



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0008840
(43) 공개일자 2021년01월25일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/705 (2006.01) A61K 35/17 (2014.01)
A61K 48/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/705 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7032411
- (22) 출원일자(국제) 2019년04월10일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2020년11월10일
- (86) 국제출원번호 PCT/NL2019/050212
- (87) 국제공개번호 WO 2019/199165
국제공개일자 2019년10월17일
- (30) 우선권주장
18166498.8 2018년04월10일
유럽특허청(EPO)(EP)

- (71) 출원인
스티호팅 산퀸 블드포르지닝
네덜란드 1066 씨엑스 암스테르담 플레즈만라안 125
- (72) 발명자
압센, 더크
네덜란드 1066 씨엑스 암스테르담 플레즈만라안 125 씨/오
- (74) 대리인
특허법인 수

전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 **키메라 노치 수용체**

(57) 요약

본 발명은 세포내 도메인, 노치(Notch) 수용체의 막관통 도메인 및 이종 세포의 리간드-결합 도메인을 포함하는 키메라 수용체, 및 이의 용도, 특히 T 세포 기능 및/또는 T 세포 생존 개선, 더욱 특히 암 치료에서 이의 용도 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 16/2803 (2013.01)

C12N 5/0636 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2319/03 (2013.01)

C07K 2319/70 (2013.01)

C12N 2510/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

키메라 수용체(Chimeric Receptor)로서,

노치(Notch) 수용체의, 세포내 도메인(Intracellular Domain), 막관통 도메인(Transmembrane Domain), 이중이량체화 도메인(Heterodimerization Domain) 및 LNR 반복 도메인(Lin-12-Notch Repeats Domain), 및

이중 세포의 리간드 결합 도메인(Heterologous Extracellular Ligand-binding Domain)을 포함하는, 키메라 수용체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 수용체는 노치 신호전달을 할 수 있는, 키메라 수용체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 이중 세포의 리간드 결합 도메인은,

- 가용성 리간드에 특이적인 리간드 결합 도메인;
- ScFv 항체 도메인, 바람직하게는 종양 세포 표면 항원에 특이적인 ScFv 항체 도메인과 같은, 세포 표면 항원에 특이적인 리간드 결합 도메인;
- Fc 수용체의 세포의 리간드 결합 도메인 또는 이의 리간드 결합 단편;
- 표면 분자의 개입 없이, 상기 키메라 수용체를 가교할 수 있는 항체용 에피토프(Epitope)를 포함하는 세포의 도메인; 및
- 스트렙타비딘(Streptavidin)과 같은 모이어티(Moiety)에 대한 다수의 결합 사이트(Binding Site)를 갖는 작용체에 의해 가교될 수 있는, 비오틴(Biotin)과 같은 모이어티를 포함하는 세포의 도메인

으로 구성된 그룹으로부터 선택되는, 키메라 수용체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 LNR 도메인과 상기 이중 세포의 리간드 결합 도메인 사이에 위치하는 연결 시퀀스를 더 포함하는, 키메라 수용체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 키메라 수용체를 인코딩하는 시퀀스를 포함하는, 핵산 분자.

청구항 6

제5항에 따른 핵산 분자를 포함하는, 벡터(vector).

청구항 7

제5항에 따른 상기 핵산 분자 또는 제6항의 상기 벡터를 포함하는, 독립 세포.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 세포가, 중앙 유래 T 세포 또는 중앙 침투 림프구(TIL: Tumor Infiltrating Lymphocyte)와 같은 T 세포인, 독립 세포.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서,

상기 T 세포는, 암을 앓고 있는 환자로부터 분리된, 자가 T 세포인(Autologous T Cell), 독립 세포.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서,

상기 T 세포는 키메라 항원 수용체를 발현하는, 독립 세포.

청구항 11

제5항 또는 제6항에 따른 상기 핵산 분자 또는 상기 벡터에 의해 형질도입된(Transduced), 유전자 변형된 T 세포.

청구항 12

제5항에 따른 상기 핵산 분자, 제6항에 따른 상기 벡터 또는 제7항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 상기 세포, 및 약제학적으로 허용가능한 캐리어, 희석제 또는 부형제를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 13

T 세포 기능 및/또는 T 세포 생존을 이를 필요로 하는 대상자 내에서 개선하기 위한 방법에 있어서,

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 치료학적 유효량의, 키메라 수용체, 핵산 분자, 벡터 또는 세포를 대상자에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 14

대상자 내에서 T 세포 기능 및/또는 T 세포 생존을 개선하기 위한 방법의 사용을 위한, 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 키메라 수용체, 핵산 분자, 벡터 또는 세포.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 따른 사용을 위한, 방법, 키메라 수용체, 핵산 분자, 벡터 또는 세포에 있어서,

상기 방법은 T 세포 기능소실(Exhaustion)을 예방 또는 억제하는 단계를 포함하는,

방법, 키메라 수용체, 핵산 분자, 벡터 또는 세포.

청구항 16

면역치료법을 필요로 하는 대상자에서 면역치료법의 방법에 있어서,

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 키메라 수용체, 핵산 분자, 벡터 또는 세포의 치료학적 유효량을 대상자에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 17

치료, 바람직하게는 면역치료법의 사용을 위한 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른, 키메라 수용체, 핵산 분자, 벡터 또는 세포.

청구항 18

제16항 또는 제17항 따른 사용을 위한, 방법, 키메라 수용체, 핵산 분자, 벡터 또는 세포에 있어서,

상기 치료 또는 면역치료법은 항체 기반 면역치료법을 더 포함하는,

방법, 키메라 수용체, 핵산 분자, 벡터 또는 세포.

청구항 19

제13항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따른 사용을 위한, 방법, 키메라 수용체, 핵산 분자, 벡터 또는 세포에 있어서,

상기 대상자는 암을 앓고 있는,

방법, 키메라 수용체, 핵산 분자, 벡터 또는 세포.

청구항 20

암을 앓고 있고 상기 항체로 치료 받는 대상자 내에서 항체 기반 면역치료법의 효능을 향상시키기 위한 방법에 있어서,

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 상기 키메라 수용체를 발현하는 T 세포의 치료학적 유효량을 상기 대상자에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 21

암을 앓고 있고 상기 항체로 치료 받는 대상자 내에서, 항체 기반 면역치료법의 효능을 향상시키기 위한 방법 내에서 사용되기 위한, 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 키메라 수용체를 발현하는, T 세포.

청구항 22

암 치료를 필요로 하는 대상자에서 암을 치료하는 방법에 있어서,

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 상기 키메라 수용체를 인코딩하는 핵산 시퀀스를 포함하는, 유효량의 T 세포를 대상자에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 23

대상자에서 암을 치료하는 방법 내에서 사용되기 위한, 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른, 상기 키메라 수용체를 인코딩하는 핵산 시퀀스를 포함하는, T 세포.

청구항 24

제22항 또는 제23항에 있어서,

상기 방법은

- 상기 대상자로부터 T 세포를 분리하는 단계;
- 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 상기 키메라 수용체를 인코딩하는 핵산 시퀀스를 제공함으로써 상기 T 세포를 변형시키는 단계; 및
- 상기 변형된 T 세포를 상기 대상자에게 반환하는 단계를 포함하는, 방법 또는 T 세포.

청구항 25

제7항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 세포의 집단을 생산하는 방법에 있어서,

- 세포, 바람직하게는 인간 T-세포를 제공하는 단계,
- 상기 세포에 제5항 또는 제6항에 따른 핵산 분자 또는 벡터를 제공하는 단계, 및
- 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 상기 키메라 항원 수용체의 발현을 허용하는 단계를 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 치료 분야, 특히 암 치료, 보다 구체적으로 입양 T 세포 면역치료법에 관한 것이다.

[0001]

배경기술

[0002] 체외(*In Vitro*) 증식 종양 침투 림프구(TIL: Tumor Infiltrating Lymphocyte) 또는 키메라 항원 수용체(CAR: Chimeric Antigen Receptor)를 발현하는 T 세포의 입양적 전달에 의한 종양 치료법에서 현저한 성공이 얻어졌다. CAR은 CD3 ζ 의 신호전달 도메인 및 CD28 또는 4-1BB와 같은 공자극 수용체에 결합된 종양에서 발견되는 항원에 특이적인 엑토도메인(Ectodomain)(항체의 일부분)을 함유한다(도 1). T 세포에서 CAR의 발현은 종양 항원에 의해 이의 활성화로 이어진다. 특정 혈액학적 악성 종양에서 CAR T 세포로 최대 90%까지 완전한 차도(Remission)가 얻어졌다. 고형 종양 치료에서 훨씬 더 적은 성공이 얻어졌다. 따라서 여전히 많은 환자가 이러한 치료로 치료되지 않는다. 주요 장애물은 전이된 T 세포의 최적이지 아닌 지속성과 다수의 억제 수용체에 의한 T 세포 기능의 차단(기능소실(Exhaustion)로 알려진 현상)이며, 이는 모두 최대 치료 효과를 목표로 해야 한다. 이상적으로는, 항종양 T 세포는 억제 메커니즘에 광범위하게 영향을 받지 않고 완전한 종양 박멸을 달성할 수 있을 만큼 오래 살 수 있다.

[0003] 노치(Notch)는 막 결합 리간드에 반응하는 세포 표면 수용체이다. 이는, 세포내 도메인이 γ -세크레타제(Secretase)에 의해 원형질 막으로부터 분리되어 핵으로 이동되어 전사 인자로서 작용하는 놀랍도록 직접적인 경로를 통해 신호를 보낸다(도 2). 노치는 CD4 및 CD8 T 세포 이펙터 분화의 주요 조절인자이다. 또한 CD4 기억 T 세포뿐만 아니라, 고형 종양에 대해 가장 효과적인 T 세포 유형으로 부상되고있는 조직 상재 기억(Tissue Resident Memory) CD8 T 세포의 장기 생존을 촉진한다. 또한, 노치는 CD8 이펙터 T 세포 유전자 발현 프로그램의 주요 조절인자이다. 직접 표적 유전자 중에는 IFN γ , 그랜자임(Granzyme) B 및 퍼포린(Perforin)을 인코딩하는 유전자와 전사 인자 T-bet 및 에오메소더민(Eomesodermin)이 있다. 노치 경로에 T 세포 특이적인 결합이 있는 마우스는 모델 종양을 거부할 수 없다. 반대로, 노치의 의도적인 활성화는 마우스에서 종양 거부를 촉진했다. 종양 관련 골수 유래 억제 세포(MDSC: Myeloid-derived Suppressor Cell)는 T 세포에서 노치 발현을 하향 조절하여, 아마도 종양이 효과적인 T 세포 매개 거부로부터 벗어나도록 돕는다. 활성화 노치 대립 유전자의 발현은 CD8 T 세포를 MDSC 매개 억제에 둔감하게 만들었다.

[0004] 최근 연구(Morsut et al. 2016 및 Roybal et al. 2016)는 막관통 영역과 노치의 세포외 영역의 일 부분을 함유하는 키메라 수용체를 생성하였다. 이들은 관련되지 않은 표면 수용체의 리간드 결합 도메인에 결합된 반면 노치의 세포내 부분은 관련 없는 전이활성제(Gal4)에 의해서 대체되었다. 이들 수용체에 의한 리간드 결합은 γ -세크레타제 매개 Gal4의 방출로 귀결되었으며, 이는 인공 반응 유전자의 전사를 활성화시켰다. 따라서, 이들 수용체에서, 노치의 세포내 이펙터 도메인과 노치의 세포외 리간드 결합 도메인, 및 결과적으로 노치 신호전달이 더 이상 존재하지 않는다.

[0005] 기존의 면역치료법과 함께 사용되거나 사용되지 않을, 종양의 면역치료법을 위한 새로운 조성물 및 방법에 대한 당 업계의 요구는 그대로 남아 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) Amsen, D., Blander, J. M., Lee, G. R., Tanigaki, K., Honjo, T., Flavell, R. A.가 2004년에 저술한 "Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells"의 타이틀을 가지는 자료로서, Cell 117, 515-526를 통해 발간된 자료.

(비특허문헌 0002) Amsen, D., Antov, A., Jankovic, D., Sher, A., Radtke, F., Souabni, A., Busslinger, M., McCright, B., Gridley, T., Flavell, R. A.가 2007년에 저술한 "Direct regulation of Gata3 expression determines the T helper differentiation potential of Notch"의 타이틀을 가지는 자료로서, Immunity 27, 89-99를 통해 발간한 자료.

(비특허문헌 0003) Anders, S., McCarthy, D. J., Chen, Y., Okoniewski, M., Smyth, G. K., Huber, W., Robinson, M. D.가 2013년에 저술한 "Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor"의 타이틀을 가지는 자료로서, Nat Protoc 8, 1765-1786을 통해 발간된 자료.

(비특허문헌 0004) Backer, R. A., Helbig, C., Gentek, R., Kent, A., Laidlaw, B. J., Dominguez, C. X., de Souza, Y. S., van Trierum, S. E., van Beek, R., Rimmelzwaan, G. F., ten Brinke, A., Willemsen, A. M., van Kampen, A. H., Kaech, S. M., Blander, J. M., van Gisbergen, K., Amsen, D.가 2014년에 저술한 "A

central role for Notch in effector CD8(+) T cell differentiation"의 타이틀을 가지는 자료로서, *Nat Immunol* 15, 1143-1151를 통해 발간된 자료.

(비특허문헌 0005) Belz, G. T., Xie, W., Altman, J. D., Doherty, P. C.가 2000년에 저술한 "A previously unrecognized H-2D(b)-restricted peptide prominent in the primary influenza A virus-specific CD8(+) T-cell response is much less apparent following secondary challenge"의 타이틀을 가지는 자료로서, *J Virol* 74, 3486-3493를 통해 발간된 자료.

(비특허문헌 0006) Gentek R, Munneke JM, Helbig C, Blom B, Hazenberg MD, Spits H, Amsen D.가 저술한 "Modulation of Signal Strength Switches Notch from an Inducer of T Cells to an Inducer of ILC2"의 타이틀을 가지는 자료로서, *Front Immunol.* 2013 Oct 22;4:334를 통해 발간된 자료.

(비특허문헌 0007) Helbig, C., Gentek, R., Backer, R. A., de Souza, Y., Derks, I. A., Eldering, E., Wagner, K., Jankovic, D., Gridley, T., Moerland, P. D., Flavell, R. A., Amsen, D.가 2012년에 저술한 "Notch controls the magnitude of T helper cell responses by promoting cellular longevity"의 타이틀을 가지는 자료로서, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 9041-9046를 통해 발간된 자료.

(비특허문헌 0008) Kochenderfer JN. et al가 저술한 "Construction and preclinical evaluation of an anti-CD19 chimeric antigen receptor"의 타이틀을 가지는 자료로서, *J Immunother.* 2009 Sep; 32(7): 689-702를 통해 발간된 자료.

(비특허문헌 0009) Legrand N. et al가 저술한 "Functional CD47/signal regulatory protein alpha (SIRP α) interaction is required for optimal human T- and natural killer- (NK) cell homeostasis in vivo"의 타이틀을 가지는 자료로서, *J Immunol* 2009; 183:7645-7655를 통해 발간된 자료.

(비특허문헌 0010) Ma, J. S., Kim, J. Y., Kazane, S. A., Choi, S. H., Yun, H. Y., Kim, M. S., Rodgers, D. T., Pugh, H. M., Singer, O., Sun, S. B., Fonslow, B. R., Kochenderfer, J. N., Wright, T. M., Schultz, P. G., Young, T. S., Kim, C. H., Cao, Y.가 2016년에 저술한 "Versatile strategy for controlling the specificity and activity of engineered T cells"의 타이틀을 가지는 자료로서, *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E450-458을 통해 발간된 자료.

(비특허문헌 0011) Mueller, S. N., Langley, W. A., Carnero, E., Garcia-Sastre, A., Ahmed, R.가 2010년에 저술한 "Immunization with live attenuated influenza viruses that express altered NS1 proteins results in potent and protective memory CD8+ T-cell responses"의 타이틀을 가지는 자료로서, *J Virol* 84, 1847-1855를 통해 발간된 자료.

(비특허문헌 0012) Morsut, L., Roybal, K. T., Xiong, X., Gordley, R. M., Coyle, S. M., Thomson, M., Lim, W. A.가 2016년 저술한 "Engineering Customized Cell Sensing and Response Behaviors Using Synthetic Notch Receptors"의 타이틀을 가지는 자료로서, *Cell* 164, 780-791를 통해 발간된 자료.

(비특허문헌 0013) Nam, Y., Sliz, P., Pear, W. S., Aster, J. C., Blacklow, S. C.가 2007년에 저술한 "Cooperative assembly of higher-order Notch complexes functions as a switch to induce transcription"의 타이틀을 가지는 자료로서, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 2103-2108를 통해 발간된 자료.

(비특허문헌 0014) Nicholson, I.C. et al가 저술한 "Construction and characterisation of a functional CD19 specific single chain Fv fragment for immunotherapy of B lineage leukaemia and lymphoma"의 타이틀을 가지는 자료로서, *Molecular Immunology* 1997;34:1157-1165를 통해 발간된 자료.

(비특허문헌 0015) Palmer, D. F., Dowdle, W. R., Coleman, M. T., Schild, G. C.가 1975년에 저술한 "Advanced laboratory techniques for influenza diagnosis: procedural guide"의 타이틀을 가지는 자료로서, *Haemagglutination inhibition test. in Atlanta: US Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, US Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service. pp 25-62*를 통해 발간된 자료.

(비특허문헌 0016) Rodgers, D. T., Mazagova, M., Hampton, E. N., Cao, Y., Ramadoss, N. S., Hardy, I. R., Schulman, A., Du, J., Wang, F., Singer, O., Ma, J., Nunez, V., Shen, J., Woods, A. K., Wright, T.

M., Schultz, P. G., Kim, C. H., Young, T. S.가 2016년에 저술한 "Switch-mediated activation and retargeting of CAR-T cells for B-cell malignancies"의 타이틀을 가지는 자료로서, Proc Natl Acad Sci U S A 113, E459-468를 통해 발간된 자료.

(비특허문헌 0017) Roybal, K. T., Rupp, L. J., Morsut, L., Walker, W. J., McNally, K. A., Park, J. S., Lim, W. A.가 2016년에 저술한 "Precision Tumor Recognition by T Cells With Combinatorial Antigen-Sensing Circuits"의 타이틀을 가지는 자료로서, Cell 164, 770-779를 통해 발간된 자료.

(비특허문헌 0018) Topham, D. J., Castrucci, M. R., Wingo, F. S., Belz, G. T., Doherty, P. C.가 2001년에 저술한 "The role of antigen in the localization of naive, acutely activated, and memory CD8(+) T cells to the lung during influenza pneumonia"의 타이틀을 가지는 자료로서, J Immunol 167, 6983-6990를 통해 발간된 자료.

(비특허문헌 0019) Van der Sluijs, K. F., van Elden, L. J., Nijhuis, M., Schuurman, R., Pater, J. M., Florquin, S., Goldman, M., Jansen, H. M., Lutter, R., van der Poll, T.가 2004년에 저술한 "IL-10 is an important mediator of the enhanced susceptibility to pneumococcal pneumonia after influenza infection"의 타이틀을 가지는 자료로서, J Immunol 172, 7603-7609를 통해 발간된 자료.

(비특허문헌 0020) van Lent AU, et al가 저술한 "IL-7 enhances thymic human T cell development in "human immune system" Rag2-/-IL-2Rgamma-/- mice without affecting peripheral T cell homeostasis"의 타이틀을 가지는 자료로서, J Immunol. 2009;183:7645-7655를 통해 발간된 자료.

(비특허문헌 0021) Wherry, E. J., Kurachi, M.가 2015년에 저술한 "Molecular and cellular insights into T cell exhaustion"의 타이틀을 가지는 자료로서, Nat Rev Immunol 15, 486-499를 통해 발간된 자료.

(비특허문헌 0022) Young, M. D., Wakefield, M. J., Smyth, G. K., Oshlack, A.가 2010년에 저술한 "Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias"의 타이틀을 가지는 자료로서, Genome biology 11, R14를 통해 발간된 자료.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 일반적으로, 특히 종양 면역치료법에서 T 세포 기능을 개선하기 위한 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 따라서 본 발명은 노치(Notch) 수용체의 세포내 도메인(Intracellular Domain) 및 막관통 도메인(Transmembrane Domain), 및 이종 세포외 리간드-결합 도메인(Heterologous Extracellular Ligand-binding Domain)을 포함하는 키메라 수용체(Chimeric Receptor)를 제공한다. 키메라 수용체는 바람직하게는 이중이량체화 도메인(Heterodimerization Domain) 및 노치 수용체의 LNR 반복 도메인(Lin-12-Notch Repeats Domain)을 더 포함한다.

[0009] 본 발명에 따른 키메라 수용체는, 이종 세포외 리간드-결합 도메인이 리간드에 결합될 때 노치 신호전달, 바람직하게는 노치1, 노치2, 노치3 및/또는 노치4 신호전달, 더 바람직하게는 노치1 및/또는 노치2 신호전달을 할 수 있다.

[0010] 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 키메라 수용체를 인코딩하는 시퀀스를 포함하는 핵산 분자를 제공한다.

[0011] 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 핵산 분자를 포함하는 벡터(Vector)를 제공한다.

