



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0025662
(43) 공개일자 2023년02월22일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/705 (2006.01) A61K 35/17 (2015.01)
A61K 39/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01) C07K 16/30 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C07K 14/70521 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2022-7042176</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2021년05월04일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2022년11월30일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2021/030625</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2021/226063
국제공개일자 2021년11월11일</p> <p>(30) 우선권주장
63/020,177 2020년05월05일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드
미합중국 뉴욕주 10591 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777</p> <p>(72) 발명자
디릴로 데이비드
미국 10591 뉴욕주 태리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
미거 토마스 크레이그
미국 10591 뉴욕주 태리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내</p> <p>(74) 대리인
유미특허법인</p> |
|---|---|

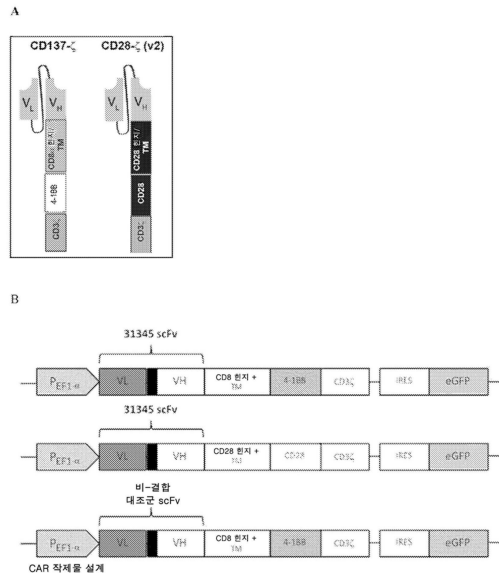
전체 청구항 수 : 총 32 항

(54) 발명의 명칭 CD28 제타 및 CD3 제타를 포함하는 CAR

(57) 요약

암의 표적 치료를 위한 조성물 및 방법이 개시된다. 본 개시내용은 키메라 항원 수용체 및 이러한 키메라 항원 수용체를 발현하는 세포를 제공한다. 특정 구현예에서, 키메라 항원 수용체를 발현하는 조작된 세포는 저밀도 암 항원 또는 그루브 내 펩티드 항원에 특이적이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 39/001186 (2018.08)

A61K 39/001188 (2018.08)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 14/7051 (2013.01)

C07K 14/70517 (2013.01)

C07K 14/70578 (2013.01)

C07K 16/30 (2013.01)

C12N 5/0638 (2013.01)

C07K 2319/03 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

CAR 폴리펩티드로서,

- a) 분화 클러스터 28 제타(CD28/ ζ) 도메인을 포함하는 적어도 하나의 세포질내/공동자극 영역,
- b) 분화 클러스터 3 제타(CD3/ ζ) 도메인을 포함하는 적어도 하나의 세포질내 신호전달 영역, 및
- c) 그루브 내 펩티드 암 항원에 특이적인 항원 결합 도메인을 포함하는, CAR 폴리펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 CAR 폴리펩티드의 세포질내/공동자극 영역이 4-1BB 도메인을 추가로 포함하는 것인, CAR 폴리펩티드.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 CAR의 힌지/스페이서 영역이 적어도 하나의 분화 클러스터 28 제타(CD28/ ζ) 도메인을 포함하는 것인, CAR 폴리펩티드.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CAR의 막관통 영역이 적어도 하나의 분화 클러스터 28 제타(CD28/ ζ) 도메인을 포함하는 것인, CAR 폴리펩티드.

청구항 5

그루브 내 펩티드 암 항원에 대한 항원 특이성을 갖는 CAR 폴리펩티드로서, 상기 CAR은 서열번호 1 내지 3에 제시된 아미노산 서열로부터 선택된 적어도 하나의 분화 클러스터 28 제타(CD28/ ζ) 아미노산 서열을 포함하는 것인, CAR 폴리펩티드.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 적어도 하나의 분화 클러스터 28(CD28) 아미노산 서열이 CAR의 세포질내/공동자극 영역의 일부인, CAR 폴리펩티드.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 적어도 하나의 분화 클러스터 28(CD28) 아미노산 서열이 CAR의 막관통 영역의 일부인, CAR 폴리펩티드.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 적어도 하나의 분화 클러스터 28(CD28) 아미노산 서열이 CAR의 힌지/스페이서 영역의 일부인, CAR 폴리펩티드.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암 항원이 MAGEA4, 티로시나제, HPV16 E7, 또는 NY-ESO 펩티드인, CAR 폴리펩티드.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 CAR이 MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉, MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄, Tyr₃₆₉₋₃₇₇, HPV16E7₁₁₋₁₉ 또는 NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅로부터 선택된

적어도 하나의 에피토프를 포함하는 항원에 특이적인 것인, CAR 폴리펩티드.

청구항 11

그루브 내 펩티드 암 항원에 대한 항원 특이성을 갖는 CAR 폴리펩티드로서, 상기 CAR은 서열번호: 7, 9, 11, 13, 30, 또는 34에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인, CAR 폴리펩티드.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CAR 폴리펩티드가 서열번호: 16 내지 19, 31, 또는 37에 제시된 아미노산 서열 중 임의의 하나를 포함하는 가변 경쇄를 포함하는 것인, CAR 폴리펩티드.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CAR 폴리펩티드가 서열번호: 20 내지 23, 32, 또는 38에 제시된 아미노산 서열 중 임의의 하나를 포함하는 가변 중쇄를 포함하는 것인, CAR 폴리펩티드.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 CAR을 발현하는 면역 세포를 포함하는 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 CAR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 핵산이 발현 벡터인, 핵산.

청구항 17

제15항 또는 제16항에 있어서, 상기 핵산이 서열번호: 14, 15, 35 또는 36에 제시된 서열을 갖는 것인, 핵산.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 발현 벡터가 바이러스 벡터인, 핵산.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 바이러스 벡터가 렌티바이러스 발현 벡터인, 핵산.

청구항 20

제15항 내지 제19항 중 어느 한 항의 핵산을 포함하는 면역 세포.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 CAR 폴리펩티드를 포함하는 면역 세포.

청구항 22

제20항 또는 제21항에 있어서, 상기 면역 세포가 백혈구인, 면역 세포.

청구항 23

제21항 또는 제22항에 있어서, 상기 면역 세포가 림프구, 단핵구, 대식세포, 수지상 세포, 비만 세포, 호중구, 호염기구, 또는 호산구인, 면역 세포.

청구항 24

제21항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역 세포가 $\alpha\beta$ T 세포, $\gamma\delta$ T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 자연 살해 T(NKT) 세포, 선천성 림프 세포(ILC), 사이토카인 유도 살해(CIK) 세포, 세포독성 T 림프구(CTL), 림포카인 활성화 살해(LAK) 세포, 조절 T 세포, 또는 이의 임의의 조합으로부터 선택된 림프구인, 면역 세포.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 면역 세포가 세포독성 T 림프구(CTL)인, 면역 세포.

청구항 26

대상체에서 종양을 치료하는 방법으로서,

- a) 분화 클러스터 28 제타(CD28/ ζ) 도메인을 포함하는 적어도 하나의 세포질내/공동자극 영역,
 - b) 분화 클러스터 3 제타(CD3/ ζ) 도메인을 포함하는 적어도 하나의 세포질내 신호전달 영역, 및
 - c) 그루브 내 펩티드 항원에 특이적인 항원 결합 도메인
- 을 포함하는 CAR 폴리펩티드를 발현하는 세포를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 CAR이 CAR의 힌지/스페이서 영역에 적어도 하나의 CD28/ ζ 도메인을 포함하는 것인, 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 CAR이 CAR의 막관통 영역에 적어도 하나의 CD28/ ζ 도메인을 포함하는 것인, 방법.

청구항 29

제26항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 분화 클러스터 28 제타(CD28/ ζ) 아미노산 서열이 서열번호 1 내지 3에 제시된 아미노산 서열로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 30

제26항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이

- a) CAR 폴리펩티드의 공동자극 영역 내 4-1BB 도메인,
 - b) 분화 클러스터 3 제타(CD3/ ζ) 도메인을 포함하는 적어도 하나의 세포질내 신호전달 영역, 및
 - c) 그루브 내 펩티드 암 항원에 특이적인 세포외 도메인
- 을 포함하는 제2 CAR 폴리펩티드를 대상체에게 공동으로 투여하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 제2 CAR 폴리펩티드가 힌지/막관통 영역에 분화 클러스터 8 알파(CD8/ α) 펩티드를 포함하는 것인, 방법.

청구항 32

입양 면역요법을 위한 세포를 포함하는 세포 은행으로서, 상기 세포는 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 CAR을 발현하는 것인, 세포 은행.

발명의 설명

기술 분야

관련 출원

본 출원은 2020년 5월 5일 출원된 미국 가출원 번호 63/020177에 대한 우선권을 주장하며, 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

배경 기술

배경

[0001]

[0002]

[0003]

[0004] 암은 미국에서 두번째 주요 사망 원인이다. 많은 암에 대한 현재 요법은 특정 환자 집단에서 실패하거나 또는 환자의 삶의 질에 크게 영향을 미치는 독성 부작용을 생성한다. *생체외*에서 생성된 항원-특이적 T 세포의 전달을 수반하는 입양 면역요법은 암을 치료하는 유망한 전략이다. 입양 면역요법에 사용되는 T 세포는 유전 공학을 통한 T 세포의 재지정에 의해(예를 들어, 키메라 항원 수용체, 또는 "CAR"을 발현하도록 조작함으로써) 생성될 수 있다. 그러나, 현재 입양 면역요법 접근법은 종종 MHC 클래스 I 단백질에 의해 제시된 펩티드 항원("그루브 내 펩티드(peptide in groove)," 또는 "PIG" 항원으로 지칭됨)과 같이, 저밀도에서 발현되는 표적화 항원에서 비효과적이다. 입양 면역요법을 사용한 PIG 항원의 표적화는 세포내 암 연관된 항원을 표적하는 CAR 폴리펩티드 발현 T 세포(CAR T 세포)의 사용을 허용하기 때문에 이를 포함한 다수의 이유로 특히 매력적이다. 따라서, 암 치료를 위한, PIG 항원을 포함하여 저밀도 항원의 표적화를 용이하게 하는 개선된 입양 면역요법 접근법이 당업계에 필요하다.

발명의 내용

[0005] **요약**

[0006] 본 출원은 적어도 부분적으로 CD28/z 신호전달 도메인을 포함하는 CAR을 발현하는 CAR T 세포가 그루브 내 펩티드(PIG) 항원 또는 저밀도 암 항원을 표적화할 때 우수한 *시험관내* 및 *생체내* 효능을 입증한다는 발견에 기반한다. 일부 측면에서, 본원에는 CD28/z 신호전달 도메인을 포함하는 PIG 항원 또는 저밀도 암 항원을 표적화하는 CAR 폴리펩티드 및 이러한 CAR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산, 뿐만 아니라 이러한 CAR 폴리펩티드 및 핵산의 사용 및 제조 방법이 제공된다.

[0007] 일부 측면에서, 본원에는 분화 클러스터 28 제타(CD28/ζ) 도메인을 포함하는 적어도 하나의 세포질내/공동자극 영역을 포함하는 CAR 폴리펩티드가 제공된다. 일부 구현예에서, CAR 폴리펩티드는 분화 클러스터 3 제타(CD3/ζ) 도메인을 포함하는 적어도 하나의 세포질내 신호전달 영역을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, CAR 폴리펩티드는 저밀도 암 및/또는 그루브 내 펩티드 항원에 특이적인 항원 결합 도메인을 추가로 포함한다.

[0008] 일부 구현예에서, CAR 폴리펩티드의 세포질내/공동자극 영역은 (예를 들어, 분화 클러스터 28 제타(CD28/ζ) 도메인에 더하여) 4-1BB 도메인을 추가로 포함한다. CAR 폴리펩티드는 적어도 하나의 분화 클러스터 28 제타(CD28/ζ) 도메인을 포함하는 힌지/스페이서 영역을 포함할 수 있다. CAR 폴리펩티드는 적어도 하나의 분화 클러스터 28 제타(CD28/ζ) 도메인을 포함하는 막관통 영역을 포함할 수 있다.

[0009] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 CAR 폴리펩티드는 암 항원에 대한 항원 특이성을 가지며, 여기서 CAR은 서열번호 1 내지 3에 제시된 아미노산 서열로부터 선택된 적어도 하나의 분화 클러스터 28 제타(CD28/ζ) 아미노산 서열을 포함한다. CD28/ζ 서열은 CAR의 힌지, 막관통, 또는 신호전달 도메인에 있을 수 있다. 또한 본원에는 암 항원에 대한 항원 특이성을 갖는 CAR 폴리펩티드가 제공되고 CAR은 서열번호: 6 내지 13, 29, 30, 33 또는 34에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0010] CAR 폴리펩티드는 CAR의 세포질내/공동자극 영역의 일부인 적어도 하나의 분화 클러스터 28(CD28) 아미노산 서열을 포함할 수 있다. CAR 폴리펩티드는 CAR의 막관통 영역의 일부인 적어도 하나의 분화 클러스터 28(CD28) 아미노산 서열을 가질 수 있다. CAR 폴리펩티드는 CAR의 힌지/스페이서 영역의 일부인 적어도 하나의 분화 클러스터 28(CD28) 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0011] 본원에 개시된 바와 같이, 암 항원은 그루브 내 펩티드 항원 및/또는 저밀도 암 항원일 수 있다. 암 항원의 2000개 미만의 카피, 1000개 미만의 카피, 또는 500개 미만의 카피가 전형적으로 종양(예를 들어, 고형 종양)에서 발견될 수 있다. 암 항원은 MAGEA4, 티로시나제, HPV16 E7, 또는 NY-ESO 펩티드일 수 있다. 암 항원은 MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉, MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄, Tyr₃₆₉₋₃₇₇, HPV16E7₁₁₋₁₉ 또는 NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅로부터 선택된 적어도 하나의 에피토프를 포함할 수 있다.

[0012] CAR 폴리펩티드는 서열번호: 16 내지 19, 31, 또는 37에 제시된 아미노산 서열 중 임의의 하나를 포함하는 가변 경쇄를 포함할 수 있다. CAR 폴리펩티드는 서열번호: 20 내지 23, 32, 또는 38에 제시된 아미노산 서열 중 임의의 하나를 포함하는 가변 중쇄를 포함할 수 있다.

[0013] 일부 측면에서, 본원에는 본원에 개시된 CAR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산이 제공된다. 핵산은 발현 벡터(예를 들어, 바이러스 벡터, 예컨대 렌티바이러스 벡터)일 수 있다. CAR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 서열번호: 14, 15, 35 또는 36에 제시된 서열을 가질 수 있다.

- [0014] 또한 본원에는 본원에 개시된 CAR 폴리펩티드 또는 본원에 개시된 CAR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하는 면역 세포가 제공된다. 또한 본원에는 본원에 개시된 면역 세포를 포함하는 조성물, 및 이러한 면역 세포를 포함하는 세포 은행이 제공된다. 세포 은행은 입양 면역요법을 위한 세포 은행일 수 있다. 면역 세포는 백혈구, 림프구, 단핵구, 대식세포, 수지상 세포, 비만 세포, 호중구, 호염기구, 또는 호산구일 수 있다. 일부 구현예에서, 면역 세포는 $\alpha\beta T$ 세포, $\gamma\delta T$ 세포, 자연 살해(NK) 세포, 자연 살해 T(NKT) 세포, 선천성 림프 세포(ILC), 사이토카인 유도 살해(CIK) 세포, 세포독성 T 림프구(CTL), 림포카인 활성화 살해(LAK) 세포, 조절 T 세포, 또는 이의 임의의 조합으로부터 선택된 림프구이다.
- [0015] 일부 측면에서, 본원에는 본원에 개시된 CAR 폴리펩티드(예를 들어, 분화 클러스터 28 제타(CD28/ ζ) 도메인을 포함하는 적어도 하나의 세포질내/공동자극 영역을 포함하는 CAR 폴리펩티드를 발현하는 세포를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여함으로써 대상체에서 암(예를 들어, 고형 종양)을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, CAR 폴리펩티드는 분화 클러스터 3 제타(CD3/ ζ) 도메인을 포함하는 적어도 하나의 세포질내 신호전달 영역을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, CAR 폴리펩티드는 저밀도 암 및/또는 그루브 내 펩티드 항원에 특이적인 항원 결합 도메인을 추가로 포함한다.
- [0016] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 방법은 CAR 폴리펩티드의 공동자극 영역에 4-1BB 도메인을 포함하는 제2 CAR 폴리펩티드를 대상체에게 공동으로 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 CAR은 분화 클러스터 3 제타(CD3/ ζ) 도메인을 포함하는 적어도 하나의 세포질내 신호전달 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 CAR은 저밀도 암 항원 및/또는 그루브 내 펩티드 암 항원에 특이적인 세포의 도메인을 포함한다. 제2 CAR 폴리펩티드는 힌지/막관통 영역에 분화 클러스터 8 알파(CD8/ α) 펩티드를 포함할 수 있다.
- [0017] 일부 구현예에서, 대상체는 암을 가질 수 있다. 암은 흑색종일 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0018] **도 1**은 a-b의 2개 파트로 구성되며, 실시예 1 및 2에 사용되는 일반적인 CAR 작제물 설계 및 예시적인 CAR 작제물을 나타낸다. 파트 a의 일반적인 BB/z 및 28/z CAR 작제물 개략도. 파트 b는 항-HLA-A2/MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ 31345 scFv + (상단) huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인(BB/z CAR), 또는 (중간) huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인(28/z CAR)을 함유하는 키메라 항원 수용체를 나타낸다. 관련 없는 scFv + huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인은 대조군 CAR로서 역할을 하였다(하단).
- 도 2**는 a-b의 2개 파트로 구성되며, 2명의 공여자로부터의 MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T 세포가 SK-MEL-37 흑색종 종양 모델에서 MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T 세포와 비교하여 우수한 생체내 항-종양 활성화 및 항-종양 동역학을 입증함을 나타낸다. NSG 마우스에 HLA-A2⁺MAGEA4⁺ SK-MEL-37 인간 흑색종 종양 세포를 피하 이식하였다. 종양이 확립된 후 7일째에, 마우스(그룹당 n=5)에 비-결합 대조군 BB/z CAR(대조군 CAR T), 2명의 상이한 공여자로부터의 항-HLA-A2/MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR, 또는 항-HLA-A2/MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR을 발현하는 4×10^6 T 세포를 정맥내 주사하였다. 종양 부피를 측정하여 종양 성장을 평가하였다. 데이터는 파트 a의 공여자 1 및 파트 b의 공여자 2로부터 제시되었. 상단 그래프: 값은 종양 이식 후 지시된 날의 평균 \pm SEM 종양 부피를 나타낸다. 하단 그래프는 개별 마우스의 종양 성장 곡선을 나타낸다.
- 도 3**은 a-b의 2개 파트로 구성되며, 2명의 공여자로부터의 MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T 세포가 A375 흑색종 종양 모델에서 MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T 세포와 비교하여 우수한 생체내 항-종양 활성화 및 항-종양 동역학을 입증함을 나타낸다. NSG 마우스에 HLA-A2⁺MAGEA4⁺ A375 인간 흑색종 종양 세포를 피하 주사하였다. 종양이 확립된 후 13일째에, 마우스(그룹당 n=5)에 비-결합 대조군 BB/z CAR(대조군 CAR T), 2명의 상이한 공여자로부터의 항-HLA-A2/MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR, 또는 항-HLA-A2/MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR을 발현하는 4×10^6 T 세포를 정맥내 주사하였다. 종양 부피를 측정하여 64일까지 종양 성장을 평가하였다. 데이터는 파트 a의 공여자 1 및 파트 b의 공여자 2로부터 제시되었다. 상단 그래프: 값은 종양 이식 후 지시된 날의 평균 \pm SEM 종양 부피를 나타낸다. 하단 그래프는 개별 마우스의 종양 성장 곡선을 나타낸다.
- 도 4**는 a-b의 2개 파트로 구성되며, 실시예 3에서 사용된 예시적인 CAR 작제물을 나타내고 MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ 28/z

CAR T 세포가 A375 흑색종 종양 모델에서 MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR T 세포와 비교하여 우수한 생체내 항-종양 활성 및 항-종양 동역학을 입증함을 나타낸다. 파트 a는 HLA-A2⁺MAGEA4⁺ A375 인간 흑색종 종양 세포를 피하 주사받은 NSG 마우스로부터의 데이터를 나타낸다. 종양이 확립된 후 13일째에, 마우스(그룹당 n=4 또는 5)에 비-결합 대조군 BB/z CAR(대조군 CAR T), 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR, 또는 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR을 발현하는 4x10⁶ T 세포를 정맥내 주사하였다. 종양 부피를 측정하여 37일까지 종양 성장을 평가하였다. 상단 그래프는 0 내지 21일 사이의 종양 성장을 나타낸다. 하단 그래프는 0 내지 37일 사이의 종양 성장 곡선을 나타낸다. 왼쪽 그래프: 값은 종양 이식 후 지시된 날의 평균 ± SEM 종양 부피를 나타낸다. 오른쪽 그래프는 개별 마우스의 종양 성장 곡선을 나타낸다. 파트 b는 항-HLA-A2/ MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ 33229P scFv + (상단) huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인(BB/z CAR), 또는 (중간) huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인(28/z CAR)을 함유하는 키메라 항원 수용체를 나타낸다. (하단) 관련 없는 scFv + huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인은 대조군 CAR로서 역할을 하였다.

도 5는 a-c의 3개 파트로 구성되며, 실시예 4에서 사용된 예시적인 CAR 작제물 및 예시적인 CAR-T 세포로 처리된 마우스에서 이종(xenogenic) 종양의 측정을 나타낸다. 결과는 항-티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ 28/z CAR T 세포가 WM266.4 및 SK-MEL-23 흑색종 종양 모델에서 티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ BB/z CAR T 세포와 비교하여 우수한 생체내 항-종양 활성 및 항-종양 동역학을 입증함을 입증한다. 파트 a는 항-HLA-A2/ 티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ D11 scFv + (상단) huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인(BB/z CAR), 또는 (중간) huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인(28/z CAR)을 함유하는 키메라 항원 수용체를 나타낸다. (하단) 관련 없는 scFv + huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인은 대조군 CAR로서 역할을 하였다. 파트 b는 4x10⁶ HLA-A2⁺티로시나제⁺ WM266.4 인간 흑색종 종양 세포를 피하 주사받은 NSG 마우스로부터의 데이터를 나타낸다. 종양이 확립된 후 7일째에, 마우스(그룹당 n=5)에 비-결합 대조군 BB/z CAR(대조군 CAR T), 2명의 상이한 공여자로부터의 항-HLA-A2/티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ BB/z CAR, 또는 항-HLA-A2/티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ 28/z CAR을 발현하는 2x10⁶ T 세포를 정맥내 주사하였다. 종양 부피를 측정하여 90일까지 종양 성장을 평가하였다. 파트 c는 5x10⁶ HLA-A2⁺티로시나제⁺ SK-MEL-23 인간 흑색종 종양 세포를 피하 주사받은 NSG 마우스로부터의 데이터를 나타낸다. 종양이 확립된 후 7일째에, 마우스(그룹당 n=5)에 비-결합 대조군 BB/z CAR(대조군 CAR T), 2명의 상이한 공여자로부터의 항-HLA-A2/티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ BB/z CAR, 또는 항-HLA-A2/티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ 28/z CAR을 발현하는 4x10⁶ T 세포를 정맥내 주사하였다. 종양 부피를 측정하여 90일까지 종양 성장을 평가하였다. 데이터는 (왼쪽 패널) 공여자 1 및 (오른쪽 패널) 공여자 2로부터 제시되었다. 상단 그래프: 값은 종양 이식 후 지시된 날의 평균 ± SEM 종양 부피를 나타낸다. 하단 그래프는 개별 마우스의 종양 성장 곡선을 나타낸다.

도 6은 a-b의 2개 파트로 구성되며, 실시예 5에서 사용된 예시적인 CAR 작제물을 나타내고 NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ 28/z CAR T 세포가 A375 흑색종 종양 모델에서 NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ BB/z CAR T 세포와 비교하여 우수한 생체내 항-종양 활성 및 항-종양 동역학을 입증함을 나타낸다. 파트 a는 항-HLA-A2/ NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ 28105P scFv + (상단) huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인(BB/z CAR), 또는 (중간) huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인(28/z CAR)을 함유하는 키메라 항원 수용체를 나타낸다. (하단) 관련 없는 scFv + huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인은 대조군 CAR로서 역할을 하였다. 파트 b는 NSG 마우스에 5x10⁶ HLA-A2⁺NY-ESO-1⁺ A375 인간 흑색종 종양 세포를 피하 주사하였음을 나타낸다. 종양이 확립된 후 3일째에, 마우스(그룹당 n=5)에 비-결합 대조군 BB/z CAR(대조군 CAR T), 항-HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ BB/z CAR, 또는 항-HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ 28/z CAR을 발현하는 20x10⁶ T 세포를 정맥내 주사하였다. 종양 부피를 측정하여 38일째까지 종양 성장을 평가하였다. 상단 그래프는 0 내지 21일 사이의 종양 성장을 나타낸다. 하단 그래프는 0 내지 38일 사이의 종양 성장 곡선을 나타낸다. 왼쪽 그래프: 값은 종양 이식 후 지시된 날의 평균 ± SEM 종양 부피를 나타낸다. 오른쪽 그래프는 개별 마우스의 종양 성장 곡선을 나타낸다.

도 7은 MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T 세포가 다양한 표적 세포에 대해 MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T 세포와 비교하여 우수한 시험관내 세포독성을 입증함을 나타낸다. MAGEA4⁺HLA-A2⁺ A375 및 SK-MEL-37 세포의 중간 정도의 세포독성은 BB/z 세포내 신호전달 도메인이 있는 항-MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ CAR(31345)에 의해 보여졌으며; 대조적으로, 증가된 세포독성은 28/z 세포내 신호전달 도메인이 있는 항-MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ CAR(31345)에 의해 보여졌다. MAGEA4⁺HLA-A2⁺ A375 및 SK-MEL-37 세포의 중간 정도의 세포독성은 BB/z 세포내 신호전달 도메인이 있는 항-MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ CAR(33229)에 의해 보여졌으며; 대조적으로, 증가된 세포독성은 28/z 세포내 신호전달 도메인이 있는 항-MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ CAR(33229)에 의해 보여졌고 최소 배경 세포독성이 CTL CAR 작제물에 의해 유도되었다. MAGEA4⁺HLA-A2⁺ A375 세포의 중간 정도의 세포독성은 BB/z 세포내 신호전달 도메인이 있는 항-MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ CAR(34852)에 의해 보여졌으며; 대조적으로, 증가된 세포독성은 28/z 세포내 신호전달 도메인이 있는 항-MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ CAR(34852)에 의해 보여졌다.

도 8은 실시예 6에서 사용된 예시적인 CAR 작제물의 예시를 나타낸다.

도 9는 BB/z 또는 28/z CAR로 포맷될 때 A375 종양을 제거하는 MAGEA4(230-239) 결합체 33229의 능력을 비교하는 생체내 용량-반응 연구 실험을 나타낸다. 이전 비-용량-반응 연구에서 나타난 바와 같이, 28/z CAR T는 우수한 생체내 항-종양 활성 및 항-종양 동역학을 입증한다.

도 10은 실시예 7에서 사용된 예시적인 CAR 작제물의 예시를 나타낸다.

도 11은 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR T 세포가 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR T 세포와 비교하여 우수한 생체내 항-종양 활성 및 항-종양 동역학을 나타냄을 입증한다. 실험 매개변수는 실시예 8에서 논의된다.

도 12는 실시예 6 및 8에서 사용된 예시적인 CAR 작제물의 예시를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

일반

[0019]

일부 측면에서, 본원에는 분화 클러스터 28 제타(CD28/ζ) 도메인을 포함하는 적어도 하나의 세포질내/공동자극 영역을 포함하는 CAR 폴리펩티드 및 상기 CAR 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 제공된다. CD28/ζ 도메인은 인간 CD28/ζ 도메인일 수 있다. 일부 구현예에서, CAR 폴리펩티드는 분화 클러스터 3 제타(CD3/ζ) 도메인을 포함하는 적어도 하나의 세포질내 신호전달 영역을 추가로 포함한다. CAR 폴리펩티드는 또한 저밀도 암 항원 및/또는 그루브 내 펩티드 항원에 특이적인 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다. 또한 본원에는 본원에 개시된 CAR 폴리펩티드를 발현하는 면역 세포, 뿐만 아니라 본원에 개시된 CAR 폴리펩티드를 발현하는 면역 세포를 포함하는 세포 은행이 제공된다.

[0020]

[0021]

본원에 개시된 바와 같이, PIG 항원 또는 저밀도 암 항원을 특징으로 하는 암은 종종 종양 내에서 낮은 표적 카피 수로 존재하기 때문에 통상적인 암 요법을 회피한다. 추가로, PIG 또는 저밀도 암 항원을 특징으로 하는 고형 종양은 CAR-T 요법에 더 내성이 있을 수 있고 세포 표면 항원이 아니라, 암 관련 펩티드 내의 그루브(groove)에 존재하기 때문에 치료하기가 더 어려울 수 있다. 따라서, 암, 특히 고형 종양을 특징으로 하는 암에서 CAR 요법의 효능을 증가/향상시키기 위해 PIG 및/또는 저밀도 암 항원을 효과적으로 표적할 수 있는 본원에 제공된 개선된 CAR 요법이 필요하다.

[0022]

본원에 개시된 방법은 본원에 개시된 CAR 폴리펩티드를 발현하는 세포를 포함하는 조성물을 투여함으로써 대생체에서 종양을 치료하는 방법을 포함한다.

[0023]

일부 구현예에서, 본원에 개시된 CAR 폴리펩티드는 저밀도 암 항원 또는 PIG 항원에 대한 특이성을 갖는다. 저밀도 암 항원은 임의의 암 항원을 포함하나 이에 제한되지 않으며 여기서 암 항원의 5000개 미만, 4000개 미만, 3000개 미만, 2000개 미만, 1500개 미만, 1000개 미만, 900개 미만, 800개 미만, 700개 미만, 600개 미만, 500개 미만, 400개 미만, 300개 미만, 200개 미만, 또는 100개 미만의 카피가 전형적으로 고형 종양에서 발견된다. 암 항원은 MAGEA4, 티로시나제, HPV16 E7, 또는 NY-ESO 펩티드일 수 있다. 암 항원은 MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉, MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄, Tyr₃₆₉₋₃₇₇, HPV16E7₁₁₋₁₉, 또는 NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅로부터 선택된 에피토프를 포함할 수 있다. 예를 들어, CAR은 MAGEA4, 티로시나제, HPV16 E7, 또는 NY-ESO 펩티드의 에피토프 서열과 같은, 저밀도 또는 PIG 항원에 특이적인 항체의

가변 경쇄 및/또는 중쇄, 또는 이의 부분을 사용하는 항원-결합 도메인을 포함할 수 있다.

- [0024] **정의**
- [0025] 편의상, 명세서, 실시예, 및 첨부된 청구범위에서 이용되는 특정 용어는 여기에 모여져 있다.
- [0026] 관사는 관사의 문법적 대상 중 하나 또는 하나 초과(즉, 적어도 하나)를 지칭하기 위해 본원에서 사용된다. 예로서, "요소"는 하나의 요소 또는 하나 초과(즉, 적어도 하나)의 요소를 의미한다.
- [0027] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "투여하는"은 대상체에게 약제학적 제제 또는 조성물을 제공하는 것을 의미하고, 전문 의료진에 의한 투여 및 자기-투여를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 이러한 제제는 예를 들어, 본원에 제공된 CAR T 세포를 함유할 수 있다.
- [0028] 용어 "아미노산"은 아미노 기능성 및 산 기능성을 둘 다 포함하고 자연 발생 아미노산의 중합체에 포함될 수 있는, 자연적이든 또는 합성이든 모든 분자를 포함하는 것으로 의도된다. 예시적인 아미노산은 자연 발생 아미노산; 이의 유사체, 유도체 및 동족체; 가변 측쇄를 갖는 아미노산 유사체; 및 전술한 것 중 임의의 것의 모든 입체이성질체를 포함한다.
- [0029] 용어 "결합하는" 또는 "상호작용하는"은 회합을 지칭하며, 이는 예를 들어, 생리학적 조건 하에 정전기, 소수성, 이온성 및/또는 수소-결합 상호작용으로 인한, 2개 분자 사이, 예를 들어, 펩티드와 결합 파트너 또는 제제, 예를 들어, 소분자 사이의 안정된 회합일 수 있다.
- [0030] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "암"은 고형 종양 및 혈액 매개 종양을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 용어 암은 자궁경부, 항문, 질, 외음부, 음경, 혀바닥, 후두, 및 편도를 포함하는, 피부, 조직, 기관, 뼈, 연골, 혈액, 및 혈관의 질환을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 용어 "암"은 원발성 및 전이성 암을 추가로 포함한다.
- [0031] 용어 "키메라 항원 수용체"(CAR)는 표적 세포 상에 존재하는 성분에 대한 결합 도메인, 예를 들어 원하는 항원(예를 들어, 종양 항원)에 대한 항체-기반 특이성을 T 세포 수용체-활성화 세포내 도메인과 조합하여 특이적 항-표적 세포 면역 활성을 나타내는 키메라 단백질을 생성하는 분자를 지칭한다. 일반적으로, CAR은 T 세포 항원 수용체 복합체 체타 쇠의 세포내 신호전달 도메인에 융합된 세포외 단일 쇠 항원-결합 도메인(scFv)으로 이루어지고, T 세포에서 발현될 때, 단클론 항체의 특이성에 기반한 항원 인식을 재지시하는 능력을 갖는다.
- [0032] "공동자극 도메인" 또는 "공동자극 분자"는 공동자극 리간드와 특이적으로 결합하여, 증식과 같으나 이에 제한되지 않는, 세포에 의한 공동자극 반응을 매개하는 T-세포 상의 동족 결합 파트너를 지칭한다. 공동자극 도메인은 인간 공동자극 도메인일 수 있다. 예시적인 공동자극 분자는 CD28, 4-1BB, CD27, CD8, 4-1BB(CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능-연관 항원-1(LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, 및 B7-H3을 포함한다.
- [0033] "공동자극 리간드"는 T-세포 상의 동족 공동자극 분자에 특이적으로 결합하여, 증식 활성화, 분화 등을 포함하나 이에 제한되지 않는, T 세포 반응을 매개하는 신호를 제공하는 항원 제시 세포 상의 분자를 지칭한다. 공동자극 리간드는 CD7, B7-1(CD80), B7-2(CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, 유도성 공동자극 리간드(ICOS-L), 세포간 접착 분자(ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, 림프독신 베타 수용체, 3/TR6, ILT3, ILT4, Toll 리간드 수용체에 결합하는 작용제 또는 항체 및 B7-H3과 특이적으로 결합하는 리간드를 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0034] "공동자극 신호"는 1차 신호와 조합하여, T 세포 증식 및/또는 주요 분자의 상향조절 또는 하향조절을 야기하는 신호를 지칭한다.
- [0035] 용어 "에피토프"는 항체 또는 면역 세포(예를 들어, T 세포)에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 결정인자를 의미한다. 에피토프는 일반적으로 아미노산 또는 당 측쇄와 같은 분자의 화학적 활성 표면 그룹화로 이루어진다. 특정 에피토프는 CAR 또는 항체가 결합할 수 있는 아미노산의 특정 서열에 의해 정의될 수 있다.
- [0036] "유전자 작제물"은 폴리펩티드에 대한 "코딩 서열"을 포함하거나 또는 달리 생물학적 활성 RNA(예를 들어, 안티센스, 디코이(decoy), 리보자임 등)로 전사될 수 있고, 세포, 예를 들어, 포유동물 세포 내에 형질감염될 수 있고, 작제물로 형질감염된 세포에서 코딩 서열의 발현을 유발할 수 있는 벡터, 플라스미드, 바이러스 게놈 등과 같은 핵산을 지칭한다. 유전자 작제물은 코딩 서열, 뿐만 아니라 인트론 서열, 폴리아데닐화 부위, 복제 기점, 마커 유전자 등에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 조절 요소를 포함할 수 있다.
- [0037] 용어 "리간드-결합 도메인" 및 "항원-결합 도메인"은 본원에서 상호교환가능하게 사용되고, 미리 결정된 항원에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체의 부분을 지칭한다.

- [0038] 용어 "링커"는 당업계에서 인식되며 2개의 폴리펩티드와 같은 2개의 화합물을 연결하는 분자 또는 분자의 그룹을 지칭한다. 링커는 단일 연결 분자로 구성될 수 있거나 또는 연결 분자 및 특정 거리만큼 연결 분자와 화합물을 분리하도록 의도된 스페이서 분자를 포함할 수 있다.
- [0039] 용어 "에 작동가능하게 연결된"은 핵산과 또 다른 핵산 서열의 기능적 관계를 지칭한다. 프로모터, 인핸서, 전사 및 번역 정지 부위, 및 다른 신호 서열은 다른 서열에 작동가능하게 연결된 핵산 서열의 예이다. 예를 들어, 전사 제어 요소에 DNA의 작동가능한 연결은 이러한 DNA의 전사가 DNA를 특이적으로 인식하고, 이에 결합하고 이를 전사하는 RNA 폴리머라제에 의해 프로모터로부터 개시되도록 하는 DNA와 프로모터 사이의 물리적 및 기능적 관계를 지칭한다.
- [0040] 본원에 사용된 바와 같이, 어구 "약제학적으로 허용되는"은 건전한 의학적 판단의 범위 내에서, 합리적인 이익/위험 비율에 비례하여, 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응, 또는 다른 문제 또는 합병증 없이 인간 및 동물의 조직과의 접촉에 사용하기에 적합한 제제, 화합물, 물질, 조성물, 및/또는 투여 형태를 지칭한다.
- [0041] 본원에 사용된 바와 같이, 어구 "약제학적으로 허용되는 담체"는 체내의 한 기관, 또는 부분에서, 체내의 또 다른 기관, 또는 부분으로 제제를 운반 또는 수송하는 데 수반되는, 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 또는 용매 캡슐화 물질과 같은 약제학적으로 허용되는 물질, 조성물 또는 비히클을 의미한다. 각 담체는 제형의 다른 성분과 호환할 수 있고 환자에게 해를 끼치지 않는다는 의미에서 "허용가능한" 것이어야 한다. 약제학적으로 허용되는 담체로서 역할을 할 수 있는 물질의 일부 예는 다음을 포함한다: (1) 당, 예컨대 락토스, 글루코스 및 수크로스; (2) 전분, 예컨대 옥수수 전분 및 감자 전분; (3) 셀룰로스, 및 이의 유도체, 예컨대 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스 및 셀룰로스 아세테이트; (4) 분말화 트라가칸트; (5) 맥아; (6) 젤라틴; (7) 활석; (8) 부형제, 예컨대 코코아 버터 및 좌제 왁스; (9) 오일, 예컨대 땅콩유, 면실유, 홍화유, 참깨유, 올리브유, 옥수수유 및 대두유; (10) 글리콜, 예컨대 프로필렌 글리콜; (11) 폴리올, 예컨대 글리세린, 소르비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜; (12) 에스테르, 예컨대 에틸 올레이트 및 에틸 라우레이트; (13) 한천; (14) 완충제, 예컨대 수산화마그네슘 및 수산화알루미늄; (15) 알긴산; (16) 무발열원수; (17) 등장성 염수; (18) 링거 용액; (19) 에틸 알코올; (20) pH 완충 용액; (21) 폴리에스테르, 폴리카보네이트 및/또는 폴리무수물; 및 (22) 약제학적 제형에서 이용되는 다른 무독성 호환성 물질.
- [0042] 용어 "폴리뉴클레오티드", 및 "핵산"은 상호교환가능하게 사용된다. 이들은 단일 뉴클레오티드 또는 하나의 뉴클레오티드의 3' 위치에서 포스페이트 기에 의해 또 다른 뉴클레오티드의 5' 단부에 연결된 2개 이상의 뉴클레오티드를 포함하는, 천연 또는 합성 분자, 또는 이의 일부 조합을 지칭한다. 뉴클레오티드의 중합체 형태는 길이에 의해 제한되지 않고 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드, 또는 이의 유사체를 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 임의의 3차원 구조를 가질 수 있고, 임의의 기능을 수행할 수 있다. 다음은 폴리뉴클레오티드의 비제한적인 예이다: 유전자 또는 유전자 단편의 코딩 또는 비-코딩 영역, 연결 분석에서 정의된 유전자좌(좌위), 엑손, 인트론, 메신저 RNA(mRNA), 전달 RNA, 리보솜 RNA, 리보자임, cDNA, 재조합 폴리뉴클레오티드, 분지형 폴리뉴클레오티드, 플라스미드, 벡터, 임의의 서열의 단리된 DNA, 임의의 서열의 단리된 RNA, 핵산 프로브, 및 프라이머. 폴리뉴클레오티드는 메틸화 뉴클레오티드 및 뉴클레오티드 유사체와 같은 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 존재하는 경우, 뉴클레오티드 구조에 대한 변형은 중합체의 조립 전 또는 후에 부여될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 표지화 성분과의 접합에 의해서와 같이 추가로 변형될 수 있다. 본원에 제공된 모든 핵산 서열에서, U 뉴클레오티드는 T 뉴클레오티드와 상호교환가능하다. 폴리뉴클레오티드는 핵산이 자연에서 발견되는 세포와 반드시 연관되고/되거나, 자연에서 연결된 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된 것은 아니다.
- [0043] 용어 "전암성 병변" 또는 "전암성 병태"는 암의 증가된 위험과 연관된 비정형 세포 및/또는 조직을 지칭한다. 용어 "전암성 병변"은 예를 들어, 동일 반응계에서 이형성증, 양성 신생물, 또는 암종을 지칭할 수 있다.
- [0044] 본원에 사용된 바와 같이, 병태를 "예방하는" 치료제는 장애 또는 병태의 발병 전에 통계적 샘플에 투여될 때, 치료되지 않은 대조군 샘플에 비해 치료된 샘플에서 장애 또는 병태의 발생을 감소시키거나, 또는 치료되지 않은 대조군 샘플에 비해 장애 또는 병태의 하나 이상의 증상의 발병을 지연시키거나 또는 중증도를 감소시키는 화합물을 지칭한다.
- [0045] 본원에 사용된 바와 같은 CAR의 "신호 전달 도메인" 또는 "신호전달 도메인"은 세포의 리간드 결합 도메인이 표적에 결합하여 면역 세포 및 면역 반응의 활성화를 초래한 후 세포내 신호전달을 담당한다. 다시 말해서, 신호 전달 도메인은 CAR이 발현되는 면역 세포의 정상 효과기 기능 중 적어도 하나의 활성화를 담당한다. 예를 들어, T 세포의 효과기 기능은 사이토카인의 분비를 포함하는 세포용해 활성 또는 헬퍼 활성일 수 있다. 따라서, 용어

"신호 전달 도메인"은 효과기 기능 신호를 전달하고 세포가 특수 기능을 수행하도록 지시하는 단백질의 부분을 지칭한다. CAR에서 사용하기 위한 신호 전달 도메인의 예는 항원 수용체 관여 후 신호 전달을 개시하는 것과 협력하여 작용하는 T 세포 수용체 및 공동 수용체의 세포질 서열, 뿐만 아니라 이들 서열의 임의의 유도체 또는 변이체 및 동일한 기능적 능력을 갖는 임의의 합성 서열일 수 있다. 일부 경우에, 신호전달 도메인은 세포질 신호전달 서열의 2가지 별개의 부류, 즉, 항원-의존적 1차 활성화를 개시하는 것들, 및 항원-독립적 방식으로 작용하여 2차 또는 공동자극 신호를 제공하는 것들을 포함한다. 1차 세포질 신호전달 서열은 ITAM의 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프로 알려진 신호전달 모티프를 포함할 수 있다. ITAM은 syk/zap70 클래스 티로신 키나제에 대한 결합 부위로서 역할을 하는 다양한 수용체의 세포질내 꼬리에서 발견된 잘 정의된 신호전달 모티프이다. 예시적인 ITAM은 TCR ζ , FcR γ , FcR β , FcR ϵ , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD5, CD22, CD79a, CD79b 및 CD66d로부터 유래된 것들을 포함한다.

