



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년10월11일

(11) 등록번호 10-2715016

(24) 등록일자 2024년10월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/705 (2006.01) C07K 16/30 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/705 (2013.01)
C07K 14/70517 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7008875
- (22) 출원일자(국제) 2016년08월30일
심사청구일자 2021년08월20일
- (85) 번역문제출일자 2018년03월28일
- (65) 공개번호 10-2018-0037294
- (43) 공개일자 2018년04월11일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2016/049493
- (87) 국제공개번호 WO 2017/040529
국제공개일자 2017년03월09일
- (30) 우선권주장
1020150122727 2015년08월31일 대한민국(KR)
62/317,950 2016년04월04일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
JP2008509656 A*
W02015105522 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
주식회사 헬릭스미스
서울특별시 강서구 마곡중앙8로7길 21(마곡동)
- (72) 발명자
모건 리처드
미국, 뉴 햄프셔 03226, 센터 하버, 피오 박스 1254
프리드먼 케빈
미국, 메사추세츠 02176, 멜로즈, 4 클로버 서클
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 14 항

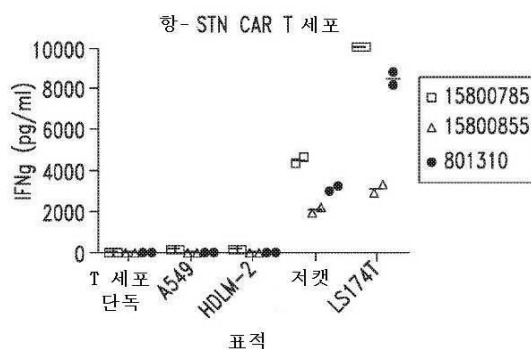
심사관 : 강덕희

(54) 발명의 명칭 항-시알릴 Tn 키메라 항원 수용체

(57) 요약

본 발명은 TAG-72 상에서 당에피토프 STn을 발현하는 암에 대한 입양 세포 요법을 위한 개선된 조성물을 제공한다.

대표도 - 도4a



(52) CPC특허분류

C07K 14/70521 (2013.01)

C07K 16/30 (2013.01)

C07K 19/00 (2023.08)

C07K 2317/52 (2013.01)

C07K 2317/53 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

(72) 발명자

유승진

서울특별시 성동구 독서당로 175, 105동 1104호 (옥수동, 극동그린아파트)

정재균

서울특별시 영등포구 영등포로3길 9, 102동 402호 (양평동2가, 양평동삼성아파트)

채진아

서울특별시 금천구 벚꽃로 73, 106동 1102호 (독산동, 금천현대아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

하기 a) 내지 d)를 포함하는 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor: CAR):

- a) 당단백질 상에서 발현된 시알릴 Tn(STn) 항원의 하나 이상의 에피토프에 결합하는 항-STn 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 세포외 도메인으로서, 상기 항-STn 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 9 내지 11에 기재된 CDRL1 내지 CDRL3 서열을 포함하는 가변 경쇄 서열, 및 서열번호 12 내지 14에 기재된 CDRH1 내지 CDRH3 서열을 포함하는 가변 중쇄 서열을 포함하는, 상기 세포외 도메인;
- b) CD8 α 및 CD28로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리펩타이드로부터 단리된 막관통 도메인(transmembrane domain);
- c) CD28, CD134(OX40), CD137(4-1BB)로 이루어진 군으로부터 선택되는 공자극성 분자로부터 단리된 하나 이상의 세포내 공자극성 신호전달 도메인(intracellular co-stimulatory signaling domain); 및
- d) CD3 ζ 1차 신호전달 도메인.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 STn 항원은

- (a) 뮤신 또는 뮤신 유사 당단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 당단백질 상에서 발현되거나;
- (b) 뮤신 1 및 뮤신 16으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뮤신 상에서 발현되거나;
- (c) 뮤신 유사 단백질 상에서 발현되거나; 또는
- (d) 종양 연관된 당단백질 72(TAG-72) 상에서 발현되는, CAR.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 항-STn 항체 또는 항원 결합 단편은

- (a) 낙타 Ig, Ig NAR, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab)'2 단편, F(ab)'3 단편, Fv, 단쇄 Fv 항체("scFv"), 비스-scFv, (scFv)2, 미니바디, 다이아바디, 트라이아바디, 테트라바디, 이황화 안정화된 Fv 단백질("dsFv"), 및 단일 도메인 항체(sdAb, 나노바디)로 이루어진 군으로부터 선택되거나; 또는
- (b) scFv인, CAR.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 항-STn 항체 또는 이의 항원 결합 단편은

(a) 서열번호 15에 기재된 바와 같은 가변 경쇄 서열 및 서열번호 16에 기재된 바와 같은 가변 중쇄 서열을 포함하거나; 또는

(b) 서열번호 23에 기재된 바와 같은 가변 경쇄 서열 및 서열번호 24에 기재된 바와 같은 가변 중쇄 서열을 포함하는, CAR.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

제1항에 있어서, (a) 힌지 영역 폴리펩타이드, (b) 스페이서 영역, 또는 (c) 신호 펩타이드를 더 포함하는, CAR.

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

제1항에 있어서, 상기 CAR은 서열번호 26 내지 27로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, CAR.

청구항 35

제1항, 제2항, 제6항, 제11항, 제26항 및 제34항 중 어느 한 항의 CAR을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 36

제1항, 제2항, 제6항, 제11항, 제26항 및 제34항 중 어느 한 항의 CAR을 코딩하는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 37

제36항의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 벡터.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 벡터는 발현 벡터, 에피솜 벡터, 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 또는 렌티바이러스 벡터인, 벡터.

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

제37항의 백터를 포함하는 면역 효과기 세포.

청구항 57

제56항에 있어서, 상기 면역 효과기 세포는 T 림프구, 자연 살해 T 림프구(NKT) 세포 및 자연 살해(NK) 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는, 면역 효과기 세포.

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

제56항의 면역 효과기 세포 및 생리적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는, 당단백질 상에서 STn 항원을 발현하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 63

면역 효과기 세포에 제1항, 제2항, 제6항, 제11항, 제26항 및 제34항 중 어느 한 항의 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 백터를 도입시키는 단계를 포함하는, 제1항, 제2항, 제6항, 제11항, 제26항 및 제34항 중 어느 한 항의 CAR을 포함하는 면역 효과기 세포의 생성 방법.

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 관한 교차 참조

[0002] 본 출원은 2016년 4월 4일 출원된 미국 가출원 제62/317,950호의 35 U.S.C. § 119(e) 하의 이득을 청구하고, 2015년 8월 31일 출원된 한국 특허 출원 제10-2015-0122727호의 35 U.S.C. § 119(a) 내지 (d) 하의 이득을 청구하며, 이들 각각은 그 전체로 본 명세서에 참고로 편입된다.

[0003] 서열 목록에 관한 진출

[0004] 본 출원과 연관된 서열 목록은 종이 복사본 대신 텍스트 형식으로 제공되며, 본 명세서에 참조로 여기에 편입된다. 서열 목록을 함유하는 텍스트 파일의 명칭은 BLBD_066_02WO_ST25.txt이다. 텍스트 파일은 38 KB이고, 2016년 8월 30일에 생성되었고, 명세서의 출원과 동시에, EFS-웹을 통해 전자 제출되었다.

[0005] 기술 분야

[0006] 본 발명은 암을 치료하기 위한 개선된 조성물 및 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 항-STn 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 개선된 키메라 항원 수용체(CAR), 이들 CAR을 발현하도록 유전자 변형된

면역 효과기 세포, 및 STn 발현 암을 효과적으로 치료하기 위한 이들 조성물의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0007] 시알릴-Tn 항원(STn)은 GalNAc α -O-Ser/Thr에 α 2,6-연결된 시알산 잔기를 함유하는 짧은 O-글리칸이다. STn의 생물합성은 O-글리칸 연장 글리코실트랜스퍼라제와 경쟁하여 암 세포가 보다 긴 O-글리칸을 나타내는 것을 방지하는, ST6GalNAc I이라고 하는 특이적 시알릴트랜스퍼라제에 의해 매개된다. STn 항원의 다양한 에피토프는 뮤신 및 뮤신 유사 단백질 예컨대 뮤신 1(MUC1), 뮤신 16(MUC16), 및 종양 연관 당단백질 72(TAG-72)를 포함하는 당 단백질 상에서 발현된다.
- [0008] STn은 태아 및 정상 성인 조직에서 약하게 발현되지만, 인간 암종의 80% 이상에 의해서도 발현된다. STn 검출은 일반적으로 부정적인 결과와 연관되고 암 환자의 전체 생존을 감소시킨다. 부정적인 결과와 연관된 이의 범암종 발현 때문에, 테라토프(Theratope)라고 하는 항암 백신이 STn 항원에 대해 디자인되었다. 이러한 면역요법에 대한 대단한 열망에도 불구하고, 테라토프는 III상 임상 시험에서 실패하였다.
- [0009] STn 발현 암을 치료하기 위한 다른 실패한 임상 시험은 키메라 항원 수용체(CAR)로 조작된 T 세포를 사용하였다. 셀 제네시스(Cell Genesys)의 과학자들은 전이성 결장암을 갖는 환자에서 당단백질 TAG-72 상에 발현된 STn 항원에 결합하는 항-STn CAR T 세포를 사용하였다. 환자들은 항-STn CAR T 세포의 정맥내 또는 간내 주입을 받았다. 항-STn CAR은 임의의 항종양 활성을 유도하지 않았다.
- [0010] 따라서, STn을 표적화하는 효과적인 면역요법 전략에 대한 가능성이 아직 실현되지 못하였다.

발명의 내용

- [0011] 본 발명은 일반적으로 T 세포 요법을 발생시키기 위한 개선된 벡터 및 이의 사용 방법을 제공한다. 보다 구체적으로, 본 발명은 항-시알릴 Tn 항체(sTn) CAR 분자 및 STn 발현 당단백질을 발현하는 암을 치료, 예방 또는 호전시킴에 있어서 이들의 용도를 제공한다.
- [0012] 다양한 실시형태에서, 키메라 항원 수용체(CAR)는 a) 당단백질 상에서 발현되는 STn 항원 또는 STn 항원의 하나 이상이 에피토프에 결합하는 항-STn 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 세포의 도메인으로서, 상기 항-STn 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 1 내지 3, 9 내지 11, 또는 17 내지 19로 기재된 CDRL1 내지 CDRL3 서열을 포함하는 가변 경쇄 서열, 및 서열번호 4 내지 6, 12 내지 14, 또는 20 내지 22에 기재된 CDRH1 내지 CDRH3 서열을 포함하는 가변 중쇄 서열을 포함하는, 세포의 도메인; b) 막관통 도메인(transmembrane domain); c) 하나 이상의 세포내 공자극성 신호전달 도메인; 및 d) 1차 신호전달 도메인을 포함하는 것이 제공된다.
- [0013] 다양한 실시형태에서, STn 항원은 뮤신 또는 뮤신 유사 당단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 당단백질 상에서 발현된다.
- [0014] 구체적인 실시형태에서, STn 항원은 뮤신 1 및 뮤신 16으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뮤신 상에서 발현된다.
- [0015] 일정 실시형태에서, STn 항원은 뮤신 유사 단백질 상에서 발현된다.
- [0016] 다양한 실시형태에서, 뮤신 유사 단백질은 TAG-72이다.
- [0017] 구체적인 실시형태에서, STn 항원에 결합하는 항-STn 항체 또는 항원 결합 단편은 낙타 Ig, Ig NAR, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab)'2 단편, F(ab)'3 단편, Fv, 단쇄 Fv 항체("scFv"), 비스-scFv, (scFv)2, 미니바디, 다이아바디, 트라이아바디, 테트라바디, 이황화 안정화된 Fv 단백질("dsFv"), 및 단일 도메인 항체(sdAb, 나노바디)로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0018] 일정 실시형태에서, STn 항원에 결합하는 항-STn 항체 또는 항원 결합 단편은 scFv이다.
- [0019] 구체적인 실시형태에서, 항-STn 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 1 내지 3 중 어느 하나에 기재된 바와 같은 하나 이상의 경쇄 CDR 및/또는 서열번호 4 내지 6 중 어느 하나에 기재된 바와 같은 하나 이상의 중쇄 CDR을 포함한다.
- [0020] 일부 실시형태에서, 항-STn 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 9 내지 11 중 어느 하나에 기재된 바와 같은 하나 이상의 경쇄 CDR 및/또는 서열번호 12 내지 14 중 어느 하나에 기재된 바와 같은 하나 이상의 중쇄

CDR을 포함한다.

- [0021] 추가의 실시형태에서, 항-STn 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 17 내지 19 중 어느 하나에 기재된 바와 같은 하나 이상의 경쇄 CDR 및/또는 서열번호 20 내지 22 중 어느 하나에 기재된 바와 같은 하나 이상의 중쇄 CDR을 포함한다.
- [0022] 일부 실시형태에서, 항-STn 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 7, 15, 또는 23 중 어느 하나에 기재된 바와 같은 가변 경쇄 서열, 및/또는 서열번호 8, 16, 또는 24 중 어느 하나에 기재된 바와 같은 가변 중쇄 서열을 포함한다.
- [0023] 일정 실시형태에서, 항-STn 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 7에 기재된 바와 같은 가변 경쇄 서열 및/또는 서열번호 8에 기재된 바와 같은 가변 중쇄 서열을 포함한다.
- [0024] 추가 실시형태에서, 항-STn 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 15에 기재된 바와 같은 가변 경쇄 서열 및/또는 서열번호 16에 기재된 바와 같은 가변 중쇄 서열을 포함한다.
- [0025] 구체적인 실시형태에서, 항-STn 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 23에 기재된 바와 같은 가변 경쇄 서열 및/또는 서열번호 24에 기재된 바와 같은 가변 중쇄 서열을 포함한다.
- [0026] 추가 실시형태에서, 막관통 도메인은 T 세포 수용체의 알파 또는 베타 사슬, CD δ , CD3 ϵ , CD γ , CD3 ζ , CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD154, 및 PD1로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리펩타이드로부터 유래된다.
- [0027] 추가의 실시형태에서, 막관통 도메인은 CD8 α ; CD4, CD45, PD1, 및 CD152로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리펩타이드로부터 유래된다.
- [0028] 일부 실시형태에서, 막관통 도메인은 CD8 α 로부터 유래된다.
- [0029] 추가 실시형태에서, 막관통 도메인은 PD1로부터 유래된다.
- [0030] 구체적인 실시형태에서, 막관통 도메인은 CD152로부터 유래된다.
- [0031] 추가 실시형태에서, 하나 이상의 공자극성 신호전달 도메인은 TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54(ICAM), CD83, CD134(OX40), CD137(4-1BB), CD278(ICOS), DAP10, LAT, NKD2C, SLP76, TRIM, 및 ZAP70으로 이루어진 군으로부터 선택되는 공자극성 분자로부터 유래된다.
- [0032] 일정 실시형태에서, 하나 이상의 공자극성 신호전달 도메인은 CD28, CD134, 및 CD137로 이루어진 군으로부터 선택되는 공자극성 분자로부터 유래된다.
- [0033] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 공자극성 신호전달 도메인은 CD28로부터 유래된다.
- [0034] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 공자극성 신호전달 도메인은 CD134로부터 유래된다.
- [0035] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 공자극성 신호전달 도메인은 CD137로부터 유래된다.
- [0036] 구체적인 실시형태에서, 1차 신호전달 도메인은 FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b, 및 CD66d로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리펩타이드로부터 단리된다.
- [0037] 구체적인 실시형태에서, 1차 신호전달 도메인은 CD3 ζ 로부터 단리된다.
- [0038] 추가의 실시형태에서, CAR은 힌지 영역 폴리펩타이드를 더 포함한다.
- [0039] 일정 실시형태에서, 힌지 영역 폴리펩타이드는 CD8 α 의 힌지 영역을 포함한다.
- [0040] 추가 실시형태에서, 힌지 영역 폴리펩타이드는 PD1의 힌지 영역을 포함한다.
- [0041] 구체적인 실시형태에서, 힌지 영역 폴리펩타이드는 CD152의 힌지 영역을 포함한다.
- [0042] 추가의 실시형태에서, CAR은 스페이서 영역을 더 포함한다.
- [0043] 추가 실시형태에서, 스페이서 영역 폴리펩타이드는 IgG1, IgG4, 또는 IgD의 CH2 및 CH3 영역을 포함한다.
- [0044] 추가 실시형태에서, CAR은 신호 펩타이드를 더 포함한다.

- [0045] 구체적인 실시형태에서, 신호 펩타이드는 IgG1 중쇄 신호 폴리펩타이드, CD8 α 신호 폴리펩타이드, 또는 인간 GM-CSF 수용체 알파 신호 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0046] 구체적인 실시형태에서, CAR은 서열번호 25 내지 27 중 어느 하나에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0047] 구체적인 실시형태에서, CAR은 서열번호 25에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0048] 구체적인 실시형태에서, CAR은 서열번호 26에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0049] 구체적인 실시형태에서, CAR은 서열번호 27에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0050] 다양한 실시형태에서, 본 명세서에서 고려하는 CAR의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 제공한다.
- [0051] 다양한 실시형태에서, 본 명세서에서 고려하는 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0052] 다양한 실시형태에서, 본 명세서에서 고려하는 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터가 제공된다.
- [0053] 일정 실시형태에서, 벡터는 발현 벡터이다.
- [0054] 구체적인 실시형태에서, 벡터는 에피솜 벡터이다.
- [0055] 추가 실시형태에서, 벡터는 바이러스 벡터이다.
- [0056] 추가 실시형태에서, 벡터는 레트로바이러스 벡터이다.
- [0057] 구체적인 실시형태에서, 벡터는 렌티바이러스 벡터이다.
- [0058] 추가 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터는 인간 면역결핍 바이러스 1(human immunodeficiency Virus 1: HIV-1); 인간 면역결핍 바이러스 2(HIV-2), 비스나-매디 바이러스(visna-maedi virus: VMV) 바이러스; 염소 관절염-뇌염 바이러스(caprine arthritis-encephalitis virus: CAEV); 말 전염성 빈혈 바이러스(equine infectious anemia virus: EIAV); 고양이 면역결핍 바이러스(feline immunodeficiency virus: FIV); 소 면역결핍 바이러스(bovine immune deficiency virus: BIV); 및 원숭이 면역결핍 바이러스(simian immunodeficiency virus: SIV)로 필수적으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0059] 구체적인 실시형태에서, 벡터는 좌측 (5') 레트로바이러스 LTR, Psi(Ψ) 패키징 신호, 중심 폴리퓨린 트랙/DNA 플랩(central polypyrine tract/DNA flap; cPPT/FLAP), 레트로바이러스 이출 성분; 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하게 연결된 프로모터; 및 우측(3') 레트로바이러스 LTR을 포함한다.
- [0060] 추가 실시형태에서, 벡터는 이중성 폴리아데닐화 서열을 더 포함한다.
- [0061] 구체적인 실시형태에서, 벡터는 B형 간염 바이러스 전사후 조절 성분(hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element: HPRE) 또는 우드치크 전사후 조절 성분(woodchuck post-transcriptional regulatory element: WPRE)을 더 포함한다.
- [0062] 추가의 실시형태에서, 5' LTR의 프로모터는 이중성 프로모터로 치환된다.
- [0063] 추가 실시형태에서, 이중성 프로모터는 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, 라우스 육종 바이러스(RSV) 프로모터, 또는 원숭이 바이러스 40(SV40) 프로모터이다.
- [0064] 일부 실시형태에서, 5' LTR 또는 3' LTR은 렌티바이러스 LTR이다.
- [0065] 일정 실시형태에서, 3' LTR은 하나 이상의 변형을 포함한다.
- [0066] 일정 실시형태에서, 3' LTR은 하나 이상의 결실을 포함한다.
- [0067] 구체적인 실시형태에서, 3' LTR은 자가 불활성화(SIN) LTR이다.
- [0068] 구체적인 실시형태에서, 폴리아데닐화 서열은 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 또는 신호 토끼 β-글로빈 폴리아데닐화 서열이다.
- [0069] 추가의 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 최적화된 코작(Kozak) 서열을 포함한다.
- [0070] 추가의 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하게 연결된 프로모터는 사이토메갈로바이러스 전초기 유전자 프로모터(CMV), 신장 인자 1 알파 프로모터(EF1-α), 포스포글리세레이트 키나제-1 프로모터(PGK), 유비퀴

틴-C 프로모터(UBQ-C), 사이토메갈로바이러스 인헨서/닭 베타-액틴 프로모터(CAG), 폴리오마 인헨서/헤르페스 심플렉스 티미딘 키나제 프로모터(MC1), 베타 액틴 프로모터(β -ACT), 원숭이 바이러스 40 프로모터(SV40), 및 골수증식성 육종 바이러스 인헨서, 음성 제어 영역 결실된, d1587rev 프라이머-결합 부위 치환된(MND) 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택된다.

- [0071] 다양한 실시형태에서, 본 명세서에서 고려하는 CAR을 코딩하는 벡터를 포함하는 면역 효과기 세포가 제공된다.
- [0072] 구체적인 실시형태에서, 면역 효과기 세포는 T 림프구, 자연 살해 T(NKT) 세포 및 자연 살해(NK) 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0073] 일부 실시형태에서, 면역 효과기 세포는 본 명세서에서 고려하는 벡터가 형질도입되고 PI3K 경로의 억제제의 존재에서 활성화되고 자극되어, PI3K 경로의 억제제의 부재에서 활성화되고 자극된 형질도입된 면역 효과기 세포의 증식과 비교하여 형질도입된 면역 효과기 세포의 증식을 유지시킨다.
- [0074] 구체적인 실시형태에서, PI3K 경로의 억제제의 존재에서 활성화되고 자극된 면역 효과기 세포는 PI3K 경로의 억제제의 부재에서 활성화되고 자극된 면역 효과기 세포와 비교하여 i) CD62L, CD127, CD197, 및 CD38로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마커 또는 ii) 모든 마커 CD62L, CD127, CD197, 및 CD38의 증가된 발현을 갖는다.
- [0075] 구체적인 실시형태에서, PI3K 경로의 억제제의 존재에서 활성화되고 자극된 면역 효과기 세포는 PI3K 경로의 억제제의 부재에서 활성화되고 자극된 면역 효과기 세포와 비교하여 i) CD62L, CD127, CD27, 및 CD8로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마커 또는 ii) 모든 마커 CD62L, CD127, CD27, 및 CD8의 증가된 발현을 갖는다.
- [0076] 일 실시형태에서, PI3K 억제제는 ZSTK474이다.
- [0077] 다양한 실시형태에서, 본 명세서에서 고려하는 면역 효과기 세포 및 생리적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 조성물이 제공된다.
- [0078] 다양한 실시형태에서, 면역 효과기 세포에 본원에서 고려하는 CAR을 코딩하는 벡터를 도입시키는 단계를 포함하는 본원에서 고려하는 CAR을 포함하는 면역 효과기 세포를 생성시키는 방법을 제공한다.
- [0079] 구체적인 실시형태에서, 상기 방법은 CD3에 결합하는 항체 및 CD28에 결합하는 항체와 세포를 접촉시켜 면역 효과기 세포를 자극시키고 세포가 증식하도록 유도시켜서, 면역 효과기 세포의 개체군을 생성시키는 단계를 더 포함한다.
- [0080] 일정 실시형태에서, 면역 효과기 세포는 벡터를 도입시키기 전에 증식되도록 자극되고 유도된다.
- [0081] 추가의 실시형태에서, 면역 효과기 세포는 T 림프구를 포함한다.
- [0082] 일부 실시형태에서, T 림프구는 자연 살해 T(NKT) 세포를 포함한다.
- [0083] 일부 실시형태에서, 면역 효과기 세포는 NK 세포를 포함한다.
- [0084] 구체적인 실시형태에서, 세포는 PI3K 경로의 억제제의 존재에서 활성화되고 자극되어서, PI3K 경로의 억제제의 부재에서 활성화되고 자극된 면역 효과기 세포의 증식과 비교하여, 형질도입된 면역 효과기 세포의 증식을 유지시킨다.
- [0085] 일부 실시형태에서, PI3K 경로의 억제제의 존재에서 활성화되고 자극된 면역 효과기 세포는 PI3K 경로의 억제제의 부재에서 활성화되고 자극된 면역 효과기 세포와 비교하여 i) CD62L, CD127, CD197, 및 CD38로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마커; 또는 ii) 모든 마커 CD62L, CD127, CD197, 및 CD38의 증가된 발현을 갖는다.
- [0086] 구체적인 실시형태에서, PI3K 경로의 억제제의 존재에서 활성화되고 자극된 면역 효과기 세포는 PI3K 경로의 억제제의 부재에서 활성화되고 자극된 면역 효과기 세포와 비교하여 i) CD62L, CD127, CD27, 및 CD8로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마커; 또는 ii) 모든 마커 CD62L, CD127, CD27, 및 CD8의 증가된 발현을 갖는다.
- [0087] 일 실시형태에서, PI3K 억제제는 ZSTK474이다.
- [0088] 다양한 실시형태에서, 투여 전에 STn을 발현하는 암 세포의 세포독성과 비교하여 STn을 발현하는 암 세포에서

세포독성을 증가시키기에 충분한 양의 본 명세서에서 고려하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 당단백질 상에 STn을 발현하는 암 세포에서 세포독성을 증가시키기 위한 방법을 제공한다.

- [0089] 다양한 실시형태에서, 투여 전에 STn을 발현하는 암 세포의 수와 비교하여 STn을 발현하는 암 세포의 수를 감소시키기에 충분한 양의, 본 명세서에서 고려하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 당단백질 상에서 STn을 발현하는 암 세포의 수를 감소시키기 위한 방법을 제공한다.
- [0090] 다양한 실시형태에서, 본 명세서에 고려되는 조성물의 치료 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0091] 구체적인 실시형태에서, 암은 고형 암이다.
- [0092] 추가 실시형태에서, 암은 식도암, 방광암, 신장암, 폐암, 난소암, 자궁경부암, 췌장암, 담관암종, 위암, 결장암, 또는 유방암이다.
- [0093] 일 실시형태에서, 암은 식도암이다.
- [0094] 일 실시형태에서, 암은 방광암이다.
- [0095] 일 실시형태에서, 암은 신장암이다.
- [0096] 일 실시형태에서, 암은 폐암이다.
- [0097] 일 실시형태에서, 암은 난소암이다.
- [0098] 일 실시형태에서, 암은 자궁경부암이다.
- [0099] 일 실시형태에서, 암은 췌장암이다.
- [0100] 일 실시형태에서, 암은 담관암종이다.
- [0101] 일 실시형태에서, 암은 위암이다.
- [0102] 일 실시형태에서, 암은 결장암이다.
- [0103] 일 실시형태에서, 암은 유방암이다.
- [0104] 구체적인 실시형태에서, 암은 액상암이다.
- [0105] 일 실시형태에서, 액상암은 혈액학적 악성종양이다.
- [0106] 일 실시형태에서, 혈액학적 악성종양은 급성 림프성 백혈병(ALL), 만성 림프성 백혈병(CLL), 모발상 세포 백혈병(HCL), 다발성 골수종(MM), 급성 골수성 백혈병(AML), 또는 만성 골수성 백혈병(CML)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0107] 일 실시형태에서, 혈액학적 악성종양은 CLL이다.
- [0108] 다양한 실시형태에서, STn을 발현하는 암과 연관된 적어도 하나의 증상을 호전시키기에 충분한 양의 본 명세서에 고려되는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 당단백질 상에서 STn을 발현하는 암과 연관된 적어도 하나 이상의 증상을 호전시키는 방법이 제공된다.
- [0109] 구체적인 실시형태에서, 호전되는 하나 이상의 증상은 쇠약, 피로, 숨가쁨, 쉬운 멍 및 출혈, 빈번한 감염, 비대화된 림프절, 팽창성 또는 통증성 복부, 뼈 또는 관절 통증, 골절, 계획치 않은 체중 감량, 식욕 부진, 도한, 지속적 미열, 및 감소된 배뇨로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0110] 전술한 실시형태의 어느 하나에서, STn 항원은 당단백질, TAG-72 상에서 발현된다.

도면의 간단한 설명

- [0111] 도 1은 항-STn CAR 작제물의 개략도를 도시한다.
- 도 2는 항-STn CAR T 세포(E)는 다양한 E:T 비율로 공배양되는 STn 발현 LS174T 세포(T)를 사멸시켰지만 미형질 도입된 대조군 T 세포는 그렇지 않았음을 도시한다.
- 도 3A는 항-STn CAR을 코딩하는 렌티바이러스 벡터가 형질도입된 T 세포에서 벡터 카피수(VCN)를 도시한다.

도 3B는 항-STn CAR을 코딩하는 렌티바이러스 벡터가 형질도입된 T 세포에서 항-STn CAR의 세포 표면 발현을 도시한다.

도 4는 예시적인 항-STn CAR의 항암 활성을 도시한다. 도 4a: 항-STn CAR T 세포는 TAG72 상에 STn을 발현하는 저켓(Jurkat) 및 LS174T 세포주와 공배양 시 IFN γ 를 분비한다. 도 4b: 항-STn CAR T 세포는 공배양 시 LS174T 세포주를 사멸시키지만 비형질도입 T 세포는 그렇지 않았다. 도 4c: 항-STn CAR T 세포(E)는 다양한 E:T 비율로 LS174T 세포(T)와 공배양 시 용량 의존적 세포독성을 보였다.

도 5는 항-STn CAR T 세포의 투여가 피하 결장 선암종 세포(174T)를 받은 NOD SCID 감마(NSG) 마우스에서 종양 과성장을 지연시킴을 도시한다.

서열 식별자의 간단한 설명

서열번호 1 내지 24는 본 명세서에서 고려하는 항-STn CAR에 대한 예시적인 경쇄 CDR 서열, 중쇄 CDR 서열, 가변 도메인 경쇄, 및 가변 도메인 중쇄의 아미노산 서열을 개시한다.

서열번호 25 내지 27은 예시적인 항-STn CAR의 아미노산 서열을 개시한다.

서열번호 28 내지 38은 다양한 링커의 아미노산 서열을 개시한다.

서열번호 39 내지 51은 프로테아제 절단 부위 및 자가 절단성 폴리펩타이드 절단 부위의 아미노산 서열을 개시한다.

서열번호 52는 인간 종양 연관된 당단백질(TAG-72)의 아미노산 서열을 개시한다.

서열번호 53은 CDR-L3를 결정하기 위한 예시적인 규칙의 아미노산 서열을 개시한다.

서열번호 54는 CDR-H1을 결정하기 위한 예시적인 규칙의 아미노산 서열을 개시한다.

서열번호 55는 CDR-H2를 결정하기 위한 예시적인 규칙의 아미노산 서열을 개시한다.

서열번호 56은 CDR-H3를 결정하기 위한 예시적인 규칙의 아미노산 서열을 개시한다.

서열번호 57은 공통 코작 서열에 대한 뉴클레오타이드 서열을 개시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

A. 개요

본 발명은 대체로 당단백질 상에서 STn 항원을 발현하는 암을 예방 또는 치료하거나, 또는 STn 발현 암과 연관된 적어도 하나의 증상을 예방, 치료, 또는 호전시키기 위한 개선된 조성물 및 방법에 관한 것이다. 구체적인 실시형태에서, 본 발명은 유전자 변형된 면역 효과기 세포를 사용하여 당단백질 상에 STn 항원을 발현하는 암의 개선된 입양 세포 요법에 관한 것이다. 유전학적인 접근법은 면역 인식 및 암 세포의 제거를 향상시키는 강력한 수단을 제공한다. 한가지 유망한 전략은 암 세포에 대해 세포독성을 재지정하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 면역 효과기 세포를 유전자 조작하는 것이다.

본 명세서에서 고려하는 입양 세포 요법의 개선된 조성물 및 방법은 쉽게 확장시킬 수 있고, 생체내에서 장기간 지속성을 나타낼 수 있으며, 당단백질 상에서 시알릴 Tn 항원(STn)을 발현하는 세포에 대한 항원 의존적 세포독성이 입증될 수 있는 유전자 변형된 면역 효과기 세포를 제공한다.

STn(Neu5Ac α 2-6GalNAc α -O-Ser/Thr)은 또한 CD175s라고도 알려져 있으며, 가장 단순한 시알릴화된 뮤신-0형-글리칸이다. STn은 세린 또는 트레오닌 잔기에 N-아세틸-갈락토사민(GalNAc) 알파-O-연결된 하나의 잔기에 의해 형성되고, 탄소 6번 상에서 시알린산(인간에서 Neu5Ac)으로 치환된 이당류이다. 이러한 시알릴화는 뮤신-0형-글리칸에 달리 존재하는 다양한 코어 구조의 형성을 방지한다.

STn은 태아 조직 예컨대 식도, 위, 췌장, 결장(배상 세포), 폐, 유선, 및 양쪽 성별 태아의 생식선 조직에서 발현된다. 그러나, 배아 발생 동안 STn의 생물학적 역할에 관해서는 많이 알려져 있지 않다.

암 조직과 비교하여 정상 조직에서 STn 발현은 드물고/드물거나 낮다고 보고된 다양한 실험들이 수행되었다. 면역조직화학은 필적하는 건강한 세포와 비교하여 암 세포에서 STn 과발현을 입증하였다. 따라서, STn은 종양태아성 항원이라고 설명되었다. STn 신생 발현 또는 과발현은 췌장, 방광, 폐, 직결장, 및 난소의 암에서 최고 빈도로 많은 상피암에서 보고되었다. 발암 초기에 STn은 암의 잠재적 전구체로 간주되는 몇몇 상피 양성 병변, 예컨

대 식도 이형성 편평 상피, 위장 화생, 결장 중등도 이형성증, 폐 비정형 선종 과형성증, 유관 과형성증, 및 아 포크린 화생에서 과발현되는 것으로 보고되었다. STn 발현은 또한 췌장 및 난소의 양성 병변에서도 보고되었으 며, 이들 2 조직은 건강한 상태에서 STn 발현이 없다.

- [0118] 또한 위(위염) 또는 결장(궤양성 결장염 및 클론성 결장염)의 염증성 질환과 STn 발현의 연결성이 보고되었다. 위염에서, STn은 사례의 50-100%에서 검출되었다. 궤양성 결장염에서, 탈-O-아세틸화 STn은 이형성-암종 서열의 독립적인 마커인 것으로 확인되었다. 탈-O-아세틸화 STn은 또한 결장암 위험과 연관된 다른 염증성 질환인, 클 론성 결장 사례의 44%에서 검출되었다.
- [0119] 다양한 실시형태에서, 항-STn 항체 서열을 포함하는 CAR은 고도로 효율적이고, 건강한 생체내 확장을 겪으며, 당단백질 상에서 STn을 발현하는 암을 인식하고, STn 발현 암 세포에 대항하여 세포독성 활성을 나타낸다. STn 항원은 제한 없이, 식도암, 폐암, 난소암, 자궁경부암, 췌장암, 담관암종, 위암, 결장암, 및 유방암을 포함하는, 광범위한 고형 종양에서 고도로 발현된다.
- [0120] 일 실시형태에서, 항-STn 항체 또는 항원 결합 단편, 막관통 도메인, 및 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 CAR이 제공된다.
- [0121] 일 실시형태에서, 면역 효과기 세포는 CAR을 발현하도록 유전자 변형된다. CAR을 발현하는 T 세포를 본 명세서 에서 CAR T 세포 또는 CAR 변형된 T 세포라고 한다.
- [0122] 다양한 실시형태에서, 유전자 변형된 면역 효과기 세포는 제한 없이, 고형 종양 및 혈액학적 악성종양을 포함하 는 당단백질 상에서 STn을 발현하는 암 세포를 갖는 환자에게 투여된다.
- [0123] 특정 실시형태의 실시는 반대로 특정하게 언급하지 않으면, 많은 것들이 이하 예시의 목적으로 설명된, 당분야 에 속하는 화학, 생화학, 유기 화학, 분자 생물학, 미생물학, 재조합 DNA 기술, 유전학, 면역학 및 세포 생물학 의 통상의 방법을 채택하게 될 것이다. 이러한 기술은 문헌에 완전하게 설명된다. 예를 들어, 하기 문헌들을 참 조한다: Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(3rd Edition, 2001); Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(2nd Edition, 1989); Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(1982); Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*(John Wiley and Sons, updated July 2008); *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Glover, *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II(IRL Press, Oxford, 1985); Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, (Academic Press, New York, 1992); *Transcription and Translation*(B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*(1984); Harlow and Lane, *Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998) *Current Protocols in Immunology* Q. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober, eds., 1991); *Annual Review of Immunology*를 비롯하여, *Advances in Immunology*와 같은 저널의 전공논문.
- [0124] **B. 정의**
- [0125] 달리 정의하지 않으면, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자들이 통상적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 기술된 것과 유사하거나 또는 균등한 임의의 방 법 및 재료가 특정 실시형태의 실시 또는 시험에서 사용될 수 있지만, 조성물, 방법 및 재료의 바람직한 실시형 태를 본 명세서에서 기술한다. 본 개시내용의 목적을 위해, 다음의 용어들을 하기에 정의한다.
- [0126] 관사 "한", "하나" 및 "그"는 하나 또는 하나 이상(즉, 적어도 하나, 또는 하나 또는 그 이상)의 그 관사의 문 법적 목적어를 의미하기 위해 본 명세서에서 사용된다. 예로서, "한 성분"은 하나의 성분 또는 하나 또는 그 이 상의 성분을 의미한다.
- [0127] 대안(예를 들어, "또는")의 사용은 대안 중 하나, 둘 모두, 또는 이의 임의 조합을 의미하는 것으로 이해해야 한다.
- [0128] 용어 "및/또는"은 대안의 하나, 또는 둘 모두를 의미하는 것으로 이해해야 한다.
- [0129] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "약" 또는 "대략"은 기준 분량, 수준, 값, 수치, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 무게 또는 길이에 대해 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 또는 1%만큼 가변적인 분량, 수준, 값, 수 치, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 무게 또는 길이를 의미한다. 일 실시형태에서, 용어 "약" 또는 "대략"은 기 준 분량, 수준, 값, 수치, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 무게 또는 길이에 대하여 $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 9\%$, \pm

8%, \pm 7%, \pm 6%, \pm 5%, \pm 4%, \pm 3%, \pm 2%, 또는 \pm 1%의 분량, 수준, 값, 수치, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 무게 또는 길이의 범위를 의미한다.

[0130] 문맥에서 달리 요구하지 않으면, 본 명세서 전반에서, 단어 "포함한다", "포함하다" 및 "포함하는"은 명시된 단계 또는 성분 또는 단계들 또는 성분들의 군의 포함을 의미하는 것으로 이해하게 될 것이나 임의의 다른 단계 또는 성분 또는 단계들 또는 성분들의 군의 배제를 의미하는 것이 아니다. "이루어지는"이란 "이루어진" 어구 이후의 것을 포함하고 그에 한정되는 것을 의미한다. 따라서, 어구 "이루어지는"은 열거된 성분이 필요하거나 또는 의무적이고, 다른 성분은 존재하지 않을 수 있다는 것을 의미한다. "본질적으로 이루어지는"이란 이 어구 이후에 열거되는 임의 성분을 포함하고, 열거된 성분들에 대한 개시에서 명시하는 활성 또는 작용을 방해하지 않거나 또는 그에 기여하지 않는 다른 성분들에 제한된다는 의미이다. 따라서, 어구 "본질적으로 이루어지는"은 열거된 성분이 필수적이거나 또는 의무적이지만, 열거된 성분의 활성 또는 작용에 실질적으로 영향을 주는 다른 성분은 존재하지 않는다는 것을 의미한다.

[0131] "일 실시형태", "실시형태", "구체적인 실시형태", "관련 실시형태", "일정 실시형태", "추가 실시형태" 또는 "추가 실시형태" 또는 이의 조합에 대한 본 명세서 전반에서의 언급은 실시형태와 함께 기술된 구체적인 특성, 구조 또는 특징이 적어도 하나의 실시형태에 포함된다는 것을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전반에서 다양한 위치에 전술한 어구의 출현은 반드시 모두 동일한 실시형태를 언급하는 것이 아니다. 또한, 구체적인 특성, 구조, 또는 특징은 하나 이상의 실시형태에서 임의의 적합한 방식으로 조합될 수 있다. 일 실시형태에서 특성의 긍정적인 인용은 구체적인 실시형태에서 그 특징의 배제를 기반으로 제공하는 것으로 또한 이해한다.

[0132] STn(Neu5Aca2-6GalNAca-O-Ser/Thr)은 CD175s로도 알려져 있고 가장 단순한 시알릴화 뮤신-O형-글리칸이다. STn은 세린 또는 트레오닌 잔기에 N-아세틸-갈락토사민(GalNAc) 알파-O-연결된 하나의 잔기로 형성되고, 탄소 6 상에서 시알산(인간에서 Neu5Ac)으로 치환된 이당류이다. 이 시알릴화는 달리 뮤신-O형-글리칸에 존재하는 다양한 코어 구조의 형성을 방지한다.

[0133] 다양한 실시형태에서, STn 항원은 뮤신 또는 뮤신 유사 당단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 당단백질 상에서 발현된다.

[0134] 구체적인 실시형태에서, STn 항원은 뮤신 1 및 뮤신 16으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뮤신 상에서 발현된다.

[0135] 일정 실시형태에서, STn 항원은 뮤신 유사 단백질 상에서 발현된다.

[0136] 다양한 실시형태에서, 뮤신 유사 단백질은 TAG-72이다.

[0137] C. 키메라 항원 수용체

[0138] 다양한 실시형태에서, 암 세포 STn 항원에 대하여 면역 효과기 세포의 세포독성을 재지정하는 유전자 조작된 수용체가 제공된다. 이들 유전자 조작된 수용체를 본 명세서에서 키메라 항원 수용체(CAR)라고 하였다. CAR은 특이적 항-STn 세포 면역 활성을 나타내는 키메라 단백질을 생성하도록 T 세포 수용체-활성화 세포내 도메인과 회망 항원(예를 들어, 당단백질 상에서 발현된 STn)에 대한 항체-기반 특이성을 조합한 분자이다. 본 명세서에서 사용 시, 용어 "키메라"는 상이한 기원에서 유래하는 상이한 단백질 또는 DNA의 부분으로 구성된 것을 의미한다.

[0139] 구체적인 실시형태에서, CAR은 STn에 결합하는 세포외 도메인(결합 도메인 또는 항원-특이적 결합 도메인이라고도 함), 막관통 도메인, 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 표적 세포의 표면 상에서 STn 결합된 당단백질, 예를 들어 TAG-72와 CAR의 항-STn 항원 결합 도메인의 연결은 CAR의 클러스터링을 유발시켜서 CAR-함유 세포에 활성화 자극을 전달한다. CAR의 주요 특징은 면역 효과기 세포 특이성을 재지정하여, 단일클론 항체, 가용성 리간드 또는 세포 특이적 공수용체의 세포 특이적 표적화 능력을 활용하는, 주요 조직적합성(MHC) 비의존적 방식으로 표적 항원 발현 세포의 세포 사멸을 매개할 수 있는 분자의 생성, 식균 작용, 사이토카인 생성, 또는 증식을 촉발시키는 그들의 능력이다.

[0140] 다양한 실시형태에서, CAR은 STn-특이적 결합 도메인을 포함하는 세포외 결합 도메인; 막관통 도메인; 하나 이상의 세포내 공자극성 신호전달 도메인; 및 1차 신호전달 도메인을 포함한다.

[0141] 구체적인 실시형태에서, CAR은 항-STn 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 세포외 결합 도메인; 하나 이상의 힌지 도메인 또는 스페이서 도메인; 포함 막관통 도메인; 하나 이상의 세포내 공자극성 신호전달 도메인;

및 1차 신호전달 도메인을 포함한다.

1. 결합 도메인

구체적인 실시형태에서, CAR은 표적 세포, 예를 들어 암 세포 상에서 발현되는 당단백질에 결합된 인간 STn에 특이적으로 결합하는 항-STn 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 세포의 결합 도메인을 포함한다. 본 명세서에서 사용 시, 용어 "결합 도메인", "세포외 도메인", "세포외 결합 도메인", "항원-특이적 결합 도메인", 및 "세포외 항원 특이적 결합 도메인"은 상호교환적으로 사용되고, 목적 표적 항원, 예를 들어 STn에 특이적으로 결합하는 능력을 갖는 CAR을 제공한다. 결합 도메인은 천연, 합성, 반합성, 또는 재조합 공급원에서 유래될 수 있다.

본 명세서에서 사용시 용어 "특이적 결합 친화성" 또는 "특이적으로 결합하다" 또는 "특이적으로 결합된" 또는 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 표적화하다"는 배경 결합보다 훨씬 더 큰 결합 친화성으로 STn에 항-STn 항체 또는 이의 항원 결합 단편(또는 이를 포함하는 CAR)의 결합을 설명한다. 결합 도메인(또는 결합 도메인을 포함하는 CAR 또는 결합 도메인을 함유하는 융합 단백질)은 예를 들어 약 10^5 M^{-1} 이상의 K_d (즉, 1/M의 단위의 특정 결합 상호작용의 평형 결합 상수) 또는 친화성으로 STn에 결합하거나 또는 그와 회합되면, 당단백질, 예컨대 TAG-72에 결합된 STn에 "특이적으로 결합한다". 일정 실시형태에서, 결합 도메인(또는 이의 융합 단백질)은 약 10^6 M^{-1} , 10^7 M^{-1} , 10^8 M^{-1} , 10^9 M^{-1} , 10^{10} M^{-1} , 10^{11} M^{-1} , 10^{12} M^{-1} , 또는 10^{13} M^{-1} 이상의 K_d 로 표적에 결합한다. "고 친화성" 결합 도메인(또는 이의 단쇄 융합 단백질)은 적어도 10^7 M^{-1} , 적어도 10^8 M^{-1} , 적어도 10^9 M^{-1} , 적어도 10^{10} M^{-1} , 적어도 10^{11} M^{-1} , 적어도 10^{12} M^{-1} , 적어도 10^{13} M^{-1} , 또는 그 이상의 K_d 의 결합 도메인을 의미한다.

