(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0149606
(43) 공개일자 2022년11월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 35/17* (2015.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2887 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7034525
(22) 출원일자(국제) 2021년03월02일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년10월04일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/020511
(87) 국제공개번호 WO 2021/178430
국제공개일자 2021년09월10일
(30) 우선권주장
62/984,139 2020년03월02일 미국(US)
63/084,138 2020년09월28일 미국(US)

(71) 출원인
더 리전츠 오브 더 유니버시티 오브 캘리포니아
미국 캘리포니아주 94607 오클랜드 프랭클린 스트리트 1111 12층
(72) 발명자
천, 이보네 유-슈안
미국, 캘리포니아 90095-7191, 로스앤젤레스 윌셔 블러바드 10889 스위트 920 유씨엘에이 테크놀로지 디벨롭먼트 그룹 내
천, 씨민
미국, 캘리포니아 90095-7191, 로스앤젤레스 윌셔 블러바드 10889 스위트 920 유씨엘에이 테크놀로지 디벨롭먼트 그룹 내
(74) 대리인
특허법인이룸리온

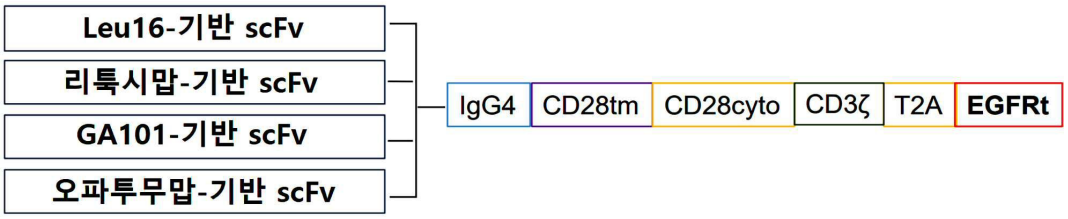
전체 청구항 수 : 총 230 항

(54) 발명의 명칭 **암 치료를 위한 키메라 항원 수용체 및 관련 방법 및 조성물**

(57) 요 약

본 개시내용의 측면은 항-종양 활성을 향상시키는 신규한 키메라 항원 수용체로의 통합(incorporation)에 유용한 신규한 scFv 분자에 관한 것이다. 추가 측면은 아미노 근위부터 카르복시 근위 말단까지 순서대로 scFv, 막관통 도메인, 비틀림 링커 및 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 영역을 포함하는 CAR을 포함하는 폴리펩타이드에 관한 것으로, 여기서 상기 비틀림 링커는 1 내지 12개의 알라닌 잔기를 포함한다. 또한, 본 개시내용의 폴리펩타이드를 암호화하는 서열을 포함하는 핵산, 본 개시내용의 핵산을 포함하는 렌티바이러스 벡터와 같은 벡터, 본 개시내용의 핵산 및/또는 폴리펩타이드를 포함 및/또는 발현하는 세포 및 본 개시내용의 세포 구현예를 포함하는 세포의 집단이 기재된다. 또한, 폴리펩타이드를 발현하는 세포의 제조방법 및 본 개시내용의 폴리펩타이드 및 세포 조성물로 환자를 치료하는 방법이 제공된다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
A61K 39/001124 (2018.08)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 2317/56 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

폴리펩타이드로서,

경쇄 가변 영역의 아미노-근위(proximal)부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 경쇄 프레임워크 영역 1 (LFR1), 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LCDR1), 경쇄 프레임워크 영역 2 (LFR2), 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LCDR2), 경쇄 프레임워크 영역 3 (LFR3), 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LCDR3) 및 경쇄 프레임워크 영역 4 (LFR4)를 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL); 및

중쇄 가변 영역의 아미노-근위부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 중쇄 프레임워크 영역 1 (HFR1), 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HCDR1), 중쇄 프레임워크 영역 2 (HFR2), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HCDR2), 중쇄 프레임워크 영역 3 (HFR3), 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HCDR3) 및 중쇄 프레임워크 영역 4 (HFR4)를 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH);

을 포함하는 항-CD20 단일 쇄 가변 단편 (scFv)을 포함하며,

상기 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3은 각각 서열번호 29, 30, 31, 22, 12, 13 및 14와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 상기 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3은 각각 서열번호 26, 27, 28, 18, 9, 10 및 11과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 2

폴리펩타이드로서,

경쇄 가변 영역의 아미노-근위(proximal)부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 경쇄 프레임워크 영역 1 (LFR1), 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LCDR1), 경쇄 프레임워크 영역 2 (LFR2), 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LCDR2), 경쇄 프레임워크 영역 3 (LFR3), 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LCDR3) 및 경쇄 프레임워크 영역 4 (LFR4)를 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL); 및

중쇄 가변 영역의 아미노-근위부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 중쇄 프레임워크 영역 1 (HFR1), 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HCDR1), 중쇄 프레임워크 영역 2 (HFR2), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HCDR2), 중쇄 프레임워크 영역 3 (HFR3), 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HCDR3) 및 중쇄 프레임워크 영역 4 (HFR4)를 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH);

을 포함하는 항-CD20 단일 쇄 가변 단편 (scFv)을 포함하며,

상기 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3은 각각 서열번호 5의 가변 영역의 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 상기 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3은 각각 서열번호 6의 가변 영역의 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및/또는 LCDR3은 서열번호 5의 가변 영역의 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및/또는 LCDR3의 아미노산 서열을 포함하고/하거나, 상기 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및/또는 HCDR3는 서열번호 5의 가변 영역의 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및/또는 HCDR3의 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및/또는 LCDR3은 각각 서열번호 29, 30, 31, 22, 12, 13 및 14의 아미노산 서열을 포함하고/하거나 상기 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및/또는 HCDR3은 각각 서열번호 26, 27, 28, 18, 9, 10 및 11의 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 5

폴리펩타이드로서,

경쇄 가변 영역의 아미노-근위(proximal)부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 LFR1, LCDR1, LFR2, LCDR2, LFR3, LCDR3 및 LFR4를 포함하는 경쇄 가변 영역; 및

중쇄 가변 영역의 아미노-근위부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 HFR1, HCDR1, HFR2, HCDR2, HFR3, HCDR3 및 HFR4를 포함하는 중쇄 가변 영역;

을 포함하는 항-CD20 scFv를 포함하며,

상기 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3은 각각 서열번호 19, 20, 21, 22, 24, 13 및 25와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 상기 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3은 각각 서열번호 15, 16, 17, 18, 9, 10 및 23과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 6

폴리펩타이드로서,

경쇄 가변 영역의 아미노-근위(proximal)부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 경쇄 프레임워크 영역 1 (LFR1), 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LCDR1), 경쇄 프레임워크 영역 2 (LFR2), 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LCDR2), 경쇄 프레임워크 영역 3 (LFR3), 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LCDR3) 및 경쇄 프레임워크 영역 4 (LFR4)를 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL); 및

중쇄 가변 영역의 아미노-근위부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 중쇄 프레임워크 영역 1 (HFR1), 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HCDR1), 중쇄 프레임워크 영역 2 (HFR2), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HCDR2), 중쇄 프레임워크 영역 3 (HFR3), 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HCDR3) 및 중쇄 프레임워크 영역 4 (HFR4)를 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH);

을 포함하는 항-CD20 단일 쇄 가변 단편 (scFv)을 포함하며,

상기 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3는 각각 서열번호 7의 가변 영역의 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 상기 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3는 각각 서열번호 8의 가변 영역의 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 7

제5항 또는 제6항에 있어서,

상기 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및/또는 LCDR3는 서열번호 7의 가변 영역의 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및/또는 LCDR3의 아미노산 서열을 포함하고/하거나, 상기 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및/또는 HCDR3는 서열번호 8의 가변 영역의 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및/또는 HCDR3의 아

미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 8

제5항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및/또는 LCDR3는 각각 서열번호 19, 20, 21, 22, 24, 13 및 25의 아미노산 서열을 포함하고; 상기 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및/또는 HCDR3는 각각 서열번호 15, 16, 17, 18, 9, 10 및 23의 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 9

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 5와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 6과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 VL은 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하고 상기 VH는 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 11

제5항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 7과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 8과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 VL은 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VH는 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 13

폴리펩타이드로서,

경쇄 가변 영역의 아미노-근위(proximal)부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 경쇄 프레임워크 영역 1 (LFR1), 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LCDR1), 경쇄 프레임워크 영역 2 (LFR2), 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LCDR2), 경쇄 프레임워크 영역 3 (LFR3), 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LCDR3) 및 경쇄 프레임워크 영역 4 (LFR4)를 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL); 및

중쇄 가변 영역의 아미노-근위부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 중쇄 프레임워크 영역 1 (HFR1), 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HCDR1), 중쇄 프레임워크 영역 2 (HFR2), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HCDR2), 중쇄 프레임워크 영역 3 (HFR3), 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HCDR3) 및 중쇄 프레임워크 영역 4 (HFR4)를 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH);

을 포함하는 항-GD2 단일 쇄 가변 단편 (scFv)을 포함하며,

상기 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3은 각각 서열번호 136, 137, 138, 139, 113, 114 및 115와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 상기 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3은 각각 서열번호 132, 133, 134, 135, 110, 111 및 112와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 14

폴리펩타이드로서,

경쇄 가변 영역의 아미노-근위(proximal)부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 경쇄 프레임워크 영역 1 (LFR1), 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LCDR1), 경쇄 프레임워크 영역 2 (LFR2), 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LCDR2), 경쇄 프레임워크 영역 3 (LFR3), 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LCDR3) 및 경쇄 프레임워크 영역 4 (LFR4)를 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL); 및

중쇄 가변 영역의 아미노-근위부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 중쇄 프레임워크 영역 1 (HFR1), 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HCDR1), 중쇄 프레임워크 영역 2 (HFR2), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HCDR2), 중쇄 프레임워크 영역 3 (HFR3), 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HCDR3) 및 중쇄 프레임워크 영역 4 (HFR4)를 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH);

을 포함하는 항-GD2 단일 쇄 가변 단편 (scFv)을 포함하며,

상기 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3는 각각 서열번호 141의 가변 영역의 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 상기 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3는 각각 서열번호 140의 가변 영역의 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서,

상기 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및/또는 LCDR3는 서열번호 141의 가변 영역의 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및/또는 LCDR3의 아미노산 서열을 포함하고/하거나, 상기 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및/또는 HCDR3는 서열번호 140의 가변 영역의 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및/또는 HCDR3의 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 16

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 141과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 140과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 VL은 서열번호 140의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VH는 서열번호 141의 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 18

폴리펩타이드로서,

경쇄 가변 영역의 아미노-근위(proximal)부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 경쇄 프레임워크 영역 1 (LFR1), 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LCDR1), 경쇄 프레임워크 영역 2 (LFR2), 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LCDR2), 경쇄 프레임워크 영역 3 (LFR3), 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LCDR3) 및 경쇄 프레임워크 영역 4 (LFR4)를 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL); 및

중쇄 가변 영역의 아미노-근위부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 중쇄 프레임워크 영역 1 (HFR1), 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HCDR1), 중쇄 프레임워크 영역 2 (HFR2), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HCDR2), 중쇄 프레임워크 영역 3 (HFR3), 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HCDR3) 및 중쇄 프레임워크 영역 4 (HFR4)를 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH);

을 포함하는 항-GD2 단일 쇄 가변 단편 (scFv)을 포함하며,

상기 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3는 각각 서열번호 120, 121, 122, 123, 129, 130 및 131과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 상기 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3는 각각 서열번호 116, 117, 118, 119, 126, 127 및 128과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 19

폴리펩타이드로서,

경쇄 가변 영역의 아미노-근위(proximal)부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 경쇄 프레임워크 영역 1 (LFR1), 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LCDR1), 경쇄 프레임워크 영역 2 (LFR2), 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LCDR2), 경쇄 프레임워크 영역 3 (LFR3), 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LCDR3) 및 경쇄 프레임워크 영역 4 (LFR4)를 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL); 및

중쇄 가변 영역의 아미노-근위부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 중쇄 프레임워크 영역 1 (HFR1), 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HCDR1), 중쇄 프레임워크 영역 2 (HFR2), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HCDR2), 중쇄 프레임워크 영역 3 (HFR3), 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HCDR3) 및 중쇄 프레임워크 영역 4 (HFR4)를 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH);

을 포함하는 항-GD2 단일 쇄 가변 단편 (scFv)을 포함하며,

상기 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3는 각각 서열번호 144의 가변 영역의 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 상기 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3는 각각 서열번호 143의 가변 영역의 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 20

제13항 또는 제14항에 있어서,

상기 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및/또는 LCDR3는 서열번호 144의 가변 영역의 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및/또는 LCDR3의 아미노산 서열을 포함하고/하거나, 상기 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및/또는 HCDR3는 서열번호 143의 가변 영역의 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및/또는 HCDR3의 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 21

제18항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 144와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 143과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 22

제21항에 있어서,

상기 VL은 서열번호 144의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VH는 서열번호 143의 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리펩타이드는 상기 VH와 VL 사이에 링커를 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 24

제23항에 있어서,

상기 링커는 4 내지 40개 아미노산의 길이인, 폴리펩타이드.

청구항 25

제23항에 있어서,

상기 링커는 적어도 4개의 글리신 및/또는 세린 잔기를 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 26

제23항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 링커는 $(GGGGS)_n$을 포함하고, 여기서 n은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6인, 폴리펩타이드.

청구항 27

제24항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 링커는 GSTSGGGSGGGSGGGGSS (서열번호 32)를 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 28

제23항 또는 제24항에 있어서,

상기 링커는 아미노산 서열 $(EAAAK)_n$을 포함하거나 이로 구성되고, 여기서 n은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6인, 폴리펩타이드.

청구항 29

제24항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 링커는 GGGGS를 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 30

제23항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 링커는 $(GGGGS)_4$인, 폴리펩타이드.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 VH는 상기 VL에 아미노 근위(amino proximal)인, 폴리펩타이드.

청구항 32

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 VH는 상기 VL에 카르복시 근위(carboxy proximal)인, 폴리펩타이드.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리펩타이드는 상기 scFv, 막관통 도메인 및 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 영역을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 34

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리펩타이드는 단일 막관통 도메인 및/또는 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 단일 세포질 영역을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 35

제33항 또는 제34항에 있어서,

상기 폴리펩타이드는 아미노 근위 말단부터 카르복시 근위 말단까지 순서대로, 상기 scFv, 상기 막관통 도메인 및 상기 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 영역을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 36

제33항 또는 제34항에 있어서,

상기 CAR은 단일특이적인, 폴리펩타이드.

청구항 37

제33항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 CAR은 상기 막관통 도메인과 상기 scFv 사이에 세포외 스페이서를 더 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 38

제37항에 있어서,

상기 세포외 스페이서는 8 내지 1000개 아미노산의 길이인, 폴리펩타이드.

청구항 39

제38항에 있어서,

상기 세포외 스페이서는 8 내지 500개 아미노산의 길이인, 폴리펩타이드.

청구항 40

제39항에 있어서,

상기 세포외 스페이서는 100 내지 300개 아미노산의 길이인, 폴리펩타이드.

청구항 41

제39항에 있어서,

상기 세포외 스페이서는 100개 미만의 아미노산을 가지는, 폴리펩타이드.

청구항 42

제37항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포외 스페이서는 IgG4 힌지, CD8a 힌지, IgG1 힌지, CD34 힌지 또는 이들의 단편인, 폴리펩타이드.

청구항 43

제42항에 있어서,

상기 세포외 스페이서는 IgG4 힌지 또는 이의 단편을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 44

제37항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포외 스페이서는 CH1, CH2 및/또는 CH3 영역을 포함하거나 이를 더 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 45

제44항에 있어서,

상기 스페이서는 IgG4 힌지 폴리펩타이드, CH2 영역 및 CH3 영역을 포함하거나 이로 구성된, 폴리펩타이드.

청구항 46

제44항 또는 제45항에 있어서,

상기 CH2 영역은 L235E 및/또는 N297Q 치환을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 47

제42항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 스페이서는 서열번호 36과 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 48

제33항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 막관통 도메인은 T 세포 수용체의 알파 또는 베타 사슬, CD28, CD3e (엡실론), CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD123, CD134, CD137 또는 CD154 막관통 도메인인, 폴리펩타이드.

청구항 49

제48항에 있어서,

상기 막관통 도메인은 CD28 막관통 도메인인, 폴리펩타이드.

청구항 50

제48항에 있어서,

상기 막관통 도메인은 서열번호 37과 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 51

제33항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 1차 세포내 신호전달 도메인은 CD3-제타인, 폴리펩타이드.

청구항 52

제51항에 있어서,

상기 1차 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 39와 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 53

제33항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포질 영역은 하나 이상의 공자극 도메인을 더 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 54

제33항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포질 영역은 2개의 공자극 도메인을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 55

제53항 또는 제54항에 있어서,

상기 하나 이상의 공자극 도메인(들)은 4-1BB (CD137), CD28, IL-15Rα, OX40, CD2, CD27, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) 및/또는 ICOS (CD278) 중 하나 이상으로부터의 공자극 도메인을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 56

제55항에 있어서,

상기 하나 이상의 공자극 도메인(들)은 CD28으로부터의 공자극 도메인을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 57

제56항에 있어서,

상기 공자극 도메인은 서열번호 38과 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 58

제33항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리펩타이드는 상기 막관통 도메인과 상기 세포질 영역 사이에 비틀림 링커(torsional linker)를 더 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 59

제58항에 있어서,

상기 비틀림 링커는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산 잔기를 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 60

제59항에 있어서,

상기 아미노산 잔기들은 알라닌 잔기를 포함하거나 이로 구성된, 폴리펩타이드.

청구항 61

제59항에 있어서,

상기 비틀림 링커는 2 또는 4개의 알라닌 잔기로 구성되는, 폴리펩타이드.

청구항 62

폴리펩타이드로서,

아미노 근위부터 카르복시 근위 말단까지 순서대로, scFv, 막관통 도메인, 비틀림 링커 및 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 영역을 포함하며,

상기 비틀림 링커는 1 내지 12개의 알라닌 잔기를 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 63

제62항에 있어서,

상기 비틀림 링커는 2 또는 4개의 알라닌 잔기를 포함하거나 이로 구성된, 폴리펩타이드.

청구항 64

제62항 또는 제63항에 있어서,

상기 scFv는 VH 및 VL을 포함하고, 상기 VH와 VL 사이에 링커가 있는, 폴리펩타이드.

청구항 65

제64항에 있어서,

상기 링커는 4 내지 40개 아미노산의 길이인, 폴리펩타이드.

청구항 66

제64항에 있어서,

상기 링커는 적어도 4개의 글리신 및/또는 세린 잔기를 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 67

제64항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 링커는 $(GGGGS)_n$을 포함하고, 여기서 n은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6인, 폴리펩타이드.

청구항 68

제65항 또는 제66항에 있어서,

상기 링커는 GSTSGGGSGGGSGGGGSS (서열번호 32)를 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 69

제64항 또는 제65항에 있어서,

상기 링커는 아미노산 서열 $(EAAAK)_n$을 포함하거나 이로 구성되고, 여기서 n은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6인, 폴리펩타이드.

청구항 70

제65항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 링커는 GGGGS를 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 71

제64항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 링커는 $(GGGGS)_4$인, 폴리펩타이드.

청구항 72

제62항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 VH는 상기 VL에 아미노 근위인, 폴리펩타이드.

청구항 73

제62항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 VH는 상기 VL에 카르복시 근위인, 폴리펩타이드.

청구항 74

제62항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리펩타이드는 단일 막관통 도메인 및/또는 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 단일 세포질 영역을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 75

제62항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 CAR은 단일특이적인, 폴리펩타이드.

청구항 76

제62항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 CAR는 이중특이적인, 폴리펩타이드.

청구항 77

제62항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 CAR은 상기 막관통 도메인과 상기 scFv 사이에 세포외 스페이서를 더 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 78

제77항에 있어서,

상기 세포외 스페이서는 8 내지 1000개 아미노산의 길이인, 폴리펩타이드.

청구항 79

제78항에 있어서,

상기 세포외 스페이서는 8 내지 500개 아미노산의 길이인, 폴리펩타이드.

청구항 80

제79항에 있어서,

상기 세포외 스페이서는 100 내지 300개 아미노산의 길이인, 폴리펩타이드.

청구항 81

제79항에 있어서,

상기 세포외 스페이서는 100개 미만의 아미노산을 가지는, 폴리펩타이드.

청구항 82

제77항 내지 제81항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포외 스페이서는 IgG4 힌지, CD8a 힌지, IgG1 힌지, CD34 힌지 또는 이들의 단편인, 폴리펩타이드.

청구항 83

제82항에 있어서,

상기 세포외 스페이서는 IgG4 힌지 또는 이의 단편을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 84

제77항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포외 스페이서는 CH1, CH2 및/또는 CH3 영역을 포함하거나 이를 더 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 85

제84항에 있어서,

상기 스페이서는 IgG4 힌지 폴리펩타이드, CH2 영역 및 CH3 영역을 포함하거나 이로 구성된, 폴리펩타이드.

청구항 86

제84항 또는 제85항에 있어서,

상기 CH2 영역은 L235E 및/또는 N297Q 치환을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 87

제82항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 스페이서는 서열번호 36과 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 88

제62항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 막관통 도메인은 T 세포 수용체의 알파 또는 베타 사슬, CD28, CD3e (엡실론), CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD123, CD134, CD137 또는 CD154 막관통 도메인인, 폴리펩타이드.

청구항 89

제88항에 있어서,

상기 막관통 도메인은 CD28 막관통 도메인인, 폴리펩타이드.

청구항 90

제89항에 있어서,

상기 막관통 도메인은 서열번호 37과 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 91

제62항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 1차 세포내 신호전달 도메인은 CD3-제타인, 폴리펩타이드.

청구항 92

제91항에 있어서,

상기 1차 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 39와 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 93

제62항 내지 제92항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포질 영역은 하나 이상의 공자극 도메인을 더 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 94

제62항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포질 영역은 2개의 공자극 도메인을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 95

제93항 또는 제94항에 있어서,

상기 하나 이상의 공자극 도메인(들)은 4-1BB (CD137), CD28, IL-15Rα, OX40, CD2, CD27, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) 및/또는 ICOS (CD278) 중 하나 이상으로부터의 공자극 도메인을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 96

제95항에 있어서,

상기 하나 이상의 공자극 도메인(들)은 CD28으로부터의 공자극 도메인을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 97

제96항에 있어서,

상기 공자극 도메인은 서열번호 38과 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 98

제62항 내지 제97항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 scFv는 동일한 항원에 결합하는 상이한 항원 결합 영역 또는 항체들로부터 유래된 프레임워크 영역들 (FRs) 및 상보성 결정 영역들 (CDRs)을 포함하는 하이브리드 scFv인, 폴리펩타이드.

청구항 99

제98항에 있어서,

상기 FR들 및 CDR들은 동일한 종으로부터 유래하는 항원 결합 영역들 또는 항체들로부터 유래된, 폴리펩타이드.

청구항 100

제98항 또는 제99항에 있어서,

상기 FR들 및 CDR들은 인간 항원 결합 영역들 또는 항체들로부터 유래된, 폴리펩타이드.

청구항 101

제98항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하이브리드 scFv를 포함하는 폴리펩타이드의 면역원성은 비-하이브리드 scFv를 포함하는 폴리펩타이드의 면역원성과 유의하게 상이하지 않고, 상기 비-하이브리드 scFv는 상기 하이브리드 scFv FR들의 동일한 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래되거나, 상기 비-하이브리드 scFv는 상기 하이브리드 scFv CDR들의 동일한 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된, 폴리펩타이드.

청구항 102

제98항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 FR들 및 CDR들은 상이한 토닉 신호전달 강도들(tonic signaling intensities)의 항원 결합 영역들 또는 항체들로부터 유래된, 폴리펩타이드.

청구항 103

제102항에 있어서,

상기 FR들은 CDR들이 유래된 항원 결합 영역 또는 항체보다 더 높은 토닉 신호전달 강도의 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된, 폴리펩타이드.

청구항 104

제102항에 있어서,

상기 CDR들은 FR들이 유래된 항원 결합 영역 또는 항체보다 더 높은 토닉 신호전달 강도의 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된, 폴리펩타이드.

청구항 105

제98항 내지 제104항에 있어서,

상기 폴리펩타이드는 비-하이브리드 scFv를 갖는 CAR에 비해 증가된 종양 살해 활성을 가지고, 여기서 상기 비-하이브리드 scFv는 상기 하이브리드 scFv FR들의 동일한 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래되고/되거나, 상기 폴리펩타이드는 비-하이브리드 scFv를 갖는 CAR에 비해 증가된 종양 살해 활성을 가지고, 여기서 상기 비-하이브리드 scFv는 상기 하이브리드 scFv CDR들의 동일한 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된, 폴리펩타이드.

청구항 106

제98항 내지 제105항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리펩타이드는 비-하이브리드 scFv를 갖는 CAR에 비해 증가된 종양 세포 제거(clearance) 활성을 가지고, 여기서 상기 비-하이브리드 scFv는 상기 하이브리드 scFv FR들의 동일한 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래되고/되거나, 상기 폴리펩타이드는 비-하이브리드 scFv를 갖는 CAR에 비해 증가된 종양 살해 활성을 가지고, 여기서 상기 비-하이브리드 scFv는 상기 하이브리드 scFv CDR들의 동일한 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된, 폴리펩타이드.

청구항 107

제62항 내지 제106항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 scFv는 항-CD20 scFv를 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 108

제107항에 있어서,

상기 scFv는:

경쇄 가변 영역의 아미노-근위(proximal)부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 경쇄 프레임워크 영역 1 (LFR1), 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LCDR1), 경쇄 프레임워크 영역 2 (LFR2), 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LCDR2), 경쇄 프레임워크 영역 3 (LFR3), 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LCDR3) 및 경쇄 프레임워크 영역 4 (LFR4)를 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL); 및

중쇄 가변 영역의 아미노-근위부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 중쇄 프레임워크 영역 1 (HFR1), 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HCDR1), 중쇄 프레임워크 영역 2 (HFR2), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HCDR2), 중쇄 프레임워크 영역 3 (HFR3), 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HCDR3) 및 중쇄 프레임워크 영역 4 (HFR4)를 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH);을 포함하고;

상기 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3는 각각 서열번호 29, 30, 31, 22, 12, 13 및 14와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 상기 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3는 각각 서열번호 26, 27, 28, 18, 9, 10 및 11과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 109

제107항에 있어서,

상기 scFv는:

경쇄 가변 영역의 아미노-근위(proximal)부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 경쇄 프레임워크 영역 1 (LFR1), 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LCDR1), 경쇄 프레임워크 영역 2 (LFR2), 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LCDR2), 경쇄 프레임워크 영역 3 (LFR3), 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LCDR3) 및 경쇄 프레임워크 영역 4 (LFR4)를 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL); 및

중쇄 가변 영역의 아미노-근위부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 중쇄 프레임워크 영역 1 (HFR1), 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HCDR1), 중쇄 프레임워크 영역 2 (HFR2), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HCDR2), 중쇄 프레임워크 영역 3 (HFR3), 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HCDR3) 및 중쇄 프레임워크 영역 4 (HFR4)를 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH);을 포함하고;

상기 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3는 각각 서열번호 5의 가변 영역의 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 상기 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3는 각각 서열번호 6의 가변 영역의 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 110

제107항에 있어서,

상기 scFv는 각각 서열번호 24, 13 및 25의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는 VL; 및 각각 서열번호 9, 10 및 23의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 포함하는 VH;를 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 111

제107항에 있어서,

상기 scFv는 서열번호 3의 가변 영역의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는 VL 및 서열번호 4의 가변 영역의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 포함하는 VH를 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 112

제107항에 있어서,

상기 scFv는:

경쇄 가변 영역의 아미노-근위(proximal)부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 LFR1, LCDR1, LFR2, LCDR2, LFR3, LCDR3 및 LFR4를 포함하는 경쇄 가변 영역; 및

중쇄 가변 영역의 아미노-근위(proximal)부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 HFR1, HCDR1, HFR2, HCDR2, HFR3, HCDR3 및 HFR4를 포함하는 중쇄 가변 영역;을 포함하고;

상기 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3는 각각 서열번호 19, 20, 21, 22, 24, 13 및 25와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 상기 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3는 각각 서열번호 15, 16, 17, 18, 9, 10 및 23과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 113

제107항에 있어서,

상기 scFv는:

경쇄 가변 영역의 아미노-근위(proximal)부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 경쇄 프레임워크 영역 1 (LFR1), 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LCDR1), 경쇄 프레임워크 영역 2 (LFR2), 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LCDR2), 경쇄 프레임워크 영역 3 (LFR3), 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LCDR3) 및 경쇄 프레임워크 영역 4 (LFR4)를 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL); 및

중쇄 가변 영역의 아미노-근위부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 중쇄 프레임워크 영역 1 (HFR1), 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HCDR1), 중쇄 프레임워크 영역 2 (HFR2), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HCDR2), 중쇄 프레임워크 영역 3 (HFR3), 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HCDR3) 및 중쇄 프레임워크 영역 4 (HFR4)를 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH);을 포함하고;

상기 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3는 각각 서열번호 7의 가변 영역의 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 상기 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3는 각각 서열번호 8의 가변 영역의 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 114

제107항에 있어서,

상기 scFv는 각각 서열번호 12, 13 및 14의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는 VL; 및 각각 서열번호 9, 10 및 11의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 포함하는 VH;를 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 115

제107항에 있어서,

상기 scFv는 서열번호 1의 가변 영역의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는 VL; 및 서열번호 2의 가변 영역의

HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 포함하는 VH;를 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 116

제62항 내지 제97항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 scFv는 항-GD2 scFv를 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 117

제116항에 있어서,

상기 scFv는:

경쇄 가변 영역의 아미노-근위(proximal)부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 경쇄 프레임워크 영역 1 (LFR1), 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LCDR1), 경쇄 프레임워크 영역 2 (LFR2), 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LCDR2), 경쇄 프레임워크 영역 3 (LFR3), 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LCDR3) 및 경쇄 프레임워크 영역 4 (LFR4)를 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL); 및

중쇄 가변 영역의 아미노-근위부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 중쇄 프레임워크 영역 1 (HFR1), 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HCDR1), 중쇄 프레임워크 영역 2 (HFR2), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HCDR2), 중쇄 프레임워크 영역 3 (HFR3), 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HCDR3) 및 중쇄 프레임워크 영역 4 (HFR4)를 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH);을 포함하고;

상기 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3는 각각 서열번호 136, 137, 138, 139, 113, 114 및 115와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 상기 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3는 각각 서열번호 132, 133, 134, 135, 110, 111 및 112와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 118

제116항에 있어서,

상기 scFv는:

경쇄 가변 영역의 아미노-근위(proximal)부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 경쇄 프레임워크 영역 1 (LFR1), 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LCDR1), 경쇄 프레임워크 영역 2 (LFR2), 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LCDR2), 경쇄 프레임워크 영역 3 (LFR3), 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LCDR3) 및 경쇄 프레임워크 영역 4 (LFR4)를 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL); 및

중쇄 가변 영역의 아미노-근위부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 중쇄 프레임워크 영역 1 (HFR1), 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HCDR1), 중쇄 프레임워크 영역 2 (HFR2), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HCDR2), 중쇄 프레임워크 영역 3 (HFR3), 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HCDR3) 및 중쇄 프레임워크 영역 4 (HFR4)를 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH);을 포함하고;

상기 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3는 각각 서열번호 141의 가변 영역의 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 상기 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3는 각각 서열번호 140의 가변 영역의 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 119

제116항에 있어서,

상기 scFv는:

경쇄 가변 영역의 아미노-근위(proximal)부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 경쇄 프레임워크 영역 1 (LFR1), 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LCDR1), 경쇄 프레임워크 영역 2 (LFR2), 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LCDR2), 경쇄 프레임워크 영역 3 (LFR3), 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LCDR3) 및 경쇄 프레임워크 영역 4 (LFR4)를 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL); 및

중쇄 가변 영역의 아미노-근위부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 중쇄 프레임워크 영역 1 (HFR1), 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HCDR1), 중쇄 프레임워크 영역 2 (HFR2), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HCDR2), 중쇄 프레임워크 영역 3 (HFR3), 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HCDR3) 및 중쇄 프레임워크 영역 4 (HFR4)를 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH);을 포함하고;

상기 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3는 각각 서열번호 120, 121, 122, 123, 129, 130 및 131과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 상기 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3는 각각 서열번호 116, 117, 118, 119, 126, 127 및 128과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 120

제116항에 있어서,

상기 scFv는:

경쇄 가변 영역의 아미노-근위(proximal)부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 경쇄 프레임워크 영역 1 (LFR1), 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LCDR1), 경쇄 프레임워크 영역 2 (LFR2), 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LCDR2), 경쇄 프레임워크 영역 3 (LFR3), 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LCDR3) 및 경쇄 프레임워크 영역 4 (LFR4)를 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL); 및

중쇄 가변 영역의 아미노-근위부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 중쇄 프레임워크 영역 1 (HFR1), 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HCDR1), 중쇄 프레임워크 영역 2 (HFR2), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HCDR2), 중쇄 프레임워크 영역 3 (HFR3), 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HCDR3) 및 중쇄 프레임워크 영역 4 (HFR4)를 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH);을 포함하고;

상기 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3는 각각 서열번호 144의 가변 영역의 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 상기 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3는 각각 서열번호 143의 가변 영역의 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 121

제116항에 있어서,

상기 scFv는 각각 서열번호 129, 130 및 131의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는 VL; 및 각각 서열번호 126, 127 및 128의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 포함하는 VH;를 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 122

제116항에 있어서,

상기 scFv는 서열번호 125의 가변 영역의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는 VL 및 서열번호 124의 가변 영역의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 포함하는 VH를 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 123

제116항에 있어서,

상기 scFv는 각각 서열번호 113, 114 및 115의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는 VL; 및 각각 서열번호 110, 111 및 112의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 포함하는 VH;를 포함하는, 폴리펩타이드

청구항 124

제116항에 있어서,

상기 scFv는 서열번호 109의 가변 영역의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는 VL 및 서열번호 108의 가변 영역의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 포함하는 VH를 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 125

폴리펩타이드로서,

아미노 근위(proximal)부터 카르복시 근위 말단까지 순서대로 가변 중(variable heavy, VH) 및 가변 경(variable light, VL) 영역을 포함하는 scFv, 막관통 도메인 및 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 영역을 포함하는 CAR을 포함하며,

상기 scFv는 동일한 항원에 결합하는 상이한 항원 결합 영역들 또는 항체들로부터 유래된 프레임워크 영역들(FRs) 및 상보성 결정 영역들 (CDRs)을 포함하는 하이브리드 scFv인, 폴리펩타이드.

청구항 126

제125항에 있어서,

상기 FR들 및 CDR들은 동일한 종으로부터 유래하는 항원 결합 영역들 또는 항체들로부터 유래된, 폴리펩타이드.

청구항 127

제125항 또는 제126항에 있어서,

상기 FR들 및 CDR들은 인간 또는 인간화 항원 결합 영역 또는 항체들로부터 유래된, 폴리펩타이드.

청구항 128

제125항 내지 제127항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하이브리드 scFv를 포함하는 폴리펩타이드의 면역원성은 비-하이브리드 scFv를 포함하는 폴리펩타이드의 면역원성과 유의하게 상이하지 않고, 상기 비-하이브리드 scFv는 상기 하이브리드 scFv FR들의 동일한 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래되거나, 상기 비-하이브리드 scFv는 상기 하이브리드 scFv CDR들의 동일한 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된, 폴리펩타이드.

청구항 129

제125항 내지 제128항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 FR들 및 CDR들은 상이한 토닉(tonic) 신호전달 강도의 항원 결합 영역 또는 항체들로부터 유래된, 폴리펩타이드.

청구항 130

제129항에 있어서,

상기 FR들은 상기 CDR들이 유래된 항원 결합 영역 또는 항체보다 더 높은 토닉 신호전달 강도의 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된, 폴리펩타이드.

청구항 131

제129항에 있어서,

상기 CDR들은 상기 FR들이 유래된 항원 결합 영역 또는 항체보다 더 높은 토닉 신호전달 강도의 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된, 폴리펩타이드.

청구항 132

제125항 내지 제131항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리펩타이드는 비-하이브리드 scFv를 갖는 CAR에 비해 증가된 종양 살해 활성을 가지고, 여기서 상기 비-하이브리드 scFv는 상기 하이브리드 scFv FR들의 동일한 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래되고/되거나, 상기 폴리펩타이드는 비-하이브리드 scFv를 갖는 CAR에 비해 증가된 종양 살해 활성을 가지고, 여기서 상기 비-하이브리드 scFv는 상기 하이브리드 scFv CDR들의 동일한 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된, 폴리펩타이드.

청구항 133

제125항 내지 제132항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리펩타이드는 비-하이브리드 scFv를 갖는 CAR에 비해 증가된 종양 세포 제거(clearance) 활성을 가지고, 여기서 상기 비-하이브리드 scFv는 상기 하이브리드 scFv FR들의 동일한 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래되고/되거나, 상기 폴리펩타이드는 비-하이브리드 scFv를 갖는 CAR에 비해 증가된 종양 살해 활성을 가지고, 여기서 상기 비-하이브리드 scFv는 상기 하이브리드 scFv CDR들의 동일한 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된, 폴리펩타이드.

청구항 134

제125항 내지 제133항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리펩타이드는 상기 막관통 도메인과 세포질 영역 사이에 비틀림 링커를 포함하고, 여기서 상기 비틀림 링커는 1 내지 12개의 알라닌 잔기들을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 135

제134항에 있어서,

상기 비틀림 링커는 2 또는 4개의 알라닌 잔기들을 포함하거나 이로 구성된, 폴리펩타이드.

청구항 136

제134항 또는 제135항에 있어서,

상기 scFv는 VH 및 VL을 포함하고, 상기 VH와 VL 사이에 링커가 있는, 폴리펩타이드.

청구항 137

제136항에 있어서,

상기 링커는 4 내지 40개 아미노산의 길이인, 폴리펩타이드.

청구항 138

제137항에 있어서,

상기 링커는 적어도 4개의 글리신 및/또는 세린 잔기들을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 139

제136항 내지 제138항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 링커는 $(GGGGS)_n$을 포함하고, 여기서 n은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6인, 폴리펩타이드.

청구항 140

제136항 내지 제139항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 링커는 GSTSGGGSGGGSGGGGSS (서열번호 32)를 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 141

제125항 내지 제140항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 VH는 상기 VL에 아미노 근위인, 폴리펩타이드.

청구항 142

제125항 내지 제140항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 VH는 상기 VL에 카르복시 근위인, 폴리펩타이드.

청구항 143

제125항 내지 제142항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 CAR은 단일특이적인, 폴리펩타이드.

청구항 144

제125항 내지 제142항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 CAR은 이중특이적인, 폴리펩타이드.

청구항 145

제125항 내지 제144항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 CAR은 상기 막관통 도메인과 상기 scFv 사이에 세포외 스페이서를 더 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 146

제145항에 있어서,

상기 세포외 스페이서는 8 내지 1000개 아미노산의 길이인, 폴리펩타이드.

청구항 147

제145항에 있어서,

상기 세포외 스페이서는 8 내지 500개 아미노산의 길이인, 폴리펩타이드.

청구항 148

제145항에 있어서,

상기 세포외 스페이서는 100 내지 300개 아미노산의 길이인, 폴리펩타이드.

청구항 149

제145항에 있어서,

상기 세포외 스페이서는 100개 미만의 아미노산을 가지는, 폴리펩타이드.

청구항 150

제145항 내지 제149항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포외 스페이서는 IgG4 힌지, CD8a 힌지, IgG1 힌지, CD34 힌지 또는 이들의 단편인, 폴리펩타이드.

청구항 151

제150항에 있어서,

상기 세포외 스페이서는 IgG4 힌지 또는 이의 단편을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 152

제145항 내지 제152항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포외 스페이서는 CH1, CH2 및/또는 CH3 영역을 포함하거나 이를 더 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 153

제152항에 있어서,

상기 스페이서는 IgG4 힌지 폴리펩타이드, CH2 영역 및 CH3 영역을 포함하거나 이로 구성된, 폴리펩타이드.

청구항 154

제152항 또는 제153항에 있어서,

상기 CH2 영역은 L235E 및/또는 N297Q 치환을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 155

제154항에 있어서,

상기 스페이서는 서열번호 36과 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 156

제 125항 내지 제155항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 막관통 도메인은 T 세포 수용체의 알파 또는 베타 사슬, CD28, CD3e (엡실론), CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD123, CD134, CD137 또는 CD154 막관통 도메인인, 폴리펩타이드.

청구항 157

제156항에 있어서,

상기 막관통 도메인은 CD28 막관통 도메인인, 폴리펩타이드.

청구항 158

제157항에 있어서,

상기 막관통 도메인은 서열번호 37과 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 159

제125항 내지 제158항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 1차 세포내 신호전달 도메인은 CD3-제타인, 폴리펩타이드.

청구항 160

제159항에 있어서,

상기 1차 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 39와 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 161

제125항 내지 제160항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포질 영역은 하나 이상의 공자극 도메인을 더 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 162

제125항 내지 제161항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포질 영역은 2개의 공자극 도메인을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 163

제161항 또는 제162항에 있어서,

상기 하나 이상의 공자극 도메인(들)은 4-1BB (CD137), CD28, IL-15Rα, OX40, CD2, CD27, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) 및/또는 ICOS (CD278)중 하나 이상으로부터의 공자극 도메인을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 164

제161항 내지 제163항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 공자극 도메인(들)은 CD28으로부터의 공자극 도메인을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 165

제164항에 있어서,

상기 공자극 도메인은 서열번호 38과 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 166

제125항 내지 제165항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 scFv는 항-CD20 scFv를 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 167

제166항에 있어서,

상기 scFv는:

경쇄 가변 영역의 아미노-근위(proximal)부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 경쇄 프레임워크 영역 1 (LFR1), 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LCDR1), 경쇄 프레임워크 영역 2 (LFR2), 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LCDR2), 경쇄 프레임워크 영역 3 (LFR3), 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LCDR3) 및 경쇄 프레임워크 영역 4 (LFR4)를 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL); 및

중쇄 가변 영역의 아미노-근위부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 중쇄 프레임워크 영역 1 (HFR1), 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HCDR1), 중쇄 프레임워크 영역 2 (HFR2), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HCDR2), 중쇄 프레임워크 영역 3 (HFR3), 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HCDR3) 및 중쇄 프레임워크 영역 4 (HFR4)를 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH);을 포함하고;

상기 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3는 각각 서열번호 29, 30, 31, 22, 12, 13 및 14와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3는 각각 서열번호 26, 27, 28, 18, 9, 10 및 11과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 168

제166항에 있어서,

상기 scFv는:

경쇄 가변 영역의 아미노-근위(proximal)부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 경쇄 프레임워크 영역 1 (LFR1), 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LCDR1), 경쇄 프레임워크 영역 2 (LFR2), 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LCDR2), 경쇄 프레임워크 영역 3 (LFR3), 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LCDR3) 및 경쇄 프레임워크 영역 4 (LFR4)를 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL); 및

중쇄 가변 영역의 아미노-근위부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 중쇄 프레임워크 영역 1 (HFR1), 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HCDR1), 중쇄 프레임워크 영역 2 (HFR2), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HCDR2), 중쇄 프레임워크 영역 3 (HFR3), 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HCDR3) 및 중쇄 프레임워크 영역 4 (HFR4)를 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH);을 포함하고;

상기 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3는 각각 서열번호 5의 가변 영역의 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 상기 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3는 각각 서열번호 6의 가변 영역의 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 169

제166항에 있어서,

상기 scFv는 각각 서열번호 24, 13 및 25의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는 VL; 및 각각 서열번호 9, 10 및 23의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 포함하는 VH;를 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 170

제166항에 있어서,

상기 scFv는 서열번호 3의 가변 영역의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는 VL 및 서열번호 4의 가변 영역의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 포함하는 VH를 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 171

제166항에 있어서,

상기 scFv는:

경쇄 가변 영역의 아미노-근위(proximal)부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 LFR1, LCDR1, LFR2, LCDR2, LFR3, LCDR3 및 LFR4를 포함하는 경쇄 가변 영역; 및

중쇄 가변 영역의 아미노-근위(proximal)부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 HFR1, HCDR1, HFR2, HCDR2, HFR3, HCDR3 및 HFR4를 포함하는 중쇄 가변 영역;을 포함하고;

상기 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3는 각각 서열번호 19, 20, 21, 22, 24, 13 및 25와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 상기 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3

는 각각 서열번호 15, 16, 17, 18, 9, 10 및 23과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 172

제166항에 있어서,

상기 scFv는:

경쇄 가변 영역의 아미노-근위(proximal)부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 경쇄 프레임워크 영역 1 (LFR1), 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LCDR1), 경쇄 프레임워크 영역 2 (LFR2), 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LCDR2), 경쇄 프레임워크 영역 3 (LFR3), 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LCDR3) 및 경쇄 프레임워크 영역 4 (LFR4)를 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL); 및

중쇄 가변 영역의 아미노-근위부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 중쇄 프레임워크 영역 1 (HFR1), 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HCDR1), 중쇄 프레임워크 영역 2 (HFR2), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HCDR2), 중쇄 프레임워크 영역 3 (HFR3), 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HCDR3) 및 중쇄 프레임워크 영역 4 (HFR4)를 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH);을 포함하고;

상기 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3는 각각 서열번호 7의 가변 영역의 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 상기 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3는 각각 서열번호 8의 가변 영역의 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 173

제166항에 있어서,

상기 scFv는 각각 서열번호 12, 13 및 14의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는 VL; 및 각각 서열번호 9, 10 및 11의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 포함하는 VH;를 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 174

제166항에 있어서,

상기 scFv는 서열번호 1의 가변 영역의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는 VL 및 서열번호 2의 가변 영역의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 포함하는 VH를 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 175

제125항 내지 제165항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 scFv는 항-GD2 scFv를 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 176

제175항에 있어서,

상기 scFv는:

경쇄 가변 영역의 아미노-근위(proximal)부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 경쇄 프레임워크 영역 1 (LFR1), 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LCDR1), 경쇄 프레임워크 영역 2 (LFR2), 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LCDR2), 경쇄 프레임워크 영역 3 (LFR3), 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LCDR3) 및 경쇄 프레임워크 영역 4

(LFR4)를 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL); 및

중쇄 가변 영역의 아미노-근위부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 중쇄 프레임워크 영역 1 (HFR1), 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HCDR1), 중쇄 프레임워크 영역 2 (HFR2), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HCDR2), 중쇄 프레임워크 영역 3 (HFR3), 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HCDR3) 및 중쇄 프레임워크 영역 4 (HFR4)를 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH);을 포함하고;

상기 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3는 각각 서열번호 136, 137, 138, 139, 113, 114 및 115와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 상기 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3는 각각 서열번호 132, 133, 134, 135, 110, 111 및 112와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 177

제175항에 있어서,

상기 scFv는:

경쇄 가변 영역의 아미노-근위(proximal)부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 경쇄 프레임워크 영역 1 (LFR1), 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LCDR1), 경쇄 프레임워크 영역 2 (LFR2), 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LCDR2), 경쇄 프레임워크 영역 3 (LFR3), 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LCDR3) 및 경쇄 프레임워크 영역 4 (LFR4)를 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL); 및

중쇄 가변 영역의 아미노-근위부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 중쇄 프레임워크 영역 1 (HFR1), 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HCDR1), 중쇄 프레임워크 영역 2 (HFR2), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HCDR2), 중쇄 프레임워크 영역 3 (HFR3), 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HCDR3) 및 중쇄 프레임워크 영역 4 (HFR4)를 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH);을 포함하고;

상기 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3는 각각 서열번호 141의 가변 영역의 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 상기 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3는 각각 서열번호 140의 가변 영역의 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 178

제175항에 있어서,

상기 scFv는:

경쇄 가변 영역의 아미노-근위(proximal)부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 경쇄 프레임워크 영역 1 (LFR1), 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LCDR1), 경쇄 프레임워크 영역 2 (LFR2), 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LCDR2), 경쇄 프레임워크 영역 3 (LFR3), 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LCDR3) 및 경쇄 프레임워크 영역 4 (LFR4)를 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL); 및

중쇄 가변 영역의 아미노-근위부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 중쇄 프레임워크 영역 1 (HFR1), 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HCDR1), 중쇄 프레임워크 영역 2 (HFR2), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HCDR2), 중쇄 프레임워크 영역 3 (HFR3), 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HCDR3) 및 중쇄 프레임워크 영역 4 (HFR4)를 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH);을 포함하고;

상기 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3는 각각 서열번호 120, 121, 122, 123, 129, 130 및 131과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 상기 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3는 각각 서열번호 116, 117, 118, 119, 126, 127 및 128과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 179

제175항에 있어서,

상기 scFv는:

경쇄 가변 영역의 아미노-근위(proximal)부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 경쇄 프레임워크 영역 1 (LFR1), 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LCDR1), 경쇄 프레임워크 영역 2 (LFR2), 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LCDR2), 경쇄 프레임워크 영역 3 (LFR3), 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LCDR3) 및 경쇄 프레임워크 영역 4 (LFR4)를 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL); 및

중쇄 가변 영역의 아미노-근위부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 중쇄 프레임워크 영역 1 (HFR1), 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HCDR1), 중쇄 프레임워크 영역 2 (HFR2), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HCDR2), 중쇄 프레임워크 영역 3 (HFR3), 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HCDR3) 및 중쇄 프레임워크 영역 4 (HFR4)를 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH);을 포함하고;

상기 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3는 각각 서열번호 144의 가변 영역의 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 상기 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3는 각각 서열번호 143의 가변 영역의 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 180

제175항에 있어서,

상기 scFv는 각각 서열번호 129, 130 및 131의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는 VL; 및 각각 서열번호 126, 127 및 128의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 포함하는 VH;를 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 181

제107항에 있어서,

상기 scFv는 서열번호 125의 가변 영역의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는 VL 및 서열번호 124의 가변 영역의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 포함하는 VH를 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 182

제175항에 있어서,

상기 scFv는 각각 서열번호 113, 114 및 115의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는 VL; 및 각각 서열번호 110, 111 및 112의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 포함하는 VH;를 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 183

제175항에 있어서,

상기 scFv는 서열번호 109의 가변 영역의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는 VL 및 서열번호 108의 가변 영역의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 포함하는 VH를 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 184

제1항 내지 제183항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드를 암호화하는 서열을 포함하는, 핵산.

청구항 185

제184항에 있어서,

상기 핵산은 발현 구조체(construct)인, 핵산.

청구항 186

제185항에 있어서,

상기 발현 구조체는 바이러스 벡터인, 핵산.

청구항 187

제186항에 있어서,

상기 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터 또는 레트로바이러스로부터 유래된 벡터인, 핵산.

청구항 188

제187항에 있어서,

상기 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터 또는 렌티바이러스로부터 유래된 벡터인, 핵산.

청구항 189

제1항 내지 제183항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드를 암호화하는 서열을 포함하는, 렌티바이러스 벡터.

청구항 190

제184항 내지 제189항 중 어느 한 항의 핵산을 포함하는, 세포.

청구항 191

제190항에 있어서,

상기 바이러스 벡터가 상기 세포의 게놈 내로 통합된, 핵산을 포함하는 세포.

청구항 192

제1항 내지 제183항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드를 발현하는, 세포.

청구항 193

제190항 내지 제192항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 T 세포, 자연 살해 (NK) 세포, 자연 살해 T 세포 (NKT), 불변 자연 살해 T 세포 (iNKT), 줄기

세포, 림프 전구 세포, 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 골수 세포, 태아 간 세포, 배아 줄기 세포, 조혈모 또는 조혈전구세포 (HSPC), 제대혈 세포 또는 유도 만능 줄기 세포 (iPS cell)인, 세포.

청구항 194

제193항에 있어서,

상기 세포는 T 세포 또는 NK 세포인, 세포.

청구항 195

제194항에 있어서,

상기 T 세포는 나이브(naive) 기억 T 세포를 포함하는, 세포.

청구항 196

제195항에 있어서,

상기 나이브 기억 T 세포는 CD4+ 또는 CD8+ T 세포를 포함하는, 세포.

청구항 197

제190항 내지 제196항 중 어느 한 항의 세포를 포함하는, 세포의 집단.

청구항 198

제197항에 있어서,

상기 집단은 10^3 내지 10^8개 세포를 포함하는, 집단.

청구항 199

제1항 내지 제183항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드, 제184항 내지 제189항 중 어느 한 항의 핵산, 제190항 내지 제196항 중 어느 한 항의 세포 또는 제197항 또는 제198항의 세포의 집단을 포함하는, 조성물.

청구항 200

제184항 내지 제189항 중 어느 한 항의 핵산을 세포에 도입하는 것을 포함하는, 폴리펩타이드를 발현하는 세포의 제조방법.

청구항 201

CAR의 제조방법으로서,

CAR의 막관통 도메인과 세포질 도메인 사이에 비틀림 링커를 도입하는 것을 포함하고,

상기 비틀림 링커는 1 내지 12개의 알라닌 잔기들을 포함하는, 방법.

청구항 202

하이브리드 scFv, 막관통 도메인 및 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 영역을 갖는 CAR의 제조방법으로서,

제1 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된 CDR들을 제2 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된 FR들과 조합하는 것을 포함하고,

상기 제1 및 제2 항원 결합 영역 또는 항체는 동일한 항원에 결합하는, 방법.

청구항 203

제202항에 있어서,

상기 FR들 및 CDR들은 동일한 종으로부터 유래하는 항원 결합 영역들 또는 항체들로부터 유래된, 방법.

청구항 204

제202항 또는 제203항에 있어서,

상기 FR들 및 CDR들은 인간 항원 결합 영역들 또는 항체들로부터 유래된, 방법.

청구항 205

제202항 내지 제204항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 FR들 및 CDR들은 상이한 토닉(tonic) 신호전달 강도들의 항원 결합 영역들 또는 항체들로부터 유래된, 방법.

청구항 206

제205항에 있어서,

상기 FR들은 CDR들이 유래된 항원 결합 영역 또는 항체보다 더 높은 토닉 신호전달 강도의 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된, 방법.

청구항 207

제205항에 있어서,

상기 CDR들은 상기 FR들이 유래된 항원 결합 영역 또는 항체보다 더 높은 토닉 신호전달 강도의 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된, 방법.

청구항 208

제202항 내지 제207항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리펩타이드는 비-하이브리드 scFv를 갖는 CAR에 비해 증가된 종양 살해 활성을 가지고, 여기서 상기 비-하이브리드 scFv는 상기 하이브리드 scFv FR들의 동일한 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래되고/되거나, 상기 폴리펩타이드는 비-하이브리드 scFv를 갖는 CAR에 비해 증가된 종양 살해 활성을 가지고, 여기서 상기 비-하이브리드 scFv는 상기 하이브리드 scFv CDR들의 동일한 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된, 방법.

청구항 209

제202항 내지 제208항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리펩타이드는 비-하이브리드 scFv를 갖는 CAR에 비해 증가된 종양 세포 제거(clearance) 활성을 가지고, 여기서 상기 비-하이브리드 scFv는 상기 하이브리드 scFv FR들의 동일한 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래되고/되거나, 상기 폴리펩타이드는 비-하이브리드 scFv를 갖는 CAR에 비해 증가된 종양 살해 활성을 가지고, 여기서 상기 비-하이브리드 scFv는 상기 하이브리드 scFv CDR들의 동일한 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된, 방법.

청구항 210

제200항 내지 제209항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 폴리펩타이드를 암호화하는 바이러스로 감염된, 방법.

청구항 211

제210항에 있어서,

상기 바이러스는 렌티바이러스 또는 렌티바이러스 유래 바이러스 또는 벡터를 포함하는, 방법.

청구항 212

제200항 내지 제211항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 T 세포, 자연 살해 (NK) 세포, 자연 살해 T 세포 (NKT), 불변 자연 살해 T 세포 (iNKT), 줄기 세포, 림프 전구 세포, 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 골수 세포, 태아 간 세포, 배아 줄기 세포, 제대혈 세포, 유도 만능 줄기 세포 (iPS cell)인, 방법.

청구항 213

제212항에 있어서,

상기 세포는 T 세포 또는 NK 세포인, 방법.

청구항 214

제213항에 있어서,

상기 T 세포는 나이브(naive) 기억 T 세포를 포함하는, 방법.

청구항 215

제214항에 있어서,

상기 나이브 기억 T 세포는 CD4+ 또는 CD8+ T 세포를 포함하는, 방법.

청구항 216

제213항 내지 제215항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 아직 T 세포 또는 NK 세포가 아니고, 상기 방법은 상기 세포의 T 세포 또는 NK 세포로의 분화를 촉진하는 조건 하에 상기 세포를 배양하는 것을 더 포함하는, 방법.

청구항 217

제200항 내지 제216항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 핵산을 상기 세포 내로 도입하기 전 그리고 또는 후에 상기 세포를 증폭시키는 조건 하에서 상기 세포를 배양하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 218

제217항에 있어서,

상기 세포는 무혈청 배지와 배양되는, 방법.

청구항 219

제200항 또는 제203항 내지 제218항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된, 세포.

청구항 220

제201항 내지 제218항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된, CAR.

청구항 221

CAR 스크리닝 방법으로서,

제1 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된 CDR들과 제2항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된 FR들을 조합하는 것을 포함하는, 하이브리드 scFv, 막관통 도메인 및 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 영역을 갖는 CAR을 제공하는 단계, 여기서 상기 제1 및 제2 항원 결합 영역 또는 항체는 동일한 항원에 결합함; 및

상기 CAR의 기능을 평가하는 단계;

를 포함하는, CAR 스크리닝 방법.

청구항 222

제221항에 있어서,

상기 CAR의 기능을 평가하는 것은 상기 CAR의 토닉 신호전달 강도를 평가하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 223

제222항에 있어서,

상기 토닉 신호전달 강도를 평가하는 것은 CDV 희석 검정 및/또는 활성 마커에 대한 항체 염색에 의한 발현 평가를 포함하는, 방법.

청구항 224

제221항 내지 제223항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 CAR의 기능을 평가하는 것은 종양 살해 효능, 종양 제거 효능, 생체 내 생존, 생체 내 종양 제거, 생체 내 종양 부담(burden)의 감소 중 하나 이상을 알아내는 것을 포함하는, 방법.

