



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0160307  
(43) 공개일자 2023년11월23일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01)  
C07K 14/725 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)
- (52) CPC특허분류  
C07K 16/28 (2013.01)  
A61K 39/4611 (2023.05)
- (21) 출원번호 10-2023-7035622
- (22) 출원일자(국제) 2022년03월17일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2023년10월18일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2022/052443
- (87) 국제공개번호 WO 2022/195535  
국제공개일자 2022년09월22일
- (30) 우선권주장  
63/163,217 2021년03월19일 미국(US)

- (71) 출원인  
글락소스미스클라인 인텔렉추얼 프로퍼티 디벨로  
프먼트 리미티드  
영국 에스지1 2엔와이 스티버지니 건넬스 우드 로  
드 지에스케이 메디슨즈 리서치 센터
- (72) 발명자  
사우스게이트, 토마스  
영국 스티버지니 건넬스 우드 로드
- (74) 대리인  
양영준, 오승현

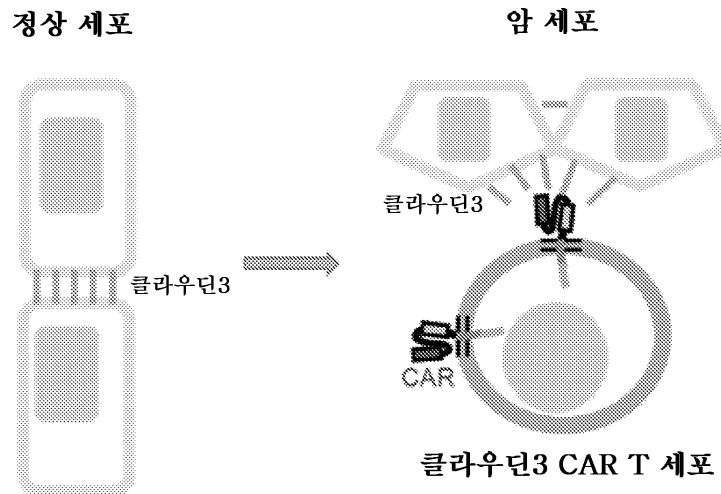
전체 청구항 수 : 총 71 항

(54) 발명의 명칭 **클라우딘-3을 표적화하는 키메라 항원 수용체 및 암을 치료하는 방법**

(57) 요약

서열식별번호: 13의 적어도 N38 및 E153을 포함하는 인간 클라우딘-3 상의 불연속적 에피토프에 결합하는 항원 결합 단백질을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)가 기재되어 있다. 또한, 본원에 기재된 항원 결합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, CAR, CAR을 함유하는 면역 이펙터 세포, 면역 이펙터 세포를 함유하는 제약 조성물, 및 면역 이펙터 세포를 사용하여 암을 치료하는 방법이 포함된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

*A61K 39/4631* (2023.05)

*A61P 35/00* (2018.01)

*C07K 14/7051* (2013.01)

*C07K 14/70517* (2013.01)

*C07K 14/70578* (2013.01)

*C12N 5/0636* (2023.05)

*C07K 2317/33* (2013.01)

*C07K 2317/565* (2013.01)

*C07K 2319/02* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

하기를 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 키메라 항원 수용체:

a) 서열식별번호: 1의 중쇄 상보성 결정 영역 1 (CDRH1) 서열; 서열식별번호: 2의 중쇄 상보성 결정 영역 2 (CDRH2) 서열; 서열식별번호: 3의 중쇄 상보성 결정 영역 3 (CDRH3) 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하는 클라우딘-3 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인;

b) 막횡단 도메인; 및

c) 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 세포외 도메인이 서열식별번호: 4의 경쇄 상보성 결정 영역 1 (CDRL1) 서열; 서열식별번호: 5의 경쇄 상보성 결정 영역 2 (CDRL2) 서열; 서열식별번호: 6의 경쇄 상보성 결정 영역 3 (CDRL3) 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하는 클라우딘-3 결합 도메인을 추가로 포함하는 것인 키메라 항원 수용체.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, VL이 VH의 N-말단에 위치되거나, 또는 VH가 VL의 N-말단에 위치되는 것인 키메라 항원 수용체.

#### 청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서, VL 및 VH가 펩티드 결합을 통해 서로 직접적으로 융합되거나 또는 펩티드 링커를 통해 서로 연결되는 것인 키메라 항원 수용체.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 도메인이 낙타 Ig, Ig NAR, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab)'<sub>2</sub> 단편, F(ab)'<sub>3</sub> 단편, Fv, 단일-쇄 가변 단편 (scFv), bis-scFv, (scFv)<sub>2</sub>, 미니바디, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 디술피드 안정화된 Fv 단백질 (dsFv), 및 단일-도메인 항체 (sdAb)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 키메라 항원 수용체.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, VH가 서열식별번호: 7과 적어도 90% 또는 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열식별번호: 7에 비해 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 갖는 아미노산 서열을 포함하고/거나, VL이 서열식별번호: 8과 적어도 90% 또는 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열식별번호: 8에 비해 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인 키메라 항원 수용체.

#### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, VH가 서열식별번호: 7의 아미노산 서열을 포함하고/거나, VL이 서열식별번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 것인 키메라 항원 수용체.

#### 청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 세포외 도메인이 서열식별번호: 11과 적어도 90% 또는 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열식별번호: 11에 비해 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 세포외 도메인이 서열식별번호: 18과 적어도 90% 또는 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열식별번호: 18에 비해 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인 키메라 항원 수용체.

**청구항 9**

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 막횡단 도메인이 T-세포 수용체의 알파 또는 베타 쇠, CD3 δ, CD3 ε, CD3 γ, CD3 ζ, CD4, CD5, CD8 α, CD9, CD16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 (4-1BB), CD152, CD154, CD278 (ICOS) 및 PD1로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리펩티드로부터 유래되는 것인 키메라 항원 수용체.

**청구항 10**

제9항에 있어서, 막횡단 도메인이 CD8 α로부터 유래되는 것인 키메라 항원 수용체.

**청구항 11**

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인이 FcR γ, FcR β, CD3 γ, CD3 ε, CD3 δ, CD3 ζ, CD22, CD66d, CD79a 및 CD79b로 이루어진 군으로부터 선택된 세포내 신호전달 분자로부터 유래되거나, 또는 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인이 CD3 ζ인 키메라 항원 수용체.

**청구항 12**

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 공동-자극 신호전달 도메인을 추가로 포함하는 키메라 항원 수용체.

**청구항 13**

제12항에 있어서, 공동-자극 도메인이 CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C, SLP76, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TRIM 및 ZAP70으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동-자극 분자로부터 유래되는 것인 키메라 항원 수용체.

**청구항 14**

하기를 포함하는 키메라 항원 수용체:

- a) 서열식별번호: 1의 CDRH1 서열; 서열식별번호: 2의 CDRH2 서열; 서열식별번호: 3의 CDRH3 서열; 서열식별번호: 4의 CDRL1 서열; 서열식별번호: 5의 CDRL2 서열; 및 서열식별번호: 6의 CDRL3 서열을 포함하는 클라우딘-3 결합 단백질을 포함하는 세포의 도메인;
- b) CD8 α로부터 유래된 막횡단 도메인;
- c) CD137 (4-1BB)로부터 유래된 공동자극 도메인; 및
- d) CD3 ζ로부터 유래된 세포내 신호전달 도메인.

**청구항 15**

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 키메라 항원 수용체가 서열식별번호: 12, 34, 35, 36, 37, 38 또는 39와 적어도 90% 또는 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열식별번호: 12, 34, 35, 36, 37, 38 또는 39에 비해 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 키메라 항원 수용체가 서열식별번호: 12, 34, 35, 36, 37, 38 또는 39의 아미노산 서열을 포함하는 것인 키메라 항원 수용체.

**청구항 16**

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 키메라 항원 수용체와 결합에 대해 경쟁하는 키메라 항원 수용체.

**청구항 17**

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 키메라 항원 수용체를 포함하는 조작된 면역 이펙터 세포.

**청구항 18**

제17항에 있어서, 면역 이펙터 세포가 T 세포, 세포독성 T 림프구, 자연 살해 T 림프구 세포, 대식세포 및 자연 살해 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 면역 이펙터 세포.

**청구항 19**

제17항 또는 제18항에 있어서, 절제 요소를 추가로 포함하는 면역 이펙터 세포.

**청구항 20**

제17항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 절제 요소가 말단절단된 인간 EGFR 폴리펩티드 및 CD20으로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리펩티드로부터 유래되거나, 또는 절제 요소가 CD20인 면역 이펙터 세포.

**청구항 21**

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 키메라 항원 수용체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

**청구항 22**

제21항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

**청구항 23**

제22항에 있어서, 벡터가 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터, 인간 면역결핍 바이러스 I (HIV-1), 인간 면역결핍 바이러스 2 (HIV-2), 비스나-매디 바이러스 (VMV), 염소 관절염-뇌염 바이러스 (CAEV), 말 감염성 빈혈 바이러스 (EIAV), 고양이 면역결핍 바이러스 (FIV), 소 면역결핍 바이러스 (BIV) 및 유인원 면역결핍 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 벡터.

**청구항 24**

제17항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 조작된 면역 이펙터 세포, 제21항에 따른 폴리뉴클레오티드, 또는 제22항 또는 제23항에 따른 벡터, 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물.

**청구항 25**

암 치료를 필요로 하는 환자에서 암을 치료하는 방법으로서, 제24항에 따른 제약 조성물의 치료 유효량을 환자에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 26**

제25항에 있어서, 암이 고형암, 상피암, 결장직장암, 췌장암, 유방암, 삼중-음성 유방암 (TNBC), 난소암, 폐암, 비소세포 폐암 (NSCLC) 또는 전립선암인 방법.

**청구항 27**

제26항에 있어서, 암이 결장직장암인 방법.

**청구항 28**

암 치료용 의약의 제조에서의, 제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따른 키메라 항원 수용체, 제19항 또는 제20항에 따른 조작된 이펙터 세포, 제21항에 따른 폴리뉴클레오티드, 제22항 또는 제23항에 따른 벡터, 또는 제24항에 따른 제약 조성물의 용도.

**청구항 29**

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 요법에서 사용하기 위한 키메라 항원 수용체, 조작된 이펙터 세포, 폴리뉴클레오티드, 벡터 또는 제약 조성물.

**청구항 30**

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 암 치료에서 사용하기 위한 키메라 항원 수용체, 조작된 이펙터 세포, 폴리뉴클레오티드, 벡터 또는 제약 조성물.

**청구항 31**

서열식별번호: 1의 중쇄 상보성 결정 영역 1 (CDRH1) 서열; 서열식별번호: 2의 중쇄 상보성 결정 영역 2 (CDRH2) 서열; 서열식별번호: 3의 중쇄 상보성 결정 영역 3 (CDRH3) 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하는 클라우딘-3 결합 단백질.

**청구항 32**

제31항에 있어서, 서열식별번호: 4의 경쇄 상보성 결정 영역 1 (CDRL1) 서열; 서열식별번호: 5의 경쇄 상보성 결정 영역 2 (CDRL2) 서열; 서열식별번호: 6의 경쇄 상보성 결정 영역 3 (CDRL3) 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 추가로 포함하는 클라우딘-3 결합 단백질.

**청구항 33**

제31항 또는 제32항에 있어서, 클라우딘-3 결합 단백질이 모노클로날 항체, 인간 IgG1 이소타입, 낙타 Ig, Ig NAR, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab)'2 단편, F(ab)'3 단편, Fv, 단일-쇄 가변 단편 (scFv), bis-scFv, (scFv)<sub>2</sub>, 미니바디, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 디설피드 안정화된 Fv 단백질 (dsFv), 및 단일-도메인 항체 (sdAb)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 클라우딘-3 결합 단백질.

**청구항 34**

제31항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, VL이 VH의 N-말단에 위치되거나, 또는 VH가 VL의 N-말단에 위치되고/거나, VL 및 VH가 펩티드 결합을 통해 서로 직접적으로 융합되거나 또는 펩티드 링커를 통해 서로 연결되는 것인 클라우딘-3 결합 단백질.

**청구항 35**

제31항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, VH가 서열식별번호: 7과 적어도 90% 또는 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열식별번호: 7에 비해 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 갖는 아미노산 서열을 포함하고/거나, VL이 서열식별번호: 8과 적어도 90% 또는 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열식별번호: 8에 비해 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나; 또는 VH가 서열식별번호: 7의 아미노산 서열을 포함하고/거나, VL이 서열식별번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 것인 클라우딘-3 결합 단백질.

**청구항 36**

제31항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 클라우딘-3 결합 단백질이 서열식별번호: 11과 적어도 90% 또는 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열식별번호: 11에 비해 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 세포외 도메인이 서열식별번호: 18과 적어도 90% 또는 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열식별번호: 18에 비해 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인 클라우딘-3 결합 단백질.

**청구항 37**

제31항 내지 제36항 중 어느 한 항에 따른 클라우딘-3 결합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

**청구항 38**

제37항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

**청구항 39**

제38항에 있어서, 벡터가 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터, 인간 면역결핍 바이러스 I (HIV-1), 인간 면역결핍 바이러스 2 (HIV-2), 비스나-매디 바이러스 (VMV), 염소 관절염-뇌염 바이러스 (CAEV), 말 감염성 빈혈 바이러스 (EIAV), 고양이 면역결핍 바이러스 (FIV), 소 면역결핍 바이러스 (BIV) 및 유인원 면역결핍 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 벡터.

**청구항 40**

제31항 내지 제36항 중 어느 한 항에 따른 클라우딘-3 결합 단백질, 제37항에 따른 폴리뉴클레오티드, 또는 제38항 또는 제39항에 따른 벡터, 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물.

**청구항 41**

암 치료를 필요로 하는 환자에서 암을 치료하는 방법으로서, 제40항에 따른 제약 조성물의 치료 유효량을 환자에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 42**

제41항에 있어서, 암이 고형암인 방법.

**청구항 43**

제41항 또는 제42항에 있어서, 암이 결장직장암, 상피암, 췌장암, 유방암, 삼중-음성 유방암 (TNBC), 난소암, 폐암, 비소세포 폐암 (NSCLC) 또는 전립선암인 방법.

**청구항 44**

제41항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 결장직장암인 방법.

**청구항 45**

암 치료용 의약의 제조에서의, 제31항 내지 제36항 중 어느 한 항에 따른 클라우딘-3 결합 단백질, 제37항에 따른 폴리뉴클레오티드, 또는 제38항 또는 제39항에 따른 벡터, 또는 제40항에 따른 제약 조성물의 용도.

**청구항 46**

제31항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 요법에서 사용하기 위한 클라우딘-3 결합 단백질, 폴리뉴클레오티드, 벡터 또는 제약 조성물.

**청구항 47**

제31항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 암 치료에서 사용하기 위한 클라우딘-3 결합 단백질, 폴리뉴클레오티드, 벡터 또는 제약 조성물.

**청구항 48**

서열식별번호: 13의 적어도 N38 및 E153을 포함하는 인간 클라우딘-3 상의 불연속적 에피토프에 결합하는 단리된 클라우딘-3 결합 단백질.

**청구항 49**

제48항에 있어서, 클라우딘-3 결합 단백질이 키메라 또는 인간화인 단리된 클라우딘-3 결합 단백질.

**청구항 50**

제48항 또는 제49항에 있어서, 클라우딘-3 결합 단백질이 모노클로날 항체, 인간 IgG1 이소타입, 낙타 Ig, IgNAR, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab)'2 단편, F(ab)'3 단편, Fv, 단일-쇄 가변 단편 (scFv), bis-scFv, (scFv)<sub>2</sub>, 미니바디, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 디술피드 안정화된 Fv 단백질 (dsFv), 및 단일-도메인 항체 (sdAb)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 단리된 클라우딘-3 결합 단백질.

**청구항 51**

제48항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 클라우딘-3 결합 단백질이 서열식별번호: 1의 중쇄 상보성 결정 영역 1 (CDRH1) 서열; 서열식별번호: 2의 중쇄 상보성 결정 영역 2 (CDRH2) 서열; 서열식별번호: 3의 중쇄 상보성 결정 영역 3 (CDRH3) 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하고/거나, 단리된 클라우딘-3 결합 단백질이 서열식별번호: 4의 경쇄 상보성 결정 영역 1 (CDRL1) 서열; 서열식별번호: 5의 경쇄 상보성 결정 영역 2 (CDRL2) 서열; 서열식별번호: 6의 경쇄 상보성 결정 영역 3 (CDRL3) 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하는 것인 단리된 클라우딘-3 결합 단백질.

**청구항 52**

제48항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, VH가 서열식별번호: 7과 적어도 90% 또는 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열식별번호: 7에 비해 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 갖는 아미노산 서열을 포함하고/거나, VL이 서열식별번호: 8과 적어도 90% 또는 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열식별번호: 8에 비해 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인 단리된 클라우딘-3 결합 단백질.

**청구항 53**

하기를 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 키메라 항원 수용체:

- a) 제48항 내지 제52항 중 어느 한 항에 따른 단리된 클라우딘-3 결합 단백질을 포함하는 세포외 도메인;
- b) 막횡단 도메인; 및
- c) 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인.

**청구항 54**

제53항에 있어서, 막횡단 도메인이 T-세포 수용체의 알파 또는 베타 쇄, CD3 δ, CD3 ε, CD3 γ, CD3 ζ, CD4, CD5, CD8 α, CD9, CD16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 (4-1BB), CD152, CD154, CD278 (ICOS) 및 PD1로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리펩티드로부터 유래되는 것인 키메라 항원 수용체.

**청구항 55**

제53항 또는 제54항에 있어서, 막횡단 도메인이 CD8 α로부터 유래되는 것인 키메라 항원 수용체.

**청구항 56**

제53항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인이 FcR γ, FcR β, CD3 γ, CD3 ε, CD3 δ, CD3 ζ, CD22, CD66d, CD79a 및 CD79b로 이루어진 군으로부터 선택된 세포내 신호전달 분자로부터 유래되는 것인 키메라 항원 수용체.

**청구항 57**

제56항에 있어서, 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인이 CD3 ζ인 키메라 항원 수용체.

**청구항 58**

제53항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 공동-자극 신호전달 도메인을 추가로 포함하는 키메라 항원 수용체.

**청구항 59**

제58항에 있어서, 공동-자극 도메인이 CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C, SLP76, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TRIM 및 ZAP70으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동-자극 분자로부터 유래되는 것인 키메라 항원 수용체.

**청구항 60**

제58항 또는 제59항에 있어서, 공동-자극 도메인이 CD137 (4-1BB)인 키메라 항원 수용체.

**청구항 61**

제53항 내지 제60항 중 어느 한 항에 따른 키메라 항원 수용체를 포함하는 조작된 면역 이펙터 세포.

**청구항 62**

제61항에 있어서, 면역 이펙터 세포가 T 세포, 세포독성 T 림프구, 자연 살해 T 림프구 세포, 대식세포 및 자연 살해 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 면역 이펙터 세포.

**청구항 63**

제61항 또는 제62항에 있어서, 절제 요소를 추가로 포함하는 면역 이펙터 세포.

**청구항 64**

제61항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 절제 요소가 말단절단된 인간 EGFR 폴리펩티드 및 CD20으로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리펩티드로부터 유래되거나, 또는 절제 요소가 CD20인 면역 이펙터 세포.

**청구항 65**

제48항 내지 제52항 중 어느 한 항에 따른 단리된 클라우딘-3 결합 단백질 또는 제61항 내지 제64항 중 어느 한 항에 따른 조작된 면역 이펙터 세포, 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물.

**청구항 66**

암 치료를 필요로 하는 환자에서 암을 치료하는 방법으로서, 제65항에 따른 제약 조성물의 치료 유효량을 환자에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 67**

제66항에 있어서, 암이 고형암, 상피암, 결장직장암, 췌장암, 유방암, 삼중-음성 유방암 (TNBC), 난소암, 폐암, 비소세포 폐암 (NSCLC) 또는 전립선암인 방법.

**청구항 68**

제67항에 있어서, 암이 결장직장암인 방법.

**청구항 69**

암 치료용 의약의 제조에서의, 제48항 내지 제52항 중 어느 한 항에 따른 단리된 클라우딘-3 결합 단백질, 제53항 내지 제61항 중 어느 한 항에 따른 키메라 항원 수용체, 제63항 또는 제64항에 따른 조작된 이펙터 세포, 또는 제65항에 따른 제약 조성물의 용도.

**청구항 70**

제48항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 요법에서 사용하기 위한 단리된 클라우딘-3 결합 단백질, 키메라 항원 수용체, 조작된 이펙터 세포 또는 제약 조성물.

**청구항 71**

제48항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 암 치료에서 사용하기 위한 클라우딘-3 결합 단백질, 키메라 항원 수용체, 조작된 이펙터 세포 또는 제약 조성물.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 세포 이음부 단백질의 적어도 하나의 에피토프에 결합하는 항원 결합 단백질을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)에 관한 것이며, 여기서 상기 세포 이음부 단백질은 세포-세포 이음부 내에 위치되고, 여기서 세포 이음부 단백질의 상기 하나 이상의 에피토프는 암 세포에서 상기 CAR 세포의 도메인에 의한 결합에만 접근가능하고/거나 이용가능하다.

**배경 기술**

[0002] 입양 T 세포 요법은 암 환자에 대한 치유 잠재성을 갖는 혁신적인 약제이다. 환자를 위한 이들 강력한 자가유래 세포 요법을 조작하기 위해, 말초 혈액을 사용하여 T 세포를 수득하며, 이는 그 후 유전적으로 변형된다.

이들 세포에 키메라 항원 수용체 (CAR)를 도입하는 것은 선택된 항원에 특이적으로 결합하는 것을 가능하게 한다. 이들 변형된 세포는 일치하는 항원을 발현하는 암 세포로 트래피킹하고 후속적으로 이를 사멸시키려는 목적으로 생체외에서 증식되고 환자에게 재주입된다 (Yeku et al., Am Soc Clin Oncol Educ Book. 2017; 37: 193-204; McBride et al., Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2019; 11(5): e1557).

[0003] CAR은 T 세포 특이성, 기능 및 지속성을 재지시하는 합성 항원 수용체이다. CAR은 항원 결합 단백질의 항원 특이적 영역, 예컨대 T 세포 활성화 도메인, 예를 들어 CD3 복합체의 제타쇄, 및 공동-자극 도메인, 예를 들어 CD28 또는 4-1BB에 융합된 단일-쇄 가변 단편 (scFv)으로 구성된다. 이러한 구성은 항원 특이적 활성화를 촉진하고 인간 1차 T 세포의 증식 및 항아포토시스 기능을 향상시킨다.

[0004] CAR-T 세포는 다양한 액체 종양 B-세포 악성종양에 대해 현저한 효능을 입증하였으며; 초기 임상 시험 결과는 다발성 골수종에서의 활성을 시사한다 (Sadelain et al., Nature. 2017; 545(7655): 423-31; June et al., N Engl J Med. 2018; 379(1): 64-73; Brudno et al., Nat Rev Clin Oncol. 2017; 15(1): 31-46). 림프종 및 백혈병에 대한 CD19 CAR-T의 2017년 FDA 승인은 고형 종양에 대한 CAR-T 세포의 개발에 집중적인 노력을 다시 활성화시켰다. 그러나, CAR-T 세포 요법은 현재까지 고형 종양에서 제한된 효능을 입증하였다.

[0005] 고형암에 대한 안전하고 효능있는 T 세포 요법을 생성하기 위해, T 세포는 제조 전반에 걸쳐 높고 효능있는 사멸 잠재성을 보유하고 종양으로 트래피킹할 수 있어야 하며 면역억압 종양 미세환경 (TME)을 극복해야 한다. 주요 성공 인자 중 하나는 항원 표적의 선택이다. 전형적으로, 표적화를 위해 선택된 항원은 암 세포 표면에서 충분한 양으로 발현되는 반면, 정상 조직의 발현은 건강한 세포에 대한 낮은 교차-반응성을 보장하기 위해 낮게 유지된다 (표적-이탈 및 표적-적중 효과 둘 다). 고형 종양에서의 CAR 면역요법은 주로 악성 조직에만 발현이 국한되는 적절한 표면 항원의 결여로 인해 여전히 어려운 과제이다. 항원 표적의 종양-이탈 발현은 영향을 받은 장기 조직에 따라 다양한 정도의 중증도로 표적-적중 독성을 유발할 잠재성을 갖는다 (Watanabe et al., Front Immunol. 2018; 9: 2486; Park et al., Sci Rep. 2017; 7(1): 14366).

[0006] 따라서, CAR 면역요법, 특히 고형 종양 및 암에 대한 T 세포 요법을 생성하기 위한 새로운 표적을 식별할 필요가 있다.

**발명의 내용**

[0007] 제1 측면에 따라, 하기를 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)가 제공된다:

[0008] a) 서열식별번호(SEQ ID NO): 13의 적어도 N38 및 E153을 포함하는 인간 클라우딘-3 상의 불연속적 에피토프에 결합하는 단리된 클라우딘-3 결합 단백질을 포함하는 세포의 도메인;

[0009] b) 막횡단 도메인; 및

[0010] c) 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인.

[0011] 추가 측면에서, 하기를 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)가 제공된다:

[0012] a) 서열식별번호: 1의 중쇄 상보성 결정 영역 1 (CDRH1) 서열; 서열식별번호: 2의 중쇄 상보성 결정 영역 2 (CDRH2) 서열; 서열식별번호: 3의 중쇄 상보성 결정 영역 3 (CDRH3) 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하는 클라우딘-3 결합 도메인을 포함하는 세포의 도메인;

[0013] b) 막횡단 도메인; 및

[0014] c) 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인.

[0015] 추가 측면에서, 서열식별번호: 13의 적어도 N38 및 E153을 포함하는 인간 클라우딘-3 상의 불연속적 에피토프에 결합하는 단리된 클라우딘-3 결합 단백질이 제공된다.

[0016] 추가 측면에서, 서열식별번호: 1의 중쇄 상보성 결정 영역 1 (CDRH1) 서열; 서열식별번호: 2의 중쇄 상보성 결정 영역 2 (CDRH2) 서열; 서열식별번호: 3의 중쇄 상보성 결정 영역 3 (CDRH3) 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하는 클라우딘-3 결합 단백질이 제공된다.

[0017] 추가 측면에서, 본원에 개시된 CAR 또는 클라우딘-3 결합 단백질의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드가 제공된다.

[0018] 다른 측면에 따라, 본원에 개시된 CAR 또는 클라우딘-3 결합 단백질을 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오

티드, 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터, 및 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드 서열 및/또는 벡터를 포함하는 벡터 생산자 세포가 제공된다.

- [0019] 또 다른 측면에서, 본원에 개시된 CAR, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드 및/또는 벡터를 포함하는 면역 이펙터 세포가 제공된다.
- [0020] 또 다른 측면에서, 본원에 개시된 면역 이펙터 세포 또는 클라우딘-3 결합 단백질 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물이 제공된다.
- [0021] 또 다른 측면에서, 본원에 개시된 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드 및/또는 벡터를 면역 이펙터 세포에 도입하는 것을 포함하는, 본원에 개시된 CAR을 포함하는 면역 이펙터 세포를 생성하는 방법이 제공된다.
- [0022] 또 다른 측면에서, 암 치료에서 사용하기 위한 본원에 개시된 CAR, 클라우딘-3 결합 단백질, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 면역 이펙터 세포 또는 제약 조성물이 제공된다.
- [0023] 또 다른 측면에서, 본원에 개시된 CAR 또는 클라우딘-3 결합 단백질, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 면역 이펙터 세포 또는 제약 조성물의 치료 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법이 제공된다.
- [0024] 또 다른 측면에서, 본원에 개시된 CAR 또는 클라우딘-3 결합 단백질, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 면역 이펙터 세포 또는 제약 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암을 갖는 대상체에서 암 세포에 대한 세포독성을 증가시키는 방법이 제공된다.
- [0025] 또 다른 측면에서, 본원에 개시된 CAR 또는 클라우딘-3 결합 단백질, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 면역 이펙터 세포 또는 제약 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암을 갖는 대상체에서 암 세포의 수를 저하시키는 방법이 제공된다.
- [0026] 또 다른 측면에서, 암 치료용 의약의 제조에서의, 본원에 개시된 CAR 또는 클라우딘-3 결합 단백질, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 면역 이펙터 세포 또는 제약 조성물의 용도가 제공된다.
- [0027] 또 다른 측면에서, 요법에서 사용하기 위한, 본원에 개시된 CAR 또는 클라우딘-3 결합 단백질, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 면역 이펙터 세포 또는 제약 조성물이 제공된다.

**도면의 간단한 설명**

[0028] 도 1: 암 세포 vs. 건강한 비암성 세포 ("정상 세포")에서 결합에 대한 클라우딘-3의 접근가능성을 제시하는 개략적 다이어그램. CLDN3은 상피 세포 사이의 치밀 이음부 (TJ) 형성에 중요한 내재성 막 단백질의 큰 패밀리에 속한다. 정상 조직 아키텍처의 파괴는 암의 특징이며, CLDN3 변경된 발현은 결장직장, 유방, 췌장 및 난소 암 종과 같은 충족되지 않은 수요가 높은 암을 포함하여 다양한 상피암의 발생과 연관되어 있다 (Singh, Sharma, and Dhawan 2010). 제시된 바와 같이, CLDN3은 종양의 TJ 외부에 잘못 편재화되어 있지만 건강한 조직에서는 그렇지 않으며, 이는 CLDN3을 종양 세포의 선택적 사멸을 위한 CAR-T 세포 표적으로 바꾸는 동시에 치밀 이음부에 숨겨져 있는 정상 세포를 보호하는 메커니즘이다.

도 2a-2b: 도 2a: LNGFR+ CAR-T 배치의 풍부화. 이지셉(EasySep) LNGFR 양성 선택을 CAR-T 배치에서 수행하여 기능 검정에서 사용하기 위한 100% CAR-T 세포 집단을 생산하였다. 도 2b: LNGFR+ 세포의 필수 빈도에 대한 CAR-T 배치의 정규화. CAR-T 배치는 비형질도입된 T 세포의 첨가에 의해 정규화되어 모든 구축물에 걸쳐 30%의 형질도입 효율을 달성하였다.

도 3a-3h: 도 3a: 비형질도입된 및 형질도입된 CAR-T 세포에 대한 기본 IFN $\gamma$  시토카인 분비 프로파일. 6명의 상이한 건강한 공여자로부터 수득된 CAR-T 세포를 사용하여 배양 상청액 내 IFN $\gamma$  분비물의 농도의 평균 및 표준 편차 (\*\*\*\* = p<0.0001 본페로니 일원 ANOVA에 의해 계산됨; UT = 비형질도입된). 도 3b-3g: 비형질도입된 및 형질도입된 CAR-T 세포에 대한 기본 고갈/활성화 표현형 (CD69+, TIM3+ 및 PD-1+). 평균 및 표준 편차가 제시된다 (p 값 범위는 본페로니 일원 ANOVA에 의해 계산된 <0.02 내지 <0.0001임; UT = 비형질도입된). 도 3h: 형질도입된 CAR-T 세포에서 CAR 특이적 pCD3 $\zeta$  수준 (PEGGY-SUE에 의해 평가된 바와 같음). 음성 대조군 (항-CD19 CAR)과 비교하여 정규화된 pCD3 $\zeta$  염색.

도 4a-4f: 도 4a: 클라우딘 단백질에 대한 반응으로 IFN $\gamma$ , IL-2 및 TNF $\alpha$ 의 분비. hCLDN3, hCLDN4, hCLDN5, hCLDN6, hCLDN8, hCLDN9, hCLDN17 또는 mCLDN3을 과발현하는 RKO KO 세포주와 공동-배양된 항-클라우딘-3 또는 항-CD19 CAR-T 세포로부터의 시토카인 방출의 정량화 (n=3의 평균 + 95% 신뢰 한계). 도 4b 및 4c: 클라우딘

단백질에 대한 반응으로 IFN  $\gamma$  분비. hCLDN3, hCLDN4, hCLDN6, hCLDN9 또는 mCLDN3을 과발현하는 RKO KO와 공동-배양된 항-클라우딘-3 CAR, 항-CD19 CAR (대조군) 또는 비형질도입된 T 세포로부터의 시토카인 방출. 도 4b: 6명의 공여자의 평균 + 95% 신뢰 한계로서 제시된 IFN  $\gamma$ 의 농도. 도 4c: 클라우딘 단백질을 발현하는 세포주와 함께 배양될 때 항-CD19 대조군 또는 비형질도입된 T 세포와 비교하여 항-클라우딘-3 CAR-T 세포로부터의 IFN  $\gamma$  분비의 배수 변화. 도 4d-4f: 클라우딘 단백질에 대한 반응으로 분비된 시토카인의 수준. 시토카인의 농도 (pg/mL)는 대조군 T 세포와 함께 배양된 RKO KO와 비교하여 각 조건의 배수 변화를 나타내는 히트맵 상에서 오버레이된다. 배수 변화는 각 실험 및 공여자 내에서 계산되고 로그 변환된다. 이 데이터는 3개의 시토카인 IFN  $\gamma$  (상단 패널), IL-2 (중간 패널) 및 TNF  $\alpha$  (하단 패널)에 대해 제시되며 특정 공여자는 좌측 컬럼에 표시된다.

도 5a-5b: 도 5a: 클라우딘 단백질을 발현하는 RKO KO 세포와 공동-배양된 항-클라우딘-3 CAR-T 세포의 이미지. 이들 이미지는 hCLDN3, hCLDN4, hCLDN6, hCLDN9 또는 mCLDN3을 발현하는 각 세포주에 대해 4일차에 촬영되었다. 좌측 패널: 이미지는 세포 구역의 윤곽을 그리는 황색 라인으로 제시되는 % 전면생장을 계산하는데 사용되는 마스크와 오버레이된다. 우측 패널: 이미지는 사이토톡스 레드 (CYTOTOX red) 염료의 강도 및 편재화를 제시하는 적색 형광과 오버레이된다. 도 5b: 이미지는 4일 동안 2시간마다 촬영되었으며 각 웰의 % 전면생장은 각 시점에서 인큐사이트(INCUCYTE) 소프트웨어를 사용하여 계산되었다. 이 실험을 위해 6명의 공여자를 3중으로 사용하였다. 3중 웰의 평균이 계산되었으며 상기 그래프의 각 포인트는 6명의 공여자의 평균  $\pm$  SEM을 나타낸다.

도 6: 클라우딘 패밀리 단백질에 대한 CAR-T 세포의 세포독성 반응. 항-클라우딘-3 CAR ("906-009"), 항-CD19 CAR ("CD19"; 대조군) 및 비형질도입된 T 세포 ("UT")를 4일 동안 hCLDN3, hCLDN4, hCLDN6, hCLDN9 또는 mCLDN3을 발현하는 RKO KO 세포와 공동-배양하였다. 사이토톡스 레드의 흡광도 및 그에 따른 적색 형광을 마스크 크로 분석하고, 데이터를 사용하여 % 살아있는 세포를 계산하였다. 1명의 대표적인 공여자로부터의 데이터는 3개의 3중 웰의 평균  $\pm$  SEM으로서 제시된다.

도 7a-7b: 정량화 비드를 사용한 표면 분자 정량화. 도 7a: T 세포당 LNGFR 분자의 평균 수. T 세포 및 퀀텀 심플리 셀룰러(Quantum Simply Cellular) 정량화 비드를 항-LNGFR PE로 염색하고, 이들의 평균 형광 강도 (MFI)를 측정하였다. 비드 MFI는 세포당 LNGFR 수를 보간하는데 사용된 표준 곡선을 생성하는데 사용되었다. 공여자 12031 및 92024의 경우 n=3 및 공여자 D5의 경우 n=5 및 오차 막대가 표준 편차를 결정한다. 도 7b: RKO 인간 결장암 세포에 대한 hCLDN3 발현의 정량화. 내인성 hCLDN3이 녹아아웃된 후 hCLDN3을 발현하도록 조작된 RKO 세포를 낮은 또는 높은 hCLDN3 발현에 대해 분류하였다. RKO 세포 및 퀀텀 심플리 셀룰러 정량화 비드를 항-hCLDN3-PE로 염색하고 이들의 MFI를 측정하였다. 비드 MFI는 세포당 hCLDN3 수를 보간하는데 사용된 표준 곡선을 생성하는데 사용되었다. 4개 반복이 측정되었으며 오차 막대가 표준 편차를 결정한다.

도 8a-8d: 예시적인 인큐사이트 및 엑셀리전스(XCELLIGENCE) 사멸 검정. 90시간 동안 RKO-KO CLDN3 L14와 함께 인큐베이션된 LNGFR 풍부화된 항-CD19 CAR-T 세포 (도 8a) 또는 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 (도 8b)의 인큐사이트 원시 데이터가 제시된다. 예시적인 사멸 곡선은 도 8a-8b의 원시 데이터에 기초하며 도 8c에 제시된다. 3개 반복이 측정되었으며 오차 막대가 표준 편차를 결정한다. 도 8d: 엑셀리전스 사멸 검정 예. 1:1 비로 HT-29-LUC 표적 세포주와 공동-배양된 비분류된 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 또는 비형질도입된 T 세포에 대한 정규화된 데이터가 제시된다. 데이터는 n=3의 평균  $\pm$  표준 편차로서 제시된다.

도 9: 다양한 수의 RKO-KO hCLDN3-발현 표적 세포를 사용한 인큐사이트 사멸 검정. RKO-KO 및 RKO-KO hCLDN3 폴리클로날 세포를 다양한 비로 혼합하고, 항-CD19 대조군 CAR-T 세포 또는 항-클라우딘-3 CAR-T 세포와 공동-배양하였다. 시간 경과에 따른 살아있는 세포의 %를 측정하였다. 3개 반복이 측정되었으며 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다.

도 10a-10d: hCLDN3 발현의 구배는 T 세포 용량 반응을 제시하였다. RKO-KO 세포를 hCLDN3 mRNA의 구배로 전기천공하고, 3명의 공여자로부터 생산된 CLDN3 및 항-CD19 대조군 CAR-T 세포와 공동-배양하였다. 도 10a: 핵 감염된 hCLDN3 mRNA의 질량과 관련된 유동 세포계측법에 의해 평가된 hCLDN3의 발현. 이 데이터는 평균 형광 강도 또는 표적 양성 집단의 %로서 제시된다. 피어슨(Pearson)의 R<sup>2</sup>는 mRNA 질량 및 평균 형광 강도 간의 상관관계에 대해 계산되었다. 도 10b: 공동-배양 후 항-클라우딘-3 CAR-T 세포를 염색하여 CD69 발현을 식별하였다. % CD69 발현은 3명의 공여자의 평균 + 95% CI로서 제시된다. 도 10c-10d: 공동-배양 상청액을 사용하여 T 세포에 의해 분비된 시토카인의 농도를 정량화하였다. 도 10c: 3명의 공여자의 평균 + 95% 신뢰 구간으로서 제시된 IFN  $\gamma$  pg/ml. 항-클라우딘-3 vs 항-CD19 대조군 CAR-T 세포로부터의 IFN  $\gamma$  분비의 비. 도

10d: 3명의 공여자의 평균 + 95% 신뢰 구간으로서 제시된 그랜자임 B pg/mL. 항-클라우딘-3 vs 항-CD19 대조군 CAR-T 세포로부터의 그랜자임 B 분비의 비.

도 11a-11c: 유동 세포계측법 및 RT-qPCR에 의한 CLDN3 발현 및 상이한 적응증: 결장직장 (도 11a), 췌장암 (도 11b) 및 유방 (도 11c) 암으로부터의 다양한 세포주에 대한 반응으로 IFN  $\gamma$  분비. hCLDN3 발현은 유동 세포계측법 (좌측)에 의해 단백질 수준에서 및 RT-qPCR (중간)에 의해 mRNA 수준에서 측정되었다. HT-29-LUC 및 RKO-KO 세포주는 각각 양성 및 음성 대조군으로서 모든 실험에 포함되었다. 상이한 적응증으로부터의 다양한 세포주에 대한 반응으로 IFN  $\gamma$  분비를 또한 평가하였다. T 세포를 표적 세포주와 함께 24시간 동안 1:1 비로 인큐베이션하고, IFN  $\gamma$  분비를 MSD에 의해 측정하였다 (우측).

도 12: 선택된 세포주의 예시적인 사멸 이미지 및 원시 데이터. 완전 사멸을 보인 2개 세포주 (HT-29-LUC 및 MDA MB468), 부분 사멸을 보인 3개 세포주 (HCC1954, HPAC 및 BxPC3) 및 어떤 사멸도 나타내지 않은 1개 세포주 (COLO-320DM)의 예시적인 이미지 (상단) 및 원시 데이터 (하단)가 제시된다. 원시 데이터는 웰당 총 사이토톡스 레드로서 제시된다. 상이한 세포주 간에는 데이터를 정규화할 수 없어 원시 데이터로만 비교가 가능하기 때문에 원시 데이터를 사용하였다.

도 13: 단백질 L-비오틴 (1차) 및 항-비오틴-PE (2차) 염색에 의해 결정된 CAR 발현. 형질도입 효율은 LNGFR-PE 염색에 의해 결정되었다. 여기서는 명명된 CAR 변이체를 사용한 형질도입 후 7일차 동안 예시적인 공여자 D5의 CAR 및 LNGFR 빈도가 제시된다.

도 14: CAR T 세포 (공여자 D5)를 사용한 사멸 검정의 결과가 제시된다. 루시퍼라제 형질도입된 T-47D 세포와 CAR-T 세포의 공동-배양에서 루시퍼라제 활성을 측정 후 용균된 표적 세포의 빈도를 계산하였다 (각 데이터 포인트는 기술적 반복의 평균을 나타냄, n=2).

도 15a-15c: 상이한 scFv 구축물을 갖는 항-클라우딘-3 CAR-T 세포에 대한 반응으로 분비된 시토카인의 농도는 MACSPlex 시토카인 12 키트 (인간)를 사용하여 결정되었다. T 세포 및 T-47D 세포와의 공동-배양 또는 T 세포 단독의 상정액을 수집하고 분석하였다 (회색되지 않음). T 세포 공여자 D5의 분비된 IFN  $\gamma$  (도 15a), IL-2 (도 15b) 및 TNF- $\alpha$  (도 15c)의 농도가 제시된다.

도 16a-16f: CAR-T 세포 (공여자 G5 및 H5)와 RKO-KO CLDN3 H1 (RKO-hCLDN3으로서 표지됨) 세포의 장기간 공동-배양의 결과는 도 16a-16c에 제시된 공여자 G5에 대한 라운드 1-3 및 도 16c-16f에 제시된 공여자 H5에 대한 라운드 1-3과 함께 제시된다. CAR-T 세포를 총 3회 라운드 동안 신선한 RKO-KO CLDN3 H1 세포로 옮겼다. GFP를 발현하는 RKO-KO CLDN3 H1의 성장을 녹색 물체 전면생장 (퍼센트)을 통해 인큐사이트를 사용하여 모니터링하고 시작 값 (4시간)으로 정규화하였다. 반복 없는 조건은 별표 (\*)로 표시된다.

도 17a-17j: 항-LAG3 (CD223)-VioBlue, 항-PD-1 (CD279)-PE-Vio770 및 항-TIM3 (CD366)-APC를 사용하여 염색함으로써 고갈 마커 발현을 결정하였다. LNGFR-양성 T 세포를 이중 (TIM3, PD-1; 채워진 원으로 표시) 및 삼중 (TIM3, PD-1, LAG3; 채워진 사각형으로 표시) 양성 고갈 마커 발현의 발현에 대해 평가하였다. 공여자 H 및 공여자 P에 대한 이중 및 삼중 양성 CAR T 세포의 빈도가 제시된다. 0일차는 표적 세포의 첨가 전 및 표적 세포의 제1 첨가 후 1일차의 빈도를 표시한다. 1, 2 및 3일차에, 신선한 RKO-KO CLDN3 H1 세포를 첨가하였다. 0일차 (도 17a-17b), 1일차 (도 17c-17d), 2일차 (도 17e-17f), 3일차 (도 17g-17h) 및 6일차 (도 17i-17j)에 공여자 H 및 공여자 P 각각에 대한 결과가 제시된다.

도 18: 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 (906-009)는 클라우딘-3 양성 표적 세포를 사용한 자극 후 다른 스페이서 또는 배향 변이체를 갖는 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 (906-002, 906-004 및 906-007)와 비교하여 향상된 클라우딘-3-특이적 증식적 반응을 나타낸다.

도 19a-19b: HT-29 인간 결장 선암종 세포주로 접종된 NSG 마우스의 성장 동역학. 접종 7일 후, 종양이 촉진 가능하였고, 동물은 PBS (T 세포 없음), 항-CD19 (대조군 CAR) 또는 항-클라우딘-3 CAR-T 세포를  $1 \times 10^7$  개 세포의 용량으로 투약받았다. 투약일은 D0으로 지칭된다. 도 19a: 종양 부피 결과는 각 측정된 시점에서 각 그룹에 대한 95% 신뢰 구간으로 한계 평균으로서 제시된다. 도 19b: 각 그룹에서 평균 종양 부피 간의 차이는 음성 대조군 항-CD19 그룹을 참조하여 제시된다. 더 큰 음성 값은 항-CD19 그룹이 비교자 그룹보다 더 큰 종양을 갖는 것을 나타낸다. 통계적 유의성을 나타내기 위해 별표가 오버레이된다: \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001.

도 20: 유동 세포계측법을 통해 분석된 투약 후 28일차에 CAR-T 투약된 NSG 마우스의 말초 혈액 내 인간 CD3 세

포 집단 (CD45+, CD3+ LNGFR+) 상에 게이팅된 LNGFR -양성 (+) CAR-T 세포의 백분율 (%). PBS 그룹 (T 세포 없음)의 6마리 마우스, 항-CD19 CAR 그룹의 3마리 마우스 및 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 그룹의 8마리 마우스가 28일차에도 여전히 연구 중이라는 점에 주목한다.

도 21a-21b: PBS (T 세포 없음), 항-CD19 (대조군 CAR) 또는 항-클라우딘-3 CAR-T 세포를 투약하기 전 및 투약 후 7일차에 HT-29-중양 보유 NSG 마우스의 혈청에서 측정된 IFN $\gamma$  방출. N=그룹당 6-8마리 마우스, 하나의 데이터 포인트는 수집될 수 있는 혈액 부피에 따라 각 마우스에 대한 단일 측정 또는 기술적 제어 2중 또는 3중의 평균을 나타낸다. 도 21a: 처리 전 및 처리 후 그룹당 IFN $\gamma$  방출 (pg/mL). HD는 가장 높은 밀도를 의미한다. 도 21b: 항-클라우딘-3 CAR 및 항-CD19 CAR 대조군 간의 처리 전 및 처리 후 간의 IFN $\gamma$  방출의 비교. 항-클라우딘-3 CAR은 항-CD19 CAR 그룹과 비교하여 IFN $\gamma$  방출의 15배 증가를 제시한다. 이 변화가 1x 변화보다 클 것이라는 베이지안(Bayesian) 사후 확률 (즉, 처리를 사용하여 IFN $\gamma$ 가 전혀 증가할 확률)은 98.2%이다. 이는 항-클라우딘-3 CAR-T 세포를 사용한 처리 후 IFN $\gamma$ 가 증가할 강한 확률을 나타낸다.

도 22: 유동 세포계측법에 의한 결장직장 환자 유래 이중이식편 (PDX) 모델의 특징화. 2개의 별도의 실험에서 해당 후 검출된 EpCAM-CLDN3- 이중 양성 (+) 세포 집단의 백분율 (%) (한 실험은 모델 CR5052, CR5080, CR89 (패널 A, 좌측)를 사용하고 또 다른 실험은 모델 CR5030, CR5087 (패널 B, 우측)을 사용함)이 요약되어 있다. 두 실험 모두에서 CLDN3 양성 (HT-29 Luc, HT-29로 지칭됨) 및 음성 대조군 (RKO-KO) 세포주가 포함되었다. EpCAM-양성 중양 세포 집단의 백분율은 CR 모델에서 41 내지 65% 범위였다. 제1 실험 (패널 A, 좌측)에서 34.6-55.4%의 CLDN3-발현 중양 세포의 범위가 관찰되었다. 제2 실험 (패널 B, 우측)에서 CLDN3-발현 중양 세포의 백분율은 26 내지 38%였다. 또한, 예상된 바와 같이 양성 대조군 (HT-29)에서는 높은 CLDN3 발현이 검출되었고, RKO-KO 세포 (음성 대조군)에서는 CLDN3이 검출되지 않았다. OV PDX 모델은 EpCAM-CLDN3-이중 양성 세포를 갖는 집단이 샘플에 존재하지 않는 것으로 도시되지 않는다. 각 실험은 모델당 하나의 중양 샘플을 지칭한다. 이들 실험은 모델당 다중 생물학적 반복을 사용하여 향후 PDX 시험관내 검정에 대한 표적 발현에 초점을 맞춘 PDX 샘플의 특징화를 설정하는데 사용되었다.

도 23a-23f: 2개의 공동-배양 실험의 시토카인 방출 (한 실험은 모델 CR5030, CR5087, OV5287 (패널 A, 좌측; 도 23a, 23c, 23e)을 사용하고 또 다른 실험은 모델 CR5052, CR5080, CR89 (패널 B, 우측; 도 23b, 23d, 23f)를 사용함). 두 실험 모두는 패널 A의 경우 웰당 50,000개 세포 및 패널 B의 경우 웰당 25,000개 세포로 대조군 세포주 HT-29 Luc (HT-29로 지칭됨, 양성 대조군) 및 RKO-KO (음성 대조군) 및 세포당 50,000개 세포로 T 세포 단독으로 실행되었다. CAR-T 세포 (이펙터)를 1:1 표적 대 이펙터 비로 PDX 세포 (표적)에 첨가하였다. 시토카인은 낮은 CLDN3 발현을 갖는 모델 OV5287을 포함하는 항-클라우딘-3 CAR-T 세포와의 모든 공동-배양에서 상승되었지만, CLDN3 음성 대조군 RKO-KO 및 T 세포 단독에서는 상승되지 않았다. 각 실험은 이용가능한 세포수에 따라 기술적 2중 또는 3중에서 1명의 T 세포 공여자를 사용한 모델당 하나의 생물학적 반복 (중양)을 사용하였다. 이들 파일럿 실험 데이터에 대해서는 통계가 수행되지 않았다.

도 24: B 세포와 비교하여 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 (CD20\_906\_009)의 이용가능한 CD20 결합 부위. CD20+ 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 (CD20\_906\_009) 및 B 세포의 중양 형광 강도는 각 조건에 대한 CD20 결합 부위의 수를 계산하는데 사용된다.

도 25: 보체 의존적 세포독성 (CDC)의 실험 조건을 개략적으로 설명하는 다이어그램.

도 26: 상이한 CDC 조건에 걸쳐 CD20 발현에 대해 결실된 세포 비율의 비교. 혼합 모델은 4시간 후에 살아있는 CTV 세포의 비율에 대해 이항 비율로 고정되었다. 보체 및 항체의 모든 조합 및 CD20 발현과의 상호작용의 고정 효과. 그 후, 무작위 효과는 무작위 절편 내의 공여자에 대한 무작위 절편을 사용하여 스플릿-플롯 설계 하에 적합하다.

도 27a-27e: 스플라이스 부위 최적화 (SO)가 있는 경우 및 없는 경우에 CD20+ 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 (CD20\_906\_009) 및 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 (906\_009)를 사용하는 ADCC에 의한 CAR-T 결실. 상이한 ADCC 조건에 대한 RTX:HI 및 RTX:RAB 간의 '비율 CTV'의 비. F(Ab)<sub>2</sub>에 의한 CAR 발현이 풍부화된 CAR T 세포.

도 28: 엑스셀리젠스 세포독성 검정 20시간에 살아있는 CD20+ 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 (CD20\_906\_009) 및 대조군 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 (906\_009). 선형 혼합 효과 모델이 이 데이터에 적합하다. % 살아있는은 반응으로서 모델링되고, CAR은 고정 효과로서 모델링된다. 이는 스플릿 플롯 설계이므로, 검정 내에 중첩된 개별 검정 및 공여자에 대한 무작위 효과가 포함된다. 선형 대비를 사용하여 CAR 쌍 간의 예상된 % 살아있는의 차이를 결정하고, 이들은 p-값 및 95% 신뢰 구간과 함께 보고된다.

도 29: 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 (906\_009) 및 CD20<sup>+</sup> 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 (CD20\_906\_009)의 엑스셀리젠스 KT50 값. CAR (백터)의 고정 효과 및 개별 검정 및 공여자의 중첩된 무작위 효과를 사용하여 선형 모델을 KT50에 적합화한다. KT50에 대해 log10 변환을 사용한다.

도 30: 엑스셀리젠스 세포독성 검정 20시간에 살아있는 세포에 대한 스플라이스 부위 최적화의 효과. 선형 혼합 효과 모델이 이 데이터에 적합하다. % 살아있는은 반응으로서 모델링되고, CAR은 고정 효과로서 모델링된다. 이는 스플릿 플롯 설계이므로, 검정 내에 중첩된 개별 검정 및 공여자에 대한 무작위 효과가 포함된다. 선형 대비를 사용하여 CAR 쌍 간의 예상된 % 살아있는의 차이를 결정하고, 이들은 p-값 및 95% 신뢰 구간과 함께 보고된다.

도 31: 엑스셀리젠스 KT50 값에 대한 스플라이스 부위 최적화의 효과. CAR (백터)의 고정 효과 및 개별 검정 및 공여자의 중첩된 무작위 효과를 사용하여 선형 모델을 KT50에 적합화한다. KT50 log10 변환됨.

도 32a-32b: CAR-T 세포에서 칼슘 플럭스에 대한 CD20의 효과. 탐시가르킨 (도 32a) 또는 DMSO (도 32b)로 전처리되고 후속적으로 이오노마이신으로 자극된 비형질도입된 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 (906\_009) 및 CD20+ 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 (CD20\_906\_009)에서 칼슘 플럭스.

도 33a-33d: 원형질막 단백질 어레이: 공여자 90928로부터의 비형질도입된 세포, BCMA-CAR T 세포 및 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 (906-009)를 사용한 사전-스크리닝 연구. HEK293 세포 (도 33a), 비형질도입된 T 세포 (도 33b), BCMA CAR-T 세포 (도 33c) 및 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 (906-009; 도 33d) 상의 단백질 발현에 대한 ZsGreen 핵심 스팟팅 패턴.

도 34a-34d: 원형질막 단백질 어레이: 확증적 스크리닝. 비형질도입된 세포 (도 34b), BCMA CAR-T 세포 (도 34c) 및 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 (906-009; 도 34d)에서 스팟팅 패턴 (도 34a)에 대한 핵심.

도 35a-35f: 902\_007-LNGFR, SO-CD20-906\_009 또는 CD20-CD19를 투약한 후 NSG 종양-보유 마우스에서 시간 경과에 따른 IFN  $\gamma$ , IL-2 및 TNF- $\alpha$ 의 분비: T 세포 투약 전 (기준선) 또는 902\_007-LNGFR, SO-CD20-906\_009 또는 CD20-CD19로 T 세포 투약 후 3, 4, 5, 7 및 14일에 HT-29Luc 종양-보유 NSG 마우스의 혈청에서 측정된 (도 35a-35b) IFN  $\gamma$ , (도 35c-35d) IL-2 및 (도 35e-35f) TNF- $\alpha$ 의 분비된 수준. 분비된 수준은 pg/ml (y-축)로 제시된다. 각 점은 주어진 마우스에 대해 주어진 시점의 시토카인 농도를 제시한다. 그래프 (도 35a, 35c, 35e)는 데이터를 모든 시점에 대한 평균 및 95% 신뢰 구간으로서 제시한다. 그래프 (도 35b, 35d, 35f)는 선형 혼합 모델로부터의 한계 평균 및 95% 신뢰 구간이 기준선을 제외한 모든 시점에 대한 원시 데이터에 오버레이되어 있음을 제시한다.

도 36: 902\_007-LNGFR, SO-CD20-906\_009 또는 CD20-CD19를 투약한 후 NSG 종양-보유 마우스에서 IFN  $\gamma$ , IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 및 TNF- $\alpha$ 에 대한 시간 경과에 따른 분비 변화: 902\_007-LNGFR, SO-CD20-906\_009 또는 CD20-CD19가 투약된 HT-29Luc 종양-보유 NSG 마우스에서 기준선 (T 세포 투약 전)과 T 세포 투약 후 각 시점 (3, 4, 5, 7 및 14일)을 비교하는 IFN  $\gamma$ , IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ 에 대한 분비 변화를 제시하는 히트맵. 선형 대비는 기준선 수준 대비 T 세포 투약 후 상이한 시점에 분비 변화를 계산하는데 사용되고 여기에 배수 변화로서 제시된다.

도 37: '14일차' 종점으로부터 902\_007-LNGFR, SO-CD20-906\_009 또는 CD20-CD19가 투약된 NSG 종양-보유 마우스에서 종양 성장 동역학. '14일차' 종점으로부터 902\_007-LNGFR, SO-CD20-906\_009 또는 CD20-CD19가 투약된 NSG 종양-보유 마우스에서 종양 성장 동역학. 마우스를 SD0에 HT-29Luc 세포로 접종하고, 종양이 ~320mm<sup>3</sup>에 도달하였을 때 SD23에 CAR T 세포를 투약받았다. '14일차' 종점으로부터의 마우스는 SD37; T 세포 투약 후 14일에 도태되었다. Y-축은 종양 부피 (mm<sup>3</sup>)를 제시하고, x-축은 모든 캘리퍼 측정에 대한 연구일을 제시한다. 모든 시점에서 모든 CAR T 그룹을 비교하기 위해 일원 ANOVA, 이어서 본페로니 다중 비교를 수행하였다. 오차 막대는 평균의 표준 오차를 나타낸다. ns > 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\*\* p < 0.0001.

도 38a-38b: '4일차' 및 '7일차' 종점으로부터 902\_007-LNGFR, SO-CD20-906\_009 또는 CD20-CD19가 투약된 NSG 종양-보유 마우스에서 종양 성장. (도 38a) '4일차' 및 (도 38b) '7일차' 종점으로부터 902\_007-LNGFR, SO-CD20-906\_009 또는 CD20-CD19가 투약된 NSG 종양-보유 마우스에서 종양 성장. 마우스를 SD0에 HT-29Luc 세포로 접종하고, 종양이 ~320mm<sup>3</sup>에 도달하였을 때 SD23에 CAR T 세포를 투약받았다. '4일차' 종점으로부터의 마우스는 SD27; T 세포 투약 후 4일에 도태되었다. '7일차' 종점으로부터의 마우스는 SD30; T 세포 투약 후 7일에 도태되었다. Y-축은 종양 부피 (mm<sup>3</sup>)를 나타내고, x-축은 CAR T 그룹을 나타낸다. 표시된 종점에서 CAR T 그룹을 비교하기 위해 일원 ANOVA, 이어서 터키의 다중 비교 테스트를 수행하였다. 오차 막대는 평균의 표준 오차

를 나타낸다. ns >0.05. 모든 비교는 유의하지 않았다.

도 39: 연구 설계. 개략도는 연구 설계를 예시한다. 간략하게, 암컷 NSG 마우스를 연구 (SD) 0일차에 HT-29Luc로 접종하였다. SD23에, 마우스는 CAR T 세포를 투약받았다 (종양이 ~320mm<sup>3</sup>에 도달하였을 때). 혈액 샘플을 SD5, SD26, SD27, SD28, SD30 및 SD37에 수집하였다. 조직 및 종양을 SD26, SD27, SD30 및 SD37에 수집하였다.

도 40: 마우스 모델. NSG-SGM3마리 마우스는 마우스 대식세포를 보유하고 인간 시토카인은 트랜스제닉적으로 발현된다. 인간 PBMC 및 인간 표적 세포 (SO-CD20-906\_009 T 세포)는 공동-주사된다. 이들 세포는 동일한 건강한 공여자로부터 생성된다. 말초 혈액 및 조직에서 SO-CD20-906\_009 T 세포의 사멸을 유도하기 위해 항-CD20 mAb 리톡시맙을 주사한다. 대조군 마우스는 SO-CD20-906\_009 T 세포의 존재 하에 이소타입 또는 비히클을 받거나 SO-CD20-906\_009 T 세포의 부재 하에 리톡시맙을 받는다.

도 41: 연구 타임라인. -1일차 (D-1)에 세포를 접종하였다 (38%의 SO-CD20-906\_009 형질도입 효율을 갖는 1x10<sup>7</sup> hPBMC, 1x10<sup>7</sup> T 세포). 0일차 (D0)에 각 마우스로부터 혈액을 수집한 후 (기준선으로서 사전-RTX 혈액), i.p. 경로를 통해 RTX, 이소타입 또는 비히클 주사를 투여하였다. mAb 투약 후 24 및 72시간에, 각 마우스로부터 혈액을 다시 수집하였다. mAb 투약 후 7 및 8일차에, 마우스를 인도적으로 희생시키고, 높은 샘플 품질 및 타당성을 보장하기 위해 시차를 두는 접근법으로 최종 혈액 및 조직을 수집하였다.

도 42a-42c: 주사 당일에 접종물의 특징화. (a) SO-CD20-906\_009 및 PBMC 하위집단을 식별하기 위한 게이팅 전략 (b) 접종물 내 PBMC 조성물 (c) 접종물 내 T 세포 상의 CAR 및 CD20 발현의 특징화. 그래프는 CAR 발현 T 세포 및 CAR 및 CD20 공동-발현 T 세포의 평균 (n=3개 반복) 백분율을 제시한다. 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다. F(ab')<sub>2</sub> CD20+ = SO-CD20-906\_009. F(ab')<sub>2</sub> = CAR.

도 43a-43d: 마우스 최종 혈액 내 SO-CD20-906\_009 및 hPBMC의 특징화 및 카운팅 (유동 세포계측법). (a) mAb/이소타입 처리 후 7일 vs. 8일에 최종 혈액 내 CD3+ (T 세포) 카운트 vs. f(ab')<sub>2</sub> 카운트의 비교. (b) 마우스 최종 혈액 내 총 f(ab')<sub>2</sub> 카운트. (c) 마우스 최종 혈액 내 총 CD3+ 카운트. (d) 마우스 최종 혈액 내 CD3+의 SO-CD20-906\_009 비율. (b,c,d) 각 점은 한계 평균 및 95% 신뢰 구간을 갖는 단일 마우스를 나타낸다. F(ab')<sub>2</sub> = CAR, CD3+ = T 세포, mAb = 모노클로날 항체 (리톡시맙), ISO = 항-RSV 항체. \* = p.값 ≤ 0.05, \*\* = p.값 ≤ 0.01, \*\*\* = p.값 ≤ 0.001.

도 44: 접종전 및 접종후 SO-CD20-906\_009 상의 CAR 및 CD20 발현의 비교. 주사 당일 (접종일)에 접종물 내 및 도태 당일 (mAb 후 7 또는 8일차)에 마우스의 혈액으로부터 SO-CD20-906\_009 T 세포 상의 CD20 및 CAR (F(ab')<sub>2</sub>) 공동-발현을 제시하는 히스토그램. F(ab')<sub>2</sub> = CAR 발현.

도 45a-45b: 혈액 내 SO-CD20-906\_009는 mAb 투여 후 24시간까지 mAb-처리된 마우스에서 감소된다. mAb 전 및 mAb 처리 후 24시간, 72시간 및 7/8일 (최종)에 마우스로부터 혈액 샘플을 수집하였다. 마우스 혈액 내 SO-CD20-906\_009의 존재의 마커로서 ddPCR을 사용하여 HIV DNA 카피를 측정하였다. (a) mAb 전, SO-CD20-906\_009 및 mAb 없음 ctrl, SO-CD20-906\_009 및 이소타입 mAb ctrl 및 SO-CD20-906\_009 및 mAb로 처리된 마우스는 혈액 내 SO-CD20-906\_009의 필적하는 발현을 가졌다. mAb 투여 후 24시간에, mAb 처리된 그룹은 SO-CD20-906\_009 및 이소타입 mAb 그룹과 비교하여 SO-CD20-906\_009를 유의하게 감소시켰으며, 이는 연구 종료 시점까지 지속되었다. 그래프는 HIV 카피의 평균 백분율 변화 및 95% 신뢰 구간을 제시한다. ▲는 SO-CD20-906\_009 및 mAb 없음 ctrl로 처리된 마우스를 제시하고, ■는 SO-CD20-906\_009 및 이소타입 mAb ctrl로 처리된 마우스를 제시하고, □는 SO-CD20-906\_009 및 mAb로 처리된 마우스를 제시한다. 그래프는 각 마우스에 대한 기하 평균 및 95% 신뢰 구간을 제시한다. (b) SO-CD20-906\_009 및 mAb 및 SO-CD20-906\_009 및 이소타입 mAb 간의 HIV 카피의 백분율 변화가 계산되었으며, 이는 이소타입 mAb 처리된 그룹과 비교하여 mAb 처리된 그룹에서 24시간 후 HIV 카피의 85.11% 저하를 제시한다. mAb 처리 후 72시간 및 연구 종료 시점에, SO-CD20-906\_009 및 이소타입 mAb ctrl과 비교하여 SO-CD20-906\_009 및 mAb에서 HIV 카피의 70.44% 및 61.56% 저하가 있었다. 그래프는 HIV 카피의 평균 백분율 변화 및 95% 신뢰 구간을 제시한다.

도 46a-46b: SO-CD20-906\_009는 mAb-처리된 마우스의 골수, 간, 폐 및 비장에서 감소된다. 연구 종료 시점 (mAb 후 7/8일차)에, 골수, 간, 폐 및 비장을 수집하고, 마우스 조직 내 SO-CD20-906\_009의 존재의 마커로서 HIV DNA 카피를 측정하였다. (a) 골수, 간, 폐 및 비장에서, SO-CD20-906\_009 및 이소타입 mAb 그룹과 비교하여 SO-CD20-906\_009 및 mAb 그룹에서 HIV 카피의 유의한 저하가 있었다 (모든 조직에 대해 p<0.0001). 또한, SO-CD20-906\_009 및 이소타입 mAb 그룹과 비교하여 SO-CD20-906\_009 및 mAb 없음 ctrl 그룹에서 유의하게 더

낮은 수의 HIV 카피가 있었다. 그래프는 각 마우스에 대한 기하 평균 및 95% 신뢰 구간을 제시한다. ▲는 SO-CD20-906\_009 및 mAb 없음 ctrl로 처리된 마우스를 제시하고, ■는 SO-CD20-906\_009 및 이소타입 mAb ctrl로 처리된 마우스를 제시하고, □는 SO-CD20-906\_009 및 mAb로 처리된 마우스를 제시한다. (b) SO-CD20-906\_009 및 mAb 및 SO-CD20-906\_009 및 이소타입 mAb ctrl 간의 HIV 카피의 백분율 변화를 계산하였다. 골수에서 95.75%, 간에서 88.05%, 폐에서 95.75% 및 비장에서 98.66%의 HIV 카피의 저하가 있었다. 그래프는 HIV 카피의 평균 백분율 변화 및 95% 신뢰 구간을 제시한다.

도 47a-47b: NSCLC 세포주 패널에 의한 CLDN3의 발현. (a) CLDN3 발현은 PCR에 의해 측정되고  $2^{-\Delta CT}$ 에서 제시되었다. (b) CLDN3 발현은 유동 세포계측법에 의해 측정되었으며 % CLDN3 양성 집단이 제시된다. HT-29 및 RKO KO를 각각 양성 및 음성 대조군으로서 사용하였다. 세포를 6주에 걸쳐 배양하고, 3개의 별개의 실험을 수행하였다. 이 데이터는 평균 + 표준 오차로서 제시된다. 주황색의 세포주는 기능적 연구에 사용되었다.

도 48a-48b: 기능 검정에서 사용하기 위한 NSCLC 및 CRC 세포주 패널에 의한 CLDN3의 발현. (a) 상대적 CLDN3 발현은 qPCR에 의해 측정되고  $2^{-\Delta CT}$ 에서 제시되었다. 이 데이터는 평균 +/- 표준 오차이다 (n = 2개의 기술적 반복). (b) hCLDN3 발현은 유동 세포계측법에 의해 측정되고 이소타입 대조군에 대해 정규화된 hCLDN3의 MFI로서 제시되었다. 기능적 실험을 위해 세포를 플레이팅한 날에 실험을 수행하였다. 두 그래프 모두에 대한 데이터는 CLDN3에 비해 낮은 내지 높음에 의해 조직화된다.

도 49a-49b: 906-009\_LNGFR, CD19-LNGFR 및 UT와 NSCLC 세포주의 공동-배양으로부터의 활성화 인자의 정량화. 다양한 CLDN3 발현 수준의 5개의 CRC 세포주를 대조군으로서 사용하였다. 이는 1:1 CAR:표적 비로 공동-배양 시점 24시간 후 활성화 인자 수준을 나타낸다. 데이터는 표적 세포 시딩 당일에 상대적 CLDN3 ( $2^{-\Delta CT}$ ) 발현에 의해 조직화되고 평균 +/- 표준 오차 평균으로 제시된다. (n = 3명의 공여자) (a) IFN  $\gamma$  pg/mL (b) 그랜자임 B pg/mL.

도 50a-50b: T 세포 활성화 및 상대적 CLDN3 mRNA 발현 간의 관계의 모델링 (dCT, 즉  $2^{-\Delta CT}$ 에 의해 정량화됨). (a) IFN  $\gamma$  (b) 그랜자임 B. 그래프의 포인트는 906-009\_LNGFR (3명의 공여자)과 세포주 (다양한 CLDN3 발현)의 공동-배양에서 활성화 인자 분비를 나타낸다. 906-009\_LNGFR (흑색), CD19\_LNGFR (중간 회색), UT (밝은 회색).

도 51: 결장암 세포주에서 표적 세포 사멸의 이미지. 결장암 세포주와 906-009\_LNGFR 또는 CD19\_LNGFR CAR-T 세포의 공동-배양의 이미지. 3명의 공여자에 대한 이미지가 표시된다. 이미지는 아빅신 V 염색 (파란색)을 제시하고, 보라색 윤곽선은 마스크를 나타낸다. 906-009\_LNGFR 공동-배양에서 HT-29 및 DLD1 세포주에서의 표적 세포 사멸을 입증하기 위해 검정 종점으로부터 이미지가 제시된다. RKO-KO는 906-009\_LNGFR에서 표적 세포 사멸을 나타내지 않았다.

도 52: NSCLC 세포주에서 표적 세포 사멸의 이미지. 다양한 NSCLC 세포주와 906-009\_LNGFR CAR-T 세포 또는 CD19\_LNGFR CAR-T 세포의 공동-배양의 이미지. 3명의 공여자에 대한 이미지가 제시된다. 표적 세포 사멸을 입증하기 위해 검정 종점으로부터 이미지가 제시된다.

도 53a-53b: CLDN3 낮은 발현과 906-009\_LNGFR 또는 CD19\_LNGFR CAR-T 세포의 공동-배양의 이미지. 3명의 공여자에 대한 이미지가 제시된다. 검정 종점으로부터 이미지가 제시되며, 이 시점에서 부분적인 세포독성을 입증한다. Co1o320DM은 906-009\_LNGFR만을 사용한 공여자 PR19K133900에서의 부분적인 표적 세포 사멸을 나타내었으며, 이는 공여자 PR19C133904 및 PR19W133916에서는 관찰되지 않았다. NCI-H1650은 공여자 PR19K133900 및 PR19C133904 906-009\_LNGFR 공동-배양에 의한 부분 사멸을 나타내었다.

도 54a-54j: 세포주는 CLDN3 mRNA의 발현에 의해 정렬된다: RKO KO (CLDN3 단백질 KO), NCI-H1650, NCI-H2023, NCI-H1651 및 DLD1. (a, c, e, g, i) 이소타입 염색된 세포주의 예시적인 플롯. (b, d, f, h, j) CLDN3 항체 염색된 플롯의 예시적인 플롯. 게이트는 이소타입 염색된 대조군에 기초하여 설정되었다.

도 55a-55d: 906-mAb 결합에 대한 CLDN3 돌연변이의 효과. (a) GFP-FITC 및 906-mAb-PE 양성 집단을 결정하는 데 사용된 게이팅 전략. (b) RKO KO 표적 세포에서 GFP 발현의 대표적인 히스토그램 오버레이. (c) WT와 비교하여 돌연변이체 세포주에 대한 906-mAb 결합의 배수-변화를 제시하는 그래프 (중앙 형광 강도 (MFI)에 의해 표시됨). (d) 906-mAb 양성 세포의 % 집단의 변화를 제시하는 그래프. (c 및 d n=2, 95% 신뢰 구간 제시).

도 56: RKO KO 표적 세포와의 공동-배양 후 906-009\_LNGFR의 활성화에 대한 CLDN3 돌연변이의 효과. 1:1 표적:형질도입된 CAR T 비로 RKO KO 표적 세포와 906-009\_LNGFR의 24시간 공동-배양 후 IFN  $\gamma$  방출. 데이터는 WT와 비교하여 % 변화 IFN  $\gamma$  로서 표현되며, 비형질도입된 T 세포 (n=3)에 대해 정규화된다. 데이터는 3명의

T 세포 공여자 (n=3)의 평균이다. 95% 신뢰 구간이 제시된다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0029] 본 명세서 및 청구범위에서 사용된 바와 같은 단수 형태는 문맥상 명확하게 달리 명시되지 않는 한 복수 지시대상을 포함한다. 그러므로, 예를 들어 "펩티드 쇠"에 대한 언급은 하나 이상의 펩티드 쇠에 대한 언급이며, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 그의 등가물을 포함한다.
- [0030] 본 명세서 및 청구범위에서 사용된 바와 같은 용어 "포함하는"은 "수반하는" 또는 "이루어진"을 포함하며, 예를 들어 X를 "포함하는" 조성물은 X로 배타적으로 이루어질 수 있거나, 추가 요소, 예를 들어 X + Y를 포함할 수 있다.
- [0031] 용어 "로 본질적으로 이루어진"은 특색의 범위를 특정된 재료 또는 단계 및 청구된 특색의 기본 특징(들)에 실질적으로 영향을 미치지 않는 것으로 제한한다. 용어 "로 이루어진"은 임의의 추가 구성성분(들)의 존재를 배제한다.
- [0032] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 등가인 임의의 조성물 및 방법이 본 개시내용의 방법의 실행 또는 테스트에서 사용될 수 있지만, 예시적인 조성물 및 방법이 본원에 기재되어 있다. 본원에 기재된 본 개시내용의 임의의 측면 및 실시양태가 또한 조합될 수 있다. 예를 들어, 본원에 개시된 임의의 종속항 또는 독립항의 대상은 다중 조합될 수 있다 (예를 들어, 각 종속항으로부터의 하나 이상의 인용은 이들이 의존하는 독립항에 기초하여 단일 청구항으로 조합될 수 있음).
- [0033] 본원에 제공된 범위는 기재된 특정한 범위 내의 모든 값 및 특정한 범위의 중점에 대한 값을 포함한다. 본 개시내용의 도면 및 표는 또한 본원에 개시된 임의의 방법의 요소를 구성할 수 있는 범위 및 별개의 값을 설명한다.
- [0034] 본원에 기재된 농도는 주위 온도 및 압력에서 결정된다. 예를 들어, 이는 실온 또는 프로세스 스트림의 특정한 부분 내의 온도 및 압력일 수 있다. 바람직하게는, 농도는 25°C 및 1 bar의 압력의 표준 상태에서 결정된다.
- [0035] 용어 "약"은 임의의 특정한 측정된 값에 대한 평균의 2개의 표준 편차 내의 값을 의미한다.
- [0036] 개요
- [0037] 네오에피토프 또는 네오항원 (암-특이적 돌연변이 또는 암 세포에 의해 배타적으로 발현되는 단백질)의 인식은 항암 요법의 개발에 중요하였다. 이러한 네오에피토프는 암 세포가 건강한 비암성 세포와 구별되도록 허용하며, 건강한 비암성 세포는 영향을 받지 않는 동안 항암제 및 환자 자신의 면역 시스템이 고유하게 표적화 되도록 허용한다. 유사하지만 덜 구체적인 접근법은 건강한 비암성 세포와 비교하여 암 세포에서 상향조절되거나 과발현되는 단백질 또는 기타 세포 구성성분인 종양-연관 자기-항원을 표적화하는 것이다. 그러나, 이들 접근법의 단점은 진정한 암-특이적 네오에피토프가 희귀하고 쉽게 예측될 수 없는 반면, 종양-연관 자기-항원의 표적화는 건강한 비암성 세포에서의 발현으로 인해 표적 이탈 효과를 유발할 수 있다는 것이다.
- [0038] 이들 단점을 해결하기 위해, 세포 이음부 단백질의 적어도 하나의 에피토프에 결합하는 키메라 항원 수용체 (CAR)가 본원에 제공되며, 여기서 상기 세포 이음부 단백질은 세포-세포 이음부 내에 위치되고, 여기서 세포 이음부 단백질의 상기 적어도 하나의 에피토프는 암 세포에서 상기 CAR 세포의 도메인에 의한 결합에만 접근가능하다. 이러한 하나 이상의 에피토프는 암 세포 및 건강한 비암성 세포 및 조직화된 조직 내의 세포 모두에 존재하거나 발현되는 반면, 조직화된 조직 내의 세포에서의 결합에 대한 접근불가능성 및/또는 이용불가능성으로 인해 표적 이탈 효과가 감소된다.
- [0039] 키메라 항원 수용체 (CAR)
- [0040] 다양한 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 에피토프를 발현하는 암 세포를 향해 면역 이펙터 세포를 재지시하는 유전적으로 조작된 수용체가 제공된다. 이들 유전적으로 조작된 수용체 (본원에서 키메라 항원 수용체 (CAR)로 지칭됨)는 원하는 항원/에피토프에 대한 항체-기반 특이성을 T 세포 수용체-활성화 세포내 도메인과 조합하여 특이적 세포성 면역 활성을 나타내는 키메라 단백질을 생성하는 분자이다. 용어 "키메라"는 상이한 기원으로부터의 상이한 단백질 또는 DNA의 일부로 구성되는 것을 설명한다.
- [0041] 특정한 실시양태에서, 하기를 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)가 제공된다:

- [0042] a) 서열식별번호: 1의 중쇄 상보성 결정 영역 1 (CDRH1) 서열; 서열식별번호: 2의 중쇄 상보성 결정 영역 2 (CDRH2) 서열; 서열식별번호: 3의 중쇄 상보성 결정 영역 3 (CDRH3) 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하는 클라우딘-3 결합 도메인을 포함하는 세포의 도메인;
- [0043] b) 막횡단 도메인; 및
- [0044] c) 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인.
- [0045] CAR의 항원 결합 도메인과 표적 세포 표면 상의 표적 항원의 결합은 CAR의 클러스터링을 초래하고 CAR-함유 세포에 활성화 자극을 전달한다. CAR의 주요 특징은 면역 이펙터 세포 특이성을 제지시켜, 이에 의해 증식, 시토키인 생산, 식균작용, 또는 주요 조직적합성 (MHC) 독립적 방식으로 표적 항원 발현 세포의 세포 사멸을 매개할 수 있는 분자의 생산을 촉발하고, 모노클로날 항체, 가용성 리간드 또는 세포 특이적 공동-수용체의 세포 특이적 표적화 능력을 이용하는 능력이다.
- [0046] 세포의 도메인
- [0047] 다양한 실시양태에서, CAR은 항원 결합 도메인 (예를 들어, 클라우딘-3 특이적 결합 도메인)을 포함하는 세포의 결합 도메인; 막횡단 도메인; 하나 이상의 공동-자극 신호전달 도메인; 및 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0048] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "키메라 항원 수용체" ("CAR")는 세포의 항원 결합 도메인 (대개 모노클로날 항체 또는 이의 단편으로부터 유래됨, 예를 들어 단일-도메인 항체 (sdAb) 형태의 VH 도메인 또는 scFv 형태의 VH 도메인 및 VL 도메인), 및 임의로 스페이서 영역, 막횡단 영역, 및 하나 이상의 세포내 이펙터 도메인을 포함하는 조작된 수용체를 지칭한다. 특정한 실시양태에서, CAR은 항원 결합 도메인 및 세포내 신호전달 도메인 사이에 힌지 영역을 추가로 포함한다. CAR은 또한 세포의 결합 도메인, 막횡단 도메인, 공동-자극 도메인 및/또는 세포내 신호전달 도메인 중 임의의 것 사이에 힌지 도메인 또는 스페이서 도메인을 포함할 수 있다. CAR은 또한 키메라 T 세포 수용체 또는 키메라 면역수용체 (CIR)로 지칭되었다. CAR은 조혈 세포, 예컨대 T 세포에 유전적으로 도입되어 원하는 세포-표면 항원에 대한 T 세포 특이성을 제지시켜 CAR-T 치료제를 초래한다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "스페이서 도메인"은 막횡단 도메인을 세포의 항원/표적 결합 도메인에 연결하는 기능을 하는 올리고- 또는 폴리펩티드를 지칭한다. 이 영역은 또한 "힌지 도메인" 또는 "스토크 도메인"으로 지칭될 수 있다. 스페이서의 크기는 CAR:표적/항원 결합 시 최적의 기능을 갖기 위해 표적 에피토프의 위치에 따라 달라질 수 있다. 일부 경우에, 임의의 이론에 얽매이기를 원하지 않고, CAR:표적/항원 결합 시 설정된 거리 (예를 들어, 14nm)를 유지함으로써 최적의 기능이 달성될 수 있다.
- [0049] 특정한 실시양태에서, CAR은 다중 세포에 존재하지만 표적 세포, 예를 들어 암 세포에 대한 결합에만 접근가능하고/거나 이용가능한 에피토프에 특이적으로 결합하는 항원 결합 단백질을 포함하는 세포의 결합 도메인을 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "결합 도메인", "항원 결합 도메인", "세포의 도메인", "세포의 결합 도메인", "항원-특이적 결합 도메인" 및 "세포의 항원 특이적 결합 도메인"은 상호교환적으로 사용되며 관심 표적 항원/에피토프에 특이적으로 결합하는 능력을 갖는 CAR을 제공한다. 결합 도메인은 천연, 합성, 반합성 또는 재조합 공급원으로부터 유래될 수 있다.
- [0050] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "항원 결합 단백질"은 단백질, 항체, 항체 단편 (예를 들어, Fabs, scFv 등) 및 다른 항체 유래 단백질 구축물, 예컨대 표적 항원에 결합할 수 있는 도메인 항체 (dAb) 및 sdAb를 포함하는 것들을 지칭한다. 용어 "항원 결합 단백질" 및 "에피토프 결합 단백질"은 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 이는 천연 동족 리간드 또는 수용체를 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 클라우딘-3 (RVP1, HRVP1, C7orf1, CPE-R2, CPETR2로도 공지됨)에 결합할 수 있으며, 이는 "클라우딘-3 결합 단백질" 또는 "클라우딘-3 특이적 결합 단백질"로 지칭될 수 있다. "클라우딘-3 결합 단백질"은 단백질, 항체, 항체 단편 (예를 들어, Fabs, scFv 등) 및 다른 항체 유래 단백질 구축물, 예컨대 클라우딘-3, 바람직하게는 인간 클라우딘-3에 결합할 수 있는 도메인 (예를 들어, dAb, sdAb 등)을 포함하는 것들을 지칭한다.
- [0051] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "항원"은 항원 결합 단백질에 의해 선택적으로 인식되는 거대분자의 구조를 지칭한다. 항원은 단백질 (다당류가 있거나 없음) 또는 하나 이상의 T 세포 에피토프를 포함하는 단백질 조성물을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0052] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "에피토프"는 파라토프로도 공지된 항원 결합 단백질의 특정한 결합 도메인과 접촉하는 항원의 부분을 지칭한다. 에피토프는 선형 또는 입체형태적/불연속적일 수 있다. 입체형태적 또는

불연속적 에피토프는 다른 서열에 의해 분리된, 즉 항원의 1차 서열에서 연속 서열에 있지 않은 아미노산 잔기를 포함하며, 폴리펩티드 쇄의 3차 폴딩에 의해 어셈블리될 수 있다. 잔기가 폴리펩티드 쇄의 상이한 영역으로부터 유래될 수 있지만, 항원의 3차원 구조에서는 매우 근접해 있다. 다량체 항원의 경우, 입체형태적 또는 불연속적 에피토프는 상이한 펩티드 쇄로부터의 잔기를 포함할 수 있다. 에피토프 내에 포함된 특정한 잔기는 컴퓨터 모델링 프로그램을 통해 또는 관련 기술분야에 공지된 방법, 예컨대 X선 결정학을 통해 수득된 3차원 구조를 통해 결정될 수 있다. 에피토프 맵핑은 간행물, 예컨대 문헌 [Methods in Molecular Biology 'Epitope Mapping Protocols', Mike Schutkowski and Ulrich Reineke (volume 524, 2009)] 및 [Johan Rockberg and Johan Nilvebrant (volume 1785, 2018)]에 기재된 것들을 포함하나 이에 제한되지 않는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 다양한 기술을 사용하여 수행될 수 있다. 비제한적인 예시적인 방법은 펩티드-기반 접근법, 예컨대 펩스캔(pepscan)을 포함하며, 여기서 일련의 중복 펩티드는 기술, 예컨대 ELISA를 사용하여 또는 예를 들어 파지 상의 펩티드 또는 단백질 돌연변이체의 대규모 라이브러리의 시험관내 디스플레이에 의해 결합에 대해 스크리닝된다. 상세한 에피토프 정보는 X선 결정학, 용액 핵자기공명 (NMR) 분광법 및 극저온-전자 현미경법 (cryo-EM)을 포함하나 이에 제한되지 않는 구조적 기술에 의해 결정될 수 있다. 돌연변이유발, 예컨대 알려진 스캐닝은 결합 손실 분석을 에피토프 맵핑에 사용하는 또 다른 효과적인 접근법이다. 또 다른 방법은 불연속적 또는 입체형태적 에피토프를 특징화하기 위해 단백질분해 및 액체-크로마토그래피 질량 분광광도법 (LC-MS) 분석과 조합된 수소/중수소 교환 (HDX)이다.

- [0053] 특정한 실시양태에서, CAR의 세포외 결합 도메인은 항체 또는 이의 항원 결합 도메인을 포함한다.
- [0054] 용어 "항체"는 이뮤노글로불린-유사 도메인 (예를 들어 IgG, IgM, IgA, IgD 또는 IgE)을 갖는 분자를 지칭하기 위해 가장 넓은 의미로 본원에서 사용되며, 모노클로날, 재조합, 폴리클로날, 키메라, 인간, 인간화, 다중특이적 항체 (이중특이적 항체 포함), 및 이중접합체 항체; dAb, sdAb, 항원 결합 항체 단편, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, 디설피드 연결된 Fv, scFv, 디설피드-연결된 scFv, 디아바디, TANDABS 등 및 전술한 것 중 임의의 것의 변형된 버전 (대안적인 "항체" 형식의 요약에 대해, 문헌 [Holliger and Hudson 2005 Nature Biotechnology 23(9):1126-1136] 참조)을 포함한다.
- [0055] 본원에서 상호교환적으로 사용되는 완전한, 전체 또는 무손상 항체라는 용어는 대략 150,000 달톤의 분자량을 갖는 이종사량체 당단백질을 지칭한다. 무손상 항체는 공유결합적 디설피드 결합에 의해 연결된 2개의 동일한 중쇄 (HC) 및 2개의 동일한 경쇄 (LC)로 구성된다. 이 H<sub>2</sub>L<sub>2</sub> 구조는 폴딩되어 'Fab' 단편으로 공지된 2개의 항원-결합 단편 및 'Fc' 결정화가능 단편을 포함하는 3개의 기능적 도메인을 형성한다. Fab 단편은 아미노-말단에 있는 가변 도메인, 가변 중쇄 (VH) 또는 가변 경쇄 (VL), 및 카르복실 말단에 있는 불변 도메인, CH1 (중쇄) 및 CL (경쇄)로 구성된다. Fc 단편은 쌍형성된 CH2 및 CH3 영역의 이량체화에 의해 형성된 2개의 도메인으로 구성된다. Fc는 면역 세포 상의 수용체에 결합함으로써 또는 고전적인 보체 경로의 제1 구성성분인 C1q에 결합함으로써 이펙터 기능을 유발할 수 있다. 항체 IgM, IgA, IgG, IgE 및 IgD의 5개 클래스는 각각  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  및  $\delta$  라고 불리는 별개의 중쇄 아미노산 서열에 의해 정의되며, 각 중쇄는  $\kappa$  또는  $\lambda$  경쇄와 쌍형성할 수 있다. 혈청 내 항체의 대부분은 IgG 클래스에 속하며, 인간 IgG에는 4개 이소타입 (IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4)이 있으며, 이들의 서열은 주로 힌지 영역에서 상이하다.
- [0056] 완전한 인간 항체는 다양한 방법을 사용하여, 예를 들어 인간 항체의 레퍼토리를 생산할 수 있는 효모-기반 라이브러리 또는 트랜스제닉 동물 (예를 들어, 마우스)을 사용하여 수득될 수 있다. 관심 항원에 결합하는 표면에 인간 항체를 제시하는 효모는 FACS (형광-활성화 세포 분류) 기반 방법을 사용하여 또는 표지된 항원을 사용하여 비드 상에 포획에 의해 선택될 수 있다. 인간 이뮤노글로불린 유전자를 발현하도록 변형된 트랜스제닉 동물은 관심 항원 및 B 세포 분류 기술을 사용하여 단리된 항원-특이적 인간 항체로 면역화될 수 있다. 그 후, 이들 기술을 사용하여 생산된 인간 항체는 원하는 특성, 예컨대 친화성, 개발성 및 선택성에 대해 특징화될 수 있다.
- [0057] 대안적인 항체 형식은 항원 결합 단백질의 하나 이상의 CDR이 적합한 비-이뮤노글로불린 단백질 스캐폴드 또는 골격, 예컨대 아피바디, SpA 스캐폴드, LDL 수용체 클래스 A 도메인, 아비머 (예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 2005/0053973, 2005/0089932 및 2005/0164301 참조) 또는 EGF 도메인 상에 배열될 수 있는 대안적인 스캐폴드를 포함한다.
- [0058] 본 명세서 전반에 걸쳐, 전장 항원 결합 서열 내, 예를 들어 항체 중쇄 서열 또는 항체 경쇄 서열 내의 가변 도메인 서열 및 가변 도메인 영역의 아미노산 잔기는 카바트(Kabat) 넘버링 관례에 따라 넘버링된다. 유사하게는, 실시예에서 사용된 용어 "CDR", "CDRL1", "CDRL2", "CDRL3", "CDRH1", "CDRH2" 및 "CDRH3"은 카바

트 넘버링 관례를 따른다. 추가 정보에 대해서는, 문헌 [Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4<sup>th</sup> Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)]을 참조한다.

[0059] 가변 도메인 서열 및 전장 항체 서열의 아미노산 잔기에 대한 대안적인 넘버링 관례가 있음이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 또한, CDR 서열에 대한 대안적인 넘버링 관례, 예를 들어 문헌 [Chothia *et al.*, 1989 Nature 342(6252):877-83]에 제시된 관례가 있다. 항원 결합 단백질의 구조 및 단백질 폴딩은 다른 잔기가 CDR 서열의 일부로 간주되고 통상의 기술자에 의해 그렇게 이해될 것임을 의미할 수 있다.

[0060] 통상의 기술자에게 이용가능한 CDR 서열에 대한 다른 넘버링 관례는 "AbM" (배스대학교) 및 "접촉" (유니버시티 칼리지 런던) 방법을 포함한다. 카바트, 코티아(Chothia), AbM 및 접촉 방법 중 적어도 2개를 사용하여 최소 중복 영역을 결정하여 "최소 결합 단위"를 제공할 수 있다. 최소 결합 단위는 CDR의 하위-부분일 수 있다.

[0061] 하기 표 1은 각 CDR 또는 결합 단위에 대해 각 넘버링 관례를 사용하는 하나의 정의를 나타낸다. 카바트 넘버링 방식은 가변 도메인 아미노산 서열의 넘버링을 위해 하기 표 1에서 사용된다. CDR 정의 중 일부는 사용된 개별 간행물에 따라 다를 수 있다는 점에 주목해야 한다.

[0062] 표 1

	카바트 CDR	코티아 CDR	AbM CDR	접촉 CDR	최소 결합 단위
H1	31-35/35A/ 35B	26-32/33/34	26-35/35A/35B	30-35/35A/35B	31-32
H2	50-65	52-56	50-58	47-58	52-56
H3	95-102	95-102	95-102	93-101	95-101
L1	24-34	24-34	24-34	30-36	30-34
L2	50-56	50-56	50-56	46-55	50-55
L3	89-97	89-97	89-97	89-96	89-96

[0063]

예시적인 클라우딘-3 결합 단백질은 하기 CDR 중 어느 하나 또는 이들의 조합을 포함한다:

[0065] 서열식별번호: 1의 CDRH1;

[0066] 서열식별번호: 2의 CDRH2;

[0067] 서열식별번호: 3의 CDRH3;

[0068] 서열식별번호: 4의 CDRL1;

[0069] 서열식별번호: 5의 CDRL2; 및/또는

[0070] 서열식별번호: 6의 CDRL3,

[0071] 또는

[0072] 서열식별번호: 7로부터의 CDRH1, CDRH2, CDRH3; 및/또는

[0073] 서열식별번호: 8로부터의 CDRL1, CDRL2, CDRL3,

[0074] 또는

[0075] 서열식별번호: 7로부터의 CDRH1, CDRH2, CDRH3; 및

[0076] 서열식별번호: 8로부터의 CDRL1, CDRL2, CDRL3.

[0077] CDR은 적어도 하나의 아미노산 치환, 결실 또는 첨가에 의해 변형될 수 있으며, 여기서 변이체 항원 결합 단백질은 비변형된 단백질의 생물학적 특징을 실질적으로 보유한다.

[0078] CDR H1, H2, H3, L1, L2, L3 각각은 단독으로 또는 임의의 다른 CDR과 조합하여, 임의의 순열 또는 조합으로 변형될 수 있음이 이해될 것이다. 한 실시양태에서, CDR은 최대 3개 아미노산, 예를 들어 1 또는 2개 아미노산, 예를 들어 1개 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가에 의해 변형된다. 전형적으로, 변형은 치환, 특히 보존적 치환, 예를 들어 하기 표 2에 제시된 바와 같은 보존적 치환이다.

[0079] 표 2

중쇄	구성원
소수성	Met, Ala, Val, Leu, Ile
중성 친수성	Cys, Ser, Thr
산성	Asp, Glu
염기성	Asn, Gln, His, Lys, Arg
쇄 배향에 영향을 미치는 잔기	Gly, Pro
방향족	Trp, Tyr, Phe

[0080]

예를 들어, 변이체 CDR에서, 대안적인 정의(들), 예를 들어 카바트 또는 코티아의 일부로서 CDR을 포함하는 플랭킹 잔기는 보존적 아미노산 잔기로 치환될 수 있다.

[0082]

상기 기재된 바와 같은 변이체 CDR을 포함하는 이러한 항원 결합 단백질은 본원에서 "기능적 CDR 변이체"로 지칭될 수 있다.

[0083]

한 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 서열식별번호: 1의 중쇄 상보성 결정 영역 1 (CDRH1) 서열; 서열식별번호: 2의 중쇄 상보성 결정 영역 2 (CDRH2) 서열; 서열식별번호: 3의 중쇄 상보성 결정 영역 3 (CDRH3) 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함한다. 한 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 서열식별번호: 4의 경쇄 상보성 결정 영역 1 (CDRL1) 서열; 서열식별번호: 5의 경쇄 상보성 결정 영역 2 (CDRL2) 서열; 서열식별번호: 6의 경쇄 상보성 결정 영역 3 (CDRL3) 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 추가로 포함한다. 특정한 실시양태에서, 본원에 제공된 CAR의 세포의 도메인은 본원에 개시된 클라우딘-3 결합 단백질을 포함한다.

[0084]

한 실시양태에서, 본 개시내용의 클라우딘-3 결합 단백질은 인간 클라우딘-3 및 또 다른 종으로부터의 클라우딘-3, 예컨대 마우스 클라우딘-3 및/또는 시노물구스 원숭이 클라우딘-3 간의 교차-반응성을 나타낸다. 한 실시양태에서, 본원에 기재된 클라우딘-3 결합 단백질은 인간, 시노물구스 원숭이 및 무린 클라우딘-3에 특이적으로 결합한다. 이는 약물 개발이 전형적으로 인간에서 약물을 테스트하기 전에 마우스 시스템에서 선도 약물 후보의 테스트를 필요로 하기 때문에 특히 유용하다. 인간 및 마우스 종에 결합할 수 있는 약물의 제공은 이들 시스템에서 결과를 테스트하도록 허용하고 동일한 약물을 사용하여 데이터를 나란히 비교할 수 있다. 이는 마우스 클라우딘-3에 대해 작용하는 약물 및 인간 클라우딘-3에 대해 작용하는 별도의 약물을 찾아야 하는 복잡성을 회피하고, 또한 동일하지 않은 약물을 사용하여 인간 및 마우스에서의 결과를 비교할 필요성을 회피한다. 질환 모델에서 사용되는 다른 종, 예컨대 개 또는 원숭이, 예컨대 시노물구스 원숭이 간의 교차 반응성이 또한 예상된다.

[0085]

"항원 결합 도메인"은 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 단백질 상의 도메인을 지칭하며, 이는 단일 가변 도메인일 수 있거나, 표준 항체에서 발견될 수 있는 쌍형성된 VH/VL 도메인일 수 있다. sdAb 또는 scFv 도메인은 또한 항원-결합 부위를 제공할 수 있다. 한 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 클라우딘-3 결합 단백질이다. 한 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 sdAb이고, 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함한다. 한 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 scFv이고, 중쇄 가변 영역 (VH) 및 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함한다. 일부 실시양태에서, VL은 VH의 N-말단에 위치되거나, 또는 VH는 VL의 N-말단에 위치된다. 일부 실시양태에서, VL 및 VH는 펩티드 결합을 통해 서로 직접적으로 융합되거나 또는 펩티드 링커를 통해 서로 연결된다.

[0086]

상이한 경쇄 또는 중쇄의 프레임워크 영역의 서열은 중, 예컨대 인간 내에서 상대적으로 보존된다. 구성적 경쇄 및 중쇄의 조합된 프레임워크 영역인 항체의 프레임워크 영역은 3차원 공간에서 CDR을 위치시키고 정렬하는 역할을 한다. CDR은 주로 항원의 에피토프에 대한 결합을 담당한다.

[0087]

"모노클로날 항체"는 B 림프구의 단일 클론에 의해 또는 단일 항체의 경쇄 및 중쇄 유전자가 형질감염된 세포에 의해 생산되는 항체이다. 모노클로날 항체는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법에 의해, 예를 들어 골수종 세포와 면역 비장 세포의 융합으로부터 하이브리드 항체-형성 세포를 제조함으로써 생산된다. 모노클로날 항체는 인간화 모노클로날 항체를 포함한다.

[0088]

"키메라 항체"는 수용자 Ab로부터 유래된 경쇄 및 중쇄 불변 영역과 회합하여 공여자 Ab로부터 유래된 자연 발생 가변 영역 (경쇄 및 중쇄)을 함유하는 조작된 Ab의 유형이다. 그러므로, 특정 실시양태에서, 본원에서 고려되는 CAR은 키메라 항체 또는 이의 항원 결합 도메인인 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0089]

일부 실시양태에서, 항체는 인간 클라우딘-3 단백질에 특이적으로 결합하는 인간 항체 (예컨대 인간 모노클로날 항체) 또는 이의 단편이다.

