(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0148745
(43) 공개일자 2022년11월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 14/725* (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2896 (2013.01)
A61K 39/0005 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0052018
(22) 출원일자 2022년04월27일
심사청구일자 2022년04월27일
(30) 우선권주장
1020210055886 2021년04월29일 대한민국(KR)

(71) 출원인
한국생명공학연구원
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
(72) 발명자
김태돈
대전광역시 유성구 과학로 125
조선아
대전광역시 유성구 과학로 125
이수연
대전광역시 유성구 과학로 125
(74) 대리인
특허법인태평양

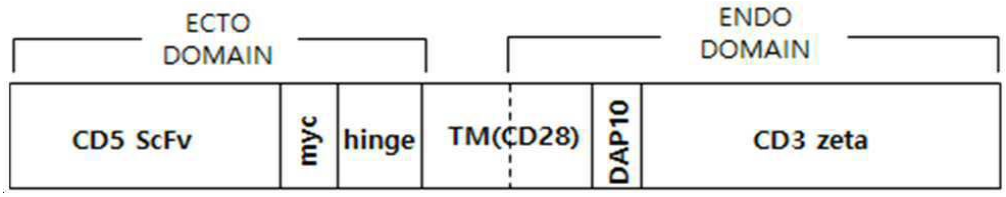
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **신규한 항-CD5 키메릭 항원 수용체 및 이를 발현하는 면역세포**

(57) 요 약

본 발명은 CD5 항체 및 이를 포함하는 키메릭 항원 수용체(chimeric antigen receptor, CAR)에 관한 것으로, 본 발명의 키메릭 항원 수용체는 면역세포에 발현되어 정상 T세포에 대한 독성이 감소된 항암면역요법에 유용하게 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C12N 5/0646 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2319/02 (2013.01)
C07K 2319/03 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 9991007800
과제번호 HN21C0117
부처명 다부처
과제관리(전문)기관명 (재단)국가신약개발재단
연구사업명 국가신약개발사업(R&D)(과기정통부,복지부,산업부)
연구과제명 난치성 T세포 혈액암종을 타겟하는 CD5 CAR-NK의 선도치료제 도출 및 최적화
기 여 율 50/100
과제수행기관명 한국생명공학연구원
연구기간 2021.09.01 ~ 2021.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711150981
과제번호 CAP-18-002-KRIBB
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 국가과학기술연구회
연구사업명 국가과학기술연구회연구운영비지원(R&D)(주요사업비)
연구과제명 미래형 유전자편집 항암면역세포치료제 개발
기 여 율 40/100
과제수행기관명 한국생명공학연구원
연구기간 2021.09.17 ~ 2022.09.16
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711134084
과제번호 KGM5502113
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국생명공학연구원
연구사업명 한국생명공학연구원연구운영비지원(R&D)(주요사업비)
연구과제명 항암 면역세포 치료기술 개발
기 여 율 10/100
과제수행기관명 한국생명공학연구원
연구기간 2021.01.01 ~ 2021.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

i) 서열번호 2, 서열번호 10, 서열번호 18 및 서열번호 26으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1, ii) 서열번호 3, 서열번호 11, 서열번호 19 및 서열번호 27로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2 및 iii) 서열번호 4, 서열번호 12, 서열번호 20 및 서열번호 28로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄가변영역; 및

iv) 서열번호 6, 서열번호 14, 서열번호 22 및 서열번호 30으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR1, v) 서열번호 7, 서열번호 15, 서열번호 23 및 서열번호 31로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR2 및 vi) 서열번호 8, 서열번호 16, 서열번호 24 및 서열번호 32로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄가변영역;

을 포함하는 CD5에 특이적으로 결합하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 중쇄가변영역은 서열번호 5, 서열번호 13, 서열번호 21 및 서열번호 29로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 것인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 경쇄가변영역은 서열번호 9, 서열번호 17, 서열번호 25 및 서열번호 33으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 것인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 4

CD5에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 포함하는 세포외 도메인(extracellular binding domain); 막통과 도메인(transmembrane domain); 및 세포내 신호전달 도메인(intracellular signaling domain);을 포함하는, 키메릭 항원 수용체(Chimeric antigen receptor, CAR)로서,

상기 CD5에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위는, i) 서열번호 2, 서열번호 10, 서열번호 18 및 서열번호 26으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1, ii) 서열번호 3, 서열번호 11, 서열번호 19 및 서열번호 27로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2 및 iii) 서열번호 4, 서열번호 12, 서열번호 20 및 서열번호 28로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄가변영역과 iv) 서열번호 6, 서열번호 14, 서열번호 22 및 서열번호 30으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR1, v) 서열번호 7, 서열번호 15, 서열번호 23 및 서열번호 31로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR2 및 vi) 서열번호 8, 서열번호 16, 서열번호 24 및 서열번호 32로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄가변영역을 포함하는 항-CD5 항체의 단일 사슬 가변 단편(single chain variable fragment; scFv)인 것인, 키메릭 항원 수용체.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 CD5에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위는,

서열번호 5, 서열번호 13, 서열번호 21 및 서열번호 29로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서

열을 갖는 중쇄가변영역을 포함하는 항-CD5 항체의 단일 사슬 가변 단편인 것인, 키메릭 항원 수용체.

청구항 6

청구항 4에 있어서,

상기 CD5에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위는,

서열번호 9, 서열번호 17, 서열번호 25 및 서열번호 33으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을을 갖는 경쇄가변영역을 포함하는 항-CD5 항체의 단일 사슬 가변 단편인 것인, 키메릭 항원 수용체.

청구항 7

청구항 4 내지 청구항 6 중 어느 한 항의 키메릭 항원 수용체를 암호화하는 염기서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 8

청구항 7의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 발현 벡터.

청구항 9

청구항 4 내지 청구항 6 중 어느 한 항의 키메릭 항원 수용체를 표면에 발현하는, 면역세포.

청구항 10

청구항 9에 있어서,

상기 면역세포는 자연살해 세포(NK cell), T 세포, 자연살해 T 세포(NKT cell), 대식세포 및 수지상세포로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나인 것인, 면역세포.

청구항 11

청구항 9의 면역세포를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 12

청구항 11에 있어서,

상기 암은 백혈병 또는 림프종을 포함하는 혈액암인 것인, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 13

청구항 12에 있어서,

상기 암은 흉선 암종(thymic carcinoma), 비-호지킨 림프종(non-Hodgkin lymphoma), 광범위큰세포림프종(diffuse large cell lymphoma), 소림프구성세포 림프종(small lymphocytic lymphoma), T-세포 종양(T-cell neoplasma), 말초 T-세포 림프종(peripheral T-cell lymphoma), 외투세포림프종(mantle cell lymphoma), T-세포 급성림프구성백혈병(T-cell acute lymphobalstic lymphoma) 및 만성림프성백혈병(chronic lymphoblastic lymphoma)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나인 것인, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 14

청구항 11에 있어서,

항암 화학요법제를 추가로 포함하는 것인, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 CD5에 대해 특이적으로 결합하는 신규한 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 상기 항체의 항원 결합 단편을 포함하는 키메릭 항원 수용체, 상기 키메릭 항원 수용체를 발현하는 면역세포에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 암을 치료하기 위한 방법은 꾸준한 발전과 변화 과정을 거쳐 왔으며, 외과적 수술, 화학요법, 방사선 요법 등의 방법이 현재까지 계속 이용되고 있으나 이러한 기존의 암 치료 방법들은 암이 전이되지 않은 초기 상태에만 효과가 있는 경우가 대부분이며, 이미 전이가 진행된 상태에서는 예컨대 외과적 수술을 하더라도 추후 재발의 가능성이 높다는 문제점이 있다. 이에, 최근 암을 치료하기 위해 면역 반응을 이용하는 방법에 대한 연구가 계속되어 오고 있다.

[0003] 그 중에서도, 면역세포를 이용하여 이를 강화시키거나 유전공학적으로 변형하여 다시 환자에게 주입하는 세포치료 방법에 대한 관심이 높아지고 있으며, 예를 들어 종양 침윤 림프구(Tumor infiltrating lymphocytes, TIL), 키메릭 항원 수용체(Chimeric antigen receptor, CAR) 및 T 세포 수용체(T-cell receptor, TCR) 기술 등이 연구되고 있다. 특히, 항원 특이성을 전달하도록 설계된 인공 수용체인 키메릭 항원 수용체(chimeric antigen receptor, CAR)가 도입된 T 세포인 CAR-T 세포의 경우, 2017년에 CD19를 표적으로 하는 CAR-T 세포가 항암제로서 FDA 승인을 받은 이후로 그 연구가 활발하게 진행되어 왔으나, 대부분 시험관 내(*in vitro*)에서만 효과를 나타낼 뿐, 실제로 생체 내(*in vivo*)에서는 유의미한 치료 효과를 나타내지 못하는 문제가 있었다.

[0004] 한편, CAR-T 세포의 경우 종양에 대해서는 효과적이지만, 일부 경우에 건강한 조직에 대해서도 비특이적으로 공격하는 부작용도 있었다. 상기 CD5는 T 세포 및 B 세포에서 발현되는 분화 클러스터의 일종으로, 골수나 림프조직에서 주로 발견되고, B 세포보다 T 세포에서 과발현되어 있기 때문에 T 세포의 마커로 주로 활용된다. 특히, CD5는 대부분의 T 세포 종양뿐만 아니라, 정상 T 세포에서도 발현되고 있기 때문에, 항-CD5 CAR-T 세포의 경우 T 세포 종양뿐만 아니라 정상 T 세포를 공격하거나, 심지어 주입된 항-CD5 CAR-T 세포 자체를 공격하기도 하는 자체 교차반응의 문제가 있었다(참고문헌 1). 그로 인해, 정상 T 세포와 항-CD5 CAR-T 세포가 감소되고, 결국에는 항암 효과까지도 저하되는 문제가 있었다.

[0005] 이에, CD5를 발현하는 암 세포에 대한 항암 활성을 그대로 유지하면서도, 항-CD5 CAR-T 세포가 지니는 상기와 같은 문제점을 보완할 수 있는, 면역세포를 연구·개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국 공개특허공보 제2018-0002604호

(특허문헌 0002) 한국 등록특허공보 제2,122,546호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 CD5에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 또한, 본 발명은 면역세포에서 발현되었을 때, 암 세포에 대한 세포독성 또는 세포용해 활성을 증폭시킬 수 있도록 하는 신규한 키메릭 항원 수용체를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 키메릭 항원 수용체를 발현시키기 위한 폴리뉴클레오티드 및 발현 벡터를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 키메릭 항원 수용체를 표면에 발현시킴으로써 암에 대한 치료 효과가 우수한 면역세포를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 면역세포를 이용하여 암을 치료하기 위한 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 측면은 i) 서열번호 2, 서열번호 10, 서열번호 18 및 서열번호 26으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1, ii) 서열번호 3, 서열번호 11, 서열번호 19 및 서열번호 27로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2 및

iii) 서열번호 4, 서열번호 12, 서열번호 20 및 서열번호 28로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄가변영역; 및 iv) 서열번호 6, 서열번호 14, 서열번호 22 및 서열번호 30으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR1, v) 서열번호 7, 서열번호 15, 서열번호 23 및 서열번호 31로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR2 및 vi) 서열번호 8, 서열번호 16, 서열번호 24 및 서열번호 32로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄가변영역;을 포함하는 CD5에 특이적으로 결합하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0013] 상기 중쇄가변영역은 서열번호 5, 서열번호 13, 서열번호 21 및 서열번호 29로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0014] 상기 경쇄가변영역은 서열번호 9, 서열번호 17, 서열번호 25 및 서열번호 33으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0015] 본 발명의 다른 측면은 CD5에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 포함하는 세포외 도메인(extracellular binding domain); 막통과 도메인(transmembrane domain); 및 세포내 신호전달 도메인(intracellular signaling domain);을 포함하는, 키메릭 항원 수용체(Chimeric antigen receptor, CAR)로서, 상기 CD5에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위는, i) 서열번호 2, 서열번호 10, 서열번호 18 및 서열번호 26으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1, ii) 서열번호 3, 서열번호 11, 서열번호 19 및 서열번호 27로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2 및 iii) 서열번호 4, 서열번호 12, 서열번호 20 및 서열번호 28로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄가변영역과 iv) 서열번호 6, 서열번호 14, 서열번호 22 및 서열번호 30으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR1, v) 서열번호 7, 서열번호 15, 서열번호 23 및 서열번호 31로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR2 및 vi) 서열번호 8, 서열번호 16, 서열번호 24 및 서열번호 32로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄가변영역을 포함하는 항-CD5 항체의 단일 사슬 가변 단편(single chain variable fragment; scFv)인 것인, 키메릭 항원 수용체를 제공한다.

[0016] 본 발명의 다른 측면은 상기 키메릭 항원 수용체를 암호화하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 그리고 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.

[0017] 본 발명의 다른 측면은 상기 키메릭 항원 수용체를 표면에 발현하는 면역세포를 제공한다.

[0018] 상기 면역세포는 자연살해 세포, T 세포, 자연살해 T 세포, 사이토카인 유도 살해세포, 마크로파지 또는 수지상 세포일 수 있다.본 발명의 또 다른 측면은 상기 면역세포를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0019] 상기 암은 백혈병 또는 림프종을 포함하는 혈액암일 수 있고, 암은 흉선 암종(thymic carcinoma), 비호지킨 림프종(non-Hodgkin lymphoma), 광범위큰세포림프종(diffuse large cell lymphoma), 소림프구성세포 림프종(small lymphocytic lymphoma), T-세포 종양(T-cell neoplasma), 말초 T세포 림프종(peripheral T-cell lymphoma), 외투세포림프종(mantle cell lymphoma), T-세포 급성림프구성백혈병(T-cell acute lymphobalstic lymphoma) 또는 만성림프성백혈병(chronic lymphoblastic lymphoma) 일 수 있다.

발명의 효과

[0020] 본 발명의 항체, 이의 항원 결합 단편, 그리고 이를 이용한 키메릭 항원 수용체는 암 세포에서 발현되는 CD5에 대해 특이적으로 결합할 수 있으며, 이에 따라 상기 키메릭 항원 수용체가 발현된 면역세포에서 신호전달이 발생함에 따라 면역세포의 세포독성 또는 세포용해 활성을 현저하게 향상시키며 사이토카인의 분비를 촉진하는 효과를 나타낸다. 또한, 이에 따라 상기 면역세포와 공배양된 암 세포의 탈과립(degranulation)을 증가시키는 효과가 있을 뿐만 아니라, 상기 키메릭 항원 수용체가 발현된 면역세포의 경우 CD5가 발현되는 정상세포에 대해서는 감소된 반응성을 나타낸다.

[0021] 따라서, 본 발명의 항체나 이를 포함하는 키메릭 항원 수용체, 그리고 이를 발현시킨 면역세포는 암을 치료하기 위한 용도로 이용될 수 있다.

[0022] 다만, 본 발명의 효과는 상기에서 언급한 효과로 제한되지 아니하며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 하기의 기재로부터 당업자에게 명확히 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 CD5에 특이적으로 결합하는 단일 사슬 가변 단편(ScFv)을 세포외 도메인으로 포함하는 본 발명의 키메릭 항원 수용체(CD5-CAR)의 구조를 나타낸 모식도이다.

도 2는 본 발명의 키메릭 항원 수용체 4종의 유전자를 도입 및 발현시킨 자연살해 세포(CD5#1-CAR-NK 세포, CD5#4-CAR-NK 세포, CD5#11-CAR-NK 세포 및 CD5#14-CAR-NK 세포)를 대상으로, 본 발명의 키메릭 항원 수용체(CD5#1-CAR, CD5#4-CAR, CD5#11-CAR 및 CD5#14-CAR)의 발현 여부를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 키메릭 항원 수용체 4종의 유전자를 도입 및 발현시킨 자연살해 세포(CD5#1-CAR-NK 세포, CD5#4-CAR-NK 세포, CD5#11-CAR-NK 세포 및 CD5#14-CAR-NK 세포)의, CD5를 발현하는 MOLT4 세포와 CD5를 발현하지 않는 U937 세포에 대한 세포독성(세포용해 활성)을 측정하여 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 키메릭 항원 수용체 CD5#11-CAR 및 CD5#14-CAR의 유전자를 도입 및 발현시킨 자연살해 세포(CD5#11-CAR-NK 세포 및 CD5#14-CAR-NK 세포)의, CD5를 발현하는 CCRF-CEM 세포 및 Jurkat 세포와 CD5를 발현하지 않는 Daudi 세포에 대한 세포독성(세포용해 활성)을 측정하여 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 5a 및 도 5b는 본 발명의 키메릭 항원 수용체 4종의 유전자를 도입 및 발현시킨 자연살해 세포(CD5#1-CAR-NK 세포, CD5#4-CAR-NK 세포, CD5#11-CAR-NK 세포 및 CD5#14-CAR-NK 세포)를 CD5를 발현하는 MOLT4 세포 또는 CD5를 발현하지 않는 U937 세포와 공배양하였을 때, 자연살해 세포들에서 분비하는 사이토카인(IFN-γ)의 양(도 5a)과 탈과립(degranulation) 지표인 CD107α의 발현량(도 5b)을 각각 측정하여 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 키메릭 항원 수용체 CD5#11-CAR 및 CD5#14-CAR의 유전자를 도입 및 발현시킨 자연살해 세포(CD5#11-CAR-NK 세포 및 CD5#14-CAR-NK 세포)의, CD5를 발현하는 정상세포를 포함하는 MNC(mononuclear cells)에 대한 세포독성(세포용해 활성)을 측정하여 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 7a는 본 발명의 키메릭 항원 수용체 CD5#11-CAR 및 CD5#14-CAR의 유전자를 도입 및 발현시킨 자연살해 세포(CD5#11-CAR-NK 세포 및 CD5#14-CAR-NK 세포)들을 단일세포로 분리 및 증식시킨 단일세포주들의 CD5-CAR의 발현양을 확인한 결과를 나타낸 것이고, 도 7b는 상기 확립된 각각의 단일세포주들의 MOLT4 세포 및 MNC에 대한 세포독성(세포용해 활성)을 측정하여 비교한 결과를 나타낸 것이며, 도 7c는 상기와 같이 확립된 단일세포주들 중에서 선도세포주를 선별하는 과정을 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 키메릭 항원 수용체(CD5-CAR)를 일시적으로 발현시키기 위하여 설계된 mRNA 구조체의 구조를 나타낸 모식도이다.