청구항 225

제221항 내지 제224항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 방법은 제1 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된 CDR들과 제2 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된 FR들을 조합하는 것을 포함하는, 하이브리드 scFv를 갖는 CAR을 제조하는 것을 포함하거나 더 포함하고, 여기서 상기 제1 및 제2 항원 결합 영역 또는 항체는 동일한 항원에 결합하는, 방법.

청구항 226

암을 갖는 환자의 치료방법으로서,

제199항의 조성물의 유효량을 상기 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 치료방법.

청구항 227

제226항에 있어서,

상기 방법은 암을 가지는 환자에서 암을 치료하기 위한 것인, 방법.

청구항 228

제226항 또는 제227항에 있어서,

상기 방법은 상기 환자에게 추가 요법을 투여하는 것을 더 포함하는, 방법.

청구항 229

제228항에 있어서,

상기 추가 요법은 면역요법을 포함하는, 방법.

청구항 230

제226항 내지 제229항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 암은 림프종 또는 신경아세포종을 포함하는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 2020년 3월 2일에 출원된 미국 가출원 제62/984,139호 및 2020년 9월 28일에 출원된 미국 가출원 제63/084,138호의 우선권을 주장하며, 이들은 그 전체가 본원에서 참조로 포함된다.

[0002] 본 발명은 일반적으로 분자생물학 및 면역요법 분야에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] CD20은 B-세포 악성종양에 대해 임상적으로 검증된 표적이다. CD20을 표적으로 하는 키메라 항원 수용체(Chimeric antigen receptor, CAR)-T 세포는 임상적으로 테스트되었으며 안전하지만, B 세포 림프종에 대한 CD19 CAR-T 세포 요법만큼 효과적이지는 않은 것으로 나타났다. 여러 이전 간행물은 CD19 CAR의 고유한 효능에 대한 주요 이유가 토닉 신호전달(tonic signaling)의 부족이라고 규정했다. 특히, 대부분의 CAR은 항원 자극이 없는 경우에도 기본 신호전달을 나타내고, 이러한 "토닉 신호전달(tonic signaling)" 행동이 조기(premature) T 세포 기능 장애를 유발하며, CD19 CAR은 토닉 신호전달을 전달하지 않고 조기 T 세포 기능 장애를 유발하지 않으므로 고유하게 효능이 있다고 주장되어 왔다. CAR 토닉 신호전달은 T-세포 표면 상의 CAR 분자의 항원-독립적 클러스터링의 결과이며, 이러한 클러스터링 거동은 CAR의 scFv 도메인의 특정 서열의 결과라는 것이 추가로 제안되었다. 잠재적으로 CAR의 토닉 신호전달 거동을 조절함으로써 강력한 T 세포 매개 항종양 기능을 지원하는 개선된 CAR이 필요하다.

발명의 내용

[0004] 구현예는 키메라 항원 수용체, 키메라 항원 수용체를 암호화하는 핵산 및 키메라 항원 수용체를 발현할 수 있는 세포를 포함하는 조성물, 뿐만 아니라 키메라 항원 수용체를 조작 및/또는 생산하는 방법 및 이들 조성물을 사용하는 방법에 관한 것이다. 따라서, 본 개시내용의 조성물 및 방법은 증가된 생체 내 효능을 갖는 CAR 및 생성된 CAR을 재설계하는 방법을 제공하며, 이는 본 개시내용의 추가 방법에서 사용될 수 있다.

[0005] 본 개시내용의 측면은 경쇄 가변 영역의 아미노-근위(proximal)부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 경쇄 프레임워크 영역 1 (LFR1), 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LCDR1), 경쇄 프레임워크 영역 2 (LFR2), 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LCDR2), 경쇄 프레임워크 영역 3 (LFR3), 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LCDR3) 및 경쇄 프레임워크 영역 4 (LFR4)를 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL); 및 중쇄 가변 영역의 아미노-근위부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 중쇄 프레임워크 영역 1 (HFR1), 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HCDR1), 중쇄 프레임워크 영역 2 (HFR2), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HCDR2), 중쇄 프레임워크 영역 3 (HFR3), 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HCDR3) 및 중쇄 프레임워크 영역 4 (HFR4)를 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH);을 포함하는 항-CD20 단일 쇄 가변 단편(scFv)을 포함하는 폴리펩타이드에 관한 것이며, 여기서, LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3은 각각 서열번호 29, 30, 31, 22, 12, 13 및 14와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 여기서, HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3은 각각 서열번호 26, 27, 28, 18, 9, 10 및 11과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0006] 추가 측면은 경쇄 가변 영역의 아미노-근위(proximal)부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 LFR1, LCDR1, LFR2, LCDR2, LFR3, LCDR3 및 LFR4를 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 중쇄 가변 영역의 아미노-근위부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 HFR1, HCDR1, HFR2, HCDR2, HFR3, HCDR3 및 HFR4를 포함하는 중쇄 가변 영역;을 포함하는 항-CD20 scFv를 포함하는 폴리펩타이드에 관한 것이며, 여기서, LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3은 각각 서열번호 19, 20, 21, 22, 24, 13 및 25와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 여기서, HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3은 각각 서열번호 15, 16, 17, 18, 9, 10 및 23과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0007] 추가 측면은 경쇄 가변 영역의 아미노-근위(proximal)부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 경쇄 프레임워크 영역 1 (LFR1), 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LCDR1), 경쇄 프레임워크 영역 2 (LFR2), 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LCDR2), 경쇄 프레임워크 영역 3 (LFR3), 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LCDR3) 및 경쇄 프레임워크 영역 4 (LFR4)를 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL); 및 중쇄 가변 영역의 아미노-근위부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 중쇄 프레임워크 영역 1 (HFR1), 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HCDR1), 중쇄 프레임워크 영역 2 (HFR2), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HCDR2), 중쇄 프레임워크 영역 3 (HFR3), 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HCDR3) 및 중쇄 프레임워크 영역 4 (HFR4)를 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH);을 포함하는 항-CD20 단일 쇄 가변 단편(scFv)을 포함하는 폴리펩타이드에 관한 것이며, 여기서, LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3은 각각 서열번호 5의 가변 영역의 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 여기서 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3은 각각 서열번호 6의 가변 영역의 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산을 포함한다.

[0008] 또한, 경쇄 가변 영역의 아미노-근위(proximal)부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 경쇄 프레임워크 영역 1 (LFR1), 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LCDR1), 경쇄 프레임워크 영역 2 (LFR2), 경쇄 상보성 결정 영역 2

(LCDR2), 경쇄 프레임워크 영역 3 (LFR3), 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LCDR3) 및 경쇄 프레임워크 영역 4 (LFR4)를 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL); 및 중쇄 가변 영역의 아미노-근위부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 중쇄 프레임워크 영역 1 (HFR1), 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HCDR1), 중쇄 프레임워크 영역 2 (HFR2), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HCDR2), 중쇄 프레임워크 영역 3 (HFR3), 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HCDR3) 및 중쇄 프레임워크 영역 4 (HFR4)를 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH);을 포함하는 항-CD20 단일 쇄 가변 단편(scFv)을 포함하는 폴리펩타이드가 기재되어 있으며, 여기서, LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3은 각각 서열번호 7의 가변 영역의 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 여기서, HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3은 각각 서열번호 8의 가변 영역의 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산을 포함한다.

[0009] 추가 측면은 경쇄 가변 영역의 아미노-근위(proximal)부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 경쇄 프레임워크 영역 1 (LFR1), 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LCDR1), 경쇄 프레임워크 영역 2 (LFR2), 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LCDR2), 경쇄 프레임워크 영역 3 (LFR3), 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LCDR3) 및 경쇄 프레임워크 영역 4 (LFR4)를 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL); 및 중쇄 가변 영역의 아미노-근위부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 중쇄 프레임워크 영역 1 (HFR1), 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HCDR1), 중쇄 프레임워크 영역 2 (HFR2), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HCDR2), 중쇄 프레임워크 영역 3 (HFR3), 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HCDR3) 및 중쇄 프레임워크 영역 4 (HFR4)를 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH);을 포함하는 항-GD2 단일 쇄 가변 단편(scFv)을 포함하는 폴리펩타이드에 관한 것이며, 여기서, LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3은 각각 서열번호 136, 137, 138, 139, 113, 114 및 115와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 여기서, HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3은 각각 서열번호 132, 133, 134, 135, 110, 111 및 112와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0010] 또한, 경쇄 가변 영역의 아미노-근위(proximal)부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 경쇄 프레임워크 영역 1 (LFR1), 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LCDR1), 경쇄 프레임워크 영역 2 (LFR2), 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LCDR2), 경쇄 프레임워크 영역 3 (LFR3), 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LCDR3) 및 경쇄 프레임워크 영역 4 (LFR4)를 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL); 및 중쇄 가변 영역의 아미노-근위부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 중쇄 프레임워크 영역 1 (HFR1), 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HCDR1), 중쇄 프레임워크 영역 2 (HFR2), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HCDR2), 중쇄 프레임워크 영역 3 (HFR3), 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HCDR3) 및 중쇄 프레임워크 영역 4 (HFR4)를 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH);을 포함하는 항-GD2 단일 쇄 가변 단편(scFv)을 포함하는 폴리펩타이드가 기재되어 있으며, 여기서, LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3는 각각 서열번호 141의 가변 영역의 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 여기서, HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3는 각각 서열번호 140의 가변 영역의 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0011] 추가 측면은 경쇄 가변 영역의 아미노-근위(proximal)부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 경쇄 프레임워크 영역 1 (LFR1), 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LCDR1), 경쇄 프레임워크 영역 2 (LFR2), 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LCDR2), 경쇄 프레임워크 영역 3 (LFR3), 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LCDR3) 및 경쇄 프레임워크 영역 4 (LFR4)를 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL); 및 중쇄 가변 영역의 아미노-근위부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 중쇄 프레임워크 영역 1 (HFR1), 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HCDR1), 중쇄 프레임워크 영역 2 (HFR2), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HCDR2), 중쇄 프레임워크 영역 3 (HFR3), 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HCDR3) 및 중쇄 프레임워크 영역 4 (HFR4)를 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH);을 포함하는 항-GD2 단일 쇄 가변 단편(scFv)을 포함하는 폴리펩타이드에 관한 것이며, 여기서, LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3는 각각 서열번호 120, 121, 122, 123, 129, 130 및 131과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 여기서, HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3는 각각 서열번호 116, 117, 118, 119, 126, 127 및 128과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0012] 또한, 경쇄 가변 영역의 아미노-근위(proximal)부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 경쇄 프레임워크 영역 1 (LFR1), 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LCDR1), 경쇄 프레임워크 영역 2 (LFR2), 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LCDR2), 경쇄 프레임워크 영역 3 (LFR3), 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LCDR3) 및 경쇄 프레임워크 영역 4 (LFR4)를 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL); 및 중쇄 가변 영역의 아미노-근위부터 카르복시-근위 말단까지 순서대로 중쇄 프레임워크 영역 1 (HFR1), 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HCDR1), 중쇄 프레임워크 영역 2 (HFR2), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HCDR2), 중쇄 프레임워크 영역 3 (HFR3), 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HCDR3) 및 중쇄 프레

임워크 영역 4 (HFR4)를 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH);을 포함하는 항-GD2 단일 쇄 가변 단편(scFv)을 포함하는 폴리펩타이드가 기재되어 있으며, 여기서, LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3는 각각 서열번호 144의 가변 영역의 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 여기서, HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3는 각각 서열번호 143의 가변 영역의 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0013] 본 개시내용의 측면은 또한 아미노 근위에서 카르복시 근위 말단으로 순서대로 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL) 영역을 포함하는 scFv, 막관통 도메인 및 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 영역을 포함하는 CAR을 포함하는 폴리펩타이드에 관한 것이며; 여기서 scFv는 동일한 항원에 결합하는 상이한 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된 프레임워크 영역(FR) 및 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 하이브리드 scFv이다.

[0014] 추가 측면은 아미노 근위에서 카르복시 근위 말단으로 순서대로 scFv, 막관통 도메인, 비틀림 링커 및 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 영역을 포함하는 CAR을 포함하는 폴리펩타이드에 관한 것으로, 여기서 비틀림 링커는 1-12개의 알라닌 잔기를 포함한다.

[0015] 본 개시내용의 측면은 CAR 내로 막관통 도메인과 세포질 도메인 사이에 비틀림 링커를 도입하는 것을 포함하는 CAR의 제조 방법에 관한 것이며; 여기서 비틀림 링커는 1-12개의 알라닌 잔기를 포함한다. 또한, 제1 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된 CDR을 제2 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된 FR과 조합하는 것을 포함하는, 하이브리드 scFv, 막관통 도메인 및 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 영역을 갖는 CAR을 제조하는 방법이 기재되어 있다. 여기서 제1 및 제2 항원 결합 영역 또는 항체는 동일한 항원에 결합한다. 이들 CAR을 생산하는 방법은 이들 설계된 CAR 중 하나 이상을 암호화하는 핵산을 포함하는 세포를 재생하는 것을 포함하거나 더 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, CAR은 토닉(tonic) 신호전달 강도가 상이한 항체 또는 항원 결합 영역으로부터의 FR 및 CDR을 포함한다.

[0016] 또한, 본 개시내용의 폴리펩타이드를 암호화하는 서열을 포함하는 핵산, 본 개시내용의 핵산을 포함하는 렌티바이러스 벡터와 같은 벡터, 본 개시내용의 핵산 및/또는 폴리펩타이드를 포함 및/또는 발현하는 세포 및 본 개시내용의 세포 구현예를 포함하는 세포의 집단이 기재되어 있다. 추가 구현예는 본 개시내용의 폴리펩타이드, 핵산, 세포 및 세포 집단을 포함하는 조성물 및 제약상 허용되는 제제에 관한 것이다. 또한, 본 개시내용의 핵산을 세포 내로 도입하는 것을 포함하는, 폴리펩타이드를 발현하는 세포의 제조 방법이 제공된다. 또한, 본 개시내용의 방법에 의해 제조된 세포, 폴리펩타이드 및 CAR이 기재되어 있다. 또 다른 측면은 유효량의 본 개시내용의 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 암에 걸린 환자를 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0017] 추가 측면은 제1 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된 CDR을 FR과 조합하는 것을 포함하는, 하이브리드 scFv, 막관통 도메인 및 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 영역을 갖는 CAR을 제공하는 것을 포함하는 CAR을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다. 제2 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래되고, 여기서 제1 및 제2 항원 결합 영역 또는 항체는 동일한 항원에 결합하고; 및 CAR의 기능을 평가, 결정 또는 측정하는 단계를 포함한다.

[0018] 일부 구현예에서, CAR의 기능을 평가, 결정 또는 측정하는 것은 CAR의 토닉(tonic) 신호전달 강도를 평가하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 토닉(tonic) 신호전달 강도를 평가, 결정 또는 측정하는 것은 CDV 희석 검정 및/또는 활성화 마커에 대한 항체 염색에 의한 발현 평가를 포함한다. 일부 구현예에서, CAR의 기능을 평가, 결정 또는 측정하는 것은 종양 살해 효능, 종양 제거 효능, 생체 내 생존, 생체 내 종양 제거, 종양 부담의 생체 내 감소 중 하나 이상을 알아내는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 제1 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된 CDR을 제2 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된 FR과 조합하는 것을 포함하는 하이브리드 scFv로 CAR을 제조하는 것을 포함하거나 더 포함할 수 있으며, 여기서 제1 및 제2 항원 결합 영역은 또는 항체는 동일한 항원에 결합한다.

[0019] 일부 구현예에서, LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3은 각각 서열번호 141의 가변 영역의 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3에 대해 적어도 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위)의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 여기서 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3은 각각 서열번호 140의 가변 영역의 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3에 대해 적어도 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97,

98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위)의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0020] 일부 구현예에서, LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3은 각각 서열번호 144의 가변 영역의 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3에 대해 적어도 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위)의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 여기서 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3은 각각 서열번호 143의 가변 영역의 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3에 대해 적어도 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위)의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0021] "단일 쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 각각의 CDR과 같은 항체의 VH 및 VL 도메인의 적어도 일부를 포함하며, 여기서 이들 도메인은 단일 폴리펩타이드 쇄에 존재한다. 일부 구현예에서 scFv는 중쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 및 경쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3을 포함하는 것으로 고려된다. CDR1, CDR2 또는 CDR3은 각각 CDR1, CDR2 또는 CDR3으로서 본원에 제공된 서열번호에 제시된 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있음이 추가로 고려된다. 또한, CDR은 특정 CDR 서열의 한쪽 또는 양쪽 측면에 인접하는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23개 또는 그 이상의 인접 아미노산 잔기(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위)를 포함할 수 있고; 따라서, 서열번호 9-14, 23, 24, 25, 110-115 및 126-131에 나타낸 것과 같은 특정 CDR 서열의 N-말단 또는 C-말단 말단에 하나 이상의 추가 아미노산이 있을 수 있다. 일부 구현예에서 scFv는 중쇄 가변 영역의 HFR1, HFR2, HFR3 및/또는 HFR4 및 경쇄 가변 영역의 LFR1, LFR2, LFR3 및/또는 LFR4를 포함하는 것으로 추가로 고려된다. FR은 CDR에 인접하는 영역이다. 예를 들어, scFv는 아미노에서 카르복시 말단까지, HFR1, HCDR1, HFR2, HCDR2, HFR3, HCDR3 및 HFR4를 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 유사하게, scFv는 아미노에서 카르복시 말단까지, LFR1, LCDR1, LFR2, LCDR2, LFR3, LCDR3 및 LFR4를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, LFR1, LFR2, LFR2 또는 LFR4는 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, LFR1, LFR2, LFR2 또는 LFR4으로 본원에 제공된 서열번호에 제시된 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있음이 추가로 고려된다. FR은 또한 특정 FR 서열의 한쪽 또는 양쪽 측면에 인접하는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 또는 그 이상의 연속 아미노산 잔기(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위)를 포함할 수 있고; 따라서 서열번호 15-22, 26-31, 116-123 및 132-139에 제시된 것과 같은 특정 FR 서열 말단의 N-말단 또는 C-말단에 하나 이상의 추가 아미노산이 있을 수 있다.

[0022] 일부 구현예에서, LFR1은 서열번호 29와 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, LFR2는 서열번호 30과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, LFR3은 서열번호 31과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, LFR4는 서열번호 22과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, LCDR1은 서열번호 12와 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, LCDR2는 서열번호 13과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, LCDR3은 서열번호 14와 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, HFR1은 서열번호 26과 적어도,

최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, HFR2는 서열번호 27과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, HFR3은 서열번호 28과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, HFR4는 서열번호 18과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, HCDR1은 서열번호 9와 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, HCDR2는 서열번호 10과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, HCDR3은 서열번호 11과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0023] 일부 구현예에서, LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및/또는 LCDR3은 각각 서열번호 29, 30, 31, 22, 12, 13 및 14의 아미노산 서열을 포함하고, HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및/또는 HCDR3은 각각 서열 26, 27, 28, 18, 9, 10 및 11의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및/또는 LCDR3은 각각 서열번호 19, 20, 21, 22, 24, 13 및 25의 아미노산 서열을 포함하고; 및 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및/또는 HCDR3은 각각 서열번호 15, 16, 17, 18, 9, 10 및 23의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, VL은 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하고 VH는 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함한다. 추가 구현예에서, VL은 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하고 VH는 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함한다.

[0024] 일부 구현예에서, LFR1은 서열번호 19와 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, LFR2는 서열번호 20과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, LFR3은 서열번호 21과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, LFR4는 서열번호 22과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, LCDR1은 서열번호 24와 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, LCDR2는 서열번호 13과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, LCDR3은 서열번호 25와 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한

임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, HFR1은 서열번호 15와 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, HFR2는 서열번호 16과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, HFR3은 서열번호 17과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, HFR4는 서열번호 18과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, HCDR1은 서열번호 9와 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, HCDR2는 서열번호 10과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, HCDR3은 서열번호 23과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0025] 일부 구현예에서, 경쇄 가변 영역은 서열번호 5에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열 및 서열번호 6에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 경쇄 가변 영역은 서열번호 5와 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 99, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 서열번호 6과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.

[0026] 일부 구현예에서, 경쇄 가변 영역은 서열번호 7에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열 및 서열번호 8에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 경쇄 가변 영역은 서열번호 7과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 99, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 서열번호 8과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.

[0027] 일부 구현예에서, LFR1은 서열번호 136과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, LFR2는 서열번호 137과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, LFR3은 서열번호 138과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, LFR4는 서열번호 139와 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64,

65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, LCDR1은 서열번호 113과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, LCDR2는 서열번호 114와 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, LCDR3은 서열번호 115와 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, HFR1은 서열번호 132와 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, HFR2는 서열번호 133과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, HFR3은 서열번호 134와 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, HFR4는 서열번호 135와 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, HCDR1은 서열번호 110과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, HCDR2는 서열번호 111과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, HCDR3은 서열번호 112와 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0028] 일부 구현예에서, LFR1은 서열번호 120과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, LFR2는 서열번호 121과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, LFR3은 서열번호 122와 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, LFR4는 서열번호 123과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, LCDR1은 서열번호 129와 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, LCDR2는 서열번호 130과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85,

86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, LCDR3은 서열번호 131과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, HFR1은 서열번호 116과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, HFR2는 서열번호 117과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, HFR3은 서열번호 118과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, HFR4는 서열번호 119와 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, HCDR1은 서열번호 126과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, HCDR2는 서열번호 127과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, HCDR3은 서열번호 128과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0029] 일부 구현예에서, LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및/또는 LCDR3은 각각 서열번호 136, 137, 138, 139, 113, 114 및 115의 아미노산 서열을 포함하고, HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및/또는 HCDR3은 각각 서열 132, 133, 134, 135, 110, 111 및 112의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및/또는 LCDR3은 각각 서열번호 120, 121, 122, 123, 129, 130 및 131의 아미노산 서열을 포함하고; 및 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및/또는 HCDR3은 각각 서열번호 116, 117, 118, 119, 126, 127 및 128의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, VL은 서열번호 141의 아미노산 서열을 포함하고 VH는 서열번호 140의 아미노산 서열을 포함한다. 추가 구현예에서, VL은 서열번호 144의 아미노산 서열을 포함하고 VH는 서열번호 143의 아미노산 서열을 포함한다.

[0030] 일부 구현예에서, 경쇄 가변 영역은 서열번호 141에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열 및 서열번호 140에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 경쇄 가변 영역은 서열번호 141과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 99, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 서열번호 140과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.

[0031] 일부 구현예에서, 경쇄 가변 영역은 서열번호 144에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열 및 서열번호 143에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 경쇄 가변 영역은 서열번호 144와 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 99, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 서열번호 143과 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99

또는 100%(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.

[0032] 일부 구현예에서, LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및/또는 LCDR3은 각각 서열번호 5의 가변 영역의 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3의 아미노산 서열을 포함하고; 및/또는 여기서 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3은 각각 서열번호 5의 가변 영역의 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3의 아미노산 서열을 포함한다.

[0033] 일부 구현예에서, LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및/또는 LCDR3은 각각 서열번호 7의 가변 영역의 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3의 아미노산 서열을 포함하고; 및/또는 여기서 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3은 각각 서열번호 8의 가변 영역의 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3의 아미노산 서열을 포함한다.

[0034] 일부 구현예에서, LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및/또는 LCDR3은 각각 서열번호 141의 가변 영역의 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3의 아미노산 서열을 포함하고; 및/또는 여기서 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3은 각각 서열번호 140의 가변 영역의 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3의 아미노산 서열을 포함한다.

[0035] 일부 구현예에서, LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및/또는 LCDR3은 각각 서열번호 144의 가변 영역의 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3의 아미노산 서열을 포함하고; 및/또는 여기서 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3은 각각 서열번호 143의 가변 영역의 HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3의 아미노산 서열을 포함한다.

[0036] 용어 하이브리드는 하나의 항원 결합 영역 또는 항체, 예컨대 scFv, 항체, 나노바디 또는 다른 항체-유래 항원-결합 단편의 항원 결합 영역으로부터의 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, HFR1, HFR2, HFR3 및 HFR4를 갖고, 상이한 항원 결합 영역 또는 항체, 예컨대 scFv, 항체, 나노바디 또는 다른 항체-유래 항원-결합 단편의 항원 결합 영역으로부터의 LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 갖는 scFv를 지칭한다. 하이브리드 scFv에서, 제1 항원 결합 영역으로부터의 LFR1, LFR2, LFR3, LFR4, HFR1, HFR2, HFR3 및 HFR4 및 LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3은 제2 항원 결합 영역으로부터 유래된다. 따라서, 하나의 항원 결합 분자의 CDR 영역은 상응하는 순서로 다른 항원 결합 분자의 FR에 이식된다. 이것은 한 항체의 VH 및 VL 영역의 FR과 다른 항체의 VH 및 VL 영역의 CDR의 조합을 입증하는 본원의 구현예에 의해 추가로 예시된다. CDR 및 FR은 항체로부터 직접 유도될 필요는 없지만 VH 및 VL 영역, 예를 들어 다른 scFv, 나노바디, TCR 및 당업계에 공지되고 본원에 기재된 기타 항원 결합 영역을 포함하는 임의의 항원 결합 단편으로부터 유도될 수 있다. 하이브리드는 하이브리드 CAR의 FR 또는 CDR에서 추가로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 또는 17개 이상의 치환(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위)을 포함하거나, 최대로 또는 적어도 포함할 수 있다. 본 개시내용의 하이브리드 scFv는 동일한 항원에 결합하는 2개의 상이한 항원 결합 영역 또는 항체의 하이브리드이다. 일부 구현예에서, 2개의 상이한 항원 결합 영역 또는 항체는 동일한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합한다. 일부 구현예에서, 2개의 상이한 항원 결합 영역 또는 항체는 동일한 항원 상의 중첩 에피토프에 결합한다. 일부 구현예에서, 2개의 상이한 항원 결합 영역 또는 항체는 항원 상의 동일한 에피토프에 결합한다. 하이브리드 scFv는 2개의 상이한 항원 결합 영역 또는 동일한 종의 항체의 하이브리드일 수 있다. 일부 구현예에서, CDR은 인간 항체로부터 유래된 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래되고, FR은 또한 인간 항체로부터 유래된 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된다. 일부 구현예에서, CDR은 비-인간 항체로부터 유래된 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래되고, FR은 또한 비-인간 항체로부터 유래된 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된다. 일부 구현예에서, CDR은 마우스 항체로부터 유래된 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래되고, FR은 또한 마우스 항체로부터 유래된 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된다. 한 구현예에서, CDR은 인간 또는 인간화 항체 또는 항원 결합 영역으로부터 유래된 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래되고, FR은 마우스와 같은 비-인간 기원의 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 하이브리드 scFv는 면역원성이 감소되거나, 낮거나, 유의하지 않은 것으로 결정된 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 하이브리드 scFv는 인간 사용에 대해 승인된 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 하이브리드 scFv는 인간화 scFv를 배제한다. 항원 결합 영역 또는 항체의 다른 적합한 공급원은 염소, 래트, 말, 토끼, 포유동물 및 비인간 영장류를 포함한다. 일부 구현예에서, CDR 및/또는 FR은 비-면역원성이거나 인간에서 면역원성이 감소된다. 일부 구현예에서, 인간에서 하이브리드 scFv 및/또는 하이브리드 scFv를 포함하는 폴리펩타이드의 면역원성 잠재력은 비-하이브리드 scFv 및/또는 비-하이브리드 scFv를 포함하는 폴리펩타이드와 통계적으로 상이하지 않다. 비-하이브리드 scFv는 하이브리드 scFv에서 CDR의 공급원으로 작용하는 scFv 또는 항원 결합 영

역일 수 있거나, 또는 비-하이브리드 scFv는 하이브리드 scFv에서 FR의 공급원으로 작용하는 scFv 또는 항원 결합 영역일 수 있다. 하이브리드 scFv의 CDR은 CDR이 유래된 영역의 항체 또는 항원 결합의 CDR과 관련이 있는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30 (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 의 치환, 결실 또는 부가를 포함하거나, 적어도 또는 최대로 포함할 수 있다. 하이브리드 scFv의 FR은 FR 이 유래된 영역의 항체 또는 항원 결합의 FR 과 관련이 있는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30 (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위)의 치환, 결실 또는 부가를 포함하거나, 적어도 또는 최대로 포함할 수 있다.

[0037] 일부 구현예에서, 하나의 항체 또는 항원 결합 영역으로부터의 FR 및 상이한 항체 또는 항원 결합 영역으로부터의 CDR로 구성된 폴리펩타이드가 존재하며, 여기서 차이는 서열에 기인하고 상이한 에피토프 및/또는 항원에 대한 인식/결합에 기인하지 않기 때문이다. FR 및 CDR은 항원 결합 영역 또는 상이한 토닉(tonic) 신호 강도의 항체로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, FR은 CDR이 유래된 항원 결합 영역 또는 항체보다 더 높은 토닉 신호전달 강도의 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된다. 일부 구현예에서, CDR은 FR이 유래된 항원 결합 영역 또는 항체보다 더 높은 토닉 신호전달 강도의 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된다. 본원에서 사용되는 용어 "토닉 신호전달 강도" 또는 "토닉 신호전달"은 항원 자극의 부재 하에 CAR 신호전달의 자극 수준을 지칭한다. 토닉 신호전달은 CTV 희석 검정(실시예 3에 기술됨) 및/또는 CD137 및/또는 CTLA-4(실시예 3에 기술됨)와 같은 활성화 마커에 대한 항체 염색에 의한 항원-비의존적 활성화-마커 발현 평가에 의해 결정될 수 있다. 일부 구현예에서, CTV 희석 검정에서 중간 형광 강도(MFI)는 하이브리드 scFv와 비교하여 하이브리드 scFv의 FR 또는 CDR과 동일한 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된 비-하이브리드 scFv를 갖는 세포에서 적어도 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4 또는 5배(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 더 높다. 일부 구현예에서, CD137+ 발현은 하이브리드 scFv를 갖는 세포에서 FR 또는 CDR과 동일한 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된 비-하이브리드 scFv 에 비해 적어도 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50배(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 더 높다. 일부 구현예에서, CTLA-4+ 발현은 FR 또는 CDR과 동일한 항원 결합 영역 또는 항체에서 유래된 비-하이브리드 scFv와 비교하여 하이브리드 scFv를 갖는 세포에서 적어도 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50배 (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 더 높다. 또한, 하이브리드 scFv는 상이한 토닉(tonic) 신호 강도의 CDR 및 FR을 포함할 수 있다. 예를 들어, CAR에서 유래된 CDR은 FR이 유래된 것에서 유래된 CAR 과 비교하여 CTV 희석 분석에서 적어도 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4 또는 5배(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) MFI를 나타낼 수 있다. 일부 구현예에서, CAR에서 유래된 CDR은 CDR이 유래된 것에서 유래된 CAR 과 비교하여 CTV 희석 분석에서 적어도 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4 또는 5배(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) MFI를 나타낼 수 있다. 일부 구현예에서, CAR에서 유래된 CDR은 CDR이 유래된 것에서 유래된 CAR 과 비교하여 적어도 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50배 (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 더 높은 CD137+ 발현을 나타낼 수 있다. 일부 구현예에서, CAR에서 유래된 FR은 FR이 유래된 것에서 유래된 CAR 과 비교하여 적어도 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50배 (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 더 높은 CD137+ 발현을 나타낼 수 있다. 일부 구현예에서, CAR에서 유래된 FR은 FR이 유래된 것에서 유래된 CAR 과 비교하여 적어도 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50배 (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 더 높은 CD137+ 발현을 나타낼 수 있다. 일부 구현예에서, CAR에서 유래된 CDR은 CDR이 유래된 것에서 유래된 CAR 과 비교하여 적어도 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50배 (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 더 높은 CTLA4+ 발현을 나타낼 수 있다. 일부 구현예에서, CAR에서 유래된 FR은 FR이 유래된 것에서 유래된 CAR 과 비교하여 적어도 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50배 (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 더 높은 CTLA4+ 발현을 나타낼 수 있다. 일부 구현예에서, CAR에서 유래된 CDR은 CDR이 유래된 것에서 유래된 CAR 과 비교하여 적어도 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50배 (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 더 높은 활성화 마커 발현을 나타낼 수 있다. 일부 구현예에서, CAR에서 유래된 FR은 FR이 유래된 것에서 유래된 CAR 과 비교하여 적어도 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50배 (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 더 높은 활성화 마커 발현을 나타낼 수 있다. 폴리펩타이드는 비-하이브리드 scFv를 갖는 CAR과 비교하여 증가된 종양 제거 활성을 갖는 것으로 추가로 정의되는 것일 수 있으며, 여기서 비-하이브리드 scFv는 하이브리드 scFv FR 및/또는 여기서 폴리펩타이드는 비-하이브리드 scFv를 갖는 CAR과 비교하여 증가된 종양 제거 활성을 갖고, 비-하이브리드 scFv는 하이브리드 scFv CDR과 동일한 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된다. 예를 들어, 하이브리드 scFv를 포함하는 CAR T 세포는 공동배양 후 적어도 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30일 후 FR 또는 CDR 과 같은 동일한 항원 결합 영역 또는 항체에서 유래된 비-하이브리드 scFv보다 적어도 2, 3, 4 또는 5배 미만인 표적

세포 배수 변화를 나타낼 수 있다. 일부 구현예에서, 폴리펩타이드는 비-하이브리드 scFv를 갖는 CAR과 비교하여 증가된 종양 제거 활성을 가지며, 여기서 비-하이브리드 scFv는 하이브리드 scFv FR의 동일한 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래되고/되거나 여기서 폴리펩타이드는 비-하이브리드 scFv를 갖는 CAR과 비교하여 증가된 종양 살해 활성을 가지며, 여기서 비-하이브리드 scFv는 하이브리드 scFv CDR과 동일한 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된다. 예를 들어, 하이브리드 scFv를 포함하는 CAR T 세포는 T 세포 주사 후 적어도 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140,160 또는 180일 이후의 FR 또는 CDR과 같은 동일한 항원 결합 영역 또는 항체로부터 유래된 비-하이브리드 scFv보다 적어도 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100, 500 또는 1000배 이상 종양 제거 배수 변화를 나타낼 수 있다.

[0038] 일부 구현예에서, 폴리펩타이드는 VH와 VL 사이에 링커를 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 4-40개 아미노산 길이이다. 일부 구현예에서, 링커는 적어도, 최대 또는 약 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50개 (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 의 아미노산 잔기 길이이다. 일부 구현예에서, 링커는 적어도 4개의 글리신 및/또는 세린 잔기를 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50개 (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 의 글리신 및/또는 세린 잔기를 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 $(GGGGS)_n$을 포함하며, 여기서 n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위)이다. 일부 구현예에서, 링커는 GSTSGGGSGGGSGGGGSS (서열번호 32) 또는 서열번호 32에 대해 적어도 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% (또는 그 안의 임의의 도출가능한 범위)의 서열 동일성을 갖는 링커를 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 $(EAAAK)_n$의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있으며, 여기서 n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10(또는 그 안의 임의의 도출가능한 범위)이다. 일부 구현예에서, 링커는 GGGGS를 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 $(GGGGS)_4$이다.

[0039] 일부 구현예에서, VH는 VL에 아미노 근위이다. 일부 구현예에서, VH는 VL에 카르복시 근위이다. 제1 영역은 제1 영역이 제2 영역의 카르복시 말단에 부착될 때 제2 영역에 카르복시 근위이다. 첫 번째 영역과 두 번째 영역 사이에 추가로 개재된 아미노산 잔기가 있을 수 있다. 따라서, 개재 아미노산 잔기를 갖지 않는 것으로 구체적으로 명시되지 않는 한, 영역이 바로 인접할 필요는 없다. 용어 "아미노 근위"는 제1 영역이 제2 영역의 아미노 말단에 부착될 때 제1 영역이 제2 영역에 아미노 근위이라는 점에서 유사하게 정의된다. 유사하게, 달리 언급되지 않는 한, 제1 및 제2 영역 사이에 추가 개재 아미노산 잔기가 있을 수 있다.

[0040] 일부 구현예에서, 폴리펩타이드는 scFv, 막관통 도메인 및 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 영역을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에서 논의되는 CAR 분자는 CAR 분자의 3개의 주요 영역, 즉 하나 이상의 표적 분자(들)에 결합하는 세포외 도메인, 1차 세포내 신호전달 도메인을 함유하는 세포질 영역 및 세포외 도메인과 세포질 도메인 사이의 막관통 영역을 갖는다. 일부 CAR 분자에는 세포외 도메인과 막관통 도메인 사이에 스페이서가 있다. 추가로, 하나 이상의 링커는 하나 이상의 영역 사이 또는 그 내에, 예를 들어 세포외 도메인 내의 상이한 결합 영역 사이 또는 결합 영역 내, 예를 들어 경쇄(VH)의 가변 영역과 중쇄(VL)의 가변 영역 사이의 CAR 분자에 포함될 수 있다. 특정 영역에 관한 모든 실시예는 여기에 개시된 임의의 다른 특정 영역에 대해 구현될 수 있다. 이들 영역 중 임의의 영역은 기능에 따라 다른 영역의 N-말단 측 또는 C-말단 측에서 바로 인접할 수 있지만 또한 연속 영역 사이에 개재된 아미노산을 적어도 또는 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 , 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 45, 49 , 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74 , 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99 개 (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 가질 수 있는 것으로 고려된다. 일부 구현예에서, 폴리펩타이드는 단일 막관통 도메인 및/또는 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 단일 세포질 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리펩타이드는 아미노 근위 말단에서 카르복시 근위 말단으로 순서대로 scFv, 막관통 도메인 및 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, CAR은 단일특이적이다. 일부 구현예에서, CAR은 이중특이적이다. 일부 구현예에서, CAR은 막관통 도메인과 scFv 사이에 세포외 스페이서를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 세포외 스페이서의 길이는 8 내지 1000개 아미노산이다. 일부 구현예에서, 세포외 스페이서의 길이는 8 내지 500개 아미노산이다. 일부 구현예에서, 세포외 스페이서는 길이가 100-300개 아미노산이다. 일부 구현예에서, 세포외 스페이서는 100개 미만의 아미노산을 갖는다. 일부 구현예에서, 세포외 스페이서는 적어도, 최대,

정확히 또는 약 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 99번 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 4, 142, 14 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 7, 164, 165, 166, 3,167,101 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 9, 192, 19, 191 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209 , 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 3, 227, 2928, 3, 227, 2928, , 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 5, 249, 250, 251, 252, 54, 2 , 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 79,2 , 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 6, 299, 300, 301, 302, 300, 301, 302, 3043, 0 , 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 3, 323, 292,3 , 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 5, 349, 350, 351, 352, 5453, 352, 5453 , 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 3, 374, 375, 376, 3738, 7978, , 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 6, 399, 400, 401, 402, 0403, 0 , 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 3, 427, 2928, 3, 4, 4, 4, 4, 4 , 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 5 453, 4 , 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 7978, 4 , 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 또는 500개의 아미노산(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위)이다. 일부 구현예에서, 세포외 스페이서는 IgG4 힌지, CD8 힌지, IgG1 힌지, CD34 힌지 또는 이들의 단편이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포외 스페이서는 IgG4 힌지 또는 이의 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포외 스페이서는 CH1, CH2 및/또는 CH3 영역을 포함하거나 더 포함한다. 일부 구현예에서, 스페이서는 IgG4 힌지 폴리펩타이드, CH2 영역 및 CH3 영역을 포함하거나 이로 구성될 수 있다. 일부 구현예에서, CH2 영역은 L235E 및/또는 N297Q 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 스페이서는 서열번호 36에 대해 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, 스페이서는 서열번호 36 또는 이의 단편에 대하여 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 99, 98, 99, 100% 서열 동일성(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위)을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0041] 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 T 세포 수용체, CD28, CD3ε(엡실론), CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD123, CD134, CD137 또는 CD154 막관통 도메인의 알파 또는 베타 사슬이다. 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 CD28 막관통 도메인을 포함하거나 CD28 막관통 도메인이거나 CD28 막관통 도메인으로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 서열번호 37에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 서열번호 37 또는 이의 단편에 대하여 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% 서열 동일성(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위)을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0042] 일부 구현예에서, 1차 세포내 신호전달 도메인은 CD3-제타이거나 이를 포함하거나 CD3-제타의 세포내 신호전달 도메인으로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 1차 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 39에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, 1차 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 39 또는 이의 단편에 대하여 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% 서열 동일성(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위)을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0043] 일부 구현예에서, 세포질 영역은 하나 이상의 공자극 도메인을 더 포함한다. 일부 구현예에서, 세포질 영역은 2개의 공자극 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 공자극 도메인(들)은 4-1BB(CD137), CD28, IL-15Rα, OX40, CD2, CD27, CDS, ICAM-1, LFA-1(CD11a/CD18) 및/또는 ICOS(CD278) 중 하나 이상으로부터의 공자극 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 공자극 도메인은 CD28로부터의 공자극 도메인 또는 CD28로부터 유래된 공자극 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 공자극 도메인은 서열번호 38에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, 공자극 도메인은 서열번호 38 또는 이의 단편에 대하여 적어도, 최대 또는 약 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73,

74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% 서열 동일성(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위)을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0044] 일부 구현예에서, 폴리펩타이드는 막관통 도메인과 세포질 영역 사이에 비틀림 링커를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 비틀림 링커는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산 잔기(또는 그 안의 임의의 유도 가능한 범위)를 포함하거나 이로 구성될 수 있다. 일부 구현예에서, 아미노산 잔기는 알라닌 잔기를 포함하거나 이로 구성될 수 있다. 일부 구현예에서, 비틀림 링커는 적어도, 최대 또는 정확히 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 알라닌 잔기를 포함한다. 일부 구현예에서, 비틀림 링커는 적어도, 최대 또는 정확히 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위)의 인접 알라닌 잔기를 포함한다. 일부 구현예에서, 비틀림 링커는 2 또는 4개의 알라닌 잔기로 이루어진다. 일부 구현예에서, 비틀림 링커는 2개의 알라닌 잔기를 포함한다. 일부 구현예에서, 비틀림 링커는 3개의 알라닌 잔기를 포함한다. 일부 구현예에서, 비틀림 링커는 4개의 알라닌 잔기를 포함한다. 일부 구현예에서, 비틀림 링커는 적어도, 최대 또는 정확히 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위)의 인접 알라닌 잔기를 포함한다. 일부 구현예에서, 비틀림 링커는 2개의 알라닌 잔기로 이루어진다.

[0045] 일부 구현예에서, scFv는 항-CD20 scFv를 포함한다. 일부 구현예에서, scFv는 항-GD2 scFv를 포함한다. 일부 구현예에서, scFv는 항-BCMA, 항-CD123, 항-CD138, 항-CD19, 항-CD20, 항-CD22, 항-CD38, 항-CD5, 항-Ig 카파쇄, 항-LeY, 항-NKG2D, 항-ROR1, 항-WT1, 항-C-Met, 항-CAIX, 항-CD133, 항-CD171, 항-CD70, 항-CEA, 항-EGFR, 항-EGFRvIII, 항-Ep-CAM, 항-EphA2, 항-FAP, 항-GD2, 항-GPC3, 항-Her2, 항-HPV16-E6, 항-IL13Ra2, 항-MAGEA3, 항-MAGEA4, 항-MART1, 항-메소틀린, 항-MUC1, 항-MUC6, 항-NY-ESO-1, 항-PD-L1, 항-PSCA, 항-PSMA, 항-ROR1 또는 항-VEGFR2 scFv를 포함한다. .

[0046] 본원에 개시된 폴리펩타이드 및 이의 부분을 암호화하는 서열을 포함하는 핵산이 구현예에서 제공된다. 핵산은 RNA 또는 DNA를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 핵산은 발현 구조체이다. 일부 구현예에서, 발현 구조체는 벡터이다. 특정 구현예에서, 벡터는 바이러스 벡터이다. 특정 구현예에서, 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터이거나 레트로바이러스로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 레트로바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터를 포함하거나 렌티바이러스로부터 유래된다. 특정 구현예에서, 바이러스 벡터는 통합 핵산임을 주목한다. 또한, 핵산은 CAR을 암호화하는 핵산(예를 들어 가이드 RNA)이 CAR-암호화 서열을 TRAC 유전자와 같은 게놈의 특정 좌로 통합하기 위해 사용되도록 유전자 편집에 관여하는 분자일 수 있다. 이는 일부 구현예에서 CRISPR/Cas9와 같은 유전자 편집 시스템을 포함한다. 핵산, 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 영역 (또는 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 영역)은 다른 서열에 대해 특정 백분율의 "서열 동일성" 또는 "상동성" (예: 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%--또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위)을 갖는다는 것은 정렬될 때 염기(또는 아미노산)의 비율이 두 서열을 비교할 때 동일함을 의미한다. 이러한 정렬 및 퍼센트 상동성 또는 서열 동일성은 당업계에 공지된 소프트웨어 프로그램, 예를 들어 Ausubel 등. eds. (2007) Current Protocols in Molecular Biology에 기재된 것을 사용하여 결정될 수 있다. 핵산은 본원에 제공된 임의의 핵산 서열번호에 대해 이러한 서열 동일성 또는 상동성을 가질 수 있는 것으로 고려된다.

[0047] 다른 구현예에서, 본원에서 논의된 임의의 폴리펩타이드의 전부 또는 일부를 암호화하는 핵산을 포함하는 세포 또는 세포의 집단이 있다. 특정 구현예에서, 세포 또는 세포의 집단은 이의 게놈 내에 본원에 기재된 임의의 폴리펩타이드를 암호화하는 서열을 포함한다. 이는 세포의 게놈에 통합된 렌티바이러스 또는 레트로바이러스를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 일부 구현예에서, 세포 또는 세포의 집단은 서열번호 1-144 중 임의의 아미노산 서열을 갖는 것을 포함하지만 이에 제한되지는 않는 본원에서 논의된 임의의 CAR의 전부 또는 일부를 발현한다. CAR 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산이 도입된 세포의 자손(F1, F2 및 그 이상)은 본원에 개시된 세포 또는 세포의 집단에 포함된다. 일부 구현예에서, 세포 또는 세포의 집단은 T 세포, 자연 살해 (NK) 세포, 자연 살해 T 세포 (NKT), 불변 자연 살해 T 세포 (iNKT), 줄기세포, 림프 전구 세포, 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 말초 혈액 줄기세포 (PBSC), 조혈 줄기 및 전구 세포(HSPC), 조혈 줄기 세포(HSC), CD34+ 세포, 말초 혈액 줄기세포(PBSC), 골수 세포, 태아 간세포, 배아 줄기세포, 제대혈세포, 유도만능줄기세포 (iPS 세포) 이다. 특정 구현예는 T 세포 또는 NK 세포인 세포에 관한 것이다. 일부 구현예에서, T 세포는 나이브 기억 T 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 나이브 기억 T 세포는 CD4+ 또는 CD8+ T 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 CD4+ 및 CD8+ T 세포 모두를 포함하는 세포의 집단이다. 일부 구현예에서, 세포는 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 포함하는 나이브 기억 T 세포를 포함하는 세포의 집단이다. 일부 구현예에서, T 세포는 CD14 고갈, CD25 고갈 및/또는 CD62L 농축된 PBMC의 집단 유래 T 세포를 포함한다.

[0048] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 하나 이상의 폴리펩타이드를 포함하는 세포에 관한 것이다. 일부

구현예에서, 세포는 면역 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 전구 세포 또는 줄기세포이다. 일부 구현예에서, 전구 세포 또는 줄기세포는 시험관 내에서 면역 세포로 분화된다. 일부 구현예에서, 세포는 T 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 CD4+ 또는 CD8+ T 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 자연 살해 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 생체 외이다. 용어 면역 세포는 감염성 질병 및 이물질 모두로부터 신체를 방어하는 데 관여하는 면역계의 세포를 포함한다. 면역 세포는 예를 들어 호중구, 호산구, 호염기구, 자연 살해 세포, B 세포 및 T 세포와 같은 림프구 및 단핵구를 포함할 수 있다. T 세포는 예를 들어 CD4+, CD8+, 도움 T 세포, 세포독성 T 세포, γδ T 세포, 조절 T 세포, 억제 T 세포 및 자연 살해 T 세포를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 세포는 조절 T 세포이다.

[0049] 일부 구현예에서, 세포의 집단은 10^3-10^8 개 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 집단은 약, 적어도 약 또는 최대 약 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10}, 10^{11}, 10^{12}(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위)개 세포이다. 특정 구현예에서, 약 10^3-10^8개의 세포가 있다. 특정 구현예에서, 세포는 세포를 받을 환자에 대해 자가(autologous)이다. 다른 구현예에서, 세포는 자가가 아니며 동종이계(allogenic)일 수 있다.

[0050] 본 개시내용의 일부 구현예에서, 방법 측면은 세포가 본 개시내용의 폴리펩타이드를 암호화하는 바이러스로 감염되는 것과 관련된다. 일부 구현예에서, 바이러스는 렌티바이러스 또는 렌티바이러스 유래 바이러스 또는 벡터를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 자연 살해 T 세포(NKT), 불변 자연 살해 T 세포(iNKT), 줄기 세포, 림프 전구 세포, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 골수 세포, 태아 간 세포, 배아 줄기 세포, 제대혈 세포, 유도 만능 줄기 세포(iPS 세포)이다. 일부 구현예에서, 세포는 T 세포 또는 NK 세포이다. 일부 구현예에서, T 세포는 나이브 메모리 T 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 나이브 메모리 T 세포는 CD4+ 또는 CD8+ T 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 아직 T 세포 또는 NK 세포가 아니고, 상기 방법은 세포의 T 세포 또는 NK 세포로의 분화를 촉진하는 조건 하에 세포를 배양하는 것을 더 포함한다.

[0051] 일부 구현예에서, 방법은 핵산을 세포 내로 도입하기 전 및 또는 후에 세포를 증폭시키는 조건 하에 세포를 배양하는 것을 더 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 무혈청 배지와 함께 배양된다.

[0052] 추가 방법은 본 개시내용의 폴리펩타이드를 발현하는 세포 집단을 포함하는 조성물의 유효량을 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 암에 걸린 환자를 치료하는 것에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 환자는 재발성 또는 재발성 암을 갖는다. 추가 구현예는 환자에게 추가 요법을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 환자는 이전에 암 치료를 받은 적이 있다. 일부 구현예에서, 환자는 이전 치료에 내성이 있는 것으로 결정되었다. 이전 치료는 추가 요법으로서 기재된 것과 같은 본원에 기재된 암 치료제일 수 있다. 추가 구현예는 환자에게 화학요법 및/또는 방사선을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 추가 요법은 면역요법을 포함한다. 일부 구현예에서, 추가 요법은 본원에 기재된 추가 요법을 포함한다. 일부 구현예에서, 면역요법은 면역 체크포인트 억제제 요법을 포함한다. 일부 구현예에서, 면역요법은 본원에 기재된 면역요법을 포함한다. 일부 구현예에서, 면역 체크포인트 억제제 요법은 PD-1 억제제 및/또는 CTLA-4 억제제를 포함한다. 일부 구현예에서, 면역 관문 억제제 요법은 본원에 기재된 하나 이상의 면역 관문 단백질의 하나 이상의 억제제를 포함한다.

[0053] 일부 구현예에서, 암은 CD20+ 암을 포함하며, 여기서 CD20+ 암은 CD20+ 세포를 포함하거나 또는 종양 세포의 집단에서 적어도 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 또는 90% CD20+ 암 세포를 포함하는 것이다. 일부 구현예에서, 암은 흑색종을 포함한다. 본 개시내용의 CAR 폴리펩타이드는 본원에 개시된 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이의 전부 또는 일부와 적어도, 최대 또는 정확히 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 동일한(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 아미노산 서열로 이루어진 영역, 도메인, 링커, 스페이서 또는 이의 다른 단편을 포함할 수 있다.

[0054] 암은 림프종 또는 신경모세포종일 수 있다. CAR이 CD20 CAR을 포함하는 구현예에서, 표적화된 암은 림프종일 수 있다. CAR이 GD2 CAR을 포함하는 구현예에서, 표적화된 암은 신경모세포종일 수 있다. 본 개시내용의 방법에서 치료될 수 있는 암은 또한 방광, 혈액, 뼈, 골수, 뇌, 유방, 결장, 식도, 위장, 잇몸, 머리, 신장, 간, 폐, 비인두, 목, 난소, 전립선, 피부, 위, 고환, 혀 또는 자궁. 또한, 암은 구체적으로 다음과 같은 조직학적 유형일 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다: 신생물, 악성; 암종; 암종, 미분화암; 거대 및 방추 세포 암종; 소세포 암종; 유두암; 편평 세포 암종; 림프상피암; 기저 세포 암; 모기질 암종; 이행 세포 암종; 유두 이행 세포 암종; 선암종; 가스트린종, 악성; 담관암종; 간세포 암; 결합된 간세포 암종 및 담관암종; 섬유주 선암종; 선양 낭성

암종; 선종 폴립의 선암종; 선암종, 가족성대장폴립증(familial polyposis coli); 고형 암종; 유암종, 악성; 세기관지-폐포 선암종; 유두 선암종; 난염성 암종; 호산성(acidophil) 암종; 호산성(oxyphilic) 선암종; 호염기구 암종; 투명 세포 선암종; 과립 세포 암종; 여포 선암종; 유두 및 여포 선암종; 비피막 경화성 암종; 부신 피질 암종; 자궁내막암종; 피부 부속기 암종; 아포크린 선암종; 피지선암종; 귀지 선암종; 점막표피양암종; 낭선암종; 유두 낭선암; 유두 장액성 낭선암종; 점액성 낭선암종; 점액성 선암종; 인장 고리 세포 암종; 침윤성 도관 암종; 수질암; 소엽 암종; 염증성 암종; 파제트병, 유방; 포상 세포 암종; 선편평암종; 편평상피화생이 있는 선암종; 흉선종, 악성; 난소 기질 종양, 악성; 테코마, 악성; 과립막 세포 종양, 악성; 남성모세포종, 악성; 세르톨리 세포 암종; 라이디히 세포 종양, 악성; 지질 세포 종양, 악성; 부신경절종, 악성; 유방외 부신경절종, 악성; 갈색 세포종; 사구체육종; 악성 흑색종; 흑색종 흑색종; 표재성 확산 흑색종; 거대 색소 모반의 악성 흑색종; 상피세포 흑색종; 청색 모반, 악성; 육종; 섬유육종; 섬유성 조직구종, 악성; 점액육종; 지방육종; 평활근육종; 횡문근육종; 배아 횡문근육종; 폐포 횡문근 육종; 기질 육종; 혼합 종양, 악성; 뮬러 혼합 종양; 신모세포종; 간모세포종; 암육종; 간엽종, 악성; 브레너 종양, 악성; 엽상 종양, 악성; 활액 육종; 악성 중피종; 이상 생식세포종; 배아 암종; 기형종, 악성; 난소 기질, 악성; 융모막암종; 중신종, 악성; 혈관육종; 혈관내피종, 악성; 카포시 육종; 혈관 주위 세포종, 악성; 림프관육종; 골육종; 피질옆 골육종; 연골육종; 연골모세포종, 악성; 중간엽 연골육종; 뼈의 거대 세포 종양; 유잉 육종; 치성 종양, 악성; 변색성 상아육종(ameloblastic odontosarcoma); 흑색모세포종, 악성; 변색성 섬유육종(ameloblastic fibrosarcoma); 송과종, 악성; 척색종; 신경교종, 악성; 뇌실막종; 성상세포종; 원형질 성상세포종; 원섬유성 성상세포종; 성상모세포종; 교모세포종; 희소돌기아교종; 희소돌기모세포종; 원시 신경외배엽; 소뇌 육종; 신경절신경모세포종; 신경 모세포종; 망막모세포종; 후각 신경성 종양; 수막종, 악성; 신경섬유육종; 신경연종, 악성; 과립 세포 종양, 악성; 악성 림프종; 호지킨병; 호지킨 림프종; 부육아종; 악성 림프종, 소림프구성; 악성 림프종, 대세포, 미만성; 악성 림프종, 여포; 균상 식육종; 기타 특정 비호지킨 림프종; 악성 조직구증; 다발성 골수종; 비만 세포 육종; 면역증식성 소장 질환; 백혈병; 림프성 백혈병; 형질 세포 백혈병; 적혈구백혈병; 림프육종 세포 백혈병; 골수성 백혈병; 호염기성 백혈병; 호산구성 백혈병; 단핵구 백혈병; 비만 세포 백혈병; 거핵모구성 백혈병; 골수 육종; 및 털세포 백혈병(hairy cell leukemia).

[0055] 특정 구현예에서, 본 개시내용 전체에 걸쳐 기재된 폴리펩타이드는 분리되며, 이는 이들이 세포 환경에서 발견되지 않음을 의미한다. 어떤 경우에는 정제되는데, 이는 아미노산 서열 및/또는 화학식이 다른 폴리펩타이드로부터 완전히 분리되지는 않더라도 대부분 정제된다는 것을 의미한다.

[0056] 본원의 개시내용에서 제공하는, 일부 구현예에서, 키메라 폴리펩타이드 또는 키메라 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산을 포함하는 세포의 집단 또는 약학 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 암을 갖는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.

[0057] 하나 이상의 서열 또는 조성물의 사용은 본원에 기재된 임의의 방법에 기초하여 사용될 수 있다. 다른 구현예는 본 출원 전체에 걸쳐 논의된다. 본 개시내용의 일 측면과 관련하여 논의된 임의의 구현예는 본 개시내용의 다른 측면에도 적용되며 그 반대도 마찬가지이다. 예를 들어, 본원에 기재된 방법의 임의의 단계는 다른 방법에 적용될 수 있다. 또한, 본원에 기재된 임의의 방법은 임의의 단계 또는 단계의 조합을 배제할 수 있다. 실시예 섹션의 구현예는 본원에 기재된 기술의 모든 측면에 적용 가능한 구현예로 이해된다.

[0058] 본 출원 전반에 걸쳐, 용어 "약"은 세포 및 분자 생물학 분야에서 그 값을 결정하기 위해 사용되는 장치 또는 방법에 대한 오차의 표준 편차를 포함한다는 것을 나타내기 위해 그것의 평범하고 일반적인 의미에 따라 사용된다.

[0059] "포함하는"이라는 용어와 함께 사용될 때 "하나" 또는 "한"이라는 단어의 사용은 "하나"를 의미할 수 있지만, "하나 이상", "적어도 하나" 및 "하나 보다는 하나 이상" 의 의미와도 일치한다.

