



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0148837
(43) 공개일자 2023년10월25일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/47 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/71 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/4747 (2013.01)
A61K 39/4611 (2023.05)
- (21) 출원번호 10-2023-7032292
- (22) 출원일자(국제) 2022년02월24일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2023년09월20일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2022/017738
- (87) 국제공개번호 WO 2022/182891
국제공개일자 2022년09월01일
- (30) 우선권주장
63/153,878 2021년02월25일 미국(US)
(뒷면에 계속)

- (71) 출원인
라이엘 이뮤노파마, 인크.
미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 헤스킨스 웨이 201
- (72) 발명자
박, 스펜서
미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 헤스킨스 웨이 201 라이엘 이뮤노파마, 인크. 내
붕, 퀴니
미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 헤스킨스 웨이 201 라이엘 이뮤노파마, 인크. 내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 이상남

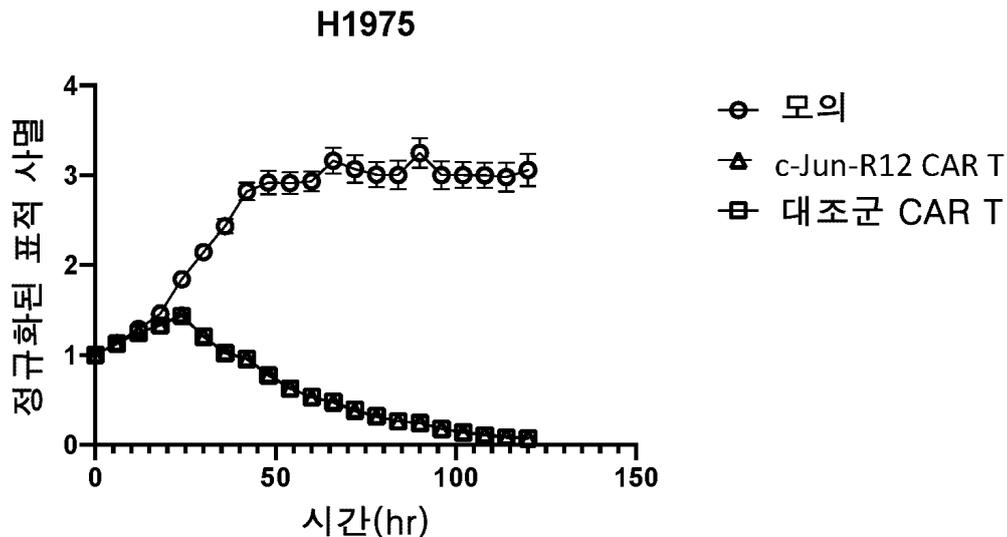
전체 청구항 수 : 총 147 항

(54) 발명의 명칭 ROR1 표적화 키메라 항원 수용체

(57) 요약

본 개시내용은 c-Jun 폴리펩티드, ROR1-결합 단백질 및 절단된 EGF 수용체를 포함하는 키메라 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 또한 ROR1-결합 단백질을 포함하는 CAR을 발현하고 c-Jun 폴리펩티드를 과발현하는 세포(예를 들어, T 세포)가 제공된다. CAR T 세포에서 c-Jun의 과발현은 개선된 특성, 예를 들어 고갈 감소 또는 방지를 부여한다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61K 39/4631 (2023.05)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/71 (2013.01)
C07K 16/2803 (2013.01)
C12N 15/62 (2013.01)
C12N 5/0636 (2023.05)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)

(72) 발명자

새더, 블라이드

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 헤스킨스 웨이 201 라이엘 이뮤노파마, 인크. 내

류, 병

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 헤스킨스 웨이 201 라이엘 이뮤노파마, 인크. 내

라주아, 마르크

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 헤스킨스 웨이 201 라이엘 이뮤노파마, 인크. 내

모페트, 하웰

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 헤스킨스 웨이 201 라이엘 이뮤노파마, 인크. 내

웨이츠너, 브라이언

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 헤스킨스 웨이 201 라이엘 이뮤노파마, 인크. 내

송, 윤

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 헤스킨스 웨이 201 라이엘 이뮤노파마, 인크. 내

보이켄, 스콧

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 헤스킨스 웨이 201 라이엘 이뮤노파마, 인크. 내

샤르마, 니라즈

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 헤스킨스 웨이 201 라이엘 이뮤노파마, 인크. 내

포틀루리, 쇼바

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 헤스킨스 웨이 201 라이엘 이뮤노파마, 인크. 내

블다지푸르, 비잔

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 헤스킨스 웨이 201 라이엘 이뮤노파마, 인크. 내

(30) 우선권주장

63/263,229 2021년10월28일 미국(US)
 63/309,393 2022년02월11일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

c-Jun 폴리펩티드(c-jun), ROR1 결합 단백질 및 절단된 EGF 수용체(EGFRt)를 포함하는 키메라 폴리펩티드를 암호화하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 2

제1항에 있어서, c-Jun 폴리펩티드가 서열 번호 1과 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 3

제2항에 있어서, c-Jun 폴리펩티드는 키메라 폴리펩티드가 세포 내에서 발현될 때 세포의 고갈을 방지하거나 감소시킬 수 있는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, ROR1 결합 단백질이 ROR1에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 T 세포 수용체(TCR)를 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 5

제4항에 있어서, CAR이 ROR1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서, ROR1 결합 단백질이 R12 항체와 동일한 에피토프에 특이적으로 결합하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 7

제6항에 있어서, ROR1-결합 단백질이 R12 항체의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH) 및 R12 항체의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 8

제7항에 있어서, VH CDR1이 서열 번호 45를 포함하고, VH CDR2가 서열 번호 46을 포함하고, VH CDR3이 서열 번호 47을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서, VL CDR1이 서열 번호 49를 포함하고, VL CDR2가 서열 번호 50을 포함하고, VL CDR3이 서열 번호 51을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 10

제6항 또는 제7항에 있어서, ROR1 결합 부분의 VH가 서열 번호 44를 포함하고 ROR1 결합 부분의 VL이 서열 번호 48을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 11

제10항에 있어서, ROR1 결합 부분이 서열 번호 52와 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 서열 동일

성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 12

제4항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, CAR이 막횡단(TM) 도메인을 추가로 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 13

제12항에 있어서, TM 도메인이 CD8a, CD2, CD4, CD28, CD45, PD1, CD152, 또는 이의 임의의 조합으로부터 유래된, 폴리뉴클레오티드.

청구항 14

제12항에 있어서, TM 도메인이 CD28로부터 유래된, 폴리뉴클레오티드.

청구항 15

제14항에 있어서, TM 도메인이 서열 번호 54와 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 16

제12항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, CAR이 ROR1 및 TM 도메인에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 부분 사이에 스페이서를 추가로 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 17

제16항에 있어서, 스페이서가 면역글로불린 힌지 영역 또는 CD8로부터 유래된, 폴리뉴클레오티드.

청구항 18

제16항에 있어서, 스페이서가 서열 번호 15에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 19

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 스페이서가 링커를 추가로 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 20

제19항에 있어서, 링커가 GGGSG(서열 번호 16)를 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 21

제4항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, CAR이 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 22

제21항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인이 CD3 ζ 활성화 도메인, CD3 δ 활성화 도메인, CD3 ϵ 활성화 도메인, CD3 η 활성화 도메인, CD79A 활성화 도메인, DAP 12 활성화 도메인, FCER1G 활성화 도메인, DAP10/CD28 활성화 도메인, ZAP70 활성화 도메인, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 23

제21항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인이 CD3 ζ 활성화 도메인을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 24

제23항에 있어서, CD3 ζ 활성화 도메인이 서열 번호 55와 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 적어도 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 25

제4항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, CAR이 세포내 공동-자극 신호전달 영역을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 26

제25항에 있어서, 세포내 공동-자극 신호전달 도메인이 인터루킨-2 수용체(IL-2R), 인터루킨-12 수용체(IL-12R), IL-7, IL-21, IL-23, IL-15, CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD27, CD28, CD30, CD40, 4-1BB/CD137, ICOS, 림프구 기능 연관 항원-1(LFA-1), LIGHT, NKG2C, OX40, DAP10, B7-H3, Lck 결합에 대해 결실된 CD28(ICA), OX40, BTLA, GITR, HVEM, LFA-1, LIGHT, NKG2C, PD-1, TILR2, TILR4, TILR7, TILR9, Fc 수용체 감마 사슬, Fc 수용체 ϵ 사슬, CD83과 특이적으로 결합하는 리간드, 또는 이의 임의의 조합의 공동자극 도메인을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 27

제25항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인이 4-1BB 공동-자극 도메인을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 28

제27항에 있어서, 4-1BB 공동-자극 도메인이 서열 번호 53과 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 적어도 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 29

(i) ROR1-결합 단백질, (ii) 서열 번호 15에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 스페이서, (iii) CD28 막횡단 단백질, (iv) 4-1BB 공동-자극 영역, 및 (v) CD3 ζ 활성화 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 30

(i) R12 항체의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH) 및 R12 항체의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 ROR1-결합 단백질; (ii) 서열 번호 15에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 스페이서; 및 (iii) 절단된 EGF 수용체(EGFRt)를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 31

제30항에 있어서, ROR1 결합 부분의 VH가 서열 번호 44를 포함하고 ROR1 결합 부분의 VL이 서열 번호 48을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 32

제30항 또는 제31항에 있어서, EGFRt가 서열 번호 3과 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 33

제29항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, c-Jun 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 34

제1항 내지 제28항 및 제33항 중 어느 한 항에 있어서, c-jun 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열 및 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 동일한 벡터 상에 있는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 35

제34항에 있어서, c-jun 폴리펩티드 및 CAR이 링커에 의해 결합된, 폴리뉴클레오티드.

청구항 36

제35항에 있어서, 링커가 절단 가능 링커인, 폴리뉴클레오티드.

청구항 37

제35항에 있어서, 링커가 P2A 링커, T2A 링커, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 38

제1항 내지 제28항 및 제33항 중 어느 한 항에 있어서, c-jun 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열 및 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 상이한 벡터 상에 있는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 39

제1항 내지 제28항 및 제33항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 절단된 EGF 수용체(EGFRt)를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 40

제39항에 있어서, 절단된 EGF 수용체(EGFRt)를 암호화하는 뉴클레오티드 서열 및 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 동일한 벡터 상에 있는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 41

제40항에 있어서, EGFRt 및 CAR이 링커에 의해 결합된, 폴리뉴클레오티드.

청구항 42

제41항에 있어서, 링커가 절단 가능 링커인, 폴리뉴클레오티드.

청구항 43

제42항에 있어서, 링커가 P2A 링커, T2A 링커, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 44

제1항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, CAR이 신호 펩티드를 추가로 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 45

제44항에 있어서, 신호 펩티드가 hIgK로부터 유래된, 폴리뉴클레오티드.

청구항 46

제45항에 있어서, hIgK 신호 펩티드가 서열 번호 17로 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 47

제1항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, EGFRt가 서열 번호 3과 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 48

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 골수증식성 육종 바이러스 인헨서, 음성 대조군 영역 결실, d1587rev 프라이머-결합 부위 치환(MND) 프로모터, EF1a 프로모터 및/또는 유비퀴틴 프로모터를 추가로 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 49

제48항에 있어서, MND 프로모터가 서열 번호 64와 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 50

제1항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 58과 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 51

서열 번호 57과 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 CAR을 암호화하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 52

제1항 내지 제51항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 벡터.

청구항 53

제1항 내지 제51항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오티드 또는 제52항의 벡터에 의해 암호화되는, 폴리펩티드.

청구항 54

(i) ROR1-결합 항체 또는 이의 항원 결합 부분, (ii) 서열 번호 15에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 스페이서, (iii) CD28 막횡단 단백질, (iv) 4-1BB 공동-자극 영역, 및 (v) CD3 ζ 활성화 도메인을 포함하는, 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드.

청구항 55

제54항에 있어서, ROR1-결합 항체 또는 이의 항원 결합 부분이 R12 항체와 동일한 에피토프에 특이적으로 결합하는, 폴리펩티드.

청구항 56

제55항에 있어서, ROR1-결합 항체 또는 이의 항원 결합 부분이 R12 항체의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH) 및 R12 항체의 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 57

제56항에 있어서, VH CDR1이 서열 번호 45를 포함하고, VH CDR2가 서열 번호 46을 포함하고, VH CDR3이 서열 번호 47을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 58

제56항 또는 제57항에 있어서, VL CDR1이 서열 번호 49를 포함하고, VL CDR2가 서열 번호 50을 포함하고, VL CDR3이 서열 번호 51을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 59

제57항 또는 제58항에 있어서, ROR1-결합 항체 또는 이의 항원 결합 부분의 VH가 서열 번호 44를 포함하고 ROR1 결합 부분의 VL이 서열 번호 48을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 60

제53항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, ROR1-결합 항체 또는 이의 항원 결합 부분이 서열 번호 52와 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적

어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 61

제53항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 막횡단(TM) 도메인을 추가로 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 62

제61항에 있어서, CD28 TM 도메인이 서열 번호 54와 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 63

제53항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, CD3 ζ 활성화 도메인이 서열 번호 55와 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 적어도 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 64

제53항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 4-1BB 공동-자극 도메인이 서열 번호 53과 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 적어도 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 65

c-Jun 폴리펩티드(c-jun), CAR 폴리펩티드 및 절단된 EGF 수용체(EGFRt)를 포함하는, 키메라 폴리펩티드.

청구항 66

제65항에 있어서, CAR 폴리펩티드가 제53항 내지 제64항 중 어느 한 항의 폴리펩티드를 포함하는, 키메라 폴리펩티드.

청구항 67

제65항 또는 제66항에 있어서, c-Jun 폴리펩티드가 서열 번호 1과 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 키메라 폴리펩티드.

청구항 68

제65항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, c-Jun 폴리펩티드는 키메라 폴리펩티드가 세포 내에서 발현될 때 세포의 고갈을 방지하거나 감소시킬 수 있는, 키메라 폴리펩티드.

청구항 69

제65항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, c-jun 폴리펩티드 및 CAR 폴리펩티드가 동일한 벡터 상에 있는, 키메라 폴리펩티드.

청구항 70

제69항에 있어서, c-jun 폴리펩티드 및 CAR 폴리펩티드가 링커에 의해 결합된, 키메라 폴리펩티드.

청구항 71

제70항에 있어서, 링커가 절단 가능 링커인, 키메라 폴리펩티드.

청구항 72

제71항에 있어서, 링커가 P2A 링커, T2A 링커, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는, 키메라 폴리펩티드.

청구항 73

제65항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, c-jun 폴리펩티드 및 CAR 폴리펩티드가 상이한 벡터 상에 있는, 키메라 폴리펩티드.

청구항 74

제65항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 절단된 EGF 수용체(EGFRt) 및 CAR이 동일한 벡터 상에 있는, 키메라 폴리펩티드.

청구항 75

제74항에 있어서, EGFRt 및 CAR이 링커에 의해 결합된, 키메라 폴리펩티드.

청구항 76

제75항에 있어서, 링커가 절단 가능 링커인, 키메라 폴리펩티드.

청구항 77

제76항에 있어서, 링커가 P2A 링커, T2A 링커, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는, 키메라 폴리펩티드.

청구항 78

제65항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서, EGFRt가 서열 번호 3과 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 키메라 폴리펩티드.

청구항 79

제65항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 52와 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 키메라 폴리펩티드.

청구항 80

서열 번호 52와 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 키메라 폴리펩티드.

청구항 81

제65항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, CAR 폴리펩티드가 신호 펩티드를 추가로 포함하는, 키메라 폴리펩티드.

청구항 82

제81항에 있어서, 신호 펩티드가 hIgK로부터 유래된, 키메라 폴리펩티드.

청구항 83

제82항에 있어서, hIgK 신호 펩티드가 서열 번호 17로 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 키메라 폴리펩티드.

청구항 84

제1항 내지 제51항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오티드, 제52항의 벡터, 제53항 내지 제64항 중 어느 한 항의 폴리펩티드, 제65항 내지 제83항 중 어느 한 항의 키메라 폴리펩티드, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는, 변형된 세포.

청구항 85

c-jun 폴리펩티드, 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드 및 절단된 EGF 수용체(EGFRt)를 포함하는, 변형된

세포.

청구항 86

제85항에 있어서, CAR 폴리펩티드가 제53항 내지 제64항 중 어느 한 항의 폴리펩티드를 포함하는, 변형된 세포.

청구항 87

제85항 또는 제86항에 있어서, CAR 폴리펩티드 및 EGFRt가 세포 표면 상에서 발현된, 변형된 세포.

청구항 88

제84항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 면역 세포인, 변형된 세포.

청구항 89

제88항에 있어서, 세포가 T 세포, B 세포, 조절 T 세포(Treg), 종양 침윤 림프구(TIL), 자연 살해(NK) 세포, 자연 살해 T(NKT) 세포, 줄기 세포, 유도된 만능 줄기 세포, 및 이의 임의의 조합인, 변형된 세포.

청구항 90

제83항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 시험관내 또는 생체외 조작된, 변형된 세포.

청구항 91

제83항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 시험관내 또는 생체외 배양된, 변형된 세포.

청구항 92

제84항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, c-Jun 폴리펩티드의 발현이 제1항 내지 제51항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오티드, 제52항의 벡터, 제53항 내지 제64항 중 어느 한 항의 폴리펩티드, 또는 제65항 내지 제83항 중 어느 한 항의 키메라 폴리펩티드를 포함하도록 변형되지 않은 상응하는 세포와 비교하여 증가된, 변형된 세포.

청구항 93

제92항에 있어서, 상응하는 세포와 비교하여 c-Jun 폴리펩티드의 발현이 적어도 약 1배, 적어도 약 2배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배, 적어도 약 11배, 적어도 약 12배, 적어도 약 13배, 적어도 약 14배, 적어도 약 15배, 적어도 약 16배, 적어도 약 17배, 적어도 약 18배, 적어도 약 19배, 적어도 약 20배, 적어도 약 25배, 적어도 약 30배, 적어도 약 35배, 적어도 약 40배, 적어도 약 45배, 적어도 약 50배, 적어도 약 75배, 적어도 약 100배, 적어도 약 200배, 적어도 약 300배, 적어도 약 400배, 적어도 약 500배, 적어도 약 750배, 또는 적어도 약 1,000배 이상만큼 증가된, 변형된 세포.

청구항 94

c-Jun 폴리펩티드, 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드 및 절단된 EGF 수용체(EGFRt)를 포함하는 면역 세포 집단으로서, c-Jun 폴리펩티드를 포함하지 않는 상응하는 참조 세포 집단과 비교하여 항원 자극 후 감소된 수의 TIGIT-양성 면역 세포를 포함하는, 면역 세포 집단.

청구항 95

제94항에 있어서, 항원 자극 후 집단에 존재하는 TIGIT-양성 면역 세포의 수가 참조 집단과 비교하여 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 또는 적어도 약 60%만큼 감소된, 면역 세포 집단.

청구항 96

제94항 또는 제95항에 있어서, 항원 자극 후 약 15% 미만, 약 14% 미만, 약 13% 미만, 약 12% 미만, 약 11% 미만, 약 10% 미만, 약 9% 미만, 약 8% 미만, 약 7% 미만, 약 6% 미만 또는 약 5% 미만의 TIGIT-양성 면역 세포

를 포함하는, 면역 세포 집단.

청구항 97

c-Jun 폴리펩티드, 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드 및 절단된 EGF 수용체(EGFRt)를 포함하는 면역 세포 집단으로서, c-Jun 폴리펩티드를 포함하지 않는 상응하는 참조 세포 집단과 비교하여 항원 자극 후 감소된 수의 TNFRSF9-양성 면역 세포를 포함하는, 면역 세포 집단.

청구항 98

제97항에 있어서, 항원 자극 후 집단에 존재하는 TNFRSF9-양성 면역 세포의 수가 참조 집단과 비교하여 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 또는 적어도 약 70%만큼 감소된, 면역 세포 집단.

청구항 99

제97항 또는 제98항에 있어서, 항원 자극 후 약 5% 미만, 약 4.5% 미만, 약 4% 미만, 약 3.5% 미만, 또는 약 2% 미만의 TNFRSF9-양성 면역 세포를 포함하는, 면역 세포 집단.

청구항 100

c-Jun 폴리펩티드, 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드 및 절단된 EGF 수용체(EGFRt)를 포함하는 면역 세포 집단으로서, c-Jun 폴리펩티드를 포함하지 않는 상응하는 참조 세포 집단과 비교하여 항원 자극 후 감소된 수의 GZMA-양성 면역 세포를 포함하는, 면역 세포 집단.

청구항 101

제100항에 있어서, 항원 자극 후 집단에 존재하는 GZMA-양성 면역 세포의 수가 참조 집단과 비교하여 적어도 약 40%, 적어도 약 35%, 적어도 약 30%, 적어도 약 25% 또는 적어도 약 20%만큼 감소된, 면역 세포 집단.

청구항 102

제100항 또는 제101항에 있어서, 항원 자극 후 약 30% 미만, 약 25% 미만, 약 20% 미만, 약 15% 미만, 또는 약 10% 미만의 GZMA-양성 면역 세포를 포함하는, 면역 세포 집단.

청구항 103

제94항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, CAR 폴리펩티드가 제54항 내지 제64항 중 어느 한 항의 CAR 폴리펩티드를 포함하는, 면역 세포 집단.

청구항 104

제94항 내지 제103항 중 어느 한 항에 있어서, c-Jun 폴리펩티드가 서열 번호 1과 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 면역 세포 집단.

청구항 105

제94항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, EGFRt가 서열 번호 3과 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 면역 세포 집단.

청구항 106

제94항 내지 제105항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 세포가 T 세포, B 세포, 조절 T 세포(Treg), 중앙 침윤 림프구(TIL), 자연 살해(NK) 세포, 자연 살해 T 세포(NKT) 세포, 줄기 세포, 유도된 만능 줄기 세포, 또는 이의 조합을 포함하는, 면역 세포 집단.

청구항 107

제106항에 있어서, 면역 세포가 T 세포인, 면역 세포 집단.

청구항 108

제1항 내지 제51항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오티드, 제52항의 벡터, 제53항 내지 제64항 중 어느 한 항의 폴리펩티드, 제65항 내지 제83항 중 어느 한 항의 키메라 폴리펩티드, 또는 제84항 내지 제93항 중 어느 한 항의 변형된 세포 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 약학 조성물.

청구항 109

세포를 제1항 내지 제51항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오티드 또는 제52항의 벡터로 형질감염시키는 단계를 포함하는, 키메라 항원 수용체를 발현하는 세포를 제조하는. 방법.

청구항 110

제53항 내지 제64항 중 어느 한 항의 폴리펩티드 또는 제65항 내지 제83항 중 어느 한 항의 키메라 폴리펩티드를 세포에서 발현하는 단계를 포함하는, 키메라 항원 수용체를 발현하는 세포를 제조하는. 방법.

청구항 111

제109항 또는 제110항에 있어서, 세포가 T 세포, B 세포, 조절 T 세포(Treg), 종양 침윤 림프구(TIL), 자연 살해(NK) 세포, 자연 살해 T(NKT) 세포, 줄기 세포, 유도된 만능 줄기 세포, 및 이의 임의의 조합을 포함하는, 방법.

청구항 112

제109항 내지 제111항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 시험관내 또는 생체의 배양된, 방법.

청구항 113

제1항 내지 제51항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오티드 또는 제52항의 벡터를 포함하거나 제53항 내지 제64항 중 어느 한 항의 폴리펩티드 또는 제65항 내지 제83항 중 어느 한 항의 키메라 폴리펩티드를 발현하는 세포를 적합한 조건 하에 배양하는 단계를 포함하는, 키메라 항원 수용체를 발현하는 세포를 증대시키는, 방법.

청구항 114

치료를 필요로 하는 대상체에서 종양을 치료하는 방법으로서, 대상체에 c-Jun 폴리펩티드를 과발현하고 키메라 항원 수용체(CAR) 및 절단된 EGF 수용체(EGFRt)를 포함하는 면역 세포를 투여하는 단계를 포함하며, CAR이 특이적이거나 종양 상에서 발현되는 항원인, 방법.

청구항 115

제114항에 있어서, 면역 세포가 제84항 내지 제93항 중 어느 한 항의 변형된 세포를 포함하는, 방법.

청구항 116

제114항 또는 제115항에 있어서, 종양이 유방암, 두경부암, 자궁암, 뇌암, 피부암, 신암, 폐암, 결장직장암, 전립샘암, 간암, 방광암, 신장암, 췌장암, 갑상샘암, 식도암, 안암, 위암(stomach cancer)(위암:gastric cancer), 위장관암, 난소암, 암종, 육종, 백혈병, 림프종, 골수종 또는 이의 조합을 포함하는 암으로부터 유래된, 방법.

청구항 117

제114항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 종양이 고형 종양인, 방법.

청구항 118

제114항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 추가 치료제를 대상체에 투여하는 단계를 추가로 포함하는. 방법.

청구항 119

제118항에 있어서, 적어도 하나의 추가 치료제가 화학치료 약물, 표적화된 항암 치료법, 종양용해 약물, 세포독 성제, 면역 기반 치료법, 사이토카인, 외과적 시술, 방사선 시술, 공동자극 분자의 활성화제, 면역 체크포인트 억제제, 백신, 세포성 면역치료법 또는 이의 임의의 조합을 포함하는, 방법.

청구항 120

제119항에 있어서, 면역 체크포인트 억제제가 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-LAG-3 항체, 항-CTLA-4 항체, 항-GITR 항체, 항-TIM3 항체, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는, 방법.

청구항 121

제114항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서, 투여 후 종양의 크기(종양 크기)가 참조 종양 크기와 비교하여 감소된, 방법.

청구항 122

제121항에 있어서, 참조 종양 크기가 (i) 투여 전 종양 크기, (ii) 투여를 받지 않은(예를 들어, c-Jun 폴리펩티드를 과발현하지 않는 상응하는 면역 세포의 투여를 받은) 상응하는 대상체에서의 종양 크기, 또는 (iii) (i) 및 (ii) 둘 모두를 포함하는, 방법.

청구항 123

제121항 또는 제122항에 있어서, 참조 종양 크기와 비교하여 종양 크기가 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90% 또는 약 100%만큼 감소된, 방법.

청구항 124

제114항 내지 제123항 중 어느 한 항에 있어서, 투여 후 대상체의 생존 기간이 참조 생존 기간과 비교하여 증가된, 방법.

청구항 125

제124항에 있어서, 참조 생존 기간이 투여를 받지 않은(예를 들어, c-Jun 폴리펩티드를 과발현하지 않는 상응하는 면역 세포의 투여를 받은) 상응하는 대상체의 생존 기간을 포함하는, 방법.

청구항 126

제124항 또는 제125항에 있어서, 참조 생존 기간과 비교하여 생존 기간이 적어도 약 1주, 적어도 약 2주, 적어도 약 3주, 적어도 약 1개월, 적어도 약 2개월, 적어도 약 3개월, 적어도 약 4개월, 적어도 약 5개월, 적어도 약 6개월, 적어도 약 7개월, 적어도 약 8개월, 적어도 약 9개월, 적어도 약 10개월, 적어도 약 11개월, 또는 적어도 약 1년만큼 증가된, 방법.

청구항 127

제114항 내지 제126항 중 어느 한 항에 있어서, 투여 후 면역 세포가 c-Jun 폴리펩티드를 과발현하지 않는 상응하는 면역 세포와 비교하여 더 오래 대상체에서 지속될 수 있는, 방법.

청구항 128

제127항에 있어서, 투여 후, 면역 세포가 상응하는 면역 세포보다 적어도 약 1개월, 적어도 약 2개월, 적어도 약 3개월, 적어도 약 4개월, 적어도 약 5개월, 또는 적어도 6개월 더 길게 대상체에서 지속될 수 있는, 방법.

청구항 129

제127항 또는 제128항에 있어서, 상응하는 면역 세포의 투여를 받은 참조 대상체에 존재하는 상응하는 면역 세포와 비교하여 대상체에 존재하는 면역 세포의 약 1배 내지 약 10배만큼이 투여 약 1개월, 약 2개월, 약 3개월,

약 4개월, 약 5개월, 약 6개월, 약 7개월 또는 약 8개월 후 존재하는, 방법.

청구항 130

종양 세포를 c-Jun 폴리펩티드를 과발현하고 키메라 항원 수용체(CAR) 및 절단된 EGF 수용체(EGFRt)를 포함하는 면역 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는, 종양 세포를 사멸시키는 방법으로서, CAR이 종양 세포 상에서 발현된 항원에 대해 특이적인, 방법.

청구항 131

제129항에 있어서, 면역 세포가 제84항 내지 제93항 중 어느 한 항의 변형된 세포를 포함하는, 방법.

청구항 132

제129항 또는 제130항에 있어서, 종양 세포의 사멸은 종양 세포가 c-Jun 폴리펩티드를 과발현하지 않는 상응하는 면역 세포와 접촉시키는 참조 방법과 비교하여 증가된, 방법.

청구항 133

제131항에 있어서, 참조 방법과 비교하여 종양 세포의 사멸이 적어도 약 0.5배, 1배, 적어도 약 2배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배 또는 적어도 약 5배만큼 증가된, 방법.

청구항 134

면역 세포를 (i) ROR-1 결합 단백질을 발현하고 (ii) 증가된 수준의 c-Jun 폴리펩티드를 갖도록 변형되지 않은 상응하는 면역 세포와 비교하여 증가된 수준의 c-Jun 폴리펩티드를 갖도록 변형하는 단계를 포함하는, 항원 자극에 반응하여 면역 세포에 의한 사이토카인의 생성을 증가시키는 방법으로서, ROR-1 결합 단백질이 R12 항체와 동일한 에피토프에 특이적으로 결합하는, 방법.

청구항 135

제133항에 있어서, 사이토카인이 IFN- γ , IL-2, 또는 둘 모두를 포함하는, 방법.

청구항 136

제134항 또는 제135항에 있어서, 변형 후, 항원 자극에 반응하여 사이토카인의 생성이 상응하는 면역 세포와 비교하여 적어도 약 1배, 적어도 약 2배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 또는 적어도 약 5배만큼 증가된, 방법.

청구항 137

제134항 내지 제136항 중 어느 한 항에 있어서, 사이토카인의 생성 증가가 메조 스케일 디스커버리(Meso Scale Discovery: MSD) U-Plex 검정을 사용하여 측정된, 방법.

청구항 138

면역 세포를 (i) ROR-1 결합 단백질을 발현하고 (ii) 증가된 수준의 c-Jun 폴리펩티드를 갖도록 변형되지 않은 상응하는 면역 세포와 비교하여 증가된 수준의 c-Jun 폴리펩티드를 갖도록 변형하는 단계를 포함하는, 항원 자극에 반응하여 면역 세포의 증식을 증가시키는 방법으로서, ROR-1 결합 단백질이 R12 항체와 동일한 에피토프에 특이적으로 결합하는, 방법.

청구항 139

제137항에 있어서, 변형 후, 항원 자극에 반응하는 면역 세포의 증식이 상응하는 면역 세포와 비교하여 적어도 약 1배, 적어도 약 2배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배 또는 적어도 약 5배만큼 증가된, 방법.

청구항 140

제137항 또는 제138항에 있어서, 증가된 증식이 더 많은 수의 면역 세포를 초래하는, 방법.

청구항 141

면역 세포를 (i) ROR-1 결합 단백질을 발현하고 (ii) 증가된 수준의 c-Jun 폴리펩티드를 갖도록 변형되지 않은 상응하는 면역 세포와 비교하여 증가된 수준의 c-Jun 폴리펩티드를 갖도록 변형하는 단계를 포함하는, 지속적인 항원 자극에 반응하여 면역 세포의 효과기 기능을 증가시키는 방법으로서, ROR-1 결합 단백질이 R12 항체와 동일한 에피토프에 특이적으로 결합하는, 방법.

청구항 142

제140항에 있어서, 면역 세포가 상응하는 면역 세포와 비교하여 항원 자극 검정의 적어도 1회, 적어도 2회 또는 적어도 3회의 추가 라운드 동안 효과기 기능을 유지하는, 방법.

청구항 143

제140항 또는 제141항에 있어서, 효과기 기능이 (i) 종양 세포를 사멸시키는 능력, (ii) 추가 항원 자극 시 사이토카인을 생성하는 능력, 또는 (iii) (i) 및 (ii) 둘 모두를 포함하는, 방법.

청구항 144

제140항 내지 제142항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 세포의 효과기 기능이 상응하는 면역 세포와 비교하여 적어도 약 1배, 적어도 약 2배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배 또는 적어도 약 5배만큼 증가된, 방법.

청구항 145

면역 세포를 (i) ROR-1 결합 단백질을 발현하고 (ii) 증가된 수준의 c-Jun 폴리펩티드를 갖도록 변형되지 않은 상응하는 면역 세포와 비교하여 증가된 수준의 c-Jun 폴리펩티드를 갖도록 변형하는 단계를 포함하는, 지속적인 항원 자극에 반응하여 면역 세포의 고갈을 감소시키거나 방지하는 방법으로서, ROR-1 결합 단백질이 R12 항체와 동일한 에피토프에 특이적으로 결합하는, 방법.

청구항 146

제144항에 있어서, 변형 후, 지속적인 항원 자극에 반응하여 면역 세포가 상응하는 면역 세포와 비교하여 (i) 고갈과 연관된 감소된 수준의 유전자, (ii) 활성화와 연관된 증가된 수준의 유전자, 또는 (iii) (i) 및 (ii) 둘 모두를 발현하는, 방법.

청구항 147

제133항 내지 제145항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 세포가 제6항 내지 제51항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오티드를 포함하도록 변형된, 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 관련 출원에 대한 상호 참조
- [0002] 이 PCT 출원은 2021년 2월 25일에 출원된 미국 가출원 번호 63/153,878; 2021년 10월 28일에 출원된 63/263,229; 및 2022년 2월 11일에 출원된 63/309,393의 우선권을 주장하며; 각각 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.
- [0003] EFS-WEB를 통해 전자적으로 제출된 서열 목록에 대한 참조
- [0004] 본 출원에서 제출된 전자적으로 제출된 서열 목록(이름: 4385_042PC04_Seqlisting_ST25.txt, 크기: 80,716바이트, 생성일: 2022년 2월 23일)의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

배경 기술

- [0005] 키메라 항원 수용체(CAR) 발현 T 세포를 사용한 차용 면역치료법은 이러한 세포가 인간 백혈구 항원(HLA)-비의존적 방식으로 항원 발현 종양 세포를 직접 인식하고 사멸시킬 수 있기 때문에 유망한 암 치료이다. 그러나 T 세포 고갈은 CAR T 세포 치료제의 유효성을 제한하는 주요 요인이다.
- [0006] 따라서 최대 유효성을 허용하기 위해 고갈 저항성 CAR T 세포를 제공하는 방법론이 필요하다.

발명의 내용

[0007] 일부 측면에서, 본 개시내용은 c-Jun 폴리펩티드(c-jun), ROR1-결합 단백질 및 절단된 EGF 수용체(EGFRt)를 포함하는 키메라 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 일부 측면에서, c-Jun 폴리펩티드는 서열 번호 1과 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 측면에서, c-Jun 폴리펩티드는 키메라 폴리펩티드가 세포에서 발현될 때 세포 고갈을 방지하거나 감소시킬 수 있다. 일부 측면에서, ROR1-결합 단백질은 ROR1에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 T 세포 수용체(TCR)를 포함한다. 일부 측면에서, CAR은 ROR1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 측면에서, ROR1-결합 단백질은 R12 항체와 동일한 에피토프에 특이적으로 결합한다. 일부 측면에서, ROR1-결합 단백질은 R12 항체의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH) 및 R12 항체의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함한다. 일부 측면에서, VH CDR1은 서열 번호 45를 포함하고, VH CDR2는 서열 번호 46을 포함하고, VH CDR3은 서열 번호 47을 포함한다. 일부 측면에서, VL CDR1은 서열 번호 49를 포함하고, VL CDR2는 서열 번호 50을 포함하고, VL CDR3은 서열 번호 51을 포함한다. 일부 측면에서, ROR1 결합 부분의 VH는 서열 번호 44를 포함하고 ROR1 결합 부분의 VL은 서열 번호 48을 포함한다. 일부 측면에서, ROR1 결합 부분은 서열 번호 52와 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 측면에서, CAR은 막횡단(TM) 도메인을 추가로 포함한다. 일부 측면에서, TM 도메인은 CD8a, CD2, CD4, CD28, CD45, PD1, CD152, 또는 이의 임의의 조합으로부터 유래된다. 일부 측면에서, TM 도메인은 CD28로부터 유래된다. 일부 측면에서, TM 도메인은 서열 번호 54와 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0008] 일부 측면에서, 본 개시내용의 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 ROR1과 TM 도메인에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 부분 사이에 스페이서를 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 스페이서는 면역글로불린 힌지 영역 또는 CD8로부터 유래된다. 일부 측면에서, 스페이서는 서열 번호 15에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 스페이서는 링커를 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 링커는 GGGSG(서열 번호 16)를 포함한다. 일부 측면에서, CAR은 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 ζ 활성화 도메인, CD3 δ 활성화 도메인, CD3 ϵ 활성화 도메인, CD3 η 활성화 도메인, CD79A 활성화 도메인, DAP 12 활성화 도메인, FCER1G 활성화 도메인, DAP10/CD28 활성화 도메인, ZAP70 활성화 도메인, 또는 이의 임의의 조합을 포함한다. 일부 측면에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 ζ 활성화 도메인을 포함한다. 일부 측면에서, CD3 ζ 활성화 도메인은 서열 번호 55와 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 적어도 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 측면에서, CAR은 세포내 공동-자극 신호전달 영역을 포함한다. 일부 측면에서, 세포내 공동-자극 신호전달 도메인은 인터루킨-2 수용체(IL-2R), 인터루킨-12 수용체(IL-12R), IL-7, IL-21, IL-23, IL-15, CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD27, CD28, CD30, CD40, 4-1BB/CD137, ICOS, 림프구 기능 연관 항원-1(LFA-1), LIGHT, NKG2C, OX40, DAP10, B7-H3, Lck 결합에 대해 결실된 CD28(ICA), OX40, BTLA, GITR, HVEM, LFA-1, LIGHT, NKG2C, PD-1, TLR2, TLR4, TLR7, TLR9, Fc 수용체 감마 사슬, Fc 수용체 ϵ 사슬, CD83과 특이적으로 결합하는 리간드, 또는 이의 임의의 조합의 공동-자극 도메인을 포함한다. 일부 측면에서, 세포내 신호전달 도메인은 4-1BB 공동-자극 도메인을 포함한다. 일부 측면에서, 4-1BB 공동-자극 도메인은 서열 번호 53과 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 적어도 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0009] 일부 측면에서, 본 개시내용은 (i) ROR1-결합 단백질, (ii) 서열 번호 15에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 스페이서, (iii) CD28 막횡단 단백질, (iv) 4-1BB 공동-자극 영역, 및 (v) CD3 ζ 활성화 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0010] 일부 측면에서, (i) R12 항체의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH) 및 R12 항체의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 ROR1-결합 단백질; (ii) 서열 번호 15에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 스페이서; 및 (iii) 절단된 EGF 수용체(EGFRt)를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 본원에 제공된다. 일부 측면에서, ROR1 결합 부분의 VH는 서열 번호 44를 포함하고 ROR1 결합 부분의 VL은 서열 번호 48을 포함한다.

일부 측면에서, EGFRt는 서열 번호 3과 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0011] 일부 측면에서, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드는 c-Jun 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함한다. 일부 측면에서, c-jun 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열 및 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 동일한 벡터 상에 있다. 일부 측면에서, c-jun 폴리펩티드 및 CAR은 링커에 의해 결합된다. 일부 측면에서, 링커는 절단 가능 링커이다. 일부 측면에서, 링커는 P2A 링커, T2A 링커, 또는 이의 임의의 조합을 포함한다. 일부 측면에서, c-jun 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열 및 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 상이한 벡터 상에 있다.

[0012] 일부 측면에서, 폴리뉴클레오티드는 절단된 EGF 수용체(EGFRt)를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 절단된 EGF 수용체(EGFRt)를 암호화하는 뉴클레오티드 서열 및 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 동일한 벡터 상에 있다. 일부 측면에서, EGFRt 및 CAR은 링커에 의해 결합된다. 일부 측면에서, 링커는 절단 가능 링커이다. 일부 측면에서, 링커는 P2A 링커, T2A 링커, 또는 이의 임의의 조합을 포함한다. 일부 측면에서, CAR은 신호 펩티드를 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 신호 펩티드는 hIgK로부터 유래된다. 일부 측면에서, hIgK 신호 펩티드는 서열 번호 17로 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 측면에서, EGFRt는 서열 번호 3과 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0013] 일부 측면에서, 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드는 골수증식성 육종 바이러스 인핸서, 결실된 음성 대조군 영역, dl587rev 프라이머-결합 부위 치환(MND) 프로모터, EF1a 프로모터, 및/또는 유비퀴틴 프로모터를 추가로 포함한다. 일부 측면에서, MND 프로모터는 서열 번호 64와 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0014] 일부 측면에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 번호 58과 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 약 100% 서열을 갖는 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0015] 일부 측면에서, 본 개시내용은 서열 번호 57과 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0016] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다. 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드 또는 벡터에 의해 암호화되는 폴리펩티드를 제공한다.

[0017] 일부 측면에서, 본 개시내용은 (i) ROR1-결합 항체 또는 이의 항원 결합 부분, (ii) 서열 번호 15에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 스페이서, (iii) CD28 막횡단 단백질, (iv) 4-1BB 공동-자극 영역, 및 (v) CD3 ζ 활성화 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드를 제공한다. 일부 측면에서, ROR1-결합 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 R12 항체와 동일한 에피토프에 특이적으로 결합한다. 일부 측면에서, ROR1-결합 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 R12 항체의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH) 및 R12 항체의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함한다. 일부 측면에서, VH CDR1은 서열 번호 45를 포함하고, VH CDR2는 서열 번호 46을 포함하고, VH CDR3은 서열 번호 47을 포함한다. 일부 측면에서, VL CDR1은 서열 번호 49를 포함하고, VL CDR2는 서열 번호 50을 포함하고, VL CDR3은 서열 번호 51을 포함한다. 일부 측면에서, ROR1-결합 항체 또는 이의 항원 결합 부분의 VH는 서열 번호 44를 포함하고 ROR1 결합 부분의 VL은 서열 번호 48을 포함한다. 일부 측면에서, ROR1-결합 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 서열 번호 52와 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0018] 일부 측면에서, 폴리펩티드는 막횡단(TM) 도메인을 추가로 포함한다. 일부 측면에서, CD28 TM 도메인은 서열 번호 54와 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 측면에서, CD3 ζ 활성화 도메인은 서열 번호 55와 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 적

어도 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 4-1BB 공동-자극 도메인은 서열 번호 53과 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 적어도 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0019] 일부 측면에서, 본 개시내용은 c-Jun 폴리펩티드(c-jun), CAR 폴리펩티드 및 절단된 EGF 수용체(EGFRt)를 포함하는 키메라 폴리펩티드를 제공한다. 일부 측면에서, CAR 폴리펩티드는 본원에 개시된 임의의 것이다. 일부 측면에서, c-Jun 폴리펩티드는 서열 번호 1과 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 측면에서, c-Jun 폴리펩티드는 키메라 폴리펩티드가 세포에서 발현될 때 세포 고갈을 방지하거나 감소시킬 수 있다. 일부 측면에서, c-jun 폴리펩티드 및 CAR 폴리펩티드는 동일한 벡터 상에 있다. 일부 측면에서, c-jun 폴리펩티드 및 CAR 폴리펩티드는 링커에 의해 결합된다. 일부 측면에서, 링커는 절단 가능 링커이다. 일부 측면에서, 링커는 P2A 링커, T2A 링커, 또는 이의 임의의 조합을 포함한다. 일부 측면에서, c-jun 폴리펩티드 및 CAR 폴리펩티드는 상이한 벡터 상에 있다. 일부 측면에서, 절단된 EGF 수용체(EGFRt) 및 CAR은 동일한 벡터 상에 있다. 일부 측면에서, EGFRt 및 CAR은 링커에 의해 결합된다. 일부 측면에서, 링커는 절단 가능 링커이다. 일부 측면에서, 링커는 P2A 링커, T2A 링커, 또는 이의 임의의 조합을 포함한다. 일부 측면에서, EGFRt는 서열 번호 3과 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 키메라 폴리펩티드는 서열 번호 52와 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0020] 일부 측면에서, 본 개시내용은 서열 번호 52와 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 키메라 폴리펩티드를 제공한다. 일부 측면에서, CAR 폴리펩티드는 신호 펩티드를 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 신호 펩티드는 hIgk로부터 유래된다. 일부 측면에서, hIgk 신호 펩티드는 서열 번호 17로 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0021] 일부 측면에서, 본 개시내용은 폴리뉴클레오티드, 벡터, 폴리펩티드, 키메라 폴리펩티드, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는 변형된 세포를 제공한다.

[0022] 일부 측면에서, 본 개시내용은 c-jun 폴리펩티드, 키메라 항원 수용체 폴리펩티드 및 절단된 EGF 수용체(EGFRt)를 포함하는 변형된 세포를 제공한다. 일부 측면에서, 변형된 세포는 본원에 개시된 폴리펩티드를 포함한다. 일부 측면에서, 변형된 세포는 CAR 폴리펩티드를 포함하고 EGFRt는 세포 표면 상에서 발현된다. 일부 측면에서, 세포는 면역 세포이다. 일부 측면에서, 세포는 T 세포, B 세포, 조절 T 세포(Treg), 중앙 침윤 림프구(TIL), 자연 살해(NK) 세포, 자연 살해 T(NKT) 세포, 줄기 세포, 유도된 다능 줄기 세포, 및 이의 임의의 조합이다. 일부 측면에서, 세포는 시험관내 또는 생체의 조작된다. 일부 측면에서, 세포는 시험관내 또는 생체의 배양된다.

[0023] 상기 기재된 임의의 변형된 세포에서, 일부 측면에서, c-Jun 폴리펩티드의 발현은 하기의 본 개시내용의 임의의 폴리뉴클레오티드, 벡터, 폴리펩티드 및/또는 키메라 폴리펩티드를 포함하도록 변형되지 않은 상응하는 세포와 비교하여 증가된다. 일부 측면에서, 상응하는 세포와 비교하여 c-Jun 폴리펩티드의 발현은 적어도 약 1배, 적어도 약 2배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배, 적어도 약 11배, 적어도 약 12배, 적어도 약 13배, 적어도 약 14배, 적어도 약 15배, 적어도 약 16배, 적어도 약 17배, 적어도 약 18배, 적어도 약 19배, 적어도 약 20배, 적어도 약 25배, 적어도 약 30배, 적어도 약 35배, 적어도 약 40배, 적어도 약 45배, 적어도 약 50배, 적어도 약 75배, 적어도 약 100배, 적어도 약 200배, 적어도 약 300배, 적어도 약 400배, 적어도 약 500배, 적어도 약 750배, 또는 적어도 약 1,000배 이상만큼 증가된다.

[0024] 또한 c-Jun 폴리펩티드, 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드 및 절단된 EGF 수용체(EGFRt)를 포함하는 면역 세포 집단이 본원에 제공되며, 집단은 c-Jun 폴리펩티드를 포함하지 않는 상응하는 참조 세포 집단과 비교하여, 항원 자극 후 감소된 수의 TIGIT 양성 면역 세포를 포함한다.

[0025] 일부 측면에서, 항원 자극 후 집단에 존재하는 TIGIT-양성 면역 세포의 수는 참조 집단과 비교하여 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 또는 적어도 약 60%만큼 감소된다. 일부 측면에서, 면역 세포 집단은 항원 자극 후 약 15% 미만, 약 14% 미만, 약 13% 미만, 약 12% 미만, 약 11% 미만, 약 10% 미만, 약 9% 미만, 약 8% 미만, 약 7% 미만, 약 6% 미만, 또는 약 5% 미만의 TIGIT-

양성 면역 세포를 포함한다.

- [0026] 일부 측면에서, 본 개시내용은 c-Jun 폴리펩티드, 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드 및 절단된 EGF 수용체(EGFRt)를 포함하는 면역 세포 집단을 추가로 제공하며, 집단은 c-Jun 폴리펩티드를 포함하지 않는 상응하는 참조 세포 집단과 비교하여, 항원 자극 후 감소된 수의 TNFRSF9-양성 면역 세포를 포함한다.
- [0027] 일부 측면에서, 항원 자극 후 집단에 존재하는 TNFRSF9-양성 면역 세포의 수는 참조 집단과 비교하여 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 또는 적어도 약 70%만큼 감소된다. 일부 측면에서, 면역 세포 집단은 항원 자극 후 약 5% 미만, 약 4.5% 미만, 약 4% 미만, 약 3.5% 미만, 또는 약 2% 미만의 TNFRSF9-양성 면역 세포를 포함한다.
- [0028] 또한 c-Jun 폴리펩티드, 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드 및 절단된 EGF 수용체(EGFRt)를 포함하는 면역 세포 집단이 본원에 제공되며, 집단은 c-Jun 폴리펩티드를 포함하지 않는 상응하는 참조 세포 집단과 비교하여, 항원 자극 후 감소된 수의 GZMA-양성 면역 세포를 포함한다.
- [0029] 일부 측면에서, 항원 자극 후 집단에 존재하는 GZMA-양성 면역 세포의 수는 참조 집단과 비교하여 적어도 약 40%, 적어도 약 35%, 적어도 약 30%, 적어도 약 25%, 또는 적어도 약 20%만큼 감소된다. 일부 측면에서, 면역 세포 집단은 항원 자극 후 약 30% 미만, 약 25% 미만, 약 20% 미만, 약 15% 미만 또는 약 10% 미만의 GZMA-양성 면역 세포를 포함한다.
- [0030] 상기 기재된 임의의 면역 세포 집단에서, 일부 측면에서, CAR 폴리펩티드는 본원에 기재된 임의의 CAR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 측면에서, c-Jun 폴리펩티드는 서열 번호 1과 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 측면에서, EGFRt는 서열 번호 3과 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0031] 상기 제공된 임의의 면역 세포 집단에서, 일부 측면에서, 면역 세포는 T 세포, B 세포, 조절 T 세포(Treg), 종양 침윤 림프구(TIL), 자연 살해(NK) 세포, 자연 살해 T 세포(NKT) 세포, 줄기 세포, 유도된 만능 줄기 세포, 또는 이의 조합을 포함한다. 일부 측면에서, 면역 세포는 T 세포(예를 들어, CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, 또는 둘 모두)이다.
- [0032] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드, 벡터, 폴리펩티드, 키메라 폴리펩티드 또는 변형된 세포 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0033] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드 또는 벡터로 세포를 형질감염시키는 단계를 포함하는, 키메라 항원 수용체를 발현하는 세포를 제조하는 방법을 제공한다. 일부 측면에서, 본 개시내용은 세포에서 본원에 개시된 폴리펩티드 또는 키메라 폴리펩티드를 발현하는 단계를 포함하는, 키메라 항원 수용체를 발현하는 세포를 제조하는 방법을 제공한다. 일부 측면에서, 세포는 T 세포, B 세포, 조절 T 세포(Treg), 종양 침윤 림프구(TIL), 자연 살해(NK) 세포, 자연 살해 T(NKT) 세포, 줄기 세포, 유도된 만능 줄기 세포, 및 이의 임의의 조합을 포함한다. 일부 측면에서, 세포는 시험관내 또는 생체의 배양된다.
- [0034] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 포함하는 세포를 배양하거나 폴리펩티드 또는 키메라 폴리펩티드를 적합한 조건 하에 발현하는 단계를 포함하는, 키메라 항원 수용체를 발현하는 세포를 증대시키는 방법을 제공한다.
- [0035] 일부 측면에서, 본 개시내용은 치료를 필요로 하는 대상체에 c-Jun 폴리펩티드를 과발현하고 키메라 항원 수용체(CAR) 및 절단된 EGF 수용체(EGFRt)를 포함하는 면역 세포를 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 종양을 치료하는 방법을 제공하며, CAR은 특이적이거나 종양 상에서 발현되는 항원이다. 일부 측면에서, 면역 세포는 본원에 개시된 임의의 변형된 세포를 포함한다.
- [0036] 일부 측면에서, 종양은 유방암, 두경부암, 자궁암, 뇌암, 피부암, 신암, 폐암, 결장직장암, 전립샘암, 간암, 방광암, 신장암, 췌장암, 갑상샘암, 식도암, 안암, 위암(위 암), 위장관암, 난소암, 암종, 육종, 백혈병, 림프종, 골수종 또는 이의 조합을 포함하는 암으로부터 유래된다. 일부 측면에서, 종양은 고형 종양이다. 일부 측면에서, 방법은 적어도 하나의 추가 치료제를 대상체에 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 적어도 하나의 추가 치료제는 화학치료 약물, 표적화된 항암 치료법, 종양용해 약물, 세포독성제, 면역 기반 치료법, 사이토카인, 외과적 기술, 방사선 기술, 공동자극 분자의 활성화제, 면역 체크포인트 억제제, 백신, 세포

면역치료법 또는 이의 임의의 조합을 포함한다. 일부 측면에서, 면역 체크포인트 억제제는 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-LAG-3 항체, 항-CTLA-4 항체, 항-GITR 항체, 항-TIM3 항체, 또는 이의 임의의 조합을 포함한다.

