(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0035304
(43) 공개일자 2020년04월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) *A61K 35/17* (2014.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61P 35/02* (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0636 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7006870
(22) 출원일자(국제) 2018년08월09일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2020년03월09일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/046137
(87) 국제공개번호 WO 2019/032916
국제공개일자 2019년02월14일
(30) 우선권주장
62/543,735 2017년08월10일 미국(US)

(71) 출원인
싱가포르국립대학교
싱가포르 119077, 싱가포르 로어 켄트리지로드 21
(72) 발명자
카미야, 타카히로
일본 135-0046 도쿄, 코토쿠, 보탄, 1-16-8-1004
캄파나, 다리오
싱가포르 089379 싱가포르 에버턴 로드 24
(74) 대리인
한라특허법인(유한)

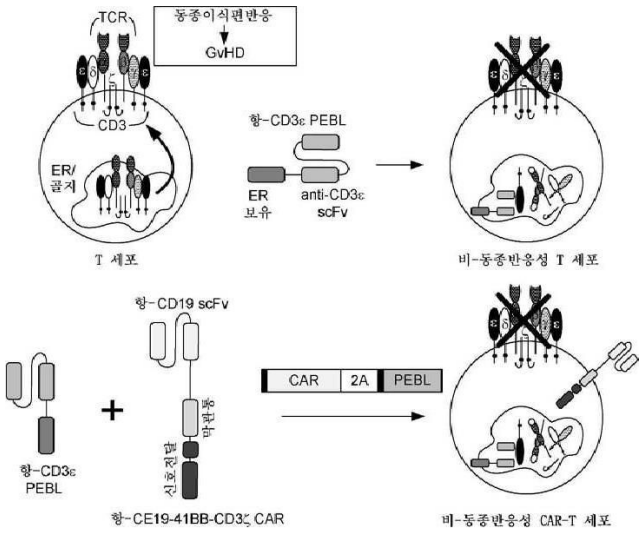
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **T 세포 수용체-결핍 키메라 항원 수용체 T-세포 및 이의 사용 방법**

(57) 요 약

본 발명은 표적-결합 분자 및 국소화 도메인을 포함하는 단백질 발현 차단제 또는 PEBL을 포함하는 조성물, 및 암 요법에서 이러한 조성물을 사용하는 방법을 제공한다. PEBL은 면역 세포에서 표적 표면 수용체 (펩티드 또는 항원)의 발현 차단에 유용하다. 또한 이러한 PEBL을 발현하는 CD3/TCRαβ-결핍 T 세포 및 CD3/TCRαβ-결핍 키메라 항원 수용체 T 세포가 본원에 제공된다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 39/001112 (2018.08)
A61P 35/02 (2018.01)
A61P 37/06 (2018.01)
C07K 16/2803 (2013.01)
C07K 16/2809 (2013.01)
C12N 15/62 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2319/02 (2013.01)
C07K 2319/03 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

조작된 CD3/TCRαβ-음성 T 세포로서, 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 분자를 포함하는 폴리펩티드를 포함하며,

상기 표적-결합 분자는 CD3/TCRαβ 복합 단백질에 결합하는 항체를 포함하고,

상기 국소화 도메인은 소포체 (ER) 보유 서열, 골지 보유 서열, 및 프로테아좀 국소화 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 보유 신호전달 도메인을 포함하고,

상기 국소화 도메인에 연결된 상기 표적-결합 분자는 상기 조작된 세포에 의해 분비되지 않고 상기 조작된 세포의 세포 표면 상에서 발현되지 않는, 조작된 CD3/TCRαβ-음성 T 세포.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 CD3/TCRαβ 복합 단백질이 TCRα, TCRβ, CD3ε, CD3δ, CD3γ, 및 CD3ζ로 이루어진 군으로부터 선택되는, 조작된 T 세포.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항체가 단일쇄 가변 단편 (scFv)인, 조작된 면역 세포.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 scFv가 서열 번호 1에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 가변 중쇄 (V_H) 서열 및 서열 번호 2에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 가변 경쇄 (V_L) 서열을 포함하는, 조작된 T 세포.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 T 세포가 동종 이계 T 세포인, 조작된 T 세포.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 T 세포가 자가 T 세포인, 조작된 T 세포.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 국소화 도메인이 CD8α, CD8β, 4-1BB, CD28, CD34, CD4, FcεRIγ, CD16, OX40, CD3ζ, CD3ε, CD3γ, CD3δ, TCRα, CD32, CD64, VEGFR2, FAS, 또는 FGFR2B로부터 유래한 막관통 도메인으로부터 선택된 막관통 도메인을 추가로 포함하는, 조작된 T 세포.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ER 보유 서열이 KDEL (서열 번호 32), KKMP (서열 번호 33), KKTN (서열 번호 43), 또는 KKXX (여기서 X는 임의의 아미노산임) (서열 번호 35)로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 T 세포.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, CD3/TCRαβ 발현이 상기 조작된 T 세포에서 차단되는, 조작된 T 세포.

청구항 10

이를 필요로 하는 환자에서 자가면역 질환 또는 바이러스 질환을 치료하는 방법으로서, 치료적 유효량의, 제1항

내지 제9항 중 어느 한 항의 조작된 T 세포를 포함하는 약학적 조성물을 자가면역 질환 또는 바이러스 질환에 걸린 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 이를 필요로 하는 환자에서 자가면역 질환 또는 바이러스 질환을 치료하는 방법.

청구항 11

환자에서 이식편-대-숙주 질환의 가능성을 감소시키거나 제거하는 방법으로서, 치료적 유효량의, 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 조작된 T 세포를 포함하는 약학적 조성물을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 환자에서 이식편-대-숙주 질환의 가능성을 감소시키거나 제거하는 방법.

청구항 12

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 T 세포가 키메라 항원 수용체 (CAR)를 추가로 포함하는, 조작된 T 세포.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 CAR은 항-CD19 scFv 도메인, 4-1BB 자극 신호전달 도메인 및 CD3ζ 신호전달 도메인을 포함하는, 조작된 T 세포.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 조작된 T 세포가 CD19+ 암 세포의 세포독성을 유도하는, 조작된 T 세포.

청구항 15

제12항에 있어서, 상기 CAR은 항-CD3 scFv 도메인, 4-1BB 자극 신호전달 도메인 및 CD3ζ 신호전달 도메인을 포함하는, 조작된 T 세포.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 조작된 T 세포가 CD3+ 암 세포의 세포독성을 유도하는, 조작된 T 세포.

청구항 17

이를 필요로 하는 환자에서 암을 치료하는 방법으로서, 치료적 유효량의, 제12항 내지 제16항 중 어느 한 항의 조작된 T 세포를 포함하는 약학적 조성물을 암에 걸린 환자에게 투여하여 상기 환자에서 암을 치료하는 단계를 포함하는, 이를 필요로 하는 환자에서 암을 치료하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 암이 CD3+ 암, CD19+ 암, 또는 B-세포 악성 종양인, 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 B 세포 악성 종양이 재발성 또는 난치성 급성 림프모구 백혈병 (ALL), 만성 림프성 백혈병 (CLL), 또는 B-세포 비호지킨 림프종 (B-NHL) 및 거대 B-세포 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 20

제17항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 투여가 정맥내 주입, 동맥내 주입, 복강내 주입, 종양 내로의 직접 주사 및/또는 수술 후의 종양 층의 관류, 인공 스캐폴드에서 종양 부위에 이식, 또는 척추강내 투여를 포함하는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본원은 2017년 8월 10일자로 출원된 미국 가출원 제62/543,735호에 대한 우선권을 주장하며, 이 출원은 그 전체 내용이 원용에 의해 본원에 포함된다.

[0003] 서열 목록에 대한 참조

[0004] 본원은, ASCII 포맷으로 전자적으로 제출되었으며 그 전체 내용이 원용에 의해 본원에 포함된 서열 목록을 포함한다. 2018년 8월 9일에 작성된 상기 ASCII 사본은 "119419-5003-WO-SequenceListing_ST25.txt"로 명명되며 크기는 24.0 킬로바이트이다.

배 경 기 술

[0005] 유전자-조작된 면역 세포는 암에 대한 강력한 새로운 치료법이다. 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하는 T 림프구를 사용한 최근의 임상 시험의 결과는 이러한 접근법의 힘을 강력하게 입증하였다. 키메라 항원 수용체 (CAR)는 면역 세포를 재유도하여 종양 세포를 특이적으로 인식하고 살해할 수 있다. CAR은 막관통 도메인을 통해 신호전달 분자에 연결된 항체의 단일쇄 가변 영역 (scFv)에 의해 구성된 인공 다분자 단백질이다. scFv가 이의 동족 항원과 결합하는 경우, 신호전달이 유발되어 CAR-발현 세포독성 T 림프구에 의한 종양 세포 살해가 발생한다 (문헌 [Eshhar Z, Waks T, et al. PNAS USA. 90(2):720-724, 1993; Geiger TL, et al. J Immunol. 162(10):5931-5939, 1999; Brentjens RJ, et al. Nat Med. 9(3):279-286, 2003; Cooper LJ, et al. Blood 101(4):1637-1644, 2003; Imai C, et al. Leukemia. 18:676-684, 2004]). CAR-발현 자가 T 림프구를 사용한 임상 시험은 B-세포 난치성 백혈병 및 림프종 환자에서 긍정적인 반응을 나타내었다 (예를 들어, 문헌 [Till BG, et al. Blood 119(17):3940-3950, 2012; Maude SL, et al. N Engl J Med. 371(16):1507-1517, 2014] 참조).

[0006] 표면 분자 CD19에 특이적인 CAR-T 세포는 급성 림프모구 백혈병 (ALL), 만성 림프성 백혈병 및 비호지킨 림프종과 같은 난치성 CD19-양성 악성 종양 환자에서 형태학적 및 분자적 완화를 유도하는 것으로 밝혀졌다. 다른 악성 종양들은 상이한 항원에 대해 재유도된 T 세포에 의해 공격될 수 있다. 따라서, 종양학에서 유전자-조작된 세포 요법에 대한 가능한 응용 분야는 광범위하다.

[0007] CAR-T 세포 주입에 대한 초기 임상 경험은 또한 잠재적인 한계를 확인하였으며, 이는 치료 효과를 심각하게 감소시키고 개발을 방해할 수 있다. 주요 문제는 암 환자로부터 수집된 면역 세포의 가변적인 적합성이며, 이는 생체 내에서 확장하고 항종양 효과를 발휘하는 능력을 예측할 수 없게 만든다. 이러한 가변성은 가장 효과적인 세포 투여량의 확인을 복잡하게 만들고, 수명이 짧고 비효과적인 세포 생성물의 주입을 초래할 수 있으며, 궁극적으로는, 일관된 "살아있는 약물"의 개발을 막을 수 있다. 건강한 공여자로부터의 T 림프구의 사용은 효과 및 일관성을 개선하지만, 공여자 림프구 주입의 심각하고 잠재적으로 치명적인 결과인 이식편-대-숙주 질환 (GvHD)의 위험을 수반한다. 이러한 동종 이계 환경에서, 필수적인 세포에 의해 발현되는 조직 항원을 인식하는 능력을 억제하기 위해, 주입된 T 세포에 대한 추가적인 변형이 요구된다.[13]

[0008] 유전자 편집을 위한 실제적인 방법론의 출현으로 암의 세포 요법에 적용가능한 치료 세포 공학의 새로운 기회가 열렸다. TCRαβ 사슬을 인코딩하는 유전자를 결실시켜 동종이식편반응이 결여된 T 세포를 유도하기 위해 아연 핑거 메가뉴클레아제, TALEN 및 CRISPR-Cas9가 사용될 수 있는 반면, 거부를 지연시키기 위해 다른 유전자들이 표적화될 수 있다. 항-CD19 CAR 발현과 함께 TCRα 및 CD52 유전자좌의 TALEN 결실을 사용한 보고서는 CAR-발현을 유전자 편집과 조합하는 것이 기술적으로 도전적이기는 하지만 임상 환경에서 실행가능하다는 것을 나타내고 있다.

[0009] 요약하면, B-세포 악성 종양 환자를 위한 새로운 치료 옵션에 대한 충족되지 않은 상당한 필요성이 존재하는 상황이다.

발명의 내용

[0010] 면역 세포에서 표면 수용체 발현을 차단하기 위한 간단하고 효과적인 방법이 본원에 제공된다. 단백질 발현 차단제 (Protein Expression Blocker (PEBL))로 명명되는 특정 구조체는 표적 단백질이 세포막으로 이동하는 것을 방지한다. PEBL 구조체는 다른 유전자 변형과 용이하게 조합될 수 있고, 면역 세포의 기능을 최적화하기 위해 생체외 세포 처리를 위한 기존의 대규모 cGMP 등급 프로토콜에 포함될 수 있다.

[0011] 일 측면에서, 본 발명은 CAR-T 세포를 포함한 T 세포에서 표면 분자의 신속하고 효율적인 하향조절을 가능하게 하는 방법을 제공한다. 본 발명의 일 구현예에서, 항-CD3ε PEBL이 제공되며, 여기서 상기 항-CD3ε PEBL의 형

질도입은 CD3의 세포내 보유를 야기하여 T 림프구 표면 상에서의 TCRαβ의 발현을 방지하였다. 본원에 개략된 PEBL 구조체는 세포외 누출을 최소화하거나 전혀 수반하지 않을 수 있고 CD3/TCRαβ 발현 및 신호전달을 차단하는데 매우 효과적이다. 이러한 PEBL 구조체는 항바이러스 TCR로 형질도입된 T 세포가 동족 바이러스 펩티드에 반응할 수 없게 만들 수 있고, 인간 T 세포가 이식편-대-숙주 질환 (GvHD)을 야기하는 능력을 현저히 감소시킬 수 있다. PEBL 발현 및 CD3/TCRαβ 차단은 지속성이 있으며 다른 표면 분자의 발현에는 영향을 미치지 않는다. PEBL-발현 T 세포뿐만 아니라 유사한 T 세포는 생존 및 증식할 수 있다. 중요하게는, PEBL-발현 T 세포는 CAR 신호전달에 정상적으로 반응하고 시험관내에서 CAR-표적화된 백혈병 세포를 효과적으로 살해할 수 있다. CD3/TCRαβ 발현 및 신호전달의 PEBL 차단은 CAR-T 세포와 같은 동종 이계 T 세포의 주입을 지원하는 간단하고 효과적인 도구이다.

[0012] 일 측면에서, 본 발명은 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 분자를 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 조작된 CD3/TCRαβ-결핍 T 세포를 제공하며, 여기서 상기 표적-결합 분자는 CD3/TCRαβ 복합 단백질에 결합하는 항체를 포함하고, 상기 국소화 도메인은 소포체 (ER) 보유 서열, 골지 보유 서열, 및 프로테아좀 국소화 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 보유 신호전달 도메인 (retention signaling domain)을 포함하고, 상기 국소화 도메인에 연결된 상기 표적-결합 분자는 상기 조작된 CD3/TCRαβ-결핍 T 세포에 의해 분비되지 않는다.

[0013] 일부 구현예에서, 상기 항체는 TCRα, TCRβ, CD3ε, CD3δ, CD3γ, 및 CD3ζ로 이루어진 군으로부터 선택된 CD3/TCRαβ 복합 단백질에 결합하는 단일쇄 가변 단편 (scFv)이다. 특정 구현예에서, 상기 scFv는 서열 번호 1에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 가변 중쇄 (V_H) 서열 및 서열 번호 2에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 가변 경쇄 (V_L) 서열을 포함한다.

[0014] 일부 구현예에서, 상기 국소화 도메인은 CD8α, CD8β, 4-1BB, CD28, CD34, CD4, FcεRIγ, CD16, OX40, CD3ζ, CD3ε, CD3γ, CD3δ, TCRα, CD32, CD64, VEGFR2, FAS, 또는 FGFR2B로부터 유래한 막관통 도메인으로부터 선택된 막관통 도메인을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 ER 보유 서열은 KDEL (서열 번호 32), KKMP (서열 번호 33), KKTN (서열 번호 43), 또는 KKXX (여기서 X는 임의의 아미노산임) (서열 번호 35)로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.

[0015] 다른 측면에서, 본원에 기술된 조작된 T 세포 중 어느 하나 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 환자에서 이식편-대-숙주 질환의 가능성을 감소시키거나 제거하는 방법이 본원에 또한 제공되며, 상기 방법은 치료적 유효량의 이러한 약학적 조성물을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0016] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 조작된 T 세포는 키메라 항원 수용체 (CAR), 예를 들어 이에 제한되는 것은 아니지만, CD3 또는 CD19에 결합하는 CAR을 추가로 포함한다. 이러한 조작된 T 세포 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물이 본원에 제공된다. 일부 측면에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 환자에서 암을 치료하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 치료적 유효량의 이러한 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 경우에서, 상기 암은 조혈암이다. 다른 경우에서, 상기 암은 CD3 발현 암 (예를 들어, CD3를 발현하는 암 세포)이다. 특정 경우에서, 상기 암은 CD19 발현 암 (예를 들어, CD19를 발현하는 암 세포)이다.

[0017] 다양한 측면에서, 본 발명은, (i) 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 분자를 포함하는 폴리펩티드 및 (ii) 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함하는 조작된 CD3/TCRαβ-결핍 키메라 항원 수용체 T 세포 (CAR-T 세포)를 제공하며, 여기서 상기 표적-결합 분자는 CD3/TCRαβ 복합 단백질에 결합하는 항체를 포함하고, 상기 국소화 도메인은 소포체 (ER) 보유 서열, 골지 보유 서열, 및 프로테아좀 국소화 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 보유 신호전달 도메인을 포함하고, 상기 국소화 도메인에 연결된 상기 표적-결합 분자는 상기 조작된 세포에 의해 분비되지 않는다.

[0018] 일부 구현예에서, 상기 항체는 TCRα, TCRβ, CD3ε, CD3δ, CD3γ, 및 CD3ζ로 이루어진 군으로부터 선택된 CD3/TCRαβ 복합 단백질에 결합하는 단일쇄 가변 단편 (scFv)이다. 특정 구현예에서, 상기 scFv는 서열 번호 1에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 가변 중쇄 (V_H) 서열 및 서열 번호 2에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 가변 경쇄 (V_L) 서열을 포함한다. 상기 국소화 도메인은 또한 CD8α, CD8β, 4-1BB, CD28, CD34, CD4, FcεRIγ, CD16, OX40, CD3ζ, CD3ε, CD3γ, CD3δ, TCRα, CD32, CD64, VEGFR2, FAS, 또는 FGFR2B로부터 유래한 막관통 도메인으로부터 선택된 막관통 도메인을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 ER 보유 서열은 KDEL (서열 번호 32), KKMP (서열 번호 33), KKTN (서열 번호 43), 또는 KKXX (여기서 X는 임의의 아미노산임)

(서열 번호 35)로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.

[0019] 일부 구현예에서, 상기 조작된 CD3/TCRαβ-결핍 CAR-T 세포의 CAR은 CD3 또는 CD19에 결합한다. 일부 경우에서, 상기 CAR은 항-CD19 scFv 도메인, 4-1BB 자극 신호전달 도메인 및 CD3ζ 신호전달 도메인을 포함한다. 다른 경우에서, 상기 CAR은 항-CD3 scFv 도메인, 4-1BB 자극 신호전달 도메인 및 CD3ζ 신호전달 도메인을 포함한다.

[0020] 특정 측면에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 환자에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 치료적 유효량의, (i) 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 분자를 포함하는 폴리펩티드 및 (ii) 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함하는 조작된 CD3/TCRαβ-결핍 키메라 항원 수용체 T 세포 (CAR-T 세포)를 포함하는 약학적 조성물을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 표적-결합 분자는 CD3/TCRαβ 복합 단백질에 결합하는 항체를 포함하고, 상기 국소화 도메인은 소포체 (ER) 보유 서열, 골지 보유 서열, 및 프로테아좀 국소화 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 보유 신호전달 도메인을 포함하고, 상기 국소화 도메인에 연결된 상기 표적-결합 분자는 상기 조작된 세포에 의해 분비되지 않는다. 상기 항체는 TCRα, TCRβ, CD3ε, CD3δ, CD3γ, 및 CD3ζ로 이루어진 군으로부터 선택된 CD3/TCRαβ 복합 단백질에 결합하는 단일쇄 가변 단편 (scFv)일 수 있다. 일부 구현예에서, CD3ε에 결합하는 scFv는 서열 번호 1에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 가변 중쇄 (V_H) 서열 및 서열 번호 2에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 가변 경쇄 (V_L) 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 국소화 도메인은 CD8α, CD8β, 4-1BB, CD28, CD34, CD4, FcεRIγ, CD16, OX40, CD3ζ, CD3ε, CD3γ, CD3δ, TCRα, CD32, CD64, VEGFR2, FAS, 또는 FGFR2B로부터 유래한 막관통 도메인으로부터 선택된 막관통 도메인을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 ER 보유 서열은 KDEL (서열 번호 32), KKMP (서열 번호 33), KKTN (서열 번호 43), 또는 KKXX (여기서 X는 임의의 아미노산임) (서열 번호 35)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 국소화 도메인은 서열 번호 11 내지 31 중 어느 하나로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 조작된 CAR-T 세포의 CAR은 CD3에 결합한다. 다른 경우에서, 상기 조작된 CAR-T 세포의 CAR은 CD3에 결합한다. 상기 CAR은 항-CD19 scFv 도메인, 4-1BB 자극 신호전달 도메인 및 CD3ζ 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 또는, 상기 CAR은 항-CD3 scFv 도메인, 4-1BB 자극 신호전달 도메인 및 CD3ζ 신호전달 도메인을 포함할 수 있다.

[0021] 일부 구현예에서, 상기 조작된 CAR-T 세포는 동종 이계 T 세포 (예를 들어, 동종 이계 조작된 CAR-T 세포)이다. 다른 구현예에서, 상기 조작된 CAR-T 세포는 자가 T 세포 (예를 들어, 자가 조작된 CAR-T 세포)이다. 이러한 조작된 CAR-T 세포는, 세포의 투여시, 환자에서 감소된 이식편-대-숙주 반응을 유도할 수 있다.

[0022] 일부 구현예에서, 상기 환자는 CD3-양성 암과 같은 암에 걸려 있다. 다른 구현예에서, 상기 환자는 CD19-양성 암과 같은 암에 걸려 있다.

[0023] 다른 측면에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 환자에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 치료적 유효량의, (i) 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 분자를 포함하는 폴리펩티드 및 (ii) 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함하는 동종 이계 조작된 CD3/TCRαβ-결핍 키메라 항원 수용체 T 세포 (CAR-T 세포)를 포함하는 약학적 조성물을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 표적-결합 분자는 CDε에 결합하는 항체를 포함하고, 상기 국소화 도메인은 소포체 (ER) 보유 서열, 골지 보유 서열, 및 프로테아좀 국소화 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 보유 신호전달 도메인을 포함하고, 상기 국소화 도메인에 연결된 상기 표적-결합 분자는 상기 조작된 세포에 의해 분비되지 않는다.

[0024] 일부 구현예에서, 상기 항체는 CD3ε에 결합하는 단일쇄 가변 단편 (scFv)이다. CD3ε에 결합하는 scFv는 서열 번호 1에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 가변 중쇄 (V_H) 서열 및 서열 번호 2에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 가변 경쇄 (V_L) 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 국소화 도메인은 CD8α, CD8β, 4-1BB, CD28, CD34, CD4, FcεRIγ, CD16, OX40, CD3ζ, CD3ε, CD3γ, CD3δ, TCRα, CD32, CD64, VEGFR2, FAS, 또는 FGFR2B로부터 유래한 막관통 도메인으로부터 선택된 막관통 도메인을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 ER 보유 서열은 KDEL (서열 번호 32), KKMP (서열 번호 33), KKTN (서열 번호 43), 또는 KKXX (여기서 X는 임의의 아미노산임) (서열 번호 35)로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 국소화 도메인은 서열 번호 11 내지 31 중 어느 하나로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 CAR은 CD3 또는 CD19에 결합한다. 상기 CAR은 항-CD3 scFv 도메인, 4-1BB 자극 신호전달 도메인, 및 CD3ζ 신호전달 도메인, 또는 항-CD19 scFv 도메인, 4-1BB 자극 신호전달 도메인, 및 CD3ζ 신호전달 도메인을 포함할 수 있다.

[0025] 일 측면에서, 본 발명은 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 분자를 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 조작된 CD3/TCRαβ-음성 T 세포를 제공하며, 여기서 상기 표적-결합 분자는 CD3/TCRαβ 복합 단백질에 결합하는 항체를 포함하고, 상기 국소화 도메인은 소포체 (ER) 보유 서열, 골지 보유 서열, 및 프로테아좀 국소화 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 보유 신호전달 도메인을 포함하고, 상기 국소화 도메인에 연결된 상기 표적-결합 분자는 상기 조작된 세포에 의해 분비되지 않는다.

[0026] 일 측면에서, 본 발명은 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 분자를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하며, 여기서 상기 표적-결합 분자는 CD3/TCRαβ 복합 단백질에 결합하는 항체를 포함하고, 상기 국소화 도메인은 소포체 (ER) 보유 서열, 골지 보유 서열, 및 프로테아좀 국소화 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 보유 신호전달 도메인을 포함한다.

[0027] 본 발명은, (i) 키메라 항원 수용체 (CAR) 및 (ii) 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 분자를 포함하는 조작된 CD3/TCRαβ-음성 키메라 항원 수용체 T 세포 (CAR-T 세포)를 제공하며, 여기서 상기 표적-결합 분자는 CD3/TCRαβ 복합 단백질에 결합하는 항체를 포함하고, 상기 국소화 도메인은 소포체 (ER) 보유 서열, 골지 보유 서열, 및 프로테아좀 국소화 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 보유 신호전달 도메인을 포함하고, 상기 국소화 도메인에 연결된 상기 표적-결합 분자는 상기 조작된 CAR-T 세포에 의해 분비되지 않는다.

[0028] 본 발명은 이를 필요로 하는 환자에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 치료적 유효량의, 본원에 기술된 조작된 면역 세포 중 어느 하나를 포함하는 약학적 조성물을 암에 걸린 상기 환자에게 투여하여 이를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 단계를 포함한다.

[0029] 다른 측면에서, 본 발명은 환자에서 CD3 또는 CD19를 발현하는 암 또는 전암 상태를 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 치료적 유효량의, 본원에 기술된 조작된 면역 세포 중 어느 하나를 포함하는 약학적 조성물을 암에 걸린 상기 환자에게 투여하여 이를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 단계를 포함한다.

[0030] 다른 측면에서, 본 발명은 CD3 또는 CD19를 발현하는 혈액암을 손상시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은 혈액암 세포를 본원에 기술된 조작된 면역 세포 중 어느 하나와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0031] 일부 구현예에서, 본 발명은 포유동물, 예를 들어 인간 환자에서 표적 세포 집단 또는 조직으로 T-세포를 자극하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 치료적 유효량의, 본원에 기술된 조작된 면역 세포 중 어느 하나를 포함하는 약학적 조성물을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1a 내지 도 1d. 항-CD3ε PEBL은 표면 CD3 발현을 차단한다. (도 1a) 유세포 분석 점 도표는 GFP 단독 ("대조군") 또는 SEKDEL (서열 번호 50)로 형질도입된 세포에 대비한 항-CD3ε PEBL에 의한 저캇 (Jurkat)에서의 표면 CD3 하향조절을 나타낸다. (도 1b) 지시된 구조체로 형질도입된 저캇에서의 표면 CD3 발현. 막대들은 KEDL, SEKDEL, 및 PEBL 2,4,5,8,9,11에 대한 2 내지 3회의 실험의 평균, 또는 나머지에 대한 개별 결과를 나타낸다. (도 1c) 저캇에서의 PEBL-유래 항-CD3ε scFv의 세포내 또는 표면 발현. 막대들은 PEBL 2,4,8,9,11에 대한 2 내지 3회의 실험의 평균, 또는 나머지에 대한 개별 결과를 나타낸다. (도 1d) 유세포 분석 막대 그래프는 형질도입 후 8 내지 13일째에, GFP 단독으로 형질도입된 림프구의 것에 대비한 항-CD3ε SEKDEL 또는 PEBL로 형질도입된 말초 혈액 T 세포에서의 CD3 발현을 나타낸다.

도 2a 내지 도 2d. 항-CD3ε PEBL은 TCRαβ를 하향조절한다. (도 2a) PEBL 형질도입 후 5 내지 9일째에 GFP-양성 T 림프구에서의 TCRαβ 발현. GFP 단독 ("대조군"; n = 25), PEBL2 (n = 4) 및 PEBL5 (n = 18)으로 형질도입된 세포에 대해 평균 (± 표준 편차 [SD])를 도시하였으며; 다른 데이터는 1회 실험의 결과 또는 2회 실험의 평균을 나타낸다. (도 2b) 유세포 분석 점 도표는 GFP 단독으로 형질도입된 세포에 대비한 T 림프구에서의 TCRαβ 하향조절을 나타낸다. (도 2c) 장기 배양 후 PEBL로 형질도입된 저캇 세포에서의 CD3/TCRαβ 발현; 대조군은 GFP 단독으로 형질도입된 세포임. (도 2d) T 림프구 (200 IU/mL IL-2와 함께) 또는 저캇 세포의 장기 배양에서의 CD3/TCRαβ 발현의 총체적 결과. 기호들은 GFP+ 형질도입된 세포에서 표면 CD3/TCRαβ의 90% 초과 감소의 지속성을 나타낸다.

도 3a 내지 도 3f. PEBL에 의한 CD3/TCRαβ 하향조절은 세포 증식에 영향을 미치지 않지만 CD3/TCRαβ 신호전달을 제거한다. (도 3a) 항-CD3 PEBL 또는 GFP 단독 ("대조군")으로 형질도입된 저캇의 성장 속도. 기호들은 3회 측정값의 평균 (± SD)을 나타낸다. (도 3b) IL-2 (200 IU/mL)과 함께 배양된 5명의 공여자로부터의 PEBL 형

질-도입된 또는 대조군 T 림프구의 생존 (7회의 실험). 기호들은 3회 측정값의 평균을 나타낸다. (도 3c) OKT3 또는 비반응 마우스 IgG2a와 함께 24시간 후 저캇에서의 CD25 및 CD69 평균 형광 강도 (MFI). 막대들은 3회 측정값의 평균 (±SD)을 나타낸다. (도 3d) OKT3을 함유하지 않는 배양물과 비교하여 OKT3을 함유하는 배양물로부터 회수된 생존가능한 PEBL 또는 대조군 T 림프구 (배양물 모두 IL-2 (200 IU/mL)를 함유함). 기호들은 3명의 공여자로부터의 세포를 사용한 9회 측정값의 평균 (± SD)을 나타낸다. 유의한 차이에 대해 스튜던트 t 검정에 의한 P 값을 표시하였다 (**** $P < 0.0001$). (도 3e) 네오마이신 선택 후, HBV s183에 특이적인 TCR 또는 네오마이신-내성 유전자 ("NeoR")만을 함유하는 벡터로 형질도입된 저캇 세포를 항-CD3 PEBL 또는 mCherry 단독 ("대조군")으로 형질도입하였다. CD3, TCRαβ 및 TCRVβ3 사슬 (HBV s183 TCR의 일부) 발현이 도시되었으며; TCRVβ3 발현은 세포 표면 상에서, 및 세포 투과화 후 세포 내에서, 시험되었다. (도 3f) 패널 e에 도시된 형질도입된 저캇 세포는 HBV s183 펩티드로 로딩된 T2 세포와 24시간 동안 공동 배양되었다. CD25 및 CD69 MFI에서 펩티드를 포함하지 않는 T2 세포와 함께 배양한 후 측정된 값을 뺀 값을 표시하였다. 기호들은 3회 측정값의 평균을 나타낸다.

도 4a 내지 도 4d. CD3/TCRαβ 발현 차단을 갖는 T 세포에서의 CAR 발현 및 신호전달. (도 4a) 유세포 분석 점도표는 CD3 하향조절 및 항-CD19-41BB-CD3ζ CAR 발현을 나타낸다. 세포는 CAR 구조체 및 이후 항-CD3ε PEBL로 형질도입되거나, 또는 GFP 단독 및 이후 mCherry 단독 ("대조군")으로 형질도입되었다. (도 4b) CAR mRNA 전기천공 (n = 5) 후 24시간째에, 또는 CAR 바이러스 형질도입 (n = 4) 후 5 내지 6일째에, 항-CD19-41BB-CD3ζ CAR을 발현하는 GFP 단독 ("대조군") 또는 PEBL로 형질도입된 T 림프구의 백분율; P=0.207. (도 4c) CAR mRNA로 전기천공되거나 mRNA로 전기천공되지 않고, E:T 1:2로 CD19+ RS4;11과 함께 8시간 동안 배양된, 대조군 T 세포 또는 PEBL에 의한 IFNγ 생산. 막대들은 3명의 공여자로부터의 세포를 사용한 9회 측정값의 평균 (± SD)을 나타낸다; ****P< 0.0001. (도 4d) T 림프구는 먼저 CAR로 형질도입된 후 mCherry 단독 또는 항-CD3 PEBL로 형질도입되었다. 이어서 세포를 방사선 조사된 CD19+ OP-1와 함께 3주 동안 배양하였다. GFP 단독 및 이후 mCherry 단독으로 형질도입한 세포 ("대조군")와 결과를 비교하였다. 기호들은 3개의 배양물에서 입력 세포의 수에 대비한 세포 회수 평균 (± SD) 백분율을 나타낸다.

