



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0003938
 (43) 공개일자 2019년01월10일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) *A61K 35/17* (2014.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61K 39/39* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C07K 14/725* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) *C12N 15/86* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0636 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7027644
- (22) 출원일자(국제) 2017년02월24일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2018년09월21일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2017/019301
- (87) 국제공개번호 WO 2017/147383
 국제공개일자 2017년08월31일
- (30) 우선권주장
 16020057.2 2016년02월25일
 유럽특허청(EPO)(EP)

- (71) 출원인
셀 메디카 스위치란트 아게
 스위스 8952 솔리렌 바기슈트라체 27
더 유니버시티 오브 노스캐롤라이나 앳 채플 힐
 미국 노스캐롤라이나주 27517 채플 힐 스위트 430
 100 유로파 드라이브
- (72) 발명자
도티 잔피에트로
 미국 노스캐롤라이나주 27516 채플 힐 111 콰이뷰
 드라이브
란도니 엘리사
 미국 노스캐롤라이나주 27514 채플 힐 469 멜라니
 코트
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인아주김장리

전체 청구항 수 : 총 48 항

(54) 발명의 명칭 **면역치료를 위한 변형된 세포**

(57) 요약

본 발명은 항원 수용체, 예컨대 T 세포 수용체(TCR) 또는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 조작된 면역 세포, 및 PD-L1을 표적화하는 항체에 관한 것이다. 암 및 병원균을 향한 면역 반응을 증대시키기 위한 관련된 핵산, 백터, 조성물 및 방법이 또한 제공된다.

(52) CPC특허분류

A61K 39/39 (2013.01)
A61K 39/39591 (2013.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 16/2827 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/33 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)
C12N 2510/02 (2013.01)

(72) 발명자

삼시예브 아브디자파

스위스 8053 취리히 부츨슈트라쎄 64

크레추마어 타이투스

스위스 6331 회넨베르그 손할든슈트라쎄 63비

디로스테 미리암

스위스 8953 디디콘 그레우나우슈트라쎄 14

필립스 더글라스

스위스 8952 솔리렌 바기슈트라쎄 27 셀 메디카 스
위처란트 아게 내

명세서

청구범위

청구항 1

조작된 면역 세포로서,

- i) 항원 수용체, 및
- ii) PD-L1(programmed cell death ligand 1)을 차단하는 항체를 발현하는, 조작된 면역 세포.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체는 CD80 및 PD-1 둘 다와의 PD-L1 상호작용을 저해하는, 조작된 면역 세포.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항체는 인간화된, 조작된 면역 세포.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역 세포는,

T 세포,

자연 살해 T(NKT) 세포,

자연 살해(NK) 세포

인간 배아 줄기 세포,

조혈 줄기 세포(HSC) 또는

유도 다능성 줄기 세포(iPS)인, 조작된 면역 세포.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T 세포는 세포독성 T 림프구(CTL), 조절 T 림프구, 염증성 T 림프구, 헬퍼 T 림프구 또는 감마-델타 T 세포인, 조작된 면역 세포.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서, 상기 T 세포는 CD4+ 또는 CD8+ 또는 CD4+ 및 CD8+ 세포의 혼합 집단인, 조작된 면역 세포.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 수용체는 CAR이고, 상기 CAR은 세포질 도메인, 막관통 도메인 및 세포외 도메인을 포함하는, 조작된 면역 세포.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 CD3 제타, CD4, CD28, CD8 알파 또는 4-1BB 막관통 도메인인, 조작된 면역 세포.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CAR은 하나 이상의 동시자극 도메인을 더 포함하는, 조작된 면역 세포.

청구항 10

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 수용체는 TCR, 예컨대 내인성 TCR 또는 조작된 TCR인, 조

작된 면역 세포.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 수용체는 재조합으로 발현된, 조작된 면역 세포.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 전장 면역글로불린 또는 항체 유도체인, 조작된 면역 세포.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 기능적 Fc 도메인을 포함하는, 조작된 면역 세포.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 세포독성 면역 반응 또는 보체 활성화를 유도하지 않도록 변형된 Fc 도메인을 포함하는, 조작된 면역 세포.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 Fc 도메인을 포함하지 않는, 조작된 면역 세포.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 항체는 Fab, Fab', scFab, scFv, Fv 단편, 나노바디, VHH, dAb, 최소 인식 단위, 다이아바디, 단쇄 다이아바디(scDb), BiTE 또는 DART로 이루어진 군으로부터 선택된 항체 단편인, 조작된 면역 세포.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 100pM 미만의 KD로 인간 PD-L1을 결합시키는, 조작된 면역 세포.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는,

- i) 각각 서열 번호 6, 7, 및 8에 기재된 바와 같은 가변 중쇄(VH) CDR 서열 CDR-H1, CDR-H2 또는 CDR-H3 중 적어도 하나, 또는 이의 변이체,
- ii) 각각 서열 번호 3, 4 및 5에 기재된 바와 같은 가변 경쇄(VL) CDR 서열 CDR-L1, CDR-L2 또는 CDR-L3 중 적어도 하나, 또는 이의 변이체를 포함하는, 조작된 면역 세포.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는,

- i) 서열 번호 2의 적어도 하나의 VH 서열, 및/또는
- ii) 서열 번호 1의 적어도 하나의 VL 서열을 포함하는, 조작된 면역 세포.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 서열 번호 9를 포함하는, 조작된 면역 세포.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

- i) 서열 번호 2의 적어도 하나의 VH 프레임워크 서열, 및/또는
- ii) 서열 번호 1의 적어도 하나의 VL 프레임워크 서열을 포함하는, 조작된 면역 세포.

청구항 22

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 PD-L1에 대한 결합에 대해 제17항 내지 제19항 중 어느 한 항의 항체와 경쟁하는, 조작된 면역 세포.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 상기 세포에 의해 분비되고/되거나, 이의 표면에서 발현되는, 예를 들어 분비되는, 조작된 면역 세포.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 하나 이상의 사이토카인, 바람직하게는 인간 사이토카인, 예컨대 IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 및/또는 MIP-1 알파를 추가로 발현하고/하거나, 면역 저해 분자, 예컨대 형질전환 성장 인자-베타(TGF-β), IL-10, Fas, CD47, CTLA-4, Tim-3, LAG-3, 및 이들의 리간드를 표적화하는 하나 이상의 항체를 추가로 발현하는, 조작된 면역 세포.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 수용체는 종양 또는 병원균에 의해 발현되거나 이로부터 유래된 항원에 결합하는, 조작된 면역 세포.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원은 GD2, WT-1, 5T4, GPC3, CSPG4, MUC16, MUC1, CA1X, CEA, CDS, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD23, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD70, CD74, CD133, CD138, CD123, 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus: CMV) 단백질, 예컨대 pp65 또는 IE-1, 인간 파필로마바이러스(human papillomavirus: HPV) 단백질, 예컨대 E6 또는 E7, 엡스타인-바 바이러스(Epstein-Barr virus: EBV) 단백질, 예컨대 EBNA-1, LMP-1, LMP-2 또는 BARF-1, ADV 단백질, 예컨대 핵소, EGP-2, EGP-40, EpCAM, erb-B2, erb-B3, erb-B4, FBP, 태아 아세틸콜린 수용체, 플레이트 수용체-a, GD3, Her-1, HER-2, 조합의 HER2-HER3 또는 조합의 HER1-HER2, hTERT, IL-13R-a2, K-경쇄, DR, LeY, LI 세포 부착 분자, MAGE-A1, MAGE-A4, MAGE-A10, 메소텔린, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PSCA, PSMA, ROR1, TAG-72, VEGF-R2, EGFR, EGFRvIII, 돌연변이된 p53, 돌연변이된 ras, 돌연변이된 raf, 돌연변이된 RAC1, bcr/abl 융합, c-Met, 알파태아단백질, CA-125, MUC-1, 상피 종양 항원, 전립선 특이적 항원, 흑색종 연관된 항원, 플레이트 결합 단백질, HIV-1 엔벨로프 당단백질 gp120, HIV-1 엔벨로프 당단백질 gp41, 메소텔린, HERV-K 또는 ERBB2로 이루어진 군으로부터 선택된, 조작된 면역 세포.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 따른 항원 수용체 및 항체를 코딩하는 핵산.

청구항 28

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 따른 항원 수용체 및/또는 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 벡터.

청구항 29

제28항에 있어서, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노 연관된 바이러스(AAV), 플라스미드, 전이인자(transposon), 및 삽입 서열, 또는 인공 염색체 벡터인, 발현 벡터.

청구항 30

제28항 또는 제29항에 있어서, 다중시스트론성 벡터, 예컨대 이중시스트론성 벡터인, 발현 벡터.

청구항 31

제28항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 IRES 서열 및/또는 적어도 하나의 자가절단 서열, 예컨대 2A 서열을 포함하는, 발현 벡터.

청구항 32

제28항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 안전성 스위치, 예를 들어 유도성 자살 스위치를 더 포함하는, 발현 벡터.

청구항 33

제27항의 핵산을 포함하는 클로닝 벡터.

청구항 34

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 따른 면역 세포를 생성하는 방법으로서,

- (a) 면역 세포를 제공하는 단계,
- (b) 상기 항원 수용체를 코딩하는 적어도 하나의 핵산 및 상기 항체를 코딩하는 적어도 하나의 핵산을 상기 세포로 도입하는 단계; 및
- (c) 상기 세포에 의해 상기 핵산을 발현시키는 단계를 포함하는, 면역 세포를 생성하는 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 단계 (b)는 제28항 내지 제32항 중 어느 한 항의 발현 벡터를 상기 세포로 도입하는 것을 포함하는, 면역 세포를 생성하는 방법.

청구항 36

제34항 또는 제35항에 있어서,

- (i) 제34항의 항원 수용체와 상이한 항원 특이성을 갖는 적어도 하나의 다른 항원 수용체를 상기 세포로 도입하는 단계; 및/또는 제34항의 항체와 상이한 항원 특이성을 갖는 적어도 하나의 다른 항체를 상기 세포로 도입하는 단계를 더 포함하는, 면역 세포를 생성하는 방법.

청구항 37

약제학적 조성물로서,

- i) 유효량의 제1항 내지 제26항 중 어느 한 항의 조작된 면역 세포 또는 제28항 내지 제32항 중 어느 한 항의 발현 벡터, 및
- ii) 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 38

치료에서 사용하기 위한, 제1항 내지 제26항 중 어느 한 항의 조작된 면역 세포, 제28항 내지 제32항 중 어느 한 항의 발현 벡터 또는 제37항의 약제학적 조성물.

청구항 39

제38항에 있어서, 치료는 항체 치료, 화학치료, 사이토카인 치료, 수지상 세포 치료, 유전자 치료, 호르몬 치료, 레이저 광 치료 및 방사선 치료의 군으로부터 선택된 하나 이상의 치료와 조합된, 조작된 면역 세포, 발현 벡터 또는 약제학적 조성물.

청구항 40

치료를 요하는 대상체를 치료하는 방법으로서,

- (a) 제1항 내지 제26항 중 어느 한 항의 조작된 면역 세포를 제공하는 단계;
- (b) 상기 대상체에게 상기 면역 세포를 투여하는 단계를 포함하는, 대상체를 치료하는 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 면역 세포는 자가유래 또는 동종이계인, 대상체를 치료하는 방법.

청구항 42

제40항 또는 제41항에 있어서, 세포는 상기 대상체에게 1회 이상 투여되는, 대상체를 치료하는 방법.

청구항 43

치료를 요하는 대상체를 치료하는 방법으로서,

(a) 제28항 내지 제32항 중 어느 한 항의 발현 백터 또는 제37항의 약제학적 조성물을 제공하는 단계;

(b) 상기 대상체에게 상기 발현 백터 또는 상기 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체를 치료하는 방법.

청구항 44

제40항 또는 제43항에 있어서, 항체 치료, 화학치료, 사이토카인 치료, 수지상 세포 치료, 유전자 치료, 호르몬 치료, 레이저 광 치료 및 방사선 치료의 군으로부터 선택된 하나 이상의 치료와 조합된, 대상체를 치료하는 방법.

청구항 45

제38항 또는 제39항, 또는 제40항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료하고자 하는 병태는 전악성 또는 악성 암 병태, 예컨대 NSCLC(비소세포 폐 암종), 방광암, 흑색종, 신장 세포 암종, 호지킨 림프종, 두경부 편평 세포 암종, 난소암, 위장암, 간세포암, 신경교종, 유방암, 림프종, 소세포 폐 암종, 골수형성이상 증후군, 전립선암, 방광암, 자궁경부암, 비투명세포 신장암, 대장결장암, 육종, 대장암, 신장암, 폐암, 췌장암 또는 위암, 피부암, 자궁암, 교모세포종, 신경아세포종, 육종, 두경부암, 백혈병, 암종, 메르켈 세포 암종 또는 신장 세포 암종(RCC), 혈액암, 다발성 골수종, 림프아구성 백혈병(ALL), B 세포 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 비호지킨 림프종 및 난소암; 병원균 감염, 자가면역 장애인, 세포 또는 백터, 또는 방법.

청구항 46

암, 병원균 감염, 자가면역 장애의 치료를 위한 키트로서,

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항의 조작된 면역 세포 또는 제28항 내지 제32항 중 어느 한 항의 발현 백터, 및 사용을 위한 서면 설명서를 포함하는, 키트.

청구항 47

제46항에 있어서, 안전성 스위치의 유도자, 예컨대 유도성 자살 스위치를 더 포함하는, 키트.

청구항 48

제9항에 있어서, 상기 CAR은 하나 이상의 동시자극 도메인, 예를 들어 CD28, 4-1BB(CD137), ICOS 또는 OX40(CD134), 또는 각각 이들의 기능적 단편을 더 포함하는, 조작된 면역 세포.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 항원 수용체 및 PD-L1을 차단하는 항체를 발현하는 조작된 세포, 및 암 및 다른 장애의 치료를 위해 이를 사용하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 항원 특이적 면역 세포, 예컨대 T, NK 세포 또는 NKT 세포에 의한 면역치료는 상이한 유형의 질환, 예를 들어 암의 치료를 위한 유망한 접근법을 제공한다.

[0003] 하나의 치료 전략은 종양 세포를 특이적으로 표적화하고 통상적으로 세포의 항원 인식 도메인, 막관통 도메인,

및 예를 들어 T 세포 수용체 CD3-제타 사슬로부터 유래된 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor: CAR)를 발현하도록 면역 세포를 조작하는 것에 의한다. 신호전달 도메인은 하나 이상의 동시자극 분자 엔도도메인에 연결될 수 있다.

[0004] 훨씬 또 다른 접근법은 면역 세포로의 한정된 특이성을 갖는 항원 특이적 T 세포 수용체(T cell receptor: TCR)의 전달이다.

[0005] 세포 기반 면역치료는, 투여의 단일 용량 후에도 증식하고 지속하도록, 질환의 부위로의 통행에 대한 이러한 유전자 변형된 면역 세포의 가능성으로 인해, 단일클론 항체에 기초한 현재 이용 가능한 면역치료에 비해 주요 이점을 갖는다.

[0006] 암 세포는 면역계를 회피하는 많은 경로를 이용한다. PD-L1은 대개 종양 세포에서 발현되고, PD-1을 결합시킴으로써 T 세포 매개된 파괴로부터 종양 세포를 보호한다. PD-L1의 상향조절된 수준은 종양 공격성의 증가 및 사망 위험의 증가와 상관된다.

[0007] 동물 연구는 단일클론 항체를 통한 PD-L1:PD-1 상호작용의 차단이 T 세포 활성화를 개선하고 종양 진행을 감소시킨다는 것을 입증하였다. 임상 환경에서, PD-1 또는 PD-L1 중 어느 하나를 차단하는 단일클론 항체는 질환의 진행된 및 전이성 상태에서도 암 하위유형의 광범위한 세트에 걸쳐 인상적인 활성을 입증하였다(Maute et al (2015), PNAS, 24; 112(47): E6506-E6514).

[0008] 따라서, 항-PD-L1 항체와 조합된 항원 특이적 면역 세포를 사용한 치료학적 접근법은 유망하다. PD-L1에 대해 항원 수용체, 예컨대 TCR 및/또는 CAR 및 항체 둘 다를 발현하는 면역 세포의 생성은, 면역 세포의 작용 부위에서의 항체의 분비가 불활성화로 부터 이것을 보호할 것이므로, 특히 매력적이다. 더구나, 이러한 국소화된 항체 전달 치료 접근법은 투여되는 약물의 양에 있어서 전신 접근법에 비해 이점, 및 잠재적인 부작용을 갖는다.

[0009] W02014134165는 마우스 T 세포에서 키메라 항원 수용체(CAR) 및 항-마우스 PD-1 scFv의 동시발현을 기재한다. scFv는 US 7,858,746에 기재된 바대로 미국 햄스터 항-PD-1 항체 클론 J43으로부터 유래된다. scFv 작제물을 CAR 표적화 인간 CD19 또는 인간 MUC-CD를 발현하는 레트로바이러스 골격으로 클로닝하였다. 1차 쥐와 T 세포를 각각의 작제물에 의해 형질도입하였다.

[0010] 문헌[Suarez E. et al, Oncotarget. 2016 Jun 7; 7(23): 34341-34355] 및 W02016100985 둘 다는 인간 항-탄산탈수효소 IX(CAIX)를 표적화하고 인간 항-PD-L1 항체를 분비하는 아밍된(armored) CAR T 세포를 기재한다. 종양 부위에서의 국소 항체 전달은 면역 관문 경로의 현저한 저해를 발생시켰다. 쥐와 모델에서, 항-CAIX CAR T 세포 단독과 비교할 때 종양 성장은 5배 감소하고, 종양 중량은 50% 내지 80% 감소하였다. 항체는 IgG1 아이소타입이고, 따라서 ADCC를 매개할 수 있고, 이는 생체 모델에서 종양 부위로의 인간 NK 세포 동원을 발생시켰다.

[0011] 그러나, 치료제로서 아직 상업화되지 않았지만, 면역 관문 저해제에 대해 항원 수용체 및 항체 둘 다를 발현하는 면역 세포를 수반하는 효과적인 조합 치료를 제공하기 위한 유의미한 충족되지 않은 의학 수요가 여전히 존재한다.

발명의 내용

[0012] 따라서, 일 양태에서, 본 발명은

[0013] i) 항원 수용체, 및

[0014] ii) PD-L1을 결합시키고 이를 차단하는 항체

[0015] 를 발현하는 조작된 세포를 제공한다.

[0016] 이러한 항체는 인간화된 항체 또는 완전 인간 항체일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 항체는 서열 번호 3, 4, 5, 6, 7 및 8에 기재된 바와 같은 적어도 하나의 CDR 서열 또는 이들의 변이체를 포함할 수 있다.

[0017] 상기 항체는 바람직하게는 PD-L1 상의 에피토프에 결합하여서, CD80 및 PD-1 둘 다와의 PD-L1 상호작용이 저해된다. PD-1 이외에, PD-L1은 T 세포 및 B 세포에서 발현된 막 수용체인 CD80에 결합하지만, CD80에 대한 PD-L1의 결합 친화도는 PD-1에 대해 훨씬 더 적다. PD-1 또는 CD80 중 어느 하나에 대한 PD-L1 결합은 T 림프구에 저해 신호를 전달하여서, T 세포 이동, 증식 및 세포독성 매개자의 분비를 억제하고, 종양 세포 사멸을 감소시킨다. 그러나, PD-1/PD-L1 상호작용이 T 세포 기능소실을 추진하지만, PD-L1/CD80 상호작용은 T 세포 아네르기를 추진시킨다. 기능소실이 주 또는 달의 기간에 걸쳐 진행성이고 만성 항원 자극에 따라 달라지므로 이것은 분

명한 과정인 한편, 적절한 동시자극의 부재 하에 항원 자극 후 아네르기는 빠르게 유도된다.

- [0018] 세포는 바람직하게는 치료학적 세포이다. 적합한 세포는 예를 들어 T 세포, 자연 살해 T(NKT) 세포, 자연 살해(NK) 세포, 인간 배아 줄기 세포, 또는 조혈 줄기 세포(HSC) 또는 유도 다능성 줄기 세포(iPS)일 수 있다. 항원 수용체 및 항체를 발현하는 조작된 면역 세포가 본 명세서에 제공된다.
- [0019] 일 실시형태에서, 세포는 T 세포이다. 이러한 T 세포는 세포독성 T 림프구(CTL), 조절 T 림프구, 염증성 T 림프구, 헬퍼 T 림프구 또는 감마-델타 T 세포일 수 있다.
- [0020] 일 실시형태에서, 세포는 NKT 세포이다.
- [0021] 일 실시형태에서, 세포는 인간 기원이다. 일 실시형태에서, 세포는 자가유래이고, 일 실시형태에서, 세포는 동종이계이다.
- [0022] 일 실시형태에서, 항원 수용체는 암 항원, 예를 들어 오직 암 세포에서 발현되거나 암 세포에서 상향조절된 항원에 특이적이다.
- [0023] 일 실시형태에서, 항원 수용체는 T 세포 수용체, 예를 들어 (예를 들어, 항원에 특이적이도록 자극되거나 항원에 대한 이의 특이성에 선택된) 네이티브 T 세포 수용체 또는 조작된 T 세포 수용체이다.
- [0024] 일 실시형태에서, 항원 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR)이다.
- [0025] 일 실시형태에서, 항원 수용체는 막 앵커링된다.
- [0026] 일 실시형태에서, 본 개시내용에 따른 면역 세포는 TCR 및 CAR, 예를 들어 네이티브 TCR 및 CAR(특히 암 항원에 특이적)을 포함할 수 있다. 대안적으로, 본 개시내용의 면역 세포(예컨대, NK 세포)는 조작된 TCR 및 CAR을 포함할 수 있다.
- [0027] 본 명세서에 기재된 예시적인 조작된 면역 세포는 오직 항원 수용체를 발현하는 조작된 면역 세포와 비교하여 증대된 종양 사멸 활성을 보여준다. 예를 들어, 항원 수용체 및 항-PD-L1 항체 둘 다를 코딩하는 면역 세포는 오직 항원 수용체를 코딩하는 상응하는 세포보다 더 긴 기간 동안 암 세포를 사멸하는 데 있어서 효과적일 수 있다. 따라서, 본 개시내용에 따른 세포는 특히 종양 미소환경에서 기능소실에 덜 감수성이다.
- [0028] 본 명세서에 기재된 바와 같은 항원 수용체 및 핵산을 코딩하는 핵산, 및 이러한 핵산을 포함하는 벡터가 추가로 제공된다.
- [0029] 하기를 포함하는 본 명세서에 기재된 바와 같은 면역 세포를 생성하는 방법이 또한 제공된다:
- [0030] (a) 면역 세포를 제공하는 단계,
- [0031] (b) 상기 항원 수용체를 코딩하는 적어도 하나의 핵산 및 상기 항체를 코딩하는 적어도 하나의 핵산을 상기 세포로 도입하는 단계; 및
- [0032] (c) 상기 세포에 의해 상기 핵산을 발현시키는 단계.
- [0033] 하기를 포함하는 약제학적 조성물이 추가로 제공된다:
- [0034] i) 유효량의 본 명세서에 기재된 조작된 면역 세포 또는 발현 벡터, 및
- [0035] ii) 약제학적으로 허용 가능한 부형제.
- [0036] 치료에서 사용하기 위해 본 명세서에 기재된 바와 같은 조작된 면역 세포, 발현 벡터 또는 약제학적 조성물이 또한 제공된다. 하기를 포함하는 치료를 요하는 대상체를 치료하는 방법이 추가로 제공된다:
- [0037] (a) 본 명세서에 기재된 바와 같은 재조합 면역 세포를 제공하는 단계; 및
- [0038] (b) 상기 대상체에게 상기 면역 세포를 투여하는 단계.
- [0039] 본 발명은 대안, 예컨대 조작된 면역 세포 및 정제된 관문 저해제 항체의 조합된 사용에 비해 실질적인 이익을 제공한다. 관문 저해제 항체와 조합하여 조작된 면역 세포를 사용하고자 하는 시도에서, 숙련자는 항체 전달의 시기가 중요한 인자라는 것을 인식할 것이다. 더구나, 항체의 국소 농도가 또한 중요하다. 예를 들어, 종양 부위에서 항원 수용체 발현 세포(효과기 세포)와 이의 표적 세포 사이에 세포 접촉이 확립될 때 보호 작용을 제공하는 항체는 존재해야 한다. 의학 실행자에 대해, 필요한 암 위치에서 항체를 제공하기 위해, 예를 들어 융합에 의해 전통적인 항체 체제에서 전신 항체 투여의 정확한 시기를 결정하는 것이 실제로 불가능하다. 더구나, 전장

항체는 일반적으로 혈액 뇌 장벽을 횡단할 수 없다. 따라서, 전통적인(즉, 전장) 항체 제제의 전신 전달은 보통 뇌에서 암에 도달하지 않을 것이다. 따라서, 항체가 전신으로 고용량으로 투여되고, 이로써 부작용의 가능성을 증가시킨다. 반대로, 본 치료학적 접근법은 작용 부위에서 항체의 제어 방출을 제공하여서, 종양방지 효능 치료를 개선하고 대상체에 대한 부작용의 가능성을 감소시킨다.