- [0037] 상기 제공된 임의의 치료 방법(예를 들어, 종양을 치료하는 방법)에서, 일부 측면에서, 투여 후 종양의 크기(종양 크기)는 참조 종양 크기와 비교하여 감소된다. 일부 측면에서, 참조 종양 크기는 (i) 투여 전 종양 크기, (ii) 투여를 받지 않은(예를 들어, c-Jun 폴리펩티드를 과발현하지 않는 상응하는 면역 세포의 투여를 받은) 상응하는 대상체에서의 종양 크기, 또는 (iii) (i) 및 (ii) 둘 모두를 포함한다. 일부 측면에서, 참조 종양 크기와 비교하여 종양 크기는 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90% 또는 약 100%만큼 감소된다.
- [0038] 상기 제공된 임의의 치료 방법(예를 들어, 종양을 치료하는 방법)에서, 일부 측면에서, 투여 후 대상체의 생존 기간은 참조 생존 기간과 비교하여 증가된다. 일부 측면에서, 참조 생존 기간은 투여를 받지 않은(예를 들어, c-Jun 폴리펩티드를 과발현하지 않는 상응하는 면역 세포의 투여를 받은) 상응하는 대상체의 생존 기간을 포함한다. 일부 측면에서, 참조 생존 기간과 비교하여, 생존 기간은 적어도 약 1주, 적어도 약 2주, 적어도 약 3주, 적어도 약 1개월, 적어도 약 2개월, 적어도 약 3개월, 적어도 약 4개월, 적어도 약 5개월, 적어도 약 6개월, 적어도 약 7개월, 적어도 약 8개월, 적어도 약 9개월, 적어도 약 10개월, 적어도 약 11개월 또는 적어도 약 1년만큼 증가된다.
- [0039] 상기 제공된 임의의 치료 방법(예를 들어, 종양을 치료하는 방법)에서, 일부 측면에서, 투여 후 면역 세포는 c-Jun 폴리펩티드를 과발현하지 않는 상응하는 면역 세포와 비교하여 더 오래 대상체에서 지속될 수 있다.
- [0040] 일부 측면에서, 투여 후, 면역 세포는 상응하는 면역 세포보다 적어도 약 1개월, 적어도 약 2개월, 적어도 약 3개월, 적어도 약 4개월, 적어도 약 5개월, 또는 적어도 약 6개월 더 오래 대상체에서 지속될 수 있다. 일부 측면에서, 상응하는 면역 세포의 투여를 받은 참조 대상체에 존재하는 상응하는 면역 세포와 비교하여 투여된 면역 세포의 약 1배 내지 약 10배만큼이 투여 약 1개월, 약 2개월, 약 3개월, 약 4개월, 약 5개월, 약 6개월, 약 7개월 또는 약 8개월 후 대상체에 존재한다.
- [0041] 본 개시내용은 종양 세포를 c-Jun 폴리펩티드를 과발현하고 키메라 항원 수용체(CAR) 및 절단된 EGF 수용체(EGFRt)를 포함하는 면역 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는, 종양 세포를 사멸시키는 방법을 추가로 제공하며, CAR은 종양 세포 상에서 발현되는 항원에 대해 특이적이다. 일부 측면에서, 면역 세포는 본원에 제공된 임의의 변형된 세포를 포함한다.
- [0042] 일부 측면에서, 종양 세포의 사멸은 종양 세포가 c-Jun 폴리펩티드를 과발현하지 않는 상응하는 면역 세포와 접촉되는 참조 방법과 비교하여 증가된다. 일부 측면에서, 참조 방법에서, 종양 세포의 사멸은 적어도 약 0.5배, 1배, 적어도 약 2배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 또는 적어도 약 5배만큼 증가된다.
- [0043] 또한 (i) ROR-1 결합 단백질을 발현하고 (ii) 증가된 수준의 c-Jun 폴리펩티드를 갖도록 변형되지 않은 상응하는 면역 세포와 비교하여 증가된 수준의 c-Jun 폴리펩티드를 갖도록 면역 세포를 변형하는 단계를 포함하는, 항원 자극에 반응하여 면역 세포에 의한 사이토카인의 생성을 증가시키는 방법이 본원에 제공되며, ROR-1 결합 단백질은 R12 항체와 동일한 에피토프에 특이적으로 결합한다.
- [0044] 일부 측면에서, 사이토카인은 IFN- γ , IL-2, 또는 둘 모두를 포함한다. 일부 측면에서, 변형 후, 항원 자극에 반응하는 사이토카인의 생성은 상응하는 면역 세포와 비교하여 적어도 약 1배, 적어도 약 2배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배 또는 적어도 약 5배만큼 증가된다. 일부 측면에서, 사이토카인의 생성 증가는 메조 스케일 디스커버리(Meso Scale Discovery: MSD) U-Plex 검정을 사용하여 측정된다.
- [0045] 일부 측면에서, 본 개시내용은 (i) ROR-1 결합 단백질을 발현하고 (ii) 증가된 수준의 c-Jun 폴리펩티드를 갖도록 변형되지 않은 상응하는 면역 세포와 비교하여 증가된 수준의 c-Jun 폴리펩티드를 갖도록 면역 세포를 변형하는 단계를 포함하는, 항원 자극에 반응하여 면역 세포의 증식을 증가시키는 방법을 추가로 제공하며, ROR-1 결합 단백질은 R12 항체와 동일한 에피토프에 특이적으로 결합한다.
- [0046] 일부 측면에서, 변형 후, 항원 자극에 반응하는 면역 세포의 증식은 상응하는 면역 세포와 비교하여 적어도 약 1배, 적어도 약 2배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배 또는 적어도 약 5배만큼 증가된다. 일부 측면에서, 증가된 증식은 더 많은 수의 면역 세포를 초래한다.
- [0047] (i) ROR-1 결합 단백질을 발현하고 (ii) 증가된 수준의 c-Jun 폴리펩티드를 갖도록 변형되지 않은 상응하는 면

역 세포와 비교하여 증가된 수준의 c-Jun 폴리펩티드를 갖도록 면역 세포를 변형하는 단계를 포함하는, 지속적인 항원 자극에 반응하여 면역 세포의 효과기 기능을 증가시키는 방법이 본원에 제공되며, ROR-1 결합 단백질은 R12 항체와 동일한 에피토프에 특이적으로 결합한다.

[0048] 일부 측면에서, 면역 세포는 상응하는 면역 세포와 비교하여 항원 자극 검정의 적어도 1회, 적어도 2회 또는 적어도 3회의 추가 라운드 동안 효과기 기능을 유지한다. 일부 측면에서, 효과기 기능은 (i) 종양 세포를 사멸시키는 능력, (ii) 추가 항원 자극 시 사이토카인을 생성하는 능력, 또는 (iii) (i) 및 (ii) 둘 모두를 포함한다. 일부 측면에서, 면역 세포의 효과기 기능은 상응하는 면역 세포와 비교하여 적어도 약 1배, 적어도 약 2배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 또는 적어도 약 5배만큼 증가된다.

[0049] (i) ROR-1 결합 단백질을 발현하고 (ii) 증가된 수준의 c-Jun 폴리펩티드를 갖도록 변형되지 않은 상응하는 면역 세포와 비교하여 증가된 수준의 c-Jun 폴리펩티드를 갖도록 면역 세포를 변형하는 단계를 포함하는, 지속적인 항원 자극에 반응하여 면역 세포의 고갈을 감소시키거나 방지하는 방법이 본원에서 제공되며, ROR-1 결합 단백질은 R12 항체와 동일한 에피토프에 특이적으로 결합한다. 일부 측면에서, 변형 후, 지속적인 항원 자극에 반응하여 면역 세포는 상응하는 면역 세포와 비교하여 (i) 감소된 수준의 고갈과 연관된 유전자, (ii) 증가된 수준의 활성화와 연관된 유전자, 또는 (iii) (i) 및 (ii) 둘 모두를 발현한다.

[0050] 일부 측면에서, 상기 방법에 유용한 면역 세포는 본원에 기재된 임의의 폴리뉴클레오티드를 포함하도록 변형된다.

도면의 간단한 설명

[0051] **도 1a** 및 **1b**는 본원에 기재된 항-ROR1 CAR T 세포(예를 들어, c-Jun을 과발현하는 항-ROR1 CAR T 세포)가 ROR1-발현 NSCLC 종양 세포를 선택적으로 용해함을 나타낸다. 모의(형질도입되지 않은) T 세포, 대조군 R12(예를 들어, c-Jun을 발현하지 않는) CAR T 세포, 또는 c-Jun-R12 CAR T 세포를 120시간 동안 1:1의 효과기 대 표적(E:T) 세포 비로 ROR1을 발현하는 NSCLC 종양 세포("H1975")(**도 1a**) 또는 NuLight Red(NLR; 핵 제약 mKate2)를 발현하는, ROR1 발현이 결여된 NSCLC 종양 세포("H1975-ROR1KO")(**도 1b**)와 공동인큐베이션하였다. NLR-양성 세포의 총 수를 경시적으로 계수하고(x축) 0시간 시점에서의 계수에 대해 정규화하여 정규화된 표적 사멸(y축)을 계산하였다.

도 2a, 2b, 2c 및 **2d**는 c-Jun 과발현이 항-ROR1 CAR T 세포에 의한 ROR1-의존적 사이토카인 분비를 향상시키지만 긴장성 신호전달을 증가시키지 않음을 나타낸다. 모의(형질도입되지 않은) T 세포, 대조군 항-ROR1 CAR T 세포(즉, c-Jun을 과발현하지 않음), 또는 c-Jun을 과발현하는 항-ROR1 CAR T 세포를 24시간 동안 1:1의 효과기 대 표적(E:T) 세포 비로 ROR1을 발현하는 NSCLC 종양 세포(**도 2a 및 2c**) 또는 ROR1 발현이 결여된 NSCLC 종양 세포(**도 2b 및 2d**)와 공동인큐베이션하였으며, 이 때 공동배양 웰로부터의 상청액을 사이토카인 정량을 위해 수집하였다. IL-2(**도 2a 및 2b**) 및 IFN- γ (**도 2c 및 2d**)의 농도는 메조 스케일 디스커버리(MSD) U-Plex를 사용하여 측정하였다. **도 2a-2d**에 나타난 결과는 3명의 비의존적 공여체(즉, 공여체 1, 공여체 2 및 공여체 3)로부터의 것이다.

도 3a, 3b 및 **3c**는 c-Jun 과발현이 항-ROR1 CAR T 세포의 사이토카인 의존적 증식 능력을 향상시킴을 나타낸다. 모의(형질도입되지 않은) T 세포, 대조군 항-ROR1 CAR T 세포(즉, c-Jun을 과발현하지 않음), 또는 c-Jun을 과발현하는 항-ROR1 CAR T 세포를 기본 T 세포 배지(**도 3a**), T-세포 배지 + 200 IU/ml IL-2(**도 3b**), 또는 T-세포 배지 + 1200 IU/ml IL-7 + 200 IU/ml IL-15(**도 3c**)로 Grex 24 웰 플레이트에서 별도 배양하였다. 제0일에 각 조건에 대해 100만 개 세포를 파종하고, 7일마다 세포를 계수하고 100만 개 세포로 다시 파종하였다. 총 세포 수(y축)는 각 증대의 종료 시 실제 T 세포 수를 나타낸다.

도 4a 및 **4b**는 c-Jun 과발현이 ROR1-발현 NSCLC 종양 세포주에 대한 만성 노출 후 항-ROR1 CAR T 세포에 의한 세포용해 활성 및 IFN- γ 분비를 연장시킴을 나타낸다. 대조군 항-ROR1 CAR T 세포(즉, c-Jun을 과발현하지 않음) 또는 c-Jun을 과발현하는 항-ROR1 CAR T 세포를 7일 동안 ROR1+ A549 NSCLC 종양 세포에 노출시켜 만성적으로 자극하였다. 만성 항원 노출은 CAR T 세포를 2일마다 1:1 E:T 비로 새로운 표적 세포와 함께 재플레이팅함으로써 보장하였다. 만성 자극 7일 후, CAR T 세포를 수집하고 A549-NLR(E:T 세포 비 1:1) 또는 H1975-NLR(E:T 1:5)과 공동인큐베이션하였다. 표적 세포의 용해는 총 NLR 강도를 추적함으로써 평가하였고, 검정 설정의 0시간 시점에 대해 정규화하였다(**도 4a**). MSD에 의한 IFN- γ , IL-2 및 TNF- α 정량을 위해 24시간 상청액을 수집하였다(**도 4b**). n = 3명의 공여체(D13814, D15195 및 D15842).

도 5a, 5b, 5c 및 **5d**는 c-Jun 과발현이 만성 항원 자극 후 항-ROR1 CAR T 세포에서 고갈 연관 전사 프로파일을

감소시킴을 나타낸다. 나타낸 결과는 2명의 공여체의 단일 세포 CITE-seq(Seurat 사용)로부터의 것이다. 도 5a는 만성 자극 후 제7일에 c-Jun 과발현 ± CAR+ T 세포 사이의 차별적 유전자 발현에 대한 유전자 세트 농축 (fgsea)을 나타낸다. 도 5b는 단일 세포로부터 c-Jun을 과발현하는 ± CAR+ 세포의 균일한 매니폴드 근사 및 투영을 나타낸다. 각 점은 2차원 공간 상으로 투영된 세포를 나타낸다. c-Jun을 추가하고 해당 빈도를 나타낼 때 빈도가 감소하는 클러스터(클러스터 0, 3 및 5)에 대한 마커(화살표 참조). 클러스터 3은 주로 문헌 기반 고갈 마커가 농축된 세포로 이루어졌다. 클러스터 0 및 5는 주로 문헌 기반 T 세포 분화/활성화 마커(예를 들어, TIGIT, TNFRSF9, 그랜자임 A)가 농축된 세포로 이루어졌다. 도 5c는 2차원 공간 상에서 도 5b의 c-Jun 과발현 항-ROR1 CAR T 세포에서 TIGIT(첫 번째 그래프), CD137(TNFRSF9; 두 번째 그래프) 및 그랜자임 A(GZMA; 세 번째 그래프)의 발현을 나타낸다. 도 5d는 고갈 마커(클러스터 3) 및 분화/활성화 마커(0, 5)가 농축된 클러스터 0, 3 및 5가 c-Jun의 첨가에 따라 빈도가 감소함(세포 백분율 감소)을 나타낸다.

도 6은 조작된 NSCLC 세포주 H1975 상에서의 다양한 ROR1 발현 수준을 나타낸다. 다양한 강도를 갖는 돌연변이된 뇌심근염 바이러스 내부 리보솜 진입 부위 요소 세트를 사용하여 광범위한 인간 ROR1의 상대적 발현을 제어하고 ROR1 발현이 걸여된 H1975 세포주에 도입하였다. 세포주(x축)별 ROR1의 발현 수준을 기하학적 MFI(y축)로 나타낸다.

도 7은 c-Jun 과발현이 낮은 수준의 ROR1을 발현하는 NSCLC 세포주에 대한 항-ROR1 CAR T 세포의 세포용해 활성화에 필요한 항원 밀도 역치를 변경하지 않음을 나타낸다. 모의(형질도입되지 않은) T 세포, 대조군 항-ROR1 CAR T 세포(즉, c-Jun을 과발현하지 않음), 또는 c-Jun을 과발현하는 항-ROR1 CAR T 세포를 148시간 동안 NLR(H1975) 및 다양한 수준의 ROR1(도 6에 기재된 바와 같음)을 발현하는 NSCLC 세포주와 인큐베이션하고, 그동안 NLR-양성 세포의 총 수를 계수하고 0시간 시점에서의 계수에 대해 정규화하여 정규화된 표적 사멸을 계산하였다(4명의 공여체; 효과기 대 표적[E:T] 비 = 1:16). ROR1 녹아웃 및 ROR1-저발현 세포는 각각 왼쪽 상단 및 오른쪽 상단 패널에 나타낸다. ROR1-저-중 및 ROR1-중발현 세포는 각각 왼쪽 및 오른쪽 중앙 패널에 나타낸다. ROR1-중-고 및 ROR1-고발현 세포는 각각 왼쪽 하단 및 오른쪽 하단 패널에 나타낸다.

도 8a 및 8b는 c-Jun 과발현이 낮은 수준의 ROR1을 발현하는 H1975 NSCLC 세포주에 반응하여 항-ROR1 CAR T 세포에 의한 사이토킨 분비에 필요한 항원 밀도 역치를 실질적으로 변경하지 않음을 나타낸다. 모의(형질도입되지 않은) T 세포(원), 대조군 항-ROR1 CAR T 세포(즉, c-Jun을 과발현하지 않음)(사각형), 또는 c-Jun을 과발현하는 항-ROR1 CAR T 세포(삼각형)를 24시간 동안 다양한 수준의 ROR1(도 6에 기재된 바와 같음)을 발현하는 H1975 세포를 함유하는 웰에서 인큐베이션하였고, 이 때 웰로부터의 상청액을 IL-2(도 8a) 및 IFN- γ (도 8b) 정량을 위해 수집하였다. 농도는 메조 스케일 디스커버리(MSD) U-Plex(4명의 공여체, 효과기 대 표적[E:T] 비 = 1:1)를 사용하여 측정하였다.

도 9a, 9b 및 9c는 본원에 기재된 항-ROR1 CAR T 세포(예를 들어, c-Jun을 과발현함)의 항종양 효과의 비교를 제공한다. 인간 ROR1-양성 H1975 NSCLC 세포가 피하 이식된 동물을 하기 중 하나의 단일 용량(4×10^6 개 세포)으로 정맥내 처리하였다: (i) 고용량의 모의(형질도입되지 않은) T 세포, (ii) 대조군 항-ROR1 CAR T 세포(즉, c-Jun을 과발현하지 않음), 및 (iii) c-Jun을 과발현하는 항-ROR1 CAR T 세포. 이어서, 동물의 종양 크기(도 9a), 체중(도 9b) 및 생존(도 9c)을 CAR T 세포 투여 후 다양한 시점에 평가하였다.

도 10은 H1975 종양 보유 NSG 마우스에서 항-ROR1 CAR T 세포의 지속성을 나타낸다. 나타낸 바와 같이, 동물은 하기 중 하나의 단일 정맥내 투여를 받았다: (i) 모의(형질도입되지 않은) T 세포(원), (ii) 대조군 항-ROR1 CAR T 세포(즉, c-Jun을 과발현하지 않음)(삼각형), 및 (iii) c-Jun을 과발현하는 항-ROR1 CAR T 세포(다이아몬드). 그런 다음, 투여 후 다양한 시점에 말초 혈액을 수집하고 혈액 1 mL당 CAR T 세포의 수를 유세포 측정을 사용하여 정량했다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052]

본 개시내용은 키메라 결합 단백질(예를 들어, CAR)을 암호화하는 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 단리된 폴리뉴클레오티드)에 관한 것이다. 일부 측면에서, 폴리뉴클레오티드는 c-Jun 단백질 및/또는 절단된 EGFR을 암호화하는 하나 이상의 추가 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 본원에 기재된 바와 같이, 일부 측면에서, 이들 추가 성분(즉, c-Jun 단백질 및/또는 절단된 EGFR)의 발현은 키메라 결합 단백질을 발현하도록 변형된 세포의 하나 이상의 특성을 개선할 수 있다. 본 개시내용은 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드를 발현하는 T 세포와 같은 조작된 세포를 제공한다. 조작된 T 세포, 예를 들어 ROR-특이적 CAR T 세포는 c-Jun을 과발현한다. T 세포에서 c-Jun의 과발현은 예를 들어 T 세포 기능장애(예를 들어, T 세포 고갈)를 완화하거나 방지함으로써 세포의 활성 상태 지

속을 돕는다. 본 발명의 조작된 T 세포는 ROR1 보유 종양 세포에 대해 지속적이고 강력한 세포독성을 나타낸다. c-Jun을 과발현하지 않는 T 세포와 비교할 때, 본 발명의 조작된 T 세포는 T 세포 고갈의 징후가 더 적고 지속적인 작동 세포의 징후가 증가했다.

[0053] 본 개시내용이 더 상세하게 설명되기 전에, 본 개시내용은 기재된 특정 조성물 또는 공정 단계가 당연히 달라질 수 있으므로, 이에 제한되지 않음이 이해되어야 한다. 본 개시내용을 읽을 때 당업자에게 명백할 바와 같이, 본원에 기재되고 예시된 각각의 개별적인 측면은 본 개시내용의 범위 또는 정신으로부터 벗어나지 않고 임의의 다른 몇몇 측면의 특징으로부터 쉽게 분리되거나 이와 조합될 수 있는 별도 성분 및 특징을 갖는다. 임의의 인용된 방법은 인용된 사건의 순서로 또는 논리적으로 가능한 임의의 다른 순서로 수행될 수 있다.

[0054] 본원에 제공된 제목은 명세서 전체를 참조하여 정의될 수 있는 본 개시내용의 다양한 측면의 제한이 아니다. 또한, 본 개시내용의 범위는 첨부된 청구범위에 의해서만 제한될 것이므로, 본원에 사용된 용어는 특정한 측면을 설명하기 위한 목적으로만 사용되며, 제한하려는 의도가 아님이 이해되어야 한다.

[0055] 따라서, 바로 아래에서 정의되는 용어들은 그 전체가 명세서를 참조하여 더욱 완전히 정의된다.

[0056] **용어**

[0057] 본 발명의 설명이 보다 용이하게 이해될 수 있도록 하기 위해, 특정 용어가 먼저 정의된다. 본원에 달리 명시적으로 제공된 경우를 제외하고, 다음 각각의 용어는 아래에 제시된 의미를 갖는다. 상세한 설명 전반에 걸쳐 추가 정의가 제시된다.

[0058] 용어 하나의("a" 또는 "an") 엔터티는 하나 이상의 해당 엔터티를 지칭함이 주지되어야 한다; 예를 들어, "뉴클레오티드 서열"은 하나 이상의 뉴클레오티드 서열을 나타내는 것으로 이해된다. 이와 같이, 용어 하나의("a" 또는 "an"), "하나 이상의" 및 "적어도 하나의"는 본원에서 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 또한 청구범위는 임의의 선택적 요소를 제외하도록 작성될 수 있음이 주지된다. 이와 같이, 이 진술은 청구항 요소의 인용 또는 부정적인 제한의 사용과 관련하여 "단독으로", "오직" 등과 같은 배타적 용어의 사용에 대한 선행 근거로 사용하기 위한 것이다.

[0059] 또한, 본원에 사용된 "및/또는"은 다른 것과 함께 또는 다른 것 없이 2개의 지정된 특징 또는 성분 각각의 구체적인 개시로 간주되어야 한다. 따라서, 본원에서 "A 및/또는 B"와 같은 어구에서 사용되는 용어 "및/또는"은 "A 및 B", "A 또는 B", "A(단독) 및 B(단독)"를 포함하는 것으로 의도된다. 유사하게, "A, B, 및/또는 C"와 같은 어구에서 사용되는 용어 "및/또는"은 각각의 하기 측면: A, B, 및 C; A, B 또는 C; A 또는 C; A 또는 B; B 또는 C; A 및 C; A 및 B; B 및 C; A(단독); B(단독); 및 C(단독)를 포괄하는 것으로 의도된다.

[0060] 측면이 "포괄하는"이라는 언어로 본원에 기재된 곳이면 어디든지 "이로 구성되는" 및/또는 "이로 본질적으로 구성되는"과 관련하여 기재된 달리 유사한 측면이 또한 제공된다는 것이 이해된다.

[0061] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 개시내용이 관련된 기술 분야에서 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 예를 들어, 문헌(the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; 및 the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press)은 본 개시내용에서 사용된 많은 용어의 일반 사전을 당업자에게 제공한다.

[0062] 단위, 접두사 및 기호는 SI(**Système International de Unites**) 승인 형식으로 표시된다. 수치 범위는 범위를 정의하는 수를 포함한다. 값의 범위가 인용되는 경우, 해당 범위의 인용된 상한 및 하한 사이의 각각의 개재 정수 값 및 이의 각각의 분수가 또한 이러한 값 사이의 각각의 하위범위와 함께 구체적으로 개시되는 것으로 이해되어야 한다. 임의의 범위의 상한 및 하한은 비의존적으로 범위에 포함되거나 이로부터 제외될 수 있으며, 어느 하나가 포함되거나, 둘 모두 포함되지 않거나, 둘 모두 포함되는 각각의 범위가 또한 본 개시내용 내에 포함된다. 따라서, 본원에 인용된 범위는 인용된 종결점을 포함하는, 범위 내의 모든 값에 대한 약칭으로 이해된다. 예를 들어, 1 내지 10의 범위는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 및 10으로 구성되는 군으로부터 임의의 수, 수의 조합 또는 하위-범위를 포함하는 것으로 이해된다.

[0063] 값이 명시적으로 인용된 경우, 인용된 값과 거의 동일한 수량 또는 양인 값도 본 개시내용의 범위 내에 있음이 이해되어야 한다. 조합이 개시되는 경우, 해당 조합 요소의 각각의 하위조합도 구체적으로 개시되며 본 개시내용의 범위 내이다. 반대로, 상이한 요소 또는 요소의 그룹이 개별적으로 개시되는 경우, 이의 조합도 개시된다.

본 개시내용의 임의의 요소가 복수의 대안을 갖는 것으로 개시되는 경우, 각각의 대안이 단독으로 또는 다른 대안과의 임의의 조합으로 제외되는 개시내용의 예가 또한 본원에 개시된다; 개시내용의 하나 초과 요소가 이러한 제의를 가질 수 있고, 이러한 제의를 갖는 요소의 모든 조합이 본원에 의해 개시된다.

- [0064] 뉴클레오티드는 이의 일반적으로 허용되는 단일-글자 코드로 지칭된다. 달리 표시되지 않는 한, 뉴클레오티드 서열은 5'에서 3' 배향으로 왼쪽에서 오른쪽으로 작성된다. 뉴클레오티드는 IUPAC-IUB 생화학 명명 위원회에서 권장되는 이의 일반적으로 알려진 한 글자 기호로 본원에서 지칭된다. 따라서 'a'는 아데닌을 나타내고, 'c'는 시토신을 나타내고, 'g'는 구아닌을 나타내고, 't'는 티민을 나타내고, 'u'는 우라실을 나타낸다.
- [0065] 아미노산 서열은 아미노에서 카복시 배향으로 왼쪽에서 오른쪽으로 작성된다. 아미노산은 이의 일반적으로 알려진 세 글자 기호 또는 IUPAC-IUB 생화학 명명 위원회에서 권장되는 한 글자 기호로 본원에서 지칭된다.
- [0066] 용어 "약"은 대략, 대강, 그 주위, 또는 그 부근을 의미하는 것으로 본원에서 사용된다. 용어 "약"은 수치 범위와 함께 사용될 때, 제시된 수치 값의 위 및 아래 경계를 연장하여 해당 범위를 변형한다. 일반적으로, 용어 "약"은 예를 들어 위 또는 아래 10%(높은 또는 낮은) 변동에 의해 명시된 값의 위 및 아래에 있는 수치 값을 변형할 수 있다.
- [0067] 용어 "투여", "투여하는" 및 이의 문법적 변이체는 약학적으로 허용 가능한 경로를 통해 대상으로 본 개시내용의 조성물(예를 들어, CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 CAR을 발현하는 세포)을 도입하는 것을 지칭한다. 본 개시내용의 조성물(예를 들어, CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 CAR을 발현하는 세포)의 대상으로의 도입은 종양내, 경구, 폐내, 비강내, 비경구(정맥내, 동맥내, 근육내, 복강내 또는 피하), 직장, 림프내, 척추강내, 안구주위 또는 국소를 포함하는 임의의 적합한 경로에 의한다.
- [0068] 투여는 자가-투여 및 타인에 의한 투여를 포함한다. 적절한 투여 경로는 조성물 또는 제제가 그 의도된 기능을 수행할 수 있도록 한다. 예를 들어, 적합한 경로가 정맥내인 경우, 조성물은 조성물 또는 제제를 대상체의 정맥내로 도입함으로써 투여된다.
- [0069] 용어 "아미노산 치환"은 모 또는 참조 서열(예를 들어, 야생형 서열)에 존재하는 아미노산 잔기를 또 다른 아미노산 잔기로 대체하는 것을 지칭한다. 아미노산은 예를 들어 화학적 펩티드 합성을 통해 또는 당분야에 알려진 재조합 방법을 통해 모 또는 참조 서열(예를 들어, 야생형 폴리펩티드 서열)에서 치환될 수 있다. 따라서 "위치 X에서의 치환"에 대한 언급은 위치 X에 존재하는 아미노산의 대안적 아미노산 잔기로의 치환을 지칭한다. 일부 측면에서, 치환 패턴은 도식 AnY에 따라 기재될 수 있으며, A는 위치 n에 자연적으로 또는 원래 존재하는 아미노산에 상응하는 단일 글자 코드이고, Y는 치환 아미노산 잔기이다. 일부 측면에서, 치환 패턴은 도식 An(YZ)에 따라 기재될 수 있으며, A는 위치 n에 자연적으로 또는 원래 존재하는 아미노산을 치환하는 아미노산 잔기에 상응하는 단일 글자 코드이고, Y 및 Z는 A를 대체할 수 있는 아미노산 잔기의 대안적 치환이다.
- [0070] 하나 이상의 관심 값에 적용되는 본원에 사용된 용어 "대략"은 명시된 참조 값과 유사한 값을 지칭한다. 특정 측면에서, 용어 "대략"은 달리 명시되지 않거나 맥락으로부터 자명하지 않은 한(이러한 수가 가능한 값의 100%를 초과하는 경우 제외) 명시된 참조 값의 어느 방향으로든 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 또는 그 미만에 속하는(더 크거나 더 작은) 값의 범위를 지칭한다.
- [0071] 본원에 사용된 용어 "보존된"은 비교되는 2개 이상의 서열의 동일한 위치에서 변경되지 않고 발생하는 것들인 폴리뉴클레오티드 서열 또는 폴리펩티드 서열의 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기를 각각 지칭한다. 상대적으로 보존된 뉴클레오티드 또는 아미노산은 서열의 다른 곳에서 나타나는 뉴클레오티드 또는 아미노산보다 더 관련된 서열 사이에서 보존된 것들이다.
- [0072] 일부 측면에서, 2개 이상의 서열은 서로 100% 동일한 경우 "완전히 보존된" 또는 "동일한" 것으로 언급된다. 일부 측면에서, 2개 이상의 서열은 이들이 서로 적어도 약 70% 동일, 적어도 약 75% 동일, 적어도 약 80% 동일, 적어도 약 85% 동일, 적어도 약 90% 동일, 또는 적어도 약 95% 동일한 경우, "고도로 보존된" 것으로 언급된다. 일부 측면에서, 2개 이상의 서열은 이들이 서로 약 70% 동일, 약 75% 동일, 약 80% 동일, 약 85% 동일, 약 90% 동일, 약 95% 동일, 약 98% 동일, 또는 약 99% 동일한 경우 "고도로 보존된" 것으로 언급된다. 일부 측면에서, 2개 이상의 서열은 이들이 서로 적어도 약 30% 동일, 적어도 약 35% 동일, 적어도 약 40% 동일, 적어도 약 45% 동일, 적어도 약 50% 동일, 적어도 약 55% 동일, 적어도 약 60% 동일, 적어도 약 65% 동일, 적어도 약 70% 동일, 적어도 약 75% 동일, 적어도 약 80% 동일, 적어도 약 85% 동일, 적어도 약 90% 동일, 또는 적어도 약 95% 동일한 경우 "보존된" 것으로 언급된다. 일부 측면에서, 2개 이상의 서열은 이들이 서로 약 30% 동일, 약 35% 동일, 약 40% 동일, 약 45% 동일, 약 50% 동일, 약 55% 동일, 약 60% 동일, 약 65% 동일, 약 70% 동일, 약 75%

동일, 약 80% 동일, 약 85% 동일, 약 90% 동일, 약 95% 동일, 약 98% 동일, 또는 약 99% 동일한 경우 "보존된" 것으로 언급된다. 서열의 보존은 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 전장에 적용될 수 있거나 이의 부분, 영역 또는 특징에 적용될 수 있다.

[0073] 본원에 사용된 용어 "~로부터 유래된"은 제1 분자와 제2 분자 사이의 관계(예를 들어, 구조적 유사성)를 표시한다. 예를 들어, 본 개시내용의 CAR 스페이스가 인간 면역글로불린 서열(예를 들어, 힌지 및/또는 불변 영역 서열)로부터 유래된 아미노산 서열을 포함하는 경우, 인간 면역글로불린 서열(예를 들어, 힌지 및/또는 불변 영역 서열)로부터 유래된 서열은 전체 힌지, 힌지 단편, 전체 힌지 또는 힌지의 단편과 야생형 면역글로불린에서 힌지에 인접한 추가 잔기(예를 들어, CH1 또는 CH2 도메인과 같은 불변 도메인으로부터의 하나 이상의 아미노산)를 포함하거나 이로 구성될 수 있고, 또는 루프 영역의 전체 서열, 루프 영역 단편, 또는 루프 영역 단편과 야생형 면역글로불린의 루프에 인접한 추가 잔기(예를 들어, 2차 구조 요소, 예를 들어 CH1, CH2 또는 CH3 도메인의 루프 영역에 인접한 β-시트로부터의 하나 이상의 아미노산)를 포함하거나 이로 구성될 수 있다. 일부 측면에서, 불변 도메인으로부터 유래된 스페이스는 경쇄 불변 도메인(CL)으로부터 유래될 수 있다.

[0074] 본원에 사용된 용어 "루프 영역"은 루프 영역으로부터의 1차 구조의 바로 N-말단 및 C-말단 방향으로 α-나선 또는 β-시트와 같은 2차 구조를 포함하는 2개의 영역을 연결하는 아미노산 잔기의 1차 서열을 지칭한다. 루프 영역의 예는 CH2 또는 CH3 루프 영역을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 면역글로불린 폴딩은 그리스 핵심 위상학을 사용하여 2개의 β 시트에 배열된 7-9개의 역평행 β 가닥의 2층 샌드위치를 포함한다. 따라서, 본 개시내용의 불변 도메인 유래 CAR 스페이스는 면역글로불린 도메인, 예를 들어 불변 면역글로불린 도메인(예를 들어, CH1, CH2, CH3, 또는 CL)에서 β-시트 A 및 β-시트 B, β-시트 B 및 β-시트 C, β-시트 C 및 β-시트 C', β-시트 C' 및 β-시트 C", β-시트 C" 및 β-시트 D, β-시트 D 및 β-시트 E, β-시트 E 및 β-시트 F, 또는 β-시트 F 및 β-시트 G를 연결하는 루프 서열(또는 이의 단편)을 포함하거나, 이로 구성되거나, 이로 본질적으로 구성될 수 있다.

[0075] 본원에 개시된 인간 Ig 면역글로불린(예를 들어, 힌지 및/또는 불변 영역 서열)으로부터 유래된 CAR 스페이스는 또한 상기 기재된 바와 같은 힌지 영역 유래 서열을 펩티드 결합을 통해 공유 결합시킴으로써 생성된 서열을 포함하며, 즉 스페이스는 전체 힌지, 이의 단편, 또는 이의 조합의 다중 반복을 포함하는 중합체일 수 있다.

[0076] 일부 측면에서, 제2 핵산 서열"로부터 유래된" 핵산 서열(예를 들어, CD8a TM 서열로부터 유래된 현재 개시된 CAR의 TM 도메인 서열)은 제2 핵산 서열의 뉴클레오티드 서열과 동일하거나 실질적으로 유사한 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 핵산 서열은 예를 들어 자연 발생 돌연변이유발, 인공 유도 돌연변이유발 또는 인공 무작위 돌연변이유발에 의해 얻을 수 있다. 뉴클레오티드를 유도하기 위해 사용되는 돌연변이유발은 의도적으로 유도되거나 의도적으로 무작위적이거나 각각의 혼합일 수 있다. 제1로부터 유래된 상이한 뉴클레오티드 또는 폴리펩티드를 생성하기 위한 뉴클레오티드의 돌연변이유발은 무작위 사건(예를 들어, 폴리머라제 비 충실도에 의해 유발됨)일 수 있고 유도된 뉴클레오티드의 확인은, 예를 들어, 본원에 논의된 바와 같이, 적절한 스크리닝 방법에 의해 수행될 수 있다.

[0077] 일부 측면에서, 제2 뉴클레오티드 서열로부터 유래된 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열은 제2 뉴클레오티드와 각각 적어도 약 50%, 적어도 약 51%, 적어도 약 52%, 적어도 약 53%, 적어도 약 54%, 적어도 약 55%, 적어도 약 56%, 적어도 약 57%, 적어도 약 58%, 적어도 약 59%, 적어도 약 60%, 적어도 약 61%, 적어도 약 62%, 적어도 약 63%, 적어도 약 64%, 적어도 약 65%, 적어도 약 66%, 적어도 약 67%, 적어도 약 68%, 적어도 약 69%, 적어도 약 70%, 적어도 약 71%, 적어도 약 72%, 적어도 약 73%, 적어도 약 74%, 적어도 약 75%, 적어도 약 76%, 적어도 약 77%, 적어도 약 78%, 적어도 약 79%, 적어도 약 80%, 적어도 약 81%, 적어도 약 82%, 적어도 약 83%, 적어도 약 84%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 서열 동일성을 가지며, 제1 뉴클레오티드는 제2 뉴클레오티드의 생물학적 활성을 유지한다.

[0078] 용어 "상보적" 및 "상보성"은 왓슨-크릭 염기쌍-형성 규칙에 의해 서로 관련된 2개 이상의 올리고머(즉, 각각이 핵염기 서열을 포함함), 또는 올리고머와 표적 유전자 사이를 지칭한다. 예를 들어, 핵염기 서열 "T-G-A(5' → 3')"는 핵염기 서열 "A-C-T(3' → 5')"와 상보적이다. 상보성은 "부분적"일 수 있으며, 주어진 핵염기 서열의 모든 핵염기보다 적은 수가 염기쌍 형성 규칙에 따라 다른 핵염기 서열과 매칭된다. 예를 들어, 일부 측면에서, 주어진 핵염기 서열과 다른 핵염기 서열 사이의 상보성은 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90% 또는 약 95% 일 수 있다. 또는, 그 예를 계속하기 위해 주어진 핵염기 서열과 다른 핵염기 서열 사이에 "완전한" 또는 "완벽

한"(100%) 상보성이 있을 수 있다. 핵염기 서열 사이의 상보성 정도는 서열 간 혼성화의 효율 및 강도에 상당한 영향을 미친다.

- [0079] 용어 "하류"는 참조 뉴클레오티드 서열의 3'에 배치된 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 특정 측면에서, 하류 뉴클레오티드 서열은 전사의 시작점에 뒤따르는 서열에 관한 것이다. 예를 들어, 유전자의 번역 개시 코돈은 전사 시작 부위의 하류에 배치된다. 용어 "상류"는 참조 뉴클레오티드 서열의 5'에 배치된 뉴클레오티드 서열을 지칭한다.
- [0080] 본원에 사용된 용어 "항원 결합 도메인" 및 "항체"는 천연인지 또는 부분적으로 또는 전체적으로 합성으로 생성된 면역글로불린인지 여부에 관계없이 면역글로불린, 및 이의 항원 결합 부분을 포괄한다. 이 용어는 또한 면역글로불린 결합 도메인과 상동성인 결합 도메인을 갖는 임의의 단백질을 포함한다. "항원 결합 도메인" 및 "항체"는 항원에 특이적으로 결합하고 이를 인식하는 면역글로불린 단백질로부터의 프레임워크 영역을 포함하는 폴리펩티드 또는 이의 부분을 추가로 포함하고, 적어도 하나의 CDR을 포함한다. 용어 "항원 결합 도메인" 및 "항체"의 사용은 전체 항체, 폴리클로날, 모노클로날 및 재조합 항체, 이의 일부를 포함하는 것을 의미하며, 추가로 단일쇄 항체, 인간화 항체, 짓과 항체, 키메라, 마우스-인간, 마우스-영장류, 영장류-인간 모노클로날 항체, 항-개별특이형 항체, 항체 작제물, 예를 들어 scFv, (scFv)₂, Fab, Fab', 및 F(ab')₂, F(ab1)₂, Fv, dAb 및 Fd, 디설피드-결합 Fv(dsFc) 및 항체 관련 폴리펩티드를 포함한다.
- [0081] 일부 측면에서, "항원-결합 부분"은 항체로부터 유래된 CDR을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 항원과 접촉하는 폴리펩티드 서열을 지칭한다.
- [0082] 항원-결합 부분은 또한 단일 도메인 항체, 맥시바디, 미니바디, 나노바디, 인트라바디, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, v-NAR 및 비스-scFv에 포함될 수 있다(예를 들어, Hollinger and Hudson, *Nature Biotechnology* 23:1126-1136, 2005 참고). 항원 결합 부분은 또한 피브로넥틴 III형(Fn3)과 같은 폴리펩티드에 기반하는 스캐폴드에 이식될 수 있다(피브로넥틴 폴리펩티드 미니바디를 기재하는 미국 특허 번호 6,703,199 참고). 따라서, 용어 "항원 결합 도메인" 및 "항체"는 또한 피브로넥틴 유형 III 도메인(모노바디), 하나 이상의 CDR이 이식된 다른 스캐폴딩 시스템(예를 들어, 테나신), 압타머 등에 기반하는 항체 모방체를 포함한다.
- [0083] 용어 "항원 결합 도메인" 및 "항체"는 또한 본 개시내용에 따라 사용될 수 있는 다른 적합한 항원 결합 도메인, 예를 들어 나노바디, VIII 항체, DARPIn(설계된 안키린 반복 단백질), 어피바디, 모노바디, 애드넥틴, 알파바디, 알부민 결합 도메인, 애드히론(Adhiron), 아필린(Affilin) 및 다른 감마-B 크리스탈린-유래 인공 단백질, 아피머(Affimer), 아피틴(Affitin)(NANOFITIN™), 안티칼린(Anticalin), 아르마딜로(Armadillo) 반복 단백질(ARM-반복 단백질, 예를 들어, β-카테닌, α-임포팅, 플라코글로빈, 선종성 결장 폴립증, ARMC4, ARMCX3 등), 아트리머(Atrimer)(예를 들어, 테트라넥틴 및 유래된 단백질), 아비머/맥시바디(Maxibody), 쉐티린(Centyrin), 파이노머(Fynomer) 및 다른 Fyn SH3 도메인-유래 단백질, 쿠니츠(Kunitz) 도메인, 오바디(Obody)/OB-폴드, 프로넥틴(Pronectin), 레페바디(Repebody), 또는 임의의 합성 및/또는 컴퓨터로 설계된 결합 단백질 또는 스캐폴드를 포함한다.
- [0084] 항체의 모듈식 구조는 60개 초과 상이한 이중특이적 또는 다중특이적 항체 형식을 생성하기 위해 활용되었다. 따라서, 일부 측면에서, 항체는 예를 들어, 크로스맵(crossMab), DAF(이중 작용 Fab)(투-인-원), DAF(포-인-원), DutaMab, DT-IgG, 낱-인-홀(Knobs-in-holes) 공통 LC, 노브-인-홀 어셈블리, 전하 쌍, Fab-아암 교환, SEED바디, 트리오맵(Triomab), LUZ-Y(2개의 HC의 이중이량체화를 유도하는 류신 지퍼가 있는 이중특이적 항체), Fcab, Kλ-바디, 직교 Fab, DVD-IgG(이중 가변 도메인 IgG), IgG(H)-scFv, scFv-(H)IgG, IgG(L)-scFv, scFv-(L)IgG, IgG(L,H)-Fv, IgG(H)-V, V(H)-IgG, IgG(L)-V, V(L)-IgG, KIH IgG-scFab, 2scFv-IgG, IgG-2scFv, scFv4-Ig, 자이바디(Zybody), DVI-IgG(포-인-원), 나노바디(Nanobody), 나노바디-HSA, BiTE(이중특이적 T 세포 연계체), 디아바디(Diabody), DART(이중-친화도-재표적화), TandAb(일렬 항체), sc디아바디, sc디아바디-CH3, 트리플 바디(Triple Body), 미니항체(Miniantibody), 미니바디(Minibody), TriBi 미니바디, scFv-CH3 KIH, Fab-scFv, scFv-CH-CL-scFv, F(ab')₂, F(ab')₂-ScFv₂, scFv-KIH, Fab-scFv-Fc, 4가 HC Ab, sc디아바디-Fc, 디아바디-Fc, 일렬 scFv-Fc, 인트라바디(Intrabody), 닥 앤드 락(Dock and Locck), ImmTAC, HSA바디, sc디아바디-HSA, 일렬 scFv-독소, IgG-IgG, Cov-X-바디, 및 scFv1-PEG-scFv2로부터 선택된 형식일 수 있다.
- [0085] "항원 결합 도메인" 및 "항체"는 이들이 원하는 생물학적 활성 또는 기능을 나타내는 한 이중특이적 항체 및 다중특이적 항체를 또한 포함한다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 키메라 결합 단백질(예를 들어, CAR)은 세포의 항원-결합 도메인, 예를 들어 scFv를 포함한다.

- [0086] 용어 "scFv"는 경쇄의 가변 영역을 포함하는 하나 이상의 항체 부분 및 중쇄의 가변 영역을 포함하는 하나 이상의 항체 부분을 포함하는 융합 단백질을 지칭하며, 경쇄 및 중쇄 가변 영역은, 예를 들어, 합성 링커, 예를 들어, 단형 가요성 폴리펩티드 링커를 통해 인접하여 결합되고 단일쇄 폴리펩티드로 발현될 수 있고, scFv는 그것이 유래된 온전한 항체의 특이성을 유지한다. 지정되지 않는 한, 본원에 사용된 바와 같은 scFv는 VL 및 VH 가변 영역을, 예를 들어 폴리펩티드의 N-말단 및 C-말단 말단에 대해, 어느 순서로든 가질 수 있으며, scFv는 VL-링커-VH를 포함할 수 있거나 VH-링커-VL을 포함할 수 있다.
- [0087] 본원에 사용된 용어 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"은 항원 특이성 및 결합 친화도를 부여하는 항체 가변 영역 내의 아미노산 서열을 지칭한다. 예를 들어, 일반적으로 각각의 중쇄 가변 영역에는 3개의 CDR(예를 들어, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3)이 있고 각각의 경쇄 가변 영역에는 3개의 CDR(LCDR1, LCDR2 및 LCDR3)이 있다. 주어진 CDR의 정확한 아미노산 서열 경계는 문헌(Kabat 등 (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.)("Kabat" 넘버링 체계), 문헌(AI-Lazikani 등, (1997) JMB 273,927-948)("Chothia" 넘버링 체계)에 기재된 것들, 또는 이의 조합을 포함하는, 임의의 여러 잘 알려진 체계를 사용하여 결정될 수 있다. Kabat 넘버링 체계 하에, 일부 측면에서, 중쇄 가변 도메인(VH)의 CDR 아미노산 잔기는 31-35(HCDR1), 50-65(HCDR2), 및 95-102(HCDR3)로 넘버링되고; 경쇄 가변 도메인(VL)의 CDR 아미노산 잔기는 24-34(LCDR1), 50-56(LCDR2), 및 89-97(LCDR3)로 넘버링된다. Chothia 넘버링 체계 하에, 일부 측면에서, VH의 CDR 아미노산은 26-32(HCDR1), 52-56(HCDR2), 및 95-102(HCDR3)로 넘버링되고; VL의 CDR 아미노산 잔기는 26-32(LCDR1), 50-52(LCDR2) 및 91-96(LCDR3)으로 넘버링된다. 조합된 Kabat 및 Chothia 넘버링 체계에서, 일부 측면에서, CDR은 Kabat CDR, Chothia CDR, 또는 둘 모두의 일부인 아미노산 잔기에 상응한다. 예를 들어, 일부 측면에서, CDR은 VH, 예를 들어 포유동물 VH, 예를 들어 인간 VH에서 아미노산 잔기 26-35(HCDR1), 50-65(HCDR2), 및 95-102(HCDR3); 및 VL, 예를 들어 포유동물 VL, 예를 들어 인간 VL의 아미노산 잔기 24-34(LCDR1), 50-56(LCDR2), 및 89-97(LCDR3)에 상응한다.
- [0088] 본원에 사용된 바와 같이, "세포 조작" 또는 "세포 변형"(이의 파생어 포함)은 세포, 예를 들어 본원에 개시된 면역 세포의 표적화된 변형을 지칭한다. 일부 측면에서, 세포 조작은 바이러스 유전 공학, 비-바이러스 유전 공학, T 세포 기능을 개선하는 하나 이상의 내인성 유전자의 종양 특이적 표적화(예를 들어, 항-ROR1 CAR) 도입을 허용하는 수용체의 도입, 면역 세포, 예를 들어 T 세포 기능(예를 들어, 면역 세포가 변형되지 않은 상응하는 세포와 비교하여 증가된 c-Jun 발현을 나타내도록 c-Jun 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드)을 향상시키는 하나 이상의 합성 유전자의 도입), 또는 이들의 조합을 포함한다. 본 개시내용의 다른 부분에서 추가로 기재된 바와 같이, 일부 측면에서, 세포는 전사 활성화제(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템 기반 전사 활성화제)로 조작되거나 변형될 수 있으며, 여기서 전사 활성화제는 관심 있는 단백질(예를 들어, c-Jun)의 내인성 발현을 유도 및/또는 증가시킬 수 있다.
- [0089] 용어 "항원"은 면역 반응을 촉발하는 분자를 지칭한다. 이 면역 반응에는 항체 생성이나 특정 면역학적-적격 세포의 활성화 또는 둘 모두가 관여될 수 있다. 당업자는 사실상 모든 단백질 또는 펩티드를 포함하는 임의의 거대분자가 항원으로 작용할 수 있음을 이해할 것이다. 또한, 항원은 제조합 또는 게놈 DNA로부터 유래될 수 있다.
- [0090] 본원에 사용된 용어 "에피토프"는 항체 분자와 특이적으로 상호작용하는 항원의 모이어티를 지칭한다. 본원에서 에피토프 결정인자로 지칭되는 이러한 모이어티는 전형적으로 아미노산 측쇄 또는 당 측쇄와 같은 요소를 포함하거나 이의 일부이다. 에피토프 결정인자는 예를 들어 당분야에 알려진 방법, 예를 들어 결정학 또는 수소-중수소 교환에 의해 정의될 수 있다. 에피토프 결정인자와 특이적으로 상호작용하는 항체 분자 상의 모이어티 중 적어도 하나 또는 일부는 전형적으로 CDR(들)에 위치한다. 전형적으로 에피토프는 특정 3차원 구조 특성을 갖는다. 전형적으로 에피토프는 특정 전하 특성을 갖는다. 일부 에피토프는 선형 에피토프인 반면 다른 에피토프는 입체형태 에피토프이다.
- [0091] 용어 "자가"는 나중에 개체로 재도입될, 동일한 개체로부터 유래된 임의의 물질을 지칭한다.
- [0092] 용어 "키메라 항원 수용체" 또는 대안적으로 "CAR"은 면역 효과기 세포에 있을 때 세포에 표적 세포, 전형적으로 암 세포에 대한 특이성 및 세포내 신호 생성을 제공하는, 전형적으로 가장 단순한 형태에서 2개의, 폴리펩티드 세트를 지칭한다. 일부 측면에서, CAR은 적어도 세포외 항원 결합 도메인, 막횡단 도메인 및 아래 정의된 바와 같은 자극 분자 및/또는 공동-자극 분자로부터 유래된 기능적 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 신호전달 도메인("세포내 신호전달 도메인"으로도 본원에서 지칭됨)을 포함한다. 일부 측면에서, 폴리펩티드 세트는 동일한 폴리펩티드 사슬에 있으며, 예를 들어 키메라 융합 단백질을 포함한다. 일부 측면에서, 폴리펩티드 세트는

서로 인접하지 않고, 예를 들어 상이한 폴리펩티드 사슬에 있다. 일부 측면에서, 폴리펩티드 세트는 이량체화 분자의 존재 시 폴리펩티드를 서로 커플링할 수 있는, 예를 들어 항원-결합 도메인을 세포내 신호전달 도메인에 커플링할 수 있는 이량체화 스위치를 포함한다. 일부 측면에서, CAR의 자극 분자는 T 세포 수용체 복합체(예를 들어, CD3 제타)와 연관된 제타 사슬이다. 일부 측면에서, 세포질 신호전달 도메인은 1차 신호전달 도메인(예를 들어, CD3 제타의 1차 신호전달 도메인)을 포함한다. 일부 측면에서, 세포질 신호전달 도메인은 아래에 정의된 바와 같이 적어도 하나의 공동-자극 분자로부터 유래된 하나 이상의 기능적 신호전달 도메인을 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 공동-자극 분자는 본원에 기재된 공동-자극 분자, 예를 들어 4-1BB(즉, CD137), CD27, 및/또는 CD28로부터 선택된다.

[0093] 일부 측면에서, CAR은 항원 결합 도메인, 막횡단 도메인 및 자극 분자로부터 유래된 기능적 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 융합 단백질을 포함하고, 항원 결합 도메인 및 막횡단 도메인은 CAR 스페이스에 의해 결합된다. 일부 측면에서, CAR은 CAR 스페이스를 통해 막횡단 도메인에 결합된 항원 결합 도메인, 및 공동-자극 분자로부터 유래된 기능적 신호전달 도메인 및 자극 분자로부터 유래된 기능적 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 융합 단백질을 포함한다. 일부 측면에서, CAR은 CAR 스페이스를 통해 막횡단 도메인에 결합된 항원 결합 도메인, 및 하나 이상의 공동-자극 분자(들)로부터 유래된 2개의 기능적 신호전달 도메인 및 자극 분자로부터 유래된 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 융합 단백질을 포함한다. 일부 측면에서, CAR은 CAR 스페이스를 통해 막횡단 도메인에 결합된 항원 결합 도메인, 및 하나 이상의 공동-자극 분자(들)로부터 유래된 적어도 2개의 기능적 신호전달 도메인 및 자극 분자로부터 유래된 기능적 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 융합 단백질을 포함한다. 일부 측면에서, CAR은 CAR의 아미노-말단(N-말단)에 선택적 리더 서열을 포함한다. 일부 측면에서, CAR은 항원-결합 도메인의 N-말단에 리더 서열을 추가로 포함하고, 리더 서열은 CAR의 세포 처리 및 세포막으로의 편재 동안 항원-결합 도메인(예를 들어, scFv)으로부터 선택적으로 절단된다.