대안적으로, 친화성은 M 단위(예를 들어, 10^{-5} M 내지 10^{-13} M , 또는 이하)의 특정 결합 상호작용의 평형 해리 상수(K_d)로서 정의될 수 있다. 본 명세서에 따라서 결합 도메인 폴리펩타이드 및 CAR 단백질의 친화성은 통상의 기술, 예를 들어 경쟁적 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)에 의하거나, 또는 결합 회합에 의하거나, 또는 표지된 리간드를 사용하는 치환 검정, 또는 표면 플라즈몬 공명 장치 예컨대 비아코어 인코포레이션(Biacore, Inc., 뉴저지주, 피캐터웨이 소재)에서 입수할 수 있는 비아코어(Biacore) T100, 또는 광학 바이오센서 기술 예컨대 각각 코당(Corning) 및 퍼킨 엘머(Perkin Elmer)에서 입수할 수 있는 에픽(EPIC) 시스템 또는 엔스파이어(EnSpire)를 사용하여 쉽게 결정할 수 있다(또한, 예를 들어, 다음의 문헌들을 참조함; Scatchard *et al.* (1949) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51:660; 및 미국 특허 제5,283,173호; 제5,468,614호, 또는 균등물).

일 실시형태에서, 특이적 결합의 친화성은 배경 결합보다 약 2배 크거나, 배경 결합보다 약 5배 크거나, 배경 결합보다 약 10배 크거나, 배경 결합보다 약 20 배 크거나, 배경 결합보다 약 50배 크거나, 배경 결합보다 약 100배 크거나, 또는 배경 결합보다 약 1000배 크거나 또는 그 이상이다.

구체적인 실시형태에서, CAR의 세포외 결합 도메인은 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. "항체"는 항원의 에피토프, 예컨대 지질, 탄수화물, 다당류, 당단백질, 펩타이드, 또는 항원 결정부를 함유하는 핵산, 예컨대 면역 세포가 인식하는 것을 특이적으로 인식하여 결합하는 적어도 경쇄 또는 중쇄 면역글로불린 가변 영역을 포함하는 폴리펩타이드인 결합제를 의미한다.

"항원(Ag)"은 동물에게 주사 또는 흡수되는 조성물(예컨대 암 특이적 단백질을 포함하는 것)을 포함하여, 동물에서 T 세포 반응 또는 항체의 생성을 자극할 수 있는 화합물, 조성물, 또는 물질을 의미한다. 예시적인 항원은 제한 없이 지질, 탄수화물, 다당류, 당단백질, 펩타이드, 또는 핵산을 포함한다. 항원은 이중성 항원, 예컨대 개시된 항원에 의해 유도되는 것을 포함하는 특이적 체액성 또는 세포성 면역의 생성물과 반응한다. 구체적인 실시형태에서, 표적 항원은 STn 항원이다.

"에피토프" 또는 "항원성 결정부"는 결합제가 결합하는 항원의 영역을 의미한다.

항체는 이의 항원 결합 단편, 예컨대 낙타 Ig, Ig NAR, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab)'2 단편, F(ab)'3 단편, Fv, 단쇄 Fv 단백질("scFv"), 비스-scFv, (scFv)₂, 미니바디, 다이아바디, 트라이아바디, 테트라바디, 이황화 안정화된 Fv 단백질("dsFv"), 및 단일 도메인 항체(sdAb, 나노바디) 및 항원 결합을 담당하는 전체 길이 항체의 일부분을 포함한다. 이 용어는 또한 유전자 조작 형태 예컨대 키메라 항체(예를 들어, 인간화 쥐과동물 항체), 이중접합 항체(예컨대, 이중특이적 항체) 및 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 또한 다음의 문헌을 참조한다; Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995(Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., Immunology, 3rd

Ed., W. H. Freeman & Co., New York, 1997.

- [0151] 당업자가 이해하고 본 명세서의 다른 곳에 기술된 바와 같이, 완전한 항체는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함한다. 각각의 중쇄는 가변 영역 및 제1, 제2 및 제3 불변 영역으로 이루어지는 한편, 각각의 경쇄는 가변 영역 및 불변 영역으로 이루어진다. 포유동물 중쇄는 α , δ , ϵ , γ 및 μ 로 분류된다. 포유동물 경쇄는 λ 또는 κ 로 분류된다. α , δ , ϵ , γ 및 μ 중쇄를 포함하는 면역글로불린은 면역글로불린(Ig) A, IgD, IgE, IgG, 및 IgM으로 분류된다. 완전한 항체는 "Y" 형상을 형성한다. Y의 줄기부는 서로 결합된 2개 중쇄의 제2 및 제3 불변 영역(IgE 및 IgM의 경우, 제4 불변 영역)으로 이루어지고 이황화 결합(사슬가)이 힌지에 형성된다. 중쇄 γ , α 및 δ 는 3개의 탠덤(한 줄로) Ig 도메인으로 구성된 불변 영역, 및 가요성 첨가를 위한 힌지 영역을 갖고, 중쇄 μ 및 ϵ 는 4개 면역글로불린 도메인으로 구성된 불변 영역을 갖는다. 제2 및 제3 불변 영역은 각각 "CH2 도메인" 및 "CH3 도메인"이라고 한다. Y의 각 부문은 단일 경쇄의 가변 및 불변 영역에 결합된 단일 중쇄의 제1 불변 영역 및 가변 영역을 포함한다. 경쇄 및 중쇄의 가변 영역은 항원 결합을 담당한다.
- [0152] 경쇄 및 중쇄 가변 영역은 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"이라고도 불리는, 초가변 영역이 개재된 "프레임워크" 영역을 함유한다. CDR은 통상의 방법, 예컨대 카밧(Kabat) 등(Wu, TT and Kabat, E. A., *J Exp Med.* 132(2):211-50,(1970); Borden, P. and Kabat E. A., *PNAS*, 84: 2440-2443(1987);(Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services, 1991, 참조로 본 명세서에 편집됨)에 따른 서열에 의해, 또는 초티아(Chothia) 등에 따른 구조(Chothia, C. and Lesk, A.M., *J Mol. Biol.*, 196(4): 901-917(1987), Chothia, C. *et al*, *Nature*, 342: 877 - 883(1989))에 의해 정의되거나 또는 식별될 수 있다.
- [0153] 경쇄 CDR을 예측하기 위한 규칙의 예시적인 예는 다음을 포함한다: CDR-L1은 약 24개 잔기에서 출발하며, Cys가 선행하고, 약 약 10 내지 17개 잔기이고, Trp이 후속되고(전형적으로 Trp-Tyr-Gln, 또한 Trp-Leu-Gln, Trp-Phe-Gln, Trp-Tyr-Leu); CDR-L2는 CDR-L1의 종료 후 약 16개 잔기에서 출발하고, 대체로 Ile-Tyr, 또한 Val-Tyr, Ile-Lys, Ile-Phe이 선행하며, 7개 잔기이며; CDR-L3은 CDR-L2의 종료 후 약 33개 잔기에서 출발하고, Cys가 선행하고, 7 내지 11개 잔기이고, Phe-Gly-XXX-Gly(XXX는 임의의 아미노산임, 서열번호 53)이 후속된다.
- [0154] 중쇄 CDR을 예상하기 위한 규칙의 예시적인 예는 다음을 포함한다: CDR-H1은 약 잔기 26에서 출발하고, Cys-XXX-XXX-XXX(서열번호 54)가 선행하며, 10 내지 12개 잔기이고 Trp(전형적으로 Trp-Val, 또한 Trp-Ile, Trp-Ala)이 후속되고; CDR-H2는 CDR-H1의 종료 후 약 15개 잔기에서 출발하고, 대체로 Leu-Glu-Trp-Ile-Gly(서열번호 55), 또는 다수의 변이가 선행하며, 16 내지 19개 잔기이고, Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala이 후속되며; CDR-H3은 CDR-H2의 종료 이후 약 33개 잔기에서 출발하고, Cys-XXX-XXX(전형적으로 Cys-Ala-Arg)가 선행되고, 3 내지 25개 잔기이고, Trp-Gly-XXX-Gly(서열번호 56)이 후속된다.
- [0155] 일 실시형태에서, 경쇄 CDR 및 중쇄 CDR은 카밧 방법에 따라서 결정된다.
- [0156] 일 실시형태에서, 경쇄 CDR 및 중쇄 CDR2 및 CDR3은 카밧 방법에 따라 결정되고, 중쇄 CDR1은 카밧과 초티아 방법 사이에 포함되는, AbM 방법에 따라 결정된다. 예를 들어, 문헌 [Whitelegg N & Rees AR, *Protein Eng.* 2000 Dec;13(12):819-24 and *Methods Mol Biol.* 2004;248:51-91]을 참조한다. CDR을 예측하기 위한 프로그램은 예를 들어, AbYsis(www.bioinf.org.uk/abysis/)에서 공개적으로 활용할 수 있다.
- [0157] 상이한 경쇄 또는 중쇄의 프레임워크 영역의 서열은 중, 예컨대 인간 내에서 상대적으로 보존된다. 성분 경쇄 및 중쇄의 조합된 프레임워크 영역인, 항체의 프레임워크 영역은 3차원 공간으로 CDR을 배치시키고 정렬시키도록 제공된다. CDR은 주로 항원의 에피토프와의 결합을 담당한다. 각 사슬의 CDR은 전형적으로 N 말단에서 출발하여 순차적으로 번호매겨지고, 또한 전형적으로 특정 CDR이 위치하는 사슬에 의해 식별되게, CDR1, CDR2, 및 CDR3이라고 한다. 따라서, 항체의 중쇄의 가변 도메인에 위치하는 CDR은 CDRH1, CDRH2, 및 CDRH3이라고 하는 한편, 항체의 경쇄의 가변 도메인에 위치하는 CDR은 CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3이라고 한다. 상이한 특이성(즉, 상이한 항원에 대한 상이한 조합 부위)을 갖는 항체는 상이한 CDR을 갖는다. 항체 마다 가변적인 CDR이지만, CDR 내에 오직 제한적인 수의 아미노산 위치가 직접적으로 항원 결합에 관여한다. CDR 내에 이들 위치는 특이성 결정 잔기(SDR)라고 한다. 본 명세서에서 고려하는 항-STn CAR을 구축하는데 적합한 경쇄 CDR의 예시적인 예는 제한 없이, 서열번호 1 내지 3, 9 내지 11, 및 17 내지 19에 기재된 CDR 서열을 포함한다. 본 명세서에서 고려하는 항-STn CAR을 구축하는데 적합한 중쇄 CDR의 예시적인 예는 제한 없이 서열번호 4 내지 6, 12 내지 14, 및 20 내지 22에 기재된 CDR 서열을 포함한다.
- [0158] "V_L" 또는 "VL"에 대한 언급은 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체, Fv, scFv, dsFv, Fab, 또는 다른 항체 단편

을 포함하는, 면역글로불린 경쇄의 가변 영역을 의미한다. 본 명세서에서 고려하는 항-STn CAR을 구축하는데 적합한 경쇄 가변 영역의 예시적인 예는 제한 없이, 서열번호 7, 15, 및 23에 기재된 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0159] "V_H" 또는 "VH"에 대한 언급은 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체, Fv, scFv, dsFv, Fab, 또는 다른 항체 단편을 포함하는, 면역글로불린 중쇄의 가변 영역을 의미한다. 본 명세서에서 고려되는 항-STn CAR을 구축하는데 적합한 중쇄 가변 영역의 예시적인 예는 제한 없이, 서열번호 8, 16, 및 24에 기재된 중쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0160] "단일클론 항체"는 단일 항체의 경쇄 및 중쇄 유전자가 형질감염된 세포에 의해서 또는 B 림프구의 단일 클론에 의해 생성된 항체이다. 단일클론 항체는 당업자에게 공지된 방법에 의해서, 예를 들어 면역 비장 세포와 골수종 세포의 융합으로 하이브리드 항체 형성 세포를 제조하여 생성된다. 단일클론 항체는 인간화 단일클론 항체를 포함한다.

[0161] "키메라 항체"는 한 종, 예컨대 인간 유래의 프레임워크 잔기, 및 다른 종, 예컨대 마우스 유래의 CDR(전형적으로 항원 결합성 부여)을 갖는다. 구체적으로 바람직한 실시형태에서, CAR은 키메라 항체 또는 이의 항원 결합 단편인 항원 특이적 결합 도메인을 포함한다.

[0162] 바람직한 실시형태에서, 항체는 인간 STn 발현 당단백질에 특이적으로 결합하는 인간 항체(예컨대 인간 단일클론 항체) 또는 이의 단편이다. 인간 항체는 상기에 기술된 바와 같이 기지의 인간 불변 도메인 서열(들)과 인간 유래 파지 디스플레이 라이브러리에서 선택된 Fv 클론 가변 도메인 서열(들)을 조합하여 구축될 수 있다. 대안적으로, 인간 단일클론 항체는 하이브리도마 방법으로 만들어질 수 있다. 인간 단일클론 항체의 생성을 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주는 예를 들어 다음의 문헌들에 기술되어 있다: [Kozbor J. *Immunol.*, 133: 3001(1984)]; [Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)]; 및 [Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86(1991)]. 또한, 형질전환 동물(예를 들어, 마우스)은 내생성 면역글로불린 생성의 부재에서 인간 항체의 완전한 레파토리를 생성시키는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Jakobovits et al., *PNAS USA*, 90: 2551(1993)]; [Jakobovits et al., *Nature*, 362: 255(1993)]; [Bruggermann et al., *Year in Immunol.*, 7: 33(1993)]을 참조한다. 유전자 서플링이 또한 비인간, 예를 들어 설치류 항체로부터 인간 항체를 유도시키는데 사용될 수 있는데, 여기서 인간 항체는 출발한 비인간 항체와 유사한 친화성 및 특이성을 갖는다(1993년 4월 1일 공개된 PCT WO 93/06213 참조). CDR 그래프팅에 의한 비인간 항체의 전통적인 인간화와 달리, 이러한 기술은 비인간 기원의 FR 또는 CDR 잔기를 갖지 않는, 완전한 인간 항체를 제공한다.

[0163] 일 실시형태에서, CAR은 "인간화" 항체를 포함한다. 인간화 항체는 비인간(예를 들어, 마우스, 래트, 또는 합성) 면역글로불린 유래의 하나 이상의 CDR 및 인간 프레임워크 영역을 포함하는 면역글로불린이다. CDR을 제공하는 비인간 면역글로불린은 "도너"라고 하고, 프레임워크를 제공하는 인간 면역글로불린은 "엑셉터"라고 한다. 일 실시형태에서, 모든 CDR은 인간화된 면역글로불린의 도너 면역글로불린 유래이다. 불변 영역은 존재할 필요는 없지만, 그들이 존재한다면, 인간 면역글로불린 불변 영역과 실질적으로 동일, 즉 적어도 약 85 내지 90%, 예컨대 약 95% 또는 그 이상 동일해야만 한다. 따라서, 가능하게 CDR을 제외하고, 인간화된 면역글로불린의 모든 부분은 천연 인간 면역글로불린 서열의 상응하는 부분과 실질적으로 동일하다. 인간화 또는 다른 단일클론 항체는 항원 결합 또는 다른 면역글로불린 기능에 실질적으로 영향이 없는, 추가의 보존성 아미노산 치환을 가질 수 있다. 인간화 항체는 유전자 조작의 수단으로 구축될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제5,585,089호 참조).

[0164] 구체적인 실시형태에서, 항-STn 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 제한 없이, 낙타 Ig(낙타과 항체(VHH)), IgNAR, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab)'2 단편, F(ab)'3 단편, Fv, 단쇄 Fv 항체("scFv"), 비스-scFv, (scFv)₂, 미니바디, 다이아바디, 트라이아바디, 테트라바디, 이황화 안정화된 Fv 단백질("dsFv"), 및 단일 도메인 항체(sdAb, 나노바디)를 포함한다.

[0165] 본 명세서에서 사용시 "낙타 Ig" 또는 "낙타과 VHH"는 중쇄 항체의 최소한의 기지 항원 결합 단위를 의미한다(Koch-Nolte, et al, *FASEB J.*, 21: 3490-3498(2007)). "중쇄 항체" 또는 "낙타과 항체"는 2개 VH 도메인을 함유하지만 경쇄는 없는 항체를 의미한다(Riechmann L. et al, *J. Immunol. Methods* 231:25-38(1999); W094/04678; W094/25591; 미국 특허 제6,005,079호).

[0166] "면역글로불린 신규 항원 수용체"의 "IgNAR"은 하나의 가변 신규 항원 수용체(VNAR) 도메인 및 5개 불변 신규

항원 수용체(CNAR) 도메인의 동종이량체로 이루어진 상어 면역 레퍼토리 유래의 항체 부류를 의미한다. IgNAR은 최소한의 기지의 면역글로불린 기반 단백질 스캐폴드의 일부를 의미하고 고도로 안정하고 효율적인 결합 특징을 보유한다. 고유한 안정성은 (i) 쥐과동물 항체에 존재하는 통상의 항체 VH 및 VL 도메인과 비교하여 상당한 수의 하전된 친수성 표면 노출 잔기가 존재하는, 기초 Ig 스캐폴드; 및 (ii) 루프간 이황화 브릿지, 및 루프내 수소 결합 패턴을 포함한 상보성 결정 영역(CDR) 루프의 안정화 구조 특성 둘 모두가 기여될 수 있다.

[0167] 항체의 파파인 분해는 각각 단일 항원 결합 부위를 갖는, "Fab" 단편, 및 그 명칭이 쉽게 결정화되는 이의 능력을 반영하는 나머지 "Fc" 단편이라고 하는, 2개의 동일한 항원 결합 단편을 생성시킨다. 펩신 처리는 2개의 항원 조합 부위를 갖고 여전히 항원을 가교시킬 수 있는 F(ab')₂ 단편을 산출한다.

[0168] "Fv"는 완전한 항원 결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 일 실시형태에서, 2-사슬 Fv 종은 조밀한, 비공유 회합된, 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인의 이량체로 이루어진다. 단쇄 Fv(scFv) 종에서, 하나의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인은 탄성 펩타이드 링커에 의해 공유적으로 연결될 수 있어서 경쇄 및 중쇄가 2-사슬 Fv 종에서와 유사한 "이량체" 구조로 회합될 수 있다. 이러한 구성에서, 각 가변 도메인의 3개 초가변 영역(HVR)은 VH-VL 이량체의 표면 상에 항원 결합 부위가 한정되도록 상호작용한다. 종합적으로, 6개 HVR이 항체에 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 단일 가변 도메인(또는 항원에 특이적인 오직 3개 HVR을 포함하는 Fv의 절반)이 항원을 인식하고 결합하는 능력을 갖지만, 전체 결합 부위에서보다 낮은 친화성이다.

[0169] Fab 단편은 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 함유하고 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인(CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역 유래의 하나 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카복시 말단에서 소수의 잔기의 첨가에 의해 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)이 자유티올기를 보유하는 Fab'에 대한 본 명세서에서의 명칭이다. F(ab')₂ 항체 단편은 본래 그들 사이에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편 쌍으로서 생성되었다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링이 또한 알려져 있다.

[0170] 용어 "다이하바디"는 단편이 동일 펩타이드 사슬(VH-VL)로 경쇄 가변 도메인(VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함하는, 2개 항원 결합 부위를 갖는 항체 단편을 의미한다. 너무 짧아서 동일한 사슬 상의 2개 도메인 사이에서 쌍형성을 허용하지 않는 링커를 사용하여, 도메인은 다른 사슬의 상보성 도메인과 쌍형성되게 강요되어 2개의 항원 결합 부위가 생성된다. 다이하바디는 이가이거나 또는 이중특이적일 수 있다. 다이하바디는 예를 들어, EP 404,097; WO 1993/01161; 문헌 [Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129-134(2003)]; 및 [Hollinger *et al.*, *PNAS USA* 90: 6444-6448(1993)]에 보다 상세하게 설명된다. 트라이아바디도 역시 문헌 [Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129-134(2003)]에 기술되어 있다.

[0171] "단일 도메인 항체" 또는 "sdAb" 또는 "나노바디"는 항체 중쇄의 가변 영역(VH 도메인) 또는 항체 경쇄의 가변 영역(VL 도메인)으로 이루어진 항체 단편을 의미한다(Holt, L., *et al.*, *Trends in Biotechnology*, 21(11): 484-490).

[0172] "단쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하고, 이들 도메인은 단일 폴리펩타이드 사슬로 존재하며 양쪽 배향으로 존재한다(예를 들어, VL-VH 또는 VH-VL). 일반적으로, scFv 폴리펩타이드는 scFv가 항원 결합에 바람직한 구조를 형성할 수 있는 VH 및 VL 도메인 사이에 폴리펩타이드 링커를 더 포함한다. scFv의 리뷰를 위해서, 예를 들어, 문헌 [Pluckthun, in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315]을 참조한다.

[0173] 바람직한 실시형태에서, CAR은 scFv이고 쥐과동물, 인간 또는 인간화된 scFv일 수 있는 항원 특이적 결합 도메인을 포함한다. 단쇄 항체는 바람직한 표적에 특이적인 하이브리도마의 V 영역 유전자로부터 클로닝될 수 있다. 이러한 하이브리도마의 생성은 일상이 되었다. 가변 영역 중쇄(V_H) 및 가변 영역 경쇄(V_L)를 클로닝하는데 사용될 수 있는 기술은 예를 들어, 문헌 [Orlandi *et al.*, *PNAS*, 1989; 86: 3833-3837]에 기술되어 있다.

[0174] 구체적인 실시형태에서, 항원 특이적 결합 도메인은 STn을 발현하는 인간 당단백질에 결합하는 scFv이다.

[0175] 본 명세서에서 고려하는 항-STn CAR을 구축하는데 적합한 가변 경쇄의 예시적인 예는 제한 없이, 서열번호 7, 15, 및 23에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.

[0176] 본 명세서에서 고려하는 항-STn CAR을 구축하는데 적합한 가변 중쇄의 예시적인 예는 제한 없이, 서열번호 8, 16, 및 24에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.

[0177] 예시적인 STn-특이적 결합 도메인은 적어도 하나의 인간 프레임워크 영역을 포함하는 STn에 특이적인 면역글로불린 가변 영역이다. "인간 프레임워크 영역"은 인간 면역글로불린 가변 영역의 야생형(즉, 천연 발생) 프레임

워크 영역, 영역 내 아미노산의 약 50% 미만(예를 들어, 바람직하게 약 45%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 또는 1% 미만)이 결실되거나 또는 치환(예를 들어, 상응하는 위치에 비인간 면역글로불린 프레임워크 영역의 하나 이상의 아미노산 잔기로)된 인간 면역글로불린 가변 영역의 변경된 프레임워크 영역, 또는 일 실시형태에서, 면역원성이 감소되도록 영역의 아미노산의 약 50% 미만(예를 들어, 45%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 미만)이 결실되거나 또는 치환(예를 들어, 노출된 잔기의 위치에서 및/또는 상응하는 위치에서 인간 면역글로불린 프레임워크 영역의 하나 이상의 아미노산 잔기로)된 비인간 면역글로불린 가변 영역의 변경된 프레임워크 영역을 의미한다.

[0178] 일정 실시형태에서, 인간 프레임워크 영역은 인간 면역글로불린 가변 영역의 야생형 프레임워크 영역이다. 일정한 다른 실시형태에서, 인간 프레임워크 영역은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 그 이상의 위치에서 아미노산 결실 또는 치환을 갖는 인간 면역글로불린 가변 영역의 변경된 프레임워크 영역이다. 다른 실시형태에서, 인간 프레임워크 영역은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 그 이상의 위치에서 아미노산 결실 또는 치환을 갖는 비인간 면역글로불린 가변 영역의 변경된 프레임워크 영역이다.

[0179] 구체적인 실시형태에서, Tn-특이적 결합 도메인은 인간 경쇄 FR1, 인간 중쇄 FR1, 인간 경쇄 FR2, 인간 중쇄 FR2, 인간 경쇄 FR3, 인간 중쇄 FR3, 인간 경쇄 FR4, 및 인간 중쇄 FR4에서 선택되는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개의 인간 프레임워크 영역(FR)을 포함한다.

[0180] STn-특이적 결합 도메인에 존재할 수 있는 인간 FR은 또한 예시적인 FR의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상의 아미노산이 치환되거나 또는 결실된 본 명세서에 제공되는 예시적인 FR의 변이체를 포함한다.

[0181] 일정 실시형태에서, STn-특이적 결합 도메인은 (a) 인간 경쇄 FR1, 인간 경쇄 FR2, 인간 경쇄 FR3, 및 인간 경쇄 FR4를 포함하는 인간화 경쇄 가변 영역, 및 (b) 인간 중쇄 FR1, 인간 중쇄 FR2, 인간 중쇄 FR3, 및 인간 중쇄 FR4를 포함하는 인간화 중쇄 가변 영역을 포함한다.

[0182] 본 명세서에 제공된 STn-특이적 결합 도메인은 또한 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개 CDR을 포함한다. 이러한 CDR은 비인간 CDR이거나 또는 경쇄의 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3, 및 중쇄의 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3에서 선택되는 변경된 비인간 CDR일 수 있다. 일정 실시형태에서, STn-특이적 결합 도메인은 (a) 경쇄 CDRL1, 경쇄 CDRL2, 및 경쇄 CDRL3을 포함하는 경쇄 가변 영역, 및 (b) 중쇄 CDRH1, 중쇄 CDRH2, 및 중쇄 CDRH3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.

[0183] 일 실시형태에서, STn-특이적 결합 도메인은 서열번호 1 내지 3, 9 내지 11, 또는 17 내지 19에 기재된 경쇄 CDR 서열을 포함한다. 구체적인 실시형태에서, STn-특이적 결합 도메인은 서열번호 1 내지 3, 9 내지 11, 또는 17 내지 19에 기재된 경쇄 CDR 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 아미노산 동일성을 갖는 경쇄 CDR 서열을 포함한다.

[0184] 일 실시형태에서, STn-특이적 결합 도메인은 서열번호 4 내지 6, 12 내지 14, 또는 20 내지 22에 기재된 중쇄 CDR 서열을 포함한다. 구체적인 실시형태에서, STn-특이적 결합 도메인은 서열번호 4 내지 6, 12 내지 14, 또는 20 내지 22에 기재된 중쇄 CDR 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 아미노산 동일성을 갖는 중쇄 CDR 서열을 포함한다.

[0185] "V_L" 또는 "VL"에 대한 언급은 항체, Fv, scFv, dsFv, Fab, 또는 본 명세서에 개시된 바와 같은 다른 항체 단편의 것을 포함하는, 면역글로불린 경쇄의 가변 영역을 의미한다. 본 명세서에서 고려하는 항-STn CAR을 구축하는 데 적합한 경쇄 가변 영역의 예시적인 예는 제한 없이, 서열번호 7, 15, 또는 23에 기재된 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0186] "V_H" 또는 "VH"에 대한 언급은 항체, Fv, scFv, dsFv, Fab, 또는 본 명세서에 개시된 바와 같은 다른 항체 단편을 포함하는, 면역글로불린 중쇄의 가변 영역을 의미한다. 본 명세서에서 고려하는 항-STn CAR을 구축하는 데 적합한 중쇄 가변 영역의 예시적인 예는 제한 없이, 서열번호 8, 16, 또는 24에 기재된 중쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0187] 2. 링커

[0188] 일정 실시형태에서, CAR은 분자의 적절한 공간화 및 입체형태를 위해 첨가되는, 다양한 도메인 사이, 예를 들어 V_H 및 V_L 도메인 사이의 링커 잔기를 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 링커는 가변 영역 연결 서열이다. "가변 영역 연결 서열"은 V_H 및 V_L 도메인을 연결하고, 2개의 하위 결합 도메인의 상호작용과 상용성인 스페이서 기능

을 제공하고 최종 폴리펩타이드가 동일한 경쇄 및 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 동일한 표적 분자에 대한 특이적 결합 친화성을 보유하게 하는 아미노산 서열이다. 구체적인 실시형태에서, 링커는 하나 이상의 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인, 힌지 도메인, 막관통 도메인, 공자극성 도메인, 및/또는 1차 신호전달 도메인을 이격시킨다. CAR은 1, 2, 3, 4, 또는 5개 또는 그 이상의 링커를 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 링커의 길이는 약 1 내지 약 25개의 아미노산, 약 5 내지 약 20개의 아미노산, 또는 약 10 내지 약 20개의 아미노산, 또는 아미노산의 임의의 개재 길이이다. 일부 실시형태에서, 링커는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25개, 또는 그 이상의 아미노산 길이이다.

[0189] 링커의 예시적인 예는 글리신 중합체(G_n); 글리신-세린 중합체($G_{1-5}S_{1-5}$)_n(여기서, n은 적어도 1, 2, 3, 4, 또는 5의 정수임); 글리신-알라닌 중합체; 알라닌-세린 중합체; 및 당분야에 공지된 임의의 탄성 링커를 포함한다. 글리신 및 글리신-세린 중합체는 비교적 비구조적이므로, 따라서 본 명세서에 기술된 CAR과 같은 융합 단백질의 도메인 사이에서 중성 속박부로서 제공될 수 있다. 글리신은 알라닌보다도 더욱 유의하게 파이-파이 공간을 접근하며, 보다 긴 측쇄를 갖는 잔기보다 훨씬 덜 제한적이다(문헌 [Scheraga, *Rev. Computational Chem.* 11173-142(1992)]을 참조함). 당업자는 구체적인 실시형태에서 CAR의 디자인이 전체 또는 부분 탄성인 링커를 포함할 수 있어서, 링커가 탄성 링커를 비롯하여 바람직한 CAR 구조를 제공하도록 덜 탄성인 구조를 부여하는 하나 이상의 부분을 포함할 수 있다는 것을 인식하게 될 것이다.

[0190] 다른 예시적인 링커는 제한 없이, 다음의 아미노산 서열을 포함한다: GGG; DGGGS(서열번호 28); TGEKP(서열번호 29)(예를 들어, 문헌 [Liu *et al.*, PNAS 5525-5530(1997)]을 참조함); GGRR(서열번호 30)(Pomerantz *et al.* 1995, 상동); (GGGS)_n(여기서 n = 1, 2, 3, 4 또는 5임)(서열번호 31)(Kim *et al.*, PNAS 93, 1156-1160(1996.)); EGKSSGSGSESKVD(서열번호 32)(Chaudhary *et al.*, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:1066-1070); KESGSVSSEQLAQFRSLD(서열번호 33)(Bird *et al.*, 1988, Science 242:423-426), GRRGGGS(서열번호 34); LRQRDGERP(서열번호 35); LRQKGGGSERP(서열번호 36); LRQK(GGGS)₂ ERP(서열번호 37). 대안적으로, 탄성 링커는 DNA-결합 부위 및 펩타이드 그 자체 둘 모두를 모델링할 수 있는 컴퓨터 프로그램(Desjarlais & Berg, PNAS 90:2256-2260(1993), PNAS 91:11099-11103(1994)을 사용하거나 또는 파지 디스플레이 방법을 통해 합리적으로 디자인될 수 있다. 일 실시형태에서, 링커는 다음의 아미노산 서열을 포함한다: GSTSGSGKPGSGEGSTKG(서열번호 38)(Cooper *et al.*, Blood, 101(4): 1637-1644(2003)).

[0191] 3. 스페이서 도메인

[0192] 구체적인 실시형태에서, CAR의 결합 도메인은 적절한 세포/세포 접촉, 항원 결합 및 활성화를 할 수 있도록 효과기 세포 표면으로부터 멀리 항원 결합 도메인을 이동시키는 영역이라고 하는, 하나 이상의 "스페이서 도메인"이 후속된다(Patel *et al.*, Gene Therapy, 1999; 6: 412-419). 스페이서 도메인은 천연, 합성, 반합성, 또는 재조합 공급원에서 유도될 수 있다. 일정 실시형태에서, 스페이서 도메인은 제한 없이 하나 이상의 중쇄 불변 영역, 예를 들어 CH2 및 CH3을 포함하는, 면역글로불린의 일부분이다. 스페이서 도메인은 천연 유래 면역글로불린 힌지 영역 또는 변경된 면역글로불린 힌지 영역의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0193] 일 실시형태에서, 스페이서 도메인은 IgG1, IgG4, 또는 IgD의 CH2 및 CH3 도메인을 포함한다.

[0194] 4. 힌지 도메인

[0195] CAR의 결합 도메인은 일반적으로 적절한 세포/세포 접촉, 항원 결합 및 활성화를 할 수 있도록 효과기 세포 표면으로부터 멀리 항원 결합 도메인을 위치시킴에 있어서 역할을 하는 하나 이상의 "힌지 도메인"이 후속된다. CAR은 일반적으로 결합 도메인과 막관통 도메인(TM) 사이에 하나 이상의 힌지 도메인을 포함한다. 힌지 도메인은 천연, 합성, 반합성, 또는 재조합 공급원에서 유도될 수 있다. 힌지 영역은 천연 유래 면역글로불린 힌지 영역 또는 변경된 면역글로불린 힌지 영역의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0196] "변경된 힌지 영역"은 (a) 최대 30% 아미노산 변화(예를 들어, 최대 25%, 20%, 15%, 10%, 또는 5%의 아미노산 치환 또는 결실)를 갖는 천연 유래 힌지 영역, (b) 최대 30% 아미노산 변화(예를 들어, 최대 25%, 20%, 15%, 10%, 또는 5%의 아미노산 치환 또는 결실)를 갖는 적어도 10개의 아미노산(예를 들어, 적어도 12, 13, 14 또는 15개의 아미노산) 길이의 천연 유래 힌지 영역의 일부분, 또는 (c) 코어 힌지 영역(4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15, 또는 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 아미노산 길이일 수 있음)을 포함하는 천연 유래 힌지 영역의 일부분을 의미한다. 일정 실시형태에서, 천연 유래 면역글로불린 힌지 영역의 하나 이상의 시스템 잔기는 하나 이상의 다른 아미노산 잔기(예를 들어, 하나 이상의 세린 잔기)에 의해 치환될 수 있다. 변경된 면역글로불린 힌지 영역은 대안적으로 또는 추가적으로 다른 아미노산 잔기(예를 들어

어, 세린 잔기)에 의해 치환된 야생형 면역글로불린 힌지 영역의 프롤린 잔기를 가질 수 있다.

[0197] 본 명세서에 기술된 CAR에서 사용하기 적합한 예시적인 힌지 도메인은 이들 분자 유래의 야생형 힌지 영역일 수 있거나 또는 변경될 수 있는, 1형 막 단백질, 예컨대 CD8 α , 및 CD4의 세포외 영역에서 유도된 힌지 영역을 포함한다. 다른 실시형태에서, 힌지 영역은 CD8 α 힌지 영역을 포함한다.

[0198] 일 실시형태에서, 힌지는 PD-1 힌지 또는 CD152 힌지.

[0199] 5. 막관통(TM) 도메인

[0200] "막관통 도메인"은 세포외 결합 도메인과 세포내 신호전달 도메인을 융합시키고 CAR을 면역 효과기 세포의 원형 질막에 앵커링시키는 CAR의 일부분이다. TM 도메인은 천연, 합성, 반합성, 또는 재조합 공급원에서 유도될 수 있다. TM 도메인은 T 세포 수용체의 α 와 또는 베타 사슬, CD δ , CD3 ϵ , CD γ , CD3 ζ , CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD154, 및 PD1의 적어도 막관통 영역(들)에서 유도(즉, 포함)될 수 있다. 구체적인 실시형태에서, TM 도메인은 합성이고 주로 소수성 잔기 예컨대 류신 및 발린을 포함한다.

[0201] 일 실시형태에서, CAR은 PD1, CD152, 또는 CD8 α 에서 유도된 TM 도메인을 포함한다. 다른 실시형태에서, CAR은 PD1, CD152, 또는 CD8 α 에서 유도된 TM 도메인 및 CAR의 TM 도메인과 세포내 신호전달 도메인을 연결하는 바람직하게 길이가 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 아미노산인 짧은 올리고펩타이드 또는 폴리펩타이드 링커를 포함한다. 글리신-세린 기반 링커가 특히 적합한 링커를 제공한다.

[0202] 6. 세포내 신호전달 도메인

[0203] 구체적인 실시형태에서, CAR은 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. "세포내 신호전달 도메인"은 CAR 결합된 표적 세포로 세포독성 인자의 방출, 또는 세포외 CAR 도메인에 결합하는 항원에 의해 유발된 다른 세포 반응을 포함하여, 효과기 세포 기능, 예를 들어 활성화, 사이토카인 생성, 증식 및 세포독성 활성을 유발시키도록 면역 효과기 세포의 내부로 인간 TAG-72 폴리펩타이드에 결합하는 효과적인 항-STn CAR의 메시지를 전달하는데 참여하는 CAR의 일부를 의미한다.

[0204] 용어 "효과기 기능"은 면역 효과기 세포의 특수화된 기능을 의미한다. T 세포의 효과기 기능은 사이토카인의 분비를 포함하는 활성 또는 도움 또는 세포용해 활성일 수 있다. 따라서, 용어 "세포내 신호전달 도메인"은 효과기 기능 신호를 전달하고 세포가 특수화된 기능을 수행하도록 지정하는 단백질의 일부분을 의미한다. 일반적으로 전체 세포내 신호전달 도메인이 적용될 수 있지만, 많은 경우에 전체 도메인을 사용하는 것이 필요하지는 않다. 세포내 신호전달 도메인의 절단된 일부만이 사용되는 정도로, 이러한 절단된 부분은 효과기 기능 신호를 전달하는 한 전체 도메인 대신에 사용될 수 있다. 용어 세포내 신호전달 도메인은 효과기 기능 신호를 전달하는데 충분한 세포내 신호전달 도메인의 임의의 일부분을 포함하는 것을 의미한다.

[0205] TCR 단백을 통해 발생된 신호는 T 세포의 완전한 활성화에 불충분하고 2차 또는 공자극성 신호가 또한 요구된다는 것이 알려져 있다. 따라서, T 세포 활성화는 2종의 별개 부류의 세포내 신호전달 도메인에 의해 매개된다고 할 수 있다: TCR(예를 들어, TCR/CD3 복합체)을 통한 항원 의존적 1차 활성화를 개시시키는 1차 신호전달 도메인 및 2차 또는 공자극성 신호를 제공하도록 항원 비의존적 방식으로 작용하는 공자극성 신호전달 도메인. 바람직한 실시형태에서, CAR은 하나 이상의 "공자극성 신호전달 도메인" 및 "1차 신호전달 도메인"을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.

[0206] 1차 신호전달 도메인은 자극성 방식, 또는 억제성 방식으로 TCR 복합체의 1차 활성화를 조절한다. 자극성 방식으로 작용하는 1차 신호전달 도메인은 면역수용체 티로신 기반 활성화 모티프 또는 ITAM이라고 알려진 신호전달 모티프를 함유할 수 있다.

[0207] 구체적인 실시형태에서 사용에 적합한 ITAM 함유 1차 신호전달 도메인의 예시적인 예는 FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b, 및 CD66d에서 유도된 것들을 포함한다. 구체적인 바람직한 실시형태에서, CAR은 CD3 ζ 1차 신호전달 도메인 및 하나 이상의 공자극성 신호전달 도메인을 포함한다. 세포내 1차 신호전달 및 공자극성 신호전달 도메인은 막관통 도메인의 카복실 말단에 탠덤으로 임의 순서로 연결될 수 있다.

[0208] 구체적인 실시형태에서, CAR은 CAR 수용체를 발현하는 T 세포의 효능 및 확장을 향상시키기 위해 하나 이상의 공자극성 신호전달 도메인을 포함한다. 본 명세서에서 사용 시, 용어 "공자극성 신호전달 도메인", 또는 "공자극성 도메인"은 공자극성 분자의 세포내 신호전달 도메인을 의미한다. 공자극성 분자는 항원에 결합 시 T 림프

구의 효율적인 활성화 및 기능에 요구되는 제2 신호를 제공하는 항원 수용체 또는 Fc 수용체 이외의 세포 표면 분자이다. 이러한 공자극성 분자의 예시적인 예는 TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54(ICAM), CD83, CD134(OX40), CD137(4-1BB), CD278(ICOS), DAP10, LAT, NKD2C, SLP76, TRIM, 및 ZAP70을 포함한다. 일 실시형태에서, CAR은 CD28, CD137, 및 CD134로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 공자극성 신호전달 도메인, 및 CD3 ζ 1차 신호전달 도메인을 포함한다.

[0209] 다른 실시형태에서, CAR은 CD28 및 CD137 공자극성 신호전달 도메인 및 CD3 ζ 1차 신호전달 도메인을 포함한다.

[0210] 또 다른 실시형태에서, CAR은 CD28 및 CD134 공자극성 신호전달 도메인 및 CD3 ζ 1차 신호전달 도메인을 포함한다.

[0211] 일 실시형태에서, CAR은 CD137 및 CD134 공자극성 신호전달 도메인 및 CD3 ζ 1차 신호전달 도메인을 포함한다.

[0212] 일 실시형태에서, CAR은 CD137 공자극성 신호전달 도메인 및 CD3 ζ 1차 신호전달 도메인을 포함한다.

[0213] 일 실시형태에서, CAR은 CD134 공자극성 신호전달 도메인 및 CD3 ζ 1차 신호전달 도메인을 포함한다.

[0214] 일 실시형태에서, CAR은 CD28 공자극성 신호전달 도메인 및 CD3 ζ 1차 신호전달 도메인을 포함한다.

[0215] 구체적인 실시형태에서, CAR은 암 세포 상에서 STn을 발현하는 당단백질에 특이적으로 결합하는 항-STn 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.

[0216] 일 실시형태에서, CAR은 당단백질 상에서 발현되는 STn에 결합하는 항-STn scFv; T 세포 수용체의 알파 또는 베타 사슬, CD δ , CD3 ϵ , CD γ , CD3 ζ , CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD154, 및 PD1로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리펩타이드에서 유도된 막관통 도메인; 및 TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54(ICAM), CD83, CD134(OX40), CD137(4-1BB), CD278(ICOS), DAP10, LAT, NKD2C, SLP76, TRIM, 및 ZAP70으로 이루어진 군으로부터 선택되는 공자극성 분자 유래의 하나 이상의 세포내 공자극성 신호전달 도메인; 및 FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b, 및 CD66d 유래의 1차 신호전달 도메인을 포함한다.

[0217] 일 실시형태에서, CAR은 당단백질 상에서 발현되는 STn에 결합하는 항-STn scFv; IgG1 힌지/CH2/CH3, IgG4 힌지/CH2/CH3, PD1 힌지, CD152 힌지, 및 CD8 α 힌지로 이루어진 군으로부터 선택되는 힌지 도메인; T 세포 수용체의 알파 또는 베타 사슬, CD δ , CD3 ϵ , CD γ , CD3 ζ , CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD154, 및 PD1로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리펩타이드에서 유도된 막관통 도메인; 및 TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54(ICAM), CD83, CD134(OX40), CD137(4-1BB), CD278(ICOS), DAP10, LAT, NKD2C, SLP76, TRIM, 및 ZAP70로 이루어진 군으로부터 선택되는 공자극성 분자 유래의 하나 이상의 세포내 공자극성 신호전달 도메인; 및 FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b, 및 CD66d 유래의 1차 신호전달 도메인을 포함한다.

[0218] 일 실시형태에서, CAR은 당단백질 상에서 발현되는 STn에 결합하는 항-STn; IgG1 힌지/CH2/CH3, IgG4 힌지/CH2/CH3, PD1 힌지, CD152 힌지, 및 CD8 α 힌지로 이루어진 군으로부터 선택되는 힌지 도메인; T 세포 수용체의 알파 또는 베타 사슬, CD δ , CD3 ϵ , CD γ , CD3 ζ , CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD154, 및 PD1로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리펩타이드에서 유도된 막관통 도메인; CAR의 세포내 신호전달 도메인에 TM 도메인을 연결시키는 바람직하게 길이가 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 아미노산인 짧은 올리고펩타이드 또는 폴리펩타이드 링커; 및 TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54(ICAM), CD83, CD134(OX40), CD137(4-1BB), CD278(ICOS), DAP10, LAT, NKD2C, SLP76, TRIM, 및 ZAP70으로 이루어진 군으로부터 선택되는 공자극성 분자 유래의 하나 이상의 세포내 공자극성 신호전달 도메인; 및 FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b, 및 CD66d 유래의 1차 신호전달 도메인을 포함한다.

[0219] 구체적인 실시형태에서, CAR은 당단백질 상에서 발현되는 STn에 결합하는 항-STn scFv; IgG1 힌지/CH2/CH3 폴리펩타이드 및 CD8 α 폴리펩타이드를 포함하는 힌지 도메인; 약 3 내지 약 10개의 아미노산의 폴리펩타이드 링커를 포함하는 CD8 α 막관통 도메인; CD137 세포내 공자극성 신호전달 도메인; 및 CD3 ζ 1차 신호전달 도메인을 포함한다.