[0012] 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 핵산 분자를 포함하는 독립 세포를 제공한다. 다른 양태에서, 본 발명은 이러한 세포의 집단을 제공한다.

[0013] 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 키메라 수용체를 발현하는 독립 세포를 제공한다. 다른 양태에서, 본

발명은 이러한 세포의 집단을 제공한다.

- [0014] 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 핵산 분자 또는 벡터에 의해 형질도입되는 유전자 변형된 T 림프구를 제공한다.
- [0015] 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 핵산 분자, 벡터 또는 세포 및 약제학적으로 허용가능한 캐리어, 희석제 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0016] 다른 양태에서, 본 발명은 T 세포 기능 및/또는 T 세포 생존을 이를 필요로 하는 대상자에서 개선하기 위한 방법을 제공하며, 이 방법은 본 발명에 따른 치료학적 유효량의, 키메라 수용체, 핵산 분자, 벡터 또는 세포를 대상자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0017] 다른 양태에서, 본 발명은 대상자에서 T 세포 기능 및/또는 T 세포 생존을 개선하기 위한 방법에서의 사용을 위한 본 발명에 따른 키메라 수용체, 핵산 분자, 벡터 또는 세포를 제공한다.
- [0018] 다른 양태에서, 본 발명은 면역치료법을 필요로 하는 대상자에서 면역치료법의 방법을 제공하며, 이 방법은 본 발명에 따른 키메라 수용체, 핵산 분자, 벡터 또는 세포의 치료학적 유효량을 대상자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0019] 다른 양태에서, 본 발명은 치료법, 바람직하게는 면역치료법에서의 사용을 위한 본 발명에 따른 키메라 수용체, 핵산 분자, 벡터 또는 세포를 제공한다.
- [0020] 다른 양태에서, 본 발명은 암을 앓고 있고 상기 항체로 치료 받는 대상자에서 항체 기반 면역치료법의 효능을 향상시키기 위한 방법을 제공하며, 이 방법은 본 발명에 따른 상기 키메라 수용체를 발현하는 T 세포의 치료학적 유효량을 상기 대상자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0021] 다른 양태에서, 본 발명은 암을 앓고 있고 상기 항체로 치료 받는 대상자에서 항체 기반 면역치료법의 효능을 향상시키기 위한 방법에서의 사용을 위한 본 발명에 따른 키메라 수용체를 발현하는 T 세포를 제공한다.
- [0022] 다른 양태에서, 본 발명은 암 치료를 필요로 하는 대상자에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 이 방법은 본 발명에 따른 상기 키메라 수용체를 인코딩하는 핵산 시퀀스를 포함하는, 유효량의 T 세포를 대상자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0023] 다른 양태에서, 본 발명은 대상자에서 암을 치료하는 방법에서의 사용을 위한 본 발명에 따른 상기 키메라 수용체를 인코딩하는 핵산 시퀀스를 포함하는 T 세포를 제공한다.
- [0024] 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 세포의 집단을 생산하는 방법을 제공하며, 이 방법은
- [0025] - 세포, 바람직하게는 인간 T-세포를 제공하는 단계,
- [0026] - 상기 세포에 본 발명에 따른 핵산 분자 또는 벡터를 제공하는 단계, 및
- [0027] - 본 발명에 따른 상기 키메라 항원 수용체의 발현을 허용하는 단계를 포함한다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1은 키메라 항원 수용체(CAR)의 개략도이다.
4-1BB 또는 CD28 공동 자극 수용체의 세포내 신호 전달 도메인 및 CD3 제타 사슬에 연결된 항체의 scFv (단일 사슬) 리간드 결합 부분이 도시된다.
- 도 2는 노치 신호전달 경로이다.
노치의 두 개의 막 결합 리간드인 Jagged 및 Delta는 연한 파란색과 빨간색으로 도시된다. 노치 수용체 자체는 주황색으로 묘사된다. 리간드 결합 후, 노치의 세포내 도메인(NICD)은 막에서 절단되어 핵으로 전위되며, 여기서 CSL 및 MAML 단백질과 복합체로 전사 활성인자를 형성한다.
- 도 3은 노치 결핍이 항바이러스 CD8 T 세포에서 감소된 효과기 기능으로 이어지는 것을 도시한다. (a) 실험 흐름도. 야생형(노치^{1^{flox/flox}} 노치^{2^{flox/flox}}) 또는 T 세포 특이적 노치1/2 녹아웃 마우스(노치^{1^{flox/flox}} 노치^{2^{flox/flox}} CD4-Cre)는 HkX31 인플루엔자 바이러스로 비강 내로 감염되었고, 10 일 후 T 세포(비장에서 나타난 결과)가 분리되었고, CD8에 대해서 염색되었고 DNP₃₆₆₋₃₇₄^b MHC 사합체에 결합되었다(b). (c) 야생형(검은색 막대) 또는 노치

1/2KO 마우스(열린 막대)에서 $D^bNP_{366-374}$ -특이적 $CD8^+$ T 세포의 수. $D^bNP_{366-374}$ -특이적 $CD8^+$ T 세포 중 백분율 $IFN\ \gamma$ (d) 또는 그랜자임 B 생산 세포(e-파란색 히스토그램 야생형, 적색 히스토그램 N1/2ko). (f) FACS 분류된 $D^bNP_{366-374}$ -특이적 $CD8^+$ T 세포에서 그랜자임 B 및 퍼포린에 대한 상대적 mRNA 수준. (g) HkX31 바이러스 부하 (h) 마우스 체중 곡선 및 (i) 감염된 마우스의 혈액에서 인플루엔자 중화 항체 역가. Backer et al. 2014로부터의 모든 결과.

도 4는 효과적인 기억 생성에서 노치에 대한 $CD8^+$ T 세포 고유 요건을 도시한다. 야생형 또는 노치1/2 녹아웃 마우스는 먼저 HkX31 인플루엔자 바이러스로 비장 내로 감염되었고, 다음으로 PR8 인플루엔자로 43 일 후에 재감염되었다. (a) 재감염 8 일 후 혈액에서 $D^bNP_{366-374}$ MHC 사합체 결합 $CD8^+$ T 세포의 백분율. (b) 비장 및 폐에서 $D^bNP_{366-374}$ MHC 사합체 결합 $CD8^+$ T 세포의 수. (c) Rag1 결핍 마우스는 $CD45.2^+$ WT BM(검은색 막대)과 혼합되거나 $CD45.2^+$ 노치1/2KO BM(흰색 막대)과 혼합된 $CD45.1^+$ WT 골수(BM)로 재구성되었다. 마우스는 다음으로 a에서와 같이 감염되고 재감염되었다. $CD45.1^+$ $CD8^+$ T 세포의 반응과 왼쪽에, $CD45.2^+$ $CD8^+$ T 세포의 반응은 오른쪽에 도시된다. 또한 $CD45.2^+$ KO BM만으로 재구성된 마우스의 반응이 표시된다(회색 막대). 결과는 해당 WT 컨트롤에 대해 정규화되었다. (d) 폐에서 분리되고 NP₃₆₆₋₃₇₄ 펩타이드 및 야생형 비장 항원 제시 세포로 체외 재자극된 백분율 $IFN\ \gamma$, $TNF\ \alpha$ 및 그랜자임 B 생산 $CD8^+$ T 세포(인플루엔자 특이적 T 세포의 수가 폐에서 유사했다는 점을 주의. 도 4b 참조).

도 5는 노치결핍이 항바이러스 $CD8^+$ T 세포에서 감소된 효과기 기능으로 이어지는 것을 도시한다. (a) 야생형의 인플루엔자 특이적 이펙터 $CD8^+$ T 세포 또는 T 세포 특이적 노치1/2 녹아웃 마우스 사이에서 차별적으로 발현된 유전자(RNAseq에 의해 획득)의 유전자 세트 강화 분석. (b) 야생형 또는 노치1/2ko 이펙터 T 세포에서 PD1 및 Lag3에 대한 mRNA 수준. (c) 10^4 개의 $CD45.2$ 야생형 또는 노치1/2ko OT1 T 세포는 $CD45.1$ 야생형 콘제닉(Congenic) 마우스로 전달되었고, 이 마우스는 이어서 인플루엔자를 발현하는 오브알부민(Ovalbumin) NP₃₆₆₋₃₇₄ 펩타이드로 감염되었다. 감염 30 일 후 폐의 인플루엔자 특이적 기억 $CD8^+$ T 세포의 PD1에 대한 대표적인 FACS 히스토그램(왼쪽) 및 MFI(오른쪽). (d) 실험 순서도: $CD45.2$ OT1 T 세포는 빈 벡터 또는 레트로바이러스 벡터를 인코딩하는 NICD(노치 세포내 도메인)로 형질도입되고 (c)에서와 같이 감염된 $CD45.1$ 야생형 마우스로 전달되었다. 7일 후, T 세포는 분리되었고 PD1 수준에 대해 FACS에 의해 분석되었다(e).

도 6은 생리학적 노치 반응이 NICD에 매우 민감하다는 점을 도시한다. (a) mER-NICD 또는 구성적 NICD 발현의 상이한 수준의 핵 방출에 의해 유도된 노치 반응성 HES1-루시퍼라제 리포터의 활성화. U2OS 세포는 파이어플라이 루시퍼라제(Firefly Luciferase)를 발현하는 리포터 플라스미드(Reporter Plasmid), 레닐라(Renilla) 루시퍼라제를 구성적으로 발현하는 플라스미드 및 빈 벡터 대조군인 mER-NICD 또는 NICD1로 각각 형질감염되었다. 타목시펜(Tamoxifen)(4-HT)은 표시된 농도로 첨가되었다. 파이어플라이 루시퍼라제 활성화는 동일한 샘플로부터 레닐라 루시퍼라제 활성화로 정규화되었으며 빈 벡터 대조군 샘플(평균 + SD)의 폴드(Fold)로 표시된다. mER-NICD는 4-HT가 없을 때 15.2배 누출 유도를 유도한다는 점을 주의한다. (b, c) 대조군 OP9 세포에 대한 공동 배양 2주 후 흉선 세포의 유세포 분석. $CD34^+$ $CD1a^-$ 전구 세포는 공동 배양 전에 NICD1, mERNICD1 또는 빈 벡터 대조군으로 형질도입되었다. 타목시펜은 표시된 농도로 mER-NICD1 및 빈 벡터 형질도입 배양물에 첨가되었다. (b) 형질도입된 세포는 T 세포 분화를 평가하기 위해 CD4 및 CD8의 표면 발현에 대해 분석되었다. (c) 형질도입된 계통 세포에서 CRTH2의 발현에 의해 결정된 ILC2 분화.

도 7은 항-TA-ch노치 수용체를 도시한다. 노치의 LNR, 이종이량체화, 막관통 및 세포내 도메인은 종양 항원(TA)과 같은 인접 세포의 표면 분자에 대항하게 지향된 항체 네오-엑토도메인에 융합된다. 항체 네오-엑토도메인을 종양 세포와 같은 반대 세포의 리간드에 결합하면 TACE 및 γ -세크레타제에 의한 절단이 유도되어 NICD가 핵으로 전위되고 내인성 노치 표적 유전자가 전사촉진된다. 항-TA-ch노치 수용체는 활성화 표면 항원이 없으면 비활성이다.

도 8은 노치1 수용체의 아미노산 시퀀스를 도시한다. UniProtKB/Swiss-Prot의 시퀀스: P46531.4.

도 9는 노치가 $CD8^+$ T 세포의 기능소실 특징이 생기는 것을 방지할 수 있다는 점을 도시한다.

(a) OT-1 $CD8^+$ T 세포는 활성화되었고, IRES-Thy1.1에 결합된 EV 또는 NICD를 발현하는 바이러스로 형질도입되

었고 5 일 동안 레스트(Rest)되었다. 그 뒤에, 세포는 B16-F10 흑색 종 세포(오브알부민을 발현하지 않음)와 밤새 공동 배양되었고, 다음으로 Thy1.1(형질도입된 세포를 식별하기 위해) 및 그랜자임 B에 대해 염색되었고 유세포 분석으로 분석되었다. Thy1.1⁻ 세포는 분석에서 게이트(Gate)되었다는 점을 주의한다. 또한 Thy1.1의 발현 수준이 NICD 삽입물의 크기로 인해 EV와 NICD 구성체 사이에 차이가 있다는 점을 주의한다. (b) OT-1 T 세포는 (a)에서와 같이 활성화되고 형질도입되었다. 형질도입 5 일 후, 세포는 추가로 6 일 동안 배양되었고 오브알부민(B16-Ova)을 발현하는 신선한 B16-F10 흑색 종 세포는 기능소실로 이어지는 반복되는 TCR 자극을 위해 매일 추가되었다. 다음으로, 세포는 Thy1.1 및 PD1에 대해 염색되었고 유세포 분석에 의해서 분석되었다. (c) OT-1 CD8⁺ T 세포는 (b)에서와 같이 처리되었고, Thy1.1⁺ 세포의 백분율은 도면에 표시된 바와 같이 B16-Ova와의 공동 배양의 상이한 시간 후에 유세포 분석에 의해 분석되었다. (d) OT-1 CD8⁺ T 세포는 활성화되었고, EV 또는 mER-NICD(NICD의 타목시펜 유도성 버전)를 발현하는 바이러스로 형질도입되었고, 0.05 mM (+) 또는 0.5 mM (++) 타목시펜 없이 (c)에서와 같이 B16-Ova와 함께 배양되었다. Thy1.1⁺ 세포는 IFN γ , IL10, 그랜자임 B 및 PD1 발현에 대해 유세포 분석으로 분석되었다.

도 10은 CD19에 대항하도록 지향된 키메라 노치 수용체(CNR)의 생성 및 발현을 도시한다. (a) 실험의 개략도. CNR은 인간 CD19에 특이적인 세포의 ScFv 도메인을 함유한다. 인간 IgG1 Fc 부분에 융합된 인간 CD19 단백질은 CNR의 표면 발현을 검출하기 위해서 사용되었다. 형광성으로 표시된 항-인간 항체는 hCD19-Ig 융합 단백질을 검출하기 위해서 사용되었다. PEST = 노치 PEST 도메인; AF647 = 알렉사 플루오르 647. (b) HEK293T 세포는 CNR 발현 구조체 또는 대조군으로 형질감염되었고, 그 뒤에 상이한 농도의 hCD19-Ig가 없는 상태에서 또는 있는 상태에서 염색되었고, 다음으로 형광성으로 라벨링된 항-인간 항체가 뒤따랐다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 본 발명은 노치의 세포내 이펙터 및 막관통 도메인과 이종 세포의 리간드 결합 도메인의 조합으로부터 생성되는 리간드 결합 후 노치 신호전달 기능을 갖는 키메라 수용체에 관한 것이다. 본 발명자들은 노치 신호전달이 T 세포에서 PD1(프로그램된 사멸 단백질 1) 및 LAG3(림프구 활성화 유전자 3)과 같은 T 세포 특이적 억제 수용체의 발현을 억제한다는 점을 발견했다. 종양은 종종 이러한 억제 분자의 상향 조절을 통해 항 종양 T 세포 반응을 감소시킴으로써 면역 파괴를 피한다. 따라서, 노치의 치료적 활성화는 인간 환자의 종양에 대한 T 세포 반응을 향상시키는 매력적인 표적이다. 지금까지, 노치의 치료적 사용은 두 가지 문제에 의해서 배제되었다. 첫째, 노치는 많은 세포 유형에서 기능하고 그 전신 활성화는 많은 부작용을 유도할 수 있다. 둘째, 과도한 노치 신호전달은 종양원성일 수 있다. 본 발명자들은 노치의 세포내 이펙터 도메인과 이종 세포의 결합 도메인을 결합시킬 때 노치 신호전달이 유지된다는 점을 발견하였으므로, 노치 신호전달의 활성화가 체내 시간과 위치 모두에서 조절될 수 있기 때문에, 이러한 결점이 회피된다. 이것은 본 발명의 키메라 수용체가 선택의 이종 리간드에 반응하기 때문이다. 예시에서, 인간 노치1 단백질의 5'말단에 융합된 인간 CD19에 대항하도록 지향된 ScFv 항체 도메인으로 구성된 키메라 노치 수용체의 제조가 설명된다.

[0030] 따라서 본 발명은 노치 수용체의 세포내 도메인, 및 막관통 도메인 및 이종 세포의 리간드-결합 도메인을 포함하는 키메라 수용체를 제공한다. 키메라 수용체는 바람직하게는 이중이량체화 도메인 및 노치 수용체의 LNR(Lin-12-Notch) 반복 도메인을 더 포함한다.

[0031] 노치 세포내 도메인, 막관통 도메인, 이중이량체화 도메인, Lin-12-노치 반복 도메인 및 음성 조절 영역(NRR: Negative Regulatory Region)을 포함하여, 노치 수용체 노치1, 노치2, 노치3 및 노치4 및 이들의 시퀀스뿐만 아니라, 이들 수용체 및 이들의 시퀀스의 상이한 도메인은 당 업계에 잘 알려져 있다. 따라서, 당업자는 본 발명에 따른 키메라 수용체를 만들거나 사용할 때 적절한 도메인을 잘 선택할 수 있다.

[0032] 본원에서 사용되는 바와 같은 "노치 수용체의 세포내 도메인"은 노치1, 노치2, 노치3 또는 노치4 신호전달, 바람직하게는 노치1 또는 노치2 신호전달을 개시할 수 있는 세포내 도메인을 의미한다. 따라서, 본 발명에 따른 키메라 수용체는 노치 신호전달, 바람직하게는 노치1, 노치2, 노치3 및/또는 노치4 신호 전달, 보다 바람직하게는 노치1 및/또는 노치2 신호전달을 할 수 있다. 노치 신호전달, 바람직하게는 노치1, 노치2, 노치3 및/또는 노치4 신호전달, 보다 바람직하게는 노치1 및/또는 노치2 신호전달은 이종 세포의 리간드 결합 도메인이 리간드에 결합될 때 유도된다. 따라서, "노치 신호전달을 할 수 있다"는 키메라 수용체의 이종 세포의 리간드 결합 도메인이 리간드에 결합될 때 노치 신호전달이 유도됨을 의미한다. 노치 세포내 도메인은 당업자에게 잘 알려져 있다. 바람직하게는, 이것은 노치 세포내 도메인(NICD)을 포함하며, 이는 온전한 노치 수용체의 노치 세포의 도메

인, 바람직하게는 노치1 또는 노치2의 NICD, 보다 바람직하게는 인간 노치1의 NICD, 또는 NICD의 일부를 시작하는 노치 신호 전달 경로에 리간드 결합 후 γ -세크레타제에 의해 절단되는 도메인이다. 상기 부분은 노치 신호 전달을 개시할 수 있다. 추가로 바람직한 실시예에서 키메라 수용체는, C-말단 트랜스활성화 도메인, RAM 도메인 및 안키린 반복체를 포함하여, 노치1의 전체 세포내 도메인을 포함한다.

[0033] NICD는 C-말단 PEST 영역을 포함하거나 포함하지 않고 사용될 수 있다. 이러한 영역이 잘리면 더 안정적인 NICD 단백질이 생성되어 더 강력하고 지속적인 신호를 유도한다. 따라서, 특히 바람직한 실시예에서, 노치 수용체의 세포내 도메인은 도 8에 도시된 시퀀스의 아미노산 1744 내지 2424의 시퀀스, 또는 노치 1 이외의 노치 수용체의 대응되는 시퀀스, 또는 상기 시퀀스와 적어도 90% 동일한 시퀀스를 포함한다. 상기 시퀀스는 바람직하게는 노치 신호전달을 개시할 수 있다. 상기 시퀀스는 바람직하게는 도 8에 도시된 상기 시퀀스의 아미노산 1744 내지 2424와 적어도 95% 동일하고, 더 바람직하게는 적어도 97%, 더 바람직하게는 적어도 98%, 더 바람직하게는 적어도 99% 동일하다. 특히 바람직한 실시예에서, 노치 수용체의 세포내 도메인은 도 8에 도시된 시퀀스의 아미노산 1744 내지 2424를 포함하고, 보다 바람직하게는 이것은 도 8에 도시된 시퀀스의 아미노산 1744 내지 2424로 구성된다. 세포내 도메인이 노치1의 지시된 시퀀스, 따라서 도 8에 도시된 시퀀스의 아미노산 1744 내지 2424를 포함하는 것이 바람직하다.

[0034] 다른 바람직한 실시예에서, 전체 NICD가 사용되고, 노치 수용체의 세포내 도메인은 도 8에 도시된 시퀀스의 아미노산 1744 내지 2555의 시퀀스, 또는 노치 1 이외의 노치 수용체의 대응되는 시퀀스, 또는 상기 시퀀스와 적어도 90% 동일한 시퀀스를 포함한다. 상기 시퀀스는 바람직하게는 노치 신호전달을 개시할 수 있다. 상기 시퀀스는 바람직하게는 도 8에 도시된 상기 시퀀스의 아미노산 1744 내지 2555와 적어도 95% 동일하고, 더 바람직하게는 적어도 97%, 더 바람직하게는 적어도 98%, 더 바람직하게는 적어도 99% 동일하다. 특히 바람직한 실시예에서, 노치 수용체의 세포내 도메인은 도 8에 도시된 시퀀스의 아미노산 1744 내지 2555를 포함하고, 보다 바람직하게는 이것은 도 8에 도시된 시퀀스의 아미노산 1744 내지 2555로 구성된다. 세포내 도메인이 노치1의 지시된 시퀀스, 및 따라서 도 8에 도시된 시퀀스의 아미노산 1744 내지 2555를 포함하는 것이 바람직하다.