도 9는 본 발명의 키메릭 항원 수용체 CD5#11-CAR 및 CD5#14-CAR의 유전자를 도입 및 발현시킨 primary 자연살해 세포를 대상으로, 본 발명의 키메릭 항원 수용체(CD5#11-CAR 및 CD5#14-CAR)의 발현 여부를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명의 키메릭 항원 수용체 CD5#11-CAR 및 CD5#14-CAR의 유전자를 도입 및 발현시킨 primary 자연살해 세포의, CD5를 발현하는 MOLT4 세포와 CCRF-CEM 세포에 대한 세포독성(세포용해 활성)을 측정하여 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 11a는 정상세포와 CD5를 발현하는 암 세포주들에서, 자연살해 세포의 활성화에 관여하는 리간드들의 발현양을 확인한 결과이고, 도 11b는 MNC를 이용하여 각 백혈구 세포마다 B7-H6의 발현 정도를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 12는 CD5를 발현하는 암 세포주인 MOLT4 세포와 Jurkat 세포에서 B7-H6의 발현을 녹-다운(knock-down)시킨 경우에, 상기 암 세포주들에 대한 본 발명의 CD5#11-CAR-NK 세포의 세포독성의 변화를 확인한 결과이다.

도 13은 CD5를 발현하는 암 세포주인 MOLT4와 MNC에 본 발명의 CD5#11-CARNK 세포를 처리한 이후, 시간의 경과에 따라 B7-H6와 CD5의 발현 정도를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수

있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0025] **1. 신규한 항-CD5 항체, 이의 항원 결합 단편, 그리고 이를 포함하는 키메릭 항원 수용체(Chimeric antigen receptor; CAR) 및 이를 발현시키기 위한 폴리뉴클레오티드 및 발현 벡터**

[0026] 본 발명의 일 측면은 CD5에 대해 특이적으로 결합할 수 있는 항-CD5 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0027] 본 발명에서 용어 "항체(antibody)"는 면역학적으로 항원의 에피토프(epitope)와 특이적 결합하여 반응성을 갖는 면역글로불린 분자를 의미한다. 상기 항체는 단일클론항체, 다클론항체, 전체 길이의 사슬 구조를 가진 항체(전장항체, full-length antibody), 적어도 항원 결합 기능을 갖는 기능적인 단편(항원 결합 단편) 및 재조합 항체를 모두 포함할 수 있으며, 구체적으로 본 발명의 항체는 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다. 상기 단일클론항체는 실질적으로 동일한 항체 집단에서 수득한 단일 분자 조성의 항체 분자를 지칭하고, 이러한 단일클론항체는 특정 에피토프에 대해 단일 결합 특이성 및 친화도를 나타낸다. 상기 전장 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며, 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합으로 연결될 수 있다. 상기 항체는 중쇄(heavy chain, HC) 및 경쇄(light chain, LC) 폴리펩타이드를 포함하며, 상기 중쇄 및 경쇄는 가변영역 및 불변영역을 포함할 수 있다.

[0028] 상기 불변영역은 면역계의 다양한 종류의 세포(T-세포 등), 보체계의 성분을 포함하는 숙주 조직 등에, 상기 항체가 결합할 수 있도록 매개하는 부위이다. 상기 불변영역은, 같은 종으로부터 유래하는 같은 종류의 항체라면 항원의 종류와 무관하게 동일한 기능을 하며, 이를 이루는 아미노산 서열 역시 항체마다 동일하거나 높은 유사도를 갖는다. 상기 불변영역은 중쇄의 불변영역(CH로 약칭될 수 있음)과 경쇄 불변영역(CL로 약칭될 수 있음)으로 나뉠 수 있다. 상기 중쇄불변영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 및/또는 엡실론(ε) 타입을 가지며, 서브클래스로 감마1(γ1), 감마2(γ2), 감마3(γ3), 감마4(γ4), 알파1(α1) 및/또는 알파2(α2)를 가진다. 경쇄불변영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가진다. IgG는 아형(subtype)으로, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한다.

[0029] 상기 가변영역은 항원에 대해 특이성을 가지는 항체 부위로, 중쇄의 가변영역(VH로 약칭될 수 있음)과 경쇄의 가변영역(VL로 약칭될 수 있음)으로 나뉠 수 있다. 상기 가변영역에는 3개의 CDR(complementary-determining regions, 또는 상보성 결정 영역)과 4개의 FR(framework regions)이 포함될 수 있다. 상기 CDR은 항원의 인식에 관여하는 고리 형태의 부위일 수 있으며, 상기 CDR의 아미노산 서열에 따라 항원에 대한 특이성이 결정될 수 있다. 상기 CDR은 그 순서에 따라 CDR1, CDR2, CDR3로 지칭될 수 있으며, 중쇄 및 경쇄 중 어느 폴리펩타이드의 CDR인지 여부에 따라, 중쇄가변영역의 경우 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3로, 경쇄가변영역의 경우 CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3로 지칭될 수 있다. FR도 마찬가지로, 중쇄가변영역의 경우 FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4로, 경쇄가변영역의 경우 FR-L1, FR-L2, FR-L3, FR-L4로 지칭될 수 있다. 또한, 상기 CDR 및 FR은 각각의 가변영역에서 다음과 같은 순서로 배열될 수 있다.

[0030] 본 발명에서 용어 "항원 결합 단편"은, 항체의 항원 결합 기능을 보유하는, 본 발명 인간화 항체의 임의의 단편을 의미한다. 상기 항원 결합 단편은 "단편", "항체 단편" 등의 용어와 호환되어 지칭될 수 있으며, 상기 항원 결합 단편은 Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv 등일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0031] 상기 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변영역 및 중쇄의 첫 번째 불변영역(CH1 도메인)을 가지는 구조로 1 개의 항원 결합 부위를 가진다. 상기 Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C 말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 상기 Fab와 차이가 있다. 상기 $F(ab')_2$는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. 상기 Fv는 중쇄가변영역 및 경쇄가변영역만을 가지고 있는 최소의 항체 조각을 의미한다. 이중쇄 Fv(two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄가변영역과 경쇄가변영역이 연결되어 있고, 단쇄 Fv(single-chain Fv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통해 중쇄가변영역과 경쇄가변영역이 공유결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다. 상기 항원 결합 단편은, 단백질 가수분해 효소를 이용하거나(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')2 단편을 얻을 수 있다.), 또는 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0032] 상기 링커는 펩타이드 링커일 수 있으며, 약 10 내지 25개 아미노산 길이를 가지는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 링커에는 글리신(G) 및/또는 세린(S)과 같은 친수성 아미노산이 포함될 수 있다. 상기 링커는 예를 들어, (GS)n, (GGS)n, (GSGGS)n 또는 (GnS)m(n, m은 각각 1 내지 10)을 포함할 수 있으며, 예를 들어 (GnS)m(n, m은 각각 1 내지 10)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0033] 본 발명에서 용어, "에피토프(epitope)"는 면역글로불린, 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 특이적으로 인식하고 결합할 수 있는 항원 상의 특정 부위를 의미한다. 상기 에피토프는 연속 아미노산으로부터 또는 단백질의 3차 접힘에 의해 병치된 불연속 아미노산으로부터 형성될 수 있다

[0034] 상기 "특이적으로 결합하는" 것은, 배경 결합보다 큰 결합 친화성으로 다른 분자에 대해 결합하는 것을 의미할 수 있으며, 예컨대 상기 세포외 도메인은 표적 항원에 대해 약 10^{-5} M 이상의 친화성 또는 Ka(1/M의 단위를 갖는 특정 결합 상호작용의 평형 해리 상수)로 표적 항원에 결합하는 것일 수 있다. 상기 친화성은 M의 단위를 갖는 특정 결합 상호작용의 평형 해리 상수(Kd)가 10^{-5} M 내지 10^{-13} M 또는 상기 범위 이하인 것일 수 있다.

[0035] 본 발명의 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 i) 서열번호 2, 서열번호 10, 서열번호 18 및 서열번호 26으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1, ii) 서열번호 3, 서열번호 11, 서열번호 19 및 서열번호 27로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2 및 iii) 서열번호 4, 서열번호 12, 서열번호 20 및 서열번호 28로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄가변영역; 및 iv) 서열번호 6, 서열번호 14, 서열번호 22 및 서열번호 30으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR1, v) 서열번호 7, 서열번호 15, 서열번호 23 및 서열번호 31로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR2 및 vi) 서열번호 8, 서열번호 16, 서열번호 24 및 서열번호 32로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄가변영역;을 포함하고, CD5에 특이적으로 결합한다.

[0036] 상기 중쇄가변영역은 서열번호 5, 서열번호 13, 서열번호 21 또는 서열번호 29의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.

[0037] 상기 경쇄가변영역은 서열번호 9, 서열번호 17, 서열번호 25 또는 서열번호 33 의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.

[0038] 상기 경쇄가변영역은 서열번호 8 또는 서열번호 16의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.

[0039] 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 예컨대 인간으로부터 유래하는 항체의 중쇄불변영역 및/또는 경쇄불변영역을 더 포함할 수 있으며, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 CD5에 대해 특이적으로 결합하는 특성을 저해하지 않는 것이라면, 상기 인간으로부터 유래하는 항체의 중쇄불변영역 및/또는 경쇄불변영역은 그 종류나 아미노산 서열에 제한없이 이용될 수 있다.

[0040] 앞서 설명한 아미노산 서열들은, 이를 포함하는 폴리펩타이드의 구조, 기능, 활성 등에 영향을 미치지 않는 범위 내에서, 아미노산 잔기의 결실, 삽입, 치환 또는 이들의 조합에 의해 상이한 서열을 가지는 변이체를 포함할 수 있다. 또한, 상기 아미노산 서열들은 당업계에 알려진 통상적인 변형이 일어난 아미노산을 포함하는 것일 수 있으며, 상기 아미노산 변형은 예컨대 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation) 등일 수 있다. 본 발명의 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 앞서 설명한 아미노산 서열들을 포함하는 것뿐만 아니라, 이와 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 것이나 이의 변이체를 포함한다. 상기 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 것의 의미는, 앞서 설명한 아미노산 서열과 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 또는 99.5% 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0041] 본 발명에서 용어 "키메릭 항원 수용체(Chimeric antigen receptor; CAR)"는 표적 항원 및 상기 항원을 발현하는 세포를 인식하여 결합하였을 때 이에 대하여 면역반응을 유도할 수 있도록 설계된 합성 복합체이다. 키메릭 항원 수용체는 세포외 도메인(extracellular binding domain), 막통과 도메인(transmembrane domain), 및 세포내 신호전달 도메인(intracellular signaling domain)을 포함할 수 있다. 키메릭 항원 수용체는 면역세포의 표면에 발현되어 세포외 도메인에 포함된 항원 결합 부위를 통해, 특정 항원, 예컨대 암 세포의 표면에 특이적으로 발현되는 항원을 인식하여 결합됨으로써, 면역세포 내에서 신호전달을 일으켜 면역세포의 활성을 변화시킬 수 있는바, 특정 항원만을 표적으로 하여 면역반응을 유발시킬 수 있다.

[0042] 본 발명의 키메릭 항원 수용체(Chimeric antigen receptor; CAR)는, CD5(ephrin type-A receptor 2)에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 포함하는 세포외 도메인(extracellular binding domain); 막통과 도메인(transmembrane domain); 및 세포내 신호전달 도메인(intracellular signaling domain);을 포함한다.

[0043] 상기 CD5에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위는, i) 서열번호 2, 서열번호 10, 서열번호 18 및 서열번호 26

으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1, ii) 서열번호 3, 서열번호 11, 서열번호 19 및 서열번호 27로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2 및 iii) 서열번호 4, 서열번호 12, 서열번호 20 및 서열번호 28로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄가변영역과 iv) 서열번호 6, 서열번호 14, 서열번호 22 및 서열번호 30으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR1, v) 서열번호 7, 서열번호 15, 서열번호 23 및 서열번호 31로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR2 및 vi) 서열번호 8, 서열번호 16, 서열번호 24 및 서열번호 32로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄가변영역을 포함하는 항-CD5 항체의 단일 사슬 가변 단편(single chain variable fragment; scFv)일 수 있다.

[0044] 본 발명의 상기 키메릭 항원 수용체가 면역세포의 표면에 발현되었을 때, 표적 항원인 CD5가 상기 수용체에 결합하게 되면 면역세포 내에서 신호전달이 발생하게 되고, 상기 면역세포의 세포독성(또는 세포용해 활성)의 향상 및/또는 상기 면역세포의 사이토카인 분비 촉진이 유도될 수 있다. 상기 세포독성(또는 세포용해 활성)의 향상 또는 사이토카인 분비 촉진은 항원이 존재하지 않는 상태의 면역세포가 나타내는 세포독성(또는 세포용해 활성)이나 사이토카인 분비보다 높은 수준으로 세포독성(또는 세포용해 활성)을 나타내거나 높은 수준으로 사이토카인을 분비하는 것일 수 있다.

[0045] 상기 세포외 도메인은, 힌지 도메인(hinge domain) 및 스페이서 도메인(spacer domain)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나를 더 포함할 수 있다. 상기 세포외 도메인의 항원 결합 부위는, 힌지 도메인 및/또는 스페이서 도메인을 통해 막통과 도메인과 연결될 수 있다.

[0046] 상기 힌지 도메인은, 적절한 세포/세포 접촉, 적절한 항원/항원 결합 부위의 결합 결합 및 적절한 키메릭 항원 수용체의 활성화를 가능하게 하도록, 상기 키메릭 항원 수용체가 발현되는 면역세포의 표면으로부터 상기 항원 결합 부위가 물리적으로 이격될 수 있게 하는 부분으로, 세포외 도메인의 위치결정에 중요한 역할을 담당할 수 있다. 상기 키메릭 항원 수용체는 상기 세포외 도메인과 막통과 도메인 사이에 하나 이상의 힌지 도메인을 포함할 수 있다. 힌지 도메인은 천연, 합성, 반-합성 또는 재조합 공급원으로부터 유래될 수 있다. 힌지 도메인은 천연 발생 면역글로불린 힌지 영역 또는 변화된 면역글로불린 힌지 영역의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 상기 변화된 힌지 영역은 (a) 최대 30%의 아미노산 변화(예: 최대 25%, 20%, 15%, 10% 또는 5%의 아미노산 치환 또는 결실)을 갖는 천연 발생 힌지 영역, (b) 최대 30% 아미노산 변화(예: 최대 25%, 20%, 15%, 10% 또는 5%의 아미노산 치환 또는 결실)을 갖는 적어도 10개 아미노산(예: 적어도 12, 13, 14 또는 15개 아미노산) 길이의 천연 발생 힌지 영역의 일부, 또는 (c) 코어 힌지 영역(이는 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15, 또는 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개 아미노산 길이일 수 있다)을 포함하는 천연 발생 힌지 영역의 일부를 지칭한다. 특정 실시형태에서, 천연 발생 면역글로불린 힌지 영역에서 하나 이상의 시스테인 잔기는 하나 이상의 다른 아미노산 잔기(예: 하나 이상의 세린 잔기)로 치환될 수 있다. 변화된 면역글로불린 힌지 영역은 대안적으로 또는 추가적으로 또 다른 아미노산 잔기, 예컨대 시스테인으로 치환된 야생형 면역글로불린 힌지 영역의 프롤린 잔기를 가질 수 있다. 힌지 도메인은 CD8, CD4, CD28 및 CD7 등의 유형 1 막단백질의 세포외 도메인으로부터 유래하는 힌지 영역일 수 있으나, 상기 항원 결합 부위와 막통과 도메인, 그리고 세포내 신호전달 도메인을 세포막 사이로 연결 가능한 것이라면 어느 것이든 제한없이 이용될 수 있다. 또한, 이는 이들 분자로부터의 야생형 힌지 영역일 수 있거나 변화될 수 있다.