- [0220] 구체적 실시형태에서, CAR은 당단백질 상에서 발현되는 STn에 결합하는 항-STn scFv; CD8 α 폴리펩타이드를 포함하는 힌지 도메인; 약 3 내지 약 10개의 아미노산의 폴리펩타이드 링커를 포함하는 CD8 α 막관통 도메인; CD134 세포내 공자극성 신호전달 도메인; 및 CD3 ζ 1차 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0221] 구체적 실시형태에서, CAR은 당단백질 상에서 발현되는 STn에 결합하는 항-STn scFv; CD8 α 폴리펩타이드를 포함하는 힌지 도메인; 약 3 내지 약 10개의 아미노산의 폴리펩타이드 링커를 포함하는 CD8 α 막관통 도메인; CD28 세포내 공자극성 신호전달 도메인; 및 CD3 ζ 1차 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0222] 구체적 실시형태에서, CAR은 당단백질 상에서 발현되는 STn에 결합하는 항-STn scFv; PD1 힌지, 폴리펩타이드를 포함하는 힌지 도메인; 약 3 내지 약 10개의 아미노산의 폴리펩타이드 링커를 포함하는 PD1 또는 CD152 막관통 도메인; CD137 세포내 공자극성 신호전달 도메인; 및 CD3 ζ 1차 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0223] 구체적 실시형태에서, CAR은 당단백질 상에서 발현되는 STn에 결합하는 항-STn scFv; PD1 힌지, 폴리펩타이드를 포함하는 힌지 도메인; 약 3 내지 약 10개의 아미노산의 폴리펩타이드 링커를 포함하는 PD1 또는 CD152 막관통 도메인; CD134 세포내 공자극성 신호전달 도메인; 및 CD3 ζ 1차 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0224] 구체적 실시형태에서, CAR은 당단백질 상에서 발현되는 STn에 결합하는 항-STn scFv; PD1 힌지, 폴리펩타이드를 포함하는 힌지 도메인; 약 3 내지 약 10개의 아미노산의 폴리펩타이드 링커를 포함하는 PD1 또는 CD152 막관통 도메인; CD28 세포내 공자극성 신호전달 도메인; 및 CD3 ζ 1차 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0225] 구체적 실시형태에서, CAR은 당단백질 상에서 발현되는 STn에 결합하는 항-STn scFv; CD152 힌지, 폴리펩타이드를 포함하는 힌지 도메인; 약 3 내지 약 10개의 아미노산의 폴리펩타이드 링커를 포함하는 PD1 또는 CD152 막관통 도메인; CD137 세포내 공자극성 신호전달 도메인; 및 CD3 ζ 1차 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0226] 구체적 실시형태에서, CAR은 당단백질 상에서 발현되는 STn에 결합하는 항-STn scFv; CD152 힌지, 폴리펩타이드를 포함하는 힌지 도메인; 약 3 내지 약 10개의 아미노산의 폴리펩타이드 링커를 포함하는 PD1 또는 CD152 막관통 도메인; CD134 세포내 공자극성 신호전달 도메인; 및 CD3 ζ 1차 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0227] 구체적 실시형태에서, CAR은 당단백질 상에서 발현되는 STn에 결합하는 항-STn scFv; CD152 힌지, 폴리펩타이드를 포함하는 힌지 도메인; 약 3 내지 약 10개의 아미노산의 폴리펩타이드 링커를 포함하는 PD1 또는 CD152 막관통 도메인; CD28 세포내 공자극성 신호전달 도메인; 및 CD3 ζ 1차 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0228] 또한, 본 명세서에서 고려하는 CAR의 디자인은 다른 CAR을 발현하도록 변형된 T 세포 또는 비변형 T 세포와 비교하여 CAR을 발현하는 T 세포에서 개선된 확장, 장기간 지속성, 및 세포독성 특성을 가질 수 있다.
- [0229] **D. 폴리펩타이드**
- [0230] CAR 폴리펩타이드 및 이의 단편, 이를 포함하는 세포 및 조성물, 및 폴리펩타이드를 발현하는 벡터를 포함하여, 다양한 폴리펩타이드가 본 명세서에서 고려된다. 바람직한 실시형태에서, 하나 이상의 CAR을 포함하는 폴리펩타이드가 제공된다. 구체적 실시형태에서, CAR은 서열번호 25 내지 27 중 어느 하나에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 항-STn CAR이다.
- [0231] "폴리펩타이드", "폴리펩타이드 단편", "펩타이드" 및 "단백질"은 반대로 명시하지 않으면, 상호교환적으로 통상의 의미에 따라서, 즉 아미노산의 서열로서 사용된다. 폴리펩타이드는 합성될 수 있거나 또는 재조합으로 생성될 수 있다. 폴리펩타이드는 특정한 길이에 제한되지 않고, 예를 들어 그들은 전체 길이 단백질 서열 또는 전체 길이 단백질의 단편을 포함할 수 있고, 폴리펩타이드의 번역후 변형, 예를 들어, 글리코실화, 아세틸화, 인산화 등을 비롯하여 천연 유래 및 비천연 유래 둘 모두의, 당분야에 공지된 다른 변형을 포함할 수 있다. 다양한 실시형태에서, CAR 폴리펩타이드는 단백질의 전달을 번역과 동시에 또는 번역 후에 지정하는, 단백질의 N 말단에 신호(또는 리더) 서열을 포함한다. 본 명세서에서 고려되는 CAR에 유용한 적합한 신호 서열의 예시적인 예는 제한 없이, IgG1 중쇄 신호 폴리펩타이드, CD8 α 신호 폴리펩타이드, 또는 인간 GM-CSF 수용체 알파 신호 폴리펩타이드를 포함한다. 폴리펩타이드는 임의의 다양한 잘 알려진 재조합 및/또는 합성 기술을 사용해서 제조될 수 있다. 본 명세서에서 고려하는 폴리펩타이드는 특별히 본 개시내용의 CAR, 또는 본 명세서에서 고려되는 바와 같은 CAR의 하나 이상의 아미노산의 결실, 첨가 및/또는 치환을 갖는 서열을 포함한다.
- [0232] 본 명세서에서 사용시 "단리된 펩타이드" 또는 "단리된 폴리펩타이드" 등은 세포 환경, 및 세포의 다른 성분과의 회합으로부터 펩타이드 또는 폴리펩타이드 분자의 시험관내 단리 및/또는 정제를 의미하고, 다시 말해서, 생체내 물질과 유의하게 회합되지 않는다. 유사하게, "단리된 세포"는 생체내 조직 또는 장기에서 획득된 세포를

의미하고 세포의 매트릭스가 실질적으로 없다.

[0233] 폴리펩타이드는 "폴리펩타이드 변이체"를 포함한다. 폴리펩타이드 변이체는 하나 이상의 치환, 결실, 첨가 및/또는 삽입으로 천연 유래 폴리펩타이드와 상이할 수 있다. 이러한 변이체는 예를 들어 하나 이상의 상기 폴리펩타이드 서열을 변형시켜 합성적으로 생성될 수 있거나 또는 천연 유래일 수 있다. 예를 들어, 구체적인 실시형태에서, CAR 폴리펩타이드의 결합 도메인, 힌지, TM 도메인, 공자극성 신호전달 도메인 또는 1차 신호전달 도메인에 하나 이상의 치환, 결실, 첨가 및/또는 삽입을 도입시켜 CAR의 결합 친화성 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선시키는 것이 바람직할 수 있다. 구체적인 실시형태에서, 폴리펩타이드는 본 명세서에서 고려하는 임의의 기준 서열과 적어도 약 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 86%, 97%, 98%, 또는 99%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함하고, 전형적으로 변이체는 기준 서열의 적어도 하나의 생물학적 활성을 유지한다.

[0234] 폴리펩타이드는 "폴리펩타이드 단편"을 포함한다. 폴리펩타이드 단편은 천연 유래 또는 재조합적으로 생성된 폴리펩타이드의 아미노 말단 결실, 카복실 말단 결실, 및/또는 내부 결실 또는 치환을 갖는 단량체 또는 다량체일 수 있는, 폴리펩타이드를 의미한다. 일정 실시형태에서, 폴리펩타이드 단편은 적어도 5 내지 약 500개의 아미노산 길이인 아미노산 사슬을 포함한다. 일정 실시형태에서, 단편은 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 또는 450개의 아미노산 길이라는 것을 이해하게 될 것이다. 구체적으로 유용한 폴리펩타이드 단편은 항원 결합 도메인 또는 항체의 단편을 포함하는 기능성 도메인을 포함한다. 항-STn 항체의 경우, 유용한 단편은 제한 없이 CDR 영역, 중쇄 또는 경쇄의 CDR3 영역; 중쇄 또는 경쇄의 가변 영역; 2개 CDR을 포함하는 가변 영역 또는 항체 사슬의 일부분 등을 포함한다.

[0235] 폴리펩타이드는 또한 폴리펩타이드의 합성, 정제 또는 동정의 용이성(예를 들어, 폴리-His)을 위해, 또는 고정 지지체에 폴리펩타이드의 결합을 향상시키기 위해 링커 또는 다른 서열에 접합되거나 또는 인프레임으로 융합될 수 있다.

[0236] 상기에 언급한 바와 같이, 폴리펩타이드는 아미노산 치환, 결실, 절단, 및 삽입을 포함하여 다양한 방식으로 변경될 수 있다. 이러한 조작 방법은 일반적으로 당분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 기준 폴리펩타이드의 아미노산 서열 변이체는 DNA에 돌연변이를 통해 제조될 수 있다. 돌연변이유발 및 뉴클레오타이드 서열 변경을 위한 방법은 당분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 하기 문헌들 및 그에 인용된 참조문헌을 참고한다: Kunkel(1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 488-492), Kunkel *et al.*, (1987, *Methods in Enzymol*, 154: 367-382), 미국 특허 제4,873,192호, Watson, J. D. *et al.*, (*Molecular Biology of the Gene*, Fourth Edition, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1987). 관심 단백질의 생물학적 활성에 영향을 주지않는 적절한 아미노산 치환에 관한 지침은 문헌 [Dayhoff *et al.*, (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure*(Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.)]의 모델에서 확인할 수 있다.

[0237] 일정 실시형태에서, 폴리펩타이드 변이체는 하나 이상의 보존성 치환을 포함한다. "보존성 치환"은 펩타이드 화학의 당업자가 폴리펩타이드의 2차 구조 및 소수성 성질이 실질적으로 변하지 않는 것으로 예상하도록, 아미노산이 유사한 특성을 갖는 다른 아미노산으로 치환되는 것이다. 변형은 구체적인 실시형태에서 고려되는 폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩타이드의 구조에 만들어질 수 있고 바람직한 특징을 갖는 변이체 또는 유도체 폴리펩타이드를 코딩하는 기능성 분자를 여전히 획득한다. 균등물, 또는 심지어 개선된, 변이체 폴리펩타이드를 생성시키기 위해 폴리펩타이드의 아미노산 서열을 변경시키는 것이 바람직한 경우, 예를 들어 당업자는, 예를 들어 표 1에 따라서 코딩되는 DNA 서열의 코돈 중 하나 이상을 변화시킬 수 있다.

표 1

[0238]

아미노산 코돈						
아미노산	1글자 코드	3글자 코드	코돈			
알라닌	A	Ala	GCA	GCC	GCG	GCU
시스테인	C	Cys	UGC	UGU		
아스파르트산	D	Asp	GAC	GAU		
글루탐산	E	Glu	GAA	GAG		
페닐알라닌	F	Phe	UUC	UUU		

글리신	G	Gly	GGA	GGC	GGG	GGU
히스티딘	H	His	CAC	CAU		
아이소류신	I	Iso	AUA	AUC	AUU	
리신	K	Lys	AAA	AAG		
류신	L	Leu	UUA	UUG	CUA	CUC
메티오닌	M	Met	AUG			
아스파라긴	N	Asn	AAC	AAU		
프롤린	P	Pro	CCA	CCC	CCG	CCU
글루타민	Q	Gln	CAA	CAG		
아르기닌	R	Arg	AGA	AGG	CGA	CGC
세린	S	Ser	AGC	AGU	UCA	UCC
트레오닌	T	Thr	ACA	ACC	ACG	ACU
발린	V	Val	GUA	GUC	GUG	GUU
트립토판	W	Trp	UGG			
티로신	Y	Tyr	UAC	UAU		

[0239] 생물학적 활성이 파괴되지 않고 어떠한 아미노산 잔기가 치환될 수 있거나, 삽입될 수 있거나, 또는 결실될 수 있는지 결정하는 지침은 당분야에 잘 알려진 컴퓨터 프로그램, 예컨대 DNASTAR, DNA 스트라이더(Strider), 지니어스(Geneious), Mac 벡터, 또는 벡터 NTI 소프트웨어를 사용해서 확인할 수 있다. 바람직하게, 본 명세서에서 개시된 단백질 변이체의 아미노산 변화는 보존성 아미노산 변화, 즉 유사하게 하전되거나 또는 비하전된 아미노산의 치환이다. 보존성 아미노산 변화는 그들의 측쇄가 관련있는 아미노산 패밀리 중 하나의 치환이 관여한다. 천연 유래 아미노산은 일반적으로 4개 패밀리로 분류된다: 산성(아스파테이트, 글루타메이트), 염기성(리신, 아르기닌, 히스티딘), 비극성(알라닌, 발린, 류신, 아이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 및 비전하 극성(글리신, 아스파라긴, 글루타민, 시스테인, 세린, 트레오닌, 티로신) 아미노산. 페닐알라닌, 트립토판, 및 티로신은 때때로 방향족 아미노산으로서 함께 분류된다. 펩타이드 또는 단백질에서 아미노산의 적합한 보존성 치환은 당업자에게 공지되어 있고 일반적으로 최종 분자의 생물학적 활성을 변경시키지 않고 만들 수 있다. 당업자는 일반적으로 폴리펩타이드의 불필수 영역 내 단일 아미노산 치환이 실질적으로 생물학적 활성을 변경시키지 않는다는 것을 인식한다(예를 들어, 문헌 [Watson *et al. Molecular Biology of the Gene*, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p.224]을 참조함).

[0240] 이러한 변화를 만드는 경우, 아미노산의 소수성 지수가 고려될 수 있다. 단백질에 대해 상호작용성 생물학적 기능을 부여함에 있어서 소수성 아미노산 지수의 중요성은 일반적으로 당분야에서 이해되고 있다(문헌 [Kyte and Doolittle, 1982], 참조로 본 명세서에 편입시킴). 각각의 아미노산은 이의 소수성 및 전하 특징을 기반으로 소수성 지수가 지정되었다(Kyte and Doolittle, 1982). 이들 값은 아이소류신(+4.5); 발린(+4.2); 류신(+3.8); 페닐알라닌(+2.8); 시스테인/시스테인(+2.5); 메티오닌(+1.9); 알라닌(+1.8); 글리신(-0.4); 트레오닌(-0.7); 세린(-0.8); 트립토판(-0.9); 티로신(-1.3); 프롤린(-1.6); 히스티딘(-3.2); 글루타메이트(-3.5); 글루타민(-3.5); 아스파테이트(-3.5); 아스파라긴(-3.5); 리신(-3.9); 및 아르기닌(-4.5)이다.

[0241] 일정 아미노산은 유사한 소수성 지수 또는 점수를 갖는 다른 아미노산으로 치환될 수 있고 여전히 유사한 생물학적 활성을 갖는 단백질을 생성시킬 수 있고, 다시 말해서 생물학적 기능적으로 균등한 단백질을 획득할 수 있다고 당분야에서 공지되어 있다. 이러한 변화를 만드는 경우, 그 소수성 지수가 ± 2 이내인 아미노산의 치환이 바람직하고, ± 1 이내의 것이 특히 바람직하며, ± 0.5 이내의 것이 보다 더 특히 바람직하다. 유사한 아미노산의 치환은 친수성을 기반으로 효과적으로 만들 수 있다고 당분야에서 또한 이해하고 있다.

[0242] 미국 특허 제4,554,101호에 상세하게 설명된 바와 같이, 다음의 친수성 값이 아미노산 잔기에 대해 지정되었다: 아르기닌(+3.0); 리신(+3.0); 아스파테이트(+3.0 ± 1); 글루타메이트(+3.0 ± 1); 세린(+0.3); 아스파라긴(+0.2); 글루타민(+0.2); 글리신(0); 트레오닌(-0.4); 프롤린(-0.5 ± 1); 알라닌(-0.5); 히스티딘(-0.5); 시스테인(-1.0); 메티오닌(-1.3); 발린(-1.5); 류신(-1.8); 아이소류신(-1.8); 티로신(-2.3); 페닐알라닌(-2.5); 트립토판(-3.4). 아미노산은 유사한 친수성 값을 갖는 다른 것으로 치환될 수 있고 여전히 생물학적 균등물, 구체적으로 면역학적으로 균등한 단백질을 획득할 수 있다고 이해된다. 이러한 변화에서, 그의 친수성 값이 ± 2 이내인 아미노산의 치환이 바람직하고, ± 1 이내인 것이 특히 바람직하며, ± 0.5 이내인 것이 보다 더 특히 바람직하다.

[0243] 상기에 약술한 바와 같이, 아미노산 치환은 아미노산 측쇄 치환기의 상대적 유사성, 예를 들어, 그들의 소수성,

친수성, 전하, 크기 등을 기반으로 할 수 있다.

- [0244] 폴리펩타이드 변이체는 글리코실화된 형태, 다른 분자와의 집합적 접합체, 및 미관련 화학 모이어티와의 공유 접합체(예를 들어, PEG화 분자)를 더 포함한다. 공유 변이체는 당분야에 공지된 바와 같이, 아미노산 사슬 또는 N 말단 또는 C 말단 잔기에 존재하는 기와 작용성을 연결하여 제조될 수 있다. 변이체는 또한 대립유전자 변이체, 중 변이체, 뮤테인을 포함한다. 단백질의 기능적 활성에 영향을 미치지 않는 절단 또는 결실이 또한 변이이다.
- [0245] 일 실시형태에서, 2 이상의 폴리펩타이드의 발현이 바람직한 경우, 그들을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 본 명세서의 다른 부분에서 설명하는 바와 같이 IRES 서열에 의해 분리될 수 있다. 다른 실시형태에서, 2 이상의 폴리펩타이드는 하나 이상의 자가 절단성 폴리펩타이드 서열을 포함하는 융합 단백질로서 발현될 수 있다.
- [0246] 구체적인 실시형태에서 고려되는 폴리펩타이드는 융합 폴리펩타이드를 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 융합 폴리펩타이드 및 융합 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어 CAR을 제공한다. 융합 폴리펩타이드 및 융합 단백질은 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 또는 그 이상의 폴리펩타이드 절편을 갖는 폴리펩타이드를 의미한다. 융합 폴리펩타이드는 전형적으로 C 말단을 N 말단에 연결시키지만, 그들은 또한 C 말단에서 C 말단, N 말단에서 N 말단, 또는 N 말단에서 C 말단으로 연결될 수도 있다. 융합 단백질의 폴리펩타이드는 임의의 순서 또는 특정한 순서일 수 있다. 융합 폴리펩타이드 또는 융합 단백질은 또한 융합 폴리펩타이드의 바람직한 전사 활성이 보존되지만 하면, 보존적으로 변형된 변이체, 다형성 변이체, 대립유전자, 돌연변이체, 하위서열, 및 중간 상동체를 포함할 수 있다. 융합 폴리펩타이드는 화학 합성 방법에 의해서 또는 2개 모이어티 사이의 화학적 연결에 의해서 생성될 수 있거나 또는 일반적으로 다른 표준 기술을 사용해서 제조될 수 있다. 융합 폴리펩타이드를 포함하는 절찰된 DNA 서열은 본 명세서의 다른 곳에 기술된 바와 같이 적합한 전사 또는 번역 제어 성분에 작동 가능하게 연결된다.
- [0247] 일 실시형태에서, 융합 파트너는 천연 재조합 단백질보다 더 높은 수율로 단백질을 발현하도록 돕는 서열(발현 인핸서)을 포함한다. 다른 융합 파트너는 단백질의 가용성을 증가시키거나 또는 단백질이 희망하는 세포내 구획으로 표적화할 수 있게 하거나 또는 세포막을 통해 융합 단백질의 수송을 용이하게 하도록 선택될 수 있다.
- [0248] 융합 폴리펩타이드는 본 명세서에 기술된 각각의 폴리펩타이드 도메인 사이에 폴리펩타이드 절단 신호를 더 포함할 수 있다. 또한, 폴리펩타이드 절단 부위는 임의의 링커 펩타이드 서열에 더할 수 있다. 예시적인 폴리펩타이드 절단 신호는 폴리펩타이드 절단 인식 부위 예컨대 프로테아제 절단 부위, 뉴클레아제 절단 부위(예를 들어, 회귀 제한효소 인식 부위, 자가 절단성 리보자임 인식 부위), 및 자가 절단성 바이러스 올리고펩타이드를 포함한다(문헌 [deFelipe and Ryan, 2004. *Traffic*, 5(8); 616-26]을 참조함).
- [0249] 적합한 프로테아제 절단 부위 및 자가 절단성 펩타이드는 당업자에게 공지되어 있다(예를 들어, 문헌 [Ryan *et al.*, 1997. *J. Gener. Virol.* 78, 699-722]; [Scymczak *et al.*(2004) *Nature Biotech.* 5, 589-594]을 참조함). 예시적인 프로테아제 절단 부위는 제한 없이, 포티바이러스 NIa 프로테아제(예를 들어, 담배 식각 바이러스 프로테아제), 포티바이러스 HC 프로테아제, 포티바이러스 P1(P35) 프로테아제, 비오바이러스 NIa 프로테아제, 비오바이러스 RNA-2-코딩된 프로테아제, 아프토바이러스 L 프로테아제, 엔테로바이러스 2A 프로테아제, 리노바이러스 2A 프로테아제, 피코르나 3C 프로테아제, 코모바이러스 24K 프로테아제, 네포바이러스 24K 프로테아제, RTSV(rice tungro spherical virus) 3C-유사 프로테아제, PYVF(parsnip yellow fleck virus) 3C-유사 프로테아제, 헤파린, 트롬빈, 인자 Xa 및 엔테로키나제의 절단 부위를 포함한다. 이의 고도의 절단 엄격성에 기인하여, TEV(담배 식각 바이러스) 프로테아제 절단 부위가 일 실시형태에서, 바람직하고, 예를 들어 EXXXYQ(G/S)(서열번호 39), 예를 들어, ENLYFQG(서열번호 40) 및 ENLYFQS(서열번호 41)(여기서, X는 임의의 아미노산을 나타냄(TEV에 의한 절단은 Q와 G 사이 또는 Q와 S 사이에서 일어남))이다.
- [0250] 구체적인 실시형태에서, 자가 절단성 펩타이드는 포티바이러스 및 카디오바이러스 2A 펩타이드, FMDV(foot-and-mouth disease virus), 말 A형 비염 바이러스, 토시아 아그시나 바이러스 및 돼지 테스코바이러스에서 획득된 폴리펩타이드 서열을 포함한다.
- [0251] 일정 실시형태에서, 자가 절단성 폴리펩타이드 부위는 2A 또는 2A-유사 부위, 서열 또는 도메인을 포함한다 (Donnelly *et al.*, 2001. *J. Gen. Virol.* 82:1027-1041). 예시적인 2A 부위는 표 2에 도시하였다.

표 2

[0252]	서열번호 42	LLNFDLLKLAGDVESNPGP
	서열번호 43	TLNFDLLKLAGDVESNPGP

서열번호 44	LLKLAGDVESNPGP
서열번호 45	NFDLLKLAGDVESNPGP
서열번호 46	QLLNFDLLKLAGDVESNPGP
서열번호 47	APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
서열번호 48	VTELLYRMKRAETCYCPRLLAIHPTTEARHKQKIVAPVKQT
서열번호 49	LNFDLLKLAGDVESNPGP
서열번호 50	LLAIHPTTEARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
서열번호 51	EARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

[0253] 바람직한 실시형태에서, 폴리펩타이드는 CAR 폴리펩타이드를 포함한다.

[0254] E. 폴리뉴클레오타이드

[0255] 바람직한 실시형태에서, 하나 이상의 CAR 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 제공된다. 본 명세서에서 사용 시, 용어 "폴리뉴클레오타이드" 또는 "핵산"은 메신저 RNA(mRNA), RNA, 게놈 RNA(gRNA), 플러스 가닥 RNA(RNA(+)), 마이너스 가닥 RNA(RNA(-)), 게놈 DNA(gDNA), 상보성 DNA(cDNA) 또는 재조합 DNA를 의미한다. 폴리뉴클레오타이드는 단일 가닥 및 이중 가닥 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 본 명세서에서 고려하는 임의의 기준 서열과 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오타이드 또는 변이체를 포함한다. 다양한 예시적인 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 발현 벡터, 바이러스 벡터, 및 전달 플라스미드, 및 이를 포함하는 조성물 및 세포를 포함한다. 다양한 예시적인 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 제한 없이, 서열번호 1 내지 51에 기재된 폴리펩타이드 서열을 포함하여, 본 명세서에서 고려하는 폴리펩타이드를 코딩한다.

[0256] 구체적인 실시형태에서, 폴리펩타이드의 적어도 약 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 1000, 1250, 1500, 1750, 또는 2000개 또는 그 이상의 인접한 아미노산 잔기를 비롯하여, 모든 중간 길이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 본 문맥에서 "중간 길이"는 인용된 값 사이의 임의의 길이, 예컨대 6, 7, 8, 9개 등; 101, 102, 103개 등; 151, 152, 153개 등; 201, 202, 203개 등을 의미하는 것으로 쉽게 이해하게 될 것이다.

[0257] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "폴리뉴클레오타이드 변이체" 및 "변이체" 등은 이후 본 명세서에서 정의하는 엄격한 조건 하에서 기준 서열과 혼성화하는 기준 폴리뉴클레오타이드 서열 또는 폴리뉴클레오타이드와 실질적으로 서열 동일성을 나타내는 폴리뉴클레오타이드를 의미한다. 이들 용어는 기준 폴리뉴클레오타이드와 비교하여 하나 이상의 뉴클레오타이드가 첨가되거나 또는 결실되거나, 또는 상이한 뉴클레오타이드로 치환된 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 이러한 점에서, 돌연변이, 첨가, 결실 및 치환을 포함하는 일정 변경이 기준 폴리뉴클레오타이드에 대해 만들어질 수 있어서, 그 변경된 폴리뉴클레오타이드는 기준 폴리뉴클레오타이드의 생물학적 기능 또는 활성을 보유하는 것을 당분야에서는 충분히 이해한다.

[0258] 본 명세서에서 사용시 설명 "서열 동일성" 또는, 예를 들어, "50% 동일한 서열"을 포함하는은 비교창 상에서 뉴클레오타이드 대 뉴클레오타이드 기반 또는 아미노산 대 아미노산 기반으로 서열이 동일한 정도를 의미한다. 따라서, "서열 동일성 백분율"은 비교창 상에서 2개의 최적으로 정렬된 서열을 비교하는 단계, 일치되는 위치의 수를 산출하기 위해 동일한 핵산 염기(예를 들어, A, T, C, G, I) 또는 동일한 아미노산 잔기(예를 들어, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys 및 Met)가 양쪽 서열에 존재하는 위치의 수를 결정하는 단계, 비교창의 전체 위치수(즉, 창크의 크기)로 일치되는 위치의 수를 나누는 단계, 및 결과에 100을 곱하여 서열 동일성 백분율을 산출하는 단계를 통해 계산될 수 있다. 본 명세서에 기술된 임의의 기준 서열과 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 및 폴리펩타이드를 포함하고, 전형적으로 폴리펩타이드 변이체는 기준 폴리펩타이드의 적어도 하나의 생물학적 활성을 유지한다.

[0259] 2 이상의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 사이의 서열 관계를 설명하기 위해 사용되는 용어는 "기준 서열", "비교창", "서열 동일성", "서열 동일성의 백분율" 및 "실질적 동일성"을 포함한다. "기준 서열"은 길이가 뉴클레오타이드 및 아미노산 잔기를 포함하여, 적어도 12개이지만 빈번하게 15 내지 18개, 그리고 종종 적어도 25개 단량체 단위이다. 2개의 폴리뉴클레오타이드가 각각 (1) 2개의 폴리뉴클레오타이드 간에 유사한 서열(즉,

완전한 폴리뉴클레오타이드 서열의 오직 일부분), 및 (2) 2개의 폴리뉴클레오타이드 간에 분기된 서열을 포함할 수 있기 때문에, 서열 2개(또는 그 이상) 폴리뉴클레오타이드 간 비교는 전형적으로 서열 유사성의 국소 영역을 동정하고 비교하기 위해 "비교창" 상에서 2개의 폴리뉴클레오타이드의 서열을 비교하여 수행된다. "비교창"은 2개의 서열을 최적으로 정렬한 후 서열을 동일한 수의 인접한 위치의 기준 서열과 비교하는 적어도 6개의 인접한 위치, 일반적으로 약 50 내지 약 100개, 보다 일반적으로 약 100 내지 약 150개의 개념적 절편을 의미한다. 비교창은 2개 서열의 최적 정렬에 대해 기준 서열(첨가 또는 결실을 포함하지 않음)과 비교하여 약 20% 이상의 첨가 또는 결실(즉, 겹)을 포함할 수 있다. 비교창을 정렬하기 위한 서열의 최적 정렬은 알고리즘(위스콘신 제네틱스 소프트웨어 패키지 릴리즈 7.0의 GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, 미국, 위스콘신주, 매디슨 소재)의 컴퓨터 실행에 의해 또는 임의의 선택된 다양한 방법으로 생성된 최고 정렬(즉, 비교창 상의 최고 비율의 상동성을 유발) 및 검사에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Altschul *et al.*, 1997, Nucl. Acids Res. 25:3389]에 개시된 바와 같은 BLAST 프로그램 패밀리를 참조할 수 있다. 서열 분석의 상세한 설명은 문헌 [Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Chapter 15]의 19.3 단원에서 확인할 수 있다.

[0260] 본 명세서에서 사용 시, "단리된 폴리뉴클레오타이드"는 천연 유래 상태에서 그것에 측정한 서열로부터 정제된 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어 단편에 정상적으로 인접하는 서열로부터 제거된 DNA 단편을 의미한다. "단리된 폴리뉴클레오타이드"는 또한 자연계에 존재하지 않고 인간이 만든 상보성 DNA(cDNA), 재조합 DNA, 또는 다른 폴리뉴클레오타이드를 의미한다.

[0261] 폴리뉴클레오타이드의 배향을 설명하는 용어는 5'(정상적으로 자유 포스페이트 기를 갖는 폴리뉴클레오타이드의 말단) 및 3'(정상적으로 자유 하이드록실(OH) 기를 갖는 폴리뉴클레오타이드의 말단)을 포함한다. 폴리뉴클레오타이드 서열은 5'에서 3' 배향 또는 3'에서 5' 배향으로 주석을 달 수 있다. DNA 및 mRNA의 경우, 5'에서 3' 가닥은 이의 서열이 프리메신저(premRNA)의 서열과 동일(DNA에서 티미딘(T) 대신, RNA에서는 우라실(U)인 것 제외)하므로 "센스", "플러스" 또는 "코딩" 가닥이라고 명명된다. DNA 및 mRNA의 경우, RNA 중합효소에 의해 전사되는 가닥인 상보성 3'에서 5' 가닥은 "주형", "안티센스", "마이너스" 또는 "넌코딩" 가닥이라고 명명하다. 본 명세서에서 사용 시, 용어 "역배향"은 3'에서 5' 배향으로 기재된 5'에서 3' 서열 또는 5'에서 3' 배향으로 기재된 3'에서 5' 서열을 의미한다.

[0262] 용어 "상보적" 및 "상보성"은 염기 쌍형성 규칙과 관련된 폴리뉴클레오타이드(즉, 뉴클레오타이드의 서열)을 의미한다. 예를 들어, DNA 서열 5' A G T C A T G 3'의 상보적 가닥은 3' T C A G T A C 5'이다. 후자의 서열은 종종 5' C A T G A C T 3'로, 좌측에 5' 말단 및 우측에 3' 말단과 역 상보체로서 종종 기재된다. 이의 역 상보체와 균등한 서열을 회문식 서열이라고 한다. 상보성은 핵산 염기의 오직 일부가 염기 쌍형성 규칙에 따라 일치되어 "부분"일 수 있다. 또는, 핵산 간에 "완전" 또는 "전체" 상보성이 존재할 수 있다.

[0263] 또한, 유전자 코드의 축퇴성의 결과로서, 본 명세서에 기술된 바와 같은, 폴리펩타이드, 또는 이의 변이체의 단편을 코딩하는 많은 뉴클레오타이드 서열이 존재한다는 것은 당업자가 이해하게 될 것이다. 이들 폴리뉴클레오타이드의 일부는 임의의 천연 유전자의 뉴클레오타이드 서열과 최소 상동성을 보유한다. 그럼에도, 코돈 활용법의 차이로 인해 가변적인 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어 인간 및/또는 영장류 코돈 선택에 최적화된 폴리뉴클레오타이드가, 구체적인 실시형태에서 특별히 고려된다. 구체적인 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 발현 및/또는 안정성을 위해 최적화된 코돈이다. 또한, 본 명세서에서 제공하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자의 대립유전자가 또한 사용될 수 있다. 대립유전자는 하나 이상의 돌연변이, 예컨대 뉴클레오타이드의 결실, 첨가 및/또는 치환의 결과로서 변경된 내생성 유전자이다.

[0264] 본 명세서에서 사용시 용어 "핵산 카세트"는 RNA, 및 후속하여 단백질을 발현할 수 있는 벡터 내 유전자 서열을 의미한다. 핵산 카세트는 관심 유전자, 예를 들어 CAR을 함유한다. 핵산 카세트는 카세트의 핵산이 RNA로 전사될 수 있고, 필요한 경우, 단백질을 또는 폴리펩타이드로 번역되어, 형질전환된 세포에서 활성화에 요구되는 적절한 번역 후 변형을 겪고, 적절한 세포내 구획으로 표적화 또는 세포외 구획으로 분비에 의해 생물학적 활성을 위한 적절한 구획으로 전위될 수 있도록 벡터 내에서 위치적으로 순차적으로 배향된다. 바람직하게, 카세트는 벡터로 쉬운 삽입을 위해 적합화된 이의 3' 및 5' 말단을 가지며, 예를 들어 각 말단에 제한 엔도뉴클레아제 부위를 갖는다. 바람직한 실시형태에서, 핵산 카세트는 당단백질, 예를 들어 TAG-72에 결합된 STn을 발현하는 암 세포의 세포독성을 증가시키기 위해 사용되는 키메라 항원 수용체의 서열을 함유한다. 카세트는 제거되어 단일 단위로 서 플라스미드 또는 바이러스 벡터에 삽입될 수 있다.

[0265] 구체적인 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 적어도 하나의 관심 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 본 명세서

에서 사용 시, 용어 "관심 폴리뉴클레오타이드"는 발현되는 것이 바람직한 발현 벡터에 삽입된 폴리펩타이드(즉, 관심 폴리펩타이드)를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 의미한다. 벡터는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 관심 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일정 실시형태에서, 관심 폴리뉴클레오타이드는 질환 또는 장애의 치료 또는 예방에서 치료적 효과를 제공하는 폴리펩타이드를 코딩한다. 관심 폴리뉴클레오타이드, 및 이를 코딩하는 폴리펩타이드는 야생형 폴리펩타이드를 비롯하여 이의 기능적 변이체 및 단편을 코딩하는 양쪽 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 기능적 변이체는 상응하는 야생형 기준 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 서열과 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99%의 동일성을 갖는다. 일정 실시형태에서, 기능적 변이체 또는 단편은 상응하는 야생형 폴리펩타이드의 생물학적 활성의 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90%를 갖는다.

[0266] 일정 실시형태에서, 관심 폴리뉴클레오타이드는 miRNA, siRNA, 또는 shRNA, 리보자임, 또는 다른 억제성 RNA를 전사하기 위한 주형이다. 다양한 다른 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 CAR을 코딩하는 관심 폴리뉴클레오타이드, 및 제한 없이, siRNA, miRNA, shRNA 및 리보자임을 포함하는, 제한 없이 억제성 핵산을 포함하는 하나 이상의 추가의 관심 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

[0267] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "siRNA" 또는 "짧은 간섭 RNA"는 동물에서 서열-특이적 전사 후 유전자 침묵화, 번역 억제, 전사 억제, 또는 후생적 RNAi의 과정을 매개하는 짧은 폴리뉴클레오타이드 서열을 의미한다(Zamore *et al.*, 2000, *Cell*, 101, 25-33; Fire *et al.*, 1998, *Nature*, 391, 806; Hamilton *et al.*, 1999, *Science*, 286, 950-951; Lin *et al.*, 1999, *Nature*, 402, 128-129; Sharp, 1999, *Genes & Dev.*, 13, 139-141; and Strauss, 1999, *Science*, 286, 886). 일정 실시형태에서, siRNA는 동일한 수의 뉴클레오타이드를 갖는 제1 가닥 및 제2 가닥을 포함하지만, 제1 및 제2 가닥은 제1 및 제2 가닥 상의 2개의 말단 뉴클레오타이드가 상보적 가닥 상의 잔기와 쌍형성되지 않도록 오프셋이다. 일정 예에서, 쌍형성되지 않는 2개 뉴클레오타이드는 티미딘 잔기이다. siRNA는 siRNA 또는 이의 단편이 표적 유전자의 하향 조절을 매개할 수 있도록, 표적 유전자와 충분한 상동성의 영역을 포함해야 하고, 뉴클레오타이드에 있어서 충분한 길이여야 한다. 따라서, siRNA는 표적 RNA와 적어도 부분적으로 상보적인 영역을 포함한다. siRNA와 표적 간에 완벽한 상보성이 존재할 필요는 없지만, 대응물은 siRNA 또는 이의 절단 생성물이 예컨대, 표적 RNA의 RNAi 절단을 통해 서열 특이적 침묵화를 지정할 수 있도록 충분해야만 한다. 상보성, 또는 표적 가닥과 상동성 정도는 안티센스 가닥에서 가장 핵심적이다. 구체적으로 안티센스 가닥에서 완벽한 상보성은 종종 바람직하지만, 일부 실시형태는 표적 RNA에 대해 하나 이상이지만, 바람직하게 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2개, 또는 더 소수의 불일치를 포함한다. 불일치는 말단 영역에서 가장 내성이고, 존재한다면, 바람직하게 말단 영역 또는 영역들, 예를 들어 5' 및/또는 3' 말단의 6, 5, 4 또는 3개의 뉴클레오타이드 내이다. 센스 가닥은 분자의 전체 이중 가닥 특징을 유지하도록 안티센스 가닥과 오직 충분히 상보성일 필요가 있다.

[0268] 또한, siRNA는 변형될 수 있거나 또는 뉴클레오타이드 유사체를 포함할 수 있다. siRNA의 단일 가닥 영역은 변형될 수 있거나 또는 뉴클레오타이드 유사체를 포함할 수 있는데, 예를 들어 헤어핀 구조의 쌍 비형성 영역 또는 영역들, 예를 들어 2개 상보성 영역을 연결하는 영역은 변형 또는 뉴클레오타이드 유사체를 포함할 수 있다. 예를 들어 엑소뉴클레아제에 대항하여, siRNA의 하나 이상의 3' 말단 또는 5' 말단을 안정화시키거나, 또는 안티센스 siRNA 작용제가 RISC에 진입하는 것을 유리하게 하는 변형이 또한 유용하다. 변형은 C3(또는 C6, C7, C12) 아미노 링커, 티올 링커, 카복실 링커, 비뉴클레오타이드 스페이서(C3, C6, C9, C12, 비염기성, 트라이에틸렌 글리콜, 헥사에틸렌 글리콜), 특이적 바이오틴 또는 포스포로라미다이트로서 되고 RNA 합성 동안 다수 커플링을 가능하게 하는 다른 DMT 보호된 하이드록실 기를 갖는 플루오레세인 시약을 포함할 수 있다. siRNA의 각각의 가닥은 길이가 30, 25, 24, 23, 22, 21, 또는 20개 이하의 뉴클레오타이드일 수 있다. 가닥은 바람직하게 길이가 적어도 19개의 뉴클레오타이드이다. 예를 들어, 각각의 가닥은 길이가 21 내지 25개의 뉴클레오타이드일 수 있다. 바람직한 siRNA는 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25개의 뉴클레오타이드 쌍의 듀플렉스 영역, 및 2-3개의 뉴클레오타이드의 하나 이상의 오버행, 바람직하게 2 내지 3개의 뉴클레오타이드의 1 또는 2개 3' 오버행을 갖는다.

[0269] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "miRNA" 또는 "마이크로RNA"는 전형적으로 프리-miRNA라고 알려진 RNA 전구체 구조에서 접힌 대략 70개의 뉴클레오타이드에서 절제된, 20 내지 22개의 뉴클레오타이드의 소형 비코딩 RNA를 의미한다. miRNA는 miRNA와 표적 사이의 상보성 정도에 의존적으로 2가지 방식 중 한 가지로 그들의 표적을 음성적으로 조절한다. 먼저, 단백질 코딩 mRNA 서열에 완벽하거나 또는 거의 완벽한 상보성으로 결합하는 miRNA는 RNA-매개 간섭(RNAi) 경로를 유도한다. 그들의 mRNA 표적의 3' 미번역 영역(UTR) 내에 미완벽한 상보성 부위에 결합하여 그들의 조절 효과를 발휘하는 miRNA는 RNAi 경로에 대해 사용되는 것과 유사하거나, 또는 가능하게 동

일한 RISC 복합체를 통해, 번역 수준에서, 전사후에, 분명하게 표적-유전자 발현을 억제한다. 번역 제어와 일관되게, 이러한 기전을 사용하는 miRNA는 그들 표적 유전자의 단백질 수준을 감소시키지만, 이들 유전자의 mRNA 수준은 오직 최소로 영향을 미친다. miRNA는 임의의 mRNA 서열을 특이적으로 표적화할 수 있는 인공적으로 디자인된 miRNA를 비롯하여, 천연 유래 miRNA를 포함한다. 예를 들어, 일 실시형태에서, 당업자는 인간 miRNA(예를 들어, miR-30 또는 miR-21) 1차 전사물질로서 발현되는 짧은 헤어핀 RNA 작제물을 디자인할 수 있다. 이러한 디자인은 드로샤(Drosha) 프로세싱 부위를 헤어핀 작제물에 첨가하고 Nick나 효율을 상당히 증가시키는 것으로 확인되었다(Pusch *et al.*, 2004). 헤어핀 줄기부는 22-nt의 dsRNA(예를 들어, 안티센스는 희망 표적에 완벽한 상보성을 가짐) 및 인간 miR 유래의 15-19-nt 루프로 이루어진다. 헤어핀의 한쪽 또는 양쪽 면에 miR 루프 및 miR30 측접 서열의 첨가는 마이크로RNA가 없는 통상의 shRNA 디자인과 비교시 발현된 헤어핀의 드로샤 및 다이서(Dicer) 프로세싱을 10배 넘게 증가시킨다. 증가된 드로샤 및 다이서 프로세싱은 더 많은 siRNA/miRNA 생성 및 발현된 헤어핀에 대한 더 많은 역가로 번역된다.

[0270] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "shRNA" 또는 "짧은 헤어핀 RNA"는 단일한 자가 상보성 RNA 가닥에 의해 형성되는 이중 가닥 구조를 의미한다. 표적 유전자의 코딩 또는 넌코딩 서열의 일부와 동일한 뉴클레오타이드 서열을 함유하는 shRNA 작제물은 억제를 선호한다. 표적 서열에 대해 삽입, 결실, 및 단일 점 돌연변이를 갖는 RNA 서열은 억제에 효과적인 것으로 확인되었다. 표적 유전자의 일부분과 억제성 RNA 사이의 90% 초과 서열 동일성, 또는 심지어 100% 서열 동일성이 바람직하다. 일정 바람직한 실시형태에서, shRNA의 듀플렉스 형성 부분의 길이는 적어도 20, 21 또는 22개의 뉴클레오타이드 길이로서, 다이서 의존적 절단으로 생성된 RNA 생성물에 상응하는 크기이다. 일정 실시형태에서, shRNA 작제물은 적어도 25, 50, 100, 200, 300 또는 400개 염기의 길이이다. 일정 실시형태에서, shRNA 작제물은 400-800개 염기의 길이이다. shRNA 작제물은 루프 서열 및 루프 크기의 변이에 고도로 내성이다.

[0271] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "리보자임"은 표적 mRNA 부위 특이적 절단을 할 수 있는 촉매적 활성 RNA 분자를 의미한다. 몇몇 아형, 예를 들어 헤어핀 리보자임이 설명된 바 있다. 리보자임 촉매 활성 및 안정성은 비촉매적 염기에서 리보뉴클레오타이드로 테옥시리보뉴클레오타이드를 치환하여 개선시킬 수 있다. 부위 특이적 인식 서열에서 mRNA를 절단하는 리보자임이 특정 mRNA를 파괴하는데 사용될 수 있지만, 헤어핀 리보자임의 사용이 바람직하다. 헤어핀 리보자임은 표적 mRNA와 상보적 염기쌍을 형성하는 영역을 측접시켜 영향받는 위치에서 mRNA를 절단한다. 유일한 요건은 표적 mRNA가 다음의 2개 염기 서열을 갖는 것이다: 5'-UG-3'. 헤어핀 리보자임의 구조 및 생성은 당분야에 잘 알려져 있다.