[0046] 본원에 사용된 바와 같은 "스페이서"는 단백질(예를 들어, 융합 단백질의 것들)을 연결하는 펩티드를 지칭한다. 일반적으로, 스페이서는 단백질을 연결하거나 또는 단백질 사이의 약간의 최소 거리 또는 또는 다른 공간적 관계를 보존하는 것 이외에 특정한 생물학적 활성이 없다. 그러나, 스페이서의 구성적 아미노산은 분자의 접힘, 순 전하, 또는 소수성과 같은 분자의 일부 특성에 영향을 미치도록 선택될 수 있다.

[0047] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "특이적으로 결합하는" 또는 "특이적 결합"은 폴리펩티드(CAR 폴리펩티드 포함)를 언급할 때 단백질 및 다른 생물체계의 이중 집단에서 단백질 또는 폴리펩티드 또는 수용체의 존재를 결정하는 결합 반응을 지칭한다. 따라서, 지정된 조건(예를 들어 항체의 경우 면역검정 조건) 하에, 명시된 리간드 또는 항체는 샘플에 존재하는 다른 단백질 또는 리간드 또는 항체가 유기체에서 접촉할 수 있는 다른 단백질에 유의한 양으로 결합하지 않을 때 특정 "표적"에 "특이적으로 결합한다"(예를 들어 항체는 내피 항원에 특이적으로 결합한다). 일반적으로, 제2 분자에 "특이적으로 결합하는" 제1 분자는 제2 분자와 약 $10^5 M^{-1}$ 초과(예를 들어, $10^6 M^{-1}$, $10^7 M^{-1}$, $10^8 M^{-1}$, $10^9 M^{-1}$, $10^{10} M^{-1}$, $10^{11} M^{-1}$, 및 $10^{12} M^{-1}$ 또는 그 이상)의 친화 상수(Ka)를 갖는다. 예를 들어, MHC(예를 들어, 클래스 I MHC 또는 클래스 II MHC) 상에 제시된 펩티드에 결합하는 PIG-특이적 CAR의 능력의 경우; 전형적으로, CAR은 적어도 약 $10^{-4} M$ 이하 KD의 친화도로 그의 펩티드/MHC에 특이적으로 결합하고, 비-특이적 및 관련 없는 펩티드/MHC 복합체(예를 들어, BSA 펩티드 또는 카세인 펩티드를 포함하는 것)에 대한 결합에 대해 그의 친화도보다 적어도 10 배 이하, 적어도 100 배 이하 또는 적어도 1000 배 이하인 친화도(KD로 표현)로 미리 결정된 항원/결합 파트너에 결합한다.

[0048] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "대상체"는 치료 또는 요법을 위해 선택된 인간 또는 비-인간 동물을 의미한다.

[0049] 용어 "형질전환", "형질감염", 또는 "형질도입"은 상기 세포의 염색체 DNA에 핵산을 도입하는 것을 포함하는 수용자 세포(예를 들어, 포유동물 세포) 내에 핵산, 예를 들어, 발현 벡터를 도입하는 것을 의미한다.

[0050] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "치료"는 임상 병리 과정 동안 치료되는 개체의 자연적 과정을 변경하도록 설계된 임상 개입을 지칭한다. 치료의 바람직한 효과는 진행 속도 감소, 병리학적 상태 개선 또는 완화, 및 특정 질환, 장애, 또는 병태의 완화 또는 개선된 예후를 포함한다. 개체는 예를 들어, 특정 질환, 장애, 또는 병태와 연관된 하나 이상의 증상이 완화되거나 또는 제거되는 경우, 성공적으로 "치료된다."

[0051] 용어 "변이체"는 보존적 아미노산 치환, 비-보존적 아미노산 치환(예를 들어, 축퇴 변이체), 아미노산을 암호화하는 각 코돈(예를 들어, DNA 및 RNA)의 동요 위치 내의 치환, 펩티드의 C-말단에 첨가된 아미노산, 또는 참조 서열에 대해 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖는 펩티드를 갖는 아미노산 또는 펩티드 서열을 지칭한다.

[0052] 용어 "벡터"는 핵산이 유기체, 세포, 또는 세포 성분 사이에 번식 및/또는 전달될 수 있는 수단을 지칭한다. 벡터는 핵산이 연결된 플라스미드, 바이러스, 박테리오파지, 프로-바이러스, 파지미드, 트랜스포존, 및 인공 염색체 등을 포함하고, 자율적으로 복제하거나 또는 숙주 세포의 염색체 내에 통합할 수 있거나 또는 하지 않을 수 있다. 이러한 벡터는 (예를 들어, 전사 제어 요소에 연결된) 세포에 의한 발현에 적합한 형태로 유전자 작제물을 함유하는 임의의 벡터, (예를 들어, 플라스미드, 코스미드 또는 파지 염색체)를 포함할 수 있다.

[0053] 특정 구현예에서, 제제는 단독으로 사용되거나 또는 또 다른 유형의 치료제와 함께 공동으로 투여될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 어구 "공동 투여" 또는 "공동으로 투여된"은 이전에 투여된 치료제가 체내에서 여전히 효과적인 동안 제2 제제가 투여되도록 2개 이상의 상이한 치료제의 임의의 형태의 투여를 지칭한다(예를 들어, 2개의 제제는 대상체에서 동시에 효과적이며, 이는 2개 제제의 상승 효과를 포함할 수 있다). 예를 들어, 상이한 치료제는 동일한 제형 또는 별개의 제형으로 부수적으로 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 특정 구현예

에서, 상이한 치료제는 서로 약 1 시간, 약 12 시간, 약 24 시간, 약 36 시간, 약 48 시간, 약 72 시간, 또는 약 1 주 이내에 투여될 수 있다. 따라서, 이러한 치료를 받는 대상체는 상이한 치료제의 조합 효과로부터 이익을 얻을 수 있다.

[0054] **키메라 항원 수용체(CAR)**

[0055] T 세포의 신규 특이성은 유전자이식 T 세포 수용체 또는 키메라 항원 수용체(CAR)의 유전적 전달을 통해 성공적으로 생성되었다. CAR은 단일 융합 분자에서 하나 이상의 신호전달 도메인 및/또는 공동자극 도메인과 연관된 표적화 모이어티를 포함하는 수용체이다. 특정 구현예에서, CAR의 결합 모이어티는 가요성 링커에 의해 연결된 단클론 항체의 경쇄 및 중쇄 가변 단편을 포함하는, 단일 쇄 항체(scFv)의 항원-결합 도메인을 포함한다. 특정 구현예에서, 결합 모이어티는 단클론 항체의 막관통 및 힌지 도메인을 추가로 포함한다.

[0056] 특정 측면에서, 본원에 제공된 CAR 폴리펩티드는 분화 클러스터 28 제타(CD28/ ζ) 도메인을 포함하는 적어도 하나의 세포질내/공동자극 영역을 포함한다. 추가로, CAR의 힌지/스페이서 영역 및/또는 막관통 영역 또는 CAR의 막관통 영역은 CD28/ ζ 도메인을 포함할 수 있다. CAR은 서열번호 1 내지 3에 제시된 아미노산 서열로부터 선택된 적어도 하나의 분화 클러스터 28 제타(CD28/ ζ) 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 본원에 개시된 CAR 폴리펩티드는 서열번호 1 내지 3에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 상동성을 갖는 적어도 하나의 분화 클러스터 28 제타(CD28/ ζ) 아미노산 서열을 포함할 수 있다. CAR 폴리펩티드는 서열번호 1 내지 3에 제시된 3개의 서열을 모두 포함할 수 있다. 예를 들어, CAR 힌지 도메인은 서열번호: 1을 포함할 수 있고, 막관통 도메인은 서열번호: 2를 포함할 수 있고, 공동자극 도메인은 서열번호: 3을 포함할 수 있다.

[0057] 표 1: 예시적인 CD28/ ζ 서열.

서열 번호:	도메인	서열
1	힌지	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKP
2	막관통	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
3	공동자극	RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFA AYRS

[0058]

[0059] 일부 구현예에서, CAR은 저밀도 암 항원 및/또는 그루브 내 펩티드 항원에 특이적인 항원 결합 도메인을 포함한다. 예시적인 PIG 항원 및 저밀도 암 항원은 표 1에서 찾을 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 CAR 폴리펩티드는 표 2에 나열된 에피토프에 특이적으로 결합한다. 일부 구현예에서, 본 개시내용은 흑색종-연관 항원 A4(MAGE-A4)-특이적 키메라 항원 수용체(CAR)를 제공하며, 여기서 상기 MAGE-A4-특이적 키메라 항원 수용체는 서열번호: 4의 아미노산 286-294, 또는 이의 일부와 상호작용한다. MAGE-A4(286-294)의 폴리펩티드 서열은 서열번호: 5로서 주어진다.

서열번호: 4	MSSEQKSQHCCKPEEGVEAQEEALGLVGAQAPTTEEQEA AV SSSSPLVPGTLEEVPAAESAGPPQSPQGASALPTTISFTCWRQ PNEGSSSQEEEGPSTSPDAESLFREALSNKVDELAHFLLRKY RAKELVTKAEMLERVIKNYKRCFPVIFGKASESLKMFIDV KEVDPASNTYTLVTCLGLSYDGLLGNQIFPKTGLLIIVLGTI AMEGDSASEEIIWEELGVMGVYDGREHTVYGEPRKLLTQD WVQENYLEYRQVPGSNPARYEFLWGPRLAETSIVKVL EH VVRVNARVRIAYPSLREAALLEEEEGV
서열번호:5	KVLEHVVRV

[0060]

[0061] 표 2: 예시적인 PIG 암 항원.

항원 펩티드	에피토프	추정된 카피 수	HLA
티로시나제	Tyr ₃₆₉₋₃₇₇	2000-4500개 카피	HLA-A2
MAGEA4	MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₆	400-1000개 카피	HLA-A2
MAGEA4	MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉	대략 500개 카피	HLA-A2
NY-ESO	NY-ESO ₁₅₇₋₁₆₅	200-400개 카피	HLA-A2
HPV16 E7	HPV16E7 ₁₁₋₁₉	50개 카피	HLA-A2

[0062]

[0063]

추가 예시적인 PIG 에피토프는 흑색종-연관 항원 3(MAGE-A3); 흑색종-연관 항원 1(MAGE-1); 흑색종-연관 항원 10(MAGEA10); T 세포에 의해 인식된 흑색종 항원 1(MART-1), 엡스타인-바 바이러스(EBV) 잠재성 막 단백질 2(LMP2); 마우스 2 분 2(MDM2); 흑색종-연관 항원 1(MAGE-A1); 당단백질 100(gp100); 종양 단백질 p53(P53); 소수 조직적합성 항원(mHag); 소수 조직적합성 항원 HA-1(HA-1); Y 염색체 상의 편재적으로 전사된 테트라트리코펩티드 반복 유전자(UTY); 리보솜 단백질 S4, Y-연결(RPS4Y); MHC 클래스-II-제한 데드-박스 RNA 헬리카제 Y(DBY); 흑색종에 대한 세포독성 T 세포(CTL)-인식된 항원(CAMEL); 윌름스 종양 1(WT1); 신 세포 암종(RCC) 종양 항원; 마우스 비만세포종 P815; 류신 지퍼 단백질 4(LUZP4); 암/고환-연관 SPANX 항원; ATPase 패밀리 AAA 도메인 함유 단백질 2(ATAD2); Rhox 호메오박스 패밀리 구성원 2(RHOXF2); 암/고환 항원 136; F-박스 단백질 39(FBX039); TDRD4; WW 도메인-결합 단백질 2 N-말단-유사(WBP2NL) 또는 암배아 항원(CEA)으로부터 유래될 수 있다.

[0064]

또한 본원에는 서열번호 6 내지 13, 29, 30, 33, 또는 34에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 CAR 폴리펩티드가 제공된다. 본원에 개시된 CAR 폴리펩티드는 서열번호 6 내지 13, 29, 30, 33, 또는 34에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 상동성을 포함할 수 있다.

[0065] 표 3: 예시적인 CAR 폴리펩티드

서열 번호:	CAR ID	서열
6	HPV 17363 VL-VH BBz	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSISSYLNW YQKPGKAPKLLIYAVSILQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTINSLQPEDFATYSCQQTYSPPITFGQGTRLE IKGGGGSGGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSYAMTWVRQAPGMGLEWVS VISGSGSETYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCVKDSSYRSSRAYYYYGMD VWGLGTTVTVSSGGGGSTTPAPRPPTPAPTIAS QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAP LAGTCGVLLLSL VITLYCKRGRKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSA DAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR
7	HPV 17363 VL-VH CD28 ^h 지 TM cytoCD3z	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSISSYLNW YQKPGKAPKLLIYAVSILQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTINSLQPEDFATYSCQQTYSPPITFGQGTRLE IKGGGGSGGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSYAMTWVRQAPGMGLEWVS VISGSGSETYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCVKDSSYRSSRAYYYYGMD VWGLGTTVTVSSGGGGSIEVMYPPPYLDNEKSN GTIIHVKGKHLCPSPLPFGPSKPFVVLVVGGVL ACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPR RPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAP AYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR
8	MAGEA4 (286-294) 31345 VL-VH BBz CAR	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSISSYLNW YQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT DFLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRL EIKRGGGGSGGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLVKP GGLRLSCAASGFTFSEYYMTWIRQAPGGGLEW VSYISSGFNIYYADSVKGRFTISRDNKNSLFLQ MNSLRVEDTAVYYCAREGVTDGMDVWVWQGT TVSSGGGGSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGV

[0066]

		LLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQE EDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQG QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
9	MAGEA4 (286-294) 31345 VL-VH CD28z 흰지 TMcyto CD3z CAR	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSISSYLNW YQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYS TPPITFGQGTRL EIKRGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLVKP GGSLRLSCAASGFTFSEYMTWIRQAPGQGLEW VSYISSGFNIYYADSVKGRFTISRDNKNSLFLQ MNSLRVEDTAVYYCAREGVTGMDVWVGQGT VTVSSGGGGSIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKG KHLCPSPLPFGPSKPFVWLVVVGGVLACYSLLVT VAFIIFWVRSKRSLHSDYMNMTPRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQN QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
10	NY-ESO(157- 165) 28105 VH-VL BBz CAR	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCEASGFIFDDYA MHWVRQAPGKLEWVSLISGDGDIYYADSVKG RFTISRDNKNSLYLQMNSLIHEDTALYYCAKDW VFGVVMTHYWYFGLDVWGQGTTVTVSSGGGGS GGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASEGDRVTITCR ASQSISTYLNWYQKPGKAPKLLIYGASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYS TPPITFGQGTKVEIKGGGGSTTPAPRPPTPAPTIA SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPF MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRS ADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY SEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQUALPPR
11	NY-ESO(157- 165) 28105 VH-VL CD28z 흰지 TMcyto CD3z CAR	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCEASGFIFDDYA MHWVRQAPGKLEWVSLISGDGDIYYADSVKG RFTISRDNKNSLYLQMNSLIHEDTALYYCAKDW VFGVVMTHYWYFGLDVWGQGTTVTVSSGGGGS GGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASEGDRVTITCR ASQSISTYLNWYQKPGKAPKLLIYGASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYS TPPITFGQGTKVEIKGGGGSIEVMYPPPYLDNEKS NGTIIHVKGKHLCPSPLPFGPSKPFVWLVVVGGV

[0067]

		LACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMT RRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSAD APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
12	티로시나제 D11 VL-VH BBz CAR	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASDIIYSNLAW YQQKQKSPQLLVYAATNLAAGVPSRFSGSGSG TQYSLKINSLQSEDFGTYYCQHFWSISIFSGGTK LEIKGGGGSGGGSGGGGSQVQLKESGPGLVAP SQLSITCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGKLEWL GVIWAGGTTNYSALMSRLSISRDNSSQVFLE MNSLQTDDTAIYYCARDGHFHFDFWQGTTLTV SSGGGGSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP AAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLS LVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQN QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMALPPR
13	티로시나제 D11 VL-VH CD28 힌지 TM cyto CD3z CAR	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASDIIYSNLAW YQQKQKSPQLLVYAATNLAAGVPSRFSGSGSG TQYSLKINSLQSEDFGTYYCQHFWSISIFSGGTK LEIKGGGGSGGGSGGGGSQVQLKESGPGLVAP SQLSITCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGKLEWL GVIWAGGTTNYSALMSRLSISRDNSSQVFLE MNSLQTDDTAIYYCARDGHFHFDFWQGTTLTV SSGGGGSIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHL CPSPLFPGPSKPFVVLVVVGGVLACYSLLVTVAF IIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQ YAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLY NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMALPPR
29	MAGEA4 (230-239) 33229 VL-VH BBz CAR	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCQASQDISNYLN WYQQKRGKAPKLLIYDASILETGVPFSRFSGSGSG TDFTFTISSLQPEDIATYFCQFDNVPLTFGGGK VEIKGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQP GRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKLE WVSGISWNSGSIAYADSVKGRFTISRDNKNSLY LQMNSLRSEDTALYHCAKDWRRTNYGMDVW GQGTTVTVSSGGGGSTTPAPRPPTPAPTIASQPL SLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAG

[0068]

		TCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPV QTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAP AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMVSKGE ELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY GKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFSR YPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNY KTRAEVKFEGDTLVNRIELKIDFKEDGNILGHK LEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIED GSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSA LSKDPNEKRDMVLEFVTAAGITLGMDEL YK*
30	MAGEA4 (230-239) 33229 VL-VH CD28z CAR	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCQASQDISNYLN WYQQKRGKAPKLLIYDASILETGVPFSRFSGSGSG TDFTFITISLQPEDATYFCQQFDNVPLTFGGGTK VEIKGGGGSGGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQP GRSLRLSCAASGFTFDYAMHWVRQAPGKGLE WVSGISWNSGSIA YADSVKGRFTISRDNANKNSLY LQMNSLRSEDALYHCAKDWRRRTNYGMDVW GQGTTVTVSSGGGGSIEVMYPPPYLDNEKSNGTII HVKGKHLCPSPFPGPSKPFVVLVVVGGVLACY SLLVTVAFIIFWVRSKRSLRHSDYMNMTPRRPG PTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAY QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUAL PPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMVSKGEELF TGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYK LTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFSRY DPMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKT RAEVKFEEDTLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLE YNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGS VQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMVLEFVTAAGITLGMDEL YK*
33	MAGEA4(230 -239) 34852 VH-VL BBz CAR P2A- GFP	EVQLLESGLLVQPGGSLRLTCAASGFTFRSYA MSWVRQAPGKGLEWVSTISGNSDSTYYADSVK GRFTISRENSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK DLHITMVRGAIPADVFDIWGQGTMTVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTTITC RASQISIFYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG VPSRFSGSGSETDFTLTISSLPEDFATYVCQQSY STPPITFGQGRLEIKGGGGSTTPAPRPPTPAPTI ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIW

[0069]

		<p>APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPF MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRS ADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY SEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMVS KGEELFTGVVPIVELDGDVNGHKFSVSGEGEGD ATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLYGVQC FSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDD GNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNIL GHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHN IEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQ SALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELY K*</p>
<p>34</p>	<p>MAGEA4(230 -239) 34852 VH-VL CD28^{hi} 지/TM /cytoCD3z CAR P2A- GFP</p>	<p>EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLTCAASGFTFRSYA MSWVRQAPGKGLEWVSTISGNSDSTYYADSVK GRFTISRENSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK DLHITMVRGAIPADVDFDIWGQGTMTVTSVSGGGG SGGGGSGGGGSDIQTQSPSSLSASVGDRTITC RASQISIFYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG VPSRFSGSGSETDFTLTISLQPEDFATYYCQQSY STPPITFGQGRLEIKGGGGSIEVMYPPPYLDNEK SNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVVLVVVGG VLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMT PRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSAD APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMVSKG EELFTGVVPIVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDAT YGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFS RYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGN YKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGH KLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIE DGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQS ALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK *</p>

[0070]

서열 번호	CAR ID	핵산 서열
14	MAGEA4 (286-294) 31345 VL-VH BBz CAR	CATCCAGATG ACCCAGTCTC CATCCTCCCT GTCTGCAICT GTAGGAGACA GAGTCACCAT CACTTGCCGG GCAAGTCAGA GCATTAGCAG CTATTAAAT TGGTATCAGC AGAACCAGG GAAAGCCCTC AAGCTCCTGA TCTATGCTGC ATCCAGTTTG CRAAGTGGGG TCCCGTCRAG GTTCRGTGGC AGTGGATCTG GGACRGTATT CACTCTCACC ATCAGCAGTC TGCACCTGA AGATTTTGC ACTIACACT GTCAACAGAG TTACAGTACC CCTCCGATCA CCTTCGGCCA AGGGACACGA CTGGAGATTA AACGAGTGG AGGCGGTAGT GCGGGAGGG GAAGTGGTGG AGGAGGCTCA CAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGAGGC TTGGTCAAGC CTGGAGGGTC CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACTTTCAGT GAATACTACA TGACCTGGAT CCGCCAGGCT CCAGGGCAGG GGCTGGAGTG GGTTTCATAC ATTAGTAGTA GTGGTTTTAA CATATACTAC GCAGACTCTG TGAAGGGCCG ATCACCATC TCAAGGGACA ACGCCAGAA CTCACTGTTT CTGCRAATGA ACAGCCTGAG AGTCGAGGAC ACGCCGTAT ATTACTGTGC GAGGARAAGT GTACGGGACG GTATGGACGT CTGGGGCRA GGGACCAAGS TCACCTCTC CTCAGGAGT GGTGGARATA CTACRCTCC TGCTCCCGCG CCCCCAACAC CTGCTCCAC TATTGCATCC CAACACTCT CCTCAGACC CGAAGCTTGI CCGCCCGCG CCGGAGGTGC TGTTCACAT AGAGGACTCG ATTTTGTCTG CGACATTTAT AICTGGGCCC CACTTGCAGG TACTTGCAGG GTATTGTCTG TCTCACTTGT TATTACTCTT TATTGCRAAC GGGCCAGAAA GAARCTCCTG TATATATCA AACARCCATT TATGAGACCA GTACAAACTA CTCAGAGGGA AGATGGCTGT AGCTGCCGAT TTCCAGAGA AGAAGRAGGA GGATGTGAAC TGAGAGTGAA GTTCRGCAGG AGCCGAGAGC CCCCCCGTA CAGCAGGGCC CAGAACCCG TCTATAACGA GCTCAATCTA GGACGRAGAG AGGAGTACGA TGTTTTGGAC AAGAGACGTG CCGGGACCC TGAGTGGGG GGAAGCCGA GAAGRAGAA CCTCAGGAA GGCCTGTACA ATRAACTGCA GAAAGATAAG ATGGCCGAGG CCTACAGTGA GATTGGGATG AAAGGCGAGC GCGGGAGGG CAAGGGGAC GATGGCCTT ACCAGGCTC CAGTACAGCC ACCAAGGACA CCTACGAGC CCTTCACATG CAGGCCCTGC CCCCCTGCTA A
15	MAGEA4 (286-294) 31345 VL-VH CD28z 힌지 TMcyto CD3z CAR	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCAICTGTAGGAGACAGA GTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTAAATTGGTAT CAGCRAAACRAGGGRAAGCCCTCAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTG CRAAGTGGGGTCCCGTCRAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACT CTCACCATCAGCAGTCTGCACCTGAAGATTTTGCARCTTACTACTGTCACACG AGTTACAGTACCCCTCCGATCACCTTCGGCCAAAGGACACGACTGGAGATTA CGAGGTGGAGGCGGTAGTGGCGGAGGGCGAAGTGGTGGAGGAGGCTCACAGGTG CAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTC TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTGAATACTACATGACCTGGATCCCG CAGGCTCCAGGGCAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATACATTAGTAGTAGTGGTTTT AACATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCAACATCTCAGGGACAC GCCAAGAACTCACTGTTTCTGCRAATGACACCTCAGAGTCGAGGACAGCGCC GTATATTACTGTGCGRAGAGGTTGTAACGACCGGTATGGACCTCTGGGGCRA GGGACCAAGGTCACCGTCTCCTCAGGAGGTTGGTGAAGTACTACCACTCCTGCT CCCCCCCCCAACACCTGCTCCACTATTGCATCCCAACCACTCTCCTCAGA CCGAAGCTTGTGCCCCGCGCCGGAGGTGCTGTTCACTAGAGGACTCGAT TTTGCTTGGACATTTATATCTGGGCCCCACTTGCAGGTAICTGGCGAGTATTG CTGCTCTCACTTGTATTACTCTTTATTGCAACCGGGCAGAAAGAACTCCTG TATATATTCAACAAACCACTTATGAGCCAGTACAACTACTCAGAGGAAAGAT GGCTGTAGCTGCCGATTTCCRAAGRAGAAAGAGGAGGATGTGACTGAGAGTG RAGTTCAGCAGGAGGCGCAGACGCCCGCCGTAACGAGCGGGCCAGAACCGACTC TATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAAGAGGAGTACGATGTTTTGGACRAGAGA CCGTGGCGGCTCAGTGTGGGGAAAGCCGAAAGRAGAAACCCCTCAGGAA GGCCTGTACATGAACTGCRGAAGATRAGATGGCGGAGGCCATCACTGAGATT GGGATGAAGGGCGAGCGCCGAGGGGCAAGGGGACAGATGGCCCTTACAGGCT CTCAGTACAGCCACCAAGGACACTACGACGCCCTTCACATGCGAGGCCCTGCCC

[0071]

<p>35</p> <p>MAGEA4(230-239) 34852 VH-VL BBz CAR P2A-GFP</p>	<p>CCTCGCTAA</p> <p>GAGGTGCAGCTGCTGGAGRGGGAGGCGCTGGTGCAGCCTGGAGGAAGCCTG AGGCTGACATGCGCAGCACTCCGGCTTCACTTTCCGCTTACGCAATGAGCTGG GTGGGCGAGCCAGCCAGGCAAGGCACTGGAGTGGGTGAGCACAATCTCCGGCAAT TCTGACAGCACATACTATGCCGATTCTGTGAGAGGGCCGCTTTACCAATCCCGG GAGAACTCAAGAATAOCCTGTATCTGCAGATGAACTCTCTGGCGGCGAGGAC ACAGCCGGTGTACTATTGCCCAAGGATCTGCACATCACCAATGGTGGAGGAGCA ATCCAGCAGACGTGTTCGATATCTGGGGCCAGGGCACAAATGGTACCGGTGAGC TCCGGAGGAGGAGGATCCGGGCGAGGAGGCTCTGGAGGAGGAGGAGGAGGACATC CAGATGACCCAGAGCCCTCTAGCCTGTCCGCTCTGTGGGGGATAGAGTGACA ATCACCCTGTAGGGCCAGCCAGTCCATCTCTTTTACCTGAATGGTATCAGCAG AAGCCCGCAGGGCCCTAAGCTGCTGATCTACGCACATCCTCTCTGCAGAGC GGAGTCCATCCAGGTTCCAGCGATCCGGCTCTGAGACGACTTTACACTGACC ATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGATTTCCGCACTACTATTGCCAGCAGAGCTAT TCCACACCCCTATCACTTTGGCCAGGGAACAGGCTGGAGATCAAGGGAGGA GGAGGATCCACCAACAACCCAGCCCTCCGCCACCCACACAGCACCACCAATC GCATCTCAGCCACTGAGCCTGAGACCTGAGGCTGTAGGCCAGCAGCAGGAGGA GCAGTGCACACAGGGGACTGGACTTCCGCTGCGATATACATCTGGGCAACA CTGGCAGGAACATGTGGCGTGTCTGTGTGAGCCTGGTCACTCCCTGTACTGCT AAGAGAGGCGAGGAGAGTGTCTATATCTTACAGCAGCCCTTCACTGGGCCCC GTGCAGAACCCAGSAGGAGGACGGCTGCTCTGTAGATTCCCTGAAGAAGAG GAGGAGGATGTGAGCTGAGGGTGAAGTTTTCTCGGAGGCGGATGCACCAACA TACCAGCAGGACAGAACAGCTGTATACAGAGCTGAATCTGGGCGGAGAGAG GAGTACGACGTGCTGGATAGAGGGCGGGGCGAGAGCCCTGAGATGGGAGGCAAG CCCCAGGAGAAACCCCTCAGGAGGGCTGTACATGAGCTGCAGAGAGCAAG ATGGCCGAGGCTATAGCGAGATCGGCATGAAGGGAGAGGAGGCGCGGGGCAAG GGACAGGATGGCTGTACCAGGGCCTGCCACAGCCACCAAGGACACATATGAT CCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCTCCAGAGGATCCGAGGCCACCACTTTTCT CTGCTGAGCAGGCGAGCCTGAGTGGAGGAACTCTGGACCAATGGTGAACAG GAGAGGAGCTGTTCCCGGACTGGTCCCAATCCTGGTGGAGCTGGAAGGCGAT GTGAATGGCCACAAGTTTTCCGTGCTGGAGAGGAGAGGGCGATGCACCAATC GGCAGCTGACCTGAGTTTCACTGTGCACACCCGGCAAGCTGCCCGTGCCTTGG CCACACTGGTGACAAOCCTGACCTACGGCGTGCAGTGTCTCTAGATATCCA GACCACATGAAGCAGCAGGATTTCTTAAAGAGCGCAATGCCGAGGGCTACGTG CAGGAGAGAACCATCTCTTTAAGGACGATGGCACTATAAGACAGGGGCGGAG GTGAGTTCCAGGGCGACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGCGATCGAG TTTAAGGAGGATGGCAATATCCTGGCCCAAGCTGGAGTACACTATAATTTCT CACACCTGTACTCATGGCCGATAGCAGAGAGAGCCGCACTCAAGTGAATCTT AAGATCAGGCACAATAICGAGGACGGCTCCGTGAGCTGGCCGATCACTACCAG CAGAACACCAATCCGCGAGCGCCCTGTGCTGCTGCCAGATAACTACTATCTG TCTACCCAGAGGCCCTGTCCAGGACCCCAACGAGAGAGCGCGATCACATGGTG CTGCTGGAGTTCTGACACGACAGGAAATCACTCCGGAATGGACGAGCTGTAT AAGTGA</p>
<p>36</p> <p>MAGEA4(230-239) 34852 VH-VL CD28^h 지/TM /cytoCD3z CAR P2A-GFP</p>	<p>GAGGTGCAGCTGCTGGAGRGGGAGGCGCTGGTGCAGCCTGGAGGATCTCTG AGGCTGACCTGCGCAGCAGCGGCTTCACTTTCCGCTTCTACGCAATGAGCTTGG GTGGGCGAGCCAGCCAGGCAAGGCACTGGAGTGGGTGAGCACAATCTCCGGCAAT TCTGACAGCACATACTATGCCGATTCTGTGAGAGGGCCGCTTTACCAATCCCGG GAGAACTCAAGAATACACTGTATCTGCAGATGAACTCTCTGGCGGCGAGGAC ACCCGGGTGTACTATTGCCCAAGGATCTGCACATCACCAATGGTGGCGGAGCA ATCCAGCAGACGTGTTCGATATCTGGGGCCAGGGCACAAATGGTACCGGTGAGC TCCGGAGGAGGAGGATCCGGGCGAGGAGGCTCTGGAGGAGGAGGAGGAGGACATC CAGATGACCCAGAGCCCTCTAGCCTGTCCGCTCTGTGGGGGATAGAGTGACC ATCACCCTGTAGGGCCAGCCAGTCCATCTCTTTTACCTGAATGGTATCAGCAG AAGCCCGCAGGGCCCTAAGCTGCTGATCTACGCACATCCTCTCTGCAGTCT GGAGTCCATCCAGGTTCCAGCGATCCGGATCTGAGACGACTTTACCTGACA ATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGATTTCCGCACTACTATTGTACGACAGAGCTAT TCCACACCCCTATCACTTTGGCCAGGGAACAGGCTGGAGATCAAGGGAGGA GGCGGCGAGCATCGAAGTGTATGCCACCCCTTATCTGGACAACGAGAGTCC AATGGCAACTCATCCAGTGAAGGGCAGCACCTGTGCCAAGCCCTCTGTTC CCAGGACCAATCCAGCCCTTTGGGTGCTGGTGGTGGGAGGCGTGTGGCC TGTACTCCCTGCTGGTGCAGCCTGGCCCTTCACTCTTTTGGGTGAGATCTAAG</p>

[0072]

	<p>CGCAGCGGCTGCTGCACCTCGATTATATGAATATGACCCCAAGGAGCCTGGC CCAACAGAAAGCACTCCAGCCATATGCACCACCAAGGACTTCGRCGCTAC AGAAGCAGGGTGAAGTTTTCTGGAGCGCGGATGCACCAAGCAATCCAGCAGGGA CAGAACCCGCTGTATACAGGCTGAATCTGGGCGAGGCGGAGGAGTATACGCTG CTGGATAGCGGAGAGGCGAGAGCCCTGAGATGGGAGGCAAGCCAGGAGGAG AACCTCAGGAGGGCTGTACCAATGAGCTGCAGAGGACAGATGGCCGAGGCT TATAGCGAGATCCGGCATGAAGGGAGAGGGAGAGGAGGAGGACAGATGGC CTGTACCCAGGGCTGTCCACCGCCACAAAGGACACCTATGATGCCCTGCACATG CAGGCCCTCCCTCCAGGGGATCCGAGCCACAACTTTCTCTGCTGAAGCAG GCAGGCGAGCTGGAGGAGAACTCCAGGACCTATGGTGTCCAGGGAGAGGAGCTG TTCACCGGAGTGGTCCCACTCCTGGTGGAGCTGGACGGGATGTGAATGGCCAC AAGTTTTCCGTGCTGGAGAGGAGAGGGGATGCAACCTACGGCAAGCTGACA CTGAGTTTCACTGCACACAGGCAAGCTGCCAGTCCCTGGCCTACCCCTGGT ACCCACTGACATACGGCGTGCAGTGTCTCCCGCTATCCTGACCAATGAAG CAGCACGATTTCTTAAAGTCTGCGCTGAGGAGGCGCTACGTGCGAGGCGCAC ATCTCTTTAAGGAGGATGGCACTATAAGACCCGCGCGAGGTTGAAGTTGAG GCGCACACTGCTGACAGAACTCAGCTGAAGGCGCATCGACTTTAAGGAGGAT GGCAATACTCCGGCCACAGCTGGAGTACACTATAATAGCCCAACGCTGTAC ATCATGGCCGATAGCAGAAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGGCAC AATATCGAGGACGGCTCCGTGCAGCTGGCCGATCACTACCAGCAGAAACCCCA ATCCGCGACGGACCTGTGCTGCTGCCAGATAACTACTATCTGTCCACAGCTGT GCCTGAGCAGGACCCCAACGAGAGAGAGATCACATGGTGTCTGTGGAGTTT GTGACCGCAGCAGGAAATCACACTGGGAATGGACGAGCTGTACAGTGA</p>
--	---

[0073]

[0074]

특정 구현예에서, 본원에 제공된 CAR의 결합 도메인 및/또는 세포의 도메인은 관심 표적 항원에 결합하는 능력이 있는 CAR을 제공한다. 결합 도메인(예를 들어, 리간드-결합 도메인 또는 항원-결합 도메인)은 생물학적 분자(예를 들어, 세포 표면 수용체 또는 중양 단백질, 또는 이의 성분)를 특이적으로 인식하고 이에 결합하는 능력을 보유하는 임의의 단백질, 폴리펩티드, 올리고펩티드, 또는 펩티드일 수 있다. 결합 도메인은 관심 생물학적 분자에 대한 임의의 자연 발생, 합성, 반-합성, 또는 재조합적으로 생산된 결합 파트너를 포함한다. 예를 들어, 그리고 본원에 추가로 기재된 바와 같이, 결합 도메인은 항체 경쇄 및 중쇄 가변 영역일 수 있거나, 또는 경쇄 및 중쇄 가변 영역은 단일쇄 및 어느 한 방향(예를 들어, V_L - V_H 또는 V_H - V_L)으로 함께 연결될 수 있다. 웨스턴 블롯(Western blot), ELISA, 유세포 분석, 또는 표면 플라즈몬 공명 분석(예를 들어, BIACORE 분석 사용)을 포

함하는, 특정 표적과 특이적으로 결합하는 본 개시내용의 결합 도메인을 식별하기 위한 다양한 검정이 알려져 있다. 표적은 중앙 사멸을 초래하는 효과기 면역 반응을 촉발하는 것이 바람직할 수 있는 관심 임상 항원일 수 있다. CAR 폴리펩티드는 서열번호: 16 내지 19, 31, 또는 37에 제시된 아미노산 서열 중 임의의 하나를 포함하는 가변 경쇄를 포함할 수 있다. 본원에 개시된 가변 경쇄는 서열번호: 16 내지 19, 31, 또는 37에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 상동성을 포함할 수 있다. CAR 폴리펩티드는 서열번호: 20 내지 23, 32, 또는 38에 제시된 아미노산 서열 중 임의의 하나를 포함하는 가변 중쇄를 포함할 수 있다. 본원에 개시된 가변 중쇄는 서열번호: 20 내지 23, 32, 또는 38에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 상동성을 포함할 수 있다.

[0075]

표 4: 예시적인 가변 경쇄

서열 번호:	작제물 ID	서열
16	HPV (대조군 CAR) 17363 VL-VH BBz	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYAVSILQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTINSLQPEDFATYSCQQTYSPPITFG QGTRLEIK
17	MAGEA4 (286-294) 31345 VL-VH BBz CAR	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSPPITFG QGTRLEIKR
18	NY-ESO(157-165) 28105 VH-VL BBz CAR	DIQMTQSPSSLSASEGDRVTITCRASQSISTYLN WYQQKPGKAPKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSPPITFG QGTKVEIK
19	티로시나제 D11 VL-VH BBz CAR	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASDIIYSNLA WYQQKQKSPQLLVYAATNLAAGVPSRFSGS GSGTQYSLKINSLQSEDFGTYCQHFVWSSISF GSGTKLEIK
31	MAGEA4 (230-239) 33229 VL-VH BBz CAR	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYL NWKYQQKRGKAPKLLIYDASILETGVPSPRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDIATYFCQFDNVPLTFG GGTKVEIK
37	MAGEA4(230-239) 34852 VH-VL BBz CAR	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSG SETDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSPPITFG QGTRLEIK

[0076]

[0077] 표 5: 예시적인 가변 중쇄

서열 번호:	작제물 ID	서열
20	HPV 17363 VL-VH BBz	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MTWVRQAPGMGLEWVSVISGSGSETYYADSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC VKDSSYRSSSRAYYYYGMDVWGLGTTVTVSS
21	MAGEA4 (286-294) 31345 VL-VH BBz CAR	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSEY YMTWIRQAPGQGLEWVSYISSGFNIYYADSV KGRFTISRDN AKNSLFLQMNSLRVEDTAVYYC AREGVTGMDVWVGQTTVTVSS
22	NY-ESO(157-165) 28105 VH-VL BBz CAR	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCEASGFIFDDYA MHWVRQAPGKGLEWVSLISGDGDIIYYADSVK GRFTISRDN SKNSLYLQMNSLIIEDTALYYCAK DWVFGVVMTHYWFGLDVWVGQTTVTVSS
23	티로시나제 D11 VL-VH BBz CAR	QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLTSYGV HWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGTTNYSALMS RLSISRDN SKSQVFLEMNSLQTD DTAIYYCARD GHFHDFWVGQTTTLTVSS
32	MAGEA4 (230-239) 33229 VL-VH BBz CAR	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDY AMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIAYADS VKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRSEDALYH CAKDWRRTNYYGMDVWVGQTTVTVSS
38	MAGEA4(230-239) 34852 VH-VL BBz	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLS TATKDTYDALHMQALPPR

[0078]

[0079] 표 6: 예시적인 가변 경쇄 및 중쇄 핵산 서열

서열 번호:	작제물 ID	서열
24	MAGEA4 (286-294) 31345 VL	ACATCCAGAT GACCCAGTCT CCATCCTCCC TGTCTGCATC TGTAGGAGAC AGAGTCACCA TCACTTGCCG GGCAAGTCAG AGCATTAGCA GCTATTTAAA TTGGTATCAG CAGAAACCAG GGAAAGCCCC TAAGCTCCTG ATCTATGCTG CATCCAGTTT GCAAAGTGGG GTCCCGTCAA GGTTCAGTGG CAGTGGATCT GGGACAGATT TCACTCTCAC CATCAGCAGT CTGCAACCTG AAGATTTTGC AACTTACTAC TGTC AACAGA GTTACAGTAC CCTCCGATC ACCTTCGGCC AAGGGACACG ACTGGAGATT AAACGA
25	MAGEA4 (286-294) 31345 VH	AGGTGCAGCT GGTGGAGTCT GGGGGAGGCT TGGTCAAGCC TGGAGGGTCC CTGAGACTCT CCTGTGCAGC CTCTGGATC ACTTTCAGTG AATACTACAT GACCTGGATC CGCCAGGCTC CAGGGCAGGG GCTGGAGTGG GTTTCATACA TTAGTAGTAG TGGTTTTAAC ATATACTACG CAGACTCTGT GAAGGGCCGA TTCACCATCT CAAGGGACAA CGCCAAGAAC TCACTGTTTC TGCAAATGAA CAGCCTGAGA GTCGAGGACA CGGCCGTATA TTAGTGTGCG AGAGAAGGTG TAACGGACGG TATGGACGTC TGGGGCCAAG GGACCACGGT CACCGTCTCC TCA
39	MAGEA4(230-239) 34852 VL	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTTCTAGCCTGT CCGCCTCTGTGGGCGATAGAGTGACCATCACATG CAGGGCCAGCCAGTCCATCTCTTTCTACCTGAAC GGTATCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCCAAGC TGCTGATCTACGCAGCATCCTCTCTGCAGTCTGGA GTGCCAAGCAGGTTTCAGCGGATCCGGATCTGAGA CCGACTTACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGCCT GAGGATTTCCGCACATACTATTGTGTCAGCAGAGT ATTCCACCCCCCTATCACATTTGGCCAGGGAAC CAGGCTGGAGATCAAG
40	MAGEA4(230-239) 34852 VH	GAGGTGCAGCTGCTGGAGAGCGGAGGAGGCTG GTGCAGCCTGGAGGATCTCTGAGGCTGACCTGCG CAGCAAGCGGCTTACATTTCTGCTCCTACGCAAT GTCTTGGGTGCGGCAGGCCAGGCAAGGGACTG GAGTGGGTGAGCACCATCTCCGGCAATTCTGACA GCACATACTATGCCGATTCTGTGAAGGGCCGCTT TACCATCAGCCGGGAGAACTCCAAGAATACACTG TATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACA CCGCCGTGTAATACTATTGTGCCAAGGATCTGCACAT CACAATGGTGCAGGAGCAATCCAGCAGACGCTG TTCGATATCTGGGGCCAGGGCACCATGGTGACAG TGAGCTCC

[0080]

[0081]

일 구현예에서, CAR의 결합 도메인은 그루브 내 펩티드 또는 저밀도 암 항원에 특이적인 단일 쇠 항체(scFv)이고, 무관, 인간 또는 인간화 scFv일 수 있다. 단일 쇠 항체는 원하는 표적에 특이적인 하이브리도마의 V 영역 유전자로부터 클로닝될 수 있다. 가변 영역 중쇄(VH) 및 가변 영역 경쇄(VL)를 클로닝하는 데 사용될 수 있는 기술은 예를 들어, Orlandi 등, PNAS, 1989; 86: 3833-3837에 기재되었다. 따라서, 특정 구현예에서, 결합 도메인은 항체-유래 결합 도메인을 포함하지만 비-항체 유래 결합 도메인일 수 있다. 항체-유래 결합 도메인은 항체의 단편 또는 항체의 하나 이상의 단편의 유전적으로 조작된 생성물일 수 있으며, 단편은 항원과의 결합에 수반된다.