도 5a 내지 도 5d. CAR^+PEBL T 림프구의 세포독성. (도 5a) 2:1 E:T에서 $CD19^+$ ALL 세포주에 대한, 항-CD19-41BB-CD3ζ CAR mRNA로 전기천공되거나 mRNA로 전기천공되지 않은 3명의 공여자로부터의 PEBL 또는 대조군 (mCherry-형질도입됨) T 세포의 4시간 세포독성 분석 (보충도 4 참조). 기호들은 각 공여자의 3회 측정값의 평균을 나타낸다. (도 5b) mCherry 단독 또는 항-CD3 PEBL을 함유하는 레트로바이러스 벡터로 순차적으로 형질도입 된, 2명의 공여자로부터의 CAR-형질도입된 T 림프구의 세포독성을 $CD19^+$ 세포주에 대해 시험하였다. 대조군은 GFP 단독 및 이어서 mCherry 단독으로 형질도입된 세포였다. 1:1 E:T에서 $CD19^+$ ALL 세포주에 대한 4시간 분석에 대한 데이터를 도시하였다 (전체 데이터 세트는 도 12a 및 도 12b에 도시됨). 각각의 기호는 각 공여자에 대한 3회 실험의 평균을 나타낸다. (도 5c 내지 도 5d) 패널 b에서와 같이 형질도입된 T 림프구를 mCherry로 형질도입된 Nalm6에 대해 장기 세포독성에 대해 시험하였다. 백혈병 세포 성장은 IncuCyte Zoom System (Essen BioScience)으로 측정하였다. E:T 1:8에서 80시간째에 3중 배양물의 전체 웰 영상을 도 5c에 도시하였으며; 지시된 E:T 비율에서의 백혈병 세포 성장 측정값을 도 5d에 도시하였다. ***P < .001; ****P < .0001.

도 6a 내지 도 6e. PEBL에 의한 CD3/TCRαβ 녹다운은 GVHD를 방지한다. (도 6a) NSG 마우스에 2.5 Gy로 방사선을 조사하고, 1일 후 항-CD3 PEBL 또는 GFP 단독 ("대조군"; n = 8/군)으로 형질도입된 1 x 10^7개의 T 림프구를 IV 주사하였다. 체중은 방사선 조사 후 3일째 체중에 대비한 변화로 표시된다. (도 6b) 말초 혈액에서의 헤모글로빈 수준 및 (c) 혈소판 수치. (도 6d) 카플란-마이어 (Kaplan-Meier) 전체 생존 곡선 및 로그-순위 검정. 2회 연속 측정에서 체중 감소가 20%를 초과할 때 마우스를 안락사시켰다 (추가 데이터는 도 14에 도시됨). (도 6e) T-세포 주사 후 18일째 혈액에서의 인간 $CD45^+$ 세포 수. *P = 0.0148; ***P < 0.001.

도 7a 내지 도 7f. PEBL 및 CAR 발현에 의한 CD3/TCRαβ 녹다운을 갖는 T 세포는 마우스에서 백혈병 세포를 살해한다. (도 7a) NSG 마우스에 5 x 10^5개의 Nalm6-루시퍼라제 세포를 IV 주사하였다. 3일 후, 마우스에 항-CD19-41BB-CD3ζ CAR 및 PEBL 또는 mCherry 단독으로 형질도입된, 2 x 10^7개의 T-림프구를 투여하였으며; 다른 마우스에는 그 대신 조직 배양 배지 ("T 세포 없음")를 투여하였다. Nalm6 생착을 나타내기 위해, 3일째의 생체 발광 이미지는 향상된 감도로 나타내었다. (도 7b) 기호들은 복부 및 등면 영상에서의 평균 생체 발광 신호에 해당한다. (도 7c) 전체 생존에 대한 카플란-마이어 (Kaplan-Meier) 곡선 및 로그-순위 검정. 복부 및 등면 생

체 발광 평균 신호가 초 당 1 x 0^{10}개의 광자에 도달했을 때 마우스를 안락사시켰다. ****P < 0.0001. (도 7d) 패널 a에 기술된 바와 같이 3일째에 NSG 마우스에 5 x 0^{5}개의 Nalm6-루시퍼라제 세포 및 2 x 10^{7}개의 T 림프구를 IV 주사하였다. T 림프구 주사 전에, 마우스는 2.5 Gy 전신 방사선 조사를 받았다. Nalm6 생착을 나타내기 위해, 3일째의 생체 발광 이미지는 향상된 감도로 나타내었다. (도 7e) 기호들은 복부 및 배면 영상에 의한 생체 발광 평균에 해당한다. (도 7f) 전체 생존에 대한 카플란-마이어 (Kaplan-Meier) 곡선 및 로그-순위 검정. 복부 및 등면 생체 발광 평균 신호가 초 당 1 x 10^{10}개의 광자에 도달했을 때, 또는 GVHD의 징후 (2회 연속 측정에서 >20% 중량 감소가 초과되고 이동성 감소 및/또는 털 손실이 발생함)가 명백할 때, 마우스를 안락사시켰다. GVHD는 5마리의 CAR+mCherry 마우스 중 3마리에서 발생하였고 6마리의 CAR+PEBL 마우스 중 0마리에서 발생하였으며; 재발 ("Rel.") 비율은 각각 5마리 중 0마리 대 6마리 중 2마리였다. **P = 0.0014; ***P = 0.0006.

도 8a. 본원에 기술된 단백질 발현 차단제 (PEBL) 구조체.

도 8b. PEBL 또는 GFP 단독 ("대조군")으로 형질도입된 T 림프구의 면역표현형. 4명의 공여자로부터의 형질도입된 림프구에서의 3-5회 측정값의 평균 (± SD)을 도시하였다. 형질도입 후 6-8일째에 세포 마커를 분석하였다. 모의 (mock)의 경우 GFP+ 세포에 대해 및 PEBL의 경우 CD3-음성 세포에 대해 게이팅한 후 백분율을 계산하였다. 모든 비교에서 P >0.05. 항체는 BD Biosciences (CD4 PE-Cy7, CD8 PE, CD7 PE, CD25 PE-Cy7, CD62L APC, CD69 PE), Biolegend (CD2 APC, CD137 APC, CD279 PE, CD366 PE), 및 ThermoFisher Scientific (CD223 APC)로부터 입수하였다.

도 8c. 항-CD3 PEBL 또는 GFP 단독 ("대조군")으로 형질도입된 T 세포를 주사한 면역결핍 마우스의 병리학적 특징.

도 9. PEBL에 대한 scFv를 유도하는데 사용되는 항-CD3 항체의 특이성. K562 세포는 각각의 CD3 서브유닛 (δ, ε, γ, ζ)의 cDNA, 2개의 서브유닛의 조합, 또는 GFP만을 함유하는 벡터 ("대조군")로 형질도입되었다. 형질도입된 세포를 투과화하고 PLU4 하이브리도마 세포로부터 분비된 상층액과 함께 배양한 다음, Alexa Fluor 647 접합된 염소 항-마우스 IgG 항체 (SouthernBiotech, Birmingham, AL)로 염색하였다. Fortessa 유세포 분석기 (BD Bioscience) 및 FlowJo 소프트웨어를 사용하여 분석을 수행하였다.

도 10a 내지 도 10c. 항-CD3ε PEBL의 세포 국소화. (도 10a) 유세포 분석 막대 그래프는 항-CD3 PEBL5 또는 GFP 단독 ("모의")으로 형질도입된 저캇 세포에서의 CD3의 표면 및 세포내 발현을 나타낸다. (도 10b) 항-CD3 PEBL5 형질도입된 저캇 세포의 공초점 현미경 영상. 세포를 투과화한 후, PEBL scFv를 비오틴 접합된 염소 항-마우스 F(ab')2 항체 및 이어서 스트렙타비딘 PE로 검출하였고, CD3는 항-CD3 APC로 검출하였다. (도 10c) PEBL은 형질도입된 세포에 의해 분비되지 않는다. PEBL은 세포 내의 세포하 구획에 국소화될 수 있다. 예를 들어, PEBL은 ER 또는 골지에 보유될 수 있다. 항-CD3 PEBL, 항-CD3 scFv 단독, 또는 GFP 단독 ("모의")로 48시간 이상 형질도입된 저캇 세포의 상층액을 CD3+ Loucy 세포와 함께 4℃에서 45분 동안 배양하였다. Loucy의 표면에 결합된 분비된 scFv를 비오틴-접합된 염소 항-마우스 F(ab')2 항체 및 이어서 스트렙타비딘 APC로 시각화하였다.

도 11. 장기 배양 후 T 림프구에서의 CD3/TCRαβ의 하향조절. 유세포 분석 점 도표는 200 IU/mL IL-2와 함께 55일 배양한 후의, PEBL5 및 GFP, 또는 GFP 단독 ("대조군")으로 형질도입된 T 림프구에서의 CD3 및 TCRαβ 발현을 나타낸다. 잔류 CD3+ 세포의 고갈 전후의 결과를 도시하였다.

도 12a 내지 도 12b. PEBL-CAR T 림프구의 세포독성. 도 11a: 항-CD19-41BB-CD3ζ CAR mRNA로 전기천공되거나 mRNA로 전기천공되지 않은 PEBL- 또는 모의-형질도입된 T 세포의 세포독성. CD19+ ALL 세포주에 대한 4시간 분석에 대한 데이터를 도시하였다. 각각의 기호는 지시된 E:T 비율에서 3회 실험의 평균 (± SD)을 나타낸다. 도 11b: mCherry 단독 또는 항-CD3 PEBL로 순차적으로 형질도입된 CAR- 또는 GFP 단독-형질도입된 T 림프구의 세포독성을 CD19+ 세포주에 대해 시험하였다. CD19+ ALL 세포주에 대한 4시간 분석에 대한 데이터를 도시하였다. 각각의 기호는 지시된 E:T 비율에서 3회 실험의 평균 (± SD)을 나타내며; 각각의 패널은 한 공여자의 세포를 사용한 실험에 해당한다.

도 13a 내지 도 13c. CAR 및 PEBL 구조체를 전달하는 바이시스트로닉 벡터의 개발. (도 13a) 바이시스트로닉 구조체의 개략도. ATNFSLLKQAGDVEENPGP (서열 번호 42)의 예시적인 2A 서열을 도 13a에 제공하였다. (도 13b) 유세포 분석 점 도표는 말초 혈액 T 림프구에서의 CD3 하향조절 및 항-CD19-41BB-CD3ζ CAR 발현을 나타낸다. 세포는 GFP 단독 ("대조군") 또는 바이시스트로닉 구조체 (CAR-2A-PEBL)로 형질도입되었다. 후자에 대해, 잔류

CD3+ 세포의 고갈 전후의 결과를 도시하였다. (도 13c) 대조군 T 림프구의 것에 대비한 CAR 또는 CAR-2A-PEBL로 형질도입된 T 림프구의 세포독성. CD19+ ALL 세포주 OP-1, Nalm6 및 RS4;11에 대한 4시간 분석에 대한 데이터를 도시하였다. 각각의 기호는 지시된 E:T 비율에서의 3회 실험의 평균 (± SD)을 나타낸다.

도 14a 내지 도 14c. CD3/TCRαβ 발현의 PEBL 하향조절 없이 인간 T 림프구를 투여받은 마우스에서의 GvHD의 징후. NOD-SCID-IL2RGnull 마우스에 2.5 Gy로 방사선을 조사하고, 1일 후에 항-CD3 PEBL 또는 GFP 단독("모의"; n = 8/군)으로 형질도입된 1 x 10^7개의 T 림프구를 IV 주사하였다. 모든 마우스에 IL-2 (20000 IU)를 1주 3회 i.p. 투여하였다. 볼 채혈을 통해 수집된 혈액에서의 (도 14a) 헤모글로빈 수준 및 (도 14b) 혈소판 수치. (도 14c) 모의군의 마우스 중 하나로부터의 조직의 항-인간 CD4 및 CD8 항체를 사용한 면역 조직 화학 및 헤마톡실린-에오신 염색. 비장 및 골수에서의 조혈 세포의 감소와 함께, 모든 조직에서 섬유화뿐만 아니라 CD4+ 또는 CD8+ 림프구의 침윤이 관찰되었다.

도 15. 항-CD3ε PEBL을 발현하는 비-동종반응성(non-alloreactive) T 세포 및 바이시스트로닉 구조체로부터 CAR 및 항-CD3ε PEBL을 발현하는 비-동종반응성 CAR-T 세포의 개략도.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 이하, 본 발명의 예시적인 구현예에 대해 설명한다.

[0034] **1.단백질 발현 차단제 (PEBL)를 발현하는 조작된 세포**

[0035] 본원에 기술된 방법은 면역 세포에서 TCRα, TCRβ, CD3 (예를 들어, CD3δ, CD3ε, CD3γ, 및 CD3ζ)와 같은 특정 표적 TCR 복합 단백질의 신속한 제거 또는 불활성화를 가능하게 한다. 상기 방법은, 제거되거나 중화될 표적 (예를 들어, 단백질)에 결합하는 표적-결합 분자를 함유하는 폴리펩티드 구조체에 부분적으로 의존한다. 상기 표적-결합 분자는, 응용 분야에 따라 폴리펩티드를 특정 세포 구획, 예를 들어 골지, 소포체 (ER), 프로테아좀 또는 세포막으로 유도하는 도메인 (예를 들어, 국소화 도메인)에 연결된다. 간략화를 위해, 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 분자는 본원에서 "단백질 발현 차단제"또는 "PEBL"로 지칭될 수 있다.

[0036] 활성화된 면역 세포에 의한 사이토카인의 분비는 사이토카인 방출 증후군 및 대식세포 활성화 증후군을 유발하여 면역 세포 요법의 심각한 부작용을 일으키는 것으로 밝혀져 있다 (문헌 [Lee DW, et al, Blood. 2014;124(2): 188-195]). 따라서, 본원에 개략된 PEBL은, 이러한 염증 캐스케이드에 기여할 수 있는 사이토카인, 예를 들어 IL-6, IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-27, IL-35, 인터페론 (IFN)-γ, IFN-β, IFN-α, 종양 괴사 인자 (TNF)-α, 및 형질전환 성장 인자 (TGF)-β를 차단하는데 사용될 수 있다. 이와 같이, 상기 표적-결합 분자는 IL-6, IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-27, IL-35, IFN-γ, IFN-β, IFN-α, TNF-α, 또는 TGF-β에 특이적으로 결합하는 분자일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 표적-결합 분자는 TCRα, TCRβ, CD3δ, CD3ε, CD3γ, 및 CD3ζ와 같은 TCR 복합 단백질에 특이적으로 결합하는 분자이다.

[0037] T 세포 상에서 발현되는 리간드 (예를 들어, 펩티드 또는 항원)에 결합시 면역 반응을 활성화 또는 비활성화할 수 있는 모든 이러한 적합한 결합 분자는 총괄적으로 "표적-결합 분자"로 지칭된다. 당업자에게 이해되는 바와 같이, 표적-결합 분자는 오로지 항체 또는 항원-결합 단편 (예를 들어, scFv)을 함유할 필요는 없으며; 오히려, 표적 분자에 결합하는 표적-결합 분자의 부분은 예를 들어 수용체-리간드 쌍의 수용체, 또는 수용체-리간드 쌍의 리간드로부터 유래할 수 있다.

[0038] 일부 구현예에서, 상기 국소화 도메인은 보유 신호전달 도메인을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 국소화 도메인은 보유 신호전달 도메인 및 막관통 도메인을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 보유 신호전달 도메인은 소포체 (ER) 보유 서열, 골지 보유 서열, 또는 프로테아좀 국소화 서열을 포함한다. 상기 보유 신호전달 도메인은 단백질이 세포에 의해 분비되는 것을 방지하거나 방해하는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 상기 보유 신호전달 도메인은 단백질을 세포내 구획에 보유하는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 상기 보유 신호전달 도메인은 ER 또는 골지의 막과 같은 세포막에 단백질을 보유하고 고정하는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 보유 신호전달 도메인은 KDEL 서열 (서열 번호 32), KKD 또는 KKE 서열 KKMP 서열 (서열 번호 33), YQRL 서열 (서열 번호 34) 또는 KKXX 서열 (여기서 X는 임의의 아미노산 서열임) (서열 번호 35)을 포함할 수 있다.

[0039] 일부 구현예에서, 상기 단백질 발현 차단 (PEBL) 폴리펩티드는 세포에 의해 분비되지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 PEBL 폴리펩티드는 세포의 세포 표면 상에서 발현되지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 PEBL 폴리펩티드는

T 세포의 세포 표면 상에서 발현되는 키메라 항원 수용체 (CAR)로서 기능하지 않는다.

[0040] 상기 막관통 도메인은 CD8α, CD8β, 4-1BB, CD28, CD34, CD4, FcεRIγ, CD16, OX40, CD3ζ, CD3ε, CD3γ, CD3δ, TCRα, CD32, CD64, VEGFR2, FAS, 또는 FGFR2B로부터 유래한 막관통 도메인을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 국소화 도메인의 막관통 도메인은 CD8α로부터 유래한다. 상기 막관통 도메인은 보유 신호전달 도메인에 연결될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 막관통 도메인은 링커를 통해 보유 신호전달 도메인에 연결된다.

[0041] 링커의 비제한적인 예는$(GS)_n$, $(GGS)_n$, $(Gly_3Ser)_n$, $(Gly_2SerGly)_n$, $(Gly_2SerGly_2)_n$, 또는 $(Gly_4Ser)_n$을 포함하고, 여기서 n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다. 일부 구현예에서, 상기 링커는 $(Gly_4Ser)_3$ 또는 $(Gly_4Ser)_4$이다. 링커 길이의 변화는 활성을 유지하거나 향상시켜, 활성 연구에서 우수한 효능을 제공할 수 있다.

[0042] 일부 구현예에서, 본 발명의 국소화 도메인은 표 1 및 도 8a에 제공된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 국소화 도메인은 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 국소화 도메인은 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 국소화 도메인은 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 국소화 도메인은 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 국소화 도메인은 서열 번호 15의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 국소화 도메인은 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 국소화 도메인은 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 국소화 도메인은 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 국소화 도메인은 서열 번호 19의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 국소화 도메인은 서열 번호 20의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 국소화 도메인은 서열 번호 21의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 국소화 도메인은 서열 번호 22의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 국소화 도메인은 서열 번호 23의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 국소화 도메인은 서열 번호 24의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 국소화 도메인은 서열 번호 25의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 국소화 도메인은 서열 번호 26의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 국소화 도메인은 서열 번호 27의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 국소화 도메인은 서열 번호 28의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 국소화 도메인은 서열 번호 29의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 국소화 도메인은 서열 번호 30의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 국소화 도메인은 서열 번호 31의 아미노산 서열을 포함한다.

[0043] 이와 같이, 상기 국소화 도메인은 PEBL의 C-말단 영역에 위치하는 반면, 상기 표적-결합 도메인은 N-말단 영역에 위치한다. 일부 구현예에서, N-말단에서 C-말단으로의 PEBL은 표적-결합 도메인, 링커 및 국소화 도메인을 포함한다. 다른 구현예에서, N-말단에서 C-말단으로의 PEBL은 신호 펩티드, 표적-결합 도메인, 링커 및 국소화 도메인을 포함한다. 특정 구현예에서, N-말단에서 C-말단으로의 PEBL은 신호 펩티드, 표적-결합 도메인, 및 국소화 도메인을 포함한다. 다른 구현예에서, N-말단에서 C-말단으로의 PEBL은 표적-결합 도메인 및 국소화 도메인을 포함한다.

[0044] 본 발명의 조작된 세포는 기능성 T 세포 수용체를 생산하지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 CD3/TCRαβ 복합체의 성분 또는 서브유닛 중 하나 이상은 세포 표면 상에서 발현되지 않는다. 다시 말하면, 이러한 세포는 CD3/TCRαβ-음성 또는 CD3/TCRαβ-결핍이다.

[0045] **2.단백질 발현 차단제 (PEBL) 및 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하는 조작된 세포**

[0046] 따라서, 일 구현예에서, 본 발명은 키메라 항원 수용체 (예를 들어, CAR)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산, 및 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 분자 (예를 들어, PEBL)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을 포함하는 조작된 면역 세포 (예를 들어, 조작된 T 세포)에 관한 것이다.

[0047] 본원에서, "조작된" 면역 세포는 자연 발생 면역 세포와 비교하여 유전자 변형된 면역 세포를 포함한다. 예를 들어, 본 방법에 따라 생산된 조작된 T 세포는 그것이 유래한 T 세포에서 자연적으로 발생하지 않는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을 갖는다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조작된 면역 세포는 PEBL 및 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함한다. 예시적인 CAR의 비제한적인 예는 CD3, CD19, CD22, CD30, CD123, B 세포 성숙 항원 (BCMA), GD2, 메소텔린, EGVRvIII, HER2, c-Met, PD-L1, 기타 종양 관련 항원에 결합하는 CAR을 포함한다.

[0048] 예시적인 종양 관련 항원은 메소텔린, EGFRvIII, TSHR, CD19, CD123, CD22, CD30, CD171, CS-1, CLL-1, CD33, GD2, GD3, BCMA, Tn Ag, 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), ROR1, FLT3, FAP, TAG72, CD38, CD44v6, CEA, EPCAM,

B7H3, KIT, IL-13Ra2, 인터류킨-11 수용체 (IL-1 1Ra), PSCA, PRSS21, VEGFR2, LewisY, CD24, 혈소판 유래 성장 인자 수용체-베타 (PDGFR-beta), SSEA-4, CD20, 엽산 수용체 알파 (FRa), ERBB2 (Her2/neu), MUC1, 표피 성장 인자 수용체 (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, CD 179a, 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, 서바이빈 및 텔로머라제, PCTA-1/갈렉틴 8, MelanA/MART1, Ras 돌연변이체, hTERT, 육종 전좌 중단점, ML-IAP, ERG (TMPRSS2 ETS 융합 유전자), NA17, PAX3, 안드로겐 수용체, 사이클린 B 1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B 1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES 1, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, 인간 텔로머라제 역전사효소, RU1, RU2, 장 카르복실 에스테라제, mut hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5, 및 IGLL1을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0049] 일부 구현예에서, 본 발명의 조작된 면역 세포는 국소화 도메인에 연결된 항-CD3 scFv 및 CD19에 결합하는 CAR을 포함한다. 특정 구현예에서, 본 발명의 조작된 면역 세포는 국소화 도메인에 연결된 항-CD3 scFv 및 항-CD19-4-1BB-CD3ζ CAR을 포함한다.

[0050] 다른 구현예에서, 본 발명의 조작된 면역 세포는 국소화 도메인에 연결된 항-CD3 scFv 및 CD3에 결합하는 CAR을 포함한다. 특정 구현예에서, 본 발명의 조작된 면역 세포는 국소화 도메인에 연결된 항-CD3 scFv 및 항-CD3-4-1BB-CD3ζ CAR을 포함한다.

[0051] 특정 구현예에서, 상기 조작된 면역 세포는 조작된 T 세포이다. 일부 경우에서, 상기 T 세포는 세포독성 T 세포, 보조 T 세포, 조절 T 세포, 효과기 T 세포, 기억 T 세포, 자연 살해 T 세포, 감마 델타 T 세포 등이다.

[0052] 본원에 개략된 PEBL은 표적 단백질이 세포막으로 수송되는 것을 방지한다. 예를 들어, 본원에 기술된 CD3/TCR 복합체의 단백질에 대한 PEBL은 ER에 보유된다. CD3ε에 대한 PEBL은 내인성 CD3과 동일한 세포내에서 공존할 수 있다. 따라서, 세포 표면 상에서의 내인성 CD3 발현이 억제된다. 일부 구현예에서, 이러한 PEBL은 CD3을 제거한다. 다른 구현예에서, PEBL은 TCRαβ 발현을 제거한다. CD3에 대한 PEBL은 CD3/TCRαβ 발현을 제거할 수 있다. 일부 경우에서, 상기 PEBL은 조작된 면역 세포에서 면역표현형 변화를 일으키지 않는다. 또한, PEBL은 조작된 면역 세포의 증식에 영향을 미치지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 PEBL은 CAR, 예를 들어 항-CD 19-4-1BB-CD3ζ CAR과 공동 발현된다.

[0053] 특정 측면에서, 상기 CAR은 CD20, CD22, CD33, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD45, CD52, CD38, CS-1, TIM3, CD123, 메소텔린, 엽산 수용체, HER2-neu, 표피 성장 인자 수용체 및 표피 성장 인자 수용체를 포함하나 이에 제한되지 않는, 종양 세포의 표면 상에서 발현되는 분자에 결합한다. 일부 구현예에서, 상기 면역 활성화 수용체는 CAR (예를 들어, 항-CD19-4-1BB-CD3ζ CAR)이다. 특정 구현예에서, 상기 면역 활성화 수용체는, CD20, CD22, CD33, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD45, CD52, CD38, CS-1, TIM3, CD123, 메소텔린, 엽산 수용체, HER2-neu, 표피 성장 인자 수용체 및 표피 성장 인자 수용체를 포함하나 이에 제한되지 않는, 종양 세포의 표면 상에서 발현되는 분자에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편 (예를 들어, scFv)을 포함한다.

[0054] 본 발명에 따른 키메라 항원 수용체 (예를 들어, CAR)의 막관통 도메인은 CD8α, CD8p, 4-1BB, CD28, CD34, CD4, FcsRIγ, CD16 (예를 들어, CD16A 또는 CD16B), OX40, CD3ζ, CD3δ, CD3γ, CD35, TCRα, CD32 (예를 들어, CD32A 또는 CD32B), CD64 (예를 들어, CD64A, CD64B, 또는 CD64C), VEGFR2, FAS, 및 FGFR2B를 포함하나 이에 제한되지 않는, 단일-통과 막 단백질로부터 유래한다. 일부 예에서, 상기 막 단백질은 CD8α가 아니다. 상기 막관통 도메인은 또한 비-자연 발생 소수성 단백질 분절일 수 있다.

[0055] 상기 키메라 항원 수용체 (예를 들어, CAR)의 힌지 도메인은 CD8α 또는 IgG와 같은 단백질로부터 유래할 수 있다. 상기 힌지 도메인은 CD8α 또는 비-자연 발생 펩티드, 예를 들어 다양한 길이의 친수성 잔기로 이루어진 폴리펩티드 또는 $(GGGGS)_n$ (서열 번호 36) 폴리펩티드 (여기서 n은 예를 들어 2 내지 12 (경계값 포함)의 정수임)의 막관통 또는 힌지 도메인의 단편일 수 있다.

[0056] 상기 키메라 항원 수용체 (예를 들어, CAR)의 신호전달 도메인은 CD3ζ, FcεRIγ, DAP10, DAP12 또는 면역 세포에서 활성화 신호를 전달하는 것으로 알려진 다른 분자로부터 유래할 수 있다. 상기 수용체의 적어도 하나의 공동-자극 신호전달 도메인은 공동-자극 분자, 예를 들어 4-1BB (CD137로도 알려져 있음), CD28 변이체, OX40, ICOS, CD27, GITR, HVEM, TIM-1, TIM-3, LFA-1, 또는 CD2일 수 있다. 이러한 분자는 용이하게 입수가능하고 당

업계에 공지되어 있다.

[0057] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 목적하는 결과를 달성하기 위해, 면역 활성화 수용체의 성분은 본원에 기술된 바와 같이 다수의 기능성 조합을 포함하도록 조작될 수 있다. 상기 특정 항-CD19-4-1BB-CD3ζ CAR을 일례로 사용하는 경우, 분자에 결합하는 항체 (예를 들어, 또는 scFv와 같은 이의 항원-결합 단편)는, 본원에 기술된 바와 같이, 상이한 분자에 결합하는 항체로 치환될 수 있다 (예를 들어, 항-CD19 대신에 항-CD20, 항-CD33, 항-CD123 등). 다른 구현예에서, 상기 공동-자극 분자 (이 특정 예에서는 4-1BB)는 또한 상이한 공동-자극 분자, 예를 들어 CD28로 변화될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 자극 분자 (이 특정 예에서는 CD3)는 다른 공지된 자극 분자로 치환될 수 있다. 다양한 구현예에서, 상기 수용체의 막관통 도메인은 또한 원하는 대로 변화될 수 있다. 이러한 면역 활성화 수용체의 설계, 생산, 및 기능에 대한 시험은 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 유사하게, 이러한 면역 활성화 수용체를 인코딩하는 핵산의 설계, 세포 내로의 전달 및 발현은 당업계에 공지되어 있으며 용이하게 이용가능하다.

[0058] 본원에서, 용어 "핵산"은 복수의 뉴클레오티드 단량체 (예를 들어, 리보뉴클레오티드 단량체 또는 데옥시리보뉴클레오티드 단량체)를 포함하는 중합체를 지칭한다. "핵산"은 예를 들어 게놈 DNA, cDNA, RNA 및 DNA-RNA 하이브리드 분자를 포함한다. 핵산 분자는 자연 발생, 재조합 또는 합성일 수 있다. 또한, 핵산 분자는 단일 가닥, 이중 가닥 또는 삼중 가닥일 수 있다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 변형될 수 있다. 이중 가닥 중합체의 경우, "핵산"은 분자의 가닥 중 하나 또는 둘 다를 지칭할 수 있다.

[0059] 핵산과 관련하여, 용어 "뉴클레오티드 서열"은 공유 결합, 예를 들어 인 결합 (예를 들어, 포스포디에스테르, 알킬 및 아릴-포스포네이트, 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르 결합) 및/또는 비-인 연결 (예를 들어, 펩티드 및/또는 설파메이트 결합)에 의해 연결된 연속적인 일련의 뉴클레오티드를 지칭한다. 특정 구현예에서, 예를 들어 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 분자를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 이종 서열 (예를 들어, 상이한 종 또는 세포 유형 기원의 유전자)이다.

[0060] 용어 "뉴클레오티드"및 "뉴클레오티드 단량체"는 자연 발생 리보뉴클레오티드 또는 데옥시리보뉴클레오티드 단량체뿐만 아니라 비-자연 발생 유도체 및 유사체를 지칭한다. 따라서, 뉴클레오티드는 예를 들어 자연 발생 염기 (예를 들어, 아데노신, 티미딘, 구아노신, 시티딘, 우리딘, 이노신, 데옥시아데노신, 데옥시티미딘, 데옥시구아노신 또는 데옥시시티딘)를 포함하는 뉴클레오티드 및 당업계에 공지된 변형된 염기를 포함하는 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0061] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 일부 측면에서, 상기 핵산은 플라스미드 서열을 추가로 포함한다. 상기 플라스미드 서열은 예를 들어, 프로모터 서열, 선택 마커 서열 및 유전자좌-표적화 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함할 수 있다.

[0062] 본원에서, 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 분자를 인코딩하는 유전자는 때때로 "PEBL을 인코딩하는 유전자"로 지칭된다.

[0063] 특정 구현예에서, 상기 표적-결합 분자는 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다. 본원에서, "항체"는 변형되거나 조작된, 또는 인간 항체인 무손상 항체 또는 항원-결합 단편을 비롯한 무손상 항체 또는 항체의 항원-결합 단편을 의미한다. 변형되거나 조작된 항체의 예는 키메라 항체, 인간화 항체, 다중파라토프 항체 (예를 들어, 이중파라토프 항체) 및 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체)이다. 항원-결합 단편의 예는 Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, 단일쇄 항체 (예를 들어, scFv), 미니바디 및 디아바디를 포함한다.

[0064] "Fab 단편"은 하나의 경쇄 및 하나의 중쇄의 CH1 및 가변 영역을 포함한다. Fab 분자의 중쇄는 다른 중쇄 분자와 이황화 결합을 형성할 수 없다.

[0065] "Fc" 영역은 항체의 CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 2개의 중쇄 단편을 함유한다. 상기 2개의 중쇄 단편은 2개 이상의 이황화 결합에 의해, 그리고 CH3 도메인의 소수성 상호작용에 의해 결합된다.

[0066] "Fab' 단편"은 하나의 경쇄 및 VH 도메인 및 CH1 도메인 및 또한 CH1과 CH2 도메인 사이의 영역을 함유하는 하나의 중쇄의 일부를 함유하여, 사슬간 이황화 결합이 2개의 Fab' 단편의 2개의 중쇄 사이에 형성되어, $F(ab')_2$ 분자를 형성할 수 있게 한다.

[0067] "$F(ab')_2$ 단편"은 2개의 경쇄 및 C_H1 및 C_H2 도메인 사이의 불변 영역의 일부를 함유하는 2개의 중쇄를 함유하여, 사슬간 이황화 결합이 2개의 중쇄 사이에 형성되게 한다. 이에 따라, $F(ab')_2$ 단편은 2개의 중쇄 사

이의 이황화 결합에 의해 결합된 2개의 Fab' 단편으로 이루어진다.

[0068] "Fv 영역"은 중쇄 및 경쇄 둘 다로부터의 가변 영역을 포함하지만, 불변 영역이 결여된다.

[0069] 특정 구현예에서, 상기 표적-결합 분자는 단일쇄 Fv 항체 ("scFv 항체")이다. scFv는 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하는 항체 단편을 지칭하며, 여기서 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 사슬에 존재한다. 일반적으로, Fv 폴리펩티드는 VH 및 VL 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 추가로 포함하며, 이는 scFv가 항원 결합을 위해 목적하는 구조를 형성하게 한다. scFv의 검토를 위하여, 문헌 [Pluckthun (1994) The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315]을 참조한다. 또한, PCT 공보 제WO 88/01649호 및 미국 특허 제4,946,778호 및 제5,260,203호를 참조한다. 예로서, 본원에 개시된 scFv의 VH 및 VL 도메인 사이의 링커는 예를 들어, GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (서열 번호 37) 또는 GGGGSGGGGSGGGGS (서열 번호 38)를 포함한다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 당업계에서 제공되고, 본원에 개시된 바와 같이, 다양한 적합한 링커가 설계되고, 최적의 기능에 대하여 시험될 수 있다.

[0070] 상기 PEBL 분자의 일부인 scFv는 예를 들어, 키메라 항원 수용체 (CAR) 또는 유사한 항체-결합 신호전달 수용체의 맥락에서 발생하는 scFv와 반드시 동일하지는 않다. 일부 구현예에서, 상기 PEBL 분자의 일부인 scFv는 예를 들어, 키메라 항원 수용체 (CAR) 또는 유사한 항체-결합 신호전달 수용체의 맥락에서 발생하는 scFv와 동일하다.

[0071] 일부 구현예에서, 표적-결합 분자 (예를 들어, PEBL 분자의 맥락에서 scFv)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산은 서열 번호 1 및 2 중 어느 하나 이상에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 88%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 하나 이상의 서열을 포함한다.