[0094] 본 출원은 개시된 주제의 상이한 측면을 예시하기 위해 종종 CAR을 사용하지만, 본원에 제공된 관련 개시가 다른 키메라 결합 단백질에 동일하게 적용될 수 있음이 당업자에게 명백할 것이다. 본원에 사용된 용어 "키메라 결합 단백질"은 하나 이상의 항원(예를 들어, 항원 결합 모이어티 포함)에 결합할 수 있고 원래는 자연 발생 방향이 아닌 방향으로 연결된 별개의 단백질 또는 단백질의 단편 또는 동일한 단백질의 다수의 단편을 암호화하는 둘 이상의 이종 폴리뉴클레오티드의 결합을 통해 생성되는 단백질을 지칭한다. 다른 키메라 결합 단백질의 비제한적 예는 T 세포 수용체(TCR)(예를 들어, 조작된 TCR), 키메라 항체-T 세포 수용체(caTCR), 키메라 신호 수용체(CSR), T 세포 수용체 모방체(TCR mimic), 및 이의 조합을 포함한다. 따라서, 달리 나타내지 않는 한, 용어 CAR은 일부 측면에서 당분야에 알려진 다른 유형의 키메라 결합 단백질, 예를 들어 본원에 기재된 것을 포함할 수 있다.

[0095] 용어 "암"은 비정상적인 세포의 제어되지 않은 성장을 특징으로 하는 질환을 지칭한다. 암 세포는 국소적으로 또는 혈류 및 림프계를 통해 신체의 다른 부분으로 퍼질 수 있다. 다양한 암의 예가 본원에 기재되어 있으며 유방암, 전립샘암, 난소암, 자궁경부암, 피부암, 췌장암, 결장직장암, 신장암, 간암, 뇌암, 림프종, 백혈병, 폐암 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 용어 "종양" 및 "암"은 본원에서 상호 교환적으로 사용되며, 예를 들어 두 용어 모두 고형 및 액형, 예를 들어 미만성 또는 순환성 종양을 포괄한다. 본원에 사용된 용어 "암" 또는 "종양"은 악성 뿐만 아니라 전악성 암 및 종양을 포함한다.

[0096] 용어 "암 연관 항원" 또는 "종양 항원" 또는 이의 변이체는 정상 세포와 비교하여, 전체적으로 또는 단편(예를 들어, MHC/펩티드)으로서 암 세포의 표면 상에 우선적으로 발현되며 암 세포에 대한 약리학적 제제의 우선적 표적화에 유용한 분자(전형적으로 단백질, 탄수화물 또는 지질)를 상호 교환적으로 지칭한다. 일부 측면에서, 종양 항원은 정상 세포 및 암 세포 둘 모두에 의해 발현되는 마커, 예를 들어 계통 마커, 예를 들어 B 세포 상의 CD19이다. 특정 측면에서, 종양 항원은 원발성 또는 전이성 흑색종, 가슴샘종, 림프종, 육종, 폐암, 간암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 백혈병, 자궁암, 자궁경부암, 방광암, 신장암 그리고 유방암, 전립샘암, 난소암, 췌장암 등과 같은 샘암종을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0097] 일부 측면에서, 종양 항원은 특정 증식성 장애에 공통적인 항원이다. 일부 측면에서, 암 연관 항원은 정상 세포와 비교하여 암 세포에서 과발현되는, 예를 들어, 정상 세포와 비교하여 약 1배 과발현, 약 2배 과발현, 약 3배 과발현 또는 그 초과인 세포 표면 분자이다. 일부 측면에서, 암 연관 항원은 암 세포에서 부적절하게 합성된 세포 표면 분자, 예를 들어 정상 세포 상에서 발현된 분자와 비교하여 결실, 부가 또는 돌연변이를 함유하는 분자이다. 일부 측면에서, 암-연관 항원은 전체적으로 또는 단편(예를 들어, MHC/펩티드)으로서 암 세포의 세포 표

면 상에서만 발현되고, 정상 세포의 표면 상에서는 합성되거나 발현되지 않을 것이다.

- [0098] 용어 "항암 효과"는 중앙 부피의 감소, 암 세포 수의 감소, 전이 수의 감소, 기대 수명의 증가, 암 세포 증식의 감소, 암 세포 생존의 감소, 또는 암 병태와 연관된 다양한 생리학적 증상의 완화를 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 수단에 의해 나타날 수 있는 생물학적 효과를 지칭한다
- [0099] "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체된 것이다. 염기성 측쇄(예를 들어, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전 극성 측쇄(예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지 측쇄(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 포함하는 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 패밀리가 당분야에 정의되어 있다. 따라서, 폴리펩티드의 아미노산이 동일한 측쇄 패밀리의 또 다른 아미노산으로 대체되는 경우, 치환은 보존적인 것으로 간주된다. 일부 측면에서, 아미노산 스트링은 측쇄 패밀리 구성원의 순서 및/또는 조성이 상이한 구조적으로 유사한 스트링으로 보존적으로 대체될 수 있다.
- [0100] 비보존적 아미노산 치환은 (i) 전기양성 측쇄를 갖는 잔기(예를 들어, Arg, His 또는 Lys)가 전기음성 잔기(예를 들어, Glu 또는 Asp)로 또는 이에 의해 치환되거나, (ii) 친수성 잔기(예를 들어, Ser 또는 Thr)가 소수성 잔기(예를 들어, Ala, Leu, Ile, Phe 또는 Val)로 또는 이에 의해 치환되거나, (iii) 시스테인 또는 프롤린이 임의의 다른 잔기로 또는 이에 의해 치환되거나, (iv) 부피가 큰 소수성 또는 방향족 측쇄를 갖는 잔기(예를 들어, Val, His, Ile 또는 Trp)가 더 작은 측쇄를 갖거나(예를 들어, Ala 또는 Ser) 측쇄가 없는(예를 들어, Gly) 것으로 또는 이에 의해 치환되는 것들을 포함한다.
- [0101] 다른 아미노산 치환도 사용될 수 있다. 예를 들어, 아미노산 알라닌의 경우, D-알라닌, 글리신, 베타-알라닌, L-시스테인 및 D-시스테인 중 어느 하나로 치환될 수 있다. 라이신의 경우, 대체물은 D-라이신, 아르기닌, D-아르기닌, 호모-아르기닌, 메티오닌, D-메티오닌, 오르니틴 또는 D-오르니틴 중 어느 하나일 수 있다. 일반적으로, 단리된 폴리펩티드의 특징 변화를 유도할 것으로 예상될 수 있는 기능적으로 중요한 영역의 치환은 (i) 극성 잔기, 예를 들어, 세린 또는 트레오닌이 소수성 잔기, 예를 들어, 류신, 이소류신, 페닐알라닌 또는 알라닌으로(또는 이에 의해) 치환되거나; (ii) 시스테인 잔기가 임의의 다른 잔기로(또는 이에 의해) 치환되거나; (iii) 전기양성 측쇄를 갖는 잔기, 예를 들어 라이신, 아르기닌 또는 히스티딘이 전기음성 측쇄를 갖는 잔기, 예를 들어 글루탐산 또는 아스파르트산으로(또는 이에 의해) 치환되거나; (iv) 부피가 큰 측쇄를 갖는 잔기, 예를 들어 페닐알라닌이 이러한 측쇄를 갖지 않는 것, 예를 들어 글리신으로(또는 이에 의해) 치환되는 것들이다. 전술한 비보존적 치환 중 하나가 단백질의 기능적 특성을 변경할 수 있는 가능성은 또한 단백질의 기능적으로 중요한 영역에 대한 치환의 위치와 상관관계가 있으며; 따라서 일부 비보존적 치환은 생물학적 특성에 영향을 거의 또는 전혀 갖지 않을 수 있다.
- [0102] 본 개시내용의 내용에서, 상기 정의된 용어 "돌연변이" 및 "아미노산 치환"(때때로 단순히 "치환"으로 지칭됨)은 상호 교환적으로 간주된다.
- [0103] 본 개시내용의 맥락에서, 치환(아미노산 치환으로 지칭되는 경우에도)은 핵산 수준에서 수행되며, 즉, 아미노산 잔기의 대안적 아미노산 잔기로의 치환은 제1 아미노산을 암호화하는 코돈을 제2 아미노산을 암호화하는 코돈으로 치환함으로써 수행된다.
- [0104] 본원에 사용된 용어 "상동성"은 중합체 분자 사이, 예를 들어 핵산 분자(예를 들어, DNA 분자 및/또는 RNA 분자) 사이 및/또는 폴리펩티드 분자 사이의 전반적인 관련성을 지칭한다. 일반적으로 용어 "상동성"은 두 분자 간 진화적 관계를 시사한다. 따라서 상동성인 두 분자는 공통 진화 조상을 가질 것이다. 본 개시내용의 맥락에서, 용어 상동성은 동일성 및 유사성을 모두 포괄한다.
- [0105] 일부 측면에서, 중합체 분자는 분자 내 단량체의 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 99%가 동일하거나(정확히 동일한 단량체) 유사한(보존적 치환) 경우 서로 "상동성"인 것으로 간주된다. 용어 "상동성"은 반드시 적어도 2개의 서열(폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열) 간 비교를 지칭한다.
- [0106] 본원에 사용된 용어 "동일성"은 중합체 분자 사이, 예를 들어 폴리펩티드 분자 또는 폴리뉴클레오티드 분자(예를 들어, DNA 분자 및/또는 RNA 분자) 사이의 전반적 단량체 보존을 지칭한다. 임의의 추가 수식어가 없는 용어

"동일한"은, 예를 들어 단백질 A가 단백질 B와 동일한이란, 서열이 100% 동일함(100% 서열 동일성)을 시사한다. 2개의 서열을, 예를 들어 "70% 동일한"으로 기재하는 것은, 예를 들어 이들을 "70% 서열 동일성"을 갖는 것으로 기재하는 것과 동등하다.

- [0107] 예를 들어, 2개의 폴리펩티드 서열의 동일성%의 계산은 최적 비교 목적을 위해 2개의 서열을 정렬함으로써 수행될 수 있다(예를 들어, 갭이 최적 정렬을 위해 제1 및 제2 폴리펩티드 서열 중 하나 또는 둘 모두에 도입될 수 있고, 동일하지 않은 서열은 비교를 위해 무시될 수 있음). 특정 측면에서, 비교 목적을 위해 정렬된 서열의 길이는 참조 서열의 길이의 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 약 100%이다. 그런 다음 해당 아미노산 위치에서 아미노산이 비교된다.
- [0108] 제1 서열의 위치가 제2 서열의 상응하는 위치와 동일한 아미노산에 의해 점유될 때, 분자는 그 위치에서 동일하다. 두 서열 간 동일성%는 두 서열의 최적 정렬을 위해 도입되어야 하는 갭의 수 및 각각의 갭의 길이를 고려하여, 서열이 공유하는 동일한 위치의 수의 함수이다. 두 서열 간 서열 비교 및 동일성%의 결정은 수학적 알고리즘을 사용하여 수행될 수 있다.
- [0109] 단백질 및 뉴클레오티드 서열 둘 모두의 정렬을 위해 다양한 소스로부터 적합한 소프트웨어 프로그램이 이용 가능하다. 서열 동일성%를 결정하기 위한 하나의 적합한 프로그램은 미국 정부의 국립 생명공학 정보 센터 BLAST 웹 사이트(blast.ncbi.nlm.nih.gov)에서 이용 가능한 BLAST 프로그램 제품군의 일부인 b12seq이다. B12seq는 BLASTN 또는 BLASTP 알고리즘을 사용하여 두 서열 간 비교를 수행한다. BLASTN은 핵산 서열을 비교하기 위해 사용되는 반면, BLASTP는 아미노산 서열을 비교하기 위해 사용된다. 다른 적합한 프로그램은 예를 들어 EMBOSS 생물정보학 프로그램 제품군의 일부인 Needle, Stretcher, Water 또는 Matcher이며 또한 유럽 생물정보학 연구소 (EBI)로부터 www.ebi.ac.uk/Tools/psa에서 이용 가능하다.
- [0110] 서열 정렬은 MAFFT, Clustal(ClustalW, Clustal X 또는 Clustal Omega), MUSCLE 등과 같은 당분야에 알려진 방법을 사용하여 수행될 수 있다.
- [0111] 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 참조 서열과 정렬되는 단일 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 표적 서열 내의 상이한 영역은 각각 이의 고유한 서열 동일성%를 가질 수 있다. 서열 동일성% 값은 가장 가까운 10분의 1로 반올림됨이 주지된다. 예를 들어 80.11, 80.12, 80.13 및 80.14는 80.1로 내림되는 반면 80.15, 80.16, 80.17, 80.18 및 80.19는 80.2로 올림된다. 또한 길이 값은 항상 정수일 것임이 주지된다.
- [0112] 특정 측면에서, 제2 아미노산 서열(또는 핵산 서열)에 대한 제1 아미노산 서열(또는 핵산 서열)의 동일성 백분율(ID%)은 $ID\% = 100 \times (Y/Z)$ 로서 계산되고, Y는 제1 및 제2 서열의 정렬에서(시각 검사 또는 특정 서열 정렬 프로그램에 의해 정렬됨) 동일한 매치로 점수가 매겨진 아미노산 잔기(또는 핵염기)의 수이고 Z는 제2 서열의 총 잔기 수이다. 제1 서열의 길이가 제2 서열보다 긴 경우, 제2 서열에 대한 제1 서열의 동일성%는 제1 서열에 대한 제2 서열의 동일성%보다 높을 것이다.
- [0113] 당업자는 서열 동일성%의 계산을 위한 서열 정렬의 생성이 1차 서열 데이터에 의해서만 유도된 이원 서열-서열 비교에 제한되지 않는다는 것을 이해할 것이다. 서열 정렬은 구조 데이터(예를 들어, 결정학적 단백질 구조), 기능 데이터(예를 들어, 돌연변이의 위치), 또는 계통발생학적 데이터와 같은 이종성 소스로부터의 데이터와 서열 데이터를 통합함으로써 생성될 수 있음이 또한 이해될 것이다. 다중 서열 정렬을 생성하기 위해 이종성 데이터를 통합하는 적합한 프로그램은 www.tcoffee.org에서 이용 가능한 T-Coffee이며 대안적으로 예를 들어 EBI로부터 이용 가능하다. 또한 서열 동일성%를 계산하기 위해 사용되는 최종 정렬은 자동으로 또는 수동으로 큐레이션될 수 있음이 이해될 것이다.
- [0114] 본원에 사용된 용어 "유사성"은 중합체 분자 사이, 예를 들어 폴리뉴클레오티드 분자(예를 들어, DNA 분자 및/또는 RNA 분자) 사이 및/또는 폴리펩티드 분자 사이의 전반적인 관련성을 지칭한다. 서로에 대한 중합체 분자의 유사성%의 계산은 동일성%의 계산과 동일한 방식으로 수행될 수 있으며, 단 유사성%의 계산은 당분야에서 이해되는 바와 같이 보존적 치환을 고려한다. 유사성 백분율은 사용된 비교 척도, 즉 아미노산이 비교되는지 여부, 예를 들어 이의 진화적 근접성, 전하, 부피, 가요성, 극성, 소수성, 방향성, 등전점, 항원성 또는 이의 조합에 따라 부수적임이 이해된다.
- [0115] 본원에 사용된 용어 "단리된", "정제된", "추출된" 및 이의 문법적 변이체는 상호 교환적으로 사용되며, 본 개시내용의 원하는 조성물, 예를 들어 하나 이상의 정제 공정을 거친, 본 개시내용의 CAR의 제조 상태를 지칭한다. 일부 측면에서, 본원에 사용된 바와 같은 단리 또는 정제는 오염물을 함유하는 샘플로부터 본 개시내

용의 조성물, 예를 들어, 본 개시내용의 CAR을 제거, 부분적으로 제거(예를 들어, 분획화)하는 공정이다.

- [0116] 일부 측면에서, 단리된 조성물은 검출 가능한 원하지 않은 활성을 갖지 않거나, 대안적으로 원하지 않은 활성의 수준 또는 양은 허용 가능한 수준 또는 양 이하이다. 일부 측면에서, 단리된 조성물은 허용 가능한 양 및/또는 농도 및/또는 활성 이상으로, 본 개시내용의 원하는 조성물의 양 및/또는 농도를 갖는다. 일부 측면에서, 단리된 조성물은 조성물이 얻어지는 출발 물질과 비교하여 농축된다. 이러한 농축은 출발 물질과 비교하여 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 적어도 약 99.9%, 적어도 약 99.99%, 적어도 약 99.999%, 적어도 약 99.9999%, 또는 99.9999% 초과만큼일 수 있다.
- [0117] 일부 측면에서, 단리된 조제물에는 잔류 생물학적 생성물이 실질적으로 없다. 일부 측면에서, 단리된 조제물은 임의의 생물학적 오염 물질을 100% 비함유, 적어도 약 99% 비함유, 적어도 약 98% 비함유, 적어도 약 97% 비함유, 적어도 약 96% 비함유, 적어도 약 95% 비함유, 적어도 약 94% 비함유, 적어도 약 93% 비함유, 적어도 약 92% 비함유, 적어도 약 91% 비함유, 또는 적어도 약 90% 비함유한다. 잔류 생물학적 생성물은 비생물적 물질(화학물질 포함) 또는 원치않는 핵산, 단백질, 지질 또는 대사산물을 포함할 수 있다.
- [0118] "핵산", "핵산 분자", "뉴클레오티드 서열", "폴리뉴클레오티드" 및 이의 문법적 변이체는 상호 교환적으로 사용되며 단일 가닥 형태 또는 이중 가닥 나선 형태의, 리보뉴클레오티드(아데노신, 구아노신, 우리딘 또는 시티딘; "RNA 분자") 또는 데옥시리보뉴클레오티드(데옥시아데노신, 데옥시구아노신, 데옥시티미딘 또는 데옥시시티딘; "DNA 분자")의 포스페이트 에스테르 중합체 형태, 또는 포스포로티오에이트 및 티오에스테르와 같은 임의의 포스포에스테르 유사체를 지칭한다. 단일 가닥 핵산 서열은 단일 가닥 DNA(ssDNA) 또는 단일 가닥 RNA(ssRNA)를 지칭한다. 이중 가닥 DNA-DNA, DNA-RNA 및 RNA-RNA 나선이 가능하다. 용어 핵산 분자, 특히 DNA 또는 RNA 분자는 분자의 1차 및 2차 구조만을 지칭하며 이를 임의의 특정 3차 형태로 제한하지 않는다. 따라서, 이 용어는 특히 선형 또는 원형 DNA 분자(예를 들어, 제한 단편), 플라스미드, 초나선 DNA 및 염색체에서 발견되는 이중 가닥 DNA를 포함한다. 특정 이중 가닥 DNA 분자의 구조를 논의할 때, 서열은 DNA의 전사되지 않은 가닥(즉, mRNA와 상동인 서열을 갖는 가닥)에 따라 5'에서 3' 방향의 서열만을 제공하는 통상적 관례에 따라 본원에 기재될 수 있다.
- [0119] "재조합 DNA 분자"는 분자 생물학적 조작을 거친 DNA 분자이다. DNA는 cDNA, 게놈 DNA, 플라스미드 DNA, 합성 DNA 및 반합성 DNA를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 본 개시내용의 "핵산 조성물"은 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 핵산을 포함한다.
- [0120] 본원에 사용된 용어 "폴리뉴클레오티드"는 리보뉴클레오티드, 데옥시리보뉴클레오티드, 이의 유사체, 또는 이의 혼합물을 포함하는 임의의 길이의 뉴클레오티드 중합체를 지칭한다. 이 용어는 분자의 1차 구조를 지칭한다. 따라서, 이 용어는 삼중, 이중 및 단일 가닥 데옥시리보핵산("DNA") 뿐만 아니라 삼중, 이중 및 단일 가닥 리보핵산("RNA")을 포함한다. 이는 또한 예를 들어 알킬화에 의해 및/또는 캡핑에 의해 변형된 폴리뉴클레오티드 및 변형되지 않은 형태의 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 보다 구체적으로, 용어 "폴리뉴클레오티드"는 폴리데옥시리보뉴클레오티드(2-데옥시-D-리보스 함유) 및 스플라이싱 여부에 관계없이 mRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드(D-리보스 함유), 퓨린 또는 피리미딘 염기의 N- 또는 C-글리코시드인 임의의 다른 유형의 폴리뉴클레오티드, 및 노르퓨클레오티드 골격을 함유하는 다른 중합체, 예를 들어, 폴리아미드(예를 들어, 펩티드 핵산 "PNA") 및 폴리모르폴리노 중합체, 및 중합체가 DNA 및 RNA에서 발견되는 것과 같은 염기쌍 형성 및 염기 적층을 허용하는 구성으로 핵 염기를 함유하는 다른 합성 서열-특이적 핵산 중합체를 포함한다.
- [0121] 일부 측면에서, 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드는 DNA, 예를 들어 박테리아에 삽입된 DNA를 포함한다. 일부 측면에서, 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드는 mRNA를 포함한다. 일부 측면에서, mRNA는 합성 mRNA이다. 일부 측면에서, 합성 mRNA는 적어도 하나의 비천연 핵염기를 포함한다. 일부 측면에서, 특정 클래스의 모든 핵염기는 비천연 핵염기로 대체되었다(예를 들어, 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드의 모든 우리딘이 비천연 핵염기, 예를 들어 5-메톡시우리딘으로 대체될 수 있음).
- [0122] 용어 "암호화"는 뉴클레오티드(예를 들어, rRNA, tRNA 및 mRNA)의 정의된 서열 또는 아미노산의 정의된 서열 및 이로부터 생성되는 생물학적 특성을 갖는 생물학적 공정에서 다른 중합체 및 거대분자의 합성을 위한 주형으로 작용하는, 유전자, cDNA 또는 mRNA와 같은 폴리뉴클레오티드에서 특정 뉴클레오티드 서열의 고유한 특성을 지칭한다. 따라서 유전자, cDNA 또는 RNA는 해당 유전자에 상응하는 mRNA의 전사 및 번역이 세포 또는 다른 생물학

적 시스템에서 단백질을 생성하는 경우 단백질을 암호화한다. 그 뉴클레오티드 서열이 mRNA 서열과 동일하고 일반적으로 서열 목록에 제공되는 코딩 가닥 및 유전자 또는 cDNA의 전사를 위한 주형으로 사용되는 비-코딩 가닥이 둘 모두 단백질 또는 해당 유전자 또는 cDNA의 다른 생성물을 암호화하는 것으로 지칭될 수 있다.

- [0123] 달리 지정되지 않는 한, "아미노산 서열"을 "암호화하는" 뉴클레오티드 서열, 예를 들어, 본 개시내용의 CAR을 "암호화하는" 폴리뉴클레오티드는 서로의 축퇴 버전이고 동일한 아미노산 서열을 암호화하는 모든 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0124] 용어 "발현"은 프로모터에 의해 유도되는 특정 뉴클레오티드 서열의 전사 및/또는 번역을 지칭한다.
- [0125] 용어 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 임의의 길이의 아미노산 중합체를 지칭하기 위해 본원에서 상호 교환적으로 사용된다. 중합체는 변형된 아미노산을 포함할 수 있다. 이 용어는 또한 자연적으로 또는 개입; 예를 들어, 디설피드 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화, 또는 표지화 성분과의 접합과 같은 임의의 다른 조작 또는 변형에 의해 변형된 아미노산 중합체를 포괄한다. 예를 들어, 하나 이상의 아미노산 유사체를 함유하는 폴리펩티드(예를 들어, 호모시스테인, 오르니틴, p-아세틸페닐알라닌, D-아미노산 및 크레아틴과 같은 비천연 아미노산 포함)뿐만 아니라 당분야에 알려진 다른 변형도 정의 내에 포함된다.
- [0126] 본원에 사용된 용어 "폴리펩티드"는 임의의 크기, 구조 또는 기능의 단백질, 폴리펩티드 및 펩티드를 지칭한다. 폴리펩티드는 유전자 생성물, 자연 발생 폴리펩티드, 합성 폴리펩티드, 동족체, 오르소로그, 파라로그, 단편 및 진술한 것들의 다른 동등물, 변이체 및 유사체를 포함한다. 폴리펩티드는 단일 폴리펩티드일 수 있거나 이량체, 삼량체 또는 사량체와 같은 다분자 복합체일 수 있다. 이들은 또한 단일쇄 또는 다중쇄 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 가장 일반적으로 디설피드 결합이 다중쇄 폴리펩티드에서 발견된다. 용어 폴리펩티드는 또한 하나 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 자연 발생 아미노산의 인공적인 화학적 유사체인 아미노산 중합체에 적용될 수 있다. 일부 측면에서, "펩티드"는 50개 이하의 아미노산 길이, 예를 들어 약 5개, 10개, 15개, 20개, 25개, 30개, 35개, 40개, 45개 또는 50개 아미노산 길이일 수 있다.
- [0127] "재조합" 폴리펩티드 또는 단백질은 재조합 DNA 기술을 통해 생성된 폴리펩티드 또는 단백질을 지칭한다. 재조합적으로 생성된 폴리펩티드 및 조작된 숙주 세포에서 발현된 단백질은 임의의 적합한 기술에 의해 분리, 분획화 또는 부분적으로 또는 실질적으로 정제된 천연 또는 재조합 폴리펩티드와 같이, 본 발명의 목적을 위해 단리된 것으로 간주된다. 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화된 폴리펩티드(예를 들어, 항-ROR1 CAR, c-Jun 및/또는 EGFRt)는 당분야에 알려진 방법을 사용하여 재조합적으로 생성될 수 있다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화된 폴리펩티드(예를 들어, 항-ROR1 CAR, c-Jun 및/또는 EGFRt)는 여기에 기재된 폴리펩티드를 암호화하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터로의 형질감염 후 세포, 예를 들어 T 세포에 의해 생성된다.
- [0128] 본원에 사용된 바와 같이, 폴리펩티드(예를 들어, c-Jun 폴리펩티드)의 "단편"이라는 용어는 자연 발생 서열보다 짧거나, 자연 발생 폴리펩티드와 비교하여 N- 및/또는 C-말단이 결실되거나, 폴리펩티드의 임의의 부분이 결실된 폴리펩티드의 아미노산 서열을 지칭한다. 따라서, 단편은 N- 및/또는 C-말단 아미노산만 결실될 필요가 없다. 자연 발생 서열에 대해 내부 아미노산이 결실된 폴리펩티드도 단편으로 간주된다.
- [0129] 본원에 사용된 용어 "기능적 단편"은 폴리펩티드 기능을 유지하는 폴리펩티드 단편을 지칭한다. 따라서, 일부 측면에서, Ig 힌지의 기능적 단편은 항원 결합 도메인(예를 들어, scFv)이 표적 에피토프(예를 들어, 종양 항원)와 효과적으로 상호 작용할 수 있도록 표적 에피토프(예를 들어, 종양 항원)로부터 거리를 두고 CAR에 항원-결합 도메인(예를 들어, scFv)을 위치시키는 능력을 유지한다. 유사하게, 일부 측면에서, c-Jun 기능성 단편은 CAR T 세포에서 발현될 때, 예를 들어 상응하는 전장 c-Jun을 발현하는 참조 CAR T 세포의 활성의 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 99% 또는 약 100%를 갖는 CAR T 세포를 초래하는 단편이다. 이러한 활성의 비제한적 예는 본 개시내용의 다른 곳에서 추가로 설명된다.
- [0130] 본원에 사용된 용어 "참조 CAR T 세포"는 동일한 구조적 CAR 성분을 포함하지만 c-Jun을 과발현하지 않는 상응하는 CAR T 세포를 지칭한다.
- [0131] 본 개시내용의 다른 곳에 추가로 기재된 바와 같이, 본원에 기재된 CAR(예를 들어, 항-ROR1 CAR)을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 c-Jun 단백질 또는 이의 기능적 단편을 암호화하는 추가의 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. c-Jun 단편이 기능적 단편인지 여부는 c-Jun 활성화를 결정하기 위한 임의의 알려진 방법(예를 들어,

abcam™으로부터의 비색 c-Jun 전사 인자 검정 키트(비색)) 등에 의해 평가될 수 있다. 본원에 기재된 CAR T 세포와 같은 T 세포에서 c-Jun의 과발현은 T 세포 기능장애(예를 들어, T 세포 고갈)를 완화하거나 방지함으로써 세포의 활성 상태를 유지하는 것을 돕는다. 따라서, c-Jun의 기능적 단편은 본원에 기재된 CAR T 세포와 같은 조작된 면역 세포에서 이 활성을 부여하는 이의 능력에 기반하여 평가될 수 있다. 이러한 활성은 표적 보유 종양 세포(예를 들어, ROR1+ 종양 세포)에 대한 지속적이고 강력한 세포독성(예를 들어, 종양 세포를 용해시키거나 사멸시키는 능력) 또는 T 세포 고갈의 감소된 징후(예를 들어, PD-1과 같은 억제 수용체의 감소된 발현) 및 지속적 효과기 세포의 증가된 징후를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. T 세포 고갈을 평가하고 이에 의해 c-Jun의 기능적 단편을 평가하기 위한 이러한 방법은, 예를 들어 유세포 측정, 세포내 사이토카인 염색(ICS), IncuCyte 면역 세포 사멸 분석, 메조 스케일 디스커버리(MSD) 또는 유사한 검정, 지속적 항원 자극 검정, 순차적 항원 자극 검정(지속적인 항원 자극 검정과 유사하지만 재자극의 각 라운드에 E:T 세포 비를 재설정하지 않음), 벌크 및 단일 세포 RNAseq(예를 들어, Fron Genet. 2020; 11:220; 2019 Bioinformatics 35:i436-445; 2019 Annual Review of Biomed. Data Sci. 2:139-173 참고), 세포독성/사멸 검정, ELISA, 웨스턴 블롯 및 본원에 기재되거나 예를 들어 문헌(Current Protocols in Molecular Biology 또는 Current Protocols in Immunology (John Wiley & Sons, Inc., 1999-2021)) 또는 다른 곳에 기재된 바와 같은 다른 표준 분자 및 세포 생물학 방법과 같이 당분야에 알려진 고갈, 세포 표현형, 지속성, 세포독성 및/또는 사멸, 증식, 사이토카인 방출, 및 유전자 발현 프로파일을 측정하는 데 유용한 검정을 포함한다.

[0132] 알려진 단백질 조작 방법 및 제조합 DNA 기술을 사용하여 폴리펩티드의 특성을 개선하거나 변경하기 위한 변이체가 생성될 수 있다. 예를 들어, 생물학적 기능의 실질적인 손실 없이 분비된 단백질의 N-말단 또는 C-말단에서 하나 이상의 아미노산이 결실될 수 있다. 그 전체가 본원에 참조로 포함된 문헌(Ron 등, *J. Biol. Chem.* 268: 2984-2988 (1993))은 3, 8 또는 27개의 아미노-말단 아미노산 잔기를 결실시킨 후에도 헤파린 결합 활성을 갖는 변이체 KGF 단백질을 보고하였다. 마찬가지로, 인터페론 감마는 이 단백질의 카복시 말단에서 8-10개의 아미노산 잔기를 결실시킨 후 최대 10배 더 높은 활성을 나타냈다(그 전체가 본원에 참조로 포함된, Dobeli 등, *J. Biotechnology* 7:199-216 (1988))

[0133] 또한 충분한 증거가 변이체는 종종 자연 발생 단백질과 유사한 생물학적 활성을 유지함을 실증한다. 예를 들어, Gayle과 동료들(그 전체가 본원에 참조로 포함된, *J. Biol. Chem* 268:22105-22111 (1993))은 인간 사이토카인 IL-1a의 광범위한 돌연변이 분석을 수행했다. 이들은 무작위 돌연변이유발을 사용하여 분자의 전장에 걸쳐 변이체당 평균 2.5개의 아미노산 변화가 있는 3,500개 초과의 개별 IL-1a 돌연변이체를 생성하였다. 가능한 모든 아미노산 위치에서 다중 돌연변이가 조사되었다. 연구자들은 "[대]부분의 분자가 [결합 또는 생물학적 활성]에 거의 영향을 미치지 않고 변경될 수 있음"을 발견했다(초록 참고). 실제로 조사된 3,500개 초과의 뉴클레오티드 서열 중 23개의 고유한 아미노산 서열만이 야생형과 활성이 크게 상이한 단백질을 생성했다.

[0134] 상기 언급된 바와 같이, 변이체 또는 유도체는 예를 들어 변형된 폴리펩티드를 포함한다. 일부 측면에서, 예를 들어 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 지질, 당단백질의 변이체 또는 유도체는 화학적 변형 및/또는 내인성 변형의 결과이다. 일부 측면에서, 변이체 또는 유도체는 생체내 변형의 결과이다. 일부 측면에서, 변이체 또는 유도체는 시험관내 변형의 결과이다. 일부 측면에서, 변이체 또는 유도체는 생산체 세포, 예를 들어 T 세포에서의 세포내 변형의 결과이다.

[0135] 변이체 및 유도체에 존재하는 변형은 예를 들어 아세틸화, 아실화, ADP-리보실화, 아미드화, 플라빈의 공유 부착, 헴 모이어티의 공유 부착, 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체의 공유 부착, 지질 또는 지질 유도체의 공유 부착, 포스포티딜이노시톨의 공유 부착, 가교, 고리화, 이황화 결합 형성, 탈메틸화, 공유 가교 형성, 시스테인 형성, 피로글루타메이트 형성, 포르밀화, 감마-카복실화, 글리코실화, GPI 앵커 형성, 하이드록실화, 요오드화, 메틸화, 미리스토일화, 산화, 페길화(그 전체가 본원에 참조로 포함된, Mei 등, *Blood* 116:270-79 (2010)), 단백질해 가공, 인산화, 프레닐화, 라세미화, 셀레노일화, 황산화, 아르기닐화와 같은 단백질에 대한 아미노산의 전달-RNA 매개 부가 및 유비퀴틴화를 포함한다.

[0136] 용어 "신호전달 도메인"은 세포 내에서 정보를 전송함으로써 2차 메신저를 생성하여 정의된 신호전달 경로를 통해 세포 활성을 조절하거나 이러한 메신저에 반응하여 효과기로서 기능함으로써 작용하는 단백질의 기능적 부분을 지칭한다.

[0137] 본원에 사용된 용어 "세포내 신호전달 도메인"은 분자의 세포내 부분을 지칭한다. 세포내 신호전달 도메인은 CAR 함유 세포, 예를 들어 본원에 기재된 항-ROR1 CAR T 세포의 면역 효과기 기능을 촉진하는 신호를 생성할 수 있다. 예를 들어, CAR T 세포에서, 면역 효과기 기능의 비제한적인 예는 사이토카인의 분비를 포함하는 세포용

해 활성 및 헬퍼 활성을 포함한다. 일부 측면에서, 세포내 신호 도메인은 효과기 기능 신호를 변환하고 세포가 특화된 기능을 수행하도록 지시하는 단백질의 부분이다. 전체 세포내 신호전달 도메인이 사용될 수 있지만, 많은 경우에 전체 사슬을 사용할 필요는 없다. 세포내 신호전달 도메인의 절단된 부분이 사용되는 경우, 이러한 절단된 부분은 효과기 기능 신호를 변환하는 한 온전한 사슬 대신에 사용될 수 있다. 따라서 용어 세포내 신호전달 도메인은 효과기 기능 신호를 변환하기 충분한 세포내 신호전달 도메인의 임의의 절단된 부분을 포함하는 것을 의미한다.

[0138] 일부 측면에서, 세포내 신호전달 도메인은 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 예시적인 1차 세포내 신호전달 도메인은 1차 자극 또는 항원 의존적 시뮬레이션을 담당하는 분자로부터 유래된 것들을 포함한다. 일부 측면에서, 세포내 신호전달 도메인은 공동자극 세포내 도메인을 포함할 수 있다. 예시적인 공동자극 세포내 신호전달 도메인은 공동자극 신호 또는 항원 비의존적 자극을 담당하는 분자로부터 유래된 것들을 포함한다. 예를 들어, CAR T 세포(예를 들어, 본원에 기재된 항-ROR1 CAR T 세포)의 경우, 1차 세포내 신호전달 도메인은 T 세포 수용체의 세포질 서열을 포함할 수 있고, 공동자극 세포내 신호전달 도메인은 공동-수용체 또는 보조자극 분자로부터의 세포질 서열을 포함할 수 있다.

[0139] 1차 세포내 신호전달 도메인은 번역수용체 티로신 기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로 알려진 신호전달 모티프를 포함할 수 있다. ITAM 함유 1차 세포질 신호 서열의 예는 CD3 제타, FcR 감마, 공통 FcR 감마(FCER1G), Fc 감마 RIa, FcR 베타(Fc 엡실론 Rib), CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD22, CD79a, CD79b, CD278(ICOS), Fc ε RI, CD66d, CD32, DAP10 및 DAP12로부터 유래된 것들을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0140] 용어 "공유적으로 연결된", "융합된" 및 이의 문법적 변형은 상호교환적으로 사용되며 제2 모이어티, 예를 들어 제2 아미노산 서열 또는 뉴클레오티드 서열에 공유적으로 또는 비공유적으로 연결된 제1 모이어티, 예를 들어 제1 아미노산 서열 또는 뉴클레오티드 서열을 각각 지칭한다. 제1 모이어티는 제2 모이어티에 직접 연결되거나 병치될 수 있거나, 대안적으로 개재 모이어티가 제1 모이어티를 제2 모이어티에 공유 연결할 수 있다. 용어 "결합된"은 C-말단 또는 N-말단에서의 제1 모이어티와 제2 모이어티의 융합을 의미할 뿐만 아니라 전체 제1 모이어티(또는 제2 모이어티)를 제2 모이어티(또는 제1 모이어티 각각)에서 임의의 두 지점, 예를 들어, 아미노산으로 삽입하는 것을 포함한다. 일부 측면에서, 제1 모이어티는 펩티드 결합 또는 링커에 의해 제2 모이어티에 결합된다. 제1 모이어티는 포스포디에스테르 결합 또는 링커에 의해 제2 모이어티에 결합될 수 있다. 링커는 펩티드 또는 폴리펩티드(폴리펩티드 사슬의 경우) 또는 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 사슬(뉴클레오티드 사슬의 경우) 또는 임의의 화학적 모이어티(폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 사슬 또는 임의의 화학 분자의 경우)일 수 있다.

[0141] 본원에 사용된 용어 "약학 조성물"은 약학적으로 허용 가능한 담체 및 부형제와 같은 하나 이상의 다른 화학적 성분과 혼합되거나 섞이거나 현탁된, 예를 들어 본 개시내용의 CAR과 같은 본원에 기재된 하나 이상의 화합물 또는 본 개시내용의 CAR을 발현하는 세포, 또는 CAR을 발현하고 c-Jun을 과발현하는 세포를 지칭한다. 약학 조성물의 하나의 목적은 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 CAR을 발현하고 c-Jun을 과발현하는 세포 조제물의 대상체에 대한 투여를 용이하게 하는 것이다.

[0142] 용어 "부형제" 및 "담체"는 상호교환적으로 사용되며 화합물, 예를 들어 본 개시내용의 CAR 또는 CAR, c-Jun 및 특정 측면에서 절단된 EGFR을 발현하도록 조작된 세포의 투여를 추가로 용이하게 하기 위해 약학 조성물에 첨가 되는 불활성 물질을 지칭한다.

[0143] 용어 "약학적으로 허용 가능한 담체", "약학적으로 허용 가능한 부형제" 및 이들의 문법적 변형은 미국 연방 정부의 규제 기관에 의해 승인되거나 인간을 포함하는 동물에서 사용하기 위해 미국 약전에 열거된 임의의 제제뿐만 아니라 대상체에 대한 조성물의 투여를 금지하는 정도로 바람직하지 않은 생리학적 효과의 생성을 유발하지 않고 투여된 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 방해하지 않는 임의의 담체 또는 희석제를 포함한다. 약학 조성물을 제조하는 데 유용하고 일반적으로 안전하고 무독성이며 바람직한 부형제 및 담체가 포함된다.

[0144] 용어 "대상체", "환자", "개체" 및 "숙주" 및 이의 변형은 본원에서 상호교환적으로 사용되며 진단, 치료 또는 치료법이 필요한 인간, 가축(예를 들어, 개, 고양이 등), 농장 동물(예를 들어, 소, 양, 돼지, 말 등) 및 실험실 동물(예를 들어, 원숭이, 래트, 마우스, 토끼, 기니피그 등), 특히 인간을 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 포유동물 대상체를 지칭한다. 본원에 기재된 방법은 인간 치료법 및 수의학적 적용 둘 모두에 적용 가능하다.

[0145] 본원에 사용된 어구 "~를 필요로 하는 대상체"는, 예를 들어 본원에 기재된 질환 또는 장애(예를 들어, 암)와

연관된 하나 이상의 증상을 개선하기 위해 본원에 기재된 조성물(예를 들어, 본 개시내용의 항-ROR1 CAR T 세포)의 투여로부터 이익을 얻을 포유동물 대상체와 같은 대상체를 포함한다.

[0146] 본원에 사용된 용어 "치료하다", "치료" 또는 "치료하는"은, 예를 들어 질환 또는 병태의 중증도 감소; 질환 과정의 기간 감소; 질환 또는 병태와 연관된 하나 이상의 증상의 개선 또는 제거; 반드시 질환 또는 병태의 근치를 필요로 하지 않는, 질환 또는 병태를 가진 대상체에 대한 유익한 효과의 제공을 지칭한다. 이 용어는 또한 질환 또는 병태 또는 그 증상의 예방 또는 방지를 포함한다. 일부 측면에서, 용어 "치료하는" 또는 "치료"는 항원에 대해 대상체에서 면역 반응을 유도하는 것을 의미한다.

[0147] 본원에 사용된 용어 "방지하다", "방지하는" 및 이의 변형은 질환, 장애 및/또는 병태의 개시를 부분적으로 또는 완전히 지연시키는 것; 특정 질환, 장애 및/또는 병태의 하나 이상의 증상, 특징 또는 임상 발현의 개시를 부분적으로 또는 완전히 지연시키는 것; 특정 질환, 장애 및/또는 병태의 하나 이상의 증상, 특징 또는 발현의 개시를 부분적으로 또는 완전히 지연시키는 것; 특정 질환, 장애 및/또는 병태로부터의 진행을 부분적으로 또는 완전히 지연시키는 것; 및/또는 질환, 장애 및/또는 병태와 연관된 병리의 발생 위험을 감소시키는 것을 지칭한다. 일부 측면에서 결과의 방지는 예방적 치료를 통해 달성된다.

[0148] 본원에 사용된 용어 "치료 유효량"은 이를 필요로 하는 대상체에서 원하는 치료 효과, 약리학적 및 /또는 생리적 효과를 생성하기 충분한 본원에 개시된 조성물(예를 들어, 본 개시내용의 항-ROR1 CAR T 세포)에 포함되는 시약 또는 약학 화합물의 양이다.

[0149] 예방이 치료법으로 간주될 수 있으므로 치료 유효량은 "예방 유효량"일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "예방적"은 질환 또는 병태의 개시를 방지하거나 질환 또는 병태와 연관된 증상을 방지 또는 지연하기 위해 사용되는 치료 또는 작용 과정을 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같은 "예방"은 건강을 유지하고 질환 또는 병태의 개시를 방지하거나 질환 또는 병태와 연관된 증상을 방지 또는 지연하기 위해 취하는 조치를 지칭한다.

[0150] **ROR1**

[0151] 본 개시내용으로부터 명백한 바와 같이, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드는 ROR1에 특이적으로 결합하는 키메라 결합 단백질(예를 들어, CAR)을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 수용체 티로신 키나제 유사 고아 수용체 1(ROR1)은 삼중 음성 유방암(TNBC) 환자의 대략 57% 및 비소세포 폐 암종(NSCLC) 샘암종 환자의 42%에서 과발현되며(Balakrishnan 2017) 키메라 항원 수용체(CAR) T 세포에 대한 매우 매력적인 표적을 나타낸다. 수용체 티로신 키나제 유사 고아 수용체 1-양성(ROR1⁺) 고형 종양은 항-ROR1 CAR T 세포로 안전하게 표적화될 수 있다(Specht 2020); 그러나 부분적으로는 CAR T 세포가 고형 종양 악성종양 환자에서 주입 후 고갈 또는 기능장애를 나타내기 때문에 유효성이 제한되었다. 또한, 고형 종양은 CAR T 세포와 같은 면역치료법의 항종양 활성을 제한하는 면역 억제 장벽을 갖는다(Newick 2016, Srivastava 2018, Martinez 2019). 임의의 하나의 이론에 구애받지 않고, 본원에 기재된 항-ROR1 키메라 결합 단백질을 발현하는 세포는 전사 인자 c-Jun을 과발현하도록 변형되었고 고갈에 더 저항성이고 당분야에서 이용 가능한 다른 항-ROR1 세포와 비교하여 개선된 효과기 기능을 나타낸다.

[0152] 일부 측면에서, 본 개시내용의 CAR, 즉 항-ROR1 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 종양 항원 상의 에피토프, 예를 들어 티로신 단백질 키나제와 같은 단백질 키나제에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, ScFv)을 포함하는 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0153] 일부 측면에서, 종양 항원은 신경영양성 티로시나제 키나제, 수용체-관련 1(NTRK1)로도 알려진 티로신-단백질 키나제 막횡단 수용체 "ROR1"이다. 인간 아미노산 및 핵산 서열은 GenBank, UniProt 및 Swiss-Prot와 같은 공개 데이터베이스에서 찾을 수 있다. 예를 들어, 인간 ROR1의 이소형 1 및 2 전구체의 아미노산 서열은 각각 접근 번호 NP_005003.2 및 NP_001077061.1에서 찾을 수 있고, 이를 암호화하는 mRNA 서열은 접근 번호 NM_005012.3 및 NM_001083592.1에서 각각 찾을 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 "ROR1"은 돌연변이, 예를 들어 전장 야생형 ROR1의 점 돌연변이, 단편, 삽입, 결실 및 스플라이스 변이체를 포함하는 단백질을 포함한다. 일부 측면에서 CAR의 항원 결합 부분은 ROR1 단백질의 세포외 도메인 내의 항원을 인식하고 이에 결합한다. 일부 측면에서, ROR1 단백질은 암 세포 상에서 발현된다.

[0154] ROR1은 수용체 티로신 키나제 유사 고아 수용체(ROR) 패밀리의 구성원이다. 인간에서 ROR1은 ROR1 유전자에 의해 암호화된다. 이 유전자에 의해 암호화된 단백질은 중추 신경계에서 성장을 조절하고 암 세포의 전이에 역할을 하는 수용체 티로신 키나제이다. ROR1은 상당한 촉매 활성이 결여되어 있고 비정규 Wnt 신호전달 경로와 상호작용하는 슈도키나제로 간주된다. ROR1의 발현 증가는 암, 예를 들어 B 세포 만성 림프구성 백혈병과 연관된

다. ROR1은 순환 종양 세포에서 고도로 발현되며 췌장암 세포의 침습을 촉진한다(Xu 등, 2018, Mol. Med. Rep. 18:5087-5094). ROR1은 또한 난소암에서의 그 역할과 유사하게 자궁내막암에서 종양 진행을 촉진하는 것으로 보인다(Henry 등, 2018, Gynecol. Oncol. 148:576-584). ROR1은 상피 종양에서 발현되고(예를 들어, 다중 상피암 조직학에서 고도로 발현됨) 난소암, 삼중 음성 유방암 및 폐암의 하위세트에서 동종 발현된다(Balakrishnan 등, 2017, Clin. Cancer Res. 23:3061-3071). ROR1 발현은 또한 결장직장암 환자의 림프절 전이와 긍정적으로 연관되었다(Zhou 등, 2017, Oncotarget 8:32864-32872). ROR1 CAR T 및 ADC 연구로부터의 사전 임상 데이터는 비인간 영장류에서 표적-상 종양-외 독성 및 유의한 독성이 없음을 보고한다. 더욱이, 본원에 실증된 바와 같이, c-Jun 과발현 항-ROR1 CAR T 세포는 시험관내 및 생체내 둘 모두에서 항종양 유효성을 실증한다. 구체적으로, 개선된 사이토카인 생성, 연장된 세포독성 및 감소된 고갈 연관 유전자 발현 프로파일이 만성 자극 후(예를 들어, 시험관내)에 관찰되었으며, NSCLC 마우스 이종이식편 모델에서 개선된 항종양 유효성을 나타냈다.

[0155] **c-Jun**

[0156] 본원에 기재된 바와 같이, 일부 측면에서, 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 키메라 결합 단백질, 예를 들어 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함함)는 c-Jun 단백질을 암호화하는 추가적인 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 본원에 제공된 폴리뉴클레오티드는 폴리시스트론 폴리뉴클레오티드이며, 폴리뉴클레오티드는 c-Jun 및 CAR을 포함하는 다중 단백질 및 일부 측면에서 하나 이상의 추가 단백질(예를 들어, EGFRt와 같은 안전 스위치 단백질)을 암호화한다. 특정 측면에서, 본원에 제공된 폴리뉴클레오티드는 c-Jun 폴리펩티드 및 ROR1-결합 단백질을 포함하는 키메라 폴리펩티드(예를 들어, 키메라 결합 단백질)를 암호화한다. 일부 측면에서, 이러한 키메라 폴리펩티드는 c-Jun 폴리펩티드 및 ROR1-결합 단백질이 번역 후 별도 기능 단백질로 절단되도록 절단 가능 링커를 포함할 수 있다.

[0157] 인간에서 c-Jun 단백질은 염색체 1에 위치한 JUN 유전자(GenBank 접근 번호 NC_000001.11의 뉴클레오티드 58,780,791 내지 58,784,047, 마이너스 가닥 배향)에 의해 암호화된다. JUN 유전자의 동의어 및 이의 암호화된 단백질은 알려져 있고 "Jun 원종양유전자, AP-1 전사 인자 서브유닛", "v-Jun 조류 육종 바이러스 17 종양유전자 동족체", "전사 인자 AP-1", "Jun 종양유전자", "AP-1", "Jun 활성화 도메인 결합 단백질", "p39" 및 "인헨서-결합 단백질 AP1"을 포함한다. 야생형 인간 c-Jun 단백질 서열은 331개 아미노산 길이이다. 야생형 인간 c-Jun의 아미노산 및 핵산 서열이 각각 표 1 및 2에 제공된다.

[0158] 야생형 인간 c-Jun(UniProt 식별자: P05412-1) 단백질 서열은 331개 아미노산 길이이다(서열 번호 1). 아미노산 및 핵산 서열을 각각 표 1 및 2에 나타낸다.

표 1

c-Jun 단백질 서열

c-Jun(UniProt: P05412-1)(서열 번호 1)	MTAKMETTFYDDALNASFLPSESGPYGYSNPKILKQSMTLNLADPVGSLKPHLRKNSDLLTSPDVGLLKLA SPELERLIIQSSNGHITTTPTPTQFLCPKNVTDEQEGFAEGFVRALAEHLSQNTLPSVTSAAQPVNGAGMVA PAVASVAGGSGSGGFSASLHSEPPVYANLSNFPGALSSGGGAPSYGAAGLAFPAQPOQQQPPIHLPQQMP VQHPRLQALKEEPQTVPEMPGETPPLSPIDMESQERIKAEKRMRNRI AASKCRKRKLERIARLEEKVKTLK AQNSELASTANMLREQVAQLKQVMNHVNSGCCQLMLTQQLQTF
-----------------------------------	--

[0159]

표 2

c-Jun 핵산 서열

<p>야생형 <i>JUN</i> (GenBank 접근 번호 NM_002228.4)(서열 번호 2) * 코딩 영역은 진하게 대문자로 표시함</p>	<pre>gctcagagtgcactgagtggtgaagcagcagggcgggagtgagggtgcgcggagtcaggc agacagacagacacagccagccagccaggtggcagatagtcgaaactgcaaatcttatttc ttttcacttctcttaactgccagagctagcgcctgtggctcccgggctggtgttcgggag tgtccagagagcctggtctccagccgccccgggagagagccctgctgccaggcctgttga cagcggcggaagcagcggtagccacgcgccccggggaagtggcgagcggctgcagcagc aaagaactttcccggctgggaggaccggagacaagtgccagagtcgggagccaactttgcaa gcctttctgcgtcttagcttctccacggcggtaagaccagaaggcggcgagagccacgca agagaagaagagcgtgcctcagctcgtcgcaccggttgttgaacttggcgagcgcgagcc gcgctgccggcgccccctccccagcagcggaggagggaacaagtctcggagtccggcg gccaagaccgcccggcggcactgagggtcgcactgatcgtccgggggagagccg ctgcttgggaagtgagtcgctcgggactccaggaaccgctgcgcagaaagcgtcagtc gagtgaccgagctttcaagccggtagcgcgcgagtcgacaagt aagagtcggggaggc atctaat taacctgcctcctggagcagctggtgaggaggcgcagcggggagcagacc agcgggtgcgtgcctcttagagaaactttcctgtcaaaggctccggggggcgcgggtgtccc cgcttggcacagcctgttgggccccgaaacttgtgcgcagcccaactaacctcagctg aagtgcaggactgtctATGACTGCAAGATGGAAACGACCTTCTATGACGATGCCCTCAACGC CTCGTTCCTCCGTCGAGAGCGGACCTTATGGTACAGTAACCCCAAGATCCTGAAACAGAGC ATGACCTGAACCTGGCCGACCCAGTGGGAGCCTGAAGCCGACCTCCGCGCCAAGAAGCTCG ACCTCTCACCTCGCCGACGTGGGGCTGCTCAAGCTGGCGTCGCCGAGCTGGAGCGCTGAT AATCCAGTCCAGCAACGGGCACATCACCACCGCCGACCCCAACCCAGTTCCTGTGCCCCAAG AACGTGACAGATGAGCAGGAGGGCTTCGCCGAGGGCTTCGTGCGGCCCTGGCCGAATGCACA GCCAGAACACGCTGCCAGCGTACGTCGGCGCGCAGCCGTCACGGGGCAGGCATGTTGGC TCCCGCGTAGCCTCGTGGCAGGGGGCAGCGGAGCGGGCTTCAGCGCCAGCTGCACAGC GAGCCCGCGTCTACGCAAACTCAGCAACTTCAACCCAGGCGCGCTGAGCAGCGGGCGGGG CGCCCTCTACGGCGGGCGGGCTGGCTTTCCCGCAACCCAGCAGCAGCAGCAGCGGCC GCACCCTGCCAGCAGATGCCCGTGCAGCACCCCGGCTGCAGGCCCTGAAGGAGGAGCCT CAGACAGTGCCCGAGATGCCCGGAGACACCGCCCTGTCCCCATCGACATGGAGTCCAGG AGCGGATCAAGGGGAGAGGAAGGCATGAGGAACCGCATCGCTGCCTCCAAGTGCAGAAAAA GAAGCTGGAGAGAATCGCCCGCTGGAGAAAAAGTAAAACTTGAAGCTCAGAACTCGGAG CTGGCGTCCACGGCCAACATGCTCAGGGAACAGGTGGCACAGCTTAAACAGAAAGTCAATG ACCTTAAACAGTGGGTGCCAACTATGCTAACGCAGCAGTTGCAAACTTTgaagagagaccgt</pre>
---	---

[0160]

<p>cggggctgagggcaacgaagaaaaaaataacacagagagacagacttgagaacttgacaag ttgcgacggagagaaaaaagaagtgtccgagaactaaagccaagggtatccaagtggactggg ttgctcctgaecggcggccagctgtgcacagtgaggaggacttggcggeccctccttggcg tggagccaggagcggccgctgcccgttggcgagggtgtccccgcggaac ggaacgttggactttcgttaacatgaccaagaactgcatggactaacatcgatctcaatc agtataaaggggggagggggaggggttacaactgcaatagagactgtagatgcttctgta gtactccttaagaacacaaagcgggggaggggtggggaggggcggcaggaggaggtttgtga gagcaggctgagcctacagatgaactcttctggcctgccttgttaactgtatgtacata tatataattttaattgatgaaagctgattactgtcaataaacagcttcagcctttgtaagt tattcttgtttgttgggtatcctcccagtggttgttaaat aagagat tggagca ctctgagttaccatttgtaataaagtataaatttttatgtttgttctgaaaatccag aaaggatattaaagaaatacaataaactatggaaagtactccccaacctttttctgcatc atctgtagatactagctatctaggtaggttgaagagatgaagaatgctgataaaatcactc cagtgcttctactatfaagcagtaaaaactgttctctatagacttagaataaatgtacct gatgtacctgatgctatggtcaggttatactctctccccagctatctatggaattgctt accaaaggatagtgcatgttccaggaggctggaggaaggggggtgcagtgagaggggacagc ccactgagaagtcaaacattcaagtttggatgtatcaagtgcatgtgcttgaccattta taatgttagtagaaatttacaataggtgcttatctcaagcaggaattggtagcagattta caaaagatgtacctccaatttggaaactctctttgacaactcctagataaaagatggcct ttgcttatgaatatataaacagcatcttgtcacaataaatgtattcaaataccaa</p>

[0161]

[0162]

대안적으로, 본 개시내용에 유용한 c-Jun은 돌연변이체 c-Jun이 기능장애(고갈된) T 세포를 구제하는 돌연변이체의 능력에 영향을 미치지 않는 한, 돌연변이체 인간 c-Jun일 수 있다. 일부 측면에서, 돌연변이체 c-Jun은 야생형 c-Jun의 C-말단 아미노산 잔기(예를 들어, C-말단 50, 75, 100, 150, 200, 또는 250개 이상의 잔기), C-말단 부분(예를 들어, 1/4, 1/3 또는 1/2) 또는 C-말단 도메인(예를 들어, 엡실론, bZIP 및 이의 아미노산 C-말단)과 적어도 약 70%(예를 들어, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99%) 서열 동일성을 포함한다. 일부 측면에서, 야생형 c-Jun의 N-말단 아미노산 잔기(예를 들어, N-말단 50, 75, 100 또는 150개 이상), N-말단 부분(예

를 들어, 1/4, 1/3 또는 1/2) 또는 N-말단 도메인(예를 들어, 델타, 트랜스활성화 도메인, 및 이의 아미노산 N-말단)이 결실되거나, 돌연변이되거나, 달리 불활성화된다.