[0082]

특정 구현예에서, 본 개시내용의 CAR은 분자의 적절한 간격 및 입체형태를 위해 첨가된 다양한 도메인 사이에 링커를 포함할 수 있다. 예를 들어, 일 구현예에서, 1 내지 10개 아미노산 길이일 수 있는 결합 도메인 VH 또는 VL 사이에 링커가 있을 수 있다. 다른 구현예에서, 키메라 항원 수용체의 도메인 중 임의의 것 사이의 링커는 1 내지 20개 또는 20개 아미노산 길이일 수 있다. 이와 관련하여, 링커는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 아미노산 길이일 수 있다. 추가의 구현예에서, 링커는 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개 아미노산 길이일 수 있다. 본원에 기재된 수를 포함하는 범위, 예를 들어, 10 내지 30개 아미노산 길이의 링커가 또한 본원에 포함된다.

[0083]

특정 구현예에서, 본원에 기재된 CAR에 사용하기에 적합한 링커는 가요성 링커이다. 적합한 링커는 용이하게 선

택될 수 있고 1개 아미노산(예를 들어, Gly) 내지 20개 아미노산, 2개 아미노산 내지 15개 아미노산, 3개 아미노산 내지 12개 아미노산, 4개 아미노산 내지 10개 아미노산 포함, 5개 아미노산 내지 9개 아미노산, 6개 아미노산 내지 8개 아미노산, 또는 7개 아미노산 내지 8개 아미노산과 같이, 상이한 길이의 적합한 임의의 것일 수 있고, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7개 아미노산일 수 있다.

[0084] 예시적인 가요성 링커는 글리신 중합체 (G)_n, 글리신-세린 중합체, 여기서 n은 적어도 하나의 정수임, 글리신-알라닌 중합체, 알라닌-세린 중합체, 및 당업계에 알려진 다른 가요성 링커를 포함한다. 글리신 및 글리신-세린 중합체는 상대적으로 비구조화되고, 따라서 본원에 기재된 CAR과 같은 융합 단백질의 도메인 사이에서 중성 테더(tether)로서 역할을 할 수 있다. 글리신은 심지어 알라닌보다 유의하게 더 많은 phi-psi 공간에 접근하고, 더 긴 측쇄를 갖는 잔기보다 훨씬 덜 제한된다. 당업자는 링커가 가요성 링커 뿐만 아니라 원하는 CAR 구조를 제공하기 위해 덜 가요성 구조를 부여하는 하나 이상의 부분을 포함할 수 있도록, CAR의 설계가 전부 또는 부분적으로 가요성인 링커를 포함할 수 있음을 인식할 것이다.

[0085] CAR의 결합 도메인은 뒤이어 "스페이서," 또는, "힌지"가 있을 수 있으며, 이는 적절한 세포/세포 접촉, 항원 결합 및 활성화를 가능하게 하기 위해 항원 결합 도메인을 효과기 세포 표면으로부터 멀리 이동시키는 영역을 지칭한다(Patel 등, Gene Therapy, 1999; 6: 412-419). CAR에서 힌지 영역은 일반적으로 막관통(TM)과 결합 도메인 사이에 있다. 특정 구현예에서, 힌지 영역은 면역글로불린 힌지 영역이고 야생형 면역글로불린 힌지 영역 또는 변경된 야생형 면역글로불린 힌지 영역일 수 있다. 본원에 기재된 CAR에서 사용되는 다른 예시적인 힌지 영역은 CD8 α , CD4, CD28 및 CD7과 같은 유형 1 막 단백질의 세포외 영역으로부터 유래된 힌지 영역을 포함하며, 이는 이들 분자로부터의 야생형 힌지 영역일 수 있거나 또는 변경될 수 있다.

[0086] "막관통" 영역 또는 도메인은 세포외 결합 부분을 면역 효과기 세포의 형질 막에 고정시키고, 표적 항원에 결합 도메인의 결합을 용이하게 하는 CAR의 부분이다. 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 CD3 ζ 막관통 도메인일 수 있다. 이용될 수 있는 다른 막관통 도메인은 일부 구현예에서 CD8, CD8 α , CD4, CD28, CD45, CD9, CD16, CD22, CD33, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, 및 CD154로부터 수득된 것들을 포함한다. 특정 구현예에서, 막관통 도메인은 류신 및 발린과 같은 소수성 잔기가 우세하게 포함되는 경우 합성이다.

[0087] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 CAR은 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 세포내 신호전달 도메인(본원에서 "신호전달 도메인"으로도 지칭됨)은 표적 항원에 대한 효과적인 CAR 결합의 메시지를 면역 효과기 세포의 내부로 전달하여 CAR-결합된 표적 세포에 대한 세포독성 인자의 방출을 포함하는 효과기 세포 기능, 예를 들어, 활성화, 사이토카인 생산, 증식 및 세포독성 활성을 유도하거나, 또는 세포외 CAR 도메인에 대한 항원 결합으로 유도된 다른 세포 반응에 참여하는 키메라 항원 수용체 단백질의 부분을 포함한다.

[0088] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 CAR은 하나 이상의 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAM을 포함한다. 사용되는 1차 세포질 신호전달 서열을 함유하는 ITAM의 예는 TCR ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD5, CD22, CD79a, CD79b 및 CD66d로부터 유래된 것들을 포함한다. 일 구현예에서, 본원에 기재된 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 CD3 ζ 로부터 유래된다.

[0089] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 CAR은 공동자극 도메인을 추가로 포함한다. 공동자극 분자는 항원에 결합시 T 림프구의 효율적인 활성화 및 기능에 필요한 제2 신호를 제공하는 항원 수용체 또는 Fc 수용체 이외의 세포 표면 분자이다. 이러한 공동자극 분자의 예는 CD27, CD28, 4-1BB(CD137), OX40(CD134), CD30, CD40, PD-1, ICOS(CD278), LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKD2C, B7-H2 및 CD83에 특이적으로 결합하는 리간드를 포함한다. 따라서, 본 개시내용은 CD28로부터 유래된 예시적인 공동자극 도메인을 제공한다. 하나 이상의 공동자극 신호전달 도메인의 포함은 CAR 수용체를 발현하는 T 세포의 효능 및 확장을 향상시킬 수 있다. 또한 본원에는 CAR 폴리펩티드가 개시되며, 여기서 CAR 폴리펩티드의 세포질내/공동자극 영역은 (예를 들어, CD28/ ζ 도메인에 더하여) 4-1BB 도메인을 추가로 포함한다. 이러한 CAR 폴리펩티드의 공동자극 영역은 완전한 4-1BB 도메인 또는 이의 단편, 및/또는 완전한 CD28/ ζ 도메인 또는 이의 단편을 포함할 수 있다. 세포내 신호전달 및 공동자극 신호전달 도메인은 막관통 도메인의 말단에 나란히 임의의 순서로 연결될 수 있다.

[0090] 본원에 개시된 CAR 폴리펩티드 서열은 서열번호 26 내지 28에 제시된 아미노산 서열 중 임의의 하나를 포함할 수 있다. 본원에 개시된 CAR 폴리펩티드는 서열번호: 26 내지 28에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 상동성을 갖는 적어도 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0091] 표 7: 추가의 예시적인 CAR 서열:

서열번호: 26	CD3 ζ	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD KMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQUALPPR
서열번호: 27	CD8	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
서열번호: 28	4-1BB	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE EEEGGCEL

[0092]

[0093]

핵산 및 벡터

[0094]

특정 측면에서, 또한 본원에 개시된 CAR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 및 폴리뉴클레오티드 벡터가 개시된다.

[0095]

개시된 CAR, 및 이의 영역을 암호화하는 핵산 서열은 예를 들어 표준 기술을 사용하여, 유전자를 발현하는 세포로부터 라이브러리를 스크리닝하거나, 이를 포함하는 것으로 알려진 벡터로부터 유전자를 유도하거나, 또는 이를 함유하는 세포 및 조직으로부터 직접 단리하는 것과 같이, 당업계에 알려진 재조합 방법을 사용하여 획득될 수 있다. 대안적으로, 관심 유전자는 클로닝되기보다는, 합성적으로 생산될 수 있다.

[0096]

CAR을 암호화하는 핵산의 발현은 전형적으로 CAR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 프로모터에 작동가능하게 연결하고, 작제물을 발현 벡터 내에 혼입함으로써 달성된다. 전형적인 클로닝 벡터는 원하는 핵산 서열의 발현 조절에 유용한 전사 및 번역 종결자, 개시 서열, 및 프로모터를 함유한다.

[0097]

특정 구현예에서, 본원에 기재된 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 벡터 내에 삽입된다. 벡터는 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 해당 단백질의 발현 및/또는 폴리뉴클레오티드의 클로닝을 유발하기 위해 공유적으로 삽입될 수 있는 비히클이다. 이러한 벡터는 또한 "발현 벡터"로 지칭될 수 있다. 단리된 폴리뉴클레오티드는 당업계에 알려진 임의의 적합한 방법을 사용하여 벡터 내에 삽입될 수 있으며, 예를 들어, 제한 없이, 벡터는 적절한 제한 효소를 사용하여 소화된 다음 일치하는 제한 단부를 갖는 단리된 폴리뉴클레오티드와 결합될 수 있다. 발현 벡터는 세포에서 전사될 수 있는 유전자 산물의 적어도 일부를 코딩하는 이중 또는 변형된 핵산 서열을 혼입하고 발현하는 능력을 갖는다. 대부분의 경우, 그런 다음 RNA 분자는 단백질로 번역된다. 발현 벡터는 다양한 제어 서열을 함유할 수 있으며, 이는 특정 숙주 유기체에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 전사 및 가능하게는 번역에 필요한 핵산 서열을 지칭한다. 전사 및 번역을 좌우하는 제어 서열에 더하여, 벡터 및 발현 벡터는 다른 기능을 제공하는 핵산 서열을 함유할 수 있을 뿐만 아니라 하기에 논의된다. 발현 벡터는 추가 요소를 포함할 수 있으며, 예를 들어, 발현 벡터는 2가지 복제 시스템을 가지고 있어서, 두 유기체, 예를 들어 발현을 위한 인간 세포 및 클로닝 및 증폭을 위한 원핵생물 숙주에서 유지되도록 할 수 있다.

[0098]

발현 벡터는 각각의 숙주 세포에서 효율적인 유전자 전사 및 번역을 위한 CMV, PGK 및 EF1알파. 프로모터와 같은 프로모터 서열, 리보솜 인식 및 결합 TATA 박스, 및 3'UTR AAUAAA 전사 종결 서열과 같은 필요한 5' 상류 및 3' 하류 조절 요소를 가질 수 있다. 다른 적합한 프로모터는 시미안 바이러스 40(SV40) 초기 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV), HIV LTR 프로모터, MoMuLV 프로모터, 조류 백혈병 바이러스 프로모터, EBV 급조기 프로모터, 및 라우스 육종 바이러스 프로모터의 구성적 프로모터를 포함한다. 또한 액틴 프로모터, 미오신 프로모터, 헤모글로빈 프로모터, 및 크레아틴 키나제 프로모터를 포함하나 이에 제한되지 않는 인간 유전자 프로모터가 사용될 수 있다. 특정 구현예에서 유도성 프로모터는 또한 키메라 항원 수용체를 발현하는 벡터의 일부로서 고려된다. 이는 관심 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 켜거나 또는 발현을 끌 수 있는 분자 스위치를 제공한다. 유도성 프로모터의 예는 메탈로티오닌 프로모터, 글루코코르티코이드 프로모터, 프로게스테론 프로모터, 또는 테트라사이클린 프로모터를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0099]

발현 벡터는 발현된 CAR 내에 혼입되는 6x-히스티딘, c-Myc, 및 FLAG 태그와 같은 추가 서열을 가질 수 있다. 따라서, 발현 벡터는 발현 벡터 상에 운반된 관심 핵산(들)의 효율적인 전사를 용이하게 하거나 또는 향상시킬 수 있는 인핸서 서열, 프로모터 영역 및/또는 종결자 서열로서 때때로 기능할 수 있는 5' 및 3' 비번역 조절 서열을 함유하도록 조작될 수 있다. 발현 벡터는 또한 특정 세포 유형, 세포 위치, 또는 조직 유형에서 복제 및/또는 발현 기능성(예를 들어, 전사 및 번역)을 위해 조작될 수 있다. 발현 벡터는 숙주 또는 수용자 세포에서 벡터의 유지를 위한 선택가능한 마커를 포함할 수 있다.

- [0100] 다양한 구현예에서, 벡터는 플라스미드, 자율적 복제 서열, 및 전이성 요소이다. 추가의 예시적인 벡터는 제한 없이, 플라스미드, 파지미드, 코스미드, 인공 염색체 예컨대 효모 인공 염색체(YAC), 박테리아 인공 염색체(BAC), 또는 P1-유래 인공 염색체(PAC), 박테리오파지 예컨대 람다 파지 또는 M13 파지, 및 동물 바이러스를 포함한다. 벡터로서 유용한 동물 바이러스 범주의 예는 제한 없이, 레트로바이러스(렌티바이러스 포함), 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 헤르페스바이러스(예를 들어, 단순 헤르페스 바이러스), 폭스바이러스, 배큘로바이러스, 유두종바이러스, 및 파보바이러스(예를 들어, SV40)를 포함한다. 발현 벡터의 예는 Lenti-X™ 비시스트로닉 발현 시스템(Neo) 벡터(Clontech), 포유동물 세포에서의 발현을 위한 pCIneo 벡터(Promega); 포유동물 세포에서 렌티바이러스-매개 유전자 전달 및 발현을 위한 pLenti4/V5-DEST™, pLenti6/V5-DEST™, 및 pLenti6.2N5-GW/lacZ(Invitrogen)이다. 본원에 개시된 CAR의 코딩 서열은 포유동물 세포에서 키메라 단백질의 발현을 위해 이러한 발현 벡터 내에 결합될 수 있다.
- [0101] 특정 구현예에서, CAR을 암호화하는 핵산은 바이러스 벡터에 제공된다. 바이러스 벡터는 예를 들어, 레트로바이러스(예를 들어, 포말성 바이러스) 또는 렌티바이러스로부터 유래된 것일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어, "바이러스 벡터"는 바이러스 기원의 적어도 하나의 요소를 포함하고 바이러스 벡터 입자 내에 패키징되는 능력을 갖는 핵산 벡터 작제물을 지칭한다. 바이러스 벡터는 비필수 바이러스 유전자 대신에 본원에 기재된 다양한 키메라 단백질에 대한 코딩 서열을 함유할 수 있다. 벡터 및/또는 입자는 시험관내 또는 생체내에서 세포 내에 DNA, RNA 또는 다른 핵산을 전달하려는 목적을 위해 활용될 수 있다. 수많은 형태의 바이러스 벡터가 당업계에 알려져 있다.
- [0102] 특정 구현예에서, 본원에 기재된 CAR에 대한 코딩 서열을 함유하는 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터이다. 용어 "레트로바이러스 벡터"는 주로 레트로바이러스로부터 유래된 구조적 및 기능적 유전적 요소를 함유하는 벡터를 지칭한다. 용어 "렌티바이러스 벡터"는 주로 렌티바이러스로부터 유래된 LTR 외부의 구조적 및 기능적 유전적 요소를 함유하는 벡터를 지칭한다.
- [0103] 본원에서 사용하기 위한 레트로바이러스 벡터는 임의의 알려진 레트로바이러스(예를 들어, 유형 c 레트로바이러스, 예컨대 모로니 뮤린 육종 바이러스(MoMSV), 하비 뮤린 육종 바이러스(HaMuSV), 뮤린 유방 종양 바이러스(MuMTV), 긴팔원숭이 백혈병 바이러스(GaLV), 고양이 백혈병 바이러스(FLV), 스푸마바이러스, 뮤린 줄기 세포 바이러스(MSCV) 및 라우스 육종 바이러스(RSV))로부터 유래될 수 있다. 레트로바이러스"는 또한 인간 T 세포 백혈병 바이러스, HTLV-1 및 HTLV-2, 및 레트로바이러스의 렌티바이러스 패밀리, 예컨대 인간 면역결핍 바이러스, HIV-1, HIV-2, 시미안 면역결핍 바이러스(SIV), 고양이 면역결핍 바이러스(FIV), 말 면역결핍 바이러스(EIV), 및 레트로바이러스의 다른 클래스를 포함한다.
- [0104] 본원에서 사용하기 위한 렌티바이러스 벡터는 천천히 발병하는 질환을 일으키는 레트로바이러스의 군(또는 속)인 렌티바이러스로부터 유래된 벡터를 지칭한다. 이 군 내에 포함된 바이러스는 HIV(인간 면역결핍 바이러스; HIV 유형 1, 및 HIV 유형 2 포함); 비스나-마에디(visna-maedi); 염소 관절염-뇌염 바이러스; 말 전염성 빈혈 바이러스; 고양이 면역결핍 바이러스(FIV); 소 면역 결핍 바이러스(BIV); 및 시미안 면역결핍 바이러스(SIV)를 포함한다. 재조합 렌티바이러스의 제조는 Dull 등 및 Zufferey 등 (Dull 등, J. Virol., 1998; 72: 8463-8471 및 Zufferey 등, J. Virol. 1998; 72:9873-9880)에 따른 방법을 사용하여 달성될 수 있다.
- [0105] 사용하기 위한 레트로바이러스 벡터(즉, 렌티바이러스 및 비-렌티바이러스 둘 다)는 바람직한 DNA 서열을 본원에 기재된 순서 및 방향으로 조합함으로써 표준 클로닝 기술을 사용하여 형성될 수 있다(Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. M. 등 (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), 섹션 9.10-9.14 및 다른 표준 실험실 메뉴얼; Eglitis, 등 (1985) Science 230:1395-1398; Danos 및 Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6460-6464; Wilson 등 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3014-3018; Armentano 등 (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6141-6145; Huber 등 (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8039-8043; Ferry 등 (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8377-8381; Chowdhury 등 (1991) Science 254:1802-1805; van Beusechem 등 (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7640-7644; Kay 등 (1992) Human Gene Therapy 3:641-647; Dai 등 (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10892-10895; Hwu 등 (1993) J. Immunol 150:4104-4115; 미국 특허 번호 4,868,116; 4,980,286; PCT 출원 WO 89/07136; PCT 출원 WO 89/02468; PCT 출원 WO 89/05345; 및 PCT 출원 WO 92/07573).
- [0106] 벡터를 형성하는 데 사용하기 위한 레트로바이러스(즉, 렌티바이러스 및 비-렌티바이러스 둘 다)를 획득하기에 적합한 공급원은 예를 들어, 메틸렌드주 록빌 소재의 타입 컬처 콜렉션(ATCC)을 포함한, 상업적으로 이용가능한 공급원으로부터 이용가능한 게놈 RNA 및 cDNA를 포함한다. 서열은 또한 화학적으로 합성될 수 있다.

- [0107] CAR의 발현을 위해, 벡터는 숙주 세포 내에 도입되어 숙주 세포 내에서 폴리펩티드의 발현을 허용할 수 있다. 발현 벡터는 제한 없이, 프로모터 서열, 전사 개시 서열, 인핸서 서열, 선택가능한 마커, 및 신호 서열을 포함한, 발현을 제어하기 위한 다양한 요소를 함유할 수 있다. 이들 요소는 상기 기재된 바와 같이, 당업자에 의해 이해되는 바와 같이 선택될 수 있다. 예를 들어, 프로모터 서열은 벡터에서 폴리뉴클레오티드의 전사를 촉진하도록 선택될 수 있다. 적합한 프로모터 서열은 제한 없이, T7 프로모터, T3 프로모터, SP6 프로모터, 베타-액틴 프로모터, EF1a 프로모터, CMV 프로모터, 및 SV40 프로모터를 포함한다. 인핸서 서열은 폴리뉴클레오티드의 전사를 향상시키도록 선택될 수 있다. 선택가능한 마커는 벡터가 삽입된 숙주 세포가 아닌 숙주 세포의 선택을 허용하도록 선택될 수 있으며, 예를 들어, 선택가능한 마커는 항생제 내성을 부여하는 유전자일 수 있다. 신호 서열은 발현된 폴리펩티드가 숙주 세포의 외부로 수송되는 것을 허용하도록 선택될 수 있다.
- [0108] 폴리뉴클레오티드의 클로닝을 위해, 벡터는 숙주 세포(단리된 숙주 세포) 내에 도입되어 벡터 자체의 복제를 허용하고 이에 의해 그 안에 함유된 폴리뉴클레오티드의 카피를 증폭시킬 수 있다. 클로닝 벡터는 일반적으로 제한 없이, 복제 기점, 프로모터 서열, 전사 개시 서열, 인핸서 서열, 및 선택가능한 마커를 포함하는 서열 성분을 함유할 수 있다. 이들 요소는 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 복제 기점은 숙주 세포에서 벡터의 자율 복제를 촉진하도록 선택될 수 있다.
- [0109] 특정 구현예에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 벡터를 함유하는 단리된 숙주 세포를 제공한다. 벡터를 함유하는 숙주 세포는 벡터에 함유된 폴리뉴클레오티드의 발현 또는 클로닝에 유용할 수 있다. 적합한 숙주 세포는 제한 없이, 원핵생물 세포, 진균 세포, 효모 세포, 또는 고등 진핵생물 세포 예컨대 포유동물 세포를 포함할 수 있다. 이 목적에 적합한 원핵생물 세포는 제한 없이, 유박테리아, 예컨대 그람-음성 또는 그람-양성 유기체, 예를 들어, 장내세균과 예컨대 에스케리키아(*Escherichia*), 예를 들어, 이. 콜라이(*E. coli*), 엔테로박터(*Enterobacter*), 에르비니아(*Erwinia*), 클렙시엘라(*Klebsiella*), 프로테우스(*Proteus*), 살모넬라(*Salmonella*), 예를 들어, 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아(*Serratia*), 예를 들어, 세라티아 마르세스칸스(*Serratia marcescans*), 및 시겔라(*Shigella*), 뿐만 아니라 바실리(Bacilli) 예컨대 비. 서브틸리스(*B. subtilis*) 및 비. 리케니포르미스(*B. licheniformis*), 슈도모나스(*Pseudomonas*) 예컨대 피. 아에루기노사(*P. aeruginosa*), 및 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)를 포함한다.
- [0110] CAR은 당업계에 알려진 형질감염 및/또는 형질도입 기술을 사용하여 숙주 세포 내에 도입된다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어, "형질감염," 및, "형질도입"은 외인성 핵산 서열이 숙주 세포 내에 도입되는 과정을 지칭한다. 핵산은 숙주 세포 DNA 내에 통합될 수 있거나 또는 염색체외에서 유지될 수 있다. 핵산은 일시적으로 유지될 수 있거나 또는 안정되게 도입될 수 있다. 형질감염은 칼슘 포스페이트-DNA 공침전, DEAE-텍스트란-매개 형질감염, 폴리브렌-매개 형질감염, 전기천공, 미세주사, 리포솜 융합, 리포펙션, 원형질체 융합, 레트로바이러스 감염, 및 유전자총을 포함하나 이에 제한되지 않는 당업계에 알려진 다수의 수단에 의해 달성될 수 있다. 형질도입은 형질감염보다는 바이러스 감염에 의해 바이러스 또는 레트로바이러스 벡터를 사용하여 유전자(들)를 전달하는 것을 지칭한다. 특정 구현예에서, 레트로바이러스 벡터는 세포와의 접촉 전에 벡터를 비리온 내에 패키징함으로써 형질도입된다. 예를 들어, 레트로바이러스 벡터에 의해 운반되는 CAR을 암호화하는 핵산은 감염 및 프로 바이러스 통합을 통해 세포 내에 형질도입될 수 있다.
- [0111] CAR 폴리펩티드 또는 이의 부분의 발현을 평가하기 위해, 세포 내에 도입될 발현 벡터는 또한 선택가능한 마커 유전자 또는 리포터 유전자 또는 둘 다를 함유하여 바이러스 벡터를 통해 형질감염 또는 감염시키고자 하는 세포의 집단으로부터 발현 세포의 식별 및 선택을 용이하게 할 수 있다. 다른 측면에서, 선택가능한 마커는 DNA의 개별 조각 상에 운반되고 공형질감염 절차에서 사용될 수 있다. 선택가능한 마커 및 리포터 유전자는 둘 다 적절한 조절 서열로 플랭킹되어 숙주 세포에서 발현을 가능하게 할 수 있다. 유용한 선택가능한 마커는 예를 들어, 항생제-내성 유전자를 포함한다.
- [0112] 리포터 유전자는 잠재적으로 형질감염된 세포를 식별하고 조절 서열의 기능성을 평가하는 데 사용된다. 일반적으로, 리포터 유전자는 수용자 유기체 또는 조직에 존재하지 않거나 또는 이에 의해 발현되지 않고 발현이 일부 용이하게 검출가능한 특성, 예를 들어, 효소적 활성에 의해 나타내는 폴리펩티드를 암호화하는 유전자이다. 리포터 유전자의 발현은 DNA가 수용자 세포 내에 도입된 후 적절한 시간에 검정된다. 적합한 리포터 유전자는 루시페라제, 베타-갈락토시다제, 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제, 분비된 알칼리성 포스파타제, 또는 녹색 형광 단백질 유전자를 암호화하는 유전자를 포함할 수 있다. 적합한 발현 시스템은 잘 알려져 있고 알려진 기술을 사용하여 제조되거나 또는 상업적으로 취득될 수 있다. 일반적으로, 리포터 유전자의 가장 높은 발현 수준을 나타내는 최소 5' 플랭킹 영역이 있는 작제물이 프로모터로서 식별된다. 이러한 프로모터 영역은 리포터 유전자에

연결되고 제제를 프로모터-구동된 전사를 조절하는 능력에 대해 평가하는 데 사용될 수 있다.

- [0113] 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내에 도입하기 위한 물리적 방법은 칼슘 포스페이트 침전, 리포펙션, 입자 충격, 미세주사, 전기천공 등을 포함한다. 벡터 및/또는 외인성 핵산을 포함하는 세포를 생산하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, Sambrook 등 (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)을 참조한다.
- [0114] 비-바이러스 전달 시스템이 활용되는 경우, 예시적인 전달 비히클은 리포솜이다. 또 다른 측면에서, 핵산은 지질과 회합될 수 있다. 지질과 회합된 핵산은 리포솜의 수성 내부에 캡슐화되거나, 리포솜의 지질 이중층 내에 산재되거나, 리포솜 및 올리고뉴클레오티드 둘 다와 회합된 연결 분자를 통해 리포솜에 부착되거나, 리포솜에 포획되거나, 리포솜과 착화되거나, 지질을 함유하는 용액에 분산되거나, 지질과 혼합되거나, 지질과 조합되거나, 지질에 현탁액으로서 함유되거나, 미셀을 함유하거나 또는 이와 착화되거나, 또는 달리 지질과 회합될 수 있다. 지질, 지질/DNA 또는 지질/발현 벡터 연관 조성물은 용액에서 임의의 특정 구조로 제한되지 않는다. 예를 들어, 이들은 미셀과 같은 이중층 구조, 또는 "붕괴된" 구조로 존재할 수 있다. 이들은 또한 단순히 용액에 산재되어, 아마도 크기 또는 모양이 균일하지 않은 응집체를 형성할 수 있다. 지질은 자연 발생 또는 합성 지질일 수 있는 지방 물질이다. 예를 들어, 지질은 세포질에서 자연 발생하는 지방 액적 뿐만 아니라 장쇄 지방족 탄화수소 및 이들의 유도체, 예컨대 지방산, 알코올, 아민, 아미노 알코올, 및 알데하이드를 함유하는 화합물의 부류를 포함한다. 사용에 적합한 지질은 상업적 공급원으로부터 취득될 수 있다. 예를 들어, 디미리스틸 포스파티딜콜린("DMPC")은 미주리주 세인트루이스 소재의 Sigma에서 취득될 수 있고; 디세틸 포스페이트("DCP")는 K & K Laboratories(뉴욕주 플레인뷰 소재)에서 취득될 수 있고; 콜레스테롤("Choi")은 Calbiochem-Behring에서 취득될 수 있고; 디미리스틸 포스파티딜글리세롤("DMPG") 및 다른 지질은 Avanti Polar Lipids, Inc. (엘라베마주 버밍햄 소재)에서 취득될 수 있다.
- [0115] **면역 효과기 세포**
- [0116] 특정 측면에서, 본원에는 개시된 CAR 폴리펩티드를 발현하도록 조작된 면역 효과기 세포가 또한 개시된다. 일부 구현예에서, 세포는 치료될 대상체로부터 취득된다(즉, 자가 조직임). 그러나, 특정 구현예에서, 면역 효과기 세포주 또는 공여자 효과기 세포(동종이계)가 사용된다.
- [0117] 면역 효과기 세포는 말초 혈액 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 체대혈, 흉선 조직, 감염 부위의 조직, 복수, 흉막 삼출, 비장 조직, 및 종양을 포함하는, 다수의 공급원으로부터 취득될 수 있다. 면역 효과기 세포는 Ficoll™ 분리와 같이, 당업자에게 알려진 임의의 수의 기술을 사용하여 대상체로부터 수집된 혈액으로부터 취득될 수 있다. 예를 들어, 개체의 순환 혈액으로부터의 세포는 성분채집술에 의해 취득될 수 있다. 일부 구현예에서, 면역 효과기 세포는 적혈구를 용해시키고 단핵구를 고갈시킴으로써, 예를 들어, PERCOLL™ 구배를 통한 원심분리 또는 역류 원심분리 경사법에 의해 말초 혈액 림프구로부터 취득된다. 면역 효과기 세포의 특정 하위집단은 양성 또는 음성 선택 기술에 의해 추가로 분리될 수 있다. 예를 들어, 면역 효과기 세포는 예를 들어, 바람직한 면역 효과기 세포의 양성 선택에 충분한 기간 동안 항체-접합 비드와 인큐베이션함으로써, 양성으로 선택된 세포에 고유한 표면 마커에 대해 지시된 항체의 조합을 사용하여 분리될 수 있다. 대안적으로, 면역 효과기 세포 집단의 풍부화는 음성으로 선택된 세포에 고유한 표면 마커에 대해 지시된 항체의 조합을 사용하여 음성 선택에 의해 달성될 수 있다.
- [0118] 본 개시내용은 본원에 기재된 CAR을 발현하는 면역 효과기 세포를 제조하는 방법을 제공한다. 일 구현예에서, 방법은 면역 효과기 세포가 본원에 기재된 바와 같이 하나 이상의 CAR을 발현하도록, PIG 및/또는 저밀도 암 항원 발현 종양 세포를 갖는 대상체와 같은 대상체로부터 분리된 면역 효과기 세포를 형질감염 또는 형질도입하는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 면역 효과기 세포는 개체로부터 분리되고 **시험관내**에서 추가 조작 없이 유전적으로 변형된다. 그런 다음 이러한 세포는 개체에게 직접 재투여될 수 있다. 추가의 구현예에서, 면역 효과기 세포는 CAR을 발현하도록 유전적으로 변형되기 전에 먼저 활성화되고 자극되어 **시험관내**에서 증식된다. 이와 관련하여, 면역 효과기 세포는 유전적으로 변형(즉, 본원에 기재된 바와 같은 CAR을 발현하도록 형질도입 또는 형질감염)되기 전 또는 후에 배양될 수 있다.
- [0119] 본원에 기재된 면역 효과기 세포의 **시험관내** 조작 또는 유전적 변형 전에, 세포의 공급원은 대상체로부터 취득될 수 있다. 특히, 본원에 기재된 바와 같은 CAR과 함께 사용하기 위한 면역 효과기 세포는 T 세포를 포함한다. T 세포는 말초 혈액 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 체대혈, 흉선 문체, 감염 부위의 조직, 복수, 흉막 삼출, 비장 조직, 및 종양을 포함한, 다수의 공급원으로부터 취득될 수 있다. 특정 구현예에서, T 세포는 FICOLL 분리와 같이, 당업자에게 알려진 임의의 수의 기술을 사용하여 대상체로부터 수집된 혈액 유닛으로부터 취득될 수

있다. 일 구현예에서, 개체의 순환 혈액으로부터의 세포는 성분채집술에 의해 획득된다. 성분채집술 생성물은 전형적으로 T 세포, 단핵구, 과립구, B 세포, 다른 유핵 백혈구, 적혈구, 및 혈소판을 포함한 림프구를 함유한다. 일 구현예에서, 성분채집술에 의해 수집된 세포는 혈장 분획을 제거하고 후속 처리를 위해 세포를 적절한 완충액 또는 배지에 배치하기 위해 세척될 수 있다. 일 구현예에서, 세포는 PBS로 세척된다. 대안적 구현예에서, 세척된 용액은 칼슘이 결여되어 있고, 마그네슘이 결여될 수 있거나 또는 전부는 아니더라도 많은 2가 양이온이 결여될 수 있다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 세척 단계는 반자동 관류 원심분리를 사용하는 것과 같이, 당업자에게 알려진 방법에 의해 달성될 수 있다. 세척 후, 세포는 다양한 생체적합성 완충액 또는 완충제가 있거나 없는 다른 염수 용액에 재현탁될 수 있다. 특정 구현예에서, 성분채집술 샘플의 바람직하지 않은 성분은 세포가 직접 재현탁된 배양 배지에서 제거될 수 있다.

[0120] 특정 구현예에서, T 세포는 적혈구를 용해시키고 단핵구를 고갈시킴으로써, 예를 들어, PERCOLL™ 구배를 통한 원심분리에 의해 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 단리된다. CD28+, CD4+, CD8+, CD45RA+, 및 CD45RO+ T 세포와 같은, T 세포의 특정한 하위집단은 양성 또는 음성 선택 기술에 의해 추가로 단리될 수 있다. 예를 들어, 음성 선택에 의한 T 세포 집단의 풍부화는 음성으로 선택된 세포에 고유한 표면 마커에 대해 지시된 항체의 조합으로 달성될 수 있다. 본원에서 사용하기 위한 한 가지 방법은 음성으로 선택된 세포 상에 존재하는 세포 표면 마커에 대해 지시된 단클론 항체의 각테일을 사용하는 음성 자기 면역부작 또는 유세포 분석을 통한 세포 분류 및/또는 선택이다. 예를 들어, 음성 선택에 의해 CD4+ 세포를 풍부화하기 위해, 단클론 항체 각테일은 전형적으로 CD14, CD20, CD1 b, CD16, HLA-DR, 및 CD8에 대한 항체를 포함한다. 유세포 분석 및 세포 분류는 또한 관심 세포 집단을 단리하는 데 사용될 수 있다.

[0121] PBMC는 본원에 기재된 바와 같은 방법을 사용하여 CAR을 사용한 유전적 변형을 위해 직접 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, PBMC의 단리 후, T 림프구가 추가로 단리되고 특정 구현예에서, 세포독성 및 헬퍼 T 림프구 둘 다 유전적 변형 및/또는 확장 전 또는 후에 나이브(naive), 기억, 및 효과기 T 세포 하위집단으로 분류될 수 있다. CD8+ 세포는 표준 방법을 사용함으로써 획득될 수 있다. 일부 구현예에서, CD8+ 세포는 CD8+ 세포의 이러한 유형 각각과 연관된 세포 표면 항원을 식별함으로써 나이브, 중추 기억, 및 효과기 세포로 추가로 분류된다. 구현예에서, 기억 T 세포는 CD8+ 말초 혈액 림프구의 CD62L+ 및 CD62L-서브세트 둘 다에 존재한다. PBMC는 항-CD8 및 항-CD62L 항체로 염색 후 CD62L-CD8+ 및 CD62L+CD8+ 분획으로 분류된다. 일부 구현예에서, 중추 기억 TCM의 표현형 마커의 발현은 CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3, 및 CD127을 포함하고 그랜자임 B에 대해 음성이다. 일부 구현예에서, 중추 기억 T 세포는 CD45RO+, CD62L+, CD8+ T 세포이다. 일부 구현예에서, 효과기 T 세포는 CD62L, CCR7, CD28, 및 CD127에 대해 음성이고, 그랜자임 B 및 퍼포린에 대해 양성이다. 일부 구현예에서, 나이브 CD8+ T 림프구는 CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD 127, 및 CD45RA를 포함하는 나이브 T 세포의 표현형 마커의 발현을 특징으로 한다.

[0122] 특정 구현예에서, CD4+ T 세포는 하위집단으로 추가로 분류된다. 예를 들어, CD4+ T 헬퍼 세포는 세포 표면 항원을 갖는 세포 집단을 식별함으로써 나이브, 중추 기억, 및 효과기 세포로 분류될 수 있다. CD4+ 림프구는 표준 방법에 의해 획득될 수 있다. 일부 구현예에서, 나이브 CD4+ T 림프구는 CD45RO-, CD45RA+, CD62L+CD4+ T 세포이다. 일부 구현예에서, 중추 기억 CD4+ 세포는 CD62L 양성 및 CD45RO 양성이다. 일부 구현예에서, 효과기 CD4+ 세포는 CD62L 및 CD45RO 음성이다.

[0123] T 세포와 같은 면역 효과기 세포는 알려진 방법을 사용하여 단리 후 유전적으로 변형될 수 있거나, 또는 면역 효과기 세포는 유전적으로 변형되기 전에 시험관내에서 활성화 및 확장(또는 선조체의 경우 분화)될 수 있다. 또 다른 구현예에서, T 세포와 같은 면역 효과기 세포는 본원에 기재된 키메라 항원 수용체로 유전적으로 변형되고(예를 들어, CAR을 암호화하는 핵산을 포함하는 바이러스 벡터로 형질도입되고) 그런 다음 시험관내에서 활성화 및 확장된다. T 세포를 활성화하고 확장하는 방법은 당업계에 알려져 있으며 예를 들어, 미국 특허 번호 6,905,874; 6,867,041; 6,797,514; W02012079000에 기재되어 있다. 일반적으로, 이러한 방법은 PBMC 또는 단리된 T 세포를 IL-2(예를 들어, 재조합 인간 IL-2)와 같은 적절한 사이토카인이 있는 배양 배지에서, 일반적으로 비드 또는 다른 표면에 부착된 항-CD3 및 항-CD28 항체와 같은 자극제 및 공동자극제와 접촉시키는 것을 포함한다. 동일한 비드에 부착된 항-CD3 및 항-CD28 항체는 "대리" 항원 제시 세포(APC)로서 역할을 한다. 다른 구현예에서, T 세포는 미국 특허 번호 6,040,177; 5,827,642; 및 W02012129514에 기재된 것들과 같은 방법을 사용하여 배양보조 세포 및 적절한 항체 및 사이토카인과 함께 증식하도록 활성화 및 자극될 수 있다.

[0124] 일부 구현예에서, 면역 효과기 세포는 감염성 질환 및 외래 물질에 대해 신체를 방어하는 데 수반되는 임의의 백혈구를 포함한다. 예를 들어, 면역 효과기 세포는 림프구, 단핵구, 대식세포, 수지상 세포, 비만 세포, 호중구, 호염기구, 호산구, 또는 이의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 예를 들어, 면역 효과기 세포는 T 림프구, B

람직하게는 세포독성 T 림프구(CTL)를 포함할 수 있다.

[0125] T 헬퍼 세포(T_H 세포)는 B 세포의 형질 세포 및 기억 B 세포로의 성숙, 및 세포독성 T 세포 및 대식세포의 활성화를 포함하는, 면역학적 과정에서 다른 백혈구를 보조한다. 이들 세포는 또한 $CD4^+$ T 세포로 알려져 있는데, 이들이 표면 상의 CD4 당단백질을 발현하기 때문이다. 헬퍼 T 세포는 항원-제시 세포(APC)의 표면 상에서 발현되는 MHC 클래스 II 분자에 의해 펩티드 항원과 함께 제시될 때 활성화된다. 활성화되면, 이들은 빠르게 분열하고 능동 면역 반응을 조절하거나 또는 보조하는 사이토카인이라 불리는 작은 단백질을 분비한다. 이들 세포는 T_H1 , T_H2 , T_H3 , T_H17 , T_H9 , 또는 T_H1 를 포함하는 여러 하위유형 중 하나로 분화될 수 있으며, 이는 상이한 유형의 면역 반응을 용이하게 하도록 상이한 사이토카인을 분비할 수 있다.

[0126] 세포독성 T 세포(T_C 세포, 또는 CTL)는 바이러스에 감염된 세포 및 종양 세포를 파괴하고, 또한 이식 거부와 연루된다. 이들 세포는 표면에서 CD8 당단백질을 발현하므로 $CD8^+$ T 세포로도 알려져 있다. 이들 세포는 모든 유핵 세포의 표면 상에 존재하는 MHC 클래스 I 분자와 연관된 항원에 결합함으로써 그들의 표적을 인식한다. IL-10, 아데노신 및 조절 T 세포에 의해 분비되는 다른 분자를 통해, $CD8^+$ 세포는 무반응 상태로 비활성화되어, 자가면역 질환을 예방할 수 있다.

[0127] 기억 T 세포는 감염이 해결된 후 장기간 지속되는 항원-특이적 T 세포의 서브세트이다. 이들은 동족 항원에 재노출시 다수의 효과기 T 세포로 빠르게 확장되어, 면역계에 과거 감염에 대한 "기억"을 제공한다. 기억 세포는 $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ 일 수 있다. 기억 T 세포는 전형적으로 세포 표면 단백질 CD45RO를 발현한다.

[0128] 이전에 억제자 T 세포로 알려진 조절 T 세포(T_{reg} 세포)는 면역학적 관용을 유지하는 데 중요하다. 그들의 주요 역할은 면역 반응이 끝날 때 T 세포-매개 면역을 차단하고 흉선에서 음성 선택 과정을 벗어난 자가-반응성 T 세포를 억제하는 것이다. $CD4^+$ T_{reg} 세포의 2가지 주요 클래스, 즉, 자연 발생 T_{reg} 세포 및 적응 T_{reg} 세포가 기재되었다.

[0129] 자연 살해 T(NKT) 세포(자연 살해(NK) 세포와 혼동되지 않아야 함)는 적응 면역계와 선천성 면역계를 이어준다. 주요 조직적합성 복합체(MHC) 분자에 의해 제시된 펩티드 항원을 인식하는 통상적인 T 세포와 달리, NKT 세포는 CD1d라고 불리는 분자에 의해 제시된 당지질 항원을 인식한다.