[0047] 상기 스페이서 도메인은 연결 도메인으로 지칭될 수 있으며, 예컨대 CD28 유래의 힌지 도메인 및/또는 CD8 유래의 힌지 도메인을 포함하는 것일 수 있으며, 상기 CD28 유래의 힌지 도메인 및/또는 CD8 유래의 힌지 도메인의 전체 또는 일부를 포함하는 것일 수 있다.

[0048] 상기 힌지 도메인 및/또는 스페이서 도메인은, Myc 에피토프, CD8 힌지 도메인 및 Fc로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있으며, 구체적으로 Myc 에피토프 및 CD8 힌지 도메인을 포함하는 것일 수 있다.

[0049] 상기 막통과 도메인(transmembrane domain)은, 세포외 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 서로 연결하여 융합시키고 면역 세포의 원형질 막에 키메릭 항원 수용체를 고정시키는 역할을 하는 일부 영역을 의미한다. 상기 막통과 도메인은 천연, 합성, 반합성 또는 재조합 공급원으로부터 유래하는 것일 수 있다. 상기 막통과 도메인은 T-세포 수용체(TCR)의 알파(α), 베타(β) 또는 제타(ζ) 사슬, CD28, CD3 엡실론(ε), CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 및 CD154로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0050] 상기 막통과 도메인은 링커(linker)를 통해 상기 세포외 도메인에 부착될 수 있다. 예를 들어, 링커는 2 내지

10개 아미노산 길이의 짧은 올리고펩타이드 또는 폴리펩타이드 링커일 수 있으며, 예컨대 글리신(G)-세린(S) 이중체(doublet)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0051] 상기 세포내 신호전달 도메인은, 면역세포의 기능(예를 들어, 키메릭 항원 수용체와 항원이 결합된 표적 세포에 대한 세포독성(또는 세포용해 활성) 인자의 방출을 포함하는 활성화, 사이토카인 생성, 증식 및 세포독성 또는 세포용해 활성, 또는 상기 항원 결합으로 유발된 기타 세포 반응)을 유발하기 위해, 상기 키메릭 항원 수용체와 항원의 결합에 따라 발생하는 신호를 면역세포의 내부로 전달하는 역할을 하는 부분에 해당한다. 상기 세포내 신호전달 도메인은 작동 기능 신호를 전달하고 세포가 특수한 기능을 수행하도록 지시하는 단백질의 일부일 수 있다.

[0052] 상기 세포내 신호전달 도메인은, 기존에 키메릭 항원 수용체의 발전 과정에서 이용되었던 세포내 신호전달 도메인이 이용될 수 있다. 구체적으로, 1세대 CAR(키메릭 항원 수용체)에서 이용되었던 CD3ζ만을 포함할 수 있다. 그리고 2세대 CAR에서 이용되었던 것처럼, 면역세포에 대한 반응성 향상을 위하여 공자극 도메인(CD28 또는 CD137/4-1BB)과 CD3ζ를 결합한 형태가 이용될 수 있다. 또한, 3세대 CAR에서 이용되었던 것처럼 두 가지 이상의 공자극 도메인이 이용될 수 있으며, 이 때 생체 내 CAR을 포함하는 면역세포의 확장 및 지속성 달성을 위해 공자극 도메인을 4-1BB, CD28 또는 OX40 등과 결합시킬 수 있다. 나아가, 4세대 CAR에서 이용하였던 것처럼 IL-12 또는 IL-15와 같은 사이토카인을 암호화하는 추가 유전자를 포함하여, 사이토카인의 CAR 기반 면역단백질이 추가로 발현될 수 있도록 할 수 있으며, 5세대 CAR에서 이용하였던 것처럼 면역세포 강화를 위해 인터루킨 리셉터 체인, 예를 들어, IL-2Rβ를 추가로 포함할 수 있다.

[0053] 상기 세포내 신호전달 도메인은 T-세포 수용체(TCR) 제타(ζ), FcR 감마(γ), FcR 베타(β), CD3 감마(γ), CD3 델타(δ), CD3 엡실론(ε), CD3 제타(ζ), CD5, CD22, CD79a, CD79b 및 CD66d로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나를 포함할 수 있다

[0054] 보다 구체적으로, 상기 세포내 신호전달 도메인에 의한 상기 면역세포의 활성화는, 세포내 신호전달 도메인의 2개 상이한 부류에 의해 매개될 수 있다. 예를 들면, 항원-의존성 일차 활성화를 개시하는 1차 신호전달 도메인 및 2차 신호를 제공하기 위해 항원-독립적 방식으로 작용하는 공자극 신호전달 도메인에 의해 면역세포 활성화가 매개될 수 있다. 따라서, 상기 세포내 신호전달 도메인은 1차 신호전달 도메인(primary signaling domain) 및 공자극 신호전달 도메인(co-stimulatory signaling domain)을 포함할 수 있다.

[0055] 상기 1차 신호전달 도메인(primary signaling domain)이란, 면역세포 활성화를 자극 또는 억제 방식으로 조절하는 신호전달 도메인을 의미한다. 자극 방식으로 작용하는 1차 신호전달 도메인은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티브 또는 ITAM으로 공지되어 있는 신호전달 모티브를 함유할 수 있다. 1차 신호전달 도메인을 함유하는 ITAM은 TCRζ, FcRγ, FcRβ, CD3γ, CD3δ, CD3ε, CD3ζ, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD66d 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 보다 구체적으로, 상기 1차 신호전달 도메인은 CD3ζ(zeta)일수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0056] 상기 공자극 신호전달 도메인(co-stimulatory signaling domain)이란, 공자극 분자의 세포내 신호전달 도메인을 의미한다. 상기 공자극 신호전달 도메인은 CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, 4-1BB(CD137), OX40(CD134), CDS, ICAM-1, ICOS(CD278), LFA-1(CD11a/CD18), GITR, MyD88, DAP10, DAP12, PD-1, LIGHT, NKG2C, CD5, CD83 등으로 이루어진 군으로부터 선택되는 공자극 신호전달 도메인(co-stimulatory signaling domain)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로, 상기 공자극 분자는 DAP10일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0057] 상기 키메라 항원 수용체는 2개 이상의 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있으며, 2개 이상의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 경우에는 세포내 신호전달 도메인들이 서로 직렬로 연결될 수 있다. 또는 2 내지 10개의 아미노산으로 이루어지는 폴리펩티드 링커를 통해 연결될 수도 있고, 상기 링커 서열은 예컨대 글리신-세린 연속 서열일 수 있다. 상기 링커는 예를 들어, (GS)n, (GGS)n, (GSGGS)n 또는 (GnS)m(n, m은 각각 1 내지 10)을 포함할 수 있으며, 예를 들어 (GnS)m(n, m은 각각 1 내지 10)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0058] 상기 키메라 항원 수용체는 면역세포의 면역 기능 촉진 인자를 추가로 포함할 수 있으며, 예를 들어 상기 면역세포의 면역 기능 촉진 인자는 인터루킨 신호 서열(interleukin signal sequence)일 수 있다. 상기 인터루킨 신호 서열은 IL(interleukin)-12, IL-8, IL-2 등의 발현을 유도하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 면역세포가 T 세포일 경우, 상기 면역 기능 촉진 인자는 IL-7, CCL19 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0059] 한편, 상기 키메라 항원 수용체는 도메인 노출을 위한 시그널(신호) 펩티드를 더 포함할 수 있다. 상기 시그널(신호) 펩티드는 임의의 분비된 또는 막통과 단백질의 일종일 수 있고, 이는 키메릭 항원 수용체가 세포막 또는 세포 표면으로 수송되도록 지시하고, 정확한 위치 선정을 제공할 수 있다. 구체적인 종류는 CD8 알파 또는 마우스 경쇄 카파 신호 펩타이드(mouse light kappa signal peptide)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0060] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 앞서 설명한 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 4종(#1, #4, #11 및 #14)의 항-CD5 항체의 scFv를 세포외 도메인에 포함하고, 이와 Myc 및 힌지 도메인으로 연결된 CD28을 막통과 도메인 및 세포내 신호전달 도메인으로 포함하며, CD3-zeta 및 DAP10을 세포내 신호전달 도메인으로 연결한 형태의 키메릭 항원 수용체를 설계하여 본 발명의 키메릭 항원 수용체를 제조하였다(CD5-CAR).

[0061] 앞서 설명한 것처럼, 본 발명의 키메릭 항원 수용체는 면역세포의 표면에서 발현하여 CD5를 인식해 결합하게 되면 면역세포의 세포독성 또는 세포용해 활성을 향상시키거나 면역세포의 사이토카인 분비를 촉진하도록 유도할 수 있다. 따라서, CD5를 발현하는 암 세포가 존재할 때 상기 키메릭 항원 수용체의 항원 결합 부위가 항원을 인식하여 결합할 경우, 신호전달에 의해 면역세포의 세포독성 또는 세포용해 활성 향상 및/또는 사이토카인 분비 촉진이 유도될 수 있어, 암 세포를 공격하는 세포독성 효능 또는 세포용해 효능이 우수한 키메릭 항원 수용체로 유용하게 이용될 수 있다.

[0062] 본 발명의 다른 측면은, 상기 키메릭 항원 수용체를 발현시키기 위한 폴리뉴클레오티드 및 발현 벡터를 제공한다.

[0063] 상기 폴리뉴클레오티드는 상기 키메릭 항원 수용체를 암호화하는 염기서열을 포함한다.

[0064] 본 발명에서 용어 "폴리뉴클레오티드"는 DNA(gDNA 및 cDNA) 및 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 것으로, 기본 구성단위인 뉴클레오티드는 자연의 뉴클레오티드 뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함한다.

[0065] 상기 키메릭 항원 수용체를 암호화한다는 것은, 상기 폴리뉴클레오티드가 전사, 번역 등의 통상적인 단백질 발현 과정을 거쳐, 본 발명의 키메릭 항원 수용체의 아미노산 서열을 갖는 단백질이 합성될 수 있는 유전 정보가 암호화되어 있다는 것을 의미한다. 이 때 상기 키메릭 항원 수용체와 완전히 동일한 아미노산 서열을 갖는 단백질뿐만 아니라, 앞서 설명한 것과 같이 상기 단백질과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 단백질이나, 상기 단백질과 동일 및/또는 유사한 활성을 갖는 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드까지 본 발명의 범위에 포함될 수 있다.

[0066] 구체적으로, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 상기 CD5에 특이적으로 결합하는 항-CD5 항체의 항원 결합 단편을 암호화하는 염기서열을 포함하는 것일 수 있다.

[0067] 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 상기 항원 결합 단편을 암호화하는 염기서열뿐만 아니라 이와 연결된 다른 세포외 도메인 부분, 상기 막통과 도메인 및/또는 상기 세포내 신호전달 도메인을 암호화하는 염기서열을 포함하는 것일 수 있다.

[0068] 상기 항체, 항원 결합 단편, 세포외 도메인, 막통과 도메인, 세포내 신호전달 도메인 등 상기 키메릭 항원 수용체에 대한 설명은 앞서 이들에 대해 설명한 것과 동일하다.

[0069] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 상기 나열된 염기서열과 실질적으로 동일한 염기서열을 포함할 수 있다. 상기 실질적으로 동일한 염기서열이란, 예컨대 전사 및 번역되었을 때 동일한 아미노산이 합성될 수 있는 경우를 포함하며, 상기 나열된 염기서열들과 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 또는 99.5% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0070] 상기 키메라 항원 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 이를 도입시켜 발현시키고자 하는 생물의 종류와 상기 생물의 전사, 번역 등 발현 시스템에 따라, 최적화된 염기서열을 포함할 수 있다. 이는 코돈의 축퇴성(degeneracy)에서 기인한 것으로, 이에 따라 발현되는 단백질을 암호화할 수 있는 다양한 조합의 뉴클레오티드 서열이 존재할 수 있으며 이들은 모두 본 발명의 범위에 포함된다. 상기 코돈 최적화에 따른 폴리뉴클레오티드의 변형은, 본 발명의 키메릭 항원 수용체를 발현시켜 적용시키고자 하는 생물의 종류에 따라 결정될 수 있으며, 예컨대 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 포유동물, 영장류의 코돈 선택에 최적화하여 변형된 폴리뉴클레오티드일 수 있고, 더욱 구체적으로는 인간으로부터 발현시켜 작용하기에 적합하도록 최적화되어 변형된 것일 수 있다.

[0071] 본 발명의 발현 벡터는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0072] 상기 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 상기 키메릭 항원 수용체를 암호화하는 염기서열을 포함하므로, 이를 포함하는 상기 발현 벡터는 상기 키메릭 항원 수용체를 발현시켜 제조하기 위해 이용될 수 있으며, 상기 키메릭 항원 수용체가 발현될 수 있도록 상기 폴리뉴클레오티드를 특정 세포 또는 생물로 이동시켜주는 역할을 하거나 상기 폴리뉴클레오티드를 보관, 저장하기 위해 이용될 수 있다.

[0073] 상기 "벡터(vector)"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자, 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 또한, 상기 "발현 벡터"는 통상 이종의 DNA의 단편이 삽입된 재조합 캐리어(recombinant carrier)로서 일반적으로 이중 가닥의 DNA의 단편을 의미한다. 여기서, 이종 DNA는 숙주 세포에서 천연적으로 발견되지 않는 DNA인 이형 DNA를 의미한다. 발현 벡터는 일단 숙주 세포내에 있으면 숙주 염색체 DNA와 무관하게 복제할 수 있으며 벡터의 수 개의 카피 및 그의 삽입된(이종) DNA가 생성될 수 있다.

[0074] 상기 발현 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다.

[0075] 예를 들어, 상기 발현 벡터가 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pLλ 프로모터, pRλ 프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로모터, trp 프로모터 및 T7 프로모터 등), 번역의 개시를 위한 리보솜 결합 자리 및 전사/번역 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 E.coli(예를 들어, HB101, BL21, DH5α 등)가 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위(Yanofsky, C, J Bacteriol, (1984) 158:1018-1024), 그리고 파지 λ의 좌향 프로모터(pLλ 프로모터, Herskowitz, I and Hagen, D, Ann Rev Genet, (1980) 14:399-445)가 조절부위로서 이용될 수 있다. 숙주 세포로서 바실러스 균이 이용되는 경우, 바실러스 츄린겐시스의 독소단백질 유전자의 프로모터(Appl Environ Microbiol (1998) 64:3932-3938; Mol Gen Genet (1996) 250:734-741) 또는 바실러스균에서 발현 가능한 어떠한 프로모터라도 조절부위로 이용될 수 있다. 상기 발현 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예를 들어, pCL, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHC79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지(예를 들어, λgt4λB, λ-Charon, λΔz1 및 M13 등) 또는 바이러스(예를 들어, SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.

[0076] 상기 발현 벡터가 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터(예를 들어, 메탈로티오닌 프로모터, β-액틴 프로모터, 사람 헤로글로빈 프로모터 및 사람 근육 크레아틴 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예를 들어, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 75K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, HSV의 tk 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 몰로니 바이러스의 프로모터 엡스타인바 바이러스(EBV)의 프로모터 및 로우스 사코마 바이러스(RSV)의 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 가질 수 있다. 상기 발현 벡터는 CMV 프로모터를 갖는 것일 수 있다.

[0077] 또한, 상기 발현 벡터는, 이로부터 발현되는 항체의 정제를 용이하게 하기 위하여 다른 서열과 융합될 수 있다. 융합되는 서열은, 예컨대 글루타티온 S-트랜스퍼라제(Pharmacia, USA), 말토스 결합 단백질(NEB, USA), FLAG(IBI, USA) 및 6x His(hexahistidine; Quiagen, USA) 등이 있다. 또한, 본 발명의 발현 벡터에 의해 발현되는 단백질이 키메릭 항원 수용체이므로 이의 특성을 고려할 때, 정제를 위한 추가적인 서열 없이도 발현된 단백질을 단백질 A 컬럼 등을 통하여 용이하게 정제할 수도 있다.

[0078] 상기 발현 벡터는 선택표지로서 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자를 포함할 수 있다.

[0079] 또한, 상기 발현 벡터는 형질주입하고자 하는 유전자의 발현을 촉진시키는 프로모터(promoter)와 전사에 필요한 기본 인자(Basal element)뿐만 아니라, 발현의 촉진 및 조절에 사용될 수 있는 인핸서(enhancer)를 더 포함할 수 있다.

[0080] **2. CD5에 대한 키메릭 항원 수용체를 표면에 발현하는 면역세포**

[0081] 본 발명의 다른 측면은 CD5를 발현하는 암 세포에 대해 향상된 세포독성 또는 세포용해 활성을 나타내는 특징이

있는 면역세포를 제공한다.