- [0163] 일부 측면에서, c-Jun은 그 트랜스활성화 도메인 및/또는 그 델타 도메인에서 불활성화 돌연변이(예를 들어, 치환, 결실 또는 삽입)를 포함한다. 일부 측면에서, c-Jun은 S63A 및 S73A 돌연변이 중 하나 또는 둘 모두를 포함한다(위치는 위에서 이중 밑줄침). 일부 측면에서, c-Jun은 야생형 인간 c-Jun과 비교하여 잔기 2와 102 사이 또는 잔기 30과 50 사이에 결실을 갖는다.
- [0164] 일부 측면에서, c-Jun 폴리펩티드는 명시적으로 그 전체가 본원에 참조로 포함된, WO2019/118902에 개시된 바와 같이 절단된 c-Jun 폴리펩티드를 포함한다. 일부 측면에서, c-Jun 폴리펩티드는 서열 번호 1과 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 측면에서, c-Jun 폴리펩티드는 서열 번호 1에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0165] 일부 측면에서, 본원에 개시된 c-Jun 뉴클레오티드 서열은 당분야에 알려진 임의의 방법을 사용하여 코돈-최적화될 수 있다. 예를 들어 각각 그 전체가 본원에 참조로 포함된, U.S. 공개 번호 2011/0081708 A1, 2014/0244228 A1, 및 2019/0325989 A1을 참고한다. 예를 들어, 특정 측면에서, 본원에 개시된 c-Jun 뉴클레오티드 서열의 코돈은 야생형 뉴클레오티드 서열(즉, 서열 번호 2)과 비교하여 하기 매개변수 중 하나 이상을 변경하기 위해(예를 들어, 증가시키거나 감소시키기 위해) 최적화되었다: (i) 코돈 적응 지수(즉, 코돈 사용 편향), (ii) 구아닌-시토신(GC) 뉴클레오티드 함량, 및 (iii) 이의 조합.
- [0166] 임의의 하나의 이론에 구애받지 않고, 일부 측면에서, 이러한 코돈 최적화는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 단백질의 발현을 증가시킬 수 있다. 따라서, 일부 측면에서, 본 개시내용의 코돈-최적화된 c-Jun 뉴클레오티드 서열은 야생형 뉴클레오티드 서열(즉, 서열 번호 2)로 형질감염된 세포에서의 상응하는 발현과 비교하여 세포에서 형질감염될 때 암호화된 c-Jun 단백질의 발현을 증가시킬 수 있다.
- [0167] 일부 측면에서, c-Jun 폴리펩티드는 세포에서 과발현될 때 세포(예를 들어, 항-ROR1 CAR T 세포)의 고갈을 방지하고/하거나 감소시킬 수 있다. 임의의 하나의 이론에 구애받지 않고, 일부 측면에서, c-Jun을 과발현하는 세포는 고갈 저항성이어서 차용 세포 치료법(예를 들어, CAR T 세포 치료법)의 진행에 대한 주요 장벽을 해결 한다. 특정 측면에서, 고갈에 대한 저항성은 참조 세포(예를 들어, c-Jun을 과발현하지 않는 상응하는 세포)와 비교하여 적어도 약 0.01배, 적어도 약 0.02배, 적어도 약 0.03배, 적어도 약 0.04배, 적어도 약 0.05배, 적어도 약 0.06배, 적어도 약 0.07배, 적어도 약 0.08배, 적어도 약 0.09배, 적어도 약 0.1배, 적어도 약 0.2배, 적어도 약 0.3배, 적어도 약 0.4배, 적어도 약 0.5배, 적어도 약 1배, 적어도 약 2배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배, 적어도 약 11배, 적어도 약 12배, 적어도 약 13배, 적어도 약 14배, 적어도 약 15배, 적어도 약 16배, 적어도 약 17배, 적어도 약 18배, 적어도 약 19배, 적어도 약 20배, 적어도 약 25배, 적어도 약 30배, 적어도 약 35배, 적어도 약 40배, 적어도 약 45배, 적어도 약 50배, 적어도 약 75배, 적어도 약 100배, 적어도 약 200배, 적어도 약 300배, 적어도 약 400배, 적어도 약 500배, 적어도 약 750배, 또는 적어도 약 1,000배 이상만큼 증가된다. 일부 측면에서, 고갈된 세포(예를 들어, 면역 세포)에서 c-Jun 폴리펩티드의 과발현은 참조 세포(예를 들어, 증가된 c-Jun 발현을 갖도록 변형되지 않은 상응하는 고갈된 세포)와 비교하여 고갈을 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 약 100%만큼 감소시킬 수 있다.
- [0168] T 세포와 같은 면역 세포에서 c-Jun의 과발현은, 예를 들어 T 세포 기능장애(예를 들어, T 세포 고갈)를 완화하거나 방지함으로써 세포의 활성 상태를 유지하는 것을 돕는다. T 세포와 같은 본 발명의 조작된 면역 세포는 ROR1 보유 종양 세포에 대해 지속적이고 강력한 세포독성을 나타낸다. c-Jun을 과발현하지 않는 T 세포와 비교할 때, 본 발명의 조작된 T 세포는 T 세포 고갈의 징후가 더 적고 더 오래 지속되고 기능할 수 있는 효과기 세포의 징후가 증가된다.
- [0169] 본원에 사용된 용어 "과발현" 또는 "과발현하다"(또는 이의 문법적 변형)는 참조 세포와 비교하여 증가된 발현(유전자 수준 및/또는 단백질 수준에서)을 의미한다. 본 개시내용으로부터 명백한 바와 같이, 일부 측면에서, 본원에 기재된 세포(예를 들어, T 세포)는, 예를 들어 c-Jun을 과발현하도록 변형되지 않은 상응하는 세포(예를 들어, 자연에 존재하는 상응하는 T 세포)와 비교하여 c-Jun을 과발현하도록 변형되었다. 일부 측면에서, 상응하는 세포와 비교하여, c-Jun 폴리펩티드의 발현은 본 개시내용의 세포에서 증가된다. 일부 측면에서, 상응하는

세포와 비교하여, c-Jun 폴리펩티드의 발현은 적어도 약 1배, 적어도 약 2배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배, 적어도 약 11배, 적어도 약 12배, 적어도 약 13배, 적어도 약 14배, 적어도 약 15배, 적어도 약 16배, 적어도 약 17배, 적어도 약 18배, 적어도 약 19배, 적어도 약 20배, 적어도 약 25배, 적어도 약 30배, 적어도 약 35배, 적어도 약 40배, 적어도 약 45배, 적어도 약 50배, 적어도 약 75배, 적어도 약 100배, 적어도 약 200배, 적어도 약 300배, 적어도 약 400배, 적어도 약 500배, 적어도 약 750배, 또는 적어도 약 1,000배 이상만큼 증가된다. c-Jun을 과발현하도록 세포를 변형하는 예시적인 방법은 본 개시내용의 다른 곳에 제공된다.

[0170] 특정 측면에서, 본원에 기재된 항-ROR1 CAR 조작된 세포(즉, c-Jun을 과발현함)는 TIGIT, PD-1, TNFRSF9, 그랜자임 A(GZMA), 및 CD39를 포함하지만 이에 제한되지 않는 하나 이상의 고갈 마커의 감소된 발현을 갖는다. 이러한 마커(예를 들어, 고갈 마커)의 발현은 벌크 RNASeq 트랜스크립톰 분석을 사용하여 유세포 측정에 의해 벌크 집단에서 측정될 수 있거나 특정 측면에서 개별 세포 트랜스크립톰 분석이 단일 세포 RNASeq를 사용하여 수행될 수 있다. 특정 측면에서, c-Jun을 과발현하는 항-ROR1 CAR 조작된 T 세포에서의 하나 이상의 마커(예를 들어, 고갈 마커)의 발현은 참조 세포(예를 들어, c-Jun을 과발현하도록 조작되지 않은 상응하는 항-ROR1 CAR T 세포)와 비교하여 적어도 약 1.5배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3.0배, 적어도 약 3.5배, 적어도 약 4배, 적어도 약 4.5배, 적어도 약 5배, 적어도 약 10배, 적어도 약 15배, 적어도 약 20배, 적어도 약 25배, 적어도 약 30배, 적어도 약 35배, 적어도 약 40배, 적어도 약 45배, 적어도 약 50배, 적어도 약 55배, 적어도 약 60배, 적어도 약 65배, 적어도 약 70배, 적어도 약 75배, 적어도 약 80배, 적어도 약 85배, 적어도 약 90배, 적어도 약 95배, 또는 적어도 약 100배 이상만큼 감소된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 면역 세포(예를 들어, c-Jun을 과발현하는 항-ROR1 CAR T 세포)에서의 하나 이상의 마커(예를 들어, 고갈 마커)의 발현은 참조 세포 상에서의 상응하는 발현과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 약 100%만큼 감소된다.

[0171] 특정 측면에서, c-Jun을 과발현하는 항-ROR1 CAR 조작된 T 세포(예를 들어, 본원에 기재된 것들)에서의 TIGIT의 발현은 참조 세포(예를 들어, c-Jun을 과발현하도록 조작되지 않은 상응하는 항-ROR1 CAR T 세포)와 비교하여 적어도 약 1.5배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3.0배, 적어도 약 3.5배, 적어도 약 4배, 적어도 약 4.5배, 적어도 약 5배, 적어도 약 10배, 적어도 약 15배, 적어도 약 20배, 적어도 약 25배, 적어도 약 30배, 적어도 약 35배, 적어도 약 40배, 적어도 약 45배, 적어도 약 50배, 적어도 약 55배, 적어도 약 60배, 적어도 약 65배, 적어도 약 70배, 적어도 약 75배, 적어도 약 80배, 적어도 약 85배, 적어도 약 90배, 적어도 약 95배, 또는 적어도 약 100배 이상만큼 감소된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 면역 세포(예를 들어, c-Jun을 과발현하는 항-ROR1 CAR T 세포)에서의 TIGIT의 발현은 참조 세포에서의 상응하는 발현과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 약 100%만큼 감소된다.

[0172] 특정 측면에서, c-Jun을 과발현하는 항-ROR1 CAR 조작된 T 세포(예를 들어, 본원에 기재된 것들)에서의 PD-1의 발현은 참조 세포(예를 들어, c-Jun을 과발현하도록 조작되지 않은 상응하는 항-ROR1 CAR T 세포)와 비교하여 적어도 약 1.5배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3.0배, 적어도 약 3.5배, 적어도 약 4배, 적어도 약 4.5배, 적어도 약 5배, 적어도 약 10배, 적어도 약 15배, 적어도 약 20배, 적어도 약 25배, 적어도 약 30배, 적어도 약 35배, 적어도 약 40배, 적어도 약 45배, 적어도 약 50배, 적어도 약 55배, 적어도 약 60배, 적어도 약 65배, 적어도 약 70배, 적어도 약 75배, 적어도 약 80배, 적어도 약 85배, 적어도 약 90배, 적어도 약 95배, 또는 적어도 약 100배 이상만큼 감소된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 면역 세포(예를 들어, c-Jun을 과발현하는 항-ROR1 CAR T 세포)에서의 PD-1의 발현은 참조 세포 상에서의 상응하는 발현과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 약 100%만큼 감소된다.

[0173] 특정 측면에서, c-Jun을 과발현하는 항-ROR1 CAR 조작된 T 세포(예를 들어, 본원에 기재된 것들)에서의 CD39의 발현은 참조 세포(예를 들어, c-Jun을 과발현하도록 조작되지 않은 상응하는 항-ROR1 CAR T 세포)와 비교하여 적어도 약 1.5배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3.0배, 적어도 약 3.5배, 적어도 약 4배, 적어도 약 4.5배, 적어도 약 5배, 적어도 약 10배, 적어도 약 15배, 적어도 약 20배, 적어도 약 25배, 적어도 약 30배,

적어도 약 35배, 적어도 약 40배, 적어도 약 45배, 적어도 약 50배, 적어도 약 55배, 적어도 약 60배, 적어도 약 65배, 적어도 약 70배, 적어도 약 75배, 적어도 약 80배, 적어도 약 85배, 적어도 약 90배, 적어도 약 95배, 또는 적어도 약 100배 이상만큼 감소된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 면역 세포(예를 들어, c-Jun을 과발현하는 항-ROR1 CAR T 세포)에서의 CD39의 발현은 참조 세포 상에서의 상응하는 발현과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 약 100%만큼 감소된다.

[0174] 일부 측면에서, 본원에 기재된 면역 세포(예를 들어, c-Jun을 과발현하는 항-ROR1 CAR T 세포)에서의 TNFRSF9의 발현은 참조 세포(예를 들어, c-Jun을 과발현하도록 조작되지 않은 상응하는 세포)와 비교하여 적어도 약 1.5배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3.0배, 적어도 약 3.5배, 적어도 약 4배, 적어도 약 4.5배, 적어도 약 5배, 적어도 약 10배, 적어도 약 15배, 적어도 약 20배, 적어도 약 25배, 적어도 약 30배, 적어도 약 35배, 적어도 약 40배, 적어도 약 45배, 적어도 약 50배, 적어도 약 55배, 적어도 약 60배, 적어도 약 65배, 적어도 약 70배, 적어도 약 75배, 적어도 약 80배, 적어도 약 85배, 적어도 약 90배, 적어도 약 95배, 또는 적어도 약 100배 이상만큼 감소된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 면역 세포(예를 들어, c-Jun을 과발현하는 항-ROR1 CAR T 세포)에서의 TNFRSF9의 발현은 참조 세포 상에서의 상응하는 발현과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 약 100%만큼 감소된다.

[0175] 일부 측면에서, 본원에 기재된 면역 세포(예를 들어, c-Jun을 과발현하는 항-ROR1 CAR T 세포)에서의 GZMA의 발현은 참조 세포(예를 들어, c-Jun을 과발현하도록 조작되지 않은 상응하는 세포)와 비교하여 적어도 약 1.5배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3.0배, 적어도 약 3.5배, 적어도 약 4배, 적어도 약 4.5배, 적어도 약 5배, 적어도 약 10배, 적어도 약 15배, 적어도 약 20배, 적어도 약 25배, 적어도 약 30배, 적어도 약 35배, 적어도 약 40배, 적어도 약 45배, 적어도 약 50배, 적어도 약 55배, 적어도 약 60배, 적어도 약 65배, 적어도 약 70배, 적어도 약 75배, 적어도 약 80배, 적어도 약 85배, 적어도 약 90배, 적어도 약 95배, 또는 적어도 약 100배 이상만큼 감소된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 면역 세포(예를 들어, c-Jun을 과발현하는 항-ROR1 CAR T 세포)에서의 GZMA의 발현은 참조 세포 상에서의 상응하는 발현과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 약 100%만큼 감소된다.

[0176] 일부 측면에서, 본원에 기재된 면역 세포 집단(예를 들어, CAR, 절단된 EGFRt 및 c-Jun 폴리펩티드의 과발현을 포함하도록 변형됨)은 c-Jun 폴리펩티드를 과발현하지 않는 상응하는 참조 세포 집단과 비교하여 항원 자극 후 감소된 수의 TIGIT-양성 면역 세포를 포함한다. 일부 측면에서, 항원 자극 후 집단에 존재하는 TIGIT-양성 면역 세포의 수는 참조 집단과 비교하여 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 또는 적어도 약 60%만큼 감소된다. 일부 측면에서, 면역 세포 집단은 항원 자극 후 약 15% 미만, 약 14% 미만, 약 13% 미만, 약 12% 미만, 약 11% 미만, 약 10% 미만, 약 9% 미만, 약 8% 미만, 약 7% 미만, 약 6% 미만, 또는 약 5% 미만의 TIGIT-양성 면역 세포를 포함한다. 특정 측면에서, 본원에 기재된 바와 같은 c-Jun을 과발현하는 조작된 항-ROR1 CAR T 세포 집단은 14일의 지속적인 항원 자극 후 약 5%, 약 6%, 약 7%, 약 8%, 약 9% 또는 약 10% 이하의 TIGIT 양성 세포를 갖는다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 바와 같은 c-Jun을 과발현하는 조작된 항-ROR1 CAR T 세포 집단은 14일의 지속적인 항원 자극 후 약 5%-10%, 약 5%-15%, 약 8%-12%, 또는 약 8%-15% 이하의 TIGIT 양성 세포를 갖는다. 이와 관련하여, CD4+ 또는 CD8+ T 세포와 같은 조작된 T 세포 집단 내의 TIGIT 양성 세포%는 유세포 측정을 사용하여 측정될 수 있다.

[0177] 특정 측면에서, 본원에 기재된 바와 같은 c-Jun을 과발현하는 조작된 항-ROR1 CAR T 세포 집단은 약 14일의 지속적인 자극 후 약 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% 또는 10% 이하의 PD1 양성 세포를 갖는다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 바와 같은 c-Jun을 과발현하는 조작된 항-ROR1 CAR T 세포 집단은 14일의 지속적인 항원 자극 후 약 2%-5% 이하의 PD1 양성 세포를 갖는다. 이와 관련하여, CD4+ 및/또는 CD8+ CAR⁺ c-Jun⁺ T 세포 집단 내의 PD1 양성 세포%는 유세포 측정과 같은 당분야에 알려진 방법을 사용하여 측정될 수 있다.

[0178] 특정 측면에서, 본원에 기재된 바와 같은 c-Jun을 과발현하는 조작된 항-ROR1 CAR T 세포 집단은 14일의 지속적인 자극 후 약 20%-60% 이하의 CD39 양성 세포를 갖는다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 바와 같은 c-Jun을 과

발현하는 조작된 항-ROR1 CAR T 세포 집단은 14일의 지속적인 자극 후 약 20%-40% 또는 25%-45% 또는 30%-40% 이하의 CD39 양성 세포를 갖는다. CAR⁺ c-Jun⁺ T 세포 집단 내의 CD39 양성 세포는 유세포 측정과 같은 당분야에 알려진 방법을 사용하여 측정될 수 있다.

[0179] 일부 측면에서, 본원에 기재된 면역 세포 집단(예를 들어, CAR, 절단된 EGFRt 및 c-Jun 폴리펩티드의 과발현을 포함하도록 변형됨)은 c-Jun 폴리펩티드를 과발현하지 않는 상응하는 참조 세포 집단과 비교하여 항원 자극 후 감소된 수의 TNFRSF9-양성 면역 세포를 포함한다. 일부 측면에서, 항원 자극 후 집단에 존재하는 TNFRSF9-양성 면역 세포의 수는 참조 집단과 비교하여 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 또는 적어도 약 70%만큼 감소된다. 일부 측면에서, 면역 세포 집단은 항원 자극 후 약 5% 미만, 약 4.5% 미만, 약 4% 미만, 약 3.5% 미만, 또는 약 2% 미만의 TNFRSF9-양성 면역 세포를 포함한다.

[0180] 일부 측면에서, 본원에 기재된 면역 세포 집단(예를 들어, CAR, 절단된 EGFRt 및 c-Jun 폴리펩티드의 과발현을 포함하도록 변형됨)은 c-Jun 폴리펩티드를 과발현하지 않는 상응하는 참조 세포 집단과 비교하여 항원 자극 후 감소된 수의 GZMA-양성 면역 세포를 포함한다. 일부 측면에서, 항원 자극 후 집단에 존재하는 GZMA-양성 면역 세포의 수는 참조 집단과 비교하여 적어도 약 40%, 적어도 약 35%, 적어도 약 30%, 적어도 약 25%, 또는 적어도 약 20%만큼 감소된다. 일부 측면에서, 면역 세포 집단은 항원 자극 후 약 30% 미만, 약 25% 미만, 약 20% 미만, 약 15% 미만 또는 약 10% 미만의 GZMA-양성 면역 세포를 포함한다.

[0181] 특정 측면에서, 본원에 기재된 바와 같은 c-Jun을 과발현하는 조작된 항-ROR1 CAR T 세포 집단은 c-Jun을 과발현하지 않는 대조군 T 세포 집단과 비교하여 적어도 약 5배, 적어도 약 10배, 적어도 약 15배, 적어도 약 20배, 적어도 약 25배, 적어도 약 30배, 적어도 약 35배, 적어도 약 40배, 적어도 약 45배, 적어도 약 50배, 적어도 약 55배, 적어도 약 60배, 적어도 약 65배, 적어도 약 70배, 적어도 약 75배, 적어도 약 80배, 적어도 약 85배, 적어도 약 90배, 적어도 약 95배, 적어도 약 100배, 적어도 약 125배, 또는 적어도 약 150배 더 많은 IL-2, INF- γ 및/또는 TNF α 를 분비한다. 특정 측면에서, 본원에 기재된 바와 같은 c-Jun을 과발현하는 조작된 항-ROR1 CAR T 세포 집단은 c-Jun을 과발현하지 않는 조작된 T 세포의 대조군 집단과 비교하여 1:1, 1:5, 1:10 및/또는 1:20 E:T 비에서 지속적인 항원 자극의 제0일 및/또는 제14일에 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3배, 적어도 약 3.5배, 적어도 약 4배, 적어도 약 4.5배, 적어도 약 5배, 적어도 약 5.5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 8배, 적어도 약 10배, 적어도 약 15배, 적어도 약 20배, 적어도 약 30배, 적어도 약 40배, 적어도 약 50배, 또는 적어도 약 100배 더 많은 IL-2, INF- γ , 및/또는 TNF α 를 발현한다. 사이토카인 분비는 ELISA 또는 MSD 분석과 같이 당분야에 알려진 방법을 사용하여 측정될 수 있다.

[0182] 특정 측면에서, 본원에 기재된 바와 같은 c-Jun을 과발현하는 조작된 항-ROR1 CAR T 세포 집단은, 예를 들어 곡선 아래 면적(AUC)에 의해 정량된 바와 같이, c-Jun을 과발현하지 않는 조작된 T 세포의 대조군 집단과 비교하여 적어도 약 2배, 적어도 약 4배, 적어도 약 6배, 적어도 약 8배, 적어도 약 10배, 적어도 약 15배, 적어도 약 20배, 적어도 약 25배, 적어도 약 30배, 적어도 약 40배, 적어도 약 50배, 적어도 약 75배, 적어도 약 100배, 적어도 약 150배, 적어도 약 200배, 또는 적어도 약 250배 이상의 향상된 사멸 효율을 실증한다.

[0183] 특정 측면에서, 본원에 기재된 바와 같은 c-Jun을 과발현하는 조작된 항-ROR1 CAR T 세포 집단은 c-Jun을 과발현하지 않는 조작된 T 세포의 대조군 집단과 비교하여 항원에 반응하여 적어도 동등하거나 적어도 약 1.5배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3배, 적어도 약 3.5배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 8배, 적어도 약 10배, 적어도 약 15배, 적어도 약 20배, 적어도 약 25배, 적어도 약 30배, 적어도 약 50배, 적어도 약 75배, 적어도 약 100배, 적어도 약 125배, 적어도 약 150배, 적어도 약 200배, 적어도 약 225배, 적어도 약 250배, 적어도 약 300배, 적어도 약 400배, 또는 적어도 약 500배 이상 향상된 증식을 실증한다. 항원 유도된 증식은 본원에 기재된 것들과 같이 당분야에 알려진 증식 검정을 사용하여 시험될 수 있다.

[0184] 고갈, 세포 표현형, 지속성, 세포독성 및/또는 사멸, 증식, 사이토카인 방출 및 유전자 발현 프로파일과 같은 본원에 기재된 세포(예를 들어, 항-ROR1 CAR T 세포)의 하나 이상의 특성을 측정하는 데 유용한 검정은 당분야에 알려져 있고, 예를 들어 유세포 측정, 세포내 사이토카인 염색(ICS), IncuCyte 면역 세포 사멸 분석, 메조스케일 디스커버리(MSD) 또는 유사한 검정, 지속적인 항원 자극 검정, 순차적 항원 자극 검정(지속적인 항원 자극 검정과 유사하지만 재자극의 각 라운드에 E:T 세포 비를 재설정하지 않음), 벌크 및 단일 세포 RNAseq(예를 들어, Fron Genet. 2020; 11:220; 2019 Bioinformatics 35:i436-445; 2019 Annual Review of Biomed. Data Sci. 2:139-173 참고), 세포독성/사멸 검정, ELISA, 웨스턴 블롯 및 본원에 기재되거나 예를 들어 문헌(Current Protocols in Molecular Biology 또는 Current Protocols in Immunology (John Wiley & Sons, Inc., 1999-2021)) 또는 다른 곳에 기재된 바와 같은 다른 표준 분자 및 세포 생물학 방법을 포함한다.

- [0185] **EGFRt**
- [0186] 일부 측면에서, 본원에 기재된 본 발명의 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 키메라 결합 단백질, 예를 들어, CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함함)는 절단된 표피 성장 인자 수용체(EGFRt)를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함한다. 따라서, 특정 측면에서, 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드는 (i) c-Jun 폴리펩티드, (ii) ROR-1 결합 단백질(예를 들어, 항-ROR1 CAR) 및 (iii) EGFRt를 포함하는 키메라 폴리펩티드(예를 들어, 키메라 결합 단백질)를 암호화한다.
- [0187] 표피 성장 인자 수용체(EGFR)는 EGF 패밀리의 리간드에 결합하는 수용체 티로신 키나제로, 몇몇 신호전달 캐스케이드를 활성화하여 세포의 신호를 적절한 세포 반응으로 전환한다. 본원에 사용된 바와 같이, "절단된 표피 성장 인자 수용체" 또는 "EGFRt"는 전장 EGFR 단백질의 부분 서열(예를 들어, 서열 번호 3)만을 포함한다. 일부 측면에서, EGFRt는 EGFR 세포의 도메인 III 및 IV 그리고 EGFR 막횡단 도메인을 포함하지만, EGFR 세포의 도메인 I 및 II 그리고 EGFR 세포내 서열은 결여되어 있다.
- [0188] 일부 측면에서, 본원에 기재된 EGFRt는 추가로 막근접 도메인을 포함한다. 본원에 사용된 용어 "막근접 도메인"은 막 횡단 도메인의 바로 C-말단에 있는 세포 표면 단백질(예를 들어, EGFR)의 세포내 부분을 지칭한다. 임의의 하나의 이론에 구애받지 않고, 일부 측면에서, 막근접 도메인의 부가는 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되는 단백질의 발현을 증가시킬 수 있다. 따라서, 일부 측면에서, EGFRt는 세포의 도메인, 막횡단 도메인, 및 세포내 도메인의 처음 3개 아미노산을 포함한다. 일부 측면에서, EGFRt는 EGFR 도메인 III, EGFR 도메인 I, 막횡단 도메인, 및 아미노산 Arg-Arg-Arg(서열 번호 3; 표 3 참고)를 포함한다.

표 3

EGFRt 아미노산 서열

EGFRt (서열 번호 3)	RKVCNGIGIGEFKDSL SINATNIKHFKNCTSISGDLHLPLVAFRGDSFHTHTPLDPQELDILKTVKEITGFL LIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGKNKLCYANTINW KKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPRF VENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENTLVWKYADAGHVCHLCH PNCTYGTGPGLEGCPNGPKIPSIATGMVALLLLLVVALGIGLFMRRR
-----------------	--

- [0189]
- [0190] 본 개시내용으로부터 명백한 바와 같이, EGFRt를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 포함은 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 키메라 결합 단백질, 예를 들어 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함함)에 특정 장점을 제공한다.
- [0191] 일부 측면에서 EGFRt는 사멸 스위치로 기능할 수 있다. 일부 측면에서, 조작된 세포(예를 들어, 본원에 기재된 c-Jun 과발현 항-ROR1 CAR T 세포)가 체내에서 더 이상 필요하지 않을 때, 세톡시맵, 파니투무맵, 니모투주맵 또는 네시투무맵과 같은 약학 등급 항-EGFR 항체가 환자에 투여되어, 예를 들어 항체-의존적 세포독성(ADCC), 보체-의존적 세포독성(CDC), 및/또는 항체-의존적 세포성 식균작용(ADCP)을 통해, 조작된 세포를 제거할 수 있다.
- [0192] 일부 측면에서, EGFRt는 서열 번호 3과 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 측면에서, EGFRt는 서열 번호 3에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0193] **스페이서**
- [0194] 일부 측면에서, 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 키메라 결합 단백질, 예를 들어 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함함)는 스페이서를 암호화하는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 본원에 사용된 용어 "스페이서"는 2개의 이격된 모이어티: 예를 들어, 키메라 결합 단백질(예를 들어, CAR)의 항원-결합 도메인 및 막횡단 도메인을 함께 공유적으로 결합시킬 수 있는 폴리펩티드 서열을 지칭한다. 일부 측면에서, 본원에 개시된 키메라 결합 단백질(예를 들어, CAR)은 ROR1과 막횡단 도메인에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 부분 사이에 스페이서를 포함한다.
- [0195] 일부 측면에서, 스페이서는 면역글로불린으로부터 유래된다(예를 들어, 힌지 영역 또는 루프 영역으로부터 유래

됨). 특정 측면에서, 이들 스페이서는 예를 들어 IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgE 또는 IgM 힌지 영역, 이의 단편 (단독으로 또는 추가 서열, 예를 들어 CH1 또는 CH2 영역 서열에 의해 캡핑됨), 또는 IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgE 또는 IgM 힌지 영역으로부터의 단편의 조합을 포함한다. 일부 측면에서, 스페이서는, 예를 들어 IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgE 또는 IgM 불변 도메인 루프 영역, 이의 단편(단독으로 또는 예를 들어 인접한 β -가닥으로부터의, 추가 서열에 의해 캡핑됨), 또는 IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgE 또는 IgM 루프 영역으로부터의 단편의 조합을 포함한다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 스페이서는 힌지 영역 유래 서열, 루프 영역 유래 서열, 또는 이의 조합을 포함한다.

[0196] 따라서, 일부 측면에서, 본 개시내용은 키메라 폴리펩티드(예를 들어, 키메라 결합 단백질, 예를 들어, CAR)를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공하고, CAR은 (i) 항원-결합 도메인(예를 들어, 항-ROR1 scFv), (ii) 막횡단 도메인, 및 (iii) 세포내 도메인을 포함한다. 특정 측면에서, 본원의 폴리뉴클레오티드는 (iv) c-Jun 폴리펩티드 및 (v) EGFRT 펩티드를 추가로 암호화한다. 특정 측면에서, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드는 또한 인간 면역글로불린(Ig) 힌지 영역 및/또는 루프 영역으로부터 유래된 아미노산 서열을 포함하는 하나 이상의 스페이서 및 선택적으로 링커(예를 들어, gly-ser 풍부 링커)를 암호화하고, 스페이서는 항원 결합 도메인과 막횡단 도메인 사이에 위치한다. 일부 측면에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 CAR을 암호화하는 트랜스유전자를 포함하는 재조합 핵산 작제물을 제공한다. 본 개시내용은 또한 본원에 개시된 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 서열 또는 벡터에 의해 암호화된 CAR을 제공한다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 CAR은 표준 CAR, 분할 CAR, 오프-스위치 CAR, 온-스위치 CAR, 1세대 CAR, 2세대 CAR, 3세대 CAR, 4세대 CAR 또는 5세대 CAR로 설계된다.

[0197] 용어 "본 개시내용의 스페이서" 및 "Ig 유래 스페이서"는 다음을 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다:

[0198] (i) "힌지 영역 유래 스페이서", 즉 인간 면역글로불린, 예를 들어 IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgE 또는 IgM의 CH1 및 CH2 불변 도메인 사이에 위치한 힌지 영역으로부터 유래된 아미노산 서열, 및 선택적으로 인접한 CH1 및/또는 CH2 도메인으로부터의 하나 이상의 아미노산을 포함하는 스페이서, 또는 이의 조합(예를 들어, 몇몇 연결된 힌지 영역 유래 스페이서);

[0199] (ii) "루프 영역 유래 스페이서", 즉 인간 면역글로불린, 예를 들어, IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgE, 또는 IgM의 불변 도메인의 루프 영역으로부터 유래된 아미노산 서열, 및 선택적으로 인접한 β -가닥으로부터의 하나 이상의 아미노산을 포함하는 스페이서, 또는 이의 조합(예를 들어, 몇몇 연결된 루프 영역 유래 스페이서); 또는,

[0200] (iii) 이의 조합(예를 들어, 둘 이상의 연결된 힌지 영역 유래 스페이서 및 루프 영역 유래 스페이서).

[0201] 일부 측면에서, 본 개시내용의 용어 스페이서는 인간 IgA1(Uniprot: P01876, IGHA1_HUMAN, 면역글로불린 중쇄 불변 알파 1; 서열 번호 5), 인간 IgA2(Uniprot P01877, IGHA2_HUMAN, 면역글로불린 중쇄 불변 알파 2; 서열 번호 6), 쥐과 IgG2A(Uniprot P01665, GCAM_MOUSE, 면역글로불린 감마 2A 사슬 C 영역; 서열 번호 7), 인간 IgG1(Uniprot P01857, IGHG1_HUMAN, 면역글로불린 중쇄 불변 감마 1; 서열 번호 8), 인간 IgG2(Uniprot P01859, IGHG2_HUMAN, 면역글로불린 중쇄 불변 감마 2; 서열 번호 9), 인간 IgG3(Uniprot P01860, IGHG3_HUMAN, 면역글로불린 중쇄 불변 감마 3; 서열 번호 10), 인간 IgG4(Uniprot P01861, IGHG4, 면역글로불린 중쇄 불변 감마 4; 서열 번호 11), 인간 IgD(Uniprot P01880, IGHD_HUMAN, 면역글로불린 중쇄 불변 델타; 서열 번호 12), 인간 IgE(Uniprot P01854, IGHE_HUMAN, 면역글로불린 중쇄 불변 엡실론; 서열 번호 13), 또는 IgM(Uniprot P01871, IGHM_HUMAN, 면역글로불린 중쇄 불변 뮤; 서열 번호 14)으로 구성된 군으로부터 선택된 면역글로불린 중쇄의 하위서열을 지칭하며, 하위서열은 CH1-CH2 힌지 영역 또는 이의 일부를 포함한다. 일부 측면에서, 하위서열은 CH1 및/또는 CH2 불변 도메인의 인접 부분을 추가로 포함한다.

[0202] 일부 측면에서, 본 개시내용의 용어 스페이서는 인간 IgA1(Uniprot: P01876, IGHA1_HUMAN, 면역글로불린 중쇄 불변 알파 1; 서열 번호 5), 인간 IgA2(Uniprot P01877, IGHA2_HUMAN, 면역글로불린 중쇄 불변 알파 2; 서열 번호 6), 쥐과 IgG2A(Uniprot P01665, GCAM_MOUSE, 면역글로불린 감마 2A 사슬 C 영역; 서열 번호 7), 인간 IgG1(Uniprot P01857, IGHG1_HUMAN, 면역글로불린 중쇄 불변 감마 1; 서열 번호 8), 인간 IgG2(Uniprot P01859, IGHG2_HUMAN, 면역글로불린 중쇄 불변 감마 2; 서열 번호 9), 인간 IgG3(Uniprot P01860, IGHG3_HUMAN, 면역글로불린 중쇄 불변 감마 3; 서열 번호 10), 인간 IgG4(Uniprot P01861, IGHG4, 면역글로불린 중쇄 불변 감마 4; 서열 번호 11), 인간 IgD(Uniprot P01880, IGHD_HUMAN, 면역글로불린 중쇄 불변 델타; 서열 번호 12), 인간 IgE(Uniprot P01854, IGHE_HUMAN, 면역글로불린 중쇄 불변 엡실론; 서열 번호 13), 또는 IgM(Uniprot P01871, IGHM_HUMAN, 면역글로불린 중쇄 불변 뮤; 서열 번호 14)으로 구성된 군으로부터 선택된 면역글로불린 중쇄의 하위서열을 지칭하며, 하위서열은 불변 도메인으로부터의 루프 영역 또는 이의 일부를 포

함한다. 일부 측면에서, 하위서열은 β -가닥의 인접 부분을 추가로 포함한다.

- [0203] 일부 측면에서, 본 개시내용의 CAR 스페이서는 IgG2 힌지, 예를 들어 찢과 IgG2A 힌지, 유래된 CAR 스페이서, 예를 들어 스페이서 1, 예를 들어 KPCPPCKCP(서열 번호 15)의 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 이로 본질적으로 구성된다.
- [0204] 일부 측면에서, 본 개시내용의 스페이서는 서열 번호 15에 제시된 서열과 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 CAR 스페이서는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산 치환을 제외하고는 서열 번호 15에 제시된 서열 중 어느 하나와 동일한 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 아미노산 치환은 보존적 아미노산 치환이다. 일부 측면에서, 아미노산 치환은 적어도 하나의 비보존적 아미노산 치환을 포함한다.
- [0205] 일부 측면에서, 본 개시내용의 스페이서는 서열 번호 15에 제시된 서열을 포함하고, 스페이서 서열은 선택적 가요성 링커(예를 들어, GGGSG(서열 번호 16)의 링커)를 추가로 포함한다. 따라서, 일부 측면에서, 본 개시내용의 스페이서는 스페이서 서열(예를 들어, 서열 번호 15) 및 선택적 C-말단 또는 N-말단 가요성 링커를 포함한다. 일부 측면에서, 본원에 개시된 임의의 선택적 가요성 링커(예를 들어, gly/ser 풍부 링커)는 스페이서의 C-말단 및/또는 N-말단에 부착될 수 있다.
- [0206] 따라서, 일부 측면에서, 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드는 (i) ROR1-결합 단백질; (ii) 스페이서; 및 (iii) EGFRt를 암호화하는 뉴클레오티드를 포함하는 키메라 결합 단백질(예를 들어, CAR)을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 폴리뉴클레오티드는 (i) R12 항체의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH) 및 R12 항체의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 ROR1-결합 단백질; (ii) 서열 번호 15에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 스페이서; 및 (iii) 절단된 EGF 수용체(EGFRt)를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 CAR을 포함한다. 본 개시내용의 다른 곳에 추가로 기재된 바와 같이, 일부 측면에서, ROR1 결합 부분의 VH는 서열 번호 44를 포함하고 ROR1 결합 부분의 VL은 서열 번호 48을 포함한다. 일부 측면에서, EGFRt는 서열 번호 3과 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0207] **신호 펩티드**
- [0208] 본원에 기재된 바와 같이, 일부 측면에서, 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 키메라 결합 단백질, 예를 들어 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함함)는 또한 신호 펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 신호 펩티드는 암호화된 단백질의 세포 표면 발현을 용이하게 할 수 있고 이어서 성숙 단백질로부터 절단될 수 있다.
- [0209] 당분야에 알려진 임의의 적합한 신호 펩티드가 본 개시내용과 함께 사용될 수 있다. 신호 펩티드의 비제한적 예가 표 4(아래)에 제공된다. 특정 측면에서, 신호 펩티드는 인간 Ig 카파로부터 유래된다. 일부 측면에서, 신호 펩티드는 서열 번호 17에 제시된 아미노산 서열(MVLQTQVFISLLLWISGAYG)과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 측면에서, 신호 펩티드는 서열 번호 17에 제시된 아미노산 서열(MVLQTQVFISLLLWISGAYG)을 포함한다. 일부 측면에서, 신호 펩티드는 GM-CSF로부터 유래된다. 특정 측면에서, 이러한 신호 펩티드는 서열 번호 18에 제시된 아미노산 서열(MLLVTSLLLCELPHPAFLIP)과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98% 또는 적어도 약 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 신호 펩티드는 서열 번호 18에 제시된 아미노산 서열(MLLVTSLLLCELPHPAFLIP)을 포함한다.
- [0210] 일부 측면에서, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드는 단일 신호 펩티드(예를 들어, 서열 번호 17 또는 18)를 포함한다. 일부 측면에서, 폴리뉴클레오티드는 다중 신호 펩티드(예를 들어, 적어도 2, 3, 4개 이상)를 포함한다. 특정 측면에서, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드는 키메라 폴리펩티드(예를 들어, 키메라 결합 단백질, 예를 들어, CAR)를 암호화하며, CAR은 (i) 항원-결합 도메인(예를 들어, 항-ROR1 scFv), (ii) 막횡단 도메인, 및 (iii) 세포내 도메인을 포함한다. 특정 측면에서 본원의 폴리뉴클레오티드는 (iv) c-Jun 폴리펩티드 및 (v) EGFRt 폴리펩티드를 추가로 암호화한다. 특정 측면에서, 본원의 폴리뉴클레오티드는 또한 하나 이상의 신호 펩티드(예를 들어, 표 4에 제시된 것들)를 암호화한다.

표 4

신호 펩티드 서열

원천	서열
EGFR	MRPSGTAGAALLALLAALCPASRA(서열 번호 19)
GM-CSF	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP(서열 번호 18)
인간 Ig 카파	MVLQTVFISLLWISGAYG(서열 번호 17)
인간 CD33	MPLLLLLPLWAGALA(서열 번호 20)

[0211]

[0212] 링커

[0213] 일부 측면에서, 본 발명의 임의의 CAR 스페이서는 선택적 N-말단 링커 및/또는 선택적 C-말단 링커를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 링커는 본원에 기재된 CAR의 임의의 성분을 결합시킬 수 있다. 당분야에 알려진 가요성 링커 서열이 선택적 링커로 사용될 수 있다. 일부 측면에서, 선택적 링커는 화학식 [(Gly)_n-Ser]_m(서열 번호 21)에 따른 글리신/세린 링커이며, n은 1 내지 100의 임의의 정수이고 m은 1 내지 100의 임의의 정수이다. 일부 측면에서, 글리신/세린 링커는 화학식 [(Gly)_x-(Ser)_y]_z(서열 번호 22)에 따르며, x는 1 내지 4의 정수이고, y는 0 또는 1이고, z는 1 내지 50의 정수이다. 일부 측면에서, 선택적 링커는 서열 (G)_n(서열 번호 23)을 포함하고, n은 1 내지 100의 정수일 수 있다. 일부 측면에서, 선택적 링커는 링커는 서열 (GlyAla)_n(서열 번호 24)을 포함할 수 있으며, n은 1 내지 100의 정수이다.

[0214] 일부 측면에서, 선택적 링커의 서열은 GGGG(서열 번호 25)이다. 일부 측면에서, 선택적 링커의 서열은 GGGSG(서열 번호 26)이다.

[0215] 일부 측면에서, 선택적 링커는 서열 (GGGSG)_n(서열 번호 27)을 포함한다. 일부 측면에서, 선택적 링커는 서열 (GGGS)_n(서열 번호 28)을 포함한다. 일부 측면에서, 선택적 링커는 서열 (GGG)_n(서열 번호 29)을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 선택적 링커는 서열 (GG)_n(서열 번호 30)을 포함할 수 있다. 이러한 경우에 n은 1 내지 100의 정수일 수 있다. 다른 경우에서, n은 1 내지 20의 정수, 즉 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20일 수 있다. 일부 측면에서 n은 1 내지 100의 정수이다.

[0216] 선택적 링커의 예는, 예를 들어 GSGSGS(서열 번호 31), GSGGG(서열 번호 32), SGGSGGS(서열 번호 33), GSGSGSGSGSGGG(서열 번호 34), GSGSGSGGGSGGGGS(서열 번호 35), GSGSGSGSGSGSGSGGS(서열 번호 63), 또는 GGGSGGGSGGGGS(서열 번호 36)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0217] 일부 측면에서, 선택적 링커는 서열 PGG를 포함한다. 일부 측면에서, 선택적 링커는 글리신 및 세린 외에 추가 아미노산을 포함한다. 일부 측면에서, 선택적 링커는 1, 2, 3, 4 또는 5개의 비-gly/비-ser 아미노산을 포함한다. 일부 측면에서, Gly/Ser-링커는 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 95% 글리신 또는 세린 아미노산을 포함한다.

[0218] 일부 특정 측면에서, 선택적 링커는 1 내지 10개 아미노산 길이이다. 일부 측면에서, 선택적 링커는 약 5 내지 약 10, 약 10 내지 약 20, 약 20 내지 약 30, 약 30 내지 약 40, 약 40 내지 약 50, 약 50 내지 약 60, 약 60 내지 약 70, 약 70 내지 약 80, 약 80 내지 약 90, 또는 약 90 내지 약 100개 아미노산 길이이다.

[0219] 일부 측면에서, 링커는 링커 및 본원에 제공된 폴리뉴클레오티드의 상이한 성분(예를 들어, c-Jun 및 키메라 결합 단백질)이 단일 폴리펩티드로 발현되도록 하는 절단 불가 링커이다. 특정 측면에서, 링커는 절단 가능 링커이다. 본원에 사용된 용어 "절단 가능 링커"는 발현될 때 선택적으로 절단되어 2개 이상의 생성물을 생성할 수 있도록 절단 부위를 포함하는 링커를 지칭한다. 일부 측면에서, 링커는 P2A 링커, T2A 링커, F2A 링커, E2A 링커, 푸린 절단 부위 또는 이의 임의의 조합으로부터 선택된다(아래 표 5 참고). 일부 측면에서, 링커는 GSG 링커 서열을 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 본 개시내용에 유용한 링커는 제1 및 제2 유전자에 의해 암호화되는 별도의 폴리펩티드가 번역 동안 생성되도록, 내부 리보솜 진입 부위(IRES)를 포함한다. 본 개시내용과 함께 사용될 수 있는 링커의 추가 설명은 예를 들어 각각 전체가 본원에 참조로 포함된, WO 2020/223625 A1 및 US 2019/0276801 A1에 제공된다.

표 5

링커 서열

P2A	ATNFSLLKQAGDVEENPGP(서열 번호 37)
T2A	EGRGSLTTCGDVEENPGP(서열 번호 38)
F2A	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP(서열 번호 39)
E2A	QCTNYALLKLAGDVESNPGP(서열 번호 40)
푸린 절단 부위	RAKR(서열 번호 41)

[0220]

[0221]

[0222]

[0223]

[0224]

[0225]

[0226]

[0227]

[0228]

일부 측면에서, 링커는 P2A 링커를 포함한다. 일부 측면에서, 링커는 서열 번호 37에 제시된 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98% 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 링커는 서열 번호 37에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

일부 측면에서, 링커는 T2A 링커를 포함한다. 일부 측면에서, 링커는 서열 번호 38에 제시된 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98% 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 링커는 서열 번호 38에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

일부 측면에서, 링커는 F2A 링커를 포함한다. 일부 측면에서, 링커는 서열 번호 39에 제시된 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98% 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 링커는 서열 번호 39에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

일부 측면에서, 링커는 E2A 링커를 포함한다. 일부 측면에서, 링커는 서열 번호 40에 제시된 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98% 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 링커는 서열 번호 40에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

일부 측면에서, 링커는 푸린 절단 부위를 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 링커는 서열 번호 41에 제시된 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98% 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 링커는 서열 번호 41에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

항원 결합 도메인

일부 측면에서, 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화된 키메라 결합 단백질(예를 들어, CAR)의 항원 결합 도메인은 Ig NAR, Fab, Fab', F(ab)'₂, F(ab)'₃, Fv, 단일 사슬 가변 단편(scFv), 비스-scFv, (scFv)₂, 미니바디, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 인트라바디, 디설피드 안정화 Fv 단백질(dsFv), 유니바디 또는 나노바디를 포함한다. 특정 측면에서, 항원 결합 도메인은 scFv이다. 일부 경우에, scFv는 당분야에 알려진 방법에 따라 제조될 수 있다(예를 들어, Bird 등, (1988) Science 242:423-426 및 Huston 등, (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 참고). 가요성 폴리펩티드 링커를 사용하여 VH 및 VL 영역을 함께 결합시켜 ScFv 분자가 생성될 수 있다. scFv 분자는 최적화된 길이 및/또는 아미노산 조성을 갖는 링커(예를 들어, Ser-Gly 링커)를 포함한다. 링커 길이는 scFv의 가변 영역이 폴딩되고 상호작용하는 방식에 크게 영향을 미칠 수 있다. 사실, 짧은 폴리펩티드 링커가 사용되는 경우(예를 들어, 5-10개 아미노산 사이) 사슬내 폴딩이 방지된다. 기능적 에피토프 결합 부위를 형성하기 위해 2개의 가변 영역을 함께 가져오기 위해 사슬간 폴딩이 또한 요구된다. 링커 배향 및 크기의 예는, 예를 들어 본원에 참조로 포함된, 문헌(Hollinger 등 1993 Proc Natl Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448, U.S. 특허 출원 공개 번호 2005/0100543, 2005/0175606, 2007/0014794, 및 PCT 공개 번호 W02006/020258 및 W02007/024715)을 참고한다.

scFv는 그 VL 및 VH 영역 사이에, 예를 들어 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50개 이상의 아미노산 잔기의 링커를 포함할 수 있다. 링커 서열은 임의의 자연 발생 아미노산을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 링커 서열은 아미노산 글리신 및 세린을 포함한다.

일부 측면에서, 링커 서열은 (Gly₄Ser)_n과 같은 글리신 및 세린 반복 세트를 포함하며, n은 1 이상의 양의 정수이다(서열 번호 42). 일부 측면에서, 링커는 (Gly₄Ser)₄(서열 번호 43) 또는 (Gly₄Ser)₃(서열 번호 36), 또는 상기 개시된 임의의 gly-ser 풍부 링커일 수 있다.

[0229] 링커 길이의 변화는 활성을 유지하거나 향상시켜 활성 연구에서 더 우수한 유효성을 발휘할 수 있다.

[0230] 일부 측면에서, 항원 결합 도메인 또는 다른 부분 또는 전체 CAR의 아미노산 서열은 변형될 수 있고, 예를 들어 본원에 기재된 아미노산 서열은 예를 들어 보존적 치환에 의해 변형될 수 있다. 염기성 측쇄(예를 들어, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전 극성 측쇄(예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지형 측쇄(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 포함하는 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 패밀리가 당분야에 정의되었다.

[0231] 예시적인 항-ROR1 CAR은 그 전체가 본원에 참조로 포함된, 문헌(Hudecek, 등 Clin. Cancer Res. 19.12(2013):3153-64)에 기재되어 있다. 일부 측면에서, 항-ROR1 CAR을 포함하는 본 개시내용의 CAR T 세포는 Hudecek 등의 문헌에 기재된 바와 같이(예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로 포함된, Hudecek 등, 3155페이지, 첫 번째 단락 전체에 기재된 바와 같이) 생성되며, Hudecek의 문헌에 개시된 스페이서는 본 개시내용의 CAR 스페이서에 의해 대체되었다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 항-ROR1 CAR은 이의 전체가 본원에 참조로 포함된, 문헌(Hudecek 등 3154-55페이지 연결 단락; Baskar 등 MAb 4(2012):349-61; 및 Yang 등 PLoS ONE 6(2011):e21018)에 기재된 2A2, R11 및 R12 항-ROR1 모노클로날 항체의 VH 및/또는 VL 서열을 포함하는 항체 또는 이의 단편을 포함한다.

