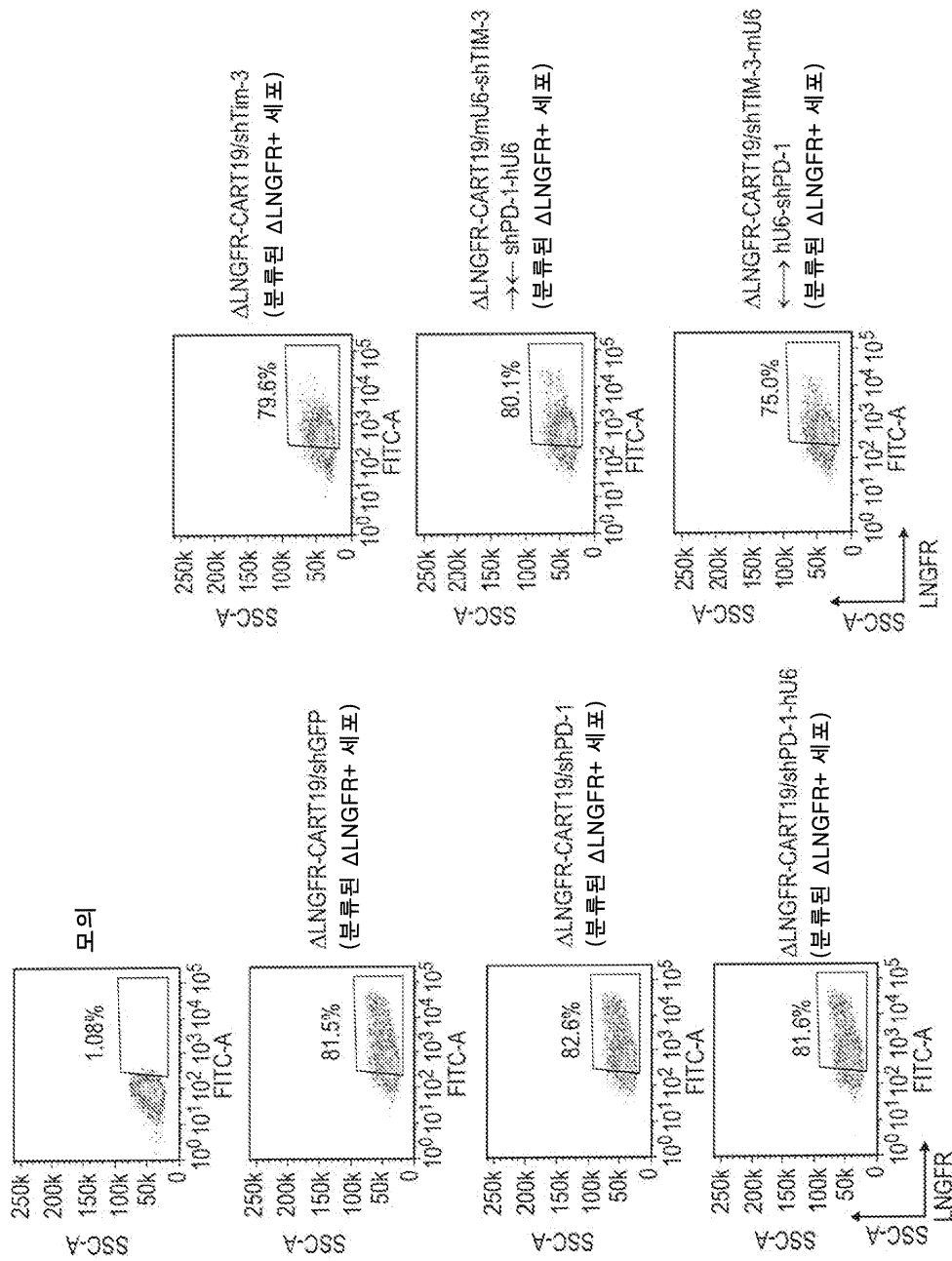
도면15



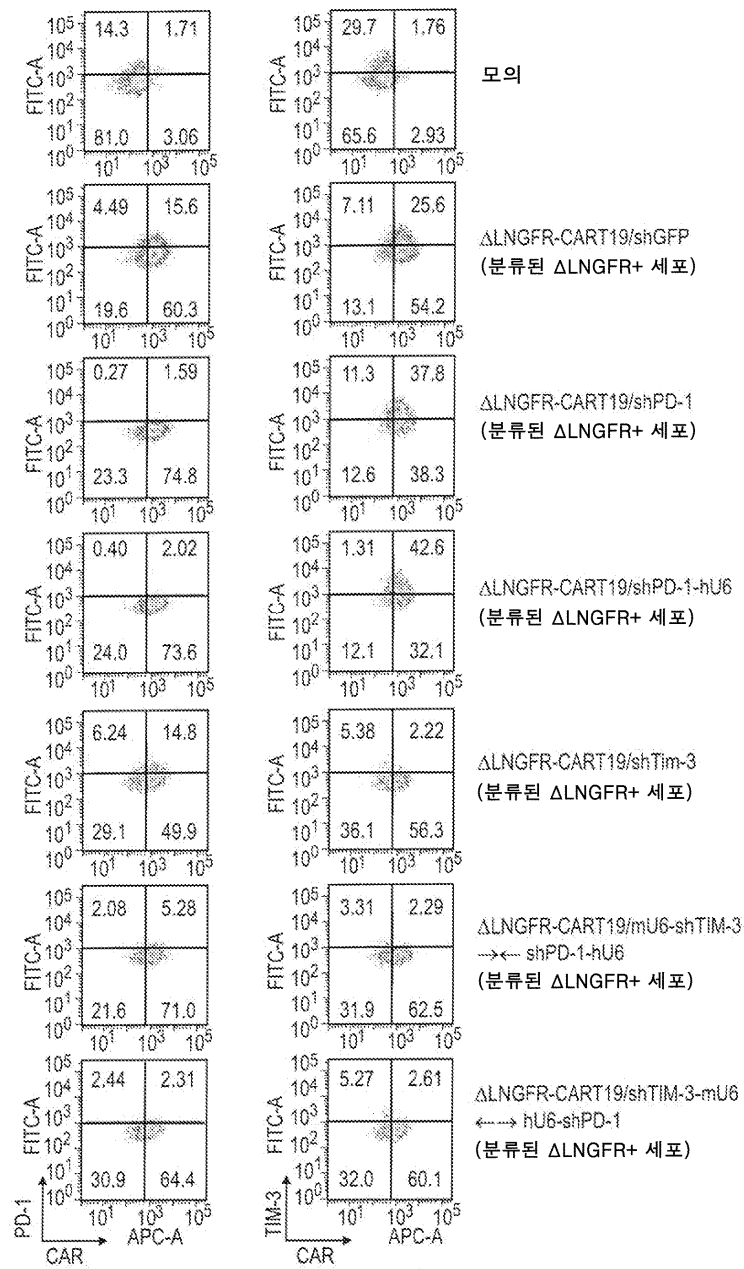
도면16



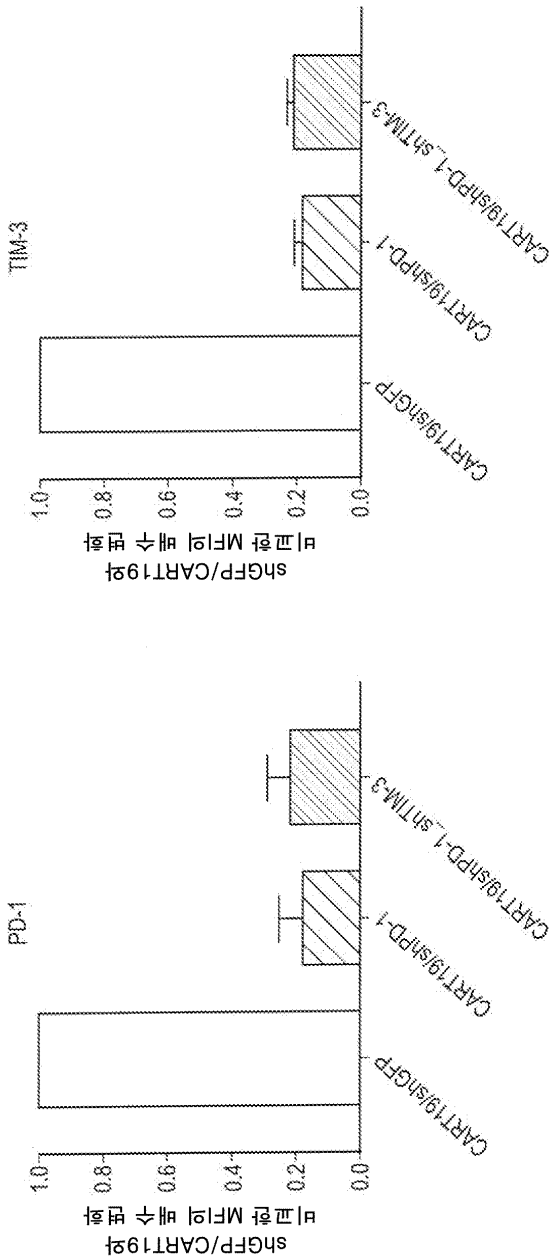
도면17



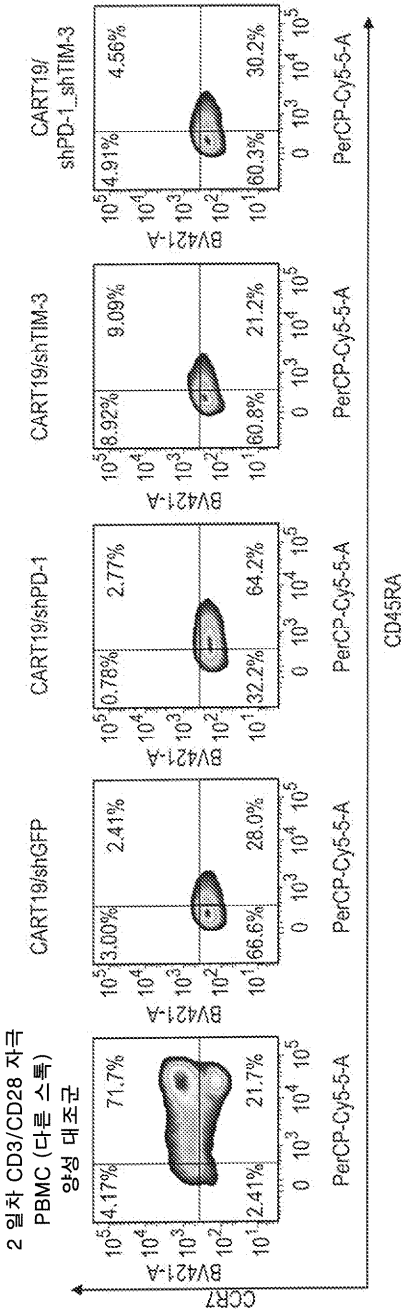
도면18a



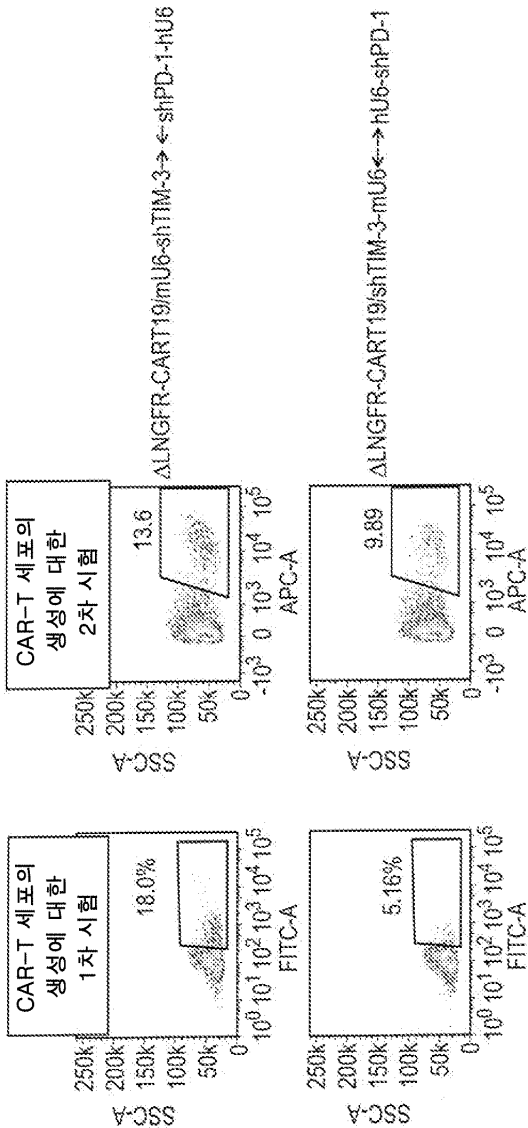
도면18b



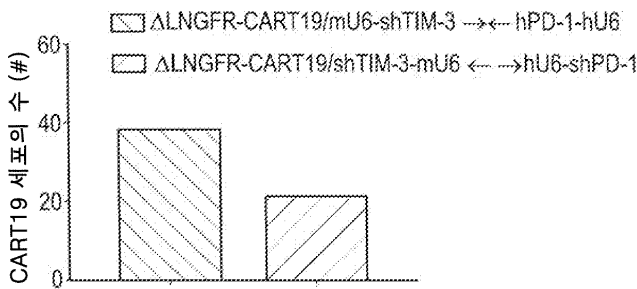
도면19



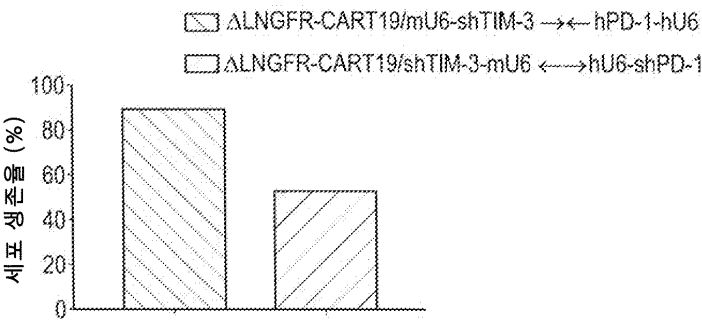
도면20a



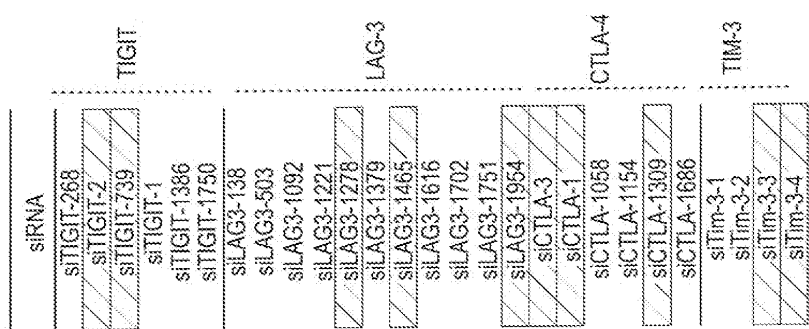
도면20b



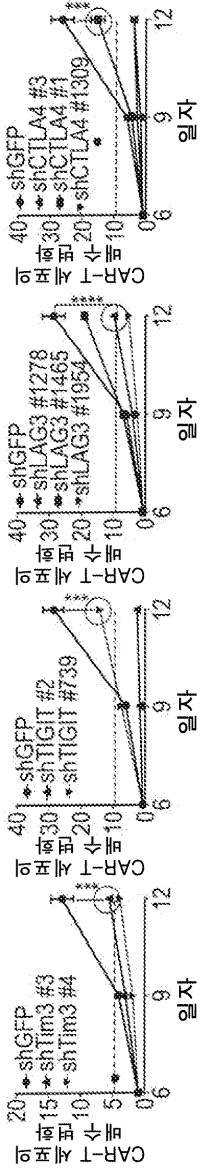
도면20c



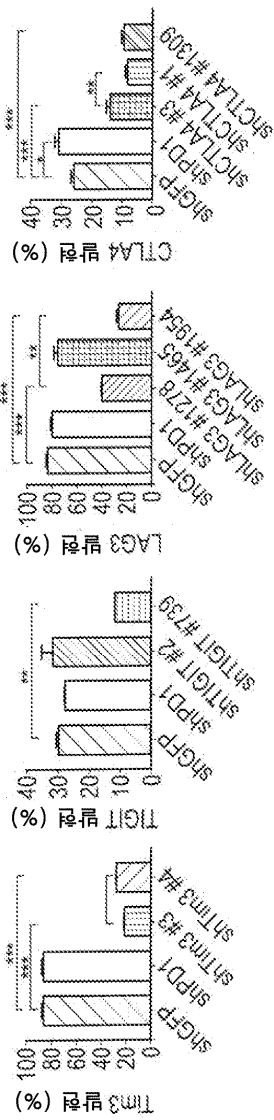
도면21a



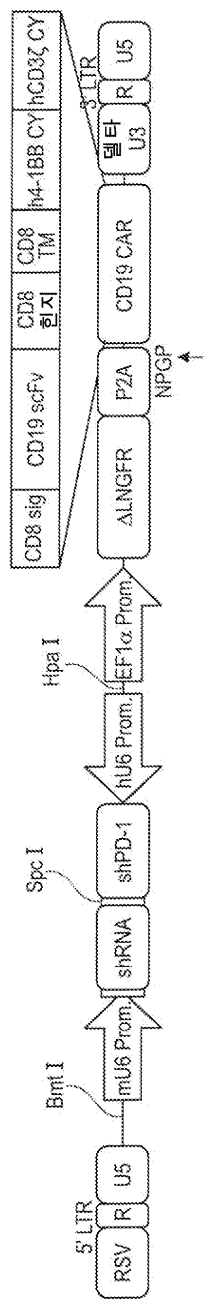
도면21b



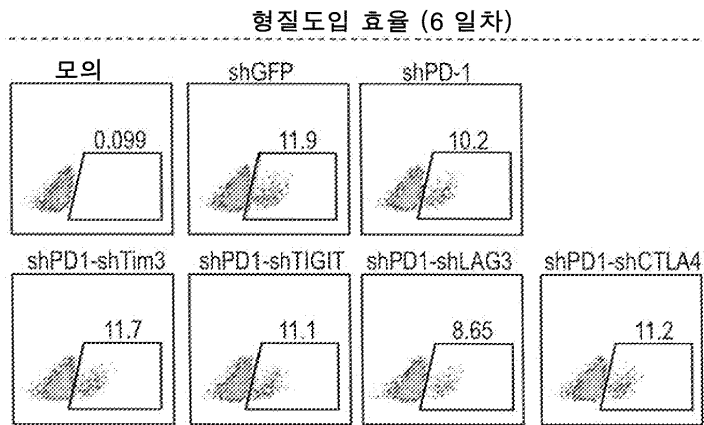
도면21c



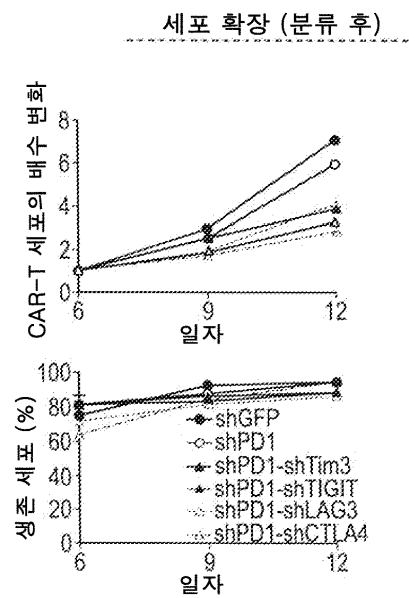
도면22a



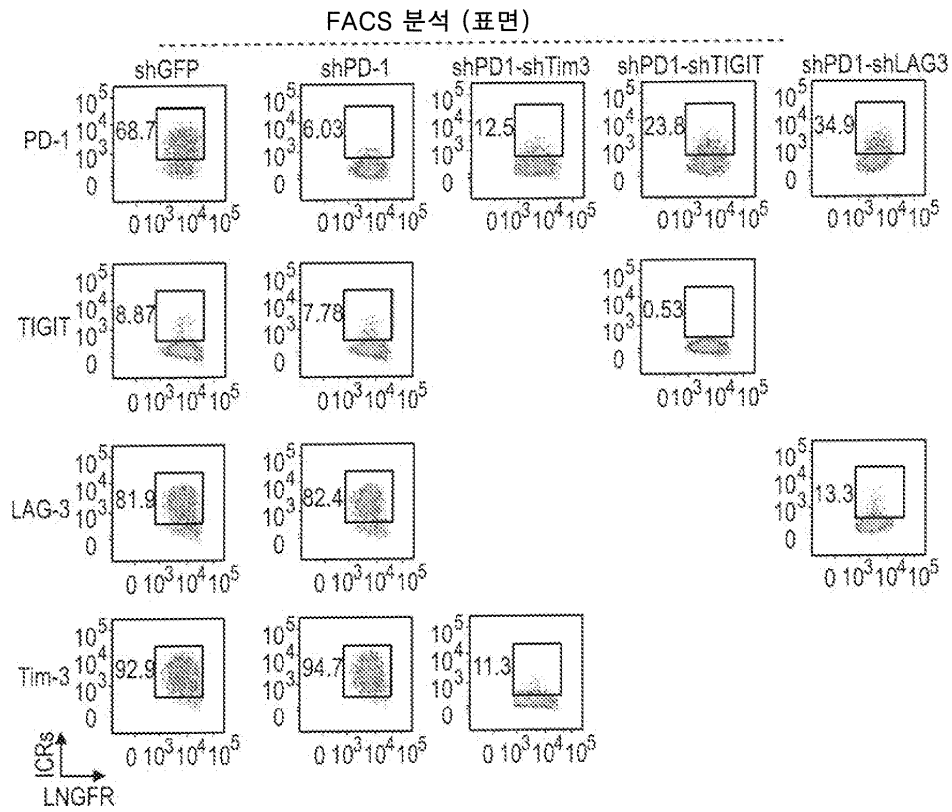
도면22b



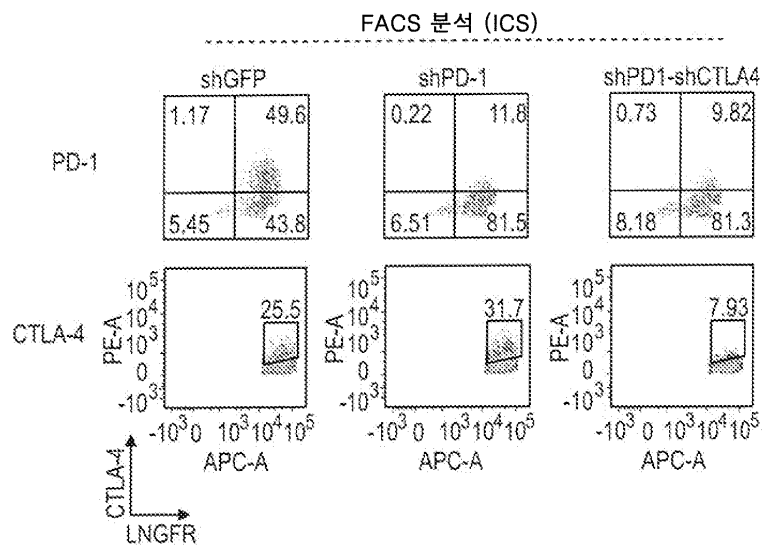
도면22c



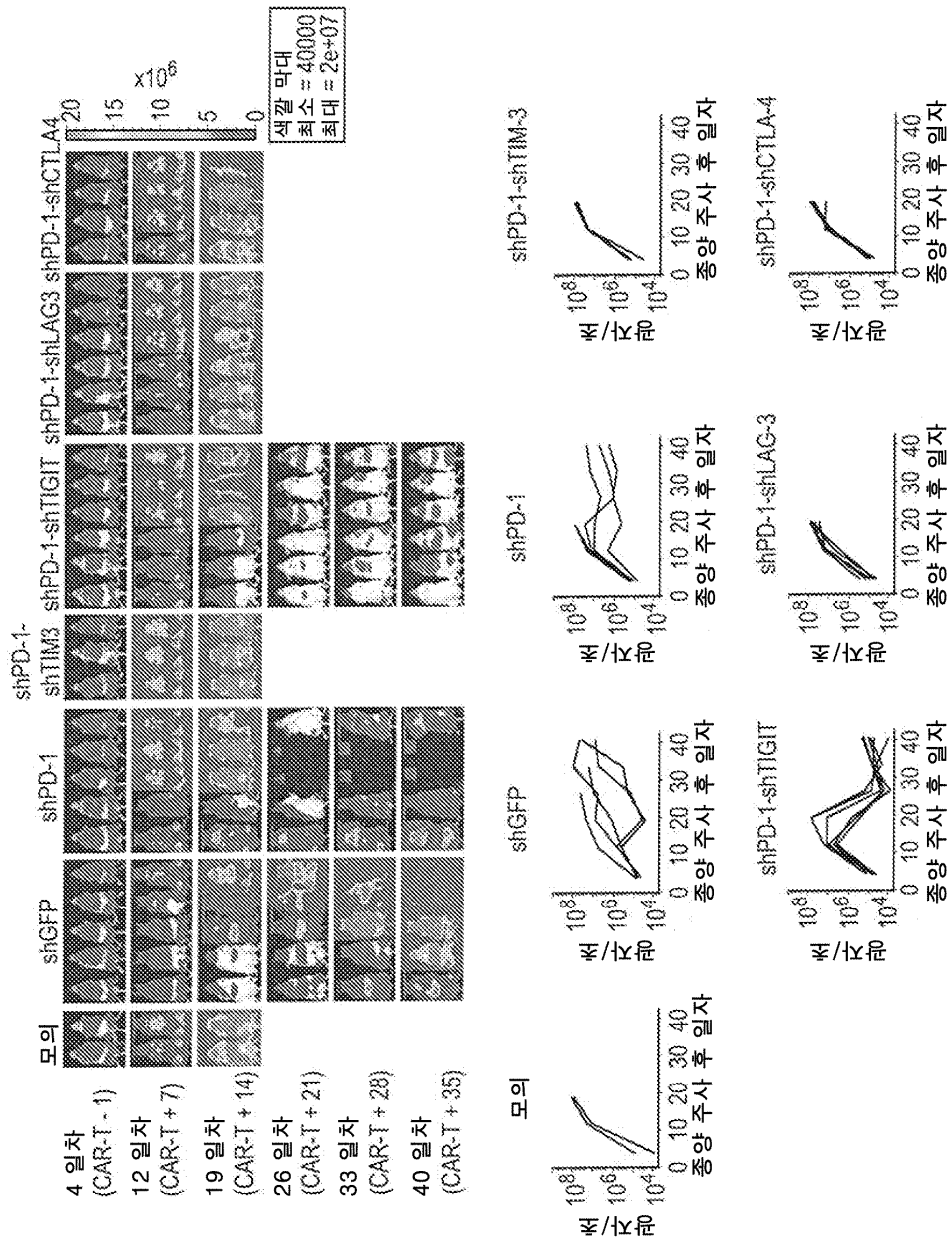
도면22d



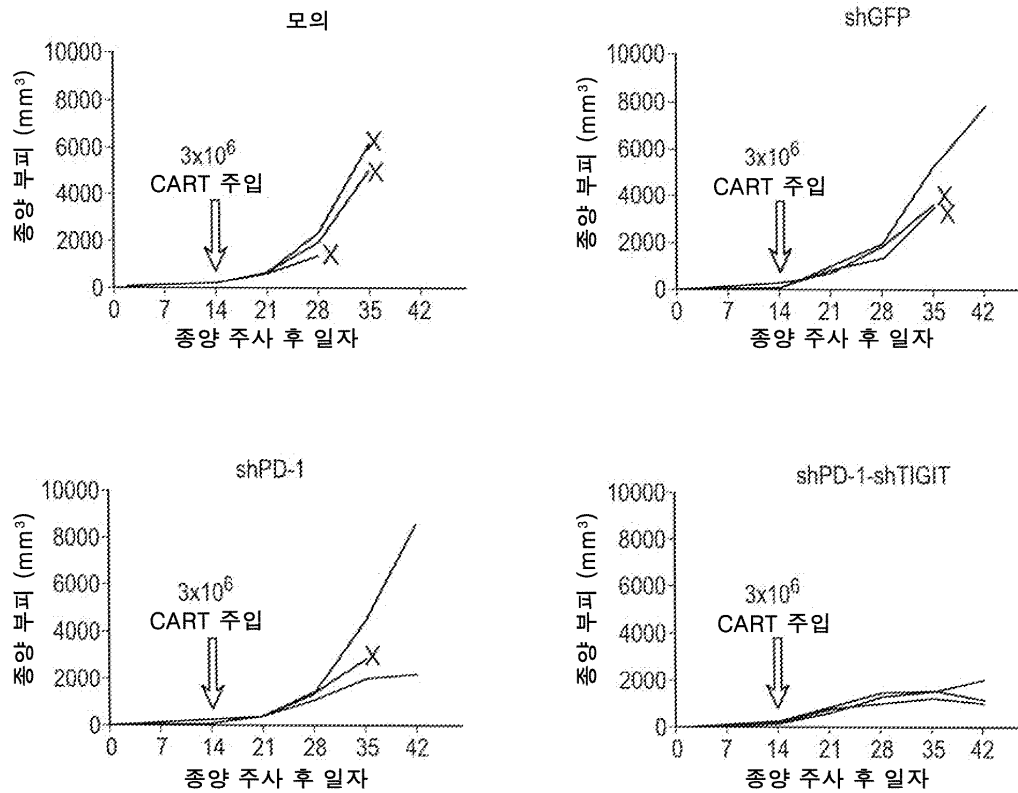
도면22e



도면23



도면24



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> CUROCELL CO. LTD.

KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

<120> ENHANCED IMMUNE CELLS USING DUAL SHRNA AND COMPOSITION INCLUDING THE SAME

<130> 14570-001-228

<140> To Be Assigned

<141> Herewith

<150> KR 10-2018-0004238

<151> 2018-01-12

<160> 289

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target GFP for RNA interference

<400> 1

tctcggcatg gacgagctgt a 21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target PD-1 for RNA interference

<400> 2

tggaacccat tcctgaaatt a 21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target PD-1 for RNA interference

<400>

3

ggaacccatt cctgaaatta t 21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target PD-1 for RNA interference