[0035] 본원에서 사용되는 바와 같은 "노치 수용체의 막관통 도메인(TMD: Transmembrane Domain)"은 노치1, 노치2, 노치3 또는 노치4의, 바람직하게는 노치1 또는 노치2의 막관통 도메인을 지칭한다. 노치 막관통 도메인은 당업자에게 잘 알려져 있다. 특히 바람직한 실시예에서, 노치 수용체의 막관통 도메인은 도 8에 도시된 시퀀스의 아미노산 1736 내지 1743의 시퀀스, 또는 노치 1 이외의 노치 수용체의 대응되는 시퀀스, 또는 상기 시퀀스와 적어도 90% 동일한 시퀀스를 포함한다. 상기 시퀀스는 바람직하게는 γ -세크레타제에 의해 NICD의 절단을 개시할 수 있다. 상기 시퀀스는 더 바람직하게는 도 8에 도시된 상기 시퀀스의 아미노산 1736 내지 1743과 적어도 95% 동일하고, 더 바람직하게는 적어도 97%, 더 바람직하게는 적어도 98%, 더 바람직하게는 적어도 99% 동일하다. 특히 바람직한 실시예에서, 노치 수용체의 막관통 도메인은 도 8에 도시된 시퀀스의 아미노산 1736 내지 1743을 포함하고, 보다 바람직하게는 이것은 도 8에 도시된 시퀀스의 아미노산 1736 내지 1743으로 구성된다. TMD가 노치1의 지시된 시퀀스, 및 따라서 도 8에 도시된 시퀀스의 아미노산 1736 내지 1743을 포함하는 것이 바람직하다.

[0036] 노치 수용체의 이중이량체화 도메인 및 LNR(Lin-12-Notch) 반복 도메인은 함께 수용체의 음성 조절 영역(NRR)을 형성한다. 노치 LNR 도메인, 이중이량체화 도메인 및 NRR은 당업자에게 잘 알려져 있다. 이중이량체화 도메인 및 LNR 반복은 본 발명의 키메라 수용체에서 이중세포외 리간드 결합 도메인 과 막관통 도메인 사이에 위치한다. 순서 또는 도메인은 바람직하게는 다음과 같다: 이중 세포외 리간드 결합 도메인 - LNR 도메인 - 이중이량체화 도메인 - 막관통 도메인. 표준 노치 신호전달은 리간드가 노치 수용체에 결합될 때 시작된다. 이것은 이중이합체의 세포외 단편의 ADAM 메탈로프로테아제(Metalloprotease) 매개 절단으로 이어진다. 막에 속박된 (Tethered) 단편은 γ -세크레타제에 의해 절단되어 노치의 세포내 단편(NICD)을 방출한다. 이중이량체화 도메인 및 LNR 도메인은 리간드 결합 도메인과 막관통 도메인 사이에 위치하는 노치 수용체의 NRR에 위치한다. LNR은 수용체를 휴지 형태로 유지하는 데 참여한다. 즉, 리간드 결합이 없는 상태에서 ADAM 메탈로프로테아제에 의한 절단을 방지하거나 억제한다. 바람직한 실시예에서, 키메라 수용체는 노치 수용체의 전체 음성 조절 영역(NRR)을 포함한다. 바람직하게는, 이러한 NRR은 도 8에 도시된 시퀀스의 아미노산 1447 내지 1735, 또는 노치 1 이외의 노치 수용체의 대응되는 시퀀스, 또는 상기 시퀀스와 적어도 90% 동일한 시퀀스를 포함한다. 상기 시퀀스는 더 바람직하게는 도 8에 도시된 상기 시퀀스의 아미노산 1447 내지 1735과 적어도 95% 동일하고, 더 바람직하게는 적어도 97%, 더 바람직하게는 적어도 98%, 더 바람직하게는 적어도 99% 동일하다. 더 바람직한 실시예에서, 이러한 NRR은 도 8에 도시된 시퀀스의 아미노산 1396 내지 1735, 또는 노치1 이외의 노치 수용체의 대응되는 시퀀스, 또는 상기 시퀀스와 적어도 90% 동일한 시퀀스를 포함한다. 상기 시퀀스는 더 바람직하게는 도 8에 도시

된 상기 시퀀스의 아미노산 1447 내지 1735과 적어도 95% 동일하고, 더 바람직하게는 적어도 97%, 더 바람직하게는 적어도 98%, 더 바람직하게는 적어도 99% 동일하다. 이러한 시퀀스에서, 노치 시퀀스의 세포외 부분은 프롤린 1396까지 확장된다(도 8 참조). 이것은 더 짧은 구조체보다 리간드 결합이 없을 때 더 안정적으로 침묵하는 수용체를 생성하기 때문이다. 본 발명의 키메라 수용체는 수용체를 세포막으로 지향시키는 신호 펩타이드를 선택적으로 더 포함한다. NRR이 노치1의 지시된 시퀀스, 및 따라서 도 8에 도시된 시퀀스의 아미노산 1447 내지 1735 또는 1396 내지 1735를 포함하는 것이 바람직하다.

[0037] 특히 바람직한 실시예에서, 본 발명의 키메라 수용체는 세포내 도메인, 막관통 도메인, 이종이량체화 도메인 및 노치 수용체의 LNR(Lin-12-Notch) 반복 도메인 및 이종 세포외 리간드 결합 도메인을, 바람직하게는 표시된 순서대로 포함한다. 따라서, 본 발명의 바람직한 키메라 수용체는 도 8에 도시된 시퀀스의 아미노산 1447 내지 2424, 또는 노치 1 이외의 노치 수용체의 대응되는 시퀀스를 포함한다. 다른 특히 바람직한 실시예에서, 본 발명의 바람직한 키메라 수용체는 도 8에 도시된 시퀀스의 아미노산 1447 내지 2555, 또는 노치1 이외의 노치 수용체의 대응되는 시퀀스를 포함한다. 추가적인 특히 바람직한 실시예에서, 본 발명의 바람직한 키메라 수용체는 도 8에 도시된 시퀀스의 아미노산 1396 내지 2424, 또는 노치1 이외의 노치 수용체의 대응되는 시퀀스를 포함한다. 다른 특히 바람직한 실시예에서, 본 발명의 바람직한 키메라 수용체는 도 8에 도시된 시퀀스의 아미노산 1396 내지 2555, 또는 노치1 이외의 노치 수용체의 대응되는 시퀀스를 포함한다. 키메라 수용체는 노치1의 따라서 도 8에 도시된 시퀀스의 상기 시퀀스를 포함하는 것이 바람직하다.

[0038] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "이종 리간드 결합 도메인"은 노치 수용체의 리간드 결합 도메인 이외의 도메인, 즉 노치1, 노치2, 노치3 또는 노치4의 세포외 리간드 결합 도메인 이외의 도메인을 가리킨다. 이종 리간드 결합 도메인은 선택의 리간드에 의해 결합될 수 있는 임의의 도메인일 수 있다. 특히, 리간드 결합 도메인은 임의의 세포 표면 항원 또는 임의의 가용성 리간드의 결합 파트너일 수 있다. 이종 리간드 결합 도메인의 다양성은 임의의 특정 응용 분야에 적합한 리간드를 선택할 수 있도록 한다. 이러한 방식으로, 본 발명의 키메라 수용체에 의한 노치 신호전달의 활성화는 선택된 시간, 선택된 위치/세포 유형 또는 둘 모두에서 유도될 수 있다. 적합한 세포외 리간드-결합 도메인의 바람직한 예시는 가용성 리간드에 특이적인 리간드 결합 도메인, 세포 표면 항원에 특이적인 리간드 결합 도메인 및 이들의 조합이다. 더 선호되는 예시는 다음과 같다:

[0039] ● 세포 표면 항원에 특이적인 단일 사슬 가변 단편(scFv)과 같은 항체 또는 항체의 항원 결합 부분;

[0040] ● 항체의 에피토프(Epitope)에 특이적인 단일 사슬 가변 단편(scFv), Fab 단편, 세포 표면 항원에 대한 F(ab)₂ 단편과 같은 항체 또는 항체의 항원 결합 부분;

[0041] ● Fc 수용체의 세포외 Fc 결합 도메인 또는 이의 리간드 결합 단편;

[0042] ● 표면 분자의 개입 없이 상기 키메라 수용체를 가교할 수 있는 항체용 에피토프를 포함하는 세포외 도메인;

[0043] ● 스트렙타비딘(Streptavidin)과 같은 모이어티(Moiety)에 대한 다수의 결합 사이트(Binding Site)를 갖는 제제에 의해 가교될 수 있는 비오틴(Biotin)과 같은 모이어티를 포함하는 세포외 도메인(상기 제제의 첨가 시 다수의 키메라 수용체의 클러스터링으로 귀결됨).

[0044] 원칙적으로 본 발명에 따른 다음 유형의 표면 항원이 사용될 수 있다:

[0045] 1. 종양 특이적 항원;

[0046] 2. 비종양 세포에서의 발현 수준과 비교하여 종양 세포상에서 더 높은 수준의 발현을 갖는 항원;

[0047] 3. 종양 세포 및 비종양 세포 둘 모두에서 발현되지만, 비종양 세포에 의해 유도된 본 발명의 키메라 수용체를 발현하는 T 세포의 활성화는 CD19 및 CD20과 같은, 허용 가능한 부작용으로 귀결되는 항원;

[0048] 4. 종양 세포 및 비종양 세포 모두에서 발현되지만, T 세포 에피토프와 같은 하나 이상의 다른 항원과 조합하여 종양 세포에 특이적인 항원; 및

[0049] 5. PDL1 및 PDL2와 같은, 종양을 둘러싼 세포에서 발현되는 항원.

[0050] 바람직한 실시예에서, 세포 표면 항원은 종양 항원이고, 이종 세포외 리간드 결합 도메인은 상기 종양 항원에 특이적인 항체 또는 항체의 항원 결합 부분이다. 종양 항원의 바람직한 예시는 TAG-72, 칼슘 활성화 염화물 채널 2, 9D7, Ep-CAM, EphA3, Her2/neu, 메조텔린(Mesothelin), SAP-1, BAGE 계열, MC1R, 전립선 특이적 항원, CML66, TGF-βRII, MUC1, CD5, CD19, CD20, CD30, CD33, CD47, CD52, CD152 (CTLA-4), CD274 (PD-L1), CD273 (PD-L2) CD340 (ErbB-2), GD2, TPBG, CA- 125, MUC1, 미성숙 라미닌(Laminin) 수용체 및 ErbB-1이다.

- [0051] 당업자는 본 발명에 따른 키메라 항원 수용체에 사용될 수 있는 가용성 리간드 및 이들의 결합 파트너를 잘 식별할 수 있다. 적합한 가용성 리간드의 예시는 키메라 노치 수용체의 세포외 도메인에 있는 에피토프 또는 키메라 노치 수용체의 비오틴화된 세포외 도메인과 조합된 스트렙타비딘과 같은 분자에 대항하여 지향된 항체이다. 가용성 리간드에 특이적인 리간드 결합 도메인과 세포 표면 항원에 특이적인 리간드 결합 도메인의 조합이 또한 가능하다. 이 경우, 노치 신호전달은 가용성 리간드와 세포 표면 항원이 모두 존재하면 유도될 뿐이다. 예를 들어, 엑토도메인은 펩타이드 네오-에피토프에 대한 항체 또는 종양의 표면 항원에 지향된 또 다른 항체("스위치" 항체)에 자체적으로 통합되는 바이오틴 또는 FITC 모이어티에 대한 항체로 구성될 수 있다. 결과적으로, 키메라 노치 수용체의 활성화는, 스위치 항체에 의해 표적화된 세포 표면 항원에 부가하여, 스위치 항체 자체가 또한 존재하는 경우에 발생할 뿐일 것이다. 이러한 설정은, 본원에 참조로 포함되는 Ma et al 2016에서 설명되고, 수용체의 일시적 제어(원하는 경우에만 켜고 끄기)뿐만 아니라 정량적 제어(스위치 항체의 농도를 높이거나 낮춤으로써)를 허용한다.
- [0052] 본 발명의 키메라 수용체는 막관통 도메인과 이중 세포외 리간드-결합 도메인 사이에 위치되는 연결 시퀀스를 선택적으로 포함한다. 이러한 연결 시퀀스는 바람직하게는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개의 아미노산과 같은 최대 30 개의 아미노산을 포함한다.
- [0053] 아미노산 시퀀스 또는 핵산 시퀀스의 동일성 백분율, 또는 용어 "% 시퀀스 동일성"은 본원에서, 두 개의 시퀀스를 정렬시키고, 최대 퍼센트 유사성을 얻기 위해서, 필요한 경우, 갭을 도입한 후 기준 아미노산 시퀀스 또는 핵산 시퀀스에 있는 잔기와 동일한 전장 아미노산 시퀀스 또는 핵산 시퀀스에 있는 잔기의 백분율로서 정의된다. 정렬을 위한 방법 및 컴퓨터 프로그램, 예를 들어, "Align 2"는 본 기술분야에 잘 알려져 있다.
- [0054] 본원에서 설명되는 바와 같이 아미노산 시퀀스에 있어서, 아미노산은 단일-글자 기호에 의해서 표시된다. 이러한 단일-글자 기호 및 세-글자 기호는 본 기술분야에서 숙련된 사람에게 잘 알려져 있고, 다음 의미를 갖는다: A(Ala)는 알라닌(Alanine), C(Cys)는 시스테인(Cysteine), D(Asp)는 아스파르트산(Aspartic Acid), E(Glu)는 글루탐산(Glutamic Acid), F(Phe)는 페닐알라닌(Phenylalanine), G(Gly)는 글리신(Glycine), H(His)는 히스티딘(Histidine), I(Ile)은 이소류신(Isoleucine), K(Lys)는 리신(Lysine), L(Leu)는 류신(Leucine), M(Met)은 메티오닌(Methionine), N(Asn)은 아스파라긴(Asparagine), P(Pro)는 프롤린(Proline), Q(Gln)은 글루타민(Glutamine), R(Arg)은 아르기닌(Arginine), S(Ser)는 세린(Serine), T(Thr)는 트레오닌(Threonine), V(Val)는 발린(Valine), W(Trp)는 트립토판(Tryptophan), Y(Tyr)는 티로신(Tyrosine)이다.
- [0055] 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "에 특이적" 및 "특이적으로 결합되는" 또는 "특이적으로 결합할 수 있는"은 리간드와 리간드-결합 도메인, 예를 들어 항체 또는 이의 항원 결합 부분과 이의 항원 또는 가용성 리간드와 이의 결합 파트너 사이의 비공유 상호작용을 지칭한다. 이는 리간드가 다른 도메인에 비해 상기 리간드-결합 도메인에 우선적으로 결합됨을 나타낸다.
- [0056] "항체의 항원 결합 부분"은, 반드시 동일한 정도는 아니나, 항체와 동일한 항원과 특이적으로 결합할 수 있는 항체의 일 부분으로서 본원에서 정의된다. 부분은 항체에서 그 자체로 존재할 필요는 없고, 항원에 결합될 수 있는 항체의 다른 단편, 예를 들어 단일 사슬 가변 단편(ScFv), 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역의 융합 단백질을 포함한다.
- [0057] 본원에서 사용되는 바와 같은 "세포 표면 항원"은 세포의 세포외 표면에서 발현되는 항원 또는 분자를 지칭한다.
- [0058] 본원에서 사용되는 바와 같은 "종양 항원"은 종양의 세포에서 발현되는 항원을 가리킨다. 종양 항원은 또한 종양 관련 항원(TAA: Tumor-associated Antigen)이라고 지칭된다.
- [0059] 본원에서 사용되는 바와 같은 "가용성 리간드"는 결합 파트너가 본 발명의 키메라 수용체의 세포외 도메인으로서 사용될 수 있는 수용성 리간드를 지칭한다. 가용성 리간드는 예를 들어, 정맥 주사와 같은 주사에 의해서 또는 경구로 대상자에게 투여될 수 있는 것이 바람직하다.
- [0060] 본 발명에 따른 키메라 수용체를 인코딩하는 시퀀스를 포함하는 핵산 분자가 또한 제공된다. 본 발명에 따른 핵산 분자를 포함하는 벡터가 또한 제공된다. 바람직한 실시예에서, 벡터는 바이러스 벡터, 예를 들어 렌티바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터이다. 다른 바람직한 실시예에서, 벡터는 트랜스포손(Transposon)을 포함하거나 트랜스포손이다. 상기 핵산 분자 또는 벡터는, 벡터가 도입되는 특정 세포에서 발현을 지시하는, 예를 들어 바이러스 기원의 강력한 프로모터와 같은, 높은 발현 수준을 위한 수단, 및 신호 시퀀스와 같은 다른 성분을 추가적으로 포함할 수 있다. 바람직한 실시예에서, 핵산 분자 또는 벡터는 다음 성분 중 하나 이상을 포함한다: T

세포에서 발현을 유도하는 프로모터, 예컨대 MSCV의 EF1a 프로모터 또는 5' LTR, 예컨대 원형질 막 및 폴리아데닐화 신호를 표적으로 하기 위한 GMCSF 단백질 또는 CD8 단백질로부터의 C-말단 신호 펩타이드.

- [0061] 또한 본 발명에 따른 핵산 분자 또는 벡터를 포함하는 독립 세포가 제공된다. 독립 세포는 바람직하게는 자연 살해 세포, 대식세포, 호중구, 호산구 또는 T 세포와 같은 면역 세포이다. 핵산 분자 또는 벡터는 렌티바이러스 형질도입, 레트로바이러스 형질도입, DNA 전기천공 또는 RNA 전기천공과 같은 당 업계에 알려진 임의의 방법에 의해 세포, 바람직하게는 면역 세포에 도입될 수 있다. 핵산 분자 또는 벡터는 일시적으로 또는 바람직하게는, 안정적으로 세포에 제공된다. 핵산에 의한 세포의 형질도입 또는 전기천공을 위한 방법은 당업자에게 알려져 있다.
- [0062] 일반적으로, 유리하게는 본 발명의 키메라 수용체는, 바람직하게는 종양에 대해 반응성인 T 세포의 T 세포 기능 및/또는 T 세포 생존을 개선시키기 위해서 사용된다. T 세포 기능 및/또는 T 세포 생존을 이를 필요로 하는 대상자에서 개선하기 위한 방법이 제공되며, 이 방법은 본 발명에 따른 치료학적 유효량의, 키메라 수용체, 핵산 분자, 벡터 또는 세포, 바람직하게는 T 세포를 대상자에게 투여하는 단계를 포함한다. T 세포 기능 및/또는 T 세포 생존을 개선하는 단계는 바람직하게는 T 세포 기능소실을 예방하거나 억제하는 단계를 포함한다. 바람직한 양태에서, 대상자는 암을 앓고 있다. 상기 세포는 바람직하게는 T 세포, 바람직하게는 종양 유래 T 세포 또는 종양 침투 림프구 (TIL) 또는 대상자의 혈액으로부터 분리된 T 세포와 같은 암을 앓고 있는 대상자의 자가 T 세포(Autologous T Cell)이다.
- [0063] 또한, 본 발명에 따른 키메라 수용체, 핵산 분자 또는 벡터, 또는 치료에서의 사용을 위한 본 발명에 따른 핵산 분자 또는 벡터를 포함하는 세포가 제공된다. 바람직하게는, 상기 치료법은 면역치료법, 보다 바람직하게는 종양 면역치료법이다. 바람직한 실시예에서, 상기 종양 면역치료법은 입양적 세포 전달, 보다 바람직하게는 입양 T 세포 전달을 포함한다.
- [0064] 따라서, 면역치료법을 필요로 하는 대상자에서 면역치료법의 방법이 또한 제공하며, 이 방법은 본 발명에 따른 키메라 수용체, 핵산 분자, 벡터 또는 세포의 치료학적 유효량을 대상자에게 투여하는 단계를 포함한다. 바람직한 실시예에서, 이러한 방법은 본 발명에 따른 세포 또는 세포의 집단의 투여를 포함한다.
- [0065] "입양 세포 전달"은 환자 안으로의 세포의 전달을 가리킨다. 특히, "입양 T 세포 전달"은 환자 안으로의 T 세포의 전달을 가리킨다 세포는 환자 자체로부터 비롯되거나 또는 다른 개인으로부터 비롯되었을 수 있다. 입양 T 세포 전달은 바람직하게는 혈액으로부터 분리된, 바람직하게는 치료될 대상자 또는 환자로부터 유래된 종양 침투 림프구(TIL) 또는 T 세포의 전달을 포함한다. 혈액으로부터 분리된 T 세포가 사용되는 경우, T 세포는 더 바람직하게는 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 종양 특이적 T 세포 수용체를 발현한다.
- [0066] "TIL"은 치료될 환자의 종양 내 또는 주변에서 발견되는 자가 T 세포를 의미한다. T 세포는 체외 증식되며, 예를 들어, 인터루킨-2 (IL-2) 및 항-CD3 항체와 같은 사이토카인과 함께 배양되고, 환자에게 다시 전달된다. 체내 투여 시, TIL은 종양에 재침투하고 종양 세포를 표적으로 한다. TIL 치료 전에, 환자는 종양 살상을 억제할 수 있는 천연 림프구를 고갈시키기 위해 비골수 파괴 화학 요법을 받을 수 있다. 림프구 제거가 완료되면, 다음으로 환자에게 선택적으로 IL-2와 함께, TIL이 주입된다. TIL을 포함하는 입양 T 세포 전달을 이용한 면역치료법을 위한 절차는 당업계에 잘 알려져 있다. 바람직한 실시예에서, 본 발명에 따라 사용되는 TIL은 환자로부터 분리된 후 본 발명에 따른 핵산 분자 또는 벡터와 함께 제공된다. TIL이 본 발명에 따른 키메라 수용체를 발현하는 것이 더욱 바람직하다.
- [0067] 본원에서 사용되는 바와 같은 "면역치료법"은 상기 개인에서 면역 반응을 유도하거나 향상시킴에 의한 질병 또는 장애를 앓고 있는 개인의 치료를 가리킨다. 종양 면역치료법은 종양 및/또는 상기 종양의 세포에 대한 개인의 면역 반응을 유도하거나 향상시키는 것과 관련된다. 본 발명에 따른 면역치료법은 치료 또는 예방을 위한 것일 수 있다. "치료"는 면역치료법 성분에 의해 유도되거나 향상된 면역 반응이 기존 종양을 개선하거나 억제하는 것을 의미한다. "예방"은 면역치료법 성분이 암 발병으로부터 개인을 보호하는 보호 면역 반응을 유도하는 점을 의미한다.
- [0068] 암 치료를 필요로 하는 대상자에서 암을 치료하는 방법이 또한 제공되며, 이 방법은 본 발명에 따른 상기 키메라 수용체를 인코딩하는 핵산 시퀀스를 포함하는, 유효량의 T 세포를 대상자에게 투여하는 단계를 포함한다. 상기 T 세포는 바람직하게는 대상자의 혈액으로부터 분리된 TIL 또는 T 세포와 같은 자가 T 세포이다.
- [0069] 본 발명에 따른 키메라 수용체 및/또는, 본 발명에 따른 키메라 항원 수용체를 인코딩하거나 본 발명에 따른 키메라 항원 수용체를 발현하는 핵산 분자를 구비하는 세포, 바람직하게는 T 세포, 보다 바람직하게는 자가 T 세