[0040] 본 발명의 치료 또는 치료 방법은 항체 치료, 화학치료, 사이토카인 치료, 수지상 세포 치료, 유전자 치료, 호르몬 치료, 레이저 광 치료 및 방사선 치료로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 치료와 조합될 수 있다.

[0041] 본 명세서에 기재된 바와 같은 조작된 면역 세포 또는 발현 벡터, 및 사용을 위한 서면 설명서를 포함하는, 암, 병원균 감염, 및/또는 자가면역 장애의 치료를 위한 키트가 추가로 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0042] 도 1은 8510bp를 갖는 scFv 항-PD-L1 레트로바이러스 작제물 SFG.scFv.항-PD-L1(I)eGFP의 설계를 보여준다. 5' 말단에서의 NcoI 제한 부위, 3' 말단에서의 SphI 제한 부위 및 TGA 중단 코돈을 PCR에 의해 scFv 항-PD-L1 DNA에 첨가하였다. PCR 산물을 레트로바이러스 벡터 SFG(I)eGFP로 클로닝하여서 최종 벡터 SFG.scFv.항-PD-L1(I)eGFP를 얻었다. IRES에서 발현된 리포터 유전자 eGFP를 사용하여 형질도입 효율을 평가하였다. LTR: 긴 말단 반복; SD: 스플라이싱 도너; PS: 팩키징 신호; TGG: 절두된 gagpol; SA: 스플라이싱 억셉터; SP: 신호 펩타이드; VL: scFv의 가변 경쇄; L: 링커; VH: scFv의 가변 중쇄; IRES: 내부 리보솜 진입 부위; eGFP: 증강 녹색 형광성 단백질.

도 2는 CD4 및 CD8 T 세포가 CD4/CD8 비율의 변경 없이 scFv 항-PD-L1 레트로바이러스 작제물에 의해 형질도입될 수 있다는 것을 보여준다. SFG.scFv.항-PD-L1(I)eGFP 벡터의 형질도입 효율은 eGFP를 발현하는 CD4(도 2a) 또는 CD8(도 2b)의 백분율로 표시된다. 도 2c: T 세포의 CD4/CD8 비율. 평균 및 s.d가 표시된다(n = 4 독립 실험) 대응 t 시험에 의해 *P<0.1. NT: 비형질도입된 T 세포 - PD-L1: 오직 SFG.scFv.항-PD-L1(I)eGFP 벡터에 의해 형질도입된 T 세포; CAR.28 PD-L1: SFG.scFv.항-PD-L1(I)eGFP 벡터 및 CD28 엔도도메인을 코딩하는 GD2.CAR에 의해 동시형질도입된 T 세포; CAR.BB PD-L1: SFG.scFv.항-PD-L1(I)eGFP 벡터 및 4-1BB 엔도도메인을 코딩하는 GD2.CAR에 의해 동시형질도입된 T 세포.

도 3은 이중 레트로바이러스 형질도입 시 T 세포 동시발현된 GD2.CAR 및 eGFP 항-PD-L1을 보여준다. 도 3a: SFG.scFv.항-PD-L1(I)eGFP 벡터의 형질도입 효율. eGFP 양성 T 세포의 백분율이 표시된다. 도 3b: CD28 또는 4-1BB 엔도도메인 중 어느 하나를 코딩하는 GD2.CAR의 형질도입 효율.

도 3c: RFI(상대 형광 강도)로 표시된 GD2.CAR의 발현. 도 3d: GD2.CAR 및 scFv 항-PD-L1 레트로바이러스 벡터에 의해 동시형질도입된 T 세포의 백분율. 도 3e: T 세포 개시 후 10일에 T 세포의 대표적인 선도. 평균 및 s.d가 표시된다(n = 6 독립 실험) 대응 t 시험에 의해 *P<0.1, **P<0.01. NT: 비형질도입된 T 세포, CAR.28: CD28 엔도도메인 CAR.BB를 코딩하는 GD2.CAR에 의해 오직 형질도입된 T 세포: 4-1BB 엔도도메인-PD-L1을 코딩하는 GD2.CAR에 의해 오직 형질도입된 T 세포: SFG.scFv.항-PD-L1(I)eGFP 벡터; CAR.28 PD-L1에 의해 오직 형질도입된 T 세포: SFG.scFv.항-PD-L1(I)eGFP 벡터 및 CD28 엔도도메인 CAR.BB PD-L1을 코딩하는 GD2.CAR에 의해 동시형질도입된 T 세포. 종합하면, 이 결과는 T 세포가 SFG.scFv.항-PD-L1(I)eGFP 및 GD2.CAR 벡터에 의해 동시형질도입될 수 있고, SFG.scFv.항-PD-L1(I)eGFP 벡터에 의한 형질도입이 GD2.CAR의 발현 수준을 변경하지 않는다는 것을 나타낸다.

도 4는 scFv 항-PD-L1에 의한 형질도입이 T 세포 증식에 영향을 미치지 않는다는 것을 보여준다. 형질도입 전 2일에 T 세포의 수로 나눈 활성화 후 6일(도 4a) 및 12일(도 4b)에 T 세포의 수로 계산된 T 세포의 배수 증가. 평균 및 s.d가 표시된다(n = 6 독립 실험). NT: 비형질도입된 T 세포, CAR.28: CD28 엔도도메인 CAR.BB를 코딩하는 GD2.CAR에 의해 오직 형질도입된 T 세포: 4-1BB 엔도도메인-PD-L1을 코딩하는 GD2.CAR에 의해 오직 형질도입된 T 세포: SFG.scFv.항-PD-L1(I)eGFP 벡터에 의해 오직 형질도입된 T 세포; CAR.28 PD-L1: SFG.scFv.항-PD-L1(I)eGFP 벡터 및 CD28 엔도도메인 CAR.BB PD-L1을 코딩하는 GD2.CAR에 의해 동시형질도입된 T 세포: SFG.scFv.항-PD-L1(I)eGFP 벡터 및 4-1BB 엔도도메인을 코딩하는 GD2.CAR에 의해 동시형질도입된 T 세포.

도 5는 항-PD-L1 scFv의 발현이 T 세포 하위집단 조성물에 영향을 미치지 않는다는 것을 보여준다. 도 5a: CD62L, CD45RA 및 CD95의 발현에 의해 결정된 T 림프구 하위집단의 체계[미경험(TN) CD62L+CD45RA+CD95-, 줄기 세포 기억(TSCM) CD62L+CD45RA+CD95+, 중앙 기억(TCM) CD62L+CD45RA-, 효과기 기억(TEM) CD62L-CD45RA-, 효과

기 T 세포(TEFF) CD62L-CD45RA+]. T 세포 하위집단 조성물(도 5b), 부동화된 항-CD3/CD28에 의한 자극 후 10일에 CD27(도 5c), CD28(도 5d) 및 PD-1(도 5e) 양성 세포의 백분율. 평균 및 s.d.가 표시된다(n = 4 독립 실험).

도 6은 항-PD-L1 scFv가 형질도입된 T 세포에 의해 방출된다는 것을 보여준다. 도 6a: 10% FBS를 갖는 T 세포 배지에서 비형질도입된(NT) 및 항-PD-L1 scFv 형질도입된 T 세포(scFv PD-L1)로부터 방출된 항-PD-L1 scFv의 정량화. T 세포를 시딩하고, 부동화된 항-CD3/CD28 항체에 의해 활성화하였다. 상청액을 18시간 후 수집하고, 항-PD-L1 scFv를 특이적 샌드위치 ELISA에 의해 정량화하였다. 도 6b: 형질도입된 T 세포에 의해 분비된 항-PD-L1 scFv는 PD-L1을 결합시킨다. 비형질도입된(NT) 및 항-PD-L1 형질도입된 T 세포(scFv PD-L1)의 세포 배양 상청액을 재조합 인간 PD-L1에 대한 이의 결합에 대해 시험하였다. 이. 콜라이에서 생성된 항-PD-L1 scFv를 기준 대조군(scFv 대조군)으로서 사용하였다.

도 7은 항-PD-L1 scFv에 의해 형질도입된 4-1BB 엔도도메인을 갖는 GD2.CAR T 세포가 scFv 항-PD-L1을 분비하지 않는 4-1BB 엔도도메인을 갖는 GD2.CAR T 세포와 비교하여 동시배양의 제2 사이클에서 종양 세포의 더 양호한 사멸을 보여준다는 것을 보여준다. 도 7a는 항원 자극의 제1 사이클(7일)에서 4-1BB를 코딩하는 GD2.CAR-T가 종양 세포를 효율적으로 제거하고, 분비된 항-PD-L1 scFv의 존재가 GD2.CAR-T 세포독성 기능의 어떠한 손상도 나타내지 않는다는 것을 보여준다. 제2 사이클(14일) 동안, 항-PD-L1 scFv에 의해 형질도입된 4-1BB 엔도도메인을 갖는 GD2.CAR T 세포는 항-PD-L1 scFv가 없는 GD2.CAR T 세포보다 종양 세포의 사멸의 증대를 보여주었다. 동시배양의 제1(배양 7일; 도 7b) 및 제2 사이클(배양 14일; 도 7c)(각각 T 세포는 CD3+로 확인되고, 종양 세포 CHLA-255는 GD2+ 세포로 확인됨)의 종료 시 T 세포의 대표적인 선도. E:T 비율 1:5. CHLA: 종양 세포, T 세포: 종양 세포가 없는 단독의 T 세포, Tc NT: 비형질도입된 T 세포, Tc PD-L1: SFG.scFv. 항-PD-L1(I)eGFP 벡터에 의해 오직 형질도입된 T 세포, Tc CAR-41BB: 4-1BB 엔도도메인을 코딩하는 GD2.CAR에 의해 오직 형질도입된 T 세포, Tc CAR-41BB PD-L1: SFG.scFv. 항-PD-L1(I)eGFP 벡터 및 4-1BB 엔도도메인을 코딩하는 GD2.CAR에 의해 동시형질도입된 T 세포.

도 8은 항원 자극의 제1 사이클(7일)에서 4-1BB를 코딩하는 GD2.CAR-T가 IFN감마를 효율적으로 방출하고, 분비된 항-PD-L1 scFv의 존재가 GD2.CAR-T 기능(IFN감마 방출)의 어떠한 손상도 나타내지 않는다는 것을 보여준다. 제2 사이클(14일) 동안, 항-PD-L1 scFv에 의해 형질도입된 4-1BB 엔도도메인을 갖는 GD2.CAR T 세포는 제1(배양 7일; 도 8a) 및 제2(배양 14일; 도 8b) 종양 특이적 자극 후 처음 24시간에 생성된 IFN감마를 정량화하기 위한 항-PD-L1 scFv IFN감마 ELISA 검정 없이 GD2.CAR T 세포와 비교하여 IFN감마의 방출의 증대를 나타냈다.

도면에 걸쳐 사용된 바와 같은, "CAR.BB"는 "CAR.41BB" 및 "CAR.4-1BB"를 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 달리 정의되지 않은 한, 명세서, 도면 및 청구항에 사용된 모든 다른 과학 용어 및 기술 용어는 당해 분야의 숙련자가 흔히 이해하는 것과 같은 이의 통상의 의미를 갖는다. 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 재료가 본 명세서에 개시된 조작된 세포, 항체, 항원 수용체, 핵산, 벡터, 조성물, 방법 및 용도의 실행 또는 시험에서 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 재료는 하기 기재되어 있다. 본 명세서에 언급된 모든 공보, 특허 출원, 특허 및 다른 참고문헌은 그 전문이 참고로 포함된다. 상충의 경우에, 정의를 포함하는 본 명세서가 우세할 것이다. 재료, 방법 및 실시예는 단지 예시적이고, 제한인 것으로 의도되지 않는다.

[0044] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "조작된 면역 세포"는 본 명세서에 기재된 단백질을 발현하도록 유전자 변형된 면역 세포를 의미한다.

[0045] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "항원 수용체"는 항원 결합에 반응하여 면역 세포를 활성화할 수 있는 수용체를 의미한다. 예시적인 항원 수용체는 내인성(즉, 내인성) 또는 재조합 T 세포 수용체(TCR) 또는 키메라 항원 수용체(CAR)일 수 있다. TCR은 면역 세포에서 발현된 막 앵커링된 이종이합체 단백질이다. 항원 제시 세포에 의해 제시된 항원 분자에 결합 시, 면역 세포는 활성화된다. 몇몇 TCR이 가변 알파 및 베타 사슬을 포함하는 한편, 다른 것은, 변치않는 CD3 사슬 분자와 복합체의 일부로서 발현되는, 감마 및 델타 사슬을 포함한다. 알파 및 베타 사슬의 각각은 가변 영역 및 불변 영역(둘 다 세포의 위치함)을 포함할 수 있고, 각각의 가변 도메인은 펩타이드/MHC 복합체에 대한 TCR의 결합을 가능하게 하는 3개의 상보성 결정 영역(CDR)을 갖는다. 베타 사슬의 가변 영역은 통상적으로 항원과 접촉하지 않는 추가 초가변 영역 HV4를 갖고, 따라서 CDR인 것으로 생각되지 않는다(예를 들어, 문헌[Richman, S.A. et al, Mol Immunol. 2009; 46(5): 902-916] 참조).

[0046] CAR은 통상적으로 세포의 도메인(엑토도메인), 막관통 도메인 및 세포질 도메인(엔도도메인)을 포함한다. 엑토

도메인은 항원 인식을 제공하고, 가장 흔히 scFv이지만, 다른 항체 포맷을 또한 사용할 수 있다. scFv는 스페이서를 통해 막관통 도메인에 연결되고, 이것은 이후 엔도도메인에 연결된다. 1세대 CAR은 CD3-제타를 포함하는 단순한 구조화된 엔도도메인을 갖는다. 항원 결합 시, 수용체 클러스터 및 활성화 신호는 세포로 전송된다. 활성화 신호를 증가시키기 위해, 2세대 CAR은 동시자극 도메인, 예컨대 CD28, OX40 및/또는 4-1BB를 더 포함하고, 3세대 CAR은 2개 이상의 동시자극 도메인을 포함한다(Maus MV et al (2014) Blood, 123: 2625-2635). CD3-제타를 제외하고, 다른 ITAM 함유 도메인은 IgE-γ 도메인에 대한 Fc 수용체를 포함하여 조사되었다.

[0047] 몇몇 실시형태에서, 항원 수용체에 대한 항원의 결합은 면역 반응의 개시를 발생시키는 면역 세포에서 단백질 발현의 변경 또는 신호 형질도입의 유도를 통해 면역 세포를 활성화한다.

[0048] 용어 "내인성"은 재조합 조작 부재로 세포 또는 조직에서 보통 발견되는 핵산 또는 폴리펩타이드를 의미한다.

[0049] 본 명세서에 사용된 바와 같은, "PD-L1"은 "프로그래밍된 세포사 리간드 1(programmed cell death ligand 1)", "분화 클러스터 274(즉, CD274)" 또는 "B7 동족체 1(즉, B7-H1)"로도 공지된 단백질을 의미한다. 네이티브 단백질은 막관통 도메인 및 세포질 도메인인 2개의 세포의 도메인을 포함한다. 상기 용어는 전장 및/또는 비가공처리된 PD-L1, 및 세포에서의 가공처리로부터 생긴 임의의 중간체를 포함한다. PD-L1은 막관통 단백질 또는 가용성 단백질로서 존재할 수 있고, 따라서 본 명세서에 사용된 바와 같은 상기 용어는 단백질의 전장 또는 세포의 도메인을 의미할 수 있다. 상기 용어는 또한 PD-L1의 천연 발생 변이체, 예를 들어 스플라이스 변이체 또는 대립형질 변이체를 포함한다. 단백질은 태그, 예컨대 his 태그 또는 Fc 태그를 추가로 함유할 수 있다. 예시적인 인간 전장 PD-L1 단백질의 아미노산 서열은 예를 들어 NCBI 단백질 데이터베이스 수탁 번호 NP_054862 하에 발견될 수 있다. 용어 "hPD-L1"은 인간 PD-L1을 의미하고, 자연 hPD-L1 및 재조합 인간 rhPD-L1을 포함한다. "rPD-L1"은 재조합 PD-L1을 의미한다. 재조합 PD-L1은 이것이 제조되는 방법에 따라 아미노 말단 메티오닌 잔기를 갖거나 갖지 않을 수 있다. "rhPD-L1"은 재조합 인간 PD-L1을 의미한다. 마찬가지로, PD-L1을 인간 또는 비인간 기원의 생물학적 샘플로부터의 단리에 의해 또한 얻을 수 있다. rhPD-L1을 예를 들어 RnD Systems(미국, 카탈로그 156-B7호), 또는 Peprotech(미국, 카탈로그 310-35호)로부터 얻을 수 있다. "원숭이 PD-L1"은 레서스 마카크(Rhesus macaque)(마카카 몰라타)의 PD-L1을 의미한다. PD-L1 단백질의 예시적인 원숭이의 아미노산 서열은 예를 들어 NCBI 단백질 데이터베이스 수탁 번호 NP_001077358 하에 발견될 수 있다. 원숭이 PD-L1을 예를 들어 Sino Biological(중국, 카탈로그 90251-C02H호)로부터 얻을 수 있다. "랫 PD-L1"은 라투스 노르베기쿠스(Rattus norvegicus)(노르웨이 랫트)의 PD-L1을 의미한다. 예시적인 랫트 PD-L1 단백질의 아미노산 서열은 예를 들어 NCBI 단백질 데이터베이스 수탁 번호 NP_001178883 하에 발견될 수 있다. 랫트 PD-L1을 예를 들어 Sino Biological(중국, 카탈로그 80450-R02H호)로부터 얻을 수 있다. "마우스 PD-L1"은 무스 무스쿨루스(Mus musculus)의 PD-L1을 의미한다. 예시적인 마우스 PD-L1 단백질의 아미노산 서열은 예를 들어 NCBI 단백질 데이터베이스 수탁 번호 NP_068693 하에 발견될 수 있다. 마우스 PD-L1을 예를 들어 Sino Biological(중국, 카탈로그 50010-M03H호) 또는 RnD Systems(미국, 카탈로그 1019-B7-100호)로부터 얻을 수 있다.

[0050] "PD-1"은 PD-L1에 대한 세포 표면 수용체인 CD279로도 공지된 프로그래밍된 세포사 단백질 1이다. PD-1은 PD-L1 및 PD-L2인 2개의 리간드를 결합시킨다. PD-1은 세포의 도메인, 이어서 막관통 영역 및 세포내 도메인을 포함하는 막관통 단백질이다. 상기 용어는 전장 및/또는 비가공처리된 PD-1, 및 세포에서의 가공처리로부터 생긴 임의의 중간체를 포함한다. PD-1은 막관통 단백질 또는 가용성 단백질로서 존재할 수 있고, 따라서 본 명세서에 사용된 바와 같은 상기 용어는 단백질의 전장 또는 세포의 도메인을 의미할 수 있다. 상기 용어는 또한 PD-1의 천연 발생 변이체, 예를 들어 스플라이스 변이체 또는 대립형질 변이체를 포함한다. 단백질은 태그, 예컨대 his 태그 또는 Fc 태그를 추가로 함유할 수 있다. 예시적인 인간 PD-1 단백질의 아미노산 서열은 예를 들어 NCBI 단백질 데이터베이스 수탁 번호 NP_005009 하에 발견될 수 있다. 용어 "hPD-1"은 인간 PD-1을 의미하고, 이의 천연 형태(hPD-1), 및 재조합 인간 형태(rhPD-1)를 포함한다. "rPD-1"은 재조합 PD-1을 의미한다.

[0051] "CD80"은 B7-1, B7.1, BB1, CD28LG, CD28LG1, LAB7로도 공지된 분화 클러스터 80을 의미한다. 이것은 CD28 및 CTLA-4 및 PD-L1에 대한 막 수용체이고, 세포의 도메인, 이어서 막관통 영역 및 세포내 도메인을 포함한다. 상기 용어는 전장 및/또는 비가공처리된 CD80, 및 세포에서의 가공처리로부터 생긴 임의의 중간체를 포함한다. CD80은 막관통 단백질 또는 가용성 단백질로서 존재할 수 있고, 따라서 본 명세서에 사용된 바와 같은 상기 용어는 단백질의 전장 또는 세포의 도메인을 의미할 수 있다. 상기 용어는 또한 CD80의 천연 발생 변이체, 예를 들어 스플라이스 변이체 또는 대립형질 변이체를 포함한다. 단백질은 태그, 예컨대 his 태그 또는 Fc 태그를 추가로 함유할 수 있다. 예시적인 인간 CD80 단백질의 아미노산 서열은 예를 들어 NCBI 단백질 데이터베이스 수탁 번호 NP_005182 하에 발견될 수 있다. CD80을 RnD Systems(미국, 카탈로그 9050-B1-100호)로부터 얻을 수 있다. 용어 "hCD80"은 인간 CD80을 의미하고, 이의 천연 형태(hCD80), 및 재조합 인간 형태(rhCD80)를

포함한다. "rCD80"은 재조합 CD80을 의미한다.