[0130] 일부 구현예에서, T 세포는 $CD4^+$ 세포의 혼합물을 포함한다. 다른 구현예에서, T 세포는 세포 표면 발현에 기반한 하나 이상의 서브세트에 대해 풍부화된다. 예를 들어, 일부 경우에, T는 세포독성 $CD8^+$ T 림프구를 포함한다.

[0131] 자연 살해(NK) 세포는 바이러스로 감염되고 형질전환된 세포를 사멸시킬 수 있는 $CD56^+CD3^-$ 거대 과립형 림프구이며, 선천성 면역계의 중요한 세포 서브세트를 구성한다(Godfrey J, 등 Leuk 림프종 2012 53:1666-1676). 세포독성 $CD8^+$ T 림프구와 달리, NK 세포는 사전 감작화에 대한 필요조건 없이 종양 세포에 대해 세포독성을 시작하고, MHC-I-음성 세포를 근절할 수 있다(Narni-Mancinelli E, 등 Int Immunol 2011 23:427-431). NK 세포는 사이토카인 폭풍(Morgan RA, 등 Mol Ther 2010 18:843-851), 종양 용해 증후군(Porter DL, 등 N Engl J Med 2011 365:725-733), 및 표적내, 종양외 효과의 잠재적인 치사 합병증을 피할 수 있으므로, 더 안전한 효과기 세포이다.

[0132] **키메라 항원 수용체의 결합 특성**

[0133] 본원에 사용된 바와 같이, 예를 들어, 세포 표면 단백질 또는 이의 단편과 같은 미리 결정된 항원(또는 HLA 분자와 같은 세포 표면 단백질에 결합된 항원)에 대한 키메라 항원 수용체의 결합의 맥락에서 용어 "결합". 결합은 전형적으로 항원-결합 도메인:항원 상호작용과 같이, 최소 2개 독립체 또는 분자 구조 사이의 상호작용 또는 회합을 지칭한다. 예를 들면, 결합 친화도는 전형적으로 예를 들면, 리간드로서 항원 및 분석물(또는 항리간드)로서 항체 또는 키메라 항원 수용체를 사용하는 BIAcore 3000 기기에서 표면 플라즈몬 공명(SPR) 기술에 의해 결정될 때 약 10^{-7} M 이하, 예컨대 약 10^{-8} M 이하, 예컨대 약 10^{-9} M 이하의 K_D 값에 상응한다. 형광-활성화 세포 분류(FACS) 결합 검정과 같은 세포-기반 결합 전략이 또한 일상적으로 사용되고, FACS 데이터는 방사선리

간드 경쟁 결합 및 SPR과 같은 다른 방법과 잘 연관된다(Benedict, CA, *J Immunol Methods*. 1997, 201(2):223-31; Geuijen, CA, 등 *J Immunol Methods*. 2005, 302(1-2):68-77).

- [0134] 따라서, 일부 구현예에서, 본 개시내용의 키메라 항원 수용체는 비-특이적 항원(예를 들어, BSA, 카세인)에 대한 결합에 대한 친화도보다 적어도 10-배 더 낮은 K_D 값에 상응하는 친화도를 갖는 미리 결정된 항원 또는 세포 표면 분자(수용체)에 결합한다. 본원에 기재된 바와 같이, 본 개시내용의 키메라 항원 수용체는 본원에 기재된 HLA-제시된 항원에 결합할 수 있다. 본 개시내용에 따르면, 일부 구현예에서, 비-특이적 항원보다 10-배 이하인 K_D 값을 갖는 키메라 항원 수용체의 친화도는 검출가능하지 않은 결합으로 간주될 수 있다.
- [0135] 용어 " K_D "(M)는 특정 항원-결합 도메인:항원 상호작용의 해리 평형 상수를 지칭한다. K_D 와 결합 친화도 사이에 역 관계가 있으므로, K_D 값이 더 작을수록, 친화도는 더 높으며, 즉, 더 강하다. 따라서, 용어 "더 높은 친화도" 또는 "더 강한 친화도"는 상호작용을 형성하는 더 높은 능력 및 따라서 더 작은 K_D 값과 관련되고, 반대로 용어 "더 낮은 친화도" 또는 "더 약한 친화도"는 상호작용을 형성하는 더 낮은 능력 및 따라서 더 큰 K_D 값과 관련된다. 일부 상황에서, 특정 분자(예를 들어, 키메라 항원 수용체)의 상호작용 파트너 분자(예를 들어 항원 X)에 대한 더 높은 결합 친화도(또는 K_D)는 분자(예를 들어, 키메라 항원 수용체)의 또 다른 상호작용 파트너 분자(예를 들어 항원 Y)에 대한 결합 친화도와 비교하여 더 큰 K_D 값(더 낮거나, 또는 더 약한 친화도)을 더 작은 K_D (더 높거나, 또는 더 강한 친화도)로 나누어 결정된 결합 비율로 표현될 수 있으며, 예를 들어, 경우에 따라 5-배 또는 10-배 더 큰 결합 친화도로 표현될 수 있다
- [0136] 용어 " k_d "(sec⁻¹ 또는 1/s)는 특정 항원-결합 도메인:항원 상호작용의 해리 속도 상수, 또는 키메라 항원 수용체의 해리 속도 상수를 지칭한다. 상기 값은 k_{off} 값으로도 지칭된다.
- [0137] 용어 " k_a "(M⁻¹ x sec⁻¹ 또는 1/M)는 특정 항원-결합 도메인:항원 상호작용의 회합 속도 상수, 또는 키메라 항원 수용체의 회합 속도 상수를 지칭한다.
- [0138] 용어 " K_A "(M⁻¹ 또는 1/M)는 특정 항원-결합 도메인:항원 상호작용의 회합 평형 상수, 또는 키메라 항원 수용체의 회합 평형 상수를 지칭한다. 회합 평형 상수는 k_a 를 k_d 로 나누어 수득된다.
- [0139] 용어 "EC50" 또는 "EC₅₀"은 기준선과 명시된 노출 시간 후 최대값 사이 중간에 반응을 유도하는 키메라 항원 수용체의 농도를 포함하는, 절반 최대 유효 농도를 지칭한다. EC₅₀은 본질적으로 최대 효과의 50%가 관찰되는 키메라 항원 수용체의 농도를 나타낸다. 특정 구현예에서, EC₅₀ 값은 예를 들어 FACS 결합 검정에 의해 결정된 바와 같이, 항원(예를 들어, 종양-연관 항원)을 발현하는 세포에 대한 절반-최대 결합을 제공하는 본 개시내용의 키메라 항원 수용체의 농도와 동일하다. 따라서, 감소되거나 더 약한 결합은 증가된 EC₅₀, 또는 절반 최대 유효 농도 값으로 관찰된다.
- [0140] 일 구현예에서, 감소된 결합은 표적 세포의 절반-최대량에 대한 결합을 가능하게 하는 증가된 EC₅₀ 키메라 항원 수용체 농도로서 정의될 수 있다.
- [0141] 본 개시내용은 높은 친화도(예를 들어, 나노몰 또는 서브-나노몰 K_D 값)로 인간 항원에 결합하는 항체로부터 유래된 항원-결합 도메인을 갖는 키메라 항원 수용체를 제공한다.
- [0142] 특정 구현예에 따르면, 본 개시내용은 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정된 바와 같이 약 5 nM 미만의 K_D 로 (예를 들어, 25°C에서) 인간 항원에 결합하는 상응하는 항체로부터 유래된 항원-결합 도메인을 갖는 키메라 항원 수용체를 제공한다. 특정 구현예에서, 상응하는 항체는 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정된 바와 같이 약 20 nM 미만, 약 10 nM 미만, 약 8 nM 미만, 약 7 nM 미만, 약 6 nM 미만, 약 5 nM 미만, 약 4 nM 미만, 약 3 nM 미만, 약 2 nM 미만, 약 1 nM 미만, 약 800 pM 미만, 약 700 pM 미만, 약 500 pM 미만, 약 400 pM 미만, 약 300 pM 미만, 약 200 pM 미만, 약 100 pM 미만, 약 50 pM 미만, 또는 약 25 pM 미만의 K_D 로 항원 단백질에 결합한다.
- [0143] 본 개시내용은 또한 25°C에서 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정된 바와 같이 약 10 분 초과 또는 약 125 분 초과 의 해리 반감기($t_{1/2}$)를 갖는 항원 단백질에 결합하는 상응하는 항체로부터 유래된 항원-결합 도메인을 갖는 키

메라 항원 수용체를 제공한다. 특정 구현예에서, 상응하는 항체는 25℃에서 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정된 바와 같이, 약 3 분 초과, 약 4 분 초과, 약 10 분 초과, 약 20 분 초과, 약 30 분 초과, 약 40 분 초과, 약 50 분 초과, 약 60 분 초과, 약 70 분 초과, 약 80 분 초과, 약 90 분 초과, 약 100 분 초과, 약 110 분 초과, 또는 약 120 분 초과와 t_{1/2}로 항원 단백질에 결합한다.

[0144] 본 개시내용은 또한 FACS 결합 검정에 의해 결정된 바와 같이, 내인성 MAGE-A4를 발현하는 인간 세포주에 특이적으로 결합하는 상응하는 항체로부터 유래된 항원-결합 도메인을 갖는 키메라 항원 수용체를 제공한다.

[0145] **치료 방법**

[0146] 본원에 개시된 CAR을 발현하는 면역 효과기 세포는 PIG 또는 저밀도 항원-발현 암 세포에 대한 치료적으로 유익한 면역 반응을 도출한다. 예를 들어, 개시된 CAR-변형된 면역 효과기 세포에 의해 도출된 항-종양 면역 반응은 능동 또는 수동 면역 반응일 수 있다. 게다가, CAR-매개 면역 반응은 CAR-변형된 면역 효과기 세포가 PIG 또는 저밀도 암 항원에 특이적인 면역 반응을 유도하는 입양 면역요법 접근법의 일부일 수 있다.

[0147] 본원에 기재된 바와 같이 제조된 CAR-발현 면역 효과기 세포는 알려진 기술, 또는 본 개시내용이 기반하는 당업계에 자명할 이의 변경에 따라 입양 면역요법에 대한 방법 및 조성물에서 활용될 수 있다. 예를 들어, Gruenberg 등의 미국 특허 출원 공개 번호 2003/0170238을 참조하고; 또한 Rosenberg의 미국 특허 번호 4,690,915를 참조한다.

[0148] 일부 측면에서, 본원에는 본원에 개시된 CAR 폴리펩티드를 발현하는 세포를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여함으로써 대상체에서 암(예를 들어, 고형 종양)을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 방법은 CAR 폴리펩티드의 공동자극 영역에 4-1BB 도메인을 포함하는 제2 CAR 폴리펩티드를 발현하는 세포를 포함하는 조성물을 대상체에게 공동으로 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 CAR은 분화 클러스터 3 제타(CD3/ζ) 도메인을 포함하는 적어도 하나의 세포질내 신호전달 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 CAR은 저밀도 암 항원 및/또는 그루브 내 펩티드 암 항원에 특이적인 세포외 도메인을 포함한다. 제2 CAR 폴리펩티드는 힌지/막관통 영역에 분화 클러스터 8 알파(CD8/α) 펩티드를 포함할 수 있다. 이론에 의해 얽매이지 않고, 제1 CAR(즉, CAR의 공동자극 도메인에 CD28/ζ 도메인을 포함하는 CAR 폴리펩티드)을 발현하는 면역 세포는 암 세포의 빠른 사멸을 용이하게 하는 초기 폭발을 제공하는 반면, 4-1BB에 의한 면역 세포의 투여는 제1 CAR을 발현하는 면역 세포의 투여와 비교할 때 더 낮은 사멸 수준에도 불구하고, 지속적인 암 세포 사멸을 제공한다. 4-1BB/CD3z CAR은 환자에서 CAR T 세포의 지속성과 연관되며, 결과적으로 지속적인 암 세포 사멸을 제공할 것이다.

[0149] 일부 구현예에서, 세포는 먼저 배양 배지에서 수확된 다음, 치료 유효량으로 투여에 적합한 배지 및 용기 시스템("약제학적으로 허용되는" 담체)에서 세포를 세척 및 농축함으로써 제형화된다. 적합한 주입 배지는 임의의 등장성 배지 제형, 전형적으로 생리 식염수, Normosol R(Abbott) 또는 Plasma-Lyte A(Baxter)일 수 있고, 또한 물 중 5% 덱스트로스 또는 Ringer의 락테이트가 활용될 수 있다. 주입 배지는 인간 혈청 알부민으로 보충될 수 있다.

[0150] 조성물 중 세포의 치료 유효량은 적어도 2개의 세포(예를 들어, 적어도 1개의 CD8+ 중추 기억 T 세포 및 적어도 1개의 CD4+ 헬퍼 T 세포 서브세트)이거나 또는 보다 전형적으로 102개 초과 세포, 최대 106개 최대이고 108개 또는 109개 세포를 포함하고 1010개 초과 세포일 수 있다. 세포의 수는 그 안에 포함되는 세포 유형과 마찬가지로 조성물이 의도되는 궁극적인 용도에 따라 달라질 것이다.

[0151] 세포는 요법을 받은 환자에 대해 자가 또는 이종일 수 있다. 세포는 동종이계일 수 있다. 원하는 경우, 치료는 또한 면역 반응의 유도를 향상시키기 위해 본원에 기재된 바와 같은 미토겐(예를 들어, PHA) 또는 림포카인, 사이토카인, 및/또는 케모카인(예를 들어, IFN-γ, IL-2, IL-12, TNF-α, IL-18, 및 TNF-β, GM-CSF, IL-4, IL-13, Flt3-L, RANTES, MIP1α 등)의 투여를 포함할 수 있다.

[0152] CAR 발현 면역 효과기 세포 집단은 단독으로, 또는 희석제 및/또는 IL-2 또는 다른 사이토카인 또는 세포 집단과 같은 다른 성분과 조합하여 약제학적 조성물로서 투여될 수 있다. 본원에 개시된 약제학적 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 또는 생리학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 조합하여, 본원에 기재된 바와 같이, T 세포와 같은 CAR-발현 면역 효과기 세포 집단을 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 완충액 예컨대 중성 완충 염수, 포스페이트 완충 염수 등; 탄수화물 예컨대 글루코스, 만노스, 수크로스 또는 덱스트란, 만니톨; 단백질; 폴리펩티드 또는 아미노산 예컨대 글리신; 산화방지제; 킬레이트화제 예컨대 EDTA 또는 글루타티온; 애드주반트(adjutant)(예를 들어, 수산화알루미늄); 및 방부제를 포함할 수 있다. 본원에 개시된 조성물은 정맥내 투여

를 위해 제형화될 수 있다.

[0153] 본원에 기재된 방법, 또는 당업계에 알려진 다른 방법을 사용하여 본원에 기재된 CAR 발현 T 세포를 투여함으로써 대상체에서 유도된 항-종양 면역 반응은 감염된 세포를 사멸시킬 수 있는 세포독성 T 세포, 조절 T 세포, 및 헬퍼 T 세포 반응에 의해 매개되는 세포 면역 반응을 포함할 수 있다. B 세포를 활성화시켜 항체 생산으로 이어질 수 있는 헬퍼 T 세포에 의해 주로 매개되는 체액성 면역 반응이 또한 유도될 수 있다. 본원에 개시된 조성물에 의해 유도된 면역 반응의 유형을 분석하기 위해 다양한 기술이 사용될 수 있으며, 당업계; 예를 들어, *Current Protocols in Immunology*, Edited by: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober (2001) John Wiley & Sons, N.Y., N.Y에 잘 기재되어 있다.

[0154] 따라서, 본원에는 본원에 기재된 바와 같은 치료 유효량의 CAR-발현 면역 효과기 세포를 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 악성종양을 갖는 것으로 진단되거나 또는 의심되거나, 또는 발병 위험이 있는 개체를 치료하는 방법이 제공된다.

[0155] 개시된 조성물의 투여는 주사, 투입, 또는 이식을 포함하는 임의의 편리한 방식으로 수행될 수 있다. 본원에 기재된 조성물은 환자에게 피하, 피내, 종양내, 결절내, 골수내, 근육내, 정맥내(i.v.) 주사에 의해, 또는 복강내로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 개시된 조성물은 피내 또는 피하 주사에 의해 환자에게 투여된다. 일부 구현예에서, 개시된 조성물은 i.v. 주사에 의해 투여된다. 조성물은 또한 종양, 림프절, 또는 감염 부위에 직접 주사될 수 있다.

[0156] 본원에는 CAR 폴리펩티드의 공동자극 영역에 4-1BB 도메인을 포함하는 제2 CAR 폴리펩티드를 대상체에게 공동으로 투여하는 방법이 제공된다. 제2 CAR 폴리펩티드는 분화 클러스터 3 제타(CD3/ ζ) 도메인 및/또는 저밀도 암항원 및/또는 그루브 내 펩티드 암 항원에 특이적인 세포의 도메인을 포함하는 적어도 하나의 세포질내 신호전달 영역을 추가로 포함할 수 있다. 제2 CAR 폴리펩티드는 힌지/막관통 영역에 분화 클러스터 8 알파(CD8/ α) 펩티드를 포함할 수 있다.

[0157] 특정 구현예에서, 개시된 CAR-변형된 면역 효과기 세포는 추가의 암 치료를 포함하나 이에 제한되지 않는, 임의의 수의 관련 치료 양식과 함께(예를 들어, 전에, 동시에 또는 후에) 환자에게 투여된다. 일부 구현예에서, CAR-변형된 면역 효과기 세포는 화학요법, 방사선, 면역억제제, 예컨대 사이클로스포린, 아자티오프린, 메토트렉세이트, 마이코페놀레이트, 및 FK506, 항체, 또는 다른 면역억제제 예컨대 CAM PATH, 항-CD3 항체 또는 다른 항체 요법, 사이토카인, 플루다리빈, 사이클로스포린, FK506, 라파마이신, 마이코페놀산, 스테로이드, FR901228, 사이토카인, 및 조사와 조합하여 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, CAR-변형된 면역 효과기 세포는 골수 이식, 화학요법제 예컨대, 플루다라빈, 외부-빔 방사선 요법(XRT), 사이클로포스파미드, 또는 항체 예컨대 OKT3 또는 CAMPATH를 사용한 T-세포 제거 요법과 함께(예를 들어, 전에, 동시에 또는 후에) 환자에게 투여된다. 다른 구현예에서, 세포 조성물은 CD20과 반응하는 제제, 예를 들어, 리툭산과 같은 B-세포 제거 요법 후 투여된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 대상체는 고용량 화학요법 이어서 말초 혈액 줄기 세포 이식으로 표준 치료를 받을 수 있다. 특정 구현예에서, 이식 후에, 대상체는 확장된 면역 세포의 주입을 받는다. 추가의 구현예에서, 확장된 세포는 대상체에서 암 또는 전암성 병변을 치료하기 위한 수술 전 또는 후에 투여된다.

[0158] **투여 레지멘**

[0159] 본 개시내용의 특정 구현예에 따르면, 조작된 세포의 다중 용량은 정의된 시간 경과에 걸쳐 대상체에게 투여될 수 있다. 이 측면에 따른 방법은 다중 용량의 세포를 대상체에게 순차적으로 투여하는 것을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, "순차적으로 투여하는"은 각 용량이 상이한 시점에, 예를 들어, 미리 결정된 간격(예를 들어, 시간, 일, 주 또는 개월)에 의해 분리된 상이한 날에 대상체에게 투여됨을 의미한다. 본 개시내용은 단일 초기 용량, 이어서 하나 이상의 2차 용량, 및 임의적으로 이어서 하나 이상의 3차 용량을 환자에게 순차적으로 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0160] 용어 "초기 용량," "2차 용량," 및 "3차 용량"은 본 개시내용의 조작된 세포를 투여하는 시간적 순서를 지칭한다. 따라서, "초기 용량"은 치료 레지멘의 시작시 투여되는 용량이고("기준 용량"으로도 지칭됨); "2차 용량"은 초기 용량 후 투여되는 용량이고; "3차 용량"은 2차 용량 후 투여되는 용량이다. 초기, 2차, 및 3차 용량은 모두 동일한 양의 조작된 세포를 함유할 수 있지만, 일반적으로 투여 빈도 면에서 서로 상이할 수 있다. 그러나, 특정 구현예에서, 초기, 2차 및/또는 3차 용량에 함유된 조작된 세포의 양은 치료 과정 동안 서로 달라진다(예를 들어, 적절하게 상향 또는 하향 조정됨). 특정 구현예에서, 2회 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 또는 5회) 용량이 "부하 용량"으로서 치료 레지멘의 시작시 투여되고 이어서 덜 빈번한 기준으로 투여되는 후속 용량(예를 들어,

"유지 용량")이 부여된다.

- [0161] 본 개시내용의 일 구현예에서, 각 2차 및/또는 3차 용량은 직전 선행 용량 후 1 내지 26(예를 들어, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½, 또는 그 이상) 주에 부여된다. 본원에 사용된 바와 같은 어구 "직전 선행 용량"은 다중 투여 순서에서, 중간 용량 없는 순서에서 바로 다음 용량의 투여 전에 환자에게 부여되는 용량을 의미한다.
- [0162] 본 개시내용의 이 측면에 따른 방법은 임의의 수의 2차 및/또는 3차 용량을 환자에게 부여하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 특정 구현예에서, 단일 2차 용량만이 환자에게 부여된다. 다른 구현예에서, 2회 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8회, 또는 그 이상)의 2차 용량이 환자에게 부여된다. 마찬가지로, 특정 구현예에서, 단일 3차 용량만이 환자에게 부여된다. 다른 구현예에서, 2회 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8회, 또는 그 이상)의 3차 용량이 환자에게 부여된다.
- [0163] 다중 2차 용량을 수반하는 구현예에서, 각 2차 용량은 다른 2차 용량과 동일한 빈도로 투여될 수 있다. 예를 들어, 각 2차 용량은 직전 선행 용량 후 1 내지 2 주에 환자에게 투여될 수 있다. 유사하게, 다중 3차 용량을 수반하는 구현예에서, 각 3차 용량은 다른 3차 용량과 동일한 빈도로 투여될 수 있다. 예를 들어, 각 3차 용량은 직전 선행 용량 후 2 내지 4주에 환자에게 투여될 수 있다. 대안적으로, 2차 및/또는 3차 용량이 환자에게 투여되는 빈도는 치료 레지멘의 과정에 걸쳐 달라질 수 있다. 투여 빈도는 또한 임상 검사 후 개별 환자의 필요에 따라 의사에 의해 치료 과정 동안 조정될 수 있다.
- [0164] **적응증**
- [0165] 특정 측면에서, 본원에는 본원에 제공된 CAR T 세포를 사용하여 암을 치료하는 방법이 제공된다. 특정 구현예에서, 치료될 암은 T 세포에 의해 발현된 CAR이 특이적으로 결합하는 PIG 항원 및/또는 저밀도 항원을 발현한다.
- [0166] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 방법 및 조성물에 의해 치료될 수 있는 암은 자궁경부, 항문, 질, 외음부, 음경, 헛바다, 후두, 편도, 방광, 혈액, 뼈, 골수, 뇌, 유방, 결장, 식도, 위장관, 잇몸, 머리, 신장, 간, 폐, 비인두, 목, 난소, 전립선, 피부, 비-흑색종 피부암(NMSC), 피부의 편평 세포 암종(SCC), 위, 고환, 혀, 또는 자궁으로부터의 암 세포를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 게다가, 암은 구체적으로 다음 조직학적 유형일 수 있지만, 이들에 제한되지 않는다: 신생물, 악성; 암종; 암종, 미분화; 거대 및 방추 세포 암종; 소세포 암종; 유두 암종; 편평상피 세포 암종; 림프상피성 암종; 기저 세포 암종; 모기질 암종; 이행 세포 암종; 유두 이행 세포 암종; 선암종; 가스트리노마, 악성; 담관암종; 간세포 암종; 조합 간세포 암종 및 담관암종; 지주 선암종; 선암 암종; 선종 폴립의 선암종; 선암종, 가족성 용종증; 고형 암종; 유암종, 악성; 세기관지폐포 선암종; 유두 선암종; 혈액소세포 암종; 호산성 암종; 호산성 선암종; 호염기구 암종; 투명 세포 선암종; 과립 세포 암종; 여포성 선암종; 유두 및 여포성 선암종; 비캡슐화 경화 암종; 부신 피질 암종; 자궁내막양 암종; 피부 부속기 암종; 아포크린 선암종; 피지샘 선암종; 이구성 선암종; 점막표피양 암종; 낭선암종; 유두 낭선암종; 유두 장액 낭선암종; 점액성 낭선암종; 점액성 선암종; 인환 세포 암종; 침윤성 도관 암종; 수질 암종; 소엽 암종; 염종 암종; 유방 파제트병; 선포 세포 암종; 선편평상피 암종; 편평상피 화생을 갖는 선암종; 악성 흥선종; 악성 난소 기질 종양; 악성 포막종; 악성 과립막 세포 종양; 및 악성 신경모세포종; 지대 세포 암종; 악성 라이디히 세포 종양; 악성 지질 세포 종양; 악성 부신경절종; 악성 유방외 부신경절종; 갈색세포종; 사구맥관육종; 악성 흑색종; 무색소성 흑색종; 표재 확장성 흑색종; 거대 색소 모반의 악성 흑색종; 유상피 세포 흑색종; 악성 청색 모반; 육종; 섬유육종; 악성 섬유 조직구종; 점액육종; 지방육종; 평활근육종; 횡문근육종; 배아 횡문근육종; 포상 횡문근육종; 기질 육종; 악성 혼합 종양; 물러리안 혼합 종양; 신아세포종; 간모세포종; 암육종; 악성 간엽세포종; 악성 브레너 종양; 악성 엽상 종양; 윤활막 육종; 악성 중피종; 미분화세포종; 배아성 암종; 악성 기형종; 악성 난소 갑상선종; 융모막암종; 악성 중신종; 혈관육종; 악성 혈관내피종; 카포시 육종; 악성 혈관주위 세포종; 림프관육종; 골육종; 피질주위 골육종; 연골육종; 악성 연골모세포종; 중간엽 연골육종; 뼈의 거대 세포 종양; 유잉 육종; 악성 지원성 종양; 범랑모세포 치아육종; 악성 범랑모세포종; 범랑모세포 섬유육종; 악성 송과체종; 청색종; 악성 교종; 뇌실막세포종; 성상세포종; 원형질 성상세포종; 원섬유 성상세포종; 성아세포종; 교아세포종; 희돌기교종; 희돌기교아세포종; 원시 신경외배엽; 소녀 육종; 신경절아세포종; 신경아세포종; 망막 아세포종; 후각 신경성 종양; 악성 수막종; 신경섬유육종; 악성 신경초종; 악성 과립 세포 종양; 악성 림프종; 호지킨병; 호지킨 림프종; 과립육아종; 소림프구성 악성 림프종; 미만성 거대 세포 악성 림프종; 여포성 악성 림프종; 균상 식육종; 다른 명시된 비-호지킨 림프종; 악성 조직구종; 다발성 골수종; 비만 세포 육종; 면역종

식성 소장 질환; 백혈병; 림프구성 백혈병; 형질 세포 백혈병; 적백혈병; 림프육종 세포 백혈병; 골수성 백혈병; 호염기구성 백혈병; 호산구성 백혈병; 단핵구성 백혈병; 비만 세포 백혈병; 거대모구성 백혈병; 골수성 육종; 및 모발 세포 백혈병.

[0167]

특정 구현예에서, 개시된 CAR-T 세포는 세포독성 또는 세포분열억제성 효과를 갖는 임의의 화합물, 모이어티 또는 군과 조합하여 사용될 수 있다. 약물 모이어티는 미세소관 억제제, 유사분열 억제제, 토포이소머라제 억제제, 또는 DNA 증간삽입제(intercalators)로서 기능할 수 있는 화학치료제, 및 특히 암 요법에 사용되는 것들을 포함한다. 예시적인 항암 화합물은 다음을 포함하나 이에 제한되지 않는다: 알렘투주맙(Campath®), 알트레티노인(Panretin®), 아나스트로졸(Arimidex®), 베마시주맙(Avastin®), 백사로텐(Targretin®), 보르테조밍(Velcade®), 보수티닙(Bosulif®), 브렌독시맙 베도틴(Adcetris®), 카보잔티닙(Cometriq™), 카르필조밍(Kyprolis™), 세특시맙(Erbix®), 크리조티닙(Xalkori®), 다사티닙(Sprycel®), 데닐류킨 디프티톡스(Ontak®), 에를로티닙 하이드로클로라이드(Tarceva®), 에베롤리무스(Afinitor®), 엑세메스탄(Aromasin®), 플베스트란트(Faslodex®), 게피티닙(Iressa®), 이브리투모맙 티옥세탄(Zevalin®), 이마티닙 메실레이트(Gleevec®), 이필리무맙(Yervoy™), 라파티닙 디토실레이트(Tykerb®), 레트로졸(Femara®), 닐로티닙(Tasigna®), 오파투무맙(Arzerra®), 파니투무맙(Vectibix®), 파조파닙 하이드로클로라이드(Votrient®), 페르투주맙(Perjeta™), 프탈라트렉세이트(Folotyn®), 레고라페닙(Stivarga®), 리툽시맙(Rituxan®), 로미렙신(Istodax®), 소라페닙 토실레이트(Nexavar®), 수니티닙 말레이트(Sutent®), 타목시펜, 탐시롤리무스(Torisel®), 토레미펜(Fareston®), 토시투모맙 및 131I-토시투모맙(Bexxar®), 트라스투주맙(Herceptin®), 트레티노인(Vesanoid®), 반데타닙(Caprelsa®), 베루라페닙(Zelboraf®), 보리노스타트(Zolinza®), 및 Ziv-아플리베르셉트(Zaltrap®). 추가 화학치료제의 예는 다음을 포함하나 이에 제한되지 않는 이러한 화학치료제의 예를 포함한다: 알킬화제 예컨대 티오테파 및 사이클로포스파미드; 알킬 술포네이트 예컨대 부술폰, 임프로술폰 및 피포술폰; 아지리딘 예컨대 벤조도파, 카보퀴온, 메투레도파, 및 우레도파; 에틸렌이민 및 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 및 트리메틸롤로멜라민을 포함한 메틸아멜라민; 아세토게닌(특히 불라타신 및 불라타시논); 캄프로테신(합성 유사체 토포테칸 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065(그의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 크립토포신(특히 크립토포신 1 및 크립토포신 8); 둘라스타틴; 듀오카마이신(합성 유사체, KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘뤼테로빈; 판크라티스타틴; 사르코티딘; 스펀기스타틴; 질소 머스타드 예컨대 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노벤비신, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 질소우레아 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 및 라니무스틴; 항생제 예컨대 에네다인 항생제(예를 들어, 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마II 및 칼리케아미신 오메가I1; 다이네미신 A를 포함하는 다이네미신; 비스포스포네이트, 예컨대 클로드로네이트; 에스페라미신; 뿐만 아니라 네오카르지노스타틴 클로모포어 및 관련 색소단백질 에네다인 항생제 클로모포어, 아클라시노마이신, 액티노마이신, 아우트라나이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 카라비신, 카미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데투루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신(모폴리노-독소루비신, 시아노모폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 테옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신 예컨대 미토마이신 C, 마이코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포르피로마이신, 퓨로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니맥스, 지노스타틴, 조루비신; 항-대사물 예컨대 메토평렉세이트 및 5-플루오로우라실(5-FU); 엽산 유사체 예컨대 데노프테린, 메토평렉세이트, 프테로프테린, 트리메프렉세이트; 퓨린 유사체 예컨대 플루다라빈, 6-머캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카모푸르, 사이타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록스우리딘; 안드로겐 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토라톤; 항-아드레날린 예컨대 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 엽산 보충물 예컨대 폴린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레블린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트렉세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지퀴온; 엘포르미틴; 엘리프티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 메이탄시노이드 예컨대 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단물; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 포도필린산; 2-에틸하이드라지드; 프로카바진; PSK 다당류 복합체; 라족산; 리족신; 시조푸란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지퀴온; 2,2',2''-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센(특히 T-2 독신, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만도무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가사이토신; 아라비노시드("Ara-C"); 사이클로포스파미드; 티오테파; 탁소이드, 예를 들어, 파클리탁셀 및

독세탁셀; 클로람부실; 켈시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토피린; 메토티렉세이트; 백금 배위 복합체 예컨대 시스플라틴, 옥사리플라틴 및 카보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드(VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빈크리 스티; 비노렐빈; 노반트론; 테니포시드; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 크셀로다; 이반드로네이 트; 이리노테칸(예를 들어, CPT-11); 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴(DMFO); 레티노 이드 예컨대 레티노산; 카페시타빈; 및 상기 중 임의의 것의 약제학적으로 허용되는 염, 산 또는 유도체.

[0168] 일부 구현예에서, 대상체는 또한 추가의 면역치료제가 투여된다. 면역요법은 암을 치료하기 위해 대상체의 면역 계를 사용하는 치료, 예를 들어, 암 백신, 사이토카인, 암-특이적 항체의 사용, T 세포 요법, 및 수치상 세포 요법을 지칭한다.

[0169] 일부 구현예에서, 대상체는 또한 면역 조절 단백질이 투여된다. 면역 조절 단백질의 예는 다음을 포함하나 이에 제한되지 않는다: B 림프구 화학유인물질("BLC"), C-C 모티프 케모카인 11("Eotaxin-1"), 호산구 화학주성 단백 질 2("Eotaxin-2"), 과립구 콜로니 자극 인자("G-CSF"), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자("GM-CSF"), 1-309, 세포간 접촉 분자 1("ICAM-1"), 인터페론 감마("IFN-감마"), 인터류킨-1 알파("IL-1 알파"), 인터류킨-1 베타 ("IL-1 베타"), 인터류킨 1 수용체 길항제("IL-1 ra"), 인터류킨-2("IL-2"), 인터류킨-4("IL-4"), 인터류킨-5("IL-5"), 인터류킨-6("IL-6"), 인터류킨-6 용해성 수용체("IL-6 sR"), 인터류킨-7("IL-7"), 인터류킨-8("IL-8"), 인터류킨-10("IL-10"), 인터류킨- 11("IL-11"), 인터류킨-12의 서브유닛 베타("IL-12 p40" 또는 "IL-12 p70"), 인터류킨-13("IL-13"), 인터류킨-15("IL-15"), 인터류킨-16("IL-16"), 인터류킨-17("IL-17"), 케모카인 (C-C 모티프) 리간드 2("MCP-1"), 대식세포 콜로니 자극 인자("M-CSF"), 감마 인터페론에 의해 유도된 모노카인 ("MIG"), 케모카인 (C-C 모티프) 리간드 2("MIP-1 알파"), 케모카인 (C-C 모티프) 리간드 4("MIP-1 베타"), 대 식세포 염증 단백질-1-델타("MIP-1 델타"), 혈소판-유래 성장 인자 서브유닛 B("PDGF-BB"), 케모카인 (C-C 모티 프) 리간드 5, 활성화 시점에서 조절된 발현되고 분비된 정상 T 세포("RANTES"), TIMP 메탈로펩티다제 억제제 1("TIMP-1"), TIMP 메탈로펩티다제 억제제 2("TIMP-2"), 종양 괴사 인자, 림포톡신-알파("TNF 알파"), 종양 괴 사 인자, 림포톡신-베타("TNF 베타"), 용해성 TNF 수용체 유형 1("sTNFRI"), sTNFRIIAR, 뇌-유래 신경영양 인 자("BDNF"), 염기성 섬유모세포 성장 인자("bFGF"), 골 형태발생 단백질 4("BMP-4"), 골 형태발생 단백질 5("BMP-5"), 골 형태발생 단백질 7("BMP-7"), 신경 성장 인자("b-NGF"), 표피 성장 인자("EGF"), 표피 성장 인 자 수용체("EGFR"), 내분비샘-유래 혈관 내피 성장 인자("EG-VEGF"), 섬유아세포 성장 인자 4("FGF-4"), 케라틴 세포 성장 인자("FGF-7"), 성장 분화 인자 15("GDF-15"), 교질 세포-유래 신경영양 인자("GDNF"), 성장 호르몬, 헤파린-결합 EGF-유사 성장 인자("HB-EGF"), 간세포 성장 인자("HGF"), 인슐린-유사 성장 인자 결합 단 백질 1("IGFBP-1"), 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질 2("IGFBP-2"), 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질 3("IGFBP-3"), 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질 4("IGFBP-4"), 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질 6("IGFBP-6"), 인슐린-유사 성장 인자 1("IGF-1"), 인슐린, 대식세포 콜로니 자극 인자("M-CSF R"), 신경 성장 인자 수용체("NGF R"), 뉴로트로핀-3("NT-3"), 뉴로트로핀-4 ("NT-4"), 파골세포형성 억제 인자("오스테오프로 테게린"), 혈소판-유래 성장 인자 수용체("PDGF-AA"), 포스파티딜이노시톨-글리칸 생합성("PIGF"), Skp, 쿨린 (Cullin), F-박스 함유 복합체("SCF"), 줄기 세포 인자 수용체("SCF R"), 형질전환 성장 인자 알파("TGF알 파"), 형질전환 성장 인자 베타-1("TGF 베타 1"), 형질전환 성장 인자 베타-3("TGF 베타 3"), 혈관 내피 성장 인자("VEGF"), 혈관 내피 성장 인자 수용체 2("VEGFR2"), 혈관 내피 성장 인자 수용체 3("VEGFR3"), VEGF-D 6Ckine, 티로신-단백질 키나제 수용체 UFO("Ax1"), 베타셀룰린("BTC"), 점막-연관 상피 케모카인("CCL28"), 케 모카인 (C-C 모티프) 리간드 27("CTACK"), 케모카인 (C-X-C 모티프) 리간드 16("CXCL16"), C-X-C 모티프 케모 카인 5("ENA-78"), 케모카인 (C-C 모티프) 리간드 26("Eotaxin-3"), 과립구 화학주성 단백질 2("GCP-2"), GRO, 케모카인 (C-C 모티프) 리간드 14("HCC-1"), 케모카인 (C-C 모티프) 리간드 16("HCC-4"), 인터류킨-9("IL-9"), 인터류킨-17 F("IL-17F"), 인터류킨-18-결합 단백질("IL-18 BPa"), 인터류킨-28 A("IL-28A"), 인터류킨 29("IL-29"), 인터류킨 31("IL-31"), C-X-C 모티프 케모카인 10("IP-10"), 케모카인 수용체 CXCR3("I-TAC"), 백혈병 억제 인자("LIF"), 경쇄, 케모카인 (C 모티프) 리간드("림포탁틴"), 단핵구 화학유인물질 단백질 2("MCP-2"), 단핵구 화학유인물질 단백질 3("MCP-3"), 단핵구 화학유인물질 단백질 4("MCP-4"), 대식세포-유래 케모카인("MDC"), 대식세포 이동 억제 인자("MIF"), 케모카인 (C-C 모티프) 리간드 20("MIP-3 알파"), C-C 모 티프 케모카인 19("MIP-3 베타"), 케모카인 (C-C 모티프) 리간드 23("MPIF-1"), 대식세포 자극 단백질 알파 쇠 ("MSP알파"), 뉴클레오솜 집합 단백질 1-유사 4("NAP-2"), 분비된 인단백질 1("오스테오펀틴"), 폐 및 활성화-조절 사이토카인("PARC"), 혈소판 인자 4("PF4"), 스트로마 세포-유래 인자- 1 알파("SDF-1 알파"), 케모카인 (C-C 모티프) 리간드 17("TARC"), 흉선 발현 케모카인("TECK"), 흉선 기질 림포포이에틴("TSLP 4- IBB"), CD 166 항원("ALCAM"), 분화 클러스터 80("B7-1"), 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 17("BCMA"), 분화 클러스터 14("CD14"), 분화 클러스터 30("CD30"), 분화 클러스터 40("CD40 리간드"), 암배아 항원-관련 세포

접착 분자 1(담즙 당단백질)("CEACAM-1"), 사멸 수용체 6("DR6"), 테옥시티미딘 키나제("Dtk"), 유형 1 막 당단백질("엔도글린"), 수용체 티로신-단백질 키나제 erbB-3("ErbB3"), 내피-백혈구 접착 분자 1("E-셀렉틴"), 세포사멸사 항원 1("Fas"), Fms-유사 티로신 키나제 3("Flt-3L"), 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 1("GITR"), 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 14("HVEM"), 세포간 접착 분자 3("ICAM-3"), IL-1 R4, IL-1 RI, IL-10 R베타, IL-17R, IL-2R감마, IL-21R, 리소좀 막 단백질 2("LIMPII"), 호중구 젤라티나제-연관 리포칼린("리포칼린-2"), CD62L ("L-셀렉틴"), 림프 내피("LYVE-1"), MHC 클래스 I 폴리펩티드-관련 서열 A("MICA"), MHC 클래스 I 폴리펩티드-관련 서열 B("MICB"), NRG1-베타1, 베타-유형 혈소판-유래 성장 인자 수용체("PDGF R베타"), 혈소판 내피 세포 접착 분자("PECAM-1"), RAGE, A형 간염 바이러스 세포 수용체 1("TIM-1"), 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 IOC("TRAIL R3"), 트랩핀 단백질 트랜스글루타미나제 결합 도메인("트랩핀-2"), 우로키나제 수용체("uPAR"), 혈관 세포 접착 단백질 1("VCAM-1"), XEDAR, 액티빈 A, 아구티-관련 단백질("AgRP"), 리보뉴클레아제 5("안지오게닌"), 안지오포이에틴 1, 안지오스타틴, 카텡신 S, CD40, 크립틱 패밀리 단백질 IB("Cripto-1"), DAN, Dickkopf-관련 단백질 1("DKK-1"), E-카드헤린, 상피 세포 접착 분자("EpCAM"), Fas 리간드(FasL 또는 CD95L), Fcg RIIB/C, FoUistatin, 갈락틴-7, 세포간 접착 분자 2("ICAM-2"), IL-13 R1, IL-13R2, IL-17B, IL-2 Ra, IL-2 Rb, IL-23, LAP, 신경 세포 접착 분자("NrcAM"), 플라스미노겐 활성화인자 억제제- 1("PAI-1"), 혈소판 유래 성장 인자 수용체("PDGF-AB"), 레시스틴, 기질 세포-유래 인자 1("SDF-1 베타"), sgp130, 분비된 프리즐드-관련 단백질 2("ShhN"), 시알산-결합 면역글로불린-유형 렉틴("Siglec-5"), ST2, 혈전질환 성장 인자-베타 2("TGF 베타 2"), Tie-2, 트롬보포이에틴("TPO"), 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 10D("TRAIL R4"), 골수성 세포 상에서 발현된 촉발 수용체 1("TREM-1"), 혈관 내피 성장 인자 C("VEGF-C"), VEGFR1, 아디포넥틴, 아답신("AND"), 알파-태아단백질("AFP"), 안지오포이에틴-유사 4("ANGPTL4"), 베타-2-마이크로글로불린("B2M"), 기저 세포 접착 분자("BCAM"), 탄수화물 항원 125("CA125"), 암 항원 15-3("CA15-3"), 암배아 항원("CEA"), cAMP 수용체 단백질("CRP"), 인간 포피 성장 인자 수용체 2("ErbB2"), 폴리스타틴, 난포-자극 호르몬("FSH"), 케모카인 (C-X-C 모티프) 리간드 1("GRO 알파"), 인간 용모성 생식선자극호르몬("베타 HCG"), 인슐린-유사 성장 인자 1 수용체("IGF-1 sR"), IL-1 sRII, IL-3, IL-18 Rb, IL-21, 렙틴, 기질 메탈로프로테이나제-1("MMP-1"), 기질 메탈로프로테이나제-2("MMP-2"), 기질 메탈로프로테이나제-3("MMP-3"), 기질 메탈로프로테이나제-8("MMP-8"), 기질 메탈로프로테이나제-9("MMP-9"), 기질 메탈로프로테이나제-10("MMP-10"), 기질 메탈로프로테이나제-13("MMP-13"), 신경 세포 접착 분자("NCAM-1"), 엔탁틴("니도겐-1"), 뉴런 특이적 에놀라제("NSE"), 온코스타틴 M("OSM"), 프로칼시토닌, 프로락틴, 전립선 특이적 항원("PSA"), 시알산-결합 Ig-유사 렉틴 9("Siglec-9"), ADAM 17 엔도렙티다제("TACE"), 티로글로불린, 메탈로프로테이나제 억제제 4("TIMP-4"), TSH2B4, 디스인테그린 및 메탈로프로테이나제 도메인-함유 단백질 9("ADAM-9"), 안지오포이에틴 2, 종양 괴사 인자 리간드 슈퍼패밀리 구성원 13/ 산성 류신-풍부 핵 인단백질 32 패밀리 구성원 B("APRIL"), 골 형태발생 단백질 2("BMP-2"), 골 형태발생 단백질 9("BMP-9"), 보체 성분 5a("C5a"), 카텡신 L, CD200, CD97, 케메린(Chemerin), 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 6B("DcR3"), 지방산-결합 단백질 2("FABP2"), 섬유아세포 활성화 단백질, 알파("FAP"), 섬유아세포 성장 인자 19("FGF-19"), 갈락틴-3, 간세포 성장 인자 수용체("HGF R"), IFN-알파/베타 R2, 인슐린-유사 성장 인자 2("IGF-2"), 인슐린-유사 성장 인자 2 수용체("IGF-2 R"), 인터류킨-1 수용체 6("IL-1R6"), 인터류킨 24("IL-24"), 인터류킨 33("IL-33", 칼리크레인 14, 아스파라기닐 엔도펩티다제("레구마인"), 산화된 저밀도 지단백질 수용체 1("LOX-1"), 만노스-결합 렉틴("MBL"), 네프릴리신("NEP"), Notch 상동체 1, 전좌-연관(드로소필라)("Notch-1"), 신아세포종 과발현("NOV"), 오스테오액티빈, 프로그램화 세포 사멸 단백질 1("PD-1"), N-아세틸무라모일-L-알라닌 아미다제("PGRP-5"), 세르핀 A4, 분비된 프리즐드 관련 단백질 3("sFRP-3"), 트롬보모듈린, Toll-유사 수용체 2("TLR2"), 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 10A("TRAIL R1"), 트랜스페린("TRF"), WIF-1ACE-2, 알부민, AMICA, 안지오포이에틴 4, B-세포 활성화 인자("BAFF"), 탄수화물 항원 19-9("CA19-9"), CD 163, 클러스테린, CRT AM, 케모카인 (C-X-C 모티프) 리간드 14("CXCL14"), 시스타틴 C, 데코린("DCN"), Dickkopf-관련 단백질 3("Dkk-3"), 델타-유사 단백질 1("DLL1"), 페투인 A, 헤파린-결합 성장 인자 1("aFGF"), 플레이트 수용체 알파("FOLR1"), 푸린, GPCR-연관 분류 단백질 1("GASP-1"), GPCR-연관 분류 단백질 2("GASP-2"), 과립구 콜로니 자극 인자 수용체("GCSF R"), 세린 프로테아제 헵신("HAI-2"), 인터류킨-17B 수용체("IL-17B R"), 인터류킨 27("IL-27"), 림프구-활성화 유전자 3("LAG-3"), 아포지단백질 A-V("LDL R"), 펩시노겐 I, 레티놀 결합 단백질 4("RBP4"), SOST, 헤파란 술페이트 프로테오글리칸("신데칸-1"), 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 13B("TACI"), 조직 인자 경로 억제제("TFPI"), TSP-1, 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리, 구성원 10b("TRAIL R2"), TRANCE, 트로포닌 I, 우로키나제 플라스미노겐 활성화인자("uPA"), CD144로도 알려진 카드헤린 5, 유형 2 또는 VE-카드헤린(혈관 내피)("VE-카드헤린"), WNT1-유도성-신호전달 경로 단백질 1("WISP-1"), 및 핵 인자 κB의 수용체 활성화인자("RANK").