<400> 4

gaaccatttc ctgaaattat t 21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target PD-1 for RNA

interference

<400> 5

acccattcct gaaattatTT a 21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target PD-1 for RNA interference

<400> 6

cccattcctg aaattattta a 21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target PD-1 for RNA interference

<400> 7

ccttcctgt ggttctatta t 21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target PD-1 for RNA interference

<400> 8

cttcctgtg gttctattat a 21

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target PD-1 for RNA interference

<400> 9

ttccctgtgg ttctattata t 21

<210>

10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target PD-1 for RNA interference

<400> 10

tccctgtgg tctattatat t 21

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target PD-1 for RNA interference

<400> 11

ccctgtggtt ctattatatt a 21

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target PD-1 for RNA interference

<400> 12

cctgtggttc tattatatta t 21

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target TIM-3 for RNA interference

<400> 13

gatgaaaggg atgtgaatta t 21

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target TIM-3 for RNA interference

<400> 14

gggagcctcc ctgatataaa t 21

<210> 15

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target TIM-3 for RNA interference

<400> 15

ggaattcgct cagaagaaa 19

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target TIM-3 for RNA interference

<400> 16

ggaccaaact gaagctatat t 21

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target TIM-3 for RNA interference

<400> 17

agaactttgg tttcctttaa t 21

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target TIM-3 for RNA interference

<400> 18

atgaaaggga tgtgaattat t 21

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target TIM-3 for RNA interference

<400> 19

tcttatcttc ggcgctttaa t 21

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target TIM-3 for RNA interference

<400> 20

cttatcttcg gcgctttaat t 21

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target TIM-3 for RNA interference

<400> 21

ttatcttcgg cgctttaatt t 21

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target TIM-3 for RNA interference

<400> 22

gaggagccca atgagtatta t 21

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target TIM-3 for RNA interference

<400> 23

aggagcccaa tgagtattat t 21

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target TIM-3 for RNA interference

<400> 24

atagatccaa ccaccttatt t 21

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target TIM-3 for RNA interference

<400> 25

atgtcattgc ctctgtattt a 21

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target TIM-3 for RNA interference

<400> 26

tgtcattgcc tctgtattta a 21

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target TIM-3 for RNA interference

<400> 27

accaccatgc ccagctaatt t 21

<210> 28

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target TIM-3 for RNA interference

<400> 28

tggtgagatt taggcttatt t 21

<210> 29

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target TIM-3 for RNA interference

<400> 29

gaccaaactg aagctatatt t 21

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target TIM-3 for RNA interference