- [0052] "PD-L2"는 "프로그래밍된 세포사 1 리간드 2", "B7-DC" 또는 "CD273"(분화 클러스터 273)으로도 공지된 단백질을 의미한다. 본 명세서에 사용된 바와 같은 상기 용어는 전장 및/또는 비가공처리된 PD-L2, 및 세포에서의 가공처리로부터 생긴 임의의 중간체를 포함한다. PD-L2는 막관통 단백질 또는 가용성 단백질로서 존재할 수 있고, 따라서 본 명세서에 사용된 바와 같은 상기 용어는 단백질의 전장 또는 세포의 도메인을 의미할 수 있다. 상기 용어는 또한 PD-L2의 천연 발생 변이체, 예를 들어 스플라이스 변이체 또는 대립형질 변이체를 포함한다. 단백질은 태그, 예컨대 his 태그 또는 Fc 태그를 추가로 함유할 수 있다. 예시적인 인간 전장 PD-L2 단백질의 아미노산 서열은 예를 들어 NCBI 단백질 데이터베이스 수탁 번호 NP_079515 하에 발견될 수 있다. PD-L2를 RnD Systems(미국, 카탈로그 1224-PL호)로부터 얻을 수 있다. 용어 "rhPD-L2"는 재조합 인간 PD-L2를 의미한다.
- [0053] "B7-H3"은 CD276(분화 클러스터 276)으로도 공지된 단백질을 의미한다. 본 명세서에 사용된 바와 같은 상기 용어는 전장 및/또는 비가공처리된 B7-H3, 및 세포에서의 가공처리로부터 생긴 임의의 중간체를 포함한다. B7-H3은 막관통 단백질 또는 가용성 단백질로서 존재할 수 있고, 따라서 본 명세서에 사용된 바와 같은 상기 용어는 단백질의 전장 또는 세포의 도메인을 의미할 수 있다. 상기 용어는 또한 B7-H3의 천연 발생 변이체, 예를 들어 스플라이스 변이체 또는 대립형질 변이체를 포함한다. 단백질은 태그, 예컨대 his 태그 또는 Fc 태그를 추가로 함유할 수 있다. 예시적인 인간 전장 B7-H3 단백질의 아미노산 서열은 예를 들어 NCBI 단백질 데이터베이스 수탁 번호 NP_079516 하에 발견될 수 있다. B7-H3을 RnD Systems(미국, 카탈로그 1027-B3호)로부터 얻을 수 있다. 용어 "rhB7-H3"은 재조합 인간 B7-H3을 의미한다.
- [0054] 본 명세서에 사용된 바와 같은 T 세포 기능소실은 많은 만성 바이러스 감염, 자가면역 및 암 동안 생긴 T 세포 기능이상 상태이다. 이것은 불량한 효과기 기능, 저해 수용체의 지속적인 발현 및 기능성 효과기 또는 기억 T 세포의 것과 구별되는 전사 상태를 특징으로 한다. 기능소실은 즉 특히 만성 환경에서 감염성 병태 및 종양의 최적 제어를 막는다.
- [0055] 종양방지 T 세포가 종양 미소환경에서 항원에 꾸준히 노출되므로, 이것은 특히 기능소실에 감수성이다. 기능소실은 마찬가지로 암 환자에서 T 세포 기능이상에 기여하는 기전이다. 따라서, 기능소실된 T 세포는 흑색종 환자, 및 난소암 및 간세포암종을 갖는 환자에 대해 보고되어 있다. 기능소실된 T 세포는 PD-1 및 LAG-3을 포함하는 다수의 저해 수용체를 발현하고, 세포독성 및 증식성 가능성을 점진적으로 소실한다. 궁극적으로, 이것은 아포토시스로 추진될 수 있다. 저해 수용체의 높은 수준의 발현은 프로그래밍된 세포사 단백질 1(PD-1), 림프구 활성화 유전자 3 단백질(LAG-3), T 세포 면역글로불린 도메인 및 뮤신 도메인 단백질 3(TIM-3), 세포독성 T 림프구 항원-4(CTLA-4), 밴드 T 림프구 감쇠기(BTLA) 및 T 세포 면역글로불린 및 면역수용체 타이로신 기반 저해 모터프 도메인(TIGIT)을 포함한다. 기능소실된 T 세포의 다른 주요 특징은 효과기 사이토카인을 발현하는 이의 능력의 점진적 소실이다. 통상적으로, 인터류킨-2(IL-2) 생성 및 세포의 사멸 역량은 기능소실의 초기 단계에서 소실된다. 중간 단계에서, 종양 괴사 인자-알파(TNF-알파) 생성은 소실된다. 마지막으로, 기능소실의 진행된 상태에서, 인터페론-감마(IFN-감마) 및 그랜자임 B(GzmB) 생성은 소실된다. 기능소실된 T 세포를 종양 미소환경과 연결시키는 제1 증거는 프로그래밍된 세포사 리간드 1이 과발현된다는 것이다. 예를 들어, 문헌[Jiang et al, Cell Death and Disease (2015) 6, e1 792]을 참조한다.
- [0056] T 세포 기능소실이 만성 과자극의 결과인 한편, T 세포 아네르기는 통상적으로 (i) CD28을 통한 적절한 동반하는 동시자극 없이 또는 (ii) 높은 동시저해 분자 신호전달의 존재에서 TCR을 촉발함으로써 유도된 과반응성 상태를 의미한다. 이의 결과로서, IL-2는 효과적으로 전사되지 않지만, 음성 피드백을 통해 손상된 TCR 신호전달에 기여하는 아네르기 연관된 유전자, 예컨대 GRAIL은 대신에 발현된다.
- [0057] 용어 "단리된"은 물질, 예컨대 펩타이드, 핵산 분자 또는 세포가 이의 정상 생리학적 환경, 예를 들어 자연 소스로부터 제거되거나, 펩타이드 또는 핵산이 합성된다는 것을 나타낸다. 용어 "단리된"의 사용은 천연 발생 서열이 이의 정상 세포(예를 들어, 염색체 또는 세포) 환경으로부터 제거된다는 것을 나타낸다. 따라서, 서열은 무세포 용액에 있거나 상이한 세포 환경에 놓일 수 있다. 폴리펩타이드 또는 핵산 분자의 언급에서 "단리된"은, 자연 소스로부터 단리되거나 합성된 폴리펩타이드 또는 핵산 분자를 포함하는, 서로에 커플링된 아미노산(2개 이상의 아미노산) 또는 뉴클레오타이드의 중합체를 의미한다. 용어 "단리된"은 서열이 존재하는 오직 아미노산 사슬 또는 뉴클레오타이드 사슬이라는 것을 암시하지 않지만, 이것과 자연적으로 연관된 각각 예를 들어 비아미노산 재료 및/또는 비핵산 재료가 본질적으로 없다는 것을 암시한다. "단리된 세포"는 세포를 자연적으로 동반하지 않는 분자 및/또는 세포 성분으로부터 분리된 세포를 의미한다.
- [0058] "변이체"는, 본 명세서에 개시된 모 서열의 적어도 하나의 원하는 활성을 보유하면서, 하나 이상의 아미노산 잔

기 또는 핵염기의 부가(삽입 포함), 결실, 변형 및/또는 치환에 의해 모 서열과 다른 아미노산 또는 핵산 서열을 의미한다. 항체의 경우에, 이러한 원하는 활성은 특이적 항원 결합을 포함할 수 있다. 유사하게, 변이체 핵산 서열은 하나 이상의 핵염기의 부가, 결실 및/또는 치환에 의해 모 서열과 비교할 때 변형될 수 있지만, 코딩된 항체는 상기 기재된 바와 같은 원하는 활성을 보유한다. 변이체는 천연 발생, 예컨대 대립형질 또는 스플라이스 변이체일 수 있거나, 인공으로 작제될 수 있다.

[0059] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "동일성"은 2개의 단백질 또는 핵산 사이의 서열 매치를 의미한다. 비교하고자 하는 단백질 또는 핵산 서열은 예를 들어 생물정보학 도구, 예컨대 EMBOS Needle(쌍별 정렬; www.ebi.ac.uk에서 이용 가능)을 이용하여 또는 수동 정렬 및 육안 검사에 의해 비교창에 걸쳐 최대 조율에 대해 정렬된다. 동일한 핵염기 또는 아미노산 잔기가 비교하고자 하는 서열에서의 동일한 위치를 점유할 때, 각각의 분자는 바로 그 위치에서 동일하다. 따라서, "동일성 백분율"은 비교되는 위치의 수로 나누고 100%을 곱한 매칭 위치의 수의 함수이다. 예를 들어, 10개 중 6개의 서열 위치가 동일한 경우, 동일성은 60%이다. 최대 조율에 대해 서열을 정렬하는 것은 갭을 도입하는 것을 요할 수 있다. 2개의 단백질 서열 사이의 동일성 백분율은, BLOSUM62 매트릭스, 10의 "갭 오픈 패널티", 0.5의 "갭 연장 패널티", 거짓 "종료 갭 패널티", 10의 "종료 갭 오픈 패널티" 및 "0.5의 종료 갭 연장 패널티"를 이용하여, 예를 들어 EMBOS Needle로 도입된, Needleman 및 Wunsch 알고리즘(Needleman S.B. and Wunsch CD. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.* 1970, vol. 48, p.443)을 이용하여 결정될 수 있거나, 동일성을 최대화하는 방식으로 갭을 수동으로 도입하는 서열을 정렬하는 방법이 이용될 수 있다. 동일한 1차 아미노산 또는 핵산 서열을 갖는 2개의 분자는 임의의 화학적 및/또는 생물학적 변형과 무관하게 동일하다. 예를 들어, 동일한 1차 아미노산 서열, 그러나 상이한 글라이코실화 패턴을 갖는 2개의 항체는 이 정의에 의해 동일하다. 핵산의 경우에, 예를 들어 동일한 서열, 그러나 포스페이트 대신에 상이한 연결 성분, 예컨대 티오포스페이트를 갖는 2개의 분자는 이 정의에 의해 동일하다. 유사하게, 사이토신 및 5-메틸-사이토신과 같은 오직 엑소사이클릭 변형 때문에 다른 핵염기는 이 정의에 의해 동일하다.

[0060] 본 명세서에 제공된 임의의 서열보다 긴 서열은 예를 들어 몇몇 가변 도메인 또는 하나 이상의 불변 도메인을 포함하므로, 이것은 그럼에도 불구하고 비교창에 걸쳐 서열 동일성이 주어지는 경우 본 명세서에 개시된 기준 서열과 동일해야 한다. 본 명세서에 사용된 바와 같은 비교창은 청구된 바와 같은 전체 서열을 포함한다.

[0061] 용어 "CDR"은 주로 항원 결합에 기여하는 항체의 추가변 영역을 의미한다. 통상적으로, 항원 결합 부위는 프레임워크 스캐폴드로 임베딩된 6개의 CDR을 포함한다. 본 명세서에서, VL의 CDR은 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3이라 불리는 한편, VH의 CDR은 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3이라 불린다. 이것은 문헌[Kabat, E.A., et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest. 5th edition. Edited by U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. NIH Publications, 1991. p. 91-3242]에 기재된 바대로 확인될 수 있다. 그러나, 본 명세서에 사용된 바와 같은 CDR-H1은 이것이 27번 위치에 의해 시작하고 36번 위치 전에 끝난다는 점에서 Kabat 정의와 다르다(AH0 위치 28 내지 42, 포함).

[0062] 본 명세서에 사용된 바대로, 항체의 VH 및 VL에서의 아미노산 잔기 위치를 식별하기 위한 넘버링 시스템은 Honegger A. 및 Plickthun A.가 기재한 "AH0"-시스템에 상응한다. 번역글로불린 가변 도메인에 대한 훨씬 또 다른 넘버링 체계: An automatic modelling and analysis tool. *J. Mol. Biol.* 2001, vol. 309, p.657. 상기 간행물은 추가로 AH0 시스템과 Kabat 시스템 사이의 전환표를 제공한다(Kabat E.A. et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest. 5th edition. Edited by U.S. Department of Health and Human Services. NIH Publications, 1991. No. 91-3242).

[0063] 용어 "프레임워크"(FR)는, 각각의 CDR을 임베딩하는, 가변 경쇄(VL) 또는 가변 중쇄(VH) 중 어느 하나인 가변 항체 도메인의 스캐폴드를 의미한다. VL 및/또는 VH 프레임워크는 통상적으로 CDR 영역을 플랭킹하는 FR1, FR2, FR3 및 FR4인 4개의 프레임워크 섹션을 포함한다. 따라서, 당해 분야에 공지된 것처럼, VL은 일반 구조: (FR-L1) - (CDR-L1) - (FR-L2) - (CDR-L2) - (FR-L3) - (CDR-L3) - (FR-L4)를 갖는 한편, VH는 일반 구조: (FR-H1) - (CDR-H1) - (FR-H2) - (CDR-H2) - (FR-H3) - (CDR-H3) - (FR-H4)를 갖는다. 본 개시내용의 다양한 양태는 하기 하위부문에 더 자세하게 기재되어 있다. 다양한 실시형태, 바람직함 및 범위가 조합될 수 있는 것으로 이해된다. 추가로, 구체적인 실시형태에 따라, 선택된 정의, 실시형태 또는 범위가 적용되지 않을 수 있다.

[0064] 제1 양태에서, 본 발명은

[0065] i) 항원 수용체, 및

- [0066] ii) PD-L1을 차단하는 항체
- [0067] 를 발현하는 조작된 면역 세포를 제공한다.
- [0068] 이러한 면역 세포는 예를 들어 T 세포, 자연 살해 T(NKT) 세포, 자연 살해(NK) 세포, 인간 배아 줄기 세포, 조혈 줄기 세포(HSC) 또는 유도 다능성 줄기 세포(iPS)일 수 있다.
- [0069] 상기 T 세포는 세포독성 T 림프구(CTL), 조절 T 림프구, 염증성 T 림프구, 또는 헬퍼 T 림프구 또는 감마-델타 T 세포일 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, 상기 T 세포는 CD4+ 또는 CD8+ 또는 CD4+ 및 CD8+ 세포의 혼합 집단이다.
- [0070] 몇몇 실시형태에서, 항원 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR)이다. 상기 설명된 바대로, CAR은 세포내 신호전달 도메인으로서 작용하는 세포질 도메인, 막관통 도메인 및 항원 인식의 역할을 하는 세포외 도메인을 포함한다. 세포외 도메인은 세포 표면으로 도메인의 운반을 지시하기 위해 신호 펩타이드에 연결될 수 있다. 상기 신호 펩타이드는 절단 가능할 수 있다.
- [0071] 통상적으로, 막관통 도메인과 세포외 도메인 사이에 스페이서 또는 힌지 영역이 존재한다. 이러한 힌지 영역은 예를 들어 CD8a 힌지, IgG1 힌지 또는 FcyR11 힌지로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0072] 몇몇 실시형태에서, CAR은 CD3 제타, CD4, CD28, CD8 알파 또는 4-1BB 막관통 도메인을 포함한다.
- [0073] 추가로, CAR은 예를 들어 각각 CD28, 4-1BB(CD137), ICOS 또는 OX40(CD134) 동시자극 도메인, 또는 이들의 기능적 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 동시자극 도메인을 포함할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, CAR은 4-1BB 동시자극 도메인 또는 이의 기능적 단편을 포함한다. CD28 및 4-1BB 동시자극 도메인의 예시적인 서열은 각각 서열 번호 49 및 47에 제공된다.
- [0074] 통상적으로, 세포질 도메인은 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함한다. CD3 제타 신호전달 도메인의 예시적인 서열은 서열 번호 48에서 주어진다.
- [0075] 상응하는 서열은 널리 공지되어 있고, 당해 분야에서 이용 가능하다. 신호 펩타이드, 힌지 영역, 막관통 도메인의 예시적인 서열은 W02016/034666(본 명세서에 참고로 포함됨)의 도 1에 제공된다. 상기 서열의 변이체를 또한 사용할 수 있다. 다른 신호 펩타이드, 힌지 영역, 막관통 도메인, 동시자극 도메인 및/또는 신호전달 도메인은 또한 본 발명의 범위 내에 사용될 수 있다.
- [0076] 몇몇 실시형태에서, CAR 구성은 문헌[Heczey A. et al, Blood. 2014 Oct 30; 124(18):2824-33](본 명세서에 참고로 포함됨)의 도 1에 도시된 바와 같다.
- [0077] 몇몇 실시형태에서, CAR은 GD2 표적화 세포의 도메인, 예컨대 14g2a scFv 또는 14g2a 가변 도메인을 포함하는 항체 또는 14g2a scFv의 CDR을 포함하는 항체, 또는 각각 이들의 변이체, CD3 제타 신호전달 도메인 및 CD28 동시자극 도메인을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, CAR은 GD2 표적화 세포의 도메인, 예컨대 14g2a scFv, 14g2a 가변 도메인을 포함하는 항체 또는 14g2a scFv의 CDR을 포함하는 항체, 또는 각각 이들의 변이체, CD3 제타 신호전달 도메인 및 4-1BB 동시자극 도메인을 포함한다. 14g2a scFv의 VH 및 VL 서열은 예를 들어 각각 수탁 번호 4TUO_A 및 4TUO_B 하에 PDB 데이터베이스에서 발견될 수 있다(또한 서열 번호 13 및 14 참조). 14g2a 유래된 서열의 변이체, 특히 프레임워크 돌연변이를 갖는 변이체, 예컨대 가변 경쇄 및/또는 중쇄에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 돌연변이의 사용이 또한 고려된다. 적어도 1개의, 바람직하게는 모든 서열 번호 13 및 14에 기재된 바와 같은 CDR 서열, 즉 서열 번호 16 내지 21의 적어도 1개의, 바람직하게는 모든 CDR 서열을 포함하는 항-GD2-CAR이 바람직하다. 예시적인 GD2 특이적 CAR 작제물은 문헌[Heczey A. et al, Blood. 2014 Oct 30; 124(18):2824-33, in Pule, M A. et al, Mol Ther, 12(5), November 2005, 933-941](상이한 수용체의 막관통 및 엔도도메인의 아미노산 서열에 대해 도 1 참조), 및 W02012033885(모든 3개는 본 명세서에 참고로 포함됨)에 기재되어 있다.
- [0078] 몇몇 실시형태에서, CAR은 CSPG4 표적화 세포의 도메인을 포함한다. 바람직하게는, 이러한 CAR은 서열 번호 22 내지 27의 적어도 1개의, 바람직하게는 모든 CDR을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 이러한 CAR은 서열 번호 28의 VL 서열 및/또는 서열 번호 29의 VH 서열을 포함한다. 예시적인 CSPG4 특이적 CAR 작제물은 W02015/080981(본 명세서에 참고로 포함됨)에 기재되어 있다.
- [0079] 몇몇 실시형태에서, CAR은 GPC3 표적화 세포의 도메인을 포함한다. 바람직하게는, 이러한 CAR은 서열 번호 30 내지 35의 적어도 1개의, 바람직하게는 모든 CDR을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 이러한 CAR은 서열 번호 36의

VL 서열 및/또는 서열 번호 37 및 서열 번호 38로 이루어진 군으로부터 선택된 VH 서열을 포함한다. 예시적인 GPC3 특이적 CAR 작제물은 W02016/049459(본 명세서에 참고로 포함됨)에 기재되어 있다.

- [0080] 몇몇 실시형태에서, CAR은 5T4 표적화 세포의 도메인을 포함한다. 바람직하게는, 이러한 CAR은 서열 번호 39 내지 44의 적어도 1개의, 바람직하게는 모든 CDR을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 이러한 CAR은 서열 번호 45의 VL 서열 및/또는 서열 번호 46의 VH 서열을 포함한다. 예시적인 5T4 특이적 CAR 작제물은 W02016/034666(본 명세서에 참고로 포함됨)에 기재되어 있다.
- [0081] 추가로 또는 대안적으로, 항원 수용체는 T 세포 수용체(TCR)이다. TCR은 내인성(또는 네이티브) TCR 또는 조작된 TCR일 수 있다. 내인성 TCR은 예를 들어 항원에 대한 이의 특이성에 대해 선택될 수 있다.
- [0082] 일 실시형태에서, 조작된 TCR은 네이티브 TCR(이의 서열은 면역 세포에서 재조합으로 발현됨)이다. 몇몇 실시형태에서, 조작된 TCR은 네이티브 TCR로부터 유래되지만, 점 돌연변이를 포함한다. 일 실시형태에서, 조작된 TCR은 예를 들어 W02006/000830(본 명세서에 참고로 포함됨)에 개시된 바대로 불변 영역에서 이황화 결합을 포함한다. 특히, 불변 영역에서의 이황화 결합의 특정한 위치가 도입된다.
- [0083] 일 실시형태에서, 조작된 TCR은 W02016/170320(본 명세서에 참고로 포함됨)에 기재된 바와 같은 표면 발현을 증가시키도록 변형된다. 예를 들어, TCR은 하기 아미노산 잔기 중 적어도 하나를 포함한다:
- [0084] 알파 사슬의 L96; 베타 사슬의 R9; 베타 사슬의 Y10; 알파 사슬의 T24; 알파 사슬의 V19; 알파 사슬의 T20; 알파 사슬의 M50; 알파 사슬의 T5; 알파 사슬의 Q8; 알파 사슬의 S86; 알파 사슬의 F39; 알파 사슬의 D55; 베타 사슬의 R43; 알파 사슬의 A66; 베타 사슬의 V19; 베타 사슬의 L21; 베타 사슬의 L103; 알파 사슬의 T3; 알파 사슬의 S7; 알파 사슬의 P9; 알파 사슬의 M11; 알파 사슬의 A16; 알파 사슬의 T18; 알파 사슬의 L21; 알파 사슬의 S22; 알파 사슬의 D26; 알파 사슬의 F40; 알파 사슬의 S47; 알파 사슬의 R48; 알파 사슬의 Q49; 알파 사슬의 I51; 알파 사슬의 L52; 알파 사슬의 V53; 알파 사슬의 T67; 알파 사슬의 E68; 알파 사슬의 N74; 알파 사슬의 F76; 알파 사슬의 N79; 알파 사슬의 Q81; 알파 사슬의 A83; 알파 사슬의 K90; 알파 사슬의 S92; 알파 사슬의 D93; 및 알파 사슬의 M101. 바람직하게는, 상기 적어도 하나의 아미노산 잔기는 상응하는 생식선 프레임워크 TCR 아미노산 서열에 존재하지 않는다.
- [0085] 일 실시형태에서, 조작된 TCR은 비인간 불변 영역, 예를 들어 찢과 불변 영역을 포함한다.
- [0086] 일 실시형태에서, TCR, 예컨대 NKT 세포의 내인성 TCR은 종양 연관된 대식세포를 결합시킬 수 있다.
- [0087] 일 실시형태에서, TCR은 서바이빈에 특이적이다. 서바이빈 종양 항원에 특이적이지만 "온-타겟 오프 종양" 독성을 갖지 않는 예시적인 TCR은 W02016/070119에 개시되어 있다. 이러한 서바이빈 특이적 TCR은 바람직하게는 서열 번호 50 및 51의 CDR을 포함한다. 바람직하게는, TCR은 서열 번호 50의 베타 사슬 및/또는 51의 알파 사슬을 포함한다.
- [0088] 일 실시형태에서, TCR은 WT-1에 특이적이다. WT-1에 특이적인 예시적인 TCR은 W02005056595에 개시되어 있다. WT-1 특이적 TCR은 바람직하게는 서열 번호 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58 및 59로 이루어진 군으로부터의 적어도 하나의 CDR을 포함한다. 일 실시형태에서, 알파 사슬은 서열 번호 52, 53 및 54를 포함한다. 일 실시형태에서, 알파 사슬은 서열 번호 52, 53 및 55를 포함한다. 일 실시형태에서, 베타 사슬은 서열 번호 56, 57 및 58을 포함한다. 일 실시형태에서, 베타 사슬은 서열 번호 56, 57 및 59를 포함한다. 이러한 TCR은 서열 번호 60 또는 62의 알파 사슬을 포함할 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, 이러한 TCR은 서열 번호 61 또는 63의 베타 사슬을 포함할 수 있다. 따라서, 일 실시형태에서, TCR은 서열 번호 60 및 61을 포함한다. 일 실시형태에서, TCR은 서열 번호 60 및 63을 포함한다. 일 실시형태에서, TCR은 서열 번호 62 및 61을 포함한다. 일 실시형태에서, TCR은 서열 번호 62 및 63을 포함한다.
- [0089] 바람직한 실시형태에서, 상기 항원 수용체는 재조합으로 발현된다. 따라서, 면역 세포는 상기 항원 수용체를 코딩하는 벡터에 의해 형질도입되거나 형질주입된다.
- [0090] 항원 수용체가 결합하는 항원은 바람직하게는 종양 또는 병원균에 의해 발현되거나 이로부터 유래된다. 몇몇 실시형태에서, 특히 CAR을 사용할 때, 항원 수용체는 하나 초과 표적을 결합시킬 수 있다. 2개 이상, 예컨대 3개, 4개 또는 5개의 상이한 재조합 항원 수용체를 발현하는 면역 세포가 또한 고려된다. 항원 수용체가 결합하는 예시적인 항원은 GD2, WT-1, 5T4, GPC3, CSPG4, MUC16, MUC1, CA1X, CEA, CDS, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD23, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD70, CD74, CD133, CD138, CD123, 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus: CMV) 단백질, 예컨대 pp65 또는 IE-1, 인간 파필로마바이러스(human