[0090]

한 실시양태에서, CAR은 "인간화" 항체 또는 항체 결합 단편을 포함한다. "인간화 항체"는 비인간 공여자 이뮤

노글로불린으로부터 유래된 CDR을 갖는 조작된 항체의 유형을 지칭하며, 분자의 나머지 이뮤노글로불린-유래 부분은 하나 (또는 그 초과)의 인간 이뮤노글로불린(들)으로부터 유래된다. 또한, 프레임워크 지지체 잔기는 결합 친화성을 보존하기 위해 변경될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Queen, et al., Proc. Natl Acad Sci USA, 1989; 86(24): 10029-10032] 및 [Hodgson, et al., Biotechnology, 1991; 9(5): 421-5] 참조). 적합한 인간 수용자 항체는 공여자 항체의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열에 대한 상동성에 의해 통상적인 데이터베이스, 예를 들어 카바트 데이터베이스, 로스 알라모스(Los Alamos) 데이터베이스 및 스위스 프로테인(Swiss Protein) 데이터베이스로부터 선택될 수 있다. 공여자 항체의 프레임워크 영역에 대한 상동성 (아미노산 기준)에 의해 특징화된 인간 항체는 공여자 CDR의 삽입을 위한 중쇄 불변 영역 및/또는 중쇄 가변 프레임워크 영역을 제공하는데 적합할 수 있다. 경쇄 불변 또는 가변 프레임워크 영역을 공여할 수 있는 적합한 수용자 항체는 유사한 방식으로 선택될 수 있다. 수용자 항체 중쇄 및 경쇄가 동일한 수용자 항체로부터 유래할 필요는 없다는 점에 주목해야 한다. 이러한 인간화 항체를 생산하는 방법의 비제한적인 예는 EP-A-0239400 및 EP-A-054951에 자세히 설명되어 있다.

[0091] 쿼리 핵산 서열 및 대상체 핵산 서열 간의 "퍼센트 동일성"은 백분율로서 표현되는 "동일성" 값이며, 이는 적합한 알고리즘 또는 소프트웨어, 예컨대 BLASTN, FASTA, ClustalW, MUSCLE, MAFFT, EMBOSS Needle, T-Coffee, 및 DNASTAR Lasergene을 사용하여 쌍별 글로벌 서열 정렬을 수행한 후 쿼리 서열의 전체 길이에 걸쳐 적합한 알고리즘 또는 소프트웨어, 예컨대 BLASTN, FASTA, DNASTAR Lasergene, GeneDoc, Bioedit, EMBOSS needle 또는 EMBOSS infoalign을 사용하여 계산된다. 중요하게도, 쿼리 핵산 서열은 본원의 하나 이상의 청구항에서 식별된 핵산 서열에 의해 설명될 수 있다.

[0092] 쿼리 아미노산 서열 및 대상체 아미노산 서열 간의 "퍼센트 동일성"은 백분율로서 표현되는 "동일성" 값이며, 이는 적합한 알고리즘/소프트웨어, 예컨대 BLASTP, FASTA, ClustalW, MUSCLE, MAFFT, EMBOSS Needle, T-Coffee, 및 DNASTAR Lasergene을 사용하여 쌍별 글로벌 서열 정렬을 수행한 후 쿼리 서열의 전체 길이에 걸쳐 적합한 알고리즘 또는 소프트웨어, 예컨대 BLASTP, FASTA, DNASTAR Lasergene, GeneDoc, Bioedit, EMBOSS needle 또는 EMBOSS infoalign을 사용하여 계산된다. 중요하게도, 쿼리 아미노산 서열은 본원의 하나 이상의 청구항에서 식별된 아미노산 서열에 의해 설명될 수 있다.

[0093] 쿼리 서열은 대상체 서열과 100% 동일할 수 있거나, % 동일성이 100% 미만인 되도록 대상체 서열과 비교하여 특정 정수까지의 아미노산 또는 뉴클레오티드 변경을 포함할 수 있다. 예를 들어, 쿼리 서열은 대상체 서열과 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하다. 이러한 변경은 적어도 하나의 아미노산 결실, 치환 (보존적 및 비보존적 치환 포함) 또는 삽입을 포함하며, 여기서 상기 변경은 쿼리 서열의 아미노- 또는 카르복시-말단 위치 또는 이들 말단 위치 사이 어디에서나 발생할 수 있으며, 쿼리 서열 내의 아미노산 또는 뉴클레오티드 사이에 개별적으로 또는 쿼리 서열 내의 하나 이상의 인접 그룹에 산재된다.

[0094] 퍼센트 (%) 동일성은 CDR을 포함하여 쿼리 서열의 전체 길이에 걸쳐 결정될 수 있다. 대안적으로, 퍼센트 동일성은 CDR 중 하나 이상 또는 모두를 배제할 수 있으며, 예를 들어 모든 CDR은 대상체 서열과 100% 동일하고, 퍼센트 동일성 변동은 쿼리 서열의 나머지 부분, 예를 들어 프레임워크 서열에 있으므로 CDR 서열은 고정되고 무손상이다.

[0095] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본원에 개시된 VH 및/또는 VL 도메인이 예를 들어 sdAb 또는 scFv의 형태로 CAR-T 치료제에 혼입될 수 있음을 이해할 것이다.

[0096] 조직 구조의 해체는 암의 특징이며, 그에 따른 세포-세포 이음부의 파괴는 암성 조직 및 암 세포에서 에피토프에 접근가능/이용가능하게 만들 수 있으며 그렇지 않으면 조직화된 또는 건강한 조직에 '숨겨진' 상태로 남아있을 것이다 [Corsini *et al.* (2018) Oncotarget]. 세포-세포 접촉의 변경은 또한 세포 극성의 손실 및 수많은 세포외 신호, 예컨대 성장 인자로부터의 신호의 노출을 유발한다 (정점-기저 극성의 부재 하에, 정점 도메인에서 뿐만 아니라 성장 신호를 받는 상피 세포는 유사분열 축의 잘못된 배향에 의해 촉진된 평면 외 분열에 의해 증식하는 경향이 있음).

[0097] 일부 실시양태에서, CAR은 세포-세포 이음부 내에 위치한 세포 이음부 단백질 (예를 들어, 클라우딘-3)의 적어도 하나의 에피토프에 결합하는 항원 결합 단백질을 포함하는 세포외 도메인을 포함하며, 여기서 세포 이음부 단백질 (예를 들어, 클라우딘-3)의 상기 적어도 하나의 에피토프는 세포 이음부 단백질이 세포-세포 이음부 외부에 잘못 편재화되고 이에 의해 세포 표면에 노출되는 경우에만 상기 CAR 세포외 도메인에 의한 결합에 접근가능하다. 세포-세포 이음부 외부에 잘못 편재화된 세포 이음부 단백질은 세포 이음부 단백질이 세포-세포 이음부, 예를 들어 치밀 이음부에 국한되지 않도록 세포 이음부 단백질의 비정상적인 편재화를 지칭한다. 예시적인

고 비제한적인 예로서, 세포 이음부 단백질 (예를 들어, 클라우딘-3)은 암에서 세포-세포 이음부 외부에 잘못 편재화되고 본원에 개시된 CAR 또는 항체에 의해 인식되고 결합될 수 있는 세포 표면에 노출된다. 대조적으로, 치밀 이음부 내에 위치한 세포 이음부 단백질 (예를 들어, 클라우딘-3)은 건강한 또는 비암성 조직의 치밀 이음부에 적절하게 국한되어, 이에 의해 세포 이음부 단백질을 표적화하는 CAR 또는 항체에 의한 접근을 금지한다.

[0098] 그러므로, 본원에 기재된 CAR에 의해 표적화되는 에피토프는 건강한 (비암성) 세포 및 암 세포 둘 다에서 발견되는 세포 이음부 단백질 상에서 발견된다. 그러나, CAR 세포의 도메인의 항원 결합 단백질에 의해 결합된 세포 이음부 단백질의 에피토프(들)는 상기 에피토프(들)가 잘못 편재화되거나 세포 이음부 단백질을 세포 표면 (예를 들어, 암 세포 또는 해체된 조직의 세포)에 노출시키는 세포-세포 이음부 외부에 제시되는 경우 결합에 이용가능하고/거나 접근가능하다. 대안적으로, CAR 세포의 도메인의 항원 결합 단백질에 의해 결합된 에피토프(들)는 세포-세포 이음부가 손상 (예를 들어, 누출) 또는 파괴되는 경우 암 세포에서의 결합에 이용가능하고/거나 접근가능하다. 예를 들어, 건강한 비암성 세포 또는 조직화된 조직 내의 세포에서, 하나 이상의 에피토프는 CAR 세포의 도메인, 항체 또는 항원 결합 단편이 상기 에피토프에 결합하는 것을 차단되도록 세포-세포 이음부 내에 위치되므로 숨겨질 수 있다. 그러므로, 건강한 비암성 세포에서 또는 건강한 비암성 세포 사이의 세포-세포 이음부에서 또는 조직화된 조직 내의 세포 사이에 위치한 세포-세포 이음부에서, 하나 이상의 에피토프는 CAR 세포의 도메인에 의한 결합에 접근불가능한/이용불가능하다.

[0099] 따라서, 임의의 특정한 이론에 얽매이기를 원하지 않고, 본원에 기재된 CAR 세포의 도메인은 건강한 비암성 세포 및 암 세포 둘 다에 존재하는 하나 이상의 에피토프에 결합하지만 상기 에피토프는 암 세포 또는 해체된 조직의 세포 사이에서 상기 결합에만 접근가능하고/거나 이용가능하다고 가설을 세운다 (도 1 참조). CAR 세포의 결합 도메인에 의한 결합에 대한 이러한 접근 및 이용가능성은 예를 들어 세포 이음부 단백질에서 매립된 루프를 언폴딩함으로써 또는 건강한 비암성 세포 또는 조직화된 조직에서 매우 근접하게 발견되지 않는 암 세포 아미노산에서 함께 가져오으로써 CAR 세포의 도메인이 결합하는 하나 이상의 에피토프의 형성 또는 노출을 초래하는 세포 이음부 단백질의 입체형태적 변화로 인한 것일 수 있다. 대안적으로, 이용가능성 및/또는 접근은 건강한 비암성 세포 또는 조직화된 조직과 비교하여 암 세포에서 세포 이음부 단백질이 결합 파트너와 복합체를 형성하거나 결합되지 않기 때문일 수 있다. 세포-세포 이음부 내에 위치한 세포 이음부 단백질은 이와 관련하여 CAR로 표적화하기에 특히 매력적인 에피토프를 포함할 수 있으며, 조직화된 조직의 무손상 또는 손상되지 않은 (예를 들어, 비파괴된) 세포-세포 이음부는 CAR에 의한 접근을 방지하고 상기 에피토프를 결합에 접근불가능하고/거나 이용불가능하게 만든다는 것이 이해될 것이다.

[0100] 그러므로, 특정 실시양태에서, 하나 이상의 에피토프는 건강한 비암성 세포에 존재하고, CAR 세포의 도메인에 의한 결합에 접근불가능하고/거나, 하나 이상의 에피토프는 세포-세포 이음부에 위치되고, 상기 세포-세포 이음부가 건강한 비암성 세포 사이에 있을 때 CAR 세포의 도메인에 의한 결합에 접근불가능하다. 추가 실시양태에서, CAR 세포의 도메인은 건강한 비암성 세포에서 하나 이상의 에피토프에 결합하는 것이 입체적으로 방해되고/거나, 건강한 비암성 세포 사이의 세포-세포 이음부에 위치한 하나 이상의 에피토프에 결합하는 것이 입체적으로 방해된다.

[0101] 그러므로, 한 실시양태에서, 세포-세포 이음부는 조직화된 조직의 세포 사이, 예를 들어 건강한 비암성 세포 사이에 존재하는 세포-세포 이음부와 비교하여 해체된 조직의 세포 사이 또는 암 세포 사이에서 파괴, 예컨대 파괴된다. 추가 실시양태에서, 세포-세포 이음부는 해체된 조직 내의 세포 사이, 암 세포 사이, 또는 암 세포 및 건강한 비암성 세포 사이에서 손상, 예컨대 손상된다. 따라서, 용어 "손상된" 및 "파괴된"은 본원에서 상호교환적으로 사용될 수 있으며, 세포-세포 이음부가 물리적으로 파괴되는 경우 (예컨대 이의 구조가 변경되는 경우), 및/또는 세포-세포 이음부가 기능적으로 손상되는 경우 (예를 들어 증가된 '누출성'을 갖는 경우)를 포함한다는 것이 이해될 것이다. 또 다른 추가 실시양태에서, 세포-세포 이음부는 상기 이음부 내에 포함된 단백질이 잘못 편재화된 경우 손상되고/거나 파괴된다. 또 다른 실시양태에서, 세포-세포 이음부 내에 포함된 단백질은 상기 이음부가 손상되고/거나 파괴되는 경우 잘못 편재화된다.

[0102] 임의의 특정한 이론에 얽매이기를 원하지 않고, 구조적으로 파괴된 세포-세포 이음부는 대개 비파괴된 세포-세포 이음부에 '숨겨진' 에피토프가 결합에 접근가능/이용가능하게 되도록 (예를 들어, 결합에 입체적으로 접근가능/이용가능하게 되도록) 초래 (예를 들어, 노출)할 수 있고/거나, 기능적으로 손상된 (예를 들어, 증가된 '누출성'을 갖는) 세포-세포 이음부는 상기 세포-세포 이음부를 통한 림프구의 증가된 침입/통과를 허용하여, 그러므로 예를 들어 CAR에 혼입된 항원 결합 단백질을 포함하는 항원 결합 단백질에 의한 결합에 대한 특정 에피토프의 접근가능성/이용가능성을 초래할 수 있다는 가설을 세운다.

- [0103] 한 실시양태에서, 하나 이상의 에피토프는 세포-세포 이음부가 파괴되지 않은 경우, 예컨대 세포-세포 이음부가 건강한 비암성 세포 사이 또는 조직화된 조직 내의 세포 사이에 있는 경우 CAR 세포의 도메인에 의한 결합에 접근불가능/이용불가능하다 (도 1, 좌측 패널 참조). 또 다른 실시양태에서, 하나 이상의 에피토프는 세포-세포 이음부가 파괴되는 경우, 예컨대 세포-세포 이음부가 암 또는 종양 세포 사이에 있거나 세포-세포 이음부가 건강한 비암성 세포 및 암 세포 사이, 또는 해체된 조직 내의 세포 사이에 있는 경우 CAR 세포의 도메인에 의한 결합에 접근가능/이용가능하다 (도 1, 우측 패널 참조). 추가 실시양태에서, 하나 이상의 에피토프는 세포-세포 이음부가 파괴되는 경우에만, 예컨대 세포-세포 이음부가 암 또는 종양 세포 사이에 있거나 세포-세포 이음부가 건강한 비암성 세포 및 암 또는 종양 세포 사이 또는 해체된 조직 내의 세포 사이에 있는 경우에만 CAR 세포의 도메인에 의한 결합에 접근가능/이용가능하다.
- [0104] 추가 실시양태에서, 하나 이상의 에피토프는 세포-세포 이음부가 손상되지 않은 경우, 예컨대 세포-세포 이음부가 건강한 비암성 세포 사이 또는 조직화된 조직 내의 세포 사이에 있는 경우 CAR 세포의 도메인에 의한 결합에 접근불가능/이용불가능하다. 또 다른 실시양태에서, 하나 이상의 에피토프는 세포-세포 이음부가 손상되는 경우, 예컨대 세포-세포 이음부가 암 또는 종양 세포 사이에 있거나, 세포-세포 이음부가 건강한 비암성 세포 및 암 세포 사이에 있거나, 또는 세포-세포 이음부가 해체된 조직 내의 세포 사이에 있는 경우 CAR 세포의 도메인에 의한 결합에 접근가능/이용가능하다. 추가 실시양태에서, 하나 이상의 에피토프는 세포-세포 이음부가 손상되는 경우에만, 예컨대 세포-세포 이음부가 암 또는 종양 세포 사이에 있거나, 세포-세포 이음부가 건강한 비암성 세포 및 암 세포 사이에 있거나, 또는 세포-세포 이음부가 해체된 조직 내의 세포 사이에 있는 경우에만 CAR 세포의 도메인에 의한 결합에 접근가능/이용가능하다.
- [0105] 암과 관련해서만 결합에 접근가능하고/거나 이용가능한 에피토프의 추가 예는 건강한 비암성 세포와 비교하여 암 세포에서 잘못 편재화된 세포 구성성분 (예를 들어, 세포 이음부 단백질)에 존재하는 것들을 포함한다. 이러한 잘못된 편재화는 세포 구성성분의 과발현 또는 상향조절, 돌연변이, 단백질의 번역후 변형에 대한 변화, 세포 분극화에 대한 변화 및/또는 조직 해체의 결과일 수 있다. 그러므로, 일부 실시양태에서, 하나 이상의 에피토프는 세포-세포 이음부가 잘못 편재화되지 않은 표적 에피토프를 함유하는 세포 이음부 단백질을 포함하는 경우, 예컨대 세포-세포 이음부가 건강한 비암성 세포 사이 또는 조직화된 조직 내의 세포 사이에 있는 경우 CAR 세포의 도메인에 의한 결합에 접근불가능/이용불가능하다. 추가 실시양태에서, 하나 이상의 에피토프는 세포-세포 이음부가 잘못 편재화된 표적 에피토프를 함유하는 세포 이음부 단백질을 포함하는 경우, 예컨대 세포-세포 이음부가 암 또는 종양 세포 사이에 있거나, 세포-세포 이음부가 건강한 비암성 세포 및 암 또는 종양 세포 사이에 있거나, 또는 세포-세포 이음부가 해체된 조직 내의 세포 사이에 있는 경우 CAR 세포의 도메인에 의한 결합에 접근가능/이용가능하다. 다른 실시양태에서, 하나 이상의 에피토프는 세포-세포 이음부가 잘못 편재화된 표적 에피토프를 함유하는 세포 이음부 단백질을 포함하는 경우에만, 예컨대 세포-세포 이음부가 암 또는 종양 세포 사이에 있거나, 세포-세포 이음부가 건강한 비암성 세포 및 암 세포 사이에 있거나, 또는 세포-세포 이음부가 해체된 조직 내의 세포 사이에 있는 경우에만 CAR 세포의 도메인에 의한 결합에 접근가능/이용가능하다. 또 다른 추가 실시양태에서, 하나 이상의 에피토프는 세포-세포 이음부가 세포-세포 이음부 외부에 잘못 편재화된 표적 에피토프를 함유하는 세포 이음부 단백질을 포함하는 경우에만, 예컨대 세포-세포 이음부가 암 세포 사이에 있거나, 세포-세포 이음부가 건강한 세포 및 암 세포 사이에 있거나, 또는 세포-세포 이음부가 그렇지 않으면 조직 내의 세포 사이에 손상 또는 파괴, 예컨대 해체되는 경우에만 CAR 세포의 도메인에 의한 결합에 접근가능/이용가능하다.
- [0106] 그러므로, 이해되는 바와 같이, 용어 "접근가능한" 및 "이용가능한"은 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 건강한 비암성 세포와 비교하여 암 세포 상의 에피토프의 공간적 및/또는 입체적 접근가능성/이용가능성 또는 에피토프의 발현을 지칭할 수 있다. 유사하게는, 용어 "접근불가능한" 및 "이용불가능한"은 또한 본원에서 상호교환적으로 사용된다.
- [0107] 특정한 실시양태에서, 하나 이상의 에피토프는 치밀 이음부 내에 위치한 세포 이음부 단백질에 존재한다.
- [0108] 치밀 이음부 (폐색 이음부 또는 폐쇄 소대로도 공지됨)는 상피 세포 사이의 다중단백질 복합체이며, 이의 일반적인 기능은 상피 장벽을 가로질러 수송된 용질 및 물의 누출을 방지하고 세포주위 경로를 밀봉하는 것이다. 이들은 또한 소분자, 예컨대 양이온, 음이온 또는 물에 대한 선택적 채널을 형성함으로써 누출 경로를 제공할 수 있으며, 상피 장벽이 '치밀' 또는 '누출'로서 분류되는지 여부는 세포 사이의 치밀 이음부가 용질 및 물의 이동을 방지하는 능력에 의존한다. '치밀' 상피 장벽의 비제한적인 예는 혈액-뇌 장벽이며, '누출' 상피 장벽의 비제한적인 예는 신장 근위 세뇨관에 있다. 따라서, 치밀 이음부는 상피 장벽을 형성하기 위해 세포를 함께 유지하는 기능을 할 뿐만 아니라, 인접한 세포막 사이의 공간을 통한 분자 및 이온의 통과를 방지/제어할 뿐만

아니라, 정점 및 측면/기저 표면 사이의 세포막 구성성분의 측면 확산을 방지함으로써 세포의 극성을 유지한다.

- [0109] 치밀 이음부는 각 가닥이 다른 가닥과 독립적으로 작용하는 밀봉 가닥의 분기 네트워크로 구성된다. 각 가닥은 상피 세포의 원형질막에 매립된 일련의 막횡단 단백질로부터 형성되며, 세포의 도메인은 서로 직접 연결된다. 치밀 이음부에는 적어도 40개의 상이한 단백질이 발견되며, 이들은 막횡단 및 세포질 단백질 둘 다를 포함한다. 치밀 이음부에서 발견되는 세 가지 주요 막횡단 단백질은 오클루딘, 클라우딘 및 이음부 접착 분자 (JAM) 단백질이다. 이들은 세포골격의 액틴 구성성분에 가닥을 고정시키는 원형질막의 세포내 측면에 위치된 ZO-1과 같은 상이한 말초 막 단백질과 회합한다. 이러한 방식으로, 치밀 이음부는 인접한 세포의 세포골격을 함께 연결한다.
- [0110] 오클루딘은 세포 대사의 특정 측면, 예컨대 글루코스 흡수, ATP 생산 및 유전자 발현에 영향을 미치는 NADH 옥시다제이다. 또한, 이는 치밀 이음부 단백질 1, 치밀 이음부 단백질 2 및 YES1과 상호작용하는 것으로 나타난 치밀 이음부의 기능에 중요하며, 치밀 이음부의 어셈블리에는 필요하지 않지만, 장벽 특성의 유지에 역할을 한다. 오클루딘의 돌연변이 또는 부재는 상피 누출성을 증가시키고, 오클루딘의 손실 또는 비정상적인 발현은 유방암 조직에서 증가된 침입, 감소된 접착 및 유의하게 감소된 치밀 이음부 기능을 유발하는 것으로 나타났다.
- [0111] 클라우딘은 많은 유기체에서 발견되는 작은 (20-27 kDa) 막횡단 단백질이다. 클라우딘은 세포막을 4번 가로지르며 (즉, 4개의 막횡단 도메인을 가짐), N- 및 C-말단은 둘 다 세포질에 위치되며 2개의 세포의 루프는 가장 높은 정도의 보존을 나타낸다. 제1 세포의 루프 (ECL1)는 길이가 대략 53개 아미노산이고, 제2 세포의 루프 (ECL2)는 길이가 대략 24개 아미노산이다. ECL1은 세포주위 이온 선택성을 제어하고 ECL2는 치밀 이음부 내에서 인접한 클라우딘 단백질과의 동종- 및 이종이량체화를 제어한다. N-말단 종결부는 대개 짧은 반면 (예를 들어, 4-10개 아미노산), C-말단 종결부는 더 길고, 길이가 예를 들어 21-63개 아미노산으로 다양하며, 치밀 이음부에서 이들 단백질의 편재화에 필요하다. 개별 또는 별도의 클라우딘의 시스테인이 디설피드 결합을 형성하는 것으로 의심된다. 모든 인간 클라우딘 (클라우딘 12 예외)은 스캐폴드 단백질의 PDZ 도메인에 결합하도록 허용하는 도메인을 갖는다.
- [0112] 이음부 접착 분자 (JAM) 단백질은 높은 내피 세포 사이의 치밀 이음부에 위치되며, 이들 이음부의 형성에 관여할 뿐만 아니라 면역 세포에 대한 접착성 리간드로서 기능한다. 이는 또한 PAR-3 및 JAM3과의 상호작용을 통해 내피 세포 극성에 연루되어 있다.
- [0113] 한 실시양태에서, 세포 이음부 단백질은 클라우딘 패밀리의 단백질의 구성원이고, 예를 들어 하기 중 어느 하나로부터 선택된다: 클라우딘-1, 클라우딘-2, 클라우딘-3, 클라우딘-4, 클라우딘-5, 클라우딘-6, 클라우딘-7, 클라우딘-8, 클라우딘-9, 클라우딘-10a, 클라우딘-10b, 클라우딘-11, 클라우딘-12, 클라우딘-14, 클라우딘-15, 클라우딘-16, 클라우딘-17, 클라우딘-18, 클라우딘-19, 클라우딘-20, 클라우딘-22, 클라우딘-23 및 클라우딘-25, 또는 관련 클라우딘 도메인 함유 1, 클라우딘 도메인 함유 2, 막횡단 단백질 204 및 말초 미엘린 단백질 22.
- [0114] 또 다른 추가 실시양태에서, 세포 이음부 단백질은 클라우딘-3이다. 특정한 실시양태에서, 세포 이음부 단백질은 인간 클라우딘-3 (예를 들어, 서열식별번호: 13에 제시된 바와 같은 인간 클라우딘-3)이다.
- [0115] 클라우딘-3 (CLDN3으로도 공지됨)은 CLDN3 유전자에 의해 인간에서 코딩되며, 치밀 이음부의 내재성 구성성분일 뿐만 아니라 또한 클로스트리디움 페르프린젠스(*Clostridium perfringens*) 엔테로톡신에 대한 저친화성 수용체이다. 이는 CLDN1 및 CLDN5와 상호작용하는 것으로 나타났으며 인간 클라우딘-3은 하기 아미노산 서열을 갖는다:
- [0116] MSMGLEITGTALAVLGLWLTIVCCALPMWRVSAFIGSNIITSQNIWEGLWMNCVVQSTGQMCKVYDSSLALPQDLQAARALIVVAILLAAFGLLVALVGAQCTNCVQDDTAKAKITIVAGVLFLLAALLTLVPVSWSANTIIRDFYNPVVPEAQKREMGAGLYVGVAAAAALQLLGGALLCCSCPPREKKYTATKVVYSAPRSTGPGASLGTGYDRKDYV (서열식별번호: 13).
- [0117] 상기 굵게 밑줄 친 잔기는 N38 및 E153을 나타낸다. 추가 실시양태에서, 하나 이상의 에피토프는 세포 이음부 단백질의 하나 이상의 세포의 루프에 존재한다. 일부 실시양태에서, 상기 세포의 루프는 하기 서열을 포함하는 인간 클라우딘-3의 세포의 루프 2 (ECL2)를 포함한다:
- [0118] WSANTIIRDFYNPVVPEAQKREM (서열식별번호: 14).
- [0119] 일부 실시양태에서, 상기 세포의 루프는 하기 서열을 포함하는 인간 클라우딘-3의 세포의 루프 1 (ECL1)을 포함한다:

[0120] RVSAFIGSNIITSQNIWEGLWMNCVVQSTGQMCKVYDSLALPQDLQAAR (서열식별번호: 26).

[0121] 또 다른 추가 실시양태에서, 하나 이상의 에피토프는 클라우딘-3에 고유하게 존재한다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "고유한" 및 "고유하게 존재하는"은 인용된 특색이 동일한 단백질 패밀리의 다른 밀접하게 관련된 단백질에서는 발견되지 않음을 지칭한다. 예를 들어, 하나 이상의 에피토프가 클라우딘-3에 고유하게 존재하는 경우, 상기 하나 이상의 에피토프는 또 다른 클라우딘 패밀리 단백질, 예컨대 밀접하게 관련된 단백질 클라우딘-4, 클라우딘-6, 클라우딘-5, 클라우딘-9 또는 클라우딘-17에서는 발견되지 않으며, 특히 상기 하나 이상의 에피토프는 클라우딘-4, 클라우딘-6, 클라우딘-5 또는 클라우딘-9, 예컨대 클라우딘-3과 가장 가까운 것으로 공지된 상동체인 클라우딘-4에서는 발견되지 않는다. 이러한 에피토프는 작을 수 있거나 짧은 길이의 아미노산, 예컨대 4 내지 10개의 아미노산, 예를 들어 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산일 수 있다. 그러므로, 한 실시양태에서, 하나 이상의 에피토프는 길이가 4개 아미노산이다. 클라우딘-3에 고유하게 존재하는 에피토프는 선형 에피토프 또는 입체형태적 에피토프일 수 있다. 선형 에피토프는 단백질 1차 서열 내의 연속 잔기로 구성된다. 예를 들어, 아미노산 서열 PVVP (서열식별번호: 15)를 포함하는 에피토프는 클라우딘-3에는 존재하지만 다른 밀접하게 관련된 클라우딘 패밀리 단백질, 예컨대 클라우딘-4에는 존재하지 않는 선형 에피토프이며, 그러므로 클라우딘-3에 고유하게 존재하는 에피토프로 간주될 수 있다. 입체형태적 에피토프는 1차 단백질 서열에서 불연속적이지만 단백질/항원의 3차원 구조에서 항원성 표면을 형성하기 위해 매우 근접한 잔기로 구성된다. 클라우딘-3에 고유하게 존재하는 에피토프는 또한 입체형태적 에피토프일 수 있다.

[0122] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 에피토프는 클라우딘-3의 ECL1 및 ECL2에 존재하는 잔기로 구성된 입체형태적 에피토프이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 에피토프는 클라우딘-3의 ECL1에 존재하는 적어도 하나의 잔기 및 클라우딘-3의 ECL2에 존재하는 적어도 하나의 잔기를 포함하는 입체형태적 에피토프이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 에피토프는 서열식별번호: 13에 따라 넘버링될 때 클라우딘-3의 ECL1에 존재하는 적어도 N38 및 클라우딘-3의 ECL2에 존재하는 적어도 E153을 포함하는 입체형태적 에피토프이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 에피토프는 서열식별번호: 13의 적어도 N38 및 E153을 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 에피토프는 서열식별번호: 13의 N38 및 E153으로 본질적으로 이루어진다.

[0123] 한 실시양태에서, 서열식별번호: 13의 적어도 N38 및 E153을 포함하는 인간 클라우딘-3 상의 불연속적 에피토프에 결합하는 단리된 클라우딘-3 결합 단백질이 제공된다. 한 실시양태에서, 서열식별번호: 13의 N38 및 E153으로 본질적으로 이루어진 인간 클라우딘-3 상의 불연속적 에피토프에 결합하는 단리된 클라우딘-3 결합 단백질이 제공된다. 한 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 키메라 또는 인간화이코/거나; 여기서 클라우딘-3 결합 단백질은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: 모노클로날 항체, 인간 IgG1 이소타입, 낙타 Ig, Ig NAR, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab)'2 단편, F(ab)'3 단편, Fv, scFv, bis-scFv, (scFv)<sub>2</sub>, 미니바디, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 디술피드 안정화된 Fv 단백질 (dsFv), 및 sdAb. 또 다른 실시양태에서, 하기를 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)가 제공된다: a) 서열식별번호: 13의 적어도 N38 및 E153을 포함하는 인간 클라우딘-3 상의 불연속적 에피토프에 결합하는 단리된 클라우딘-3 결합 단백질을 포함하는 세포외 도메인; b) 막횡단 도메인; 및 c) 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인. 또 다른 실시양태에서, 세포외 도메인은 서열식별번호: 13의 N38 및 E153으로 본질적으로 이루어진 인간 클라우딘-3 상의 불연속적 에피토프에 결합하는 단리된 클라우딘-3 결합 단백질을 포함한다.

[0124] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "특이적 결합 친화성", "특이적으로 결합하다", "특이적으로 결합된", "특이적 결합" 또는 "특이적으로 표적화하다"는 암 세포 상의 결합에만 접근가능하고/거나 이용가능한 에피토프에 대한 항원/에피토프 결합 도메인 (또는 이를 포함하는 CAR)의 결합을 설명한다. 특정 실시양태에서, 결합 도메인 (또는 결합 도메인을 포함하는 CAR 또는 결합 도메인을 함유하는 융합 단백질)은 약  $10^6 M^{-1}$ ,  $10^7 M^{-1}$ ,  $10^8 M^{-1}$ ,  $10^9 M^{-1}$ ,  $10^{10} M^{-1}$ ,  $10^{11} M^{-1}$  또는  $10^{12} M^{-1}$  이상의  $K_a$ 로 표적에 결합한다. "고친화성" 결합 도메인 (또는 이의 단일쇄 융합 단백질)은 적어도  $10^7 M^{-1}$ , 적어도  $10^8 M^{-1}$ , 적어도  $10^9 M^{-1}$ , 적어도  $10^{10} M^{-1}$ , 적어도  $10^{11} M^{-1}$  또는 적어도  $10^{12} M^{-1}$  또는 그 초과  $K_a$ 를 갖는 결합 도메인을 지칭한다. 결합 도메인 (또는 결합 도메인을 포함하는 CAR 또는 결합 도메인을 함유하는 융합 단백질)은 예를 들어  $10^3 M^{-1}$  내지  $10^{10} M^{-1}$ 의 친화성 또는  $K_a$  (즉, I/M 단위와의 특정한 결합 상호작용의 평형 회합 상수)로 클라우딘-3에 결합하거나 회합하는 경우 클라우딘-3에 "특이적으로 결합"하는 것으로 간주될 수 있다.

[0125] 대안적으로, 친화성은 M 단위 (예를 들어,  $10^{-5} M$  내지  $10^{-13} M$ , 또는 그 이하)로 특정한 결합 상호작용의 평형

해리 상수 (Kd)로서 정의될 수 있다. 본 개시내용에 따른 결합 도메인 폴리펩티드 및 CAR의 친화성은 통상적인 기술을 사용하여, 예를 들어 경쟁적 ELISA (효소 결합 면역흡착 검정), 결합 회합, 표지된 리간드를 사용한 대체 검정, 표면-플라즈몬 공명 장치, 예컨대 비아코어(Biacore) T 100 (비아코어, 인크. (미국 뉴저지주 피스카타웨이)로부터 입수가가능함) 또는 광학 바이오센서 기술, 예컨대 EPIC 시스템 또는 EnSpire (각각 코닝(Corning) 및 퍼킨 엘머(Perkin Elmer)로부터 입수가가능함) (또한, 예를 들어 문헌 [Scatchard, Ann NY Acad Sci. 1949; 51(4): 660] 및 미국 특허 번호 5,283,173 또는 등가물 참조)에 의해 쉽게 결정될 수 있다.

[0126] 그러나, 통상의 기술자는 본원에 개시된 바와 같은 항원/에피토프 결합 단백질은 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 CAR이 동일한 항원/에피토프 결합 도메인을 포함하는 항체보다 더 큰 민감성 및 선택성을 나타낼 수 있음을 이해할 것이다. 이는 결합이 예컨대 표지된 항체 또는 CAR을 사용한 상기 결합의 시각화에 의해 직접적으로 검출될 수 없는 반면, 결합은 예컨대 세포 기능 검정 및 측정을 통해 간접적으로 결정될 수 있음을 의미한다. 예를 들어, 결합은 표지된 항체 또는 CAR, 예를 들어 형광으로 표지된 가용성 항체를 사용하여 상기 결합의 시각화에 의해 직접적으로 검출될 수 있거나, 또는 항체 또는 CAR을 발현하는 세포의 기능 (예컨대 활성화)을 통해, 예컨대 시토키인 방출 검정 (예를 들어, IFN $\gamma$  방출의 측정), 세포 사멸의 측정, 또는 하기 실시예 섹션에 자세히 기재된 바와 같은 다른 기능적 측정/기술에 의해 간접적으로 검출될 수 있다. 그러므로, 특정 실시양태에서, 결합은 항체 또는 항원/에피토프 결합 단편이 CAR에 포함되며 그러므로 세포에 의해 불용성 세포 형식으로 발현되는 경우 예를 들어 CAR-발현 세포의 활성화에 의해 검출되지만, 항체 또는 항원/에피토프 결합 단편이 가용성 비세포 형식 (예를 들어, 가용성 항체 또는 이의 항원 결합 단편)에 포함된 경우 검출되지 않는다. 본원에 기재된 바와 같은 CAR은 다른 관련 단백질, 예컨대 클라우딘-4, 클라우딘-5, 클라우딘-6 및/또는 클라우딘-9를 포함하는 다른 클라우딘 패밀리 구성원 단백질과 비교하여 표적 항원/에피토프, 예컨대 클라우딘-3에 대해 더 큰 선택성을 가질 수 있다는 것이 통상의 기술자에 의해 추가로 이해될 것이다.

[0127] 특정한 실시양태에서, CAR의 세포의 결합 도메인은 항원 결합 단백질, 예컨대 항-클라우딘-3 결합 단백질을 포함하며, 여기서 항원 결합 단백질은 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로부터 선택된다.

[0128] 특정한 실시양태에서, 항원 결합 단백질, 예컨대 항-클라우딘-3 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 낙타 Ig (낙타과 항체 (VHH)), Ig NAR, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab)'2 단편, F(ab)'3 단편, Fv, scFv, bis-scFv, (scFv)<sub>2</sub>, 미니바디, 디아바디, 트리야바디, 테트라바디, 디숄피드 안정화된 Fv 단백질 ("dsFv") 및 sdAb (나노바디로도 공지됨)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0129] 한 실시양태에서, 항원 결합 단백질, 예컨대 항-클라우딘-3 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 scFv이다.

[0130] 일부 실시양태에서, CAR 세포의 도메인은 클라우딘-3 결합 단백질을 포함한다. 예시적인 클라우딘-3 결합 단백질은 적어도 하나의 인간 프레임워크 영역을 포함하는 클라우딘-3에 대해 특이적인 이뮤노글로불린 가변 영역이다. "인간 프레임워크 영역"은 인간 이뮤노글로불린 가변 영역의 야생형 (즉, 자연 발생) 프레임워크 영역, 영역 내 아미노산의 약 50% 미만 (예를 들어, 바람직하게는 약 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% 또는 1% 미만)이 (예를 들어, 상응하는 위치에서 비인간 이뮤노글로불린 프레임워크 영역의 하나 이상의 아미노산 잔기로) 결실 또는 치환된 비인간 이뮤노글로불린 가변 영역의 변경된 프레임워크 영역, 또는 영역 내 아미노산의 약 50% 미만 (예를 들어, 바람직하게는 약 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% 또는 1% 미만)이 (예를 들어, 노출된 잔기의 위치에서 및/또는 상응하는 위치에서 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 영역의 하나 이상의 아미노산 잔기로) 결실 또는 치환되어 한 실시양태에서 면역원성이 감소된 비인간 이뮤노글로불린 가변 영역의 변경된 프레임워크 영역을 지칭한다.

[0131] 특정 실시양태에서, 인간 프레임워크 영역은 인간 이뮤노글로불린 가변 영역의 야생형 프레임워크 영역이다. 특정 다른 실시양태에서, 인간 프레임워크 영역은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과 위치에서 아미노산 결실 또는 치환을 갖는 인간 이뮤노글로불린 가변 영역의 변경된 프레임워크 영역이다. 다른 실시양태에서, 인간 프레임워크 영역은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과 위치에서 아미노산 결실 또는 치환을 갖는 비인간 이뮤노글로불린 가변 영역의 변경된 프레임워크 영역이다.

[0132] 특정한 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 인간 경쇄 FR1, 인간 중쇄 FR1, 인간 경쇄 FR2, 인간 중쇄 FR2, 인간 경쇄 FR3, 인간 중쇄 FR3, 인간 경쇄 FR4 및 인간 중쇄 FR4로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개의 인간 프레임워크 영역 (FR)을 포함한다.

[0133] 클라우딘-3-특이적 결합 도메인에 존재할 수 있는 인간 FR은 또한 예시적인 FR의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과 아미노산이 치환 또는 결실된 본원에 제공된 예시적인 FRS의 변이체를 포함한다.

- [0134] 특정 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 하기를 포함한다: (a) 인간 경쇄 FR1, 인간 경쇄 FR2, 인간 경쇄 FR3 및 인간 경쇄 FR4를 포함하는 인간화 경쇄 가변 영역; 및 (b) 인간 중쇄 FR1, 인간 중쇄 FR2, 인간 중쇄 FR3 및 인간 중쇄 FR4를 포함하는 인간화 중쇄 가변 영역.
- [0135] 본원에 제공된 클라우딘-3 결합 단백질은 또한 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 CDR을 포함할 수 있다. 이러한 CDR은 중쇄 가변 영역의 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3 및 경쇄 가변 영역의 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3으로부터 선택된 비인간 CDR 또는 변경된 비인간 CDR일 수 있다. 특정 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 중쇄 CDRH1, 중쇄 CDRH1 및 중쇄 CDRH3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 경쇄 CDRL1, 경쇄 CDRL2 및 경쇄 CDRL3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 (a) 중쇄 CDRH1, 중쇄 CDRH1 및 중쇄 CDRH3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 경쇄 CDRL1, 경쇄 CDRL2 및 경쇄 CDRL3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0136] 그러므로, 한 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 서열식별번호: 7로부터의 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3 및/또는 서열식별번호: 8로부터의 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3으로부터 선택된 CDR 중 어느 하나 또는 이들의 조합을 포함한다. 추가 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 서열식별번호: 7 및 8로부터의 6개 CDR 모두를 포함한다.
- [0137] 한 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 서열식별번호: 1-3에 제시된 적어도 하나의 중쇄 CDR 서열을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 서열식별번호: 1-3에 제시된 중쇄 CDR 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 아미노산 동일성을 갖는 적어도 하나의 중쇄 CDR 서열을 포함한다. 추가 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 서열식별번호: 1-3에 제시된 중쇄 CDR 서열과 적어도 90% 동일한 적어도 하나의 중쇄 CDR 서열을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 서열식별번호: 1과 적어도 90% 동일한 CDRH1, 서열식별번호: 2와 적어도 90% 동일한 CDRH2 및/또는 서열식별번호: 3과 적어도 90% 동일한 CDRH3을 포함한다. 다른 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 서열식별번호: 1의 CDRH1, 서열식별번호: 2의 CDRH2 및/또는 서열식별번호: 3의 CDRH3을 포함한다.
- [0138] 한 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 서열식별번호: 4-6에 제시된 적어도 하나의 경쇄 CDR 서열을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 서열식별번호: 4-6에 제시된 경쇄 CDR 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 아미노산 동일성을 갖는 적어도 하나의 경쇄 CDR 서열을 포함한다. 추가 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 서열식별번호: 4-6에 제시된 경쇄 CDR 서열과 적어도 90% 동일한 적어도 하나의 경쇄 CDR 서열을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 서열식별번호: 4와 적어도 90% 동일한 CDRL1, 서열식별번호: 5와 적어도 90% 동일한 CDRL2 및/또는 서열식별번호: 6과 적어도 90% 동일한 CDRL3을 포함한다. 다른 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 서열식별번호: 4의 CDRL1, 서열식별번호: 5의 CDRL2 및/또는 서열식별번호: 6의 CDRL3을 포함한다.
- [0139] 일부 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 서열식별번호: 1과 적어도 90% 동일한 CDRH1, 서열식별번호: 2와 적어도 90% 동일한 CDRH2, 서열식별번호: 3과 적어도 90% 동일한 CDRH3, 서열식별번호: 4와 적어도 90% 동일한 CDRL1, 서열식별번호: 5와 적어도 90% 동일한 CDRL2 및 서열식별번호: 6과 적어도 90% 동일한 CDRL3을 포함한다.
- [0140] 또 다른 추가 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 서열식별번호: 1의 CDRH1, 서열식별번호: 2의 CDRH2, 서열식별번호: 3의 CDRH3, 서열식별번호: 4의 CDRL1, 서열식별번호: 5의 CDRL2 및 서열식별번호: 6의 CDRL3을 포함한다.
- [0141] "VH"에 대한 언급은 항체, Fv, scFv, dsFv, Fab, sdAb, 또는 본원에 개시된 바와 같은 다른 항체 단편의 가변 영역을 포함하는 이뮤노글로불린 중쇄의 가변 영역을 지칭한다. 본원에서 고려되는 클라우딘-3 결합 단백질을 구축하는데 적합한 중쇄 가변 영역의 예시적인 예는 서열식별번호: 7에 제시된 중쇄 가변 영역 서열을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0142] "VL"에 대한 언급은 항체, Fv, scFv, dsFv, Fab, 또는 본원에 개시된 바와 같은 다른 항체 단편의 가변 영역을 포함하는 이뮤노글로불린 경쇄의 가변 영역을 지칭한다. 본원에서 고려되는 클라우딘-3 결합 단백질을 구축하는데 적합한 경쇄 가변 영역의 예시적인 예는 서열식별번호: 8에 제시된 경쇄 가변 영역 서열을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0143] 한 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 서열식별번호: 7의 서열과 적어도 75%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 VH 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 서열식별번호: 7의 서열과 적어도 90% 동일한 VH 서열을 포함한다. 대안적인 실시양

태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 서열식별번호: 7의 VH 서열을 포함한다.

- [0144] 추가 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 서열식별번호: 8의 서열과 적어도 75%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 VL 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 서열식별번호: 8의 서열과 적어도 90% 동일한 VL 서열을 포함한다. 대안적인 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 서열식별번호: 8의 VL 서열을 포함한다.
- [0145] 그러므로, 한 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 서열식별번호: 7의 서열과 적어도 90% 동일한 VH 서열 및 서열식별번호: 8의 서열과 적어도 90% 동일한 VL 서열을 포함한다. 추가 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 도메인은 서열식별번호: 7의 VH 서열 및 서열식별번호: 8의 VL 서열을 포함한다.
- [0146] 특정한 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 서열식별번호: 7의 서열과 적어도 90% 동일한 VH 서열을 포함하는 sdAb이다. 한 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 서열식별번호: 7의 VH 서열을 포함하는 sdAb이다.
- [0147] 특정한 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 서열식별번호: 7의 서열과 적어도 90% 동일한 VH 서열 및 서열식별번호: 8의 서열과 적어도 90% 동일한 VL 서열을 포함하는 scFv이고, 바람직하게는 서열식별번호: 7의 VH 서열 및 서열식별번호: 8의 VL 서열을 포함한다.
- [0148] 일부 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 N-말단에서 C-말단으로 VH 서열 및 VL 서열을 포함하는 scFv이고, 여기서 VH 및 VL 서열은 임의로 링커 서열에 의해 분리된다. 특정한 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 N-말단에서 C-말단으로 서열식별번호: 7의 VH 서열 및 서열식별번호: 8의 VL 서열을 포함하는 scFv이다. 다른 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 N-말단에서 C-말단으로 VL 서열 및 VH 서열을 포함하는 scFv이고, 여기서 VL 및 VH 서열은 임의로 링커 서열에 의해 분리된다. 특정한 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 N-말단에서 C-말단으로 서열식별번호: 8의 VL 서열 및 서열식별번호: 7의 VH 서열을 포함하는 scFv이다.
- [0149] 특정 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 서열식별번호: 11의 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함한다. 추가 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 서열식별번호: 11과 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 또 다른 추가 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 서열식별번호: 11의 서열을 포함한다.
- [0150] 특정 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 서열식별번호: 18의 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함한다. 추가 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 서열식별번호: 18과 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 또 다른 추가 실시양태에서, 클라우딘-3 결합 단백질은 서열식별번호: 18의 서열을 포함한다.
- [0151] 링커
- [0152] 특정 실시양태에서, CAR은 분자의 적절한 간격 및 입체형태를 위해 첨가된 다양한 도메인 사이, 예를 들어 VH 및 VL 도메인 사이에 링커 잔기를 포함한다. 특정한 실시양태에서 링커는 가변 영역 연결 서열이다. "가변 영역 연결 서열"은 VH 및 VL 도메인을 연결하는 아미노산 서열이고, 2개의 하위-결합 도메인의 상호작용과 양립가능한 스페이서 기능을 제공하여 생성된 폴리펩티드가 동일한 경쇄 및 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 동일한 표적 분자에 대한 특이적 결합 친화성을 보유한다. 특정한 실시양태에서, 링커는 하나 이상의 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 공동-자극 도메인 및/또는 세포내 신호전달 도메인을 분리한다. CAR은 1, 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과인 링커를 포함할 수 있다. 특정한 실시양태에서, 링커의 길이는 약 1 내지 약 25개의 아미노산, 약 5 내지 약 20개의 아미노산, 약 10 내지 약 20개의 아미노산 또는 임의의 개입 길이의 아미노산이다. 일부 실시양태에서, 링커는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25개 또는 그 초과인 아미노산 길이이다.
- [0153] 링커의 예시적인 예는 글리신 폴리머 (G)<sub>n</sub>; 글리신-세린 폴리머 (G<sub>1-5</sub>S<sub>1-5</sub>)<sub>n</sub> (여기서 n은 적어도 1, 2, 3, 4 또는 5의 정수임); 글리신-알라닌 폴리머; 알라닌-세린 폴리머; 및 관련 기술분야에 공지된 다른 가요성 링커를 포함한다. 예시적인 링커는 서열식별번호: 9에 제시된 바와 같은 글리신-세린 폴리머이다.
- [0154] 스페이서 도메인
- [0155] 특정한 실시양태에서, 세포외 도메인, 즉 CAR의 결합 도메인 다음에는 하나 이상의 "스페이서 도메인"이 오며, 이는 항원 결합 도메인을 이펙터 세포 표면으로부터 멀리 이동시켜 적절한 세포/세포 접촉, 항원 결합 및 활성화

화를 가능하게 하는 영역을 지칭한다 (Patel *et al.*, Gene Therapy, 1999; 6: 412-419). 스페이스 도메인은 천연, 합성, 반합성 또는 재조합 공급원으로부터 유래될 수 있다. 특정 실시양태에서, 스페이스 도메인은 하나 이상의 중쇄 불변 영역, 예를 들어 CH2 및 CH3을 포함하나 이에 제한되지는 않는 이뮤노글로불린의 일부이다. 스페이스 도메인은 자연 발생 이뮤노글로불린 힌지 영역 또는 변경된 이뮤노글로불린 힌지 영역의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

- [0156] 한 실시양태에서, 스페이스 도메인은 IgG1, IgG4 또는 IgD의 CH2 및 CH3 도메인을 포함한다.
- [0157] 힌지 도메인
- [0158] 일반적으로 CAR의 결합 도메인 다음에는 하나 이상의 "힌지 도메인"이 오며, 이는 항원 결합 도메인을 이펙터 세포 표면으로부터 멀리 위치시키는 역할을 하여 적절한 세포/세포 접촉, 항원 결합 및 활성화를 가능하게 한다. CAR은 일반적으로 결합 도메인 및 막횡단 도메인 (TM) 사이에 하나 이상의 힌지 도메인을 포함한다. 힌지 도메인은 천연, 합성, 반합성 또는 재조합 공급원으로부터 유래될 수 있다. 힌지 도메인은 자연 발생 이뮤노글로불린 힌지 영역 또는 변경된 이뮤노글로불린 힌지 영역의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0159] 본원에 기재된 CAR에서 사용하기에 적합한 예시적인 힌지 도메인은 유형 I 막 단백질, 예컨대 CD8 $\alpha$  및 CD4의 세포외 영역으로부터 유래된 힌지 영역을 포함하며, 이는 이들 분자로부터의 야생형 힌지 영역일 수 있거나 변경될 수 있다. 특정한 실시양태에서, 힌지 도메인은 CD8 $\alpha$  힌지 영역으로부터 유래되거나 이를 포함한다.
- [0160] 막횡단 도메인
- [0161] 특정한 실시양태에서, CAR은 막횡단 도메인을 추가로 포함한다. "막횡단 도메인" (TM)은 세포외 결합 부분 및 공동-자극 도메인/세포내 신호전달 도메인을 융합하고, 예를 들어 세포막을 횡단함으로써 면역 이펙터 세포의 원형질막에 CAR을 고정시키는 CAR의 부분이다. TM 도메인은 천연, 합성, 반합성 또는 재조합 공급원으로부터 유래될 수 있다. TM 도메인은 적어도 T-세포 수용체의 알파 또는 베타 쇄의 막횡단 영역(들), CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\zeta$ , CD4, CD5, CD8 $\alpha$ , CD9, CD16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 (4-1BB), CD152, CD154, CD278 (ICOS) 및 PD1로부터 유래될 수 있다 (예를 들어, 이를 포함함). 특정한 실시양태에서, TM 도메인은 합성이고 소수성 잔기, 예컨대 류신 및 발린을 우세하게 포함한다.
- [0162] 한 실시양태에서, CAR은 CD8 $\alpha$ 로부터 유래된 TM 도메인을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, CAR은 CD8 $\alpha$ 로부터 유래된 TM 도메인 및 TM 도메인 및 CAR의 공동-자극/세포내 신호전달 도메인을 연결하는 짧은 올리고- 또는 폴리펩티드 링커 (바람직하게는 길이가 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산임)를 포함한다. 글리신-세린 기반 링커는 특히 적합한 링커를 제공한다. CD8 $\alpha$ 로부터 유래된 예시적인 TM 도메인은 서열식별번호: 19에 제시다.
- [0163] 세포내 신호전달 도메인
- [0164] 특정한 실시양태에서, CAR은 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함한다. "세포내 신호전달 도메인" ("세포내 이펙터 도메인" 또는 "신호전달 도메인"으로도 지칭됨)은 표적 항원 (예를 들어, 클라우딘-3 단백질)에 대한 세포외 도메인의 효과적인 결합 (예를 들어, 항-클라우딘-3 CAR 결합)의 메시지를 면역 이펙터 세포의 내부로 전달하여 이펙터 세포 기능을 유발하는데 참여하는 CAR의 부분을 지칭한다. 세포내 신호전달 도메인은 CAR이 발현되는 면역 세포의 정상적인 이펙터 기능 중 적어도 하나의 활성화, 예를 들어 활성화, 시토카인 생산, 증식 및/또는 세포독성 활성 (세포독성 인자의 CAR-결합된 표적 세포로의 방출 포함), 또는 세포외 CAR 도메인에 대한 항원 결합으로 유발된 다른 세포 반응을 담당한다.
- [0165] 용어 "이펙터 기능"은 면역 이펙터 세포의 특화된 기능을 지칭한다. 예를 들어, T 세포의 이펙터 기능은 세포 용균 활성 또는 시토카인의 분비를 포함한 헬퍼 활성일 수 있다. 그러므로, 용어 "세포내 신호전달 도메인"은 이펙터 기능 신호를 전달하고 세포가 특화된 기능을 수행하도록 지시하는 단백질의 부분을 지칭한다. 대개 전체 세포내 신호전달 도메인이 사용될 수 있지만, 많은 경우에 전체 도메인을 사용할 필요는 없다. 세포내 신호전달 도메인의 말단절단된 부분이 사용되는 정도로, 이러한 말단절단된 부분은 이펙터 기능 신호를 전달하는 한 전체 도메인 대신 사용될 수 있다.
- [0166] 용어 세포내 신호전달 도메인은 이펙터 기능 신호를 전달하기에 충분한 세포내 신호전달 도메인의 임의의 말단절단된 부분을 포함하는 것을 의미한다.
- [0167] T 세포 수용체 (TCR)를 통해 생성된 신호만으로는 T 세포의 완전한 활성화가 불충분하며 2차 또는 공동-자극 신호가 또한 필요한 것으로 공지되어 있다. 그러므로, T 세포 활성화는 2개의 별개의 클래스의 신호전달 도메인

에 의해 매개된다고 말할 수 있다: TCR (예를 들어, TCR/CD3 복합체)을 통해 항원-의존적 1차 활성화를 개시하는 세포내 신호전달 도메인 및 2차 또는 공동-자극 신호를 제공하는 항원-독립적 방식으로 작용하는 공동-자극 신호전달 도메인. 일부 실시양태에서, CAR은 적어도 하나의 "공동-자극 신호전달 도메인" 및 적어도 하나의 "세포내 신호전달 도메인"을 포함한다.

- [0168] 세포내 신호전달 도메인은 자극 방식으로 또는 억제 방식으로 TCR 복합체의 1차 활성화를 조절한다. 자극 방식으로 작용하는 세포내 신호전달 도메인은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로 공지된 신호전달 모티프를 함유할 수 있다.
- [0169] 본원에 기재된 CAR의 특정한 실시양태에서 사용하기에 적합한 ITAM 함유 세포내 신호전달 도메인의 예시적인 예는 FcR $\gamma$ , FcR $\beta$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\epsilon$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\zeta$ , CD22, CD66d, CD79a 및 CD79b로부터 유래된 것들을 포함한다. 한 실시양태에서, 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인은 CD3 $\zeta$ 이다. 예시적인 CD3 $\zeta$  세포내 신호전달 도메인은 서열식별번호: 21에 제시된다. 특정한 바람직한 실시양태에서, CAR은 CD3 $\zeta$  세포내 신호전달 도메인 및 하나 이상의 공동-자극 신호전달 도메인을 포함한다. 세포내 신호전달 및 공동-자극 신호전달 도메인은 막횡단 도메인의 카르복실 말단에 탠덤으로 임의의 순서로 연결될 수 있다.
- [0170] 공동-자극 도메인
- [0171] 특정한 실시양태에서, CAR은 CAR을 발현하는 T 세포의 효능 및 확장을 향상시키기 위해 하나 이상의 공동-자극 신호전달 도메인을 추가로 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "공동-자극 신호전달 도메인" 또는 "공동-자극 도메인"은 공동-자극 분자의 세포내 신호전달 도메인을 지칭한다. 공동-자극 분자는 항원에 결합 시 T 림프구의 효율적인 활성화 및 기능에 필요한 제2 신호를 제공하는 항원 수용체 또는 Fc 수용체 이외의 세포 표면 분자이다. 이러한 공동-자극 분자의 예시적인 예는 CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C, SLP76, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TRIM 및 ZAP70을 포함한다.
- [0172] 한 실시양태에서, CAR은 CD28, CD134 (OX40) 및 CD137 (4-1BB)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 공동-자극 신호전달 도메인을 포함한다. 추가 실시양태에서, 하나 이상의 공동-자극 도메인은 CD137 (4-1BB)이다. 예시적인 CD137 (4-1BB) 공동-자극 도메인은 서열식별번호: 20에 제시된다.
- [0173] 또 다른 실시양태에서, CAR은 CD137 (4-1BB) 공동-자극 신호전달 도메인 및 CD3 $\zeta$  세포내 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0174] 특정 실시양태에서, CAR은 리더 서열을 추가로 포함한다. 특정한 실시양태에서, 리더 서열은 CD8 리더 서열이다. 예시적인 CD8 리더 서열은 서열식별번호: 10에 제시된다.
- [0175] 그러므로, 특정 실시양태에서, 본원에서 고려되는 CAR은 서열식별번호: 12, 34, 35, 36, 37, 38 또는 39의 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 아미노산 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 추가 실시양태에서, CAR은 서열식별번호: 12, 34, 35, 36, 37, 38 또는 39와 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 또 다른 추가 실시양태에서, CAR은 서열식별번호: 12, 34, 35, 36, 37, 38 또는 39의 서열을 포함한다.
- [0176] 특정 실시양태에서, 본원에서 고려되는 CAR은 서열식별번호: 25의 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 아미노산 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 추가 실시양태에서, CAR은 서열식별번호: 25와 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 또 다른 추가 실시양태에서, CAR은 서열식별번호: 25의 서열을 포함한다.
- [0177] 특정 실시양태에서, 본원에서 고려되는 CAR은 서열식별번호: 27의 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 아미노산 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 추가 실시양태에서, CAR은 서열식별번호: 27과 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 또 다른 추가 실시양태에서, CAR은 서열식별번호: 27의 서열을 포함한다.
- [0178] 특정 실시양태에서, 본원에서 고려되는 CAR은 서열식별번호: 28의 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 아미노산 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 추가 실시양태에서, CAR은 서열식별번호: 28과 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 또 다른 추가 실시양태에서, CAR은 서열식별번호: 28의 서열을 포함한다.
- [0179] 특정 실시양태에서, 본원에서 고려되는 CAR은 서열식별번호: 29의 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%,

90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 아미노산 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 추가 실시양태에서, CAR은 서열식별번호: 29와 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 또 다른 추가 실시양태에서, CAR은 서열식별번호: 29의 서열을 포함한다.

[0180] 특정 실시양태에서, 본원에서 고려되는 CAR은 서열식별번호: 30의 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 아미노산 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 추가 실시양태에서, CAR은 서열식별번호: 30과 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 또 다른 추가 실시양태에서, CAR은 서열식별번호: 30의 서열을 포함한다.

[0181] 특정한 실시양태에서, 하기를 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)가 제공된다:

[0182] a) 본원에 개시된 실시양태 중 어느 하나에 따른 클라우딘-3 결합 단백질을 포함하는 세포외 도메인;

[0183] b) CD8 α로부터 유래된 막횡단 도메인; 및

[0184] c) CD3 ζ로부터 유래된 세포내 신호전달 도메인.

[0185] 또 다른 특정한 실시양태에서, 하기를 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)가 제공된다:

[0186] a) 서열식별번호: 1의 CDRH1 서열; 서열식별번호: 2의 CDRH2 서열; 서열식별번호: 3의 CDRH3 서열; 서열식별번호: 4의 CDRL1 서열; 서열식별번호: 5의 CDRL2 서열; 및 서열식별번호: 6의 CDRL3 서열을 포함하는 클라우딘-3 결합 단백질을 포함하는 세포외 도메인;

[0187] b) CD8 α로부터 유래된 막횡단 도메인;

[0188] c) CD3 ζ로부터 유래된 세포내 신호전달 도메인; 및

[0189] d) CD137 (4-1BB)로부터 유래된 공동-자극 도메인.

[0190] 일부 실시양태에서, 세포외 도메인의 클라우딘-3 결합 단백질은 sdAb이다. 다른 실시양태에서, 세포외 도메인의 클라우딘-3 결합 단백질은 서열식별번호: 1의 CDRH1 서열; 서열식별번호: 2의 CDRH2 서열; 서열식별번호: 3의 CDRH3 서열을 포함하는 sdAb이다. 일부 실시양태에서, 세포외 도메인의 클라우딘-3 결합 단백질은 scFv이다. 다른 실시양태에서, 세포외 도메인의 클라우딘-3 결합 단백질은 서열식별번호: 1의 CDRH1 서열; 서열식별번호: 2의 CDRH2 서열; 서열식별번호: 3의 CDRH3 서열; 서열식별번호: 4의 CDRL1 서열; 서열식별번호: 5의 CDRL2 서열; 및 서열식별번호: 6의 CDRL3 서열을 포함하는 scFv이다. 또 다른 실시양태에서, 세포외 도메인의 클라우딘-3 결합 단백질은 서열식별번호: 7의 VH 서열 및 서열식별번호: 8의 VL 서열을 포함하는 scFv이다.

[0191] 또한, 서열식별번호: 1의 CDRH1 서열; 서열식별번호: 2의 CDRH2 서열; 서열식별번호: 3의 CDRH3 서열; 서열식별번호: 4의 CDRL1 서열; 서열식별번호: 5의 CDRL2 서열; 및 서열식별번호: 6의 CDRL3 서열을 포함하는 클라우딘-3 결합 단백질을 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 CAR과 결합에 대해 경쟁하는 클라우딘-3 결합 단백질 또는 키메라 항원 수용체 (CAR)가 본원에 제공된다. 특정 실시양태에서, 본원에서 고려되는 CAR은 서열식별번호: 7의 VH 서열 및 서열식별번호: 8의 VL 서열을 포함하는 클라우딘-3 결합 단백질을 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 CAR과 결합에 대해 경쟁한다. 적합하게는, 상기 CAR은 scFv인 클라우딘-3 결합 단백질을 포함한다.

[0192] 폴리펩티드

[0193] CAR 폴리펩티드 및 이의 단편, 이를 포함하는 세포 및 조성물, 폴리펩티드를 발현하는 항체 및 벡터를 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 폴리펩티드가 본원에서 고려된다. 바람직한 실시양태에서, 하나 이상의 CAR을 포함하는 폴리펩티드가 제공된다. 특정한 실시양태에서, CAR은 서열식별번호: 11과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 바람직하게는 서열식별번호: 12, 34, 35, 36, 37, 38 또는 39와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 클라우딘-3 결합 CAR이다.

[0194] "폴리펩티드", "폴리펩티드 단편", "펩티드" 및 "단백질"은 달리 명시되지 않는 한, 그리고 통상적인 의미, 즉 아미노산의 서열에 따라 상호교환적으로 사용된다. 폴리펩티드는 합성되거나 재조합적으로 생산될 수 있다. 폴리펩티드는 특정 길이로 제한되지 않으며, 예를 들어 전장 단백질 서열 또는 전장 단백질의 단편을 포함할 수 있고, 폴리펩티드의 번역후 변형, 예를 들어 글리코실화, 아세틸화, 인산화 등, 뿐만 아니라 관련 기술분야에 공지된 다른 변형 (자연 발생 및 비-자연 발생 둘 다)을 포함할 수 있다. 다양한 실시양태에서, CAR 폴리펩티드는 단백질의 N-말단 종결부에 단백질의 전달을 공동-번역적으로 또는 번역후로 지시하는 신호 (또는 리더) 서열을 포함한다. 본원에서 고려되는 CAR에 유용한 적합한 신호 서열의 예시적인 예는 IgG1 중쇄 신호 폴리펩티드

드, CD8 $\alpha$  신호 폴리펩티드, 또는 인간 GM-CSF 수용체 알파 신호 폴리펩티드를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 폴리펩티드는 다양한 널리 공지된 재조합 및/또는 합성 기술 중 임의의 것을 사용하여 제조될 수 있다. 본원에서 고려되는 폴리펩티드는 구체적으로 본 개시내용의 CAR, 또는 본원에서 고려되는 바와 같은 CAR의 하나 이상의 아미노산으로부터의 결실, 첨가 및/또는 치환을 갖는 서열을 포함한다.

[0195] 본원에서 사용된 바와 같은 "단리된 펩티드" 또는 "단리된 폴리펩티드" 등은 세포 환경으로부터, 및 세포의 다른 구성성분과의 회합으로부터 펩티드 또는 폴리펩티드 분자의 시험관내 단리 및/또는 정제를 지칭한다 (즉, 이는 생체내 성분과 유의하게 회합되지 않음). 유사하게는, "단리된 세포"는 생체내 조직 또는 장기로부터 수득되고 세포의 기질이 실질적으로 없는 세포를 지칭한다.

[0196] 폴리펩티드는 "폴리펩티드 변이체"를 포함한다. 폴리펩티드 변이체는 하나 이상의 치환, 결실, 첨가 및/또는 삽입에서 자연 발생 폴리펩티드와 상이할 수 있다. 이러한 변이체는 자연적으로 발생할 수 있거나, 예를 들어 상기 폴리펩티드 서열 중 하나 이상을 변형함으로써 합성적으로 생성될 수 있다.

[0197] 본원에 제공된 바와 같은 CAR, 예컨대 서열식별번호: 11 또는 서열식별번호: 12, 34, 35, 36, 37, 38 또는 39의 아미노산 서열을 포함하는 CAR을 포함하는 폴리펩티드가 추가적 및/또는 부가적 폴리펩티드 서열 또는 요소를 포함할 수 있음을 이해할 것이다. 이러한 추가 요소는 세포에서 폴리펩티드 서열의 발현을 제어하거나 폴리펩티드-함유 세포를 표적화하는데 사용될 수 있는 절제 또는 제어 요소를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 발현을 제어하는 요소 또는 폴리펩티드 서열은 내부 리보솜 진입 부위 (IRES), 번역 시작 서열 및/또는 번역 후 폴리펩티드 서열의 요소의 분리를 허용하는 절단 부위를 포함할 수 있다.

[0198] 그러므로, 한 실시양태에서, 본원에서 고려되는 폴리펩티드는 절제 요소를 추가로 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같은 "절제 요소"는 세포 표면 상에 발현되고 상기 세포를 표적화 또는 검출하는데 사용될 수 있는 폴리펩티드 서열 및/또는 단백질 ("소거 마커"로도 공지됨)을 지칭한다. 예를 들어, 절제 요소는 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 대한 세포외 에피토프 또는 결합 영역을 포함하는 세포 표면 단백질의 폴리펩티드 서열일 수 있다. 그러므로, 한 실시양태에서, 절제 요소는 세포 표면 단백질에 대해 특이적인 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 사용하여 항체-의존적 세포성 세포독성 (ADCC) 및/또는 보체-의존적 세포독성 (CDC)에 대해 표적화되는 세포 표면 단백질이다. 따라서, 이러한 메커니즘을 활용함으로써, 본원에서 고려되는 폴리펩티드를 발현하는 세포는 특이적으로 표지/검출될 수 있고, 예를 들어 형질도입된 및 비형질도입된 세포의 혼합 집단으로부터 특이적으로 선택 또는 단리될 수 있음이 이해될 것이다. 또한, 절제 요소를 포함하는 폴리펩티드를 발현하는 세포는 치료되는 대상체의 순환으로부터 특이적으로 및 선택적으로 소거된, 예컨대 소거/제거될 수 있다.

[0199] 적합한 절제 요소의 예는 각각 세특시맵 및 리특시맵에 의해 인식될 수 있는 말단절단된 인간 EGFR 폴리펩티드 (huEGFRt) 및 CD20을 포함하나 이에 제한되지는 않는다 (문헌 [Wang *et al.*, Blood, 2011; 118(5): 1255-1263], [Paszkiwicz *et al.*, J Clin Invest, 2016; 126(11):4262-4272], [Vogler *et al.*, Mol Ther J Am Soc Gene Ther, 2010; 18:1330-8], [Griffioen *et al.*, Haematologica, 2009; 94:1316-20] 및 [Philip *et al.*, Blood, 2014; 124:1277-87]). 적합한 절제 요소의 또 다른 예는 CAR의 세포외 도메인에 혼입된 짧은 폴리펩티드 에피토프 태그 (소위 "E-태그")이며, 그 후 여기서 항-에피토프 태그 CAR이 생성될 수 있다 (Koristka *et al.*, Cancer Immunol Immunother CII, 2019; 68:1401-15).

[0200] 그러므로, 한 실시양태에서, 절제 요소는 말단절단된 인간 EGFR 폴리펩티드 (huEGFRt) 및 CD20으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정한 실시양태에서, 절제 요소는 CD20이다.

[0201] 일부 실시양태에서, 절제 요소는 CAR 폴리펩티드 서열로부터 절단된다. 그러므로, 한 실시양태에서, 본원에서 고려되는 폴리펩티드는 절단 부위, 예컨대 P2A 절단 부위를 포함한다.

[0202] 특정 실시양태에서, 폴리펩티드는 서열식별번호: 24에 제시된 서열을 포함한다.

[0203] 폴리뉴클레오티드

[0204] 또 다른 측면에서, 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산"은 메신저 RNA (mRNA), RNA, 게놈 RNA (gRNA), 플러스 가닥 RNA (RNA(+)), 마이너스 가닥 RNA (RNA(-)), 게놈 DNA (gDNA), 상보적 DNA (cDNA) 또는 재조합 DNA를 지칭한다. 폴리뉴클레오티드는 단일 및 이중 가닥 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0205] 다양한 예시적인 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 발현 벡터, 바이러스 벡터 및 전이 플라스미드, 및 이를 포함하는 조성물 및 세포를 포함한다. 다양한 예시적인 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 12,

34, 35, 36, 37, 38 또는 39의 서열을 갖는 CAR 또는 서열식별번호: 12, 34, 35, 36, 37, 38 또는 39를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 또는 서열식별번호: 16 및 17에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하나 이에 제한되지는 않는 본원에서 고려되는 CAR 또는 폴리펩티드를 코딩한다.

- [0206] 그러므로, 또한 서열식별번호: 16 및/또는 17과 적어도 75%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 본원에 개시된 항원 결합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 한 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 16 및/또는 17의 서열을 포함한다.
- [0207] 본원에서 사용된 바와 같은 "단리된 폴리뉴클레오티드"는 자연-발생 상태에서 플랭킹하는 서열로부터 정제된 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 정상적으로 단편에 인접한 서열로부터 제거된 DNA 단편을 지칭한다. "단리된 폴리뉴클레오티드"는 또한 상보적 DNA (cDNA), 재조합 DNA, 또는 자연에 존재하지 않고 인간의 손에 의해 만들어진 다른 폴리뉴클레오티드를 지칭한다.
- [0208] 폴리뉴클레오티드는 관련 기술분야에 공지되고 이용가능한 다양한 잘 확립된 기술 중 임의의 것을 사용하여 제조, 조작 및/또는 발현될 수 있다. 원하는 폴리펩티드를 발현하기 위해, 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 적절한 벡터에 삽입될 수 있다.
- [0209] 벡터
- [0210] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 CAR 및/또는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0211] 본원에서 용어 "벡터"는 또 다른 핵산 분자를 전이 또는 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭하는데 사용된다. 전이된 핵산은 일반적으로 벡터 핵산 분자에 연결, 예를 들어 삽입된다. 벡터는 세포에서 자율 복제를 지시하는 서열을 포함할 수 있거나, 숙주 세포 DNA로의 통합을 허용하기에 충분한 서열을 포함할 수 있다. 유용한 벡터는 예를 들어 플라스미드 (예를 들어, DNA 플라스미드 또는 RNA 플라스미드), 트랜스포손, 코스미드, 박테리아 인공 염색체 및 바이러스 벡터를 포함한다. 유용한 바이러스 벡터는 예를 들어 복제 결합이 있는 레트로바이러스 및 렌티바이러스를 포함한다.
- [0212] 특정한 실시양태에서, 벡터는 발현 벡터이다. 발현 벡터는 본원에서 고려되는 CAR 및 폴리펩티드를 생산하는데 사용될 수 있다. 또한, 발현 벡터는 바이러스 벡터의 생산을 허용하는 추가 구성성분을 포함할 수 있으며, 이는 결국 본원에서 고려되는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 바이러스 벡터는 대상체 또는 대상체의 세포로의 본원에서 고려되는 폴리뉴클레오티드의 전달을 위해 사용될 수 있다. 발현 벡터의 예는 플라스미드, 자율 복제 서열 및 전이가능한 요소를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 추가적인 예시적인 벡터는 제한 없이, 플라스미드, 파지미드, 코스미드, 트랜스포손, 인공 염색체, 예컨대 효모 인공 염색체 (YAC), 박테리아 인공 염색체 (BAC), 또는 PI-유래 인공 염색체 (PAC), 박테리오파지, 예컨대 람다 파지 또는 M1 3 파지, 및 동물 바이러스를 포함한다.
- [0213] 발현 벡터의 추가적인 예는 포유동물 세포에서의 발현을 위한 pCIneo 벡터 (프로메가(Promega)); 포유동물 세포에서의 렌티바이러스-매개 유전자 전이 및 발현을 위한 pLenti4/V5-DESTM pLenti6/V5-DESTM 및 pLenti6.2/V5-GW/lacZ (인비트로젠(Invitrogen))이다. 특정한 실시양태에서, 본원에 개시된 CAR 및 폴리펩티드의 코딩 서열은 포유동물 세포에서 CAR 및/또는 폴리펩티드의 발현을 위해 이러한 발현 벡터에 라이게이션될 수 있다.
- [0214] 특정한 실시양태에서, 본원에 제공된 발현 벡터는 본원에 기재된 바와 같은 폴리뉴클레오티드를 포함하는 BAC이다. 특정한 실시양태에서, BAC는 생산자 또는 패키징 세포주에서 발현될 때 바이러스 벡터의 생산을 허용하는데 필요한 단백질을 코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 추가로 포함한다. 예로서, PCT 출원 W02017/089307 및 W02017/089308은 레트로바이러스 벡터, 특히 렌티바이러스 벡터를 생산하는데 사용되는 발현 벡터를 설명한다. 특정한 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 폴리뉴클레오티드를 포함하는 W02017/089307 및 W02017/089308에 기재된 발현 벡터가 제공된다.
- [0215] 발현 벡터에 존재하는 "제어 요소" 또는 "조절 서열"은 벡터-복제 기점의 비번역된 영역, 선택 카세트, 프로모터, 인핸서, 번역 개시 신호 (샤인 달가노(Shine Dalgarno) 서열 또는 코작(Kozak) 서열), 인트론, 폴리아데닐화 서열, 5' 및 3' 비번역된 영역 (숙주 세포 단백질과 상호작용하여 전사 및 번역을 수행함)이다. 이러한 요소는 세기 및 특이성이 다양할 수 있다. 활용되는 벡터 시스템 및 숙주에 따라, 유비쿼터스 프로모터 및 유도

성 프로모터를 포함하여 임의의 수의 적합한 전사 및 번역 요소가 사용될 수 있다.

- [0216] 전달용 벡터
- [0217] 또한, 대상체 및/또는 대상체의 세포로의 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드의 전달을 위한 벡터가 제공된다. 이러한 벡터의 예는 플라스미드, 자율 복제 서열, 전이가능한 요소, 파지미드, 코스미드, 인공 염색체, 예컨대 효모 인공 염색체 (YAC), 박테리아 인공 염색체 (BAC), 또는 PI-유래 인공 염색체 (PAC), 박테리오파지, 예컨대 람다 파지 또는 M1 3 파지, 및 바이러스 벡터를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0218] 바이러스 벡터로서 유용한 동물 바이러스 카테고리의 예는 제한 없이, 레트로바이러스 (렌티바이러스 포함), 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스 (AAV), 헤르페스바이러스 (예를 들어, 헤르페스 심플렉스 바이러스), 폭스 바이러스, 바콜로바이러스, 유두종바이러스 및 파코바바이러스 (예를 들어, SV40)를 포함한다. 이들 벡터는 본원에서 "바이러스 벡터"로 지칭된다.
- [0219] 통상의 기술자가 이해하는 바와 같이, 용어 "바이러스 벡터"는 전형적으로 핵산 분자의 전이 또는 세포 계승으로의 통합을 용이하게 하는 바이러스-유래 핵산 요소를 포함하는 핵산 분자 (예를 들어, 전이 플라스미드) 또는 핵산 전이를 매개하는 바이러스 입자를 지칭하기 위해 널리 사용된다.
- [0220] 레트로바이러스는 유전자 전달을 위한 일반적인 도구이다 (Miller, 2000, Nature. 357: 455-460). 특정한 실시양태에서, 레트로바이러스는 본원에 기재된 바와 같은 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 세포에 전달하는데 사용된다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "레트로바이러스"는 이의 계승 RNA를 선형 이중-가닥 DNA 카피로 역전사하고 후속적으로 이의 계승 DNA를 숙주 계승에 공유결합적으로 통합하는 RNA 바이러스를 지칭한다. 바이러스가 숙주 계승에 통합되면, 이는 "프로바이러스"로 지칭된다. 프로바이러스는 RNA 폴리머라제 II에 대한 주형 역할을 하며 새로운 바이러스 입자를 생산하는데 필요한 구조적 단백질 및 효소를 코딩하는 RNA 분자의 발현을 지시한다.
- [0221] 특정한 실시양태에서 사용하기에 적합한 예시적인 레트로바이러스는 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스 (M-MuLV), 몰로니 뮤린 육종 바이러스 (MoMSV), 하비 뮤린 육종 바이러스 (HaMuSV), 뮤린 유선 종양 바이러스 (MuMTV), 기빈 유인원 백혈병 바이러스 (GaLV), 고양이 백혈병 바이러스 (FLV), 스푸마바이러스, 프렌드 뮤린 백혈병 바이러스, 뮤린 줄기 세포 바이러스 (MSCV) 및 라우스 육종 바이러스 (RSV) 및 렌티바이러스를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0222] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "렌티바이러스"는 복합 레트로바이러스의 그룹 (또는 속)을 지칭한다. 예시적인 렌티바이러스는 HIV (인간 면역결핍 바이러스; HIV 유형 1, 및 HIV 유형 2 포함); 비스나-매디 바이러스 (VMV); 염소 관절염-뇌염 바이러스 (CAEV); 말 감염성 빈혈 바이러스 (EIAV); 고양이 면역결핍 바이러스 (FIV); 소 면역결핍 바이러스 (BIV); 및 유인원 면역결핍 바이러스 (SIV)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 한 실시양태에서, HIV 기반 벡터 백본 (즉, HIV 시스-작용 서열 요소)이 바람직하다.
- [0223] 레트로바이러스 벡터 및 더욱 특히 렌티바이러스 벡터는 특정한 실시양태를 실행하는데 사용될 수 있다. 따라서, 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "레트로바이러스" 또는 "레트로바이러스 벡터"는 각각 "렌티바이러스" 및 "렌티바이러스 벡터"를 포함하는 의미이다.
- [0224] 바이러스 입자는 전형적으로 다양한 바이러스 구성성분을 포함하며 때로는 핵산(들) 외에 숙주 세포 구성성분을 또한 포함할 것이다.
- [0225] 용어 바이러스 벡터는 핵산을 세포 내로 전이할 수 있는 바이러스 또는 바이러스 입자 또는 전이된 핵산 자체를 지칭할 수 있다. 바이러스 벡터 및 전이 플라스미드는 주로 바이러스로부터 유래된 구조적 및/또는 기능적 유전적 요소를 함유한다. 용어 "레트로바이러스 벡터"는 주로 레트로바이러스로부터 유래된 구조적 및 기능적 유전적 요소 또는 이의 일부를 함유하는 바이러스 벡터 또는 플라스미드를 지칭한다. 용어 "렌티바이러스 벡터"는 주로 렌티바이러스로부터 유래된 LTR을 포함하여 구조적 및 기능적 유전적 요소 또는 이의 일부를 함유하는 바이러스 벡터 또는 플라스미드를 지칭한다. 용어 "하이브리드 벡터"는 레트로바이러스 (예를 들어 렌티바이러스) 서열 및 비-렌티바이러스 바이러스 서열 둘 다를 함유하는 벡터, LTR 또는 기타 핵산을 지칭한다. 한 실시양태에서, 하이브리드 벡터는 역전사, 복제, 통합 및/또는 패키징을 위한 레트로바이러스 (예를 들어, 렌티바이러스) 서열을 포함하는 벡터 또는 전이 플라스미드를 지칭한다.
- [0226] 특정한 실시양태에서, 용어 "렌티바이러스 벡터" 및 "렌티바이러스 발현 벡터"는 렌티바이러스 전이 플라스미드 및/또는 감염성 렌티바이러스 입자를 지칭하는데 사용될 수 있다. 본원에서 요소, 예컨대 클로닝 부위, 프로모

터, 조절 요소, 이중 핵산 등에 대해 언급하는 경우, 이들 요소의 서열은 렌티바이러스 입자에서 RNA 형태로 존재하고 DNA 플라스미드에서 DNA 형태로 존재하는 것으로 이해되어야 한다.

[0227] 프로바이러스의 각 말단에 "긴 말단 반복부" 또는 "LTR"이라고 불리는 구조가 있다. 용어 "긴 말단 반복부 (LTR)"는 천연 서열 문맥에서 직접 반복부이고 U3, R 및 U5 영역을 함유하는 레트로바이러스 DNA의 말단에 위치한 염기 쌍의 도메인을 지칭한다. LTR은 일반적으로 레트로바이러스 유전자의 발현 (예를 들어, 유전자 전사체의 촉진, 개시 및 폴리아데닐화) 및 바이러스 복제에 근본적인 기능을 제공한다. LTR은 전사 제어 요소, 폴리아데닐화 신호 및 바이러스 게놈의 복제 및 통합에 필요한 서열을 포함하는 수많은 조절 신호를 함유한다. 바이러스 LTR은 U3, R 및 U5라고 불리는 3개 영역으로 나뉜다. U3 영역은 인핸서 및 프로모터 요소를 함유한다. U5 영역은 프라이머 결합 부위 및 R 영역 사이의 서열이며 폴리아데닐화 서열을 함유한다. R (반복부) 영역은 U3 및 U5 영역에 의해 플랭킹된다. LTR은 U3, R, 및 U5 영역을 포함하며 바이러스 게놈의 5' 및 3' 말단 둘 다에 나타난다. 게놈의 역전사에 필요한 서열 (tRNA 프라이머 결합 부위) 및 바이러스 RNA의 입자로의 효율적인 패키징에 필요한 서열 (Psi 부위)은 5' LTR에 인접하여 있다.

[0228] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "패키징 신호" 또는 "패키징 서열"은 바이러스 RNA의 바이러스 캡시드 또는 입자로의 삽입에 필요한 레트로바이러스 게놈 내에 위치한 서열을 지칭한다 (예를 들어, 문헌 [Clever et al., J Virol. 1995; 69(4): 2101-9] 참조). 여러 레트로바이러스 벡터는 바이러스 게놈의 캡시드화에 필요한 최소 패키징 신호 (psi [W] 서열로도 지칭됨)를 사용한다. 그러므로, 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "패키징 서열", "패키징 신호", "psi" 및 기호 "W"는 바이러스 입자 형성 동안 레트로바이러스 RNA 가닥의 캡시드화에 필요한 비코딩 서열과 관련하여 사용된다.

[0229] 다양한 실시양태에서, 벡터는 변형된 5' LTR 및/또는 3' LTR을 포함한다. LTR 중 어느 하나 또는 둘 다는 하나 이상의 결실, 삽입 또는 치환을 포함하나 이에 제한되지는 않는 하나 이상의 변형을 포함할 수 있다. 3' LTR의 변형은 종종 바이러스에 복제 결함을 제공함으로써 렌티바이러스 또는 레트로바이러스 시스템의 안전성을 개선하기 위해 이루어진다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "복제-결함"은 감염성 비리온이 생성되지 않을 정도로 완전하고 효과적인 복제가 불가능한 바이러스를 지칭한다 (예를 들어, 복제-결함 렌티바이러스 자손). 용어 "복제-적격"은 바이러스의 바이러스 복제가 감염성 비리온을 생성할 수 있을 정도로 복제가 가능한 야생형 바이러스 또는 돌연변이체 바이러스를 지칭한다 (예를 들어, 복제-적격 렌티바이러스 자손).

[0230] "자기-불활성화" (SIN) 벡터는 우측 (3') LTR 인핸서-프로모터 영역 (U3 영역으로 공지됨)이 바이러스 복제의 제1 라운드 이후의 바이러스 전사를 방지하도록 (예를 들어, 결실 또는 치환에 의해) 변형된 복제-결함 벡터, 예를 들어 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터를 지칭한다. 이는 우측 (3') LTR U3 영역이 바이러스 복제 동안 좌측 (5') LTR U3 영역에 대한 주형으로서 사용되며 그러므로 U3 인핸서-프로모터 없이는 바이러스 전사체가 만들어질 수 없기 때문이다. 추가 실시양태에서, 3' LTR은 U5 영역이 예를 들어 이상적인 폴리(A) 서열로 대체되도록 변형된다. LTR에 대한 변형, 예컨대 3' LTR, 5' LTR, 또는 3' 및 5' LTR 둘 다에 대한 변형이 또한 포함된다는 점에 주목해야 한다.

[0231] 5' LTR의 U3 영역을 이중 프로모터로 대체하여 바이러스 입자 생산 동안 바이러스 게놈의 전사를 구동함으로써 추가적인 안전성 향상이 제공된다. 사용될 수 있는 이중 프로모터의 예는 예를 들어 바이러스성 유인원 바이러스 40 (SV40) (예를 들어, 초기 또는 후기), 사이토메갈로바이러스 (CMV) (예를 들어, 급초기), 몰로니 무린 백혈병 바이러스 (MoMLV), 라우스 육종 바이러스 (RSV) 및 헤르페스 심플렉스 바이러스 (HSV) (티미딘 키나제) 프로모터를 포함한다. 전형적인 프로모터는 Tat-독립적 방식으로 높은 수준의 전사를 구동할 수 있다. 이러한 대체는 바이러스 생산 시스템에 완전한 U3 서열이 없기 때문에 복제-적격 바이러스를 생성하기 위한 재조합 가능성을 감소시킨다. 특정 실시양태에서, 이중 프로모터는 바이러스 게놈이 전사되는 방식을 제어하는데 추가적인 장점을 갖는다. 예를 들어, 이중 프로모터는 유도 인자가 존재할 때만 바이러스 게놈의 전부 또는 일부의 전사가 발생하도록 유도성일 수 있다. 유도 인자는 하나 이상의 화학적 화합물 또는 숙주 세포가 배양되는 생리학적 조건, 예컨대 온도 또는 pH를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0232] 특정 구체적인 실시양태에 따라, 바이러스 벡터 백본 서열의 대부분 또는 전부는 렌티바이러스, 예를 들어 HIV-1로부터 유래된다. 그러나, 레트로바이러스 및/또는 렌티바이러스 서열의 많은 상이한 공급원이 사용 또는 조합될 수 있고 특정 렌티바이러스 서열의 수많은 치환 및 변경이 본원에 기재된 기능을 수행하는 전이 벡터의 능력을 손상시키지 않고 수용될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 더욱이, 다양한 렌티바이러스 벡터가 관련 기술분야에 공지되어 있으며 (문헌 [Naldini et al., (Science. 1996; 272(5259): 263-7; Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93(21): 11382-8; Curr Opin Biotechnol. 1998; 9(5): 457-63)]; [Zufferey et al., Nat Biotechnol.

1997; 15(9): 871-5]; [Dull et al., J Virol. 1998; 72(11): 8463-71]; 미국 특허 번호 6,013,516; 및 5,994,136 참조), 이들 중 다수는 바이러스 벡터 또는 전이 플라스미드를 생산하도록 적용될 수 있다.

- [0233] 다양한 실시양태에서, 벡터는 본원에 기재된 바와 같은 CAR 또는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함한다.
- [0234] 특정한 실시양태에서, 벡터는 에피솜 벡터 또는 염색체외에서 유지되는 벡터를 포함하나 이에 제한되지는 않는 비-통합 벡터이다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "에피솜"은 숙주의 염색체 DNA로의 통합 없이 및 분열하는 숙주 세포로부터의 점진적인 손실 없이 복제할 수 있는 벡터를 지칭하며, 또한 상기 벡터가 염색체외에서 또는 에피솜에서 복제하는 것을 의미한다.
- [0235] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 벡터는 바이러스 벡터이다.
- [0236] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터이다.
- [0237] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 레트로바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터이다.
- [0238] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 레트로바이러스 벡터는 인간 면역결핍 바이러스 I (HIV-1); 인간 면역결핍 바이러스 2 (HIV-2), 비스나-매디 바이러스 (VMV); 염소 관절염-뇌염 바이러스 (CAEV); 말 감염성 빈혈 바이러스 (EIAV); 고양이 면역결핍 바이러스 (FIV); 소 면역결핍 바이러스 (BIV); 및 유인원 면역결핍 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0239] 일부 실시양태에서, 벡터는 서열식별번호: 17의 서열을 포함하는 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 벡터는 서열식별번호: 17의 서열을 포함하는 핵산 서열을 포함하는 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 레트로바이러스 벡터는 서열식별번호: 17의 서열을 포함하는 핵산을 포함하는 렌티바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 서열식별번호: 17의 서열을 포함하는 핵산을 포함하는 레트로바이러스 벡터는 인간 면역결핍 바이러스 I (HIV-1); 인간 면역결핍 바이러스 2 (HIV-2), 비스나-매디 바이러스 (VMV); 염소 관절염-뇌염 바이러스 (CAEV); 말 감염성 빈혈 바이러스 (EIAV); 고양이 면역결핍 바이러스 (FIV); 소 면역결핍 바이러스 (BIV); 및 유인원 면역결핍 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택된 레트로바이러스 벡터이다.
- [0240] 제어 요소
- [0241] 특정한 실시양태에서, 발현 벡터 및 바이러스 벡터를 포함하나 이에 제한되지는 않는 벡터는 외인성, 내인성 또는 이중성 제어 서열, 예컨대 프로모터 및/또는 인헨서를 포함할 것이다. "내인성" 제어 서열은 게놈의 주어진 유전자와 자연적으로 연결된 서열이다. "외인성" 제어 서열은 해당 유전자의 전사가 연결된 인헨서/프로모터에 의해 지시되도록 유전자 조작 (즉, 분자 생물학적 기술)에 의해 유전자에 병치되어 배치된 서열이다. "이중" 제어 서열은 유전적으로 조작되는 세포와는 상이한 종으로부터 유래된 외인성 서열이다.
- [0242] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "프로모터"는 RNA 폴리머라제가 결합하는 폴리뉴클레오티드 (DNA 또는 RNA)의 인식 부위를 지칭한다. RNA 폴리머라제는 프로모터에 작동가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드를 개시하고 전사한다. 특정한 실시양태에서, 포유동물 세포에서 작동하는 프로모터는 전사가 개시되는 부위로부터 대략 25 내지 30개 염기 상류에 위치한 AT-풍부 영역 및/또는 전사 시작으로부터 70 내지 80개 염기 상류에서 발견되는 또 다른 서열인 CNCAAT 영역 (여기서 N은 임의의 뉴클레오티드일 수 있음)을 포함한다.
- [0243] 용어 "인헨서"는 향상된 전사를 제공할 수 있는 서열을 함유하고 일부 경우에 또 다른 제어 서열에 대한 배향과 관계없이 기능할 수 있는 DNA의 세그먼트를 지칭한다. 인헨서는 프로모터 및/또는 다른 인헨서 요소와 협력적으로 또는 부가적으로 기능할 수 있다. 용어 "프로모터/인헨서"는 프로모터 및 인헨서 기능 둘 다를 제공할 수 있는 서열을 함유하는 DNA의 세그먼트를 지칭한다.
- [0244] 용어 "작동가능하게 연결된"은 기재된 구성성분이 의도된 방식으로 기능하도록 허용하는 관계에 있는 병치를 지칭한다. 한 실시양태에서, 상기 용어는 핵산 발현 제어 서열 (예컨대 프로모터 및/또는 인헨서) 및 제2 폴리뉴클레오티드 서열, 예를 들어 관심 폴리뉴클레오티드 사이의 기능적 연결을 지칭하며, 여기서 발현 제어 서열은 제2 서열에 상응하는 핵산의 전사를 지시한다.
- [0245] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "구성적 발현 제어 서열"은 작동가능하게 연결된 서열의 전사를 끊임없이 또는 연속적으로 허용하는 프로모터, 인헨서 또는 프로모터/인헨서를 지칭한다. 구성적 발현 제어 서열은 각각 광범위하게 다양한 세포 및 조직 유형에서 발현을 허용하는 "유비쿼터스" 프로모터, 인헨서 또는 프로모터/인헨서일

수 있거나, 제한된 다양한 세포 및 조직 유형에서 발현을 허용하는 "세포-특이적", "세포 유형-특이적", "세포 계통-특이적" 또는 "조직-특이적" 프로모터, 인핸서 또는 프로모터/인핸서일 수 있다.

- [0246] 특정한 실시양태에서 사용하기에 적합한 예시적인 유비퀴틴 발현 제어 서열은 사이토메갈로바이러스 (CMV) 급 초기 프로모터, 바이러스성 유인원 바이러스 40 (SV40) (예를 들어, 초기 또는 후기), 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스 (MoN4LV) LTR 프로모터, 라우스 육종 바이러스 (RSV) LTR, 헤르페스 심플렉스 바이러스 (HSV) (티미딘 키나제) 프로모터, 백시니아 바이러스로부터의 H5, P7.5 및 P11 프로모터, 신장 인자 1-알파 (EF1a) 프로모터, 초기 성장 반응 1 (EGR1), 페리틴 H (FerH), 페리틴 L (FerL), 글리세르알데히드 3-포스페이트 데히드로게나제 (GAPDH), 진핵생물 번역 개시 인자 4A1 (EIF4A1), 열 충격 70kDa 단백질 5 (HSPA5), 열 충격 단백질 90kDa 베타, 구성원 1 (HSP90B1), 열 충격 단백질 70kDa (HSP70),  $\beta$ -키네신 ( $\beta$ KIN), 인간 ROSA 26 유전자좌 (Irions *et al.*, Nature Biotechnology 25, 1477 - 1482 (2007)), 유비퀴틴 C 프로모터 (UBC), 포스포글리세레이트 키나제-1 (PGK) 프로모터, 사이토메갈로바이러스 인핸서/닭  $\beta$ -액틴 (CAG) 프로모터,  $\beta$ -액틴 프로모터 및 골수증식성 육종 바이러스 인핸서, 음성 대조군 영역 결실된, d1587rev 프라이머 결합 부위 치환된 (MND) 프로모터 (Challita *et al.*, J Virol. 69(2) : 748-55 (1995))를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0247] 한 실시양태에서, 벡터는 PGK 프로모터를 포함한다.
- [0248] 특정한 실시양태에서, T 세포 특이적 프로모터로부터 CAR을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 발현하는 것이 바람직할 수 있다.
- [0249] 본원에서 사용된 바와 같은 "조건부 발현"은 유도성 발현; 억압성 발현; 특정한 생리학적, 생물학적 또는 질환 상태 등을 갖는 세포 또는 조직에서의 발현을 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 유형의 조건부 발현을 지칭할 수 있다. 이 정의는 세포 유형- 또는 조직-특이적 발현을 배제하려는 것이 아니다. 특정 실시양태는 관심 폴리뉴클레오티드의 조건부 발현을 제공하며, 예를 들어 폴리뉴클레오티드가 발현되도록 유발하거나 관심 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된 폴리뉴클레오티드의 발현의 증가 또는 저하를 유발하는 치료 또는 조건을 세포, 조직, 유기체 등에게 적용함으로써 발현이 제어된다.
- [0250] 유도성 프로모터/시스템의 예시적인 예는 스테로이드-유도성 프로모터, 예컨대 글루코코르티코이드 또는 에스트로겐 수용체를 코딩하는 유전자에 대한 프로모터 (상응하는 호르몬을 사용한 처리에 의해 유도가능), 메탈로티오닌 프로모터 (다양한 중금속을 사용한 처리에 의해 유도가능), MX-I 프로모터 (인터페론에 의해 유도가능), "진스위치" 미페프리스톤-조절가능 시스템 (Sirin *et al.*, 2003, Gene, 323 :67), 쿠메이트 유도성 유전자 스위치 (WO 2002/088346), 테트라사이클린-의존적 조절 시스템 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0251] 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 세포는 유도성 자살 유전자를 포함한 자살 유전자를 활용하여 직접적인 독성 및/또는 비제어된 증식의 위험을 감소시킨다. 특정 실시양태에서, 자살 유전자는 폴리뉴클레오티드 또는 세포를 포함하는 숙주에 대해 면역원성이 아니다. 사용될 수 있는 자살 유전자의 특정 예는 카스파제-9 또는 카스파제-8 또는 시토신 데아미나제이다. 카스파제-9는 특정 화학적 이량체화 유도제 (CID)를 사용하여 활성화될 수 있다.
- [0252] 특정 실시양태에서, 벡터는 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T 세포가 생체내 음성 선택에 대해 감수성이 있게 만드는 유전자 세그먼트를 포함한다. "음성 선택"은 개체의 생체내 조건 변화의 결과로 주입된 세포가 소거될 수 있음을 의미한다. 음성 선택가능한 표현형은 투여되는 작용제, 예를 들어 화합물에 민감성을 부여하는 유전자의 삽입으로 인해 발생할 수 있다.
- [0253] 음성 선택가능한 유전자는 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 특히 하기를 포함한다: 간시클로비르 민감성을 부여하는 헤르페스 심플렉스 바이러스 유형 I 티미딘 키나제 (HSV-I TK) 유전자 (Wigler *et al.*, Cell 1 :223, 1977); 세포성 히포크산틴 포스포리보실트랜스퍼라제 (HPRT) 유전자, 세포성 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라제 (APRT) 유전자, 및 박테리아성 시토신 데아미나제 (Mullen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992; 89(33)).
- [0254] 일부 실시양태에서, 유전적으로 변형된 면역 이펙터 세포, 예컨대 T 세포는 시험관내에서 음성 선택가능한 표현형의 세포의 선택을 가능하게 하는 양성 마커를 추가로 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 양성 선택가능한 마커는 숙주 세포에 도입 시 유전자를 보유하는 세포의 양성 선택을 허용하는 음성 표현형을 발현하는 유전자일 수 있다. 이러한 유형의 유전자는 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 특히, 히그로마이신 B에 대한 저항성을 부여하는 히그로마이신-B 포스포트랜스퍼라제 유전자 (hph), 항생제 G418에 대한 저항성을 코딩하는 Tn5로부터의 아미노 글리코시드 포스포트랜스퍼라제 유전자 (neo 또는 aph), 디히드로폴레이트 리덕타제 (DHFR) 유전

자, 아데노신 데아미나제 유전자 (ADA), 및 다중-약물 저항성 (MDR) 유전자를 포함한다.