포, 예를 들어, 혈액으로부터 분리된 TIL 또는 T 세포를 기반으로 한 치료법을 사용하여 치료되거나 예방될 수 있는 종양은, 원발성 종양, 이차 종양, 진행성 종양 및 전이를 포함하여 임의의 유형의 종양일 수 있다. 본 발명에 따라 치료되거나 또는 예방될 수 있는 비제한적 예시의 종양은 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 골수성 백혈병(CML), 만성 림프 구성 백혈병(CLL), 급성 림프 구성 백혈병(ALL), 만성 골수단 구성 백혈병(CMML), 림프종, 다발성 골수종, 호산 구성 백혈병, 모세포 백혈병, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 대세포 면역 모세포 림프종, 형질 세포종, 폐 종양, 소세포 폐 암종, 비소세포 폐 암종, 췌장 종양, 유방 종양, 간 종양, 뇌종양, 피부 종양, 뼈 종양, 결장 종양, 직장 종양, 항문 종양, 소장 종양, 위 종양, 신경 교종, 내분비계 종양, 갑상선 종양, 식도 종양, 위 종양, 자궁 종양, 요로 종양 및 방광 종양, 신장 종양, 신장 세포 암종, 전립선 종양, 담낭 종양, 두경부 종양, 난소 종양, 자궁 경부 종양, 교모세포종, 흑색 종, 연골 육종, 섬유 육종, 자궁 내막, 식도, 눈 또는 위장 간질 종양, 지방 육종, 비인두, 갑상선, 질 및 외음부 종양이다.

[0070] 본원에 사용되는 바와 같은 "대상자"는 바람직하게는 포유 동물, 보다 바람직하게는 인간이다.

[0071] 본원에서 언급된 "T 세포" 또는 "TIL"은 CD4⁺ 또는 CD8⁺ T 세포 또는 TIL 또는 CD4⁺ 또는 CD8⁺ T 세포 또는 TIL의 조합일 수 있다. 바람직한 실시예에서, T 세포 또는 TIL은 CD8⁺ T 세포 또는 TIL이다.

[0072] 본 발명은 또한 본 발명의 핵산 분자 또는 벡터에 의해 형질도입되는 유전자 변형된 T 세포를 제공한다. 상기 변형된 T 세포는 바람직하게는 종양 유래 T 세포 또는 종양 침투 림프구(TIL)이다. 또한, 본 발명에 따른 독립 세포는 바람직하게는 T 세포, 보다 바람직하게는 종양 유래 T 세포 또는 TIL이다. 특히 바람직한 실시예에서, T 세포는 암을 앓고 있는 환자로부터 분리된 자가 T 세포, 즉 자가 TIL 또는 혈액으로부터 분리된 자가 T 세포이다. T 세포가 본 발명에 따른 키메라 항원 수용체를 발현하는 점이 더 바람직하다.

[0073] 일 양태에서, 본 발명에 따른 키메라 수용체를 기반으로 한 치료는 적어도 하나의 다른 면역치료법과 조합된다. 이러한 다른 면역치료법 성분은 당업계에 알려진 임의의 면역치료법 성분일 수 있다. 바람직하게는, 상기 다른 면역치료법 성분은 세포 면역치료법, 항체 치료법, 사이토카인 치료법, 예방접종 및/또는 소분자 면역치료법, 또는 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0074] 바람직한 실시예에서, 키메라 수용체를 사용한 치료법은 항체 기반 면역치료법과 조합되며, 바람직하게는 공동 억제 T 세포 분자에 대항하도록 지향된 항체를 사용한 치료를 포함한다. 공동 억제 T 세포 분자는 또한 면역 체크포인트라고 지칭된다. 공동-억제 T 세포 분자의 바람직한 예시는 세포독성 T-림프구 항원-4(CTLA-4), 프로그램된 사멸-1(PD-1), PD-리간드 1(PD-L1), PD-L2, 신호 조절 단백질 알파(SIRP α), T 세포 면역글로불린 및 뮤신 도메인 3 함유 분자 3(TIM3), 림프구 활성화 유전자 3(LAG3), 킬러 세포 면역 글로불린 항체 유사 수용체(KIR), CD276, CD272, A2AR, VISTA 및 인돌아민 2,3 디옥시게나 제(IDO: Indoleamine 2,3 Dioxygenase)이다. 따라서, 본 발명에 따른 키메라 수용체 또는 키메라 수용체를 포함하는 세포와 조합되는 공동-억제 T 세포 분자에 대한 항체는 바람직하게는 항-CTLA4 항체, 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-PD-L2 항체, 항-SIRP α 항체, 항-TIM3 항체, 항-LAG3 항체, 항-CD276 항체, 항-CD272 항체, 항-KIR 항체, 항-A2AR 항체, 항-VISTA 항체, 항-TIGIT 항체 및 항-IDO 항체이다. 다른 면역치료법 성분으로서 사용되는 적합한 항체는 니블루맵(Nivolumab), 펨브롤리주맵(Pembrolizumab), 람브롤리주맵(Lambrolizumab), 이필리무맵(Ipilimumab) 및 리릴루맵(Lirilumab)이다.

[0075] 예시에서 입증된 바와 같은, 노치 신호전달은 공동-억제 T 세포 분자의 발현을 감소시킨다. 암을 앓고 있고 상기 항체로 치료 받는 대상자에서 본원에서 정의되는 바와 같은 항체 기반 면역치료법의 효능을 향상시키기 위한 방법이 제공되며, 이 방법은 본 발명에 따른 상기 키메라 수용체를 발현하는 T 세포의 치료학적 유효량을 상기 대상자에게 투여하는 단계를 포함한다. 상기 T 세포는 바람직하게는 자가 TIL 또는 대상자의 혈액으로부터 분리된 T 세포와 같은 자가 T 세포이다.

[0076] 다른 바람직한 실시예에서, 키메라 수용체를 사용한 치료는 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 종양 특이적 T 세포 수용체를 포함하는 치료와 조합된다. 바람직하게는 키메라 항원 수용체(CAR)를 더 포함하는 본 발명에 따른 키메라 수용체를 포함하고 그리고/또는 발현하는 세포가 사용된다. 이는 혈액으로부터 분리된 자가 T 세포와 같은 TIL 이외의 T 세포가 사용되는 경우 특히 바람직하다. CAR은 세포의 종양 결합 모이어티에 융합된 세포내 T-세포 신호전달 도메인으로 구성된 항원 표적 수용체로, 대부분 단일 클론 항체로부터의 단일 사슬 가변 단편(scFv)이다. CAR은 MHC 매개 항원 제시와 무관하게 (종양) 세포 표면 항원을 특이적으로 인식한다. CAR은 바람직하게는 신호 도메인, 바람직하게는 CD3 ζ 및 CD28 또는 4-1BB와 같은 공동 자극 수용체에 결합된 종양 관련 항원에 특이적인 엑토 도메인(예를 들어, 항체의 항원 결합 부분)을 함유한다. 상기 세포는 바람직하게는 T 세

포이고, 보다 바람직하게는 치료될 대상자로부터, 예를 들어 혈액 또는 종양으로부터 유래된 자가 T 세포이다.

[0077] 특징은, 명확성 및 간결한 설명을 위해서 본 발명의 동일한 또는 별개의 양태 또는 실시예의 부분으로서 본원에 설명될 수 있다. 본 발명의 범위가 동일한 또는 별개의 실시예의 부분으로서 여기에서 설명되는 특징의 전부 또는 일부의 조합을 갖는 실시예를 포함할 수 있다는 점이 숙련된 사람에게 의해서 이해될 것이다.

[0078] 본 발명은 다음의 비한정적인 예시에서 더욱 자세히 설명될 것이다.

[0079] **예시**

[0080] **예시 1**

[0081] **결과**

[0082] Backer et al.(2014년)에서, CD8 T 세포 반응에서 노치의 역할을 조사하기 위해, 노치1 및 노치2 유전자(노치1/2ko)에 T 세포 특이적 결실을 보유한 마우스가 인플루엔자 바이러스에 감염되었다. 반응의 피크에서, 인플루엔자의 면역 우성(immuno-dominant) 펩타이드가 로드된 D^b 사합체를 사용하여 인플루엔자 특이적 CD8 T 세포가 검출되었다(도 3a 및 도 3b). 인플루엔자 특이적 CD8 T 세포 반응의 크기가 야생형(WT)과 노치1/2ko 마우스에서 유사했지만 (도 3c 및 미도시), 노치1/2 결핍 T 세포는 WT CD8 T 세포보다 IFN γ 및 그랜자임 B를 더 적게 생성했다(도 3d, 3e 및 도 3f). 노치1/2ko 마우스는 또한 인플루엔자 바이러스를 제대로 제거할 수 없었고 지연된 회복을 나타냈다(도 3g 및 도 3h). 오히려, 노치1/2ko 마우스에서 중화 항체의 역할은 상승되었으며(도 3i), 이는 이들이 바이러스를 제거할 수 없는 것이 이들의 효과적이지 못한 CD8 T 세포 반응에 의해 유발된 점을 시사한다.

[0083] 인플루엔자에 대한 기억 반응은 조사된 모든 해부학적 위치에서 노치1/2 결핍에 의해 더욱 더 심각하게 영향을 받았다(도 4a 및 도 4b). 결함이 있는 기억 활성화는, 노치1/2ko CD8 T 세포가 혼합된 골수 키메라에서도 증식할 수 없는 것에 의해서 보여지는 바와 같이, 노치의 CD8 T 세포 내재 기능의 결과이었다(도 4c). 놀랍게도, 정상적인 수의 노치1/2ko 기억 CD8 T 세포가 폐에서 발견되었지만(도 4b), 이들은 이펙터 분자를 거의 생성하지 않았다(도 4d).

[0084] 노치1/2ko CD8 T 세포의 심각한 무반응성은 "기능소실(exhaustion)"을 연상시킨다: PD1 및 Lag3와 같은 억제 수용체의 발현으로 인해 충분히 반응하지 못함(Wherry and Kurachi, 2015). 이러한 개념은 노치1/2ko CD8 이펙터 T 세포의 전체 전사체 분석에 의해 강화되었다. 노치1/2ko와 WT 이펙터 T 세포 사이에서 차별적으로 발현된 유전자 중에서, 가장 유의하게 농후해진 유전자 세트는 T 세포 기능소실을 연구하기 위해서 사용되는 원형 모델인 LCMV(도 5a)를 이용한 급성 감염과 만성 감염 사이의 비교로부터 도출되었다(Wherry 및 Kurachi, 2015). 실제로 PD1과 Lag3 모두에 대한 mRNA 레벨은 노치1/2ko CD8 이펙터 T 세포에서 상승되었다(도 5b).

[0085] 중요한 것은, PD1의 발현이 인플루엔자-Ova(OT1 T 세포 수용체가 반응하는)에 감염된 WT 콘제닉 수용자 마우스로 전달된 노치1/2 결핍 OT1 T 세포의 표면에서 상승되었다(도 5c). T 세포 및 B 세포의 내인성 레퍼토리는, 선택적으로 노치1/2ko T 세포에서의 상승된 PD1 발현에 대한 설명인 바이러스 지속성을 제외하고, 이들 마우스에서 인플루엔자 바이러스를 효과적으로 제거한다. 또한, 특히 노치1/2ko OT1 T 세포에서 활성화된 노치1 대립유전자(NICD)의 발현은 PD1 발현을 강력하게 억제했다(도 5e). 이것은 노치가 CD8 T 세포 고유 방식으로 PD1의 발현을 억제한다는 점을 입증한다.

[0086] 노치의 세포내 도메인(NICD)의 발현은 CD4 T 세포 및 CD8 T 세포 모두에서 노치의 활성화를 모방한다(Helbig et al. 2012; Backer et al. 2014; Amsen et al. 2007). 노치 신호전달은 정교하게 민감하고, NICD 구조체의 과발현에 의해 얻어진 핵 NICD 분자의 수는 리간드 매개 활성화 후 얻어진 분자의 수를 훨씬 초과할 가능성이 높다. 이것은 흉선 전구 세포에서 타목시펜 유도성 MER-NICD 대립유전자를 사용하는 실험에 의해 설명된다. OP9 기질 세포에서 CD34⁺CD1a⁻ 인간 흉선 전구 세포를 배양하는 것은, NICD가 발현된 경우에 분화로 귀결되게 될 뿐이었다(도 6b). 놀랍게도, CD4⁺CD8⁺ 이중 양성 세포의 최대 분화는 이미 타목시펜의 부재 하에서, 즉 루시페라제 리포터 구조체의 매우 약한 전사촉진으로 귀결되는 조건(그림 6a)에서, MER-NICD의 누출 활성화(leaky activity)에 의해 얻어졌다(도 6b). 또한, 타목시펜의 첨가에 의한 MER-NICD의 증가되는 활성화는 이중 양성 흉선 세포로부터 CRTH2⁺ILC2 세포로의 분화의 점진적 변환으로 귀결되었다(도 6c). 이러한 결과는 NICD에 대한 내인성 반응 프로그램의 정교한 민감성을 강조한다. 또한, 그들은 노치 신호전달의 강도가 때때로 이러한 수용체에 대한 생물학적 반응에 질적으로 영향을 미친다는 점을 보여준다. (이 결과는 *Gentek et al. 2013*에 공개되었다.)

- [0087] 재료 및 방법
- [0088] **마우스.** 모든 마우스는 C57BL/6 백그라운드 상에 있었다. 노치1^{flox/flox}노치2^{flox/flox}Cd4-Cre 마우스가 사용되었다 (Amsen et al. 2014; Amsen et al. 2004). Cre-negative 한배새끼가 모든 실험에서 사용되었다. OT-I TCR (003831)을 발현하는 유전자이식 마우스는 Jackson Laboratories로부터 이용 가능하다. 마우스는 Academic Medical Center의 동물 센터(AMC, 네덜란드 암스테르담)에서 특정 병원균 부재 조건에서 사육 및 수용되었다. 마우스(수컷과 암컷 모두)는 실험 시작 시 생후 8 내지 16 주 사이였다. 감염 실험 중에, 야생형 및 노치1-2-KO 마우스는 케이지 편향을 회피하기 위해서 함께 수용되었다. 무작위화를 위한 의도적인 방법은 사용되지 않았다. 바이러스 로드 결정과 혈구응집 분석을 제외하고, 조작자가 마우스 유전자형을 알지 못하는 블라인딩을 위한 정식 방법은 사용되지 않았다. 야생형 및 노치1-2-KO BM을 1:1 비율로 포함하는 혼합 골수(BM) 키메라는 5 내지 10×10⁶ 공여체 BM 세포를 치사적으로 조사된 RAG1 결핍 마우스에 정맥 주사하여 생성되었다. 공여체 기원의 야생형 및 노치1-2-KO 세포는 콘제닉 CD45.1/2 마커로 식별되었다. BM 키메라는 생착 후 12주에 사용되었다. 모든 마우스는 제도적 그리고 국가적 동물 실험 가이드라인에 따라 사용되었다. 모든 절차는 지역 동물 윤리 위원회의 승인을 받았다.
- [0089] **마우스 연구를 위한 배지, 시약 및 mAbs.** 배양 배지는, 10% 열 불활성화 FCS (Lonza), 200 U/ml 페니실린, 200 µg/ml 스트렙토마이신 (Gibco), GlutaMAX (Gibco) 및 50 µM β-머캅토에탄올 (Invitrogen) (IMDMc)으로 보충된 Iscove의 변형된 Dulbecco 배지(IMDM; Lonza)였다. 유세포 분석을 위해 사용된 모든 직접적으로 접합된 단일 클론 항체는 달리 명시되지 않는 한 캘리포니아주 샌디에고 소재의 eBioscience로부터 구입했다: 항-CD3ε (클론 145-2C11), 항-CD4 (클론 GK1.5), 항-CD8α (Ly-2, 클론 53-6.7), 항-CD28 (클론 37.51), 항-CD44 (클론 IM7), 항-CD45.1 (클론 A20, BD Biosciences), 항-CD45.2 (클론 104), 항-CD127 (항-IL7Rα, 클론 A7R34), 항-Granzyme B (클론 GB-11, Sanquin PeliCluster), 항-IL-2 (클론 JES6-5H4), 항-IFN-γ (클론 XMG1.2), 항-KLRG-1 (클론 2F1) 및 항-TNFα (클론 MP6-XT22), 아이소타입 대조군 (cat. # 3900S) (Cell Signaling Technology).
- [0090] **인플루엔자 감염.** 마우스는 H3N2 인플루엔자 A 바이러스 HKx31 (Belz et al. 2000), 인플루엔자 A/WSN/33, A/WSN/33-OVA(I) (Topham et al. 2001), A/PR/8/34 (H1N1) 또는 LCMV gp33-41 에피토프를 발현하는 재조합 A/PR/8/34 (Mueller et al. 2010)의 100 내지 200 × 50% 조직 배양 유효 용량(TCID₅₀)으로 비강 내 감염되었다. 스톱 및 바이러스 역가는 앞에서 설명된 바와 같은 MDCK 또는 LLC-MK2 세포를 감염시킴으로써 얻어졌다(Van der Sluijs et al. 2004). 표시된 시간 간격으로, 혈액 샘플이 꼬리 정맥에서 채취되거나, 또는 마우스가 희생되고, 인플루엔자 특이적 CD8⁺ T 세포의 수를 결정하기 위해서 장기가 수집되었다. 인플루엔자-특이적 CD8⁺ T 세포는 항-CD8 (53-6.7) 및, 인플루엔자-A-유래 뉴클레오펙시드 단백질(NP) 펩타이드 NP₃₆₆₋₃₇₄ ASNENMETM(혈액 연구를 위한 Sanquin 실험실에서 생산됨)을 포함하는 H-2D^b의 PE- 또는 APC-공액 사합체를 사용하여 열거되었다. 감염된 마우스의 폐에서 A/PR/8/34 바이러스 로드는 A/PR/8/34 M 유전자에 특이적인 다음 프라이머 및 프로브를 사용하여 정량적 PCR에 의한 바이러스 mRNA의 검출 및 폐 mRNA를 분리함으로써 결정되었다. 센스 프라이머: 5'-CAAAGCGTCTACGCTGCAGTCC-3'; 안티센스 프라이머: 5'-TTTGTGTTACGCTCACCGTGCC-3'; 프로브: 5'-AAGACCAATCTGTCACTCTGA-3'.
- [0091] 혈청은 칠면조 적혈구 및 바이러스의 4개의 혈구응집 단위를 사용하여 이전에 설명된 바와 같은 혈구응집 억제(HI) 분석에 의해 이러한 바이러스에 대한 중화 항체의 존재에 대해 테스트되었다(Palmer et al. 1975). 값은 응집이 완전히 억제된 최대 혈청 희석을 나타낸다.
- [0092] **유세포 분석 및 세포 분류.** 세포내 사이토카인 및 그랜자임 B 염색의 경우, 비장세포 및 총 폐 샘플은 사이토카인 방출을 방지하기 위해서 10 µg/ml 브레펠딘 A (Sigma)의 존재 하에 4 시간 동안 MHC 클래스 I 제한 인플루엔자 유래 펩타이드 NP₃₆₆₋₃₇₄ ASNENMETM 1 µg/ml로 자극되었다. 세포는 0.5% BSA 및 0.02% Na₃N을 함유하는 PBS에서 4 °C에서 30 분 동안 관련 형광염료-결합된 mAb로 염색되었다. 세포 내 염색을 위해, 세포는 Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences)을 사용하여 고정되고 투과화되었다. 데이터 획득 및 분석은 FACSCanto (Becton Dickinson) 및 FlowJo 소프트웨어에서 수행되었다.
- [0093] 인플루엔자에 감염된 마우스로부터 H-2 Db-NP 사합체 양성 CD8⁺ T 세포를 분리하기 위해, 비장의 단일 세포 현탁액이 인플루엔자 특이적 사합체 및 다양한 마커로 염색되었다. 세포는 FACSria 세포 분류기(BD Bioscience

s)를 사용하여 분류되었다.