papillomavirus: HPV) 단백질, 예컨대 E6 또는 E7, 엡스타인-바 바이러스(Epstein-Barr virus: EBV) 단백질, 예컨대 EBNA-1, LMP-1, LMP-2 또는 BARF-1, ADV 단백질, 예컨대 핵손, EGP-2, EGP-40, EpCAM, erb-B2, erb-B3, erb-B4, FBP, 태아 아세틸콜린 수용체, 플레이트 수용체-a, GD3, Her-1, HER-2, 조합의 HER2-HER3 또는 조합의 HER1-HER2, hTERT, IL-13R~a2, K-경쇄, DR, LeY, LI 세포 부착 분자, MAGe-A1, MAGe-A4, MAGe-A10, 메소텔린, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PSCA, PSMA, ROR1, TAG-72, VEGF-R2, EGFR, EGFRvIII, 돌연변이된 p53, 돌연변이된 ras, 돌연변이된 raf, 돌연변이된 RAC1, bcr/abl 융합, c-Met, 알파태아단백질, CA-125, MUC-1, 상피 종양 항원, 전립선 특이적 항원, 흑색종 연관된 항원, 플레이트 결합 단백질, HIV-1 엔벨로프 당단백질 gp120, HIV-1 엔벨로프 당단백질 gp41, 메소텔린, HERV-K 또는 ERBB2를 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0091] 항체는 전장 면역글로불린 또는 항체 유도체일 수 있다. 과거 10년에 걸쳐, 전장 면역글로불린은 나뉘지고, 모두는 1가, 2가 또는 다가 유도체, 및 단일특이적, 이중특이적 또는 다중특이적 유도체를 생성하도록 사용된다. 초기에, 더 작은 항원 결합 단편은 단백질분해에 의해 생성되고, 이후에, 인공 작제물은 유전자 조작에 의해 생성된다. 항체 유도체는 따라서 가능하게는 다수의 카피로 전장 면역글로불린의 작용성 부분 또는 전부를 포함하는 재조합 분자이다. 예시적인 항체 유도체는 Fab, Fab', scFab, scFv, Fv 단편, 나노바디, VHH, 최소 인식 단위, 다이아바디, 단쇄 다이아바디(scDb), 탠덤 scDb(Tandab), 선형 이합체 scDb(LD-scDb), 원형 이합체 scDb(CD-scDb), BiTE(또는 탠덤 다이-scFv 또는 탠덤 scFv), DART, 탠덤 트라이-scFv, 트라이(아)바디, 이중특이적 Fab2, 다이-미니항체, 테트라바디, scFv-Fc-scFv 융합, scFv-Fc 융합, 다이-다이아바디, DVD-Ig, CrossMab, 듀오바디, scFab-Fc, scFab-Fc-scFab, IgG-scFab, scFab-dsscFv, Fv2-Fc, IgG-scFv 융합(예컨대, bsAb, Bs1Ab, Bs2Ab, Bs3Ab, Ts1Ab, Ts2Ab 등), 구멍에 손잡이(Knob-into-Hole)(KiH), 듀오바디(DuoBody)를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다(예를 들어, 문헌[Holliger P and Hudson J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. Nature Biotechnol. 2005, vol. 23, 9, p.1126; Dimasi N. et al (2009), JMB 393, 672-692)] 참조).

[0092] 항체 유도체의 하위그룹은 항체 단편이다. 본 명세서에 사용된 바대로, 용어 "항체 단편"은 (i) 항체의 가변 중쇄 및/또는 경쇄 또는 기능적 단편을 포함하고 Fc 부분이 결여된 1가 및 단일특이적 항체 유도체; 및 (ii) BiTE(탠덤 scFv), DART, 다이아바디 및 단쇄 다이아바디(scDB)를 의미한다. 따라서, 항체 단편은 예를 들어 Fab, Fab', scFab, scFv, Fv 단편, 나노바디, VHH, dAb, 최소 인식 단위, 단쇄 다이아바디(scDb), BiTE 및 DART로 이루어진 군으로부터 선택된다. 언급된 항체 단편은 60kDa 미만의 분자량을 갖는다. 일 실시형태에서, 항체 유도체는 항체 단편, 바람직하게는 인간화된 항체 단편이다.

[0093] 일 실시형태에서, 항체는 세포독성 면역 반응을 매개할 수 있는 Fc 도메인을 포함한다. Fc 도메인을 포함하는 항체의 비제한적인 예는 전장 면역글로불린, DVD-Ig, scFv-Fc 및 scFv-Fc.scFv 융합, IgG-scFab, scFab-Fc, scFab-Fc-scFab, Fv2-Fc, IgG-scFv 융합(예컨대, bsAb, Bs1Ab, Bs2Ab, Bs3Ab, Ts1Ab, Ts2Ab 등), 듀오바디 및 CrossMab이다.

[0094] 일 실시형태에서, 항체는 세포독성 면역 반응을 유도하지 않고/않거나, 보체를 활성화하지 않도록 변형된 Fc 도메인을 포함한다. 일 실시형태에서, 항체 유도체는 Fc 도메인이 결여된다. Fc 도메인이 결여된 예시적인 항체 유도체는 Fab, Fab', scFab, scFv, Fv 단편, 나노바디, VHH, 최소 인식 단위, 다이아바디, 단쇄 다이아바디(scDb), 탠덤 scDb(Tandab), 선형 이합체 scDb(LD-scDb), 원형 이합체 scDb(CD-scDb), BiTE(탠덤 다이-scFv 또는 탠덤 scFv라고도 불림), 탠덤 트라이-scFv, 트라이(아)바디, 이중특이적 Fab2, 다이-미니항체, 다이-다이아바디, scFab-dsscFv 또는 DART이다. 일 실시형태에서, 항체는 구멍에 손잡이(KiH) 기술을 이용하여 조작된 Fc 도메인을 포함한다.

[0095] Fc 부분은 세포독성 면역 반응, 예컨대 ADCC, ADCP 및/또는 CDC를 매개하지만, 단백질 둘 다 종양방지 세포독성 T 세포의 표면에서 발현되면서 이러한 Fc 매개된 효과는 필요하지 않거나, PD-1:PD-L1 축을 표적화할 때 심지어 바람직하지 않다. 그러므로, 기능적 Fc 부분을 갖는 전장 단일클론 항체를 투여하는 것은 이들이 활성화하도록 의도된 바로 림프구의 결실을 발생시킬 수 있다. 항-PD-1 항체에 의한 치료는 환자에서의 더 낮은 순환 T 세포 수와 상관되는 것으로 발견되었다. PD-L1은 또한 비종양 세포에서 발현되고, 이 세포를 표적화하고 ADCC, ADCP 및/또는 CDC를 매개화하는 것이 바람직하지 않다.

[0096] 몇몇 실시형태에서, 항체 유도체는 약 60kDa 이하, 예컨대 약 55kDa, 50kDa, 45kDa, 40kDa, 35kDa, 30kDa 또는 27kDa 이하의 분자량을 갖는다. 고체 종양은 전장 면역글로불린이, 치료학적 효과를 감소시키는, 중심으로 침투하는 것을 대개 막는 실질적인 물리적 장벽을 갖는다(Christiansen, I, and Rajasekaran, A.K. (2004), Mol. Cancer Ther. 3, 1493-1501). 더 작은 항체 유도체는 반대로 종양으로 더 깊게 침투할 수 있다. 약 60kDa 이하

의 분자량을 갖는 예시적인 항체 유도체는 Fab, Fab', scFab, scFv, Fv 단편, 나노바디, VHH, dAb, 최소 인식 단위, 단쇄 다이아바디(scDb) 또는 DART(이들로 제한되지는 않음)를 포함하는 항체 단편이다.

- [0097] 항체의 크기 및/또는 구조는 이의 반감기에 영향을 갖는다. 치료학적 환경에서 부작용을 감소시키기 위해, 짧은 반감기를 갖는 항체를 사용하는 것이 유리할 수 있다. 이것은 예를 들어 Fc 부분이 결합된 항체 유도체, 더 바람직하게는 저분자량, 예컨대 약 60kDa 이하, 예컨대 약 55kDa, 50kDa, 45kDa, 40kDa, 35kDa, 30kDa 또는 27kDa 이하를 갖는 항체 유도체를 사용함으로써 달성될 수 있다.
- [0098] 이 특징을 갖는 바람직한 항체 유도체는 예를 들어 Fab, Fab', scFab, scFv, Fv 단편, 나노바디, VHH, dAb, 최소 인식 단위, 단쇄 다이아바디(scDb), BiTE 또는 DART이다.
- [0099] 항체는 따라서 1가 또는 다가, 즉 하나 이상의 항원 결합 부위를 갖는 것일 수 있다. 1가 항체, 특히 항체 유도체의 비제한적인 예는 scFv, Fv 단편, Fab, scFab, dAb, VHH, 나노바디 또는 최소 인식 단위를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 다가 항체는 2개, 3개, 4개 이상의 항원 결합 부위를 가질 수 있다. 전장 면역글로불린, F(ab')₂ 단편, 단쇄 다이아바디(scDb), 텐덤 scDb(Tandab), 선형 이합체 scDb(LD-scDb), 원형 이합체 scDb(CD-scDb), BiTE(또는 텐덤 다이-scFv 또는 텐덤 scFv), DART, 텐덤 트라이-scFv, 트라이(아)바디, 이중특이적 Fab₂, 다이-미니항체, 테트라바디, scFv-Fc-scFv 융합, scFv-Fc 융합, 다이-다이아바디, DVD-Ig, CrossMab, 듀오바디, scFab-Fc, scFab-Fc-scFab, IgG-scFab, scFab-dsscFv, Fv₂-Fc, IgG-scFv 융합, 다이아바디, 트리아바디 및 테트라바디는 다가 항체의 비제한적인 예이고, 예시적인 다가 항체는 2개의 결합 부위를 포함하고, 즉 항체는 2가이다.
- [0100] 몇몇 실시형태에서, 항체, 특히 항체 유도체는 이중특이적이고, 즉 항체 유도체는 1개의 표적 분자에서의 2개의 상이한 표적 또는 2개의 상이한 에피토프에 관한 것이다. 몇몇 실시형태에서, 항체 유도체는 다가이고, 각각 3개 또는 4개의 상이한 항원에 대해 2개 초과, 예를 들어 3개 또는 4개의 상이한 결합 부위를 포함한다. 이러한 항체는 각각 다가 및 다중특이적, 특히 삼중특이적 또는 사중특이적이다.
- [0101] 바람직하게는, 상가 항체 유도체는 scFv("단쇄 가변 단편" 또는 "단쇄 항체")이다. scFv는 링커에 의해 연결된 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하는 융합 단백질이다. 이것은 따라서 전장 항체에 존재하는 불변 Fc 영역이 결합된다. VH 및 VL 도메인은 가요성 링커에 의해 VL-링커-VH 또는 VH-링커-VL인 어느 한 방향으로 연결될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 배향은 VL-링커-VH이고, 즉 경쇄 가변 영역은 폴리펩타이드의 N 말단 끝에 있고 중쇄 가변 영역은 C 말단 끝에 있다. 링커는 서열 번호 10의 서열을 가질 수 있지만, 더 짧거나 더 긴 링커 또는 서열 번호 10의 변이체를 또한 사용할 수 있다.
- [0102] 따라서, 일 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 세포는 본 개시내용에 따른 scFv 차단 PD-L1 및 적어도 하나의 CAR을 발현하는 T 세포이다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 세포는 scFv 차단 PD-L1 및 본 개시내용에 따른 적어도 하나의 TCR을 발현하는 T 세포이다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 세포는 scFv 차단 PD-L1 및 적어도 하나의 CAR, 및 본 개시내용에 따른 적어도 하나의 TCR을 발현하는 T 세포이다.
- [0103] 따라서, 일 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 세포는 scFv 차단 PD-L1 및 본 개시내용에 따른 적어도 하나의 CAR을 발현하는 자연 살해 T(NKT) 세포이다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 세포는 scFv 차단 PD-L1 및 본 개시내용에 따른 적어도 하나의 TCR을 발현하는 NKT 세포이다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 세포는 scFv 차단 PD-L1 및 적어도 하나의 CAR, 및 본 개시내용에 따른 적어도 하나의 TCR을 발현하는 NKT 세포이다.
- [0104] 따라서, 일 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 세포는 scFv 차단 PD-L1 및 본 개시내용에 따른 적어도 하나의 CAR을 발현하는 자연 살해(NK) 세포이다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 세포는 scFv 차단 PD-L1 및 본 개시내용에 따른 적어도 하나의 TCR을 발현하는 NK 세포이다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 세포는 scFv 차단 PD-L1 및 적어도 하나의 CAR, 및 본 개시내용에 따른 적어도 하나의 TCR을 발현하는 NK 세포이다.
- [0105] 따라서, 일 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 세포는 본 개시내용에 따른 scFv 차단 PD-L1 및 적어도 하나의 CAR을 발현하는 인간 배아 줄기 세포이다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 세포는 본 개시내용에 따른 scFv 차단 PD-L1 및 적어도 하나의 TCR을 발현하는 인간 배아 줄기 세포이다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 세포는 scFv 차단 PD-L1 및 적어도 하나의 CAR, 및 본 개시내용에 따른 적어도 하나의 TCR을 발현하는 인간 배아 줄기 세포이다.
- [0106] 따라서, 일 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 세포는 본 개시내용에 따른 scFv 차단 PD-L1 및 적어도 하나의 CAR을 발현하는 조혈 줄기 세포(HSC)이다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 세포는 scFv 차단 PD-L1 및 본 개시내용에 따른 적어도 하나의 TCR을 발현하는 조혈 줄기 세포이다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 세

포는 scFv 차단 PD-L1 및 적어도 하나의 CAR, 및 본 개시내용에 따른 적어도 하나의 TCR을 발현하는 조절 줄기 세포이다.

- [0107] 따라서, 일 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 세포는 본 개시내용에 따른 scFv 차단 PD-L1 및 적어도 하나의 CAR을 발현하는 유도 다능성 줄기 세포(iPS)이다.
- [0108] 일 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 세포는 scFv 차단 PD-L1 및 본 개시내용에 따른 적어도 하나의 TCR을 발현하는 유도 다능성 줄기 세포이다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 세포는 scFv 차단 PD-L1 및 적어도 하나의 CAR, 및 본 개시내용에 따른 적어도 하나의 TCR을 발현하는 유도 다능성 줄기 세포이다.
- [0109] 본 명세서에 사용된 바와 같은 프레임워크를 갖는 항체는 scFv 포맷에서 놀랍게도 안정한 것으로 기재된다(예를 들어, WO/2009/155726 또는 문헌[Borras et al, JBC, Vol. 285, no. 12, 9 March 2010, pages 9054-9066] 참조). 따라서, 항체는 바람직하게는 서열 번호 1 및/또는 2에 포함된 프레임워크 서열 또는 이의 변이체를 포함한다. 변이체는 예를 들어 특허 W02014/206561의 VL 프레임워크 서열 서열 번호 15 내지 22를 포함하는 W02014/206561에 기재된 바와 같은 변형을 포함할 수 있다.
- [0110] 항체는 단백질에 대한 면역 반응을 피하기 위해 바람직하게는 인간화된다. "인간화된" 항체는 비인간 모 항체의 1개 이상의, 통상적으로 모든 6개의 CDR 영역 또는 이의 변이체 또는 합성 CDR을 포함하고, 프레임워크가 예를 들어 (i) 잠재적으로 비인간 모 항체의 하나 이상의 프레임워크 잔기를 포함하는 인간 프레임워크, 또는 (ii) 천연 생성된 인간 프레임워크에 대한 유사성을 증가시키도록 변형된 비인간 항체로부터의 프레임워크인 항체를 포함한다. 항체를 인간화하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있고, 예를 들어 문헌[Leger O., and Saldanha J. Antibody Drug Discovery. Edited by Wood C. London: Imperial College Press, 2011. ISBN 1848166281. p.1-23]을 참조한다.
- [0111] 몇몇 실시형태에서, 항체는 완전 인간이다.
- [0112] 바람직한 실시형태에서, CD80 및 PD-1 둘 다와의 PD-L1 상호작용이 차단되도록 항체는 PD-L1에서의 에피토프에 결합한다. PD-1에 대한 PD-L1 결합이 T 세포 기능소실을 추진시키고, CD80에 대한 PD-L1 결합이 T 세포 아네르기를 추진시키므로, CD80 및 PD-1에 대한 PD-L1의 결합을 동시에 차단하는 것은 아네르기를 막고, 기능소실을 복귀시킨다.
- [0113] 바람직한 실시형태에서, 항체는
- [0114] i) 각각 서열 번호 6, 7 및 8에 기재된 바와 같은 적어도 하나의 가변 중쇄(VH) CDR 서열 CDR-H1, CDR-H2 또는 CDR-H3, 또는 이의 변이체,
- [0115] ii) 각각 서열 번호 3, 4 및 5에 기재된 바와 같은 적어도 하나의 가변 경쇄(VL) CDR 서열 CDR-L1, CDR-L2 또는 CDR-L3, 또는 이의 변이체를 포함한다.
- [0116] 바람직하게는, 항체는
- [0117] i) 서열 번호 2의 적어도 하나의 VH 서열, 및/또는
- [0118] ii) 서열 번호 1의 적어도 하나의 VL 서열,
- [0119] 또는 각각 이들의 변이체를 포함한다.
- [0120] 몇몇 실시형태에서, 상기 항체는 서열 번호 9를 포함하는 scFv 또는 이의 변이체이다.
- [0121] 변이체는 몇몇 실시형태에서 이의 아미노산 서열의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 이상의 위치에서 소정의 항체와 다른 항체일 수 있다. 이러한 차이는 예를 들어 치환, 부가, 변형 또는 결실일 수 있다. 일 실시형태에서, 변이체는 본 명세서에 개시된 서열, 특히 서열 번호 1, 2 또는 9와 적어도 85%, 더 바람직하게는 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 가장 바람직하게는 100%의 서열 동일성을 갖는다.
- [0122] 본 명세서에 제공된 항체의 변이체는 항체를 코딩하는 핵산 서열로 적절한 변형을 도입함으로써 제조될 수 있다. 프레임워크 또는 CDR에 결실, 치환, 부가, 변형 및 삽입의 임의의 조합(들)이 만들어질 수 있고, 단 생성된 항체는 이것이 적절한 방법을 이용하여 스크리닝될 수 있는 원하는 특징을 보유한다. 치환, 바람직하게는 보존적 치환이 특히 관심 있다.
- [0123] 본 명세서에 사용된 바와 같은, "보존적 치환"은 상응하는 기준과 관련하여 물리적으로, 생물학적으로, 화학적으로 및/또는 기능적으로 특성을 유지시키는 변형 및 치환을 의미한다. 보존적 치환을 갖는 서열을 포함하는 본

자는 예를 들어 공유 또는 수소 결합을 형성하는 필적하는 능력, 및/또는 필적하는 극성을 포함하는 유사한 크기, 형상, 전기 전하, 화학 특성을 가질 수 있다. 이러한 보존적 변형은 하나 이상의 핵염기 및 아미노산 치환, 부가 및 결실을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

- [0124] 예를 들어, 보존적 아미노산 치환은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기에 의해 대체된 것을 포함한다. 예를 들어, 항원에 대한 결합과 관련하여 비필수인 아미노산 잔기는 동일한 측쇄 패밀리로부터의 또 다른 아미노산 잔기에 의해 대체될 수 있고, 예를 들어 세린은 트레오닌에 대해 치환될 수 있다. 아미노산 잔기는 보통 흔한 유사한 측쇄 특성에 기초하여 패밀리로 분류된다, 예컨대:
 - [0125] 1. 비극성 측쇄(예를 들어, 글라이신, 알라닌, 발린, 류신, 아이소류신, 메티오닌),
 - [0126] 2. 비하전된 극성 측쇄(예를 들어, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 타이로신, 프롤린, 시스테인, 트립토판),
 - [0127] 3. 염기성 측쇄(예를 들어, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 프롤린),
 - [0128] 4. 산성 측쇄(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산),
 - [0129] 5. 베타-분지된 측쇄(예를 들어, 트레오닌, 발린, 아이소류신) 및
 - [0130] 6. 방향족 측쇄(예를 들어, 타이로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘).
- [0131] 보존적 치환은 6개의 그룹의 동일한 그룹 내의 추가의 아미노산에 의한 상기 6개 중 1개의 그룹 내의 제1 아미노산의 치환인 것으로 취해질 수 있다. 바람직한 보존적 치환은
 - [0132] 1. 발린(V)에 의한 알라닌(A)의 치환;
 - [0133] 2. 라이신(K)에 의한 아르기닌(R)의 치환;
 - [0134] 3. 글루타민(Q)에 의한 아스파라긴(N)의 치환;
 - [0135] 4. 글루탐산(E)에 의한 아스파르트산(D)의 치환;
 - [0136] 5. 세린(S)에 의한 시스테인(C)의 치환;
 - [0137] 6. 아스파르트산(D)에 의한 글루탐산(E)의 치환;
 - [0138] 7. 알라닌(A)에 의한 글라이신(G)의 치환;
 - [0139] 8. 아르기닌(R) 또는 라이신(K)에 의한 히스티딘(H)의 치환;
 - [0140] 9. 류신(L)에 의한 아이소류신(I)의 치환;
 - [0141] 10. 류신(L)에 의한 메티오닌(M)의 치환;
 - [0142] 11. 타이로신(Y)에 의한 페닐알라닌(F)의 치환;
 - [0143] 12. 트레오닌(T)에 의한 세린(S)의 치환;
 - [0144] 13. 타이로신(Y)에 의한 트립토판(W)의 치환;
 - [0145] 14. 트립토판(W)에 의한 페닐알라닌(F)의 치환; 및/또는
 - [0146] 15. 류신(L)에 의한 발린(V)의 치환 및
- [0147] 그 반대를 포함한다. 다른 치환, 예컨대 알라닌(A)에 의한 프롤린(P)의 치환은 또한 허용 가능하고, 경험적으로 또는 다른 공지된 보존적 또는 비보존적 치환에 따라 결정될 수 있다. 보존적 치환은 또한 비자연 아미노산의 사용을 수반할 수 있다.
- [0148] 본 명세서에 기재된 항체는 1개 이상, 예컨대 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개 이상의 이러한 보존적 치환을 포함할 수 있다.
- [0149] 또 다른 실시형태에서, 비보존적 치환은 변이체를 생성하도록 본 명세서에 개시된 임의의 서열로 도입된다. 일 실시형태에서, 항체는 1개 이상, 예컨대 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개 이상의 이러한 비보존적 치환을 포함한다.