- [0255] 바람직하게는, 양성 선택가능한 마커 및 음성 선택가능한 요소는 음성 선택가능한 요소의 손실이 반드시 양성 선택가능한 마커의 손실도 동반하도록 연결된다. 훨씬 더 바람직하게는, 양성 및 음성 선택가능한 마커가 융합되어 하나의 손실이 의무적으로 다른 하나의 손실을 유발한다. 상기 기재된 원하는 양성 및 음성 선택 특색 둘 다를 부여하는 폴리펩티드를 발현 생성물로서 생성하는 융합된 폴리뉴클레오티드의 예는 히그로마이신 포스포트랜스퍼라제 티미딘 키나제 융합 유전자 (HyTK)이다. 이 유전자의 발현은 시험관내 양성 선택을 위한 히그로마이신 B 저항성 및 생체내 음성 선택을 위한 간시클로비르 민감성을 부여하는 폴리펩티드를 생성한다. 문헌 [Lupton S. D., *et al.*, Mol. And Cell. Biology, 1991; 11:3374-3378]을 참조한다. 또한, 바람직한 실시양태에서, CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 융합된 유전자를 함유하는 레트로바이러스 벡터, 특히 시험관내 양성 선택을 위한 히그로마이신 B 저항성 및 생체내 음성 선택을 위한 간시클로비르 민감성을 부여하는 벡터, 예를 들어 문헌 [Lupton, S. D. et al. (1991), *supra*]에 기재된 HyTK 레트로바이러스 벡터에 존재한다.
- [0256] 벡터 생산
- [0257] 특정한 실시양태에서, 세포 (예를 들어, 면역 이펙터 세포)는 CAR을 코딩하는 레트로바이러스 벡터, 예를 들어 렌티바이러스 벡터로 형질도입된다. 예를 들어, 면역 이펙터 세포는 본원에 기재된 바와 같은 CAR을 코딩하는 벡터로 형질도입된다. 이들 형질도입된 세포는 CAR 매개 세포독성 반응을 유발할 수 있다.
- [0258] "숙주 세포"는 벡터 또는 폴리뉴클레오티드로 생체내, 생체외 또는 시험관내에서 전기천공, 형질감염, 감염 또는 형질도입된 세포를 포함한다. 숙주 세포는 패키징 세포, 생산자 세포, 및 바이러스 벡터로 형질도입된 세포를 포함할 수 있다. 특정한 실시양태에서, 바이러스 벡터로 형질도입된 숙주 세포는 요법을 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 특정 실시양태에서, 용어 "표적 세포"는 숙주 세포와 상호교환적으로 사용되며, 원하는 세포 유형의 형질감염, 감염 또는 형질도입된 세포를 지칭한다. 바람직한 실시양태에서, 표적 세포는 T 세포이다.
- [0259] 적합한 바이러스 역가를 달성하기 위해 대규모 바이러스 벡터 생산이 종종 필요하다. 바이러스 입자는 바이러스 구조적 및/또는 보조적 유전자, 예를 들어 gag, POI, env, tat, rev, vif, vpr, vpu, vpx, 또는 nef 유전자 또는 다른 레트로바이러스 유전자를 포함하는 패키징 세포주에 전이 벡터를 형질감염시킴으로써 생산될 수 있다.
- [0260] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "패키징 벡터"는 패키징 신호가 결여되어 있고 1, 2, 3, 4개 또는 그 초과 바이러스 구조적 및/또는 보조적 유전자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 또는 바이러스 벡터를 지칭한다. 전형적으로, 패키징 벡터는 패키징 세포에 포함되며 형질감염, 형질도입 또는 감염을 통해 세포에 도입된다. 형질감염, 형질도입 또는 감염 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다. 특정한 실시양태에서, 레트로바이러스/렌티바이러스 전이 벡터는 형질감염, 형질도입 또는 감염을 통해 패키징 세포주에 도입되어 생산자 세포 또는 세포주를 생성한다. 특정한 실시양태에서, 패키징 벡터는 예를 들어 인산칼슘 형질감염, 리포펙션 또는 전기천공을 포함하는 표준 방법에 의해 인간 세포 또는 세포주에 도입된다. 일부 실시양태에서, 패키징 벡터는 우성 선택가능한 마커, 예컨대 네오마이신, 히그로마이신, 푸로마이신, 블라스토시딘, 제오신, 티미딘 키나제, DHFR, Gln 신세타제 또는 ADA와 함께 세포에 도입된 후, 적절한 약물의 존재 하에 선택되고 클론이 단리된다. 선택가능한 마커 유전자는 패키징 벡터, 예를 들어 IRES 또는 자기-절단 바이러스 펩티드에 의해 코딩되는 유전자에 물리적으로 연결될 수 있다.
- [0261] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "패키징 세포주"는 패키징 신호를 함유하지 않지만 바이러스 입자의 올바른 패키징에 필요한 바이러스 구조적 단백질 및 복제 효소 (예를 들어, gag, pol 및 env)를 안정적으로 또는 일시적으로 발현하는 세포주와 관련하여 사용된다. 임의의 적합한 세포주를 사용하여 패키징 세포를 제조할 수 있다. 일반적으로, 세포는 포유동물 세포이다. 특정한 실시양태에서, 패키징 세포주를 생산하는데 사용되는 세포는 인간 세포이다. 사용될 수 있는 적합한 세포주는 예를 들어 CHO 세포, BHK 세포, NOCK 세포, C3H IOT1/2 세포, FLY 세포, Psi2 세포, BOSC 23 세포, PA317 세포, WEHI 세포, COS 세포, BSC 1 세포, BSC 40 세포, BMT 10 세포, VERO 세포, W 138 세포, MRC5 세포, A549 세포, HT1080 세포, HEK293 세포, HEK293T 세포, B-50 세포, 3T3 세포, NIH3T3 세포, HepG2 세포, Saos-2 세포, Huh7 세포, HeLa 세포, W 163 세포, 211 세포 및 21 IA 세포를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 패키징 세포는 HEK293 세포 또는 HEK293 T 세포이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 세포는 HEK293T 세포이다.
- [0262] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "생산자 세포주"는 패키징 세포주 및 패키징 신호를 포함하는 전이 벡터 구성물을 포함하는 재조합 레트로바이러스 입자를 생산할 수 있는 세포주를 지칭한다. 감염성 바이러스 입자 및 바

이러스 스톱 용액의 생산은 통상적인 기술을 사용하여 수행될 수 있다. 생산자 세포주는 예를 들어 W02017/089307 및 W02017/089308에 기재된 세포주를 포함하며, 이는 숙주 세포 계놈의 단일 유전자좌에서 레트로바이러스 벡터의 생산에 필요한 모든 요소를 포함한다.

- [0263] 바이러스 스톱 용액을 제조하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌 [Y. Soneoka et al., (1995) Nucl. Acids Res. 23:628-633] 및 [N. R. Landau et al., (1992) J. Virol. 66:5110-5113]에 예시되어 있다. 감염성 바이러스 입자는 통상적인 기술을 사용하여 패키징 세포로부터 수집될 수 있다. 예를 들어, 감염성 입자는 관련 기술분야에 공지된 바와 같이 세포 용균 또는 세포 배양 상청액의 수집에 의해 수집될 수 있다. 임의로, 수집된 바이러스 입자는 원하는 경우 정제될 수 있다. 적합한 정제 기술은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다.
- [0264] 바이러스 외피 단백질 (env)은 세포주로부터 생성된 재조합 레트로바이러스에 의해 궁극적으로 감염 및 형질전환될 수 있는 숙주 세포의 범위를 결정한다. 렌티바이러스, 예컨대 HIV-1, HIV-2, SIV, FIV 및 EIV의 경우, env 단백질은 gp41 및 gp120을 포함한다.
- [0265] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "위형" 또는 "위형화"는 바이러스 외피 단백질이 바람직한 특징을 보유하는 또 다른 바이러스의 단백질로 치환된 바이러스를 지칭한다. 예를 들어, HIV는 수포성 구내염 바이러스 G 단백질 (VSV-G) 외피 단백질로 위형화될 수 있으며, 이는 HIV 외피 단백질 (env 유전자에 의해 코딩됨)이 정상적으로 바이러스를 CD4+ 제시 세포로 표적화하기 때문에 HIV가 더 넓은 범위의 세포를 감염시키도록 허용한다. 바람직한 실시양태에서, 렌티바이러스 외피 단백질은 VSV-G로 위형화된다. 한 실시양태에서, 패키징 세포는 VSV-G 외피 당단백질로 위형화된 재조합 레트로바이러스, 예를 들어 렌티바이러스를 생산한다.
- [0266] 다른 실시양태에서, 바이러스 벡터는 또 다른 레트로바이러스 또는 비관련 바이러스로부터의 외피 단백질로 위형화될 수 있다. 통상의 기술자는 본원에 기재된 바이러스 벡터가 임의의 적합한 외피 단백질로 위형화될 수 있음을 이해할 것이다.
- [0267] 형질감염보다는 바이러스 감염을 통해 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터를 사용하여 유전자(들) 또는 다른 폴리뉴클레오티드 서열을 전달하는 것은 "형질도입"으로 지칭된다. 한 실시양태에서, 레트로바이러스 벡터는 감염 및 프로바이러스 통합을 통해 세포에 형질도입된다. 특정 실시양태에서, 표적 세포, 예를 들어 T 세포는 바이러스 또는 레트로바이러스 벡터를 사용한 감염에 의해 세포에 전달된 유전자 또는 다른 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 경우 "형질도입"된다. 특정한 실시양태에서, 형질도입된 세포는 이의 세포 계놈에서 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터에 의해 전달되는 하나 이상의 유전자 또는 다른 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0268] 면역 이펙터 세포
- [0269] 또 다른 측면에서, 본원에 기재된 바와 같은 CAR, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드 및/또는 벡터를 포함하는 면역 이펙터 세포가 제공된다. 다양한 실시양태에서, 암 치료에서 사용하기 위한 본원에서 고려되는 CAR을 발현하도록 유전적으로 변형된 세포가 제공된다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "유전적으로 조작된" 또는 "유전적으로 변형된"은 세포 내의 총 유전 물질에 DNA 또는 RNA 형태의 추가 유전 물질을 첨가하는 것을 지칭한다. 용어 "유전적으로 변형된 세포", "변형된 세포" 및 "제지시킨 세포"는 상호교환적으로 사용된다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "유전자 요법"은 유전자의 발현을 복원, 교정 또는 변형하거나, 또는 치료용 폴리펩티드, 예를 들어 CAR의 발현의 목적으로 세포 내의 총 유전 물질로의 DNA 또는 RNA 형태의 추가 유전 물질의 도입을 지칭한다.
- [0270] 특정한 실시양태에서, 본원에서 고려되는 CAR은 면역 이펙터 세포의 특이성을 관심 표적 항원, 예를 들어 세포-세포 이음부 내에 위치한 세포 이음부 단백질, 예컨대 클라우딘 패밀리 단백질의 구성원, 특히 클라우딘-3으로 재지시하도록 면역 이펙터 세포에 도입되고 발현된다.
- [0271] "면역 이펙터 세포"는 하나 이상의 이펙터 기능 (예를 들어, 세포독성 세포 사멸 활성, 시토카인의 분비, ADCC 및/또는 CDC의 유도)을 갖는 면역 시스템의 임의의 세포이다. 본원에서 고려되는 예시적인 면역 이펙터 세포는 T 림프구, 특히 세포독성 T 세포 (CTL; CD8+ T 세포), 종양 침윤 림프구 (TIL) 및 헬퍼 T 세포 (HTL; CD4+ T 세포)이다. 한 실시양태에서, 면역 이펙터 세포는 자연 살해 (NK) 세포를 포함한다. 한 실시양태에서, 면역 이펙터 세포는 자연 살해 T 세포를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 면역 이펙터 세포는 대식세포를 포함한다. 면역 이펙터 세포는 자가유래/자가발생 ("자기" 또는 비-자가유래 ("비자기"), 예를 들어 동종이계, 동계 또는 이종발생)일 수 있다.

- [0272] 본원에서 사용된 바와 같은 "자가유래"는 동일한 대상체로부터의 세포를 지칭한다.
- [0273] 본원에서 사용된 바와 같은 "동종이계"는 비교 대상 세포와 유전적으로 상이한 동일한 종의 세포를 지칭한다.
- [0274] 본원에서 사용된 바와 같은 "동계"는 비교 대상 세포와 유전적으로 동일한 상이한 대상체의 세포를 지칭한다.
- [0275] 본원에서 사용된 바와 같은 "이종발생"은 비교 대상 세포와 상이한 종의 세포를 지칭한다.
- [0276] 바람직한 실시양태에서, 세포, 예를 들어 면역 이펙터 세포는 동종이계이다.
- [0277] 본원에서 고려되는 CAR과 함께 사용되는 예시적인 면역 이펙터 세포는 T 림프구를 포함한다. 용어 "T 세포" 또는 "T 림프구"는 관련 기술분야에서 인정된 것이며 흉선세포, 미성숙 T 림프구, 성숙 T 림프구, 휴지기 T 림프구 또는 활성화된 T 림프구를 포함하도록 의도된다. T 세포는 T 헬퍼 (Th) 세포, 예를 들어 T 헬퍼 I (Th1) 또는 T 헬퍼 2 (Th2) 세포일 수 있다. T 세포는 헬퍼 T 세포 (HTL; CD4+ T 세포), 세포독성 T 세포 (CTL; CD8+ T 세포), CD4+ CD8+ T 세포, CD4- CD8- T 세포 또는 임의의 다른 서브세트의 T 세포일 수 있다. 특정한 실시양태에서 사용하기에 적합한 다른 예시적인 T 세포 집단은 나이브 T 세포 및 기억 T 세포를 포함한다.
- [0278] 일부 실시양태에서, 면역 이펙터 세포는 T 림프구, 자연 살해 T 림프구 (NKT) 세포, 대식세포 및 자연 살해 (NK) 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0279] 한 실시양태에서, 면역 이펙터 세포는 세포독성 T 림프구 (CD8+)이다.
- [0280] 통상의 기술자가 이해하는 바와 같이, 다른 세포는 또한 본원에 기재된 바와 같은 CAR과 함께 면역 이펙터 세포로서 사용될 수 있다. 특히, 면역 이펙터 세포는 또한 NK 세포, NKT 세포, 호중구 및 대식세포를 포함한다. 면역 이펙터 세포는 또한 이펙터 세포의 선조를 포함하며, 여기서 이러한 선조 세포는 생체내 또는 시험관내에서 면역 이펙터 세포로 분화되도록 유도될 수 있다. 그러므로, 특정한 실시양태에서, 면역 이펙터 세포는 제대혈, 골수 또는 동원된 말초 혈액으로부터 유래된 세포의 CD34 집단 내에 함유된 면역 이펙터 세포의 선조, 예컨대 조혈 줄기 세포 (HSC)를 포함하며, 이는 대상체에 투여 시 성숙 면역 이펙터 세포로 분화되거나, 시험관내에서 유도되어 성숙 면역 이펙터 세포로 분화될 수 있다.
- [0281] 본원에서 사용된 바와 같이, 예를 들어 클라우딘-3 특이적 CAR을 함유하도록 유전적으로 조작된 면역 이펙터 세포는 "항원-특이적 재지시된 면역 이펙터 세포" 또는 "AG-특이적 재지시된 면역 이펙터 세포"로 지칭될 수 있다.
- [0282] 본원에 기재된 CAR을 발현하는 면역 이펙터 세포를 제조하거나 생성하는 방법이 특정한 실시양태에서 제공된다. 다양한 실시양태에서, 이러한 방법은 본원에 기재된 바와 같은 폴리뉴클레오티드 및/또는 벡터를 면역 이펙터 세포에 도입하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 방법은 면역 이펙터 세포가 본원에서 고려되는 하나 이상의 CAR을 발현하도록 개체로부터 단리된 면역 이펙터 세포를 형질감염 또는 형질도입하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 면역 이펙터 세포는 개체로부터 단리되고 시험관내에서 추가 조작 없이 유전적으로 변형된다. 그 후, 이러한 세포는 개체에게 직접 재투여될 수 있다. 추가 실시양태에서, 면역 이펙터 세포는 CAR을 발현하도록 유전적으로 변형되기 전에 먼저 활성화되고 시험관내에서 증식되도록 자극된다. 이와 관련하여, 면역 이펙터 세포는 유전적으로 변형되기 전 및/또는 후에 배양될 수 있다 (즉, 본원에서 고려되는 CAR을 발현하도록 형질도입 또는 형질감염됨). 그러므로, 특정 실시양태에서, 면역 이펙터 세포는 세포를 CD3에 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편 및/또는 CD28에 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편과 접촉시키고; 이에 의해 면역 이펙터 세포 집단을 생성함으로써 증식하도록 자극 및 유도될 수 있다. 추가 실시양태에서, 본원에서 고려되는 면역 이펙터 세포를 생성하는 방법은 세포를 CD3에 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편 및 CD28에 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편과 접촉시키고; 이에 의해 면역 이펙터 세포 집단을 생성함으로써 증식하도록 면역 이펙터 세포를 자극하고 세포를 유도하는 것을 포함한다.
- [0283] 특정한 실시양태에서, 본원에 기재된 면역 이펙터 세포의 시험관내 조작 또는 유전적 변형 전에, 면역 이펙터 세포는 대상체로부터 수득된다. 특정한 실시양태에서, CAR-변형 면역 이펙터 세포는 T 세포를 포함한다.
- [0284] 특정한 실시양태에서, 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)는 본원에서 고려되는 방법을 사용하여 CAR을 발현하도록 직접적으로 유전적으로 변형될 수 있다. 특정 실시양태에서, PBMC의 단리 후, T 림프구는 추가로 단리되고, 특정 실시양태에서 세포독성 및 헬퍼 T 림프구 둘 다는 유전적 변형 및/또는 확장 전 또는 후에 나이브, 기억 및 이펙터 T 세포 하위집단으로 분류될 수 있다.
- [0285] 면역 이펙터 세포, 예컨대 T 세포는 공지된 방법을 사용하여 단리 후 유전적으로 변형될 수 있거나, 면역 이펙

터 세포는 유전적으로 변형되기 전에 시험관내에서 활성화 및 확장 (또는 선조의 경우 분화)될 수 있다. 특정한 실시양태에서, 면역 이펙터 세포, 예컨대 T 세포는 본원에서 고려되는 CAR로 유전적으로 변형 (예를 들어, CAR을 코딩하는 핵산을 포함하는 바이러스 벡터로 형질도입)된 후, 시험관내에서 활성화 및 확장된다. 다양한 실시양태에서, T 세포는 CAR을 발현하기 위한 유전적 변형 전 또는 후에 활성화 및 확장될 수 있다.

[0286] 특정한 실시양태에서, 암 치료를 위한 변형된 면역 이펙터 세포 집단은 본원에 개시된 바와 같은 CAR을 포함한다. 예를 들어, 변형된 면역 이펙터 세포 집단은 암으로 진단된 환자 (자가유래 공여자)로부터 수득된 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)로부터 제조된다. PBMC는 CD4+, CD8+, 또는 CD4+ 및 CD8+일 수 있는 T 림프구의 이질성 집단을 형성한다.

[0287] PBMC는 또한 다른 세포독성 림프구, 예컨대 NK 세포 또는 NKT 세포를 포함할 수 있다. 본원에 기재된 CAR의 코딩 서열을 보유하는 벡터는 인간 공여자 T 세포, NK 세포 또는 NKT 세포의 집단에 도입될 수 있다. 특정한 실시양태에서, 발현 벡터를 보유하는 성공적으로 형질도입된 T 세포는 유동 세포계측법을 사용하여 분류되어 CD3 양성 T 세포를 분리한 후, 항-CD3 항체 및 또는 항-CD28 항체 및 IL-2 또는 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같이 관련 기술분야에 공지된 임의의 다른 방법을 사용하여 추가로 전파시켜 세포 활성화 외에도 T 세포를 발현하는 이들 CAR 단백질의 수를 증가시킬 수 있다.

[0288] 인간 대상체에서 사용하기 위한 저장 및/또는 제조를 위해 CAR 단백질을 발현하는 T 세포의 동결보존을 위해 표준 절차가 사용된다.

[0289] 추가 실시양태에서, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과 상이한 벡터의 혼합물이 면역 이펙터 세포의 공여자 집단을 유전적으로 변형하는데 사용될 수 있으며, 여기서 각 벡터는 본원에서 고려되는 바와 같은 상이한 키메라 항원수용체 단백질을 코딩한다. 생성된 변형된 면역 이펙터 세포는 변형된 세포의 혼합 집단을 형성하며, 변형된 세포의 일부는 하나 초과 상이한 CAR 단백질을 발현한다.

[0290] T 세포 제조 방법

[0291] 인간 요법을 위한 T 세포를 제조하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 바람직한 실시양태에서, 본원에서 고려되는 방법에 의해 제조된 T 세포는 개선된 입양 면역요법 조성물을 제공한다. 임의의 특정한 이론에 얽매이기를 원하지 않고, 본원에서 고려되는 특정한 실시양태의 방법에 의해 제조된 T 세포 조성물은 증가된 생존, 분화의 상대적 부재 하의 확장, 생체내 지속성 및 우수한 항-고갈 특성을 포함하는 우수한 특성을 갖는 것으로 여겨진다. 예를 들어, 항-클라우딘-3 CAR을 발현하도록 변형된 T 세포는 접근가능한 클라우딘-3에 대한 더 낮은 결합 동역학을 나타내고 접근가능한 클라우딘-3 표적의 존재 하에 생체내에서 고갈될 더 낮은 잠재성을 갖는다. 항-클라우딘-3 CAR-T 세포의 고갈에 대한 낮은 경향은 이펙터 기능을 보유하고, 억제성 수용체의 낮은 지속적인 발현을 유발하고, 기능적 이펙터 또는 기억 T 세포의 전사 상태를 보유한다. 고갈은 감염 및 종양의 최적 제어를 방지하기 때문에 CAR-T 요법의 원하는 특색이 아니다.

[0292] 한 실시양태에서, T 세포는 본원에서 고려되는 항-클라우딘-3 CAR을 포함하는 바이러스 벡터로 T 세포를 형질도입함으로써 변형된다. 항-클라우딘-3 CAR-T 세포는 CAR-T 요법의 원하는 속성인 항원의 부재 하에 낮은 수준의 기본 CAR 활성화 및 인터페론-감마 (IFN $\gamma$ ) 분비를 나타낸다. 항원-독립적 (기본) 신호전달에 대한 CAR 성향은 항원-독립적 CAR 활성화로 이어지는 자기-응집을 나타낼 수 있으며, 이는 결국 초기 CAR 고갈을 유발하여 치료 효력의 손실을 초래할 수 있다 (문헌 [Ajina and Maher, 2018] 및 [Long *et al.*, 2015a]). CAR-T 세포의 기본 활성화는 활성화 마커 CD69, 고갈 마커 PD1 및 TIM3의 수준, CD3 $\zeta$  세포내 신호전달 도메인의 인산화, 및 항원의 부재 하에 IFN $\gamma$ 를 분비하는 CAR-T 세포의 능력을 통해 결정될 수 있다. 인간화 항-클라우딘-3 CAR-T 세포는 유사한 수준의 IFN $\gamma$  분비, 활성화 및 고갈 마커 발현, 및 비형질도입된 세포에 대한 시험관내 강장성 CD3 $\zeta$  신호전달의 수준을 나타내었고, 양성 대조군 CAR로 형질도입된 CAR-T 세포와 비교하여 더 낮은 수준을 나타내었다.

[0293] 한 실시양태에서, T 세포는 활성화되기 위해 더 높은 표적 역치를 요구하여 '더 안전한' CAR을 제공하는 본원에서 고려되는 항-클라우딘-3 CAR을 포함하는 바이러스 벡터로 T 세포를 형질도입함으로써 변형된다. 높은 친화성을 갖는 CAR은 건강한 조직의 부수적인 표적화를 유발하여 표적-적중/이탈, 종양-이탈 독성을 초래할 수 있는 것으로 나타났다 (Johnson *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2017; Watanabe *et al.*, 2018).

[0294] 제약 조성물

[0295] 본원에 기재된 면역 이펙터 세포는 본원에 기재된 인간 질환의 치료에서 사용하기 위한 제약 조성물에 혼입될 수 있다. 한 실시양태에서, 제약 조성물은 임의로 하나 이상의 제약상 허용되는 담체 및/또는 부형제와 조합하

여 면역 이펙터 세포를 포함한다.

- [0296] 이러한 조성물은 공지되어 있고 허용되는 제약 실무에 의해 요구되는 바와 같은 제약상 허용되는 담체를 포함한다 (예를 들어, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition (1980) Mack Publishing Co.] 참조)
- [0297] 제약 조성물은 주사 또는 연속적 주입 (예는 정맥내, 복강내, 피내, 피하, 근육내, 안구내 및 문맥내를 포함하나 이에 제한되지는 않음)에 의해 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 조성물은 정맥내 투여에 적합하다.
- [0298] 유전적으로 변형된 치료적 세포의 "치료 유효량"은 인자, 예컨대 개체의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 개체에서 원하는 반응을 유발하는 줄기 및 선조 세포의 능력에 따라 달라질 수 있다. 치료 유효량은 또한 바이러스 또는 형질도입된 치료적 세포의 임의의 독성 또는 해로운 효과보다 치료적으로 유의한 효과가 더 큰 양이다. 용어 "치료 유효량"은 대상체 (예를 들어, 환자)를 "치료"하는데 효과적인 양을 포함한다. 치료량이 표시되는 경우, 투여될 조성물의 정확한 양은 연령, 체중, 종양 크기, 감염 또는 전이의 정도 및 환자 (대상체)의 상태의 개체 차이를 고려하여 의사에 의해 결정될 수 있다. 일반적으로, 본원에 기재된 T 세포를 포함하는 제약 조성물은 해당 범위 내의 모든 정수 값을 포함하여  $10^2$  내지  $10^{10}$  개 세포/kg 체중, 바람직하게는  $10^5$  내지  $10^6$  개 세포/kg 체중의 투여량으로 투여될 수 있다고 언급할 수 있다. 세포의 수는 조성물에 포함된 세포의 유형과 마찬가지로 조성물이 의도하는 궁극적 용도에 의존할 것이다. 본원에 제공된 용도를 위해, 세포의 부피는 일반적으로 1 리터 이하이며, 500ml 이하, 심지어 250ml 또는 100ml 이하일 수 있다. 따라서 원하는 세포의 밀도는 전형적으로  $10^6$  개 세포/ml 초과, 예를 들어  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  또는  $10^9$  개 세포/ml 초과이다.
- [0299] 임상적으로 관련된 면역 세포 수는 누적적으로  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$  또는  $10^{12}$  개 세포와 동일하거나 이를 초과하는 다중 주입으로 분배될 수 있다. 일부 실시양태에서, 특히 주입된 모든 세포가 특정한 표적 항원으로 재지시될 것이기 때문에,  $10^6$ /킬로그램 범위 (환자당  $10^6$  내지  $10^{11}$ )의 더 적은 수의 세포가 투여될 수 있다. 특정한 실시양태에서,  $1 \times 10^7$  내지  $9 \times 10^7$  개의 CAR-T 세포가 투여될 수 있다. CAR 발현 세포 조성물은 이들 범위 내의 투여량으로 여러 번 투여될 수 있다. 예를 들어, CAR-발현 세포 조성물은 7일마다 투여될 수 있다. 대안적으로, CAR-발현 세포 조성물은 단일 용량으로 투여될 수 있다. 세포는 요법을 받는 환자에 대해 동종이계, 동계, 이종발생 또는 자가유래일 수 있다. 원하는 경우, 치료는 또한 면역 반응의 유도를 향상시키기 위한 본원에 기재된 바와 같은 미토겐 (예를 들어, PHA) 또는 림포카인, 시토카인 및/또는 케모카인 (예를 들어,  $IFN \gamma$ , IL-2, IL-12,  $TNF \alpha$ , IL-18 및  $TNF \beta$ , GM-CSF, IL-4, IL-13, Flt3-L, RANTES, MIP1 $\alpha$  등)의 투여를 포함할 수 있다.
- [0300] 일반적으로, 본원에 기재된 바와 같이 활성화 및 확장된 세포를 포함하는 조성물은 면역손상된 개체에서 발생하는 질환의 치료 및 예방에 활용될 수 있다. 특히, 본원에서 고려되는 CAR-변형 T 세포를 포함하는 조성물은 암 치료에 사용된다. 특정한 실시양태에서, CAR-변형 T 세포는 단독으로 투여되거나, 담체, 희석제, 부형제 및/또는 다른 구성성분, 예컨대 IL-2 또는 다른 시토카인 또는 세포 집단과 조합하여 제약 조성물로서 투여될 수 있다. 특정한 실시양태에서, 제약 조성물은 하나 이상의 제약상 또는 생리학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 조합하여 일정량의 유전적으로 변형된 T 세포를 포함한다.
- [0301] CAR-발현 면역 이펙터 세포 집단, 예컨대 T 세포를 포함하는 제약 조성물은 완충제, 예컨대 중성 완충 식염수, 포스페이트 완충 식염수 등; 탄수화물, 예컨대 글루코스, 만노스, 수크로스 또는 텍스트란, 만니톨; 단백질; 폴리펩티드 또는 아미노산, 예컨대 글리신; 항산화제; 킬레이트제, 예컨대 EDTA 또는 글루타티온; 아주반트 (예를 들어, 수산화알루미늄); 및 보존제를 포함할 수 있다. 특정한 실시양태에서, 조성물은 바람직하게는 비경구 투여, 예를 들어 혈관내 (정맥내 또는 동맥내), 복강내 또는 근육내 투여용으로 제형화된다.
- [0302] 용액, 현탁액 또는 다른 유사 형태인지에 관계없이 액체 제약 조성물은 하기 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 멸균 희석제, 예컨대 주사용수, 식염수 용액, 바람직하게는 생리 식염수, 링거액, 등장성 염화나트륨, 고정 오일, 예컨대 용매 또는 현탁 매질로서 작용할 수 있는 합성 모노 또는 디글리세리드, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 다른 용매; 항박테리아제, 예컨대 벤질 알콜 또는 메틸 파라벤; 항산화제, 예컨대 아스코르브산 또는 중아황산나트륨; 킬레이트제, 예컨대 에틸렌디아민테트라아세트산; 완충제, 예컨대 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트, 및 강장성 조정용 작용제, 예컨대 염화나트륨 또는 텍스트로스. 비경구 제제는 앰플, 일회용 주사기 또는 유리 또는 플라스틱으로 만들어진 다중 용량 바이알에 담을 수 있다.

주사가능한 제약 조성물은 바람직하게는 멸균이다.

- [0303] 한 실시양태에서, 본원에서 고려되는 T 세포 조성물은 제약상 허용되는 세포 배양 배지에서 제형화된다. 이러한 조성물은 인간 대상체에게 투여하기에 적합하다. 특정한 실시양태에서, 제약상 허용되는 세포 배양 배지는 무혈청 배지이다.
- [0304] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 본원에서 고려되는 T 세포를 포함하는 조성물은 동결보존 배지를 포함하는 용액으로 제형화된다. 예를 들어, 동결보존제가 포함된 동결보존 배지를 사용하여 해동후 높은 세포 생존력 결과를 유지할 수 있다. 특정한 조성물에 사용되는 동결보존 배지의 예시적인 예는 CRYOSTOR CS10, CRYOSTOR CS5 및 CRYOSTOR CS2를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0305] 특정한 실시양태에서, 조성물은 단독으로 또는 하나 이상의 치료제와 조합하여 CAR 발현 면역 이펙터 세포의 유효량을 포함한다. 그러므로, CAR 발현 면역 이펙터 세포 조성물은 단독으로 또는 다른 공지된 암 치료, 예컨대 방사선 요법, 화학요법, 이식, 면역요법, 호르몬 요법, 광역학 요법 등과 조합하여 투여될 수 있다. 조성물은 또한 항생제와 조합하여 투여될 수 있다. 이러한 치료제는 본원에 기재된 바와 같은 특정한 질환 상태, 예컨대 특정한 암에 대한 표준 치료로서 관련 기술분야에서 인정될 수 있다. 고려되는 예시적인 치료제는 시토카인, 성장 인자, 스테로이드, NSAID, DMARD, 항염증제, 화학요법제, 방사선요법제, 치료용 항체, 또는 다른 활성 및 보조 작용제를 포함한다.
- [0306] 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 CAR-발현 면역 이펙터 세포를 포함하는 조성물은 관련 기술분야에 공지된 임의의 수의 화학요법제와 함께 투여될 수 있다.
- [0307] 다양한 다른 치료제가 본원에 기재된 조성물과 함께 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, CAR 발현 면역 이펙터 세포를 포함하는 조성물은 항염증제와 함께 투여된다. 항염증제 또는 약물은 관련 기술분야에 공지되어 있다.
- [0308] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물은 시토카인과 함께 투여된다. 본원에서 사용된 바와 같은 "시토카인"은 세포간 매개체로서 또 다른 세포에 작용하는 한 세포 집단에 의해 방출되는 단백질에 대한 일반적인 용어를 의미한다. 이러한 시토카인의 예는 관련 기술분야에 공지되어 있다.
- [0309] 추가 실시양태에서, 본원에서 고려되는 조성물 및 CAR은 다른 CAR 또는 CAR-발현 세포 및/또는 조성물과 함께 투여된다. 예를 들어, 항-클라우딘-3 CAR 또는 조성물은 항-세포 표면 회합된 뮤신 1 (MUC1) CAR 또는 CAR-발현 세포 조성물과 함께 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 항-MUC1 CAR은 비정상적으로 글리코실화된 MUC1 단백질 ("AG-MUC1"; 예를 들어, TnMUC1, STnMUC1 등), 예컨대 암 세포에 의해 발현되는 것을 표적화한다. 대안적으로, 본원에서 고려되는 항-클라우딘-3 CAR 또는 조성물은 항-뉴욕 식도 편평 세포 암종 1 (NY-ESO-1) T-세포 수용체 (TCR) 또는 TCR-발현 세포 조성물과 함께 투여될 수 있다.
- [0310] 제약 조성물은 다른 의약과 함께, 임의로 및/또는 사용 지침서와 함께 CAR 발현 면역 이펙터 세포를 함유하는 파트들의 키트에 포함될 수 있다. 편의를 위해, 키트는 사용 지침서와 함께 미리 결정된 양의 시약을 포함할 수 있다. 키트는 또한 제약 조성물의 투여에 사용되는 장치를 포함할 수 있다.
- [0311] 용어 "개체", "대상체" 및 "환자"는 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 본원의 다른 곳에서 고려되는 CAR, 유전자 요법 벡터, 세포-기반 치료제 및 방법으로 치료될 수 있는 질환, 장애 또는 병태의 증상을 나타내는 임의의 동물을 지칭한다. 바람직한 실시양태에서, 대상체는 본원의 다른 곳에서 고려되는 CAR, 유전자 요법 벡터, 세포-기반 치료제 및 방법으로 치료될 수 있는 암과 관련된 질환, 장애 또는 병태의 증상을 나타내는 임의의 동물을 포함한다. 적합한 대상체 (예를 들어, 환자)는 실험 동물 (예컨대 마우스, 래트, 토끼 또는 기니피그), 농장 동물, 및 가축 또는 애완동물 (예컨대 고양이 또는 개)을 포함한다. 비인간 영장류 및 바람직하게는 인간 환자가 포함된다. 전형적인 대상체는 접근가능한 클라우딘-3 단백질을 발현하는 암으로 진단되었거나 암에 걸릴 위험이 있는 인간 환자를 포함한다. 그러므로, 한 실시양태에서, 대상체는 포유동물, 예컨대 영장류, 예를 들어 마모셋 또는 원숭이이다. 또 다른 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 추가 실시양태에서, 대상체는 마우스이다.
- [0312] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "환자"는 본원의 다른 곳에 개시된 CAR, 유전자 요법 벡터, 세포-기반 치료제 및 방법으로 치료될 수 있는 특정한 질환, 장애 또는 병태로 진단된 대상체를 지칭한다.
- [0313] 본원에서 사용된 바와 같은 "치료" 또는 "치료하는"은 질환 또는 병리학적 병태의 증상 또는 병리학에 대한 임의의 유의한 또는 바람직한 효과를 포함하며, 치료될 질환 또는 병태의 하나 이상의 측정가능한 마커의 최소한의 감소도 포함할 수 있다. 치료는 임의로 질환 또는 병태의 감소, 또는 질환 또는 병태의 진행의 지연, 예를

들어 종양 성장의 지연을 수반할 수 있다. "치료"가 반드시 질환 또는 병태, 또는 이와 연관된 증상의 완전한 근절 또는 치유를 나타내는 것은 아니다.

[0314] 본원에서 사용된 바와 같은 "예방하다" 및 유사한 단어, 예컨대 "예방된", "예방하는" 등은 질환 또는 병태의 발생 또는 재발의 가능성을 예방, 억제 또는 감소시키기 위한 접근법을 나타낸다. 이는 또한 질환 또는 병태의 발병 또는 재발을 지연시키거나 질환 또는 병태의 증상의 발생 또는 재발을 지연시키는 것을 지칭한다. 본원에서 사용된 바와 같은 "예방" 및 유사한 단어는 또한 질환 또는 병태의 발병 또는 재발 이전에 질환 또는 병태의 강도, 효과, 증상 및/또는 부담을 감소시키는 것을 포함한다.

[0315] 암

[0316] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "암", "신생물" 및 "종양"은 상호교환적으로 사용되며, 단수 또는 복수 형태로 악성 형질전환을 겪거나 비정상적인 또는 조절되지 않는 성장 또는 과다증식을 초래하는 세포 변화를 겪은 세포를 지칭한다. 이러한 변화 또는 악성 형질전환은 대개 이러한 세포를 숙주 유기체에 대해 병리적으로 만들므로, 병리적이거나 병리적이 될 수 있고 개입을 필요로 하거나 개입으로부터 이익을 얻을 수 있는 전암 또는 전암성 세포가 또한 포함되도록 의도된다. 원발성 암 세포 (즉, 악성 형질전환 부위 근처로부터 수득된 세포)는 잘 확립된 기술, 예컨대 조직학적 검사에 의해 비암성 세포와 쉽게 구별될 수 있다. 예를 들어, 이러한 조직학적 검사는 파괴된 또는 손상된 세포-세포 이음부, 예컨대 치밀 이음부를 식별함으로써 암 세포를 비암성 세포와 구별할 수 있다.

[0317] 그러므로, 특정한 실시양태에서, 암 세포는 파괴된 또는 손상된 세포-세포 이음부를 포함한다. 추가 실시양태에서, 암 세포는 파괴된 또는 손상된 치밀 이음부를 포함한다. 이러한 실시양태에서, 세포-세포 이음부, 예컨대 치밀 이음부 내에 위치한 세포 이음부 단백질은 잘못 편재화되며 본원에 기재된 CAR 및 CAR 발현 세포에 의해 결합에 접근가능하고/거나 이용가능하게 된다. 다른 실시양태에서, 암 세포는 잘못 편재화된 세포 이음부 단백질, 예컨대 표면의 세포-세포 이음부에 위치한 것을 포함한다. 그러므로, 일부 실시양태에서, 암 세포는 표면에 노출된 잘못 편재화된 세포 이음부 단백질을 포함한다.

[0318] 본원에서 사용된 바와 같은 암 세포의 정의는 원발성 암 세포 뿐만 아니라 암 세포 조상으로부터 유래된 임의의 세포를 포함한다. 이는 전이된 암 세포, 및 암 세포로부터 유래된 시험관내 배양 및 세포주를 포함한다. 정상적으로 고휘 종양으로서 나타나는 암 유형을 언급할 때, "임상적으로 검출가능한" 종양은 예를 들어 절차, 예컨대 CAT 스캔, MR 이미징, X선, 초음파 또는 촉지에 의해 종양 덩어리를 기준으로 검출가능한 종양; 및/또는 환자로부터 수득가능한 샘플에서 하나 이상의 암-특이적 항원의 발현 때문에 검출가능한 종양이다. 달리 말하면, 본원에서 상기 용어는 임상적이거나 전암, 종양, 제자리 성장, 뿐만 아니라 말기 전이성 성장으로 지칭하는 것을 포함하는 임의의 단계의 세포, 신생물, 암 및 종양을 포함한다.

[0319] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "치료하는", "치료" 및 이의 파생어는 치료적 요법을 의미한다. 특정한 병태와 관련하여, 치료하는 또는 치료는 하기를 의미한다: (1) 병태 또는 병태의 하나 이상의 생물학적 징후를 호전 시킴; (2) (a) 병태를 유발하거나 원인이 되는 생물학적 캐스케이드의 하나 이상의 포인트 또는 (b) 병태의 하나 이상의 생물학적 징후를 방해함; (3) 병태와 연관된 하나 이상의 증상, 효과 또는 부작용, 또는 병태 또는 이의 치료와 연관된 하나 이상의 증상, 효과 또는 부작용을 경감시킴; 또는 (4) 병태의 진행 또는 병태의 하나 이상의 생물학적 징후를 늦춤.

[0320] 본원에서 사용된 바와 같은 "예방"은 병태 또는 이의 생물학적 징후의 가능성 또는 중증도를 실질적으로 감소시키거나 이러한 병태 또는 이의 생물학적 징후의 발병을 지연시키기 위한 약물, 예컨대 작용제의 예방적 투여를 의미한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 "예방"이 절대적인 용어가 아니라는 것을 이해할 것이다. 예를 들어, 대상체가 암 발병 위험이 높은 것으로 간주되는 경우, 예컨대 대상체가 암에 대한 강한 가족력을 갖는 경우, 또는 대상체가 발암물질에 노출된 경우 예방적 요법이 적절하다.

[0321] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "악성"은 종양 세포 그룹이 비제어된 성장 (예를 들어, 정상 한계를 넘어서는 분열), 침입 (예를 들어, 인접한 조직에 대한 침범 및 파괴), 및 전이 (예를 들어, 림프 또는 혈액을 통해 신체의 다른 위치로 확산) 중 하나 이상을 나타내는 암을 지칭한다.

[0322] "암 세포"는 암성 성장 또는 조직의 개별 세포를 지칭한다. 암 세포는 고휘암 및 액상암 둘 다를 포함한다. "종양" 또는 "종양 세포"는 일반적으로 양성, 전악성 또는 악성일 수 있는 세포의 비정상적인 성장에 의해 형성된 종창 또는 병변을 지칭한다. 대부분의 암은 종양을 형성하지만, 액상암, 예를 들어 백혈병은 반드시 종양을 형성하는 것은 아니다. 종양을 형성하는 암의 경우, 용어 암 (세포) 및 종양 (세포)은 상호교환적으로 사용

된다. 개체의 종양의 양은 종양의 수, 부피 또는 중량으로서 측정될 수 있는 "종양 부담"이다.

- [0323] 한 실시양태에서, 표적 세포 (예를 들어, 암 세포)는 건강한 비암성 세포 상에서 및 일부 경우에 이와 동일한 수준으로 또한 발현되는 항원 또는 에피토프를 포함하는 세포 이음부 단백질을 발현한다. 추가 실시양태에서, 상기 세포 이음부 단백질의 항원 또는 에피토프는 암 세포에 의해 발현되는 경우에만 이용가능하고/거나 접근가능하다. 그러므로, 특정한 실시양태에서, 상기 세포 이음부 단백질의 항원 또는 에피토프는 건강한 비암성 세포에 의해 발현되는 경우 이용가능하지 않거나 접근가능하지 않다 (예를 들어, '숨겨져' 있음).
- [0324] 특정한 실시양태에서, 암은 클라우딘-3이 본원에 기재된 바와 같은 CAR에 의한 결합에 접근가능하도록 치밀 이음부 외부의 클라우딘-3의 잘못된 편재화 및/또는 치밀 이음부의 파괴를 포함하거나 이에 의해 특정화된다.
- [0325] 한 실시양태에서, 표적 세포는 골 세포, 골세포, 골모세포, 지방 세포, 연골세포, 연골모세포, 근육 세포, 골격근 세포, 근모세포, 근세포, 평활근 세포, 방광 세포, 골수 세포, 중추 신경계 (CNS) 세포, 말초 신경계 (PNS) 세포, 신경아교세포, 성상세포, 뉴런, 색소 세포, 상피 세포, 피부 세포, 내피 세포, 혈관 내피 세포, 유방 세포, 결장 세포, 식도 세포, 위장 세포, 위 세포, 결장 세포, 머리 세포, 목 세포, 잇몸 세포, 혀 세포, 신장 세포, 간 세포, 폐 세포, 비인두 세포, 난소 세포, 여포 세포, 자궁경부 세포, 질 세포, 자궁 세포, 췌장 세포, 췌장 실질 세포, 췌장 관 세포, 췌장 섬 세포, 전립선 세포, 음경 세포, 생식선 세포, 고환 세포, 조혈 세포, 림프양 세포 또는 골수양 세포이다.
- [0326] 한 실시양태에서, 표적 세포는 클라우딘-3 단백질을 발현한다. 한 실시양태에서, 표적 세포는 조혈 세포, 식도 세포, 폐 세포, 난소 세포, 자궁경부 세포, 췌장 세포, 담낭 또는 담관 세포, 위 세포, 결장 세포, 유방 세포, 술잔 세포, 창자세포, 줄기 세포, 내피 세포, 상피 세포, 또는 클라우딘-3 단백질을 발현하는 임의의 세포이다. 특정한 실시양태에서, 표적 세포는 내피 또는 상피 세포이다.
- [0327] 특정한 실시양태에서 고려되는 조성물 및 방법에 의해 표적화될 수 있는 세포의 예시적인 예는 하기 고형암을 포함하나 이에 제한되지는 않는다: 부신암, 부신피질 암종, 항문암, 충수암, 성상세포종, 비정형 기형양/횡문근양 종양, 기저 세포 암종, 담관암, 방광암, 골암, 뇌/CNS 암, 유방암, 기관지 종양, 심장 종양, 자궁경부암, 담관암종, 연골육종, 척색종, 결장암, 결장직장암, 두개인두종, 관내 제자리 암종 (DCIS) 자궁내막암, 뇌실막종, 식도암, 감각신경모세포종, 유잉 육종, 두개의 생식 세포 종양, 생식선의 생식 세포 종양, 눈암, 나팔관암, 섬유성 조직육종, 섬유육종, 담낭암, 위암, 위장 카르시노이드 종양, 위장 간질 종양 (GIST), 생식 세포 종양, 신경교종, 교모세포종, 두경부암, 혈관모세포종, 간세포암, 하인두암, 안구내 흑색종, 카포시 육종, 신장암, 후두암, 평활근육종, 구순암, 지방육종, 간암, 폐암, 비소세포 폐암, 폐 카르시노이드 종양, 악성 중피종, 수질 암종, 수모세포종, 수막종, 흑색종, 메르켈 세포 암종, 정중선 관 암종, 입안 암, 점액육종, 골수이형성 증후군, 골수증식성 신생물, 비강 및 부비동 암, 비인두암, 신경모세포종, 희돌기교종, 구내암, 구강암, 구인두암, 골육종, 난소암, 췌장암, 췌장 섬 세포 종양, 유두상 암종, 부신절종, 부갑상선암, 음경암, 인두암, 크롬친화세포종, 송과체종, 뇌하수체 종양, 흉막폐 모세포종, 원발성 복막암, 전립선암, 직장암, 망막모세포종, 신장 세포암종, 신우 및 요관 암, 횡문근육종, 타액선암, 피지선 암종, 피부암, 연조직 육종, 편평 세포 암종, 소세포 폐암, 소장암, 위암, 담낭 암종, 윤활막종, 고환암, 인후암, 흉선암, 갑상선암, 요도암, 자궁암, 자궁 육종, 질암, 혈관암, 외음부암 및 윌름스 종양.
- [0328] 또 다른 실시양태에서, 세포는 접근가능한 클라우딘-3 단백질을 발현하는 고형암 세포이다. 또 다른 추가 실시양태에서, 암은 고형암이다. 본원에 기재된 CAR, CAR 발현 세포 및 조성물로 예방, 치료 또는 호전될 수 있는 접근가능한 클라우딘-3 단백질을 발현하는 예시적인 고형암 세포는 식도암, 폐암 (예를 들어, 비소세포 폐암 (NSCLC)), 난소암, 자궁경부암, 췌장암, 담관암종, 위암, 결장암, 결장직장암, 방광암, 신장암 및 유방암 (예를 들어, 삼중-음성 유방암 (TNBC)) 세포를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0329] 특정 실시양태에서, 암 세포는 결장직장암, 췌장암, 유방암, 난소암 또는 폐암이다. 일부 실시양태에서, 유방암은 삼중-음성 유방암 (TNBC)이다. 일부 실시양태에서, 폐암은 비소세포 폐암 (NSCLC)이다. 그러므로, 추가 실시양태에서, 암은 결장직장암, 췌장암, 삼중-음성 유방암 (TNBC), 난소암 및 비소세포 폐암 (NSCLC)으로부터 선택된다.
- [0330] 다른 실시양태에서, 세포는 상피 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 암은 상피암이다. 예시적인 상피암은 고형암, 예컨대 상기 기재된 것들을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0331] 본원에서 고려되는 CAR, CAR 발현 세포 및 조성물로 예방, 치료 또는 호전될 수 있는 액상암 또는 혈액암의 예시적인 예는 백혈병, 림프종 및 다발성 골수종을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 본원에서 고려되는 CAR 및

조성물에 의해 표적화될 수 있는 세포의 예시적인 예는 하기 백혈병을 포함하나 이에 제한되지는 않는다: 급성 림프구성 백혈병 (ALL), T 세포 급성 림프모구성 백혈병, 급성 골수양 백혈병 (AML), 골수모구성, 전골수구성, 골수단핵구성, 단핵구성, 적백혈병, 털모양 세포 백혈병 (HCL), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 및 만성 골수양 백혈병 (CML), 만성 골수단핵구성 백혈병 (CNL) 및 진성 다혈구증.

- [0332] 치료 방법 및 세포독성 증가
- [0333] 본원에서 고려되는 CAR 분자는 본원에 기재된 암을 치료하기 위한 조성물, 세포 및 방법에 사용되어, 이에 의해 상기 암과 연관된 적어도 하나의 증상을 예방, 치료 또는 호전시키도록 의도된다. 특정한 실시양태에서, 본 발명은 유전적으로 변형된 면역 이펙터 세포를 사용하여 상기 암에서 CAR의 결합에만 접근가능하고/거나 이용가능한 에피토프를 발현하는 암의 개선된 세포 요법에 관한 것이다.
- [0334] 본원에서 고려되는 입양 세포 요법의 개선된 조성물 및 방법은 쉽게 확장될 수 있고, 생체내에서 장기간 지속성을 나타내고, 본원에 기재된 에피토프를 발현하는 암 세포에 대한 항원 의존적 세포독성을 입증하는 유전적으로 변형된 면역 이펙터 세포를 제공한다.
- [0335] 용어 "개체", "대상체" 및 "환자"는 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 한 실시양태에서, 대상체는 동물이다. 또 다른 실시양태에서, 대상체는 포유동물, 예컨대 영장류, 예를 들어 마모셋 또는 원숭이이다. 또 다른 실시양태에서, 대상체는 인간이다.
- [0336] 그러므로, 다른 측면에서, 본원에 기재된 CAR, 폴리펩티드, 벡터, 면역 이펙터 세포 및 조성물을 사용하여 암을 치료하는 방법이 제공된다. 본원에서 고려되는 유전적으로 변형된 면역 이펙터 세포는 접근가능한 클라우딘-3 단백질을 발현하는 암의 예방, 치료 및 호전에서 사용하기 위한, 또는 접근가능한 클라우딘-3 단백질 발현 암과 연관된 적어도 하나의 증상을 예방, 치료 또는 호전시키기 위한 입양 면역요법의 개선된 방법을 제공한다.
- [0337] 다양한 실시양태에서, 본원에서 고려되는 유전적으로 변형된 면역 이펙터 세포는 암을 갖는 대상체에서 암 세포에 대한 세포독성을 증가시키는데 사용하기 위한 또는 암을 갖는 대상체에서 암 세포의 수를 저하시키는데 사용하기 위한 입양 면역요법의 개선된 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 암 또는 암 세포는 본원에 기재된 CAR 및 CAR 발현 세포에 의해 결합에 접근가능하고/거나 이용가능한 클라우딘-3 단백질을 발현한다.
- [0338] 특정한 실시양태에서, 1차 면역 이펙터 세포의 특이성은 본원에서 고려되는 CAR을 사용하여 1차 면역 이펙터 세포를 유전적으로 변형함으로써 접근가능한 클라우딘-3 단백질을 발현하는 세포, 예를 들어 암 세포로 재지시된다. 다양한 실시양태에서, 바이러스 벡터는 클라우딘-3 결합 단백질, 예를 들어 항-클라우딘-3 항체 또는 항원 결합 도메인; 힌지 도메인; 막형단 (TM) 도메인; 하나 이상의 공동-자극 도메인; 및 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 CAR을 코딩하는 특정한 폴리뉴클레오티드로 면역 이펙터 세포를 유전적으로 변형하는데 사용된다.
- [0339] 한 실시양태에서, T 세포가 본원에 기재된 바와 같은 CAR을 발현하도록 유전적으로 변형되어 그러므로 CAR-T 세포를 제공하는 세포 요법의 유형이 제공되며, 여기서 CAR-T 세포는 이를 필요로 하는 수용자 또는 대상체에게 주입된다. 주입된 세포는 수용자에서 질환 유발 세포를 사멸시킬 수 있다. 항체 요법과 달리, CAR-T 세포는 생체내에서 복제할 수 있어 장기간 지속성을 초래하여 지속적인 암 요법을 유발할 수 있다. 또한, 본원에서 고려되는 CAR-T 세포 요법은 상기 본원에 기재된 바와 같은 항체 요법과 비교하여 증가된 민감성 및 선택성을 입증할 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 항원/에피토프 결합 도메인을 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 CAR은 동일한 항원/에피토프 결합 도메인을 포함하는 항체보다 더 큰 민감성 및 선택성을 나타내어 CAR-발현 세포의 활성화가 검출될 수 있지만 (즉, 항체 또는 항원/에피토프 결합 도메인이 CAR에 포함되며 그러므로 불용성 세포 형식으로 세포에 의해 발현되는 경우), 가용성 항체의 결합은 직접적인 시각화 방법을 통해 검출되지 않는다.
- [0340] 한 실시양태에서, CAR-T 세포는 견고한 생체내 T 세포 확장을 겪을 수 있고 연장된 시간 동안 지속될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, CAR-T 세포는 임의의 추가적인 종양 형성 또는 성장을 억제하기 위해 재활성화될 수 있는 특정 기억 T 세포로 진화한다.
- [0341] 일부 실시양태에서, 본원에서 고려되는 CAR을 포함하는 면역 이펙터 세포를 포함하는 조성물은 접근가능한 클라우딘-3 단백질을 발현하는 암 세포 또는 암 줄기 세포와 연관된 병태의 치료에 사용된다.
- [0342] 본원에서 사용된 바와 같은 어구 "적어도 하나의 증상을 호전시키는"은 대상체가 치료되는 질환 또는 병태의 하나 이상의 증상을 저하시키는 것을 지칭한다. 특정한 실시양태에서, 치료될 질환 또는 병태는 암이며, 여기서

호전된 하나 이상의 증상은 쇠약, 피로, 숨가쁨, 쉽게 멍이 들고 출혈이 발생함, 빈번한 감염, 림프절 비대, 복부가 팽창하거나 통증이 있음 (복부 장기 비대로 인해), 뼈 또는 관절 통증, 골절, 계획되지 않은 체중 감소, 식욕 부진, 야간 발한, 지속적인 미열, 및 배뇨 저하 (신장 기능 손상으로 인해)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0343] 본원에서 사용된 용어 "향상시키다", "촉진하다", "증가시키다" 또는 "확장하다"는 일반적으로 대조군 분자/조성물에 의해 또는 대조군 조건에서 유발된 반응과 비교하여 더 큰 생리학적 반응 (즉, 하류 효과)을 생성, 유발 또는 초래하는 본원에서 고려되는 조성물, 예를 들어 CAR을 코딩하는 유전적으로 변형된 T 세포 또는 백터의 능력을 지칭한다. 측정가능한 생리학적 반응은 T 세포 확장, 활성화, 지속성의 증가 및/또는 암 세포 사멸 능력의 증가를 포함할 수 있으며, 특히 관련 기술분야의 이해 및 본원의 설명으로부터 명백하다. "증가된" 또는 "향상된" 양은 전형적으로 "통계적으로 유의한" 양이며, 대조군 조성물 또는 대조군 세포 계통에 의해 생성된 반응의 1.1, 1.2, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 50, 100, 200, 500배 또는 그 초과와 증가를 포함할 수 있다. 예를 들어, 이러한 증가된 또는 향상된 양은 접근불가능/이용불가능한 클라우딘-3 단백질을 발현하고/거나 무손상 또는 손상되지 않은 (예를 들어, 비파괴된) 세포-세포 이음부를 포함하는 건강한 비암성 세포에 나타나는 반응과 비교될 수 있다. 그러므로, 일부 실시양태에서, 이러한 증가된 또는 향상된 반응은 접근가능한 클라우딘-3 단백질을 발현하고/거나 손상된/파괴된 세포-세포 이음부를 포함하는 암 세포에 대해 나타난다.

[0344] 용어 "저하시키다", "낮추다", "줄이다", "감소시키다" 또는 "약해지다"는 일반적으로 대조군 분자/조성물에 의해 또는 대조군 조건에서 유발된 반응과 비교하여 더 적은 생리학적 반응 (즉, 하류 효과)을 생성, 유발 또는 초래하는 본원에서 고려되는 조성물의 능력을 지칭한다. "저하된" 또는 "감소된" 양은 전형적으로 "통계적으로 유의한" 양이며, 대조군 조성물에 의해 생성된 반응 (참조 반응) 또는 특정한 세포 계통에서의 반응의 1.1, 1.2, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 50, 100, 200, 500배 또는 그 초과와 저하를 포함할 수 있다.

[0345] 한 측면에서, 요법에서 사용하기 위한, 예컨대 암의 요법 및/또는 치료에서 사용하기 위한, 본원에서 고려되는 CAR, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 백터, 면역 이펙터 세포 또는 조성물이 제공된다. 추가 측면에서, 의약, 예컨대 항암 의약으로서 사용하기 위한, 본원에서 고려되는 CAR, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 백터, 면역 이펙터 세포 또는 조성물이 제공된다. 일부 실시양태에서, 요법에서 사용하기 위한, 본원에서 고려되는 CAR, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 백터, 면역 이펙터 세포 또는 조성물은 요법 방법 및/또는 치료 방법, 예컨대 암 요법 방법 및/또는 암 치료 방법에서 사용하기 위한 것이다.

[0346] 한 측면에서, 암 치료에서 사용하기 위한, 본원에서 고려되는 CAR, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 백터, 면역 이펙터 세포 또는 조성물이 제공되며, 여기서 암은 세포-세포 이음부의 파괴 및/또는 손상된 세포-세포 이음부를 포함한다. 또 다른 측면에서, 암에 걸린 대상체를 치료하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 본원에서 고려되는 CAR, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 백터, 면역 이펙터 세포 또는 제약 조성물의 치료 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 여기서 암은 세포-세포 이음부의 파괴 및/또는 손상된 세포-세포 이음부를 포함한다. 그러므로, 일부 실시양태에서, 암 치료를 필요로 하는 대상체에서 암 치료 방법은 본원에서 고려되는 유전적으로 변형된 면역 이펙터 세포를 포함하는 조성물의 유효량, 예를 들어 치료 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 투여량 및 투여 빈도는 인자, 예컨대 환자의 상태 및 환자의 질환의 유형 및 중증도에 의해 결정될 것이지만, 적절한 투여량은 임상 시험에 의해 결정될 수 있다.

[0347] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 원하는 요법에 영향을 미치기 위해 본원에서 고려되는 조성물의 다중 투여가 필요할 수 있음을 인식할 것이다. 예를 들어, 조성물은 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 1년, 2년, 5년, 10년 또는 그 초과와 기간에 걸쳐 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10회 또는 그 초과 투여될 수 있다. 대안적으로, 본원에서 고려되는 조성물의 단 1회 투여가 필요할 수 있다.

[0348] 한 실시양태에서, 이를 필요로 하는 대상체는 대상체에서 암에 대한 세포성 면역 반응을 증가시키기 위한 조성물의 유효량을 투여받는다. 그러므로, 추가 측면에서, 이를 필요로 하는 대상체, 예컨대 암에 걸린 대상체에서 파괴된 세포-세포 이음부를 포함하는 암 세포에 대한 세포독성을 증가시키는 방법이 제공되며, 상기 방법은 본원에서 고려되는 CAR, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 백터, 면역 이펙터 세포 또는 조성물의 일정량을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0349] 면역 반응은 감염된 세포를 사멸시킬 수 있는 세포독성 T 세포, 조절성 T 세포 및 헬퍼 T 세포 반응에 의해 매개되는 세포성 면역 반응을 포함할 수 있다. B 세포를 활성화시켜 항체 생산을 유발할 수 있는 헬퍼 T 세포에

의해 주로 매개되는 체액성 면역 반응이 또한 유도될 수 있다. 조성물에 의해 유도된 면역 반응의 유형을 분석하기 위해 다양한 기술이 사용될 수 있으며, 이는 관련 기술분야에 잘 기재되어 있다; 예를 들어, 문헌 [Current Protocols in Immunology, Edited by: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober (2001) John Wiley & sons, NY, N.Y.].

[0350] T 세포-매개 사멸의 경우, CAR-리간드 결합은 T 세포에 대한 CAR 신호전달을 개시하여, T 세포가 다양한 메커니즘에 의해 표적 세포 아포토시스를 유도할 수 있는 단백질을 생성 또는 방출하도록 유도하는 다양한 T 세포 신호전달 경로의 활성화를 초래한다. 이들 T 세포-매개 메커니즘은 T 세포로부터 표적 세포로의 세포내 세포독성 과립의 전이, 표적 세포 사멸을 직접적으로 (또는 다른 살해 이펙터 세포의 모집을 통해 간접적으로) 유도할 수 있는 전염증성 시토카인의 T 세포 분비, 및 표적 세포 상의 동족 사멸 수용체 (예를 들어, Fas)에 결합한 후 표적 세포 아포토시스를 유도하는 T 세포 표면 상의 사멸 수용체 리간드 (예를 들어, FasL)의 상향조절을 포함한다 (그러나 이에 제한되지는 않음). 그러므로, 한 측면에서, 암에 걸린 대상체에서 파괴된 세포-세포 이음부를 포함하는 암 세포의 수를 저하시키는 방법이 제공되며, 상기 방법은 본원에서 고려되는 CAR, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 면역 이펙터 세포 또는 조성물의 치료 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 파괴된 세포-세포 이음부를 포함하는 암 세포의 수를 저하시키는 것은 T 세포-매개 사멸을 포함한다.

[0351] 한 실시양태에서, 치료 유효량을 포함할 수 있는 "유효량"은 투여 전에 파괴된 세포-세포 이음부 및/또는 손상된 세포-세포 이음부를 포함하는 암 세포에 대한 세포독성과 비교하여 암 세포, 예컨대 파괴된 세포-세포 이음부 및/또는 손상된 세포-세포 이음부를 포함하는 암 세포에 대한 세포독성을 증가시키기에 충분하다. 또 다른 실시양태에서, "유효량"은 투여 전에 파괴된 세포-세포 이음부 및/또는 손상된 세포-세포 이음부를 포함하는 암 세포의 수와 비교하여 암 세포, 예컨대 파괴된 세포-세포 이음부 및/또는 손상된 세포-세포 이음부를 포함하는 암 세포의 수를 저하시키기에 충분하다.

[0352] 특정 실시양태에서, 본원에서 고려되는 방법은 절제 요소의 활성화제 또는 결합제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 이러한 활성화제 또는 결합제는 항체 (예를 들어, 임상적으로 승인된 항체), 예컨대 huEGFRt 또는 CD20을 인식하고 결합하는 항체 (즉, 각각 세톡시맵 또는 리톡시맵), CD20의 소분자 길항제 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 예컨대 대상체 또는 암의 완전한 반응 이후 대상체의 치료가 완료된 것으로 간주되면 절제 요소의 활성화제 또는 결합제의 투여가 수행될 수 있다. 그러므로 절제 요소 활성화제 또는 결합제의 투여가 대상체에서 임의의 만성 CAR-발현 T 세포 활성을 예방할 것이라는 것이 이해될 것이다. 추가 실시양태에서, 본원에서 고려되는 방법은 항체-의존적 세포성 세포독성 (ADCC) 및/또는 보체-의존적 세포독성 (CDC)에 대해 CAR-발현 세포를 표적화하기 위해 절제 요소를 활용하는 것을 추가로 포함한다. 그러므로, 특정 실시양태에서, 본원에서 고려되는 방법은 CAR-발현 세포, 예컨대 CAR-발현 T 세포의 소거를 추가로 포함한다. 다른 실시양태에서, 예를 들어 시토카인 폭풍을 치료하기 위해, 예컨대 스테로이드를 투여함으로써 대상체에서 임의의 급성 CAR-발현 T 세포 활성을 억압하는 것이 바람직할 수 있다.

[0353] 추가 측면에서, 의약, 예컨대 항암 의약의 제조를 위한, 본원에서 고려되는 CAR, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 면역 이펙터 세포 또는 조성물의 용도가 제공된다. 한 실시양태에서, 본원에서 고려되는 의약의 제조를 위한 용도는 암 치료용 의약의 제조이다.

[0354] 한 실시양태에서, 하기를 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR): a) 세포 이음부 단백질의 적어도 하나의 에피토프에 결합하는 항원 결합 단백질을 포함하는 세포의 도메인, 여기서 상기 세포 이음부 단백질은 세포-세포 이음부 내에 위치되고, 여기서 세포 이음부 단백질의 상기 적어도 하나의 에피토프는 암 세포에서 상기 CAR 세포의 도메인에 의한 결합에만 접근가능함; b) 막횡단 도메인; 및 c) 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인. 한 실시양태에서, CAR은 하나 이상의 공동-자극 도메인을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 어느 하나에 따른 CAR, 여기서 세포 이음부 단백질은 치밀 이음부 단백질이고/거나, 여기서 적어도 하나의 에피토프는 세포-세포 이음부가 조직화된 조직 내의 세포 사이에 있는 경우; 및/또는 세포-세포 이음부가 손상되지 않은 경우 CAR 세포의 도메인에 의한 결합에 접근불가능하고/거나; 여기서 적어도 하나의 에피토프는 세포-세포 이음부가 암 세포 사이, 암 세포 및 비암성 세포 사이에 있는 경우, 세포-세포 이음부가 손상되는 경우, 및/또는 세포 이음부 단백질이 세포-세포 이음부 외부에 잘못 편재화된 경우 CAR의 세포의 도메인에 의한 결합에 접근가능하다.

[0355] 한 실시양태에서, 선행 실시양태 중 어느 하나에 따른 CAR, 여기서 세포 이음부 단백질은 클라우딘 패밀리 단백질의 구성원이고/거나; 여기서 적어도 하나의 에피토프는 세포 이음부 단백질의 하나 이상의 세포의 루프에 존

재하고/거나; 여기서 세포 이음부 단백질은 클라우딘-3이고/거나; 여기서 클라우딘-3은 파괴된 또는 해체된 치밀 이음부를 갖는 고형암에서 세포 표면에 노출되고/거나; 여기서 클라우딘-3은 세포 표면에 노출되지 않고, 정상 또는 비암성 세포에서 세포-세포 이음부에 편재화된다.

[0356] 한 실시양태에서, 선행 실시양태 중 어느 하나에 따른 CAR, 여기서 적어도 하나의 에피토프는 클라우딘-3에 고유하게 존재하고/거나; 여기서 적어도 하나의 에피토프는 길이가 4개 아미노산이고/거나; 여기서 적어도 하나의 에피토프는 불연속적 에피토프이다.

[0357] 한 실시양태에서, 선행 실시양태 중 어느 하나에 따른 CAR, 여기서 항원 결합 단백질은 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로부터 선택되고/거나; 여기서 항원 결합 단백질은 모노클로날 항체, 낙타 Ig, Ig NAR, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab)'2 단편, F(ab)'3 단편, Fv, scFv, bis-scFv, (scFv)2, 미니바디, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 디숄피드 안정화된 Fv 단백질 ("dsFv") 및 sdAb로 이루어진 군으로부터 선택되고/거나; 여기서 항원 결합 단백질은 scFv이다.

[0358] 한 실시양태에서, 선행 실시양태 중 어느 하나에 따른 CAR, 여기서 항원 결합 단백질은 서열식별번호: 7로부터의 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3 및/또는 서열식별번호: 8로부터의 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3으로부터 선택된 CDR 중 어느 하나 또는 이들의 조합을 포함하거나; 또는 항원 결합 단백질은 서열식별번호: 7 및 8로부터의 6개 CDR 모두를 포함하거나; 또는 항원 결합 단백질은 서열식별번호: 1의 CDRH1 서열; 서열식별번호: 2의 CDRH2 서열; 서열식별번호: 3의 CDRH3 서열; 서열식별번호: 4의 CDRL1 서열; 서열식별번호: 5의 CDRL2 서열; 및 서열식별번호: 6의 CDRL3 서열을 포함한다. 이들 실시양태와 일치하여, 항원 결합 단백질은 서열식별번호: 7의 서열과 적어도 90% 동일한 가변 중쇄 (VH) 서열, 및 서열식별번호: 8의 서열과 적어도 90% 동일한 가변 경쇄 (VL) 서열을 포함하거나; 또는 여기서 항원 결합 단백질은 서열식별번호: 7의 가변 중쇄 (VH) 서열, 및 서열식별번호: 8의 가변 경쇄 (VL) 서열을 포함하거나; 또는 여기서 항원 결합 단백질은 N-말단에서 C-말단으로 서열식별번호: 7의 VH 서열 및 서열식별번호: 8의 VL 서열을 포함하거나; 또는 여기서 항원 결합 단백질은 N-말단에서 C-말단으로 서열식별번호: 8의 VL 서열 및 서열식별번호: 7의 VH 서열을 포함한다.

[0359] 한 실시양태에서, 선행 실시양태 중 어느 하나에 따른 CAR, 여기서 막횡단 도메인은 T-세포 수용체의 알파 또는 베타 쇄, CD3  $\delta$ , CD3  $\epsilon$ , CD3  $\gamma$ , CD3  $\zeta$ , CD4, CD5, CD8  $\alpha$ , CD9, CD16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 (4-1BB), CD152, CD154, CD278 (ICOS) 및 PD1로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리펩티드로부터 유래되거나; 또는 여기서 막횡단 도메인은 CD8  $\alpha$ 로부터 유래된다. 한 실시양태에서, 선행 실시양태 중 어느 하나에 따른 CAR, 선행 실시양태 중 어느 하나에 따른 CAR, 여기서 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인은 FcR  $\gamma$ , FcR  $\beta$ , CD3  $\gamma$ , CD3  $\epsilon$ , CD3  $\delta$ , CD3  $\zeta$ , CD22, CD66d, CD79a 및 CD79b로 이루어진 군으로부터 선택된 세포내 신호전달 분자로부터 유래되거나; 또는 여기서 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인은 CD3  $\zeta$ 이다. 한 실시양태에서, 선행 실시양태 중 어느 하나에 따른 CAR, CAR은 CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C, SLP76, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TRIM 및 ZAP70으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동-자극 분자로부터 유래된 하나 이상의 공동-자극 도메인을 추가로 포함하거나; 또는 여기서 하나 이상의 공동-자극 도메인은 CD137 (4-1BB)이다.

[0360] 한 실시양태에서, 선행 실시양태 중 어느 하나에 따른 CAR, 세포의 도메인은 서열식별번호: 11과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산을 포함하거나; 또는 여기서 CAR은 서열식별번호: 11의 아미노 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 선행 실시양태 중 어느 하나에 따른 CAR, 세포의 도메인은 서열식별번호: 18과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산을 포함하거나; 또는 여기서 CAR은 서열식별번호: 18의 아미노 서열을 포함한다.

[0361] 한 실시양태에서, 선행 실시양태 중 어느 하나에 따른 CAR, CAR은 서열식별번호: 12, 24, 25, 27, 28, 29 또는 30과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나; 또는 여기서 CAR은 서열식별번호: 12, 24, 25, 27, 28, 29 또는 30의 아미노산 서열을 포함하거나; 또는 여기서 CAR은 서열식별번호: 10의 CD8 리더 서열 없이 서열식별번호: 12, 24, 25, 27, 28, 29 또는 30과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 선행 실시양태 중 어느 하나에 따른 CAR에 도입된 서열식별번호: 10의 CD8 리더 서열이 관련 기술분야에 공지된 표준 기술을 사용하여 CAR의 기능에 영향을 주지 않고 변형 또는 결실될 수 있음을 이해할 것이다. 이들 실시양태와 일치하여, 선행 실시양태 중 어느 하나에 따른 CAR,

CAR은 서열식별번호: 34, 35, 36, 37, 38 또는 39와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0362] 한 실시양태에서, 선행 실시양태 중 어느 하나에 따른 CAR, CAR은 a) 서열식별번호: 1의 CDRH1 서열; 서열식별번호: 2의 CDRH2 서열; 서열식별번호: 3의 CDRH3 서열; 서열식별번호: 4의 CDRL1 서열; 서열식별번호: 5의 CDRL2 서열; 및 서열식별번호: 6의 CDRL3 서열을 포함하는 클라우딘-3 결합 단백질을 포함하는 세포외 도메인; b) CD8 α로부터 유래된 막횡단 도메인; c) CD137 (4-1BB)로부터 유래된 공동-자극 도메인; 및 d) CD3 ζ로부터 유래된 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 선행 실시양태 중 어느 하나에 따른 CAR와 결합에 대해 경쟁하는 CAR이 제공된다.

[0363] 한 실시양태에서, 선행 실시양태 중 어느 하나의 CAR의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드가 제공된다. 또 다른 실시양태에서, 폴리펩티드는 절제 요소를 추가로 포함한다. 이들 실시양태와 일치하여, 절제 요소는 항체 또는 항원 결합 단편을 사용하여 항체-의존적 세포성 세포독성 (ADCC) 및/또는 보체-의존적 세포독성 (CDC)에 대해 표적화되는 세포 표면 단백질이고/거나; 여기서 절제 요소는 말단절단된 인간 EGFR 폴리펩티드 (huEGFRt) 및 CD20으로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리펩티드로부터 유래되거나, 또는 여기서 절제 요소는 CD20이다. 한 실시양태에서, 선행 실시양태 중 어느 하나에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터가 제공된다. 또 다른 실시양태에서, 벡터는 바이러스 벡터이고/거나; 여기서 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터, 예컨대 렌티바이러스 벡터이고/거나; 여기서 레트로바이러스 벡터는 인간 면역결핍 바이러스 I (HIV-I); 인간 면역결핍 바이러스 2 (HIV-2), 비스나-매디 바이러스 (VMV); 염소 관절염-뇌염 바이러스 (CAEV); 말 감염성 빈혈 바이러스 (EIAV); 고양이 면역결핍 바이러스 (FIV); 소 면역결핍 바이러스 (BIV); 및 유인원 면역결핍 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 어느 하나에 따른 폴리뉴클레오티드 서열 및/또는 선행 실시양태 중 어느 하나에 따른 벡터를 포함하는 벡터 생산자 세포가 제공된다.

[0364] 한 실시양태에서, 선행 실시양태 중 어느 하나에 따른 CAR, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드 및/또는 벡터를 포함하는 면역 이펙터 세포가 제공된다. 이들 실시양태와 일치하여, 면역 이펙터 세포는 T 림프구, 자연 살해 T 림프구 (NKT) 세포, 대식세포 및 자연 살해 (NK) 세포로 이루어진 군으로부터 선택되거나; 또는 여기서 면역 이펙터 세포는 세포독성 T 림프구 (CD8+)이다. 한 실시양태에서, 선행 실시양태 중 어느 하나에 따른 면역 이펙터 세포 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물이 제공된다. 또한, 선행 실시양태 중 어느 하나에 따른 CAR을 포함하는 면역 이펙터 세포를 생성하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 선행 실시양태 중 어느 하나에 따른 폴리뉴클레오티드 및/또는 벡터를 면역 이펙터 세포에 도입하는 것을 포함한다. 이들 실시양태와 일치하여, 상기 방법은 세포를 CD3에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 CD28에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 접촉시키고; 이에 의해 면역 이펙터 세포 집단을 생성함으로써 증식하도록 면역 이펙터 세포를 자극하고 세포를 유도하는 것을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 면역 이펙터 세포를 자극하는 것은 선행 실시양태 중 어느 하나에 따른 벡터를 세포에 도입하기 전에 수행되고/거나; 여기서 면역 이펙터 세포는 T 림프구를 포함한다.

[0365] 한 실시양태에서, 암 치료에서 사용하기 위한 선행 실시양태 중 어느 하나에 따른 CAR, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 면역 이펙터 세포 또는 제약 조성물이 제공된다. 한 실시양태에서, 암 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 선행 실시양태 중 어느 하나에 따른 CAR, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 면역 이펙터 세포 또는 제약 조성물의 치료 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 암을 갖는 대상체에서 암 세포에 대한 세포독성을 증가시키는 방법이 제공되며, 상기 방법은 선행 실시양태 중 어느 하나에 따른 CAR, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 면역 이펙터 세포 또는 제약 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 암을 갖는 대상체에서 암 세포에 대한 세포독성을 증가시키는 방법이 제공되며, 상기 방법은 선행 실시양태 중 어느 하나에 따른 CAR, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 면역 이펙터 세포 또는 제약 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 다른 실시양태에서, 암을 갖는 대상체에서 암 세포의 수를 저하시키는 방법이 제공되며, 상기 방법은 선행 실시양태 중 어느 하나에 따른 CAR, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 면역 이펙터 세포 또는 제약 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 이들 실시양태와 일치하여, 암은 클라우딘-3이 결합에 접근가능하도록 치밀 이음부 외부의 클라우딘-3의 잘못된 편재화 및/또는 치밀 이음부의 파괴에 의해 특징화되거나; 또는 여기서 암은 치밀 이음부의 파괴로 인해 세포 표면에 노출된 클라우딘-3에 의해 특징화된다. 한 실시양태에서, 암은 고형암이거나; 또는 여기서 고형암은 결장직장암, 췌장암, 유방암 (예를 들어, 삼중-음성 유방암 (TNBC)), 난소암, 폐암 (예를 들어, 비소세포 폐암 (NSCLC)), 또는 전립선암이거나; 또는 여기서 암은 상피암이다.

- [0366] 한 실시양태에서, 암 치료용 의약의 제조에서 선행 실시양태 중 어느 하나에 따른 CAR, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 면역 이펙터 세포 또는 제약 조성물의 용도가 제공된다. 또 다른 실시양태에서, 요법에서 사용하기 위한, 제48항에 따른 선행 실시양태 중 어느 하나에 따른 CAR, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 면역 이펙터 세포 또는 제약 조성물이 제공된다.
- [0367] 전술한 실시양태는 명확한 이해를 위해 예시 및 실시예를 통해 어느 정도 상세하게 설명되었지만, 본원에서 고려되는 교시에 비추어 특정 변화 및 변형이 첨부된 청구범위의 취지 또는 범위를 벗어나지 않으면서 이에 따라 이루어질 수 있다는 것은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 쉽게 명백할 것이다. 하기 실시예는 예시로서만 제공되며 제한으로서 제공되지 않는다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본질적으로 유사한 결과를 산출하기 위해 변화 또는 변형될 수 있는 다양한 중요하지 않은 파라미터를 쉽게 인식할 것이다.
- [0368] 실시예
- [0369] 실시예 1 - CAR-T 세포의 생성
- [0370] 건강한 인간 말초 혈액으로부터의 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T 세포를 단리하고, 후속적으로 항-클라우딘-3 또는 대조군 CAR 구축물 (대조군 CAR은 항-CD19 CAR이었음)을 코딩하는 렌티바이러스 벡터로 형질도입하였다. 건강한 공여자로부터 단리된 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T 세포를 모두 항-클라우딘-3 CAR 또는 대조군 항-CD19 CAR을 코딩하는 렌티바이러스 벡터로 성공적으로 형질도입하였다. 다중 공여자로부터 단리된 세포로부터 CAR T 세포를 생성하고, 후속 시험 관내 및 생체내 기능 검정에 필요한 바와 같이 확장 및 동결하였다.
- [0371] 재료 및 방법
- [0372] CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T 세포의 단리 및 T 세포의 활성화
- [0373] 제조업체의 지침에 따라 히스토파크(Histopaque) (시그마(Sigma), 카탈로그 번호 10771)를 사용하여 하기와 같이 전체 말초 혈액 및 NHS 혈액 및 이식물 (NHSBT) 콘으로부터 말초 혈액 단핵구 (PBMC)를 단리하였다. 세포를 AutoMACS 러닝 완충액에 재현탁하고, FcR 차단 시약, CD4 마이크로비드 및 CD8 마이크로비드 (모두 밀테니 바이오 오텍(Miltenyi Biotec))를 10<sup>7</sup>개 세포당 첨가하였다. 세포를 혼합하고, 15분 동안 4°C에서 인큐베이션하였다. 그 후, 세포를 세척하고, 원심분리하고, 10<sup>8</sup>개 세포당 냉 AutoMACS 러닝 완충액에 재현탁하였다. Posse1\_S 분리 프로토콜을 사용하여 AutoMACS 프로-분리기 (밀테니 바이오오텍)에서 세포 용액을 실행하였다. EDTA가 T 세포 활성화에 영향을 미칠 수 있으므로, 자기적으로 표지된 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T 세포를 함유하는 양성 분획을 PBS로 3회 세척하여 세포 용액 내 EDTA 양의 적어도 200배 감소를 보장하였다. 최종 PBS 세척 후, 세포 펠렛을 적절한 부피의 TEXMACS 배지 (밀테니 바이오오텍)에 재현탁하고, NC-250 뉴클레오카운터(Nucleocounter) (케모메텍 (ChemoMetec))에서 카운팅하기 위해 샘플을 제거하였다.
- [0374] 세포를 TEXMACS 배지에 재현탁하였다. 트랜스액트(TransAct) T 세포 활성화 시약 (밀테니 바이오오텍) 뿐만 아니라 IL-7 및 IL-15를 세포에 첨가하여 각 시토카인에 대한 10ng/mL의 최종 농도를 달성하였다. 세포 용액을 세포 배양 플레이트에 플레이팅하고 (1x10<sup>6</sup>개 세포/mL), 후속적으로 세포를 5% CO<sub>2</sub>와 함께 가습 인큐베이터 내에서 37°C에서 24시간 동안 인큐베이션하였다.
- [0375] 렌티바이러스 벡터를 사용한 T 세포의 형질도입 및 CAR-T 세포의 확장
- [0376] 906\_009-LNGFR로 지칭되는 리포터 유전자 (LNGFR)를 갖는 항-클라우딘-3 CAR (906\_009)을 코딩하는 렌티바이러스 벡터, 또는 항-CD19 CAR 벡터 (대조군)로 3의 MOI에서 세포를 형질도입하였다. CAR 구축물은 T-세포를 발현하는 CAR-T 세포의 검출 및/또는 풍부화를 가능하게 하는 LNGFR 마커를 포함하였다. LNGFR 마커 시스템은 일시적으로 발현된 말단절단된 인간 저친화성 신경 성장 인자 수용체 (LNGFR) 분자를 표면 마커로서 사용하여 형질감염된 세포를 검출 및/또는 선택한다. 세포를 가습 인큐베이터 내에서 5% CO<sub>2</sub>와 함께 37°C에서 인큐베이션하였다. 세포를 배양 기간 전반에 걸쳐 각 시토카인의 10 ng/mL 농도에서 TEXMACs 배지 및 IL-17 및 IL-15에서 유지하였다. 일부 배치의 경우, IL-7 & IL-15 대신 IL-2에서 세포를 배양하였다. IL-2를 사용한 경우, 동일한 배양 절차를 따랐지만, IL-7 & IL-15 대신 100 국제 단위 (IU)/mL의 IL-2를 첨가하였다. 형질도입 후 12일에 T 세포를 수확하고, 1x10<sup>7</sup> 내지 1x10<sup>8</sup>개 세포/mL의 세포 밀도로 CS5 동결 배지 (시그마, # C2999)에서 동결하였다.

- [0377] 유동 세포계측법 (맥스퀀트(MACSQuant) 분석기 10)을 사용하여 PE 접합된 항-LNGFR 항체 (Ab)를 사용하여 말단 절단된 인간 저친화성 신경 성장 인자 수용체 (LNGFR; CD271)의 발현을 검출함으로써 형질도입 효율을 결정하였다. 플로우조(FlowJo) v10.1을 사용하여 데이터를 분석하였다.
- [0378] 특정 CAR-T 배치의 경우, 모든 CAR-T 집단을 가장 낮은 형질도입 효율로 정규화해야 하였다. CAR-T 세포 집단을 정확하게 정규화하기 위해, LNGFR<sup>+</sup> 세포의 빈도를 분석하고 세포를 카운팅하였다. 그 후, LNGFR<sup>+</sup> 세포의 빈도를 정의된 수준으로 낮추는데 필요한 비형질도입된 T 세포의 부피를 계산하고, 적절하게는 각 세포 집단에 첨가하였다.
- [0379] 항-클라우딘-3 CAR 벡터 (906\_009-LNGFR)로 형질도입된 세포의 2개 제제를 제조하였으며, 하나는 현탁액 세포 ("벡터 1"로 지칭됨)에서, 다른 하나는 접착성 세포 ("벡터 3"으로 지칭됨)에서 제조하였다. 2개의 상이한 세포 제제 사이의 형질도입 효율의 차이 (하기 논의 참조) 외에, 2개의 상이한 세포 제제 방법 사이에 유의한 차이가 관찰되지 않았다.
- [0380] CAR-T 세포의 순수한 집단의 생성을 위한 T 세포 풍부화
- [0381] 일부 CAR-T 배치의 경우, 하기 기재된 바와 같이 AutoMACs 프로-분리기 풍부화 또는 이지셀 풍부화를 사용한 양성 선택에 의해 CAR-T 세포의 순수한 집단을 생성하기 위해 유도 후 12일차에 T 세포를 풍부화하였다.
- [0382] AutoMACs 프로-분리기 풍부화를 위해, LNGFR 마이크로비드 (밀테니 바이오텍)를 10<sup>7</sup>개 세포당 첨가하고, 세포를 잘 혼합한 후, 15분 동안 4°C에서 인큐베이션하였다. 세포를 세척하고, Posse1\_S 분리 프로토콜을 사용하여 AutoMACS 프로-분리기에서 세포 용액을 실행하였다. EDTA가 T 세포 활성화에 영향을 미칠 수 있으므로, 자기적으로 표지된 LNGFR<sup>+</sup> T 세포를 함유하는 양성 분획을 PBS로 3회 세척하여 세포 용액 내 EDTA 양의 적어도 200배 감소를 보장하였다.
- [0383] 검정 요구사항 및 배양 내 총 세포 수에 따라 형질도입 후 9일차 또는 형질도입 후 12일차에 이지셀 풍부화를 수행하였다. 이지셀 인간 CD271 양성 선택 키트 II (스텝셀 테크놀로지스 유케이 리미티드(STEMCELL Technologies UK Ltd)) 및 이지셀 래피드스피어 비드 (스텝셀 테크놀로지스)를 사용하여 LNGFR로 태그부착된 상이한 CAR을 갖는 형질도입된 T-세포를 양성으로 선택하였다. 풍부화될 형질도입된 T-세포의 수에 따라, 이지플레이트(EASYPLATE) 자석 (스텝셀 테크놀로지스) 또는 이지에이트(EASYEIGHT) 자석 (스텝셀 테크놀로지스)을 사용하였다. 신선하게 해동된 또는 배양된 형질도입된 T 세포를 이지셀 인간 FcR 차단제 (25 µL/ml) 및 이지셀 인간 CD271 양성 선택 카테일 (50 µL/ml)이 보충된 TEXMACS 배지에 1x10<sup>7</sup> 내지 2x10<sup>7</sup> 사이의 밀도로 재현탁하고, 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다.
- [0384] 더 높은 세포 밀도를 위해, 1x10<sup>8</sup> 내지 2x10<sup>8</sup>개 세포를 표시된 농도의 이지셀 인간 FcR 차단제 및 이지셀 인간 CD271 양성 선택 카테일이 보충된 TEXMACS 배지에 재현탁하였다. 50 µL/mL의 이지셀 래피드스피어 비드를 각 샘플에 첨가하고, 세포를 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 샘플을 세척 완충액 (2% 소테아 혈청 (FBS) 및 2mM EDTA를 함유하는 PBS)으로 토핑하고, 이지플레이트 또는 이지에이트 이지셀 자석으로 이동시키고, 10분 동안 인큐베이션하였다. 비드에 부착된 양성 선택된 세포를 방해하지 않고 상청액을 조심스럽게 제거하였다. 3회 더 세척을 수행한 후, 세포를 TEXMACS 배지에 재현탁하고, NC-250 뉴클레오카운터에서 카운팅을 위해 샘플을 제거하고, 풍부화 후 LNGFR 분석을 위해 풍부화가 성공적이었는지 확증하였다.
- [0385] 형질도입 후 9일차에 풍부화를 수행한 경우, 풍부화된 CAR-T 세포를 10ng/mL 농도의 IL-7 및 IL-15를 갖는 TEXMACS 배지로 재플레이팅하였다. 세포를 37°C에서 5% CO<sub>2</sub>와 함께 가습 인큐베이터 내에서 72시간 동안 인큐베이션하고, 형질도입 후 12일차에 상기 기재된 바와 같이 동결시켰다.
- [0386] 형질도입 후 12일차에 풍부화를 수행한 경우, 풍부화된 세포를 기능 검정에 즉시 사용하거나 동결하였다.
- [0387] 결과
- [0388] T 세포의 확장, 형질도입 효율 및 CAR-T 세포 집단의 풍부화 및 정규화
- [0389] 모든 T 세포 집단은 성공적으로 확장되었으며, 배수 확장은 특정 공여자에 따라 14배 내지 178배 범위였다. 모든 T 세포 집단에 걸친 평균 배수 확장은 76이었다.
- [0390] 3의 MOI에서 항-클라우딘-3 CAR 벡터 1로 형질도입된 CAR-T 세포는 다중 공여자 및 벡터 배치에 걸쳐 41-60%의

형질도입 효율 (LNGFR 양성 세포의 빈도 기준)을 가졌다. 3의 MOI에서 항-클라우딘-3 CAR 벡터 3으로 형질도입된 CAR-T 세포는 사용된 3명의 공여자에서 29-37%의 더 낮은 형질도입 효율을 달성하였다. 모든 대조군 CAR T 세포 (항-CD19 CAR)는 3의 MOI를 사용하여 다중 공여자 및 벡터 배치에 걸쳐 48-75%의 형질도입 효율을 달성하였다.

- [0391] 100% LNGFR<sup>+</sup> CAR-T 세포 집단을 제공하기 위한 LNGFR<sup>+</sup> CAR-T 세포의 풍부화는 생산된 모든 CAR-T 세포 배치에 대해 도 2a에 제시된 바와 같이 AutoMACS 프로-분리기 풍부화 (데이터는 제시되지 않음) 및 이지셉 LNGFR 풍부화 둘 다를 통해 성공적이었다.
- [0392] LNGFR 발현 T 세포의 필수 빈도에 대한 CAR-T 세포 집단의 정규화는 생산된 CAR-T 배치에 대해 도 2b에 제시된 바와 같이 성공적이었다.
- [0393] AutoMACS 프로-분리기를 사용한 CD4 및 CD8 양성 선택은 0일차에 >95% CD3<sup>+</sup> 세포 집단이 형질도입되는 것을 가능하게 하였다. 이는 벡터가 원하는 세포 유형만을 효율적으로 형질도입하는 것을 가능하게 하였다. CD4/CD8 양성 선택 후 최소 단핵구 오염 (<5%)이 있었고, 남아있는 단핵구는 배양 기간에 걸쳐 사멸하여 형질도입 후 12일차에 순수한 CD3<sup>+</sup> 세포 집단이 생성되었다.
- [0394] 건강한 공여자로부터 단리된 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T 세포를 모두 항-클라우딘-3 CAR 또는 대조군 항-CD19 CAR을 코딩하는 렌티바이러스 벡터로 성공적으로 형질도입하였다. 렌티바이러스 벡터 1 내지 3 사이에서 형질도입 효율의 차이가 관찰되었다. 모든 T 세포 집단은 성공적으로 확장되었으며, 특정 CAR 구축물에 대한 공여자 내에서 일부 변칙적인 확장이 관찰되었다.
- [0395] AutoMACs 프로-분리기 및 이지셉 LNGFR 마이크로비드 둘 다를 사용함으로써 CAR-T 세포의 풍부화는 성공적이며, 후속 기능 검정을 위해 100% LNGFR+ CAR-T 집단의 제공을 가능하게 하였다. 이 외에도, LNGFR+ 세포의 필수 빈도에 대한 CAR-T 세포 집단의 정규화는 성공적이었다.
- [0396] 생산된 모든 CAR-T 세포는 항-클라우딘-3 CAR 벡터 1을 테스트하기 위한 기능 검정에 사용될 수 있었다. 현탁액 세포에서 생산된 CAR-T 세포를 후속 실험에 사용하였다.
- [0397] 실시예 2 - CAR 발현의 효과 및 T 세포 표현형
- [0398] 이 연구의 목적은 시험관내에서 항-클라우딘-3 CAR-T 세포에 대한 강장성 신호전달 (항원 독립적 신호전달)의 효과를 평가하는 것이었다. 강장성 신호전달을 나타내는 CAR-T 세포는 손상된 시험관내 T 세포 기능 및 고갈 및 열등한 생체내 효능을 유발한다. 강장성 신호전달은 CAR 구조, 링커 또는 힌지, 신호전달 도메인, 표면 발현 위치 및 수준의 특색의 조합에 의해 영향을 받는다. 강장성 신호전달은 세포 상청액에서 분비된 시토카인의 기본 수준 (IFN  $\gamma$ )의 측정에 의해 평가되었으며, 연속적 T-세포 표현형의 분화는 활성화 (CD69) 및 고갈 (PD-1 및 TIM-3) 마커의 측정 및 향상된 항원 독립적 신호전달 (pCD3  $\zeta$ )의 측정에 의해 평가되었다. 반응은 각각 낮은 수준 및 높은 수준의 강장성 신호전달을 나타내는 음성 대조군 항-CD19 CAR 및 양성 대조군 (GD2-28  $\zeta$ ) CAR에 대해 벤치마킹되었다.
- [0399] 결과는 항-CD19 CAR 음성 대조군 및 항-클라우딘-3 CAR 둘 다가 양성 대조군 (GD2-28  $\zeta$ ) CAR-T 세포와 비교하여 낮은 수준의 강장성 신호전달을 부여하였음을 입증하였으며, 이는 클라우딘-3 CAR 구축물에 대한 시험관내 낮은 수준의 항원 독립적 활성화를 나타낸다.
- [0400] 재료 및 방법
- [0401] 음성 및 양성 대조군 CAR의 생성
- [0402] 음성 대조군 항-CD19 CAR은 4-1BB-CD3  $\zeta$  세포질 신호전달 도메인을 갖는 FMC62 ScFv를 사용하여 생성되었으며, 낮은 수준의 강장성 신호전달 반응을 벤치마킹하기 위한 대조군으로서 본원에서 사용되었다. 양성 대조군 CAR (GD2-28  $\zeta$ )은 CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> IgG1 링커 및 CD28-CD3  $\zeta$  막횡단 및 세포질 관통 도메인을 갖는 14g2a scFv를 사용하여 생성되었다. 여기서, EF1a 프로모터는 CAR의 형질도입 효율을 향상시키는데 사용되었으며 강장성 신호전달 반응을 구동하는 증가된 성향을 초래해야 한다. CD28  $\zeta$  막횡단 및 세포질 도메인은 사용된 렌티벡터 형질도입 프로모터와 독립적인 4-1BB  $\zeta$  세포질 도메인과 비교하여 강장성 신호전달의 수준을 증가시켜야 한다. 또한, 14g2a 항-GD2 scFv 클론은 올리고머화하는 성향을 갖는다 - CAR 의존적 신호전달의 본질적인 활성화를 초래하는 GD2-28  $\zeta$  CAR 구조에 의해 특징화된 특색. 양성 대조군 CAR에 사용된 IgG1 CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> 세포의 링커는 또한 관찰된

강장성 신호전달 수준에 기여할 수 있다.