[0094] 인간 흉선 세포의 분석을 위해, 살아있는 세포와 죽은 세포의 구별은 7-Aminoactinomycin D (7-AAD, eBiosciences) 또는 고정 가능한 살아있는/죽은 염료(Invitrogen)를 사용한 염색을 기반으로 하였다. LSR Fortessa 유세포 분석기(BD Bioscience)에서 데이터가 획득되었고, FlowJo 소프트웨어(TreeStar)를 사용하여 분석되었다. 단일 세포 현탁액은 Fluorescein Isothiocyanate (FITC), Phycoerythrin (PE), Phycoerythrin-Cyanine 5 (PE-Cy5), PE-Cy5.5, PE-Cy7, PerCP-Cy5.5, Allophycocyanin (APC) / Alexa Fluor 647, APC-Cy7, AF700 (모두 BD Bioscience, Biolegend 또는 MACS Miltenyi), Horizon V500 (HV500, BD Bioscience), Brilliant Violet 421 (BV421), BV711 및 BV785 (모두 Biolegend)으로 직접 표지된 항체로 염색되었다. 다음 인간 항원에 대해 특이적인 항체가 사용되었다: CD1a, CD3, CD4, CD7, CD8, CD11c, CD14, CD19, CD25, CD34, CD45, CD56, CD94, CD117 (cKit), CD123, CD127 (IL-7R α), CD161, CD294 (CRTH2), CD303 (BDCA2), CD336 (Nkp44), CD278 (ICOS), TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$ 및 FcER1. MSCV-IRES-Thy1.1 레트로바이러스로 형질도입된 세포를 검출하기 위해서 항-마우스 CD90.1 (Thy1.1) -FITC, -PE 또는 -APC-eFluor 780 (eBioscience)가 사용되었다.

[0095] **마우스 CD8⁺ T 세포의 레트로 바이러스 형질도입 및 입양적 전달.** 설명된 바와 같이 PlatE 세포에서 바이러스가 생성되었다 (Amsen et al. 2004). CD45.2⁺ OT-I 야생형 또는 OT-I 노치1-2-KO 마우스로부터의 총 비장 세포는 1 nM OVA₂₅₇₋₂₆₄ 펩타이드와 함께 배양되었고, 다음날 세포는 바이러스 상청액(8 μ g / ml 폴리 브렌 포함)으로 스핀 감염(37 ° C에서 90분 동안 700 x g)된 후 37 ° C에서 5 시간 스핀 감염되었다. 배지가 교체되었고 다음날, 살아있는 T 세포는 밀도 원심 분리(Lymphoprep, Axis-shield PoC)에 의해서 분리되었고, 7.5 x 10² 내지 5 x 10⁴ 세포가 시간 제한 인플루엔자-OVA 감염된 CD45.1⁺ 마우스 안으로 전달되었다. 공여체 OT-1 T 세포는 CD45.2⁺ CD8⁺ 및 Thy1.1 또는 GFP 삼중 양성 세포로서 전달 후 5 내지 10 일에 검출되었다.

[0096] **인간 흉선 세포의 바이러스 생산 및 형질도입.** 바이러스 생산을 위해 Phoenix GALV 포장 세포는 FuGene HD (Promega)를 사용하여 일시적으로 형질감염되었다. 바이러스를 포함하는 상청액은 형질 감염 48 시간 후 수확되었고, 드라이 아이스에서 급속 냉동되었고, 사용 전까지 -80 ° C에서 보관되었다. 형질 도입을 위해, 세포는 Retronectin (Takara Biomedicals)으로 코팅된 플레이트에서 바이러스 상청액과 함께 다음 날 37 ° C에서 6 내지 8 시간 동안 배양되었다.

[0097] **인간 흉선 세포 실험을 위해서 사용되는 레트로바이러스 구조체.** 인간 NICD1-IRES-Thy1.1-MSCV 구조체는 이전에 설명되었다(Amsen et al. 2004). mER-NICD 융합을 생성하기 위해, 다음 프라이머: GATCAGGAATCCACACCATGGGAGATCCACGAAATGAA 및 GATCAGGATATCCACCTTCTCTTCTTCTTGG를 사용하여 N-말단 mER 도메인이 PCR 증폭되었고, pBluescript (pBS)의 EcOR1 및 EcORV 사이트로 클로닝되어 mER-pBS를 생성하였다. 번역 개시 신호가 결여된 인간 NICD1은 ATCGGAGGTTCTCGCAAGCGCCGGCGGCAGCAT 및 GATCAGAAGCTTGAATCTTACTTGAAGGCTCCGGAATG 프라이머를 사용하여 PCR 증폭되었고, 그 뒤에 mER-pBS의 EcORV 사이트 및 HindIII 사이트에 클로닝되었다. mER-NICD1 융합 삽입물은 다음으로 BamH1 및 Cla1을 사용하여 IRES-Thy1.1-MSCV로 복제되었다.

[0098] **유전자 발현 프로파일링 마우스 연구.** H-2 D^b-NP₃₆₆₋₃₇₄⁺ CD8⁺ T 세포는 유세포 분석에 의해 인플루엔자 감염 마우스의 비장에서 분리되었다. 전체 RNA는 제조사의 프로토콜에 따라 TRIzol 시약 (Invitrogen)으로 추출되었다. Deep sequencing 분석을 위해, total RNA는 nucleospin RNAII 컬럼 (Macherey-Nagel)으로 추가 정제되었고, RNA는 Superscript RNA 증폭 시스템 (Invitrogen)을 사용하여 증폭되었고, Cy3 또는 Cy5 염료 (Amersham)를 사용하여 ULS 시스템 (Kreatech)으로 라벨링되었다. 시퀀스는 HiSeq2000 기계의 한 레인에 10개의 샘플을 수합(pooling)함으로써 얻어졌다. 샘플 당 1,700만 내지 2,700만 회 판독이 얻어졌다.

[0099] 판독 매핑 (TopHat) 및 차별적으로 발현된 유전자 (DESeq) 결정은 (Anders et al. 2013)에 설명된대로 수행되었다. 판독 값은 TopHat (버전 1.4.0)를 사용하여 마우스 참조 게놈 (빌드 mm9)에 대해 매핑되었으며, 이는 엑손-엑손 접합을 확장시킬 수 있다. TopHat에는 알려진 유전자 모델 세트(NCBI 빌드 37, 버전 64)가 제공되었다. 샘플 당 진카운트(genecount)를 얻기 위해 HTSeq-count가 사용되었다. 이 도구는 제공된 GTF (Gene Transfer Format) 파일에 있는 각 유전자에 대한 진카운트를 생성한다. 모든 샘플에서 제로 카운트를 갖는 유전자는 데이터 세트로부터 제거되었다. R 패키지 DESeq를 사용하여 통계 분석이 수행되었다. SLEC 샘플과 MPEC 샘플 간에, 그리고 야생형 샘플과 녹아웃 샘플 간에 차별적으로 발현된 유전자가 결정되었다. DESeq는 유전자 카운트가 음이항 분포로 모델링될 수 있다고 가정한다. 샘플 정규화의 경우, '크기 인자'는 카운트 데이터로부터 결정되었

다. 경험적 분산은, 단일 수합 분산 값을 추정하기 위해 복제물로 모든 조건으로부터의 샘플을 사용하는 '수합된' 방법으로 결정되었다. 그 뒤에, 매개변수적 끼워맞춤(parametric fit)은 각 유전자에 대한 두 개의 분산 추정치 (경험적 추정값 및 끼워맞춤된 값)로 귀결되는 발현 값에 대한 분산-평균 관계를 결정한다. '최대 공유 모드'를 사용하여, 보다 보존적이 되도록 이 두 값의 최대 값이 선택되었다. 마지막으로, p-값과 FDR 수정된 p-값이 계산되었다.

[0100] 차별적으로 발현된 유전자 세트에서 과도하게 표현되는 생물학적 과정을 강조하기 위해, RNA-seq 데이터 분석을 위해 개발된 Bioconductor 패키지 G0seq (Young et al. 2010)가 사용되었다. 먼저 SLEC-MPEC 비교 및 WT-KO 비교로부터 FDR <0.5 인 모든 유전자가 선택되었다. 그 뒤에, 과다 표현된 과정을 결정하기 위해서, GO '생물학적 프로세스' 유전자 세트가 사용되었다. 또한 어노테이트된 유전자 세트 모음인 Molecular Signatures Database (MSigDB; <http://www.broadinstitute.org/gsea>)로부터의 'C7' 유전자 세트가 사용되었다. 유전자 세트 C7은 면역 체계 내의 세포 유형, 상태 및 교란을 나타내는 유전자 세트로 구성된 면역학적 시그니처를 포함한다. 시그니처는 인간 및 마우스 면역학에서 발표된 마이크로 어레이 연구의 수동 큐레이션에 의해 생성되었다. 이 유전자 세트는 Human Immunology Project Consortium (HIPC; <http://www.immuneprofiling.org>)의 일부로 생성되었다. C7 유전자 세트를 G0seq에 의해 사용될 수 있는 형식으로 변환시키기 위해 인-하우스 R 스크립트가 개발되었다.

[0101] **통계 분석.** 수치는 평균을 나타내고 에러 막대는 평균의 표준 오차(s.e.m.)를 나타낸다. Standard Student의 t-test(비쌍, 양측)는 GraphPadPrism 소프트웨어로 적용되었다. 3 개 이상의 그룹이 비교되는 경우, Bonferroni 보정을 갖는 One-way ANOVA이 사용되었다. P <0.05는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

[0102] **인간 흉선 조혈 전구 세포의 분리.** 출생 후 흉선 (PNT) 조직 건본은 심장 절개 수술을 받는 어린이로부터 얻어졌다(LUMC, Leiden, the Netherlands). 이의 사용은 헬싱키 선언에 따라 AMC 윤리위원회에서 승인되었다. Stomacher 80 Biomaster (Seward)를 사용하여 기계적 파괴에 의해 세포 현탁액이 제조되었다. 4C에서 밤새 배양 후, 흉선 세포는 Ficoll-Hypaque (Lymphoprep; Nycomed Pharma) 밀도 구배로부터 분리되었다. 단일 세포 현탁액은 MACS (Miltenyi Biotec)에 의해 CD34⁺ 세포에 대해 농축되고, 형광성으로 표지된 항체로 염색되고, 그 뒤에 FACS Aria (BD Bioscience)에서 CD34⁺CD1a⁻CD3⁻CD56⁻BDCA2⁻ 또는 CD34⁺CD1a⁺CD3⁻CD56⁻BDCA2⁻(이 연구에서는 CD34⁺CD1a⁻ 및 CD34⁺CD1a⁺ 언급됨)로 각각 분류되었다. 분류된 집단의 순도는 > 99%였다.

[0103] **흉선 전구 세포의 체외 분화.** 분류된 흉선 전구 세포는 5% 정상 인간 혈청, SCF (20 ng/ml) 및 IL-7 (10 ng/ml, 둘 다 PeproTech)이 포함된 Yssel 배지에서 밤새 배양되었다. OP9 세포는 30 Grey 조사에 의해 유사분열적으로 비활성화되었고, 공동 배양 개시 하루 전에 5x10³/cm²의 밀도로 시드(seed)되었다. 형질 도입 후, 흉선 전구 세포는 미리 시드된 OP9 세포에 추가되었다. 공동 배양은 FCS (20 % 태아 클론 I, 하이 클론) 및 IL-7 (5 ng/ml)과 함께 MEM α (Invitrogen)에서 수행되었다. 일부 경우에, Flt3l (5 ng/ml, PeproTech)이 배지에 부가되었다. 배양은 3 내지 4 일마다 리프레쉬되었다. 선천적 림프구 세포에 대한 분화 분석은, 달리 언급하지 않는 한, 일반적으로 1 주일 후에 분석되었다. 세포는 강력한 피펫팅에 의해서 수확되고, 70 mm 나일론 메쉬 필터 (Spectrum Labs)를 통과했다.

[0104] **리포터 유전자 분석.** U2OS 세포는 FuGene HD 형질감염 시약(Promega)을 사용하여 일시적으로 형질감염되었다. 세포는 노치-반응성 프로모터 및, NICD1 - MSCV Th1.1, mER-NICD1 - MSCV Th1.1 또는 빈 벡터 대조군으로 공동 형질감염되었다. 형질감염 효율의 차이를 보정하기 위해, pRL-CMV 대조군 벡터는 공동 형질감염되었고, 이로부터 레닐라 루시페라제가 항시적으로 발현되었다. 형질감염은 3중으로 수행되었다. 해당되는 경우, 4-하이드록시-타목시펜(Sigma)은 밤새 배양된 후 첨가되어 mER-NICD1의 핵 전위를 유도했다. 세포는 형질 감염 48 시간 후에 용해되었고, Synergy HT 마이크로 플레이트 판독기(Syntek)에서 Dual Luciferase Reporter Assay System(Promega)을 사용하여 루시페라아제 활성이 측정되었다. 두 개의 다른 노치 반응형 리포터 구조체가 사용되었으며, 이는 이전에 설명되었다(Nam et al. 2007).

[0105] **키메라 노치 수용체(ChNR) 시스템.** 키메라 노치 수용체를 생성하기 위해, 이중이량체화 도메인을 제외하고 노치의 세포외 도메인은 노치의 이중이량체화 도메인에 융합된 scFv 항체 도메인으로 구성된 이중 리간드 결합 도메인에 의해서 대체된다. 이 수용체는 인접한 세포 표면에 있는 scFv 항체의 동족 리간드에 결합됨으로써 활성화될 것이지만, 이 표면 항원이 존재하지 않을 때는 침묵을 유지한다(도 7). ChNR은 레트로 바이러스 형질 도입 또는 기타 방법을 통해 CD4 T 세포에서 발현될 수 있다. 이러한 변형된 T 세포가 입양적으로 환자에게 전달되는 경우, 노치는 이러한 T 세포에서만 특이적으로 턴온(turned on)될 수 있다.

- [0106] ChNR은 일반적으로, 홀로 T 세포를 완전히 활성화시키기에 충분하지 않다. 이를 위해서, 추가적인 T 세포 수용체 신호(또는 이의 모사체)가 요구된다. 예를 들어, T 세포는 종양 반응성에 대한 선택 후 원발성 종양(종양 침투 림프구-TIL)으로부터 유래될 수 있다. 또한, ChNR은 전통적인 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 조작된 T 세포에서 또는 종양 항원에 대한 재조합 T 세포 수용체와 관련하여 사용될 수 있다.
- [0107] 이 기본 개념의 다양한 변형이 가능하다. 표면 항원을 인식하는 모든 항체가 원칙적으로 엑토도메인으로서 사용될 수 있고, 종양 세포 표면에 발현된 모든 표면 항원은 원칙적으로 타겟이 될 수 있다. 마지막으로, 가용성 리간드에 의해 활성화된 엑토도메인조차도 옵션이다. 예를 들어, 엑토도메인은 펩타이드 네오-에피토프(Rogers et al. 2016에 설명 됨) 또는 바이오틴 또는 FITC 모이어티(Ma et al. 2016에 설명 됨)에 대한 항체로 구성될 수 있으며, 이 항체는 그 자체가 종양의 표면 항원에 대한 또 다른 항체(스위치 항체)에 통합된다. 결과적으로, 키메라 노치 수용체의 활성화는, 스위치 항체에 의해 표적화된 세포 표면 항원에 부가하여, 스위치 항체 자체가 또한 존재하는 경우에 발생할 뿐일 것이다. 이 설정은 수용체의 일시적인 제어(원할 때만 켜고 끄는 것)와 정량적 제어(스위치 항체의 농도를 높이거나 낮춤으로써)를 허용할 것이다. 그러나 이러한 모든 상황에서, 키메라 노치 수용체로부터 노치의 세포내 도메인의 유리(liberation)는 여전히 핵심 목표로 남아 있다.
- [0108] 예시적인 키메라 노치 수용체의 제조는 예시 2에서 설명된다.
- [0109] **예시 2**
- [0110] **결과**
- [0111] T 세포 기능소실은, T 세포가 T 세포 수용체를 통해 만성적으로 자극될 때 발생된다. 예시 1의 결과는, 인플루엔자 바이러스 감염에 반응하는 CD8 T 세포가 노치에 의해 이러한 기능소실 프로그램의 활성화로부터 보호된다는 점을 보여준다. 그러나, 인플루엔자 감염은 일반적으로 T 세포의 만성 자극을 유발하지 않는다. 따라서, 우리는 노치의 의도적인 활성화가 일반적으로 기능소실로 이어지는 조건 하에서 기능소실을 방지할 수 있는지 여부를 물었다. 이를 위해, 우리는 활성화된 노치 대립 유전자(NICD)가 도입되어 다음으로 반복된 TCR 자극을 받을 수 있는 체외 시스템에 의지했다. NICD는 레트로 바이러스 발현 시스템을 사용하여 OT-1 CD8 T 세포(H2-K^b에서 오브알부민 단백질로부터의 SIINFEKL 펩타이드를 인식함)에서 발현되었다. 이 레트로 바이러스 구조체의 IRES-Thy1.1 시퀀스는 형질도입된 T 세포(Thy1.1⁺)와 형질도입되지 않은 T 세포(Thy1.1⁻) 사이의 구별을 허용한다. CD8⁺ OT-1 T 세포에서 NICD의 발현은 예를 들어, 세포용해 효소기 단백질 Granzyme B의 자발적 생산에 의해 입증된 바와 같이, 효소기 기능을 강력하게 향상시켰다(도 9A). 형질도입된 OT-1 세포는 오브알부민 (B16-Ova)을 발현하는 B16F10 흑색 종 세포를 매일 첨가하여 반복적으로 자극되었다. 이러한 조건은 대조군 바이러스 (Empty Vector-EV)로 형질도입된 OT-1 T 세포의 표면에서 체크 포인트 분자 (및 기능소실의 특징) PD1의 두드러진 발현으로 귀결된다(도 9b, 왼쪽). 그러나, NICD의 발현은 PD1의 발현을 거의 완전히 방지하였다(도 9b, 오른쪽). NICD의 발현은 또한 OT-1 T 세포: 시간이 지남에 따라 점진적으로 증가되는 NICD로 형질도입된 집단에서 Th1.1⁺ 세포의 비율에 대해 경쟁 우위를 제공하였고, 반면, Th1.1⁺ 집단은 세포가 다음으로 Empty 벡터로 형질도입되었을 때 안정적으로 유지되었다(도 9c).
- [0112] NICD 대립 유전자의 발현 후 획득된 활성 노치 분자의 농도는 아마도 비생리학적으로 높다. 더욱이, ChNR을 사용하여 유사하게 높은 수준의 이러한 활성 노치 분자를 달성하는 것이 가능하지 않을 수 있다. 더 약한 노치 자극으로도 CD8 T 세포에 대한 보호 효과가 얻어질 수 있는지 여부를 테스트하기 위해, NICD의 Tamoxifen 유도성 버전이 사용되었다(또한 예시 1에서 사용됨, 도 6). 이 구조체는 N-말단에서 에스트로겐 수용체(ER)의 리간드 결합 도메인에 결합된 NICD로 구성되며, 이는 타목시펜에만 반응하고 더 이상 에스트로겐에는 반응하지 않도록 돌연변이되었다. 이 돌연변이된 ER 도메인(mER)은 열 충격 단백질에 결합됨으로써 세포질에서 NICD 분자를 분리하여 비활성 상태로 유지시킨다. 그러나 타목시펜을 첨가하면, mER-NICD 융합 단백질이 이러한 열 충격 단백질로부터 분리되어, NICD가 활성화되는 것을 허용한다. 루시퍼라제 리포터 분석에 의해서 보여지는 바와 같이(도 6a), 이 융합 단백질은 NICD 자체보다 훨씬 낮은 최대 수준의 노치 활성화에 도달하고, 그 활성화는 타목시펜 적정에 의해 정량적으로 제어될 수 있다. 마지막으로, 이러한 mER-NICD는 타목시펜이 없는 경우에도 일부 "누출" 노치 활성을 보유하며, 이는 루시퍼라제 리포터 분석에서 거의 탐지 불가능하지만 흥선 전구체 세포에서 CD4⁺CD8⁺ 흥선 세포의 분화 유도도와 같은 노치의 생리학적 기능을 이끌어 낼 수 있다(도 6b). 따라서 우리는 이러한 mER-NICD 구조체를 사용하여 CD8 T 세포의 기능소실에 대한 보호를 위한 신호 강도 요구 사항을 조사하였으며, 다시 B16-Ova 흑색 종 세포(a 내지 c에서와 같이)를 사용한 반복적 자극 모델을 사용하였다. 0.5 또는 0.05 mM의 타

목시펜으로 mER-NICD를 자극하면 실제로 PD1의 발현이 감소되고 관용원성 사이토카인 IL10이 생성되었다(도 9d). 또한 IFN γ 및 그랜자임 B와 같은 이펙터 분자의 생산을 동원하였다. 놀랍게도, 이러한 효과 중 일부는 타목시펜이 없을 때 mER-NICD에 의해 유도되는 매우 낮은 누출 NICD 활성화에 의해서도 얻어졌다. 따라서 우리는 노치가 상대적으로 적당한 수준의 노치 활성화에서도 CD8 T 세포가 기능소실의 특징(PD1의 발현, 이펙터 분자의 생산 손실)을 발생시키는 것을 방지할 수 있다는 결론을 내린다.