[0072] 용어 "서열 동일성"은 2개의 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열이 예를 들어, 디폴트 갭 가중치를 사용하여 프로그램 GAP 또는 BESTFIT에 의해 최적으로 정렬되는 경우 적어도, 예를 들어, 70% 서열 동일성, 또는 적어도 80% 서열 동일성, 또는 적어도 85% 서열 동일성, 또는 적어도 90% 서열 동일성, 또는 적어도 95% 서열 동일성 또는 그 이상을 공유하는 것을 의미한다. 서열 비교의 경우, 전형적으로 하나의 서열이 시험 서열이 비교되는 참조 서열 (예를 들어, 모서열)로 작용한다. 서열 비교 알고리즘을 사용하는 경우, 시험 및 참조 서열을 컴퓨터에 입력하고, 필요에 따라 하위서열 좌표를 지정하고, 서열 알고리즘 프로그램 파라미터를 지정한다. 그 다음, 서열 비교 알고리즘은 지정된 프로그램 파라미터에 기초하여, 참조 서열에 대비한 시험 서열(들)의 서열 동일성 백분율을 계산한다.

[0073] 비교를 위한 서열의 최적의 정렬은, 예를 들어, 문헌 [Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)]의 국소 상동성 알고리즘에 의해, 문헌 [Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)]의 상동성 정렬 알고리즘에 의해, 문헌 [Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)]의 유사성에 대한 검색 방법에 의해, 이들 알고리즘의 컴퓨터화된 구현 (위스콘신주 매디슨 사이언스 드라이브 575에 소재한 Genetics Computer Group의 Wisconsin Genetics Software Package의 GAP, BESTFIT, FASTA 및 TFASTA)에 의해, 또는 육안 검사 (일반적으로 문헌 [Ausubel et ah, Current Protocols in Molecular Biology] 참조)에 의해 수행될 수 있다. 서열 동일성 및 서열 유사성 백분율을 측정하기에 적합한 알고리즘의 일례는 BLAST 알고리즘이며, 이는 문헌 [Altschul et al, J. Mol. Biol. 215:403 (1990)]에 기술되어 있다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 미국 국립생물공학정보센터 (National Center for Biotechnology Information)를 통해 공개적으로 입수 가능하다 (미국 국립보건원 NCBI 인터넷 서버를 통해 공개적으로 접근가능함). 전형적으로 디폴트 프로그램 파라미터를 사용하여 서열 비교를 수행할 수 있지만, 맞춤 파라미터도 또한 사용할 수 있다. 아미노산 서열의 경우, BLASTP 프로그램은 디폴트로서 3의 워드 길이 (W), 10의 기대값 (E) 및 BLOSUM62 점수화 매트릭스 (문헌 [Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 (1989)] 참조)를 사용한다.

[0074] 특정 구현예에서, 상기 항체 (예를 들어, scFv)는 각각 서열 번호 1 및 서열 번호 2에 제시된 아미노산 서열을 갖는 V_H 및 V_L을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 항체 (예를 들어, scFv)는 각각 서열 번호 1 및 서열 번호 2 각각에 제시된 V_H 및 V_L 서열에 대해 적어도 90% 서열 동일성, 적어도 91% 서열 동일성, 적어도 92% 서열 동일성, 적어도 93% 서열 동일성, 적어도 94% 서열 동일성, 적어도 95% 서열 동일성, 적어도 96% 서열 동일성, 적어도 97% 서열 동일성, 적어도 98% 서열 동일성, 적어도 99% 서열 동일성, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 서열을 갖는 V_H 및 V_L을 포함한다.

[0075] "디아바디"는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 작은 항체 단편이다. 상기 단편은 동일한 폴리펩티드 사슬에서 경쇄

가변 영역 (V_L)에 연결된 중쇄 가변 영역 (V_H)을 포함한다 (V_H-V_L 또는 V_L-V_H). 동일한 사슬 상의 2개의 도메인 사이에 쌍 형성을 가능하게 하기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 상기 도메인들이 다른 사슬의 상보성 도메인과 쌍을 형성하여 2개의 항원-결합 부위를 생성하도록 만든다. 디아바디는 예를 들어, 특허 문헌 EP 404,097; WO 93/11161; 및 문헌 [Holliger et al, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448]에 기술되어 있다.

[0076] 특정 구현예에 있어서, 상기 항체는 트리아바디 또는 테트라바디이다. 트리아바디 및 테트라바디의 설계 및 생산 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Todorovska et al, J. Immunol. Methods 248(1-2):47-66, 2001]을 참조한다.

[0077] "도메인 항체 단편"은 중쇄의 가변 영역 또는 경쇄의 가변 영역만을 함유하는 면역학적으로 기능성인 면역글로불린 단편이다. 일부 경우에서, 둘 이상의 VH 영역은 펩티드 링커로 공유 결합에 의해 연결되어, 2가 도메인 항체 단편을 생성한다. 2가 도메인 항체 단편의 2개의 VH 영역은 동일하거나 상이한 항원을 표적화할 수 있다.

[0078] 일부 구현예에서, 상기 항체는 변형되거나 조작된다. 변형되거나 조작된 항체의 예는 키메라 항체, 다중파라토프 항체 (예를 들어, 이중파라토프 항체) 및 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체)를 포함한다.

[0079] 본원에서, "다중파라토프 항체"는 적어도 2개의 단일 도메인 항체를 포함하는 항체를 의미하며, 여기서 적어도 하나의 단일 도메인 항체는 항원 상의 제1 항원 결정기에 대한 것이며, 적어도 하나의 다른 단일 도메인 항체는 동일한 항원 상의 제2 항원 결정기에 대한 것이다. 따라서, 예를 들어, "이중파라토프" 항체는 항원 상의 제1 항원 결정기에 대한 적어도 하나의 단일 도메인 항체 및 동일한 항원 상의 제2 항원 결정기에 대한 적어도 하나의 추가적인 단일 도메인 항체를 포함한다.

[0080] 본원에서, "다중특이적 항체"는 적어도 2개의 단일 도메인 항체를 포함하는 항체를 의미하며, 여기서 적어도 하나의 단일 도메인 항체는 제1 항원에 대한 것이며, 적어도 하나의 다른 단일 도메인 항체는 (상기 제1 항원과 상이한) 제2 항원에 대한 것이다. 따라서, 예를 들어, "이중특이적" 항체는 제1 항원에 대한 적어도 하나의 단일 도메인 항체 및 예를 들어, 상기 제1 항원과 상이한 제2 항원에 대한 적어도 하나의 추가적인 단일 도메인 항체를 포함하는 것이다.

[0081] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 항체는 단클론 항체, 예를 들어, 쥐 단클론 항체이다. 단클론 항체를 생산하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Pluckthun (1994) The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenburg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315]을 참조한다.

[0082] 다양한 구현예에서, PEBL 분자의 맥락에서 상기 표적-결합 분자는 표적 분자에 결합하는 수용체 또는 리간드이다. 예를 들어, 상기 표적-결합 분자는 PD-1에 결합하는 리간드 (예를 들어, PD-L1 또는 PD-L2)일 수 있다. 따라서, 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 상기 표적-결합 분자는 표적 분자에 결합하는 항체 또는 리간드/수용체일 수 있다.

[0083] 본원에서, PEBL 유전자의 맥락에서 "작동가능하게 연결된"은 하나 이상의 국소화 도메인을 인코딩하는 하나 이상의 유전자에 인접한 프레임 내에서 (예를 들어, 링커 없이) 직접적으로 표적-결합 분자를 인코딩하는 유전자를 지칭한다. 대안적으로, 표적-결합 분자를 인코딩하는 유전자는 본원에 기술된 바와 같이 링커 서열을 통하여 하나 이상의 국소화 도메인을 인코딩하는 하나 이상의 유전자에 연결될 수 있다.

[0084] 본원에서, PEBL 단백질의 맥락에서 "연결된"은 제1 도메인, 예를 들어 표적-결합 분자를 제2 도메인, 예를 들어 국소화 도메인에 연결시키는 것을 지칭한다. 상기 링커는 아미노산 서열일 수 있다. 당업계에 공지된 다양한 적합한 링커를 사용하여 상기 표적-결합 분자를 국소화 도메인에 연결할 수 있다. 예를 들어, 비-자연 발생 펩티드, 예를 들어, 다양한 길이의 친수성 잔기로 이루어진 폴리펩티드 또는 $(GGGGS)_n$ (서열 번호 40) 폴리펩티드 (여기서 n은 예를 들어 2 내지 12 (경계값 포함)의 정수임)가 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 링커는 예를 들어, GGGGSGGGGS (서열 번호 39)를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 링커는 예를 들어, GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (서열 번호 37)를 포함한다. 다양한 구현예에서, 약 5 내지 약 100개 아미노산 (경계값 포함)의 길이를 갖는 펩티드 링커가 본 발명에 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 약 20 내지 약 40개 아미노산 (경계값 포함)의 길이를 갖는 펩티드 링커가 본 발명에 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 적어도 5개 아미노산, 적어도 10개 아미노산, 적어도 15개 아미노산, 적어도 20개 아미노산, 적어도 25개 아미노산, 적어도 30개 아미노산, 적어도 35개 아미노산 또는 적어도 40개 아미노산의 길이를 갖는 펩티드 링커가 본 발명에 사용될 수 있다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 이러한 링커 서열 및 이러한 링커 서열의 변이체는 해당 분야

에 공지되어 있다. 링커 서열을 포함하는 구조체를 설계하는 방법 및 기능을 평가하는 방법은 당업자가 용이하게 이용가능하다.

[0085] 특정 구현예에서, 상기 PEBL 분자는 면역 세포의 표면 상에서 발현되는 표적에 결합한다. 일부 구현예에서, 상기 PEBL 분자는 표적 분자의 활성 또는 기능을 억제한다. 예로서, 본원에 개시된 바와 같이, PEBL 분자는 예를 들어, TCRα, TCRβ, CD3 (예를 들어, CD3ε, CD3γ, CD3δ, 또는 CD3ζ), CD7, CD45, hB2MG, KIR2DL1, KIR2DL2/DL3, NKG2A, 또는 NKG2D에 결합하여, 이러한 분자의 세포 표면 발현을 하향조절하도록 설계될 수 있다. 이러한 분자의 하향조절은 예를 들어, 분해 및/또는 내재화를 위한 분자의 국소화/표적화를 통해 달성될 수 있다. 다른 구현예에서, 상기 PEBL 분자는 표적을 불활성화시킨다 (예를 들어, 표적은 더 이상 이의 동족 리간드 또는 수용체와 상호작용하고/거나 이에 결합할 수 없다).

[0086] 일부 구현예에서, 본 발명의 조작된 면역 세포는 향상된 치료 효능을 갖는다. 본원에서, "향상된 치료 효능"은 숙주 또는 수용체에서의 감소된 이식편-대-숙주 질환 (GvHD), 숙주에 의한 거부의 감소 또는 제거, 숙주에서의 생존 연장, 숙주에서의 종양에 의한 억제 감소, 숙주에서의 자가-살해 감소, 숙주에서의 염증성 캐스케이드의 감소 또는 숙주에서의 CAR-매개된 신호전달의 지속 중 하나 이상을 지칭한다.

[0087] 본 발명의 특정 구현예에서, PEBL 분자의 맥락에서 상기 표적-결합 분자는 CD3/T-세포 수용체 (TCR) 복합체 내의 분자, 사이토카인, 인간 MHC 부류 I 분자, 인간 MHC 부류 II 분자, 또는 면역 반응을 하향조절하는 수용체에 결합한다.

[0088] 특정 구현예에서, CD3/TCR 복합체 내의 분자는 TCRα, TCRβ, TCRγ, TCRδ, CD3ε, CD3δ, CD3γ, 또는 CD3ζ일 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 분자는 CD3δ이다. 특정 구현예에서, 상기 분자는 CD3γ이다. 일부 구현예에서, 상기 분자는 CD3ε이다. 특정 구현예에서, 상기 분자는 CD3ζ이다.

[0089] 다른 구현예에서, 상기 MHC 부류 I 분자는 β-2 마이크로글로불린, α1-마이크로글로불린, α2-마이크로글로불린 또는 α3-마이크로글로불린일 수 있다.

[0090] 다른 구현예에서, 면역 반응을 하향조절하는 수용체는 예를 들어, PD-1, CTLA-4, TIM-1, TIM-3, 살해 면역글로불린-유사 수용체 (KIR, 예를 들어, KIR2DL1 (CD158a로도 공지됨), KIR2DL2/DL3 (CD158b로도 공지됨)), CD94 또는 NKG2A (CD159a로도 공지됨), 단백질 티로신 포스파타제, 예를 들어, Src 상동성 영역 2 도메인-함유 포스파타제 (SHP)-1 및 SHP-2로부터 선택된다. 따라서, 이러한 수용체는 본원에 기술된 바와 같이 PEBL 분자의 표적-결합 분자에 의해 표적화될 수 있다.

[0091] 다양한 구현예에서, PEBL 분자의 표적-결합 분자로 표적화될 수 있는 사이토카인의 예는 예를 들어, 인터류킨 (IL)-6, IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-27, IL-35, 인터페론 (IFN)-γ, IFN-β, IFN-α, TNF-α, 또는 TGF-β를 포함한다. 추가적인 측면에서, 상기 PEBL 분자는 예를 들어, CD2, CD4, CD5, CD7, CD8, CD30, CD38, CD45, CD52, 또는 CD127로부터 선택된 분자에 결합한다. 본 발명의 특정 측면에서, 상기 PEBL은 당단백질의 CD1 패밀리의 구성원, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD25, CD28, CD30, CD38, CD45, CD45RA, CD45RO, CD52, CD56, CD57, CD99, CD127, 및 CD137를 포함하나 이에 제한되지 않는, 세포의 표면 상에서 발현되는 분자에 결합한다. 일부 구현예에서, 상기 PEBL 분자는 CD3ε, CD3γ, CD3δ, 또는 CD3ζ에 특이적으로 결합한다.

[0092] 임의의 표적 단백질에 대한 항체 및 이의 항체 단편을 생산하는 방법은 해당 분야에 널리 공지되어 있으며 일상적이다. 더욱이, 본원에 예시된 바와 같이, 다양한 표적, 예를 들어, CD3 및 CD7에 대한 상업적으로 입수가능한 항체를 사용하여, PEBL 분자를 생성할 수 있다. 본원에 예시된 바와 같이, 당업계에 공지되어 있는 항체 및 그로부터 유래한 항체의 단편 (예를 들어, scFv)을 본 발명에 사용할 수 있다.

[0093] 다른 측면에서, 상기 PEBL 분자의 상기 국소화 도메인은 소포체 (ER) 보유 서열 KDEL (서열 번호 32) 또는 기타 ER 또는 골지 보유 서열, 예를 들어, KKXX (서열 번호 35), KXD 또는 KXE (여기서 X는 임의의 아미노산일 수 있음, 예를 들어 문헌 [Gao C, et al, Trends in Plant Science 19: 508-515, 2014] 참조) 및 YQRL (서열 번호 34) (문헌 [Zhan J, et al, Cancer Immunol Immunother 46:55-60, 1998] 참조); 예를 들어, "PEST" 모티프-SHGFPPEVEEQDDGTLPMSCAQESGMDRHPAACASARINV (서열 번호 41)를 포함하는 프로테아좀 표적화 서열; 및/또는 상기 표적-결합 분자를 세포막, 예를 들어, CD8a 막관통 도메인 또는 본원에 기술된 다른 단일-통과 막 단백질 (예를 들어, CD8a, CD8p, 4-1BB, CD28, CD34, CD4, FcsRIy, CD 16 (예를 들어 CD16A 또는 CD16B), OX40, CD3ζ, CD3δ, CD3ε, CD3γ, CD35, TCRa, CD32 (예를 들어 CD32A 또는 CD32B), CD64 (예를 들어 CD64A, CD64B, 또는 CD64C), VEGFR2, FAS, 또는 FGFR2B)의 막관통 도메인에 표적화하는 서열을 포함한다. 본원에 예시된 특정 국소

화 도메인 (서열)의 예는 도 8a에 도시되어 있다. 다양한 다른 국소화 서열이 당업계, 예를 들어 WO2016/126213에 공지되어 있으며 이용가능하다.

[0094] 일부 구현예에서, 본 발명의 PEBL 분자는 하나 이상의 국소화 도메인을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 PEBL 분자는 함께 연결된 적어도 하나, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개 또는 적어도 10개의 국소화 도메인을 가질 수 있다. 특정 PEBL 분자에 1개 초과의 국소화 도메인이 사용되는 경우, 각각의 국소화 도메인은 임의의 개재 링커로 또는 이러한 링커 없이 연결될 수 있다. 일부 경우에서, 국소화 도메인, 예를 들어 CD8α 막관통 도메인, KDEL 모티프, 및 링커가 단일 PEBL 분자에 사용될 수 있다. 이러한 특정 구조체가 임의의 개재 링커가 없는 국소화 도메인을 나타내는 반면, 다양한 개재 링커가 상기 국소화 도메인 중 일부 또는 전부 사이에 포함될 수 있다. 다른 예는 도 8a에 도시되어 있다.

[0095] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 상기 키메라 항원 수용체 및/또는 상기 PEBL 분자는 본원에 개시된 표적뿐만 아니라 본원에 개시된 표적의 변이체에 결합하도록 설계될 수 있다. 예로서, 키메라 항원 수용체 및/또는 PEBL 분자는 CD3/TCR 복합체 내의 분자 또는 이의 자연-발생 변이체 분자에 결합하도록 설계될 수 있다. 이러한 자연-발생 변이체는 상기 분자의 야생형 형태와 동일한 기능을 가질 수 있다. 다른 구현예에서, 상기 변이체는 상기 분자의 야생형 형태에 비하여 변경된 기능을 가질 수 있다 (예를 들어, 병에 걸린 상태를 부여함).

[0096] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 상기 PEBL 분자 구조체의 다양한 성분은, 조합이 기능성 PEBL 분자를 생성하는 한, 상이한 조합 (예를 들어, 상이한 링커, 상이한 국소화 서열, 상이한 scFv 등을 함유함)으로 치환될 수 있다. 특정 구조체의 기능을 평가하는 방법은 본원에 개시된 바와 같이, 당업자의 범주 내에 있다.

[0097] 추가적인 측면에서, 본 발명은 치료적 유효량의 상기 조작된 면역 세포를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암의 치료를 위한, PEBL 분자를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 및 키메라 항원 수용체를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을 포함하는 조작된 면역 세포의 용도에 관한 것이다.

[0098] 다른 측면에서, 본 발명은 치료적 유효량의 상기 조작된 면역 세포를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암의 치료를 위한, 키메라 항원 수용체 (CAR)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 핵산 및 국소화 도메인에 연결된 단일쇄 가변 단편 (scFv)을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 핵산을 포함하는 조작된 면역 세포의 용도에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 상기 제 1 핵산 서열 및 상기 제 2 핵산 서열은 바이시스트로닉이다.

[0099] 다른 측면에서, 본 발명은 치료적 유효량의 상기 조작된 면역 세포를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 자가면역 질환의 치료를 위한, 키메라 항원 수용체 (CAR)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 및 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 분자 (예를 들어 scFv)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을 포함하는 조작된 면역 세포의 용도에 관한 것이다.

[0100] 다른 측면에서, 본 발명은 또한, 치료적 유효량의 상기 조작된 면역 세포를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 감염성 질환의 치료를 위한, 키메라 항원 수용체 (CAR)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 및 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 분자 (예를 들어 scFv)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을 포함하는 조작된 면역 세포의 용도에 관한 것이다.

[0101] 다양한 구현예에서, 상기 키메라 항원 수용체는 CAR (예를 들어, 항-CD19-4-1-BB-CD3ζ CAR)이다. 일부 구현예에서, 국소화 도메인에 연결된 단일쇄 가변 단편 (scFv) 또는 PEBL 분자는 도 8a에 도시된 임의의 하나 이상의 구조체로부터 선택된다.

[0102] **3.조작된 면역 세포의 투여**

[0103] 치료적 유효량의, PEBL 및/또는 CAR을 발현하는 조작된 면역 세포를 투여함으로써 질환 또는 장애를 감소 또는 개선시키는 방법이 본원에 제공된다. 일 구현예에서, 상기 조작된 CD3/TCRαβ-음성 T 세포는 암의 증상을 감소시키거나, 암을 치료하거나 또는 예방하기 위해 투여된다. 일부 구현예에서, 상기 조작된 CD3/TCRαβ-음성 T 세포는 자가면역 질환의 증상을 감소시키거나, 자가면역 질환을 치료 또는 예방하기 위해 투여된다. 다른 구현예에서, 상기 조작된 CD3/TCRαβ-음성 T 세포는 이식 수술 시행시 이식편-대-숙주 질환 또는 이식 거부를 치료 또는 예방하기 위해 투여된다.

[0104] 용어 "치료적 유효량"은, 환자에게 투여되는 경우, 질환 (예를 들어, 암, 감염 또는 GVHD)의 징후 또는 증상을 완화하는, 본 발명의 조작된 면역 세포 (예를 들어, 조작된 CD3/TCRαβ-음성 T 세포)의 양을 지칭한다. 투여될

실제량은 기능성 CD3/TCRαβ-음성 T 세포가 질환에 대해 약리학적 활성을 나타내는, 시험관내 또는 생체내에서 수행된 연구에 기초하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 표적 세포 증식의 억제에 대해 CD3/TCRαβ-음성 T 세포의 양을 분석할 수 있고, 억제를 나타내는 CD3/TCRαβ-음성 T 세포의 양은 치료적 유효량을 나타낼 수 있다.

[0105] "약학적 조성물"은 대상체, 예를 들어 인간 대상체에게 투여하기에 적합한 조성물을 지칭한다. 이러한 조성물은, 협측, 동맥내, 심장내, 뇌실내, 피내, 근육내, 안내, 복강내, 척수내, 척추강내, 정맥내, 경구, 비경구, 관장제 또는 좌약을 통해 직장으로, 피하, 설하, 경피 및 경점막을 포함하나 이에 제한되지 않는 다수의 경로 중 하나 이상을 통한 투여를 위해 구체적으로 제형화될 수 있다. 또한, 투여는 주사제, 액체, 겔, 점적제 또는 다른 투여 수단에 의해 발생할 수 있다.

[0106] 본 발명에 따른 조작된 T 세포는 적절한 담체 또는 희석제 (이는 또한 약학적으로 허용가능할 수 있음)와 함께, 생체내 투여에 적합한 임플란트 또는 약학적 조성물로 제조될 수 있다. 이러한 조성물 또는 임플란트를 제조하는 수단은 당업계에 기술되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed., Mack, ed. (1980)] 참조). 적절한 경우, 상기 조작된 T 세포는 각각의 투여 경로에 대한 통상적인 방식으로, 반고체 또는 액체 형태, 예를 들어 캡슐, 용액, 주사제, 흡입제 또는 에어로졸로 제제화될 수 있다. 대부분의 경우, 약학적으로 허용가능한 형태는 상기 PEBL 및/또는 CAR을 발현하는 세포에 영향을 미치지 않는 형태이다. 일부 구현예에서, 상기 조작된 T 세포는 평형 염 용액, 바람직하게는 행크스 평형 염 용액 또는 생리 식염수를 함유하는 약학적 조성물로 제조될 수 있다.

[0107] 일부 측면에서, 상기 조작된 면역 세포는 대상체 내로의 주입에 의해 투여된다. 면역 세포 (예를 들어, 동종 이계 또는 자가 면역 세포)를 주입하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 질환의 증상을 개선시키기 위해 충분한 수의 세포를 수용체에게 투여한다. 전형적으로, 10^7 내지 10^{10}개 세포의 투여량, 예를 들어, 10^9개 세포의 투여량을 단일 환경에서 주입한다. 주입은 단일 10^9개 세포 투여량으로서, 또는 몇몇의 10^9개 세포 투여량으로 분할하여, 투여된다. 주입 빈도는 3 내지 30일마다, 또는 원하는 경우 또는 지시되는 경우 더 긴 간격일 수 있다. 주입량은 일반적으로, 견딜 수 있는 만큼, 또는 질환 증상이 개선될 때까지, 대상체 당 적어도 1회의 주입, 바람직하게는 적어도 3회의 주입이다. 세포는 50 내지 250 ml/시간의 속도로 정맥내 주입할 수 있다. 다른 적합한 투여 방식은 동맥내 주입, 종양 내로의 직접 주사 및/또는 수술 후의 종양 층의 관류, 인공 스캐폴드에서 종양 부위에 이식, 척추강내 투여 및 안내 투여를 포함한다. 이러한 전달 방식에 맞춰 본 발명을 조정하는 방법은 당업자가 용이하게 이용가능하다.

[0108] 특정 측면에서, 치료될 암은 고형 종양 또는 혈액 악성 종양이다. 혈액 악성 종양의 예는 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 척수형성이상증, 급성 림프모구 백혈병, 만성 림프성 백혈병, 다발성 골수종, 호지킨 및 비호지킨 림프종을 포함한다. 고형 종양의 예는 폐암, 흑색종, 유방암, 전립선암, 결장암, 신장 세포 암종, 난소암, 췌장암, 간세포 암종, 신경모세포종, 횡문근육종, 뇌 종양을 포함한다.

[0109] **4.조작된 면역 세포의 생산**

[0110] 다른 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 조작된 면역 세포를 생산하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 키메라 항원 수용체를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산, 및 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 분자 (예를 들어, PEBL 분자)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을 면역 세포 내로 도입하여, 조작된 면역 세포를 생산하는 단계를 포함한다.

[0111] 특정 구현예에서, 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산은 생체외에서 또는 시험관내에서 면역 세포 내로 도입된다. 다른 구현예에서, 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산은 생체내에서 면역 세포 내로 도입된다.

[0112] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 핵산은, 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치되는 경우, "작동가능하게 연결"된다. 예를 들어, 신호 서열에 대한 DNA는, 폴리펩티드의 분비에 참여하는 전구단백질로서 발현되는 경우, 상기 폴리펩티드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결되고; 프로모터 또는 인핸서는, 그것이 서열의 전사에 영향을 미치는 경우, 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 상기 표적-결합 분자를 인코딩하는 핵산은 상기 국소화 도메인을 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결될 수 있다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결된 DNA 서열이 연속적이며, 분비 리더 (secretory leader)의 경우, 연속적이고 리딩 프레임 내인 것을 의미한다. 그러나 인핸서는 연속적일 필요는 없다. 연결은 편리한 제한 부위에서의 라이게이션에 의해 또는 대안적으로 당업자에게 친숙한 PCR/재조합 방법을 통해 달성된다. 이러한 부위가 존재하지 않는 경우, 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터 또는 링커가 통상적인 관례에 따라 사용된다.

[0113] 일부 구현예에서, "면역 세포"는 예를 들어 T 세포, 예를 들어 이에 제한되는 것은 아니지만, 세포독성 T 세포, 보조 T 세포, 조절 T 세포, 효과기 T 세포, 기억 T 세포, 자연 살해 T 세포, 감마 델타 T 세포 등을 포함한다.

[0114] 도입될 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산은 본원에 기술된 키메라 항원 수용체 및 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 분자 (예를 들어, scFv)를 함유하는 단일 바이시스트로닉 구조체일 수 있다. 본원에 기술된 바와 같이, 단일 바이시스트로닉 구조체는 본원에 기술된 바와 같은 키메라 항원 수용체 (예를 들어, CAR) 및 상기 표적-결합 분자 (예를 들어, scFv)를 인코딩하는 2개의 cDNA 사이에 내부 리보솜 진입 부위 (IRES) 또는 2A 펩티드-코딩 영역 부위를 삽입함으로써 제조될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 바이시스트로닉 구조체는 PEBL의 상류에 위치한 CAR, 및 이들 사이의 IRES 또는 2A 펩티드 코딩 영역을 포함한다. 일부 경우에서, 예시적인 바이시스트로닉 구조체가 도 13a에 도시되어 있다. 다른 구현예에서, 상기 바이시스트로닉 구조체는 CAR 상류에 위치한 PEBL, 및 이들 사이의 IRES 또는 2A 펩티드 코딩 영역을 포함한다. 1개 초과의 표적을 결실시키기 위한 트리시스트로닉 전달 시스템의 설계도 또한 실행가능해야 한다. 대안적으로, 개개의 구조체들 (예를 들어, CAR 및 PEBL)의 (동시 또는 순차적) 개별 형질도입이 수행될 수 있다. 외인성 핵산을 도입하는 방법은 본원에 예시되어 있으며, 당업계에 널리 공지되어 있다.

[0115] 본원에 기술된 핵산은 레트로바이러스 및 렌티바이러스 벡터 구조체를 사용하여 세포 내로 도입 (직접 형질도입)될 수 있다. 용어 "렌티바이러스 벡터"는, 특히 문헌 [Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009)]에 제공된 바와 같은 자가-활성화 렌티바이러스 벡터를 포함한, 렌티바이러스 게놈의 적어도 일부로부터 유래한 벡터를 지칭한다. 임상에 사용될 수 있는 렌티바이러스 벡터의 다른 예는 예를 들어 Oxford BioMedica의 LENTIVECTOR® 유전자 전달 기술, Lentigen의 LENTIMAX™ 벡터 시스템 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 비임상 유형의 렌티바이러스 벡터가 또한 이용가능하고, 당업자에게 공지되어 있을 것이다. 다른 구현예에서, 상기 핵산은 세포 내로 직접 형질감염될 수 있다. 다른 구현예에서, 상기 핵산은 세포 내로 전기천공될 수 있다. 전기천공에 대한 상세한 방법은 예를 들어 문헌 [Roth et al., Nature, 2018, 559: 405-409 and Van Tendello et al., Gene Therapy, 2000, 7, 1431-1437]에 기술되어 있다.

[0116] 본원에 사용된 단수 표현은, 명백하게 반대로 표시되지 않는 한, "적어도 하나"를 의미하는 것으로 이해되어야 한다.

[0117] 본원에 기술된 조작된 면역 세포는, WO2016/126213에 기술된 바와 같이, CD3에 결합하는 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 분자를 포함할 수 있다. 항-CD3 PEBL의 성분의 서열은 WO2016/126213의 도 2 및 표 1 및 2, 및 하기 표 1에 기술된 바와 같다.

[0118] [표 1]

표 1. 국소화 도메인에 연결된 항-CD3ε 표적-결합 분자의 성분에 대한 서열 정보.

성분	서열
CD8 신호 펩티드	MALPVTALLLPLALLLHAARP (서열 번호 5)
VH-VL 링커	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (서열 번호 6)
CD8α 막관통 아미노산	KPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLITLY (서열 번호 7)
CD8 신호 펩티드 cDNA	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGC TCCACGCCGCCAGGCCG (서열 번호 8)
VH-VL 링커 cDNA	GGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGCGGCGGCGGCTCCG GTGGTGGTGGATCC (서열 번호 9)
CD8 막관통 cDNA	AAGCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCC ACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGC CAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCT GTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCT TCTCCTGTCACTGGTTATCACCCTTTAC (서열 번호 10)
VH 아미노산 서열	EVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLE WIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAV YYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSA (서열 번호 1)
VL 아미노산 서열	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWI YDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNP FTFGSGTKLEINR (서열 번호 2)
VH 뉴클레오티드 서열	GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGG GCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTA GGTACACGATGCACTGGGTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGG AATGGATTGGATACATTAATCCTAGCCGTGGTTATACTAATTACAA TCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTACAGACAAATCCTC CAGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACTC TGCAGTCTATTACTGTGCAAGATATTATGATGATCATTACTGCCTT GACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCC (서열 번호 3)
VL 뉴클레오티드 서열	CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAG GGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTT ACATGAACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAAGAT GGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCACTT CAGGGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCGGC ATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGT AGTAACCCATTCACGTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAC CGG (서열 번호 4)

[0119]

[0120] **5.CD3/TCRαβ-음성 면역 세포를 생산하기 위한 게놈 편집**

[0121] 상기 언급한 바와 같이, 효과기 T 세포 상에서의 면역 분자의 발현의 하향조절은 예를 들어 메가뉴클레아제, TALEN, CRISPR/Cas9, 및 아연 핑거 뉴클레아제를 사용한 유전자 편집 방법을 포함한 다양한 다른 공지된 방법에 따라 달성될 수 있다. 따라서, 특정 구현예에서, 상기 조작된 면역 세포는 변형된 유전자를 추가로 포함하며, 이 변형은 표적 유전자 또는 단백질을 비기능성으로 만든다. 예로서, 본 발명의 조작된 면역 세포는, CD 단백질의 발현을 방지 또는 감소시키고/거나 그렇지 않으면 CD 단백질이 CAR에 의해 인식되거나 이를 방해하는 것을 (예를 들어, 구조적으로) 방해하는 변형된 (예를 들어, 비기능성) TCRα 유전자, TCRβ 유전자 또는 CD3 유전자 (예를 들어, 메가뉴클레아제, TALEN, CRISPR/Cas9 또는 아연 핑거 뉴클레아제를 사용하여 변형됨)를 추가로 포함한다. 이러한 방법을 사용하여 유전자 발현을 변형시키는 방법은 당업계에서 용이하게 이용가능하고 널리 공지되어 있다.

[0122] CRISPR/Cas6 기술을 사용하여 면역 세포에서 표적 유전자를 불활성화하는 방법은 예를 들어 미국 특허 공보 제US2016/0272999호, 제US2017/0204372호, 및 제US2017/0119820호에 기술되어 있다.