[0272] siRNA, miRNA, shRNA, 또는 리보자임을 포함하는 관심 폴리뉴클레오타이드의 바람직한 전달 방법은 본 명세서의 다른 곳에서 설명한 바와 같이, 하나 이상의 조절 서열, 예컨대, 예를 들어, 강력한 항상성 pol III, 예를 들어, 인간 U6 snRNA 프로모터, 마우스 U6 snRNA 프로모터, 인간 및 마우스 H1 RNA 프로모터 및 인간 tRNA-val 프로모터, 또는 강력한 항상성 pol II 프로모터를 포함한다.

[0273] 코딩 서열 자체의 길이와 무관하게, 본 명세서에서 고려되는 폴리뉴클레오타이드는 그들 전체 길이가 상당히 가변적일 수 있도록, 본 명세서의 다른 곳에 개시되거나 또는 당분야에 공지된 바와 같이, 다른 DNA 서열, 예컨대 프로모터 및/또는 인핸서, 미번역 영역(UTR), 신호 서열, 코작 서열, 폴리아데닐화 신호, 추가의 제한 효소 부위, 다중 클로닝 부위, 내부 리보솜 진입 부위(IRES), 리코비나제 인식 부위(예를 들어, LoxP, FRT, 및 Att 부위), 말단 코돈, 전사 종결 신호, 및 자가 절단성 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 에피토프 태그와 조합될 수 있다. 따라서, 대부분의 임의 길이의 폴리뉴클레오타이드 단편이 적용될 수 있고, 전체 길이는 바람직하게 의도하는 재조합 DNA 프로토콜의 사용 및 제조의 편의성에 의해 제한된다는 것을 고려한다.

[0274] 폴리뉴클레오타이드는 당분야에 공지되고 이용될 수 있는 임의의 다양한 충분히 확립된 기술들을 사용해서 제조될 수 있고/있거나, 조작될 수 있고/있거나 발현될 수 있다. 희망하는 폴리펩타이드를 발현시키기 위해서, 그 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 적절한 벡터에 삽입될 수 있다.

[0275] 벡터의 예는 플라스미드, 자체 복제 서열, 및 전이성 성분이다. 추가의 예시적인 벡터는 제한 없이, 플라스미드, 파지미드, 코스미드, 트랜스포존, 인공 염색체 예컨대 효모 인공 염색체(YAC), 박테리아 인공 염색체(BAC), 또는 P1-유도된 인공 염색체(PAC), 박테리오파지 예컨대 람다 파지 또는 M13 파지, 및 동물 바이러스를 포함한다. 벡터로서 유용한 동물 바이러스 범주의 예는 제한 없이, 레트로바이러스(렌티바이러스 포함), 아데노바이러스, 아데노 회합 바이러스, 헤르페스바이러스(예를 들어, 헤르페스 심플렉스 바이러스), 포크바이러스, 배콜로바이러스, 파필로마바이러스, 및 파코바바이러스(예를 들어, SV40)를 포함한다. 발현 벡터의 예는 포유동물 세포에서의 발현을 위한 pCIneo 벡터(Promega); 포유동물에서 렌티바이러스 매개 유전자 전달 및 발현을

위한 pLenti4/V5-DEST(상표명), pLenti6/V5-DEST(상표명), 및 pLenti6.2/V5-GW/lacZ(Invitrogen)를 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 키메라 단백질의 코딩 서열은 포유동물 세포에서 키메라 단백질의 발현을 위한 이러한 발현 벡터에 결합될 수 있다.

[0276] 구체적인 실시형태에서, 벡터는 제한 없이, 염색체외에서 유지되는 벡터 또는 에피솜 벡터를 포함하여, 비통합 벡터이다. 본 명세서에서 사용 시, 용어 "에피솜"은 상기 벡터가 염색체외에서 또는 에피솜으로 복제된다는 것을 역시 의미하는, 분열되는 숙주 세포로부터 점자적 손실이 없고 숙주의 염색체 DNA로 통합되지 않고 복제될 수 있는 벡터를 의미한다. 벡터는 림프친화성 헤르페스 바이러스 또는 감마 헤르페스 바이러스, 아데노바이러스, SV40, 소 파필로마 바이러스, 또는 효모 유래의 DNA 복제 기원 또는 "ori", 특히 EBV의 oriP에 상응하는 감마 헤르페스바이러스 또는 림프친화성 헤르페스 바이러스의 복제 기원을 코딩하는 서열을 보유하도록 조작된다. 구체적인 실시형태에서, 림프친화성 헤르페스 바이러스는 엡스테인 바 바이러스(EBV), 카포시 육종 헤르페스 바이러스(KSHV), 헤르페스 바이러스 사이미리(HS), 또는 마렉병 바이러스(MDV)일 수 있다. 엡스테인 바 바이러스(EBV) 및 카포시 육종 헤르페스 바이러스(KSHV)가 역시 감마 헤르페스바이러스의 예이다. 전형적으로 숙주 세포는 복제를 활성화시키는 바이러스 복제 트랜스전사인자 단백질을 포함한다.

[0277] 구체적인 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 트랜스포존 벡터 시스템을 사용해서 표적 또는 숙주 세포로 도입된다. 일정 실시형태에서, 트랜스포존 벡터 시스템은 전이성 성분 및 본 명세서에서 고려되는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터; 및 트랜스포사제를 포함한다. 일 실시형태에서, 트랜스포존 벡터 시스템은 단일 트랜스포사제 벡터 시스템이고, 예를 들어, 국제 특허 출원 제PCT/US07/18922호를 참조한다. 예시적인 트랜스포사제는 제한 없이, piggyBac, 슬리핑 뷰티, Mos1, Tc1/마리너, Tol2, 미니-Tol2, Tc3, MuA, Himar I, 프로그 프린스, 및 이의 유도체를 포함한다. piggyBac 트랜스포존 및 트랜스포사제는 예를 들어, 그 전체를 참조로 본 명세서에 편입시키는 미국 특허 제6,962,810호에 기술되어 있다. 슬리핑 뷰티 트랜스포존 및 트랜스포사제는 예를 들어, 그 전체로 참조로 본 명세서에 편입시키는 문헌 [Izsvak *et al.*, *J. Mol. Biol.* 302: 93-102(2000)]에 기술되어 있다. 송사리 오리자스 라티페스(*Oryzias latipes*)에서 처음 단리되고 트랜스포존의 hAT 패밀리에 속하는 Tol2 트랜스포존은 문헌 [Kawakami *et al.*(2000)]에 기술되어 있다. 미니-Tol2는 Tol2의 변이체이고 문헌 [Balciunas *et al.*(2006)]에 기술되어 있다. Tol2 및 미니-Tol2 트랜스포존은 Tol2 트랜스포사제와 함께 작용 시 유기체의 게놈에 전이유전자의 통합을 용이하게 한다. 프로그 프린스 트랜스포존 및 트랜스포사제는 예를 들어, 문헌 [Miskey *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 31:6873-6881(2003)]에 기술되어 있다.

[0278] 발현 벡터에 존재하는 "제어 성분" 또는 "조절 서열"은 전사 및 번역을 수행하기 위해 숙주 세포 단백질과 상호작용하는, 벡터의 비번역 영역 - 복제 기원, 선별 카세트, 프로모터, 인핸서, 번역 개시 신호(샤인 달가르노 서열 또는 코작 서열) 인트론, 폴리아데닐화 서열, 5' 및 3' 미번역 영역이다. 이러한 성분은 그들의 강도 및 특이성이 가변적일 수 있다. 이용되는 벡터 시스템 및 숙주에 따라서, 편재성 프로모터 및 유도성 프로모터를 포함하여, 임의의 수의 적합한 전사 및 번역 성분이 사용될 수 있다.

[0279] 구체적인 실시형태에서, 벡터는 제한 없이, 발현 벡터 및 바이러스 벡터를 포함하고, 외생성, 내생성, 또는 이중성 제어 서열 예컨대 프로모터 및/또는 인핸서를 포함하게 될 것이다. "내생성" 제어 서열은 게놈의 소정 유전자와 자연적으로 연결된 것이다. "외생성" 제어 서열은 유전자 조작(즉, 분자 생물학적 기술)에 의해 유전자와 병치로 위치되어서 그 유전자의 전사가 연결된 인핸서/프로모터에 의해 지정되는 것이다. "이중성" 제어 서열은 유전자 조작된 세포와 상이한 종 유래의 외생성 서열이다.

[0280] 본 명세서에서 사용시 용어 "프로모터"는 RNA 중합효소가 결합하는 폴리뉴클레오타이드(DNA 또는 RNA)의 인식 부위를 의미한다. RNA 중합효소는 프로모터에 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오타이드를 개시시키고 전사시킨다. 구체적인 실시형태에서, 포유동물 세포에서 작동하는 프로모터는 전사가 개시되는 부위로부터 상향으로 대략 25 내지 30번 염기에 위치하는 AT-풍부 영역 및/또는 전사 출발로부터 상향으로 70 내지 80번 염기에 존재하는 다른 서열, CNCAAT 영역(여기서 N은 임의의 뉴클레오타이드일 수 있음)을 포함한다.

[0281] 용어 "인핸서"는 향상된 전사를 제공할 수 있고 일부 예에서 다른 제어 서열에 대해서 그들 배향과 독립적으로 기능할 수 있는 DNA의 절편을 의미한다. 인핸서는 프로모터 및/또는 다른 인핸서 성분과 협동적으로 또는 부가적으로 기능할 수 있다. 용어 "프로모터/인핸서"는 프로모터 및 인핸서 둘 모두의 기능을 제공할 수 있는 서열을 포함하는 DNA의 절편을 의미한다.

[0282] 용어 "작동 가능하게 연결된"은 기술된 성분이 그들의 의도하는 방식으로 그들을 기능할 수 있게 허용하는 관계로 있는 병치를 의미한다. 일 실시형태에서, 이 용어는 핵산 발현 제어 서열(예컨대, 프로모터 및/또는 인핸서) 및 제2 폴리뉴클레오타이드 서열, 예를 들어 관심 폴리뉴클레오타이드 사이의 기능적 연결을 의미하고, 여기서

발현 제어 서열은 제2 서열에 상응하는 핵산의 전사를 지정한다.

- [0283] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "항상성 발현 제어 서열"은 작동 가능하게 연결된 서열의 전사를 계속적으로 또는 연속해서 가능하게 하는 프로모터, 인핸서, 또는 프로모터/인핸서를 의미한다. 항상성 발현 제어 서열은 광범위하게 다양한 세포 및 조직 유형에서 발현 가능하게 하는 "편재성" 프로모터, 인핸서, 또는 프로모터/인핸서일 수 있거나, 또는 각각 제한적으로 다양한 세포 및 조직 유형에서 발현 가능하게 하는 "세포 특이적", "세포 유형 특이적", "세포 계통 특이적", 또는 "조직 특이적" 프로모터, 인핸서, 또는 프로모터/인핸서일 수 있다.
- [0284] 구체적인 실시형태에서 사용하기 적합한 예시적인 편재성 발현 제어 서열은 제한 없이, 사이토메갈로바이러스(CMV) 전초기 프로모터, 바이러스 원숭이 바이러스 40(SV40)(예를 들어, 초기 또는 후기), 물로니 컷과동물 백혈병 바이러스(MoMLV) LTR 프로모터, 라우스 육종 바이러스(RSV) LTR, 헤르페스 심플렉스 바이러스(HSV)(티미딘 키나제) 프로모터, 백시니아 바이러스 유래의 H5, P7.5, 및 P11 프로모터, 신장 인자 1-알파(EF1a) 프로모터, 초기 성장 반응 1(EGR1), 페리틴 H(FerH), 페리틴 L(FerL), 글리세르알데하이드 3-포스페이트 디하이드로게나제(GAPDH), 진핵생물 번역 개시 인자 4A1(EIF4A1), 열충격 70kDa 단백질 5(HSPA5), 열충격 단백질 90kDa 베타, 구성원 1(HSP90B1), 열충격 단백질 70kDa(HSP70), β -키네신(β -KIN), 인간 ROSA 26 유전자좌(Irions *et al.*, *Nature Biotechnology* 25, 1477 - 1482(2007)), 유비퀴틴 C 프로모터(UBC), 포스포글리세레이트 키나제-1(PKG) 프로모터, 사이토메갈로바이러스 인핸서/닭 β -액틴(CAG) 프로모터, β -액틴 프로모터 및 골수증식성 육종 바이러스 인핸서, 음성 제어 영역 결실된, d1587rev 프라이머-결합 부위 치환된(MND) 프로모터(Challita *et al.*, *J Virol.* 69(2):748-55(1995))를 포함한다.
- [0285] 일 실시형태에서, 벡터는 MND 프로모터를 포함한다.
- [0286] 일 실시형태에서, 벡터는 인간 EF1a 유전자의 제1 인트론을 포함하는 EF1a 프로모터를 포함한다.
- [0287] 일 실시형태에서, 벡터는 인간 EF1a 유전자의 제1 인트론이 결여된 EF1a 프로모터를 포함한다.
- [0288] 구체적인 실시형태에서, T 세포 특이적 프로모터 유래의 CAR을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 발현시키는 것이 바람직할 수 있다.
- [0289] 본 명세서에서 사용 시, "조건적 발현"은 제한 없이, 유도성 발현; 억제성 발현; 특정 생리학적, 생물학적, 또는 질환 상태 등을 갖는 세포 또는 조직에서의 발현을 포함하여 임의 유형의 조건적 발현을 의미할 수 있다. 이러한 정의는 세포 유형 또는 조직 특이적 발현을 배제하려는 의도가 아니다. 일정 실시형태는 관심 폴리뉴클레오타이드의 조건적 발현을 제공하고, 예를 들어 발현은 세포, 조직, 유기체 등이 폴리뉴클레오타이드가 발현되도록 하거나 또는 관심 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩되는 폴리뉴클레오타이드의 발현의 감소 또는 증가를 야기시키는 치료 또는 상태를 겪게하여 제어된다.
- [0290] 유도성 프로모터/시스템의 예시적인 예는 제한 없이, 스테로이드 유도성 프로모터 예컨대 글루코코르티코이드 또는 에스트로겐 수용체를 코딩하는 유전자에 대한 프로모터(상응하는 호르몬 처리에 의해 유도가능), 메탈로티오닌 프로모터(다양하나 중금속 처리에 의해 유도가능), MX-1 프로모터(인터페론에 의해 유도가능), "유전자 스위치" 미페프리스트온-조절성 시스템(Sirin *et al.*, 2003, *Gene*, 323:67), 큐메이트 유도성 유전자 스위치(WO 2002/088346), 테트라사이클린-의존적 조절 시스템 등을 포함한다.
- [0291] 조건적 발현은 또 한 부위 특이적 DNA 리컴비나제를 사용해서 획득될 수 있다. 일정 실시형태에 따라서, 벡터는 부위 특이적 리컴비나제에 의해 매개되는 재조합을 위한 적어도 하나(전형적으로 2개)의 부위(들)를 포함한다. 본 명세서에서 사용 시, 용어 "리컴비나제" 또는 "부위 특이적 리컴비나제"는 야생형 단백질(Landy, *Current Opinion in Biotechnology* 3:699-707(1993)), 또는 이의 돌연변이체, 유도체(예를 들어, 재조합 단백질 서열 또는 이의 단편을 함유하는 융합 단백질), 및 변이체일 수 있는, 하나 이상의 재조합 부위(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 11, 15, 20, 30, 50개 등)를 포함하는 재조합 반응에 관여하는 절제성 또는 통합성 단백질, 효소, 보조인자 또는 회합된 단백질을 포함한다. 구체적인 실시형태에서 사용하기 적합한 리컴비나제의 예시적인 예는 제한 없이, Cre, Int, IHF, Xis, Flp, Fis, Hin, Gin, Φ C31, Cin, Tn3 리솔바제, TndX, XerC, XerD, TnpX, Hjc, Gin, SpCCE1, 및 ParA를 포함한다.
- [0292] 벡터는 임의의 광범위하게 다양한 부위 특이적 리컴비나제에 대한 하나 이상의 재조합 부위를 포함할 수 있다. 부위 특이적 리컴비나제에 대한 표적 부위는 벡터, 예를 들어 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터의 통합에 요구되는 임의의 부위(들) 이외의 것이라는 것을 이해해야 한다. 본 명세서에서 사용 시, 용어 "재조합 서열", "재조합 부위" 또는 "부위 특이적 재조합 부위"는 리컴비나제가 인식하고 결합하는 특정 핵산 서열을 의

미한다.

- [0293] 예를 들어, Cre 리코비나제에 대한 1개의 재조합 부위는 8개 염기쌍 코어 서열이 축적한 2개의 13개 염기쌍의 인버티드 반복부(리코비나제 결합 부위로 제공)를 포함하는 34개 염기쌍 서열인 loxP이다(문헌 [Sauer, B., *Current Opinion in Biotechnology* 5:521-527(1994)]의 도 1 참조). 다른 예시적인 loxP 부위는 제한 없이, lox511(Hoess *et al.*, 1996; Bethke and Sauer, 1997), lox5171(Lee and Saito, 1998), lox2272(Lee and Saito, 1998), m2(Langer *et al.*, 2002), lox71(Albert *et al.*, 1995), 및 lox66(Albert *et al.*, 1995)을 포함한다.
- [0294] FLP 리코비나제에 적합한 인식 부위는 제한 없이, FRT(McLeod, *et al.*, 1996), F₁, F₂, F₃(Schlake and Bode, 1994), F₄, F₅(Schlake and Bode, 1994), FRT(LE)(Senecoff *et al.*, 1988), FRT(RE)(Senecoff *et al.*, 1988)를 포함한다.
- [0295] 인식 서열의 다른 예는 리코비나제 효소 λ 인테그라제, 예를 들어 파이-c31에 의해 인식되는 attB, attP, attL, 및 attR 서열이다. ϕ C31 SSR은 이형 attB(34 bp 길이) 및 attP(39 bp 길이) 사이에서만 재조합을 매개한다(Groth *et al.*, 2000). 각각 박테리아 및 파지 게놈 상의 파지 인테그라제에 대한 부착 부위에 대해 명명된, attB 및 attP는 둘 모두 ϕ C31 동종이량체가 결합할 수도 있는 완벽하지 않은 인버티드 반복부를 함유한다(Groth *et al.*, 2000). 생성물 부위, attL 및 attR은 ϕ C31-매개 재조합을 더욱 효과적으로 불활성하게 하여(Belteki *et al.*, 2003), 반응을 비가역적으로 만든다. 삽입을 촉매하기 위해서, attB-보유 DNA는 attP 부위가 게놈 attB 부위로 삽입되는 것보다 더욱 쉽게 게놈 attP 부위로 삽입된다(Thyagarajan *et al.*, 2001; Belteki *et al.*, 2003). 따라서, 전형적인 전략은 상동성 재조합에 의해 attP-보유 "도킹 부위"를 정해진 유전자좌로 위치시킨 후, 삽입을 위한 attB-보유 이입 서열과 파트너가 된다.
- [0296] 본 명세서에서 사용 시, "내부 리보솜 진입 부위" 또는 "IRES"는 시스트론(단백질 코딩 영역)의 개시 코돈, 예컨대 AT로 직접 내부 리보솜 진입을 촉진하여, 유전자의 캡-비의존적 번역을 유도하는 성분을 의미한다. 예를 들어, 문헌 [Jackson *et al.*, 1990. *Trends Biochem Sci* 15(12):477-83] 및 [Jackson and Kaminski. 1995. *RNA* 1(10):985-1000]을 참조한다. 구체적인 실시형태에서, 벡터는 하나 이상의 폴리펩타이드를 코딩하는 하나 이상의 관심 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 각각의 다수의 폴리펩타이드의 효율적인 번역을 달성하기 위해서, 폴리뉴클레오타이드 서열은 자가 절단 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열 또는 1개 이상의 IRES 서열에 의해 이격될 수 있다.
- [0297] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "코작 서열"은 리보솜의 소형 서브유닛에 mRNA의 초기 결합을 상당히 용이하게 하고 번역을 증가시키는 짧은 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 공통 코작가 서열은 (GCC)CCCATGG(서열번호 57)이고, 여기서 R은 푸린(A 또는 G)([Kozak, 1986. *Cell*. 44(2):283-92], 및 [Kozak, 1987. *Nucleic Acids Res.* 15(20):8125-48])이다. 구체적인 실시형태에서, 벡터는 공통 코작 서열을 갖고 회망하는 폴리펩타이드, 예를 들어 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0298] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 또는 이러한 폴리뉴클레오타이드를 보유하는 세포는 직접 독성 및/또는 비제어적 증식의 위험성을 감소시키기 위한 유도성 자살 유전자를 포함하여, 자살 유전자를 이용한다. 특정한 실시형태에서, 자살 유전자는 폴리뉴클레오타이드를 보유하는 숙주 또는 세포에 대해 면역원성이 아니다. 사용할 수 있는 자살 유전자의 일정 예는 캐스파제-9 또는 캐스파제-8 또는 시토신 디아미나제이다. 캐스파제-9는 이량체화의 특정하나 화학적 유도인자(CID)를 사용해서 활성화될 수 있다.
- [0299] 일정 실시형태에서, 벡터는 면역 효과기 세포, 예를 들어 T 세포를 생체내에서 음성 선별에 민감하게 유발시키는 유전자 절편을 포함한다. "음성 선별"이란 주입된 세포가 개체의 생체내 조건에서의 변화의 결과로서 제거될 수 있다는 것을 의미한다. 음성 선별가능 표현형은 투여된 작용제, 예를 들어 화합물에 감수성을 부여하는 유전자의 삽입으로 초래될 수 있다. 음성 선별가능 유전자는 당분야에 공지되어 있고, 그 중에서도 다음을 포함한다: 간시클로비어 감수성을 부여하는 헤르페스 심플렉스 바이러스 I형 티미딘 키나제(HSV-I TK) 유전자(Wigler *et al.*, *Cell* 11:223, 1977); 세포 하이포잔틴 포스포리보실트랜스퍼라제(HPRT) 유전자, 세포 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라제(APRT) 유전자, 및 박테리아 시토신 디아미나제(Mullen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:33(1992)).
- [0300] 일부 실시형태에서, 유전자 변형된 면역 효과기 세포, 예컨대 T 세포는 시험관내에서 음성 선별가능 표현형의 세포를 선별할 수 있는 양성 마커를 더 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 양성 선별가능 마커는 숙주 세포에 유입시, 유전자를 보유하는 세포의 양성 선별을 가능하게 하는 우성 표현형을 발현하는 유전자일 수 있

다. 이러한 유형의 유전자는 당분야에 공지되어 있고, 그 중에서도, 하이그로마이신 B에 대한 내성을 부여하는 하이그로마이신-B 포스포트랜스퍼라제 유전자(hph), 항생제 G418에 대한 내성을 코딩하는 Tn5 유래의 아미노 글리코사이드 포스포트랜스퍼라제 유전자(neo 또는 aph), 다이하이드로폴레이트 리덕타제(DHFR) 유전자, 아데노신 디아미나제 유전자(ADA), 및 다수 약제 내성(MDR) 유전자를 포함한다.

[0301] 바람직하게, 양성 선별가능 마커 및 음성 선별가능 성분은 연결되어서 음성 선별가능 성분의 상실이 또한 반드시 양성 선별가능 마커의 상실을 수반한다. 보다 더 바람직하게, 양성 및 음성 선별가능 마커는 융합되어서 하나의 상실이 반드시 다른 것의 상실을 초래한다. 상기 기술된 바람직한 양성 및 음성 선별 특성 둘 모두를 부여하는 발현 생성물로서 폴리펩타이드를 산출하는 융합된 폴리뉴클레오타이드의 예는 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라제 티미딘 키나제 융합 유전자(HyTK)이다. 이 유전자의 발현은 시험관 내에서 양성 선별을 위해 하이그로마이신 B 내성, 및 생체내에서 음성 선별을 위한 간시클로비어 감수성을 부여하는 폴리펩타이드를 산출한다. 문헌 [Lupton S. D., *et al.*, *Mol. and Cell. Biology* 11:3374- 3378, 1991]을 참조한다. 또한, 바람직한 실시형태에서, 키메라 수용체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 융합된 유전자, 특히 시험관 내에서 양성 선별을 위한 하이그로마이신 B 내성, 및 생체 내에서 음성 선별을 위한 간시클로비어 감수성을 부여하는 것을 함유하는 레트로바이러스 벡터, 예를 들어, 문헌 [Lupton, S. D. *et al.* (1991), 상동]에 기술된 HyTK 레트로바이러스 벡터에 존재한다. 또한, 음성 선별가능 마커와 우성 양성 선별가능 마커의 융합으로 유도된 이중기능성 선별가능 융합 유전자의 사용을 설명하는 PCT US91/08442 및 PCT/US94/05601(S. D. Lupton)의 공개물을 참조한다.

[0302] 바람직한 양성 선별가능 마커는 hph, nco, 및 gpt로 이루어진 군으로부터 선택되는 유전자에서 유도되고, 바람직한 음성 선별가능 마커는 시토신 디아미나제, HSV-I TK, VZV TK, HPRT, APRT 및 gpt로 이루어진 군으로부터 선택되는 유전자에서 유도된다. 특히 바람직한 마커는 양성 선별가능 마커는 hph 또는 neo에서 유도되고, 음성 선별가능 마커는 시토신 디아미나제 또는 TK 유전자 또는 선별가능 마커에서 유도된 것인 이중기능성 선별가능 융합 유전자이다.

[0303] 다양한 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 회망하는 폴리펩타이드를 일시적으로 발현시키기 위해 세포에 유입되는 mRNA이다. 본 명세서에서 사용 시, "일시적"은 수 시간, 수 일, 또는 수 주의 기간 동안 비통합 전이유전자의 발현을 의미하고, 이러한 발현 기간은 세포 내 적합한 벡터 또는 플라스미드 내에 함유되거나 또는 게놈에 통합되면 폴리뉴클레오타이드의 발현 기간보다 짧다.

[0304] 구체적인 실시형태에서, 폴리펩타이드를 코딩하는 mRNA는 시험관내에서 전사된 mRNA이다. 본 명세서에서 사용 시, "시험관내 전사된 RNA"는 시험관내에서 합성된, RNA, 바람직하게 mRNA를 의미한다. 일반적으로, 시험관내에서 전사된 RNA는 시험관내 전사 벡터에서 생성된다. 시험관내 전사 벡터는 시험관내에서 전사된 RAN를 발생시키는 데 사용되는 주형을 포함한다.

[0305] 구체적인 실시형태에서, mRNA는 5' 캡 또는 변형된 5' 캡 및/또는 폴리(A) 서열을 더 포함한다. 본 명세서에서 사용 시, 5' 캡(RNA 캡, RNA 7-메틸구아노신 캡 또는 an RNA m^{7G} 캡이라고도 함)은 전사 출발 직후에 진행생물 메신저 RNA의 "앞쪽" 또는 5' 말단에 첨가된 변형된 구아닌 뉴클레오타이드이다. 5' 캡은 처음 전사된 뉴클레오타이드에 연결되어 리보솜에 의해 인식되고 RNase로부터 보호되는 말단 기를 포함한다. 캡핑 모이어티는 mRNA의 기능 예컨대 이의 안정성 또는 번역 효율을 조정하도록 변형될 수 있다. 구체적인 실시형태에서, mRNA는 약 50 내지 약 5000개 아데닌의 폴리(A) 서열을 포함한다. 일 실시형태에서, mRNA는 약 100 내지 약 1000개 염기, 약 200 내지 약 500개 염기, 또는 약 300 내지 약 400개 염기의 폴리(A) 서열을 포함한다. 일 실시형태에서, mRNA는 약 65개 염기, 약 100개 염기, 약 200개 염기, 약 300개 염기, 약 400개 염기, 약 500개 염기, 약 600개 염기, 약 700개 염기, 약 800개 염기, 약 900개 염기, 또는 약 1000개 또는 그 이상의 염기의 폴리(A) 서열을 포함한다. 폴리(A) 서열은 mRNA 기능 예컨대 국제화, 안정화 또는 번역 효율을 조절하도록 화학적으로 또는 효소적으로 변형될 수 있다.

[0306] F. 바이러스 벡터

[0307] 구체적인 실시형태에서, 세포(예를 들어, 면역 효과기 세포)는 CAR을 코딩하는 레트로바이러스 벡터, 예를 들어 렌티바이러스 벡터가 형질도입된다. 예를 들어, 면역 효과기 세포는 CD3 ζ , CD28, 4-1BB, OX40, 또는 이의 임의 조합의 세포내 신호전달 도메인과, STn을 발현하는 당단백질, 예를 들어 TAG-72에 결합하는 항-STn 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 CAR을 코딩하는 벡터가 형질도입된다. 따라서, 이들 형질도입된 세포는 CAR-매개 세포독성 반응을 유발시킬 수 있다.

[0308] 레트로바이러스는 유전자 전달을 위한 일반적인 도구이다(Miller, 2000, *Nature*. 357: 455-460). 구체적인 실시

형태에서, 레트로바이러스를 사용하여 키메라 항원 수용체(CAR)를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 세포로 전달한다. 본 명세서에서 사용 시, 용어 "레트로바이러스"는 이의 게놈 RNA를 선형 이중 가닥 DNA 카피로 역전사시킨 후 이의 게놈 DNA를 숙주 게놈으로 공유적으로 통합시키는 RNA 바이러스를 의미한다. 바이러스가 숙주 게놈에 통합되면, 이를 "프로바이러스"라고 한다. 프로바이러스는 RNA 중합효소 II에 대한 주형으로서 제공되어 새로운 바이러스 입자를 생성하는데 필요한 구조 단백질 및 효소를 코딩하는 RNA 분자의 발현을 지정한다.

[0309] 구체적인 실시형태에서 사용을 위해 적합한 예시적인 레트로바이러스는 제한 없이, 몰로니 췌장동물 백혈병 바이러스(M-MuLV), 몰로니 췌장동물 육종 바이러스(MoMSV), 하비 췌장동물 육종 바이러스(HaMuSV), 췌장동물 유방종양 바이러스(MuMTV), 기본 원숭이 백혈병 바이러스(GaLV), 고양이 백혈병 바이러스(FLV), 스푸마바이러스, 프리엔드 췌장동물 백혈병 바이러스, 췌장동물 줄기 세포 바이러스(MSCV) 및 라우스 육종 바이러스(RSV) 및 렌티바이러스를 포함한다.

[0310] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "렌티바이러스"는 복합 레트로바이러스의 군(또는 속)을 의미한다. 예시적인 렌티바이러스는 제한 없이, HIV(인간 면역결핍 바이러스; 1형 HIV, 및 2형 HIV 포함); 비스나-매디 바이러스(VMV) 바이러스; 염소 관절염-뇌염 바이러스(CAEV); 말 전염성 빈혈 바이러스(EIAV); 고양이 면역결핍 바이러스(FIV); 소 면역결핍 바이러스(BIV); 및 원숭이 면역결핍 바이러스(SIV)를 포함한다. 일 실시형태에서, HIV 기반 벡터 골격(즉, HIV 시스 작용성 서열 성분)이 바람직하다. 구체적인 실시형태에서, 렌티바이러스는 CAR을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 세포로 전달하는데 사용된다.

[0311] 레트로바이러스 벡터 및 보다 구체적으로 렌티바이러스는 구체적인 실시형태를 실시하는데 사용될 수 있다. 따라서, 본 명세서에서 사용 시, 용어 "레트로바이러스" 또는 "레트로바이러스 벡터"는 각각 "렌티바이러스" 및 "렌티바이러스 벡터"를 포함하는 의미이다.

[0312] 용어 "벡터"는 다른 핵산 분자를 전달 또는 수송할 수 있는 핵산 분자를 의미하고자 본 명세서에서 사용된다. 전달되는 핵산은 일반적으로 벡터 핵산 분자에 연결되고, 예를 들어 삽입된다. 벡터는 세포에서 자체 복제를 지정하는 서열을 포함할 수 있거나, 또는 숙주 세포 DNA에 통합가능하도록 충분한 서열을 포함할 수 있다. 유용한 벡터는 예를 들어, 플라스미드(예를 들어, DNA 플라스미드 또는 RNA 플라스미드), 트랜스포존, 코스미드, 박테리아 인공 염색체, 및 바이러스 벡터를 포함한다. 유용한 바이러스 벡터는 예를 들어, 복제 결함 레트로바이러스 및 렌티바이러스를 포함한다.

[0313] 당업자에게 명백한 바와 같이, 용어 "바이러스 벡터"는 전형적으로 핵산 분자의 전달 또는 세포의 게놈으로의 통합을 용이하게 하는 바이러스 유도된 핵산 분자를 포함하는 핵산 분자(예를 들어, 전달 플라스미드) 또는 핵산 전달을 매개하는 바이러스 입자를 의미하는데 광범위하게 사용된다. 바이러스 입자는 전형적으로 다양한 바이러스 성분을 포함하게 될 것이고 때때로, 또한 핵산(들)이외에도 숙주 세포 성분을 포함하게 될 것이다.

[0314] 용어 바이러스 벡터는 세포로 핵산을 전달할 수 있는 바이러스 또는 바이러스 입자이거나 또는 전달되는 핵산 그 자체를 의미할 수 있다. 바이러스 벡터 및 전달 플라스미드는 주로 바이러스로부터 유도된 구조적 및/또는 기능적 유전자 성분을 함유한다. 용어 "레트로바이러스 벡터"는 주로 레트로바이러스로부터 유도된, 구조적 및 기능적 유전자 성분을 함유하는 바이러스 벡터 또는 플라스미드를 의미한다. 용어 "렌티바이러스 벡터"는 주로 렌티바이러스로부터 유도된 LTR을 포함하는 구조적 및 기능적 유전자 성분, 또는 이의 일부분을 함유하는 바이러스 벡터 또는 플라스미드를 의미한다. 용어 "하이브리드 벡터"는 레트로바이러스, 예를 들어 렌티바이러스 서열 및 비렌티바이러스 바이러스 서열 둘 모두를 함유하는 벡터, LTR 또는 다른 핵산을 의미한다. 일 실시형태에서, 하이브리드 벡터는 역전사, 복제, 통합 및/또는 패키징을 위한 레트로바이러스 예를 들어 렌티바이러스 서열을 포함하는 벡터 또는 전달 플라스미드를 의미한다.

[0315] 구체적인 실시형태에서, 용어 "렌티바이러스 벡터", "렌티바이러스 발현 벡터"는 렌티바이러스 전달 플라스미드 및/또는 감염성 렌티바이러스 입자를 의미하고자 사용될 수 있다. 성분 예컨대 클로닝 부위, 프로모터, 조절 성분, 이중성 핵사나 등에 대해 본 명세서에서 언급하는 경우, 이들 성분의 서열은 렌티바이러스 입자에서 RNA 형태로 존재하고 DNA 플라스미드에서 DNA 형태로 존재한다는 것을 이해해야 한다.

[0316] 프로바이러스의 각 말단은 "장형 말단 반복부" 또는 "LTR"이라고 하는 구조이다. 용어 "장형 말단 반복부(LTR)"는 그들의 천연 서열 상태에서, 직접 반복부이고 U3, R 및 U5 영역을 함유하는 레트로바이러스 DNA의 말단에 위치한 염기쌍의 도메인을 의미한다. LTR은 일반적으로 바이러스 복제 및 레트로바이러스 유전자의 발현에 기본적인 기능(예를 들어, 촉진, 개시 및 유전자 전사물의 폴리아데닐화)을 제공한다. LTR은 전사 제어 성분, 폴리아데닐화 신호 및 바이러스 게놈의 복제 및 통합에 필요한 서열을 포함하는 수많은 조절 신호를 함유한다. 바이

러스 LTR은 U3, R 및 U5라고 하는 3개 영역으로 나뉘어 진다. U3 영역은 인핸서 및 프로모터 성분을 함유한다. U5 영역은 프라이머 결합 부위 및 R 영역 사이의 서열이고 폴리아데닐화 서열을 함유한다. R(반복) 영역은 U3 및 U5 영역에 축적한다. LTR은 U3, R 및 U5 영역으로 구성되었고 바이러스 게놈의 5' 및 3' 말단 둘 모두에 나타난다. 게놈의 역전사(tRNA 프라이머 결합 부위) 및 입자로 바이러스 RNA의 효율적인 패키징(파이 부위)에 필요한 서열이 5' LTR에 인접한다.

[0317] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "패키징 신호" 또는 "패키징 서열"은 바이러스 캡시드 또는 입자로 바이러스 RNA의 삽입을 위해 필요한 레트로바이러스 게놈 내에 위치한 서열을 의미하며, 예를 들어, 문헌 [Clever *et al.*, 1995. *J. of Virology*, Vol. 69, No. 4; pp. 2101-2109]을 참조한다. 몇몇 레트로바이러스 벡터는 바이러스 게놈의 캡시드화에 필요한 최소 패키징 신호(파이[Ψ] 서열이라고도 함)를 사용한다. 따라서, 본원에서 사용 시, 용어 "패키징 서열," "패키징 신호," "파이" 및 기호 "Ψ"는 바이러스 입자 형성 동안 레트로바이러스 RNA 가닥의 캡시드화에 필요한 네크코딩 서열을 의미하는데 사용된다.

[0318] 다양한 실시형태에서, 벡터는 변형된 5' LTR 및/또는 3' LTR을 포함한다. LTR의 한쪽 또는 양쪽은 제한 없이, 1개 이상의 결실, 삽입 또는 치환을 포함하는 1개 이상의 변형을 포함할 수 있다. 3' LTR의 변형은 종종 바이러스를 복제 결합으로 만들어서 렌티바이러스 또는 레트로바이러스 시스템의 안전성을 개선시키기 위해 만들어진 다. 본 명세서에서 사용 시, 용어 "복제 결합"은 감염성 비리온이 생성되지 않도록 완전한, 효과적 복제를 할 수 없는 바이러스를 의미한다(예를 들어, 복제 결합 렌티바이러스 자손). 용어 "복제 유능한"은 바이러스의 바이러스 복제가 감염성 비리온(예를 들어, 복제 유능한 렌티바이러스 자손)을 생성시킬 수 있도록, 복제할 수 있는 야생형 바이러스 또는 돌연변이체 바이러스를 의미한다.

[0319] "자가 불활성화"(SIN) 벡터는 U3 영역으로 알려진, 우측(3') LTR 인핸서-프로모터 영역이 변형(예를 들어, 결실 또는 치환에 의함)되어 바이러스 복제의 제1회 이상으로 바이러스 전사를 방지하는, 복제 결합 벡터, 예를 들어 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터를 의미한다. 이는 우측(3') LTR U3 영역이 바이러스 복제 동안 좌측(5') LTR U3 영역에 대한 주형으로 사용되어서, 바이러스 전사물이 U3 인핸서-프로모터없이 만들어질 수 없기 때문이다. 추가 실시형태에서, 3' LTR은 U5 영역이, 예를 들어 이상적인 폴리(A) 서열로 치환되도록 변형된다. LTR에 대한 변형 예컨대 3' LTR, 5' LTR, 또는 3' 및 5' LTR 둘 모두에 대한 변형이 또한 포함된다는 것을 주의해야 한다.

[0320] 추가의 안전성 향상이 바이러스 입자의 생성 동안 바이러스 게놈의 전사를 구동시키기 위한 이중성 프로모터로 5' LTR의 U3 영역을 치환시켜 제공된다. 사용될 수 있는 이중성 프로모터의 예는 예를 들어, 바이러스 원숭이 바이러스 40(SV40)(예를 들어, 초기 또는 후기, 사이토메갈로바이러스(CMV)(예를 들어, 전초기), 물로니 컷과동물 백혈병 바이러스(MoMLV), 라우스 육종 바이러스(RSV), 및 헤르페스 심플렉스 바이러스(HSV)(티미딘 키나제) 프로모터를 포함한다. 전형적인 프로모터는 Tat 독립적 방식으로 높은 수준의 전사를 구동시킬 수 있다. 이러한 치환은 바이러스 생성 시스템에 완전한 U3 서열이 존재하지 않기 때문에 복제 유능한 바이러스를 생성시키는 재조합의 가능성을 감소시킨다. 일정 실시형태에서, 이중성 프로모터는 바이러스 게놈이 전사되는 방식을 제어하는 추가의 장점을 갖는다. 예를 들어, 이중성 프로모터는 유도성일 수 있어서, 바이러스 게놈의 전부 또는 일부의 전사가 오직 유도 인자가 존재할 때만 일어나게 될 것이다. 유도 인자는 제한 없이, 하나 이상의 화학적 화합물 또는 숙주 세포가 배양되는 생리적 상태 예컨대 온도 또는 pH를 포함한다.

[0321] 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 TAR 성분을 포함한다. 용어 "TAR"은 렌티바이러스(예를 들어, HIV) LTR의 R 영역에 위치한 "트랜스-활성화 반응" 유전자 성분을 의미한다. 이 성분은 렌티바이러스 트랜스-활성인자(tat) 유전자 성분과 상호작용하여 바이러스 복제를 향상시킨다. 그러나, 이 성분은 5' LTR의 U3 영역이 이중성 프로모터에 의해 치환된 실시형태에서는 필요하지 않다.

[0322] "R 영역"은 캡핑 기의 출발(즉, 전사의 출발)부에서 시작하여 폴리(A) 트랙의 시작부 직전에 종료되는 레트로바이러스 LTR 내 영역을 의미한다. R 영역은 또한 U3 및 U5 영역에 축적하는 것으로 정의된다. R 영역은 게놈의 한 말단에서 다른 쪽으로 초기 DNA의 전달을 가능하게 하는데 있어서 역전사 동안 역할을 한다.

[0323] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "플랩(FLAP) 성분"은 그의 서열이 레트로바이러스, 예를 들어 HIV-1 또는 HIV-2의 중심 폴리퓨린 트랙(central polypurin tract: cPPT) 및 중심 말단 서열(central terminal sequence: CST)을 포함하는 핵산을 의미한다. 일부 실시형태에서, 용어 "플랩 성분" 및 "cPPT/FLAP"은 전술한 FLAP 성분을 의미하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 적합한 FLAP 성분은 미국 특허 제6,682,907호 및 문헌 [Zennou, *et al.*, 2000, *CeII*, 101:173]에 기술되어 있다. HIV-1 역전사 동안, 중심 폴리퓨린 트랙(cPPT)에서 플러스 가닥 DNA의 중심 개시 및 중심 종결 서열(CTS)의 중심 종결은 3중 가닥 DNA 구조: HIV-1 중심 DNA 플랩의 형성을 초래한다.

임의의 이론에 국한하려는 것은 아니나, DNA 플랩은 렌티바이러스 게놈 핵 이입의 시스 활성 결정부로서 작용할 수 있고/있거나 바이러스의 역가를 증가시킬 수 있다. 구체적인 실시형태에서, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터 골격은 벡터 내에서 관심 이중성 유전자의 상류 또는 하류에 1개 이상의 FLAP 성분을 포함한다. 예를 들어, 구체적인 실시형태에서 전달 플라스미드는 FLAP 성분을 포함한다. 일 실시형태에서, 벡터는 HIV-1로부터 단리된 FLAP 성분을 포함한다.