- [0113] *키메라 노치 수용체의 생성*
- [0114] 인간 CD19에 대항하도록 지향된 ScFv 항체 도메인으로 구성된 키메라 노치 수용체가 생성되었다 (ScFv는 Molecular Immunology 1997; 34: 1157-1165에 설명되어 있으며 J Immunother의 CAR 구성에 사용되었다. 2009 Sep; 32 (7): 689- 702). 이 ScFv는 세포의 이중이량체화 도메인의 상류에서 잘린 인간 노치1 단백질의 5' 말단에 프레임 내에서 융합되었다(도 10a).
- [0115] 구체적으로, GMCSF 리더 시퀀스(MLLLVTSLLL CELPAPAFLL)는, (도 8에 묘사된 시퀀스의) Isoleucine 1427에서 시작하여 Lysine 2555까지 인간 전장 노치1 단백질의 C- 말단과 프레임 융합된(fused in frame), FMC63-28Z 항 CD19 ScFv(IPDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTINLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLVIGWSETTYNSALKSRLTIKDNSKSVFLKMNLSLQDDTAIYYCAKHYYGGSYAMDYWGQGTSTVSSAAA)의 Ig 중쇄 가변 도메인이 뒤 따르는 Ig κ 경쇄 가변 도메인에 프레임 내에서 융합되었다.
- [0116] 대안적 구성에서, 사용된 인간 노치1 시퀀스의 C 말단은 프롤린 1390에서 시작된다. 두 변이체(I1e 1427 또는 프롤린 1390으로 시작, 도 8의 시퀀스 참조)는 또한 인간 노치1의 C-말단 PEST 도메인(인간 노치1 단백질의 알라닌 2424에서 종료, 도 8의 시퀀스 참조)의 결실로 만들어진다.
- [0117] 융합 단백질은 HEK293T 세포로의 형질감염 이후 pHEFTIG 렌티바이러스 발현 벡터(J Immunol 2009; 183: 7645-7655에 "변형된 pCDH1"로, PNAS 2011 년 8 월 9 일 108 (32) 13224-13229에서 "pHEF"로 설명됨)로부터 발현되었고, 세포 표면에서 이의 존재가 재조합 인간 CD19-Ig 단백질로 염색됨으로써 다큐먼트화되었다(도 10b).
- [0118] 재료 및 방법
- [0119] **마우스.** H2-Kb에 의해 제시된 오브알부민 잔기 257-264를 표적화하도록 특별히 구성된 TCR α -V2 및 TCR β -V5 유전자에 대한 유전자이식 삽입물을 갖는 암컷 또는 수컷 OT-1 TCR 유전자이식 마우스(C57BL / 6 균주)를 네덜란드 암 연구소(NKI, 암스테르담, 네덜란드)의 동물 시설에서 사육되고 유지되었다. 모든 동물 실험은 기관 가이드라인에 부합하는 프로토콜에 따라 수행되었고 NKI의 동물 윤리위원회의 승인을 받았다.
- [0120] **세포주 및 시약.** B16-F10 및 B16-OVA 종양 세포주는 10% 열 불활성화된 태아 송아지 혈청(Bodingo BV), 5% L-글루타민(벨기에 론자) 및 5% 페니실린/스트렙토 마이신(Sigma, 10.000 U 페니실린 및 10 mg 스트렙토 마이신)가 보충된 HEPES를 갖는 IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium)에서 배양되었다. Platinum-Eco 세포와 HEK293T 세포는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)에서 10% 열 불활성화된 태아 송아지 혈청(Bodingo BV) 및 5% L-글루타민(벨기에 론자)이 보충된 HEPES와 함께 배양되었다. 모든 세포는 37 ° C, 5% CO $_2$ 에서 배양되었다.
- [0121] **세포 정제.** OT-1 마우스의 비장 및 림프절에서 단일 세포 현탁액을 얻었다. CD8 $^+$ T 세포는 MACS(Magnetic-Activated Cell Sorting)에 의해 농축되고 정제되었다. CD8 α^+ T 세포 분리 키트, 마우스(Miltenyi Biotec)는 CD8 α^+ T 세포의 음성 선별을 위해 사용되었다. 그런 다음 세포는 10% 열 불활성화된 송아지 태아 혈청(Bodingo BV), 5% L-글루타민(Lonza, 벨기에), 5% 페니실린/스트렙토마이신(Sigma, 10.000 U 페니실린 및 10mg 스트렙토마이신) 및 50 μ M β -머캅토-에탄올(Sigma Aldrich)이 보충된 IMDM으로 최대 2 주까지 배양되었다.
- [0122] **퓨린 CD8 $^+$ T 세포의 레트로 바이러스 형질 도입.** 제조업체의 지침에 따라 FuGENE $\text{\textcircled{R}}$ HD 시약(Promega)을 사용하여 Platinum-Eco 세포를 구조체로 형질감염시킴으로써 레트로바이러스 스톡이 생성되었다. 형질감염 하루 전에 3×10^6 세포는 100 mm 접시에 플레이팅되었다. 56 μ l의 FuGENE $\text{\textcircled{R}}$ HD 시약은 879 μ l의 플라스미드 용액(OptiMEM (OptiMEM(Gibco by Life Technologies)에서 0.020 μ g/ μ l)에 첨가되었고, 그 뒤에 RT에서 10 분 동안 배양되었다. 그런 다음 복합 용액은 세포에 첨가되었고, 37 ° C에서 o/n 배양되었다. 바이러스 상청액이 수집되었고 0.45 μ M 주사기 필터로 여과되어 세포 파편이 제거되었다. 바이러스 상청액은 pMSCV-EV 및 pMSCV-NICD로부터

만들어졌다. 레트로바이러스 벡터는 캡 독립적 번역을 가능하게 하는 IRES 시퀀스와 양성 형질도입 선택을 위해 사용된 Thy1.1 (CD90.1) 선택 마커를 함유했다. OT-1 마우스로부터 정제된 활성화된 CD8⁺ T 세포를 24-웰 플레이트(1x10⁶ 세포/웰)에 10 μg/ml 폴리브렌(머크)을 첨가하여 바이러스로 감염시켰다. 세포는 실온에서 2000 RPM으로 90분 동안 회전되었고, 다음으로 37 ° C 및 5% CO₂에서 4 시간 동안 배양되었다.

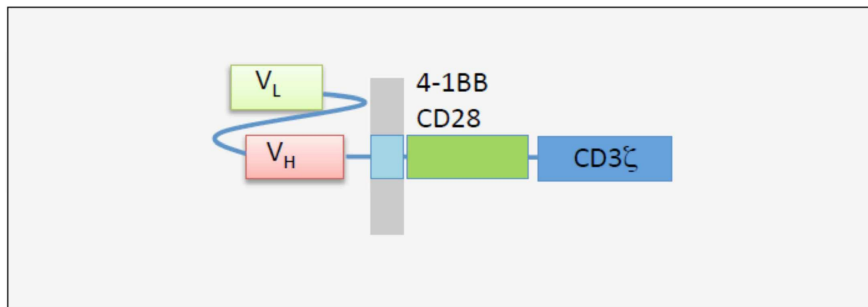
[0123] **형질감염 HEK293T 세포.** 제조사의 지시에 따라 Fugene HD 시약을 사용하여 6 웰 플레이트에서 CNR-pHEFTIG 또는 pHEFTIG 빈 벡터로 세포는 형질감염되었다. 48 시간 후, 유세포 분석기에 의해서 발현이 분석되었다.

[0124] **CD8⁺ T 세포 활성화 및 재자극.** T 세포의 효율적인 체외 활성화를 위해, OVA257-264 (SIINFEKL) 펩타이드를 인코딩하는 조작된 APC 세포주 MEC.B7.SigOVA(SAMBcd8+OK)가 사용되었다. CD8⁺ T 세포 정제 후, 10⁶개의 CD8⁺ T 세포는 24 시간 동안 24-웰 플레이트에서 10⁵ 개의 SAMBOK 세포와 공동 배양되었다. 그런 다음 세포는 수집되고 형질도입되었다. 세포는 재자극까지 ± 1.5 x 10⁶ 세포/ml의 세포 밀도로 유지되었다. 형질 도입 5일 후, 300.000 CD8⁺ T 세포는 96-평면 바닥 웰 플레이트에서 50.000 B16-F10/B16-OVA와 함께 공동 배양되었다(도 5). 부착성 B16 세포로부터 T 세포는 제거되었고, 24 시간마다 새로운 B16 세포에 시드되었다. 각각의 원하는 재자극 시점 4 시간 전에 Brefeldin A(1000x, Invitrogen, USA)가 첨가되었다. 사이토카인 생산 및 억제 수용체의 발현은 유세포 분석을 통해 평가되었다.

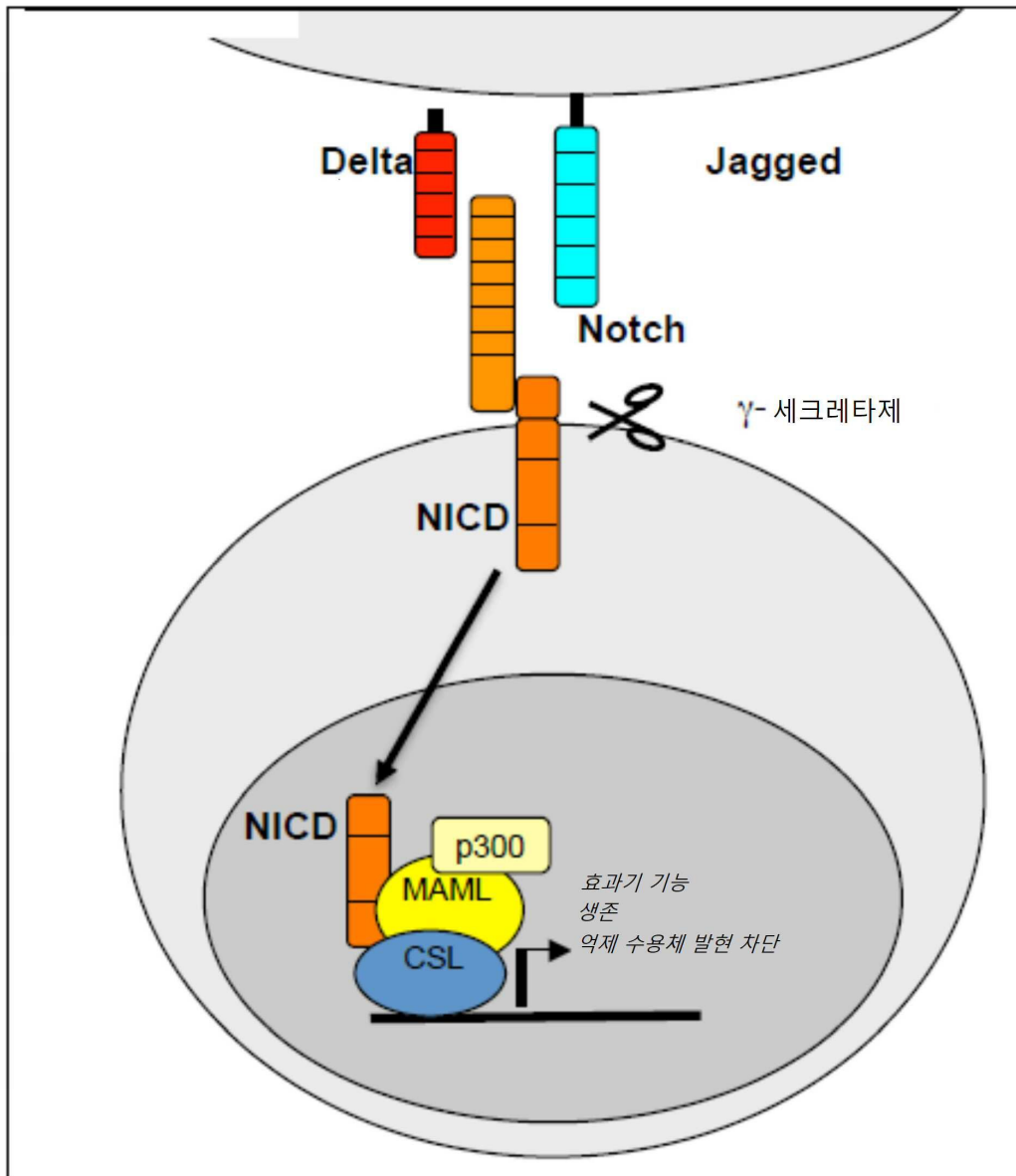
[0125] **유세포 분석 및 항체.** 모든 샘플은 BD FACSymphony A5(BD Biosciences)에서 측정되었다. 유세포 분석 측정 전에, 세포는 세포외로 염색되었고(4 ° C에서 1.5% FCS를 함유하는 PBS에서), Cytofix/Cytoperm (BD Pharmingen)을 사용하여 고정되고 투과화되었다. 그런 다음 세포는 세포 내로 염색되었다(4 ° C에서 1X Permwash에서). 인간 IgG1 Fc 부분(R & D Systems)에 융합된 인간 CD19 단백질은 CNR의 표면 발현을 검출하기 위해서 사용되었다. 형광성으로 표지된 항-인간 항체(Invitrogen)는 hCD19-Ig 융합 단백질을 검출하기 위해서 사용되었다.