- [0170] 개시된 CAR 및 CAR을 발현하는 면역 세포는 면역 체크포인트 억제제와 조합하여 사용될 수 있다. 면역 체크포인트 억제제는 광범위하게 암 세포가 면역 반응을 방지하거나 또는 하향조절하기 위해 생산될 수 있는 체크포인트를 억제하는 것을 지칭한다. 2가지 알려진 면역 체크포인트 경로는 세포독성 T-림프구 항원-4(CTLA-4) 및 프로그램화-사멸 1(PD-1) 수용체를 통한 신호전달을 수반한다. 이들 단백질은 T 세포 기능의 모든 단계 전반에 걸쳐 중요한 역할을 하는 공동-신호전달 분자의 CD28-B7 패밀리의 구성원이다. PD-1 수용체(CD279로도 알려짐)는 활성화된 T 세포의 표면 상에서 발현된다. 이의 리간드인 PD-L1(B7-H1; CD274) 및 PD-L2(B7-DC; CD273)는 수지상 세포 또는 대식세포와 같은 APC의 표면 상에서 발현된다. PD-L1은 우세한 리간드인 반면, PD-L2는 훨씬 더 제한된 발현 패턴을 갖는다. 리간드가 PD-1에 결합할 때, 억제 신호는 T 세포 내로 전송되어, 사이토카인 생산을 감소시키고 T 세포 증식을 억제한다. 체크포인트 억제제는 PD-1(니볼루맵(BMS-936558 또는 MDX1106), CT-011, MK-3475, AMP-514), PD-L1(MDX-1105(BMS-936559), MPDL3280A, MSB0010718C), PD-L2(rHIgM12B7, AMP-224), CTLA-4(이필리무맵(MDX-010), 트레멜리무맵(CP-675,206)), IDO, B7-H3(MGA271), B7-H4, TIM3, LAG-3(BMS-986016)을 차단하는 압타머 및 항체를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 면역 체크포인트 억제제는 세미플리맵(REGN2810), 니볼루맵(BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538), 캄브롤리주맵(MK-3475, SCH 900475), 아테졸리주맵(MPDL3280A, RG7446, RO5541267), 두르발루맵(MEDI4736, MEDI-4736), 아벨루맵(MSB0010718C), 이필리무맵(BMS-734016, IBI310, MDX-010), SHR1210, 신틸리맵(ABI308), 스파르탈리주맵(PDR001), 티슬렐리주맵(BGB-A317), 피딜리주맵, BCD-100, 토리팔리맵(JSO01), BAY 1905254, ASP 8374, PF-06801591, AMP-224, AB122, AK105, AMG 404, BCD-100, BI 754091, F520, HLX10, HX008, JTX-4014, LZM009, MEDI0680, MGA012, Sym021, TSR-042, PSB205, MGD019, MGD013, AK104, XmAb20717, RO7121661, CX-188, INCB086550, FS118, BCD-135, BGB-A333, CBT-502, CK-301, CS1001, FAZ053, HLX20, KN035, MDX-1105, MSB2311, SHR-1316, TG-1501, ZKAB001, INBRX-105, MCLA-145, KN046, M7824, LY3415244, INCB086550, CA-170, CX-072, ADU-1604, AGEN1181, AGEN1884, MK-1308, REGN4659, XmAb22841, ATOR-1015, PSB205, MGD019, AK104, XmAb20717, BMS-986249, 트레멜리무맵, BMS-986258, BGB-A425, INCAGN02390, Sym023, JNJ 61610588, BI 754111, LAG525, MK-4280, REGN3767, Sym022, TSR-033, 렐라틀리맵, JTX-2011, MGD009, BMS-986207, OMP-313M32, MK-7684 또는 TSR-022일 수 있다.
- [0171] 프로그램화 사멸 1(PD-1)에 대한 인간 단클론 항체 및 항-PD-1 항체를 단독으로 또는 다른 면역요법제와 조합하여 사용하여 암을 치료하는 방법은 미국 특허 번호 8,008,449에 기재되어 있으며, 이는 이들 항체에 대해 참조로 포함된다. 항-PD-L1 항체 및 이의 용도는 미국 특허 번호 8,552,154에 기재되어 있으며, 이는 이들 항체에 대해 참조로 포함된다. 항-PD-1 항체 또는 항-PD-L1 항체를 포함하는 항암제는 미국 특허 번호 8,617,546에 기재되어 있으며, 이는 이들 항체에 대해 참조로 포함된다.
- [0172] 일부 구현예에서, PD-L1 억제제는 PDL1에 특이적으로 결합하는 항체, 예컨대 BMS-936559(Bristol-Myers Squibb) 또는 MPDL3280A(Roche)를 포함한다. 일부 구현예에서, PD-1 억제제는 PD-1에 특이적으로 결합하는 항체, 예컨대 람브롤리주맵(Merck), 니볼루맵(Bristol-Myers Squibb), 또는 MEDI4736(AstraZeneca)을 포함한다. PD-1에 대한 인간 단클론 항체 및 항-PD-1 항체를 단독으로 또는 다른 면역요법제와 조합하여 사용하여 암을 치료하는 방법은 미국 특허 번호 8,008,449에 기재되어 있으며, 이는 이들 항체에 대해 참조로 포함된다. 항-PD-L1 항체 및 이에 대한 용도는 미국 특허 번호 8,552,154에 기재되어 있으며, 이는 이들 항체에 대해 참조로 포함된다. 항-PD-1 항체 또는 항-PD-L1 항체를 포함하는 항암제는 미국 특허 번호 8,617,546에 기재되어 있으며, 이는 이들 항체에 대해 참조로 포함된다.
- [0173] 최적의 "살해" CD8 T 세포 반응을 생성하는 것은 또한 T 세포 수용체 활성화 + 공동-자극을 필요로 하며, 이는 OX40(CD134) 및 4-1BB(CD137)를 포함하는 종양 괴사 인자 수용체 패밀리의 구성원의 결합을 통해 제공될 수 있다. 활성화(작용제) 항-OX40 mAb를 사용한 치료가 T 세포 분화 및 세포용해 기능을 증가시켜 다양한 종양에 대한 향상된 항-종양 면역을 야기하므로 OX40이 특히 관심이다.
- [0174] 일부 구현예에서, 이러한 추가의 치료제는 항대사물, 예컨대 메토트렉세이트, 6-머캅토프린, 6-티오구아닌, 사이타라빈, 플루다라빈, 5-플루오로우라실, 데카르바진, 하이드록시우레아, 아스파라기나제, 켄시타빈 또는 클라드리빈으로부터 선택될 수 있다.
- [0175] 일부 구현예에서, 이러한 추가의 치료제는 알킬화제, 예컨대 메클로레타민, 티오에파, 클로람부실, 멜팔란, 카르무스틴(BSNU), 로무스틴(CCNU), 사이클로포스파미드, 부술판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 다카르바진(DTIC), 프로카바진, 미토마이신 C, 시스플라틴 및 다른 백금 유도제, 예컨대 카보플라틴으로부터 선택될 수 있다.
- [0176] 일부 구현예에서, 이러한 추가의 치료제는 항-유사분열제, 예컨대 탁산, 예를 들면 도세탁셀, 및 파클리탁셀,

및 빈카 알칼로이드, 예를 들면 빈데신, 빈크리стин, 빈블라스틴, 및 비노렐빈으로부터 선택될 수 있다.

- [0177] 일부 구현예에서, 이러한 추가의 치료제는 토포이소머라제 억제제, 예컨대 토포테칸 또는 이리노테칸, 또는 세포분열억제 약물, 예컨대 에토포시드 및 테니포시드로부터 선택될 수 있다.
- [0178] 일부 구현예에서, 이러한 추가의 치료제는 성장 인자 억제제, 예컨대 ErbB1(EGFR)의 억제제(예컨대 EGFR 항체, 예를 들어 잘루투무맙, 세톡시맙, 파니투무맙 또는 니모투주맙 또는 다른 EGFR 억제제, 예컨대 게피티닙 또는 에를로티닙), ErbB2(HER2/neu)의 또 다른 억제제(예컨대 HER2 항체, 예를 들어 트라스투주맙, 트라스투주맙-DM 1 또는 페르투주맙) 또는 EGFR 및 HER2 둘 다의 억제제, 예컨대 라파티닙)으로부터 선택될 수 있다.
- [0179] 일부 구현예에서, 이러한 추가의 치료제는 티로신 키나제 억제제, 예컨대 이마티닙(Glivec, Gleevec STI571) 또는 라파티닙으로부터 선택될 수 있다.
- [0180] 따라서, 일부 구현예에서, 개시된 항체는 오파투무맙, 자놀리무맙, 다라투무맙, 라니비주맙, 니모투주맙, 파니투무맙, hu806, 다클리주맙(Zenapax), 바실릭시맙(Simulect), 인플릭시맙(Remicade), 아달리무맙(Humira), 나탈리주맙(Tysabri), 오말리주맙(Xolair), 에팔리주맙(Raptiva), 및/또는 리툽시맙과 조합하여 사용된다.
- [0181] 일부 구현예에서, 상기 기재된 바와 같은 장애를 치료하기 위해 CAR(예를 들어, 본원에 개시된 CAR 및 이러한 CAR을 발현하는 면역 세포)과 조합하여 사용하기 위한 치료제는 항암 사이토카인, 케모카인, 또는 이의 조합일 수 있다. 적합한 사이토카인 및 성장 인자의 예는 IFN γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-23, IL-24, IL-27, IL-28a, IL-28b, IL-29, KGF, IFN α (예를 들어, IFN α 2b), IFN γ , GM-CSF, CD40L, Flt3 리간드, 줄기 세포 인자, 안세스틴, 및 TNF α 를 포함한다. 적합한 케모카인은 Glu-Leu-Arg(ELR)-음성 케모카인 예컨대 인간 CXC 및 C-C 케모카인 패밀리로부터의 IP-10, MCP-3, MIG, 및 SDF-1 α 를 포함할 수 있다. 적합한 사이토카인은 사이토카인 유도체, 사이토카인 변이체, 사이토카인 단편, 및 사이토카인 융합 단백질 포함한다.
- [0182] 일부 구현예에서, 상기 기재된 바와 같은 장애를 치료하기 위해 CAR과 조합하여 사용하기 위한 치료제는 세포 주기 제어/세포자멸사 조절인자(또는 "조절제")일 수 있다. 세포 주기 제어/세포자멸사 조절인자는 세포 주기 제어/세포자멸사 조절인자를 표적하고 조절하는 분자 예컨대 (i) cdc-25(예컨대 NSC 663284), (ii) 세포 주기를 과도하게 자극하는 사이클린-의존적 키나제(예컨대 플라보피리돌(L868275, HMR1275), 7-하이드록시스타우로스포린(UCN-01, KW-2401), 및 로스코비틴(R-로스코비틴, CYC202)), 및 (iii) 텔로머라제 조절제(예컨대 BIBR1532, SOT-095, GRN163 및 예를 들면 US 6,440,735 및 US 6,713,055에 기재된 조성물)를 포함할 수 있다. 세포자멸사 경로를 방해하는 분자의 비제한적인 예는 TNF-관련 세포자멸사-유도 리간드(TRAIL)/세포자멸사-2 리간드(Apo-2L), TRAIL 수용체를 활성화하는 항체, IFN, 및 안티센스 Bcl-2를 포함한다.
- [0183] 일부 구현예에서, 상기 기재된 바와 같은 장애를 치료하기 위해 CAR(예를 들어, 본원에 개시된 CAR 및 이러한 CAR을 발현하는 면역 세포)과 조합하여 사용하기 위한 치료제는 호르몬 조절제, 예컨대 항안드로겐 및 항에스트로겐 요법에 유용한 제제일 수 있다. 이러한 호르몬 조절제의 예는 타목시펜, 이독시펜, 플베스트란트, 드롤록시펜, 토레미펜, 탈록시판, 디에틸stil베스트롤, 에티닐 에스트라디올/에스티닐, 항안드로겐(예컨대 플루타민드/유락신), 프로게스틴(예컨대 예컨대 하이드록시프로게스테론 카프로에이트, 메드록시프로게스테론/프로베라, 메게스트롤 아세페이트/메가세), 부신피질스테로이드(예컨대 하이드로코르티손, 프레드니손), 황체형성 호르몬-방출 호르몬(및 이의 유사체 및 다른 LHRH 작용제 예컨대 부세렐린 및 고세렐린), 아로마타제 억제제(예컨대 아나스트라졸/아리미덱스, 아미노글루테티미드/사이트라텐, 엑세메스탄) 또는 호르몬 억제제(예컨대 옥트레오티드/산도스타틴)이다.
- [0184] 상기 기재된 바와 같이, 조합 투여는 동시, 개별, 또는 순차적일 수 있다. 동시 투여의 경우 제제는 적절하게 하나의 조성물로 또는 개별 조성물로 투여될 수 있다.
- [0185] **예시**
- [0186] **실시예 1: SK-MEL-37 종양 및 항-HLA-A2/MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ scFv를 함유하는 키메라 항원 수용체.**
- [0187] *CAR의 생성:*
- [0188] V_L-V_H 방향의 항-HLA-A2/MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ scFv + 1) huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인(BB/z CAR), 또는 2) huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인(28/z CAR)을 함유하는 키메라 항원 수용체를 항-HLA-A2/MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ 항체, 31345의 V_L 및 V_H 서열을 사용하여 구축하였다. 비

-결합 대조군으로서, BB/z CAR을 상이한 scFv + huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인을 사용하여 설계하였다. 이들 CAR을 EF1a 프로모터 및 IRES:eGFP 서열(CAR-형질도입된 세포를 추적하기 위함)이 있는 pLVX 렌티바이러스 벡터 내에 클로닝하고, VSV-위형 렌티바이러스를 생산하였다. 작제물 개략도에 대해 도 1, 파트 b를 참조한다.

[0189] CD3+ T 세포를 2명의 정상 공여자('공여자 1' 및 '공여자 2')의 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)에서 단리하고, CD3/CD28 마이크로비드 + 100 U/ml 재조합 인간 IL-2로 자극하고, MOI=5에서 렌티바이러스로 형질도입하였다. 형질도입된 세포를 CD3/CD28 마이크로비드 + 100 U/ml 재조합 인간 IL-2를 사용하여 19일 동안 확장시킨 후 생체내 실험 동안 사용할 때까지 동결보존하였다.

[0190] 이종 종양의 이식 및 측정

[0191] HLA-A2/MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄-표적화된 키메라 항원 수용체(CAR) T 세포의 생체내 효능을 결정하기 위해, 이종 종양 연구를 수행하였다. 0일째에, 면역결핍 NOD.Cg-Prkdc^{scid} I12rg^{tm1Wjl}/SzJ(NSG) 마우스에 5×10^6 HLA-A2⁺MAGEA4⁺ SK-MEL-37 인간 흑색종 종양 세포를 피하 주사하였다. 질량 분광법 기술을 사용하여 SK-MEL-37 흑색종 세포가 MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ 펩티드의 대략 1,326개 세포-표면 카피를 발현하는 것으로 결정되었다. 종양이 확립된 후 7일째에, 마우스(그룹당 n=5)에 비-결합 대조군 BB/z CAR(대조군 CAR T), 2명의 상이한 공여자로부터의 항-HLA-A2/MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR, 또는 항-HLA-A2/MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR(CAR로 형질도입된 세포에 대한 마커인, GFP를 발현하는 세포의 빈도에 의해 결정됨)을 발현하는 4×10^6 T 세포를 정맥내 주사하였다. 종양 부피를 측정하여 64 일째까지 종양 성장을 평가하였다.

[0192] 이종 종양 성장 및 억제 계산

[0193] 외부 캘리퍼에 의해 종양 부피를 결정하기 위해, 최대 세로 직경(길이 mm) 및 최대 가로 직경(너비 mm)을 결정하였다. 캘리퍼 측정에 기반한 종양 부피는 다음 공식에 의해 계산하였다: 부피(mm³) = (길이 x 너비²)/2.

[0194] 종합하면, 결과는 2명의 공여자로부터의 MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T 세포가 MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T 세포와 비교하여 우수한 생체내 항-종양 활성 및 항-종양 동역학을 입증함을 입증한다.

[0195] 표 8: CAR의 설명:

AbPID	AbPID	특이성	설명
17363	17363	비-결합 대조군	VL-VH 방향의 항-HLA-A2/HPV16E7 ₁₁₋₁₉ scFv 17363과 huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인(대조군 CAR)
31345	31345	HLA-A2/MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄	VL-VH 방향의 항-MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ scFv 31345와 huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인(BB/z CAR)
31345	31345	HLA-A2/MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄	VL-VH 방향의 항-MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ scFv 31345와 huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인(28/z CAR)

[0196] 실험적 절차: 결과 요약 및 결론:

[0198] 공여자 1: SK-MEL-37 종양을 대조군 CAR T 세포 또는 MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T 세포를 받은 마우스에서 점진적으로 성장시켰다. 대조군으로, MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ 28/z는 생체내에서 확립된 SK-MEL-37 종양의 성장을 억제하였다. 31, 35, 40, 47, 55, 및 62일째에 종양 크기가 2-원 ANOVA 검정에 의해 p<0.0001로 통계적으로 유의하므로, MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR 대 MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR의 향상된 효능이 확인된다. 도 2, 파트 a를 참조한다.

[0199] 공여자 2: SK-MEL-37 종양을 대조군 CAR T 세포를 받은 마우스에서 점진적으로 성장시켰다. MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T 세포를 사용한 처리는 효능을 입증하였고 종양 성장을 대략 1주까지 지연시켰다. 그러나, MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T 세포는 SK-MEL-37 종양 성장을 강력하게 억제하여, 종양을 20일까지 5마리 마우스 중 5마리에서 검출할 수 없는(측지할 수 없는) 수준으로 가져왔다. 이들 종양은 62-69일까지 검출할 수 없는 상태로 남아있었고, 이 시간에 종양이 재발하였다. 2-원 ANOVA 검정에 의해 $p < 0.0001$ 로, 35일째에 종양 크기가 통계적으로 유의하고($p = 0.0037$) 40, 47, 55, 및 62일째에 종양 크기가 통계적으로 유의하므로, MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR 대 MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR의 향상된 항-종양 활성이 확인된다. 도 2, 파트 b를 참조한다.

[0200] 표 9: 데이터 요약:

CAR T 처리	6일째에 평균 종양 크기 (mm ³) ± SEM	6일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
공여자 1: 대조군 CAR T	80.6±4.2	5
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	109.4±14.6	5
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	115.3±7.0	5
공여자 2: 대조군 CAR T	92.6±12.4	5
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	115.4±16.7	5
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	112.8±5.5	5

CAR T 처리	11일째에 평균 종양 크기 (mm ³) ± SEM	11일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
공여자 1: 대조군 CAR T	104.0±9.4	5
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	133.5±21.1	5
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	120.8±22.0	5
공여자 2: 대조군 CAR T	87.7±10.6	5
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	97.3±12.9	5
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	136.9±23.3	5

CAR T 처리	13일째에 평균 종양 크기 (mm ³) ± SEM	13일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
공여자 1: 대조군 CAR T	142.2±9.0	5
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	133.7±20.1	5
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	106.4±17.0	5

[0201]

공여자 2: 대조군 CAR T	106.4±14.7	5
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	83.5±16.4	5
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	72.7±14.8	5

CAR T 처리	18일째에 평균 종양 크기 (mm ³) ± SEM	18일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
공여자 1: 대조군 CAR T	181.3±24.4	5
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	171.3±29.3	5
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	63.7±6.8	5
공여자 2: 대조군 CAR T	139.8±17.6	5
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	70.7±6.6	5
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	14.1±6.5	5

CAR T 처리	20일째에 평균 종양 크기 (mm ³) ± SEM	20일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
공여자 1: 대조군 CAR T	202.7±16.5	5
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	194.5±33.0	5
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	70.0±15.6	5
공여자 2: 대조군 CAR T	174.3±33.7	5
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	79.4±11.0	5
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	0.0±0.0	5

CAR T 처리	24일째에 평균 종양 크기 (mm ³) ± SEM	24일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
-------------	--	-----------------------------------

[0202]

공여자 1: 대조군 CAR T	312.5±35.3	5
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	272.3±66.8	5
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	52.9±12.2	5
공여자 2: 대조군 CAR T	237.3±37.7	5
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	78.2±11.2	5
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	0.0±0.0	5

CAR T 처리	27일째에 평균 종양 크기 (mm ³) ± SEM	27일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
공여자 1: 대조군 CAR T	396.5±44.7	5
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	328.0±60.3	5
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	49.9±16.1	5
공여자 2: 대조군 CAR T	371.0±54.6	5
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	100.0±15.9	5
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	0.0±0.0	5

CAR T 처리	31일째에 평균 종양 크기 (mm ³) ± SEM	31일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
공여자 1: 대조군 CAR T	635.0±73.7	5
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	610.4±116.4	5
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	50.5±11.8	5
공여자 2: 대조군 CAR T	512.6±54.2	5
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	158.0±17.2	5
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	0.0±0.0	5

[0203]

CAR T 처리	35일째에 평균 종양 크기 (mm ³) ± SEM	35일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
공여 자 1: 대조군 CAR T	796.8±132.7	5
공여 자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	803.1±166.7	5
공여 자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	52.6±19.8	5
공여 자 2: 대조군 CAR T	724.1±85.7	5
공여 자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	325.4±61.1	5
공여 자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	0.0±0.0	5

CAR T 처리	40일째에 평균 종양 크기 (mm ³) ± SEM	40일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
공여 자 1: 대조군 CAR T	986.3±136.1	5
공여 자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	1067.8±152.5	5
공여 자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	62.2±28.2	5
공여 자 2: 대조군 CAR T	778.5±69.8	5
공여 자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	446.5±71.1	5
공여 자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	0.0±0.0	5

CAR T 처리	47일째에 평균 종양 크기 (mm ³) ± SEM	47일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
공여 자 1: 대조군 CAR T	1414.9±311.2	5
공여 자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	1205.2±193.7	5
공여 자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	80.5±42.3	5
공여 자 2: 대조군 CAR T	804.6±85.8	5

[0204]

공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	496.7±57.6	5
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	0.0±0.0	5

CAR T 처리	55일째에 평균 종양 크기 (mm ³) ± SEM	55일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
공여자 1: 대조군 CAR T	동물 안락사시킴	0
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	동물 안락사시킴	0
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	175.9±76.5	5
공여자 2: 대조군 CAR T	동물 안락사시킴	0
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	823.1±85.8	5
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	0.0±0.0	5

CAR T 처리	62일째에 평균 종양 크기 (mm ³) ± SEM	62일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
공여자 1: 대조군 CAR T	동물 안락사시킴	0
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	동물 안락사시킴	0
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	298.0±110.8	5
공여자 2: 대조군 CAR T	동물 안락사시킴	0
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	1048.0±124.3	5
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	0.0±0.0	5

CAR T 처리	69일째에 평균 종양 크기 (mm ³) ± SEM	69일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
공여자 1: 대조군 CAR T	동물 안락사시킴	0

[0205]

공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	동물 안락사시킴	0
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	533.3±166.8	5
공여자 2: 대조군 CAR T	동물 안락사시킴	0
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	동물 안락사시킴	0
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	7.3±5.6	5

CAR T 처리	77일째에 평균 종양 크기 (mm ³) ± SEM	77일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
공여자 1: 대조군 CAR T	동물 안락사시킴	0
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	동물 안락사시킴	0
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	759.6±175.7	5
공여자 2: 대조군 CAR T	동물 안락사시킴	0
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	동물 안락사시킴	0
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	20.6±10.1	5

CAR T 처리	84일째에 평균 종양 크기 (mm ³) ± SEM	84일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
공여자 1: 대조군 CAR T	동물 안락사시킴	0
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	동물 안락사시킴	0
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	동물 안락사시킴	0
공여자 2: 대조군 CAR T	동물 안락사시킴	0
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	동물 안락사시킴	0
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	73.0±42.6	5

[0206]

CAR T 처리	118일째에 평균 종양 크기 (mm ³) ± SEM	118일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
공여자 1: 대조군 CAR T	동물 안락사시킴	0
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	동물 안락사시킴	0
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	동물 안락사시킴	0
공여자 2: 대조군 CAR T	동물 안락사시킴	0
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	동물 안락사시킴	0
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	928.2±291.1	5

[0207]

[0208]

실시예 2: A375 종양 및 항-HLA-A2/MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ scFv를 함유하는 키메라 항원 수용체.

[0209]

작제물 및 CAR T 세포

[0210]

V_L-V_H 방향의 항-HLA-A2/MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ scFv + 1) huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인(BB/z CAR), 또는 2) huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인(28/z CAR)을 함유하는 키메라 항원 수용체를 항-HLA-A2/MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ 항체, 31345의 V_L 및 V_H 서열을 사용하여 구축하였다. 비-결합 대조군으로서, BB/z CAR을 scFv + huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인을 사용하여 설계하였다. 이들 CAR을 EF1a 프로모터 및 IRES:eGFP 서열(CAR-형질도입된 세포를 추적하기 위함)이 있는 pLVX 렌티바이러스 벡터 내에 클로닝하였고, VSV-위형 렌티바이러스를 생산하였다. 작제물 개략도

에 대해 도 1, 파트 b를 참조하고, 결과에 대해 도 3을 참조한다.

- [0211] CD3+ T 세포를 2명의 정상 공여자('공여자 1' 및 '공여자 2')의 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)에서 단리하고, CD3/CD28 마이크로비드 + 100 U/ml 재조합 인간 IL-2로 자극하고, MOI=5에서 렌티바이러스로 형질도입하였다. 형질도입된 세포를 CD3/CD28 마이크로비드 + 100 U/ml 재조합 인간 IL-2로 19일 동안 확장시킨 후 생체내 실험 동안 사용할 때까지 동결건조하였다.
- [0212] 이종 종양의 이식 및 측정
- [0213] HLA-A2/MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄-표적화된 키메라 항원 수용체(CAR) T 세포의 생체내 효능을 결정하기 위해, 이종 종양 연구를 수행하였다. 0일째에, 면역결핍 NOD.Cg-Prkdc^{scid}.I12rg^{tm1Wjl}/SzJ(NSG) 마우스에 5×10^6 HLA-A2⁺MAGEA4⁺A375 인간 흑색종 종양 세포를 피하 주사하였다. 질량 분광법 기술을 사용하여 A375 흑색종 세포가 MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ 펩티드의 대략 424개 세포-표면 카피를 발현하는 것으로 결정되었다. 종양이 확립된 후 13일째에, 마우스(그룹당 n=5)에 비-결합 대조군 BB/z CAR(대조군 CAR T), 2명의 상이한 공여자로부터의 항-HLA-A2/MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR, 또는 항-HLA-A2/MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR(CAR로 형질도입된 세포에 대한 마커인, GFP를 발현하는 세포의 빈도에 의해 결정됨)을 발현하는 4×10^6 T 세포를 정맥내 주사하였다. 종양 부피를 측정하여 64일째까지 종양 성장을 평가하였다.
- [0214] 이종 종양 성장 및 억제 계산
- [0215] 외부 캘리퍼에 의해 종양 부피를 결정하기 위해, 최대 세로 직경(길이 mm) 및 최대 가로 직경(너비 mm)을 결정하였다. 캘리퍼 측정에 기반한 종양 부피는 다음 공식에 의해 계산하였다: 부피(mm³) = (길이 x 너비²)/2.
- [0216] 결과 요약 및 결론:
- [0217] 공여자 1: A375 종양을 대조군 CAR T 세포 또는 MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T 세포를 받은 마우스에서 점진적으로 성장시켰다. 대조적으로, MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ 28/z는 생체내에서 확립된 A375 종양의 성장을 억제하였으며, 5마리 마우스 중 1마리는 64일에 종양이 없었다. 27, 29, 33, 36, 40 및 44일째에 종양 크기가 2-원 ANOVA 검정에 의해 p<0.0001로 통계적으로 유의하므로, MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR 대 MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR의 향상된 효능이 확인된다. 도 3, 파트 a를 참조한다.
- [0218] 공여자 2: A375 종양을 대조군 CAR T 세포를 받은 마우스에서 점진적으로 성장시켰다. MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ BB/z 및 MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T 세포 둘 다를 사용한 치료는 A375 종양 성장을 억제하였지만, 동역학은 상이하였다. MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T 세포는 더 빠른 동역학으로 작용하여, 27일째까지 5마리의 마우스 중 5마리에서 종양을 근절시켰다. MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T 세포는 더 느린 동역학으로 작용하여, 44일까지 5마리 마우스 중 4마리에서 종양을 근절시켰다. 19 및 22일째에 종양 크기가 2-원 ANOVA 검정에 의해 각각 p=0.0071 및 p=0.0008로 통계적으로 유의하므로, MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR 대 MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR의 항-종양 활성의 향상된 동역학이 확인된다. 도 3, 파트 b를 참조한다.

[0219] 표 10: 데이터 요약

CAR T 처리	7일째에 평균 종양 크기 (mm ³) ± SEM	7일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
공여 자 1: 대조군 CAR T	76.5±9.6	5
공여 자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	73.8±4.0	5
공여 자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	89.9±4.4	5
공여 자 2: 대조군 CAR T	102.8 ±.6	5
공여 자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	87.1±9.7	5
공여 자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	83.7±4.0	5

CAR T 처리	12일째에 평균 종양 크기 (mm ³) ± SEM	12일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
공여 자 1: 대조군 CAR T	152.1±27.7	5
공여 자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	131.2±22.1	5
공여 자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	153.0±7.0	5
공여 자 2: 대조군 CAR T	177.1±26.4	5
공여 자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	154.9±7.3	5
공여 자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	117.2±9.3	5

CAR T 처리	15일째에 평균 종양 크기 (mm ³) ± SEM	15일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
공여 자 1: 대조군 CAR T	311.7±61.7	5
공여 자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	308.8±33.2	5

[0220]

공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	337.9±16.5	5
공여자 2: 대조군 CAR T	443.5±56.9	5
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	343.2±41.2	5
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	247.2±42.3	5

CAR T 처리	16일째에 평균 종양 크기 (mm ³) ± SEM	16일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
공여자 1: 대조군 CAR T	336.2±60.9	5
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	402.6±35.7	5
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	440.6±36.4	5
공여자 2: 대조군 CAR T	541.7±62.6	5
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	409.9±40.7	5
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	212.8±33.8	5

CAR T 처리	19일째에 평균 종양 크기 (mm ³) ± SEM	19일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
공여자 1: 대조군 CAR T	731.6±103.9	5
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	755.6±92.2	5
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	769.7±86.6	5
공여자 2: 대조군 CAR T	1136.3±122.1	5
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	603.9±36.8	5
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	98.4±15.6	5

CAR T 처리	22일째에 평균 종양	22일째에 아직
-------------	-------------	----------

[0221]

	크기 (mm ³) ± SEM	살아있는 마우스 수 (5마리 중)
공여 자 1: 대조군 CAR T	1021.3±138.5	5
공여 자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	1027.8±111.5	5
공여 자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	785.7±97.4	5
공여 자 2: 대조군 CAR T	1725.9±216.2	5
공여 자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	641.5±119.9	5
공여 자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	30.2±13.0	5

CAR T 처리	27일째에 평균 종양 크기 (mm ³) ± SEM	27일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
공여 자 1: 대조군 CAR T	1983.6±187.3	5
공여 자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	1759.7±247.6	5
공여 자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	347.9±54.2	5
공여 자 2: 대조군 CAR T	2806.0±222.7	5
공여 자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	258.2±50.5	5
공여 자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	0.0±0.0	5

CAR T 처리	29일째에 평균 종양 크기 (mm ³) ± SEM	29일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
공여 자 1: 대조군 CAR T	2503.7±169.4	5
공여 자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	1941.9±252.1	5
공여 자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	270.3±49.9	5
공여 자 2: 대조군 CAR T	3387.0±154.8	5

[0222]

공여 자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	203.6±123.4	5
공여 자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	0.0±0.0	5

CAR T 처리	33일째에 평균 종양 크기 (mm ³) ± SEM	33일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
공여 자 1: 대조군 CAR T	동물 안락사시킴	0
공여 자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	2201.9±321.9	5
공여 자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	202.7±70.7	5
공여 자 2: 대조군 CAR T	동물 안락사시킴	0
공여 자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	106.2±80.5	5
공여 자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	0.0±0.0	5

CAR T 처리	40일째에 평균 종양 크기 (mm ³) ± SEM	36일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
공여 자 1: 대조군 CAR T	동물 안락사시킴	0
공여 자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	2171.2±286.1	5
공여 자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	230.9±106.4	5
공여 자 2: 대조군 CAR T	동물 안락사시킴	0
공여 자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	97.1±83.8	5
공여 자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	0.0±0.0	5

CAR T 처리	40일째에 평균 종양 크기 (mm ³) ± SEM	40일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
-------------	--	-----------------------------------

[0223]

공여자 1: 대조군 CAR T	동물 안락사시킴	0
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	2431.9±359.6	
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	443.9±175.3	
공여자 2: 대조군 CAR T	동물 안락사시킴	0
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	205.7±193.7	
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	0.0±0.0	5

CAR T 처리	44일째에 평균 종양 크기 (mm ³) ± SEM	44일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
공여자 1: 대조군 CAR T	동물 안락사시킴	0
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	2892.7±432.7	5
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	416.7±195.0	5
공여자 2: 대조군 CAR T	동물 안락사시킴	0
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	166.0±166.0	5
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	0.0±0.0	5

CAR T 처리	48일째에 평균 종양 크기 (mm ³) ± SEM	48일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
공여자 1: 대조군 CAR T	동물 안락사시킴	0
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	3266.4±1026.4	2
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	749.7±364.4	5
공여자 2: 대조군 CAR T	동물 안락사시킴	0
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	292.0±292.0	5
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	0.0±0.0	5

[0224]

CAR T 처리	50일째에 평균 종양 크기 (mm ³) ± SEM	50일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
공여자 1: 대조군 CAR T	동물 안락사시킴	0
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	2835.7±0.0	1
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	955.8±367.2	5
공여자 2: 대조군 CAR T	동물 안락사시킴	0
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	349.0±349.0	5
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	0.0±0.0	5

CAR T 처리	57일째에 평균 종양 크기 (mm ³) ± SEM	57일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
공여자 1: 대조군 CAR T	동물 안락사시킴	0
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	동물 안락사시킴	0
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	1311.0±660.5	3
공여자 2: 대조군 CAR T	동물 안락사시킴	0
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	0.0±0.0	4
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	0.0±0.0	5

CAR T 처리	64일째에 평균 종양 크기 (mm ³) ± SEM	64일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
공여자 1: 대조군 CAR T	동물 안락사시킴	0
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	동물 안락사시킴	0
공여자 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	1973.0±990.8	3

공여자 2: 대조군 CAR T	동물 안락사시킴	0
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	0.0±0.0	4
공여자 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	0.0±0.0	5

[0225]

[0226]

[0227]

종합하면, 실시예 1 및 2의 결과는 2명의 공여자로부터의 MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T 세포가 MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T 세포와 비교하여 우수한 생체내 항-종양 활성 및 항-종양 동역학을 입증함을 입증한다. (도 2, 파트 a와 b, 및 도 3, 파트 a와 b).

[0228]

실시예 3: 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ scFv를 함유하는 키메라 항원 수용체.

[0229]

V_L-V_H 방향의 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ scFv + 1) huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인(BB/z CAR), 또는 2) huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인(28/z CAR)을 함유하는 키메라 항원 수용체를 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ 항체, 33229P의 V_L 및 V_H 서열을 사용하여 구축하였다. 비-결합 대조군으로서, 28/z CAR을 관련 없는 scFv + huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인을 사용하여 설계하였다. 이들 CAR을 EF1a 프로모터 및 P2A:eGFP 서열(CAR-형질도입된 세포를 추적하기 위함)이 있는 pLVX 렌티바이러스 벡터 내에 클로닝하였고, VSV-위형 렌티바이러스를 생산하였다. 작제물에 대해 도 4, 파트 b 및 결과에 대해 도4, 파트 a를 참조한다.

[0230] 표 11: CAR scFv ID:

AbPID	AbPID	특이성	설명
17363	17363N	비-결합 대조군	VL-VH 방향의 항-HLA-A2/HPV16E7 ₁₁₋₁₉ scFv 17363N과 huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인(대조군 CAR)
33229P	33229P	HLA-A2/MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉	VL-VH 방향의 항-HLA-A2/MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ scFv 33229P와 huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인(MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR)
33229P	33229P	HLA-A2/MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉	VL-VH 방향의 항-HLA-A2/MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ scFv 33229P와 huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인(MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR)

[0231]

[0232] 표 12: 렌티바이러스 prep ID:

렌티바이러스 Prep #	AbPID	설명
VVT - 렌티바이러스 - 500-001	17363N	VL-VH 방향의 항-HLA-A2/HPV16E7 ₁₁₋₁₉ scFv 17363N과 huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인(대조군 CAR)
VVT - 렌티바이러스 - 595-001	33229P	VL-VH 방향의 항-HLA-A2/MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ scFv 33229P와 huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인(MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR)
VVT - 렌티바이러스 - 596-001	33229P	VL-VH 방향의 항-HLA-A2/MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ scFv 33229P와 huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인(MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR)

[0233]

[0234] 실험적 절차

[0235] CAR 작제물 및 CAR T 세포의 생성

[0236] V_L-V_H 방향의 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ scFv + 1) huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인(BB/z CAR), 또는 2) huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인(28/z CAR)을 함유하는 키메라 항원 수용체를 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ 항체, 33229P의 V_L 및 V_H 서열을 사용하여 구축하였다. 비-결합 대조군으로서, 28/z CAR을 관련 없는 scFv + huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인을 사용하여 설계하였다. 이들 CAR을 EF1a 프로모터 및 P2A:eGFP 서열(CAR-형질도입된 세포를 추적하기 위

함)이 있는 pLVX 렌티바이러스 벡터 내에 클로닝하였고, VSV-위형 렌티바이러스를 생산하였다.

[0237] CD3+ T 세포를 정상 공여자의 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)에서 단리하고, CD3/CD28 마이크로비드 + 100 U/ml 재조합 인간 IL-2로 자극하고, MOI=5에서 렌티바이러스로 형질도입하였다. 형질도입된 세포를 CD3/CD28 마이크로비드 + 100 U/ml 재조합 인간 IL-2로 대략 14일 동안 확장시킨 후 생체내 실험 동안 사용할 때까지 동결 보존하였다.

[0238] 이종 종양의 이식 및 측정

[0239] 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉-표적화된 키메라 항원 수용체(CAR) T 세포의 생체내 효능을 결정하기 위해, 이종 종양 연구를 수행하였다. 0일째에, 면역결핍 NOD.Cg-Prkdc^{scid} I12rg^{tm1Wjl}/SzJ(NSG) 마우스에 5×10^6 HLA-A2⁺MAGEA4⁺ A375 인간 흑색종 종양 세포를 피하 주사하였다. 질량 분광법 기술을 사용하여 A375 흑색종 세포가 HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ 펩티드의 대략 553개 세포-표면 카피를 발현하는 것으로 결정되었다. 종양이 확립된 후 13일째에, 마우스(그룹당 n=4 또는 5)에 비-결합 대조군 BB/z CAR(대조군 CAR T), 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR, 또는 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR(CAR로 형질도입된 세포에 대한 마커인, GFP를 발현하는 세포의 빈도에 의해 결정됨)을 발현하는 4×10^6 T 세포를 정맥내 주사하였다. 종양 부피를 측정하여 28일째까지 종양 성장을 평가하였다.