- [0403] CAR T-세포 해동 및 배양
- [0404] CAR-T 세포 (냉동-동결된 스톱 또는 신선한 세포로부터 해동됨)를 TEXMACS 배지에 재현탁하고, 세포 밀도를 10ng/mL IL-7/IL-15가 포함된 TEXMACS 배지에서  $2 \times 10^6$  개 세포/mL로 조정하였다. 재현탁된 세포를 LNGFR 풍부화 전에 24시간 동안 37°C에서 5% CO<sub>2</sub>와 함께 가습 인큐베이터에 배치하였다.
- [0405] 해동 후 CAR-T 세포 LNGFR 풍부화
- [0406] LNGFR 발현 CAR-T 웰은 이지셉 인간 CD271 양성 선택 키트 및 이지셉 텍스트란 래피드스피어스(RAPIDSFERES)를 사용하여 양성으로 선택되었다. CAR-T 세포를 수확하고, 비-조직 배양 처리된 96-웰 플레이트에서 이지셉 인간 FcR 차단제 및 이지셉 인간 CD271 양성 선택 각테일이 보충된 TEXMACS 배지에 10 내지  $20 \times 10^6$  개 세포의 밀도로 재현탁하고, 15분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 이지셉 텍스트란 래피드스피어스를 세포 현탁액에 첨가하고, 15분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 그 후, 이지플레이트 이지셉 자석을 사용하여 LNGFR 발현 세포를 선택하고, 10ng/mL의 인간 IL-7/IL-15가 보충된 TEXMACS 배지에 재현탁하고, 후속 검정 또는 동결보존 전에 72 시간 동안 37°C에서 5% CO<sub>2</sub>와 함께 가습 인큐베이터에 배치하였다. 동결보존된 LNGFR 풍부화된 세포를 해동하고, 10U/mL IL-2가 보충된 TEXMACS 배지에  $2.5 \times 10^6$  /웰의 밀도로 시딩하고, 24시간 동안 37°C에서 5% CO<sub>2</sub>와 함께 가습 인큐베이터에 배치하였다. 후속 검정을 위해 상청액 및 세포를 제공하였다.
- [0407] 용균물 생성 및 단백질 정량화
- [0408] CAR-T 및 비형질도입된 T 세포를 배양물로부터 수확하고,  $2 \times 10^6$  개 세포를 냉 dpBS (칼슘 및 마그네슘 포함)에 재현탁하고, 원심분리하고, 생성된 세포 펠렛을 냉 용균 완충액의 반복 피펫팅에 의해 용균하였다. 용균물을 원심분리하고, 분취하고, 급속 동결하고, 장기간 저장을 위해 -80°C에서 저장하였다. 비신코닌산 (BCA) 검정을 사용하여 용균물 내 단백질 수준을 정량화하였다.
- [0409] CAR-T 세포 상청액에서 IFN  $\gamma$  시토카인 분비의 결정
- [0410] 인간 IFN  $\gamma$  메조 스케일 디스커버리(meso scale discovery) (MSD) 플레이트를 테스트 샘플로 로딩하였다. 그 후, 플레이트를 밀봉하고, 실온에서 플레이트 진탕기 상에서 90분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척하고, 검출 항체를 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 밀봉하고, 실온에서 플레이트 진탕기 상에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 플레이트를 세척하고, MSD 섹터(Sector) 600 이미저에서 판독하였다. 6명의 공여자에 걸쳐 테스트 CAR T 세포에 대해 분비된 IFN  $\gamma$  수준에 대한 평균 및 평균의 표준 오차를 계산하고, 그래프패드 프리즘(GRAPHPAD PRISM) (본페로니 일원 ANOVA)을 사용하여 데이터를 플롯팅하였다.
- [0411] CAR-T 세포 표현형 (CD69, TIM-3, PD-1)의 결정
- [0412] 비형질도입된 T 세포 및 CAR-T 세포를 해동하고 카운팅하였다.  $2.5 \times 10^5$  개 세포/웰을 96 웰 플레이트에 분취하였다. 그 후, 세포를 세척하고, 적절한 항체 믹스 (CD3, CD8, CD69, TIM3, PD1에 대한 항체 함유)를 각 웰에 첨가하였다. 세포를 15분 동안 실온에서 암실에서 인큐베이션한 후, 1  $\mu$ g/mL의 최종 농도의 DAPI 살아있는/죽은 염료가 포함된 배지에 재현탁하였다. 샘플을 유동 세포계측법에 의해 분석하고, 플로우조 V10 소프트웨어를 사용하여 유동 세포계측 데이터를 분석하였다.
- [0413] CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> 집단에 의해 단일 살아있는 세포를 계층화함으로써 활성화/고갈 마커 CD69, PD-1 및 TIM-3의 발현 및 공동-발현을 생성하였다. CD4<sup>+</sup> 또는 CD8<sup>+</sup> 세포 집단으로 게이팅되면, 활성화/고갈 마커는 단일 양성에 의해 서만 식별되었다. 그 후, 후속 부울 게이팅 논리를 적용하여 3개 활성화/고갈 마커의 단일, 이중 및 삼중 양성/음성 세포 집단을 특징화하였다.
- [0414] 데이터 분석을 위해, 6명의 PBMC 공여자에 걸쳐 음성 대조군 (항-CD19 CAR), 양성 대조군 (GD2-28  $\zeta$  CAR) 및 항-클라우딘-3 CAR에 대한 삼중 양성 (PD-1, TIM-3 및 CD69), 이중 양성 (CD69 및 TIM-3 또는 CD69 및 PD-1 또는 TIM-3 및 PD-1) 및 단일 양성 (PD-1 또는 TIM-3 또는 CD69)의 평균 백분율을 계산하였다. 그래프패드 프리즘 (본페로니 일원 ANOVA)을 사용하여 데이터를 분석하였다.
- [0415] CAR 특이적 CD3  $\zeta$  의 인산화를 통한 하류 신호전달의 결정

- [0416]  $2 \times 10^6$  개 CAR-T 세포로부터 용균물을 수득하고, 농도를  $300 \mu\text{g/mL}$ 에 대해 정규화하고 가열하였다. 로딩 전에 항-pCD3  $\zeta$ , 항-CD3  $\zeta$ , GAPDH 및 2차 항체를 용균물에 첨가하였다. PEGGY-SUE 고처리량 모세관 웨스턴 기술을 사용하여 단백질 수준을 평가하였다. 최대 6명의 공여자로부터의 총-CD3  $\zeta$  및 GAPDH 로딩 대조군에 기초하여 인산화된 CD3  $\zeta$  (pCD3  $\zeta$ )의 정규화된 수준을 계산하였다.
- [0417] 1차 매트릭스를 생성하는 SW 소프트웨어 (PEGGY-SUE)를 위한 Compass를 사용하여 항원 독립적 신호전달 데이터 분석을 수행하였다. 여기서, 소프트웨어를 사용하여 각각의 염색에 대한 피크 아래 면적 (AuP)을 결정하고, GAPDH (총 단백질 로드) 수준의 AuP에 기초하여 반응을 정규화하였다. 테스트 CAR-T 세포 (양성 대조군 (GD2-28  $\zeta$ ) 및 항-클라우딘-3 CAR-T 세포)에 대한 정규화된 pCD3  $\zeta$  수준을 음성 대조군 CAR-T 세포 (항-CD19 CAR)에 대해 검출된 정규화된 pCD3  $\zeta$  수준으로 나누었다. 6명의 공여자에 걸쳐 테스트 CAR T 세포에 대한 CAR 특이적 인산화 (pCD3  $\zeta$ ) 수준에 대한 평균 및 평균의 표준 오차를 계산하였다. 그래프패드 프리즘 (본페로니 일원 ANOVA)을 사용하여 데이터를 플롯팅하였다.
- [0418] 결과
- [0419] CAR T 세포로부터의 기본 수준 IFN  $\gamma$  분비
- [0420] T 세포에 의한 IFN  $\gamma$  분비는 T 세포 활성화의 핵심 측정이며, 항원 독립적 신호전달은 부분적으로 이 시토카인의 분비에 의해 평가될 수 있다. 도 3a에 제시된 데이터는 양성 대조군 (GD2-28  $\zeta$ ) CAR-T 세포 ( $22557 \pm 12903\text{pg/mL}$ )와 비교하여 항-클라우딘-3 CAR T-세포 ( $611.8 \pm 755.1\text{pg/mL}$ )로부터의 유의하게 더 적은 IFN  $\gamma$  분비를 제시한다. 비형질도입된 T 세포 ( $123.7 \pm 103.0\text{pg/mL}$ ), 음성 대조군 (항-CD19 CAR;  $666.4 \pm 725.1\text{pg/mL}$ ) 및 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 사이에는 유의한 차이가 관찰되지 않았다 (도 3a).
- [0421] 기본 T 세포 활성화 (CD69<sup>+</sup>) 및 고갈 (TIM-3<sup>+</sup> 및 PD-1<sup>+</sup>) 표현형
- [0422] 활성화 (CD69<sup>+</sup>) 및 고갈 마커 (TIM-3<sup>+</sup> 및 PD-1<sup>+</sup>)의 증가를 제시하기 위한 T 세포의 기본 연속적 표현형의 분화는 강장성 신호전달을 검출하는데 사용되는 검정의 서브세트를 보완할 수 있다. 도 3b에 제시된 데이터는 음성 대조군 (항-CD19 CAR) 및 항-클라우딘-3 CAR-T 세포와 비교하여 양성 대조군 (GD2-28  $\zeta$  CAR)에서 활성화 및 고갈 표현형의 유의한 증가를 제시한다. 양성 대조군 (GD2-28  $\zeta$  CAR)의 경우, CD4<sup>+</sup> T 세포 (삼중 양성:  $2.05 \pm 1.57\%$ , 이중 양성:  $6.89 \pm 3.61$ , 단일 양성:  $14.59 \pm 7.36\%$ )는 CD8<sup>+</sup> T 세포 (삼중 양성:  $0.42 \pm 0.4\%$ , 이중 양성:  $3.9 \pm 2.31\%$ , 단일 양성:  $14.18 \pm 4.75\%$ )와 비교하여 활성화 및 고갈 표현형의 더 높은 증가를 나타내었다. 항-클라우딘-3 CAR-T 세포의 경우, CD4<sup>+</sup> T 세포 (삼중 양성:  $0.06 \pm 0.06\%$ , 이중 양성:  $0.71 \pm 0.44$ , 단일 양성:  $2.99 \pm 0.96\%$ )는 유의하게 더 낮은 CD8<sup>+</sup> T 세포 (삼중 양성:  $0.54 \pm 0.5\%$ , 이중 양성:  $0.61 \pm 0.25\%$ , 단일 양성:  $3.51 \pm 1.37\%$ )와 비교하여 활성화 및 고갈 표현형의 더 높은 증가를 나타내었다 (도 3b).
- [0423] CAR 특이적 CD3  $\zeta$ 의 인산화
- [0424] 결과 분석으로부터, 항-클라우딘-3 CAR ( $0.68 \pm 0.39$ )에 대한 CAR pCD3  $\zeta$ 의 정규화된 수준은 양성 대조군 (GD2-28  $\zeta$ ) CAR ( $7.32 \pm 3.84$ )과 비교하여 유의하게 더 낮았으며 음성 대조군 (항-CD19) CAR pCD3  $\zeta$ 과 유의하게 상이하지 않았다 (도 3c).
- [0425] IFN  $\gamma$  분비, 활성화 (CD69<sup>+</sup>) 및 고갈 (TIM-3<sup>+</sup> 및 PD-1<sup>+</sup>) 표현형 및 CAR pCD3  $\zeta$  수준으로부터 수득된 결과로부터, 항-CD19 CAR 및 항-클라우딘-3 CAR 둘 다 양성 대조군 (GD2-28  $\zeta$ ) CAR-T 세포와 비교하여 낮은 수준의 강장성 신호전달을 부여하였다. 총-CD3  $\zeta$  염색으로부터 추정된 T 세포의 CAR 형질도입 수준은 사용된 프로모터에 기초하여 차이를 나타내었다. EF1a 프로모터를 사용하여 형질도입된 양성 대조군 (GD2-28  $\zeta$ ) CAR-T 세포는 PGK 프로모터를 사용하여 발현된 항-CD19 CAR 및 항-클라우딘-3 CAR과 비교하여 더 높은 수준의 CAR 특이적 총-CD3  $\zeta$ 를 부여하였다. 결과적으로, 항-CD19 CAR 및 항-클라우딘-3 CAR은 또한 더 낮은 수준의 포스포-CD3  $\zeta$ , 시토카인 방출 및 활성화 및 고갈 표현형의 분화를 나타내었다. 이는 벡터의 효율이 강장성 신호전달을 유도하는 기여 인자일 수 있음을 재확인한다.
- [0426] 프로모터 외에, 양성 대조군 (GD2-28  $\zeta$ ) CAR-T 세포와 달리, 항-CD19 CAR 및 항-클라우딘-3 CAR-T 세포는 IgG1 CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> 링커 없이 4-1BB  $\zeta$  세포질 도메인으로 생성되며, 이는 임의의 강장성 신호전달 효과를 호전시킨다. 이 데이터는 항-클라우딘-3 CAR-T 세포가 시험관내에서 CAR-T 세포 기능에 달리 부정적인 영향을 미칠 수 있는 낮

은 수준의 강장성 신호전달 및 항원 독립적 활성화를 나타낸다는 것을 재확인한다.

- [0427] 실시예 3 - 클라우딘-발현 세포주에 대한 항-클라우딘-3 CAR-T 세포의 특이성
- [0428] 이들 연구의 목적은 항-클라우딘-3 CAR-T 세포의 특이성의 검증 및 기능적 활성의 평가를 위한 클라우딘-3-발현 세포주를 생성하는 것이었다. 구체적으로, 사이토톡스 레드 검정 및 표적 세포의 전면생장을 사용하여 항-클라우딘-3 CAR-T 세포의 세포독성을 측정하였다. 또한, 클라우딘-3-발현 세포와의 24시간 공동-배양 후 메조 스케일 디스커버리 (MSD) 검정을 사용하여 IFN  $\gamma$  방출을 측정함으로써 CAR-T 세포의 활성화를 평가하였다. 결과는 항-클라우딘-3 CAR-T 세포가 주로 hCLDN3에 대한 반응으로 사멸하고 다른 인간 클라우딘에 대한 세포독성 교차 반응성이 거의 또는 전혀 없음을 시사한다.
- [0429] 재료 및 방법
- [0430] RKO-KO 세포주, RKO-KO 인간 CLDN3 GFP 및 마우스 CLDN3 GFP 세포주의 생성 및 특징화
- [0431] RKO-KO 세포주는 CRISPR-CAS 편집 기술을 사용하여 결장직장암 (RKO) 세포주에서 CLDN3 유전자를 녹아웃시킴으로써 만들어졌다.
- [0432] 세포의 CLDN3 발현의 검출 결여를 확증하기 위해 항-CLDN3 항체를 사용하는 유동 세포계측법에 의해 선택된 RKO-KO 클론을 추가로 테스트하였다. 과발현 hCLDN3, mCLDN3 및 다른 인간 클라우딘 세포주의 추가 생성을 위한 부모 세포주로서 1차 클론으로서 RKO-KO 클론 26.1을 선택하였다.
- [0433] (i) C-말단 단량체성 GFP 태그로 태그부착된 단백질로서 발현된 인간 CLDN3 유전자 또는 (ii) MOI 5에서 C-말단 단량체성 GFP 태그 및 퓨로마이신 선택 마커로 태그부착된 단백질로서 발현된 마우스 CLDN3 유전자를 함유하는 상업용 렌티바이러스 벡터 (LV)로 RKO-KO 클론 26.1 세포주를 형질도입함으로써 인간 CLDN3 및 마우스 CLDN3을 과발현하는 RKO-KO 세포주를 생성하였다. 유동 세포계측법을 사용하여 형질도입 효율 (GFP 발현)을 평가하였다.
- [0434] 이질성 집단으로부터 단일-세포 분류에 의해 높은, 중간 및 낮은 수준의 GFP를 발현하는 세포를 선택함으로써 모노클로날 세포주를 개발하였다.
- [0435] 퓨로마이신 선택 마커와 함께 C-말단 단량체성 GFP 태그로 태그부착된 단백질로서 발현된 CLDN4, CLDN5, CLDN6, CLDN8, CLDN9 또는 CLDN17 유전자를 코딩하는 상업용 렌티바이러스로 RKO-KO 클론 26.1 세포주를 형질도입함으로써 상기 기재된 바와 같은 유사한 방법을 사용하여 인간 CLDN 패밀리 구성원 CLDN4, CLDN5, CLDN6, CLDN8, CLDN9 및 CLDN17 세포주를 발현하는 폴리클로날 RKO-KO 세포주를 생성하였다.
- [0436] qPCR에 의한 RKO-KO 및 RKO-KO 형질도입된 세포주의 특징화
- [0437] RKO-KO 비형질도입된 세포 뿐만 아니라 각각 CLDN3, 4, 6, 9, 17 및 mCLDN3을 과발현하는 RKO-KO에서 하우스키핑 유전자 ACTB에 비해 인간 클라우딘 3, 4, 5, 6, 9 및 17 및 마우스 CLDN3 유전자의 mRNA 발현을 평가하였다. 실시간 정량적 PCR (RT-qPCR)에 의해 mRNA 발현을 검출하였다. RT-qPCR 결과는 형질도입된 CLDN이 각각의 RKO-KO 세포주에서 과발현되었음을 제시하였다 (데이터는 제시되지 않음).
- [0438] CAR-T 세포 해동 및 배양
- [0439] 냉동-동결된 CAR-T 세포를 사용한 경우, 세포를 해동하고 TEXMACS로 재현탁하였다. 일부 실험에서 CAR-T 세포는 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같이 풍부화되었다.
- [0440] 인큐사이트 사멸 검정을 위한 공동-배양 설정
- [0441] 표적 세포를 세포 배양 배지에  $2 \times 10^5$  개 세포/ml의 밀도로 재현탁한 후, 검정 플레이트의 각각의 웰로 옮겨 웰당  $2 \times 10^4$  개 세포를 생성하였다. 그 후, 검정 배양 플레이트를 CAR-T 세포 공동-배양 전에 24시간 동안  $36.5^\circ\text{C}$  /  $5\% \text{CO}_2$ 에서 가습된 인큐사이트 S3으로 옮겼다.
- [0442] 세포 상청액을 각각의 검정 웰로부터 제거하고, 500nM 사이토톡스 레드 시약을 함유하는 신선한 세포 배양 배지로 대체한 후, 플레이트를 이펙터 세포 (CAR-T 세포) 첨가 전에  $36.5^\circ\text{C}$  /  $5\% \text{CO}_2$ 에서 가습된 인큐사이트 S3으로 옮겼다. CAR-T 세포 및 비형질도입된 T 세포를 세포 배양 배지에  $2 \times 10^5$  개 세포/mL의 밀도로 재현탁하고, 웰에 첨가하였다. 검정 플레이트를  $37^\circ\text{C}$  /  $5\% \text{CO}_2$ 에서 가습된 인큐사이트 S3에 배치하였다. 이미지 획득을 6일 기

간에 걸쳐 2시간 간격으로 예약하였다. 표적 세포 사멸을 도시하는 총 적색 구역의 증가 및 총 구역 ( $\mu\text{m}^2$ /이미지)을 결정하기 위해 생성된 총 적색 구역 마스크의 특이적 시각화를 보장하기 위해 이미지 분석을 수행하였다. 정규화를 각 공여자 내에서 수행하였다.

- [0443] MSD를 사용한 시토카인 농도 측정
- [0444] 정규화된 또는 풍부화된 T 세포를 표적 세포와 1:1 E:T (이펙터:표적 세포, 여기서 "이펙터"는 형질도입된 CAR-T 세포임) 비로 혼합하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 공동-배양하였다. 24시간 후 플레이트를 원심분리하고, 적절한 검출 항체 (sulfo-태그 항-hIFN $\gamma$ , sulfo-태그 항-hTNF $\alpha$  및 sulfo-태그 항-hIL2 Ab)를 사용하여 상기 실시예 2에 기재된 것과 유사한 방법을 사용하여 시토카인 분비를 정량화하기 위해 상청액을 수집하였다.
- [0445] 결과
- [0446] 클라우딘을 발현하는 RKO KO에 대한 CAR T 세포의 활성화 반응
- [0447] 비형질도입된 또는 항-CD19 (대조군) 및 항-클라우딘-3 CAR-T 세포를 클라우딘 3과 밀접하게 관련된 클라우딘 단백질을 발현하는 RKO KO 세포주와 공동-배양하였다. 그 후, 이들 공동-배양물로부터의 상청액을 수집하고, 관심 시토카인을 정량화하였다. 이들 실험으로부터의 데이터는 도 4a-4d 및 표 3에 제시된다.
- [0448] 초기에 CAR-T 세포에 의한 IL-2, IFN $\gamma$  및 TNF $\alpha$ 의 분비를 전체 세포주 패널에 대한 반응으로 연구하였다. hCLDN3에 대한 항-클라우딘-3 CAR-T 세포의 극적인 반응 외에, 도 4a에 제시된 이 데이터는 hCLDN4에 대한 반응으로 3개 시토카인 모두의 분비의 작은 증가를 제시한다.
- [0449] 그 후, 6명의 공여자에서 IFN $\gamma$  반응을 조사한 실험에서 세포주의 코어 패널 (hCLDN4, hCLDN6 및 hCLDN9)에 주의가 집중되었다 (도 4b 및 4c에 제시됨). 다시 한번 항-클라우딘-3 CAR-T 세포는 hCLDN4에 반응하였고, 이 실험에서는 hCLDN9에 대한 반응이 또한 관찰되었다. hCLDN4 및 hCLDN9에 대한 반응으로 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 대 항-CD19 대조군 CAR-T 세포로부터 분비된 IFN $\gamma$ 의 배수 변화는 각각 25 및 14.3이었다. 이 반응은 유의하지만, hCLDN3 공동-배양에서 2495배 더 높은 반응과 비교하여 균형감 있게 봐야 한다.
- [0450] 이들 2개 실험으로부터의 데이터는 7명의 추가 공여자로부터의 시토카인 분비를 제시하는 도 4d에 제시된 정보에 의해 추가로 뒷받침된다. 이들 공여자 중 한 명만이 hCLDN9에 대한 반응을 나타내었지만, hCLDN4에 대해서는 보다 일관된 반응이 나타났다 (이 역시 최소였음). 그 후, 이 도면에 제시된 공여자 중 일부는 다시 사용되었다 (12031, 92024 및 C1700657). 이들 각각의 경우, 데이터는 이전 결과를 뒷받침하였다.
- [0451] hCLDN3에 대한 항-클라우딘-3 CAR-T 세포의 강한 반응 외에, 가장 일관된 반응은 mCLDN3에 대한 것이었다. 이는 상향조절된 IFN $\gamma$ 의 형태 뿐만 아니라 IL-2 및 TNF $\alpha$ 의 형태로도 볼 수 있다 (도 4a, 4b 및 4c). 이 반응의 유의성은 또한 도 4b 및 4c 및 표 3에서 입증되었으며, 여기서 항-클라우딘-3 CAR-T 세포의 IFN $\gamma$  반응은 항-CD19 대조군 CAR-T 세포의 것보다 439배 더 높았다.
- [0452] 표 3 - 대조군 (항-CD19 CAR-T 세포)과 비교하여 항-클라우딘-3 CAR T 세포로부터의 IFN $\gamma$  분비 배수 변화의 통계적 유의성. CL = 신뢰 구간.

표적 세포주	대조군	추정치 배수 변화	하위.CL	상위.CL	p-값
RKO KO	UT <sup>1</sup>	3.221	0.955	10.863	0.99389
RKO KO	항-CD19 CAR	3.987	1.182	13.447	0.941671
RKO KO hCLDN3	UT	1353.398	401.269	4564.731	<0.00001
RKO KO hCLDN3	항-CD19 CAR	2495.371	739.853	8416.368	<0.00001
RKO KO hCLDN4	UT	29.188	8.654	98.444	0.000104
RKO KO hCLDN4	항-CD19 CAR	25.074	7.434	84.570	0.000311
RKO KO hCLDN6	UT	2.588	0.767	8.728	0.999853
RKO KO hCLDN6	항-CD19 CAR	10.927	3.240	36.855	0.053334
RKO KO hCLDN9	UT	11.321	3.357	38.183	0.0445
RKO KO hCLDN9	항-CD19 CAR	14.323	4.247	48.307	0.0121
RKO KO mCLDN3	UT	520.965	154.461	1757.106	<0.00001
RKO KO mCLDN3	항-CD19 CAR	439.364	130.267	1481.882	<0.00001
T 세포 단독	UT	4.186	1.241	14.120	0.914967
T 세포 단독	항-CD19 CAR	2.598	0.770	8.762	0.99984

[0453]

- [0454] <sup>1</sup> UT=비형질도입된
- [0455] CAR-T 세포에 의한 RKO 세포 사멸
- [0456] CAR-T 세포와 함께 배양될 때 표적 세포 생존력을 구체적으로 연구하기 위해, T 세포 활성화 (시토카인 반응에 의해 측정됨)가 세포독성 및 후속 표적 세포 아포토시스로 어떻게 번역되는지 결정하기 위해 수많은 사멸 검정을 수행하였다.
- [0457] 이 일련의 실험으로부터 수집된 데이터는 표 4에 요약되어 있다 (검정 중점에서 % 살아있는 세포로서 보고됨). 어떤 실험도 hCLDN4, hCLDN6 또는 hCLDN9의 생존력 손실을 유발하지 않았지만, 가끔 mCLDN3에 대한 반응이 관찰되었다. 이는 RKO KO mCLDN3이 71% 및 86%에 도달한 96시간 또는 2명의 공여자로부터의 항-클라우딘-3 CAR-T 세포와 함께 배양될 때 최대 반응에 가장 분명하였다.
- [0458] 항-클라우딘-3 CAR-T 세포의 CLDN3 특이적 세포독성 반응을 확증하기 위해 6명의 공여자 및 세포주의 코어 패널에서 실험을 수행하였다. % 전면생장 (도 5a 및 5b) 및 사이토톡스 발색 현상, 또는 % 살아있는 세포 (도 6a-6c)의 두 가지 판독값이 사용되었다. 이들 중 첫 번째인 % 전면생장은 특정 공동-배양에 특이적인 표적 세포 수의 변화를 통한 세포 사멸을 나타낸다. 두 번째 판독값은 생존력 손실이 사이토톡스 염료의 인플릭스를 유발할 때 발생하는 적색 발색 현상을 정량화한다. 세포 사멸의 증가가 있는 곳에서는 사이토톡스 레드 반응이 더 높아서 낮은 % 살아있는 세포로 전환되었다. 이 데이터를 수집하는데 사용된 이미지의 예는 도 5a에 제시된다.
- [0459] IFN  $\gamma$  분비와 마찬가지로 hCLDN3에 대한 반응의 크기가 훨씬 더 컸지만 항-클라우딘-3 CAR-T 세포가 hCLDN3 또는 mCLDN3을 발현하는 RKO KO와 함께 배양되었을 때 % 전면생장의 변화가 구체적으로 관찰되었다. 이는 항-클라우딘-3 CAR-T 세포가 대조군과 비교하여 RKO KO mCLDN3 또는 RKO KO hCLDN3과 공동-배양되었을 때 유의한 세포독성 효과가 관찰된 % 살아있는 세포 판독값에 의해 확증되었다.
- [0460] 표 4 - 폴리클로날 세포주에 대한 검정 중점에서의 % 살아있는 세포

중점 (시간)	공여자	구축물	표적 세포주					
			RKO KO hCLDN3	RKO KO mCLDN3	RKO KO hCLDN9	RKO KO hCLDN6	RKO KO hCLDN4	
70시간	D5	항-클라우딘-3 CAR	95.3	0	97.7	96.3		
		비형질도입된	97.3	99.7	99	99.7		
40시간	92024	항-클라우딘-3 CAR	97.7	16.3	89	96.7	96.3	
		비형질도입된	96.3	96	95.3	95	95	
96시간	C1700979	항-클라우딘-3 CAR	98	29*	71	92.7	96	
		비형질도입된	92.3	95.7*	93	92.3	91.7	
	C1700980	항-클라우딘-3 CAR	101	57.3*	86	100.7	100.3	
		비형질도입된	105	101.3*	101.7	106	102	
90시간	0372470	항-클라우딘-3 CAR	107.7	-6*	94.5		94.7	
		항-CD19 대조군 CAR	102.7	104*	99.3		108.7	
120시간	0372470	항-클라우딘-3 CAR	92	20.3	81.7		90.7	
		항-CD19 대조군 CAR	84.7	91.3	85		90.7	

- [0461]
- [0462] \* RKO KO hCLDN3 L14와의 공동-배양
- [0463] 항-클라우딘-3 CAR-T 세포는 mCLDN3-발현 세포와 교차-반응한다
- [0464] 마우스 조직을 사용하여 수많은 관련 실험을 수행할 수 있으며, 따라서 항-클라우딘-3 CAR-T 세포가 mCLDN3에 어떻게 반응하는지 이해하는 것이 유용하다. 본원에서 수행된 실험은 항-클라우딘-3 CAR-T 세포가 mCLDN3 발현

에 의해 활성화되어 IFN  $\gamma$ , TNF  $\alpha$  및 IL-2의 분비를 유도한다는 것을 일관되게 제시한다. 비록 hCLDN3에 대한 반응만큼 높지는 않지만, 활성화된 T 세포는 표적 세포의 손실에 의해 나타나는 유의한 세포독성 반응을 나타낸다.

- [0465] 이 데이터의 대부분은 상이한 수준의 mCLDN3 발현을 발현하는 세포주를 사용하여 수행되었지만, 반응을 추가로 이해하기 위해 높은 또는 낮은 수준의 mCLDN3을 발현하는 몇 가지 세포주가 또한 사용되었다. 이들 조건에서 활성화 반응은 항-클라우딘-3 CAR-T 세포가 높은 mCLDN3을 발현하는 RKO KO 세포와 함께 배양되었을 때만 관찰되었다.
- [0466] 항-클라우딘-3 CAR-T 세포는 다른 인간 클라우딘 단백질에 대한 반응으로 사멸하지 않는다
- [0467] 본원에 제시된 임의의 실험에서 hCLND6, hCLDN5, hCLDN8 또는 hCLDN17에 대한 반응으로 항-클라우딘-3 CAR-T 세포의 활성화가 관찰되지 않았다. 그러나, hCLDN4 및 hCLDN9에 대한 일부 반응성은 시토카인의 분비에 의해 나타났다. 유의한 활성화 반응이 도 4a에 기재되어 있지만, 이는 hCLDN3 및 mCLDN3에 대한 항-클라우딘-3 CAR-T 세포의 반응과 비교하지 않는다. 특히, 이는 임의의 사멸 반응으로 번역되지 않으며, 이는 항-클라우딘-3 CAR-T 세포가 hCLDN3 이외의 임의의 인간 클라우딘에 대한 반응으로 유의하게 사멸하지 않는다는 것을 시사한다.
- [0468] 본원에 제시된 데이터는 항-클라우딘-3 CAR-T 세포가 hCLDN4 및 hCLDN9에 의해 적어도 부분적으로 활성화된다는 것을 제시한다. 이 반응은 hCLDN3에 대한 반응보다 유의하게 더 적으며, 세포독성 효과 또는 세포 사멸로 번역되지 않는다. 항-클라우딘-3 CAR-T 세포는 mCLDN3과 교차-반응하지만 표적 세포의 부분 사멸이 설명되었다. 이 데이터는 항-클라우딘-3 CAR-T 세포가 주로 hCLDN3에 대한 반응으로 사멸하고 다른 인간 클라우딘에 대한 세포독성 교차 반응성이 거의 또는 전혀 없음을 시사한다.
- [0469] 실시예 4 - 클라우딘-3 양성 종양 세포주에 대한 항-클라우딘-3 CAR-T 세포의 세포독성
- [0470] 이 연구의 목적은 인간 클라우딘-3 (hCLDN3) 발현 표적 세포를 특이적으로 사멸시키는 이 구축물을 발현하는 T 세포의 성향에 기초하여 항-클라우딘-3 CAR의 발현 및 세포독성 효력을 제시하는 것이다. 이들 데이터는 항-클라우딘-3 CAR-T 세포가 IFN  $\gamma$ 를 분비하고 결장직장암, 유방암 및 췌장암으로부터 유래된 hCLDN3-발현 암 세포주를 사멸시킬 수 있음을 입증한다.
- [0471] 재료 및 방법
- [0472] 맥스퀀트 Tyto 분류에 의한 LNGFR 양성 CAR-T 세포의 풍부화
- [0473] 세포를 완충액에서 세척하고, 30분 동안 4°C에서 1:50의 희석으로 LNGFR PE 항체로 염색한 후, 제조업체의 지침에 따라 맥스퀀트 Tyto 분류를 사용하여 분류하였다. 본원에 기재된 실험에 사용된 모든 CAR-T 세포는 적어도 90% LNGFR 양성의 순도를 가졌다.
- [0474] T 세포 표면 상의 CAR 분자의 정량화
- [0475]  $1 \times 10^5$  개 세포 및 50  $\mu$ L 방스 랩스(Bangs Labs) 퀀텀 심플리 셀룰러 비드를 항-LNGFR PE에 1:20 희석으로 재현탁하거나 항-hCLDN3 PE에 1:50 희석으로 재현탁하고, 30분 동안 4°C에서 인큐베이션하였다. 세포 및 비드를 2회 세척한 후, 세포 및 비드의 PE 신호를 사이토플렉스(CytoFLEX) S 기계에서 측정하였다.
- [0476] 세포 사멸 검정을 위한 공동-배양 설정
- [0477] 인큐사이트 사멸 검정을 위한 공동-배양은 인큐사이트 S3보다는 인큐사이트 줌(INCUCYTE Zoom)을 사용한 점을 제외하고는 상기 실시예 3에 기재된 바와 같이 설정되었다.
- [0478] 표적 세포를 세포 배양 플레이트에 25,000개 세포/웰의 밀도로 시딩하고 엑스셀리젠스 실시간 세포 분석(RTCA) 기구의 세포 배양 인큐베이터에서 배양함으로써 엑스셀리젠스 사멸 검정을 위한 공동-배양을 설정하였다. 시딩 후 대략 20시간에, 이펙터 세포를 0.5:1 또는 1:1 CAR-T 세포 대 표적 세포의 비로 첨가하고, 다시 세포 배양 인큐베이터에 배치하였다. 사용된 표적 세포는 하기 표 5에 제시된 암 세포주였다.

[0479] 표 5 - 암 세포주:

표적 세포주	적응증
RKO-KO	결장직장암
RKO-KO hCLDN3	결장직장암
RKO-KO hCLDN3 L14 (낮은 hCLDN3 발현에 대해 분류됨)	결장직장암
RKO-KO hCLDN3 H12 (높은 hCLDN3 발현에 대해 분류됨)	결장직장암
HT-29-LUC	결장직장암
COLO-205	결장직장암
COLO-320DM	결장직장암
DLD-1	결장직장암
HCT-15	결장직장암
SW403	결장직장암
SW480	결장직장암
SW620	결장직장암
SW48	결장직장암
HCT116	결장직장암
HCT116-p53het	결장직장암
T84	결장직장암
LS174-T	결장직장암
HCC1954	유방암
MDA MB468	유방암
HCC1937	유방암
MT-3	유방암
SUM185	유방암
HCC38	유방암
AsPC-1	췌장암
Capan-1	췌장암
Capan-2	췌장암
Panc-1	췌장암

[0480]

Panc02.03	췌장암
Panc08.13	췌장암
BxPC3	췌장암
HPAC	췌장암
HuP-T4	췌장암
MiaPaCa2	췌장암
HPAF-II	췌장암

[0481]

[0482]

MSD를 사용한 시토카인 농도 측정

[0483]

표적 세포주를 재현탁한 후, 2 또는  $2.5 \times 10^4$  개 세포를 96-웰 플레이트에 시딩하였다. 그 후, 정규화된 또는 풍부화된 T 세포를 플레이트에 1:1 E:T (이펙터: 표적 세포, 여기서 "이펙터"는 형질도입된 CAR-T 세포임) 비로 첨가하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 24-48시간 동안 공동-배양하였다. 공동-배양 후, 플레이트를 원심분리하고, 상기

실시에 2에 기재된 바와 같이 적절한 검출 항체를 사용하여 시토카인 분비를 정량화하기 위해 상청액을 수집하였다.

- [0484] 결과
- [0485] CAR 발현 및 hCLDN3 발현의 정량화
- [0486] T 세포 표면 상의 CAR 분자의 발현은 CAR 기능에 대한 요구사항이다. LNGFR 발현을 CAR 발현에 대한 대응으로서 측정하였다. LNGFR 및 CAR 분자는 1 대 1 비로 번역되어야 하지만, 단백질 안정성의 잠재적인 차이로 인해 LNGFR 정량화는 따라서 CAR 분자 수의 추정치일 뿐이다.
- [0487] 비형질도입된 세포 (UT)는 LNGFR 발현에 대해 매우 낮은 신호만을 나타내었으며 (10,000 내지 20,000 (도 7a)), 이는 배경 신호로 간주되었다.
- [0488] 공여자 12031 및 92024는 표면 상에 평균 190,000 및 166,000개의 LNGFR 분자를 가졌고, 공여자 D5는 표면 상에 301,000개의 분자를 가졌다. 이 차이는 잠재적으로 T-세포 생성의 변화로 인한 것이었다.
- [0489] 상기 본원에 기재된 바와 같이, hCLDN3 녹아웃 RKO 세포주 (RKO-KO)를 생성하였으며, 기능 검정을 위한 음성 대조군으로서 사용하였다. 다양한 수준 (폴리클로날 RKO-KO hCLDN3 세포주; 단일-세포 분류되지 않음)으로 또는 높은 (RKO-KO hCLDN3 H12) 또는 낮은 (RKO-KO hCLDN3 L14) 발현에 대해 분류된 hCLDN3을 발현하는 RKO-KO 세포의 사멸은 CAR 효력의 표시이다. 퀴텀 심플리 셀룰러 비드 및 항-CLDN3 PE를 사용하여 발현을 정량화함으로써 hCLDN3 발현의 차이를 입증하였다 (도 7b). RKO-KO 세포는 비드 수준 미만의 신호를 나타내었으며, 따라서 hCLDN3 수준은 0으로 간주되었다. RKO-KO hCLDN3 L14 낮은 세포는 표면 상에 평균 80,000개의 hCLDN3 분자를 갖는 반면, RKO-KO hCLDN3 H12 높은 세포는 표면 상에 평균 800,000개의 hCLDN3 분자를 가졌다. 그러므로, 이들 2개 세포주는 hCLDN3 발현의 10배 차이를 가졌다.
- [0490] CAR-T 세포에 의한 세포독성
- [0491] 도 8a-8d는 90시간 인큐베이션을 사용한 예시적인 인큐사이트 사멸 검정을 제시한다. 낮은 수준으로 hCLDN3을 발현하는 RKO-KO 세포 또는 RKO-KO 세포와 함께 인큐베이션된 LNGFR 풍부화된 항-CD19 대조군 CAR-T 세포 (도 8a) 또는 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 (도 8b)의 예시적인 이미지가 제시되어 있으며, 상응하는 사멸 곡선은 항-클라우딘-3 CAR-T 세포에서 세포독성을 나타내지만 대조군에서는 그렇지 않다 (도 8c). 항-클라우딘-3 CAR-T 세포를 표적 세포주와 함께 인큐베이션하였을 때 적색 염료의 면적에 의해 측정된 신호 발달은 가시적이었다. 정량화된 및 정규화된 데이터는 도 8c에 제시되어 있으며, 이는 표적-음성 세포와 함께 인큐베이션된 항-클라우딘-3 CAR-T 세포가 세포 용균을 유발하지 않았지만, hCLDN3-발현 RKO 세포와 함께 인큐베이션된 항-클라우딘-3 CAR-T 세포가 완전한 표적 세포 사멸을 유발한 반면, 항-CD19 대조군은 그렇지 않았음을 제시한다.
- [0492] 표 6은 표적 세포 사멸의 50%를 나타내는 최대 반응의 50%에 도달하는데 필요한 시간을 제시한다. 이들 값은 hCLDN3 발현의 차이에 의해 설명될 수 있는 검정 간의 차이를 나타냈지만 이는 실험 전반에 걸쳐 일관되지 않았다. 일부 실험에서는 24 내지 41시간 후에 최대 반응의 50%가 달성된 반면, 다른 실험에서는 51시간 후 최대 74시간 후에 최대 반응의 50%가 나타났다. 6명의 공여자 모두에 대해 T 세포 및 표적 세포를 동등하게 처리한 다른 데이터 (제시되지 않음)는 80 내지 86시간 사이에 6명의 공여자 중 4명에서 감소된 확산을 제시하였으며, 1명의 공여자는 68시간 동안, 그리고 1명의 공여자는 실험 96시간 이내에 50% 세포독성에 도달하지 못하였다. 사멸 동역학의 차이는 설명할 수 없지만 중요한 것은 모든 실험이 완전한 표적 세포 용균을 유발하였다는 것이다.
- [0493] 클라우딘-3 발현 세포주 HT-29-LUC에 대해 엑스셀리젠스 방법을 사용하여 유사한 세포독성 결과를 획득하였다 (도 8d). 100% 세포독성은 3명의 공여자에서 1:1 비로 관찰되었으며, 80시간, 30시간 및 50시간 후에 100% 세포독성에 도달하였다. 1:2 비 (이펙터:표적)에서 100% 세포독성은 40시간 및 60시간 후에 달성되었다. 엑스셀리젠스 실험과 동일한 방식으로 수행된 공동-배양을 MSD에 의한 시토카인 분비에 대해 분석하였다 (데이터는 제시되지 않음). T 세포를 HT-29-LUC와 공동-배양한 경우에는 동결 및 해동된 공여자 및 신선하게 사용한 공여자에 대해 인터페론  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ )가 검출되었으나 세포주 없이 인큐베이션한 경우에는 검출되지 않았다.
- [0494] 클라우딘-3 발현 세포에 대한 반응으로 비형질도입된 세포 또는 항-CD19 대조군 CAR-T 세포에 의한 IFN  $\gamma$ 의 분비는 클라우딘-3을 발현하지 않는 세포에 대한 반응과 동일한 수준이었다. 이들 결과는 비특이적 시토카인 분비가 관찰되지 않았음을 시사한다. 클라우딘-3을 발현하지 않는 표적 세포에 대한 반응으로 항-클라우딘-3 CAR-T 세포에 의한 분비는 음성 대조군과 유사한 배경 시토카인 분비를 유도하였으며, 이는 항-클라우딘-3 CAR

이 표적 세포 상의 다른 분자를 인식하지 못한다는 것을 나타낸다.

[0495] 클라우딘-3 발현 표적 세포와 함께 항-클라우딘-3 CAR-T 세포를 배양하는 것은 8회 수행된 실험 모두에서 IFN  $\gamma$  분비를 유발하였다. 측정된 실제 시토카인 양은 실험 간에 상이하지만, 모든 경우에 이의 표적에 대한 반응으로 항-클라우딘-3 CAR-T 세포에 의한 특이적 시토카인 분비는 표적-음성 세포에 대한 반응으로 항-클라우딘-3 CAR-T 세포와 비교하여 적어도 100배 증가되었다.

[0496] 표 6 - CLDN3을 발현하는 RKO 세포의 최대 반응 (완전한 표적 세포 사멸)의 50%에 도달하는 시간

공여자	CLDN3 발현	최대 반응의 50%까지의 시간 [h]*
D5	폴리	32
92024	폴리	22
90144	높은	38
	낮은	27
C1700979	높은	53
	낮은	54
C1700980	높은	56
	낮은	63
372470	낮은	74
PR19t133635	낮은	68
PR19K133652	낮은	81
PR19T133651	낮은	84
PR19K133900	낮은	80
PR19C133904	낮은	86
PR19W133916	낮은	도달하지 않음

[0497]

[0498] \* 이들 값은 3개 반복으로부터 결정되었음

[0499] RKO-KO CLDN3-발현 표적 세포의 적정

[0500] 최대 반응 (완전한 표적 세포 사멸)은 세포주 간에 상이하지만 부분적인 표적 세포 사멸을 나타낼 수도 있다. 이는 불충분한 세포독성 이펙터 기능으로 인한 것일 수 있거나 모든 중앙 세포가 표적을 발현하지 않을 때 발생한다. 최대 반응의 차이를 결정하고 인큐사이트 검정에서 부분 사멸이 달성가능한지 입증하기 위해, 표적 세포의 적정을 수행하였다. RKO-KO 및 RKO-KO hCLDN3 폴리클로날 세포를 다양한 비로 혼합하고 항-클라우딘-3 CAR-T 세포와 함께 인큐베이션하였다. RKO-KO 세포의 2%만이 hCLDN3을 발현하였을 때 신호가 가시적이 아니었지만, hCLDN3 발현 세포의 더 높은 비율에서 신호의 증가가 가시적이었다 (도 9). 이들 결과는 동일한 표적 세포주를 비교할 경우 최대 반응의 차이에서 가시적인 부분 사멸이 달성될 수 있음을 나타낸다.

[0501] hCLDN3 발현 및 CAR-T 활성화 간의 관계

[0502] CAR-T 세포가 표적 밀도에 어떻게 반응하는지 이해하는 것은 대체 설정에서 표적 발현의 효과를 예측하는데 도움이 될 수 있다. T 세포 활성화 및 표적 발현 간의 관계를 연구하기 위해 실험을 수행하였다.

[0503] hCLDN3 발현은 hCLDN3 발현의 구매를 생성하기 위해 hCLDN3 mRNA (mMESSAGE mMACHINE T7 울트라 키트를 사용하여 선형화된 플라스미드로부터 시험관내에서 생산됨)로 hCLDN3 녹아웃 (KO) 세포주 (RKO-KO)를 핵감염시킴으로써 치밀하게 제어되었다 (도 10a). 이는 hCLDN3에 대한 T 세포 반응에 영향을 미칠 수 있는 가변 인자 (예컨대 다른 바이오마커)와 관계없이 잘 정의된 시스템에서 연구가 수행되도록 허용하였다. hCLDN3의 발현을 확증한 후, 표적 세포를 CAR-T 세포와 함께 배양하고, 활성화 반응을 CD69 발현 (이전 실시예에서 기재된 바와 같이 유동 세포계측법에 의해 측정됨) 또는 시토카인 분비 (IFN  $\gamma$ /그랜자임 B)에 의해 평가하였다.

[0504] 각 실험에서 항-클라우딘-3 CAR-T 세포에 대해 특이적인 활성화 및 hCLDN3 발현이 관찰되었다. 이러한 hCLDN3 의존적 활성화는 표적 발현 및 IFN  $\gamma$  및 그랜자임 B의 T 분비 간의 상관관계를 제시하였다 (도 10c 및 10d 및 표 7). 통계적 분석은 수행되지 않았지만, 또한 hCLDN3 양성 집단 크기 및 100% 표적 발현에서 정제된 CD69 발현 간에 명확한 관계가 있었다 (도 10b). 전반적으로, 이는 표적 발현 및 CAR-T 활성화 간의 관계를 제시한다.

[0505] 상기 기재된 실험에서, RKO-KO는 hCLDN3 양성 집단을 저하시키면서 표적 구배를 생성하는 최적화된 구배로 핵감염되었다. 또 다른 실험에서, 전체 세포 집단 내에서 hCLDN3의 발현을 저하시키는 효과를 연구하였다 (표 8). 이 경우, 데이터는 hCLDN3 발현이 증가함에 따라 T 세포 활성화가 저하하였음을 시사하였다 (IFN  $\gamma$  분비에 의해 제시된 바와 같음). CD69 발현은 각 발현 수준 간에 일관되게 유지되었다.

[0506] 표 7 - 다양한 수준의 표적 발현에서 시토카인 분비의 유의성

시토카인	선형 대비	추정치	하위 CL	상위 CL	p-값
IFN $\gamma$	항-클라우딘3 vs 항-CD19 CAR 2.5ng vs 1ng	2.070	1.508	2.840	0.0001
	항-클라우딘3 vs 항-CD19 CAR 5ng vs 1ng	3.410	2.423	4.799	0.0001
	항-클라우딘3 vs 항-CD19 CAR 10ng vs 1ng	4.812	3.434	6.744	0.0001
	항-클라우딘3 vs 항-CD19 CAR 25ng vs 1ng	6.427	4.746	8.703	0.0001
	항-클라우딘3 vs 항-CD19 CAR 50ng vs 1ng	7.519	5.207	10.859	0.0001
그랜자임 B	항-클라우딘3 vs 항-CD19 CAR 2.5ng vs 1ng	1.890	0.843	4.237	0.1185
	항-클라우딘3 vs 항-CD19 CAR 5ng vs 1ng	3.029	0.829	11.059	0.0913
	항-클라우딘3 vs 항-CD19 CAR 10ng vs 1ng	4.253	1.007	17.959	0.0489
	항-클라우딘3 vs 항-CD19 CAR 25ng vs 1ng	5.495	1.470	20.539	0.0127
	항-클라우딘3 vs 항-CD19 CAR 50ng vs 1ng	6.191	1.551	24.705	0.0112

[0507]

[0508] 추정치는 항-클라우딘-3 및 항-CD19 대조군 CAR-T 세포 간의 IFN  $\gamma$  수준의 배수 변화로서 보고된다. CL= 신뢰 구간.

[0509] 표 8 - 표적 발현 구배에 대한 T 세포 반응을 연구하는 데이터 요약

클라우딘 3 mRNA (ng)	IFN $\gamma$ 분비 (pg/mL)	CD69 %
0	36	5.88
250	4115	74.1
500	3349	70.5
1000	3271	75.6
2000	2603	70.1
0	19	2.73
1	539	24
2	834	35.3
6	891	43.9
7	2324	47.2
50	8469	76.8

[0510]

[0511]

hCLDN3 발현 및 T 세포 활성화에 대한 3개의 상이한 적응증으로부터의 암 세포주의 스크리닝

[0512]

상기 기재된 연구에서, 상이한 수준의 외인성 hCLDN3을 발현하는 단 하나의 결장직장암 세포주에 대한 항-클라우딘-3 CAR-T 세포의 반응을 조사하였다. 여기서, 각각 양성 및 음성 대조군으로서 HT-29-LUC 및 RKO-KO 세포주를 포함하여, 내인성 hCLDN3을 발현하는 3개의 1차 적응증 (결장직장암, 췌장암 및 유방암)으로부터의 31개 암 세포주 패널에 대한 항-클라우딘-3 CAR-T 세포의 반응을 평가하였다. 결장직장암 (도 11a), 췌장암 (도 11b) 및 유방암 (도 11c)으로부터의 세포주를 유동 세포계측법 및 실시간 정량적 PCR (RT-qPCR)에 의해 hCLDN3 발현에 대해 먼저 스크리닝하였다. 0% 내지 100% 범위의 모든 세포주 (도 11a-11c, 좌측)에서 상이한 수준의 hCLDN3 발현이 검출되었다. 흥미롭게도, 부분적으로 양성인 세포주, 예컨대 SW403 또는 SW480에서는, 잘 정의된 양성 및 음성 집단 대신 hCLDN3 항체와 함께 세포를 인큐베이션하였을 때 총 집단의 이동이 나타났다. hCLDN3 유전자의 발현 수준을 세포주의 동일한 패널에서 RT-qPCR에 의해 정량화하였으며 (도 11a-11c, 중간), 유사한 패턴이 일정량의 CLDN3 mRNA에서 나타났다. CRISPR 방법론으로 인해 음성 세포주 대조군 (RKO-KO)에서도 소량의 hCLDN3 mRNA가 검출될 수 있었다. RT-qPCR 및 유동 세포계측법 데이터를 비교할 때, HT-29-LUC, T84 및 SW403은 두 검정 모두에서 가장 높은 클라우딘 3 발현인자인 반면, RKO-KO 및 COLO320-DM은 가장 낮은 발현인자인 것으로 관찰되었다.

[0513]

음성 CAR 대조군으로서 항-CD19를 사용하여 선택된 암 세포주와 공동-배양 후에 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 활성화를 또한 연구하였다 (도 11a-11c, 우측). 중요하게도, hCLDN3을 발현하는 모든 세포주는 높은 수준의 IFN  $\gamma$ 에 의해 나타낸 바와 같이 항-클라우딘-3 CAR-T 세포를 활성화시킨 반면, RKO-KO와 공동-배양된 항-클라우딘-3 CAR-T 세포로부터는 반응이 보이지 않았다. 그럼에도 불구하고, 유동에 의해 hCLDN3의 검출가능한 발현을 나타내지 않은 일부 세포주인 COLO320-DM (0.068%), DLD-1 (0.347%), HC1954 (0.55%) 및 BxPC3 (1.95%)은 또한 항-클라우딘-3 CAR-T 세포를 활성화시킬 수 있었다. 하나의 가능한 설명은 사용되는 상업용 항체의 검출 한계이다.

[0514]

모든 hCLDN3 양성 세포주는 항-클라우딘-3을 활성화시킬 수 있었지만 항-CD19 대조군 CAR-T 세포는 그렇지 않았다. 그러나, 유동 세포계측법 또는 RT-qPCR에 의해 항-클라우딘-3 CAR-T 활성화 및 hCLDN3 발현 수준 간에는 명확한 상관관계가 나타나지 않았다.

[0515]

3개 적응증으로부터의 암 세포주의 사멸

[0516]

더 넓은 범위의 종양에 대한 항-클라우딘-3 CAR-T 세포의 기능성을 연구하기 위해, 상이한 수준의 hCLDN3 발현을 갖는 여러 암 세포주를 선택하여 사멸 검정을 수행하였다. 표 9는 각각 3명의 공여자로 수행된 3개의 인큐 사이트 실험의 요약을 제시한다. 결과는 공여자 간에 매우 일관되었으므로, 표 9는 실험당 3명의 공여자를 요약한다. 3개 적응증으로부터의 세포주는 항-클라우딘-3 CAR-T 세포에 의해 사멸되었으며, 이는 이러한 CAR이 여러 적응증에 사용될 잠재성이 있음을 제시한다. HT-29-LUC 완전 사멸이 또한 가지적이었다 (데이터는 제시되지 않음). 단 하나의 결장직장암 세포주인 COLO-320DM만이 항-클라우딘-3 CAR-T 세포에 의해 사멸되지 않았다.

3개의 세포주인 HCC1954, BxPC3 및 HPAC가 부분적으로 사멸되었다. 부분 사멸은 현미경법 이미지에서 아포토시스 세포 또는 세포층의 구멍으로서 가시적이었지만, 수득된 신호는 원시 데이터에서 가시적인 바와 같이 매우 낮거나 없었다 (도 12).

[0517] 표 9 - 결장직장암, 유방암 또는 췌장암으로부터 유래된 표적 세포에 대한 항-클라우딘-3 CAR-T 세포의 세포독성

적응증	세포주	실험 1	실험 2	실험 3
결장직장암	SW403	c	N/A	N/A
	SW480	c	N/A	N/A
	SW620	c	N/A	N/A
	HT29	c	N/A	c
	COLO-320DM	N/A	N/A	n
	DLD1_col	N/A	N/A	c
	HCT15	N/A	N/A	c
유방암	HCC1954	N/A	p	p
	MDA MB468	N/A	c	c
	MT-3	N/A	c	N/A
	HCC1937	N/A	N/A	c
췌장암	ASPC1	c	N/A	N/A
	CAPAN2	c	N/A	N/A
	PANC02.03	c	N/A	N/A
	BxPC3	N/A	N/A	p
	HPAC	N/A	N/A	p
	HUPT4	N/A	N/A	c

[0518]

n 사멸 없음

[0519]

p 부분 사멸 (사멸은 이미지에서 가시적이지만 정량화가능하지 않음)

[0520]

c 완전 사멸

[0521]

N/A 수득된 데이터 없음

[0522]

LNGFR 분자 정량은 견고한 CAR 발현을 나타낸다

[0523]

166,000 내지 301,000의 LNGFR 수가 검출되었다. CAR 발현 및 LNGFR 발현이 필적하다고 가정하고 평균 CD8+ T 세포가 표면 상에 50,000개의 T 세포 수용체를 갖는다는 점을 고려하면, T 세포 표면 상의 hCLDN3 CAR 풍부도는 T 세포 활성화에 충분한 것으로 추정된다.

[0524]

항-클라우딘-3 CAR-T 세포 사멸 동역학은 실험 간에 다르다

[0525]

CAR-T 세포 효력을 결정하기 위한 한 측면은 세포독성이 얼마나 빠르게 유도되는지이다. 최대 반응의 50%가 몇 시간 후에 달성되는지를 결정함으로써 이를 분석하였다. 이들 결과는 실험 간에 달라서, 결론을 도출하기 어렵게 만든다. 그러나, 모든 경우에, CAR 효력을 결정하기 위한 중요한 측면인 완전 표적 세포 사멸이 달성되었다고 언급할 수 있다.

[0526]

항-클라우딘-3 CAR-T 세포는 CLDN3-발현 세포를 특이적으로 사멸시킨다

[0527]

항-클라우딘-3 CAR-T 세포는 hCLDN3을 발현하는 표적 세포에 대해 특이적이다. 이에 대한 증거는 내인성 hCLDN3이 녹아웃된 RKO 세포 (RKO-KO)가 항-클라우딘-3 CAR-T 세포에 의해 사멸되지 않은 실험에 기인한다. 대조적으로, hCLDN3 발현을 보인 세포주는 항-클라우딘-3 CAR-T 세포에 의해 사멸되었다. 또한, RKO-KO 및 RKO-KO 과발현 외인성 hCLDN3 세포를 혼합한 경우, 부분적인 세포독성만이 검출되었으며, 이는 심지어 T 세포가 hCLDN3을 발현하는 표적 세포에 의해서만 특이적으로 활성화되는 것을 제시한다. 이들 결과는 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 활성이 hCLDN3에 대해 특이적임을 시사한다.

[0528]

- [0529] 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 활성화의 증가는 클라우딘 3 발현의 증가와 상관관계가 있다
- [0530] 어떤 환자 집단이 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 치료에 반응할 수 있는지 조사하기 위해, CAR의 활성화 역치를 이해하는 것이 유용하다. 상기 기재된 바와 같이 제어된 모델을 사용하여 표적 발현 및 T 세포 활성화 간의 관계를 구체적으로 연구하였다. 유동 세포계측법에 의해 더 이상 검출할 수 없는 포인트까지 표적의 발현을 저하시킴으로써, 목적은 항-클라우딘-3 CAR-T 세포를 활성화시키는데 필요한 표적 발현 수준을 정의하는 것이었다.
- [0531] IFN $\gamma$  분비는 T 세포 활성화 반응의 핵심 측정이며, CD69는 일반적으로 활성화의 마커로 사용된다. 표적 세포 아포토시스의 내재성 유도제인 그랜자임 B의 정량화는 또한 표적 발현 및 CAR-T 세포 세포독성 간의 관계에 대한 명확한 증거를 제공하는데 사용되었다. RKO-KO가 1ng의 클라우딘 3 mRNA로 핵감염되어 5% 양성 집단을 유발하는 경우 이들 지표의 상향조절은 항-클라우딘-3 CAR-T 세포의 민감성을 명확하게 제시한다. 항원 이용가능성이 낮은 경우에도 CAR-T 세포 반응은 효능있다. 배양 배지 내 그랜자임 B의 존재는 표적 세포 아포토시스가 발생하였음을 시사하지만, 표적 세포 자체를 연구하지 않으면 이는 명백히 언급될 수 없다.
- [0532] 항체의 검출 한계로 인해, 관찰된 발현이 클라우딘 3 발현 세포의 작은 집단인지 또는 낮은 발현을 갖는 100% 표적 양성 집단인지를 언급하는 것은 어렵다. 관찰된 임의의 표적 세포 아포토시스는 클라우딘 양성 집단의 정확한 정량화와 상관관계가 있을 수 없다.
- [0533] 항원 발현 및 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 활성화 간의 명확한 관계의 관찰에도 불구하고, 주로 항원 검출의 한계로 인해 활성화 역치를 확립할 수 없었다. 중요하게도, 그러나, 이 인공 시스템 내에서 클라우딘 3 발현에 대한 항-클라우딘-3 CAR-T 세포의 용량 반응이 있었다.
- [0534] 상이한 적응증의 세포주 패널과 공동-배양될 때 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 활성화가 관찰된다
- [0535] 보다 광범위한 표적 세포 패널을 사용하여 항-클라우딘-3 CAR-T 세포의 효능을 조사하기 위해, 결장직장암, 췌장암 및 유방암을 포함한 31개의 암 세포주를 mRNA 및 단백질 수준 둘 다에서 클라우딘 3 발현에 대해 스크리닝하였다. 특히, hCLDN3을 발현하는 모든 세포주는 항-클라우딘-3 CAR-T 세포를 활성화시킬 수 있으며, 이는 이러한 CAR의 효능을 더 광범위한 암 적응증 패널로 확장한다.
- [0536] 항-클라우딘-3 CAR-T 세포는 상이한 적응증으로부터 유래된 종양 세포를 사멸시킬 잠재성을 갖는다
- [0537] 항-클라우딘-3 CAR-T 세포의 활성화는 표적 세포의 사멸을 초래하지 않을 수 있으므로 3개의 종양 적응증에 대해 세포독성을 테스트하였다. 테스트된 대부분의 표적 세포주에서 완전 또는 부분 사멸이 가지적이었으며, 이는 CAR-T 세포의 IFN $\gamma$  방출과 일치하였다 (도 11a-11c). 결장직장암 세포주 COLO-320DM만이 항-클라우딘-3 CAR-T 세포에 의해 사멸되지 않았으며, 이는 CAR-T 세포를 부분적으로 활성화시킬 수 있음에도 불구하고 hCLDN3 발현이 나타나지 않았기 때문일 가능성이 높다.
- [0538] 항-클라우딘-3 CAR은 T 세포 활성을 hCLDN3-발현 종양 세포로 재지시할 수 있음을 시사하는 수준으로 T 세포에서 발현된다. 이는 hCLDN3의 외인성 발현으로 표적 세포를 특이적으로 사멸시키는 동시에, CRISPR/Cas9 기술을 통해 항원이 제거된 세포를 보호한다. 항-클라우딘-3 CAR-T 세포는 IFN $\gamma$ 를 분비하고 결장직장암, 유방암 및 췌장암으로부터 유래된 hCLDN3-발현 암 세포주를 사멸시킬 수 있었지만, 검출 시약의 한계로 인해 활성화 역치를 정의할 수 없었다. 이는 CAR이 T 세포를 여러 유형의 암으로 재지시할 수 있음을 시사한다. 최종적으로, 이들 세포주의 hCLDN3 발현 및 IFN $\gamma$  방출 수준 간에는 명확한 상관관계가 나타나지 않았는데, 이는 아마도 이들 세포주의 생물학적 특성이 상이하기 때문일 것이다.
- [0539] 실시예 5 - 시험관내에서 항-클라우딘-3 CAR-T 세포의 장기간 항종양 활성을 평가하기 위한 반복된 항원-의존적 자극
- [0540] 이 연구의 목적은 동일한 scFv 변이체에 기초한 6개의 항-클라우딘-3 CAR 구축물의 발현, 시토카인 분비 및 세포독성 효력을 분석하는 것이었다. 또한, 반복된 항원 자극에 의해 항-클라우딘-3 CAR-T 세포의 장기간 기능을 평가하였다.
- [0541] 재료 및 방법
- [0542] 밀테니 바이오텍 CAR 스페이서 라이브러리의 3개 백본 (L, S, XS)으로 클라우딘-3에 대해 지시된 scFv의 클로닝
- [0543] scFv 변이체를 코딩하는 플라스미드는 2개의 상이한 배향: 중쇄-경쇄 ( $V_H$ - $V_L$ ) 및 경쇄-중쇄 ( $V_L$ - $V_H$ )으로 제조되었다. scFv는 스페이서 길이, 긴 (L, hIgG4 H-CH2-CH3), 짧은 (S, hCD8) 및 매우 짧은 스페이서 (XS, hIgG4

힌지)가 상이한 밀테니 바이오텍 CAR 스페이서 라이브러리의 3개 백본에 클로닝되었으며, 이는 6개의 상이한 구축물을 생성하였다:

스페이서 <sup>1</sup>	scFv 배향 H-L	scFv 배향 L-H
긴 (L)	906_002	906_007
짧은 (S)	906_004	906_009
매우 짧은 (XS)	906_005	906_010

[0544]

[0545] <sup>1</sup> 스페이서 (또는 힌지 도메인): 세포의 도메인 및 막횡단 도메인 사이의 도메인.

[0546] Pan T 세포의 PBMC 제조 및 단리

[0547] 2명의 건강한 공여자로부터 수득된 버피 코트로부터 PBMC를 단리하였다. Pan T 세포 인간 단리 키트를 사용하여 T 세포를 손대지 않은 상태로 단리하였다.  $2 \times 10^8$ 개 백혈구를 사용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 Pan T 세포의 단리를 수행하였다. T 세포를 IL-7 (10ng/mL), IL-15 (10ng/mL) 및 T 세포 트랜스액트 인간 (1:100)을 함유하는 TEXMACS 배지에 재현탁하고,  $1 \times 10^6$ 개 세포/mL의 농도로 조정하였다.

[0548] CAR-T 세포의 생성 및 확장

[0549] Pan T 세포를  $1 \times 10^6$ 개 세포/ml의 농도로 및 24-웰 플레이트에 웰당 2ml 시딩하였다 (상기 참조). 트랜스액트를 사용한 T 세포의 활성화 후 1일에, 형질도입을 수행하였다. 렌티바이러스 벡터를 5의 감염 다중도 (MOI)로 T 세포에 첨가하였다. 형질도입 후 24 내지 48시간에, 각 웰의 상청액을 제거하고, IL-7 및 IL-15를 함유하는 신선한 TEXMACS를 첨가하였다. T 세포 밀도에 따라 T 세포 배양물을 2 내지 3일마다 1:2 또는 1:3 스플릿하여 세포의 농도를  $0.5 \times 10^6$  내지  $2 \times 10^6$ 개 세포/ml로 유지하였다.

[0550] 형질도입 효율 (LNGFR에 의한) 및 CAR 발현의 결정

[0551] 생성된 CAR 구축물은 마커 유전자로서 LNGFR을 함유하므로, 이전에 기재된 바와 같이 유동 세포계측법 (맥스퀀트 분석기 10)에 의해 항-LNGFR-PE를 사용한 항-LNGFR 염색을 통해 형질도입 효율을 분석하였다.

[0552] CAR 발현을 분석하기 위해, 가변 경쇄 (카파 쇠)를 통해 CAR을 염색하기 위해 단백질 L을 사용하였다. 세포를 단백질 L-비오틴 ( $5 \mu\text{g}/1000 \mu\text{l}$ )을 함유하는 완충액에 재현탁하고, 45분 동안 4°C에서 인큐베이션 후 세포를 세척하고, 항-비오틴-PE를 함유하는 완충액에 재현탁하였다. 그 후, 세포를 세척하고, 유동 세포계측법 (맥스퀀트 분석기 10)에 의해 분석하였다.

[0553] 장기간 공동-배양: 인큐사이트

[0554] 표적 세포 RKO-KO CLDN3 H1 (인간 클라우딘-3 녹아웃 + 인간 클라우딘-3 및 렌티바이러스 형질도입을 통한 GFP 마커 도입)을 이 검정에 사용하였다. 검정을 설정하기 72시간 전에 T 세포를 해동하고 (상기 참조), IL-7 및 IL-15가 포함된 TEXMACS에서 회수하였다. 검정 당일, T 세포를 잘 재현탁하고, 동일한 조건 (동일한 공여자 및 동일한 CAR 구축물을 발현함)을 플링하고, LNGFR 양성 T 세포의 세포 농도 및 빈도를 고려하여, T 세포를 형질도입 효율로 조정하고, 공동-배양을  $4 \times 10^4$  및  $3 \times 10^4$ 개 표적 세포에 대해 이펙터:표적 2.5:1로 설정하였다. T 세포 현탁액을 첨가하고, 공동-배양물을 인큐사이트에서 인큐베이션하여 녹색 전면생장을 통해 표적 세포 성장을 모니터링하였다. 3일차에, 신선한 표적 세포 배지를 첨가하였다. 4일차에, T 세포를 첨가하기 대략 4 내지 5시간 전에 신선한 표적 세포를 제1 라운드와 동일한 농도로 새로운 세포 배양 플레이트에 시딩하였다. 동일한 조건으로부터의 T 세포를 플링하고, 조정된 T 세포를 신선하게 시딩된 표적 세포에 2.5:1의 E:T로 첨가하였다. 세포 배양 플레이트를 인큐사이트에서 인큐베이션하여 녹색 전면생장을 통해 표적 세포 성장을 모니터링하였다. 7일차에 T 세포를 첨가하기 대략 4 내지 5시간 전에 신선한 표적 세포를  $3 \times 10^4$ 개 표적 세포의 농도로 새로운 세포 배양 플레이트에 시딩하였다. 동일한 조건으로부터의 모든 T 세포를 플링하였다.

[0555] 반복된 항원 자극: 항원 스파이크-인

[0556] 표적 세포 RKO-KO CLDN3 H1 (인간 클라우딘-3 녹아웃 + 인간 클라우딘-3 및 마커 GFP)을 T 세포와 공동-배양하였다. 공여자 H5 및 P로부터의 T 세포를 공동-배양을 설정하기 96시간 전에 해동하고, IL-7 및 IL-15가 포함된

TEXMACS에서 회수하였다.

- [0557] 고갈 마커, 형질도입 효율, CD4 및 CD8에 대해 염색하기 위해, 하기 접합체를 사용하였다: LAG3 (CD223)-VioBlue, PD-1 (CD279)-PE-Vio770, TIM3 (CD366)-APC, CD8-APC-Vio770, CD4-VioGreen, LNGFR-PE, 및 7-AAD. 이들 접합체의 마스터믹스를 제조하였다. 세포를 마스터믹스에 재현탁한 후, 10분 동안 4°C에서 (암실에서) 인큐베이션하였다. 세포를 PEB (0.5% BSA가 포함된 CliniMACS)에 재현탁하고, 샘플을 맥스퀀트 분석기 10에서 측정하였다. 형질도입된 T 세포를 기준으로 2:1의 E:T에 도달하는데 필요한 T 세포 현탁액의 부피를 적절한 부피의 표적 세포 배지에 재현탁하고, T 세포 현탁액을 표적 세포에 첨가하고, 공동-배양물을 가습 인큐베이터 (37°C 및 5% CO<sub>2</sub>)에서 인큐베이션하였다. 24시간마다 T 세포를 고갈 마커에 대해 염색하고, 신선한 표적 세포를 공동-배양물에 첨가하였다. 신선한 표적 세포의 마지막 첨가는 3일차에 있었다.
- [0558] 결과
- [0559] 형질도입 효율 (LNGFR을 통해) 및 CAR 발현을 분석하기 위한 T 세포의 염색
- [0560] 공여자 D5로부터 생성된 CAR T 세포의 형질도입 효율을 분석하기 위해 (상기 참조), LNGFR 마커 유전자 발현을 7일차에 유동 세포계측법에 의해 측정하였다. 염색으로부터 수득된 데이터는 형질도입이 성공적이었고 39% 내지 50% LNGFR 양성 T 세포의 빈도가 달성되었음을 제시하였다 (도 13 참조). 더욱이, 기능성 테스트를 위해 T 세포를 형질도입 효율로 조정하기 위해 15일차에 LNGFR 발현을 다시 분석하였다 (도 13 참조). T 세포 표면 상의 CAR 분자의 발현은 CAR 기능에 대한 요구사항이다. 따라서, CAR 발현을 단백질 L 염색을 통해 결정하였다 (상기 참조). 수득된 데이터는 모든 생성된 CAR 변이체가 발현되었고 35% 내지 43% 범위의 CAR 양성 T 세포 집단의 빈도에 도달하였음을 제시하였다 (도 13 참조). 또한, 클라우딘-3에 대해 상이한 scFv를 발현하는 CAR-T 세포가 양성 대조군으로서 포함되었다.
- [0561] 루시퍼라제 사멸 검정
- [0562] 항-클라우딘-3 CAR-T 세포의 세포독성을 평가하기 위해, 루시퍼라제-기반 사멸 검정을 수행하였다. 공동-배양을 위해 유방암 세포주 T-47D를 사용하였다. 이 표적 세포주는 2개의 마커를 코딩하는 렌티바이러스 벡터, 이어서 세포를 사용한 형질도입 후 루시퍼라제 및 eGFP 둘 다를 발현하도록 조작되었다. 다양한 항-클라우딘-3 CAR을 발현하는 T 세포 또는 비형질도입된 T 세포를 제조하고 확장하고, 공동-배양 전 48시간 동안 시토카인 없이 배양하였다. 그 후, T 세포를 가장 낮은 형질도입 효율 (LNGFR 양성 세포의 빈도)에 따라 조정된 3개의 상이한 이펙터 대 표적 (E:T) 비, 즉 5:1, 1:1 및 0.2:1로 표적 세포주에 첨가하고, 공동-배양물을 인큐베이션하였다 (가습됨, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). 공동-배양을 설정한 후 20시간에 상청액을 제거하고, MACSPlex 검정을 통해 시토카인이 측정될 때까지 저장하였다. D-루시페린 용액을 세포에 첨가하고, 인큐베이션 5분 후, 루미노미터 (VICTOR, 퍼킨엘머)를 사용하여 발광성을 판독하였다.
- [0563] 클라우딘-3에 대해 상이한 scFv를 발현하는 CAR T 세포를 양성 대조군으로서 사용하였다. 그래프 (도 14)는 20시간의 공동-배양 후 사멸된 표적 세포의 빈도를 표시한다. 비형질도입된 T 세포와 공동-배양될 때 사멸된 표적 세포의 빈도의 증가는 가시적이 아니었다. 인간 클라우딘-3을 발현하는 T-47D와 공동-배양된 다양한 항-클라우딘-3 CAR 구축물을 발현하는 T 세포는 E:T 비에 따라 사멸된 표적 세포 및 세포독성의 증가된 빈도를 나타내었다. 5:1의 E:T에서, 사멸된 표적 세포의 빈도는 96%-99.7%였으며, 더 낮은 E:T 비로 사멸된 표적 세포의 빈도가 저하하는 것으로 밝혀졌다. 더욱이, 사멸된 표적 세포의 빈도는 7개의 테스트된 CAR 구축물 간에 유사하였다.
- [0564] MACSPlex 검정을 통한 상청액으로의 시토카인 분비의 결정
- [0565] MACSPlex 검정을 사용하여 공동-배양 상청액 (상기 참조)을 시토카인 IL-2, IFN $\gamma$  및 TNF- $\alpha$ 의 농도에 대해 분석하였다. 1:1의 E:T 비로 공동-배양물로부터의 샘플만을 분석하였다. 샘플 및 MACSPlex 검정을 MACSPlex 시토카인 12 키트 (인간)에 대한 제조업체의 프로토콜에 따라 제조하고, 맥스퀀트 분석기 10에서 분석하였다. 생성된 농도는 pg/ml로 도시된다 (도 15a-15c). 분석에 사용된 상청액은 희석하지 않았다. IL-2, IFN $\gamma$  및 TNF- $\alpha$ 에 대한 상승된 수준은 비형질도입된 T 세포가 암 세포주 T-47D와 공동-배양된 조건으로부터의 상청액에서 검출되지 않았다. 또한, "표적 세포 단독" 조건으로부터의 샘플에서는 시토카인이 검출될 수 없었다. 906 변이체에 기초한 다양한 항-클라우딘-3 CAR을 발현하는 CAR T 세포를 T-47D 세포와 공동-배양한 모든 조건은 모의 T 세포와 비교하여 IL-2 및 IFN $\gamma$ 의 상승된 수준을 나타내었다. IL-2의 가장 높은 양은 T-47D의 존재 하에 906\_004, 906\_009 및 양성 대조군 클라우딘-3 CAR에 의해 분비되었다. 906\_005를 포함하는 이들 구축물은 또한

가장 높은 IFN $\gamma$  분비를 나타내었다. 낮은 수준의 TNF- $\alpha$ 만이 검출되었으며, 그 중 샘플 906\_009 및 양성 대조군 클라우딘-3 CAR에 대해 가장 높은 농도가 검출되었다.

[0566]

반복된 항원 자극을 사용한 T 세포의 장기간 공동-배양

[0567]

906\_002 (긴 스페이서), 906\_004 (짧은 스페이서) 또는 906\_005 (매우 짧은 스페이서) CAR 변이체를 발현하는 T 세포와의 공동-배양에서 표적 세포의 성장을 인큐사이트에 의해 모니터링하였다. 결과는 두 공여자 (G5 및 H5) 모두에 대해 표적 세포 노출의 제1 라운드에서 표적 세포가 모든 3개의 CAR 구축물에 의해 효율적으로 제거되었음을 나타낸다 (도 16a 및 16d). 표적 세포 RKO-KO CLDN3 H1을 단독으로 배양한 대조군에서는 증식이 관찰되었다. 제2 및 제3 라운드의 표적 세포 만남을 위해 CAR T 세포를 신선한 표적 세포로 옮긴 후, CAR 변이체 간의 차이는 가시적이 되었다. 긴 스페이서를 갖는 CAR 변이체를 발현하는 T 세포는 짧은 및 매우 짧은 스페이서 변이체를 갖는 항-클라우딘-3 CAR을 발현하는 T 세포와 비교하여 표적 세포 성장을 덜 효율적으로 제어하였다 (도 16c 및 16e). 공여자 H5의 경우, 제2 라운드 이후 LNGFR 양성 T 세포가 충분히 획득되지 않아서, 제3 라운드를 수행하지 않았다.

[0568]

반복된 항원 자극: 항원 스파이크-인

[0569]

고갈 마커 (TIM3, PD-1, LAG3)의 발현을 0, 1, 2, 3 및 6일차에 유동 세포계측법에 의해 분석하였다. 이 중 (TIM3, PD-1) 및 삼중 양성 (TIM3, PD-1, LAG3) T 세포에 대한 분석에는 LNGFR 양성 T 세포만이 포함되었다.

[0570]

도 17a-17d에 도시된 결과는 표적 세포의 처음 첨가 전 0일차에 이중 및 삼중 양성 형질도입된 T 세포의 빈도가 5% 미만임을 제시하였다. 그러나, 이중 및 삼중 양성 T 세포의 빈도는 두 공여자 모두에 대해 1일차부터 3일차까지 표적 세포 만남과 함께 증가하였다. 공여자 P는 공여자 H5와 비교하여 고갈 마커 발현의 더 높은 증가를 나타내었다 (도 17b). 신선한 표적 세포의 첨가 없이 2일 (4일차 및 5일차) 후인 6일차에 염색은 이중 및 삼중 양성 형질도입된 T 세포의 빈도가 저하하였음을 나타내었으며, 이는 공여자 H5보다 공여자 P에서 더 두드러졌다.

[0571]

인간 클라우딘-3을 발현하는 T-47D와 공동-배양된 906 scFv 변이체에 기초한 다양한 항-클라우딘-3 CAR 구축물을 발현하는 T 세포는 E:T 비에 따라 사멸된 표적 세포의 증가된 빈도를 나타내었다. 이는 암 세포주가 비형질도입된 T 세포와 공동-배양되었을 때 관찰되지 않았다. 이는 항-인간 클라우딘-3 CAR-T 세포와 공동-배양될 때 인간 클라우딘-3을 발현하는 표적 세포의 특이적 용균을 나타내었다. 더욱이, scFv 배향 및 스페이서 길이 (L, S 및 XS)가 상이한 항-클라우딘-3 CAR 구축물을 발현하는 모든 T 세포는 테스트된 표적 세포에 대해 필적하는 용균 능력을 나타내었다. 전반적으로, 인간 클라우딘-3을 발현하는 표적 세포의 용균에 관한 항-클라우딘-3 CAR의 기능성은 양성 대조군 클라우딘-3 구축물을 발현하는 CAR-T 세포에 필적하였다.

[0572]

비형질도입된 T 세포와 비교하여 T-47D와 공동-배양된 항-클라우딘-3 CAR-T 세포에 대해 상청액 내 분비된 시토카인 IL-2 및 IFN $\gamma$  농도가 증가되었다. 이는 인간 클라우딘-3을 발현하는 표적 세포의 존재 하에 906 변이체에 기초한 항-클라우딘-3 CAR-T 세포의 특이적 시토카인 분비를 나타내었다. 구축물 906\_009 및 906\_004는 분비된 시토카인의 가장 높은 농도를 나타냈으며, 둘 다는 공통적으로 짧은 스페이서를 갖는다. 이들 구축물의 경우, 분비된 시토카인 수준은 양성 대조군 클라우딘-3 구축물을 발현하는 CAR-T 세포에 필적하거나 훨씬 더 높았다.

[0573]

906 scFv에 기초한 상이한 CAR 변이체를 발현하는 T 세포의 성능을 추가로 평가하기 위해, 더욱 까다로운 검정을 수행하였다. 따라서, 장기간 공동-배양을 수행하였으며, 여기서 3회 라운드의 신선한 표적 세포를 첨가하였다. 3개의 상이한 스페이서 (L, S 및 XS)를 갖는 906 변이체를 발현하는 CAR-T 세포는 제1 라운드의 표적 세포 만남에서 동등하게 잘 수행하였다. 그러나, 짧은 및 매우 짧은 스페이서를 발현하는 변이체는 3회 라운드 모두의 공동-배양 동안 신선하게 첨가된 RKO-KO CLDN3 H1 세포를 제거할 수 있었다. 긴 스페이서 변이체에 기초한 CAR의 경우, 1명의 공여자 (H5)로부터의 CAR-T 세포는 제1 라운드 동안에만 표적 세포를 제거하였고, 제2 공여자 (G5)로부터의 CAR T 세포는 처음 2회 라운드의 표적 세포 노출 동안에만 표적 세포를 제거하였다. scFv의 배향은 이들 결과에 영향을 미치지 않을 것으로 예상된다.

[0574]

항원 스파이크-인을 통한 반복된 항원 자극이 수행된 검정에서, 반복된 항원 만남 후 LNGFR 양성 T 세포의 고갈 마커의 증가된 발현이 명백하였지만 (도 17a-17e), 2명의 테스트된 공여자 간의 차이는 906 scFv에 기초한 다양한 CAR 구축물을 발현하는 T 세포보다 더 두드러졌다. 따라서, 이 검정에서, 특이적 CAR 구축물 변이체의 기능성의 차이에 관한 결론을 내릴 수 없었다. 또한, 6일차의 데이터는 4 및 5일차에 신선한 표적 세포를 첨가하지 않은 후 고갈 마커 이중 및 삼중 양성 CAR T 세포의 빈도가 저하하였음을 나타내었다. 빈도의 저하가 LNGFR 양

성 T 세포 상의 해당 마커의 실제 감소로 인한 것인지 또는 또 다른 이유 (예를 들어, 비교갈된 T 세포의 확장 및 비교갈된 T 세포의 감소된 전체 빈도를 유발할 수 있음)에 기인할 수 있는 것인지 결정되지 않았다.

- [0575] 항-클라우딘-3 CAR은 T 세포 활성을 클라우딘-3-발현 종양 세포로 재지시할 수 있음을 시사하는 수준으로 1차 T 세포에서 발현된다. 이러한 항-클라우딘-3 CAR-T 세포는 클라우딘-3을 발현하는 표적 세포를 용균시킬 수 있었고 표적의 존재 하에 선택적으로 IL-2 및 IFN  $\gamma$  를 분비하였다. 또한, 항-클라우딘-3 CAR-T 세포는 여러 라운드의 표적 세포 노출 동안 클라우딘-3-발현 종양 세포를 제거할 수 있었다.
- [0576] 실시예 6 - CLDN3 양성 종양 세포에 대한 항-클라우딘-3 CAR-T 세포의 증식적 반응
- [0577] 이 연구의 목적은 클라우딘-3 양성 표적 세포를 사용한 항원성 자극에 대한 반응으로 증식하는 항-클라우딘-3 CAR-T 세포의 능력을 평가하는 것이었다.
- [0578] 재료 및 방법
- [0579] 실험 준비(들)
- [0580] CAR T 세포의 증식은 이펙터 및 표적 세포를 72시간 동안 배양함으로써 평가하였다.
- [0581] 이들 실험을 위해, 2개의 독립적 실험에서 6명의 공여자로부터의 T 세포를 동일한 scFv 변이체 (906-002, 906-004, 906-007 및 906-009; 실시예 5 참조)에 기초한 4개의 구축물로 렌티바이러스로 형질도입하였다. T 세포는 CAR 서열에 직접적으로 저친화성 신경-성장-인자 수용체 (LNGFR) 마커 유전자로 조작하여, CAR 분자의 세포외 부분에서 발현된 LNGFR 마커 유전자를 표적화하는 면역-자성 비드를 사용한 분류에 의해 CAR 양성 세포의 단리를 허용하였다.
- [0582] 클라우딘-3 양성 (RKO) 및 클라우딘-3 음성 (RKO-KO) 세포주와의 72시간 1:1 공동-배양 후 [<sup>3</sup>H] 티미딘의 혼입에 의해 CAR-T 세포 증식을 측정하였다. 티미딘 혼입 검정은 유사분열 세포 분열 동안 방사성 뉴클레오시드인 3H-티미딘이 염색체 DNA의 새로운 가닥에 혼입되는 전략을 활용한다.
- [0583] 실험 프로토콜(들)
- [0584] 이펙터 세포 및 표적 세포를 1:1 비로 공동-배양함으로써 CAR-T 세포 증식을 측정하였다.  $1 \times 10^5$  개 풍부화된 CAR-T 세포를  $1 \times 10^5$  개 CLDN-3 양성 RKO 또는 CLDN-3-음성 (RKO huCLDN-3ko) 세포주와 공동-배양하였다. 48시간 후, 세포를 1  $\mu$ Ci (37Bq)의 [<sup>3</sup>H]-티미딘 (피킨엘머)으로 펄스화하고, 추가 21시간 동안 인큐베이션하여 T 세포가 분열하는 세포의 새로 합성된 DNA에 방사능을 혼입하도록 허용하였다. 세포 수확기 (Micro 96 수확기-스카트론 인스트루먼트스(Skatron Instruments))를 사용하여 세포를 필터 매트에 수확하였다. [<sup>3</sup>H] 티미딘 혼입에 대한 반응으로 발생한 세포 분열의 정도를 결정하기 위해, 왈락 1450 마이크로베타 트릴룩스(Wallac 1450 MicroBeta triluX) 액체 섬광 및 발광성 베타-카운터 (피킨 엘머)를 사용하여 DNA에 혼입된 방사능을 측정하였으며, 이를 분당 카운트 (CPM)로서 표현하였다. 데이터 분석을 그래프패드 프리즘, 버전 5.0.4에서 수행하였다. 데이터를 평균  $\pm$  표준 오차로서 표현하였으며, 분석을 도면 범례에 제시된 바와 같이 양쪽꼬리 스튜던트 t-테스트에 의해 수행하였다. 발견의 유의성은 하기와 같이 정의된다: NS, 유의하지 않음; \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001; \*\*\*\*P < 0.0001.
- [0585] 결과
- [0586] 2개의 상이한 배향 ( $V_H-V_L$  및  $V_L-V_H$ ) 및 2개의 스페이서 길이의 항-클라우딘-3 scFv를 코딩하는 4개의 렌티바이러스 구축물 (906-002, 906-004, 906-007 및 906-009)로 형질도입된 CAR-T 세포의 증식적 능력을 비교하였다.
- [0587] 결과는 906-009 항-클라우딘-3 CAR T 세포가 클라우딘-3 발현하는 세포주 (RKO)에 대한 다른 구축물 906-002, 906-004, 906-007 CAR (도 18)로 형질도입된 T 세포보다 시험관내에서 유의하게 더 큰 항원-특이적 증식을 나타내었음을 입증한다.
- [0588] 항-클라우딘-3 CAR-T 세포는 RKO-클라우딘-3 KO 세포주와 함께 배양될 때 어떠한 증식도 나타내지 않았다.
- [0589] 항-CD19 CAR-T 세포는 클라우딘-3 RKO 세포와 함께 배양될 때 증식을 나타내지 않았다.
- [0590] 이들 데이터는 906-009 항-클라우딘-3 CAR-T 세포가 더 큰 항-종양 임상적 활성을 초래할 수 있는 더 큰 생체내 증식을 가질 수 있다고 예측한다. 이들 발견은 결장암에 대한 암 면역요법으로서 항-클라우딘-3 CAR-T 세포를

사용하는 것이 종양 항원에 대한 증식적 및 세포독성 반응을 지속시킬 것임을 시사한다.

- [0591] 실시예 7 - CDX NSG 모델에서의 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 활성화의 생체내 평가 및 인간 CRC PDX 샘플에 대한 시험관내 평가
- [0592] 이 연구의 목적은 생체내 마우스 모델에서 항-클라우딘-3 CAR로 형질도입된 T 세포의 효능 및 시험관내 환자-유래 인간 이종이식편 (PDX) 모델에서의 이의 기능성을 평가하는 것이었다. 결과는 항-클라우딘-3 CAR-T 세포가 마우스의 생존을 연장하고 종양 성장을 제어한다는 것을 입증한다.
- [0593] 재료 및 방법
- [0594] 생체내에서 종양 세포를 사멸시키는 항-클라우딘-3 CAR-T 세포의 효능을 평가하기 위해, CLDN3 발현 결장암 세포주 HT-29 Luc를 사용하였다. 연구의 1차 관독값은 (1) 마우스의 종양 성장 및 생존에 미치는 영향이었다. 2차 관독값은 (2) T 세포 활성화를 평가하기 위한 혈청 시토카인 방출, (3) 조직병리학에 의한 종양 및 마우스 조직 내 T 세포의 분포 및 (4) 혈액 내 CAR T 검출이었다.
- [0595] 항-클라우딘-3 CAR-T 세포의 기능성을 환자-유래 인간 이종이식편 (PDX) 모델에서 추가로 평가하였다. 0일차 (D0)에, PDX 세포를 해동하고, 유동 세포계측법에 의해 특징화하고, 시딩하였다. 1일차 (D1)에, T 세포를 해동하고, PDX 세포의 상단에 1:1 비로 시딩하였다. 2일차 (D2)에, 상청액을 수집하고, MSD 검정을 통해 시토카인 수준을 평가하였다. PDX 및 T 세포를 수확하고, 유동 세포계측법을 통해 CLDN3, PD-L1, EpCAM (종양 세포) 및 CD69 (T 세포) 발현에 대해 특징화하였다.
- [0596] NSG 마우스
- [0597] 연구 착수 전에, 접종에 사용된 HT-29 Luc 세포를 인간 및 뮤린 병원체 (찰스 리버(Charles River))의 포괄적 패널에 대해 스크리닝하였으며, 모든 결과는 음성으로 나타났다. 병행하여, 공여자 혈액은 B형, C형 간염 및 HIV I/II에 대해 음성으로 테스트되었다.
- [0598] 추가적인 병원체에 대한 연구 동안 마우스의 대변을 테스트하였다. 연구에 참여한 마우스의 대변 뿐만 아니라 또 다른 연구에 참여한 동일한 공급업체로부터의 마우스의 대변은 아스트로바이러스-1 및 분절형 사상 박테리아 (SFB)에 대해 양성으로 테스트되었다. 수의사와 상담한 후 두 유기체 모두는 임상적 건강에 영향을 미치지 않는 것으로 가정되었다. SFB 및 아스트로바이러스-1 둘 다는 적격 면역 시스템의 발달에 영향을 미치는 것으로 보고되었으며 SFB는 또한 염증 조절에서 역할을 하였다.
- [0599] 종양 세포 준비 및 NSG 마우스에 대한 접종
- [0600] HT-29 Luc 세포를 수확하고, 세포의 무병원체 상태의 확증을 위한 인간 및 뮤린 병원체 테스트를 위해 상청액을 수집하였다. 수확된 세포를 카운팅하고, 후속적으로 각 NSG 마우스의 우측 옆구리에  $0.5 \times 10^6$  개 HT-29 Luc 세포의 피하 (s/c) 접종에 사용하였다.
- [0601] 종양 성장, 안락사 및 조직 수확
- [0602] 연구 종결까지 마우스를 밀접하게 모니터링하였다. 모든 마우스의 종양 크기를 축지/캘리퍼 측정에 의해 측정하고, 일주일에 3회 기록한 후, 일주일에 2회 체중을 기록하였다.
- [0603] 종점 기준, 예컨대 종양 부피로 인해 마우스를 도태하고 개별 종점에서 조직을 수확하였다. 종양 및 비장 (전체 조직/장기 무손상)을 얼음 위의 PBS에서 수집하였다. 절반은 조직 프로세싱에 사용하였고, 나머지 절반은 조직병리학적 검사를 위해 최대 48시간 동안 10% 중성 완충 포르말린 (NBF)으로 고정하였다. 심장, 폐, 결장, 신장, 간, 난소 및 뇌를 수집하고, 10% NBF로 직접적으로 고정하였다. 모든 고정된 조직을 GSK TMCP UK 히스톨로지, 웨어(GSK TMCP UK Histology, Ware)에 공급하였다.
- [0604] T 세포 해동, 배양 및 투약
- [0605] 그룹 전체에 걸쳐 종양 크기가 균등하게 확산되도록 보장하기 위해, 마우스를 종양 부피에 따라 7-8마리 마우스 그룹으로 블록 무작위화하였다. 종양이 축지가능할 때 (~100mm<sup>3</sup>), CAR-T 세포를 하기 표 10에 제시된 바와 같이 마우스당  $1 \times 10^7$  개 세포의 용량으로 꼬리 정맥 주사를 통해 투약하였다.

[0606] 표 10: 마우스 연구에서 CAR-T 세포의 투약

그룹	T 세포	용량	마우스/그룹
A	T 세포 없음 (PBS)	NA	8
B	Ctrl (항-CD19) CAR	1x10 <sup>7</sup>	7
C	항-클라우딘-3 CAR (906-009)	1x10 <sup>7</sup>	8

[0607]

[0608]

혈청 시토카인 검정 및 혈액 내 CAR-T 세포 검출

[0609]

혈청 시토카인 방출을 평가하기 위해 연구에 참여한 모든 마우스로부터의 혈액 샘플을 T 세포 투약 전 및 투약 후 7일에 수집하고, 혈액 내 CAR-T 세포를 평가하기 위해 투약 후 28일차에 수집하였다.

[0610]

하기 검출 항체를 사용하여 MSD에 의해 수집된 마우스 혈청 샘플에서 시토카인을 검출하였다: 스포-태그 항-hu IFN $\gamma$  항체, 스포-태그 항-hu IL-1 $\beta$  항체, 스포-태그 항-hu IL-2 항체, 스포-태그 항-hu IL-4 항체, 스포-태그 항-hu IL-6 항체, 스포-태그 항-hu IL-8 항체, 스포-태그 항-hu IL-10 항체, 스포-태그 항-hu IL-12p70 항체, 스포-태그 항-hu IL-13 항체, 및 스포-태그 항-hu TNF  $\alpha$  항체.

[0611]

투약 후 28일차에 여전히 연구 중인 각 마우스로부터의 전혈을 수집하고, 하기 항체로 염색하였다: CD45-FITC (1/100 희석); CD3-BUV395 (1/50 희석); CD8-APCVio770 (1/200 희석); CD4-PerCPVio770 (1/50 희석); 및 LNGFR-PEVio770 (1/600 희석).

[0612]

PDX 공동-배양 및 유동 세포계측법

[0613]

5개의 결장직장암 모델 및 1개의 난소암 모델을 사용하여 환자-유래 인간 이중이식편 (PDX) 모델을 확립하였다. PDX 결장직장암 세포 모델 (CR5052, CR5080, CR5089, CR5030, CR5087) 및 PDX 난소암 세포 모델 (OV5287)을 크라운 바이오사이언시스(Crown Biosciences)로부터 획득하였다.

[0614]

0일차: PDX 세포 현탁액을 해동하고, 카운팅하고, 50,000-100,000개 세포/웰로 시딩하였다.

[0615]

나머지 PDX 세포를 하기 항체 패널을 사용하여 유동 세포계측법 분석에 의해 특징화하였다: EpCAM-BV650 (1/600 희석); Clbn3-PE (1/10 희석); PDL1-BV421 (1/100 희석); CD45-FITC (1/100 희석); LNGFR-PEVio770 (1/100 희석); 및 CD69-BV786 (1/100 희석).

[0616]

1일차: T 세포를 해동하고, 1:1 CAR-T 세포 대 PDX 세포 비로 PDX 세포에 첨가하였다. PDX 세포 단독 및 T 세포 단독을 갖는 추가적인 웰을 사용하였다.

[0617]

2일차: 상청액을 수집하고, 시토카인 검정에 적용하였다. 또한, 공동-배양된 세포를 수확하고, D0에 사용된 것과 동일한 패널을 사용하여 유동 세포계측법에 의해 평가하였다.

[0618]

상청액을 수집하고, 상기 기재된 바와 같이 시토카인 검정을 수행하였다.

[0619]

결과

[0620]

종양 성장 지연 및 생존

[0621]

생체내 연구의 1차 목적은 생체내 HT-29 Luc 결장암 모델에서 항-클라우딘-3 CAR-T 세포의 효능을 평가하는 것이었다.

[0622]

인간 T 세포를 형질도입 효율, 기억 및 고갈 표현형과 관련하여 생체내 투약과 동일한 날에 표현형분석하였다. 세포는 높은 생존력 (87-92%)을 나타내었고, 형질도입 효율은 LNGFR 염색에 의해 항-CD19 CAR의 경우 32% 및 항-클라우딘-3 CAR의 경우 35.8%로 결정되었다. 이는 T 세포가 30% 형질도입 효율에 대해 정규화되었을 때 동결 전에 획득된 형질도입 효율 및 생존력과 일치하였다. 또한, 보다 복잡한 T 세포 표현형분석은 세포의 30% (CD19의 경우 27% 및 항-클라우딘-3 CAR의 경우 32.7%)에서 LNGFR 발현을 확증하였으며, 두 CAR 모두에서 CD8 T 세포가 CD4 T 세포보다 더 풍부하다는 것을 예시하였다. LNGFR 발현 백분율은 CD8 T 세포보다 CD4 T 세포에서 더 높았다. TIM3 및 PDL-1은 CD3 T 세포에서 각각 97% 및 86-88% 발현되었다.

[0623]

항-클라우딘-3 CAR-T 세포는 종양 성장을 제어하였다 (도 19a-19b). 종양 집중 부위로부터의 조직을 생체의 조직학적 분석에 적용하였다. 종양 세포는 검출되지 않았으므로, 항-클라우딘-3 CAR-T 세포는 종양을 완전히 파

과하였다. 이 연구에서 생존 시간은 '마우스의 종양이 1000 mm<sup>3</sup>에 도달하는데 필요한 시간'으로 정의되었다. 1000mm<sup>3</sup> 미만의 종양을 갖는 각 그룹의 마우스 비율은 도 19a에 제시되어 있으며, 이는 항-CD19 및 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 간의 생존 시간의 유의한 차이를 확증한다.

[0624] T 세포 접종 후 30일차에 시작하여, 일부 마우스는 차분한 자세, 눈을 가늘게 뜬, 탈모, 호흡 곤란, 비정상적인 보행, 입모 및 체중 감소의 징후를 나타내었다. 이들 마우스는 동물 복지에 따라 이들 증상의 첫 징후가 나타나면 도태되었다. 이들 증상은 발병 시점을 고려하면 종양 파괴와 연관된 시토카인 방출 증후군 (CRS) 또는 이식편-대-숙주-질환 (GVHD)에 기인할 수 있다. 이들 임상적 증상은 항-CD19 CAR 치료된 대조군 그룹의 모든 마우스가 큰 종양 부피로 인해 더 이른 시점에 희생되었기 때문에 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 치료된 그룹에서만 관찰되었다.

[0625] 종양 및 건강한 조직 (IHC)에서 항-클라우딘-3 CAR-T 세포의 분포

[0626] 항-클라우딘-3 CAR-T 세포의 조직 분포 및 잠재적인 마우스 조직 손상을 조직병리학에 의해 평가하였다. 이 연구에 대한 평가는 T 세포 투약된 그룹 둘 다의 무린 조직에서 광범위한 혈관주위 인간 T 세포 축적을 나타내었다. 항-클라우딘-3 CAR은 마우스 CLDN3을 인식할 수 있으므로 잠재적인 독성 효과를 고려할 필요가 있다. 항-CD19 또는 항-클라우딘-3 CAR-T 세포를 제공받은 동물에서는 매우 미미하게 증가된 간세포 및 상피 전환이 존재하였다. 또한, 결장 또는 폐의 상피 손상이 관찰되지 않았다. 따라서, 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 관련 조직 손상 또는 무린 내인성 표적의 파괴에 대한 조직학적 증거는 찾을 수 없었다.

[0627] 말초 혈액 내 CAR T 세포

[0628] 투약 후 28일차에, CAR-T 세포의 존재를 식별하기 위해 여전히 연구 중인 모든 마우스에 대해 혈액의 유동 세포 계측법 분석을 수행하였다. 이들 세포는 25 내지 4438 CAR-T 세포 카운트/전혈  $\mu$ L 범위에서 검출되었다. T 세포 상의 LNGFR 발현에 의해 측정된 바와 같은 CAR-T 세포의 백분율은 대략 30-40%로 유지되었으며, 투약 당일에 테스트된 발현에 필적하였다 (도 20). 연구 그룹 간에는 큰 차이가 없었다. LNGFR 발현의 빈도는 항-CD19 및 항-클라우딘-3 CAR 그룹 둘 다에서 CD8 T 세포보다 CD4 T 세포에서 더 높았다.

[0629] 혈청 시토카인 수준

[0630] 혈청 내 시토카인 수준을 평가하기 위해, T 세포 투약 전 및 투약 후 D7에 모든 마우스로부터 샘플을 수집하였다. 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 투약된 마우스는 도 21a-21b에 제시된 바와 같이 처리 후 7일에 증가된 IFN  $\gamma$  수준을 나타내었다 (CD19의 경우 32pg/mL와 비교하여 225pg/mL의 중앙값). 다른 테스트된 시토카인은 명확한 추세를 나타내지 않았거나 측정값이 검출 수준보다 낮았다.