- [0324] 일 실시형태에서, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 전달 벡터는 1개 이상의 이출 성분을 포함한다. 용어 "이출 성분"은 핵으로부터 세포의 세포질로 RNA 전사물의 수송을 조절하는 시스 작용성 전사후 조절 성분을 의미한다. RNA 이출 성분의 예는 제한 없이, 인간 면역결핍 바이러스(HIV) rev 반응 성분(RRE)(예를 들어, 문헌 [Cullen *et al.*, 1991, *J. Virol.* 65: 1053]; 및 [Cullen *et al.*, 1991, *Cell* 58: 423] 참조), 및 B형 간염 바이러스 전사후 조절 성분(HPRE)을 포함한다. 일반적으로, RNA 이출 성분은 유전자의 3' UTR 내에 위치하고, 1개 또는 다수의 카피로 삽입될 수 있다.
- [0325] 구체적인 실시형태에서, 바이러스 벡터 내 이중성 서열의 발현은 전사후 조절 성분, 효율적인 폴리아데닐화 부위, 및 경우에 따라 전사 종결 신호를 벡터에 도입시켜 증가된다. 다양한 전사후 조절 성분, 예를 들어, 우드치 간염 바이러스 전사후 조절 성분(WPRE; Zufferey *et al.*, 1999, *J. Virol.*, 73:2886); B형 간염 바이러스에 존재하는 전사후 조절 성분(HPRE)(Huang *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 5:3864); 등(Liu *et al.*, 1995, *Genes Dev.*, 9:1766)은 단백질에서 이중성 핵산의 발현을 증가시킨다. 구체적인 실시형태에서, 벡터는 전사후 조절 성분 예컨대 WPRE 또는 HPRE를 포함한다.
- [0326] 구체적인 실시형태에서, 벡터는 일부 경우에서 이들 성분이 세포 변형의 위험성을 증가시키고/시키거나 mRNA 전사물의 양을 실질적으로 또는 유의하게 증가시키지 않거나 mRNA 안정성을 증가시키지 않기 때문에 전사후 조절 성분 예컨대 WPRE 또는 HPRE가 결여되거나 또는 포함하지 않는다. 그러나, 소정 벡터에서 WPRE를 포함하는 효과는 일부 실시형태에서 예측할 수 없을 수 있다. 따라서, 일부 실시형태에서, 벡터는 WPRE 또는 HPRE가 결여되거나 또는 포함하지 않는다.
- [0327] 이중성 핵산 전사물의 효율적인 종결 및 폴리아데닐화를 지정하는 성분은 이중성 유전자 발현을 증가시킨다. 전사 종결 신호는 일반적으로 폴리아데닐화 신호의 하류에 존재한다.
- [0328] 구체적인 실시형태에서, 벡터는 발현시키려는 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 폴리아데닐화 서열 3'을 포함한다. 본 명세서에서 사용시 용어 "폴리(A) 부위" 또는 "폴리(A) 서열"은 RNA 중합효소 II에 의한 초기 RNA 전사물의 종결 및 폴리아데닐화 둘 모두를 지정하는 DNA 서열을 의미한다. 폴리아데닐화 서열은 코딩 서열의 3' 말단에 폴리(A) 꼬리부를 첨가하여 mRNA 안정성을 촉진시킬 수 있고, 따라서 증가된 번역 효율에 기여한다. 절단 및 폴리아데닐화는 RNA의 폴리(A) 서열에 의해 지정된다. 포유동물 프리-mRNA에 대한 코어 폴리(A) 서열은 절단-폴리아데닐화 부위가 축적된 2개 인식 성분을 갖는다. 전형적으로 대부분의 비변이 AAUAAA 핵사머가 U 또는 GU 잔기가 풍부한 보다 가변적인 성분의 상류 20-50 뉴클레오타이드에 위치한다. 초기 전사물의 절단은 이들 2개 성분 사이에서 일어나고 5' 절단 생성물에 최대 250개 아데노신의 첨가와 커플링된다. 구체적인 실시형태에서, 코어 폴리(A) 서열은 이상적인 폴리(A) 서열(예를 들어, AATAAA, ATTAAA, AGTAAA)이다. 구체적인 실시형태에서 폴리(A) 서열은 SV40 폴리(A) 서열, 소 성장 호르몬 폴리(A) 서열(BGHpA), 토끼 β -글로빈 폴리(A) 서열(r β gpA), 또는 당분야에 공지된 다른 적합한 이중성 또는 내생성 폴리(A) 서열이다.
- [0329] 일정 실시형태에서, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터는 1개 이상의 절연체 성분을 더 포함한다. 절연체 성분은 게놈 DNA에 존재하는 시스 작용성 성분에 의해 매개될 수 있고 전달된 서열의 탈조절 발현을 초래할 수 있는, 통합 부위 효과로부터 렌티바이러스 발현된 서열, 예를 들어 치료적 폴리펩타이드를 보호하는데 기여할 수 있다(즉, 위치 효과; 예를 들어 문헌 [Burgess-Beusse *et al.*, 2002, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 99:16433]; 및 [Zhan *et al.*, 2001, *Hum. Genet.*, 109:471]를 참조함). 일부 실시형태에서, 전달 벡터는 3' LTR에 1개 이상의 절연체 성분을 포함하고 숙주 게놈으로 프로바이러스의 통합 시, 프로바이러스는 3' LTR의 중복으로 인해, 5' LTR 또는 3' LTR 둘 모두에 1개 이상의 절연체를 포함한다. 구체적인 실시형태에 사용하기 적합한 절연체는 제한 없이, 닭 β -글로빈 절연체를 포함한다(문헌 [Chung *et al.*, 1993, *Cell* 74:505]; [Chung *et al.*, 1997, *PNAS* 94:575]; 및 [Bell *et al.*, 1999, *Cell* 98:387]를 참조하고, 본 명세서에 참조로 편입시킴). 절연체 성분의 예는 제한 없이, β -글로빈 유전자와 유래의 절연체, 예컨대 닭 HS4를 포함한다.
- [0330] 일정한 특정 실시형태에 따라서, 바이러스 벡터 골격 서열의 대부분 또는 전부는 렌티바이러스, 예를 들어 HIV-1에서 유도된다. 그러나, 레트로바이러스 및/또는 렌티바이러스 서열은 많은 상이한 공급원이 사용될 수 있거나, 또는 조합될 수 있고 렌티바이러스 서열의 일정 부분에서 수많은 치환 및 변경이 본 명세서에 기술된

기능을 수행하는 전달 벡터의 능력을 손상시키지 않고 수용될 수 있다는 것을 이해해야 한다. 또한, 다양한 렌티바이러스 벡터는 당분야에 공지되어 있고, 문헌 [Naldini *et al.*, (1996a, 1996b, 및 1998)]; [Zufferey *et al.*, (1997)]; [Dull *et al.*, 1998], 미국 특허 제6,013,516호; 및 제5,994,136호를 참조하며, 이들 중 많은 것들이 바이러스 벡터 또는 전달 벡터를 생성하도록 적합화될 수 있다.

- [0331] 다양한 실시형태에서, 벡터는 CAR 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하게 연결된 프로모터를 포함한다. 벡터는 1개 이상의 LTR을 가질 수 있고, 모든 LTR은 1개 이상의 변형, 예컨대 1개 이상의 뉴클레오타이드 치환, 첨가 또는 결실을 포함한다. 벡터는 전달 효율을 증가시키기 위한 1개 이상의 부속 성분(예를 들어, cPPT/FLAP), 바이러스 패키징(예를 들어, 파이(Ψ) 패키징 신호, RRE), 및/또는 치료적 유전자 발현을 증가시키는 다른 성분(예를 들어, 폴리(A) 서열)을 더 포함할 수 있고, 경우에 따라 WPRE 또는 HPRE를 포함할 수 있다.
- [0332] 구체적인 실시형태에서, 전달 벡터는 좌측(5') 레트로바이러스 LTR; 중심 폴리펩린 트랙/DNA 플랩(cPPT/FLAP); 레트로바이러스 이출 성분; 본 명세서에서 고려하는 CAR 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하게 연결된, T 세포에서 활성인 프로모터; 및 우측(3') 레트로바이러스 LTR; 및 경우에 따라 WPRE 또는 HPRE를 포함한다.
- [0333] 구체적인 실시형태에서, 전달 벡터는 좌측(5') 레트로바이러스 LTR; 레트로바이러스 이출 성분; 본 명세서에서 고려하는 CAR 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 작용적으로 연결된, T 세포에서 활성인 프로모터; 우측(3') 레트로바이러스 LTR; 및 폴리(A) 서열; 및 경우에 따라 WPRE 또는 HPRE를 포함한다. 다른 특정 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터는 좌측(5') LTR; cPPT/FLAP; RRE; 본 명세서에서 고려하는 CAR 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하게 연결된, T 세포에서 활성인 프로모터; 우측(3') LTR; 및 폴리아데닐화 서열; 및 경우에 따라 WPRE 또는 HPRE를 포함한다.
- [0334] 일정 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터는 좌측(5') HIV-1 LTR; 파이(Ψ) 패키징 신호; cPPT/FLAP; RRE; 본 명세서에서 고려하는 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하게 연결된, T 세포에서 활성인 프로모터; 우측(3') 자가 불활성화(SIN) HIV-1 LTR; 및 토끼 β -글로빈 폴리아데닐화 서열; 및 경우에 따라 WPRE 또는 HPRE를 포함한다.
- [0335] 다른 실시형태에서, 벡터는 적어도 하나의 LTR; 중심 폴리펩린 트랙/DNA 플랩(cPPT/FLAP); 레트로바이러스 이출 성분; 및 본 명세서에서 고려하는 CAR 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하게 연결된, T 세포에서 활성인 프로모터; 및 경우에 따라 WPRE 또는 HPRE를 포함한다.
- [0336] 구체적인 실시형태에서, 벡터는 적어도 하나의 LTR; cPPT/FLAP; RRE; 본 명세서에서 고려하는 CAR 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하게 연결된, T 세포에서 활성인 프로모터; 및 폴리아데닐화 서열; 및 경우에 따라 WPRE 또는 HPRE를 포함한다.
- [0337] 일정 실시형태에서, 벡터는 적어도 하나의 SIN HIV-1 LTR; Psi(Ψ) 패키징 신호; cPPT/FLAP; RRE; 본 명세서에서 고려되는 CAR 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하게 연결된, T 세포에서 활성인 프로모터; 및 토끼 β -글로빈 폴리아데닐화 서열; 및 경우에 따라 WPRE 또는 HPRE를 포함한다.
- [0338] "숙주 세포"는 재조합 벡터 또는 폴리뉴클레오타이드로 생체내, 생체외, 또는 시험관내에서 전기천공, 형질감염, 감염 또는 형질도입된 세포를 포함한다. 숙주 세포는 패키징 세포, 생산자 세포, 및 바이러스 벡터로 감염된 세포를 포함할 수 있다. 구체적인 실시형태에서, 바이러스 벡터로 감염된 숙주 세포는 요법을 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 일정 실시형태에서, 용어 "표적 세포"는 숙주 세포와 상호교환적으로 사용되고 바람직한 세포 유형의 형질감염, 감염, 또는 형질도입된 세포를 의미한다. 바람직한 실시형태에서, 표적 세포는 T 세포이다.
- [0339] 대규모 바이러스 입자 생성이 종종 타당한 바이러스 역가를 획득하기 위해 필요하다. 바이러스 입자는 바이러스의 구조적 및/또는 부속 유전자, 예를 들어, gag, pol, env, tat, rev, vif, vpr, vpu, vpx, 또는 nef 유전자 또는 다른 레트로바이러스 유전자를 포함하는 패키징 세포주에 전달 벡터를 형질감염시켜 생성된다.
- [0340] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "패키징 벡터"는 패키징 신호가 결합되고 1, 2, 3, 4, 또는 그 이상의 바이러스의 구조적 및/또는 부속 유전자를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터 또는 바이러스 벡터를 의미한다. 전형적으로, 패키징 벡터는 패키징 세포에 포함되고, 형질감염, 형질도입 또는 감염을 통해 세포로 도입된다. 형질감염, 형질도입 또는 감염을 위한 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 구체적인 실시형태에서, 레트로바이러스/렌티바이러스 벡터는 생산자 세포 또는 세포주가 생성되도록, 형질감염, 형질도입 또는 감염을 통해

패키징 세포주로 도입된다. 구체적인 실시형태에서, 패키징 벡터는 예를 들어 인산칼슘 형질감염, 리포펙션 또는 전기천공을 포함하는 표준 방법에 의해 인간 세포 또는 세포주에 도입된다. 일부 실시형태에서, 패키징 벡터는 우선 선별 마커, 예컨대 네오마이신, 하이그로마이신, 푸로마이신, 블라스토시딘, 제오신, 티미딘 키나제, Gln 신세포제 또는 ADN와 함께 세포에 도입된 후, 적절한 약물 존재에서 선별 및 클론 단리된다. 선별가능 마커는 예를 들어 IRES 또는 자가 절단성 바이러스 펩타이드에 의해, 패키징 벡터에 의해 코딩되는 유전자에 물리적으로 연결될 수 있다.

[0341] 바이러스 엔벨로프 단백질(env)은 세포주로부터 생성되는 재조합 레트로바이러스에 의해 궁극적으로 감염 및 형질전환될 수 있는 숙주 세포의 범위를 결정한다. 렌티바이러스, 예컨대 HIV-1, HIV-2, SIV, FIV 및 EIV의 경우에서, env 단백질은 gp41 및 gp120을 포함한다. 바람직하게, 패키징 세포에 의해 발현되는 바이러스 env 단백질은 앞서 기술된 바와 같이, 바이러스 gag 및 pol 유전자로부터 개별 벡터 상에서 코딩된다.

[0342] 구체적인 실시형태에서 적용할 수 있는 레트로바이러스 유도된 env 유전자의 예시적인 예는 제한 없이, MLV 엔벨로프, 10A1 엔벨로프, BAEV, FeLV-B, RD114, SSAV, 에볼라, 센다이, FPV(Fowl plague virus), 및 인플루엔자 바이러스 엔벨로프를 포함한다. 유사하게, RNA 바이러스(예를 들어, 피코르나바이러스과(*Picornaviridae*), 칼시 바이러스과(*Calciviridae*), 아스트로바이러스과(*Astroviridae*), 토가바이러스과(*Togaviridae*), 플라비바이러스과(*Flaviviridae*), 코로나바이러스과(*Coronaviridae*), 파라믹소바이러스과(*Paramyxoviridae*), 라브도바이러스과(*Rhabdoviridae*), 필로바이러스과(*Filoviridae*), 오르조믹소바이러스과(*Orthomyxoviridae*), 부나바이러스과(*Bunyaviridae*), 아레나바이러스과(*Arenaviridae*), 레오바이러스과(*Reoviridae*), 비르나바이러스과(*Birnaviridae*), 레트로바이러스과(*Retroviridae*)의 RNA 바이러스과)를 비롯하여 DNA 바이러스(헤파드나바이러스과(*Hepadnaviridae*), 시르코바이러스과(*Circoviridae*), 파보바이러스과(*Parvoviridae*), 파보바바이러스과(*Papovaviridae*), 아데노바이러스과(*Adenoviridae*), 헤르페스바이러스과(*Herpesviridae*), 폭시바이러스과(*Poxviridae*), 및 이리도바이러스과(*Iridoviridae*)의 바이러스과) 유래의 엔벨로프를 코딩하는 유전자가 이용될 수 있다. 이들 바이러스의 대표적인 예는 제한 없이, FeLV, VEE, HFVW, WDSV, SFV, 광견병, ALV, BIV, BLV, EBV, CAEV, SNV, ChTLV, STLV, MPMV, SMRV, RAV, FuSV, MH2, AEV, AMV, CT10, 및 EIAV를 포함한다.

[0343] 다른 실시형태에서, 바이러스를 위형화시키기 위한 엔벨로프 단백질은 제한 없이, 임의의 하기 바이러스를 포함한다: 인플루엔자 A 예컨대 H1N1, H1N2, H3N2 및 H5N1(조류 독감), 인플루엔자 B, 인플루엔자 C 바이러스, A형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, D형 간염 바이러스, E형 간염 바이러스, 로타바이러스, 노르윙크 바이러스군의 임의의 바이러스, 장 아데노바이러스, 파보바이러스, 탕기열 바이러스, 원숭이 폭스, 모노 네가바이러스, 리사바이러스 예컨대 광견병 바이러스, 라고스 박쥐 바이러스, 모콜라 바이러스, 듀벤헤이즈 바이러스, 유럽 박쥐 바이러스 1 및 2, 및 오스트리아 박쥐 바이러스, 에페메로바이러스, 베시쿨로바이러스, 수포성 구내염 바이러스(VSV), 헤르페스바이러스 예컨대 헤르페스 심플렉스 바이러스 1형 및 2형, 바리셀라 조스터, 사이토메갈로바이러스, 엡스테인 바 바이러스(EBV), 인간 헤르페스바이러스(HHV), 인간 헤르페스바이러스 6형 및 8형, 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 파필로마 바이러스, 젓과동물 감마헤르페스바이러스, 아레나바이러스 예컨대 아르헨티나 출혈열 바이러스, 볼리비아 출혈열 바이러스, 사비아 연관 출혈열 바이러스, 베네수엘라 출혈열 바이러스, 라사열 바이러스, 마추포 바이러스, 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV), 분야바이러스과 예컨대 크림-콩고 출혈열 바이러스, 한타바이러스, 신증후군 유행 출혈열 바이러스, 리프트 밸리 열 바이러스, 에볼라 출혈열 및 마르부르크 출혈열을 포함한 필로바이러스과(필로바이러스), 카이사누어 숲 질환 바이러스를 포함한 플라비바이러스과, 옴스크 출혈열 바이러스, 진드기 매개 뇌염 유행 바이러스 및 파라믹소바이러스과 예컨대 헨드라 바이러스 및 니파 바이러스, 바리올라 주요 및 바리올라 소수(두창), 알파바이러스 예컨대 베네수엘라 말 뇌염 바이러스, 동부 말 뇌염 바이러스, 서부 말 뇌염 바이러스, SARS-연관 코로나바이러스(SARS-CoV), 웨스트 나일 바이러스, 임의의 뇌염 유행 바이러스.

[0344] 일 실시형태에서, 패키징 세포는 재조합 레트로바이러스, 예를 들어 VSV-G 당단백질로 위형화된, 렌티바이러스를 생성시킨다.

[0345] 본 명세서에서 사용시 "위형" 또는 "위형화"는 그의 바이러스 엔벨로프 단백질이 바람직한 특징을 갖는 다른 바이러스의 것으로 치환된 바이러스를 의미한다. 예를 들어, HIV는 HIV 엔벨로프 단백질(env 유전자에 의해 코딩됨)이 정상적으로 바이러스를 CD4+ 세포에 대해 표적화시키므로 보다 광범위한 세포를 HIV가 감염시킬 수 있게 하는, 수포성 구내염 바이러스 G-단백질(VSV-G) 엔벨로프 단백질로 위형화될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 렌티바이러스 엔벨로프 단백질은 VSV-G로 위형화된다. 일 실시형태에서, 패키징 세포는 재조합 레트로바이러스, 예를 들어 VSV-G 엔벨로프 당단백질로 위형화된 렌티바이러스를 생성시킨다.

- [0346] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "패키징 세포주"는 패키징 신호를 함유하지 않지만 바이러스 입자의 올바른 패키징에 필요한 바이러스의 구조 단백질 및 복제 단백질(예를 들어, gag, pol 및 env)을 안정하게 또는 일시적으로 발현하는 세포주에 대해 사용된다. 임의의 적합한 세포주는 패키징 세포를 제조하는데 적용될 수 있다. 일반적으로, 세포는 포유동물 세포이다. 구체적인 실시형태에서, 패키징 세포주를 생성시키는데 사용되는 세포는 인간 세포이다. 사용될 수 있는 적합한 세포주는 예를 들어, CHO 세포, BHK 세포, MDCK 세포, C3H 10T1/2 세포, FLY 세포, Psi-2 세포, BOSC 23 세포, PA317 세포, WEHI 세포, COS 세포, BSC 1 세포, BSC 40 세포, BMT 10 세포, VERO 세포, W138 세포, MRC5 세포, A549 세포, HT1080 세포, 293 세포, 293T 세포, B-50 세포, 3T3 세포, NIH3T3 세포, HepG2 세포, Saos-2 세포, Huh7 세포, HeLa 세포, W163 세포, 211 세포, 및 211A 세포를 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 패키징 세포는 293 세포, 293T 세포, 또는 A549 세포이다. 다른 바람직한 실시형태에서, 세포는 A549 세포이다.
- [0347] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "생산자 세포주"는 패키징 세포주 및 패키징 신호를 포함하는 전달 벡터를 포함하는, 제조용 레트로바이러스 입자를 생성시킬 수 있는 세포주를 의미한다. 감염성 바이러스 입자 및 바이러스 스톱 용액의 생성은 통상의 기술을 사용해서 수행할 수 있다. 바이러스 스톱 용액을 제조하는 방법은 당분야에 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Y. Soneoka *et al.*(1995) *Nucl. Acids Res.* 23:628-633], 및 [N. R. Landau *et al.*(1992) *J. Virol.* 66:5110-5113]에 예시되어 있다. 감염성 바이러스 입자는 통상의 기술을 사용해서 패키징 세포로부터 수집될 수 있다. 예를 들어, 감염성 입자는 당분야에 공지된 바와 같이, 세포 용해에 의해서, 또는 세포 배양물의 상등액의 수집에 의해 수집될 수 있다. 경우에 따라, 수집된 바이러스 입자는 바람직하다면 정제될 수 있다. 적합한 정제 기술은 당업자에게 잘 알려져 있다.
- [0348] 형질감염보다는 바이러스 감염을 통해서 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터를 사용하는 유전자(들) 또는 다른 폴리뉴클레오타이드 서열의 전달은 "형질도입"이라고 한다. 일 실시형태에서, 레트로바이러스 벡터는 감염 및 프로바이러스 통합을 통해 세포로 형질도입된다. 일정 실시형태에서, 표적 세포, 예를 들어 T 세포는 바이러스 또는 레트로바이러스 벡터를 사용한 감염에 의해 세포에 전달되는 유전자 또는 다른 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하면 "형질도입"된다. 구체적인 실시형태에서, 형질도입된 세포는 이의 세포 계통에 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터에 의해 전달된 하나 이상의 유전자 또는 다른 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0349] 구체적인 실시형태에서, 하나 이상의 폴리펩타이드를 발현하는 바이러스 벡터가 형질도입된 숙주 세포는 B 세포 악성종양을 치료 및/또는 예방하기 위해 대상체에게 투여된다. 일정 실시형태에 따라서 이용할 수 있는, 유전자 요법에서 바이러스 벡터의 사용과 관련된 다른 방법은 예를 들어, 하기 문헌들에서 확인할 수 있다: Kay, M. A.(1997) *Chest* 111(6 Supp.):138S-142S; Ferry, N. and Heard, J. M.(1998) *Hum. Gene Ther.* 9:1975-81; Shiratory, Y. *et al.*(1999) *Liver* 19:265-74; Oka, K. *et al.*(2000) *Curr. Opin. Lipidol.* 11:179-86; Thule, P. M. and Liu, J. M.(2000) *Gene Ther.* 7:1744-52; Yang, N. S.(1992) *Crit. Rev. Biotechnol.* 12:335-56; Alt, M.(1995) *J. Hepatol.* 23:746-58; Brody, S. L. and Crystal, R. G.(1994) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 716:90-101; Strayer, D. S.(1999) *Expert Opin. Investig. Drugs* 8:2159-2172; Smith-Arica, J. R. and Bartlett, J. S.(2001) *Curr. Cardiol. Rep.* 3:43-49; and Lee, H. C. *et al.*(2000) *Nature* 408:483-8.
- [0350] **G. 유전자 변형된 세포**
- [0351] 다양한 실시형태에서, 암의 치료에 사용을 위해, 본 명세서에서 고려되는 CAR을 발현하도록 유전자 변형된 세포가 제공된다. 본 명세서에서 사용 시, 용어 "유전자 조작된" 또는 "유전자 변형된"은 세포의 전체 유전자 물질에 DNA 또는 RNA 형태의 추가의 유전자 물질의 첨가를 의미한다. 용어 "유전자 변형된 세포", "변형된 세포" 및 "재지정된 세포"는 상호교환적으로 사용된다. 본 명세서에서 사용 시, 용어 "유전자 요법"은 치료적 폴리펩타이드, 예를 들어 CAR을 발현시키는 목적을 위해, 또는 유전자의 발현을 복원, 교정, 또는 변형하는 세포내 전체 유전자 물질에 DNA 또는 RNA 형태의 추가의 유전자 물질의 도입을 의미한다.
- [0352] 구체적인 실시형태에서, 본 명세서에서 고려되는 CAR은 관심 표적 항원, 예를 들어 STn 발현 당단백질에 대해 그들 특이성을 재지정하도록 면역 효과기 세포에 도입되어 발현된다. "면역 효과기 세포"는 하나 이상의 효과기 기능(예를 들어, 세포독성 세포 사멸 활성, 사이토카인의 분비, ADCC 및/또는 CDC의 유도)을 갖는 면역계의 임의의 세포이다. 본 명세서에서 고려되는 예시적인 면역 효과기 세포는 T 림프구, 구체적으로 세포독성 T 세포(CTL; CD8+ T 세포), TIL, 및 헬퍼 T 세포(HTL; CD4+ T 세포)를 포함한다. 일 실시형태에서, 면역 효과기 세포는 자연 살해(NK) 세포를 포함한다. 일 실시형태에서, 면역 효과기 세포는 자연 살해 T(NKT) 세포를 포함한다.
- [0353] 면역 효과기 세포는 자기유래/자생적("자기") 또는 비자기유래("비자기", 예를 들어 동종이계, 동계 또는 이종

발생)일 수 있다.

- [0354] 본 명세서에서 사용시 "자기유래"는 동일 대상체에서 유래된 세포를 의미한다.
- [0355] 본 명세서에서 사용시 "동종이계"는 비교시 세포와 유전적으로 상이한 동일종의 세포를 의미한다.
- [0356] 본 명세서에서 사용시 "동계"는 비교시 세포와 유전적으로 동일한 상이한 대상체의 세포를 의미한다.
- [0357] 본 명세서에서 사용시 "이종발생"은 비교시 세포에 대해 상이한 종의 세포를 의미한다. 바람직한 실시형태에서, 세포는 동종이계이다.
- [0358] 본 명세서에서 고려되는 CAR과 사용되는 예시적인 면역 효과기 세포는 T 림프구를 포함한다. 용어 "T 세포" 또는 "T 림프구"는 당분야에서 인식되며 흥선세포, 미성숙 T 림프구, 성숙한 T 림프구, 휴지 T 림프구, 또는 활성화된 T 림프구를 포함하고자 한다. T 세포는 T 헬퍼(Th) 세포, 예를 들어 T 헬퍼 1(Th1) 또는 T 헬퍼 2(Th2) 세포일 수 있다. T 세포는 헬퍼 T 세포(HTL; $CD4^{+}$ T 세포) $CD4^{+}$ T 세포, 세포독성 T 세포(CTL; $CD8^{+}$ T 세포), $CD4^{+}CD8^{+}$ T 세포, $CD4^{-}CD8^{-}$ T 세포, 또는 T 세포의 임의의 다른 서브셋일 수 있다. 구체적인 실시형태에서 사용하기 적합한 T 세포의 다른 예시적인 개체군은 나이브 T 세포 및 기억 T 세포를 포함한다.
- [0359] 당업자가 이해하는 바와 같이, 다른 세포가 또한 본 명세서에 기술된 바와 같은 CAR과 면역 효과기 세포로서 사용될 수 있다. 구체적으로, 면역 효과기 세포는 또한 NK 세포, NKT 세포, 호중구, 및 마크로파지를 포함한다. 또한 면역 효과기 세포는 효과기 세포의 전구세포를 포함하고 이러한 전구 세포는 생체내 또는 시험관내에서 면역 효과기 세포로 분화되도록 유도될 수 있다. 따라서, 구체적인 실시형태에서, 면역 효과기 세포는 면역 효과기 세포의 전구세포 예컨대 대상체에 투여 시 성숙한 면역 효과기 세포로 분화되거나, 또는 성숙한 면역 효과기 세포로 분화되도록 시험관내에서 유도시킬 수 있는 제대혈, 골수 또는 이동성 말초 혈액에서 유도된 $CD34^{+}$ 세포 개체군 내에 함유된 조혈 줄기 세포(HSC)를 포함한다.
- [0360] 본 명세서에서 사용 시, STn-특이적 CAR을 함유하도록 유전자 조작된 면역 효과기 세포는 "STn-특이적 재지정된 면역 효과기 세포"라고 할 수 있다.
- [0361] 본 명세서에서 사용 시, 용어 " $CD34^{+}$ 세포"는 이의 세포 표면 상에서 CD34 단백질을 발현하는 세포를 의미한다. 본 명세서에서 사용시 "CD34"는 종종 세포 대 세포 부착 인자로서 기능하고 림프절로 T 세포 진입에 관여하는 세포 표면 당단백질(예를 들어, 시알로뮤신 단백질)을 의미한다. $CD34^{+}$ 세포 개체군은 대상체에 투여시 T 세포, NK 세포, NKT 세포, 호중구 및 단핵구/마크로파지 계통의 세포를 포함하여, 모든 조혈 계통으로 분화되고 기여하는 조혈 줄기 세포(HSC)를 함유한다.
- [0362] 본 명세서에서 고려하는 CAR을 발현하는 면역 효과기 세포를 제조하기 위한 방법을 구체적인 실시형태에서 제공한다. 일 실시형태에서, 상기 방법은 면역 효과기 세포가 본 명세서에 기술한 바와 같은 하나 이상의 CAR을 발현하도록 개체로부터 단리된 면역 효과기 세포를 형질감염 또는 형질도입시키는 단계를 포함한다. 일정 실시형태에서, 면역 효과기 세포는 개체로부터 단리되어 시험관내에서 추가 조작없이 유전자 조작된다. 이러한 세포는 이후 개체에게 직접 재투여될 수 있다. 추가 실시형태에서, 면역 효과기 세포는 CAR을 발현하도록 유전자 조작되기 전에 시험관내에서 증식되도록 먼저 활성화되고 자극된다. 이러한 점에서, 면역 효과기 세포는 유전자 조작(즉, 본 명세서에서 고려하는 CAR을 발현하도록 형질도입 또는 형질감염) 이전 및/또는 이후에 배양될 수 있다.
- [0363] 구체적인 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 면역 효과기 세포의 시험관내 조작 또는 유전자 변형 전에, 세포 공급원을 대상체로부터 획득한다. 구체적인 실시형태에서, CAR-변형된 면역 효과기 세포는 T 세포를 포함한다.
- [0364] 구체적인 실시형태에서, PBMC는 본 명세서에서 고려되는 방법을 사용하여 CAR을 발현하도록 직접적으로 유전자 조작될 수 있다. 일정 실시형태에서, PBMC의 단리 후, T 림프구는 더욱 단리되고, 일정 실시형태에서, 세포독성 및 헬퍼 T 림프구 둘 모두는 유전자 변형 및/또는 확장 이전 또는 이후에, 나이브, 기억, 효과기 T 세포 하위개체군으로 분류될 수 있다.
- [0365] 면역 효과기 세포, 예컨대 T 세포는 기지 방법을 사용해서 단리 후 유전자 변형될 수 있거나, 또는 면역 효과기 세포는 유전자 변형되기 이전에 시험관내에서 활성화되고 확장(또는 전구세포의 경우 분화)될 수 있다. 구체적인 실시형태에서, 면역 효과기 세포, 예컨대 T 세포는 본 명세서에서 고려하는 키메라 항원 수용체로 유전자 변형(예를 들어, CAR을 코딩하는 핵산을 포함하는 바이러스 벡터가 형질도입)된 후 시험관내에서 활성화되고 확장

된다. 다양한 실시형태에서, T 세포는 예를 들어, 미국 특허 제6,352,694호; 제6,534,055호; 제6,905,680호; 제6,692,964호; 제5,858,358호; 제6,887,466호; 제6,905,681호; 제7,144,575호; 제7,067,318호; 제7,172,869호; 제7,232,566호; 제7,175,843호; 제5,883,223호; 제6,905,874호; 제6,797,514호; 제6,867,041호; 및 미국 공개 특허 출원 제20060121005호에 기술된 바와 같은 방법을 사용해, CAR을 발현하도록 유전자 변형 이전 또는 이후에 활성화되고 확장될 수 있다.

[0366] 일 실시형태에서, CD34⁺ 세포는 본 명세서에서 고려되는 핵산 작제물이 형질도입된다. 일정 실시형태에서, 형질도입된 CD34⁺ 세포는 대상체, 일반적으로 세포가 본래 단리된 대상체에게 투여 후, 생체 내에서 성숙한 면역 효과기 세포로 분화된다. 다른 실시형태에서, CD34⁺ 세포는 이전에 기술된 방법에 따라서 하기 사이토카인 중 하나 이상으로, 본 명세서에 기술된 바와 같은 CAR로 유전자 변형된 후 또는 그에 노출되기 전에 시험관내에서 자극될 수 있다: Flt-3 리간드(FLT3), 줄기 세포 인자(SCF), 거핵구 성장 및 분화 인자(TPO), IL-3 및 IL-6(Asheuer *et al.*, 2004; Imren, *et al.*, 2004).

[0367] 구체적인 실시형태에서, 암의 치료를 위한 변형된 면역 효과기 세포의 개체군은 본 명세서에 개시된 바와 같은 CAR을 포함한다. 예를 들어, 변형된 면역 효과기 세포의 개체군은 본 명세서에 기술된 B 세포 악성종양으로 진단받은 환자로부터 획득된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 제조된다(자기유래 도너). PBMC는 CD4⁺, CD8⁺, 또는 CD4⁺ 및 CD8⁺일 수 있는 T 림프구의 이종성 개체군을 형성한다.

[0368] PBMC는 또한 다른 세포독성 림프구 예컨대 NK 세포 또는 NKT 세포를 포함할 수 있다. 본 명세서에서 고려하는 CAR의 코딩 서열을 보유하는 발현 벡터는 인간 도너 T 세포, NK 세포 또는 NKT 세포의 개체군에 도입될 수 있다. 구체적인 실시형태에서, 발현 벡터를 운반하는 성공적으로 형질도입된 T 세포는 CD3 양성 T 세포를 단리하기 위해 유세포측정법을 사용해서 분류될 수 있고 다음으로 항-CD3 항체 및 또는 항-CD28 항체 및 IL-2 또는 본 명세서의 다른 곳에 기술된 바와 같은 당분야에 공지된 다른 방법을 사용해서 세포 활성화 이외에도 이들 CAR 단백질 발현 T 세포의 수를 증가시키기 위해 더욱 증식될 수 있다. 인간 대상체에서 사용을 위한 저장 및/또는 제조를 위해 CAR 단백질을 발현하는 T 세포의 저온보존을 위한 표준 절차가 사용된다. 일 실시형태에서, T 세포의 시험관내 형질도입, 배양 및/또는 확장은 인간이외 동물 유도된 생성물 예컨대 태아 송아지 혈청 및 태아 소 혈청의 부재에서 수행된다. PBMC의 이종성 개체군이 유전자 조작되므로, 최종 형질도입된 세포는 본 명세서에서 고려되는 바와 같은 STn 발현 당단백질 표적화 CAR을 포함하는 변형된 세포의 이종성 개체군이다.

[0369] 추가 실시형태에서, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5종, 또는 그 이상의 상이한 발현 벡터의 혼합물이 면역 효과기 세포의 도너 개체군을 유전자 변형시키는데 사용될 수 있고 각각의 벡터는 본 명세서에서 고려되는 바와 같은 상이한 키메라 항원 수용체 단백질을 코딩한다. 최종 변형된 면역 효과기 세포는 변형된 세포의 혼합 개체군을 형성하며, 상기 변형된 세포의 개체군은 1종이 넘는 상이한 CAR 단백질을 발현한다.

[0370] H. T 세포 제조 방법

[0371] 다양한 실시형태에서, 유전자 변형된 T 세포는 CD3 TCR 복합체 회합된 신호를 자극시키는 작용제 및 T 세포의 표면 상에서 공자극성 분자를 자극하는 리간드와의 접촉에 의해 확장된다.

[0372] 구체적인 실시형태에서, PBMC 또는 단리된 T 세포는 적절한 사이토카인, 예컨대 IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15가 있는 배양 배지 중에서, 자극제 및 공자극제, 예컨대, 가용성 항-CD3 및 항-CD28 항체, 또는 비드 또는 다른 표면에 부착된 항체와 접촉된다.

[0373] 구체적인 실시형태에서, PBMC 또는 단리된 T 세포는 적절한 사이토카인, IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15 및/또는 PI3K/Akt/mTOR 세포 신호전달 경로를 조절하는 하나 이상의 작용제가 있는 배양 배지에서, 자극제 및 공자극제, 예컨대 가용성 항-CD3 및 항-CD28 항체, 또는 비드 또는 다른 표면에 부착된 항체와 접촉된다.

[0374] 바람직한 실시형태에서, 본 명세서에서 고려하는 방법으로 제조되는 T 세포는 개선된 입양 면역요법 조성물을 제공한다. 임의의 특정 이론에 국한하려는 것은 아니나, 본 명세서에서 고려되는 구체적인 실시형태에서 상기 방법으로 제조된 T 세포 조성물은 증가된 생존, 분화의 상대적 부재에서의 확장, 및 생체내 지속성을 포함한, 우수한 특성으로 채워진다고 여겨진다. 일 실시형태에서, T 세포를 제조하는 방법은 PI3K 세포 신호전달 경로를 조절하는 하나 이상의 작용제와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일 실시형태에서, T 세포를 제조하는 방법은 PI3K/Akt/mTOR 세포 신호전달 경로를 조절하는 하나 이상의 작용제와 세포를 접촉시키는 단계를 포함한다. 다양한 실시형태에서, T 세포는 임의의 공급원으로부터 획득될 수 있고 제조 과정의 활성화 및/또는 확장 시기 동안

작용제와 접촉될 수 있다. 최종 T 세포 조성물은 증식되고 다음의 생물마커 중 하나 이상을 발현하는 능력을 갖는 발생적으로 강력한 T 세포로 농후화된다: CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122, CD127, CD197, CD38, 및 CD8. 일 실시형태에서, 1 종 이상의 PI3K 억제제를 처리한, T 세포를 포함하는 세포 개체군은 다음의 생물마커 중 하나 이상, 또는 전부를 공발현하는 CD8⁺ T 세포의 개체군에 대해 농후화된다: CD62L, CD127, CD197, 및 CD38.

[0375] 일 실시형태에서, 하나 이상의 PI3K 억제제로 처리된 T 세포를 포함하는 세포의 개체군은 다음의 생물마커 중 하나 이상, 또는 전부를 공발현하는 CD8⁺ T 세포의 개체군에 대해 농후화된다: CD62L, CD127, CD27, 및 CD8.

[0376] 일 실시형태에서, 유지되는 수준의 증식 및 감소된 분화를 포함하는 변형된 T 세포를 제조한다. 구체적인 실시형태에서, T 세포는 하나 이상의 자극 신호 및 PI3K 세포 신호전달 경로의 억제제인 작용제의 존재에서 활성화되고 증식되도록 T 세포를 자극하여 제조된다.

[0377] 다음으로, T 세포는 항-STn CAR을 발현하도록 변형될 수 있다. 일 실시형태에서, T 세포는 본 명세서에서 고려되는 항-STn CAR을 포함하는 바이러스 벡터로 T 세포를 형질도입하여 변형된다. 일정 실시형태에서, T 세포는 PI3K 세포 신호전달 경로의 억제제의 존재에서 자극 및 활성화 이전에 변형된다. 다른 실시형태에서, T 세포는 PI3K 세포 신호전달 경로의 억제제의 존재에서 자극 및 활성화 후 변형된다. 구체적인 실시형태에서, T 세포는 PI3K 세포 신호전달 경로의 억제제 존재에서 자극 및 활성화의 12시간, 24시간, 36시간, 또는 48시간 이내에 변형된다.

[0378] T 세포가 활성화된 후, 세포는 증식되도록 배양된다. T 세포는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7일, 적어도 2주, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개월 또는 그 이상 동안 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10회 또는 그 이상의 확장으로 배양될 수 있다.

[0379] 다양한 실시형태에서, T 세포는 PI3K/Akt/mTOR 세포 신호전달 경로의 하나 이상의 억제제의 존재에서 제조된다. 억제제는 경로의 1가지 이상의 활성화 또는 단일 활성을 표적으로 할 수 있다. 임의의 특정 이론에 국한하려는 것은 아니나, 제조 과정 동안 자극, 활성화, 및/또는 확장기 동안 PI3K 경로의 하나 이상의 억제제와 T 세포의 접촉 또는 처리는 우선적으로 어린 T 세포를 증가시켜서, 우수한 치료적 T 세포 조성물을 생성시킨다고 여겨진다.

[0380] 구체적인 실시형태에서, 조작된 T 세포 수용체를 발현하는 T 세포의 증식을 증가시키기 위한 방법이 제공된다. 이러한 방법은 예를 들어, 대상체 유래의 T 세포의 공급원을 수확하는 단계, PI3K 경로의 하나 이상의 억제제의 존재에서 T 세포를 자극 및 활성화시키는 단계, 항-STn CAR을 발현하도록 T 세포를 변형시키는 단계, 및 배양으로 T 세포를 확장시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0381] 일정 실시형태에서, 다음의 생물마커 중 하나 이상의 발현에 대해 농후화된 T 세포의 개체군을 생성시키기 위한 방법이 고려된다: CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122, CD127, CD197, CD38, 및 CD8. 일 실시형태에서, 어린 T 세포는 다음의 생물마커 중 하나 이상, 또는 전부를 포함한다: CD62L, CD127, CD197, 및 CD38.

[0382] 일 실시형태에서, 어린 T 세포는 다음의 생물학적 마커 중 하나 이상, 또는 전부를 포함한다: CD62L, CD127, CD27, 및 CD8.

[0383] 일 실시형태에서, CD57, CD244, CD160, PD-1, CTLA4, TIM3, 및 LAG3의 발현이 결여된 어린 T 세포를 제공한다. 본 명세서의 다른 곳에서 기술한 바와 같이, 어린 T 세포 생물마커의 발현도는 보다 분화된 T 세포 또는 면역 효과기 세포 개체군으로부터의 이러한 마커의 발현도에 상대적이다.

[0384] 일 실시형태에서, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)는 본 명세서에서 고려되는 T 세포 제조 방법에서 T 세포의 공급원으로서 사용된다. PBMC는 CD4⁺, CD8⁺, 또는 CD4⁺ 및 CD8⁺일 수 있는 T 림프구의 이중성 개체군을 형성하고 다른 단핵 세포 예컨대 단핵구, B 세포, NK 세포 및 NKT 세포를 포함할 수 있다. 본 명세서에서 고려되는 조작된 TCR 또는 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터는 인간 도너 T 세포, NK 세포 또는 NKT 세포의 개체군에 도입될 수 있다. 구체적인 실시형태에서, 발현 벡터를 운반하는 성공적으로 형질도입된 T 세포는 CD3 양성 T 세포를 분리하기 위해 유세포측정법을 사용해서 분류될 수 있고 이후 항-CD3 항체 및 또는 항-CD28 항체 및 IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15를 사용하여 세포 활성화 이외에도 변형된 T 세포의 수를 증가시키기 위해 더욱 증식된다.

[0385] 본 명세서에서 고려되는 제조 방법은 인간 대상체에서 사용을 위한 저장 및/또는 제조를 위해 변형된 T 세포의 저온보존을 더 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 세포가 해동시 생존상태로 남아있도록 면역 효과기 세포를 저온보존하는 단계를 포함하는, STn 발현 당단백질을 표적으로 하는 면역 효과기 세포를 발현하는 유전자 변형된

첫과동물, 인간 또는 인간화 CAR 단백질을 저장하는 방법이 제공된다. CAR 단백질을 발현하는 면역 효과기 세포의 분획은 암 세포에서 발현되는 STn 발현 당단백질의 영향을 받는 환자의 향후 치료를 위해 이러한 세포의 영구적인 공급원을 제공하도록 당분야에 공지된 방법에 의해 저온보존될 수 있다. T 세포는 해동 시 생존상태로 세포가 남도록 저온보존된다. 필요하다면, 저온보존된 형질전환된 면역 효과기 세포는 더 많은 이러한 세포를 위해 해동, 성장 및 확장될 수 있다. 본 명세서에서 사용 시, "저온보존"은 0 이하의 온도, 예컨대(전형적으로) 77 K 또는 -196℃(액체 질소의 비등점)로 냉각에 의한 세포의 보존이다. 저온보호제가 종종 저온에서 냉동 또는 실온으로 해동으로 인한 손상으로부터 세포를 보호하기 위해 0 이하의 온도에서 사용된다. 저온보존제 및 최적 냉각 속도는 세포 손상으로부터 보호할 수 있다. 사용할 수 있는 저온보호제는 제한 없이, 다이메틸 설폭사이드(DMSO)(Lovelock and Bishop, *Nature*, 1959; 183: 1394-1395; Ashwood-Smith, *Nature*, 1961; 190: 1204-1205), 글리세롤, 폴리비닐피롤리딘(Rinfret, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1960; 85: 576), 및 폴리에틸렌 글리콜(Sloviter and Ravdin, *Nature*, 1962; 196: 48)을 포함한다. 바람직한 냉각 속도는 1℃ 내지 3℃/분이다. 적어도 2시간 후, T 세포가 -80℃의 온도에 도달하고, 영구 저장을 위해 예컨대 장기간 저온 저장 용기에서 액체 질소(-196℃)에 직접 위치될 수 있다.

[0386] **1. T 세포**

[0387] 개선된 CAR T 세포 조성물의 제조가 구체적인 실시형태에서 제공된다. CAR T 세포 생성에 사용되는 T 세포는 자기유래/자생적("자기") 또는 비자기유래("비자기" 예를 들어, 동종이계, 동계 또는 이종발생)일 수 있다. 바람직한 실시형태에서, T 세포는 포유동물 대상체로부터 획득된다. 보다 바람직한 실시형태에서, T 세포는 유인원 대상체로부터 획득된다. 가장 바람직한 실시형태에서, T 세포는 인간 대상체로부터 획득된다.