[0123] CRISPR/Cas 시스템은 표적화된 유전자 변경 (게놈 변형)을 유도하기 위한 시스템이다. Cas9 단백질에 의한 표적 인식은 가이드 RNA (gRNA) 내의 "시드" 서열 및 gRNA-결합 영역 상류의 보존된 멀티뉴클레오티드 함유 프로토스페이서 인접 모티프 (PAM) 서열을 필요로 한다. 이에 의해, 상기 CRISPR/Cas 시스템은 세포주, 1차 세포, 및 조작된 세포 내의 gRNA를 재설계함으로써 실질적으로 임의의 DNA 서열을 절단하도록 조작될 수 있다. 상기 CRISPR/Cas 시스템은 2개 이상의 gRNA를 갖는 단일 Cas9 단백질을 공동 발현함으로써 복수의 게놈 유전자좌를 동시에 표적화할 수 있으며, 이는 상기 시스템을 복수의 유전자 편집 또는 표적 유전자의 상승적 활성화에 유례없이 적합하도록 만든다. 유전자 발현을 억제하는데 사용되는 CRISPR/Cas 시스템의 예는 미국 공보 제2014/0068797호 및 미국 특허 제8,697,359호 및 제8,771,945호에 기술되어 있다. 이 시스템은 RNA-안내된 Cas9 엔도뉴클레아제를 이용하는 영구적인 유전자 붕괴를 유도하여, 오류빈발 수복 경로를 촉발하는 DNA 이중 가닥 파괴를 도입하여 프레임 시프트 돌연변이를 생성한다. 일부 경우에서, 다른 엔도뉴클레아제가 또한 사용될 수 있으며, 이는 Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (also known as Csn1 및 Csx12), Cas10, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, T7, Fok1, 당업계에 공지된 다른 뉴클레아제, 이의 상동체 또는, 이의 변형된 형태를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0124] CRISPR/Cas 유전자 붕괴는, 표적 유전자 및 Cas 엔도뉴클레아제에 특이적인 gRNA 서열이 세포 내로 도입되어 상기 Cas 엔도뉴클레아제가 상기 표적 유전자에 이중 가닥 파괴를 도입할 수 있게 하는 복합체를 형성하는 경우, 발생한다. 일부 경우에서, 상기 CRISPR 시스템은 Cas 엔도뉴클레아제를 인코딩하는 핵산 서열 및 상기 표적 유전자에 특이적인 안내 핵산 서열을 포함하는 하나 이상의 발현 벡터를 포함한다. 상기 안내 핵산 서열은 유전자에 특이적이고 Cas 엔도뉴클레아제-유도된 이중 가닥 파괴를 위해 상기 유전자를 표적화한다. 상기 안내 핵산 서열의 서열은 유전자의 유전자좌 내에 존재할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 안내 핵산 서열은 길이가 적어도 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 45, 50개 또는 그 이상의 뉴클레오티드이다. 상기 안내 핵산 서열은 RNA 서열, DNA 서열, 이의 조합 (RNA-DNA 조합 서열), 또는 펩티드 핵산 (PNA) 또는 잠금 핵산 (LNA)과 같은 합성 뉴클레오티드를 갖는 서열을 포함한다. 상기 안내 핵산 서열은 단일 분자 또는 이중 분자일 수 있다. 일 구현예에서, 상기 안내 핵산 서열은 단일 안내 RNA를 포함한다.

[0125] 일부 구현예에서, 본 발명의 조작된 면역 세포는 CRISPR/Cas 시스템을 통해 변형되어 인간 CD3 유전자를 불활성화시킬 수 있다. 인간 CD3 유전자의 게놈 구조 및 서열의 세부사항은, 예를 들어, NCBI 유전자 데이터베이스의 GeneID 번호 6955 (TCRα), 6957 (TCRβ), 915 (CD3δ), 916 (CD3ε), 917 (CD3γ), 및 919 (CD3ζ)에서 찾을 수 있다.

[0126] 특정 표적 유전자의 녹아웃을 위한 상업적으로 입수가능한 키트, gRNA 벡터 및 공여자 벡터는 예를 들어 Origene (Rockville, Md.), GenScript (Atlanta, Ga.), Applied Biological Materials (ABM; Richmond, British Colombia), BioCat (Heidelberg, Germany) 또는 기타로부터 입수가능하다. 예를 들어, CRISPR을 통한 CD3δ 녹아웃을 위한 상업적으로 입수가능한 키트 또는 키트 성분은 예를 들어 카탈로그 번호 KN210010, KN210010G1, KN210010G2, 및 KN210010D로 입수가능한 것들을 포함하며, CRISPR을 통한 CD3εδ의 녹아웃을 위한 것들은 예를 들어 카탈로그 번호 KN208276, KN208276G1, KN208276G2, 및 KN208276D로 입수가능한 것들을 포함하며, CRISPR을 통한 CD3γ의 녹아웃을 위한 것들은 예를 들어 카탈로그 번호 KN220512, KN220512G1, KN220512G2, 및 KN220512D로 입수가능한 것들을 포함하며, 이들 각각은 OriGene으로부터 입수가능하다. 또한, Santa Cruz Biotechnology로부터 입수가능한 CRISPR을 통한 CD3ζ 녹아웃을 위한 상업적으로 입수가능한 시판되는 키트 또는 키트 성분은 예를 들어 카탈로그 번호 sc-419554, sc-419554-HDR, sc-419554-NIC, 및 sc-419554-NIC2로 입수가능한 것들을 포함한다.

[0127] 일부 구현예에서, 상기 CRISPR/Cas 시스템은 본원에 개략된 핵산 중 임의의 것을 면역 세포, 예를 들어 T 세포의 게놈 내로 도입하는데 사용될 수 있다.

[0128] **6.예시적인 구현예의 상세한 설명**

[0129] 특정 구현예에서, 본 발명은 조작된 면역 세포를 제공하며, 이는 (i) 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 분자 (예를 들어, PEBL)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을 포함하고, 여기서 상기 표적-결합 분자는 CD3에 결합하는 항체이고, 상기 국소화 도메인은 소포체 (ER) 보유 서열, 골지 보유 서열, 프로테아좀 국소화 서열, 및 CD8α, CD8β, 4-1BB, CD28, CD34, CD4, FcεRIγ, CD16, OX40, CD3ζ, CD3ε, CD3γ, CD3δ, TCR

α, CD32, CD64, VEGFR2, FAS, 또는 FGFR2B로부터 유래한 막관통 도메인 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 보유 신호 도메인을 포함한다. 일부 경우에서, 키메라 항원 수용체 (CAR)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 다른 핵산이 제공된다. 특정 경우에서, 상기 CAR은 4-1BB 및 CD3ζ의 세포내 신호전달 도메인, 및 분화 클러스터 19 (CD19)에 결합하는 항체를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 표적-결합 분자의 맥락에서 CD3에 결합하는 항체는 서열 번호 1에 제시된 V_H 서열 및 서열 번호 2에 제시된 V_L 서열을 포함한다. 본원에 기술된 바와 같이, 일부 구현예에서, 상기 항체는 서열 번호 1 및 서열 번호 2 각각에 제시된 VH 및 VL 서열에 대해 각각 적어도 95% 서열 동일성, 적어도 96% 서열 동일성, 적어도 97% 서열 동일성, 적어도 98% 서열 동일성, 적어도 99% 서열 동일성, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 서열을 갖는 V_H 및 V_L을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 항체는 단일쇄 가변 단편 (scFv)이다. 일부 구현예에서, 상기 PEBL의 국소화 도메인은 도 8a 및 표 1에 제공된 아미노산 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 CAR은 힌지 및 막관통 서열을 추가로 포함한다.

[0130] 일부 구현예에서, 상기 조작된 면역 세포는 조작된 T 세포 (예를 들어, 조작된 세포독성 T 세포, 조작된 보조 T 세포, 조작된 조절 T 세포, 조작된 효과기 T 세포, 조작된 기억 T 세포, 조작된 자연 살해 T 세포 및 조작된 감마 델타 T 세포), 조작된 자연 살해 (NK) 세포, 조작된 NK/T 세포, 조작된 단핵구, 조작된 대식세포 또는 조작된 수지상 세포이다. 일부 경우에서, 상기 조작된 면역 세포는 동종 이계 세포이다. 일부 경우에서, 상기 조작된 면역 세포는 자가 세포이다.

[0131] 일부 구현예에서, 상기 조작된 면역 세포는 적어도 6개월, 예를 들어, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 13개월, 14개월, 15개월, 16개월, 17개월, 또는 그 이상 동안 CD3/TCRαβ 발현이 결여되어 있다. 다른 구현예에서, 상기 조작된 면역 세포는 적어도 12개월, 예를 들어, 12개월, 13개월, 14개월, 15개월, 16개월, 17개월, 18개월, 19개월, 20개월, 22개월, 23개월, 24개월, 또는 그 이상 동안 CD3/TCRαβ 발현이 결여되어 있다. 특정 구현예에서, 상기 조작된 면역 세포는 적어도 20개월, 예를 들어, 20개월, 22개월, 23개월, 24개월, 25개월, 26개월, 27개월, 28개월, 29개월, 30개월, 31개월, 32개월, 또는 그 이상 동안 CD3/TCRαβ 발현이 결여되어 있다.

[0132] 특정 구현예에서, 상기 조작된 면역 세포는 유사한 면역 세포와 비교하여 실질적으로 동일한 속도로 증식한다.

[0133] 본 발명의 조작된 세포는 특정 조건 하에서 배양 배지에서 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 조작된 세포는 IL-2의 존재 하에 배양된다. 상기 조작된 세포는 당업자에 의해 인식되는 임의의 방법에 따라 동결보존될 수 있다. 상기 조작된 세포는, 환자에게 투여하기 전에, 해동 및 배양될 수 있다. 다른 경우에서, 상기 조작된 세포는 또한 투여 전에 확장될 수 있다.

[0134] 일부 구현예에서, 상기 조작된 면역 세포가 대상체에게 투여되는 경우, 상기 대상체는 이식편-대-숙주 질환이 발생할 가능성이 감소되며, 여기서 상기 조작된 면역 세포는 상기 대상체에 대해 동종 이계이다. 상기 조작된 면역 세포는 CD19+ 백혈병 세포의 세포독성을 유도할 수 있다.

[0135] 일부 측면에서, 본 발명은 또한, 본원에 기술된 조작된 면역 세포 중 어느 하나를 포함하는 조작된 면역 세포의 실질적으로 순수한 집단을 제공하며, 여기서 적어도 90%, 예를 들어, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 상기 조작된 면역 세포는 CD3/TCRαβ 발현이 결여되어 있다. 일부 경우에서, 상기 실질적으로 순수한 집단은 적어도 80%, 예를 들어, 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 이상의, CD3/TCRαβ 발현이 결여된 조작된 면역 세포를 포함한다.

[0136] 일부 측면에서, 본 발명은 또한 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 분자 (예를 들어, PEBL)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을 제공하며, 여기서 상기 표적-결합 분자는 CD3에 결합하는 항체이고, 상기 국소화 도메인은 소포체 (ER) 보유 서열, 골지 보유 서열, 프로테아좀 국소화 서열, 및 CD8α, CD8β, 4-1BB, CD28, CD34, CD4, FcεRIγ, CD16, OX40, CD3ζ, CD3ε, CD3γ, CD3δ, TCRα, CD32, CD64, VEGFR2, FAS, 또는 FGFR2B로부터 유래한 막관통 도메인 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열인 보유 신호 도메인을 포함한다. 일부 경우에서, 본원에 기술된 핵산을 포함하는 발현 벡터가 제공된다. 일부 경우에서, 상기 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다.

[0137] 다른 측면에서, 본 발명은 또한 이를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 치료적 유효량의, 본원에 기술된 구현예 중 임의의 것을 갖는 조작된 면역 세포를 상기 대상체에게 투여하여 이를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 단계를 포함한다. 일부 측면에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 대상체에

서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 치료적 유효량의, 본원에 기술된 구현예 중 임의의 것을 갖는 조작된 면역 세포의 실질적으로 순수한 집단을 상기 대상체에게 투여하여 이를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 단계를 포함한다.

[0138] 일부 구현예에서, 본 발명은 또한 이를 필요로 하는 대상체에서 자가면역 질환을 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 치료적 유효량의, 본원에 기술된 구현예 중 임의의 것을 갖는 조작된 면역 세포를 상기 대상체에게 투여하여 이를 필요로 하는 대상체에서 자가면역 질환을 치료하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 대상체에서 자가면역 질환을 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 치료적 유효량의, 본원에 기술된 구현예 중 임의의 것을 갖는 조작된 면역 세포의 실질적으로 순수한 집단을 상기 대상체에게 투여하여 이를 필요로 하는 대상체에서 자가면역 질환을 치료하는 단계를 포함한다.

[0139] 특정 구현예에서, 상기 방법은 본원에 기술된 바와 같이, 치료적 유효량의, 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 분자를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 갖는 핵산을 포함하는 조작된 면역 세포를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 경우에서, 제2 핵산은 CAR을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 CAR은 4-1BB 및 CD3ζ의 세포내 신호전달 도메인, 및 CD19 또는 CD3와 같은 사이토카인에 결합하는 항체를 포함한다.

[0140] 특정 구현예에서, 상기 암은 CD3-양성 암, CD19-양성 암, 고형 종양 암, 혈액암, B-세포 악성 종양, 예를 들어 B-세포 급성 림프성 백혈병, 림프모구 백혈병, B-세포 만성 림프성 백혈병, B-세포 비호지킨 림프종을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0141] 본원에서, 용어 "치료하다", "치료하는" 또는 "치료"는, 임상적으로 허용가능한 표준에 따라 의학적 병태가 개선되는 정도까지 의학적 병태 (예를 들어, 악성 종양, 자가면역 질환, 이식편-대-숙주 질환, 이식 거부, 바이러스 감염, 감염성 질환 등과 관련된 병태)에 대응하는 것을 지칭한다.

[0142] 상호교환적으로 사용되는 용어 "대상체" 또는 "환자"는 포유동물 (예를 들어, 인간, 비인간 영장류, 소, 양, 염소, 말, 개, 고양이, 토끼, 기니피그, 래트, 마우스)을 지칭한다. 특정 구현예에서, 상기 대상체는 인간이다. "이를 필요로 하는 대상체"는 T 세포가 표적 세포에 대해 특이적인 세포독성을 발휘하도록 유도함으로써 치료 (예를 들어, 개선, 예방)될 수 있는 질환 또는 병태에 걸려 있거나 걸릴 위험이 있는 대상체 (예를 들어, 환자)를 지칭한다.

[0143] 본원에 정의된 "치료적 유효량"은 대상체에게 투여되는 경우, 투여 조건 하에서 대상체에서 목적하는 치료 효과 (T 세포 악성 종양과 관련된 병태 치료)를 달성하기에 충분한 양을 지칭한다. 투여될 제제의 유효량은 본원에 제공된 지침 및 당업계에 공지된 다른 방법을 사용하여 통상의 지식을 갖는 임상의에 의해 결정될 수 있으며, 예를 들어 선택된 특정 제제, 대상체의 연령, 민감성, 약물에 대한 내성 및 전반적인 복지를 포함한 여러 가지 요인에 의해 결정된다.

[0144] 일부 구현예에서, 상기 조작된 면역 세포는 치료, 예를 들어 암 치료, 자가면역 질환 치료, 감염성 질환 치료, GVHD 치료 및 이식 거부 치료를 필요로 하는 대상체에 대해 자가이다. 다른 구현예에서, 상기 조작된 면역 세포는 치료를 필요로 하는 대상체에 대해 동종 이계이다. 본 발명의 단리된 조작된 면역 세포는 복수의 대상체에게 투여될 수 있고 GVHD의 위험 감소를 제공하는 "기성품" 면역 세포일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 조작된 면역 세포는 복수의 대상체 (예를 들어, 적어도 둘 또는 그 이상의 대상체)에 투여시 GVHD 반응을 유발하지 않는다.

[0145] 특정 구현예에서, 상기 조작된 면역 세포는 정맥내 주사, 정맥내 주입, 동맥내 주입, 피하 주사, 근육내 주사, 흉골내 주사, 종양내 주사, 종양 내로의 직접 주사 및/또는 수술 후의 종양 층의 관류, 인공 스캐폴드에서 종양 부위에 이식, 척추강내 투여 및 안내 투여에 의해 상기 대상체에 투여된다.

[0146] 특정 구현예에서, 상기 조작된 면역 세포는 상기 대상체 내로의 주입에 의해 투여된다. 면역 세포 (예를 들어, 동종 이계 또는 자가 면역 세포)를 주입하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 질환의 증상을 개선시키기 위해 충분한 수의 세포를 수용체에게 투여한다. 전형적으로, 10^7 내지 10^{10}개 세포의 투여량, 예를 들어, 10^9개 세포의 투여량을 단일 환경에서 주입한다. 주입은 단일 10^9개 세포 투여량으로서, 또는 몇몇의 10^9개 세포 투여량으로 분할하여, 투여된다. 주입 빈도는 매일, 2 내지 30일마다, 또는 원하는 경우 또는 지시되는 경우, 더 긴 간격일 수 있다. 주입량은 일반적으로, 견딜 수 있는 만큼, 또는 질환 증상이 개선될 때까지, 대상체 당 적어도 1회의 주입, 바람직하게는 적어도 3회의 주입이다. 상기 세포는 50 내지 250 ml/시간의 속도로 정맥내 주입될 수 있다. 다른 적합한 투여 방식은 동맥내 주입, 복강내 주입, 종양 내로의 직접 주사 및/또는 수술 후의 종양 층

의 관류, 인공 스캐폴드에서 종양 부위에 이식, 척추강내 투여를 포함한다. 이러한 전달 방식에 맞춰 본 발명을 조정하는 방법은 당업자가 용이하게 이용가능하다.

[0147] 특정 구현예에서, 본 발명에 따른 암을 치료하는 방법은 적어도 하나의 다른 공지된 암 요법, 예를 들어 화학요법과 조합된다.

[0148] 추가적인 측면에서, 본 발명은 치료적 유효량의 상기 조작된 면역 세포를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암의 치료를 위한, 본원에 기술된 구현예 중 임의의 것을 갖는 조작된 면역 세포의 용도에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 상기 암은 B 세포 악성 종양이다. 특정 구현예에서, 상기 B 세포 악성 종양은 급성 림프모구 백혈병 (ALL), 만성 림프성 백혈병, 또는 비호지킨 림프종이다.

[0149] 특정 구현예에서, 상기 조작된 면역 세포는 정맥내 주입, 동맥내 주입, 복강내 주입, 종양 내로의 직접 주사 및/또는 수술 후의 종양 층의 관류, 인공 스캐폴드에서 종양 부위에 이식, 또는 척추강내 투여에 의해 상기 대상체에 투여된다.

[0150] 일부 구현예에서, CAR을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 PEBL을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이 순차적으로 도입된다. 일부 구현예에서, CAR을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 PEBL을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이 동시에 도입된다. 특정 경우에서, CAR을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 PEBL을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 작동가능하게 연결되며, 따라서 단일 발현 벡터 또는 플라스미드 상에서 도입될 수 있다.

[0151] 특정 구현예에서, 본 발명은 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 분자 (예를 들어, PEBL)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 표적-결합 분자는 CD3/TCRαβ 복합 단백질에 결합하는 항체이고, 상기 국소화 도메인은 ER 보유 서열, 골지 보유 서열, 및 프로테아좀 국소화 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 보유 신호전달 도메인을 포함한다. 상기 CD3/TCRαβ 복합 단백질은 TCRα, TCRβ, CD3ε, CD3δ, CD3γ, 및 CD3ζ로부터 선택될 수 있다. CD3/TCRαβ 복합 단백질에 결합하는 항체는 scFv일 수 있다. 일부 경우에서, 상기 scFv는 서열 번호 1에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 가변 중쇄 (V_H) 서열 및 서열 번호 2에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 가변 경쇄 (V_L) 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 scFv는 서열 번호 1에 제시된 가변 중쇄 (V_H) 서열 및 서열 번호 2에 제시된 가변 경쇄 (V_L) 서열을 포함한다. 전술한 바와 같이, 상기 조작된 면역 세포는 동종 이계 면역 세포일 수 있다. 예를 들어, 상기 조작된 면역 세포는 "기성품" 면역 세포로서 사용될 수 있다. 다른 구현예에서, 상기 조작된 면역 세포는 자가 면역 세포이다. 상기 막관통 도메인은 CD8α, CD8β, 4-1BB, CD28, CD34, CD4, FcεRIγ, CD16, OX40, CD3ζ, CD3ε, CD3γ, CD3δ, TCRα, CD32, CD64, VEGFR2, FAS, 또는 FGFR2B로부터 유래한 막관통 도메인을 포함할 수 있다. 예를 들어, 막관통 도메인은 CD8α로부터의 막관통 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 보유 신호전달 서열은 KDEL, KKMP, KKTN, 또는 KKXX (여기서 X는 임의의 아미노산임)로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 상기 국소화 도메인은 도 8a 또는 표 1에 제공된 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 다른 측면에서, 본원에 개략된 핵산을 포함하는 발현 벡터가 제공된다. 특정 측면에서, 본원에 기술된 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다.

[0152] 다른 측면에서, 상기 조작된 면역 세포를 생산하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 본원에 개략된 핵산을 면역 세포 내로 도입하는 단계를 포함한다. 상기 면역 세포는 T 세포일 수 있다. 일부 경우에서, 상기 조작된 면역 세포는 동종 이계 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 키메라 항원 수용체 (CAR)를 인코딩하는 핵산을 상기 면역 세포 내로 도입하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 PEBL의 핵산은 상기 CAR을 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된다. 다른 구현예에서, 상기 PEBL의 핵산 및 상기 CAR을 인코딩하는 핵산은 바이시스트로닉 발현을 위해 배열된다 (예를 들어, 두 핵산 서열은 동일한 RNA 전사체로부터 발현된다).

[0153] 다른 측면에서, 본 발명은 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 분자를 포함하는 폴리펩티드를 제공하며, 여기서 상기 국소화 도메인은 소포체 (ER) 서열, 골지 보유 서열, 및 프로테아좀 국소화 서열, 및 CD8α로부터 유래한 막관통 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 보유 신호전달 도메인을 포함하고, 상기 폴리펩티드는 세포에 의해 분비되지 않으며 세포의 세포 표면 상에서 발현되지 않는다. 이와 같이, 상기 폴리펩티드는 세포 내에 유지되고, 이웃 세포 (예를 들어, 암 세포)와 상호작용하거나 결합하지 않는다. 일부 경우에서, 상기 표적-결합 분자의 C-말단은 상기 국소화 도메인의 N-말단에 연결된다. 상기 표적-결합 분자는 체크포인트 억제제, CD 단백질 또는 T 세포 항원에 특이적으로 결합할 수 있다. 상기 표적-결합 분자는 단일쇄 가변 단편 또는 scFv와 같은 항체일 수 있다. 일부 경우에서, 상기 scFv는 서열 번호 1에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 가변 중쇄 (V_H) 서열 및 서열 번호 2에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 가변 경쇄 (V_L) 서열

을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 scFv는 서열 번호 1에 제시된 가변 중쇄 (V_H) 서열 및 서열 번호 2에 제시된 가변 경쇄 (V_L) 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 보유 신호전달 서열은 KDEL, KKMP, KKTN, 또는 KKXX (여기서 X는 임의의 아미노산임)로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 상기 국소화 도메인은 도 8a 또는 표 1에 제공된 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 이러한 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드가 본원에 제공된다. 다른 구현예에서, 본원에 개략된 이러한 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터가 본원에 제공된다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다.

[0154] 다양한 측면에서, 본원에 기술된 조작된 면역 세포를 생산하기위한 키트가 또한 제공된다. 본 키트는 예를 들어 동종 이계 또는 자가 효과기 T 세포, 동종 이계 또는 자가 세포독성 T 세포, 동종 이계 또는 자가 보조 T 세포, 동종 이계 또는 자가 조절 T 세포 등을 생산하는데 사용될 수 있다.

[0155] 따라서, 항-CD3ε PEBL과 같은 PEBL을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을 포함하는 키트가 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 상기 키트는 항-CD3ε PEBL과 같은 PEBL을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산, 및 CAR을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을 포함한다. 상기 키트는 본원에 기술된 구현예 중 임의의 것에 따라 설계될 수 있다.

[0156] 특정 구현예에서, 상기 CAR을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 및/또는 상기 PEBL을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 예를 들어 클로닝 및/또는 발현을 가능하게 하는 서열 (예를 들어, 플라스미드 또는 벡터 서열)을 추가로 포함한다. 예를 들어, 상기 뉴클레오티드 서열은 예를 들어 세포 (예를 들어, 면역 세포) 내로의 형질감염을 위한 다른 플라스미드 및/또는 벡터로 용이하게 클로닝하기 위한 플라스미드의 일부로서 제공될 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 CAR을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 상기 PEBL을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 단일 플라스미드 또는 벡터 상에 제공된다. 특정 구현예에서, 상기 뉴클레오티드 서열은 별도의 플라스미드 또는 벡터 상에 제공된다.

[0157] 일부 구현예에서, 상기 키트는 CD3/TCRαβ-음성 면역 세포를 단리하기 위한 성분 또는 시약을 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 키트는 항-CD3 항체 또는 항-TCRαβ 항체를 포함한다. CD3/TCRαβ-음성 세포는 CD3/TCRαβ-양성 세포를 제거함으로써 세포 집단으로부터 단리될 수 있다. 상기 키트는 또한 CD3/TCRαβ-양성 세포에 결합하는 항-CD3 항체에 부착된 고체 지지체를 포함할 수 있다. 다양한 구현예에서, 상기 키트는 또한 CD3/TCRαβ-양성 세포에 결합하는 항-TCRαβ 항체에 부착된 고체 지지체를 포함할 수 있다.

[0158] 전형적으로, 상기 키트는 사용의 용이성을 위해 구획화되고, 시약을 갖는 하나 이상의 용기를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 모든 키트 성분들은 함께 포장된다. 대안적으로, 상기 키트의 하나 이상의 개개의 성분은 다른 키트 성분들로부터 분리된 패키지에 제공될 수도 있다. 또한, 상기 키트는 키트 성분들의 사용 지침서를 포함할 수 있다.

[0159] WO 2016/126213 및 문헌 [Kamiya et al., Blood Advances, 2018, 2(8):517-528]의 개시 내용은 모든 목적을 위해 그 전체 내용이 원용에 의해 본원에 포함된다.

[0160] 이하에 제시된 예시적인 구현예들이 본원에 제공된다.

[0161] 구현예 1. 조작된 CD3/TCRαβ-음성 T 세포로서, 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 분자를 포함하는 폴리펩티드를 포함하며, 상기 표적-결합 분자는 CD3/TCRαβ 복합 단백질에 결합하는 항체를 포함하고, 상기 국소화 도메인은 소포체 (ER) 보유 서열, 골지 보유 서열, 및 프로테아좀 국소화 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 보유 신호전달 도메인을 포함하고, 상기 국소화 도메인에 연결된 상기 표적-결합 분자는 상기 조작된 세포에 의해 분비되지 않는, 조작된 CD3/TCRαβ-음성 T 세포.

[0162] 구현예 2. CD3/TCRαβ 복합 단백질이 TCRα, TCRβ, CD3ε, CD3δ, CD3γ, 및 CD3ζ로 이루어진 군으로부터 선택되는, 구현예 1의 조작된 T 세포.

[0163] 구현예 3. 항체가 단일쇄 가변 단편 (scFv)인, 구현예 1 또는 구현예 2의 조작된 면역 세포.

[0164] 구현예 4. scFv가 서열 번호 1에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 가변 중쇄 (V_H) 서열 및 서열 번호 2에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 가변 경쇄 (V_L) 서열을 포함하는, 구현예 3의 조작된 T 세포.

[0165] 구현예 5. scFv가 서열 번호 1에 제시된 가변 중쇄 (V_H) 서열 및 서열 번호 2에 제시된 가변 경쇄 (V_L) 서열을 포함하는, 구현예 3의 조작된 T 세포.

[0166] 구현예 6. 조작된 T 세포가 조작된 CD4+ T 세포 또는 조작된 CD8+ T 세포인, 구현예 1 내지 구현예 5 중 어느 한 구현예의 조작된 T 세포.

[0167] 구현예 7. 조작된 T 세포가 조작된 보조 T 세포 또는 조작된 조절 T 세포인, 구현예 1 내지 구현예 5 중 어느 한 구현예의 조작된 T 세포.

[0168] 구현예 8. 조작된 T 세포가 조작된 효과기 T 세포 또는 조작된 기억 T 세포인, 구현예 1 내지 구현예 5 중 어느 한 구현예의 조작된 T 세포.

[0169] 구현예 9. 조작된 T 세포가 동종 이계 T 세포인, 구현예 1 내지 구현예 8 중 어느 한 구현예의 조작된 T 세포.

[0170] 구현예 10. 조작된 T 세포가 자가 T 세포인, 구현예 1 내지 구현예 8 중 어느 한 구현예의 조작된 T 세포.

[0171] 구현예 11. 국소화 도메인이 CD8α, CD8β, 4-1BB, CD28, CD34, CD4, FcεRIγ, CD16, OX40, CD3ζ, CD3ε, CD3γ, CD3δ, TCRα, CD32, CD64, VEGFR2, FAS, 또는 FGFR2B로부터 유래한 막관통 도메인으로부터 선택된 막관통 도메인을 추가로 포함하는, 구현예 1 내지 구현예 10 중 어느 한 구현예의 조작된 T 세포.

[0172] 구현예 12. 막관통 도메인이 CD8α로부터 유래한 막관통 도메인인, 구현예 11의 조작된 T 세포.

[0173] 구현예 13. ER 보유 서열이 KDEL (서열 번호 32), KKMP (서열 번호 33), KKTN (서열 번호 43), 또는 KKXX (여기서 X는 임의의 아미노산임) (서열 번호 35)로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 구현예 1 내지 구현예 12 중 어느 한 구현예의 조작된 T 세포.

[0174] 구현예 14. 국소화 도메인이 도 8a의 어느 하나 또는 서열 번호 11 내지 31 중 어느 하나로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 구현예 1 내지 구현예 13 중 어느 한 구현예의 조작된 T 세포.

[0175] 구현예 15. CD3/TCRαβ 발현이 조작된 T 세포에서 차단되는, 구현예 1 내지 구현예 14 중 어느 한 구현예의 조작된 T 세포.

[0176] 구현예 16. CD3/TCRαβ 발현의 차단이 적어도 6개월 또는 적어도 12개월 동안 지속되는, 구현예 15의 조작된 T 세포.

[0177] 구현예 17. 조작된 T 세포가 유사한 T 세포와 실질적으로 동등한 속도로 증식하는, 구현예 1 내지 구현예 16 중 어느 한 구현예의 조작된 T 세포.

[0178] 구현예 18. 조작된 T 세포가 상기 세포의 투여시 대상체에서 감소된 이식편-대-숙주 반응을 유도하는, 구현예 1 내지 구현예 17 중 어느 한 구현예의 조작된 T 세포.

[0179] 구현예 19. 조작된 T 세포가 키메라 항원 수용체 (CAR)를 추가로 포함하는, 구현예 1 내지 구현예 18 중 어느 한 구현예의 조작된 T 세포.

[0180] 구현예 20. CAR이 항-CD19 scFv 도메인, 4-1BB 자극 신호전달 도메인 및 CD3ζ 신호전달 도메인을 포함하는, 구현예 19의 조작된 T 세포.

[0181] 구현예 21. 조작된 T 세포가 CD19+ 암 세포의 세포독성을 유도하는, 구현예 20의 조작된 T 세포.

[0182] 구현예 22. CAR이 항-CD3 scFv 도메인, 4-1BB 자극 신호전달 도메인 및 CD3ζ 신호전달 도메인을 포함하는, 구현예 19의 조작된 T 세포.

[0183] 구현예 23. 조작된 T 세포가 CD3+ 암 세포의 세포독성을 유도하는, 구현예 22의 조작된 T 세포.

[0184] 구현예 24. 조작된 T 세포의 실질적으로 순수한 집단으로서, 구현예 1 내지 구현예 23의 조작된 T 세포 중 어느 하나를 포함하고, 상기 조작된 T 세포 중 적어도 90%가 CD3/TCRαβ 발현의 차단을 나타내는, 조작된 T 세포의 실질적으로 순수한 집단.

[0185] 구현예 25. 조작된 T 세포 중 적어도 95%가 CD3/TCRαβ 발현의 차단을 나타내는, 구현예 24의 조작된 T 세포의 실질적으로 순수한 집단.

[0186] 구현예 26. 이를 필요로 하는 환자에서 자가면역 질환 또는 바이러스 질환을 치료하는 방법으로서, 치료적 유효량의, 구현예 1 내지 구현예 18 중 어느 한 구현예의 조작된 T 세포를 포함하는 약학적 조성물을 자가면역 질환 또는 바이러스 질환에 걸린 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 이를 필요로 하는 환자에서 자가면역 질환 또는 바이러스 질환을 치료하는 방법.

[0187] 구현예 27. 환자에서 이식편-대-숙주 질환의 가능성을 감소시키거나 제거하는 방법으로서, 치료적 유효량의, 구현예 1 내지 구현예 18 중 어느 한 구현예의 조작된 T 세포를 포함하는 약학적 조성물을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 환자에서 이식편-대-숙주 질환의 가능성을 감소시키거나 제거하는 방법.

[0188] 구현예 28. 투여가 정맥내, 근육내, 피하, 동맥내, 복강내 또는 척추강내 투여를 포함하는, 구현예 26 또는 구현예 27의 방법.

[0189] 구현예 29. 이를 필요로 하는 환자에서 암을 치료하는 방법으로서, 치료적 유효량의, 구현예 19 내지 구현예 23 중 어느 한 구현예의 조작된 T 세포를 포함하는 약학적 조성물을 암에 걸린 환자에게 투여하여 상기 환자에서 암을 치료하는 단계를 포함하는, 이를 필요로 하는 환자에서 암을 치료하는 방법.

[0190] 구현예 30. 상기 암이 B-세포 악성 종양인, 구현예 29의 방법.

[0191] 구현예 31. B 세포 악성 종양이 재발성 또는 난치성 급성 림프모구 백혈병 (ALL), 만성 림프성 백혈병 (CLL), 또는 B-세포 비호지킨 림프종 (B-NHL) 및 거대 B-세포 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 구현예 30의 방법.

[0192] 구현예 32. 투여가 정맥내 주입, 동맥내 주입, 복강내 주입, 종양 내로의 직접 주사 및/또는 수술 후의 종양 층의 관류, 인공 스캐폴드에서 종양 부위에 이식, 또는 척추강내 투여를 포함하는, 구현예 29 내지 구현예 31 중 어느 한 구현예의 방법.

[0193] 구현예 33. 폴리뉴클레오티드로서, 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 분자를 인코딩하며, 상기 표적-결합 분자는 CD3/TCRαβ 복합 단백질에 결합하는 항체를 포함하고, 상기 국소화 도메인은 소포체 (ER) 보유 서열, 골지 보유 서열, 및 프로테아좀 국소화 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 보유 신호전달 도메인을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

[0194] 구현예 34. CD3/TCRαβ 복합 단백질이 TCRα, TCRβ, CD3ε, CD3δ, CD3γ, 및 CD3ζ로 이루어진 군으로부터 선택되는, 구현예 33의 폴리뉴클레오티드.