[0060] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "또는" 및 "및/또는"은 서로 조합되거나 배타적인 다수의 구성요소를 설명하는 데 사용된다. 예를 들어, "x, y 및/또는 z"는 "x" 단독, "y" 단독, "z" 단독, "x, y 및 z", "(x 및 y) 또는 z"를 나타낼 수 있다. "x 또는 (y 및 z)"또는 "x 또는 y 또는 z." x, y 또는 z는 실시예에서 구체적으로 제외될 수 있음이 구체적으로 고려된다.

[0061] 단어 "포함하는(comprising)"(및 "포함하다(comprise)" 및 "포함하다(comprises)"과 같은 임의의 형태), "가지는(having)"(및 "가지다(have)" 및 "가지다(has)"과 같은 임의의 형태), "포함하는(including)" (및 "포함하다(includes)" 및 "포함하다(include)"과 같은 임의의 형태), "특성화됨(characterized by)"(및 "다음으로 특성화됨(characterized as)"과 같은 임의의 형태) 또는 "함유하는(containing)"(및 "함유하다(contains)" 및 "함

유하다(contain)" 과 같은 임의의 형태)은 포괄적이거나 개방형이며 추가의 인용되지 않은 요소 또는 방법 단계를 제외하지 않는다.

[0062] 조성물 및 이의 사용 방법은 명세서 전체에 걸쳐 개시된 임의의 성분 또는 단계를 "포함(comprise)", "본질적으로 구성(consist essentially of)" 또는 "구성(consist of)"할 수 있다. "구성된(consisting of)"이라는 문구는 지정되지 않은 요소, 단계 또는 성분을 제외한다. "본질적으로 구성되는(consisting essentially of)"이라는 문구는 기술된 주제의 범위를 지정된 재료 또는 단계 및 기본적이고 새로운 특성에 실질적으로 영향을 미치지 않는 것으로 제한한다. "포함하는(comprising)"이라는 용어의 맥락에서 설명된 실시예는 또한 "구성된(consisting of)" 또는 "본질적으로 구성되는(consisting essentially of)"이라는 용어의 맥락에서 구현될 수 있음이 고려된다.

[0063] 본 발명의 일 실시예와 관련하여 논의된 임의의 제한이 본 발명의 임의의 다른 실시예에 적용될 수 있다는 것이 구체적으로 고려된다. 또한, 본 발명의 임의의 조성물은 본 발명의 임의의 방법에 사용될 수 있고, 본 발명의 임의의 방법은 본 발명의 임의의 조성물을 생산하거나 사용하기 위해 사용될 수 있다. 실시예에 설명된 실시예의 구현예는 또한 발명의 요약, 실시예의 상세한 설명, 청구범위 및 도면 설명에 대한 설명이다.

[0064] 본 발명의 다른 목적, 특징 및 장점은 다음 상세한 설명으로부터 명확해질 것이다. 그러나, 본 발명의 사상 및 범위 내의 다양한 변경 및 수정이 이 상세한 설명으로부터 당업자에게 명백해질 것이므로, 상세한 설명 및 특정 실시예는 본 발명의 특정 구현예를 나타내면서 단지 예시로서 제공되는 것임을 이해해야 한다.

도면의 간단한 설명

[0065] 다음 도면은 본 명세서의 일부를 형성하고 본 발명의 특정 측면을 추가로 입증하기 위해 포함된다. 본 발명은 여기에 제시된 특정 실시예의 상세한 설명과 함께 이들 도면 중 하나 이상을 참조함으로써 더 잘 이해될 수 있다.

도 1a-b. (a) 다양한 항체에서 유래된 scFv로 구성된 CD20 CAR의 개략도. 모든 CAR은 CD28 공자극 도메인을 포함하는 2세대 수용체였다. (b) CD20 CAR 구축에 사용되는 scFv 도메인의 서열.

도 2a-b. 리툭시맙 유래 CD20 CAR은 항원 독립적인 CAR 신호전달을 보여 (a) 활성화 및 고갈 마커의 상향조절 및 (b) 항원 자극 부재 하에 T 세포 증식을 초래한다. CD19 CAR 및 GD2 CAR은 토닉(tonic) 신호전달에 대해 각각 음성 및 양성 대조군으로 포함되었다.

도 3. CAR 분자의 구조적 전환을 유발하는 알라닌 삽입의 개략도를 나타낸다.

도 4. 알라닌 삽입은 CAR 토닉(tonic) 신호 강도를 보정한다. (a) CellTrace Violoet 염료 희석에 의해 정량화된 T-세포 증식 및 (b) 항원 자극 없이 ELISA로 정량화된 사이토카인 생성은 다양한 막관통과 세포질 CD28 도메인 사이에 삽입된 알라닌 잔기 수를 포함하는 리툭시맙 기초 CD20 CAR을 발현하는 T 세포에서 다양한 정도의 항원 독립적 활성화를 보여준다.

도 5. 막관통 및 세포질 CD28 도메인 사이에 삽입된 2개의 알라닌 잔기를 함유하는 리툭시맙 기초 CD20 CAR은 우수한 생체 내 항종양 기능을 초래한다. NOD/scid/γ-/-(NSG) 마우스에 50만 개 반딧불이 루시페라제 발현 라지(Raji) 림프종 세포를 이식하고 종양 주사 7일 후 CD20 CAR 또는 형질도입 마커(EGFRt)를 발현하는 135만 T 세포로 처리했다. 7일 후 동물에게 150만 T 세포를 다시 투여했다. 본 발명에서 테스트된 모든 CAR에는 리툭시맙 기반 scFv, IgG4 힌지-CH2-CH3 세포외 스페이서, CD28 막관통 및 세포질 도메인, CD3 제타 신호전달 도메인이 포함되었다. 0 내지 4개의 알라닌이 CD28 막관통 및 CD28 세포질 도메인 사이에 삽입되었다. 종양 진행은 생물발광 영상화를 통해 모니터링되었으며, 종양 주입 이후 시간의 함수로서의 광도 신호가 표시되었다. 2-알라닌 삽입 변이체는 다른 변이체뿐만 아니라 모(알라닌 삽입 없음) 구성체와 비교하여 우수한 종양 제어 및 연장된 중앙 생존을 보여주었다.

도 6a-b. (a) Leu16 기반, 리툭시맙 기반 또는 하이브리드 scFv 도메인을 포함하는 CD20 CAR의 개략도. 두 개의 하이브리드가 제조되었다. RFR-LCDR 하이브리드만이 기능적이었다(도 7 참조). 모든 CAR은 도 3에 도시된 바와 같이 CD28 공동-자극 도메인을 함유하는 2세대 수용체였다. (b) CD20 CAR 제조에 사용된 scFv 도메인의 서열.

도 7a-b. RFR-LCDR 하이브리드 CD20 CAR은 항원-독립적 CAR 신호전달을 나타내어 (a) 활성화 및 고갈 마커의 상향조절 및 (b) 항원 자극 부재 하에 T 세포 증식을 초래하였다. CD19 CAR 및 GD2 CAR은 토닉(tonic) 신호전달에 대해 각각 음성 및 양성 대조군으로 포함되었다.

도 8. RFR-LCDR 하이브리드 CD20 CAR은 시험관 내 반복된 항원 공격 시 우수한 종양 세포 사멸을 보여주었다. 다양한 CAR 또는 형질도입 마커(EGFRt)를 발현하는 T 세포에 48시간마다 새로운 라지(Raji) 림프종 세포를 공격했다. 생존 가능한 표적 세포 수를 각각의 재시험 전에 유세포 분석에 의해 정량화했다. 여러 기증자의 결과는 RFR-LCDR 하이브리드 CAR이 모(parental) 구성물(Leu16 및 리툭시맙(Rituximab)) 중 하나와 비교하여 우수한 종양 세포 사멸을 나타냈다.

도 9a-c. RFR-LCDR 하이브리드 CD20 CAR은 생체 내에서 우수한 종양 제거를 보여주었다. NSG 마우스에 50만 개 반딧불이 루시퍼라제-발현 라지(Raji) 림프종 세포를 이식하고 도 2에 대해 설명된 2회 용량의 T 세포로 처리하였다. 동물에게 첫 번째 T 세포 처리 55일 후 두 번째 용량의 종양 세포로 재공격했다. (a) 종양 진행은 생물발광 영상화를 통해 모니터링되었다. (b) 생존 곡선은 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 곡선으로 표시되었다. 결과는 하이브리드 CAR이 종양 제거 및 장기 재발 예방에서 모 CD20 CAR 뿐만 아니라 CD19 CAR보다 우수함을 나타냈다. (c) 초기 T-세포 주입 23일 후 말초 혈액에서 CAR-발현 인간 T 세포의 빈도를 유세포 분석에 의해 측정하였다. CAR 내로의 2개의 알라닌 잔기의 첨가는 리툭시맙-기반 수용체를 개선시켰고, 이는 도 5에 도시된 이전 데이터를 확증한다. 2개의 알라닌 삽입이 있는 하이브리드 CAR을 결합하면 초기 종양 제거 속도가 더욱 가속화되고 알라닌 삽입이 없는 하이브리드 CAR에 비해 T-세포 지속성이 크게 증가하여 scFv 변경 및 알라닌 삽입 전략이 결합되어 CAR 기능의 개선에 시너지 효과를 얻을 수 있음을 나타냈다.

도 10a-f. (a) IgG4 스페이서, CD28 막관통 및 세포질 도메인, CD3ζ 신호전달 도메인에 융합된 4개의 상이한 모노클로날 항체로부터 유래된 scFv로 구성된 2세대 항-CD20 CAR 패널의 개략도. CAR은 자가 절단 T2A 펩타이드를 통해 형질도입 마커로 사용된 절단된 EGFR(EGFRt)에 추가로 융합되었다(상단). scFv가 파생된 4개의 항체의 K_D 값 및 CDR 구조 패밀리 명칭이 파생되었다(하단). FR 및 CDR 서열 및 구조 패밀리 명칭은 이전에 기술된 바와 같이 결정되었다(Chothia and Lesk, 1987; Chothia 등., 1989; Kabat 및 Wu, 1971; Martin and Thornton, 1996). (b-c) NSG 마우스에 0.5 x 10^6개 반딧불이-루시페라제를 발현하는 라지(Raji) 세포를 정맥내(i.v.) 주사했다. (b) 종양 진행은 생물발광 영상화에 의해 모니터링되었다(n=그룹당 마우스 6마리). 광도-강도 스케일(radiance-intensity scale)의 최소값과 최대값은 각각 5 x 10^4와 1 x 10^7 이었다. (c) 각 테스트 그룹에 대한 개별 동물의 평균 광도(p/sec/cm2/sr)를 나타낸다. (d) CAR+ T 세포에 대한 활성화 및 고갈 마커 발현은 CD20 항원 자극 없이 다이나비드(Dynabead) 제거 후 11일에 평가되었다. 데이터 막대는 기술적 삼중의 평균 ± 1 표준 편차(S.D.)를 나타낸다. 결과는 3명의 다른 건강한 기증자로부터 유래된 T 세포를 사용한 3개의 독립적인 실험을 대표한다. 달리 명시되지 않는 한, p 값은 쌍을 이루지 않은 양측, 2-표본 스튜던트 t-검정에 의해 결정되었다; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, n.s. 통계적으로 유의하지 않다. (e) 표적 세포(온-타겟, CD19+/CD20+ K562 세포, 오프-타겟, 모 K562 세포)의 부재 또는 존재하에 CTV(CellTrace Violet) 염료를 사용한 2:1 효과기 대 타겟(E:T) 비율에서 CAR^+ T 세포에 대한 4일 T-세포 증식 분석을 나타낸다. 표시된 데이터는 5명의 다른 건강한 기증자의 5가지 독립적인 실험을 나타낸다. (f) CD20 항원 자극 없이 10% dFBS 및 외인성 IL-2 및 IL-15가 보충된 RPMI에서 24시간 동안 배양된 CD20 CAR-T 세포의 대사율을 나타낸다. 데이터 막대는 기술적 삼중의 평균 ± 1 SD를 나타낸다. 결과는 세 명의 다른 건강한 기증자의 세 가지 독립적인 실험을 나타낸다. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, n.s. 통계적으로 유의하지 않다.

도 11a-e. 신호전달 도메인의 비틀림 재배향은 CAR-T 세포 활동을 조정한다. (a) 리툭시맙 기초 CAR에 알라닌 통합의 개략도를 나타낸다. (b) 2:1 E:T 비율에서 표적 세포의 부재 또는 존재 하에서 CellTrace Violet(CTV) 염료를 사용한 4일 T-세포 증식 분석을 나타낸다. 표시된 데이터는 세 명의 다른 건강한 기증자의 세 가지 독립적인 실험을 나타낸다. (c) CAR-T 세포의 TNF-α 생산은 CD20 항원 자극 없이 다이나비드(Dynabead) 제거 후 7일에 측정되었다. 결과는 세 명의 다른 건강한 기증자의 세 가지 독립적인 실험을 나타낸다. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, n.s. 통계적으로 유의하지 않다. (d, e) NSG 마우스에 0.5 x 10^6 반딧불이-루시페라제 발현 라지(Raji) 세포를 정맥 주사한 후 6일(1.35 x 10^6 세포) 및 12일(1.5 x 10^6 세포) 후에 CAR+ T 세포를 2회 투여했다; n=그룹당 6마리의 마우스. (d) 종양 진행은 생물발광 영상화(상단)에 의해 모니터링되었다. 개별 동물의 평균 광도(p/sec/cm2/sr)는 각 그룹(하단)에 대해 표시되었다. (e) 카플란-마이어 생존 곡선. 통계적 유의성은 로그 순위(Mantel-Cox) 테스트에 의해 결정되었다. *p<0.05, **p 0.01, ***p<0.001, n.s. 통계적으로 유의하지 않다.

도 12a-e. scFv 서열 혼성화는 기능적으로 우수한 CAR 변이체를 산출한다. (a) CAR 분자에서 scFv 서열 혼성화의 개략도를 나타낸다. Leu16 및 리툭시맙 기반 scFv의 프레임워크 영역(FR) 및 상보성 결정 영역(CDR)을 혼합

하여 2개의 새로운 CAR 변이체를 생성했다. (b) RFR-LCDR 하이브리드 CAR-T 세포는 반복된 항원 공격 시 우수한 항종양 기능 및 T-세포 증식을 나타낸다. CAR-T 세포는 2일마다 2:1 E:T 비율로 라지(Raji) 세포(CD19+/CD20+)로 공격되었다. T-세포 및 표적-세포 카운트를 유세포 분석에 의해 정량화하였다. 데이터 막대는 기술적 삼중의 평균 ± 1 SD를 나타낸다. 결과는 세 명의 다른 건강한 기증자의 세 가지 독립적인 실험을 나타낸다. (c) 활성화 및 고갈 마커 발현은 CD20 항원 자극 없이 다이나비드(Dynabead) 제거 후 11일에 평가되었다. 데이터 막대는 기술적 삼중의 평균 ± 1 SD를 나타낸다. 결과는 세 명의 다른 건강한 기증자의 세 가지 독립적인 실험을 나타낸다. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, n.s. 통계적으로 유의하지 않다. (d) 2:1 E:T 비율에서 표적 세포의 부재 또는 존재 하에서 CTV(CellTrace Violet) 염료를 사용한 4일 CAR-T 세포 증식 분석을 나타낸다. (e) 항원 자극이 없는 배양물에서 CAR-T 세포의 대사 분석을 나타낸다. CAR-T 세포는 10% 열 불활성화 투석된 소 태아 혈청(HI-dFBS), IL-2 및 IL-15가 보충된 RPMI에서 72시간 동안 배양되었다. 데이터 막대는 기술적 삼중의 평균 ± 1 SD를 나타낸다. 결과는 세 명의 다른 건강한 기증자의 세 가지 독립적인 실험을 나타낸다. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, n.s. 통계적으로 유의하지 않다.

도 13a-g. CAR 단백질의 비틀림 재배향과 함께 scFv 혼성화는 생체 내에서 CAR-T 세포 기능을 추가로 향상시켰다. (a-d) NSG 마우스에 반딧불이-루시퍼라제를 발현하는 라지(Raji) 세포를 정맥 주사한 후 CAR+ T 세포를 2회 투여하고 라지(Raji) 종양 재공격(Re-challenge)을 1회 투여했다. (a) 생체 내 실험의 개략도(n=그룹당 마우스 6마리)를 나타낸다. (b) 생물발광 영상화에 의해 정량화된 개별 동물의 종양 신호를 나타낸다. (c) 카플란-마이어 생존 곡선을 나타낸다. 쌍별 비교를 위해 로그 순위(Mantel-Cox) 테스트를 수행했다. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, n.s. 통계적으로 유의하지 않다. (d) T 세포 주입의 첫 번째 용량 후 23일째에 마우스로부터 수집된 말초 혈액에서 인간 $CD45^{+}EGFRt^{+}$ 세포의 빈도를 나타낸다. (e-g) NSG 마우스에 라지(Raji) 세포를 발현하는 반딧불이-루시퍼라제를 정맥 주사한 후 CAR+ T 세포를 단일 용량으로 주사했다. T-세포 주사 후 25일 및 45일에 마우스를 라지(Raji) 세포로 2회 재공격시켰다. (e) 생체 내 실험의 개략도(n=그룹당 마우스 6마리)를 나타낸다. (f) 생물발광 영상화에 의해 정량화된 개별 동물의 종양 신호를 나타낸다. (g) 시간 경과에 따라 마우스로부터 수집된 말초 혈액에서 인간 $CD45^{+}EGFRt^{+}$ 세포의 빈도를 나타낸다. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, n.s. 통계적으로 유의하지 않다.

도 14a-c. 전사체 및 후성유전학적 분석은 T 세포 표현형에서 CAR 의존적 변이를 밝힌다. (a,b) NSG 마우스는 정맥 내(i.v.) 2.85×10^{6} CAR+ T 세포를 처리하기 6일 전에 0.5×10^{6} 반딧불이-루시페라제-발현 라지(Raji) 세포로 정맥 내(i.v.) 투여되었다. 간, 비장, 심장 혈액 및 골수는 T 세포 주입 9일 후 종양 보유 마우스로부터 수집되었다(그룹당 n=2 마우스). CAR^{+} T 세포는 $huCD45^{+}$ $EGFRt^{+}$ 집단을 강화하여 얻은 다음 RNA-서열 및 ATAC-서열로 분석했다. (a) RNA-seq를 기반으로 한 리툭시맙 CAR-T 세포 대 Leu16(왼쪽), RFR-LCDR(가운데) 또는 RFR-LCDR.AA(오른쪽) CAR-T 세포의 차별적으로 발현된 유전자의 화산 플롯을 나타낸다. 차등적으로 발현된 모든 유전자는 회색으로 표시되었다. FDR < 0.05로 최소 2배 상향 조절 또는 하향 조절(log2FC > 1 또는 log2FC < -1)이 있는 유전자는 빨간색 점으로 표시된다. $\log_2FC > 1$ 및 FDR < 0.05 또는 $\log_2FC < -1$ 및 FDR < 0.05인 쌍별 비교의 세 세트 모두에 나타나는 유전자의 이름이 표시되었다. (b) *ATP9A, KIR2DL3, KIR2DL1, KIR3DL1* 유전자좌에서 Leu16, 리툭시맙, RFR-LCDR, RFR-LCDR.AA CAR-T 세포에서 차등 액세스 가능한 영역의 게놈 브라우저 파일을 나타낸다. (c) 리툭시맙 기반 CAR-T 세포로 처리된 동물은 혈청에서 감소된 글루코스 수준을 나타낸다. 혈청은 도 13e-g 에 나타낸 연구에서 T 세포 주입 후 58일차의 동물로부터 수집하였다. 혈청 내 글루코스 농도를 LC-MS로 측정했다. 데이터 막대는 생물학적 복제 ± 1 SD의 평균을 나타낸다. (두 하이브리드 CAR-T 세포 그룹에 대해 n=6; 샘플 수집 날짜 이전에 종양 부담으로 인한 사망으로 인한 리툭시맙.AA CAR-T 세포 치료 그룹에 대해 n=4). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, n.s. 통계적으로 유의하지 않다.

도 15a-d. RFR-LCDR.AA CAR-T 세포는 기억 표현형과 결합된 강력한 T 세포 활성화를 보여준다. (a) GSEA(Gene Set Enrichment Analysis)는 도 14a에 기술된 바와 같이 획득된 RNA-서열 데이터에 대해 수행되었다. T 세포 표현형 및 기능과 관련된 경로의 결과 요약은 버블검(BubbleGUM) 지도 형식으로 표시된다(Spinelli 등., 2015). (b) T 세포 아형과 관련된 경로의 마운틴 플롯(Mountain plots)을 나타낸다. (c) T 세포 활성화 및 인터페론 감마 신호전달과 관련된 경로의 마운틴 플롯(Mountain plots)을 나타낸다. (d) 세포 주기, DNA 복제 및 세포 대사와 관련된 경로의 마운틴 플롯(Mountain plots)을 나타낸다.

도 16a-d. CD20 CAR이 시험관 내에서 유사한 특성을 나타내는 경우 패널을 나타낸다. (a) T-커피(Coffee)를 사용한 leu16, 리툭시맙, GA101 및 오파투무맙 scFv 서열의 정렬(Notredame 등., 2000)을 나타낸다. (b) CAR의

IgG4 세포외 스페이서(Fc) 및 EGFRt의 항체 염색을 통해 각각 검출된 CAR 표면 발현(상단) 및 형질도입 마커 발현(하단)에 의해 정량화된 CAR-T 세포 형질도입 효율을 나타낸다. 각 항원 염색의 중앙 형광 강도(MFI) 및 양성 %는 유세포 분석 히스토그램 아래에 기록되어 있다. 결과는 세 명의 다른 건강한 기증자의 세 가지 독립적인 실험을 나타낸다. (c) 외인성 사이토카인 IL-2 및 IL15를 사용한 생체 외(*ex vivo*) 배양 동안 CD20 CAR-T 세포 증식을 나타낸다. 2일과 14일 사이의 총 생존 세포 수의 배수 변화가 표시된다. 각 데이터 포인트는 한 명의 기증자를 나타낸다; 구성당 4명의 기증자에 대한 데이터가 표시된다. 짝을 이루지 않은 양측, 2-표본 스튜던트 t 검정에서는 기증자 간의 통계적 차이가 감지되지 않았다. (d) 반복된 항원 공격 시 CAR-T 세포 세포독성 및 증식을 나타낸다. CD20 CAR-T 세포에 2:1 효과기 대 표적(E:T) 비율로 2일마다 라지(Raji) 종양 세포를 공격하고 생존 가능한 라지(Raji) 및 CAR-T 세포의 수를 유세포 분석에 의해 정량화했다. 표시된 데이터는 ± 1 표준 편차(S.D.)를 나타내는 오류 막대가 있는 기술적 3중 반복의 평균이다. 결과는 세 명의 다른 건강한 기증자의 세 가지 독립적인 실험을 나타낸다.

도 17a-e. 라지(Raji) 이종이식 모델에서 종양 진행 및 사후 CD20 CAR-T 세포 특성화를 나타낸다. (a) NSG 마우스에 반딧불이-루시페라제-발현 라지(Raji) 세포를 이식하고 도 10b에 기재된 바와 같이 CD20 CAR-T 세포로 처리하였다. 종양 부담은 생물발광 영상화에 의해 측정되었고, T-세포 주입 후 12일째와 인간적 종말점 사이의 종양 성장 속도는 각 개별 동물의 종양 진행 데이터에 지수 회귀 곡선을 피팅함으로써 정량화되었다. 각 그룹의 마우스(n=6) 간의 종양 신호에 대한 평균 배가 시간($T_{doubling}$)은 각 플롯 위에 표시된다. (b, c) 유세포 분석에 의해 정량화된 안락사 시점에 마우스로부터 수집된 골수, 뇌, 간 및 비장에서 종양 세포(b) 및 인간 $CD45^{+}EGFRt^{+}$ 세포(b)의 빈도를 나타낸다. (d,e) 안락사 시 마우스로부터 수집된 골수, 뇌, 간 및 비장의 인간 $CD45^{+}EGFRt^{+}$ 세포 중 유세포 분석에 의해 정량화된 PD-1+(d) 및 LAG-3+(e) 세포의 빈도(정량화됨)를 나타낸다. 패널 (b)에서 (e)에 표시된 모든 데이터에 대해 짝을 이루지 않은 양측, 2-표본 스튜던트 t 검정에 의해 기증자 간의 통계적 차이가 감지되지 않았다.

도 18. 리툭시맙 CAR-T 세포는 다른 CD20 CAR-T 세포보다 대사적으로 더 활성화된다. 10% 열 비활성화 투석 소 태아 혈청(HI-dFBS), IL-2 및 IL-15가 보충된 RPMI에서 24시간 동안 배양된 CAR-T 세포에 의한 아미노산 및 기타 영양소의 흡수를 나타낸다. 데이터 막대는 기술적 삼중의 평균 ± 1 SD를 나타낸다. 결과는 세 명의 다른 건강한 기증자의 세 가지 독립적인 실험을 나타낸다. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, n.s. 통계적으로 유의하지 않다. 이 도면의 결과는 도 10F 에서와 동일한 실험에서 나온 것이다. 4개의 막대로 구성된 각 세트는 각각 EGFRt, CD19, Leu16 및 리툭시맙에 대한 데이터를 왼쪽에서 오른쪽으로 나타낸다.

도 19. CD20 CAR은 항원 결합 없이 T 세포 표면에 균일하게 분포된다. CAR-HaloTag 융합 단백질로 형질도입된 주르카트(Jurkat) 세포를 적색 형광 염료 테트라메틸로다민(TMR)으로 염색하고 공초점 현미경으로 이미지화했다. CAR 분자는 항원 자극 없이 세포 표면에 균일하게 분포되었다.

도 20a-d. 비틀림 재배향이 있는 리툭시맙 CAR-T 세포는 유사한 시험관 내 세포독성 및 항원 비의존적 활성화 마커 발현을 나타낸다. (a) CD28 막관통 도메인과 세포질 도메인 사이에 0~4개의 알라닌이 삽입된 리툭시맙 기반 CAR 구성의 개략도를 나타낸다. (b) CAR 표면 발현은 각 CAR의 N-말단에 융합된 HA 태이의 항체 염색에 의해 정량화되었다. 데이터는 세 명의 다른 건강한 기증자의 세 가지 독립적인 실험을 나타낸다. (c) 반복된 항원 공격 시 CAR-T 세포 세포독성 및 증식을 나타낸다. CD20 CAR-T 세포에 2:1 E:T 비율로 2일마다 Raji 종양 세포를 공격하고, 생존 가능한 라지(Raji) 및 CAR-T 세포의 수를 유세포 분석에 의해 정량화했다. 표시된 데이터는 ± 1 표준 편차(S.D.)를 나타내는 오류 막대가 있는 기술적 3중 반복의 평균이다. 결과는 세 명의 다른 건강한 기증자의 세 가지 독립적인 실험을 나타낸다. (d) 활성화- 및 고갈-마커 발현은 CD20 항원 자극 없이 다이나비드(Dynabead) 제거 후 11일에 평가되었다. 데이터 막대는 기술적 삼중의 평균 ± 1 SD를 나타낸다. 결과는 세 명의 다른 건강한 기증자의 세 가지 독립적인 실험을 나타낸다. 달리 명시되지 않는 한, p 값은 쌍을 이루지 않은 양측 스튜던트 t 테스트에 의해 결정되었다. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, n.s. 통계적으로 유의하지 않다.

도 21a-e. 비틀림 재배향이 있는 GD2 CAR-T 세포는 동일한 시험관 내 성능에도 불구하고 생체 내에서 차등적인 종양 제어를 나타낸다. (a) CD28 막관통 도메인과 세포질 도메인 사이에 0 내지 4개의 알라닌이 삽입된 GD2 CAR 구축물의 개략도를 나타낸다. (b) CAR 표면 발현(상단) 및 형질도입 효율(하단)을 Fc 및 EGFRt의 항체 염색에 의해 정량화하였다. (c) 반복된 항원 공격 시 CAR-T 세포 세포독성 및 증식을 나타낸다. GD2 CAR-T 세포에 2:1 E:T 비율의 CHLA-255 종양 세포를 2일마다 공격하고, 생존 Raji 및 CAR-T 세포의 수를 유세포 분석으로 정량화했다. 표시된 데이터는 ± 1 표준 편차(S.D.)를 나타내는 오류 막대가 있는 기술적 3중 반복의 평균이다. (d,e)

NSG 마우스에 CHLA-255 세포를 발현하는 3.5 x 10^6 반딧불이-루시페라제를 정맥 주사한 후 17일 후 2 x 10^6 GD2 CAR-T 세포를 주사했다. (d) 종양 진행은 생물발광 영상화에 의해 모니터링되었다. (e) 안락사 시 마우스로부터 수집된 간 및 비장에서 인간 CD45+EGFRt+ 세포의 빈도를 유세포 분석에 의해 정량화하였다. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, n.s. 통계적으로 유의하지 않다.

도 22a-d. 하이브리드 CAR-T 세포의 시험관 내 특성화를 나타낸다. (a) CAR 표면 발현(상단) 및 형질도입 효율(하단)은 Fc 및 EGFRt의 항체 염색에 의해 정량화되었다. 결과는 세 명의 다른 건강한 기증자의 세 가지 독립적인 실험을 나타낸다. (b) CAR 분자는 항원 자극 없이 T 세포 표면에 균일하게 분포되어 있다. CAR-HaloTag 융합 단백질로 형질도입된 주르카트(Jurkat) 세포를 TMR로 염색하고 공초점 현미경으로 이미지화했다. (c,d) $CD19^+/CD20^+$ K562 표적 세포의 존재(c) 및 부재(d)에서 IFN-ɣ, TNF-α, IL-2 생산을 나타낸다. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, n.s. 통계적으로 유의하지 않다. (c) 및 (d)의 경우, 7개 막대의 각 세트는 각각 EGFRt, CD19, Leu16, 리툭시맙, 리툭시맙.AA, RFR-LCDR 및 RFR-LCDR.AA에 대한 데이터를 왼쪽에서 오른쪽으로 나타낸다.

도 23. 하이브리드 CAR-T 세포는 리툭시맙 CAR-T 세포와 비교하여 감소된 대사 활성을 나타낸다. 10% 열 비활성화 투석 소 태아 혈청(HI-dFBS), IL-2 및 IL-15가 보충된 RPMI에서 72시간 동안 배양된 CAR-T 세포에 의한 아미노산 및 기타 영양소의 흡수를 나타낸다. 데이터 막대는 기술적 삼중의 평균 ± 1 SD를 나타낸다. 데이터는 세 명의 다른 건강한 기증자의 세 가지 독립적인 실험을 나타낸다. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, n.s. 통계적으로 유의하지 않다. 이 도면의 결과는 도 12E 에서와 동일한 실험에서 나온 것이다. 7개 막대의 각 세트는 왼쪽에서 오른쪽으로 각각 EGFRt, CD19, Leu16, 리툭시맙, 리툭시맙.AA, RFR-LCDR 및 RFR-LCDR.AA에 대한 데이터를 나타낸다.

도 24a-b. 전사체 및 후성유전학적 프로파일링을 위한 종양 보유 마우스로부터의 CAR-T 세포 수확을 나타낸다. NSG 마우스에 라지(Raji) 세포를 발현하는 0.5 x 10^6 반딧불이-루시페라제를 정맥내 주사한 후 6일 후 CAR+ T 세포 2.85 x 10^6을 주사했다. CAR+ T 세포는 T 세포 주입 9일 후 종양 보유 마우스로부터 수집되었다(n=그룹당 마우스 2마리). 소수의 모의 형질도입된(EGFRt만 있는) T 세포만 마우스에서 회수되었으며, 이는 항원 인식이 없는 상태에서 T 세포 증폭의 결핍과 일치했다. 그러나 이러한 열악한 세포 복구로 인해 RNA-서열 및 ATAC-서열의 리드 수가 낮아 신뢰할 수 있는 데이터 분석이 불가능했다. 그 결과, 이들 샘플은 도 14, 14 및 25에 도시된 분석에서 제외되었다. (a) 생체 내 실험의 개략도를 나타낸다. (b) 생물발광 영상화에 의해 모니터링되는 종양 진행을 나타낸다.

도 25. RNA-서열은 종양 보유 마우스에서 회수된 CD20 CAR-T 세포 변이체 전반에 걸쳐 급격한 전사체 차이를 나타낸다. Leu16, 리툭시맙, RFR-LCDR, RFR-LCDR.AA CAR-T 세포의 ANOVA 비교에서 차등적으로 발현된 유전자(FDR < 0.05)의 히트맵을 나타낸다. 각 열은 1마리의 마우스를 나타내며, 각 처리군에 대해 2개의 생물학적 복제물을 분석했다. 각 행은 각 유전자의 상대적 발현을 강조하기 위해 최대 1 및 최소 0으로 조정되었다.

도 26. T 세포 하위 집합 분포는 생체 외 배양에서 CAR-T 세포 간에 크게 다르지 않았다. 생체 외 배양에서 CAR-T 세포의 아형은 항원 자극의 부재 하에 CD45RA 및 CD62L 염색에 의해 결정되었다. $CD45RA^+CD62L^+$, $CD45RA^-CD62L^+$, $CD45RA^-CD62L^-$ 및 $CD45RA^+CD62L^-$은 각각 나이브(naive), 중심 기억(central memory), 효과 기억(effector memory) 및 효과기 세포(effector cell) 유형을 나타낸다.

도 27a-c. (a) 한 기증자로부터 각각 CAR의 IgG4 세포외 스페이서(Fc) 및 EGFRt의 항체 염색을 통해 검출된 CAR 표면 발현(상단) 및 형질도입-마커 발현(하단)을 나타낸다. 각 샘플의 양성 퍼센트 및 중앙 형광 강도(MFI)가 기록된다. (b) 6개의 다른 건강한 기증자로부터 생성된 T 세포에 대한 % Fc+ 및 MFI의 CAR 표면 염색 데이터가 표시된다. (c) 외인성 사이토카인 IL-2 및 IL15를 사용한 생체 외 배양 동안 CD20 CAR CD8+ T-세포 증폭을 나타낸다. 2일과 14일 사이의 총 생존 세포 수의 배수 변화가 표시된다. 각 데이터 포인트는 한 명의 기증자를 나타낸다. 구성당 4명의 기증자에 대한 데이터가 표시된다. 짝을 이루지 않은 양측, 2-표본 스튜던트 t 검정에서는 기증자 간의 통계적 차이가 감지되지 않았다.

도 28a-c. (a) 라지(Raji) 및 K562 세포주에 대한 CD20 발현 수준의 유세포분석 분석을 나타낸다. (b) 3가지 효과기 대 표적(E:T, effector-to-target) 비율에서 다양한 CD20 발현 수준을 갖는 표적 세포에 대한 CD20 CAR-TN/M 세포의 24시간 용해 분석을 나타낸다. 데이터 막대는 기술적 삼중의 평균 ± 1 표준 편차(S.D.)를 나타낸다. 짝을 이루지 않은 양측, 2-표본 스튜던트 t-검정에서는 통계적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다. (c)

CAR CD8+ T-세포 세포독성 및 라지(Raji) 종양 세포에 대한 반복된 항원 공격 시 증식을 나타낸다. CD20 CAR-T 세포에 2:1 E:T 비율로 2일마다 라지(Raji) 세포를 공격하고, 생존 가능한 라지(Raji) 및 CAR-T 세포의 수를 유세포분석에 의해 정량화했다. 표시된 데이터는 ± 1 SD를 나타내는 오차 막대가 있는 기술적 3중 반복의 평균이다. 세 명의 다른 건강한 기증자로부터의 세 가지 독립적인 실험의 결과가 표시된다.

도 29a-d. 항원-비의존적 CAR 신호전달 또는 리툭시맙 유래 CD20 CAR로서, (a,b) 활성화 및 고갈 마커의 상향조절 및 (c,d) 항원 자극 부재 시 T-세포 증식을 나타낸다. 리툭시맙 기반 CAR-T 세포의 토닉(tonic) 신호전달은 CD8+(a,c) 및 나이브/기억 T(TN/M) 세포 모두에서 관찰되었으며, 이는 CD14-/CD25-/CD62L+ 표현형에 대해 분류되었다. a-d의 7개 막대의 각 세트는 왼쪽에서 오른쪽으로 각각 EGFRt, CD19, GD2, Leu16, 리툭시맙, GA101 및 오파투무맙에 대한 데이터를 나타낸다.

도 30. 리툭시맙 기반 CD20 CAR의 대사 플럭스를 나타낸다. 4개의 막대로 구성된 각 세트는 왼쪽에서 오른쪽으로 각각 EGFRt, CD19, Leu16 및 리툭시맙에 대한 데이터를 나타낸다.

도 31a-b. (a) 주르카트(Jurkat) 세포를 발현하는 CAR을 DyLight 405에 접합된 항-Fc 항체로 염색하고 항원 자극 부재 하에 공초점 현미경으로 영상화하였다. (b) CAR-HaloTag 융합 단백질로 형질도입된 주르카트(Jurkat) 세포를 적색 형광 염료 테트라메틸로다민(TMR)으로 염색하고 항원 자극 없이 공초점 현미경으로 이미지화했다.

도 32a-b. (a) NSG 마우스는 정맥내로 전달된 5 x 10^6 CD8+ CD20 표적 CAR-T 세포로 치료하기 6일 전에 0.5 x 10^6 반딧불이-루시퍼라제를 발현하는 라지(Raji) 세포를 정맥내 주사했다. 종양 진행은 생물발광 영상화에 의해 모니터링되었다(n=그룹당 마우스 6마리). 광도-강도 스케일(radiance-intensity scale)의 최소값과 최대값은 각각 5 x 10^4와 1 x 10^7이다. (b) 각 테스트 그룹에 대한 개별 동물의 평균 광도(p/sec/cm2/sr)를 나타낸다. 검은색 점선은 T-세포 주사 후 12일째로, 리툭시맙 CAR-T 세포 그룹이 종양 제어를 빠르게 잃기 시작한 시간을 나타낸다. 각 흔적의 끝점은 각 동물의 인간적인 끝점을 나타낸다.

도 33a-c. (a) 리툭시맙 기반 CAR의 알라닌 삽입 변이체의 개략도를 나타낸다. (b) 한 기증자로부터 각각 CAR의 IgG4 세포외 스페이서(Fc) 및 EGFRt의 항체 염색을 통해 검출된 CAR 표면 발현(상단) 및 형질도입-마커 발현(하단)을 나타낸다. 각 샘플의 양성 퍼센트 및 중앙 형광 강도(MFI)가 기록된다. (c) 4개의 상이한 T 세포 제조 실행에서 생성된 T 세포에 대한 % Fc+ 및 MFI의 CAR 표면 염색 데이터를 나타낸다.

도 34a-b. (a) 항원 자극 없이 CAR-T 세포에 의한 종양 괴사 인자(TNF)-α 생산은 다이나비드(Dynabead) 제거 후 7일째에 측정되었다. 한 명의 대량 CD8+ T 세포 기증자와 한 명의 $T_{N/M}$ 세포 기증자의 결과가 표시된다. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, n.s. 통계적으로 유의하지 않다. (b) 표적 세포 또는 외인성 사이토카인이 없는 4일 배양 후 CTV 염료로 염색된 CAR^+ $CD8^+$ 및 $T_{N/M}$ 세포의 증식을 분석했다. 한 명의 대량 CD8+ T 세포 기증자와 한 명의 $T_{N/M}$ 세포 기증자의 결과가 표시된다. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, n.s. 통계적으로 유의하지 않다.

도 35a-b. (a) 상이한 E:T 비율에서 다양한 CD20 발현 수준을 갖는 표적 세포에 대한 리툭시맙 CAR-TN/M 세포의 24시간 용해 분석을 나타낸다. 데이터 막대는 기술적 삼중의 평균 ± 1 SD를 나타낸다. 짝을 이루지 않은 양측, 2-표본 스튜던트 t-검정에서는 통계적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다. (b) 반복된 항원 공격 시 CAR-T 세포 세포독성 및 증식을 나타낸다. CD20 CAR-T 세포에 2:1 E:T 비율로 2일마다 라지(Raji) 종양 세포를 공격하고, 생존 라지(Raji) 및 CAR-T 세포의 수를 유세포 분석에 의해 정량화했다. 표시된 데이터는 ± 1 SD를 나타내는 오차 막대가 있는 기술적 3중 반복의 평균이다. 4명의 다른 건강한 기증자의 T 세포를 사용한 4개의 독립적인 실험 결과가 표시된다.

도 36a-c. (a) CD28 막관통 도메인과 세포질 도메인 사이에 0 내지 4개의 알라닌이 삽입된 GD2 CAR 제조물의 개략도를 나타낸다. (b) NSG 마우스에 CHLA-255 세포를 발현하는 3.5 x 10^6 반딧불이-루시페라제를 정맥내 주사한 후 17일 후 2 x 10^6 GD2 CAR-T 세포를 주사했다. 종양 진행은 생물발광 영상화에 의해 모니터링되었다. (c) 안락사 시 마우스로부터 수집된 간 및 비장에서 인간 CD45+EGFRt+ 세포의 빈도를 유세포 분석에 의해 정량화하였다. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, n.s. 통계적으로 유의하지 않다. 각 흔적의 끝점은 각 동물의 인간적인 끝점을 나타낸다.

도 37a-b. (a) CAR 표면 발현(상단) 및 형질도입 효율(하단)은 Fc 및 EGFRt의 항체 염색에 의해 정량화되었다.

(b) 10개의 다른 건강한 기증자로부터 생성된 T 세포에 대한 % Fc+ 및 MFI의 CAR 표면 염색 데이터가 표시된다.

도 38a-b. RFR-LCDR 하이브리드 CD20 CAR은 항원-독립적 CAR 신호전달을 나타내어 (a) 활성화 및 고갈 마커의 상향조절 및 (b) 항원 자극 부재 하에 T 세포 증식을 초래한다. CD19 CAR 및 GD2 CAR은 토닉(tonic) 신호전달에 대해 각각 음성 및 양성 대조군으로 포함되었다. 7개 막대의 각 세트는 왼쪽에서 오른쪽으로 각각 EGFRt, CD19, GD2, Leu16, 리툭시맙, RFR-LCDR 및 LFR-RCDR에 대한 데이터를 나타낸다.

도 39. Leu16, 리툭시맙 및 RFR-LCDR scFv의 결합 동역학 매개변수를 생물층 간섭계로 측정했다. KD: 평형 해리 상수; ka: 연관 상수; kdis: 해리 상수; 평균: 3회 평균; SD: 3회 실행의 표준 편차. 양측 스튜던트 t 테스트는 표시된 p 값을 계산하는 데 사용되었다.

도 40a-b. (a) RFR-LCDR.AA는 RFR-LCDR scFv와 CD28 막관통 및 세포질 도메인 사이에 삽입된 2개의 알라닌을 포함하는 CAR 제조물이다. 이 CAR은 시험관 내에서 다른 CD20 CAR과 유사한 항원 검출 역치를 보여주었다. (b) 하이브리드 scFv 서열 및/또는 알라닌 삽입을 포함하는 CAR은 세포 표면에서 클러스터가 없는 상태로 유지된다. CAR-HaloTag 융합 단백질로 형질도입된 주르카트(Jurkat) 세포를 TMR 적색 형광 염료로 염색하고 공초점 현미경으로 이미지화했다. CAR 분자는 항원 자극 없이 세포 표면에 균일하게 분포된다.

도 41a-c. (a) CD20 항원 자극이 없는 상태에서 CAR-TN/M 세포에 의한 활성화 및 고갈 마커 발현을 다이나비드(Dynabead) 제거 후 11일에 평가했다. 데이터 막대는 기술적 삼중의 평균 ± 1 SD를 나타낸다. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, n.s. 통계적으로 유의하지 않다. (b) CTV 염료로 염색된 CAR+ TN/M 세포의 증식은 표적 세포 또는 외인성 사이토카인이 없는 4일 배양 후 분석되었다. 히스토그램에 표시된 데이터는 막대 그래프의 기증자 1에 해당한다. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, n.s. 통계적으로 유의하지 않다. (c) 항원 자극 없이 CAR+ TN/M 세포에 의한 IFN-ɣ, TNF-α, IL-2 생산을 나타낸다. 외인성 사이토카인 없이 48시간 배양한 세포의 상등액 중 사이토카인 농도를 ELISA로 측정하였다. 데이터 막대는 기술적 삼중의 평균 ± 1 SD를 나타낸다. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, n.s. 통계적으로 유의하지 않다. 7개 막대의 각 세트는 왼쪽에서 오른쪽으로 각각 EGFRt, CD19, Leu16, 리툭시맙, 리툭시맙.AA, RFR-LCDR 및 RFR-LCDR.AA에 대한 데이터를 나타낸다. (b)의 데이터는 위에서 아래로 EGFRt, CD19, Leu16, 리툭시맙, 리툭시맙.AA, RFR-LCDR 및 RFR-LCDR.AA를 나타낸다.

도 42. CAR의 토닉(tonic) 신호전달. 7개 막대의 각 세트는 왼쪽에서 오른쪽으로 각각 EGFRt, CD19, Leu16, 리툭시맙, 리툭시맙.AA, RFR-LCDR 및 RFR-LCDR.AA에 대한 데이터를 나타낸다.

도 43a-h. 토닉(tonically) 신호전달 CAR은 (a) 미토콘드리아 단백질 번역 증가, (b) 항원 제시 증가, (c) MYC 신호 증가, (d) MTORC 신호 증가, (e) TNF-α 신호 증가, (f) 다양한 인터페론 반응, (g) 효과기(기억과 대조적으로) T 세포 아형과 관련된 유전자의 농축된 특징 및 (h) 증가된 세포 주기 활성을 나타내는 뚜렷한 전사 프로파일을 보여준다. 표시 가능한 공간을 초과하는 유전자를 포함하는 히트맵의 경우 히트맵에 표시된 유전자의 이름이 각 맵의 측면에 순서대로 나열된다.

도 44a-d. RFR-LCDR 하이브리드 CD20 CAR은 생체 내에서 우수한 종양 제거를 보여준다. (a) 동물 연구의 개략도를 나타낸다. NSG 마우스에 50만 개의 반딧불이 루시페라제를 발현하는 라지(Raji) 림프종 세포를 이식하고 2회 투여량의 T 세포로 처리했다. 동물은 첫 번째 T 세포 치료 55일 후에 두 번째 용량의 종양 세포로 재공격되었다. (b) 종양 진행은 생물발광 영상화를 통해 모니터링되었다. (c) 생존 곡선은 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 곡선으로 표시된다. 결과는 하이브리드 CAR이 종양 제거 및 장기 재발 예방에서 부모 CD20 CAR뿐만 아니라 CD19 CAR보다 우수함을 나타낸다. (d) 초기 T 세포 주사 23일 후 말초 혈액에서 CAR-발현 인간 T 세포의 빈도를 유세포 분석에 의해 측정하였다. CAR 내로의 2개의 알라닌 잔기의 첨가는 리툭시맙-기반 수용체를 개선시켰고, 이는 도 5에 도시된 이전 데이터를 확증한다. 2개의 알라닌 삽입이 있는 하이브리드 CAR을 결합하면 초기 종양 제거 속도가 더욱 가속화되고 알라닌 삽입이 없는 하이브리드 CAR에 비해 T-세포 지속성이 크게 증가하여 scFv 변경 및 알라닌 삽입 전략이 결합되어 CAR 기능의 개선에 시너지 효과를 얻을 수 있음을 나타낸다.

도 45a-c. (a) RNA 서열을 기반으로 한 리툭시맙 CAR-T 세포 대 Leu16(왼쪽), RFR-LCDR(가운데) 또는 RFR-LCDR.AA(오른쪽) CAR-T 세포의 차별적으로 발현된 유전자의 화산 플롯을 나타낸다. 차등적으로 발현된 모든 유전자는 회색으로 표시된다. FDR < 0.05로 최소 2배 상향 조절 또는 하향 조절(log2FC > 1 또는 log2FC < -1)이 있는 유전자는 빨간색 점으로 표시된다. log2FC > 1 및 FDR < 0.05 또는 log2FC < -1 및 FDR < 0.05인 쌍별 비교의 세 세트 모두에 나타나는 유전자의 이름이 표시된다. (b) *ATP9A, KIR2DL3, KIR2DL1, KIR3DL1* 유전자좌에서 Leu16, 리툭시맙, RFR-LCDR, RFR-LCDR.AA CAR-T 세포의 ATACseq를 기반으로 하는 차등 액세스 영역의 게놈

브라우저 파일을 나타낸다. (c) 유전자 세트 농축 분석(GSEA)은 도 5a에 설명된 대로 얻은 RNA-서열 데이터에 대해 수행되었다. T 세포 표현형 및 기능과 관련된 경로의 결과 요약은 버블검(BubbleGUM) 맵 형식으로 표시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0066] 키메라 항원 수용체는 상보성 결정 영역(CDR)에 인접하는 프레임워크 영역(FR)을 각각 함유하는 중쇄(VH) 및 경쇄(VL)를 갖는 단일 쇄 가변 단편(scFv)을 포함한다. 프레임워크 영역은 scFv의 구조를 결정하는 주요 요인으로 여겨진다. 특정 FR 서열이 CAR의 scFv 부분의 일부로 통합될 때 CAR 클러스터링을 유도하는 효과로 인해 토닉(tonic) 신호전달을 유발할 수 있다고 제안되었다. 이전 작업에서는 토닉(tonically) 신호전달 CAR(GD2)의 FR 서열이 비-토닉(non-tonically) 신호전달 CD19 CAR의 CDR 서열과 결합되었고, 생성된 하이브리드 CAR이 토닉(tonically) 신호를 나타내는 것으로 나타났다. 이 결과로부터, 새로운 CAR 분자의 발달에서 토닉(tonically) 신호전달 CAR의 FR 서열을 통합하는 것은 일반적으로 바람직하지 않을 것이라는 가설이 세워졌다(Long 등. Nature Medicine, 2015. 21(6):581-590). 놀랍게도, 본 발명자들은 토닉(tonically) 신호전달 CAR로부터의 FR의 혼입이 우수한 특성을 갖는 CAR을 생성한다는 것을 발견하였다. 따라서, 본 개시내용의 조성물 및 방법은 생체 내 효능이 증가된, CD20 CAR을 포함하는 재설계된 CAR을 제공한다.

[0067] **I. 정의**

[0068] 본 개시내용의 펩타이드는 키메라 항원 수용체 또는 CAR을 포함하는 펩타이드에 관한 것이다. CAR은 면역 효과기 세포에 임의의 특이성을 접목할 수 있는 조작된 수용체이다. 어떤 경우에는 이러한 수용체를 사용하여 모노클로날 항체의 특이성을 T 세포에 이식한다. 수용체는 다른 출처의 부분으로 구성되어 있기 때문에 키메라라고 한다.

[0069] 용어 "단백질(protein)", "폴리펩타이드(polypeptide)" 및 "펩타이드(peptide)"는 유전자 산물을 언급할 때 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다.

[0070] "상동성(homology)" 또는 "동일성(identity)"은 2개의 펩타이드 또는 2개의 핵산 분자 사이의 서열 유사성을 의미한다. 동일성은 비교 목적으로 정렬될 수 있는 각 서열의 위치를 비교함으로써 결정될 수 있다. 비교 서열의 위치가 동일한 염기 또는 아미노산에 의해 점유될 때, 분자는 그 위치에서 서열 동일성을 공유한다. 서열 간의 동일성 정도는 서열이 공유하는 일치하는 위치 또는 상동 위치의 수치의 함수이다. "비관련(unrelated)" 또는 "비-상동(non-homologous)" 서열은 본 개시내용의 서열 중 하나와 60% 미만의 동일성, 50% 미만의 동일성, 40% 미만의 동일성, 30% 미만의 동일성 또는 25% 미만의 동일성을 공유한다.

[0071] 본원에 사용된 용어 "아미노 부분(amino portion)", "N-말단(N-terminus)", "아미노 말단(amino terminus)" 등은 폴리펩타이드 영역의 순서를 나타내는 데 사용된다. 더욱이, 어떤 것이 영역의 N-말단일 때 그것은 반드시 전체 폴리펩타이드의 말단(또는 끝)에 있는 것이 아니라, 단지 영역 또는 도메인의 N-말단에 있다. 유사하게, 본원에 사용된 용어 "카르복시 부분(carboxy portion)", "C-말단(C-terminus)", "카르복시 말단(carboxy terminus)" 등은 폴리펩타이드의 영역의 순서를 나타내는 데 사용되며, 어떤 것이 영역에 대한 C-말단인 경우 반드시 전체 폴리펩타이드의 말단(또는 끝)에 있는 것이 아니라, 영역 또는 도메인의 C-말단에 있다.

[0072] 용어 "폴리뉴클레오타이드(polynucleotide)", "핵산(nucleic acid)" 및 "올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)"는 상호교환적으로 사용되며 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 또는 이들의 유사체인 임의의 길이의 뉴클레오타이드의 중합체 형태를 지칭한다. 폴리뉴클레오타이드는 3차원 구조를 가질 수 있으며 알려지거나 알려지지 않은 모든 기능을 수행할 수 있다. 다음은 폴리뉴클레오타이드의 비제한적인 예다: 유전자 또는 유전자 단편(예: 프로브, 프라이머, EST 또는 SAGE 태그), 엑손, 인트론, 메신저 RNA(mRNA), 전달 RNA, 리보솜 RNA, 리보자임, cDNA, dsRNA, siRNA, miRNA, 재조합 폴리뉴클레오타이드, 분지형 폴리뉴클레오타이드, 플라스미드, 벡터, 임의의 서열의 단리된 DNA, 임의의 서열의 단리된 RNA, 핵산 프로브 및 프라이머. 폴리뉴클레오타이드는 메틸화된 뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 유사체와 같은 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 존재하는 경우, 뉴클레오타이드 구조에 대한 변형은 폴리뉴클레오타이드의 조립 전 또는 후에 부여될 수 있다. 뉴클레오타이드의 서열은 비뉴클레오타이드 성분에 의해 중단될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 예를 들어 표지 성분과의 접합에 의해 중합 후에 추가로 변형될 수 있다. 이 용어는 또한 이중 가닥 및 단일 가닥 분자를 모두 나타낸다. 달리 명시되거나 요구되지 않는 한, 폴리뉴클레오타이드인 본 발명의 임의의 구현예는 이중 가닥 형태 및 이중 가닥 형태를 구성하는 것으로 알려져 있거나 예측되는 2개의 상보적 단일 가닥 형태 각각을 모두 포함한다.

[0073] 특정 단백질을 "암호화(encodes)"하는 "유전자(gene)", "폴리뉴클레오타이드(polynucleotide)", "암호화 영역(coding region)", "서열(sequence)", "세그먼트(segment)", "단편(fragment)" 또는 "전이유전자(transgene)"는 적절한 조절 서열의 제어하에 배치될 때 시험관 내 또는 생체 내에서 전사되고 임의로 유전자 산물, 예를 들어 폴리펩타이드로 번역되는 핵산 분자이다. 암호화 영역은 cDNA, 게놈 DNA 또는 RNA 형태로 존재할 수 있다. DNA 형태로 존재할 때, 핵산 분자는 단일 가닥(즉, 센스 가닥) 또는 이중 가닥일 수 있다. 암호화 영역의 경계는 5'(아미노) 말단의 시작 코돈과 3'(카르복시) 말단의 번역 종결 코돈에 의해 결정된다. 유전자는 원핵생물 또는 진핵생물 mRNA로부터의 cDNA, 원핵생물 또는 진핵생물 DNA로부터의 게놈 DNA 서열 및 합성 DNA 서열을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다. 전사 종결 서열은 일반적으로 유전자 서열의 3'에 위치할 것이다.

[0074] 용어 "항체(antibody)"는 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 이량체, 다량체, 다중특이적 항체 및 인간, 마우스, 인간화, 키메라일 수 있거나 다른 종으로부터 유래될 수 있는 항체 단편을 포함한다. "모노클로날 항체(monoclonal antibody)"는 특정 항원 부위에 대해 지시되는 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 수득된 항체이다.

[0075] "항체 또는 이의 기능적 단편(antibody or functional fragment thereof)"은 특정 항원 또는 에피토프에 특이적으로 결합하거나 면역학적으로 반응성인 면역글로불린 분자를 의미하고, 폴리클로날 및 모노클로날 항체를 모두 포함한다. 용어 "항체"는 유전자 조작되거나 달리 변형된 형태의 면역글로불린, 예를 들어 인트라바디, 펩티바디, 키메라 항체, 완전 인간 항체, 인간화 항체 및 이종접합 항체(예: 이중특이적 항체, 디아바디, 트리아바디 및 테트라바디)를 포함한다. 용어 "기능적 항체 단편"은 예를 들어 Fab', F(ab')2, Fab, Fv, rlgG 및 scFv 단편을 포함하는 항체의 항원 결합 단편 또는 영역을 포함한다. 용어 "scFv"는 전통적인 2쇄 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인이 연결되어 하나의 쇄를 형성한 단일 쇄 Fv 항체를 지칭한다.

[0076] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "결합 친화도(binding affinity)"는 두 제제의 가역적 결합에 대한 평형상수를 말하며 해리 상수(Kd)로 표현된다. 결합 친화도는 관련 없는 아미노산 서열에 대한 항체의 결합 친화도보다 적어도 1배 이상, 적어도 2배 이상, 적어도 3배 이상, 적어도 4배 이상, 적어도 5배 이상, 적어도 6배 이상, 적어도 7배 이상, 적어도 8배 이상, 적어도 9배 이상, 적어도 10배 이상, 적어도 20배 이상, 적어도 30배 이상, 적어도 40배 이상, 적어도 50배 이상, 적어도 60배 이상, 적어도 70배 이상, 적어도 80배 이상, 적어도 90배 이상, 적어도 100배 이상 또는 적어도 1000배 이상 또는 그 이상(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위)일 수 있다. 본원에 사용된 용어 "결합활성(avidity)"은 희석 후 해리에 대한 2종 이상의 제제 복합체의 내성을 지칭한다. 용어 "면역반응성(immunoreactive)" 및 "우선적으로 결합(preferentially binds)"은 항체 및/또는 항원-결합 단편과 관련하여 본원에서 상호교환가능하게 사용된다.

[0077] 용어 "결합(binding)"은 예를 들어 염 다리 및 물 다리와 같은 상호 작용을 포함하는 공유, 정전기, 소수성, 이온 및/또는 수소 결합 상호작용으로 인한 두 분자 사이의 직접적인 회합을 의미한다.

[0078] "개체(individual)", "대상체(subject)" 및 "환자(patient)"는 같은 의미로 사용되며 인간 또는 비인간을 가리킬 수 있다.