[0388] T 세포는 제한 없이, 말초 혈액 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 체대혈, 흉선 조직, 감염 부위 유래 조직, 복수, 흉막 삼출액, 비장 조직, 및 종양을 포함하는, 수많은 공급원으로부터 획득될 수 있다. 일정 실시형태에서, T 세포는 당업자에게 공지된 임의의 많은 기술, 예컨대 침강법, 예를 들어 피콜(FICOLL)(상표명) 분리법을 사용해서 대상체에서 채취된 혈액 단위로부터 획득될 수 있다. 일 실시형태에서, 개체의 순환 혈액 유래의 세포는 분리반출법에 의해 획득된다. 분리반출법 생성물은 전형적으로 T 세포, 단핵구, 과립구, B 세포, 다른 유핵 백혈 세포, 적혈 세포, 및 혈소판을 포함한, 림프구를 함유한다. 일 실시형태에서, 분리반출법으로 수집된 세포를 세척하여 혈장 분획을 제거하고 후속 과정을 위해 적절한 완충액 또는 배지에 세포를 위치시킬 수 있다. 세포는 PBS 또는 칼슘, 마그네슘, 및 전부는 아니지만, 대부분의 2가 양이온이 결여된 다른 적합한 용액으로 세척될 수 있다. 당업자가 이해하게 되는 바와 같이, 세척 단계는 당분야에 공지된 방법, 예컨대 반자동 통과액 원심분리를 사용해서 수행될 수 있다. 예를 들어, 코브(Cobe) 2991 세포 프로세서, 백스터 사이토메이트(Baxter Cytomate) 등. 세척 후, 세포는 다양한 생물적합성 완충액 또는 완충액이 있거나 없는 다른 염수 용액에 재현탁될 수 있다. 일정 실시형태에서, 분리반출 샘플의 바람직하지 않은 성분은 세포 직접 재현탁시킨 배양 배지에서 제거될 수 있다.

[0389] 구체적인 실시형태에서, T 세포, 예를 들어 PBMC를 포함하는 세포의 개체군이 본 명세서에서 고려되는 제조 방법에서 사용된다. 다른 실시형태에서, T 세포의 단리되거나 또는 정제된 개체군이 본 명세서에서 고려되는 제조 방법에서 사용된다. 세포는 예를 들어, 피콜(PERCOLL)(상표명) 구배를 통한 원심분리에 의해, 적혈 세포를 용해시키고 단핵구를 고갈시켜 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 단리될 수 있다. 일부 실시형태에서, PBMC의 단리 후, 세포독성 및 헬퍼 T 림프구 둘 모두는 활성화, 확장, 및/또는 유전자 변형 이전 또는 이후에 나이브, 기억 및 효과기 T 세포 하위개체군으로 분류될 수 있다.

[0390] 구체적인 실시형태에서, T 세포, 예를 들어 PBMC를 포함하는 세포의 개체군이 본 명세서에서 고려하는 제조 방법에서 사용된다. 다른 실시형태에서, T 세포의 단리되거나 또는 정제된 개체군이 본 명세서에서 고려되는 제조 방법에서 사용된다. 세포는 예를 들어 피콜 구배를 통해 원심분리를 통해, 적혈 세포를 용해시키고 단핵구를 고갈시켜 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 단리될 수 있다. 일부 실시형태에서, PBMC의 단리 후, 세포독성 및 헬퍼 T 림프구 둘 모두는 활성화, 확장, 및/또는 유전자 변형 이전 또는 이후에 나이브, 기억, 및 효과기 T 세포 하위개체군으로 분류될 수 있다.

[0391] 구체적인 실시형태에서, 면역 효과기 세포의 개체군은 본 명세서에서 고려하는 방법을 사용해서 CAR을 발현하도록 유전자 변형되지만, 양성 또는 음성 선별을 겪지 않은 PBMC로부터 제조된다. 일정 실시형태에서, PBMC의 단리 후, T 림프구는 더욱 단리되고, 일정 실시형태에서, 세포독성 및 헬퍼 T 림프구 둘 모두는 유전자 변형 및/또는 확장 이전 또는 이후에 나이브, 기억, 및 효과기 T 세포 하위개체군으로 분류될 수 있다.

[0392] 일정 실시형태에서, 다음의 마커 중 하나 이상을 발현하는, T 세포의 특별한 하위개체군은 양성 또는 음성 선별

기술에 의해 더욱 단리될 수 있다: CD3, CD4, CD8, CD28, CD45RA, CD45RO, CD62, CD127, 및 HLA-DR. 일 실시형태에서, i) CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122, CD127, CD197; ii) CD62L, CD127, CD197, 및 CD38 또는 iii) CD62L, CD127, CD27, 및 CD8로 이루어진 군으로부터 선택되는 마커 중 하나 이상을 발현하는, T 세포의 특별한 하위개체군은 양성 또는 음성 선별 기술에 의해 더욱 단리된다. 다양한 실시형태에서, 제조된 T 세포 조성물은 다음의 마커 중 하나 이상을 발현하지 않거나 또는 실질적으로 발현하지 않는다: CD57, CD244, CD160, PD-1, CTLA4, TIM3, 및 LAG3.

[0393] 일 실시형태에서, i) CD62L, CD127, CD197, 및 CD38 또는 ii) CD62L, CD127, CD27, 및 CD8로 이루어진 군으로부터 선택되는 마커의 1 종 이상의 발현은 PI3K 억제제 없이 활성화되고 확장된 T 세포의 개체군과 비교하여 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 적어도 10배, 적어도 25배, 또는 그 이상 증가된다. 일 실시형태에서, T 세포는 $CD8^+$ T 세포를 포함한다.

[0394] 일 실시형태에서, CD57, CD244, CD160, PD-1, CTLA4, TIM3, 및 LAG3로 이루어진 군으로부터 선택된 마커의 1 종 이상의 발현은 PI3K 억제제로 활성화되고 확장된 T 세포의 개체군과 비교하여 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 적어도 10배, 적어도 25배, 또는 그 이상이 감소된다. 일 실시형태에서, T 세포는 $CD8^+$ T 세포를 포함한다.

[0395] 일 실시형태에서, 본 명세서에서 고려하는 제조 방법은 나이브 또는 발생적으로 강력한 T 세포의 하나 이상의 마커를 포함하는 CAR T 세포의 수를 증가시킨다. 임의의 특정 이론에 국한하려는 것은 아니나, 본 발명자는 1 종 이상의 PI3K 억제제로 T 세포를 포함하는 세포의 개체군을 처리하는 것은 발생적으로 강력한 T 세포의 확장 증가를 유발시키고 현존하는 CAR T 세포 요법과 비교하여 보다 강건하고 효율적인 입양 CAR T 세포 면역요법을 제공한다고 믿는다.

[0396] 본 명세서에서 고려하는 방법을 이용해 제조된 T 세포에서 증가된 나이브 또는 발생적으로 강력하나 T 세포의 마커의 예시적인 예는 제한 없이, i) CD62L, CD127, CD197, 및 CD38 또는 ii) CD62L, CD127, CD27, 및 CD8을 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 나이브 T 세포는 다음의 마커 중 하나 이상을 발현하지 않거나 또는 실질적으로 발현하지 않는다: CD57, CD244, CD160, PD-1, BTLA, CD45RA, CTLA4, TIM3, 및 LAG3.

[0397] T 세포의 경우, 본 명세서에서 고려하는 다양한 확장 방법론으로 생성된 T 세포 개체군은 적용된 조건에 따라서, 다양한 특이적 표현형적 특성을 가질 수 있다. 다양한 실시형태에서, 확장된 T 세포 개체군은 다음의 표현형 마커 중 하나 이상을 포함한다: CD62L, CD27, CD127, CD197, CD38, CD8, 및 HLA-DR.

[0398] 일 실시형태에서, 이러한 표현형 마커는 CD62L, CD127, CD197, 및 CD38 중 하나 이상, 또는 전부의 향상된 발현을 포함한다. 구체적인 실시형태에서, CD62L, CD127, CD197, 및 CD38을 포함하는 나이브 T 세포의 표현형 마커의 발현을 특징으로 하는 $CD8^+$ T 림프구가 확장된다.

[0399] 일 실시형태에서, 이러한 표현형 마커는 CD62L, CD127, CD27, 및 CD8 중 하나 이상, 또는 전부의 향상된 발현을 포함한다. 구체적인 실시형태에서, CD62L, CD127, CD27, 및 CD8을 포함하는 나이브 T 세포의 표현형 마커의 발현을 특징으로 하는 $CD8^+$ T 림프구가 확장된다.

[0400] 구체적인 실시형태에서, CD45RO, CD62L, CD127, CD197, 및 CD38을 포함하는 중심 기억 T 세포의 표현형 마커의 발현을 특징으로 하고 그랜자임 B에 대해 음성이 T 세포가 확장된다. 일부 실시형태에서, 중심 기억 T 세포는 $CD45RO^+$, $CD62L^+$, $CD8^+$ T 세포이다.

[0401] 일정 실시형태에서, CD62L을 포함하는 나이브 $CD4^+$ 세포의 표현형 마커의 발현을 특징으로 하고 CD45RA 및/또는 CD45RO의 발현에 대해 음성이 $CD4^+$ T 림프구가 확장된다. 일부 실시형태에서, CD62L 및 CD45RO 양성을 포함하는 중심 기억 $CD4^+$ 세포의 표현형 마커의 발현을 특징으로 하는 $CD4^+$ 세포. 일부 실시형태에서, 효과기 $CD4^+$ 세포는 CD62L 양성 및 CD45RO 음성이다.

[0402] 일정 실시형태에서, T 세포는 개체로부터 단리되고 항-STn CAR을 발현하도록 유전자 변형되기 전에 시험관내에서 증식되도록 활성화 및 자극된다. 이와 관련하여, T 세포는 유전자 변형(즉, 본 명세서에서 고려되는 항-STn CAR을 발현하도록 형질도입 또는 형질감염) 이전 및/또는 이후에 배양될 수 있다.

[0403] **2. 활성화 및 확장**

- [0404] T 세포 조성물의 충분한 치료적 용량을 획득하기 위해서, T 세포는 종종 1회 이상의 자극, 활성화 및/또는 확장을 겪는다. T 세포는 예를 들어, 각각이 그 전체로 참조로 본 명세서에 편입되는, 미국 특허 제6,352,694호; 제6,534,055호; 제6,905,680호; 제6,692,964호; 제5,858,358호; 제6,887,466호; 제6,905,681호; 제7,144,575호; 제7,067,318호; 제7,172,869호; 제7,232,566호; 제7,175,843호; 제5,883,223호; 제6,905,874호; 제6,797,514호; 및 제6,867,041호에 기술된 바와 같은 방법을 사용해서 일반적으로 활성화되고 확장될 수 있다. 항-STn CAR을 발현하도록 변형된 T 세포는 T 세포가 변형되기 이전 및/또는 이후에 활성화되고 확장될 수 있다. 또한, T 세포는 활성화 및/또는 확장 이전, 그 동안, 및/또는 이후에 PI3K/Akt/mTOR 세포 신호전달 경로를 조절하는 하나 이상의 작용제와 접촉할 수 있다. 일 실시형태에서, 본 명세서에서 고려되는 방법으로 제조된 T 세포는 1, 2, 3, 4, 또는 5회 또는 그 이상의 활성화 및 확장을 겪으며, 그 각각은 PI3K/Akt/mTOR 세포 신호전달 경로를 조절하는 하나 이상의 작용제를 포함할 수 있다.
- [0405] 인공 항원 제시 세포(aAPC)는 천연 APC의 사용과 대조적으로, 외생성 사이토카인의 첨가를 요구하지 않고 기능성 인간 CD8⁺ T 세포의 생체외 성장 및 장기간 확장을 지원한다. 구체적인 실시형태에서, PBMC 또는 단리된 T 세포는 적절한 사이토카인, 예컨대 IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15가 있는 배양 배지에서, 대체로 비드 또는 다른 표면에 부착된, 자극제 및 공자극제, 예컨대 항-CD3 및 항-CD28 항체와 접촉된다.
- [0406] 다른 실시형태에서, 인공 APC(aAPC)는 다양한 공자극성 분자 및 사이토카인의 안정한 발현 및 분비를 지정하기 위해 K562, U937, 721.221, T2, 및 C1R 세포를 조작하여 만들었다. 구체적인 실시형태에서, K32 또는 U32 aAPC는 AAPC 세포 표면 상에 하나 이상의 항체 기반 자극성 분자의 전시를 지정하는데 사용된다. T 세포의 개체군은 제한 없이, CD137L(4-1BBL), CD134L(OX40L), 및/또는 CD80 또는 CD86을 포함하는, 다양한 공자극성 분자를 발현하는 aAPC에 의해 확장될 수 있다. aAPC는 유전자 변형된 T 세포를 확장시키고 CD8⁺ T 세포 상에서 CD28 발현을 유지하기 위한 효율적인 플랫폼을 제공한다. WO 03/057171 및 US2003/0147869에 제공된 aAPC가 그들 전체로 참조로 본 명세서에 편입된다.
- [0407] 일 실시형태에서, 공자극성 리간드는 T 세포 상의 동족 공자극성 분자에 특이적으로 결합하는 항원 제시 세포(예를 들어, aAPC, 수지상 세포, B 세포 등) 상에 제시되어, TCR/CD3 복합체의 결합에 의해 제공되는 1차 신호 이외에도, 바람직한 T 세포 반응을 매개하는 신호를 제공한다. 적합한 공자극성 리간드는 제한 없이, CD7, B7-1(CD80), B7-2(CD86), 4-1BBL, OX40L, 유도성 공자극성 리간드(ICOS-L), 세포간 부착 분자(ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, 림프독소 베타 수용체, ILT3, ILT4, Toll 리간드 수용체에 결합하는 작용제 또는 항체, 및 B7-H3에 특이적으로 결합하는 리간드를 포함한다.
- [0408] 구체적인 실시형태에서, 공자극성 리간드는 제한 없이, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, ICOS, 림프구 기능-연관된 항원-1(LFA-1), CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 및 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드를 포함하는, T 세포 상에 제시된 공자극성 분자에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0409] 적합한 공자극성 리간드는 변형된 T 세포 상에서 발현된 조작된 TCR 또는 CAR에 결합하는 ATC 또는 aAPC 상에서 발현되거나 또는 가용성 형태로 제공될 수 있는 표적 항원을 포함한다.
- [0410] 다양한 실시형태에서, 본 명세서에서 고려하는 T 세포를 제조하기 위한 방법은 T 세포를 포함하는 세포의 개체군을 활성화시키는 단계 및 T 세포의 개체군을 확장시키는 단계를 포함한다. T 세포 활성화는 T 세포 TCR/CD3 복합체를 통하거나 또는 CD2 표면 단백질의 자극을 통해 1차 자극 신호를 제공하고 부속 분자, 예를 들어 CD28을 통한 2차 공자극 신호를 제공하여 수행될 수 있다.
- [0411] TCR/CD3 복합체는 T 세포를 적합한 CD3 결합제, 예를 들어 CD3 리간드 또는 항-CD3 단일클론 항체와 접촉시켜 자극시킬 수 있다. CD3 항체의 예시적인 예는 제한 없이, OKT3, G19-4, BC3, 및 64.1을 포함한다.
- [0412] 다른 실시형태에서, CD2 결합제는 T 세포에 1차 자극 신호를 제공하는데 사용될 수 있다. CD2 결합제의 예시적인 예는 제한 없이, CD2 리간드 및 항-CD2 항체, 예를 들어 T11.1 또는 T11.2 항체와 조합된 T11.3 항체(Meuer, S. C. *et al.* (1984) *Cell* 36:897-906) 및 9-1 항체와 조합된 9.6 항체(TI 1.1과 동일한 에피토프를 인식)(Yang, S. Y. *et al.* (1986) *J. Immunol.* 137:1097-1100)를 포함한다. 임의의 상기에 기술된 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 다른 항체가 또한 사용될 수 있다. 추가의 항체, 또는 항체의 조합이 본 명세서의 다른 곳에서 개시한 바와 같은 표준 기술에 의해 제조되고 동정될 수 있다.
- [0413] TCR/CD3 복합체, 또는 CD2를 통해 제공되는 1차 자극 신호 이외에도, T 세포 반응의 유도는 2차, 공자극성 신호를 요구한다. 구체적인 실시형태에서, CD28 결합제가 공자극성 신호를 제공하는데 사용될 수 있다. CD28 결합제

의 예시적인 예는 제한 없이, 천연 CD 28 리간드, 예컨대 CD28(예를 들어, 단백질의 B7 패밀리 구성원, 예컨대 B7-1(CD80) 및 B7-2(CD86)에 대한 천연 리간드; 및 CD28 분자를 가교할 수 있는 항-CD28 단일클론 항체 또는 이의 단편, 예를 들어 단일클론 항체 9.3, B-T3, XR-CD28, KOLT-2, 15E8, 248.23.2, 및 EX5.3D10을 포함한다.

- [0414] 일 실시형태에서, 1차 자극 신호를 제공하는 분자, 예를 들어 TCR/CD3 복합체 또는 CD2를 통해 자극을 제공하는 분자, 및 공자극성 분자는 동일 표면 상에 커플링된다.
- [0415] 일정 실시형태에서, 자극성 및 공자극성 신호를 제공하는 결합체는 세포의 표면 상에 국재된다. 이는 세포 표면 상에서 이의 발현에 적합한 형태로 결합체를 코딩하는 핵산으로 세포를 형질감염 또는 형질도입시키거나 또는 대안적으로 세포 표면에 결합체의 커플링에 의해 수행될 수 있다.
- [0416] 다른 실시형태에서, 1차 자극 신호를 제공하는 분자, 예를 들어 TCR/CD3 복합체 또는 CD2를 통해 자극을 제공하는 분자, 및 공자극성 분자는 항원 제시 세포 상에 전시된다.
- [0417] 일 실시형태에서, 1차 자극 신호를 제공하는 분자, 예를 들어 TCR/CD3 복합체 또는 CD2를 통해 자극을 제공하는 분자, 및 공자극성 분자는 개별 표면 상에 제공된다.
- [0418] 일정 실시형태에서, 자극성 및 공자극성 신호를 제공하는 결합체 중 하나는 가용성(용액으로 제공)이고 다른 작용제(들)는 하나 이상의 표면 상에 제공된다.
- [0419] 구체적인 실시형태에서, 자극성 및 공자극성 신호를 제공하는 결합체는 둘 모두 가용성 형태로 제공된다(용액으로 제공).
- [0420] 다양한 실시형태에서, 본 명세서에서 고려되는 T 세포를 제조하기 위한 방법은 T 세포를 항-CD3 및 항-CD28 항체로 활성화시키는 단계를 포함한다.
- [0421] 본 명세서에서 고려하는 방법으로 제조된 T 세포 조성물은 PI3K 세포 신호전달 경로를 억제하는 하나 이상의 작용제의 존재에서 활성화되고/되거나 확장된 T 세포를 포함한다. 항-STn CAR을 발현하도록 변형된 T 세포는 T 세포가 변형되기 이전 및/또는 이후에 활성화되고 확장될 수 있다. 구체적인 실시형태에서, T 세포의 개체군은 항-STn CAR을 발현하도록 활성화, 변형된 후, 확장을 위해 배양된다.
- [0422] 일 실시형태에서, 본 명세서에서 고려하는 방법으로 제조된 T 세포는 T 세포 분화의 미검출 마커를 발현하지 않거나 또는 실질적으로 발현하지 않지만 자가재생하는 능력 및 높은 증식성 잠재력을 의미하는 마커를 발현하는 T 세포의 증가된 수를 포함한다. 이들 T 세포는 강건한 방식으로 반복적으로 활성화되고 확장될 수 있어서 개선된 치료적 T 세포 조성물을 제공할 수 있다.
- [0423] 일 실시형태에서, PI3K 세포 신호전달 경로를 억제하는 하나 이상의 작용제의 존재에서 활성화되고 확장된 T 세포의 개체군은 PI3K 억제제 없이 활성화되고 확장된 T 세포의 개체군과 비교하여 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 적어도 10배, 적어도 25배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 250배, 적어도 500배, 적어도 1000배, 또는 그 이상이 확장된다.
- [0424] 일 실시형태에서, PI3K 세포 신호전달 경로를 억제하는 하나 이상의 작용제의 존재에서 어린 T 세포가 활성화되고 확장된 마커의 발현을 특징으로 하는 T 세포의 개체군은 PI3K 억제제 없이 활성화되고 확장된 T 세포의 개체군과 비교하여 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 적어도 10배, 적어도 25배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 250배, 적어도 500배, 적어도 1000배, 또는 그 이상이 확장된다.
- [0425] 일 실시형태에서, 본 명세서에서 고려하는 방법으로 활성화된 T 세포의 확장은 수 시간(약 3시간) 내지 약 7일 내지 약 28일 또는 그 사이의 임의의 매시간 정수값 동안 T 세포를 포함하는 세포의 개체군을 배양하는 단계를 포함한다. 다른 실시형태에서, T 세포 조성물은 14일 동안 배양될 수 있다. 구체적인 실시형태에서, T 세포는 약 21일 동안 배양된다. 다른 실시형태에서, T 세포 조성물은 약 2 내지 3일 동안 배양된다. 자극/활성화/확장의 몇몇 주기는 T 세포의 배양 시간이 60일 또는 그 이상일 수 있게 하는 것이 바람직할 수 있다.
- [0426] 구체적인 실시형태에서, T 세포 배양에 적절한 조건은 적절한 배지(예를 들어, 최소 필수 배지 또는 RPMI 배지 1640 또는, X-vivo 15, (Lonza)) 및 제한 없이, 혈청(예를 들어, 태아 소 또는 인간 혈청), 인터루킨-2(IL-2), 인슐린, IFN- γ , IL-4, IL-7, IL-21, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF β , 및 TNF- α 를 포함한 증식 및 생존에 필요한 하나 이상의 인자, 또는 당업자에게 공지된 세포 성장에 적합한 임의의 다른 첨가제를 포함한다.
- [0427] 세포 배양 배지의 추가의 예시적인 예는 제한 없이, 아미노산, 피루브산나트륨, 및 비타민이 첨가되고, 무혈청

이거나 또는 적절한 양의 혈청(또는 혈장) 또는 정해진 세트의 호르몬, 및/또는 T 세포의 성장 및 확장에 충분한 양의 사이토카인(들)이 보충된, RPMI 1640, 클릭스, AIM-V, DMEM, MEM, a-MEM, F-12, X-vivo 15, 및 X-vivo 20, 옵티마이저를 포함한다.

[0428] T 세포 확장을 위한 다른 첨가제의 예시적인 예는 제한 없이, 계면활성제, 피아스마네이트, pH 완충제 예컨대 HEPES, 및 환원제 예컨대 N-아세틸-시스테인 및 2-머캅토에탄올을 포함한다.

[0429] 항생제, 예를 들어 페니실린 및 스트렙토마이신은 오직 실험 배양에만 포함되고, 대상체에게 주입하려는 세포 배양에는 포함되지 않는다. 표적 세포는 성장을 지원하는데 필요한 조건, 예를 들어 적절한 온도(예를 들어, 37 °C) 및 분위기(예를 들어, 5% CO₂가 더해진 공기) 하에서 유지된다.

[0430] 3. 작용제

[0431] 다양한 실시형태에서, T 세포를 제조하기 위한 방법은 세포에서 PI3K 경로를 조절하는 작용제와 T 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는 미분화되거나 또는 발생적으로 강력한 T 세포를 확장시키는 것이 제공된다. 다양한 실시형태에서, 세포에서 PI3K/AKT/mTOR 경로를 조절하는 작용제와 T 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는 미분화되거나 또는 발생적으로 강력한 T 세포를 확장시키는 T 세포를 제조하기 위한 방법이 제공된다. 세포는 활성화 및 확장 이전, 그 동안, 및/또는 이후에 접촉된다. T 세포 조성물은 그들이 분화의 실질적 증가없이 다수회의 확장을 겪을 수 있도록 충분한 T 세포 역가를 유지한다.

[0432] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "조절하다", "조절인자" 또는 "조절제" 또는 상등하는 용어는 세포 신호전달 경로에서 변화를 유발시키는 작용제의 능력을 의미한다. 조절인자는 경로 성분 양, 활성을 증가시키거나 또는 감소시킬 수 있거나 또는 세포 신호전달 경로의 바람직한 효과 또는 출력을 증가시키거나 또는 감소시킬 수 있다. 일 실시형태에서, 조절인자는 억제제이다. 다른 실시형태에서, 조절인자는 활성화인자이다.

[0433] "작용제"는 PI3K/AKT/mTOR 경로의 조절에 사용되는 화합물, 소형 분자, 예를 들어 소형 유기 분자, 핵산, 폴리펩타이드, 또는 이의 단편, 아이소폼, 변이체, 유사체, 또는 유도체를 의미한다.

[0434] "소형 분자"는 약 5 kD 미만, 약 4 kD 미만, 약 3 kD 미만, 약 2 kD 미만, 약 1 kD 미만, 또는 약 .5kD 미만의 분자량을 갖는 조성물을 의미한다. 소형 분자는 핵산, 펩타이드, 폴리펩타이드, 펩티도모방체, 펩토이드, 탄수화물, 지질, 이의 성분 또는 다른 유기 또는 무기 분자를 포함할 수 있다. 화학적 및/또는 생물학적 혼합물의 라이브러리, 예컨대 진균, 박테리아 또는 조류 추출물이 당분야에 공지되어 있고, 임의의 검정으로 스크리닝될 수 있다. 분자 라이브러리의 합성을 위한 방법의 예를 확인할 수 있다:(Carell *et al.*, 1994a; Carell *et al.*, 1994b; Cho *et al.*, 1993; DeWitt *et al.*, 1993; Gallop *et al.*, 1994; Zuckermann *et al.*, 1994).

[0435] "유사체"는 희망하는 활성을 갖는 화합물, 뉴클레오타이드, 단백질 또는 폴리펩타이드 또는 화합물과 유사하거나 또는 동일한 활성 또는 기능(들)을 보유하지만 바람직한 실시형태의 서열 또는 구조와 유사하거나 또는 동일한 구조 또는 서열을 반드시 포함할 필요는 없는 수형 유기 화합물, 뉴클레오타이드, 단백질 또는 폴리펩타이드를 의미한다.

[0436] "유도체"는 아미노산 잔기 치환, 결실 또는 첨가의 도입으로 변형된 부모 단백질 또는 폴리펩타이드의 아미노산 서열을 포함하는 화합물, 단백질 또는 폴리펩타이드, 또는 뉴클레오타이드 치환 또는 결실, 첨가 또는 돌연변이에 의해 변형된 핵산 또는 뉴클레오타이드를 의미한다. 유도체 핵산, 뉴클레오타이드, 단백질 또는 폴리펩타이드는 부모 폴리펩타이드와 유사하거나 또는 동일한 기능을 보유한다.

[0437] 다양한 실시형태에서, PI3K 경로를 조절하는 작용제는 경로의 성분을 활성화시킨다. "활성인자" 또는 "작용제"는 제한 없이, PI3K의 하나 이상의 활성을 활성화시키는 분자를 포함하여, PI3K/AKT/mTOR 경로의 분자의 하나 이상의 활성을 촉진하거나, 증가시키거나 또는 유도시키는 작용제를 의미한다.

[0438] 다양한 실시형태에서, PI3K 경로를 조절하는 작용제는 경로의 성분을 억제한다. "억제제" 또는 "길항제"는 제한 없이, PI3K의 하나 이상의 활성을 억제하는 분자를 포함하여, PI3K/AKT/mTOR 경로의 분자의 하나 이상의 활성을 억제하거나, 저하시키거나 또는 감소시키는 작용제를 의미한다. 일 실시형태에서, 억제제는 이중 분자 억제제이다. 구체적인 실시형태에서, 억제제는 동일하거나 또는 실질적으로 유사한 활성을 갖는 부류의 분자(범억제제)를 억제할 수 있거나 또는 분자의 활성을 특이적으로 억제할 수 있다(선택적 또는 특이적 억제제). 억제는 또한 비가역적이거나 또는 가역적일 수 있다.

[0439] 일 실시형태에서, 억제제는 적어도 1nM, 적어도 2nM, 적어도 5nM, 적어도 10nM, 적어도 50nM, 적어도 100nM, 적

어도 200nM, 적어도 500nM, 적어도 1 μ M, 적어도 10 μ M, 적어도 50 μ M, 또는 적어도 100 μ M의 IC50을 갖는다. IC50 결정은 당분야에 공지된 임의의 통상의 기술을 사용해서 수행될 수 있다. 예를 들어, IC50은 실험 중인 일정 농도 범위의 억제제 존재에서 소정 효소의 활성을 측정하여 결정할 수 있다. 다음으로 효소 활성의 실험적으로 획득된 값을 사용된 억제제 농도에 대해 그래프화한다. 50% 효소 활성(임의 억제제 부재에서의 활성화 비교하여)을 보이는 억제제의 농도를 "IC50" 값으로 취한다. 유사하게, 다른 억제성 농도는 활성의 적절한 결정을 통해 정의할 수 있다.

[0440] 다양한 실시형태에서, T 세포는 적어도 1nM, 적어도 2nM, 적어도 5nM, 적어도 10nM, 적어도 50nM, 적어도 100nM, 적어도 200nM, 적어도 500nM, 적어도 1 μ M, 적어도 10 μ M, 적어도 50 μ M, 적어도 100 μ M, 또는 적어도 1M의 농도에서 PI3K/AKT/mTOR 경로의 하나 이상의 조절인자와 접촉시키거나 또는 이로 처리되거나 또는 함께 배양된다.

[0441] 구체적인 실시형태에서, T 세포는 적어도 12시간, 18시간, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7일, 적어도 2주, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개월 또는 그 이상 동안 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10회 또는 그 이상의 확장으로 PI3K/AKT/mTOR 경로의 하나 이상의 조절인자와 접촉할 수 있거나, 이로 처리될 수 있거나 또는 배양될 수 있다.

[0442] 라파마이신 경로의 포스포티딜-이노시톨-3 키나제/Akt/포유동물 표적은 세포 증식, 분화, 물질대사, 및 생존과 성장 인자 신호전달을 통합하는 전달자로서 제공된다. PI3K는 고도로 보존된 세포내 지질 키나제의 패밀리아이다. 클래스 IA PI3K는 어댑터 분자의 인슐린 수용체 기질 패밀리아와의 상호작용을 통해 또는 직접적으로, 성장 인자 수용체 티로신 키나제(RTK)에 의해 활성화된다. 이러한 활성화는 세린/트레오닌 키나제 Akt의 조절인자인 포스포티딜-이노시톨-3,4,5-트라이포스페이트(PIP3)의 생성을 유발시킨다. mTOR은 각각 별개 활성을 부여하는 상이한 결합 파트너를 특징으로 하는, 2종의 개별 복합체를 통해 정규 PI3K 경로를 통해서 작용한다. mTORC1(PRAS40, 랩톨, 및 mLST8/GbL과의 복합체로서 mTOR)는 성장 인자 신호와 단백질 전위, 세포 성장, 증식, 및 생존을 연결시키는, PI3K/Akt 신호전달의 하류 효과기로서 작용된다. mTORC2(릭톨, mSIN1, 프로톨, 및 mLST8과의 복합체로서 mTOR)은 Akt의 상류 활성화인자로서 작용한다.

[0443] PI3K의 성장 인자 수용체-매개 활성화 시, Akt는 PIP3과 이의 플렉스트린 상동성 도메인의 상호작용을 통해 구성원에 동원되어서, 이의 활성화 루프가 노출되고 항상적으로 활성화인 포스포이노시타이드-의존적 단백질 키나제 1(PDK1)에 의해 트레오닌 308(Thr308)에서 인산화될 수 있다. 최대 활성화를 위해서, Akt는 또한 이의 C 말단 소수성 모티프의 세린 473(Ser473)에서, mTORC2에 의해 인산화된다. DNA-PK 및 HSP는 또한 Akt 활성화의 조절에서 중요한 것으로 확인되었다. Akt는 mTORC1의 양성 조절인자인, Rheb GTPase를 억제하여 mTORC1을 음성적으로 조절하는, TSC1과 함께, TSC2의 억제성 인산화를 통해 mTORC1을 활성화시킨다. mTORC1은 2개의 충분히 정의된 기질, p70S6K(이하 S6K1이라고 함) 및 4E-BP1을 가지며, 둘 모두 결정적으로 단백질 합성을 조절한다. 따라서, mTORC1은 성장 인자 신호전달을 단백질 전위 및 세포 증식과 연결시키는, PI3K의 중요한 하류 효과기이다.

[0444] a. PI3K 억제제

[0445] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "PI3K 억제제"는 PI3K의 적어도 하나의 활성화에 결합하여 억제하는 핵산, 펩타이드, 화합물, 또는 소형 유기 분자를 의미한다. PI3K 단백질은 3개 클래스로서, 클래스 1 PI3K, 클래스 2 PI3K, 및 클래스 3 PI3K로 분류될 수 있다. 클래스 1 PI3K는 4개 p110 촉매 서브유닛(p110 α , p110 β , p110 δ , 및 p110 γ) 중 하나 및 조절 서브유닛의 2개 패밀리 중 하나로 이루어진 이종이량체로서 존재한다. 구체적인 실시형태에서, PI3K 억제제는 바람직하게 클래스 1 PI3K 억제제를 표적으로 한다. 일 실시형태에서, PI3K 억제제는 클래스 1 PI3K 억제제의 하나 이상의 아이소폼에 대한 선택성(즉, p110 α , p110 β , p110 δ 및 p110 γ 또는 p110 α , p110 β , p110 δ , 및 p110 γ 중 1종에 대한 선택성)을 나타내게 될 것이다. 다른 실시형태에서, PI3K 억제제는 아이소폼 선택성을 나타내지 않을 것이고 "범PI3K 억제제"로서 간주된다. 일 실시형태에서, PI3K 억제제는 ATP와의 결합에 대해 PI3K 촉매 도메인과 경쟁하게 될 것이다.

[0446] 일정 실시형태에서, PI3K 억제제는 예를 들어, PI3K를 비롯하여 PI3K-AKT-mTOR 경로의 추가 단백질을 표적으로 할 수 있다. 구체적인 실시형태에서, mTOR 및 PI3K 둘 모두를 표적으로 하는 PI3K 억제제는 mTOR 억제제 또는 PI3K 억제제라고 할 수 있다. PI3K만을 표적으로 하는 PI3K 억제제는 선택적 PI3K 억제제라고 할 수 있다. 일 실시형태에서, 선택적 PI3K 억제제는 mTOR 및/또는 경로의 다른 단백질에 대한 억제제의 IC50보다 적어도 10배, 적어도 20배, 적어도 30배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 1000배, 또는 그 이상이 낮은 PI3K에 대한 50% 억제성 농도를 나타내는 작용제를 의미하는 것으로 이해할 수 있다.

- [0447] 구체적 실시형태에서, 예시적인 PI3K 억제제는 약 200nM 이하, 바람직하게 약 100 nm 이하, 보다 더 바람직하게 약 60nM 이하, 약 25nM, 약 10nM, 약 5nM, 약 1nM, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 또는 그 이하의 IC50(활성의 50%를 억제하는 농도)으로 PI3K를 억제한다. 일 실시형태에서, PI3K 억제제는 약 2nM 내지 약 100 nm, 보다 바람직하게 약 2nM 내지 약 50nM, 보다 더 바람직하게 약 2nM 내지 약 15nM의 IC50으로 PI3K를 억제한다.
- [0448] 본 명세서에서 고려하는 T 세포 제조 방법에서 사용하기 적합한 PI3K 억제제의 예시적인 예는 제한 없이, BKM120(클래스 1 PI3K 억제제, Novartis), XL147(클래스 1 PI3K 억제제, Exelixis), (범PI3K 억제제, GlaxoSmithKline), 및 PX-866(클래스 1 PI3K 억제제; p110 α , p110 β , 및 p110 γ 아이소폼, Oncothyreone)를 포함한다.
- [0449] 선택적 PI3K 억제제의 다른 예시적인 예는 제한 없이, BYL719, GSK2636771, TGX-221, AS25242, CAL-101, ZSTK474, 및 IPI-145를 포함한다.
- [0450] 범PI3K 억제제의 추가의 예시적인 예는 제한 없이 BEZ235, LY294002, GSK1059615, TG100713, 및 GDC-0941을 포함한다.
- [0451] 바람직한 실시형태에서, PI3K 억제제는 ZSTK474이다.
- [0452] b. AKT 억제제
- [0453] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "AKT 억제제"는 AKT의 적어도 한 활성을 억제하는 핵산, 펩타이드, 화합물, 또는 소형 유기 분자를 의미한다. AKT 억제제는 지질 기반 억제제(예를 들어, 원형질막으로 국재화로부터 AKT를 방지하는 AKT의 플렉스트린 상동성 도메인을 표적으로 하는 억제제), ATP-경쟁적 억제제, 알로스테릭 억제제를 포함하는, 몇몇 클래스로 분류될 수 있다. 일 실시형태에서, AKT 억제제는 AKT 촉매 부위에 결합하여 작용한다. 구체적 실시형태에서, Akt 억제제는 하류 AKT 표적 예컨대 mTOR의 인산화를 억제하여 작용한다. 다른 실시형태에서, AKT 활성은 예를 들어, AKT의 DNA-PK 활성화, AKT의 PDK-1 활성화, 및/또는 Akt의 mTORC2 활성화를 억제하여, Akt를 활성화시키도록 입력 신호를 억제하여 억제된다.
- [0454] AKT 억제제는 모든 3종의 AKT 아이소폼, AKT1, AKT2, AKT3을 표적으로 할 수 있거나 또는 아이소폼 선택적일 수 있고 AKT 아이소폼의 오직 하나 또는 2종만을 표적으로 할 수 있다. 일 실시형태에서, AKT 억제제는 AKT를 비롯하여 PI3K-AKT-mTOR 경로의 추가 단백질을 표적으로 할 수 있다. AKT만을 표적으로 하는 AKT 억제제는 선택적 AKT 억제제라고 할 수 있다. 일 실시형태에서, 선택적 AKT 억제제는 경로의 다른 단백질에 대한 억제제의 IC50 보다 적어도 10배, 적어도 20배, 적어도 30배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 1000배, 또는 그 이상 더 낮은 AKT에 대한 50% 억제성 농도를 나타내는 작용제를 의미하는 것으로 이해할 수 있다.
- [0455] 구체적 실시형태에서, 예시적인 AKT 억제제는 약 200nM 이하, 바람직하게, 약 100 nm 이하, 보다 더 바람직하게 약 60nM 이하, 약 25nM, 약 10nM, 약 5nM, 약 1nM, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 또는 그 이하의 IC50(활성의 50%를 억제하는 농도)로 AKT를 억제한다. 일 실시형태에서, AKT는 약 2nM 내지 약 100 nm, 보다 바람직하게 약 2nM 내지 약 50nM, 보다 더 바람직하게 약 2nM 내지 약 15nM의 IC50으로 AKT를 억제한다.
- [0456] 아우리스타틴 기반 항체-약물 접합체와 조합하여 사용하기 위한 AKT 억제제의 예시적인 예는 예를 들어, 페리포신(Keryx), MK2206(Merck), VQD-002(VioQuest), XL418(Exelixis), GSK690693, GDC-0068, 및 PX316(PROXX Pharmaceuticals)을 포함한다.
- [0457] 선택적 Akt1 억제제의 예시적인, 비제한적인 예는 A-674563이다.
- [0458] 선택적 Akt2 억제제의 예시적인, 비제한적인 예는 CCT128930이다.
- [0459] 구체적 실시형태에서, Akt 억제제 Akt의 DNA-PK 활성화, Akt의 PDK-1 활성화, Akt의 mTORC2 활성화, 또는 Akt의 HSP 활성화.
- [0460] DNA-PK 억제제의 예시적인 예는 제한 없이, NU7441, PI-103, NU7026, PIK-75, 및 PP-121을 포함한다.
- [0461] c. mTOR 억제제
- [0462] 용어 "mTOR 억제제" 또는 "mTOR을 억제하는 작용제"는 mTOR 단백질의 적어도 하나의 활성, 예컨대, 예를 들어, 이의 기질(예를 들어, p70S6 키나제 1, 4E-BP1, AKT/PKB 및 eEF2)에 대한 세린/트레오닌 단백질 키나제 활성을 억제하는 핵산, 펩타이드, 화합물, 또는 소형 유기 분자를 의미한다. mTOR 억제제는 mTORC1, mTORC2 또는

mTORC1 및 mTORC2 둘 모두에 직접 결합하여 억제할 수 있다.

- [0463] mTORC1 및/또는 mTORC2 활성의 억제는 PI3K/Akt/mTOR 경로의 신호 전달의 감소를 통해 결정할 수 있다. 광범위한 관독치를 이용하여 이러한 신호전달 경로의 출력의 감소를 확립할 수 있다. 일부 비제한적인 예시적인 관독치는 (1) 제한 없이 5473 및 T308을 포함하는, 잔기에서 Akt의 인산화 감소; (2) 예를 들어, 제한 없이 FoxO1/3a T24/32, GSK3 α / β ; S21/9, 및 TSC2 T1462를 포함하는, Akt 기질의 인산화의 감소로 입증되는 Akt 활성화의 감소; (3) 제한 없이, 리보솜 S6 S240/244, 70S6K T389, 및 4EBP1 T37/46을 포함하는, mTOR의 하류 신호전달 분자의 인산화 감소; 및 (4) 암성 세포의 증식 억제를 포함한다.
- [0464] 일 실시형태에서, mTOR 억제제는 활성 부위 억제제이다. 이들은 mTOR의 ATP 결합 부위(ATP 결합 포켓이라고도 함)에 결합하여 mTORC1 및 mTORC2 둘 모두의 촉매 활성을 억제하는 mTOR 억제제이다. 본 명세서에서 고려하는 T 세포 제조 방법에서 사용하기 적합한 활성 부위 억제제의 한 클래스는 PI3K 및 mTOR 둘 모두를 표적으로 하여 직접적으로 억제하는 이중 특이성 억제제이다. 이중 특이적 억제제는 mTOR 및 PI3K의 ATP 결합 부위 둘 모두에 결합한다. 이러한 억제제의 예시적인 예는 제한 없이, 이미다조퀴나졸린, 위트만닌, LY294002, PI-103(Cayman Chemical), SF1126(Semafore), BGT226(Novartis), XL765(Exelixis) 및 NVP-BEZ235(Novartis)를 포함한다.
- [0465] 본 명세서에서 고려하는 방법에서 사용하기 적합한 mTOR 활성 부위 억제제의 다른 클래스는 하나 이상의 I형 포스파티딜이노시톨 3-키나제, 예를 들어 PI3 키나제, α , β , γ , 또는 δ 에 비해 mTORC1 및 mTORC2 활성을 선택적으로 억제한다. 이들 활성 부위 억제제는 PI3K가 아닌 mTOR의 활성부위에 결합한다. 이러한 억제제의 예시적인 예는 제한 없이, 피라졸로피리미딘, 토린1(Guertin and Sabatini), PP242(2-(4-아미노-1-아이스프로필-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-3-일)-1H-인돌-5-올), PP30, Ku-0063794, WAY-600(Wyeth), WAY-687(Wyeth), WAY-354(Wyeth), 및 AZD8055(Liu *et al.*, Nature Review, 8, 627-644, 2009)를 포함한다. I
- [0466] 일 실시형태에서, 선택적 mTOR 억제제는 1, 2, 3, 또는 그 이상의 I형 PI3-키나제 또는 모든 I형 PI3 키나제에 대한 억제제의 IC50보다 적어도 10배, 적어도 20배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 1000배, 또는 그 이상이 낮은 mTORC1 및/또는 mTORC2에 대한 50% 억제성 농도(IC50)을 나타내는 작용제를 의미한다.
- [0467] 구체적인 실시형태에서 사용을 위한 mTOR 억제제의 다른 부류는 본 명세서에서 "라파로그"라고 한다. 본 명세서에서 사용 시, 용어 "라파로그"는 mTOR FRB 도메인(FKBP 라파마이신 결합 도메인)에 특이적으로 결합하고, 라파마이신과 구조적으로 관련있으며, mTOR 억제 특성을 보유하는 화합물을 의미한다. 용어 라파로그는 라파마이신은 배제한다. 용어 라파로그는 라파마이신의 에스테르, 에테르, 옥심, 하이드라존, 및 하이드록실아민을 비롯하여, 라파마이신 코어 구조 상의 작용기가 예를 들어 산화 또는 환원에 의해 변형된 화합물을 의미한다. 이러한 화합물의 약학적으로 허용가능한 염이 또한 라파마이신 유도체라고 간주된다. 본 명세서에서 고려되는 방법에서 사용하기 적합한 라파로그의 예시적인 예는 제한 없이, 템시롤리무스(CC1779), 에버롤리무스(RAD001), 데포롤리무스(AP23573), AZD8055(AstraZeneca), 및 OSI-027(OSI)을 포함한다.
- [0468] 일 실시형태에서, 작용제는 mTOR 억제제 라파마이신(시롤리무스)이다.
- [0469] 구체적인 실시형태에서, 예시적인 mTOR 억제제는 mTORC1, mTORC2 또는 mTORC1 및 mTORC2 둘 모두를 약 200nM 이하, 바람직하게 약 100 nm 이하, 보다 더 바람직하게 약 60nM 이하, 약 25nM, 약 10nM, 약 5nM, 약 1nM, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 또는 그 이하의 IC50(활성의 50%를 억제하는 농도)로 억제한다. 일 실시형태에서, mTOR 억제제는 mTORC1, mTORC2 또는 mTORC1 및 mTORC2 둘 모두를 약 2nM 내지 약 100 nm, 보다 바람직하게 약 2nM 내지 약 50nM, 보다 더 바람직하게 약 2nM 내지 약 15nM의 IC50으로 억제한다.
- [0470] 일 실시형태에서, 예시적인 mTOR 억제제는 PI3K 및 mTORC1 또는 mTORC2 또는 mTORC1 및 mTORC2 및 PI3K 모두를 약 200nM 이하, 바람직하게 약 100 nm 이하, 보다 더 바람직하게 약 60nM 이하, 약 25nM, 약 10nM, 약 5nM, 약 1nM, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 또는 그 이하의 IC50(활성의 50%를 억제하는 농도)로 억제한다. 일 실시형태에서, mTOR 억제제는 PI3K 및 mTORC1 또는 mTORC2 또는 mTORC1 및 mTORC2 및 PI3K 모두를 약 2nM 내지 약 100 nm, 보다 바람직하게 약 2nM 내지 약 50nM, 보다 더 바람직하게 약 2nM 내지 약 15nM의 IC50으로 억제한다.
- [0471] 구체적인 실시형태에서 사용하기 위한 mTOR 억제제의 추가의 예시적인 예는 제한 없이, AZD8055, INK128, 라파마이신, PF-04691502, 및 에버롤리무스를 포함한다.
- [0472] mTOR은 웨스턴 블롯팅에서 포스포-특이적 항체로 측정시 생리적 기질 단백질, p70 S6 리보솜 단백질 키나제 I(p70S6K1) 및 eIF4E 결합 단백질 1(4EBP1)에 대해 강건하고 특이적인 촉매 활성을 입증한 것으로 확인되었다.