[0195] 구현예 35. 항체가 scFv인, 구현예 33 또는 구현예 34의 폴리뉴클레오티드.

[0196] 구현예 36. scFv가 서열 번호 1에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 가변 중쇄 (V_H) 서열 및 서열 번호 2에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 가변 경쇄 (V_L) 서열을 포함하는, 구현예 35의 폴리뉴클레오티드.

[0197] 구현예 37. scFv가 서열 번호 1에 제시된 가변 중쇄 (V_H) 서열 및 서열 번호 2에 제시된 가변 경쇄 (V_L) 서열을 포함하는, 구현예 35의 폴리뉴클레오티드.

[0198] 구현예 38. 국소화 도메인이 CD8α, CD8β, 4-1BB, CD28, CD34, CD4, FcεRIγ, CD16, OX40, CD3ζ, CD3ε, CD3γ, CD3δ, TCRα, CD32, CD64, VEGFR2, FAS, 또는 FGFR2B로부터 유래한 막관통 도메인으로부터 선택된 막관통 도메인을 추가로 포함하는, 구현예 33 내지 구현예 37 중 어느 한 구현예의 폴리뉴클레오티드.

[0199] 구현예 39. 막관통 도메인이 CD8α로부터 유래한 막관통 도메인인, 구현예 38의 폴리뉴클레오티드.

[0200] 구현예 40. 보유 신호전달 서열이 KDEL (서열 번호 32), KKMP (서열 번호 33), KKTN (서열 번호 43), 또는 KKXX (여기서 X는 임의의 아미노산임) (서열 번호 35)로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 구현예 33 내지 구현예 39 중 어느 한 구현예의 폴리뉴클레오티드.

[0201] 구현예 41. 국소화 도메인이 도 8a의 어느 하나 또는 서열 번호 11 내지 31 중 어느 하나로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 구현예 33 내지 구현예 40 중 어느 한 구현예의 폴리뉴클레오티드.

[0202] 구현예 42. 발현 벡터로서, 구현예 33 내지 구현예 41 중 어느 한 구현예의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 발현 벡터.

[0203] 구현예 43. 키메라 항원 수용체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 추가로 포함하는, 구현예 42의 발현 벡터.

[0204] 구현예 44. 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 분자를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 키메라 항원 수용체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드가 바이시스트로닉인, 구현예 43의 발현 벡터.

[0205] 구현예 45. 숙주 세포로서, 구현예 42 내지 구현예 44 중 어느 한 구현예의 발현 벡터를 포함하는, 숙주 세포.

[0206] 구현예 46. 치료적 유효량의, 조작된 T 세포의 실질적으로 순수한 집단을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하

는 것을 포함하는, 암의 치료를 위한, 구현예 25 또는 구현예 26의 조작된 T 세포의 실질적으로 순수한 집단의 용도.

[0207] 구현예 47. 암이 B 세포 악성 종양인, 구현예 46의 용도.

[0208] 구현예 48. B 세포 악성 종양이 재발성 또는 난치성 급성 림프모구 백혈병 (ALL), 만성 림프성 백혈병 (CLL), 또는 B-세포 비호지킨 림프종 (B-NHL) 및 거대 B-세포 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 구현예 47의 용도.

[0209] 구현예 49. 조작된 면역 세포의 실질적으로 순수한 집단이 정맥내 주입, 동맥내 주입, 복강내 주입, 종양 내로의 직접 주사 및/또는 수술 후의 종양 층의 관류, 인공 스캐폴드에서 종양 부위에 이식, 또는 척추강내 투여에 의해 대상체에게 투여되는, 구현예 46 내지 구현예 48 중 어느 한 구현예의 용도.

[0210] 구현예 50. 조작된 CD3/TCRαβ-음성 T 세포를 생산하는 방법으로서, (i) 제33항 내지 제41항 중 어느 한 항의 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 도메인을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 T 세포 내로 도입하는 단계, 및 (ii) 생성된 CD3/TCRαβ-음성 T 세포를 단리하는 단계를 포함하는, 조작된 CD3/TCRαβ-음성 T 세포를 생산하는 방법.

[0211] 구현예 51. T 세포가 동종 이계 T 세포인, 구현예 50의 방법.

[0212] 구현예 52. T 세포가 조작된 CD4+ T 세포 또는 조작된 CD8+ T 세포인, 구현예 50 또는 구현예 51의 방법.

[0213] 구현예 53. 조작된 T 세포가 조작된 보조 T 세포 또는 조작된 조절 T 세포인, 구현예 50 또는 구현예 51의 방법.

[0214] 구현예 54. 조작된 T 세포가 조작된 효과기 T 세포 또는 조작된 기억 T 세포인, 구현예 50 또는 구현예 51의 방법.

[0215] 구현예 55. 키메라 항원 수용체 (CAR)를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 T 세포 내로 도입하는 단계를 추가로 포함하는, 구현예 50 내지 구현예 54 중 어느 한 구현예의 방법.

[0216] 구현예 56. 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 도메인을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 CAR을 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 키메라 항원 수용체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드가 바이시스트로닉인, 구현예 55의 방법.

[0217] 구현예 57. 조작된 CD3/TCRαβ-음성 키메라 항원 수용체 T (CAR-T) 세포로서, (i) 키메라 항원 수용체 (CAR) 및 (ii) 국소화 도메인에 연결된 표적-결합 분자를 포함하며, 상기 표적-결합 분자는 CD3/TCRαβ 복합 단백질에 결합하는 항체를 포함하고, 상기 국소화 도메인은 소포체 (ER) 보유 서열, 골지 보유 서열, 및 프로테아좀 국소화 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 보유 신호전달 도메인을 포함하고, 상기 국소화 도메인에 연결된 상기 표적-결합 분자는 상기 조작된 CAR-T 세포에 의해 분비되지 않는, 조작된 CD3/TCRαβ-음성 키메라 항원 수용체 T (CAR-T) 세포.

[0218] 구현예 58. CD3/TCRαβ 복합 단백질이 TCRα, TCRβ, CD3ε, CD3δ, CD3γ, 및 CD3ζ로 이루어진 군으로부터 선택되는, 구현예 57의 조작된 CAR-T 세포.

[0219] 구현예 59. 항체가 단일쇄 가변 단편 (scFv)인, 구현예 57 또는 구현예 58의 조작된 CAR-T 세포.

[0220] 구현예 60. scFv가 서열 번호 1에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 가변 중쇄 (V_H) 서열 및 서열 번호 2에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 가변 경쇄 (V_L) 서열을 포함하는, 구현예 59의 조작된 CAR-T 세포.

[0221] 구현예 61. scFv가 서열 번호 1에 제시된 가변 중쇄 (V_H) 서열 및 서열 번호 2에 제시된 가변 경쇄 (V_L) 서열을 포함하는, 구현예 59의 조작된 CAR-T 세포.

[0222] 구현예 62. 조작된 CAR-T 세포가 조작된 CD4+ T 세포 또는 조작된 CD8+ T 세포인, 구현예 57 내지 구현예 61 중 어느 한 구현예의 조작된 CAR-T 세포.

[0223] 구현예 63. 조작된 CAR-T 세포가 조작된 보조 T 세포 또는 조작된 조절 T 세포인, 구현예 57 내지 구현예 61 중 어느 한 구현예의 조작된 CAR-T 세포.

[0224] 구현예 64. 조작된 CAR-T 세포가 조작된 효과기 T 세포 또는 조작된 기억 T 세포인, 구현예 57 내지 구현예 61

중 어느 한 구현예의 조작된 CAR-T 세포.

[0225] 구현예 65. 조작된 CAR-T 세포가 자가 T 세포인, 구현예 57 내지 구현예 64 중 어느 한 구현예의 조작된 CAR-T 세포.

[0226] 구현예 66. 조작된 CAR-T 세포가 동종 이계 T 세포인, 구현예 57 내지 구현예 64 중 어느 한 구현예의 조작된 CAR-T 세포.

[0227] 구현예 67. 국소화 도메인이 CD8α, CD8β, 4-1BB, CD28, CD34, CD4, FcεRIγ, CD16, OX40, CD3ζ, CD3ε, CD3γ, CD3δ, TCRα, CD32, CD64, VEGFR2, FAS, 또는 FGFR2B로부터 유래한 막관통 도메인으로부터 선택된 막관통 도메인을 추가로 포함하는, 구현예 57 내지 구현예 66 중 어느 한 구현예의 조작된 CAR-T 세포.

[0228] 구현예 68. 막관통 도메인이 CD8α로부터 유래한 막관통 도메인인, 구현예 67의 조작된 CAR-T 세포.

[0229] 구현예 69. ER 보유 서열이 KDEL (서열 번호 32), KKMP (서열 번호 33), KKTN (서열 번호 43), 또는 KKXX (여기서 X는 임의의 아미노산임) (서열 번호 35)로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 구현예 57 내지 구현예 68 중 어느 한 구현예의 조작된 CAR-T 세포.

[0230] 구현예 70. 국소화 도메인이 도 8a의 어느 하나 또는 서열 번호 11 내지 31 중 어느 하나로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 구현예 57 내지 구현예 69 중 어느 한 구현예의 조작된 CAR-T 세포.

[0231] 구현예 71 CAR이 CD3 또는 CD19에 결합하는, 구현예 57 내지 구현예 70 중 어느 한 구현예의 조작된 CAR-T 세포.

[0232] 구현예 72. CAR이 항-CD3 scFv 도메인, 4-1BB 자극 신호전달 도메인 및 CD3ζ 신호전달 도메인을 포함하는, 구현예 71의 조작된 CAR-T 세포.

[0233] 구현예 73. CAR이 항-CD19 scFv 도메인, 4-1BB 자극 신호전달 도메인 및 CD3ζ 신호전달 도메인을 포함하는, 구현예 71의 조작된 CAR-T 세포.

[0234] 실시예

[0235] **실시예 1: T 세포 수용체-결핍 키메라 항원 수용체 T 세포를 생성하는 신규한 방법**

[0236] **요약**

[0237] 키메라 항원 수용체 (CAR)-T 세포 요법을 개선하기 위한 실질적인 방법이 이들의 적용성을 넓히기 위해 필요한 실정이다. 자가 CAR-T 세포 대신 동종 이계의 사용이 이목을 끌기는 하지만, 이식편-대-숙주 질환 (GVHD)의 위험을 감소시키기 위해 내인성 T-세포 수용체 (TCR)를 녹다운해야 한다. 표면 TCRαβ를 제거하기 위해, 본 발명자들은 CD3ε에 특이적인 항체-유래 단일쇄 가변 단편 (scFv)을 세포내에서 이를 유지하도록 매개하는 것으로 예상되는 21개의 상이한 아미노산 서열과 조합하였다. 저캇 세포 및 말초 혈액 T 세포에 형질도입 후, 이들 단백질 발현 차단제 (PEBL) 중 몇몇은 CD3과 동일한 세포내에서 공존하여, 표면 CD3 및 TCRαβ 발현을 차단하였다. 25회의 실험에서, T 림프구에서의 중앙값 TCRαβ 발현은 95.7%에서 25.0%로 감소되었고; CD3/TCRαβ 세포 고갈은 실질적으로 순수한 TCRαβ-음성 T 세포를 초래하였다. 항-CD3ε PEBL은 면역표현형 또는 증식에 영향을 주지 않으면서 TCRαβ-매개된 신호전달을 제거하였다. 항-CD3ε PEBL-T 세포에서 항-CD19-41BB-CD3ζ CAR의 발현은, 정상적인 CD3/TCRαβ 발현을 갖는 CAR-T 세포의 것을 충족하거나 초과하는 비율로, 사이토카인 분비, 장기 증식 및 $CD19^{+}$ 백혈병 세포 살해를 유도하였다. 면역결핍 쥐에서, 항-CD3ε PEBL T 세포는 GVHD 가능성을 현저히 감소시켰고; 항-CD19 CAR로 형질도입된 경우, 이들 T 세포는 백혈병 세포에 생착되었다. 표면 CD3/TCRαβ 발현의 PEBL 차단은 동종 이계 CAR-T 세포를 제조하는 효과적인 도구이다. 조합된 PEBL 및 CAR 발현은 단일 단계 절차로 달성될 수 있고, 현재의 세포 제조 프로토콜에 쉽게 적응할 수 있으며, CAR-T 세포 요법을 향상시키기 위해 다른 T-세포 분자를 표적화하는데 사용될 수 있다.

[0238] **서론**

[0239] 유전자-조작된 면역 세포는 암에 대한 강력한 새로운 치료법이다. 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하는 T 림프구를 사용한 최근의 임상 시험의 결과는 이러한 접근법의 힘을 강력하게 입증하였다. 따라서, 표면 분자 CD19에 특이적인 CAR-T 세포는 급성 림프모구 백혈병 (ALL), 만성 림프성 백혈병 및 비호지킨 림프종과 같은 난치성 CD19-양성 악성 종양 환자에서 형태학적 및 분자적 완화를 유도하였다.[1-10] 다른 악성 종양들은 상이한 항원에 대해 재유도된 T 세포에 의해 공격될 수 있다. 따라서, 종양학에서 유전자-조작된 세포 요법에 대한 가능한 응용

분야는 광범위하다.[10,11]

[0240] CAR-T 세포를 사용한 초기 임상 경험은 또한, 치료 효과를 감소시키고 개발을 방해할 수 있는 한계를 확인하였다. 주요 문제는 암 환자로부터 수집된 면역 세포의 가변적인 적합성이며, 이는 생체 내에서 확장하고 항종양 효과를 발휘하는 능력을 예측할 수 없게 만든다.[10,12] 이러한 가변성은 가장 효과적인 세포 용량의 확인을 복잡하게 만들고, 수명이 짧고 비효과적인 세포의 주입을 초래할 수 있다. 건강한 공여자로부터의 T 림프구의 사용은 개선된 효과 및 일관성을 제공하지만, 공여자 림프구 주입의 잠재적으로 치명적인 결과인 이식편-대-숙주 질환(GVHD)의 위험을 제기한다.[13,14] 이러한 동종 이계 환경에서, 숙주 조직을 인식하는 능력을 억제하기 위해; 즉, CD3/TCRαβ의 하향조절을 위해, 주입된 T 세포에 대한 추가적인 변형이 요구된다.[15,16]

[0241] 유전자 편집을 위한 현대적인 방법론으로 인해 암의 세포 요법과 관련된 새로운 기회가 열렸다.[17] 아연 핑거 메가뉴클레아제, TALEN 및 CRISPR-Cas9는 TCRαβ 사슬을 인코딩하는 유전자를 결실시켜 동종이식편반응이 결여된 T 세포를 유도할 수 있는 반면,[15,18,19] 다른 유전자들을 표적화하여 거부를 지연시킬 수 있다.[15] 항-CD19 CAR 발현과 함께 TCRα 및 CD52 유전자좌의 TALEN 결실을 사용한 보고서는 CAR 발현을 유전자 편집과 조합하는 것이 아직 기술적으로 도전적일 수 있지만 임상 환경에서 실행가능하다는 것을 나타내고 있다.[20]

[0242] 암의 세포 기반 요법을 향상시키기 위한 도구를 확장하기 위해, 본 발명자들은 면역 세포에서 표면 수용체 발현의 단순하고 효과적인 차단을 가능하게 하는 방법을 개발하였다. 단백질 발현 차단제 (Protein Expression Blocker (PEBL))로 명명되는 특정 구조체는 표적 단백질이 세포막으로 이동하는 것을 방지한다. PEBL 구조체는 다른 유전자 변형과 용이하게 조합될 수 있고, 면역 세포의 기능을 최적화하기 위해 생체외 세포 처리를 위한 기존의 임상 등급 프로토콜에 포함될 수 있다. 본 발명자들은 CAR-T 세포에서 CD3/TCRαβ 발현을 하향조절하는 이러한 접근법의 가능성을 시험하였다.

[0243] **물질 및 방법**

[0244] **종양 세포주 및 T 세포**

[0245] Kurkat, Loucy, Nalm6, RS4;11, 및 K562는 American Type Culture Collection (Rockville, MD)로부터 입수하였고; OP-1는 자체 실험실에서 확립하였다.[21] 쥐 줄기 세포 바이러스 (MSCV) 레트로바이러스 벡터를 사용하여 Nalm6에서 반딧불이 루시퍼라제 유전자 및 녹색 형광 단백질 (GFP)을 발현시켰고, K562에서 CD19 및 DsRed를 발현시켰다.[22]

[0246] 헬싱키 선언에 따라 Institutional Review Board (National University of Singapore)의 승인을 받아, 싱가포르에 소재한 National University Hospital Blood Bank의 혈소판 기부의 익명 부산물로부터 건강한 공여자의 말초 혈액을 수득하였다. 단핵화 세포를 Lymphoprep (Axis-Shield, Oslo, Norway)에서 원심 분리에 의해 분리하였다. Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)이 풍부한 T 세포를 RPMI-1640 (Thermo Fisher), 10% 소 태아 혈청 (GE-Healthcare, Chicago, IL), 및 항생제에서 2일마다 인터류킨 2 (IL-2; Proleukin, Novartis, Basel, Switzerland; 100 IU/mL)을 첨가하면서 배양하였다.

[0247] **PEBL 구조체**

[0248] 항-인간 CD3 단클론 항체 (면역글로불린 G2a [IgG2a] 이소타입; Creative Diagnostics, Shirley, NY)를 분비하는 PLU4 쥐 하이브리도마의 RNA로부터, 본 발명자들은 몰로니 쥐 백혈병 바이러스 역전사효소 및 Oligo(dT)15 프라이머 (Promega, Madison, WI)에 의해 cDNA를 합성하였다. 본 발명자들은 IgG Library Primer Set Mouse BioGenomics (US Biological, Salem, MA)로 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 증폭시키고, 이들을 가요성 링커 서열 인코딩 $(Gly_4Ser)_4$에 의해 단일쇄 가변 단편 (scFv)으로 조립하였다. CD8α 신호 펩티드 및 막관통 도메인은 인간-활성화된 T-세포 cDNA로부터 유래하였다.

[0249] PEBL 구조체를 생성하기 위해, 각각의 보유-신호전달 도메인 (도 8a)을 PCR에 의해 가변 중쇄 단편의 3' 말단에 첨가하였다. 구조체를 내부 리보솜 진입 부위 및 GFP 또는 mCherry를 함유하는 MSCV 레트로바이러스 벡터로 서브클로닝하였다. 레트로바이러스 상층액의 제조 및 유전자 형질도입은 전술한 바와 같이 수행되었다.23 간단히 말하면, 레트로바이러스 벡터-조절 배지를 RetroNectin (Takara, Otsu, Japan)으로 코팅된 폴리프로필렌 튜브에 첨가하고; 상층액을 제거한 후, 활성화된 T 세포를 첨가하고 37℃에서 12시간 동안 방치하고; 신선한 바이러스

상층액을 2일 계속해서 추가로 첨가하였다. 실험 시점까지 소 태아 혈청, 항생제 및 200 IU/mL IL-2와 함께 RPMI-1640에서 T 림프구를 유지하였다.

[0250] PEBL 형질도입 후 잔류 CD3/TCRαβ-양성 T 세포를 제거하기 위해, 본 발명자들은 알로피코시아닌 (APC)-접합된 항-CD3 (BD Biosciences, San Jose, CA; 또는 Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) 및 항-TCRαβ 항체 (BioLegend, San Diego, CA)를 항-APC 마이크로비드 및 LD 컬럼 (Miltenyi Biotec)과 함께 사용하였다.

[0251] PEBL에 대해 기술된 바와 같이, 항-CD19 scFv, CD8α 힌지 및 막관통 도메인, 및 41BB 및 CD3ζ의 세포질 도메인으로 구성된 CAR (항-CD19-41BB-CD3ζ)[22]을 MSCV 벡터에 삽입하였다. 일부 실험에서, CAR-T 세포는 CD19로 형질도입된 100 Gy-방사선 조사된 K562 세포와 1:1 E:T 비율로 공동 배양함으로써 확장되었다. 또한, 자가-절단 2A 펩티드를 인코딩하는 서열에 의해 분리된 CAR 및 PEBL 구조체 둘 다를 함유하는 MSCV 벡터로 T 세포를 형질도입하였다.[24] 항-CD19-41BB-CD3ζ mRNA의 전기천공은 전술한 바와 같이 수행되었다.[25,26] mRNA 없이 전기천공된 세포를 대조군으로 사용하였다.

[0252] **scFv 특이성, PEBL 및 CAR 발현, 및 세포 마커 프로파일의 측정**

[0253] PLU4 하이브리도마로부터 유래한 항체에 결합된 CD3 서브유닛을 확인하기 위해, 각 CD3 서브유닛 (Origene, Rockville, MD)의 cDNA를 MSCV-내부 리보솜 진입 부위-GFP로 서브클로닝하고 K562 세포로 형질도입하였다. 이어서 K562 세포를 8E 시약 (본 발명자들에 의해 개발된 투과화 시약)으로 투과화하고, PLU4 하이브리도마 세포로부터의 상층액과 함께 배양한 다음, Alexa Fluor 647 접합된 염소 항-마우스 IgG (Southern Biotech, Birmingham, AL)를 사용하였다.

[0254] CAR 및 PEBL 발현은 비오틴-접합된 염소 항-마우스 IgG $F(ab')_2$ 항체 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) 및 피코에리트린 (PE)- 또는 APC-접합된 스트렙타비딘 (Jackson ImmunoResearch)에 의해 검출되었다. 세포내 염색을 위해, 세포를 8E로 투과화시켰다. PEBL이 분비되었는지 여부를 측정하기 위해, 항-CD3ε scFv- 또는 PEBL-형질도입된 저캇으로부터의 상층액을 Loucy에 첨가하고 4℃에서 45분 동안 배양하였으며; 비오틴-접합된 염소 항-마우스IgG $F(ab')_2$ 항체 및 스트렙타비딘 APC로 표면-결합된 scFv 및 PEBL을 검출하였다.

[0255] CD3 발현은 항-CD3 APC (SK7, BD Biosciences)로 검출하였다. PE- 또는 APC-접합된 항-TCRαβ (IP26), CD2 APC (RPA-2.10), CD137 APC (4B4-1), CD279 PE (EH12.2H7), 및 CD366 PE (F38-2E2)는 BioLegend (San Diego, CA)로부터 입수하였다. 항-CD4 PE-Cy7 (SK3), CD8 PE (RPA-T8), CD7 PE (M-T701), CD25 PE-Cy7 또는 APC (2A3), CD62L APC (DREG-56), 및 CD69 PE 또는 APC (L78)는 BD Biosciences로부터 입수하였고; CD223 APC (3DS223H)는 Thermo Fisher로부터 입수하였다. 세포 염색은 Fortessa 또는 Accuri C6 유세포 분석기 (BD Biosciences)를 사용하여 분석하였다.

[0256] **T-세포 활성화, 사이토카인 생산, 증식 및 세포독성**

[0257] OKT3 (10 μg/mL, Miltenyi Biotech) 또는 이소타입-매칭된 대조군 (R&D, Minneapolis, MN)을 96-웰 편평 바닥 플레이트 (Corning, Corning, NY)에 분배하고 4℃에서 12시간 동안 방치하였다. 가용성 항체를 제거한 후, 웰당 1 내지 2 x 10^5개의 저캇 세포를 분주하고 37℃, 5% CO_2에서 24시간 동안 배양하였다. PE- 또는 APC-접합된 항-CD25 및 항-CD69 항체를 사용하여 T-세포 활성화를 측정하였으며, 대조군으로서 이소타입-매칭된 비반응 항체를 사용하였다 (모두 BD Biosciences로부터 입수함).

[0258] 저캇 세포는 HLA-A2의 맥락에서 B형 간염 바이러스 (HBV) s183 펩티드에 특이적인 TCR로 형질도입되었다 (싱가포르에 소재한 Duke-NUS의 A. Bertoletti에 의해 제공됨).[27] 네오마이신-내성 유전자를 함유하는 MSCV 벡터에 TCR을 삽입하고, 네오마이신에 노출시킴으로써 형질도입된 세포를 선택하였다. 플루오레세인 이소티오시아네이트 (Beckman Coulter, Brea, CA)에 접합된 항-TCR Vβ3 항체로 세포 표면 및 세포내에서의 (8E로 세포 투과화 후) TCRβ의 발현을 검출하였다. 항-CD3 PEBL을 포함하거나 포함하지 않는 mCherry 벡터로 형질도입된 HBV s183-저캇 세포를 1 μg/mL HBV s183 peptide (Genscript, Piscataway, NJ) 로 펄스한 T2 세포 (또한 A. Bertoletti로부터)와 1:1 E:T 비율로 공동 배양하였다. 24시간 후, 세포를 항-CD25 PE 및 항-CD69 APC로 염색하였다.

[0259] 인터페론 γ (IFNγ) 생산량을 측정하기 위해, 1 x 10^5개의 T 세포 및 2 x 10^5개의 RS4;11 세포를 96-웰 둥근 바닥 플레이트에 분주하였다. 0.1% 브레펠딘 A (GolgiPlug, BD Biosciences)의 존재 하에 8시간 후, 세포막 투

과화 후에 APC- 또는 PE-접합된 항-IFNγ (클론 25723.11, BD Biosciences)로 세포를 표지하였다.

[0260] 세포 증식을 측정하기 위해, CAR 또는 GFP 단독으로 형질도입된 5 x 10^4개의 T 세포를 96-웰 둥근 바닥 플레이트 내에 10% 소 태아 혈청, 항생제 및 200 IU/mL의 IL-2를 함유하는 RPMI-1640에 배치하였다. OP-1 세포에 방사선을 조사하고 (100 Gy) T 세포와 1:1 E:T로 혼합하였다. 2일마다, 200 IU/mL의 IL2를 첨가하였다. GFP+ 세포를 유세포 분석에 의해 계수하였고; 방사선 조사된 OP-1 세포의 새로운 세트를 7일마다 1:1 E:T로 첨가하였다.[23]

[0261] 세포독성을 시험하기 위해, 표적 세포를 칼세인 레드-오렌지 AM (Thermo Fisher)으로 표지하고 100 μL 당 5 x 10^4개의 세포의 농도로 96-웰 둥근 바닥 플레이트에 도말하였다. 다양한 E:T 비율로 T 세포를 첨가하고 37℃, 5% CO_2에서 배양하였다. 4시간 후, 유세포 분석에 의해 생존가능한 표적 세포의 수를 계수하였다. 일부 시험에서, 루시퍼라제-표지된 세포가 표적으로서 사용되었다. 96-웰 편평 바닥 플레이트에서 분석을 수행하였고, 4시간 후 웰에 BrightGlo (Promega)를 첨가하였으며, Flx 800 플레이트 판독기 (BioTek, Winooski, VT)를 사용하여 발광을 측정하였다.[23]

[0262] **마우스 모델**

[0263] GVHD를 만들기 위해, NOD.Cg-Prkdc^{scid} IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) 마우스 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)에 2.5 Gy 전신 방사선 조사를 실시하였다. 1일 후, 항-CD3 PEBL 및 GFP 또는 GFP 단독으로 형질도입된 1 x 10^7개의 T 세포를 IV 주입하였다. 모든 마우스에 IL-2 (20 000 IU)를 1주 3회 복강내 (IP) 투여하였다. 체중 및 GVHD 증상을 1주 3회 모니터링하였고; 볼 채혈에 의해 1주 1회 혈액을 수집하였다. 2회 연속 측정에서 체중 감소가 기준치의 20%를 초과하였을 때 마우스를 안락사시켰다. GVHD에 대한 조직병리학 평가는 Institute of Molecular and Cell Biology (Singapore)의 Advanced Molecular Pathology Laboratory에서 수행되었다. 면역조직 화학에는 항-인간 CD3 다클론 항체 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), 항-인간 CD4 (EPR6855) 및 항-인간 CD8 (EP1150Y; 둘 다 영국 캠브리지 소재의 Abcam으로부터 입수함)이 사용되었다.

[0264] 급성 림프모구 백혈병 (ALL) 모델의 경우, 루시퍼라제를 발현하는 Nalm6 세포 (마우스 당 0.5 x 10^6개의 세포)를 IV 주사한 다음, 3일 후에 항-CD19-41BB-CD3ζ 및 항-CD3 PEBL 또는 mCherry로 형질도입된 T 세포 (마우스 당 2 x 10^7개, IV)를 주사하였고; 대조군 마우스는 RPMI-1640 배지를 투여받았다. 2차 실험에서, 마우스는 T 세포 또는 RPMI-1640의 주입 전 3일째에 2.5 Gy 전신 방사선 조사되었다. 모든 마우스에 IL-2 (20 000 IU)를 1주 3회 IP 투여하였다. 백혈병 세포 부하는 150 μg/g 체중의 d-루시페린 칼륨염 수용액 (Perkin Elmer)을 IP 주사한 후 Xenogen IVIS-200 시스템 (Perkin Elmer, Waltham, MA)으로 측정하였다. Living Image 3.0 소프트웨어로 발광을 분석하였다. 발광이 초 당 1 x 10^{10}개의 광자에 도달했을 때, 또는 2회 연속 측정에서 체중 감소가 기준치의 20%를 초과하거나, 또는 안락사를 보증하는 다른 물리적 징후가 있는 경우 더 일찍, 마우스를 안락사시켰다.

[0265] **결과**

[0266] **PEBL 구조체의 설계 및 기능적 스크리닝**

[0267] CD3/TCRαβ 복합체는 소포체 (ER)에 조립되며; 이의 세포 표면 발현에는 모든 성분이 요구된다. PLU4 항체의 CD3 특이성을 측정하기 위해, 본 발명자들은 K562 세포를 CD3ε, CD3γ, CD3δ, 및 CD3ζ로, 단독으로 또는 조합하여, 형질도입하였고 유세포 분석에 의해 PLU4 반응성을 시험하였다 (도 9). 염색 패턴은 CD3γ 또는 CD3δ와 결합된 경우 CD3ε의 에피토프와의 반응성이 가장 접근 가능함을 나타내었다.

[0268] 본 발명자들은 PLU4 하이브리도마 cDNA로부터 scFv를 생성하고, 이를 ER 및/또는 골지체에 고정시킬 것으로 예측되는 펩티드를 인코딩하는 서열에 이를 연결시켰다 (도 8a). 본 발명자들은 21개의 구조체에 대해 CD3 표면 발현을 억제하는 이들의 능력을 시험하고, scFv에 연결되는 경우 표면 단백질의 발현을 억제하는 것으로 보고된 서열인 SEKDEL (서열 번호 50)을 함유하는 구조체과 이들을 비교하였다.[31] 저캇 세포에서, 상기 PEBL 중 대부분의 레트로바이러스 형질도입은 표면 CD3 발현의 거의 완전한 제거를 야기한 반면 (도 1a 내지 도 1b), SEKDEL 구조체로 형질도입된 대부분의 세포는 CD3-양성으로 유지되었다.

[0269] PEBL 1 내지 8, 11 및 19의 발현은 세포내로 제한되었고; 다른 PEBL은 다양한 정도의 표면 발현을 나타내었다

(도 1c, 도 10a 내지 도 10c). PEBL은 C3과 동일한 세포내에서 공존하였고; PEBL 1 내지 5를 사용한 시험에서 분비가 검출되지 않았다 (도 10a 내지 도 10c). 중요하게는, PEBL은 또한, 활성화된 말초 혈액 T 림프구에서 CD3 발현을 효과적으로 하향조절하였다 (도 1d).

[0270] **PEBL을 사용한 CD3 하향조절은 TCRαβ 발현을 억제한다**

[0271] CD3뿐만 아니라, PEBL 형질도입은 말초 혈액 T 림프구에서 TCRαβ 발현을 또한 하향조절하였다. 25회의 실험에서, TCRαβ를 발현하는 T 세포의 중앙값 백분율은 95.7% (범위, 89.4% 내지 99.0%)에서 25.0% (범위, 3.5% 내지 55.2%; FIG. 2a)로 감소되었다. CD3/TCRαβ 하향조절의 정도를 결정하는 주요 요인은 레트로바이러스 형질도입 효율이었으며, 이는 58.5% 내지 99.8% (중앙값 GFP+ 세포, 94.2%) 범위였다. 잔류 CD3/TCRαβ-양성 세포의 자기 제거는 CD3/TCRαβ-음성 T 세포의 실질적으로 순수한 집단을 생성하였고 (도 2b); 6명의 공여자로부터의 11개의 T-세포 조제물에서, 단지 1회의 CD3/TCRαβ 고갈 후에, 정상 수준의 CD3/TCRαβ를 발현하는 T 세포는 0.01% (<0.01% 내지 0.15%)였다.

[0272] 연속 배양에서 유지된 말초 혈액 T 림프구 및 저캇 세포에서, CD3/TCRαβ 하향조절이 지속적이었으며, T 림프구의 경우 최대 2개월 동안 후속 검사하였고 저캇 세포의 경우 21개월 동안 후속 검사하였다 (도 2c 내지 도 2d;도 11).

[0273] **PEBL에 의한 하향조절된 CD3/TCRαβ를 갖는 T 세포의 기능**

[0274] 표면 CD3/TCRαβ의 결여뿐만 아니라, PEBL로 형질도입된 림프구에서 현저한 표현형 변화는 없었으며; CD4, CD8, CD2, CD7, CD25, CD62L, CD69, CD137 (4-1BB), CD223 (LAG3), CD279 (PD-1), 및 CD366 (TIM-3)의 발현이 유의하게 변경되지 않았다 (도 8b). T-세포 증식 또한 영향을 받지 않았다. 저캇 세포를 사용한 실험에서, PEBL-형질도입된 세포의 증식 속도는 GFP 단독으로 형질도입된 세포의 것과 동일하였다 (도 3a). 마찬가지로, IL-2 (200 IU/mL)를 포함하는 말초 혈액 T 세포의 확장 및 생존은 PEBL 형질도입 및 CD3/TCRαβ 하향조절에 의해 영향을 받지 않았다 (도 3b).