<400> 30

aggccttcag caatctatat t 21

<210> 31

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target TIM-3 for RNA interference

<400> 31

ggccttcagc aatctatatt a 21

<210> 32

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target TIM-3 for RNA interference

<400> 32

gagtgggtccc taaacttaaa t 21

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target TIM-3 for RNA interference

<400> 33

agtgggtcct aaacttaaat t 21

<210> 34

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target TIM-3 for RNA interference

<400> 34

gtggtccta aacttaaatt t 21

<210> 35

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target TIM-3 for RNA interference

<400> 35

ctaacacaaa tatccacat 19

<210> 36

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target LAG-3 for RNA interference

<400> 36

tcagcagccc agtccaaata a 21

<210> 37

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target LAG-3 for RNA interference

<400> 37

cagcagccca gtccaaataa a 21

<210> 38

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target LAG-3 for RNA interference

<400> 38

tcaacgtctc catcatgtat a 21

<210> 39

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target LAG-3 for RNA interference

<400> 39

caacgtctcc atcatgtata a 21

<210> 40

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target LAG-3 for RNA interference

<400> 40

ctggagacaa tggcgacttt a 21

<210> 41

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target LAG-3 for RNA interference

<400> 41

ctcagcagcc cagtccaaat a 21

<210> 42

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target LAG-3 for RNA interference

