



등록특허 10-2822623



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년06월20일

(11) 등록번호 10-2822623

(24) 등록일자 2025년06월16일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0636 (2025.01)
A61K 39/0011 (2025.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7030463(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2019년05월23일
심사청구일자 2023년10월05일
- (85) 번역문제출일자 2023년09월06일
- (65) 공개번호 10-2023-0132889
- (43) 공개일자 2023년09월18일
- (62) 원출원 특허 10-2020-7035529
원출원일자(국제) 2019년05월23일
심사청구일자 2020년12월10일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2019/033836
- (87) 국제공개번호 WO 2019/226945
국제공개일자 2019년11월28일
- (30) 우선권주장
62/675,511 2018년05월23일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
W02017146767 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
싱가포르국립대학교
싱가포르 119077, 싱가포르 로어 켄트리지로드 21
- (72) 발명자
캄파나, 다리오
싱가포르 089379 싱가포르 에버턴 로드 24
비나니카, 나타샤
싱가포르 589664 싱가포르 #09-18 부킷 티마 로드 969
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
한라특허법인(유한)

전체 청구항 수 : 총 20 항

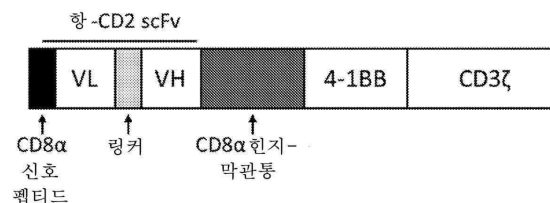
심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 T-세포 악성 종양의 면역요법을 위한 CD2 표면 발현 및 키메라 항원 수용체의 발현에 대한 차단

(57) 요약

본 발명은 항-CD2 단백질 발현 차단제(PEBL) 및 항-CD2 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 조작된 면역 세포를 제공한다. 일부 실시형태에서, 이러한 조작된 면역 세포는 표면 발현 CD2가 결핍되어 있다. 또한, 본 명세서에는 암 요법에서 상기 세포를 사용하는 방법이 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 14/7051 (2013.01)

C07K 14/70517 (2013.01)

C07K 14/70578 (2013.01)

C07K 16/2887 (2013.01)

C12N 5/0646 (2025.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2319/02 (2013.01)

C07K 2319/09 (2013.01)

(72) 발명자

피앤지, 이 티안

싱가포르 753128 싱가포르 #13-564 캔베라 스트리트 128시 비엘케이

카미야, 타카히로

일본 도쿄 코토구 몬젠나카초 308 1-19-11

명세서

청구범위

청구항 1

조작된 면역 세포로서,

(i) 세포 국소화 도메인(cellular localizing domain)의 N-말단에 연결된 단일쇄 가변 단편(single chain variable fragment: scFv)을 포함하는 CD2 차단 폴리펩티드로서,

상기 scFv는 CD2에 결합하고, 상기 세포 국소화 도메인은 소포체(endoplasmic reticulum: ER) 보유 서열을 포함하고, 상기 CD2 차단 폴리펩티드는 상기 조작된 세포 내에서 세포 내에 유지되어, 상기 조작된 세포 내의 내인성 CD2에 결합하고, 상기 CD2 차단 폴리펩티드는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는, CD2 차단 폴리펩티드; 및

(ii) CD2 표적화 도메인, 막관통 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor: CAR)를 포함하며, 상기 CAR는 항-CD2-4-1BB-CD3 ζ CAR이고, 상기 항-CD2-4-1BB-CD3 ζ CAR는 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 면역 세포.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조작된 면역 세포는 CD2⁺ 세포의 세포독성을 유도하는, 조작된 면역 세포.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조작된 세포에 의한 CD2 표면 발현은 CD2 차단 폴리펩티드에 의해서 차단되는, 조작된 면역 세포.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 조작된 세포에 의한 상기 CD2 표면 발현의 상기 차단은 적어도 6개월 동안 지속되는, 조작된 면역 세포.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 조작된 세포에 의한 상기 CD2 표면 발현의 상기 차단은 적어도 12개월 동안 지속되는, 조작된 면역 세포.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 조작된 면역 세포는 대등한 면역 세포와 실질적으로 동일한 속도로 증식하는, 조작된 면역 세포.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 조작된 면역 세포는 동종이계 세포인, 조작된 면역 세포.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 조작된 면역 세포는 자가 세포인, 조작된 면역 세포.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 조작된 면역 세포는 조작된 T 세포인, 조작된 면역 세포.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 조작된 면역 세포는 조작된 감마-델타 T 세포인, 조작된 면역 세포.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 조작된 면역 세포는 조작된 NK 세포인, 조작된 면역 세포.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 조작된 면역 세포 중 적어도 하나를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 13

암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 조작된 면역 세포를 포함하는 치료량의 조성물을 대상체에게 투여함으로써 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함하는, 방법.

청구항 15

제13항에 있어서, 암은 T-세포 악성 종양 또는 CD2 연관 암인, 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 T-세포 악성 종양 또는 상기 CD2 연관 암은 T 세포 백혈병 T 세포 림프종, T-세포 급성 림프모구성 백혈병(T-cell acute lymphoblastic leukemia: T-ALL), 조기 T-세포 전구세포 급성 림프모구성 백혈병(early T-세포 progenitor acute lymphoblastic leukemia: ETP-ALL), T-세포 전림프구성백혈병 백혈병, T-세포 거대 과립 림프구성 백혈병, 장질환-연관 T-세포 림프종, 간비장 T-세포 림프종, 피하 지방층염-유사 T-세포 림프종, 피부 T-세포 림프종(cutaneous T-cell lymphomas: CTCL), CTCL의 임의의 아형, 군상 식육종, 세자리 증후군(Sézary syndrome), 1차 피부 감마-델타 T-세포 림프종, 비호지킨 림프종(NHL)의 T 계통 하위세트가 동반된 악성 종양, 달리 규정되지 않은 말초 T-세포 림프종(peripheral T-cell lymphoma: PTCL)(PTCL-NOS) 및 혈관면역모구성 T-세포 림프종 및 역형성 거대 세포 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 17

제13항에 있어서, 상기 투여는 정맥내 주입, 동맥내 주입, 복강내 주입, 종양 내로의 직접 주사 및/또는 수술 후의 종양 층의 관류, 인공 스캐폴드에서 종양 부위에서의 이식 또는 척추강내 투여에 의한 것인, 방법.

청구항 18

- i) 제1항의 CD2 차단 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드; 및
- ii) 제1항의 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 19

제18항의 발현벡터를 포함하는 숙주세포.

청구항 20

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 조작된 면역 세포의 생산 방법으로서, 제18항의 발현 벡터를 면역 세포에 도입하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 교차 참조

[0002] 본 출원은 2018년 5월 23일자로 출원된 미국 임시출원 제62/675,511호에 대한 우선권을 주장하며, 이 내용은 전 문이 본 명세서에 인용되어 포함된다.

[0003] 서열 목록에 대한 참조

[0004] 본 출원은 ASCII 형식으로 전자적으로 제출되었으며 그 전체 내용이 본 명세서에 인용되어 포함된 서열 목록을 포함한다. 2019년 5월 23일자로 작성된 상기 ASCII 사본은 파일명이 "119419-5004-WO_ST25.txt"이고, 크기가 40.0 킬로바이트이다.

[0005] 기술분야

[0006] 본 명세서에 기재된 본 발명은 일반적으로 CD2에 세포 내에서 결합하는 단백질 발현 차단 융합 단백질을 포함하 는 키메라 항원 수용체 T 세포(chimeric antigen receptor T cell: CAR-T 세포)의 임상적으로 효과적인 집단 및 추가로 T 세포 악성 종양을 치료하기 위한 이러한 CAR-T 세포의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 CD2에

세포 내에서 결합하는 단백질 발현 차단 융합 단백질을 포함하는 다른 면역 세포의 임상적으로 효과적인 집단에 관한 것이다.

배경 기술

- [0007] 유전자-조작된 면역 세포는 암 및 자가면역 질환에 대한 강력한 새로운 치료법이다. 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 T 림프구를 사용한 최근의 임상 시험의 결과는 이러한 접근법의 힘을 강력하게 입증하였다. 키메라 항원 수용체(CAR)는 면역 세포에 재지향되어, 종양 세포를 특이적으로 인식하고 살해할 수 있다. CAR은 막관통 도메인을 통해 신호전달 분자에 연결된 항체의 단일쇄 가변 영역(scFv)에 의해 구성된 인공 다분자 단백질이다. scFv가 이의 동족 항원과 결합하는 경우, 신호전달이 유발되어 CAR-발현 세포독성 T 림프구에 의한 종양 세포 살해가 발생한다(문헌[Eshhar et al. PNAS USA. 90(2):720-724, 1993; Geiger et al. J Immunol. 162(10):5931-5939, 1999; Brentjens et al. Nat Med. 9(3):279-286, 2003; Cooper et al. Blood 101(4):1637-1644, 2003; Imai C, et al. Leukemia. 18:676-684, 2004]). CAR-발현 자가 T 림프구를 사용한 임상 시험은 B-세포 난치성 백혈병 및 림프종 환자에서 긍정적인 반응을 나타내었다(예를 들어, 문헌[Till et al. Blood 119(17):3940-3950, 2012; Maude et al. N Engl J Med. 371(16):1507-1517, 2014] 참조).
- [0008] 표면 분자 CD19에 특이적인 CAR-T 세포는 급성 림프모구 백혈병 (ALL), 만성 림프성 백혈병 및 비호지킨 림프종과 같은 난치성 CD19-양성 악성 종양 환자에서 형태학적 및 분자적 완화를 유도하는 것으로 밝혀졌다. 다른 악성 종양은 상이한 항원에 대해 재지향되는 T 세포에 의해 공격될 수 있다. 따라서, 종양학에서 유전자-조작된 세포 요법에 대한 가능한 응용 분야는 광범위하다.
- [0009] CAR-T 세포 주입에 대한 초기 임상 경험은 또한 잠재적인 한계를 확인하였으며, 이는 치료 효과를 심각하게 감소시키고 개발을 방해할 수 있다. 주요 문제는 암 환자로부터 수집된 면역 세포의 가변적인 적합성이며, 이는 생체 내에서 확장하고 항종양 효과를 발휘하는 능력을 예측할 수 없게 만든다. 이러한 가변성은 가장 효과적인 세포 투여량의 확인을 복잡하게 만들고, 수명이 짧고 비효과적인 세포 생성물의 주입을 초래할 수 있으며, 궁극적으로는, 일관된 "살아있는 약물"의 개발을 막을 수 있다. 건강한 공여자로부터의 T 림프구의 사용은 효과 및 일관성을 개선하지만, 공여자 림프구 주입의 심각하고 잠재적으로 치명적인 결과인 이식편-대-숙주병(graft-versus-host disease: GvHD)의 위험을 수반한다. 이러한 동종이계 환경에서, 필수적인 세포에 의해 발현되는 조직 항원을 인식하는 능력을 억제하기 위해, 주입된 T 세포에 대한 추가적인 변형이 요구된다.
- [0010] 요약하면, 암 및 자가면역 질환을 갖는 환자를 위한 새로운 치료 옵션에 대한 충족되지 않은 상당한 필요성이 존재하는 상황이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 면역 세포에서 표면 수용체 발현을 차단하기 위한 간단하고 효과적인 방법이 본 명세서에 제공된다. 단백질 발현 차단제(Protein Expression Blocker: PEBL)로 명명되는 특정 작제물은 표적 단백질이 세포막으로 이동하는 것을 방지한다. PEBL 작제물은 다른 유전자 변형과 용이하게 조합될 수 있고, 면역 세포의 기능을 최적화하기 위해 생체의 세포 처리를 위한 기존의 대규모 cGMP 등급 프로토콜에 포함될 수 있다.

과제의 해결 수단

- [0012] 일 양태에서, 본 명세서에는 조작된 면역 세포가 제공되며, 조작된 면역 세포는,
- [0013] (i) 세포 국소화 도메인의 N-말단에 연결된 CD2에 결합하는 단일쇄 가변 단편(scFv)을 포함하는 CD2 차단 폴리펩티드로서, 세포 국소화 도메인은 소포체(endoplasmic reticulum: ER) 보유 서열, 골지 보유 서열 및 프로테오솜 국소화 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, 상기 CD2 차단 폴리펩티드는 상기 조작된 세포 내에서 세포 내에 유지되어, 조작된 세포 내의 내인성 CD2에 결합하는, CD2 차단 폴리펩티드; 및
- [0014] (ii) CD2 표적화 도메인, 막관통 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함한다.
- [0015] 일부 실시형태에서, scFv는 서열번호 18에 대해 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 가변 중쇄(variable heavy chain: VH) 서열 및 서열번호 19에 대해 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 가변 경쇄(variable light chain: VL) 서열을 포함한다.

- [0016] 일부 실시형태에서, scFv는 서열번호 20에 대해 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 가변 중쇄(VH) 서열 및 서열번호 21에 대해 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 가변 경쇄(VL) 서열을 포함한다.
- [0017] 일부 실시형태에서, ER 보유 서열은 KDEL, KKXX, KKMP 및 KKTN으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, 여기서, X는 임의의 아미노산일 수 있거나; 또는 골지 보유 서열은 YGRL, YQRL, YKGL 및 YXXL로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서, X는 임의의 아미노산일 수 있다.
- [0018] 일부 실시형태에서, CD2 차단 폴리펩티드는 scFv와, KKMP 또는 KKTN을 포함하는 상기 ER 보유 서열 도메인 또는 YGRL, YQRL, YKGL을 포함하는 골지 보유 서열 도메인 중 어느 하나 사이에 연결된 막관통 도메인을 더 포함하고, 막관통 도메인은 CD8 α , CD8 β , 4-1BB, CD28, CD34, CD4, Fc ϵ RI γ , CD16, OX40, CD3 ζ , CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 δ , TCR α , CD32, CD64, VEGFR2, FAS 및 FGFR2B로 이루어진 군 중 어느 하나로부터 선택된 막관통 도메인이다.
- [0019] 일부 실시형태에서, 막관통 도메인은 CD8 α 의 힌지-막관통 도메인을 포함한다.
- [0020] 일부 실시형태에서, CD2 차단 폴리펩티드는 서열번호 1 내지 4로 이루어진 군으로부터 선택된 임의의 하나와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0021] 일부 실시형태에서, CAR은 항-CD2-4-1BB-CD3 ζ CAR이다. 일부 실시형태에서, 항-CD2-4-1BB-CD3 ζ CAR은 서열번호 5에 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0022] 일부 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 CD2+ 세포의 세포독성을 유도한다. 일부 실시형태에서, 조작된 세포에 의한 CD2 표면 발현은 CD2 차단 폴리펩티드에 의해서 차단되거나 상당히 감소된다. 일부 실시형태에서, 조작된 세포에 의한 CD2 표면 발현의 상기 차단은 적어도 6개월 동안 지속된다. 일부 실시형태에서, 조작된 세포에 의한 CD2 표면 발현의 상기 차단은 적어도 12개월 동안 지속된다. 일부 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 대등한 면역 세포와 실질적으로 동일한 속도로 증식한다.
- [0023] 일부 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 동종이계 세포이다. 일부 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 자가 세포이다.
- [0024] 일부 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 조작된 T 세포이다. 일부 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 조작된 NK 세포이다.
- [0025] 또 다른 양태에서, 본 발명은 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 이 방법은 본 명세서에 요약된 조작된 면역 세포를 포함하는 치료량의 조성물을 대상체에게 투여함으로써 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 단계를 포함한다.
- [0026] 일부 실시형태에서, 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함한다.
- [0027] 일부 실시형태에서, 암은 T-세포 악성 종양 또는 CD2 연관 암이다. 일부 실시형태에서, T-세포 악성 종양 또는 상기 CD2 연관 암은 T 세포 백혈병 T 세포 림프종, T-세포 급성 림프모구성 백혈병(T-cell acute lymphoblastic leukemia: T-ALL), 조기 T-세포 전구세포 급성 림프모구성 백혈병(early T-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia: ETP-ALL), T-세포 전림프구성백혈병 백혈병, T-세포 거대 과립 림프구성 백혈병, 장질환-연관 T-세포 림프종, 간비장 T-세포 림프종, 피하 지방층염-유사 T-세포 림프종, 피부 T-세포 림프종(cutaneous T-cell lymphomas: CTCL), CTCL의 임의의 아형, 균상 식육종, 세자리 증후군(Sézary syndrome), 1차 피부 감마-델타 T-세포 림프종, 비호지킨 림프종(NHL)의 T 계통 하위세트가 동반된 악성 종양, 달리 규정되지 않은 말초 T-세포 림프종(peripheral T-cell lymphoma: PTCL)(PTCL-NOS) 및 혈관면역모구성 T-세포 림프종 및 역형성 거대 세포 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0028] 일부 실시형태에서, 투여 단계는 정맥내 주입, 동맥내 주입, 복강내 주입, 종양 내로의 직접 주사 및/또는 수술 후의 종양 층의 관류, 인공 스캐폴드에서 종양 부위에서의 이식 또는 척추강내 투여에 의한 것이다.
- [0029] 또한 본 명세서에는 기재된 CD2 차단 폴리펩티드 중 임의의 것을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 또한 본 명세서에는 기재된 CAR 중 임의의 것을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 제공된다.
- [0030] 일부 실시형태에서, 발현 벡터는 CD2 차단 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 중 임의의 하나를 포함한다. 일부 실시형태에서, 발현 벡터는 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 중 임의의 하나를 포함한다. 일부 실시형태에서, CD2 차단 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 중 임의의 하나 및 기재된 CAR을 암호화하는

폴리뉴클레오티드 중 임의의 하나를 포함하는 발현 벡터가 제공된다.

- [0031] 또한 본 명세서에는 CD2 차단 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드중 임의의 하나를 포함하는 발현 벡터 및 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 중 임의의 하나를 포함하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다.
- [0032] 본 명세서에는 CD2 차단 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드중 임의의 하나를 함유하는 발현 벡터 및 본 명세서에 기재된 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 중 임의의 하나를 포함하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다.
- [0033] 일부 양태에서, 본 발명은 실시형태 중 임의의 하나의 조작된 면역 세포의 생산 방법을 제공한다. 방법은 예시적인 폴리뉴클레오티드를 면역 세포에 도입하는 단계를 포함한다.
- [0034] 다른 양태에서, 본 발명은 실시형태 중 임의의 하나의 조작된 면역 세포의 생산 방법을 제공한다. 방법은 예시적인 발현 벡터 중 하나 이상을 면역 세포에 도입하는 단계를 포함한다.
- [0035] 본 발명의 추가 설명은 2018년 5월 24일자로 출원된 미국 임시 출원 제62/675,525호에서 찾아볼 수 있으며, 서열, 도면 및 도면 설명을 비롯한 내용은 전문이 본 명세서에 포함된다.

도면의 간단한 설명

- [0036] 도 1은 본 명세서에 기재된 예시적인 항-CD2 키메라 항원 수용체(CAR) 작제물의 개략도를 도시한다.
- 도 2는 주카트(Jurkat) 세포에서 항-CD2 CAR의 발현을 예시한다. 항-CD2 CAR은 항-CD2 단클론성 항체 9.6에 기반한 항-CD2 scFv를 포함한다. 9.6의 상세한 설명은 예를 들어, 문헌[Kamoun et al. J Exp Med, 1981, 153:207-212]에서 찾아볼 수 있다. 세포에 CAR 작제물과 GFP를 함유하는 벡터 또는 GFP 단독을 함유하는 벡터("Mock")를 형질도입하였다. 유세포 분석법 점 플롯(flow cytometric dot plot)은 항-CD2 CAR 발현을 예시한다. 항-염소 항-마우스 항체 APC(GAM-APC)를 사용하였다.
- 항-CD2 단클론성 항체 9.6 및 9-1의 상세한 설명은 각각 예를 들어, 문헌[Kamoun et al. J Exp Med, 1981, 153:207-212 및 Bernard et al., in *Leukocyte Typing II*, 1986, eds. Reinherz, E.L., Haynes, B.F., Nadler, L.M., & Bernstein, I.D. (Springer, New York), pp. 53-66]에서 찾아볼 수 있다.
- 도 3은 항-CD2 CAR의 발현이 CD2+ 표적 세포의 존재 하에서 활성화 마커의 발현을 유도하였다는 것을 나타낸다. 막대 그래프는 9.6 항-CD2 CAR을 발현하는 세포가 존재하는 경우 CCRF-CEM 세포주의 CD25+ 세포 및 CD69+ 세포의 증가하는 수를 도시한다.
- 도 4는 T 세포 상에서 9.6 항-CD2 CAR 작제물의 발현을 도시한다. T 세포에 CAR 작제물과 GFP를 함유하는 벡터 또는 GFP 만을 함유하는 벡터("Mock")를 형질도입하였다. 유세포 분석법 점 플롯은 항-CD2 CAR 발현을 예시한다. 항-염소 항-마우스 항체 APC(GAM-APC)를 사용하였다.
- 도 5는 표적 세포(CD2+ 표적 세포)에 대한 T 세포를 발현하는 9.6 항-CD2 CAR의 세포독성 활성도를 도시한다. 항-CD2 scFv-41BB-CD3 ζ CAR mRNA 또는 GFP 단독 mRNA로 전기천공된 CAR- 또는 모의-형질도입된 T 세포의 세포독성을 공동배양 실험으로 나타낸다. CAR T 세포 및 표적을 1:1 효과기-대-표적 비(E:T)로 플레이팅하였다. 수일간 공동배양 후, 살아있는 세포의 수를 결정하였다. 막대 그래프는 9.6 항-CD2 CAR T 세포가 CD2+ 표적 세포에 대해서 세포독성을 발휘하였음을 나타낸다. CD107a는 자극 및 NK 세포 기능성 활성화 후에 CD8+ T 세포 탈과립화에 대한 마커를 나타낸다. 막대 그래프는 GFP 단독에 비해서 9.6 항-CD2 CAR을 발현할 때 CD107a+ 세포의 더 높은 백분율을 도시한다.
- 도 6은 본 명세서에 기재된 항-CD2 단백질 발현 차단제(PEBL) 작제물의 예시적인 실시형태를 제공한다. 9.6 PEBL I 작제물은 CD8 α 신호 펩티드, 링커를 통해서 VH 도메인에 연결된 VL 도메인을 포함하는 9.6 항-CD2 scFv 및 ER 보유 도메인을 포함한다. 9.6 PEBL II 작제물은 CD8 α 신호 펩티드, 링커를 통해서 VH 도메인에 연결된 VL 도메인을 포함하는 9.6 항-CD2 scFv, CD8 α 힌지-막관통 도메인 및 ER 보유 도메인을 포함한다. 9-1 PEBL I 작제물은 CD8 α 신호 펩티드, 링커를 통해서 VH 도메인에 연결된 VL 도메인을 포함하는 9-1 항-CD2 scFv 및 ER 보유 도메인을 포함한다. 9-1 PEBL II 작제물은 CD8 α 신호 펩티드, 링커를 통해서 VH 도메인에 연결된 VL 도메인을 포함하는 9-1 항-CD2 scFv, CD8 α 힌지-막관통 도메인 및 ER 보유 도메인을 포함한다.
- 9.6 항-CD2 단클론성 항체 및 9-1 항-CD2 단클론성 항체의 상세한 설명은 각각 예를 들어, 문헌[Kamoun et al. J Exp Med, 1981, 153:207-212 및 Bernard et al., in *Leukocyte Typing II*, 1986, eds. Reinherz, E.L.,

Haynes, B.F., Nadler, L.M., & Bernstein, I.D. (Springer, New York), pp. 53-66]에서 찾아볼 수 있다. 9.6 scFv는 휴지 T 세포 및 활성화 T 세포 둘 다 상의 CD2를 인식하고, 이에 결합한다. 그것은 또한 CD2에 대한 CD58의 결합을 저해한다(차단한다). 9-1 scFv는 활성화된 T 세포 상의 CD2를 인식하고, 이에 결합한다. 그것은 CD2에 대한 CD58 결합을 차단하지 않는다.

도 7은 9.6 항-CD2 PEBL I, 9.6 항-CD2 PEBL II, 9-1 항-CD2 PEBL I, 9-1 항-CD2 PEBL II 또는 GFP 단독("Mock")이 형질도입된 주카트 세포에서 CD2의 표면 및 세포내 발현의 유세포 분석법 히스토그램을 도시한다. 주카트 세포에서 9.6 항-CD2 PEBL II 작제물의 발현은 CD2의 발현을 하향조절하였다.

도 8은 9.6 항-CD2 PEBL II 작제물이 전기천공된 T 세포에서 CD2의 표면 발현의 유세포 분석법 점 플롯을 도시한다. 이 데이터는 전기천공된 T 세포에 의한 CD2 발현의 하향조절(부분적인 하향조절)을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명의 예시적인 실시형태에 대해 설명한다.