[0275] 예상한 바와 같이, 표면 CD3의 녹다운은 CD3 신호전달을 제거하였다. 따라서, 항-CD3 항체 OKT3와 함께 배양된 저캇 세포에서, 세포가 항-CD3 PEBL로 형질도입된 경우, 활성화 마커 CD25 및 CD69는 상향조절되지 않았다 (도 3c). 또한, 말초 혈액 T 세포를 OKT3와 함께 48시간 동안 배양한 경우, GFP 단독으로 형질도입된 세포의 생존력은 급격히 감소한 반면, PEBL-형질도입된 세포의 수는 높게 유지되었다 (도 3d). 마지막으로, 본 발명자들은 HLA-A2의 맥락에서 발현된 HBV s183 펩티드에 대한 TCR로 저캇 세포를 형질도입시켰다.27 항-CD3ε PEBL 형질도입은 CD3, 항-HBV TCRαβ 및 이의 TCRVβ3 사슬의 표면 발현을 차단하였으며 (도 3e); 이는 HBV s183 펩티드로 펄스된 HLA-A2-발현 세포 (T2)에 반응하는 세포의 능력을 제거하였다 (도 3f).

[0276] **항-CD3ε PEBL로 형질도입된 T 세포에서의 항-CD19 CAR의 기능**

[0277] PEBL 형질도입은 T-세포 면역표현형 및 증식에 영향을 미치지 않았으며, 이는 PEBL-T 세포에서의 CAR의 발현이 표적-특이적 세포독성을 유도할 수 있을 뿐만 아니라 CD3/TCRαβ-양성 T 세포에서도 그러할 수 있음을 시사한다. 이러한 개념을 시험하기 위해, 본 발명자들은 T 세포에서 항-CD19-41BB-CD3ζ CAR 및 항-CD3 PEBL을 발현시키고 이들의 기능을 PEBL을 포함하지 않는 CAR-T 세포의 기능과 비교하였다. 9쌍의 실험에서, CD3/TCRαβ 발현에 관계없이, 바이러스 형질도입 (n = 4) 또는 mRNA 전기천공 (n = 5)에 의한 CAR 발현이 높았다 (도 4a 내지 도 4b). PEBL 발현 또는 CD3/TCRαβ 하향조절은, CAR-매개된 IFNγ 분비 및 T-세포 증식을 비롯한 CAR 기능에 영향을 미치지 않았다 (도 4c 내지 도 4d).

[0278] PEBL-형질도입된 T 세포에서의 CAR 발현은, CAR이 mRNA 전기천공 또는 바이러스 형질도입에 의해 발현되는지 여부에 관계없이, CD19+ 백혈병 세포 표적에 대해 강한 세포독성을 유도하였다 (도 5a 내지 도 5b, 도 12a 내지 도 12b). 본 발명자들은 또한 라이브 셀 이미징 시스템 (live-cell imaging system)을 사용하여 낮은 E:T 비율에서 더 긴 기간 동안 CAR 세포독성을 측정하였다. CAR+PEBL-T 세포는 항백혈병 세포 살해에 있어서 PEBL을 포함하지 않는 CAR-T 세포 이상으로 효과적이었으며, 1:8 및 1:16 E:T에서 보다 높은 세포독성을 보였다 (도 5c 내지 도 5d).

[0279] CAR 발현 및 기능을 사용한 CD3의 하향조절은 CAR 및 PEBL 둘 다를 함유하는 바이시스트로닉 벡터를 사용함으로써 효과적으로 달성될 수 있다 (도 13a 내지 도 13c).[24]

[0280] **면역결핍 마우스에서 PEBL-T 세포의 이종 반응성과 항백혈병 효능**

[0281] PEBL에 의한 CD3/TCRαβ 녹아웃의 효과를 추가로 시험하기 위해, 2.5 Gy 방사선 조사된 NSG 마우스에 항-CD3 PEBL T 세포를 주입하고, T 세포가 GVHD를 유발하는 능력을 평가하였다. GFP 단독으로 형질도입된 인간 T 세포를 주사한 8마리 마우스 모두 체중 감소, 빈혈 및 혈소판 감소증을 나타낸 반면, PEBL-형질도입된 T 세포를 주사한 8마리 마우스 중에서는 1마리에서만 이러한 GVHD 징후가 관찰되었다 (도 6a 내지 도 6d; 생존의 로그-순위 검정에서 P=0.0003). 말초 혈액에서 측정된 인간 T-세포 수는 GFP-형질도입된 T 세포를 주사한 마우스에서 전체적으로 현저히 높았으며 (도 6e), 이는 PEBL이 이종항원에 의한 T-세포 자극을 억제하였음 시사한다. GVHD의 발생은 병리학적 발견에 의해 확인되었다 (도 14c 및 도 8c).

[0282] 시험관내 실험 결과는 항-CD19 CAR을 발현하는 PEBL-형질도입된 T 세포가 CAR-매개된 세포독성 능력을 보유함을 나타내었다. 따라서, 본 발명자들은 이종 이식 ALL 모델에서 이들의 항백혈병 능력을 시험하였다. 도 7a 내지 도 7c에 도시된 바와 같이, 모든 미치료 대조군 마우스에서 백혈병 세포 성장이 발생한 반면, CAR^+ PEBL-T 세포는 항-CD3ε PEBL 대신 mCherry로 형질도입된 CAR-T 세포의 것과 중첩되는 속도로 Nalm6 백혈병 세포를 효과적으로 살해하였다. 3차 모델에서, 본 발명자들은 이전의 두 조건을 조합하였다. 마우스에 Nalm6 세포를 주사하고 생착을 평가한 후, 마우스에 2.5 Gy로 방사선을 조사한 후, PEBL 또는 mCherry 단독으로 형질도입된 CAR-T 세포로 치료하였다. 도 7d 내지 도 7e에 도시된 바와 같이, 모든 미치료 대조군 마우스에서, 방사선 조사와 무관하게 백혈병이 발생한 반면, CAR-T 세포는 백혈병 부담을 현저히 감소시켰다. 특히, PEBL을 포함하지 않는 CAR-T 세포를 투여받은 5마리 마우스 중 3마리에서 GVHD (>20% 체중 감소, 털 손실, 이동성 감소)가 발생한 반면, CAR^+PEBL T 세포를 투여받은 6마리 중 어느 것에서도 GVHD가 발생하지 않았다 (도 7f). CAR^+mCherry군의 나머지 2마리 마우스 및 CAR^+PEBL T 세포를 투여받은 6마리 마우스 중 4마리는, 백혈병 세포 생착 후 150일 초과 동안 차도를 보였다 (도 7f).

[0283] **논의**

[0284] 본 발명자들은 T 세포에서 CD3/TCRαβ의 신속하고 효율적인 하향조절을 가능하게 하는 방법을 개발하였다. 항-CD3ε PEBL 형질도입은 CD3ε의 세포내 보유를 야기하였고, 이는 결국 T 림프구 표면 상에서의 TCRαβ의 발현을 방지하였다. 본 발명자들은, 세포외 누출을 최소화하거나 전혀 수반하지 않을 수 있고 TCRαβ 신호전달을 차단하는데 매우 효과적인 PEBL 구조체를 확인하였다. 항바이러스 TCR로 형질도입된 PEBL-T 세포는 동족 바이러스 펩티드에 반응할 수 없었고; PEBL 형질도입은 인간 T 세포가 마우스에서 GVHD를 야기하는 능력을 현저히 감소시켰다. PEBL 발현 및 CD3/TCRαβ 하향조절은 지속성이 있었으며; 다른 표면 분자의 발현, T-세포 생존 또는 증식에는 영향을 미치지 않았다. 중요하게는, PEBL-T 세포는 CAR 신호전달에 정상적으로 반응하였고 시험관내 및 생체내에서 CAR-표적화된 ALL 세포를 살해하였다. KDEL 서열 (서열 번호 32), KKD/E 서열 KKMP 서열 (서열 번호 33), YQRL 서열 (서열 번호 34), 또는 KKXX 서열 (여기서 X는 임의의 아미노산 서열임) (서열 번호 35).

[0285] 본 연구에서 최고의 PEBL은, 관련된 내강 ER 단백질을 고정시켜 이들의 분비 또는 막 발현을 방지하는 KDEL (서열 번호 32) 또는 KKXX [서열 번호 35; 예를 들어 이에 제한되는 것은 아니지만, KKMP (서열 번호 33) 또는 KKTN (서열 번호 43)] 보유 도메인을 함유하였다.[32,33] 따라서, 본 발명의 항-CD3ε PEBL은 CD3/TCRαβ 복합체의 다른 성분들과의 CD3ε 조립 및 이의 표면 발현을 차단하였다. 주로 세포주들을 사용하여 수행된 실험들에서 KDEL 펩티드 (예를 들어 SEKDEL, 서열 번호 50)는 scFv에 미리 연결되어 다양한 효율로 단백질 발현을 차단하였다.[31,34] 단백질 이동 연구는, KDEL을 벗어난 위치 -5 및 -6의 아미노산이 가용성 단백질의 ER 국소화에 있어 중요함을 발견하였다.[35] PEBL의 맥락에서, 본 발명자들은 scFv와 KDEL 사이의 개재 서열이 이의 기능에 중요함을 발견하였으며, SEKDEL에 비해 단백질 보유를 개선한 서열을 확인하였다. 단백질 이동 연구는 또한, 카르복실-말단 KKXX 모티프가 ER 국소화를 유도하고, 막에 대한 KKXX 위치결정이 이의 효과적인 기능에 중요하다는 것을 나타내었다.[36] 본 발명자들은 CD8α 막관통 도메인에 연결된 KKXX 모티프가 PEBL을 위한 강력한 고정 플랫폼을 구성하고, 이 두 구성 요소 사이의 스페이서가 PEBL 기능에 영향을 미친다는 것을 발견하였다.

[0286] 잠재적인 우려는, 본 발명자들이 TCRα 또는 TCRβ 사슬을 직접 표적화하지 않았기 때문에, 유세포 분석으로는 검출할 수 없지만 신호를 유도하기에 충분한 낮은 수준의 TCRαβ가 여전히 지속될 수 있다는 점이다. 그러나, 본 발명자들은 항-CD3ε PEBL로 형질도입된 T 세포는 일반적으로 TCR-매개된 신호전달에 비반응성인 것을 발견하였다. CD3/TCR 및/또는 PEBL의 보유가 이들의 축적 및 스트레스 반응을 초래할 가능성이 있지만, 본 발명자들은 유해한 영향을 검출하지 못했다. 거의 2년 동안 PEBL-형질도입된 CD3/TCR-음성 저캇 세포의 정상적인 성장을 관찰하였을 뿐만 아니라, PEBL-형질도입된 T 세포의 증식성 및 세포독성 잠재력에는 결함이 없었다. PEBL의 쥐-

유래 scFv는 주입된 CAR-T 세포의 거부를 가속화할 수 있는 것으로 생각된다. 그러나, CAR에 포함된 scFv에 대해 보고된 바와 같이, 이러한 우려는 인간 기원의 scFv를 사용함으로써 해결될 수 있다.[37]

[0287] 현대의 유전자 편집 방법은 CAR-T-세포 요법에서 흥미롭게 적용된다.[15,18,20] 예를 들어, 최근 CRISPR/Cas9는 TCR α-불변 (TRAC) 유전자좌에 항-CD19 CAR 유전자를 삽입하여 TCRαβ 발현을 제거하는데 사용되었다.[19,38] PEBL 방법의 장점 중 하나는 임상 등급의 대규모 세포 처리를 위한 현재 프로토콜에 대한 주요 변형을 요구하지 않다는 것이다. 항-CD3 PEBL 유전자는 단일 바이시스트로닉 구조체에서 CAR 유전자와 조합될 수 있기 때문에, 단일 형질도입 절차 후에 동종 이계 CAR-T 세포 생성물을 수득할 수 있다. PEBL 및 CAR 발현을 갖는 T 세포의 제조는 현재 임상 시험에서 CAR 발현에 사용되는 것들과 실질적으로 동일한 바이러스 벡터 및 유전자 성분에 의존한다. 따라서, 이러한 접근법은 표준 CAR 발현과 관련된 것들 이상의 안전 문제를 제기하지 않을 것이며; 유전자 편집 방법론의 적용에 관한 불확실성이 존재하지 않는다. 그럼에도 불구하고, 거부에 내성이 있고 더 높은 효능을 갖는 CAR-T 세포를 조작하기 위해, PEBL 접근법은 유전자 편집 방법과 조합될 수도 있다.[15,39,40] 다른 응용 분야는 정상 및 악성 T 세포에 의해 공유되는 T-세포 항원의 발현을 차단하여, T-세포 백혈병 및 림프종을 표적화하면서 CAR-매개된 형제살해를 피하는 것이다.[41]

[0288] 자가 CAR-T 세포를 사용한 임상 결과는 이들의 탁월한 잠재력을 입증하였다.[1-10] 이 기술의 중요한 다음 단계는 일관성과 제조를 개선하여, 환자가 균일하게 강력하고 시기 적절한 제품에 접근할 수 있도록 하는 것이다. 이를 위해, 동종 이계 CAR-T 세포를 확실하게 생성하는 방법이 중요한 발전이다. 동종 이계 세포는, 환자 면역 세포 상태 및/또는 성분채집술을 받기 위한 환자의 적합성에 관계없이, 이용가능할 수 있다. CAR-T 세포는 최적의 세포 조성, 높은 CAR 발현 및 최대의 기능적 효능으로 제조될 수 있다. 임상 관찰 및 실험 데이터는, CAR이 CD28 공동자극에 의존하고 HLA-매칭된 수용체에 주입되는 경우, 동종 이계 CAR-T 세포에서의 GVHD에 대한 위험이 예상보다 낮을 수 있음을 시사한다.[42-45] 그러나 이는 다른 CAR 및/또는 다른 이식 환경으로 확장되지 않을 수 있다. 따라서, CD137 공동자극된 공여자 CAR-T 세포의 주입을 받은 3명의 환자 중 2명에서 II 등급 GVHD가 보고되었고,46 CD28, CD137, 및 CD27로 공동자극된 동일단배체 CAR-T 세포의 주입을 받은 6명의 환자 중 3명에서 II/III 등급 GVHD가 보고되었다.[47] 이들 연구에서, GVHD는 CAR-T 세포를 제거할 것으로 예상되는 코르티코스테로이드의 투여를 필요로 하였다. 임상적 효능 및 독성의 관점에서 상이한 공동자극 분자의 상대적인 장점에 관계없이,[48] TCRαβ 발현의 결여는 CAR-T 세포의 항종양 활성을 향상시킬 수 있는 것으로 보고되어 있다.[19] 흥미롭게도, 시험관내 장기 세포독성 시험에서, PEBL 및 CAR로 형질도입된 T 세포는 CAR 단독으로 형질도입된 것들보다 더 우수한 성능을 나타내었으며, 이는 이러한 관찰과 일치하였다. 전체적으로, 동종 이계 CAR-T 세포 생성물로부터 CD3/TCRαβ를 제거하는 것이 유리할 것으로, 특히 확립된 제조 프로토콜의 붕괴를 최소화하면서 이것이 달성될 수 있는 경우에, 유리할 것으로 보인다.

[0289] **참고문헌**

[0290] 1. Kochenderfer JN, Wilson WH, Janik JE, Dudley ME, Stetler-Stevenson M, Feldman SA, et al. Eradication of B-lineage cells 및 regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. Blood 2010 Nov 18; 116(20): 4099-4102.

[0291] 2. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. N Engl J Med 2011; 365(8): 725-733.

[0292] 3. Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. N Engl J Med 2014 Oct 16; 371(16): 1507-1517.

[0293] 4. Davila ML, Riviere I, Wang X, Bartido S, Park J, Curran K, et al. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR-T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. Science Transl Med 2014 Feb 19; 6(224): 224ra225.

[0294] 5. Kochenderfer JN, Dudley ME, Kassim SH, Somerville RP, Carpenter RO, Stetler-Stevenson M, et al. Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor. J Clin Oncol 2014 Aug 25.

[0295] 6. Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, Cui YK, Delbrook C, Feldman SA, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. Lancet 2014 Oct 10.

[0296] 7. Turtle CJ, Hanafi LA, Berger C, Gooley TA, Cherian S, Hudecek M, et al. CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. J Clin Invest 2016 Jun 1; 126(6): 2123-2138.

[0297] 8. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma. N. Engl J Med. 2017; 377(26):2531-2544.

[0298] 9. Schulester et al. Chimeric antigen receptor T cells in refractory B-cell lymphomas. N. Engl J Med. 2017; 377(26):2545-2554.

[0299] 10. Sadelain M, Riviere I, Riddell S. Therapeutic T cell engineering. Nature 2017 May 24; 545(7655): 423-431.

[0300] 11. Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. Science 2015 Apr 3; 348(6230): 62-68.

[0301] 12. Park JH, Geyer MB, Brentjens RJ. CD19-targeted CAR T-cell therapeutics for hematologic malignancies: interpreting clinical outcomes to date. Blood 2016 Jun 30; 127(26): 3312-3320.

[0302] 13. Appelbaum FR. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. Nature 2001; 411(6835): 385-389.

[0303] 14. Bleakley M, Riddell SR. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. Nature Rev Cancer 2004 May; 4(5): 371-380.

[0304] 15. Poirot L, Philip B, Schiffer-Mannioui C, Le Clerre D, Chion-Sotinel I, Derniame S, et al. Multiplex Genome-Edited T-cell Manufacturing Platform for "Off-the-Shelf" Adoptive T-cell Immunotherapies. Cancer Res 2015 Sep 15; 75(18): 3853-3864.

[0305] 16. Yang et al., Challenges and opportunities of allogeneic donor-derived CAR T cells. Curr Opin Hematol. 2015;22(6): 5095-515.

[0306] 17. Boettcher M, McManus MT. Choosing the right tool for the job: RNAi, TALEN, or CRISPR. Mol Cell 2015 May 21; 58(4): 575-585.

[0307] 18. Torikai H, Reik A, Liu PQ, Zhou Y, Zhang L, Maiti S, et al. A foundation for universal T-cell based immunotherapy: T cells engineered to express a CD19-specific chimeric-antigen-receptor and eliminate expression of endogenous TCR. Blood 2012 Jun 14; 119(24): 5697-5705.

[0308] 19. Eyquem J, Mansilla-Soto J, Giavridis T, van der Stegen SJ, Hamieh M, Cunanan KM, et al. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. Nature 2017 Mar 02; 543(7643): 113-117.

[0309] 20. Qasim W, Zhan H, Samarasinghe S, Adams S, Amrolia P, Stafford S, et al. Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. Science translational medicine 2017 Jan 25; 9(374).

[0310] 21. Manabe A, Coustan-Smith E, Kumagai M, Behm FG, Raimondi SC, Pui CH, et al. Interleukin-4 induces programmed cell death (apoptosis) in cases of high-risk acute lymphoblastic leukemia. Blood 1994; 83(7): 1731-1737.

[0311] 22. Imai C, Mihara K, Andreansky M, Nicholson IC, Pui CH, Campana D. Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 2004; 18: 676-684.

[0312] 23. Kudo K, Imai C, Lorenzini P, Kamiya T, Kono K, Davidoff AM, et al. T lymphocytes expressing a CD16 signaling receptor exert antibody-dependent cancer cell killing. Cancer Res 2014 Jan 1; 74(1): 93-103.

[0313] 24. Shimasaki N, Fujisaki H, Cho D, Masselli M, Lockey T, Eldridge P, et al. A clinically adaptable method to enhance the cytotoxicity of natural killer cells against B-cell malignancies. Cytotherapy 2012 Aug;14(7): 830-40.

[0314] 26. Shimasaki N, Campana D. Natural killer cell reprogramming with chimeric immune receptors. Methods Mol Biol 2013; 969: 203-220.

[0315] 27. Koh S, Shimasaki N, Suwanarusk R, Ho ZZ, Chia A, Banu N, et al. A practical approach to immunotherapy of hepatocellular carcinoma using T cells redirected against hepatitis B virus. Mol Ther Nucleic Acids 2013; 2: e114.

[0316] 28. Alarcon B, Berkhout B, Breitmeyer J, Terhorst C. Assembly of the human T cell receptor-CD3 complex takes place in the endoplasmic reticulum and involves intermediary complexes between the CD3-gamma delta epsilon core and single T cell receptor alpha or beta chains. J Biol Chem 1988 Feb 25; 263(6): 2953-2961.

[0317] 29. Clevers H, Alarcon B, Wileman T, Terhorst C. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. Annu Rev Immunol 1988; 6: 629-662.

[0318] 30. Weiss A. Molecular and genetic insights into T cell antigen receptor structure and function. Annu Rev Genet 1991; 25: 487-510.

[0319] 31. Marasco et al., Design, intracellular expression, and activity of a human anti-humna immunodeficiency virus type 1 gp120 single-chain antibody. Proc Natl Acad Sci USA. 1993; 90(16): 7889-7893.

[0320] 32. Munro S, Pelham HR. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. Cell 1987 Mar 13; 48(5): 899-907.

[0321] 33. Jackson MR, Nilsson T, Peterson PA. Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. EMBO J 1990 Oct; 9(10): 3153-3162.

[0322] 34. Marschall AL, Dubel S, Boldicke T. Specific in vivo knockdown of protein function by intrabodies. mAbs 2015; 7(6): 1010-1035.

[0323] 35. Alanen et al., Beyond KDEL: the role of positions 5 and 6 in determining ER localization. J Mol Biol. 2011; 409(3): 291-297.

[0324] 36. Shikano et al., Membrane receptor trafficking: evidence of proximal and distal zones conferred by two independent endoplasmic reticulum localization signals. Proc Natl Acad Sci USA. 2003; 100(10): 5783-5788.

[0325] 37. Sommermeyer et al., Fully human CD19-specific chimeric antigen receptors for T-cell therapy. Leukemia, 2017; 31(10): 2191-2199.

[0326] 38. MacLeod DT, Antony J, Martin AJ, Moser RJ, Hekele A, Wetzel KJ, et al. Integration of a CD19 CAR into the TCR alpha chain locus streamlines production of allogeneic gene-edited CAR T cells. Mol Ther 2017 Apr 05; 25(4): 949-961.

[0327] 39. Schumann K, Lin S, Boyer E, Simeonov DR, Subramaniam M, Gate RE, et al. Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins. Proc Natl Acad Sci U S A 2015 Aug 18; 112(33): 10437-10442.

[0328] 40. Su S, Hu B, Shao J, Shen B, Du J, Du Y, et al. CRISPR-Cas9 mediated efficient PD-1 disruption on human primary T cells from cancer patients. Sci Reports. 2016; 6(1): 20070.

[0329] 41. Png et al., Blockade of CD7 expression in T cells for effective chimeric antigen receptor targeting of T-cell malignancies. Blood Adv, 2017; 1(25): 2348-2360.

[0330] 42. Kochenderfer JN, Dudley ME, Carpenter RO, Kassim SH, Rose JJ, Telford WG, et al. Donor-derived

CD19-targeted T cells cause regression of malignancy persisting after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Blood 2013 Dec 12; 122(25): 4129-4139.

[0331] 43. Brudno et al., Allogeneic T cells that express an anti-CD19 chimeric antigen receptor induce remissions of B-cell malignancies that progress after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation without causing graft-versus-host disease. J Clin Oncol. 2016; 34(10): 1112-1121.

[0332] 44. Ghosh A, Smith M, James SE, Davila ML, Velardi E, Argyropoulos KV, et al. Donor CD19 CAR T cells exert potent graft-versus-lymphoma activity with diminished graft-versus-host activity. Nat Med 2017 Feb; 23(2): 242-249.

[0333] 45. Anwer et al., Donor origin CAR T cells: graft versus malignancy effect without GVHD, a systemic review. Immunotherapy. 2017; 9(2): 123-130.

[0334] 46. Dai et al., Tolerance and efficacy of autologous or donor-derived T cells expression CD19 chimeric antigen receptors in adult B-ALL with extramedullary leukemia. OncoImmunology. 2015; 4(11): e1027469.

[0335] 47. Chen et al., Donor-derived CD19-targeted T cell infusion induces minimal residual disease-negative remission in relapsed B-cell acute lymphoblastic leukaemia with no response to donor lymphocyte infusions after haploidentical haematopoietic stem cell transplantation. Br J Haematol. 2017; 179(4): 598-605.

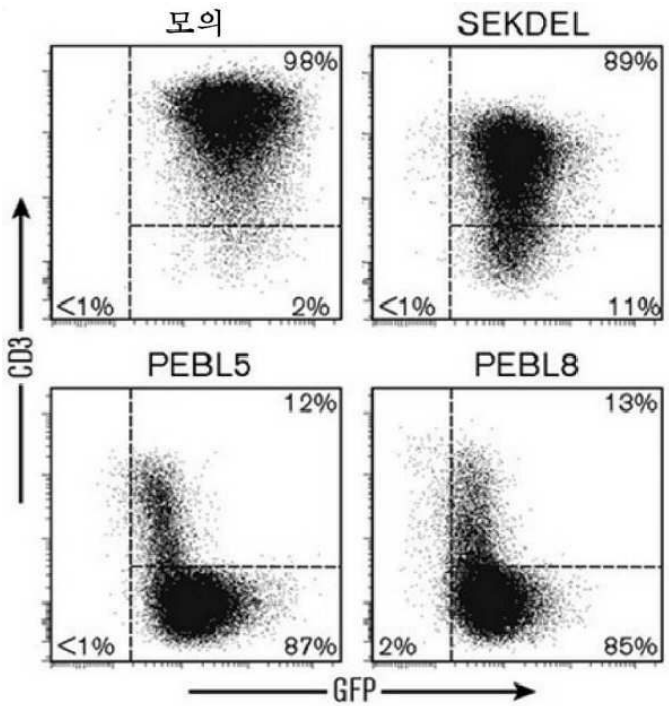
[0336] 48. Campana D, Schwarz H, Imai C. 4-1BB chimeric antigen receptors. Cancer J 2014 Mar-Apr; 20(2): 134-140.

[0337] 본원에 인용된 모든 특허, 공개된 출원 및 참조문헌의 교시는 그 전체 내용이 원용에 의해 포함된다.

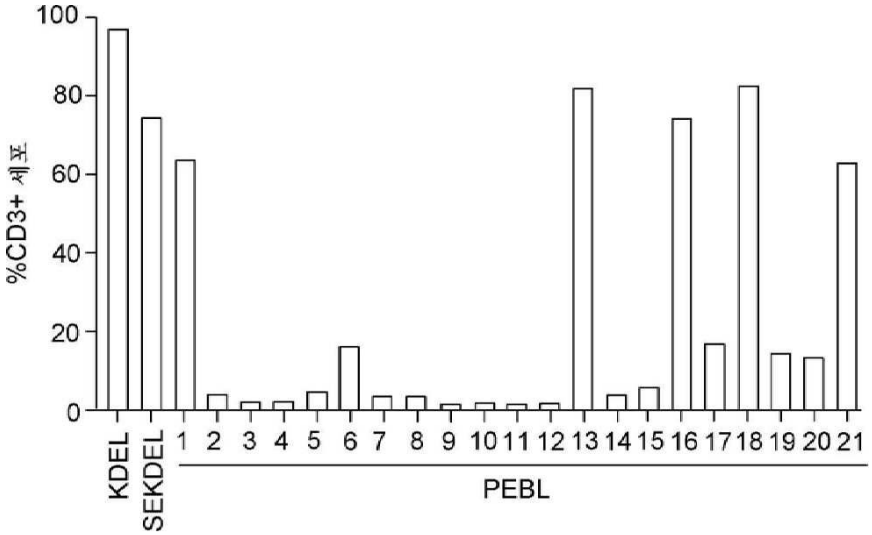
[0338] 본 발명이 이의 예시적인 구현예를 참조하여 특히 도시되고 설명되었지만, 첨부된 청구범위에 의해 포함되는 본 발명의 범위를 벗어나지 않으면서 형태 및 세부사항에 대한 다양한 변경이 이루어질 수 있음이 당업자에 의해 이해될 것이다.

도면

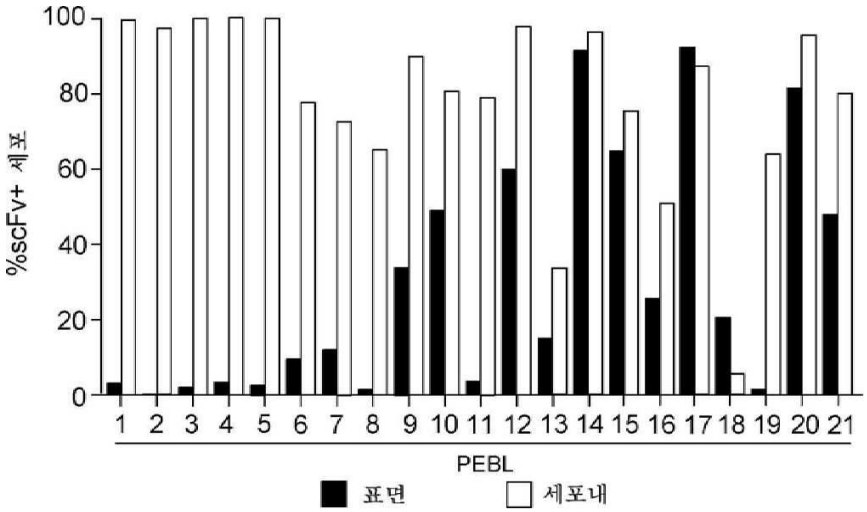
도면1a



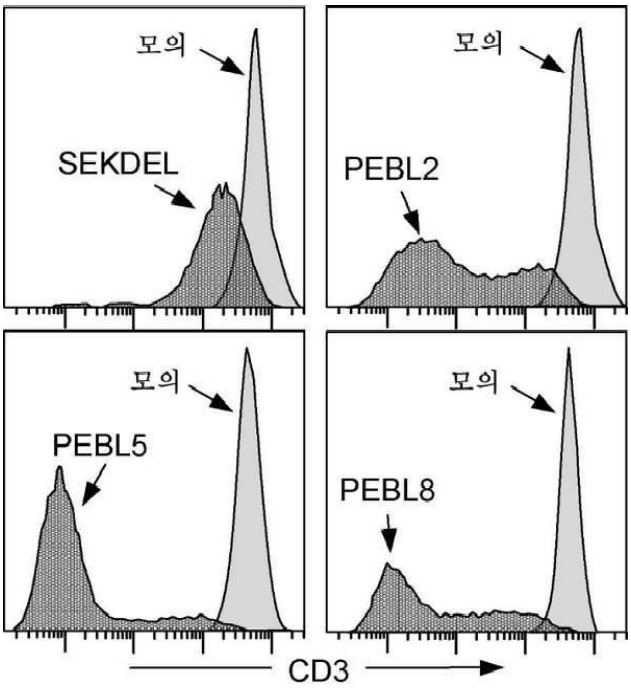
도면1b


100
80
60
40
20
0
%CD3+ 세포
KDEL
SEKDEL
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21
PEBL

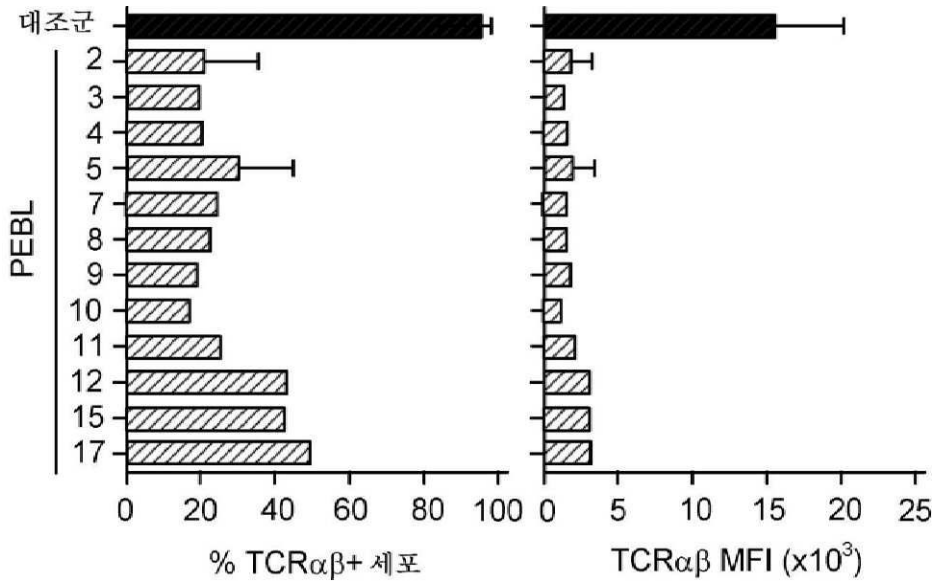
도면1c


100
80
60
40
20
0
%scFv+ 세포
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21
PEBL
표면
세포내

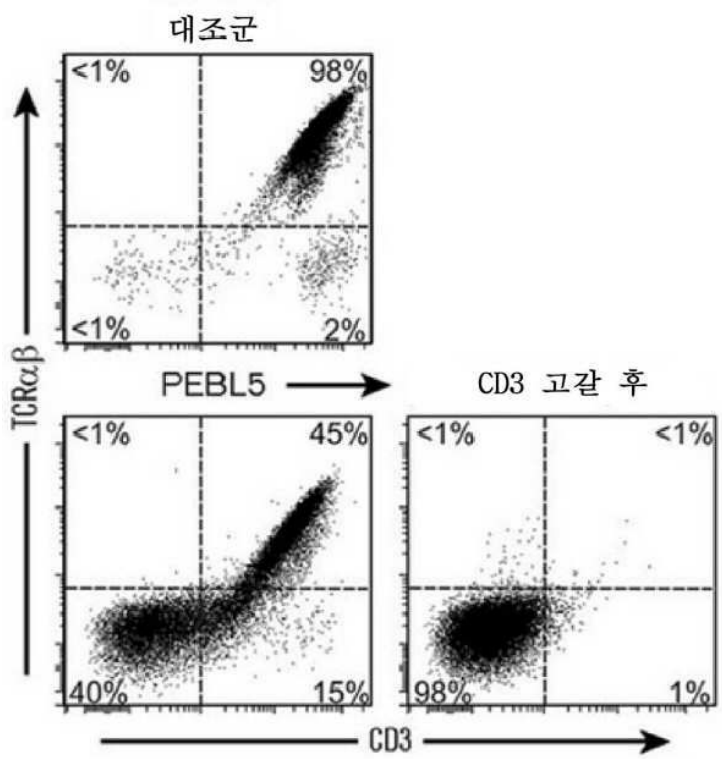
도면1d


모의
SEKDEL
모의
PEBL2
모의
PEBL5
모의
PEBL8
CD3

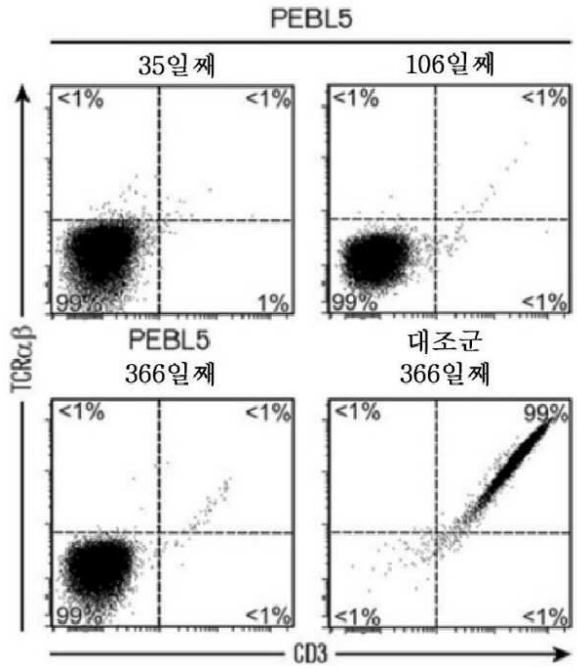
도면2a


대조군
2
3
4
5
7
8
9
10
11
12
15
17
PEBL
0
20
40
60
80
100
% TCRαβ+ 세포
0
5
10
15
20
25
TCRαβ MFI (x10³)