[0079] 용어 "낮추다(lower)", "저하된(reduced)", "저하시키다(reduction)", "감소하다(decrease)" 또는 "억제하다(inhibit)"는 모두 통계적으로 유의한 양만큼 감소를 의미하기 위해 본원에서 일반적으로 사용된다. 그러나 의심의 여지를 없애기 위해 "낮추다(lower)", "저하된(reduced)", "저하시키다(reduction)", "감소하다(decrease)" 또는 "억제하다(inhibit)"는 참조 수준과 비교하여 적어도 10% 감소, 예를 들어 적어도 약 20%, 또는 적어도 약 30%, 또는 적어도 약 40%, 또는 적어도 약 50%, 또는 적어도 약 60%, 또는 적어도 약 70%, 또는 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 90% 또는 최대 100% 또는 100% 감소 포함(즉, 참조 샘플과 비교하여 수준이 없음), 또는 참조 수준과 비교하여 10-100% 사이의 임의의 감소를 의미한다.

[0080] 용어 "증가된(increased)", "증가하다(increase)", "향상시키다(enhance)" 또는 "활성화하다(activate)"는 모두 일반적으로 정적으로 유의한 양만큼 증가를 의미하기 위해 본 명세서에서 사용되며; 의심의 여지를 없애기 위해, 용어 "증가된(increased)", "증가하다(increase)", "향상시키다(enhance)" 또는 "활성화하다(activate)"는 참조 수준과 비교하여 적어도 10%의 증가, 예를 들어 적어도 약 20%, 또는 적어도 약 30%, 또는 적어도 약 40%, 또는 적어도 약 50%, 또는 적어도 약 60%, 또는 적어도 약 70%, 또는 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 90% 또는 최대 100% 증가 및 100% 증가 포함 또는 참조 수준과 비교하여 10-100% 사이의 임의의 증가, 또는 적어도 약 2배, 또는 적어도 약 3배, 또는 적어도 약 4배, 또는 적어도 약 5배 또는 적어도 약 10배 증가, 또는 참조 수준과 비교하여 2배 내지 10배 이상의 증가를 의미한다.

[0081] **Ⅱ. 폴리펩타이드**

[0082] **A. 신호 펩타이드**

[0083] 본 개시내용의 폴리펩타이드는 신호 펩타이드를 포함할 수 있다. "신호 펩타이드"는 세포 내, 예를 들어, 특정 세포 소기관(예: 소포체) 및/또는 세포 표면에서 단백질의 수송 및 국소화를 지시하는 펩타이드 서열을 의미한다. 일부 구현예에서, 신호 펩타이드는 초기 단백질을 소포체 내로 지시한다. 이것은 수용체가 글리코실화되고 세포막에 고정되어야 하는 경우 필수적이다. 일반적으로 대부분의 아미노 말단 성분에 고유하게 부착된 신호 펩타이드가 사용된다(예: 경쇄 - 링커 - 중쇄 방향을 갖는 scFv에서는 경쇄의 고유 신호가 사용됨).

[0084] 일부 구현예에서, 신호 펩타이드는 소포체(ER) 통과 후 절단되며, 즉 절단 가능한 신호 펩타이드다. 일부 구현예에서, 제한 부위는 절단을 용이하게 하기 위해 신호 펩타이드의 카르복시 말단에 있다.

[0085] **B. 항원 결합 도메인**

[0086] 본 개시내용의 폴리펩타이드는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다. "항원 결합 도메인"은 적절한 조건하에서 항원에 결합할 수 있는 폴리펩타이드의 영역을 기술한다. 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인은 하나 이상의 항체(예, CD20 항체)를 기반으로 하는 단일 쇄 가변 단편(scFv)이다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 폴리펩타이드의 항원 결합 도메인은 가변 중쇄(VH) 영역 및 가변 경쇄(VL) 영역을 포함하며, VH 및 VL 영역은 동일한 폴리펩타이드 상에 존재한다. 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인은 VH 및 VL 영역 사이에 링커를 포함한다. 링커는 항원 결합 도메인이 항원 결합을 위한 원하는 구조를 형성하도록 할 수 있다.

[0087] 본 개시내용의 폴리펩타이드의 항원-결합 도메인의 가변 영역은 VH 및/또는 VL CDR 1, CDR 2 및/또는 CDR 3 영역 내의 아미노산 잔기를 돌연변이시킴으로써 변형되어 항체의 하나 이상의 결합 특성(예: 친화도)을 개선할 수 있다. 용어 "CDR"은 B 세포 및 T 세포에 의해 생성된 면역글로불린(항체) 및 T 세포 수용체의 가변 사슬의 일부를 기반으로 하는 상보성 결정 영역을 나타내며, 여기서 이들 분자는 특정 항원에 결합한다. 면역글로불린 및 T 세포 수용체와 관련된 대부분의 서열 변이가 CDR에서 발견되기 때문에, 이러한 영역은 때때로 초가변 영역으로 지칭된다. 돌연변이는 부위 지정 돌연변이 유발 또는 PCR 매개 돌연변이 유발에 의해 도입될 수 있으며 항체 결합에 대한 효과 또는 관심 있는 다른 기능적 특성은 적절한 시험관 내 또는 생체 내 분석에서 평가될 수 있다. 바람직하게는 보존적 변형이 도입되고 일반적으로 CDR 영역 내의 1, 2, 3, 4 또는 5개 이하의 잔기가 변경된다. 돌연변이는 아미노산 치환, 추가 또는 결실일 수 있다.

[0088] 예를 들어, 하나 이상의 프레임워크 잔기를 상응하는 생식계열 서열로 "역돌연변이"시킴으로써 면역원성을 감소시키기 위해 항체에 프레임워크 변형이 이루어질 수 있다.

[0089] 항원 결합 도메인은 동일한 항원(다가) 또는 상이한 항원(다중 특이적)에 결합하는 VH 및 VL 영역 쌍으로 항원 결합 도메인을 다량체화함으로써 다중-특이적 또는 다가일 수 있는 것으로 또한 고려된다.

[0090] 가변 영역(중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역)과 같은 항원 결합 영역 또는 CDR의 결합 친화도는 적어도 10-5M, 10-6M, 10-7M, 10-8M, 10-9M, 10-10M, 10-11M, 10-12M 또는 10-13M일 수 있다. 일부 구현예에서, 가변 영역(중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역)과 같은 항원 결합 영역 또는 CDR의 KD는 적어도 10-5M, 10-6M, 10-7M, 10-8M, 10-9M, 10-10M, 10-11M, 10-12M 또는 10-13M(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위)일 수 있다.

[0091] 결합 친화도, KA 또는 KD 는 표면 플라즈몬 공명(SRP) 기반 바이오센서, 동역학 배제 분석(KinExA), 편광 변조 경사 입사 반사율 차이(OI-RD) 또는 ELISA에 기반한 마이크로어레이 검출용 광학 스캐너와 같은 당업계에 공지된 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0092] 일부 구현예에서, 인간화 결합 영역을 포함하는 폴리펩타이드는 비인간화 결합 영역(예: 마우스 유래 결합 영역)을 포함하는 폴리펩타이드와 비교하여, 숙주 세포에서 동일하거나, 더 우수하거나 또는 적어도 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 104, 106, 106, 108, 109, 110, 115 또는 120%(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위)의 결합 친화도 및/또는 발현 수준을 갖는다.

[0093] 일부 구현예에서, 인간 프레임워크의 FR1, FR2, FR3 및/또는 FR4와 같은 프레임워크 영역은 각각 또는 집합적으로 마우스 프레임워크에 대해 적어도, 최대 또는 정확히 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90,

91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199 또는 200개(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 아미노산 치환, 인접 아미노산 추가 또는 인접 아미노산 결실을 가질 수 있다.

[0094] 일부 구현예에서, 마우스 프레임워크의 FR1, FR2, FR3 및/또는 FR4와 같은 프레임워크 영역은 각각 또는 집합적으로 인간 프레임워크에 대해 적어도, 최대 또는 정확히 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199 또는 200개(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 아미노산 치환, 인접 아미노산 추가 또는 인접 아미노산 결실을 가질 수 있다.

[0095] 치환은 중쇄 또는 경쇄 가변 영역의 FR1, FR2, FR3 또는 FR4의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100 위치에 있을 수 있다.

[0096] **C. 세포외 스페이서**

[0097] 세포외 스페이서는 항원-결합 도메인을 막관통 도메인에 연결할 수 있다. 일부 구현예에서, 힌지는 항원 결합 도메인이 항원 결합을 용이하게 하기 위해 상이한 방향으로 배향되도록 하기에 충분히 유연하다. 일 구현예에서, 스페이서는 IgG 유래 힌지 영역이다. 일 구현예에서 스페이서는 면역글로불린의 CH2CH3 영역 및 CD3의 일부를 포함하거나 더 포함한다. 일부 구현예에서, CH2CH3 영역은 L235E/N297Q 또는 L235D/N297Q 변형 또는 CH2CH3 영역의 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 스페이서는 IgG4 유래이다. 세포외 스페이서는 힌지 영역을 포함할 수 있다.

[0098] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "힌지(hinge)"는 측면 폴리펩타이드 영역에 구조적 가요성 및 간격을 제공하는 가요성 폴리펩타이드 커넥터 영역(본원에서 "힌지 영역"으로도 지칭됨)을 지칭하고 천연 또는 합성 폴리펩타이드로 구성될 수 있다. 면역글로불린(예: IgG1)에서 유래된 "힌지"는 일반적으로 인간 IgG1의 Glu216에서 Pro230으로 늘어나는 것으로 정의된다(Burton (1985) Molec. Immunol., 22: 161- 206). 다른 IgG 이소타입의 힌지 영역은 중쇄간 이황화(S-S) 결합을 형성하는 첫 번째 및 마지막 시스테인 잔기를 동일한 위치에 배치함으로써 IgG1 서열과 정렬될 수 있다. 힌지 영역은 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 제5,677,425호에 기재된 변경된 힌지 영역을 포함하나 이에 제한되지 않는 자연 발생 또는 비-자연 발생일 수 있다. 힌지 영역은 CH1 도메인의 것과 상이한 클래스 또는 서브클래스의 항체로부터 유래된 완전한 힌지 영역을 포함할 수 있다. 용어 "힌지" 는 또한 측면 영역에 가요성 및 간격을 제공하는 데 유사한 기능을 제공하는 CD8 및 기타 수용체로부터 유래된 영역을 포함할 수 있다.

[0099] 세포외 스페이서는 적어도, 최대 또는 정확히 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 110, 119, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 325, 350 또는 400개의 아미노산(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 길이를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 세포외 스페이서는 면역글로불린(예: IgG)의 힌지 영역으로 구성

되거나 이를 포함한다. 면역글로불린 힌지 영역 아미노산 서열은 당업계에 공지되어 있다; 예를 들어, Tan 등. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 162; 및 Huck 등. (1986) Nucl. Acids Res 참조.

[0100] 세포외 스페이서의 길이는 항원 자극 CAR 신호전달에 대한 반응으로 CAR의 신호전달 활성 및/또는 CAR-T 세포의 증폭 특성에 영향을 미칠 수 있다. 일부 구현예에서, 50, 45, 40, 30, 35, 30, 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11 또는 10개 미만의 아미노산과 같은 더 짧은 스페이서가 사용된다. 일부 구현예에서, 적어도 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 260, 270, 280 또는 290개 아미노산인 것과 같은 더 긴 스페이서는 생체 내 또는 시험관 내에서 증가된 증폭의 이점을 가질 수 있다.

[0101] 비제한적인 예로서, 면역글로불린 힌지 영역은 다음 아미노산 서열 중 하나를 포함할 수 있다:

[0102] 표: 예시적인 힌지 영역

서열	서열번호
DKTHT	42
CPPC	42
CPEPKSCDTPPPCPR	44
ELKTPLGDTTHT	45
KSCDKTHTCP	46
KCCVDCP	47
KYGPPCP	48
EPKSCDKTHTCPPCP	49
ELKTPLGDTTHTCPRCP	50
SPNMVPHAHHAQ	51
ESKYGPPCPPCP	52
EPKSCDKTYTCPPCP	53

[0103]

[0104] 세포외 스페이서는 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 힌지 영역의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 세포외 스페이서는 또한 야생형(자연 발생) 힌지 영역과 비교하여 하나 이상의 아미노산 치환 및/또는 삽입 및/또는 결실을 포함할 수 있다. 예를 들어, 인간 IgG1 힌지의 His229는 Tyr로 치환되어 힌지 영역이 EPKSCDKTYTCPPCP 서열(서열번호 53)을 포함하도록 할 수 있다.

[0105] 세포외 스페이서는 인간 CD8로부터 유래된 아미노산 서열을 포함할 수 있고; 예를 들어, 힌지 영역은 아미노산 서열 TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (서열번호 54) 또는 이의 변이체를 포함할 수 있다.

[0106] 세포외 스페이서는 CH2 영역을 포함하거나 더 포함할 수 있다. 예시적인 CH2 영역은 APEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK (서열번호 55)이다. 세포외 스페이서는 CH3 영역을 포함하거나 더 포함할 수 있다. 예시적인 CH3 영역은 GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (서열번호 56)이다.

[0107] 세포외 스페이서가 다중 부분을 포함하는 경우, 다양한 부분 사이에 0-50개 아미노산이 있을 수 있다. 예를 들어, 힌지 및 CH2 또는 CH3 영역 사이 또는 둘 다 존재하는 경우 CH2 및 CH3 영역 사이에 적어도, 최대 또는 정확히 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45 또는 50개 아미노산(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위)이 있을 수 있다. 일부 구현예에서, 세포외 스페이서는 본질적으로 힌지, CH2 및/또는 CH3 영역으로 구성되며, 이는 힌지, CH2 및/또는 CH3 영역은 유일하게 존재하는 식별 가능한 영역이고 다른 모든 도메인 또는 영역은 제외되지만 식별 가능한 영역의 일부가 아닌 추가 아미노산이 존재할 수 있음을 의미한다.

[0108] **D. 막관통 도메인**

[0109] 본 개시내용의 폴리펩타이드는 막관통 도메인을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 막을 가로지르는 소수성 알파 나선이다. 상이한 막관통 도메인은 상이한 수용체 안정성을 초래할 수 있다.

[0110] 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 세포외 스페이서와 세포질 영역 사이에 삽입된다. 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 세포외 스페이서와 하나 이상의 공자극 영역 사이에 삽입된다. 일부 구현예에서, 링커는 막관통 도메인과 하나 이상의 공자극 영역 사이에 있다.

[0111] 진핵세포(예를 들어, 포유동물)의 세포막 내로 폴리펩타이드의 삽입을 제공하는 임의의 막관통 도메인이 사용에 적합할 수 있다. 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 CD28, CD8, CD4, CD3-zeta, CD134 또는 CD7 유래이다.

[0112] 본 개시내용의 임의의 구현예에서 유용한 예시적인 막관통 도메인은 하기 표의 것들을 포함한다:

[0113] 표: 예시적인 막관통 도메인 서열

설명	서열	서열번호
CD28-유래	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	57
CD8 베타 유래	LGLLVAGVLVLLVSLGVAIHLCC	58
CD4 유래	ALIVLGGVAGLLLFIGLGIFFCVRC	59
CD3 제타 유래	LCYLLDGILFIYGVILTALFLRV	60
CD28 유래	WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	61
CD134(OX40) 유래	VAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLL	62
CD7 유래	ALPAALAVISFLLGLGLGVACVLA	63

[0114]

[0115] **E. 세포질 영역**

[0116] 항원 인식 후, 본 개시내용의 수용체는 클러스터링될 수 있고 신호는 세포질 영역을 통해 세포로 전달된다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 공자극 도메인은 세포질 영역의 일부이다. 일부 구현예에서, 세포질 영역은 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다. 세포내 신호전달 도메인은 1차 신호전달 도메인 및 하나 이상의 공자극 도메인을 포함할 수 있다.

[0117] 본 개시내용의 폴리펩타이드에 사용하기에 적합한 세포질 영역 및/또는 공자극 영역은 항원 결합 도메인에 대한 항원의 결합에 의한 활성화에 반응하여 구별되고 검출가능한 신호(예: 세포에 의한 하나 이상의 사이토카인의 생산 증가; 표적 유전자의 전사 변화; 단백질 활성의 변화, 세포 행동의 변화, 예를 들어, 세포 사멸; 세포 증식; 세포 분화; 세포 생존; 세포 신호전달 반응의 조절 등)를 제공하는 임의의 바람직한 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포질 영역은 본원에 기재된 바와 같은 적어도 하나(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6 등)의 ITAM 모티프를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포질 영역은 DAP10/CD28 유형 신호전달 사슬을 포함한다.

[0118] 본 개시내용의 폴리펩타이드에 사용하기에 적합한 세포질 영역은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM)-함유 세포내 신호전달 폴리펩타이드를 포함한다. ITAM 모티프는 YX1X2(L/I)이며, 여기서 X1과 X2는 독립적으로 임의의 아미노산이다. 일부 경우에, 세포질 영역은 1, 2, 3, 4 또는 5개의 ITAM 모티프를 포함한다. 일부 경우에, ITAM 모티프는 엔도도메인에서 두 번 반복되며, ITAM 모티프의 첫 번째 및 두 번째 경우는 6 내지 8개의 아미노산에 의해 서로 분리되며, 예를 들어, (YX1X2(L/I))(X3)n(YX1X2(L/I)), 여기서 n은 6 내지8의 정수이고, 각각의 6~8 X3은 모든 아미노산이 될 수 있다.

[0119] 적합한 세포질 영역은 ITAM 모티프를 함유하는 폴리펩타이드로부터 유래된 ITAM 모티프-함유 부분일 수 있다. 예를 들어, 적합한 세포질 영역은 임의의 ITAM 모티프-함유 단백질의 ITAM 모티프-함유 도메인일 수 있다. 따라서, 적합한 엔도도메인은 그것이 유래된 전체 단백질의 전체 서열을 포함할 필요는 없다. 적합한 ITAM 모티프-함유 폴리펩타이드의 예는 다음을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다: DAP12, DAP10, FCER1G (Fc 엡실론 수용체 I 감마 사슬); CD3D (CD3 델타); CD3E (CD3 엡실론); CD3G (CD3 감마); CD3-제타; 및 CD79A (항원 수용체 복합체-관련 단백질 알파 사슬).

[0120] 예시적인 세포질 영역은 당업계에 공지되어 있다. 하기에 나타낸 세포질 영역은 또한 본 개시내용의 CAR에 포함될 수 있는 영역의 예를 제공한다:

[0121] 일부 구현예에서, 적합한 세포질 영역은 전장 DAP12 아미노산 서열의 ITAM 모티프-함유 부분을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포질 영역은 FCER1G (FCRG; Fc 엡실론 수용체 I 감마 사슬; Fc 수용체 감마-사슬; fc-엡실론 R1-감마; fcR감마; fceRI 감마; 고친화성 면역글로불린 엡실론 수용체 서브유닛 감마; 면역글로불린 E 수용체, 고친화도, 감마 사슬 등으로도 알려짐). 일부 구현예에서, 적합한 세포질 영역은 전장 FCER1G 아미노산 서

열의 ITAM 모티프-함유 부분을 포함할 수 있다.

[0122] 일부 구현예에서, 세포질 영역은 T 세포 표면 당단백질 CD3 델타 사슬(CD3D; CD3-델타; T3D; CD3 항원, 델타 서브유닛; CD3 델타; CD3d; CD3d 항원, 델타 폴리펩타이드 (TiT3 복합체); OKT3, 델타 사슬; T 세포 수용체 T3 델타 사슬; T 세포 표면 당단백질 CD3 델타 사슬 등으로도 알려짐). 일부 구현예에서, 적합한 세포질 영역은 전장 CD3 델타 아미노산 서열의 ITAM 모티프-함유 부분을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포질 영역은 T 세포 표면 당단백질 CD3 엡실론 사슬 (CD3e, CD3e; T 세포 표면 항원 T3/Leu-4 엡실론 사슬, T 세포 표면 당단백질 CD3 엡실론 사슬, AI504783, CD3, CD3-엡실론, T3e 등으로도 알려짐). 일부 구현예에서, 적합한 세포질 영역은 전장 CD3 엡실 아미노산 서열의 ITAM 모티프-함유 부분을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포질 영역은 T 세포 표면 당단백질 CD3 감마 사슬 (CD3G, CD3g, T 세포 수용체 T3 감마 사슬, CD3-감마, T3G, 감마 폴리펩타이드 (TiT3 복합체) 등으로도 알려짐)으로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 적합한 세포질 영역은 전장 CD3 감마 아미노산 서열의 ITAM 모티프-함유 부분을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포질 영역은 T 세포 표면 당단백질 CD3 제타 사슬 (CD3Z, CD3z, T 세포 수용체 T3 제타 사슬, CD247, CD3-제타, CD3H, CD3Q, T3Z, TCRZ 등으로도 알려짐)로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 적합한 세포질 영역은 전장 CD3 제타 아미노산 서열의 ITAM 모티프-함유 부분을 포함할 수 있다.

[0123] 일부 구현예에서, 세포질 영역은 CD79A(B-세포 항원 수용체 복합체-관련 단백질 알파 사슬; CD79a 항원 (면역글로불린-관련 알파); MB-1 막 당단백질; ig-알파; 막 - 결합된 면역글로불린-관련 단백질, 표면 IgM-관련 단백질 등으로도 알려짐)로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 적합한 세포질 영역은 전장 CD79A 아미노산 서열의 ITAM 모티프-함유 부분을 포함할 수 있다.

[0124] 특정 예시적인 세포질 영역은 당업계에 알려져 있으며, 하기 표에 추가로 제시된다.

[0125] **표: 세포질 영역**

서열	서열 번호
MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLV LTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSD LNTQRPYYK	64
MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLV LTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDL NTQRPYYK	65
MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIALAVYFL GRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK	66
MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIALAVYFL GRLVPRGRGAAEATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK	67
MIPAVVLLLLLLVEQAAALGEPQLCYILDAILFLYGIVLTLLYCRLKIQVRKA AITSYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQ	68
DGVYTGLSTRNQETYETLKHE	69
MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDRVFVNCNTSITWVEGTVGTLLSD ITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVAGI IVTDVIATLLLALGVFCFAGHETGRLSGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDA QYSHLGGNWARNK	70
MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDRVFVNCNTSITWVEGTVGTLLSD ITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRTADTQALLRNDQVYQ PLRDRDDAQYSHLGGNWARNK	71
DQVYQPLRDRDDAQYSHLGGN	72
MQSGTHWRVLGLCLLSVGVWGQDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQ YPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGS KPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLLLLVYYWSKN RKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQRDLYSGLNQR RI	73
NPDYEPIRKGQRDLYSGLNQR	74

[0126]

MEQGKGLAVLILAIILLQGTLAQSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKN ITWFKDGKMIGFLTEDKKKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNKSKPLQVYYR MCQNCIELNAATISGFLFAEIVSIFVLAVGVYFIAGQDGVRQSRASDKQTLLP NDQLYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRRN	75
DQLYQPLKDREDDQYSHLQGN	76
MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRV KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQALPPR	77
MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRV KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRR KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY DALHMQALPPR	78
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR	39
NQLYNELNLGRREEYDVLDKR	79
EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK	80
DGLYQGLSTATKDTYDALHMQ	81
MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKVPASLMVSLGEDAH FQCPHNSSNNANVTWWRVLHGNYTWPPEFLGPGEDPNGTLIIQNVNKSHGG IYVCRVQEGNESYQQSCGTYLRVRQPPPRPFLDMGEGTKNRIITAEGIILLFCA VVPGTLLLFRKRWQNEKLGLDAGDEYEDENLYEGLNLDDCSMYEDISRGLQ GTYQDVGSLNIGDVQLEKP	82
MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKVPASLMVSLGEDAH FQCPHNSSNNANVTWWRVLHGNYTWPPEFLGPGEDPNEPPPRPFLDMGEGT KNRIITAEGIILLFCAVVPGTLLLFRKRWQNEKLGLDAGDEYEDENLYEGLNL DDCSMYEDISRGLQGTYQDVGSLNIGDVQLEKP	83
ENLYEGLNLDDCSMYEDISRG	84
FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTR KHYQPYAPPRDFAAYRS	85
FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTR KHYQPYAPPRDFAAYRS	86

[0127]

[0128] **F. 공자극 영역**

[0129] 세포질 영역에 포함된 것과 같은 적절한 공자극 영역의 비제한적 예는 4-1BB(CD137), CD28, ICOS, OX-40, BTLA, CD27, CD30, GITR 및 HVEM의 폴리펩타이드를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0130] 공자극 영역은 적어도, 최대 또는 정확히 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200 또는 300개의 아미노산 또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위의 길이를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 공자극 영역은 막관통 단백질 4-1BB(TNFRSF9; CD137; CDw137; ILA 등으로도 알려짐)의 세포내 부분에서 유래한다. 일부 구현예에서, 공자극 영역은 막관통 단백질 CD28(Tp44로도 알려짐)의 세포내 부분에서 유래한다. 일부 구현예에서, 공자극 영역은 막관통 단백질 ICOS(AILIM, CD278 및 CVID1로도 알려짐)의 세포내 부분에서 유래한다. 일부 구현예에서, 공자극 영역은 막관통 단백질 OX-40(TNFRSF4, RP5-902P8.3, ACT35, CD134, OX40, TXGP1L로도 알려짐)의 세포내 부분에서 유래한다. 일부 구현예에서, 공자극 영역은 막관통 단백질 BTLA(BTLA1 및 CD272로도 알려짐)의 세포내 부분에서 유래한다. 일부 구현예에서, 공자극 영역은 막관통 단백질 CD27(S 152, T14, TNFRSF7 및 Tp55로도 알려짐)의 세포내 부분에서 유래한다. 일부 구현예에서, 공자극 영역은 막관통 단백질 CD30(TNFRSF8, D1S166E 및 Ki-1로도 알려짐)의 세포내 부분에서 유래한다. 일부 구현예에서, 공자극 영역은 막관통 단백질 GITR(TNFRSF18, RP5-902P8.2, AITR, CD357 및 GITR-D로도 알려짐)의 세포내 부분에서 유래한다. 일부 구현예에서, 공자극 영역은 막관통 단백질 HVEM(TNFRSF14, RP3-395M20.6, ATAR, CD270, HVEA, HVEM, LIGHTR 및 TR2로도 알려짐)의 세포내 부분에서 유래한다.

[0131] 특정 예시적인 공자극 도메인은 하기 아미노산 서열로 표시된다:

[0132] 표: 공-자극 도메인

서열	서열 번호
KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	87
FWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	88
TKKKYSSSVHDPNGEYMFMRAVNTAKKSRLTDVTL	89
RRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI	90
CCLRRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYD NDPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASLNHSVIGPNSRLARNVKEAP TEYASICVRS	91
HQRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP	92
RRACRKRIRQKLHLCYPVQTSQPKLELVDSRPRRSSTQLRSGASVTEPVAEER GLMSQPLMETCHSVGAAYLESLPLQDASPAGGPSSPRDLPEPRVSTEHTNNKI EKIYIMKADTVIVGTVKAELPEGRGLAGPAEPELEEELEADHTPHYPEQETEP PLGSCSDVMLSVEEEGKEDPLPTAASGK	93
HIWQLRSQCMWPRETQLLLEVPPSTEDARSCQFPEEERGERSAEEKGRLGDL WV	94
CVKRRKPRGDVVKVIVSVQRKRQEAEGEATVIEALQAPPDVTTVAVEETIPS FTGRSPNH	95
RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	38

[0133]

[0134] **G. 검출 펩타이드**

[0135] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 폴리펩타이드는 검출 펩타이드를 더 포함할 수 있다. 적합한 검출 펩타이드는 헤마글루티닌(HA; 예를 들어, YPYDVPDYA (서열번호 96); FLAG (예를 들어, DYKDDDDK (서열번호 97); c-myc (예를 들어, EQKLISEEDL; 서열번호 98) 등을 포함한다. 다른 적합한 검출 펩타이드는 당업계에 공지되어 있다.

[0136] **H. 펩타이드 링커**

[0137] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 폴리펩타이드는 펩타이드 링커(때때로 링커로 지칭됨)를 포함한다. 펩타이드 링커는 본원에 기재된 임의의 펩타이드 도메인/영역을 분리하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 링커는 신호 펩타이드와 항원 결합 도메인 사이, 항원 결합 도메인의 VH와 VL 사이, 항원 결합 도메인과 펩타이드 스페이서 사이, 펩타이드 스페이서와 막관통 도메인 사이, 공자극 영역 또는 공자극 영역의 N- 또는 C- 영역 측면 및/또는 막관통 도메인과 엔도도메인 사이에 위치할 수 있다. 펩타이드 링커는 다양한 아미노산 서열 중 임의의 것을 가질 수 있다. 도메인 및 영역은 일반적으로 가요성 성질을 갖는 펩타이드 링커에 의해 연결될 수 있지만, 다른 화학적 연결은 배제되지 않는다. 링커는 약 6 내지 약 40개 아미노산 길이, 또는 약 6 내지 약 25개 아미노산 길이의 펩타이드일 수 있다. 이러한 링커는 합성, 링커-암호화 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 단백질을 커플링함으로써 생성될 수 있다.

[0138] 가요성이 있는 펩타이드 링커를 사용할 수 있다. 펩타이드 링커는 적절한 펩타이드 링커가 일반적으로 가요성 펩타이드를 생성하는 서열을 가질 것이라는 점을 염두에 두고 사실상 모든 아미노산 서열을 가질 수 있다. 글리신 및 알라닌과 같은 작은 아미노산의 사용은 가요성 펩타이드를 만드는 데 유용하다. 이러한 서열의 생성은 당업자에게 일상적이다.

[0139] 적합한 링커는 용이하게 선택될 수 있고 임의의 적합한 길이, 예를 들어 1개 아미노산(예: Gly) 내지 20개 아미노산, 2개 아미노산 내지 15개 아미노산, 3개 아미노산 내지 12개 아미노산(4개 아미노산 내지 10개 아미노산, 5개 아미노산 내지 9개 아미노산, 6개 아미노산 내지 8개 아미노산, 또는 7개 아미노산 내지 8개 아미노산 포함)일 수 있고, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7개 아미노산 일 수 있다.

[0140] 적합한 링커는 용이하게 선택될 수 있고 상이한 길이의 임의의 적합한 길이, 예를 들어 1개 아미노산(예: Gly) 내지 20개 아미노산, 2개 아미노산 내지 15개 아미노산, 3개 아미노산 내지 12개 아미노산(4개 아미노산 내지 10개 아미노산, 5개 아미노산 내지 9개 아미노산, 6개 아미노산 내지 8개 아미노산, 또는 7개 아미노산 내지 8개 아미노산 포함)일 수 있고, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7개 아미노산 일 수 있다.

[0141] 예시적인 가요성 링커는 글리신 중합체(G)n, 글리신-세린 중합체(예를 들어, (GS)n, (GSGGS)n (서열번호 99), (G4S)n 및 (GGGS)n (서열번호 100)을 포함하며, 여기서 n은 1 이상의 정수이다. 일부 구현예에서, n은 적어도, 최대, 또는 정확히 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위)이다. 글리신-알라닌 중합체, 알라닌-세린 중합체 및 당업계에 공지된 기타 가요성 링커. 글리신 및 글리신-세린 폴리머를 사용할 수 있고; Gly와 Ser은 모두 상대적으로 구조화되지 않았으므로 구성 요소 사이의 중립적인 연결 고리 역할을 할 수 있다. 글리신 폴리머를 사용할 수 있고; 글리신은 알라닌보다 훨씬 더 많은 phi-psi 공간에 접근하고 더 긴 측쇄를 가진 잔기보다 훨씬 덜 제한된다. 예시적인 스페이서는 GGSG (서열번호 101), GGSGG (서열번호 102), GSGSG (서열번호 103), GSGGG (서열번호 104), GGGSG (서열번호 105), GSSSG (서열번호 106) 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0142] 추가 구현예에서, 링커는 (EAAAAK)n (서열번호 107)을 포함하고, 여기서 n은 적어도 1의 정수이다. 일부 구현예에서, n은 적어도, 최대, 또는 정확히 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위)이다.

[0143] **I. 추가 변형 및 폴리펩타이드 향상**

[0144] 추가로, 본 개시내용의 폴리펩타이드는 화학적으로 변형될 수 있다. 폴리펩타이드의 글리코실화는 예를 들어 항원에 대한 폴리펩타이드의 친화성을 증가시키기 위해 폴리펩타이드 서열 내의 글리코실화의 하나 이상의 부위를 변형함으로써 변경될 수 있다(미국 특허 제5,714,350호 및 제6,350,861호).

[0145] 본 개시내용의 폴리펩타이드의 영역 또는 단편은 서열번호 1-144 중 임의의 것에 대해 (적어도 또는 최대) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200개 이상의 아미노산 치환, 인접 아미노산 부가, 또는 인접 아미노산 결실을 갖는 아미노산 서열을 가질 수 있는 것으로 고려된다. 대안적으로, 본 개시내용의 폴리펩타이드의 영역 또는 단편은 서열번호 1-144 중 임의의 것과 (적어도 또는 최대) 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100%(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된 아미노산 서열을 가질 수 있다. 더욱이, 일부 구현예에서, 영역 또는 단편은 서열번호 1-144 중 임의의 것에서 위치 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362,

363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 또는 500 위치(여기서 1 위치는 서열의 N-말단에 있음)에서 시작하는 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500개 또는 그 이상의 인접 아미노산의 아미노산 영역을 포함한다. 본 개시내용의 폴리펩타이드는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50개 또는 그 이상의 변이체 아미노산을 포함할 수 있거나, 서열번호 1-144 중 어느 하나의 적어도 또는 최대 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 300, 400, 500, 550, 600개 또는 그 이상(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위)의 인접 아미노산과 적어도 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 유사하거나 동일하거나 상동일 수 있다.

[0146] 본 개시내용의 폴리펩타이드는 적어도, 최대, 또는 정확히 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614 또는 615개의 치환(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위)을 포함할 수 있다.

[0147] 치환은 서열번호 1-144 중 하나의 아미노산 위치 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393,

394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 또는 650(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위)에 있을 수 있다.

[0148] 본원에 기재된 폴리펩타이드는 적어도, 최대, 또는 정확히 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 300, 400, 500, 550, 1000개 또는 그 이상의 아미노산(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위)의 고정된 길이일 수 있다.

[0149] 치환 변이체는 일반적으로 단백질 내의 하나 이상의 부위에서 하나의 아미노산을 다른 것으로 교환하는 것을 포함하고, 다른 기능 또는 특성의 손실이 있거나 또는 없는 상태로, 폴리펩타이드의 하나 이상의 특성을 조절하도록 설계될 수 있다. 치환은 보존적일 수 있는데, 즉, 하나의 아미노산이 유사한 모양과 전하를 갖는 아미노산으로 대체된다. 보존적 치환은 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 알라닌에서 세린으로; 아르기닌에서 리신으로; 아스파라긴에서 글루타민 또는 히스티딘으로; 아스파테이트에서 글루타메이트로; 시스테인에서 세린으로; 글루타민에서 아스파라긴으로; 글루타메이트에서 아스파르테이트로; 글리신에서 프롤린으로; 히스티딘에서 아스파라긴 또는 글루타민으로; 이소류신에서 류신 또는 발린으로; 류신에서 발린 또는 이소류신으로; 리신에서 아르기닌으로; 메티오닌에서 류신 또는 이소류신으로; 페닐알라닌에서 티로신, 류신 또는 메티오닌으로; 세린에서 트레오닌으로; 트레오닌에서 세린으로; 트립토판에서 티로신으로; 티로신에서 트립토판 또는 페닐알라닌으로; 및 발린에서 이소류신 또는 류신으로의 교체를 포함한다. 대안적으로, 치환은 폴리펩타이드의 기능 또는 활성이 영향을 받도록 비보존적일 수 있다. 비보존적 교체는 일반적으로 극성 또는 전하를 띤 아미노산을 비극성 또는 전하를 띠지 않는 아미노산으로 또는 그 반대로와 같이 화학적으로 유사하지 않은 것으로 잔기를 치환하는 것을 포함한다.

[0150] 단백질은 재조합되거나 시험관 내에서 합성될 수 있다. 대안적으로, 비재조합 또는 재조합 단백질은 박테리아로부터 단리될 수 있다. 이러한 변이체를 함유하는 박테리아가 조성물 및 방법에서 구현될 수 있음이 또한 고려된다. 따라서 단백질을 단리할 필요가 없다.

[0151] 용어 "기능적으로 등가인 코돈(functionally equivalent codon)"은 아르기닌 또는 세린에 대한 6개의 코돈과 같이 동일한 아미노산을 암호화하는 코돈을 지칭하기 위해 본원에서 사용되며, 또한 생물학적으로 등가인 아미노산을 암호화하는 코돈을 지칭한다.

[0152] 또한 아미노산 및 핵산 서열은 각각 추가 N- 또는 C-말단 아미노산, 또는 5' 또는 3'서열과 같은 추가 잔기를 포함할 수 있고, 상기 서열이 단백질 발현이 관련된 생물학적 단백질 활성의 유지를 포함하여 상기 제시된 기준을 충족하는 한, 여전히 본질적으로 본원에 개시된 서열 중 하나에 제시된 바와 같을 수 있음이 이해될 것이다. 말단 서열의 추가는 특히, 예를 들어 암호화 영역의 5'또는 3'부분 중 하나에 인접하는 다양한 비-암호화 서열

을 포함할 수 있는 핵산 서열에 적용된다.

[0153] 다음은 동등하거나 개선된 2세대 분자를 생성하기 위해 단백질의 아미노산을 변화시키는 것에 기초한 논의이다. 예를 들어, 특정 아미노산은 상호작용 결합 능력의 상당한 손실 없이 단백질 구조의 다른 아미노산으로 대체될 수 있다. 예를 들어, 효소 촉매 도메인 또는 상호작용 성분과 같은 구조는 이러한 기능을 유지하기 위해 치환된 아미노산을 가질 수 있다. 단백질의 생물학적 기능적 활성을 정의하는 것은 단백질의 상호작용 능력과 특성이기 때문에 단백질 서열과 그 기본 DNA 암호화 서열에서 특정 아미노산 치환이 이루어질 수 있지만, 그럼에도 불구하고 유사한 특성을 가진 단백질을 생성한다. 따라서 본 발명자들은 생물학적 유용성 또는 활성의 상당한 손실 없이 유전자의 DNA 서열에 다양한 변화가 이루어질 수 있음을 고려한다.

[0154] 다른 구현예에서, 폴리펩타이드의 기능의 변경은 하나 이상의 치환을 도입함으로써 의도된다. 예를 들어, 특정 아미노산은 상호작용 성분의 상호작용 결합 능력을 변경하기 위한 의도로 단백질 구조의 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 예를 들어, 단백질 상호작용 도메인, 핵산 상호작용 도메인 및 촉매 부위와 같은 구조는 이러한 기능을 변경하기 위해 치환된 아미노산을 가질 수 있다. 단백질의 생물학적 기능적 활성을 정의하는 것은 단백질의 상호작용 능력과 성질이기 때문에, 단백질 서열과 그 기본 DNA 암호화 서열에서 특정 아미노산 치환이 이루어질 수 있지만 그럼에도 불구하고 상이한 특성을 가진 단백질을 생성할 수 있다. 따라서 본 발명자들은 생물학적 유용성 또는 활성의 상당한 변경이 있도록 유전자의 DNA 서열에 다양한 변경이 이루어질 수 있음을 고려한다.

[0155] 이러한 변경을 수행할 때 아미노산의 소수성 지표를 고려할 수 있다. 단백질에 상호작용적 생물학적 기능을 부여하는 데 있어서 소수성 아미노산 지표의 중요성은 일반적으로 당업계에서 이해된다(Kyte and Doolittle, 1982). 아미노산의 상대적인 소수성 특성은 생성된 단백질의 2차 구조에 기여하고, 이는 결국 단백질과 다른 분자, 예를 들어 효소, 기질(substrate), 수용체, DNA, 항체, 항원 등과의 상호작용을 정의한다는 것이 인정된다.

[0156] 유사 아미노산의 치환은 친수성에 기초하여 효과적으로 이루어질 수 있음이 또한 당업계에서 이해된다. 본원에 참조로 포함된 미국 특허 제4,554,101호는 인접 아미노산의 친수성에 의해 좌우되는 단백질의 최대 로컬 평균 친수성이 단백질의 생물학적 특성과 상관관계가 있다고 기술하고 있다. 아미노산은 유사한 친수성 값을 갖는 다른 아미노산으로 치환될 수 있고 여전히 생물학적으로 등가이고 면역학적으로 등가인 단백질을 생성할 수 있는 것으로 이해된다.

[0157] 위에서 약술한 바와 같이, 아미노산 치환은 일반적으로 아미노산 측쇄 치환기의 상대적 유사성, 예를 들어 소수성, 친수성, 전하, 크기 등을 기반으로 한다. 전술한 다양한 특성을 고려한 예시적인 치환은 잘 알려져 있으며 아르기닌 및 리신; 글루타메이트 및 아스파르테이트; 세린 및 트레오닌; 글루타민 및 아스파라긴; 및 발린, 류신 및 이소류신을 포함한다.

[0158] 특정 구현예에서, 본원에 기재된 단백질의 전부 또는 일부는 또한 통상적인 기술에 따라 용액 내 또는 고체 지지체 상에서 합성될 수 있다. 다양한 자동 합성기가 시판되고 있으며 공지된 프로토콜에 따라 사용할 수 있다. 예를 들어 각각 본원에 참조로 포함된 문헌[Stewart and Young, (1984); Tam 등., (1983); Merrifield, (1986); 및 Barany and Merrifield (1979)]을 참조한다. 대안적으로, 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열이 발현 벡터에 삽입되고, 적절한 숙주 세포로 형질전환되거나 형질주입되고, 발현에 적합한 조건 하에 배양되는 재조합 DNA 기술이 사용될 수 있다.

[0159] 한 구현예는 단백질의 생산 및/또는 제시를 위한 미생물을 비롯한 세포로의 유전자 전달의 사용을 포함한다. 관심 단백질에 대한 유전자는 적절한 숙주 세포로 전달된 후 적절한 조건 하에서 세포 배양이 이루어질 수 있다. 사실상 모든 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산이 사용될 수 있다. 재조합 발현 벡터의 생성 및 이에 포함된 요소들이 본원에서 논의된다. 대안적으로, 생산될 단백질은 단백질 생산에 사용되는 세포에 의해 정상적으로 합성되는 내인성 단백질일 수 있다.

[0160] **Ⅲ. 세포**

[0161] 특정 구현예는 본 개시내용의 폴리펩타이드 또는 핵산을 포함하는 세포에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 세포는 면역 세포 또는 T 세포이다. "T 세포"는 도움 T 세포, 불변 자연 살해 T(iNKT) 세포, 세포독성 T 세포, 조절 T 세포(Treg) 감마-델타 T 세포, 자연 살해(NK) 세포 및 호중구를 포함하는 CD3을 발현하는 모든 유형의 면역 세포를 포함한다. T 세포는 CD4+ 또는 CD8+ T 세포를 의미할 수 있다.

[0162] 적합한 포유동물 세포는 1차 세포 및 불멸화 세포주를 포함한다. 적합한 포유동물 세포주는 인간 세포주, 비인간 영장류 세포주, 설치류(예를 들어, 마우스, 래트) 세포주 등을 포함한다. 적합한 포유동물 세포주는 HeLa 세

포(예: American Type Culture Collection(ATCC) No. CCL-2), CHO 세포(예: ATCC No. CRL9618, CCL61, CRL9096), 인간 배아 신장(HEK) 293 세포(예: ATCC No. CRL-1573), Vero 세포, NIH 3T3 세포(예: ATCC No. CRL-1658), Huh-7 세포, BHK 세포(예: ATCC No. CCL10), PC12 세포 (ATCC No. CRL1721), COS 세포, COS-7 세포 (ATCC No. CRL1651), RATI 세포, 마우스 L 세포(ATCC No. CCLI.3), HLHepG2 세포, Hut-78, Jurkat, HL-60, NK 세포주(예를 들어, NKL, NK92 및 YTS) 등을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0163] 일부 경우에, 세포는 불멸화 세포주가 아니라 대신 개체로부터 수득된 세포(예: 1차 세포)이다. 예를 들어, 일부 경우에, 세포는 개체로부터 수득된 면역 세포이다. 예를 들어, 세포는 개체로부터 수득된 T 림프구이다. 다른 예를 들어, 세포는 개체로부터 수득된 세포독성 세포이다. 또 다른 예로서, 세포는 줄기 세포(예를 들어, 말초 혈액 줄기 세포) 또는 개체로부터 수득된 전구 세포이다.

[0164] **Ⅳ. 게놈 DNA 변형 방법**

[0165] 특정 구현예에서, 게놈 DNA는 추가 돌연변이, 삽입 또는 결실을 포함하거나 본 발명의 특정 분자 구조체를 통합하여 구조체가 게놈 DNA로부터 발현되도록 변형된다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산은 세포의 게놈 DNA 내로 통합된다. 일부 구현예에서, 핵산은 렌티바이러스 또는 레트로바이러스 형질도입에 의한 유전자 전달과 같은 바이러스 형질도입을 통해 세포에 통합된다. 일부 구현예에서, 게놈 DNA는 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 또는 아데노-연관 바이러스 벡터를 통해 숙주 세포의 게놈 내로 본 개시내용의 폴리펩타이드(예를 들어, CAR)를 암호화하는 핵산의 통합에 의해 변형된다.

[0166] 일부 구현예에서, 통합은 표적 통합이다. 일부 구현예에서, 표적화된 통합은 부위 특이적 재조합효소 및/또는 표적화 엔도뉴클레아제와 같은 DNA 소화제/폴리뉴클레오타이드 변형 효소의 사용을 통해 달성된다. 용어 "DNA 소화제"는 핵산의 뉴클레오타이드 서브유닛 사이의 결합(즉, 포스포디에스테르 결합)을 절단할 수 있는 작용제를 의미한다. 하나의 특정 표적은 TRAC(T 세포 수용체 알파 불변) 유전자좌이다. 예를 들어, 세포는 먼저 TRAC(T 세포 수용체 알파 불변) 유전자좌를 표적으로 하는 단일 가이드 RNA(sgRNA)와 복합된 Cas9 단백질로 구성된 리보핵단백질(RNP) 복합체로 전기천공될 것이다. 전기천공 15분 후, 세포는 CAR을 암호화하는 HDR 주형을 운반하는 AAV6으로 처리될 것이다. 다른 예에서, 이중 가닥 또는 단일 가닥 DNA는 HDR 주형을 포함하고 RNP 복합체와 함께 전기천공을 통해 세포 내로 도입된다.

[0167] 따라서, 일 측면에서, 본 개시는 표적화된 통합을 포함한다. 이를 달성하는 한 가지 방법은 부위-특이적 재조합효소 및/또는 표적화 엔도뉴클레아제와 같은 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 변형 효소에 대한 하나 이상의 인식 서열을 포함하는 외인성 핵산 서열(즉, 랜딩 패드)을 사용하는 것이다. 부위-특이적 재조합효소는 당업계에 잘 알려져 있으며 일반적으로 인버타제, 레졸바제 또는 인테그라제로 지칭될 수 있다. 부위-특이적 재조합효소의 비제한적 예는 람다 인테그라제, Cre 재조합효소, FLP 재조합효소, 감마-델타 레졸바제, Tn3 리졸바제, ΦC31 인테그라제, Bxb1-인테그라제 및 R4 인테그라제를 포함할 수 있다. 부위-특이적 재조합효소는 특정 인식 서열(또는 인식 부위) 또는 이의 변이체를 인식하며, 이들 모두는 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, Cre 재조합효소는 LoxP 부위를 인식하고 FLP 재조합효소는 FRT 부위를 인식한다.

[0168] 고려되는 표적화 엔도뉴클레아제는 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN), 메가뉴클레아제, 전사 활성화제-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), CRISPR/Cas-유사 엔도뉴클레아제, I-TevI 뉴클레아제 또는 관련 단량체 하이브리드, 또는 인공 표적화된 DNA 이중 가닥 절단 유도제를 포함한다. 예시적인 표적화 엔도뉴클레아제는 하기에 추가로 설명된다. 예를 들어, 전형적으로, 징크 핑거 뉴클레아제는 DNA 결합 도메인(즉, 징크 핑거) 및 절단 도메인(즉, 뉴클레아제)을 포함하며, 이들 둘 모두는 하기에 기재되어 있다. 또한 폴리뉴클레오타이드 변형 효소의 정의에는 DNA 결합 도메인 및 뉴클레아제를 포함할 수 있는 것과 같이 당업자에게 공지된 임의의 다른 유용한 융합 단백질이 포함된다.

[0169] 랜딩 패드 서열은 부위-특이적 재조합효소 및/또는 표적화 엔도뉴클레아제와 같은 특정 폴리뉴클레오타이드 변형 효소에 의해 선택적으로 결합 및 변형되는 적어도 하나의 인식 서열을 포함하는 뉴클레오타이드 서열이다. 일반적으로, 랜딩 패드 서열의 인식 서열(들)은 변형될 세포의 게놈에 내인적으로 존재하지 않는다. 예를 들어, 변형될 세포가 CHO 세포인 경우 랜딩 패드 서열의 인식 서열은 내인성 CHO 게놈에 존재하지 않는다. 표적화된 세포의 게놈 내에 내인적으로 존재하지 않는 고효율 뉴클레오타이드 변형 효소에 대한 인식 서열을 선택함으로써 표적화된 통합 속도를 개선할 수 있다. 내인적으로 존재하지 않는 인식 서열의 선택은 또한 잠재적인 표적외 통합을 감소시킨다. 다른 측면에서, 변형될 세포에서 고유한 인식 서열의 사용이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 다중 인식 서열이 랜딩 패드 서열에 사용되는 경우, 하나 이상은 외인성일 수 있고 하나 이상은 천연일 수 있다.

[0170] 당업자는 부위-특이적 재조합 및/또는 표적화 엔도뉴클레아제에 의해 결합 및 절단된 서열을 쉽게 결정할 수 있다.

[0171] 사용될 수 있는 표적화 엔도뉴클레아제의 또 다른 예는 진핵 세포의 핵 내로 엔도뉴클레아제의 진입을 허용하는 적어도 하나의 핵 국소화 신호를 포함하는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제이다. RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 또한 하나 이상의 뉴클레아제 도메인 및 가이드 RNA와 상호작용하는 하나 이상의 도메인을 포함한다. RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제가 특정 염색체 서열을 절단하도록 가이드 RNA에 의해 특정 염색체 서열에 지시된다. 가이드 RNA가 표적 절단에 대한 특이성을 제공하기 때문에, RNA-가이드 엔도뉴클레아제의 엔도뉴클레아제는 보편적이고 상이한 타겟 염색체 서열을 절단하기 위해 상이한 가이드 RNA와 함께 사용될 수 있다. 예시적인 RNA-가이드 엔도뉴클레아제 단백질이 아래에서 더 상세히 논의된다. 예를 들어, RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 CRISPR/Cas 단백질 또는 CRISPR/Cas-유사 융합 단백질, 클러스터링된 규칙적으로 산재된 짧은 회문 반복(CRISPR)/CRISPR-연관(Cas) 시스템으로부터 유래된 RNA-가이드 엔도뉴클레아제일 수 있다.

[0172] 표적화 엔도뉴클레아제는 또한 메가뉴클레아제일 수 있다. 메가뉴클레아제는 큰 인식 부위를 특징으로 하는 엔도데옥시리보뉴클레아제, 즉 인식 부위는 일반적으로 약 12개 염기쌍 내지 약 40개 염기쌍 범위이다. 이 요구사항의 결과로 인식 부위는 일반적으로 주어진 게놈에서 한 번만 발생한다. 메가뉴클레아제 중 "LAGLIDADG"라는 호밍 엔도뉴클레아제 계열은 게놈 및 게놈 공학 연구에 유용한 도구가 되었다. 메가뉴클레아제는 당업자에게 잘 알려진 기술을 사용하여 그들의 인식 서열을 변형함으로써 특정 염색체 서열에 표적화될 수 있다. 예를 들어, Epinat 등., 2003, Nuc. Acid Res., 31(11):2952-62 및 Stoddard, 2005, Quarterly Review of Biophysics, pp. 1-47. 참조.

[0173] 사용될 수 있는 표적화 엔도뉴클레아제의 또 다른 예는 전사 활성제-유사 효과기(TALE) 뉴클레아제이다. TALE은 새로운 DNA 표적에 결합하도록 쉽게 조작될 수 있는 식물 병원체 Xanthomonas의 전사 인자이다. TALE 또는 이의 절단된 버전은 FokI와 같은 엔도뉴클레아제의 촉매 도메인에 연결되어 TALE 뉴클레아제 또는 TALEN이라고 하는 표적화 엔도뉴클레아제를 생성할 수 있다. 예를 들어, Sanjana 등., 2012, Nature Protocols 7(1):171-192; Bogdanove A J, Voytas D F., 2011, Science, 333(6051):1843-6; Bradley P, Bogdanove A J, Stoddard B L., 2013, Curr Opin Struct Biol., 23(1):93-9. 참조.

[0174] **Ⅴ. 방법**

[0175] 본 개시내용의 측면은 흑색종과 같은 암을 치료하는 방법에 관한 것이다. 추가 구현예에서, 본원에 기재된 치료적 수용체(예를 들어, CAR)는 면역 반응을 자극하기 위해 사용될 수 있다. 면역 반응 자극은 시험관 내(in vitro), 생체 내(in vivo) 또는 생체 외(ex vivo)에서 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 치료적 수용체는 재발을 예방하기 위한 것이다. 상기 방법은 일반적으로 본 개시내용의 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 벡터, 또는 DNA, RNA(예를 들어, 시험관 내 전사된 RNA), 또는 아데노-연관 바이러스(AAV)로 포유동물 세포를 유전적으로 변형시키거나 세포에 폴리펩타이드를 직접 전달하는 단계를 포함한다. 세포는 면역 세포(예를 들어, T 림프구 또는 NK 세포), 줄기 세포, 전구 세포 등일 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 본원에 기재된 세포이다.

[0176] 일부 구현예에서, 유전자 변형은 생체 외에서 수행된다. 예를 들어, T 림프구, 줄기 세포, 또는 NK 세포(또는 본원에 기재된 세포)는 개체로부터 수득되고; 개체로부터 수득된 세포는 본 개시내용의 폴리펩타이드를 발현하도록 유전적으로 변형된다. 일부 경우에, 유전자 변형 세포는 생체 외에서 활성화된다. 다른 경우에, 유전자 변형 세포가 개인(예: 세포를 수득한 개체)에게 도입되고; 유전자 변형 세포는 생체 내에서 활성화된다.

[0177] 일부 구현예에서, 방법은 암의 치료를 위한 본원에 기재된 세포 또는 펩타이드의 투여 또는 암에 걸린 사람에게의 투여에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 암은 CD20+ 암이다. 일부 구현예에서, 암은 흑색종이다.

[0178] **Ⅵ. 추가 요법**

[0179] **A. 면역 요법**

[0180] 일부 구현예에서, 방법은 암 면역 요법의 투여를 포함한다. 암 면역 요법(때때로 면역 종양학, 약칭 IO라고도 함)은 암을 치료하기 위해 면역 체계를 사용하는 것이다. 면역 요법은 능동, 수동 또는 하이브리드(능동 및 수동)로 분류할 수 있다. 이러한 접근 방식은 암세포가 종종 표면에 종양 관련 항원(TAA)으로 알려진 면역 체계에 의해 감지될 수 있는 분자를 가지고 있다는 사실을 이용하고; 이들은 종종 단백질 또는 기타 거대분자(예: 탄수화물)이다. 능동 면역 요법은 TAA를 표적으로 하여 면역계가 종양 세포를 공격하도록 지시한다. 수동 면역 요법

은 기존의 항종양 반응을 강화하고 모노클로날 항체, 림프구 및 사이토카인의 사용을 포함한다. 본 개시내용의 방법에 유용한 면역요법이 하기에 기재되어 있다.

[0181] **1. 체크포인트 억제제 및 병용 치료**

[0182] 본 개시내용의 구현예는 면역 체크포인트 억제제(관문 억제제 요법으로도 지칭됨)의 투여를 포함할 수 있으며, 이는 하기에 추가로 설명된다. 체크포인트 억제제 요법은 하나의 세포 체크포인트 단백질만을 표적으로 하는 단일 요법일 수 있거나 또는 적어도 2개의 세포 체크포인트 단백질을 표적으로 하는 병용 요법일 수 있다. 예를 들어, 체크포인트 억제제 단독요법은 PD-1, PD-L1 또는 PD-L2 억제제 중 하나를 포함할 수 있거나 CTLA-4, B7-1 또는 B7-2 억제제 중 하나를 포함할 수 있다. 체크포인트 억제제 병용 요법은 PD-1, PD-L1 또는 PD-L2 억제제 중 하나를 포함할 수 있고, 병용하여 CTLA-4, B7-1 또는 B7-2 억제제 중 하나를 더 포함할 수 있다. 병용 요법에서 억제제의 병용은 동일한 조성일 필요는 없지만, 동시에, 실질적으로 동시에, 또는 두 억제제 모두의 주기적 투여를 포함하는 투여 요법으로 투여될 수 있으며, 여기서 기간은 본원에 설명된 기간일 수 있다.

[0183] a. PD-1, PD-L1 및 PD-L2 억제제

[0184] PD-1은 T 세포가 감염 또는 종양과 만나는 종양 미세 환경에서 작용할 수 있다. 활성화된 T 세포는 PD-1을 상향조절하고 말초 조직에서 계속해서 PD-1을 발현한다. IFN-감마와 같은 사이토카인은 상피 세포 및 종양 세포에서 PD-L1의 발현을 유도한다. PD-L2는 대식세포와 수지상 세포에서 발현된다. PD-1의 주요 역할은 말초에서 효과기 T 세포의 활성을 제한하고 면역 반응 동안 조직에 대한 과도한 손상을 방지하는 것이다. 본 개시내용의 억제제는 PD-1 및/또는 PD-L1 활성의 하나 이상의 기능을 차단할 수 있다.

[0185] "PD-1"의 대체 이름은 CD279 및 SLEB2를 포함한다. "PD-L1"의 대체 이름은 B7-H1, B7-4, CD274 및 B7-H를 포함한다. "PD-L2"의 대체 이름은 B7-DC, Btdc 및 CD273를 포함한다. 일부 구현예에서, PD-1, PD-L1 및 PD-L2는 인간 PD-1, PD-L1 및 PD-L2이다.