I. 서론

본 발명은 CAR-T 세포를 포함한 T 세포에서 표면 분자의 신속하고 효율적인 하향조절을 가능하게 하는 방법을 제공한다. 본 발명의 일 실시형태에서, 항-CD2 PEBL(CD2 PEBL이라고도 지칭됨)이 제공되며, 여기서 항-CD2 PEBL의 형질도입은 CD2의 세포내 보유를 야기하였다. 본 명세서에 개략된 PEBL 작제물은 세포의 누출을 최소화하거나 전혀 수반하지 않을 수 있고, CD2 발현 및 신호전달을 차단하는데 매우 효과적이다. PEBL 발현 및 CD2 차단은 지속성이 있으며 다른 표면 분자의 발현에는 영향을 미치지 않는다. PEBL-발현 면역 세포, 예를 들어, T 세포뿐만 아니라 대등한 면역 세포, 예를 들어, T 세포는 생존 및 증식할 수 있다. 중요하게는, PEBL-발현 T 세포는 CAR 신호전달에 정상적으로 반응하고 시험관내에서 CAR-표적화된 세포, 예를 들어, 암 세포를 효과적으로 살해할 수 있다. CD2 발현 및 신호전달의 PEBL 차단은 CAR-T 세포와 같은 동종이계 T 세포의 주입을 지원하는 간단하고 효과적인 도구이다.

II. 정의

본 발명의 실시는 달리 제시되지 않는 한, 당업계의 기술에 포함되는 세포 생물학, 세포 배양학, 분자 생물학, 트랜스제닉 생물학, 미생물학, 재조합 DNA 및 면역학의 종래의 기술을 사용할 것이다. 이러한 기술은 문헌에 완전히 설명되어 있다. 예를 들어, 문헌[Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA)]; 문헌[Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, (Sambrook et al, 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press)]; 문헌[Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984)]; 특허[Mullis et al. U.S. Pat. No. 4,683,195]; 문헌[Nucleic Acid Hybridization (B. D. Harries & S. J. Higgins eds. 1984)]; 문헌[Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984)]; 문헌[Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987)]; 문헌[Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986)]; 문헌[B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the series, Methods In ENZYMOLOGY (J. Abelson and M. Simon, eds.-in-chief, Academic Press, Inc., New York), 특별히, Vols. 154 및 155 (Wu et al. eds.) and Vol. 185, "Gene Expression Technology" (D. Goeddel, ed.)]; 문헌[Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory)]; 문헌[Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987)]; 문헌[Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986)]; 및 문헌[Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986)]을 참조한다.

본 개시내용을 보다 쉽게 이해하기 위해서, 특정 용어를 먼저 정의한다. 본 출원에 사용된 바와 같이, 본 명세서에 달리 제공된 것을 제외하고는, 하기 용어 각각은 하기에 제시된 의미 세트를 가질 것이다. 추가 정의는 본 출원 전체에 제시되어 있다.

달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 개시내용이 관련된 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 예를 들어, 문헌[Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press]; 문헌[The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press]; 및 문헌[the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular

Biology, Revised, 2000, Oxford University Press]은 당업자에게 본 개시내용에 사용된 용어 중 다수의 일반적인 사전을 제공한다.

- [0044] 본 명세서에서 양태가 "포함하는"이라는 언어로 설명되는 모든 경우에, "이루어지는" 및/또는 "본질적으로 이루어진"의 관점에서 설명된 유사한 양태가 또한 제공된다는 것이 이해된다.
- [0045] 본 명세서에서, "조작된 면역 세포"는 자연 발생 면역 세포와 비교하여 유전자 변형된 면역 세포를 지칭한다.
- [0046] 본 명세서에서, 용어 "핵산"은 복수의 뉴클레오타이드 단량체(예를 들어, 리보뉴클레오타이드 단량체 또는 데옥시리보뉴클레오타이드 단량체)를 포함하는 중합체를 지칭한다. "핵산"은 예를 들어, 게놈 DNA, cDNA, RNA 및 DNA-RNA 하이브리드 분자를 포함한다. 핵산 분자는 자연 발생, 재조합 또는 합성일 수 있다. 또한, 핵산 분자는 단일 가닥, 이중 가닥 또는 삼중 가닥일 수 있다. 일부 실시형태에서, 핵산 분자는 변형될 수 있다. 이중 가닥 중합체의 경우, "핵산"은 분자의 가닥 중 하나 또는 둘 다를 지칭할 수 있다.
- [0047] 핵산과 관련하여, 용어 "뉴클레오타이드 서열"은 공유 링키지, 예를 들어, 인 링키지(예를 들어, 포스포디에스테르, 알킬 및 아릴-포스포네이트, 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르 결합) 및/또는 비-인 링키지(예를 들어, 펩티드 및/또는 설파메이트 결합)에 의해 연결된 연속적인 일련의 뉴클레오타이드를 지칭한다. 특정 실시형태에서, 예를 들어 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 분자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 이중 서열(예를 들어, 상이한 종 또는 세포 유형 기원의 유전자)이다.
- [0048] 용어 "뉴클레오타이드" 및 "뉴클레오타이드 단량체"는 자연 발생 리보뉴클레오타이드 또는 데옥시리보뉴클레오타이드 단량체뿐만 아니라 비-자연 발생 유도체 및 유사체를 지칭한다. 따라서, 뉴클레오타이드는 예를 들어 자연 발생 염기(예를 들어, 아데노신, 티미딘, 구아노신, 시티딘, 우리딘, 이노신, 테옥시아데노신, 테옥시티미딘, 테옥시구아노신 또는 테옥시시티딘)를 포함하는 뉴클레오타이드 및 당업계에 공지된 변형된 염기를 포함하는 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0049] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 일부 양태에서, 핵산은 플라스미드 서열을 추가로 포함한다. 플라스미드 서열은 예를 들어, 프로모터 서열, 선택 마커 서열 및 유전자좌-표적화 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함할 수 있다.
- [0050] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 분자를 암호화하는 유전자는 때때로 "PEBL을 암호화하는 유전자", "PEBL을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드", "PEBL을 암호화하는 유전자" 등으로 지칭된다.
- [0051] 특정 실시형태에서, 표적-결합 분자는 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다. 본 명세서에서, "항체"는 변형되거나 조작된, 또는 인간 항체인 무손상 항체 또는 항원-결합 단편을 비롯한 무손상 항체 또는 항체의 항원-결합 단편을 의미한다. 변형되거나 조작된 항체의 예는 키메라 항체, 인간화 항체, 다중과라토프 항체(예를 들어, 이중과라토프 항체) 및 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체)이다. 항원-결합 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, 단일쇄 항체(예를 들어, scFv), 미니바디 및 디아바디를 포함한다.
- [0052] "디아바디"는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 작은 항체 단편이다. 단편은 동일한 폴리펩티드 사슬에서 경쇄 가변 영역(V_L)에 연결된 중쇄 가변 영역(V_H)을 포함한다(V_H-V_L 또는 V_L-V_H). 동일한 사슬 상의 2개의 도메인 사이에 쌍 형성을 가능하게 하기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 상기 도메인들이 다른 사슬의 상보성 도메인과 쌍을 형성하여 2개의 항원-결합 부위를 생성하도록 만든다. 디아바디는 예를 들어, 특허 제EP 404,097호; 제WO 93/11161호; 및 문헌[Holliger et al, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448]에 기술되어 있다.
- [0053] 특정 실시형태에 있어서, 항체는 트리아바디 또는 테트라바디이다. 트리아바디 및 테트라바디의 설계 및 생산 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Todorovska et al, J. Immunol. Methods 248(1-2):47-66, 2001]을 참조한다.
- [0054] "도메인 항체 단편"은 중쇄의 가변 영역 또는 경쇄의 가변 영역 만을 함유하는 면역학적으로 기능성인 면역글로불린 단편이다. 일부 경우에서, 둘 이상의 VH 영역은 펩티드 링커로 공유 결합에 의해 연결되어, 2가 도메인 항체 단편을 생성한다. 2가 도메인 항체 단편의 2개의 VH 영역은 동일하거나 상이한 항원을 표적화할 수 있다.
- [0055] 일부 실시형태에서, 상기 항체는 변형되거나 조작된다. 변형되거나 조작된 항체의 예는 키메라 항체, 다중과라토프 항체(예를 들어, 이중과라토프 항체) 및 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체)를 포함한다.
- [0056] 본 명세서에서, "다중과라토프 항체"는 적어도 2개의 단일 도메인 항체를 포함하는 항체를 의미하며, 여기서 적어도 하나의 단일 도메인 항체는 항원 상의 제1 항원 결정기에 대한 것이며, 적어도 하나의 다른 단일 도메인

항체는 동일한 항원 상의 제2 항원 결정기에 대한 것이다. 따라서, 예를 들어, "이중과라토프" 항체는 항원 상의 제1 항원 결정기에 대한 적어도 하나의 단일 도메인 항체 및 동일한 항원 상의 제2 항원 결정기에 대한 적어도 하나의 추가적인 단일 도메인 항체를 포함한다.

- [0057] 본 명세서에서, "다중특이적 항체"는 적어도 2개의 단일 도메인 항체를 포함하는 항체를 의미하며, 여기서 적어도 하나의 단일 도메인 항체는 제1 항원에 대한 것이며, 적어도 하나의 다른 단일 도메인 항체는 (상기 제1 항원과 상이한) 제2 항원에 대한 것이다. 따라서, 예를 들어, "이중특이적" 항체는 제1 항원에 대한 적어도 하나의 단일 도메인 항체 및 예를 들어, 상기 제1 항원과 상이한 제2 항원에 대한 적어도 하나의 추가적인 단일 도메인 항체를 포함하는 것이다.
- [0058] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항체는 단클론 항체, 예를 들어, 쥐 단클론성 항체이다. 단클론성 항체를 생산하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Pluckthun (1994) The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer- Verlag, New York, pp. 269-315]을 참조한다.
- [0059] "Fab 단편"은 하나의 경쇄 및 하나의 중쇄의 CH1 및 가변 영역을 포함한다. Fab 분자의 중쇄는 다른 중쇄 분자와 디설파이드 결합을 형성할 수 없다.
- [0060] "Fc" 영역은 항체의 CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 2개의 중쇄 단편을 함유한다. 2개의 중쇄 단편은 2개 이상의 디설파이드 결합에 의해, 그리고 CH3 도메인의 소수성 상호작용에 의해 결합된다.
- [0061] "Fab' 단편"은 하나의 경쇄 및 VH 도메인 및 CH1 도메인 및 또한 CH1과 CH2 도메인 사이의 영역을 함유하는 하나의 중쇄의 일부를 함유하여, 사슬간 디설파이드 결합이 2개의 Fab' 단편의 2개의 중쇄 사이에 형성되어, F(ab')₂ 분자를 형성할 수 있게 한다.
- [0062] "F(ab')₂ 단편"은 2개의 경쇄 및 C_H1 및 C_H² 도메인 사이의 불변 영역의 일부를 함유하는 2개의 중쇄를 함유하여, 사슬간 디설파이드 결합이 2개의 중쇄 사이에 형성되게 한다. 이에 따라, F(ab')₂ 단편은 2개의 중쇄 사이의 디설파이드 결합에 의해 결합된 2개의 Fab' 단편으로 이루어진다.
- [0063] "Fv 영역"은 중쇄 및 경쇄 둘 다로부터의 가변 영역을 포함하지만, 불변 영역이 결여된다.
- [0064] 특정 실시형태에서, 상기 표적-결합 분자는 단일쇄 Fv 항체 ("scFv 항체")이다. scFv는 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하는 항체 단편을 지칭하며, 여기서 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 사슬에 존재한다. 일반적으로, Fv 폴리펩티드는 VH 및 VL 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 추가로 포함하며, 이는 scFv가 항원 결합을 위해 목적하는 구조를 형성하게 한다. scFv의 검사를 위하여, 문헌[Pluckthun (1994) The Pharmacology Of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer- Verlag, New York, pp. 269-315]을 참조한다. 또한, PCT 공보 제WO 88/01649호 및 미국 특허 제4,946,778호 및 제5,260,203호를 참조한다.
- [0065] 용어 "서열 동일성"은 2개의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열이 예를 들어, 디폴트 갭 가중치를 사용하여 프로그램 GAP 또는 BESTFIT에 의해 최적으로 정렬되는 경우 적어도, 예를 들어, 70%의 서열 동일성, 또는 적어도 80%의 서열 동일성, 또는 적어도 85%의 서열 동일성, 또는 적어도 90%의 서열 동일성, 또는 적어도 90% 이상의 서열 동일성을 공유하는 것을 의미한다. 서열 비교의 경우, 전형적으로 하나의 서열이 시험 서열이 비교되는 참조 서열(예를 들어, 모서열)로 작용한다. 서열 비교 알고리즘을 사용하는 경우, 시험 및 참조 서열을 컴퓨터에 입력하고, 필요에 따라 하위서열 좌표를 지정하고, 서열 알고리즘 프로그램 파라미터를 지정한다. 그 다음, 서열 비교 알고리즘은 지정된 프로그램 파라미터에 기초하여, 참조 서열에 대비한 시험 서열(들)의 서열 동일성 백분율을 계산한다.
- [0066] 비교를 위한 서열의 최적의 정렬은, 예를 들어, 문헌[Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)]의 국소 상동성 알고리즘에 의해, 문헌[Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)]의 상동성 정렬 알고리즘에 의해, 문헌[Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)]의 유사성에 대한 검색 방법에 의해, 이들 알고리즘의 컴퓨터화된 구현(위스콘신주 매디슨 사이언스 드라이브 575에 소재한 Genetics Computer Group의 Wisconsin Genetics Software Package의 GAP, BESTFIT, FASTA 및 TFASTA)에 의해, 또는 육안 검사(일반적으로 문헌[Ausubel et al, Current Protocols in Molecular Biology] 참조)에 의해 수행될 수 있다. 서열 동일성 및 서열 유사성 백분율을 측정하기에 적합한 알고리즘의 일례는 BLAST 알고리즘이며, 이는 문헌[Altschul et al, J. Mol. Biol. 215:403 (1990)]에 기술되어 있다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는

미국 국립생물공학정보센터(National Center for Biotechnology Information)를 통해 공개적으로 입수 가능하다(미국 국립보건원 NCBI 인터넷 서버를 통해 공개적으로 접근가능함). 전형적으로 디폴트 프로그램 파라미터를 사용하여 서열 비교를 수행할 수 있지만, 맞춤 파라미터도 또한 사용할 수 있다. 아미노산 서열의 경우, BLASTP 프로그램은 디폴트로서 3의 워드 길이(W), 10의 기대값(E) 및 BLOSUM62 점수화 매트릭스(문헌[Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 (1989)] 참조)를 사용한다.

[0067] 본 명세서에 사용된 바와 같이, PEBL 유전자의 맥락에서 "작동 가능하게 연결된"은 하나 이상의 국소화 도메인을 암호화하는 하나 이상의 유전자에 인접한 프레임 내에서(예를 들어, 링커 없이) 직접적으로 표적-결합 분자를 암호화하는 유전자를 지칭한다. 대안적으로, 표적-결합 분자를 암호화하는 유전자는 본 명세서에 기술된 바와 같이 링커 서열을 통하여 하나 이상의 국소화 도메인을 암호화하는 하나 이상의 유전자에 연결될 수 있다.

[0068] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 단백질의 맥락에서 "연결된"은 제1 도메인, 예를 들어 표적-결합 분자를 제2 도메인, 예를 들어 국소화 도메인에 연결시키는 것을 지칭한다. 링커는 아미노산 서열일 수 있다. 당업계에 공지된 다양한 적합한 링커를 사용하여 상기 표적-결합 분자를 국소화 도메인에 연결할 수 있다. 예를 들어, 비-자연 발생 펩티드, 예를 들어, 다양한 길이의 친수성 잔기로 이루어진 폴리펩티드 또는 (GGGGS)_n(서열번호 35) 폴리펩티드(여기서 n은 예를 들어 3 내지 12(경계값 포함)의 정수임)가 본 발명에 따라 사용될 수 있다.

[0069] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "치료하다", "치료하는" 또는 "치료"는, 임상적으로 허용 가능한 표준에 따라 의학적 병태가 개선되는 정도까지 의학적 병태(예를 들어, T 세포 악성 종양과 관련된 병태)에 대응하는 것을 지칭한다.

[0070] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "대상체"는 포유동물(예를 들어, 인간, 비인간 영장류, 소, 양, 염소, 말, 개, 고양이, 토끼, 기니피그, 래트, 마우스)을 지칭한다. 특정 실시형태에서, 대상체는 인간이다. "이를 필요로 하는 대상체"는 T 세포가 악성 T 세포에 대해 특이적인 세포독성을 발휘하도록 유도함으로써 치료(예를 들어, 개선, 예방)될 수 있는 질환 또는 병태에 걸려 있거나 걸릴 위험이 있는 대상체(예를 들어, 환자)를 지칭한다.

[0071] 본 명세서에 정의된 "치료량"은 대상체에게 투여되는 경우, 투여 조건 하에서 대상체에서 목적하는 치료 효과(T 세포 악성 종양과 관련된 병태 치료)를 달성하기에 충분한 양을 지칭한다. 투여될 작용제의 유효량은 본 명세서에 제공된 지침 및 당업계에 공지된 다른 방법을 사용하여 통상의 지식을 갖는 임상의로 인해 결정될 수 있으며, 예를 들어 선택된 특정 제제, 대상체의 연령, 민감성, 약물에 대한 내성 및 전반적인 복지를 포함한 여러 가지 요인에 의해 결정된다.

[0072] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "향상된 치료 효능"은 숙주에서의 감소된 이식편-대-숙주병(GvHD), 숙주에 의한 거부의 감소 또는 제거, 숙주에서의 생존 연장, 숙주에서의 종양에 의한 억제 감소, 숙주에서의 자가-살해 감소, 숙주에서의 염증성 캐스케이드의 감소 또는 숙주에서의 CAR-매개된 신호전달의 지속 중 하나 이상을 지칭한다.

[0073] III. 단백질 발현 차단제(PEBL)

[0074] 본 명세서에 기재된 방법은 면역 세포에서 특정 표적 단백질, 예컨대, CD2의 신속한 제거 또는 불활성화를 가능하게 한다. 상기 방법은, 제거되거나 중화된 표적(예를 들어, 단백질)에 결합하는 표적-결합 분자를 함유하는 폴리펩티드 작제물에 부분적으로 의존한다. 표적-결합 분자는, 응용 분야에 따라 폴리펩티드를 특정 세포 구획, 예를 들어 골지, 소포체(ER), 프로테아좀 또는 세포막으로 안내하는 도메인(예를 들어, 국소화 도메인 또는 세포내 보유 도메인)에 연결된다. 간략화를 위해, 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 분자는 본 명세서에서 때때로 "단백질 발현 차단제"또는 "PEBL"로 지칭된다. 일부 실시형태에서, PEBL은 또한 신호 펩티드 도메인을 포함한다. 추가의 다른 실시형태에서, PEBL은 막관통 도메인을 함유하거나 또는 세포 국소화 도메인은 막관통 도메인을 포함한다.

[0075] PEBL의 예시적인 실시형태는 도 6에 제시되며, 예시적인 아미노산 및 핵산 서열은 표 1에 제공된다.

표 1

표 1. PEBL, CAR 및 이들의 성분의 서열

명칭	서열번호	서열
9-1 PEBL I	서열번호 1	MALPVTALLLPLALLLHAARPIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSSIS DYLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSSISGIPSRFSGSGSGSDFTLSINSVEP EDVGVIYCCQNGHSFPLTFGAGTKLELRGGGGSGGGSGGGGSQVQLQQP GTSLVLRPGSSVKLSCKASGYTFSTYWNWVKQRPDQGLEWIGRIDPYDSE THYNQKFTDKAISTIDTSSNTAYMQLSTLTSDASAVYYCSRSPRDSSTNL ADWGQGTILVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGSAEKDEL
9-1 PEBL II	서열번호 2	MALPVTALLLPLALLLHAARPIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSSIS DYLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSSISGIPSRFSGSGSGSDFTLSINSVEP EDVGVIYCCQNGHSFPLTFGAGTKLELRGGGGSGGGSGGGGSQVQLQQP GTSLVLRPGSSVKLSCKASGYTFSTYWNWVKQRPDQGLEWIGRIDPYDSE THYNQKFTDKAISTIDTSSNTAYMQLSTLTSDASAVYYCSRSPRDSSTNL ADWGQGTILVTVSSKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYKYKSRRSFIEEKMP
9.6 PEBL I	서열번호 3	MALPVTALLLPLALLLHAARPNIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMTCKSSQSV LYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVDPDRFTGSGSGTDFTL TISVQPEDLAVYYCHQYLSSTFGGGTKLEIKRGGGGSGGGSGGGGSQ LQQPGAELVRPGSSVKLSCKASGYTFTRYWIHWVKQRPIQGLEWIGNIDP SDSETHYNQKFKDKATLTVDKSSGTAYMQLSSLTSEDSAVYYCATEDLYY AMEYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGSAEKDEL
9.6 PEBL II	서열번호 4	MALPVTALLLPLALLLHAARPNIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMTCKSSQSV LYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVDPDRFTGSGSGTDFTL TISVQPEDLAVYYCHQYLSSTFGGGTKLEIKRGGGGSGGGSGGGGSQ LQQPGAELVRPGSSVKLSCKASGYTFTRYWIHWVKQRPIQGLEWIGNIDP SDSETHYNQKFKDKATLTVDKSSGTAYMQLSSLTSEDSAVYYCATEDLYY AMEYWGQGTSTVTVSSKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYKYKSRRSFIEEKMP
9.6 항-CD2 CAR	서열번호 5	MALPVTALLLPLALLLHAARPNIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMTCKSSQSV LYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVDPDRFTGSGSGTDFTL TISVQPEDLAVYYCHQYLSSTFGGGTKLEIKRGGGGSGGGSGGGGSQ LQQPGAELVRPGSSVKLSCKASGYTFTRYWIHWVKQRPIQGLEWIGNIDP SDSETHYNQKFKDKATLTVDKSSGTAYMQLSSLTSEDSAVYYCATEDLYY AMEYWGQGTSTVTVSSSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL NLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0076]

9-1 PEBL I	서열번호 6	GAATTCGGCTTCCACCATGGCTCTGCCCCTGACCGCCCTGCTGCTGCCTC TGGCTCTGCTGCTGCACGCTGCCCGCCCAATCGTGATGACCCAGAGCCCA GCCACCCGTGTCCTGACACCTGGCGACCGGGTGTCTCTGAGCTGCAGAGC CTCCAGTCTATCAGCGATTACCTGCACTGGTATCAGCAGAAGTCCACAG AGTCTCCCCGGCTGCTGATCAAGTACGCTAGCCAGTCTATCAGCGGCATC CCTAGCCGGTTCTCCGGATCTGGAAGCGGATCCGACTTTACCCTGAGCAT CAACTCCGTGGAGCCAGAGGATGTGGGCGTGTACTATTGCCAGAATGGCC ACTCCTTCCCCCTGACCTTTGGCGCCGGCACAAGCTGGAGCTGCGGAGA GGCGGCGGGCGGCTCTGGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGCTCCCAGGT GCAGCTGCAGCAGCCAGGAACAGAGCTGGTGCGGCCCGGCAGCTCCGTGA AGCTGTCCCTGTAAGGCCTCTGGCTACACCTTCACAAGCTATTGGGTGAAC TGGGTGAAGCAGAGGCCTGACCAGGGCCTGGAGTGGATCGGAAGGATCGA CCCATACGATTCTGAGACACACTATAACCAGAAGTTTACAGACAAGGCCA TCAGCACCATCGATACATCTAGCAATACCGCCTATATGCAGCTGTCCACC CTGACATCTGATGCCAGCGCCGTGTACTATTGTCTAGGAGCCCTCGCGA CTCCTCTACAAATCTGGCAGATTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACAGTGA GCTCCGGTGGTGGCGGCAGTGGTGGCGGTGGCTCAGGCGGTGGTGGCTCC GGTGGCGGTGGCTCTGCAGAAAAAGATGAGTTGTAACTCGAG
9-1 PEBL II	서열번호 7	GAATTCGGCTTCCACCATGGCTCTGCCCCTGACCGCCCTGCTGCTGCCTC TGGCTCTGCTGCTGCACGCTGCCCGCCCAATCGTGATGACCCAGAGCCCA GCCACCCGTGTCCTGACACCTGGCGACCGGGTGTCTCTGAGCTGCAGAGC CTCCAGTCTATCAGCGATTACCTGCACTGGTATCAGCAGAAGTCCACAG AGTCTCCCCGGCTGCTGATCAAGTACGCTAGCCAGTCTATCAGCGGCATC CCTAGCCGGTTCTCCGGATCTGGAAGCGGATCCGACTTTACCCTGAGCAT CAACTCCGTGGAGCCAGAGGATGTGGGCGTGTACTATTGCCAGAATGGCC ACTCCTTCCCCCTGACCTTTGGCGCCGGCACAAGCTGGAGCTGCGGAGA GGCGGCGGGCGGCTCTGGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGCTCCCAGGT GCAGCTGCAGCAGCCAGGAACAGAGCTGGTGCGGCCCGGCAGCTCCGTGA AGCTGTCCCTGTAAGGCCTCTGGCTACACCTTCACAAGCTATTGGGTGAAC TGGGTGAAGCAGAGGCCTGACCAGGGCCTGGAGTGGATCGGAAGGATCGA CCCATACGATTCTGAGACACACTATAACCAGAAGTTTACAGACAAGGCCA TCAGCACCATCGATACATCTAGCAATACCGCCTATATGCAGCTGTCCACC CTGACATCTGATGCCAGCGCCGTGTACTATTGTCTAGGAGCCCTCGCGA CTCCTCTACAAATCTGGCAGATTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACAGTGA GCTCCAAGCCAACCACAACCCCTGCACCAAGGCCACCTACACCAGCACCT ACCATCGCAAGCCAGCCACTGTCCCTGAGGCCAGAGGCATGTAGGCCTGC AGCAGGAGGCGCCGTGCACACACGCGGCCTGGACTTTGCCTGCGATATCT ACATCTGGGCACCACTGGCAGGAACCTGTGGCGTGCTGCTGCTGAGCCTG GTGATTACCCTGTATAAGTACAAGTCCAGACGCTCATTCATTGAGGAAAA GAAAATGCCTTAACTCGAG