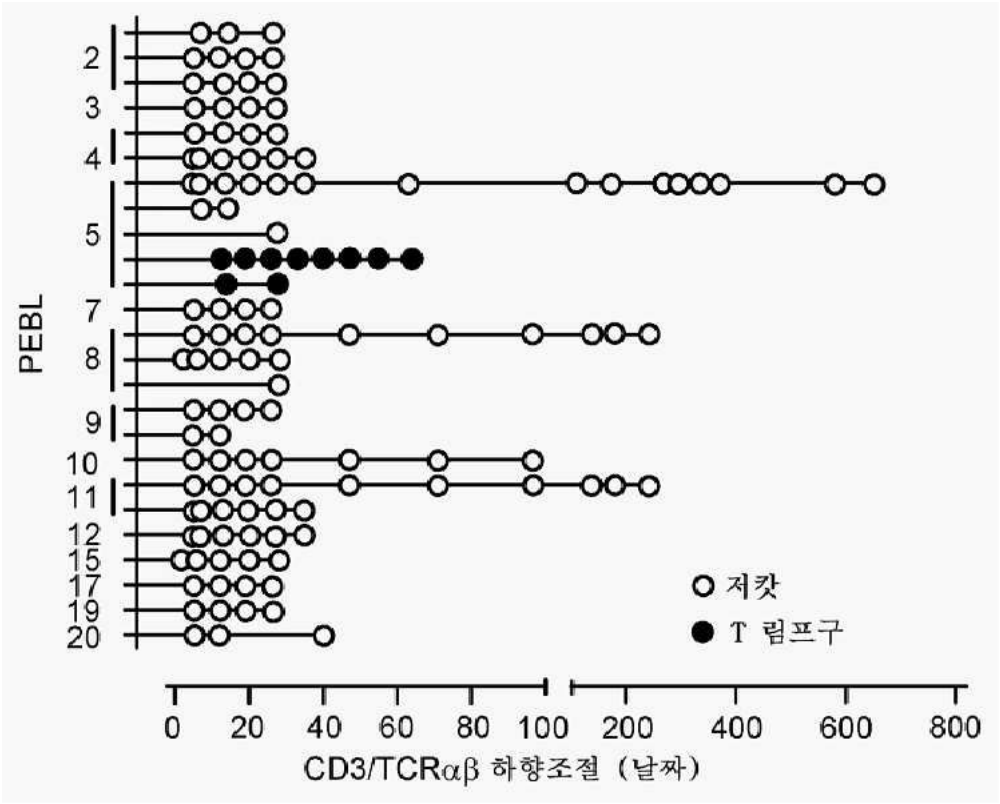
도면2b


대조군
<1%
98%
<1%
2%
TCRαβ
PEBL5
CD3 고갈 후
<1%
45%
40%
15%
<1%
<1%
98%
1%
CD3

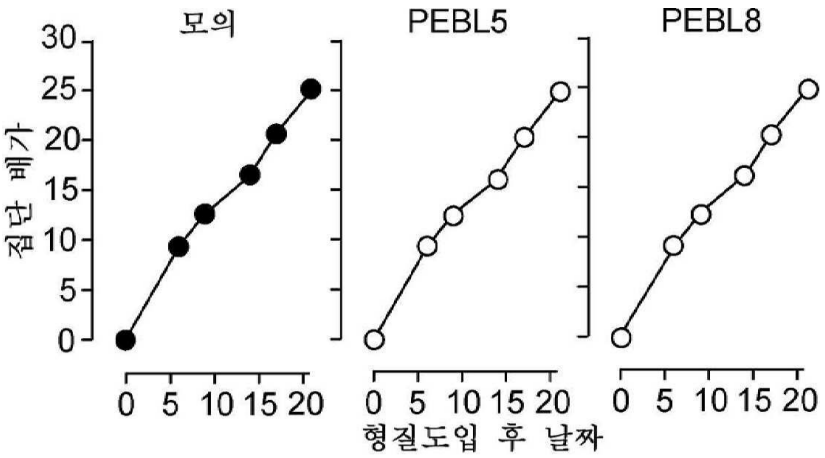
도면2c


PEBL5
35일째
106일째
<1%
<1%
99%
1%
<1%
<1%
99%
<1%
TCRαβ
PEBL5
366일째
대조군
366일째
<1%
<1%
99%
<1%
<1%
99%
<1%
<1%
CD3

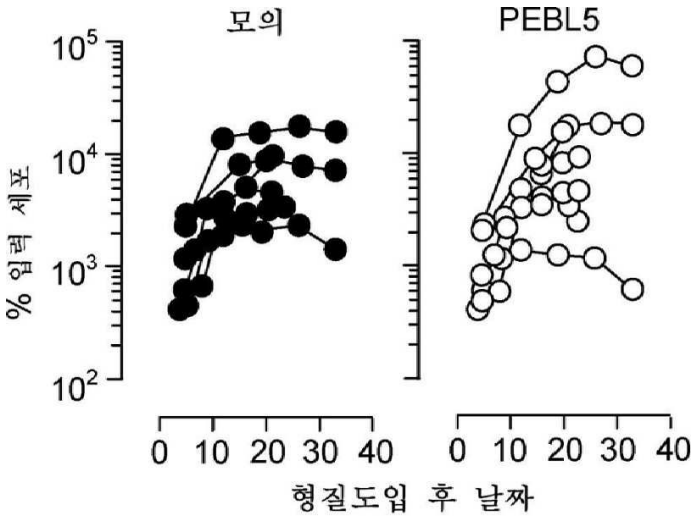
도면2d


PEBL
2
3
4
5
7
8
9
10
11
12
15
17
19
20
저캇
T 림프구
0 20 40 60 80 100 200 400 600 800
CD3/TCRαβ 하향조절 (날짜)

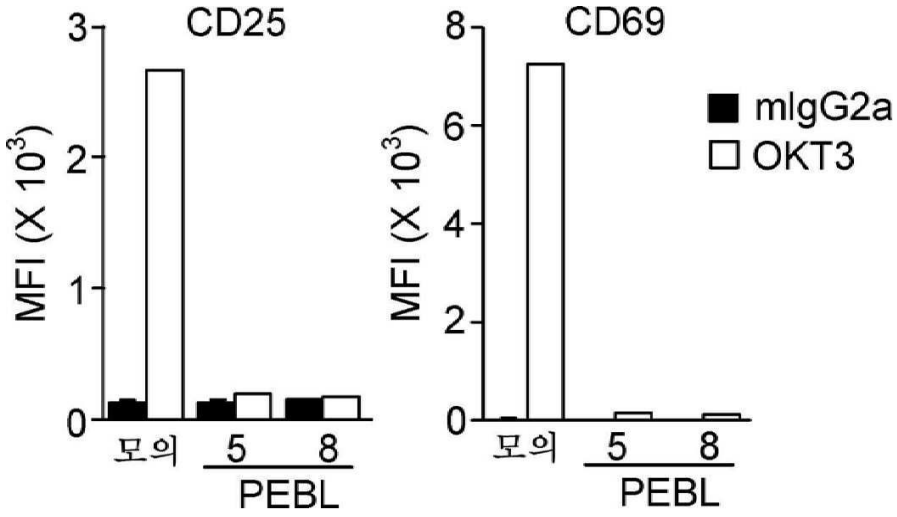
도면3a


모의
PEBL5
PEBL8
30
25
20
15
10
5
0
절단 배가
0 5 10 15 20
0 5 10 15 20
0 5 10 15 20
형질도입 후 날짜

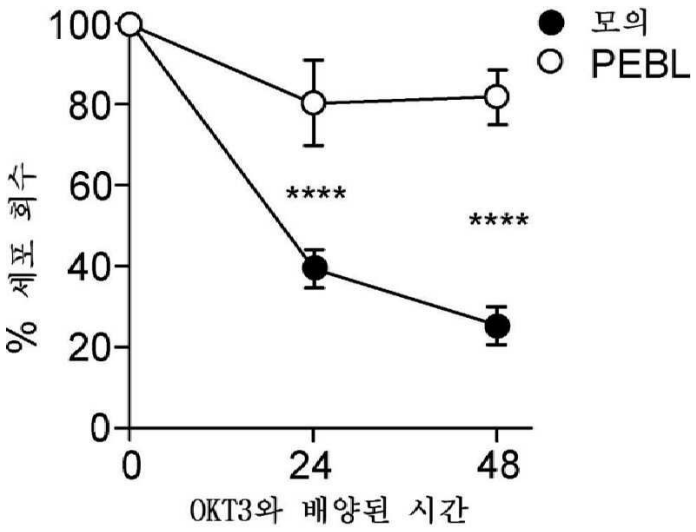
도면3b



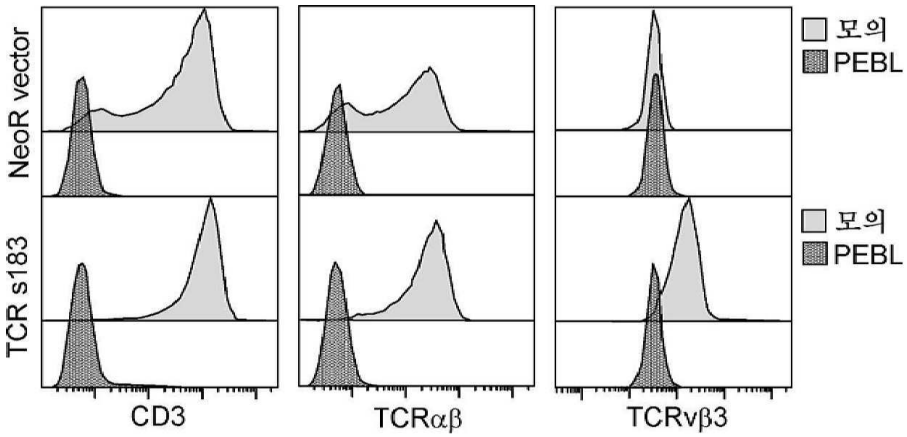
도면3c



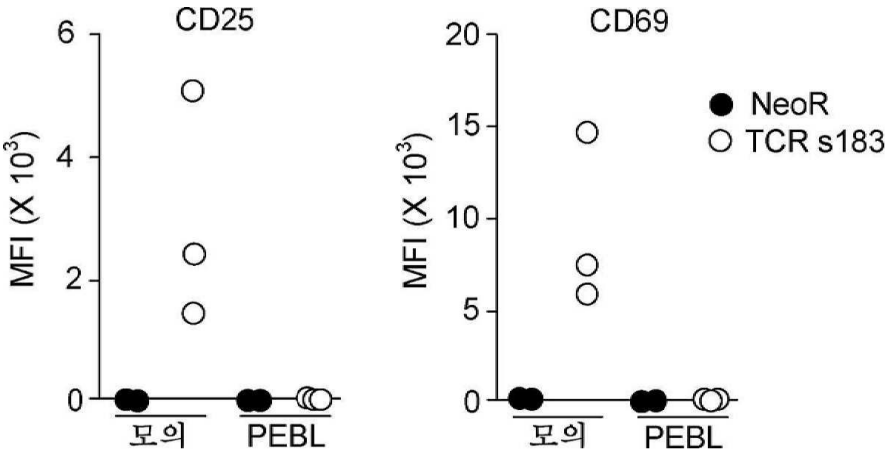
도면3d



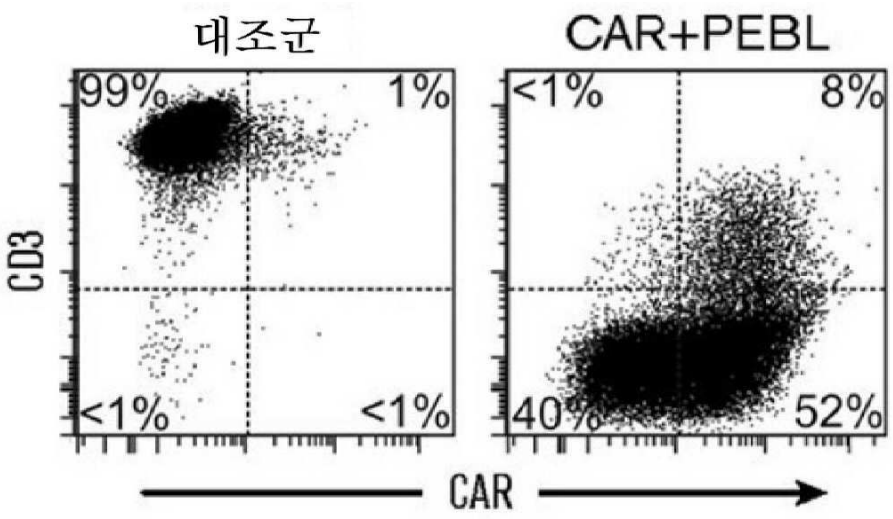
도면3e



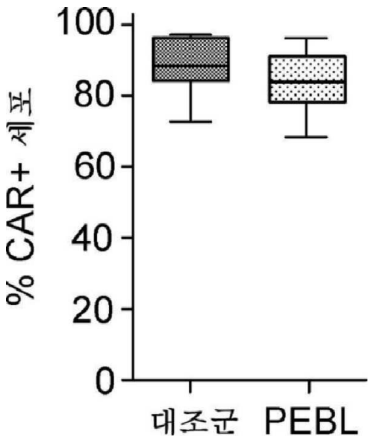
도면3f



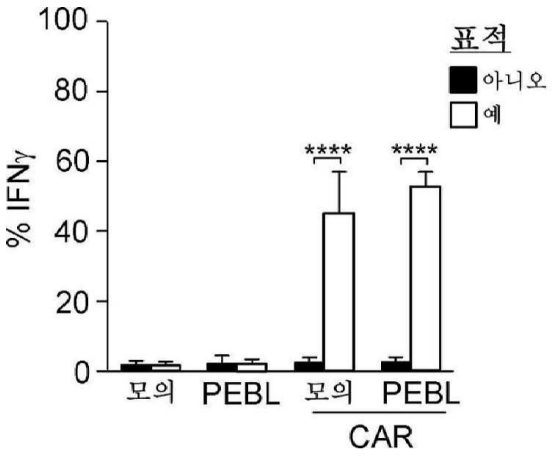
도면4a



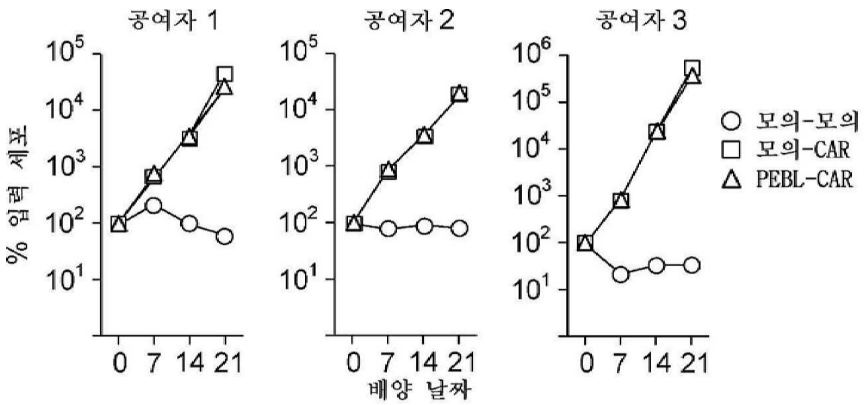
도면4b



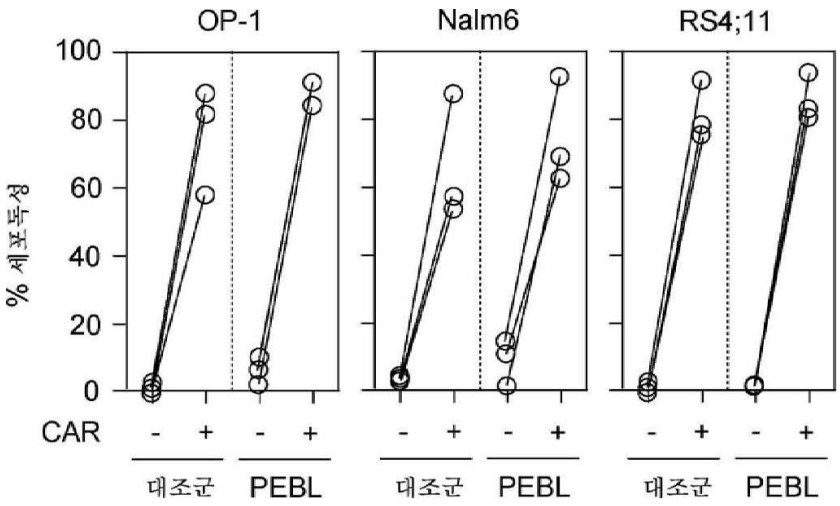
도면4c



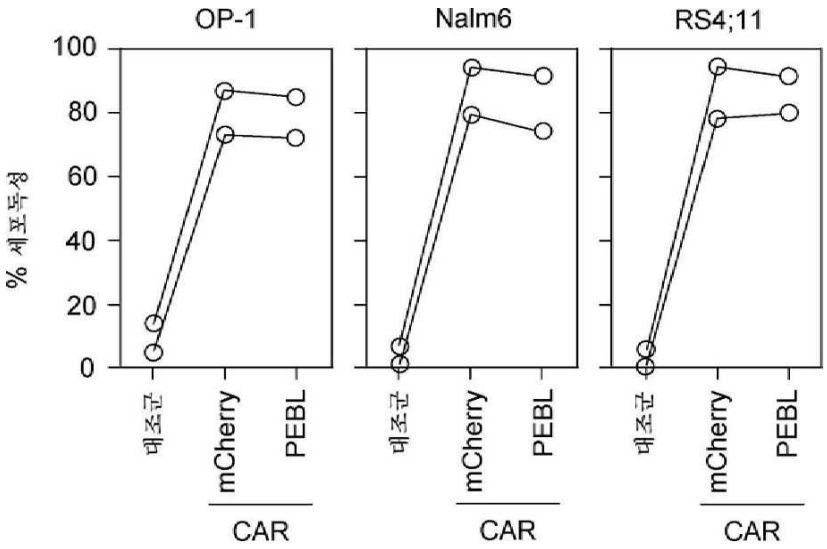
도면4d



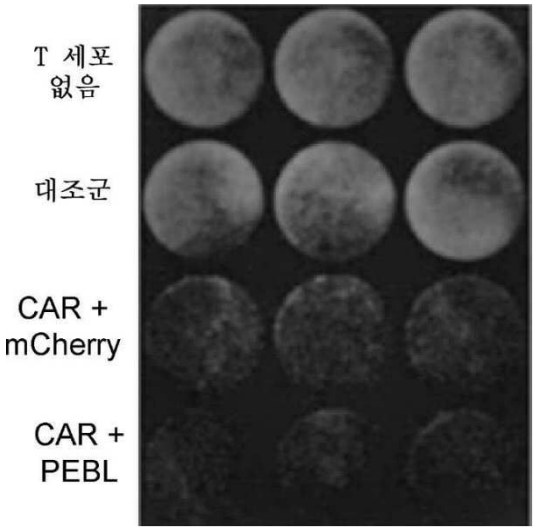
도면5a



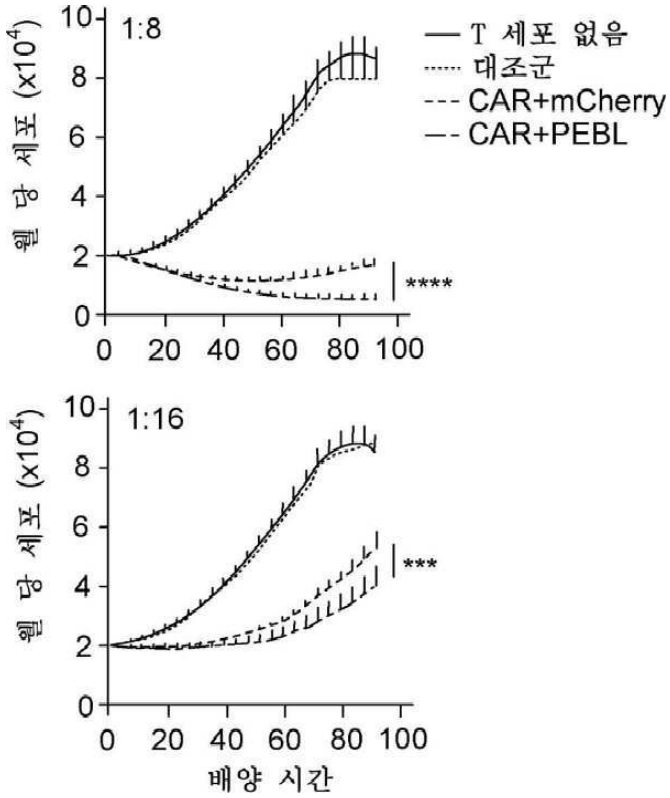
도면5b



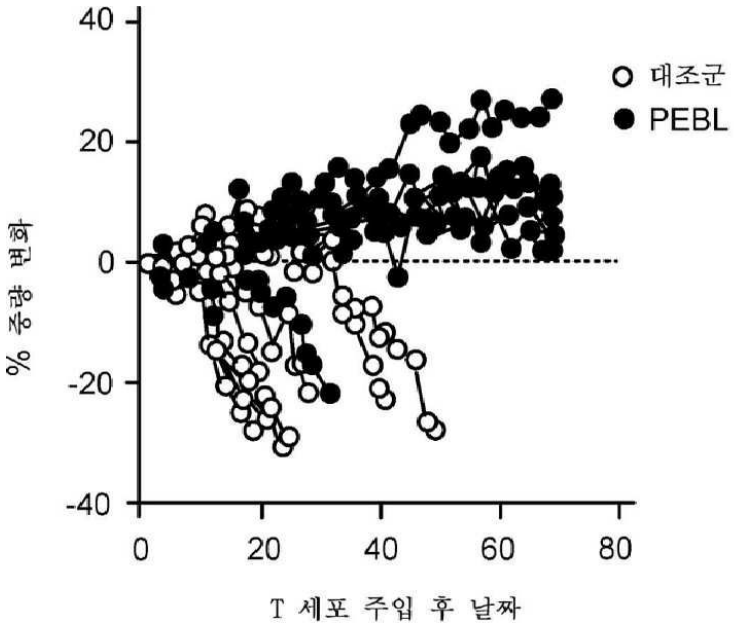
도면5c



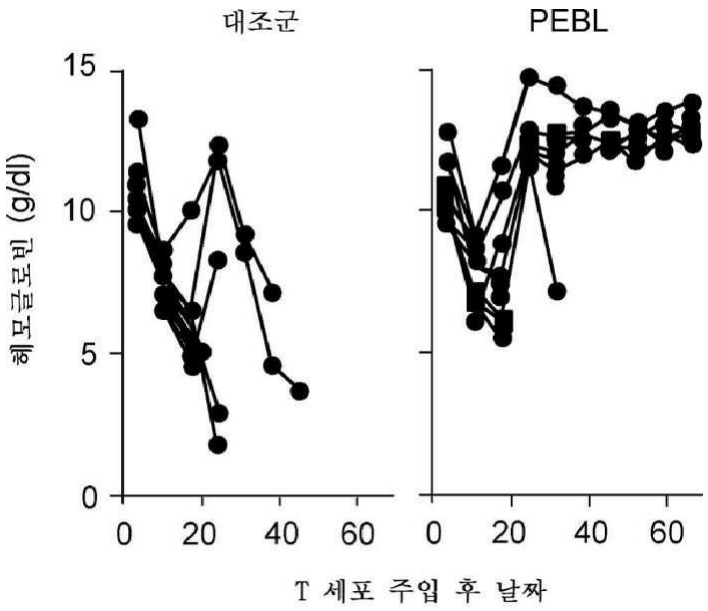
도면5d


1:8
1:16
웰 당 세포 (x10^4)
T 세포 없음
대조군
CAR+mCherry
CAR+PEBL
****
***
0
2
4
6
8
10
0
20
40
60
80
100
배양 시간

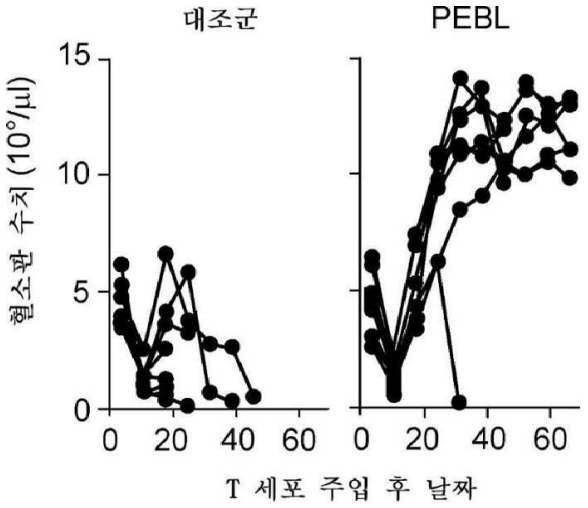
도면6a


대조군
PEBL
% 중량 변화
40
20
0
-20
-40
0
20
40
60
80
T 세포 주입 후 날짜

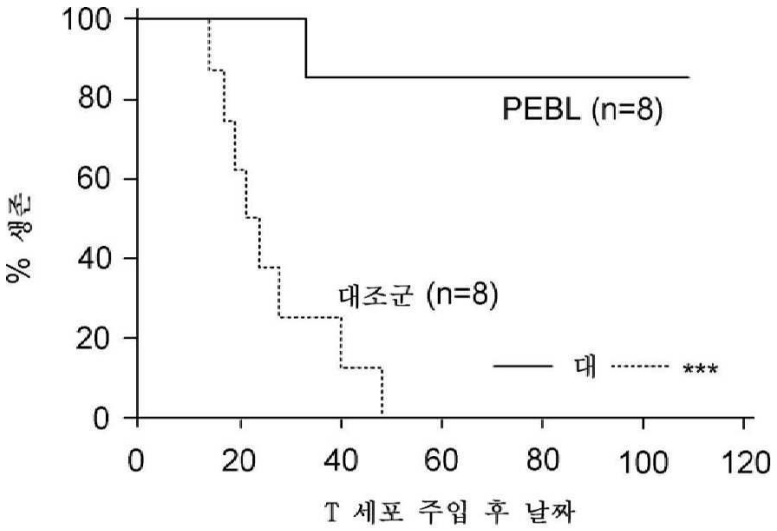
도면6b


대조군
PEBL
헤모글로빈 (g/dl)
15
10
5
0
0
20
40
60
T 세포 주입 후 날짜

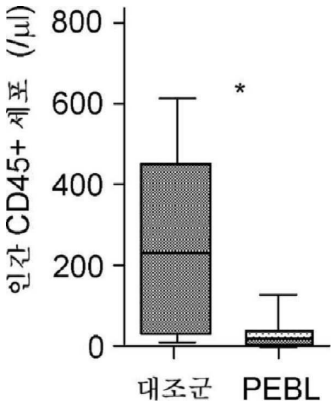
도면6c


대조군
PEBL
혈소판 수치 (10°/μl)
15
10
5
0
0
20
40
60
T 세포 주입 후 날짜

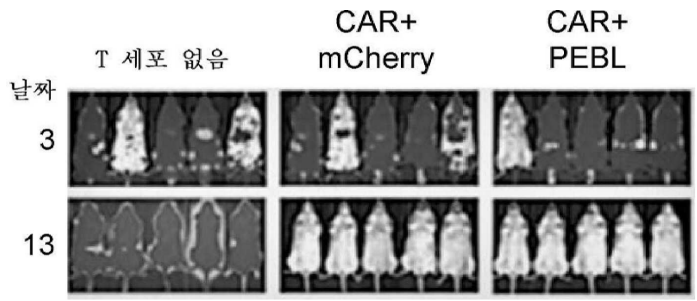
도면6d



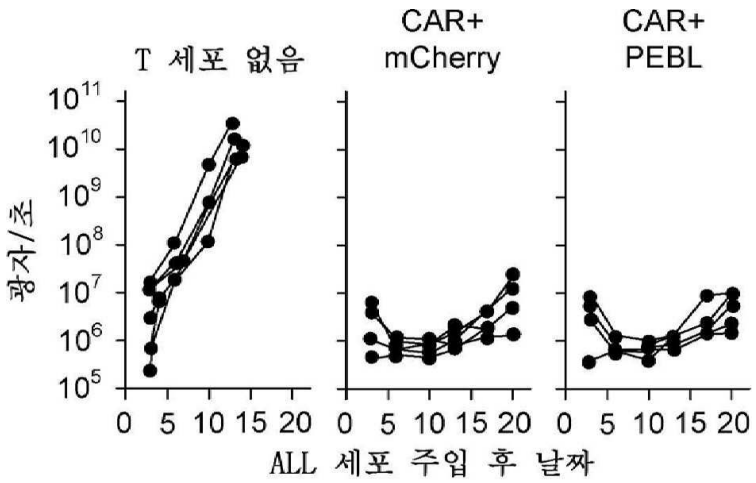
도면6e



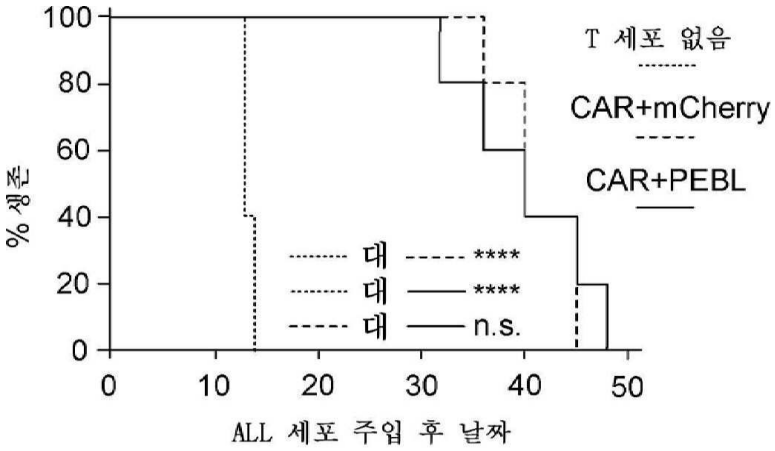
도면7a



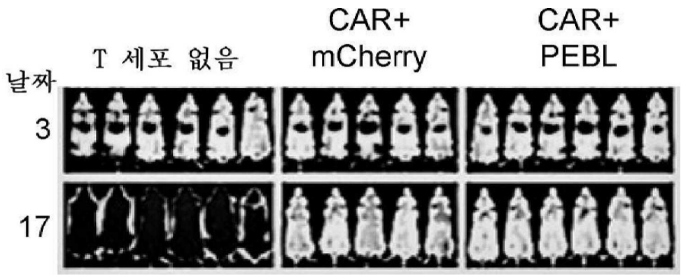
도면7b



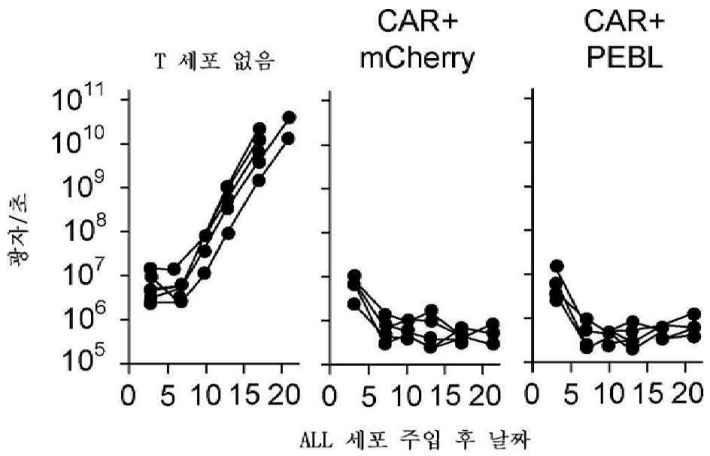
도면7c



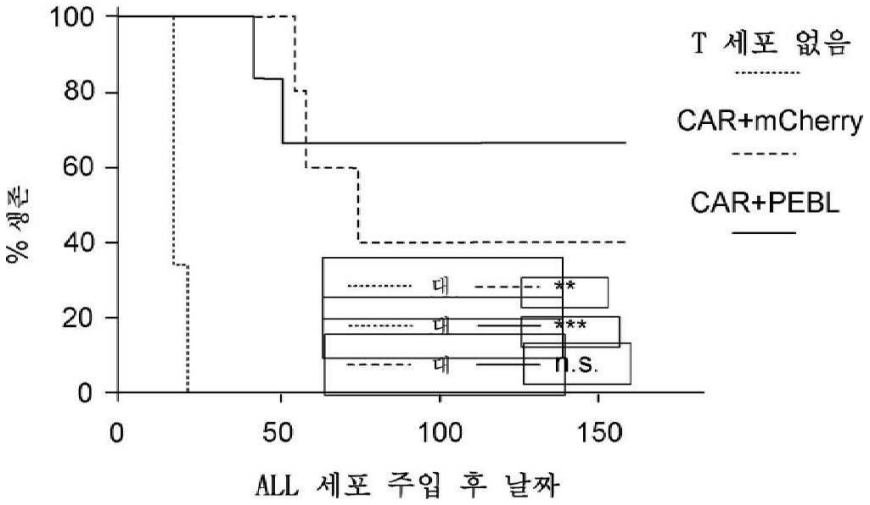
도면7d



도면7e


T 세포 없음
CAR+
mCherry
CAR+
PEBL
광자/초
10^{11}
10^{10}
10^{9}
10^{8}
10^{7}
10^{6}
10^{5}
0 5 10 15 20
0 5 10 15 20
0 5 10 15 20
ALL 세포 주입 후 날짜

도면7f


100
80
60
40
20
0
% 생존
0
50
100
150
ALL 세포 주입 후 날짜
T 세포 없음
CAR+mCherry
CAR+PEBL
대
**
대
***
대
n.s.