[0240] 이종 종양 성장 및 억제 계산

[0241] 외부 캘리퍼에 의해 종양 부피를 결정하기 위해, 최대 세로 직경(길이 mm) 및 최대 가로 직경(너비 mm)을 결정하였다. 캘리퍼 측정에 기반한 종양 부피는 다음 공식에 의해 계산하였다: 부피(mm³) = (길이 x 너비²)/2.

[0242] 결과 요약 및 결론:

[0243] A375 종양을 미처리 마우스 및 대조군 CAR T 세포를 받은 마우스에서 점진적으로 성장시켰다. 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR T 세포를 받은 마우스는 19일째 (p<0.02), 23일째 (p<0.02), 및 26일째 (p<0.0001)(2-원 ANOVA에 의해 분석된 통계)에 대조군 CAR T-처리된 마우스와 비교하여 감소된 종양 성장과 함께, 일부 종양 제어를 입증하였다. 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR T 처리는 또한 19일째 (p=0.007), 23일째 (p<0.0001), 및 26일째 (p<0.0001)(2-원 ANOVA에 의해 분석된 통계)에 확립된 A375 종양 성장의 억제를 야기하였다. 23일째(p<0.0001) 및 26일째 (p<0.0001)에 종양 크기가 2-원 ANOVA에 의해 통계적으로 유의하므로, 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR 대 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR의 향상된 효능이 확인된다. 도 4, 파트 a 를 참조한다.

[0244] 종합하면, 결과는 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR T 세포가 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR T 세포와 비교하여 우수한 생체내 항-종양 활성 및 항-종양 동역학을 입증함을 입증한다.

[0245] 표 13: 데이터 요약

CAR T 처리	7일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)	7일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
미처리	59.7	9.7	4
대조군 CAR T	98.1	16.2	5
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR T	72.8	3.9	5
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR T	72.3	5.9	5

CAR T 처리	10일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)	10일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
미처리	154.0	16.1	4
대조군 CAR T	163.0	21.6	5
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR T	146.1	4.9	5
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR T	148.9	14.1	5

CAR T 처리	13일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)	13일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
미처리	302.9	47.2	4

[0246]

대조군 CAR T	369.4	47.3	5
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR T	209.9	30.3	5
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR T	304.4	25.7	5

CAR T 처리	17일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)	17일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
미처리	702.5	105.7	4
대조군 CAR T	652.7	71.3	5
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR T	416.1	51.4	5
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR T	487.1	32.0	5

CAR T 처리	19일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)	19일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
미처리	1191.9	174.2	4
대조군 CAR T	1055.6	68.2	5
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR T	590.9	111.2	5
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR T	535.4	60.6	5

CAR T 처리	23일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차	23일째에 아직 살아있는
----------	-----------------------------------	-----------------	---------------

[0247]

		(SEM)	마우스 수 (5마리 중)
미처리	1823.6	240.4	4
대조군 CAR T	1583.3	74.6	5
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR T	1103.7	234.8	5
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR T	356.2	67.3	5

CAR T 처리	26일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)	26일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
미처리	2605.5	196.9	4
대조군 CAR T	2246.8	132.9	5
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR T	1435.5	498.0	4
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR T	332.1	132.4	5

CAR T 처리	33일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)	33일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
미처리	안락사시킴	안락사시킴	0
대조군 CAR T	안락사시킴	안락사시킴	0
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR T	2618.3	652.4	4
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR T	712.1	302.9	5

[0248]

CAR T 처리	37일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)	37일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
미처리	안락사시킴	안락사시킴	0
대조군 CAR T	안락사시킴	안락사시킴	0
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR T	안락사시킴	안락사시킴	0
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR T	1021.8	387.1	5

[0249]

[0250]

[0251]

실시예 4: 항-HLA-A2/티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ scFv를 함유하는 키메라 항원 수용체.

V_L-V_H 방향의 항-HLA-A2/티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ scFv + 1) huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인(BB/z CAR), 또는 2) huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인(28/z CAR)을 함유하는 키메라 항원 수용체를 항-HLA-A2/티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ 항체, D11(특히 WO/2016/199141에서 식별됨)의 V_L 및 V_H 서열을 사용하여 구축하였다. 항-HLA-A2/티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ 항체는 HLA-A2/티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ 뿐만 아니라 HLA-A2/티로시나제_{369-377(N371D)} 둘 다에 결합하며, 여기서 N371은 D371로 탈아미드화된다. 비-결합 대조군으로서, BB/z CAR을 관련 없는 scFv + huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인을

사용하여 설계하였다. 이들 CAR을 EF1a 프로모터 및 P2A:eGFP 서열(CAR-형질도입된 세포를 추적하기 위함)이 있는 pLVX 렌티바이러스 벡터 내에 클로닝하였고, VSV-위형 렌티바이러스를 생산하였다. 작제물 개략도에 대해 도 5, 파트 a를 참조한다.

[0252] 종합하면, 결과는 2명의 공여자로부터의 항-HLA-A2/티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ 28/z CAR T 세포가 항-HLA-A2/티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ BB/z CAR T 세포와 비교하여 우수한 생체내 항-종양 활성 및 항-종양 동역학을 입증함을 입증한다.

[0253] 표 14: CAR scFv ID:

AbPID	AbPID	특이성	설명
17363	17363	비-결합 대조군	VL-VH 방향의 항-HLA-A2/HPV16E7 ₁₁₋₁₉ scFv 17363과 huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인(대조군 CAR)
D11	D11	HLA-A2/티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇	VL-VH 방향의 항-HLA-A2/티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇ scFv D11과 huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인(티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇ BB/z CAR)
D11	D11	HLA-A2/티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇	VL-VH 방향의 항-HLA-A2/티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇ scFv D11과 huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인(티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇ 28/z CAR)

[0254]

[0255] 표 15: 렌티바이러스 prep ID:

렌티바이러스 Prep #	AbPID	날짜	설명
	17363		VL-VH 방향의 항-HLA-A2/HPV16E7 ₁₁₋₁₉ scFv 17363과 huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인(대조군 CAR)
	D11		VL-VH 방향의 항-HLA-A2/티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇ scFv D11과 huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인(티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇ BB/z CAR)
	D11		VL-VH 방향의 항-HLA-A2/티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇ scFv D11과 huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인(티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇ 28/z CAR)

[0256]

[0257] 실험적 적차

[0258] CAR 작제물 및 CAR T 세포의 생성

[0259] V_L-V_H 방향의 항-HLA-A2/티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ scFv + 1) huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인(BB/z CAR), 또는 2) huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인(28/z CA

R)을 함유하는 키메라 항원 수용체를 항-HLA-A2/티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ 항체, D11(특허 WO/2016/199141로부터 식별됨)의 V_L 및 V_H 서열을 사용하여 구축하였다. 비-결합 대조군으로서, BB/z CAR을 관련 없는 scFv + huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인을 사용하여 설계하였다. 이들 CAR을 EF1a 프로모터 및 P2A:eGFP 서열(CAR-형질도입된 세포를 추적하기 위함)이 있는 pLVX 렌티바이러스 벡터 내에 클로닝하였고, VSV-위형 렌티바이러스를 생산하였다. 작제물 개략도에 대해 도 5, 파트 a를 참조한다.

[0260] CD3+ T 세포를 2명의 정상 공여자('공여자 1' 및 '공여자 2')의 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)에서 분리하고, CD3/CD28 마이크로비드 + 100 U/ml 재조합 인간 IL-2로 자극하고, MOI=5에서 렌티바이러스로 형질도입하였다. 형질도입된 세포를 CD3/CD28 마이크로비드 + 100 U/ml 재조합 인간 IL-2로 19일 동안 확장시킨 후 생체내 실험 동안 사용할 때까지 동결보존하였다.

[0261] 이종 종양의 이식 및 측정

[0262] 항-HLA-A2/티로시나제₃₆₉₋₃₇₇-표적화된 키메라 항원 수용체(CAR) T 세포의 생체내 효능을 결정하기 위해, 이종 종양 연구를 수행하였다. 0일째에, 면역결핍 NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wj1}/SzJ(NSG) 마우스에 4x10⁶ HLA-A2⁺티로시나제⁺ WM266.4 인간 흑색종 종양 세포를 피하 주사하였다. 질량 분광법 기술을 사용하여, WM266.4 흑색종 세포가 HLA-A2/티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ 펩티드의 대략 4,500개 세포-표면 카피를 발현하는 것으로 결정되었다. 종양이 확립된 후 7일째에, 마우스(그룹당 n=5)에 비-결합 대조군 BB/z CAR(대조군 CAR T), 2명의 상이한 공여자로부터의 항-HLA-A2/티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ BB/z CAR, 또는 항-HLA-A2/티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ 28/z CAR(CAR로 형질도입된 세포에 대한 마커인, GFP를 발현하는 세포의 빈도에 의해 결정됨)을 발현하는 2x10⁶ T 세포를 정맥내 주사하였다. 종양 부피를 측정하여 90일까지 종양 성장을 평가하였다.

[0263] 상이한 종양 세포주로 두번째 이종 종양 연구를 수행하였다. 0일째에, 면역결핍 NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wj1}/SzJ(NSG) 마우스에 5x10⁶ HLA-A2⁺티로시나제⁺ SK-MEL-23 인간 흑색종 종양 세포를 피하 주사하였다. 질량 분광법 기술을 사용하여, SK-MEL-23 흑색종 세포가 HLA-A2/티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ 펩티드의 대략 2,000-3,000개 세포-표면 카피를 발현하는 것으로 결정되었다. 종양이 확립된 후 7일째에, 마우스(그룹당 n=5)에 비-결합 대조군 BB/z CAR(대조군 CAR T), 2명의 상이한 공여자로부터의 항-HLA-A2/티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ BB/z CAR, 또는 항-HLA-A2/티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ 28/z CAR(CAR로 형질도입된 세포에 대한 마커인, GFP를 발현하는 세포의 빈도에 의해 결정됨)을 발현하는 4x10⁶ T 세포를 정맥내 주사하였다. 종양 부피를 측정하여 90일까지 종양 성장을 평가하였다.

[0264] 이종 종양 성장 및 억제 계산

[0265] 외부 캘리퍼에 의해 종양 부피를 결정하기 위해, 최대 세로 직경(길이 mm) 및 최대 가로 직경(너비 mm)을 결정하였다. 캘리퍼 측정에 기반한 종양 부피는 다음 공식에 의해 계산하였다: 부피(mm³) = (길이 x 너비²)/2.

[0266] 결과 요약 및 결론:

[0267] WM266.4 종양 모델:

[0268] 공여자 1: WM266.4 종양을 처리되지 않은 마우스 및 대조군 CAR T 세포를 받은 마우스에서 점진적으로 성장시켰다. 항-HLA-A2/티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ BB/z CAR T 세포를 받은 마우스는 31일째 (p=0.02), 35일째 (p=0.001), 42일째 (p=0.0004), 및 49일째 (p<0.0001)(2-원 ANOVA에 의해 분석된 통계)에 대조군과 비교하여 감소된 종양 성장과 함께, 중간 정도 효능을 입증하였다. 대조적으로, 항-HLA-A2/티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ 28/z CAR T 처리는 확립된 WM266.4 종양의 퇴행을 야기하였으며, 5마리의 마우스 중 4마리는 90일째까지 종양이 없는 상태로 남아 있었다. 35, 42, 및 49일째에 종양 크기가 2-원 ANOVA에 의해 통계적으로 유의하므로(각각 p=0.01, p<0.0001, 및 p<0.000), 항-HLA-A2/티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ 28/z CAR 대 항-HLA-A2/티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ BB/z CAR의 향상된 효능이 확인된다. 도 5, 파트 b를 참조한다.

[0269] 공여자 2: WM266.4 종양을 처리되지 않은 마우스 및 대조군 CAR T 세포를 받은 마우스에서 점진적으로 성장시켰다. 항-HLA-A2/티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ BB/z CAR T 세포를 받은 마우스는 28일째 (p=0.03), 31일째 (p=0.004), 35일째

($p=0.0001$), 42일째 ($p=0.0001$), 및 49일째 ($p<0.0001$)(2-원 ANOVA에 의해 분석된 통계)에 대조군과 비교하여 감소된 종양 성장과 함께, 중간 정도 효능을 입증하였다. 대조적으로, 항-HLA-A2/티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ 28/z CAR T 처리는 확립된 WM266.4 종양의 퇴행을 야기하였으며, 5마리의 마우스 중 5마리는 90일째까지 종양이 없는 상태로 남아있었다. 24, 28, 31, 35, 42, 및 49일째에 종양 크기가 2-원 ANOVA에 의해 통계적으로 유의하므로(각각 $p=0.03$, $p=0.008$, $p=0.0004$, $p<0.0001$, $p<0.0001$, 및 $p<0.0001$), 항-HLA-A2/티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ 28/z CAR 대 항-HLA-A2/티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ BB/z CAR의 향상된 효능이 확인된다. 도 5, 파트 b를 참조한다.

[0270] SK-MEL-23 종양 모델:

[0271] 공여자 1: SK-MEL-23 종양을 처리되지 않은 마우스, 및 대조군 CAR T 세포를 받은 마우스에서 점진적으로 성장시켰다. 항-HLA-A2/티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ BB/z CAR T 세포를 받은 마우스를 또한 대조군과 유사한 방식으로 점진적으로 성장시켰다. 대조적으로, 항-HLA-A2/티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ 28/z CAR T 처리는 대조군 CAR T 세포를 받은 동물과 비교하여, 31일($p=0.02$), 35일($p=0.004$), 42일($p=0.0003$), 뿐만 아니라 49, 55, 63, 72, 78, 및 90일(이 날짜에 대해 $p<0.0001$)(2-원 ANOVA에 의해 분석된 통계)째에 확립된 SK-MEL-23 종양 억제에 유의한 억제를 야기하였다. 35, 42, 49, 55, 63, 72, 78, 및 90일째에 종양 크기가 2-원 ANOVA 검정에 의해 통계적으로 유의하므로(35 및 42일째에 $p=0.04$ 및 $p=0.004$; 모든 다른 날짜에 대해 $p<0.0001$), 항-HLA-A2/티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ 28/z CAR 대 항-HLA-A2/티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ BB/z CAR의 향상된 효능이 확인된다. 도 5, 파트 c를 참조한다.

[0272] 공여자 2: SK-MEL-23 종양을 처리되지 않은 마우스, 및 대조군 CAR T 세포를 받은 마우스에서 점진적으로 성장시켰다. 항-HLA-A2/티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ BB/z CAR T 세포를 받은 마우스를 또한 대조군과 유사한 방식으로 점진적으로 성장시켰다. 대조적으로, 항-HLA-A2/티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ 28/z CAR T 처리는 대조군 CAR T 세포를 받은 동물과 비교하여, 21일($p=0.02$), 24일($p=0.004$), 및 28일($p=0.0004$), 뿐만 아니라 31, 35, 42, 49, 55, 63, 72, 78, 및 90일(이들 날짜에 대해 $p<0.0001$)(2-원 ANOVA에 의해 분석된 통계)째에 확립된 SK-MEL-23 종양의 크기 감소 및 종양 성장 억제를 야기하였다. 21, 24, 28, 31, 35, 42, 49, 55, 63, 72, 78, 및 90일째에 종양 크기가 2-원 ANOVA 검정에 의해 통계적으로 유의하므로(21 및 24일째에 $p=0.01$ 및 $p=0.005$; 모든 다른 날짜에 대해 $p<0.0001$), 항-HLA-A2/티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ 28/z CAR 대 항-HLA-A2/티로시나제₃₆₉₋₃₇₇ BB/z CAR의 향상된 효능이 확인된다.

[0273] 표 16: 데이터 요약:

CAR T 처리	6일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)	6일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
WM266.4: 처리되지 않음	75.8	10.4	5
WM266.4: 공여자 1: 대조군 CAR T	72.0	4.5	5
WM266.4: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ BB/z CAR T	75.3	6.7	5
WM266.4: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	66.0	2.9	5
WM266.4: 공여자 2: 대조군 CAR T	79.7	8.9	5
WM266.4: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ BB/z CAR T	73.6	6.7	5
WM266.4: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	71.8	6.5	5
SK-MEL-23: 처리되지 않음	50.8	4.9	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 대조군 CAR T	46.9	3.0	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ BB/z CAR T	46.3	1.2	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	48.9	6.7	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 대조군 CAR T	48.7	5.4	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ BB/z CAR T	54.0	4.8	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷	49.4	5.7	5

[0274]

28/z CAR T			
------------	--	--	--

CAR T 처리	10일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)	0일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
WM266.4: 처리되지 않음	99.6	6.7	5
WM266.4: 공여자 1: 대조군 CAR T	111.7	23.2	5
WM266.4: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ BB/z CAR T	79.6	8.3	5
WM266.4: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	78.6	7.0	5
WM266.4: 공여자 2: 대조군 CAR T	96.1	14.8	5
WM266.4: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ BB/z CAR T	88.7	4.5	5
WM266.4: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	83.3	11.1	5
SK-MEL-23: 처리되지 않음	58.5	4.0	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 대조군 CAR T	55.8	5.2	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ BB/z CAR T	51.5	2.5	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	51.0	8.4	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 대조군 CAR T	54.0	8.2	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ BB/z CAR T	58.3	2.4	5

[0275]

SK-MEL-23: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	53.7	7.1	5
--	------	-----	---

CAR T 처리	3일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)	3일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
WM266.4: 처리되지 않음	132.0	7.6	5
WM266.4: 공여자 1: 대조군 CAR T	149.3	19.4	5
WM266.4: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ BB/z CAR T	123.5	10.5	5
WM266.4: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	132.3	19.4	5
WM266.4: 공여자 2: 대조군 CAR T	143.9	22.8	5
WM266.4: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ BB/z CAR T	145.8	7.2	5
WM266.4: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	86.7	6.5	5
SK-MEL-23: 처리되지 않음	90.3	12.9	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 대조군 CAR T	76.5	4.6	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ BB/z CAR T	87.0	5.0	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	69.1	7.3	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 대조군 CAR T	73.9	7.1	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷	88.3	3.8	5

[0276]

BB/z CAR T			
SK-MEL-23: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷			5
28/z CAR T	47.5	6.5	

CAR T 처리	16일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)	16일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
WM266.4: 처리되지 않음	180.1	11.9	5
WM266.4: 공여자 1: 대조군 CAR T	172.5	15.1	5
WM266.4: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷			5
BB/z CAR T	168.7	20.9	
WM266.4: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	114.2	22.5	5
WM266.4: 공여자 2: 대조군 CAR T	167.0	18.1	5
WM266.4: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷			5
BB/z CAR T	175.5	20.5	
WM266.4: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	32.2	9.3	5
SK-MEL-23: 처리되지 않음	120.2	18.3	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 대조군 CAR T	107.1	12.2	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷			5
BB/z CAR T	98.0	9.8	
SK-MEL-23: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷			5
28/z CAR T	65.9	7.7	
SK-MEL-23: 공여자 2: 대조군 CAR T	89.9	13.2	5

[0277]

SK-MEL-23: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ BB/z CAR T	100.5	6.4	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	29.9	3.8	5

CAR T 처리	21일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)	21일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
WM266.4: 처리되지 않음	320.9	11.8	5
WM266.4: 공여자 1: 대조군 CAR T	312.7	34.8	5
WM266.4: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ BB/z CAR T	197.4	25.5	5
WM266.4: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	39.2	5.8	5
WM266.4: 공여자 2: 대조군 CAR T	303.6	27.9	5
WM266.4: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ BB/z CAR T	184.2	22.9	5
WM266.4: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	0.0	0.0	5
SK-MEL-23: 처리되지 않음	146.9	14.5	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 대조군 CAR T	148.9	18.6	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ BB/z CAR T	105.7	13.6	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	49.9	5.1	5

[0278]

SK-MEL-23: 공여자 2: 대조군 CAR T	125.5	14.3	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇ BB/z CAR T	135.4	9.5	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇ 28/z CAR T	11.0	6.8	5

CAR T 처리	24일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)	24일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
WM266.4: 처리되지 않음	457.8	53.3	5
WM266.4: 공여자 1: 대조군 CAR T	566.0	103.8	5
WM266.4: 공여자 1: 티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇ BB/z CAR T	234.8	35.4	5
WM266.4: 공여자 1: 티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇ 28/z CAR T	37.4	9.2	5
WM266.4: 공여자 2: 대조군 CAR T	455.4	57.0	5
WM266.4: 공여자 2: 티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇ BB/z CAR T	235.9	38.4	5
WM266.4: 공여자 2: 티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇ 28/z CAR T	0.0	0.0	5
SK-MEL-23: 처리되지 않음	180.4	14.5	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 대조군 CAR T	195.1	29.7	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇ BB/z CAR T	132.6	15.0	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇	57.3	6.7	5

[0279]

28/z CAR T			
SK-MEL-23: 공여자 2: 대조군 CAR T	144.5	17.1	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇			5
BB/z CAR T	165.4	9.9	
SK-MEL-23: 공여자 2: 티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇			5
28/z CAR T	7.9	7.9	

CAR T 처리	28일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)	28일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
WM266.4: 처리되지 않음	594.7	71.0	5
WM266.4: 공여자 1: 대조군 CAR T	705.0	168.3	5
WM266.4: 공여자 1: 티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇			5
BB/z CAR T	301.7	37.5	
WM266.4: 공여자 1: 티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇ 28/z CAR T	21.2	9.3	5
WM266.4: 공여자 2: 대조군 CAR T	517.3	30.7	5
WM266.4: 공여자 2: 티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇			5
BB/z CAR T	276.9	32.2	
WM266.4: 공여자 2: 티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇ 28/z CAR T	0.0	0.0	5
SK-MEL-23: 처리되지 않음	207.9	16.1	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 대조군 CAR T	217.0	47.0	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇			5
BB/z CAR T	153.7	22.6	

[0280]

SK-MEL-23: 공여자 1: 티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇ 28/z CAR T	68.1	16.1	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 대조군 CAR T	160.5	18.6	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇ BB/z CAR T	197.8	16.5	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇ 28/z CAR T	0.0	0.0	5

CAR T 처리	31일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)	31일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
WM266.4: 처리되지 않음	893.7	124.8	5
WM266.4: 공여자 1: 대조군 CAR T	850.9	162.0	5
WM266.4: 공여자 1: 티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇ BB/z CAR T	369.1	40.1	5
WM266.4: 공여자 1: 티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇ 28/z CAR T	12.9	7.9	5
WM266.4: 공여자 2: 대조군 CAR T	646.0	42.2	5
WM266.4: 공여자 2: 티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇ BB/z CAR T	352.2	60.6	5
WM266.4: 공여자 2: 티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇ 28/z CAR T	0.0	0.0	5
SK-MEL-23: 처리되지 않음	232.8	13.0	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 대조군 CAR T	271.1	24.9	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇	196.1	16.0	5

[0281]

BB/z CAR T			
SK-MEL-23: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷			5
28/z CAR T	79.9	21.7	
SK-MEL-23: 공여자 2: 대조군 CAR T	192.5	17.8	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷			5
BB/z CAR T	256.1	19.6	
SK-MEL-23: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷			5
28/z CAR T	0.0	0.0	

CAR T 처리	35일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)	35일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
WM266.4: 처리되지 않음	1145.0	143.1	5
WM266.4: 공여자 1: 대조군 CAR T	1160.0	216.4	5
WM266.4: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷			5
BB/z CAR T	533.6	127.4	
WM266.4: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	13.7	9.0	5
WM266.4: 공여자 2: 대조군 CAR T	813.2	63.1	5
WM266.4: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷			5
BB/z CAR T	436.8	55.2	
WM266.4: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	0.0	0.0	5
SK-MEL-23: 처리되지 않음	258.3	25.0	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 대조군 CAR T	320.4	42.4	5

[0282]

SK-MEL-23: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ BB/z CAR T	265.3	19.8	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	88.1	21.9	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 대조군 CAR T	205.7	16.0	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ BB/z CAR T	289.9	15.0	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	0.0	0.0	5

CAR T 처리	42일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)	42일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
WM266.4: 처리되지 않음	1405.3	167.6	5
WM266.4: 공여자 1: 대조군 CAR T	1460.2	348.8	5
WM266.4: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ BB/z CAR T	787.1	235.7	5
WM266.4: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	9.8	6.7	5
WM266.4: 공여자 2: 대조군 CAR T	1058.5	90.7	5
WM266.4: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ BB/z CAR T	679.0	68.9	5
WM266.4: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	0.0	0.0	5
SK-MEL-23: 처리되지 않음	323.8	46.1	5

[0283]

SK-MEL-23: 공여자 1: 대조군 CAR T	367.8	47.4	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ BB/z CAR T	321.2	12.2	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	89.8	21.3	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 대조군 CAR T	231.4	22.7	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ BB/z CAR T	353.3	20.3	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	13.3	8.6	5

CAR T 처리	49일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)	49일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
WM266.4: 처리되지 않음	1795.4	159.4	5
WM266.4: 공여자 1: 대조군 CAR T	2031.6	455.2	5
WM266.4: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ BB/z CAR T	1134.8	200.1	5
WM266.4: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	0.0	0.0	5
WM266.4: 공여자 2: 대조군 CAR T	1639.4	160.8	5
WM266.4: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ BB/z CAR T	1022.2	139.6	5
WM266.4: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	0.0	0.0	5

[0284]

SK-MEL-23: 처리되지 않음	378.4	36.3	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 대조군 CAR T	443.9	69.3	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ BB/z CAR T	410.7	34.4	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	114.3	27.5	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 대조군 CAR T	288.8	18.6	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ BB/z CAR T	467.6	47.4	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	28.2	7.3	5

CAR T 처리	55일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)	55일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
WM266.4: 처리되지 않음	안락사시킴	안락사시킴	0
WM266.4: 공여자 1: 대조군 CAR T	안락사시킴	안락사시킴	0
WM266.4: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ BB/z CAR T	안락사시킴	안락사시킴	0
WM266.4: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	0.0	0.0	5
WM266.4: 공여자 2: 대조군 CAR T	안락사시킴	안락사시킴	0
WM266.4: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ BB/z CAR T	1448.1	261.0	5
WM266.4: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z	0.0	0.0	5

[0285]

CAR T			
SK-MEL-23: 처리되지 않음	452.8	37.4	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 대조군 CAR T	467.6	56.5	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ BB/z CAR T	500.0	21.1	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	141.5	53.8	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 대조군 CAR T	341.3	28.1	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ BB/z CAR T	596.7	40.0	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	53.2	17.0	5

CAR T 처리	63일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)	63일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
WM266.4: 처리되지 않음	안락사시킴	안락사시킴	0
WM266.4: 공여자 1: 대조군 CAR T	안락사시킴	안락사시킴	0
WM266.4: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ BB/z CAR T	안락사시킴	안락사시킴	0
WM266.4: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	0	0	5
WM266.4: 공여자 2: 대조군 CAR T	안락사시킴	안락사시킴	0
WM266.4: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ BB/z CAR T	안락사시킴	안락사시킴	0

[0286]

WM266.4: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	0	0	5
SK-MEL-23: 처리되지 않음	516.4	34.1	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 대조군 CAR T	537.1	63.5	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ BB/z CAR T	602.4	30.9	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	214.2	81.8	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 대조군 CAR T	487.6	41.4	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ BB/z CAR T	767.7	45.5	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	111.6	38.2	5

CAR T 처리	72일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)	72일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
WM266.4: 처리되지 않음	안락사시킴	안락사시킴	0
WM266.4: 공여자 1: 대조군 CAR T	안락사시킴	안락사시킴	0
WM266.4: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ BB/z CAR T	안락사시킴	안락사시킴	0
WM266.4: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	0	0	5
WM266.4: 공여자 2: 대조군 CAR T	안락사시킴	안락사시킴	0
WM266.4: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷	안락사시킴	안락사시킴	0

[0287]

BB/z CAR T			
WM266.4: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	0	0	5
SK-MEL-23: 처리되지 않음	521.4	20.0	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 대조군 CAR T	716.6	94.7	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ BB/z CAR T	747.2	30.5	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	281.7	106.0	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 대조군 CAR T	546.2	38.4	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ BB/z CAR T	856.0	45.5	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	136.9	49.1	5

CAR T 처리	78일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)	78일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
WM266.4: 처리되지 않음	안락사시킴	안락사시킴	0
WM266.4: 공여자 1: 대조군 CAR T	안락사시킴	안락사시킴	0
WM266.4: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ BB/z CAR T	안락사시킴	안락사시킴	0
WM266.4: 공여자 1: 티로시나제 ³⁶⁹⁻³⁷⁷ 28/z CAR T	0	0	5
WM266.4: 공여자 2: 대조군 CAR T	안락사시킴	안락사시킴	0

[0288]

WM266.4: 공여자 2: 티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇ BB/z CAR T	안락사시킴	안락사시킴	0
WM266.4: 공여자 2: 티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇ 28/z CAR T	0	0	5
SK-MEL-23: 처리되지 않음	671.6	37.6	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 대조군 CAR T	806.8	87.2	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇ BB/z CAR T	855.2	50.2	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇ 28/z CAR T	374.6	119.6	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 대조군 CAR T	637.2	34.8	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇ BB/z CAR T	988.5	47.0	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇ 28/z CAR T	152.0	42.6	5

CAR T 처리	90일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)	90일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
WM266.4: 처리되지 않음	안락사시킴	안락사시킴	0
WM266.4: 공여자 1: 대조군 CAR T	안락사시킴	안락사시킴	0
WM266.4: 공여자 1: 티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇ BB/z CAR T	안락사시킴	안락사시킴	0
WM266.4: 공여자 1: 티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇ 28/z CAR T	0	0	5

[0289]

WM266.4: 공여자 2: 대조군 CAR T	안락사시킴	안락사시킴	0
WM266.4: 공여자 2: 티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇ BB/z CAR T	안락사시킴	안락사시킴	0
WM266.4: 공여자 2: 티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇ 28/z CAR T	0	0	5
SK-MEL-23: 처리되지 않음	826.9	44.7	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 대조군 CAR T	977.9	114.0	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇ BB/z CAR T	1193.5	97.3	5
SK-MEL-23: 공여자 1: 티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇ 28/z CAR T	600.9	191.1	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 대조군 CAR T	917.2	80.1	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇ BB/z CAR T	1208.2	71.4	5
SK-MEL-23: 공여자 2: 티로시나제 ₃₆₉₋₃₇₇ 28/z CAR T	258.9	62.6	5

[0290]

[0291] 실시예 5: 항-HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ scFv를 함유하는 키메라 항원 수용체.

[0292] V_H-V_L 방향의 항-HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ scFv + 1) huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인(BB/z CAR), 또는 2) huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인(28/z CAR)을 함유하는 키메라 항원 수용체를 항-HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ 항체, 28105P의 V_L 및 V_H 서열을 사용하여 구축하였다. 비-결합 대조군으로서, BB/z CAR을 관련 없는 scFv + huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인을 사용하여 설계하였다. 이들 CAR을 EF1a 프로모터 및 P2A:eGFP 서열(CAR-형질도입된 세포를 추적하기 위함)이 있는 pLVX 렌티바이러스 벡터 내에 클로닝하였고, VSV-위형 렌티바이러스를 생산하였다. 작제물 설계(파트 a) 및 결과(파트 b)에 대해 도 6을 참조한다.

[0293] 종합하면, 결과는 항-HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ 28/z CAR T 세포가 항-HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ BB/z CAR T 세포와 비교하여 우수한 생체내 항-종양 활성 및 항-종양 동역학을 입증함을 입증한다.

[0294] 표 17: CAR scFv ID:

AbPID	AbPID	특이성	설명
17363	17363	비-결합 대조군	VL-VH 방향의 항-HLA-A2/HPV16E7 ₁₁₋₁₉ scFv 17363과 huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인(대조군 CAR)
28105P	28105P	HLA-A2/NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅	VH-VL 방향의 항-HLA-A2/NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅ scFv 28105P와 huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인(NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅ BB/z CAR)
28105P	28105P	HLA-A2/NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅	VH-VL 방향의 항-HLA-A2/NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅ scFv 28105P와 huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인(NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅ 28/z CAR)

[0295]

[0296] 표 18: 렌티바이러스 prep ID:

렌티바이러스 Prep #	AbPID	날짜	설명
VV17 Lv-DD00024/30	17363		VL-VH 방향의 항-HLA-A2/HPV16E7 ₁₁₋₁₉ scFv 17363과 huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인(대조군 CAR)
VV84 LvDD0037	28105P		VH-VL 방향의 항-HLA-A2/NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅ scFv 28105P와 huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인(NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅ BB/z CAR)
VV85 Lv-DD0038	28105P		VH-VL 방향의 항-HLA-A2/NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅ scFv 28105P와 huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인(NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅ 28/z CAR)

[0297]

[0298] 실험적 절차:

[0299] CAR 작제물 및 CAR T 세포의 생성

[0300] V_H-V_L 방향의 항-HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ scFv + 1) huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인(BB/z CAR), 또는 2) huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인(28/z CAR)을 함유하는 키메라 항원 수용체를 항-HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ 항체, 28105P의 V_L 및 V_H 서열을 사용하여 구축하였다. 비-결합 대조군으로서, BB/z CAR을 관련 없는 scFv + huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인을 사용하여 설계하였다. 이들 CAR을 EF1a 프로모터 및 P2A:eGFP 서열(CAR-형질도입된 세포를 추적하기 위함)이 있는 pLVX 렌티바이러스 벡터 내에 클로닝하였고, VSV-위형 렌티바이러스를 생산하였다.

[0301] CD3+ T 세포를 정상 공여자의 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)에서 단리하고, CD3/CD28 마이크로비드 + 100

U/ml 재조합 인간 IL-2로 자극하고, MOI=5에서 렌티바이러스로 형질도입하였다. 형질도입된 세포를 CD3/CD28 마이크로비드 + 100 U/ml 재조합 인간 IL-2로 19일 동안 확장시킨 후 생체내 실험 동안 사용할 때까지 동결건조하였다.

[0302] 이종 종양의 이식 및 측정

[0303] 항-HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅-표적화된 키메라 항원 수용체(CAR) T 세포의 생체내 효능을 결정하기 위해, 이종 종양 연구를 수행하였다. 0일째에, 면역결핍 NOD.Cg-Prkdc^{scid}I12rg^{tm1Wjl}/SzJ(NSG) 마우스에 5x10⁶ HLA-A2⁺NY-ESO-1⁺A375 인간 흑색종 종양 세포를 피하 주사하였다. 종양이 확립된 후 3일째에, 마우스(그룹당 n=5)에 비-결합 대조군 BB/z CAR(대조군 CAR T), 2명의 상이한 공여자로부터의 항-HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ BB/z CAR, 또는 항-HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ 28/z CAR(CAR로 형질도입된 세포에 대한 마커인, GFP를 발현하는 세포의 빈도에 의해 결정됨)을 발현하는 20x10⁶ T 세포를 정맥내 주사하였다. 종양 부피를 측정하여 38일까지 종양 성장을 평가하였다.

[0304] 이종 종양 성장 및 억제 계산

[0305] 외부 캘리퍼에 의해 종양 부피를 결정하기 위해, 최대 세로 직경(길이 mm) 및 최대 가로 직경(너비 mm)을 결정하였다. 캘리퍼 측정에 기반한 종양 부피는 다음 공식에 의해 계산하였다: 부피(mm³) = (길이 x 너비²)/2.

[0306] 결과 요약 및 결론:

[0307] A375 종양을 대조군 CAR T 세포를 받은 마우스에서 점진적으로 성장시켰다. 항-HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ BB/z CAR T 세포를 받은 마우스는 21일(p<0.04), 28일(p<0.0001), 및 38일(p<0.0001)(2-원 ANOVA에 의해 분석된 통계)째에 대조군 CAR T-처리된 마우스와 비교하여 감소된 종양 성장과 함께, 일부 종양 제어를 입증하였다. 항-HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ 28/z CAR T 처리는 또한 16일(p=0.03), 19일(p=0.0002), 21일(p<0.0001), 28일(p<0.0001), 및 38일(p<0.0001)(2-원 ANOVA에 의해 분석된 통계)째에 확립된 A375 종양 성장의 억제를 야기하였다. 21일(p=0.002), 28일(p<0.0001), 및 38일(p<0.0001)째에 종양 크기가 2-원 ANOVA에 의해 통계적으로 유의하므로(각 날짜에 대해 p<0.0001), 항-HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ 28/z CAR 대 항-HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ BB/z CAR의 향상된 효능이 확인된다. 도 6, 파트 b를 참조한다.

[0308] 표 19: 데이터 요약:

CAR T 처리	3일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)	3일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
대조군 CAR T	57.2	7.1	5
NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅ BB/z CAR T	69.1	11.4	5
NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅ 28/z CAR T	79.4	4.0	5

CAR T 처리	5일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)	5일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
대조군 CAR T	78.8	7.0	5
NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅ BB/z CAR T	65.9	10.9	5
NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅ 28/z CAR T	80.7	8.0	5

CAR T 처리	7일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)	7일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
대조군 CAR T	118.4	12.2	5
NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅ BB/z CAR T	69.8	8.4	5
NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅ 28/z CAR T	77.6	7.1	5

CAR T 처리	10일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)	10일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
대조군 CAR T	134.0	12.1	5
NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅ BB/z CAR T	81.8	10.4	5
NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅ 28/z CAR T	43.7	2.5	5

CAR T 처리	12일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)	12일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
----------	-----------------------------------	-----------------------	-----------------------------

[0309]

	크기 (mm ³)	표준 오차 (SEM)	살아있는 마우스 수 (5마리 중)
대조군 CAR T	224.6	23.7	5
NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅ BB/z CAR T	92.1	12.0	5
NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅ 28/z CAR T	43.8	8.1	5

CAR T 처리	14일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)	14일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
대조군 CAR T	281.8	31.8	5
NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅ BB/z CAR T	98.3	16.4	5
NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅ 28/z CAR T	56.6	5.6	5

CAR T 처리	16일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)	16일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
대조군 CAR T	409.8	44.5	5
NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅ BB/z CAR T	157.9	16.7	5
NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅ 28/z CAR T	70.5	6.0	5

CAR T 처리	19일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)	19일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
대조군 CAR T	657.3	81.3	5
NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅ BB/z CAR T	359.8	41.9	5
NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅ 28/z CAR T	106.6	14.5	5

CAR T 처리	21일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)	21일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
대조군 CAR T	943.1	110.5	5
NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅ BB/z CAR T	607.6	57.8	5
NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅ 28/z CAR T	142.7	12.6	5

대조군 CAR T	943.1	110.5	5
NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅ BB/z CAR T	607.6	57.8	5
NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅ 28/z CAR T	142.7	12.6	5

CAR T 처리	28일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)	28일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
대조군 CAR T	2168.4	162.9	5
NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅ BB/z CAR T	1351.5	154.6	5
NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅ 28/z CAR T	523.8	57.7	5

CAR T 처리	38일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)	38일째에 아직 살아있는 마우스 수 (5마리 중)
대조군 CAR T	3904.3	157.4	5
NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅ BB/z CAR T	2754.3	443.7	5
NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅ 28/z CAR T	1696.4	144.0	5

[0310]

[0311]

[0312]

실시예 6: 2개의 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ scFv 중 하나 또는 항-HLA-A2/MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄를 함유하는 키메라 항원 수

용체를 발현하는 T 세포에 의한 시험관내 세포독성

[0313] 2개의 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ scFv 중 하나 또는 항-HLA-A2/MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ scFv + 1) huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인(BB/z CAR), 또는 2) huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인(28/z CAR)을 함유하는 키메라 항원 수용체를 2개의 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ 항체(33229 또는 34852), 및 항-HLA-A2/MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ 항체(31345)의 V_L 및 V_H 서열을 사용하여 구축하였다. 비-결합 대조군으로서, BB/z CAR을 관련 없는 scFv + huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인을 사용하여 설계하였고, 28/z CAR을 관련 없는 scFv + huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인을 사용하여 설계하였다. 이들 CAR을 EF1a 프로모터 및 P2A:eGFP 서열(CAR-형질도입된 세포를 추적하기 위함)이 있는 pLVX 렌티바이러스 벡터 내에 클로닝하였고, VSV-위형 렌티바이러스를 생산하였다. 작제물 설계에 대해 도 8과 11 및 결과에 대해 도 7을 참조한다.