[0077]

9.6 PEBL I	서열번호 8	GAATTCGGCTTCCACCATGGCTCTGCCCCTGACCGCCCTGCTGCTGCCTC TGGCTCTGCTGCTGCACGCTGCCCCGCCAAACATCATGATGACCCAGTCC CCCAGCTCCCTGGCCGTGTCTGCCGGAGAGAAGGTGACCATGACATGCAA GTCTAGCCAGTCCGTGCTGTACTCCTCTAACCAGAAGAATTACCTGGCCT GGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCTAAGCTGCTGATCTATTGGGCA AGCACCCGGGAGTCCGGAGTGCCAGACAGATTACCCGAAGCGGATCCGG AACAGACTTCACCCTGACAATCAGCTCCGTGCAGCCTGAGGACCTGGCCG TGTAATATTGCCACCACTACCTGTCTAGCCACACCTTCGGCGGCGGCACA AAGCTGGAGATCAAGAGGGGAGGAGGAGGATCCGGAGGAGGAGGCTCTGG CGGCGGCGGCAGCCAGCTGCAGCAGCCAGGAGCAGAGCTGGTGAGGCCCC GCTCCTCTGTGAAGCTGTCTTGTAAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACAAGG TATTGGATCCACTGGGTGAAGCAGCGCCCTATCCAGGGCCTGGAGTGGAT CGGCAACATCGACCCATCTGATAGCGAGACACACTACAATCAGAAGTTTA AGGACAAGGCCACCTGACAGTGGATAAAGAGCTCCGGCACCGCCTATATG CAGCTGTCTAGCCTGACATCCGAGGACTCTGCCGTGTACTATTGTGCCAC AGAGGATCTGTACTATGCCATGGAGTACTGGGGCCAGGGCACCTCCGTGA CAGTGTCTCTGGTGGTGGCGGAGTGGTGGCGGTGGCTCAGGCGGTGGT GGCTCCGGTGGCGGTGGCTCTGCAGAAAAGATGAGTTGTAACCTCGAG
9.6 PEBL II	서열번호 9	GAATTCGGCTTCCACCATGGCTCTGCCCCTGACCGCCCTGCTGCTGCCTC TGGCTCTGCTGCTGCACGCTGCCCCGCCAAACATCATGATGACCCAGTCC CCCAGCTCCCTGGCCGTGTCTGCCGGAGAGAAGGTGACCATGACATGCAA GTCTAGCCAGTCCGTGCTGTACTCCTCTAACCAGAAGAATTACCTGGCCT GGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCTAAGCTGCTGATCTATTGGGCA AGCACCCGGGAGTCCGGAGTGCCAGACAGATTACCCGAAGCGGATCCGG AACAGACTTCACCCTGACAATCAGCTCCGTGCAGCCTGAGGACCTGGCCG TGTAATATTGCCACCACTACCTGTCTAGCCACACCTTCGGCGGCGGCACA AAGCTGGAGATCAAGAGGGGAGGAGGAGGATCCGGAGGAGGAGGCTCTGG CGGCGGCGGCAGCCAGCTGCAGCAGCCAGGAGCAGAGCTGGTGAGGCCCC GCTCCTCTGTGAAGCTGTCTTGTAAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACAAGG TATTGGATCCACTGGGTGAAGCAGCGCCCTATCCAGGGCCTGGAGTGGAT CGGCAACATCGACCCATCTGATAGCGAGACACACTACAATCAGAAGTTTA AGGACAAGGCCACCTGACAGTGGATAAAGAGCTCCGGCACCGCCTATATG CAGCTGTCTAGCCTGACATCCGAGGACTCTGCCGTGTACTATTGTGCCAC AGAGGATCTGTACTATGCCATGGAGTACTGGGGCCAGGGCACCTCCGTGA CAGTGTCTCTAAGCCAACCACAACCCCTGCACCAAGGCCACCTACACCA GCACCTACCATCGCAAGCCAGCCACTGTCCCTGAGGCCAGAGGCATGTAG GCCTGCAGCAGGAGGCGCCGTGCACACACGCGGCTGGACTTTGCCTGCG ATATCTACATCTGGGCACCACTGGCAGGAACCTGTGGCGTGTCTGCTGCTG AGCCTGGTGATTACCCTGTATAAGTACAAGTCCAGACGCTCATTTCATTGA GGAAAAGAAAATGCCTTAACCTCGAG

[0078]

9.6 항-CD2 CAR	서열번호 10	GAATTCGGCTTCCACCATGGCTCTGCCCGTGACCGCCCTGCTGCTGCCTC TGGCTCTGCTGCTGCACGCTGCCCGCCAAACATCATGATGACCCAGTCC CCCAGCTCCCTGGCCGTGTCTGCCGGAGAGAAGGTGACCATGACATGCAA GTCTAGCCAGTCCGTGCTGTACTCCTCTAACCAGAAGAATTACCTGGCCT GGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCTAAGCTGCTGATCTATTGGGCA AGCACCCGGGAGTCCGGAGTGCCAGACAGATTACCCGAAGCGGATCCGG AACAGACTTCACCTGACAATCAGCTCCGTGCAGCCTGAGGACCTGGCCG TGCTACTATTGCCACCACTACCTGTCTAGCCACACCTTCGGCGGGCCACA AAGCTGGAGATCAAGAGGGGAGGAGGAGGATCCGGAGGAGGAGGCTTGG CGGCGGGCGCAGCCAGCTGCAGCAGCCAGGAGCAGAGCTGGTGAGGCCCG GCTCCTCTGTGAAGCTGTCTTGTAAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACAAGG TATTGGATCCACTGGGTGAAGCAGCGCCCTATCCAGGGCCTGGAGTCCGTG CGGCAACATCGACCCATCTGATAGCGAGACACACTACAATCAGAAGTTTA AGGACAAGGCCACCTGACAGTGGATAAGAGCTCCGGCACCGCCTATATG CAGCTGTCTAGCCTGACATCCGAGGACTCTGCCGTGTACTATTGTGCCAC AGAGGATCTGTACTATGCCATGGAGTACTGGGGCCAGGGCACCTCCGTGA CAGTGTCTCTACCACTACACCTGCACCAAGGCTCCACACCCGCTCCC ACTATCGCTTCCAGCCACTGTCCCTGAGGCCCGAGGCTGCAGGCCAGC AGCTGGCGGAGCCGTGCATACTAGGGGGCTGGACTTCGCTTGCAGACATCT ACATCTGGGCCCCACTGGCAGGACATGCGGAGTCTTGTGCTGTCCGTG GTCATCACACTGTACTGCAAGCGGGGGCGCAAAAACTGCTGTATATCTT TAAGCAGCCTTTTCATGAGACAGTGACAGACAACCCAGGAGGAAGATGGGT GCTCATGCCGGTTTCCCGAGGAGGAGGAAGCGGGCTGCGAGCTGAGGGTG AAGTTTCCCGCTCAGCAGATGCTCCTGCTTACCAGCAGGGCCAGAACCA GCTGTATAATGAGCTGAACCTGGGCAGACGCGAAGAGTATGATGTGCTGG ACAAAAGCGGGGGAAGAGACCCGAAATGGGAGGGAAGCCAAAGCGGAAA AACCCCCAGGAGGGCTGTACAATGAGCTGCAGAAGGACAAAATGGCAGA GGCTTACAGTGAGATTGGGATGAAGGGAGAGACGGAGGGGAAAAGGGC ACGATGGCCTGTACCAGGGGCTGAGCACAGCAACCAAGATACCTTATGAC GCACTGCACATGACGGCACTGCCACCCAGATGACAGCCAGGGGATTTCAC CACTCAAAGGCCAGACCTGCAGACGCCAGATTATGAGACACACTCGAG
CD8 신호 펩티드	서열번호 11	MALPVTALLPLALLLHAARP
VL-VH 링커	서열번호 12	GGGSGGGSGGGSGS
ER-보유 도메인	서열번호 13	GGGSGGGSGGGSGGGSGGSAEKDEL
ER-보유 도메인	서열번호 14	LYKYKSRRSFIEEKMP
CD8α 힌지 및 막관통 도메인	서열번호 15	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLLLSLITLY
4-1BB 세포내 신호전달 도메인	서열번호 16	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCEL
CD3ζ 세포내 신호전달 도메인	서열번호 17	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR
항-CD2 VH(9-1)	서열번호 18	QVQLQQPGTELVRPGSSVKLSCKASGYTFTSYWNWVKQRPDQGLEWIGR IDPYDSETHYNQKFTDKAISTIDTSSNTAYMQLSTLTSASAVYYCSRSP RDSSTNLADWGQGLTVTVSS
항-CD2 VL(9-1)	서열번호 19	IVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSIQSYLHWYQQKSHESPRLLIKYA SQSISGIPSRFSGSGSGDFTLSINSVEPEDVGYYCQNGHSFPLTFGAG TKLELRR

항-CD2 VH(9.6)	서열번호 20	QLQQPGAELVRPGSSVKLSCKASGYTFTRYWIHWVKQRPIQGLEWIGNID PSDSETHYNQKFKDKATLTVDKSSGTAYMQLSSLTSEDSAVYYCATEDLY YAMEYWGQTSVTVSS
항-CD2 VL(9.6)	서열번호 21	NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMTCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSP KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAVYYCHQYLSS HTFGGGTKLEIKR
항-CD2 scFv(9-1)	서열번호 22	IVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSIQSYLHWYQQKSHESPRLLIKYA SQSISGIPSRFSGSGSGDFTLSINSVEPEDVGYYCQNGHSFPLTFGAG TKLELRRGGGSGGGSGGGSGVQLQQPGTELVRPGSSVKLSCKASGYT FTSYWNWVKQRPDQGLEWIGRIDPYDSETHYNQKFTDKAISTIDTSSNT AYMQLSTLTSASAVYYCSRSPRDSSTNLADWGQGLTVTVSS
항-CD2 scFv(9)	서열번호 23	NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMTCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSP KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAVYYCHQYLSS HTFGGGTKLEIKRGGGSGGGSGGGSGVQLQQPGAELVRPGSSVKLSCKA SGYTFTRYWIHWVKQRPIQGLEWIGNIDPSDSETHYNQKFKDKATLTVDK SSGTAYMQLSSLTSEDSAVYYCATEDLYYAMEYWGQTSVTVSS

활성화된 면역 세포에 의한 사이토카인의 분비는 사이토카인 방출 증후군 및 대식세포 활성화 증후군을 유발하
여 면역 세포 요법의 심각한 부작용을 일으키는 것으로 밝혀져 있다(문헌[Lee et al., Blood, 2014,124(2):
188-195]).

일부 실시형태에서, PEBL의 표적-결합 분자는 CD 단백질, 예를 들어, 인간 CD2에 특이적으로 결합하는

분자이다. 일부 경우에, 표적-결합 분자는 항-CD2 항체 또는 CD2에 결합하는 항원-결합 단편이다.

- [0083] T 세포 상에서 발현되는 리간드(예를 들어, 펩티드 또는 항원)에 결합시 면역 반응을 활성화 또는 비활성화할 수 있는 모든 이러한 적합한 결합 분자는 총괄적으로 "표적-결합 분자"로 지칭된다. 당업자에게 이해되는 바와 같이, 표적-결합 분자는 항체 또는 항원-결합 단편(예를 들어, scFv)을 함유할 필요는 없으며; 오히려, 표적 분자에 결합하는 표적-결합 분자의 부분은 예를 들어 수용체-리간드 쌍의 수용체, 또는 수용체-리간드 쌍의 리간드로부터 유래할 수 있다.
- [0084] 본 명세서에 기재된 PEBL의 표적 결합 분자는 CD2에 결합하는 항체로부터 유래될 수 있다. 일부 실시형태에서, CD2에 결합하는 항체는 항-CD2 단클론성 항체 단클론성 항체 9.6 또는 이의 변이체이다. 일부 실시형태에서, CD2에 결합하는 항체는 항-CD2 단클론성 항체 9.6의 인간화된 변이체이다. 다른 실시형태에서, CD2에 결합하는 항체는 항-CD2 단클론성 항체 9-1이다. 일부 실시형태에서, CD2에 결합하는 항체는 항-CD2 단클론성 항체 9-1의 인간화된 변이체이다.
- [0085] 9.6 및 9-1의 상세한 설명은 각각 예를 들어, 문헌[Kamoun et al. J Exp Med, 1981, 153:207-212 및 Bernard et al., in *Leukocyte Typing II*, 1986, eds. Reinherz, E.L., Haynes, B.F., Nadler, L.M., & Bernstein, I.D. (Springer, New York), pp. 53-66]에서 찾아볼 수 있다.
- [0086] 인간화된 항체는 표적 항원(예를 들어, 인간 CD2)에 결합할 수 있고, 실질적으로 인간 면역글로불린의 아미노산 서열을 갖는 프레임워크(framework: FR) 및 실질적으로 비-인간 면역글로불린의 아미노산 서열을 갖는 CDR을 포함하는 면역글로불린 아미노산 서열 변이체 또는 이의 단편을 지칭한다. 따라서, 인간화된 항체 9-1은 CD2에 결합할 수 있고, 인간 면역글로불린의 아미노산 서열을 갖는 FR 영역 및 실질적으로 무린 항체 9-1의 아미노산 서열을 갖는 CDR을 포함한다. 마찬가지로, 인간화된 항체 9.6은 CD2에 결합할 수 있고, 인간 면역글로불린의 아미노산 서열을 갖는 FR 영역 및 실질적으로 무린 항체 9.6의 아미노산 서열을 갖는 CDR을 포함한다.
- [0087] 일반적으로, 인간화된 항체는 적어도 1개, 전형적으로 2개의 가변 도메인(Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, Fv) 중 실질적으로 전부를 포함하고, 여기서 CDR 영역 중 전부 또는 실질적으로 전부는 비-인간 면역글로불린의 것에 상응하고, FR 영역 중 전부 또는 실질적으로 전부는 인간 면역글로불린 공통(consensus) 서열의 것이다. 인간화 항체는 또한 최적으로 면역글로불린의 불변 영역(Fc)의 적어도 일부, 전형적으로 인간 면역글로불린의 일부를 포함할 것이다. 보통, 항체는 경쇄뿐만 아니라 적어도 중쇄의 가변 도메인을 함유할 것이다. 항체는 또한 중쇄의 CH1, 힌지, CH2, CH3 및 CH4 영역을 포함할 수 있다.
- [0088] 인간화된 항체는 IgM, IgG, IgD, IgA 및 IgE를 비롯한 면역글로불린의 임의의 클래스 및 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 비롯한 임의의 아이소타입으로부터 선택될 수 있다. 보통 불변 도메인은, 인간화된 항체가 세포독성 활성을 나타내고, 클래스가 전형적으로 IgG1인 것이 바람직한 경우 상보체 고정 불변 도메인이다. 이러한 세포독성 활성이 바람직하지 않은 경우, 불변 도메인은 IgG2 클래스를 가질 수 있다. 인간화된 항체는 하나를 초과하는 클래스 또는 아이소타입으로부터의 서열을 포함할 수 있고, 목적하는 효과기 기능을 최적화시키도록 특정 불변 도메인을 선택하는 것은 당업계에 기술에 속한다.
- [0089] 인간화된 항체의 FR 및 CDR 영역은 모체 서열에 정확하게 상응하지 않고, 예를 들어, 임포트 CDR 또는 공통 FR은 그 부위에서의 CDR 또는 FR 잔기가 공통 또는 임포트 항체에 상응하지 않도록 적어도 하나의 잔기의 치환, 삽입 또는 결실에 의해서 변이유발될 수 있다. 그러나, 이러한 돌연변이는 광범위하지 않을 것이다. 보통, 인간화된 항체 잔기 중 적어도 75%, 보다 자주는 90%, 가장 바람직하게는 95 초과는 모체 FR 서열 및 CDR 서열의 것에 상응할 것이다.
- [0090] 일반적으로, 인간화된 항체는 모체 서열 및 인간화된 서열의 3차원 모델을 사용한 모체 서열 및 다양한 개념의 인간화된 생성물의 분석 과정에 의해서 생산된다. 3차원 면역글로불린 모델은 일반적으로 입수 가능하고, 당업자에게 익숙하다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 개연성 있는 3차원 입체배와 구조를 예시하고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램이 입수 가능하다. 이러한 디스플레이의 검사는 후보 면역글로불린 서열의 기능에 있어서 잔기의 가능한 역할의 분석, 즉, 항원에 결합하는 후보 면역 글로불린의 능력에 영향을 미치는 잔기의 분석을 허용한다.
- [0091] 항원 결합(예를 들어, CD2 결합)에 영향을 미치는 잔기는 긍정적인 의미 또는 부정적인 의미에서 후보 면역 글로불린의 항원 친화성 또는 항원 특이성을 실질적으로 담당하는 잔기로 정의된다. 일부 경우, 목적하는 면역글로불린 특성을 얻기 위해 공통 및 임포트 서열로부터의 FR 잔기의 선택 및 조합을 수행한다. 이러한 목적하는 특성은 표적 항원에 대한 친화성 증가 및 더 큰 특이성을 포함하지만, 일부 상황에서 반대 효과가 바람직할 수

있는 것이 가능하다. 일반적으로, CDR 잔기는 영향을 미치는 항원 결합에 직접적이고 가장 실질적으로 관여한다 (모든 CDR 잔기가 그렇게 관여하는 것은 아니므로 공통 서열로 대체될 필요는 없다). 그러나, FR 잔기는 또한 중요한 효과를 갖고, 적어도 세 가지 방식으로 이의 영향을 발휘할 수 있다: 이들은 항원에 비공유적으로 직접 결합할 수 있고, CDR 잔기와 상호 작용할 수 있으며, 중쇄와 경쇄 사이의 계면에 영향을 미칠 수 있다.

[0092] 전형적으로, 이웃하는 CDR의 공간적 위치와 표적 항원의 크기 및 구조로부터 항원의 위치에 책임이 있을 필요가 있다. 일반적으로, 염 브리지, 수소 결합 또는 소수성 상호작용을 형성할 수 있는 인간화된 항체 잔기 만 비공유 항원 결합에 관여할 가능성이 있지만, 항원과 공간적으로 3.2 옹스트롬 이하로 분리된 원자를 갖는 잔기 또한 항원과 비공유적으로 상호작용할 수 있다. 이러한 잔기는 전형적으로 티로신, 아르기닌 및 라이신과 같이 가장 큰 부피를 갖는 측쇄를 갖는 비교적 큰 아미노산이다. 다시 3차원 모델링으로 시각화되는 경우, 항원-결합 FR 잔기는 또한 전형적으로 CDR 도메인으로부터 용매로 약 7 옹스트롬 및 CDR 도메인의 양측에서 약 7 옹스트롬으로 연장되는 CDR의 용매 배향면을 둘러싸는 엔벨로프(envelope)로 배향된 측쇄를 가질 것이다.

[0093] CDR과 상호작용하는 잔기는 일반적으로 CDR 폴리펩티드 골격의 입체배치에 영향을 미치거나 CDR 잔기 측쇄와 비공유 결합을 형성하는 잔기이다. 입체배치에 영향을 미치는 잔기는 일반적으로 임의의 CDR 골격 원자의 공간 위치를 약 0.2 옹스트롬을 초과하게 변화시키는 잔기이다. CDR 서열의 골격 원자는 예를 들어, 베타 시트, 나선 또는 루프와 같은 조직화된 구조를 방해하거나 변형하는 잔기에 의해 대체된다. 이웃하는 서열의 입체배치에 중대한 영향을 미칠 수 있는 잔기는 프롤린 및 글리신을 포함하며, 이들 둘 다는 골격에 굴곡을 도입할 수 있다. 골격 원자를 대체할 수 있는 다른 잔기는 염 브리지 및 수소 결합에 참여할 수 있는 잔기이다.

[0094] CDR 측쇄와 상호작용하는 잔기는 일반적으로 염 브리지 또는 수소 결합인 CDR 측쇄와 비공유 결합을 형성할 것으로 합리적으로 예상되는 잔기이다. 이러한 잔기는 측쇄의 3차원 위치에 의해 식별된다. 염 또는 이온 브리지는 서로 반대 전하를 갖는 약 2.5 내지 3.2 옹스트롬 내에 위치한 2개의 측쇄, 예를 들어, 리시닐과 글루타미드 짝지움 사이에 형성될 것으로 예상될 수 있다. 수소 결합은 아스파틸 또는 글루타미드(또는 다른 수소 수용 잔기)와 함께 세틸 또는 트레오닐과 같은 잔기 쌍의 측쇄 사이에 형성될 것으로 예상될 수 있다. 이러한 짝지움은 단백질 화학 분야에 널리 공지되어 있고, 후보 항체의 3차원 모델링 시 당업자에게 명백할 것이다.

[0095] 주어진 치환의 정확한 영향이 무엇인지 미리 예측하는 것은 전적으로 불가능하기 때문에, 치환을 만들고, 목적하는 특성에 대해 후보 항체를 검증하는 것이 필요할 수 있다. 그러나, 이러한 단계는 그 자체로 일상적이고, 당업계의 통상의 기술 내에 있다.

[0096] CDR 잔기 및 FR 잔기는 표준 서열 정의(문헌[Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda Md. (1987)]) 및 구조 정의(문헌[Chothia and Lesk, J. Mol Biol. 196:901-917 (1987)]에서와 같음)에 따라서 결정된다. 이러한 두 방법이 CDR의 약간 다른 식별을 초래하는 경우, 구조적 정의가 선호되지만 서열 정의 방법에 의해 식별된 잔기는 어느 프레임워크 잔기가 공통 서열로 임포트될 지를 결정하기 위한 중요한 FR 잔기로 간주된다.

[0097] 일반적으로, 임포트 항체(예를 들어, 9-1 항체 또는 9.6 항체)를 인간화하는 첫 번째 단계는 임포트 서열을 혼입할 공통 아미노산 서열을 유도하는 것이다. 다음으로, 상기에 기재된 방법을 사용하여 이러한 서열에 대한 모델을 생성한다. 특정 실시형태에서, 공통 인간 서열은 Kabat 등의 서열 편집에서 가장 풍부한 서브클래스로부터 유래된다(문헌[Kabat, E. A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987)]). 이들 단계는 상이한 순서로 수행될 수 있지만, 전형적으로 전체 상응하는 인간 CDR이 제거된 후, 비인간 임포트 서열로부터의 적어도 하나의 CDR을 공통 인간 구조로 전달함으로써 후보 인간화된 항체에 대한 구조가 생성된다. 인간화된 항체는 서열 가변성에 의해 정의된 바와 같이(문헌[Kabat, E. A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987)]) 또는 구조적 가변성에 의해 정의된 바와 같이(문헌[Chothia, C. & Lesk, AM, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)]) CDR 내의 위치에서 비인간 임포트 잔기의 인간 대체물을 함유할 수 있다. 비인간 임포트 잔기와 인간 공통 프레임워크 잔기 간의 차이를 개별적으로 조사하여 CDR 입체배치 및/또는 항원에 대한 결합에 대한 가능한 영향을 결정한다. 이러한 가능한 영향에 대한 조사는 모델링을 통해서, 특정 위치에서 아미노산의 특성을 조사하여 수행하거나, 또는 특정 아미노산의 치환 또는 돌연변이생성 효과를 평가하여 실험적으로 결정하는 것이 바람직하다.