<400> 42

agcagcccag tccaaataaa c 21

<210> 43

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CTLA-4 for RNA interference

<400> 43

gggatcaaag ctatctatat a 21

<210> 44

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CTLA-4 for RNA interference

<400> 44

ggatcaaagc tatctatata a 21

<210> 45

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CTLA-4 for RNA interference

<400> 45

ggcaacggaa cccagattta t 21

<210> 46

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CTLA-4 for
RNA interference

<400> 46

tgaagaagag agtccatatt t 21

<210> 47

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CTLA-4 for
RNA interference

<400> 47

ttggatgcgg aacccaaatt a 21

<210> 48

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CTLA-4 for
RNA interference

<400> 48

agcatcactt gggattaata t 21

<210> 49

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CTLA-4 for
RNA interference

<400> 49

tgatgtgggt caaggaatta a 21

<210> 50

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CTLA-4 for
RNA interference

<400> 50

agcgaggag aagactatat t 21

<210> 51

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CTLA-4 for
RNA interference

<400> 51

tttacgtatg agacgttat a 21

<210> 52

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target BTLA for RNA
interference

<400> 52

gctcctgtat agtttacttc c 21

<210> 53

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target BTLA for RNA
interference

<400> 53

ggaaattaac ctggttgatg c 21

<210> 54

<

211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target BTLA for RNA interference

<400> 54

gcaccaacag aatatgcatc c 21

<210> 55

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target BTLA for RNA interference

<400> 55

gtcaacagg atgtcaaata a 21

<210> 56

<211>

> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target BTLA for RNA interference

<400> 56

gcattcttgct gttcttctta c 21

<210> 57

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target BTLA for RNA interference

<400> 57

gcatttgtgg acaacttatg t 21

<210> 58

<211>

21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CD160 for RNA interference

<400> 58

ggaacgcgac taaacttaat c 21

<210> 59

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CD160 for RNA interference

<400> 59

gatgttcacc ataagccaag t 21

<210> 60

<211>

> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CD160 for RNA interference

<400> 60

gcaagatgag tctgactatg g 21

<210> 61

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CD160 for RNA interference

<400> 61

ggcacagaga agaatgcaac a 21

<210> 62

<211>

> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CD160 for RNA interference

<400> 62

gggaagagat gctaaatata c 21

<210> 63

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CD160 for RNA interference

<400> 63

gcaaatcagt gtaatccttg a 21

<210> 64

<211

> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target VISTA for RNA interference

<400> 64

gcaacttctc catcaccatg c 21

<210> 65

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target VISTA for RNA interference

<400> 65

gcaaagatgc accatccaac t 21

<210> 66

<211

> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target VISTA for RNA interference

<400> 66

gcggatggac agcaacattc a 21

<210> 67

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target VISTA for RNA interference

<400> 67

ggacatttct gattatgaag c 21

<210> 68

<211

> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target VISTA for RNA interference

<400> 68

gggaaccaca atgcacgaaa g 21

<210> 69

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target VISTA for RNA interference

<400> 69

ggtgctttcc aacacacttt c 21

<210> 70

<211

> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target TIGIT for RNA
interference

<400> 70

gcttctggcc attgtaatg c 21

<210> 71

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target TIGIT for RNA
interference

<400> 71

gggagtactt ctgcacat c 21

<210> 72

<211

> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target TIGIT for RNA
interference

<400> 72

gctgcatgac tacttcaatg t 21

<210> 73

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target TIGIT for RNA
interference

<400> 73

taacgtggat cttgatcata a 21

<210> 74

<211

> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target TIGIT for RNA

interference

<400> 74

ggagacatac acaggccttc a 21

<210> 75

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target TIGIT for RNA

interference

<400> 75

gcatttgggc ctgatctac c 21

<210> 76

<211

> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target 2B4 for RNA

interference

<400> 76

gacaggttgc aaggcagttc t 21

<210> 77

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target 2B4 for RNA

interference

<400> 77

gggagtgccct cttcagttac a 21

<210> 78

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target 2B4 for RNA

interference

<400> 78
ggacgaggag gttgacatta a 21

<210> 79
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target 2B4 for RNA
interference

<400> 79
gaggagaaag aggaaggaga a 21

<210> 80
<211> 21
<212>
> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target 2B4 for RNA
interference

<400> 80
gcccttcctt caatagcact a 21

<210> 81
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target 2B4 for RNA
interference

<400> 81
ggttgactgc atttctagac t 21

<210> 82
<211> 21
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target PD-L1 for RNA
interference

<400> 82

gcatttgctg aacgcattta c 21

<210> 83

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target PD-L1 for RNA interference

<400> 83

gctgcactaa ttgtctattg g 21

<210> 84

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target PD-L1 for RNA interference

<400> 84

ggatccagtc acctctgaac a 21

<210> 85

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target PD-L1 for RNA interference

<400> 85

gcacatctc caaatgaaag g 21

<210> 86

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target PD-L1 for RNA interference

<400> 86

ggattctcaa cctgtggttt a 21

<210> 87

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target PD-L1 for RNA interference

<400> 87

ggtgcttggt ctcctctata a 21

<210> 88

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CEACAM-1 for RNA interference

<400> 88

gcacagtact cctggcttat c 21

<210> 89

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CEACAM-1 for RNA interference

<400> 89

gcaacaggac cacagtcaag a 21

<210> 90

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CEACAM-1 for RNA interference

<400> 90

gcaacaccac cctcagcata a 21

<210> 91

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CEACAM-1 for
RNA interference

<400> 91

gcctgttcag agcactcatt c 21

<210> 92

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CEACAM-1 for
RNA interference

<400> 92

gcagtaatgc cttctcctat t 21

<210> 93

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CEACAM-1 for
RNA interference

<400> 93

gcaccttggt gcttagctag a 21

<210> 94

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CEACAM-3 for
RNA interference

<400> 94

gcttccatct atgaggaatt g 21

<210> 95

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CEACAM-3 for
RNA interference

<400> 95

gccagagaac cagctataag t 21

<210> 96

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CEACAM-3 for
RNA interference

<400> 96

gggtccctga tgaatatctg g 21

<210> 97

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CEACAM-3 for
RNA interference

<400> 97

ggcttgcagg gaaagtgaat g 21

<210> 98

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CEACAM-3 for
RNA interference

<400> 98

gcttgcaggg aaagtgaatg g 21

<210> 99

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CEACAM-3 for
RNA interference

<400> 99

agcttccatc tatgaggaat t 21

<210> 100

<211> 21

<212>

DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CEACAM-5 for
RNA interference

<400> 100

ggaatccaga acgaattaag t 21

<210> 101

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CEACAM-5 for
RNA interference

<400> 101

ggctgattga tgggaacatc c 21

<210> 102

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CEACAM-5 for
RNA interference

<400> 102

ggactacagt caagacaatc a 21

<210> 103

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CEACAM-5 for
RNA interference

<400> 103

ggaccctcac tctattcaat g 21

<210> 104

<

211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CEACAM-5 for
RNA interference

<400> 104

gtacttgcc gcaataattc c 21

<210> 105

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CEACAM-5 for
RNA interference

<400> 105

gtcttttgta tgacagaata c 21

<210>

> 106

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CD96 for RNA
interference

<400> 106

ggtccaaggt caccaataag a 21

<210> 107

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CD96 for RNA

interference

<400> 107

gcaaccatac gatagaaata g 21

<

210> 108

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CD96 for RNA interference

interference

<400> 108

ggtttctgaaa tttcctcaac a 21

<210> 109

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CD96 for RNA interference

interference

<400> 109

gcaagatatc cagctacatc t 21

<210> 110

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CD96 for RNA interference

interference

<400> 110

gcaactcacc ctcttccatc t 21

<210> 111

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CD96 for RNA interference

interference

<400> 111

gctgcattcc ctaagataat t 21

<210> 112

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target LAIR1 for RNA interference

<400> 112

gggacagtag atccacatac a 21

<210> 113

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target LAIR1 for RNA interference

<400> 113

ggacaacagt cacaatgagc a 21

<210> 114

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target LAIR1 for RNA interference

<400> 114

ggctgttgat gttctagaga g 21

<210> 115

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target LAIR1 for RNA interference

<400> 115

gcagacaagg ccacagtcaa t 21

<210> 116

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target LAIR1 for RNA interference

<400> 116

ggaggtttct aaccagcatc c 21

<210> 117

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target LAIR1 for RNA interference

<400> 117

gccttgagac tgtctatac a 21

<210> 118

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target KLRG1 for RNA interference

<400> 118

ccaagcccag aatgactatg g 21

<210> 119

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target KLRG1 for RNA interference