- [0150] 변이체의 특히 바람직한 유형은 하나 이상의 전체 CDR이 대체된 것이다. 통상적으로, CDR-H3 및 CDR-L3은 항원 결합에 가장 유의미하게 기여한다. 예를 들어, 전체 CDR-L1, CDR-L2, CDR-H1 및/또는 CDR-H2는 자연 또는 인공 기원의 상이한 CDR에 의해 대체될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 하나 이상의 CDR은 알라닌-카세트에 의해 대체된다.
- [0151] 몇몇 실시형태에서, 변이체는 모 항체에 비해 임의의 개선을 보여주지 않는다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 변이체 항체는,
- [0152] (i) PD-L1, 특히 hPD-L1에 대한 특이적 결합을 보유하여, 바람직하게는 PD-L1과 PD-1 사이의 상호작용을 차단하고/하거나,
- [0153] (ii) KinExA(등록상표)에 의해 측정된 바와 같은, 500pM 미만, 바람직하게는 250pM 미만, 100pM, 75pM, 50pM, 40pM, 30pM, 20pM, 더 바람직하게는 10pM 미만의 인간 PD-L1에 대한 KD를 갖고/갖거나,
- [0154] (iv) PD-L1에 대한 결합에 대해 본 명세서에 개시된 항체와 경쟁하고/하거나,
- [0155] (v) 본 명세서에 개시된 서열과 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 90%, 95% 또는 97%의 서열 동일성을 갖는다.
- [0156] 몇몇 실시형태에서, 항체는 PD-L1에 대한 높은 친화도를 갖고, 100pM 미만, 예컨대 약 75pM 미만, 50pM, 25pM 또는 10pM의 KD로 hPD-L1을 결합시킨다. 예를 들어, 항체는 2가이고, KinExA(등록상표)에 의해 측정된 바와 같이 10pM 미만, 바람직하게는 5pM 미만, 더 바람직하게는 약 3pM, 예를 들어 2.9pM, 2.8pM 또는 2.7pM의 KD로 PD-L1을 결합시킨다. 몇몇 실시형태에서, 이러한 2가 항체는 전장 면역글로불린이다.
- [0157] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 1가이고, KinExA(등록상표)에 의해 측정된 바와 같이 50pM 미만의 KD로 인간 PD-L1을 결합시킨다. 상기 KD는 바람직하게는 약 10pM 미만, 예컨대 약 9pM, 예를 들어 9.0pM, 8.9pM, 8.8pM 또는 8.7pM이다. 몇몇 실시형태에서, 상기 1가 항체는 scFv이다.
- [0158] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 1가이고, KinExA(등록상표)에 의해 측정된 바와 같이 50pM 미만의 KD로 원숭이 PD-L1을 결합시킨다. 상기 KD는 바람직하게는 KinExA(등록상표)에 의해 측정된 바와 같이 약 10pM 미만, 더 바람직하게는 미만 약 5pM, 예컨대 예를 들어, 약 3.4pM, 3.3pM 또는 3.2pM이다.
- [0159] 이러한 KinExA(등록상표) 측정은 바람직하게는 실온에서, 더 바람직하게는 실시예 1에 기재된 바와 같은 조건 하에 수행된다.
- [0160] 고친화도 항체는 소량의 조작된 면역 세포가 이의 표적 부위에 존재하고, 따라서 항체의 제한된 양을 발현하더라도 보호 효과를 제공하는 것이 유리할 수 있다.
- [0161] 인간 PD-L1, 및 원숭이 PD-L1에 결합하는 항체를 발현하는 상기 기재된 바와 같은 조작된 면역 세포가 또한 제공된다. 바람직하게는, 원숭이 PD-L1에 대한 친화도는 인간 PD-L1에 대한 친화도만큼 단단하게 적어도 2배이다. 몇몇 실시형태에서, 원숭이 PD-L1에 대한 1가 항체, 바람직하게는 scFv의 친화도 KD는 KinExA(등록상표)에 의해 측정될 때 예를 들어 실온에서, 바람직하게는 실시예 1에 기재된 바와 같은 조건 하에 측정될 때 약 3.3pM이다.
- [0162] PD-L2 및 B7-H3과 같은 B7 패밀리와 다른 구성원에 대한 교차반응성을 갖지 않는 항체가 추가로 제공된다.
- [0163] PD-L1에 대한 결합에 대해 본 명세서에 개시된 항체와 경쟁하는 항체를 발현하는 상기 기재된 바와 같은 조작된 면역 세포가 추가로 고려된다.
- [0164] 본 명세서에 기재된 조작된 면역 세포는 항체를 분비하고/하거나, 이의 표면에서 항체를 발현할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 항체는 분비된다.
- [0165] 몇몇 실시형태에서, 세포는 적어도 하나의 추가의 단백질 화합물, 예컨대 제2 항체 또는 사이토카인을 추가로 제조함으로써 발현할 수 있다. 사이토카인은 예를 들어 IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 또는 MIP-1알파로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게는 인간 기원, 즉 hIL-2, hIL-4, hIL-7, hIL-15, hIL-21, 또는 hMIP-1 알파이다. 몇몇 실시형태에서, 이러한 세포는 hIL-15를 발현한다. IL-15는 CAR NKT 세포의 생체내 지속성 및 종양방지 활성을 개선하는 것으로 기재되어 있다(WO2013/040371 참조). 이러한 제2 항체는 예를 들어 표적 면역 저해 분자, 예컨대 형질전환 성장 인자-베타(TGF-β), IL-10, Fas, CD47, CTLA-4, Tim-3, LAG-3, 또는 이들의 리간드일 수 있다.
- [0166] 몇몇 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 4-1BB 동시자극 도메인을 포함하는 CAR인 항원 수용체, 본 명세서에 기

재된 바와 같은 항체 및 추가의 IL-15를 발현한다. 몇몇 실시형태에서, 조작된 면역 세포는 CD28 동시자극 도메인을 포함하는 CAR인 항원 수용체, 본 명세서에 기재된 바와 같은 항체 및 추가의 IL-15를 발현한다.

- [0167] 따라서, 네이티브 TCR, (특히 중앙 항원에 특이적인) 키메라 항원 수용체, 및 본 개시내용에 따른 PD-L1에 대한 항체, 특히 scFv를 갖는 NKT 세포가 제공된다. NKT 세포는 사이토카인, 예컨대 IL-15를 추가로 코딩한다.
- [0168] 본 명세서에 기재된 항원 수용체 및/또는 항체를 코딩하는 핵산이 추가로 고려된다. 단백질은 복수의 핵산 서열에 의해 코딩될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 단백질은 단일 핵산 서열에 의해 코딩된다. 통상적으로, 핵산은 단리된 핵산이다.
- [0169] 항체 및/또는 항원 수용체의 서열을 알아서, 각각의 폴리펩타이드 서열을 코딩하는 cDNA는 당해 분야에 널리 공지된 방법에 의해, 예를 들어 유전자 합성에 의해 생성될 수 있다. 이 cDNA는 적합한 벡터, 예컨대 발현 벡터 또는 클로닝 벡터로의 표준 클로닝 및 돌연변이유발 기법에 의해 클로닝될 수 있다. 따라서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 항원 수용체 및/또는 항체를 코딩하는 cDNA가 추가로 고려된다.
- [0170] 선택된 클로닝 전략에 기초하여, 유전적 작제물은 N 말단 또는 C 말단 끝에서 하나 이상의 추가 잔기를 갖는 항체 및/또는 항원 수용체를 생성할 수 있다. 따라서, 본 명세서에 개시된 항체가 이들로 이루어지기보다는 개시된 서열을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0171] 표준 클로닝, 돌연변이유발 및 분자 생물학 기법의 염기성 프로토콜은 예를 들어 문헌[Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Green M. and Sambrook, J. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 4th edition. Cold Spring Harbor Laboratory, 2012. ISBN 1936113422.)]에 기재되어 있다.
- [0172] 엄격한 조건 하에 본 명세서에 기재된 핵산과 혼성화하는 단리된 핵산이 추가로 고려된다.
- [0173] 본 명세서에 제공된 핵산, 예컨대 발현 벡터 또는 클로닝 벡터를 포함하는 벡터가 또한 제공된다. 본 명세서에 기재된 항원 수용체 및 항체를 코딩하는 1개, 2개 이상의 핵산은 벡터에 포함될 수 있고, 이것은 동일한 벡터 (이중시스트론성 또는 다중시스트론성) 또는 별개의 벡터일 수 있다. 발현 벡터는 예를 들어 내부 리보솜 진입 부위(IRES), 2A-유사 서열 또는 이중 촉진자를 사용한 다중시스트론성 벡터, 예컨대 이중시스트론성 벡터일 수 있다.
- [0174] 발현 벡터는 예를 들어 렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스 또는 아데노 연관된 바이러스(AAV) 벡터일 수 있다. 발현 벡터는 또한 플라스미드, 전이인자(transposon), 삽입 서열, 또는 인공 염색체를 포함하는 비 바이러스 벡터일 수 있다. 핵산 분자는 몇몇 실시형태에서 발현 카세트를 한정할 수 있다. 발현 카세트는 적절한 숙주 세포에서 특정한 뉴클레오타이드 서열의 발현을 지시할 수 있는 핵산 분자이다. 발현 카세트는 하나 이상의 종결 신호에 작동 가능하게 연결된 관심 대상의 뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게 연결된 촉진자를 포함한다. 이것은 또한 뉴클레오타이드 서열의 적절한 번역에 필요한 서열을 포함할 수 있다. 코딩 영역은 관심 대상의 폴리펩타이드를 코딩할 수 있다. 발현 카세트에서의 뉴클레오타이드 서열의 발현은 숙주 세포가 몇몇 특정한 외부 자극에 노출될 때에만 전사를 개시하는 구성적 촉진자 또는 유도성 촉진자의 제어 하에 있을 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 항체는 레트로바이러스의 5' 말단 LTR의 제어 하에 있다. 항원 수용체를 코딩하는 핵산 및/또는 항체를 코딩하는 핵산은 각각 동일한 또는 상이한 촉진자일 수 있는 촉진자에 작동 가능하게 연결될 수 있다.
- [0175] 핵산 및/또는 벡터는 신호 펩타이드를 더 포함할 수 있다. 통상적으로, 신호 펩타이드는 분비시키고자 하는 단백질의 N 말단에 부착된 5개 내지 30개의 아미노산 펩타이드이고, 단백질 분비를 증가시키도록 부착된다. 바람직한 실시형태에서, 신호 펩타이드는 인간 신호 펩타이드이다. 몇몇 실시형태에서, 신호 펩타이드는 hIgG1이다. 몇몇 실시형태에서, 신호 펩타이드는 서열 번호 15를 포함한다.
- [0176] 추가로 또는 대안적으로, 항체는 막 앵커링된다. 이러한 막 앵커링된 항체는 막관통 도메인을 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 막 앵커링된 항체는 신호전달 도메인을 포함하지 않는다. 일 실시형태에서, 항체는 분비되고, 또한 막 앵커링된 형태로서 제공된다.
- [0177] 유전자 조작된 면역 세포는 안전성 스위치, 예컨대 자살 스위치를 포함할 수 있다. 이러한 스위치는 심각한 부작용이 생기는 경우 세포의 활성을 억제하거나, 이들이 건강한 조직을 공격하는 경우 세포가 자가 파괴하게 만든다. 통상적으로, 이러한 스위치는 제어 가능하고, 따라서 세포에 추가 수용체 또는 다른 표적을 요한다. 이러한 안전성 스위치는 대상체에게 제2 약제를 투여함으로써 제어된다. 따라서, 몇몇 실시형태에서, 벡터는 안전성 스위치, 바람직하게는 자살 스위치를 코딩하는 핵산 서열을 포함한다.

- [0178] 본 발명은 또한
- [0179] (a) 면역 세포를 제공하는 단계,
- [0180] (b) 상기 항원 수용체를 코딩하는 적어도 하나의 핵산 및 상기 항체를 코딩하는 적어도 하나의 핵산을 상기 세포로 도입하는 단계; 및
- [0181] (c) 상기 세포에 의해 상기 핵산을 발현시키는 단계를 포함하는 본 명세서에 기재된 바와 같은 면역 세포를 생성하는 방법을 제공한다.
- [0182] 몇몇 실시형태에서, 단계 (b)는 상기 세포로 상기 기재된 바와 같은 발현 벡터를 도입하는 단계를 포함한다.
- [0183] 상기 방법은
- [0184] (i) 단계 (b)의 항원 수용체와 상이한 항원 특이성을 갖는 적어도 하나의 다른 항원 수용체를 상기 세포로 도입하고/하거나, 단계 (b)의 항체와 상이한 항원 특이성을 갖는 적어도 하나의 다른 항체를 상기 세포로 도입하는 단계의 추가 단계를 포함할 수 있다.
- [0185] 본 발명은 또한
- [0186] i) 유효량의 본 명세서에 기재된 조작된 면역 세포 또는 본 명세서에 기재된 발현 벡터, 및
- [0187] ii) 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0188] 적합한 "부형제"는 (i) 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트 또는 다른 유기 산; (ii) 항산화제, 예컨대 아스코르브산 및 토코페롤; (iii) 보존제, 예컨대 3-벤탄올, 헥사메토늄 클로라이드, 벤즈알코늄 클로라이드, 벤질 알코올, 알킬 파라벤, 카테콜 또는 사이클로헥산올; (iv) 아미노산, 예를 들어 히스티딘, 아르기닌 등; (v) 펩타이드, 바람직하게는 10개 이하의 잔기, 예컨대 폴리 라이신; (vi) 단백질, 예컨대 소 또는 인간 혈청 알부민; (vii) 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; (viii) 당당류, 이당류, 다당류 및/또는 다른 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스, 수크로스, 만니톨, 트레할로스, 소르비톨, 아미노덱스트란 또는 폴리아미도아민; (ix) 킬레이트화제, 예를 들어 EDTA; (x) 염 형성 이온, 예컨대 나트륨, 칼륨, 및/또는 클로라이드; (xi) 금속 복합체 (예를 들어, Zn-단백질 복합체); (xii) 이온성 및 비이온성 계면활성제, 예컨대 TWEEN(상표명), PLURONICS(상표명) 또는 폴리에틸렌 글라이콜(PEG), (xiii) 저온보존제, 예컨대 다이메틸 설폭사이드(DMSO)를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0189] 본 명세서에 기재된 조작된 면역 세포, 본 명세서에 기재된 발현 벡터 및/또는 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물은 치료에 유용하다. 따라서, 본 명세서에 기재된 조작된 면역 세포, 본 명세서에 기재된 발현 벡터 및/또는 치료에서 사용하기 위한 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물이 추가로 제공된다.
- [0190] 하기 단계를 포함하는 치료를 요하는 대상체를 치료하는 방법이 또한 제공된다:
- [0191] (a) 본 명세서에 기재된 조작된 면역 세포를 제공하는 단계; 및
- [0192] (b) 상기 대상체에게 상기 면역 세포를 투여하는 단계.
- [0193] 추가로 또는 대안적으로, 치료의 방법은 본 명세서에 기재된 발현 벡터 및/또는 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물의 제공 및 투여를 수반한다.
- [0194] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "치료" 및 "치료하는"은 치료학적 효과 및/또는 대상체의 유기체에서 병리학 적 상태를 포함하는 비정상 상태를 예방하거나, 느리게 하거나(줄이거나), 또는 적어도 부분적으로 경감하거나 무효화시키는 것을 갖는 예방적 또는 예방학적 조치를 포함한다. 본 개시내용에 따른 치료는 치료하고자 하는 병태의 발병 및/또는 진행의 예방, 치유, 지연, 이의 중증도의 감소, 이의 하나 이상의 증상의 안정화, 조절, 치유 또는 경감을 시키기 위해 이를 요하는 대상체에 대한 약제학적 유효량의 본 명세서에 기재된 바와 같은 분자, 핵산, 벡터, 약제학적 조성물, 및/또는 조작된 면역 세포, 즉 특히 본 명세서에 개시된 세포, 벡터 또는 조성물의 투여를 수반한다. 치료를 요하는 사람은 이미 장애를 갖춘 사람, 및 장애를 갖기 쉬운 사람 또는 장애가 예방되어야 하는 사람(예방책)을 포함한다. 일반적으로, 치료는 질환 또는 병리학 적 병태의 존재 및/또는 진행과 연관된 증상을 감소시키거나 안정화시키거나 이의 진행을 저해한다.
- [0195] 치료를 요하는 대상체는 인간 또는 비인간 동물일 수 있다. 통상적으로, 대상체는 포유류, 예를 들어 마우스, 래트, 토끼, 햄스터, 개, 고양이, 원숭이, 유인원, 염소, 양, 말, 닭, 기니아 피그 또는 돼지이다. 통상적인 실

시형태에서, 대상체는 암 및/또는 PD-L1 관련 장애로 진단되거나, 이러한 장애를 획득할 수 있다. 동물 모델의 경우에, 동물은 이러한 장애를 발생시키도록 유전자 조작될 수 있다.

[0196] 통상적으로, 유효량의 본 명세서에 개시된 세포, 벡터 또는 조성물은 대상체에게 투여된다. "유효량"은 - 단일 용량으로서 또는 일련의 용량의 일부로서 - 적용된 투약량 섭생에서 원하는 치료학적 효과를 생성시키는, 즉 소정의 치료 목표에 도달하기 위한 양이다. 치료학적 유효량은 일반적으로 관련 병리학적 병태의 치료 또는 관리에서의 치료학적 이익을 제공하기 위한, 또는 병태의 존재와 연관된 하나 이상의 증상을 지연시키거나 감소시키기 위한 충분한 양이다. 투약량은 환자 및 임상 인자를 포함하는 다양한 인자(예를 들어, 연령, 중량, 성별, 환자의 임상 병력, 장애의 중증도 및/또는 치료에 대한 반응), 투여되는 장애의 성질, 투여하고자 하는 특정한 조성물, 투여 경로 및 다른 인자에 따라 달라질 것이다.

[0197] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "투여하는"은 물질, 예컨대 본 명세서에 기재된 세포, 벡터 또는 조성물을 대상체에게 전송, 전달, 도입 또는 운반하는 임의의 방식을 의미한다. 투여는 국소로 또는 전신으로 투여될 수 있다. 바람직한 투여 방식은 비경구, 예를 들어 정맥내 또는 전신 투여를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 추가의 물질, 예컨대 하나 이상의 치료제와 "조합된" 투여는 임의의 순서의 동시(concurrent) 및 연속 투여를 포함한다.

[0198] 세포, 벡터 또는 조성물은 상기 대상체에게 1회 이상 투여된다.

[0199] 세포, 벡터 또는 조성물은 항체 치료, 화학치료, 사이토카인 치료, 수지상 세포 치료, 유전자 치료, 호르몬 치료, 레이저 광 치료 및 방사선 치료의 군으로부터 선택된 하나 이상의 치료와 조합되어 투여될 수 있다. 본 발명의 치료는 본 내지 주의 범위의 간격으로 다른 물질 치료를 선행하거나 후행할 수 있다.

[0200] 세포는 대상체 또는 동일한 종의 또 다른 개인으로부터 기원할 수 있고, 즉 이들은 자가유래 또는 동종이계이다. 자가유래 입양 전달은 환자의 세포의 추출, 예를 들어 상기 기재된 바와 같은 이의 유전적 변형 및 이들을 동일한 환자에게 반환하기 전에 시험관내 상기 세포를 배양하는 것을 요한다. 각각의 새로운 환자에 대한 이러한 개별 제제는 암을 치료하는 데 있어서 세포 면역치료의 적용을 제한한다. 그러나, 기성품 제품으로서, 건강한 도너로부터 유래된 동종이계 T 세포는 외래로서 환자의 신체를 인식할 위험을 보유하고, 이는 이식편 대 숙주 질환(GvHD)이라 불리는 심각한 부작용을 발생시킬 수 있다. 건강한 도너로부터 많은 용적으로 생성된 CAR 변형된 NKT 세포에 기초한 기성품 치료는 큰 가능성을 제공한다. 종래의 T 세포와 같은 강력한 암 사멸 특성이 부여되면서, 변치않는 NKT 세포는 GvHD와 연관되지 않은 특별한 T 세포 수용체를 발현한다. 그러므로, 동종이계 NKT 세포는 GvHD의 최소 위험을 갖는 다수의 암 환자를 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0201] 치료를 요하는 대상체는 전악성 또는 악성 암 병태, 예컨대 NSCLC(비소세포 폐 암종), 방광암, 흑색종, 신장 세포 암종, 호지킨 림프종, 두경부 편평 세포 암종, 난소암, 위장암, 간세포암, 신경교종, 유방암, 림프종, 소세포 폐 암종, 골수형성이상 증후군, 전립선암, 방광암, 자궁경부암, 비투명세포 신장암, 대장결장암, 육종, 대장암, 신장암, 폐암, 췌장암 또는 위암, 피부암, 자궁암, 교모세포종, 신경아세포종, 육종, 두경부암, 백혈병, 암종, 메르켈 세포 암종 또는 신장 세포 암종(RCC), 다발성 골수종, 림프아구성 백혈병(ALL), B 세포 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 비호지킨 림프종; 병원균 감염, 자가면역 장애로 제한되지 않는 병태를 가질 수 있다.

[0202] 본 발명은 추가로 본 명세서에 기재된 조작된 면역 세포, 본 명세서에 기재된 발현 벡터 또는 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물, 및 사용에 대한 서면 설명서를 포함하는 암, 병원균 감염, 자가면역 장애의 치료를 위한 키트를 제공한다.

[0203] 몇몇 실시형태에서, 키트는 안전성 스위치의 유도자를 더 포함할 수 있다.