[0314] 표 20: CAR scFv ID:

AbPID	AbPID	특이성	설명
8808	8808	비-결합 대조군	패널 A-F에서 사용된 VL-VH 방향의 항-MUC16 scFv 8808과 huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인(BB/z 대조군 CAR)
8808	8808	비-결합 대조군	패널 A-F에서 사용된 VL-VH 방향의 항-MUC16 scFv 8808과 huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인(28/z 대조군 CAR)
3B9	3B9	비-결합 대조군	패널 G-H에서 사용된 VL-VH 방향의 항-CD20 scFv 3B9와 huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인(28/z 대조군 CAR)
33229	33229	HLA-A2/MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉	VL-VH-VL 방향의 항-HLA-A2/MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ scFv 33229와 huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인(HLA-A2/MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ CAR 33229 BB/z)
33229	33229	HLA-A2/MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉	VL-VH 방향의 항-HLA-A2/MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ scFv 33229와 huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인(HLA-A2/MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ CAR 33229 28/z)
34852	34852	HLA-A2/MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉	VH-VL 방향의 항-HLA-A2/MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ 34852와 huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인(HLA-A2/MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ CAR 34852 BB/z)
34852	34852	HLA-A2/MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉	VH-VL 방향의 항-HLA-A2/MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ 34852와 huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인(HLA-A2/MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ CAR 34852 28/z)
31345	31345	HLA-A2/MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄	VL-VH 방향의 항-HLA-A2/MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ scFv 31345와 huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인(HLA-A2/MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR 31345 BB/z)

[0315]

31345	31345	HLA-A2/MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄	VL-VH 방향의 항-HLA-A2/MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ scFv 31345와 huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인(HLA-A2/MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR 31345 28/z)
-------	-------	----------------------------------	--

[0316] 실험적 절차

[0318] CAR 작제물 및 CAR T 세포의 생성

- [0319] 2개의 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ scFv 중 하나 또는 항-HLA-A2/MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ scFv + 1) huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인(BB/z CAR), 또는 2) huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인(28/z CAR)을 함유하는 키메라 항원 수용체를 2개의 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ 항체(33229 또는 34852) 및 항-HLA-A2/MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ 항체(31345)의 V_L 및 V_H 서열을 사용하여 구축하였다. 비-결합 대조군으로서, BB/z CAR을 관련 없는 scFv + huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인을 사용하여 설계하였고, 28/z CAR을 관련 없는 scFv + huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인을 사용하여 설계하였다. 이들 CAR을 EF1a 프로모터 및 P2A:eGFP 서열(CAR-형질도입된 세포를 추적하기 위함)이 있는 pLVX 렌티바이러스 벡터 내에 클로닝하였고, VSV-위형 렌티바이러스를 생산하였다.
- [0320] CD3+ T 세포를 정상 공여자의 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)에서 단리하고, CD3/CD28 마이크로비드 + 100 U/ml 재조합 인간 IL-2로 자극하고, MOI=5에서 렌티바이러스로 형질도입하였다. 형질도입된 세포를 CD3/CD28 마이크로비드 + 100 U/ml 재조합 인간 IL-2로 14일 동안 확장시킨 후 시험관내 세포독성 검정에 사용하였다.
- [0321] 칼세인-방출 세포독성 검정
- [0322] BB/z 또는 28/z 세포내 신호전달 도메인이 있는 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ 및 항-HLA-A2/MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄-처리된 키메라 항원 수용체(CAR) T 세포의 시험관내 세포독성 활성을 결정하기 위해, 2.5-시간 칼세인 방출 검정을 수행하였다. A375 또는 SK-MEL-37 세포(2 x 10⁶ 세포/mL)를 8 μM 칼세인-AM(ThermoFisher)으로 37°C에서 35분 동안 표지하고 배지로 3회 세척하였다. CAR-형질도입된 활성화/확장된 T 세포 및 칼세인 표지된 표적 세포를 37°C에서 96-웰 둥근-바닥 플레이트에서 2.5 시간 동안 삼중으로 다양한 비율로 공배양하였다. 인큐베이션 후, 배양 상청액을 흑색 투명 바닥 96 웰 마이크로플레이트(Greiner Bio One)로 옮기고 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 칼세인 형광을 측정하였다. 칼세인 방출률(%)을 다음과 같이 계산하고: ((칼세인 신호 - 자발적 칼세인 방출)/(칼세인 최대 방출 - 자발적 칼세인 방출))*100 세포독성률(%)로서 기록하였다. 자발적 방출은 표적 세포에 의해서만 결정되었고, 최대 방출은 표적 세포를 1% Triton X-114 세제로 용해시켜 결정되었다.
- [0323] 결과 요약 및 결론
- [0324] MAGEA4⁺HLA-A2⁺ A375 및 SK-MEL-37 세포의 중간 정도의 세포독성은 BB/z 세포내 신호전달 도메인이 있는 항-MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ CAR(31345)에 의해 보여졌으며; 대조적으로, 증가된 세포독성은 28/z 세포내 신호전달 도메인이 있는 항-MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ CAR(31345)에 의해 보여졌다(도 7). 최소 배경 세포독성은 CTL CAR 작제물에 의해 유도되었다(도 7). 따라서, 28/z 신호전달 도메인이 있는 항-MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ CAR(31345) CAR은 BB/z 신호전달 도메인을 활용하는 동일한 CAR과 비교하여 우수한 세포독성을 유도하였다.
- [0325] MAGEA4⁺HLA-A2⁺ A375 및 SK-MEL-37 세포의 중간 정도의 세포독성은 BB/z 세포내 신호전달 도메인이 있는 항-MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ CAR(33229)에 의해 보여졌으며; 대조적으로, 증가된 세포독성은 28/z 세포내 신호전달 도메인이 있는 항-MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ CAR(33229)에 의해 보여졌고(도 7), 최소 배경 세포독성은 CTL CAR 작제물에 의해 유도되었다(도 7). 따라서, 28/z 신호전달 도메인이 있는 항-MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ CAR (33229) CAR은 BB/z 신호전달 도메인을 활용하는 동일한 CAR과 비교하여 우수한 세포독성을 유도하였다.
- [0326] MAGEA4⁺HLA-A2⁺ A375 세포의 중간 정도의 세포독성은 BB/z 세포내 신호전달 도메인이 있는 항-MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ CAR(34852)에 의해 보여졌으며; 대조적으로, 증가된 세포독성은 28/z 세포내 신호전달 도메인이 있는 항-MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ CAR(34852)에 의해 보여졌다(도 7). 최소 배경 세포독성은 CTL CAR 작제물에 의해 유도되었다(도 7). 따라서, 28/z 신호전달 도메인이 있는 항-MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ CAR(34852)은 BB/z 신호전달 도메인을 활용하는 동일한 CAR과 비교하여 우수한 세포독성을 유도하였다.
- [0327] 표 21: 표로 만든 데이터 요약:

[0328] A375 세포독성

항-MAGEA4(286-294) CAR 31345 - BB/z			
CAR+ T 세포:종양 세포 비율	평균 % 세포독성	SEM % 세포독성	
0.34361233	3.495440717	2.621060458	
0.68722467	2.077001	1.186968046	
1.37665198	4.103343463	2.073290977	
2.75330396	10.03039513	3.189478464	
5.50660793	16.5653495	1.145152438	
11.0132159	23.20162103	2.583586633	
22.0264317	42.35055723	1.150741309	

항-MAGEA4(286-294) CAR 31345 - 28/z			
CAR+ T 세포:종양 세포 비율	평균 % 세포독성	SEM % 세포독성	
0.26	2.407704657	1.08602371	
0.52	9.898341357	1.371429173	
1.04	21.40181917	1.913488987	
2.08	35.04547887	2.43842243	
4.16	47.56554307	1.689422527	
8.32	53.611557	3.258510426	
16.65	64.0449438	3.152684838	

항-MAGEA4(230-239) CAR 33229 - BB/z			
CAR+ T 세포:종양 세포 비율	평균 % 세포독성	SEM % 세포독성	
0.44	-2.940311667	1.020250017	
0.87	0.588062337	2.199541805	
1.75	1.822993237	0.459291368	
3.49	7.350779187	0.058806233	
6.98	15.99529547	1.617973121	
13.97	29.69714793	2.627263494	
27.93	47.16259923	2.619354002	

항-MAGEA4(230-239) CAR 33229 - 28/z			
CAR+ T 세포:종양 세포 비율	평균 % 세포독성	SEM % 세포독성	

[0329]

	0.1	3.267093297	1.391982373
	0.21	2.458740327	3.043275709
	0.41	6.972044467	1.549343217
	0.83	19.63624117	1.659640955
	1.66	32.83933983	2.168201695
	3.32	64.0956551	5.554466059
	6.65	86.8642641	1.8187942

CTL CAR - BB/z			
CAR+ T 세포:종양 세포 비율	평균 % 세포독성	SEM % 세포독성	
	0.38	0.754840817	2.047453102
	0.75	-0.426649173	1.430554304
	1.51	-0.42664915	3.847548632
	3.02	0.623564147	3.012935339
	6.05	4.036757463	1.197787175
	12.1	9.419100757	0.328191663
	24.2	12.11027239	4.125827394

CTL CAR - 28/z			
CAR+ T 세포:종양 세포 비율	평균 % 세포독성	SEM % 세포독성	
	0.15	2.63578275	1.615315369
	0.31	2.476038337	0.76193227
	0.61	3.35463259	2.47603834
	1.22	3.115015967	2.429218272
	2.44	3.11501597	3.203861205
	4.88	17.25239617	2.514389178
	9.77	30.5910543	5.9904153

형질 도입되지 않음			
CAR+ T 세포:종양 세포 비율	평균 % 세포독성	SEM % 세포독성	
	0.78	5.599313063	1.428185853
	1.56	2.844442065	1.866547656
	3.125	3.016582507	1.041244538
	6.25	-1.919486757	1.386474998
	12.5	6.7716742	2.405323802
	25	7.53120193	1.474651073
	50	6.269535185	1.783611187

[0330]

항-MAGEA4(230-239) CAR- scFv X - BB/z		
CAR+ T 세포:종양 세포 비율	평균 % 세포독성	SEM % 세포독성
0.6828125	2.17524042	1.08412645
1.365625	-1.030377047	0.992567116
2.73125	0.40451838	0.820902448
5.4625	3.304838947	1.953900173
10.925	4.007021827	0.61968503
21.85	7.97588155	1.117153078

항-MAGEA4(230-239) CAR- scFv X - 28/z		
CAR+ T 세포:종양 세포 비율	평균 % 세포독성	SEM % 세포독성
0.78125	2.877423307	1.702013098
1.5625	3.426957713	1.021262627
3.125	7.67058466	2.474788746
6.25	12.83010229	2.871738919
12.5	25.1030377	1.344346732
25	42.6270798	3.696614762

CTL CAR - 28/z		
CAR+ T 세포:종양 세포 비율	평균 % 세포독성	SEM % 세포독성
1.328125	3.011329757	0.823567521
2.65625	1.311866427	1.104368467
5.3125	2.116875373	0.823567522
10.625	2.683363157	1.64308237
21.25	2.05724508	1.213663237
42.5	1.84853906	1.058752588

[0331]

[0332] SK-MEL-37 세포독성

항-MAGEA4(286-294) CAR 31345 - BB/z			
CAR+ T 세포:종양 세포 비율	평균 % 세포독성	SEM % 세포독성	
0.34361233	-1.834261367	0.654273987	
0.68722467	-3.799541433	0.947623724	
1.37665198	0.851621356	0.472394533	
2.75330396	2.39109072	2.491724015	
5.50660793	6.48542417	0.53920988	
11.0132159	13.00360301	2.042378942	
22.0264317	27.7432034	0.654273954	

항-MAGEA4(286-294) CAR 31345 - 28/z			
CAR+ T 세포:종양 세포 비율	평균 % 세포독성	SEM % 세포독성	
0.26	2.338101827	0.244185631	
0.52	2.245808323	1.448547295	
1.04	4.768497154	1.42416699	
2.08	13.41332103	0.857551751	
4.16	21.47361947	1.595310522	
8.32	32.42578065	2.599008367	
16.65	52.11505923	0.378040479	

항-MAGEA4(230-239) CAR 33229 - BB/z			
CAR+ T 세포:종양 세포 비율	평균 % 세포독성	SEM % 세포독성	
0.44	-4.988222233	0.530892193	
0.87	-3.4363309	0.4156852	
1.75	-4.572537065	0.91618541	
3.49	-2.272412367	0.534496362	
6.98	-1.88443953	1.796179079	
13.97	4.766523486	0.762467313	
27.93	13.68989883	1.903698993	

항-MAGEA4(230-239) CAR 33229 - 28/z			
CAR+ T 세포:종양 세포 비율	평균 % 세포독성	SEM % 세포독성	
0.1	-1.572367567	0.292764964	
0.21	-2.990076067	0.717587881	

[0333]

	0.41	-1.546591056	0.87526366
	0.83	1.13416677	0.491108619
	1.66	3.660265497	0.558226776
	3.32	11.36744428	1.838825301
	6.65	25.36409333	1.120908121

CTL CAR - BB/z			
CAR+ T 세포:종양 세포 비율	평균 % 세포독성	SEM % 세포독성	
0.38	-0.878821637	1.275090509	
0.75	-3.230597833	0.483208867	
1.51	-1.05211041	1.974399741	
3.02	-0.878821633	0.202632828	
6.05	-1.2501547	0.546307122	
12.1	1.57197673	0.433752085	
24.2	0.903577163	1.045317121	

CTL CAR - 28/z			
CAR+ T 세포:종양 세포 비율	평균 % 세포독성	SEM % 세포독성	
0.15	-0.44298047	2.513689458	
0.31	-1.919582027	2.632422705	
0.61	-2.691958201	0.315593912	
1.22	-0.261244887	1.753183224	
2.44	-0.011358463	2.32546539	
4.88	1.737846437	3.57826167	
9.77	4.327578373	2.241162378	

형질도입되지 않음			
CAR+ T 세포:종양 세포 비율	평균 % 세포독성	SEM % 세포독성	
0.78	-1.3856173	0.308591616	
1.56	-1.662740733	0.26435893	
3.125	-4.7110988	1.009505652	
6.25	-4.461687682	1.637844185	
12.5	1.998034703	1.962821925	
25	1.99803472	0.484724813	
50	-0.818866707	0.681580484	

[0334]

[0335]

실시예 7: 2개의 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ scFv 중 하나를 함유하는 키메라 항원 수용체

[0336]

V_L-V_H 방향의 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ scFv + 1) huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인(BB/z CAR), 또는 2) huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인(28/z CAR)을 함유하는 키메라 항원 수용체를 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ 항체, 33229P의 V_L 및 V_H 서열을 사용하여 구축하였다. 비-결합 대조군으로서, 28/z CAR을 관련 없는 scFv + huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인을 사용하여 설계하였다. 이들 CAR을 EF1a 프로모터 및 P2A:eGFP 서열(CAR-형질도입된 세포를 추적하기 위함)이 있는 pLVX 렌티바이러스 벡터 내에 클로닝하였고, VSV-위형 렌티바이러스를 생산하였다. 결과 및 작제물의 설계에 대해 각각 도 9 및 10을 참조한다.

[0337]

종합하면, 결과는 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR T 세포가 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR T 세포와 비교하여 우수한 생체내 항-종양 활성 및 항-종양 동역학을 입증함을 입증한다.

[0338] 표 22: CAR scFv ID:

AbPID	AbPID	특이성	설명
17363	17363N	비-결합 대조군	VL-VH 방향의 항-HLA-A2/HPV16E7 ₁₁₋₁₉ scFv 17363N과 huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인(대조군 CAR)
33229P	33229P	HLA-A2/MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉	VL-VH 방향의 항-HLA-A2/MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ scFv 33229P와 huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인(MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR)
33229P	33229P	HLA-A2/MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉	VL-VH 방향의 항-HLA-A2/MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ scFv 33229P와 huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인(MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR)

[0339]

실험적 절차

[0340]

[0341] CAR 작제물 및 CAR T 세포의 생성

[0342]

V_L-V_H 방향의 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ scFv + 1) huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인(BB/z CAR), 또는 2) huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인(28/z CAR)을 함유하는 키메라 항원 수용체를 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ 항체, 33229P의 V_L 및 V_H 서열을 사용하여 구축하였다. 비-결합 대조군으로서, 28/z CAR을 관련 없는 scFv + huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인을 사용하여 설계하였다. 이들 CAR을 EF1a 프로모터 및 P2A:eGFP 서열(CAR-형질도입된 세포를 추적하기 위함)이 있는 pLVX 렌티바이러스 벡터 내에 클로닝하였고, VSV-위형 렌티바이러스를 생산하였다.

[0343]

CD3+ T 세포를 정상 공여자의 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)에서 단리하고, CD3/CD28 마이크로비드 + 100 U/ml 재조합 인간 IL-2로 자극하고, MOI=5에서 렌티바이러스로 형질도입하였다. 형질도입된 세포를 CD3/CD28 마이크로비드 + 100 U/ml 재조합 인간 IL-2로 대략 14일 동안 확장시킨 후 생체내 실험 동안 사용할 때까지 동결 건조하였다.

[0344]

이종 종양의 이식 및 측정

[0345]

항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉-표적화된 키메라 항원 수용체(CAR) T 세포의 생체내 효능을 결정하기 위해, 이종 종양 연구를 수행하였다. 0일째에, 면역결핍 NOD.Cg-Prkdc^{scid}I12rg^{tm1Wjl}/SzJ(NSG) 마우스에 5x10⁶ HLA-A2⁺MAGEA4⁺A375 인간 흑색종 종양 세포를 피하 주사하였다. 질량 분광법 기술을 사용하여, A375 흑색종 세포가 HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ 펩티드의 대략 553개 세포-표면 카피를 발현하는 것으로 결정되었다. 종양이 확립된 후 11일째에, 마우스(그룹당 n≥5)에 비-결합 대조군 28/z CAR(대조군 CAR T), 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR, 또는 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR(CAR로 형질도입된 세포에 대한 마커인, GFP를 발현하는 세포의 빈도에 의해 결정됨)을 발현하는 1x10⁶, 5x10⁶, 또는 10x10⁶ T 세포를 정맥내 주사하였다. 종양 부피를 측정하여 28일까지 종양 성장을 평가하였다.

[0346]

이종 종양 성장 및 억제 계산

[0347]

외부 캘리퍼에 의해 종양 부피를 결정하기 위해, 최대 세로 직경(길이 mm) 및 최대 가로 직경(너비 mm)을 결정하였다. 캘리퍼 측정에 기반한 종양 부피는 다음 공식에 의해 계산하였다: 부피(mm³) = (길이 x 너비²)/2.

[0348]

결과 요약

[0349]

1x10⁶ 용량의 CAR T: A375 종양을 대조군 CAR T 세포를 받은 마우스에서 점진적으로 성장시켰다. 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR T 세포를 받은 마우스는 종양 체어를 입증하지 못하였다. 대조적으로, 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR T 처리는 9일(p=0.001), 13일(p<0.0001), 및 16일(p<0.0001)(2-원 ANOVA에 의해 분석된 통계)째에 대조군 CAR T와 비교하여 확립된 A375 종양 성장의 억제를 야기하였다. 9일(p=0.0086), 13일

($p < 0.0001$) 및 16일($p < 0.0001$)째에 종양 크기가 2-원 ANOVA에 의해 통계적으로 유의하므로, 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR 대 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR의 향상된 효능이 확인된다.

[0350] 5×10^6 용량의 CAR T: A375 종양을 대조군 CAR T 세포를 받은 마우스에서 점진적으로 성장시켰다. 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR T 세포 처리는 9일($p < 0.0001$), 13일($p < 0.0001$), 및 16일($p < 0.0001$)(2-원 ANOVA에 의해 분석된 통계)째에 대조군 CAR T와 비교하여 확립된 A375 종양 성장의 억제를 야기하였다. 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR T 처리는 또한 6일($p < 0.0001$), 9일($p < 0.0001$), 13일($p < 0.0001$), 및 16일($p < 0.0001$)(2-원 ANOVA에 의해 분석된 통계)째에 확립된 A375 종양 성장의 억제를 야기하였다. 6일($p = 0.0049$), 9일($p < 0.0001$), 13일($p = 0.0003$) 및 16일($p = 0.0453$)째에 종양 크기가 2-원 ANOVA에 의해 통계적으로 유의하므로, 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR 대 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR의 향상된 효능이 확인된다.

[0351] 10×10^6 용량의 CAR T: A375 종양을 대조군 CAR T 세포를 받은 마우스에서 점진적으로 성장시켰다. 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR T 세포 처리는 6일($p = 0.0214$), 9일($p < 0.0001$), 13일($p < 0.0001$), 및 16일($p < 0.0001$)(2-원 ANOVA에 의해 분석된 통계)째에 대조군 CAR T와 비교하여 확립된 A375 종양 성장의 억제를 야기하였다. 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR T 처리는 또한 6일($p < 0.0001$), 9일($p < 0.0001$), 13일($p < 0.0001$), 및 16일($p < 0.0001$)(2-원 ANOVA에 의해 분석된 통계)째에 확립된 A375 종양 성장의 억제를 야기하였다. 6일($p = 0.0282$) 및 9일($p = 0.0212$)째에 종양 크기가 2-원 ANOVA에 의해 통계적으로 유의하므로, 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR 대 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR의 향상된 효능이 확인된다.

[0352] 표 23: 표로 만든 데이터 요약:

대조군 CAR T 28/z			
CAR T 투약 후 일	평균 종양 부피 (mm ³)	종양 부피 평균의 표준 오차 (SEM)	살아있는 마우스 수
0	152.93	28.39	5
2	273.33	47.33	5
6	706.24	94.17	5
9	1076.98	155.83	5
13	1690.17	167.36	5
16	2438.08	270.27	4
20			0
23			0

항-MAGEA4(230-239) CAR T BB/z 1e6 용량			
CAR T 투약 후 일	평균 종양 부피 (mm ³)	종양 부피 평균의 표준 오차 (SEM)	살아있는 마우스 수
0	147.95	23.54	5
2	217.85	45.47	5
6	562.00	83.95	5
9	926.51	140.92	5
13	1322.27	263.85	5
16	1594.67	350.63	5
20	1902.97	209.18	4
23	1988.75	408.62	2

항-MAGEA4(230-239) CAR T BB/z 5e6 용량			
CAR T 투약 후 일	평균 종양 부피 (mm ³)	종양 부피 평균의 표준 오차 (SEM)	살아있는 마우스 수

[0353]

0	175.91	15.38	8
2	225.22	33.12	8
6	492.59	49.56	8
9	513.64	47.10	8
13	406.94	52.15	8
16	238.39	48.51	8
20	198.05	71.77	8
23	175.28	84.08	8

항-MAGEA4(230-239) CAR T BB/z 10e6 용량

CAR T 투약 후 일	평균 종양 부피 (mm ³)	종양 부피 평균의 표준 오차 (SEM)	살아있는 마우스 수
0	167.56	16.84	7
2	235.62	42.37	7
6	376.09	112.15	7
9	337.07	64.66	7
13	132.88	29.92	7
16	14.81	12.74	7
20	0.00	0.00	7
23	0.00	0.00	7

항-MAGEA4(230-239) CAR T 28/z 1e6 용량

CAR T 투약 후 일	평균 종양 부피 (mm ³)	종양 부피 평균의 표준 오차 (SEM)	살아있는 마우스 수
0	129.31	25.19	5
2	190.09	48.25	5
6	342.10	95.56	5
9	267.18	78.18	5
13	187.90	98.59	5
16	208.26	145.32	5
20	280.10	252.66	5
23	212.50	168.19	5

[0354]

CAR T 투약 후 일	평균 종양 부피 (mm ³)	종양 부피 평균의 표준 오차 (SEM)	살아있는 마우스 수
0	161.61	14.84	8
2	210.63	21.97	8
6	193.05	32.71	8
9	90.31	35.41	8
13	27.67	18.02	8
16	13.17	13.17	8
20	3.33	3.33	8
23	6.06	6.06	8

CAR T 투약 후 일	평균 종양 부피 (mm ³)	종양 부피 평균의 표준 오차 (SEM)	살아있는 마우스 수
0	155.47	21.18	6
2	235.05	49.94	6
6	74.45	24.65	6
9	23.02	9.07	6
13	3.41	3.41	6
16	0.00	0.00	6
20	0.00	0.00	6
23	0.00	0.00	6

[0355]

[0356]

실시예 8: 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ scFv를 함유하는 키메라 항원 수용체

[0357]

V_L-V_H 방향의 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ scFv + 1) huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인(BB/z CAR), 또는 2) huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인(28/z CAR)을 함유하는 키메라 항원 수용체를 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ 항체, 34852의 V_L 및 V_H 서열을 사용하여 구축하였다. 비-결합 대조군으로서, 28/z CAR을 관련 없는 scFv + huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인을 사용하여 설계하였다. 이들 CAR을 EF1a 프로모터 및 P2A:eGFP 서열(CAR-형질도입된 세포를 추적하기 위함)이 있는 pLVX 렌티바이러스 벡터 내에 클로닝하였고, VSV-위형 렌티바이러스를 생산하였다. 작제물 설계 및 결과에 대해 각각 도 11 및 12를 참조한다.

[0358]

종합하면, 결과는 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR T 세포가 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR T 세포와 비교하여 우수한 생체내 항-종양 활성 및 항-종양 동역학을 나타냄을 입증한다.

[0359]

표 24: CAR scFv ID:

AbPID	AbPID	특이성	설명
3B9	3B9	비-결합 대조군	패널 G-H에서 사용된 VL-VH 방향의 항-CD20 scFv 3B9와 huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인(대조군 CAR)
34852	34852	HLA-A2/MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉	VH-VL 방향의 항-HLA-A2/MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ 34852와 huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인(HLA-A2/MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ CAR 34852 BB/z)
34852	34852	HLA-A2/MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉	VH-VL 방향의 항-HLA-A2/MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ 34852와 huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인(HLA-A2/MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ CAR 34852 28/z)

[0360]

- [0361] 실험적 절차
- [0362] CAR 작제물 및 CAR T 세포의 생성
- [0363] V_L - V_H 방향의 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ scFv + 1) huCD8 힌지/막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3z 신호전달 도메인(BB/z CAR), 또는 2) huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인(28/z CAR)을 함유하는 키메라 항원 수용체를 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ 항체, 34852의 V_L 및 V_H 서열을 사용하여 구축하였다. 비-결합 대조군으로서, 28/z CAR을 관련 없는 scFv + huCD28 힌지/막관통/공동자극 도메인 및 CD3z 신호전달 도메인을 사용하여 설계하였다. 이들 CAR을 EF1a 프로모터 및 P2A:eGFP 서열(CAR-형질도입된 세포를 추적하기 위함)이 있는 pLVX 렌티바이러스 벡터 내에 클로닝하였고, VSV-위형 렌티바이러스를 생산하였다.
- [0364] CD3+ T 세포를 정상 공여자의 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)에서 단리하고, CD3/CD28 마이크로비드 + 100 U/ml 재조합 인간 IL-2로 자극하고, MOI=5에서 렌티바이러스로 형질도입하였다. 형질도입된 세포를 CD3/CD28 마이크로비드 + 100 U/ml 재조합 인간 IL-2로 대략 14일 동안 확장시킨 후 생체내 실험 동안 사용할 때까지 동결 건조하였다.
- [0365] 이종 종양의 이식 및 측정
- [0366] 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉-표적화된 키메라 항원 수용체(CAR) T 세포의 생체내 효능을 결정하기 위해, 이종 종양 연구를 수행하였다. 0일째에, 면역결핍 NOD.Cg-Prkdc^{scid} I12rg^{tm1Wjl}/SzJ(NSG) 마우스에 5×10^6 HLA-A2⁺MAGEA4⁺ A375 인간 흑색종 종양 세포를 피하 주사하였다. 질량 분광법 기술을 사용하여, A375 흑색종 세포가 HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ 펩티드의 대략 553개 세포-표면 카피를 발현하는 것으로 결정되었다. 종양이 확립된 후 10일째에, 마우스(그룹당 n= 5)에 비-결합 대조군 28/z CAR(대조군 CAR T), 2명의 상이한 공여자로부터의 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR, 또는 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR(CAR로 형질도입된 세포에 대한 마커인, GFP를 발현하는 세포의 빈도에 의해 결정됨)을 발현하는 4×10^6 T 세포를 정맥내 주사하였다. 종양 부피를 측정하여 28일까지 종양 성장을 평가하였다.
- [0367] 이종 종양 성장 및 억제 계산
- [0368] 외부 캘리퍼에 의해 종양 부피를 결정하기 위해, 최대 세로 직경(길이 mm) 및 최대 가로 직경(너비 mm)을 결정하였다. 캘리퍼 측정에 기반한 종양 부피는 다음 공식에 의해 계산하였다: 부피(mm³) = (길이 x 너비²)/2.
- [0369] 결과 요약 및 결론:
- [0370] A375 종양을 대조군 CAR T 세포를 받은 마우스에서 점진적으로 성장시켰다. 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR T 세포를 받은 마우스는 임의의 종양 제어를 입증하지 못하였다. 대조적으로, 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR T 처리는 17일(대조군 CAR T 대비 p<0.0001) 및 20일(대조군 CAR T 대비 p<0.0001)(2-원 ANOVA에 의해 분석된 통계)째에 확립된 A375 종양 성장의 억제를 야기하였다. 13일(p=0.0256), 17일(p=0.0002), 및 21일(p<0.0001)째에 종양 크기가 2-원 ANOVA에 의해 통계적으로 유의하므로, 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR 대 항-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR의 향상된 효능이 확인된다.

[0371] 표 25: 표로 만든 데이터 요약:

CAR T 처리	0일(CAR T 투약 일)째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)
대조군 CAR T	144.71	26.81
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ CAR T 34852 BB/z	125.77	21.00
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ CAR T 34852 28/z	130.64	13.71

CAR T 처리	CAR T 투약 후 3일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)
대조군 CAR T	210.44	37.31
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ CAR T 34852 BB/z	185.85	42.71
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ CAR T 34852 28/z	263.48	44.05

CAR T 처리	CAR T 투약 후 6일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)
대조군 CAR T	374.09	59.33
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ CAR T 34852 BB/z	464.29	81.15
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ CAR T 34852 28/z	312.28	33.90

CAR T 처리	CAR T 투약 후 10일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)
대조군 CAR T	825.94	167.02
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ CAR T 34852 BB/z	1018.90	137.83
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ CAR T 34852 28/z	538.26	87.09

CAR T 처리	CAR T 투약 후 13일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)
대조군 CAR T	1274.25	182.63
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ CAR T 34852 BB/z	1365.24	178.27
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ CAR T 34852 28/z	648.70	132.34

[0372]

CAR T 처리	CAR T 투약 후 17일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)
대조군 CAR T	2311.83	461.10
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ CAR T 34852 BB/z	2209.72	321.33
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ CAR T 34852 28/z	1058.88	163.82

CAR T 처리	CAR T 투약 후 20일째에 평균 종양 크기 (mm ³)	종양 크기 평균의 표준 오차 (SEM)
대조군 CAR T	2930.09	302.64
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ CAR T 34852 BB/z	3346.67	329.10
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ CAR T 34852 28/z	1657.89	261.70

[0373]

[0374] 참조에 의한 통합

[0375] 본원에 언급된 모든 간행물, 특허, 특허 출원 및 서열 수탁 번호는 각 개별 간행물, 특허 또는 특허 출원이 구체적으로 및 개별적으로 참조에 의해 포함되는 것으로 지시되는 것처럼 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. 상충하는 경우, 본원의 임의의 정의를 포함한 본 출원이 우선할 것이다.

[0376] 등가물

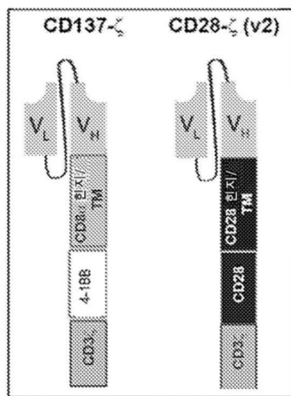
[0377] 본 발명의 다수의 구현예가 기재되었다. 그럼에도 불구하고, 다양한 변형이 본 발명의 취지 및 범위를 벗어나지 않고 이루어질 수 있음이 이해될 것이다. 따라서, 다른 구현예는 하기 청구범위의 범위 내에 있다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 개시된 발명이 속하는 분야의 숙련자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다.

[0378] 당업자는 본원에 기재된 본 발명의 구체적 구현예에 대한 많은 등가물은 일상적인 실험을 통해서만 인식하거나, 또는 확인할 수 있을 것이다. 이러한 등가물은 하기 청구범위에 의해 포괄되는 것으로 의도된다.

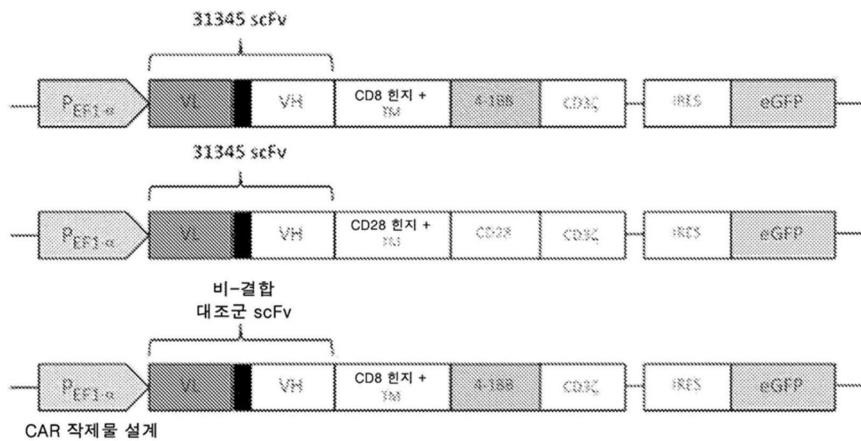
도면

도면1

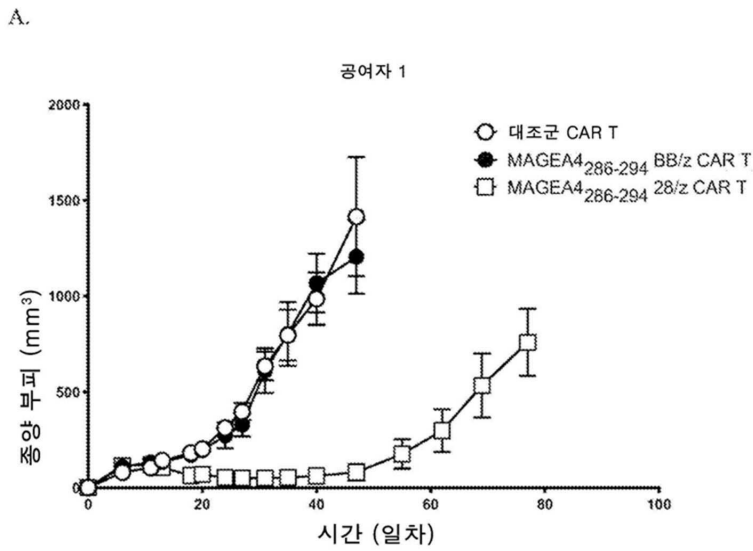
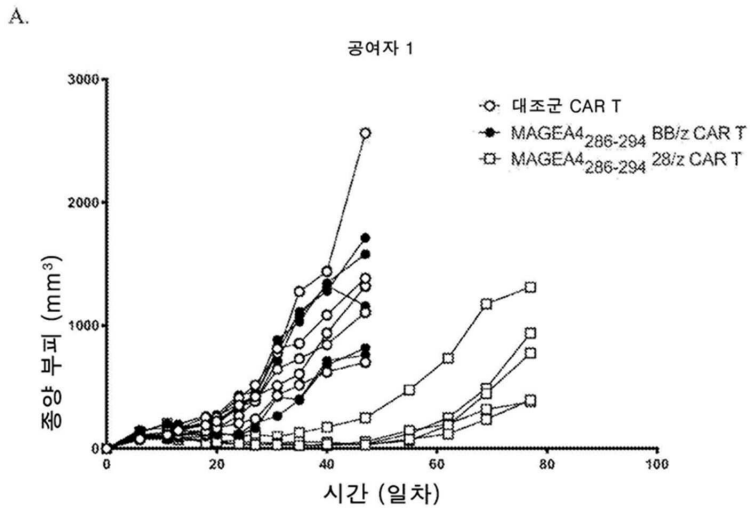
A



B

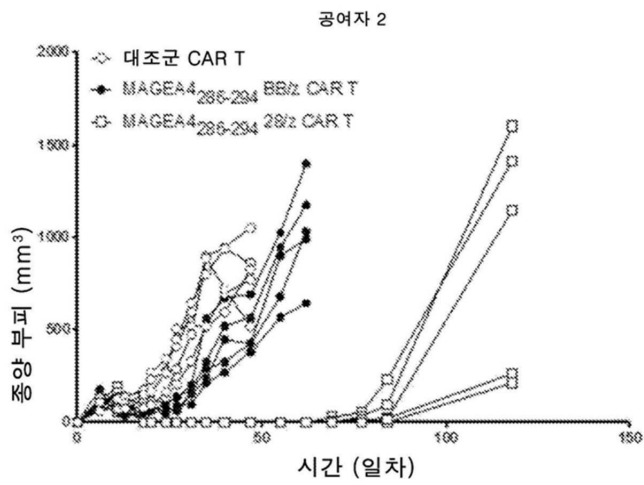
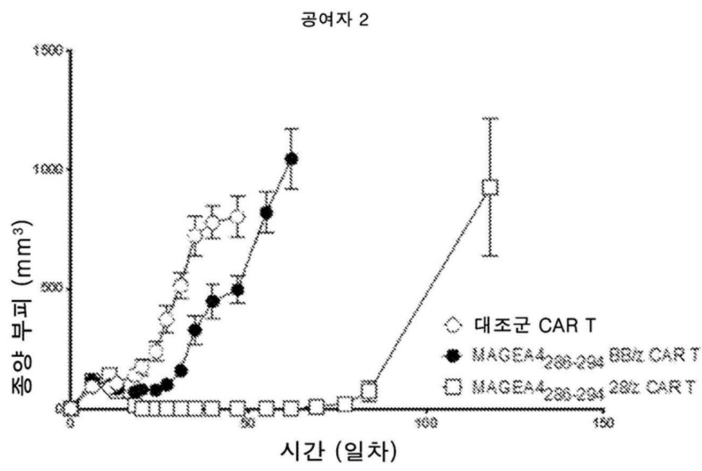


도면2a



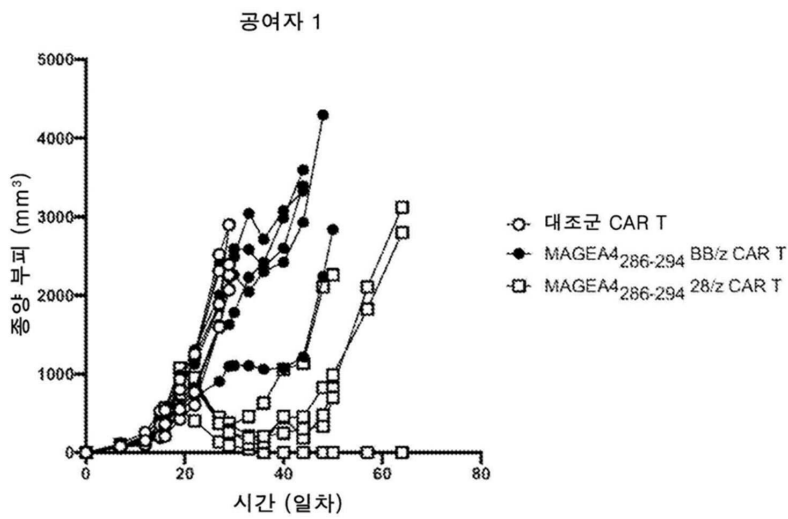
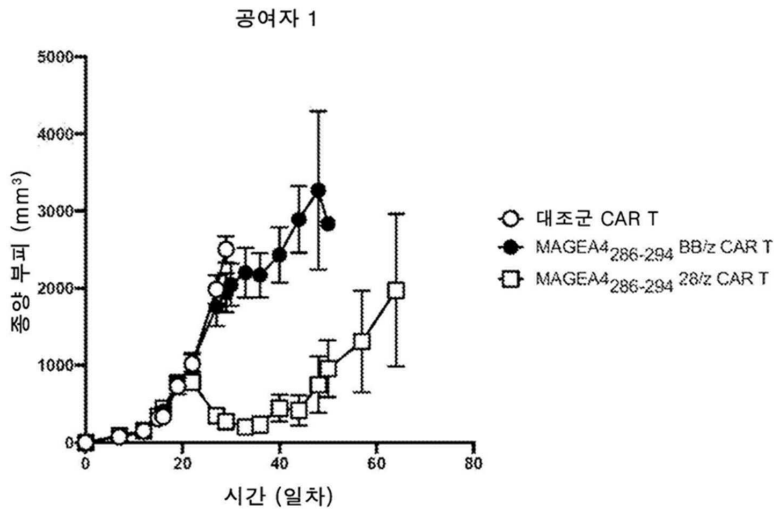
도면2b

B



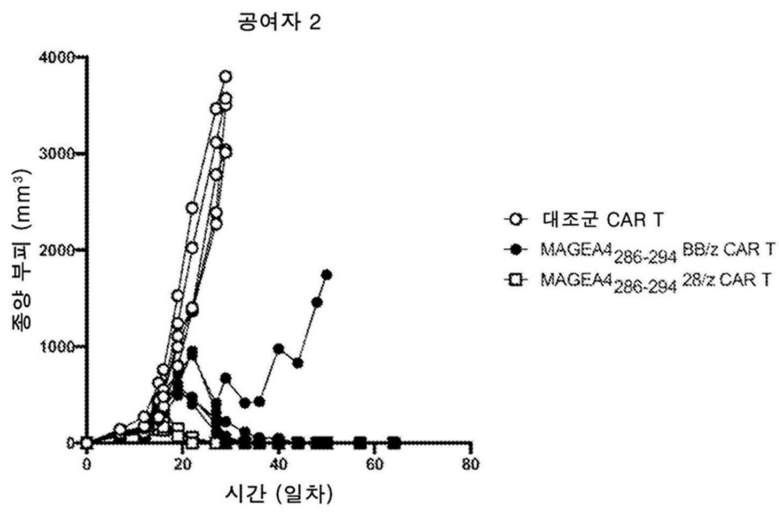
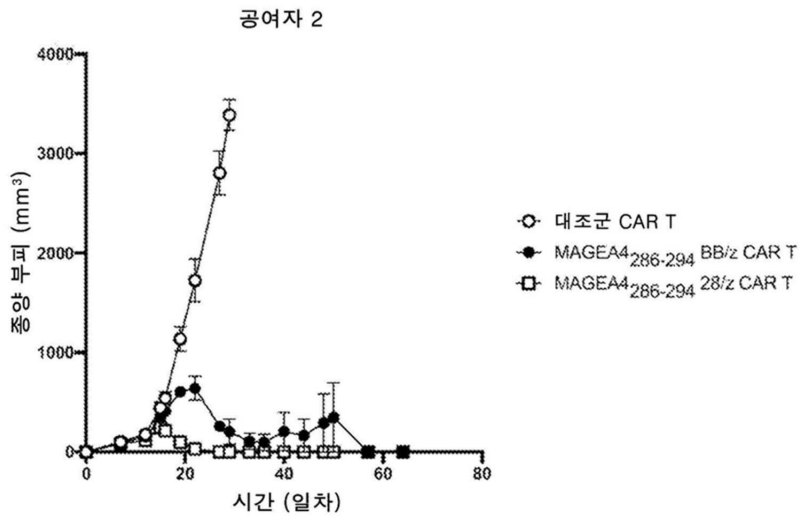
도면3a

A



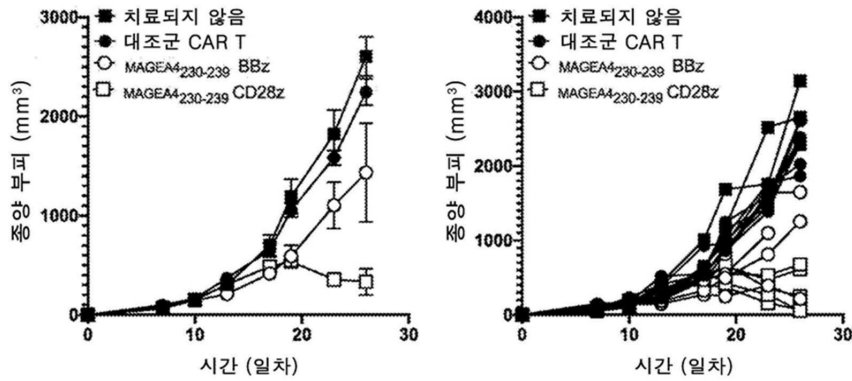
도면3b

B

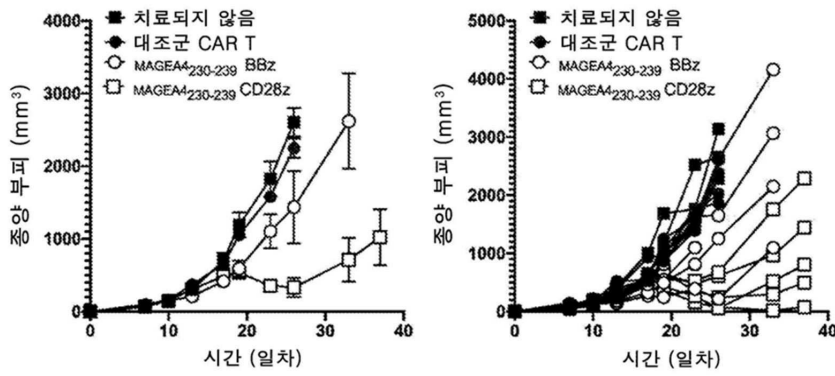


도면4a

A. 0-21일차 종양 곡선

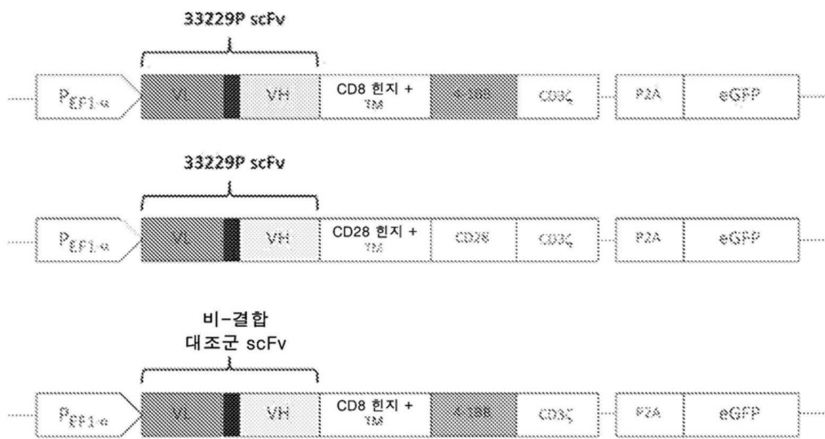


0-37일차 종양 곡선



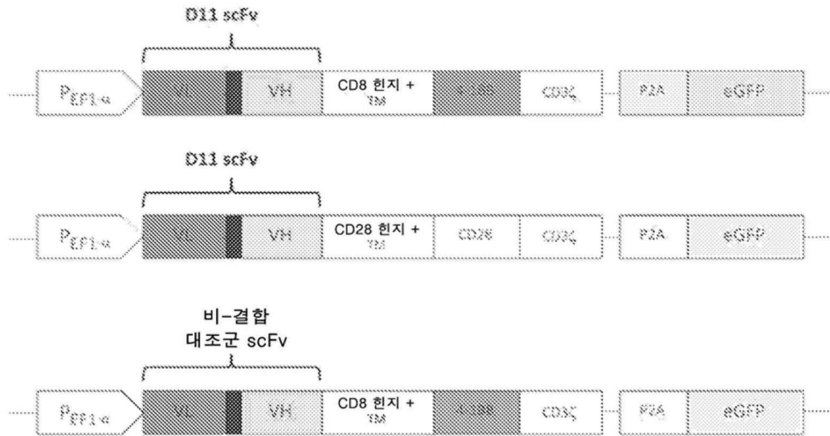
도면4b

B.