[0098] 일부 실시형태에서, 임포트 비인간 항체 및 인간 항체의 아미노산 서열을 포함하는 인간화된 항체는, (a) 임포터 항체 가변 도메인의 적어도 일부의 서열 및 공통 인간 가변 도메인의 적어도 일부의 서열을 얻는 단계; (b) 임포터 내의 상보성 결정 영역(CDR) 아미노산 서열 및 인간 가변 도메인 서열을 식별하는 단계; (c) 임포터 CDR

아미노산 서열을 상응하는 인간 CDR 아미노산 서열 대신 치환하는 단계; (d) 임포터 항체의 프레임워크 영역 (FR)의 아미노산 서열 및 공통 항체의 상응하는 FR의 아미노산을 정렬하는 단계; (e) 상응하는 공통 항체 잔기에 비상동성인 정렬된 FR 서열에서 임포터 항체 FR 잔기를 정렬하는 단계; (f) 비상동성 임포터 아미노산 잔기가 하기 효과 중 적어도 하나를 갖는 것으로 타당하게 예측되는지를 결정하는 단계: (1.) 항원에 직접 비공유적으로 결합함; (2.) CDR과 상호작용함; 또는 (3.) VL -VH 계면에 참여함; 및 (g) 이러한 효과 중 적어도 하나를 갖는다고 타당하게 예측되는 임의의 비상동성 임포터 항체 아미노산 잔기의 경우, 공통 항체 FR 서열에서 상응하는 아미노산 잔기 대신 그 잔기를 치환시키는 단계를 활용하여 제조된다.

[0099] 선택적으로, 단계 (e)에서 식별된 임의의 비-상동성 잔기가 도메인의 표면 상에 노출되어 있는지 또는 도메인 내에 묻혀있는지를 결정하고, 그러나 잔기가 단계 (f)에서 식별된 효과 중 어느 것도 갖지 않으면, 공통 잔기를 유지시킬 수 있다.

[0100] 인간화된 항체의 생성 방법의 추가 설명은 예를 들어, 내용이 전체적으로 본 명세서에 참조에 의해 포함된 미국 특허 제US6,054,297호; 제US6,407,213호; 및 제US6,719,971호에서 발견된다.

[0101] 일부 실시형태에서, PEBL의 표적 결합 분자는 서열번호 18과 적어도 90%(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%)의 서열 동일성을 갖는 VH 도메인 및 서열번호 19와 적어도 90%(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%)의 서열 동일성을 갖는 VL 도메인을 포함하는 항-CD2 단일쇄 가변 단편을 포함한다. 일부 예에서, 링커는 scFv의 VH 도메인 및 VL 도메인을 연결한다. VH-VL 링커는 (GGGG)_n(서열번호 35) 링커일 수 있고, 식 중, n은 1 내지 6의 범위, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6일 수 있다. 다른 예에서, VH-VL 링커는 임의의 GS 링커 또는 당업자에게 공지된 다른 가요성 링커일 수 있다. 일부 예에서, VH 도메인은 서열번호 18에 제시된 서열 내에 적어도 하나(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 초과)의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 경우에, VL 도메인은 서열번호 19에 제시된 서열 내에 적어도 하나(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 초과)의 아미노산 치환을 포함한다.

[0102] 일부 실시형태에서, PEBL의 표적 결합 분자는 서열번호 20과 적어도 90%(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%)의 서열 동일성을 갖는 VH 도메인 및 서열번호 21과 적어도 90%(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%)의 서열 동일성을 갖는 VL 도메인을 포함하는 항-CD2 단일쇄 가변 단편을 포함한다. 일부 예에서, 링커는 scFv의 VH 도메인 및 VL 도메인을 연결한다. VH-VL 링커는 (GGGG)_n(서열번호 35) 링커일 수 있고, 식 중, n은 1 내지 6의 범위, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6일 수 있다. 다른 예에서, VH-VL 링커는 임의의 GS 링커 또는 당업자에게 공지된 다른 가요성 링커일 수 있다.

[0103] 일부 경우에, 항-CD2 scFv는 인간 면역 세포에서 CD2에 대한 결합에 양립성인 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD2 발현이 인간 면역 세포에서 차단되거나, 감소되거나 또는 줄어들도록, VH 도메인은 서열번호 18에 제시된 서열 내에 적어도 하나(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 초과)의 아미노산 치환을 포함하고, VL 도메인은 서열번호 19에 제시된 서열 내에 적어도 하나(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 초과)의 아미노산 치환을 포함한다. 다른 실시형태에서, CD2 발현이 인간 면역 세포에서 차단되거나, 감소되거나 또는 줄어들도록, VH 도메인은 서열번호 20에 제시된 서열 내에 적어도 하나(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 초과)의 아미노산 치환을 포함하고, VL 도메인은 서열번호 21에 제시된 서열 내에 적어도 하나(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 초과)의 아미노산 치환을 포함한다.

[0104] 다양한 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 PEBL의 표적 결합 분자는 서열번호 22와 적어도 90%(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%)의 서열 동일성을 포함하는 항-CD2 scFv를 포함한다. 다양한 다른 실시형태에서, 표적 결합 분자는 서열번호 23과 적어도 90%(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%)의 서열 동일성을 포함하는 항-CD2 scFv를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD2 scFv는 서열번호 22의 변이체이고, 서열번호 22의 항-CD2 scFv와 동일한 결합 활성을 갖는다. 다른 실시형태에서, 항-CD2 scFv는 서열번호 23의 변이체이고, 서열번호 23의 항-CD2 scFv와 동일한 결합 활성을 갖는다.

[0105] 일부 실시형태에서, PEBL의 scFv는 항-CD2 항체의 가변 중쇄 서열과 적어도 90%의 서열 동일성, 적어도 91%의 서열 동일성, 적어도 92%의 서열 동일성, 적어도 93%의 서열 동일성, 적어도 94%의 서열 동일성, 적어도 95%의 서열 동일성, 적어도 96%의 서열 동일성, 적어도 97%의 서열 동일성, 적어도 98%의 서열 동일성, 적어도 99%의 서열 동일성 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 가변 중쇄 서열을 포함한다. 일부 실

시형태에서, 본 발명의 scFv는 항-CD2 항체의 가변 경쇄 서열과 적어도 90%의 서열 동일성, 적어도 91%의 서열 동일성, 적어도 92%의 서열 동일성, 적어도 93%의 서열 동일성, 적어도 94%의 서열 동일성, 적어도 95%의 서열 동일성, 적어도 96%의 서열 동일성, 적어도 97%의 서열 동일성, 적어도 98%의 서열 동일성, 적어도 99%의 서열 동일성 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 가변 경쇄 서열을 포함한다. 예를 들어, 항-CD2 항체는 당업자에 의해서 인지되는 임의의 이러한 서열일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 항-CD2 항체 또는 항-CD2 scFv는 이의 인간화된 변이체이다.

[0106] 일부 실시형태에서, PEBL의 항-CD2 scFv는 체류 T 세포 및 활성화된 T 세포에서 세포내 CD2에 결합한다. 다른 실시형태에서, 항-CD2 scFv는 활성화된 T 세포에서 세포내 CD2에 결합한다. 특정 실시형태에서, 항-CD2 scFv는 활성화된 T 세포에서 세포내 CD2에 결합하고, 체류 T 세포에서는 그렇지 않다. 특정 실시형태에서, 항-CD2 scFv는 면역 세포에서 세포내 CD2에 결합한다.

[0107] 일부 실시형태에서, PEBL의 항-CD2 scFv는 CD58의 CD2 결합을 저해하거나, 차단하거나, 방지한다. 다른 실시형태에서, 항-CD2 scFv는 CD58의 CD2 결합을 저해하거나, 차단하거나, 방지하지 않는다.

[0108] 세포 국소화 도메인은 보유 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포 국소화 도메인은 보유 신호전달 도메인 및 막관통 도메인을 포함한다. 일부 예에서, 세포 국소화 도메인은 소포체(ER) 보유 서열, 골지 보유 서열, 또는 프로테아좀 국소화 서열을 포함한다. 세포 국소화 도메인은 단백질이 세포에 의해 분비되는 것을 방지하거나 방해하는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 세포 국소화 도메인은 단백질을 세포내 구획에 보유하는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 세포 국소화 도메인은 ER 또는 골지의 막과 같은 세포막에 단백질을 보유하고 고정하는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 보유 신호전달 도메인은 KDEL 서열(서열번호 24), KKD/E 서열(서열번호 25), KKXX 서열(서열번호 26), KKMP 서열(서열번호 27), 또는 YQRL 서열(서열번호 28)을 포함할 수 있고, 여기서, X는 임의의 아미노산 서열을 나타낸다. 일부 실시형태에서, 보유 신호전달 도메인이 KKXX 또는 KKMP를 포함하는 경우, 세포 국소화 도메인은 CD8α 힌지 및 막관통 도메인, 예컨대, 비제한적으로 서열번호 15의 서열을 추가로 포함한다. 일부 경우에, CD8α 힌지 및 막관통 도메인은 서열번호 14의 ER 보유 도메인의 N-말단에 연결된다.

[0109] 일부 실시형태에서, 세포 국소화 도메인은 KDEL 서열(서열번호 24)을 포함한다. 특정 실시형태에서, 세포 국소화 도메인은 AEKDEL(서열번호 29)의 서열을 포함한다. 각종 실시형태에서, 세포 국소화 도메인은 GGGSGGGSGGGSGGGSGGSAEKDEL(서열번호 30)의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포 국소화 도메인은 KKMP 서열(서열번호 27)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포 국소화 도메인은 LYKYKRRSFIEKKMP의 서열(서열번호 31) 및 KKMP 서열(서열번호 27)을 포함한다.

[0110] 특정 실시형태에서, 세포 국소화 도메인은 목적하는 기능을 보유하는 한, 서열번호 30과 적어도 90%의 서열 동일성, 적어도 91%의 서열 동일성, 적어도 92%의 서열 동일성, 적어도 93%의 서열 동일성, 적어도 94%의 서열 동일성, 적어도 95%의 서열 동일성, 적어도 95%의 서열 동일성, 적어도 96%의 서열 동일성, 적어도 97%의 서열 동일성, 적어도 98%의 서열 동일성, 적어도 99%의 서열 동일성 또는 100%의 서열 동일성을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포 국소화 도메인은 목적하는 기능을 보유하는 한, 서열번호 31과 적어도 90%의 서열 동일성, 적어도 91%의 서열 동일성, 적어도 92%의 서열 동일성, 적어도 93%의 서열 동일성, 적어도 94%의 서열 동일성, 적어도 95%의 서열 동일성, 적어도 95%의 서열 동일성, 적어도 96%의 서열 동일성, 적어도 97%의 서열 동일성, 적어도 98%의 서열 동일성, 적어도 99%의 서열 동일성 또는 100%의 서열 동일성을 포함한다.

[0111] 일부 실시형태에서, ER 보유 서열은 KDEL, KKXX, KKMP 및 KKTN으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, 여기서, X는 임의의 아미노산일 수 있다. 일부 실시형태에서, 골지 보유 서열은 YGRL(서열번호 40), YQRL(서열번호 41), YKGL(서열번호 42) 및 YXXL(서열번호 43)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서, X는 임의의 아미노산일 수 있다.

[0112] 일부 실시형태에서, 프로테아좀 국소화는 scFv 서열을 3부분 모티프 함유 21(tripartite motif containing 21: TRIM21) 표적화 도메인 서열에 연결하고, 인간 TRIM21 E3 유비퀴틴 리가제 단백질을 암호화하는 서열을 공동발현시킴으로써 달성된다. TRIM21은 항체의 Fc 도메인에 높은 친화도로 결합하고, 유비퀴틴-프로테아좀 복합체를 동원하여 항체에 결합된 분자(예를 들어, 단백질 및 펩티드)를 분해한다. TRIM21 표적화 도메인 서열은 인간 면역글로불린 G(IgG) 불변 영역(Fc) 유전자, 예컨대, IgG1, IgG2 또는 IgG4의 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 암호화하고, scFv 및 Fc 도메인을 포함하는 융합 단백질을 형성하는 데 사용된다. 이러한 실시형태에서, 외인적으로 발현되는 TRIM21 단백질은 표적 단백질(예를 들어, CD2)에 결합된 scFv-Fc 융합 단백질에 결합하고, 분해를 위해서 복합체를 프로테아좀으로 안내한다.

- [0113] 인간 TRIM21 E3 리가제 단백질의 아미노산 서열의 상세사항은 예를 들어, NCBI Ref. 서열번호 NP_003132.2 하의 NCBI 단백질 데이터베이스에서 찾아볼 수 있다. 인간 TRIM21 E3 리가제 단백질을 암호화하는 핵산 서열의 상세사항은 예를 들어, NCBI Ref. Seq. No. NM_003141.3 하의 NCBI 단백질 데이터베이스에서 찾아볼 수 있다.
- [0114] 막관통 도메인은 CD8 α , CD8 β , 4-1BB, CD28, CD34, CD4, Fc ϵ RI γ , CD16, OX40, CD3 ζ , CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 δ , TCR α , CD32, CD64, ICOS, VEGFR2, FAS 또는 FGFR2B로부터 유래된, 막관통 도메인 또는 힌지와 막관통 도메인의 조합물을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 막관통 도메인은 CD8 α 로부터 유래된다. 특정 실시형태에서, 막관통 도메인은 CD8 α 로부터 유래된다. CD8 α 로부터 유래된 힌지 및 막관통 도메인은 ER 또는 골지 보유 신호 전달 도메인에 연결된다.
- [0115] 일부 실시형태에서, 막관통 도메인 또는 힌지와 막관통 도메인은, 목적하는 기능을 보유하는 한, 서열번호 15와 적어도 90%의 서열 동일성, 적어도 91%의 서열 동일성, 적어도 92%의 서열 동일성, 적어도 93%의 서열 동일성, 적어도 94%의 서열 동일성, 적어도 95%의 서열 동일성, 적어도 95%의 서열 동일성, 적어도 96%의 서열 동일성, 적어도 97%의 서열 동일성, 적어도 98%의 서열 동일성, 적어도 99%의 서열 동일성 또는 100%의 서열 동일성을 포함한다.
- [0116] 일부 실시형태에서, 막관통 도메인은 링커에 의해서 보유 신호전달 도메인에 연결된다. 일부 실시형태에서, scFv의 VL 도메인 및 VH 도메인은 링커에 의해서 연결된다. 막관통 도메인과 보유 신호전달 도메인 사이의 링커는 scFv의 링커의 동일한 서열이다. 일부 예에서, 막관통 도메인과 보유 신호전달 도메인 사이의 링커는 scFv의 링커와 상이한 서열을 갖는다. 링커의 비제한적인 예는 (GS)_n, (GGS)_n, (GGGS)_n(서열번호 32), (GGSG)_n(서열번호 33), (GGSGG)_n(서열번호 34) 또는 (GGGGG)_n(서열번호 35)를 포함하고, 여기서 n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다. 일부 실시형태에서, 링커는 (GGGGG)₃ (서열번호 36) 또는 (GGGGG)₄(서열번호 37)이다. 링커 길이의 변화는 활성을 유지하거나 향상시켜, 활성 연구에서 우수한 효능을 제공할 수 있다.
- [0117] 특정 실시형태에서, 상기 링커는 예를 들어, GGGGSGGGGS(서열번호 38)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 링커는 예를 들어, GGGGSGGGSGGGSGGGGS (서열번호 39)를 포함한다. 다양한 실시형태에서, 약 5 내지 약 100개 아미노산 (경계값 포함)의 길이를 갖는 펩티드 링커가 본 발명에 사용될 수 있다. 특정 실시형태에서, 약 20 내지 약 40개 아미노산 (경계값 포함)의 길이를 갖는 펩티드 링커가 본 발명에 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 적어도 5개 아미노산, 적어도 10개 아미노산, 적어도 15개 아미노산, 적어도 20개 아미노산, 적어도 25개 아미노산, 적어도 30개 아미노산, 적어도 35개 아미노산 또는 적어도 40개 아미노산의 길이를 갖는 펩티드 링커가 본 발명에 사용될 수 있다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 이러한 링커 서열 및 이러한 링커 서열의 변이체는 해당 분야에 공지되어 있다. 링커 서열을 포함하는 작제물을 설계하는 방법 및 기능을 평가하는 방법은 당업자가 용이하게 이용 가능하다.
- [0118] 특정 실시형태에서, PEBL의 신호 펩티드는 CD8 α 신호전달 펩티드로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 신호 펩티드는 서열번호 11과 적어도 90%의 서열 동일성, 적어도 91%의 서열 동일성, 적어도 92%의 서열 동일성, 적어도 93%의 서열 동일성, 적어도 94%의 서열 동일성, 적어도 95%의 서열 동일성, 적어도 96%의 서열 동일성, 적어도 97%의 서열 동일성, 적어도 98%의 서열 동일성, 적어도 99%의 서열 동일성 또는 100%의 서열 동일성을 포함한다. 신호 펩티드는 표적-결합 분자에 대해서 N-말단에 위치될 수 있다.
- [0119] 당업자가 인식할 바와 같이, 특정 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 다양한 성분(예를 들어, 신호 펩티드, scFv, 세포내 신호전달 도메인, 막관통 도메인, 링커, 국소화 도메인 및 이들의 조합)의 서열 중 임의의 것은 본 명세서에 개시된 특정 상응하는 서열과 적어도 90%의 서열 동일성, 적어도 91%의 서열 동일성, 적어도 92%의 서열 동일성, 적어도 93%의 서열 동일성, 적어도 94%의 서열 동일성, 적어도 95%의 서열 동일성, 적어도 96%의 서열 동일성, 적어도 97%의 서열 동일성, 적어도 98%의 서열 동일성, 적어도 99%의 서열 동일성, 또는 100%의 서열 동일성을 가질 수 있다.
- [0120] 본 명세서에 기재된 PEBL의 예시적인 실시형태가 표 1에 제공되어 있다.
- [0121] 일부 실시형태에서, 항-CD2 PEBL을 암호화하는 핵산 서열은 표 1에 제시된 하나 이상의 핵산 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 항-CD2 PEBL은 서열번호 6과 적어도 90%의 서열 동일성(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과)의 서열 동일성)을 갖는 뉴클레오티드 서열 또는 이의 코돈 최적화된 변이체를 포함한다. 특정 실시형태에서, 항-CD2 PEBL은 서열번호 7과 적어도 90%의 서열 동일성(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과)의 서열 동일성)을 갖는 뉴클레오티드 서열

또는 이의 코돈 최적화된 변이체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD2 PEBL은 서열번호 8과 적어도 90%의 서열 동일성(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과)의 서열 동일성)을 갖는 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 코돈 최적화된 변이체를 포함한다. 다른 실시형태에서, 항-CD2 PEBL은 서열번호 9와 적어도 90%의 서열 동일성(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과)의 서열 동일성)을 갖는 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 코돈 최적화된 변이체를 포함한다. 예를 들어, 항-CD2 PEBL을 암호화하는 핵산 서열은 인간 세포, 예를 들어, 인간 면역 세포에서 목적하는 발현 또는 활성을 얻도록 변형될 수 있다.

[0122] 임의의 표적 단백질에 대한 항체 및 이의 항체 단편을 생산하는 방법은 해당 분야에 널리 공지되어 있으며 일상적이다. 더욱이, 본 명세서에 예시된 바와 같이, 다양한 표적, 예를 들어, CD2에 대한 상업적으로 입수 가능한 항체를 사용하여, PEBL 분자를 생성할 수 있다. 본 명세서에 예시된 바와 같이, 당업계에 공지되어 있는 항체 및 그로부터 유래한 항체의 단편(예를 들어, scFv)을 본 발명에 사용할 수 있다.

[0123] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 상기 키메라 항원 수용체 및/또는 상기 PEBL 분자는 본 명세서에 개시된 표적뿐만 아니라 본 명세서에 개시된 표적의 변이체에 결합하도록 설계될 수 있다. 예로서, 키메라 항원 수용체 및/또는 PEBL 분자는 CD2 또는 이의 자연-발생 변이체 분자에 결합하도록 설계될 수 있다. 이러한 자연-발생 변이체는 상기 분자의 야생형 형태와 동일한 기능을 가질 수 있다. 다른 실시형태에서, 상기 변이체는 상기 분자의 야생형 형태에 비하여 변경된 기능을 가질 수 있다(예를 들어, 병에 걸린 상태를 부여함).

[0124] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 상기 PEBL 분자 작제물의 다양한 성분은, 조합이 기능성 PEBL 분자를 생성하는 한, 상이한 조합(예를 들어, 상이한 링커, 상이한 국소화 서열, 상이한 scFv 등을 함유함)으로 치환될 수 있다. 특정 작제물의 기능을 평가하는 방법은 본 명세서에 개시된 바와 같이, 당업자의 범주 내에 있다.

[0125] IV. 키메라 항원 수용체(CAR)

[0126] 키메라 항원 수용체(CAR)는 단일 융합 분자 내의 하나 이상의 신호전달 도메인과 회합된 표적화 모이어티로 이루어진 합성 수용체이다. 일반적으로, CAR의 결합 모이어티는 가요성 링커에 의해서 연결된 단클론성 항체의 경쇄 가변 분절을 포함하는, 단일-쇄 항체(scFv)의 항원-결합 도메인으로 이루어진다. 1세대 CAR에 대한 신호전달 도메인은 CD3제타 또는 Fc 수용체 감마 쉘의 세포질 영역으로부터 유래되었다. 1세대 CAR은 T 세포 세포독성을 성공적으로 재유도하는 것으로 나타났지만, 이것은 생체내에서 연장된 확장 및 항-종양 활성을 제공하지 못했다. CD28, OX40(CD134) 및 4-1BB(CD137)를 비롯한 공자극성 분자로부터의 신호전달 도메인은 단독으로(2세대) 또는 조합으로(3세대) 첨가되어 CAR 변형된 T 세포의 생존을 향상시키고 증식을 증가시켰다.

[0127] 단일-쇄 CAR에 더하여, 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 CAR은 다중-쇄 CAR이다. 다중-쇄 CAR 또는 다중 특이적 CAR은 상이한 표적에 동시에 결합함으로써 면역 세포 활성화 및 기능을 향상시키기 위해서, 몇몇(예를 들어, 2 또는 그 초과) 세포외 항원-(리간드)-결합 도메인을 포함한다. 일부 예에서, 세포외 항원-결합 도메인은 동일한 막관통 폴리펩티드 상에 일렬로 배치되고, 선택적으로 링커에 의해서 분리될 수 있다. 다른 예에서, 상이한 세포외 항원-결합 도메인은 다중-쇄 CAR을 구성하는 상이한 막관통 폴리펩티드 상에 배치될 수 있다. 단일-쇄 CAR과 유사하게, 다중-쇄 CAR의 신호 전달 도메인은 항원 수용체 맞물림 후에 함께 신호 전달을 개시하는 작용을 하는 Fc 수용체 또는 T 세포 수용체 공동-수용체의 세포질 서열, 뿐만 아니라 이들 서열 및 동일한 기능성 능력을 갖는 임의의 합성 서열의 임의의 유도체 또는 변이체일 수 있다.

[0128] 신호 전달 도메인은 2개의 세포질 신호전달 서열의 상이한 부류를 포함하는데, 하나는 항원-의존적 1차 활성화를 개시하는 것이고, 하나는 항원-독립적 방식으로 작용하여 2차 또는 공자극성 신호를 제공하는 것이다. 1차 세포질 신호전달 서열은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(immunoreceptor tyrosine-based activation motif: ITAM)라고 공지된 신호전달 모티프를 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 ITAM의 비제한적인 예는 비제한적인 예로서 TCR제타, FcR감마, FcR베타, FcR엡실론, CD3감마, CD3델타, CD3엡실론, CD5, CD22, CD79a, CD79b 및 CD66d로부터 유래된 것을 포함할 수 있다. 신호 전달 도메인은 또한 공자극성 신호 분자를 포함할 수 있다. 이중특이적 또는 다중특이적 CAR의 추가 설명은 내용이 전체적으로 참조에 의해 포함된 국제 특허 공개 제W02014/401198호에 기재되어 있다.

[0129] 따라서, 일 실시형태에서, 본 발명은 키메라 항원 수용체(예를 들어, CAR)를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산, 및 CD2에 결합하는 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 분자(예를 들어, PEBL)를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산을 포함하는 조작된 면역 세포에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 CD2에 결합하는 키메라 항원 수용체(예를 들어, CAR) 및 CD2에 결합하는 국소화 도메인(예를 들어, PEBL)에 연

결된 표적-결합 분자를 포함하는 조작된 면역 세포(예컨대, CAR-T 세포)에 관한 것이다. CAR-T 세포의 CD2 CAR은 또 다른 세포의 세포 표면 상의 CD2에 결합하고, CAR-T 세포의 CD2 PEBL은 CAR-T 세포의 세포내 구획에 위치한 CD2에 결합한다. 이와 같이, CD2 PEBL은 다른 CD2 결합 CAR에 의한 CAR-T 세포의 동족살해를 방지한다.