[0082] 상기 면역세포는, 앞서 설명한 본 발명의 상기 키메릭 항원 수용체를 표면에 발현한다.상기 키메릭 항원 수용체는 앞서 "*1. 신규한 항-CD5 항체, 이의 항원 결합 단편, 그리고 이를 포함하는 키메릭 항원 수용체(Chimeric antigen receptor; CAR) 및 이를 발현시키기 위한 폴리뉴클레오티드 및 발현 벡터*"에서 이에 대해 설명한 것과 동일하다. 구체적으로, 상기 키메릭 항원 수용체는 암 세포에서 발현되는 CD5 항원에 대해 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 부위를 포함할 수 있다.

[0083] 상기 키메릭 항원 수용체가 면역세포의 표면에 "발현"된다는 것은 키메릭 항원 수용체를 암호화하는 핵산의 첨가 또는 변형에 의해 조작된 임의의 면역세포를 의미한다. 따라서, 상기와 같이 면역세포의 표면에 키메릭 항원 수용체를 발현시키기 위하여, 상기 키메릭 항원 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 이를 포함하는 발현 벡터를 상기 면역세포에 형질주입(트렌스펙션; transfection) 또는 형질도입(트렌스덕션; transduction)할 수 있다. 상기 형질주입은 칼슘 포스페이트-DNA 공침전법, DEAE-덱스트란-매개 형질감염법, 폴리브렌-매개 형질감염법, 전기충격법, 미세주사법, 리포좀 융합법, 리포펙타민 및 원형질체 융합법 등의 해당분야에 공지된 여러 방법에 의해 수행될 수 있다. 또한, 상기 형질주입은 감염(infection)을 수단으로 하여 바이러스 또는 바이러스 벡터 입자를 사용하여 세포 내로 유전자를 전달시키는 것을 의미한다. 본 명세서에서 형질주입과 형질도입은 혼용될 수 있으나, 양자 큰 의미로 숙주세포에 외래 유전자 전달의 형질전환(transformation)으로 해석됨이 바람직하고, 형질주입 또는 형질도입에 의해 외래 유전자가 도입된 세포는 형질전환체라고 한다.

[0084] 상기 면역세포는 면역을 유도하여 목적하는 치료 효과를 유발할 수 있는 세포라면 제한 없이 이용될 수 있으며, 말초혈액, 제대혈, 골수, 종양침윤 림프구, 림프절조직 또는 흉선 조직으로부터 획득될 수 있고, 태반세포, 배아줄기세포, 유도만능줄기세포 또는 조혈줄기세포로부터 분화시켜 획득할 수 있다. 또한, 상기 면역세포는 인간, 원숭이, 침팬지, 개, 고양이, 마우스, 래트 및 그의 유전자삽입 종뿐만 아니라 확립세포주로부터 획득할 수 있다.

[0085] 면역세포 획득방법은 임의의 당업계에 알려진 수단을 사용할 수 있고, 자가, 동종 또는 이종으로부터 획득할 수 있다. "자가"는 이후에 개체에게 재도입될 동일한 개체로부터 파생된 모든 세포를 의미하고, "동종"은 세포가 도입되는 개체와 동일한 종의 다른 동물로부터 유래된 모든 세포를 의미하는 것이며, "이종"은 다른 종의 동물에서 유래된 세포를 의미한다.

[0086] 특히, 상기 면역세포는 자연살해 세포(Natural Killer cell, NK cell), T 세포, 자연살해 T 세포(natural killer T cell, NKT cell), 사이토카인 유도 살해세포(Cytokine Induced Killer cell; CIK), 마크로파지, 수지상세포 등에서 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 따라서, 본 발명에 따른 키메라 항원 수용체를 세포 표면에 발현하는 면역세포는 CAR-NK 세포(Chimeric Antigen Receptor Natural Killer Cell), CAR-T 세포(Chimeric Antigen Receptor T Cell), CAR-NKT 세포(Chimeric Antigen Receptor Natural killer T Cell), CAR-대식세포(Chimeric Antigen Receptor Macrophage) 등일 수 있다.

[0087] 본 발명에서 제공되는 면역세포는 통상적인 키메릭 항원 수용체의 표적 세포에 대한 반응 개시(on)/중지(off)를 조절할 수 있으므로, 후속 세포 요법, 치료 세포의 활성이 증가 또는 감소될 필요가 있는 상황에서 매우 유익할 수 있는 안전성 스위치를 포함한다. 예를 들어, 키메릭 항원 수용체를 발현하는 면역세포가 환자에게 제공되는 경우, 어떤 상황에서는 부작용, 예를 들어 탈표적(off-target) 독성이 있을 수 있다. 또는 예를 들어, 치료 세포가 종양 세포의 수 또는 종양 크기를 감소시키는 작용을 할 수 있고, 더 이상 필요하지 않을 수 있다. 이러한 상황에서는 치료세포가 더 이상 활성화되지 않도록 조절할 수 있다. 특히, 자연살해 세포에 키메릭 항원 수용체가 도입된 상기 CAR-NK 세포는, 기존의 T 세포를 기반으로 한 CAR-T 치료제를 이용하였을 때의 암 면역치료가 가지고 있는 지속적인 독성에 의한 문제점, 자가면역 질환의 위험, 이종세포 이식에 대한 이식편대숙주질환(GVHD)의 문제점, 비표적 독성 문제 등을 반응 개시(on)/중지(off)의 스위치를 통해 해결할 수 있을 뿐만 아니라, 다양한 암 세포를 표적할 수 있도록 하여 범용의 치료제로 활용가능한 장점이 있다.

[0088] 본 발명의 면역세포는, 암 세포에서 특이적으로 발현될 수 있는 CD5를 특이적으로 인식하여 결합할 수 있는 항체의 항원 결합 가변 단편(scFv)를 세포외 도메인으로 포함하는 키메릭 항원 수용체를, 세포 표면에 발현하고 있다. 따라서, 상기 CD5가 발현된 암 세포가 존재하는 경우 상기 키메릭 항원 수용체에 의해 신호전달이 발생할 수 있으며, 이를 통해 면역세포의 세포독성 또는 세포용해 활성이 더욱 향상되고 사이토카인의 분비량이 증가하게 된다. 그러므로, 본 발명의 면역세포는 암 세포를 공격해 이를 치료하는 활성을 가질 수 있다.

[0089] 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 본 발명의 CD5 특이적 항체 4종의 항원 결합 가변 단편을 세포외 도메인으로

포함하는 키메릭 항원 수용체를 자연살해 세포의 표면에 발현시켰다. 상기 각각의 4종의 자연살해 세포는 CD5를 발현하는 암 세포주인 MOLT4 세포나 CCRF-CEM, Jurkat 세포 등과 공배양되었을 때 세포독성(또는 세포용해 활성)이 향상되었고, 사이토카인의 분비량과 탈과립(degranulation) 정도가 현저하게 증가할 뿐만 아니라, CD5를 발현하는 정상세포가 포함된 MNC에 대해서는 감소된 세포독성을 나타내는 것으로 확인되어, 본 발명의 면역세포는 CD5를 발현하는 암 세포에 대해 선택적으로 탁월한 치료 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

[0090] **3. 본 발명 면역세포의 암에 대한 예방 또는 치료 용도**

[0091] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 면역세포를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0092] 상기 면역세포, 이로부터 발현되는 키메릭 항원 수용체 등에 관한 설명은, "*1. 신규한 항-CD5 항체, 이의 항원 결합 단편, 그리고 이를 포함하는 키메릭 항원 수용체(Chimeric antigen receptor; CAR) 및 이를 발현시키기 위한 폴리뉴클레오티드 및 발현 벡터*" 및 "*2. CD5에 대한 키메릭 항원 수용체를 표면에 발현하는 면역세포*" 항목에서 이들에 대해 설명한 것과 동일하므로, 반복 설명을 피하기 위해 기재를 생략한다.

[0093] 본 발명에서 용어 "암"은 "종양"은 동일한 의미로 사용되며, 전형적으로 조절되지 않은 세포 성장/증식을 특징으로 하는 포유동물의 생리학적 상태를 지칭하거나 의미한다.

[0094] 본 발명의 상기 약학적 조성물로 치료할 수 있는 암 또는 암종은 특별히 제한되지 않으며, 고형암 및 혈액암을 모두 포함한다. 특히, 상기 백혈병 또는 림프종 등과 같은 혈액암일 수 있고, 구체적으로 흉선 암종(thymic carcinoma), 비-호지킨 림프종(non-Hodgkin lymphoma), 광범위큰세포림프종(diffuse large cell lymphoma), 소림프구성세포 림프종(small lymphocytic lymphoma), T-세포 종양(T-cell neoplasma), 말초 T-세포 림프종(peripheral T-cell lymphoma), 외투세포림프종(mantle cell lymphoma), T-세포 급성림프구성백혈병(T-cell acute lymphobalstic lymphoma), 만성림프성백혈병(chronic lymphoblastic lymphoma) 등에서 선택된 것일 수 있다.

[0095] 또한, 본 발명의 상기 약학적 조성물은, 치료 대상인 개체의 종양 세포의 수에 비해 상기 면역세포의 수가 1배 내지 10배, 2배 내지 10배, 또는 5배 내지 8배로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0096] 한편, 암의 치료에는 화학요법 및 방사선 요법을 병행하는 것이 일반적이다. 화학요법에 이용되는 항암제는 증식이 활발한 세포의 세포사멸을 유도하고 항암제의 치료 효과를 높이기 위한 방사선 조사는 이러한 세포사멸을 증가시킨다. 이때 항암제 및 방사선에 의해 세포사멸이 유도되는 세포는 암세포에 한정되는 것이 아니며, 면역치료를 위해 개체에 투여된 면역세포치료제에도 영향을 미칠 수 있다.

[0097] 화학요법은 CHOP(cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone), EPOCH(etoposide, vincristine, doxorubicin, cyclophosphamide, prednisone) 또는 임의의 다른 여러약물 요법을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0098] 본 발명에서 "세포치료제"는 개체로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품(미국 FDA규정)으로서, 세포 혹은 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가, 동종, 또는 이종 세포를 체외에서 증식 선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 의미한다.

[0099] 한편, 본 발명의 약학적 조성물은 약학적 또는 약제학적으로 허용되는 담체를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 '약학적으로 허용 가능한'의 의미는 유효성분의 활성을 억제하지 않으면서 적용(처방) 대상이 적응 가능한 이상의 독성을 지니지 않는다는 것이며, 상기 '담체'는 세포 또는 조직 내로의 화합물의 부가를 용이하게 하는 화합물로 정의된다.

[0100] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 단독으로 또는 어떤 편리한 담체 등과 함께 혼합하여 투여될 수 있고, 그러한 투여 제형은 단회 투여 또는 반복 투여 제형일 수 있다. 상기 약학 조성물은 고형 제제 또는 액상 제제일 수 있다. 고형 제제는 산제, 과립제, 정제, 캅셀제, 좌제 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 고형 제제에는 담체, 착향제, 결합제, 방부제, 붕해제, 활택제, 충진제 등이 포함될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 액상 제제로는 물, 프로필렌 글리콜 용액 같은 용액제, 현탁액제, 유제 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 적당한 착색제, 착향제, 안정화제, 점성화제 등을 첨가하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 산제는 본 발명의 유효성분인 다중불포화지방산의 트리-하이드록시 유도체와 유당, 전분, 미결정셀룰로오스 등 약제학적으로 허용 가능한 적당한 담체를 단순 혼합함으로써 제조될 수 있다. 과립제는 본 발명의 상기 다중불포화지방산의 트리-하

이드록시 유도체, 약학적으로 허용 가능한 적당한 담체 및 폴리비닐피롤리돈, 히드록시프로필셀룰로오스 등의 약학적으로 허용가능한 적당한 결합제를 혼합한 후, 물, 에탄올, 이소프로판올 등의 용매를 이용한 습식 과립법 또는 압축력을 이용한 건식 과립법을 이용하여 제조될 수 있다. 또한 정제는 상기 과립제를 마그네슘스테아레이트 등의 약학적으로 허용 가능한 적당한 활택제와 혼합한 후, 타정기를 이용하여 타정함으로써 제조될 수 있다.

[0101] 본 발명의 약학적 조성물은 치료해야 할 질환 및 개체의 상태에 따라 경구제, 주사제(예를 들어, 근육주사, 복강주사, 정맥주사, 주입(infusion), 피하주사, 임플란트), 흡입제, 비강투여제, 질제, 직장투여제, 설하제, 트랜스더말제, 토피칼제 등으로 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 투여 경로에 따라 통상적으로 사용되고 비독성인, 약학적으로 허용 가능한 운반체, 첨가제, 비히클을 포함하는 적당한 투여 유닛 제형으로 제제화될 수 있다.

[0102] 특히, 본 발명의 약학적 조성물은 주사용 앰플을 통해 사용될 수 있다. 상기 주사용 앰플은 사용 직전에 주사액과 혼합 조제할 수 있으며, 주사액으로는 생리 식염수, 포도당, 만니톨, 링거액 등을 사용할 수 있다. 이렇게 제조된 본 발명의 약학적 조성물 또는 제제는 당업계에서 통상적으로 사용하는 투여방법을 이용하여 이식 및 기타 용도에 사용되는 세포와 함께 혼합물의 형태로 투여될 수 있다. 유효성분의 실제 투여량은 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 한다.

[0103] 또한, 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여경로, 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예컨대, 상기 약학적 조성물은 매일 약 0.0001 ㎎/㎏ 내지 약 10 g/kg이 투여될 수 있으며, 약 0.001 ㎎/㎏ 내지 약 1 g/kg의 1일 투여 용량으로 투여될 수 있다. 그러나 상기 투여량은 상기 혼합물의 정제 정도, 환자의 상태(연령, 성별, 체중 등), 치료하고 있는 상태의 심각성 등에 따라 다양할 수 있다. 필요에 따라 편리성을 위하여 1일 총 투여량을 하루 동안 여러 번 나누어 투여될 수 있다.

[0104] 한편, 상기 조성물은 약학적 조성물 이외에도, 의약외품 조성물, 건강식품용 조성물 등의 형태일 수 있다.

[0105] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0106] 다만, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로서 본 발명의 범위가 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0107] **[실시예 1]**

[0108] **CD5에 대한 키메릭 항원 수용체를 표면에 발현하는 면역세포의 제조**

[0109] **[1-1] CD5에 특이적으로 결합하는 항체의 단일 사슬 가변 단편 제작**

[0110] CD5에 대해 특이적으로 결합할 수 있는 항-CD5 항체 서열 중에서, 특이적 결합에 중요한 역할을 하는 서열을 이용해 단일 사슬 가변 단편(single chain variable fragment; scFv) 4종(#1, #4, #11, #14)을 제조하였다.

[0111] 하기 표 1에 기재된 바와 같이, #1 scFv의 경우, 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1, 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄가변영역과, 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR1, 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR2 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄가변영역을 포함하도록 설계하였다. #4 scFv의 경우, 서열번호 10의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1, 서열번호 11의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄가변영역과, 서열번호 14의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR1, 서열번호 15의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR2 및 서열번호 16의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄가변영역을 포함하도록 설계하였다. #11 scFv의 경우, 서열번호 18의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1, 서열번호 19의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2 및 서열번호 20의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄가변영역과, 서열번호 22의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR1, 서열번호 23의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR2 및 서열번호 24의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄가변영역을 포함하도록 설계하였다. 그리고 #14 scFv의 경우, 서열번호 26의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1, 서열번호 27의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2 및 서열번호 28의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄가변영역과, 서열번호 30의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR1, 서열번호 31의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR2 및 서열번호 32의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄가변영역을 포함하도록 설계하였다.