[0631] 환자-유래 이중이식편 (PDX) 특징화 및 공동-배양 확립

[0632] 항-클라우딘-3 CAR-T 세포의 기능성을 환자-유래 인간 이중이식편 (PDX) 모델에서 테스트하였다. 이들 모델은 인간의 종양에서 나타나는 종양 세포의 이질성의 재현을 허용한다. CLDN3 발현, 조직병리학적 종양 특징 및 시험관내 배양물에서의 세포 생존에 기초하여 5개의 결장직장암 모델을 선택하였다. 또한, 낮은 CLDN3 발현인자로서 1개의 난소암 모델을 선택하였다.

[0633] 그 후, PDX 샘플을 사용하여 항-클라우딘-3 CAR vs. 항-CD19 CAR (음성 대조군) T 세포와의 공동-배양을 설정하였다. 1차 판독값은 하기와 같았다: (1) 종양 마커 EpCAM, PDL-1 및 CLDN3을 사용한 유동 세포계측법을 통한 해동 (D0) 후 PDX 샘플의 특징화 및 (2) 시토카인 방출에 의해 측정된 T 세포 활성화 (24시간 공동-배양물로부터의 상청액에 대한 MSD 검정). 2차 판독값은 하기와 같았다: (3) 종양 마커 EpCAM, PDL-1 및 CLDN3 및 T 세포 마커 CD45, LNGFR (CAR T 세포의 지표) 및 CD69 (활성화 마커)를 사용한 유동 세포계측법을 통한 공동-배양된 샘플의 특징화. 이들 실험은 HT-29 세포를 CLDN3 양성 대조군으로 사용하고 RKO-KO 세포를 CLDN3 음성 대조군으로 사용하여 실행하였다.

[0634] PDX 모델 공급업체로부터 취득된 RNAseq 데이터는 EpCAM이 결장직장 (CR) PDX 모델에 적합한 종양 세포 마커이지만 난소 (OV) PDX 모델에는 그렇지 않음을 나타내었다. EpCAM-양성 세포 집단의 백분율은 CR 모델의 경우 41 내지 65% 범위였지만 OV PDX 샘플에서는 14 내지 17%만이 검출되었다. CR PDX 샘플의 특징화는 EpCAM-양성 종양 세포에서 26 내지 55%의 CLDN3 발현을 입증하였다 (도 22). 유동 세포계측법을 통해 OV 모델에서는 CLDN3이 검출될 수 없었다 (0.29%). 또한, 예상된 바와 같이 임의의 실험에서 RKO-KO 세포 (음성 대조군)에서는 CLDN3이 검출되지 않았다. PDL-1 발현 표적 세포 (EpCAM+ CLDN3+ PDL-1+ 집단)의 백분율은 D0에 PDX 샘플에서 2% 미만이었지만 공동-배양 후에 증가하였으며, D2에 항-CD19 CAR-T 세포 공동-배양과 비교하여 항-클라우딘-3

CAR-T 세포 공동-배양에서 상승되었다.

- [0635] 이 과일릿 공동-배양 실험 (CR5030, CR5080, CR5052, CR5087, CR5089, OV5287) 및 양성 대조군 (HT-29) 내에서 테스트된 모든 PDX 모델은 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 시토카인 방출 (IFN $\gamma$ , IL-2 및 TNF- $\alpha$ )을 유도한 반면, 음성 대조군 (RKO-KO, T 세포 단독 및 항-CD19 CAR T 세포와의 모든 공동-배양)은 MSD 검정에서 측정된 바와 같이 T 세포 반응을 유도하지 않았다 (도 23).
- [0636] T 세포의 특징화는 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 공동-배양을 항-CD19 CAR-T 세포 공동-배양과 비교할 때 초기 T 세포 활성화 마커 CD69의 상승된 발현을 나타내었다 (CD45+ LNGFR+ CD69+ 집단은 항-CD19 T 세포 공동-배양의 경우 11 내지 22%와 비교하여 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 공동-배양의 경우 69 내지 82%의 범위였음).
- [0637] 측지가능한 HT-29 Luc 종양을 갖는 NSG 마우스를 항-클라우딘-3 또는 항-CD19 CAR-T 세포 ( $1 \times 10^7$  개 총 세포 수의 용량으로) 또는 PBS (T 세포 없음)로 접종하였다. 항-클라우딘-3 CAR-T 세포는 마우스의 생존을 연장하고, 종양 덩어리의 완전한 파괴 (조직학)에 의해 확증된 바와 같이 종양 성장을 제어하였다. 이들 데이터는 T 세포 투약 후 D7에 IFN $\gamma$ 의 상승된 혈청 수준에 의해 뒷받침되었다. 따라서, 항-클라우딘-3 CAR-T 세포는 생체내 종양 사멸 측면에서 높은 효능을 입증하였다.
- [0638] 마우스 조직의 조직병리학적 분석은 T 세포 투약된 그룹 둘 다의 광범위한 혈관주위 인간 T 세포 축적을 입증하였다. 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 관련 조직 손상의 증거는 관찰되지 않았다. 이는 건강한 조직에서 치밀 이음부 (TJ)로 제한된 CLDN3이 항-클라우딘-3 CAR-T 세포에 접근가능하지 않다는 가설을 뒷받침하였다. 그러나, TJ 외부에 잘못 편재화된 경우 CLDN3이 종양의 항-클라우딘-3 CAR-T 세포에 의해 인식되었다.
- [0639] 결론적으로, 항-클라우딘-3 CAR-T 세포는 생체내에서 효율적인 항암 요법임이 입증되었다.
- [0640] 또 다른 모델에서 CAR-T 세포의 효능을 평가하기 위해, 인간에서 볼 수 있는 종양 세포의 이질성의 모방을 가능하게 하는 환자-유래 인간 이중이식편 (PDX) 모델을 사용하였다. 시험관내 항-클라우딘-3 CAR-T 세포의 기능성을 평가하기 위해 이를 사용하였다. 5개의 결합장 PDX 모델 및 CLDN3 양성 대조군 세포 (HT-29)를 사용한 실험은 상승된 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 시토카인 방출 (IFN $\gamma$ , IL-2 및 TNF- $\alpha$ )을 나타낸 반면, 음성 대조군 (RKO-KO 공동-배양 및 T 세포 단독 및 항-CD19 CAR-T 세포와의 모든 공동-배양)은 T 세포 반응을 유도하지 않았다. RNAseq에 의한 매우 낮은 CLDN3 발현을 갖는 OV 모델은 또한 동일한 실험 및 필적하는 TNF- $\alpha$  측정에서 실행된 2개의 CR 모델과 비교하여 더 낮은 수준의 IFN $\gamma$  및 IL-2로 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 반응을 유도하였다.
- [0641] 하류 PDX 세포 특징화는 유동 세포계측법을 통해 난소 모델에서 CLDN3 발현 없음을 입증하였다. 항-클라우딘-3 CAR-T 세포는 다른 클라우딘 패밀리를 구성원에 대한 세포독성 교차-반응성을 나타내지 않았고 (상기 참조) 표적-이탈 결합 효과가 스크리닝에서 나타나지 않았음 (하기 참조)이 입증되었으므로, 난소 세포는 유동 세포계측법의 검출 수준 미만의 낮은 CLDN3 수준을 발현할 수 있다. 이는 매우 낮은 CLDN3 발현을 갖는 세포주의 존재 하에 증가된 시토카인 수준을 나타낸 항-클라우딘-3 CAR-T 세포를 사용한 이전의 공동-배양 실험과 일치한다. 예상된 바와 같이 어떠한 실험에서도 RKO-KO 세포 (음성 대조군)에서 CLDN3이 검출되지 않았다. 공동-배양 후, 항-CD19 대조군 그룹과 비교하여 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 그룹에서 표적 발현 종양 세포의 PDL-1 수준이 상승되었다. 또한, 항-클라우딘-3 CAR-T 세포는 항-CD19 CAR-T 세포와 비교하여 증가된 CD69 수준을 나타내었으며, 이는 공동-배양에 대한 반응을 추가로 확증하였다.
- [0642] 실시예 8 - 항-클라우딘-3 CAR 벡터에 CD20의 포함은 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 표적화된 세포독성 활성화에 대한 변화 없이 제어된 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 결실의 메커니즘을 제공한다
- [0643] 클라우딘-3의 제시는 비-종양 관련된 비정상적인 클라우딘-3 발현이 CAR-T 세포를 재활성화시키고 세포독성 T 세포가 정상 세포 상의 암 항원을 공격하도록 제지시킬 수 있는 연관 위험이 있다. 클라우딘-3 표적화 CAR-T 세포의 안전성 프로파일을 개선하기 위해, T 세포 결실 기술 형태의 사전 프로그래밍된 제어 안전성 측정이 치료용 벡터 내에 도입되어 T 세포 생성물이 T 세포 결실에 대해 감수성이 되도록 만들 수 있다.
- [0644] 세포 표면 B 세포 항원인 CD20은 여러 치료용 항체, 즉 CD20 주요 세포의 루프의 디설피드-제약 부분에 결합하고 보체 의존적 세포독성 (CDC) 및 항체 의존적 세포성 세포독성 (ADCC; Golay et al., 2013 MAb 5:826-837)을 통해 아포토시스를 유도하는 유형 I 항체인 FDA 승인된 리툭시맵에 대한 표적이다.
- [0645] 연구의 목적은 i) 효과적인 CAR-T 세포 결실 기술로서 CD20을 평가하고, ii) 906\_009 치료용 벡터에 CD20의 포함이 클라우딘 3 발현 표적 세포에 대한 906\_009 CAR-T 세포의 세포독성 반응을 변경하는지 여부를 평가하고, iii) CD20을 발현하는 CAR-T 세포에서 칼슘 플럭스의 임의의 변화를 관찰하고, iv) CD20\_906\_009\_SO (항-클라

우던-3 CAR, 스플라이스 부위 최적화된 (S0) 벡터)의 면역원성을 예측하는 것이었다. 결과는 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 요법 전략에 CD20의 포함이 CAR-T 세포 결실 기술로서 사용될 수 있음을 입증한다.

- [0646] 재료 및 방법
- [0647] CD20의 활성을 평가하기 위해, CD20 절제 요소 (CD20\_906\_009)를 포함하거나 CD20 절제 요소 (906\_009)가 결합된 클라우딘-3 CAR 벡터로 형질도입된 CAR-T 세포를 비교하였다. 비형질도입된 및 CD20\_ZSGreen (CD20 및 ZSGreen 형광 단백질을 발현하는 벡터) 또는 CD20\_CD19 (CD20 및 CD19를 발현하는 벡터) 형질도입된 T 세포를 대조군으로서 포함시켰다. CD20을 CDC 및 ADCC 검정에 의해 표적화된 T 세포 결실에 대해 평가하였다. 906\_009의 상류에 CD20의 포함에 의한 CAR-T 세포 세포독성 활성의 임의의 변화를 엑스셀리젠스 세포독성 검정에 의해 평가하였다.
- [0648] 렌티바이러스 전이 벡터의 설계 및 생성
- [0649] 906\_009 CAR의 상류에 있는 CD20 세포 절제 유전자를 코딩하는 렌티바이러스 (pG3) 전이 구축물은 CD20\_906\_009를 생성하도록 설계되었다. 이와 함께, 상류 CD20 및 짧은 스페이스 CD8 $\alpha$  힌지를 갖는 항-CD19 CAR 분자 (906\_009 CAR에 존재하는 2개의 아키텍처를 미러링)는 또한 CD20\_CD19\_GSK로 설계되었다. 서열을 코돈 최적화하고, 서열로부터 임의의 잠재적인 스플라이스 부위를 제거하도록 추가로 변형하였다. 생성된 트랜스젠 플라스미드 CD20\_906\_009\_S0 및 906\_009\_S0은 각각 전임자 CD20\_906\_009 및 906\_009와 동일한 단백질 서열을 갖는다.
- [0650] CAR T-세포의 풍부화
- [0651] 형질도입 후 13일차에, CAR-T 세포는 세포를 항-LNGFR/CD271 Ab보다는 염소 항-마우스 F(Ab)2 - 비오틴에 재현탁한 것을 제외하고는 상기 실시예 2에 기재된 바와 같이 래피드스피어를 사용하여 CAR 발현에 의해 선택되었다.
- [0652] CDC 및 ADCC 검정
- [0653] CAR-T 세포 및 대조군 세포를 염색 용액에 재현탁하였다. 특히, CD20\_906\_009 CAR-T 세포를 셀 트레이스 바이올렛 (Cell Trace Violet; CTV)으로 염색하고, 906\_009 CAR T-세포를 셀 트레이스 파 레드 (Cell Trace Far Red; CTRF)로 염색하였다 (CTRF는 비형질도입된 세포 또는 항-클라우딘-3 CAR만을 발현하는 세포를 염색하는데 사용되었으며, CTV는 CD20를 발현하는 세포를 염색하는데 사용되었음). CTV 및 CTRF 염색된 세포는 1:1 비로 공여자에 의해 쌍형성되었다.
- [0654] CDC 검정을 위해, 그 후 쌍을 리톡시맙 (맵테라(MabThera)) 또는 항-RSV 이소타입 대조군 및 토끼 보체 (Rab) 또는 열 불활성화된 토끼 보체 (HI)로 처리하였다 (도 25). 13명의 공여자로부터의 총 세포 풀 내 CTV의 비율을 도 26에서 CD20 발현 세포에 대해 플롯팅하였다.
- [0655] ADCC 검정을 위해, 신선한 혈액을 헌혈 기관 (GSK-스티버니지(Stevenage))로부터 획득하였다. PBMC를 상기 본원에 기재된 바와 같이 단리하였다. 그 후, 세포에 대해 NK 세포 비오틴-항체 및 마이크로비드를 사용하여 NK 세포의 음성 선택을 진행하였다. 그 후, 세포에 대해 LS 컬럼에서 자성 분리를 진행하고, 비표지된 세포를 수집하고 염색되고 쌍형성된 T-세포에 첨가하였다. 공동-배양물을 37°C에서 20시간 동안 인큐베이션하였다.
- [0656] 엑스셀리젠스 세포독성 검정
- [0657] 엑스셀리젠스 사멸 검정을 위한 공동-배양을 상기 실시예 4에 기재된 바와 같이 설정하였으며, 표적 세포 K562 및 RKO-KO를 이펙터 대 표적 세포의 1:1 비로 이펙터 세포 (CAR-T 및 대조군 T 세포)와 공동-배양하였다. 존재하는 대조군은 표적 세포 단독, 이펙터 세포 단독 및 표적 플러스 100% 용균 (0.5% Triton X)이었다.
- [0658] 칼슘 플럭스 분석
- [0659] CAR-T 세포 및 비형질도입된 대조군을 세포 배양 플레이트에 웰당  $5 \times 10^4$  개 세포로 시딩하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 인큐베이션한 후, 하기를 함유하는 검정 완충액을 첨가하였다: 1) 탐시가르긴 (5XFAC = 18  $\mu$ M, 3.6  $\mu$ M FAC) 및 DMSO (5XFAC = 0.6% v/v, 0.12% v/v FAC); 및 2) 이오노마이신 (6XFAC = 4  $\mu$ M, 0.67  $\mu$ M FAC). 그 후, 처리된 세포를 FLIPR에 의해 분석하였다.
- [0660] CD20은 보체 의존적 세포독성 (CDC) 및 항체 의존적 세포성 세포독성 (ADCC) 둘 다로부터 리톡시맙에 의해 표적화된다

- [0661] 항-클라우딘-3 CAR-T 세포에 CD20의 포함이 리톡시맵에 의한 결실에 대해 요법 세포를 표시할 수 있는지 여부를 입증하기 위해, CDC 및 ADCC 검정을 수행하였다.
- [0662] 치료용 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 상의 CD20 발현의 수준을 잘 확립된 리톡시맵 표적인 B 세포와 비교하였다 (도 24). 공지된 인간 Fc 결합 부위를 갖는 비드 및 CD20에 대해 지시된 인간 mAb (각각 항-인간 퀴텀 심플리셀룰러 비드 및 항-CD20-PE-Vio770)를 사용하여, CD20의 중앙 형광 강도를 사용하여 잠재적인 CD20 결합 부위의 수를 계산하였다. 데이터는 CD20\_906\_009 CAR-T 세포 상의 CD20 결합 부위의 수가 5.75 내지 5.9 범위의 공여자 매치된 B 세포와 비교하여 3명의 공여자에 걸쳐 5.16 내지 5.24 범위임을 제시한다. CD20\_906\_009 CAR-T 세포 내의 CD20+ 집단은 35-41% 범위였다. 본원에 제시된 CDC 및 ADCC 데이터 전반에 걸쳐 사용된 CD20\_906\_009 CAR-T 세포의 CD20+ 발현 범위는 35-74%이며, 따라서 이 검정에서 세포는 더 낮은 형질도입 비율을 나타내며, 이는 CD20\_906\_009 CAR-T 세포의 CD20 발현이 B 세포에 필적한다는 결론에 이르게 한다.
- [0663] 리톡시맵 및 보체로 처리될 때 CD20을 발현하는 항-클라우딘-3 CAR-T 세포가 결실될 수 있음을 입증하기 위해 CDC 검정을 수행하였다. 이 데이터는 토끼 보체 (Rab) 플러스 리톡시맵으로 처리될 때 CTV 염색된 세포에서 결실이 발생하는 반면, 이소타입 및 HI 처리된 CTV 염색된 세포 (대조군)는 결실되지 않음을 입증한다 (도 25 및 26). 결실 효과는 또한 CTV 염색된 세포 내의 % CD20 발현에 의존적이며, CD20+ 집단이 증가함에 따라 더 많은 세포 결실이 관찰된다. 추가 분석은 Rab의 CTV 세포 (pCTV)의 비율을 HI 처리된 조건과 비교한다.
- [0664] 리톡시맵이 CD20+ 세포를 결실시키는 메커니즘은 완전히 이해되지 않았고 CDC 및/또는 ADCC에 의한 것일 수 있으며, 인간 보체 대신 토끼 보체의 사용은 인간에서 CDC를 정확하게 예측할 수 없기 때문에, CD20을 발현하는 항-클라우딘-3 CAR-T 세포가 리톡시맵 플러스 NK 세포로 처리될 때 결실될 수 있음을 입증하기 위해 ADCC 검정을 수행하였다. 원본 CD20\_906\_009 및 906\_009 벡터로 생성된 항-클라우딘-3 CAR-T 세포를 스플라이스 부위 최적화된 (SO) 벡터 CD20\_906\_009\_SO 및 906\_009\_SO와 비교하였다. 본원에 제시된 ADCC에 대한 데이터 세트는 3명의 공여자로부터 유래된 것이다.
- [0665] 도 27은 이소타입 또는 리톡시맵 조건에 대해 플롯팅된 배지 대조군과 비교하여 NK 처리의 pCTV 비를 제시한다. 공여자 62에 대한 검정을 반복하였고, 데이터는 각각 제1 및 제2 실험에 대해 1 및 2로 표시되었다. 결과는 원본 CD20\_906\_009 및 CD20\_906\_009\_SO CAR-T 세포 둘 다에 대해 세포 수가 저하하였음을 시사한다. 공여자 62에서, 결실 사건은 각각의 독립적 검정에 대한 원본 및 SO 변이체 간에 유사하지만, CD20 발현은 각각 54% 및 76%로 상이하다. 결과를 방해할 수 있는 신선하게 해동된 세포를 사용하여 제2 검정을 수행하였다. 공여자 79를 사용한 ADCC를 또한 신선하게 해동된 세포를 사용하여 수행하였으며, 이는 다시 CD20\_906\_009 또는 CD20\_906\_009\_SO CAR-T 세포에 대한 놀라운 결과를 나타내지 않는다. 공여자 87에서 CAR-T 세포 결실은 CD20\_906\_009 CAR-T 세포보다 CD20\_906\_009\_SO에 대해 더 크며, 이는 CD20 발현이 각각 83% 및 62%이기 때문일 수 있다. ADCC의 효과를 향상시키기 위해, 공여자 62 및 87로부터의 CD20\_906\_009 및 906\_009 비-동결보존된 CAR-T 세포를 906\_009 CAR 발현에 의해 풍부화하였다. pCTV 비의 차이가 관찰되는데, 이는 CTV 염색된 조건에서 CD20+ 집단이 증가하였기 때문일 가능성이 높다.
- [0666] CD20은 클라우딘-3 표적 세포의 906\_009 CAR T 세포 세포독성을 변경하지 않는다
- [0667] CD20이 있거나 없는 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 세포독성의 검증을 엑스셀리젠스 검정에 의해 실시간으로 측정하였으며, 여기서 임피던스 측정을 사용하여 시간 경과에 따른 세포 성장을 추적하였다. 클라우딘 3 발현 세포주인 HT-29-Luc는 13명의 공여자로부터의 906\_009 및 CD20\_906\_009 CAR-T 세포에 의해 표적화되었다. 비형질도입된, CD20-ZSGreen T 세포 및 CD20\_CD19\_GSK CAR-T 세포를 대조군에 포함시켰다. 세포독성을 30분마다 측정하였으며, 여기서 임피던스 결여는 중앙 세포 사멸과 상관관계가 있었다. 대조군 표적 세포의 과도한 전면생장으로 인해, 세포독성 분석은 최대 24시간까지만 유효하였다. 도 28은 20시간에 살아있는 세포의 %가 CD20\_906\_009 및 906\_009 CAR-T 세포 간에 유의하게 상이하지 않다는 것을 제시하며, 여기서 두 값 모두는 0%에 가까운 반면, 대조군 세포는 100% 살아있는데 더 가깝다. 도 29에서 KT50 값은 표적 세포의 50%를 사멸시키는 데 걸리는 시간이 CD20\_906\_009 및 906\_009 CAR-T 세포 간에 유의하게 상이하지 않다는 것을 입증한다.
- [0668] 도 30은 4명의 공여자로부터의 SO 및 원본 CAR-T 세포에 대한 20시간의 % 살아있는 세포를 제시한다. 모든 조건은 20시간에 살아있는 세포가 0%이거나 거의 0%에 가까웠지만, 20시간에 % 살아있는 세포는 CD20\_906\_009\_SO에 비해 CD20\_906\_009에서 유의하게 더 낮았고, 906\_009\_SO에 비해 906\_009에서 암시적으로 더 낮았다. 또한, KT50 값은 CD20\_906\_009\_SO에 비해 CD20\_906\_009에서 유의하게 더 낮았고, 906\_009\_SO에 비해 906\_009에서 암시적으로 더 낮았다 (도 31).

- [0669] CD20이 있거나 없는 CAR-T 세포의 칼슘 플럭스에는 변화가 없다
- [0670] CD20이 CAR-T 세포의 칼슘 플럭스에 영향을 미치는지 여부를 결정하기 위해, 4명의 공여자로부터의 비형질도입된 T 세포, CD20\_906\_009\_SO 및 906\_009 CAR-T 세포를 먼저 소포체 Ca<sup>2+</sup>-의존적 ATPase를 억제하여 증가된 세포질 칼슘 수준을 유발하는 탐시가르긴에 노출시킨 후, 칼슘 인플럭스를 자극하기 위해 이오노마이신을 첨가하였다. 대조군을 위해 DMSO를 포함시켰고, 처리된 세포를 FLIPR에 의해 분석하였다. 공여자 99 906\_009\_SO CAR-T 세포에 대한 DMSO 조건은 플레이트로부터 분리되어 따라서 외부 음성 값을 생성하였다. 도 32의 결과는 CD20이 있거나 없는 비형질도입된 또는 CAR-T 세포 간에 칼슘 플럭스의 차이가 없음을 제시한다.
- [0671] 본원에 제시된 데이터는 CAR-T 세포 결실 기술로서 항-클라우딘-3 CAR-T 세포 요법 전략에서 CD20의 사용을 뒷받침한다.
- [0672] CDC 데이터는 CD20을 발현하는 항-클라우딘-3 CAR-T 세포가 리톡시맵에 의해 결실에 대해 표시되는 것으로 입증하였다. 예비 ADCC 데이터는 또한 리톡시맵을 사용한 결실이 또한 NK 세포에서 수행된다는 것을 시사한다. CDC 및 ADCC 검정 둘 다에서 CAR-T 세포 결실의 성능은 CD20+ 집단에 의존하며, 이는 이들 시험관내 방법에서 CD20+ CAR-T 세포의 완전한 제거 잠재성을 시사할 수 있다. 트랜스진 벡터에서 906\_009 CAR의 상류에 CD20을 코딩하는 것은 항-클라우딘-3 CAR-T 세포의 세포독성에 영향을 미치지 않았다.
- [0673] CD20은 B 세포에서 칼슘 채널로서 작용하는 것으로 생각되지만, CD20은 비형질도입된 또는 906\_009 CAR-T 세포와 비교하여 CD20\_906\_009\_SO으로 생성된 항-클라우딘-3 CAR-T 세포의 칼슘 플럭스를 변경하지 않는 것으로 보인다.
- [0674] 실시예 9 - 원형질막 단백질 어레이를 사용하여 의도된 표적 이외의 단백질에 대한 항-클라우딘-3 CAR-T 세포의 결합 (표적-이탈 결합)의 평가
- [0675] 이 연구의 목적은 형질도입된 T 세포에 대한 임의의 표적-이탈 활성을 식별하는 것이었다. 의도된 표적 이외의 단백질에 대한 항-클라우딘-3 CAR-T 세포의 결합은 3500개 초과 상이한 원형질막 단백질을 커버하는 >5000개의 전장 클론으로 이루어진 패널이 있는 발현 벡터 세트를 사용하여 원형질막 단백질 어레이에 의해 평가하였으며, 많은 단백질은 다중 변이체에 의해 표시된다. BCMA CAR-T 세포를 양성 대조군으로서 연구에 포함시켰다.
- [0676] 재료 및 방법
- [0677] 사전, 1차 및 확증적 스크리닝을 지원하기 위한 CAR-T 세포의 생성
- [0678] 실시예 1에 기재된 바와 같이 인간 혈액으로부터 단리된 PBMC로부터 정제된 T 세포를 2.4의 MOI로 BCMA-CAR 렌티바이러스 벡터 (BCMA-030) 또는 5의 MOI로 클라우딘 3 CAR 렌티바이러스 벡터 (906-009)로 형질도입하였다. 세포를 5% CO<sub>2</sub>와 함께 37°C에서 인큐베이션하고, 배양 기간 전반에 걸쳐 TEXMACS 배지 및 100 IU/ml의 IL-2에서 유지하였다. 형질도입 후 12일에 세포를 수확하고, CryStor CS5 동결 배지에서 1x10<sup>8</sup> 개 세포/ml로 동결하였다. 비형질도입된 T 세포는 음성 대조군으로서 생성되었다. T 세포는 1명의 공여자, 90928로부터 생성되었다.
- [0679] 유동 세포계측법 (맥스퀀트 분석기 10)을 사용하여 BCMA-AF647에 대한 결합을 측정함으로써 BCMA CAR-T 세포에 대한 형질도입 효율을 결정하였다. PE 접합된 항-LNGFR Ab 및 유동 세포계측법 (맥스퀀트 분석기 10)을 사용하여 LNGFR 발현을 측정함으로써 항-클라우딘-3 CAR-T 세포에 대한 형질도입 효율을 결정하였다. 플로우조 v10.1을 사용하여 데이터를 분석하였다.
- [0680] 원형질막 단백질 어레이
- [0681] 사전-스크리닝 연구: 비형질도입된 및 CAR 형질도입된 T 세포 (공여자 90928)를 고정된 비형질감염된 HEK293 세포 및 BCMA, 클라우딘 3, 공지된 T 세포 상호작용자 및 대조군 단백질을 과발현하는 HEK293 세포의 슬라이드에 첨가하여, 1차 스크리닝 전 배경 염색 수준을 조사하였다.
- [0682] 1차 스크리닝: 1차 스크리닝을 위해, 전장 인간 원형질막 단백질을 코딩하는 4070 단백질을 역형질감염을 사용하여 인간 HEK293 세포에서 개별적으로 발현하였다. 세포를 13개의 마이크로어레이 슬라이드에 걸쳐 2중으로 어레이하고 고정하였다. 공여자 90928로부터의 비형질도입된 및 CAR 형질도입된 T 세포를 세포 트레이서 적색 염료로 표지하고, T 세포 대 HEK293 세포의 사전-최적화된 비로 원형질막 단백질 어레이에 적용하였다.
- [0683] 확증적 스크리닝: 1차 스크리닝에서 식별된 히트를 코딩하는 벡터를 2중으로 스팟팅하고, 인간 HEK293 세포를 역형질감염시키는데 사용하였다. 2중 슬라이드를 설정하였다. 공여자 90928로부터의 비형질도입된 및 형질도

입된 T 세포 (슬라이드당 3.2 x 10<sup>7</sup> 개 세포)를 원형질막 단백질 어레이에 적용하였다.

[0684] 결합을 형광 이미징에 의해 평가하고, 이미지퀀트(ImageQuant) 소프트웨어 (GE)를 사용하여 형질도입 효율에 대해 정량하였다. 단백질 '히트'는 배경 수준과 비교하여 상승된 신호를 나타내는 2중 스팟으로서 정의되었다. 이는 이미지퀀트 소프트웨어에 그리드로 표시된 이미지를 사용하여 육안 검사에 의해 달성되었다. 히트는 2중 스팟의 강도에 따라 '강함', '중간', '약함' 또는 '매우 약함'으로 분류되었다.

[0685] 결과

[0686] 1차 및 확장적 스크리닝을 지원하기 위한 CAR-T 세포의 생성

[0687] 형질도입 후 12일에 형질도입 효율을 결정하였다. BCMA CAR-T 세포의 형질도입 효율은 63.1%였고, 906-009 CAR-T 세포의 형질도입 효율은 50%였다.

[0688] 원형질막 단백질 어레이: 사전-스크리닝

[0689] 1차 스크리닝을 위해 공여자 90928을 선택하였다. HEK 형질도입된 세포에 대한 스팟팅 패턴은 도 33a에 제시되어 있다. 공지된 T 세포 상호작용자 (PVR, CD244, TNFSF4, ICOSLG, CD86)에 대한 비형질도입된 T 세포의 결합이 관찰되었다 (도 33b). BCMA 형질감염된 HEK293 세포에 대한 BCMA 형질도입된 T 세포의 결합 (도 33c) 및 클라우딘 3 형질감염된 HEK293 세포에 대한 906-009 CAR-T 세포의 결합 (도 33d)이 관찰되었다.

[0690] 원형질막 단백질 어레이: 1차 스크리닝

[0691] 이미지퀀트에서 형광을 분석함으로써 총 28개의 히트가 식별되었다. 검색의 강도는 매우 약함 내지 강함의 범위였다.

[0692] 원형질막 단백질 어레이: 확장적 스크리닝

[0693] 28개의 히트에 대한 스팟팅 패턴은 도 34a에 제시되어 있다. 공지된 T 세포 상호작용자에 대한 비형질도입된 T 세포의 결합이 관찰되었다. BCMA 발현 HEK 세포와의 하나의 특이적 상호작용은 BCMA CAR-T 세포에서 강한 강도로 식별되었다. 906-009 CAR-T 세포에서 클라우딘 3 발현 HEK 세포와 하나의 CAR-특이적 상호작용이 식별되었다 (도 34d 및 표 11). 매우 약한 강도 결합은 확장 스크리닝 내에서 SLC6A6 발현 HEK 세포에서 906-009 CAR-T 세포와 일관되게 관찰되지 않았지만, 1차 스크리닝 내에서 그렇지 않았다 (데이터는 제시되지 않음).

[0694] 표 11 - CAR의 요약 - 특이적 히트

샘플 ID	유전자 ID	단백질 명칭	접속	1차 스크리닝		확장 스크리닝		참조
				Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	
BCMA CAR-T 세포	TNFRSF17	TNF 수용체 슈퍼패밀리 구성원 17 / BCMA	BC058291	중간	중간	강함	강함	184aa, 이소형 1/정규, 천연 변이체 81 N-S, 단일-통과 유형 III 막 단백질
항-CLDN3-LNGFR CAR-T 세포	CLDN3	클라우딘 3	BC016056	약함	약함	약함	약함	220aa, 단일 형태/정규, 다중-통과 막 단백질

[0695]

[0696] 4070개 인간 단백질의 라이브러리를 과발현하는 인간 HEK293에 대한 결합에 대해 CAR-T 세포를 스크리닝한 후, 비형질도입된 T 세포는 많은 공지된 T 세포 상호작용자에 대한 결합을 나타내었다. 양성 대조군을 사용한 BCMA CAR-T 세포는 강한 강도로 BCMA와의 단일 특이적 상호작용을 나타내었다. 906-009 CAR-T 세포는 클라우딘 3 발현 HEK 세포에 대한 약한 강도 결합을 입증하였다.

[0697] 실시예 10 - 시토카인 피크 생체내 연구

[0698] CAR은 T 세포 특이성, 기능 및 지속성을 재프로그래밍하는 합성 항원 수용체이다. 이들은 일반적으로 T 세포 활성화 도메인 - CD3 복합체의 제타 쇄 및 공동-자극 도메인 - 전형적으로 CD28 또는 4-1BB에 융합된 ScFv 또는 sdAb로 구성된다. 특이적 리간드와의 결합은 CAR 아암 T 세포의 활성화를 촉진하고 표적 종양 세포의 사멸을 향상시킬 것이다 (June and Sadelain 2018). 최근 10년 동안 키메라 항원 수용체 (CAR)-T 요법은 혈액학적 종양에서 높은 성공을 나타내고 고형 종양의 치료 잠재성을 입증하는 면역요법에서 유망한 분야가 되었다

(Jackson, Rafiq, and Brentjens 2016; Fuca et al., 2020).

- [0699] CLDN3은 상피 세포 사이의 치밀 이음부 (TJ) 형성에 중요한 내재성 막 단백질의 큰 패밀리에 속한다 (Itallie and Anderson 2004). 정상 조직 아키텍처의 파괴는 암의 특징이며, CLDN3 변형된 발현은 결장직장, 유방, 췌장 및 난소 암종과 같은 충족되지 않은 수요가 높은 암을 포함하여 다양한 상피암의 발생과 연관되어 있다 (Singh, Sharma, and Dhawan 2010). CLDN3은 종양의 TJ 외부에 잘못 편재화되어 있지만 건강한 조직에서는 그렇지 않으며 (Corsini et al., 2018), 이는 CLDN3을 종양 세포의 선택적 사멸을 위한 CAR-T 세포 표적으로 바꾸는 동시에 치밀 이음부에 숨겨져 있는 정상 세포를 보호하는 메커니즘임이 보고되었다.
- [0700] "SO-CD20-906\_009"는 CD8 힌지, CD3  $\zeta$  신호전달 도메인 및 4-1BB 공동-자극 도메인과 함께 인간화 scFv로 구성된 CLDN3 항원을 특이적으로 표적화하는 인간화 CAR T이다. "902\_007-LNGFR"은 인간 및 마우스 CLDN3 둘 다에 대해 유사한 친화성을 갖는 scFv CAR-T 대조군이다. "CD20-CD19"는 CD20 절제 구성성분을 갖는 비-CLDN3 CAR-T 대조군이다.
- [0701] 염증으로 인한 조직 손상 (즉, 증가된 시토카인 방출)은 치밀 이음부의 손실로 인해 건강한 조직 상의 CLDN3의 노출을 유발하며, 이는 CLDN3 CAR T 세포에 접근가능하게 만들어 따라서 잠재적인 안전성 위험을 초래할 수 있다. 이 연구의 1차 목적은 CLDN3 CAR T /종양 세포 결합에 의해 유도된 시토카인 분비의 잠재적 증가가 치밀 이음부의 잠재적 파괴로 인해 건강한 조직에 독성을 초래할 수 있는지 여부를 평가하는 것이었다. 이 방향으로, 902\_007-LNGFR, SO-CD20-906\_009 또는 CD20-CD19가 투약된 CDX 마우스 모델로부터의 혈청 샘플에서 생체의 시토카인 방출 측정을 위해 여러 시점을 선택하였다. 시토카인 분비 피크가 식별될 수 있도록 하고 후속적으로 시토카인 분비 피크 시점에 정상 조직이 평가될 수 있도록 보장하기 위해 시점을 선택하였다. 시간 경과에 따른 하기 시토카인: IFN  $\gamma$ , IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ 의 검출을 위해 MSD 멀티플렉스 검정을 사용하였다. 정상 조직 및 종양의 조직병리학적 평가를 개별 종점에서 수행하였다.
- [0702] 재료 및 방법
- [0703] CLDN3 CAR T /종양 세포 결합에 의해 유도된 시토카인 분비의 증가가 치밀 이음부의 잠재적 파괴로 인해 건강한 조직에 독성을 초래할 수 있는지 여부를 평가하기 위해, HT-29 Luc 인간 결장직장암 모델을 사용하였다. HT29-Luc 종양-보유 NSG 마우스는 종양이 320 mm<sup>3</sup>의 평균 종양 부피에 도달하였을 때 CLDN3 CAR T 세포 (SO-CD20-906\_009, 902\_007-LNGFR) 또는 비-표적화 대조군 CD19 CAR T 세포 (CD20-CD19)를 투약받았다. 시토카인 분비 프로파일의 시간-경과를 수행하였다. 이는 종양 및 장기 (폐, 간, 비장, 심장, 결장, 신장, 난소, 뇌, 눈, 시신경)의 조직병리학적 평가를 동반하였다. 구체적으로, 하기 연구 관독값이 있었다: a) T 세포 투약 후 3, 4, 5, 7 및 14일차 동안 MSD에 의해 측정된 혈액 혈청 샘플 내 시토카인 방출 (IFN  $\gamma$ , IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) 및 b) T 세포 투약 후 3, 4, 7 및 14일차 동안 종양 및 장기 (폐, 간, 비장, 심장, 결장, 신장, 난소, 뇌) 및 T 세포 투약 후 14일차 동안 눈 및 시신경의 조직병리학적 평가. 시점 'T 세포 투약 후 5일'은 초기 시점 (3, 4일차), 7일차 (이전 생체내 효능 연구에서 역사적으로 선택됨) 및 후기 시점 (14일차) 사이의 중간으로서만 혈액/혈청 수집에 포함되었다.
- [0704] NOD SCID 감마 (NSG) 마우스의 소싱
- [0705] 96마리의 암컷 8-9주령 NSG 마우스를 찰스 리버 (영국)로부터 획득하였다.
- [0706] 종양 세포 접종 (연구 0일차)
- [0707] 연구가 시작되기 전에, HT29-Luc 세포로부터의 상청액 (3x 200  $\mu$ l)을 마우스/랫트 병원체 (찰스 리버)의 포괄적 PCR 패널에 대한 테스트 및 무균 테스트를 위해 제출하였다. 모든 샘플은 음성으로 테스트되었다. HT29-Luc 세포는 마우스에 접종하기 전 2주 동안 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 인큐베이터에서 맥코이(McCoy), 10% FBS 배양 배지에서 확대되었다. 접종 전에, HT29-Luc 세포를 수확하고, 마우스/랫트 병원체 테스트 (찰스 리버) 및 세포의 무병원체 상태의 확증을 위한 무균 테스트를 위해 상청액 (3x 200  $\mu$ l)을 수집하였다. 수확된 HT29-Luc 세포를 카운팅하고, 미리 냉각된 PBS: 매트릭셀 (1:1)에 얼음 위에 마우스당 100  $\mu$ l 중 0.5 x 10<sup>6</sup>개 세포의 최종 농도로 재현탁하였다. 총 95마리의 마우스에 대해, 세포 필요량은 하기와 같았다: 95 x 0.5x 10<sup>6</sup>개 세포 (세포 용량/마우스) x 2 (주사기 불용 부피의 경우) = 9.5 x 10<sup>7</sup>개 세포. 그러므로, 총 10 x 10<sup>7</sup>개 세포를 20 ml의 미리 냉각된 PBS: 매트릭셀 (1:1)에 재현탁하였다. 세포를 얼음 위에서 유지하고, 각 NSG 마우스의 우측 옆구리에 세포의 피하 (s/c) 접종을 위해 IVSD (8F, 동물 유닛)로 옮겼다.

- [0708] T 세포 투약 (연구 23일차)
- [0709] 형질도입 후 12일차 및 T 세포 동결 전에, CAR T 세포 (SO-CD20-906\_009, 902\_007-LNGFR 및 CD20-CD19)로부터의 상청액 (3x 200  $\mu$ l)을 마우스/랫트 병원체 (찰스 리버)의 포괄적 PCR 패널에 대한 테스트 및 무균 테스트를 위해 제출하였다. 모든 샘플은 음성으로 테스트되었다. 모든 세포를 형질도입 후 12일차에 동결하고, 동결된 상태 (-150°C)로 유지하였다. T 세포 투약에 필요한 바이알의 수를 미리 계산하였으며, 하기 기재된 바와 같이 동일한 날짜에 T 세포 투약 사용을 위해 세포를 해동하였다.
- [0710] T 세포 투약 당일, CAR T 세포 (SO-CD20-906\_009, 902\_007-LNGFR 및 CD20-CD19)를 수조 (37°C)에서 해동하고, 냉 TexMACS 배지를 함유하는 50 mL 튜브로 옮기고, 부드럽게 위 아래로 피펫팅하여 해동 프로세스를 계속하였다. 냉 TexMACS를 각 튜브에 첨가하여 50 mL의 최종 부피로 만들었다. 300xg에서 10분 동안 실온에서 원심분리 후, 세포 펠릿을 냉 TexMACS에 재현탁하였다. 세포를 300xg에서 10분 동안 실온에서 원심분리한 후, 따뜻한 TexMACS에 재현탁하고 카운팅하였다. 그 후, 세포를 300xg에서 10분 동안 실온에서 원심분리하고, 미리 냉각된 PBS에 마우스당 100  $\mu$ l 중  $1 \times 10^7$ 개 세포의 최종 농도로 재현탁하였다. 세포를 얼음 위에서 유지하고, HT29-Luc 종양-보유 NSG 마우스의 정맥내 (i.v.) 주사를 위해 동물 유닛 (8F)으로 IVSD로 옮겼다. 자세한 계산은 하기와 같았다:
- [0711] · SO-CD20-906\_009: 인계됨:  $5.5 \times 10^8$ 개 세포
- [0712] · 902\_007-LNGFR: 인계됨:  $6.47 \times 10^8$ 개 세포
- [0713] · CD20-CD19: 인계됨:  $6.4 \times 10^8$ 개 세포
- [0714] 연구 설계
- [0715] 도 39는 연구 설계를 예시한다. 간략하게, 암컷 NSG 마우스를 연구 (SD) 0일차에 HT-29Luc로 접종하였다. SD23에, 마우스는 CAR T 세포를 투약받았다 (종양이 ~320mm<sup>3</sup>에 도달하였을 때). 혈액 샘플을 SD5, SD26, SD27, SD28, SD30 및 SD37에 수집하였다. 조직 및 종양을 SD26, SD27, SD30 및 SD37에 수집하였다.
- [0716] 견고한 연구 설계 고려사항
- [0717] UK SRF와 일치하여, 연구 통계학자 및 견고한 연구 설계 가이드라인, 무작위화 및 맹검 전략은 하기와 같았다:
- [0718] 무작위화: 동물을 도착 시 무작위화하였다. 추가적으로, T 세포 투약 전에, 연구 통계학자: 잭 유스덴(Jack Euesden)과 상담한 후 종양 부피 확산에 기초한 공식 무작위화 계획에 따라 동물을 치료 그룹에 할당하였다. 종양이 평균 부피 ~320mm<sup>3</sup>에 도달하였을 때, 종양 부피 확산에 따라 동물을 무작위화하였다 (무작위화 결정을 위한 시간을 허용하기 위해 T 세포 투약 1일 전 종양 측정에 기초함). 구체적으로, 각 케이지에 대해 평균 log<sub>10</sub> 종양 부피를 계산하고, 케이지를 2개 블록으로 스플릿하였다 - '낮은' 종양 부피 (전체 종양값 이하) 또는 '높은' (전체 종양값 초과) 종양 부피. JMP v14를 사용하여 2개 치료 인자 (일 및 치료)를 사용한 무작위화된 완전 블록 설계를 수행하였다. 모든 12x 그룹 (상이한 치료 및 상이한 종점/혈액 샘플링/종양 수집)에 대해 무작위화를 수행하였다. 또한, 생체의 MSD 판독값을 무작위화에 적용하였다.
- [0719] 맹검: 연구 인력은 연구 전반에 걸쳐 맹검되었다. 구체적으로, 세포 용량 및 치료는 IVSD에 대해 맹검되었고, 과학자들은 투약을 위한 T 세포 준비를 지원하였다. 또한, MSD 및 조직병리학 판독값 둘 다는 맹검되었다.
- [0720] 종양 세포 접종 (연구 0일차)
- [0721] S/c 종양 이식을 클래스 II 멸균 캐비닛에서 수행하였다. 사용된 모든 장비를 사용 전에 멸균화하였다. 동물을 이소플루란-산소 믹스에 의해 챔버에서 간략하게 마취시키고 이끝 원뿔로 이동시켰다. 우측 옆구리를 면도한 후, 알콜 와이프로 닦아내었다. 세포를 PBS에 재현탁한 후, 얼음 위에서 매트릭셀과 잘 혼합하였다 (1:1 PBS/세포:매트릭셀). 총 부피 100 $\mu$ L의 매트릭셀 및 세포가 포함된 PBS 용액을 마우스당 s/c 주사하였다. 동물을 회복 구역으로 이동시켜 완전히 회복될 때까지 모니터링한 후, 다시 홈 케이지에 넣고 모니터링하였다.
- [0722] T 세포 투약 (연구 23일차)
- [0723] 종양이 320mm<sup>3</sup>의 평균 부피에 도달하였을 때, CAR T 세포를 마우스당  $1 \times 10^7$ 개 세포의 용량으로 꼬리 정맥 주사를 통해 투약하였다. 요법의 정맥내 (i.v.) 용량을 클래스 II 멸균 캐비닛에서 수행하였다.

- [0724] 종양 측정, 연구 계획 및 개별 종점
- [0725] 모든 마우스의 종양 크기를 캘리퍼 측정에 의해 측정하고, 일주일에 3회 기록하였다. 모든 마우스에 대한 체중을 연구 -21일차 (마우스 출산 후 7일)부터 시작하여 측정하였다. 연구 -16일차에 체중 측정 후, 모든 후속 측정을 2일 간격으로 기록하였다. 종양 부피를 하기 나타낸 바와 같이 엑셀로 계산하였다:
- [0726] 종양 부피 = 종양 길이 \* (종양 너비<sup>2</sup>) \* 0.5
- [0727] 이 연구에는 개별 종점 (T 세포 투약 후 3, 4, 7 및 14일차)이 있었다.
- [0728] 혈액 수집
- [0729] 저체중으로 인해 마우스 #43 ('3일차' 종점, 그룹: 902\_007-LNGFR)을 제외하고 모든 마우스로부터의 혈액 샘플을 연구 5일차 (T 세포 투약 23일 전)에 수집하였다. 상기 기재된 바와 같이 공식 무작위화 계획에 기초하여 케이지 ID에 따라 마우스에서 연구 26, 27, 28, 30 및 37일차 (각각 T-세포 투약 후 3, 4, 5, 7 및 14일차)에 후속 혈액 회수를 수행하였다. 주목할 점은, 모든 시점에 걸쳐 모든 CAR T 그룹으로부터 혈액 샘플을 수집하였다는 것이다. 샘플당 낭비를 위해 추가 5 µl의 혈액을 포함하여 마우스당 대략 100 µl 혈액을 수집하였다. 혈청 샘플의 경우, 전혈을 혈청 마이크로테이너(Microtainer) 튜브에 수집하고, 실온(RT)에서 최소 30분 동안 응혈되도록 허용하였다. 일단 응혈되면, 혈액을 14840 x g에서 3분 동안 원심분리하고, 혈청을 마이크로닉스(Micronics) 튜브로 옮겼다. 혈청을 MSD 검정에서 사용될 때까지 -80°C에서 동결하였다. 허가에 따라, 연속 28일 이내에 마우스당 채취할 수 있는 최대 혈액 부피는 마우스 체중의 10%이다.
- [0730] 혈청 시토카인 검정 MSD
- [0731] 10개의 플렉스 플레이트를 사용한 MSD 검정을 제조업체의 지침에 따라 수행하였다:
- [0732] 시약 및 샘플 제조: 동결된 마우스 혈청 샘플, 상업용 마우스 혈청 및 V-플렉스 희석제를 해동하고 RT에서 평형화하였다. 검정 교정기를 제조업체의 지침에 따라 재구성하였다. 실험 동안 사용하지 않을 때는 모든 시약 및 항체를 얼음 위에서 유지하였다.
- [0733] 교정기 및 샘플 희석: MSD 키트에 의해 공급된 교정기 1을 1mL 희석제 2에 재현탁하고, 3회 뒤집고, 실온에서 15분 동안 평형화한 후, 짧은 펄스를 사용하여 간략하게 볼텍싱하였다. 시토카인 표준 교정 곡선을 생성하기 위한 연속 희석의 경우: 300 µl의 재구성된 교정기 1 용액을 신선한 에펜도르프 튜브에 옮겨 가장 높은 교정기 1 농도를 만들었다. 그 후, 100 µl의 가장 높은 교정기를 300 µl의 희석제 2에 옮겨 다음 교정기 희석을 수행하고, 볼텍싱에 의해 잘 혼합하였다. 이러한 4배 연속 희석을 5회 추가로 수행하여 7개의 교정기를 생성하였다. 제8 바이알을 희석제 2만으로 충전하였다. 회수를 확증하기 위해 추가적인 교정 세트 (혈청 표준) 상업적으로 이용가능한 마우스 혈청을 포함시켰다: 교정기 희석물을 상기 기재된 바와 같이 20% 상업적으로 이용가능한 마우스 혈청을 사용하여 희석제 2에서 제조하였다 (4배 연속 희석). 최종 바이알 (제8 바이알)은 희석제 2에만 20% 마우스 혈청을 함유하였다. 샘플 희석의 경우: 25 µl의 혈청을 100 µl의 희석제 2 (1 대 5 희석)에 첨가함으로써 모든 마우스 혈청 샘플을 제조하고 적절하게 혼합하였다. 검출 항체 용액 제조의 경우: MSD는 각 검출 항체를 50x 스톡 용액으로서 별도로 제공하였다. 작업 용액은 1x였다. 그 후, 검출 항체 용액을 사용 직전에 검출하였다: 60 µl의 각 항체 (총 10개)를 조합하고 2.40 mL의 희석제 3에 첨가하였다. 판독 완충액 제조의 경우: MSD는 판독 완충액 T를 4x 스톡 용액으로서 제공하였다. 작업 용액은 2x였다. 1 플레이트의 경우, 10 mL의 판독 완충액 T (4x)를 10 mL의 탈이온수와 조합하였다.
- [0734] 검정 프로토콜: 플레이트를 150 µl/웰의 세척 완충액으로 3회 세척하였다. 플레이트 레이아웃에 따라 웰당 50 µl의 교정기 또는 제조된 혈청 샘플을 첨가하였다. 다음으로, 플레이트를 실온에서 750 rpm에서 2시간 동안 진탕하면서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 플레이트를 150 µl/웰의 세척 완충액으로 3회 세척한 후, 검출 항체 용액 (25 µl/웰)을 첨가하고, 플레이트를 실온에서 750 rpm에서 2시간 동안 진탕하면서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 플레이트를 150 µl/웰의 세척 완충액으로 3회 세척하였다. 다음으로, 150 µl의 2x 판독 완충액 T를 각 웰에 첨가한 후, 즉시 MSD 섹터 600 이미저에서 플레이트를 판독하였다.
- [0735] 종양 성장
- [0736] 종양 부피 데이터 (mm<sup>3</sup>)를 그래프패드 프리즘에 플롯팅하였다. 터키의 다중 비교 테스트를 사용한 일원 ANOVA를 사용하여 개별 시점에 대해 CAR T 그룹을 비교하였다. 본페로니 다중 비교를 사용한 일원 ANOVA를 사용하여 'T 세포 투약 후 14일차' 종점에 대해 시간 경과에 따른 CAR T 그룹을 비교하였다.

- [0737] 혈청 시토카인 검정
- [0738] 연구 통계학자가 R 버전 3.6.1 내의 lme4 패키지에 구현된 선형 혼합 모델을 사용하여 MSD 원시 데이터를 분석하였다. 각 시토카인을 별도로 모델링하였다. 전체 데이터세트는 eLNB: N74766-9에서 볼 수 있다. 동분산성을 보장하기 위해 시토카인 방출을 log10으로 변환하였다. CAR T 그룹 및 시간 (및 이들의 상호작용)에 대해 고정 효과를 사용하였다. 4 자유도 (AIC에 의해 결정됨)를 사용한 천연 스플라인을 사용하여 시간을 모델링하였다. 무작위 절편을 플레이트 및 마우스에 사용하였으며, 각 마우스에 대해 무작위 기울기를 사용하였다. 구축물/시점 사이의 한계 평균을 비교하기 위해 선형 대비를 사용하였으며, 적절한 자유도 수정과 함께 정량화 하한 미만의 값을 취급하기 위해 1,000회 반복의 다중 대치를 사용하였다 (Barnard and Rubin 1999).
- [0739] 결과
- [0740] 암컷 NSG 마우스를 SD0에 결장직장암 세포주 HT-29Luc (0.5x10<sup>6</sup>개 세포 /마우스)로 접종하였다. 종양이 ~320mm<sup>3</sup>에 도달하였을 때 (SD23), 마우스는 CAR T 세포 (SO-CD20-906\_009, 902\_007-LNGFR 또는 CD20-CD19); (1x10<sup>7</sup>개 세포/마우스)를 투약받았다. 저체중으로 인해 마우스 #43 ('3일차' 종점, 그룹: 902\_007-LNGFR)을 제외하고 SD5 (T 세포 투약 23일 전)에 모든 마우스로부터 혈청 샘플을 수득하였다. 다음으로, T 세포 투약 후 하기 일자: 3, 4, 5, 7 및 14일차 (각각 SD26, SD27, SD28, SD30 및 SD37)에 상응하는 케이지 (무작위화 계획에 기초함)로부터 혈청 샘플을 수집하였다. 시점: 3, 4, 7 및 14는 종점이었고; 후속 혈청 단리를 위한 혈액 회수를 안락사 전에 사용하였다. 종점 '14일차'로부터의 마우스를 또한 '5일차' 시점의 혈청 수집에 사용하였다. 모든 개별 종점에 대해, 종양 및 조직 (폐, 간, 비장, 심장, 결장, 신장, 난소, 뇌)을 수집하고, 조직병리학적 평가를 위해 제출하였다. '14일차' 종점의 경우, 구체적으로, 눈 및 시신경을 또한 수집하였다.
- [0741] SO-CD20-906\_009, 902\_007-LNGFR 또는 CD20-CD19를 투약받은 CDX 마우스 모델에서 시간 경과에 따른 시토카인 방출
- [0742] 모든 시점에 걸쳐 모든 마우스로부터의 혈청 샘플을 공식 무작위화 계획에 따라 MSD 10-플렉스 검정을 사용하여 3회 후속 라운드로 실행하였다. 라운드 간 변동성을 회피하고 견고한 연구 설계 원칙을 준수하기 위해, MSD 검정을 위한 무작위화된 플레이트 레이아웃은 모든 시점으로부터의 샘플을 포함하였다. IFN  $\gamma$ , IL-2 및 TNF- $\alpha$  분비에 대한 일부 핵심 관찰 (도 35)은 하기 요약되어 있다:
- [0743] IFN  $\gamma$  :
- [0744] · 902\_007-LNGFR은 3일차, 4일차, 5일차 및 7일차 시점에서 CD20-CD19 대조군 그룹과 비교하여 기준선으로부터 유의하게 상이하였다 (전체에 대해 p<0.0001) (도 35a-도 35b).
- [0745] · SO-CD20-906\_009는 3일차, 4일차, 5일차 및 7일차 시점에서 CD20-CD19 대조군 그룹과 비교하여 기준선으로부터 유의하게 상이하였다 (전체에 대해 p<0.0001) (도 35a-도 35b).
- [0746] · 3일차, 4일차, 5일차 및 7일차 시점과 비교하여 902\_007-LNGFR 그룹의 경우 14일차에 통계적으로 유의한 감소가 있었다 (전체에 대해 p<0.0001, 3일차 vs. 14일차 제외: p= 0.0079) (도 35a-도 35b).
- [0747] · 3일차, 4일차, 5일차 및 7일차 시점과 비교하여 SO-CD20-906\_009 그룹의 경우 14일차에 통계적으로 유의한 감소가 있었다 (전체에 대해 p<0.0001), (도 35a-도 35b).
- [0748] · 902\_007-LNGFR 및 SO-CD20-906\_009 그룹은 상이한 동역학을 갖는 것으로 보이며; 3일차부터 SO-CD20-906\_009 그룹에서 더 일찍 증가하는 추세가 있다 (도 35a).
- [0749] · 분비 '피크'는 7일차에 902\_007-LNGFR 및 SO-CD20-906\_009 그룹 둘 다에서 관찰될 수 있다 (도 35b).
- [0750] IL-2:
- [0751] · 902\_007-LNGFR은 4일차 (p= 0.0331) 및 5일차 시점 (p= 0.0098)에서 CD20-CD19 대조군 그룹과 비교하여 기준선으로부터 유의하게 상이하였다 (도 35c-도 35d).
- [0752] · SO-CD20-906\_009는 4일차 (p= 0.0022) 및 5일차 (p= 0.0031) 시점에서 CD20-CD19 대조군 그룹과 비교하여 기준선으로부터 유의하게 상이하였다 (도 35c-도 35d).
- [0753] · 4일차 (p= 0.582) 및 5일차 (p= 0.8862) 시점과 비교하여 902\_007-LNGFR의 경우 14일차에 통계적으로 유의한 감소가 없었다 (도 35c-도 35d).

- [0754] · 4일차 (p= 0.0963) 및 5일차 (p= 0.0518) 시점과 비교하여 SO-CD20-906\_009의 경우 14일차에 통계적으로 유의한 감소가 없었다 (도 35c-도 35d).
- [0755] TNF- $\alpha$
- [0756] · 902\_007-LNGFR은 4일차 (p= 0.0377), 5일차 (p= 0.0094) 및 7일차 (p= 0.0291) 시점에서 CD20-CD19 대조군 그룹과 비교하여 기준선으로부터 유의하게 상이하였다 (도 35e-도 35f).
- [0757] · SO-CD20-906\_009는 3일차 (p= 0.003), 4일차 ( p<0.0001), 5일차 ( p<0.0001) 및 7일차 (p= 0.0126) 시점에서 CD20-CD19 대조군 그룹과 비교하여 기준선으로부터 유의하게 상이하였다 (도 35e-도 35f).
- [0758] · 7일차 (p= 0.0317)와 비교하여 902\_007-LNGFR 그룹의 경우 14일차에 통계적으로 유의한 감소가 있었다 (도 35e-도 35f).
- [0759] · 3일차 (p= 0.0011), 4일차 (p<0.0001), 5일차 (p<0.0001) 및 7일차 (p=0.0002)와 비교하여 SO-CD20-906\_009 그룹의 경우 14일차에 통계적으로 유의한 감소가 있었다 (도 35e-도 35f).
- [0760] 전반적으로, T-세포 투약 후 모든 시토카인 (도 36)에 대해 CD20-CD19 대조군 그룹과 비교하여 902\_007-LNGFR 및 SO-CD20-906\_009 그룹 둘 다에서 증가된 시토카인 분비가 있었다. 모든 시토카인에 대해 SO-CD20-906\_009의 경우 14일차에 시토카인 분비의 감소가 있다는 점을 언급할 가치가 있다 (도 36).
- [0761] CDX 마우스 모델에서 종양 성장에 대한 902\_007-LNGFR 및 SO-CD20-906\_009의 영향
- [0762] 이 연구에서 사용하기 전에, CLDN3 CAR T 세포 (902\_007-LNGFR 또는 SO-CD20-906\_009) 둘 다를 시험관내에서 QC-테스트하였다. 간략하게, 902\_007-LNGFR 또는 SO-CD20-906\_009의 기능적 활성을 MSD에 의해 측정된 시토카인 (IFN $\gamma$ , IL-2 및 TNF- $\alpha$ ) 방출에 의해 평가하였다. 구체적으로, 902\_007-LNGFR, SO-CD20-906\_009, CD20-CD19 또는 비형질도입된 ("UT") 세포를 HT-29Luc 세포를 포함한 결장직장암 세포주 패널과 ~22시간 동안 공동-배양하였다. 이 패널은 CLDN3 표적을 발현하는 암 세포주 (HT-29Luc, RKO KO 인간 CLDN3) 및 CLDN3 발현이 낮거나 없는 RKO KO 세포주를 포함하도록 선택되었다. 전반적으로, CLDN3 CAR T 세포는 생체내 이전에 QC를 성공적으로 통과하였으며, 예상된 바와 같이 CLDN3 CAR T 세포가 CLDN3-발현 결장직장 종양 세포에 대한 반응으로 IFN $\gamma$ , IL-2 및 TNF- $\alpha$ 를 분비한 것으로 나타났다.
- [0763] 기능적 평가는 마우스 CLDN3에 대한 902\_007-LNGFR 및 SO-CD20-906\_009의 교차-반응성을 입증하였다. 902\_007-LNGFR 및 SO-CD20-906\_009는 인간 CLDN3에 대해 유사한 수준의 세포독성을 나타내었다 (유사한 비율로 감소하는 세포 구역에 의해 제시됨). SO-CD20-906\_009는 또한 마우스 CLDN3 표적 세포 및 부분적으로 사멸된 마우스 CLDN3 세포주에 대한 반응으로 시토카인을 분비하였다 (검정 종료 시 이미지에서 대조군과 비교하여 저하된 세포 구역 및 살아있는 및 죽은 세포의 혼합물에 의해 제시됨). 마우스 CLDN3에 대한 SO-CD20-906\_009의 사멸 반응은 마우스 CLDN3에 대한 902\_007-LNGFR의 반응보다 유의하게 적었다. 마우스 CLDN3 및 인간 CLDN3에 대한 902\_007-LNGFR의 반응을 비교했을 때, 마우스 CLDN3 및 902\_007-LNGFR 공동-배양에서 죽은 세포 구역의 백분율이 더 적었다.
- [0764] '14일차' 종점으로부터 마우스 그룹에 대한 종양 성장 동역학을 평가하였다 (도 37). SD35 (T 세포 투약 후 12일)에 CD20-CD19를 투약받은 마우스와 비교하여 SO-CD20-906\_009를 투약받은 마우스에서 종양 부피의 통계적으로 유의한 저하가 있었으며 (p<0.01); 종점 (SD37; T 세포 투약 후 14일)까지 효과가 연장되었다 (p < 0.0001). 주목할 점은, SO-CD20-906\_009 및 CD20-CD19에 대한 형질도입 효율 (T.E.)은 이러한 비교를 허용하기 위해 마우스에 투약하기 전에 63%에 대해 정규화되었다는 점이다. 전반적으로, SO-CD20-906\_009는 급격한 종양 부피 감소를 나타내는 강력한 항-종양 효과를 가졌다.
- [0765] 다른 한편, SD33에 시작하여 902\_007-LNGFR에 의한 종양 성장 제어의 추세가 있었지만, 다른 CAR T 그룹과 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 없었다 (도 37). 이는 902\_007-LNGFR이 생체내에서 종양 성장을 적극적으로 제어하고, 시토카인 분비 프로파일을 고려하여 902\_007-LNGFR이 이 종양 모델에서 효능있는 것으로 보인다는 것을 나타내었다. 902\_007-LNGFR이 다른 CAR 분자와 비교하여 더 낮은 T.E.를 가졌다는 점에 주목해야 한다. 구체적으로, 902\_007-LNGFR 세포는 CD20-CD19 및 SO-CD20-906\_009와 비교하여 거의 절반의 T.E.를 가졌다. 902\_007-LNGFR은 마우스에 투약하기 전에 정규화되지 않았다. 그러므로, 902\_007-LNGFR 및 다른 CAR T 그룹 간의 종양 성장 영향의 차이에 관해 어떠한 가정 또는 결론도 도출할 수 없다. 주목할 점은, 본 연구는 CLDN3 CAR T 세포-처리된 종양의 종양 성장 동역학을 비교 또는 평가하는 것을 목표로 하지 않았는데, 이는 표준 효능 연구가 아니었지만 대신 정의된 종점을 가졌기 때문이다.

- [0766] 최종적으로, '4일차' 또는 '7일차' 종점에 CD20-CD19 대 SO-CD20-906\_009 또는 902\_007-LNGFR를 투약받은 마우스에서 종양 부피의 통계적으로 유의한 차이가 없었다는 점을 언급할 가치가 있다 (도 38).
- [0767] 902\_007-LNGFR, SO-CD20-906\_009 또는 CD20-CD19를 투약받은 CDX 마우스 모델에서 독성 평가
- [0768] 902\_007-LNGFR 또는 SO-CD20-906\_009의 독성을 HT-29 Luc 인간 결장직장 암종의 NSG 마우스 모델에서 2주에 걸쳐 조사하였다. 종양을 포함한 선택된 조직을 현미경으로 검사하였다. 조직병리학적 평가는 견고한 종양 결착 후 CLDN3 CAR T 세포에 의해 혈액 순환으로 잠재적으로 방출되는 높은 순환 수준의 전염증성 시토카인이 CLDN3의 노출을 유발하는 정상 조직의 상피에서 치밀 이음부를 파괴함으로써 잠재적으로 후속 표적-적중-종양-이탈 독성을 유도할 수 있는지 여부를 결정하기 위한 조사의 일부였다.
- [0769] 902\_007-LNGFR 또는 SO-CD20-906\_009는 독성을 유발하지 않았으며 무린 CLDN3을 발현하는 정상적인 비-염증 (내재적 또는 유도된 염증 없음) 조직, 즉 폐, 간, 비장, 심장, 결장, 신장, 난소 및 뇌에서 축적되지 않았다. 그러나, CLDN3 CAR T 생성물 둘 다는 인간 CLDN3 양성 결장직장 암종 종양을 절제하였다.
- [0770] 종양 조직에서 CLDN3의 잘못된 편재화는 이 표적이 선택적 종양 세포 사멸을 위한 CAR T 세포 요법에 접근가능하게 만든다. 다른 한편, 염증으로 인한 조직 손상 (즉, 증가된 시토카인 방출)은 건강한 조직에 CLDN3의 노출 및/또는 치밀 이음부의 손실을 유발할 수 있으며, 이는 CLDN3 CAR-T 세포에 접근가능하게 만들어 잠재적인 위험을 초래할 수 있다. TJ 및 상피 투과성에 대한 전염증성 시토카인, 예컨대 IFN $\gamma$  및 TNF- $\alpha$ 의 효과가 설명되었다 (Coyne *et al.*, 2002; Prasad *et al.*, 2005; Capaldo and Nusrat 2009).
- [0771] CLDN3이 편재화되는 것으로 공지된 정상 조직에 대한 임의의 CAR T 세포-관련 효과의 부재는 NSG 마우스를 사용한 이전 생체내 연구에서 보고되었다. 이러한 발견은 고무적이지만 인간 임상적 안전성 측면에서 결정적인 것은 아니다. 따라서, 견고한 종양 결착 후 CLDN3 CAR T 세포에 의해 높은 수준의 전염증성 시토카인이 혈액 순환으로 방출되는지 여부를 평가하기 위한 생체내 조사가 필요하였다. 더욱이, 이러한 시토카인 분비가 CLDN3의 노출을 유발하는 정상 조직의 상피에서 치밀 이음부를 파괴함으로써 잠재적으로 후속 표적-적중-종양-이탈 독성을 유도할 수 있는지 여부를 평가하였다. HT-29Luc 종양 모델 및 CLDN3 CAR T 세포 (다양한 구축물)를 사용한 이전 생체내 효능 연구는 T 세포 투약 전 (기준선) 및 T 세포 투약 후 7일에 시토카인 분비를 평가하였다. 비-표적화 대조군 CAR T 세포를 투약받은 마우스와 비교하여 CLDN3 CAR T 세포를 투약받은 마우스에서 IFN $\gamma$  분비의 증가는 기준선과 비교하여 T 세포 투약 후 7일에 보고되었다. 그럼에도 불구하고, 기준선과 비교하여 T 세포 투약 후 7일에 비-표적화 대조군 CAR T 세포를 투약받은 마우스와 비교하여 CLDN3 CAR T 세포를 투약받은 마우스에서 TNF- $\alpha$  및 IL-2의 최소/무시가능한 분비가 관찰되었다. 이러한 발견은 생체내에서 CLDN3 CAR T 세포의 효능에 관한 핵심 증거를 제공하였지만, 시토카인 분비 동역학은 탐구되지 않았다. 동시에, 정상 조직 및 종양의 조직병리학적 평가를 앞서 언급된 연구에서만 종점에서 수행하였다. 마찬가지로, 잠재적인 표적-적중-종양-이탈 독성을 평가하기 위한 '창'은 이들 연구의 종점까지 완료된 빠른 조직 회수로 인해 놓쳤을 수 있다. 따라서, 시토카인 분비 피크에 가까운 시점에서 독성을 평가하기로 결정하였다. 이를 위해, 상승된 시토카인 분비의 존재 하에 CLDN3 CAR T/ 종양 세포 결착 효과의 결과로서 시토카인 분비 동역학 및 잠재적인 독성 둘 다를 빈번한 시점에서 조사하였다.
- [0772] 이 방향으로, HT-29Luc-종양 보유 NSG 마우스의 확립된 종양은 CLDN3 CAR T 세포 (SO-CD20-906\_009 또는 902\_007-LNGFR) 또는 비-표적화 대조군 CAR T 세포 (CD20-CD19)를 투약받았다. 주목할 점은, T 세포 용량은 이전 생체내 효능 연구와 비교하여 동일하게 유지되었다는 점이다. 높은 시토카인 분비 수준을 촉발하기 위해 생체내 모델을 '스트레치'하기 위해, T 세포 투약 시 종양 부피는 이전 생체내 효능 연구와 비교하여 더 높았다. 두 CLDN3 CAR T 그룹 모두는 IFN $\gamma$ 에 대한 분비 '피크'를 나타내었다. 더 이른 시점 (3 4 또는 5일차) 및 7일차 사이에는 통계적으로 유의한 차이가 없지만, 여기서는 분비 '피크'는 엄격하게 정의되지 않는다. 3일차, 4일차, 5일차 및 7일차 시점과 비교하여 14일차에 IFN $\gamma$  분비의 통계적으로 유의한 감소가 있었다는 점을 강조할 가치가 있다. 추가적으로, 7일차는 IFN $\gamma$  분비 수준이 14일차에 강하하기 전에 유의하게 더 높은 마지막 시점으로 볼 수 있다. 이를 고려하면, IFN $\gamma$  방출이 생체내에서 전신적으로 CLDN3 CAR T 세포 투약 후 7일차에 이의 최대 수준인 '피크'에 도달하였다고 제안할 수 있다. 재발성 또는 불응성 외투세포암종을 갖는 환자에서 항-CD19 CAR T 세포 요법인 KTE-X19의 경우 투약 후 7일차가 또한 분비 '피크'인 것으로 보고되었다 (Wang *et al.*, 2020).
- [0773] 주목할 점은, SO-CD20-906\_009에서 IFN $\gamma$  분비된 수준이 초기 시점 (3일차)부터 상승되었으며, 7일차까지 이러한 프로파일을 보유하였다는 점이다. 그러나, T 세포 투약 후 7일에 모든 CAR T 그룹 간에 종양 성장에 차별적인 영향은 없었다. 대조적으로, SO-CD20-906\_009는 투약 12일 후 생체내 종양 부피를 유의하게 저하시켰다.

이는 CLDN3 CAR-T /종양 세포 결착 후 시토카인 분비가 생체내에서 종양 성장 제어에 선행한다는 것을 시사한다.

- [0774] 중요하게도, SO-CD20-906\_009 및 902\_007-LNGFR은 이 연구에서 무린 CLDN3-발현 정상적인 비-염증 (내재적 또는 유도된 염증 없음) 조직, 즉 폐, 간, 비장, 심장, 결장, 신장, 난소 및 뇌에서 독성 또는 축적을 나타내지 않았다.
- [0775] 조직병리학 판독값은 캘리퍼에 의한 종양 성장 측정으로부터 결론을 보완하였으며 종양이 절제 시 즉시 과열되지 않기 때문에 캘리퍼 측정은 조직병리학과 비교하여 약간 더 낮은 민감성 및 더 늦은 발병을 가질 수 있다는 점을 언급할 가치가 있다. SO-CD20-906\_009는 종양 성장을 효율적으로 제어하였으며, 이는 SO-CD20-906\_009가 인간 CLDN3 양성 결장직장 암종 종양을 절제하였음을 제시하는 조직병리학 판독값과 일치하였다. 그러나, 조직병리학 판독값은 902\_007-LNGFR이 종양 성장을 제어하는 효력/능력을 갖는다는 결론을 내릴 수 있었지만, 캘리퍼 측정으로부터 이를 명시하기에는 연구가 너무 일찍 종결되었다 (이 연구의 1차 목적이 아님). 902\_007-LNGFR이 본 생체내 연구에서 CD20-CD19 및 SO-CD20-906\_009와 비교하여 거의 절반의 T.E.를 가졌다는 점을 강조해야 한다. 그러므로, 902\_007-LNGFR은 종양 성장에 영향을 미치지 위해 더 많은 시간이 필요하다.
- [0776] 결론적으로, 이 연구는 생체내에서 SO-CD20-906\_009 또는 902\_007-LNGFR /종양 세포 결착에 의해 유도된 증가된 시토카인 분비가 무린 CLDN3 발현 정상적인 비-염증 (내재적 또는 유도된 염증 없음) 조직에서 독성 또는 축적을 유발하지 않았음을 제시하였다.
- [0777] 실시예 11 - 절제 생체내 연구
- [0778] CAR은 T 세포 특이성, 기능 및 지속성을 재프로그래밍하는 합성 항원 수용체이다. "SO-CD20-906\_009"는 CD8 힌지, CD3 ζ 신호전달 도메인 및 4-1BB 공동-자극 도메인과 함께 인간화 scFv로 구성된 CLDN3 항원을 특이적으로 표적화하는 인간화 CAR-T 세포이다.
- [0779] CLDN3은 종양의 치밀 이음부 (TJ) 외부에 잘못 편재화되어 있지만 건강한 조직에서는 그렇지 않으며 (Corsini et al., 2018), 이는 CLDN3을 종양 세포의 선택적 사멸을 위한 CAR-T 세포 표적으로 바꾸는 동시에 치밀 이음부에 숨겨져 있는 정상 세포를 보호하는 메커니즘이 보고되었다. 그러나, CLDN3은 표적-적중 종양-이탈 독성의 위험을 보유할 수 있다. 이러한 잠재적인 위험을 제어하기 위해, 장기적으로 부적절하게 활성화된 CAR T 세포의 표적화된 고갈을 가능하게 하는 "절제 기술"을 조사하였다. 이는 CAR-T 세포의 CD20 공동-발현 및 항-CD20 항체의 적용에 의해 달성된다.
- [0780] 본 연구의 목적은 항-CD20 mAb인 리툭시맷의 투여에 의한 생체내 SO-CD20-906\_009 (CD20-공동-발현 CAR) T 세포의 절제에 대한 원리 증명을 제공하는 것이었다. mAb 투여 후 CAR T 세포 존재를 ddPCR, 유동 세포계측법 및 면역조직화학 (IHC)에 의해 혈액 및 조직 (비장, 골수, 폐 및 간)에서 조사하였다.
- [0781] 리툭시맷 (리툭산, 이 보고서 내에서는 RTX로 약칭됨)은 B 세포 림프종 치료용으로 FDA-승인된 마우스-인간 키메라 항-CD20 mAb이다. 인간에서 RTX의 작용 방식 (MoA)은 주로 대식세포 및 자연 살해 (NK) 세포에 의해 매개된다 (Marshall et al., 2017). 마우스에서, 골수양, 특히 대식세포에 의해 매개되는 것으로 생각되는 반면, 다른 보고서는 NK 세포의 필수적인 영향을 입증한다 (문헌 [Marshall et al., 2017] 및 해당 참고문헌 [Uchida 2004, Shiokawa et al., 2010]에 의한 검토). 이 연구에서, T, B, 및 NK 세포가 결핍된 NSG-SGM3 마우스 라인을 사용하였다. 그러나, 이 균주는 마우스 대식세포를 통해 식세포 이펙터 기능을 보유하고 인간 IL3, GM-CSF 및 SCF를 트랜스제닉적으로 발현하며, 이는 마우스 대식세포 존재를 증가시키는 것으로 나타났다 (Nicolini et al., 2004). 또한, NK 세포 및 단핵구를 포함하는 이들 마우스에 인간 PBMC (hPBMC)를 주사하였다. 이 시스템은 RTX의 항체-의존적 세포성 식균작용 (ADCP) 뿐만 아니라 항체 의존적 세포-매개 세포독성 (ADCC) 메커니즘의 사용을 용이하게 한다. 보체 시스템을 통한 직접적인 세포 사멸 및 보체-의존적 세포독성 (CDC)은 마우스 설정에서 RTX MoA에 대해 다소 무시할 수 있으며 후자는 설정에 따라 유리할 수도 있고 불리할 수도 있다고 주장되었다 (Marshall et al., 2017). 사용된 마우스 모델은 원리 증명에 적합한 것으로 밝혀졌지만 모든 마우스 모델과 마찬가지로 환자에게 번역가능성에 관한 제한사항이 있다. 이 연구 내에서 하기 파라미터를 평가하였다:
- [0782] 1) 최종 혈액 샘플에서 SO-CD20-906\_009 CAR-T 세포의 수를 평가하기 위한 유동 세포계측 분석.
- [0783] 2) 연구 과정 (이전, 24시간 및 72시간 및 말기)에 걸쳐 DNA로의 HIV 벡터 통합의 측정에 의해 마우스 혈액에서 및 종료 시점에 조직 (골수, 간, 폐, 비장)에서 SO-CD20-906\_009 CAR-T 세포의 존재를 평가하기 위한 ddPCR 분석.

- [0784] 4) 일반적인 생착 및 분포를 위한 CD3+ T 세포, RTX-표적 세포로서 CD20 발현, 및 종료 시점에 조직 (골수, 간, 폐, 비장)에서 SO-CD20-906\_009 백터 RNA 발현으로서 WPRE-04를 식별하기 위한 면역조직화학적 (IHC) 및 제자리 혼성화 (ISH) 분석.
- [0785] 5) 최종 혈청 RTX 농도를 평가하기 위한 생분석적 분석. 이는 성공적 RTX 적용을 확증하고 이 모델 내에서 SO-CD20-906\_009 CAR-T 세포 절제의 부재의 경우 잠재적인 설명으로 최종 수준을 평가하기 위한 것이다. 이는 면역결핍된 마우스 계통이 더 높은 mAb 제거율을 나타내는 것으로 보고되었기 때문에 특히 관련이 있다 (Oldham et al., 2020).
- [0786] 6) 종료 시점에 이러한 신규 NSG-SGM3 마우스 계통에서 정상적인 건강한 조직에 대한 CAR-T 세포의 잠재적인 독성을 추가로 이해하기 위한 조직 (심장, 결장, 신장, 뇌, 난소, 폐, 간, 비장)의 조직병리학적 분석.
- [0787] 구체적 주장은 없지만, 이 연구는 이러한 유형의 연구에 대해 허용되는 과학적 관행에 따라 수행되었다.
- [0788] 재료 및 방법
- [0789] 마우스 계통: NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl1Tg(CMVIL3,CSF2,KITLG)1Eav/Ml0ySzJ (약어: NSG-SGM3), 10-12주령 암컷. 배송 시, 마우스를 10일 동안 순화되도록 허용하였다.
- [0790] 무작위화: 마우스에게 연구 시작 전 가중치를 부여하고 체중을 기준으로 치료 그룹 (A-D) 및 최종 샘플링 날짜로 무작위화하였다.
- [0791] 샘플 크기는 케이지당 5마리의 마우스가 있는 2개의 케이지를 사용하여 그룹당 10마리의 마우스에 대한 통계학자의 권장사항에 기초하였다.
- [0792] 표 12: 투약 레지멘 및 샘플 크기에 따른 치료 그룹. X는 각각의 제목이 적용됨을 의미한다. N/A는 적용되지 않음 (세포 없음)을 의미한다. 비히클은 mAb가 없고 대신 비히클이 투여되었음을 나타낸다.

그룹	PBMC	T 세포	mAb/비히클	샘플 크기	명칭
A	X	N/A	RTX	10	SO-CD20-906_009 없음 ctrl
B	N/A	X	비히클	10	SO-CD20-906_009 및 mAb 없음 ctrl
C	X	X	RTX	10	SO-CD20-906_009 및 mAb
D	X	X	이소타입	10	SO-CD20-906_009 및 이소타입 mAb ctrl

- [0793]
- [0794] 연구 -1일차: 동일한 공여자로부터의 hPBMC 및 SO-CD20-906\_009 CAR-T 세포를 TexMACS 배지에서 해동하고, 카운팅하고, 1:1 비율로 혼합하고, 포스페이트 완충 식염수 (PBS)로 1회 세척하고, 투약을 위해 멸균 PBS에서 제조하였다. T 세포 용량은 CLDN3 CAR-T 세포를 사용한 이전 생체내 효능 연구에 기초하였으며, hPBMC 용량은 사내 연구에 기초하였다. SO-CD20-906\_009 구축물의 형질도입 효율 (TE)은 주사 전에 37.8%로 측정된 반면, 32.4% CD20+ 세포가 검출되었다 (N74546-5). SO-CD20-906\_009 T 세포 생성물의 백터 카피 수 (VCN)는 세포당 0.93 카피이다.  $1 \times 10^7$ 개 SO-CD20-906\_009 T 세포 또는  $1 \times 10^7$ 개 hPBMC 또는  $1 \times 10^7$ 개 T 세포 플러스  $1 \times 10^7$ 개 hPBMC를 상기 표 12의 레지멘에 따라 꼬리 정맥 (i.v.)을 통해 200 $\mu$ L PBS 중 마우스에 주사하였다. 세포 현탁액을 절차 전반에 걸쳐 부드럽게 교반하여 세포가 주사기에 침전되는 것을 방지하였다. TE, CD20 발현을 확증하고 세포 조성을 평가하기 위해 유동 세포계측 분석을 위해 나머지 세포를 사용하였다.
- [0795] 연구 0일차: 최종 항체 농도를 아침에 신선하게 제조하고, 상기 표 12의 레지멘에 따라 복강내 (i.p.) 경로를 통해 100 $\mu$ L 중 마우스당 250 $\mu$ g을 투여하였다. RTX 용량은 문헌 ([Bonifant et al., 2016] 및 [Valton et al., 2018]) 및 해당 분야 전문가의 권설팅에 기초하였다. 이소타입 대조군으로서, 항-호흡기 세포융합 바이러스 (RSV) mAb 시나지스를 사용하였다. 이는 RSV 질환에 걸릴 위험이 높은 어린이에서 호흡기 세포융합 바이러스 (RSV)로 인해 입원이 필요한 심각한 하기도 질환의 치료 또는 예방용으로 FDA-승인되었다. 시나지스 용량은 RTX 용량에 기초하며, 이전에는 보고된 임의의 독성 없이 마우스 모델에서 유사하거나 더 높은 용량이 사용되었다 (Mejias et al., 2004). 비히클 대조군으로서 5% 텍스트로스를 사용하였다.
- [0796] 샘플링: 샘플링 시점은 문헌 및 전문가 권장사항에 기초한다 (Tasian et al., 2017, Bonifant et al., 2016, Valton et al., 2018, 해당 분야 전문가와의 커뮤니케이션). 생애 단계 동안, mAb 투약 전 (mAb 전) D0에 및 그 후 mAb 또는 이소타입 또는 비히클 후 24 및 72시간에 PCR 분석을 위해 각 마우스로부터 65  $\mu$ L 혈액을 수집

하였다. 혈액 수집을 위해, 동물을 멸균 전이 컨테이너에 배치하고, 꼬리 채혈 전 대략 10분 동안 39℃의 주위 온도에서 가온 캐비닛에서 가온하였다. 타당성 및 높은 샘플 품질을 보장하기 위해 최종 샘플링은 최종 2일 (각각 mAb 후 7 및 8일)에 걸쳐 시차를 두었다. 각 최종 샘플링 당일에, 그룹당 5마리의 마우스를 인도적으로 사멸시키고 샘플을 수집하였다. 하루에 그룹당 희생된 마우스는 상기 기재된 바와 같이 연구 개시에 앞서 무작위화되었다.

[0797] 각 마우스를 이소플루란으로 깊게 마취시키고, 유동 세포계측법, PCR 및 혈청 RTX 농도 검정을 위해 심장 천자를 통해 최종 혈액을 수집하였다. 마우스를 경추 탈구로 안락사시킨 후, 심장 제거를 통해 순환을 중단시켜 사망을 확증하였다. 일부 주목할만한 사례에서는, 최종 혈액 수집 동안 혈액이 덩어리졌다. 이는 SO-CD20-906\_009에서 1마리의 마우스에 대한 혈청 샘플 없음 및 mAb ctrl 그룹 없음을 초래하였다.

[0798] 그 후, PCR 및 조직학을 위해 골수, 비장, 간 및 폐를 수확하였다. 추가적으로, 마우스 계통에서 일반적인 조직병리학적 평가를 위해 심장, 결장, 신장, 뇌 및 난소를 수집하였다.

[0799] 맹검: 1차 및 2차 판독값의 평가 및 분석은 완전히 맹검되었다. 이 연구 내에서 1차 및 2차 판독값은 SO-CD20-906\_009 및 CD20 세포의 검출을 위한 ddPCR, 유동 세포계측법 및 IHC, ISH였다. 3차 판독값은 RTX 농도 및 일반적인 조직병리학적 평가였다.

[0800] 유동 세포계측 분석

[0801] 접종전 접종물 내 SO-CD20-906\_009 & 인간 PBMC 조성물의 특징화

[0802] 항체 염색을 위해 웰당  $1-2 \times 10^5$  개 세포를 96-웰 V 바닥 폴리프로필렌 플레이트에 첨가하였다. 먼저 플레이트를 5분 동안 원심분리 (300 x g에서)하고, 상청액을 폐기하고, 200  $\mu$ L FACS 완충액에 재현탁함으로써 샘플을 세척하였다. 원심분리를 반복하고, 상청액을 폐기하였다. 그 후, 샘플을 100  $\mu$ L의 Fc 차단제에 재현탁하고, 10분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 그 후, 100  $\mu$ L의 FACS 완충액을 첨가함으로써 샘플을 세척한 후, 5분 동안 원심분리하고 상청액을 폐기하였다. 그 후, 샘플을 100  $\mu$ L의 항-f(ab')<sub>2</sub>-비오틴으로 염색하고 30분 동안 4℃에서 암실에서 인큐베이션하였다. 그 후, 2회 세척하고 (먼저 100  $\mu$ L FACS 완충액을 첨가하고, 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 폐기함), 그 후 200  $\mu$ L FACS 완충액으로 반복하였다. 그 후, 샘플을 100  $\mu$ L의 항체 콕테일 (hPBMC 특이적 항체 및 스트렙타비딘-APC 2차 함유)로 염색하고, 30분 동안 4℃에서 암실에서 인큐베이션하였다. 상기 기재된 바와 같이 2회 더 세척을 수행한 후, 샘플을 DAPI를 함유하는 100  $\mu$ L의 FACS 완충액에 재현탁하였다. 실온에서 암실에서 10분 인큐베이션 후, BD LSRFORTESSA X-20 유동 세포계측기에서 샘플을 획득하였다.

[0803] 보상 대조군의 제조: 울트라 COMP EBEADS를 사용하여 보상 대조군을 제조하였다. 간략하게, 1 방울의 울트라 COMP EBEADS를 96-웰 v-바닥 플레이트의 웰에 첨가하고, 0.5  $\mu$ L의 각 항체-접합체를 스톱 농도로 첨가하였다. 항-f(ab')<sub>2</sub>-비오틴 + 스트렙타비딘-APC 보상 대조군의 경우, 0.5  $\mu$ L의 각 시약을 비드에 첨가하였다. DAPI 보상 대조군의 경우, 100  $\mu$ L의 세포를 플레이팅하고, 스톱 농도의 0.5  $\mu$ L DAPI를 첨가하였다. 실온에서 암실에서 15분 인큐베이션 후, BD LSRFORTESSA X-20에서 보상 대조군을 획득하고, 혈액 샘플의 획득 전에 보상 매트릭스를 계산하였다.

[0804] 마우스 최종 혈액 내 SO-CD20-906\_009 & 인간 PBMC의 특징화 & 카운팅 (유동 세포계측법)

[0805] RBC 용균: RBC 용균 용액을 제조업체의 사양에 따라 제조하였다. 마우스 전혈을 받으면, 마우스당 대략 400  $\mu$ L의 혈액을 EDTA를 함유하는 배큐테이너로부터 10 mL RBC 용균 용액을 함유하는 15mL 팔콘 튜브로 옮겼다. 샘플을 간략하게 볼텍싱한 후, 10분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 그 후, 샘플을 7분 동안 원심분리하고 (300 x g에서), 상청액을 조심스럽게 제거하였다. 그 후, 샘플을 추가 1-5 mL의 RBC 용균 용액에 재현탁하고, 추가 5분 동안 인큐베이션하여 임의의 남아있는 RBC를 용균시켰다. 그 후, 5mL의 FACS 완충액 (DPBS + 2% FBS (HI) + 0.05% 아지드화나트륨 +2mM EDTA)을 첨가한 후, 샘플을 5분 동안 원심분리하였다. 상청액을 제거한 후, 샘플을 남아있는 상청액 (튜브에 ~100-200  $\mu$ L 남음)에 재현탁한 후, 항체 염색을 위해 96-웰 V 바닥 폴리프로필렌 플레이트로 옮겼다.

[0806] 항체 염색: 항체 염색을 준비하기 위해, 먼저 플레이트를 5분 동안 원심분리 (300 x g에서)하고, 상청액을 폐기하고, 200  $\mu$ L FACS 완충액에 재현탁함으로써 샘플을 세척하였다. 원심분리를 반복하고 상청액을 폐기하였다. 그 후, 샘플을 100  $\mu$ L의 Fc 차단제에 재현탁하고, 10분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 그 후, 100  $\mu$ L의 FACS 완충액을 첨가함으로써 샘플을 세척한 후, 5분 동안 원심분리하고 상청액을 폐기하였다. 그 후, 샘플을

100  $\mu$ L의 항-f(ab')<sub>2</sub>-비오틴으로 염색하고 30분 동안 4°C에서 암실에서 인큐베이션하였다. 그 후, 2회 세척하고 (먼저 100  $\mu$ L FACS 완충액을 첨가하고, 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 폐기함), 그 후 200  $\mu$ L FACS 완충액으로 반복하였다. 그 후, 샘플을 100  $\mu$ L의 항체 칵테일 (hPBMC 특이적 항체 및 스트렙타비딘-APC 2차 함유)로 염색하고, 30분 동안 4°C에서 암실에서 인큐베이션하였다. 상기 기재된 바와 같이 2회 더 세척을 수행한 후, 샘플을 DAPI를 함유하는 100-200  $\mu$ L의 FACS 완충액에 재현탁하였다. 또한, 10  $\mu$ L의 카운트브라이트 비드를 각 샘플에 첨가하였다. 실온에서 암실에서 10분 인큐베이션 후, BD LSRFORTESSA X-20 유동 세포계측기에서 샘플을 획득하였다.

[0807] 보상 대조군의 제조: 울트라 COMP EBEADS를 사용하여 보상 대조군을 제조하였다. 간략하게, 1 방울의 울트라 COMP EBEADS를 96-웰 v-바닥 플레이트의 웰에 첨가하고, 0.5  $\mu$ L의 각 항체-접합체를 스톱 농도로 첨가하였다. 항-f(ab')<sub>2</sub>-비오틴 + 스트렙타비딘-APC 보상 대조군의 경우, 0.5  $\mu$ L의 각 시약을 비드에 첨가하였다. DAPI 보상 대조군의 경우, 100  $\mu$ L의 세포를 플레이팅하고, 스톱 농도의 0.5  $\mu$ L DAPI를 첨가하였다. 실온에서 암실에서 15분 인큐베이션 후, BD LSRFORTESSA X-20에서 보상 대조군을 획득하고, 혈액 샘플의 획득 전에 보상 매트릭스를 계산하였다.

[0808] ddPCR을 사용한 마우스 혈액 및 조직 내 SO-CD20-906\_009 CAR-T 세포 DNA의 측정

[0809] 마우스 혈액으로부터 DNA의 추출

[0810] 제조업체의 지침에 따라 QIAamp DNA Micro 키트를 사용하여 마우스 혈액으로부터 DNA를 추출하였다. 간략하게, 35  $\mu$ L의 완충액 ATL을 65  $\mu$ L 혈액 샘플에 첨가하여 총 100  $\mu$ L의 부피를 만들고, 여기에 10  $\mu$ L 프로테이나제 K 및 100  $\mu$ L 완충액 AL을 첨가하였다. 샘플을 볼텍싱에 의해 완전히 혼합하고, 56°C에서 10분 동안 진탕하면서 인큐베이션하였다. 샘플을 간략하게 원심분리하여 뚜껑으로부터 소적을 수집하고, 50  $\mu$ L의 에탄올을 첨가하였다. 샘플을 완전히 볼텍싱하고, 실온에서 3분 동안 인큐베이션하였다. 전체 용균물을 QIAamp MinElute 컬럼으로 옮기고, 뚜껑을 닫고, 컬럼을 6000g에서 1분 동안 원심분리하고, 통과액을 폐기하였다. 500  $\mu$ L의 완충액 AW2를 첨가하고, 샘플을 6,000 x g에서 1분 동안 원심분리하고, 통과액을 폐기하였다. 그 후, 컬럼을 3분 동안 20,000 x g에서 원심분리하여 막을 완전히 건조하였다. 그 후, QIAamp MinElute 컬럼을 깨끗한 1.5 ml 미세원심분리기 튜브에 배치하고, 20  $\mu$ L의 뉴클레아제-비함유 물을 막에 첨가하고, 실온에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 20,000 x g에서 1분 동안 원심분리함으로써 DNA를 용리하였다. 나노드롭(Nanodrop) 2000을 사용하여 DNA 농도를 측정하였다.

[0811] 마우스 조직으로부터 DNA의 추출

[0812] 마우스 장기 (간, 폐 및 비장)를 2 ml 에펜도르프 세이프-락 튜브에 수집하고, 여기에 TE 완충액 및 1개의 스테인레스 스틸 비드 (5mm 직경)를 첨가하였다. 골수 펠릿을 TE 완충액에 재현탁하고, 1개의 스테인레스 스틸 비드 (5mm 직경)가 있는 2 ml 에펜도르프 세이프-락 튜브로 옮겼다. 튜브를 티슈라이저(TISSUELYSER) 어댑터에 배치하고, 20초 동안 15 Hz에서 균질화하였다. 가시적 덩어리가 남지 않을 때까지 이 균질화 단계를 반복하였다. 골수 샘플의 경우, 2개의 샘플은 추가 20초 균질화를 필요로 하였다. 다른 장기의 경우, 균질화를 3회 반복하여, 총 균질화 시간이 80초가 되었다. 제조업체의 지침에 따라 프로메가 맥스웰 RSC 조직 DNA 키트를 사용하여 균질화된 샘플로부터 DNA를 추출하였다. 카트리지를 테크 트레이에 로딩하고, 균질화된 샘플을 카트리지의 웰 1에 첨가하였다. 플런저를 카트리지의 웰 8에 배치하고, 100  $\mu$ L의 용리 완충액을 함유하는 빈 용리 튜브를 랙의 용리 튜브 구역에 배치하고, 실행을 개시하였다. 나노드롭 2000을 사용하여 DNA 농도를 측정하였다.

[0813] ddPCR

[0814] 추출된 DNA를 M1uI를 사용하여 소화시켜 ddPCR에 적합한 단편을 생성하였으며, 이를 96 웰 플레이트에서 준비하였다. 혈액 샘플의 경우, 500 ng의 DNA를 20  $\mu$ L 반응에서 소화시키고, 조직 샘플의 경우, 1  $\mu$ g의 DNA를 40  $\mu$ L 반응에서 소화시켰다. 하기 표에 기재된 바와 같이 반응물을 제조하고, 37°C에서 15분 동안 인큐베이션한 후, 80°C에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 50ng의 M1uI 소화된 DNA 및 1X의 최종 농도로 프로브용 ddPCR 슈퍼믹스를 함유하는 22  $\mu$ L ddPCR 반응물을 제조하였다. 프라이머는 900 nM의 최종 농도로 사용하였으며, 프로브는 CDKN1A의 경우 125 nM 및 HIV의 경우 250nM의 최종 농도로 사용하였다. 22  $\mu$ L 반응물 중 20  $\mu$ L를 소적 생성에 사용하였다. 샘플을 2중으로 실행하였다. PX1 PCR 플레이트 밀봉기를 사용하여 5초 동안 180°C에서 플레이트를 밀봉하고, 반응 믹스를 간략하게 볼텍싱하고 원심분리하였다. 샘플을 나노리터 크기의 소적으로 분배하는 QX200 자동 소적 생성기를 사용하여 소적을 생성하였으며, 각 소적은 개별 반응 역할을 한다. 소적 생성 후, PX1 PCR 플레이트 밀봉기를 사용하여 5초 동안 180°C에서 플레이트를 밀봉하였다. 플레이트를 PCR 열순환기에

삽입하고, 10분 동안 95°C에서 인큐베이션한 후, 30초 동안 95°C 및 1분 동안 60°C의 40회 사이클을 수행하였다. 효소를 98°C에서 10분 동안 불활성화시키고, 플레이트를 소적 판독 전에 4°C로 냉각하였다. 소적 판독기에서 소적을 판독하고, HIV (FAM)를 채널 1에서 측정하고, CDKN1A (VIC)를 채널 2에서 측정하였다.

[0815] 혈청 리톡시맙 농도

[0816] 샘플 희석 (1/10 MRD, 최대 희수 희석제) 및 항-이디오타입 (ID) 포획 및 항-인간 항체 검출에 기초한 검증된 자이로랩(Gyrolab) 면역검정 방법을 사용하여 마우스 혈청 샘플을 리톡시맙에 대해 분석하였다. 정량화 하한 (LLQ)은 1 µL의 혈청 분취액을 사용하여 0.3 ug/mL였다. 정량화 상한 (HLQ)은 100 µg/mL였다. 3개의 상이한 분석물 농도로 제조되고 연구 샘플과 함께 저장된 리톡시맙을 함유하는 품질 제어 샘플 (QC)을 별도로 제조된 교정 표준에 대해 각 샘플 배치로 분석하였다. 분석이 허용되려면, 총 QC 결과의 1/3 이하 및 각 농도 수준으로부터의 결과의 1/2 이하가 명목 농도로부터 25% 이상 벗어나서는 안된다. 적용가능한 분석 실행은 미리 정의된 실행 허용 기준을 모두 충족하였다. 간단히 말해서, 비오틴화된 항-리톡시맙 REXXIP A 및 REXXIP F 내 알렉사 표지된 항-인간 IgG를 희석하였다. 마우스 혈청의 작업 용액을 제조하였다. 작업 용액을 384LDV 플레이트 상의 스톱\_용액에 첨가하였다. 대조군 매트릭스를 대조군 웰에 첨가하였다. 혈청 샘플을 스톱\_용액 384LDV 플레이트에 첨가하고, 5분 동안 1,500 x g에서 원심분리하였다. LABCYTE ECHO 525를 활용함으로써 교정기 및 품질 대조군을 PCR 플레이트에 첨가하였다. 포획 항체, 검출 항체 및 세척 완충액을 PCR 플레이트에 첨가하고, 플레이트를 5분 동안 3,000 x g에서 원심분리하였다. 최종적으로, 플레이트를 밀봉하고, 자이로랩 XPAND를 사용하여 실행하였다.