<400> 119

gccttcttgt tcttgccttg t 21

<210> 120

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target KLRG1 for RNA interference

<400> 120

gcttctgact gcagttcttc t 21

<210> 121

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target KLRG1 for RNA interference

<400> 121

gctggatgaa atatgtaac c 21

<210> 122

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target KLRG1 for RNA interference

<400> 122

ggaaatgagc ctgctccaag t 21

<210> 123

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target KLRG1 for RNA interference

<400> 123

ggattggtct gaggaacaat t	21
<210> 124	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target FAS for RNA interference	
<400> 124	
gccaagaagg gaaggagtac a	21
<210> 125	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target FAS for RNA interference	
<400> 125	
gccaattcca ctaattgttt g	21
<210> 126	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target FAS for RNA interference	
<400> 126	
ggtttctcatg aatctccaac t	21
<210> 127	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target FAS for RNA interference	
<400> 127	

gctggagtca tgacactaag t 21

<210> 128

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target FAS for RNA interference

<400> 128

gcctggtttg gagatactaa c 21

<210> 129

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target FAS for RNA interference

<400> 129

ggaaccacct aaagaacttc c 21

<210> 130

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target Cbl-b for RNA interference

<400> 130

ccgcgttgat ttaaagaaag a 21

<210> 131

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target Cbl-b for RNA interference

<400> 131

gcctgataca tatcagcatt t 21

<210> 132

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target Cbl-b for RNA interference

<400> 132

gcggaattgg aatttcttag c 21

<210> 133

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target Cbl-b for RNA interference

<400> 133

gcacgactac agaaatatag c 21

<210> 134

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target Cbl-b for RNA interference

<400> 134

tttccgggta agttgcactc g 21

<210> 135

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target Cbl-b for RNA interference

<400> 135

gcctggatct aattcagaaa g 21

<210> 136
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target LRR1 for RNA
 interference
 <400> 136
 gaaagccact gttcggtaa a 21
 <210> 137
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target LRR1 for RNA
 interference
 <400> 137
 tcctgtggat atctgtctaa g 21
 <210> 138
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target LRR1 for RNA
 interference
 <400> 138
 ggctcataga ggctgtaatg t 21
 <210> 139
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target LRR1 for RNA
 interference
 <400> 139

gggcttgcc gaggatgat g 21

<210> 140

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target LRR1 for RNA interference

<400> 140

aagatttgga taccgcaaaa a 21

<210> 141

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target LRR1 for RNA interference

<400> 141

gtggtactga agcacctatt a 21

<210> 142

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target TGFBR1 for RNA interference

<400> 142

gcttggtcag agaacaattg c 21

<210> 143

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target TGFBR1 for RNA interference

<400> 143

ggagattgtt ggtaccaag g 21

<210> 144

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target TGFBR1 for
RNA interference

<400> 144

gcagctaggc ttacagcatt g 21

<210> 145

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target TGFBR1 for
RNA interference

<400> 145

ggtcctttct gtgcactatg a 21

<210> 146

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target TGFBR1 for
RNA interference

<400> 146

ggtggttagct aaagaacatt c 21

<210> 147

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target TGFBR1 for
RNA interference

<400> 147

ggacctgtct acaggtgac t	21
<210> 148	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target DNMT3A for RNA interference	
<400> 148	
gccaaggtca ttgcaggaat g	21
<210> 149	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target DNMT3A for RNA interference	
<400> 149	
gcagaacaag cccatgattg a	21
<210> 150	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target DNMT3A for RNA interference	
<400> 150	
cccaaggtca aggagattat t	21
<210> 151	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target DNMT3A for RNA interference	
<400> 151	

gcagaagtgc cggaacattg a 21

<210> 152

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target DNMT3A for RNA interference

<400> 152

gcgtcacaca gaagcatatc c 21

<210> 153

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target DNMT3A for RNA interference

<400> 153

ccggctcttc tttagattct a 21

<210> 154

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target A2aR for RNA interference

<400> 154

cagaacgtca ccaactactt t 21

<210> 155

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target A2aR for RNA interference

<400> 155

ccatgctagg ttggaacaac t	21
<210> 156	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target A2aR for RNA interference	
<400> 156	
ccaagtggcc tgtctctttg a	21
<210> 157	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target A2aR for RNA interference	
<400> 157	
ggtgtctatt tgcggatctt c	21
<210> 158	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target A2aR for RNA interference	
<400> 158	
agaccttccg caagatcatt c	21
<210> 159	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target A2aR for RNA interference	
<400> 159	

tccttagcca tgagctcaag g 21

<210> 160

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target Cbl-c for RNA interference

<400> 160

gaaagtactg tggacacatg t 21

<210> 161

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target Cbl-c for RNA interference

<400> 161

gcacgtgtcc atcttcgagt t 21

<210> 162

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target Cbl-c for RNA interference

<400> 162

ggccaacact cctcaagaac t 21

<210> 163

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target Cbl-c for RNA interference

<400> 163

ggctttctacc tctacccaga t 21

<210> 164

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target Cbl-c for RNA interference

<400> 164

ggccatggac tccacatttg a 21

<210> 165

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target Cbl-c for RNA interference

<400> 165

ggccgtgagt atctaccagt t 21

<210> 166

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target DGK alpha for RNA interference

<400> 166

gccagaagac aagttagaat t 21

<210> 167

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target DGK alpha for RNA interference

<400> 167

gctctggaag ttccagtata t 21

<210> 168

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target DGK alpha for
RNA interference

<400> 168

ggaaatgac tggctcgatg c 21

<210> 169

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target DGK alpha for
RNA interference

<400> 169

gcaaagatcc tcaaggattt a 21

<210> 170

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target DGK alpha for
RNA interference

<400> 170

ggatgcctct attgctcatc g 21

<210> 171

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target DGK alpha for
RNA interference

<400> 171

gctatggtac ttcgaatttg c 21

<210> 172

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target DGK zeta for
RNA interference

<400> 172

ggaagggatt ccagcagaag t 21

<210> 173

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target DGK zeta for
RNA interference

<400> 173

gcaaggagat tgtggccatc a 21

<210> 174

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target DGK zeta for
RNA interference

<400> 174

gggcatacctt caagaggaag t 21

<210> 175

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target DGK zeta for
RNA interference

<400> 175

gcaaagatca tccagtcttt c 21

<210> 176

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target DGK zeta for
RNA interference

<400> 176

gctggagatg taccgcaaag t 21

<210> 177

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target DGK zeta for
RNA interference

<400> 177

gcacaggatg agatttatat c 21

<210> 178

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target MerTK for RNA
interference

<400> 178

ggaagaccac atacaggaaa c 21

<210> 179

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target MerTK for RNA
interference

<400> 179

gcattgggtgt ttctgcatg a 21

<210> 180

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target MerTK for RNA interference

<400> 180

gcacacgggtt ggtagatta t 21

<210> 181

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target MerTK for RNA interference

<400> 181

gggtctgtaa tggaaggaaa t 21

<210> 182

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target MerTK for RNA interference

<400> 182

gcatgttgcg agatgacatg a 21

<210> 183

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target MerTK for RNA interference

<400> 183

gcagaccgag tctacacaag t 21

<210> 184

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target SHP1 for RNA interference

<400> 184

gcaccatcat ccacctcaag t 21

<210> 185

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target SHP1 for RNA interference

<400> 185

ggtcaccac atcaaggta t 21

<210> 186

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target SHP1 for RNA interference

<400> 186

gggcaagaac cgctacaaga a 21

<210> 187

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target SHP1 for RNA interference

<400> 187

ggaacaaatg cgtcccatat t 21

<210> 188

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target SHP1 for RNA interference

<400> 188

gcctggactg tgacattgac a 21

<210> 189

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target SHP1 for RNA interference

<400> 189

gaacctgcac actaagaaca a 21

<210> 190

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target SHP2 for RNA interference

<400> 190

gcagatccta cctctgaaag g 21

<210> 191

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target SHP2 for RNA interference

<400> 191

gcaatgacgg caagtctaaa g 21

<210> 192

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target SHP2 for RNA interference

<400> 192

ggaactgaaa tacgacgttg g 21

<210> 193

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target SHP2 for RNA interference

<400> 193

gcgtgttagg aacgtcaaag a 21

<210> 194

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target SHP2 for RNA interference

<400> 194

gctcatgact atacgctaag a 21

<210> 195

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target SHP2 for RNA interference

<400> 195

ggagagaacg gtctggcaat a 21

<210> 196

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target PP2A for RNA interference

<400> 196

gcagctgaac gagaaccaag t 21

<210> 197

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target PP2A for RNA interference

<400> 197

ggagactgtg actcttcttg t 21

<210> 198

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target PP2A for RNA interference