[0204] 서열

[0205] 본 명세서에 개시된 서열은 하기와 같다

[0206] 서열 번호 1 - scFv의 VL

EIVMTQSPSTLSASVGDRIITCQASEDIYSLAWYQQKPGKAPKLLIYDASDLASG
VPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQPDFATYYCQGNYGSSSSSYGAVFGQGTKLTVLG

[0207]

- [0208] 서열 번호 2 - scFv의 VH
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGIDLSSYTMGWVVRQAPGKGLEWVGISSGG
 RTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRYTGYPYFAL
 WGQGLVTVSS
- [0209]
- [0210] 서열 번호 3 - scFv의 CDR-L1
 QASEDIYSLLA
- [0211]
- [0212] 서열 번호 4 - scFv의 CDR-L2
 DASDLAS
- [0213]
- [0214] 서열 번호 5 - scFv의 CDR-L3
 QGNYGSSSSSYGAV
- [0215]
- [0216] 서열 번호 6 - scFv의 CDR-H1
 IDLSSYTMG
- [0217]
- [0218] 서열 번호 7 - scFv의 CDR-H2
 IISGGRTYYASWAKG
- [0219]
- [0220] 서열 번호 8 - scFv의 CDR-H3
 GRYTGYPYFAL
- [0221]
- [0222] 서열 번호 9 - scFv
 EIVMTQSPSTLSASVGDRIITCQASEDIYSLLA~~WYQKPGKAPKLLIYDASDLASG~~
 VPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQPDFATYYCQGNYGSSSSSYGAVFGQGKLTVLG
 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGIDLSSYTMG
 WVRQAPGKGLEWVGISSGGRTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAED
 TAVYYCARGRYTGYPYFALWGQGLVTVSS
- [0223]
- [0224] 서열 번호 10 - 링커
 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
- [0225]
- [0226] 서열 번호 11 - 정방향 프라이머
 TAACCATGGAGTTTGGGCTGAG
- [0227]
- [0228] 서열 번호 12 - 역방향 프라이머
 GACGCATGCTCAGCTCGACACGGTGACC
- [0229]
- [0230] 서열 번호 13 - 14g2a scFv의 VL 서열
 DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIHK
 VSNRFSGVPDRFSGSGGTDFLTKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPPLTFGAGTKLE
 LKR
- [0231]
- [0232] (볼드체로 강조된 CDR 서열)

- [0233] 서열 번호 14 - 14g2a scFv의 VH 서열
EVQLLQSGPELEKPGASVMISCKASGSSFTGYNMNWVRQNIGKSLEWIGAIDPYY****
GGTSYNQKFKGRATLTVDKSSSTAYMHLKSLTSEDSAVYYCVSGMEY**WGQGTS**
VTVSS
- [0234] (볼드체로 강조된 CDR 서열)
- [0235] 서열 번호 15 - h1gG1 신호 펩타이드
- [0237] **MEFGLSWLFLVAILKGVQ**
- [0238] 서열 번호 16 - 항-GD2-CAR의 CDR-L1
- [0239] **RSSQSLVHRNGNTYLH**
- [0240] 서열 번호 17 - 항-GD2-CAR의 CDR-L2
- [0241] **KVSNRFS**
- [0242] 서열 번호 18 - 항-GD2-CAR의 CDR-L3
- [0243] **SQSTHVPPLT**
- [0244] 서열 번호 19 - 항-GD2-CAR의 CDR-H1
- [0245] **SSFTGYNMN**
- [0246] 서열 번호 20 - 항-GD2-CAR의 CDR-H2
- [0247] **AIDPYYGGTSYNQKFKG**
- [0248] 서열 번호 21 - 항-GD2-CAR의 CDR-H3
- [0249] **GMEY**
- [0250] 서열 번호 22 - 항-CSPG4 CAR의 CDR-L1
- [0251] **RASQTIYKNLH**
- [0252] 서열 번호 23 - 항-CSPG4 CAR의 CDR-L2
- [0253] **YGSDSIS**
- [0254] 서열 번호 24 - 항-CSPG4 CAR의 CDR-L3
- [0255] **LQGYSTPWT**
- [0256] 서열 번호 25 - 항-CSPG4 CAR의 CDR-H1
- [0257] **YTFTDYSMH**
- [0258] 서열 번호 26 - 항-CSPG4 CAR의 CDR-H2
- [0259] **WINTATGEPTYADDFKG**
- [0260] 서열 번호 27 - 항-CSPG4 CAR의 CDR-H3
- [0261] **YYDY**

- [0262] 서열 번호 28 - 항-CSPG4 CAR의 VL 서열
LDIKLTQSPSILSVTPGETVLSCLASQTIYKNLHWYQQKSHRSPRLLIKYGSDSISG
- [0263] IPSRFTGSGSGTDYTLNINSVKPEDEGIYYCLQGYSTPWTFGGGKLEIKR
- [0264] 서열 번호 29 - 항-CSPG4 CAR의 VH 서열
QVKLKESGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSMHVVKKTPGKGLKWLGWINTA
TGEPTYADDFKGRFAISLETSARTVYLQINNLRNEDTATYFCFSYYDYWGQGTTV
TVSS
- [0265]
- [0266] 서열 번호 30 - 항-GPC3 CAR의 CDR-L1
RSSQSLVHSNRNTYLH
- [0267]
- [0268] 서열 번호 31 - 항-GPC3 CAR의 CDR-L2
KVSNRFS
- [0269]
- [0270] 서열 번호 32 - 항-GPC3 CAR의 CDR-L3
SQNTHVPPT
- [0271]
- [0272] 서열 번호 33 - 항-GPC3 CAR의 CDR-H1
YTFTDYEMH
- [0273]
- [0274] 서열 번호 34 - 항-GPC3 CAR의 CDR-H2
ALDPKTGDTAYSQKFKG
- [0275]
- [0276] 서열 번호 35 - 항-GPC3 CAR의 CDR-H3
FYSYTY
- [0277]
- [0278] 서열 번호 36 - 항-GPC3 CAR의 VL
DVVMTQSPLSLPVTGPGEASISCRSSQSLVHSNRNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKV
SNRFSGVPDRFSGSGSDFTLTKISRVEAEDVGVYYCSQNTHVPPTFGQGKLEIK
R
- [0279]
- [0280] 서열 번호 37 - 항-GPC3 CAR의 VH
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEWMGALD
PKTGDTAYSQKFKGRVTLTADKSTSTAYMELSSLTSEDVAVYYCTRFYSYTYWG
QGTLVTVSS
- [0281]
- [0282] 서열 번호 38 - 항-GPC3 CAR의 VH
QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLKWIGALDP
KTGDTAYSQKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTRFYSYTYWGQ
GTLVTVSA
- [0283]
- [0284] 서열 번호 39 - 항-5T4 CAR의 CDR-L1
YSFTGYMH
- [0285]

- [0286] 서열 번호 40 - 항-5T4 CAR의 CDR-L2
 RINPNNGVTLYNQKFKD
- [0287]
- [0288] 서열 번호 41 - 항-5T4 CAR의 CDR-L3
 STMITNYVMDY
- [0289]
- [0290] 서열 번호 42 - 항-5T4 CAR의 CDR-H1
 KASQSVSNDVA
- [0291]
- [0292] 서열 번호 43 - 항-5T4 CAR의 CDR-H2
 YTSSRYA
- [0293]
- [0294] 서열 번호 44 - 항-5T4 CAR의 CDR-H3
 QQDYNSPPT
- [0295]
- [0296] 서열 번호 45 - 항-5T4 CAR의 VL
 SIVMTQTPTFLLVSAGDRVITITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPTLLISYTSSRYA
 GVPDRFIGSGYGTDFTFITISLQAEDLAVYFCQQDYNSPPTFGGGTKLEIKR
- [0297]
- [0298] 서열 번호 46 - 항-5T4 CAR의 VH
 EVQLQQSGPDLVKPGASVKISCKASGYSFTGYMHVVKQSHGKSLEWIGRINPNN
 GVTLYNQKFKDKAILTVDKSSTAYMELRSLTSEDSAVVYCARSTMITNYVMDY
 WGQVTSVTVSS
- [0299]
- [0300] 서열 번호 47 - 41BB 동시자극 도메인
 KRGRKKLLYI FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
- [0301]
- [0302] 서열 번호 48 - CD3 제타 세포내 도메인
 RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN
 PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM
 QALPPR
- [0303]
- [0304] 서열 번호 49 - CD28 동시자극 도메인
 RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
- [0305]
- [0306] 서열 번호 50 - 서바이빈 특이적 TCR, 베타 사슬
 DAMVIQNPRYQVTQFGKPVTLSCSQTLNHNVMYWYQQKSSQAPKLLFHYYDKD
 FNNEADTPDNFQSRPNTSFCFLDIRSPGLGDAAMYLCATSRGDSTAEPQHFGDGT
 RLSIL
- [0307]
- [0308] 서열 번호 51 - 서바이빈 특이적 TCR, 알파 사슬
 GESVGLHLPVLSVQEGDNSIINCAYSNSASDYFIWYKQESGKGPQFIIDIRSNMDKR
 QGQRVTVLLNKTVKHLSQLAATQPGDSAVYFCAETVTDSWGKLGAGTQVVV
 TPD
- [0309]

- [0310] 서열 번호 52 - WT-1 특이적 TCR, CDR1 알파
 [0311] SSYSPS
- [0312] 서열 번호 53 - WT-1 특이적 TCR, CDR2 알파
 [0313] YTSAATL
- [0314] 서열 번호 54 - WT-1 특이적 TCR, CDR3 알파
 [0315] WSPFSGGGADGLT
- [0316] 서열 번호 55 - WT-1 특이적 TCR, CDR3 알파
 [0317] SPFSGGGADGLT
- [0318] 서열 번호 56 - WT-1 특이적 TCR, CDR1 베타
 [0319] DFQATT
- [0320] 서열 번호 57 - WT-1 특이적 TCR, CDR2 베타
 [0321] SNEGSKA
- [0322] 서열 번호 58 - WT-1 특이적 TCR, CDR3 베타
 [0323] SARDGGEG
- [0324] 서열 번호 59 - WT-1 특이적 TCR, CDR3 베타
 [0325] RDGGEGSETQY
- [0326] 서열 번호 60 - WT-1 특이적 TCR, 알파 사슬
 MLLLLVPVLEVIFTLGGTRAQSVTQLDSHVSVSEGTPVLLRCNYSSSYSPSLFWYV
 QHPNKGLQLLLKYTSAATLVKGINGFEAEFKKSETSFHLTKPSAHMSDAAEYFCV
 [0327] VSPFSGGGADGLT
- [0328] 서열 번호 61 - WT-1 특이적 TCR, 베타 사슬
 MLLLLLLGPGSGLGAVVSQHPSWVICKSGTXVKIECRSLDFQATTMFWYRQFPK
 QSLMLMATSNEGSKATYEQGVEKDKFLINHASLTLSTLTVTSAHPEDSSFYIC
 [0329] SARDGGEG
- [0330] 서열 번호 62 - WT-1 특이적 TCR, 알파 사슬
 MLLLLVPVLEVIFTLGGTRAQSVTQLDSHVSVSEGTPVLLRCNYSSSYSPSLFWYV
 QHPNKGLQLLLKYTSAATLVKGINGFEAEFKKSETSFHLTKPSAHMSDAAEYFCV
 [0331] V SPFSGGGADGLT
- [0332] 서열 번호 63 - WT-1 특이적 TCR, 베타 사슬
 MLLLLLLGPGSGLGAVVSQHPSWVICKSGTSVKIECRSLDFQATTMFWYRQFPK
 QSLMLMATSNEGSKATYEQGVEKDKFLINHASLTLSTLTVTSAHPEDSSFYIC SAR
 [0333] DGGEGSETQY
- [0334] 하기는 본 명세서에 개시된 방법 및 조성물을 예시하는 실시예이다. 상기 제공된 일반적인 설명을 고려하여 다양한 다른 실시형태가 실행될 수 있는 것으로 이해된다.

- [0335] 실시예
- [0336] 세포주
- [0337] 293T 세포는 ATCC로부터 얻은 한편, 신경아세포종 종양 세포주 CHLA-255는 베일러 의대(Baylor College of Medicine)(텍사스주 휴스턴)의 Leonid Metelitsa 박사에 의해 친절히 제공되었다. 세포를 37°C에서 5% CO₂를 함유하는 습윤 분위기에서 10% FBS(Corning), 1% GlutaMAX 및 1% 페니실린/스트렙타비딘(Gibco)을 함유하는, 293T에 대해 IMDM(Gibco) 또는 CHLA-255에 대해 RPMI 1640(Gibco)을 갖는 배양물 중에 유지시켰다.
- [0338] 실시예 1 - scFv의 규명
- [0339] 인간 PD-L1의 중화
- [0340] 항-PD-L1 scFv(서열 번호 9 참조)는 토끼 CDR을 포함하는 인간화된 단백질이다. 경쟁 ELISA에 의해 PD-1에 대한 PD-L1의 결합을 저해하는 이의 능력을 시험하였다. 간단히 말하면, rhPD-L1 Fc 융합체를 96웰 마이크로플레이트에 코팅하였다. 차단 후, scFv의 연속 희석액을 플레이트에 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. scFv 희석액의 절반을 바이오티닐화 PD-1 Fc 융합체에 의해 대체하고, 결합된 PD-1을 스트렙타비딘-HRP에 의해 검출하였다.
- [0341] 유사하게, rhCD80-His를 사용하여 경쟁 ELISA에 의해 CD80에 대한 PD-L1의 결합을 저해하는 능력을 시험하였다. 차단 후, scFv의 연속 희석액을 50nM rhPD-L1 Fc 융합체의 일정한 농도에 의해 제조하였다. 이 혼합물을 실온에서 2시간 동안 CD80 코팅된 플레이트와 항온처리하였다. 임의의 PD-L1-Fc의 부재 하에 scFv1의 연속 희석액을 포함함으로써 CD80에 대한 PD-L1의 비결합에 상응하는 배경 수준을 결정하였다. 결합된 PD-L1 Fc 융합체를 염소 항-인간 IgG Fc-HRP에 의해 검출하였다. 이 검정에서, CD80과 상호작용하는 PD-L1의 능력은 scFv에 의해 배경 수준으로 효과적으로 중화된 흡광도 신호를 생성시킨다. 종합하면, 이 결과는 scFv가 PD-1 및 CD80 둘 다와의 PD-L1의 상호작용을 차단한다는 것을 나타낸다.
- [0342] 안정성
- [0343] scFv의 안정성에 영향을 미칠 수 있는 2개의 상이한 과정이 관찰될 수 있다. 첫째로, scFv는 이합체화가 되기 쉽고, 대개 올리고머화 및 추가의 응집 및 침전이 후행한다. 둘째로, 더 작은 단편을 생성시키는 scFv 분해가 시간이 지나면서 발생할 수 있다.
- [0344] 상이한 온도 조건(4°C, 22°C, 37°C 및 -20°C)에서 저장 시 10mg/ml 농도에서 PBS(pH 7.2) 중에 제제화된 scFv의 안정성을 조사하였다. 4°C, 22°C 및 37°C에서 2주 동안 저장 시 scFv의 오직 소량의 이합체화 또는 고분자량 분자의 형성이 관찰되었다. scFv는 각각 37°C에서 저장 1주 또는 2주 후 이합체의 1.8% 및 2.7%까지 형성되었다.
- [0345] 실시간 PCR 장치(Corbett, Rotor-Gene)에서 시차 주사 형광측정법(DSF)에 의해 열 안정성을 평가하였다. Rotor-Gene 6000 Series 소프트웨어 1.7.을 사용하여 계산된 scFv의 중간점 용점(T_m)은 81.5°C이었다.
- [0346] 단백질성 생물물질은 응집 및 분해를 발생시킬 수 있는 제조, 저장 및 선적 동안 냉동/해동 스트레스에 노출될 수 있다. 냉동/해동 사이클 동안 항-PD-L1 scFv의 안정성을 평가하기 위해, 이것을 1.5ml 폴리프로필렌 관에서 10mg/ml에서 PBS(pH 7.2) 중에 제제화하였다. 바이알을 액체 질소로 액침시키고, 이어서 실온에서 물 욕 중에 항온처리하였다. 원심분리 후, SE-HPLC에 의해 상청액을 분석하였다. scFv의 사실상 100%는 10회 냉동/해동 사이클 후 단량체로 남아 있고, 단백질 소실 또는 침전이 관찰되지 않았다.
- [0347] 인간 혈청(Sigma-Aldrich, 카탈로그 H4522호)에서의 항-PD-L1 scFv의 안정성을 ELISA에 의해 평가하였다. 37°C에서 인간 혈청에 의한 항온처리의 20시간까지 후 scFv의 결합 활성의 소실이 없었다.
- [0348] scFv 및 전장 항체의 역학적 배제 검정
- [0349] KinExA3200(Sapidyne Instruments, 미국, 카탈로그 5001호)에 의해 역학적 배제 검정(KinExA(등록상표))에 의해 PD-L1에 대한 1가 및 2가 항체의 친화도를 결정하였다. KinExA(등록상표)는 평형 결합 친화도 및 용액 중의 비변형된 분자 사이의 역학을 측정한다. 측정은 용액 중의 상응하는 결합 파트너의 농도를 결정하기 위해 오직 프로브로서 작용하도록 고상에서 하나의 상호작용 파트너의 부동화를 요한다.
- [0350] a) 1가 항체
- [0351] 0.02% 나트륨 아자이드(pH 7.4)를 갖는 PBS 중에 실온에서 PD-L1-Fc 융합체 대한 scFv의 친화도를 결정하였다. 2개의 곡선을 측정하고, 하나는 5시간의 항온처리 시간에 의해 20pM scFv1을 이용하고, 다른 하나는 9시간의 항

온처리에 의해 10pM scFv1에 있다. scFv에 대한 KD 값은 8.8pM이었고, 이것은 KinExA(등록상표) Pro 소프트웨어 버전 4.1.9 또는 4.2.10의 "n-곡선 분석"을 이용하여 계산되었다.

[0352]

b) 2가 항체

[0353]

scFv를 IgG 포맷으로 재포맷팅하고, 원래 ATCC로부터 받은 현탁 적응된 CHO K1 세포 중에 배양하고, 현탁 배양 물 중에 혈청 비함유 성장에 적응시켰다. IgG 항체를 단백질 A 크로마토그래피, 이어서 크기 배제 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 2개의 곡선을 이용하여 0.02% 나트륨 아자이드(pH 7.4)를 갖는 PBS 중에 실온에서 PD-L1-His에 대한 결합에 대해 KD를 계산하였다. 하나의 곡선은 5시간의 항온처리 시간에 의해 100pM의 IgG를 사용하고, 다른 곡선은 10시간의 항온처리 시간에 의해 10pM의 IgG를 사용하였다. 인간 PD-L1에 대한 IgG의 결합에 계산된 KD 값은 2.77pM이었다. 결과는 IgG가 PD-L1의 친화도보다 대략 3배 더 뽁뽁한 친화도로 PD-L1에 결합한다는 것을 입증한다.

[0354]

선택도

[0355]

인간(RnD Systems, 미국, 카탈로그 156-B7호), rat(Sino Biological, 중국, 카탈로그 80450-R02H호) 또는 원숭이(Sino Biological, 중국, 카탈로그 90251-C02H호)으로부터의 PD-L1 Fc 융합체를 사용하여 ELISA에 의해 다른 종으로부터의 PD-L1에 대한 scFv의 교차반응성을 결정하였다. 결과는 scFv가 래트 PD-L1에가 아니라 인간 및 원숭이 PD-L1에 특이적으로 결합한다는 것을 나타낸다. KinExA(등록상표)를 사용하여 원숭이 PD-L1에 대한 항-PD-L1 scFv의 교차반응성을 추가로 조사하였다. 2개의 곡선을 이용하여 0.02% 나트륨 아자이드(pH 7.4)를 갖는 PBS 중에 실온에서 KD 값을 계산하였다. 하나의 곡선은 6시간의 항온처리 시간에 의해 50pM의 scFv를 사용하고, 다른 곡선은 16시간의 항온처리 시간에 의해 10pM의 scFv를 사용하였다. scFv에 대해 계산된 KD 값은 3.3pM이었다. 결과는 scFv가 인간 PD-L1에 대한 결합보다 대략 2.7배 더 뽁뽁한 친화도로 원숭이 PD-L1에 결합한다는 것을 입증한다.

[0356]

rhPD-L1 Fc 융합체(RnD Systems, 미국, 카탈로그 156-B7호), rhPD-L2 Fc 융합체(RnD Systems, 미국, 카탈로그 1224-PL호) 또는 rhB7-H3 Fc 융합체(RnD Systems, 미국, 카탈로그 1027-B3호)를 사용하여 ELISA에 의해 PD-L1과 서열 유사성을 공유하는 재조합 인간 단백질에 대한 scFv의 교차반응성을 결정하였다. 결과는 scFv가 인간 PD-L2 또는 B7-H3에 대한 교차반응성 없이 인간 PD-L1에 특이적으로 결합한다는 것을 나타낸다.

[0357]

세포 표면 PD-L1에 대한 결합

[0358]

ES-2 세포(ATCC, 미국, 카탈로그 CRL-1978호)의 세포의 FACS 염색에 의해 세포의 표면에서 PD-L1에 결합하는 scFv의 능력을 결정하였다. 결과는 scFv가 세포의 표면에서 발현된 PD-L1의 천연 형태를 특이적으로 인식할 수 있다는 것을 입증한다.

[0359]

KinExA(등록상표)를 사용하여 0.02% 나트륨 아자이드(pH 7.4)를 갖는 PBS 중에 실온에서 세포 표면 PD-L1에 대한 scFv의 결합을 추가로 조사하였다. 50pM scFv 및 5시간의 항온처리 시간을 이용하여 하나의 곡선을 작도하였다. ES-2 세포에서 세포 표면 발현된 PD-L1에 대한 scFv 결합에 대한 계산된 KD 값은 12.8pM이다.

[0360]

실시예 2 - 항-PD-L1 scFv를 코딩하는 레트로바이러스 작제물의 생성 및 레트로바이러스 생성

[0361]

5' 말단(정방향 프라이머)에서의 NcoI 제한 부위 및 3' 말단(역방향 프라이머)에서의 중단 코돈 TGA 및 제한 부위 SphI를 부가하기 위해 하기 프라이머에 의해 PCR에 의해 항-PD-L1 scFv를 코딩하는 DNA를 증폭시켰다: 정방향: 5'-TAACCATGG AGTTTGGGCTGAG-3'(서열 번호 11) 및 역방향: 5'-GACGCATGCTCAGCTCGACACGGTGACC-3'(서열 번호 12). PCR 산물 및 레트로바이러스 골격 SFG(I)eGFP를 NcoI 및 SphI에 의해 분해하고 결합하였다. 삽입체를 서열 분석하여 클로닝 동안 돌연변이가 발생하지 않는다는 것을 확인하였다. 최종 벡터는 SFG.scFv.항-PD-L1(I)eGFP라 불린다(도 1 참조). IRES에서 발현된 리포터 유전자 GFP를 사용하여 형질도입 효율을 평가하였다. 레트로바이러스 벡터 및 각각 gag-pol 및 RDF 엔벨로프를 코딩하는 2개의 플라스미드에 의한 293T 세포의 형질 주입에 의해 일시적인 레트로바이러스 상청액을 제조하였다. 48시간에 수집된 상청액을 사용하여 건강한 도너로부터 단리된 활성화된 T 세포를 형질도입하였다. CD28(CAR.CD28 또는 CAR.28) 또는 4-1BB(CAR.41BB 또는 CAR.BB) 엔도도메인 중 어느 하나를 포함하는 GD2 항원을 표적화하는 CAR(GD2.CAR)을 코딩하는 레트로바이러스 벡터는 이전에 기재되어 있다(Heczey A. et al, Blood. 2014 Oct 30; 124(18):2824-33). 상기 CAR은 서열 번호 16 내지 21의 CDR 서열을 손상시킨다.

[0362]

실시예 3 - 항-PD-L1 scFv를 생성하는 CAR T 세포의 생성 및 증식

[0363]

Lymphoprep(Fresenius) 밀도 구배 원심분리에 의해 건강한 인간 도너로부터의 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 단

리하였다. 1차 T 세포를 IL-7(10ng/ml) 및 IL-15(5ng/ml)(PeproTech로부터)의 존재 하에 44% Click 배지 (Irvine Scientific), 44% RPMI 1640(Hyclone), 10% FBS(Hyclone), 1% Glutamax 및 1% 페니실린/스트렙타미딘 을 함유하는 완전 T 세포 배지 중에 배양하였다. T 세포를 사이토카인이 없는 T 세포 배지 중에 0.5×10^6 개 세포 /ml의 농도로 24웰 플레이트에서 부동화된 항-CD3(1mcg/ml)(Miltenyi, 카탈로그 130-093-387호) 및 항-CD28(1mcg/ml)(BD Biosciences, 카탈로그 555725호)에 의해 활성화하였다. 자극 후 24시간에, IL-7 및 IL-15를 배지에 첨가하였다. 2일에, T 세포를 레트로바이러스 상청액 SFG.scFv.항-PD-L1(I)eGFP에 의해 및/또는 GD2.CAR(레트로벡틴 코팅된 24웰 플레이트에서 레트로바이러스 상청액의 1ml/웰)에 대해 형질도입하였다. GD2.CAR을 발현하고 항-PD-L1 scFv를 방출하는 T 세포를 생성하기 위해, 레트로바이러스 작제물 둘 다에 의한 동시형질도입을 수행하였다(1ml/웰의 GD2.CAR 상청액과 1ml/웰의 항-PD-L1 scFv). 비형질도입된(NT) T 세포를 레트로벡틴에 의해 코팅된 비조직 배양 플레이트에서 동일한 농도(0.25×10^6 개 세포/ml)에서 플레이팅하였다. 형 질도입 후 72시간에, T 세포를 세척하고 계수하고 1×10^6 개 세포/ml로 IL-7/IL-15를 갖는 완전 T 세포 배지 중에 현탁시켰다. T 세포를 5일 동안 시험관내 증식시키고, 이후 유세포분석법에 의해 분석하여 형질도입 효율 및 T 세포 조성물을 평가하였다. 개시 후 11일 내지 12일에, T 세포를 기능 검정에서 시험하였다.