- [0473] 일 실시형태에서, PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제는 BI-D1870, H89, PF-4708671, FMK, 및 AT7867로 이루어진 군으로부터 선택되는 s6 키나제 억제제이다.
- [0474] **I. 조성물 및 제제**
- [0475] 본 명세서에서 고려하는 조성물은 본 명세서에서 고려하는 바와 같은, 하나 이상의 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드, 이를 포함하는 벡터, 유전자 변형된 면역 효과기 세포 등을 포함할 수 있다. 조성물은 제한 없이 약학 조성물을 포함한다. "약학 조성물"은 단독으로, 또는 하나 이상의 다른 요법 양식과 조합하여 세포 또는 동물에게 투여를 위한 약학적으로 허용될 수 있거나 또는 생리적으로 허용될 수 있는 용액으로 제제화된 조성물을 의미한다. 바람직하다면, 조성물은 다른 작용제, 예컨대 예를 들어 사이토카인, 성장 인자, 호르몬, 소형 분자, 화학요법제, 프로드러그, 약물, 항생제 또는 다른 다양한 약학적 활성제와 조합하여 투여될 수 있다. 실제로 추가 작용제가 의도하는 요법을 전달하는 조성물의 능력에 부정적으로 영향을 미치지 않는다면, 조성물에 포함될 수도 있는 다른 성분에 제한은 없다.
- [0476] 용어 "약학적으로 허용가능한"은 건전한 의학적 판단 범위 내에서, 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응, 또는 다른 문제 또는 합병증없이 인간 및 동물의 조직과 접촉하기에 적합하고, 타당한 유익/위험 비율과 적합한, 화합물, 재료, 조성물, 및/또는 제형을 의미하기 위해 본 명세서에서 적용된다.
- [0477] 본 명세서에서 사용 시, "약학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제"는 인간 또는 가축에서 사용이 허용될 수 있다고 미국 식품 의약청이 승인한, 제한 없이, 임의의 보조제, 담체, 부형제, 활택제, 감미제, 희석제, 보존제, 염료/착색제, 풍미 향상제, 계면활성제, 습윤제, 분산제, 현탁제, 안정화제, 등장화제, 용매, 계면활성제, 또는 유화제를 포함한다. 예시적인 약학적으로 허용가능한 담체는 제한 없이, 당류, 예컨대 락토스, 포도당, 수크로스; 전분, 예컨대 옥수수 전분 및 감자 전분; 셀룰로스, 및 그의 유도체, 예컨대 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스 및 셀룰로스 아세테이트; 트라가칸트; 맥아; 젤라틴; 탈크; 코코아 버터, 왁스, 동물성 및 식물성 지방, 파라핀, 실리콘, 벤토나이트, 실리산, 산화 아연; 오일, 예컨대 땅콩유, 면실유, 홍화유, 참깨유, 올리브유, 옥수수유 및 대두유; 글리콜, 예컨대 프로필렌 글리콜; 폴리올, 예컨대 글리세린, 솔비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜; 에테르, 예컨대 에틸 올레에이트 및 에틸 라우레이트; 한천; 완충제, 예컨대 수산화마그네슘 및 수산화알루미늄; 알긴산; 발열원 무함유 물; 등장성 염수; 링거액; 에틸 알코올; 포스페이트 완충 용액; 및 약학 제제에 적용되는 임의의 다른 적합한 물질을 포함한다.
- [0478] 구체적인 실시형태에서, 조성물은 본 명세서에서 고려하는 CAR 발현 면역 효과기 세포의 양을 포함한다. 본 명세서에서 사용 시, 용어 "양"은 임상 결과를 포함하여 유익하거나 또는 바람직한 예방적 또는 치료적 결과를 획득하기 위한 유전자 변형된 치료적 세포, 예를 들어 T 세포의 "효과적인 양" 또는 "유효량"을 의미한다.
- [0479] "예시적인 유효량"은 바람직한 예방적 결과를 획득하는데 효과적인 유전자 변형된 치료적 세포의 양을 의미한다. 전형적이지만 필수적이지는 않게, 예방적 용량은 질환의 초기 단계 이전 또는 초기 단계에 사용되므로, 예방적 유효량은 치료적 유효량 미만이다.
- [0480] 유전자 변형된 치료적 세포의 "치료적 유효량"은 인자들 예컨대 개체의 질환 상태, 연령, 성별, 및 체중, 및 개체에서 바람직한 반응을 유발시키는 줄기 및 전구 세포의 능력에 따라서 가변적일 수 있다. 치료적 유효량은 또한 바이러스 또는 형질도입된 치료적 세포의 임의의 독성 또는 유해한 효과를 치료적으로 유의한 효과가 능가하는 것이다. 용어 "치료적 유효량"은 대상체(예를 들어, 환자)를 "치료하는"데 효과적인 양을 포함한다. 치료적 양이 표시된 경우, 투여되는 조성물의 정확한 양은 환자(대상체)의 연령, 체중, 종양 크기, 감염 또는 전이 정도, 및 상태의 개별적 차이를 고려하여 의사가 결정할 수 있다. 본 명세서에 기술된 T 세포를 포함하는 약학 조성물은 이 범위내의 모든 정수값을 포함하여, 체중 기준으로 10^2 내지 10^{10} 세포/kg, 바람직하게 체중 기준으로 10^5 내지 10^6 세포/kg의 용량으로 투여될 수 있다고 일반적으로 명시할 수 있다. 세포의 수는 조성물이 그에 포함된 세포의 유형에 따라 의도하는 최종 용도에 따라 좌우될 것이다. 본 명세서에서 제공되는 용도의 경우, 세포는 일반적으로 1 리터 이하의 부피이고, 500 mL 이하, 심지어 250 mL 또는 100 mL 이하일 수 있다. 따라서, 바람직한 세포의 밀도는 전형적으로 10^6 세포/mL 초과이고 일반적으로 10^7 세포/mL 초과, 일반적으로 10^8 세포/mL 이상이다. 임상적으로 관련된 수의 면역 세포는 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 또는 10^{12} 세포와 점증적으로 동일하거나 또는 초과하는 다수 주입으로 분배될 수 있다. 일부 실시형태에서, 구체적으로 모든 주입되는 세포는 구체적인 표적 항원에 대해 재지정될 것이므로, 10^6 /킬로그램(환자 당 10^6 - 10^{11}) 범위의 낮은 세포수가 투여될 수 있다. CAR 발현 세포 조성물은 이들 범위내의 용량으로 다수 회 투여될 수 있다. 세포는 요

법을 겪는 환자에 대해 동종이계, 동계, 이종발생, 또는 자기유래일 수 있다. 바람직하다면, 치료는 또한 면역 반응의 유도를 향상시키기 위해 본 명세서에 기술된 바와 같이 미토겐(예를 들어, PHA) 또는 림포카인, 사이토카인, 및/또는 케모카인(예를 들어, IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF-알파, IL-18, 및 TNF-베타, GM-CSF, IL-4, IL-13, Flt3-L, RANTES, MIP1 α 등)의 투여를 포함할 수 있다.

[0481] 일반적으로, 본 명세서에 기술된 바와 같이 활성화되고 확장된 세포를 포함하는 조성물은 면역약화된 개체에서 발생하는 질환의 치료 및 예방에 이용될 수 있다. 구체적으로, 본 명세서에서 고려하는 CAR 변형된 T 세포를 포함하는 조성물은 암의 치료에 사용된다. 구체적인 실시형태에서, CAR-변형된 T 세포는 단독으로, 또는 담체, 희석제, 부형제, 및/또는 다른 성분 예컨대 IL-2 또는 다른 사이토카인 또는 세포 개체군과 조합한 약학 조성물로서 투여될 수 있다. 구체적인 실시형태에서, 약학 조성물은 1종 이상의 약학적으로 또는 생리적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제와 조합하여, 유전자 변형된 T 세포의 양을 포함한다.

[0482] CAR-발현 면역 효과기 세포 개체군, 예컨대 T 세포를 포함하는 약학 조성물은 완충제 예컨대 중성 완충 염수, 포스페이트 완충 염수 등; 탄수화물 예컨대 포도당, 만노스, 수크로스 또는 텍스트란, 만니톨; 단백질; 폴리펩타이드 또는 아미노산 예컨대 글리신; 항산화제; 킬레이트화제 예컨대 EDTA 또는 글루타티온; 보조제(예를 들어, 수산화알루미늄); 및 보존제를 포함할 수 있다. 구체적인 실시형태에서, 조성물은 바람직하게 비경구 투여, 예를 들어, 혈관내(정맥내 또는 동맥내), 복강내 또는 근육내 투여를 위해 제제화된다.

[0483] 그들이 용액, 현탁액 또는 다른 유사 형태이건 무관하게, 액상 약학 조성물은 다음 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 멸균 희석제 예컨대 주사용 수, 염수 용액, 바람직하게 생리적 염수, 링거액, 등장성 염화나트륨 고정염 예컨대 용매 또는 현탁 매질로서 제공될 수 있는 합성 모노글리세라이드 또는 다이글리세라이드, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 다른 용매; 항박테리아제 예컨대 벤질 알코올 또는 메틸 파라벤; 항산화제 예컨대 아스코르브산 또는 아황산나트륨; 킬레이트화제 예컨대 에틸렌다이아민테트라아세트산; 완충제 예컨대 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트 및 등장성 조정용 작용제 예컨대 염화나트륨 또는 텍스트로스. 비경구 조제물은 앰플, 1회용 시린지 또는 유리 또는 플라스틱으로 제조된 다수 용량 바이알에 내장될 수 있다. 주사가 가능한 약학 조성물은 바람직하게 멸균된다.

[0484] 일 실시형태에서, 본 명세서에서 고려되는 T 세포 조성물은 약학적으로 허용가능한 세포 배양 배지에 제제화된다. 이러한 조성물은 인간 대상체에 투여를 위해 적합하다. 구체적인 실시형태에서, 약학적으로 허용가능한 세포 배양 배지는 혈청 무함유 배지이다.

[0485] 혈청 무함유 배지는 단순하고 보다 정의된 조성, 감소된 오염도, 감염체의 잠재적인 공급원의 감소, 및 저비용을 포함하여, 혈청 함유 배지에 비해 몇몇 장점을 갖는다. 다양한 실시형태에서, 혈청 무함유 배지는 동물 무함유이고, 경우에 따라 단백질 무함유일 수 있다. 경우에 따라, 배지는 생물약학적으로 허용가능한 재조합 단백질을 함유할 수 있다. "동물 무함유" 배지는 비동물 공급원에서 성분이 유도된 배지를 의미한다. 재조합 단백질이 동물 무함유 배지에서 천연 동물 단백질을 대체하고, 영양분은 합성, 식물 또는 미생물 공급원으로부터 획득한다. 대조적으로, "단백질 무함유" 배지는 단백질이 실질적으로 없는 것으로 정의된다.

[0486] 구체적인 조성물에 사용되는 혈청 무함유 배지의 예시적인 예는 제한 없이, QBSF-60(Quality Biological, Inc.), StemPro-34(Life Technologies), 및 X-VIVO 10을 포함한다.

[0487] 바람직한 일 실시형태에서, 본 명세서에서 고려하는 T 세포를 포함하는 조성물은 플라스마라이트(PlasmaLyte) A를 포함하는 용액으로 제제화된다.

[0488] 다른 바람직한 실시형태에서, 본 명세서에서 고려되는 T 세포를 포함하는 조성물은 저온보존 배지를 포함하는 용액으로 제제화된다. 예를 들어, 저온보존제가 있는 저온보존 배지는 해동 후 높은 세포 생존능 결과를 유지시키는데 사용될 수 있다. 구체적인 조성물에 사용되는 저온보존 배지의 예시적인 예는 제한 없이, 크리오스톨(CryoStor) CS10, 크리오스톨 CS5, 및 크리오스톨 CS2를 포함한다.

[0489] 보다 바람직한 실시형태에서, 본 명세서에서 고려되는 T 세포를 포함하는 조성물은 50:50 플라스마라이트 A 대 크리오스톨 CS10을 포함하는 용액으로 제제화된다.

[0490] 구체적인 실시형태에서, 조성물은 단독으로 또는 하나 이상의 치료제와 조합하여 CAR 발현 면역 효과기 세포의 유효량을 포함한다. 따라서, CAR-발현 면역 효과기 세포 조성물은 단독으로 또는 다른 기지의 암 치료, 예컨대 방사선 요법, 화학요법, 이식, 면역요법, 호르몬 요법, 광역학 요법 등과 조합하여 투여될 수 있다. 조성물은 또한 항생제와 조합하여 투여될 수 있다. 이러한 치료제는 본 명세서에서 기술되는 구체적인 질환 상태, 예컨대 구체적인 암의 표준 치료로서 당분야에서 허용될 수 있다. 본 명세서에서 고려되는 예시적인 치료제는 사이토카

인, 성장인자, 스테로이드, NSAID, DMARD, 항염증제, 화학요법제, 방사선요법제, 치료적 항체, 또는 다른 활성 및 보조제를 포함한다.

[0491] 일정 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 CAR 발현 면역 효과기 세포를 포함하는 조성물은 임의의 수의 화학요법제와 함께 투여될 수 있다. 화학요법제의 예시적인 예는 알킬화제 예컨대 티오페타 및 사이클로포스파마이드(사이톡산(CYTOXAN)(상표명)); 알킬 설포네이트 예컨대 부실판, 임프로실판 및 피포실판; 아지리딘 예컨대 벤조도파, 카보퀴온, 메투레도파, 및 우레도파; 알트레타민, 트라이에틸렌멜라민, 트라이에틸렌포스포라마이드, 트라이에틸렌티오포스포라마이드 및 트라이메틸올로멜라민 레즘을 포함한 에틸렌이민 및 메틸라멜라민; 질소 머스타드 예컨대 클로람부실, 클로르나파진, 콜로포스파마이드, 에스트라무스틴, 이포스파마이드, 메클로레타민, 메클로레타민 산화물 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노벤펜, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파마이드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아 예컨대 칼무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 라니무스틴; 항생제 예컨대 아클라시노마이신, 악티노마이신, 오프라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 칼리케아미신, 카라비신, 칼미노마이신, 칼지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루미신, 6-다이아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신, 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 말셀로마이신, 미토마이신, 마이코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 켈라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투버시딘, 우버니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항대사산물 예컨대 메토평렉세이트 및 5-플루오로우라실(5-FU); 폴산 유사체 예컨대 데놈테린, 메토평렉세이트, 프테롭테린, 트라이메토평렉세이트; 푸린 유사체 예컨대 플루다라빈, 6-머캅토평린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 칼모푸어, 시타라빈, 다이데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘, 5-FU; 안드로겐 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤; 항부신제 예컨대 아미노글루테티마이드, 미토탄, 트라이로스탄; 폴산 보충제 예컨대 프로린산; 아세그락톤; 알도포스파마이드 글리코사이드; 아미노레볼린산; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트렉세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지퀴온; 엘폴미틴; 엘립티늄 아세테이트; 에토글루시드; 갈륨 나이트레이트; 하이드록시우레아; 레티난; 로니다민; 미토구아존; 미톡산트론; 모피다몰; 니트라크린; 펜토스타틴; 페나멧; 피라루비신; 포도필산; 2-에틸하이드라자이드; 프로카바진; PSK(등록상표); 라족산; 시조피란; 스피로게르마늄; 테뉴아존산; 트리아지퀴온; 2,2',2"-트라이클로로트라이에틸아민; 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노사이드("Ara-C"); 사이클로포스파마이드; 티오페타; 탁소이드, 예를 들어 팍클리탁셀(탁솔(TAXOL)(등록상표), Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) 및 도세탁셀(탁소테르(TAXOTERE)(등록상표), Rhne-Poulenc Rorer, Antony, France); 클로람부실; 켈시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토평린; 메토평렉세이트; 플레티늄 유사체 예컨대 시스플라틴 및 카보플라틴; 빈블라스틴; 플레티늄; 에토평사이드(VP-16); 이포스파마이드; 미토마이신 C; 미톡산트론; 빈크리스틴; 비노렐빈; 나벨빈; 노반트론; 테니포사이드; 다우노마이신; 아미노테린; 셀로다; 이반드로네이트; CPT-11; 토평아이소머라제 억제제 RFS 2000; 다이플루오로메틸로미틴(DMFO); 레티난 유도체 예컨대 타르그레틴(Targretin)(상표명)(백사로텐), 판레틴(Panretin)(상표명)(알리트레티노인); 온탁(ONTAK)(상표명)(데니류킨 디프티톡스); 에스프라미신; 카페시타빈; 및 상기 임의의 약학적으로 허용가능한 염, 산 또는 유도체를 포함한다. 또한 이 정의에 암에 대한 호르몬 작용을 조절하거나 또는 억제하도록 작용하는 항호르몬제 예컨대 예를 들어 타목시펜, 탈록시펜, 아로마타제 억제제 4(5)-이미다졸, 4-하이드록시타목시펜, 트리아옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤, 및 토레미펜(파레스톤)을 포함하는 항에스트로겐제; 및 항안드로겐제 예컨대 플루타마이드, 닐루타마이드, 바이칼루타마이드, 류프롤라이드, 및 고세렐린; 및 상기 임의의 약학적으로 허용가능한 염, 산 또는 유도체가 포함된다.

[0492] 다양한 다른 치료제가 본 명세서에 기술된 조성물과 함께 사용될 수 있다. 일 실시형태에서, CAR-발현 면역 효과기 세포를 포함하는 조성물은 항염증제와 함께 투여된다. 항염증제 또는 약물은 제한 없이, 스테로이드 및 글루코코르티코이드(베타메타손, 부테소나이드, 텍사메타손, 하이드로코르티손 아세테이트, 하이드로코르티손, 메틸프레드니솔론, 프레드니솔론, 프레드니손, 트라이아미놀론 포함), 아스피린, 이부프로펜, 나프록센, 메토평렉세이트, 셀파살라진, 레플루노마이드, 항-TNF 약물, 사이클로포스파마이드 및 마이코페놀레이트를 포함하는 비스테로이드 항염증 약물(NSAIDS)을 포함한다.

[0493] 다른 예시적인 NSAID는 이부프로펜, 나프록센, 나프록센 나트륨, Cox-2 억제제 예컨대 비옥스(VIOXX)(등록상표)(로페콕시) 및 셀레브렉스(CELEBREX)(등록상표)(셀레콕시), 및 시알릴레이트로 이루어진 군으로부터 선택된다. 예시적인 진통제는 아세트아미노펜, 옥시코돈, 프로폭시펜 하이드로클로라이드의 트라마돌로 이루어진 군으로부터 선택된다. 예시적인 글루코코르티코이드는 코르티손, 텍사메타손, 하이드로코르티손, 메틸프레드니솔론, 프레드니솔론, 또는 프레드니손으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 예시적인 생물학적 반응 변형제는 세포 표면 마커(예를 들어, CD4, CD5 등), 사이토카인 억제제, 예컨대 TNF 길항제(예를 들어, 에타너셉트(엔브렐

(ENBREL)(등록상표)), 아달리무맙(휴미라(HUMIRA)(등록상표)) 및 인플릭시맙(레미케이트(REMICADE)(등록상표)), 케모카인 억제제 및 부착 분자 억제제에 대항하는 분자를 포함한다. 생물학적 반응 변형체는 단일클론 항체를 비롯하여 분자의 재조합 형태를 포함한다. 예시적인 DMARD는 아자티오프린, 사이클로포스파마이드, 사이클로스포린, 메토틱렉세이트, 페니실라민, 레플루노마이드, 설파살라진, 하이드록시클로로퀸, 금(경구(아우라노핀) 및 근육내) 및 미노사이클린을 포함한다.

[0494] 본 명세서에서 고려하는 CAR 변형된 T 세포와 조합하는데 적합한 치료적 항체의 예시적인 예는 제한 없이, 바비투시맙, 베바시주맙(아바스틴), 비바투주맙, 블리나투모맙, 코나투무맙, 다라투무맙, 돌리고투맙, 다세투주맙, 달로투주맙, 엘로투주맙(HuLuc63), 켈투주맙, 이브리투모맙, 인다투시맙, 이노투주맙, 볼보투주맙, 루카투무맙, 밀라투주맙, 목세투모맙, 오카라투주맙, 오파투무맙, 리투시맙, 실투시맙, 테프로투무맙, 및 우블리투시맙을 포함한다.

[0495] 일정 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 조성물은 사이토카인과 함께 투여된다. 본 명세서에서 사용시 "사이토카인"이란, 세포간 매개인자로서 다른 세포에 대해 작용하는 한 세포 개체군에 의해 방출된 단백질에 대한 일반 용어를 의미한다. 이러한 사이토카인의 예에는 림포카인, 모노카인, 및 전통적인 폴리펩타이드 호르몬이다. 사이토카인에는 성장 호르몬 예컨대 인간 성장 호르몬, N-메티오닐 인간 성장 호르몬, 및 소 성장 호르몬; 부갑상선 호르몬; 티록신; 인슐린; 프로인슐린; 렐락신; 프로렐락신; 당단백질 호르몬 예컨대 여포성 자극 호르몬(FSH), 갑상선 자극 호르몬(TSH), 및 루테인화 호르몬(LH); 간 성장 인자; 섬유아세포 성장 인자; 프로락틴; 태반성 락토겐; 종양 괴사 인자 알파 및 베타; 필러 억제 물질; 마우스 고나도트로핀 연관 펩타이드; 인히빈; 액티빈; 혈관 내피 성장 인자; 인테그린; 트롬보포이에틴(TPO); 신경 성장 인자 예컨대 NGF-베타; 혈소판 성장 인자; 형질전환 성장 인자(TGF) 예컨대 TGF-알파 및 TGF-베타; 인슐린 유사 성장 인자 I 및 II; 에리트로포이에틴(EPO); 골유도성 인자; 인터페론 예컨대 인터페론 알파, 베타 및 감마; 콜로니 자극 인자(CSF) 예컨대 마크로파지-CSF(M-CSF); 과립구-마크로파지-CSF(GM-CSF); 및 과립구-CSF(G-CSF); 인터루킨(IL) 예컨대 IL-1, IL-1알파, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, 종양 괴사 인자 예컨대 TNF-알파 또는 TNF-베타; 및 LIF 및 kit 리간드(KL)를 포함하는 다른 폴리펩타이드 인자가 포함된다. 본 명세서에서 사용 시, 용어 사이토카인은 천연 공급원 또는 재조합 세포 배양 유래의 단백질, 및 천연 서열 사이토카인의 생물학적 활성 균등물을 포함한다.

[0496] 구체적인 실시형태에서, 조성물은 본 명세서에 개시된 바와 같이 PI3K 억제제 존재에서 배양되고 다음의 마커 중 하나 이상을 발현하며 양성 또는 음성 선별 기술로 더욱 단리될 수 있는 본 명세서에서 고려하는 CAR T 세포를 포함한다: CD3, CD4, CD8, CD27, CD28, CD45RA, CD45RO, CD62L, CD127, 및 HLA-DR. 일 실시형태에서, 조성물은 i) CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122, CD127, CD197; ii) CD62L, CD127, CD197, CD38; 및 iii) CD62L, CD27, CD127, 및 CD8로 이루어진 군으로부터 선택되는 마커 중 1 종 이상을 발현하고, 양성 또는 음성 선별 기술에 의해 더욱 단리되는, T 세포의 특이적 하위개체군을 포함한다. 다양한 실시형태에서, 조성물은 다음의 마커 중 하나 이상을 발현하지 않거나 또는 실질적으로 발현하지 않는다: CD57, CD244, CD160, PD-1, CTLA4, TIM3, 및 LAG3.

[0497] 일 실시형태에서, CD62L, CD127, CD197, 및 CD38로 이루어진 군으로부터 선택되는 마커의 하나 이상의 발현은 PI3K 억제제 없이 활성화되고 확장된 T 세포의 개체군과 비교하여 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 적어도 10배, 적어도 25배, 또는 그 이상이 증가된다.

[0498] 일 실시형태에서, CD62L, CD127, CD27, 및 CD8로 이루어진 군으로부터 선택되는 마커의 하나 이상의 발현은 PI3K 억제제 없이 활성화되고 확장된 T 세포의 개체군과 비교하여 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 적어도 10배, 적어도 25배, 또는 그 이상이 증가된다.

[0499] 일 실시형태에서, CD57, CD244, CD160, PD-1, CTLA4, TIM3, 및 LAG3으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마커의 발현은 PI3K 억제제로 활성화되고 확대된 T 세포의 개체군과 비교하여 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 적어도 10배, 적어도 25배, 또는 그 이상 감소된다.

[0500] J. 표적 세포 및 항원

[0501] 유전자 변형된 면역 효과기 세포는 표적 세포, 예를 들어 암 세포로 재지정되었고, 표적 세포 상에서 STn 발현

당단백질, 예를 들어 TAG-72에 결합하는 결합 도메인을 갖는 CAR을 포함한다.

- [0502] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "암"은 일반적으로 비정상 세포가 제어되지 않고 분열되어 근처 세포를 침입할 수 있는 질환 또는 병태의 부류를 의미한다.
- [0503] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "악성"은 종양 세포군이 비제어적인 성장(즉, 정상 한계 이상의 분열), 침입(즉, 인접한 조직에 침범 및 파괴), 및 전이(즉, 림프 또는 혈액을 통해 신체의 다른 위치로 확산) 중 하나 이상을 나타내는 암을 의미한다. 본 명세서에서 사용 시, 용어 "전이하다"는 신체의 한 부분에서 다른 부분으로 암의 확산을 의미한다. 확산된 세포에 의해 형성된 종양은 "전이성 종양" 또는 "전이"라고 한다. 전이성 종양은 본래(원발성) 종양의 것과 유사한 세포를 함유한다.
- [0504] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "양성" 또는 "비악성"은 보다 크게 성장할 수 있지만 신체의 다른 부분으로 확산되지 않는 종양을 의미한다. 양성 종양은 자가 제한적이고 전형적으로 침입하거나 또는 전이하지 않는다.
- [0505] "암 세포"는 암성 성장 또는 조직의 개별 세포를 의미한다. 암 세포는 고형암 및 액상암 둘 모두를 포함한다. "종양" 또는 "종양 세포"는 일반적으로 양성, 전악성 또는 악성일 수 있는 세포의 비정상적인 성장으로 형성된 팽윤 또는 병변을 의미한다. 대부분의 암은 종양을 형성하지만, 액상암, 예를 들어 백혈병은 반드시 종양을 형성하지는 않는다. 종양을 형성하는 암의 경우, 용어 암(세포) 및 종양(세포)는 상호교환적으로 사용된다. 개체에서 종양의 양은 종양의 수, 부피, 또는 무게로서 측정할 수 있는 "종양 부하량"이다.
- [0506] 일 실시형태에서, 표적 세포는 항원, 예를 들어 다른 정상(바람직한) 세포의 표면 상에서 실질적으로 존재하지 않는 표적 상원을 발현한다.
- [0507] 일 실시형태에서, 표적 세포는 뼈 세포, 골세포, 골아세포, 지방 세포, 연골세포, 연골아세포, 근육 세포, 골격근 세포, 근아세포, 근세포, 평활근 세포, 방광 세포, 골수 세포, 중추 신경계(CNS) 세포, 말초 신경계(PNS) 세포, 교질 세포, 성상세포, 뉴런, 색소 세포, 상피 세포, 피부 세포, 내피 세포, 혈관 내피 세포, 유방 세포, 결장 세포, 식도 세포, 위장 세포, 위 세포, 결장 세포, 머리 세포, 목 세포, 잇몸 세포, 혀 세포, 신장 세포, 간 세포, 폐 세포, 인두 세포, 난소 세포, 여포 세포, 자궁경부 세포, 질 세포, 자궁 세포, 췌장 세포, 췌장 실질 세포, 췌장 관 세포, 췌장 도세포, 전립선 세포, 음경 세포, 고환 세포, 생식선 세포, 고환 세포, 조혈 세포, 림프계 세포, 또는 골수계 세포를 포함한다.
- [0508] 일 실시형태에서, 표적 세포는 STn 발현 당단백질을 발현한다. 일 실시형태에서, 표적 세포는 조혈 세포, 식도 세포, 폐 세포, 난소 세포, 경부 세포, 췌장 세포, 담낭 또는 담도의 세포, 위 세포, 결장 세포, 유방 세포, 배상 세포, 장세포, 줄기 세포, 내피 세포, 상피 세포, 또는 당에피토프, 예를 들어 ST6GALNAC1를 발현하는 임의의 세포를 포함한다.
- [0509] 일정 실시형태에서, 표적 세포는 소화관(예를 들어, 식도, 위, 결장)의 내막 일부, 유방 조직, 폐 조직, 결장 조직, 췌장 조직, 담낭 또는 담도 조직, 난소 조직, 경부 조직, 방광 조직, 신장 조직 또는 상피 조직이다.
- [0510] 구체적인 실시형태에서, 표적 세포는 STn 발현 당단백질을 발현하는 암 세포 또는 암 줄기 세포이다.
- [0511] 일 실시형태에서, 표적 세포는 STn 발현 당단백질을 발현하는 고형 암 세포이다.
- [0512] 구체적인 실시형태에서 고려하는 조성물 및 방법으로 표적화할 수 있는 세포의 예시적인 예는 제한 없이, 다음의 고형암의 것들을 포함한다: 부신 암, 부신피질 암종, 향문암, 맹장암, 성상세포종, 비정형 유기형/간상 종양, 기저 세포 암종, 담관암, 방광암, 골암, 뇌/CNS 암, 유방암, 기관지 종양, 심장 종양, 자궁경부암, 담관 암종, 연골육종, 척색종, 결장암, 직결장암, 두개인두종, 유관상피내 암종(DCIS) 자궁내막암, 상의세포종, 식도 암, 감각신경모세포종, 유잉 육종, 두개의 배세포 종양, 생식선의 배세포 종양, 안암, 나팔관암, 섬유성 조직육종, 섬유육종, 담낭암, 위암, 위장 유암종, 위장 기질 종양(GIST), 배세포 종양, 신경교종, 교모세포종, 두경부 암, 혈관모세포종, 간세포암, 하인두암, 안구내 흑색종, 카포시 육종, 신장암, 후두암, 평활근육종, 입술암, 지방육종, 간암, 폐암, 비소세포 폐암, 폐 유암종, 악성 중피종, 수질 암종, 수모세포종, 뇌수막종, 흑색종, 메르켈 세포 암종, 미드라인 트랙 암종, 입암, 점액육종, 골수이형성증후군, 골수증식성 신생물, 비강 및 부비강 암, 비인두암, 신경아세포종, 핍돌기신경교종, 경구암, 구강암, 구강인두암, 골육종, 난소암, 췌장암, 췌장 도 세포 종양, 유두상 암종, 부신경절종, 부갑상선암, 음경암, 인두암, 갈색세포종, 송과체종, 뇌하수체 종양, 흉막폐 모세포종, 원발성 복막암, 전립선암, 직장암, 망막모세포종, 신장 세포 암종, 신우 및 수뇨관 암, 횡문근 육종, 타액선암, 피지선 암종, 피부암, 연조직 육종, 편평 세포 암종, 소세포 폐암, 소장암, 위암, 땀샘 암종, 활막종, 고환암, 인후암, 흉선암, 갑상선암, 요도암, 자궁암, 자궁 육종, 질암, 혈관암, 외음부암, 및 빌름스

종양.

- [0513] 다른 실시형태에서, 세포는 STn-발현 당단백질을 발현하는 고휘 암 세포이다. 조성물로 예방하거나, 치료하거나, 또는 호전시킬 수 있는 예시적인 STn 발현 고휘 암 세포는 제한 없이, 식도암, 폐암, 난소암, 자궁 경부암, 췌장암, 담관암종, 위암, 결장암, 방광암, 신장암, 및 유방암을 포함한다.
- [0514] 구체적인 실시형태에서, 표적 세포는 STn-발현 당단백질을 발현하는 액상암 또는 혈액학적 암 세포이다.
- [0515] 구체적인 실시형태에서 고려되는 조성물로 예방하거나, 치료하거나, 또는 호전될 수 있는 액상암 또는 혈액학적 암의 예시적인 예는 제한 없이, 백혈병, 림프종, 및 다발성 골수종을 포함한다.
- [0516] 구체적인 실시형태에서 고려되는 항-STN CAR에 의해 표적화될 수 있는 세포의 예시적인 예는 제한 없이, 다음의 백혈병의 것을 포함한다: 급성 림프성 백혈병(ALL), T 세포 급성 림프아구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병(AML), 골수아구성, 전골수구성, 골수단핵구성, 단핵구성, 적백혈병, 모발상 세포 백혈병(HCL), 만성 림프성 백혈병(CLL), 및 만성 골수성 백혈병(CML), 만성 골수단핵구성 백혈병(CMML) 및 진성적혈구 증가증.
- [0517] 구체적인 실시형태에서 고려되는 조성물 및 방법으로 표적화될 수 있는 세포의 예시적인 예는 제한 없이, 다음의 림프종의 것을 포함한다: 호지킨 림프종, 결절성 림프구-우세형 호지킨 림프종 및 제한 없이 B 세포 비호지킨 림프종을 포함하는 비호지킨 림프종; 버킷 림프종, 소형 림프구 림프종(SLL), 미만성 거대 B 세포 림프종, 여포성 림프종, 면역아성 거대 세포 림프종, 전구체 B-림프아구성 림프종, 및 맨틀 세포 림프종; 및 T-세포 비호지킨 림프종: 균상식균종, 역형성 거대 세포 림프종, 시자리 증후군, 및 전구체 T-림프아구성 림프종.
- [0518] 구체적인 실시형태에서 고려되는 조성물 및 방법에 의해 표적화될 수 있는 세포의 예시적인 예는 제한 없이, 다음의 다발성 골수종의 것을 포함한다: 현성 다발성 골수종, 무증상 다발성 골수종, 형질 세포 백혈병, 비분비성 골수종, IgD 골수종, 골경화성 골수종, 뼈의 고립성 형질세포종, 및 골수외 형질세포종.
- [0519] 구체적인 실시형태에서, 표적 세포는 STn-발현 당단백질을 발현하는 암 세포 또는 암 줄기 세포이다.
- [0520] 다른 구체적인 실시형태에서, 표적 세포는 암 세포, 예컨대 암을 갖는 환자의 세포이다.
- [0521] **K. 치료 방법**
- [0522] 본 명세서에서 고려되는 유전자 변형된 면역 효과기 세포는 STn 발현 당단백질, 예를 들어 TAG-72를 발현하는 암을 예방, 치료, 및 호전시킴에 있어서 사용하기 위해서, 또는 STn 발현 암과 연관된 적어도 하나의 증상을 예방, 치료 또는 호전시키기 위해서 입양 면역요법의 개선된 방법을 제공한다.
- [0523] 다양한 실시형태에서, 본 명세서에서 고려되는 유전자 변형된 면역 효과기 세포는 대상체에서 STn 발현 당단백질을 발현하는 암 세포에서의 세포독성을 증가시킴에 있어서 사용을 위하여 또는 대상체에서 STn 발현 암 세포의 수를 감소시킴에 있어서 사용을 위한 입양 면역요법의 개선된 방법을 제공한다.
- [0524] 구체적인 실시형태에서, 1차 면역 효과기 세포의 특이성은 본 명세서에서 고려되는 CAR로 초대 면역 효과기 세포를 유전자 변형시켜, STn 발현 당단백질을 발현하는 세포, 예를 들어 암 세포에 대해 재지정된다. 다양한 실시형태에서, 바이러스 벡터는 당단백질 상에서 발현된 STn에 결합하는 항-STn 항원 결합 도메인; 힌지 도메인; 막관통(TM) 도메인, CAR의 세포내 신호전달 도메인에 TM 도메인을 연결시키는, 짧은 올리고폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 링커; 및 하나 이상의 세포내 공자극성 신호전달 도메인; 및 1차 신호전달 도메인을 포함하는 CAR을 코딩하는 특정 폴리뉴클레오타이드로 면역 효과기 세포를 유전자 변형시키는데 사용된다.
- [0525] 일 실시형태에서, T 세포가 STn 발현 당단백질이 발현된 암 세포를 표적으로 하는 CAR을 발현하도록 유전자 변형되고, 이를 필요로 하는 수용자에게 CAR T 세포를 주입시키는 세포 요법 유형이 제공된다. 주입되는 세포는 수용자에서 질환 유발 세포를 사멸시킬 수 있다. 항체 요법과 달리, CAR T 세포는 생체내에서 복제될 수 있어서 지속적인 암요법을 유도할 수 있는 장기간 지속성이 야기된다.
- [0526] 일 실시형태에서, CAR T 세포는 강건한 생체내 T 세포 확장을 겪을 수 있고 연장된 시간량 동안 지속될 수 있다. 다른 실시형태에서, CAR T 세포는 임의의 추가적인 종양 형성 또는 성장을 억제하도록 재활성화될 수 있는 특이적 기억 T 세포로 진화된다.
- [0527] 구체적인 실시형태에서, 본 명세서에서 고려되는 CAR을 포함하는 면역 효과기 세포를 포함하는 조성물은 STn 발현 당단백질을 발현하는 암 세포 또는 암 줄기 세포와 연관된 병태의 치료에 사용된다.
- [0528] 본 명세서에서 고려되는 CAR을 포함하는 면역 효과기 세포를 사용하여 치료, 예방 또는 호전될 수 있는 병태의

예시적인 예는 제한 없이, 혈액학적 암, 식도암, 폐암, 난소암, 자궁경부암, 췌장암, 담관암종, 위암, 결장암, 방광암, 신장암, 및 유방암을 포함한다.

[0529] 구체적 실시형태에서, 본 명세서에서 고려되는 CAR 변형된 T 세포를 포함하는 조성물은 고형 암의 치료에 사용된다. 일정 실시형태에서, 고형 암은 식도암, 폐암, 난소암, 자궁경부암, 췌장암, 담관암종, 위암, 방광암, 결장암, 신장암, 및 유방암으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0530] 구체적 실시형태에서, 본 명세서에서 고려되는 CAR 변형된 T 세포를 포함하는 조성물은 액상 또는 혈액학적 암의 치료에 사용된다.

[0531] 일정 실시형태에서, 액상 또는 혈액학적 암은 백혈병, 림프종, 및 다발성 골수종으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0532] 일정 실시형태에서, 액상 또는 혈액학적 암은 급성 림프성 백혈병(ALL), 급성 골수성 백혈병(AML), 골수아구성, 전골수구성, 골수단핵구성, 단핵구성, 적백혈병, 모발상 세포 백혈병(HCL), 만성 림프성 백혈병(CLL), 및 만성 골수성 백혈병(CML), 만성 골수단핵구성 백혈병(CMML) 및 진성적혈구 증가증, 호지킨 림프종, 결정성 림프구-우세형 호지킨 림프종, 버킷 림프종, 소형 림프구 림프종(SLL), 미만성 거대 B 세포 림프종, 여포성 림프종, 면역아성 거대 세포 림프종, 전구체 B-림프아구성 림프종, 맨틀 세포 림프종, 변연부 림프종, 균상식균종, 역형성 거대 세포 림프종, 시자리 증후군, 전구체 T-림프아구성 림프종, 다발성 골수종, 현성 다발성 골수종, 무증상 다발성 골수종, 형질 세포 백혈병, 비분비성 골수종, IgD 골수종, 골경화성 골수종, 뼈의 고립성 형질세포종, 및 골수외 형질세포종으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0533] 일정 실시형태에서, 액상 또는 혈액학적 암은 급성 림프성 백혈병(ALL), 만성 림프성 백혈병(CLL), 모발상 세포 백혈병(HCL), 다발성 골수종(MM), 급성 골수성 백혈병(AML), 또는 만성 골수성 백혈병(CML)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0534] 일정 실시형태에서, 액상 또는 혈액학적 암은 CLL이다.

[0535] 구체적 실시형태에서, 본 명세서에서 고려되는 CAR 발현 면역 효과기 세포 또는 이를 포함하는 조성물의 치료적 유효량을 단독으로 하나 이상의 치료제와 조합하여, 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 일정 실시형태에서, 세포는 STn 발현 당단백질을 발현하는 암과 연관된 병태가 발병될 위험성이 있는 환자의 치료에 사용된다. 따라서, 구체적 실시형태에서, 본 명세서에서 고려하는 CAR-변형된 세포의 치료적 유효량을, 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 암의 적어도 한 증상의 치료 또는 예방 또는 호전을 위한 방법.

[0536] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "개체" 및 "대상체"는 종종 상호교환적으로 사용되고 본 명세서의 다른 곳에서 고려되는 유전자 요법 벡터, 세포 기반 치료제, 및 방법으로 치료할 수 있는 질환, 장애 또는 병태의 증상을 나타내는 동물을 의미한다. 바람직한 실시형태에서, 대상체는 본 명세서의 다른 곳에서 고려하는 유전자 요법 벡터, 세포 기반 치료제, 및 방법으로 치료될 수 있는 암과 연관된 질환, 장애 또는 병태의 증상을 나타내는 임의의 동물을 포함한다. 적합한 대상체(예를 들어, 환자)는 실험실 동물(예컨대, 마우스, 래트, 토끼, 또는 기니피그), 농장 동물, 및 가축 또는 애완동물(예컨대, 고양이 또는 개)을 포함한다. 인간 이외 영장류, 바람직하게 인간 환자가 포함된다. 전형적인 대상체는 당단백질 상에서 STn을 발현하는 암을 갖고, 암으로 진단받거나, 또는 그러한 암을 갖거나 또는 가질 위험성이 있는 인간 환자를 포함한다.

[0537] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "환자"는 본 명세서의 다른 곳에 개시된 유전자 요법 벡터, 세포 기반 치료제 및 방법으로 치료할 수 있는 특정 질환, 장애 또는 병태로 진단받는 대상체를 의미한다.

[0538] 본 명세서에서 사용 시, "치료" 또는 "치료하는"은 질환의 증상 또는 병인 또는 병적 상태에 대한 임의의 유익하거나 또는 바람직한 효과를 포함하고, 치료하려는 질환 또는 병태의 하나 이상의 측정가능한 마커의 최소한의 감소를 포함할 수 있다. 치료는 경우에 따라 질환 또는 병태의 감소, 또는 질환 또는 병태의 진행의 지연, 예를 들어 종양 과성장의 지연을 포함할 수 있다. "치료"는 질환 또는 병태, 또는 이의 연관된 증상의 완전한 제거 또는 치료를 반드시 의미하지는 않는다.

[0539] 본 명세서에서 사용 시, "예방하다" 및 유사한 단어 예컨대 "예방된", "예방하는" 등은 질환 또는 병태의 발생 또는 재발의 가능성을 예방, 억제 또는 감소시키기 위한 접근법을 의미한다. 또한 질환 또는 병태의 개시 또는 재발의 지연 또는 질환 또는 병태의 증상의 발생 또는 재발의 지연을 의미한다. 본 명세서에서 사용 시, "예방" 및 유사한 단어는 또한 질환 또는 병태의 개시 또는 재발 이전에 질환 또는 병태의 강도, 효과, 증상 및/또는

부하의 감소를 포함한다.