[0232] 일부 측면에서, 본 개시내용의 항원 결합 도메인은 항-ROR1 항체, 예를 들어 R12 항체와 교차 경쟁할 수 있다. R12 항체 서열을 표 6에 나타낸다. 일부 측면에서, 본 개시내용에 유용한 항원-결합 도메인은 R12 항체의 동일한 에피토프에 결합한다. 당업자에게 명백할 바와 같이, 당분야에 알려진 임의의 항-ROR1 항체가 본 개시내용과 함께 사용될 수 있다. 이러한 항체의 비제한적 예는 각각 그 전체가 본원에 참조로 포함된, 문헌(Hudecek, 등 Clin. Cancer Res. 19.12(2013):3153-64; Baskar 등 MAb 4(2012):349-61; 및 Yang 등 PLoS ONE 6(2011):e21018; US 9,316,646 B2; 및 US 9,758,586 B2)에 기재된 2A2 및 R11 항체를 포함한다.

표 6

R12 항체 CDR

R12 VH (서열 번호 44)	QEQLVESGGRLVTPGGSLTSLCKASGFDFAAYMSWVRQAPGKGLEWIATIYPSSGKTYATWVNGRF TISSDNAQNTVDLQMNSLTAADRATYFCARDSYADDGALFNIWPGTLVTIIS
R12 VH CDR1 (서열 번호 45)	AYYMS
R12 VH CDR2 (서열 번호 46)	TIYPSSGKTYATWVNG
R12 VH CDR3 (서열 번호 47)	DSYADDGALFNI
R12 VL (서열 번호 48)	ELVLTQSPSVSAALGSPAKITCTLSSAHKTDITD ^W YQQLQGEAPRYLMQVQSDGSYTKRPGVDRFSG SSSGADRYLIIPSVQADDEADYCYGADYIGGYVFGGGTQLTVTGTG
R12 VL CDR1 (서열 번호 49)	TLSSAHKTDITD
R12 VL CDR2 (서열 번호 50)	GSYTKRP
R12 VL CDR3 (서열 번호 51)	GADYIGGYV

[0233]

[0234] 일부 측면에서, 본 개시내용의 항원-결합 도메인은 R12 항체의 VH CDR3을 포함한다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 항원-결합 도메인은 R12 항체의 VH CDR1, VH CDR2 및 VH CDR3을 포함한다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 항원-결합 도메인은 R12 항체의 VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 및 VL CDR3을 포함한다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 항원-결합 도메인, 예를 들어 R12 scFv는 R12 항체의 VH 및 VL을 포함한다. 일부 측면에서, R12 scFv는 IgG2 링커, 예를 들어 스페이서 1(서열 번호 15), 및 선택적으로 서열 번호 16의 링커에 의해

막횡단 도메인에 결합된다.

- [0235] 일부 측면에서, ROR1-결합 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 서열 번호 52와 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0236] 일부 측면에서, ROR1을 표적화하는 본 개시내용의 CAR은 각각 그 전체가 본원에 참조로 포함된, 2017년 9월 12일에 허여된 U.S. 특허 번호 US9316646B2, 또는 2016년 4월 19일에 허여된 US9758586B2에 기재된 것들을 포함하여, ROR1을 표적화하는 항체 또는 이의 단편(예를 들어, 단일 사슬 가변 단편(scFv))을 포함한다.
- [0237] 일부 측면에서, 본 개시내용의 CAR은 항원 결합 도메인, 막횡단 도메인 및 세포내 도메인을 포함하고, 항원 결합 도메인 및 막횡단 도메인은 KCPPCKCP(서열 번호 15) 및 선택적으로 서열 번호 16의 링커를 포함하는 CAR 스페이스에 의해 결합되며, 항원-결합 도메인은 R12 항체의 VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3, 예를 들어, R12 항체의 VH 및 VL을 포함한다.
- [0238] 일부 측면에서, 항-ROR1 항원-결합 항체 단편(예를 들어, scFv)은 생물학적 활성 분자에 접합되거나 융합되어, 예를 들어 면역 세포, 예를 들어 T 세포가 ROR1-발현 세포에 반응하도록 지시하는 본 개시내용의 CAR을 형성한다.
- [0239] 일부 측면에서, 본 개시내용의 키메라 항원 수용체(CAR)(즉, c-Jun을 과발현하는 항-ROR1 CAR)는 UC-961(썸투주맵)로 불리는 항-ROR1 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 부분을 포함한다. 예를 들어 임상 시험 식별자 번호 NCT02222688을 참고한다. 썸투주맵은 만성 림프구성 백혈병(CLL), 난소암 및 흑색종과 같은 암을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌(Hojjat-Farsangi 등 PLoS One. 8(4): e61167; 및 NCT02222688)을 참고한다.
- [0240] **신호전달, 막횡단, 공동자극 도메인**
- [0241] 일부 측면에서, 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화된 키메라 결합 단백질(예를 들어, CAR)의 세포내 도메인은 CD3 제타, FcR 감마, FcR 베타, CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD5, CD22, CD79a, CD79b 또는 CD66d로부터 유래된 것과 같은 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 측면에서, CAR은 2B4, HVEM, ICOS, LAG3, DAP10, DAP12, CD27, CD28, 4-1BB(CD137), OX40(CD134), CD30, CD40, ICOS(CD278), 글루코코르티코이드-유도 종양 괴사 인자 수용체(GITR), 림프구 기능 연관 항원-1(LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C 또는 B7-H3으로부터 유래된 것과 같은 공동-자극 도메인을 추가로 포함한다. 일부 측면에서, CAR은 4-1BB 공동자극 도메인을 포함한다. 일부 측면에서, 4-1BB 공동자극 도메인은 서열 번호 53에 제시된 서열을 포함한다.
- [0242] 일부 측면에서, 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되는 키메라 결합 단백질(예를 들어, CAR)은 T-세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 사슬, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD2, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD45, PD1, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD152 및 CD154로 구성된 군으로부터 선택된 것과 같은 막횡단 도메인(TM)을 포함한다. 막횡단 도메인은 천연 또는 재조합 원천으로부터 유래될 수 있다. 원천이 천연인 경우, 도메인은 모든 막 결합 또는 막횡단 단백질로부터 유래될 수 있다. 일부 측면에서, 막횡단 도메인은 본 개시내용의 CAR이 표적에 결합될 때마다 세포내 도메인(들)에 신호를 전달할 수 있다.
- [0243] 일부 측면에서, 막횡단 도메인은 적어도, 예를 들어, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1(CD11a, CD18), ICOS(CD278), 4-1BB(CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM(LIGHT), SLAMF7, NKp80(KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD160, CD19, IL2R 베타, IL2R 감마, IL7R α, ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1(CD226), SLAMF4(CD244, 2B4), CD84, CD96(Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9(CD229), CD160(BY55), PSGL1, CD100(SEMA4D), SLAMF6(NTB-A, Ly108), SLAM(SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME(SLAMF8), SELPLG(CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKG2D, NKG2C 또는 CD19의 막횡단 영역(들)을 포함할 수 있다.
- [0244] 일부 측면에서, TM 도메인은 CD8a, CD2, CD4, CD28, CD45, PD1, CD152, 또는 이의 임의의 조합으로부터 유래된다. 일부 측면에서, TM 도메인은 CD28로부터 유래된다. 일부 측면에서, TM 도메인은 서열 번호 54와 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 측면에서, TM 도메인은 서열 번호 54에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

- [0245] 일부 측면에서, 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화된 키메라 결합 단백질(예를 들어, CAR)은 공동 자극 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 공동자극 도메인을 암호화하는 서열을 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 공동자극 도메인은 인터루킨-2 수용체(IL-2R), 인터루킨-12 수용체(IL-12R), IL-7, IL-21, IL-23, IL-15, CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD27, CD28, CD30, CD40, 4-1BB/CD137, ICOS, 림프구 기능 연관 항원-1(LFA-1), LIGHT, NKG2C, OX40, DAP10, B7-H3, Lck 결합에 대해 결실된 CD28(ICA), BTLA, GITR, HVEM, LFA-1, LIGHT, NKG2C, PD-1, TILR2, TILR4, TILR7, TILR9, Fc 수용체 감마 사슬, Fc 수용체 ε 사슬, CD83에 특이적으로 결합하는 리간드 또는 이의 임의의 조합의 공동자극 도메인을 포함한다.
- [0246] 일부 측면에서, 본 개시내용의 키메라 결합 단백질(예를 들어, CAR)(예를 들어, 항-ROR1 CAR)은 세포내 신호전달 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 세포내 신호전달 도메인을 암호화하는 서열을 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 ζ 활성화 도메인, CD3 δ 활성화 도메인, CD3 ε 활성화 도메인, CD3 η 활성화 도메인, CD79A 활성화 도메인, DAP 12 활성화 도메인, FCER1G 활성화 도메인, DAP10/CD28 활성화 도메인, ZAP70 활성화 도메인, 또는 이의 임의의 조합을 포함한다. 일부 측면에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 ζ 활성화 도메인을 포함한다. 일부 측면에서, CD3 ζ 활성화 도메인은 서열 번호 55와 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 측면에서, 세포내 신호전달 도메인은 서열 번호 55에 제시된 서열을 포함한다.
- [0247] 일부 측면에서, 본 개시내용의 키메라 결합 단백질(예를 들어, CAR)(예를 들어, ROR1을 표적화하는 CAR)의 막횡단 도메인은 링커에 의해 키메라 결합 단백질(예를 들어, CAR)의 세포내 도메인에 결합된 막횡단 도메인을 포함한다.
- [0248] 일부 측면에서, 세포내 신호전달 도메인은 4-1BB 공동-자극 도메인을 포함한다. 일부 측면에서, 4-1BB 공동-자극 도메인은 서열 번호 53과 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 측면에서, 4-1BB 공동-자극 도메인은 서열 번호 53에 제시된 서열을 포함한다.
- [0249] 상기 개시내용으로부터 명백한 바와 같이, 일부 측면에서, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드는 (5'에서 3'으로) (i) c-Jun 폴리펩티드를 암호화하는 제1 뉴클레오티드 서열, (ii) 제1 링커(예를 들어, P2A 링커)를 암호화하는 제2 뉴클레오티드 서열, (iii) 제1 신호 펩티드(예를 들어, hI κ)를 암호화하는 제3 뉴클레오티드 서열, (iv) 항원-결합 도메인(예를 들어, 항-ROR1 scFv)을 암호화하는 제4 뉴클레오티드 서열, (v) 제2 링커(예를 들어, GGGSG; 서열 번호 16)를 암호화하는 제5 뉴클레오티드 서열, (vi) 스페이서(예를 들어, IgG2 힌지 유래 스페이서)를 암호화하는 제6 뉴클레오티드 서열, (vii) 막횡단 도메인(예를 들어, CD28)을 암호화하는 제7 뉴클레오티드 서열, (viii) 공동-자극 도메인(예를 들어, 4-1BB)을 암호화하는 제8 뉴클레오티드 서열, (ix) 세포내 신호전달 도메인(예를 들어, CD3 ζ)을 암호화하는 제9 뉴클레오티드 서열, (x) 제3 링커(예를 들어, P2A 링커)를 암호화하는 제10 뉴클레오티드 서열, (xi) 제2 신호 펩티드(예를 들어, GMCSFR αSP)를 암호화하는 제11 뉴클레오티드 서열, 및 (xii) EGFRt를 암호화하는 제12 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0250] **이중특이적 CAR**
- [0251] 일부 측면에서, 본 개시내용의 CAR은 이중특이적 CAR이다. 따라서, 일부 측면에서, 본 개시내용의 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 적어도 이중특이적 CAR(예를 들어, 제1 항원 및 제2 항원을 표적화하는 CAR)의 폴리펩티드를 암호화한다.
- [0252] 일부 측면에서, 본 개시내용의 CAR의 항원 결합 도메인은 이중특이적 항체 분자이다. 이중특이적 항체는 2개 이하의 항원에 대해 특이성을 갖는다. 이중특이적 항체 분자는 제1 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 제1 면역글로불린 가변 도메인 서열 및 제2 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 제2 면역글로불린 가변 도메인 서열을 특징으로 한다. 일부 측면에서, 제1 및 제2 에피토프는 동일한 항원, 예를 들어 동일한 단백질(또는 다량체 단백질의 서브유닛) 상에 있다. 일부 측면에서, 제1 및 제2 에피토프는 중첩된다. 일부 측면에서, 제1 및 제2 에피토프는 중첩되지 않는다. 일부 측면에서, 제1 및 제2 에피토프는 상이한 항원, 예를 들어 상이한 단백질(또는 다량체 단백질의 상이한 서브유닛) 상에 있다.
- [0253] 일부 측면에서, 이중특이적 항체 분자는 제1 에피토프에 대해 결합 특이성을 갖는 중쇄 가변 도메인 서열 및 경쇄 가변 도메인 서열 그리고 제2 에피토프에 대해 결합 특이성을 갖는 중쇄 가변 도메인 서열 및 경쇄 가변 도메인 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 이중특이적 항체 분자는 제1 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 절반

항체 및 제2 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 절반 항체를 포함한다. 일부 측면에서, 이중특이적 항체 분자는 제1 에피토프에 대해 결합 특이성을 갖는 절반 항체 또는 이의 단편, 및 제2 에피토프에 대해 결합 특이성을 갖는 절반 항체 또는 이의 단편을 포함한다. 일부 측면에서, 이중특이적 항체 분자는 제1 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 scFv 또는 이의 단편, 및 제2 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 scFv 또는 이의 단편을 포함한다.

[0254] 특정 측면에서, 항체 분자는 다중특이적(예를 들어, 이중특이적 또는 삼중특이적) 항체 분자이다. 이중특이적 또는 이중이량체 항체 분자를 생성하기 위한 프로토콜은 당분야에 알려져 있다.

[0255] 이중특이적 항체 분자의 각각의 항체 또는 항원-결합 항체 단편(예를 들어, scFv) 내에서, VH는 VL의 상류 또는 하류일 수 있다. 일부 측면에서, 전체 이중특이적 항체 분자가 배열 VH₁-VL₁-VL₂-VH₂를 갖도록, 상류 항체 또는 항체 단편(예를 들어, scFv)은 그 VL(VL₁)의 상류에 그 VH(VH₁)와 함께 배열되고 하류 항체 또는 항체 단편(예를 들어, scFv)은 그 VH(VH₂)의 상류에 그 VL(VL₂)과 함께 배열된다. 일부 측면에서, 전체 이중특이적 항체 분자가 배열 VL₁-VH₁-VH₂-VL₂를 갖도록, 상류 항체 또는 항체 단편(예를 들어, scFv)은 그 VH(VH₁)의 상류에 그 VL(VL₁)과 함께 배열되고 하류 항체 또는 항체 단편(예를 들어, scFv)은 그 VL(VL₂)의 상류에 그 VH(VH₂)와 함께 배열된다. 선택적으로, 링커는 2개의 항체 또는 항체 단편(예를 들어, scFv) 사이, 예를 들어, 작체물이 VH₁-VL₁-VL₂-VH₂로 배열되는 경우 VL₁과 VL₂ 사이, 또는 작체물이 VL₁-VH₁-VH₂-VL₂로 배열되는 경우 VH₁과 VH₂ 사이에 배치된다. 링커는 본원에 기재된 바와 같은 링커, 예를 들어 (Gly₄Ser)_n 링커일 수 있고, n은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6, 예를 들어 4(서열 번호 43)이다. 일반적으로, 2개의 scFv 사이의 링커는 2개의 scFv의 도메인 간 짝짓기 오류를 피하기에 충분히 길어야 한다. 선택적으로 링커는 제1 scFv의 VL과 VH 사이에 배치된다. 선택적으로, 링커는 제2 scFv의 VL과 VH 사이에 배치된다. 다중 링커를 갖는 작체물에서, 임의의 2개 이상의 링커는 동일하거나 상이할 수 있다. 따라서, 일부 측면에서, 이중특이적 CAR은 본원에 기재된 바와 같은 배열로 VL, VH, 및 선택적으로 하나 이상의 링커를 포함한다.

[0256] 일부 측면에서, 항체 분자는 제1 종양 항원(예를 들어, ROR1)에 위치한 제1 에피토프 및 제2 항원, 예를 들어 CD10, CD19, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3, ROR1, CD79b, CD179b 또는 CD79a에 위치한 제2 에피토프를 갖는 이중특이적 항체 분자이다. 일부 측면에서, 이중특이적 항체는 CD19 상에 위치한, 제1 에피토프 및 CD20 상에 위치한, 제2 에피토프에 결합한다. 일부 측면에서, 이중특이적 항체는 CD19 상에 위치한, 제1 에피토프 및 CD22 상에 위치한, 제2 에피토프에 결합한다. 일부 측면에서, 이중특이적 항체는 CD20 상에 위치한, 제1 에피토프 및 CD22 상에 위치한, 제2 에피토프에 결합한다. 특정 측면에서, 항체 분자는 제1 B-세포 에피토프에 대한 제1 결합 특이성 및 또 다른 B-세포 항원에 대한 제2 결합 특이성을 갖는 이중특이적 항체 분자이다. 예를 들어, 일부 측면에서 이중특이적 항체 분자는 제1 B-세포 에피토프, 예를 들어 ROR1에 대한 제1 결합 특이성 및 CD10, CD19, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3, ROR1, CD79b, CD179b 또는 CD79a B 세포 에피토프 중 하나 이상에 대한 제2 결합 특이성을 갖는다.

[0257] 일부 측면에서, 제2 항원은 ROR1, HER2, AFP, CD19, TRAC, TCRβ, BCMA, CLL-1, CS1, CD38, CD19, TSHR, CD123, CD22, CD30, CD70, CD171, CD33, EGFRvIII, GD2, GD3, Tn Ag, PSMA, ROR2, GPC1, GPC2, FLT3, FAP, TAG72, CD44v6, CEA, EPCAM, B7H3, KIT, IL-13Ra2, 메조텔린, IL-11Ra, PSCA, PRSS21, VEGFR2, LewisY, CD24, PDGFR-베타, SSEA-4, CD20, 엽산 수용체 알파, ERBB2(Her2/neu), MUC1, MUC16, EGFR, NCAM, 프로스타제, PAP, ELF2M, 에프린 B2, IGF-I 수용체, CAIX, LMP2, gp100, bcr-abl, 티로시나제, EphA2, 푸코실 GM1, sLe, GM3, TGS5, HMWMAA, o-아세틸-GD2, 엽산 수용체 베타, TEM1/CD248, TEM7R, CLDN6, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, 폴리시알산, PLAC1, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR51E2, TARP, WT1, NY-ESO-1, LAGE-1a, MAGE-A1, 레구마인, HPV E6, E7, MAGE A1, ETV6-AML, 정자 단백질 17, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT-2, Fos 관련 항원 1, p53, p53 돌연변이체, 프로스테인, 서바틴 및 텔로머라제, PCTA-1/갈렉틴 8, MelanA/MART1, Ras 돌연변이체, hTERT, 육종 전위 파단점, ML-IAP, ERG(TMPS2 ETS 융합 유전자), NA17, PAX3, 안드로겐 수용체, 사이클린 B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TE51, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, 인간 텔로머라제 역전사효소, RU1, RU2, 장 카복실 에스테라제, mut hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5, IGLL1, CD2, CD3ε, CD4, CD5, CD7, APRIL 단백질의 세포외 부분, 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0258] 유도성 발현 작체물

- [0259] 일부 측면에서, 본원에 기재된 바와 같은 CAR(예를 들어, 항-ROR1 CAR), c-Jun 및/또는 EGFRt를 암호화하는 본원의 폴리시스트론 폴리뉴클레오티드의 발현은 구성적 프로모터, 예를 들어, 즉시 초기 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, 신장 성장 인자-1 α (EF-1 α), 유인원 바이러스 40(SV40) 초기 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV), 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 긴 말단 반복(LTR) 프로모터, MoMuLV 프로모터, 조류 백혈병 바이러스 프로모터, 엡스타인-바 바이러스 즉시 초기 프로모터, 라우스 육종 바이러스 프로모터뿐만 아니라 액틴 프로모터, 유비퀴틴 프로모터, 미오신 프로모터, 헤모글로빈 프로모터 및 크레아틴 키나제 프로모터와 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 인간 유전자 프로모터에 의해 조절된다. 그러나, 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 항-ROR1 CAR, c-Jun 및/또는 EGFRt)에 의해 암호화되는 폴리펩티드 발현의 조절은 구성적 프로모터의 사용으로 제한되지 않는다.
- [0260] 따라서, 일부 측면에서, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 항-ROR1 CAR, c-Jun, EGFRt 단백질, 신호 펩티드 및/또는 스페이서)에 의해 암호화되는 단백질의 발현은 유도성이다. 용어 "유도성"은 "유도성 프로모터", 즉 유전자 생성물, 예를 들어 본 개시내용의 CAR, c-Jun, EGFRt를 암호화하거나 지정하는 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하게 결합될 때, 프로모터에 해당하는 유도제가 세포에 존재할 때만 유전자 생성물이 실질적으로 세포에서 생성되도록 유발하는 뉴클레오티드 서열의 존재를 지칭한다. 유도성 프로모터의 사용은 이러한 발현이 요망될 때 작동 가능하게 결합된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 켜거나 발현이 요망되지 않을 때 발현을 끌 수 있는 분자 스위치를 제공한다. 유도성 프로모터의 예는 메탈로티오닌 프로모터, 글루코코르티코이드 프로모터, 프로게스테론 프로모터 및 테트라사이클린 프로모터를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0261] 일부 측면에서, 본 개시내용의 CAR, c-Jun 및/또는 EGFRt를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 "조직-특이적" 프로모터, 즉 유전자 생성물, 예를 들어 본 개시내용의 CAR를 암호화하거나 지정하는 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하게 결합될 때 세포가 프로모터에 상응하는 조직 유형의 세포인 경우에만 유전자 생성물(들)이 실질적으로 세포에서 생성되도록 유발하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0262] **벡터**
- [0263] 본 개시내용은 또한 조절 요소에 작동 가능하게 결합된 본 개시내용의 항-ROR1 CAR, c-Jun, 및 EGFRt 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드(즉, c-Jun-항-ROR1 CAR 작제물)를 포함하는 벡터를 제공한다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 CAR, c-Jun, EGFRt를 암호화하는 폴리시스트론 폴리뉴클레오티드는 DNA 분자 또는 RNA 분자이다.
- [0264] 일부 측면에서, 벡터는 전달 벡터이다. 용어 "전달 벡터"는 단리된 핵산(예를 들어, 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드)을 포함하고 단리된 핵산을 세포 내부로 전달하기 위해 사용될 수 있는 물질의 조성을 지칭한다. 선형 폴리뉴클레오티드, 이온성 또는 양친매성 화합물과 연관된 폴리뉴클레오티드, 플라스미드 및 바이러스를 포함하지만 이에 제한되지 않는 수많은 벡터가 당분야에 알려져 있다. 따라서, 용어 "전달 벡터"는 자율 복제 플라스미드 또는 바이러스를 포함한다. 이 용어는 또한 예를 들어, 폴리라이신 화합물, 리포솜 등과 같이 핵산을 세포로 전달하는 것을 용이하게 하는 비플라스미드 및 비바이러스 화합물을 추가로 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 바이러스 전달 벡터의 예는 아데노바이러스 벡터, 아데노 연관 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티 바이러스 벡터 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0265] 일부 측면에서, 벡터는 발현 벡터이다. 용어 "발현 벡터"는 발현될 뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 결합된 발현 제어 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드)를 포함하는 벡터를 지칭한다. 일부 측면에서, 발현 벡터는 폴리시스트론 발현 벡터이다. 발현 벡터는 발현을 위해 충분한 시스 작용 요소를 포함하고; 발현을 위한 다른 요소는 숙주 세포에 의해 또는 시험관내 발현 시스템에서 공급될 수 있다. 발현 벡터는 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함하는 코스미드, 플라스미드(예를 들어, 네이키드이거나 리포솜에 함유됨) 및 바이러스(예를 들어, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노 연관 바이러스)를 포함하는 당분야에 알려진 모든 것들을 포함한다.
- [0266] 일부 측면에서, 벡터는 바이러스 벡터, 포유동물 벡터 또는 박테리아 벡터이다. 일부 측면에서, 벡터는 아데노 바이러스 벡터, 렌티바이러스, 센다이 바이러스 벡터, 바콜로바이러스 벡터, 엡스타인 바 바이러스 벡터, 파포 바바이러스 벡터, 백시니아 바이러스 벡터, 단순 헤르페스 바이러스 벡터, 하이브리드 벡터 및 아데노 연관 바이러스(AAV) 벡터로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0267] 일부 측면에서, 아데노바이러스 벡터는 3세대 아데노바이러스 벡터이다. ADEASY™는 아데노바이러스 벡터 작제물을 생성하기 위해 가장 널리 알려진 방법이다. 이 시스템은 서틀(또는 전달) 벡터 및 아데노바이러스 벡터의 두 가지 유형의 플라스미드로 구성된다. 관심 트랜스유전자는 서틀 벡터에 클로닝되고, 확인되고, 제한 효소

PmeI로 선형화된다. 그런 다음 이 작제물은 PADEASY™를 함유하는 BJ5183 대장균 세포인 ADEASIER-1 세포로 형질전환된다. PADEASY™는 바이러스 생성에 필요한 아데노바이러스 유전자를 함유하는 약 33 Kb 아데노바이러스 플라스미드이다. 셔틀 벡터 및 아데노바이러스 플라스미드는 아데노바이러스 플라스미드로의 트랜스유전자의 상동 재조합을 용이하게 하는 매칭되는 왼쪽 및 오른쪽 상동성 아암을 갖는다. 또한 표준 BJ5183을 슈퍼코일링된 PADEASY™ 및 셔틀 벡터로 공동 형질전환할 수 있지만 이 방법은 비재조합 아데노바이러스 플라스미드의 배경이 더 높다. 그 다음 재조합 아데노바이러스 플라스미드는 크기 및 적절한 제한 소화 패턴에 대해 확인되어 트랜스 유전자가 아데노바이러스 플라스미드에 삽입되었고 다른 패턴의 재조합이 발생하지 않았음을 결정한다. 일단 확인되면 재조합 플라스미드는 PacI로 선형화되어 ITR이 측면에 있는 선형 dsDNA 구조를 생성한다. 293 또는 911 세포가 선형화된 작제물로 형질감염되고 바이러스가 약 7-10일 후 수확될 수 있다. 이 방법에 더하여, 본 출원이 출원된 당시 당분야에 알려진 아데노바이러스 벡터 작제물을 생성하는 다른 방법이 본원에 개시된 방법을 실시하기 위해 사용될 수 있다.

[0268] 일부 측면에서, 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터, 예를 들어 렌티바이러스 벡터(예를 들어, 3세대 또는 4세대 렌티바이러스 벡터)이다. 용어 "렌티바이러스"는 레트로바이러스과의 한 속을 지칭한다. 렌티바이러스는 비분열 세포를 감염시킬 수 있다는 점에서 레트로바이러스 중에서 독특하다; 이들은 상당한 양의 유전 정보를 숙주 세포의 DNA로 전달할 수 있어서, 유전자 전달 벡터의 가장 효율적인 방법 중 하나이다. HIV, SIV 및 FIV는 모두 렌티바이러스의 예이다. 용어 "렌티바이러스 벡터"는 특히 문헌(Milone 등, Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009))에 제공된 바와 같은 자가-비활성화 렌티바이러스 벡터를 포함하는, 렌티바이러스 계통의 적어도 일부로부터 유래된 벡터를 지칭한다. 임상에서 사용될 수 있는 렌티바이러스 벡터의 다른 예는 예를 들어 Oxford BioMedica의 LENTIVECTOR® 유전자 전달 기술, Lentigen의 LENTIMAX™ 벡터 시스템 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 비임상 유형의 렌티바이러스 벡터도 이용 가능하며 당업자에게 알려져 있을 것이다.

[0269] 렌티바이러스 벡터는 일반적으로 세포주가 3개의 별도 플라스미드 발현 시스템으로 형질감염되는 일시적 형질감염 시스템에서 생성된다. 이들은 전달 벡터 플라스미드(HIV 프로바이러스의 일부), 패키징 플라스미드 또는 작제물, 그리고 상이한 바이러스의 이중 외피 유전자(*env*)가 포함된 플라스미드를 포함한다. 벡터의 3가지 플라스미드 성분은 패키징 세포에 넣어진 다음 HIV 셀에 삽입된다. 벡터의 바이러스 부분은 바이러스가 세포 시스템 내부에서 복제할 수 없도록 삽입 서열을 함유한다. 현재 3세대 렌티바이러스 벡터는 9개의 HIV-1 단백질(Gag, Pol, Rev) 중 3개만 암호화하며, 이는 복제 적격 바이러스의 재조합 매개 생성을 피하기 위해 별도의 플라스미드로부터 발현된다. 4세대 렌티바이러스 벡터에서는 레트로바이러스 계통이 추가 감소되었다(예를 들어, TAKARA® LENTI-X™ 4세대 패키징 시스템 참조).

[0270] 일부 측면에서, 본 개시내용은 (i) 서열 번호 52를 포함하는 R12 scFv; (ii) c-Jun 폴리펩티드; (iii) 절단된 EGF 수용체(EGFRt)를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 렌티바이러스 벡터를 포함한다.

[0271] 일부 측면에서, 본 개시내용은 (i) 서열 번호 52를 포함하는 R12 scFv; (ii) c-Jun 폴리펩티드; (iii) 절단된 EGF 수용체(EGFRt); (iv) 막횡단 도메인; (v) 세포내 신호전달 도메인; (vi) 세포내 공동-자극 신호전달 영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터(예를 들어, 렌티바이러스 벡터)를 포함한다. 일부 측면에서, 벡터(예를 들어, 렌티바이러스 벡터)는 ROR1 및 TM 도메인에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 부분 사이에 스페이서를 포함한다. 일부 측면에서, 벡터(예를 들어, 렌티바이러스 벡터)는 링커를 추가로 포함하는 스페이서를 포함한다. 일부 측면에서, 벡터(예를 들어, 렌티바이러스 벡터)는 c-Jun 폴리펩티드와 CAR 펩티드 사이에 링커를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 벡터(예를 들어, 렌티바이러스 벡터)는 CAR 펩티드와 EGFRt 펩티드 사이에 링커를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다. 따라서, 특정 측면에서, 본원에 기재된 벡터는 (5'에서 3'으로) (i) c-Jun 폴리펩티드를 암호화하는 제1 뉴클레오티드 서열, (ii) 제1 링커(예를 들어, P2A 링커)를 암호화하는 제2 뉴클레오티드 서열, (iii) 신호 펩티드(예를 들어, hIgκ)를 암호화하는 제3 뉴클레오티드 서열, (iv) 항원 결합 도메인(예를 들어, 항-ROR1 scFv)을 암호화하는 제4 뉴클레오티드 서열, (v) 제2 링커(예를 들어, GGGSG; 서열 번호 16)를 암호화하는 제5 뉴클레오티드 서열, (vi) 스페이서(예를 들어, IgG2 힌지 유래 스페이서)를 암호화하는 제6 뉴클레오티드 서열, (vii) 막횡단 도메인(예를 들어, CD28)을 암호화하는 제7 뉴클레오티드 서열, (viii) 공동자극 도메인(예를 들어, 4-1BB)을 암호화하는 제8 뉴클레오티드 서열, (ix) 세포내 신호전달 도메인(예를 들어, CD3ζ)을 암호화하는 제9 뉴클레오티드 서열, (x) 제3 링커(예를 들어, P2A 링커)를 암호화하는 제10 뉴클레오티드 서열, (xi) 신호 펩티드(예를 들어, GMCSFR α SP)를 암호화하는 제11 뉴클레오티드 서열, 및 (xii) EGFRt를 암호화하는 제12 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0272] 일부 측면에서, 비-바이러스 방법이 CAR 및 본 개시내용의 다른 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를

포함하는 핵산을 대상체의 세포 또는 조직으로 전달하기 위해 사용될 수 있다. 일부 측면에서, 비바이러스 방법은 트랜스포존의 사용을 포함한다. 일부 측면에서, 비-바이러스 전달 방법의 사용은 세포, 예를 들어 T 또는 NK 세포의 재프로그래밍 및 세포의 대상체로의 직접적 주입을 허용한다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산 서열은 CRISPR/Cas 시스템 및 징크-핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화제 유사 효과기 뉴클레아제(TALEN) 및 메가뉴클레아제(MN)와 같은 게놈 편집 대안을 사용하여 표적 세포(예를 들어, T 세포) 또는 숙주 세포(예를 들어, CAR 폴리펩티드의 재조합 발현을 위한 세포)의 게놈으로 삽입될 수 있다.

[0273] 일부 측면에서, 본 개시내용의 작제물(예를 들어, c-Jun-항-ROR1 CAR 작제물)은 바이시스트론 또는 멀티시스트론 발현 벡터를 사용하여 세포에서 발현될 수 있다. 일부 측면에서, 바이시스트론 또는 멀티시스트론 벡터는 (1) 다중 개방 관독 프레임에 융합된 다중 프로모터; (2) 개방 관독 프레임 사이의 스플라이싱 신호 삽입; 단일 프로모터에 의해 구동되는 단백질 발현의 융합; (3) 작제물에 의해 발현되는 단백질 사이의 단백질해 절단 부위(자가-절단 펩티드, 예를 들어, P2A)의 삽입; 및 (iv) 내부 리보솜 진입 부위(IRES)의 삽입을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0274] 일부 측면에서, 본원의 작제물의 다중 단백질 단위는 단일 개방 관독 프레임(ORF)에서 발현되어 다중 단백질 단위를 갖는 단일 폴리펩티드를 생성하며, 적어도 하나는 CAR이고 하나는 본 개시내용의 c-Jun 폴리펩티드이다. 일부 측면에서, 고효율 절단 부위를 함유하는 아미노산 서열 또는 링커는 본원에 기재된 발현 작제물에 의해 발현되는 각각의 단백질 사이에 배치된다. 본원에 사용된 바와 같이, 높은 절단 효율은 번역된 단백질의 50% 초과, 70% 초과, 80% 초과 또는 90% 초과가 절단되는 것으로 정의된다. 절단 효율은 웨스턴 블롯 분석에 의해 측정될 수 있다.

[0275] 고효율 절단 부위의 비제한적 예는 돼지 테스코바이러스-1 2A(P2A), FMDV 2A(본원에서 F2A로 약칭함); 말 비염 A 바이러스(ERAV) 2A(E2A); 및 테세아아시그나 바이러스 2A(T2A), 세포질 다각체증 바이러스 2A(BmCPV2A) 및 플라세리 바이러스 2A(BmIFV2A) 또는 이의 조합을 포함한다. 일부 측면에서, 고효율 절단 부위는 P2A이다. 고효율 절단 부위는 그 내용이 본원에 참조로 포함된, 문헌(Kim 등 (2011) High Cleavage Efficiency of a 2A Peptide Derived from Porcine Teschovirus-1 in Human Cell Lines, Zebrafish and Mice. PLoS ONE 6(4): e18556)에 기재되어 있다.

[0276] 일부 측면에서, P2A는 돼지 테스코바이러스-1로부터 유래된 자가-절단 펩티드 서열(접근 #QKV27547.1, 아미노산 #1-22(서열 번호 56))을 포함하거나 이로 구성된다. 일부 측면에서, P2A 서열은 재조합을 방지하기 위해 코돈 최적화되고 코돈 분기된다. 일부 측면에서, P2A 서열은 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드의 c-Jun 및 항-ROR1 CAR 부분 뒤에(예를 들어, C-말단으로) 배치된다. 일부 측면에서, P2A는 폴리펩티드 수준에서 절단된다.

[0277] 일부 측면에서, 다중 단백질이 단일 개방 관독 프레임(ORF)에서 발현되며, 발현은 강력한 프로모터의 제어 하에 있다. 일부 측면에서, 프로모터는 골수증식성 육종 바이러스 인핸서, 음성 대조군 영역 결실, d1587rev 프라이머-결합 부위 치환(MND) 프로모터, EF1a 프로모터, 유비퀴틴 프로모터를 포함한다.

[0278] 일부 측면에서, 본 개시내용의 벡터는 보조 유전자를 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 보조 유전자는 비면역성 선택 도구, 추적 마커 또는 자살 유전자이다. 일부 측면에서, 보조 유전자는 절단된 EGFR 유전자(EGFRt)이다. 본원에 기재된 측면에 따라 사용될 수 있는 절단된 EGFR(EGFRt) 유전자의 예는 서열 번호 3을 포함한다.

[0279] **폴리뉴클레오티드 변형**

[0280] 일부 측면에서, 본 개시내용의 단백질(예를 들어, c-Jun, 항-ROR1 CAR 및/또는 EGFRt)을 암호화하는 폴리뉴클레오티드(예를 들어, c-Jun-항-ROR1 CAR 작제물)는 적어도 하나의 화학적으로 변형된 핵염기, 당, 골격, 또는 이의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 따라서, 본 개시내용의 단백질을 암호화하는 폴리 뉴클레오티드는 하나 이상의 변형을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 CAR, c-Jun 및/또는 EGFRt를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 적어도 하나의 뉴클레오티드 유사체를 포함한다. 일부 측면에서, IVT(시험관내 전사) 또는 화학적 합성을 사용하여 도입된 적어도 하나의 뉴클레오티드 유사체는 2'-O-메톡시에틸-RNA(2'-MOE-RNA) 단량체, 2'-플루오로-DNA 단량체, 2'-O-알킬-RNA 단량체, 2'-아미노-DNA 단량체, 잠긴 핵산(LNA) 단량체, cEt 단량체, cMOE 단량체, 5'-Me-LNA 단량체, 2'-(3-하이드록시)프로필-RNA 단량체, 아라비노 핵산(ANA) 단량체, 2'-플루오로-ANA 단량체, 안하이드로핵시톨 핵산(HNA) 단량체, 중격 핵산(INA) 단량체, 및 상기 뉴클레오티드 유사체 중 2개 이상의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 측면에서, 최적화된 핵산 분자는 적어도 하나의 골격 변형, 예를 들어 포스포포티오에이트 뉴클레오티드간 결합을 포함한다.

[0281] 일부 측면에서, 본 개시내용의 단백질(예를 들어, 항-ROR1, c-Jun, 및/또는 EGFRt)을 암호화하는 폴리뉴클레오

티드는 말단 위치에서, 예를 들어 5' 및/또는 3' 말단에 대한 위치 1, 2, 3에서 M(2'-O-메틸), MS(2'-O-메틸 3' 포스포로티오에이트), 또는 MSP(2'-O-메틸 3'티오PACE, 포스포노아세테이트) 변형, 또는 이의 조합을 도입함으로써 화학적으로 변형될 수 있다.

- [0282] 본 개시내용의 c-Jun, CAR 및/또는 EGFRt 단백질을 암호화하는 변형된 폴리뉴클레오티드(즉, c-Jun-항-ROR1 CAR 작제물)가 분자의 전장을 따라 균일하게 변형될 필요는 없다. 상이한 뉴클레오티드 변형 및/또는 골격 구조가 핵산의 다양한 위치에 존재할 수 있다. 당업자는 뉴클레오티드 유사체 또는 다른 변형(들)이 핵산의 기능이 실질적으로 감소하지 않도록 핵산의 임의의 위치(들)에 위치할 수 있음을 이해할 것이다. 변형은 또한 5' 또는 3' 말단 변형일 수 있다. 핵산은 최소 1개 및 최대 100% 변형된 뉴클레오티드, 또는 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 99% 변형된 뉴클레오티드와 같은 임의의 개재 백분율을 함유할 수 있다.
- [0283] 일부 측면에서, 본 개시내용의 CAR, c-Jun 및/또는 EGFRt를 암호화하는 폴리뉴클레오티드(예를 들어, c-Jun-항-ROR1 CAR 작제물)는 엔도- 및 엑소-뉴클레아제에 의한 신속한 분해를 방지하기 위한 변형을 포함할 수 있다. 변형은 예를 들어 (a) 말단 변형, 예를 들어 5' 말단 변형(인산화 탈인산화, 접합, 반전된 결합 등), 3' 말단 변형(접합, DNA 뉴클레오티드, 반전된 결합, 등), (b) 염기 변형, 예를 들어, 변형된 염기, 안정화 염기, 탈안정화 염기, 또는 증대된 파트너 레퍼토리와 염기쌍을 형성하는 염기 또는 접합된 염기로의 대체, (c) 당 변형(예를 들어, 2' 위치 또는 4' 위치에서) 또는 당의 대체뿐만 아니라 (d) 포스포디에스테르 결합의 변형 또는 대체를 포함하는 뉴클레오시드간 결합 변형을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0284] 본원에 기재된 방법에 유용한 본 개시내용의 합성, 변형된 폴리뉴클레오티드(즉, c-Jun-항-ROR1 CAR 작제물)의 특정 예는 변형된 또는 비-천연 뉴클레오시드간 결합을 함유하는 폴리뉴클레오티드를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 변형된 뉴클레오시드간 결합을 갖는 변형된 합성 폴리뉴클레오티드는 특히 뉴클레오시드간 결합에 인 원자를 갖지 않는 것들을 포함한다. 일부 측면에서, 변형된 합성 폴리뉴클레오티드는 그 뉴클레오시드간 결합(들)에 인 원자를 갖는다.
- [0285] 변형된 뉴클레오시드간 결합의 비제한적 예는 포스포로티오에이트, 키랄 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포트리에스테르, 아미노알킬포스포트리에스테르, 3'-알킬렌 포스포네이트 및 키랄 포스포네이트를 포함하는 메틸 및 다른 알킬 포스포네이트, 포스포네이트, 3'-아미노포스포르아미데이트 및 아미노알킬포스포르아미데이트를 포함하는 포스포르아미데이트, 티오노포스포르아미데이트, 티오노알킬포스포네이트, 티오노알킬포스포트리에스테르 및 정상 3'-5' 결합을 갖는 보라노스페이트, 이의 T-5' 결합 유사체, 및 반전된 극성을 갖는 것들을 포함하며, 뉴클레오시드 단위의 인접한 쌍은 3'-5'에서 5'-3'로 또는 T-5'에서 5'-T로 연결된다. 다양한 염, 혼합 염 및 유리 산 형태도 포함된다.
- [0286] 내부에 인 원자를 포함하지 않는 변형된 뉴클레오시드간 결합은 짧은 사슬 알킬 또는 시클로알킬 뉴클레오시드간 결합, 혼합 헤테로원자 및 알킬 또는 시클로알킬 뉴클레오시드간 결합, 또는 하나 이상의 짧은 사슬 헤테로원자 또는 헤테로사이클릭 뉴클레오시드간 결합에 의해 형성된 뉴클레오시드간 결합을 갖는다. 이들은 모르폴리노 연결(뉴클레오시드의 당 부분에서 부분적으로 형성됨); 실록산 골격; 설피드, 설픽시드 및 설피온 골격; 포름아세틸 및 티오포름아세틸 골격; 메틸렌 포름아세틸 및 티오포름아세틸 골격; 알켄 함유 골격; 설피페이트 골격; 메틸렌이미노 및 메틸렌하이드라지노 골격; 설피네이트 및 설피논아미드 골격; 아미드 골격을 갖는 것들; 및 혼합된 N, O, S 및 CH₂ 성분 부분을 갖는 다른 것들을 포함한다.
- [0287] 일부 측면에서, 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드(예를 들어, c-Jun-항-ROR1 CAR 작제물)는 하나 이상의 동의 코돈 변화를 도입함으로써 코돈 최적화될 수 있다. 본원에 사용된 용어 "코돈 최적화", "최적화된 코돈" 및 이의 문법적 변형은 그 번역 효율을 증가시키기 위해 동의 코돈을 대체하는 것에 의한 핵산의 1차 서열의 변형을 지칭한다. 따라서, 코돈 최적화는 암호화하는 아미노산 서열을 변화시키지 않고 폴리뉴클레오티드에서 사용되는 코돈을 전환하는 것을 포함하며, 이는 전형적으로 "회귀한" 코돈을 제거하고 이들을 풍부한 코돈으로 대체하거나 낮은 tRNA 재충전율을 가진 코돈을 tRNA 재충전율이 높은 코돈으로 제거하기 때문에 코돈 최적화된 유전자가 암호화하는 단백질의 존재비를 극적으로 증가시킨다. 이러한 코돈 최적화는, 예를 들어 (i) 재조합 단백질 발현에서 단백질 수율을 개선하거나, (ii) 본원에 개시된 결합 분자를 암호화하는 DNA 또는 mRNA의 안정성, 반감기, 또는 다른 바람직한 특성을 개선할 수 있으며, 이러한 mRNA 또는 DNA는 이를 필요로 하는 대상체에 투여된다.
- [0288] 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드(예를 들어, c-Jun, 항-ROR1 CAR 또는 EGFRt)의 암호화 서열 중 하나 이상은 본

출원이 출원된 당시 당분야에 알려진 임의의 방법을 사용하여 코돈 최적화될 수 있다.

[0289] 일부 측면에서, 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드(예를 들어, c-Jun-항-ROR1 CAR 작제물)는 서열 최적화되었다. 본원에 사용된 용어 "최적화된 서열"은 그 번역 효율을 증가시키는 특징을 도입하거나, 그 번역 효율을 감소시키는 특징을 제거하거나, 일반적으로 생체내 투여 후 발현 유효성과 관련된 특성을 개선하는 것에 의한 핵산의 서열 변형을 지칭한다. 이러한 특성은 핵산 안정성(예를 들어, mRNA 안정성) 개선, 표적 조직에서 번역 유효성 증가, 발현된 절단 단백질의 수 감소, 발현된 단백질의 폴딩 개선 또는 폴딩오류 방지, 발현된 생성물의 독성 감소, 발현된 생성물에 의해 유발된 세포 사멸 감소 또는 단백질 응집 증가 및/또는 감소를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0290] 본 개시내용은 기능적으로 동등한 분자를 생성하기 위해 전체 작제물에 대한 변형, 예를 들어 CAR, c-Jun, EGFRt 작제물의 다양한 도메인의 하나 이상의 아미노산 서열에서의 변형을 고려한다. 작제물은 본원에 개시된 출발 발현 작제물(예컨대 서열 번호 58에 제공된 작제물)의 적어도 약 70%, 적어도 약 71%, 적어도 약 72%, 적어도 약 73%, 적어도 약 74%, 적어도 약 75%, 적어도 약 76%, 적어도 약 77%, 적어도 약 78%, 적어도 약 79%, 적어도 약 80%, 적어도 약 81%, 적어도 약 82%, 적어도 약 83%, 적어도 약 84%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일성을 유지하도록 변형될 수 있다. 본 개시내용은 또한 기능적으로 동등한 분자를 생성하기 위해, 예를 들어 CAR의 하나 이상의 CDR 또는 c-Jun 또는 EGFRt 작제물의 도메인의 하나 이상의 아미노산 서열에서 변형을 초래하는, 작제물의 특정 영역의 변형을 고려한다.

[0291] **세포**

[0292] 본 개시내용은 또한 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드 작제물(즉, c-Jun-항-ROR1 CAR 작제물)을 포함하는 유전적으로 변형된 세포를 제공한다. 일부 측면에서, c-Jun, 항-ROR1 CAR 및 EGFRt는 작제물을 발현하도록 유전적으로 변형된 세포에 의해 재조합적으로 발현되며, 세포는 본 개시내용의 c-Jun, CAR 또는 EGFRt를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열 또는 벡터 중 하나 이상을 포함한다.

[0293] 일부 측면에서, 본원에 개시된 유전적으로 변형된 세포는 본 개시내용의 단백질 성분(예를 들어, 항-ROR1 CAR, c-Jun 및/또는 EGFRt)을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 벡터로 형질감염되었다. 용어 "형질감염된"(또는 동등한 용어 "형질전환된" 및 "형질도입된")은 외인성 핵산, 예를 들어 본 개시내용의 단백질(예를 들어, 항-ROR1, c-Jun, 및/또는 EGFRt)을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 벡터가 숙주 세포, 예를 들어 T 세포의 게놈으로 전달되거나 도입되는 공정을 지칭한다. "형질감염된" 세포는 외인성 핵산, 예를 들어 본 개시내용의 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 벡터로 형질감염, 형질전환 또는 형질도입된 세포이다. 세포는 1차 대상체 세포 및 그 자손을 포함한다.

[0294] 일부 측면에서, 본원에 기재된 세포는 세포에서 관심 단백질(예를 들어, c-Jun)의 내인성 발현을 유도 및/또는 증가시킬 수 있는 전사 활성화제로 변형되었다. 본원에 사용된 용어 "전사 활성화제"는 유전자 또는 유전자 세트의 전사를 증가시키는(예를 들어, 핵산 서열의 인핸서 또는 프로모터-근위 요소에 결합하고, 이에 의해 그 전사를 유도함으로써) 단백질을 지칭한다. 본 개시내용과 함께 사용될 수 있는 이러한 전사 활성화제의 비제한적인 예는 다음을 포함한다: 전사 활성화제 유사 효과기(TALE) 기반 전사 활성화제, 징크 핑거 단백질(ZFP) 기반 전사 활성화제, 클러스터링된 규칙적 간격의 짧은 회문 반복(CRISPR)/CRISPR-연관 단백질(Cas) 시스템 기반 전사 활성화제, 또는 이의 조합. 예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로 포함된, 문헌(Kabadi 등, *Methods* 69(2): 188-197 (Sep. 2014))을 참고한다.

[0295] 일부 측면에서, 본원에 기재된 세포는 CRISPR 활성화(CRISPRa)와 같은 CRISPR/Cas-시스템 기반 전사 활성화제로 변형되었다. 예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로 포함된 문헌(Nissim 등, *Molecular Cell* 54: 1-13 (May 2014))을 참고한다. CRISPRa는 엔도뉴클레아제 활성이 결여되어 있지만 그 가이드 RNA 및 표적 DNA 핵산 서열에 결합하는 능력을 유지하는 변형된 Cas 단백질의 사용을 포함하는 CRISPR 도구의 한 유형이다. 본 개시내용과 함께 사용될 수 있는 이러한 변형된 Cas 단백질의 비제한적인 예는 당분야에 알려져 있다. 예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로 포함된, 문헌(Pandelakis 등, *Cell Systems* 10(1): 1-14 (Jan. 2020))을 참고한다. 일부 측면에서, 변형된 Cas 단백질은 변형된 Cas9 단백질(당분야에서 "dCas9"로도 지칭됨)을 포함한다. 일부 측면에서, 변형된 Cas 단백질은 변형된 Cas12a 단백질을 포함한다. 일부 측면에서, 본 개시내용에 유용한 변형된 Cas 단백질은 가이드 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 작은 가이드 RNA)("변형된 Cas-가이드 복합체")에 결합되며, 가이드 폴리뉴클레오티드는 관심 단백질(예를 들어, c-Jun)을 암호화하는 핵산 서열의 영역과 상보적인 인식 서열

을 포함한다. 일부 측면에서, 가이드 폴리뉴클레오티드는 관심 단백질을 암호화하는 내인성 핵산 서열의 프로모터 영역과 상보적인 인식 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 전사 활성화제는 변형된 Cas-가이드 복합체가 세포로 도입될 때, 하나 이상의 전사 활성화제가 핵산 서열의 조절 요소(예를 들어, 프로모터 영역)에 결합할 수 있고, 이에 의해 암호화된 단백질(예를 들어, c-Jun)의 발현을 유도 및/또는 증가시킬 수 있도록, 변형된 Cas-가이드 복합체(예를 들어, 변형된 Cas 단백질의 N- 및/또는 C-말단)에 부착된다. 일부 측면에서, 하나 이상의 전사 활성화제는 내인성 유전자의 조절 요소(예를 들어, 프로모터 영역)에 결합할 수 있고, 이에 의해 암호화된 단백질(예를 들어, c-Jun)의 발현을 유도 및/또는 증가시킬 수 있다. 사용될 수 있는 공통적인 일반 활성화제의 비제한적인 예시적 예는 RNAP의 오메가 서브유닛, VP16, VP64 및 p65를 포함한다. 예를 들어, 그 전체가 본원에 참고로 포함된, 문헌(Kabadi and Gersbach, *Methods* 69: 188-197 (2014))을 참고한다.

[0296] 일부 측면에서, 하나 이상의 전사 억제인자(예를 들어, 크루펠 연관 박스 도메인(KRAB))는 세포로 도입될 때, 하나 이상의 전사 억제인자가 예를 들어 c-Jun의 발현을 방해할 수 있는 것들(예를 들어, Bach2)과 같은 유전자의 전사를 억제하거나 감소시킬 수 있도록, 변형된 Cas-가이드 복합체(예를 들어, 변형된 Cas 단백질의 N- 및/또는 C-말단)에 부착될 수 있다. 예를 들어, 각각 그 전체가 본원에 참조로 포함된, 문헌(HS20200030379A1 및 Yang 등, *J Transl Med* 19:459 (2021))을 참고한다. 일부 측면에서, 본 개시내용에 유용한 변형된 Cas 단백질은 하나 이상의 전사 활성화제 및 하나 이상의 전사 억제인자 둘 모두에 부착될 수 있다.

[0297] 임의의 하나의 이론에 구애받지 않고, 일부 측면에서, 이러한 변형된 Cas 단백질의 사용은 관심 유전자의 조건부 전사 및 발현을 가능하게 할 수 있다. 예를 들어, 일부 측면에서, 세포(예를 들어, T 세포)는 프로테아제(예를 들어, 담배 식각 바이러스(TEV)) 및 c-Jun의 프로모터 영역을 표적화하는 단일 가이드 RNA(sgRNA)에 결합되는, 리간드 결합 단백질(예를 들어, 항-ROR1 CAR)을 포함하도록 변형된다. 일부 측면에서, 세포는 T 세포의 활성화를 위한 링커(LAT)를 추가로 포함하도록 변형되며, 링커(예를 들어, TEV-절단 가능 링커)를 통해 전사 활성화제(예를 들어, dCas9-VP64-p65-Rta 전사 활성화제(VPR))에 부착된 변형된 Cas 단백질에 착화된다. 리간드 결합 단백질의 활성화 시, 변형된 Cas 단백질은 핵 편체를 위해 방출되고 c-Jun의 발현을 조건부로 및 가역적으로 유도한다(그 전체가 본원에 참조로 포함된, Yang 등, *J Immunother Cancer* 9(Suppl2): A164 (2021)).