[0364] 실시예 4 - GD2.CAR 및 SFG.scFv.항-PD-L1 벡터에 의해 동시형질도입된 T 세포는 GD2.CAR 및 항-PD-L1 scFv 둘 다를 발현한다

[0365] CD3, CD4, CD8, CD60L, CD45RA, CD95, CD27, CD2, PD-L1(BD Bioscience 또는 Biolegend)에 대해 mAb를 사용하여 T 세포의 표현형을 평가하였다. 항-이디오타입 1A7mAb, 이어서 2차 래트 항-마우스-IgG1-PE mAb(BD Bioscience)에 의한 염색을 이용하여 GD2.CAR 발현을 검출하였다. GFP 발현을 측정함으로써 SFG.scFv.항-PD-L1(I)eGFP 벡터의 형질도입 효율을 평가하였다. 비형질도입된 T 세포의 MFI로 나눈 CAR T 세포의 평균 형광 강도(MFI)로서 GD2.CAR 상대 형광 강도(RFI)를 계산하였다. 도 2에 도시된 바대로, CD4 및 CD8 T 세포를 CD4/CD8 비율의 변경 없이 실시예 2의 항-PD-L1 scFv 레트로바이러스 작제물에 의해 성공적으로 형질도입하였다. T 세포 는 이중 레트로바이러스 형질도입 시 GD2.CAR 및 eGFP 항-PD-L1을 동시발현하였다(도 3). 항-PD-L1 scFv에 의한 형질도입은 T 세포 증식에 영향을 미치지 않았다(도 4). 더구나, 항-PD-L1 scFv의 발현은 T 세포 하위집단 조성 물에 영향을 미치지 않았다(도 5). 이 실시예는 항-GD2 CAR 및 항-PD-L1 scFv를 동시발현하는 CAR T 세포의 생 성을 입증한다.

[0366] 실시예 5 - SFG.scFv.항-PD-L1 벡터에 의해 형질도입된 T 세포는 내인성 TCR/CD3 복합체를 통한 활성화 시 활성화 항-PD-L1 scFv를 기능적으로 방출한다

[0367] T 세포가 항-PD-L1 scFv를 분비할 수 있는지를 시험하기 위해, 내인성 TCR을 통해 세포를 자극하였다. 비형질도 입된 T 세포 또는 항-PD-L1 scFv 형질도입된 T 세포를 10% FBS를 갖는 T 세포 배지의 2ml/웰에서 0.5×10^6 개 세 포/ml의 농도로 부동화된 항-CD3(1 μ g/ml, Miltenyi) 및 항-CD28(1 μ g/ml, BD Biosciences) 항-CD3/CD28 항-CD3/CD28 항체에 의해 코팅되거나 코팅되지 않은 조직 배양 처리된 24웰 플레이트에서 플레이팅하였다. 18시간 후, 특이적 샌드위치 ELISA 검정을 이용하여 T 세포에 의해 방출된 항-PD-L1 scFv의 정량화를 위해 1ml의 상청 액을 수집하였다. 이 샌드위치 ELISA에 마우스 기원의 항-scFv 단일클론 항체의 매칭된 쌍을 사용하였다. 도 6a 에 도시된 바대로, 부동화된 항-CD3/항-CD28 항체에 의한 자극 후 형질도입된 T 세포에 의해 항-PD-L1 scFv를 방출시켰다. 이 T 세포는 이의 자연 내인성 TCR/CD3 복합체를 발현한다. 결과는 내인성 TCR/CD3 복합체를 통한 형질도입된 T 세포의 활성화가 항-PD-L1 scFv의 합성 및 세포의 분비를 유도하기에 충분하다는 것을 제안한다. 정량적 ELISA는 분비된 항-PD-L1 scFv의 많은 양을 보여주었다(도 6a). 비형질도입된 세포는 scFv를 분비하지 않았다. 항-PD-L1 scFv가 레트로바이러스 벡터의 구성적으로 활성인 5'LTR의 제어 하에 있으므로, 비코팅된 웰 에 플레이팅된 형질도입된 T 세포는 항-PD-L1 scFv의 기저 수준을 방출하였고, 이것은 그러나 T 세포 활성화 시 유의미하게 증가하였다.

[0368] 활성화된 T 세포에 의해 생성된 항-PD-L1 scFv는 부동화된 PD-L1에 결합할 수 있다(도 6b). 간단히 말하면, 재 조합 인간 PD-L1-Fc(R&D Systems)를 PBS 중에 마이크로플레이트로 2 μ g/ml의 농도에서 부동화하였다. 5% 탈지 분 유에 의해 차단한 후, 증가하는 농도의 scFv를 첨가하고 단백질 L-HRP(Sigma-Aldrich)에 의해 검출하였다. 도 6b은 T 세포 생성된 항-PD-L1 scFv가 이. 콜라이에서 생성된 항-PD-L1 scFv인 기준 대조군으로서 PD-L1에 또한 동등하게 결합한다는 것을 보여준다. 이 데이터는 형질도입된 T 세포가 내인성 TCR을 통해 활성화 시 다량으로 활성화 항-PD-L1 scFv를 기능적으로 방출한다는 것을 입증한다. 이 데이터는 또한 형질도입된 T 세포가 유전자 변 형된 TCR 및 CAR을 통해 활성화될 때 항-PD-L1 scFv를 용이하게 분비한다는 것을 제안한다.

[0369] 실시예 6 - GD2.CAR-4-1BB 및 SFG.scFv. 항-PD-L1 벡터에 의해 동시형질도입된 T 세포는 증대된 종양 사멸 활성을 갖는다

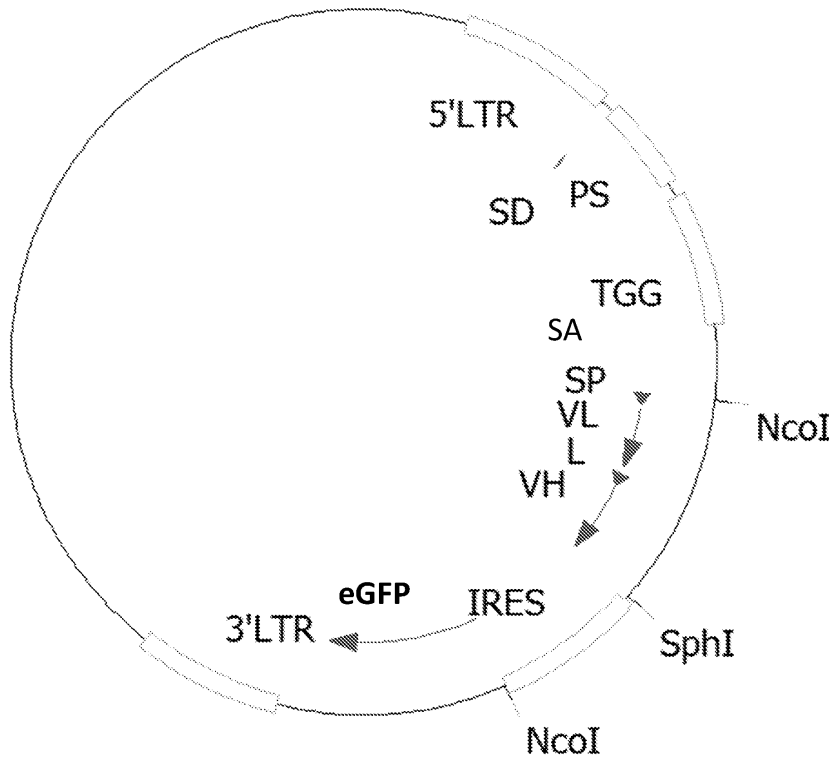
[0370] 형질도입된 및 비형질도입된 T 세포(0.5×10^5 개 세포/웰)를 외인성 사이토카인의 부재 하에 24웰 플레이트에서 1:5의 효과기:표적(E:T) 비율에서 종양 세포주 CHLA-255(2.5×10^5 개 세포/웰)와 동시배양하였다. 동시배양의 7일 후, T 세포를 수확하고 계수하였다. 잔류 종양 세포의 백분율이 (유세포분석법에 의해 평가된 바대로) 5% 미만인 경우, T 세포를 동시배양의 제2 사이클 동안 동일한 1:5 E:T 비율에서 새로운 종양 세포에 의해 재플레이트하였다. 추가 7일 내지 8일 후, 세포를 이후 수집하고 유세포분석법에 의해 분석하여 T 세포 및 잔류 종양 세포를 열거하였다. 구체적으로, CD3 및 GD2 항체를 사용하여 각각 T 세포 및 종양 세포를 염색하였다. CountBright 비드(Invitrogen)를 유세포분석법에 의해 세포 계수에 사용하였다. 제조사의 지시에 따라 ELISA(R&D System)에 의해 IFN γ 방출을 측정하도록 배양의 24시간 후 상청액을 또한 수집하였다.

[0371] 항-PD-L1 scFv에 의해 형질도입된 4-1BB 엔도도메인을 갖는 GD2.CAR T 세포는 동시배양의 제2 사이클(배양 14일)에서 종양 세포의 더 양호한 사멸을 보여주었고(도 7), 항-PD-L1 scFv가 없는 GD2.CAR T 세포보다 종양 세포와의 동시배양의 제2 사이클(배양 14일)에서 IFN γ 의 더 높은 수준을 생성하였다(도 8). 따라서, 반복적으로 종양 세포를 참여시키는 GD2.CAR T 세포의 기능소실은 4-1BB 동시자극에 의해 발생하지만, 항-PD-L1 scFv의 존재는 기능소실로부터 CAR T 세포를 보호하고, 생체내 연장된 종양방지 활성을 제공하고 종양 재발생을 막을 수 있다.

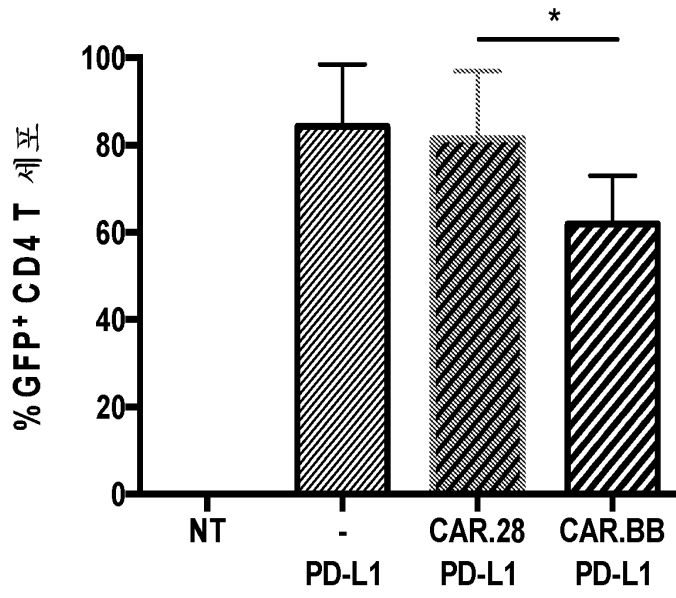
[0372] 본 발명의 현재 바람직한 실시형태가 도시되고 기재되어 있지만, 본 발명이 이들에 제한되지 않고, 하기 청구항의 범위 내에 달리 다양하게 구현되고 실행될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명의 많은 변형 및 대안적인 실시형태가 당해 분야의 숙련자에 의해 용이하게 명확하므로, 본 설명은 오직 예시적인 것으로 해석되어야 하고, 본 발명을 수행하기 위한 최고의 방식으로 당해 분야의 숙련자를 교시하는 목적을 위한 것이다. 따라서, 모든 적합한 변형 및 균등물은 하기 청구항의 범위 내에 해당하는 것으로 생각될 수 있다.