표 1

[0112]

CD5 ScFv	서열
#1 (서열번호 35)	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVSAISGSGSSTHYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGSSSVYSEAMDLWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYATSNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTYPWTFGQGTKVEIKAS TGPGGQHHHHHHGAWSHPQFEK CDR1-VH (서열번호 2): DYGMH CDR2-VH (서열번호 3): AISGSGSSTHYADSVKG CDR3-VH (서열번호 4): GSSSVYSEAMDL CDR1-VL (서열번호 6): RASQDISSYLN CDR2-VL (서열번호 7): ATSNLQS CDR3-VL (서열번호 8): QQSYTYPWT
#4 (서열번호 36)	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISQSGGSTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLASVYGAAFDVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQTIASYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSFPWTFGQGTKVEIKAS TGPGGQHHHHHHGAWSHPQFEK CDR1-VH (서열번호 10): DYAMS CDR2-VH (서열번호 11): AISQSGGSTYYADSVKG CDR3-VH (서열번호 12): DLASVYGAAFDV CDR1-VL (서열번호 14): RASQTIASYLN CDR2-VL (서열번호 15): AASTLQS CDR3-VL (서열번호 16): QQSYSFPWT
#11 (서열번호 37)	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISSSGGSKYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRSYAGEYFDHWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQSISNWLNWYQQKPGKAPKLLIYDASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSFPWTFGQGTKVEIKASTG PGGQHHHHHHGAWSHPQFEK CDR1-VH (서열번호 18): SYAMS CDR2-VH (서열번호 19): AISSSGGSKYYADSVKG CDR3-VH (서열번호 20): RSYAGEYFDH CDR1-VL (서열번호 22): RASQSISNWLN CDR2-VL (서열번호 23): DASSLQS CDR3-VL (서열번호 24): QQSYSFPWT
#14 (서열번호 38)	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAISSSGSYTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGSYYGYYFDIWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQSISNDLNWYQQKPGKAPKLLIYDTSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSFPWTFGQGTKVEIKASTG PGGQHHHHHHGAWSHPQFEK CDR1-VH (서열번호 26): DYAMH CDR2-VH (서열번호 27): AISSSGSYTYYADSVKG CDR3-VH (서열번호 28): GSYYGYYFDI CDR1-VL (서열번호 30): RASQSISNDLN CDR2-VL (서열번호 31): DTSRLQS CDR3-VL (서열번호 32): QQSYSFPWT

[0113] **[1-2] 키메라 항원 수용체의 설계**

[0114] 상기와 같이 설계된 4종의 scFv를 항원 결합 부위로 포함하는 세포외 도메인으로 하고, 하기 표 2에 기재된 바와 같은 서열의 CAR 영역을 이용하여 자연살해 세포에 도입할 키메릭 항원 수용체(Chimeric antigen receptor; CAR)를 설계하였다. 구체적으로, 상기 4종의 scFv를 항원 결합 부위로 포함하는 세포외 도메인과, CD28을 막통과 도메인으로 하여 Myc 및 힌지 도메인으로 연결시켰고, 상기 막통과 도메인에 세포내 신호전달 도메인으로 CD3-zeta와 공자극 분자로 CD28 DAP10을 추가하여 연결함으로써, 소위 3세대 CAR로 분류되는 키메릭 항원 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 갖도록, 본 발명의 키메릭 항원 수용체를 설계하였다(각각 'CD5#1-CAR', 'CD5#4-CAR', 'CD5#11-CAR' 및 'CD5#14-CAR'라 하고, 이들을 통칭하여 'CD5-CAR'라고 함). 그리고, 이를 암호화하는 유전자 컨스트럭트의 염기서열을 렌티-바이러스 벡터(Clontech사, 632155)에 삽입하였다(도 1).

표 2

[0115]

CAR 영역	서열
Signal peptide (서열번호 43)	ACCATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTACTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGC
Myc (서열번호 44)	GCGAACAAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG
Hinge (서열번호 45)	GGGGTCACCGTCTCTTCAGCGCTGAGCAACTCCATCATGTACTTCAGCCACTTCGTGCCGGTCTTCCTGCCAGCGAAGCCC ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCATGC CGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGAT
Transmembrane (서열번호 46)	GTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGA GTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCAC AGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTC GCAGCCTAT
DAP10 (서열번호 47)	CTGTGCGCACGCCCACGCCGCAGCCCCGCCCAAGAAGATGGCAAAGTCTACATCAACATGCCAGGCAGGGGC
CD3ζ (서열번호 48)	TAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGG ACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCC TCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCG GAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGC CCTGCCCCCTCGCTAA

[0116] [1-3] CD5-CAR를 발현하는 자연살해 세포의 제조

[0117] 상기 실시예 1-2에서 준비한 렌티-바이러스 벡터를, 바이러스 패키징 벡터(viral packaging vector; PMDLg/RRE, RSV/REV, VSVG)와 함께 HEK293T 세포에 형질전환시키고, 그로부터 CD5-CAR를 발현하는 렌티바이러스를 얻었다. 상기 렌티바이러스를 초고속원심분리기를 이용하여 농축시키고, 농축된 상기 렌티바이러스를 HEK293T 세포에 감염시킨 뒤, CD5-CAR의 Myc 에피토프 양을 유동세포계수법(Flow cytometry)으로 확인하여 감염단위(Infection Unit)을 계산하였다. 감염다중도(Multiplicity of infection; MOI)가 30이 되도록 자연살해 세포 수 및 렌티바이러스의 양을 계산하고, CD5-CAR를 발현하는 렌티바이러스를 자연살해 세포(NK92 세포)에 spinoculation 방법(360g, 90min, RT)으로 감염시켰다. 상기와 같이 감염된 자연살해 세포를 37℃, 5% CO_2 조건에서 5시간 동안 배양한 후, 신선한 배양배지로 갈아주고, 3일 후에 제대로 감염된 자연살해 세포의 선별을 위하여 3ug/ml 농도의 퓨로마이신(puromycin)을 처리하여 배양을 계속 진행하였다.

[0118] 대조군으로, 감염되지 않은 자연살해 세포에도 퓨로마이신을 처리하고, 대조군에서 자연살해 세포가 퓨로마이신에 의해 모두 사멸할 때까지 퓨로마이신이 처리된 배지를 이용하여 배양을 계속하였다. 대조군의 자연살해 세포가 모두 사멸한 시점에서 감염된 자연살해 세포를 선별하고, 상기 선별된 자연살해 세포를 퓨로마이신이 없는 배지로 다시 배양하여 증식 또는 확장 시켰다. 상기 선별된 자연살해 세포의 증식 또는 확장에는 Alpha-MEM 함유 12.5% 우태아 혈청, 12.5% 말혈청, 0.2 mM 이노시톨, 0.1 mM 2-머캅토에탄올, 0.02 mM 폴릭산 및 200 U/ml 재조합 IL-2를 이용한 배지를 이용하하였다.

[0119] 상기와 같이 제작 및 선별된 CD5#1-CAR, CD5#4-CAR, CD5#11-CAR 및 CD5#14-CAR를 발현하는 자연살해 세포(각각 'CD5#1-CAR-NK 세포', 'CD5#4-CAR-NK 세포', 'CD5#11-CAR-NK 세포' 및 'CD5#14-CAR-NK 세포'라고 하고, 이들을 통칭하여 'CD5-CAR-NK 세포'라고 함)에, CD5-CAR의 myc에 특이적으로 결합하는 항-myc 항체(CST; 9B11)를 처리하고(4℃, 암소에서 30분), 유동세포계수법을 통하여 Myc의 발현을 확인함으로써 CD5-CAR의 발현을 확인하였다. 이때, 대조군으로는 CD5-CAR를 발현하지 않는 본래의 자연살해 세포를 사용하였다.

[0120] 그 결과, 도 2에 도시된 바와 같이, 대조군에 비해 4종의 CD5-CAR-NK 세포 모두에서 CD5-CAR가 제대로 발현되고 있음을 확인하였다.

[0121] [실시예 2]

[0122] CD5를 발현하는 암 세포에 대한, CD5-CAR를 발현하는 면역세포의 활성 확인

[0123] [2-1] CD5를 발현하는 암 세포에 대한, CD5-CAR-NK 세포의 활성 확인

[0124] CD5를 발현하는 것으로 알려진 암 세포주인 MOLT4와 CD5를 발현하지 않는 것으로 알려진 암 세포주 U937에 대하여, 상기 실시예 1-3에서 제조한 4종의 CD5-CAR-NK 세포들의 세포독성(cytotoxicity)(또는 세포살상능, 세포용

해 활성)을 칼세인 AM 분석법으로 확인하였다. 구체적으로, MOLT4 세포와 U937 세포에 칼세인-AM(life technologies; C1430)을 5ug/ml의 농도로 처리하여 반응시킨 후(37℃, 5% CO2, 암소에서 1시간), 칼세인으로 염색된 MOLT4 세포와 U937 세포에 상기 4종의 각 CD5-CAR-NK 세포를 각각 2:1, 1:1, 0.5:1의 비율(자연살해 세포 : 암 세포)로 처리하여 200ul의 RPMI1640(10% FBS)에서 반응시킨 다음(37℃, 5% CO_2에서 2시간) 상등액 100ul를 취하여 상등액 내에 존재하는 칼세인의 양을 확인하여, 각 조건에 따른 세포독성을 아래와 같은 방법으로 계산하였다.

[0125] 세포독성(%) = (조건에 따른 칼세인 release value-spontaneous value) / (maximum value-spontaneous value) x 100

[0126] 대조군으로는, 본 발명의 CD5-CAR를 암호화하는 유전자 컨스트럭트가 포함되지 않은 빈(empty) 렌티-바이러스 벡터 또는 본 발명의 CD5-CAR에서 세포외 도메인이 제거된 유전자 컨스트럭트가 포함된 렌티-바이러스 벡터를, 상기 실시예 [1-3]과 같은 방법으로 자연살해 세포에 도입하고 퓨로마이신으로 선별하는 과정을 거쳐 얻은 자연살해 세포를 이용하였고, 이들을 각각 'PURO NK 세포' 및 'dEcto-NK 세포'라고 한다.

[0127] 그 결과, 도 3에 도시된 바와 같이, CD5를 발현하는 MOLT4 세포에 대해서는 상기 4종의 CD5-CAR-NK 세포가 모두 대조군(PURO NK 세포 또는 dEcto-NK 세포)에 비해 훨씬 높은 세포독성을 나타내는 낼 뿐만 아니라, 이러한 세포독성이, 처리된 CD5-CAR-NK 세포에 농도의존적인 것으로 확인되었다. 그에 반해, CD5를 발현하지 않는 U937 세포에 대해서는 대조군과 상기 4종의 CD5-CAR-NK 세포 모두 세포독성을 거의 나타내지 못하는 것으로 확인되었다.

[0128] 또한, 상기와 같은 4종의 CD5-CAR-NK 세포 중 세포독성이 가장 우수한 것으로 확인된 2종(CD5#11-CAR-NK 세포, CD5#14-CAR-NK 세포)을 선별하여, CD5를 발현하는 것으로 알려진 다른 암 세포주인 CCRF-CEM, Jurkat와 CD5를 발현하지 않는 것으로 알려진 다른 암 세포주인 Daudi를 대상으로, 상기 2종의 각 CD5-CAR-NK 세포를 각각 2:1의 비율(자연살해 세포 : 암 세포)로 처리하여 상기와 동일한 방법으로 CD5-CAR-NK 세포의 세포 독성을 다시 한 번 확인하였다.

[0129] 그 결과, 도 4에 도시된 바와 같이, CD5를 발현하는 CCRF-CEM 세포와 Jurkat 세포에 대해서는 상기 2종의 CD5-CAR-NK 세포가 모두 대조군(PURO NK 세포 또는 dEcto-NK 세포)에 비해 훨씬 높은 세포독성을 나타낸 것으로 확인된데 반해, CD5를 발현하지 않는 Daudi 세포에 대해서는 대조군과 상기 2종의 CD5-CAR-NK 세포 모두 세포독성을 거의 나타내지 못하는 것으로 확인되었다.

[0130] 나아가, 상기 4종의 CD5-CAR-NK 세포에 대하여 사이토카인(cytokine)과 그래뉼(granule)의 분비를 확인하였다. 구체적으로, MOLT4 세포와 U937 세포에 Puro NK 세포, dEcto-NK 세포 또는 상기 실시예 1-3에서 제조한 4종의 CD5-CAR-NK 세포 각각을 1:1로 처리하여 RPMI1640(10% FBS)에서 반응시킨 다음(37℃, 5% CO_2 조건에서 12시간), 상등액을 모아서 상등액 내에 존재하는 사이토카인인 IFN-γ를 ELISA를 통해 확인하였다. 이때, Puro NK 세포, dEcto-NK 세포 및 CD5-CAR-NK 세포의 단독에서 분비되는 사이토카인의 양을 대조군으로 사용하였다.

[0131] 그 결과, 도 5a에 도시된 바와 같이, CD5를 발현하는 MOLT4 세포에 처리한 CD5-CAR-NK 세포에서만 INF-γ의 분비량이 현저히 향상된 것으로 확인되었다.

[0132] 또한, MOLT4 세포와 U937 세포에 Puro NK 세포, dEcto-NK 세포 또는 상기 실시예 1-3에서 제조한 4종의 CD5-CAR-NK 세포 각각을 1:1로 처리하여 RPMI1640(10% FBS)에서 반응시킨 다음(37℃, 5% CO_2 조건에서 4시간), 자연살해 세포를 선별할 수 있도록 항-CD56 항체를 처리하여 염색하고, 유동세포계수법을 이용하여 Puro NK 세포, dEcto-NK 세포 및 상기 4종의 CD5-CAR-NK 세포들에서 의 CD107a가 발현되는 정도를 분석하였다.

[0133] 그 결과, 도 5b에 도시된 바와 같이, INF-γ의 경우와 마찬가지로, CD5를 발현하는 MOLT4 세포에 처리한 CD5-CAR-NK 세포에서만 CD107a의 발현이 현저히 향상되어 있는 것으로 확인되었다.

[0134] **[2-2] CD5를 발현하는 정상 T 세포에 대한, CD5-CAR-NK 세포의 활성 확인**

[0135] 본 발명의 CD5-CAR-NK 세포가, CD5를 발현하는 암 세포가 아닌 CD5를 발현하는 정상 T 세포에 대해서는 어떠한 활성을 나타내는지 확인하기 위하여, 먼저 Ficoll-Paque® Gradient 방법을 이용하여 제대혈로부터 NMC(mononuclear cells)를 분리하였다. 구체적으로, 피콜(ficoll) 위에 제대혈이 섞이지 않도록 조심스럽게 넣고 상온에서 2000rpm으로 30분 동안 원심분리한 다음, 백혈구와 혈소판을 포함하는 버피코트(buffy coat)(Enriched MNC fraction)를 분리하였다. 상기와 같이 분리한 분획에 1X ACK(Ammonium-Chloride-

Potassium) 용해 완충용액을 37℃에서 10분간 처리하여 남아있는 적혈구를 깨어 순수한 MNC만을 분리해내었다.

[0136] 상기와 같이 분리된 MNC를 대상으로, 상기 실시예 1-3에서 제조한 CD5#11-CAR-NK 세포 및 CD5#14-CAR-NK 세포를 각각 1:1의 비율(자연살해 세포 : MNC)로 처리하여 상기 실시예 [2-1]에서와 동일한 방법으로 CD5-CAR-NK 세포의 세포독성을 확인하였다.

[0137] 그 결과, 도 6에 도시된 바와 같이, CD5#11-CAR-NK 세포와 CD5#14-CAR-NK 세포 모두, MNC에 대해서는 CD5를 발현하는 암 세포인 MOLT4에 비해 감소된 세포독성을 나타내는 것으로 확인되었다.

[0138] **[2-3] CD5-CAR의 발현량에 따른 CD5-CAR-NK 세포의 활성 확인**

[0139] 초고속유세포분리기(BD FACS Aria Fusion)를 이용하여, 상기 실시예 1-3에서 제조한 CD5#11-CAR-NK 세포 및 CD5#14-CAR-NK 세포 각각을 96웰 플레이트에 단일세포로 분리하였다. 그리고, 이중 서로 비슷한 속도로 증식하는 세포들을 반복적으로 선별하여 48웰 플레이트, 24웰 플레이트, 6웰 플레이트 및 25T 플라스크의 순으로 증식시켰다.

[0140] 그런 다음, 상기와 같이 분리된 CD5#11-CAR-NK 세포 및 CD5#14-CAR-NK 세포의 단일세포들 각각을 대상으로 CD5-CAR의 발현량을 확인하였고, 이를 기반으로 CD5-CAR의 발현 정도가 다른 세포주들을 구축 하였다(도 7a).

[0141] 그런 다음, CD5가 발현되는 암 세포주인 MOLT4와 상기 실시예 [2-2]에서 분리한 MNC를 대상으로, 상기와 같이 구축된 CD5#11-CAR-NK 세포 및 CD5#14-CAR-NK 세포의 단일세포주들을 각각 1:1의 비율(자연살해 세포 : 암 세포 또는 MNC)로 처리하여 상기 실시예 [2-1]에서와 동일한 방법으로 CD5-CAR-NK 세포의 개별 단일세포주들의 세포독성을 확인하였다.

[0142] 그 결과, 도 7b에 도시된 바와 같이, 비록 CD5-CAR-NK 세포의 개별 단일세포주들이 CD5를 발현하는 암 세포인 MOLT4에 대하여 향상된 세포독성을 나타내기는 하나, 세포독성 자체가 CD5-CAR의 발현량에 비례하지는 않는 것으로 확인되었다. 또한, 정상 T 세포가 포함된 MNC에 대해서는, CD5#11-CAR-NK 세포의 개별 단일세포주들은 모두 감소된 세포독성을 나타내었으나, CD5#14-CAR-NK 세포의 개별 단일세포주들은 세포독성이 그다지 감소하지 않은 것으로 확인되었다.

[0143] 상기와 같은 결과로부터, 상기 2종의 CD5-CAR-NK 세포 중 정상 T 세포에 보다 낮은 세포독성을 나타내는 CD5#11-CAR-NK 세포의 개별 단일세포주들을 대상으로, CD5를 발현하는 암 세포인 MOLT4에 대해서는 높은 세포독성을 나타내면서도 정상 T 세포가 포함된 MNC에 대해서는 낮은 세포독성을 나타내는 단일세포주를 선별하였고, 그 결과 도 7c에 도시된 바와 같이 L4 단일세포주를 선도세포주로 선택하였다.