[0298] 당업자에게 명백할 바와 같이, 일부 측면에서, 본원에 기재된 세포는 다중 접근의 조합을 사용하여 변형되었다. 예를 들어, 일부 측면에서, 세포는 본원에 기재된 외인성 폴리뉴클레오티드(예를 들어, c-Jun 단백질, ROR1-결합 단백질 및 EGFRt를 암호화함)로 변형되었다. 일부 측면에서, 이러한 세포는 내인성 c-Jun 단백질의 발현을 증가시킬 수 있는 외인성 전사 활성화제(예를 들어, CRISPRa)로 변형되어 추가로 변형된다. 임의의 하나의 이론에 구애받지 않고, 일부 측면에서, 이러한 조합 접근은 면역 세포가 훨씬 더 높은 수준의 c-Jun 단백질 발현(예를 들어, 외인성 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되면서 면역 세포에 의해 내인성으로 발현됨)을 갖는 것을 가능하게 할 수 있다.

[0299] 본 개시내용으로부터 명백한 바와 같이, 본원에 기재된 면역 세포는 참조 세포(예를 들어, 자연에 존재하는 상응하는 세포)와 비교하여 더 우수한 하나 이상의 특성을 나타낸다. 예를 들어, 일부 측면에서 참조 세포와 비교하여 본원에 제공된 면역 세포

[0300] 달리 표시하지 않는 한, 하나 이상의 외인성 뉴클레오티드 서열 및/또는 전사 활성화제는 당분야에 알려진 임의의 적합한 방법을 사용하여 세포로 도입될 수 있다. 하나 이상의 외인성 뉴클레오티드 서열을 세포에 전달하기 위해 적합한 방법의 비제한적 예는 형질감염(형질전환 및 형질도입으로도 알려짐), 전기천공, 비바이러스 전달, 바이러스 형질도입, 지질 나노입자 전달 및 이의 조합을 포함한다.

[0301] 일부 측면에서, 세포(예를 들어, T 세포)는 본 개시내용의 벡터, 예를 들어 아데노 연관 바이러스(AAV) 벡터 또는 렌티바이러스 벡터로 형질감염된다. 일부 이러한 측면에서, 세포는 본 개시내용의 단백질을 안정적으로 발현할 수 있다.

[0302] 일부 측면에서, 세포(예를 들어, T 세포)는 본 개시내용의 단백질(예를 들어, 항-ROR1, c-Jun 및/또는 EGFRt)을 암호화하는 핵산, 예를 들어 mRNA, cDNA, DNA로 형질감염된다. 이러한 측면에서, 세포는 본 개시내용의 단백질을 일시적으로 발현할 수 있다. 예를 들어, RNA 작제물은 세포에 직접 형질감염될 수 있다. 형질감염에 사용하기 위한 mRNA를 생성하는 방법에는 특이적으로 설계된 프라이머를 사용한 주형의 시험관내 전사(IVT), 이어서 폴리A 부가로는 3' 및 5' 비번역 서열(UTR), 5' 캡 및/또는 내부 리보솜 진입 부위(IRES), 발현될 핵산, 및 전형적으로 50-2000개 염기 길이인 폴리A 꼬리를 함유하는 작제물을 제조하는 것이 관여된다. 이렇게 생성된 RNA는 상이한 종류의 세포를 효율적으로 형질감염시킬 수 있다. 일부 측면에서, 주형은 본 개시내용의 CAR, c-Jun, EGFRt 및 다른 단백질에 대한 서열을 포함한다. 특정 측면에서, RNA 벡터는 전기천공에 의해 T 세포로 형질도입

된다.

- [0303] 일부 측면에서, 본원에 기재된 단백질(예를 들어, CAR 폴리펩티드 및 c-Jun 폴리펩티드)에 대한 코딩 서열은 별도 발현 작제물 상에 배치될 수 있다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 단백질(예를 들어, CAR 폴리펩티드, c-Jun 단백질, 및 존재하는 경우 EGFRt)에 대한 코딩 서열은 단일 발현 작제물 상에 배치될 수 있다. 코딩 서열은 작제물 상의 하나 이상의 발현 카세트에 배치될 수 있으며, 각각의 카세트는 자체 전사 단위(예를 들어, 자체 프로모터 및 폴리아데닐화 부위 및 다른 전사 조절 요소를 가짐)이다. 특정 측면에서, 3개의 코딩 서열(예를 들어, 각각 CAR, c-Jun 및 EGFRt를 암호화함)은 3개의 코딩 서열이 공통 프로모터 하에 전사되는, 단일 발현 카세트(예를 들어, 3-시스템 발현 카세트)로 배치될 수 있다.
- [0304] 일부 측면에서, 세포는 면역 효과기 세포이다. 본원에 사용된 용어 "면역 효과기 세포"는 면역 반응, 예를 들어 면역 효과기 반응의 촉진에 관여하는 세포를 지칭한다. "면역 효과기 기능" 또는 "면역 효과기 반응"은 예를 들어, 표적 세포의 면역 공격을 향상시키거나 촉진하는 면역 효과기 세포의 기능 또는 반응을 지칭한다. 예를 들어, 면역 효과기 기능 또는 반응은 표적 세포의 사멸 또는 성장 또는 증식의 억제를 촉진하는 T 또는 NK 세포의 특성을 지칭한다. T 세포의 경우, 1차 자극 및 공동-자극은 면역 효과기 기능 또는 반응의 예이다.
- [0305] 용어 "효과기 기능"은 세포의 특화된 기능을 지칭한다. 예를 들어 T 세포의 효과기 기능은 사이토카인의 분비를 포함하는 세포용해 활성 또는 헬퍼 활성일 수 있다. CAR의 세포내 신호전달 도메인은 CAR 함유 세포, 예를 들어 CAR T 세포의 면역 효과기 기능을 촉진하는 신호를 생성할 수 있다. 예를 들어, CAR T 세포에서, 면역 효과기 기능의 예는 사이토카인의 분비를 포함하는 세포용해 활성 및 헬퍼 활성을 포함한다. 일부 측면에서, 세포내 신호 도메인은 효과기 기능 신호를 변환하고 세포가 특화된 기능을 수행하도록 지시하는 CAR의 부분이다. 전체 세포내 신호전달 도메인이 사용될 수 있지만, 많은 경우에 전체 사슬을 사용할 필요는 없다. 세포내 신호전달 도메인의 절단된 부분이 사용되는 정도까지, 이러한 절단된 부분은 효과기 기능 신호를 변환하는 한 온전한 사슬 대신 사용될 수 있다. 따라서 용어 세포내 신호전달 도메인은 효과기 기능 신호를 전달하기 충분한 세포내 신호전달 도메인의 임의의 절단된 부분을 포함하는 것을 의미한다.
- [0306] 일부 측면에서, 세포내 신호전달 도메인은 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 예시적인 1차 세포내 신호전달 도메인은 1차 자극 또는 항원 의존적 시뮬레이션을 담당하는 분자로부터 유래된 것들을 포함한다. 일부 측면에서, 세포내 신호전달 도메인은 공동자극 세포내 도메인을 포함할 수 있다. 예시적인 공동자극 세포내 신호전달 도메인은 공동자극 신호 또는 항원 비의존적 자극을 담당하는 분자로부터 유래된 것들을 포함한다. 예를 들어, CAR T 세포의 경우, 1차 세포내 신호전달 도메인은 T 세포 수용체의 세포질 서열을 포함할 수 있고 공동자극 세포내 신호전달 도메인은 공동-수용체 또는 공동자극 분자로부터의 세포질 서열을 포함할 수 있다.
- [0307] 1차 세포내 신호전달 도메인은 면역수용체 티로신 기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로 알려진 신호전달 모티프를 포함할 수 있다. ITAM 함유 1차 세포질 신호전달 서열의 예는 CD3 제타, FcR 감마, 공동 FcR 감마(FCER1G), Fc 감마 RIIa, FcR 베타(Fc 엡실론 Rib), CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD22, CD79a, CD79b, CD278("ICOS"), FcεRI, CD66d, CD32, DAP10 및 DAP12로부터 유래된 것들을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0308] 면역 효과기 세포의 예는, 예를 들어 T 세포, 예를 들어 알파/베타 T 세포 및 감마/델타 T 세포, B 세포, 자연 살해(NK) 세포, 자연 살해 T(NKT) 세포, 비만 세포 및 골수-유래 식세포를 포함한다. 선천성 림프 세포(ILC)는 공통 림프 전구체(CLP)로부터 유래되고 림프 계통에 속하는 선천성 면역 세포의 한 그룹이다. 이들 세포는 재조합 활성화 유전자(RAG)의 결여 때문에 항원 특이적 B 또는 T 세포 수용체의 부재로 정의된다. ILC는 골수 또는 수지상 세포 마커를 발현하지 않는다. ILC는 다양한 생리적 기능을 갖는다; 일부 기능은 헬퍼 T 세포와 유사하지만 이 그룹은 세포독성 NK 세포를 또한 포함한다. 따라서, 일부 측면에서, 본 개시내용의 CAR을 발현하도록 유전적으로 변형된 세포는, 예를 들어 T 세포, NK 세포, NKT 세포 또는 ILC 세포이다.
- [0309] T 세포는 말초 혈액 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 제대혈, 가슴샘 조직, 감염 부위로부터의 조직, 복수, 흉막 삼출액, 비장 조직 및 종양을 포함하는 여러 원천으로부터 얻을 수 있다.
- [0310] 본 개시내용의 조작된 면역 세포의 원천은 치료받을 환자(즉, 자가 세포)이거나 치료받을 환자가 아닌 공여체(예를 들어, 동종이형 세포)로부터일 수 있다. 일부 측면에서, 조작된 면역 세포는 조작된 T 세포이다. 본원에서 조작된 T 세포는 CD4⁺CD8⁻(즉, CD4 단일 양성) T 세포, CD4⁻CD8⁺(즉, CD8 단일 양성) T 세포, 또는 CD4⁺CD8⁺(이중 양성) T 세포일 수 있다. 기능적으로 T 세포는 세포독성 T 세포, 헬퍼 T 세포, 자연 살해 T 세포, 억제 T 세포 또는 이의 혼합물일 수 있다. 조작된 T 세포는 자가 또는 동종이형일 수 있다.
- [0311] 1차 T 세포를 포함하는 1차 면역 세포는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 골수, 림프절 조직, 제대혈, 가슴샘 조직,

감염 부위로부터의 조직, 복수, 흉막 삼출액, 비장 조직 및/또는 종양 조직을 포함하는 여러 조직 원천으로부터 얻을 수 있다. PBMC를 포함하는 백혈구는 잘 알려진 기술, 예를 들어 FICOLL™ 분리 및 백혈구성분채집술에 의해 다른 혈액 세포로부터 분리될 수 있다. 백혈구성분채집술 생성물은 전형적으로 림프구(T 및 B 세포 포함), 단핵구, 과립구 및 다른 유핵 백혈구를 함유한다. T 세포는 예를 들어 PERCOLL™ 구배를 통한 원심분리 또는 역류 원심 정화에 의해 다른 백혈구로부터 추가로 분리된다. CD3⁺, CD25⁺, CD28⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺, GITR⁺, 및 CD45RO⁺ T 세포와 같은 T 세포의 특정 하위집단은 양성 또는 음성 선택 기술에 의해(예를 들어, 형광 기반 또는 자성 기반 세포 분류를 사용하여) 추가 분리될 수 있다. 예를 들어, T 세포는 원하는 T 세포에 대한 양성 선택 또는 원치 않는 세포의 제거를 위한 음성 선택에 충분한 시기 동안 Dynabeads®, CELLlection™, DETACHaBEAD™ (Thermo Fisher) 또는 MACS® 세포 분리 제품(Miltenyi Biotec)과 같은 임의의 다양한 상업적으로 이용 가능한 항체 접합 비드와의 인큐베이션에 의해 분리될 수 있다.

[0312] 일부 경우에 암 치료 직후 암 환자로부터 자가 T 세포를 얻는다. 특정 암 치료 후, 특히 면역계를 손상시키는 치료 후, 치료 직후 수집된 T 세포의 품질이 생체의 증대 및/또는 생체의 조작된 후 생각하는 능력이 개선됨이 관찰되었다.

[0313] 유전적 변형 전이든 후든, T 세포는 일반적으로 예를 들어 각각 그 전체가 명시적으로 본원에 참조로 포함된, U.S. 특허 5,858,358; 5,883,223; 6,352,694; 6,534,055; 6,797,514; 6,867,041; 6,692,964; 6,887,466; 6,905,680; 6,905,681; 6,905,874; 7,067,318; 7,144,575; 7,172,869; 7,175,843; 7,232,566; 7,572,631; 및 10,786,533에 기재된 바와 같은 방법을 사용하여 활성화되고 증대될 수 있다. 일반적으로 T 세포는 CD3/TCR 복합체 연관된 신호를 자극하는 제제 및 T 세포 표면 상의 공동자극 분자를 자극하는 리간드가 부착된 표면과의 접촉에 의해 시험관내 또는 생체의 증대될 수 있다. 특히, T 세포 집단은 항-CD3 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 표면 상에 고정화된 항-CD3 항체와의 접촉에 의해, 또는 갈슘 이오노포어와 함께 단백질 키나제 C 활성화제(예를 들어, 브리오스타틴)와의 접촉에 의해서와 같이 자극될 수 있다. T 세포의 표면 상에 있는 보조 분자의 공동-자극을 위해 보조 분자에 결합하는 리간드가 사용될 수 있다. 예를 들어, T 세포 집단은 T 세포의 증식을 자극하기 적합한 조건 하에 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체와 접촉될 수 있다. CD4⁺ T 세포 또는 CD8⁺ T 세포의 증식을 자극하기 위해 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체가 사용될 수 있다.

[0314] 세포 배양 조건은 특정 배지, 온도, 산소 함량, 이산화탄소 함량, 시간, 제제, 예를 들어 영양소, 아미노산, 항생제, 이온, 및/또는 사이토카인, 케모카인, 항원, 결합 파트너, 용해 단백질, 재조합 가용성 수용체 및 세포를 활성화하도록 설계된 임의의 다른 제제와 같은 자극 인자 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 배양 조건은 IL-2, IL-7 및/또는 IL-15의 첨가를 포함한다.

[0315] 일부 측면에서, 조작될 세포는 조작 후 성숙 T 세포로 분화되는 만능 또는 다능 세포일 수 있다. 이러한 비-T 세포는 동종이형일 수 있고, 예를 들어, 인간 배아 줄기 세포, 인간 유도된 만능 줄기 세포 또는 조혈 줄기 또는 전구 세포일 수 있다. 설명의 용이함을 위해, 만능 및 다능 세포는 본원에서 "전구 세포"로 총칭된다.

[0316] 동종이형 세포가 사용될 때, 특정 측면에서, 이들은 이식편 대 숙주 거부를 감소시키도록 조작된다(예를 들어, B2M 및/또는 TRAC 유전자를 녹아웃함으로써).

[0317] **약학 조성물**

[0318] 본 개시내용은 또한 본원에 개시된 조성물, 예를 들어 본 개시내용의 단백질(예를 들어, c-Jun, 항-ROR1 CAR, EGFRt)을 암호화하는 폴리뉴클레오티드(예를 들어, c-Jun-항-ROR1 작제물), 본 개시내용의 항-ROR1 CAR, c-Jun 및 EGFRt 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드(예를 들어, c-Jun-항-ROR1 CAR 작제물)를 포함하는 벡터, 또는 본 개시내용의 항-ROR1 CAR, c-Jun 및 EGFRt 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 작제물 또는 벡터를 포함하는 유전적으로 변형된 세포를 포함하는 약학 조성물을 제공하며, 이는 대상체에 투여하기 적합하다.

[0319] 약학 조성물은 일반적으로 본 개시내용의 항-ROR-1 CAR, c-Jun 및 EGFRt 단백질을 암호화하거나 포함하는 폴리뉴클레오티드, 벡터 또는 세포 및 약학적으로 허용 가능한 부형제 또는 담체를 대상체에 투여하기 적합한 형태로 포함한다. 약학적으로 허용 가능한 부형제 또는 담체는 부분적으로 투여되는 특정 조성물뿐만 아니라 조성물을 투여하기 위해 사용되는 특정 방법에 의해 결정된다.

[0320] 본 개시내용은 본원에 기재된 발현 작제물(예를 들어, 본원에 기재된 c-Jun-항-ROR1 CAR 작제물)로 변형된 조작된 T 세포를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 약학 조성물은 환자로의 도입 전에 세포의 건강을 유지하기 적합한 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다.

- [0321] 일부 측면에서, 조작된 세포는 배양 배지로부터 수확되고, 세척되고 치료 유효량으로 담체로 농축될 수 있다. 예시적인 담체는 식염수, 완충 식염수(예를 들어, 인산염 완충 식염수), 생리 식염수, 물, 헵크 용액, 링거 용액, Nonnosol-R(Abbott Labs), Plasma-Lyte A(R)(Baxter Laboratories, Inc., Morton Grove, IL), 글리세롤, 에탄올, 및 이의 조합을 포함한다. 담체는 등장성인 것이 바람직하다. 일부 측면에서, 담체는 인간 혈청 알부민(HSA) 또는 다른 인간 혈청 성분, 5% 글루코스 또는 텍스트로스와 같은 구성분으로 보충될 수 있다. 추가 등장화제는 글리세린, 에리트리톨, 아라비톨, 자일리톨, 소르비톨 또는 만니톨과 같은 3가 이상의 당 알코올을 포함하는 다가 당 알코올을 포함하며 또한 포함될 수 있다.
- [0322] 약학 T 세포 조성물은 암 환자에 전신으로(예를 들어, 정맥내 또는 간문맥 주사를 통해) 또는 국소적으로(예를 들어, 종양내 주사를 통해) 치료 유효량으로 투여될 수 있다. 일부 측면에서, ROR1을 표적화하는 것들과 같은 조성물이 ROR1을 발현하는 것으로 알려진 종양을 가진 환자를 치료하기 위해 사용된다. 일부 측면에서, ROR1을 표적화하는 것들과 같은 조성물은 전이성 흑색종, 비소세포 폐암, 골수종, 식도암, 운할막 육종, 위암, 유방암, 간세포암, 두경부암, 난소암, 전립샘암 및 방광암으로부터 선택된 암을 갖는 환자를 치료하기 위해 사용된다. 본원에 사용된 용어 "치료" 또는 "치료하는"은 치료 대상체에서 유익하거나 원하는 결과를 얻기 위한 접근을 지칭한다. 이러한 결과는 다음을 포함하지만 이에 제한되지 않는다: 질환으로 초래되는 하나 이상의 증상 완화, 질환 정도의 감퇴(예를 들어, 종양 부피 감소), 질환 안정화(예를 들어, 질환의 악화 방지 또는 지연), 질환의 확산(예를 들어, 전이)의 방지 또는 지연, 질환의 재현 또는 재발 방지 또는 지연, 질환 상태 개선, 질환의 차단(부분적 또는 전체적) 제공, 질환을 치료하기 위해 필요한 하나 이상의 다른 약제의 용량 감소, 삶의 질 개선, 체중 회복 및/또는 생존 연장(예를 들어, 전체 생존 또는 무진행 생존).
- [0323] 조성물의 치료 유효량은 원하는 임상 종결점을 달성하기 충분한 조작된 T 세포의 수를 지칭한다. 일부 측면에서, 치료 유효량은 약 10^4 개 초과, 약 10^5 개 초과, 약 10^6 개 초과, 약 10^7 개 초과, 약 10^8 개 초과 또는 약 10^9 개 초과인 조작된 세포를 함유한다.
- [0324] 일부 측면에서 약학 조성물은 치료 유효량 또는 예방 유효량과 같은 질환 또는 병태를 치료 또는 방지하는 데 효과적인 양으로 세포를 포함한다. 일부 측면에서 치료 또는 예방 유효성은 치료받은 대상체의 주기적인 평가에 의해 모니터링된다. 수일 이상에 걸쳐 반복 투여하는 경우, 병태에 따라 원하는 질환 증상의 역제가 일어날 때까지 치료가 반복된다. 그러나 다른 투여량 요법이 유용할 수 있고 결정될 수 있다. 원하는 투여량은 조성물의 단일 볼루스 투여, 조성물의 다중 볼루스 투여 또는 조성물의 연속 주입 투여에 의해 전달될 수 있다.
- [0325] 본 개시내용의 CAR을 포함하는 약학 조성물의 매우 다양한 적합한 제형물이 존재한다(예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18th ed. (1990) 참고). 약학 조성물은 일반적으로 멸균 상태로 미국 식품의약국의 모든 우수 의약품 제조 및 품질관리 기준(GMP) 규정을 완전히 준수하여 제형화된다.
- [0326] 특정 측면에서, 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체 중 하나 이상의 추가 치료제와 공동-투여된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 항-ROR1 CAR, c-Jun 및/또는 EGFRt를 암호화함)를 포함하는 약학 조성물은 추가 치료제(들)의 투여 전에 투여된다. 특정 측면에서, 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 항-ROR1 CAR, c-Jun, 및/또는 EGFRt를 암호화함)를 포함하는 약학 조성물은 추가 치료제(들)의 투여 후에 투여된다. 추가 측면에서, 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 항-ROR1 CAR, c-Jun, 및/또는 EGFRt를 암호화함)를 포함하는 약학 조성물은 추가 치료제(들)와 동시에 투여된다.
- [0327] 허용 가능한 담체, 부형제 및 안정화제는 사용되는 투여량 및 농도로 수신체(예를 들어, 동물 또는 인간)에 무독성이며, 인산염, 구연산염 및 다른 유기 산과 같은 완충제; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 보존제(예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤잘코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 메틸 또는 프로필 파라벤과 같은 알킬 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 사이클로헥산올; 3-펜탄올 및 m-크레졸); 저분자량(약 10개 잔기 미만의) 폴리펩티드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 라이신과 같은 아미노산; 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 포함하는 단당류, 이당류 및 다른 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이트제; 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨과 같은 당; 나트륨과 같은 염 형성 짝이온; 금속 복합체(예를 들어, Zn-단백질 복합체); 및/또는 TWEEN™, PLURONICS™ 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 비이온성 계면활성화제를 포함한다.
- [0328] 담체 또는 희석제의 예는 물, 식염수, 링거 용액, 텍스트로스 용액 및 5% 인간 혈청 알부민을 포함하지만 이에

제한되지 않는다. 약학 활성 물질에 대한 이러한 매질 및 화합물의 사용은 당분야에 잘 알려져 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 화합물이 본 발명의 조성물(예를 들어, 폴리뉴클레오티드, 백터 또는 세포)과 비상용성인 경우를 제외하고, 조성물에서 이의 사용이 고려된다.

[0329] **적용증**

[0330] 일부 측면에서, 본원에 개시된 조성물(예를 들어, c-Jun을 과발현하는 항-ROR1 CAR T 세포)은 질환 또는 병태, 예를 들어 암 또는 악성종양과 같은 증식성 질환 또는 골수이형성증, 골수이형성 증후군 또는 전백혈병과 같은 전암성 병태를 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0331] "암"은 체내 비정상 세포의 제어되지 않는 성장을 특징으로 하는 다양한 증식성 질환의 광범위한 그룹을 지칭한다. 조절되지 않은 세포 분열 및 성장은 이웃 조직을 침범하는 악성 종양의 형성을 초래하고 림프계 또는 혈류를 통해 신체의 원위 부분으로 전이될 수도 있다. 본원에 사용된 용어 "증식성" 장애 또는 질환은 다세포 유기체에 유해(즉, 불편 또는 감소된 기대 수명)를 초래하는 다세포 유기체에서의 하나 이상의 세포 하위세트의 원치 않는 세포 증식을 지칭한다. 예를 들어, 본원에 사용된 바와 같이, 증식성 장애 또는 질환은 신생물성 장애 및 다른 증식성 장애를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, "신생물성"은 악성이든 양성이든 비정상적 조직 성장을 초래하는 이상조절되거나 조절되지 않는 임의의 형태의 세포 성장을 지칭한다. 따라서, "신생물성 세포"는 세포 성장이 이상조절되거나 조절되지 않는 악성 및 양성 세포를 포함한다. 일부 측면에서, 암은 종양이다. 본원에 사용된 바와 같은 "종양"은 악성이든 양성이든 모든 신생물성 세포 성장 및 증식, 그리고 모든 전암성 및 암성 세포 및 조직을 지칭한다.

[0332] 일부 측면에서, c-Jun을 과발현하는 조작된 항-ROR1 CAR T 세포는 ROR1 양성인 재발성 또는 불응성 고형 종양 악성종양을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 특정 측면에서, 치료받을 질환은 삼중 음성 유방암 또는 비-소세포 폐 암종과 같은 유방암이다. 일부 측면에서, 질환은 고형 또는 액상 종양이다. 일부 측면에서, 암은 췌장암이다. 일부 측면에서, 질환은 혈액암이다. 일부 측면에서, 혈액암은 백혈병이다.

[0333] 일부 측면에서, 본원에 개시된 조성물(예를 들어, 본 개시내용의 c-Jun 및 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 발현하도록 조작된 세포, 본 개시내용의 c-Jun 및 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 백터, 본 개시내용의 c-Jun 및 CAR), 또는 본 개시내용의 c-Jun 및 CAR을 발현하는 세포, 예를 들어 CAR T 세포)은 이를 필요로 하는 대상체에서 종양의 크기를 줄이거나, 감소시키거나, 종양 성장을 억제하기 위해 사용된다. 일부 측면에서, 종양은 암종(즉, 상피 기원의 암)이다. 일부 측면에서, 종양은 예를 들어 위암, 위식도 접합부암(GEJ), 식도암, 결장직장암, 간암(간세포 암종, HCC), 난소암, 유방암, NSCLC, 방광암, 폐암, 췌장암, 두경부암, 림프종, 자궁암, 신암 또는 신장암, 담도암, 전립샘암, 고환암, 요도암, 음경암, 흉부암, 직장암, 뇌암(신경아교종 및 교모세포종), 자궁경부암, 귀밑샘암, 후두암, 갑상샘암, 샘암종, 신경모세포종, 흑색종 및 메르켈 세포 암종으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0334] "암" 또는 "암 조직"은 다양한 단계의 종양을 포함할 수 있다. 특정 측면에서, 암 또는 종양은 예를 들어 암 또는 종양이 발생의 매우 초기이고 전이되지 않은, 0기이다. 일부 측면에서, 암 또는 종양은 예를 들어 암 또는 종양의 크기가 상대적으로 작고, 인근 조직으로 확산되지 않았으며 전이되지 않은, I기이다. 일부 측면에서, 암 또는 종양은, 예를 들어 암 또는 종양이 0기 또는 I기보다 크고 인근 조직으로 성장했지만 잠재적으로 림프절을 제외하고는 전이되지 않은, II기 또는 III기이다. 일부 측면에서, 암 또는 종양은, 예를 들어 암 또는 종양이 전이된, IV기이다. IV기는 진행성 또는 전이성 암으로도 지칭될 수 있다.

[0335] 일부 측면에서, 암은 부신피질암, 진행성 암, 항문암, 재생불량성 빈혈, 담관암, 방광암, 뼈암, 뼈 전이, 뇌 종양, 뇌암, 유방암, 소아기 암, 원발 기원이 알려지지 않은 암, 캐슬만병, 자궁경부암, 결장암/직장암, 자궁내막암, 식도암, 유양계 종양, 안암, 담낭암, 위장관 카르시노이드 종양, 위장관 기질 종양, 임신 영양모세포병, 호지킨병, 카포시 육종, 신세포 암종, 후두암 및 하인두암, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 골수단구성 백혈병, 간암, 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 폐 카르시노이드 종양, 피부 림프종, 악성 중피종, 다발성 골수종, 골수이형성 증후군, 비강 및 부비동암, 비인두암, 신경모세포종, 비호지킨 림프종, 구강 및 구강인두암, 골육종, 난소암, 췌장암, 음경암, 뇌하수체 종양, 전립샘암, 망막모세포종, 횡문근육종, 침샘암, 성인 연조직 육종, 기저 세포 및 편평 세포 피부암, 흑색종, 소장암, 위암, 고환암, 인후암, 가슴샘암, 갑상샘암, 자궁 육종, 질암, 외음부암, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 윌름스 종양 및 암 치료에 의해 유발된 속발성 암을 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다.

[0336] 일부 측면에서, 종양은 고형 종양이다. "고형 종양"은 육종, 흑색종, 암종 또는 다른 고형 종양 암을 포함하지

만 이에 제한되지 않는다. "육종"은 배아 결합 조직과 같은 물질로 구성되고 일반적으로 원섬유 또는 균질 물질에 포매된 조밀 패킹된 세포로 이루어진 종양을 지칭한다. 육종은 연골육종, 섬유육종, 림프육종, 흑색육종, 점액육종, 골육종, 아베메시 육종, 지방 육종, 지방육종, 폐포 연부 육종, 사기질모세포 육종, 포도 육종, 녹색종육종, 융모막 암종, 배아 육종, 윌름스 종양 육종, 자궁내막 육종, 간질 육종, 유방 육종, 근막 육종, 섬유아세포 육종, 거대 세포 육종, 과립구 육종, 호지킨 육종, 특발성 다발성 색소 출혈 육종, B 세포의 면역모세포 육종, 림프종, T 세포의 면역모세포 육종, 엔센 육종, 카포시 육종, 쿠퍼 세포 육종, 혈관육종, 백혈구육종, 악성 중간엽 육종, 방골 육종, 망상적혈구 육종, 라우스 육종, 장액낭종 육종, 율환막 육종 또는 혈관확장성 육종을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0337] 용어 "흑색종"은 피부 및 다른 기관의 멜라닌세포계로부터 발생하는 종양을 지칭한다. 흑색종은 예를 들어, 사지말단-흑점형 흑색종, 무색소성 흑색종, 양성 소아 흑색종, 클라우드만 흑색종, S91 흑색종, 하딩-파세이 흑색종, 소아 흑색종, 악성 흑자 흑색종, 악성 흑색종, 전이성 흑색종, 결절성 흑색종, 조갑하 흑색종, 또는 표재성 확산 흑색종을 포함한다.

[0338] 용어 "암종"은 주변 조직에 침윤하여 전이를 일으키는 경향이 있는 상피 세포로 이루어진 악성 신생장을 지칭한다. 예시적인 암종은, 예를 들어, 샘과피 암종, 세엽 암종, 샘낭성 암종, 샘낭 암종, 샘종 암종, 부신 피질의 암종, 폐포 암종, 폐포 세포 암종, 기저 세포 암종, 기저세포 암종, 기저양 암종, 기저편평 세포 암종, 기관지 폐포 암종, 세기관지 암종, 기관지 암종, 대뇌양 암종, 담관세포 암종, 융모막 암종, 콜로이드 암종, 코메도 암종, 코퍼스 암종, 사상 암종, 흉부 갑옷 암종, 피부 암종, 원통형 암종, 원통형 세포 암종, 관 암종, 듀림 암종, 배아 암종, 뇌양 암종, 표피양 암종, 상피 아데노이드 암종, 외향성 암종, 케양성 암종, 섬유종 암종, 젤라틴형 암종, 젤라틴성 암종, 거대 세포 암종, 거대세포 암종, 샘 암종, 과립막 세포 암종, 모발 기질 암종, 혈양 암종, 간세포 암종, 휘틀 세포 암종, 유리질 암종, 하이페메프رويد(hypemephroid) 암종, 영아 배아 암종, 제자리 암종, 표피내 암종, 상피내 암종, 크롬페허 암종, 쿨치츠키 세포 암종, 대세포 암종, 수정체성 암종, 수정체 암종, 지방종성 암종, 림프상피 암종, 수질 암종, 수질성 암종, 흑색성 암종, 물 암종, 점액성 암종, 점액 분비성 암종, 점액세포 암종, 점액표피양 암종, 점액질 암종, 점액 암종, 점액종 암종, 비인두 암종, 귀리 세포 암종, 골화성 암종, 유골 암종, 유두 암종, 문맥주위 암종, 전침윤성 암종, 가시 세포 암종, 반점상 암종, 신장의 신세포 암종, 예비 세포 암종, 육종성 암종, 슈나이더막 암종, 경성 암종, 음낭 암종, 인환 세포 암종, 단순 암종, 소세포 암종, 선륜 암종, 회전타원체 세포 암종, 방추세포 암종, 해면상 암종, 편평 암종, 편평 세포 암종, 스트링 암종, 혈관확장성 암종, 모세혈관확장성 암종, 이행 세포 암종, 결절 암종, 결절성 암종, 사마귀양 암종 또는 융모상 암종을 포함한다.

[0339] 본원에 개시된 조성물(예를 들어, 본 개시내용의 c-Jun 및 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 발현하도록 조작된 세포, 본 개시내용의 c-Jun 및 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 본 개시내용의 c-Jun 및 CAR, 또는 본 개시내용의 c-Jun 및 CAR을 발현하는 세포, 예를 들어 CAR T 세포)로 치료받을 수 있는 추가 암은, 예를 들어 백혈병, 호지킨병, 비호지킨 림프종, 다발성 골수종, 신경모세포종, 유방암, 난소암, 폐암, 횡문근육종, 원발성 혈소판증가증, 원발성 거대글로불린혈증, 소세포 폐 종양, 원발성 뇌 종양, 위암, 결장암, 악성 체장 섬유종, 악성 유암종, 자궁 방광암, 전악성 피부 병변, 고환암, 림프종, 갑상샘암, 유두 갑상샘 암종, 신경모세포종, 신경내분비암, 식도암, 비뇨생식기암, 악성 고칼슘혈증, 자궁경부암, 자궁내막암, 부신피질암, 전립샘암, 췌장암, 난소암, 복막암, 나팔관암 또는 자궁 유두 장액 암종을 포함한다.

[0340] **방법**

[0341] 본 개시내용은 또한 차용 치료법을 위해 본원에 기재된 하나 이상의 조성물(예를 들어, c-Jun 및 항-ROR1 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드; 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터; 또는 본원에 기재된 바와 같은 c-Jun을 과발현하는 항-ROR1 CAR T 세포와 같이, 벡터로 형질도입된 세포)을 사용하는 방법을 제공한다. 아래 제공된 개시내용은 주로 세포(예를 들어, c-Jun을 과발현하는 항-ROR1 CAR T 세포)의 투여를 지칭하지만, 기재된 방법이 대상체에 본원에 기재된 임의의 다른 조성물(예를 들어, c-Jun 및 항-ROR1 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터)을 투여하여 달성될 수 있음은 당업자에게 명백할 것이다.

[0342] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 항-ROR1 CAR을 발현하고 c-Jun 폴리펩티드를 과발현하는 유효량의 세포를 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 표적 세포 집단 또는 조직에 대한 T 세포-매개 면역 반응을 자극하는 방법을 제공한다. 또한 항종양 면역성을 필요로 하는 대상체에 본 개시내용의 항-ROR1 CAR을 발현하고 c-Jun 폴리펩티드를 과발현하는 유효량의 세포를 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 항종양 면역성을 제공하는 방법이 제공된다.

- [0343] 본 개시내용은 또한 치료를 필요로 하는 대상체에 본 개시내용의 항-ROR1 CAR을 발현하고 c-Jun 폴리펩티드를 과발현하는 유효량의 세포를 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 측면에서, 암을 치료하는 방법은 치료를 필요로 하는 대상체에 c-Jun 폴리펩티드를 과발현하고 키메라 항원 수용체 (CAR) 및 절단된 EGF 수용체(EGFRt)를 포함하는 면역 세포를 투여하는 단계를 포함하며, CAR은 특이적이거나 중앙 상에서 발현되는 항원이다. 이러한 면역 세포의 비제한적 예는 본 개시내용에 걸쳐 기재된다. 본 개시내용으로부터 명백한 바와 같이, 이러한 방법은 ROR1 발현과 연관된 임의의 암을 치료하는 데 유용할 수 있다. 이러한 암의 비제한적 예는 본 개시내용의 다른 곳에 제공된다.
- [0344] 본원에 실증된 바와 같이, 일부 측면에서, 본원에 기재된 변형된 면역 세포(예를 들어, c-Jun 폴리펩티드를 과발현하고 CAR(예를 들어, 항-ROR1 CAR) 및 EGFRt를 포함함)를 대상체에 투여하는 것은 암의 하나 이상의 증상 또는 측면을 감소시키거나 완화할 수 있다. 예를 들어, 일부 측면에서, 본원에 기재된 변형된 면역 세포를 투여하는 것은 참조 종양 크기에 비해 감소된 종양 크기를 초래할 수 있다. 일부 측면에서, 참조 종양 크기는 (i) 투여 전 종양 크기, (ii) 투여를 받지 않은(예를 들어, c-Jun 폴리펩티드를 과발현하지 않는 상응하는 면역 세포의 투여를 받은) 상응하는 대상체에서의 종양 크기, 또는 (iii) (i) 및 (ii) 둘 모두를 포함한다. 일부 측면에서, 본원에 제공된 변형된 면역 세포를 투여하는 것은 참조 종양 크기와 비교하여 대상체에서의 종양의 크기를 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 약 100%만큼 감소시킬 수 있다.
- [0345] 일부 측면에서, 본원에 기재된 변형된 면역 세포의 투여는 대상체의 생존 기간을 개선할 수 있다. 일부 측면에서, 참조 생존 기간과 비교하여, 생존 기간은 적어도 약 1주, 적어도 약 2주, 적어도 약 3주, 적어도 약 1개월, 적어도 약 2개월, 적어도 약 3개월, 적어도 약 4개월, 적어도 약 5개월, 적어도 약 6개월, 적어도 약 7개월, 적어도 약 8개월, 적어도 약 9개월, 적어도 약 10개월, 적어도 약 11개월 또는 적어도 약 1년만큼 증가된다. 일부 측면에서, 참조 생존 기간은 투여를 받지 않은(예를 들어, c-Jun 폴리펩티드를 과발현하지 않는 상응하는 면역 세포의 투여를 받은) 상응하는 대상체의 생존 기간을 포함한다.
- [0346] 본 개시내용에서 다른 곳에 추가 기재된 바와 같이, 일부 측면에서, 본원에 기재된 변형된 면역 세포는 참조 세포(예를 들어, c-Jun을 과발현하도록 변형되지 않은 상응하는 세포)와 비교하여 종양 세포를 사멸시키는 개선된 능력을 나타낸다. 따라서, 일부 측면에서, 종양 세포를 c-Jun 폴리펩티드를 과발현하고 키메라 항원 수용체 (CAR) 및 절단된 EGF 수용체(EGFRt)를 포함하는 면역 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는, 종양 세포를 사멸시키는 방법이 본원에 제공되며, CAR은 종양 세포 상에서 발현되는 항원에 대해 특이적이다. 이러한 면역 세포의 비제한적 예는 본 개시내용에 걸쳐 제공된다. 일부 측면에서, 참조 세포(예를 들어, 본원에 기재된 바와 같이 변형되지 않은 상응하는 세포)와 비교하여, 종양 세포의 사멸은 적어도 약 0.5배, 1배, 적어도 약 2배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 또는 적어도 약 5배만큼 증가된다.
- [0347] 본 개시내용으로부터 명백한 바와 같이, 본 개시내용의 변형된 면역 세포는 참조 세포(예를 들어, c-Jun을 과발현하도록 변형되지 않은 상응하는 세포)와 비교하여 다양한 더 우수한 특성을 나타낸다. 예를 들어, 일부 측면에서, 본원에 기재된 변형된 세포는 항원으로 자극될 때 증가된 양의 사이토카인(예를 들어, IFN- γ , IL-2, 또는 둘 모두)을 생성할 수 있다. 따라서, 일부 측면에서, (i) ROR-1 결합 단백질을 발현하고 (ii) 증가된 수준의 c-Jun 폴리펩티드를 갖도록 변형되지 않은 상응하는 면역 세포와 비교하여 증가된 수준의 c-Jun 폴리펩티드를 갖도록 면역 세포를 변형하는 단계를 포함하는, 항원 자극에 반응하여 면역 세포에 의한 사이토카인의 생성을 증가시키는 방법이 본원에 제공된다. 일부 측면에서, ROR-1 결합 단백질은 R12 항체와 동일한 에피토프에 특이적으로 결합한다. 일부 측면에서, 항원 자극에 반응하여 사이토카인의 생성은 상응하는 면역 세포와 비교하여 적어도 약 1배, 적어도 약 2배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배, 적어도 약 11배, 적어도 약 12배, 적어도 약 13배, 적어도 약 14배, 적어도 약 15배, 적어도 약 16배, 적어도 약 17배, 적어도 약 18배, 적어도 약 19배, 적어도 약 20배, 적어도 약 25배, 적어도 약 30배, 적어도 약 35배, 적어도 약 40배, 적어도 약 45배, 적어도 약 50배, 적어도 약 75배, 적어도 약 100배, 적어도 약 200배, 적어도 약 300배, 적어도 약 400배, 적어도 약 500배, 적어도 약 750배, 또는 적어도 약 1,000배 이상만큼 증가된다. 일부 측면에서, 사이토카인의 생성은 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 100% 이상만큼 증가된다.
- [0348] 일부 측면에서, 본원에 기재된 변형된 면역 세포는 참조 세포(예를 들어, c-Jun을 과발현하도록 변형되지 않은

상응하는 면역 세포)와 비교하여 항원 자극에 반응하여 증가된 증식을 나타낸다. 따라서, (i) ROR-1 결합 단백질을 발현하고 (ii) 증가된 수준의 c-Jun 폴리펩티드를 갖도록 변형되지 않은 상응하는 면역 세포와 비교하여 증가된 수준의 c-Jun 폴리펩티드를 갖도록 면역 세포를 변형하는 단계를 포함하는, 항원 자극에 반응하여 면역 세포의 증식을 증가시키는 방법이 또한 본원에 제공된다. 일부 측면에서, ROR-1 결합 단백질은 R12 항체와 동일한 에피토프에 특이적으로 결합한다. 일부 측면에서, 변형 후, 항원 자극에 반응하여 면역 세포의 증식은 상응하는 면역 세포와 비교하여 적어도 약 1배, 적어도 약 2배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배, 적어도 약 11배, 적어도 약 12배, 적어도 약 13배, 적어도 약 14배, 적어도 약 15배, 적어도 약 16배, 적어도 약 17배, 적어도 약 18배, 적어도 약 19배, 적어도 약 20배, 적어도 약 25배, 적어도 약 30배, 적어도 약 35배, 적어도 약 40배, 적어도 약 45배, 적어도 약 50배, 적어도 약 75배, 적어도 약 100배, 적어도 약 200배, 적어도 약 300배, 적어도 약 400배, 적어도 약 500배, 적어도 약 750배, 또는 적어도 약 1,000배 이상만큼 증가된다. 일부 측면에서, 증식은 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 100% 이상만큼 증가된다.

[0349] 본 개시내용으로부터 명백한 바와 같이, 본원에 제공된 방법은 또한 지속적인 항원 자극에 반응하여 면역 반응의 하나 이상의 효과기 기능을 증가시키기 위해 사용될 수 있다. 개선될 수 있는 효과기 기능의 비제한적 예는 (i) 종양 세포를 사멸시키는 능력 (ii) 추가 항원 자극 시 사이토카인을 생성하는 능력, 또는 (iii) (i) 및 (ii) 둘 모두를 포함한다. 일부 측면에서, 이러한 방법은 (i) ROR-1 결합 단백질을 발현하고 (ii) 증가된 수준의 c-Jun 폴리펩티드를 갖도록 변형되지 않은 상응하는 면역 세포와 비교하여 증가된 수준의 c-Jun 폴리펩티드를 갖도록 면역 세포를 변형하는 단계를 포함한다. 일부 측면에서, ROR-1 결합 단백질은 R12 항체와 동일한 에피토프에 특이적으로 결합한다.

[0350] 일부 측면에서, 변형 후, 면역 세포는 상응하는 면역 세포와 비교하여 항원 자극 검정의 적어도 1회, 적어도 2회 또는 적어도 3회 추가 라운드 동안 효과기 기능을 유지한다.

[0351] 일부 측면에서, 변형 후, 면역 세포의 효과기 기능은 상응하는 면역 세포와 비교하여 적어도 약 1배, 적어도 약 2배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배, 적어도 약 11배, 적어도 약 12배, 적어도 약 13배, 적어도 약 14배, 적어도 약 15배, 적어도 약 16배, 적어도 약 17배, 적어도 약 18배, 적어도 약 19배, 적어도 약 20배, 적어도 약 25배, 적어도 약 30배, 적어도 약 35배, 적어도 약 40배, 적어도 약 45배, 적어도 약 50배, 적어도 약 75배, 적어도 약 100배, 적어도 약 200배, 적어도 약 300배, 적어도 약 400배, 적어도 약 500배, 적어도 약 750배, 또는 적어도 약 1,000배 이상만큼 증가된다. 일부 측면에서, 효과기 기능은 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 100% 이상만큼 증가된다.

[0352] 일부 측면에서, 본원에 제공된 방법은 또한 지속적인 항원 자극 후 면역 세포(예를 들어, T 세포)의 고갈을 감소시키거나 방지하기 위해 사용될 수 있다. 일부 측면에서, 이러한 방법은 (i) ROR-1 결합 단백질을 발현하고 (ii) 증가된 수준의 c-Jun 폴리펩티드를 갖도록 변형되지 않은 상응하는 면역 세포와 비교하여 증가된 수준의 c-Jun 폴리펩티드를 갖도록 면역 세포를 변형하는 단계를 포함한다. 일부 측면에서, ROR-1 결합 단백질은 R12 항체와 동일한 에피토프에 특이적으로 결합한다.

[0353] 일부 측면에서, 변형 후, 지속적인 항원 자극에 반응하여, 면역 세포는 상응하는 면역 세포와 비교하여 (i) 감소된 수준의 고갈과 연관된 유전자, (ii) 증가된 수준의 활성화와 연관된 유전자, 또는 (iii) (i) 및 (ii) 둘 모두를 발현한다. 이러한 유전자의 비제한적 예는 본 개시내용의 다른 곳에 기재되어 있다.

[0354] 본 개시내용은 또한 대상체로부터 단리된 세포 집단을 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터로 형질도입하는 단계를 포함하는, 치료법을 위해 세포, 예를 들어 c-Jun 폴리펩티드를 과발현하는 항-ROR1 CAR T 세포 집단을 제조하는 방법을 제공한다. 일부 측면에서, 형질도입은 적합한 조건 하에 세포를 배양하는 것을 포함한다.

[0355] 본 개시내용은 또한 암으로 진단된 대상체에서 유전적으로 조작된 세포의 지속적 집단을 생성하는 방법을 제공하며, 방법은 대상체에 본 개시내용의 항-ROR1 CAR을 발현하고 c-Jun 폴리펩티드를 과발현하도록 유전적으로 조작된 세포를 투여하는 단계를 포함한다. 임의의 하나의 이론에 구애받지 않고, 본 개시내용의 다른 곳에 기재된 바와 같이, c-Jun의 과발현은 본 개시내용의 변형된 면역 세포가 대상체에 투여될 때 참조 세포(예를 들어, c-Jun을 과발현하도록 변형되지 않은 상응하는 세포)와 비교하여 더 오래 대상체에서 지속될 수 있도록 하여, 고갈을 감소시키거나 방지하는 것을 도울 수 있다. 일부 측면에서, 대상체에 투여될 때, 본 개시내용의 변형된 면

역 세포는 상응하는 면역 세포보다 적어도 약 1주, 적어도 약 2주, 적어도 약 3주, 적어도 약 1개월, 적어도 약 2개월, 적어도 약 3개월, 적어도 약 4개월, 적어도 약 5개월, 적어도 약 6개월, 적어도 약 7개월, 적어도 약 8개월, 적어도 약 9개월, 적어도 약 10개월, 적어도 약 11개월, 또는 적어도 약 1년 이상 동안 대상체에서 지속될 수 있다. 따라서, 일부 측면에서, 참조 대상체에 투여될 때 상응하는 면역 세포와 비교하여, 투여 약 1개월 후, 대상체에 존재하는 변형된 면역 세포의 수는 적어도 적어도 약 1배, 적어도 약 2배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 또는 적어도 약 10배만큼 더 많다. 일부 측면에서, 투여 약 2개월 후, 참조 대상체의 상응하는 면역 세포와 비교하여, 변형된 면역 세포의 수는 적어도 약 1배, 적어도 약 2배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 또는 적어도 약 10배만큼 더 많다. 일부 측면에서, 투여 약 3개월 후, 참조 대상체의 상응하는 면역 세포와 비교하여, 변형된 면역 세포의 수는 적어도 약 1배, 적어도 약 2배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 또는 적어도 약 10배만큼 더 많다. 일부 측면에서, 투여 약 4개월 후, 참조 대상체의 상응하는 면역 세포와 비교하여, 변형된 면역 세포의 수는 적어도 적어도 약 1배, 적어도 약 2배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 또는 적어도 약 10배만큼 더 많다. 일부 측면에서, 투여 약 5개월 후, 참조 대상체의 상응하는 면역 세포와 비교하여, 변형된 면역 세포의 수는 적어도 약 1배, 적어도 약 2배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 또는 적어도 약 10배만큼 더 많다. 일부 측면에서, 투여 약 6개월 후, 참조 대상체의 상응하는 면역 세포와 비교하여, 변형된 면역 세포의 수는 적어도 약 1배, 적어도 약 2배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 또는 적어도 약 10배만큼 더 많다. 일부 측면에서, 투여 약 7개월 후, 참조 대상체의 상응하는 면역 세포와 비교하여, 변형된 면역 세포의 수는 적어도 약 1배, 적어도 약 2배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 또는 적어도 약 10배만큼 더 많다. 일부 측면에서, 투여 약 8개월 후, 참조 대상체의 상응하는 면역 세포와 비교하여, 변형된 면역 세포의 수는 적어도 약 1배, 적어도 약 2배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 또는 적어도 약 10배만큼 더 많다.

[0356] 본 개시내용은 또한 암으로 진단된 대상체에서 유전적으로 조작된 세포(예를 들어, T 세포) 집단을 증대시키는 방법을 제공하며, 방법은 대상체에 본 개시내용의 항-ROR1 CAR을 발현하고 c-Jun 폴리펩티드를 과발현하도록 유전적으로 조작된 세포(예를 들어, T 세포)를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 측면에서, 세포는 T 세포, 예를 들어 자가 T 세포이다. 일부 측면에서, T 세포는 이중 T 세포이다. 본원에 개시된 방법의 일부 측면에서, 대상은 인간 대상체이다.

[0357] 일부 측면에서, 본 개시내용의 항-ROR1 CAR을 포함하는 조성물(예를 들어, c-Jun-항-ROR1 CAR 작제물)의 투여는 본 개시내용의 CAR 대신 항-ROR1 CAR을 포함하는 상응하는 조성물(예를 들어, c-Jun을 과발현하지 않음)의 투여 후 관찰된 인터루킨 분비와 비교하여 적어도 약 0.01배, 적어도 약 0.02배, 적어도 약 0.03배, 적어도 약 0.04배, 적어도 약 0.05배, 적어도 약 0.06배, 적어도 약 0.07배, 적어도 약 0.08배, 적어도 약 0.09배, 적어도 약 0.1배, 적어도 약 0.2배, 적어도 약 0.3배, 적어도 약 0.4배, 적어도 약 0.5배, 적어도 약 1배, 적어도 약 2배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배, 적어도 약 11배, 적어도 약 12배, 적어도 약 13배, 적어도 약 14배, 적어도 약 15배, 적어도 약 16배, 적어도 약 17배, 적어도 약 18배, 적어도 약 19배, 적어도 약 20배, 적어도 약 25배, 적어도 약 30배, 적어도 약 35배, 적어도 약 40배, 적어도 약 45배, 적어도 약 50배, 적어도 약 75배, 적어도 약 100배, 적어도 약 200배, 적어도 약 300배, 적어도 약 400배, 적어도 약 500배, 적어도 약 750배, 또는 적어도 약 1,000배 이상만큼 인터루킨(예를 들어, 인터루킨-2) 분비의 증가를 초래한다.

[0358] 일부 측면에서 본 개시내용의 항-ROR1 CAR을 포함하는 조성물(예를 들어, c-Jun-항-ROR1 CAR 작제물)의 투여는 본 개시내용의 CAR 대신 항-ROR1 CAR을 포함하는 상응하는 조성물(예를 들어, c-Jun을 과발현하지 않음)의 투여 후 관찰된 인터페론(예를 들어, 인터페론-감마) 분비와 비교하여 적어도 약 0.01배, 적어도 약 0.02배, 적어도 약 0.03배, 적어도 약 0.04배, 적어도 약 0.05배, 적어도 약 0.06배, 적어도 약 0.07배, 적어도 약 0.08배, 적어도 약 0.09배, 적어도 약 0.1배, 적어도 약 0.2배, 적어도 약 0.3배, 적어도 약 0.4배, 적어도 약 0.5배, 적어도 약 1배, 적어도 약 2배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배, 적어도 약 11배, 적어도 약 12배, 적어도 약 13배, 적어도 약 14배, 적어도 약 15배, 적어도 약 16배, 적어도 약 17배, 적어도 약 18배, 적어도 약 19배, 적어도 약 20배, 적어도 약 25배, 적어도 약 30배, 적어도 약 35배, 적어도 약 40배, 적어도 약 45배, 적어도 약 50배, 적어도 약

75배, 적어도 약 100배, 적어도 약 200배, 적어도 약 300배, 적어도 약 400배, 적어도 약 500배, 적어도 약 750배, 또는 적어도 약 1,000배 이상만큼 인터페론(예를 들어, 인터페론-감마) 분비의 증가를 초래한다.