[0817] 결과

[0818] 이 연구 내에서 사용된 SO-CD20-906\_009 CAR-T 세포 생성물은 동결 전 초기 평가에서 37.8% TE를 갖는다. 이 세포 배치를 ADCC 및 CDC 검정에 적용하여, 세포가 생체내 연구의 개시 전에 시험관내에서 절제될 수 있는지를 확증하였다.

[0819] 마우스에 접종하는 것과 병행하여, 접종된 세포를 유동 세포계측법을 통해 세포 조성, TE 및 CD20 발현에 대해 평가하였다 (도 42a-42c). 이 분석은 hPBMC 내 세포의 대다수 (51%)가 T 세포이고, 그 다음이 단핵구 (21%) 및 B 세포 (21%)이고, NK 세포의 극히 일부 (4%)가 있음을 제시하였다. 예상된 바와 같이, T 세포 단독은 99% CD3+ T 세포 순도로 확증되었다. 둘 다를 받은 그룹에 대한 hPBMC 및 T 세포 믹스는 1:1 혼합물 비율 나타내며, 74% T 세포, 그 다음에 11% 단핵구 및 11% B 세포 및 단지 2% NK 세포이다. 접종일 (해동후)에, 35%의 TE가 검출된 반면 (T 세포 단독을 갖는 그룹 B의 경우 33+2% F(ab')<sub>2</sub>), T 세포의 38%는 CD20+였다. PBMC 및 T 세포 혼합물에서, B 세포도 존재하기 때문에 접종된 T 세포와 비교하여 CD20+ F(ab')<sub>2</sub>- 세포의 백분율이 약간 더 높았다. hPBMC 단독은 B 세포를 차지하는 세포인 13% CD20+ F(ab')<sub>2</sub>를 가졌다.

[0820] mAb 처리 후 7 또는 8일에 마우스 최종 혈액 내 SO-CD20-906\_009 카운트 및 hPBMC 조성 (유동 세포계측법)

[0821] f(ab')<sub>2</sub> 항체를 통해 SO-CD20-906\_009를 검출하였다. 평균 2,293개의 f(ab')<sub>2</sub>-양성 세포 (95%CI: 1,484-3,544)가 도태 당일에 SO-CD20-906\_009 및 mAb 없음 ctrl 마우스로부터의 ~400 µL의 혈액으로부터 회수되었다 (도 43a-43b, 표 12-13). 이는 평균 135개의 f(ab')<sub>2</sub>-양성 세포 (95%CI: 87-210)가 회수된 SO-CD20-906\_009 없음 ctrl 마우스에서 관찰된 것보다 평균 17배 더 높았으며, 이는 이 검정에서 관찰된 배경 f(ab')<sub>2</sub> 검출의 수준 (T 세포에 대한 항-f(ab')<sub>2</sub>' 결합)을 반영한다. mAb 없음 ctrl 마우스 및 SO-CD20-906\_009 없음 ctrl 마우스는 이 연구에서 혈액 f(ab')<sub>2</sub> 카운트에 대해 각각 양성 및 음성 대조군 그룹을 나타내었다. SO-CD20-906\_009 및 mAb 처리된 마우스에서, f(ab')<sub>2</sub> 카운트는 SO-CD20-906\_009 및 이소타입 mAb ctrl 마우스와 비교하여 mAb 처리 후 7 및 8일에 유의하게 더 낮았다. 평균적으로, 이소타입 mAb ctrl 마우스에서 2,527 (95%CI: 1,635 - 3,906)과 비교하여, mAb 처리된 마우스의 혈액에서 413개의 f(ab')<sub>2</sub>-양성 세포 (95%CI: 267-639)가 검출되었다. 또한, mAb 없음 ctrl 마우스로부터 회수된 f(ab')<sub>2</sub> 카운트와 이소타입 mAb ctrl 마우스로부터 회수된 f(ab')<sub>2</sub> 카운트에 차이가 없었으며, 둘 다는 동일한 용량의 T 세포를 받았다. f(ab')<sub>2</sub> 카운트는 이소타입 mAb ctrl 마우스와 비교하여 mAb 처리된 마우스에서 유의하게 감소되었지만, f(ab')<sub>2</sub> 카운트는 여전히 SO-CD20-906\_009 없음 ctrl 마우스보다 더 높게 유지되었다 (<0.001의 p-값). F(ab')<sub>2</sub> 카운트는 평균 18.6배 더 높은 이소타입 mAb ctrl 마우스 (2,392 카운트의 평균 차이)와는 대조적으로 SO-CD20-906\_009 없음 ctrl (278 카운트의 평균 차이)보다 mAb 처리된 마우스에서 평균 3배 더 높았다. 따라서 이는 절대 카운트에 기초하여, mAb 처리 후 7 및 8일 후에 마우스에서 f(ab')-양성 세포의 유의하지만 완전하지 않은 절제를 나타낸다.

[0822] 표 13. 마우스 최종 혈액으로부터 유래된 카운트 (유동 세포계측법):

SO-CD20-906_009 (F(ab') <sub>2</sub> ) 카운트					
그룹 명칭	한계 평균	표준 오차	df	하위. 95% CL	상위. 95% CL
SO-CD20-906_009 없음 ctrl	135.937	29.049	32	87.962	210.077
SO-CD20-906_009 및 mAb 없음 ctrl	2293.392	490.089	32	1484.009	3544.215
SO-CD20-906_009 및 이소타입 mAb ctrl	2527.756	540.172	32	1635.661	3906.403
SO-CD20-906_009 및 mAb	413.906	88.45	32	267.831	639.652
CD3+ 카운트					
그룹 명칭	한계 평균	표준 오차	df	하위. 95% CL	상위. 95% CL
SO-CD20-906_009 없음 ctrl	2919.09	520.604	32	2029.919	4197.747
SO-CD20-906_009 및 mAb 없음 ctrl	6730.26	1200.305	32	4680.186	9678.333
SO-CD20-906_009 및 이소타입 mAb ctrl	9740.574	1737.178	32	6773.542	14007.26
SO-CD20-906_009 및 mAb	7932.746	1414.762	32	5516.388	11407.55
CD3+ 세포의 SO-CD20-906_009 비율.					
그룹 명칭	한계 평균	표준 오차	df	접근적 하위 95% CL	접근적 상위 95% CL
SO-CD20-906_009 없음 ctrl	0.049	0.003	Inf	0.043	0.055
SO-CD20-906_009 및 mAb 없음 ctrl	0.341	0.013	Inf	0.316	0.367
SO-CD20-906_009 및 이소타입 mAb ctrl	0.26	0.011	Inf	0.238	0.282
SO-CD20-906_009 및 mAb	0.053	0.003	Inf	0.047	0.059

[0823]

[0824]

Std = 표준. df = 자유도. CL = 신뢰 구간.

[0825] 표 14. 마우스 최종 혈액으로부터 유래된 카운트의 통계적 분석 (유동 세포계측법)

F(ab') <sub>2</sub> 카운트							
대비	추정치	표준 오차	df	하위, 95% CL	상위, 95% CL	t.비	p.값
SO-CD20-906_009 및 mAb Vs. SO-CD20-906_009 및 이소타입 mAb ctrl	0.163745	0.131249	32	0.088475	0.303049	-5.98734	1.1E-06
SO-CD20-906_009 및 mAb Vs. SO-CD20-906_009 없음 ctrl	3.04484	0.131249	32	1.645201	5.635209	3.684328	0.000843
CD3+ 카운트							
대비	추정치	표준 오차	df	하위, 95% CL	상위, 95% CL	t.비	p.값
SO-CD20-906_009 및 mAb Vs. SO-CD20-906_009 및 이소타입 mAb ctrl	0.814402	0.109537	32	0.487215	1.361312	-0.81398	0.42167
SO-CD20-906_009 및 mAb Vs. SO-CD20-906_009 없음 ctrl	2.717541	0.109537	32	1.625764	4.542497	3.963755	0.000388
CD3+ 세포의 F(ab') <sub>2</sub> + 세포 비율.							
대비	오즈비	표준 오차	df	점근적 하위 95% CL	점근적 상위 95% CL	z.비	p.값
SO-CD20-906_009 및 mAb Vs. SO-CD20-906_009 및 이소타입 mAb ctrl	0.1582	0.013293	Inf	0.134179	0.186521	-21.9449	P<0.0001
SO-CD20-906_009 및 mAb Vs. SO-CD20-906_009 없음 ctrl	1.087773	0.097247	Inf	0.912938	1.296091	0.941081	0.346663

[0826]

[0827]

[0828]

Std = 표준. df = 자유도. CL = 신뢰 구간.

회수된 f(ab')<sub>2</sub> 카운트에서, 상당한 마우스 간 변동성이 관찰되었다. 이는 총 T 세포 카운트를 포함하여 마우스에서 회수된 전체 인간 세포의 수에 반영되었다 (도 43c). SO-CD20-906\_009 없음 ctrl 마우스에서, 평균적으로, T 세포 카운트는 접종 레지멘으로 인해 mAb 없음 ctrl 마우스 또는 이소타입 mAb ctrl 마우스보다 더 낮았다. 더욱이, 마우스에서 회수된 T 세포 카운트의 수 및 회수된 f(ab')<sub>2</sub> 카운트의 수 간에 양의 상관관계가 관찰되었다 (SO-CD20-906\_009 T 세포를 함유하지 않은 SO-CD20-906\_009 없음 ctrl 마우스에서도). 이 때문에, f(ab')<sub>2</sub> 카운트는 또한 이를 설명하기 위해 각 마우스 내에서 회수된 T 세포 카운트의 비율로 간주되었다 (도 43d). mAb 없음 ctrl 마우스에서, f(ab')<sub>2</sub>-양성인 T 세포의 비율은 도태 당일에 평균 0.34 (95%CI: 0.32-0.37)였다. 이는 주사 시 관찰된 것과 비교하여 변화하지 않았다 (도 43a). 대조적으로, SO-CD20-906\_009 없음 ctrl 마우스에서, f(ab')<sub>2</sub>-양성인 T 세포의 비율은 평균 0.049 (95%CI: 0.043-0.055)로 유의하게 더 낮았다. 이는 이 검정에서 관찰된 f(ab')<sub>2</sub> 검출의 배경 수준을 반영한다. 유사하게는, mAb 처리된 마우스에서, f(ab')<sub>2</sub>-양성인 T 세포의 비율은 또한 평균 0.055 (95%CI: 0.047-0.059)로 낮았으며; 이는 평균 0.26 (95%CI: 0.24-0.28)인 이소타입 mAb ctrl 마우스에서 f(ab')<sub>2</sub>-양성 세포의 비율보다 유의하게 더 낮았다 (>0.0001의 p-값). 그러나, 가장 중요하게도 mAb 처리된 마우스에서 f(ab')<sub>2</sub>-양성인 T 세포의 비율은 SO-CD20-906\_009 없음 ctrl 마우스에 필적하였다 (0.35의 p-값). 따라서 이는 SO-CD20-906\_009인 T 세포의 비율에 기초하여 mAb 처리 후 7 및 8일에 마우스 혈액에서 SO-CD20-906\_009 CAR-T 세포의 고도로 효율적인 절제를 나타낸다.

[0829]

T 세포 내의 f(ab')<sub>2</sub>-양성 세포의 비율의 저하가 mAb 없음 ctrl 마우스와 비교하여 이소타입 mAb ctrl 마우스에서 관찰되었지만 (각각 0.26 vs. 0.34), 절대 f(ab')<sub>2</sub> 카운트는 필적하였다. 또한, 도태 시 이소타입 mAb ctrl 마우스에서 관찰된 f(ab')<sub>2</sub>의 비율은 주사 시 관찰된 비율로 변화하지 않았다. T 세포 내의 f(ab')<sub>2</sub>의 비율의 관찰된 차이는 사용된 접종물의 조성으로 인한 것이다 (추가 hPBMC를 함유하지 않은 mAb 없음 ctrl 마우스와 비교하여 이소타입 mAb ctrl 마우스에서 더 많은 양의 비형질도입된 T 세포 (hPBMC에 의해 기여됨)를 함유함). 언급된 바와 같이, 사전-접종물 및 최종 혈액을 비교할 때 T 세포 내의 f(ab')<sub>2</sub>-양성 세포의 동등한

비율이 mAb 없음 ctrl 마우스 및 이소타입 mAb ctrl 마우스에서 유지되었다. 또한, 도태 시 혈액에서 CAR 및 CD20 공동-발현 SO-CD20-906\_009의 비율이 세포 접종물의 비율에 필적하였기 때문에 f(ab')<sub>2</sub> 상의 CD20의 발현은 또한 유지되었다 (도 44).

- [0830] f(ab')<sub>2</sub> 카운트 외에도, 마우스 혈액 내 hPBMC 조성을 또한 도태 시 평가하였다. 모든 hPBMC 및 SO-CD20-906\_009 세포를 대표하는 마우스에서 회수된 hCD45+ 세포 중 대다수는 도태 시 T 세포였다 (테이터는 제시되지 않음). 평균적으로, T 세포는 이소타입 mAb ctrl 마우스에서 모든 hCD45+ 세포의 98.44%를 차지하였고, SO-CD20-906\_009 없음 ctrl 마우스에서 94.69%를 차지하였다. 이는 주사 시점보다 유의하게 더 높았다 - 여기서 T 세포는 각각 이소타입 mAb ctrl 마우스 및 SO-CD20-906\_009 없음 ctrl 마우스에서 hCD45+ 세포의 74.03% 및 51.3%를 차지하였다 (도 42a-42c). 일부 B, NK 및 단핵구가 마우스 혈액에서 검출가능하였지만, 일반적으로 검출 민감성 수준보다 낮았다.
- [0831] 요약하면, SO-CD20-906\_009 CAR-T 세포는 유동 세포계측법 (f(ab')<sub>2</sub>)에 의해 검출된 바와 같이 mAb 처리 후 7 및 8일에 마우스 혈액에서 효율적으로 절제되었다.
- [0832] ddPCR을 사용한 마우스 샘플 내 SO-CD20-906\_009의 검출
- [0833] 시간 경과에 따른 마우스 혈액
- [0834] mAb 투여 전에, SO-CD20-906\_009를 받은 모든 그룹 사이에 혈액 내에 필적하는 HIV 카피 수가 있었다 (도 45a). 예상된 바와 같이, SO-CD20-906\_009 없음 그룹은 검출가능하지 않은 수준의 HIV 카피를 가졌고, 대부분의 값이 0이었기 때문에 HIV 카피의 분석으로부터 배제되었다. SO-CD20-906\_009를 받은 모든 그룹의 경우, 각 그룹 내에서 측정된 HIV 카피에 대해 상당한 변이가 있었다. 연구 종료 시점에, 마우스는 mAb 후 7일차 및 8일차에 샘플링 날짜에 걸쳐 스플릿되었다. 이들 최종 날짜 둘 다의 경우 HIV 카피에 유의한 차이가 없었다. 연구 전반에 걸쳐, SO-CD20-906\_009를 받은 모든 그룹에서 관찰된 총 HIV 카피의 꾸준한 저하가 있었으며, 이는 mAb 후 72시간 및 종료 시점에서 가장 두드러졌다. mAb 투여 후, 이소타입 mAb 그룹과 비교하여 mAb 처리된 그룹에서 HIV 카피의 유의한 감소가 mAb 투여 후 24시간에 관찰되었다 (p<0.0001, 도 45b). 이는 mAb 처리된 그룹에서 HIV 카피의 85.11% 저하에 상응하였다. HIV 카피의 감소는 또한 mAb 후 72시간 및 종료 시점에 관찰되었으며, 여기서 70.44% 및 61.56%의 백분율 저하가 관찰되었다.
- [0835] mAb 처리 후 7 또는 8일의 마우스 조직
- [0836] 혈액 샘플과 마찬가지로, SO-CD20-906\_009 없음 ctrl 그룹은 대부분의 값이 0이므로 HIV 카피의 분석으로부터 배제되었다. 연구 종료 시점에서, 2개의 도태 날짜 (mAb 후 7 및 8일차)에 걸쳐 마우스를 스플릿하였다. 도태 날짜는 조직에서 측정된 HIV 카피에 유의한 영향을 미쳤으며 (F 테스트, p=0.001), 따라서 이 용어는 통계적 분석 모델에 포함되었다. 테스트된 4개 조직 모두 (골수, 간, 폐 및 비장)에서, 이소타입 mAb 처리된 그룹과 비교하여 mAb 처리된 그룹에서 HIV 카피의 유의한 감소가 있었다 (p<0.0001, 도 46a-46b). 이소타입 mAb 그룹과 비교하여 mAb 그룹에서 골수에서 95.75%, 간에서 88.05%, 폐에서 95.75% 및 비장에서 98.66%의 HIV 카피의 저하가 있었다. 또한, 이소타입 mAb ctrl 그룹과 비교하여 mAb 없음 ctrl 그룹에서 측정된 HIV 카피에 유의한 차이가 있었으며 이는 골수, 간, 폐 및 비장에서 관찰되었다는 점에 주목하였다 (p<0.0001).
- [0837] 조직학
- [0838] 복강내 투여 후 7/8일에 RTX가 특히 비장 뿐만 아니라 간 및 폐에서도 SO-CD20-906\_009를 70 내지 98% (95% 신뢰 구간 30 내지 100%) 절제하였다는 강력한 증거가 수득되었다. SO-CD20-906\_009는 정상적인 비-염증 무린 조직에서 어떠한 독성도 유발하지 않았으며, 이는 약물 후보의 잠재적인 표적-적중-종양-이탈 독성 위험을 정의하는데 도움이 된다.
- [0839] 혈청 리톡시맙 농도
- [0840] 모든 리톡시맙-처리된 마우스에 대해 최종 혈청 리톡시맙 농도 (ug/mL)를 측정하였다 (표 17). SO-CD20-906\_009 없음 ctrl 그룹은 18.038 내지 39.862 ug/mL의 농도 범위 (평균 28.672 ug/mL)를 나타내었다. mAb 그룹은 18.657 내지 38.646 ug/mL의 범위 (평균 27.372 ug/mL)를 나타내었다.
- [0841] 면역손상된 마우스 계통에서 hPBMC의 생착에 관한 이전 보고와 일치하여 (Schultz et al., 2012), T 세포는 세포 주입 후 8 또는 9일 (mAb 후 D7/8일) 후에 혈액 내 대부분의 세포를 제시하며, B 세포 또는 골수양 세포의 오직 소량의 생착만 있다 (테이터는 제시되지 않음). 또한, T 세포는 주입 후 6 내지 7일 후 다른 연구 (Valton et al., 2018, King et al., 2008, Bonifant et al., 2016, Tasian et al., 2014)에서 이전에 제시된

바와 같이 혈액 및 조직에서 검출될 수 있다 (도 43a-43d, 44, 45a-45b, 및 46a-46b).

- [0842] 유동 세포계측법에 의해 결정된 마우스 혈액 내 절대  $f(ab')_2$  카운트는 mAb 처리 후 SO-CD20-906\_009 절제를 나타내었다. SO-CD20-906\_009 세포로 집중되지 않은 경우에도 혈액 내 더 높은 전체 T 세포를 갖는 마우스가 또한 더 높은  $f(ab')_2$  카운트를 가졌다는 것을 관찰한 것처럼, 절대  $f(ab')_2$  카운트는 총 T 세포 생착을 설명하지 못하였다. 이는 SO-CD20-906\_009 없음 ctrl 마우스 및 mAb 마우스 간에  $f(ab')_2$  카운트를 비교할 때 특히 중요하였으며, 이는 SO-CD20-906\_009 없음 ctrl 마우스가 mAb 마우스와 비교하여 더 적은 전체 T 세포로 집중되었기 때문이다. 유사하게는, 혈액에서 관찰된 T 세포 카운트의 마우스 간 변동성을 고려하는 것도 중요하였다. 이 때문에,  $f(ab')_2$  카운트는 총 T 세포 카운트에 비해 평가되었으며, 이를 통해 마우스 사이에 뿐만 아니라 더 중요하게는 치료 그룹 간에 마우스 혈액 내  $f(ab')_2$  카운트의 더 정확한 비교가 가능하게 되었다.
- [0843] SO-CD20-906\_009 없음 ctrl 마우스에서  $f(ab')_2$ 의 일부 배경 검출이 유동 세포계측법에 의해 관찰되었다. 이는 항-F(ab')<sub>2</sub> 염색이 관찰된 T 세포의 작은 비율에 기초하였다. 일부 배경  $f(ab')_2$  검출은 검정 개발 작업 및 1,000개 세포 하에  $f(ab')_2$  검출의 감소된 민감성을 입증한 각 실험 당일에 실행된 공지된 카운트 참조 대조군에 기초하여 예상되었다 (데이터는 제시되지 않음). 그러나, 모든 PBMC 집단의 검출 민감성이 또한 1,000 카운트 미만으로 감소되었기 때문에 이는  $f(ab')_2$ -양성 세포에만 제한되지 않았다 (데이터는 제시되지 않음). 그 결과, 유동 세포계측법에 의해 1,000 미만으로 떨어진 마우스 혈액 내 정확한  $f(ab')_2$  카운트를 결정할 수 없었다 (이는 모든 SO-CD20-906\_009 및 mAb 마우스, 뿐만 아니라 SO-CD20-906\_009 없음 ctrl 마우스를 포함함). 그럼에도 불구하고, mAb 마우스 (RTX로 처리됨)의 혈액에서,  $f(ab')_2$  카운트가 배경 (SO-CD20-906\_009 없음 ctrl 마우스의 혈액 내  $f(ab')_2$  카운트) 이상으로 검출되지 않았음을 보여줄 수 있었으며, 따라서 이는 mAb로 처리된 마우스의 혈액에서 SO-CD20-906\_009 T 세포의 고도로 효율적인 절제를 나타내었다.
- [0844] 또한, 이소타입 mAb ctrl 마우스, 뿐만 아니라 mAb 없음 ctrl 마우스에서, 최종 혈액에 존재하는 SO-CD20-906\_009 CAR-T 세포가 접종전 수준과 동등한 CAR 및 CD20 발현을 보유하였음을 관찰하였다. 이는 형질도입된 세포가 생체내 세포 표면에서 CD20 및 CAR 둘 다의 발현을 유지하였음을 나타낸다.
- [0845] 연구의 핵심 중점은 혈액 및 조직에서 SO-CD20-906\_009 및 mAb 그룹의 HIV 카피를 SO-CD20-906\_009 및 이소타입 mAb 그룹과 비교하는 것이었으며, 따라서 mAb 및 이소타입 처리된 그룹을 비교하기 위해 백분율 저하를 계산하였다. ddPCR을 사용함으로써, 이 연구는 이소타입 mAb ctrl 그룹과 비교하여 mAb 그룹의 혈액에서 최대 85.11% 및 조직에서 최대 98.66%의 HIV 카피의 효율적인 저하를 제시하였다. 혈액 내 HIV 카운트를 비교할 때, 시간 경과에 따라 모든 SO-CD20-906\_009 생착된 그룹에 걸쳐 총 HIV 카피의 꾸준한 저하가 있었다. 이는 mAb 후 72시간 및 연구 종료 시점에서 가장 두드러졌다. 따라서, 2개 그룹 (mAb 및 이소타입 mAb ctrl) 간의 백분율 차이는 시간 경과에 따라 감소한다 (mAb 후 24시간에 85.11%, 종료 시점에 61.56%). 따라서, 백분율 변화 데이터는 mAb 처리된 그룹에서 총 HIV 카피와 함께 해석되어야 하며, 이는 연구 종료 시점까지 HIV 카피의 지속적인 저하를 제시한다.
- [0846] 연구 종료 시점 (mAb 후 7/8일차)에, 골수, 간, 폐 및 비장을 수확하였고, 이소타입 mAb를 받은 모든 조직은 검출가능한 HIV 카피를 가졌다. 이는 조직에 SO-CD20-906\_009의 존재를 확증하고, 혈액으로부터 조직으로 SO-CD20-906\_009 재분포를 시사하며, 이는 부분적으로 이후 연구 시점에서 혈액에서 측정된 HIV 카피 감소에 기여할 수 있다. 연구된 모든 조직에서, 이소타입 mAb 그룹과 비교하여 mAb 그룹에서 HIV 카피의 강하게 유의한 감소가 있었다. 이는 mAb 처리된 그룹에서 SO-CD20-906\_009 T 세포의 성공적 절제를 추가로 확증한다.
- [0847] 이 데이터를 해석할 때 주목할 점은 혈액 또는 조직에서 측정된 HIV (또는 연구 내에서 대조군으로서 사용된 인간 참조 유전자 CDKN1A, 여기서 보고되지 않음)의 카피로부터 SO-CD20-906\_009 세포 수를 정확하게 정량화하는 것이 불가능하다는 것이다. 이론적으로, 세포 수는 PCR 반응에서 측정된 유전자의 카피 수로부터 추정될 수 있다. 그러나, 이는 추출 절차 동안 모든 DNA의 총 회수 및 PCR에서 전체 증폭을 가정할 것이다. 또한, 샘플에 걸쳐 세포 카운트를 비교하기 위해, 이는 모든 샘플에 걸쳐 DNA의 동등한 추출 효율을 가정할 것이다. 공지된 수의 CAR-T 세포를 혈액으로 테스트하고 추출하는 예비 실험은 스파이크된 세포와 비교하여 DNA 카피의 낮은 회수 및 샘플에 걸쳐 총 DNA 수율의 변동을 밝혀내었다. 이는 모든 PCR 반응에서 동등한 부피의 DNA를 로딩함으로써 샘플에 걸쳐 정규화되었다. 따라서, PCR은 총 세포 수를 추정하기 위한 정확한 정량화 방법으로 간주되어서는 안되며, 대신 HIV 카피 수는 임의의 결론을 위해 사용된다.
- [0848] 성공적 RTX 적용을 확증하고 SO-CD20-906\_009 CAR-T 세포 절제의 부재의 경우 최종 수준을 평가하기 위해, 최종 혈청 샘플에서 RTX 농도를 측정하였다. 본 발명자들의 결과는 RTX-처리된 그룹의 모든 마우스가 RTX를 투약받았으며 최종 샘플링에서 10ug/mL 이상의 표시된 수준이 유지되었음을 확증한다. 이는 면역결핍된 마우스 계통

이 더 높은 mAb 제거율을 나타내는 것으로 보고되었기 때문에 특히 관련이 있다 (Oldham et al., 2020).

[0849] 요약하면, 제시된 연구는 SO-CD20-906\_009 CAR-T 세포가 단일 RTX 용량으로 주어진 마우스 모델에서 효율적으로 절제될 수 있음을 제시한다. 혈액 내 절제 (24시간 이내)가 입증되었으며, 임상적 설정에서 혈액과 비교하여 덜 접근가능하고 더 낮은 RTX 효율을 갖는 조직에서 절제를 입증할 수 있었다 (EMA, 2005).

[0850] 표 15 - SO-CD20-906\_009 및 mAb로 처리된 마우스 및 SO-CD20-906\_009 및 이소타입 mAb ctrl로 처리된 마우스 간의 혈액 HIV 카피의 백분율 변화의 요약.

일	HIV 카피 변화 %	하위.CL	상위.CL	p.값
mAb 전	+8.04	-33.76	+76.23	0.754
mAb 후 24시간	-85.11	-91.01	-75.31	p<0.0001
mAb 후 72시간	-70.44	-81.68	-52.31	p<0.0001
최종	-61.56	-76.18	-37.98	0.000141

[0851]

[0852] CL=신뢰 구간.

[0853] 표 16 - SO-CD20-906\_009 및 mAb로 처리된 마우스 및 SO-CD20-906\_009 및 이소타입 mAb ctrl로 처리된 마우스의 조직 내 HIV 카피의 백분율 변화의 요약.

조직	HIV 카피 변화 %	하위.CL	상위.CL	p.값
간	-88.05	-92.12	-81.87	p<0.0001
폐	-95.75	-97.2	-93.56	p<0.0001
비장	-98.66	-99.12	-97.97	p<0.0001
골수	-95.75	-97.2	-93.55	p<0.0001

[0854]

[0855] CL=신뢰 구간.

[0856] 표 17 - 리톡시맙-처리된 마우스에 대한 최종 혈청 리톡시맙 농도 (ug/mL). SO-CD20-906\_009 없음 ctrl 그룹은 18.038 내지 39.862  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도 범위 (평균 28.672  $\mu\text{g/mL}$ )를 제시한다. SO-CD20-906\_009 및 mAb 그룹은 18.657 내지 38.646  $\mu\text{g/mL}$ 의 범위 (평균 27.372  $\mu\text{g/mL}$ )를 제시한다.

동물 수	그룹	최종일	리톡시맙 농도 (µg/mL)
9	A	8	39.862
10	A	8	30.463
21	A	8	36.700
30	A	8	24.440
40	A	8	27.967
6	A	9	26.090
7	A	9	18.038
17	A	9	22.074
19	A	9	34.109
31	A	9	26.975
14	C	8	27.426
16	C	8	31.459
20	C	8	38.646
26	C	8	20.075
39	C	8	28.513
1	C	9	18.657
4	C	9	26.348
27	C	9	30.609
33	C	9	29.513
36	C	9	22.471

[0857]

[0858]

실시예 12 - 폐암에서의 효과

[0859]

비소세포 폐암은 CAR-T 세포 요법에 의해 충족될 수 있는 미충족 환자 수요가 높다. 이 연구의 목적은 시험관 내에서 비소세포 폐암 (NSCLC) 세포주에 대한 CLDN3 CAR-T 세포의 효력을 조사하는 것이었다. "906-009\_LNGFR"은 "SO-CD20-906\_009" CLDN3 CAR-T 세포와 동일한 scFv, 힌지, 신호전달 모이어티 및 공동-자극 도메인을 함유하지만, CD20 도메인을 함유하지 않고 LNGFR 태그를 함유한다.

[0860]

먼저, 다양한 NSCLC 세포주를 CLDN3 발현에 대해 연구하고, 세포주 패널을 선택하였다. 후속적으로, NSCLC 세포주에 대한 906-009\_LNGFR CAR-T 세포 ("906-009\_LNGFR")의 반응을 조사하기 위해 기능적 실험을 수행하였다. 기능적 실험을 위해 사용된 세포주 패널은 다양한 CLDN3 발현 수준 (mRNA 및 단백질), 관심 질환 하위유형 (편평 또는 선암종) 및 전이성 및 원발성 병리 둘 다를 포괄하도록 선택되었다. 활성화 및 세포독성은 NSCLC 세포주에 대한 906-009\_LNGFR의 기능적 반응에 대한 지표로서 사용되었으며, 활성화 인자 (IFN $\gamma$  및 그랜자임 B) 및 아넥신 V 발현을 각각 정량화함으로써 시험관내에서 조사되었다.

[0861]

CLDN3을 발현하는 모든 NSCLC 세포주는 906-009\_LNGFR을 활성화시켜, UT ("비형질도입된") 및 CD19 MB CAR-T 세포 ("CD19\_LNGFR")와 비교하여 IFN $\gamma$  및 그랜자임 B의 증가된 분비를 유발하였다. CLDN3을 발현하는 NSCLC에 대한 반응으로 강력한 세포독성이 또한 관찰되었다. 가장 낮은 수준의 CLDN3 발현을 갖는 2개 세포주 (NCI-H1650 및 Co1o320DM)를 제외한 모든 세포주에서 완전 사멸이 관찰되었다. 이는 그랜자임 B 수준과 상관관계가 있었으며; 완전 사멸이 관찰된 모든 공동-배양물은 1998 pg/mL (3명의 공여자의 평균) 초과의 그랜자임 B 수준을 가졌다. 오직 부분적인 공여자 특이적 사멸이 관찰된 NCI-H1650 및 Co1o320DM 공동-배양에서, 훨씬 더 낮은 수준의 그랜자임 B가 정량화되었다.

[0862]

완전히 사멸된 세포주 중에서, 가장 낮은 CLDN3 mRNA (NCI-H1651) 및 가장 높은 CLDN3 발현 (HT-29) 세포주 (9.55 및 93.93 (FPKM), 0.004 및 0.13 상대적 CLDN3) 둘 다는 906-009\_LNGFR에 의해 유사한 수준의 IFN $\gamma$  분비를 유도할 수 있었으며 (각각 40,534 pg/mL 및 31,138 pg/mL), 이는 낮은 수준의 CLDN3이 906-009\_LNGFR을 활성화시킬 수 있음을 시사한다. 활성화된 T 세포는 또한 CD19 및 UT보다 높은 수준의 그랜자임 B를 분비하였으며, 이는 간접적으로 NSCLC 세포주에 대한 906-009\_LNGFR 세포독성 활성을 나타낸다.

[0863]

전반적으로, 이 연구의 데이터는 906-009\_LNGFR의 활성화 및 세포독성 반응이 높은 수준에서 낮은 수준의 CLDN3

을 발현하는 NSCLC 세포주에 의해 유도될 것임을 제시한다. 유동 세포계측법에 의한 검출 한계에 있는 세포주는 또한 강한 반응을 유도하여 CAR의 민감성을 나타내었다. 질환 하위유형 분석 및 병리학은 906-009\_LNGFR CAR-T 세포가 질환 하위유형 (편평 또는 선암종) 및 병리학 (전이성 또는 원발성)에 관계없이 CLDN3을 발현하는 NSCLC 세포주에 반응할 것임을 입증하였다. 요약하면, 이 보고서는 NSCLC가 CLDN3 CAR-T 세포에 적절한 환자 집단일 수 있다는 시험관내 증거를 제공한다.

[0864] 재료 및 방법

[0865] 이 연구의 목적은 NSCLC 세포주에서 견고한 CLDN3 발현 및 CLDN3 CAR-T 세포에 의한 기능적 반응을 확증함으로써 NSCLC 환자가 CLDN3 CAR-T 세포로 치료될 수 있는지 여부를 이해하는 것이었다.

[0866] 초기에 RNASeq 데이터를 사용하여 3개의 주요 질환 하위집단으로부터 다양한 수준의 CLDN3을 갖는 세포주를 선택하였다. 후속적으로, CLDN3 단백질 및 CLDN3 mRNA 발현을 각각 유동 세포계측법 및 qRT-PCR에 의해 평가하였다. 수집된 데이터에 기초하여, 기능적 실험에서 사용하기 위해 높은 수준 내지 낮은 수준의 표적 발현을 발현한 다양한 세포주를 선택하였다. NSCLC 환자 집단의 다양성을 설명하기 위해, 전이성 및 원발성 병리 둘 다에서 가장 일반적인 두 가지 하위유형 (선암종 및 편평 세포 암종)으로부터 세포주를 선택하였다.

[0867] 2개의 핵심 관독값, 활성화 인자 분비 (그랜자임 B 및 IFN  $\gamma$ ) 및 사멸 (아넥신 V의 발현에 의해 확증됨)을 사용하여 906-009\_LNGFR CAR-T 세포의 기능적 반응을 평가하였다. T 세포 활성화 및 표적 세포 사멸의 조합은 세포독성 반응을 확증하는 반면, 활성화 인자의 수준 단독은 세포독성 반응을 나타내거나 농도가 낮은 경우 감소된 반응을 제안하는데 사용될 수 있다. CLDN3 발현을 또한 평가하여 표적 세포 플레이팅 당일에 표적 발현에 대한 반응을 비교하였다. CRC는 FTiH 연구의 1차 적응증이므로, 이전 효력 검정에서 사용된 수많은 CRC 세포주가 906-009\_LNGFR에 대한 벤치마크로서 패널에 포함되었다. 구체적인 주장은 없지만, 이 연구는 이러한 유형의 연구에 대해 허용되는 과학적 관행에 따라 수행되었다.

[0868] 세포주 배양. 10% FBS 및 1% 글루타맥스 (GLUTAMAX)가 보충된 RPMI를 사용하여 공동-배양하기 1 내지 2주 전에 세포주를 해동하였다. 세포를 3-4일마다 스플릿하고: 공동-배양을 위해 시딩 당일에 TrypLE로 세포를 수집하고, 뉴클레오카운터 202에서 카운팅하였다.

[0869] T 세포 해동. 공여자 PR19K133900, PR19C133904 및 PR19W133916으로부터의 906-009\_LNGFR, CD19 MB (CD19 CAR 음성 대조군, "CD19\_LNGFR") 및 UT (비형질도입된) T 세포 (2021N467314에 기재된 생산)를 공동-배양 당일에 해동하였다. T 세포를 손으로 해동하고, 10 mL의 냉 TEXMACS에 재현탁하였다. 세포를 300xg에서 10분 동안 (RT) 회전시키고, 냉 TEXMACS에 재현탁하였다. 세포 현탁액을 300xg에서 20분 동안 한 번 더 회전시키고, 5mL의 냉 TEXMACS에 재현탁하였다. 그 후, 세포를 뉴클레오카운터 202에서 카운팅하고, 추가 검정을 위해 분취하였다.

[0870] qPCR. RNA 추출: 프로메가 맥스웰 RSC SIMPLYRNA 세포 키트를 사용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 세포주 펠릿으로부터 RNA를 추출하였다. 간략하게, 세포 펠릿을 티오글리세롤을 함유하는 200  $\mu$ l 균질화 용액에 재현탁하였다. 그 후, 균질화된 세포는 200  $\mu$ l 용균 완충액의 첨가 시 용균되었다. 그 후, 용균된 세포를 맥스웰 카트리지의 웰 1에 첨가하고, 5  $\mu$ l 재구성된 DNase 1을 웰 5에 첨가하였다. 플런저를 웰 8에 첨가하고, 카트리지를 맥스웰® RSC 48 기계에서 실행하였다. RNA를 50  $\mu$ L 뉴클레아제-비함유 물에서 용리하고, cDNA 합성 전에 -80°C에서 저장하였다. cDNA 합성: 나노드롭 2000을 사용하여 RNA를 측정하였다. 그 후, 제조업체의 프로토콜에 따라 샘플당 4  $\mu$ L SUPERScript IV VILO™ 마스터 믹스 및 1  $\mu$ g의 RNA를 사용하여 RNA를 역전사하였다. 4개의 샘플에 대해, 1  $\mu$ g RNA 및 4  $\mu$ l의 No RT 마스터 믹스를 함유한 No RT 대조군을 생성하였다. C1000 TOUCH 열순환기를 사용하여 반응물을 25°C에서 10분 동안, 그 후 50°C에서 10분 동안, 이어서 85°C에서 5분 동안 인큐베이션하였다. RT-qPCR: 인간 CLDN3 뿐만 아니라 내인성 참조 유전자 액틴 B (ACTB) 및 유비퀴틴 C (UBC)에 대해 택맨 (TAQMAN) 유전자 발현 검정을 사용하여 cDNA에 대해 RT-qPCR을 수행하였다. 간단히 말해서, 샘플 cDNA를 뉴클레아제-비함유 물로 1/5로 미리 희석하였다. 1/5 7 포인트 gDNA 연속 희석이 생성되었다. 5  $\mu$ L 택맨 패스트 어드밴스드 마스터 믹스, 0.5  $\mu$ L 택맨 유전자 발현 검정, 2.5  $\mu$ L 뉴클레아제-비함유 물 및 2  $\mu$ L의 cDNA/gDNA (상기 제조된 바와 같음)를 혼합함으로써 제조업체의 프로토콜에 따라 각 PCR 반응을 설정하였다. QUANTSTUDIO 6 Flex 실시간 PCR 시스템을 사용하여 마이크로앰프 (MICROAMP) 광학 384-웰 반응 플레이트에서 PCR을 수행하였다.

[0871] 초기 실험에는 gDNA 오염이 있었기 때문에 IP08 및 UBC 를 사용한 문제 해결 실험을 사용하여 실패 원인을 결정하였다. IV VILO No RT 마스터 믹스의 오염은 실험 실패의 원인이므로, 신선한 IV VILO cDNA 합성 키트를 사용

하여 상기 방법을 반복하였다.

- [0872] 유동 세포계측법. 표적 세포주를 유동 세포계측법에 의해 분석하여 CLDN3 발현을 결정하였다. 세포 현탁액을 FACS 완충액 (D-PBS + 2% FBS)에서 2회 세척하고, 40 µl 인간 트루스테인(TRUSTAIN) FCX Fc 차단제에 재현탁하고, 10분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 그 후, 세포를 40 µl의 2X PE 클라우딘-3 항체 또는 PE REA IgG1 이소타입 대조군 항체 (5 µg/ml의 작업 농도)로 염색하고, 30분 동안 실온에서 암실에서 인큐베이션하였다. 그 후, 세포를 FACS 완충액에서 3회 세척한 후, DAPI 용액 (D-PBS 중 1 µg/mL DAPI)에 재현탁하였다. 사이토플렉스 유동 세포계측기를 사용하여 세포를 즉시 분석하였다.
- [0873] 시토카인 검출을 위한 공동-배양 설정. 표적 세포주를 분리하고, T 세포와의 공동-배양 전날 카운팅하였다. 세포를 세척하고, 300 xg에서 원심분리하고, 각 실험에 적합한 밀도로 배지에 재현탁하였다. 그 후, 2.5 x 10<sup>4</sup> 개 세포를 96-웰 플레이트에 시딩하였다. 다음 날, 신선하게 해동되고 정규화된 T 세포를 그 후 플레이트에 1:1 E:T (이펙터: 표적 세포, 여기서 "이펙터"는 형질도입된 CAR-T 세포임) 비로 첨가하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 공동-배양하였다. 각 공동-배양 조건을 3중으로 실행하였다. 24시간 후 플레이트를 원심분리하고, 상청액을 수집하고, 시토카인 분비를 정량화하기 위해 -80°C에서 저장하였다.
- [0874] 인간 IFN $\gamma$  시토카인 U-플렉스 MSD 검정. 2개의 시토카인 U-플렉스 플레이트를 사용한 MSD 검정을 제조업체의 지침에 따라 수행하였다.
- [0875] 플레이트 준비. 링커:항체를 3:2 비로 첨가함으로써 비오틴화된 항체를 링커 (IFN $\gamma$ 는 링커 1로, 및 그랜자임 B는 링커 10으로)에 커플링하였다. 믹스를 볼텍싱하고, 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 3:2:2의 링커:항체:정지 용액에 대해 정지 용액을 첨가하고, 믹스를 볼텍싱한 후, 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 링커 커플링된 항체를 정지 용액에 1/10으로 조합 및 희석함으로써 코팅 용액을 제조하였다. 코팅 용액을 볼텍싱하고, 각 웰에 50 µL를 첨가함으로써 플레이트를 코팅하였다. 플레이트를 밀봉하고, 실온에서 1시간 동안 진탕하면서 인큐베이션하였다.
- [0876] 시약 및 샘플 준비. 동결된 샘플 및 희석제 3 및 2를 해동하고, RT로 평형화하였다. 그 후, 샘플 플레이트를 2000xg에서 3분 동안 회전시켰다. 검정 교정기 1을 250 µL 희석제 2에서 재구성하고, 실온에서 30분 동안 인큐베이션하고, 검정 교정기 23을 얼음 위에서 해동하였다.
- [0877] 교정기 및 샘플 희석. 시토카인 표준 교정 곡선을 생성하기 위한 연속 희석의 경우: 교정기 1 및 교정기 23을 희석제 2에서 1/10으로 희석함으로써 제1 표준을 제조하였다. 그 후, 4배 연속 희석으로 표준 2 내지 7을 제조하였다. 또한, 표준 곡선의 상단 및 하단에 피팅하기 위해 샘플을 희석제 2에서 희석하였다.
- [0878] 검정 프로토콜. 플레이트를 150 µL/웰의 세척 완충액 (PBS + 0.05% Tween)으로 3회 세척하고, 50 µl의 교정기 또는 희석된 상청액 샘플을 플레이트하였다. 플레이트를 실온에서 2시간 동안 적어도 750 rpm으로 진탕하면서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 플레이트를 150 µL/웰의 세척 완충액으로 3회 세척한 후, 50 µL의 검출 항체 용액을 각 웰에 첨가하였다 (희석제 3에 1/100 희석된 IFN $\gamma$  및 그랜자임 B에 대한 항체). 플레이트를 실온에서 1시간 동안 적어도 750 rpm으로 진탕하면서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 플레이트를 150 µL/웰의 세척 완충액으로 3회 세척하였다. 다음으로, 150 µl의 MSD GOLD 판독 완충액을 각 웰에 첨가한 후, 플레이트를 MSD 섹터 600 이미저에서 즉시 판독하였다.
- [0879] 인큐사이트 기반 사멸 검정
- [0880] 플레이트 코팅. NUNCLON 델타 표면 96 웰 플레이트의 각 웰에 50 µl의 0.01% 폴리-L-오르니틴을 첨가하고, 플레이트를 밤새 4°C에서 인큐베이션하였다. 다음 날, 플레이트를 150 µl PBS로 3회 세척하고, 생물안전성 캐비닛에서 1시간 동안 공기 건조하였다.
- [0881] 표적 세포 플레이트링. 표적 세포주를 상기 기재된 바와 같이 분리하고 카운팅하고, 적절한 농도로 재현탁하여 50 µl의 공동-배양 배지 (페놀-비함유 RPMI + 10% FBS + 1% 글루타맥스 + 1% 피루브산나트륨 + 1% NEAA)의 부피에 웰당 15,000 또는 25,000개 세포를 시딩하였다. 시딩 밀도를 각 세포주에 대해 개별적으로 결정하였다. 플레이트를 밤새 37°C에서 5% CO<sub>2</sub>와 함께 인큐베이션하였다.
- [0882] T 세포 플레이트링. 다음 날, 아포토시스를 위한 50 µl의 아넥신 V 염료 (150 µl 총 웰 부피에서 1:500의 최종 농도를 달성하기 위해 공동-배양 배지에서 희석됨)를 표적 세포를 함유하는 플레이트에 첨가하였다. T 세포가 준비되는 동안 플레이트를 37°C에서 5% CO<sub>2</sub>와 함께 인큐베이션하였다. 상기 기재된 바와 같이 준비된 T 세포를

적절한 농도로 재현탁하여 50  $\mu$ l의 공동-배양 배지에서 1:1 표적 세포:T 세포 비를 달성하였다. 그 후, 플레이트를 인큐베이터 SX5로 옮기고, 실험 전반에 걸쳐 37°C에서 5% CO<sub>2</sub>와 함께 인큐베이션하였다.

- [0883] 이미지 수집. 10X 배율의 접착성 셀바이셀(Ce11-by-Ce11) 스캔 유형을 사용하여 인큐베이터 SX5를 사용하여 이미지를 획득하였다. 데이터를 Phase 및 NIR 채널에서 수집하였다. 7일의 기간 동안 3시간 간격으로 웰당 4개의 이미지를 획득하였다.
- [0884] 결과
- [0885] NSCLC 세포주에 의한 CLDN3 발현.
- [0886] 24개의 NSCLC 세포주 및 양성 (HT-29) 및 음성 (RKO KO) CRC 대조군에 의한 CLDN3 mRNA 및 단백질의 발현을 평가하였다. 세포주를 6주 기간에 걸쳐 배양하고, 3개의 별개의 유동 세포계측법 및 qPCR 실험을 위해 샘플을 수집하였다 (도 47a-47b 및 표 18).
- [0887] 유동 세포계측법 분석에 의해 결정된 바와 같이, NSCLC 세포주의 대다수 (16개)는 균질한 CLDN3 양성 집단으로 구성되었으며, 상이한 세포주 (1.2 (RKO KO) 내지 738 (HT-29) 정규화된 MFI)의 세포 표면 상의 다양한 수준의 CLDN3을 반영하는 MFI 범위를 갖는다. 나머지 8개 세포주는 별개의 집단이 아닌 형광의 집단 이동에 기초하여 CLDN3에 대해 부분적으로 양성하였고, 하나는 CLDN3 음성 (NCI-H1703)이었다. 일부 특이치, 예컨대 NCI-H1650이 있었지만 단백질 수준의 증가는 대부분 mRNA의 증가를 반영하였다.
- [0888] 발현 데이터에 기초하여, 병리학 (전이성 또는 원발성 둘 다) 및 2개의 주요 질환 서브세트 (선암종 및 편평)와 관계없이 다양한 발현 수준에서 NSCLC CLDN3 발현 세포주에 대한 기능적 반응을 제시하기 위한 목적으로 다양한 세포주를 선택하였다 (표 19). 낮은 수준의 표적 발현 뿐만 아니라 높은 수준에 대한 906-009\_LNGFR의 반응을 조사하기 위해 광범위한 CLDN3 발현 수준 (상대적 CLDN3 및 % 막 결합된 CLDN3 집단 기준)을 갖는 12개의 세포주 패널을 선택하였다. 부분 양성 집단을 갖는 3개 세포주, 뿐만 아니라 낮은 상대적 CLDN3 mRNA, 0% 막 결합된 CLDN3 집단 및 RKO KO와 유사한 정규화된 MFI (음성 대조군으로서 사용된 CLDN3 KO 세포주)에 기초하여 음성으로 추정되는 NSCLC 세포주, NCI-H1703을 선택하였다 (표 18).
- [0889] 본 출원에서 특징화되었던 여러 CRC 세포주가 또한 연구에 포함되었다. 하기 세포주를 선택하였다; CLDN3 mRNA의 매우 낮은 발현을 갖는 CRC 세포주 (Co1o320DM), 및 중간 및 높은 CLDN3 발현 NSCLC 세포주에 필적하는 CLDN3 발현 수준을 갖는 3개의 추가 세포주 (DLD1, HCT15 및 HT-29). 세포주에 대한 CLDN3 CAR-T 세포의 반응을 연구하는 대량의 데이터가 이미 존재하며, 이들 CRC 세포주를 이 연구에서 벤치마크로서 사용하였다.
- [0890] 공동-배양을 위한 시딩 당일 (T 세포 첨가 전날)에 표적 세포 내 CLDN3 발현을 재확인하였다. CLDN3 단백질 발현 수준 (도 47b 및 표 18에서 정규화된 MFI로서 분석됨)에 대한 실험에 걸친 차이를 주목하였다. 구체적으로, 초기 세포주 스크리닝 단계에서, NCI-H1650은 RKO KO (2.7 vs 1.4, n=3)보다 더 큰 정규화된 CLDN3 MFI를 갖는 부분적으로 양성인 낮은 CLDN3 집단 (35%, n=3)을 함유하는 것으로 일관되게 입증되었다. 기능적 실험을 위한 표적 세포 시딩 당일에 NCI-H1650은 RKO KO (1.55 vs 1.8 정규화된 MFI)에서 관찰된 배경보다 낮은 CLDN3 수준을 발현하였으며, 단지 2.28% CLDN3 양성이었다 (도 54a-54j). 주목할 점은, NCI-H1650이 35% CLDN3 양성임을 제시하는 실험에서 NCI-H1650은 일관되게 NCI-H1703보다 낮은 상대적 CLDN3 mRNA 수준을 가졌다 (표 18).
- [0891] 표 18 - NSCLC 세포주에 의한 CLDN3의 발현. CLDN3 발현은 3개 실험에 걸쳐 qPCR (2- $\Delta$ CT) 및 유동 세포계측법 (정규화된 PE MFI)에 의해 평가되었다.

	실험 1		실험 2	
	qPCR	정규화된 MFI	qPCR	정규화된 MFI
RKO-KO	0.003335241	1.204845815	0.000824114	1.556936
NCI-H1703	N/A	N/A	0.00047003	1.389313
NCI-H2023	0.003670222	1.276021265	0.001647853	1.392581
NCI-H460	0.003358099	1.413461538	0.001671613	1.51897
LU65	0.007209422	1.709439528	0.001503094	1.895317
NCI-H1755			0.002563686	3.248598
NCI-H1650	0.001068008	2.733506944	0.000461306	2.686047
A549	0.002224594	1.747826087	0.000972491	2.058613
NCI-H2347			0.09115699	16.18642
NCI-H441	0.028635202	9.648679679	0.022278655	15.95519
NCI-H2122	0.033484859	17.30518909	0.0362018	20.27599
NCI-H522	0.023850311	25.7360179	0.010584087	56.79117
NCI-H2291	0.120269035	35.70586053	0.072841574	47.56344
NCI-H520	0.041490987	31.74115044	0.026495499	33.58874
NCI-H1581	0.019139604	30.10164425	0.012905015	32.73684
NCI-H1651	0.013032526	35.05640244		
NCI-H2106				
NCI-H2170	0.07077233	38.60678925	0.042534057	66.98403
NCI-H661			0.023307234	67.62993
NCI-H1838			0.045997443	34.20717
HCC0827	0.264411515	74.20557491	0.192664904	116.28
NCI-H2126	0.090398007	69.48458781	0.048488585	107.0213
HCC15	0.033510941	166.397454	0.012848113	195.3033
HCC2935	0.071200384	81.21613237	0.042042582	149.7204
NCI-H810	0.107472822	208.4030837		
HT-29	0.3535203	738.2565056	0.17054177	747.2527

[0892]

[0893] 표 18 - 계속

실험 3		
	qPCR	정규화된 MFI
RKO-KO	0.001812296	1.433566434
NCI-H1703	0.001255001	1.154345006
NCI-H2023	0.002431704	1.57408075
NCI-H460	0.001818073	1.579298831
LU65	0.001021064	1.730099502
NCI-H1755	0.002473057	1.982664234
NCI-H1650	0.001372299	2.702734839
A549	0.003373824	5.378596087
NCI-H2347	0.106000687	12.44494659
NCI-H441	0.021552347	15.67727931
NCI-H2122	0.036126528	21.36960986
NCI-H522	0.006209105	30.85344828
NCI-H2291	0.06916814	34.54140571
NCI-H520	0.024306636	35.20707071
NCI-H1581	0.01281286	35.47157623
NCI-H1651		
NCI-H2106	0.012820521	38.68181818
NCI-H2170	0.034667675	43.16472303
NCI-H661	0.068285278	62.53742802
NCI-H1838	0.055718987	95.45022624
HCC0827	0.102515074	99.54487179
NCI-H2126	0.089747535	102.6476101
HCC15	0.019220253	120.7115385
HCC2935	0.040968824	150.8306709
NCI-H810		
HT-29	0.225382435	1000

[0894]

[0895] 표 19 - 추가 실험을 위해 선택된 세포주 및 기능 검증에서의 용도

세포주	질환 하위유형	병리상태	CLDN3 발현 (% 집단, 유동)	활성화	사멸
NCI-H2170	편평	원발성	100%	예	예
NCI-H520	편평	원발성	100%	예	예
HCC15	편평	원발성	100%	예	예
NCI-H1703	편평	원발성	음성	예	예
NCI-H2023	선암종	전이	부분	예	아니오
NCI-H1650	선암종	전이	부분	예	예
NCI-H2347	선암종	원발성	부분	예	아니오
NCI-H2291	선암종	전이	100%	예	아니오
NCI-H441	선암종	전이	100%	예	아니오
NCI-H522	선암종	원발성	100%	예	아니오
NCI-H1651	선암종	원발성	100%	예	예
HCC0827	선암종	원발성	100%	예	아니오

[0896]

[0897] 표 20 - 선택된 상대적 CLDN3 수준에서 IFN  $\gamma$  배수 변화 (906-009\_LNGFR vs CD19\_LNGFR) 발현 추정. CL = 신뢰 구간.

대비	추정치	하위.CL	상위.CL	p.값
0.00037	10.37	4.16	25.86	P<0.001
0.001	227.07	129.2	399.08	P<0.001
0.003	2963.58	1367.58	6422.18	P<0.001
0.01	8076.66	4132.53	15785.1	P<0.001
0.03	14593.88	8859.49	24039.91	P<0.001
0.1	4887.35	2536.91	9415.47	P<0.001

[0898]

[0899] 표 21 - 선택된 상대적 CLDN3 수준에서 그랜자임 B 배수 변화 (906-009\_LNGFR vs CD19\_LNGFR) 발현 추정. CL = 신뢰 구간.

대비	추정치	하위.CL	상위.CL	p.값
0.00037	3.63	2.1	6.25	P<0.001
0.001	36.46	26.05	51.02	P<0.001
0.003	263.98	166.49	418.54	P<0.001
0.01	622.32	417.42	927.79	P<0.001
0.03	534.92	397.29	720.23	P<0.001
0.1	446.28	301.92	659.66	P<0.001

[0900]

[0901] 표 22 - 906-009\_LNGFR 공동-배양에서 표적 세포 사멸 반응의 정성적 요약

세포주	적응증	공여자 1	공여자 2	공여자 3
HT-29	결장직장	예	예	예
RKO-KO	결장직장	아니오	아니오	아니오
Colo 320	결장직장	부분	아니오	아니오
DLD1	결장직장	예	예	예
NCI-H1650	NSCLC	부분	부분	아니오
NCI-H1703	NSCLC	아니오	아니오	아니오
NCI-H520	NSCLC	예	예	예
NCI-H2170	NSCLC	예	예	예
NCI-H1651	NSCLC	예	예	예
HCC15	NSCLC	예	예	예

[0902]

[0903] 표 23 - 다양한 NSCLC 세포주 및 결장직장 대조군 세포주에서 906-009\_LNGFR의 CLDN3 발현 및 기능적 반응의 요약.

세포주	적응증 (결장 하위 유형)	발현상태	CLDN3 (PKM) <sup>2</sup> KO 세포주	상대적 CLDN3 KO 세포주	활성화 :iFN $\gamma$ (pg/mL)	활성화 :그렐린 B (pg/mL)	사멸
RKO KO	CRC	N/A	KO 세포주	KO 세포주	49	10	아니오
NCI-H1650	NSCLC - 전암종	권의	0.61	0.0004	2525	147	부분 (일부 공여자)
NCI-H1703	NSCLC - 권형	원발성	0.03	0.0006	12	6	아니오
COLO-320DM	CRC	N/A	0.18	0.0008	184	32	부분 (일부 공여자)
NCI-H2023	NSCLC - 권형	권의	1.33	0.001	13251	2314	N/A
NCI-H1651	NSCLC - 전암종	원발성	9.55	0.004	40535	2655	완전
NCI-H522	NSCLC - 전암종	원발성	5.73	0.005	29574	1301	N/A
NCI-H520	NSCLC - 권형	원발성	5.82	0.015	36074	1998	완전
NCI-H441	NSCLC - 전암종	권의	10.52	0.048	63328	3400	N/A
DLD-1	CRC	N/A	n/a	0.022	54859	2019	완전
HCC15	NSCLC - 권형	원발성	28.45	0.024	75245	3332	완전
NCI-H2291	NSCLC - 전암종	권의	60.76	0.029	43970	3079	N/A
NCI-H2170	NSCLC - 권형	원발성	35.46	0.033	29899	3026	완전
NCI-H2347	NSCLC - 전암종	원발성	50.76	0.037	59954	3012	N/A
HCC15	CRC	N/A	62.11	0.072	57168	2514	N/A
HCC0827	NSCLC - 전암종	원발성	10.09	0.099	65415	3678	N/A
HT29	CRC	N/A	93.93	0.13	31139	4357	완전

[0904]

- [0905] NSCLC 세포주에 의한 906-009\_LNGFR의 활성화.
- [0906] NSCLC 세포주에 대한 906-009\_LNGFR의 효능을 조사하기 위해, 활성화 인자 IFN $\gamma$  및 그랜자임 B를 906-009\_LNGFR 및 표적 세포 공동-배양 24시간 후에 정량화하였다. 이 데이터는 도 49a-49b에서 3명의 공여자의 평균으로서 제시된다.
- [0907] 0.001 dCT (가장 높은 CLDN3 발현 세포주 HT-29, 0.13 dCT까지)를 초과하는 상대적 CLDN3 mRNA 발현을 갖는 모든 세포주는 906-009\_LNGFR CAR-T 세포를 활성화시켜 대조군 수준 (UT/CD19\_LNGFR 공동-배양)을 초과하는 견고한 IFN $\gamma$  및 그랜자임 B 분비를 유발하였다. 2개의 세포주 (CRC 1개 및 NSCLC 1개)를 제외한 모든 세포주에서 그랜자임 B의 수준이 800pg/mL 이상이었다. 더 낮은 수준의 그랜자임 B를 갖는 두 세포주 모두는 또한 더 낮은 수준의 IFN $\gamma$ 를 분비하였으며, 0.001 미만의 CLDN3 mRNA 및 배경 수준의 CLDN3 단백질을 발현하는 것으로 나타났다.
- [0908] 이전 효력 검정에 사용되었던 유사한 수준의 CLDN3 (낮음, 중간 및 높음)을 갖는 CRC 세포주가 공동-배양에 포함되었다. CRC 세포주에 대한 반응으로 906-009\_LNGFR에 의해 분비된 IFN $\gamma$  및 그랜자임 B의 수준은 NSCLC 세포주에 대한 반응보다 높지 않았다. 가장 높은 수준의 CLDN3 mRNA를 갖는 CRC 세포주인 HT-29는 가장 높은 CLDN3 mRNA 발현 NSCLC 세포주 HCC0827 (65,415 pg/ML IFN $\gamma$  및 3,678 pg/mL 그랜자임 B)과 유사한 수준의 IFN $\gamma$  및 그랜자임 B (31,139 pg/mL 및 4,357 pg/mL)를 가졌다 (표 23).
- [0909] 906-009\_LNGFR의 이들 반응은 표적 발현 세포에 대해 특이적이었다. UT 수준 이상으로 CD19\_LNGFR에 의한 IFN $\gamma$  및 그랜자임 B의 분비가 없었고, CLDN3 음성 세포주 NCI-H1703 및 RKO KO에 대한 반응으로 906-009\_LNGFR에 의한 이들 인자의 분비가 없었다.
- [0910] 발현 및 반응 간의 관계.
- [0911] 도 3에 제시된 데이터는 낮은 수준의 CLDN3이 906-009\_LNGFR에 의해 유의한 활성화 반응을 유도할 수 있음을 입증한다 (IFN $\gamma$  및 그랜자임 B 분비에 의해 정량화됨). CLDN3 mRNA의 어느 수준에서 활성화 반응이 피크에 도달하고 정체될 수 있는지 이해하기 위해 발현 및 반응 간의 관계를 모델링하였다 (도 50a-50b). 그 후, 곡선을 사용하여 CLDN3 발현의 특정 수준에서 CD19 MB 대비 배수 변화를 추정하였다 (표 20 및 표 21).
- [0912] 이들 모델은 낮은 수준의 CLDN3에서 활성화 인자의 통계적으로 유의한 증가가 예상된다는 것을 시사한다. 0.00037 상대적 CLDN3에서도 IFN $\gamma$ 의 경우 10.37 및 그랜자임 B의 경우 3.63의 유의한 배수 변화 (CD19\_LNGFR 대비)가 추정되었다. 모델에 사용된 가장 높은 CLDN3 mRNA 수준은 0.099 (HCC0827 NSCLC) 세포주였다. 소수의 세포주만이 매우 낮은 수준의 CLDN3을 나타내었기 때문에, 낮은 발현 수준에서 CD19\_LNGFR 대비 배수 변화를 추정하는 통계적 검정력은 더 낮으며; 그럼에도 불구하고, 906-009\_LNGFR이 NSCLC 세포주에 의한 낮은 수준의 CLDN3 발현에 반응한다는 것은 분명하다.
- [0913] 도 50a의 곡선에 기초하여, IFN $\gamma$  농도가 ~ 0.02 상대적 CLDN3 mRNA 발현에서 정체되었다. 0.03 상대적 CLDN3 mRNA에서 추정된 IFN $\gamma$  분비 배수 변화는 CD19\_LNGFR에 비해 14594배 더 높았으며, 이는 NSCLC 세포주에 대한 강력한 활성화 반응을 나타낸다. 도 4b에 기초하여, 그랜자임 B 반응은 더 낮은 수준의 CLDN3 발현에서; 대략 0.005 상대적 CLDN3 mRNA의 상대적 CLDN3 발현에서 정체되었다.
- [0914] NSCLC 세포주에서 표적 세포 사멸을 유도하는 906-009\_LNGFR의 효력
- [0915] 이 작업은 다양한 NSCLC 표적 세포에서 세포 사멸을 유도하는 906-009\_LNGFR의 능력을 평가하는 것을 목표로 하였다. 아포토시스 세포 사멸 동안, 포스파티딜세린은 외부화되며, 이는 아넥신 V 염색에 의해 시각화될 수 있다. 이 연구에서 표적 세포 사멸을 평가하기 위해, 906-009\_LNGFR과의 표적 세포 공동-배양의 지속기간 전반에 걸쳐 아넥신 V 염색을 정량화하였다. 906-009\_LNGFR과의 공동-배양 후 표적 세포의 존재를 평가하기 위해 아넥신 V 염색의 총 면적을 위상 이미지와 함께 해석하였다.
- [0916] 906-009\_LNGFR에 의해 유도된 표적 세포의 완전 사멸은 테스트된 여러 NSCLC 세포주에서 관찰되었으며, 이는 아넥신 V 발현 세포의 클러스터의 존재 및 가시적 아넥신 V 음성 표적 세포 없음에 의해 결정되었다 (CRC 세포주의 경우 도 51 및 NSCLC 세포주의 경우 도 52). 906-009\_LNGFR과의 공동-배양에서 표적 세포 사멸이 관찰된 경우, 이는 짧은 시간 프레임 내에 발생하였다 (CAR-T 세포의 첨가 후 최대 4일). CLDN3 발현에 대해 음성인 NCI-H1703 세포주에서, 906-009\_LNGFR과의 공동-배양 동안 표적 세포 사멸이 관찰되지 않았다.
- [0917] 낮은 수준의 CLDN3을 발현하는 세포주에서 표적 세포 사멸을 유도하는 906-009\_LNGFR의 능력을 평가하기 위해, CRC 세포주 Co1o320DM 및 NSCLC 세포주 NCI-H1650을 906-009\_LNGFR과 함께 배양하였다. 두 세포주 모두에서,

부분적인 표적 세포 사멸이 관찰되었으며, 이는 CD19\_LNGFR 공동-배양과 비교하여 906-009\_LNGFR 공동-배양에서 아넥신 V 염색의 증가 및 표적 세포 수 또는 무결성의 감소로서 정의되었다 (도 53a-53b). CRC 세포주 Colo320DM의 경우, 사멸은 테스트된 3명의 공여자 중 1명의 공여자에서만 관찰되었으며, 아넥신 V 염색의 증가 및 표적 세포 수의 감소가 동반되었다. NSCLC 세포주 NCI-H1650에서, 아넥신 V 염색은 테스트된 3명의 공여자 모두에서 CD19\_LNGFR 공동-배양보다 더 일찍 906-009\_LNGFR 공동-배양에서 증가하였지만, 감소된 표적 세포 무결성은 테스트된 3명의 공여자 중 2명에서만 관찰되었다.

[0918] 이 연구는 편평 세포 암종 및 선암종 NSCLC 하위유형 둘 다로부터 유래된 다양한 CLDN3 발현 NSCLC 세포주에 대해 표적 세포 사멸을 유도하는 906-009\_LNGFR CLDN3 CAR-T 세포의 능력을 입증하였다 (표 22 및 도 51, 52 및 53a-53b).

[0919] CLDN3 CAR T 세포 요법으로부터 혜택을 받을 수 있는 잠재적 적응증을 확장하기 위해, 관심 질환으로부터 유래한 다양한 세포주에 대한 견고한 기능적 반응이 있음을 제시하는 것이 중요하다. 이 연구는 NSCLC 세포주와의 906-009\_LNGFR 공동-배양을 사용하고 CLDN3 CAR-T 세포가 NSCLC에 대한 요법으로서 사용될 수 있다는 증거가 있는지 결정함으로써 이를 제시하는 것을 목표로 하였다. 따라서, 이 작업에서, 상이한 수준의 CLDN3, 및 전이성 및 원발성 병리상태를 갖는 편평 및 선암종 하위유형로부터 세포주 패널을 선택하였다.

[0920] 유동 세포계측법에 의한 CLDN3 단백질 검출이 제한적이라는 증거가 있다. 첫째, 부분적으로 양성인 세포주에서는 별개의 CLDN3 양성 및 음성 집단이 관찰되지 않았고, 음성 대조군과 비교하여 형광의 이동만 관찰되었다 (도 54a, 54c, 54e, 54g, 54i). 둘째, 기능적 실험 당일에 수행된 유동 세포계측법에 기초하여 CLDN3 (DLD1 - 36% 및 NCI-H1651 - 75%)에 대해 부분적으로만 양성인 일부 세포주가 100% 사멸되었다.

[0921] 이 연구 내의 데이터는 다양한 NSCLC 세포주에 대한 906-009\_LNGFR의 효력을 제시한다. CLDN3 FPKM이 5.82 이상인 모든 세포주에서 완전한 표적 세포 사멸이 관찰되었다 (나머지 모든 표적 세포에 의한 아넥신 V 발현) (표 23). 이들 모든 조건에서 800pg/mL 이상의 그랜자임 B 분비가 또한 있었다. 공여자 PR19W133916 906-009\_LNGFR (969 pg/mL)과의 NCI-H520 공동-배양에서 가장 낮은 수준의 그랜자임 B (동등한 실험에서 완전 사멸이 명백함)가 관찰되었다. 이는 그랜자임 B의 이러한 수준이 모든 표적 세포에서 아포토시스를 유도하는 반응을 나타낸다는 것을 시사한다. 이와 같이, 이 수준보다 높은 그랜자임 B를 갖는 모든 세포주는 (본질적으로 그랜자임 B를 통한 T 세포 사멸을 회피할 수 없는 한) 906-009\_LNGFR에 의해 사멸될 가능성이 있다. 표적 세포와의 공동-배양 후 969pg/mL 이상의 그랜자임 B의 수준은 적응증, 질환 하위유형 및 병리상태와 관계없이 관찰될 수 있으며, 이는 아마도 상대적 CLDN3 수준과 관련이 있을 것이다.

[0922] CLDN3의 변화하는 수준에서 예상되는 활성화 인자 수준을 모델링하기 위해 이 연구에서 수집된 데이터를 사용하여 IFN  $\gamma$ /그랜자임 B 및 CLDN3 발현 간의 관계를 또한 연구하였다. 주목해야 할 중요한 점은 낮은 수준의 CLDN3 발현에서 활성화 반응이 피크에 도달한다는 것이다; (IFN  $\gamma$ 의 경우 ~0.02 상대적 CLDN3 및 그랜자임 B의 경우 ~0.005 상대적 CLDN3). 더 낮은 수준의 CLDN3 mRNA에서 그랜자임 B 분비의 이러한 정체는 완전 사멸과 상관관계가 있으며, 이는 그랜자임 B 분비의 이러한 뚜렷한 패턴이 사멸을 나타낸다는 것을 추가로 시사한다.

[0923] 세포주 패널에 포함된 4개의 CLDN3 양성 CRC 세포주는 906-009\_LNGFR에 의해 유사한 수준의 IFN  $\gamma$  및 그랜자임 B 분비를 유도하였다. HT-29 (가장 높은 CLDN3 발현 NSCLC 세포주 HCC0827 0.099 상대적 CLDN3과 비교하여 0.12 상대적 CLDN3을 발현함)는 더 높은 수준의 IFN  $\gamma$ 를 분비하지 않았고 (65,414 pg/mL와 비교하여 31,138 pg/mL), 유사한 수준의 그랜자임 B를 분비하였으며 (3,678 pg/mL와 비교하여 4,357 pg/mL), 이는 CLDN3 양성 세포 내 항원 수준에 관계없이 가장 높은 활성화 수준에 도달하였음을 입증한다. 가장 낮은 수준의 CLDN3 발현 (mRNA 및 단백질)을 갖는 NSCLC 및 CRC 세포주 둘 다에서, 906-009\_LNGFR에 의한 IFN  $\gamma$  분비는 또한 비교적 더 낮았다. 전반적으로, 이는 NSCLC 세포주가 유사한 수준의 발현을 갖는 CRC 세포주에 의해 유도된 반응만큼 견고한 시험관내 활성화 반응을 유도할 수 있음을 제시한다.

[0924] IFN  $\gamma$ /그랜자임 B의 상향조절은 CLDN3의 기준선 수준 (0.0036 상대적 CLDN3 및 0.61 FPKM)에도 불구하고 NCI-H1650과 906-009\_LNGFR CAR-T 세포의 공동-배양에서 관찰되었다. 기능적 실험으로부터의 발현 데이터에 기초하여, NCI-H1650에 의한 CLDN3 단백질의 발현은 기준선 수준인 1.5 정규화된 CLDN3 발현보다 높지 않았다. 그러나, 일부 공동-배양에서는 명확한 활성화 반응 (2,525 pg/mL IFN  $\gamma$  및 220 pg/mL 그랜자임 B) 및 부분 사멸이 있었다. 결과에 제시된 바와 같이, NCI-H1650은 이전에 낮은 상대적 CLDN3에도 불구하고 음성 세포주보다 일관되게 더 높은 CLDN3 단백질을 나타내었으며, 이는 이 세포주 mRNA가 단백질 발현을 나타내지 않음을 시사한다. 실험 간의 불일치는 사용된 항체의 검출 하한에 접근할 때 유동 세포계측법 검정의 저하된 신뢰성로 인한 것일 수 있다. 데이터는 또한 표적 세포 플레이팅 후 16시간에 T 세포 플레이트로써 공동-배양 시점에 CLDN3 발현을

나타내지 않을 수도 있다. 이와 같이, 이 세포주는 이 연구에서 사용된 유동 항체에 의해 검출되지 않은 낮은 수준의 CLDN3을 발현할 가능성이 있으며, 이는 활성화 반응 및 최소 아넥신 V 발현을 유도하기에 충분하다.

[0925] NSCLC 세포주 NCI-H1650의 부분 사멸 반응은 표적 세포 성장 및 부분적 아포토시스의 감소된 제어에 의해 특징화되었다 (아넥신 V 발현에 의해 확증됨). 이는 완전히 사멸된 세포주 (969 pg/mL 이상의 그랜자임 B가 있는 경우)와 비교하여 저하된 그랜자임 B 분비 (220 pg/mL)와 상관관계가 있었다. 이러한 부분 사멸 반응은 유동 세포계측법에 의한 검출 한계에서 낮은 CLDN3 단백질 발현을 갖는 CRC 세포주인 Colo320DM과 유사하였지만, NCI-H1703보다 CLDN3 mRNA가 더 높았다. 1명의 공여자 (가장 높은 IFN $\gamma$  및 그랜자임 B 농도를 가짐) 내에서 부분 사멸이 관찰되었으며, 세포주의 성장이 계속되었다. 이는 906-009\_LNGFR CAR-T 세포의 이러한 감소된 반응이 적응증 의존적이지 않음을 시사한다.

[0926] 요약하면, NSCLC 세포주는 견고한 활성화 반응 (유의한 그랜자임 B 및 IFN $\gamma$  분비 vs CD19가 0.00037 상대적 CLDN3만큼 낮은 것으로 추정됨) 및 강력한 사멸 반응 (0.0038 이상의 상대적 CLDN3을 갖는 세포주에서 100% 세포 사멸)을 유도하였다. 병리상태 및 질환 서브세트와 관계없이 낮은 수준의 CLDN3에서 활성화 및 사멸이 관찰되었다. CRC 및 NSCLC 세포주에서 유사한 수준의 CLDN3 발현이 있었던 경우 유사한 활성화 및 사멸 반응이 있었다. CLDN3 CAR-T 세포의 효력을 나타내는 이들 CRC 세포주에 대한 광범위한 데이터 세트가 이미 존재하므로 NSCLC에 대한 유사한 반응 및 벤치마크는 이 데이터 세트를 추가로 검증한다. 표적 세포 사멸은 2개의 핵심 NSCLC 서브세트 (선암종 및 편평 세포 암종)로부터의 NSCLC 세포주에서 유도되었으며, 이는 906-009\_LNGFR CAR-T 세포가 별개의 질환 하위유형으로부터 유래한 다양한 NSCLC 세포주에 대해 효과적이라는 것을 나타낸다.

[0927] CLDN3의 발현 및 IFN $\gamma$  및 그랜자임 B에 대해 상이한 활성화 인자 분비 간에 관계가 또한 관찰되었다. 이들 활성화 인자의 수준은 낮은 수준의 CLDN3 발현에서 피크에 도달하였으며 (실험 당일에 각각 0.02 dCT 및 0.005 dCT 상대적 CLDN3), 이는 이 적응증에서 CLDN3 발현 세포주에 대한 906-009\_LNGFR CAR-T 세포의 민감성을 제시한다. 제한된 활성화 및 세포독성 반응은 또한 0.0008 상대적 CLDN3 mRNA 이하에서 관찰되었으며, 여기서 부분 사멸만이 유도되었고 더 낮은 수준의 IFN $\gamma$  및 그랜자임 B가 검출되었다.

[0928] 전반적으로, 이는 높은 및 낮은 수준의 CLDN3을 발현하는 다양한 NSCLC 세포주가 906-009\_LNGFR CAR-T 세포를 활성화시켜 표적 세포 사멸을 유발할 수 있음을 확증하며, 이는 NSCLC가 이 요법에 대한 관심의 적응증이 될 수 있음을 시사한다.

[0929] 실시예 13 - CLDN3 에피토프 맵핑

[0930] 본 연구 내에서, CLDN3 CAR 에피토프의 평가를 위해 906-009\_LNGFR을 사용하였다. "906-009\_LNGFR"은 "SO-CD20-906\_009" CLDN3 CAR-T 세포와 동일한 scFv, 힌지, 신호전달 모이어티 및 공동-자극 도메인을 함유하지만; CD20 도메인을 함유하지 않고 LNGFR 태그를 함유한다. CLDN3 결합 요소는 동일하게 유지되며, 2개의 분자는 필적하는 기능을 갖는 것으로 입증되었다. 야생형 잔기를 알라닌으로 대체하는 상이한 CLDN3 돌연변이체를 발현하는 도구 RKO 표적 세포가 생성되었다. 906-009\_LNGFR 활성화는 돌연변이체를 발현하는 RKO 표적 세포주와의 공동-배양 후 IFN $\gamma$  방출에 의해 평가되었다. 또한, 906-009\_LNGFR에 scFv를 포함하는 모노클로날 항체 버전인 906-mAb를 유동 세포계측법에서 사용하여 세포주에 대한 결합을 평가하였다.

[0931] 906-009\_LNGFR의 에피토프를 식별하기 위해, 인실리코 단백질 구조 분석을 수행하여 잔기 표면 접근가능성을 예측하였다. 데이터는 후보 야생형 잔기를 알라닌으로 대체하는 상이한 돌연변이된 CLDN3 버전을 발현하는 도구 RKO CLDN3 KO 표적 세포를 생성하는데 사용되었다. CLDN3 세포의 루프 1 및 2 (ECL-1 및 ECL-2) 둘 다에 걸쳐 돌연변이가 생성되었다.

[0932] 유동 세포계측법을 사용하여 RKO KO 표적 세포에 대한 906-mAb의 결합을 측정함으로써 에피토프를 결정하였다. RKO KO 표적 세포와 3명의 건강한 공여자로부터 생산된 906-009\_LNGFR의 공동-배양 후 IFN $\gamma$  분비에 의해 CAR T 활성화를 평가하였다. 돌연변이가 906-009\_LNGFR의 에피토프 내에 있는 경우, 결합 및 활성화의 감소가 예상되며, 따라서 RKO KO CLDN3 야생형 (WT) 세포와 비교하여 906-mAb 및 IFN $\gamma$  신호의 감소가 예상된다.

[0933] 906-mAb의 결합은 WT CLDN3을 발현하는 RKO 세포와 비교하여 N38A 및 E153A 돌연변이체 표적 세포에서 유의하게 감소되었다. 이들 돌연변이체와 906-009\_LNGFR의 공동-배양은 또한 WT CLDN3을 발현하는 RKO 세포와 비교하여 24시간 후 IFN $\gamma$  방출의 유의한 저하를 유발하였다. 데이터는 아미노산 N38 및 E153이 906-009\_LNGFR의 결합 및 활성화에 중요하고 따라서 CAR 결합 에피토프의 일부임을 시사한다. 데이터는 또한 906-009\_LNGFR 에피토프가 CLDN3 단백질의 세포의 루프 1 (N38) 및 세포의 루프 2 (E153) 둘 다에 걸쳐 비선형이라는 것을 제시한다 (예를 들어, 서열식별번호: 13 참조).

- [0934] 재료 및 방법
- [0935] 단백질 구조 분석. 세포주 생성을 위한 CLDN3 돌연변이를 선택하기 위해 단백질 구조 분석을 수행하였다. 단백질 서열은 CCG (케미칼 컴퓨팅 그룹(Chemical Computing Group)) MOE (몰레큘라 오퍼레이팅 인바이런먼트 (Molecular Operating Environment)) 2018.01 또는 2019.0101에서 수동으로 또는 자동화된 MOE 정렬 함수를 사용하여 정렬하였다. CCG MOE 2018.01을 사용하여 단백질 결정 구조를 서로 중첩하였다. 구조의 임의의 비-클라우딘 쇄가 결실되었으며, 존재하는 경우 다중 클라우딘 쇄는 중첩 전에 별개의 태그로 분리되었다. CCG MOE 2018.01 또는 2019.0101에서 잔기 특성 함수를 사용하여 잔기 표면 접근가능성을 계산하였다. 다중 상이한 중첩된 구조가 사용된 경우, 출력을 마이크로소프트 엑셀에서 분석하였다. CCG MOE에서 생성된 자동화된 서열 정렬을 사용하여 연관 표면 접근가능성 데이터와 함께 엑셀에서 단백질 서열을 수동으로 정렬하였다. 평균 "ASA (Å<sup>2</sup>)" [표면 접근가능한 구역] 및 "노출 (%)" [Gly-X-Gly 트리펩티드 펩티드 내의 잔기에 대한 백분율 표면 접근가능성] 값을 관련 구조에 걸쳐 평균화하고, 노출됨 (>36%) 또는 부분적으로 노출됨 (>9%)으로 주석을 달았다. 디플트 파라미터를 사용하여 CCG MOE 2019.0101 상동성 모델 함수를 사용하여 단백질 상동성 모델링을 수행하였다.
- [0936] CLDN3 돌연변이체 표적 세포주 생성. 밀리포어(MILLIPORE) 시그마는 15개의 상이한 카세트 (각각은 CLDN3 WT 또는 CLDN3 단일-포인트 아미노산 돌연변이체 (본원에서 "RKO KO 표적 세포"로 지칭됨)의 발현을 구동하는 EF1 알파 프로모터 및 RKO CLDN3 KO 세포 (본원에서 "RKO KO"로 지칭됨)에서 AAVS1 유전자좌에 있는 GFP를 코딩함)의 표적화된 통합을 사용하여 총 15개의 모노클로날 세포주를 생성하였다. 세포를 사용 전에 -150°C에서 저장하였다.
- [0937] 항-CLDN 3 906-mAb 생성. 항-CLDN3 906-mAb는 실험 N65028-27에 따라 생성되었으며 BIORAD에서 외부적으로 PE-접합되었다.
- [0938] 906-009\_LNGFR 및 UT- T 세포 생산. 이전 섹션에 약술된 바와 같이 T 세포를 생산하고 정규화하였다. 간략하게, CD4/CD8 T 세포를 인간 전혈로부터 단리하고 형질도입하고 확장하였다. -150°C에서 동결보존 및 저장 전에 세포를 30% 형질도입 효율에 대해 정규화하였다.
- [0939] RKO KO 표적 세포주의 배양. 10% FBS, 1% 글루타맥스 및 1% 피루브산나트륨을 함유하는 RPMI에서 세포를 배양하였다. 공동-배양 설정과 동일한 날짜에 유동 세포계측법을 사용하여 세포를 분석하였다.
- [0940] 공동-배양 및 유동을 위한 RKO KO 표적 세포주 준비. 모든 세포를 10% FBS, 1% 글루타맥스 및 1% 피루브산나트륨을 함유하는 RPMI에 시딩하였다. RKO KO 세포 (CLDN3에 대해 음성임, 사내에서 생성됨)를 음성 대조군 세포 주로서 사용하고, 시그마에 의해 생성된 RKO KO CLDN3 WT 세포를 양성 대조군 세포주로서 사용하였다. T75 플라스크로부터 배지를 제거하고, 플라스크당 3mL trypleE의 첨가 전에 플라스크를 PBS로 세척하였다. 세포를 5분 이상 방치하지 않고, 플라스크를 두드려서 세포를 제거하였다. TrypleE를 비활성화시키기 위해, 플라스크당 9mL 배지를 첨가하고, 뉴클레오카운터 NC-250을 사용하여 세포 카운트를 수행하였다. 플레이팅에 필요한 세포의 부피를 팔콘 튜브로 옮기고, 400 xg에서 5분 동안 원심분리하였다. 상청액을 제거하고, 세포를 3x10<sup>5</sup>개 세포/mL의 최종 농도로 플레이팅 배지에 재현탁하였다. 세포를 100uL 중 3x10<sup>4</sup>개 세포/웰로 96-웰 평면-바닥 플레이트에 3중으로 시딩하고, 공동-배양을 위한 T 세포를 준비하는 동안 1시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 인큐베이션하였다. 유동 세포계측법을 위해, 1x10<sup>5</sup>개 세포를 2중 96-웰 V-바닥 플레이트에 시딩하였다.
- [0941] T 세포의 해동 및 표적 세포와의 공동-배양. T 세포 (-150°C에서 저장됨)를 37°C로 해동하고, 10mL 가온된 플레이팅 배지에 적가하여 옮겼다. 세포를 400xg에서 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 제거하고, 5mL의 플레이팅 배지에 재현탁하였다. 뉴클레오카운터 NC-250을 사용하여 세포를 카운팅하였다. 표적 세포:형질도입된 T 세포의 1:1 비를 위해 세포를 표적 세포의 상단에 9x10<sup>4</sup>개 세포/웰로 시딩하였다. 공동-배양 플레이트를 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 인큐베이션하였다.
- [0942] 유동 세포계측법. RKO KO 표적 세포를 이전 섹션에 기재된 바와 같이 유동 세포계측법을 위해 시딩하였다. 웰을 유동 완충액 (PBS + 2% FBS + 2mM EDTA + 0.05% 아지드화나트륨)으로 도핑하고, 플레이트를 300xg에서 5분 동안 원심분리하였다. 상청액을 제거하고, 세포를 150uL 유동 완충액에 재현탁하였다. 플레이트를 300xg에서 5분 동안 원심분리하였다. 상청액을 제거하고, 세포를 1:100으로 10분 동안 실온에서 50uL IgG 블럭에 재현탁하였다. 인큐베이션 후, 플레이트를 상기와 같이 2회 세척하였다. 세포를 유동 완충액 중 50uL의 희석된 항체

(모두 1/300 희석) 또는 유동 완충액 단독 (비염색된 대조군)에 재현탁하였다. 세포를 30분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 플레이트를 150 $\mu$ L 유동 완충액으로 2회 세척하였다. 그 후, 세포를 살아있는 /죽은 염색으로서 1:200 농도의 DAPI를 함유하는 100 $\mu$ L 유동 완충액에 재현탁하였다. 세포를 사이토플렉스 S에서 즉시 실행하였다. 10,000개의 살아있는 세포의 정지 조건 (총>단일체>살아있는 기준)으로 빠른 유속으로 세포를 획득하였다.

[0943] MSD. 공동-배양 플레이트를 400xg에서 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 96-웰 V 바닥 플레이트로 옮기고, MSD 분석까지 -80 $^{\circ}$ C에서 저장하였다. 제조업체의 지침에 따라 IFN $\gamma$  MSD 검정을 수행하였다. 상청액을 실온으로 해동하고, 희석제 2에 적절하게 희석하였다. V-플렉스 MSD 플레이트를 플레이트 세척기를 사용하여 150  $\mu$ L의 PBS + 0.05% Tween (소텍스(Sodexo))로 3회 세척하였다. 인간 IFN $\gamma$  교정기를 1000  $\mu$ L의 희석제 2에 재구성하고, 실온에서 15분 동안 평형화하고, 간략하게 볼텍싱하였다. 희석제 2를 사용하여, 1:4 희석 시리즈를 수행하여 블랭크로서 희석제 2만을 포함하는 8-포인트 교정 곡선을 작성하였다. 각 플레이트를 50  $\mu$ L의 교정기 및 관련 샘플로 로딩하고, 밀봉하고, 실온에서 진탕하면서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 이전과 같이 세척하였다. 검출 항체를 희석제 3 (1:50)에 희석하고, 25  $\mu$ L를 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 밀봉하고, 실온에서 2시간 동안 진탕하면서 인큐베이션하였다. 플레이트를 이전과 같이 세척하고, MSD 색터 600 이미지에서 판독하기 전에 150  $\mu$ L의 2X 판독 완충액 T를 각 웰에 첨가하였다.

[0944] 데이터 분석: 유동 세포계측법. 플로우조를 사용하여 유동 세포계측법 데이터를 분석하였으며, 마이크로소프트 엑셀 및 RStudio에서 추가로 분석하였다. 906-mAb의 결합은 비염색된 대조군 상에 게이팅된 PE-양성 세포로서 결정된 반면, GFP-발현은 GFP-음성 RKO KO 대조군 세포주 상에 게이팅된 FITC-양성 세포로서 결정되었다. 게이트는 총 세포 > 단일체 > 살아있는 > 906-mAb-PE 양성 내에서 설정되었다 (도 55a). % PE-양성 세포 (살아있는 세포의 %로서) 및 중앙 형광 강도 (MFI)에 대한 통계를 플로우조에서 계산하고, 추가 분석을 위해 마이크로소프트 엑셀로 내보내었다. 통계적 분석을 R 버전 3.6.3에서 수행하였다. 간략하게, MFI는 log10 변환되었고, 혼합 모델은 세포주에 대한 고정 효과 및 플레이트에 대한 무작위 효과와 함께 사용된 반면, % 부모는 세포주에 대한 고정 효과 및 플레이트에 대한 무작위 효과가 있는 혼합 모델에서 선형 규모로 분석되었다.

[0945] 데이터 분석: IFN $\gamma$  방출의 MSD 분석. MSD WORKBENCH 소프트웨어를 사용하여 MSD 데이터를 분석하였다. 표준 및 미지물질을 각 MSD 플레이트의 관련 웰에 할당하였다. 교정기로부터의 원시 신호는 소프트웨어에 의해 사용되어 1/y2 가중치 함수를 사용하는 4-파라미터 로지스틱 모델 (또는 S자형 용량-반응)을 사용하여 표준 곡선을 생성하였다. 상대적 표준 곡선으로부터 미지의 샘플을 보간하고, 정의된 희석 인자를 곱하여 IFN $\gamma$ 의 '계산된 농도' (pg/mL)를 생성하였다. 이들 값을 통계적 분석 및 프레젠테이션용 데이터 플롯팅을 위해 마이크로소프트 엑셀로 내보내었다. 시토카인 방출은 log10 변환되었으며, CAR, 세포주 및 이들의 상호작용에 대한 고정 효과가 있는 혼합 모델을 사용하였다. 플레이트 및 공여자에 대해 무작위 효과를 사용하였다.

[0946] 결과

[0947] 돌연변이체 세포주 생성의 선택을 위한 단백질 구조 분석. 어떤 아미노산이 알라닌으로 돌연변이될 것인지 우선순위를 정하기 위해 인실리코 단백질 구조 분석을 수행하였다. 아미노산의 우선순위 지정은 906-009\_LNGFR 결합 에피토프의 일부가 될 가능성이 가장 높은 아미노산을 선택하기 위한 표면 접근가능성 예측에 기초하였다. 각 후속 단백질 분석에 대한 정보를 제공하기 위해 예비 시험관내 실험을 사용하여 순차적으로 분석을 수행하였다 (데이터는 제시되지 않음).

[0948] 분석 1. 인간 CLDN4 (PDB 5B2G), 마우스 CLDN15 (PDB 4P79) 및 마우스 CLDN19 (PDB 3X29)의 단백질 결정 구조를 CCG MOE 2018.01에서 정렬 및 중첩하였고, 평균 ASA 및 백분율 표면 노출을 오직 CLDN4 쇠 또는 모든 구조에 걸쳐 계산하고, 정렬된 CLDN3 단백질 서열에 맵핑하였다. 표면 접근가능성 예측은 알라닌 스캐닝 돌연변이유발을 위한 CLDN3 잔기를 선택하는데 사용되었으며, 초기에는 [1] CLDN4 쇠에 걸쳐 "노출된", [2] 모든 구조에 걸친 추가적인 "노출된" 잔기, [3] CLDN4 쇠에 걸쳐 "부분적으로 노출된", 및 [4] 모든 구조에 걸친 추가적인 "부분적으로 노출된" 잔기로서 카테고리화되었다. 선형 펩티드 스캐닝은 이전에 세포외 루프 2 (ECL2)를 잠재적으로 에피토프의 일부로서 식별하였으며, 따라서 이 정보는 하기 나열된 바와 같이 알라닌 스캐닝 돌연변이유발을 위한 "노출된" 잔기의 우선순위를 추가로 지정하기 위해 시각적으로 사용되었다.

[0949] 1. 공간적으로 관련된 ECL2 잔기: Phe146, Tyr147, Pro149, Leu150, Pro152 및 Glu153

[0950] 2. 공간적으로 관련된 ECL1 루프 1 잔기: Ile35, Gly36, Ser37, Asn38, Ile40 및 Thr41

[0951] 3. 공간적으로 관련된 ECL1 루프 3 잔기: Asp67, Ser68, Leu69, Leu70, Ala71, Leu72, Pro73 및 Gln74

- [0952] 4. ECL1 루프 2, 플러스 추가적인 공간적으로 덜 관련된 ECL1/2 잔기: Ser57, Thr58, Gly59, Gln60, Met61, Gln62, Cys63, Lys64, Val65, Gln77, Ala78, Asn140, Arg144, Lys156 및 Glu158
- [0953] 분석 2. 알라닌 스캐닝 돌연변이유발은 ECL2 내의 잔기 Glu153을 잠재적으로 에피토프의 일부로서 식별하였다. 인간 CLDN4 (PDB 5B2G)를 주형으로서 사용하여 인간 CLDN3의 상동성 모델을 생성하였다. ECL1의 2개의 고도로 표면 노출된 영역 (잔기 35-42 및 57-61)에 대해 평균 ASA 및 퍼센트 노출을 계산하였고, 알라닌 스캐닝 출력으로부터 ECL2에 대한 근접성과 조합하여, Ser37, Asn38, Gly36, Ile35, Ile40, Thr41, Ser57, Thr58, Gly59, Gln60에서 Met61 순서로 알라닌 스캐닝 돌연변이유발을 위해 이들 ECL1 잔기의 우선순위를 지정하는데 사용되었다.
- [0954] 분석 3. 추가적인 알라닌 스캐닝 돌연변이유발은 ECL1 내의 잔기 Asn 38을 잠재적으로 에피토프의 일부로서 추가로 식별하였다. 이 정보는 CCG MOE 2019.0101의 CLDN3 상동성 모델에 맵핑되었으며, 이전 돌연변이유발 데이터와 조합하여, 하기 제시된 바와 같이 추가적인 알라닌 스캐닝 돌연변이유발을 위한 추가 잔기를 시각적으로 선택하는데 사용되었다.
- [0955] 1. ECL2: Phe146, Tyr147 및 Gln155
- [0956] 2. ECL1: Gln43, Ile45, Gln56, Leu70 및 Ala71
- [0957] 분석 4. 인간 클라우딘 3, 4, 5, 6, 8, 9 및 17의 단백질 서열은 CCG MOE 2019.0101에서 수동으로 정렬되었다. CLDN4는 CAR-T IFN $\gamma$  검정에서 작은 신호를 나타내는 반면, 나열된 나머지 클라우딘 중 어느 것도 임의의 IFN $\gamma$  신호를 나타내지 않는다. 따라서 CLDN3 및 후가 클라우딘 패밀리 구성원 간에만 상이한 잔기가 관찰된 신호결여의 원인일 수 있다. (1) CLDN4와 상이하거나 또는 (2) 임의의 다른 CLDN 서열 (그러나 CLDN4는 아님)과 상이한 CLDN3의 세포외 루프 내의 잔기는 CLDN3 상동성 모델에 독립적으로 맵핑되었다. 그러나, CAR-T의 결합/효력에 영향을 미치는 이전 돌연변이의 위치와 조합된 정렬 및 구조에 대한 이들 후자 잔기의 분석은 알라닌 돌연변이유발을 위한 임의의 명백한 추가 잔기 위치를 식별할 수 없었다.
- [0958] 분석 5. CCG MOE 2019.0101을 활용하여 CLDN3 상동성 모델에 맵핑된 모든 알라닌 스캐닝 돌연변이유발 데이터의 추가 육안 검사를 사용하여 돌연변이유발을 위한 3개의 추가 잔기: Ala154, Phe34 및 Arg157을 선택하였다. 최종 RKO KO CLDN3 돌연변이체 세포는 이전 섹션에 기재된 바와 같이 이 단백질 구조 분석에 기초하여 생성되었다.
- [0959] 906-mAb 및 항-hCLDN3 결합의 유동 세포계측법 분석. CAR T 결합에 대한 CLDN3 돌연변이의 효과를 평가하기 위해, 906-mAb로 공지된 906-009\_LNGFR 결합 도메인을 구성하는 scFv의 모노클로날 항체 버전의 RKO KO 표적 세포에 대한 결합을 유동 세포계측법에 의해 평가하였다. 분석을 위한 세포주는 RKO KO, CLDN3 녹아웃 (음성 대조군으로서 포함됨), RKO KO CLDN3 돌연변이체 세포 (다양한 단일-아미노산 CLDN3 돌연변이 포함) 및 RKO KO CLDN3 WT 세포 (양성 대조군)를 포함하였다. RKO KO CLDN3 돌연변이체 세포주를 선택하고, 이전 섹션에 약속된 바와 같이 생성하였다.
- [0960] 906-mAb는 RKO KO CLDN3 WT 세포주 및 모든 RKO KO CLDN3 돌연변이체 세포에 대한 결합 (PE-MFI에 의해 표시된 바와 같음)을 나타내었으며, 단, WT와 비교하여 유의하게 저하된 906-mAb-PE MFI 및 % 906-mAb-PE 양성 집단을 나타낸 N38A 및 E153A 돌연변이체 세포주는 예외이다 (도 55b, 55c, 55d; 표 24, 25). 예상된 바와 같이, 906-mAb는 RKO KO 음성 대조군 세포주에 결합하지 않았다.
- [0961] GFP 발현은 RKO KO CLDN3 WT 및 돌연변이체 세포주 간에 유사하게 유지되었으며 (도 55b), 이는 906-mAb 결합의 차이가 총 CLDN3 단백질 발현의 차이로 인한 인공물이 아니라는 것을 시사한다.
- [0962] 이들 데이터는 CLDN3 단백질의 잔기 N38 및 E153의 돌연변이가 906-mAb의 결합 능력 저하를 유발한다는 것을 제시하며, 이는 이들 아미노산이 906-009\_LNGFR 결합 에피토프에 관련되어 있음을 시사한다.
- [0963] 표 24 - RKO KO CLDN3 WT 세포와 비교하여 RKO KO CLDN3 돌연변이체 세포에 대한 906-mAb 결합의 비교. 추정치는 CLDN3 WT 대비 MFI의 배수 변화이며, 여기서 1x는 동일함이다. CL = 신뢰 구간.