[0186] 일부 구현예에서, PD-1 억제제는 PD-1이 리간드 결합 파트너에 결합하는 것을 억제하는 분자이다. 특정 측면에서, PD-1 리간드 결합 파트너는 PD-L1 및/또는 PD-L2이다. 다른 구현예에서, PD-L1 억제제는 PD-L1이 결합 파트너에 결합하는 것을 억제하는 분자이다. 특정 측면에서, PD-L1 결합 파트너는 PD-1 및/또는 B7-1이다. 다른 구현예에서, PD-L2 억제제는 PD-L2이 결합 파트너에 결합하는 것을 억제하는 분자이다. 특정 측면에서, PD-L2 결합 파트너는 PD-1이다. 억제제는 항체, 이의 항원 결합 단편/영역, 면역접착소(immunoadhesin), 융합 단백질, 또는 올리고펩타이드일 수 있다. 예시적인 항체는 미국 특허 제8,735,553호, 제8,354,509호 및 제8,008,449호에 기재되어 있으며, 이들 모두는 본원에 참조로 포함된다. 본원에서 제공되는 방법 및 조성물에 사용하기 위한 다른 PD-1 억제제는 미국 특허 출원 번호 US2014/0294898, US2014/022021 및 US2011/0008369(모두 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 것과 같이 당업계에 공지되어 있다.

[0187] 일부 구현예에서, PD-1 억제제는 항-PD-1 항체(예를 들어, 인간 항체, 인간화 항체, 또는 키메라 항체)이다. 일부 구현예에서, 항-PD-1 항체는 니볼루맙, 펨브롤리주맙 및 피딜리주맙으로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구현예에서, PD-1 억제제는 면역접착소(예를 들어, 불변 영역(예를 들어, 면역글로불린 서열의 Fc 영역)에 융합된 PD-L1 또는 PD-L2의 세포외 또는 PD-1 결합 부분을 포함하는 면역접착소)이다. 일부 구현예에서, PD-L1 억제제는 AMP-224를 포함한다. MDX-1106-04, MDX-1106, ONO-4538, BMS-936558 및 OPDIVO®로도 알려진 니볼루맙은 WO2006/121168에 기재된 항-PD-1 항체이다. MK-3475, Merck 3475, 람브롤리주맙, KEYTRUDA® 및 SCH-900475로도 알려진 펨브롤리주맙은 WO2009/114335에 기재된 항-PD-1 항체이다. CT-011, hBAT 또는 hBAT-1로도 알려진 피딜리주맙은 WO2009/101611에 기술된 항-PD-1 항체이다. B7-DCIg로도 알려진 AMP-224는 WO2010/027827 및 WO2011/066342에 기재된 PD-L2-Fc 융합 가용성 수용체이다. 추가 PD-1 억제제는 MEDI0680(AMP-514라고도 함) 및 REGN2810을 포함한다.

[0188] 일부 구현예에서, 면역 체크포인트 억제제는 PD-L1 억제제, 예컨대 MEDI4736으로도 공지된 더발루맙, MPDL3280A로도 공지된 아테졸리주맙, MSB00010118C로도 공지된 아벨루맙, MDX-1105, BMS-936559 또는 이들의 조합이다. 특정 측면에서, 면역 체크포인트 억제제는 rHIgM12B7과 같은 PD-L2 억제제이다.

[0189] 일부 구현예에서, 억제제는 니볼루맙, 펨브롤리주맙 또는 피딜리주맙의 중쇄 및 경쇄 CDR 또는 VR을 포함한다. 따라서, 일 구현예에서, 억제제는 니볼루맙, 펨브롤리주맙 또는 피딜리주맙의 VH 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인 및 니볼루맙, 펨브롤리주맙 또는 피딜리주맙의 VL 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함한다. 다른 구현예에서, 항체는 상기 언급된 항체와 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2 상의 동일한 에피토프와 결합하기 위해 경쟁하고/하거나 이에 결합한다. 다른 구현예에서, 항체는 상기 언급된 항체와 적어도 약 70, 75, 80, 85, 90, 95,

97, 또는 99%(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 가변 영역 아미노산 서열 동일성을 갖는다.

[0190] b. CTLA-4, B7-1 및 B7-2 억제제

[0191] 본원에서 제공되는 방법에서 표적화될 수 있는 또 다른 면역 체크포인트는 CD152로도 알려진 세포독성 T-림프구 관련 단백질 4(CTLA-4)이다. 인간 CTLA-4의 완전한 cDNA 서열은 Genbank 수탁 번호 L15006을 가지고 있다. CTLA-4는 T 세포 표면에서 발견되며 항원 제시 세포 표면의 B7-1(CD80) 또는 B7-2(CD86)에 결합할 때 "오프" 스위치 역할을 한다. CTLA-4는 도움 T 세포의 표면에서 발현되고 억제 신호를 T 세포에 전달하는 면역글로불린 슈퍼패밀리의 멤버이다. CTLA-4는 T 세포 공자극 단백질인 CD28과 유사하며 두 분자 모두 항원 제시 세포의 B7-1 및 B7-2에 결합한다. CTLA-4는 억제 신호를 T 세포에 전달하는 반면 CD28은 자극 신호를 전달한다. 세포내 CTLA-4는 조절 T 세포에서도 발견되며 기능에 중요할 수 있다. T 세포 수용체와 CD28을 통한 T 세포 활성화는 B7 분자에 대한 억제 수용체인 CTLA-4의 발현을 증가시킨다. 본 개시내용의 억제제는 CTLA-4, B7-1 및/또는 B7-2 활성의 하나 이상의 기능을 차단할 수 있다. 일부 구현예에서, 억제제는 CTLA-4와 B7-1의 상호작용을 차단한다. 일부 구현예에서, 억제제는 CTLA-4와 B7-2의 상호작용을 차단한다.

[0192] 일부 구현예에서, 면역 체크포인트 억제제는 항-CTLA-4 항체(예를 들어, 인간 항체, 인간화 항체, 또는 키메라 항체), 그의 항원 결합 단편, 면역접착소, 융합 단백질 또는 올리고펩타이드다.

[0193] 본 방법에 사용하기에 적합한 항-인간-CTLA-4 항체(또는 이로부터 유래된 VH 및/또는 VL 도메인)는 당업계에 널리 공지된 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 대안적으로, 당업계에서 인정된 항-CTLA-4 항체가 사용될 수 있다. 예를 들어, US 8,119,129, WO 01/14424, WO 98/42752; WO 00/37504(CP675,206, 트레멜리무맙으로도 알려짐; 이전에는 티실리무맙), 미국 특허 제6,207,156호; Hurwitz 등., 1998에 개시된 항-CTLA-4 항체는 본원에 개시된 방법에서 사용될 수 있다. 전술한 각 간행물의 교시 내용은 참조로 본원에 포함된다. CTLA-4에 대한 결합에 대해 이러한 기술분야에서 인정된 항체와 경쟁하는 항체도 사용될 수 있다. 예를 들어, 인간화 CTLA-4 항체는 국제 특허 출원 WO2001/014424, WO2000/037504 및 미국 특허 No. 8,017,114에 기술되어 있으며; 모두 본원에 참조로 포함된다.

[0194] 본 개시내용의 방법 및 조성물에서 체크포인트 억제제로서 유용한 추가의 항-CTLA-4 항체는 이필리무맙(10D1, MDX-010, MDX-101 및 Yervoy®로도 알려짐) 또는 이의 항원 결합 단편 및 변이체이다(예를 들어, WOO 1/14424 참조).

[0195] 일부 구현예에서, 억제제는 트레멜리무맙 또는 이필리무맙의 중쇄 및 경쇄 CDR 또는 VR을 포함한다. 따라서, 일부 구현예에서, 억제제는 트레멜리무맙 또는 이필리무맙의 VH 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인 및 트레멜리무맙 또는 이필리무맙의 VL 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함한다. 다른 구현예에서, 항체는 상기 언급된 항체와 PD-1, B7-1, 또는 B7-2 상의 동일한 에피토프와 결합하기 위해 경쟁하고/하거나 이에 결합한다. 다른 구현예에서, 항체는 상기 언급된 항체와 적어도 약 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 또는 99%(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 가변 영역 아미노산 서열 동일성을 갖는다.

[0196] **2. 공자극 분자의 억제**

[0197] 일부 구현예에서, 면역요법은 공자극 분자의 억제제를 포함한다. 일부 구현예에서, 억제제는 B7-1(CD80), B7-2(CD86), CD28, ICOS, OX40(TNFRSF4), 4-1BB(CD137; TNFRSF9), CD40L(CD40LG), GITR(TNFRSF18) 및 이들의 조합의 억제제를 포함한다. 억제제는 억제 항체, 폴리펩타이드, 화합물 및 핵산을 포함한다.

[0198] **3. 수지상 세포 요법**

[0199] 수지상 세포 요법은 수지상 세포가 림프구에 종양 항원을 제시하도록 하여 항종양 반응을 유발하고, 이는 림프구를 활성화하여 항원을 제시하는 다른 세포를 죽이도록 자극한다. 수지상 세포는 포유동물 면역계의 항원 제시 세포(APC)이다. 암 치료에서 암 항원 표적화를 돕는다. 수지상 세포를 기반으로 한 세포 암 치료의 한 예는 시풀류셀-T(sipuleucel-T)이다.

[0200] 수지상 세포가 종양 항원을 제시하도록 유도하는 한 가지 방법은 자가 종양 용해물 또는 짧은 펩타이드(암 세포의 단백질 항원에 해당하는 단백질의 작은 부분)로 백신 접종하는 것이다. 이러한 펩타이드는 면역 및 항종양 반응을 증가시키기 위해 종종 보조제(고도의 면역원성 물질)와 함께 제공된다. 다른 보조제는 과립구 대식세포 집락 자극 인자(GM-CSF)와 같은 수지상 세포를 유인 및/또는 활성화하는 단백질 또는 기타 화학 물질을 포함한다.

[0201] 수지상 세포는 또한 종양 세포가 GM-CSF를 발현하도록 함으로써 생체 내에서 활성화될 수 있다. 이것은 GM-

CSF를 생산하도록 종양 세포를 유전적으로 조작하거나 GM-CSF를 발현하는 종양 용해성 바이러스로 종양 세포를 감염시켜 달성할 수 있다.

[0202] 또 다른 전략은 환자의 혈액에서 수지상 세포를 제거하고 신체 외부에서 활성화하는 것이다. 수지상 세포는 단일 종양 특이적 펩타이드/단백질 또는 종양 세포 용해물(분해된 종양 세포의 용액)일 수 있는 종양 항원의 존재하에 활성화된다. 이 세포(선택적 보조제 포함)는 주입되어 면역 반응을 유발한다.

[0203] 수지상 세포 요법은 수지상 세포 표면의 수용체에 결합하는 항체의 사용을 포함한다. 항원은 항체에 추가될 수 있으며 수지상 세포가 성숙하도록 유도하고 종양에 대한 면역을 제공할 수 있다.

[0204] **4. 사이토카인 요법**

[0205] 사이토카인은 종양 내에 존재하는 여러 유형의 세포에서 생성되는 단백질이다. 그들은 면역 반응을 조절할 수 있다. 종양은 종종 종양이 성장하고 면역 반응을 감소시키기 위해 그것들을 사용한다. 이러한 면역 조절 효과로 인해 면역 반응을 유발하는 약물로 사용될 수 있다. 일반적으로 사용되는 두 가지 사이토카인은 인터페론과 인터루킨이다.

[0206] 인터페론은 면역 체계에 의해 생성된다. 그들은 일반적으로 항 바이러스 반응에 관여하지만 암에도 사용된다. 그들은 유형 I(IFNα 및 IFNβ), 유형 II(IFNɣ) 및 유형 III(IFNλ)의 세 그룹으로 나뉜다.

[0207] 인터루킨은 일련의 면역 체계 효과를 가지고 있다. IL-2는 예시적인 인터루킨 사이토카인 요법이다.

[0208] **5. 입양 T 세포 요법**

[0209] 입양 T 세포 요법은 T 세포의 수혈(입양 세포 이식)에 의한 수동 면역의 한 형태이다. 그들은 혈액과 조직에서 발견되며 일반적으로 외래 병원체를 발견하면 활성화된다. 특히, T 세포의 표면 수용체가 표면 항원에 외부 단백질의 일부를 표시하는 세포를 만날 때 활성화된다. 이들은 감염된 세포 또는 항원 제시 세포(APC)일 수 있다. 그들은 정상 조직과 종양 조직에서 발견되며, 여기서 종양 침윤 림프구(TIL)로 알려져 있다. 이들은 종양 항원을 제시하는 수지상 세포와 같은 APC의 존재에 의해 활성화된다. 이들 세포가 종양을 공격할 수 있지만, 종양 내의 환경은 고도로 면역억제적이어서 면역 매개 종양 사멸을 예방한다.

[0210] 종양 표적 T 세포를 생산하고 얻는 다양한 방법이 개발되었다. 종양 항원에 특이적인 T 세포는 종양 샘플(TIL)에서 제거하거나 혈액에서 여과할 수 있다. 후속 활성화 및 배양은 생체 외에서 수행되고 결과가 재주입된다. 종양 표적 T 세포는 유전자 요법을 통해 생성될 수 있다. 종양 표적 T 세포는 T 세포를 종양 항원에 노출시킴으로써 증폭될 수 있다.

[0211] 일부 구현예에서, 입양 세포 요법에 사용되는 치료 세포는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현한다. CAR은 통상적으로 세포외 항원-결합 도메인 (scFv일 수 있음), 세포외 스페이서, 막관통 도메인, 공자극 신호전달 영역 (이의 수는 특이적 CAR 설계에 따라 달라짐) 및 CD3-제타 신호전달 도메인/엔도도메인으로 이루어진 융합 단백질이다.

[0212] 일부 구현예에서, 입양 세포 요법에 사용되는 치료 세포는 종양 항원을 표적화하는 이종성 TCR 분자인 조작된 T-세포 수용체 (TCR)를 발현한다. T 세포 및 자연 살해 (NK) 세포를 비롯한 면역 세포는 바이러스 형질도입, DNA 뉴클레오펙션(nucleofection) 및 RNA 뉴클레오펙션(nucleofection)을 비롯한 관련 기술분야에 공지된 다양한 방법에 의해 CAR 또는 TCR을 발현하도록 조작될 수 있다. 항원 표적에 대한 CAR 또는 TCR의 결합은 CAR 또는 TCR을 발현하는 인간 T 세포를 활성화할 수 있고, 이는 항원 또는 일부 다른 면역학적 반응을 보유하는 세포의 사멸을 초래할 수 있다.

[0213] 일부 구현예에서, 세포는 암-특이적 CAR 또는 TCR을 포함한다. CAR 또는 TCR 폴리펩타이드의 맥락에서 용어 "암-특이적"은 암-특이적 항원과 같은 암-특이적 분자에 대한 항원 결합 특이성을 갖는 폴리펩타이드를 지칭한다. 일부 구현예에서, 암-특이적 CAR 및 또 다른 CAR은 별개의 폴리펩타이드 상에 있다.

[0214] **B. 종양 용해 바이러스**

[0215] 일부 구현예에서, 추가 요법은 종양 용해성 바이러스를 포함한다. 종양용해성 바이러스는 암세포를 우선적으로 감염시켜 죽이는 바이러스이다. 감염된 암세포가 종양 용해에 의해 파괴됨에 따라 새로운 감염성 바이러스 입자 또는 비리온을 방출하여 남아 있는 종양을 파괴하는 데 도움을 준다. 종양 용해성 바이러스는 종양 세포를 직접 파괴할 뿐만 아니라 장기 면역 요법을 위해 숙주의 항종양 면역 반응을 자극하는 것으로 생각된다.

[0216] **C. 다당류**

[0217] 일부 구현예에서, 추가 요법은 다당류를 포함한다. 버섯에서 발견되는 특정 화합물, 주로 다당류는 면역 체계를 상향 조절하고 항암 특성을 가질 수 있다. 예를 들어, 렌티난과 같은 베타 글루칸은 실험실 연구에서 대식세포, NK 세포, T 세포 및 면역계 사이토카인을 자극하는 것으로 나타났으며 면역 보조제로 임상 시험에서 조사되었다.

[0218] **D. 신생항원**

[0219] 일부 구현예에서, 추가 요법은 신생항원 돌연변이의 표적화를 포함한다. 많은 종양이 돌연변이를 나타낸다. 이러한 돌연변이는 잠재적으로 T 세포 면역요법에 사용하기 위한 새로운 표적 항원(신생항원)을 생성한다. RNA 시퀀싱 데이터를 사용하여 확인된 바와 같이 암 병변에서 CD8+ T 세포의 존재는 돌연변이 부담이 높은 종양에서 더 높다. 자연 살해 세포 및 T 세포의 세포용해 활성과 관련된 전사체의 수준은 많은 인간 종양의 돌연변이 부하와 양의 상관관계가 있다.

[0220] **E. 화학 요법**

[0221] 일부 구현예에서, 추가 요법은 화학요법을 포함한다. 화학요법제의 적합한 부류는 (a) 알킬화제, 예를 들어 질소 머스타드(예: 메클로레타민, 시클로포스파미드, 이포스파미드, 멜팔란, 클로람부실), 에틸렌이민 및 메틸멜라민(예: 헥사메틸멜라민, 티오테파), 알킬설포네이트, 설포네이트 (예: 카르무스틴, 로무스틴, 클로로조티신, 스트렙토조신) 및 트리아진(예: 디카르바진), (b) 대사길항제, 예를 들어 엽산 유사체(예: 메토트렉세이트), 피리미딘 유사체(예: 5-플루오로우라실, 우라시타라빈), 아자시타라빈 및 퓨린 유사체 및 관련 물질(예: 6-메르캅토퓨린, 6-티오구아닌, 펜토스타틴), (c) 천연물, 예를 들어 빈카 알칼로이드(예: 빈블라스틴, 빈크리스틴), 에피포도필로톡신(예: 에토포사이드, 테니포사이드), 항생제 , 닥티노마이신, 다우노루비신, 독소루비신, 블레오마이신, 플리카마이신 및 미톡산트론), 효소(예: L-아스파라기나제) 및 생물학적 반응 조절제(예: 인터페론-α) 및 (d) 기타 제제, 예를 들어 백금 배위 착물(예: 시스플라틴, 카르보플라틴), 치환된 요소(예: 히드록시우레아), 메틸히디아진 유도체(예: 프로카바진) 및 부뇌피질 억제제(예: 탁솔 및 미토탄)를 포함한다. 일부 구현예에서, 시스플라틴은 특히 적합한 화학요법제이다.

[0222] 시스플라틴은 예를 들어 전이성 고환 또는 난소 암종, 진행성 방광암, 두경부암, 자궁경부암, 폐암 또는 기타 종양과 같은 암을 치료하는 데 널리 사용되었다. 시스플라틴은 경구로 흡수되지 않으므로 예를 들어 정맥내, 피하, 종양내 또는 복강내 주사와 같은 다른 경로를 통해 전달되어야 한다. 시스플라틴은 단독으로 또는 다른 제제와 조합하여 사용될 수 있으며, 특정 구현예에서 고려되는 총 3개의 과정에 대해 3주마다 약 15 mg/m^{2}내지 약 20 mg/m^{2}를 포함하는 임상 적용에 사용되는 효과적인 용량이다. 일부 구현예에서, 치료용 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 작동적으로 연결된 Egr-1 프로모터를 포함하는 구조체와 함께 세포 및/또는 대상체에 전달되는 시스플라틴의 양은 시스플라틴 단독을 사용할 때 전달될 양보다 적다.

[0223] 다른 적합한 화학요법제는 항미세관제, 예를 들어 파클리탁셀("탁솔") 및 독소루비신 염산염("독소루비신")을 포함한다. 아데노바이러스 벡터를 통해 전달된 Egr-1 프로모터/TNFα 구조체와 독소루비신의 조합은 화학요법 및/또는 TNF-α에 대한 내성 극복에 효과적인 것으로 확인되었으며, 이는 구조체와 독소루비신의 병용 치료가 독소루비신 및 TNF-α 모두에 대한 내성을 극복함을 시사한다.

[0224] 독소루비신은 잘 흡수되지 않으며 정맥내 투여하는 것이 바람직하다. 특정 구현예에서, 성인에 대한 적절한 정맥내 용량은 약 21일 간격으로 약 60mg/m^2~약 75mg/m^2 또는 약 3주 내지 약 4주 간격으로 반복되는 연속 2일 또는 3일 각각에 약 25mg/m^2~약 30mg/m^2 또는 일주일에 한 번 약 20 mg/m^{2}를 포함한다. 고령자, 이전의 화학요법 또는 신생물성 골수 침범으로 인한 이전 골수 억제가 있는 경우, 또는 이 약물을 다른 골수 형성 억제제와 병용하는 경우 가장 낮은 용량을 사용해야 한다.

[0225] 질소 머스타드는 본 개시내용의 방법에 유용한 또 다른 적합한 화학요법제이다. 질소 머스타드는 메클로레타민(HN2), 사이클로포스파미드 및/또는 이포스파미드, 멜팔란(L-사르콜리신) 및 클로람부실을 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 사이클로포스파미드(CYTOXAN®)는 Mead Johnson으로부터 입수가능하고 NEOSTAR®는 Adria로부터 입수가능하다)는 또 다른 적합한 화학요법제이다. 성인에게 적합한 경구 투여량은 예를 들어 약 1 mg/kg/일 내지 약 5 mg/kg/일을 포함하고, 정맥내 투여량은 예를 들어 초기에 약 2일 내지 약 5일에 걸쳐 약 40 mg/kg 내지 약 50 mg/kg 또는 약 7일 내지 약 10일마다 약 10mg/kg 내지 약 15mg/kg 또는 주 2회 약 3 mg/kg

내지 약 5 mg/kg 또는 약 1.5 mg/kg/일 내지 약 3 mg/kg/일의 분할 투여량을 포함한다. 위장에 대한 부작용 때문에 정맥 주사가 선호된다. 이 약물은 또한 때때로 근육내, 침윤 또는 체강 내로 투여된다.

[0226] 추가의 적합한 화학요법제는 피리미딘 유사체, 예를 들어 시타라빈(시토신 아라비노사이드), 5-플루오로우라실(플루우라실; 5-FU) 및 플록수리딘(플루오로데-옥시우리딘; FudR)을 포함한다. 5-FU는 약 7.5 내지 약 1000 mg/m2 사이의 임의의 용량으로 대상체에게 투여될 수 있다. 또한, 5-FU 투여 일정은 다양한 기간 동안, 예를 들어 최대 6주 동안 또는 본 개시내용이 속하는 기술분야의 통상의 기술자에 의해 결정될 수 있다.

[0227] 젬시타빈 디포스페이트(GEMZAR®, Eli Lilly & Co., "젬시타빈"), 다른 적절한 화학요법제는 진행성 및 전이성 췌장암의 치료에 권장되며, 따라서 이러한 암에 대한 본 개시내용에서도 유용할 것이다.

[0228] 환자에게 전달되는 화학요법제의 양은 가변적일 수 있다. 하나의 적합한 구현예에서, 화학요법제는 화학요법이 구조체와 함께 투여될 때 숙주에서 암의 정지 또는 퇴행을 야기하기에 효과적인 양으로 투여될 수 있다. 다른 구현예에서, 화학요법제는 화학요법제의 화학요법 유효량보다 2 내지 10,000배 적은 양으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 화학요법제는 화학요법제의 화학요법 유효량보다 약 20배, 약 500배, 또는 심지어 약 5000배 적은 양으로 투여될 수 있다. 본 개시내용의 화학요법제는 유효 투여량의 결정뿐만 아니라 구조체와 병용하여 원하는 치료 활성에 대해 생체 내에서 시험될 수 있다. 예를 들어, 그러한 화합물은 인간에서 테스트하기 전에 적합한 쥐, 생쥐, 닭, 소, 원숭이, 토끼 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 동물 모델 시스템에서 테스트할 수 있다. 시험관 내 시험은 또한 실시예에 기술된 바와 같이 적절한 조합 및 투여량을 결정하는 데 사용될 수 있다.

[0229] **F. 방사선 요법**

[0230] 일부 구현예에서, 추가 요법 또는 이전 요법은 전리 방사선과 같은 방사선을 포함한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, "이온화 방사선"은 이온화(전자의 획득 또는 손실)를 생성하기에 충분한 에너지를 갖거나 핵 상호작용을 통해 충분한 에너지를 생성할 수 있는 입자 또는 광자를 포함하는 방사선을 의미한다. 예시적이고 바람직한 이온화 방사선은 x-방사선이다. 표적 조직 또는 세포에 x-방사선을 전달하는 수단은 당업계에 잘 알려져 있다.

[0231] 일부 구현예에서, 전리방사선량은 20Gy를 초과하며, 1회 투여한다. 일부 구현예에서, 전리방사선량은 18Gy이며, 3회 투여한다. 일부 구현예에서, 전리방사선량은 적어도, 최대 또는 정확히 2, 4, 6, 8, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 18, 19, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 40 Gy(또는 그 안에서 유도가능한 범위)이다. 일부 구현예에서, 전리방사선은 적어도, 최대, 또는 정확히 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10회(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 투여된다. 1회 초과의 용량이 투여되는 경우, 투여량은 약 1, 4, 8, 12 또는 24시간 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8일 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14 또는 16주, 또는 그 내에서 유도가능한 임의의 범위일 수 있다.

[0232] 일부 구현예에서, IR의 양은 IR의 총 용량으로 표시될 수 있으며, 그런 다음 분할된 용량으로 투여된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 총 용량은 각각 5Gy의 10분할된 용량으로 투여된 50Gy이다. 일부 구현예에서, 총 용량은 50-90Gy이며 각각 2-3Gy의 20-60분할 용량으로 투여된다. 일부 구현예에서, IR의 총 용량은 적어도, 최대 또는 약 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40,41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 125, 130, 135, 140 또는 150(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위)이다. 일부 구현예에서, 총 용량은 적어도, 최대 또는 정확히 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50 Gy(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위)의 분할 용량으로 투여된다. 일부 구현예에서, 적어도, 최대 또는 정확히 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40,41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100 분할 용량(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위)이 투여된다. 일부 구현예에서, 적어도, 최대 또는 정확히 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 분할 용량이 1일 당 투여된다. 일부 구현예에서, 적어도, 최대 또는 정확히 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30(또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위) 분할 용량이 1주 당 투여된다.

[0233] G. 수술

[0234] 암에 걸린 사람의 약 60%는 예방, 진단 또는 병기, 치료 및 완화 수술을 포함하는 특정 유형의 수술을 받게 된다. 근치적 수술은 암 조직의 전체 또는 일부를 물리적으로 제거, 절제 및/또는 파괴하는 절제를 포함하며 본 구현예의 치료, 화학요법, 방사선 요법, 호르몬 요법, 유전자 요법, 면역요법 및/또는 대체 요법과 같은 다른 요법과 함께 사용될 수 있다. 종양 절제는 종양의 적어도 일부를 물리적으로 제거하는 것을 지칭한다. 수술에 의한 치료는 종양 절제 외에 레이저 수술, 냉동 수술, 전기 수술, 현미경으로 제어되는 수술(모스 수술)을 포함한다.

[0235] 암세포, 조직 또는 종양의 일부 또는 전체를 절제하면 체내에 공동이 형성될 수 있다. 치료는 관류, 직접 주사 또는 추가 항암 요법과 함께 해당 부위의 국소 적용으로 달성할 수 있다. 이러한 치료는 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7일마다, 또는 1, 2, 3, 4 및 5주마다 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개월마다 반복될 수 있다. 이러한 치료법도 다양한 복용량을 가질 수 있다.

[0236] H. 기타 제제

[0237] 치료의 치료 효능을 개선하기 위해 다른 제제가 본 구현예의 특정 측면과 조합되어 사용될 수 있음이 고려된다. 이러한 추가 제제는 세포 표면 수용체 및 GAP 접합의 상향조절에 영향을 미치는 제제, 세포증식억제제 및 분화제제, 세포 부착 억제제, 아폽토시스 유도제에 대한 과증식성 세포의 감수성을 증가시키는 제제, 또는 기타 생물학적 제제를 포함한다. GAP 접합의 수를 증가시킴으로써 세포간 신호전달의 증가는 이웃하는 과증식 세포 집단에 대한 항과증식 효과를 증가시킬 것이다. 다른 구현예에서, 세포증식억제제 또는 분화제는 치료의 항과증식성 효능을 개선하기 위해 본 구현예의 특정 측면과 조합하여 사용될 수 있다. 세포 부착의 억제제는 본 구현예의 효능을 개선하기 위해 고려된다. 세포 접착 억제제의 예는 초점 접착 키나제(FAK) 억제제 및 로바스타틴이다. 항체 c225와 같은 세포자멸사에 대한 과증식성 세포의 감수성을 증가시키는 다른 제제가 치료 효능을 개선하기 위해 본 구현예의 특정 측면과 조합되어 사용될 수 있다는 것이 추가로 고려된다.

[0238] 암 치료는 본 명세서에 기재된 임의의 암 치료를 배제할 수 있는 것으로 고려된다. 또한, 본 개시내용의 구현예는 본 명세서에 기재된 요법을 위해 이전에 치료된, 본 명세서에 기재된 요법을 위해 현재 치료되고 있는, 또는 본 명세서에 기재된 요법을 위해 치료되지 않은 환자를 포함한다. 일부 구현예에서, 환자는 본원에 기재된 요법에 내성이 있는 것으로 결정된 환자이다. 일부 구현예에서, 환자는 본원에 기재된 요법에 민감한 것으로 결정된 환자이다.

[0239] Ⅶ. 약학 조성물

[0240] 본 개시내용은 질병을 치료하고 이를 필요로 하는 대상체에서 면역 반응을 조절하는 방법을 포함한다. 본 개시내용은 면역 반응을 유도하거나 변형하기 위해 사용될 수 있는 약학 조성물의 형태일 수 있는 세포를 포함한다.

[0241] 본 개시내용에 따른 조성물의 투여는 전형적으로 임의의 공통 경로를 통해 이루어질 것이다. 이것은 비경구, 정위, 피내, 피하, 경구, 경피, 근육내, 복강내, 복강내, 안와내, 이식, 흡입, 심실내, 비강내 또는 정맥내 주사를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 조성물(예를 들어, 치료적 수용체를 발현하는 세포를 포함하는 조성물)은 정맥내 주사를 통해 투여된다.

[0242] 전형적으로, 본 개시내용의 조성물 및 요법은 투여 제형과 양립가능한 방식으로, 그리고 치료학적으로 유효하고 면역 변형이 되는 양으로 투여된다. 투여할 양은 치료할 대상체에 따라 다르다. 투여에 필요한 활성 성분의 정확한 양은 의사의 판단에 달려 있다.

[0243] 적용 방식은 매우 다양할 수 있다. 세포 성분을 포함하는 약학 조성물의 투여를 위한 임의의 통상적인 방법이 적용가능하다. 약학 조성물의 투여량은 투여 경로에 따라 달라질 것이며 대상체의 크기 및 건강에 따라 달라질 것이다.

[0244] 많은 경우에, 최대 약 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 이상의 다중 투여가 바람직할 것이다. 투여는 2일 내지 12주 간격, 보다 일반적으로 1주 내지 2주 간격의 범위일 수 있다. 투여 과정은 동종반응성 면역 반응 및 T 세포 활성에 대한 분석이 뒤따를 수 있다.

[0245] 문구 "약학적으로 허용 가능한(pharmaceutically acceptable)" 또는 "약리학적으로 허용 가능한(pharmacologically acceptable)"은 동물 또는 인간에게 투여될 때 유해한, 알레르기성 또는 기타 유해한 반응을 일으키지 않는 분자적 실체 및 조성물을 지칭한다. 본원에 사용된 "약학적으로 허용 가능한 담체"는 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 항균제 및 항진균제, 등장제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 약학적 활성 물질을

위한 이러한 매질 및 제제의 사용은 당업계에 잘 알려져 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 제제가 활성 성분과 양립할 수 없는 경우를 제외하고, 면역원성 및 치료 조성물에서의 그의 사용이 고려된다. 본 개시내용의 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 조성물이다.

[0246] 본 개시내용의 조성물은 비경구 투여용으로 제제화될 수 있으며, 예를 들어 정맥내, 근육내, 피하 또는 심지어 복강내 경로를 통한 주사용으로 제제화될 수 있다. 전형적으로, 이러한 조성물은 액체 용액 또는 현탁액으로서 주사제로 제조될 수 있고 제제는 또한 유화될 수 있다.

[0247] 주사용으로 적합한 약학적 형태는 멸균 수용액 또는 분산액; 참기름, 땅콩 오일 또는 수성 프로필렌 글리콜을 포함하는 제형을 포함한다. 또한 제조 및 보관 조건에서 안정해야 하며 박테리아 및 곰팡이와 같은 미생물의 오염 작용에 대해 보존되어야 한다.

[0248] 멸균 주사 용액은 활성 성분(즉, 본 개시내용의 세포)을 필요한 양의 적절한 용매에 필요에 따라 위에 열거된 다양한 기타 성분과 혼입시킨 후 여과 멸균함으로써 제조된다. 일반적으로, 분산액은 기본 분산 매질 및 위에 열거된 것들로부터 필요한 기타 성분을 함유하는 멸균 비히클에 다양한 멸균 활성 성분을 혼입함으로써 제조된다.

[0249] 조성물의 유효량은 의도한 목표에 따라 결정된다. 용어 "단위 용량(unit dose)" 또는 "투여량(dosage)"은 대상체에서 사용하기에 적합한 물리적으로 분리된 단위를 말하며, 각 단위는 그의 투여, 즉 적절한 경로와 관련하여 본원에서 논의된 원하는 반응을 생성하도록 계산된 조성물의 미리 결정된 양을 함유한다. 치료 횟수와 단위 용량 모두에 따라 투여되는 양은 원하는 결과 및/또는 보호에 따라 다르다. 조성물의 정확한 양은 또한 의사의 판단에 달려 있으며 각 개체에 고유하다. 용량에 영향을 미치는 인자는 대상체의 신체적 및 임상적 상태, 투여 경로, 의도된 치료 목표(증상의 경감 대 치유) 및 특정 조성물의 효능, 안정성 및 독성을 포함한다. 제형화 시, 용액은 투여 제형과 양립가능한 방식으로 치료학적 또는 예방학적으로 유효한 양으로 투여될 것이다. 제형은 위에서 설명한 주사액의 유형과 같은 다양한 투여 형태로 쉽게 투여된다.

[0250] 본 개시내용의 조성물 및 관련 방법, 특히 본 개시내용의 조성물의 투여는 또한 본 명세서에 기재된 추가 치료법과 같은 추가 요법의 투여와 병용하여 또는 당업계에 공지된 다른 전통적인 치료법과 병용하여 사용될 수 있다.

[0251] 본 명세서에 개시된 치료적 조성물 및 치료는 수분 내지 수주 범위의 간격으로 다른 치료 또는 작용제보다 선행하거나, 동시 진행되고/되거나 후속할 수 있다. 제제가 세포, 조직 또는 유기체에 별도로 적용되는 구현예에서, 일반적으로 치료제가 여전히 세포, 조직 또는 유기체에 유리하게 조합된 효과를 발휘할 수 있도록 각 전달 시간 사이에 상당한 기간이 만료되지 않도록 할 것이다. 예를 들어, 이러한 경우에, 세포, 조직 또는 유기체를 2, 3, 4 또는 그 이상의 제제 또는 치료제와 실질적으로 동시에(즉, 약 1분 미만) 접촉시킬 수 있는 것으로 고려된다. 다른 측면에서, 하나 이상의 치료제 또는 치료는 또 다른 치료제 또는 치료를 투여하기 전 및/또는 투여한 후 1분, 5분, 10분, 20분, 30분, 45분, 60분, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 11시간, 12시간, 13시간, 14시간, 15시간, 16시간, 17시간, 18시간, 19시간, 20시간, 21시간, 22시간, 22시간, 23시간, 24시간, 25시간, 26시간, 27시간, 28시간, 29시간, 30시간, 31시간, 32시간, 33시간, 34시간, 35시간, 36시간, 37시간, 38시간, 39시간 , 40시간, 41시간, 42시간, 43시간, 44시간, 45시간, 46시간, 47시간, 48시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 21일, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주 또는 8주 또는 그 이상 및 그 안에서 유도가능한 임의의 범위 이내에 투여되거나 제공될 수 있다.

[0252] 치료는 다양한 "단위 용량"을 포함할 수 있다. 단위 용량은 미리 결정된 양의 치료 조성물을 함유하는 것으로 정의된다. 투여할 양, 특정 경로 및 제형은 임상 분야의 전문가의 기술 범위 내에 있다. 단위 용량은 단일 주사로 투여될 필요는 없지만 정해진 기간에 걸쳐 연속 주입을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 단위 용량은 단일 투여 용량을 포함한다.

[0253] 투여할 양은 치료 횟수와 단위 용량 모두에 따라 원하는 치료 효과에 따라 다르다. 유효 용량은 특정 효과를 달성하기 위해 필요한 양을 나타내는 것으로 이해된다. 특정 구현예의 실시에서, 10 mg/kg 내지 200 mg/kg 범위의 용량이 이들 제제의 보호 능력에 영향을 미칠 수 있는 것으로 고려된다. 따라서, 용량은 약 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195 및 200, 300, 400, 500, 1000 ㎍/kg, mg/kg, ㎍/일, 또는 mg/일 또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위의 용량을 포함하는 것으로 고려된다. 또한,

이러한 용량은 하루 동안 여러 번 및/또는 여러 날, 몇 주 또는 몇 달에 걸쳐 투여될 수 있다.

[0254] 일부 구현예에서, 인간에게 투여되는 면역 체크포인트 억제제, 예를 들어 항체 및/또는 미생물 조절제의 치료학적 유효량 또는 충분한 양은 1회 이상의 투여에 의한 환자 체중의 약 0.01 내지 약 50 mg/kg의 범위일 것이다. 일부 구현예에서, 사용된 요법은 예를 들어, 약 0.01 내지 약 45 mg/kg, 약 0.01 내지 약 40 mg/kg, 약 0.01 내지 약 35 mg/kg, 약 0.01 내지 약 30 mg/kg, 약 0.01 내지 약 25 mg/kg, 약 0.01 내지 약 20 mg/kg, 약 0.01 내지 약 15 mg/kg, 약 0.01 내지 약 10 mg/kg, 약 0.01 내지 약 5 mg/kg, 또는 약 0.01 내지 약 1 mg/kg이 매일 투여된다. 일 구현예에서, 본원에 기술된 요법은 21일 주기 중 1일째에 약 100 mg, 약 200 mg, 약 300 mg, 약 400 mg, 약 500 mg, 약 600 mg, 약 700 mg, 약 800 mg, 약 900 mg, 약 1000 mg, 약 1100 mg, 약 1200 mg, 약 1300 mg 또는 약 1400 mg의 용량으로 대상체에게 투여된다. 용량은 단일 용량 또는 주입과 같은 다중 용량(예를 들어, 2 또는 3 용량)으로 투여될 수 있다. 이 요법의 진행 상황은 기존 기술로 쉽게 모니터링할 수 있다.

[0255] 특정 구현예에서, 약학 조성물의 유효 용량은 약 1 mM 내지 150 mM의 혈액 수준을 제공할 수 있는 용량이다. 다른 구현예에서, 유효 용량은 약 4 mM 내지 100 mM; 또는 약 1 mM 내지 100 mM; 또는 약 1 mM 내지 50 mM; 또는 약 1 mM 내지 40 mM; 또는 약 1 mM 내지 30 mM; 또는 약 1 mM 내지 20 mM; 또는 약 1 mM 내지 10 mM; 또는 약 10 mM 내지 150 mM; 또는 약 10 mM 내지 100 mM; 또는 약 10 mM 내지 50 mM; 또는 약 25 mM 내지 150 mM; 또는 약 25 mM 내지 100 mM; 또는 약 25 mM 내지 50 mM; 또는 약 50 mM 내지 150 mM; 또는 약 50 mM 내지 100 mM (또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위)의 혈액 수준을 제공한다. 일부 구현예에서, 용량은 대상체에게 투여되는 치료제로 인한 다음과 같은 약제의 혈중 농도를 제공할 수 있다: 약, 적어도 약 또는 최대 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100 μM 또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위. 특정 구현예에서, 대상체에게 투여되는 치료제는 체내에서 대사된 치료제로 대사되며, 이 경우 혈액 수치는 해당 제제의 양을 나타낼 수 있다. 대안적으로, 치료제가 대상체에 의해 대사되지 않는 정도까지, 본원에서 논의된 혈액 수준은 대사되지 않은 치료제를 지칭할 수 있다.

[0256] 치료적 조성물의 정확한 양은 또한 의사의 판단에 달려 있으며 각 개체에 고유하다. 용량에 영향을 미치는 인자는 환자의 신체적 및 임상적 상태, 투여 경로, 의도된 치료 목표(증상 완화 대 치료) 및 특정 치료 물질 또는 대상이 받고 있을 수 있는 기타 요법의 효능, 안정성 및 독성을 포함한다.

[0257] 당업자는 μg/kg 또는 mg/kg 체중의 투여량 단위는 4 mM 내지 100 mM과 같이 μg/ml 또는 mM(혈액 수준)의 상응하는 농도 단위로 변환 및 표현될 수 있음을 이해하고 인지할 것이다. 또한 흡수는 종 및 기관/조직에 따라 달라지는 것으로 이해된다. 흡수 및 농도 측정과 관련하여 만들어지는 적용 가능한 변환 계수 및 생리학적 가정은 잘 알려져 있으며 당업자가 하나의 농도 측정을 다른 농도 측정으로 변환하고 본원에 설명된 용량, 효능 및 결과에 관한 합리적인 비교 및 결론을 내릴 수 있도록 한다.

[0258] **Ⅷ. 치료 방법**

[0259] 본 개시내용의 조성물은 생체 내, 시험관 내 또는 생체 외 투여에 사용될 수 있다. 조성물의 투여 경로는 예를 들어, 피내, 피하, 정맥내, 국소, 국부 및 복강내 투여일 수 있다.

[0260] 일부 구현예에서, 개시된 방법은 암을 치료하는 방법에 관한 것이다. 상기 암은 고형 종양, 전이성 암, 또는 비-전이성 암일 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 암은 방광, 피, 뼈, 골수, 뇌, 유방, 비뇨기, 자궁 경부, 식도, 십이지장, 소장, 대장, 결장, 직장, 항문, 잇몸(gum), 머리, 신장, 간, 폐, 비인두, 목, 난소, 전립선, 피부, 위, 고환, 혀 또는 자궁에서 기원할 수 있다.

[0261] 상기 암은 구체적으로 하기 조직학적 유형 중 하나 이상일 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다: 미분화암, 방광, 피, 뼈, 뇌, 유방, 비뇨기과, 식도, 흉선종, 십이지장, 결장, 직장, 항문, 잇몸, 머리, 신장, 연조직, 간, 폐, 비인두, 목, 난소, 전립선, 피부, 위, 고환, 혀, 자궁, 흉선, 피부 편평 세포, 비대장 직장 위장관, 결장직장, 흑색종, 메르켈세포, 신장세포, 자궁경부, 간세포, 요로상피, 비소세포 폐(non-small cell lung), 두경부, 자궁내막, 식도위, 소세포폐 중피종, 난소, 식도위, 교모세포종, 부신피질, 눈(vueal), 췌장, 생식 세포, 거대 및 방추 세포 암종; 소세포 암종; 유두모양암; 편평 세포 암종; 림프상피암종; 기저 세포 암종; 모기질 암종; 이행 세포 암종; 유두 이행 세포 암종; 선암종; 담관암종; 간세포 암; 혼합 간세포성 암종 및 담관암종; 섬

유주 선암종; 선낭암종; 선종폴립의 선암종; 선암종, 가족성대장폴립증(familial polyposis coli); 고형 암종; 세기관지-폐포 선암종; 유두모양샘암종; 난염성 암종; 호산성(acidophil) 암종; 호산성(oxyphilic) 선암종; 호염기구 암종; 투명 세포 선암종; 과립 세포 암종; 여포 선암종; 유두모양 및 여포 선암종; 비피막 경화성 암종; 부신 피질 암종; 자궁내막양 난소암; 피부 부속기 암종; 아포크린 선암종; 피지선암종; 귀지 선암종; 점막표피양암종; 낭선암종; 유두 낭선암종; 유두 장액성 낭선암종; 점액성 낭선암종; 점액성 선암종; 반지 세포 암종; 침윤성 관 암종; 수질암종; 소엽 암종; 염증성 암종; 파제트병, 유방; 선포 세포 암종; 선편평상피암종; 흉선종; 협막세포종; 남성모세포종; 세르톨리 세포 암종; 악성 흑색종; 멜라닌결핍 흑색종; 표재성 확산 흑색종; 유상피세포 흑색종; 육종; 간충직 (예를들어, 섬유육종; 섬유성 조직구종; 점액육종; 지방육종; 평활근육종; 횡문근육종; 배아형 횡문근육종; 포상 횡문근육종; 기질 육종; 뮬러리안 혼합 종양; 신아세포종; 간모세포종; 암육종; 난소고환종; 배아 암종; 융모막암종; 중신종; 혈관육종; 카포시 육종; 림프관육종; 골육종; 방피질성 골육종; 연골육종; 중간엽 연골육종; 골 거대 세포 종양; 유잉 육종; 변색성 상아육종(ameloblastic odontosarcoma); 변색성 섬유육종(ameloblastic fibrosarcoma); 척색종; 뇌실막세포종; 성상세포종; 원형질 성상세포종; 원섬유성 성상세포종; 성상아세포종; 희소돌기아교세포종; 희소돌기모세포종; 원시 신경외배엽종양; 소뇌 육종; 신경절신경모세포종; 신경 모세포종; 망막모세포종; 후각 신경성 종양; 신경섬유육종; 부육아종); 또는 조혈성 (예를들어, 다발성 골수종; 비만 세포 육종; 면역증식성 소장 질환; 백혈병; 림프성 백혈병; 형질세포 백혈병; 적백혈병; 림프육종 세포 백혈병; 골수성 백혈병; 호염기성 백혈병; 호산구성 백혈병; 단핵구성 백혈병; 비만 세포 백혈병; 거핵아구성 백혈병; 골수성 육종; 털세포 백혈병(hairy cell leukemia))

[0262] **Ⅸ. 서열**

[0263] 본 개시내용의 방법 및 조성물에 유용한 예시적인 키메라 폴리펩타이드 및 CAR 분자의 아미노산 서열은 하기 표 1에 제공된다.

설명	서열	서열번호
Leu16 VL	DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIK	1
Leu16 VH	EVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSS	2
리툭시맙 VL	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIK	3
리툭시맙 VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSS	4
RFR-LCDR VL	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIK	5
RFR-LCDR VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSS	6
LFR-RCDR VL	DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIK	7
LFR-RCDR VH	EVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSS	8
Leu16 HCDR1	SYNMH	9
Leu16 HCDR2	AIYPGNGDTSYNQKFKG	10

[0264]

[0265]

Leu16 HCDR3	SNYYGSSYWFFDV	11
Leu16 LCDR1	RASSSVNYMD	12
Leu16 LCDR2	ATSNLAS	13
Leu16 LCDR3	QQWSFNPPT	14
Leu16 HFR1	EVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFT	15
Leu16 HFR2	WVKQTPGQGLEWIG	16
Leu16 HFR3	KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCAR	17
Leu16 HFR4	WGAGTTVTVSS	18
Leu16 LFR1	DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTC	19
Leu16 LFR2	WYQKKPGSSPKPWIY	20
Leu16 LFR3	GVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYC	21
Leu16 LFR4	FGGGTKLEIK	22
리툭시맙 HCDR1	SYNMH	9
리툭시맙 HCDR2	AIYPGNGDTSYNQKFKG	10
리툭시맙 HCDR3	STYYGGDWYFNV	23
리툭시맙 LCDR1	RASSSVSYIH	24
리툭시맙 LCDR2	ATSNLAS	13

리툭시맙 LCDR3	QQWTSNPPT	25
리툭시맙 HFR1	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFT	26
리툭시맙 HFR2	WVKQTPGRGLEWIG	27
리툭시맙 HFR3	KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR	28
리툭시맙 HFR4	WGAGTTVTVSS	18
리툭시맙 LFR1	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTC	29
리툭시맙 LFR2	WFQQKPGSSPKPWIY	30
리툭시맙 LFR3	GVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYC	31
리툭시맙 LFR4	FGGGTKLEIK	22
RFR-LCDR HCDR1	SYNMH	9
RFR-LCDR HCDR2	AIYPGNGDTSYNQKFKG	10
RFR-LCDR HCDR3	SNYYGSSYWFFDV	11
RFR-LCDR LCDR1	RASSSVNYMD	12
RFR-LCDR LCDR2	ATSNLAS	13
RFR-LCDR LCDR3	QQWSFNPPT	14

[0266]

RFR-LCDR HFR1	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFT	26
RFR-LCDR HFR2	WVKQTPGRGLEWIG	27
RFR-LCDR HFR3	KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR	28
RFR-LCDR HFR4	WGAGTTVTVSS	18
RFR-LCDR LFR1	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTC	29
RFR-LCDR LFR2	WFQQKPGSSPKPWIY	30
RFR-LCDR LFR3	GVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYC	31
RFR-LCDR LFR4	FGGGTKLEIK	22
LFR-RCDR HCDR1	SYNMH	9
LFR-RCDR HCDR2	AIYPGNGDTSYNQKFKG	10
LFR-RCDR HCDR3	STYYGGDWYFNV	23
LFR-RCDR LCDR1	RASSSVSYIH	24
LFR-RCDR LCDR2	ATSNLAS	13
LFR-RCDR LCDR3	QQWTSNPPT	25
LFR-RCDR HFR1	EVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFT	15

[0267]

LFR-RCDR HFR2	WVKQTPGQGLEWIG	16
LFR-RCDR HFR3	KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCAR	17
LFR-RCDR HFR4	WGAGTTVTVSS	18
LFR-RCDR LFR1	DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTC	19
LFR-RCDR LFR2	WYQKKPGSSPKPWIY	20
LFR-RCDR LFR3	GVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYC	21
LFR-RCDR LFR4	FGGGTKLEIK	22

[0268]

RFR-LCDR (pYC1917) - 뮤린 카파 사슬(Murine kappa chain) 신호 서열 - RFR-LCDR VL - scFv 링커(Linker) - RFR-LCDR VH - IgG4 힌지(hinge)/CH2/CH3 (L235E, N297Q) - CD28 막관통 (transmembrane) - CD28 세포질의 (cytoplasmic) (gg) - GGG - CD3-제타(zeta)-세포질의 (cytoplasmic) - T2A - EGFRt	METDTLLLWVLLLWVPGSTGQIVLSQSPAILSASPGEKVTM TCRASSSVNYMDWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRF SGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPTFGGGTK LEIKGSTSGGGSGGGSGGGGSSQVQLQQPGAELVKPGASVK MSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTS YNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARS NYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSSESKYGPPCPPCPAPEFE GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGKMFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSK RSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSGG GRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRLEGGGEG RGSLLTCGDVEENPGPRMLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKV CNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGD SFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFE NLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISG NKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVC HALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEP REFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDG PHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTY GCTGPGLEGCPTNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLF M*	33

[0269]

LFR-RCDR (pYC1918); 뮤린 카파 사슬(Murine kappa chain) 신호 서열 - LFR-RCDR VL - scFv 링커(Linker) - LFR-RCDR VH - IgG4 힌지(hinge)/CH2/CH3 (L235E, N297Q) - CD28 막관통 (transmembrane) - CD28 세포질의 (cytoplasmic) (gg) - GGG - CD3-제타(zeta)-세포질의 (cytoplasmic) - T2A - EGFRt	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIVLTQSPAILSASPGEKVTM TCRASSSVSYIHWYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFS GSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKL EIKGSTSGGGSGGGSGGGGSSEVQLQQSGAELVKPGASVK MSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTS YNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARS TYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSSESKYGPPCPPCPAPEFEG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGKMFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSK RSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSGG GRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRLEGGGEG RGSLLTCGDVEENPGPRMLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKV CNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGD SFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFE NLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISG NKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVC HALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEP REFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDG PHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTY GCTGPGLEGCPTNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLF M*	34

[0270]

RFR-LCDR (RFR-LCDR VL – scFv 링커(Linker) – RFR-LCDR VH – IgG4 힌지(hinge)/CH2/CH3 (L235E, N297Q) – CD28 막관통(transmembrane) – CD28 세포질의(cytoplasmic) (gg) – GGG – CD3-제타(zeta)-세포질의(cytoplasmic) – T2A – EGFRt)	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWFQQKPGS SPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAA TYYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIKGSTSGGGSGGGSGGGGS SQVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK QTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTA YMQLSSLTSEDSAVYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVT VSSESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF QSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKMFWVLVVVGG VLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPT RKHYQPYAPPRDFAAYRSGGGRVKFSRSADAPAYQQGQNQ LYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKD TYDALHMQALPPRLEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPRMLL LVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIK HFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVK EITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVV SLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTS GQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVS CRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQA MNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTL VWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSI ATGMVGALLLLLVVALGIGLFM*	42

[0271]

LFR-RCDR (LFR-RCDR VL – scFv 링커(Linker) – LFR-RCDR VH – IgG4 힌지(hinge)/CH2/CH3 (L235E, N297Q) – CD28 막관통(transmembrane) – CD28 세포질의(cytoplasmic) (gg) – GGG – CD3-제타(zeta)-세포질의(cytoplasmic) – T2A – EGFRt)	DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWYQKKPGSS PKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAAT YYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKGSTSGGGSGGGSGGGSS EVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQ TPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAY MQLSSLTSEDSADYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTV SSESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQ STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKMFWVLVVVGGV LACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTR KHYQPYAPPRDFAAYRSGGGRVKFSRSADAPAYQQGQNQL YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPRLEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPRMLLL VTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKH FKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEI TGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSL NITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSG QKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSC RNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAM NITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLV WKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSIA TGMVGALLLLLVVALGIGLFM*	43
뮤린 카파 사슬 신호 서열(Murine kappa chain signal sequence)	METDTLLLWVLLLWVPGSTG	35
scFv 링커(Linker)	GSTSGGGSGGGSGGGGSS	32
IgG4 힌지(hinge)/CH2/CH3	ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	36
CD28 막관통(transmembrane)	MFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	37

[0272]

CD28 세포질의 (cytoplasmic) (gg)	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	38
CD3-zeta 세포질의 (cytoplasmic)	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	39
T2A	LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR	40
EGFRt	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM	41
KM8138 (huKM666L) VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSITCTVSGFSLASYNIHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGSTNYNSALMSRLTISKDNSKNQVFLKMSSLTAADTAVYYCAK RSDDYSWFAYWGQGTLVTVSS	108
KM8138 (huKM666L) VL	ENQMTQSPSSLSASVGDRVTMTCRASSSVSSSYLHWYQQKSGKAPKVWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC QQYSGYPITFGQGTKVEIK	109
KM8138 (huKM666L) HCDR1	SYNIH	110
KM8138 (huKM666L) HCDR2	VIWAGGSTNYNSALMS	111
KM8138 (huKM666L) HCDR3	RSDDYSWFAY	112
KM8138 (huKM666L) LCDR1	RASSSVSSSYLH	113

[0273]

[0274]

KM8138 (huKM666L) LCDR2	STSNLAS	114
KM8138 (huKM666L) LCDR3	QQYSGYPIT	115
KM8138 (huKM666L) HFR1	QVQLQESGPGLVKPSQTLSITCTVSGFSLA	116
KM8138 (huKM666L) HFR2	WVRQPPGKGLEWLG	117
KM8138 (huKM666L) HFR3	RLTISKDNSKNQVFLKMSSLTAADTAVYYCAK	118
KM8138 (huKM666L) HFR4	WGQGTLVTVSS	119
KM8138 (huKM666L) LFR1	ENQMTQSPSSLSASVGDRVTMTC	120
KM8138 (huKM666L) LFR2	WYQQKSGKAPKVWIY	121
KM8138 (huKM666L) LFR3	GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC	122
KM8138 (huKM666L) LFR4	FGQGTKVEIK	123
14g2a VH	EVQLLQSGPELEKPGASVMISCKASGSSFTGYNMNWVRQNI GKSLEWIGAIDPYYGGTSYNQKFKGRATLTVDKSSSTAYMH LKSLTSEDSAVYYCVSGMEYWGQGTSVTVSS	124

14g2a VL	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHRNGNTYLHW YLQKPGQSPKLLIHKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDLGVYFCSQSTHVPPLTFGAGTKLELKRA	125
14g2a HCDR1	GYNMN	126
14g2a HCDR2	AIDPYYGGTSYNQKFKG	127
14g2a HCDR3	GMEY	128
14g2a LCDR1	RSSQSLVHRNGNTYLH	129
14g2a LCDR2	KVSNRFS	130
14g2a LCDR3	SQSTHVPPLT	131
14g2a HFR1	EVQLLQSGPELEKPGASVMISCKASGSSFT	132
14g2a HFR2	WVRQNIGKSLEWIG	133
14g2a HFR3	RATLTVDKSSSTAYMHLKSLTSEDSAVYYCVS	134
14g2a HFR4	WGQGTSVTVSS	135
14g2a LFR1	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISC	136
14g2a LFR2	WYLQKPGQSPKLLIH	137
14g2a LFR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC	138
14g2a LFR4	FGAGTKLELKRA	139
14g2a FR + KM8138 CDR VH	EVQLLQSGPELEKPGASVMISCKASGSSFTSYNIHWVRQNIG KSLEWIGVIWAGGSTNYNSALMSRATLTVDKSSSTAYMHL KSLTSEDSAVYYCVSRSDDYSWFAYWGQGTSVTVSS	140

[0275]

14g2a FR + KM8138 CDR VL	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRASSSVSSSYLHWYLQKP GQSPKLLIHSTSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED LGVYFCQQYSGYPITFGAGTKLELKRA	141
KM8138 FR + 14g2a CDR VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSITCTVSGFSLAGYNMNWVRQP PGKGLEWLGAIDPYYGGTSYNQKFKGRLTISKDNSKNQVFL KMSSLTAADTAVYYCAKGMEYWGQGTLVTVSS	143
KM8138 FR + 14g2a CDR VL	ENQMTQSPSSLSASVGDRVTMTCRSSQSLVHRNGNTYLHW YQQKSGKAPKVWIYKVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYCSQSTHVPPLTFGQGTKVEIK	144

[0276]

[0277] **X. 실시예**

[0278] 하기 실시예들은 본 개시내용의 바람직한 구현예를 설명하기 위해 포함된다. 하기 실시예들에 개시된 기술은 본 개시내용의 실시에서 잘 기능하는 발명자에 의해 발견된 기술을 나타내고, 따라서 이의 실시를 위한 바람직한 모드를 구성하는 것으로 간주될 수 있다는 것이 당업자에 의해 이해되어야 한다. 그러나, 당업자는 본 개시 내용에 비추어, 개시되는 특정 구현예에서 많은 변경이 이루어질 수 있고 개시내용의 사상 및 범위를 벗어나지 않고 여전히 유사하거나 유사한 결과를 얻을 수 있음을 인식해야 한다. 실시예는 어떤 식으로든 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 인용된 모든 참조의 내용(본 출원 전반에 걸쳐 인용된 참조 참고문헌, 발행된 특허, 공개된 특허 출원 및 GenBank Accession number 포함)은 본원에 참조로 명시적으로 포함된다. 본원에 참조로 포함된 문서의 용어의 정의가 본원에 사용된 용어의 정의와 상충하는 경우, 본원에서 사용된 정의가 우선한다.