[0359] 일부 측면에서, 본 개시내용의 항-ROR1 CAR을 포함하는 조성물(예를 들어, c-Jun-항-ROR1 CAR 작제물)의 투여는 본 개시내용의 CAR 대신 항-ROR1 CAR을 포함하는 상응하는 조성물(예를 들어, c-Jun을 과발현하지 않음)의 투여 후 관찰된 TNF α 분비와 비교하여 적어도 약 0.01배, 적어도 약 0.02배, 적어도 약 0.03배, 적어도 약 0.04배, 적어도 약 0.05배, 적어도 약 0.06배, 적어도 약 0.07배, 적어도 약 0.08배, 적어도 약 0.09배, 적어도 약 0.1배, 적어도 약 0.2배, 적어도 약 0.3배, 적어도 약 0.4배, 적어도 약 0.5배, 적어도 약 1배, 적어도 약 2배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배, 적어도 약 11배, 적어도 약 12배, 적어도 약 13배, 적어도 약 14배, 적어도 약 15배, 적어도 약 16배, 적어도 약 17배, 적어도 약 18배, 적어도 약 19배, 적어도 약 20배, 적어도 약 25배, 적어도 약 30배, 적어도 약 35배, 적어도 약 40배, 적어도 약 45배, 적어도 약 50배, 적어도 약 75배, 적어도 약 100배, 적어도 약 200배, 적어도 약 300배, 적어도 약 400배, 적어도 약 500배, 적어도 약 750배, 또는 적어도 약 1,000배 이상만큼 TNF α 분비의 증가를 초래한다.

[0360] 일부 측면에서, 본 개시내용은 약제로서 사용하기 위한 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드, 벡터, CAR, 조성물, 키트, 세포 또는 약학 조성물을 제공한다. 일부 측면에서, 본 개시내용은 치료를 필요로 하는 대상체에서 암 치료를 위한 약제로서 사용하기 위한 본 개시내용의 폴리 뉴클레오티드, 벡터, CAR, 조성물, 키트, 세포 또는 약학 조성물을 제공한다. 일부 측면에서, 본 개시내용은 치료를 필요로 하는 대상체에서 암의 치료를 위한 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드, 벡터, CAR, 조성물, 키트, 세포 또는 약학 조성물을 제공한다. 일부 측면에서, 본 개시내용은 약제의 제조를 위한 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드, 벡터, CAR, 조성물, 키트, 세포 또는 약학 조성물의 용도를 제공한다. 일부 측면에서, 본 개시내용은 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하기 위한 약제의 제조를 위한 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드, 벡터, CAR, 조성물, 키트, 세포 또는 약학 조성물의 용도를 제공한다.

[0361] 본 개시내용은 또한 폴리뉴클레오티드 작제물(예를 들어, c-Jun-항-ROR1 CAR 작제물), 작제물을 포함하는 벡터(예를 들어, c-Jun, CAR 또는 EGFRt를 암호화함), 또는 CAR 치료법을 필요로 하는 대상체를 치료하기 위한 작제물 또는 벡터를 포함하는 유전적으로 변형된 세포를 포함하는 조성물을 제공한다. 본 개시내용은 또한 약제로 사용하기 위한 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드 작제물(예를 들어, c-Jun-항-ROR1 CAR 작제물), 폴리뉴클레오티드 작제물을 포함하는 벡터, 또는 c-Jun, CAR 또는 EGFRt를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 포함하는 유전적으로 변형된 세포를 포함하는 조성물을 제공한다. 또한 CAR 치료법을 필요로 하는 대상체에서 암에 대한 치료로 사용하기 위한 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드 작제물(예를 들어, c-Jun-항-ROR1 CAR 작제물), 폴리뉴클레오티드 작제물을 포함하는 벡터, 또는 c-Jun, CAR 또는 EGFRt를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 작제물 또는 벡터를 포함하는 유전적으로 변형된 세포를 포함하는 조성물이 제공된다. 또한 CAR 치료법을 필요로 하는 대상체에서 암에 대한 치료를 위한 약제의 제조를 위한 폴리뉴클레오티드 작제물(예를 들어, c-Jun-항-ROR1 CAR 작제물), c-Jun, CAR 또는 EGFRt를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 또는 c-Jun, CAR 또는 EGFRt를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 포함하는 유전적으로 변형된 세포를 포함하는 조성물이 제공된다.

[0362] 일부 측면에서, 본 개시내용은 세포를 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드(예를 들어, c-Jun-항-ROR1 CAR 작제물)로 형질감염시키는 단계를 포함하는, 키메라 항원 수용체를 발현하는 세포를 제조하는 방법을 제공한다. 일부 측면에서, 세포는 T 세포, B 세포, 조절 T 세포(Treg), 중앙 침윤 림프구(TIL), 자연 살해(NK) 세포, 자연 살해 T(NKT) 세포, 줄기 세포, 유도된 만능 줄기 세포, 및 이의 임의의 조합을 포함한다.

[0363] 일부 측면에서, 본 개시내용은 적합한 조건 하에 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드 또는 본원에 개시된 벡터 또는 본원에 개시된 폴리캡티드를 포함하는 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 키메라 항원 수용체를 발현하는 세포를 증대시키는 방법을 제공한다.

[0364] 일부 측면에서, 본원에 개시된 치료 방법은 적어도 하나의 추가 치료제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 추가 치료제는 화학치료 약물, 표적 항암 치료법, 중앙용해 약물, 세포독성제, 면역 기반 치료법, 사이토카인, 외과적 시술, 방사선 시술, 공동자극 분자의 활성화제, 면역 체크포인트 억제제, 백신, 세포 면역 치료법, 또는 이의 임의의 조합을 포함한다. 일부 측면에서, 면역 체크포인트 억제제는 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-LAG-3 항체, 항-CTLA-4 항체, 항-GITR 항체, 항-TIM3 항체, 또는 이의 임의의 조합을 포함한다.

[0365] 키트

- [0366] 본 개시내용은 또한 (i) 본 개시내용의 항-ROR1 CAR, c-Jun 및/또는 EGFRt 단백질을 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드(예를 들어, c-Jun-항-ROR1 CAR 작제물), 본원에 기재된 하나 이상의 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 항-ROR1 CAR, c-Jun 및/또는 EGFRt)를 암호화하는 하나 이상의 벡터, 또는 폴리뉴클레오티드(들) 또는 벡터(들)를 포함하는 조성물, 및 선택적으로 (ii) 사용 지침, 예를 들어 본원에 개시된 방법에 따른 사용 지침을 포함하는 키트 또는 제조 제품을 제공한다.
- [0367] 본 개시내용은 또한 (i) 본 개시내용의 항-ROR1 CAR, c-Jun 및 EGFRt 단백질을 발현하도록 유전적으로 변형된 세포, 즉 본 개시내용의 항-ROR1 CAR, c-Jun 폴리펩티드, 및/또는 EGFRt 단백질을 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드, 또는 본원에 기재된 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 하나 이상의 벡터를 포함하는 세포(예를 들어, T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 자연 살해 T(NKT) 세포, 또는 ILC 세포), 또는 세포를 포함하는 약학 조성물, 및 선택적으로 (ii) 사용 지침을 포함하는 키트를 제공한다.
- [0368] 일부 측면에서, 키트 또는 제조 제품은 적어도 본 개시내용의 항-ROR1 CAR, c-Jun 폴리펩티드, 및/또는 EGFRt 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 벡터, 본 개시내용의 항-ROR1 CAR, c-Jun 폴리펩티드 및/또는 EGFRt 단백질을 발현하도록 유전적으로 변형된 세포, 또는 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드, 벡터 또는 세포를 포함하는 조성물(예를 들어, 약학 조성물)을 하나 이상의 용기에 포함한다.
- [0369] 일부 측면에서, 키트 또는 제조 제품은 적어도 본 개시내용의 항-ROR1 CAR, c-Jun 폴리펩티드 및 EGFRt 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 벡터, 본 개시내용의 항-ROR1 CAR, c-Jun 및 EGFRt을 발현하도록 유전적으로 변형된 세포, 또는 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드, 벡터 또는 세포를 포함하는 조성물(예를 들어, 약학 조성물), 및 선택적으로 브로셔를 포함한다.
- [0370] 당업자는 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드, 벡터, 세포 및 조성물, 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 벡터 또는 세포를 포함하는 약학 조성물, 또는 이의 조합이 당분야에 잘 알려진 확립된 키트 형식 중 하나에 용이하게 포함될 수 있음을 쉽게 인식할 것이다.
- [0371] 일부 측면에서, 키트 또는 제조 제품은, 예를 들어 본 개시내용의 항-ROR1 CAR, c-Jun 폴리펩티드 및 EGFRt 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 벡터, 또는 폴리뉴클레오티드, 벡터를 포함하는 조성물(예를 들어, 약학 조성물)을 건조 형태로 용기(예를 들어, 유리 바이알)에, 및 선택적으로 용매와 함께 바이알에 포함한다.
- [0372] 일부 측면에서, 키트 또는 제조 제품은, 예를 들어 본 개시내용의 항-ROR1 CAR, c-Jun 펩티드 및 EGFRt 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 벡터, 또는 폴리뉴클레오티드, 벡터를 포함하는 조성물(예를 들어, 약학 조성물)을 적어도 하나의 용기에, 및 형질감염 시약을 또 다른 또는 추가 용기에 포함한다.
- [0373] ***
- [0374] 본 개시내용의 실시는 달리 표시되지 않는 한 당분야의 기술 내에 있는 세포 생물학, 세포 배양, 분자 생물학, 트랜스제닉 생물학, 미생물학, 재조합 DNA 및 면역학의 통상적인 기술을 사용할 것이다. 이러한 기술은 문헌에 충분히 설명되어 있다. 예를 들어 문헌(Sambrook 등, ed. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook 등, ed. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) *DNA Cloning*, Volumes I 및 II; Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; Mullis 등 U.S. 특허 번호 4,683,195; Hames 및 Higgins, eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames 및 Higgins, eds. (1984) *Transcription And Translation*; Freshney (1987) *Culture Of Animal Cells* (Alan R. Liss, Inc.); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press) (1986); Perbal (1984) *A Practical Guide To Molecular Cloning*; the treatise, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu 등, eds., *Methods In Enzymology*, Vols. 154 and 155; Mayer 및 Walker, eds. (1987) *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Academic Press, London); Weir 및 Blackwell, eds., (1986) *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV; *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986);); Crooke, *Antisense drug Technology: Principles, Strategies and Applications*, 2nd Ed. CRC Press (2007) 및 in Ausubel 등 (1989) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.))을 참고한다.
- [0375] 하기 실시예는 제한으로서가 아니라 예시로서 제공된다.

[0376] 실시예

표 7

c-Jun-항-ROR1 CAR 서열

c-Jun-항-ROR1 CAR		
서열 번호	설명	서열
57	전체 서열 1, 198aa	MTAKMETTFYDDALNASFLPSESGPYGYSNPKILKQSMTLNLADPVGSLKPHLRAKNSDLLT SPDVGLLKLASPELERLIIQSSNGHITTTPTTQFLCPKNVTDEQEGFAEGFVRALAEHLSQ NTLPSVTSAAQPVNGAGMVAPAVASVAGGSGGGFSASLHSEPPVYANL SNFNPGALSSGGG APSYGAAGLAFPAPQPPQQPPHLLPQQMPVQHPRLQALKEEPQTVPEMPGETPPLSPIDME SQERIKAEKRRMRNRIAASKCRKKLERIARLEEKVKTLKAQNSELASTANMLREQVAQLKQ KVMNHVNSGCQLMLTQQLQTFGSGATNFSLLKQAGDVEENPGMVLQTVFISLLLWISGAY GQEQLVESGGRLVTPGSLTSLCKASGDFSAAYMSWVRQAPGKLEWIIAT IYPSGGKTYIA TWVNGRFTI SSDNAQNTVDLQMNSLTAADRATYFCARDSYADDGALFN I WGPGLVTI SSGG GSGGGGSGGGSELVLTQSPSVSAALGSPAKITCTLSSAHKTDITDWYQQLQGEAPRYLMQ VQSDG SYTKRPGVPDRFSGSSGADRYLIIPSVQADDEADYCYGADYIGGYVFGGGTQLTVT GGGSGGKPCPPCKPMFVVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFVVKRGRKLLYIFKQPFMRPV QTTQEEGDCSRFPPEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHGHDGLYQGLSTATKDTY DALHMQUALPPRSGATNFSLLKQAGDVEENPGMMLLVTSLCELPHPAFLIIPKVCNGIG IGEFKDSLINATNIKHFKNCTSI SGLHILPVAFRGSFTHITPPLDPQELDILKTVKEITG FLLIQAWPENRDLHAFENLEIRGRTKQHGFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDV IISG NKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGEPRDCVSCR NVSIRGECVDKCNLLEGEPRFVENSEC IQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGP HCVKTCPAGVMGENTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCCTGPGLGECPTNGPKIPS IATGMV GALLLLVVALGIGLFMRRR
1	c-Jun 331aa aa 1-331	MTAKMETTFYDDALNASFLPSESGPYGYSNPKILKQSMTLNLADPVGSLKPHLRAKNSDLLT SPDVGLLKLASPELERLIIQSSNGHITTTPTTQFLCPKNVTDEQEGFAEGFVRALAEHLSQ NTLPSVTSAAQPVNGAGMVAPAVASVAGGSGGGFSASLHSEPPVYANL SNFNPGALSSGGG APSYGAAGLAFPAPQPPQQPPHLLPQQMPVQHPRLQALKEEPQTVPEMPGETPPLSPIDME SQERIKAEKRRMRNRIAASKCRKKLERIARLEEKVKTLKAQNSELASTANMLREQVAQLKQ KVMNHVNSGCQLMLTQQLQTF
59	P2A 절단 후 c-Jun (잔류물은 상자로 표시함)	MTAKMETTFYDDALNASFLPSESGPYGYSNPKILKQSMTLNLADPVGSLKPHLRAKNSDLLT SPDVGLLKLASPELERLIIQSSNGHITTTPTTQFLCPKNVTDEQEGFAEGFVRALAEHLSQ NTLPSVTSAAQPVNGAGMVAPAVASVAGGSGGGFSASLHSEPPVYANL SNFNPGALSSGGG APSYGAAGLAFPAPQPPQQPPHLLPQQMPVQHPRLQALKEEPQTVPEMPGETPPLSPIDME SQERIKAEKRRMRNRIAASKCRKKLERIARLEEKVKTLKAQNSELASTANMLREQVAQLKQ KVMNHVNSGCQLMLTQQLQTF GSGATNFSLLKQAGDVEENPG
56	P2A 22aa aa 332-353	GSGATNFSLLKQAGDVEENPG
17	hIgK 20aa aa 354-373	MVLQTVFISLLLWISGAYG
60	P2A 절단 후 hIgK	P MVLQTVFISLLLWISGAYG(P2A 잔류 잔기는 이중 밑줄침

[0377]

52	scFv 248aa aa 374-621	QEQLVESGGRLVTPGGSLTLSCKASGFDFAAYMSWVRQAPGKLEW IATIYPSGKTYAT WVNGRFTI SSDNAQNTVDLQMNSLTAADRATYFCARDSYADDGALFN I WGPGLVTI SSSGG GSGGGGSGGGSELVLTQSPSVSAALGSPAKITCTLSSAHKTDITD WYQQLQGEAPRYLMQV QSDGSYTKRPGVDRFSGSSSGADRYLI I P SVQADDEADY YCGADY I GGYVFGGQTQ LTVTG
16	링커 5aa aa 622-626	GGGSG
15	스페이서 1 9aa aa 627-635	KPCPPCKCP
54	CD28 막형단 도메인 28aa aa 636-663	MFWLVVVVGGVLACYSLLVTVAF I IFWV
53	4-1BB 42aa aa 664-705	KRGRKKLLY I F K Q P F M R P V Q T T Q E E D G C S C R F P E E E E G G C E L
55	CD3z 112aa aa 706-817	RVKFSRSADAPAYQQGQNL YNELNLGRREYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSE I G M K G E R R R G K G H D G L Y Q L S T A T K D T Y D A L H M Q A L P P R
61	P2A 절단 후 CD3z	RVKFSRSADAPAYQQGQNL YNELNLGRREYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSE I G M K G E R R R G K G H D G L Y Q L S T A T K D T Y D A L H M Q A L P P R S G A T N F S L L K Q A GDVEENPGP(링커-P2A 잔류물은 상자로 표시함)
56	SG 링커 - P2A 21aa aa 819-838	SG-ATNFSLLKQAGDVEENPGP
18	GMCSFR-알파-SP 22aa aa 839-860	MLLVTSLLLCELPHPAFL I P
62	P2A 절단 후 GMCSFR-알파-SP	PMLLVTSLLLCELPHPAFL I P(P2A 잔류 잔기는 이중 밑줄침)
3	EGFRt 338aa aa 860-1,198	RKVCNG I G I G E F K D S L S I N A T N K H F K N C T S I S G D L H I L P V A F R G D S F T H T P P L D P Q E L D I L K TVKE I T G F L L I Q A W P E N R T D L H A F E N L E I I R G R T K Q H G Q F S L A V V S L N I T S L G L R S L K E I S D G D V I I S G N K N L C Y A N T I N W K K L F G T S G Q K T R I I S N R G E N S C K A T G V C H A L C S P E G C W G P E P R D C V S C R N V S R G R E C V D R C N L L E G E P R E F V E N S E C I Q C H P E C L P Q A M N I T C T G R G P D N C I Q C A H Y I D G P H C V K T C P A G V M G E N N T L V W K Y A D A G H V C H L C H P N C T Y G C T G P G L E G C P T N G P K I P S I A T G M V G A L L L L V V A L G I G L F M R R R
58	전체 서열(프로모터 포함) 4,022 개 뉴클레오티드	TGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGGATCAAGGTTAGGAACAGAGACAGCAG AATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGTAAGCAGTTCCTGCCCGGCTCAGGCCAAGAACA GTTGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGTAAGCAGTTCCTGCCCGGCTC AGGCCAAGAACAGATGGTCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATC AGATGTTCCAGGGTGCCCAAGGACCTGAAATGACCTGTGCCTTATTGAACTAACCAAT CAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTTCGCGGCTTCTGCTCCCGAGCTCAATAAAGAGCCACA ACCCCTCACTCGCGGATCAGAACCTCTTACGAGTCGGCTAGCGCCGCCACCATGACAGCC AAGATGGAACCACATTCTACGACGACGCCCTGAAACGCCCTATTCTGCTTCTGAGAGCGG ACCTTACGGCTACAGCAATCCTAAGATCCTGAAACAGAGCATGACCTTAACCTGGCTGATC CTGTTGGAAGCCTGAAACCTCACCTGAGACCAAAAACAGCGACCTGCTACCCAGCCCTGAT GTGGGCTGCTGAAGCTGGCTCTCCAGAGCTGGAACGGTGATCATCCAGAGCAGCAACGG

[0378]

	<p>CCACATCAGAACCACCCTACCCCTACACAATTCTGTGCCCTAAGAACGTGACCGACGAGC AGGAGGGCTTGGCGAAGGCTTTGTGGGGCCCTGGCAGAAGTGCACCTCAGAACACCCTG CCTAGCGTGACCTCCGCCGCCAGCCTGTCAACGGCGCGGAATGGTGGCCCTGCCGTGGC TTCTGTGGCCGGCGGAGCGGCAGCGGGGATTACGGCCTCTCTGCACTCTGAGCCTCCTG TCTACGCCAATCTGTCTAATTTCAACCCCGGAGCCCTGTCCAGCGCGGCGGAGCTCCTAGC TACGGCGCTGTGGACTGGCTTCCCGCCAGCCCAACAGCAGCAGCAGCCTCCACACCA CCTGCCCCAGCAGATGCCGTGCAGCACCTAGACTGCAGGCCCTGAAGGAAGAACCACAAA CAGTGGCTGAGATGCCGTGGGAGACACCTCCTGAGCCCATCGACATGGAAGCCAGGAG CGGATCAAGGCCGAGAGAAGAGAATGCGGAACAGAATCGCCGCTAGCAAGTGCAGAAAGCG GAAGTGGAAAGAATCGCCAGACTGGAAGAGAAGGTGAAGACCCCTGAAAGCCCAAAATAGCG AGCTGGCCAGCACCCCAACATGCTGCGGGAACAGGTGGCCAGCTGAAGCAGAAGGTGATG AACCACTGAACTCTGGTTGTCACTGATGCTGACCCAGCAGCTCCAGACCTTCCGCTCCGG TGCAACGAACTCAGCTGCTGAAGCAGCGGAGATGTTGAGGAAAATCCAGGTCCCATGG TCTTGCAGACTCAAGTATTATATCCCTTTGTCTGATCTCTGGAGCTTACGGCCAGGAA CAGCTCGTCAAGCGCGGAGACTGGTGACACTGGCGGAGCCTGACCCCTGAGCTGCAA GGCCAGCGGCTTCGACTTCAGCGCTACTACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAGG GACTGGAATGGATCGCCACCTACTACCCAGCAGCGGCAAGACCTACTACGCCACTGGGTG AACGGACGGTTCACCATCTCCAGCACAACGCCAGAACCCGTGGACCTGCAGATGAACAG CCTGACAGCCCGGAGCGGGCCACTACTTTTGGCTCGGGACAGCTACGCCGAGCAGCGGG CCCTGTTCAACATCTGGGCCCTGGCACCTGGTGACAATCTCTAGCGCGGAGGCGGATCT GGTTGGCGGAGGAGTGGCGGGAGGATCTGAGCTGGTGTGACCCAGAGCCCTCTGTGTCT TGCTGCCCTGGAAAGCCCTGCCAAGATCACCTGTACCTGAGCAGCGCCACAAAGCCGACA CCATCGACTGGTATCAGCAGTGCAGGGCGAGGCCCCAGATACCTGATGCAGGTGCAGAGC GACGGCAGCTACACCAGAGGCCAGGGCTGCCGACAGGTTAGCGGATCTAGCTCTGGCGC CGACCCGCTACCTGATCATCCAGCGTGCAGGGCGATGACAGGGCCGATTACTACTGTGGCG CCGACTACATCGCGGCTACGTGTTCCGGGAGGACCCAGCTGACCGTGCAGCGGTGGCGGA GGTTTAGGCAAAACCGTCCCTCCGTGCAAGTGTCTATGTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGG AGGGGTGTGGCTGTACAGCTGTGTGTCACCGTGGCTTTCATCTTTTGGGTGAAAC GGGGCAGAAAGAACTCTGTATATATCAAAACACCATTTATGAGACCAGTACAACACTACT CAAGGAGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACCTGGC GGTGAAGTTACAGCAGAAGCGCCGACGCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAATCAGCTGTACA ACGAGCTGAACCTGGCAGAAAGGAGTACGACGCTCTGGATAAGCGGAGAGGCCGGGAC CCTGAGATGGCGGCAAGCCTCGGCGGAAGAACCCAGGAAGGCTGTATAACGAACTGCA GAAAGACAAGATGGCCGAGGCTACAGCGAGATCGGATGAAGGGCGAGCGGAGGCGGGCA AGGGCCAGCAGCGGCTGTATCAGGGCTGTCCACCGCCACCAAGGATACCTAGCAGCCCTG CACATGAGGGCTTCCGCCAAGTCCGAGCCACTAATCTCCCTGTGAAACAAGCAGG GGATGTCGAAGAGAATCCCGGGCAATGCTTCTCTGGTGACAAGCCCTTCTGCTCTGTAAT TACCACACCAGCATCTCTCTGATCCACGCAAGGTGCAACGGAATAGGTATTGGTGAA TTTAAGGACTCACTTCCATAAATGTACGAATATTAACACACTCAAAAATCGCACCTCCAT CAGTGGGATCTCCACATCTCCCGTGGCATTAGGGGTGACTCCTTACACATACTCCTC CTCTGGACCCACAAGAACTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTTTGTGTG ATTCAAGCTTGGCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCTTTGAGAACCTAGAAATCATAGG CGGCAGGACCAAGCAGCATGGACAGTTTTCTCTGTGCTGTGAGCCGTAACATAACATCCT TGGGATTAGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGTGGAGATGTGATAATTCAGGAAACAAAAAT TTGTGCTATGCAATAACAATAAAGTGGAAAAAATGTTGGGACCTCCGGCCAGAAAACCAA AATTATAAGCAACAGAGGGGAAAACAGTGCAGGCCACAGGCCAGGTTGCGCATGCGTGTG GCTCCCCGAGGGCTGTGGGGCCGGAGCCAGGATTGCGTGTCTTGGCGAATGTCAGC CGAGGCAGGGAATGCGTGGACAAGTGCACCTTCTGGAAGGGAGCCAAAGGGAGTTGTGGA GAACTCTGAGTGCATACAGTGCACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCA</p>
--	--

[0379]

	<p>CAGGACGGGACCAGACAAGTATCCAGTGTGCCACTACATTGACGGCCCCACTGCGTC AAGACTTCCCGCAGGAGTCAATGGGAGAAAACAACACCTGGTCTGGAAGTACGCAGAGCG CGGCCATGTGTCCACTGTGCCATCAAATGCACCTACGGATGCAGTGGGCCAGGTCTTG AAGGCTGTCCAACGAACGGGCTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGGGGCCCTC CTCTGTGCTGTGGTGGCCCTGGGGATCGGCCTTTCATGCGCGAAGGTGA</p>
64	<p>MND 프로모터</p> <p>TGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGGATCAAGTTAGGAACAGAGACAGCAG AATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACA GTTGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGTAAGCAGTTCTGCCCCGGCTC AGGGCCAAGAACAGATGGTCCCAAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTCTAGAGAACCATC AGATGTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCTGTGCCTTATTGAACTAACCAT CAGTTCGCTTCTGCTTCTGTTCGCGGCTTCTGCTCCCGAGCTCAATAAAGAGCCACA ACCCTCACTCGGC</p>

[0380]

[0381] 실시예 1: c-Jun을 과발현하는 항-ROR1 CAR T 세포의 종양 세포를 사멸시키는 능력 분석

[0382] 본원에 기재된 항-ROR1 CAR T 세포(예를 들어, c-Jun을 과발현함)의 ROR1-의존적 생물학적 활성의 특성규명을 시작하기 위해, CAR T 세포의 종양 세포를 사멸시키는 능력을 평가하였다. 간략하게, c-Jun을 과발현하는 항-ROR1 CAR T 세포(본원에서 "c-Jun 과발현 항-ROR1 CAR T 세포"로 지칭됨)를 ROR1⁺ NSCLC 세포주("H1975") 또는 인간 ROR1 클러스터링된 규칙적 간격의 짧은 회문 반복(CRISPR)/CRISPR-연관 단백질 9(Cas9)를 통해 인간 ROR1 이 녹아웃된 H1975("H1975-ROR1KO")와 공동인큐베이션한다. 비교로서, 종양 세포를 용해시키지 않아야 하는 형

질도입되지 않은 "모의" T 세포(즉, 항-ROR1 scFv를 발현하지 않음) 및 c-Jun을 과발현하지 않는 "대조군" 항-ROR1 CAR T 세포를 또한 H1975 또는 H1975-ROR1KO 세포와 공동인큐베이션한다. H1975 및 H1975-ROR1KO 세포 둘 모두 NuLight Red(NLR; 핵 제약 mKate2)를 발현하여 용해되지 않은 세포를 정량할 수 있다. 상이한 CAR T 세포를 120시간 동안 1:1의 효과기-대-표적(E:T) 세포 비로 인큐베이션하였다.

[0383] 도 1a에 나타난 바와 같이, c-Jun 과발현-항-ROR1 CAR T 세포는 대조군 항-ROR1 CAR T 세포와 유사하게 ROR1 발현-의존적 방식으로 종양 세포의 세포용해를 매개하였다. 중요하게는, 항-ROR1 CAR T 세포에 의한 표적 음성 H1975-ROR1 녹아웃 세포의 사멸은 관찰되지 않았다(도 1b). 이들 결과는 c-Jun을 과발현하는 항-ROR1 CAR T 세포가 보다 전통적인 항-ROR1 CAR T 세포(예를 들어, c-Jun을 과발현하지 않음)와 비교하여 종양 세포를 사멸시키는 데 효율적임을 실증한다.

[0384] **실시예 2: c-Jun을 과발현하는 항-ROR1 CAR T 세포가 선택적 사이토카인 분비를 생성하는 능력 분석**

[0385] 본원에 기재된 항-ROR1 CAR T 세포의 기능적 능력을 추가 특성규명하기 위해, c-Jun을 과발현하는 -항-ROR1 CAR T 세포 또는 대조군 항-ROR1 CAR T 세포(즉, c-Jun을 과발현하지 않음)를 H1975 또는 H1975-ROR1KO 종양 세포와 24시간 동안 1:1의 효과기 대 표적(E:T) 세포 비로 24시간 동안 공동인큐베이션하였다. 그 후, IL-2 및 IFN- γ 정량을 위해 상이한 인큐베이션 조건으로부터 상청액을 수집하였다. 사이토카인의 농도는 메조 스케일 디스크 커버리(MSD) U-Plex를 사용하여 측정하였다.

[0386] 도 2a 및 2c에 나타난 바와 같이, ROR1 항원에 반응하여, 대조군 항-ROR1 CAR T 세포 및 c-Jun 과발현-항-ROR1 CAR T 세포 둘 모두 상당한 양의 IL-2 및 IFN- γ 를 모두 생성하였다. 그러나, 사이토카인 생성은 c-Jun을 과발현하는 항-ROR1 CAR T 세포에서 훨씬 더 컸다. 사이토카인은 H1975-ROR1KO 세포의 존재 하에 배양될 때 대조군 항-ROR1 CAR T 세포 또는 c-Jun 과발현-항-ROR1 CAR T에 의해 분비되지 않았다(도 2b 및 2d).

[0387] 종합적으로, 이들 데이터는 c-Jun 과발현-항-ROR1 CAR T 세포만이 항원-의존적 방식으로 종양 세포를 용해시키고 사이토카인을 분비한다는 점에서, c-Jun 과발현-항-ROR1 CAR T 세포의 선택적 생물학적 활성을 실증하였다. 또한, c-Jun 과발현 항-ROR1 CAR T 세포에 의한 표적 의존적 사이토카인 분비는 c-Jun을 과발현하지 않는 대조군 항 ROR1 CAR-T 세포와 비교하여 향상되었다.

[0388] **실시예 3: c-Jun을 과발현하는 항-ROR1 CAR T 세포의 사이토카인 의존적 증식 분석**

[0389] c-Jun의 과발현이 사이토카인에 대한 항-ROR1 CAR T 세포의 민감도에 임의의 영향을 미쳤는지 결정하기 위해, 대조군 항-ROR1 CAR T 세포(예를 들어, c-Jun을 과발현하지 않음) 및 c-Jun 과발현-항-ROR1 CAR T 세포를 하기 조건 중 하나 하에 Grex 24 웰 플레이트(1 x 10⁶개 세포/웰)에서 별도 배양하였다: (i) T-세포 배지(OpTmizer 기본 배지, OpTmizer 세포 보충물, 면역 세포 혈청 대체물), 2-mM L-글루타민, 1x GlutaMAX) 단독, (ii) 200 IU/ml의 IL-2가 보충된 T 세포 배지, 또는 (iii) 1200 IU/ml IL-7 및 200 IU/mL IL-15가 보충된 T 세포 배지. 형질도입하지 않은("모의") 세포도 이러한 조건 하에 배양하여 대조군으로 사용했다. 제7일 및 제14일에, 각 배양 조건에서 T 세포의 총 수를 계수하고, 제7일로부터의 세포를 후속 배양 라운드를 위해 1 x 10⁶개 세포/웰로 다시 파종하였다. 분석 기간에 걸쳐 각 샘플에 대해 배지 조건을 유지했다.

[0390] 도 3a에 나타난 바와 같이, 사이토카인의 부재 하에, T 세포 중 어느 것도 증대될 수 없었다. 사이토카인 지원으로 일시적으로 제한된 수까지 증대된 모의 또는 대조군 항-ROR1 CAR T 세포와 비교하여, c-Jun 과발현-항-ROR1 CAR T 세포는 연구에 걸쳐 유지된 더 우수한 증식 능력을 나타냈다(도 3b 및 3c). 이들 결과는 c-Jun의 과발현이 항-ROR1 CAR T 세포의 다양한 기능적 특성(예를 들어, 사이토카인 민감성)을 개선할 수 있음을 추가 실증한다.

[0391] **실시예 4: 만성 항원 자극 후 항-ROR1 CAR T 세포의 항종양 특성에 대한 c-Jun 과발현의 효과 분석**

[0392] 만성 감염 및 암에서, T 세포는 지속적인 항원 노출을 통해 고갈되어 세포용해 활성 및 사이토카인 분비와 같은 T 세포 효과기 기능의 점진적인 손실을 야기할 수 있다. 따라서, c-Jun의 과발현이 연장된 항원 자극 후 항-ROR1 CAR T 세포의 효과기 기능에 임의의 영향을 미치는지 여부를 평가하기 위해, c-Jun 과발현-항-ROR1 CAR T 세포 및 대조군 항-ROR1 CAR T 세포(예를 들어, c-Jun을 과발현하지 않음)를 ROR1⁺ A549 NSCLC 종양 세포에 대한 반복 노출로 만성 자극하였다. CAR T 세포를 2일마다 1:1 E:T 비로 새로운 표적 세포와 함께 체플레이팅함으로써 만성 항원 노출을 보장하였다. 만성 자극 7일 후, CAR T 세포를 수집하고 A549-NLR(E:T 세포 비 1:1) 또는 H1975-NLR(E:T 1:5)과 함께 공동인큐베이션하였다. 표적 세포의 용해는 검정 설정의 0시간 시점에 대해 정규화된 총 NLR 강도를 추적하여 평가하였다. MSD에 의한 IFN- γ , IL-2 및 TNF- α 정량을 위해 24시간 상청액을 수집

하였다.

[0393] 도 4a에 나타난 바와 같이, 반복된 항원 자극 후에도 c-Jun 과발현 항-ROR1 CAR T 세포는 대조군 항-ROR1 CAR T 세포(예를 들어, c-Jun을 과발현하지 않음)와 비교하여 ROR1⁺ 종양 세포를 효과적으로 용해시킬 수 있었다. 유사하게, c-Jun 과발현-항-ROR1 CAR T 세포는 또한 적어도 증가된 수준의 IFN- γ 를 생성하였다(도 4b). 이러한 결과는 c-Jun의 과발현이 만성 항원 자극의 존재 하에 CAR T 세포가 효과기 기능을 유지하도록 도울 수 있음을 실증한다.

[0394] **실시예 5: c-Jun을 과발현하는 만성 자극된 항-ROR1 CAR T 세포에서 고갈 연관 전사 프로파일 분석**

[0395] T 세포 고갈에 대한 c-Jun 과발현의 효과를 추가 이해하기 위해, 벌크 RNA-시퀀싱을 7일 만성 자극 시점으로부터의 CAR⁺ T 세포(n=3 공여체, 도 5a에 기재됨) 상에서 수행하였고 대조군 항-ROR1 CAR T 세포(예를 들어, c-Jun을 과발현하지 않음) 및 c-Jun 과발현-항-ROR1 CAR T 세포 사이에서 차별적으로 발현된 유전자를 확인하였다. 문헌(Beltra JC, 등, *Immunity*. 2020;52(5):825-841.e8; Zhang L, 등, *Nature*. 2018;564(7735):268-272)으로부터의 T 세포 고갈 모델에서 유전자 세트를 사용하는 차별적으로 발현된 유전자에 대한 유전자 세트 농축 분석(GSEA)은 c-Jun 과발현-항-ROR1 CAR T 세포에서 하향 조절된 유전자가 (Texterm_UP[Beltra 2020으로부터의 유전자 세트] 및 Tex_multiTumors[Zhang 2018으로부터의 유전자 세트])에서 상향조절된 유전자 세트에 대해 유의하게 농축됨을 나타내었다. 반대로, c-Jun 과발현 항-ROR1 CAR T 세포에서 상향조절된 유전자는 T 세포 증식 유전자를 함유하는 유전자 세트(TexProg2_UP[Beltra 2020으로부터의 유전자 세트]) 및 말단 고갈 표현형에서 하향조절된 유전자 세트(Texterm_DOWN[Beltra 2020으로부터의 유전자 세트])에 대해 유의하게 농축되었다(도 5a). 이러한 데이터는 함께 고갈 유전자 발현 특징부를 감소시키고 T 세포 증식과 연관된 유전자 발현을 유지하는 데 있어서 c-Jun의 영향을 표시한다.

[0396] c-Jun의 영향을 더 잘 이해하기 위해 트랜스크립토 및 에피토프(CITE)-seq의 단일 세포 세포성 인덱싱을 2명의 공여체의 제7일 CAR⁺ T 세포 상에서 수행했다(도 5b-도 5d). 전사(및 단백질) 프로파일에 기반한 세포 클러스터링은 문헌 기반 고갈 마커에 대해 우선적으로 농축된 세포를 갖는 클러스터 3을 확인하는 것을 도왔다(도 5b). 클러스터 3의 빈도는 c-Jun의 첨가로 두 공여체 모두에서 감소하여 고갈에 대한 c-Jun의 효과를 예시하였다(도 5d). 또한, 보다 분화된/활성화된 마커(예컨대 4-1BB, 그랜자임 A[GZMA](도 5c))가 농축된 클러스터 0 및 5(도 5b)도 c-Jun의 첨가로 빈도가 감소하였다(도 5d).

[0397] **실시예 6: 저수준의 ROR1을 발현하는 NSCLC 세포주에 대한 c-Jun을 과발현하는 항-ROR1 CAR T 세포의 반응성 분석**

[0398] c-Jun 과발현이 항원을 인식하는 항-ROR1 CAR T 세포에 대해 임의의 영향을 미치는지 여부를 평가하기 위해, c-Jun 과발현-항-ROR1 CAR T 세포 및 대조군-항-ROR1 CAR T 세포(즉, c-Jun을 과발현하지 않음)를 다양한 수준의 세포 표면 ROR1을 발현하도록 조작된 H1975 세포와 공동인큐베이션하였다(도 6). 다양한 강도로 돌연변이된 뇌심근염 바이러스 내부 리보솜 진입 부위 요소의 세트를 사용하여 인간 ROR1의 상대적인 발현을 광범위하게 제어하고 H1975-ROR1KO 세포주에 도입했다(Koh 2013. *PLoS One*, 8(12):e82100.doi:10.1371). 세포주에 의한 ROR1의 발현 수준을 기하학적 MFI로 나타낸다(도 6). 세포를 148시간의 과정에 걸쳐 공동인큐베이션하고 다양한 시점에서 NLR-양성 세포의 총 수를 계수하고 0시간 시점에서의 계수에 대해 정규화하여 정규화된 표적 사멸을 계산했다. 초기 항원 자극 24시간 후 상청액을 수집하고 IL-2 및 IFN- γ 의 양을 메조 스케일 디스커버리(MSD) U-Plex를 사용하여 정량했다.

[0399] 도 7에 나타난 바와 같이, c-Jun 과발현-항-ROR1 CAR T 세포 및 대조군-항-ROR1 CAR T 세포(예를 들어, c-Jun을 과발현하지 않음)는 ROR1 항원 밀도와 관계없이 유사한 비율로 H1975 세포를 용해시켰다. IL-2 및 IFN- γ 수준이 정량될 때 유사한 결과가 관찰되었다(도 8a 및 8b). 이러한 결과는 c-Jun 과발현이 항-ROR1 CAR T 세포가 효과기 기능을 발휘하는 데 필요한 항원 밀도 역치를 실질적으로 변경하지 않음을 제시한다.

[0400] **실시예 7: c-Jun을 과발현하는 -항-ROR1 CAR T 세포의 생체내 항종양 유효성 분석**

[0401] c-Jun의 과발현이 또한 생체내 CAR T 세포의 다양한 기능적 특성을 개선할 수 있는지 여부를 평가하기 위해, c-Jun 과발현-항-ROR1 CAR T 세포의 항종양 활성을 이종이식편 동물 모델에서 시험했다. 간략하게, 종양 세포(즉, ROR1-양성 H1975 NSCLC 세포주)를 NOD scid 감마; NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ(NSG) 마우스의 옆구리에 피하 이식하였다. 종양이 약 100 mm³에 도달했을 때, 마우스에 하기 중 하나를 정맥내 주입했다: (i) 형질도입되지 않은 모의 T 세포, (ii) 대조군 항-ROR1 CAR T 세포(예를 들어, c-Jun을 과발현하지 않음), 또는 (iii)

c-Jun 과발현-항-ROR1 CAR T 세포. 캘리퍼를 사용해서 종양 부피를 측정하여 항종양 활성을 평가하고 동물 체중을 측정하여 치료 관련 독성을 평가했다. 추가로, 총 6주 동안 T 세포 주입 24시간 후부터 시작하여 매주 수집한 말초 혈액의 유세포 측정을 사용하여 T 세포의 증대를 평가했다.

[0402] 도 9a 및 9c에 나타낸 바와 같이, 대조군 항-ROR1 CAR T 세포(예를 들어, c-Jun을 과발현하지 않음)로 처리된 동물은 초기에 종양 성장을 제어하는 것으로 보였지만 결국에는 종양에 굴복하여, 약 40%의 동물만이 실험 종료까지 생존하였다. 대조적으로, c-Jun 과발현-항-ROR1 CAR T 세포(예를 들어, c-Jun을 과발현함)로 처리된 동물은 훨씬 더 큰 종양 제어를 나타내었고 실험의 전체 기간에 걸쳐 생존했다. 개선된 항종양 데이터와 일치하게, c-Jun 과발현-항-ROR1 CAR T 세포(예를 들어, c-Jun을 과발현함)는 대조군 항-ROR1 CAR T 세포(예를 들어, c-Jun을 과발현하지 않음)와 비교하여 훨씬 더 큰 지속성 및 증대를 나타내었다(도 10). 이들 결과는 초기 시험관내 데이터를 확인시켜주며 본원에 기재된 c-Jun 과발현 항-ROR1 CAR T 세포가 보다 전통적인 항-ROR1 CAR T 세포(예를 들어, c-Jun을 과발현하지 않음)와 비교하여 훨씬 개선된 항종양 효과를 나타냄을 실증한다.

[0403] **실시예 8: 임상 개발**

[0404] ROR1-양성 재발성 및/또는 불응성 TNBC 및 NSCLC 환자에서 c-Jun 과발현-항-ROR1 CAR T 세포의 안전성, PK 및 항종양 활성을 평가하기 위해 설계된 FIH, 1상, 단일 아암, 공개 표지, 용량 증량 및 확대, 다기관 연구를 수행할 것이다. 1상 연구의 1차 목적은 재발성/불응성 TNBC 및 NSCLC 환자에서 c-Jun 과발현-항-ROR1 CAR T 세포의 안전성 및 내약성을 평가하고 c-Jun 과발현 항-ROR1 CAR T 세포의 RP2D를 결정하는 것이다. 1상 연구의 2차 목적은 c-Jun 과발현 항-ROR1 CAR T 세포의 항종양 활성을 평가하고 c-Jun 과발현 항-ROR1 CAR T 세포의 말초 혈액 샘플에서 PK(예를 들어, 증대 및 지속성)를 평가하는 것이다.

[0405] **제안된 1상 설계**

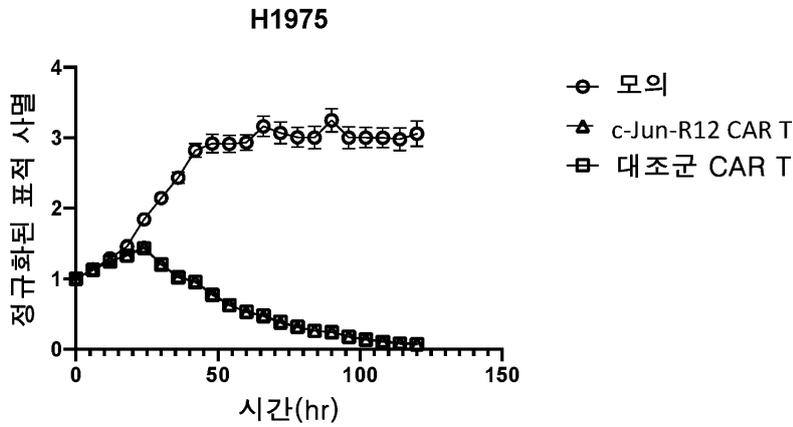
[0406] 이는 재발성 및/또는 불응성 TNBC 및 NSCLC 환자에서 c-Jun 과발현-항-ROR1 CAR T 세포의 안전성, PK 및 항종양 활성을 평가하기 위해 설계된 단일 아암, 공개 표지, 용량 증량 및 확대, 다기관 연구이다. 용량 증량 단계 동안에는 TNBC를 갖는 참가자만 등록받을 것이다; 확대 단계 동안 등록은 TNBC 및 NSCLC 연구 코호트 둘 모두에서 발생할 것이다.

[0407] 다른 자격 기준에 더하여, 면역조직화학에 의해 ROR1 양성이고 체크포인트 억제제 및 아브라산을 포함하는 2개 라인의 치료법을 실패한 TNBC를 갖거나 EGFR⁺ 및 ALK⁺ 질환 환자에 대한 표적화된 치료법을 포함하는 2개 라인의 치료법을 실패한 NSCLC를 갖는 참가자가 등록에 적격일 수 있다. 모든 적격성 기준을 충족하는 참가자가 등록될 것이고 제품 생성을 가능하게 하기 위해 백혈구성분채집술을 받을 것이다. 성공적인 제품 제조 후, 참가자는 치료 단계에 들어갈 것이며 1주기의 치료를 받을 것이다. 치료 주기는 3일 동안 플루다라빈 및 사이클로포스파미드를 사용한 림프구고갈 화학치료법에 이어 IV 투여되는 프로토콜에 정의된 용량 수준 중 하나로 단일 용량의 세포 제품을 포함할 것이다. 세포 제품은 의료 모니터와 논의 후 임상적 또는 병참 상황으로 인해 이 시기를 후일로 수정해야 하는 경우가 아니면 림프구고갈 화학치료법 완료 며칠 후에 투여할 것이다.

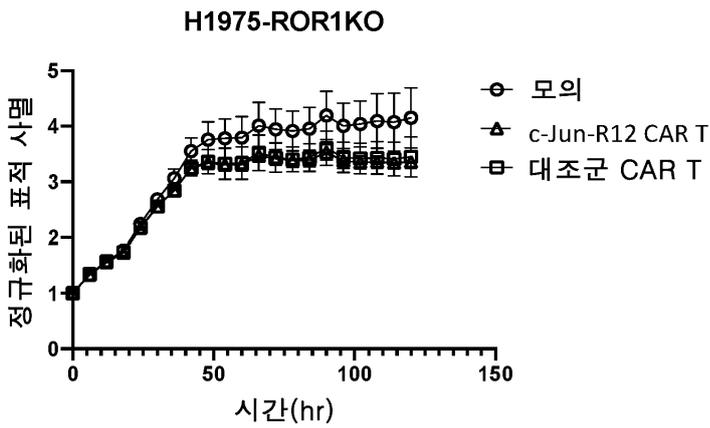
[0408] 참가자는 안전성, 질환 상태, 추가 항암 치료법 및 생존에 대해 세포 제품 투여 후 최대 2년 동안 추적할 것이다. c-Jun 과발현-항-ROR1 CAR T 세포를 받는 모든 참가자는 이 연구의 완료 또는 중단 시 후원 받는 장기 추적 조사(LTFU) 연구에 등록하도록 요청받을 것이다.