도면8a

PEBL	아미노산 서열	서열 번호
1	AEKDEL	11
2	EQKLISEEDLKDEL	12
3	GGGGSGGGGSKDEL	13
4	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSKDEL	14
5	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAEKDEL	15
6	CD8α* 및 KYKSRRSFIEEKKMP	16
7	CD8α* 및 LKYKSRRSFIEEKKMP	17
8	CD8α* 및 LYKYKSRRSFIEEKKMP	18
9	CD8α* 및 LYCKYKSRRSFIEEKKMP	19
10	CD8α* 및 LYCNKYKSRRSFIEEKKMP	20
11	CD8α* 및 LYKYKSRRSFIDEKKMP	21
12	CD8α* 및 LYCNKYKSRRSFIDEKKMP	22
13	CD8α* 및 LYEQKLISEEDLKYKSRRSFIEEKKMP	23
14	CD8α* 및 LYCYPYDVPDYAKYKSRRSFIEEKKMP	24
15	CD8α* 및 LYKKLETFKKTN	25
16	CD8α* 및 LYEQKLISEEDLKKLETFKKTN	26
17	CD8α* 및 LYYQRL	27
18	CD8α* 및 LYEQKLISEEDLYQRL	28
19	CD8α* 및 LYKRKIIAFALEGKRSKVTRRPKASDYQRL	29
20	CD8α* 및 LYRNIKCD	31
21	CD8α* 및 LYEQKLISEEDLRNIKCD	31
	CD8α*는 CD8α TM 도메인임 (서열 번호 7)	

도면8b

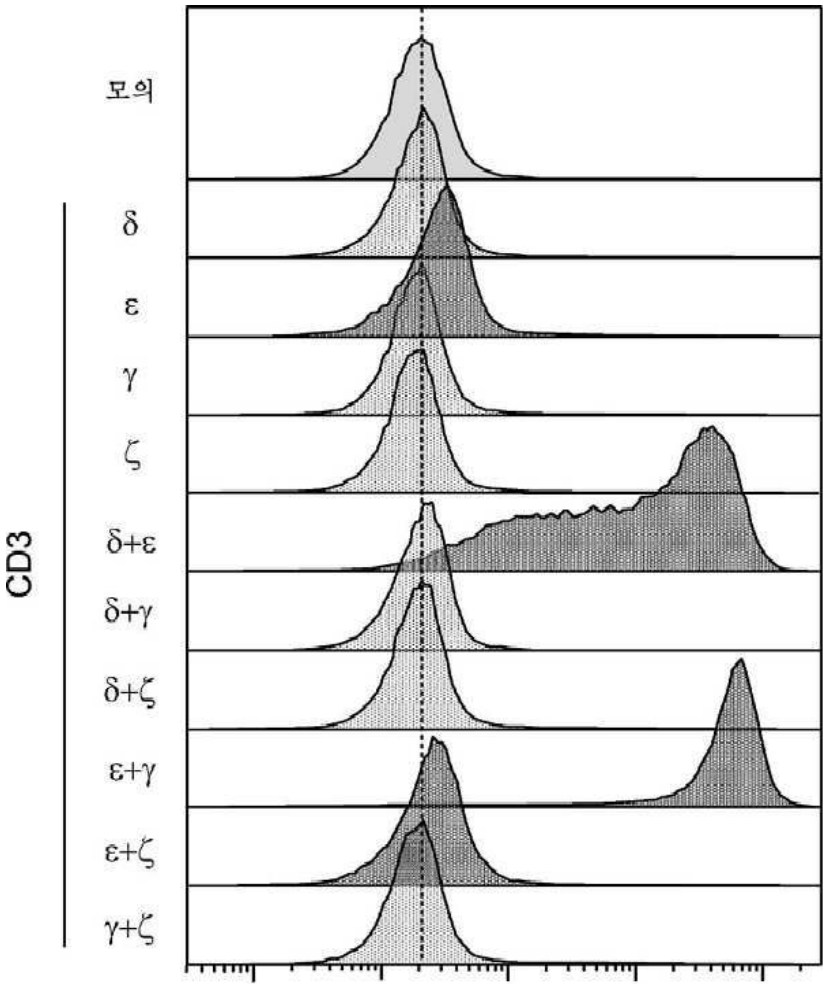
마커	n	모의(%)	PEBL(%)
CD4	5	33.0 ±8.0	31.0±11.1
CD8	5	63.7 ±8.0	65.7 ±11.1
CD2	3	100±0	100±0
CD7	3	99.6 ±0.2	99.6 ±0.2
CD25(IL2Ra)	3	58.1 ±24.7	60.9 ±25.5
CD62L	3	78.5 ± 11.0	68.3 ±17.5
CD69	3	21.9 ±5.4	25.2 ±6.7
41BB (CD137)	3	17.0± 13.0	3.7 ±2.9
TIM-3 (CD366)	3	89.6 ±0.4	88.3 ±3.0
PD-1 (CD279)	3	25.5 ± 10.1	26.0 ±8.0
LAG3 (CD223)	3	25.3 + 8.6	21.5 ±6.9

도면8c

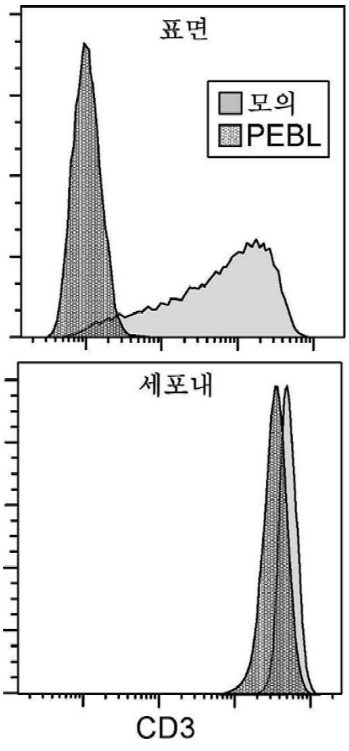
기관	T 세포 없음			대조군			항-CD3 PEBL		
	설명	섬유증	염증	설명	섬유증	염증	설명	섬유증	염증
비장	최소 초점 혈관주위 섬유증	1	0	단핵 세포 침윤을 동반한 증증 다초점 혈관주위 섬유증; 계별 세포 괴사; 골수의 조혈 세포 감소	4	4	단핵 세포 침윤을 동반한 중등증 다초점 혈관주위 섬유증	3	3
간		0	0	중등증 문맥주위 단핵 세포 침윤; 골혈관 백혈구증가증; 정증 다초점 골수의 조혈	2	2	최소 문맥주위 단핵 세포 침윤; 골혈관 백혈구증가증; 정증 다초점 골수의 조혈	1	1
폐		0	0	중증 확장성 혈관주위 및 간질성 단핵 및 다핵 세포 침윤, 섬유증 및 부종; 중증 화산성 폐포 조직구증	4	4	정증 확장성 혈관주위 및 간질성 단핵 및 다핵 세포 침윤, 섬유증 및 부종; 정증 화산성 폐포 조직구증	1	1
피부		0	0	최소 화산성 단핵 및 비만세포 간질성 피부 침윤	0	1		0	0
소장		0	0	정증 고유판 림프형질세포성 침윤 및 섬유증	1	1		0	0
골수		0	0	중증 섬유증, 단핵 세포 침윤, 조혈 세포 소실	3	2		0	0

섬유증 및 염증과 관련된 침윤의 중증도는 다음과 같이 점수가 매겨진다: 0: 침윤 없음; 1: 산발적이거나 <5%의 침윤; 2: 5%의 정증 침윤; 3: 25% 내지 50%의 중등증 침윤; 4: 60%의 중증 침윤.

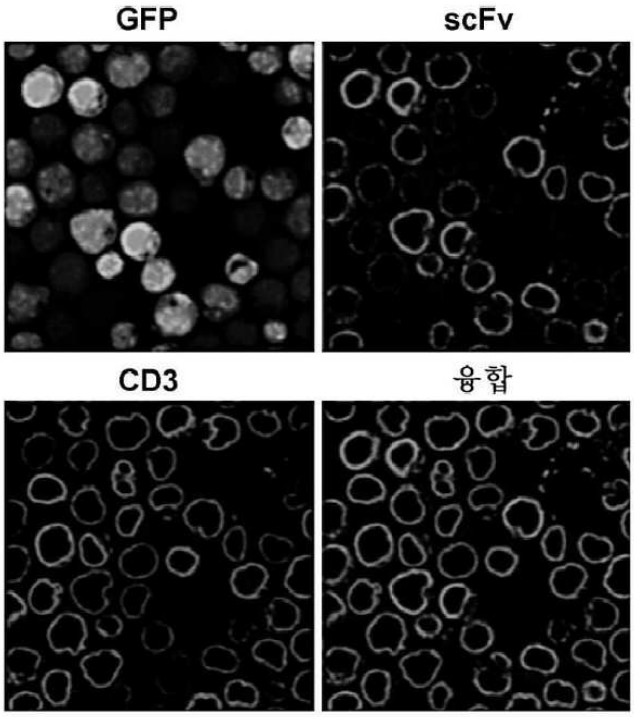
도면9



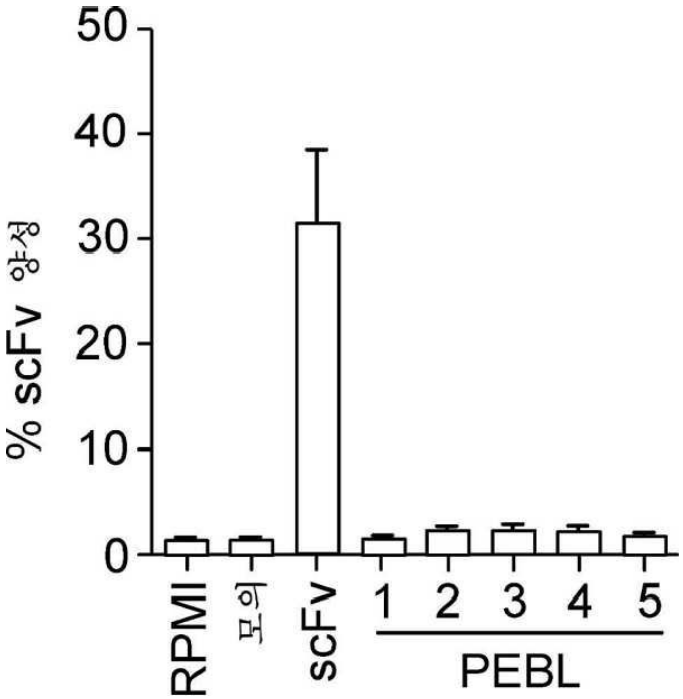
도면10a



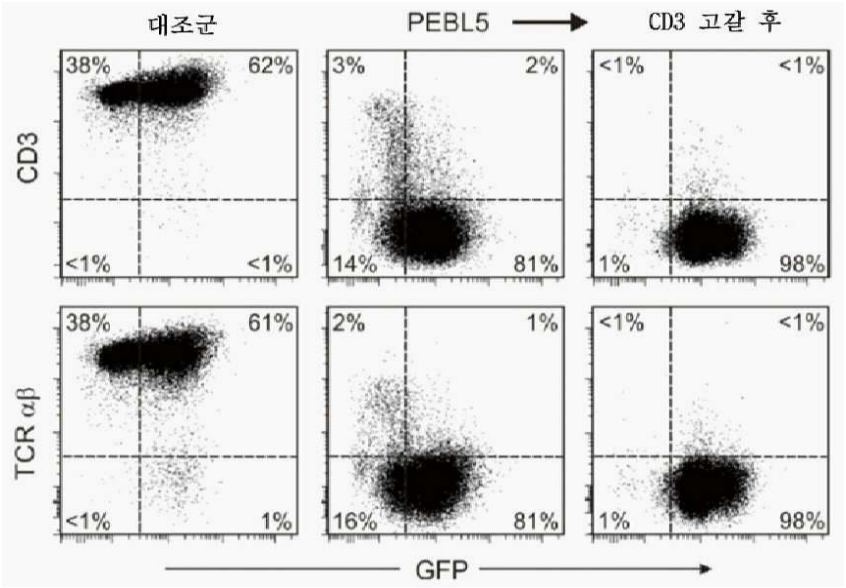
도면10b



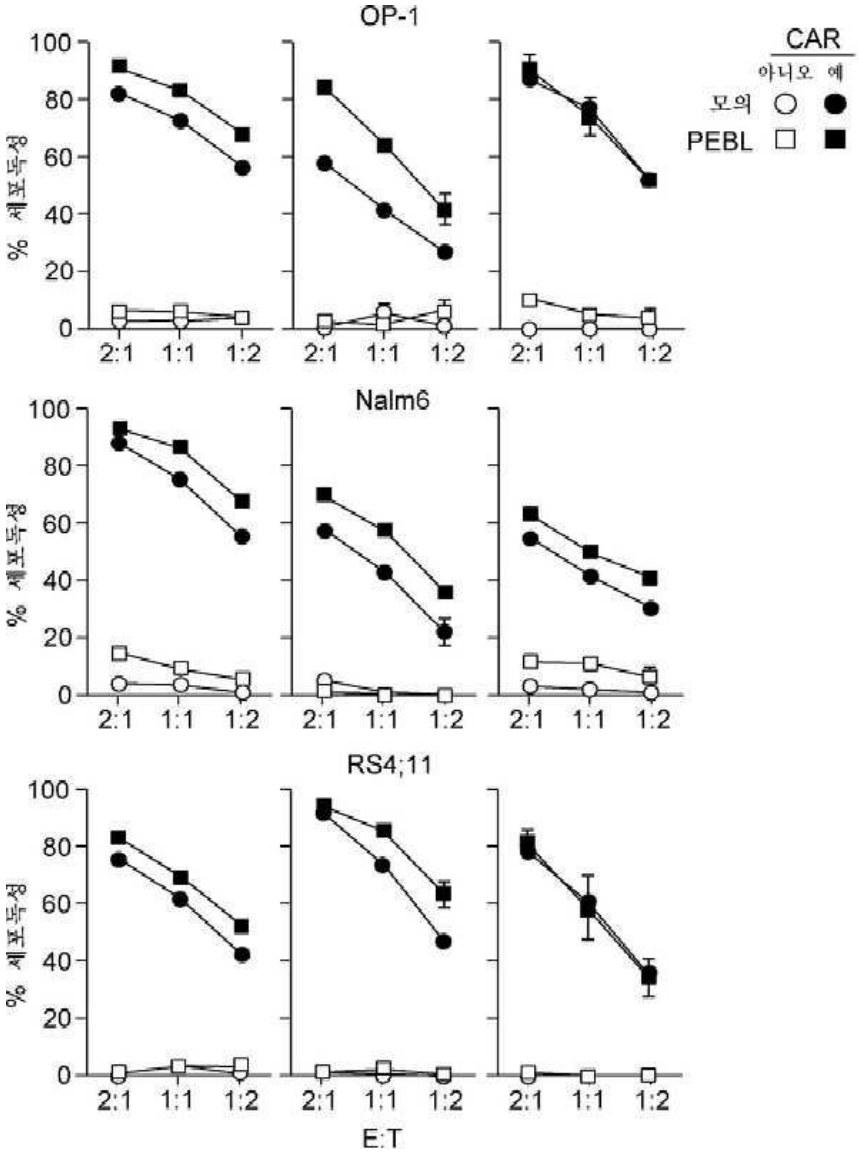
도면10c



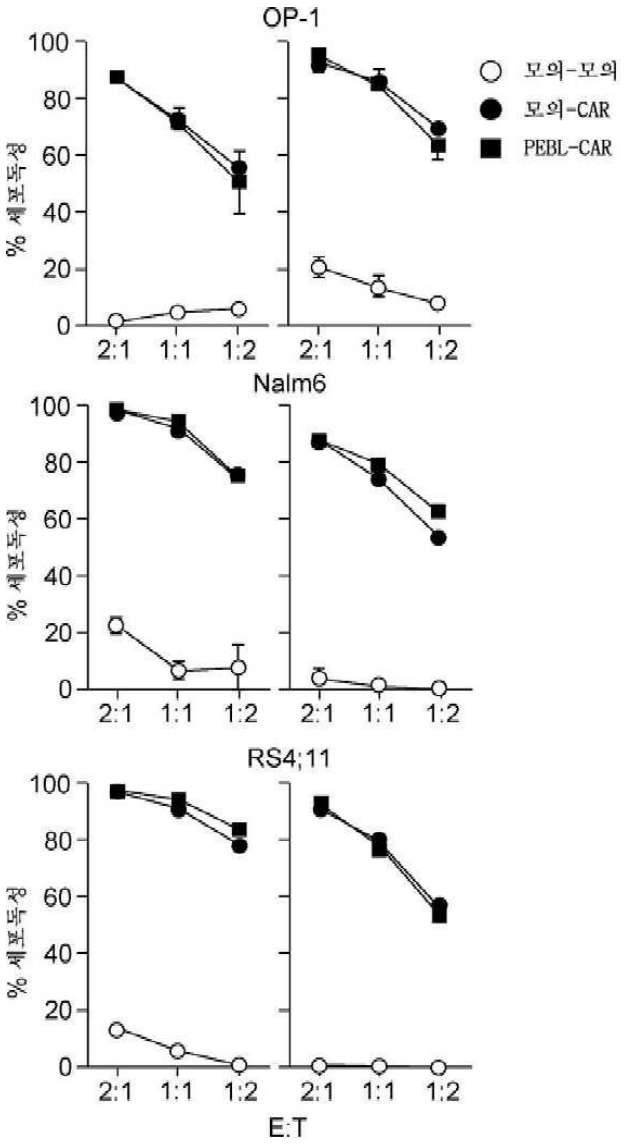
도면11


대조군
PEBL5
CD3 고갈 후
CD3
TCR αβ
GFP
38%
62%
<1%
<1%
3%
2%
14%
81%
<1%
<1%
1%
98%
38%
61%
<1%
1%
2%
1%
16%
81%
<1%
<1%
1%
98%

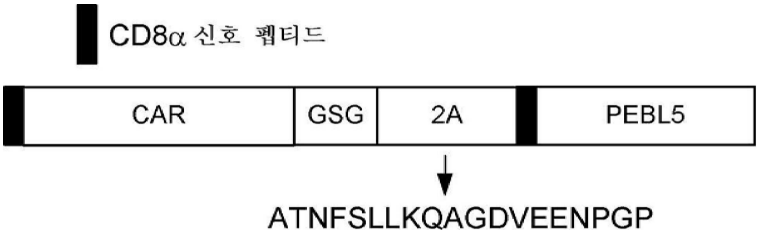
도면12a


OP-1
Nalm6
RS4;11
% 세포독성
100
80
60
40
20
0
2:1
1:1
1:2
E:T
CAR
아니오
예
모의
PEBL

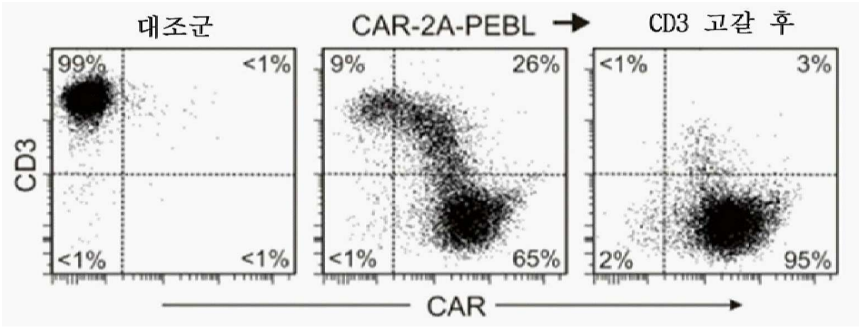
도면12b


OP-1
Nalm6
RS4;11
% 세포독성
100
80
60
40
20
0
2:1
1:1
1:2
E:T
모의-모의
모의-CAR
PEBL-CAR

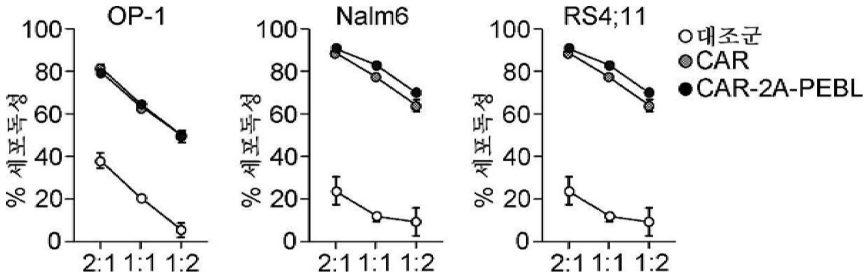
도면13a


CD8α 신호 펩티드
CAR
GSG
2A
PEBL5
ATNFSLLKQAGDVEENPGP

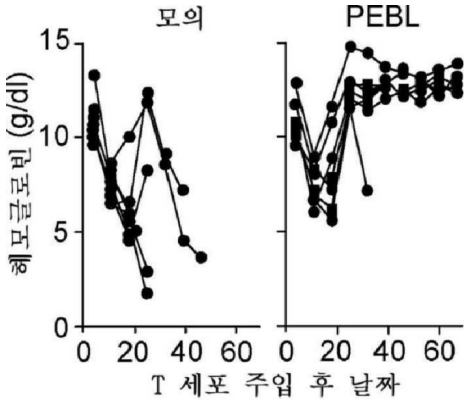
도면13b



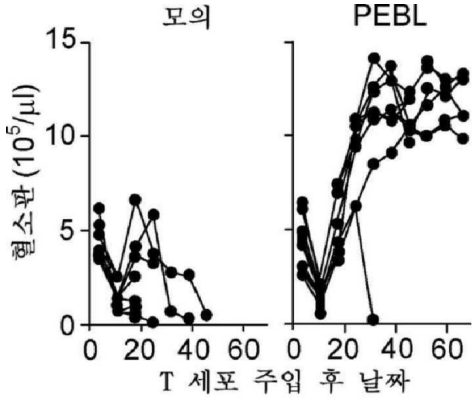
도면13c



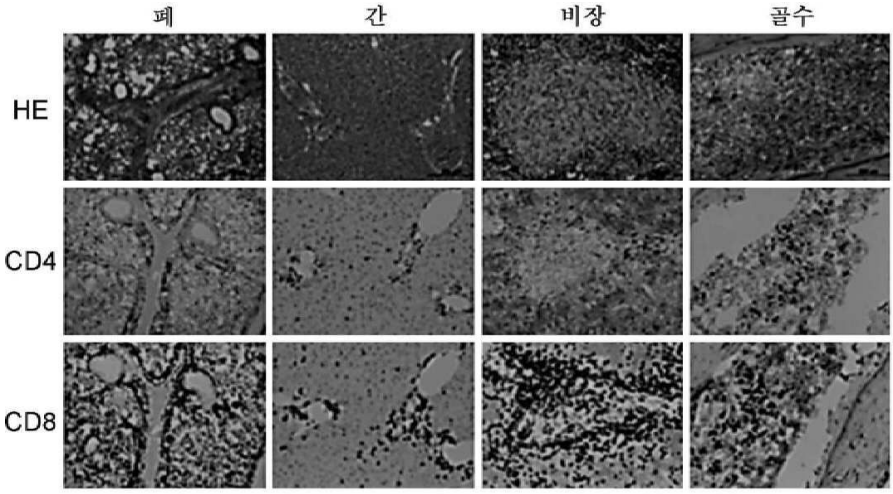
도면14a



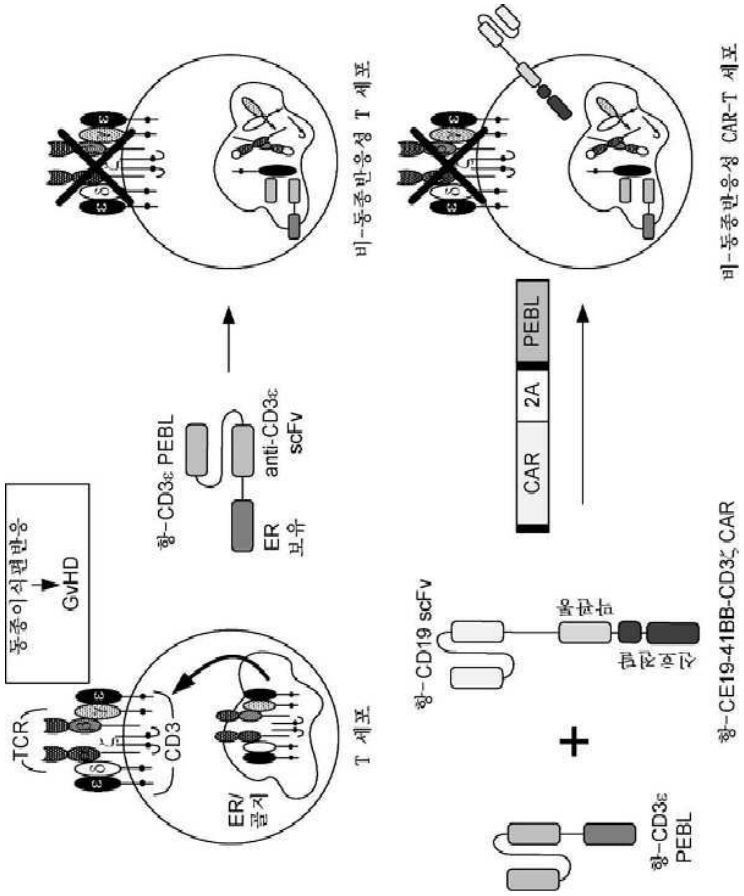
도면14b



도면14c



도면15



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> MediSix Therapeutics Pte Ltd.

National University of Singapore

<120> T CELL RECEPTOR DEFICIENT CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR T-CELLS AND

METHODS OF USE THEREOF

<130> 119419-5003-US, 119419-5003-US01 and 119419-5003-WO

<140> Filed Herewith

<141> 2018-08-09

<150> 62/543,735

<151> 2017-08-10

<160> 43

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 1

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
20 25 30

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

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

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 2

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

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

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg
100 105

<210> 3

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polynucleotide

<400> 3

gaggtccagc tgcagcagtc tggggctgaa ctggcaagac ctggggcctc agtgaagatg 60

tcctgcaagg cttctggcta cacctttact aggtacacga tgcactgggt aaaacagagg 120

cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gccgtggtta tactaattac 180

aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actacagaca aatcctccag cacagcctac 240

atgcaactga gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagatattat 300

gatgatcatt actgccttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctcctcagcc 360

<210> 4

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polynucleotide

<400> 4

caaattgttc tcacccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60

atgacctgca gtgccagctc aagtgtaagt tacatgaact ggtaccagca gaagtcaggc 120

acctccccca aaagatggat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt ccctgctcac 180

ttcaggggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacaa tcagcggcat ggaggctgaa 240

gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg agtagtaacc cattcacgtt cggctcgggg 300

acaaagttgg aaataaaccg g 321

<210> 5

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 5

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro

20

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 6

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> 7

<211> 69

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 7

Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr

1 5 10 15

Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala

20 25 30

Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile

35 40 45

Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser

50 55 60

Leu Ile Thr Leu Tyr

65

<210

> 8

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polynucleotide

<400> 8

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60

ccg 63

<210> 9

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polynucleotide

<400> 9

ggtggtggtg gttctggtgg tggtggttct ggcggcggcg gctccggtgg tggtggatcc 60

<210> 10

<211> 210

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polynucleotide

<400> 10

aagcccacca cgacgccagc gccgcgacca ccaacaccgg cgcccaccat cgcgtcgcag 60

cccctgtccc tgcgcccaga ggcgtgccgg ccagcggcgg ggggcgcagt gcacacgagg 120

gggctggact tcgcctgtga tatctacatc tgggcgccct tggccgggac ttgtggggtc 180

cttctcctgt cactggttat cacccttac 210

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 11

Ala Glu Lys Asp Glu Leu

1 5

<210> 12

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 12

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Lys Asp Glu Leu

1 5 10

<210> 13

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 13

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Lys Asp Glu Leu

1 5 10

<210> 14

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 14

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

Gly Gly Gly Ser Lys Asp Glu Leu
20

<210> 15

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 15

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

Gly Gly Gly Ser Ala Glu Lys Asp Glu Leu
20 25

<210> 16

<211> 84

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 16

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

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

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

Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser
50 55 60

Leu Ile Thr Leu Tyr Lys Tyr Lys Ser Arg Arg Ser Phe Ile Glu Glu
65 70 75 80

Lys Lys Met Pro

<210> 17

<211> 85

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 17

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

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

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

Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser
50 55 60

Leu Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Tyr Lys Ser Arg Arg Ser Phe Ile Glu
65 70 75 80

Glu Lys Lys Met Pro
85

<210> 18

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 18

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

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

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

Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser

50 55 60

Leu Ile Thr Leu Tyr Leu Tyr Lys Tyr Lys Ser Arg Arg Ser Phe Ile

65 70 75 80

Glu Glu Lys Lys Met Pro

85

<210> 19

<211> 87

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 19

Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr

1 5 10 15

Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala

20 25 30

Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile

35 40 45

Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser

50 55 60

Leu Ile Thr Leu Tyr Leu Tyr Cys Lys Tyr Lys Ser Arg Arg Ser Phe

65 70 75 80

Ile Glu Glu Lys Lys Met Pro

85

<210> 20

<211> 88

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 20

Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr

1 5 10 15

Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala

20 25 30

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

Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser
50 55 60
Leu Ile Thr Leu Tyr Leu Tyr Cys Asn Lys Tyr Lys Ser Arg Arg Ser
65 70 75 80
Phe Ile Glu Glu Lys Lys Met Pro
85

<210> 21
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic polypeptide
<400> 21
Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr

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

65 70 75 80
Asp Glu Lys Lys Met Pro
85

<210> 22
<211> 88
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic polypeptide
<400> 22

Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr
1 5 10 15
Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala
20 25 30
Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile

35 40 45
Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser
50 55 60
Leu Ile Thr Leu Tyr Leu Tyr Cys Asn Lys Tyr Lys Ser Arg Arg Ser
65 70 75 80
Phe Ile Asp Glu Lys Lys Met Pro
85

<210> 23
<211> 96
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic polypeptide
<400> 23

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

Leu Ile Thr Leu Tyr Leu Tyr Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp
65 70 75 80
Leu Lys Tyr Lys Ser Arg Arg Ser Phe Ile Glu Glu Lys Lys Met Pro
85 90 95

<210> 24
<211> 96

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 24

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

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

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

Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser
50 55 60

Leu Ile Thr Leu Tyr Leu Tyr Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr
65 70 75 80

Ala Lys Tyr Lys Ser Arg Arg Ser Phe Ile Glu Glu Lys Lys Met Pro
85 90 95

<210> 25

<211> 81

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 25

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

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

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

Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser
50 55 60

Leu Ile Thr Leu Tyr Leu Tyr Lys Lys Leu Glu Thr Phe Lys Lys Thr
65 70 75 80

Asn

<210> 26

<211> 91

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 26

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

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

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

Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser
50 55 60

Leu Ile Thr Leu Tyr Leu Tyr Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp
65 70 75 80

Leu Lys Lys Leu Glu Thr Phe Lys Lys Thr Asn
85 90

<210> 27

<211> 75

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 27

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

Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala

20 25 30

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

Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser
50 55 60

Leu Ile Thr Leu Tyr Leu Tyr Tyr Gln Arg Leu
65 70 75

<210> 28

<211> 85

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 28

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

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

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

Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser
50 55 60

Leu Ile Thr Leu Tyr Leu Tyr Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp
65 70 75 80

Leu Tyr Gln Arg Leu
85

<210> 29

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 29

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

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

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

Gln Arg Leu

<210> 30
<211> 77
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic polypeptide
<400> 30
Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr
1 5 10 15
Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala
20 25 30
Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile
35 40 45

Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser
50 55 60
Leu Ile Thr Leu Tyr Leu Tyr Arg Asn Ile Lys Cys Asp
65 70 75
<210> 31
<211> 87
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic polypeptide
<400> 31
Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr

1 5 10 15

Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala

20 25 30

Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile

35 40 45

Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser

50 55 60

Leu Ile Thr Leu Tyr Leu Tyr Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp

65 70 75 80

Leu Arg Asn Ile Lys Cys Asp

85

<210> 32

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 32

Lys Asp Glu Leu

1

<210> 33

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 33

Lys Lys Met Pro

1

<210> 34

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 34

Tyr Gln Arg Leu

1

<210> 35

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(4)

<223> wherein Xaa is any amino acid

<400> 35

Lys Lys Xaa Xaa

1

<210> 36

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 36

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 37

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 37

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> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 38

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

1 5 10 15

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 39

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 40

<211> 5

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> wherein n is 2-12

<400> 40

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 41

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 41

Ser His Gly Phe Pro Pro Glu Val Glu Glu Gln Asp Asp Gly Thr Leu

1 5 10 15

Pro Met Ser Cys Ala Gln Glu Ser Gly Met Asp Arg His Pro Ala Ala

20 25 30

Cys Ala Ser Ala Arg Ile Asn Val

35 40

<210> 42

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 42

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

1 5 10 15

Pro Gly Pro

<210> 43

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 43

Lys Lys Thr Asn

1