[0279] **실시예 1: 비틀리게 변형된 CAR**

[0280] 일부 CAR이 항원 자극의 부재 하에 신호전달할 수 있다는 관찰은 이들 수용체가 신호전달에 도움이 되는 천연 단백질 형태를 채택할 수 있다는 가능성을 시사한다. 이 가설의 결과는 CAR 단백질의 형태를 변경하는 것이 토

닉(tonic) 신호전달 경향과 잠재적으로 항원-의존성 CAR 신호전달의 강도에 영향을 미칠 수 있다는 것이다. 여기서, 본 발명자들은 CAR-T 세포의 항-종양 활성이 CAR의 막관통 및 세포질 신호전달 도메인 사이에 알라닌을 삽입함으로써 조정될 수 있다는 발견을 보고한다(도 1). 각각의 알라닌의 삽입은 약 109° 회전을 야기할 것으로 예상된다. 이것은 CAR의 막관통 및 세포질 도메인 사이에 알라닌을 삽입함으로써 CD28 공동-자극 도메인을 함유하는 제2 세대 CD20 CAR의 생체 내 항종양 효능을 유의하게 개선시킬 수 있다는 가설이었다(도 2; 결과는 도 8에 도시된 후속 연구에서 확인됨). CD20에 추가하여, 이 디자인은 다른 CAR에 통합될 수 있는 것으로 고려된다. 일부 구현예에서, 알라닌 삽입은 신경모세포종을 치료하는데 유용한 GD2 CAR에 혼입된다.

[0281] **실시예 2: 증가된 효능을 갖는 하이브리드 CAR**

[0282] 본 발명자들은 이전에 제안된 가설(5)과 반대로, 토닉(tonically) 신호전달 CAR의 FR 서열을 비-토닉(tonically) 신호전달 CAR의 CDR 서열과 조합함으로써 기능적으로 우수한 CAR을 구축할 수 있다는 발견을 보고한다. Leu16 및 리툭시맙은 둘 다 CD20을 표적화하는 모노클로날 항체이다. scFv는 각각의 항체의 Vh 및 Vh로부터 제조되었다(도 3). Leu16-유래 scFv를 혼입하는 CAR은 토닉(tonically) 신호를 나타내지 않는 반면, 리툭시맙-유래 scFv를 혼입하는 CAR은 토닉(tonically) 신호를 나타낸다(도 4). 본 발명자들은 scFv가 Leu16-유래 scFv의 CDR 서열에 커플링된 리툭시맙-유래 scFv의 FR 서열을 포함하는 "하이브리드" CD20 CAR을 구축하였다(도 5). 이 하이브리드 CAR은 "RFR-LCDR"으로 지칭되며, 또한 토닉(tonically) 신호를 나타낸다(도 6). 그러나, RFR-LCDR 하이브리드 CAR을 발현하는 T 세포는 시험관 내(도 7) 및 생체 내(도 8) 둘 다에서 모(즉, Leu16- 또는 리툭시맙-기반) CAR 중 어느 하나를 발현하는 T 세포와 비교하여 기능적으로 우수한 것으로 나타났다. 중요하게는, RFR-LCDR 하이브리드 CAR은 종양 이종이식 모델에서 CD19 CAR을 능가하여 완전하고 내구성 있는 종양 제거를 달성하고 초기 T-세포 치료 55일 후 두 번째 용량의 종양 공격(tumor challenge)에도 종양 재발을 예방했다(도 8).

[0283] **실시예 3: CAR 토닉(Tonic) 신호전달의 합리적인 조정은 암에 대한 우수한 T 세포 치료를 제공한다**

[0284] 키메라 항원 수용체(CAR)는 면역 세포를 매우 다양한 질환 관련 항원에 대해 재지시할 수 있는 모듈형 단백질이다. 그러나, 현재까지 CAR-지시된 면역요법은 B-세포 악성종양 외부에서 제한된 임상 효능을 달성하였다. 여기에서, 본 발명자들은 CAR-T 세포 기능에 대한 CAR 단백질 서열 및 구조의 효과를 체계적으로 탐구한다. 본 발명자들은 토닉(tonic) 신호전달이 CAR-T 세포의 대사 및 항-종양 효능에 유의하게 영향을 미친다는 것을 보고한다. 구체적으로, 본 발명자들은 토닉(tonic) 신호전달의 낮은 그러나 비-제로 수준이 CAR-T 세포에 의한 조기 기능적 고갈을 피하면서 항원 자극시 강건한 효과기 기능을 촉진할 수 있다는 것을 발견하였다. 또한, 본 발명자들은 CAR의 리간드-결합 도메인 및 전체 단백질 형태의 합리적인 변경을 통해 토닉(tonic) 신호전달의 강도를 조정하여 종양 이종이식 모델에서 CD19 CAR을 능가하는 CD20 CAR 변이체를 생성할 수 있음을 입증한다. 이러한 발견은 암 요법을 위한 차세대 CAR의 합리적인 설계를 안내하기 위한 정보 파라미터로서 토닉(tonic) 신호전달 및 기저 T-세포 활성화를 가리킨다.

[0285] 키메라 항원 수용체(CAR)-T 세포의 입양 전달은 진행된 B-세포 악성종양에 대해 현저한 효능을 나타내었고, 광범위한 암 유형에 대한 CAR-T 세포 후보는 임상 시험에 진입하였다. 그러나, 현재까지 CD19 CAR-T 세포에 필적할만한 항종양 효능을 보여준 것은 거의 없었다(Grigor 등, 2019; Guedan 등, 2018; Majzner and Mackall, 2019; Yamamoto 등, 2019). CAR 구축에 대한 표준 접근법은 관심 항원에 특이적인 리간드-결합 모이어티를 갖는 세포외 스페이서, 막관통 및 세포질 신호전달 도메인의 제한된 세트를 재조합하는 것에 의존한다. 이 경험적으로 유도된 프로세스는 종양 반응성을 갖는 CAR 분자를 신뢰성 있게 산출할 수 있지만, 생성된 CAR-T 세포는 종종 강력한 임상 효능을 달성하는 데 실패하였다. 예를 들어, CD20 CAR-T 세포가 전임상 모델에서 유망한 활성을 나타내었지만, 임상 시험 결과는 동일한 질환 유형에 대한 CD19 CAR-T 세포 요법과 비교하여 현저하게 더 낮은 효능을 보여주었다(Till 등, 2012; Zhang 등, 2016). 유사하게, CD28 공자극 도메인을 포함하는 2세대 GD2 CAR은 동일한 신호전달 도메인을 포함하는 CD19 CAR과 비교하여 열등한 생체 내 항종양 기능을 나타내는 것으로 나타났다(Long 등., 2015). 관심 항원에 대해 강력하게 기능하는 CAR을 일관되게 생성할 수 없다는 점은 CAR 설계와 CAR-T 세포 기능 사이의 분자 및 기계적 관계를 더 이해할 필요가 있음을 강조한다.

[0286] 지금까지 CAR 조작 노력은 CAR-T 세포 기능에 영향을 미치는 몇몇 설계 파라미터를 밝혀냈다(Chang and Chen, 2017; Hong 등, 2020). 이들은 항원 자극시 T-세포 활성화를 촉진하는 공동-자극 도메인(Omer 등, 2018; Wijewarnasuriya 등, 2020; Zhao 등, 2015), 최적 T-세포/표적-세포 접합을 위한 구조적 지지를 제공하는 세포외 도메인(Hudecek 등, 2013; Srivastava and Riddell, 2015), CAR과 표적화된 항원 사이의 결합 친화도(Drent 등, 2019; Liu 등, 2015), 뿐만 아니라 CAR-독립적 파라미터, 예컨대 표적 세포 상의 항원 발현 수준(Majzner

등, 2020; Watanabe 등, 2015)을 포함한다. 그러나 이러한 파라미터는 CD19 CAR과, 유사하게 높은 결합 친화도를 갖고, 동일한 공자극 도메인을 함유하고, CD19 CAR에 의해 표적화된 동일한 유형의 종양 세포에서도 고도로 발현되는 항원에 결합하는 CD20 CAR과 같은 다른 구조체 간의 차이점을 완전히 설명할 수 없다.

[0287] 보다 최근에, 몇몇 연구는 CAR 토닉(tonic) 신호전달 - 즉, 항원 자극의 부재 하의 CAR 신호전달 - 및 조기 T-세포 기능장애를 촉발하는데 있어서의 그의 잠재적 역할의 현상을 강조하였다 (Frigault 등, 2015; Gomes-Silva 등, 2017; Long 등, 2015; Watanabe 등, 2016). CD19 CAR-T 세포의 강력한 기능성은 CD19 CAR에 의한 토닉(tonic) 신호전달의 부족에 기인할 수 있다고 제안되었다(Frigault 등., 2015; Long 등., 2015). 그러나 토닉(tonic) 신호 T 세포에 대한 표현형 설명은 다양했으며 특정 CAR 구성 요소가 토닉(tonic) 신호전달을 유발하거나 예방할 수 있다는 가설은 때때로 모순된다(Frigault 등., 2015; Gomes-Silva 등., 2017; Long 등., 2015). 또한, 토닉(tonic) 신호전달에 대한 대부분의 연구에서 CD19 CAR을 다른 항원을 표적으로 하는 CAR과 비교한다는 점을 감안할 때, 관찰된 기능적 차이가 토닉(tonic) 신호전달에 엄격하게 기인한 것인지, 토닉(tonic) 신호전달의 폐지가 예상대로 CAR-T 세포의 항종양 효능의 개선으로 이어질 것인지 여부는 불분명하다.

[0288] 여기서, 본 발명자들은 CAR 서열 및 아키텍처가 토닉(tonic) 신호전달에 상당하고 조정가능한 영향을 미치고, CAR-T 세포 대사 및 항종양 기능이 토닉(tonic)- 신호전달 강도 및 연관된 기저 T-세포 활성화의 조정을 통해 변경될 수 있음을 보고한다. 본 발명자들은 낮지만 0이 아닌 수준의 토닉(tonic) 신호가 조기 T 세포 고갈을 피하면서 신속한 항종양 반응을 강화함으로써 CAR-T 세포 기능을 증가시킬 수 있고, 기초 T 세포 활성화 수준은 비틀림(torsional) 링커의 삽입 및 다른 리간드 결합 도메인의 서열 혼성화를 통해 조정될 수 있다. 이러한 단백질 조작 전략을 적용함으로써, 본 발명자들은 B 세포 림프종의 마우스 모델에서 CD19 CAR을 능가하는 새로운 CD20 CAR을 생성하고, 개선된 CAR-T 세포 기능과 관련된 특성으로서 기억 표현형 농축(enrichment) 및 CAR-유도 대사 장애의 최소화를 발견했다. 이러한 결과는 암에 대한 강력한 CAR-T 세포 요법을 조작(engineering)하는 데 유용하고 잠재적으로 광범위하게 일반화할 수 있는 접근 방식으로서 토닉(tonic) 신호전달 및 기초 T 세포 활성화의 합리적인 조정을 가리킨다.

[0289] **A. 결과**

[0290] **1. scFv 서열은 토닉(tonic) 신호전달 및 CAR-T 세포 대사를 변경시킨다**

[0291] 지금까지, 토닉(tonic) 신호전달에 대한 연구는 주로 상이한 항원을 표적화하는 CAR을 비교하는 것에 의존하였고, 따라서 CAR 서열, 항원 동일성 및 발현 수준 및 CAR-항원 결합 상호작용의 생물물리학적 특징을 비롯한 다수의 파라미터에서의 동시 변화로 인한 결과의 해석을 복잡하게 하였다(Frigault 등, 2015; Gomes-Silva 등, 2017; Long 등, 2015). 여기서, 본 발명자들은 CAR의 리간드-결합 도메인의 아미노산 서열이 표적-항원 동일성 또는 결합 친화도와 무관하게 수용체 활성에 유의하게 영향을 미칠 수 있다는 가설을 조사함으로써 시작하였다. 본 발명자들은 CD20이 임상적으로 검증된 항원이고 B-세포 림프종의 치료에서 CD19 CAR에 대한 직접적인 벤치마킹을 가능하게 하기 때문에 테스트 플랫폼으로서 CD20 CAR에 집중하기로 선택했다. CD20 CAR 패널은 유사한 KD 값(Mossner 등., 2010; Reff 등., 1994; Uchiyama 등., 2010) 및 abYsis에 의해 예측된 상보성 결정 영역(CDR) 구조(Martin and Thornton, 1996; Swindells 등., 2017)를 가진 4개의 다른 모노클로날 항체에서 유래된 단일쇄 가변 단편(scFv)으로 구성되었다. scFv 중 3개(Leu16, rituximab 및 GA101)는 CD20의 주요 세포외 루프에서 겹치는 에피토프에 결합하는 반면, 오파투무맙(ofatumumab)은 CD20의 마이너 및 메이저 루프 모두에 결합한다(Klein 등., 2013; Niederfellner 등., 2011; Rufener 등., 2016; Teeling 등., 2006)(도 10a, 도 S16a). 4개의 CAR은 모두 동일한 세포외 스페이서, 막관통 및 세포질 신호전달 도메인을 갖는다. 이 패널은 결합 친화도 및 결합-에피토프 위치의 차이와 같은 교란 요인을 제거하면서 특히 scFv 서열에 대한 기능적 차이의 귀인을 가능하게 한다. scFv 서열과 CAR 강장제 신호전달 사이의 잠재적인 관계를 더 잘 탐구하기 위해, 본 발명자들은 CD28-함유 CAR이 이전에 4-1BB-함유 CAR보다 토닉(tonic) 신호전달에 더 취약한 것으로 보고되었기 때문에 공동-자극 도메인으로 CD28을 통합하기로 선택했다 (Frigault 등., 2015; Long 등., 2015).

[0292] 모든 4개의 CD20 CAR 변이체는 1차 인간 T 세포의 표면 상에서 효율적으로 발현되었고 (도 16b), 각각의 CAR을 발현하는 T 세포는 사이토카인 지지체를 사용한 생체 외 증폭 동안 필적할만한 속도로 성장하였다 (도 16c). 반복된 항원 자극에 반응하여, 모든 CAR-T 세포 변이체는 표적 세포를 용해시키고 증식하는 능력을 입증하였다(도 16d). 그러나, 시험관 내 기능적 검정 동안 유사한 성능에도 불구하고, 4개의 CD20 CAR 변이체를 발현하는 T 세포는 Raji 이종이식 모델에서 뚜렷한 생체 내 종양-사멸 역학을 나타내었다 (도 10b). 특히, 리툭시맙-기반 CAR-T 세포는 시험된 모든 다른 CD20 CAR-T 세포와 비교하여 초기 시점에 실질적으로 더 강한 종양 제어를 발휘하였다 (도 10b). 그럼에도, T 세포 주사 약 2주 후부터 리툭시맙 CAR-T 세포로 처리된 동물은 리툭시맙 CAR-T

세포 사이에서 기능적 소진의 급속한 발병을 시사하는 가속화된 종양 성장(다른 테스트 그룹보다 빠름(도 10c; 도 17a))을 나타내기 시작했다.

[0293] 모든 테스트 그룹의 동물은 희생 시, 특히 간, 비장 및 뇌로부터 회복된 종양 전이에서 검출가능한 CAR-T 세포 집단을 보유하였다(도 17b, c). 그러나, 거의 모든 T 세포는 PD-1+였고, 많은 것은 상승된 LAG-3 발현을 나타냈다(도 17d, e). 종양을 근절하지 못한 것과 조합하여, 이들 결과는 CAR-T 세포의 4개 군 모두가 생체 내 지속성에도 불구하고 연구의 끝까지 기능 장애를 일으켰음을 시사한다.

[0294] 다음으로, 본 발명자들은 4개의 CD20 CAR-T 세포 변이체 간의 생물학적 차이가 이들의 생체 내 종양 반응의 상이한 시간적 역학을 설명할 수 있는 것과, 근본적인 생물학이 지속적인 종양 제어가 가능한 개선된 CAR 디자인에 대해 밝힐 수 있는지 여부를 설명하고자 했다. 특히, 본 발명자들은 리툭시맙 CAR이 초기에 강력하지만 궁극적으로 단명한 항종양 반응을 유도한 이유와, 본 발명자들이 합리적인 CAR 단백질 조작을 통해 항종양 효능을 연장할 수 있는지 여부를 이해하고자 하였다.

[0295] 항원 자극의 부재 하에, 리툭시맙 CAR을 발현하는 T 세포는 분명한 활성화-마커 발현 (도 10d) 및 세포 증식(도 10e)을, 토닉(tonic) 신호인 것으로 공지된 14g2a-기반 GD2 CAR을 발현하는 T 세포와 유사하거나 더 강한 정도로 나타내었다 (Long 등, 2015). 이들 관찰은 CAR 구조체에 직접적으로 기인한 리툭시맙 CAR-T 세포의 분명한 기저 활성화를 나타내었고, 본 발명자들은 리툭시맙 CAR-T 세포가 부분적으로 T-세포 활성화를 향한 이러한 사전-불활성화로 인해 항-종양 반응을 신속하게 개시할 수 있다는 가설을 세웠다. 강력한 T 세포 효과기 기능의 시작은 호기성 해당과정의 지원을 필요로 하는 것으로 나타났다(Chang 등., 2013). 따라서, 리툭시맙 CAR-T 세포가 신속한 효과기 기능을 향해 강화된다는 가설을 조사하기 위해, 본 발명자들은 영양소 흡수 및 부산물 분비의 속도를 측정함으로써 그의 기저 대사 상태를 특성화하도록 설정하였다. 항원 자극의 부재 하에, 리툭시맙 CAR-T 세포는 CD19 CAR 또는 Leu16 기반 CD20 CAR을 발현하는 모의-형질도입된 T 세포 및 T 세포와 비교하여 상당히 더 빠른 글루코스, 글루타민 및 아미노산 흡수를 나타냈다(도 10f, 도 18). 또한, 리툭시맙 CAR-T 세포는 다른 CAR-T 세포에 비해 젖산과 알라닌 분비가 2~7배 증가했으며, 글루타메이트 분비가 3배 이상 증가하여 각각 해당과정 플럭스와 글루타민분해가 극적으로 증가했음을 나타낸다. 포도당과 글루타민이 ATP 생산의 대부분을 담당하기 때문에 빠른 해당과정과 글루타민분해는 활성화된 T 세포의 행동과 일치하는 더 많은 에너지 소비를 의미한다(Chang 등., 2013).

[0296] 종합하면, 이러한 관찰은 항원 자극의 부재 하에, 리툭시맙 CAR-T 세포가 기저 활성화되고 대사적으로 T-세포 효과기 기능을 개시하도록 장착되어 있다는 것을 나타낸다. 이러한 휴지기에서의 상승된 대사는 생체 내 초기 시점에서의 리툭시맙 CAR-T 세포의 빠른 항-종양 활성을 설명할 수 있지만, 동물 연구에서 관찰된 바와 같이, 항원 자극의 부재 하의 만성의 저수준 T-세포 활성화는 또한, 다른 CAR-T 세포 변이체와 비교하여 리툭시맙 CAR-T 세포의 종양 제어의 가속화된 상실에 기여할 수 있다. 이러한 가능성과 CAR 디자인에 대한 그의 의미를 평가하기 위해, 본 발명자들은 다음으로 기초 활성화 수준을 조정하는 것이 신속하고 지속적인 항종양 반응 모두가 가능한 CAR-T 세포를 생성할 수 있는지 여부를 조사했다.

[0297] **2. 신호전달 도메인의 비틀림(Torsional) 재배향은 CAR-T 세포 활성을 조정한다**

[0298] 세포 표면에서의 수용체 이합체화는 CAR 신호전달을 촉발할 수 있고 (Chang 등, 2018), 이전 연구는 토닉(tonic) 신호전달이 특정 scFv 서열에 의해 유발된 항원-비의존성 CAR 클러스터링의 결과일 수 있다는 것을 제안하였다(Long 등, 2015). 본 발명자들은 도 10a에 제시된 모든 4개의 CD20 CAR 변이체가 항원 자극의 부재 하에 T-세포 표면 상에 균일하게 분포되어 (도 19), 리툭시맙-기반 CAR에 의한 토닉(tonic) 신호전달의 원인으로서 거대-규모 CAR 클러스터링을 배제한다는 것을 입증하였다. 그럼에도 불구하고, CD3ζ의 신호 캐스케이드 하류는 수용체 사슬과의 상호작용이 수용체 사슬의 물리적 근접성과 형태에 의해 직접적으로 영향을 받는 어댑터 단백질 및 키나아제를 포함한다(Hartman 및 Groves, 2011). 따라서, 본 발명자들은 CAR 신호전달이 기초 수용체 신호전달을 가능하게 하는 형태를 채택할 수 있고, CAR 분자의 형태를 변경하는 것이 항원 자극의 부재 및 존재 모두에서 CAR 신호전달 강도의 조정을 가능하게 하여 하류 CAR-T 세포 행동에 영향을 미칠 수 있다는 가설을 세웠다.

[0299] CAR-형성 변화의 효과를 체계적으로 조사하기 위해, 본 발명자들은 리툭시맙-기반 CAR에서 CD28의 막관통 및 세포질 도메인 사이에 1 내지 4개의 알라닌을 삽입하였으며, 각각의 알라닌은 알파 나선의 형성을 통해 단백질 구조에서 ~109° 회전을 야기할 것으로 예상되었다 (Constantinescu 등, 2001; Liu 등, 2008; Scheller 등, 2018) (도 11a; 도 20a). 이 "비틀림" 과정은 CAR의 세포외 리간드 결합 도메인과 세포질 신호전달 도메인 사이의 정렬을 변경하도록 설계되어, 고밀도 영역(예: 항원 결찰 시 미세 클러스터 내)에서 수용체의 패킹 행동과 다운스

트림 신호전달과 관련된 도킹 및 인산화 잔기의 접근성에 잠재적으로 영향을 미친다.

[0300] 모든 알라닌-삽입 변이체 뿐만 아니라 T-세포 표면 상에 잘 발현된 원래의 리툭시맙 CAR (도 20b)은 반복된 항원 공격에 반응하여 표적 세포를 용해시키고 증식하는 유사한 능력을 입증하였고 (도 20c), 항원 자극의 부재하에 유사한 수준의 활성화 및 소진 마커 발현을 나타냈다(도 20d). 그러나, 알라닌 삽입은 원래의 리툭시맙-기반 CAR에 비해 항원-독립적 T-세포 증식 및 TNF-α 생산의 명백한 감소를 초래하였고 (도 11b, c), 이는 비틀림(torsional) 링커의 삽입이 기저 CAR-T 세포 활성을 유의하게 감소시켰음을 나타낸다. CAR 구조적 변경의 영향은 생체 내에서 명백했으며, 1, 2 또는 4개의 알라닌을 함유하는 리툭시맙 기반 CAR을 발현하는 T 세포는 원래의 리툭시맙 CAR과 비교하여 Raji 이종이식편의 상당히 개선된 제어를 나타냈다(도 11d). 특히, 2-알라닌 CAR은 원래의 리툭시맙 CAR에 비해 중앙 생존 기간을 2.1배 증가시켰다(55일 대 26일; 도 11e).

[0301] 원칙적으로, 알라닌-기반 비틀림 링커의 삽입은 CAR에 혼입된 특정 리간드-결합 또는 신호전달 도메인과 무관하게, 임의의 CAR 단백질 상에서 수행될 수 있다. 이 CAR-조정 방법의 일반화 가능성을 조사하기 위해, 본 발명자들은 14g2a 기반 GD2 CAR에서 알라닌 삽입의 효과를 평가했다. 5개의 모든 GD2 CAR 변이체(막관통 및 세포질 도메인 사이에 삽입된 0 내지 4개의 알라닌 포함)는 T-세포 표면에서 잘 발현되었고 시험관 내 반복된 항원 공격(challenge)시 유사한 항종양 반응을 나타냈다(도 21a-c). CD20 CAR 패널(도 11d)의 결과와 일관되게, 1, 2 또는 4개의 알라닌을 함유하는 GD2 CAR을 발현하는 T 세포는 0 또는 3개의 알라닌이 삽입된 GD2 CAR을 능가했습다(도 21d). 또한, 희생 시점에 회수된 간 및 비장의 분석은 2-알라닌 CAR 구조체를 발현하는 T 세포의 상당히 더 높은 수준을 나타내었고, 이는 CD28 막관통 및 세포질 도메인을 함유하는 CAR에서 2-알라닌 삽입의 유용성을 강조한다(도 21e).

[0302] 종합하면, 이들 결과는 CAR 분자 내로의 알라닌 삽입이 CAR-T 세포 활성화를 조정하고 생체 내 항-종양 효능을 강화시키는 일반화가능한 방법이라는 것을 나타낸다. 그러나, 알라닌 삽입에 의해 나타난 개선에도 불구하고, CD20 CAR-T 세포는 마우스 모델에서 Raji 이종이식편을 근절시킬 수 없는 채로 남아있었다 (도 11d, e). 따라서, 본 발명자들은 CAR-T 세포 기능을 추가로 향상시킬 수 있는 추가의 설계 파라미터를 탐구하도록 설정하였다.

[0303] **3. scFv 서열 하이브리드화는 우수한 CAR 변이체를 산출한다**

[0304] 리툭시맙 CAR의 거동이 4개의 CD20 CAR의 원래 패널 사이에서 상이하다는 관찰은 모든 CAR이 scFv 이외의 동일한 성분을 가졌다는 것을 고려하면 두드러졌다(도 10a). 또한, 리툭시맙 scFv는 Leu16 scFv와 비교하여 91% 서열 동일성을 갖지만(도 16a), Leu16 및 리툭시맙 CAR-T 세포는 기저 T-세포 활성화 및 생체 내 종양-사멸 역학 둘 다의 측면에서 극적으로 상이한 거동을 가졌다(도 10b 내지 도 10e). 이러한 결과는 scFv 서열의 제한된 변이가 CAR 신호전달 활성에 상당한 영향을 미칠 수 있음을 나타낸다.

[0305] 각각의 scFv는 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 각각의 사슬은 3개의 상보성 결정 영역(CDR)을 플랭킹(flanking)하는 4개의 프레임워크 영역(FR)으로 추가로 세분될 수 있다(도 11a). 14g2a와 같은 특정 scFv의 FR이 토닉(tonic) 신호전달 및 CAR-T 세포 고갈의 원인일 수 있다고 이전에 제안되었으며, 14g2a scFv의 FR을 CD19 CAR에 통합하면 T 세포 고갈을 유발하는 하이브리드 수용체가 생성된다는 것이 입증되었다(Long 등., 2015). 따라서, scFv 변경을 통해 CAR을 손상시키는 것이 가능하였지만, CAR이 scFv 서열 혼성화를 통해 개선될 수 있는지 여부는 여전히 불명확하였다. 본 발명자들의 결과는 지금까지 알라닌 삽입을 통한 CAR 토닉(tonic) 신호전달의 강도를 낮추는 것이 CAR-T 세포 기능을 개선할 수 있음을 나타내었다. 다음으로 본 발명자들은 서열 혼성화를 통한 scFv의 변화가 CAR 신호전달 활성을 합리적으로 조정할 수 있는 두 번째 "손잡이"를 제공할 수 있는지 여부를 조사했다.

[0306] Leu16 및 리툭시맙은 유사한 서열이지만 활성 프로파일이 다르기 때문에 혼성화의 시작점으로 선택되었다. 본 발명자들은 scFv가 리툭시맙의 FR 및 Leu16의 CDR(RFR-LCDR), 또는 그 반대(LFR-RCDR)를 포함하는 하이브리드 CAR을 작제하였다(도 12a). RFR-LCDR 하이브리드 CAR은 반복된 항원 공격(challenge) 시에 강력한 종양-세포 용해 및 T-세포 증식을 촉발하였고, 그의 기능성이 시험관 내 검정에서 CD19 CAR의 것에 필적하는 CD20 CAR의 제1 예를 제공하였다(도 12b). RFR-LCDR 하이브리드 CAR-T 세포는 항원 자극의 부재 시에 명확한 활성화 마커 발현을 나타내었고, 이는 휴지기에서의 비-제로 수준의 T-세포 활성화를 나타낸다(도 12c). 반대로, LFR-RCDR 하이브리드는 T-세포 표면 상에서 효율적으로 발현되었음에도 불구하고 완전히 비-기능성이었고(도 12b; 도 22a), 따라서 이는 추가의 특성화로부터 배제되었다. 따라서, 용어 "하이브리드 CAR"은 RFR-LCDR 변이체를 지칭한다.

[0307] 막관통 및 세포질 CD28 신호전달 도메인 (RFR-LCDR.AA) 사이에 삽입된 2개의 알라닌을 갖는 변형된 하이브리드

CAR을 후속 연구에 포함시켜 서열 혼성화 및 알라닌 삽입이 상승작용하여 CAR-T 세포 기능을 추가로 개선시킬 것인지 여부를 결정하였다. 두 하이브리드 CAR은 알라닌이 있거나 없는 리툭시맙 기반 CAR과 유사한 표면 분포를 보였고(도 22b), 모든 CAR-T 세포는 항원 자극에 반응하여 Th1 사이토카인을 생성하여(도 22c), 종양 반응성을 확인했다. 그러나, 하이브리드 CAR-T 세포는 항원-비의존적 T-세포 증식의 징후를 나타내지 않았으며(도 12d), scFv 서열 하이브리드화는 리툭시맙-기반 CAR-T 세포에 비해 항원 자극의 부재 하에 TNF-α 생성을 유의하게 감소시키고 IL-2 생성을 증가시켰다(도 22d). 추가로, CAR-T 세포 배양 상청액에 대한 대사 분석은 scFv 혼성화가 항원 자극의 부재 하에 글루코스 및 글루타민 흡수뿐만 아니라 글루타메이트, 알라닌 및 락테이트 분비를 유의하게 감소시키는 것으로 밝혀졌다(도 12e; 도 23). 결과적으로, 휴지 상태의 하이브리드 CAR-T 세포의 대사율은 두 개의 모 구조체(즉, 리툭시맙 또는 Leu16 CAR) 중 하나를 발현하는 T 세포의 대사율 사이에서 중간 수준이었다. 종합하면, 이러한 결과는 scFv 혼성화가 기초 T-세포 활성화를 완전히 폐지하지 않고도 토닉(tonic) 신호의 강도를 상당히 감소시킬 수 있음을 나타낸다.

[0308] 본 발명자들은 그 다음에 생체 내에서 각각의 그의 모 구조체 및 CD19 CAR에 대한 하이브리드 CAR의 헤드-투-헤드 비교를 수행했다(도 13a). 결과는 RFR-LCDR CAR-T 세포가 원래의 종양뿐만 아니라 종양 재-공격(re-challenge) 둘 다를 효율적으로 거부했다는 것을 나타낸다(도 13b, c). 사실, 이는 B-세포 림프종 이종이식편을 근절하는데 있어서 CD19 CAR을 능가하는 CD20 CAR의 본 발명자들의 지식에 대한 제1 예를 표시하였다.

[0309] 이전 결과와 일관되게, 알라닌 삽입은 리툭시맙 CAR을 실질적으로 개선시켰다(도 13b,c). RFR-LCDR 및 RFR-LCDR.AA CAR-T 세포 둘 다 종양 및 재공격에 대한 거의 완벽한 보호를 제공했기 때문에, 본 발명자들은 하이브리드 CAR 맥락에서 알라닌 삽입이 종양 사멸에서 추가 이점을 제공했는지 여부를 평가할 수 없었다. 그러나, RO 혈액 분석은 RFR-LCDR.AA CAR-T 세포가 RFR-LCDR CAR-T 세포와 비교하여 우수한 생체 내 생존 및 증폭을 가짐을 나타내었다(도 13d). 이러한 결과는 동물을 단일(분할 대신) 용량의 CAR-T 세포로 처리하고 종양 용량 수준을 증가시키면서 종양 세포로 2회 재공격한 두 번째 생체 내 연구에서 추가로 검증되었다(도 13e, f). 리툭시맙.AA, RFR-LCDR 및 RFR-LCDR.AA CAR-T 세포는 모두 각 종양 재공격(Re-challenge) 후 지속되고 반등했으며, RFR-LCDR.AA CAR-T 세포는 첫 번째 종양 재공격 전후의 말초 혈액에서 가장 높은 수준의 CAR-T 세포를 나타냈다(도 13g). 두 하이브리드 CAR 변이체는 연구를 통해 동물에게 완전한 보호를 부여했다.

[0310] 종합하면, 이들 결과는 CAR의 기능성이 그의 scFv 서열을 변화시킴으로써 개선될 수 있고, 기저 T-세포 활성화의 조정(오히려 완전한 제거)가 유의하게 개선된 항종양 기능을 갖는 CAR 설계를 초래할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0311] **4. CAR-유도 대사 장애의 기억 표현형 농축(enrichment) 및 최소화는 CAR-T 세포 기능을 향상시킨다**

[0312] 생체 내에서 관찰된 기능적 차이를 뒷받침하는 생물학을 더 잘 이해하기 위해, 본 발명자들은 T-세포 주사 9일 후 종양-보유 동물로부터 회수된 리툭시맙, Leu16, RFR-LCDR 및 RFR-LCDR.AA CAR-T 세포에 대해 RNA-seq 및 ATAC-seq 분석을 수행했다(도 249). 결과는 RFR-LCDR.AA CAR이 리툭시맙 CAR로부터 가장 멀리 떨어져 있는 것과 함께, 다른 것과 비교하여 리툭시맙 CAR-T 세포의 전사체적 및 후성적 프로파일에서 뚜렷한 차이를 나타냈다(도 14 a,b; 도 25). 각각의 다른 CAR 변이체와 비교하여, 리툭시맙 CAR-T 세포는 GLUT1 재활용을 긍정적으로 조절하는 인지질 플립파제를 암호화하는 ATP9A의 발현이 유의하게 증가된 것으로 나타났다(Tanaka 등., 2016)(도 14b, c). 엔도솜에서 원형질막으로의 GLUT1 재활용은 해당과정을 지원하는 세포 포도당 흡수에 필수적이며, 다양한 GLUT1 발현 수준은 인간 T 세포의 별개의 효과기 기능과 상관관계가 있는 것으로 나타났다(Cretenet 등., 2016; Macintyre 등., 2014). 이러한 결과는 리툭시맙 및 리툭시맙.AA CAR-T 세포가 휴지 시 상승된 글루코스 흡수를 나타낸다는 이전 관찰을 반영하고(도 12e), 도 13e-g에 표시된 생체 내 연구에서 수집된 혈청 샘플의 포도당 수준을 분석하도록 촉구했다. 결과는 리툭시맙.AA CAR-T 세포로 처리된 마우스의 혈청에서 상당히 더 낮은 글루코스 수준을 나타내었고(도 14d), 리툭시맙 기반 CAR-T 세포가 하이브리드 CAR-T 세포보다 실질적으로 더 당분해 활성이라는 개념을 추가로 뒷받침한다.

[0313] 증가된 당분해 이외에, 마우스로부터 회수된 리툭시맙 CAR-T 세포는 다른 3개의 CAR-T 세포 유형 각각에 비해, 억제 수용체 KIR2DL1, KIR2DL3 및 KIR3DL1에 대해 유의하게 더 낮은 CD62L 발현(SELL 유전자에 의해 암호화됨) 및 더 높은 전사체 수준을 나타냈다 (Bjorkstrom 등., 2012) (도 14b). 억제 KIR의 상향조절은 ATAC-seq에 의해 추가로 확인되었다(도 14c). 종합하면, 리툭시맙 CAR-T 세포는 기능적 소진 경향이 있는 효과기 T 세포와 일치하는 표현형을 나타낸다.

[0314] 대조적으로, 하이브리드 CAR-T 세포, 특히 RFR-LCDR.AA CAR-T 세포는 유전자 세트 농축 분석(GSEA)에 기초한 기억 표현형이 상당히 풍부하다(도 15a, b). GSEA는 또한 마우스로부터 회수된 하이브리드 CAR-T 세포 집단 둘 모

두가 리툭시맙 및 Leu16 CAR-T 세포에 비해 유의하게 더 강한 T-세포 활성화, 세포독성, 수용체-신호전달 및 인터페론 감마 특징을 나타낸다는 것을 밝혀냈다(도 15a, c). 특히 RFR-LCDR.AA CAR-T 세포의 경우, 이 강력한 T 세포 활성화 특징은 낮은 세포 주기 및 DNA 복제 활성과 공존하며, 이는 기억 표현형과 일치하고 리툭시맙 CAR-T 세포와 극명한 대조를 이룬다(도 15a,d). 참고로, RFR-LCDR.AA CAR-T 세포 중 기억 아형의 강화는 종양 보유 마우스에 주사하기 전에는 분명하지 않았으며(도 2611), 이는 항원 자극 및/또는 생체 내 환경에 직면할 때 변화가 발생했음을 나타낸다.

[0315] 종합하면, 이들 데이터는 리툭시맙 CAR-T 세포가 휴지시 및 생체 내 항원 노출시 둘 모두에서 상승된 해당과정을 나타낸다는 것을 가리킨다. 대조적으로, 알라닌 삽입과 상승적으로 결합된 scFv 서열 혼성화를 통해 얻은 새로운 CAR인 RFR-LCDR.AA는 생체 내에서 비교적 낮은 대사 활성 수준과 장기간 지속성을 유지하면서 강력한 효과기 기능을 탑재할 수 있는 기억 T 세포의 형성을 촉진한다.

[0316] B. 논의

[0317] 본 연구에서, 본 발명자들은 CAR-T 세포의 거동에 대한 합리적인 CAR 서열 및 구조적 변형의 효과를 조사하였고, 심지어 약간의 변경(2개의 알라닌 잔기들의 삽입만큼 작음)이 결과적으로 생성된 CAR-T 세포의 항-종양 효능에 극적인 변화를 유도할 수 있음을 관찰하였다. 본 발명자들은 CAR 행동을 정량화하고 조정하기 위한 유용한 척도인 토닉 신호전달 (및 관련 기초 T 세포 활성화)을 발견하였다. 이러한 결과는 토닉 신호전달의 효과가 구배에서 작동하고, 낮은 수준의 토닉 신호전달이 지속적인 항-종양 활성을 가능하게 하면서 항원 자극에 대한 신속한 T 세포 반응을 강화할 수 있는 스위트 스팟(sweet spot)이 존재함을 시사한다. 알라닌으로 구성된 비틀림 링커의 삽입과 다른 scFv들의 FR 및 CDR 서열의 혼성화와 같은 방법은 토닉 신호전달 강도들의 스펙트럼에 속하는 CAR 변이체의 생성을 가능하게 하며, 이러한 변이체 중 일부는 심지어 생체 내 종양 대조군에서 금-표준 CD19 CAR을 능가할 수 있다.

[0318] 알라닌 삽입은 CAR 토닉 신호전달 및 항원-자극된 CAR-T 세포 기능을 조정하기 위한 일반화 가능한 방법이다. 본 연구에서, 본 발명자들은 CD20 및 GD2 CAR들 둘 다의 생체 내 기능을 개선하기 위해 CD28의 막관통 및 세포질 도메인 사이에 2개의 알라닌을 삽입하는 것을 발견하였다. 알라닌 삽입의 의도된 효과가 CAR 구조를 변경하거나 "비트는(twist)" 것이고, 시작 단백질 구조가 CAR에 통합된 특정 구성요소에 따라 달라질 수 있다는 점을 감안할 때, 최적의 알라닌 수는 CAR에 사용된 특정 막관통 및 세포질 도메인에 따라 다를 수 있다. 다운스트림 신호 전달 경로의 상세한 생화학적 분석은 본 연구에서 기능적 개선을 뒷받침하는 분자 메커니즘을 추가로 설명하고, 알라닌-삽입 전략이 다양한 막관통 및 세포질 도메인을 갖는 CAR에 적용될 수 있는지 여부를 알려줄 수 있다.

[0319] 알라닌 삽입에 더하여, scFv 혼성화는 개선된 CAR 변이체를 생성하는 유익한 방법임이 입증되었다. 본 연구에서 특징지어지는 RFR-LCDR 하이브리드의 경우, 토닉 신호전달 CAR(리툭시맙)의 FR들과 비-토닉 신호전달 CAR(Leu16)의 CDR들로 구축된 CAR은 중간 토닉 신호전달 강도를 갖는 키메라를 유도하였으며, 어느 한쪽 모체에 비해 훨씬 우수한 항종양 효능을 나타내었다. 이 결과는 CAR-T 세포 기능에 대한 scFv 서열 효과의 예측 불가능성을 강조한다. 단백질 구조 및 부위 특이적 돌연변이의 심층 분석은 진정으로 중요한 잔기의 정확한 식별을 가능하게 하고, 추후 scFv 설계에 대한 완전히 합리적인 접근을 가능하게 할 수 있다.

[0320] 토닉 신호전달과 강하게 연관된 - 상기 논의된 단백질 조작 방법에 의해 조정가능한 - 것으로 밝혀진 표현형은 안정 시 증가된 대사 활성, 특히 해당 작용 및 글루타민분해이다. 상당량의 문헌에서 증가된 해당 작용 활성이 효과기 T 세포의 특징이며, 강화된 해당 작용이 강력한 T 세포 효과기 기능에 필수적임을 보여주었다 (Bantug 등., 2018). 리툭시맙 CAR-T 세포가 안정 시 그리고 항원 자극 시 모두 강한 해당 작용을 나타낸다는 사실은 토닉 신호전달 및 기초 T 세포 활성화가 신속한 효과기 기능을 위해 T 세포를 강화할 수 있다는 가설과 일치한다. 동시에 지속적인 호기성 해당 활성은 또한 노화 표현형의 획득 및 장기 지속성과 기억 형성에 대한 가능성의 결여와도 관련이 있으며 (Kishton 등., 2017), 이는 종양 이종이식편의 지속적인 제어를 달성하기 위한 리툭시맙 기반 CAR-T 세포의 무능과 일치한다. 이는 상대적으로 낮은 해당과정 플럭스(flux)를 나타내지만 강력하고 지속적인 항종양 활성을 나타내는 하이브리드 CAR-T 세포와 극명한 대조를 이룬다. 본질적으로 대사율이 높은 CAR-T 세포가 직면한 주요 과제는 종양 세포와의 대사 경쟁이며, 이는 CAR-T 세포의 기능을 유지하는 능력을 더욱 압박할 수 있다 (Chang 등., 2015). 산소의 존재에도 불구하고 높은 포도당 흡수율과 락테이트 분비율을 특징으로 하는 바르부르크 효과 (Warburg effect)는 종양 세포의 특징이다 (Liberti and Locasale, 2016). 종양 미세 환경에서, CAR-T 세포와 종양 세포는 동일한 제한된 영양소 공급을 위해 경쟁해야 하며 락테이트 분비를 통해 종양 미세 환경의 동일한 잠재적 독성 산성화에 기여해야 한다 (Fischer 등., 2007). 이 경쟁은 대사 부담이 더

낮은 다른 CAR-T 세포 변이체와 비교하여 리툭시맙 기반 CAR-T 세포의 항-종양 효능에 불균형적으로 강한 영향을 미칠 수 있다.

[0321] 강력한 효과기 T-세포 기능을 지원하기 위해 높은 대사율이 필요하지만 기억 표현형은 장기간 종양 제어에 도움이 된다는 점을 감안할 때, 흥미로운 질문은 동일한 항원을 표적하는 상이한 CAR-T 세포를 결합 - 예를 들어, 리툭시맙 CAR-T 세포를 RFR-LCDR.AA CAR-T 세포와 동시에 또는 순차적으로 공동 투여 - 하는 것이 어느 하나의 세포 집단을 단독으로 투여하는 것보다 더 큰 치료 효능을 달성하는지 여부이다. 다수의 세포 산물의 사용은 단일 산물 투여에 비해 상당한 비용과 기술적 문제가 발생할 수 있다. 그럼에도 불구하고, 이러한 조합은 지금까지 CAR-T 세포 요법에 대한 반응에 저항하였던 조건에서 유용할 수 있다.

[0322] CAR 분자의 구조적 모듈 방식은 광범위한 장애에 대한 CAR-T 세포 요법의 개발을 지원하지만, 생체 내에서 예측 가능하게 강력한 기능을 생성하는 CAR들을 합리적으로 설계하는 능력은 여전히 파악하기 어렵다. 본 연구에서 탐구한 단백질 조작 전략 및 CAR-T 세포 특성화 방법은 CAR 신호전달을 조정하고 CAR-T 세포 표현형 및 대사를 정량적으로 평가하는 체계적인 접근 방식을 제공하여, 현재 효과적인 옵션이 부족한 난치성 질환에 대한 차세대 CAR-T 세포의 조작 기술을 지원한다.

[0323] **C. 물질 및 방법**

[0324] **1. 항-CD20 scFv 및 CAR의 구축**

[0325] 리툭시맙 및 GA101의 scFv 서열을 암호화하는 플라스미드는 Anna M. Wu 박사의 관대한 선물이었다 (Zettlitz 등., 2017)(UCLA 및 City of Hope). 오파투무맙 scFv를 암호화하는 DNA 서열은 Integrated DNA Technologies (IDT; Coralville, IA)에 의해 코돈 최적화되고 합성되었다. Leu16 단일클론 항체 (mAb)에서 유래된 scFv를 암호화하는 플라스미드는 Michael C. Jensen 박사의 관대한 선물이었다 (Seattle Children's Research Institute)(Jensen 등., 1998). 항-GD2 scFv의 V_L 및 V_H 서열은 abYsis를 사용하여 14g2a mAb(PDB 코드 4TUJ)에서 확인되었다 (Swindells 등., 2017). 항-CD20 CAR은 scFv (V_L-V_H 방향), L235E N297Q 돌연변이를 함유하는 세포외 IgG4 힌지-CH2-CH3 스페이서 (Hudecek 등., 2015), CD28 막관통 및 세포질 도메인, CD3z 세포질 도메인 및 MSCV 백본을 갖는 절단된 표피 성장 인자 수용체 (EGFRt)가 뒤따르는 T2A "자가-절단" 서열을 조립함으로써 구축되었다. EGFRt를 형질도입 및 분류 마커로 사용하였다. 상기 언급된 항-CD20 CAR 구조체는 CAR 클러스터링의 현미경 영상화를 위한 CAR-HaloTag 융합 단백질을 생성하기 위해 주형으로 사용되었다.

[0326] 세포주 생성 및 유지

[0327] HEK 293T 및 Raji 세포는 ATCC로부터 입수하였다. K562 세포는 Michael C. Jensen 박사(시애틀 어린이 연구소)의 선물이었다. $CD19^+CD20^+$ K562 세포는 이전에 개시된 바와 같이 생성되었다 (Zah 등., 2016). 루시페라아제-발현 CHLA-255 세포주 (CHLA-255-Luc)는 Shahab Asgharzadeh 박사(로스앤젤레스 어린이 병원)의 선물이었다. CHLA-255-Luc-EGFP 세포는 EGFP를 발현하기 위한 CHLA-255-Luc의 레트로바이러스 형질도입에 의해 생성되었고, EGFP+ 세포는 UCLA 유세포 분석 핵심 시설에서 FACSAria(II) (BD Bioscience)에 대한 형광 활성화 세포 분류 (FACS)에 의해 농축되었다. HEK 293T 세포는 10% 열-불활성화 FBS (HI-FBS; ThermoFisher)가 보충된 DMEM(HyClone)에서 배양되었다. CHLA-255-Luc-EGFP 세포는 10% HI-FBS를 갖는 IMDM (ThermoFisher)에서 배양하였다. 1차 인간 T 세포, Raji 및 K562 세포는 10% HI-FBS를 갖는 RPMI-1640 (Lonza)에서 배양하였다. 대사체학 연구에 사용된 CAR-T 세포의 경우, T 세포는 10% 열-불활성화 투석 FBS (HI-dFBS)와 함께 2g/L의 1,2-^{13}C-글루코스를 함유하는 RPMI-1640에서 배양하였다.

[0328] **2. 레트로바이러스 생산 및 인간 1차 CAR-T 세포의 생성**

[0329] 레트로바이러스 상청액은 선형 폴리에틸렌이민 (PEI, 25 kDa; Polysciences)을 사용하여, HEK 293 T 세포를 항-CD20 CAR 또는 대조 구조체를 암호화하는 플라스미드 및 pRD114/pHIT60 바이러스-팩킹 플라스미드 (Steven Feldman 박사의 선물)로 일시적 공동-형질감염시켜 생산되었다. 48시간 및 72시간 후에 상청액을 수집하고, 0.45㎛ 멤브레인 필터로 세포 파편을 제거한 후 모았다. 건강한 기증자 혈액은 UCLA 혈액 및 혈소판 센터에서 수득하였다. $CD8^+$ T 세포는 제조업체의 프로토콜에 따라 RosetteSep 인간 $CD8^+$ T 세포 농축 칵테일 (StemCell Technologies)을 사용하여 분리하였다. 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) 밀도 구배에서 분리하였다. $CD14^-/CD25^-/CD62L^+$ 나이브 (naive)/기억 T 세포 ($T_{N/M}$)는 자성-활성화 세포 분류 (MACS, Miltenyi)를 사용하여 PBMC로부터 농축되었다. T 세포는 0일차 (분리일)에 3:1 세포 대 비드 비율로

CD3/CD28 Dynabeads (ThermoFisher)로 자극되었고, 2일차 및 3일차에 레트로바이러스 상청액으로 형질도입되었다. Dynabead는 7일차에 제거되었다. T 세포를 10% HI-FBS가 보충된 RPMI-1640에서 배양하였고 2일마다 재조합 인간 IL-2 (ThermoFisher) 및 IL-15 (Miltenyi)를 각각 50U/mL 및 1ng/mL의 최종 농도로 공급하였다. RNA-seq, ATAC-seq 및 대사체 연구에 사용된 CAR-T 세포의 경우, T 세포는 항-비오틴 마이크로비드 (Miltenyi)가 뒤따르는, 비오틴화된 세툭시맙 (Eli Lilly; 내부에서 바이오틴화됨)으로 EGFRt의 염색을 통한 자성 세포 분류를 통해 CAR^+ 발현에 대해 농축되었다. RNA-seq 및 ATAC-seq의 경우, $EGFRt^+$ 집단을 농축하기 전에 죽은 세포 제거 키트 (Miltenyi)로 죽은 세포를 고갈시켰다.

[0330] **3. 사이토카인 생산 정량화**

[0331] 13일 또는 14일에 50,000개의 CAR+ T 세포를 96-웰 U-바닥 플레이트에서 2:1 효과기 대 표적 (E:T) 비율로 25,000개의 EGFP-발현 모 K562 ($CD19^-CD20^-$) 또는 $CD19^+CD20^+$ K562 표적 세포와 함께 인큐베이션하였다. 형질도입 효율의 차이를 고려하면서 세포 밀도를 제어하기 위해, 웰당 동일한 수의 총 T 세포에 도달하는 데 필요한 만큼 형질도입되지 않은 T 세포를 추가하였다. 48시간 공동 인큐베이션 후, 세포를 2분 동안 300 xg에서 회전시켰다. 상청액을 수확하고 사이토카인 수준을 ELISA (BioLegend)로 정량화하였다.

[0332] **4. 증식 검정**

[0333] T 세포를 1.25 μM CellTrace Violet (ThermoFisher)으로 염색하고 40,000개의 CAR^+ T 세포를 2:1 E:T 비율로 모 K562 또는 $CD19^+CD20^+$ K562 세포와 함께 9-웰 U-바닥 플레이트의 각 웰에 파종하였다. 형질도입되지 않은 T 세포를 필요에 따라 웰에 추가하여 다양한 형질도입 효율을 정규화하고 웰당 T 세포의 총 수가 전체에 걸쳐 일관되게 유지되도록 하였다. 필요에 따라 배양물을 계대하고, 4일간 공동-인큐베이션 후, MACSQuant VYB 유세포 분석기에서 CTV 희석액을 분석하였다.

[0334] **5. 반복 항원 공격을 이용한 세포독성 검정**

[0335] CAR^+ T 세포를 24-웰 플레이트에 4 x 10^5개 세포/웰로 파종하고, 2:1 E:T 비율로 표적 세포와 공동 인큐베이션하였다. 형질도입되지 않은 T 세포를 필요에 따라 웰에 추가하여 다양한 형질도입 효율을 정규화하고 웰 당 T 세포의 총 수가 전체에 걸쳐 일관되게 유지되도록 하였다. 신선한 표적 세포 (2 x 10^5 세포/웰)를 추가하기 전에 2일마다 MACSQuant VYB 유세포 분석기로 세포 수를 정량화하였다.

[0336] **6. 유세포 분석을 위한 항체 염색**

[0337] EGFRt 발현은 비오틴화된 세툭시맙 (Eli Lilly; 내부에서 비오티닐화됨)에 이어 PE-접합된 스트렙타비딘 (Jackson ImmunoResearch #016-110-084)으로 측정되었다. CAR 발현은 Flag 태그 (DYKDDDDK 태그, APC, 클론 L5, BioLegend #637308), HA (FITC, 클론 GG8-1F3.3.1, Miltenyi #130-120-722)를 사용하여 또는 항-Fc (Alexa Fluor 488, Jackson ImmunoResearch #709-546-098)로 표면 에피토프 염색에 의해 정량화되었다. CAR-T 세포의 항원-독립적 활성화-마커 발현은 18일차 (즉, Dynabead 추가 후 18일째 및 Dynabead 제거 후 11일째)에 CD137 (PE/Cy7, 클론 4B4-1, BioLegend #309818) 및 CTLA-4 (PE/Cy7, 클론 BNI3, BioLegend #369614)에 대한 항체 염색에 의해 평가되었다. CD45RA (VioGreen, 클론 T6D11, Miltenyi #130-113-361), CD62L (APC, 클론 DREG-56, ThermoFisher #17-0629-42), PD-1 (APC, 클론 EH12.2H3, BioLegend #329908) 및 LAG-3 (APC, 클론 3DS223H, ThermoFisher #17-2239-42)에 대한 항체를 사용하여 T 세포 아형 및 고갈 상태를 평가하였다. 생체 내 T 세포 및 종양 세포 지속성은 안와후 혈액 샘플의 항체 염색으로 모니터링되었다. 샘플은 제조업체의 프로토콜에 따라 적혈구 용해 용액 (10X, Miltenyi)으로 처리되었다. 남아있는 세포 내용물은 항-인간 CD45 (PacBlue 또는 PECy7, 클론 HI30, BioLegend #304029 또는 #304016) 및 비오틴화된 세툭시맙으로 염색된 후, PE-접합된 스트렙타비딘으로 염색되었다. 모든 샘플은 MACSQuant VYB 유세포 분석기 (Miltenyi)에서 분석되었으며, 결과 데이터는 FlowJo 소프트웨어 (TreeStar)를 사용하여 분석되었다.

[0338] **7. 공초점 현미경**

[0339] CAR-HaloTag 융합 단백질로 형질도입된 Jurkat 세포를 4-웰 평평한 바닥 유리 플레이트 (MatTek)의 한 웰에서 50 mL RPMI-1640 + 10% HI-FBS로 웰당 10,000개의 세포로 파종하였다. 스캐닝 공초점 이미징은 AiryScan 및 63X 1.4 NA 오일 대물렌즈가 있는 Zeiss LSM 880 레이저 스캐닝 공초점 현미경으로 획득하였다.

[0340] **8. 생체 내 연구**

[0341] 6주 내지 8주령 NOD/SCID/IL-2Rγ^{null} (NSG) 마우스를 UCLA 방사선 종양학과에서 얻었다. 프로토콜은 UCLA 기관 동물 관리 및 사용 위원회의 승인을 받았다. CD19 및 CD20 CAR-T 세포의 평가를 위해, 각 마우스에 꼬리 정맥 주사로 0.5 x 10^5 EGFP$^+$ 반딧불이 루시페라아제 (ffLuc)-발현 Raji 세포를 투여하였다. 6 내지 9일 후, 1.5 x 10^6 내지 5 x 10^6 CAR$^+$ T 세포 또는 EGFRt만 발현하는 세포 (음성 대조군)를 종양 이식 (engraftment)을 확인한 후 종양 보유 마우스에 꼬리 정맥을 통해 주사하였다. 0.5 x 10^6의 종양 세포 2차 투여량과 2 x 10^6의 종양 세포의 3차 투여량은 본물과 도면에 표시된 바와 같이 연구의 하위집합에 투여되었다. GD2 CAR-T 세포의 연구에서, 꼬리 정맥 주사로 각 마우스에 3.5 x 10^6 CHLA-255-Luc-EGFP 세포를 투여하였다. CHLA-255 종양 이식이 확인되면 (종양 주사 후 17일째), 2 x 10^6 CAR$^+$ T 세포를 꼬리 정맥을 통해 종양 보유 마우스에 주사하였다. 종양 투여량, T 세포 투여량, 종양 재공격에 대한 세부 사항은 본문 및 도면에 표시되었다. IVIS Illumina III LT 이미징 시스템 (PerkinElmer)으로 종양 진행/퇴행을 모니터링하였다. 혈액 샘플은 T-세포 주사 후 3일째 그리고 그 후로부터 10일마다 안와후 채혈을 통해 수집되었다. 마우스를 인도적 종말점에서 안락사시켰다. 안락사 후 골수, 비장 및 간을 수집하였다. 조직을 갈아서 100-μm 필터에 통과시킨 후 유세포 분석 전에 적혈구 용해를 수행하였다. ATAC-seq 및 RNA-seq 실험의 경우, NSG 마우스는 2.85 x 10^6 CAR-T 세포로 처리하기 6일 전에 0.5 x 10^6 Raji 세포로 이식되었다. T 세포 주사 9일 후, CAR-T 세포를 동물 조직 (간, 비장, 심장 혈액 및 골수)으로부터 회수하고, ATAC-seq/RNA-seq 라이브러리 구축 전에 자성 활성화 세포 분류 (MACS)로 huCD45$^+$ 및 EGFRt$^+$ 하위집단에 대해 농축하였다.