도면

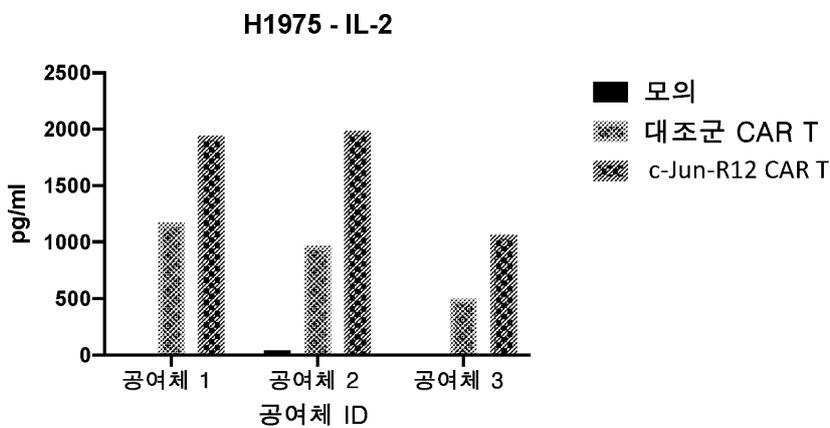
도면1a



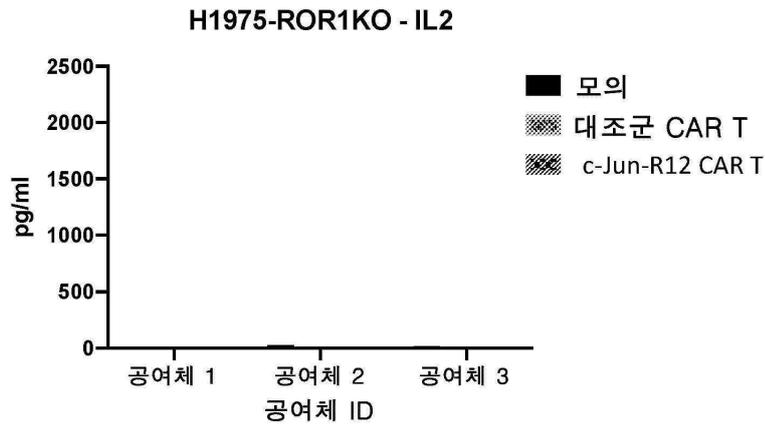
도면1b



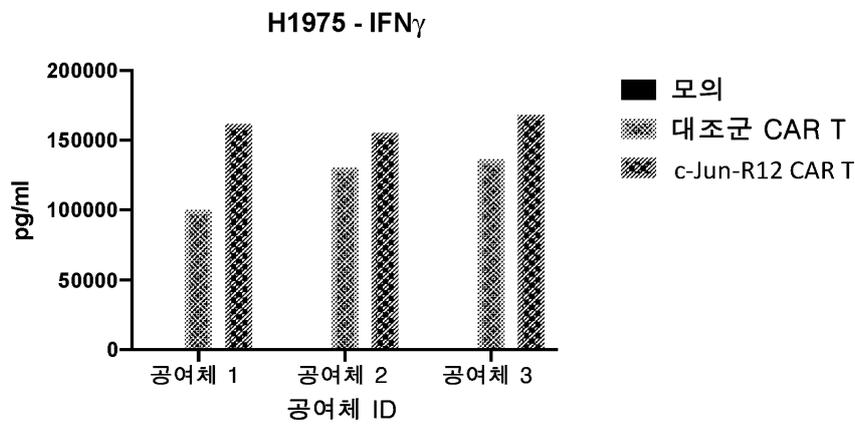
도면2a



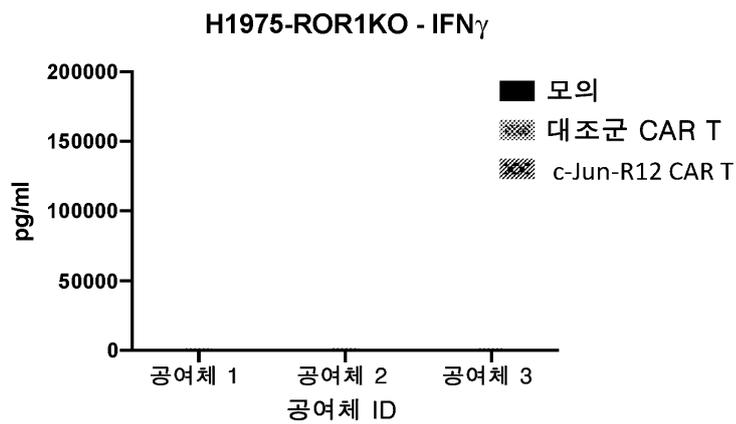
도면2b



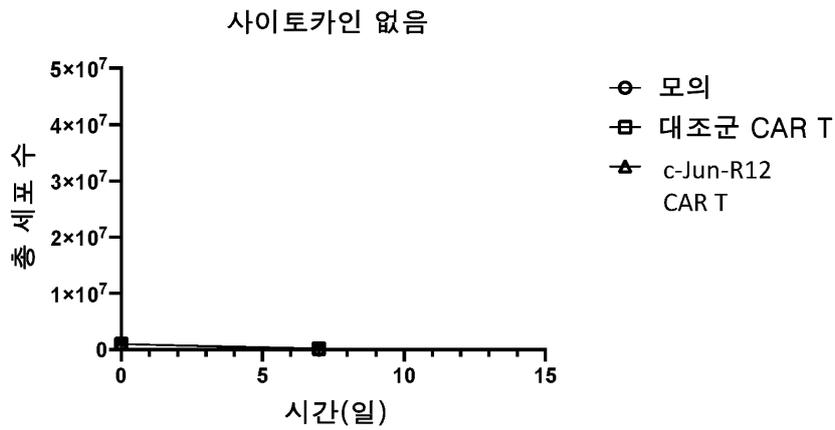
도면2c



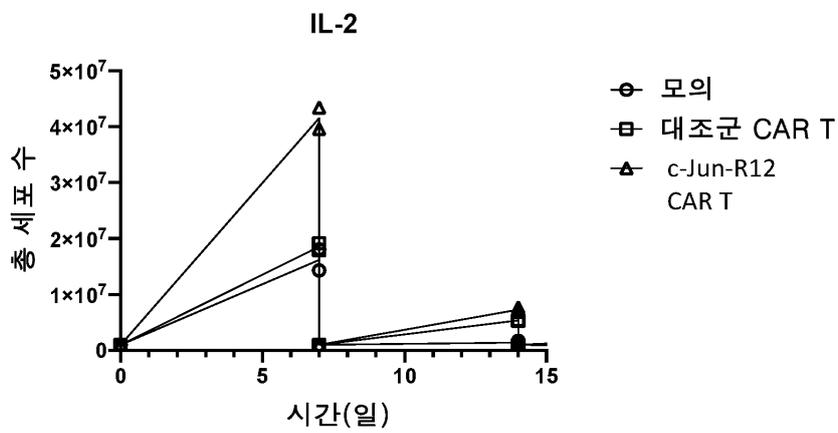
도면2d



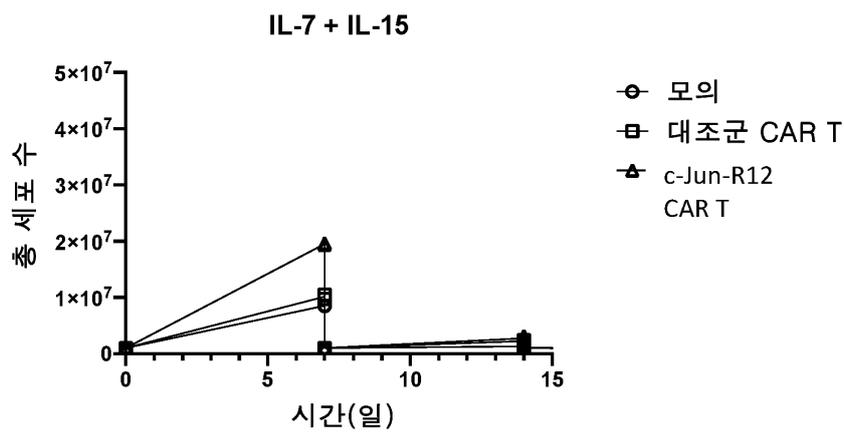
도면3a



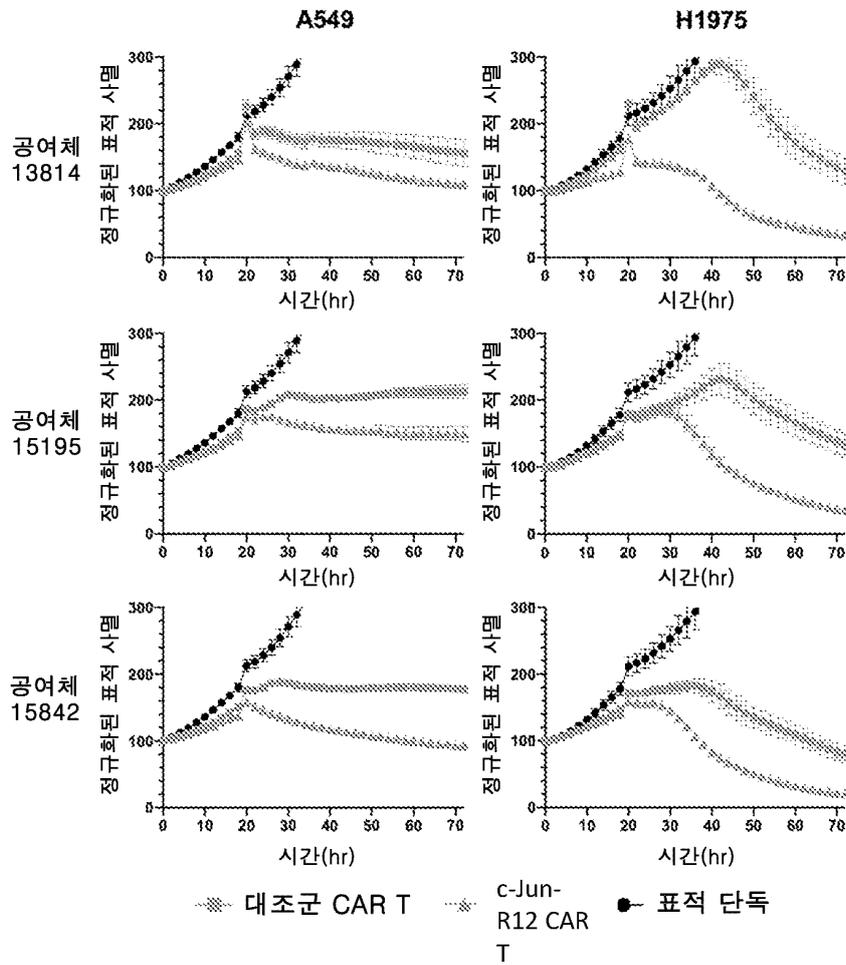
도면3b



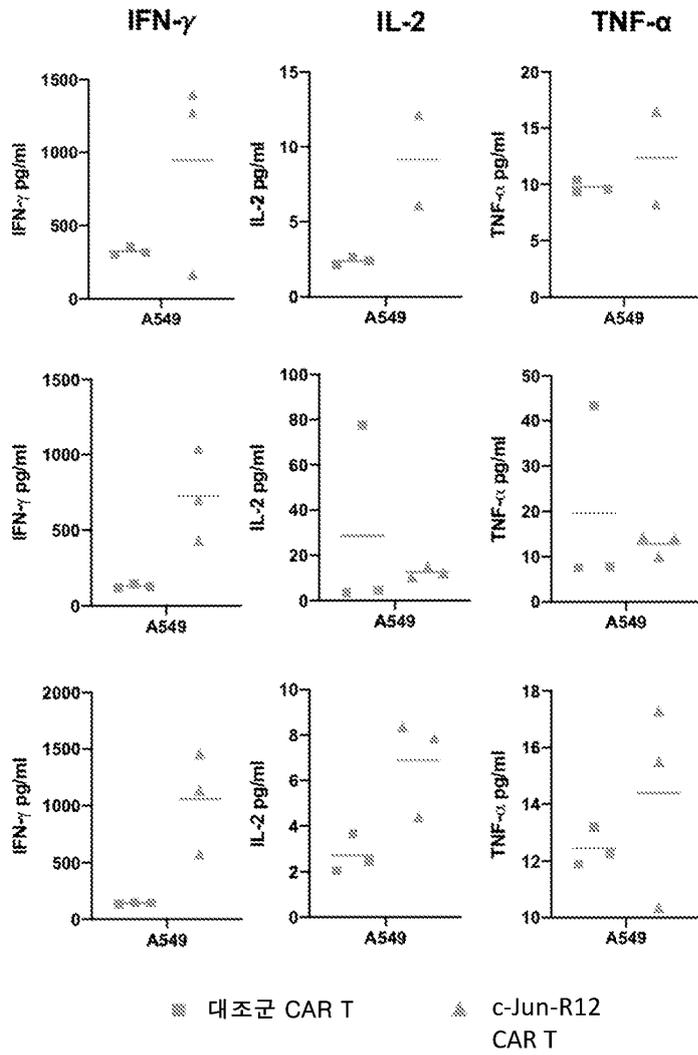
도면3c



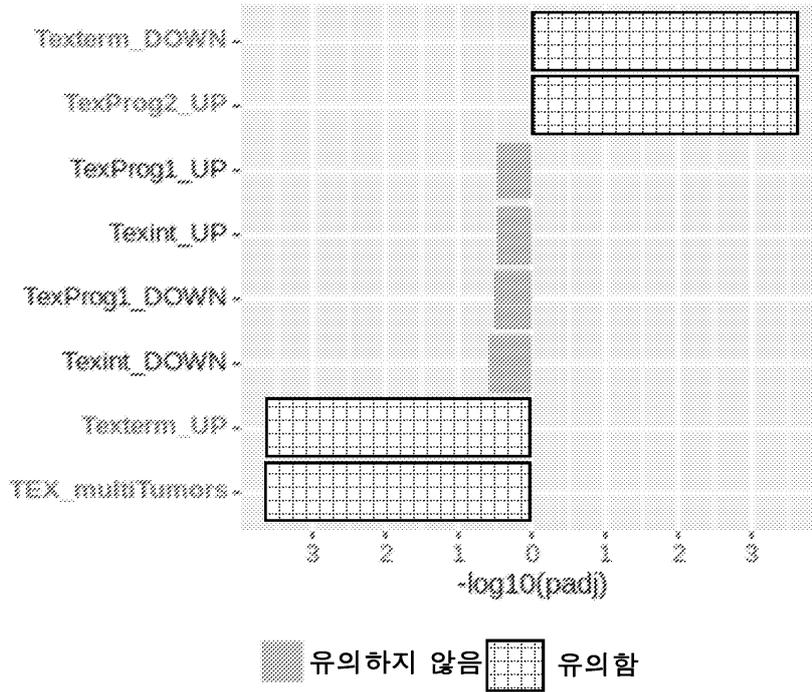
도면4a



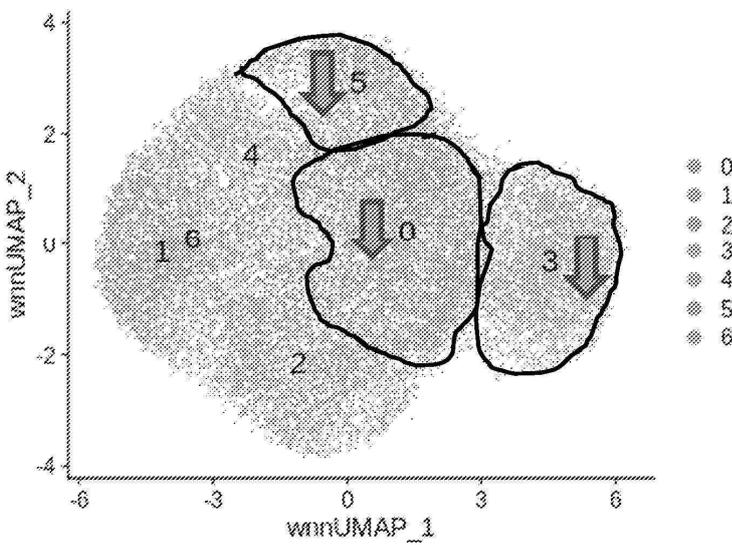
도면4b



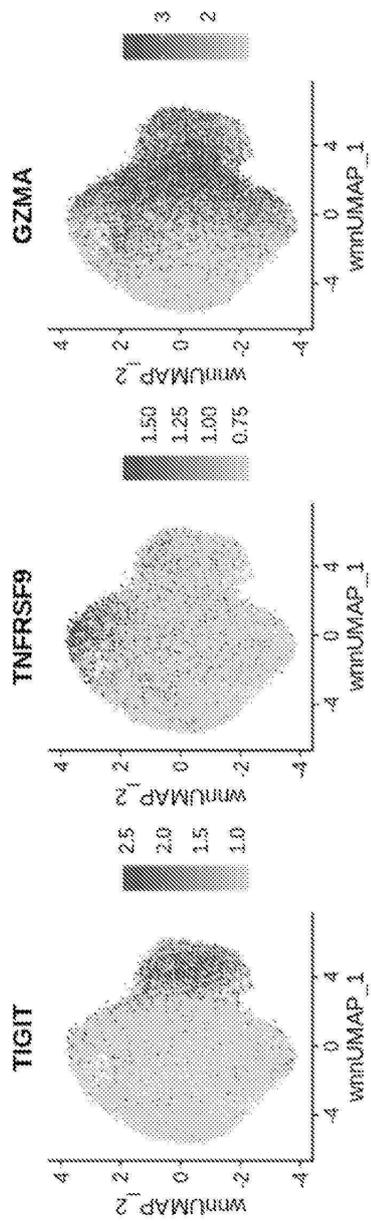
도면5a



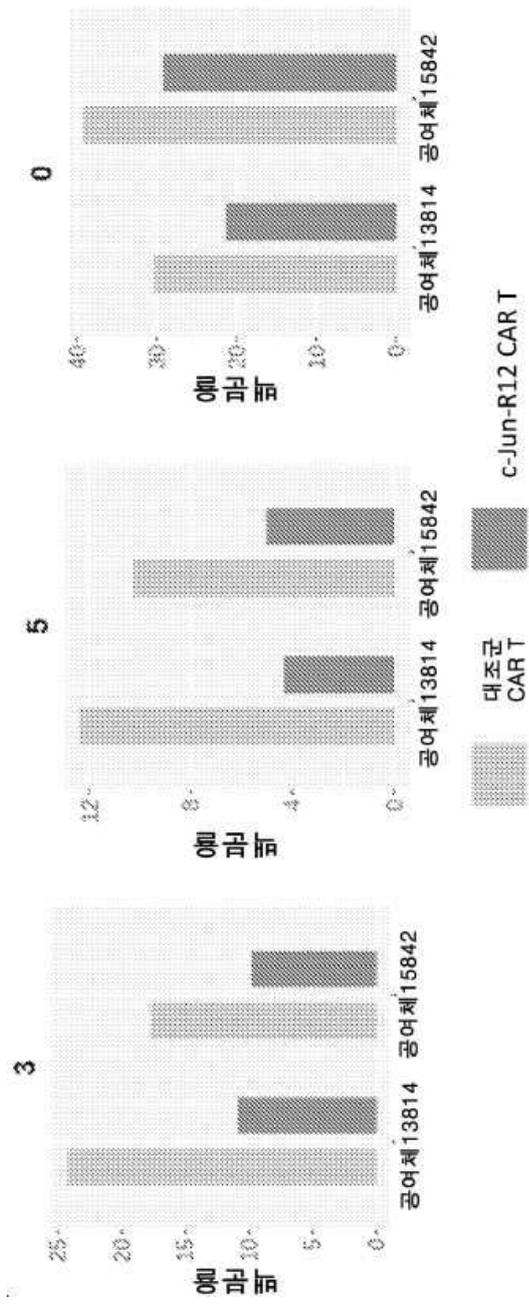
도면5b



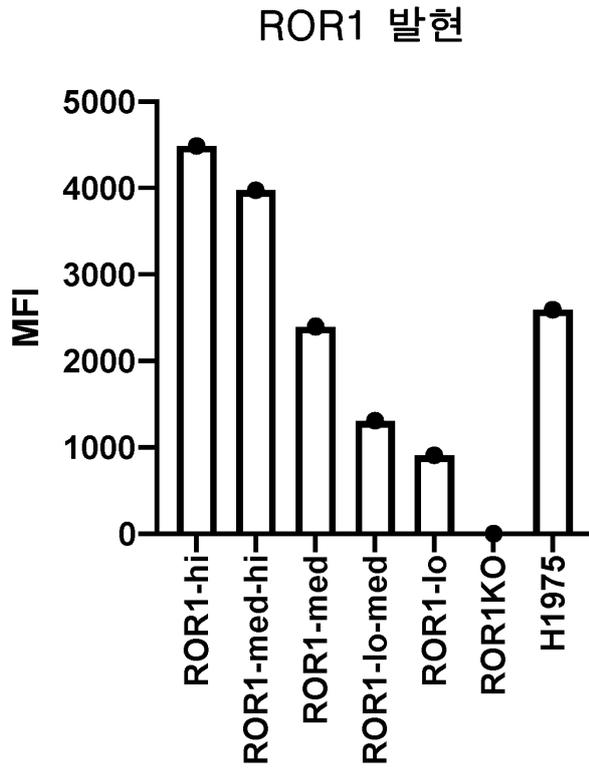
도면5c



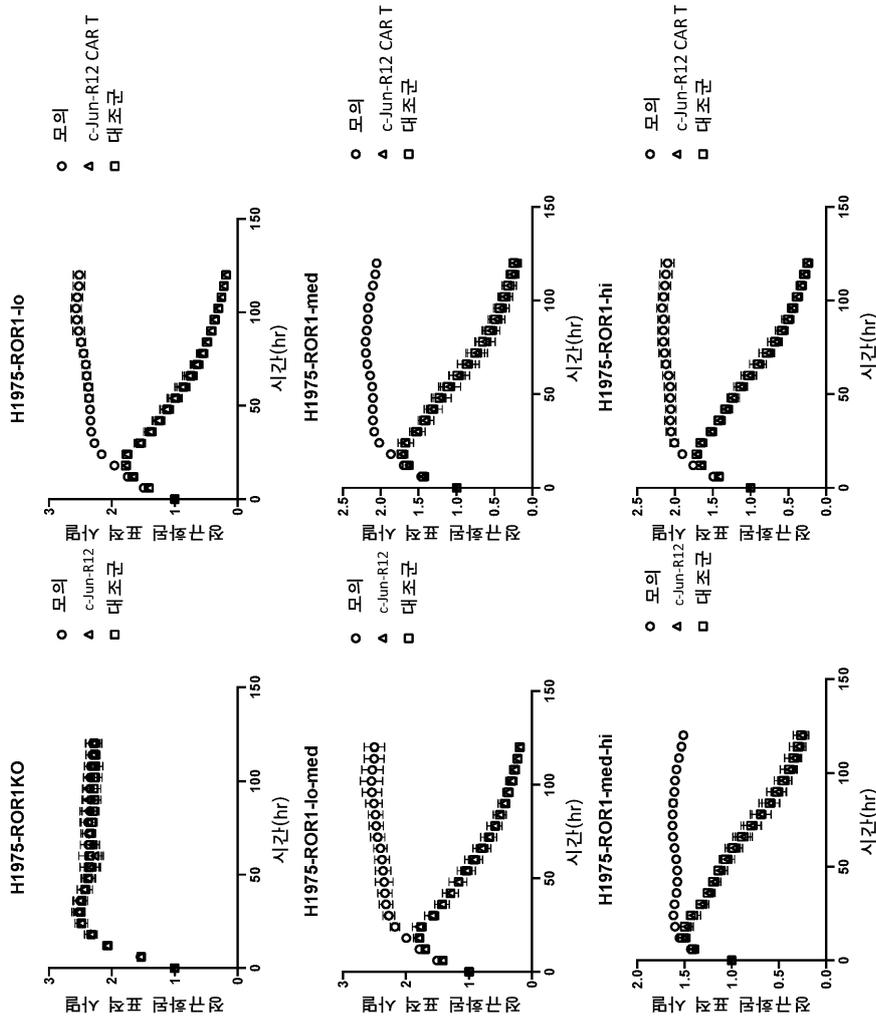
도면5d



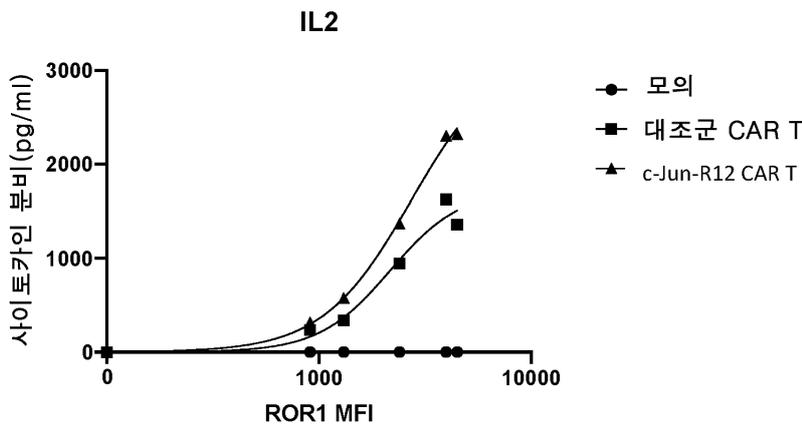
도면6



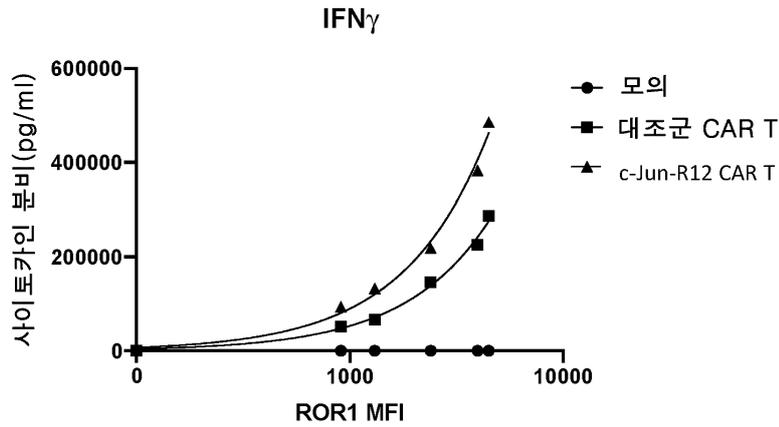
도면7



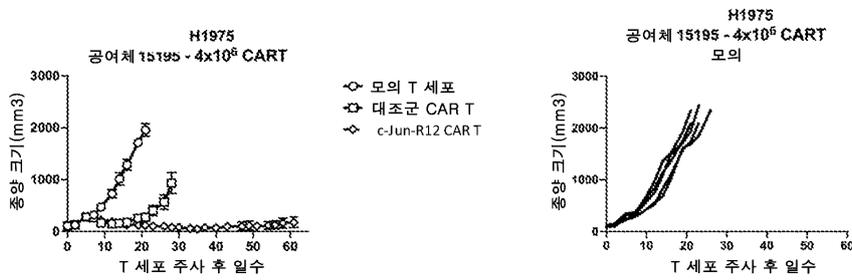
도면8a



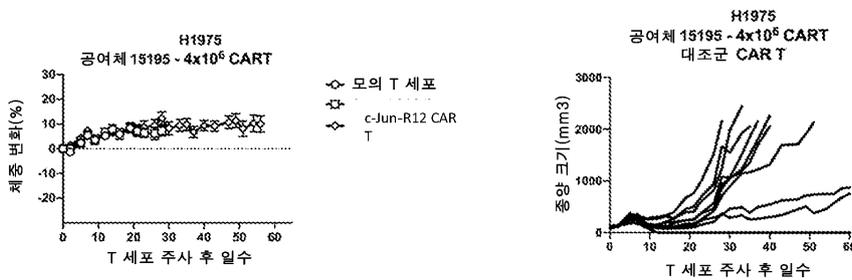
도면8b



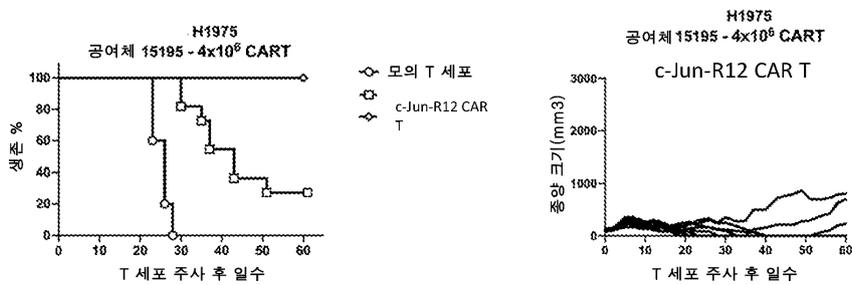
도면9a



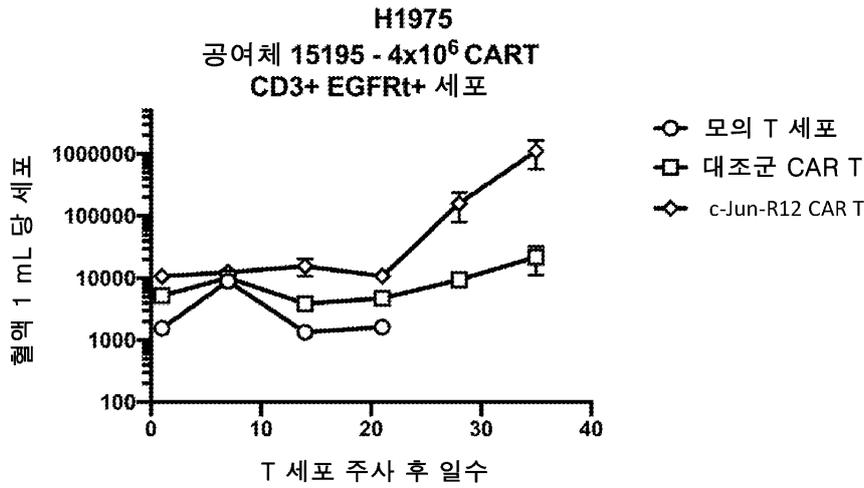
도면9b



도면9c



도면10



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> LYELL IMMUNOPHARMA, INC.

<120> ROR1 TARGETING CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR

<130> 4385.042PC04

<150> US 63/153,878

<151> 2021-02-25

<150> US 63/263,229

<151> 2021-10-28

<150> US 63/309,393

<151> 2022-02-11

<160> 64

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 331

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> wild type human c-Jun protein

<400> 1

Met Thr Ala Lys Met Glu Thr Thr Phe Tyr Asp Asp Ala Leu Asn Ala

1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Glu Ser Gly Pro Tyr Gly Tyr Ser Asn Pro Lys

Lys Leu Glu Arg Ile Ala Arg Leu Glu Glu Lys Val Lys Thr Leu Lys
 275 280 285
 Ala Gln Asn Ser Glu Leu Ala Ser Thr Ala Asn Met Leu Arg Glu Gln
 290 295 300
 Val Ala Gln Leu Lys Gln Lys Val Met Asn His Val Asn Ser Gly Cys
 305 310 315 320
 Gln Leu Met Leu Thr Gln Gln Leu Gln Thr Phe
 325 330

<210> 2

<211> 3257

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> wild type human c-Jun gene

<400> 2

gctcagagtt gcaactgagtg tggctgaagc agcagggcgg gaggaggagt gcgcggagtc 60
 aggcagacag acagacacag ccagccagcc aggtcggcag tatagtccga actgcaaac 120
 ttatttttctt ttcacctct ctctaactgc ccagagctag cgctgtggc tcccgggctg 180
 gtgtttcggg agtgtccaga gaggctggc tccagccgcc cccgggagga gagccctgct 240
 gccagggcgc tgttgacagc ggcgaaaagc agcggtagcc acgcgccgc cgggggaagt 300
 cggcgagcgg ctgcagcagc aaagaacttt cccggctggg aggaccggag acaagtggca 360

 gaggccgga gccaaacttt gcaagccttt cctgcgtctt aggtttctcc acggcggtaa 420
 agaccagaag gcggcggaga gccacgcaag agaagaagga cgtgcgctca gcttcgctcg 480
 caccggttgt tgaacttggg cgagcgcgag ccgaggctgc cgggcgcccc ctccccctag 540
 cagcggagga ggggacaagt cgtcggagtc cgggcggcca agaccgccc cggcggccc 600
 actgcagggt ccgactgat ccgctccgcg gggagagccg ctgctctggg aagtgagttc 660
 gcctcggac tccgaggaac cgctgcgcac gaagagcgt cagtgagtga ccgcacttt 720
 tcaaagccgg gtagcgcgcg cgagtcgaca agtaagagt cgggagcat ctaattaac 780

 cctgcgctcc ctggagcag ctggtgagga gggcgcagc gggacgacag ccagcgggtg 840
 cgtgcgctct tagagaaact ttccctgtca aaggctccgg gggcgcggg tgtccccgc 900
 ttgccacagc cctgttgagg ccccgaaact tgtgcgcgca gcccaacta acctcacgtg 960
 aagtgcagga ctgttctatg actgcaaaga tggaaacgac cttctatgac gatgcctca 1020
 acgcctcgtt cctcccgctc gagagcggac cttatggcta cagtaacccc aagatcctga 1080

aacagagcat gaccctgaac ctggccgacc cagtggggag cctgaagccg cacctccgcg 1140
ccaagaactc ggacctctc acctcgcccg acgtggggct gctcaagctg gcgtcgcccg 1200

agctggagcg cctgataatc cagteccagca acgggcacat caccaccacg cggaccceca 1260
cccagttcct gtgcccgaag aacgtgacag atgagcagga gggcttcgcc gagggcttcg 1320
tgccgcccct ggccgaactg cacagccaga acacgtgcc cagcgtcacg tcggcgccgc 1380
agccggtcaa cggggcaggc atggtggctc ccgcggtagc ctcggtggca gggggcagcg 1440
gcagcggcgg cttcagcgc agcctgcaca gcgagccgcc ggtctacgca aacctcagca 1500
acttcaacce aggcgcgctg agcagcggcg gcggggcgcc ctctacggc gggccggcc 1560
tgccctttcc cgcgcaacce cagcagcagc agcagccgcc gcaccacctg ccccagcaga 1620

tgcccgtgca gcaccgcgg ctgcaggccc tgaaggagga gcctcagaca gtgcccgaga 1680
tgccggcgga gacaccgccc ctgtccceca tcgacatgga gtccaggag cggatcaagg 1740
cggagaggaa gcgcatgagg aaccgcatcg ctgcctcaa gtgccgaaaa aggaagctgg 1800
agagaatcgc ccggctggag gaaaaagtga aaacctgaa agctcagaac tcggagctgg 1860
cgtccacggc caacatgctc agggaacagg tggcacagct taaacagaaa gtcataaacc 1920
acgttaacag tgggtgccaa ctcatgctaa cgcagcagtt gcaaacattt tgaagagaga 1980
ccgtcggggg ctgaggggca acgaagaaaa aaaataacac agagagacag acttgagaac 2040

ttgacaagtt gcgacggaga gaaaaagaa gtgtccgaga actaaagcca aggtatcca 2100
agttggactg ggttgcgtcc tgacggcgcc ccagtgctc acgagtgga aggacttggc 2160
gcgccctccc ttggcgtgga gccagggagc ggccgcctgc gggetgcccc gctttcgga 2220
cgggctgtcc ccgcgcgaac ggaacgttgg acttttcggt aacattgacc aagaactgca 2280
tggacctaac attgatctc attcagtatt aaagggggga gggggagggg gttacaaact 2340
gcaatagaga ctgtagattg cttctgtagt actccttaag aacacaaagc ggggggaggg 2400
ttggggaggg gcggcaggag ggaggtttgi gagagcgagg ctgacacctc agatgaactc 2460

tttctggcct gccttcgta actgtgtatg tacatatata tatttttaa tttgatgaaa 2520
gctgattact gtcaataaac agcttcatgc ctttgtaagt tatttcttgt ttgtttgttt 2580
gggtatcctg ccagtggtg tttgtaata agagatttg agcactctga gttaccatt 2640
tgtaataaag tatataattt ttttatgttt tgtttctgaa aattccagaa aggatattta 2700
agaaaataca ataaactatt ggaaagtact ccctaacct ctttctgca tcatctgtag 2760
atactagcta tctaggtgga gttgaaagag ttaagaatgt cgattaaaat cactctcagt 2820

gcttcttact attaagcagt aaaaactggt ctctattaga ctttagaaat aaatgtacct 2880
gatgtacctg atgctatggt caggttatac tcctcctccc ccagctatct atatggaatt 2940
gcttaccaaa ggatagtgcg atgtttcagg aggctggagg aaggggggtt gcagtggaga 3000
gggacagccc actgagaagt caaacatttc aaagtttga ttgtatcaag tggcatgtgc 3060
tgtgaccatt tataatgta gtagaaattt tacaataggt gcttattctc aaagcaggaa 3120
ttggtggcag attttacc aaatgtatcc ttccaatttg gaatcttctc ttgacaatt 3180
cctagataaa aagatggcct ttgcttatga atatttataa cagcattctt gtcacaataa 3240
atgtattcaa ataccaa 3257

<210> 3

<211> 338

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> epidermal growth factor receptor protein opt (EGFRopt)

<400> 3

Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu

1 5 10 15

Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile

20 25 30

Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe

35 40 45

Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr

50 55 60

Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn

65 70 75 80

Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg

85 90 95

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

100 105 110

Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val

115 120 125

Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp

130 135 140
 Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn
 145 150 155 160
 Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu
 165 170 175

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

 Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro
 245 250 255
 His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr
 260 265 270
 Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His
 275 280 285
 Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro
 290 295 300

 Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala
 305 310 315 320
 Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met Arg
 325 330 335
 Arg Arg

<210> 4

<400> 4

000

<210> 5

<211> 353

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Uniprot: P01876, IGHA1_HUMAN, immunoglobulin heavy constant alpha

1

<400> 5

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

1 5 10 15
Gln Pro Asp Gly Asn Val Val Ile Ala Cys Leu Val Gln Gly Phe Phe

 20 25 30
Pro Gln Glu Pro Leu Ser Val Thr Trp Ser Glu Ser Gly Gln Gly Val

 35 40 45
Thr Ala Arg Asn Phe Pro Pro Ser Gln Asp Ala Ser Gly Asp Leu Tyr

50 55 60
Thr Thr Ser Ser Gln Leu Thr Leu Pro Ala Thr Gln Cys Leu Ala Gly

65 70 75 80
Lys Ser Val Thr Cys His Val Lys His Tyr Thr Asn Pro Ser Gln Asp

 85 90 95
Val Thr Val Pro Cys Pro Val Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro

 100 105 110
Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Cys Cys His Pro Arg Leu Ser

 115 120 125
Leu His Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu Leu Leu Gly Ser Glu Ala Asn

 130 135 140
Leu Thr Cys Thr Leu Thr Gly Leu Arg Asp Ala Ser Gly Val Thr Phe

145 150 155 160
Thr Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Ser Ala Val Gln Gly Pro Pro Glu

 165 170 175
Arg Asp Leu Cys Gly Cys Tyr Ser Val Ser Ser Val Leu Pro Gly Cys

 180 185 190
Ala Glu Pro Trp Asn His Gly Lys Thr Phe Thr Cys Thr Ala Ala Tyr

195 200 205

Pro Glu Ser Lys Thr Pro Leu Thr Ala Thr Leu Ser Lys Ser Gly Asn
 210 215 220
 Thr Phe Arg Pro Glu Val His Leu Leu Pro Pro Pro Ser Glu Glu Leu
 225 230 235 240
 Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Arg Gly Phe Ser
 245 250 255
 Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu Gln Gly Ser Gln Glu Leu Pro
 260 265 270
 Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser Arg Gln Glu Pro Ser Gln Gly
 275 280 285
 Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile Leu Arg Val Ala Ala Glu Asp
 290 295 300
 Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys Met Val Gly His Glu Ala Leu
 305 310 315 320
 Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp Arg Leu Ala Gly Lys Pro
 325 330 335
 Thr His Val Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp Gly Thr Cys
 340 345 350
 Tyr

<210> 6

<211> 340

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Uniprot P01877, IGHA2_HUMAN, immunoglobulin heavy constant alpha

2

<400> 6

Ala Ser Pro Thr Ser Pro Lys Val Phe Pro Leu Ser Leu Asp Ser Thr
 1 5 10 15

Pro Gln Asp Gly Asn Val Val Val Ala Cys Leu Val Gln Gly Phe Phe
 20 25 30

Pro Gln Glu Pro Leu Ser Val Thr Trp Ser Glu Ser Gly Gln Asn Val

Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly Glu Thr Phe Ser Cys Met Val Gly His
 290 295 300
 Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp Arg Met Ala
 305 310 315 320
 Gly Lys Pro Thr His Ile Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu Ala Asp
 325 330 335

Gly Thr Cys Tyr
 340

<210> 7

<211> 398

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Uniprot P01665, GCAM_MOUSE, immunoglobulin gamma 2A chain C
 region

<400> 7

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

35 40 45
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser
 50 55 60
 Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr
 65 70 75 80
 Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile
 85 90 95

Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro
 100 105 110
 Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys
 115 120 125

Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val

180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu

225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 9

<211> 326

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Uniprot P01859, IGHG2_HUMAN, immunoglobulin heavy constant gamma

2

<400> 9

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 10

<211> 377

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Uniprot P01860, IGHG3_HUMAN, immunoglobulin heavy constant gamma
 3

<400> 10

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
 100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
 115 120 125

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
 130 135 140

<211> 327

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Uniprot P01861, IGHG4, immunoglobulin heavy constant gamma 4

<400> 11

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 12

<211> 384

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Uniprot P01880, IGHD_HUMAN, immunoglobulin heavy constant delta

<400> 12

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

Ile Asn Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu
 145 150 155 160
 Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln Ser

 165 170 175
 Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr
 180 185 190
 Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys
 195 200 205
 Cys Ala Asp Ser Asn Pro Arg Gly Val Ser Ala Tyr Leu Ser Arg Pro
 210 215 220
 Ser Pro Phe Asp Leu Phe Ile Arg Lys Ser Pro Thr Ile Thr Cys Leu

 225 230 235 240
 Val Val Asp Leu Ala Pro Ser Lys Gly Thr Val Asn Leu Thr Trp Ser
 245 250 255
 Arg Ala Ser Gly Lys Pro Val Asn His Ser Thr Arg Lys Glu Glu Lys
 260 265 270
 Gln Arg Asn Gly Thr Leu Thr Val Thr Ser Thr Leu Pro Val Gly Thr
 275 280 285
 Arg Asp Trp Ile Glu Gly Glu Thr Tyr Gln Cys Arg Val Thr His Pro

 290 295 300
 His Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr Lys Thr Ser Gly Pro
 305 310 315 320
 Arg Ala Ala Pro Glu Val Tyr Ala Phe Ala Thr Pro Glu Trp Pro Gly
 325 330 335
 Ser Arg Asp Lys Arg Thr Leu Ala Cys Leu Ile Gln Asn Phe Met Pro
 340 345 350
 Glu Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu His Asn Glu Val Gln Leu Pro Asp

 355 360 365
 Ala Arg His Ser Thr Thr Gln Pro Arg Lys Thr Lys Gly Ser Gly Phe
 370 375 380
 Phe Val Phe Ser Arg Leu Glu Val Thr Arg Ala Glu Trp Glu Gln Lys

Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr
 165 170 175
 Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Gly Gln
 180 185 190
 Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln
 195 200 205
 Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val
 210 215 220
 Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr
 225 230 235 240
 Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr
 245 250 255
 Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn
 260 265 270
 Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala
 275 280 285
 Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr
 290 295 300
 Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg
 305 310 315 320
 Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro
 325 330 335
 Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu
 340 345 350
 Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg
 355 360 365
 Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro
 370 375 380
 Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val
 385 390 395 400
 Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala

405 410 415
 His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser

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

435 440 445
 Ala Gly Thr Cys Tyr

450
 <210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220><223> Spacer 1

<400> 15
 Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro
 1 5

<210> 16
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220><223> linker

<400>
 16
 Gly Gly Gly Ser Gly

1 5
 <210> 17
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220><223> human Ig kappa signal peptide

<400> 17
 Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly
 20

<210> 18

<211> 22

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> GM-CSF signal peptide

<400> 18

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro

20

<210> 19

<211> 24

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> EGFR signal peptide

<400> 19

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala

1 5 10 15

Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala

20

<210> 20

<211> 16

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> human CD33 signal peptide

<400> 20

Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala

1 5 10 15

<210> 21

<211> 2

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Linker

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Wherein Gly may be repeated by an integer from 1 to 100.
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> Wherein the sequence may be repeated by an integer from 1 to 100.
 <400> 21
 Gly Ser
 1
 <210> 22
 <211> 2

<212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220><223> Linker
 <220><221> misc_feature
 <222> (0)..(1)
 <223> Wherein Ser may be repeated by an integer from 1 to 100.
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Wherein Gly may be repeated by an integer from 1 to 4.
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> Wherein The sequence may be repeated by an integer from 1 to 50.
 <400> 22
 Gly Ser
 1
 <210> 23
 <211> 1
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220><223> Linker

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)

<223> Wherein Gly can be repeated between 1 to 100.

<400> 23

Gly

1

<210> 24

<211> 2

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Linker

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> Wherein Gly Ala may be repeated between 1 and 100.

<400> 24

Gly Ala

1

<210> 25

<211> 4

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 25

Gly Gly Gly Gly

1

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 26

Gly Gly Gly Ser Gly

1

5

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Linker

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(5)

<223> Wherein the sequence can be repeated between an integer of 1 and
100

<400> 27

Gly Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Linker

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(5)

<223> Wherein the sequence can be repeated between an integer of 1 and
100.

<400> 28

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 29

<211> 4

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Linker

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(4)

<223> Wherein the sequence can be repeated between an integer of 1 and
100

<400> 29

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 30

<211> 3

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Linker

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> Wherein the sequence can be repeated between an integer of 1 and
100

<400> 30

Gly Gly Ser

1

<210> 31

<211> 6

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 31

Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5

<210> 32

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 32

Gly Gly Ser Gly Gly

1 5

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223>

> Linker

<400> 33

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 34

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

1 5 10 15

<210> 35

<211> 16

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 35

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

1 5 10 15

<210> 36

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 36

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

1 5 10 15

<210> 37

<211> 19

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> P2A

<400> 37

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

1 5 10 15

Pro Gly Pro

<210> 38

<211> 18

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> T2A

<400> 38

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

1 5 10 15

Gly Pro

<210> 39

<211> 22

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> F2A

<400> 39

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

1 5 10 15

Glu Ser Asn Pro Gly Pro

20

<210> 40

<211> 20

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> E2A

<400> 40

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

1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro

20

<210> 41

<211> 4
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220><223> Furin Cleavage Site
 <400> 41
 Arg Ala Lys Arg
 1
 <210> 42
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220><223> Linker
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(5)

 <223> Wherein the sequence can be repeated by a positive integer equal
 to, or greater than 1
 <400> 42
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 43
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220><223> Linker
 <400> 43
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser
 20
 <210> 44
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220><223> R12 VH

<400> 44

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

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

<210> 45

<211> 5

<212> PRT

<

213> artificial sequence

<220><223> R12 VH CDR1

<400> 45

Ala Tyr Tyr Met Ser
 1 5

<210> 46

<211> 17

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> R12 VH CDR2

<400> 46

Thr Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Lys Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Val Asn
 1 5 10 15
 Gly

<210> 47

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> R12 VH CDR3

<400> 47

Asp Ser Tyr Ala Asp Asp Gly Ala Leu Phe Asn Ile

1 5 10

<210> 48

<211> 112

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> R12 VL

<400> 48

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

1 5 10 15

Pro Ala Lys Ile Thr Cys Thr Leu Ser Ser Ala His Lys Thr Asp Thr

20 25 30

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

35 40 45

Gln Val Gln Ser Asp Gly Ser Tyr Thr Lys Arg Pro Gly Val Pro Asp

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Val Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ala Asp Tyr

85 90 95

Ile Gly Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Thr Gly

100 105 110

<210> 49

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> R12 VL CDR1

<400> 49

Thr Leu Ser Ser Ala His Lys Thr Asp Thr Ile Asp

1 5 10

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> R12 VL CDR2

<400> 50

Gly Ser Tyr Thr Lys Arg Pro

1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> R12 VL CDR3

<400> 51

Gly Ala Asp Tyr Ile Gly Gly Tyr Val

1 5

<210> 52

<211> 248

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> R12 scFv

<400> 52

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

1 5 10 15

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ala Tyr

20 25 30

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

<210> 53

<211> 42

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> 4-1BB costimulatory domain

<400> 53

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> 54

<211> 28

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> CD28 transmembrane domain

<400> 54

Met Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser

1 5 10 15

Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val

 20 25

<210> 55

<211> 112

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> CD3zeta activating domain

<400> 55

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

Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr Leu Ile Ile Pro Ser Val Gln
 580 585 590
 Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ala Asp Tyr Ile Gly Gly
 595 600 605
 Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Thr Gly Gly Gly Gly
 610 615 620

 Ser Gly Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Met Phe Trp Val Leu
 625 630 635 640
 Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val
 645 650 655
 Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr
 660 665 670
 Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu
 675 680 685

 Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu
 690 695 700
 Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln
 705 710 715 720
 Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
 725 730 735
 Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
 740 745 750

 Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
 755 760 765
 Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
 770 775 780
 Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
 785 790 795 800
 Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
 805 810 815

 Arg Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val

Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile
 1070 1075 1080
 Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys
 1085 1090 1095
 Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile
 1100 1105 1110
 Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly
 1115 1120 1125

Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val
 1130 1135 1140
 Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro
 1145 1150 1155
 Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile
 1160 1165 1170
 Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala
 1175 1180 1185

Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met Arg Arg Arg
 1190 1195

<210> 58

<211> 4022

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> DNA construct

<400> 58

tgaaagacc cacctgtagg tttggcaagc taggatcaag gttaggaaca gagagacagc 60
 agaatatggg ccaaacagga tatctgtggt aagcagtcc tgccccggct cagggccaag 120
 aacagttgga acagcagaat atgggccaaa caggatatct gtgtaagca gttcctgccc 180
 cggctcaggg ccaagaacag atggccccca gatgcggtcc cgcctcagc agtttctaga 240
 gaaccatcag atgtttccag ggtgccccaa ggacctgaaa tgacctgtg cttatttga 300

 actaaccaat cagttcgctt ctcgcttctg ttcgcgcgct tctgctcccc gagctcaata 360
 aaagagccca caaccctca ctccggcgca tcagaacctc ttacgagtcg gctagcgcgg 420
 ccacatgac agccaagatg gaaaccacat tctacgacga cgcctgaac gcctcattcc 480

tgccttctga gagcggacct tacggctaca gcaatcctaa gatcctgaaa cagagcatga 540
 cccttaacct ggctgatcct gttggaagcc tgaacctca cctgagagcc aaaaacagcg 600
 acctgctcac cagccctgat gtgggcctgc tgaagctggc ctctccagag ctggaacggc 660
 tgatcatcca gagcagcaac ggccacatca caaccacccc taccctaca caattcctgt 720

 gccctaagaa cgtgaccgac gagcaggagg gcttcgccga aggctttgtg cgggccctgg 780
 cagaactgca ctctcagaac accctgccta gcgtgacctc cgccgccag cctgtcaacg 840
 gcgccggaat ggtggccctt gccgtggctt ctgtggccgg cggcagcggc agcggcggat 900
 tcagcgcctc tctgactct gagcctcctg tctacgcaa tctgtctaatt tcaaccccg 960
 gagccctgtc cagcggcggc ggagctccta gctacggcgc tgctggactg gccttccccg 1020
 cccagcccca gcaacagcag cagcctccac accacctgcc ccagcagatg cccgtgcagc 1080
 accctagact gcaggccctg aaggaagaac cccaaacagt gcctgagatg cctggcgaga 1140

 cacctccact gagccccatc gacatggaaa gccaggagcg gatcaaggcc gagagaaaga 1200
 gaatgcgga cagaatcgcc gctagcaagt gcagaaagcg gaagctggaa agaatcgcca 1260
 gactggaaga gaaggtgaag accctgaaag cccaaaatag cgagctggcc agcaccgcca 1320
 acatgtctgc ggaacaggtg gccagctga agcagaaggt gatgaaccac gtgaactctg 1380
 gttgtcagct gatgctgacc cagcagctcc agacctcgg ctccggtgca acgaacttca 1440
 gcctgtctgaa gcaggccgga gatgttgagg aaaatccagg tcccatggtc ttgcagactc 1500
 aagtatttat atccctttg ctctggatct ctggagctta cggccaggaa cagctcgtcg 1560

 aaagcggcgg cagactggtg acacctggcg gcagcctgac cctgagctgc aaggccagcg 1620
 gcttcgactt cagcgcctac tacatgagct ggttcgccca ggccctggc aagggactgg 1680
 aatggatcgc caccatctac cccagcagcg gcaagaccta ctacgccacc tgggtgaacg 1740
 gacggttcac catctccagc gacaacgccc agaacaccgt ggacctgcag atgaacagcc 1800
 tgacagccgc cgaccgggcc acctactttt gcgctcggga cagctacgcc gacgacggcg 1860
 ccctgttcaa catctggggc cctggcacc tggtgacaat ctctagcggc ggaggcggat 1920
 ctggtggcgg aggaagtggc ggcggaggat ctgagctggt gctgaccag agccctctg 1980

 tgtctgctgc cctgggaagc cctgccaaga tcacctgtac cctgagcagc gcccacaaga 2040
 ccgacaccat cgactggtat cagcagctgc agggcgaggc ccccagatac ctgatgcagg 2100
 tgcagagcga cggcagctac accaagaggc caggcgtgcc cgacaggttc agcggatcta 2160
 gctctggcgc cgaccgctac ctgatcatcc ccagcgtgca ggccgatgac gaggccgatt 2220
 actactgtgg cgccgactac atcggcggct acgtgttcgg cggaggcacc cagctgaccg 2280
 tgaccggtgg cggaggttca ggcaaacctg gcctccgtg caagtgtcct atgttctggg 2340

tgctgggtgtt ggtcggaggc gtgctggcct gctacagcct gctggtcacc gtggccttca 2400

 tcactctttt ggtgaaacgg ggcagaaaaga aactcctgta tatattcaaa caaccattta 2460
 tgagaccagt acaaactact caagaggaag atggctgtag ctgccgattt ccagaagaag 2520
 aagaaggagg atgtgaactg cgggtgaagt tcagcagaag cgccgacgcc cctgcctacc 2580
 agcagggccca gaatcagctg tacaacgagc tgaacctggg cagaagggaag gactacgacg 2640
 tcctggataa ggggagaggc cgggacctg agatgggagg caagcctcgg cggagaacc 2700
 cccaggaagg cctgtataac gaactgcaga aagacaagat ggccgaggcc tacagcgaga 2760
 tcggcatgaa gggcgagcgg aggcggggca agggccacga cggcctgtat cagggcctgt 2820

 ccaccgccac caaggatacc tacgacgcc tgcacatgca ggccctgccc ccaaggtccg 2880
 gagccactaa ctctcctg ttgaaacaag caggggatgt cgaagagaat cccgggcca 2940
 tgcttctctt ggtgacaagc ctctctctct gtgaattacc acaccagca tctctctga 3000
 tcccacgcaa agtgtgcaac ggaataggta ttggtgaatt taaggactca ctctccataa 3060
 atgctacgaa tattaaacac ttcaaaaact gcacctccat cagtggcgat ctccacatcc 3120
 tgccggtggc atttaggggt gactccttca cacatactcc tctctggac ccacaagaac 3180
 tggatattct gaaaaccgta aaggaaatca cagggttttt gctgattcaa gcttggcctg 3240

 aaaacaggac ggacctccat gcctttgaga acctagaaat catacgcggc aggaccaagc 3300
 agcatggaca gttttctctt gctgtcgtga gcctgaacat aacatccttg ggattacgct 3360
 ccctcaagga gataagtgat ggagatgtga taatttcagg aaacaaaaat ttgtgctatg 3420
 caaatacaat aaactggaag aaactgtttg ggacctccgg ccagaaaacc aaaattataa 3480
 gcaacagagg cgaacacagc tgcaaggcca caggccaggc ctgccatgcc ttgtgctccc 3540
 ccgagggctg ctggggcccg gagcccaggg attgcgtgtc ttgccggaat gtcagccgag 3600
 gcaggaatg cgtggacaag tgcaaccttc tggaaggcga gccaaaggag tttgtggaga 3660

 actctgagtg catacagtc caccagagt gcctgcctca ggccatgaac atcacctgca 3720
 caggacgggg accagacaac tgtatccagt gtgcccacta cattgacggc cccactgcg 3780
 tcaagacctg cccggcagga gtcatgggag aaaacaacac cctggtctgg aagtacgcag 3840
 acgccggcca tgtgtgccac ctgtgccatc caaactgcac ctacggatgc actgggccag 3900
 gctttgaagg ctgtccaacg aacgggacct agatcccgtc catcgccact gggatggtgg 3960
 gggcctcct ctgtctgctg gtggggccc tgggatcgg cctcttcag cggcgaaggt 4020
 ga 4022

<210> 59

<211> 352

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> c-Jun after P2A cleavage

<400> 59

Met Thr Ala Lys Met Glu Thr Thr Phe Tyr Asp Asp Ala Leu Asn Ala

1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Glu Ser Gly Pro Tyr Gly Tyr Ser Asn Pro Lys

 20 25 30

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

 35 40 45

Leu Lys Pro His Leu Arg Ala Lys Asn Ser Asp Leu Leu Thr Ser Pro

 50 55 60

Asp Val Gly Leu Leu Lys Leu Ala Ser Pro Glu Leu Glu Arg Leu Ile

65 70 75 80

Ile Gln Ser Ser Asn Gly His Ile Thr Thr Thr Pro Thr Pro Thr Gln

 85 90 95

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

 100 105 110

Gly Phe Val Arg Ala Leu Ala Glu Leu His Ser Gln Asn Thr Leu Pro

 115 120 125

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

 130 135 140

Pro Ala Val Ala Ser Val Ala Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Phe Ser

145 150 155 160

Ala Ser Leu His Ser Glu Pro Pro Val Tyr Ala Asn Leu Ser Asn Phe

 165 170 175

Asn Pro Gly Ala Leu Ser Ser Gly Gly Gly Ala Pro Ser Tyr Gly Ala

 180 185 190

Ala Gly Leu Ala Phe Pro Ala Gln Pro Gln Gln Gln Gln Pro Pro

 195 200 205

His His Leu Pro Gln Gln Met Pro Val Gln His Pro Arg Leu Gln Ala
 210 215 220

Leu Lys Glu Glu Pro Gln Thr Val Pro Glu Met Pro Gly Glu Thr Pro
 225 230 235 240

Pro Leu Ser Pro Ile Asp Met Glu Ser Gln Glu Arg Ile Lys Ala Glu
 245 250 255

Arg Lys Arg Met Arg Asn Arg Ile Ala Ala Ser Lys Cys Arg Lys Arg
 260 265 270

Lys Leu Glu Arg Ile Ala Arg Leu Glu Glu Lys Val Lys Thr Leu Lys
 275 280 285

Ala Gln Asn Ser Glu Leu Ala Ser Thr Ala Asn Met Leu Arg Glu Gln
 290 295 300

Val Ala Gln Leu Lys Gln Lys Val Met Asn His Val Asn Ser Gly Cys
 305 310 315 320

Gln Leu Met Leu Thr Gln Gln Leu Gln Thr Phe Gly Ser Gly Ala Thr
 325 330 335

Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly
 340 345 350

<210> 60

<211> 21

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> hIgK after P2A cleavage

<400> 60

Pro Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile
 1 5 10 15

Ser Gly Ala Tyr Gly
 20

<210> 61

<211> 133

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> CD3z after P2A cleavage

<400> 61

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

Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu
 115 120 125

Glu Asn Pro Gly Pro
 130

<210> 62

<211> 23

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> GMCSFR-alpha-SP after P2A cleavage

<400> 62

Pro Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His
 1 5 10 15

Pro Ala Phe Leu Leu Ile Pro
 20

<210> 63

<211> 18

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 63

Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Ser

<210> 64

<211> 386

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> MND promotor

<400> 64

tgaaagaccc cacctgtagg ttggcaagc taggatcaag gttaggaaca gagagacagc 60

agaatatggg ccaaacagga tatctgtggt aagcagttcc tgccccggct caggccaag 120

aacagtggga acagcagaat atgggcaaaa caggatatct gtgtaagca gttctgccc 180

cggctcaggg ccaagaacag atggccccca gatgcggtcc cgcctcagc agtttctaga 240

gaaccatcag atgtttccag ggtgccccaa ggacctgaaa tgacctgtg cttatttga 300

actaaccaat cagttcgett ctcgettctg ttcgcgcgct tctgctcccc gagctcaata 360

aaagagccca caaccctca ctcggc 386