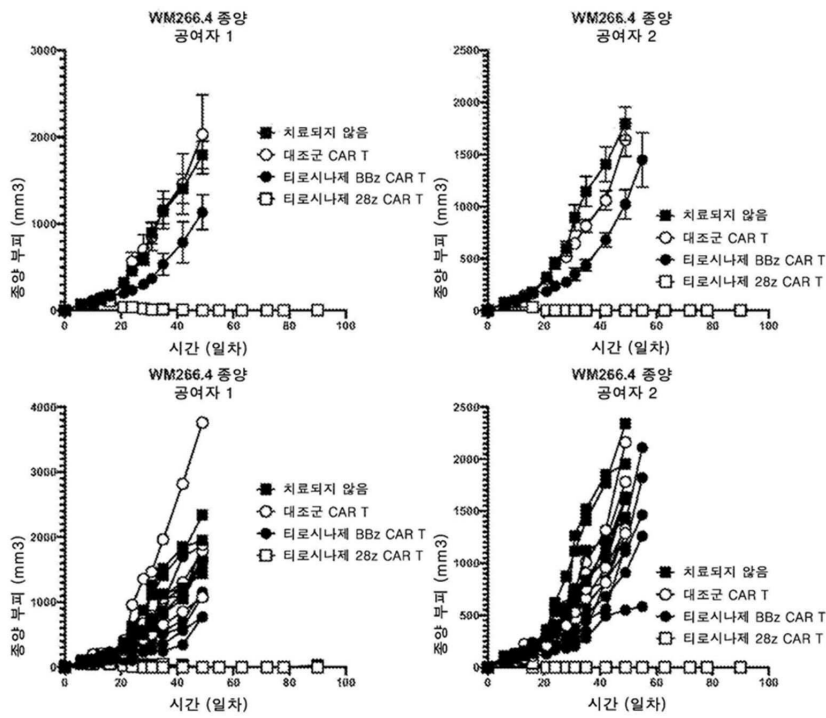
도면5a

A



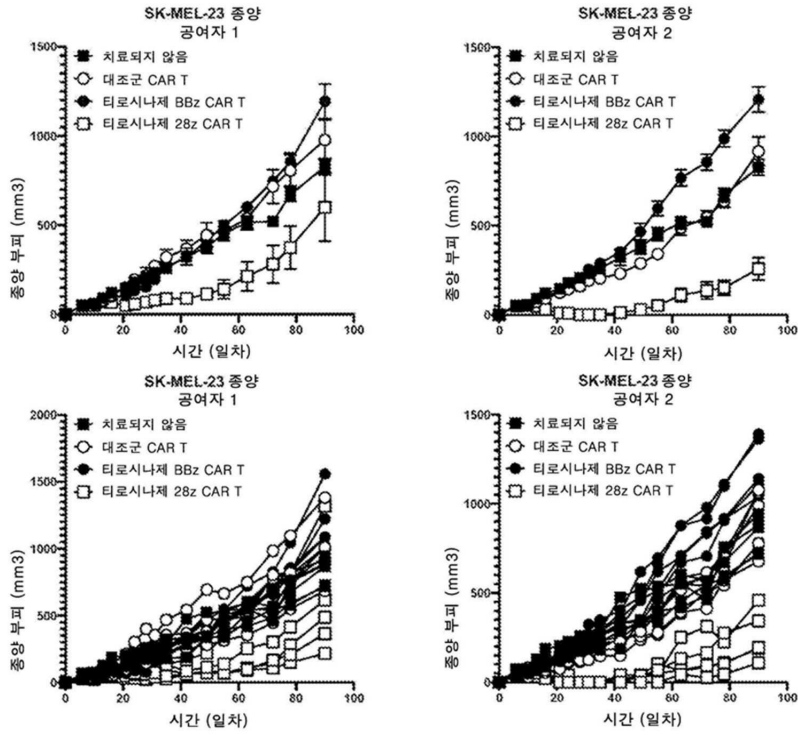
도면5b

B



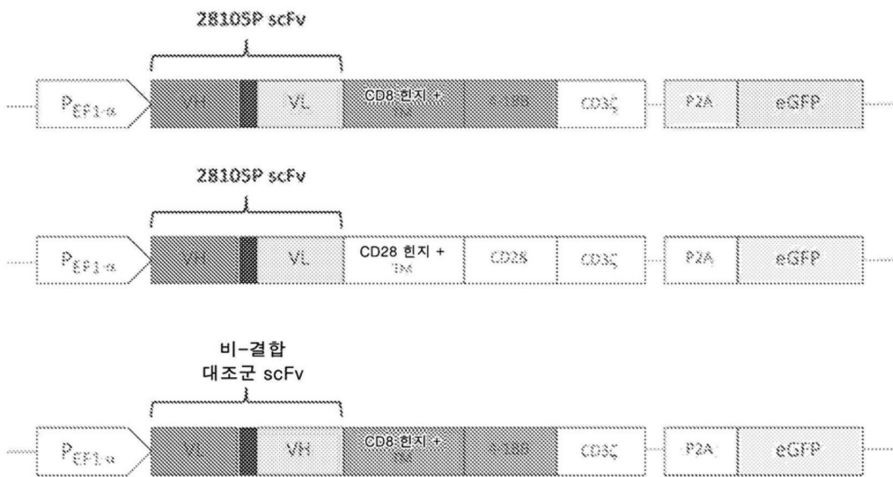
도면5c

C



도면6a

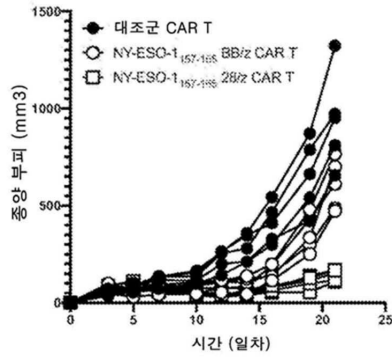
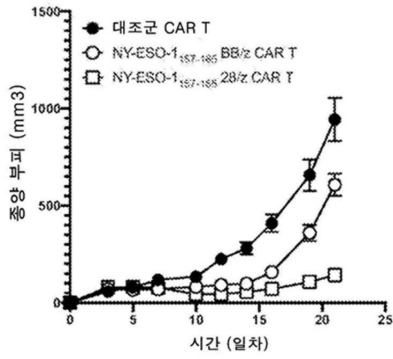
A.



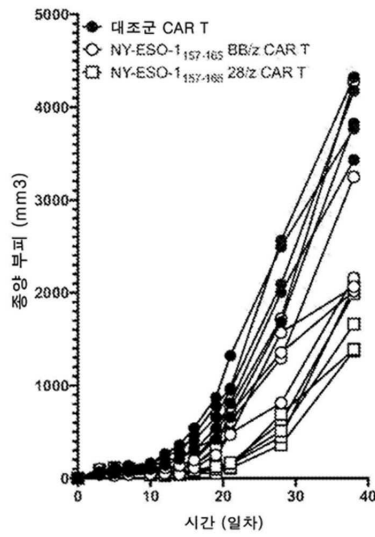
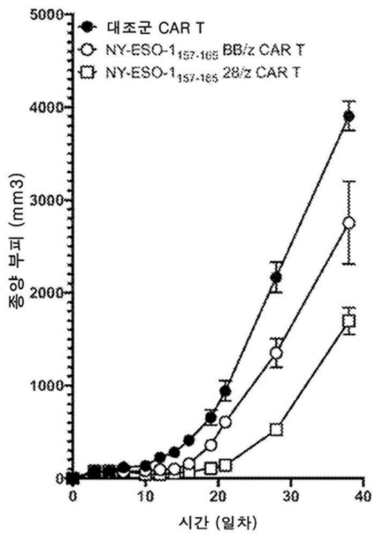
도면6b

B.

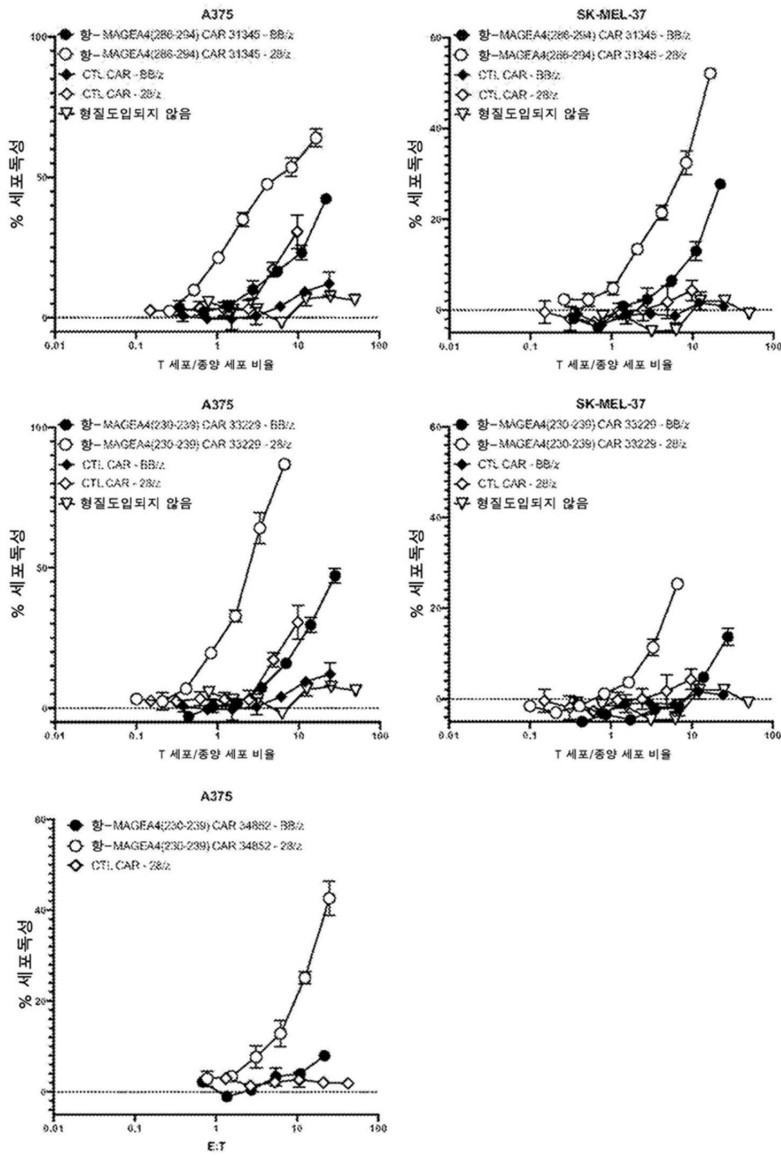
0-21일차 증양 곡선



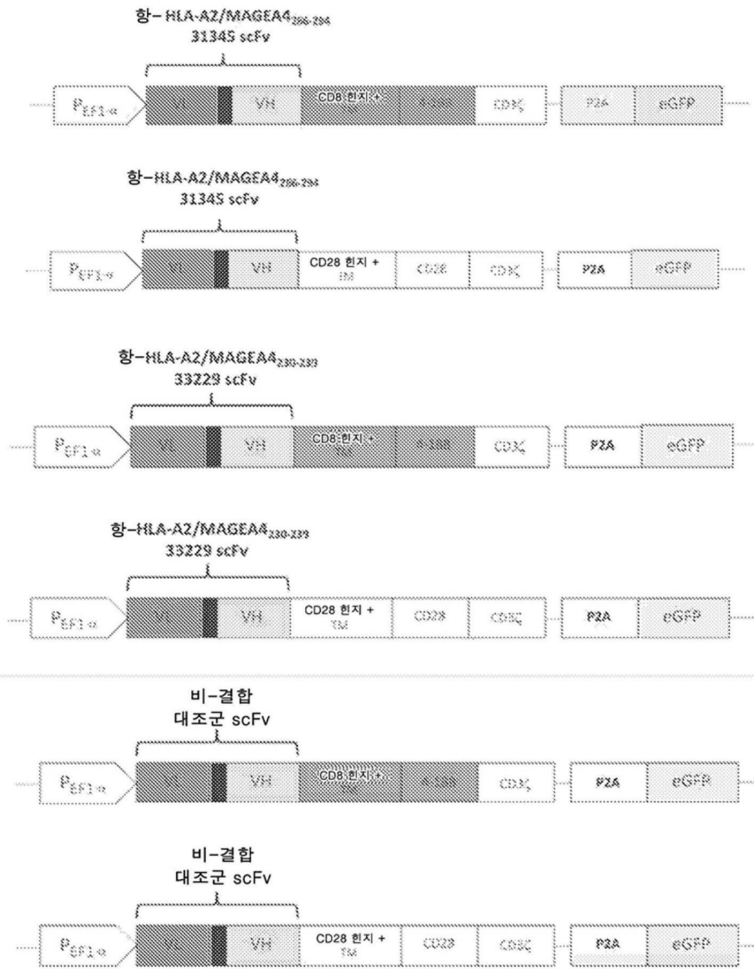
0-38일차 증양 곡선



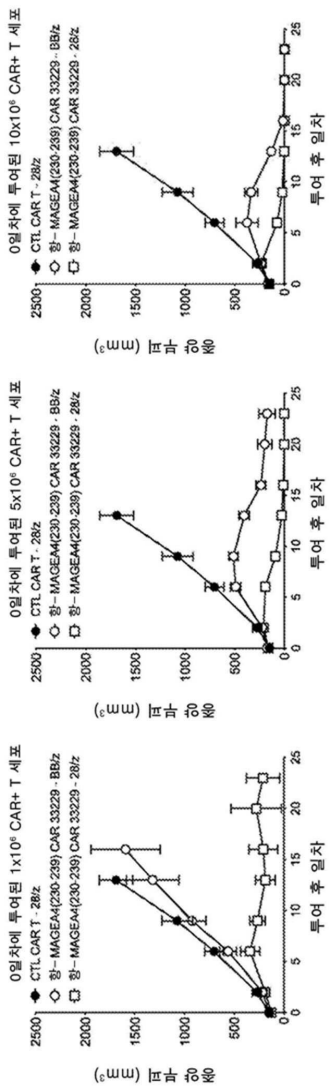
도면7



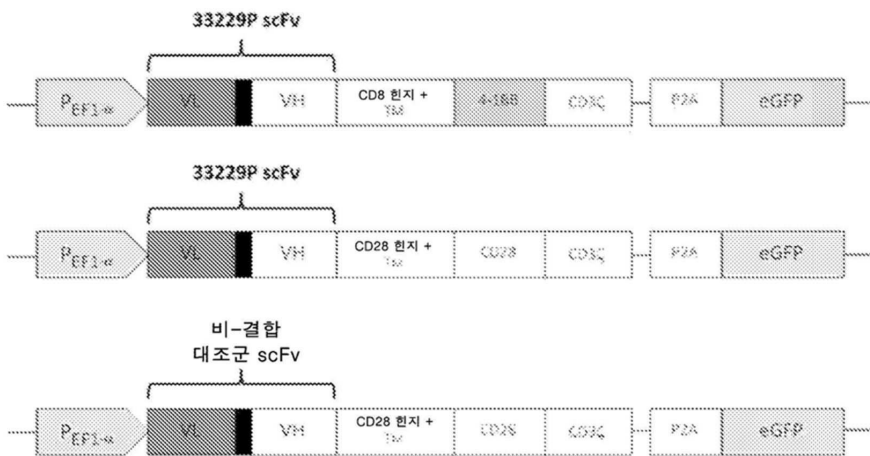
도면8



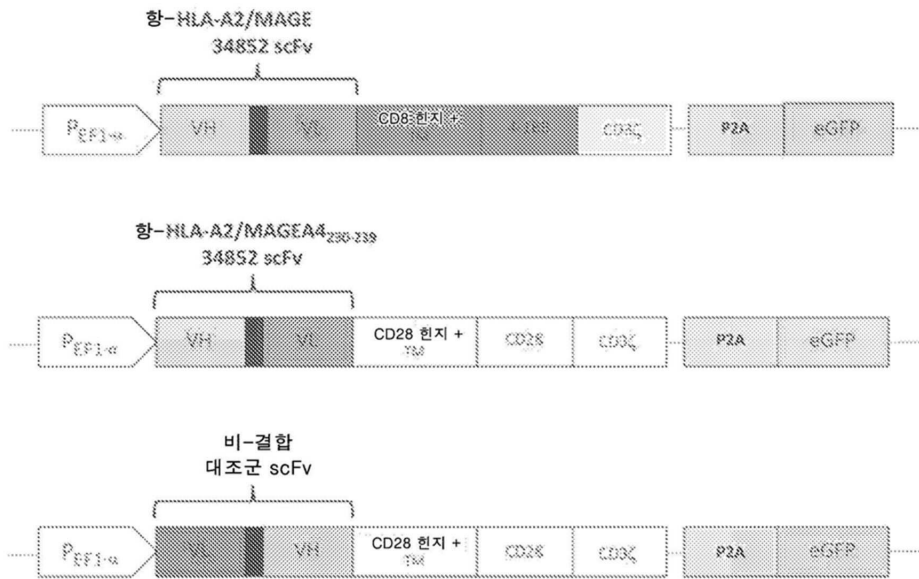
도면9



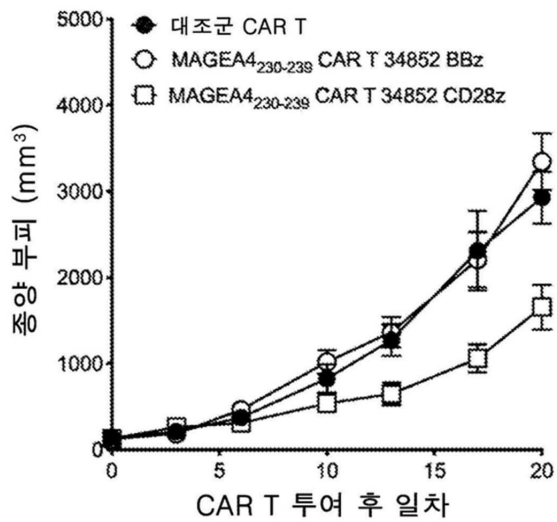
도면10



도면11



도면12



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING CANCER

<130> RPB-02125

<140> PCT/US2021/030625

<141> 2021-05-04

<150> 63/020,177

<151> 2020-05-05

<160> 41

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 1

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn

1 5 10 15

Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu

 20 25 30

Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro

 35

<210> 2

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 2

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

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val

 20 25

<210> 3

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"
 <400> 3
 Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
 1 5 10 15
 Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
 20 25 30
 Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

 35 40
 <210> 4
 <211> 317
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 4
 Met Ser Ser Glu Gln Lys Ser Gln His Cys Lys Pro Glu Glu Gly Val
 1 5 10 15
 Glu Ala Gln Glu Glu Ala Leu Gly Leu Val Gly Ala Gln Ala Pro Thr
 20 25 30
 Thr Glu Glu Gln Glu Ala Ala Val Ser Ser Ser Ser Pro Leu Val Pro
 35 40 45
 Gly Thr Leu Glu Glu Val Pro Ala Ala Glu Ser Ala Gly Pro Pro Gln
 50 55 60
 Ser Pro Gln Gly Ala Ser Ala Leu Pro Thr Thr Ile Ser Phe Thr Cys
 65 70 75 80
 Trp Arg Gln Pro Asn Glu Gly Ser Ser Ser Gln Glu Glu Glu Gly Pro
 85 90 95
 Ser Thr Ser Pro Asp Ala Glu Ser Leu Phe Arg Glu Ala Leu Ser Asn
 100 105 110
 Lys Val Asp Glu Leu Ala His Phe Leu Leu Arg Lys Tyr Arg Ala Lys
 115 120 125

Glu Leu Val Thr Lys Ala Glu Met Leu Glu Arg Val Ile Lys Asn Tyr
 130 135 140
 Lys Arg Cys Phe Pro Val Ile Phe Gly Lys Ala Ser Glu Ser Leu Lys
 145 150 155 160
 Met Ile Phe Gly Ile Asp Val Lys Glu Val Asp Pro Ala Ser Asn Thr
 165 170 175
 Tyr Thr Leu Val Thr Cys Leu Gly Leu Ser Tyr Asp Gly Leu Leu Gly
 180 185 190
 Asn Asn Gln Ile Phe Pro Lys Thr Gly Leu Leu Ile Ile Val Leu Gly
 195 200 205
 Thr Ile Ala Met Glu Gly Asp Ser Ala Ser Glu Glu Glu Ile Trp Glu
 210 215 220
 Glu Leu Gly Val Met Gly Val Tyr Asp Gly Arg Glu His Thr Val Tyr
 225 230 235 240
 Gly Glu Pro Arg Lys Leu Leu Thr Gln Asp Trp Val Gln Glu Asn Tyr
 245 250 255
 Leu Glu Tyr Arg Gln Val Pro Gly Ser Asn Pro Ala Arg Tyr Glu Phe
 260 265 270
 Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Ala Glu Thr Ser Tyr Val Lys Val Leu
 275 280 285
 Glu His Val Val Arg Val Asn Ala Arg Val Arg Ile Ala Tyr Pro Ser
 290 295 300
 Leu Arg Glu Ala Ala Leu Leu Glu Glu Glu Gly Val
 305 310 315
 <210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 5

Lys Val Leu Glu His Val Val Arg Val

1 5

<210> 6

<211> 478

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 6

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 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 Val Ser Ile 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 Asn Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Gly Ser Glu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
 180 185 190

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 195 200 205

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Lys Asp Ser Ser
 210 215 220

Tyr Arg Ser Ser Ser Arg Ala Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
 225 230 235 240

Gly Leu Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr
 245 250 255

Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser
 260 265 270

Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly
 275 280 285

Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp
 290 295 300

Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile
 305 310 315 320

Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys
 325 330 335

Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys
 340 345 350

Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val
 355 360 365

Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn
 370 375 380

Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
 385 390 395 400

Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
 405 410 415

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

420 425 430
 Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
 435 440 445

Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
 450 455 460
 Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 465 470 475

<210> 7

<211> 474

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 7

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 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 Val Ser Ile 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 Asn Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly
 100 105 110

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu
 115 120 125

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

Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
 340 345 350

Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
 355 360 365

Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
 370 375 380

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

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

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

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

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

Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 465 470

<210> 9

<211> 466

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<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 Ser 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 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 Thr Pro Pro
 85 90 95
 Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly
 100 105 110
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu
 115 120 125
 Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
 130 135 140
 Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Glu Tyr Tyr Met Thr Trp
 145 150 155 160
 Ile Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser
 165 170 175
 Ser Ser Gly Phe Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
 180 185 190
 Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe Leu Gln Met Asn
 195 200 205
 Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly
 210 215 220
 Val Thr Asp Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 225 230 235 240
 Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
 245 250 255
 Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys
 260 265 270
 His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp
 275 280 285
 Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val

1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Ile Phe Asp 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 Leu Ile Ser Gly Asp Gly Asp Ile Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

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

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

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

Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser
 260 265 270

Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly
 275 280 285

Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp
 290 295 300

Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile
 305 310 315 320

Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys
 325 330 335

Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys
 340 345 350

Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val
 355 360 365

Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn
 370 375 380

Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
 385 390 395 400

Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
 405 410 415

Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
 420 425 430

Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
 435 440 445

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

Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 465 470 475

<210> 11

<211> 474

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 11

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Ile Phe Asp 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 Leu Ile Ser Gly Asp Gly Asp Ile Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Lys Asp Trp Val Phe Gly Val Val Met Thr His Tyr Trp Tyr Phe
 100 105 110

Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly
 115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile
 130 135 140

Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Glu Gly Asp Arg
145 150 155 160

Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Tyr Leu Asn
 165 170 175

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly
 180 185 190

Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 195 200 205

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

Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

465 470

<210> 12

<211> 466

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 12

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

1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Asp Ile Ile Tyr Ser Asn

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Ser Ser Ile

85 90 95

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

100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu

115 120 125

Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys

130 135 140

Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Val His Trp Val Arg

145 150 155 160

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

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

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

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

Pro Arg
 465

<210> 13

<211> 462

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 13

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

1 5 10 15
 Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Asp Ile Ile Tyr Ser Asn
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
 35 40 45

Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Ala Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80
 Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Ser Ser Ile
 85 90 95

Ser Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
 100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu
 115 120 125

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

370 375 380
 Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg

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

405 410 415
 Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg

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

435 440 445
 Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

450 455 460

<210> 14

<211> 1411

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 14

catccagatg acccagtctc catctccct gtctgcatct gtaggagaca gagtccacat 60

cattgccgg gcaagtcaga gcattagcag ctatttaaatt tggatcagc agaaaccagg 120

gaaagcccct aagctcctga tctatgctgc atccagtttg caaagtgggg tcccgtcaag 180

gttcagtggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc atcagcagtc tgcaacctga 240

agattttgca acttactact gtcaacagag ttacagtacc cctccgatca ccttcggcca 300

agggacacga ctggagatta aacgaggtgg aggcggtagt ggcggaggcg gaagtgggtg 360

aggaggctca caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggagggtc 420

cctgagactc tctgtgagc cctctggatt cactttcagt gaatactaca tgacctggat 480

ccgccaggct ccagggcagg ggctggagtg ggtttcatac attagtagta gtggttttaa 540

catatactac gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tcaagggaca acgccaagaa 600

ctcactgttt ctgcaaatga acagcctgag agtcgaggac acggccgtat attactgtgc 660

gagagaaggt gtaacggacg gtatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcacctctc 720

ctcaggaggt ggtggaagta ctaccactcc tgetccccgc cccccaacac ctgctccaac 780
tattgcatcc caaccactct ccctcagacc cgaagcttgt cccccgcgc cgggaggtgc 840
tgttcacact agaggactcg attttgcttg cgacatttat atctgggccc cacttgcagg 900
tacttgcgga gtattgtctg tctcacttgt tattactctt tattgcaaac ggggcagaaa 960
gaaactcctg tatatattca aacaaccatt tafgagacca gtacaaacta ctcaagagga 1020
agatggctgt agctgccgat ttccagaaga agaagaagga ggatgtgaac tgagagtga 1080

gttcagcagg agcgcagacg cccccgcgta ccagcagggc cagaaccagc tctataacga 1140
gctcaatcta ggacgaagag aggagtacga tgttttggac aagagacgtg gccgggaccc 1200
tgagatgggg gaaagccga gaaggaagaa ccctcaggaa ggcctgtaca atgaactgca 1260
gaaagataag atggcggagg cctacagtga gattgggatg aaaggcgagc gccggagggg 1320
caaggggcac gatggccttt accaggtct cagtacagcc accaaggaca cctacgacgc 1380
ccttcacatg caggccctgc cccctcgcta a 1411

<210> 15

<211> 1413

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 15

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccgtca 180
aggttcagt gcaagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc 300
caagggacac gactggagat taaacagagt ggagggcgta gtggcggagg cggaaagtgt 360

ggaggaggct cacaggtgca gctggtggag tctgggggag gcttgggtcaa gcctggaggg 420
tccttgagac tctcctgtgc agcctctgga ttcactttca gtgaatacta catgacctgg 480
atccgccagg ctccagggca ggggctggag tgggtttcat acattagtag tagtggtttt 540
aacatatact acgcagactc tgtgaagggc cgattcacca tctcaaggga caacgccaag 600
aactcactgt ttctgcaaat gaacagcctg agagtcgagg acacggccgt atattactgt 660
gcgagagaag gtgtaacgga cggtatggac gtctggggcc aagggaccac ggtcacctgc 720

tcctcaggag gtggtggaag tactaccact cctgctcccc gcccccaac acctgctcca 780

actattgcat cccaaccact ctccctcaga cccgaagctt gtcgccccgc cgccggaggt 840

gctgttcaca ctagaggact cgattttgct tgcgacattt atatctgggc cccacttgea 900

ggtacttgcg gagtattgct gctctcactt gttattactc tttattgcaa acggggcaga 960

aagaaactcc tgtatatatt caaacaacca tttatgagac cagtacaaac tactcaagag 1020

gaagatggct gtagctgccg atttcagaa gaagaagaag gaggatgtga actgagagtg 1080

aagttcagca ggagcgcaga cgccccgcg taccagcagg gccagaacca gctctataac 1140

gagctcaatc taggacgaag agaggagtac gatgttttgg acaagagacg tggccgggac 1200

cctgagatgg ggggaaagcc gagaaggaag aaccctcagg aaggcctgta caatgaactg 1260

cagaaagata agatggcgga ggcctacagt gagattggga tgaaaggcga gcgccggagg 1320

ggcaaggggc acgatggcct ttaccagggt ctcagtacag ccaccaagga cacctacgac 1380

gcccttcaca tgcaggcctt gcccctcgc taa 1413

<210> 16

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 16

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 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 Val Ser	Ile 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 Asn	Ser Leu Gln Pro
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala	Thr Tyr Ser Cys	Gln Gln Thr Tyr	Ser Thr Pro Pro

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Gly 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 Thr Pro Pro

85 90 95

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

100 105

<210> 19

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 19

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

1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Asp Ile Ile Tyr Ser Asn

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80
 Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Ser Ser Ile
 85 90 95
 Ser Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 20

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 20

Glu Val Gln Leu Leu 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 Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Met Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Val Ile Ser Gly Ser Gly Ser Glu 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
 Val Lys Asp Ser Ser Tyr Arg Ser Ser Ser Arg Ala Tyr Tyr Tyr Tyr
 100 105 110
 Gly Met Asp Val Trp Gly Leu Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 21

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 21

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

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

<210> 22

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 22

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Ile Phe Asp 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 Leu Ile Ser Gly Asp Gly Asp Ile Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Lys Asp Trp Val Phe Gly Val Val Met Thr His Tyr Trp Tyr Phe
 100 105 110

Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 23

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 23

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met
 50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80

Glu Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala

85

90

95

Arg Asp Gly His Phe His Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu

100

105

110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 24

<211> 326

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 24

acatccagat gaccagctct ccatectccc tgtctgcate tgtaggagac agagtcacca 60
 tcacttgccg ggcaagtcag agcattagca gctatttaaa ttggtatcag cagaaaccag 120
 ggaaagcccc taagctcctg atctatgctg catccagttt gcaaagtggg gtcccgtaa 180

ggttcagtgg cagtggatct gggacagatt tcaactctcac catcagcagt ctgcaacctg 240
 aagattttgc aacttactac tgtcaacaga gttacagtac ccctccgac accttcggcc 300
 aaggacacg actggagatt aaacga 326

<210> 25

<211> 353

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 25

agggtcagct ggtggagtct gggggagget tggtaagcc tggagggtcc ctgagactct 60
 cctgtgcagc ctctggattc actttcagtg aatactacat gacctggatc cgccaggctc 120

cagggcaggg gctggagtgg gtttcataca ttagtagtag tggttttaac atatactacg 180
 cagactctgt gaagggccga ttcaccatct caagggacaa cgccaagaac tcaactgtttc 240
 tgcaaatgaa cagcctgaga gtcgaggaca cggccgtata ttactgtgcg agagaaggtg 300

taacggacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc tca 353

<210> 26

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 26

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

1 5 10 15
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr

20 25 30
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys

35 40 45
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys

50 55 60
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg

65 70 75 80
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala

85 90 95
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

100 105 110

<210> 27

<211> 69

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 27

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala

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

65

<210

> 28

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 28

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

<210> 29

<211> 732

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 29

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 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Arg Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

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

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

 Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro
 245 250 255
 Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro

Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu
 515 520 525
 Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr
 530 535 540
 Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr
 545 550 555 560

 Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp
 565 570 575
 Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile
 580 585 590
 Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe
 595 600 605
 Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe
 610 615 620

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

 Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp
 690 695 700
 Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala
 705 710 715 720
 Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 725 730

<210> 30

<211> 728

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 30

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 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Ile Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Phe Asp Asn Val Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
 100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
 115 120 125

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys
 130 135 140

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg
145 150 155 160

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

Ser Gly Ser Ile Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
 180 185 190

Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 195 200 205

Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr His Cys Ala Lys Asp Trp Arg Arg

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

 Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr
 515 520 525
 Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro
 530 535 540
 Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys
 545 550 555 560
 Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser
 565 570 575

 Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp
 580 585 590
 Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr
 595 600 605
 Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly
 610 615 620
 Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val
 625 630 635 640

 Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys
 645 650 655
 Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr
 660 665 670
 Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn
 675 680 685
 His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys
 690 695 700

 Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr

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

 85 90 95
 Ala Lys Asp Trp Arg Arg Thr Asn Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 33
 <211> 739
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 33
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Thr Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg 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 Thr Ile Ser Gly Asn Ser Asp Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

305 310 315 320
 Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys

 325 330 335
 Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys
 340 345 350
 Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val
 355 360 365
 Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn
 370 375 380
 Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val

 385 390 395 400
 Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
 405 410 415
 Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
 420 425 430
 Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
 435 440 445
 Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys

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

 515 520 525
 Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr
 530 535 540
 Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr
 545 550 555 560

Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro
 565 570 575
 Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly
 580 585 590
 Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys
 595 600 605
 Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile
 610 615 620
 Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His
 625 630 635 640
 Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp
 645 650 655
 Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile
 660 665 670
 Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro
 675 680 685
 Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr
 690 695 700
 Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val
 705 710 715 720
 Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu
 725 730 735
 Leu Tyr Lys

<210> 34

<211> 735

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 34

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
 500 505 510

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
 515 520 525

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
 530 535 540

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 545 550 555 560

Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 565 570 575

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 580 585 590

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 595 600 605

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 610 615 620

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
 625 630 635 640

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
 645 650 655

Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
 660 665 670

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
 675 680 685

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
 690 695 700

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
 705 710 715 720

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 725 730 735

<210> 35

<211> 2220

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 35

```

gaggtgcagc tgctggagag cggaggaggc ctggtgcagc ctggaggaag cctgaggctg      60
acatgcgcag catccgctt cacctttcgc tcttacgcaa tgagctgggt gcggcaggca      120
ccaggcaagg gactggagtg ggtgagcaca atctccggca attctgacag cacctactat      180

gccgattccg tgaagggccg ctttacaatc tcccgggaga actctaagaa tacctgtat      240
ctgcagatga acitctctcg ggccgaggac acagccgtgt actattgcgc caaggatctg      300
cacatcacca tggtagagagg agcaatcca gcagacgtgt tcgatatctg gggccagggc      360
acaatggtga ccgtgagctc cggaggagga ggatccggcg gaggaggctc tggaggagga      420
ggaagcgaca tccagatgac ccagagccct tctagcctgt ccgcctctgt gggcgataga      480
gtgacaatca cctgtagggc cagccagtcc atctctttt acctgaattg gtatcagcag      540
aagcccggca aggccctaa gctgctgac tacgcagcat cctctctgca gagcggagtg      600

ccatccaggt tcagcggatc cggctctgag acagacttta cactgacat cagctccctg      660
cagcctgagg atttcgccac ctactattgc cagcagagct attccacacc ccctatcacc      720
tttgccagg gaaccaggct ggagatcaag ggaggaggag gatccaccac aaccccagcc      780
cctcgccac ccacaccagc accaaccatc gcatctcagc cactgagcct gagacctgag      840
gcctgtaggc cagcagcagg aggagcagtg cacaccaggg gactggactt cgctgcgat      900
atctacatct gggcaccact ggcaggaaca tgtggcgtgc tgctgctgag cctggtcac      960
acctgtact gcaagagagg caggaagaag ctgctgtata tcttaagca gccttcatg      1020

cggcccgtgc agacaacca ggaggaggac ggctgctcct gtagattccc tgaagaagag      1080
gagggaggat gtgagctgag ggtgaagttt tctcggagcg ccgatgcacc agcataccag      1140
cagggacaga accagctgta taacgagctg aatctgggcc ggagagagga gtacgacgtg      1200
ctggataaga ggcggggcag agacctgag atgggaggca agccccggag aaagaacct      1260
caggagggcc tglacaatga gctgcagaag gacaagatgg ccgaggccta tagcgagatc      1320
ggcatgaagg gagagaggcg ccggggcaag ggacacgatg gcctgtacca ggcctgtcc      1380
acagccacca aggacacata tgatgccctg cacatgcagg ccctgcctcc aagaggatcc      1440

```

ggagccacca acTTTTctct gctgaagcag gcaggcgacg tggaggagaa tcttgacca 1500
 atggtgagca agggagagga gctgttcacc ggagtgggtc caatcctggt ggagctggac 1560
 ggcgatgtga atggccacaa gTTTTccgtg tctggagagg gagagggcga tgcaacatac 1620
 ggcaagctga ccctgaagtt catctgcaca accggcaagc tgcccgtgcc ttggccaaca 1680
 ctggtgacaa ccctgaccta cggcgtgcag tgtttctcta gataccaga ccacatgaag 1740
 cagcacgatt tctttaagag cgccatgcc gagggctacg tgcaggagag aaccatcttc 1800
 ttttaaggacg atggcaacta taagacaagg gccgaggtga agttcgaggg cgacacccctg 1860

gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttttaaggagg atggcaatat cctgggccac 1920
 aagctggagt acaactataa ttctcacaac gtgtacatca tggccgataa gcagaagaac 1980
 ggcatcaagg tgaacttcaa gatcaggcac aatctgagg acggctccgt gcagctggcc 2040
 gatcactacc agcagaacac accaatcggc gacggccctg tgctgctgcc agataatcac 2100
 tatctgtcta cccagagcgc cctgtccaag gacccaacg agaagcgcga tcacatggtg 2160
 ctgctggagt tcgtgacagc agcaggaatc acctgggaa tggacgagct gtataagtga 2220

<210> 36

<211> 2208

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 36

gaggtgcagc tgctggagag cggaggaggc ctggtgcagc ctggaggatc tctgaggctg 60
 acctgcgcag caagcggett cacatttcgc tctacgcaa tgtcttgggt gcggcaggca 120
 ccaggcaagg gactggagtg ggtgagcacc atctcggca attctgacag cacatactat 180
 gccgattctg tgaagggcgg ctttaccatc agccgggaga actccaagaa tacactgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag ggccgaggac accgccgtgt actattgtgc caaggatctg 300
 cacatcaaa tggcgcggc agcaatcca gcagacgtgt tcgatatctg gggccagggc 360

accatggtga cagtgagctc cggaggagga ggatccggcg gaggaggctc tggaggagga 420
 ggaagcgaca tccagatgac ccagagccct tctagcctgt ccgcctctgt gggcgataga 480
 gtgaccatca catgcagggc cagccagtcc atctctttct acctgaactg gtatcagcag 540
 aagccaggca aggcccccaa gctgctgac tacgcagcat cctctctgca gtctggagtg 600
 ccaagcaggt tcagcggatc cggatctgag accgacttta ccctgacaat cagctccctg 660

cagcctgagg atttcgccac atactattgt cagcagagct attccacccc ccctatcaca 720
 ttggccagg gaaccaggct ggagatcaag ggaggaggcg gcagcatcga agtgatgtac 780

ccaccccctt atctggacaa cgagaagtcc aatggcacia tcatccacgt gaaggcaag 840
 cacctgtgcc caagccctct gttcccagga ccatccaagc ccttttgggt gctggtggtg 900
 gtgggaggcg tgctggcctg ttaactccctg ctggtgaccg tggccttcat catcttttgg 960
 gtgagatcta agcgcagccg gctgetgcac tctgattata tgaatatgac cccacggaga 1020
 cctggcccaa caagaaagca ctaccagcca tatgcaccac caagggactt cgcagcctac 1080
 agaagcaggg tgaagtttct tccgagcgcc gatgcaccag cataccagca gggacagaac 1140
 cagctgtata acgagctgaa tctgggcagg cgcgaggagt atgacgtgct ggataagcgg 1200

agaggcagag accctgagat gggaggcaag ccaaggagga agaaccctca ggaggcctg 1260
 tacaatgagc tgcagaagga caagatggcc gaggcctata gcgagatcgg catgaaggga 1320
 gagcggagaa ggggcaaggg acacgatggc ctgtaccagg gcctgtccac cgccacaaag 1380
 gacacctatg atgccctgca catgcaggcc ctgcctccaa ggggatccgg agccacaaac 1440
 ttttctctgc tgaagcaggc aggcgacgtg gaggagaatc caggacctat ggtgtccaag 1500
 ggagaggagc tgttcaccgg agtgggtgcca atcctggtgg agctggacgg cgatgtgaat 1560
 ggccacaagt tttccgtgtc tggagaggga gagggcgatg caacctacgg caagctgaca 1620

ctgaagtcca tctgcaccac aggcaagctg ccagtgcctt ggcctaccct ggtgaccaca 1680
 ctgacatacg gcgtgcagtg tttctcccgc tctctgacc acatgaagca gcacatttc 1740
 ttttaagtctg ccatgccaga gggctacgtg caggagcgca ccatcttctt taaggacgat 1800
 ggcaactata agacccgggc cgaggtgaag ttcgaggcg acacactggt gaacagaatc 1860
 gagctgaagg gcatcgactt taaggaggat ggcaatatcc tgggccacaa gctggagtac 1920
 aactataata gccacaacgt gtacatcatg gccgataagc agaagaacgg catcaaggtg 1980
 aacttaaga tccggcacia tctcaggac ggctccgtgc agctggccga tcaactaccg 2040

cagaacacc caatcggcga cggacctgtg ctgctgccag ataactacta tctgtccaca 2100
 cagtctgccc tgagcaagga ccccaacgag aagagagatc acatggtgct gctggagttc 2160
 gtgaccgcag caggaatcac actgggaatg gacgagctgt acaagtga 2208

<210> 37

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 37

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 Phe 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 Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Glu 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 Thr Pro Pro
 85 90 95

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

<210> 38

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 38

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
 1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 35 40 45

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

gccgattctg tgaagggccg ctttaccatc agccgggaga actccaagaa tacactgtat 240
ctgcagatga acagcctgag ggccgaggac accgccgtgt actattgtgc caaggatctg 300
cacatcacia tggatgcgagg agcaatccca gcagacgtgt tcgatatctg gggccagggc 360
accatggtga cagtgagctc c 381

<210> 41

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

6xHis tag"

<400> 41

His His His His His His

1

5