[0342] **9. ATAC-seq 라이브러리 구축 및 데이터 분석**

[0343] ATAC-seq 라이브러리는 이전에 개시된 바와 같이 구축되었다 (Buenrostro 등., 2013; Corces 등., 2017). 요약하면, MACS 분류에서 마우스 당 30,000 내지 50,000개의 생존 T 세포를 PBS로 한 번 세척하고 0.1 % IGEPAL CA-630, 0.1% Tween-20 및 0.01% 디지토닌을 포함하는 50 μL Resuspension Buffer (RSB) 완충액 (10 mM Tris-HCL, pH 7.4, 10 mM NaCl, 3 mM $MgCl_2$)에 용해시켰다. 샘플을 0.1% Tween-20을 함유하는 1 mL RSB 완충액으로 세척하고, 4° C에서 500xg로 10분 동안 원심분리하였다. 펠릿화된 핵을 25 μL Tn5 전위 믹스 (12.5 μL 2X Tagment DNA 완충액, 1.25 μL Tn5 트랜스포사제 및 11.25 μL 멸균수, Illumina)에 재현탁하고 37° C 및 500 RPM에서 1시간 동안 진탕 인큐베이터에 보관하였다. DNA Clean & Concentrator 키트 (Zymo Research)를 사용하여 전위 반응을 정제하였다. DNA 단편은 이전에 개시된 바와 같이 NEB Q5 MasterMix 및 맞춤형 프라이머를 사용하여 PCR 증폭되었다 (Buenrostro 등., 2013). 라이브러리는 AmPure 비드 (Beckman Coulter)로 크기를 선택하고 TapeStation으로 정량화하였다. 라이브러리는 50bp 쌍-말단 판독으로 UCLA 브로드 줄기세포 연구 센터 (Broad Stem Cell Research Center)의 고처리량 시퀀싱 코어 (High Throughput Sequencing core)에 있는 Illumina NovaSeq S1 플랫폼에서 시퀀싱되었다. ATAC-seq의 Fastq 파일은 FastQC (Linux, v0.11.8)로 품질을 검사하였다. 판독은 cutadapt (Linux, v1.18)로 처리되어 품질이 낮은 (품질 점수 < 33) 판독을 제거하고 어댑터를 트리밍하였다. Bowtie2 (Linux, v2.2.9)를 사용하여 트리밍된 판독을 mm10 참조 게놈에 대해 정렬하여 마우스 세포로부터 오염된 판독을 제거하였다. 비-뮤린 판독은 이후 Bowtie2에 의해 hg38 게놈에 맵핑되었고, sam 파일은 samtools (Linux, v1.9)에 의해 bam 파일로 변환되었다. 피크는 정렬된 판독에서 MACS2 (Linux, v2.1.2)를 사용하여 각 복제에 대해 독립적으로 명명되었으며, 이후에 bedtools (v2.26.0)에 의해 병합되었다. 각 피크에 할당된 판독은 하위판독 (Linux, v1.6.3)의 *featureCounts* 함수로 계산되었다. 염색질 접근 가능한 부위를 시각화하기 위해, MACS2에서 명명된 피크를 IGV (v2.8.0)에서 시각화하였다. 전사 시작 부위 (TSS)의 -1 kb 내지 1 kb 내 피크의 배 농축 (MACS2에 의해 계산됨)은 프로모터 영역의 접근성을 나타낸다.

[0344] **10. 대량 RNA-seq 및 유전자 세트 농축 분석 (GSEA)**

[0345] Qiagen RNeasy Plus Mini 키트를 사용하여 200,000 내지 700,000 개의 MACS 분류 CAR-T 세포에서 총 RNA를 추출하였다. mRNA는 NEBNext Poly(A) mRNA 자성 분리 모듈 (New England BioLabs)을 사용하여 분리하였다. RNA-seq 라이브러리는 제조업체의 프로토콜에 따라 NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit (New England BioLabs)를 사용하여 생성하였다. RNA-seq의 Fastq 파일은 FastQC (Linux, v0.11.8)로 품질 검사를 하였다. 판독은 cutadapt (Linux, v1.18)로 처리되어 품질이 낮은 (품질 점수 < 33) 판독을 제거하고 어댑터를 트리밍하였다. 트리밍된 판독은 Tophat2 (Linux, v2.1.0)를 사용하여 mm10 참조 게놈에 정렬되어 마우스 세포로부터 오염된 판독을 제거하였다. 비-뮤린 판독은 Tophat2에 의해 hg38 게놈에 맵핑되었다. 각 유전자에 할당된 판독은 ensembl 38 유전자 세트를 참조로 사용하여 하위 판독 패키지 (Linux, v1.6.3)의 *featureCounts* 함수로

계산되었다. 적어도 하나의 샘플에 맵핑된 적어도 8개의 판독값이 없는 유전자는 신뢰할 수 있는 검출 한계 미만으로 간주되어 제거되었다. 판독 수는 M 값의 Trimmed Mean 방법 (R v3.6.3에서 실행되는 edgeR의 TMM 정규화 방법)으로 정규화되어 RPKM (킬로베이스 당 100만 당 판독) 값을 산출하고, 패키지 edgeR을 사용하여 차등 발현을 계산하였다. 유전자 온톨로지 분석은 GSEA 소프트웨어 (v4.1.0, Broad Institute) 및 BubbleGUM (v1.3.19) (Spinelli 등., 2015)을 사용하여 수행되었다. 차등적으로 발현된 유전자의 발현 값은 현재 MSigDB 유전자 세트에서 선택된 2493개의 T 세포 관련 유전자 세트의 선별된 목록을 사용하여 프로그램에 입력되었다. R (버전 3.6.3)에서 *peamap* 및 *ggplot2* 패키지를 사용하여 차등적으로 발현된 유전자에 대한 히트맵을 생성하였다. 볼케이노 플롯은 R (버전 3.6.3)의 *ggplot2*를 사용하여 생성하였다.

[0346] **11. 대사산물 추출 및 분석**

[0347] 세포를 초기에 10% HI-FBS가 보충된 RPMI-1640에서 배양하였다. 대사산물 추출 24 내지 72시간 전에 배양 배지를 10% FBS 또는 2g/L 1,2-^{13}C-글루코스를 포함하는 투석된 FBS (dFBS)를 함유하는 RPMI로 변경하였다. 세포 배양 배지는 영양 섭취 및 소비를 평가하기 위해 24시간마다 각 세포주에서 수집되었다. 4부피의 100% HPLC-등급 메탄올을 1부피의 배지에 첨가하고 17,000 xg 및 4° C에서 5분 동안 원심분리하여 세포 파편을 침전시켰다. 투명한 상청액을 수거하고 액체 크로마토그래피로 분석한 다음 질량 분석법 (LC-MS)으로 분석하였다. 영양소 섭취 및 소비량을 정확하게 추정하기 위해, 24시간마다 부분 배지 교체를 수행하여 영양소 고갈을 방지하였다. 표지된 글루코스 배지로 전환한 후 24 시간 또는 72 시간 후에, 세포내 대사산물 추출을 이전에 개시된 바와 같이 수행하였다 (Bennett 등., 2008; Park 등., 2019). 요약하면, 세포를 나일론 멤브레인 필터 (0.45 μm; Millipore)로 옮기고 진공으로 배지를 제거하였다. 각 필터를 6-웰 플레이트의 한 웰에 400 μL의 차가운 추출 용매 (HPLC-등급 아세토니트릴:메탄올:물 40:40:20, v/v)에 빠르게 담그었다. 플레이트를 -20° C에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 이어서 세포 추출물을 1.7 mL 미세원심분리 튜브로 옮기고 5분 동안 4° C에서 17,000 xg로 원심분리하였다. 상청액을 동결건조하고 총 세포 수 (1백만 세포 당 50 μL)로 정규화된 HPLC-등급 물에 재구성하였다. 메탄올 처리된 배지 샘플과 세포내 대사산물 추출물은 모두 UCLA의 Molecular Instrumentation Center (MIC)에서 고해상도 오비트랩 질량 분석기 (Q-Exactive plus Orbitrap, Thermo Fisher Scientific)와 결합된 역상 이온-쌍 액체 크로마토그래피 (Vanquish UPLC, Thermo Fisher Scientific)로 분석하였다. 대사산물은 질량 대 전하 (m/z) 비율 및 머무름 시간을 이전에 검증된 표준과 비교하여 확인하였다. 샘플은 음이온 모드와 양이온 모드 둘 다에서 검출되었다. 음이온 모드는 m/z 비율이 각각 60 내지 200 및 200 내지 2000인 데이터를 얻기 위해 두 개의 하위그룹 - nlo 및 nhi - 으로 분리되었다. LC-MS 데이터는 Metabolomic Analysis and Visualization Engine (MAVEN)을 사용하여 처리되었다 (Clasquin 등., 2012). 라벨링 분획은 ^{13}C의 자연 발생 존재비에 대해 교정되었다. 배양 배지에서 대사산물의 농도는 알려진 농도의 대조군에 대해 LC-MS 측정에서 이온 수를 정규화하여 24시간 및 72시간에 정량화하였다. 신선한 배지에서 샘플 농도를 빼고 생존 세포 수로 정규화하여 흡수 및 분비 속도를 계산하였다 (양수 값은 분비를 나타내고 음수 값은 섭취를 나타냄). 세포 배양에서 배지 변화를 설명하기 위해 몰 밸런스를 수행하였다. 계산은 24시간마다 배지 증발의 10-20%를 차지하였다.

[0348] **12. 통계 분석**

[0349] 양측, 짝을 이루지 않은, 2-표본 스튜던트 *t* 테스트 및 로그 순위 Mentel-Cox 테스트를 포함하는 통계 테스트는 GraphPad Prism V8을 사용하여 수행하였다. RNA-seq에서 차등 유전자 분석을 위한 일원 ANOVA 테스트는 edgeR에서 *glmQLFTest* 함수로 수행하였다.

[0350] **실시예 4: CAR 조작**

[0351] 본 실시예는 상기 실시예를 보완하기 위한 데이터를 제공한다. 경우에 따라, 데이터가 상기 실시예에서와 중복되어 다른 방식으로 제공될 수 있다. 도 1에 도시된 것은 다양한 항체로부터 유래된 scFv로 구축된 CD20 CAR의 개략도이다. 모든 CAR은 CD28 공-자극 도메인 (도 1a) 및 CD20 CAR 구조체에 사용된 scFv 도메인의 서열을 함유하는 2세대 수용체였다.

[0352] Leu16, 리툭시맙, GA101 및 오파투무맙을 기반으로 하는 CAR은 모두 1차 인간 T 세포의 표면에서 효율적으로 발현되며, 생체 외 배양 동안 T-세포 증폭에 미치는 영향에 유의미한 차이가 없다 (도 27a 내지 c). Leu16, 리툭시맙, GA101 및 오파투무맙에 기반한 CAR은 유사한 항원 검출 역치를 나타낸다 (도 28a 내지 c). 리툭시맙-유래 CD20 CAR은 항원-독립적 CAR 신호전달을 나타내며, 활성화 및 고갈 마커의 상향조절 (도 29 a,b) 및 항원 자극의 부재 하에 T-세포 증식 (도 29c,d)을 초래한다. 도 29a, c는 CD8+ 및 순수/기억 T (TN/M) 세포 모두에서 관찰된 리툭시맙-기반 CAR-T 세포에서 토닉 신호전달을 보여주며, 이는 CD14-/CD25-/CD62L+ 표현형에 대해 분류되

었다. 리툭시맙-유래 CD20 CAR은 증가된 글루코스 및 글루타민 흡수뿐만 아니라 증가된 락테이트, 알라닌 및 글루타메이트 분비에 의해 입증된 바와 같이, 항원-독립적 CAR 신호전달을 나타내어 대사 플럭스의 상향 조절을 초래한다. CD19 CAR 및 GD2 CAR은 토닉 신호전달에 대한 음성 및 양성 대조군으로 각각 포함되었다 (도 30). 공초점 현미경은 Leu16, 리툭시맙, GA101 및 오파투무맙을 기반으로 하는 CAR의 균일한 표면 발현을 보여주며, 이는 리툭시맙 CAR-T 세포에 의한 토닉 신호전달이 CAR 클러스터링에 의해 유발되지 않음을 나타낸다 (도 31). 리툭시맙-기반 CAR-T 세포는 초기 시점에서 Leu16-, GA101- 및 오파투무맙-기반 CAR보다 더 큰 종양 제어를 나타내지만, 2주 후에 항-종양 효능을 빠르게 상실한다 (도 32). 리툭시맙-기반 CAR의 알라닌-삽입 변이체 (도 17)는 1차 인간 T 세포의 표면에서 잘 발현된다 (도 33). 알라닌 삽입은 리툭시맙-기반 CAR-T 세포에서 감소된 토닉 신호전달을 초래한다 (도 34). 알라닌 삽입은 리툭시맙-기반 CAR-T 세포의 시험관 내 항-종양 활성을 변경하지 않았다 (도 35).

[0353] 막관통 및 세포질 CD28 도메인 사이에 삽입된 2개의 알라닌 잔기를 함유하는 리툭시맙-유래 CD20 CAR은 우수한 생체 내 항-종양 기능을 초래한다. NOD/scid/γ-/- (NSG) 마우스에 50만 개 반딧불이 루시페라아제 발현 Raji 림프종 세포를 이식하고, 종양 주사 7일 후 CD20 CAR 또는 형질도입 마커 (EGFRt) 중 하나를 발현하는 135만 개의 T 세포로 처리하였다. 동물에게 7 일 후에 150만 개의 T 세포를 다시 투여하였다. 본 연구에서 테스트된 모든 CAR에는 리툭시맙-유래 scFv, IgG4 힌지-CH2-CH3 세포외 스페이서, CD28 막관통 및 세포질 도메인, CD3 제타 신호전달 도메인이 포함되었다. 0 내지 4개의 알라닌이 CD28 막관통 및 CD28 세포질 도메인 사이에 삽입되었다. 종양 진행은 생물발광 이미징을 통해 모니터링되었으며, 종양 주입 이후 시간의 함수로 방사 휘도 신호가 표시된다. 각 방사 휘도 기록의 종점은 각 동물의 인도적인 종점을 나타낸다. 2 개의 알라닌 삽입 변이체는 다른 변이체뿐만 아니라 모체 (알라닌 삽입 없음) 구조체와 비교하여 우수한 종양 제어 및 연장된 중간 생존을 보여주었다. 이 데이터는 도 5에 도시되었다. 알라닌 삽입은 CAR-T 세포 기능을 개선하기 위한 일반화 가능한 방법이다 (도 36).

[0354] 하이브리드 scFv를 갖는 CD20 CAR (도 6)은 1차 인간 T 세포의 표면 상에서 효율적으로 발현된다 (도 37). RFR-LCDR 하이브리드 CD20 CAR은 항원-독립적 CAR 신호전달을 나타내며, 결과적으로 활성화 및 고갈 마커의 상향조절 (도 38a) 및 항원 자극의 부재 하에 T-세포 증식 (도 38b)을 초래한다. CD19 CAR 및 GD2 CAR은 각각 도 38의 토닉 신호전달에 대해 음성 및 양성 대조군으로 포함되었다. RFR-LCDR 하이브리드 CD20 CAR은 시험관 내 반복된 항원 공격 시 우수한 종양-세포 살해를 보여준다. 다양한 CAR 또는 형질도입 마커 (EGFRt)를 발현하는 T 세포는 48시간마다 신선한 Raji 림프종 세포로 공격하였다. 생존 가능한 표적 세포 수를 각각의 재-공격 전에 유세포 분석으로 정량화하였다. 다수의 기증자로부터의 결과는 RFR-LCDR 하이브리드 CAR에 의한 종양-세포 살해가 이의 모체 구조체 (Leu16 및 리툭시맙) 중 하나와 비교하여 더 우수함을 나타낸다 (도 8). Leu16, 리툭시맙 및 RFR-LCDR scFv의 결합 동역학 매개변수를 생물층 간섭계로 측정하였다 (도 39).

[0355] 알라닌 삽입 및 scFv 혼성화는 신규 CAR 구조체를 생성하기 위해 결합될 수 있다 (도 40). 알라닌 삽입이 있거나 없는 RFR-LCDR 하이브리드 scFv를 함유하는 CAR은 낮지만 0이 아닌 수준의 토닉 신호전달을 초래한다 (도 41). 알라닌 삽입이 있거나 없는 RFR-LCDR 하이브리드 scFv를 함유하는 CAR은 글루코스 및 글루타민 흡수뿐만 아니라 젖산, 알라닌 및 글루타메이트 분비에 의해 입증되는 바와 같이, 낮지만 0이 아닌 수준의 토닉 신호전달을 초래한다 (도 42). 토닉 신호전달 CAR은 증가된 미토콘드리아 단백질 번역 (도 43a), 증가된 항원 제시 (도 43b), 증가된 MYC 신호전달 (도 43c), 증가된 MTORC 신호전달 (도 43d), 증가된 TNF-α 신호전달 (도 43e), 다양한 인터페론 반응 (도 43f), 효과기 (기억과 대조적으로) T-세포 아형과 관련된 유전자의 풍부한 시그니처 (도 43g) 및 증가된 세포 주기 활성 (도 43h)을 나타내는 뚜렷한 전사 프로파일을 보여준다. 표시 가능한 공간을 초과하는 유전자를 포함하는 히트맵의 경우, 히트맵에 표시된 유전자의 이름이 각 맵의 측면에 순서대로 나열된다. RFR-LCDR 하이브리드 CD20 CAR은 생체 내에서 우수한 종양 제거를 나타낸다 (도 44). 전사체 및 후성유전학적 분석은 T-세포 표현형에서 CAR-의존적 변이를 보여준다 (도 45). NSG 마우스는 정맥 내(i.v.)로 전달되는 2.85 x 10^6개의 CAR^+ T 세포로 치료하기 6일 전에, 0.5 x 10^6 반딧불이-루시페라아제-발현 Raji 세포를 정맥 내 (i.v.)로 주사하였다. 간, 비장, 심장 혈액 및 골수는 T 세포 주입 9일 후, 종양 보유 마우스로부터 수집되었다 (그룹 당 n = 2 마리 마우스). CAR^+ T 세포는 $huCD45^+$ $EGFRt^+$ 집단을 농축하여 얻었고, 이어서 RNAseq 및 ATACseq로 분석하였다 (도 45).

[0356] * * *

[0357] 본원에 개시되고 청구된 모든 방법은 본 개시내용에 비추어 과도한 실험 없이 제조되고 실행될 수 있다. 본 개시내용의 조성물 및 방법이 바람직한 구현예의 측면에서 설명되었지만, 본 개시의 개념, 사상 및 범위를 벗어나

지 않고, 본원에 기술된 방법 및 방법의 단계 또는 단계의 순서에 변형이 적용될 수 있음이 당업자에게 명백할 것이다. 보다 구체적으로, 화학적으로 및 생리학적으로 모두 관련된 특정 제제가 동일하거나 유사한 결과가 달성되는 한 본원에 기술된 제제를 대체할 수 있음이 명백할 것이다. 당업자에게 자명한 그러한 모든 유사한 대체물 및 변형은 첨부된 청구범위에 의해 정의된 본 개시내용의 사상, 범위 및 개념 내에 있는 것으로 간주된다.

[0358] 본 출원에 인용된 참고문헌은 본원에 기재된 것에 대한 보충적인 예시적 절차 또는 기타 세부사항을 제공하는 정도로, 본원에 구체적으로 참고문헌으로 포함된다.

[0359] 본 명세서 전체에 걸쳐 언급된 하기 참고문헌 및 간행물은 본원에 기재된 것에 대한 보충적인 예시적 절차 또는 기타 세부사항을 제공하는 정도로, 본원에 구체적으로 참고문헌으로 포함된다.

[0360] **참고문헌**

[0361] Till B.G. 등. Blood, 2008; 112(6):2261-2271.

[0362] Wang 등. Clinical Immunology, 2014; 155:160-175.

[0363] Constantiescu 등. Molecular Cell, 2001. 7:377-385.

[0364] Bantug, G.R., Galluzzi, L., Kroemer, G., and Hess, C. (2018). The spectrum of T cell metabolism in health and disease. Nat Rev Immunol 18, 19-34.

[0365] Bennett, B.D., Yuan, J., Kimball, E.H., and Rabinowitz, J.D. (2008). Absolute quantitation of intracellular metabolite concentrations by an isotope ratio-based approach. Nat Protoc 3, 1299-1311.

[0366] Bjorkstrom, N.K., Beziat, V., Cichocki, F., Liu, L.L., Levine, J., Larsson, S., Koup, R.A., Anderson, S.K., Ljunggren, H.G., and Malmberg, K.J. (2012). CD8 T cells express randomly selected KIRs with distinct specificities compared with NK cells. Blood 120, 3455-3465.

[0367] Buenrostro, J.D., Giresi, P.G., Zaba, L.C., Chang, H.Y., and Greenleaf, W.J. (2013). Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. Nat Methods 10, 1213-1218.

[0368] Chang, C.H., Curtis, J.D., Maggi, L.B., Jr., Faubert, B., Villarino, A.V., O'Sullivan, D., Huang, S.C., van der Windt, G.J., Blagih, J., Qiu, J., 등. (2013). Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. Cell 153, 1239-1251.

[0369] Chang, C.H., Qiu, J., O'Sullivan, D., Buck, M.D., Noguchi, T., Curtis, J.D., Chen, Q., Gindin, M., Gubin, M.M., van der Windt, G.J., 등. (2015). Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. Cell 162, 1229-1241.

[0370] Chang, Z.L., and Chen, Y.Y. (2017). CARs: Synthetic Immunoreceptors for Cancer Therapy and Beyond. Trends Mol Med 23, 430-450.

[0371] Chang, Z.L., Lorenzini, M.H., Chen, X., Tran, U., Bangayan, N.J., and Chen, Y.Y. (2018). Rewiring T-cell responses to soluble factors with chimeric antigen receptors. Nat Chem Biol 14, 317-324.

[0372] Chothia, C., and Lesk, A.M. (1987). Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. J Mol Biol 196, 901-917.

[0373] Chothia, C., Lesk, A.M., Tramontano, A., Levitt, M., Smith-Gill, S.J., Air, G., Sheriff, S., Padlan, E.A., Davies, D., Tulip, W.R., 등. (1989). Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. Nature 342, 877-883.

[0374] Clasquin, M.F., Melamud, E., and Rabinowitz, J.D. (2012). LC-MS data processing with MAVEN: a metabolomic analysis and visualization engine. Curr Protoc Bioinformatics Chapter 14, Unit14 11.

[0375] Constantinescu, S.N., Keren, T., Socolovsky, M., Nam, H., Henis, Y.I., and Lodish, H.F. (2001). Ligand-independent oligomerization of cell-surface erythropoietin receptor is mediated by the transmembrane domain. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 4379-4384.

[0376] Corces, M.R., Trevino, A.E., Hamilton, E.G., Greenside, P.G., Sinnott-Armstrong, N.A., Vesuna, S.,

Satpathy, A.T., Rubin, A.J., Montine, K.S., Wu, B., 등. (2017). An improved ATAC-seq protocol reduces background and enables interrogation of frozen tissues. Nat Methods 14, 959-962.

[0377] Cretenet, G., Clerc, I., Matias, M., Loisel, S., Craveiro, M., Oburoglu, L., Kinet, S., Mongellaz, C., Dardalhon, V., and Taylor, N. (2016). Cell surface Glut1 levels distinguish human CD4 and CD8 T lymphocyte subsets with distinct effector functions. Sci Rep 6, 24129.

[0378] Drent, E., Poels, R., Ruiter, R., van de Donk, N., Zweegman, S., Yuan, H., de Bruijn, J., Sadelain, M., Lokhorst, H.M., Groen, R.W.J., 등. (2019). Combined CD28 and 4-1BB Costimulation Potentiates Affinity-tuned Chimeric Antigen Receptor-engineered T Cells. Clin Cancer Res 25, 4014-4025.

[0379] Fischer, K., Hoffmann, P., Voelkl, S., Meidenbauer, N., Ammer, J., Edinger, M., Gottfried, E., Schwarz, S., Rothe, G., Hoves, S., 등. (2007). Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. Blood 109, 3812-3819.

[0380] Frigault, M.J., Lee, J., Basil, M.C., Carpenito, C., Motohashi, S., Scholler, J., Kawalekar, O.U., Guedan, S., McGettigan, S.E., Posey, A.D., Jr., 등. (2015). Identification of chimeric antigen receptors that mediate constitutive or inducible proliferation of T cells. Cancer Immunol Res 3, 356-367.

[0381] Gomes-Silva, D., Mukherjee, M., Srinivasan, M., Krenciute, G., Dakhova, O., Zheng, Y., Cabral, J.M.S., Rooney, C.M., Orange, J.S., Brenner, M.K., 등. (2017). Tonic 4-1BB Costimulation in Chimeric Antigen Receptors Impedes T Cell Survival and Is Vector-Dependent. Cell Rep 21, 17-26.

[0382] Grigor, E.J.M., Fergusson, D., Kekre, N., Montroy, J., Atkins, H., Seftel, M.D., Daugaard, M., Presseau, J., Thavorn, K., Hutton, B., 등. (2019). Risks and Benefits of Chimeric Antigen Receptor T-Cell (CAR-T) Therapy in Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. Transfus Med Rev 33, 98-110.

[0383] Guedan, S., Ruella, M., and June, C.H. (2018). Emerging Cellular Therapies for Cancer. Annu Rev Immunol 37, 145-171.

[0384] Hartman, N.C., and Groves, J.T. (2011). Signaling clusters in the cell membrane. Curr Opin Cell Biol 23, 370-376.

[0385] Hong, M., Clubb, J.D., and Chen, Y.Y. (2020). Engineering CAR-T Cells for Next-Generation Cancer Therapy. Cancer Cell.

[0386] Hudecek, M., Lupo-Stanghellini, M.T., Kosasih, P.L., Sommermeyer, D., Jensen, M.C., Rader, C., and Riddell, S.R. (2013). Receptor affinity and extracellular domain modifications affect tumor recognition by ROR1-specific chimeric antigen receptor T cells. Clin Cancer Res 19, 3153-3164.

[0387] Hudecek, M., Sommermeyer, D., Kosasih, P.L., Silva-Benedict, A., Liu, L., Rader, C., Jensen, M.C., and Riddell, S.R. (2015). The nonsignaling extracellular spacer domain of chimeric antigen receptors is decisive for in vivo antitumor activity. Cancer Immunol Res 3, 125-135.

[0388] Jensen, M., Tan, G., Forman, S., Wu, A.M., and Raubitschek, A. (1998). CD20 is a molecular target for scFvFc:zeta receptor redirected T cells: implications for cellular immunotherapy of CD20+ malignancy. Biol Blood Marrow Transplant 4, 75-83.

[0389] Kabat, E.A., and Wu, T.T. (1971). Attempts to locate complementarity-determining residues in the variable positions of light and heavy chains. Ann N Y Acad Sci 190, 382-393.

[0390] Kishton, R.J., Sukumar, M., and Restifo, N.P. (2017). Metabolic Regulation of T Cell Longevity and Function in Tumor Immunotherapy. Cell Metab 26, 94-109.

[0391] Klein, C., Lammens, A., Schafer, W., Georges, G., Schwaiger, M., Mossner, E., Hopfner, K.P., Umana, P., and Niederfellner, G. (2013). Response to: monoclonal antibodies targeting CD20. MAbs 5, 337-338.

[0392] Liberti, M.V., and Locasale, J.W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? Trends Biochem Sci 41, 211-218.

[0393] Liu, W., Kawahara, M., Ueda, H., and Nagamune, T. (2008). Construction of a fluorescein-responsive chimeric receptor with strict ligand dependency. Biotechnol Bioeng 101, 975-984.

[0394] Liu, X., Jiang, S., Fang, C., Yang, S., Olalere, D., Pequignot, E.C., Cogdill, A.P., Li, N., Ramones, M., Granda, B., 등. (2015). Affinity-Tuned ErbB2 or EGFR Chimeric Antigen Receptor T Cells Exhibit an Increased Therapeutic Index against Tumors in Mice. Cancer Res 75, 3596-3607.

[0395] Long, A.H., Haso, W.M., Shern, J.F., Wanhainen, K.M., Murgai, M., Ingaramo, M., Smith, J.P., Walker, A.J., Kohler, M.E., Venkateshwara, V.R., 등. (2015). 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. Nat Med 21, 581-590.

[0396] Macintyre, A.N., Gerriets, V.A., Nichols, A.G., Michalek, R.D., Rudolph, M.C., Deoliveira, D., Anderson, S.M., Abel, E.D., Chen, B.J., Hale, L.P., 등. (2014). The glucose transporter Glut1 is selectively essential for CD4 T cell activation and effector function. Cell Metab 20, 61-72.

[0397] Majzner, R.G., and Mackall, C.L. (2019). Clinical lessons learned from the first leg of the CAR T cell journey. Nat Med 25, 1341-1355.

[0398] Majzner, R.G., Rietberg, S.P., Sotillo, E., Dong, R., Vachharajani, V.T., Labanieh, L., Myklebust, J.H., Kadapakkam, M., Weber, E.W., Tousley, A.M., 등. (2020). Tuning the Antigen Density Requirement for CAR T-cell Activity. Cancer Discov 10, 702-723.

[0399] Martin, A.C., and Thornton, J.M. (1996). Structural families in loops of homologous proteins: automatic classification, modelling and application to antibodies. J Mol Biol 263, 800-815.

[0400] Mossner, E., Brunker, P., Moser, S., Puntener, U., Schmidt, C., Herter, S., Grau, R., Gerdes, C., Nopora, A., van Puijenbroek, E., 등. (2010). Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. Blood 115, 4393-4402.

[0401] Niederfellner, G., Lammens, A., Mundigl, O., Georges, G.J., Schaefer, W., Schwaiger, M., Franke, A., Wiechmann, K., Jenewein, S., Slootstra, J.W., 등. (2011). Epitope characterization and crystal structure of GA101 provide insights into the molecular basis for type I/II distinction of CD20 antibodies. Blood 118, 358-367.

[0402] Notredame, C., Higgins, D.G., and Heringa, J. (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. J Mol Biol 302, 205-217.

[0403] Omer, B., Castillo, P.A., Tashiro, H., Shum, T., Huynh, M.T.A., Cardenas, M., Tanaka, M., Lewis, A., Sauer, T., Parihar, R., 등. (2018). Chimeric Antigen Receptor Signaling Domains Differentially Regulate Proliferation and Native T Cell Receptor Function in Virus-Specific T Cells. Front Med (Lausanne) 5, 343.

[0404] Park, J.O., Tanner, L.B., Wei, M.H., Khana, D.B., Jacobson, T.B., Zhang, Z., Rubin, S.A., Li, S.H., Higgins, M.B., Stevenson, D.M., 등. (2019). Near-equilibrium glycolysis supports metabolic homeostasis and energy yield. Nat Chem Biol 15, 1001-1008.

[0405] Reff, M.E., Carner, K., Chambers, K.S., Chinn, P.C., Leonard, J.E., Raab, R., Newman, R.A., Hanna, N., and Anderson, D.R. (1994). Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. Blood 83, 435-445.

[0406] Rufener, G.A., Press, O.W., Olsen, P., Lee, S.Y., Jensen, M.C., Gopal, A.K., Pender, B., Budde, L.E., Rossow, J.K., Green, D.J., 등. (2016). Preserved Activity of CD20-Specific Chimeric Antigen Receptor-Expressing T Cells in the Presence of Rituximab. Cancer Immunol Res 4, 509-519.

[0407] Scheller, L., Strittmatter, T., Fuchs, D., Bojar, D., and Fussenegger, M. (2018). Generalized extracellular molecule sensor platform for programming cellular behavior. Nat Chem Biol 14, 723-729.

[0408] Spinelli, L., Carpentier, S., Montanana Sanchis, F., Dalod, M., and Vu Manh, T.P. (2015). BubbleGUM:

automatic extraction of phenotype molecular signatures and comprehensive visualization of multiple Gene Set Enrichment Analyses. BMC Genomics 16, 814.

[0409] Srivastava, S., and Riddell, S.R. (2015). Engineering CAR-T cells: Design concepts. Trends Immunol 36, 494-502.

[0410] Swindells, M.B., Porter, C.T., Couch, M., Hurst, J., Abhinandan, K.R., Nielsen, J.H., Macindoe, G., Hetherington, J., and Martin, A.C. (2017). abYsis: Integrated Antibody Sequence and Structure-Management, Analysis, and Prediction. J Mol Biol 429, 356-364.

[0411] Tanaka, Y., Ono, N., Shima, T., Tanaka, G., Katoh, Y., Nakayama, K., Takatsu, H., and Shin, H.W. (2016). The phospholipid flippase ATP9A is required for the recycling pathway from the endosomes to the plasma membrane. Mol Biol Cell 27, 3883-3893.

[0412] Teeling, J.L., Mackus, W.J., Wiegman, L.J., van den Brakel, J.H., Beers, S.A., French, R.R., van Meerten, T., Ebeling, S., Vink, T., Slootstra, J.W., 등. (2006). The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. J Immunol 177, 362-371.

[0413] Till, B.G., Jensen, M.C., Wang, J., Qian, X., Gopal, A.K., Maloney, D.G., Lindgren, C.G., Lin, Y., Pagel, J.M., Budde, L.E., 등. (2012). CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results. Blood 119, 3940-3950.

[0414] Uchiyama, S., Suzuki, Y., Otake, K., Yokoyama, M., Ohta, M., Aikawa, S., Komatsu, M., Sawada, T., Kagami, Y., Morishima, Y., 등. (2010). Development of novel humanized anti-CD20 antibodies based on affinity constant and epitope. Cancer Sci 101, 201-209.

[0415] Watanabe, K., Terakura, S., Martens, A.C., van Meerten, T., Uchiyama, S., Imai, M., Sakemura, R., Goto, T., Hanajiri, R., Imahashi, N., 등. (2015). Target antigen density governs the efficacy of anti-CD20-CD28-CD3 zeta chimeric antigen receptor-modified effector CD8+ T cells. J Immunol 194, 911-920.

[0416] Watanabe, N., Bajgain, P., Sukumaran, S., Ansari, S., Heslop, H.E., Rooney, C.M., Brenner, M.K., Leen, A.M., and Vera, J.F. (2016). Fine-tuning the CAR spacer improves T-cell potency. Oncoimmunology 5, e1253656.

[0417] Wijewarnasuriya, D., Bebernitz, C., Lopez, A.V., Rafiq, S., and Brentjens, R.J. (2020). Excessive Costimulation Leads to Dysfunction of Adoptively Transferred T Cells. Cancer Immunol Res 8, 732-742.

[0418] Yamamoto, T.N., Kishton, R.J., and Restifo, N.P. (2019). Developing neoantigen-targeted T cell-based treatments for solid tumors. Nat Med 25, 1488-1499.

[0419] Zah, E., Lin, M.Y., Silva-Benedict, A., Jensen, M.C., and Chen, Y.Y. (2016). T Cells Expressing CD19/CD20 Bispecific Chimeric Antigen Receptors Prevent Antigen Escape by Malignant B Cells. Cancer Immunol Res 4, 498-508.

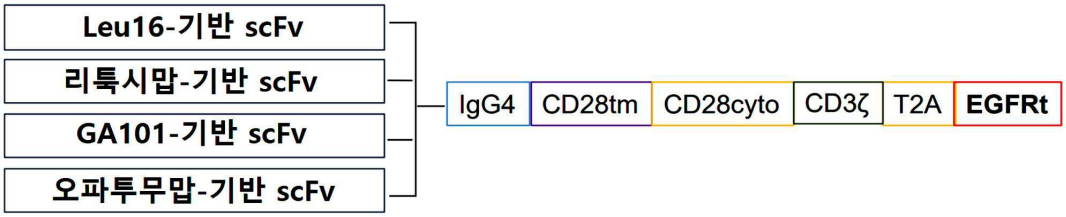
[0420] Zettlitz, K.A., Tavare, R., Knowles, S.M., Steward, K.K., Timmerman, J.M., and Wu, A.M. (2017). ImmunoPET of Malignant and Normal B Cells with (89)Zr- and (124)I-Labeled Obinutuzumab Antibody Fragments Reveals Differential CD20 Internalization In Vivo. Clin Cancer Res 23, 7242-7252.

[0421] Zhang, W.Y., Wang, Y., Guo, Y.L., Dai, H.R., Yang, Q.M., Zhang, Y.J., Zhang, Y., Chen, M.X., Wang, C.M., Feng, K.C., 등. (2016). Treatment of CD20-directed Chimeric Antigen Receptor-modified T cells in patients with relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma: an early phase IIa trial report. Signal Transduct Target Ther 1, 16002.

[0422] Zhao, Z., Condomines, M., van der Stegen, S.J.C., Perna, F., Kloss, C.C., Gunset, G., Plotkin, J., and Sadelain, M. (2015). Structural Design of Engineered Costimulation Determines Tumor Rejection Kinetics and Persistence of CAR T Cells. Cancer Cell 28, 415-428.

도면

도면1a



도면1b

```
                                                CDRL1                                   CDRL2
Leu16_VL          1 DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSV------NYMDWYQKKPGSSPKPWIYATSNLA
리툭시맙-VL       1 QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSV------SYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLA
GA101_VL          1 DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLV
오파투무맙-VL     1 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVS-----SYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA

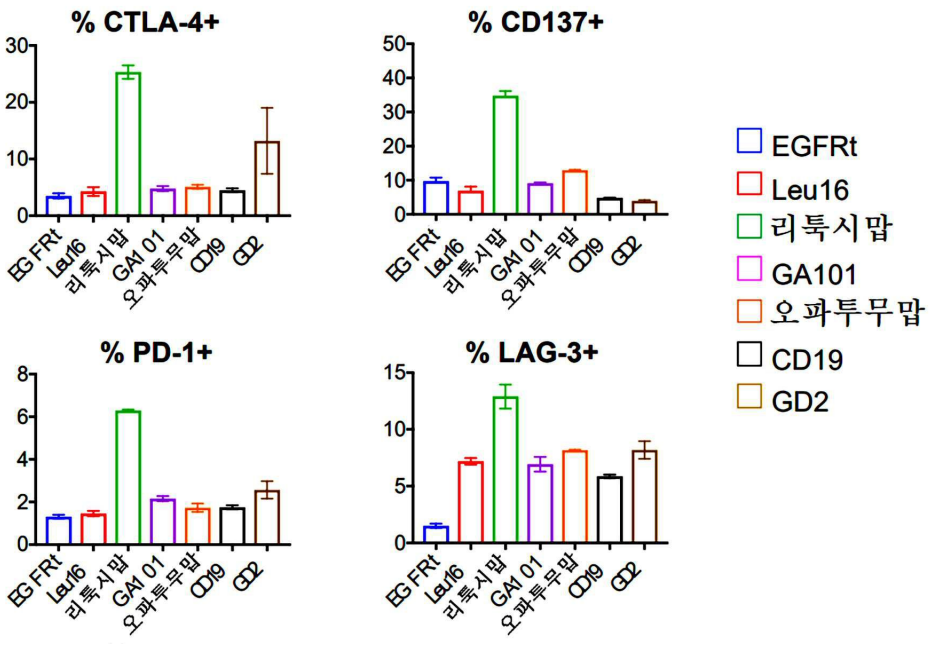
                                                CDRL3
Leu16_VL         55 SGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIK
리툭시맙-VL      55 SGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIK
GA101_VL         61 SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGTKVEIK
오파투무맙-VL    56 TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIK

                                        CDRH1                   CDRH2
Leu16_VH          1 EVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSY
리툭시맙-VH       1 QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSY
GA101_VH          1 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWMNWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDTDY
오파투무맙-VH     1 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGY

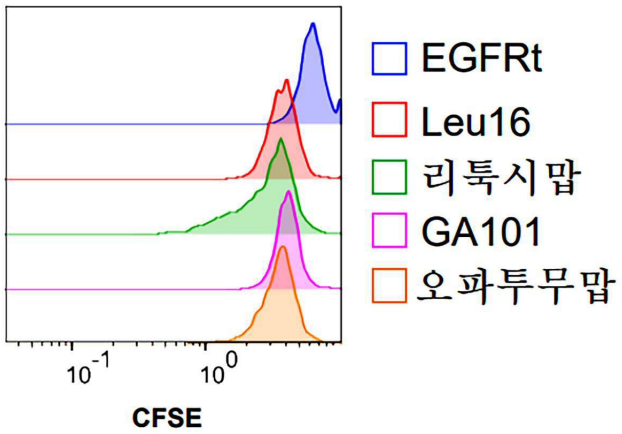
                                                CDRH3
Leu16_VH         61 NQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTV
리툭시맙-VH      61 NQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYF-NVWGAGTTVTV
GA101_VH         61 NGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTLVTVSS-
오파투무맙-VH    61 ADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVTV

Leu16_VH        121 SS
리툭시맙-VH     120 SS
GA101_VH            --
오파투무맙-VH   121 SS
```

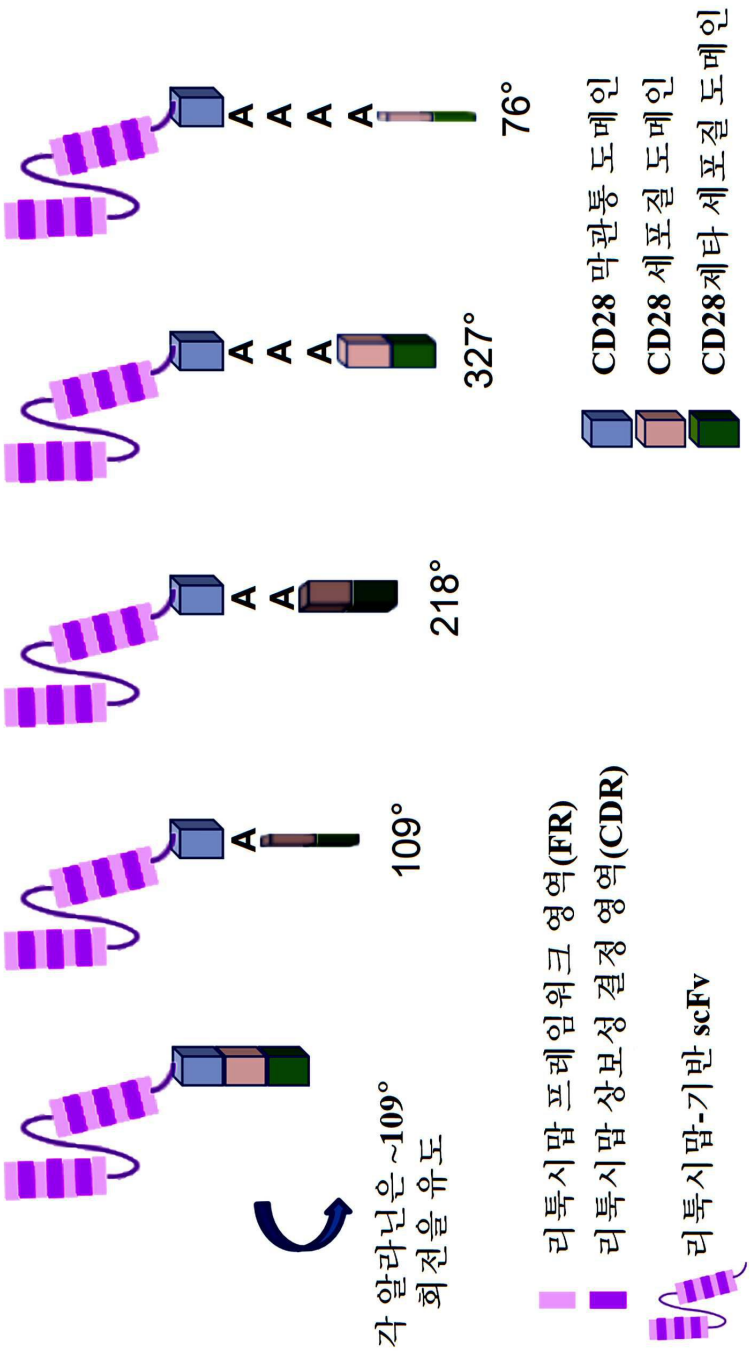
도면2a


% CTLA-4+
% CD137+
% PD-1+
% LAG-3+
EGFRt
Leu16
리툭시맙
GA101
오파투무맙
CD19
GD2

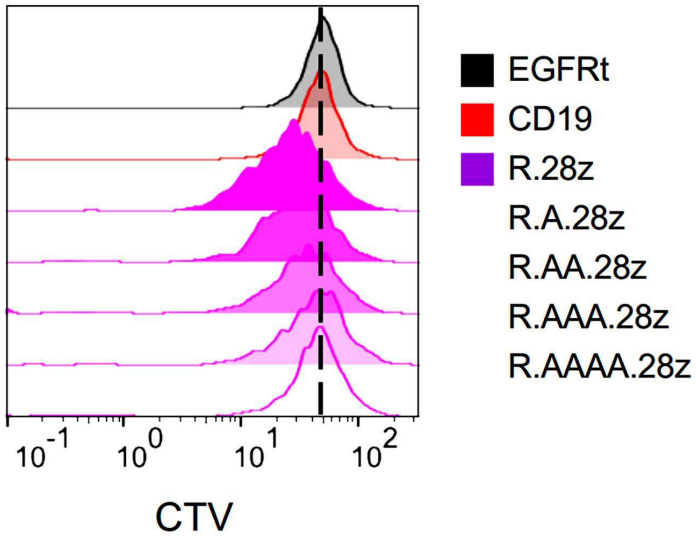
도면2b


EGFRt
Leu16
리툭시맙
GA101
오파투무맙
CFSE

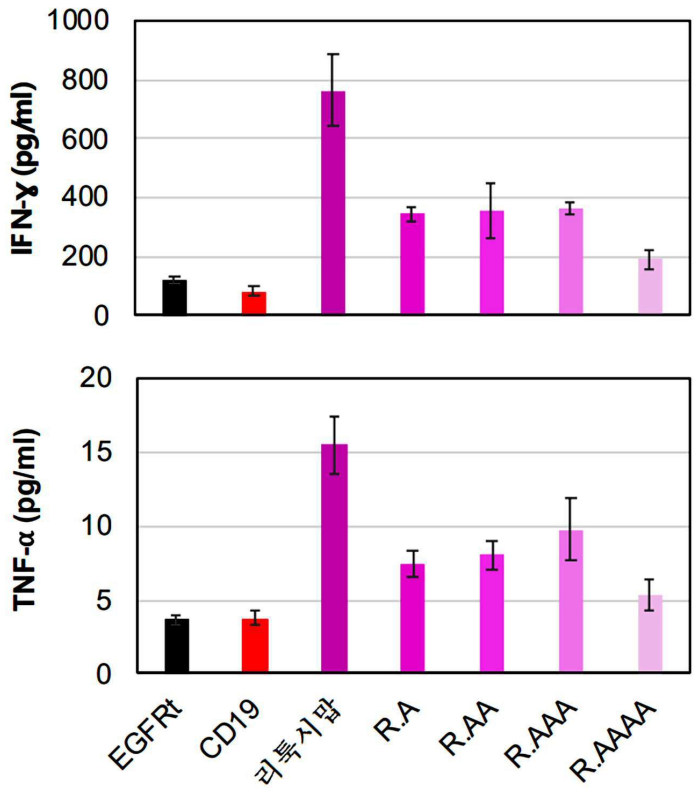
도면3


각 알라닌은 ~109° 회전을 유도
109°
218°
327°
76°
리툭시맙 프레임워크 영역(FR)
리툭시맙 상보성 결정 영역(CDR)
리툭시맙-기반 scFv
CD28 막관통 도메인
CD28 세포질 도메인
CD28제타 세포질 도메인

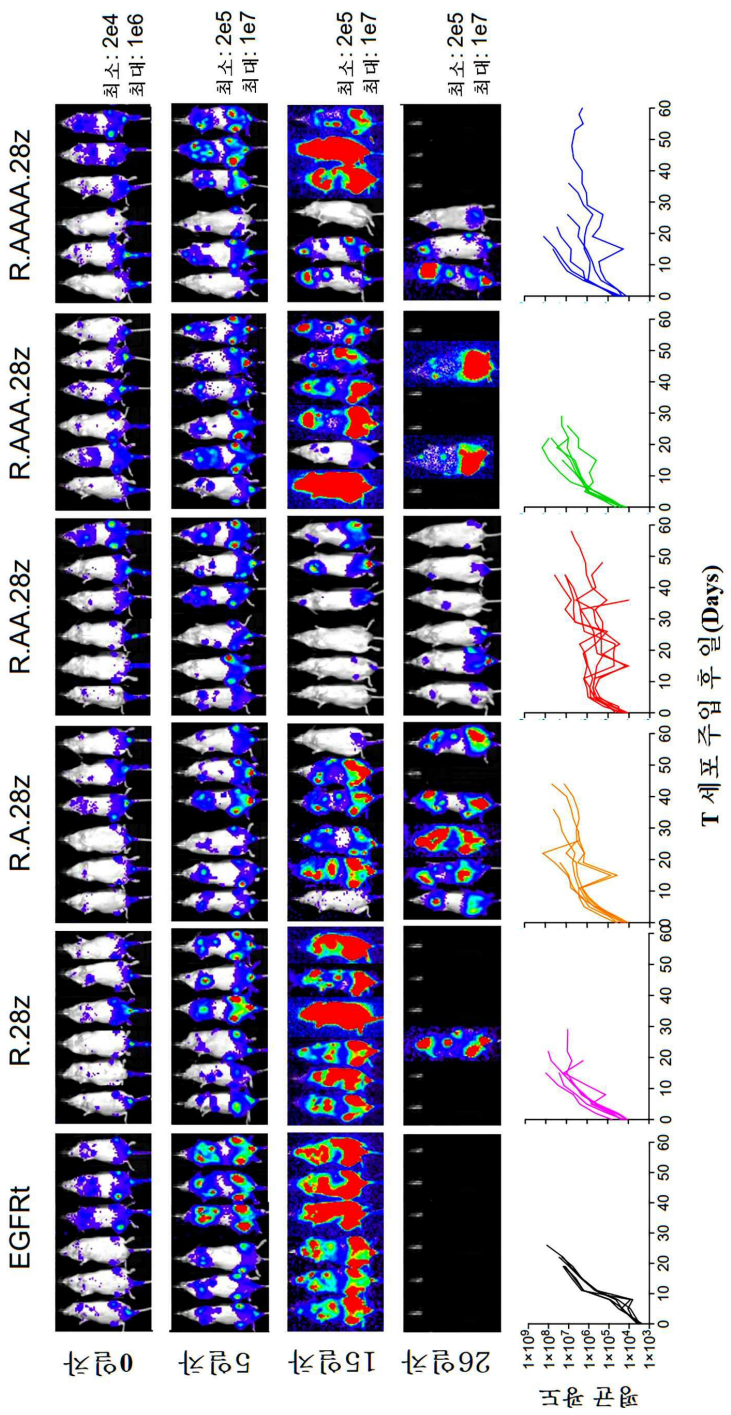
도면4a


EGFRt
CD19
R.28z
R.A.28z
R.AA.28z
R.AAA.28z
R.AAAA.28z
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
CTV

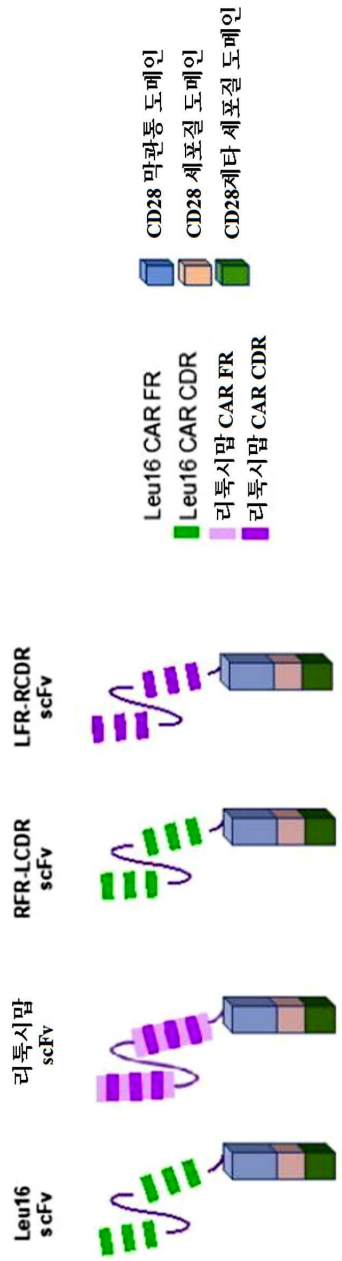
도면4b


IFN-γ (pg/ml)
1000
800
600
400
200
0
TNF-α (pg/ml)
20
15
10
5
0
EGFRt
CD19
리툭시맙
R.A
R.AA
R.AAA
R.AAAA

도면5


EGFRt
R.28z
R.A.28z
R.AA.28z
R.AAA.28z
R.AAAA.28z
최소: 2e4
최대: 1e6
최소: 2e5
최대: 1e7
최소: 2e5
최대: 1e7
최소: 2e5
최대: 1e7
0일차
5일차
15일차
26일차
평균 광도
T 세포 주입 후 일(Days)

도면6a


CD28 막관통 도메인
CD28 세포질 도메인
CD28계타 세포질 도메인
Leu16 CAR FR
Leu16 CAR CDR
리툭시맙 CAR FR
리툭시맙 CAR CDR
LFR-RCDR scFv
RFR-LCDR scFv
리툭시맙 scFv
Leu16 scFv

도면6b

```
                                                CDRL1                                CDRL2
Leu16_VL          1 DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSV------NYMDWYQKKPGSSPKPWIYATSNLA
리툭시맙-VL       1 QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSV------SYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLA
RFR-LCDR_VL       1 QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSV------NYMDWFQQKPGSSPKPWIYATSNLA
LFR-RCDR_VL       1 DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSV------SYIHWYQKKPGSSPKPWIYATSNLA

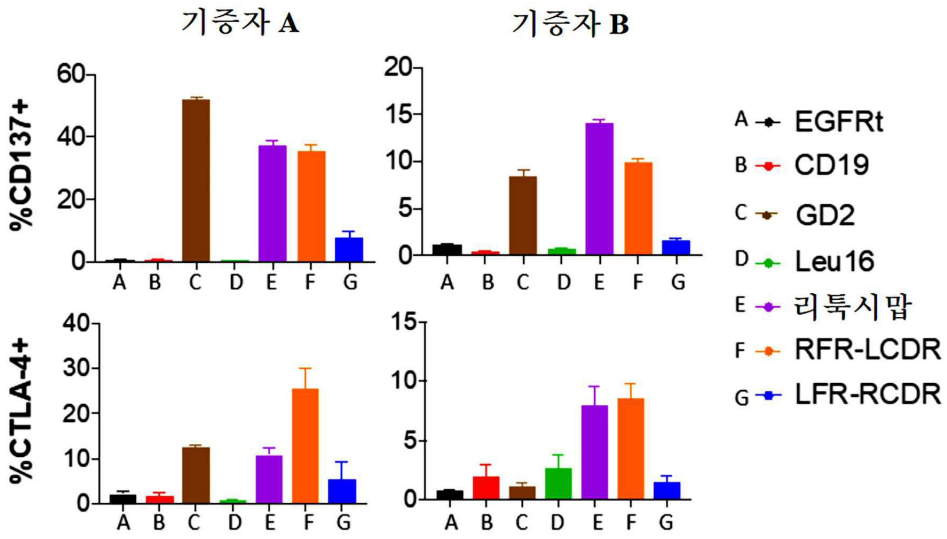
                                                CDRL3
Leu16_VL         55 SGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIK
리툭시맙-VL      55 SGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIK
RFR-LCDR_VL      61 SGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIK
LFR-RCDR_VL      56 SGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIK

                                        CDRH1                CDRH2
Leu16_VH          1 EVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSY
리툭시맙-VH       1 QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSY
RFR-LCDR_VH       1 QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSY
LFR-RCDR_VH       1 EVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSY

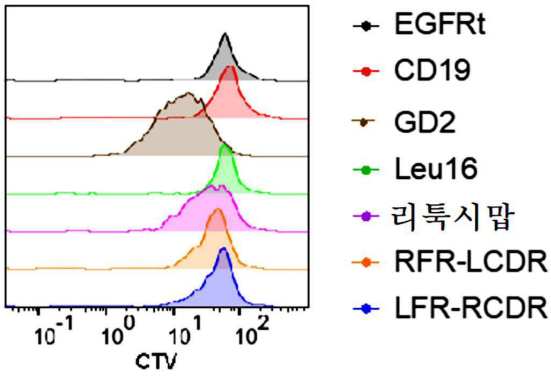
                                                CDRH3
Leu16_VH         61 NQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTV
리툭시맙-VH      61 NQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYF-NVWGAGTTVTV
RFR-LCDR_VH      61 NQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTV
LFR-RCDR_VH      61 NQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSTYYGGDWYF-NVWGAGTTVTV


Leu16_VH        121 SS
리툭시맙-VH     120 SS
RFR-LCDR_VH     121 SS
LFR-RCDR_VH     120 SS
```