도면

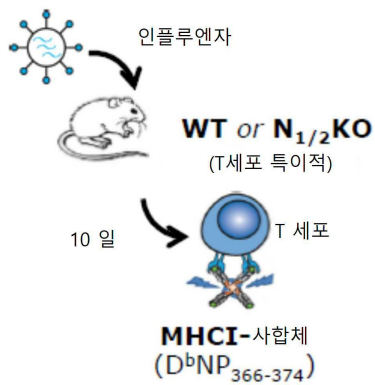
도면1



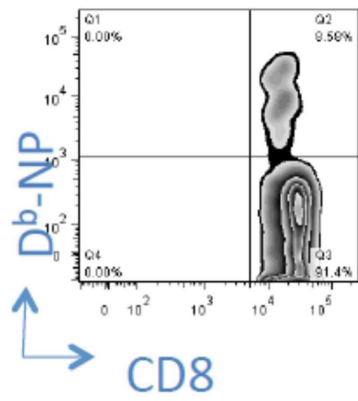
도면2



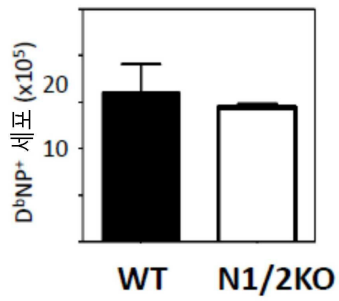
도면3a



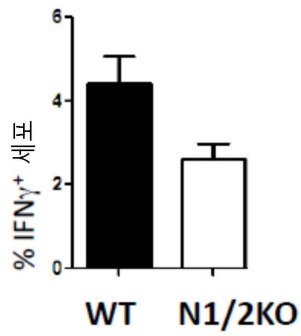
도면3b



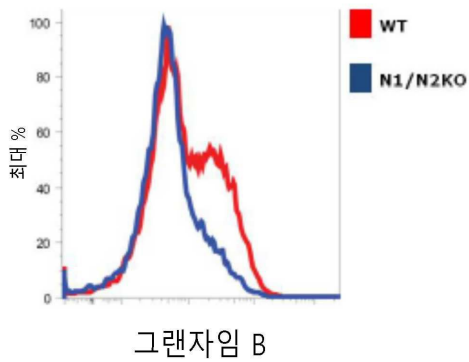
도면3c



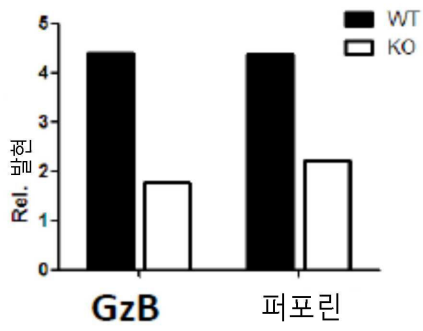
도면3d



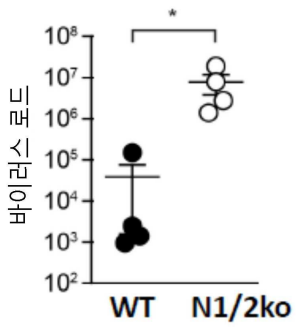
도면3e



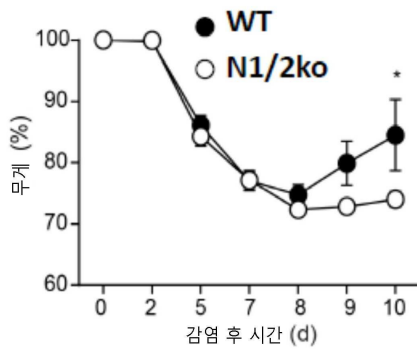
도면3f



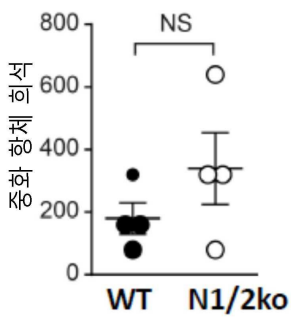
도면3g



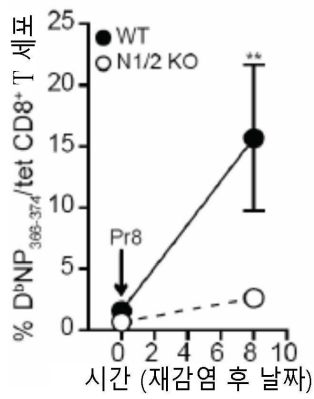
도면3h



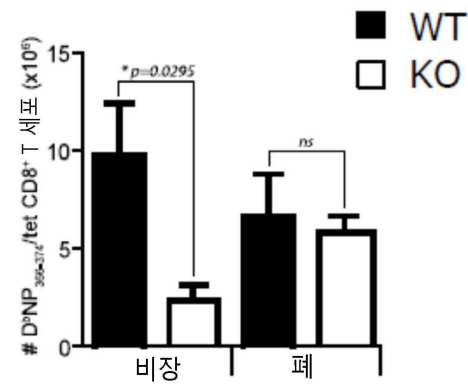
도면3i



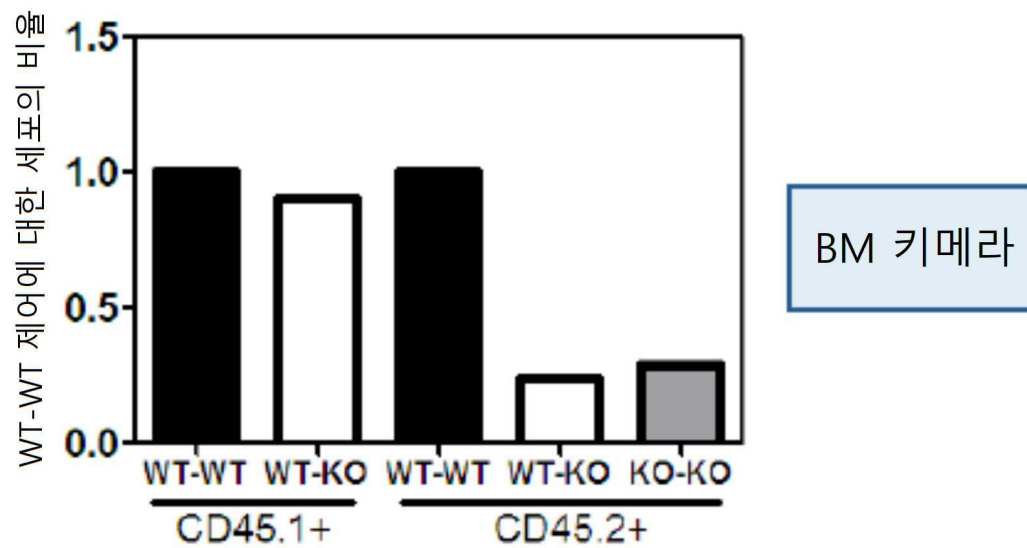
도면4a



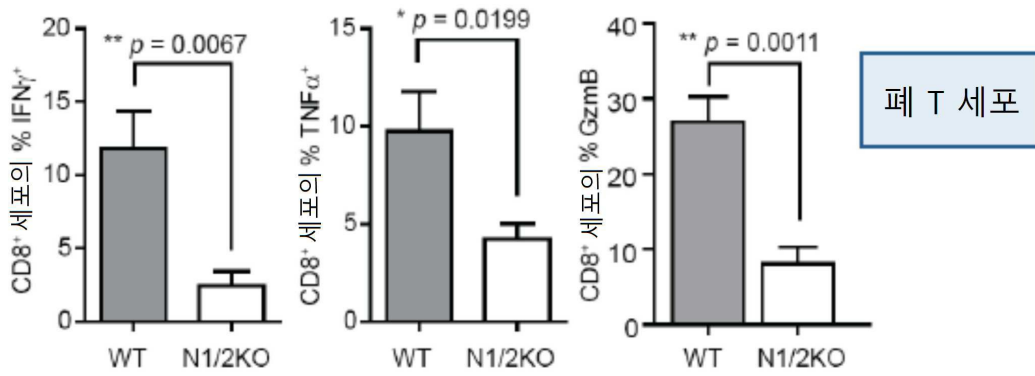
도면4b



도면4c



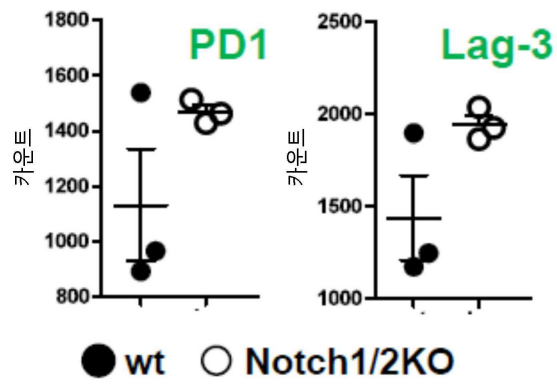
도면4d



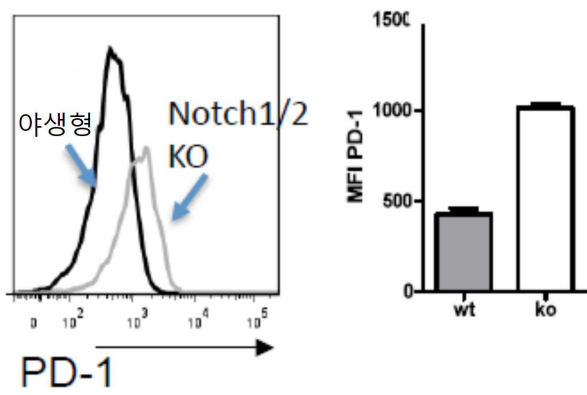
도면5a

id	category	url	over_repressed_pvalue	umhic	padj	Organism
1						
2	GSE30962 ACUTE VS CHRONIC CD4V PRIMARY INF CD8 TCELL UP	http://www.broadinstitute.org/ncbi/geo/query/acc.cgi?acc=GSE30962	1.39E-47	195	2.60E-44	Mus musculus
3	GSE6679 IL7R LOW VS HIGH EFF CD8 TCELL UP	http://www.broadinstitute.org/ncbi/geo/query/acc.cgi?acc=GSE6679	7.71E-40	188	7.37E-37	Mus musculus
4	GOLDMATH NAIVE VS MEMORY CD8 TCELL DN	http://www.broadinstitute.org/ncbi/geo/query/acc.cgi?acc=GOLDMATH	1.67E-33	193	1.00E-30	Mus musculus
5	KARCH NAIVE VS DAVIS EFF CD8 TCELL DN	http://www.broadinstitute.org/ncbi/geo/query/acc.cgi?acc=KARCH	5.30E-32	187	2.53E-29	Mus musculus
6	KARCH NAIVE VS MEMORY CD8 TCELL DN	http://www.broadinstitute.org/ncbi/geo/query/acc.cgi?acc=KARCH	5.09E-30	190	1.97E-27	Mus musculus
7	GSE6650 NAIVE VS MEMORY CD8 TCELL DN	http://www.broadinstitute.org/ncbi/geo/query/acc.cgi?acc=GSE6650	6.45E-28	190	2.05E-25	Mus musculus
8	GSE30962 ACUTE VS CHRONIC CD4V SECONDARY INF CD8 TCELL UP	http://www.broadinstitute.org/ncbi/geo/query/acc.cgi?acc=GSE30962	1.29E-27	195	3.41E-25	Mus musculus
9	GSE7064 NKCELL VS SPLENOCYTE UP	http://www.broadinstitute.org/ncbi/geo/query/acc.cgi?acc=GSE7064	4.08E-27	190	9.75E-25	Mus musculus
10	GSE9050 NAIVE VS EFF CD8 TCELL DN	http://www.broadinstitute.org/ncbi/geo/query/acc.cgi?acc=GSE9050	9.43E-27	192	2.00E-24	Mus musculus
11	KARCH NAIVE VS DAVIS EFF CD8 TCELL DN	http://www.broadinstitute.org/ncbi/geo/query/acc.cgi?acc=KARCH	1.09E-25	197	2.09E-23	Mus musculus
12	GSE30083 SPL VS SP4 THYMOCYTE DN	http://www.broadinstitute.org/ncbi/geo/query/acc.cgi?acc=GSE30083	2.03E-2	194	3.53E-20	Mus musculus
13	GSE30083 SP3 VS SP4 THYMOCYTE DN	http://www.broadinstitute.org/ncbi/geo/query/acc.cgi?acc=GSE30083	9.47E-2	201	1.51E-17	Mus musculus
14	GSE20495 NAIVE VS PDL1LOW CD8 TCELL DN	http://www.broadinstitute.org/ncbi/geo/query/acc.cgi?acc=GSE20495	2.43E-1	177	3.57E-17	Homo sapiens
15	GSE12350 L2RB KO VS WT TREG DN	http://www.broadinstitute.org/ncbi/geo/query/acc.cgi?acc=GSE12350	8.29E-1	181	1.13E-16	Mus musculus
16	GSE7385 TREG VS TCONV RN IP	http://www.broadinstitute.org/ncbi/geo/query/acc.cgi?acc=GSE7385	1.43E-1	196	1.87E-15	Mus musculus

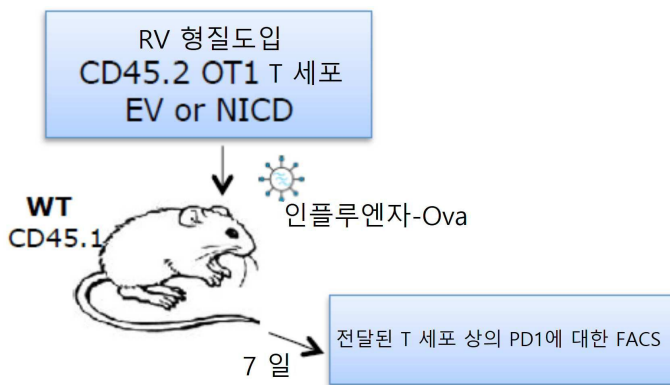
도면5b



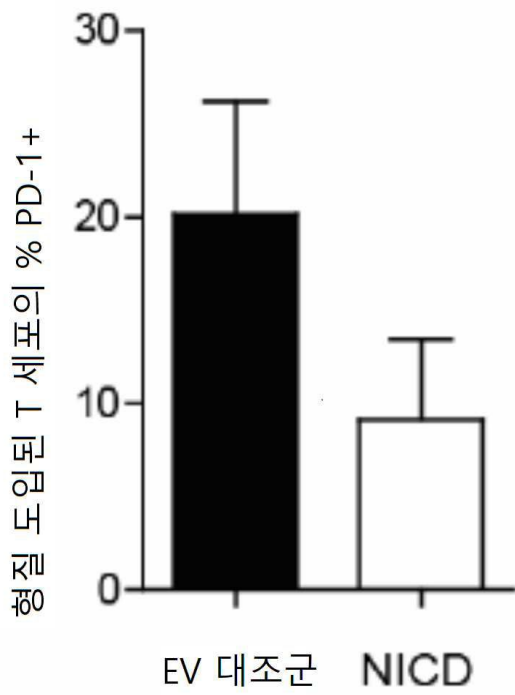
도면5c



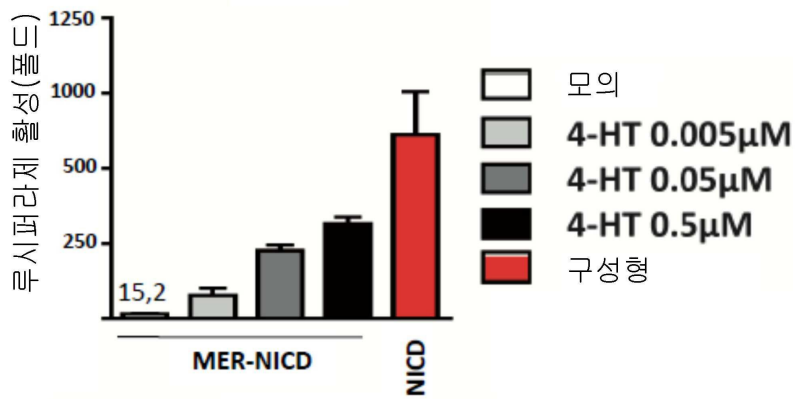
도면5d



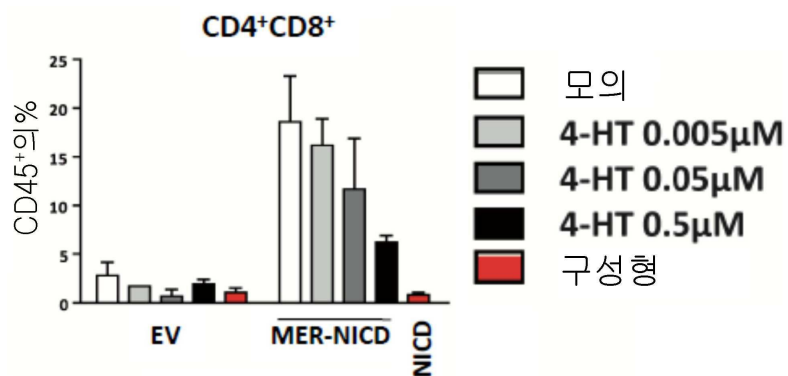
도면5e



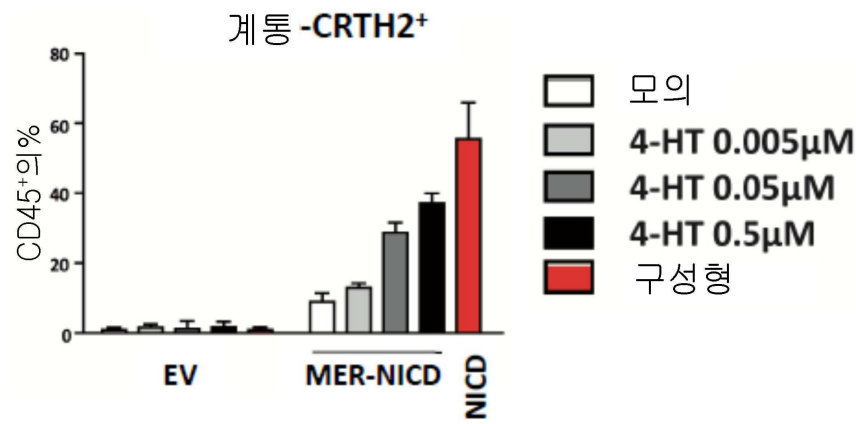
도면6a



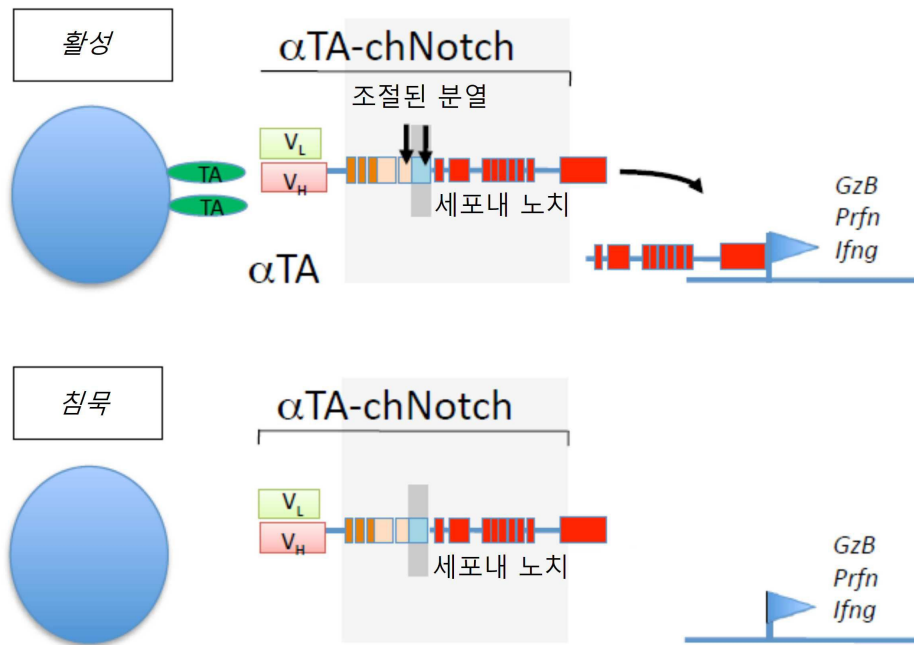
도면6b



도면6c



도면7

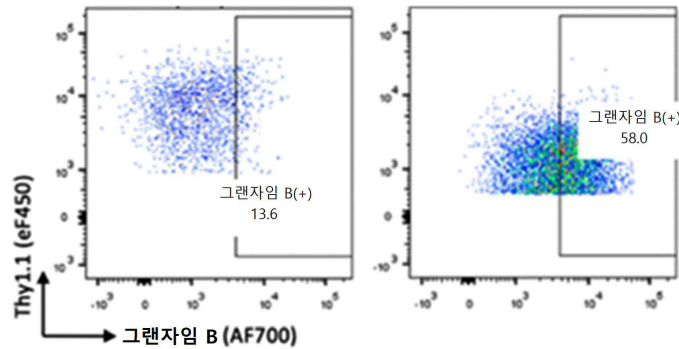


도면8

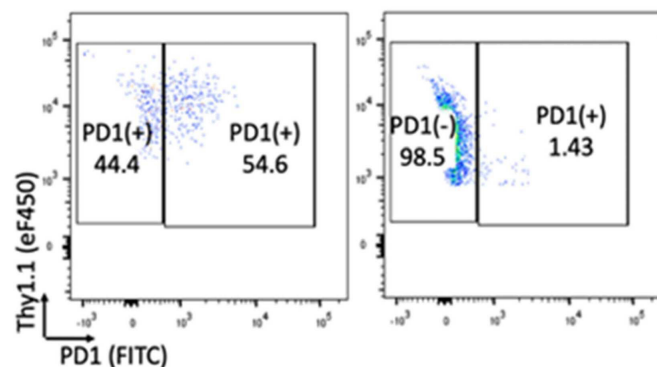
```

1  mppllapl1c lallpalaar gprcsqpget clnggkceaa ngteacvcgg afvgprcqdq
61  nplclstpkcn agtchvvdrr gvadyacsca lgfsgp1clt pldnacltnp crnggtcdll
121 tltaykrcrp pgwsgkscqg adpcasnpcn nggqclpfea syichcpps f hgptcrqdv
181 eogqkpglcr hggctchnevq syrcvcrath tgpncerpvy pcspspcqng gtorptgdvt
241 hecaclpgft gqnceenidd cpgnnckngg acvdgvntyn crcppewtgq yctedvdecq
301 lmpnacqngg tchnthggyn cvcvngwtge dcseniddca saacfhgac hdrvasfyce
361 cphgrtgllc hlndacisnp cnegsnctdn pvngkaictc psygtgpacs qdvdecslga
421 npcehagkci ntlgsfecqc lqgytgprce idvnecvsnp cqndatcldq igefqciamp
481 gyegvhcevn tdecassp1c hngrcldkin efqcecptgf tghlcydvd ecastpckng
541 akclldpnty tcvcteytyt thoeviddec dpdpchygsc kdgvatftcl crpgytghhc
601 etninecssq pcrhggctcq dndaylcfcl kgttgpncei nlddcasspc dsgtcldkid
661 gyecacepgy tgsncinid ecagnpchn gtcceodingf tcrcepyhd ptclsevne
721 nsnpcvhgac rdslnykc dpgwsgtnc dinnnecsn pcvnggtckd mtsgyvctcr
781 egfsgpncqt ninecasnpc lnggtciddv agykcnc1lp ytgatcevv1 apcasp1crn
841 ggecrqsedy erfscvcp1t wgggtcevid necv1s1prh gascqnt1hg yrchc1qag
901 grncetdidd cspnchnng sctdgintaf cdc1pgf1rgt fceedineca s1pcrn1ganc
961 tdcvdsytct cpagfsgihc enntpdctes scfnggtc1vd ginsftc1cp p1gftg1sycq
1021 dvnecdsqpc lhggtcqdgc gsyrc1cp1g ytgnpcn1lv hwc1ss1pkn g1gk1qwt1tq
1081 yrcecp1sgwt glycdvpsvs cevaaqr1g1v dvarlcq1hg lcvdagnt1h crcqagyt1s
1141 ycedlvdec1 spscqngatc tdy1ggysck cvagyhg1vnc seeidecl1sh pcqnggtc1d
1201 l1ntyk1sc1p rgtqgvh1cei nvddcn1pvd pvsrs1pkofn ngtcvd1qv1g ysctcp1pgfv
1261 gercegd1vne clsnpcd1arg t1ncvq1rvnd fhcecrag1t grrces1vng ck1gk1pckngg
1321 tcavasnt1ar gfickcp1agf egatcendar t1cgs1rlc1ng g1t1c1sg1prsp t1cl1c1gp1ftg
1381 pecqf1passp cl1ggnpc1yn g1t1cept1se1p fyrc1cp1akf ng1llch1ildy s1fgg1g1grdi
1441 p1pl1eeace l1pecqeda1gn kvcs1qc1nnh acgwd1g1dcs lnfn1dp1wkn t1qsl1qc1wkyf
1501 sdghcds1qcn sagc1fd1gfd cqrae1g1qcn lydqyck1dhf sdghcd1qcn sae1cew1d1gld
1561 caehv1perla agt1lvv1v1m p1peqlr1nssf h1flr1el1rvl h1tnv1v1f1rda h1gq1mi1fpyy
1621 greeelr1khp ikraae1gwaa pdall1g1q1vka s1llp1gg1se1g rrrr1eld1pmd vrgsiv1ylei
1681 dnrqcvq1ass qcfqsat1dva aflgalas1g sln1ipy1kiea vqset1vepp1 paqlh1fmyva
1741 aaafv1llffv gcgvlls1rkr r1rqhg1qlw1fp egfkv1se1ask kkrre1pl1ged svglk1p1kna
1801 sdgalmd1dq newgded1let k1k1fr1eep1vv lpd1dd1qt1dh r1qwt1q1h1lda adl1rms1amap
1861 tppqgevd1ad cmdvnr1vrgpd g1ftpl1miasc sgg1g1let1gns eeee1dap1avi sdfiy1q1gas1
1921 hngtd1rtget alhlaa1rysr sdaakr1llea sadan1iq1dnm grtp1haa1avs adaqgv1f1qil
1981 irrnatd1lda r1mhgd1t1pli laarlave1gm led1lin1shad vna1vdd1lgks alhwa1aa1avn
2041 vdaav1llkn gankdm1qnr eetpl1flaar egsyeta1kvl ldhfan1rdit dhmdrl1prdi
2101 aqermh1hd1v r1l1deyn1lv spqlhg1ap1g g1t1pt1s1p1lc spngyl1g1slk pgvqg1k1vrk
2161 psskg1lacgs keakdl1karr kksqd1g1kgcl ldssg1ml1spv dsles1ph1yl sdvasp1p1lp
2221 spfqq1spsvp lnhlp1gmpdt hlgh1h1nva akpema1alg ggrlafet1gp prlsh1lpvas
2281 gtstvl1g1sss ggalnft1vgg stslng1q1cew lsrlq1sg1mvp ngyn1pl1rgsv appg1l1stqap
2341 slghgm1v1p1 hsslaa1sals qmmsy1q1glps trlat1q1hlv qtq1v1q1p1n1 qmqqn1l1qpa
2401 niqqq1s1lq ppppp1q1hlq vssaas1gh1g rsfls1ge1psq advq1p1lg1ss lavht1il1pqe
2461 spalpt1slps slvppvt1aaq fltpps1q1sh sspvdnt1psh qlqv1pehp1f1 tpspes1pd1q
2521 sssps1sh1nvs dwsegv1s1pp tsmqs1qiari peafk
    
```