도면

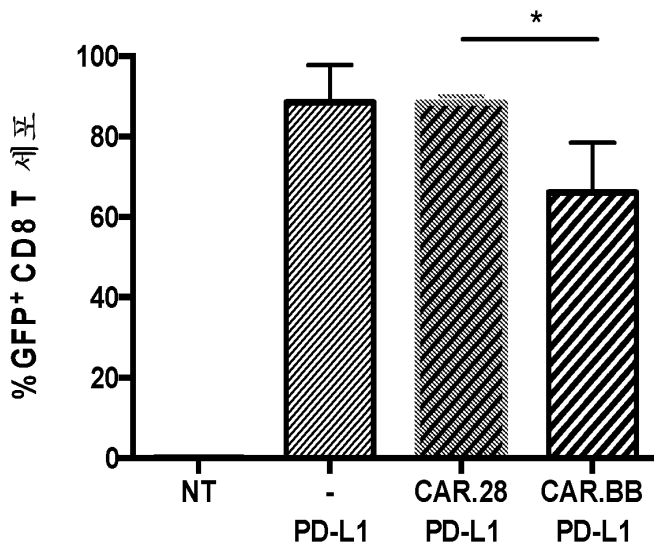
도면1



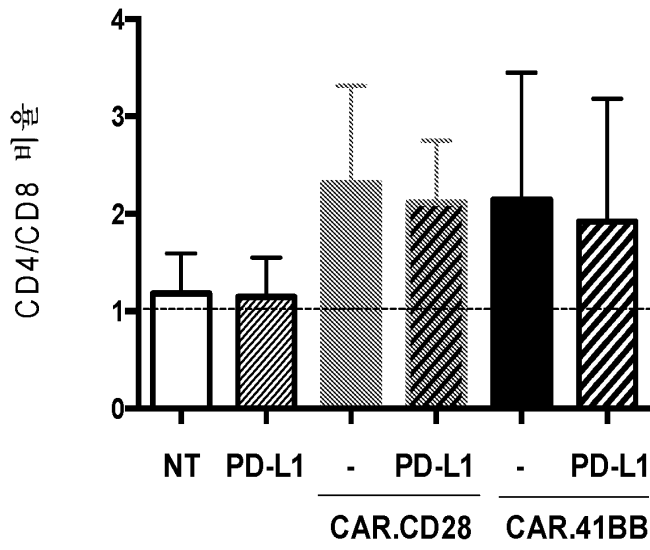
도면2a



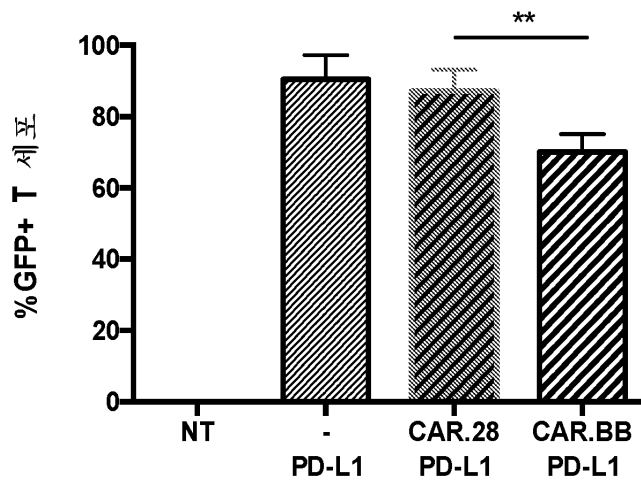
도면2b



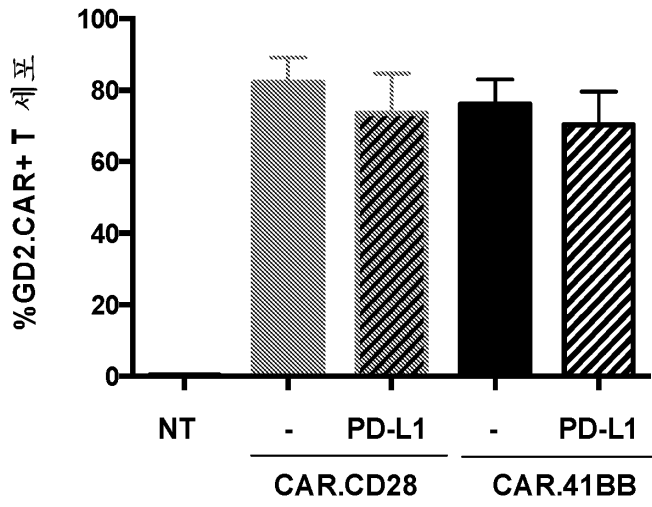
도면2c



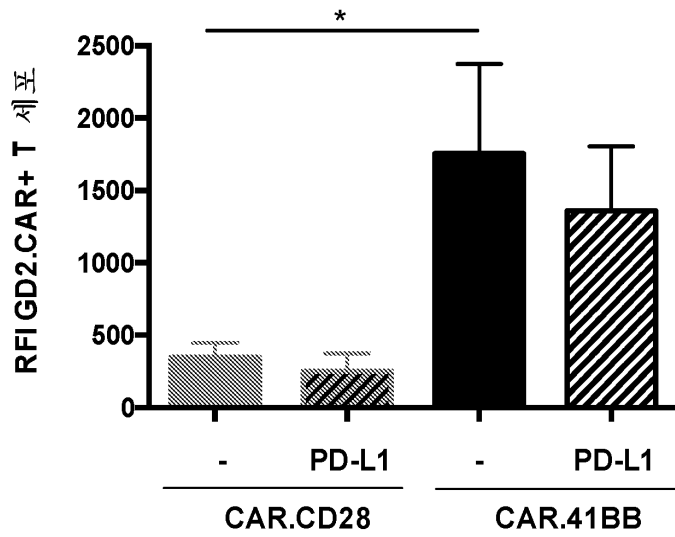
도면3a



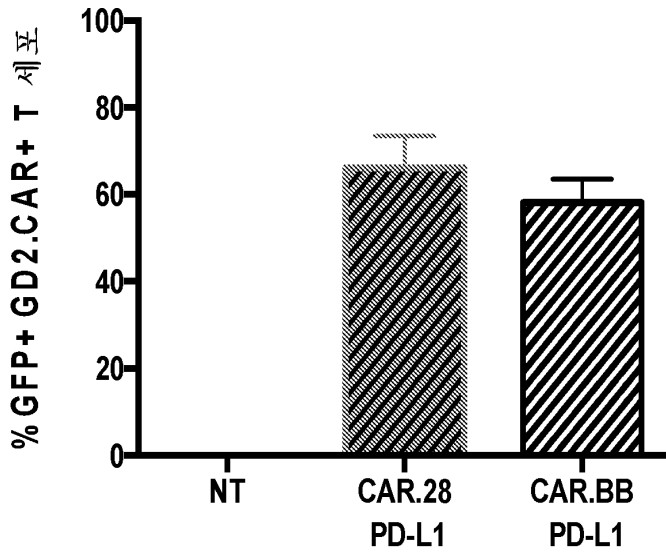
도면3b



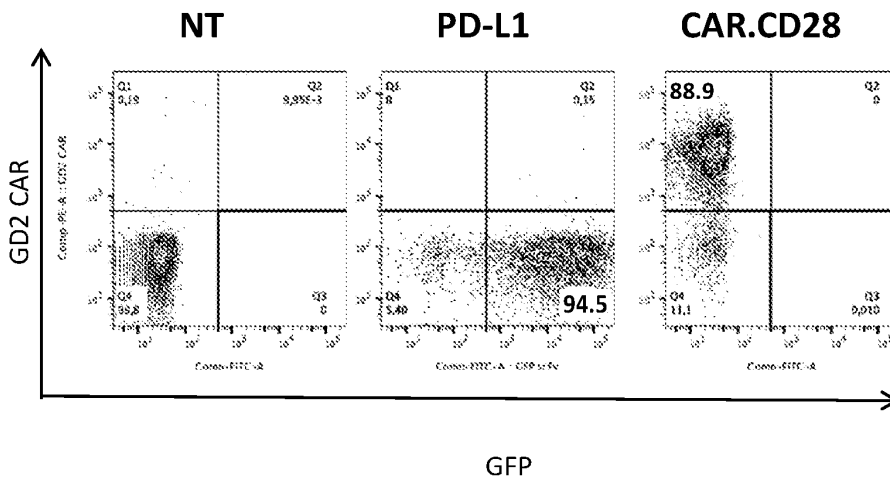
도면3c



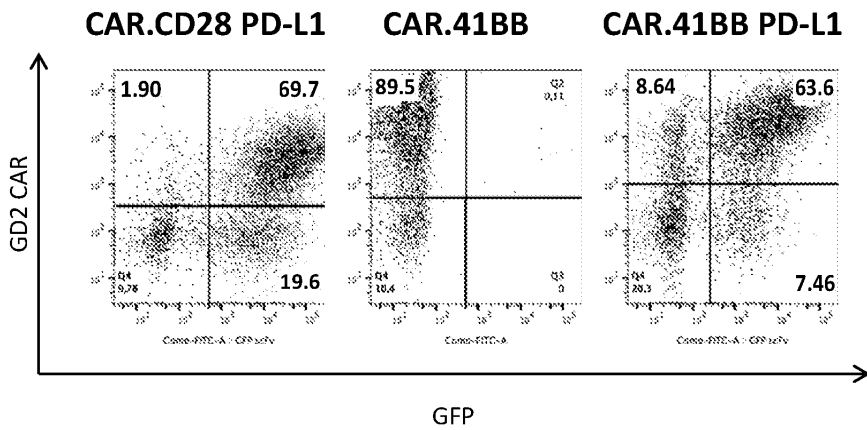
도면3d



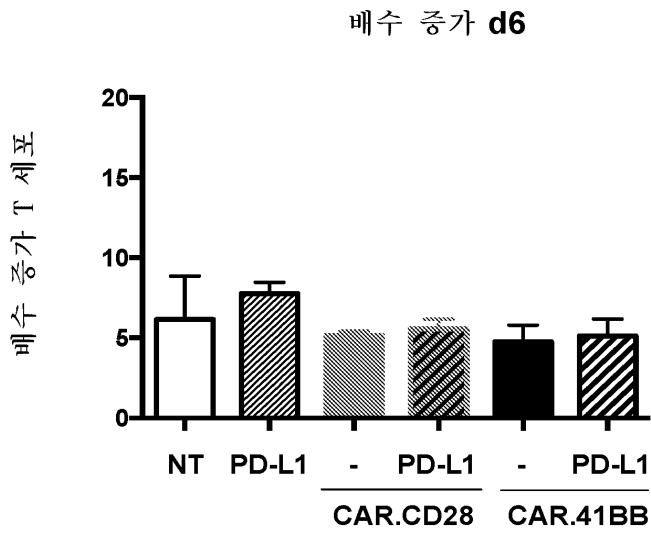
도면3e



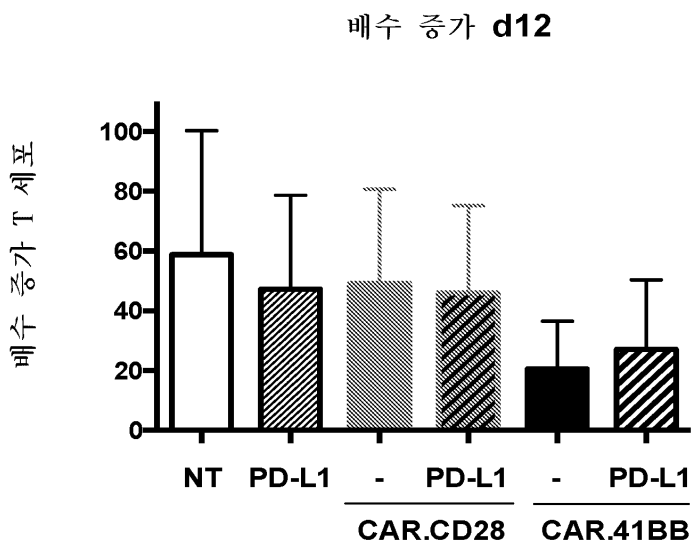
도면3f



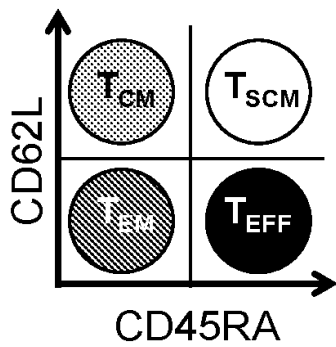
도면4a



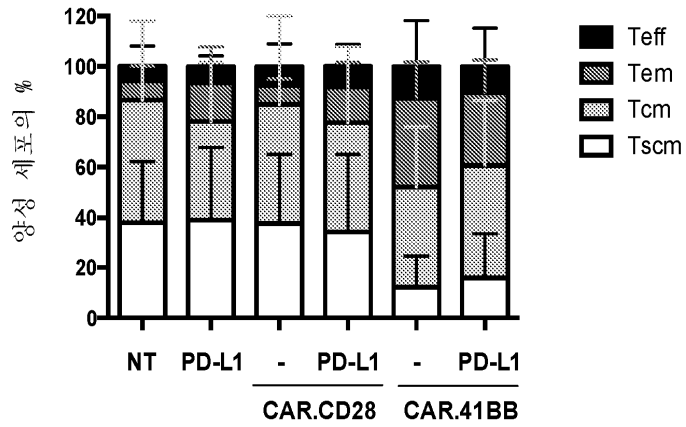
도면4b



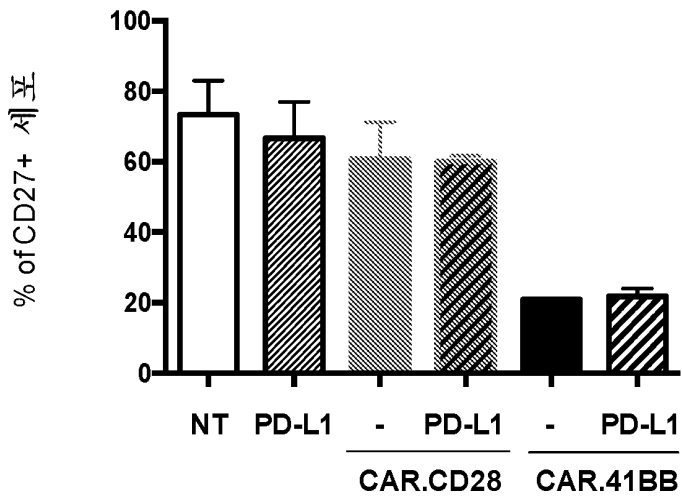
도면5a



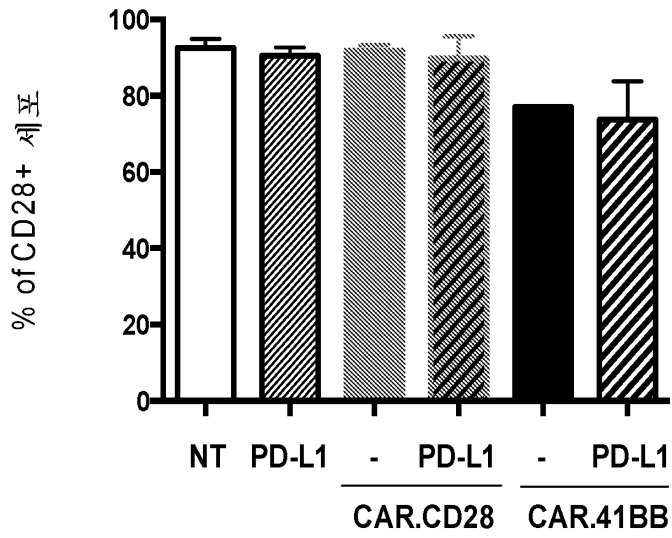
도면5b



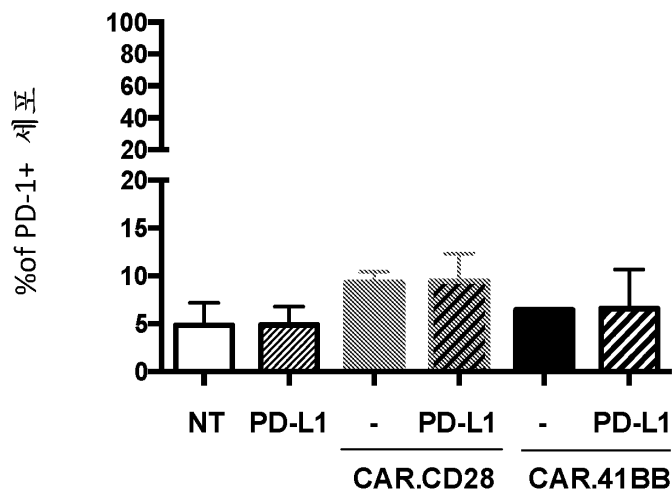
도면5c



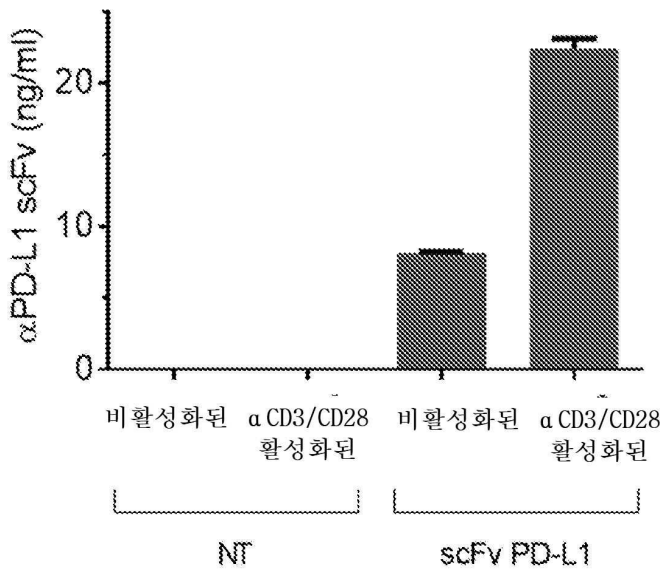
도면5d



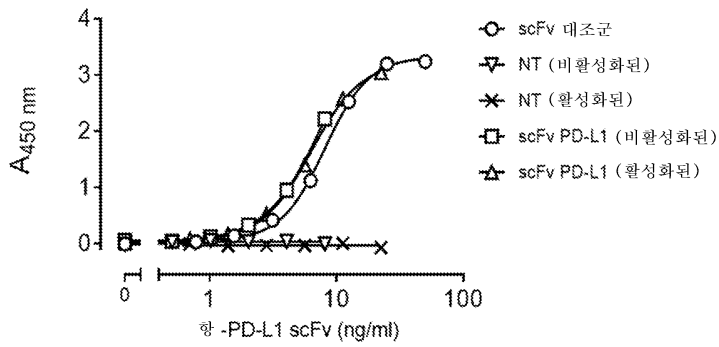
도면5e



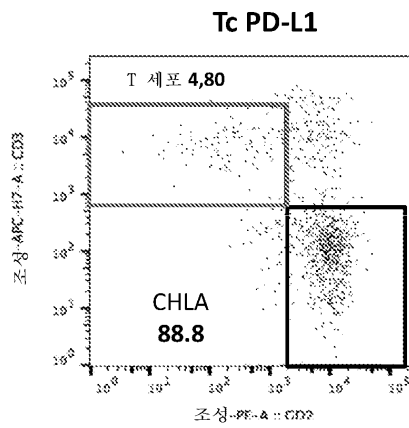
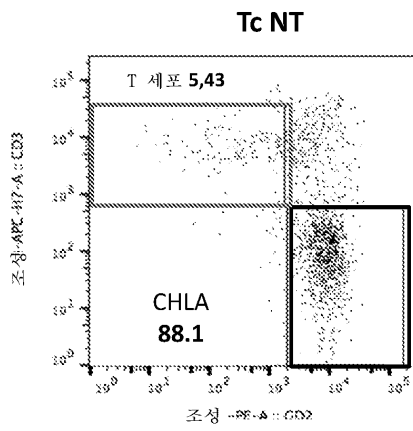
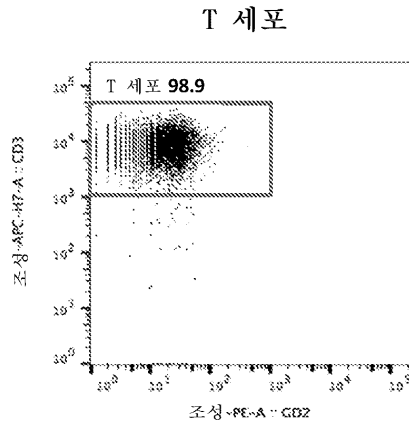
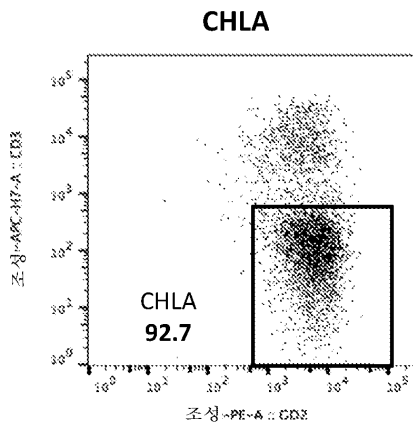
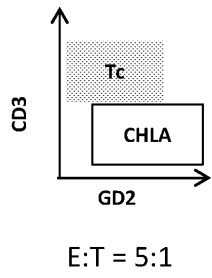
도면6a



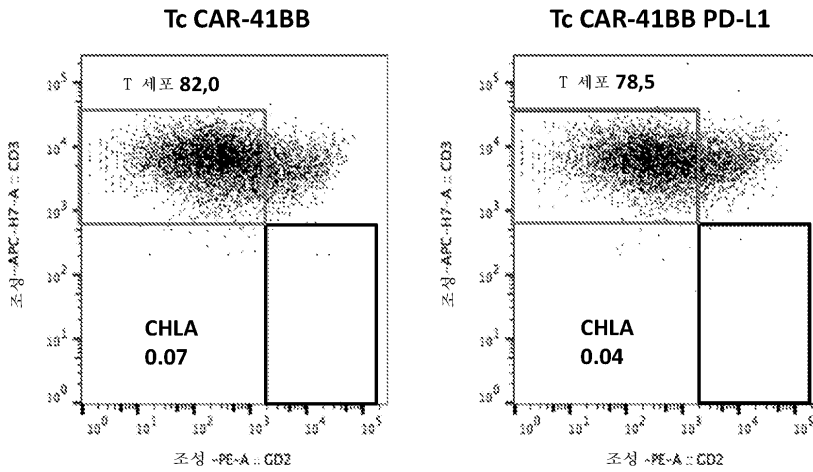
도면6b



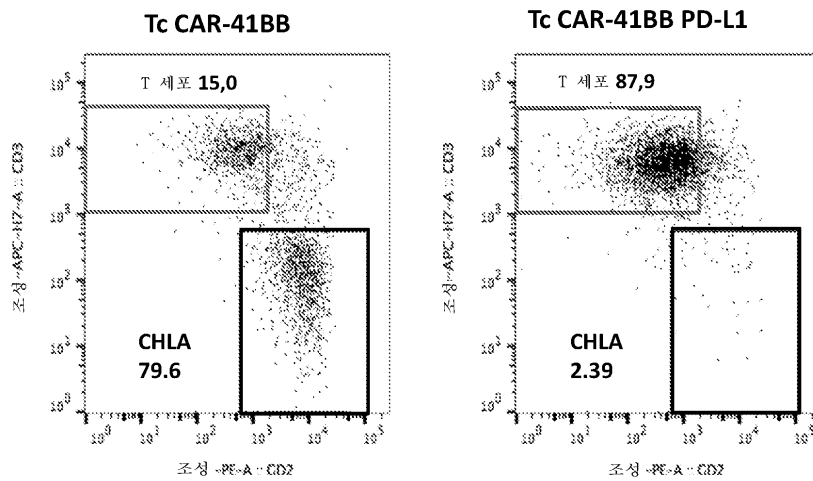
도면7a



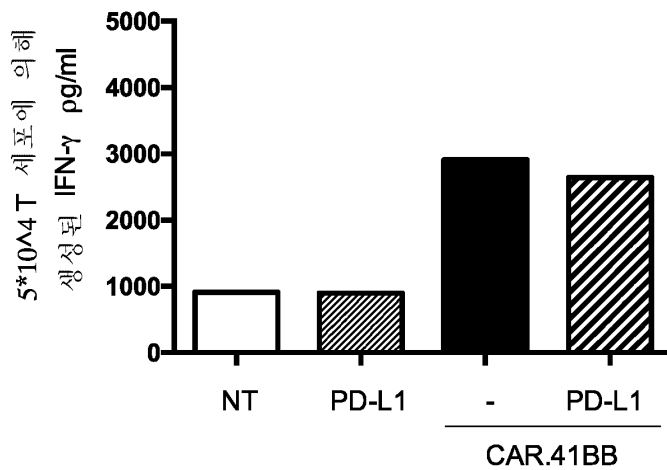
도면7b



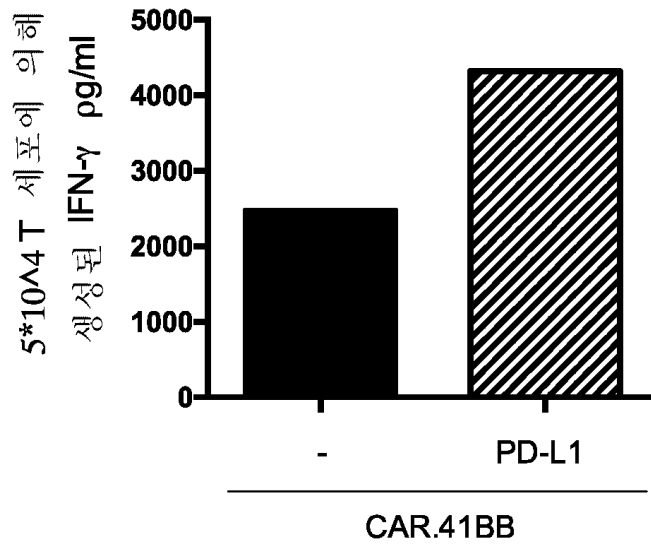
도면7c



도면8a



도면8b



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Cell Medica Switzerland AG
 THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL

<120> MODIFIED CELLS FOR IMMUNOTHERAPY

<130> W02017/147383

<140> PCT/US2017/019301

<141> 2017-02-24

<150> EP16020057.2

<151> 2016-02-25

<160> 63

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL of scFv

<400> 1

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

1 5 10 15

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Asn Tyr Gly Ser Ser Ser
 85 90 95

Ser Ser Ser Tyr Gly Ala Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val
 100 105 110

Leu Gly

<210> 2

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH of scFv

<400> 2

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr
 20 25 30

Thr Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Ile Ile Ser Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60

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

<210> 7

<211> 16

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 7

Ile Ile Ser Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly

1 5 10 15

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 8

Gly Arg Tyr Thr Gly Tyr Pro Tyr Tyr Phe Ala Leu

1 5 10

<210> 9

<211> 254

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> scFv

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Asn Tyr Gly Ser Ser Ser

85 90 95

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

<210> 10

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 10

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 11

<211> 22

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer
 <400> 11
 taaccatgga gtttgggctg ag 22

<210> 12
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer
 <400> 12
 gacgcatgct cagctcgaca cggtgacc 28

<210> 13
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VL sequence of 14g2a scFv
 <400> 13
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile His Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Val Pro Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
 100 105 110

Lys Arg

<210> 14

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH sequence of 14g2a scFv

<400> 14

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

1 5 10 15

Ser Val Met Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Ser Ser Phe Thr Gly Tyr

 20 25 30

Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Asn Ile Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

 35 40 45

Gly Ala Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

 50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met His Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

 85 90 95

Val Ser Gly Met Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser

 100 105 110

Ser

<210> 15

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hIgG1 signal peptide

<400> 15

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln

<210> 16

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L1 of anti-GD2-CAR

<400> 16

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L2 of anti-GD2-CAR

<400> 17

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L3 of anti-GD2-CAR

<400> 18

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Leu Thr

1 5 10

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H1 of anti-GD2-CAR

<400> 19

Ser Ser Phe Thr Gly Tyr Asn Met Asn

1 5

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H2 of anti-GD2-CAR

<400> 20

Ala Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 21

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H3 of anti-GD2-CAR

<400> 21

Gly Met Glu Tyr

1

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L1 of anti-CSPG4 CAR

<400> 22

Arg Ala Ser Gln Thr Ile Tyr Lys Asn Leu His

1 5 10

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L2 of anti-CSPG4 CAR

<400> 23

Tyr Gly Ser Asp Ser Ile Ser

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L3 of anti-CSPG4 CAR

<400> 24

Leu Gln Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Thr

1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H1 of anti-CSPG4 CAR

<400> 25

Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Met His

1 5

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H2 of anti-CSPG4 CAR

<400> 26

Trp Ile Asn Thr Ala Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 27

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H3 of anti-CSPG4 CAR

<400> 27

Tyr Tyr Asp Tyr

1

<210> 28

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL sequence of anti-CSPG4 CAR

<400> 28

Leu Asp Ile Lys Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Leu Ser Val Thr Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Arg Ser Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Lys Tyr Gly Ser Asp Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Thr

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Asn Ile Asn Ser Val Lys

65 70 75 80

Pro Glu Asp Glu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly Tyr Ser Thr Pro

85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 29

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH sequence of anti-CSPG4 CAR

<400> 29

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Met His Trp Val Lys Lys Thr Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Leu

<400> 32

Ser Gln Asn Thr His Val Pro Pro Thr

1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H1 of anti-GPC3 CAR

<400> 33

Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Glu Met His

1 5

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H2 of anti-GPC3 CAR

<400> 34

Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 35

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H3 of anti-GPC3 CAR

<400> 35

Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr

1 5

<210> 36

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL of anti-GPC3 CAR

<400> 36

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
 85 90 95

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 37

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH of anti-GPC3 CAR v

<400> 37

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 Tyr
 20 25 30

Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L1 of anti-5T4 CAR

<400> 39

Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His

1 5

<210> 40

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L2 of anti-5T4 CAR

<400> 40

Arg Ile Asn Pro Asn Asn Gly Val Thr Leu Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 41

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L3 of anti-5T4 CAR

<400> 41

Ser Thr Met Ile Thr Asn Tyr Val Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H1 of anti-5T4 CAR

<400> 42

Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Ala

1 5 10

<210> 43

<211>

7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H2 of anti-5T4 CAR

<400> 43

Tyr Thr Ser Ser Arg Tyr Ala

1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H3 of anti-5T4 CAR

<400> 44

Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Pro Thr

1 5

<210> 45

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL of anti-5T4 CAR

<400> 45

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp

20 25 30

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

35 40 45

Ser Tyr Thr Ser Ser Arg Tyr Ala Gly Val Pro Asp Arg Phe Ile Gly

50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Leu Gln Ala

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 46

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH of anti-5T4 CAR

<400> 46

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Arg Ile Asn Pro Asn Asn Gly Val Thr Leu Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Thr Met Ile Thr Asn Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Val Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 47

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 41BB costimulatory domain

<400> 47

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

1 5 10 15

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

Asp Asn Ser Ile Ile Asn Cys Ala Tyr Ser Asn Ser Ala Ser Asp Tyr

20 25 30

Phe Ile Trp Tyr Lys Gln Glu Ser Gly Lys Gly Pro Gln Phe Ile Ile

35 40 45

Asp Ile Arg Ser Asn Met Asp Lys Arg Gln Gly Gln Arg Val Thr Val

50 55 60

Leu Leu Asn Lys Thr Val Lys His Leu Ser Leu Gln Ile Ala Ala Thr

65 70 75 80

Gln Pro Gly Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Glu Thr Val Thr Asp

85 90 95

Ser Trp Gly Lys Leu Gln Phe Gly Ala Gly Thr Gln Val Val Val Thr

100 105 110

Pro Asp

<210> 52

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> WT-1 specific TCR, CDR1 alpha

<400> 52

Ser Ser Tyr Ser Pro Ser

1 5

<210> 53

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> WT-1 specific TCR, CDR2 alpha

<400> 53

Tyr Thr Ser Ala Ala Thr Leu

1 5

<210> 54

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> WT-1 specific TCR, CDR3 alpha

<400> 54

Trp Ser Pro Phe Ser Gly Gly Gly Ala Asp Gly Leu Thr

1 5 10

<210> 55

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> WT-1 specific TCR, CDR3 alpha v

<400> 55

Ser Pro Phe Ser Gly Gly Gly Ala Asp Gly Leu Thr

1 5 10

<210> 56

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> WT-1 specific TCR, CDR1 beta

<400> 56

Asp Phe Gln Ala Thr Thr

1 5

<210> 57

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> WT-1 specific TCR, CDR2 beta

<400> 57

Ser Asn Glu Gly Ser Lys Ala

1 5

<210> 58

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> WT-1 specific TCR, CDR3 beta

<400> 58

Ser Ala Arg Asp Gly Gly Glu Gly

1 5

<210> 59

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> WT-1 specific TCR, CDR3 beta v

<400> 59

Arg Asp Gly Gly Glu Gly Ser Glu Thr Gln Tyr

1 5 10

<210> 60

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> WT-1 specific TCR, alpha chain

<400> 60

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

1 5 10 15

Gly Thr Arg Ala Gln Ser Val Thr Gln Leu Asp Ser His Val Ser Val

20 25 30

Ser Glu Gly Thr Pro Val Leu Leu Arg Cys Asn Tyr Ser Ser Ser Tyr

35 40 45

Ser Pro Ser Leu Phe Trp Tyr Val Gln His Pro Asn Lys Gly Leu Gln

50 55 60

Leu Leu Leu Lys Tyr Thr Ser Ala Ala Thr Leu Val Lys Gly Ile Asn

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Pro Ser Ala His Met Ser Asp Ala Ala Glu Tyr Phe Cys Val Val

100 105 110

Ser Pro Phe Ser Gly Gly Gly Ala Asp Gly Leu Thr

115

120

<210> 61

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> WT-1 specific TCR, beta chain

<220><221> misc_feature

<222> (32)..(32)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 61

Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Pro Gly Ser Gly Leu Gly Ala

1 5 10 15

Val Val Ser Gln His Pro Ser Trp Val Ile Cys Lys Ser Gly Thr Xaa

20 25 30

Val Lys Ile Glu Cys Arg Ser Leu Asp Phe Gln Ala Thr Thr Met Phe

35 40 45

Trp Tyr Arg Gln Phe Pro Lys Gln Ser Leu Met Leu Met Ala Thr Ser

50 55 60

Asn Glu Gly Ser Lys Ala Thr Tyr Glu Gln Gly Val Glu Lys Asp Lys

65 70 75 80

Phe Leu Ile Asn His Ala Ser Leu Thr Leu Ser Thr Leu Thr Val Thr

85 90 95

Ser Ala His Pro Glu Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Cys Ser Ala Arg Asp

100 105 110

Gly Gly Glu Gly

115

<210> 62

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

WT-1 specific TCR, alpha chain v

<400> 62

Met Leu Leu Leu Leu Val Pro Val Leu Glu Val Ile Phe Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Thr Arg Ala Gln Ser Val Thr Gln Leu Asp Ser His Val Ser Val
 20 25 30
 Ser Glu Gly Thr Pro Val Leu Leu Arg Cys Asn Tyr Ser Ser Ser Tyr
 35 40 45
 Ser Pro Ser Leu Phe Trp Tyr Val Gln His Pro Asn Lys Gly Leu Gln
 50 55 60
 Leu Leu Leu Lys Tyr Thr Ser Ala Ala Thr Leu Val Lys Gly Ile Asn
 65 70 75 80
 Gly Phe Glu Ala Glu Phe Lys Lys Ser Glu Thr Ser Phe His Leu Thr
 85 90 95
 Lys Pro Ser Ala His Met Ser Asp Ala Ala Glu Tyr Phe Cys Val Val
 100 105 110
 Ser Pro Phe Ser Gly Gly Gly Ala Asp Gly Leu Thr

115 120

<210> 63

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> WT-1 specific TCR, beta chain v

<400> 63

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