- [0130] 본 발명의 특정 양태에서, 키메라 항원 수용체(CAR)는 표적 세포의 표면 상에서 발견되는 CD2에 결합한다. 다른 실시형태에서, CAR은 또한 CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD25, CD28, CD30, CD38, CD45, CD45RA, CD45RO, CD52, CD56, CD57, CD99, CD127 또는 CD137에 결합할 수 있다.
- [0131] CAR의 CD2 결합 도메인은 CD2에 결합하는 항-CD2 항체 또는 항원-결합 단편일 수 있다. 일부 실시형태에서, CD2에 결합하는 항체는 항-CD2 단클론성 항체 단클론성 항체 9.6이다. 다른 실시형태에서, CD2에 결합하는 항체는 항-CD2 단클론성 항체 9-1이다. 일부 실시형태에서, CD2에 결합하는 항체는 항-CD2 단클론성 항체 단클론성 항체 9.6 또는 이의 변이체이다. 일부 실시형태에서, CD2에 결합하는 항체는 항-CD2 단클론성 항체 9.6의 인간화된 변이체이다. 다른 실시형태에서, CD2에 결합하는 항체는 항-CD2 단클론성 항체 9-1이다. 일부 실시형태에서, CD2에 결합하는 항체는 항-CD2 단클론성 항체 9-1의 인간화된 변이체이다.
- [0132] 일부 실시형태에서, CAR의 CD2 결합 도메인은 항-CD2 scFv이다. 일부 실시형태에서, scFv는 항-CD2 항체의 가변 중쇄 서열과 적어도 90%의 서열 동일성, 적어도 91%의 서열 동일성, 적어도 92%의 서열 동일성, 적어도 93%의 서열 동일성, 적어도 94%의 서열 동일성, 적어도 95%의 서열 동일성, 적어도 95%의 서열 동일성, 적어도 96%의 서열 동일성, 적어도 97%의 서열 동일성, 적어도 98%의 서열 동일성, 적어도 99%의 서열 동일성 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 가변 중쇄 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 scFv는 항-CD2 항체의 가변 경쇄 서열과 적어도 90%의 서열 동일성, 적어도 91%의 서열 동일성, 적어도 92%의 서열 동일성, 적어도 93%의 서열 동일성, 적어도 94%의 서열 동일성, 적어도 95%의 서열 동일성, 적어도 95%의 서열 동일성, 적어도 96%의 서열 동일성, 적어도 97%의 서열 동일성, 적어도 98%의 서열 동일성, 적어도 99%의 서열 동일성 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 가변 경쇄 서열을 포함한다. 예를 들어, 항-CD2 항체는 당업자에 의해서 인지되는 임의의 이러한 서열일 수 있다.
- [0133] 일부 실시형태에서, 항-CD2 단일쇄 가변 단편은 서열번호 18과 적어도 90%(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%)의 서열 동일성을 갖는 VH 도메인 및 서열번호 19와 적어도 90%(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%)의 서열 동일성을 갖는 VL 도메인을 포함할 수 있다. 일부 예에서, 링커는 scFv의 VH 도메인 및 VL 도메인을 연결한다. VH-VL 링커는 (GGGGS)_n(서열번호 35) 링커일 수 있고, 식 중, n은 1 내지 6의 범위, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6일 수 있다. 다른 예에서, VH-VL 링커는 임의의 GS 링커 또는 당업자에게 공지된 다른 가요성 링커일 수 있다.
- [0134] 일부 예에서, VH 도메인은 서열번호 18에 제시된 서열 내에 적어도 하나(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 초과)의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 경우에, VL 도메인은 서열번호 19에 제시된 서열 내에 적어도 하나(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 초과)의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0135] 일부 실시형태에서, 항-CD2 scFv는 서열번호 20과 적어도 90%(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%)의 서열 동일성을 갖는 VH 도메인 및 서열번호 21과 적어도 90%(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%)의 서열 동일성을 갖는 VL 도메인을 함유한다. 일부 예에서, 링커는 scFv의 VH 도메인 및 VL 도메인을 연결한다. VH-VL 링커는 (GGGGS)_n(서열번호 35) 링커일 수 있고, 식 중, n은 1 내지 6의 범위, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6일 수 있다.
- [0136] 일부 경우에, 항-CD2 scFv는 인간 면역 세포에서 CD2에 대한 결합에 양립성인 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD2 발현이 인간 면역 세포에서 차단되거나, 감소되거나 또는 줄어들도록, VH 도메인은 서열번호 18에 제시된 서열 내에 적어도 하나(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 초과)의 아미노산 치환을 포함하고, VL 도메인은 서열번호 19에 제시된 서열 내에 적어도 하나(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 초과)의 아미노산 치환을 포함한다. 다른 실시형태에서, CD2 발현이 인간 면역 세포에서 차단되거나, 감소되거나 또는 줄어들도록, VH 도메인은 서열번호 20에 제시된 서열 내에 적어도 하나(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 초과)의 아미노산 치환을 포함하고, VL 도메인은 서열번호 21에 제시된 서열 내에 적어도 하나(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 초과)의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0137] 다양한 실시형태에서, 항-CD2 scFv는 서열번호 22와 적어도 90%(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%)의 서열 동일성을 포함한다. 다양한 다른 실시형태에서, 항-CD2 scFv는 서열번호

23과 적어도 90%(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%)의 서열 동일성을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD2 scFv는 서열번호 22의 변이체이고, 서열번호 22의 항-CD2 scFv와 동일한 결합 활성을 갖는다. 다른 실시형태에서, 항-CD2 scFv는 서열번호 23의 변이체이고, 서열번호 23의 항-CD2 scFv와 동일한 결합 활성을 갖는다.

[0138] PEBL의 CD2 결합 도메인은 CAR의 항-CD2 결합 도메인과 동일한 CD2의 에피토프에 결합할 수 있다. 다른 경우에, PEBL의 항-CD2 결합 도메인은 CAR의 CD2 결합 도메인과 상이한 CD2의 에피토프에 결합할 수 있다. PEBL의 CD2 결합 도메인 및 CAR의 CD2 결합 도메인의 아미노산 서열은 실질적으로 동일할 수 있다. 또는 PEBL의 CD2 결합 도메인과 CAR의 CD2 결합 도메인의 아미노산 서열은 상이할 수 있다. 일부 실시형태에서, PEBL의 CD2 결합 도메인의 서열은 CAR의 CD2 결합 도메인과 적어도 90%(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%)의 서열 동일성을 갖는다.

[0139] CAR의 예시적인 실시형태는 도 1에 제시되며, 예시적인 아미노산 및 핵산 서열은 표 1에 제공된다.

[0140] 일부 실시형태에서, 항-CD2 CAR을 암호화하는 핵산 서열은 표 1에 제시된 하나 이상의 핵산 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 항-CD2 CAR은 서열번호 10과 적어도 90%의 서열 동일성(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과)의 서열 동일성(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과)을 갖는 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 코돈 최적화된 변이체를 포함한다. 예를 들어, 항-CD2 CAR을 암호화하는 핵산 서열은 인간 세포, 예를 들어, 인간 면역 세포에서 목적하는 발현 또는 활성을 얻도록 변형될 수 있다.

[0141] 당업자가 인식할 바와 같이, 특정 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 다양한 성분(예를 들어, 신호 펩티드, scFv, 세포내 신호전달 도메인(들), 막관통 도메인, 링커 및 이들의 조합)의 서열 중 임의의 것은 본 명세서에 개시된 특정 상응하는 서열과 적어도 90%의 서열 동일성, 적어도 91%의 서열 동일성, 적어도 92%의 서열 동일성, 적어도 93%의 서열 동일성, 적어도 94%의 서열 동일성, 적어도 95%의 서열 동일성, 적어도 96%의 서열 동일성, 적어도 97%의 서열 동일성, 적어도 98%의 서열 동일성, 적어도 99%의 서열 동일성, 또는 100%의 서열 동일성을 가질 수 있다.

[0142] 일부 실시형태에서, 4-1BB 세포내 신호전달 도메인은 목적하는 기능을 보유하는 한, 서열번호 16과 적어도 90%의 서열 동일성, 적어도 91%의 서열 동일성, 적어도 92%의 서열 동일성, 적어도 93%의 서열 동일성, 적어도 94%의 서열 동일성, 적어도 95%의 서열 동일성, 적어도 95%의 서열 동일성, 적어도 96%의 서열 동일성, 적어도 97%의 서열 동일성, 적어도 98%의 서열 동일성, 적어도 99%의 서열 동일성 또는 100%의 서열 동일성을 가질 수 있다.

[0143] 특정 실시형태에서, 4-1BB 세포내 신호전달 도메인은 공자극성 분자, 예컨대, CD28, OX40, ICOS, CD27, GITR, HVEM, TIM1, LFA1 또는 CD2로부터의 또 다른 세포내 신호전달 도메인에 의해서 대체될 수 있다. 일부 실시형태에서, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 CD28, OX40, ICOS, CD27, GITR, HVEM, TIM1, LFA1 또는 CD2의 세포내 신호전달 도메인과 적어도 90%의 서열 동일성, 적어도 91%의 서열 동일성, 적어도 92%의 서열 동일성, 적어도 93%의 서열 동일성, 적어도 94%의 서열 동일성, 적어도 95%의 서열 동일성, 적어도 96%의 서열 동일성, 적어도 97%의 서열 동일성, 적어도 98%의 서열 동일성, 적어도 99%의 서열 동일성, 또는 100%의 서열 동일성을 가질 수 있다. 선택적으로, 4-1BB 세포내 신호전달 도메인은 또한 공자극성 분자, 예컨대, CD28, OX40, ICOS, CD27, GITR, HVEM, TIM1, LFA1 또는 CD2로부터의 또 다른 세포내 신호전달 도메인(또는 이의 부분)을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 추가적인 세포내 신호전달 도메인은 CD28, OX40, ICOS, CD27, GITR, HVEM, TIM1, LFA1 또는 CD2의 세포내 신호전달 도메인과 적어도 90%의 서열 동일성, 적어도 91%의 서열 동일성, 적어도 92%의 서열 동일성, 적어도 93%의 서열 동일성, 적어도 94%의 서열 동일성, 적어도 95%의 서열 동일성, 적어도 96%의 서열 동일성, 적어도 97%의 서열 동일성, 적어도 98%의 서열 동일성, 적어도 99%의 서열 동일성, 또는 100%의 서열 동일성을 가질 수 있다.

[0144] 일부 실시형태에서, CD3제타(CD3 ζ) 세포내 신호전달 도메인은 목적하는 기능을 보유하는 한, 서열번호 17과 적어도 90%의 서열 동일성, 적어도 91%의 서열 동일성, 적어도 92%의 서열 동일성, 적어도 93%의 서열 동일성, 적어도 94%의 서열 동일성, 적어도 95%의 서열 동일성, 적어도 95%의 서열 동일성, 적어도 96%의 서열 동일성, 적어도 97%의 서열 동일성, 적어도 98%의 서열 동일성, 적어도 99%의 서열 동일성 또는 100%의 서열 동일성을 가질 수 있다.

[0145] 일부 예에서, 세포내 신호전달 도메인은 목적하는 기능을 보유하는 한, 면역수용체 타이로신-기반 활성화 모터프(ITAM) 또는 이의 부분을 포함한다. CAR의 세포내 신호전달 도메인은 ITAM과 적어도 90%의 서열 동일성, 적어

도 91%의 서열 동일성, 적어도 92%의 서열 동일성, 적어도 93%의 서열 동일성, 적어도 94%의 서열 동일성, 적어도 95%의 서열 동일성, 적어도 96%의 서열 동일성, 적어도 97%의 서열 동일성, 적어도 98%의 서열 동일성, 적어도 99%의 서열 동일성, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 목적하는 기능을 보유하는 한, Fc ϵ RI γ , CD4, CD7, CD8, CD28, OX40 또는 H2-Kb와 적어도 95%의 서열 동일성, 적어도 96%의 서열 동일성, 적어도 97%의 서열 동일성, 적어도 98%의 서열 동일성, 적어도 99%의 서열 동일성, 또는 100%의 서열 동일성을 가질 수 있다.

[0146] 일부 실시형태에서, CD8알파(CD8 α) 힌지 및 막관통 도메인은 목적하는 기능을 보유하는 한, 서열번호 11과 적어도 90%의 서열 동일성, 적어도 91%의 서열 동일성, 적어도 92%의 서열 동일성, 적어도 93%의 서열 동일성, 적어도 94%의 서열 동일성, 적어도 95%의 서열 동일성, 적어도 95%의 서열 동일성, 적어도 96%의 서열 동일성, 적어도 97%의 서열 동일성, 적어도 98%의 서열 동일성, 적어도 99%의 서열 동일성 또는 100%의 서열 동일성을 가질 수 있다.

[0147] 본 발명에서 사용하기에 적합한 힌지 및 막관통 서열은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어, 전문이 참조에 의해 포함된 국제 특허 공개 제W02016/126213호에 제공되어 있다.

[0148] 일부 실시형태에서, 항-CD2 CAR의 힌지 및 막관통 도메인은 CD8 α , IgG, CD8 β , 4-1BB, CD28, CD34, CD4, Fc ϵ RI γ , CD16, OX40, CD3 ζ , CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 δ , TCR α , CD32, CD64, VEGFR2, FAS, FGFR2B 또는 또 다른 막관통 단백질로부터의 신호전달 도메인(예를 들어, 막관통 도메인)을 포함할 수 있다. 상기 막관통 도메인은 또한 비-자연 발생 소수성 단백질 분절일 수 있다.

[0149] 일부 실시형태에서, CD8알파(CD8 α) 신호 펩티드는 목적하는 기능을 보유하는 한, 서열번호 11과 적어도 90%의 서열 동일성, 적어도 91%의 서열 동일성, 적어도 92%의 서열 동일성, 적어도 93%의 서열 동일성, 적어도 94%의 서열 동일성, 적어도 95%의 서열 동일성, 적어도 95%의 서열 동일성, 적어도 96%의 서열 동일성, 적어도 97%의 서열 동일성, 적어도 98%의 서열 동일성, 적어도 99%의 서열 동일성 또는 100%의 서열 동일성을 가질 수 있다.

[0150] V. 조작된 면역 세포

[0151] 따라서, 일 실시형태에서, 본 발명은 CD2 CAR 및 CD2 PEBL을 발현하는 조작된 면역 세포에 관한 것이다. 특정 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 조작된 T 세포, 조작된 자연 살해(NK) 세포, 조작된 NK/T 세포, 조작된 단핵구, 조작된 대식세포 또는 조작된 수지상 세포이다. 일부 실시형태에서, 면역 세포는 말초 혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cell: PBMC)-유래 T 세포이다.

[0152] 일부 실시형태에서, 본 발명은 CD2에 결합하는 PEBL, 예컨대, 본 명세서에 요약된 것을 발현하는 조작된 면역 세포를 기재한다. 일부 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 서열번호 1 내지 4로부터 선택된 임의의 하나와 적어도 90%(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과)의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 PEBL을 발현한다. 일부 실시형태에서, 조작된 세포는 서열번호 1과 적어도 90%(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과)의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 PEBL을 발현한다. 일부 실시형태에서, 조작된 세포는 서열번호 2와 적어도 90%(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과)의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 PEBL을 발현한다. 일부 실시형태에서, 조작된 세포는 서열번호 3과 적어도 90%(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과)의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 PEBL을 발현한다. 일부 실시형태에서, 조작된 세포는 서열번호 4와 적어도 90%(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과)의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 PEBL을 발현한다. 일부 실시형태에서, 조작된 세포는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 PEBL을 발현한다. 일부 실시형태에서, 조작된 세포는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 PEBL을 발현한다. 일부 실시형태에서, 조작된 세포는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 PEBL을 발현한다. 일부 실시형태에서, 조작된 세포는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 PEBL을 발현한다. 특정 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 조작된 T 세포, 조작된 $\gamma\delta$ T 세포, PBMC-유래 T 세포, 조작된 자연 살해(NK) 세포, 조작된 NK/T 세포, 조작된 단핵구, 조작된 대식세포 또는 조작된 수지상 세포이다.

[0153] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 요약된 것을 비롯한 CD2에 결합하는 CAR을 발현하는 조작된 면역 세포에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 조작된 세포는 서열번호 5와 적어도 90%(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과)의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 CAR을 발현한다. 특정 실시형태에서, 조작된 세포는 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CAR을 발현한다. 특정 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 조작된 T 세포, 조작된 $\gamma\delta$ T 세포, PBMC-유래 T 세포, 조작된 자연 살해(NK)

세포, 조작된 NK/T 세포, 조작된 단핵구, 조작된 대식세포 또는 조작된 수지상 세포이다.

[0154] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 요약된 것을 비롯한 CD2에 결합하는 CAR 및 CD2에 결합하는 PEBL을 발현하는 조작된 면역 세포에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 서열번호 5와 적어도 90% (예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과)의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 CAR에 더하여, 서열번호 1 내지 4 중 임의의 하나와 적어도 90%(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과)의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 PEBL을 발현한다. 특정 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CAR에 더하여 서열번호 1 내지 4 중 임의의 하나로부터 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 PEBL을 발현한다.

[0155] 일부 예에서, 조작된 면역 세포는 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 PEBL 및 서열번호 5의 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 CAR을 발현한다. 일부 예에서, 조작된 면역 세포는 서열번호 2의 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 PEBL 및 서열번호 5의 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 CAR을 발현한다. 일부 예에서, 조작된 면역 세포는 서열번호 3의 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 PEBL 및 서열번호 5의 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 CAR을 발현한다. 일부 예에서, 조작된 면역 세포는 서열번호 4의 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 PEBL 및 서열번호 5의 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 CAR을 발현한다. 일부 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 서열번호 1의 PEBL 및 서열번호 5의 CAR을 발현한다. 일부 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 서열번호 1의 PEBL 및 서열번호 5의 CAR을 발현한다. 일부 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 서열번호 2의 PEBL 및 서열번호 5의 CAR을 발현한다. 일부 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 서열번호 3의 PEBL 및 서열번호 5의 CAR을 발현한다. 일부 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 서열번호 4의 PEBL 및 서열번호 5의 CAR을 발현한다. 특정 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 조작된 T 세포, 조작된 $\gamma \delta$ T 세포, PBMC-유래 T 세포, 조작된 자연 살해(NK) 세포, 조작된 NK/T 세포, 조작된 단핵구, 조작된 대식세포 또는 조작된 수지상 세포이다.

[0156] 본 명세서에 개략된 PEBL은 표적 단백질이 세포막으로 수송되는 것을 방지한다. 예를 들어, 상기에 기재된 CD2에 지향되는 PEBL은 세포 내에, 예컨대, ER 내에 보유된다. CD2에 지향되는 PEBL은 CD2와 세포 내에서 공동 국소화될 수 있다. 따라서, 세포 표면 상에서의 CD2 발현이 억제된다. 일부 실시형태에서, 이러한 PEBL은 CD2의 표면 발현을 제거한다. 일부 경우에서, 상기 PEBL은 조작된 면역 세포에서 면역표현형 변화를 일으키지 않는다. 또한, PEBL은 조작된 면역 세포의 증식에 영향을 미치지 않거나 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 상기 PEBL은 CAR, 예컨대, 항-CD2-4-1BB-CD3 ζ CAR과 공동 발현된다. 일부 예에서, CD2 CAR을 발현하는 면역 세포에서 CD2 결합 PEBL의 발현 또는 존재는 다른 CD2 CAR-T 세포에 의한 이러한 세포의 동족살해를 방지한다.

[0157] 특정 실시형태에서, 본 발명은 조작된 면역 세포를 제공하며, 이는 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 분자(예를 들어, PEBL)를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산을 포함하고, 여기서 상기 표적-결합 분자는 CD2에 결합하는 항체이고, 상기 국소화 도메인은 소포체(ER) 보유 서열, 골지 보유 서열 및 프로테아좀 국소화 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 보유 신호 도메인을 포함한다. 일부 경우에, PEBL은 또한 CD8 α , CD8 β , 4-1BB, CD28, CD34, CD4, Fc ϵ RI γ , CD16, OX40, CD3 ζ , CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 δ , TCR α , CD32, CD64, VEGFR2, FAS 또는 FGFR2B로부터 유래된 막관통 도메인 서열을 포함한다.

[0158] 일부 경우에서, 조작된 세포는 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산을 포함한다. 특정 경우에서, CAR은 4-1BB 및 CD3 ζ 의 세포내 신호전달 도메인, 및 CD2에 결합하는 항체를 포함한다. 특정 실시형태에서, 표적-결합 분자의 맥락에서 CD2에 결합하는 항체는 표 1에 제시된 VH 서열 및 VL 서열을 포함한다.

[0159] 일부 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 조작된 T 세포, 조작된 자연 살해(NK) 세포, 조작된 NK/T 세포, 조작된 단핵구, 조작된 대식세포 또는 조작된 수지상 세포이다. 일부 경우에서, 상기 조작된 면역 세포는 동종이계 세포이다. 일부 경우에서, 상기 조작된 면역 세포는 자가 세포이다.

[0160] 일부 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 적어도 6개월 동안 CD2 표면 발현이 결핍된다. 다른 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 적어도 12개월 동안 CD2 표면 발현이 결핍된다. 특정 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 적어도 20개월 동안 CD2 표면 발현이 결핍된다. 일부 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 적어도 24개월 동안 CD2 표면 발현이 결핍된다.

[0161] 일부 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 CD2 PEBL을 생성시키지 않는 면역 세포에 비해서 적어도 6개월 동안 상당히 감소된 CD2 표면 발현을 갖는다. 다른 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 적어도 12개월 동안 감소된 CD2

표면 발현을 갖는다. 특정 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 적어도 20개월 동안 감소된 CD2 표면 발현을 갖는다. 일부 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 적어도 24개월 동안 감소된 CD2 표면 발현을 갖는다.

[0162] 특정 실시형태에서, 상기 조작된 면역 세포는 유사한 면역 세포와 비교하여 실질적으로 동일한 속도로 증식한다. 일부 실시형태에서, CAR 및 항-CD2 PEBL을 발현하는 조작된 면역 세포는 상응하는 CAR을 발현하는 면역 세포와 유사하게 증식한다.

[0163] 일부 실시형태에서, 본 발명의 조작된 면역 세포는 향상된 치료 효능을 갖는다. 이러한 조작된 면역 세포는 대상체에서 암을 치료하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 암은 CD2 연관 암 또는 T-세포 악성 종양, 예를 들어, T 세포 백혈병 또는 T 세포 림프종, 예컨대, T-세포 급성 림프모구성 백혈병(T-ALL), T-세포 전림프구성백혈병 백혈병, T-세포 거대 과립 림프구성 백혈병, 장질환-연관 T-세포 림프종, 간비장 T-세포 림프종, 피하지방층염-유사 T-세포 림프종, 피부 T-세포 림프종(CTCL), 이의 임의의 아형, 균상 식육종, 세자리 증후군, 1차 피부 감마-델타 T-세포 림프종, 비호지킨 림프종(NHL)의 T 계통 하위세트가 동반된 악성 종양, 예컨대, 비제한적으로 달리 규정되지 않은 말초 T-세포 림프종(PTCL)(PTCL-NOS) 및 혈관면역모구성 T-세포 림프종 및 역형성 거대 세포 림프종이다. 특정 실시형태에서, T 세포 악성종양은 조기 T-세포 전구세포 급성 림프모구성 백혈병(ETP-ALL)이다.

[0164] 일부 실시형태에서, CAR 및 항-CD2 PEBL을 발현하는 본 발명의 조작된 면역 세포는 상응하는 CAR을 발현하는 면역 세포에 비해서 향상되거나 증가된 치료 효과를 갖는다. 일부 실시형태에서, CAR 및 항-CD2 PEBL을 발현하는 조작된 면역 세포는 상응하는 CAR을 발현하는 면역 세포와 대등한 치료 효과를 갖는다.

[0165] 다른 실시형태에서, 본 발명은 본 발명의 조작된 면역 세포를 생산하는 방법에 관한 것이며, 이 방법은 키메라 항원 수용체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산, 및 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 분자(예를 들어, PEBL 분자)를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산을 면역 세포 내로 도입하여, 조작된 면역 세포를 생산하는 단계를 포함한다.