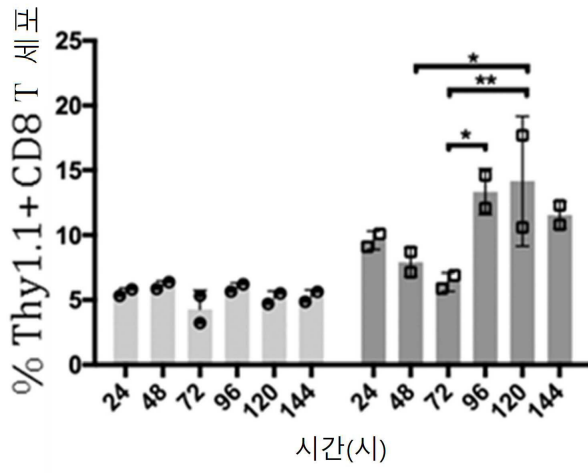
도면9a



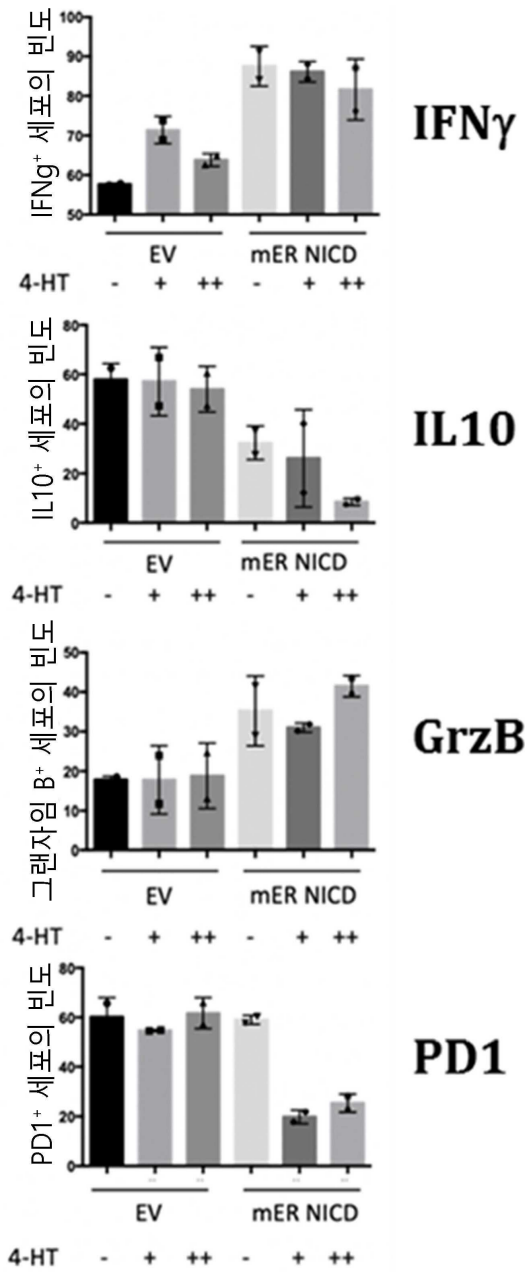
도면9b



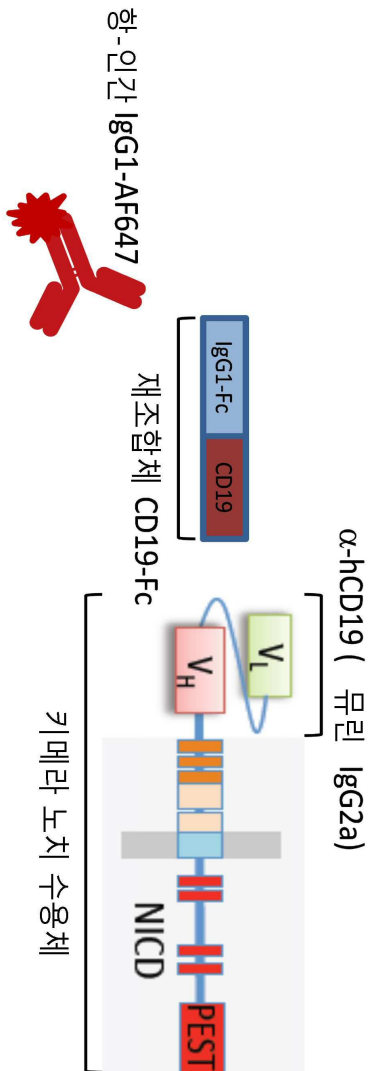
도면9c



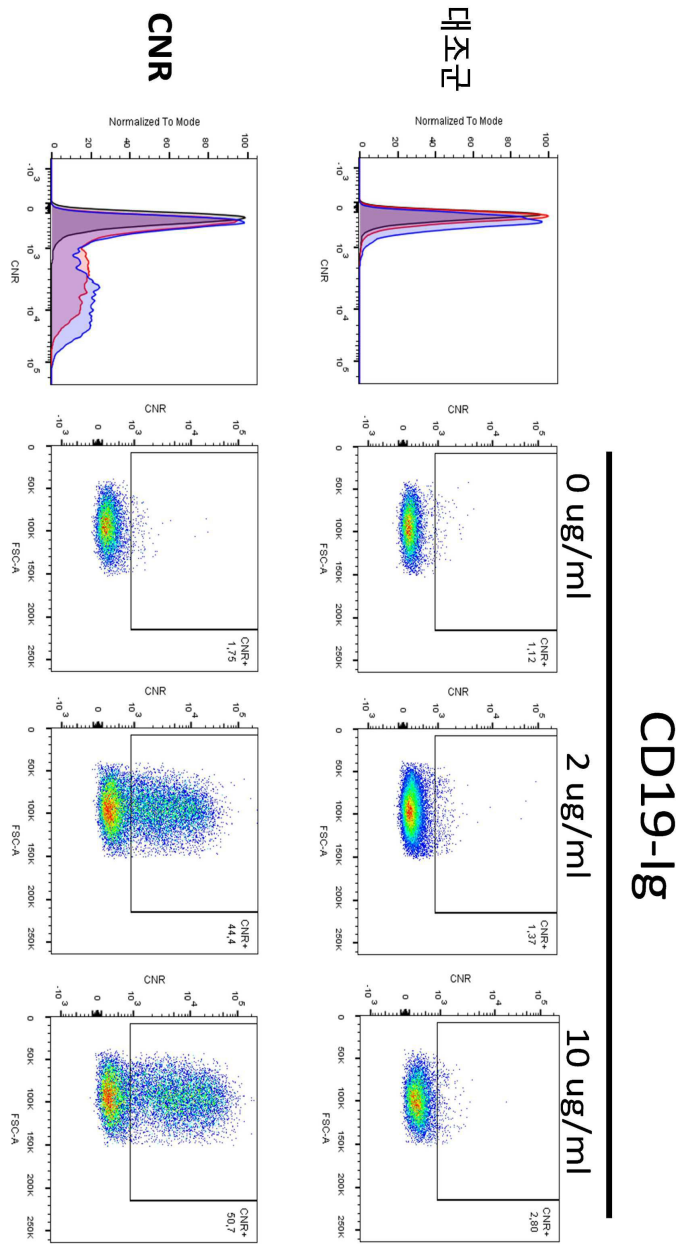
도면9d



도면10a



도면10b



서열목록

- <110> Stichting Sanquin Bloedvoorziening
- <120> Chimeric Notch receptors
- <130> P118461PC00
- <140> PCT/NL2019/050212
- <141> 2019-04-10
- <150> EP 18166498.8
- <151> 2018-04-10
- <160> 12
- <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 2555
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 Met Pro Pro Leu Leu Ala Pro Leu Leu Cys Leu Ala Leu Leu Pro Ala
 1 5 10 15
 Leu Ala Ala Arg Gly Pro Arg Cys Ser Gln Pro Gly Glu Thr Cys Leu
 20 25 30
 Asn Gly Gly Lys Cys Glu Ala Ala Asn Gly Thr Glu Ala Cys Val Cys
 35 40 45
 Gly Gly Ala Phe Val Gly Pro Arg Cys Gln Asp Pro Asn Pro Cys Leu
 50 55 60
 Ser Thr Pro Cys Lys Asn Ala Gly Thr Cys His Val Val Asp Arg Arg
 65 70 75 80
 Gly Val Ala Asp Tyr Ala Cys Ser Cys Ala Leu Gly Phe Ser Gly Pro
 85 90 95
 Leu Cys Leu Thr Pro Leu Asp Asn Ala Cys Leu Thr Asn Pro Cys Arg
 100 105 110
 Asn Gly Gly Thr Cys Asp Leu Leu Thr Leu Thr Glu Tyr Lys Cys Arg
 115 120 125
 Cys Pro Pro Gly Trp Ser Gly Lys Ser Cys Gln Gln Ala Asp Pro Cys
 130 135 140
 Ala Ser Asn Pro Cys Ala Asn Gly Gly Gln Cys Leu Pro Phe Glu Ala
 145 150 155 160
 Ser Tyr Ile Cys His Cys Pro Pro Ser Phe His Gly Pro Thr Cys Arg
 165 170 175
 Gln Asp Val Asn Glu Cys Gly Gln Lys Pro Gly Leu Cys Arg His Gly
 180 185 190
 Gly Thr Cys His Asn Glu Val Gly Ser Tyr Arg Cys Val Cys Arg Ala
 195 200 205
 Thr His Thr Gly Pro Asn Cys Glu Arg Pro Tyr Val Pro Cys Ser Pro

Ala Thr Cys Leu Asp Gln Ile Gly Glu Phe Gln Cys Ile Cys Met Pro
 465 470 475 480

Gly Tyr Glu Gly Val His Cys Glu Val Asn Thr Asp Glu Cys Ala Ser
 485 490 495

Ser Pro Cys Leu His Asn Gly Arg Cys Leu Asp Lys Ile Asn Glu Phe
 500 505 510

Gln Cys Glu Cys Pro Thr Gly Phe Thr Gly His Leu Cys Gln Tyr Asp
 515 520 525

Val Asp Glu Cys Ala Ser Thr Pro Cys Lys Asn Gly Ala Lys Cys Leu
 530 535 540

Asp Gly Pro Asn Thr Tyr Thr Cys Val Cys Thr Glu Gly Tyr Thr Gly
 545 550 555 560

Thr His Cys Glu Val Asp Ile Asp Glu Cys Asp Pro Asp Pro Cys His
 565 570 575

Tyr Gly Ser Cys Lys Asp Gly Val Ala Thr Phe Thr Cys Leu Cys Arg
 580 585 590

Pro Gly Tyr Thr Gly His His Cys Glu Thr Asn Ile Asn Glu Cys Ser
 595 600 605

Ser Gln Pro Cys Arg His Gly Gly Thr Cys Gln Asp Arg Asp Asn Ala
 610 615 620

Tyr Leu Cys Phe Cys Leu Lys Gly Thr Thr Gly Pro Asn Cys Glu Ile
 625 630 635 640

Asn Leu Asp Asp Cys Ala Ser Ser Pro Cys Asp Ser Gly Thr Cys Leu
 645 650 655

Asp Lys Ile Asp Gly Tyr Glu Cys Ala Cys Glu Pro Gly Tyr Thr Gly
 660 665 670

Ser Met Cys Asn Ile Asn Ile Asp Glu Cys Ala Gly Asn Pro Cys His
 675 680 685

Asn Gly Gly Thr Cys Glu Asp Gly Ile Asn Gly Phe Thr Cys Arg Cys
 690 695 700

Pro Glu Gly Tyr His Asp Pro Thr Cys Leu Ser Glu Val Asn Glu Cys
 705 710 715 720

Gly Trp Asp Gly Gly Asp Cys Ser Leu Asn Phe Asn Asp Pro Trp Lys
 1475 1480 1485

Asn Cys Thr Gln Ser Leu Gln Cys Trp Lys Tyr Phe Ser Asp Gly His
 1490 1495 1500

Cys Asp Ser Gln Cys Asn Ser Ala Gly Cys Leu Phe Asp Gly Phe Asp
 1505 1510 1515 1520

Cys Gln Arg Ala Glu Gly Gln Cys Asn Pro Leu Tyr Asp Gln Tyr Cys
 1525 1530 1535

Lys Asp His Phe Ser Asp Gly His Cys Asp Gln Gly Cys Asn Ser Ala
 1540 1545 1550

Glu Cys Glu Trp Asp Gly Leu Asp Cys Ala Glu His Val Pro Glu Arg
 1555 1560 1565

Leu Ala Ala Gly Thr Leu Val Val Val Val Leu Met Pro Pro Glu Gln
 1570 1575 1580

Leu Arg Asn Ser Ser Phe His Phe Leu Arg Glu Leu Ser Arg Val Leu
 1585 1590 1595 1600

His Thr Asn Val Val Phe Lys Arg Asp Ala His Gly Gln Gln Met Ile
 1605 1610 1615

Phe Pro Tyr Tyr Gly Arg Glu Glu Glu Leu Arg Lys His Pro Ile Lys
 1620 1625 1630

Arg Ala Ala Glu Gly Trp Ala Ala Pro Asp Ala Leu Leu Gly Gln Val
 1635 1640 1645

Lys Ala Ser Leu Leu Pro Gly Gly Ser Glu Gly Gly Arg Arg Arg Arg
 1650 1655 1660

Glu Leu Asp Pro Met Asp Val Arg Gly Ser Ile Val Tyr Leu Glu Ile
 1665 1670 1675 1680

Asp Asn Arg Gln Cys Val Gln Ala Ser Ser Gln Cys Phe Gln Ser Ala
 1685 1690 1695

Thr Asp Val Ala Ala Phe Leu Gly Ala Leu Ala Ser Leu Gly Ser Leu
 1700 1705 1710

Asn Ile Pro Tyr Lys Ile Glu Ala Val Gln Ser Glu Thr Val Glu Pro
 1715 1720 1725

Pro Pro Pro Ala Gln Leu His Phe Met Tyr Val Ala Ala Ala Ala Phe
 1730 1735 1740
 Val Leu Leu Phe Phe Val Gly Cys Gly Val Leu Leu Ser Arg Lys Arg

 1745 1750 1755 1760
 Arg Arg Gln His Gly Gln Leu Trp Phe Pro Glu Gly Phe Lys Val Ser
 1765 1770 1775
 Glu Ala Ser Lys Lys Lys Arg Arg Glu Pro Leu Gly Glu Asp Ser Val
 1780 1785 1790
 Gly Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ala Ser Asp Gly Ala Leu Met Asp Asp
 1795 1800 1805
 Asn Gln Asn Glu Trp Gly Asp Glu Asp Leu Glu Thr Lys Lys Phe Arg
 1810 1815 1820

 Phe Glu Glu Pro Val Val Leu Pro Asp Leu Asp Asp Gln Thr Asp His
 1825 1830 1835 1840
 Arg Gln Trp Thr Gln Gln His Leu Asp Ala Ala Asp Leu Arg Met Ser
 1845 1850 1855
 Ala Met Ala Pro Thr Pro Pro Gln Gly Glu Val Asp Ala Asp Cys Met
 1860 1865 1870
 Asp Val Asn Val Arg Gly Pro Asp Gly Phe Thr Pro Leu Met Ile Ala
 1875 1880 1885
 Ser Cys Ser Gly Gly Gly Leu Glu Thr Gly Asn Ser Glu Glu Glu Glu

 1890 1895 1900
 Asp Ala Pro Ala Val Ile Ser Asp Phe Ile Tyr Gln Gly Ala Ser Leu
 1905 1910 1915 1920
 His Asn Gln Thr Asp Arg Thr Gly Glu Thr Ala Leu His Leu Ala Ala
 1925 1930 1935
 Arg Tyr Ser Arg Ser Asp Ala Ala Lys Arg Leu Leu Glu Ala Ser Ala
 1940 1945 1950
 Asp Ala Asn Ile Gln Asp Asn Met Gly Arg Thr Pro Leu His Ala Ala
 1955 1960 1965

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

1970 1975 1980
 Ala Thr Asp Leu Asp Ala Arg Met His Asp Gly Thr Thr Pro Leu Ile
 1985 1990 1995 2000
 Leu Ala Ala Arg Leu Ala Val Glu Gly Met Leu Glu Asp Leu Ile Asn
 2005 2010 2015
 Ser His Ala Asp Val Asn Ala Val Asp Asp Leu Gly Lys Ser Ala Leu
 2020 2025 2030
 His Trp Ala Ala Ala Val Asn Asn Val Asp Ala Ala Val Val Leu Leu

 2035 2040 2045
 Lys Asn Gly Ala Asn Lys Asp Met Gln Asn Asn Arg Glu Glu Thr Pro
 2050 2055 2060
 Leu Phe Leu Ala Ala Arg Glu Gly Ser Tyr Glu Thr Ala Lys Val Leu
 2065 2070 2075 2080
 Leu Asp His Phe Ala Asn Arg Asp Ile Thr Asp His Met Asp Arg Leu
 2085 2090 2095
 Pro Arg Asp Ile Ala Gln Glu Arg Met His His Asp Ile Val Arg Leu
 2100 2105 2110

 Leu Asp Glu Tyr Asn Leu Val Arg Ser Pro Gln Leu His Gly Ala Pro
 2115 2120 2125
 Leu Gly Gly Thr Pro Thr Leu Ser Pro Pro Leu Cys Ser Pro Asn Gly
 2130 2135 2140
 Tyr Leu Gly Ser Leu Lys Pro Gly Val Gln Gly Lys Lys Val Arg Lys
 2145 2150 2155 2160
 Pro Ser Ser Lys Gly Leu Ala Cys Gly Ser Lys Glu Ala Lys Asp Leu
 2165 2170 2175
 Lys Ala Arg Arg Lys Lys Ser Gln Asp Gly Lys Gly Cys Leu Leu Asp

 2180 2185 2190
 Ser Ser Gly Met Leu Ser Pro Val Asp Ser Leu Glu Ser Pro His Gly
 2195 2200 2205
 Tyr Leu Ser Asp Val Ala Ser Pro Pro Leu Leu Pro Ser Pro Phe Gln
 2210 2215 2220
 Gln Ser Pro Ser Val Pro Leu Asn His Leu Pro Gly Met Pro Asp Thr

2225 2230 2235 2240
 His Leu Gly Ile Gly His Leu Asn Val Ala Ala Lys Pro Glu Met Ala
 2245 2250 2255

 Ala Leu Gly Gly Gly Gly Arg Leu Ala Phe Glu Thr Gly Pro Pro Arg
 2260 2265 2270
 Leu Ser His Leu Pro Val Ala Ser Gly Thr Ser Thr Val Leu Gly Ser
 2275 2280 2285
 Ser Ser Gly Gly Ala Leu Asn Phe Thr Val Gly Gly Ser Thr Ser Leu
 2290 2295 2300
 Asn Gly Gln Cys Glu Trp Leu Ser Arg Leu Gln Ser Gly Met Val Pro
 2305 2310 2315 2320
 Asn Gln Tyr Asn Pro Leu Arg Gly Ser Val Ala Pro Gly Pro Leu Ser

 2325 2330 2335
 Thr Gln Ala Pro Ser Leu Gln His Gly Met Val Gly Pro Leu His Ser
 2340 2345 2350
 Ser Leu Ala Ala Ser Ala Leu Ser Gln Met Met Ser Tyr Gln Gly Leu
 2355 2360 2365
 Pro Ser Thr Arg Leu Ala Thr Gln Pro His Leu Val Gln Thr Gln Gln
 2370 2375 2380
 Val Gln Pro Gln Asn Leu Gln Met Gln Gln Gln Asn Leu Gln Pro Ala
 2385 2390 2395 2400

 Asn Ile Gln Gln Gln Gln Ser Leu Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro Gln
 2405 2410 2415
 Pro His Leu Gly Val Ser Ser Ala Ala Ser Gly His Leu Gly Arg Ser
 2420 2425 2430
 Phe Leu Ser Gly Glu Pro Ser Gln Ala Asp Val Gln Pro Leu Gly Pro
 2435 2440 2445
 Ser Ser Leu Ala Val His Thr Ile Leu Pro Gln Glu Ser Pro Ala Leu
 2450 2455 2460
 Pro Thr Ser Leu Pro Ser Ser Leu Val Pro Pro Val Thr Ala Ala Gln

 2465 2470 2475 2480

Phe Leu Thr Pro Pro Ser Gln His Ser Tyr Ser Ser Pro Val Asp Asn
 2485 2490 2495
 Thr Pro Ser His Gln Leu Gln Val Pro Glu His Pro Phe Leu Thr Pro
 2500 2505 2510
 Ser Pro Glu Ser Pro Asp Gln Trp Ser Ser Ser Ser Pro His Ser Asn
 2515 2520 2525
 Val Ser Asp Trp Ser Glu Gly Val Ser Ser Pro Pro Thr Ser Met Gln
 2530 2535 2540

Ser Gln Ile Ala Arg Ile Pro Glu Ala Phe Lys
 2545 2550 2555

<210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Influenza A virus
 <400> 2

Ala Ser Asn Glu Asn Met Glu Thr Met
 1 5

<210> 3
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 3

caaagcgtct acgctgcagt cc 22

<210> 4
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<

220><223> primer

<400> 4

tttgtgttca cgetcaccgt gcc 23

<210> 5
 <211> 23

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 5
 aagaccaatc ctgtcacctc tga 23
 <210> 6
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 6
 gatcaggaat tccacacat gggagatcca cgaatgaa 39
 <210> 7
 <211> 32

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 7
 gatcaggata tccacattcc ttttttctt gg 32
 <210> 8
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 8
 atcggaggtt ctgcaagcg ccggcggcag cat 33
 <210> 9
 <211> 8
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 9
 SIINFEKL 8

<210> 10
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
 1 5 10 15
 Ala Phe Leu Leu
 20
 <210> 11
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ig heavy chain Variable domain of FMC63-28Z anti CD19 ScFv
 <400> 11
 Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser
 1 5 10 15
 Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser
 20 25 30
 Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu
 65 70 75 80
 Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu
 85 90 95
 Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Ser Thr
 100 105 110
 Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Glu
 115 120 125
 Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser
 130 135 140

Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly
 145 150 155 160

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

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
 180 185 190

Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys
 195 200 205

Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys
 210 215 220

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

225 230 235 240

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala
 245 250

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<400> 12

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu

1 5