<400> 198

ggaatgcaa cgtttgaaa t 21

<210> 199

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target PP2A for RNA interference

<400> 199

ggatcgttta caggaagttc c 21

<210> 200

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target PP2A for RNA interference

<400> 200

gcctttgtat gtggaagtat a 21

<210> 201

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target PP2A for RNA interference

<400> 201

gcctgctgta tttatagtaa c 21

<210> 202

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CD45 for RNA interference

<400> 202

gctgcacatc aaggagtaat t 21

<210> 203

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CD45 for RNA interference

<400> 203

gctggaaata ctctggtag a 21

<210> 204

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CD45 for RNA interference

<400> 204

ggagcttggt gaaagggatg a 21

<210> 205

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CD45 for RNA interference

<400> 205

gcagaatact ggccgtcaat g 21

<210> 206

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CD45 for RNA interference

<400> 206

ggttatgttg tcaagctaag g 21

<210> 207

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CD45 for RNA interference

<400> 207

gcagaaccca aggaattaat c 21

<210> 208

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CD148 for RNA interference

<400> 208

ggtgtaacat cacaggctta c 21

<210> 209

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CD148 for RNA interference

<400> 209

gccatagagt tcaggacaaa t 21

<210> 210

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CD148 for RNA interference

<400> 210

gcaattctcg ggtagaaata a 21

<210> 211

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CD148 for RNA interference

<400> 211

gctggcttca ccaacattac c 21

<210> 212

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CD148 for RNA interference

<400> 212

gggagcaaat catctgcatt c 21

<210> 213

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target CD148 for RNA interference

<400> 213

gcgactcaaa tatcaccttg a 21

<210> 214

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target IL-10R alpha for RNA interference

<400> 214

gctcctgagg tatggaatag a 21

<210> 215

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target IL-10R alpha for RNA interference

<400> 215

gcaaatgaca catatgaaag c 21

<210> 216

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target IL-10R alpha
for RNA interference

<400> 216

ggtctaaaga ggagtgcac t 21

<210> 217

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target IL-10R alpha
for RNA interference

<400> 217

gggctatttg aaacaggac c 21

<210> 218

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target IL-10R alpha
for RNA interference

<400> 218

gctgtaggaa tggaagcttc a 21

<210> 219

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial shRNA sequence, included in shRNA to target IL-10R alpha
for RNA interference

<400> 219

gcttgtgttt gctgctaattg t	21
<210> 220	
<211> 726	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> mU6-shTIM-3-><-shPD-1-hU6	
<400> 220	
gttaacaagg tcgggcagga agagggccta tttcccatga ttccttcata ttgcatata	60
cgatacaagg ctgttagaga gataattaga attaatatga ctgtaaaccac aaagatatta	120
gtacaaaata cgtgacgtag aaagtaataa tttcttgggt agtttgcagt tttaaaatta	180
tgttttaaaa tggactatca tatgtctacc gtaacttgaa agtatctcga tttcttggct	240
ttatatatct tgtggaaagg acgaaacacc gcctgtgggt ctattatatt atttcaagag	300
aataatataa tagaaccaca ggtttttgac tagtcaaaaa ggaattcgct cagaagaaat	360
ctcttgaatt tcttctgagc gaattccaaa caaggctttt ctccaaggga tatttatagt	420
ctcaaacac acaattactt tacagttagg gtgagtttcc tttgtgctg ttttttaaaa	480
taataattta gtatttgtat ctcttataga aatccaagcc tatcatgtaa aatgtagcta	540
gtattaaaaa gaacagatta tctgtctttt atcgacatt aagcctctat agttactagg	600
aaatattata tgcaaatata ccggggcagg ggagtagccg agcttctccc acaagtctgt	660
gcgagggggc cggcgcgggc ctagagatgg cggcgtcgga tcgctagcca tatgtctaga	720
gtatac	726
<210> 221	
<211> 726	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> shTIM-3-mU6<-->hU6-shPD-1	
<400> 221	
gttaacaaaa aacctgtggt tctattatat tttctcttg aaataatata atagaaccac	60
aggcgggtgtt tcgtcctttc cacaagatat ataaagccaa gaaatcgaaa tactttcaag	120
ttacggtaag catatgatag tccattttta aacataattt taaaactgca aactacccaa	180
gaaattatta ctttctacgt cagctatatt gtactaatat ctttgtgttt acagtcaaat	240
taattctaatt tatctctcta acagccttgt atcgatatat caaatatgaa ggaatcatgg	300

gaaataggcc ctcttcctgc ccgaccttac tagtgatccg acgcgcgat ctctaggccc 360

gcgcccggccc cctcgacacag acttgtggga gaagctcggc tactcccctg ccccggttaa 420

tttgcatata atatttccta gtaactatag aggccttaatg tgcgataaaa gacagataat 480

ctgttctttt taatactagc tacattttac atgataggct tggatttcta taagagatac 540

aaataactaaa ttattatttt aaaaaacagc acaaaaggaa actcacccta actgtaaagt 600

aattgtgtgt ttgagacta taaatatecc ttggagaaaa gccttggttg gaattcgctc 660

agaagaaatt caagagattt cttctgagcg aattcctttt tggctagcca tatgtctaga 720

gtatac 726

<210> 222

<211> 385

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shRNA cassette base sequence

<220><221> misc_feature

<222> (323)..(343)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (353)..(373)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 222

gttaacgac cgacgccgc atctctaggc ccgcgccggc cccctcgac agacttgtgg 60

gagaagctcg gctactcccc tgccccggtt aatttgcata taatatttcc tagtaactat 120

agaggcttaa tgtgcgataa aagacagata atctgttctt ttaataacta gctacatttt 180

acatgatagg cttggatttc tataagagat acaataacta aattattatt ttaaaaaaca 240

gcacaaaagg aaactcacc taactgtaaa gtaattgtgt gttttgagac tataaatatc 300

ccttgagaaa aagccttgtt tgnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnttcaaga gannnnnnnn 360

nnnnnnnnnn nnntttttgg ttaac 385

<210> 223

<211> 409

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mU6-shPD-1 MCS base sequence

<400> 223
 gttaacgatac cgacgccgcc atctctaggc ccgcgccggc cccctcgac agacttgtgg 60
 gagaagctcg gctactcccc tgccccggtt aatttgcata taatatttcc tagtaactat 120
 agaggcttaa tgtgcgataa aagacagata atctgttctt ttttaacta gctacatatt 180

acatgatagg cttggatttc tataagagat acaaatacta aattattatt ttaaaaaaca 240
 gcacaaaagg aaactcacc taactgtaaa gtaatttgtt gttttgagac tataaatatc 300
 ccttggagaa aagccttgtt tgccgtgtgt tctattatat tatttcaaga gaataatata 360
 atagaaccac aggtttttga ctagtgttag ccatatgtct agagtatac 409

<210> 224

<211> 328

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hU6-shPD-1 base sequence

<400> 224
 gttacaagg tcgggcagga agaggcccta tttcccatga ttccttcata ttgcatata 60
 cgatacaagg ctgttagaga gataattaga attaatttga ctgtaaacac aaagatatta 120

gtacaaaata cgtgacgtag aaagtaataa tttcttgggt agtttgcagt tttaaaatta 180
 tgttttaaaa tggactatca tatgcttacc gtaacttgaa agtatcttga tttcttggct 240
 ttatatatct tgtggaaagg acgaaacacc gcctgtggtt ctattatatt atttcaagag 300
 aataatataa tagaaccaca gggtttttg 328

<210> 225

<211> 468

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD22-CAR

<400> 225
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
 50 55 60
 Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80

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

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

 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Phe Ala Thr
 210 215 220
 Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Pro Gln Thr Phe Gly Gln Gly
 225 230 235 240
 Thr Lys Leu Glu Ile Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro
 245 250 255
 Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys
 260 265 270

 Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala
 275 280 285
 Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu

290 295 300
 Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys
 305 310 315 320
 Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr
 325 330 335

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

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

 Leu Pro Pro Arg
 465
 <210> 226
 <211> 486
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CD19-CAR
 <400> 226

 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 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu

20					25					30						
Ser	Ala	Ser	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	
35					40					45						
Asp	Ile	Ser	Lys	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr	
50					55					60						
Val	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	His	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	
65					70					75					80	
Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	
85					90					95						
Ser	Asn	Leu	Glu	Gln	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	
100					105					110						
Asn	Thr	Leu	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Thr	
115					120					125						
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	
130					135					140						
Val	Lys	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Ala	Pro	Ser	Gln	Ser	
145					150					155					160	
Leu	Ser	Val	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Val	Ser	Leu	Pro	Asp	Tyr	Gly	
165					170					175						
Val	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Arg	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	
180					185					190						
Val	Ile	Trp	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys	Ser	
195					200					205						
Arg	Leu	Thr	Ile	Ile	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu	Lys	
210					215					220						
Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Thr	Asp	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	
225					230					235					240	
His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
245					250					255						
Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	
260					265					270						