[0144] **[2-4] primary 자연살해 세포 기반의 CD5-CAR-NK 세포의 활성 확인**

[0145] 나아가, 본 발명의 CD5-CAR-NK 세포를 NK92 세포가 아닌 primary 자연살해 세포를 이용하여 제작하였을 때도, 상기 실시예 [2-1] 내지 [2-3]에서 확인된 바와 같은 우수한 활성을 나타낼 수 있는지 확인하였다.

[0146] 이를 위하여, 먼저 도 8에 도시된 바와 같이 mRNA의 UTR을 조합하여 단백질 발현 및 mRNA 안전성을 향상시키는 구조를 갖는 CD5#11-CAR와 CD5#14-CAR의 mRNA 구조체를 설계 및 제작하였고, 상기와 같은 mRNA 구조체의 염기서열을 렌티-바이러스 벡터(Clontech사, 632155)에 삽입하였다. 그런 다음, mRNA 합성 Kit(EZ™ High Yield In Vitro Transcription kit)를 이용하여 상기 유전자 컨스트럭트를 주형으로 하여 도 8에 도시된 구조를 갖는 CD5-CAR의 mRNA를 합성하였다.

[0147] 상기와 같이 합성된 CD5-CAR의 mRNA를 전기천공법으로 primary 자연살해 세포 에 도입하였고, 7시간이 경과한 뒤에 CD5-CAR의 Myc에 특이적으로 결합하는 항-Myc 항체(CST; 9B11)를 처리하고(4℃, 암소에서 30분), 유동세포계수법을 통하여 Myc의 발현을 확인함으로써 CD5-CAR의 발현을 확인하였다.그 결과, 도 9에 도시된 바와 같이, primary 자연살해 세포에서 CD5-CAR가 제대로 발현되고 있음을 확인하였다.

[0148] 또한, CD5를 발현하는 것으로 알려진 암 세포주인 MOLT4, CCRF-CEM 및 상기 실시예 [2-2]에서 분리한 MNC를 대상으로, 상기와 같이 primary 자연살해 세포를 기반으로 제조한 2종의 CD5-CAR-NK 세포들을 각각 0.5:1, 1:1의 비율(primary 자연살해 세포 : 암 세포)로 처리하여 상기 실시예 [2-1]에서와 동일한 방법으로 primary 자연살해 세포 기반의 CD5-CAR-NK 세포의 세포독성을 확인하였다.

[0149] 그 결과, 도 10에 도시된 바와 같이, CD5를 발현하는 암 세포인 MOLT4 세포 및 CCRF-CEM 세포에 대해서는 상기 2종의 primary 자연살해 세포 기반의 CD5-CAR-NK 세포가 모두 대조군(PURO NK 세포 또는 dEcto-NK 세포)에 비해 훨씬 높은 세포독성을 나타내는 낼 뿐만 아니라, 이러한 세포독성이, 처리된 CD5-CAR-NK 세포에 농도의존적

인 것으로 확인되었다. 그에 반해, CD5를 발현하는 정상 T 세포가 포함된 MNC에대해서는 보다 감소된 세포독성을 나타내는 것으로 확인되었다.

[0150] **[실시예 3]**

[0151] **본 발명의 CD5-CAR-NK 세포의 활성을 조절하는 리간드 확인**

[0152] **[3-1] 본 발명의 CD5-CAR-NK 세포에 대한 리간드 스크리닝**

[0153] 정상 T 세포와 T 세포 기반 암 세포가 모두 CD5를 발현함에도 불구하고, 상기 실시예 2에서 확인된 바와 같이 본 발명의 CD5-CAR-NK 세포가 CD5를 발현하는 암 세포에 대하여 유독 높은 세포독성을 나타내는 이유를 알아보기 위해, 정상 세포인 상기 실시예 [2-2]에서 분리한 MNC와 CD5를 발현하는 암 세포인 MOLT4, CCRF-CEM, Jurkat에서 자연살해 세포의 활성화에 관여하는 리간드의 발현을 확인하였다. 상기 각각의 세포들에 각각의 리간드에 특이적으로 결합하는 항체를 처리하고, 유동세포계수법으로 해당 리간드의 발현 정도를 분석하였다.

[0154] 그 결과, 도 11a에 도시된 바와 같이, 여러 리간드들 중에서 B7-H6가 상기와 같은 3종의 암 세포 모두에서 유의적으로 높게 발현되어 있었고, 억제성(inhibitory) 리간드인 HLA class1이 정상 세포에 높게 발현되어 있는 것으로 확인되었다.

[0155] 또한, 상기 실시예 [2-2]에서 분리한 MNC를 대상으로, T 세포에 대한 마커인 CD3, 조혈모세포(Hematopoietic stem cell, HSC)에 대한 마커인 CD34, 골수성 세포(myeloid cell)에 대한 마커인 CD33 및 자연살해 세포에 대한 마커인 CD56에 각각 특이적으로 결합하는 항체를 처리하고, 유동계수법으로 각 백혈구 세포 종류별로 B7-H6의 발현 정도를 측정한 결과, 도 11b에 도시된 바와 같이 대부분의 정상 백혈구에서는 B7-H6가 발현되지 않는 것으로 확인되었다.

[0156] **[3-2] B7-H6 발현이 CD5-CAR-NK 세포의 활성에 미치는 영향 확인**

[0157] 상기 실시예 [3-1]에서 확인된 자연살해 세포 활성화 리간드인 B7-H6의 발현이 본 발명의 CD5-CAR-NK 세포의 활성에 어떠한 영향을 미치는지 확인하였다.

[0158] 이를 위해, CD5를 발현하는 암 세포주인 MOLT4 세포와 Jurkat 세포에 B7-H6의 유전자에 상보적인 서열을 가진 siRNA를 도입하여 도입시켜 일시적으로 B7-H6의 발현을 녹-다운(knock-down)시켰다. 그런 다음, 상기와 같이 B7-H6의 발현이 감소된 암 세포들을 대상으로, CD5#11-CAR-NK 세포를 각각 1:1의 비율(자연살해 세포 : 암 세포)로 처리하여 상기 실시예 [2-1]에서와 동일한 방법으로 CD5#11-CAR-NK 세포의 세포독성을 확인하였다.

[0159] 그 결과, 도 12에 도시된 바와 같이, B7-H6의 발현을 감소시키지 않은 암 세포들에 비하여, B7-H6의 발현을 감소시킨 암 세포들에서 CD5#11-CAR-NK 세포의 세포독성이 감소된 것으로 확인되었다.

[0160] 더 나아가, CD5를 발현하는 암 세포주인 MOLT4와 상기 실시예 [2-2]에서 분리한 MNC를 대상으로, CD5#11-CARNK 세포를 각각 1:1의 비율(자연살해 세포 : 암 세포 또는 MNC)로 처리하고, 유동세포계수법으로 2시간 마다 살아있는 MOLT4 세포와 MNC에서 B7-H6와 CD5의 발현 정도를 측정하였다.

[0161] 그 결과, 도 13에 도시된 바와 같이, 시간이 경과할수록 살아있는 MOLT4에서 B7-H6의 발현과 CD5의 발현이 감소하는 것으로 확인되었다. 상기와 같은 결과로부터, B7-H6 발현이 높은 세포가 상대적으로 CD5#11-CAR-NK 세포에 의해 먼저 살상되었음을 알 수 있다.

[0162] **[실시예 2] 및 [실시예 3]의 고찰**

[0163] 본 발명의 CD5-CAR-NK 세포는, CD5를 발현하는 암 세포에 대하여, 농도의존적으로 향상된 세포독성을 나타낼 뿐만 아니라, IFN-γ의 분비와 탈과립화 도 증가되는 것으로 확인된바, 이로부터 본 발명의 CD5-CAR-NK 세포가 CD5를 발현하는 암 세포에 대해 특이적으로 반응함을 알 수 있다.

[0164] CD5는 대부분의 T 세포 악성종양에서 발현되어 있지만 정상 T 세포에도 발현되는 것이고, 종래까지 개발된 CD5-CAR들은 모두 정상 T 세포에 대해 부작용을 나타내는 것으로 보고되어 있다. 그러나, 본 발명의 CD5-CAR-NK 세포의 경우, 제대혈에서 분리한 MNC들에 대하여 보다 감소된 세포독성을 나타내는 것으로 확인되었고, 특히 CD5#11-CAR-NK 세포가 CD5#14-CAR-NK 세포에 비해 더욱 낮은 세포독성을 나타내는 것으로 확인되었다. 상기와 같은 CD5#11-CAR-NK 세포와 CD5#14-CAR-NK 세포 간의 차이는 단일 사슬 가변 단편의 구조의 차이로 인한 것으로 사료되며, 서열번호 18의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1, 서열번호 19의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2 및 서열번호 20의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄가변영역과, 서열번호 22의 아미노산 서열을 갖

는 경쇄 CDR1, 서열번호 23의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR2 및 서열번호 24의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄가변영역을 포함하는 #11 ScFv가 안전성에 더 유리한 효과를 가진다고 판단된다. 나아가, CD5-CAR-NK 세포들을 단일 세포로 분리 및 증식하여 확립한 개별 세포주의 세포독성 평가에서도 비슷한 양상이 나타났으며, 특히 CD5#11-CAR-NK 세포의 경우 CD5를 발현하는 암 세포에 대한 세포독성은 대조군에 비해 약 10배 정도 높은데 반해 CD5를 발현하는 정상세포에 대한 세포독성은 대조군에 비해 약 2배 정도 밖에 상승되지 않은 것으로 확인되었다. 상기와 같은 결과로부터, 본 발명의 CD5#11-CAR-NK 세포는 기존에 보고되었던 CD5-CAR들에 비해 안전성이 훨씬 높은 것으로 판단된다. 또한, NK92 세포에 영구적으로 발현시킨 CD5-CAR뿐만 아니라 primary 자연살해 세포에 CD5-CAR의 mRNA를 도입하여 일시적으로 CD5-CAR를 발현시킨 primary 자연살해 세포 기반의 CD5-CAR-NK 세포 역시도 CD5를 발현하는 암 세포에 대한 세포독성을 가짐을 보여줌으로써 CD5를 발현하는 정상세포까지 감소되는 부작용을 낮출 수 있는 가능성을 확인하였다.

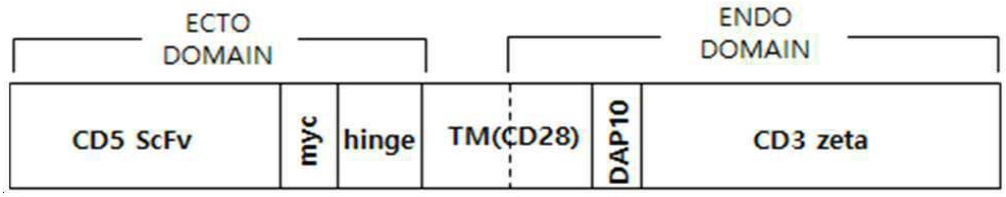
[0165] 한편, 정상세포와는 달리 CD5를 발현하는 암 세포에서, 자연살해 세포의 활성화에 관여하는 여러 리간드들 중 B7-H6가 특히 높게 발현되어 있음을 확인하였고, 이로부터 B7-H6의 발현 차이로 인해 본 발명의 CD5-CAR-NK 세포가 CD5를 발현하는 암 세포와 정상세포에 다르게 반응하는 것으로 예상하였다. 나아가, CD5를 발현하는 암 세포에서 B7-H6의 발현량을 조절한 경우에, 본 발명의 CD5-CAR-NK 세포의 세포독성이 B7-H6의 발현량에 따라 변함을 확인하였고, 이로부터 B7-H6가 본 발명의 CD5-CAR-NK 세포의 활성에 주요한 요인으로 작용하며 CD5를 발현하는 암 세포에 상대적으로 높게 발현되어 있기 때문에 본 발명의 CD5-CAR-NK 세포가 정상세포보다 암 세포에 먼저 반응하는 것임을 알 수 있다.

[0166] 요컨대, CD5에 대한 항체의 CDR 서열 차이에 따른 CD5-CAR의 활성 차이로 인해 CD5를 발현하는 암 세포와 정상세포에 대한 세포독성이 완전히 차별화될 수 있고, CD5-CAR의 발현 정도에 따라 각기 다른 세포독성을 가진 단일세포주를 활용하여 암 세포에 대해서는 높은 항암효과를 보이는 동시에 정상세포에 대해서는 반응성 낮은 T 세포 혈액암에 대한 새로운 치료제의 개발이 가능할 것으로 판단된다.

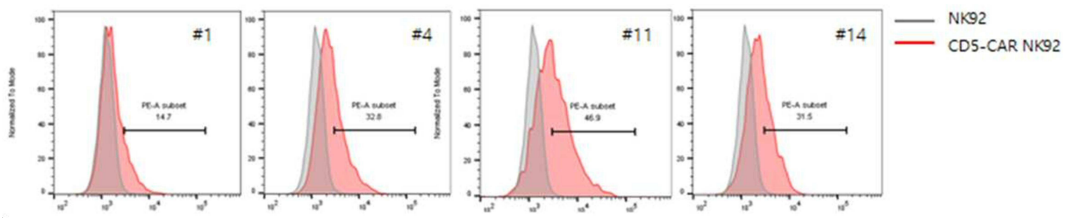
[0167] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

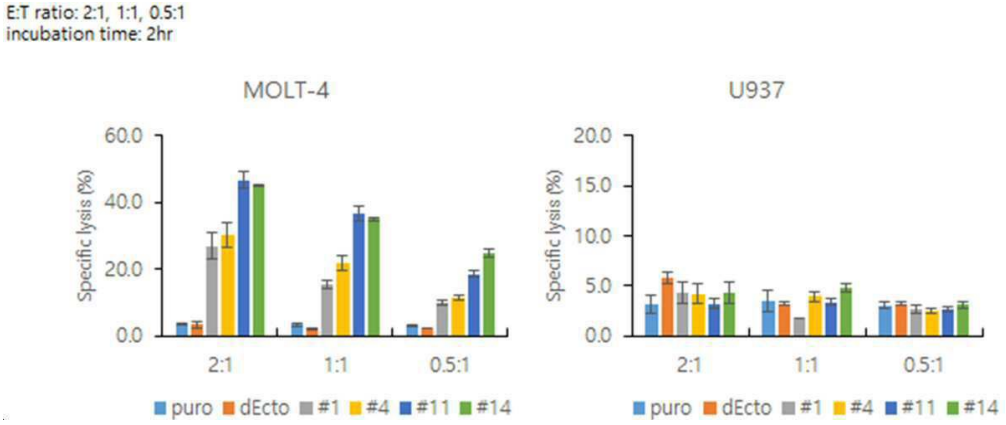
도면1



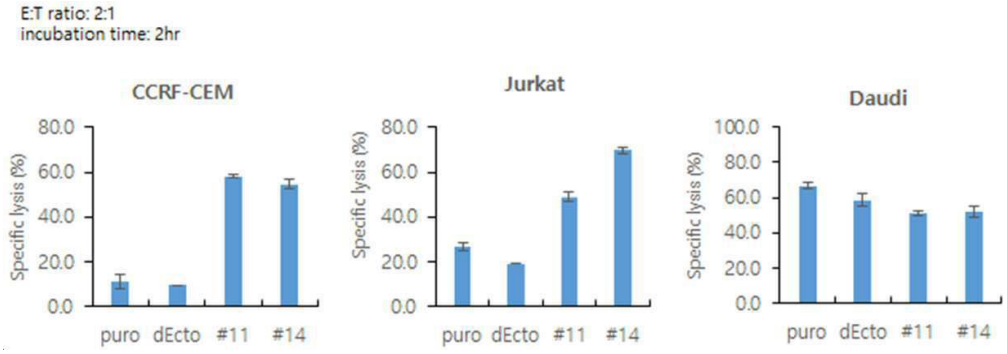
도면2



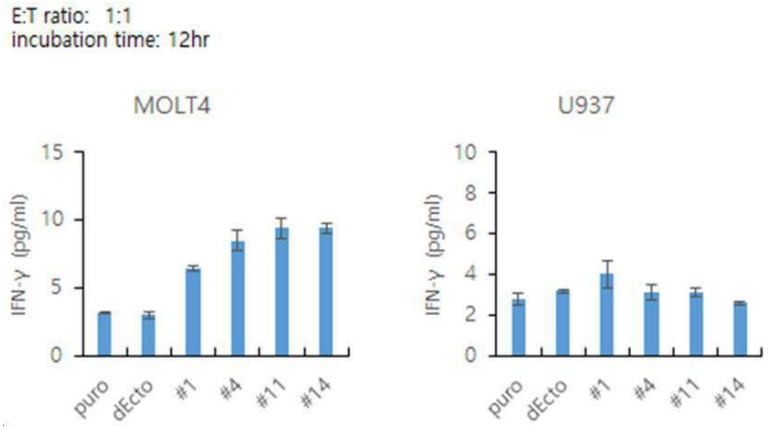
도면3


E:T ratio: 2:1, 1:1, 0.5:1
incubation time: 2hr
MOLT-4
U937
Specific lysis (%)
60.0
40.0
20.0
0.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
2:1
1:1
0.5:1
puro
dEcto
#1
#4
#11
#14