- [0540] 본 명세서에서 사용 시, 어구 "∼의 적어도 한 증상의 호전"은 대상체가 치료되는 질환 또는 병태의 하나 이상의 증상의 감소를 의미한다. 구체적인 실시형태에서, 치료하려는 질환 또는 병태는 암이고, 호전되는 하나 이상의 증상은 제한 없이, 쇠약, 피로, 숨가쁨, 쉬운 멍 및 출혈, 빈번한 감염, 비대화된 림프절, 팽창성 또는 통증성 복부(확장된 복부 장기로 인한), 뼈 또는 관절 통증, 골절, 계획치 않은 체중 감량, 식욕 부진, 도한, 지속적 미열, 및 감소된 배뇨(손상된 신장 기능에 의함)를 포함한다.
- [0541] "향상되다" 또는 "촉진하다" 또는 "증가하다" 또는 "확장되다"란 일반적으로 비히클 또는 대조군 분자/ 조성물에 의해 야기되는 반응과 비교하여 더 큰 생리적 반응(즉, 하류 효과)을 생성시키거나, 유발시키거나 또는 야기시키는, 본 명세서에서 고려되는 조성물, 예를 들어 유전자 변형된 T 세포 또는 CAR을 코딩하는 벡터의 능력을 의미한다. 측정가능한 생리적 반응은 당분야에서 이해하고 본 명세서에 기술된 것으로부터 자명한 다른 것들 중에서도, T 세포 확장, 활성화, 지속성, 및/또는 암 세포 사멸능의 증가를 포함할 수 있다. "증가된" 또는 "향상된" 양은 전형적으로 "통계적으로 유의한" 양이고, 비히클 또는 대조군 조성물에 의해 생성되는 반응의 1.1, 1.2, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30배 또는 그 이상의 배수(예를 들어, 500, 1000배)(그 사이 및 1 이상의 모든 정수 및 소수점, 예를 들어 1.5, 1.6, 1.7, 1.8 등을 포함)인 증가를 포함할 수 있다.
- [0542] "저하되다" 또는 "하락하다" 또는 "줄어들다" 또는 "감소되다" 또는 "약화되다"란 일반적으로 비히클 또는 대조군 분자/조성물에 의해 야기되는 반응과 비교하여 덜한 생리적 반응(즉, 하류 효과)을 생성시키거나, 유발시키거나, 또는 야기시키는 본 명세서에서 고려하는 조성물의 능력을 의미한다. "저하" 또는 "감소된" 양은 전형적으로 "통계적으로 유의한" 양이고, 비히클, 대조군 조성물에 의해 생성된 반응(기준 반응), 또는 특정 세포 계통의 반응의 1.1, 1.2, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30배 또는 그 이상의 배수(예를 들어, 500, 1000배)(그 사이 및 1 이상의 모든 정수 및 소수점, 예를 들어 1.5, 1.6, 1.7, 1.8 등을 포함)의 감소를 포함할 수 있다.
- [0543] "유지하다" 또는 "보존하다" 또는 "유지", "무변화" 또는 "실질적으로 무변화" 또는 "실질적을 무저하"란 일반적으로 비히클, 대조군 분자/조성물에 의해 야기되는 반응, 또는 특정 세포 계통의 반응과 비교하여, 세포에서 실질적으로 유사하거나 또는 비슷한 생리적 반응(즉, 하류 효과)을 생성시키거나, 유발시키거나, 또는 야기시키는 본 명세서에서 고려하는 조성물의 능력을 의미한다. 비슷한 반응은 기준 반응과 유의하게 상이하지 않거나 또는 측정가능하게 상이하지 않은 것이다.
- [0544] 일 실시형태에서, 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법은 본 명세서에서 고려하는 유전자 변형된 면역 효과기 세포를 포함하는 조성물의 유효량, 예를 들어 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 투여의 분량 및 빈도는 환자의 병태, 및 환자 질환의 유형 및 중증도와 같은 인자에 의해 결정될 것이지만, 적절한 용량은 임상 실험으로 결정할 수 있다.
- [0545] 일 실시형태에서, 대상체에게 투여되는 조성물 중 면역 효과기 세포, 예를 들어 T 세포의 양은 적어도 0.1×10^5 세포, 적어도 0.5×10^5 세포, 적어도 1×10^5 세포, 적어도 5×10^5 세포, 적어도 1×10^6 세포, 적어도 0.5×10^7 세포, 적어도 1×10^7 세포, 적어도 0.5×10^8 세포, 적어도 1×10^8 세포, 적어도 0.5×10^9 세포, 적어도 1×10^9 세포, 적어도 2×10^9 세포, 적어도 3×10^9 세포, 적어도 4×10^9 세포, 적어도 5×10^9 세포, 또는 적어도 1×10^{10} 세포이다. 구체적인 실시형태에서, 약 1×10^7 T 세포 내지 약 1×10^9 T 세포, 약 2×10^7 T 세포 내지 약 0.9×10^9 T 세포, 약 3×10^7 T 세포 내지 약 0.8×10^9 T 세포, 약 4×10^7 T 세포 내지 약 0.7×10^9 T 세포, 약 5×10^7 T 세포 내지 약 0.6×10^9 T 세포, 또는 약 5×10^7 T 세포 내지 약 0.5×10^9 T 세포가 대상체에게 투여된다.
- [0546] 일 실시형태에서, 대상체에게 투여되는 조성물 중 면역 효과기 세포, 예를 들어 T 세포의 양은 체중 기준으로 적어도 0.1×10^4 세포/kg, 체중 기준으로 적어도 0.5×10^4 세포/kg, 체중 기준으로 적어도 1×10^4 세포/kg, 체중 기준으로 적어도 5×10^4 세포/kg, 체중 기준으로 적어도 1×10^5 세포/kg, 체중 기준으로 적어도 0.5×10^6 세포/kg, 체중 기준으로 적어도 1×10^6 세포/kg, 체중 기준으로 적어도 0.5×10^7 세포/kg, 체중 기준으로 적어도 1×10^7 세포/kg, 체중 기준으로 적어도 0.5×10^8 세포/kg, 체중 기준으로 적어도 1×10^8 세포/kg, 체중 기준으로 적어도 2×10^8 세포/kg, 체중 기준으로 적어도 3×10^8 세포/kg, 체중 기준으로 적어도 4×10^8 세

포/kg, 체중 기준으로 적어도 5×10^8 세포/kg, 또는 체중 기준으로 적어도 1×10^9 세포/kg이다. 구체적인 실시형태에서, 체중 기준으로 약 1×10^6 T 세포/kg 내지 체중 기준으로 약 1×10^8 T 세포/kg, 체중 기준으로 약 2×10^6 T 세포/kg 내지 체중 기준으로 약 0.9×10^8 T 세포/kg, 체중 기준으로 약 3×10^6 T 세포/kg 내지 체중 기준으로 약 0.8×10^8 T 세포/kg, 체중 기준으로 약 4×10^6 T 세포/kg 내지 체중 기준으로 약 0.7×10^8 T 세포/kg, 체중 기준으로 약 5×10^6 T 세포/kg 내지 체중 기준으로 약 0.6×10^8 T 세포/kg, 또는 체중 기준으로 약 5×10^6 T 세포/kg 내지 체중 기준으로 약 0.5×10^8 T 세포/kg이 대상체에게 투여된다.

[0547] 당업자는 본 명세서에서 고려되는 조성물의 다수 투여가 회망하는 요법을 실시하는데 필요할 수 있다는 것을 인식할 것이다. 예를 들어, 조성물은 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 1년, 2년, 5년, 10년 또는 그 이상의 주기 동안 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10회 또는 그 이상의 횟수로 투여될 수 있다.

[0548] 일정 실시형태에서, 활성화된 면역 효과기 세포를 대상체에게 투여한 후 후속하여 혈액을 재채혈(또는 분리반출법 수행)하고, 그로부터의 면역 효과기 세포를 활성화시키고, 이들 활성화되고 확장된 면역 효과기 세포를 환자에게 재주입시키는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 과정은 수주마다 다수회 수행될 수 있다. 일정 실시형태에서, 면역 효과기 세포는 10cc 내지 400cc의 체혈로부터 활성화될 수 있다. 일정 실시형태에서, 면역 효과기 세포는 20cc, 30cc, 40cc, 50cc, 60cc, 70cc, 80cc, 90cc, 100cc, 150cc, 200cc, 250cc, 300cc, 350cc, 또는 400cc 또는 그 이상의 체혈로부터 활성화된다. 이론에 국한하려는 것이 아니나, 이러한 다수 채혈/다수 재주입 프로토콜의 사용은 면역 효과기 세포의 일정 개체군을 선별해내기 위해 제공될 수 있다.

[0549] 본 명세서에서 고려되는 조성물의 투여는 에어로졸 흡입, 주사, 섭취, 수혈, 이식 또는 외과적 이식에 의한 것을 포함하여, 임의의 편리한 방식으로 수행될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 조성물은 비경구적으로 투여된다. 본 명세서에서 사용시 어구 "비경구 투여" 및 "경구적으로 투여되는"은 일반적으로 주사에 의한, 장 및 국소 투여이외의 투여 방식을 의미하고, 제한 없이, 정맥내, 근육내, 동맥내, 척추강내, 피막내, 안와내, 종양내, 심장내, 피내, 복강내, 기관지경, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내 및 흉골내 주사 및 주입을 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 본 명세서에서 고려되는 조성물은 종양, 림프절, 또는 감염 부위의 직접 주사에 의해 대상체에게 투여된다.

[0550] 일 실시형태에서, 이를 필요로 하는 대상체는 대상체의 암에 대한 세포 면역 반응을 증가시키기 위해 조성물의 유효량이 투여된다. 면역 반응은 감염된 세포를 사멸시킬 수 있는 세포독성 T 세포, 조절 T 세포 및 헬퍼 T 세포 반응에 의해 매개되는 세포 면역 반응을 포함할 수 있다. B 세포를 활성화시킬 수 있어서 항체 생성을 유발시킬 수 있는 헬퍼 T 세포에 의해 주로 매개되는 체액성 면역 반응이 또한 유도될 수 있다. 당분야, 예를 들어 문헌 [Current Protocols in Immunology, Edited by: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober(2001) John Wiley & Sons, NY, N.Y.]에 충분히 기술된, 조성물에 의해 유도된 면역 반응의 유형을 분석하기 위해 다양한 기술이 사용될 수 있다.

[0551] T 세포 매개 사멸의 경우, CAR-리간드 결합은 T 세포로의 CAR 신호전달을 개시시켜서, 다양한 기전에 의해 표적 세포 아포토시스를 유도할 수 있는 단백질을 생성 또는 방출하도록 T 세포를 유도시키는 다양한 T 세포 신호전달 경로의 활성화를 유발시킨다. 이들 T 세포 매개 기전은 (제한 없이), T 세포로부터 표적 세포로 세포내 세포독성 과립의 전달, 직접적으로(또는 다른 사멸 효과기 세포의 동원을 통해 간접적으로) 표적 세포 사멸을 유도할 수 있는 프로염증성 사이토카인의 T 세포 분비, 및 표적 세포 상의 그들의 동족 사멸 수용체(예를 들어, Fas)에 결합 후 표적 세포 아포토시스를 유도하는 T 세포 표면 상의 사멸 수용체 리간드(예를 들어, FasL)의 상향 조절을 포함한다.

[0552] 일 실시형태에서, STn 발현 암으로 진단된 대상체로부터 면역 효과기 세포를 제거하는 단계, 상기 면역 효과기 세포를 본 명세서에서 고려하는 CAR을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터로 유전자 변형시키는 단계, 그리하여 변형된 면역 효과기 세포의 개체군을 생성시키는 단계, 및 변형된 면역 효과기 세포의 개체군을 동일한 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 당단백질 상에 STn을 발현하는 암으로 진단된 대상체를 치료하는 방법이 제공된다. 바람직한 실시형태에서, 면역 효과기 세포는 T 세포를 포함한다.

[0553] 일정 실시형태에서, 대상체에게 CAR 분자를 코딩하는 핵산을 발현하는 면역 효과기 세포를 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서 표적 세포 개체군에 대해 면역 효과기 세포 매개된 면역 조절인자 반응을 자극시키기 위한

방법을 제공한다.

[0554] 구체적 실시형태에서 고려되는 세포를 투여하기 위한 방법은 대상체에서 CAR을 직접 발현하는 유전자 변형된 면역 효과기 세포의 생체의 재도입 또는 대상체에 도입시 CAR을 발현하는 성숙한 면역 효과기 세포로 분화되는 면역 효과기 세포의 유전자 변형된 전구세포의 재도입을 유발시키는데 효과적인 임의 방법을 포함한다. 한가지 방법은 본 명세서에서 고려되는 바에 따라서 핵산 작제물로 생체외에서 말초 혈액 T 세포를 형질도입시키는 단계 및 형질도입된 세포를 대상체에게 반환시키는 단계를 포함한다.

[0555] 본 명세서에서 인용된 모든 출판물, 특허 출원, 및 특허 공보는 각 개별 출판물, 특허 출원, 또는 특허 공보가 참조로 편입된다고 특별히 개별적으로 표시한 만큼 참조로 본 명세서에 편입된다.

[0556] 전술한 실시형태를 이해의 명확함의 목적을 위해 예시 및 예의 방식으로 일부 상세하게 기술하였지만, 첨부된 청구항의 정신 또는 범주를 벗어나지 않고 일정 변화 및 변형을 가할 수 있다는 것은 본 명세서에서 고려되는 교시의 관점에서 당업자에게 쉽게 자명해질 것이다. 하기의 실시예는 단지 예시로서 제공되며 제한하려는 것이 아니다. 당업자는 본질적으로 유사한 결과를 산출하기 위해 변화시키거나 또는 변형시킬 수 있는 다양한 중요치 않은 변수를 쉽게 인식하게 될 것이다.

[0557] 실시예

[0558] 실시예 1

[0559] 항-STn CAR의 구축

[0560] 인간화 항-STn scFv 항체를 함유하는 CAR은 항-STn scFv, CD8 α 유래의 힌지 및 막관통 도메인 및 CD137 공자극성 도메인과 이후 CD3 ζ 사슬의 세포내 신호전달 도메인에 작동 가능하게 연결된 MND 프로모터를 함유하도록 디자인되었다. 도 1. 항-STn CAR은 면역 효과기 세포 상의 표면 발현을 위한 CD8 α 신호 펩타이드(SP) 서열을 포함한다. 표 3은 예시적인 항-STn CAR 렌티바이러스 벡터의 다양한 뉴클레오타이드 절편에 대한 동일성, 유전자 은행 참조번호, 공급원 명칭 및 인용을 표시한다.

표 3

[0561]

뉴클레오타이드	정체	유전자은행 참조번호	공급원 명칭	인용
1-185	pUC19 플라스미드 골격	등록번호#L09137.2 nt 1 - 185	pUC19	New England Biolabs
185-222	링커	적용 불가	합성	적용 불가
223-800	CMV	적용 불가	pHCMV	(1994) PNAS 91: 9564-68
801-1136	R, U5, PBS, 및 패키징 서열	등록번호#M19921.2 nt 454-789	pNL4-3	Maldarelli, et.al.(1991) J Virol: 65(11):5732-43
1137-1139	Gag 출발 코돈(ATG)이 중지 코돈(TAG)으로 변화됨	적용 불가	합성	적용 불가
1140-1240	HIV-1 gag 서열	등록번호#M19921.2nt 793-893	pNL4-3	Maldarelli, et.al.(1991) J Virol: 65(11):5732-43
1241-1243	HIV-1 gag 서열이 제2 중지 코돈으로 변화됨	적용 불가	합성	적용 불가
1244-1595	HIV-1 gag 서열	등록번호#M19921.2nt 897-1248	pNL4-3	Maldarelli, et.al.(1991) J Virol: 65(11):5732-43
1596-1992	HIV-1 polcPPT/CTS	등록번호#M19921.2 nt 4745-5125	pNL4-3	Maldarelli, et.al.(1991) J Virol: 65(11):5732-43
1993-2517	HIV-1, 단리 HXB3 env 영역(RRE)	등록번호#M14100.1nt 1875-2399	PgTAT-CMV	Malim, M. H. Nature(1988) 335:181-183

2518-2693	HIV-1 env 서열 S/A	등록번호#M19921.2nt 8290-8470	pNL4-3	Maldarelli, et.al.(1991) J Virol: 65(11):5732-43
2694-2708	링커	적용 불가	합성	적용 불가
2709-3096	MND	적용 불가	rSPA.mPro.MND	Challita et al.(1995) J.Virol. 69: 748-755
3097-3125	링커	적용 불가	합성	적용 불가
3126-3188	신호 펩타이드		합성	적용 불가
variable	항-STn scFv	적용 불가	합성	적용 불가
3927-3935	링커	적용 불가	합성	적용 불가
3936-4142	CD8a 힌지 및 TM	등록번호# NM_001768	합성	Milone et al(2009) Mol Ther 17(8):1453-64
4143-4268	CD137(4-1BB) 신호전달 도메인	등록번호# NM_001561	합성	Milone et al(2009)Mol Ther 17(8):1453-64
4269-4607	CD3- ζ 신호전달 도메인	등록번호# NM_000734	합성	Milone et al(2009)Mol Ther 17(8):1453-64
4608-4718	HIV-1 ppt 및 U3의 일부	등록번호#M19921.2nt 9005-9110	pNL4-3	Maldarelli, et.al.(1991) J Virol: 65(11):5732-43
4719-4835	U3(399bp 결실) 및 R의 HIV-1 부분	등록번호#M19921.2 nt 9511-9627	pNL4-3	Maldarelli, et.al.(1991) J Virol: 65(11):5732-43
4836-4859	합성 폴리(A)	적용 불가	합성	Levitt, N. Genes & Dev(1989) 3:1019-1025
4860-4878	링커	적용 불가	합성	적용 불가 ¹
4879-7351	pUC19 골격	등록번호#L09137.2nt 2636-2686	pUC19	New England Biolabs(첨부)

[0562]

실시예 2

[0563] 인간 직결장암의 시험관내 모델에서 항-STn CAR T 세포의 세포독성

[0564] 서열번호 15에 따른 경쇄 가변 영역 및 서열번호 16에 따른 중쇄 가변 영역을 갖는 항-STn CAR을 포함하는 CAR T 세포는 직결장 암종의 시험관내 모델에서 LS174T 세포의 선택적 사멸을 보여주었다. LS174T 세포는 높은 수준으로 STn 발현 TAG-72 당단백질을 발현하는 인간 직결장암 세포이다.

[0565] LS174T 세포 상의 STn 발현 TAG-72 당단백질의 발현은 면역조직화학으로 확인하였다. 5×10^5 LS174T 세포를 1% 소 혈청 알부민(BSA), 및 5 μ g의 STn 특이적 항체(3E8)를 함유하는 PBS 100 μ l에 현탁시켰다. 반응물을 30분간 4℃에서 항온반응시킨 후, 세포를 1% BSA를 함유하는 PBS로 2회 세척하였다. 다음으로, 1 μ l의 마우스 항인간 IgG-PE(Southern Biotech)를 첨가하였고 혼합물을 30분간 4℃에서 항온반응시켰다. 이후 세포를 1% BSA를 함유하는 PBS로 2회 세척하였다. STn 발현 TAG-72 당단백질 발현은 유세포측정으로 확인하였다. 98%의 LS174T 세포가 STn 발현 TAG-72 당단백질을 발현하였다. 인간 위암 세포주 유래 세포의 95%가 또한 STn 발현을 보였다. 대조적으로 TAG-72 음성 인간 제정맥 내피세포 세포(HUVEC)의 약 2%만이 STn을 발현하였다.

[0566] LS174T 세포에 대한 항-STn CAR T 세포의 세포독성 활성은 셀톡스(CellTox)(상표명) 그린을 사용해서 검정하였다. 1×10^4 LS174T 세포는 50 μ l의 배양 배지에 현탁하였고 첨가한 2.0 μ l의 셀톡스 그린과 배합하였다. 혼합물을 검은색 96웰 플레이트에 분취하였고 분취액은 인간 혈청 및 IL-2를 함유하는 50 μ l의 배양 배지 중 5×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5 , 또는 3×10^5 항-STn CAR T 세포와 배합하였다(E:T 비율 = 5, 10, 20, 30). 37℃에서

24시간 배양 후, 세포독성은 다음과 같이 계산하였다.

[0567] 셀톡스 그린 형광발광성(RFU) = {T 세포 및 E- 세포의 반응} - (E-세포의 반응)} - (T 세포의 반응, 배경값)

[0568] 결과는 항-STn-CAR T 세포가 STn-부재 HUVEC과 비교하거나 또는 항-STn CAR을 발현하지 않는 대조군 T 세포와 비교하여 STn-TAG-72 발현 LS174T 암세포를 효과적으로 사멸시키는 것을 보여주었다.

[0569] 실시예 3

[0570] 형질도입된 T 세포에서 항-STn CAR 발현 및 벡터 카피수

[0571] CAR T 세포 배양을 대량 임상적 제조 과정으로 직접 확장가능한 시스템을 사용해서 확립시켰다. 간략하게, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 IL-2(Cell Genix), CD3 및 CD28에 특이적인 항체(Miltenyi Biotec) 및 ZSTK474(Selleckchem)를 함유하는 배지에서 정적 플라스크에서 배양하였다. 서열번호 15에 따른 경쇄 가변 영역 및 서열번호 16에 따른 중쇄 가변 영역을 갖는 항-STn CAR을 코딩하는 렌티바이러스의 2×10^8 형질도입 유닛을 배양 개시 후 1일에 첨가하였다. 항-STn CAR T 세포는 총 10일 배양 동안 IL-2 및 ZSTK474를 함유하는 신선한 배지를 첨가하여 대수기로 유지시켰다. 배양 종료 시, 항-STn CAR의 세포 표면 발현 및 벡터 카피수(VCN)는 3명의 도너로부터 획득된 형질도입된 T 세포에 측정하였다.

[0572] VCN은 벡터 또는 게놈 대조군 RNaseP를 검출하는 프라이머를 사용해서 배양 종료시 정량적 PCR에 의해 평가하였다. 미형질도입된 T 세포와 비교하여 3명 도너 유래의 형질도입된 T 세포에서의 항-STn CAR VCN에 대한 데이터를 도 3A에 도시하였다. 형질도입된 T 세포는 미형질도입된 대조군 세포에서 미검출된 VCN과 비교하여 약 4.5의 VCN을 가졌다.

[0573] T 세포의 표면 상에서 항-STn CAR의 발현은 배양 종료 시 유세포측정을 통해 평가하였다. 항-STn CAR T 세포는 바이오틴 단백질 L과 이후 스트렙타비딘-PE의 2단계 검출 방법을 사용해서 특이적으로 식별하였다. 3명의 정상 도너 유래의 T 세포는 항-STn CAR의 높은 발현을 보여주었다. 이러한 실험의 결과를 도 3B에 도시하였다.

[0574] 실시예 4

[0575] 항-STn CAR T 세포의 항원 특이적 세포독성

[0576] 항-STn CAR T 세포는 실시예 3에 기술된 대로 생성시켰다. 배양 종료 시, 항-STn CAR T 세포는 2회의 독립적인 검정법에서 항원 특이적 반응에 대해 검정하였다.

[0577] TAG72 상에서 STn을 발현하는 세포주에 대해 반응하여 IFN γ 를 생성시키는 항-STn CAR T 세포의 능력은 비드 기반 사이토카인 검정(Luminex)을 사용해서 조사하였다. 균등한 수의 종양 세포 및 항-STn CAR T 세포(각각 5×10^4)를 24시간 동안 공배양하였다. 상등액을 채취하였고 생성된 IFN γ 의 수를 루미넥스를 통해 정량하였다. 항-STn CAR T 세포는 종양 세포없이 배양 시 IFN γ 를 거의 생성시키지 않거나 전혀 생성시키지 않았다. IFN γ 는 2차원 배양으로 그들 세포 표면 상에서 STn을 발현하지 않는 종양 세포와 공배양할 경우(A549 및 HDLM-2) 항-STn CAR T 세포에 의해 생성되지 않았다. TAG72상에서 STn을 발현하는 종양 세포와 공배양(저넷 및 LS174T)되었을 때, 생성된 IFN γ 양의 두드러진 감소가 존재하였다. 도 4a.

[0578] 항-STn CAR T 세포와 공동배양된 LS174T 세포의 세포용해를 분석하였다. 세포독성은 살아있는 세포의 전기 임피던스를 모니터링할 수 있는 아이셀리젠스(iCELLigence) 장비를 사용해서 실시간으로 모니터링하였다. 미형질도입된 대조군 T 세포와 달리, 항-STn CAR T 세포는 공동배양된 LS174T 세포에서 세포용해를 유도하였다. 도 4b.

[0579] 항-STn CAR T 세포(효과기 세포)는 상이한 효과기:표적 세포 비율로 LS174T 세포(표적 세포)와 공배양하였다. 항-STn CAR T 세포는 용량 의존적 방식으로 공배양된 LS174T 세포에서 독성을 증가시켰다. 도 4c.

[0580] 실시예 5

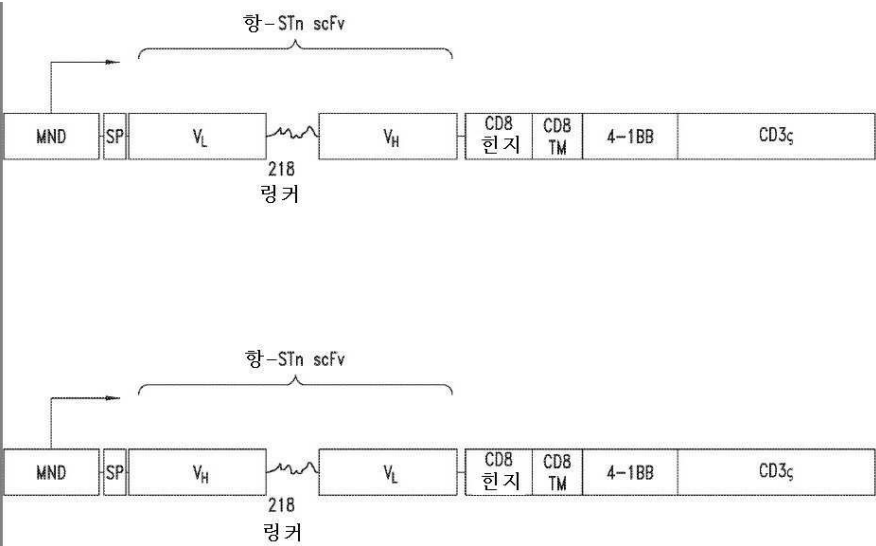
[0581] 항-STn CAR T 세포는 공격적 생체내 종양 모델에서 종양 과성장을 지연시킨다

[0582] 항-STn CAR T 세포는 실시예 3에 기술된 대로 생성시켰다. CAR T 세포의 항종양 활성은 공격적 생체내 종양 모델에서 조사하였다. 동물은 결장 선암종 세포(LS174T)의 피하 투여를 받았고 다음 날 균등한 CAR T 세포 용량(2×10^7 T 세포)을 주입받았다. 신호를 전달하는 능력이 결여된 절단된 CAR을 포함하는 대조군 CAR T 세포는 비히클 처리 동물과 비교하여 종양 성장에 효과가 없었다. 항-STn CAR T 세포는 공격적 결장암 모델에서 종양 과성장을 지연시켰다. 도 5.

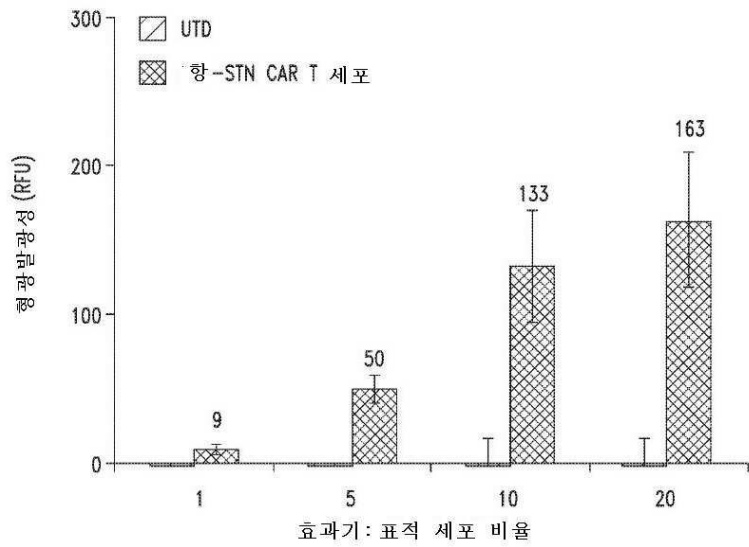
[0583] 대체로, 하기 청구항에서, 사용되는 용어는 명세서 및 청구항에 개시하는 특정한 실시형태에 청구항을 한정하는 것으로 해석해서는 안되지만, 이러한 청구항이 부여하는 균등물의 모든 범주와 함께 가능한 모든 실시형태를 포함하는 것으로 해석해야 한다. 따라서, 청구항은 개시내용에 의해 한정되지 않는다.

도면

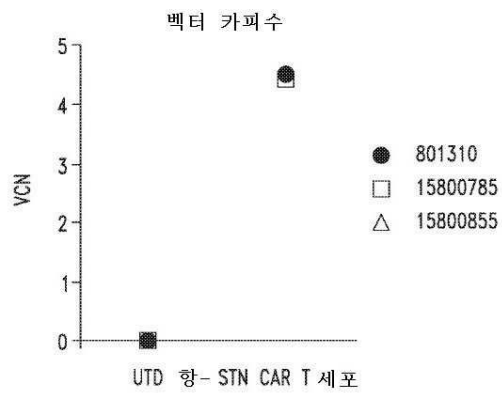
도면1



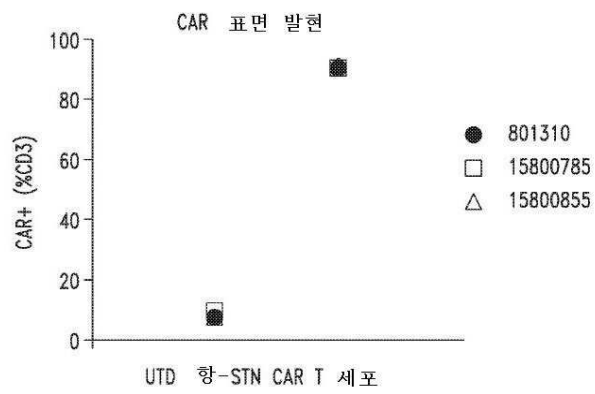
도면2



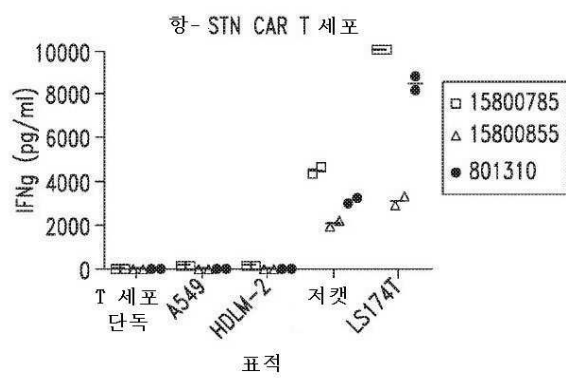
도면3a



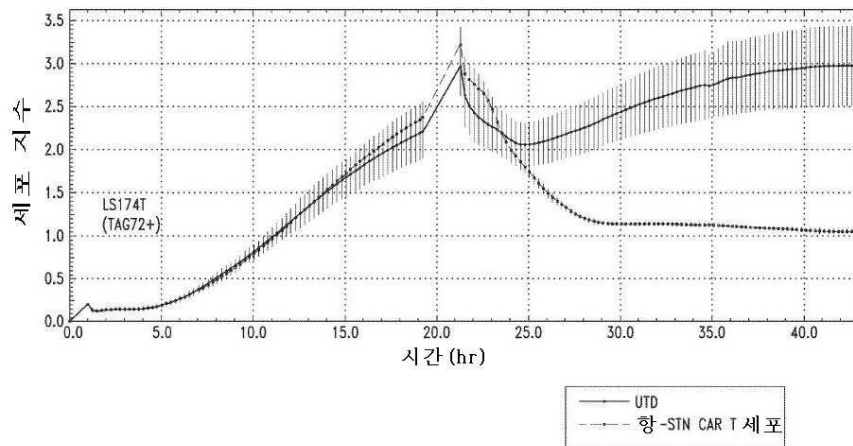
도면3b



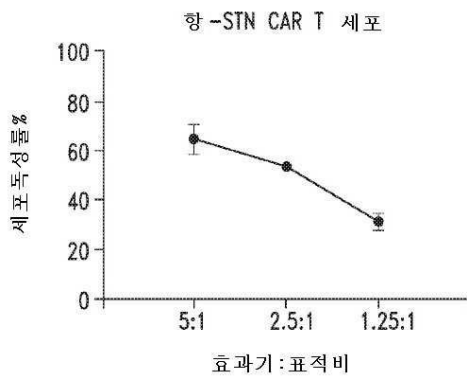
도면4a



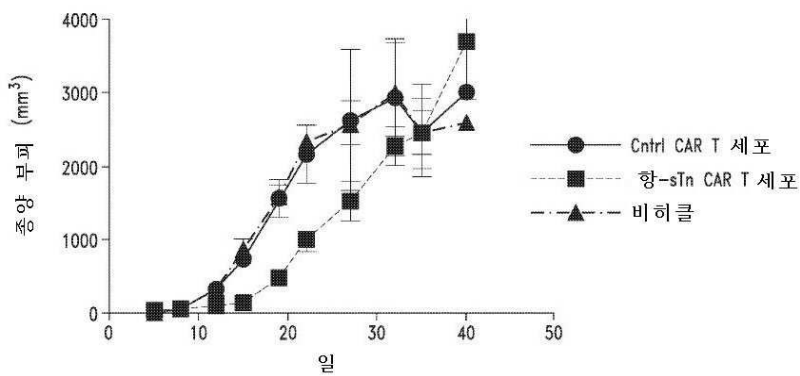
도면4b



도면4c



도면5



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> BLUEBIRD BIO, INC.

VIROMED CO., LTD.

<120> ANTI-SIALYL TN CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS

<130> IPA180231-US

<140> PCT/US2016/049493

<141> 2016-08-30

<150> KR 10-2015-0122727

<151> 2015-08-31

<150> US 62/317,950

<151> 2016-04-04

<160> 57

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Ala Ile His

1 5 10

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Ser Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Ser Leu Asn Met Ala Tyr

1 5

<210> 7

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric light chain sequence

<400> 7

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

 85 90 95
 Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 8

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric heavy chain sequence

<400> 8

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His

 20 25 30
 Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45

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

65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

 85 90 95
 Ala Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Ala Ile His

1 5 10

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Ser Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 14

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Ser Trp Ile Met Gln Tyr

1 5

<210> 15

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric light chain sequence

<400> 15

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Lys

<210> 16

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric heavy chain sequence

<400> 16

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His

20 25 30

Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Ser Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Trp Ile Met Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210

> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Ala Ile His

1 5 10

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Ser Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 22

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

Ser Trp Ile Met Gln Tyr

1 5

<210> 23

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric light chain sequence

<400> 23

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Lys

<210> 24

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric heavy chain sequence

<400> 24

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His

20 25 30
Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met

35 40 45
Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Ser Gln Lys Phe

50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
Ala Arg Ser Trp Ile Met Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110
Val Ser Ser

115

<210> 25

<211> 488

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized Anti-STN CAR

<400> 25

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val

20 25 30

Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr

100 105 110

Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys

115 120 125

Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

130 135 140

Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

145 150 155 160

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

165 170 175

Thr Asp His Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu

180 185 190

Glu Trp Met Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Ser

195 200 205

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Ala Ser

210 215 220

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val

225 230 235 240

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

245 250 255

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala 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> 26

<211> 488

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized Anti-STN CAR

<400> 26

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val
20 25 30

Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val
35 40 45

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

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

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

 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Trp Ile Met Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 245 250 255
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala 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> 27

<211> 488

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized Anti-STN CAR

<400> 27

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val
20 25 30
Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val
35 40 45
Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60
Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu
65 70 75 80
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr
100 105 110
Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125
Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140
Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
145 150 155 160
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
165 170 175
Thr Asp His Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu
180 185 190
Glu Trp Met Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Ser
195 200 205
Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Ala Ser
210 215 220
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
225 230 235 240
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Trp Ile Met Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

245 250 255
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala 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> 28

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Exemplary linker sequence
 <400> 28

Asp Gly Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 29
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Exemplary linker sequence
 <400> 29

Asp Gly Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 30
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Exemplary linker sequence
 <400> 30

Gly Gly Arg Arg
 1
 <210> 31
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Exemplary linker sequence
 <400> 31

Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 32
 <211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exemplary linker sequence

<400> 32

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Val Asp

1 5 10

<210> 33

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exemplary linker sequence

<400> 33

Lys Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Gln Leu Ala Gln Phe Arg Ser

1 5 10 15

Leu Asp

<210> 34

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exemplary linker sequence

<400> 34

Gly Gly Arg Arg Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exemplary linker sequence

<400> 35

Leu Arg Gln Arg Asp Gly Glu Arg Pro

1 5

<210> 36

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exemplary linker sequence

<400> 36

Leu Arg Gln Lys Asp Gly Gly Gly Ser Glu Arg Pro

1 5 10

<210> 37

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exemplary linker sequence

<400> 37

Leu Arg Gln Lys Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Arg Pro

1 5 10 15

<210> 38

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exemplary linker sequence

<400> 38

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cleavage sequence by TEV protease

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa = Gly or Ser

<400> 39

Glu Xaa Xaa Tyr Xaa Gln Xaa

1 5

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cleavage sequence by TEV protease

<400> 40

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly

1 5

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cleavage sequence by TEV protease

<400> 41

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser

1 5

<210> 42

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Self-cleaving polypeptide comprising 2A site

<400> 42

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

1 5 10 15

Pro Gly Pro

<210> 43
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Self-cleaving polypeptide comprising 2A site
 <400> 43
 Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn
 1 5 10 15
 Pro Gly Pro

<210> 44
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Self-cleaving polypeptide comprising 2A site
 <400> 44
 Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro

1 5 10
 <210> 45
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Self-cleaving polypeptide comprising 2A site
 <400> 45
 Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly
 1 5 10 15
 Pro

<210> 46
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Self-cleaving polypeptide comprising 2A site

<400> 46

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

1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro

20

<210> 47

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Self-cleaving polypeptide comprising 2A site

<400> 47

Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly

1 5 10 15

Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro

20

<210> 48

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> Self-cleaving polypeptide comprising 2A site

<400> 48

Val Thr Glu Leu Leu Tyr Arg Met Lys Arg Ala Glu Thr Tyr Cys Pro

1 5 10 15

Arg Pro Leu Leu Ala Ile His Pro Thr Glu Ala Arg His Lys Gln Lys

20 25 30

Ile Val Ala Pro Val Lys Gln Thr

35 40

<210> 49

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Self-cleaving polypeptide comprising 2A site

<400> 49

Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro

1 5 10 15

Gly Pro

<210> 50

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Self-cleaving polypeptide comprising 2A site

<400> 50

Leu Leu Ala Ile His Pro Thr Glu Ala Arg His Lys Gln Lys Ile Val

1 5 10 15

Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly

20 25 30

Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro

35 40

<210> 51

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Self-cleaving polypeptide comprising 2A site

<400> 51

Glu Ala Arg His Lys Gln Lys Ile Val Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu

1 5 10 15

Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly

20 25 30

Pro

<210> 52

<211> 937

<212>

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

```

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

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

Phe Gln Cys Val Ala Thr Asn Gly Lys Glu Val Val Ser Ser Thr Gly
           130          135          140
Val Leu Phe Val Lys Phe Gly Pro Pro Pro Thr Ala Ser Pro Gly Tyr
145          150          155          160
Ser Asp Glu Tyr Glu Glu Asp Gly Phe Cys Gln Pro Tyr Arg Gly Ile
           165          170          175
Ala Cys Ala Arg Phe Ile Gly Asn Arg Thr Val Tyr Met Glu Ser Leu
           180          185          190

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

```

245								250								255							
Asn	Val	Leu	Cys	Gln	Thr	Glu	Tyr	Ile	Phe	Ala	Arg	Ser	Asn	Pro	Met								
260								265								270							
Ile	Leu	Met	Arg	Leu	Lys	Leu	Pro	Asn	Cys	Glu	Asp	Leu	Pro	Gln	Pro								
275								280								285							
Glu	Ser	Pro	Glu	Ala	Ala	Asn	Cys	Ile	Arg	Ile	Gly	Ile	Pro	Met	Ala								
290								295								300							
Asp	Pro	Ile	Asn	Lys	Asn	His	Lys	Cys	Tyr	Asn	Ser	Thr	Gly	Val	Asp								
305				310								315				320							
Tyr	Arg	Gly	Thr	Val	Ser	Val	Thr	Lys	Ser	Gly	Arg	Gln	Cys	Gln	Pro								
				325								330				335							
Trp	Asn	Ser	Gln	Tyr	Pro	His	Thr	His	Thr	Phe	Thr	Ala	Leu	Arg	Phe								
340								345								350							
Pro	Glu	Leu	Asn	Gly	Gly	His	Ser	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Gly	Asn	Gln								
355								360								365							
Lys	Glu	Ala	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr	Leu	Asp	Glu	Asn	Phe	Lys	Ser	Asp								
370								375								380							
Leu	Cys	Asp	Ile	Pro	Ala	Cys	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Lys	Glu	Lys	Asn								
385				390								395				400							
Lys	Met	Glu	Ile	Leu	Tyr	Ile	Leu	Val	Pro	Ser	Val	Ala	Ile	Pro	Leu								
				405								410				415							
Ala	Ile	Ala	Leu	Leu	Phe	Phe	Phe	Ile	Cys	Val	Cys	Arg	Asn	Asn	Gln								
420								425								430							
Lys	Ser	Ser	Ser	Ala	Pro	Val	Gln	Arg	Gln	Pro	Lys	His	Val	Arg	Gly								
435								440								445							
Gln	Asn	Val	Glu	Met	Ser	Met	Leu	Asn	Ala	Tyr	Lys	Pro	Lys	Ser	Lys								
450								455								460							
Ala	Lys	Glu	Leu	Pro	Leu	Ser	Ala	Val	Arg	Phe	Met	Glu	Glu	Leu	Gly								
465				470								475				480							
Glu	Cys	Ala	Phe	Gly	Lys	Ile	Tyr	Lys	Gly	His	Leu	Tyr	Leu	Pro	Gly								
				485								490				495							

Met Asp His Ala Gln Leu Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys Asp Tyr Asn
500 505 510

Asn Pro Gln Gln Trp Thr Glu Phe Gln Gln Glu Ala Ser Leu Met Ala
515 520 525

Glu Leu His His Pro Asn Ile Val Cys Leu Leu Gly Ala Val Thr Gln
530 535 540

Glu Gln Pro Val Cys Met Leu Phe Glu Tyr Ile Asn Gln Gly Asp Leu
545 550 555 560

His Glu Phe Leu Ile Met Arg Ser Pro His Ser Asp Val Gly Cys Ser
565 570 575

Ser Asp Glu Asp Gly Thr Val Lys Ser Ser Leu Asp His Gly Asp Phe
580 585 590

Leu His Ile Ala Ile Gln Ile Ala Ala Gly Met Glu Tyr Leu Ser Ser
595 600 605

His Phe Phe Val His Lys Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Ile Gly
610 615 620

Glu Gln Leu His Val Lys Ile Ser Asp Leu Gly Leu Ser Arg Glu Ile
625 630 635 640

Tyr Ser Ala Asp Tyr Tyr Arg Val Gln Ser Lys Ser Leu Leu Pro Ile
645 650 655

Arg Trp Met Pro Pro Glu Ala Ile Met Tyr Gly Lys Phe Ser Ser Asp
660 665 670

Ser Asp Ile Trp Ser Phe Gly Val Val Leu Trp Glu Ile Phe Ser Phe
675 680 685

Gly Leu Gln Pro Tyr Tyr Gly Phe Ser Asn Gln Glu Val Ile Glu Met
690 695 700

Val Arg Lys Arg Gln Leu Leu Pro Cys Ser Glu Asp Cys Pro Pro Arg
705 710 715 720

Met Tyr Ser Leu Met Thr Glu Cys Trp Asn Glu Ile Pro Ser Arg Arg
725 730 735

Pro Arg Phe Lys Asp Ile His Val Arg Leu Arg Ser Trp Glu Gly Leu

740 745 750
 Ser Ser His Thr Ser Ser Thr Thr Pro Ser Gly Gly Asn Ala Thr Thr
 755 760 765

Gln Thr Thr Ser Leu Ser Ala Ser Pro Val Ser Asn Leu Ser Asn Pro
 770 775 780
 Arg Tyr Pro Asn Tyr Met Phe Pro Ser Gln Gly Ile Thr Pro Gln Gly
 785 790 795 800
 Gln Ile Ala Gly Phe Ile Gly Pro Pro Ile Pro Gln Asn Gln Arg Phe
 805 810 815
 Ile Pro Ile Asn Gly Tyr Pro Ile Pro Pro Gly Tyr Ala Ala Phe Pro
 820 825 830

Ala Ala His Tyr Gln Pro Thr Gly Pro Pro Arg Val Ile Gln His Cys
 835 840 845
 Pro Pro Pro Lys Ser Arg Ser Pro Ser Ser Ala Ser Gly Ser Thr Ser
 850 855 860
 Thr Gly His Val Thr Ser Leu Pro Ser Ser Gly Ser Asn Gln Glu Ala
 865 870 875 880
 Asn Ile Pro Leu Leu Pro His Met Ser Ile Pro Asn His Pro Gly Gly
 885 890 895

Met Gly Ile Thr Val Phe Gly Asn Lys Ser Gln Lys Pro Tyr Lys Ile
 900 905 910
 Asp Ser Lys Gln Ala Ser Leu Leu Gly Asp Ala Asn Ile His Gly His
 915 920 925
 Thr Glu Ser Met Ile Ser Ala Glu Leu
 930 935

<210> 53

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exemplary rule for determining light chain CDR-L3 motif

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is any amino acid

<400> 53

Phe Gly Xaa Gly

1

<210> 54

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exemplary rule for determining heavy chain CDR-H1motif

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(4)

<223> Xaa is any amino acid

<400> 54

Cys Xaa Xaa Xaa

1

<210> 55

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exemplary rule for determining heavy chain CDR-H2motif

<400> 55

Leu Glu Trp Ile Gly

1 5

<210> 56

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exemplary rule for determining heavy chain CDR-H3 motif

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is any amino acid

<400> 56

Trp Gly Xaa Gly

1

<210> 57

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Consensus Kozak sequence

<400> 57

gccrccatgg

10