세포주	추정치	하위.CL	상위.CL	p.값
RKO KO	0.01	0	0.05	P<0.001
F34A	0.4	0.11	1.51	0.28
N38A	0.01	0	0.04	P<0.001
I39A	0.95	0.25	3.6	1
S42A	3.91	1.04	14.73	0.043
Q43A	2.68	0.71	10.12	0.216
I45A	3.17	0.84	11.94	0.109
N148A	2.75	0.73	10.39	0.195
P149A	2.03	0.54	7.66	0.545
V150A	2.98	0.79	11.26	0.141
P152A	5.07	1.34	19.11	0.013
E153A	0.01	0	0.05	P<0.001
Q155A	3.4	0.9	12.83	0.08
K156A	0.73	0.19	2.76	0.971
R157A	1.31	0.35	4.93	0.985

[0964]

[0965]

표 25 - RKO KO CLDN3 WT 세포와 비교하여 RKO KO CLDN3 돌연변이체 세포에 대한 906-mAb 결합의 비교. 추정치는 CLDN3 WT 대비 % 부모의 변화이며, 여기서 0%는 변화 없음이다. CL = 신뢰 구간.

세포주	추정치	하위.CL	상위.CL	p.값
RKO KO	-99.72	-102.33	-97.11	P<0.001
F34A	-0.95	-3.56	1.66	0.845
N38A	-99.16	-101.78	-96.55	P<0.001
I39A	0.1	-2.51	2.71	1
S42A	0.1	-2.51	2.71	1
Q43A	0.1	-2.51	2.71	1
I45A	0.05	-2.56	2.66	1
N148A	0.1	-2.51	2.71	1
P149A	0.1	-2.51	2.71	1
V150A	0	-2.61	2.61	1
P152A	0.1	-2.51	2.71	1
E153A	-94.52	-97.14	-91.91	P<0.001
Q155A	0.1	-2.51	2.71	1
K156A	0.05	-2.56	2.66	1
R157A	0.1	-2.51	2.71	1

[0966]

[0967]

표 26 - RKO KO CLDN3 WT 세포와 비교하여 RKO KO CLDN3 돌연변이체 세포와 906-009\_LNGFR의 공동-배양 후 IFN  $\gamma$  방출 (비형질도입된 T 세포에 대해 정규화됨). 추정치는 CLDN3 WT 내 IFN  $\gamma$  의 %로서 IFN  $\gamma$  이며, 여기서 100%는 동일함이다. CL = 신뢰 구간.

세포주	추정치	하위.CL	상위.CL	p.값
RKO KO	0.19	0.11	0.32	P<0.001
F34A	79.74	47.25	134.57	0.395
N38A	0.11	0.07	0.19	P<0.001
I39A	71.45	42.34	120.58	0.207
S42A	95.23	56.43	160.7	0.854
Q43A	72.63	43.04	122.56	0.23
I45A	66.09	39.16	111.53	0.12
N148A	104.38	61.85	176.15	0.872
P149A	95.53	56.61	161.21	0.863
V150A	91.26	54.08	154	0.731
P152A	61.57	36.48	103.9	0.069
E153A	3.56	2.11	6.01	P<0.001
Q155A	86.26	51.12	145.57	0.579
K156A	101.26	60	170.87	0.963
R157A	106.81	63.29	180.25	0.804

[0968]

[0969]

RKO 표적 세포주와 906-009\_LNGFR의 공동-배양 후 IFN $\gamma$  시토카인 분비. 시토카인 분비는 항원 결합에 대한 T 세포 반응의 일부이며, IFN $\gamma$  방출의 검출을 사용하여 CAR T 활성화에 대한 CLDN3 돌연변이의 효과를 결정하였다. RKO KO 표적 세포와 906-009\_LNGFR의 24시간 공동-배양 후 IFN $\gamma$  시토카인 방출을 측정하였다. 예상된 바와 같이, RKO KO 세포 (CLDN3 음성)와 906-009\_LNGFR의 공동-배양은 T 세포 단독 대조군에서의 수준 이상으로 IFN $\gamma$ 를 유도하지 않았다 (데이터는 제시되지 않음). IFN $\gamma$  분비는 WT와 비교하여 N38A 및 E153A 돌연변이체 세포주 단독과의 906-009\_LNGFR 공동-배양 후 유의하게 감소되었다 (두 돌연변이체 모두에 대해 0.01의 배수-변화, P<0.001). 일치하는 공여자로부터의 비형질도입된 T 세포와의 공동-배양에서 IFN $\gamma$  분비에 대해 데이터를 정규화하였다 (도 56; 표 26). S42A, P152A 및 Q155A 돌연변이체 세포주와의 공동-배양은 WT와 비교하여 IFN $\gamma$  분비의 작지만 유의한 증가를 초래하였다 (p<0.05) (표 26). 그러나, 이들 돌연변이체에 대한 % 906-mAb-PE 양성 세포 집단은 WT 세포와 비교하여 유의하게 저하하지 않았고, 또한 이들 돌연변이체 세포와의 공동-배양 후 906-009\_LNGFR IFN $\gamma$  방출의 유의한 저하가 없었으므로, 이는 MFI에 대한 이들 관찰이 생물학적으로 관련이 있을 가능성은 거의 없다. 이들 데이터는 CLDN3 (예를 들어, 서열식별번호: 13 참조) 단백질의 잔기 N38 및 E153의 돌연변이가 906-009\_LNGFR이 표적 세포에 의해 활성화되는 능력을 저하시킨다는 것을 시사한다.

[0970]

이 연구의 목적은 906-009\_LNGFR 결합 및 활성화에 필요한 아미노산 잔기를 결정함으로써 906-009\_LNGFR 에피토프를 식별하는 것이었다. CLDN3 세포의 루프 둘 다에 걸쳐 단일-아미노산을 알라닌으로 돌연변이시킴으로써 도구 세포주를 생성하였다. 유동 세포계측법을 사용하여 이들 변경 중 어느 것이 CAR 결합 (906-009\_LNGFR scFv 결합 도메인의 모노클로날 항체 버전인 906-mAb의 결합에 의해 측정됨)을 감소시키는지 식별하였으며, 돌연변이체 세포주와의 CAR T 공동-배양 후 IFN $\gamma$  분비의 평가는 돌연변이가 CAR T 활성화를 감소시키는지 여부를 결정하는 것이었다.

[0971]

테스트된 돌연변이 중에서 CLDN3 아미노산 잔기 N38 및 E153의 돌연변이만이 906-mAb의 결합의 유의한 저하를 유발하였다. 이들 돌연변이는 또한 배타적으로 906-009\_LNGFR의 활성화의 유의한 저하를 유발하였다. 종합하면, 이들 데이터는 N38 및 E153 잔기가 906-009\_LNGFR (및 SO-CD20-906\_009) 결합 에피토프의 일부이고 906-009\_LNGFR 표적 결합 및 후속 활성화에 중요하다는 것을 시사한다. 이들 데이터는 또한 CAR 에피토프가 CLDN3 단백질의 ECL-1 (N38) 및 ECL-2 (E153) 둘 다에 걸쳐 비선형적이고 불연속적이라는 것을 제시한다.

[0972]

전반적으로, 이 연구로부터의 데이터는 잔기 N38 및 E153이 돌연변이될 때 906-009\_LNGFR (및 SO-CD20-906\_009)의 활성화 및 결합 둘 다의 저하를 제시하며, 이는 이들 아미노산이 CLDN3 CAR 에피토프에서 중요하다는 강력한 증거를 제공한다.

[0973]

본 발명의 바람직한 실시양태가 본원에 제시되고 설명되었지만, 이러한 실시양태는 단지 예로서 제공된다는 것이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 본 발명을 벗어나지 않으면서 관련 기술분야의 통상의 기술자는 이제 수많은 변이, 변화 및 치환을 할 수 있을 것이다. 본원에 기재된 본 발명의 실시양태에 대한 다

양한 대안이 본 발명을 실시하는데 사용될 수 있다는 것이 이해되어야 한다.

서열 목록

SEQ ID NO: 1: 906 CDRH1  
NYWVH

SEQ ID NO: 2: 906 CDRH2  
RIEPNSSGSQYNEKFKN

SEQ ID NO: 3: 906 CDRH3  
GVMVPLDY

SEQ ID NO: 4: 906 CDRL1  
KASQDINRYIA

SEQ ID NO: 5 906 CDRL2  
YTSTLQP

SEQ ID NO: 6 906 CDRL3  
LQYETLYS

SEQ ID NO: 7: 906 VH  
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYFTFTNYVHWVRQAPGQGLEWMGRIEPNSSGSQYNEKFKNR  
VTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGVMVPLDYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 8: 906 VL  
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINRYIAWYQKPKGKAPKLLIHYTSTLQPGVPSRFSGSGSGTD  
FTLTISSLQPEDFATYYCLQYETLYSFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 9: 클리신-세린 링커  
GGGSGGGSGGGSGGGGS

SEQ ID NO: 10: CD8 리더 서열  
MALPVTALLLPLALLHAARP

SEQ ID NO: 11: 906 scFv (VL-VH 배향)

[0974]

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCKASQDINRYIAWYQQKPGKAPKLLIHYTSTLQPGVPSRFSGSGSGTD  
FTLTISSLQPEDFATYYCLQYETLYSFGQGTKLEIKGGGGSGGGSGGGSGGGGSQVLVQSGAEVKKP  
GSSVKVSCASGYTFTNYVWHWRQAPGQGLEWMGRIEPNSSGSQYNEKFNKRVTTITADKSTSTAYME  
LSSLRSEDNAVYVCARGVMVPLDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 12: 906\_009 전체 CAR 서열

MALPVTALLPLALLLHAARPDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCKASQDINRYIAWYQQKPGKAPKLLIHY  
TSTLQPGVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCLQYETLYSFGQGTKLEIKGGGGSGGGSGGGG  
SGGGGSQVLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTNYVWHWRQAPGQGLEWMGRIEPNSSGSQYN  
EKFNKRVTTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYVCARGVMVPLDYWGQGLTVTVSSATTTTPAPRPPTPA  
PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPF  
MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDRRGR  
DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUAL  
PPR

SEQ ID NO: 13: 인간 클라우딘-3

MSMGLGITGALAVLWGLTIVCCALPMWRVSAFIGSNIITSQNIWEGLWMNCVVQSTGQMCKVYDS  
LLALPQDLQAARALIVVAILLAFAFLLVALVGAQCTNCVQDDTAKAKITIVAGVLFLLAALLTLVPVSWSAN  
TIIRDFYNPVVPEAQKREMGAGLYVWGAAALQLLGGALLCCSCPPREKKTATKVVYSAPRSTGPGASL  
GTGYDRKDYY

SEQ ID NO: 14: 인간 클라우딘-3 ECL2

WSANTIIRDFYNPVVPEAQKREMGAGLY

SEQ ID NO: 15: PVVP 에피토프

PVVP

SEQ ID NO: 16: 906 scFv를 코딩하는 Nt 서열 (VL-VH 배향)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGAGACAGGGTGACCATCACCT  
GCAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGGTACATCGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCCAA  
GCTGCTGATCCACTACACCAGCACCTGCAGCCGGCGTGCCCTCTAGGTTTAGCGGCAGCGGCAGC  
GGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTCCAGCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCA  
GTACGAGACCTGTACAGCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATTAAGGGCGGAGGTGGGAGCGGC  
GGAGGAGGCAGCGCGGAGCGGTAGCGGGGGCGGAGGCAGCCAGGTGCAGCTCGTGCAGAGCGG  
AGCCGAGGTGAAAAAGCCCGAAGCTCTGTCAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGTACACCTTACC

[0975]

AACTACTGGGTGCACTGGGTGAGGCAGGCTCCCGGACAGGGCCTGGAGTGGATGGGCAGGATCGAG  
 CCCAACAGCAGCGGCAGCCAGTACAACGAGAAGTTCAAGAACAGGGTGACCATCACCGCCGACAAGA  
 GCACCAGCACCGCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGGAGCGAGGACACCGCCGTGTATTACTGGCGC  
 CAGGGGCGTGATGGTGCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACAGTGAAGCAGC  
 SEQ ID NO: 17: 906\_009 전체 CAR 서열을 코딩하는 nt seq  
 ATGACCACCCCAAGAACTCCGTGAACGGCACCTTCCCGCCGAGCCAATGAAGGGCCCTATCGCTAT  
 GCAGAGCGGCCCAAGCCCTGTTGAGGAGGATGTCAAGCCTCGTGGGCCCTACCCAGAGCTTCTTC  
 ATGAGGGAGAGCAAGACCCCTGGGCGCCGTGCAGATCATGAACGGCCTTCCATATCGCCCTGGGCG  
 GCCTGCTGATGATCCCCGCTGGCATTACGCCCCATCTGCGTGACCGTGTGGTATCCCTGTGGG  
 CGGCATCATGTACATCATTAGCGGGAGCCTGCTGGCCGCCACCGAGAAGAAGTCTCGGAAGTGCTG  
 GTGAAGGGCAAGATGATCATGAACAGCCTGAGCCTTTCGCCGCATCTCCGGCATGATCTGAGCAT  
 CATGGACATCCTGAACATCAAGATCAGCCACTTCTGAAGATGGAAGCCTCAACTTCATCAGGGCCC  
 ACACCCCTACATCAACATCTACAAGTGCAGCCCGCAATCCAGCGAGAAGAAGCAGCCCAAGCACC  
 CAGTACTGCTACAGCATCCAGAGCCTGTTCTCGGCATCCTGAGCGTGTGCTGATCTTCGCTTCTT  
 CCAAGAGCTGGTGATCGCGGCATCGTGGAGAAGCAGTGGAAGAGGACCTGCAGCAGGCCAAAGAGC  
 AACATCGTGTGCTGAGCGCCGAGGAGAAGAAGGAGCAGACTATCGAGATCAAGGAGGAGGTGGTGG  
 GCCTGACAGAGACCAGCAGCCCAAGAACGAGGAGGACATCGAGATCATCCCATCCAGGAGGA  
 GGAGGAGGAGAAACCAGACCAACTTCCCGAGCCCCCAGGATCAGGAGTCTAGCCCATCGAG  
 AACGACAGCAGCCCCGCGCAGCGGCAAAAAGGAGCGGCGAGCGGCAACCAACTTCAGCCTGCTGA  
 AGCAGGCCGAGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCAATGGCACTGCCAGTACCCTCTGCTGCTGCC  
 CCTGGCCCTGCTGCTGCACGCCGCCAGGCCGATATTAGATGACCCAGTCCCCTCTAGCCTGAGCG  
 CCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGATACATCGCCTG  
 GTACCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCCACTACCCAGCACCCTGCAGCCCGGCG  
 TGCCTAGCAGATTTAGCGGCAGCGCAGCGGACCGACTTACCCTGACTATCAGCAGCCTGCAGCCC  
 GAGGACTTCGCCACCTACTACTGCTGAGTACGAGACACTGTACAGCTTCGGCCAGGGCACCAAGCT  
 GGAAATTAAGCGGAGGCGGCGAGCGGCGGCGGCTCAGGCGGCGGAGGAGCGGCGGCGGGG  
 GCAGCCAGTGCAGTGGTCCAGAGCGGCGGAGGTGAAAAAGCCCGGCGCAGCGTGAAAGTGTG  
 CTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTACCAACTACTGGGTGCACTGGGTCCGGCAGGCCCCCGGCCAG  
 GGACTGGAGTGGATGGGAGGATCGAGCCTAACAGCAGCGGCGAGCCAGTACAACGAGAAGTTCAAGA  
 ACAGGGTGACCATCACCGCCGACAAGAGCACCAGCACCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGCGCAG  
 CGAAGACACCGCGTGTATTACTGCGCCAGGGGCGTGATGGTGCCCTGGACTACTGGGACAGGGC  
 ACCCTGGTGACCGTGAAGCAGCCTTACCACAACCCCGCTCCAGGCCCCCAACCTGCCCCCAC  
 CATTGCCTACAACCCCTGAGCCTGAGGCCCGAGGCCTGTAGGCCCGCCCGGAGGCGCGGTGCAC  
 ACCAGGGGCGCTGGACTTCGCTGCGCATCTATCTGGGCCCCCTGGCCGGAACCTGTGGCGTGC  
 TGCTCCTGAGCCTGGTGTACCCCTGTACTGCAAGCGGGCAGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTCAA

[0976]

GCAGCCCTTCATGAGCCCGTCCAGACCACCCAGGAGGAGGACGGGTGCAGCTGCAGGTTTCCCGAA  
GAGGAGGAAGGCGGCTGCGAGCTGAGGGTCAAGTTTAGCAGGAGCGCCGACGCTCCCGCTACCAGC  
AAGGGCAGAATCAGCTCTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGGAGGGAGGAGTACGACGTGCTGGACAA  
AAGGAGGGGACGGACCCGAGATGGGCGGCAAGCCAGAAGGAAGAACCCCGAGGAGGGCTGTA  
CAACGAGCTGCAGAAGGACAAAATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGAGGAGG  
AGGGGCAAGGGCCACGACGGCTGTACCAGGCCTGAGCACCCTACCAAGGACACCTACGACGCC  
TGCACATGCAGGCCCTGCCTCCAGATGA

SEQ ID NO: 18: 906 scFv (VH-VL 배향)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYFTFTNYWVHWVRQAPGQGLEWMGRIEPNSSGSQYNEKFKNR  
VTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGVMVPLDYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGG  
GSDIQMTQSPSSLSASVGRVITCKASQDINRYIAWYQKPKGKAPKLLIHYTSTLQPGVPSRFSGSGSG  
TDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYETLYSFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 19: CD8 막횡단 도메인

IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC

SEQ ID NO: 20: 4-1BB 공동-자극 도메인

KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

SEQ ID NO: 21: CD3z 세포내 신호전달 도메인

RVKFRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA  
EAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO: 22: 인간 CD20

MTTPRNSVNGTFPAEPMKGPIAMQSGPKPLFRRMSSLVGPTQSFFMRESKTLGAVQIMNGLFHIALGGLL  
MIPAGIYAPICVTWVYPLWGGIMYIISGSLAATEKNSRKCLVKGMIMNSLFAAISGMILSIMDILNIKI  
SHFLKMESLNFIRAHTPYINIYNCEPANPSEKNPSTQYCYISQLFLGILSVMLIFAFFQELVIAGIVENEW  
KRTCSRPKSNIVLLSAEEKKEQTIEIKEEVVGLTETSSQPKNEEDIEIIPIQEEEEETETNFPEPPQDQESSP  
IENDSSP

SEQ ID NO: 23: P2A 절단 부위

GSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGP

SEQ ID NO: 24: HCD20 및 906\_009 CAR 서열을 포함하는 폴리펩티드

MTTPRNSVNGTFPAEPMKGPIAMQSGPKPLFRRMSSLVGPTQSFFMRESKTLGAVQIMNGLFHIALGGLL

[0977]



AEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO: 28: 906\_010 전체 CAR 서열

MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINRYIAWYQQKPGKAPKLLIHY  
TSTLQPGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYETLYSFGQGTKLEIKGGGGSGGGGGSGGGG  
SGGGGSQVLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTNYWVHWVRQAPGQGLEWMGRIEPNSSGSQYN  
EKFKNRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGVMVPLDYWGQGLTVTVSSASESKYGPPCPPCP  
IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSR  
SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI  
GMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO: 29: 906\_002 전체 CAR 서열

MALPVTALLLPLALLLHAARPVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTNYWVHWVRQAPGQGLEW  
MGRIEPNSSGSQYNEKFKNRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGVMVPLDYWGQGLTVTVS  
SGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINRYIAWYQQKPGKAPKLLI  
HYTSTLQPGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYETLYSFGQGTKLEIKASESKYGPPCPPCP  
APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYR  
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKS  
LSLSLGIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE  
LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM  
AEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO: 30: 906\_005 전체 CAR 서열

MALPVTALLLPLALLLHAARPVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTNYWVHWVRQAPGQGLEW  
MGRIEPNSSGSQYNEKFKNRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGVMVPLDYWGQGLTVTVS  
SGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINRYIAWYQQKPGKAPKLLI  
HYTSTLQPGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYETLYSFGQGTKLEIKASESKYGPPCPPCP  
IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSR  
SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI  
GMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO: 31: 스페이서 L

ESKYGPPCPPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT  
KPREEQFQSTYRVSLSLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT

[0979]

KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM  
HEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO: 32:       스페이서 S  
TTTTAPRPPTPAPTIASQP LSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

SEQ ID NO: 33:       스페이서 XS  
ESKYGPPCPPCP

SEQ ID NO: 34:       CD8 리더 서열이 없는 906\_009 전체 CAR 서열  
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINRYIAWYQQKPKAPKLLIHYTSTLQPGVPSRFSGSGSGTD  
FTLTISSLQPEDFATYYCLQYETLYSFGQGTKLEIKGGGGSGGGSGGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKP  
GSSVKVSCKASGYFTFTNYVWHWVRQAPGQGLEWMGRIEPNSSGSQYNEKFKNRVTITADKSTSTAYME  
LSSLRSEDTAVYYCARGVMVPLDYWGQGLTVVSSASTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG  
AVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE  
EEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE  
LQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLPPR

SEQ ID NO: 35:       CD8 리더 서열이 없는 906\_004 전체 CAR 서열  
QVQLVQSGAEVKKPQSSVKVSCKASGYFTFTNYVWHWVRQAPGQGLEWMGRIEPNSSGSQYNEKFKNR  
VTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGVMVPLDYWGQGLTVVSSGGGGSGGGSGGGGGSGGG  
GSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINRYIAWYQQKPKAPKLLIHYTSTLQPGVPSRFSGSGSG  
TDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYETLYSFGQGTKLEIKASTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG  
GAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE  
EEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN  
ELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLPPR

SEQ ID NO: 36:       CD8 리더 서열이 없는 906\_007 전체 CAR 서열  
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINRYIAWYQQKPKAPKLLIHYTSTLQPGVPSRFSGSGSGTD  
FTLTISSLQPEDFATYYCLQYETLYSFGQGTKLEIKGGGGSGGGSGGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKP  
GSSVKVSCKASGYFTFTNYVWHWVRQAPGQGLEWMGRIEPNSSGSQYNEKFKNRVTITADKSTSTAYME  
LSSLRSEDTAVYYCARGVMVPLDYWGQGLTVVSSASESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI  
SRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC  
KVSNGKLPSSIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  
KTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGKIYWAPLAGTCGVL

[0980]

LLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQN  
QLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH  
DGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

SEQ ID NO: 37: CD8 리더 서열이 없는 906\_010 전체 CAR 서열  
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINRYIAWYQQKPKAPKLLIHYTSTLQPGVPSRFSGSGSGTD  
FTLTISSLQPEDFATYYCLQYETLYSFGQGTKLEIKGGGGSGGGSGGGSGGGGSQVLVQSGAEVKKP  
GSSVKVSKASGYTFTNYVWHVWRQAPGQGLEWMGRIEPNSSGSQYNEKFKNRVTITADKSTSTAYME  
LSSLRSEDVAVYYCARGVMVPLDYWGQGLTVTVSSASESKYGPPCPPCIYIWAPLAGTCGVLLSLVITL  
YCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN  
LRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH  
DGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

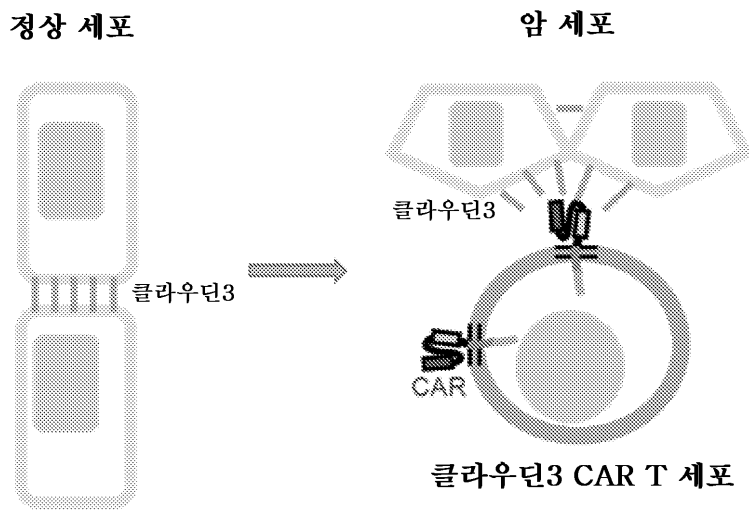
SEQ ID NO: 38: CD8 리더 서열이 없는 906\_002 전체 CAR 서열  
QVQLVQSGAEVKKPSSVKVSKASGYTFTNYVWHVWRQAPGQGLEWMGRIEPNSSGSQYNEKFKNR  
VTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGVMVPLDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGG  
GSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINRYIAWYQQKPKAPKLLIHYTSTLQPGVPSRFSGSGSG  
TDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYETLYSFGQGTKLEIKASESKYGPPCPPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL  
MISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEY  
KCKVSNKGLPSSIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN  
NYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLKIYIWAPLAGTCG  
VLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQ  
NQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH  
DGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

SEQ ID NO: 39: CD8 리더 서열이 없는 906\_005 전체 CAR 서열  
QVQLVQSGAEVKKPSSVKVSKASGYTFTNYVWHVWRQAPGQGLEWMGRIEPNSSGSQYNEKFKNR  
VTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGVMVPLDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGG  
GSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINRYIAWYQQKPKAPKLLIHYTSTLQPGVPSRFSGSGSG  
TDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYETLYSFGQGTKLEIKASESKYGPPCPPCIYIWAPLAGTCGVLLSLVIT  
LYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN  
LRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH  
DGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

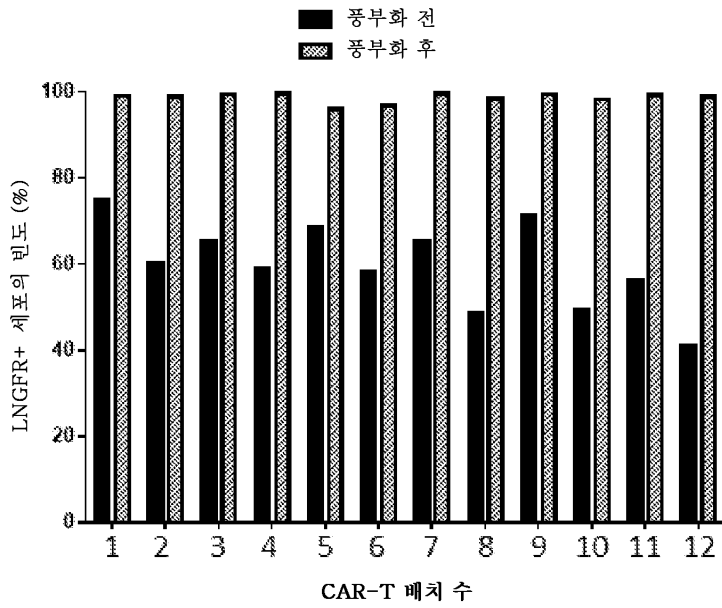
[0981]

도면

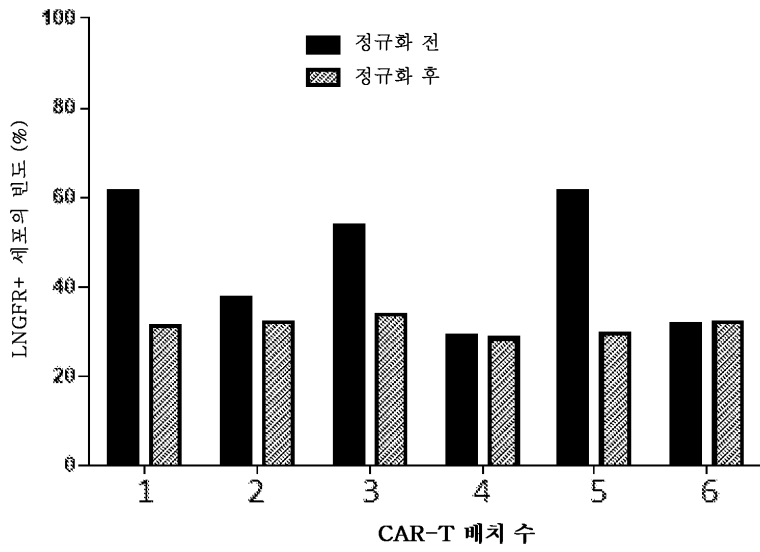
도면1



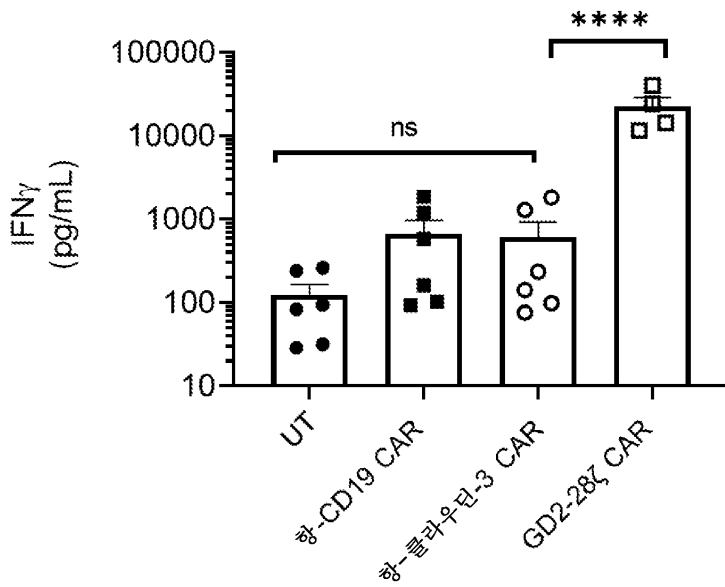
도면2a



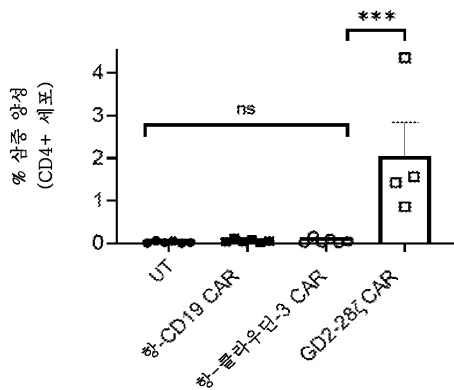
도면2b



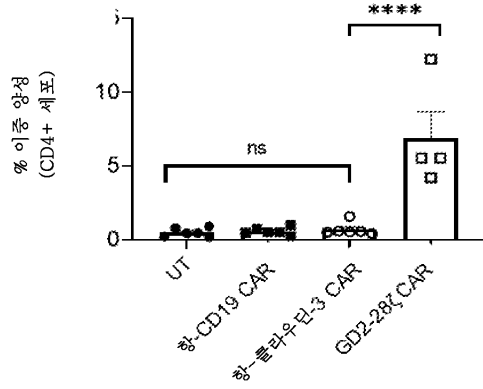
도면3a



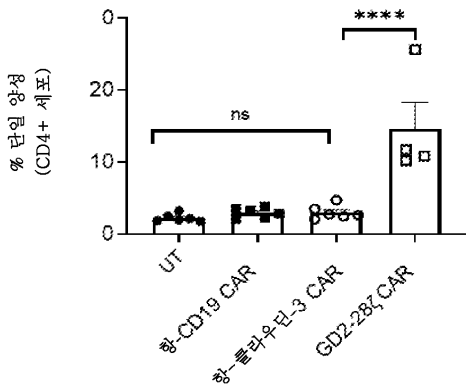
도면3b



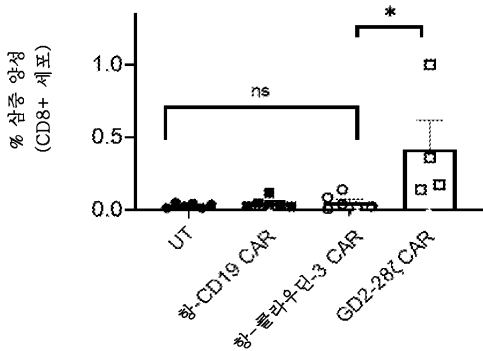
도면3c



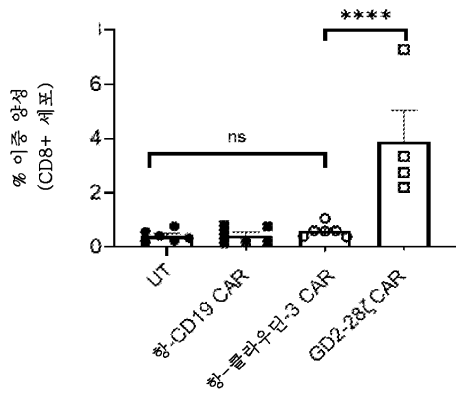
도면3d



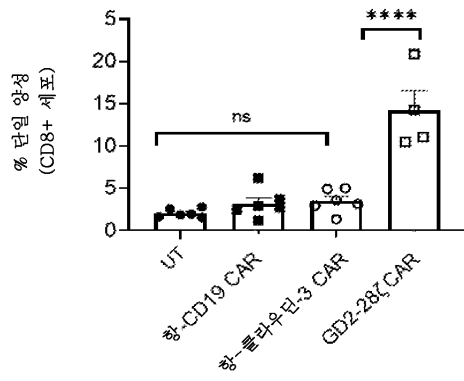
도면3e



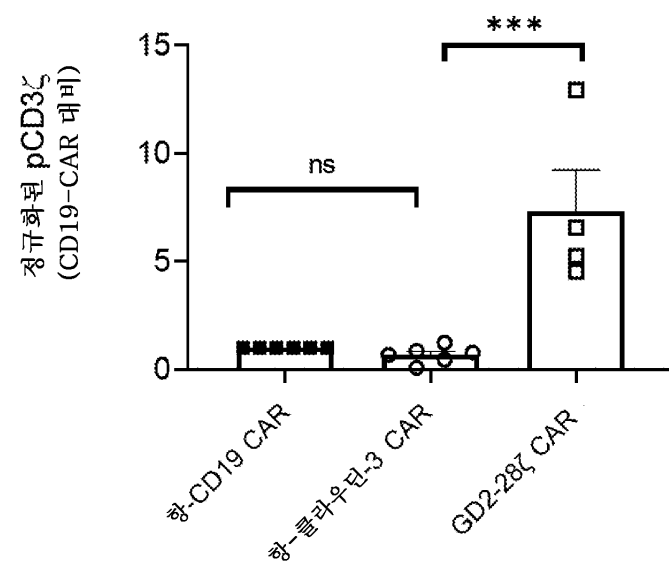
도면3f



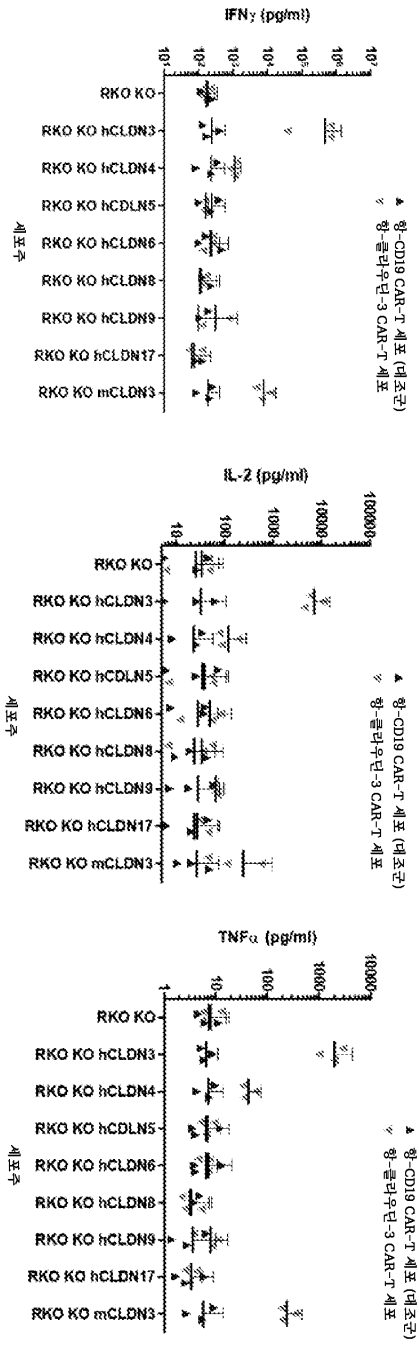
도면3g



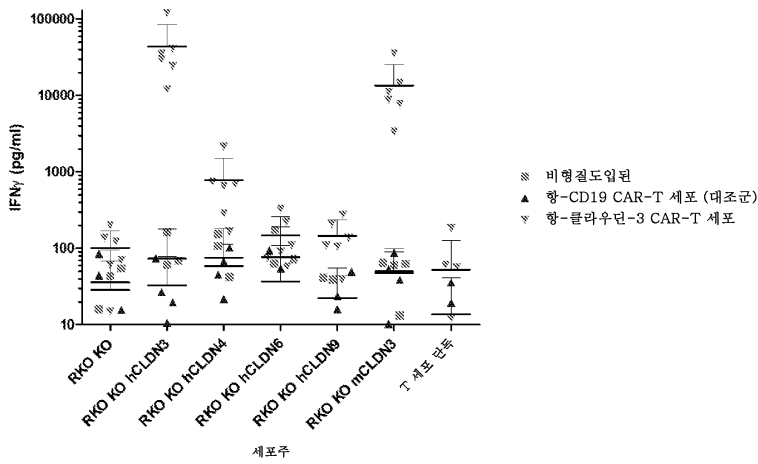
도면3h



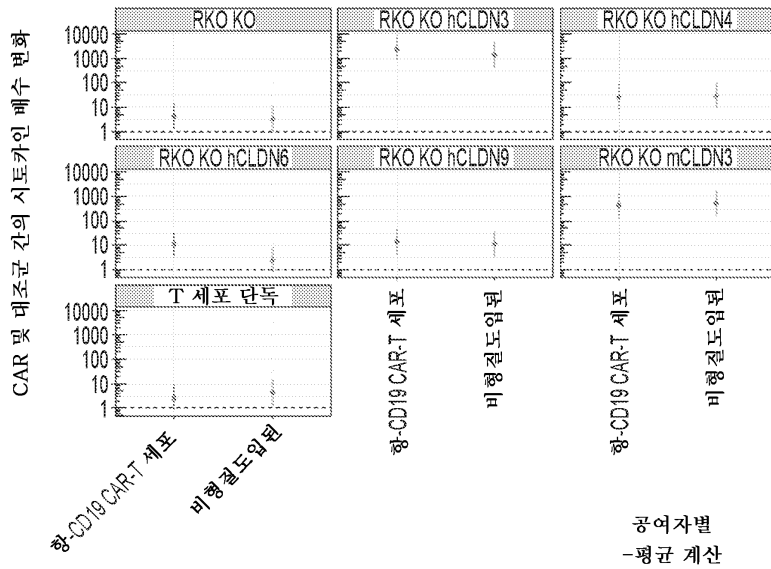
도면4a



도면4b



도면4c



도면4d

IFN $\gamma$

		RKO KO	RKO KO hCLDN3	RKO KO mCLDN3	RKO KO hCLDN9	RKO KO hCLDN6	RKO KO hCLDN4	RKO KO hCLDN5	RKO KO hCLDN8	RKO KO hCLDN17
G5	비형질도입된	40	38	50	7	38	52	53	14	7
	항-클라우딘-3 CAR	39	12934	680	14	20	77	37	12	21
H5	비형질도입된	17	22	22	10	15	20	16	17	13
	항-클라우딘-3 CAR	25	12923	238	13	20	53	17	9	13
92024	비형질도입된	3040	3795		396	3633	2014			
	항-클라우딘-3 CAR	4767	113008		4458	4014	4274			
12031	비형질도입된	1146	1105		1289	1151	990			
	항-클라우딘-3 CAR	1298	62948		1081	830	2192			
C1700657	항-CD19 CAR	12544	11419	14850	8757	10620	7673			
	항-클라우딘-3 CAR	14814	583672	114504	17517	16621	12348			
D5	비형질도입된	64	54	35	53					
	항-클라우딘-3 CAR	151	21269	21269	712					
C1700658	비형질도입된	38104	36396	33746	26421	31363	35520			
	항-CD19 CAR	19091	19606	19318	20678	16079	21291			
	항-클라우딘-3 CAR	20380	254070	58439	25425	17469	28925			

도면4e

IL2

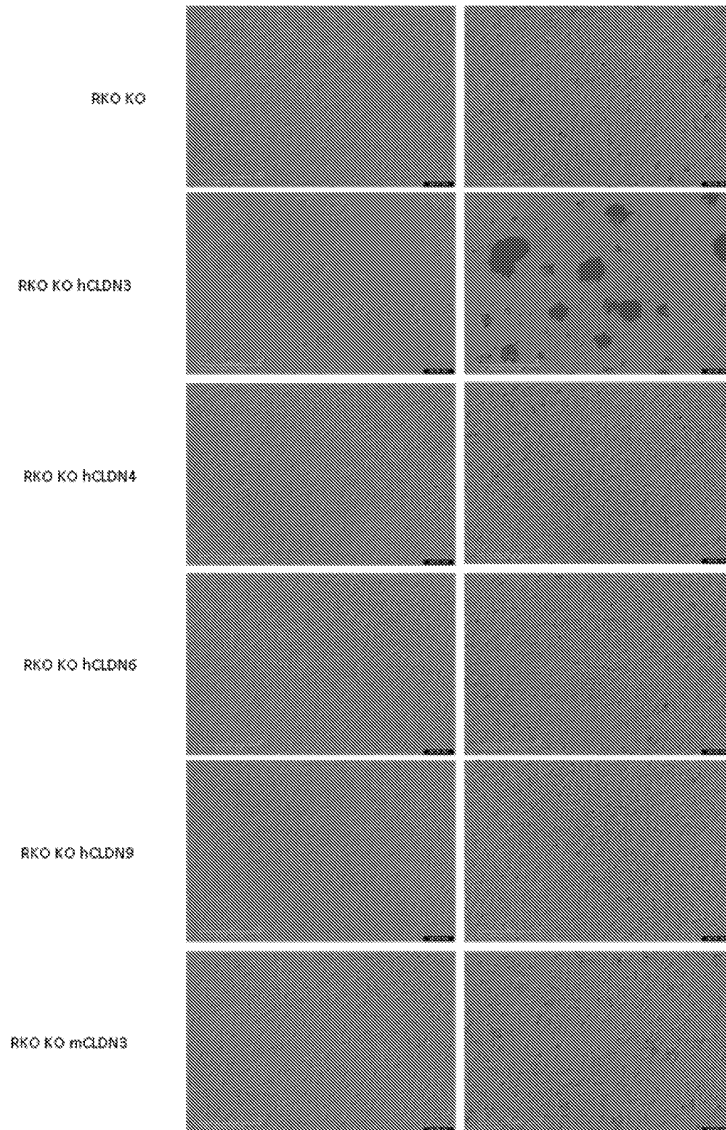
		RKO KO	RKO KO hCLDN3	RKO KO mCLDN3	RKO KO hCLDN9	RKO KO hCLDN6	RKO KO hCLDN4	RKO KO hCLDN5	RKO KO hCLDN8	RKO KO hCLDN17
G5	비형질도입된	14	17	15	4	15	15	14	6	5
	항-클라우딘-3 CAR	13	1516	57	8	12	23	11	7	7
H5	비형질도입된	9	10	8	4	8	10	12	7	6
	항-클라우딘-3 CAR	13	594	19	6	10	15	12	6	6
92024	비형질도입된	42	57		69	65	46			
	항-클라우딘-3 CAR	16	12917		26	34	22			
12031	비형질도입된	25	26		24	19	14			
	항-클라우딘-3 CAR	16	14992		24	17	39			
C1700657	항-CD19 CAR	673	373	457	346	384	68			
	항-클라우딘-3 CAR	519	17729	2084	670	587	133			
D5	비형질도입된	13	13	11	14					
	항-클라우딘-3 CAR	20	21269	21269	82					

도면4f

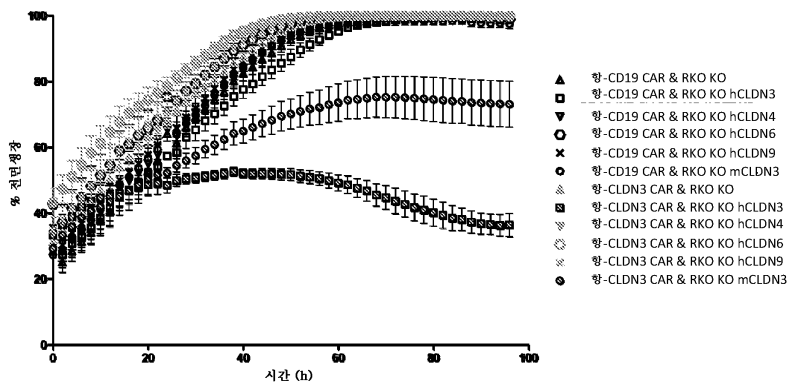
TNF $\alpha$

		RIKO KO	RIKO KO hCLDN3	RIKO KO mCLDN3	RIKO KO hCLDN9	RIKO KO hCLDN6	RIKO KO hCLDN4	RIKO KO hCLDN5	RIKO KO hCLDN8	RIKO KO hCLDN17
G5	비형질도입된	3	2	1	3	2	3	2	1	
	항-클라우딘-3 CAR	2	2	1	1	5	1	2	1	
H5	비형질도입된	2	2	1	2	2	2	2	1	
	항-클라우딘-3 CAR	1	2	1	2	4	2	1	2	
92024	비형질도입된	3033	555		3045	552	1126			
	항-클라우딘-3 CAR	1249	2676		3171	1052	1170			
12031	비형질도입된	301	290		315	302	259			
	항-클라우딘-3 CAR	207	2362		381	217	574			
C1700657	항-CD19 CAR	201	157	189	144	142	115			
	항-클라우딘-3 CAR	207	2013	1495	421	584	296			
D5	비형질도입된	5	5	5						
	항-클라우딘-3 CAR	5	271	264	39					

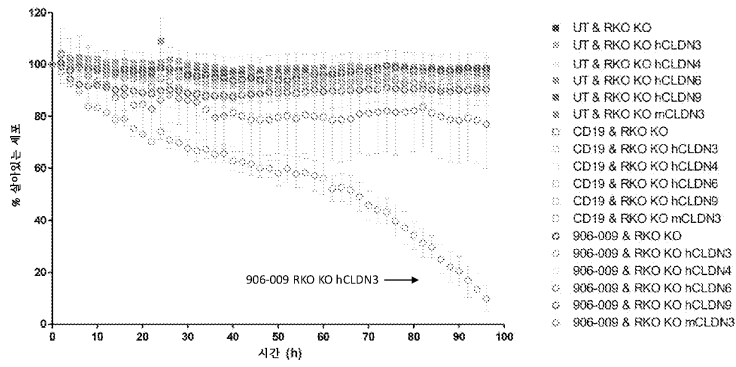
도면5a



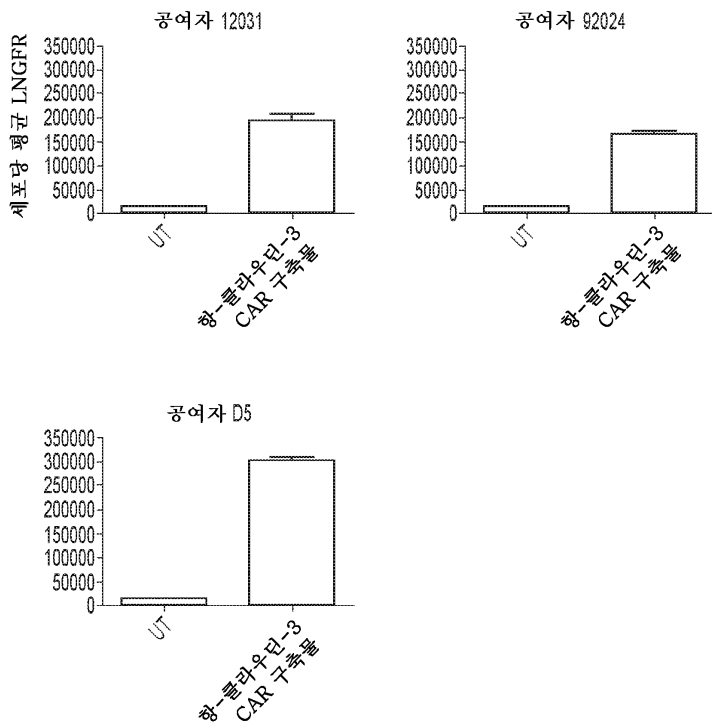
도면5b



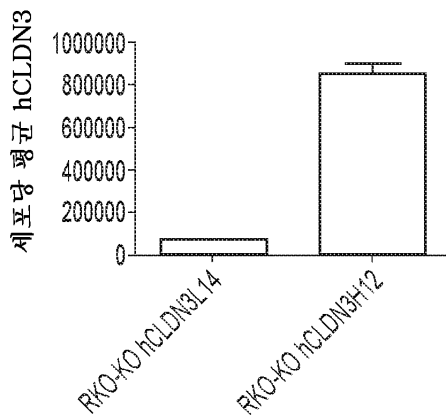
도면6



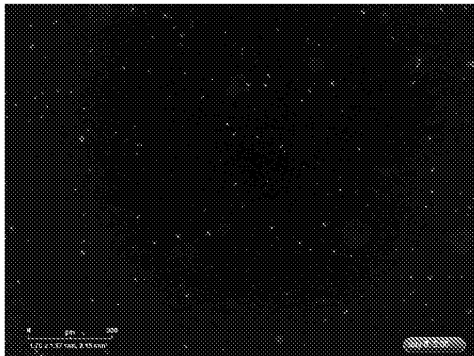
도면7a



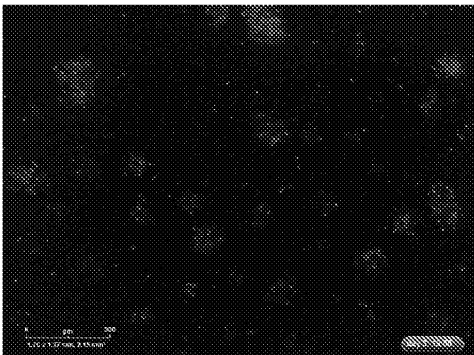
도면7b



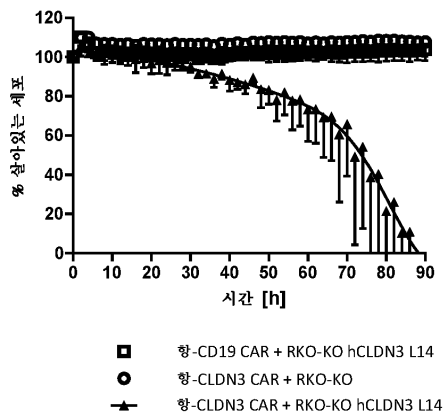
도면8a



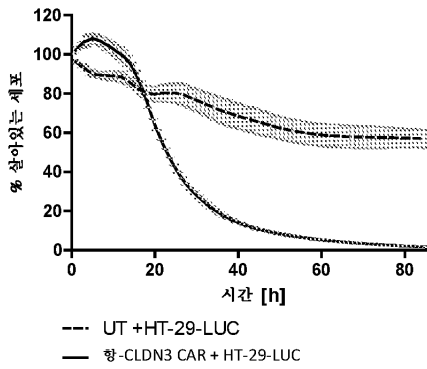
도면8b



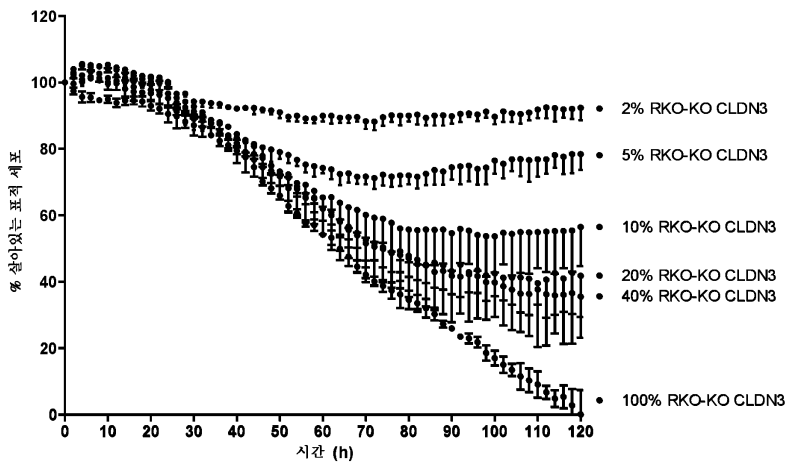
도면8c



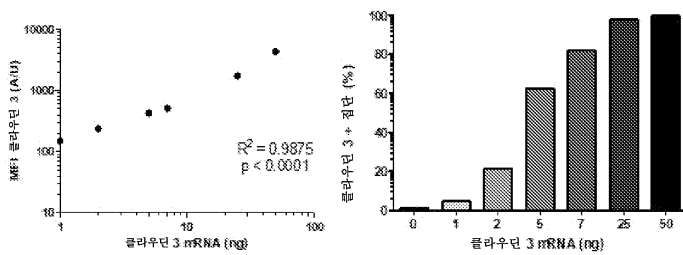
도면8d



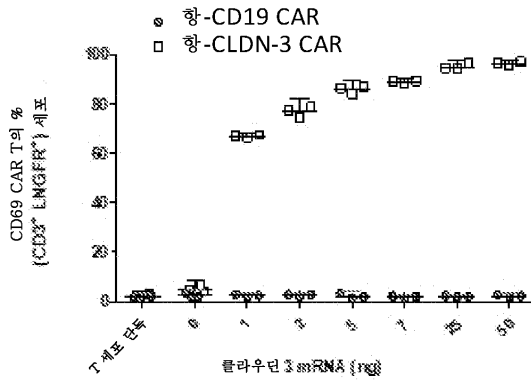
도면9



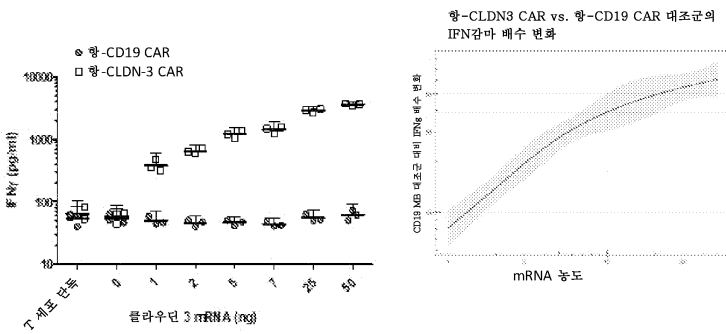
도면10a



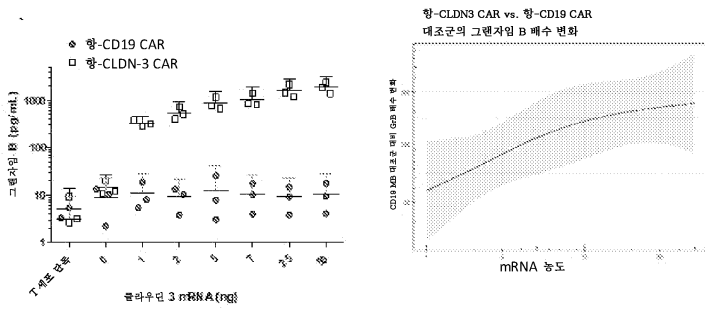
도면10b



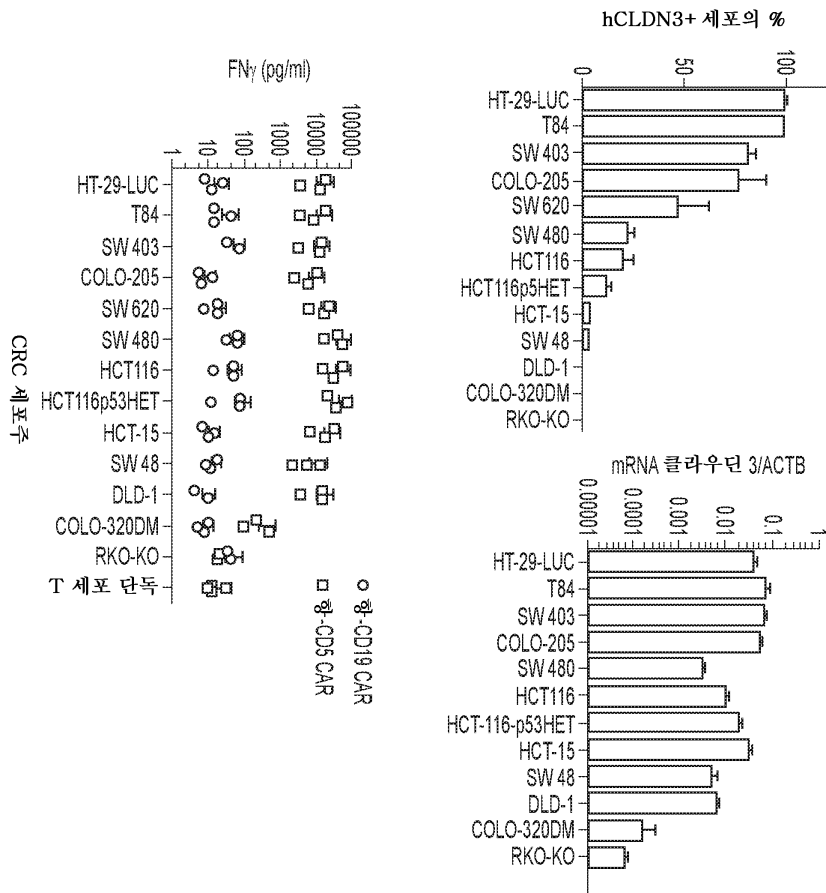
도면10c



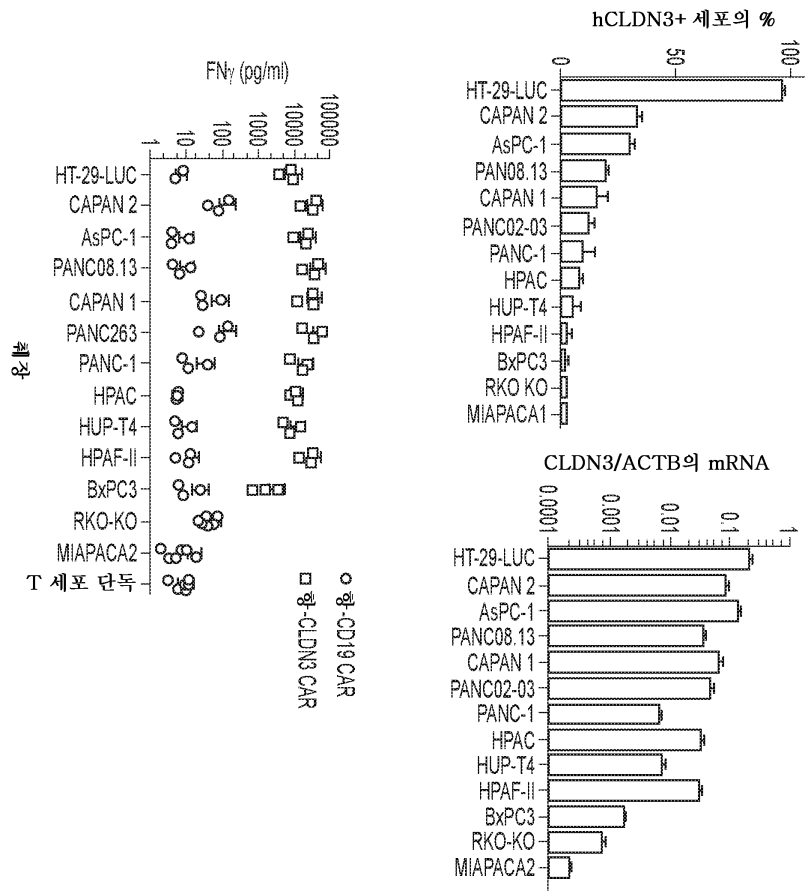
도면10d



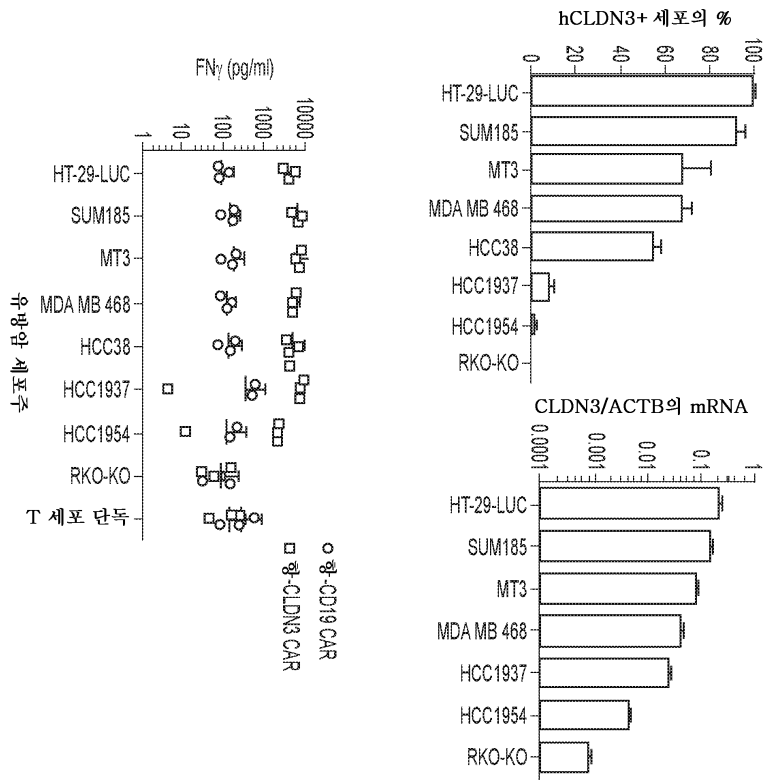
도면11a



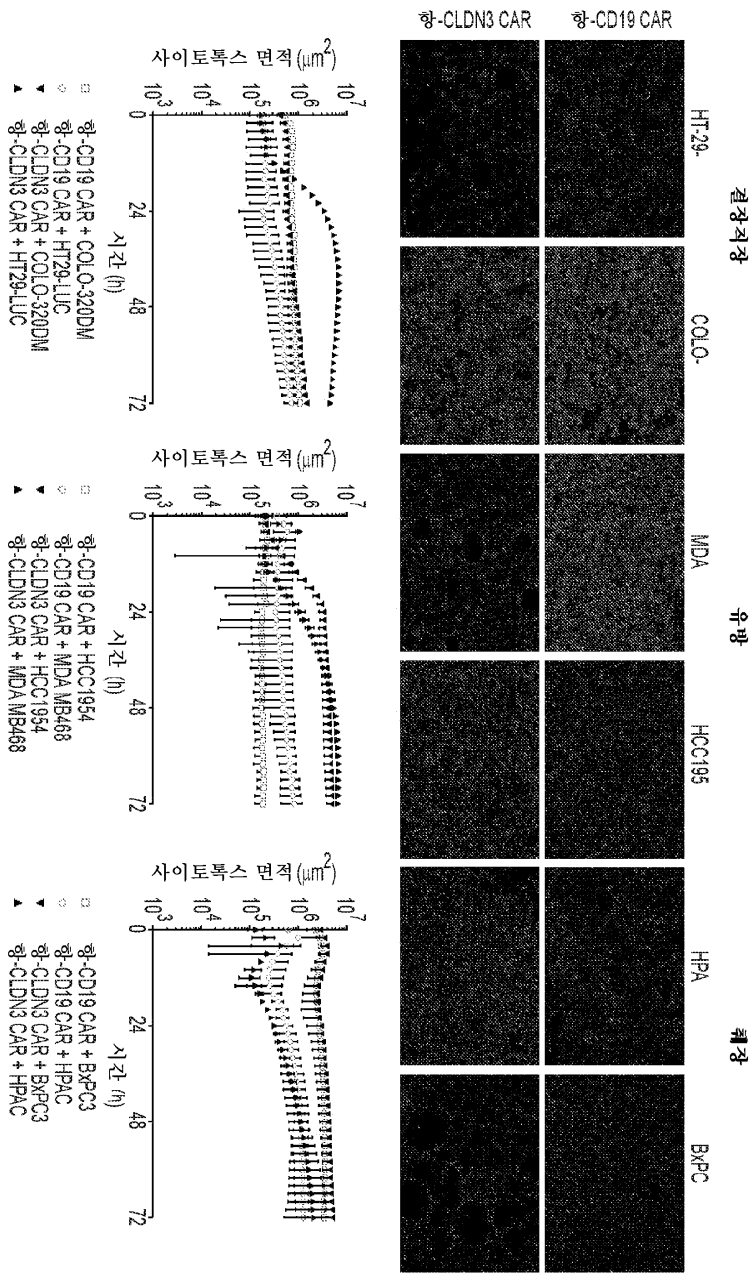
도면11b



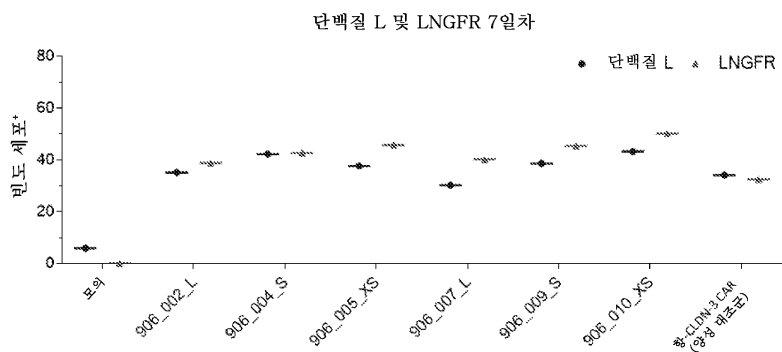
도면11c



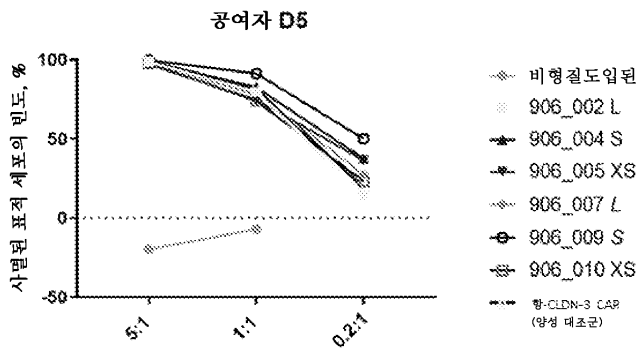
도면12



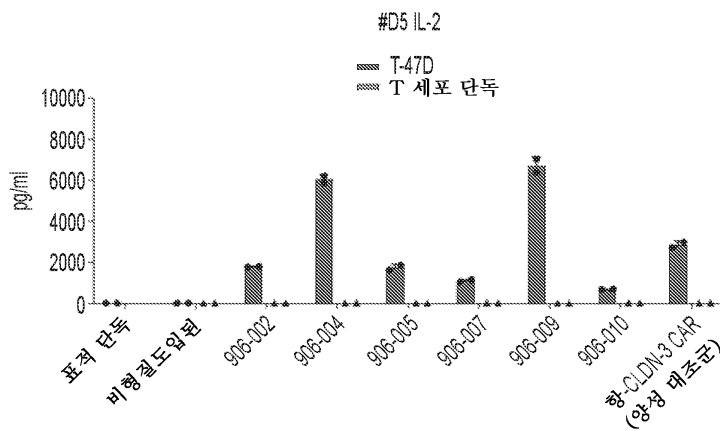
도면13



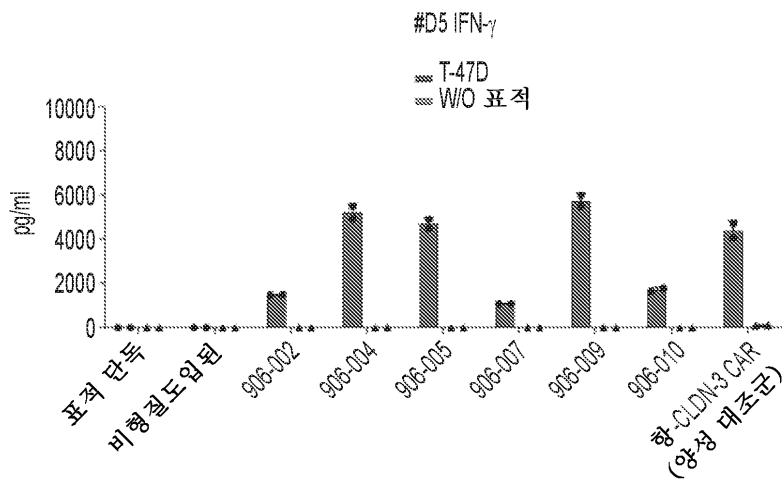
도면14



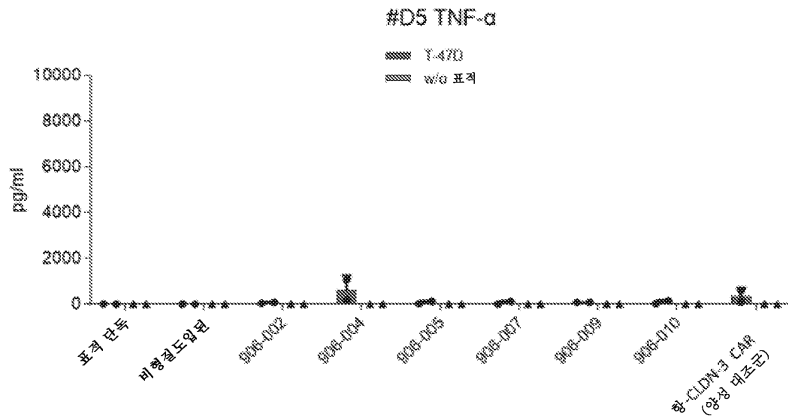
도면15a



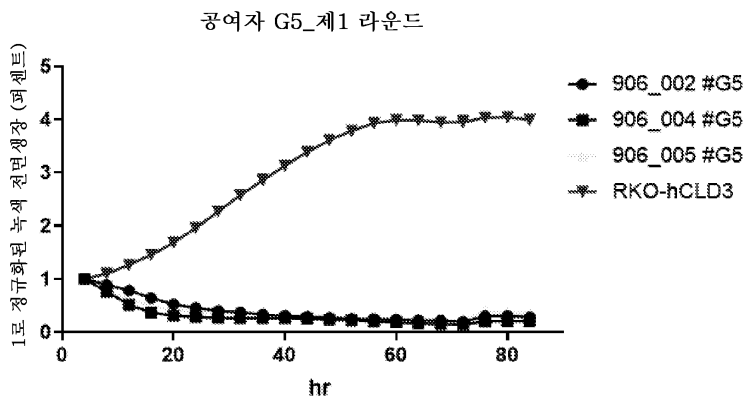
도면15b



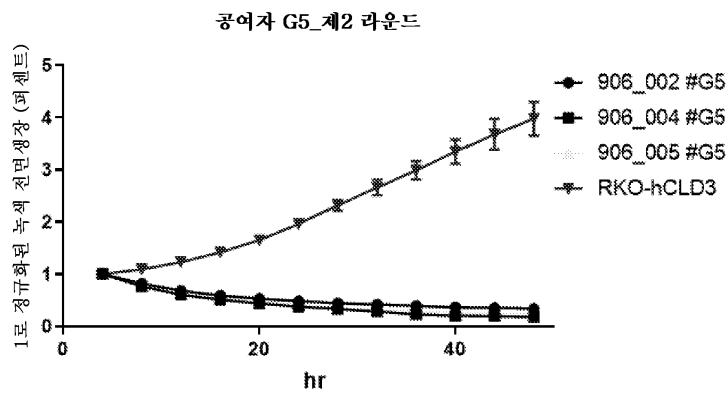
도면15c



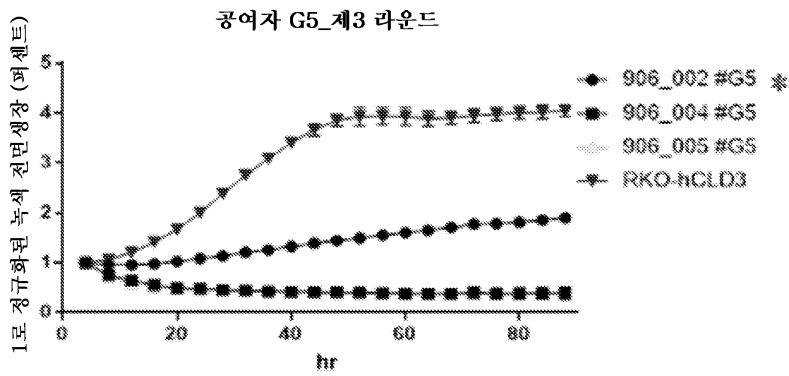
도면16a



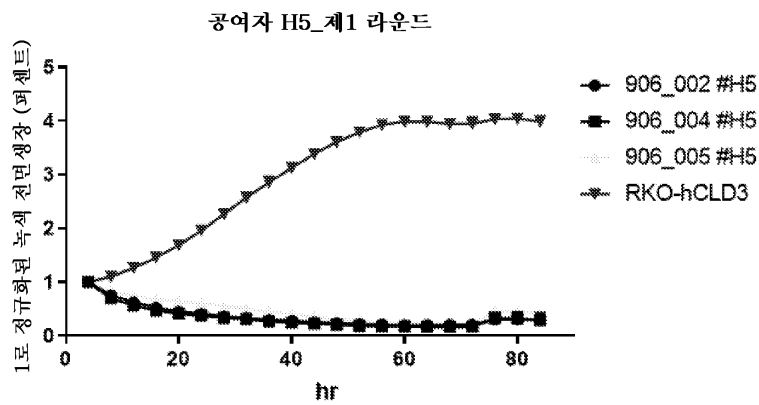
도면16b



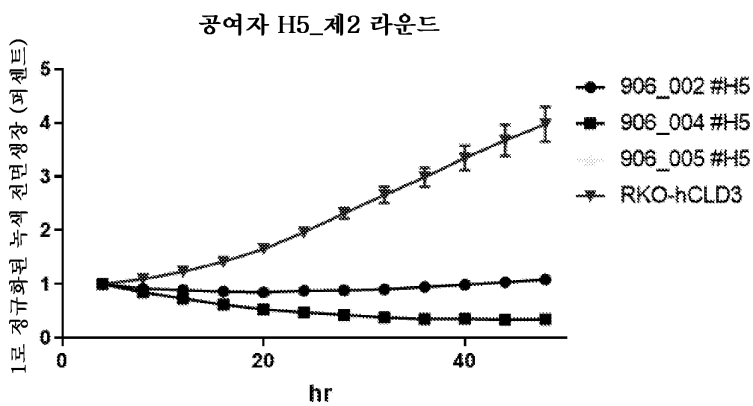
도면16c



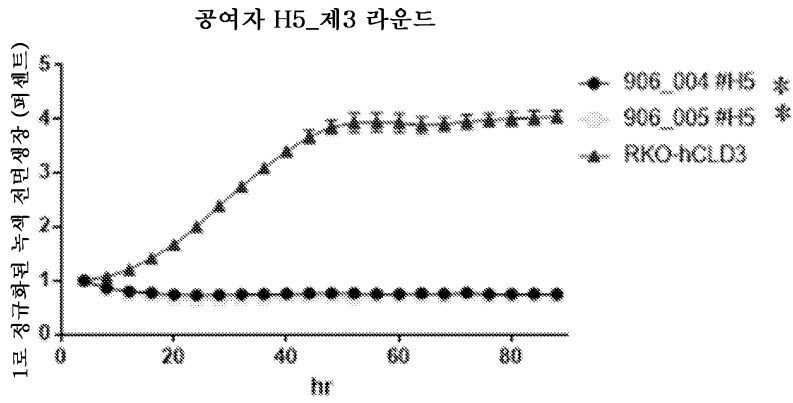
도면16d



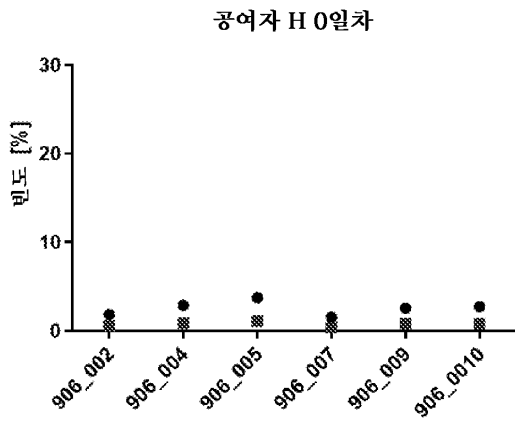
도면16e



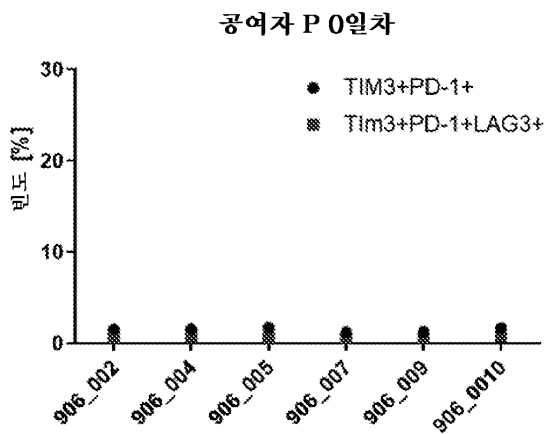
도면16f



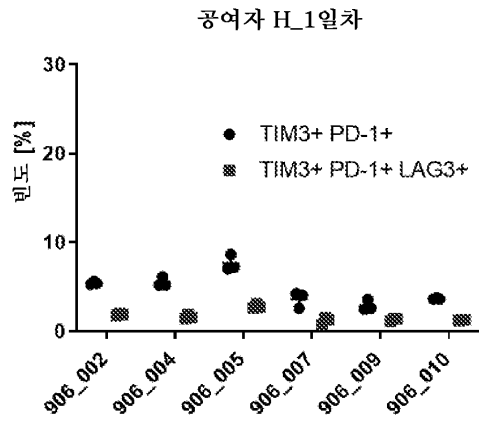
도면17a



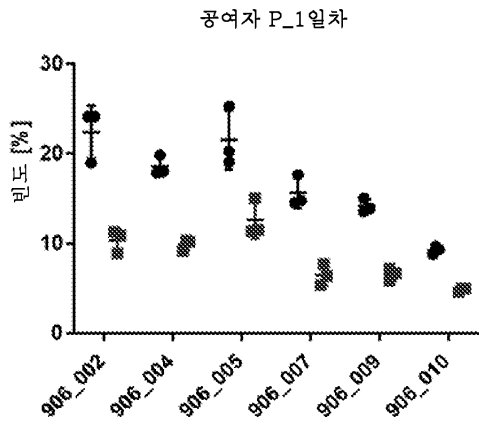
도면17b



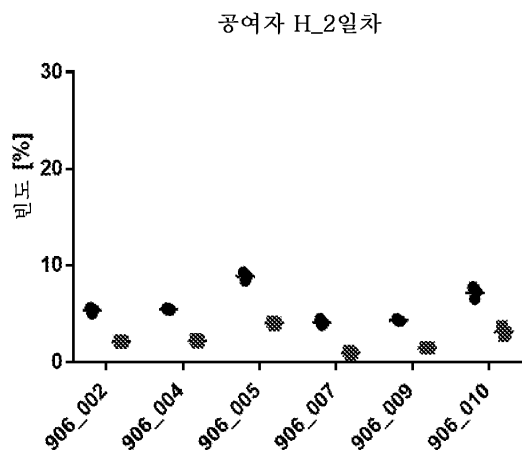
도면17c



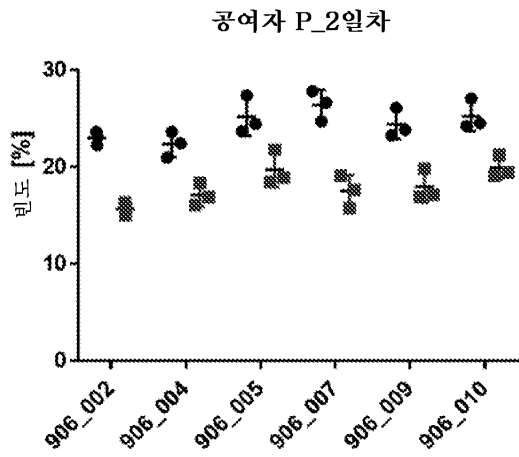
도면17d



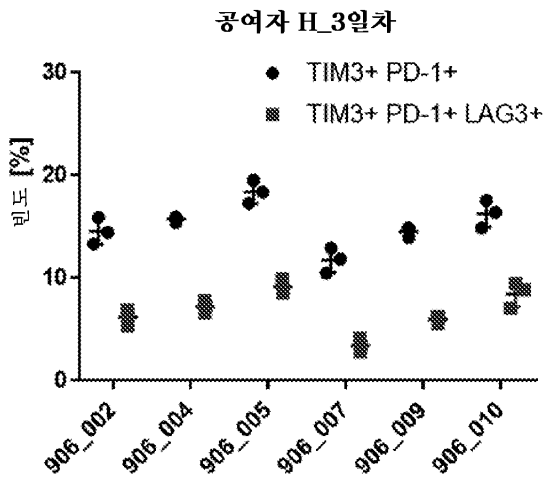
도면17e



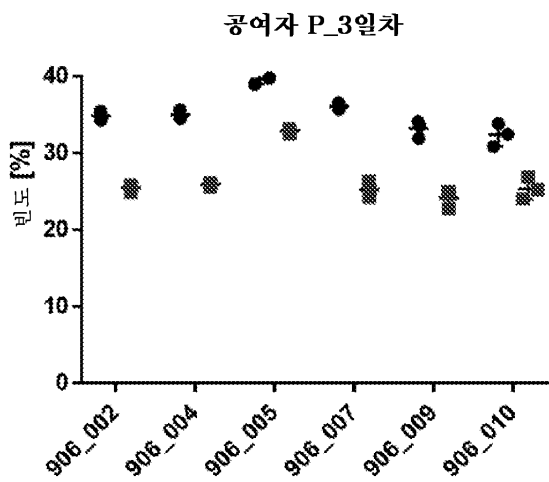
도면17f



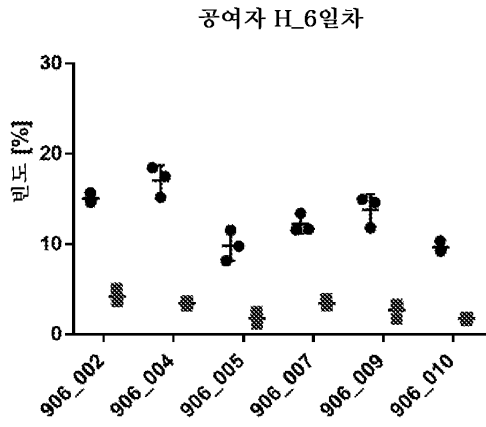
도면17g



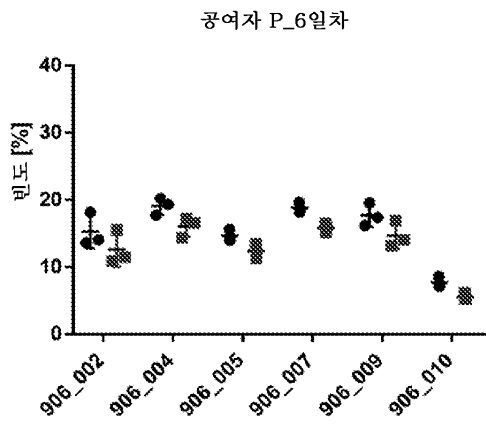
도면17h



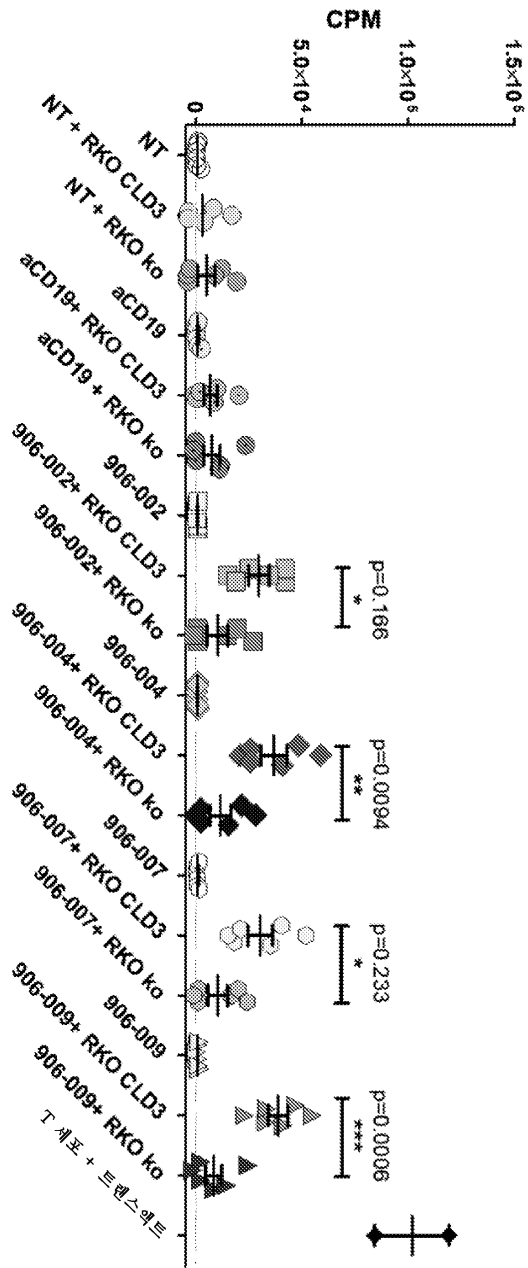
도면17i



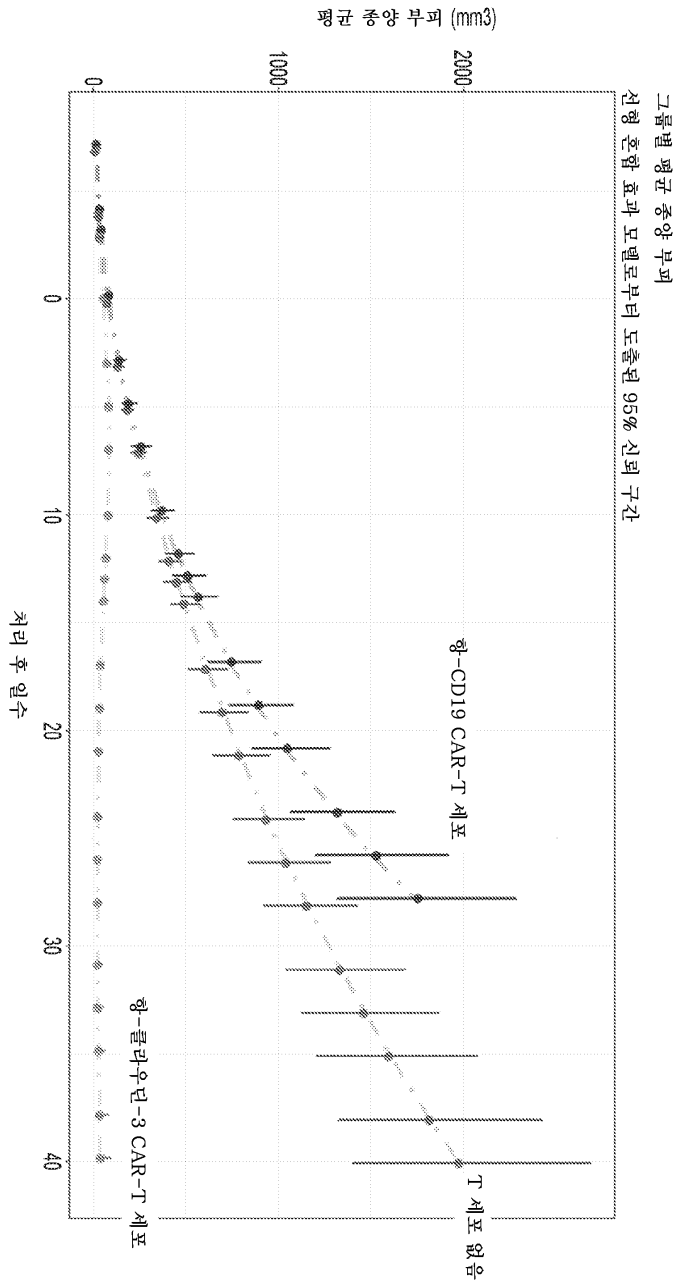
도면17j



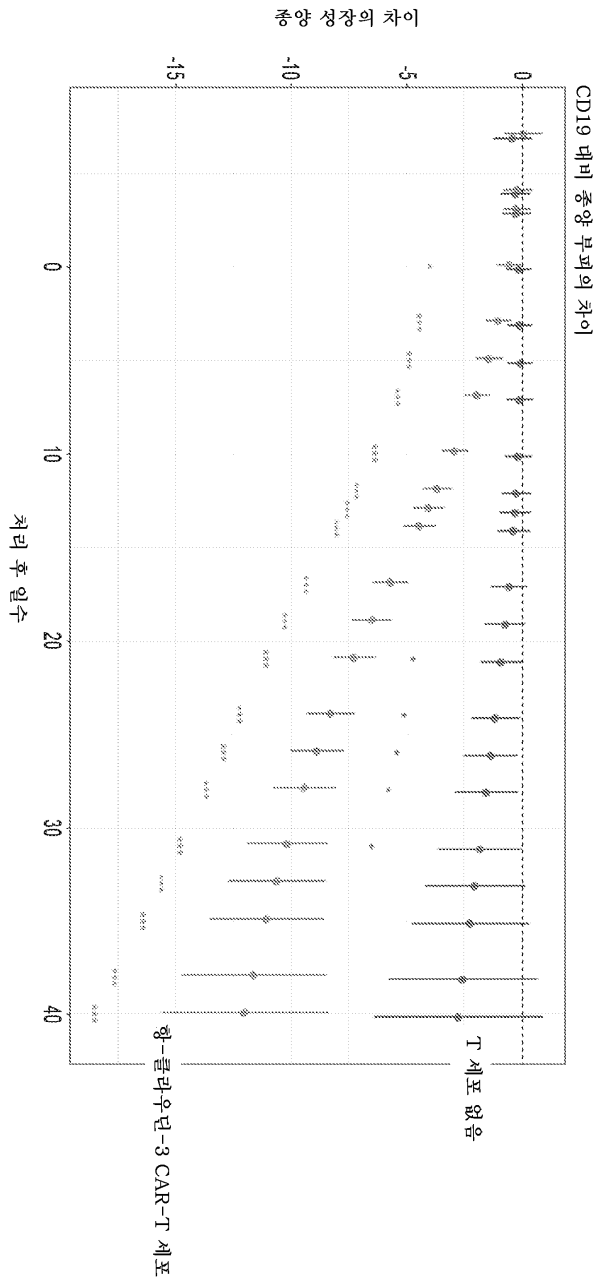
도면18



도면19a

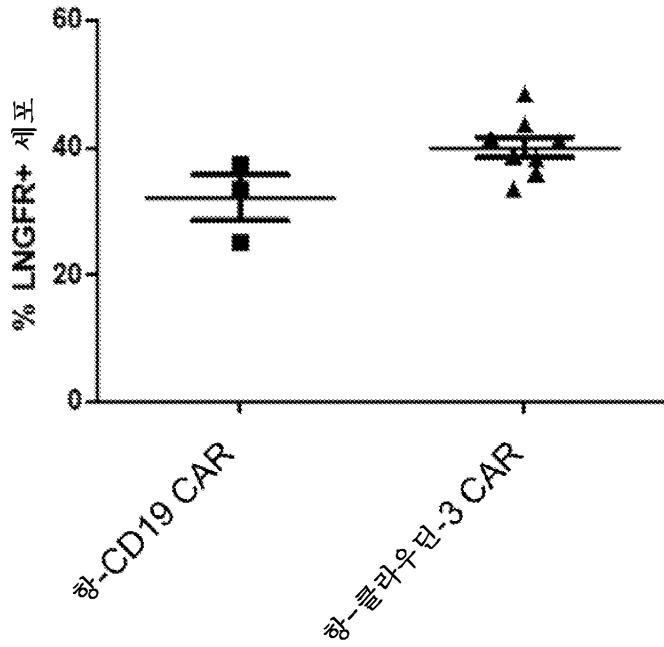


도면19b

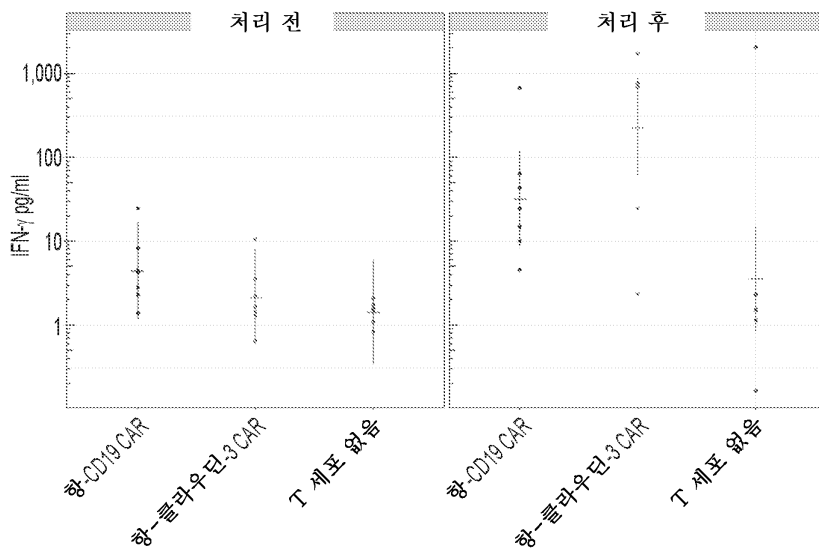


도면20

T 세포 상의 LNGFR 발현

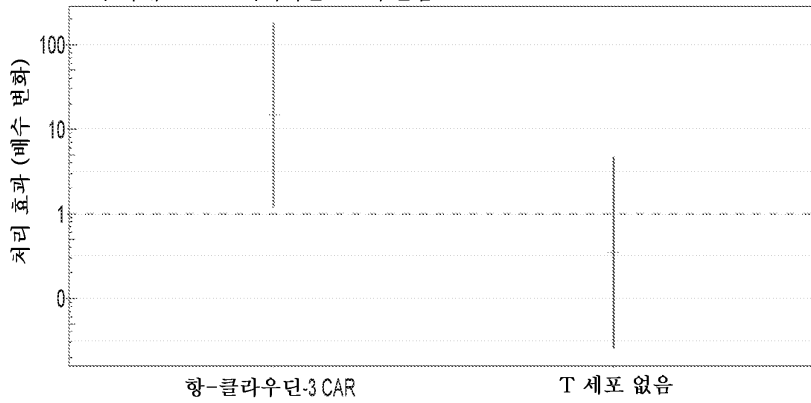


도면21a

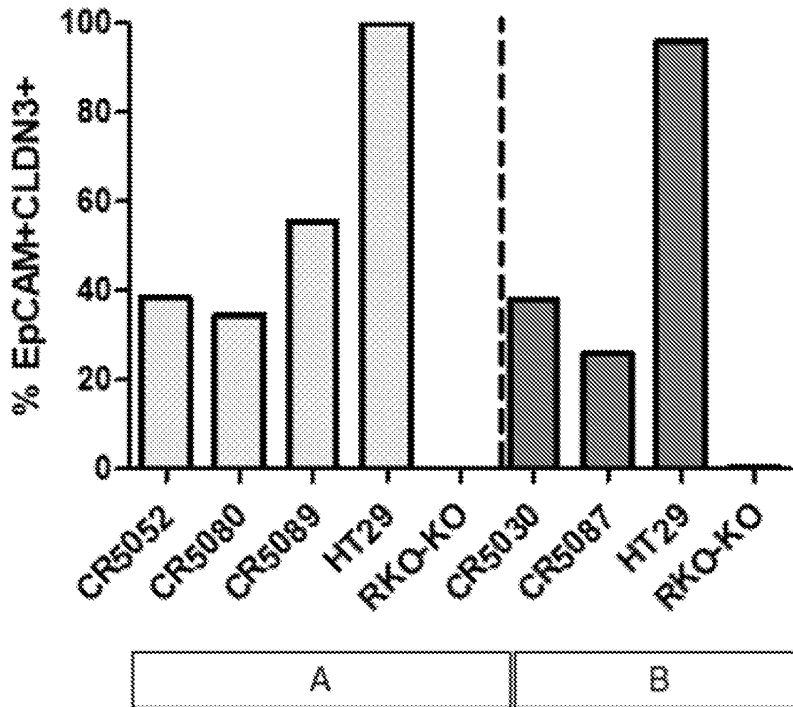


도면21b

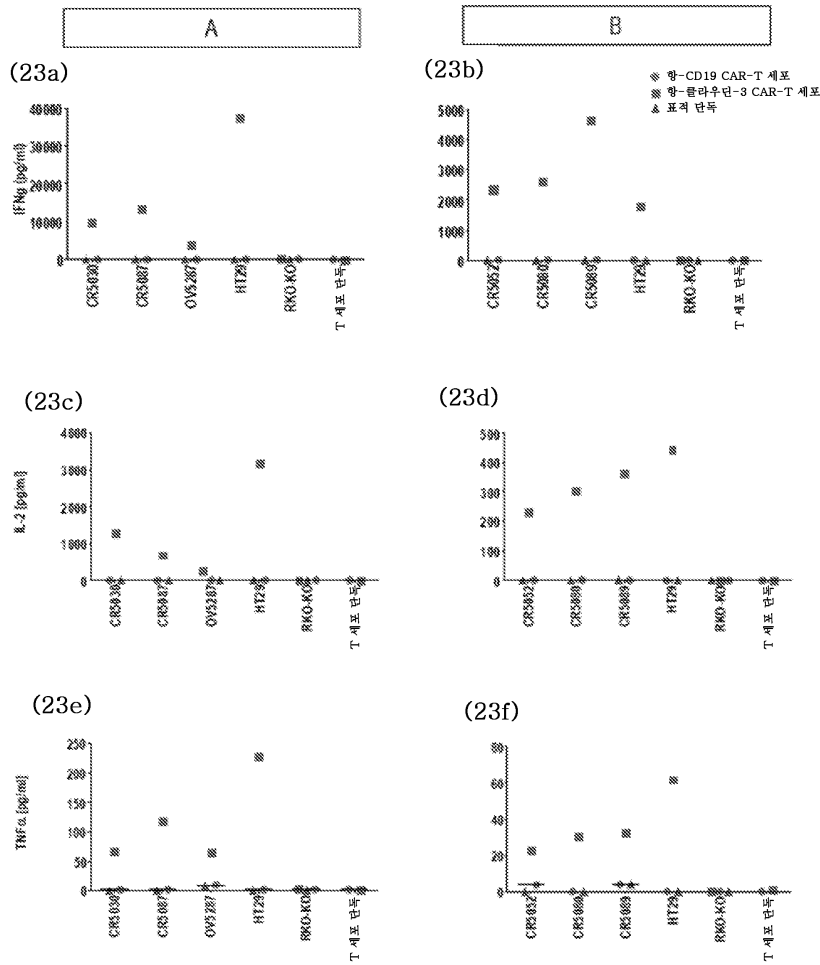
처리 효과는 CD19 음성 대조군과 비교하여 처리 전 및  
처리 후 간의 IFN $\gamma$  배수 변화임  
오차 막대는 95% 베이지안 HD 구간임