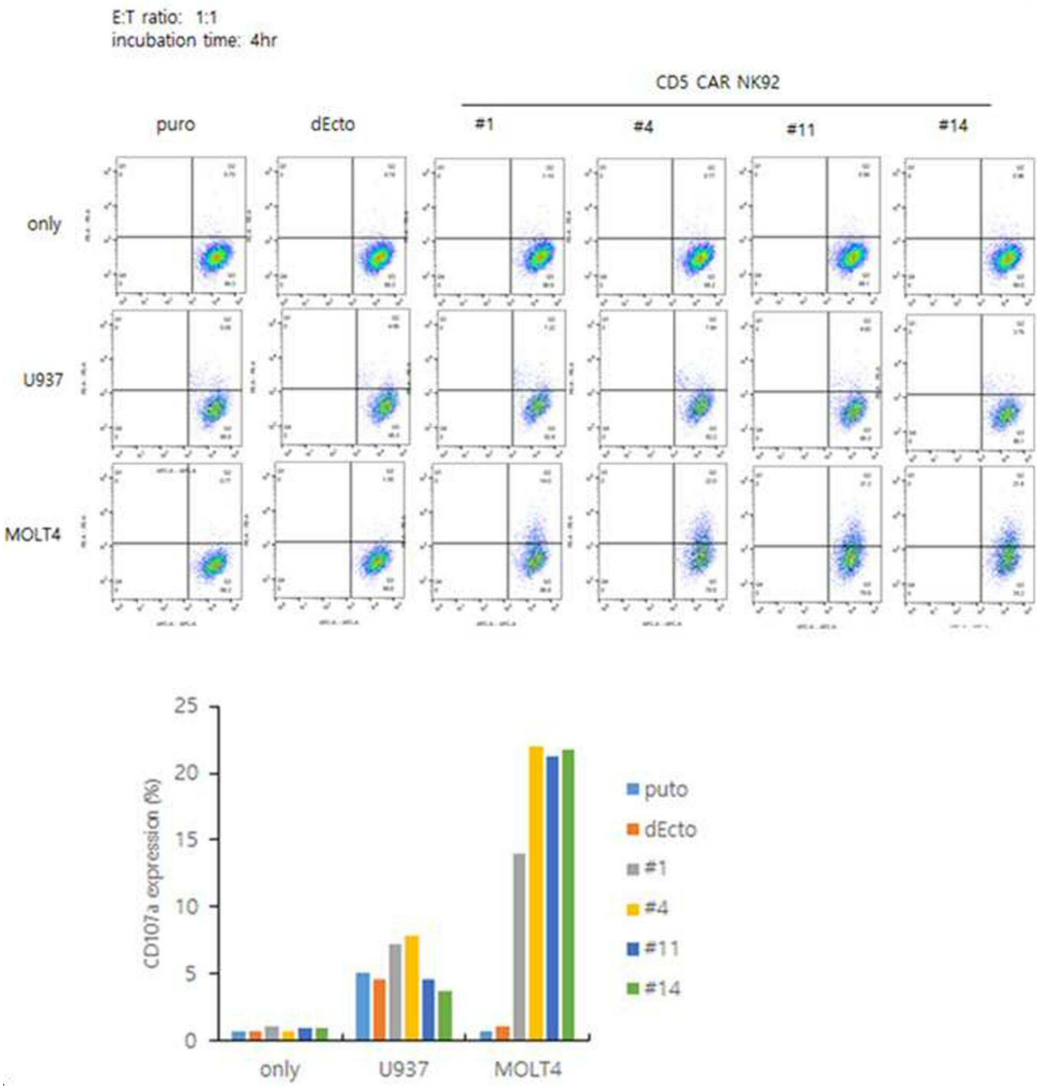
도면4


E:T ratio: 2:1
incubation time: 2hr
CCRF-CEM
Jurkat
Daudi
Specific lysis (%)
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
100.0
puro
dEcto
#11
#14

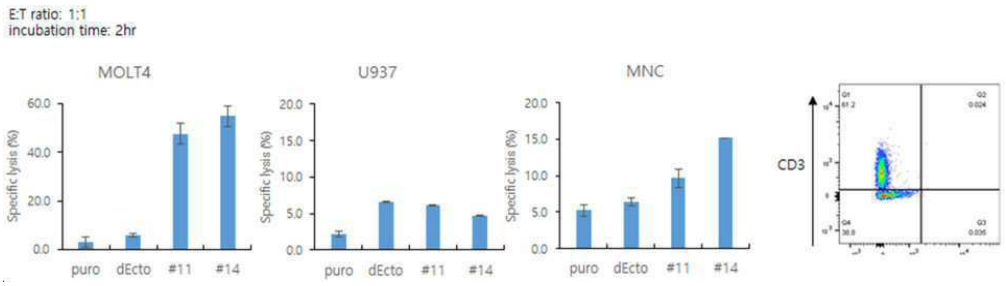
도면5a


E:T ratio: 1:1
incubation time: 12hr
MOLT4
U937
IFN-γ (pg/ml)
15
10
5
0
8
6
4
2
puro
dEcto
#1
#4
#11
#14

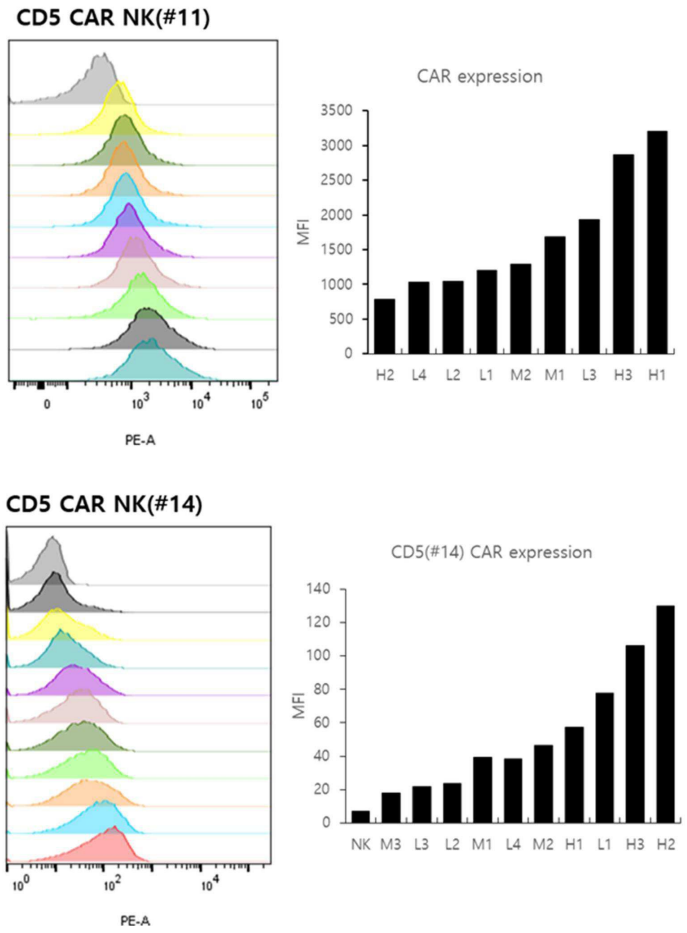
도면5b


E:T ratio: 1:1
incubation time: 4hr
CD5 CAR NK92
puro
dEcto
#1
#4
#11
#14
only
U937
MOLT4
CD107a expression (%)
25
20
15
10
5
0
only
U937
MOLT4
puto
dEcto
#1
#4
#11
#14

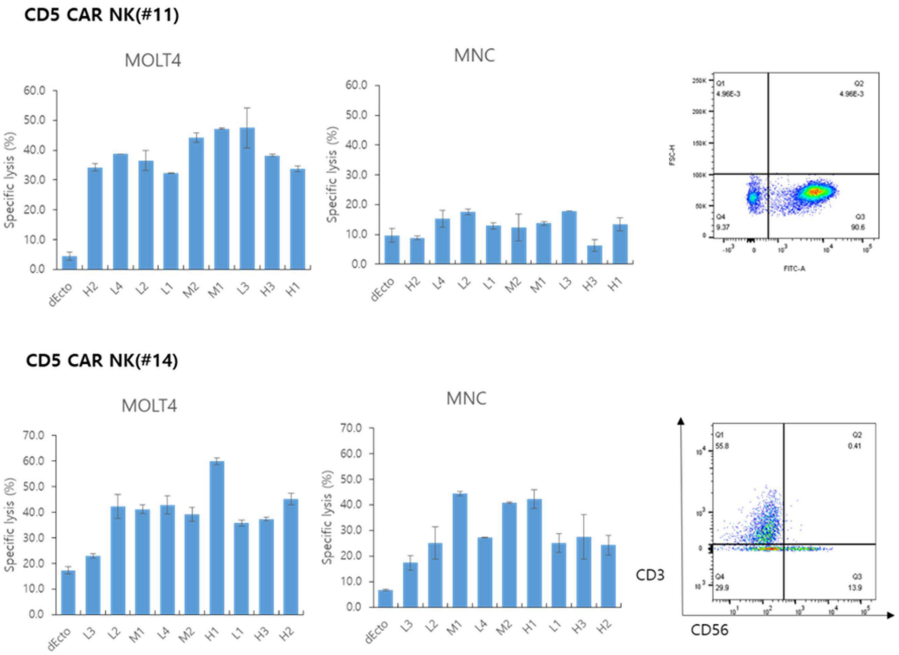
도면6


E:T ratio: 1:1
incubation time: 2hr
MOLT4
U937
MNC
Specific lysis (%)
puro
dEcto
#11
#14
CD3

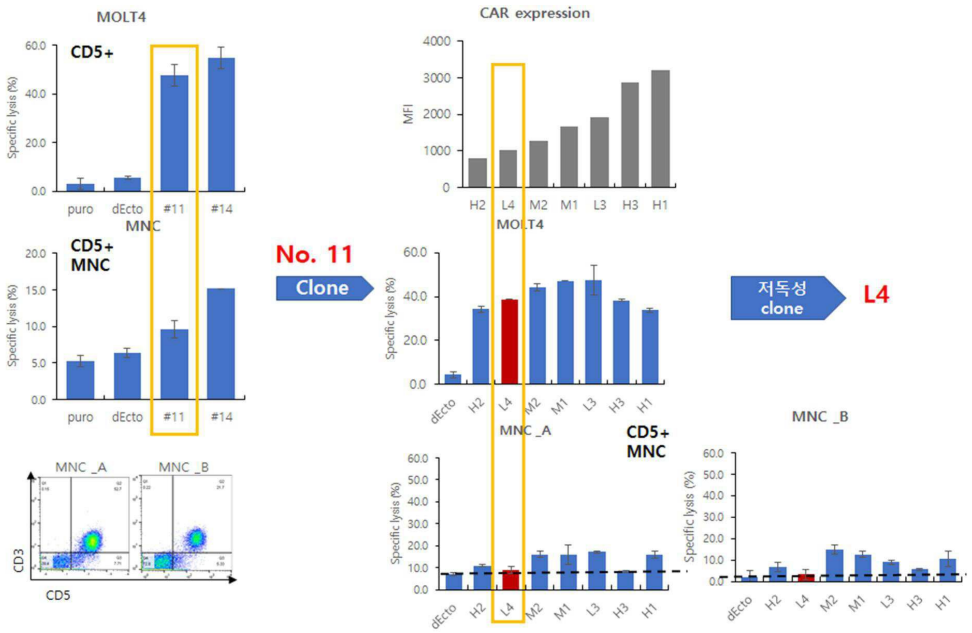
도면7a


CD5 CAR NK(#11)
CAR expression
MFI
PE-A
CD5 CAR NK(#14)
CD5(#14) CAR expression
MFI
PE-A

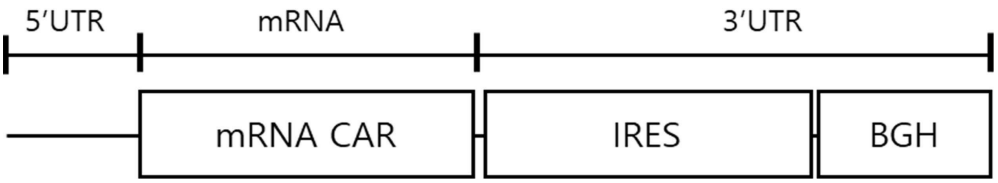
도면7b


CD5 CAR NK(#11)
MOLT4
MNC
Specific lysis (%)
CD5 CAR NK(#14)
MOLT4
MNC
Specific lysis (%)
CD3
CD56

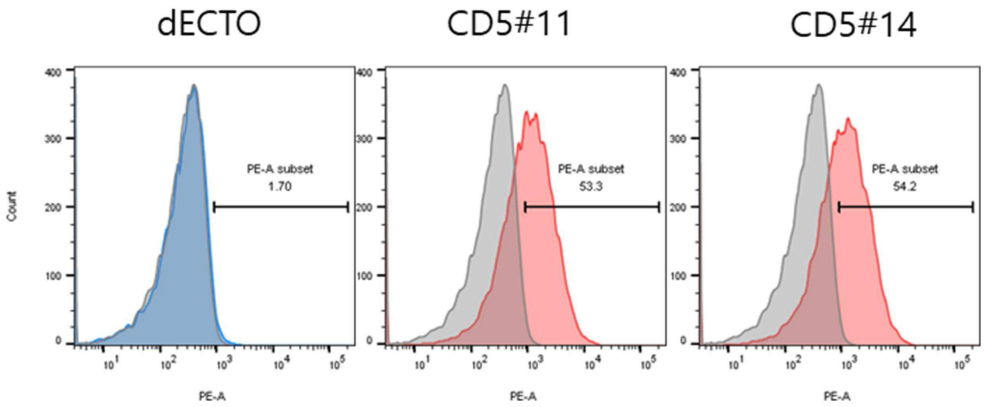
도면7c


MOLT4
CD5+
Specific lysis (%)
puro
dEcto
#11
#14
MNC
CD5+ MNC
MNC _A
MNC _B
CD3
CD5
No. 11
Clone
CAR expression
MFI
H2
L4
M2
M1
L3
H3
H1
저독성 clone
L4