[0166] 특정 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 조작된 T 세포, 조작된 자연 살해(NK) 세포, 조작된 NK/T 세포, 조작된 단핵구, 조작된 대식세포 또는 조작된 수지상 세포이다. 일부 실시형태에서, 조작된 T 세포는 T 세포의 임의의 유형이다. 특정 실시형태에서, 조작된 T 세포는 감마-델타($\gamma \delta$) T 세포이다. 특정 실시형태에서, 조작된 T 세포는 PBMC-유래 T 세포로부터 생산된다.

[0167] 특정 실시형태에서, 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산은 생체외에서 면역 세포 내로 도입된다. 다른 실시형태에서, 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산은 생체내에서 면역 세포 내로 도입된다.

[0168] 도입될 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산은 본 명세서에 기술된 키메라 항원 수용체 및 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 분자(예를 들어, scFv)를 함유하는 단일 바이시스트로닉 작제물일 수 있다. 본 명세서에 기술된 바와 같이, 단일 바이시스트로닉 작제물은 본 명세서에 기술된 바와 같은 키메라 항원 수용체(예를 들어, CAR) 및 상기 표적-결합 분자(예를 들어, scFv)를 암호화하는 2개의 cDNA 사이에 내부 리보솜 유입 부위(IRES) 또는 2A 펩티드-암호 영역 부위를 삽입함으로써 제조될 수 있다. 1개 초과 표적을 결실시키기 위한 트리시스트로닉 전달 시스템의 설계도 또한 실행가능해야 한다. 대안적으로, 개개의 작제물(예를 들어, CAR 및 PEBL)의 (동시 또는 순차적) 개별 형질도입이 수행될 수 있다. 외인성 핵산을 도입하는 방법은 본 명세서에 예시되어 있으며, 당업계에 널리 공지되어 있다.

[0169] 일부 실시형태에서, CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 및 PEBL을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열이 순차적으로 도입된다. 일부 실시형태에서, CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 및 PEBL을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열이 동시에 도입된다. 특정 경우에서, CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 및 PEBL을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 작동가능하게 연결되며, 따라서 단일 발현 벡터 또는 플라스미드 상에서 도입될 수 있다.

[0170] 일부 실시형태에서, 면역 세포는 IL-2, IL-7, IL-15 및 이들의 임의의 조합을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 하나 이상의 사이토카인의 존재 하에서 배양된다. 일부 경우에, 면역 세포는 T 세포, CD4+ T 세포 및/또는 CD8+ T 세포의 증식을 향상시키거나 유도할 수 있는 작용제의 존재 하에서 배양된다. 일부 경우에, 면역 세포는 TCR/CD3 복합체의 분자에 결합하는 작용제 및/또는 CD28에 결합하는 작용제의 존재 하에서 배양된다. 특정 실시형태에서, 조작된 면역 세포의 배양 방법은 CD90(Thy-1), CD95(Apo-/Fas), CD137(4-1BB), CD154(CD40L), ICOS, LAT, CD27, OX40 및 HVEM으로 이루어진 군으로부터 선택된 분자의 존재 하에서의 배양을 포함한다. 특정 실시형태에서, 배양 방법은 CD90 (Thy-1), CD95 (Apo-/Fas), CD137 (4-1BB), CD154 (CD40L), ICOS, LAT, CD27, OX40 또는 HVEM에 결합하는 작용제의 존재 하에서의 배양을 포함한다. 본 명세서에 기재된 조작된 면역 세포의 추가

배양 방법은 예를 들어, 미국 특허 제US20190136186호, 제US20190062706호 및 제US20170037369호에서 찾아볼 수 있다.

[0171] 일부 실시형태에서, 말초 혈액 단핵세포(PBMC)를 얻는다. 일부 실시형태에서, 말초 혈액 단핵세포(PBMC)를 인간 대상체로부터 수거한다. 일부 실시형태에서, 말초 혈액 단핵세포(PBMC)를 건강한 인간 대상체로부터 수거한다. 일부 실시형태에서, 말초 혈액 단핵세포(PBMC)를 본 명세서에 기재된 임의의 것을 비롯한 암을 갖는 인간 대상체로부터 수거한다. 일부 실시형태에서, T 세포의 양성 선택은 제조사의 지침에 따라서, (a) CD3 마이크로비드 또는 (b) CD4 및 CD8 마이크로비드를 사용하여 수행된다. 일부 경우에, 세포를 멸균 여과된 PBS + 0.5% BSA + 2mM EDTA를 포함하는 MACS 완충액 80 μ l당 1×10^7 개의 세포를 재현탁시키고, 세포 현탁액 80 μ l당 20 μ l의 마이크로비드로 표지한다. 세포를 4°C에서 15분 동안 인큐베이션시키고, 이어서 MACS 완충액으로 세척한다. 표지된 세포를 LS 컬럼(Miltenyi Biotec)에 통과시키고, LS 컬럼에 결합된 양성 선택된 T 세포를 수집 튜브에서 용리시킨다. 단리된 T 세포를 세척하고, 3% 인간 AB 혈청(Sigma)이 보충된 TexMACS 배지에 1×10^6 개 세포/ml로 재현탁시킨다. 일부 실시형태에서, T 세포를 1×10^6 개 T 세포당 10 μ l의 T Cell TransAct(Miltenyi Biotec)로 활성화시키고, (a) 120 IU/ml 재조합 인간 IL-2, 또는 (b) 12.5ng/ml 재조합 인간 IL-7 및 12.5ng/ml 재조합 인간 IL-15와 함께 배양한다.

[0172] 일부 실시형태에서, 선택 및 활성화 후 1일(제1일)에, T 세포에 본 명세서에 기재된 PEBL을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 및/또는 본 명세서에 기재된 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 렌티바이러스를 정적 형질도입을 사용하여 1 내지 10에 대한 MOI(예를 들어, MOI 1, MOI 2, MOI 3, MOI 4, MOI 5, MOI 6, MOI 7, MOI 8, MOI 9 및 MOI 10)로 형질도입한다. 일부 경우에, T 세포 배양물을 모니터링하고, 배양 배지 ml당 0.5 내지 2×10^6 개의 T 세포의 세포 밀도로 유지시킨다. 새로운 IL-2 또는 IL-7 및 IL-15 사이토카인을 3 내지 4일마다 배양물에 첨가할 수 있다. 일부 실시형태에서, 형질도입 10일 후(제11일), 확장된 T 세포를 수거한다. 일부 경우에 확장된 T 세포를 유세포 분석법에 의한 기능성 검정 및 표현형 분석을 사용하여 분석한다.

[0173] 다양한 양태에서, 본 명세서에 기술된 조작된 면역 세포를 생산하기 위한 키트가 또한 제공된다. 본 발명의 키트는 동종이게 또는 자가 효과기 T 세포를 생산하는 데 사용될 수 있다.

[0174] 따라서, 항-CD2 PEBL과 같은 PEBL을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을 포함하는 키트가 본 명세서에 제공된다. 일부 실시형태에서, 상기 키트는 항-CD2 PEBL과 같은 PEBL을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산, 및 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을 포함한다. 상기 키트는 본 명세서에 기술된 실시형태 중 임의의 것에 따라 설계될 수 있다.

[0175] 특정 실시형태에서, 상기 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열 및/또는 상기 PEBL을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 예를 들어 클로닝 및/또는 발현을 가능하게 하는 서열(예를 들어, 플라스미드 또는 벡터 서열)을 추가로 포함한다. 예를 들어, 상기 뉴클레오티드 서열은 예를 들어 세포(예를 들어, 면역 세포) 내로의 형질감염을 위한 다른 플라스미드 및/또는 발현 벡터로 용이하게 클로닝하기 위한 플라스미드의 일부로서 제공될 수 있다. 특정 실시형태에서, 상기 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열 및 상기 PEBL을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 단일 플라스미드 또는 벡터 상에 제공된다. 특정 실시형태에서, 상기 뉴클레오티드 서열은 별도의 플라스미드 또는 발현 벡터 상에 제공된다. 일부 실시형태에서, 발현 벡터는 바이러스 발현을 위해서 선택된다.

[0176] 전형적으로, 상기 키트는 사용의 용이성을 위해 구획화되고, 시약을 갖는 하나 이상의 용기를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 모든 키트 성분들은 함께 포장된다. 대안적으로, 상기 키트의 하나 이상의 개개의 성분은 다른 키트 성분들로부터 분리된 패키지에 제공될 수도 있다. 또한, 상기 키트는 키트 성분들의 사용 지침서를 포함할 수 있다.

[0177] VI. 치료 방법

[0178] 일 양태에서, 본 발명은 치료량의 조작된 면역 세포를 암의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암의 치료를 위한, 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 및 국소화 도메인에 연결된 단일쇄 가변 단편(scFv)을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을 포함하는 조작된 면역 세포의 용도에 관한 것이다.

[0179] 다른 양태에서, 본 발명은 치료량의 조작된 면역 세포를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 자가면역 질환의 치료를 위한, 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 및 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 분자(예를 들어 scFv)를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을

포함하는 조작된 면역 세포의 용도에 관한 것이다.

- [0180] 다른 양태에서, 본 발명은 또한, 치료량의 조작된 면역 세포를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 감염성 질환의 치료를 위한, 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 및 국소화 도메인에 연결된 CD2에 대한 표적-결합 분자(예를 들어, 항-CD2 scFv)를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을 포함하는 조작된 면역 세포의 용도에 관한 것이다.
- [0181] 일부 양태에서, 상기 조작된 면역 세포는 대상체 내로의 주입에 의해 투여된다. 면역 세포(예를 들어, 동종이계 또는 자가 면역 세포)를 주입하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 질환의 증상을 개선시키기 위해 충분한 수의 세포를 수용체에게 투여한다. 전형적으로, 10^7 내지 10^{10} 개 세포의 투여량, 예를 들어, 10^9 개 세포의 투여량을 단일 환경에서 주입한다. 주입은 단일 10^9 개 세포 투여량으로서, 또는 몇몇의 10^9 개 세포 투여량으로 분할하여, 투여된다. 주입 빈도는 3 내지 30일마다, 또는 원하는 경우 또는 지시되는 경우 더 긴 간격일 수 있다. 주입량은 일반적으로, 허용되는 만큼, 또는 질환 증상이 개선될 때까지, 대상체 당 적어도 1회의 주입, 바람직하게는 적어도 3회의 주입이다. 세포는 50 내지 250 ml/hr의 속도로 정맥내로 주입될 수 있다. 다른 적합한 투여 방식은 동맥내 주입, 종양 내로의 직접 주사 및/또는 수술 후의 종양 층의 관류, 인공 스캐폴드에서 종양 부위에 이식, 척추강내 투여 및 안내 투여를 포함한다. 이러한 전달 방식에 맞춰 본 발명을 조정하는 방법은 당업자가 용이하게 이용 가능하다.
- [0182] 일부 양태에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 조작된 면역 세포 중 어느 하나를 포함하는 조작된 면역 세포의 실질적으로 순수한 집단을 제공하며, 여기서 적어도 90%, 예를 들어, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 상기 조작된 면역 세포는 CD2 발현이 결여되어 있다. 일부 경우에서, 실질적으로 순수한 집단은 적어도 80%, 예를 들어, 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 이상의, CD2 발현이 결여된 조작된 면역 세포를 포함한다.
- [0183] 다른 양태에서, 본 발명은 또한 암 또는 자가면역 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암 또는 자가면역 장애를 치료하는 방법을 제공하며, 이 방법은 치료량의, 본 명세서에 기술된 실시형태 중 임의의 것을 갖는 조작된 면역 세포를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하여 대상체에서 암 또는 자가면역 장애를 치료하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명은 암 또는 자가면역 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암 또는 자가면역 장애를 치료하는 방법을 제공하며, 이 방법은 치료량의, 본 명세서에 기술된 실시형태 중 임의의 것을 갖는 조작된 면역 세포의 실질적으로 순수한 집단을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하여 대상체에서 암 또는 자가면역 장애를 치료하는 단계를 포함한다.
- [0184] 특정 실시형태에서, 방법은 본 명세서에 기술된 바와 같이, 국소화 도메인에 연결된 CD2에 대한 표적-결합 분자를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 갖는 핵산을 포함하는 치료량의 조작된 면역 세포를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 경우에서, 제2 핵산은 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, CAR은 4-1BB 및 CD3 ζ 의 세포내 신호전달 도메인, 및 CD2와 같은 사이토카인에 결합하는 항체를 포함한다.
- [0185] 일부 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 치료를 필요로 하는 대상체에 대해서 자가이다. 다른 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 치료를 필요로 하는 대상체에 대해 동종이계이다.
- [0186] 특정 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 정맥내 주입, 동맥내 주입, 종양 내로의 직접 주사 및/또는 수술 후의 종양 층의 관류, 인공 스캐폴드에서 종양 부위에 이식, 또는 척추강내 투여 및 안내투여에 의해 상기 대상체에게 투여된다.
- [0187] 특정 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 상기 대상체 내로의 주입에 의해 투여된다. 면역 세포(예를 들어, 동종이계 또는 자가 면역 세포)를 주입하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 질환의 증상을 개선시키기 위해 충분한 수의 세포를 수용체에게 투여한다. 전형적으로, 10^7 내지 10^{10} 개 세포의 투여량, 예를 들어, 10^9 개 세포의 투여량을 단일 환경에서 주입한다. 주입은 단일 10^9 개 세포 투여량으로서, 또는 몇몇의 10^9 개 세포 투여량으로 분할하여, 투여된다. 주입 빈도는 매일, 2 내지 30일마다, 또는 원하는 경우 또는 지시되는 경우, 더 긴 간격일 수 있다. 주입량은 일반적으로, 허용되는 만큼, 또는 질환 증상이 개선될 때까지, 대상체 당 적어도 1회의 주입, 바람직하게는 적어도 3회의 주입이다. 세포는 50 내지 250 ml/hr의 속도로 정맥내로 주입될 수 있다. 다른 적합한 투여 방식은 동맥내 주입, 복강내 주입, 종양 내로의 직접 주사 및/또는 수술 후의 종양 층의 관류, 인공 스캐폴드에서 종양 부위에 이식, 척추강내 투여를 포함한다. 이러한 전달 방식에 맞춰 본 발명을 조정하는 방법은

당업자가 용이하게 이용 가능하다.

- [0188] 특정 실시형태에서, 본 발명에 따른 암을 치료하는 방법은 적어도 하나의 다른 공지된 암 요법, 예를 들어 화학 요법과 조합된다. 일부 실시형태에서, 본 발명에 따른 암의 치료 방법은 음성 면역관문 조절제, 예컨대, PD-1, CTLA4, LAG3, TIM3, TIGIT 또는 또 다른 면역 면역관문 분자에 대한 항체를 억제하는 작용제를 치료적으로 조합한다. 이러한 조합은, 림프종에 종종 존재하는 면역 억제 환경으로 인해서, T 세포 림프종을 치료할 때 특히 효과적일 수 있다.
- [0189] 추가적인 양태에서, 본 발명은 치료량(치료적 집단)의 조작된 면역 세포를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암의 치료를 위한, 본 명세서에 기술된 실시형태 중 임의의 것을 갖는 조작된 면역 세포의 용도에 관한 것이다. 특정 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 정맥내 주입, 동맥내 주입, 복강내 주입, 종양 내로의 직접 주사 및/또는 수술 후의 종양 층의 관류, 인공 스케폴드에서 종양 부위에 이식, 척추강내 투여에 의해 대상체에 투여된다.
- [0190] 일부 실시형태에서, 대상체는 본 명세서에 요약된 조작된 면역 세포의 투여(예를 들어, 주입) 전에 비-골수제거 화학요법(non-myeloablative chemotherapy)으로 치료된다. 일부 실시형태에서, 비-골수제거 화학요법은 2일(조작된 면역 세포의 주입 전 제27일 및 제26일) 동안 시클로포스파미드 60 mg/kg/d 및 5일(조작된 면역 세포의 제27일 내지 제23일 주입) 동안 플루다라빈 25 mg/m²/d이다. 대상체는 1종 이상의 림프구제거(lymphodepletion)(예를 들어, 면역억제 컨디셔닝)제가 투여된다. 사전컨디셔닝제의 비제한적인 예는 시클로포스파미드, 플루다라빈 및 이들의 임의의 조합물을 포함한다. CAR-T 세포 요법은 예를 들어, 내용이 전체적으로 본 명세서에 참조에 의해 포함된 미국 특허 제US9,855,298호에서 발견된다.
- [0191] 추가의 사전컨디셔닝 방법은 모두 전체적으로 본 명세서에 참조에 의해 포함된 문헌[Gassner et al., Cancer Immunol. Immunother. 2011, 60, 75-85, Muranski et al., Nat. Clin. Pract. Oncol., 2006, 3, 668-681, Dudley, et al., J. Clin. Oncol. 2008, 26, 5233-5239, 및 Dudley et al., J. Clin. Oncol. 2005, 23, 2346-2357]에 기재되어 있다.
- [0192] 일부 실시형태에서, 비-골수제거 화학요법 및 조작된 면역 세포의 주입을 제공받은 후, 대상체는 사이토카인, 예컨대, IL-2, IL-7, IL-15 또는 이들의 임의의 조합물의 정맥내 투여를 제공받는다. 일부 실시형태에서, 비-골수제거 화학요법을 제공받은 후, 환자는 IL-2, IL-7, IL-15 또는 이들의 임의의 조합물과 조합하여 조작된 면역 세포의 집단을 제공받는다. 일부 경우에, IL-2, IL-7, IL-15 또는 이들의 임의의 조합물은 세포의 집단 이후에 투여된다. 특정 경우에, IL-2, IL-7, IL-15 또는 이들의 조합물은 세포의 집단과 동시에 투여된다. IL-2는 IL-2(알데스큐킨(aldesleukin)), 이의 바이오시밀러 또는 이의 변이체를 포함한다.
- [0193] 일부 실시형태에서, IL-2는 고용량 IL-2 요법을 포함하는데, 이러한 요법은 예컨대, 본 명세서에 기재된 조작된 면역 세포의 치료적 유효 집단을 투여한 후에 그 날에 시작하는 정맥내 투여지만 이들로 제한되지 않고, 여기서 IL-2는 최대 14회 용량 동안, 용인될 때까지 8시간마다 15분 볼러스 정맥내 주입을 사용한 0.037 mg/kg 또는 0.044 mg/kg IU/kg(환자 체질량)의 용량으로 투여된다. 9일 휴식 후, 스케줄은 총 최대 28회 용량 동안 추가의 14회 용량 동안 반복될 수 있다.
- [0194] 다른 실시형태에서, IL-2는 6시간에 걸친 약 18x10⁶ IU/m²의 용량, 그다음 12시간에 걸친 18x10⁶ IU/m²의 용량, 그 다음 24시간에 걸친 18x10⁶ IU/m²의 용량, 그리고 그 다음 72시간에 걸친 18x10⁶ IU/m²의 용량으로 투여된다. 이러한 치료 요법은 최대 4주기 동안 28일마다 반복될 수 있다. 일부 실시형태에서, IL-2 요법은 제1일에 18,000,000 IU/m², 제2일에 9,000,000 IU/m² 및 제3일 및 제4일에 4,500,000 IU/m²을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, IL-2 요법은 0.10 mg/일 내지 50 mg/일의 용량으로 1, 2, 4, 6, 7, 14 또는 21일마다 폐경화된 IL-2를 투여하는 것을 포함한다.
- [0195] 일부 실시형태에서, 조작된 면역 세포 또는 조작된 면역 세포의 집단은 또 다른 치료적 개입, 예컨대, 항체 또는 조작된 세포 또는 수용체 또는 작용제, 예컨대, 세포독성제 또는 치료제와 병용 요법의 일부로서, 예컨대, 동시에 또는 임의의 순서로 순차적으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 세포는 1종 이상의 추가 치료제와 또는 또 다른 치료적 개입과 동시에 또는 임의의 순서로 순차적으로 공동 투여된다. 일부 실시형태에서, 세포는, 세포 집단이 1종 이상의 추가 치료제의 효과를 향상시키도록 하는 시간에 충분히 가깝게 또 다른 요법과 공통 투여되고, 그 반대도 가능하다. 일부 실시형태에서, 세포는 1종 이상의 추가 치료제 이전에 투여된다. 일부 실시형태에서, 세포는 1종 이상의 추가 치료제 이후에 투여된다. 일부 실시형태에서, 1종 이상의 추가 치료제는 예

를 들어, 지속성을 향상시키기 위해서, 사이토카인, 예컨대, IL-2를 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 화학 치료제의 투여를 포함한다. 일부 실시형태에서, 치료제는 예컨대, 비제한적으로 PD-1, CTLA4, LAG3, TIM3, TIGIT 또는 또 다른 면역 면역관문 분자에 대한 항체인 음성 면역관문 조절제를 억제한다.

[0196] 본 명세서에 기재된 조작된 면역 세포의 투여 이후에, 일부 실시형태에서 조작된 세포 집단의 생물학적 활성은 예를 들어, 다수의 공지된 방법 중 임의의 것에 의해서 측정된다. 평가를 위한 파라미터는, 생체내에서 예를 들어, 영상화에 의해서, 또는 생체외에서 예를 들어, ELISA 또는 유세포 분석법에 의해서 항원에 대한 조작된 또는 자연 T 세포 또는 다른 면역 세포의 특이적 결합을 포함한다. 특정 실시형태에서, 표적 세포를 파괴하는 조작된 세포의 능력은 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법, 예컨대, 예를 들어, 문헌[Kochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009)], 및 문헌[Herman et al. J. Immunological Methods, 285(1): 25-40 (2004)]에 기재된 세포독성 검정을 사용하여 측정될 수 있다. 특정 실시형태에서, 세포의 생물학적 활성은 1종 이상의 사이토카인, 예컨대, CD107a, IFN γ , IL-2 및 TNF의 발현 및/또는 분비를 검정함으로써 측정된다. 일부 양태에서, 생물학적 활성은 임상 결과, 예컨대, 암의 존재량이나 부하의 감소를 평가함으로써 측정된다.

[0197] VII. 본 발명의 예시적인 실시형태

[0198] 일 양태에서, 본 발명은 항-CD2 단일쇄 가변 단편(scFv) 도메인, CD8 α 힌지-막관통 도메인, 4-1BB 세포내 신호전달 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하는 항-CD2-4-1BB-CD3 ζ 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

[0199] 임의의 실시형태의 폴리뉴클레오타이드 중에서, CAR의 상기 항-CD2 scFv 도메인은 서열번호 22 또는 서열번호 23과 적어도 90%(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%)의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 임의의 실시형태의 폴리뉴클레오타이드 중에서, CAR의 상기 CD8 α 힌지-막관통 도메인은 서열번호 15와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 임의의 실시형태의 폴리뉴클레오타이드 중에서, CAR의 상기 4-1BB 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 16과 적어도 90%(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%)의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 임의의 실시형태의 폴리뉴클레오타이드 중에서, CAR의 상기 CD3 ζ 신호전달 도메인은 서열번호 17과 적어도 90%(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%)의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 임의의 실시형태의 폴리뉴클레오타이드 중에서, CAR은 서열번호 5와 적어도 90%(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%)의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에, CAR은 서열번호 10 중 임의의 하나와 적어도 80%(예를 들어, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99 또는 100%)의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 갖는다.

[0200] 본 명세서에는 본 명세서에 기재된 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 중 임의의 하나를 포함하는 단리된 바이러스 벡터가 제공된다. 일부 양태에서, 본 명세서에 요약된 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 중 임의의 하나를 포함하는 단리된 바이러스 벡터는 면역 세포에 도입된다.

[0201] 본 명세서에는 또한 본 명세서에 기재된 항-CD2-4-1BB-CD3 ζ 키메라 항원 수용체를 포함하는 조작된 면역 세포가 제공된다. 임의의 실시형태의 조작된 면역 세포는 조작된 동종이체 세포이다. 임의의 실시형태의 조작된 면역 세포는 조작된 자가 세포이다. 임의의 실시형태의 조작된 면역 세포는 조작된 T 세포이다. 임의의 실시형태의 조작된 면역 세포는 조작된 감마-델타 T 세포 수용체 보유 T 세포이다. 임의의 실시형태의 조작된 면역 세포는 조작된 NK 세포이다. 임의의 실시형태의 조작된 면역 세포는 조작된 감마-델타 T 세포 수용체 보유 T 세포이다.

[0202] 본 명세서에는 단리된 바이러스 벡터가 제공되며, 이러한 단리된 바이러스 벡터는, 세포 국소화 도메인의 N-말단에 연결된 CD2에 결합하는 단일쇄 가변 단편(scFv)을 포함하는 CD2 차단 폴리펩티드로서, 세포 국소화 도메인은 소포체(ER) 보유 서열, 골지 보유 서열 및 프로테오솜 국소화 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, 상기 CD2 차단 폴리펩티드는 세포 내의 내인성 CD2에 결합하는, 상기 CD2 차단 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

[0203] 실시형태 중 임의의 하나의 단리된 바이러스 벡터 중에서, 상기 scFv는 (i) 서열번호 18과 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 가변 중쇄(VH) 서열 및 서열번호 19와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 가변 경쇄(VL) 서열, 또는 (ii) 서열번호 20과 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 가변 중쇄(VH) 서열 및 서열번호 21과 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 가변 경쇄(VL) 서열을 포함한다.