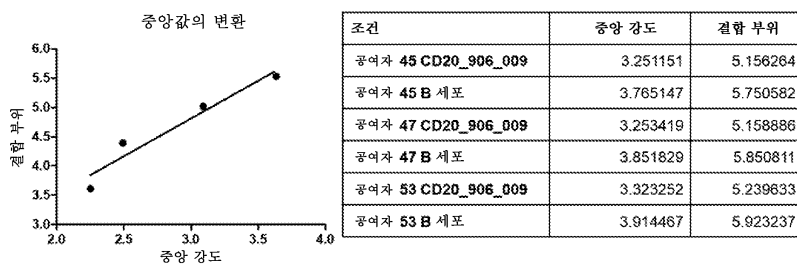
도면22



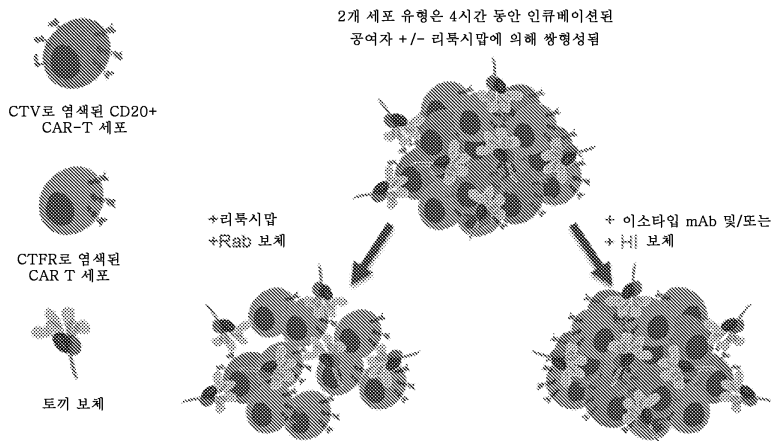
도면23



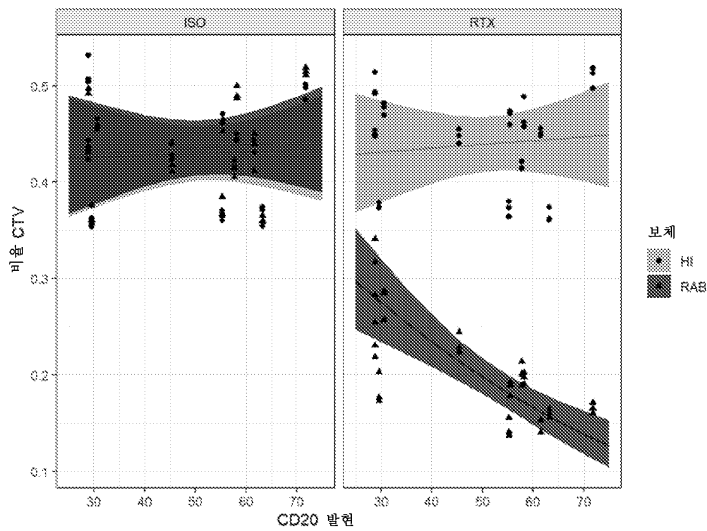
도면24



도면25

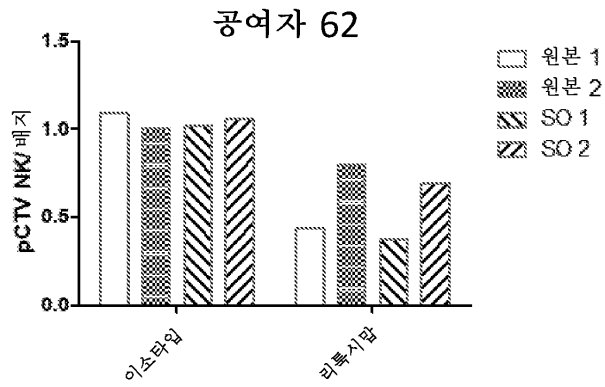


도면26

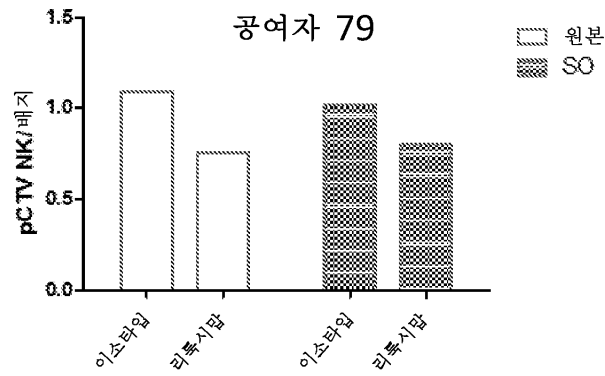


비교	CD20 발현	오즈비	SE	점근적 LCL	점근적 UCL	p.값
ISO : HI	75 대비 25	0.961	0.204	0.504	1.831	p>0.99999
RTX : HI	75 대비 25	0.923	0.196	0.485	1.760	0.999952
ISO : RAB	75 대비 25	0.937	0.199	0.492	1.786	0.999988
RTX : RAB	75 대비 25	2.925	0.622	1.535	5.573	1.3e-05

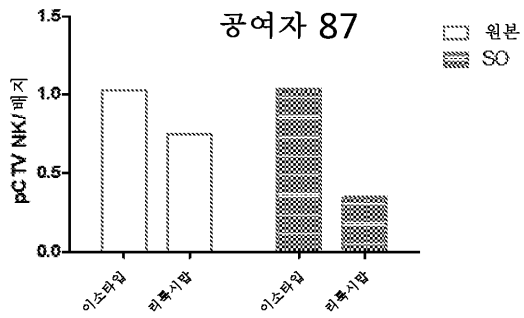
도면27a



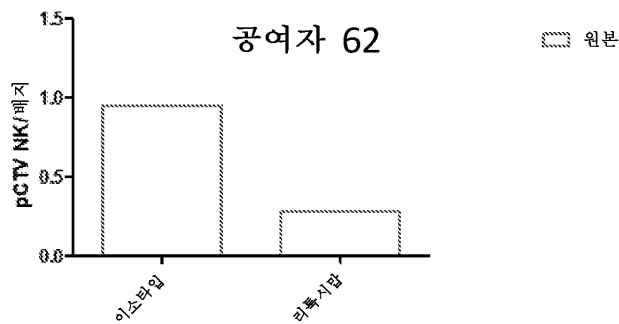
도면27b



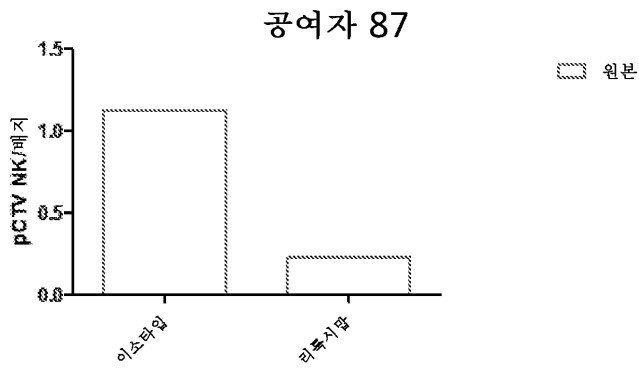
도면27c



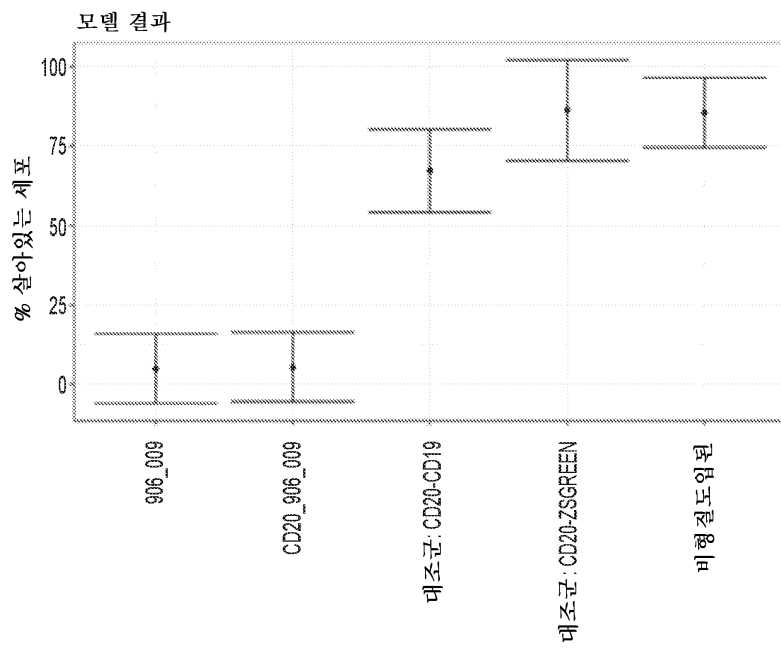
도면27d



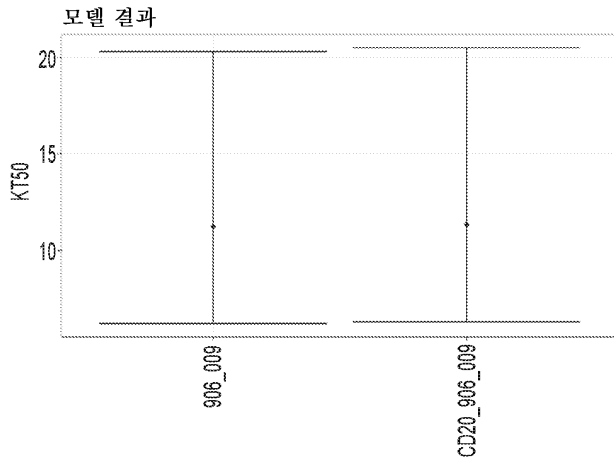
도면27e



도면28

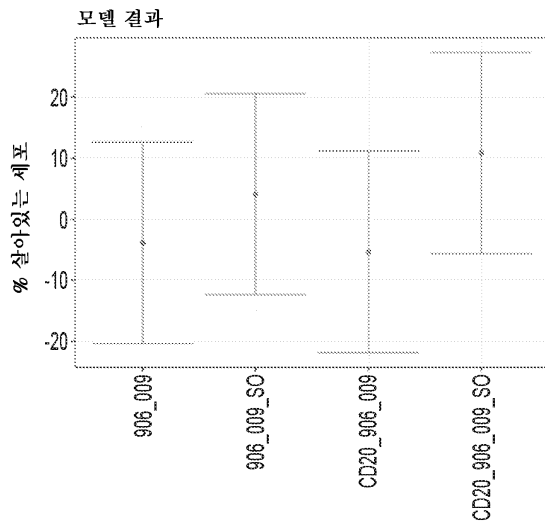


도면29



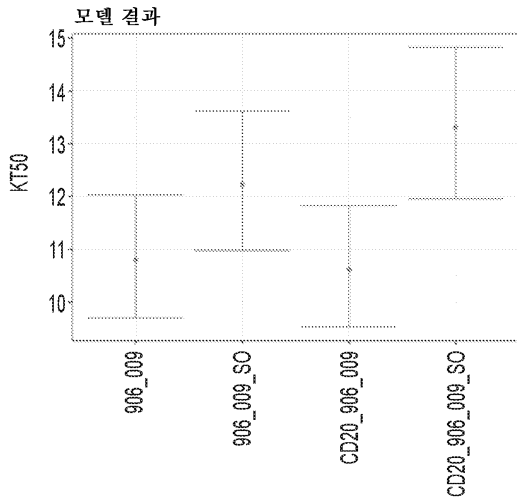
대비	추정치	SE	하위.CL	상위.CL	p.값
906_009 vs CD20_906_009	0.99	0.012	0.933	1.05	0.718

도면30



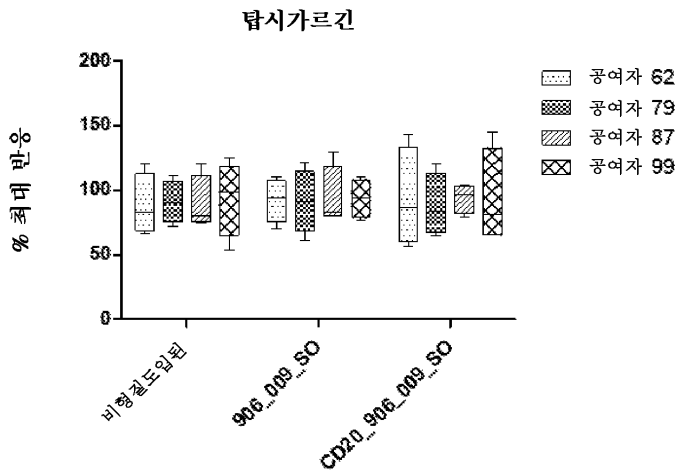
대비	추정치	SE	df	하위 CL	상위 CL	P 값
906-009 vs 906-009 SO	-7.972	4.419	41	-16.898	0.953	0.078595
CD20-906-009 vs CD20-906-009 SO	-16.174	4.419	41	-25.099	-7.248	0.000714

도면31

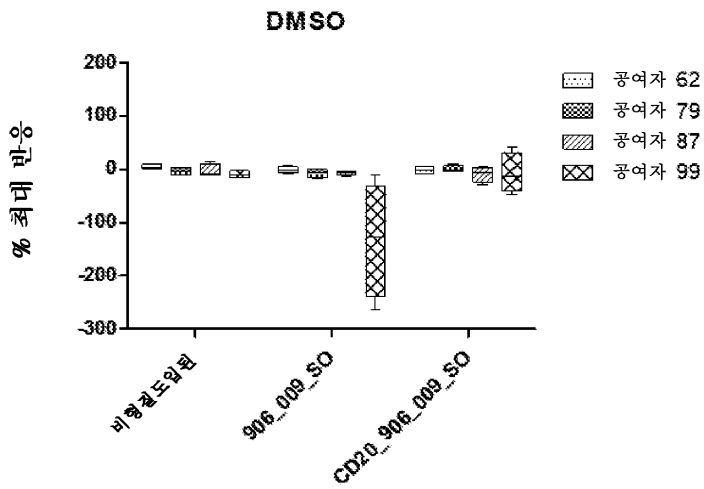


대비	추정치 (배수 변화)	SE	df	하위.CL	상위.CL	p.값
906_009 vs 906_009_SO	0.883	0.025	9	0.775	1.008	0.062
CD20_906_009 vs CD20_906_009_SO	0.798	0.025	9	0.699	0.910	0.004

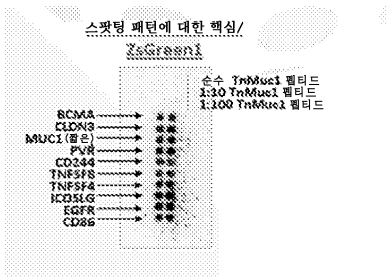
도면32a



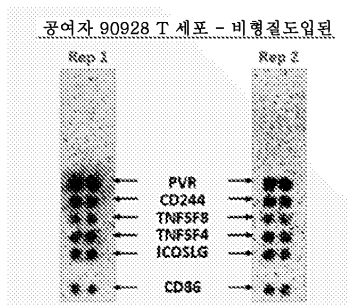
도면32b



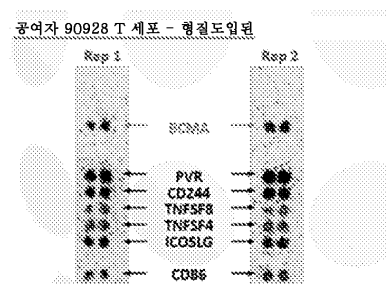
도면33a



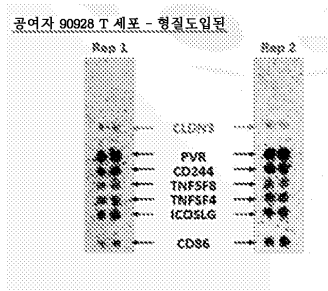
도면33b



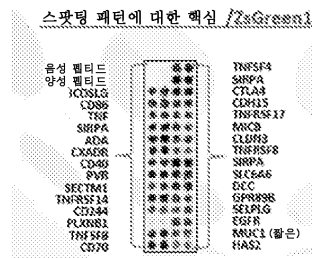
도면33c



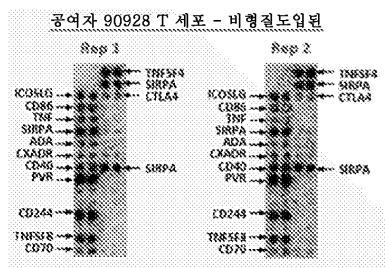
도면33d



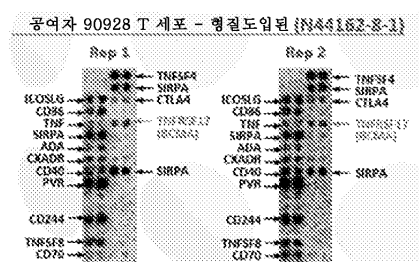
도면34a



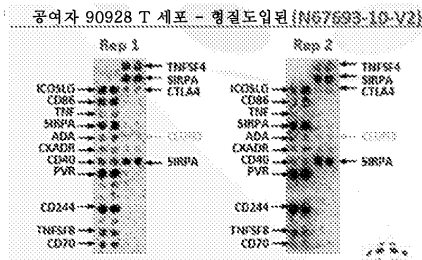
도면34b



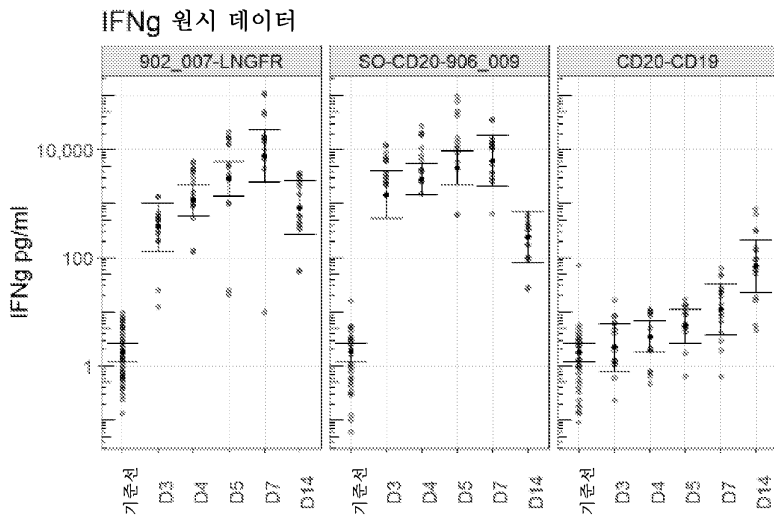
도면34c



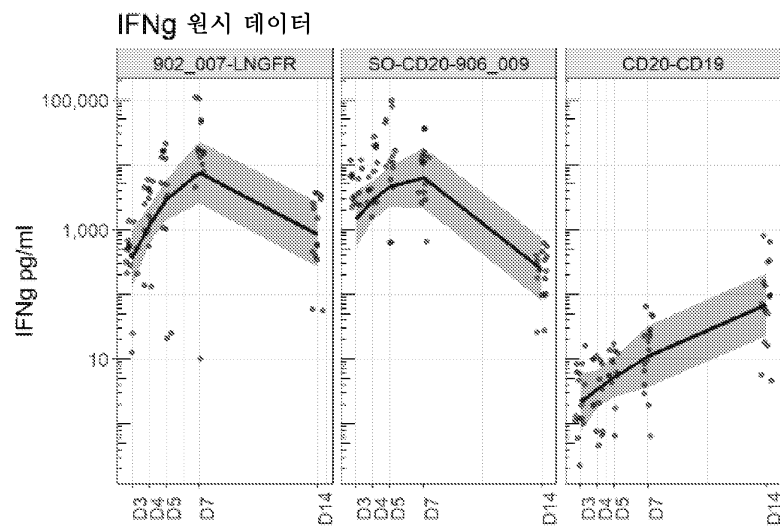
도면34d



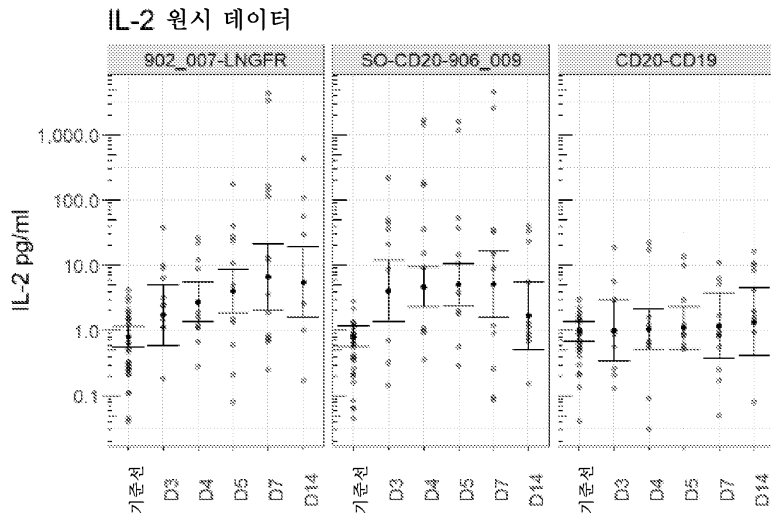
도면35a



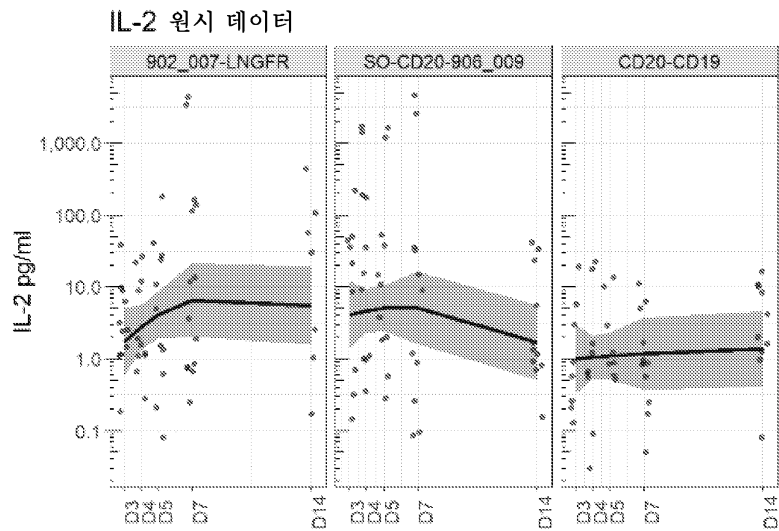
도면35b



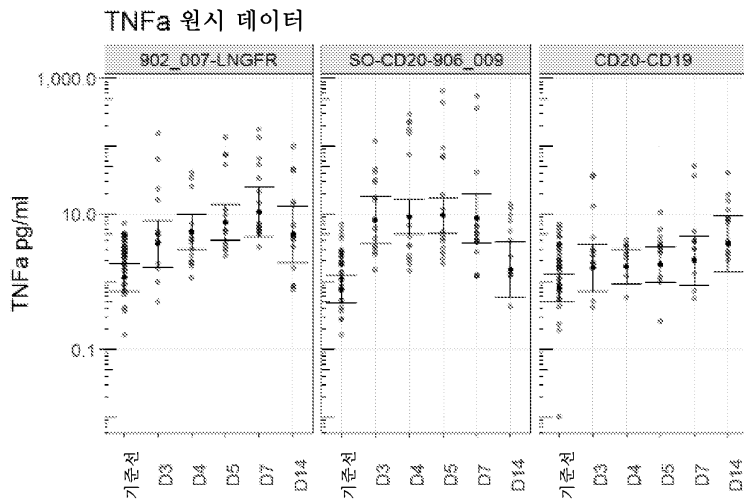
도면35c



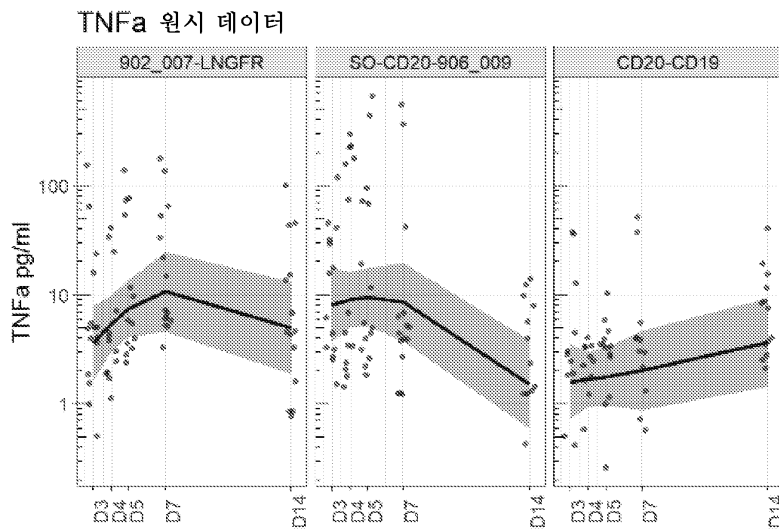
도면35d



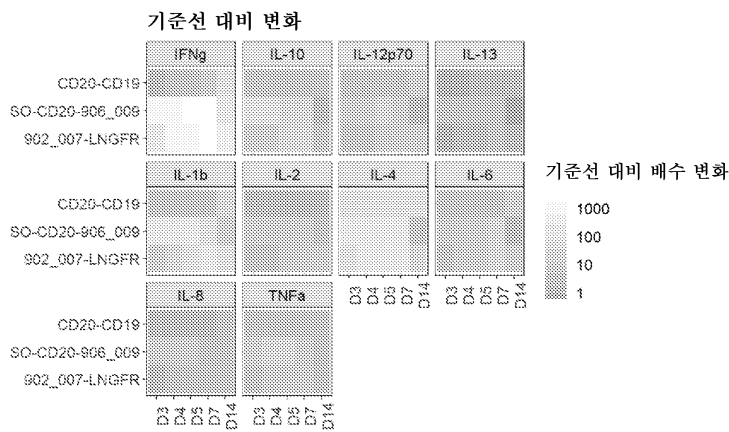
도면35e



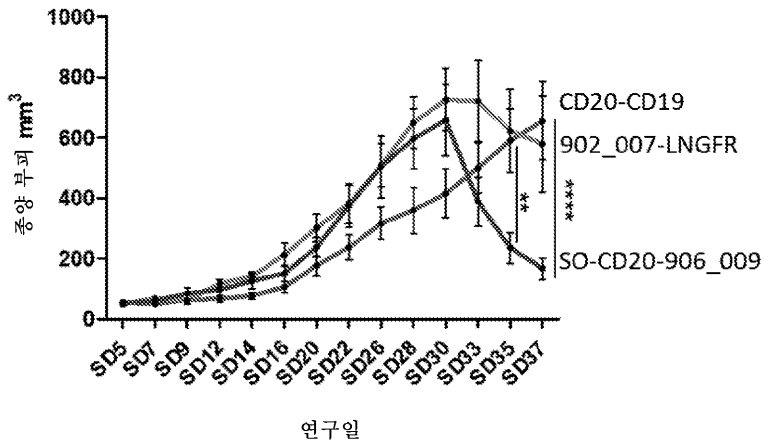
도면35f



도면36

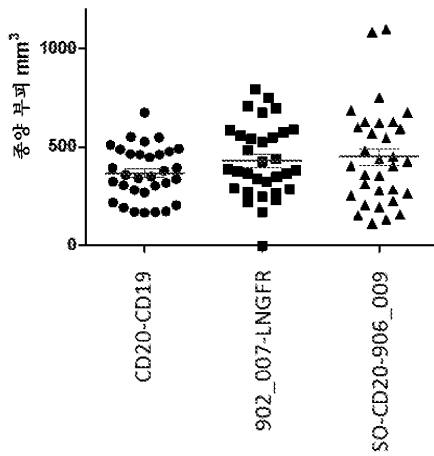


도면37



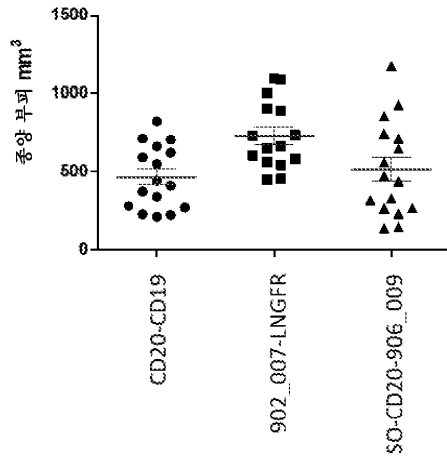
도면38a

T-세포 투약 후 4일차

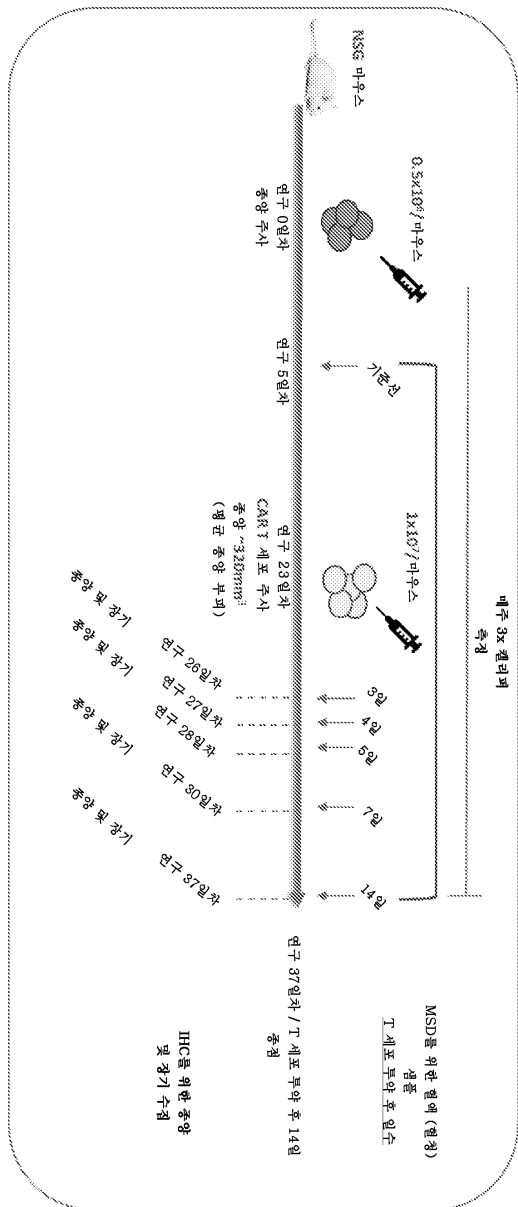


도면38b

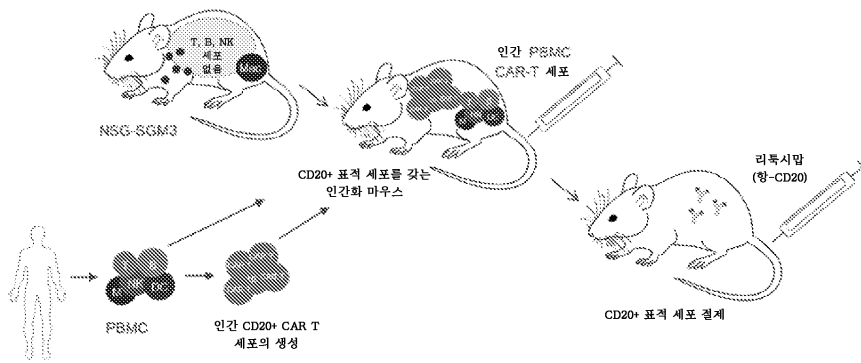
T-세포 투약 후 7일차



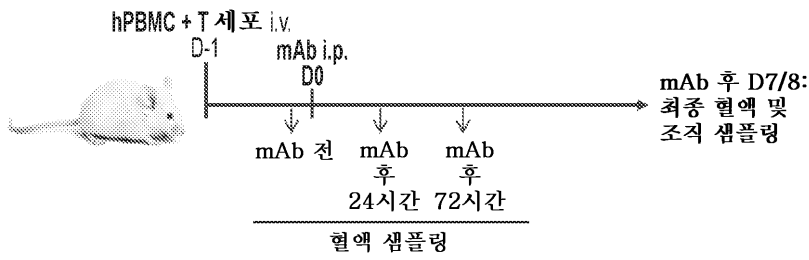
도면39



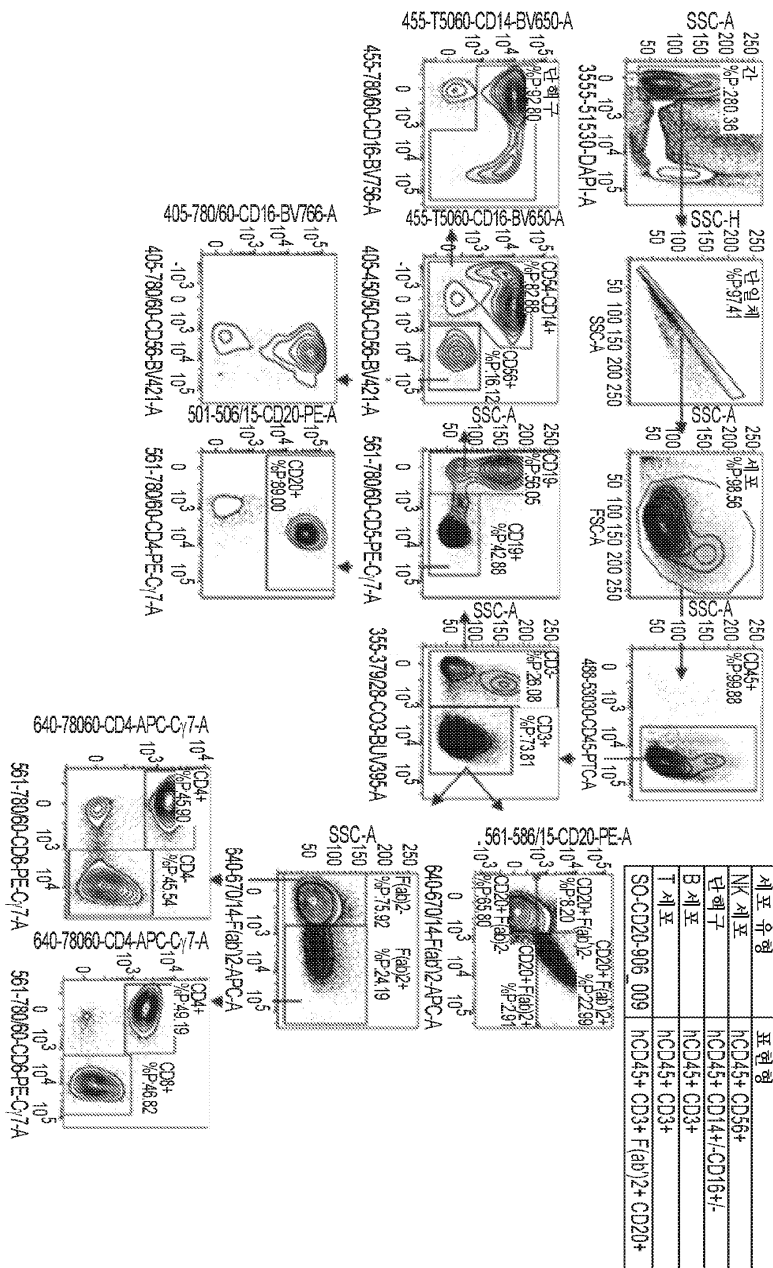
도면40



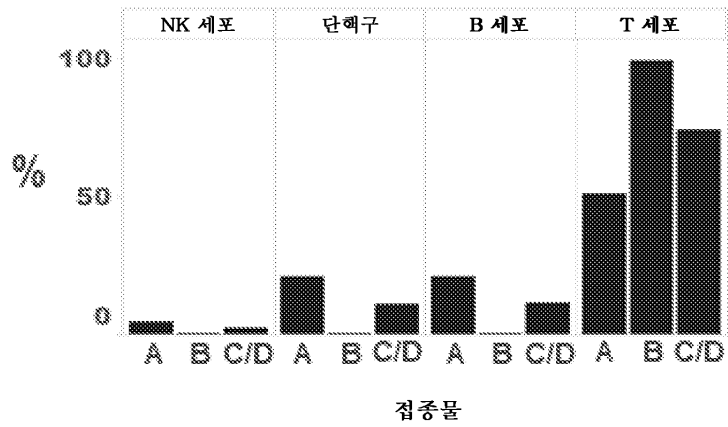
도면41



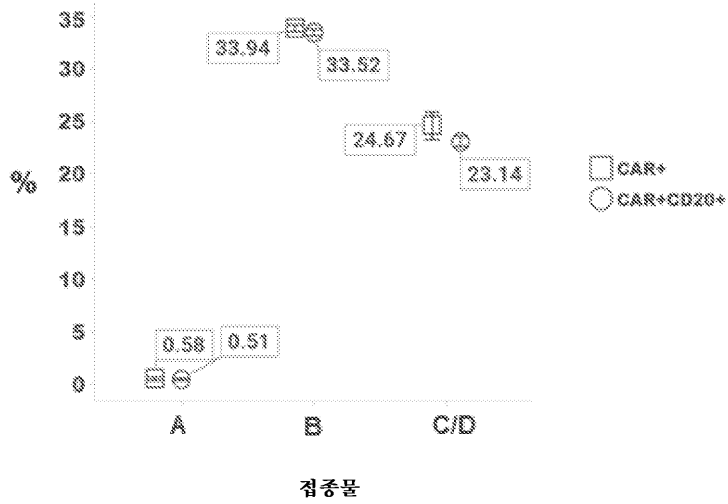
도면42a



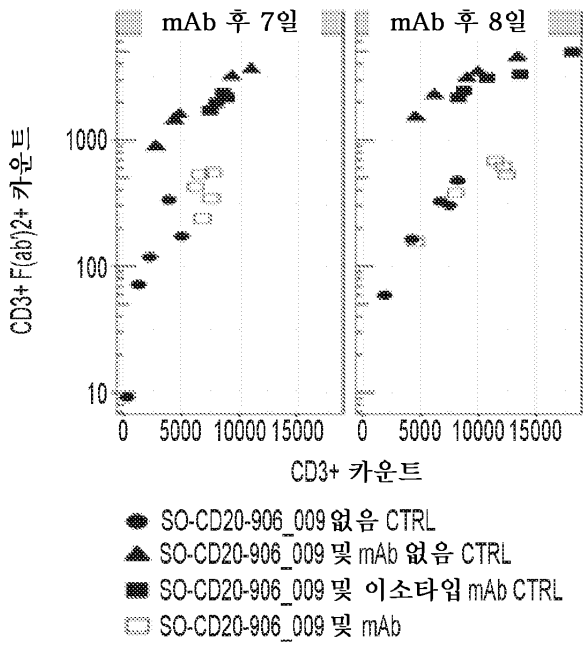
도면42b



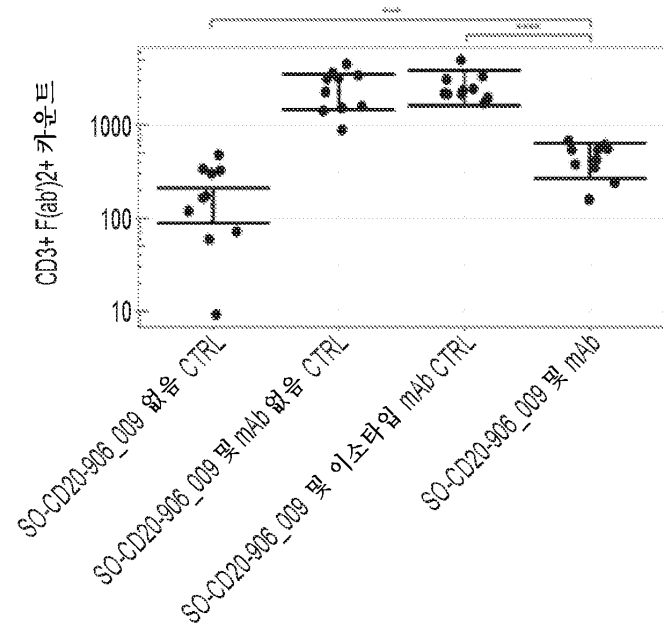
도면42c



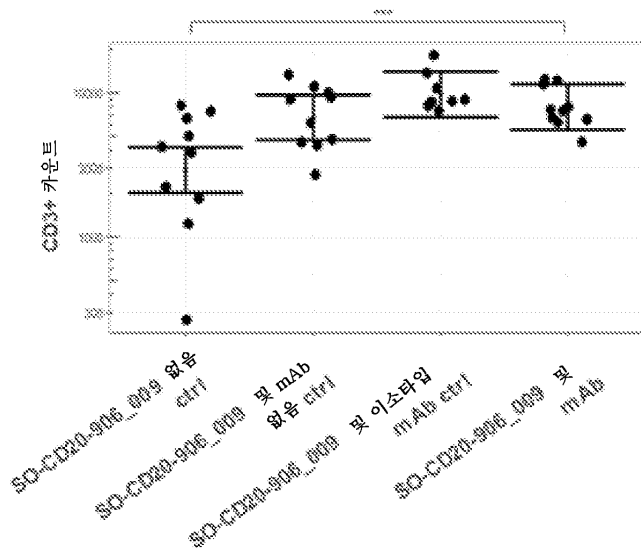
도면43a



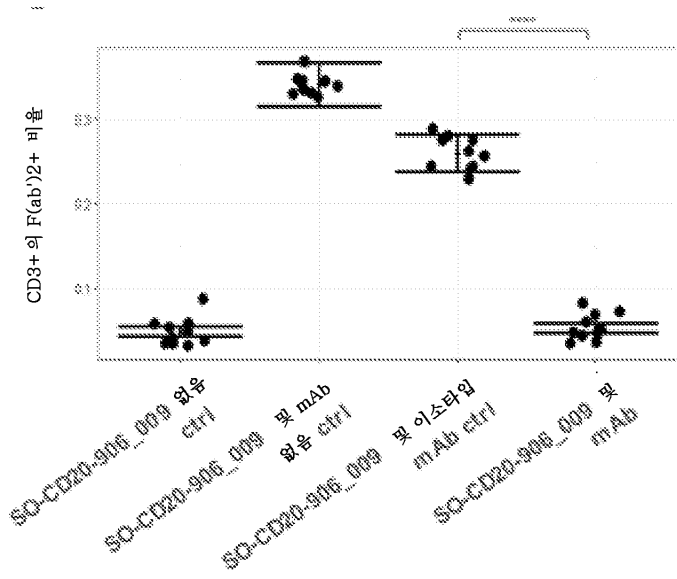
도면43b



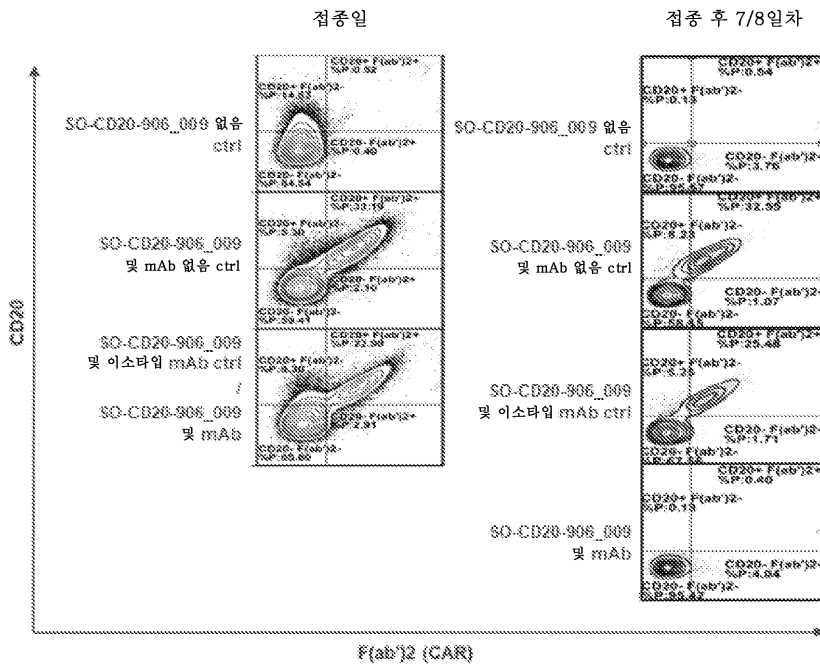
도면43c



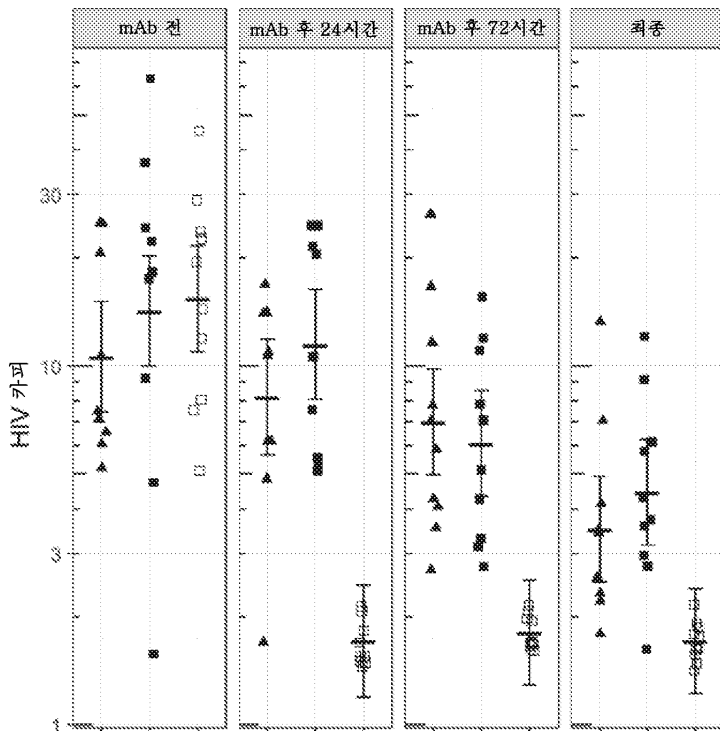
도면43d



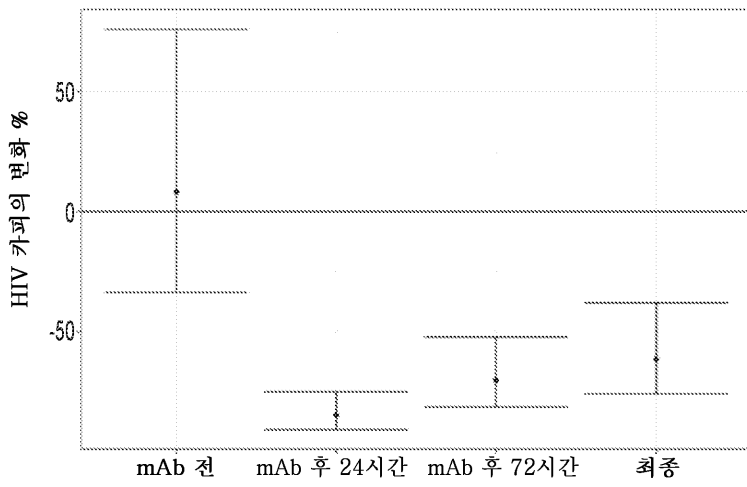
도면44



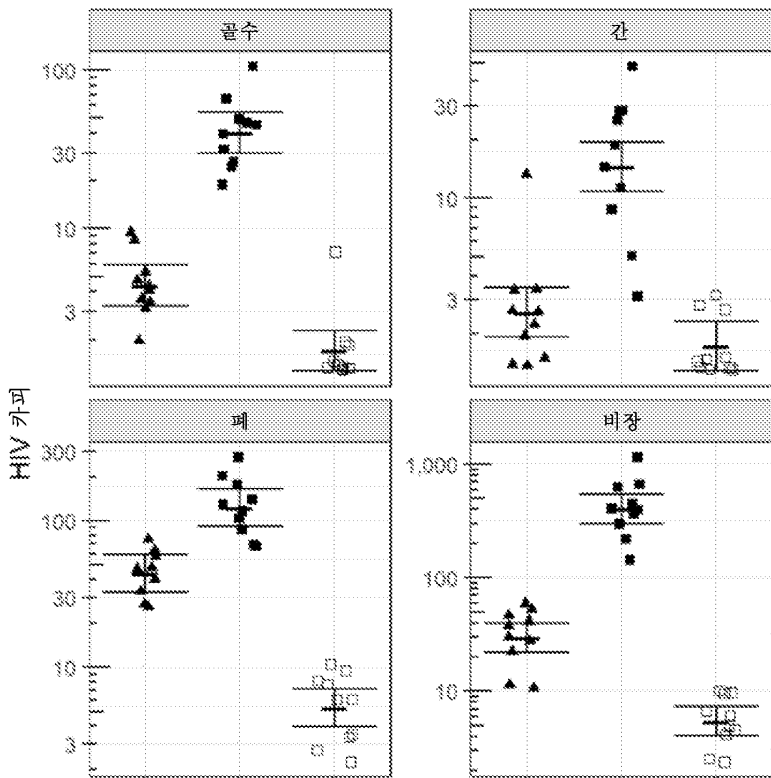
도면45a



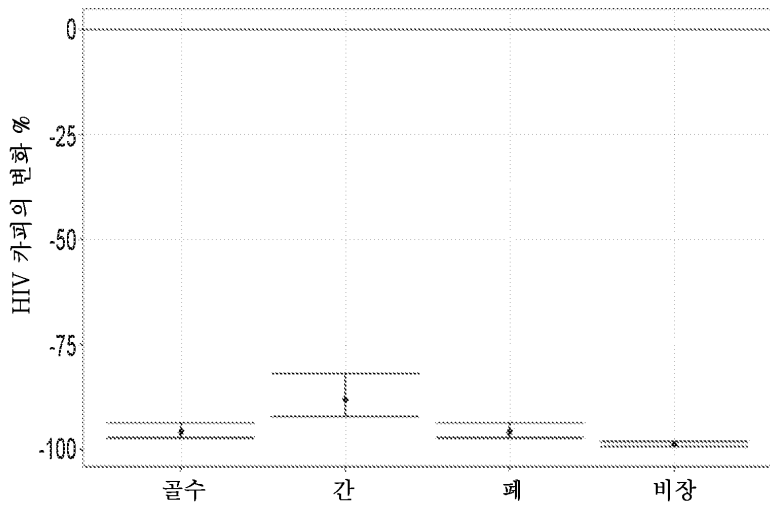
도면45b



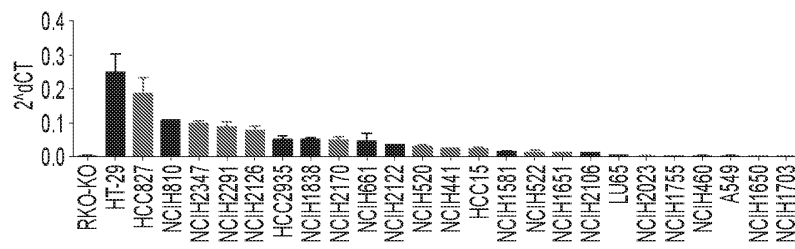
도면46a



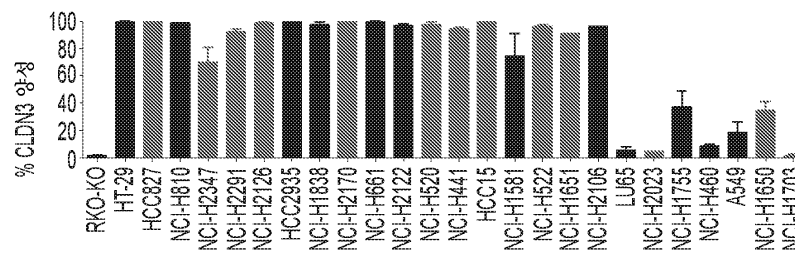
도면46b



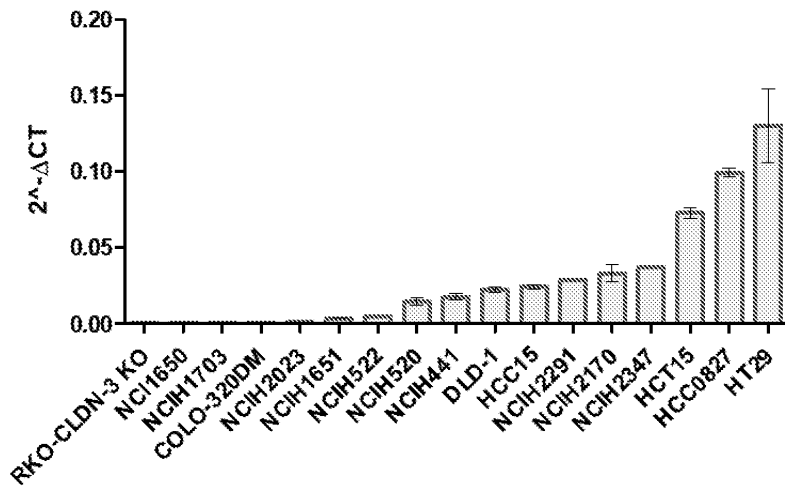
도면47a



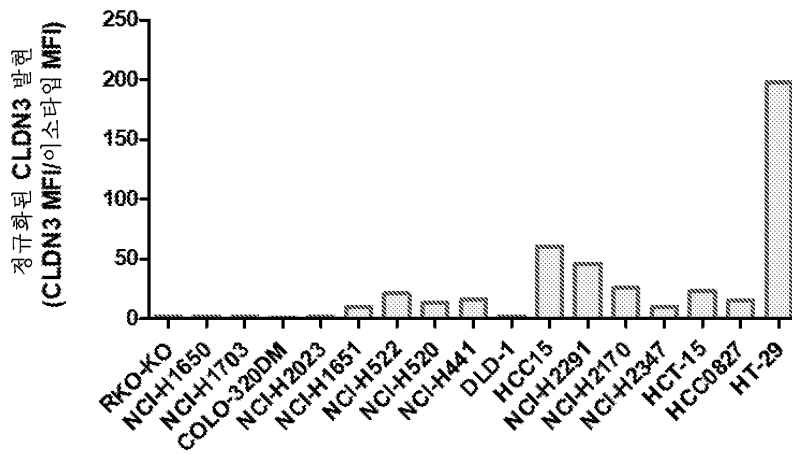
도면47b



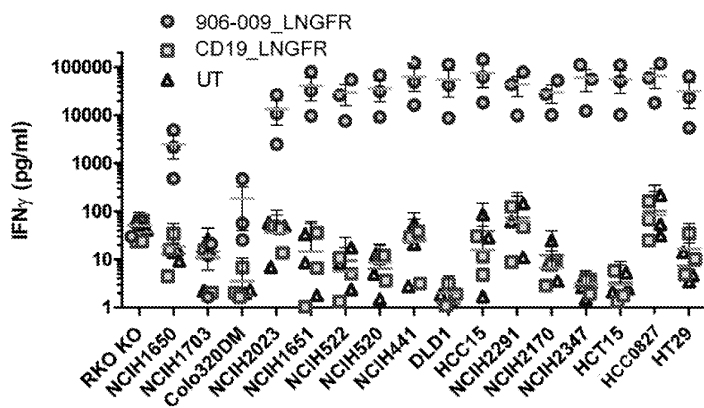
도면48a



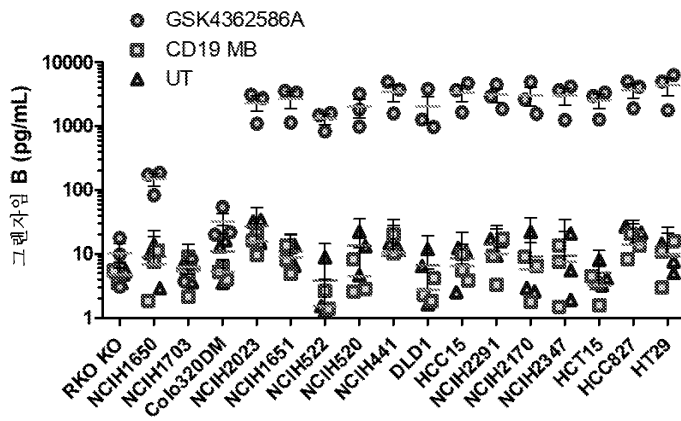
도면48b



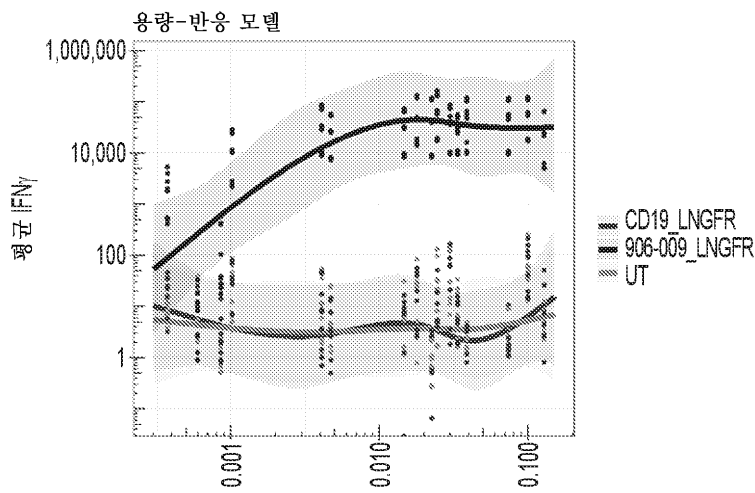
도면49a



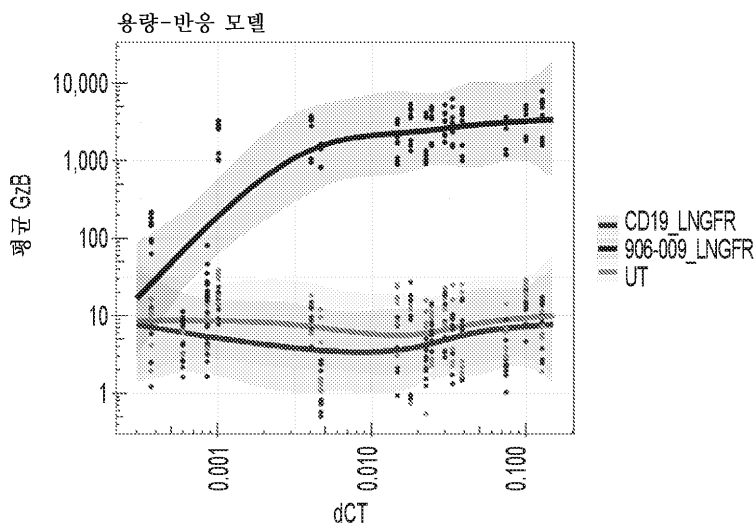
도면49b



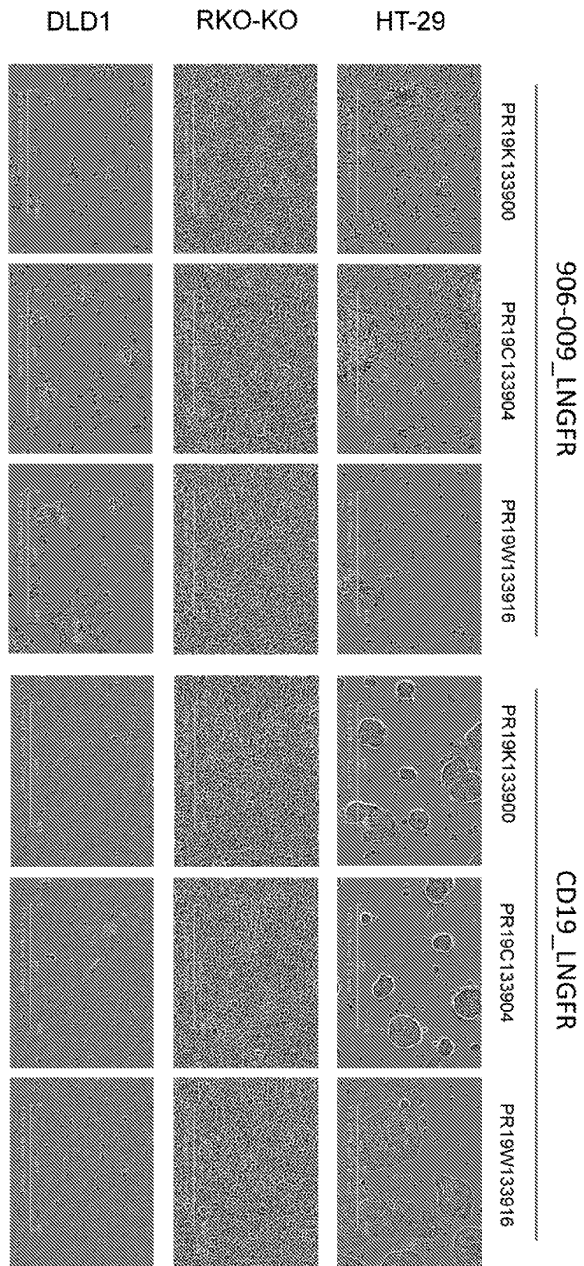
도면50a



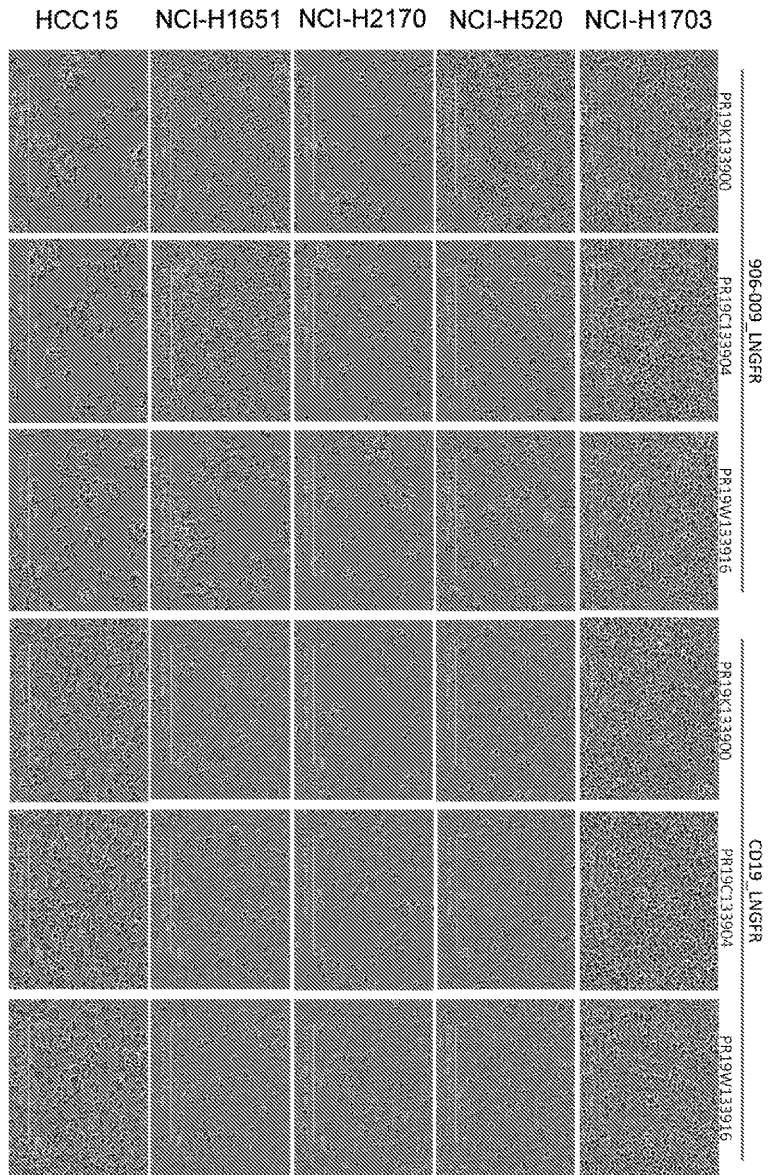
도면50b



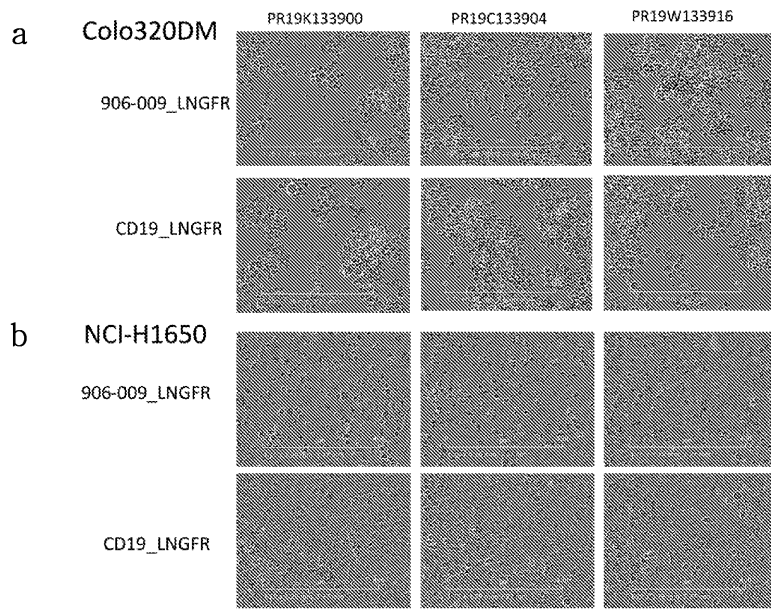
도면51



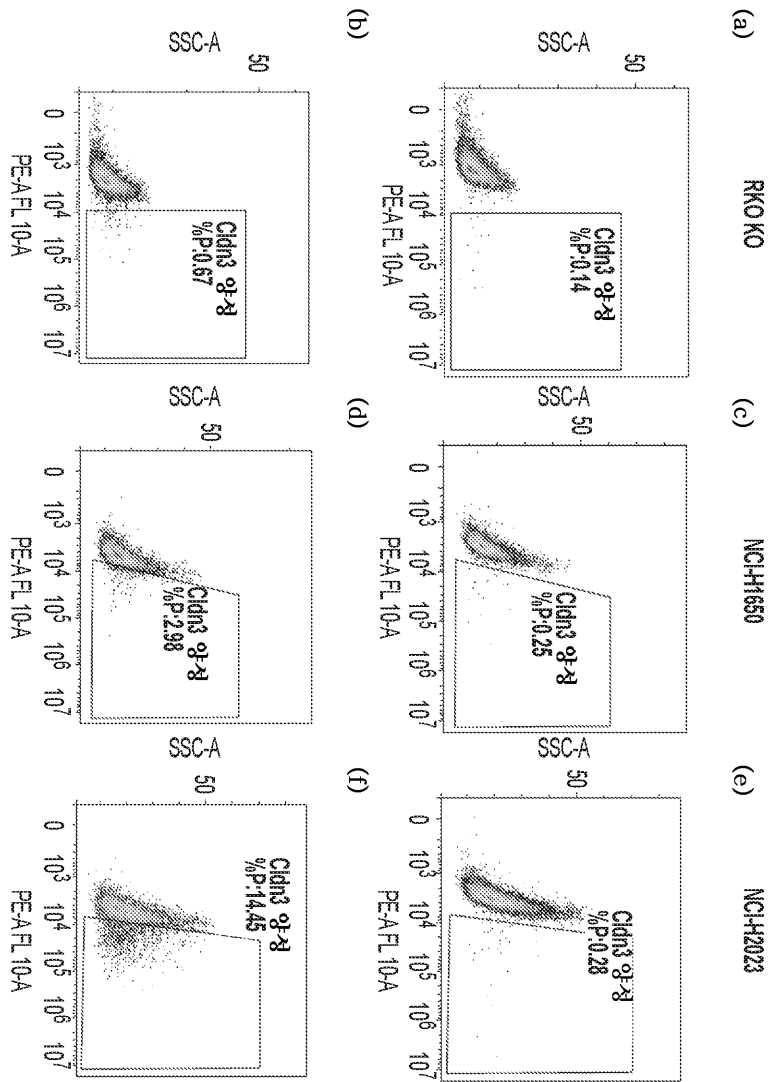
도면52



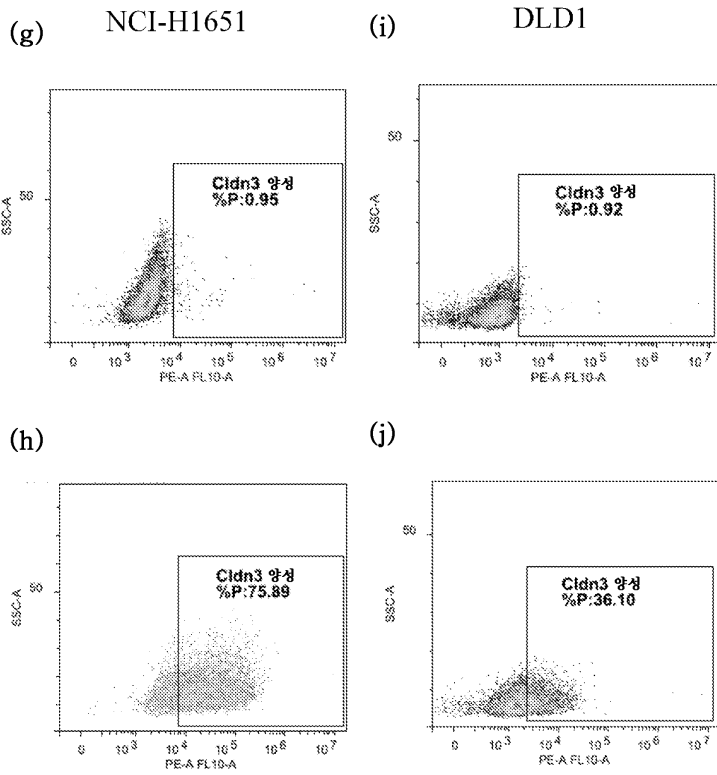
도면53



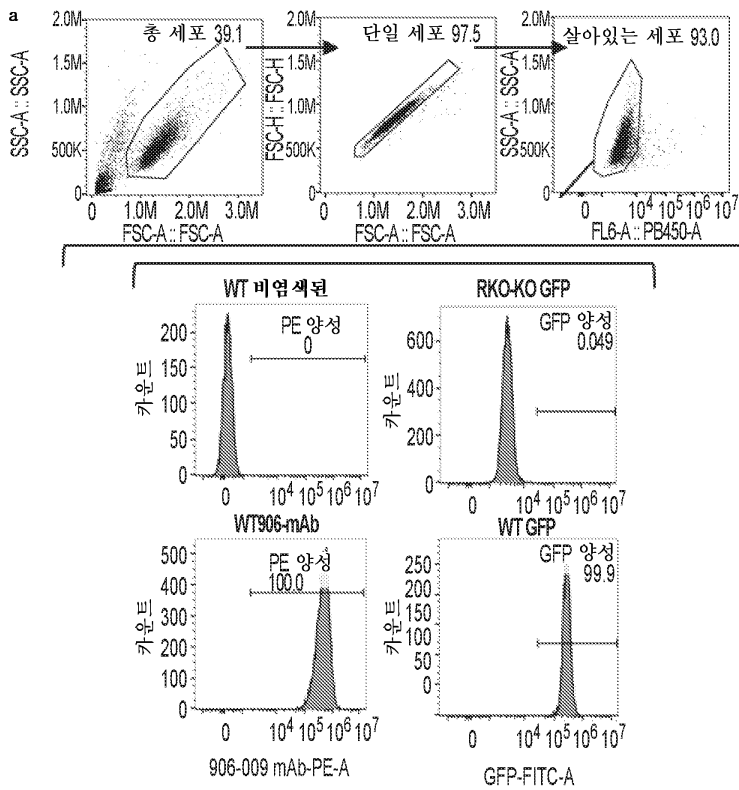
도면54i



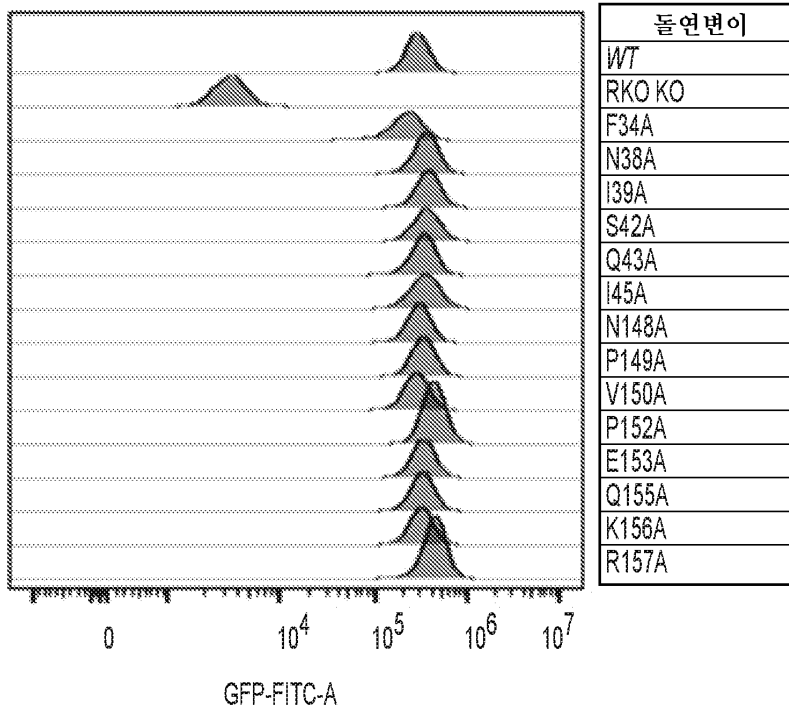
도면54ii



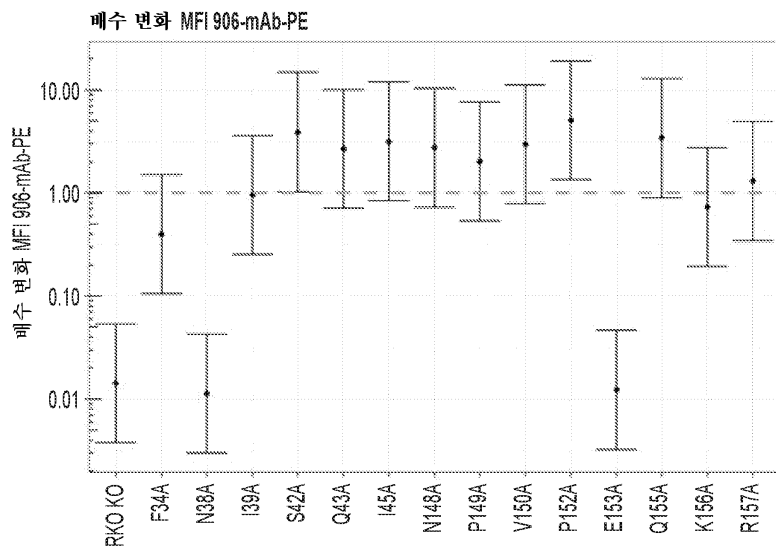
도면55a



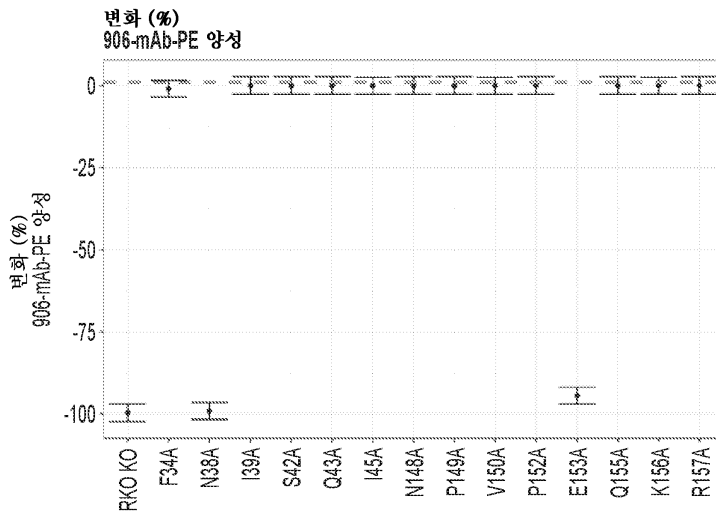
도면55b



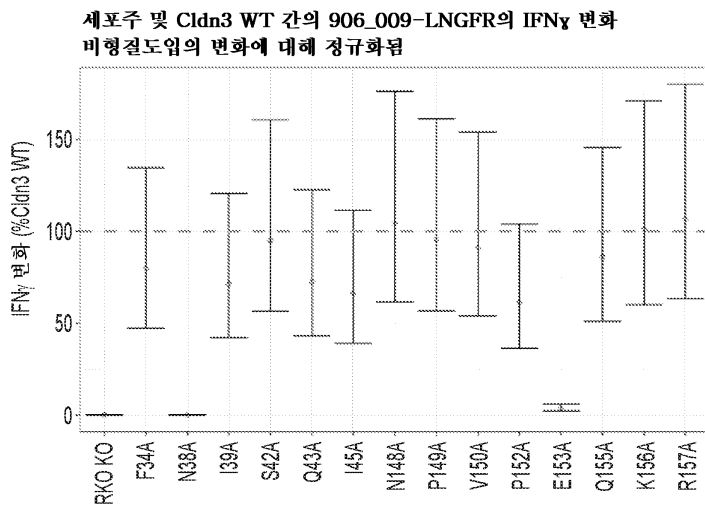
도면55c



도면55d



도면56



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> GLAXOSMITHKLINE INTELLECTUAL PROPERTY DEVELOPMENT LIMITED

<120> CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS TARGETING CLAUDIN-3 AND METHODS FOR TREATING CANCER

<130> PU66983

<140><141><150> 63/163,217

<151> 2021-03-19

<160> 39

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="906 CDRH1"

<400> 1

Asn Tyr Trp Val His

1                    5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="906 CDRH2"

<400> 2

Arg Ile Glu Pro Asn Ser Ser Gly Ser Gln Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1                    5                    10                    15

Asn

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="906 CDRH3"

<400> 3

Gly Val Met Val Pro Leu Asp Tyr

1                    5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="906 CDRL1"

<400> 4

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr Ile Ala

1                    5                    10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="906 CDRL2"

<400> 5

Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro

1                    5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="906 CDRL3"

<400> 6

Leu Gln Tyr Glu Thr Leu Tyr Ser

1                    5

<210> 7

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="906 VH"

<400> 7

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

1                    5                    10                    15

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

20                    25                    30

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

35                    40                    45

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

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

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

Ala Arg Gly Val Met Val Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 8

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221

> source

<223> /note="906 VL"

<400> 8

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr  
 20 25 30

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

His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Glu Thr Leu Tyr Ser  
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 9





<223

> /note="906\_009 full CAR sequence"

<400> 12

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



Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

485

<210> 13

<211> 220

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

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

1                    5                    10                    15  
Trp Leu Gly Thr Ile Val Cys Cys Ala Leu Pro Met Trp Arg Val Ser

                  20                    25                    30  
Ala Phe Ile Gly Ser Asn Ile Ile Thr Ser Gln Asn Ile Trp Glu Gly

                  35                    40                    45  
Leu Trp Met Asn Cys Val Val Gln Ser Thr Gly Gln Met Gln Cys Lys

                  50                    55                    60  
Val Tyr Asp Ser Leu Leu Ala Leu Pro Gln Asp Leu Gln Ala Ala Arg

65                    70                    75                    80  
Ala Leu Ile Val Val Ala Ile Leu Leu Ala Ala Phe Gly Leu Leu Val

                  85                    90                    95  
Ala Leu Val Gly Ala Gln Cys Thr Asn Cys Val Gln Asp Asp Thr Ala

                  100                    105                    110  
Lys Ala Lys Ile Thr Ile Val Ala Gly Val Leu Phe Leu Leu Ala Ala

                  115                    120                    125  
Leu Leu Thr Leu Val Pro Val Ser Trp Ser Ala Asn Thr Ile Ile Arg

                  130                    135                    140  
Asp Phe Tyr Asn Pro Val Val Pro Glu Ala Gln Lys Arg Glu Met Gly

145                    150                    155                    160  
Ala Gly Leu Tyr Val Gly Trp Ala Ala Ala Ala Leu Gln Leu Leu Gly

                  165                    170                    175  
Gly Ala Leu Leu Cys Cys Ser Cys Pro Pro Arg Glu Lys Lys Tyr Thr

                  180                    185                    190

Ala Thr Lys Val Val Tyr Ser Ala Pro Arg Ser Thr Gly Pro Gly Ala

195 200 205

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

210 215 220

<210> 14

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Trp Ser Ala Asn Thr Ile Ile Arg Asp Phe Tyr Asn Pro Val Val Pro

1 5 10 15

Glu Ala Gln Lys Arg Glu Met Gly Ala Gly Leu Tyr

20 25

<210> 15

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="PVVP epitope"

<400> 15

Pro Val Val Pro

1

<210> 16

<211> 729

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Nt sequence encoding 906 scFv (VL-VH orientation)"

<400> 16

gacatccaga tgaccagag ccttagcagc ctgagcgcca gcgtgggaga cagggtgacc 60

atcacctgca aggccagcca ggacatcaac aggtacatcg cctggtacca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatccactac accagcacc tgcagcccg cgtgcctct 180

aggttttagcg gcagcggcag cggcacccgac ttcacctga ccatcagcag cctccagccc 240  
  
 gaggacttcg ccacctacta ctgcctgcag tacgagacc tgtacagctt cggccagggc 300  
 accaagctgg agattaaggg cggaggtggg agcggcggag gaggcagcgg cggaggcggt 360  
 agcgggggcg gaggcagcca ggtgcagctc gtgcagagcg gagccgaggt gaaaaagccc 420  
 ggaagctctg tcaaggtgag ctgcaaggcc agcggctaca ccttcacaa ctactgggtg 480  
 cactgggtga ggcaggtccc cggacagggc ctggagtgga tgggcaggat cgagcccaac 540  
 agcagcggca gccagtacaa cgagaagttc aagaacaggg tgaccatcac cgccgacaag 600  
 agcaccagca ccgcctacat ggaactgagc agcctgagga gcgaggacac cgccgtgtat 660  
  
 tactgcgcca ggggcgtgat ggtgcccttg gactactggg gccagggcac cctggtgaca 720  
 gtgagcagc 729  
  
 <210> 17  
 <211> 2448  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Nt sequence encoding 906\_009 full CAR sequence"  
 <400> 17  
  
 atgaccacc ccaggaactc cgtgaacggc accttccccg ccgagccaat gaagggccct 60  
 atcgctatgc agagcggccc caagcccctg ttcaggagga tgtcaagcct cgtgggcct 120  
 acccagagct tcttcatgag ggagagcaag accctgggcg ccgtgcagat catgaacggc 180  
  
 ctcttcata tcgccctggg cggcctgctg atgatccccg ctggcattta cgeccccatc 240  
 tgcgtgaccg tgtggtatcc cctgtggggc ggcatcatgt acatcattag cgggagcctg 300  
 ctggccgcca ccgagaagaa ctctcgggaag tgcttggtga agggcaagat gatcatgaac 360  
 agcctgagcc tcttcgccgc catctccggc atgactctga gcatcatgga catcctgaac 420  
 atcaagatca gccacttctt gaagatggaa agcctcaact tcatcagggc ccacaccccc 480  
 tacatcaaca tctacaactg cgagcccgcc aatcccagcg agaagaacag ccccagcacc 540  
 cagtactgct acagcatcca gagcctgttc ctcgccatcc tgagcgtgat gctgatcttc 600  
  
 gccttcttc aagagctggt gatcggcggc atcgtggaga acgagtggaa gaggacctgc 660  
 agcagcccaa agagcaacat cgtgctgctg agcggcggag agaagaagga gcagactatc 720  
 gagatcaagg aggaggtggt gggcctgaca gagaccagca gccagcccaa gaacgaggag 780  
 gacatcgaga tcatccccat ccaggaggag gaggaggagg aaaccgagac caacttcccc 840

gagcccccc aggatcagga gtctagcccc atcgagaacg acagcagccc cggcagcagg 900  
gccaaaagga gggcagcgg cgcaaccaac ttcagcctgc tgaagcaggc cggagacgtg 960  
gaggagaatc cgggccaat ggcaactgcca gtcaccgctc tgctgctgcc cctggcctg 1020

ctgctgcacg ccgccaggcc cgatattcag atgaccaggt cccctctag cctgagcgcc 1080  
agcgtggcg acagggtgac catcacctgc aaggccagcc aggacatcaa cagatacatc 1140  
gcctgtacc agcagaagcc cggcaaggcc cccaagctgc tgatccacta caccagcacc 1200  
ctgcagcccg gcgtgcctag cagatttagc ggcagcggca gggcaccga cttcacctg 1260  
actatcagca gcctgcagcc cgaggacttc gccacactact actgcctgca gtacgagaca 1320  
ctgtacagct tcggccaggg caccaagctg gaaattaaag ggggagcgg cagcggcggc 1380  
ggcggctcag gggcggagg cagcggcggc gggggcagcc aggtgcagct ggtccagagc 1440

ggcggcagg tgaaaaagcc cggcagcagc gtgaaagtgt cctgcaagcc cagcggctac 1500  
accttaccac actactgggt gcactgggtc cggcagggcc cggccaggg actggagtgg 1560  
atggggagga tcgagcctaa cagcagcggc agccagtaca acgagaagtt caagaacagg 1620  
gtgaccatca ccgccacaa gagcaccagc accgcctaca tggagctcag cagcctgcgc 1680  
agcgaagaca ccgccgtgta ttactgcgcc aggggcgtga tgggtcccct ggactactgg 1740  
ggacagggca ccttggtagc cgtgagcagc gcctctacca caacccccgc tcccaggccc 1800  
ccccccctg cccccacat tgccctacaa ccctgagcc tgaggcccga gcctgtagg 1860

cccggcccg gaggcgcctg gcacaccagg ggcttgact tcgcctgca catctatc 1920  
tgggcccccc tggccggaac ctgtggcgtg ctgctcctga gcctggatg caccctgtac 1980  
tgcaagcggg gcaggaagaa gctgctgtac atcttcaagc agcccttcat gaggcccgtc 2040  
cagaccacc aggaggagga cgggtgcagc tgcaggttc ccgaagagga ggaaggcggc 2100  
tgcgagctga ggtcaagtt tagcaggagc gccgacgctc ccgctacca gcaaggcag 2160  
aatcagctct acaacgagct gaacctgggc aggaggagg agtacgacgt gctggacaaa 2220  
aggaggggca gggaccccga gatgggcggc aagcccagaa ggaagaacc ccaggaggc 2280

ctgtacaacg agctgcagaa ggacaaaatg gccgaggcct acagcgagat cggcatgaag 2340  
ggcgagagga ggaggggcaa gggccacgac ggctgtacc agggcctgag caccgctacc 2400  
aaggacacct acgacccct gcacatgcag gcctgctc ccagatga 2448

<210> 18

<211> 243

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="scFv (VH-VL orientation)"

<400> 18

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

1                    5                    10                    15

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

20                    25                    30

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

35                    40                    45

Gly Arg Ile Glu Pro Asn Ser Ser Gly Ser Gln Tyr Asn Glu Lys Phe

50                    55                    60

Lys Asn Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65                    70                    75                    80

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

85                    90                    95

Ala Arg Gly Val Met Val Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100                    105                    110

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

115                    120                    125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser

130                    135                    140

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

145                    150                    155                    160

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr Ile Ala Trp Tyr Gln Gln Lys

165                    170                    175

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

180                    185                    190

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

195                    200                    205

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

210                    215                    220

Cys Leu Gln Tyr Glu Thr Leu Tyr Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu  
 225                      230                      235                      240  
 Glu Ile Lys

<210> 19

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="CD8 transmembrane domain"

<400> 19

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu  
 1                      5                      10                      15  
 Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys

20

<210> 20

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="4-1BB costimulatory domain"

<400> 20

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met  
 1                      5                      10                      15  
 Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe  
                          20                      25                      30  
 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu  
                          35                      40

<210> 21

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="CD3z intracellular signalling domain"

<400> 21

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

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

                  50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

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

                  100                    105                    110

<210> 22

<211> 297

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Met Thr Thr Pro Arg Asn Ser Val Asn Gly Thr Phe Pro Ala Glu Pro

1                    5                    10                    15

Met Lys Gly Pro Ile Ala Met Gln Ser Gly Pro Lys Pro Leu Phe Arg

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

Ser Lys Thr Leu Gly Ala Val Gln Ile Met Asn Gly Leu Phe His Ile

                  50                    55                    60

Ala Leu Gly Gly Leu Leu Met Ile Pro Ala Gly Ile Tyr Ala Pro Ile

65                    70                    75                    80

Cys Val Thr Val Trp Tyr Pro Leu Trp Gly Gly Ile Met Tyr Ile Ile



<223> /note="P2A cleavage site"

<400> 23

Gly Ser Arg Ala Lys Arg Ser Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu  
 1                    5                    10                    15  
 Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro  
                   20                    25

<210> 24

<211> 815

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="polypeptide including hCD20 and 906\_009 CAR"

<400> 24

Met Thr Thr Pro Arg Asn Ser Val Asn Gly Thr Phe Pro Ala Glu Pro  
 1                    5                    10                    15

Met Lys Gly Pro Ile Ala Met Gln Ser Gly Pro Lys Pro Leu Phe Arg  
                   20                    25                    30

Arg Met Ser Ser Leu Val Gly Pro Thr Gln Ser Phe Phe Met Arg Glu  
                   35                    40                    45

Ser Lys Thr Leu Gly Ala Val Gln Ile Met Asn Gly Leu Phe His Ile  
                   50                    55                    60

Ala Leu Gly Gly Leu Leu Met Ile Pro Ala Gly Ile Tyr Ala Pro Ile  
 65                    70                    75                    80

Cys Val Thr Val Trp Tyr Pro Leu Trp Gly Gly Ile Met Tyr Ile Ile  
                   85                    90                    95

Ser Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Glu Lys Asn Ser Arg Lys Cys Leu  
                   100                    105                    110

Val Lys Gly Lys Met Ile Met Asn Ser Leu Ser Leu Phe Ala Ala Ile  
                   115                    120                    125

Ser Gly Met Ile Leu Ser Ile Met Asp Ile Leu Asn Ile Lys Ile Ser  
                   130                    135                    140

His Phe Leu Lys Met Glu Ser Leu Asn Phe Ile Arg Ala His Thr Pro  
 145                      150                      155                      160  
 Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn  
                                  165                      170                      175  
 Ser Pro Ser Thr Gln Tyr Cys Tyr Ser Ile Gln Ser Leu Phe Leu Gly  
                                  180                      185                      190  
 Ile Leu Ser Val Met Leu Ile Phe Ala Phe Phe Gln Glu Leu Val Ile  
                                  195                      200                      205  
  
 Ala Gly Ile Val Glu Asn Glu Trp Lys Arg Thr Cys Ser Arg Pro Lys  
                                  210                      215                      220  
 Ser Asn Ile Val Leu Leu Ser Ala Glu Glu Lys Lys Glu Gln Thr Ile  
 225                      230                      235                      240  
 Glu Ile Lys Glu Glu Val Val Gly Leu Thr Glu Thr Ser Ser Gln Pro  
                                  245                      250                      255  
 Lys Asn Glu Glu Asp Ile Glu Ile Ile Pro Ile Gln Glu Glu Glu Glu  
                                  260                      265                      270  
  
 Glu Glu Thr Glu Thr Asn Phe Pro Glu Pro Pro Gln Asp Gln Glu Ser  
                                  275                      280                      285  
 Ser Pro Ile Glu Asn Asp Ser Ser Pro Gly Ser Arg Ala Lys Arg Ser  
                                  290                      295                      300  
 Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val  
 305                      310                      315                      320  
 Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu  
                                  325                      330                      335  
  
 Pro Leu Ala Leu Leu Leu His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr  
                                  340                      345                      350  
 Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile  
                                  355                      360                      365  
 Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr Ile Ala Trp Tyr Gln  
                                  370                      375                      380  
 Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile His Tyr Thr Ser Thr



Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val  
 645 650 655

Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe  
 660 665 670

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly  
 675 680 685

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg  
 690 695 700

Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln  
 705 710 715 720

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp  
 725 730 735

Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro  
 740 745 750

Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp  
 755 760 765

Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg  
 770 775 780

Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr  
 785 790 795 800

Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 805 810 815

<210> 25

<211> 489

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="906\_004 full CAR sequence"

<400> 25

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 1 5 10 15

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



<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Arg Val Ser Ala Phe Ile Gly Ser Asn Ile Ile Thr Ser Gln Asn Ile

1                    5                    10                    15

Trp Glu Gly Leu Trp Met Asn Cys Val Val Gln Ser Thr Gly Gln Met

                  20                    25                    30

Gln Cys Lys Val Tyr Asp Ser Leu Leu Ala Leu Pro Gln Asp Leu Gln

                  35                    40                    45

Ala Ala Arg

50

<210> 27

<211> 672

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="906\_007 full CAR sequence"

<400> 27

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

Asp Ile Asn Arg Tyr Ile Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala

50                    55                    60

Pro Lys Leu Leu Ile His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Val Pro

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr

100                    105                    110

Glu Thr Leu Tyr Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly  
 115 120 125  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 130 135 140  
 Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
 145 150 155 160  
  
 Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 165 170 175  
 Thr Asn Tyr Trp Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
 180 185 190  
 Glu Trp Met Gly Arg Ile Glu Pro Asn Ser Ser Gly Ser Gln Tyr Asn  
 195 200 205  
 Glu Lys Phe Lys Asn Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser  
 210 215 220  
  
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
 225 230 235 240  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Val Met Val Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln  
 245 250 255  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro  
 260 265 270  
 Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe  
 275 280 285  
  
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
 290 295 300  
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val  
 305 310 315 320  
 Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
 325 330 335  
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 340 345 350  
  
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys



Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys  
 610                      615                      620  
 Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg  
 625                      630                      635                      640  
 Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala  
                                  645                      650                      655  
 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
                                  660                      665                      670

<210> 28

<211> 456

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="906\_010 full CAR sequence"

<400> 28

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

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

Glu Thr Leu Tyr Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly  
 115                      120                      125  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

130                      135                      140  
 Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
 145                      150                      155                      160  
 Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
                                  165                      170                      175  
  
 Thr Asn Tyr Trp Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
                                  180                      185                      190  
 Glu Trp Met Gly Arg Ile Glu Pro Asn Ser Ser Gly Ser Gln Tyr Asn  
                                  195                      200                      205  
 Glu Lys Phe Lys Asn Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser  
                                  210                      215                      220  
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
 225                      230                      235                      240  
  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Val Met Val Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln  
                                  245                      250                      255  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro  
                                  260                      265                      270  
 Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr  
                                  275                      280                      285  
 Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg  
                                  290                      295                      300  
  
 Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro  
 305                      310                      315                      320  
 Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu  
                                  325                      330                      335  
 Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala  
                                  340                      345                      350  
 Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu  
                                  355                      360                      365  
  
 Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly  
                                  370                      375                      380

Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu  
 385                      390                      395                      400  
 Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser  
                                  405                      410                      415  
 Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly  
                                  420                      425                      430  
  
 Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu  
                                  435                      440                      445  
 His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
                                  450                      455  
 <210> 29  
 <211> 672  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="906\_002 full CAR sequence"  
 <400> 29  
  
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 1                      5                      10                      15  
 His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val  
  
                                  20                      25                      30  
 Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr  
                                  35                      40                      45  
 Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln  
                                  50                      55                      60  
 Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Glu Pro Asn Ser Ser Gly Ser Gln  
 65                      70                      75                      80  
 Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asn Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser  
  
                                  85                      90                      95  
 Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr  
                                  100                      105                      110  
 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Val Met Val Pro Leu Asp Tyr Trp



Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 370 375 380  
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
 385 390 395 400  
 Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
 405 410 415  
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
 420 425 430  
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
 435 440 445  
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
 450 455 460  
 Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
 465 470 475 480  
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ile Tyr  
 485 490 495  
 Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu  
 500 505 510  
 Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile  
 515 520 525  
 Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp  
 530 535 540  
 Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu  
 545 550 555 560  
 Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly  
 565 570 575  
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr  
 580 585 590  
 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys  
 595 600 605  
 Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys



Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile  
 145                      150                      155                      160  
 Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg  
  
                                  165                      170                      175  
 Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr Ile Ala  
                                  180                      185                      190  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile His Tyr  
                                  195                      200                      205  
 Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly  
                                  210                      215                      220  
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp  
  
 225                      230                      235                      240  
 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Glu Thr Leu Tyr Ser Phe Gly  
                                  245                      250                      255  
 Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro  
                                  260                      265                      270  
 Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr  
                                  275                      280                      285  
 Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg  
  
                                  290                      295                      300  
 Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro  
 305                      310                      315                      320  
 Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu  
                                  325                      330                      335  
 Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala  
                                  340                      345                      350  
 Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu  
  
                                  355                      360                      365  
 Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly  
                                  370                      375                      380  
 Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu

385                    390                    395                    400  
 Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser  
                           405                    410                    415  
 Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly  
  
                           420                    425                    430  
 Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu  
                           435                    440                    445  
 His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
                           450                    455  
 <210> 31  
 <211> 228  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="spacer L"  
 <400> 31  
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val  
 1                    5                    10                    15  
  
 Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
                           20                    25                    30  
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
                           35                    40                    45  
 Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
                           50                    55                    60  
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser Thr  
 65                    70                    75                    80  
  
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
                           85                    90                    95  
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser  
                           100                    105                    110  
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
                           115                    120                    125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val  
 130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
 145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
 165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr  
 180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
 195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
 210 215 220

Ser Leu Gly Lys

225

<210> 32

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="spacer S"

<400> 32

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala  
 1 5 10 15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly  
 20 25 30

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp  
 35 40 45

<210> 33

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="spacer XS

<400> 33

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1                    5                    10

<210> 34

<211> 468

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="906\_009 full CAR sequence without CD8 Leader sequence"

<400> 34

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

1                    5                    10                    15

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

20                    25                    30

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

35                    40                    45

His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50                    55                    60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65                    70                    75                    80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Glu Thr Leu Tyr Ser

85                    90                    95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly

100                    105                    110

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

115                    120                    125

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

130                    135                    140

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

145                    150                    155                    160

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



Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met  
 420 425 430

Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly  
 435 440 445

Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala  
 450 455 460

Leu Pro Pro Arg  
 465

<210> 35

<211> 468

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="906\_004 full CAR sequence without CD8 Leader sequence"

<400> 35

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Gly Val Met Val Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser



Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu  
 385                      390                      395                      400

Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn  
                                  405                      410                      415

Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met  
                                  420                      425                      430

Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly  
                                  435                      440                      445

Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala  
                                  450                      455                      460

Leu Pro Pro Arg  
 465

<210> 36

<211> 651

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="906\_007 full CAR sequence without CD8 Leader sequence"

<400> 36

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr  
                                  20                      25                      30

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

His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
                                  50                      55                      60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Glu Thr Leu Tyr Ser  
                                  85                      90                      95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly



Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 355 360 365  
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met  
 370 375 380  
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 385 390 395 400  
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 405 410 415  
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 420 425 430  
 Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val  
 435 440 445  
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
 450 455 460  
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu  
 465 470 475 480  
 Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr  
 485 490 495  
 Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe  
 500 505 510  
 Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg  
 515 520 525  
 Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser  
 530 535 540  
 Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr  
 545 550 555 560  
 Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys  
 565 570 575  
 Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn  
 580 585 590  
 Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu



Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Val  
 145                      150                      155                      160  
 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg  
                                  165                      170                      175  
 Ile Glu Pro Asn Ser Ser Gly Ser Gln Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asn  
                                  180                      185                      190  
 Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu  
                                  195                      200                      205  
 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 210                      215                      220  
 Gly Val Met Val Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 225                      230                      235                      240  
 Val Ser Ser Ala Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys  
                                  245                      250                      255  
 Pro Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu  
                                  260                      265                      270  
 Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu  
 275                      280                      285  
 Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln  
                                  290                      295                      300  
 Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly  
 305                      310                      315                      320  
 Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr  
                                  325                      330                      335  
 Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg  
 340                      345                      350  
 Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met  
                                  355                      360                      365  
 Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu  
                                  370                      375                      380  
 Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys





Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 385 390 395 400

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 405 410 415

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 420 425 430

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val  
 435 440 445

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
 450 455 460

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu  
 465 470 475 480

Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr  
 485 490 495

Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe  
 500 505 510

Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg  
 515 520 525

Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser  
 530 535 540

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr  
 545 550 555 560

Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys  
 565 570 575

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn  
 580 585 590

Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu  
 595 600 605

Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly  
 610 615 620

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





Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu  
420 425 430

Pro Pro Arg  
435