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu

355 360 365

Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

Gln Ala Leu Pro Pro Arg

485

<210> 227

<211> 782

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Delta LNGFR_P2A_CD19-CAR

<400> 227

```

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

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

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

           180          185          190
Gly Arg Trp Ile Thr Arg Ser Thr Pro Pro Glu Gly Ser Asp Ser Thr
           195          200          205
Ala Pro Ser Thr Gln Glu Pro Glu Ala Pro Pro Glu Gln Asp Leu Ile
           210          215          220

```

Ala Ser Thr Val Ala Gly Val Val Thr Thr Val Met Gly Ser Ser Gln
225 230 235 240
Pro Val Val Thr Arg Gly Thr Thr Asp Asn Leu Ile Pro Val Tyr Cys
245 250 255
Ser Ile Leu Ala Ala Val Val Val Gly Leu Val Ala Tyr Ile Ala Phe
260 265 270
Lys Arg Trp Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala
275 280 285
Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu
290 295 300
Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln
305 310 315 320
Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val
325 330 335
Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp
340 345 350
Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr
355 360 365
Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
370 375 380
Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile
385 390 395 400
Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly
405 410 415
Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
420 425 430
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro
435 440 445
Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser
450 455 460
Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro

465 470 475 480
 Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr
 485 490 495
 Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn

 500 505 510
 Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp
 515 520 525
 Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr
 530 535 540
 Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr
 545 550 555 560
 Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser

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

 625 630 635 640
 Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys
 645 650 655
 Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val
 660 665 670
 Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn
 675 680 685
 Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val

 690 695 700
 Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
 705 710 715 720

Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
725 730 735
Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
740 745 750
Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys

755 760 765
Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
770 775 780

<210> 228

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward PCR cloning primer #1

<400> 228

ggtatactct agacatatgg ctagcactag tcaaaaacct gtggttc 47

<210> 229

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse PCR cloning primer #1

<400> 229

ttgtaccgtt aacgatccga cgccgc 26

<210> 230

<211> 102

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward PCR cloning primer #2

<400> 230

tgactagtca aaaacctgtg gttctattat attattctct tgaaataata taatagaacc 60

acaggcgggtg tttcgctctt tccacaagat atataaagcc aa 102

<210> 231

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse PCR cloning primer #2

<400> 231

gtaccgttaa caaggtcggg caggaagagg gcctatttcc catgattcct 50

<210> 232

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward PCR cloning primer #3

<400> 232

aggactagtc aaaaaggaat tcgctcagaa gaaatctct 39

<210> 233

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse PCR cloning primer #3

<400> 233

ctagctagcg atccgacgcc gccatct 27

<210> 234

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward PCR cloning primer #4

<400> 234

atgttaacca aaaacctgtg gttctattat attattctct tg 42

<210> 235

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse PCR cloning primer #4

<400> 235

tcactagtaa ggtcgggcag gaagagggcc tatt 34

<210> 236

<211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward PCR cloning primer #5
 <400> 236
 taggccctca ctagtgatcc gacgccgcc 29
 <210> 237
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse PCR cloning primer #5

 <400> 237
 ctagctagcc aaaaaggaat tcgctcagaa gaaatctc 38
 <210> 238
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TIGIT-268
 <400> 238
 gcttctggcc atttgtaatg c 21
 <210> 239
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TIGIT-2
 <400> 239
 gggagtactt ctgcatctat c 21
 <210> 240
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> TIGIT-739
 <400> 240

gctgcatgac tacttcaatg t	21
<210> 241	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> TIGIT-1	
<400> 241	
taacgtggat cttgatcata a	21
<210> 242	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> TIGIT-1386	
<400> 242	
ggagacatac acaggccttc a	21
<210> 243	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> TIGIT-1750	
<400> 243	
gcatttgggc cttgatctac c	21
<210> 244	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> LAG3-138	
<400> 244	
ccagctttcc agctttcctc t	21
<210> 245	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> LAG3-503	

<400> 245
gatctcagcc ttctgcaag a 21
<210> 246

<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> LAG3-1092
<400> 246
gettcaacgt ctccatcatg t 21
<210> 247
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> LAG3-1221
<400> 247
ggtctttcct cactgccaa g t 21
<210> 248
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> LAG3-1278
<400> 248
ctggagacaa tggcgacttt a 21

<210> 249
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> LAG3-1379
<400> 249
gccactgtca cattggcaat c 21
<210> 250
<211> 21
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> LAG3-1465
 <400> 250
 tccagtatct ggacaagaac g 21
 <210> 251
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LAG3-1616
 <400> 251
 gcagcagtgt acttcacaga g 21

 <210> 252
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LAG3-1702
 <400> 252
 gctgtttctc atccttggtg t 21
 <210> 253
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LAG3-1751
 <400> 253
 gcctttggct ttcacctttg g 21
 <210> 254
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LAG3-1954
 <400> 254
 tcagcagccc agtccaaata a 21

 <210> 255

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CTLA4-3
 <400> 255
 ggtggagctc atgtaccac c 21
 <210> 256
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CTLA4-1
 <400> 256
 cccaaattac gtgtactaca a 21
 <210> 257
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CTLA4-1058
 <400> 257
 gcatcacttg ggattaatat g 21

 <210> 258
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CTLA4-1154
 <400> 258
 gcgagggaga agactatatt g 21
 <210> 259
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CTLA4-1309
 <400> 259
 gccagtgatg ctaaaggttg t 21

<210> 260
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CTLA4-1686
 <400> 260
 ggtggtatct gattgactt g 21

<210> 261
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Tim3-1
 <400> 261
 gatgaaaggg atgtgaatta t 21

<210> 262
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Tim3-2
 <400> 262
 gggagcctcc ctgataaaa t 21

<210> 263
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Tim3-3
 <400> 263
 ggaattcgct cagaagaaa 19

<210> 264
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Tim3-4

<400> 264	
ggaccaaact gaagctatat t	21
<210> 265	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PD1-1	
<400> 265	
cctgtgggttc tattatatta t	21
<210> 266	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PD1-2	
<400> 266	
gcctagagaa gtttcaggga a	21
<210> 267	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PD1-3	
<400> 267	
cattgtcttt cctagcggaa t	21
<210> 268	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 18s rRNA Forward	
<400> 268	
gattaagtcc ctgccctttg	20
<210> 269	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> 18s rRNA Reverse
 <400> 269
 gttcacctac ggaaaccttg 20

<210> 270
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PDCD1 Forward
 <400> 270
 cctccacctt tacacatgcc 20
 <210> 271
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PDCD1 Reverse
 <400> 271
 cttactgcct cagcttcctt 20
 <210> 272
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL2 Forward
 <400> 272
 ccaagaaggc cacagaactg a 21
 <210> 273
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL2 Reverse
 <400> 273
 gttgtttcag atccctttag ttccag 26
 <210> 274
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL4 Forward
 <400> 274
 actttgaaca gcctcacaga g 21
 <210> 275
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL4 Reverse
 <400> 275
 ccgagttgac cgtaacagac at 22

 <210> 276
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL17A Forward
 <400> 276
 caaccgatcc acctcacctt 20
 <210> 277
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL17A Reverse
 <400> 277
 ggcactttgc ctcccagat 19
 <210> 278
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CD25 Forward
 <400> 278
 cacaagctct gccactcgga a 21

<210> 279	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CD25 Reverse	
<400> 279	
tgcaagtacc tggaaggctc	20
<210> 280	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CTLA4 Forward	
<400> 280	
ctacctgggc ataggcaacg	20
<210> 281	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CTLA4 Reverse	
<400> 281	
ccccgaacta actgctgcaa	20
<210> 282	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> FOXP3 Forward	
<400> 282	
gaaacagcac attcccagag ttc	23
<210> 283	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> FOXP3 Reverse	
<400> 283	

atggcccagc ggatgag	17
<210> 284	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> TGF-beta1 Forward	
<400> 284	
cccagcatct gcaaagctc	19
<210> 285	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> TGF-beta1 Reverse	
<400> 285	
gtccttgagg aagtcaatgt	20
<210> 286	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> TGFBR1 Forward	
<400> 286	
acatgattca gccacagata cc	22
<210> 287	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> TGFBR1 Reverse	
<400> 287	
gcatagatgt cagcacgttt g	21
<210> 288	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> TGFBR2 Forward

<400> 288

acgtgttgag agatcgagg

19

<210> 289

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TGFBR2 Reverse

<400> 289

cccagcactc agtcaacgtc

20