- [0204] 실시형태 중 임의의 하나의 단리된 바이러스 벡터 중에서, 상기 ER 보유 서열은 KDEL, KKXX, KKMP 및 KKTN으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, 여기서, X는 임의의 아미노산일 수 있거나; 또는 상기 골지 보유 서열은 YGRL(서열번호 40), YQRL(서열번호 41), YKGL(서열번호 42) 및 YXXL(서열번호 43)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서, X는 임의의 아미노산일 수 있다. 실시형태 중 임의의 하나의 단리된 바이러스 벡터 중에서, 상기 CD2 차단 폴리펩티드는 상기 scFv와, KKMP 또는 KKTN을 포함하는 상기 ER 보유 서열 도메인 또는 YGRL, YQRL, YKGL을 포함하는 상기 골지 보유 서열 도메인 중 어느 하나 사이에 연결된 막관통 도메인을 더 포함하고, 상기 막관통 도메인은 CD8 α , CD8 β , 4-1BB, CD28, CD34, CD4, Fc ϵ RI γ , CD16, OX40, CD3 ζ , CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 δ , TCR α , CD32, CD64, VEGFR2, FAS 및 FGFR2B 중 어느 하나로부터 선택된 막관통 도메인이다. 실시형태 중 임의의 하나의 단리된 바이러스 벡터 중에서, 상기 막관통 도메인은 CD8 α 의 힌지-막관통 도메인을 포함한다.
- [0205] 실시형태 중 임의의 하나의 단리된 바이러스 벡터 중에서, 상기 CD2 차단 폴리펩티드는 서열번호 1 내지 4로 이루어진 군으로부터 선택된 임의의 하나와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD2 차단 폴리펩티드는 서열번호 6 내지 9 중 임의의 하나와 적어도 80%(예를 들어, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%)의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 갖는다.
- [0206] 본 발명의 일부 실시형태에서, 본 명세서에 요약된 CD2 차단 폴리펩티드 중 임의의 것을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 단리된 바이러스 벡터가 면역 세포 내에 도입된다.
- [0207] 또한 본 명세서에는 본 명세서에 기재된 CD2 차단 폴리펩티드를 포함하는 조작된 면역 세포가 제공된다. 임의의 실시형태의 조작된 면역 세포는 조작된 동종이체 세포이다. 임의의 실시형태의 조작된 면역 세포는 조작된 자가 세포이다. 임의의 실시형태의 조작된 면역 세포는 조작된 T 세포이다. 임의의 실시형태의 조작된 면역 세포는 조작된 NK 세포이다.
- [0208] 일 양태에서, 본 명세서에는 세포 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 분자를 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 조작된 면역 세포가 제공되며, 여기서 표적-결합 분자는 CD2 단백질(예를 들어, 인간 CD2 단백질)에 결합하는 항체이고, 세포 국소화 도메인은 소포체(ER) 보유 서열, 골지 보유 서열 및 프로테아좀 국소화 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하며, 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 분자는 조작된 세포에 의해서 분비되지 않는다.
- [0209] 일부 실시형태에서, CD2 단백질(예를 들어, 인간 CD2 단백질)에 결합하는 항체는 항-CD2 단일 체 가변 단편(scFv)이다. 일부 실시형태에서, scFv는 서열번호 18에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 가변 중쇄(V_H) 서열 및 서열번호 19에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 가변 경쇄(V_L) 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, scFv는 서열번호 18에 제시된 가변 중쇄(V_H) 서열 및 서열번호 19에 제시된 가변 경쇄(V_L) 서열을 포함한다.
- [0210] 일부 실시형태에서, scFv는 서열번호 20에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 가변 중쇄(V_H) 서열 및 서열번호 21에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 가변 경쇄(V_L) 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, scFv는 서열번호 20에 제시된 가변 중쇄(V_H) 서열 및 서열번호 21에 제시된 가변 경쇄(V_L) 서열을 포함한다.
- [0211] 일부 실시형태에서, 세포 국소화 도메인은 KDEL, KKXX, KKMP 또는 KKTN으로부터 선택된 아미노산을 포함하고, 여기서, X는 임의의 아미노산일 수 있다. 특정 실시형태에서, 폴리펩티드는 표적-결합 분자와 세포 국소화 도메인 사이를 연결하는 막관통 도메인을 추가로 포함한다. 일부 경우에, 막관통 도메인은 CD8 α , CD8 β , 4-1BB, CD28, CD34, CD4, Fc ϵ RI γ , CD16, OX40, CD3 ζ , CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 δ , TCR α , CD32, CD64, VEGFR2, FAS 또는 FGFR2B로부터 유래된다.
- [0212] 특정 실시형태에서, 막관통 도메인은 CD8 α 로부터 유래된 힌지-막관통 도메인을 포함한다.
- [0213] 다양한 실시형태에서, 조작된 면역 세포의 폴리펩티드는 서열번호 1 또는 서열번호 3과 적어도 90%(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%)의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 폴리펩티드는 서열번호 1 또는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0214] 특정 실시형태에서, 조작된 면역 세포의 폴리펩티드는 서열번호 2 또는 서열번호 4와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 폴리펩티드는 서열번호 2 또는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

- [0215] 일부 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 키메라 항원 수용체(CAR)를 더 포함한다. 일부 예에서, CAR은 항-CD2-4-1BB-CD3 ζ CAR이다. 항-CD2-4-1BB-CD3 ζ CAR은 서열번호 5와 적어도 90%(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%)의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 항-CD2-4-1BB-CD3 ζ CAR은 CD2(예를 들어, 인간 CD2)에 결합할 수 있다. 일부 예에서, 이러한 항-CD2-4-1BB-CD3 ζ CAR은 "CD2 CAR"이라고 지칭된다.
- [0216] 일부 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 CD2+ 세포의 세포독성을 유도한다.
- [0217] 일부 실시형태에서, 내인성 CD2 발현은 조작된 면역 세포에서 차단된다. 내인성 CD2 발현의 차단은 적어도 6개월 동안 지속될 수 있다. 내인성 CD2 발현의 차단은 적어도 12개월 동안 지속될 수 있다. 일부 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 대등한 면역 세포와 실질적으로 동일한 속도로 증식한다.
- [0218] 일부 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 조작된 동종이계 세포이거나 또는 조작된 자가 세포이다. 다른 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 조작된 T 세포, 예컨대, 감마-델타 T 세포이다.
- [0219] 또 다른 양태에서, 본 명세서에는 암 또는 자가면역 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, 이 방법은 본 명세서에 기재된 조작된 면역 세포 중 임의의 하나를 포함하는 치료량의 조성물을 대상체에게 투여함으로써 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 단계를 포함한다. 일부 예에서, 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함한다. 암은 T-세포 악성 종양 또는 CD2 연관 암일 수 있다. 일 실시형태에서, T 세포 악성종양은 조기 T 세포 전구세포 급성 림프모구성 백혈병(ETP-ALL) 또는 또 다른 T 세포 백혈병이다. 또 다른 실시형태에서, T 세포 악성종양은 피부 T-세포 림프종(CTCL), 균상 식육종, 세자리 증후군 또는 말초 T 세포 림프종(PTCL)을 비롯한 림프종이다.
- [0220] 일부 실시형태에서, 투여는 정맥내 주입, 동맥내 주입, 복강내 주입, 종양 내로의 직접 주사 및/또는 수술 후의 종양 층의 관류, 인공 스캐폴드에서 종양 부위에서의 이식 또는 척추강내 투여에 의한 것이다.
- [0221] 또 다른 양태에서, 본 명세서에는 세포 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 분자를 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 일부 경우에, 표적-결합 분자는 CD2 단백질(예를 들어, 인간 CD2 단백질)에 결합하는 항체이고, 세포 국소화 도메인은 소포체(ER) 보유 서열, 골지 보유 서열 및 프로테아좀 국소화 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하며, 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 분자는 조작된 세포에 의해서 분비되지 않는다.
- [0222] 특정 실시형태에서, CD2 단백질(예를 들어, 인간 CD2 단백질)에 결합하는 항체는 항-CD2 단일쇄 가변 단편(scFv)이다. 특정 실시형태에서, scFv는 서열번호 18과 적어도 90%(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%)의 서열 동일성을 갖는 가변 중쇄(V_H) 서열 및 서열번호 19와 적어도 90%(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%)의 서열 동일성을 갖는 가변 경쇄(V_L) 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, scFv는 서열번호 18에 제시된 가변 중쇄(V_H) 서열 및 서열번호 19에 제시된 가변 경쇄(V_L) 서열을 포함한다.
- [0223] 다른 실시형태에서, scFv는 서열번호 20에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 가변 중쇄(V_H) 서열 및 서열번호 21에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 가변 경쇄(V_L) 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, scFv는 서열번호 20에 제시된 가변 중쇄(V_H) 서열 및 서열번호 21에 제시된 가변 경쇄(V_L) 서열을 포함한다.
- [0224] 일부 실시형태에서, 세포 국소화 도메인은 KDEL, KKXX, KKMP 또는 KKTN으로부터 선택된 아미노산을 포함하고, 여기서, X는 임의의 아미노산일 수 있다. 특정 실시형태에서, 폴리펩티드는 표적-결합 분자와 세포 국소화 도메인 사이를 연결하는 막관통 도메인을 추가로 포함한다. 일부 경우에, 막관통 도메인은 CD8 α, CD8 β, 4-1BB, CD28, CD34, CD4, Fc ε RI γ, CD16, OX40, CD3 ζ, CD3 ε, CD3 γ, CD3 δ, TCR α, CD32, CD64, VEGFR2, FAS 또는 FGFR2B로부터 유래된다.
- [0225] 특정 실시형태에서, 막관통 도메인은 CD8 α로부터 유래된 힌지-막관통 도메인을 포함한다.
- [0226] 특정 실시형태에서, 조작된 면역 세포의 폴리펩티드는 서열번호 1 또는 서열번호 3과 적어도 90%(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%)의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 폴리펩티드는 서열번호 1 또는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0227] 다양한 실시형태에서, 조작된 면역 세포의 폴리펩티드는 서열번호 2 또는 서열번호 4와 적어도 90%(예를 들어,

90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%)의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 폴리펩티드는 서열번호 2 또는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0228] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 PEBL은 서열번호 6 내지 9 중 임의의 하나와 적어도 80%(예를 들어, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%)의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 갖는다.

[0229] 일부 실시형태에서, 본 명세서에는 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오티드 중 임의의 하나를 포함하는 발현 벡터가 제공된다. 일부 경우에, 발현 벡터는 또한 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. CAR은 항-CD2-4-1BB-CD3 ζ CAR일 수 있다. 일부 실시형태에서, 항-CD2-4-1BB-CD3 ζ CAR은 서열번호 5와 적어도 90%(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%)의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0230] 일부 실시형태에서, 발현 벡터는 서열번호 10 중 임의의 하나와 적어도 80%(예를 들어, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%)의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 갖는다. 일부 경우에, 발현 벡터는 서열번호 10의 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 발현 벡터는 서열번호 6 내지 9 중 임의의 하나와 적어도 80%(예를 들어, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%)의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 갖는다. 일부 경우에, 발현 벡터는 서열번호 6 내지 9 중 임의의 하나의 핵산 서열을 포함한다.

[0231] 일부 실시형태에서, 본 명세서에는 본 명세서에 기재된 발현 벡터 중 임의의 하나를 포함하는 숙주 세포가 제공된다.

[0232] 추가의 또 다른 양태에서, 본 명세서에는 조작된 면역 세포의 생산 방법이 제공되며, 이 방법은 본 명세서에 개시된 폴리뉴클레오티드 또는 발현 벡터 중 임의의 하나를 면역 세포 내에 도입하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 내인성 CD2 발현은 조작된 면역 세포에서 차단된다. 일부 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 조작된 동종이계 세포이거나 또는 조작된 자가 세포이다. 다른 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 조작된 T 세포, 예컨대, 감마-델타 T 세포이다.

[0233] 일 양태에서, 본 명세서에는 항-CD2 단일쇄 가변 단편(scFv) 도메인, CD8 α 힌지-막관통 도메인, 4-1BB 세포내 신호전달 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하는 단리된 항-CD2-4-1BB-CD3 ζ 키메라 항원 수용체(CAR) 분자가 제공된다. 항-CD2 단일쇄 가변 단편(scFv) 도메인은 서열번호 22 또는 서열번호 23과 적어도 90%(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%)의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. CD8 α 힌지-막관통 도메인은 서열번호 15와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 4-1BB 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 16과 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 함유할 수 있다. CD3 ζ 신호전달 도메인은 서열번호 17과 적어도 90%(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%)의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 함유할 수 있다. 일부 실시형태에서, 단리된 CAR 분자는 서열번호 5와 적어도 90%(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%)의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 양태에서, 본 명세서에는 본 명세서에 기재된 단리된 CAR 분자 중 임의의 하나를 암호화하는 단리된 핵산 분자가 제공된다. 항-CD2-4-1BB-CD3 ζ CAR은 CD2(예를 들어, 인간 CD2)에 결합할 수 있다.

[0234] 또 다른 양태에서, 본 명세서에는 항-CD2 단일쇄 가변 단편(scFv) 도메인, CD8 α 힌지-막관통 도메인, 4-1BB 세포내 신호전달 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하는 항-CD2-4-1BB-CD3 ζ 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 조작된 면역 세포가 제공된다. 항-CD2-4-1BB-CD3 ζ CAR은 CD2(예를 들어, 인간 CD2)에 결합할 수 있다.

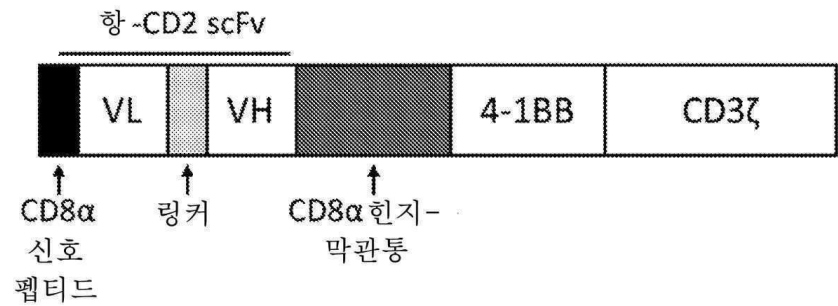
[0235] 일부 실시형태에서, 항-CD2 단일쇄 가변 단편(scFv) 도메인은 서열번호 22 또는 서열번호 23과 적어도 90%(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%)의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, CD8 α 힌지-막관통 도메인은 서열번호 15와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 4-1BB 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 16과 적어도 90%(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%)의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 함유한다. 특정 실시형태에서, CD3 ζ 신호전달 도메인은 서열번호 17과 적어도 90%(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%)의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

일부 실시형태에서, 단리된 CAR 분자는 서열번호 5와 적어도 90%(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%)의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 단리된 CAR 분자는 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 단리된 CAR 분자는 서열번호 10의 핵산 서열을 포함한다.

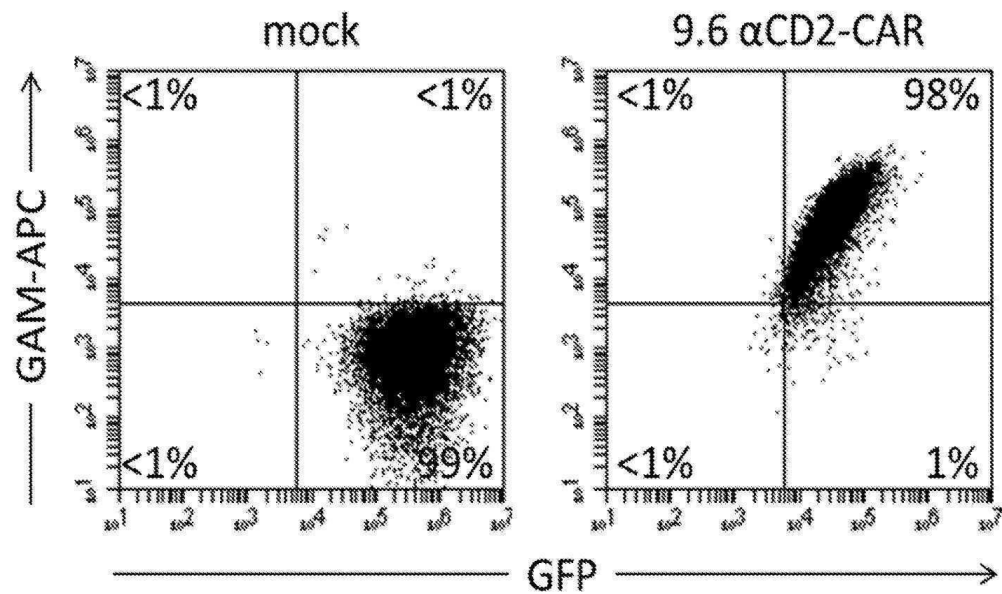
- [0236] 일부 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 조작된 동종이계 세포이거나 또는 조작된 자가 세포이다. 다른 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 조작된 T 세포, 예컨대, 감마-델타 T 세포이다.
- [0237] WO 2016/126213 및 PCT/US2017/063048의 내용, 예컨대, 명세서, 청구범위 및 도면은 모든 목적을 위해서 전문이 본 명세서에 참조에 의해 포함된다.
- [0238] 실시예
- [0239] **실시예 1: 효과적인 키메라 항원 수용체 요법을 위한 T 세포에서의 CD2 발현의 차단**
- [0240] 본 실시예는 강력한 항-CD2 CAR-T 세포를 야기하는, 2세대 CAR과 조합된, 신규한 방법을 사용한 CD2 발현의 차단을 설명한다. 이러한 실시 전략은 암 환자를 위한 새로운 치료 선택을 제공한다.
- [0241] 도 1은 예시적인 항-CD2 키메라 항원 수용체(CAR)를 제공한다. 항-CD2 단클론성 항체 9.6의 scFv를 실험실에서 이전에 개발된 CD8 α 신호 펩티드, CD8 α 힌지-막관통 도메인, 및 4-1BB의 세포내 도메인 및 항-CD19-4-1BB-CD3 CAR의 CD3 ζ 에 연결하였다. 항-CD2 단클론성 항체 9.6 또는 9-1의 scFv를 CD8 α 신호 펩티드 및 국소화 도메인을 암호화하는 서열, 선택적으로, CD8 α 힌지-막관통 도메인에 연결하였다. 이것은 무린 줄기세포 바이러스(murine stem cell virus: MSCV) 벡터 내에 서브클로닝하였다. 일부 경우에, MSCV는 파이어플라이 루시퍼라제 유전자를 함유하는 MSCV-내부 리보솜 유입 부위(internal ribosome entry site: IRES)-녹색 형광 단백질(green fluorescent protein: GFP) 레트로바이러스 벡터이다.
- [0242] 9.6 항-CD2 CAR 레트로바이러스 벡터 작제물을 주카트 세포(백혈병 세포주)에 형질도입하였다. 당업자에게 공지된 표준 프로토콜을 사용하여 레트로바이러스 상청액의 제조 및 형질도입을 수행하였다. 발현 결과를 도 2에 도시한다.
- [0243] CD2 유전자를 갖는 CCRF-CEM 세포에 9.6 항-CD2 CAR 레트로바이러스 벡터 작제물을 형질도입하였다. 생성된 세포를 10% FBS 및 1% Pen-Strep이 보충된 RPMI-1640 배지에서 유지시켰다. 9.6 항-CD2의 활성을 평가하였다. 도 3은 항-CD2 CAR이 CD2 표적 세포의 존재 하에서 CD2 및 CD69(활성화 마커)의 발현을 유도하였다는 것을 나타낸다.
- [0244] 말초 혈액 T 림프구에서 항-CD2 CAR의 효과를 결정하기 위해서, 항-CD2 CAR을 레트로바이러스(예를 들어, 렌티바이러스) 형질도입 또는 전기천공에 의해서 1차 T 세포에 도입하였다.
- [0245] 도 4는 CAR 발현을 도시한다.
- [0246] 도 5는 CD2+ 표적 세포(MOLT-4)를 항-CD2 CAR이 형질도입된 주카트 세포 또는 GFP 단독을 함유하는 벡터가 형질도입된 주카트 세포와 함께 공배양하는 경우 항-CD2 CAR의 기능을 도시한다. 일부 경우에, 세포를 1:1 E:T로 공배양하였다. 결과는, 9.6 항-CD2 CAR-T 세포가 CD2+ 표적 세포에 대해서 세포독성을 발휘함을 나타낸다.
- [0247] 도 6은 항-CD2 PEBL 작제물의 예시적인 실시형태를 도시한다. 9.6 PEBL 및 9-1 PEBL을 주카트 세포에 레트로바이러스에 의해서 형질도입하였다. 도 7의 히스토그램은 CD2 발현의 하향조절을 나타낸다.
- [0248] 도 8은 9.6 PEBL II가 인간 말초 혈액 T 세포에서 CD2 발현을 하향조절함을 나타낸다.
- [0249] 본 명세서에 인용된 모든 특허, 공개된 출원 및 참조문헌의 교시는 그 전체 내용이 원용에 의해 포함된다.
- [0250] 본 발명이 이의 예시적인 실시형태를 참조하여 특히 도시되고 설명되었지만, 첨부된 청구범위에 의해 포함되는 본 발명의 범위를 벗어나지 않으면서 형태 및 세부사항에 대한 다양한 변경이 이루어질 수 있음이 당업자에 의해 이해될 것이다.