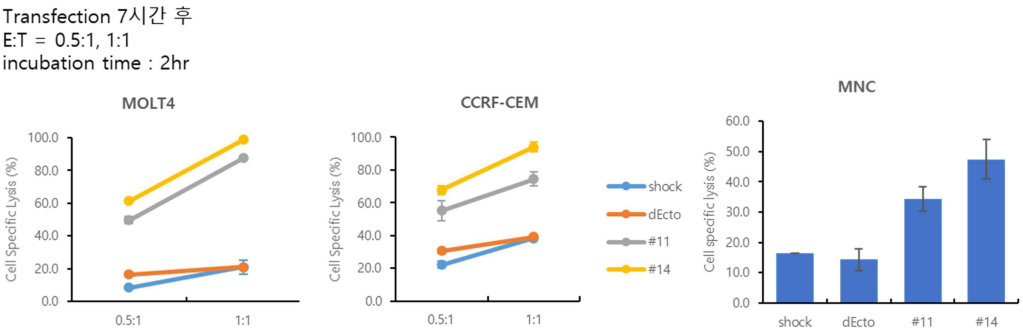
도면8


5'UTR
mRNA
3'UTR
mRNA CAR
IRES
BGH

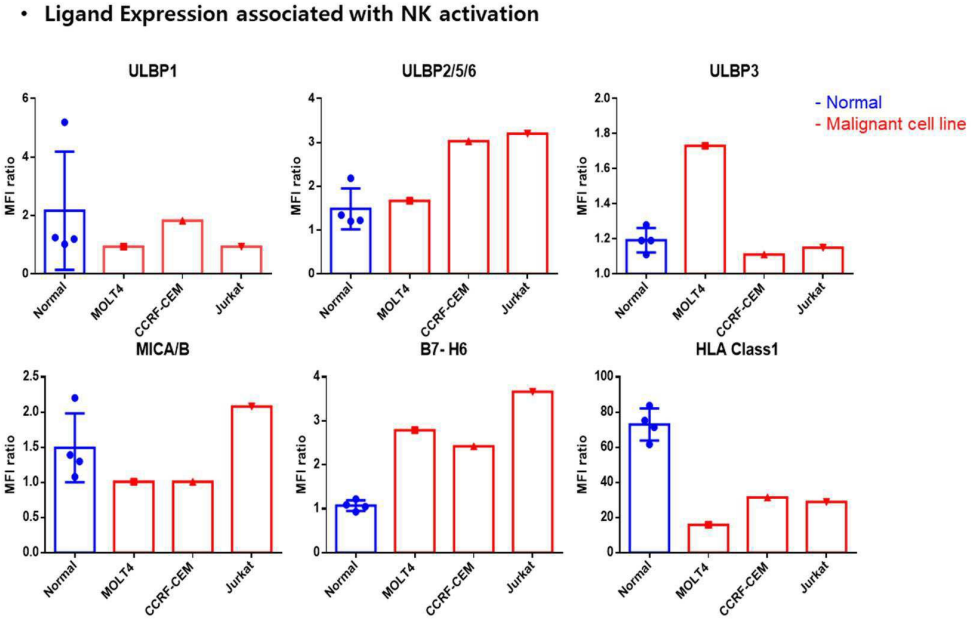
도면9


dECTO
CD5#11
CD5#14
Count
PE-A subset
1.70
53.3
54.2
PE-A

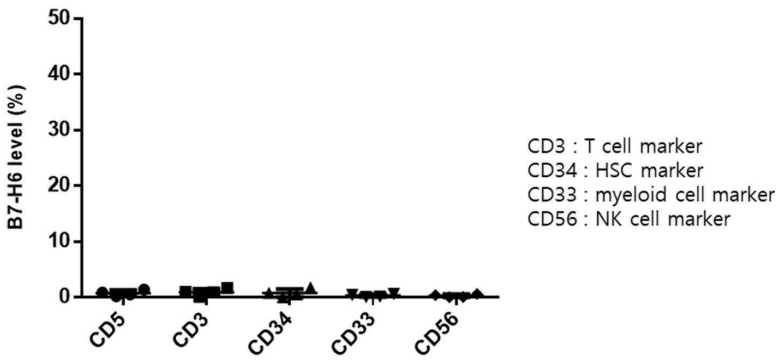
도면10



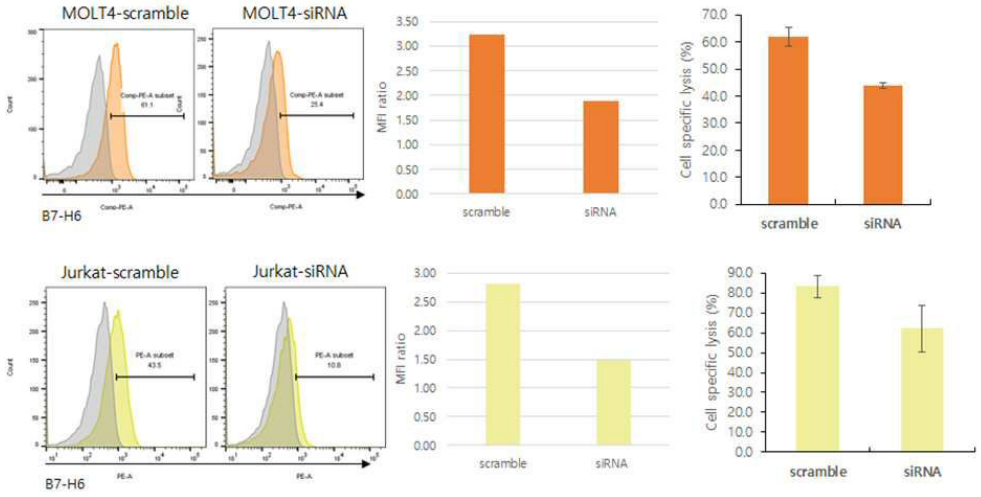
도면11a



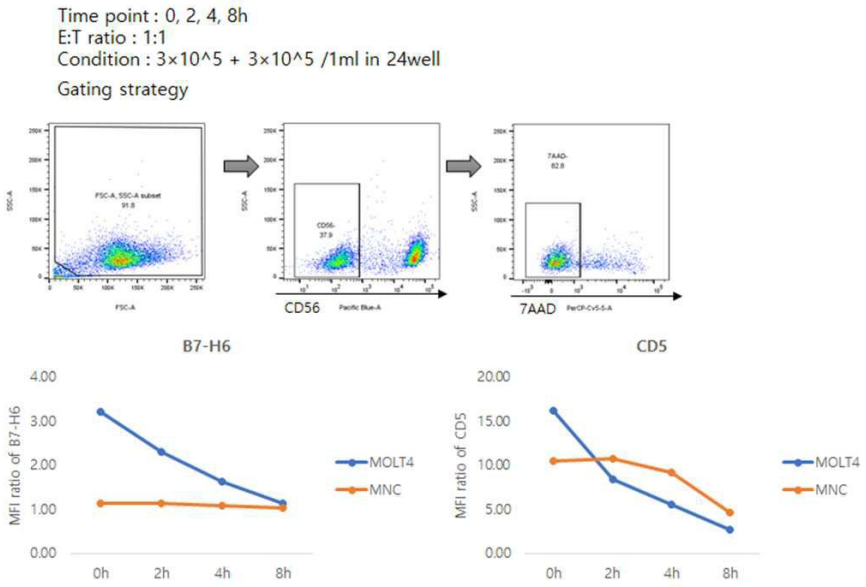
도면11b



도면12



도면13



서 열 목 록

<110> Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology

<120> Novel Anti-CD5 Chimeric Antigen Receptor and Immune Cells Expressing the Same

<130> 2022-DPA-4746

<150> KR 10-2021-0055886

<151> 2021-04-29

<160> 48

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Leader sequence

<400> 1

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala

1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala

20

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD5 #1 CDR1-VH

<400> 2

Asp Tyr Gly Met His

1 5

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD5 #1 CDR2-VH

<400> 3

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> CD5 #1 CDR3-VH

<400> 4

Gly Ser Ser Ser Val Tyr Ser Glu Ala Met Asp Leu

1 5 10

<210> 5

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD5 #1 Variable Heavy Chain

<400> 5

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Gly Ser Ser Ser Val Tyr Ser Glu Ala Met Asp Leu Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

115

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD5 #1 CDR1-VL

<400> 6

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD5 #1 CDR2-VL

<400> 7

Ala Thr Ser Asn Leu Gln Ser

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD5 #1 CDR3-VL

<400> 8

Gln Gln Ser Tyr Thr Tyr Pro Trp Thr

1 5

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD5 #1 Variable Light Chain

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD5 #4 CDR1-VH

<400> 10

Asp Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD5 #4 CDR2-VH

<400> 11

Ala Ile Ser Gln Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> CD5 #4 CDR3-VH

<400> 12

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

1 5 10

<210> 13

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD5 #4 Variable Heavy Chain

<400> 13

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gln Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Asp Leu Ala Ser Val Tyr Gly Ala Ala Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD5 #4 CDR1-VL

<400> 14

Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ala Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD5 #4 CDR2-VL

<400> 15

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD5 #4 CDR3-VL

<400> 16

Gln Gln Ser Tyr Ser Phe Pro Trp Thr

1 5

<210> 17

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD5 #4 Variable Light Chain

<400> 17

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD5 #11 CDR1-VH

<400> 18

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD5 #11 CDR2-VH

<400> 19

Ala Ile Ser Ser Ser Gly Gly Ser Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD5 #11 CDR3-VH

<400> 20

Arg Ser Tyr Ala Gly Glu Tyr Phe Asp His

1 5 10

<210> 21

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD5 #11 Variable Heavy Chain

<400> 21

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

Ala Lys Arg Ser Tyr Ala Gly Glu Tyr Phe Asp His Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CD5 #11 CDR1-VL
<400> 22
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Trp Leu Asn
1 5 10

<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CD5 #11 CDR2-VL
<400> 23

Asp Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CD5 #11 CDR3-VL

<400> 24

Gln Gln Ser Tyr Ser Phe Pro Trp Thr

1 5

<210> 25

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD5 #11 Variable Light Chain

<400> 25

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD5 #14 CDR1-VH

<400> 26

Asp Tyr Ala Met His

1 5

<210> 27

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD5 #14 CDR2-VH

<400> 27

Ala Ile Ser Ser Ser Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD5 #14 CDR3-VH

<400> 28

Gly Ser Tyr Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 29

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD5 #14 Variable Heavy Chain

<400> 29

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

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

20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Ser Ser Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

85 90 95

Ala Lys Gly Ser Tyr Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD5 #14 CDR1-VL

<400> 30

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asp Leu Asn

1 5 10

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD5 #14 CDR2-VL

<400> 31

Asp Thr Ser Arg Leu Gln Ser

1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD5 #14 CDR3-VL

<400> 32

Gln Gln Ser Tyr Ser Phe Pro Trp Thr

1 5

<210> 33

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD5 #14 Variable Light Chain

<400> 33

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

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

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

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

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

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

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

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 34

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

<210> 35

<211> 289

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD5 #1 scFv

<400> 35

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

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

His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
85 90 95
Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
100 105 110
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Ser Ser Ser Val Tyr Ser Glu
115 120 125
Ala Met Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
130 135 140
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile

145 150 155 160
Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
165 170 175
Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
180 185 190
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala
195 200 205
Thr Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
210 215 220

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

Gln His His His His His His Gly Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu
275 280 285
Lys

<210> 36
<211> 289
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CD5 #4 scFv
<400> 36
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15
Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
20 25 30
Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
35 40 45
Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

50 55 60
Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gln Ser Gly Gly Ser Thr
65 70 75 80
Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
85 90 95
Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
100 105 110
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Leu Ala Ser Val Tyr Gly Ala
115 120 125

Ala Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
130 135 140
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile
145 150 155 160
Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
165 170 175

Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ala Ser Tyr Leu Asn
180 185 190
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala

195 200 205
Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
210 215 220
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
225 230 235 240
Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Phe Pro Trp Thr Phe
245 250 255
Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ser Thr Gly Pro Gly Gly
260 265 270

Gln His His His His His His Gly Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu
275 280 285
Lys

<210> 37
<211> 287
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CD5 #11 scFv
<400> 37
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15
Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
20 25 30
Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly

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

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
85 90 95
Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
100 105 110

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Arg Ser Tyr Ala Gly Glu Tyr Phe
115 120 125
Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
130 135 140
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met
145 150 155 160
Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
165 170 175
Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Trp Leu Asn Trp Tyr

180 185 190
Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser
195 200 205
Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
210 215 220
Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
225 230 235 240
Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gln
245 250 255

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ser Thr Gly Pro Gly Gly Gln His
260 265 270
His His His His His Gly Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
275 280 285

<210> 38
<211> 287
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CD5 #14 scFv
<400> 38

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15
Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly

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

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
100 105 110
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Ser Tyr Tyr Gly Tyr Tyr Phe
115 120 125
Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
130 135 140
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met
145 150 155 160
Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr

165 170 175
Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asp Leu Asn Trp Tyr
180 185 190
Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser
195 200 205
Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
210 215 220
Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
225 230 235 240

Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gln

245 250 255

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ser Thr Gly Pro Gly Gly Gln His

260 265 270

His His His His His Gly Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

275 280 285

<210> 39

<211> 586

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD5 #1 CAR

<400> 39

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 Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Gln Leu

20 25 30

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

35 40 45

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Gly Met His Trp

50 55 60

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser

65 70 75 80

Gly Ser Gly Ser Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe

85 90 95

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn

100 105 110

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

115 120 125

Ser Ser Val Tyr Ser Glu Ala Met Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

Thr Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala

260 265 270

Ser Thr Gly Pro Gly Gly Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp

275 280 285

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

290 295 300

Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr

305 310 315 320

Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln

325 330 335

Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala

340 345 350

Val His Thr Arg Gly Leu Asp Lys Leu Val Lys Gly Lys His Leu Cys

355 360 365

Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val

370 375 380

Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala

385 390 395 400

Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser

405 410 415

Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His

420 425 430

Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Glu Phe Leu

435 440 445

Cys Ala Arg Pro Arg Arg Ser Pro Ala Gln Glu Asp Gly Lys Val Tyr

450 455 460

Ile Asn Met Pro Gly Arg Gly Ala Ala Ala Arg Val Lys Phe Ser Arg

465 470 475 480

Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn

485 490 495

Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg

500 505 510

Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro

515 520 525

Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala

530 535 540

Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His

545 550 555 560

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

565 570 575

Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

580 585

<210> 40

<211> 586

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD5 #4 CAR

<400> 40

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 Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Gln Leu

20 25 30

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

35 40 45

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

115 120 125
Ala Ser Val Tyr Gly Ala Ala Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
130 135 140
Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
145 150 155 160
Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
165 170 175
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr
180 185 190

Ile Ala Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
195 200 205
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
210 215 220
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
225 230 235 240
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr
245 250 255
Ser Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala

260 265 270
Ser Thr Gly Pro Gly Gly Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp
275 280 285

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

Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala
340 345 350
Val His Thr Arg Gly Leu Asp Lys Leu Val Lys Gly Lys His Leu Cys
355 360 365
Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val
370 375 380
Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala
385 390 395 400
Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser
405 410 415
Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His
420 425 430
Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Glu Phe Leu
435 440 445
Cys Ala Arg Pro Arg Arg Ser Pro Ala Gln Glu Asp Gly Lys Val Tyr
450 455 460
Ile Asn Met Pro Gly Arg Gly Ala Ala Ala Arg Val Lys Phe Ser Arg
465 470 475 480

Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
485 490 495
Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
500 505 510
Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
515 520 525
Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
530 535 540

Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His

545 550 555 560

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

565 570 575

Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

580 585

<210> 41

<211> 584

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD5 #11 CAR

<400> 41

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 Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Gln Leu

20 25 30

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

35 40 45

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp

50 55 60

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn

100 105 110

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

115 120 125

Tyr Ala Gly Glu Tyr Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

130 135 140

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

145 150 155 160

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

225 230 235 240
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Phe
245 250 255
Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ser Thr
260 265 270
Gly Pro Gly Gly Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Lys
275 280 285
Leu Gly Val Thr Val Ser Ser Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe
290 295 300

Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro
305 310 315 320
Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu
325 330 335
Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His
340 345 350
Thr Arg Gly Leu Asp Lys Leu Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser
355 360 365
Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val

370 375 380
Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile
385 390 395 400

Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr
405 410 415
Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln
420 425 430
Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Glu Phe Leu Cys Ala
435 440 445

Arg Pro Arg Arg Ser Pro Ala Gln Glu Asp Gly Lys Val Tyr Ile Asn
450 455 460
Met Pro Gly Arg Gly Ala Ala Ala Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala
465 470 475 480
Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
485 490 495
Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
500 505 510
Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu

515 520 525
Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
530 535 540
Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
545 550 555 560
Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
565 570 575
His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
580
<210> 42
<
211> 584
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CD5 #14 CAR
<400> 42
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 Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Gln Leu
             20                  25                  30
Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
         35                  40                  45
Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Ala Met His Trp

     50                  55                  60
Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser
 65                  70                  75                  80
Ser Ser Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
                 85                  90                  95
Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
            100                 105                 110
Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Ser
        115                 120                 125

Tyr Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
    130                 135                 140
Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
145                 150                 155                 160
Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
                165                 170                 175
Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser
            180                 185                 190
Asn Asp Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

        195                 200                 205
Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
    210                 215                 220
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
225                 230                 235                 240
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Phe
                245                 250                 255
Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ser Thr
```

260 265 270

Gly Pro Gly Gly Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Lys
275 280 285
Leu Gly Val Thr Val Ser Ser Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe
290 295 300
Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro
305 310 315 320
Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu
325 330 335
Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His

340 345 350
Thr Arg Gly Leu Asp Lys Leu Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser
355 360 365
Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val
370 375 380
Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile
385 390 395 400
Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr
405 410 415

Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln
420 425 430
Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Glu Phe Leu Cys Ala
435 440 445
Arg Pro Arg Arg Ser Pro Ala Gln Glu Asp Gly Lys Val Tyr Ile Asn
450 455 460
Met Pro Gly Arg Gly Ala Ala Ala Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala
465 470 475 480
Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu

485 490 495
Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
500 505 510

Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
515 520 525

Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
530 535 540

Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
545 550 555 560

Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
565 570 575

His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
580

<210> 43

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Signal peptide

<400> 43

accatggcct taccagtgac cgccttgctc ctgccgctgg ccttactgct ccacgccgcc 60

aggccggc 68

<210> 44

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Myc

<400> 44

gcgaacaaaa actcatctca gaagaggatc tg 32

<210> 45

<211> 204

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hinge

<400> 45

ggggtcaccg tctcttcagc gctgagcaac tccatcatgt acttcagcca cttcgtgccg 60

gtcttcctgc cagcgaagcc caccacgacg ccagcgccgc gaccaccaac accggcgccc 120

accatcgcgt cgcagcccct gtccctgcgc ccagaggcat gccggccagc ggcgggggggc 180

gcagtgcaca cgagggggct ggat 204

<210> 46

<211> 252

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Transmembrane

<400> 46

gtgaaaggga aacacctttg tccaagtccc ctatttcccg gaccttctaa gccctttttgg 60

gtgctggtgg tggttggtgg agtcctggct tgctatagct tgctagtaac agtggccttt 120

attattttct gggtgaggag taagaggagc aggctcctgc acagtgacta catgaacatg 180

actccccgcc gccccgggcc cacccgcaag cattaccagc cctatgcccc accacgcgac 240

ttcgcagcct at 252

<210> 47

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAP10

<400> 47

ctgtgcgcac gcccacgccg cagccccgcc caagaagatg gcaaagtcta catcaacatg 60

ccaggcaggg gc 72

<210> 48

<211> 340

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3z

<400> 48

tagagtgaag ttcagcagga gcgcagacgc ccccgcgtac cagcagggcc agaaccagct 60

ctataacgag ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat gttttggaca agagacgtgg 120

ccgggaccct gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac cctcaggaag gcctgtacaa 180

tgaactgcag aaagataaga tggcggaggc ctacagtgag attgggatga aaggcgagcg 240

ccggaggggc aaggggcacg atggccttta ccagggtctc agtacagcca ccaaggacac 300

ctacgacgcc cttcacatgc aggccctgcc ccctcgctaa 340