도면

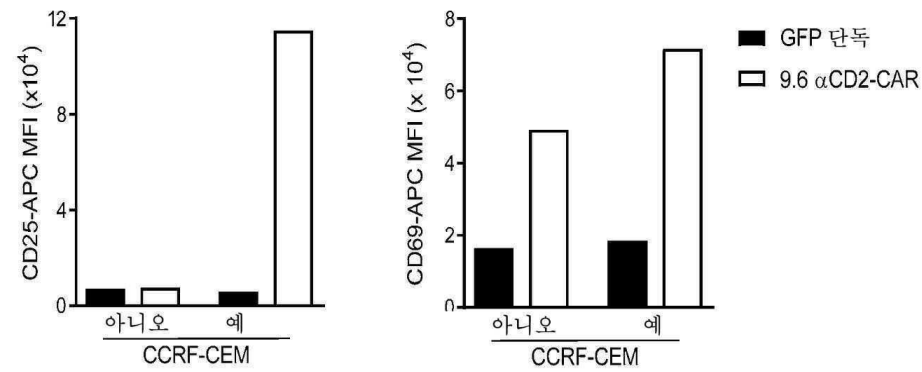
도면1



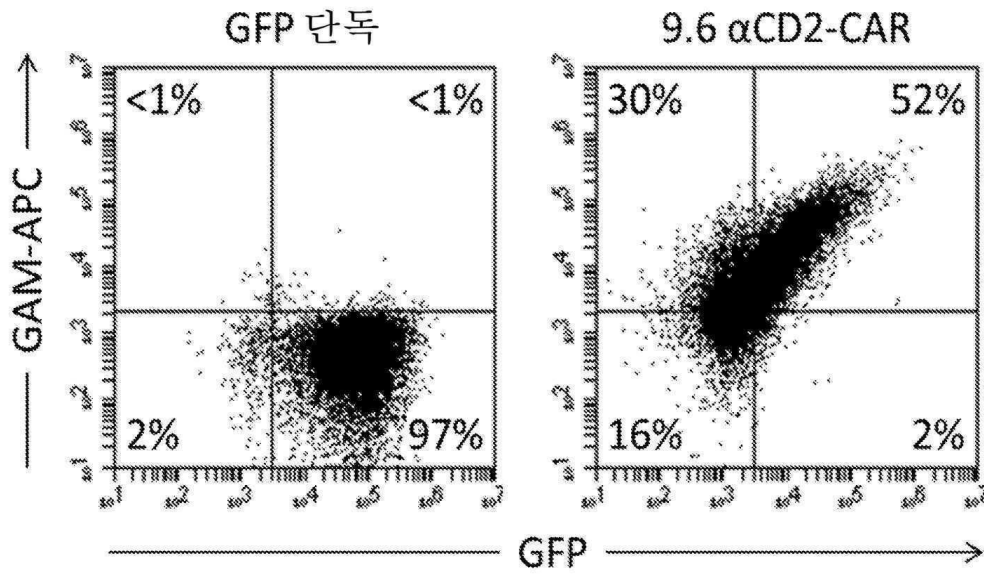
도면2



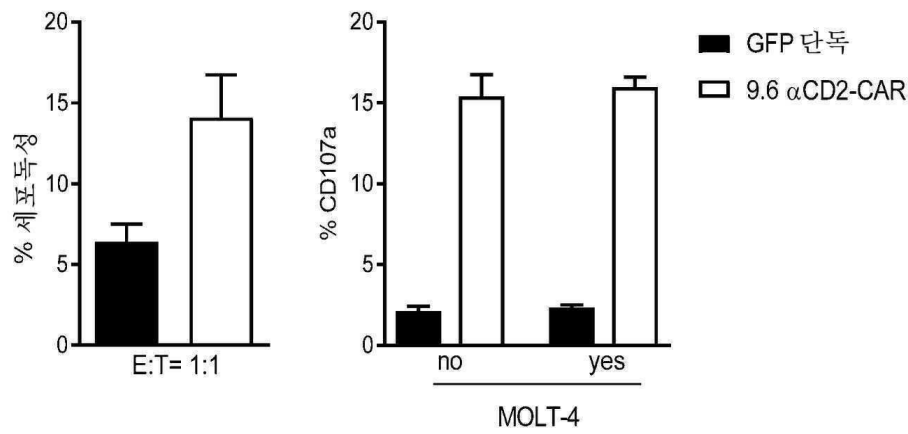
도면3



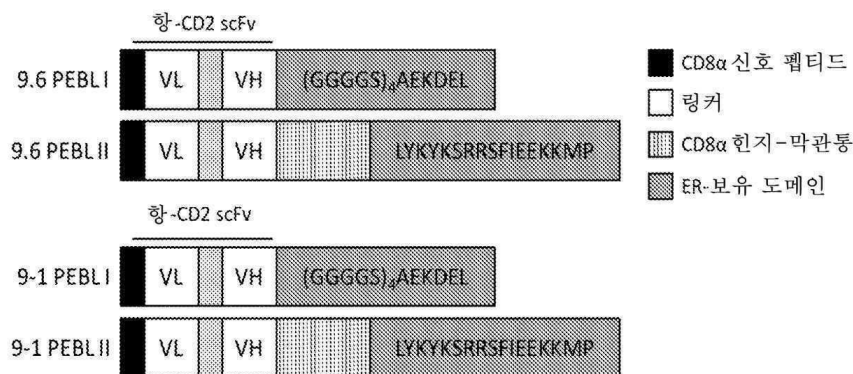
도면4



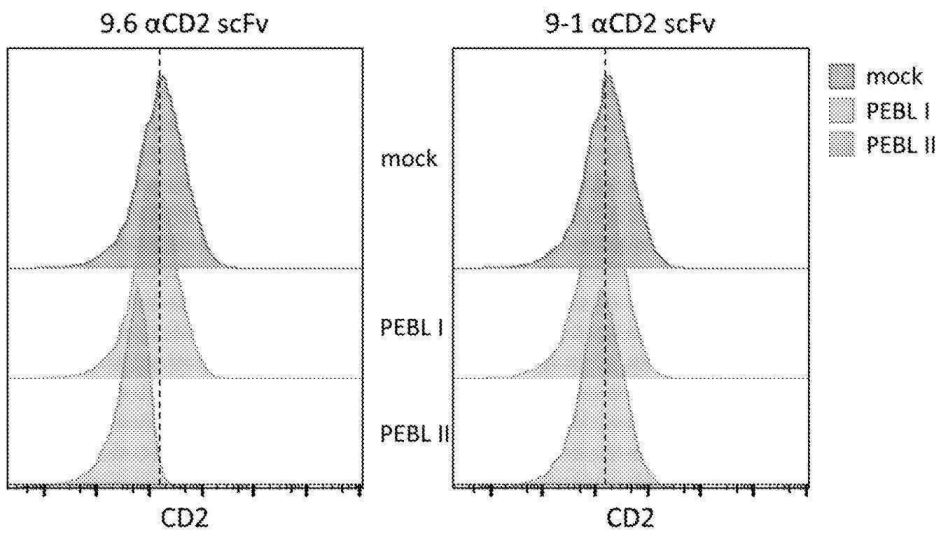
도면5



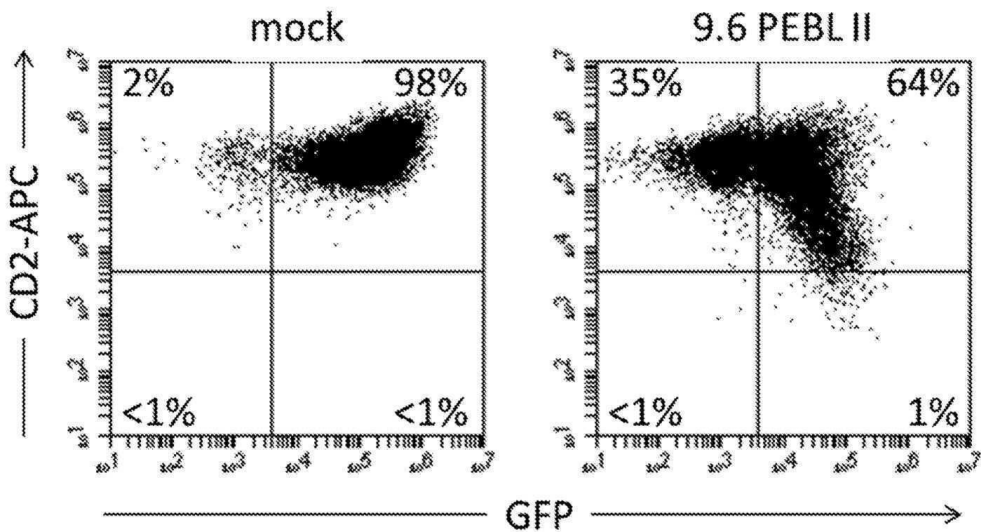
도면6



도면7



도면8



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> National University of Singapore
- <120> BLOCKADE OF CD2 SURFACE EXPRESSION AND EXPRESSION OF CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS FOR IMMUNOTHERAPY OF T-CELL MALIGNANCIES
- <130> 119419-5004-WO
- <140> Filed Herewith
- <141> 2019-05-23
- <150> 62/675,511
- <151> 2018-05-23
- <160> 43

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 289

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 1

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 Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser

20 25 30
Val Thr Pro Gly Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser

35 40 45
Ile Ser Asp Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro

50 55 60
Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser

65 70 75 80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn

85 90 95
Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly His

100 105 110
Ser Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg Arg

115 120 125
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln

130 135 140
Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Thr Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser Ser

145 150 155 160
Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp

165 170 175
Val Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Asp Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

180 185 190

Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe Thr

195 200 205
Asp Lys Ala Ile Ser Thr Ile Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met

210 215 220
Gln Leu Ser Thr Leu Thr Ser Asp Ala Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
225 230 235 240

Arg Ser Pro Arg Asp Ser Ser Thr Asn Leu Ala Asp Trp Gly Gln Gly
245 250 255

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

260 265 270
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu Lys Asp Glu

275 280 285
Leu

<210> 2

<211> 348

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 2

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 Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser

20 25 30
Val Thr Pro Gly Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser

35 40 45
Ile Ser Asp Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro

50 55 60
Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser

65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn

85	90	95	
Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly His			
100	105	110	
Ser Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg Arg			
115	120	125	
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln			
130	135	140	
Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Thr Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser Ser			
145	150	155	160
Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp			
165	170	175	
Val Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Asp Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly			
180	185	190	
Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe Thr			
195	200	205	
Asp Lys Ala Ile Ser Thr Ile Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met			
210	215	220	
Gln Leu Ser Thr Leu Thr Ser Asp Ala Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ser			
225	230	235	240
Arg Ser Pro Arg Asp Ser Ser Thr Asn Leu Ala Asp Trp Gly Gln Gly			
245	250	255	
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg			
260	265	270	
Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg			
275	280	285	
Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly			
290	295	300	
Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr			
305	310	315	320
Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Lys Tyr Lys			
325	330	335	

Ser Arg Arg Ser Phe Ile Glu Glu Lys Lys Met Pro

340

345

<210> 3

<211> 291

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 3

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 Asn Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu

20 25 30

Ala Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Lys Ser Ser Gln

35 40 45

Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln

50 55 60

Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro Glu Asp Leu Ala Val

100 105 110

Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Leu Ser Ser His Thr Phe Gly Gly Gly Thr

115 120 125

Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

130 135 140

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

145 150 155 160

Pro Gly Ser Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

165 170 175

Thr Arg Tyr Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Ile Gln Gly Leu

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

Tyr Tyr Cys Ala Thr Glu Asp Leu Tyr Tyr Ala Met Glu Tyr Trp Gly
 245 250 255
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 260 265 270
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu Lys
 275 280 285

Asp Glu Leu

290

<210> 4

<211> 350

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 4

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 Asn Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 20 25 30
 Ala Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Lys Ser Ser Gln
 35 40 45
 Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln
 50 55 60

Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr
 65 70 75 80
 Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr

85	90	95	
Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro Glu Asp Leu Ala Val			
100	105	110	
Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Leu Ser Ser His Thr Phe Gly Gly Gly Thr			
115	120	125	
Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser			
130	135	140	
Gly Gly Gly Gly Ser Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg			
145	150	155	160
Pro Gly Ser Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe			
165	170	175	
Thr Arg Tyr Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Ile Gln Gly Leu			
180	185	190	
Glu Trp Ile Gly Asn Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn			
195	200	205	
Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Gly			
210	215	220	
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val			
225	230	235	240
Tyr Tyr Cys Ala Thr Glu Asp Leu Tyr Tyr Ala Met Glu Tyr Trp Gly			
245	250	255	
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala			
260	265	270	
Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser			
275	280	285	
Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr			
290	295	300	
Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala			
305	310	315	320
Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Lys			
325	330	335	

Tyr Lys Ser Arg Arg Ser Phe Ile Glu Glu Lys Lys Met Pro
340 345 350

<210> 5
<211> 488
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic polypeptide
<400> 5

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Asn Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
20 25 30
Ala Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Lys Ser Ser Gln
35 40 45
Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln
50 55 60
Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr
65 70 75 80
Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr
85 90 95
Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro Glu Asp Leu Ala Val
100 105 110
Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Leu Ser Ser His Thr Phe Gly Gly Gly Thr
115 120 125
Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140
Gly Gly Gly Gly Ser Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
145 150 155 160
Pro Gly Ser Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
165 170 175
Thr Arg Tyr Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Ile Gln Gly Leu
180 185 190

Glu Trp Ile Gly Asn Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
 195 200 205
 Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Gly
 210 215 220
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 225 230 235 240
 Tyr Tyr Cys Ala Thr Glu Asp Leu Tyr Tyr Ala Met Glu Tyr Trp Gly
 245 250 255
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg
 260 265 270
 Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg
 275 280 285
 Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly
 290 295 300
 Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr
 305 310 315 320
 Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg
 325 330 335
 Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro
 340 345 350
 Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu
 355 360 365
 Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala
 370 375 380
 Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
 385 390 395 400
 Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
 405 410 415
 Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
 420 425 430
 Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser

435 440 445
Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly

450 455 460
Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu

465 470 475 480
His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

485

<210> 6

<211> 892

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polynucleotide

<400> 6

gaattcggct tccaccatgg ctctgccctg gaccgccctg ctgtgcctc tggctctgct 60

gtgtgcagct gcccgcccaa tcgtgatgac ccagagccca gccaccctgt ccgtgacacc 120

tggcgaccgg gtgtctctga gctgcagagc ctcccagtct atcagcgatt acctgcactg 180

gtatcagcag aagtcccacg agtctccccg gctgctgac aagtacgcta gccagtctat 240

cagcggcatc cctagccggt tctccggatc tggaagcgga tccgacttta ccctgagcat 300

caactccgtg gagccagagg atgtgggcgt gtactattgc cagaatggcc actccttccc 360

cctgaccttt ggcgccggca caaagctgga gctgcggaga ggcggcggcg gctctggagg 420

aggaggaagc ggaggaggag gctcccaggt gcagctgcag cagccaggaa cagagctggt 480

gcggccccgc agctccgtga agctgtctg taaggcctct ggctacacct tcacaagcta 540

ttgggtgaac tgggtgaagc agaggcctga ccagggcctg gagggtgatc gaaggatcga 600

cccatacga tctgagacac actataacca gaagtttaca gacaaggcca tcagcaccat 660

cgatacatct agcaataacc cctatatgca gctgtccacc ctgacatctg atgccagcgc 720

cgtgtactat tgttctagga gccctcgca ctctctaca aatctggcag attggggaca 780

gggcaccctg gtgacagtga gctccggtgg tggcggcagt ggtggcggtg gctcaggcgg 840

tgggtggctcc ggtggcggtg gctctgcaga aaaagatgag ttgtaactcg ag 892

<210> 7

<211> 1069

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polynucleotide

<400> 7

gaattcggct tccacatgg ctctgccctg gaccgccctg ctgtgcctc tggtctgtct 60

gtgcacgct gcccgcccaa tcgtgatgac ccagagccca gccaccctgt ccgtgacacc 120

tggcgaccgg gtgtctctga gctgcagagc ctcccagtct atcagcgatt acctgcactg 180

gtatcagcag aagtcccacg agtctccccc gctgtctgac aagtacgcta gccagtctat 240

cagcggcatc cctagccggt tctccggatc tggaagcgga tccgacttta cctgagcat 300

caactccgtg gagccagagg atgtgggcgt gtactattgc cagaatggcc actccttccc 360

cctgaccttt ggcgccggca caaagctgga gctgcggaga ggcgcgggcg gctctggagg 420

aggaggaagc ggaggaggag gctcccaggt gcagctgcag cagccaggaa cagagctggt 480

gcggcccggc agctccgtga agctgtctct taaggcctct ggctacacct tcacaagcta 540

ttgggtgaac tgggtgaagc agaggcctga ccagggcctg gaggatcg gaaggatcga 600

cccatacgat tctgagacac actataacca gaagtttaca gacaaggcca tcagcaccat 660

cgatacatct agcaataccg cctatatgca gctgtccacc ctgacatctg atgccagcgc 720

cgtgtactat tgttctagga gccctcgcga ctctcttaca aatctggcag attggggaca 780

gggcaccctg gtgacagtga gctccaagcc aaccacaacc cctgcaccaa ggccacctac 840

accagcacct accatcgcaa gccagccact gtccctgagg ccagaggcat gtaggcctgc 900

agcaggaggc gccgtgcaca cagcggcct ggactttgcc tgcgatatct acatctgggc 960

accactggca ggaacctgtg gcgtgctgct gctgagcctg gtgattacc tgtataagta 1020

caagtccaga cgctcattca ttgaggaaaa gaaaatgcct taactcgag 1069

<210> 8

<211> 898

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polynucleotide

<400> 8

gaattcggct tccacatgg ctctgccctg gaccgccctg ctgtgcctc tggtctgtct 60

gtgcacgct gcccgcccaa acatcatgat gaccagctcc ccagctccc tggccgtgtc 120

tgccggagag aaggtgacca tgacatgcaa gtctagccag tccgtgtgt actcctctaa 180

ccagaagaat tacctggcct ggtatcagca gaagcccggc cagagcccta agctgtgat 240

ctattgggca agcaccggg agtccggagt gccagacaga ttcaccgaa gcggatccgg 300

aacagacttc accctgacaa tcagctccgt gcagcctgag gacctggccg tgtactattg 360
ccaccagtac ctgtctagcc acaccttcgg cggcggcaca aagctggaga tcaagagggg 420
aggaggagga tccggaggag gaggtcttgg cggcggcggc agccagctgc agcagccagg 480
agcagagctg gtgaggcccg gctcctctgt gaagctgtct tgtaaggcca gcggctacac 540
cttcacaagg tattggatcc actgggtgaa gcagcgcct atccagggcc tggagtggat 600
cggcaacatc gacctatctg atagcgagac aactacaat cagaagtta aggacaaggc 660

cacctgaca gtggataaga gctccggcac cgcctatatg cagctgtcta gcctgacatc 720
cgaggactct gccgtgtact attgtgccac agaggatctg tactatgcca tggagtactg 780
gggccagggc acctccgtga cagtgtctc tgggtggggc ggagtggtg gcggtggctc 840
aggcgggtgt ggctccgtg gcggtggctc tgcagaaaaa gatgagttgt aactcgag 898

<210> 9

<211> 1075

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polynucleotide

<400> 9

gaattcggct tccaccatgg ctctgcccgt gaccgcccgt ctgtgcctc tggctctgct 60
gctgcacgct gcccgcccaa acatcatgat gaccagctcc ccagctccc tggccgtgtc 120

tgccggagag aaggtgacca tgacatgcaa gtctagccag tccgtgtgt actcctctaa 180
ccagaagaat tacctggcct ggtatcagca gaagcccggc cagagcccta agctgtgat 240
ctattgggca agcaccggg agtccggagt gccagacaga ttcaccgga gcggatccgg 300
aacagacttc accctgacaa tcagctccgt gcagcctgag gacctggccg tgtactattg 360
ccaccagtac ctgtctagcc acaccttcgg cggcggcaca aagctggaga tcaagagggg 420
aggaggagga tccggaggag gaggtcttgg cggcggcggc agccagctgc agcagccagg 480
agcagagctg gtgaggcccg gctcctctgt gaagctgtct tgtaaggcca gcggctacac 540

cttcacaagg tattggatcc actgggtgaa gcagcgcct atccagggcc tggagtggat 600
cggcaacatc gacctatctg atagcgagac aactacaat cagaagtta aggacaaggc 660
cacctgaca gtggataaga gctccggcac cgcctatatg cagctgtcta gcctgacatc 720
cgaggactct gccgtgtact attgtgccac agaggatctg tactatgcca tggagtactg 780
gggccagggc acctccgtga cagtgtctc taagccaacc acaaccctg caccaaggcc 840
acctacacca gcacctacca tcgcaagcca gccactgtcc ctgaggccag aggcattgag 900

gcctgcagca ggaggcgccg tgcacacacg cggcctggac tttgcctgcg atatctacat 960

ctgggcacca ctggcaggaa cctgtggcgt gctgctgctg agcctggtga ttaccctgta 1020

taagtacaag tccagacgct cattcattga ggaaaagaaa atgccttaac tcgag 1075

<210> 10

<211> 1549

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polynucleotide

<400> 10

gaattcggct tccaccatgg ctctgcccgt gaccgccctg ctgctgcctc tggctctgct 60

gctgcacgct gcccgcccaa acatcatgat gaccagtc ccagctccc tggccgtgtc 120

tgccggagag aaggtgacca tgacatgcaa gtctagccag tccgtgctgt actcctctaa 180

ccagaagaat tacctggcct ggtatcagca gaagcccgcc cagagcccta agctgctgat 240

ctattgggca agcaccgggg agtccggagt gccagacaga ttcaccggaa gcggatccgg 300

aacagacttc accctgacaa tcagctccgt gcagcctgag gacctggccg tgtactattg 360

ccaccagtac ctgtctagcc acaccttcgg cggcggcaca aagctggaga tcaagagggg 420

aggaggagga tccggaggag gaggtcttgg cggcggcgcc agccagctgc agcagccagg 480

agcagagctg gtgaggcccc gctcctctgt gaagctgtct tgtaaggcca gcggctacac 540

cttcacaagg tattggatcc actgggtgaa gcagcgccct atccagggcc tggagtggat 600

cggcaacatc gaccatctg atagcgagac aactacaat cagaagtta aggacaaggc 660

caccctgaca gtggataaga gctccggcac cgcctatatg cagctgtcta gcctgacatc 720

cgaggactct gccgtgtact attgtgccac agaggatctg tactatgcca tggagtactg 780

gggccagggc acctccgtga cagtgtcctc taccactaca cctgcaccaa ggcctccac 840

accgctccc actatcgctt ccagccact gtcctgagg ccgaggcct gcaggccagc 900

agctggcgga gccgtgcata ctagggggct ggacttcgct tgcgacatct acatctgggc 960

cccactggca gggacatgcg gagtctgct gctgtccctg gtcacacac tgtactgcaa 1020

gcgggggcgc aaaaaactgc tgtatatctt taagcagcct ttcagagac cagtgcagac 1080

aaccaggag gaagatgggt gctcatgccg gtttcccag gaggaggaag gcggctgcga 1140

gctgagggtg aagttttccc gctcagcaga tgctcctgcc taccagcagg gccagaacca 1200

gctgtataat gagctgaacc tgggcagacg cgaagagtat gatgtgctgg acaaaaggcg 1260

gggaagagac cccgaaatgg gaggaagcc aaggcgaaa aacccccagg agggcctgta 1320

caatgagctg cagaaggaca aaatggcaga ggcttacagt gagattggga tgaagggaga 1380
gagacggagg ggaaaagggc acgatggcct gtaccagggg ctgagcacag caaccaaaga 1440
tacttatgac gcactgcaca tgcaggcact gccacccaga tgacagccag gggatttcac 1500

cactcaaagg ccagacctgc agacgcccag attatgagac acactcgag 1549

<210> 11

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 11

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

20

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 12

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 13

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 13

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Ala Glu Lys Asp Glu Leu

20

25

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 14

Leu Tyr Lys Tyr Lys Ser Arg Arg Ser Phe Ile Glu Glu Lys Lys Met

1 5 10 15
Pro

<210> 15

<211> 67

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 15

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

1 5 10 15
Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
20 25 30
Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile

35 40 45
Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Ile
50 55 60
Thr Leu Tyr

65

<210> 16

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 16

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

35 40

<210> 17

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 17

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 18

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 18

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Thr Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser

1 5 10 15

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

Trp Val Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Asp Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Thr Asp Lys Ala Ile Ser Thr Ile Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ser Arg Ser Pro Arg Asp Ser Ser Thr Asn Leu Ala Asp Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 19

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 19

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

Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr Leu

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys
35 40 45

Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly His Ser Phe Pro Leu Thr

85 90 95
Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg Arg
100 105
<210> 20
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic polypeptide
<400> 20
Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser Ser Val
1 5 10 15
Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Trp Ile
20 25 30
His Trp Val Lys Gln Arg Pro Ile Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asn
35 40 45
Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp
50 55 60
Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Gly Thr Ala Tyr Met Gln
65 70 75 80
Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr
85 90 95
Glu Asp Leu Tyr Tyr Ala Met Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115
<210> 21
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic polypeptide
<400> 21
Asn Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Pro Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln
85 90 95

Tyr Leu Ser Ser His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 22

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 22

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

Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr Leu
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys
35 40 45

Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly His Ser Phe Pro Leu Thr

85

90

95

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

100

105

110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln

115

120

125

Pro Gly Thr Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser Ser Val Lys Leu Ser Cys

130

135

140

Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Val Asn Trp Val Lys

145

150

155

160

Gln Arg Pro Asp Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Tyr

165

170

175

Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe Thr Asp Lys Ala Ile Ser

180

185

190

Thr Ile Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Thr Leu

195

200

205

Thr Ser Asp Ala Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Ser Pro Arg Asp

210

215

220

Ser Ser Thr Asn Leu Ala Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

225

230

235

240

Ser Ser

<210> 23

<211> 244

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 23

Asn Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly

1

5

10

15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20

25

30

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

35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Pro Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Trp Ile

145 150 155 160

His Trp Val Lys Gln Arg Pro Ile Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asn

165 170 175

Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp

180 185 190

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

195 200 205

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr

210 215 220

Glu Asp Leu Tyr Tyr Ala Met Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val

225 230 235 240

Thr Val Ser Ser

<210> 24

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 24

Lys Asp Glu Leu

1

<210> 25

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 25

Lys Lys Asp Glu

1

<210> 26

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(4)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 26

Lys Lys Xaa Xaa

1

<210> 27

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 27

Lys Lys Met Pro

1

<210> 28

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 28

Tyr Gln Arg Leu

1

<210> 29

<211> 6

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 29

Ala Glu Lys Asp Glu Leu

1 5

<210> 30

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 30

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Ala Glu Lys Asp Glu Leu

20 25

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 31

Leu Tyr Lys Tyr Lys Ser Arg Arg Ser Phe Ile Glu Glu Lys Lys Met

1 5 10 15

Pro

<210> 32

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(4)

<223> wherein n is 1-10

<400> 32

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 33

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<

220><221> MOD_RES

<222> (1)..(4)

<223> wherein n is 1-10

<400> 33

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 34

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(5)

<223> wherein n is 1-10

<400> 34

Gly Gly Ser Gly Gly

1

5

<210> 35

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic polypeptide
 <220><221> MOD_RES
 <222> (1)..(5)
 <223> wherein n is 1-10
 <400>
 35
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 36
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic polypeptide
 <400> 36
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 37
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic polypeptide
 <400> 37
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 38
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic polypeptide
 <400> 38
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 39

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 39

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 40

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 40

Tyr Gly Arg Leu

1

<210> 41

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 41

Tyr Gln Arg Leu

1

<210> 42

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 42

Tyr Lys Gly Leu

1

<210> 43

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 43

Tyr Xaa Xaa Leu

1