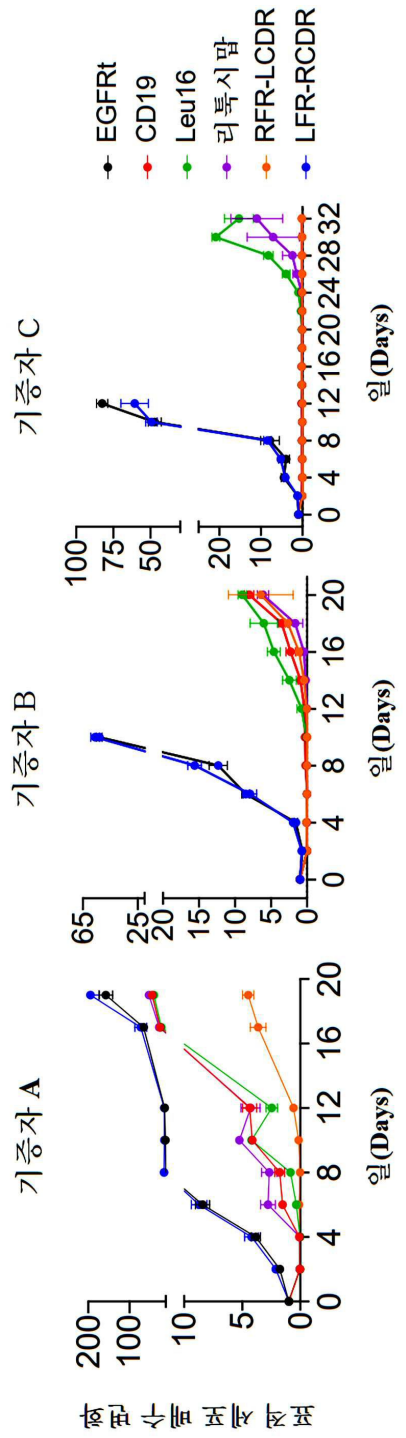
도면7a



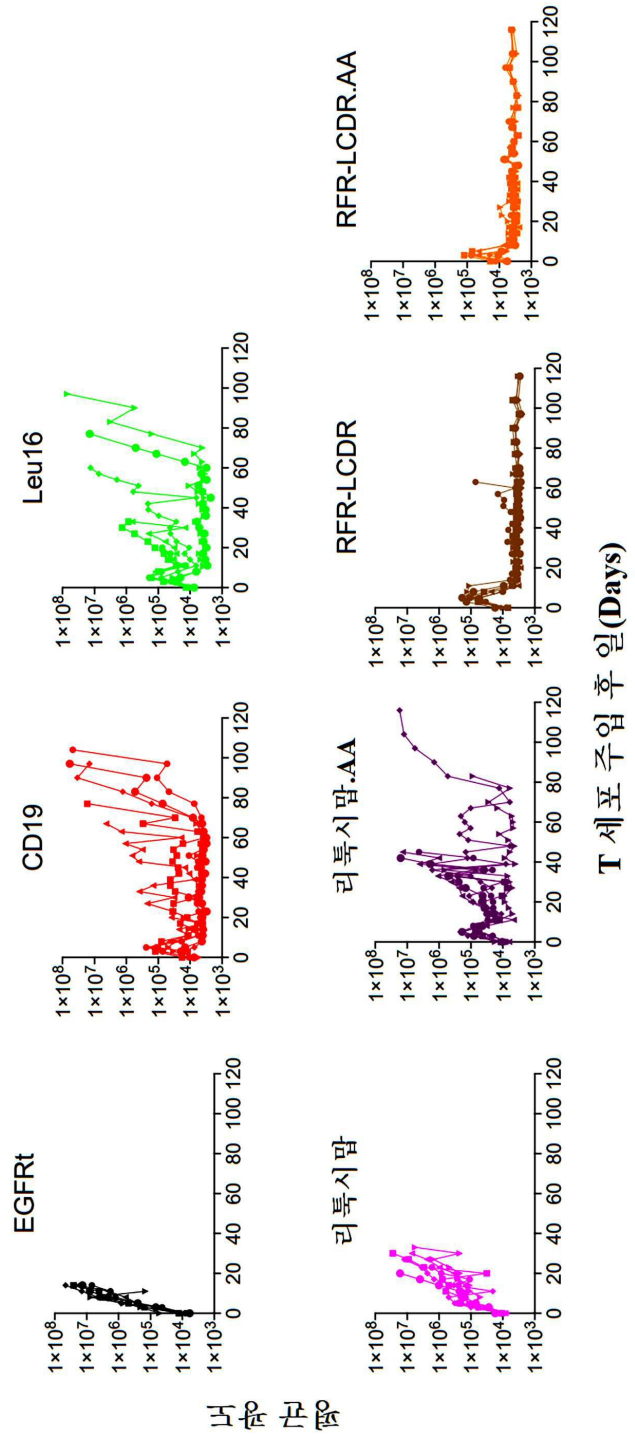
도면7b


EGFRt
CD19
GD2
Leu16
리툭시맙
RFR-LCDR
LFR-RCDR
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
CTV

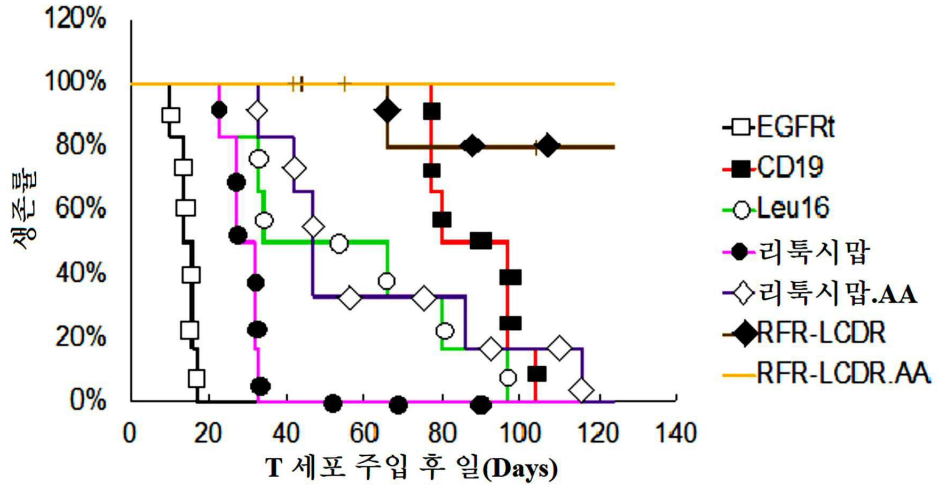
도면8


표적 세포 배수 변화
기증자 A
기증자 B
기증자 C
일(Days)
일(Days)
일(Days)
EGFRt
CD19
Leu16
리툭시맙
RFR-LCDR
LFR-RCDR

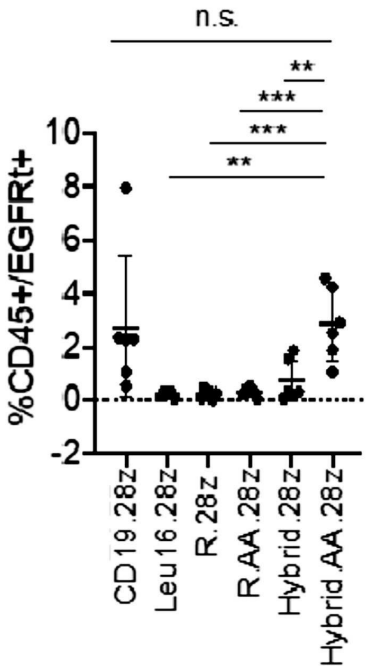
도면9a


EGFRt
CD19
Leu16
리툭시맙
리툭시맙.AA
RFR-LCDR
RFR-LCDR.AA
평균 광도
T 세포 주입 후 일(Days)

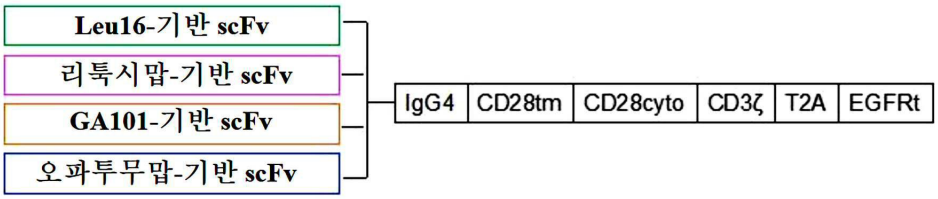
도면9b



도면9c

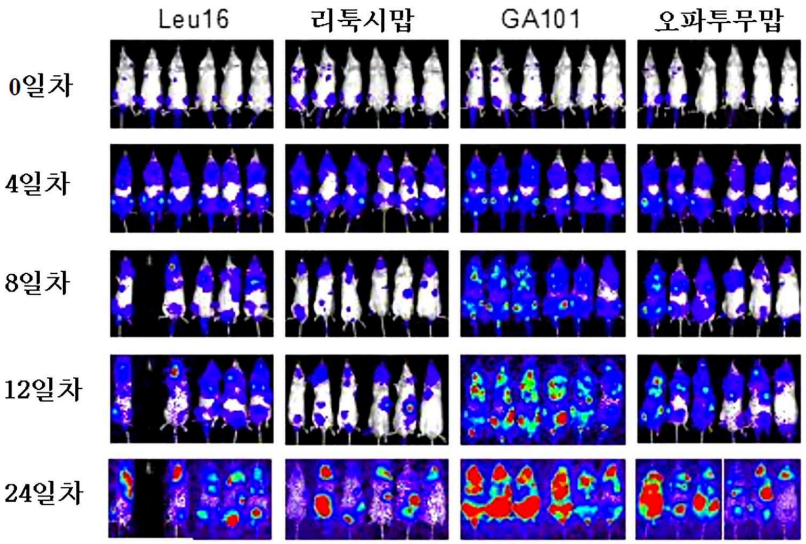


도면10a

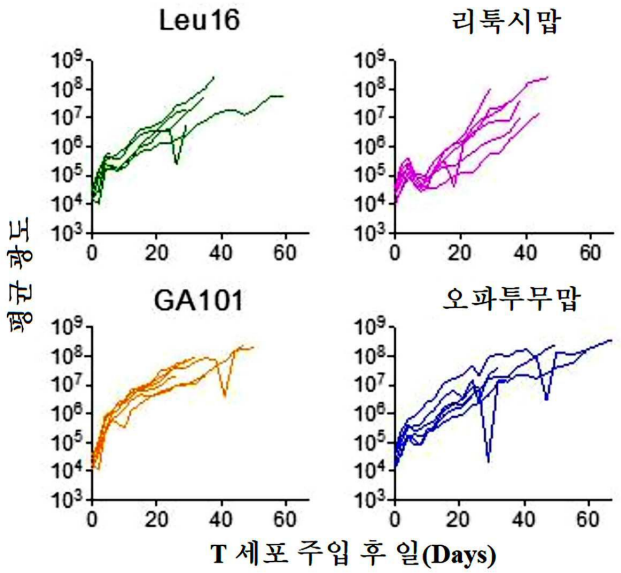


항체	Kd	CDRL1	CDRL2	CDRL3	CDRH1	CDRH2
Leu 16	N/A	1/10A	1/7A	1/9A	1/10A	2/10A
리툭시맙	4.5 ~ 5.45 nM	1/10A	1/7A	1/9A	1/10A	2/10A
GA101	4.0 nM	4/16A	1/7A	1/9A	1/10A	2/10A
Ofatumumab	4.76 +/- 0.99 nM	2/11A	1/7A	1/9A	1/10A	3/10B

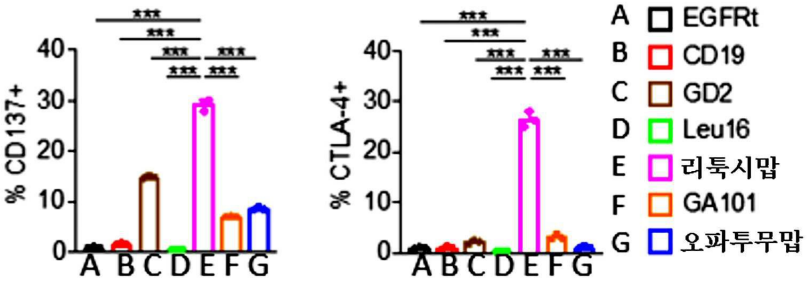
도면10b



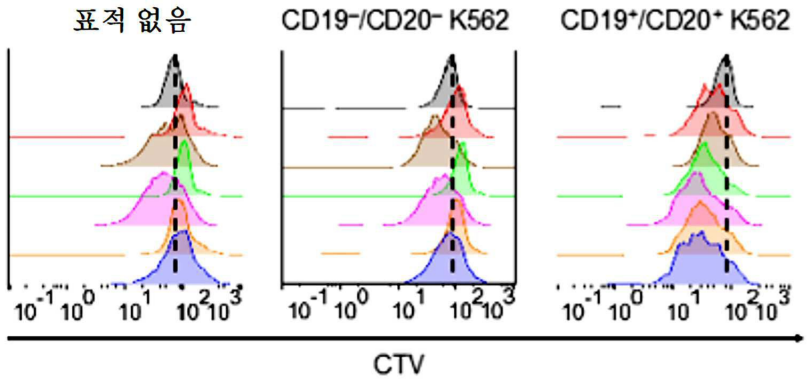
도면10c



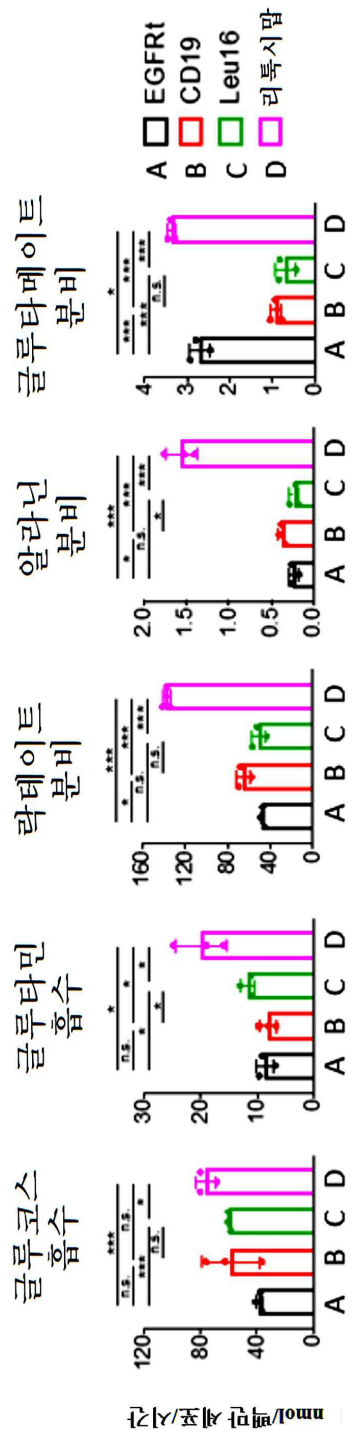
도면10d



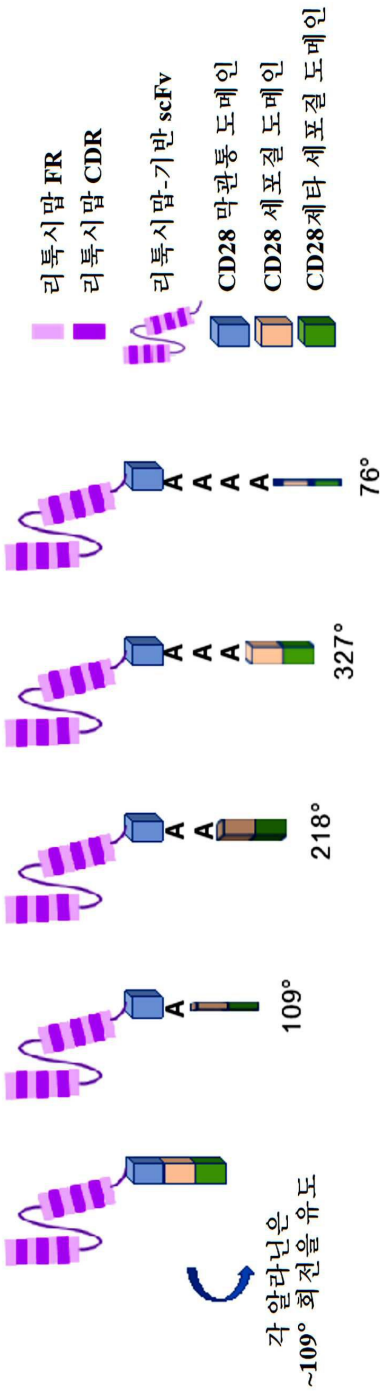
도면10e



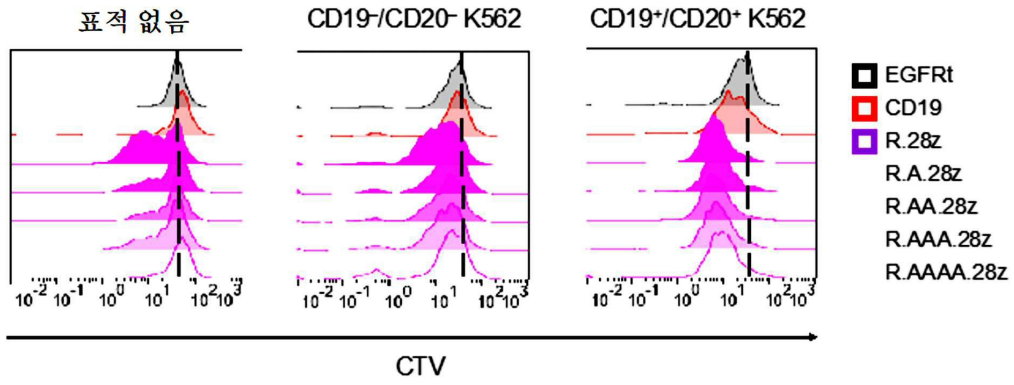
도면10f


글루코스 흡수
글루타민 흡수
락테이트 분비
알라닌 분비
글루타메이트 분비
nmol/백만 세포/시간
A B C D
EGFRt
CD19
Leu16
리툭시맙

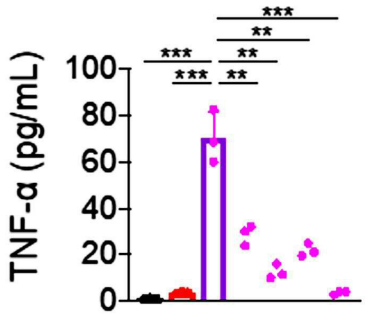
도면11a


리툭시맙 FR
리툭시맙 CDR
리툭시맙-기반 scFv
CD28 막관통 도메인
CD28 세포질 도메인
CD28제타 세포질 도메인
A
A
A
A
76°
A
A
A
327°
A
A
218°
A
109°
각 알라닌은
~109° 회전을 유도

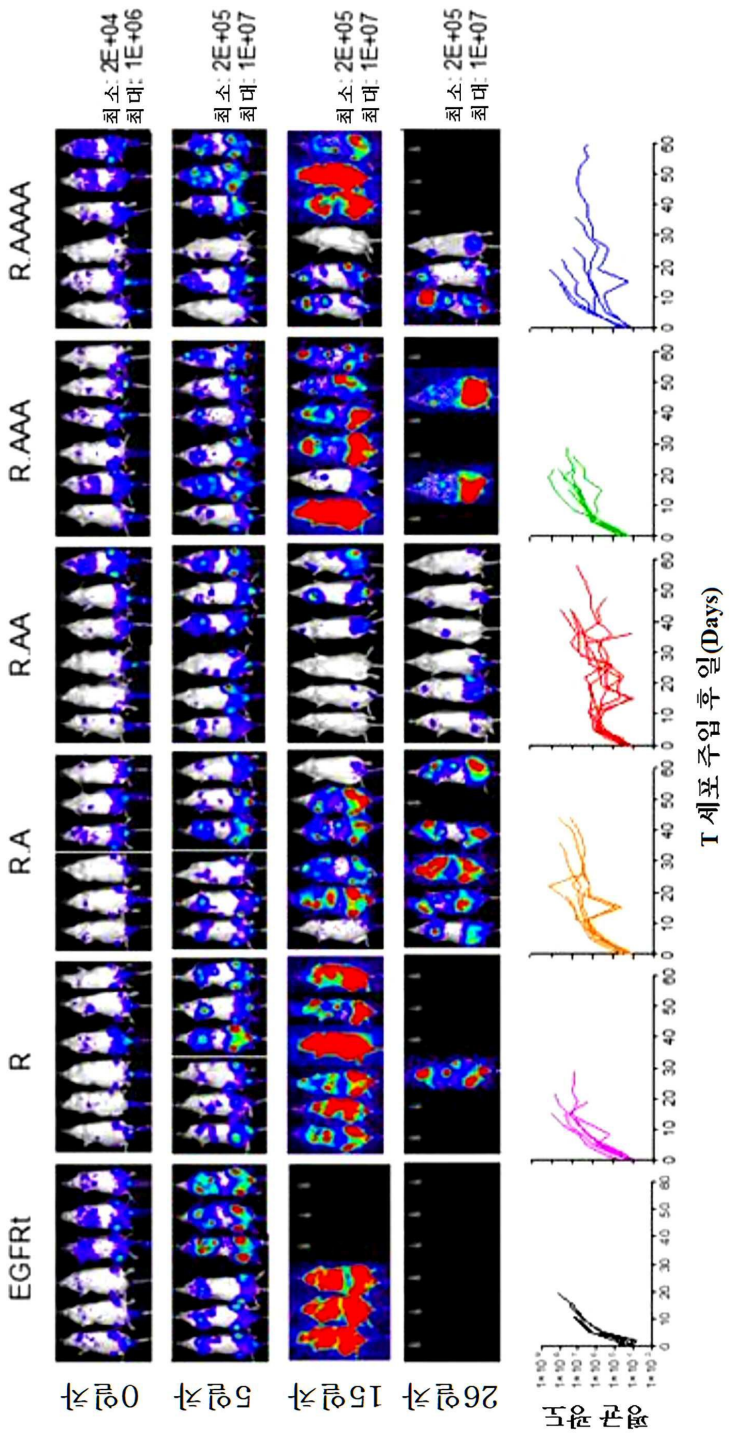
도면11b


표적 없음
CD19-/CD20- K562
CD19+/CD20+ K562
EGFRt
CD19
R.28z
R.A.28z
R.AA.28z
R.AAA.28z
R.AAAA.28z
CTV

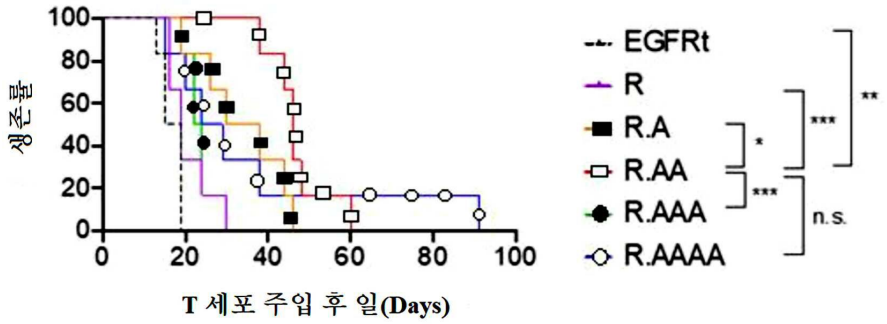
도면11c


TNF-α (pg/mL)
100
80
60
40
20
0
***
**

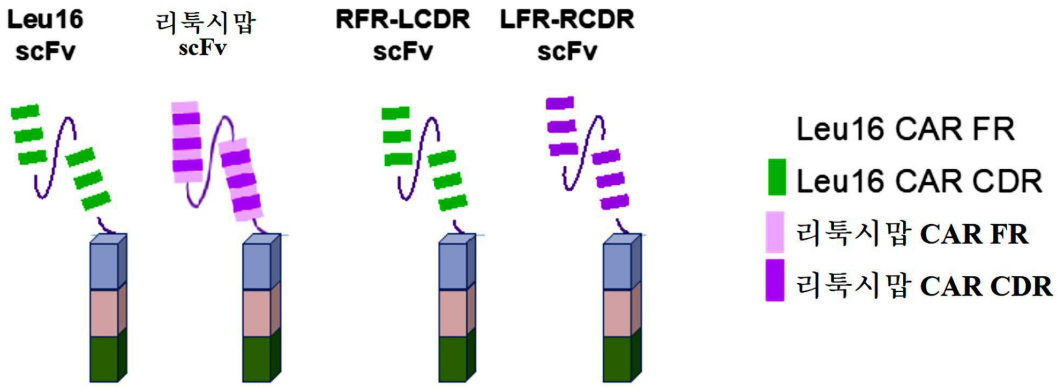
도면11d


EGFRt
R
R.A
R.AA
R.AAA
R.AAAA
최소: 2E+04
최대: 1E+06
최소: 2E+05
최대: 1E+07
최소: 2E+05
최대: 1E+07
최소: 2E+05
최대: 1E+07
0일차
5일차
15일차
26일차
평균 광도
T 세포 주입 후 일(Days)

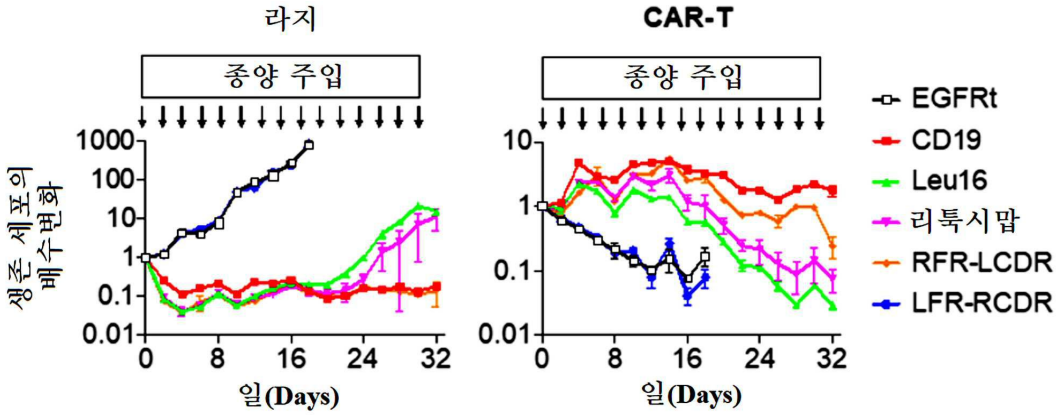
도면11e



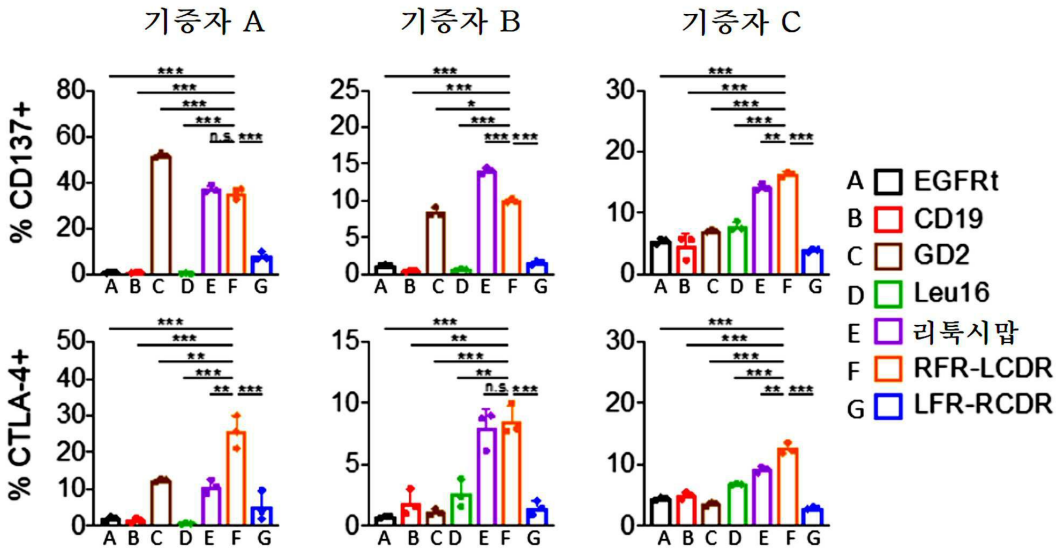
도면12a



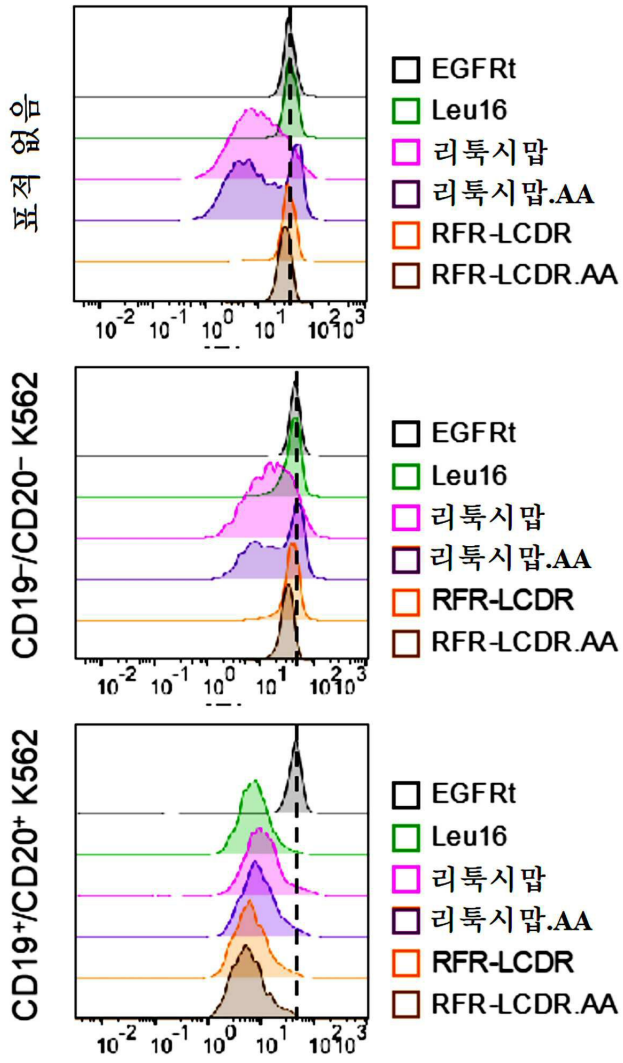
도면12b



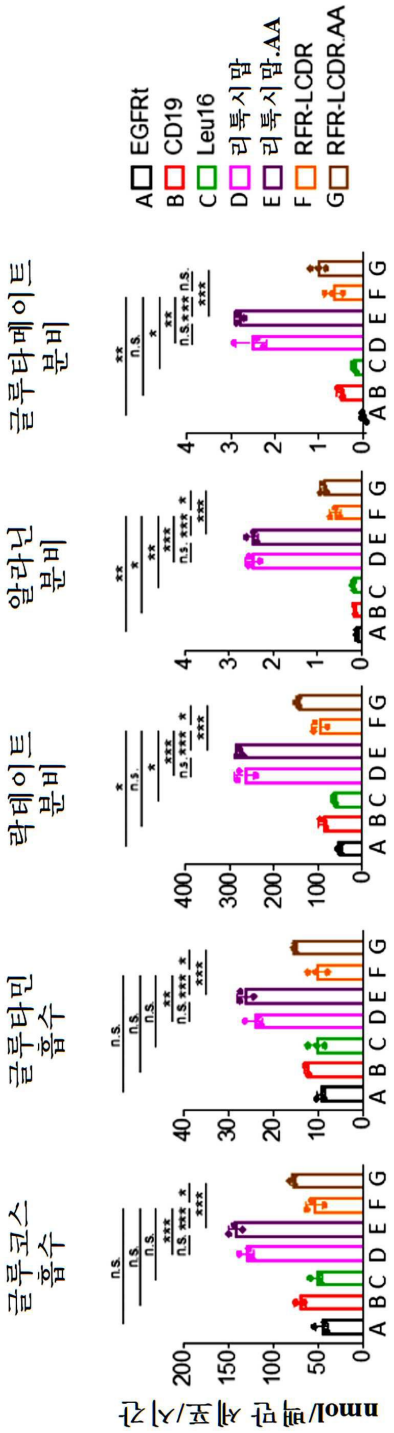
도면12c


기증자 A
기증자 B
기증자 C
% CD137+
% CTLA-4+
A EGFRt
B CD19
C GD2
D Leu16
E 리툭시맙
F RFR-LCDR
G LFR-RCDR

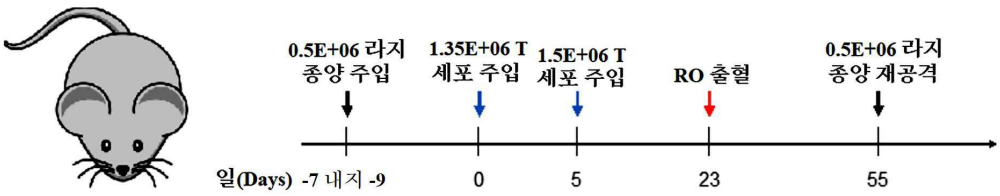
도면12d


표적 없음
CD19-/CD20- K562
CD19+/CD20+ K562
EGFRt
Leu16
리툭시맙
리툭시맙.AA
RFR-LCDR
RFR-LCDR.AA

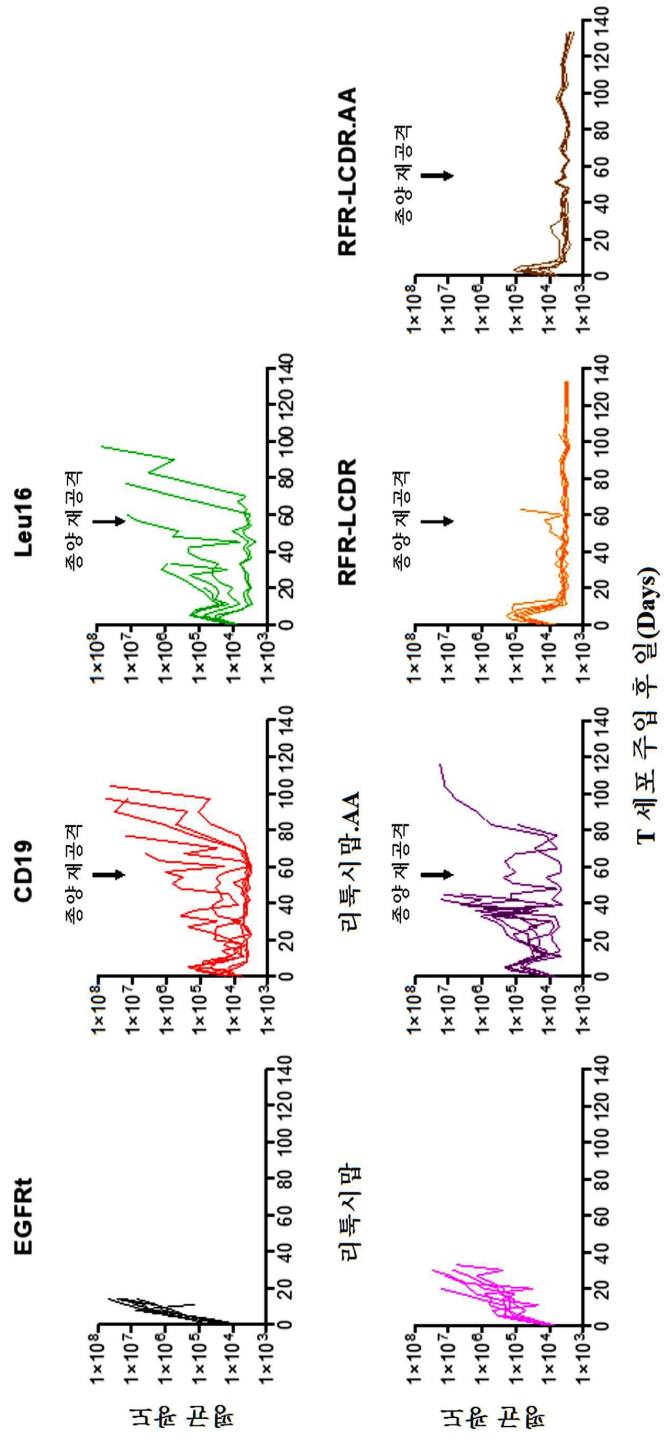
도면12e


A EGFRt
B CD19
C Leu16
D 리툭시맙
E 리툭시맙.AA
F RFR-LCDR
G RFR-LCDR.AA
글루코스 흡수
글루타민 흡수
락테이트 분비
알라닌 분비
글루타메이트 분비
nmol/백만 세포/시간

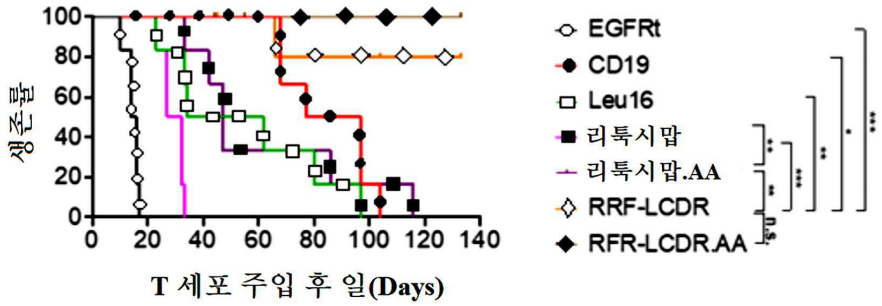
도면13a


0.5E+06 라지 종양 주입
1.35E+06 T 세포 주입
1.5E+06 T 세포 주입
RO 출혈
0.5E+06 라지 종양 재공격
일(Days) -7 내지 -9
0
5
23
55

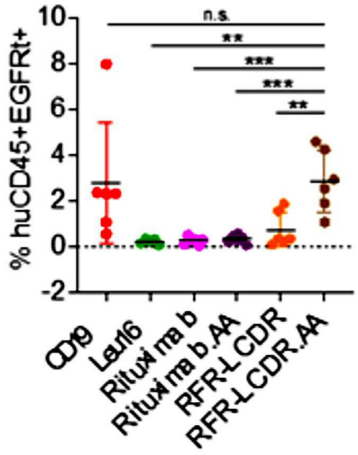
도면13b


EGFRt
CD19
Leu16
리툭시맙
리툭시맙.AA
RFR-LCDR
RFR-LCDR.AA
종양 제공격
평균 광도
T 세포 주입 후 일(Days)

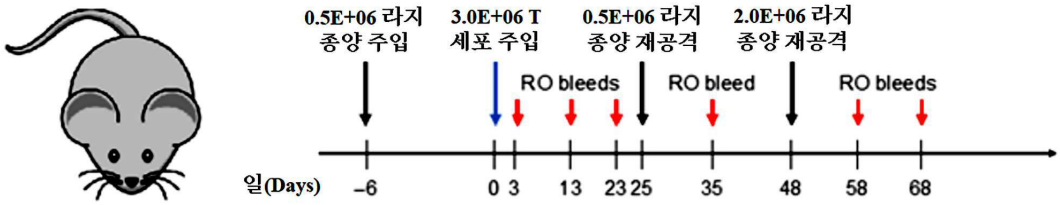
도면13c



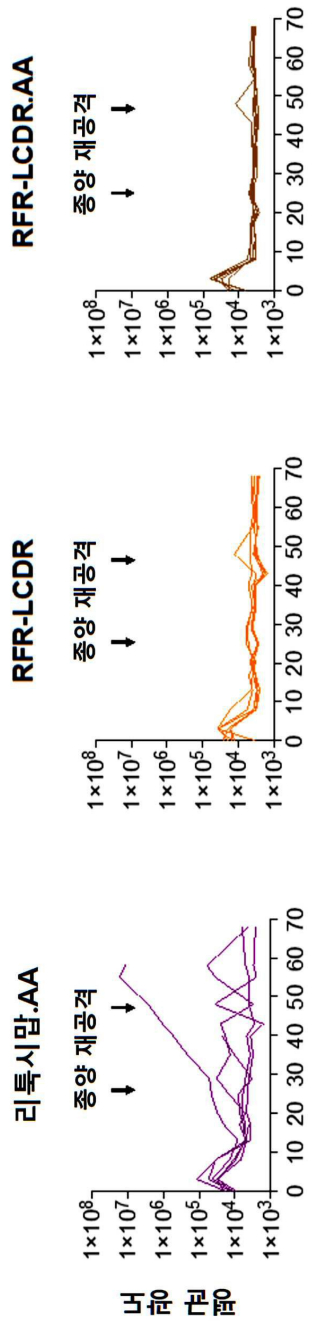
도면13d



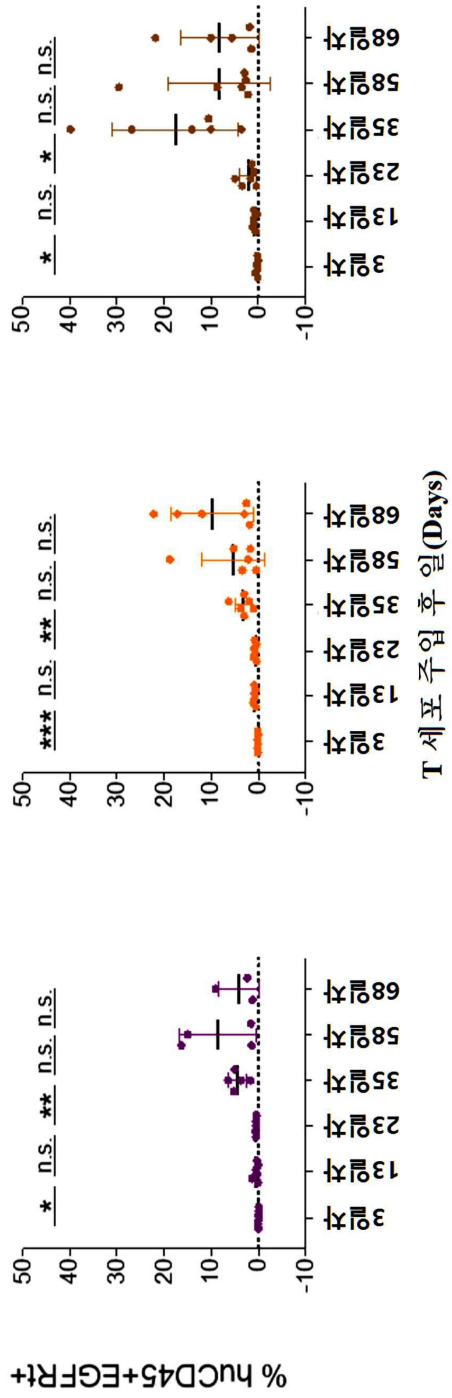
도면13e



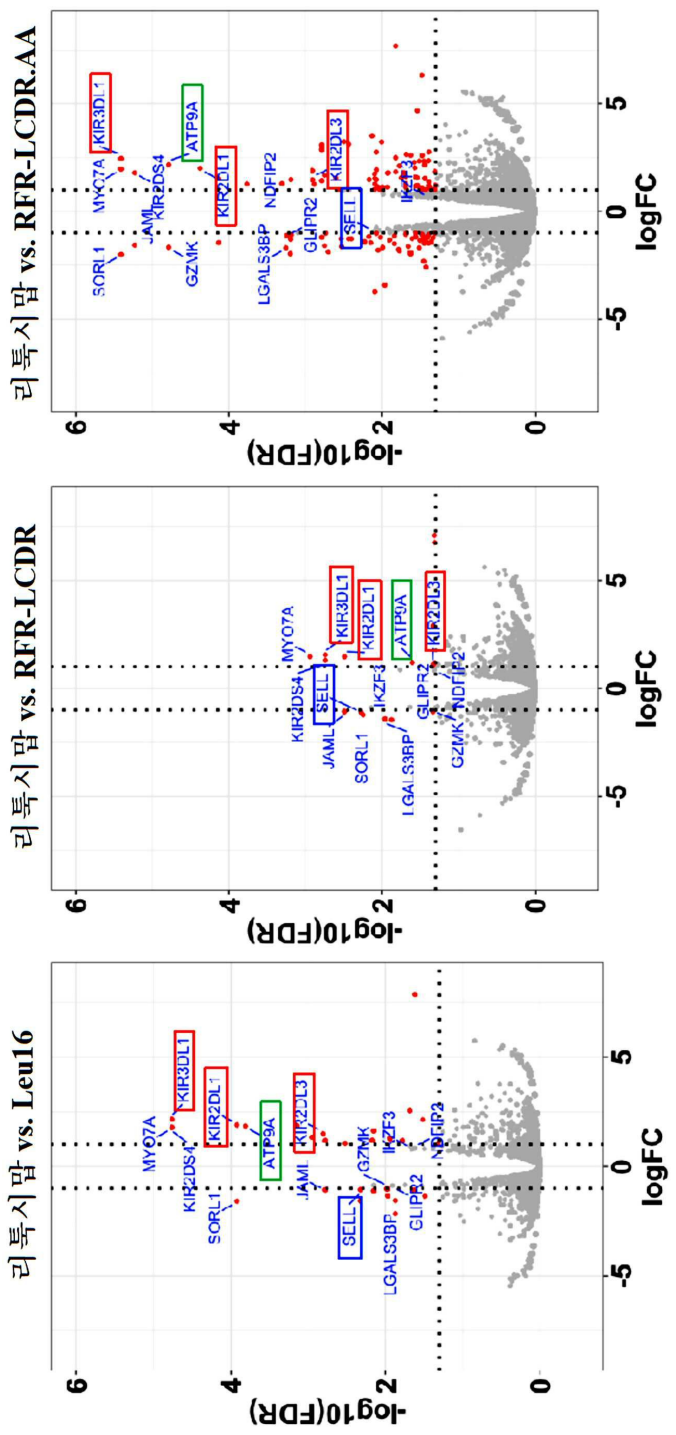
도면13f


RFR-LCDR.AA
RFR-LCDR
리툭시맙.AA
종양 재공격
종양 재공격
종양 재공격
평균 광도
1×10^8
1×10^7
1×10^6
1×10^5
1×10^4
1×10^3
0 10 20 30 40 50 60 70

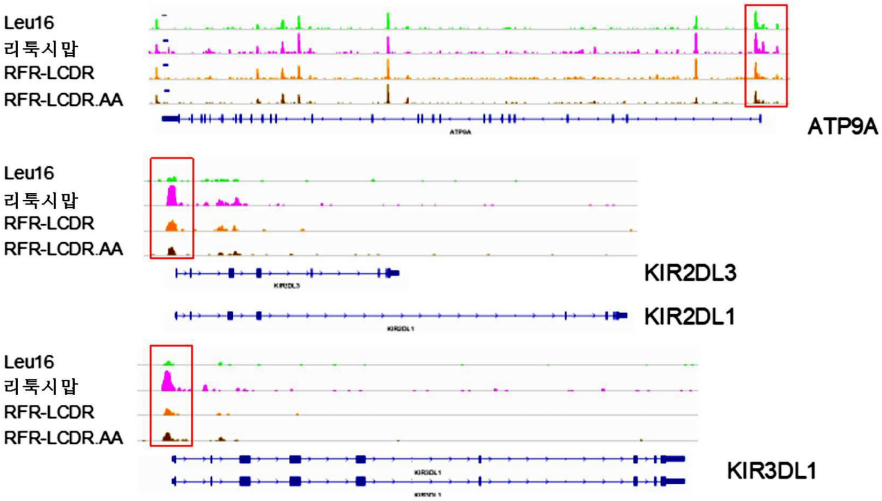
도면13g


% huCD45+EGFRt+
T 세포 주입 후 일(Days)
3일차
13일차
23일차
35일차
58일차
68일차
50
40
30
20
10
0
-10
*
n.s.
**
***
n.s.

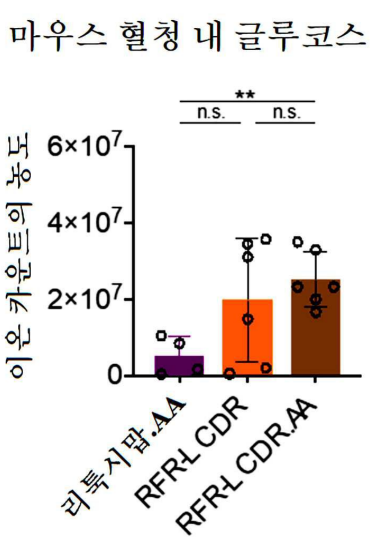
도면14a


리툭시맙 vs. RFR-LCDR.AA
리툭시맙 vs. RFR-LCDR
리툭시맙 vs. Leu16
-log10(FDR)
logFC
MYO7A
KIR3DL1
JAML
KIR2DS4
ATP9A
KIR2DL1
SORL1
GZMK
LGALS3BP
NDFIP2
GLIPR2
SELL
IKZF3
KIR2DL3

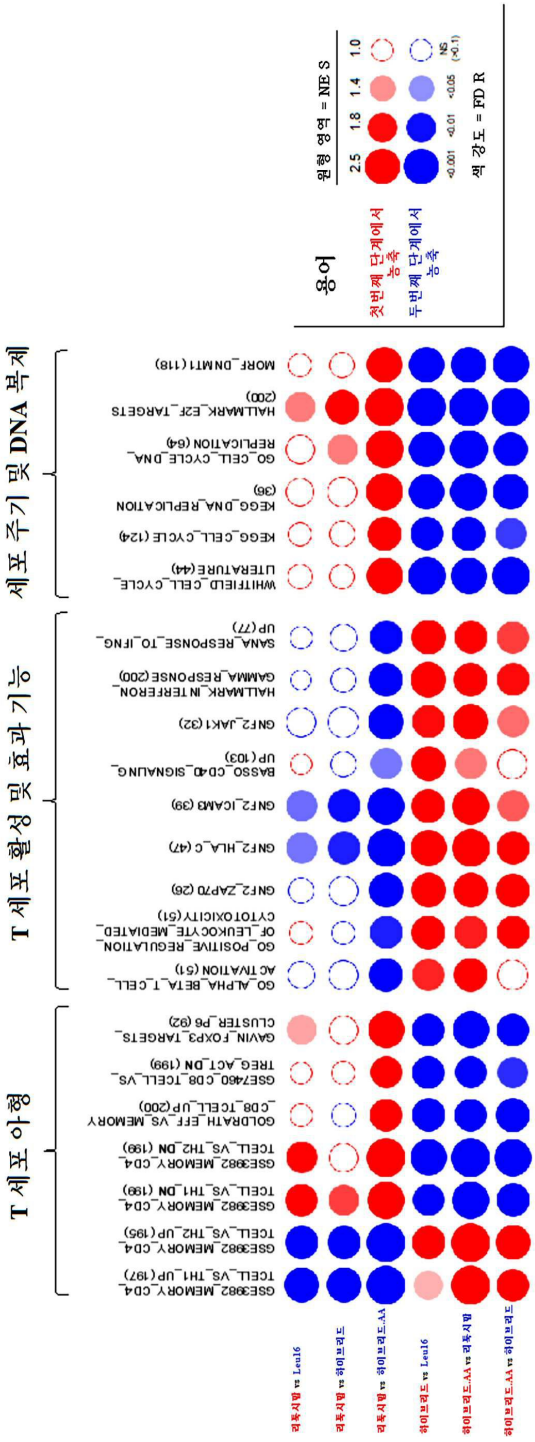
도면14b


Leu16
리툭시맙
RFR-LCDR
RFR-LCDR.AA
ATP9A
Leu16
리툭시맙
RFR-LCDR
RFR-LCDR.AA
KIR2DL3
KIR2DL1
Leu16
리툭시맙
RFR-LCDR
RFR-LCDR.AA
KIR3DL1

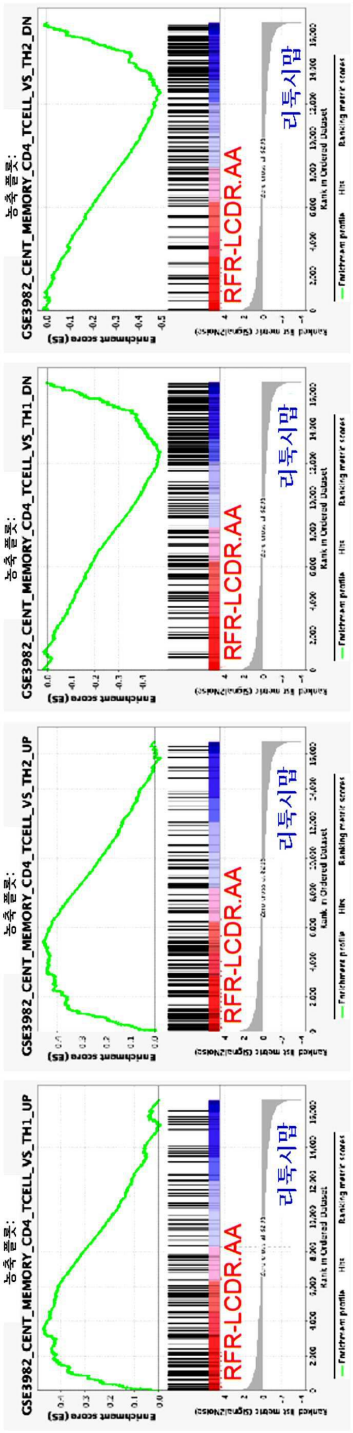
도면14c


마우스 혈청 내 글루코스
**
n.s.
n.s.
이온 카운트의 농도
6×10^7
4×10^7
2×10^7
0
리툭시맙.AA
RFR-L CDR
RFR-L CDR.AA

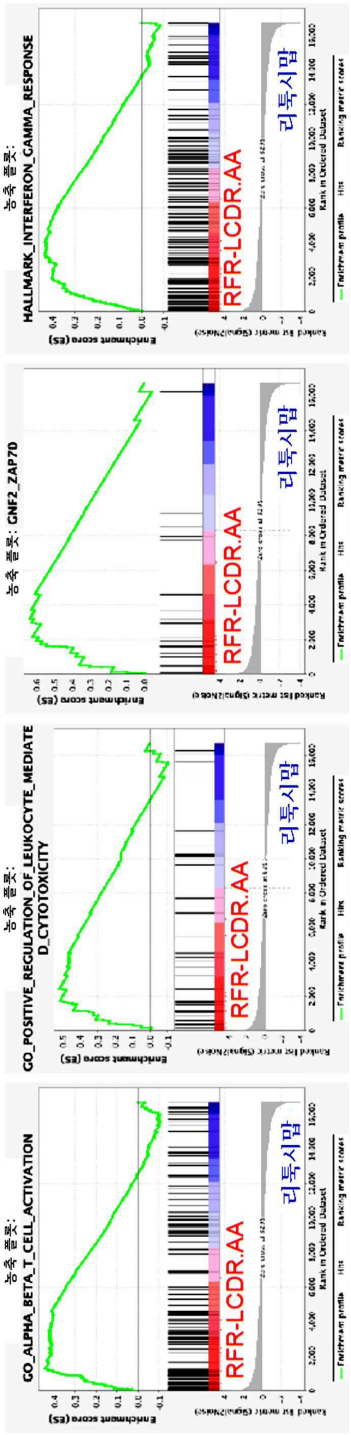
도면15a


T 세포 아형
T 세포 활성 및 효과 기능
세포 주기 및 DNA 복제
GSE3982_MEMORY_CD4_TCELL_VS_TH1_UP (197)
GSE3982_MEMORY_CD4_TCELL_VS_TH2_UP (195)
GSE3982_MEMORY_CD4_TCELL_VS_TH1_DN (199)
GSE3982_MEMORY_CD4_TCELL_VS_TH2_DN (199)
GOLDRATH_EFF_VS_MEMORY_CD8_TCELL_UP (200)
GSE7460_CD8_TCELL_VS_TREG_ACT_DN (199)
GAVIN_FOXP3_TARGETS_CLUSTER_P6 (92)
GO_ALPHA_BETA_T_CELL_ACTIVATION (51)
GO_POSITIVE_REGULATION_OF_LEUKOCYTE_MEDIATED_CYTOTOXICITY (51)
GNF2_ZAP70 (26)
GNF2_HLA_C (47)
GNF2_ICAM3 (39)
BASSO_CD40_SIGNALING_UP (103)
GNF2_JAK1 (32)
HALLMARK_INTERFERON_GAMMA_RESPONSE (200)
SANA_RESPONSE_TO_IFNG_UP (77)
WHITFIELD_CELL_CYCLE_LITERATURE (44)
KEGG_CELL_CYCLE (124)
KEGG_DNA_REPLICATION (36)
GO_CELL_CYCLE_DNA_REPLICATION (64)
HALLMARK_E2F_TARGETS (200)
MORF_DNMT1 (118)
휘록시텝 vs Leu16
휘록시텝 vs 휘이브리드
휘록시텝 vs 휘이브리드_AA
휘이브리드 vs Leu16
휘이브리드_AA vs 휘록시텝
휘이브리드_AA vs 휘이브리드
용어
첫번째 단계에서 농축
두번째 단계에서 농축
원형 영역 = NES
2.5
1.8
1.4
1.0
색 강도 = FDR
<0.001
<0.01
<0.05
NS (>0.1)

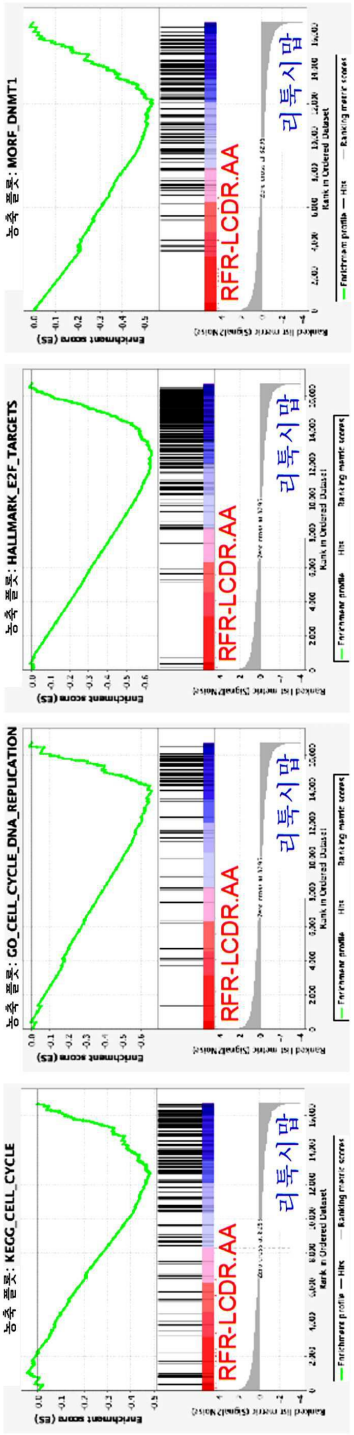
도면15b


GSE3982_CENT_MEMORY_CD4_TCELL_VS_TH1_UP
GSE3982_CENT_MEMORY_CD4_TCELL_VS_TH2_UP
GSE3982_CENT_MEMORY_CD4_TCELL_VS_TH1_DN
GSE3982_CENT_MEMORY_CD4_TCELL_VS_TH2_DN
RFR-LCDR.AA
리툭시맙

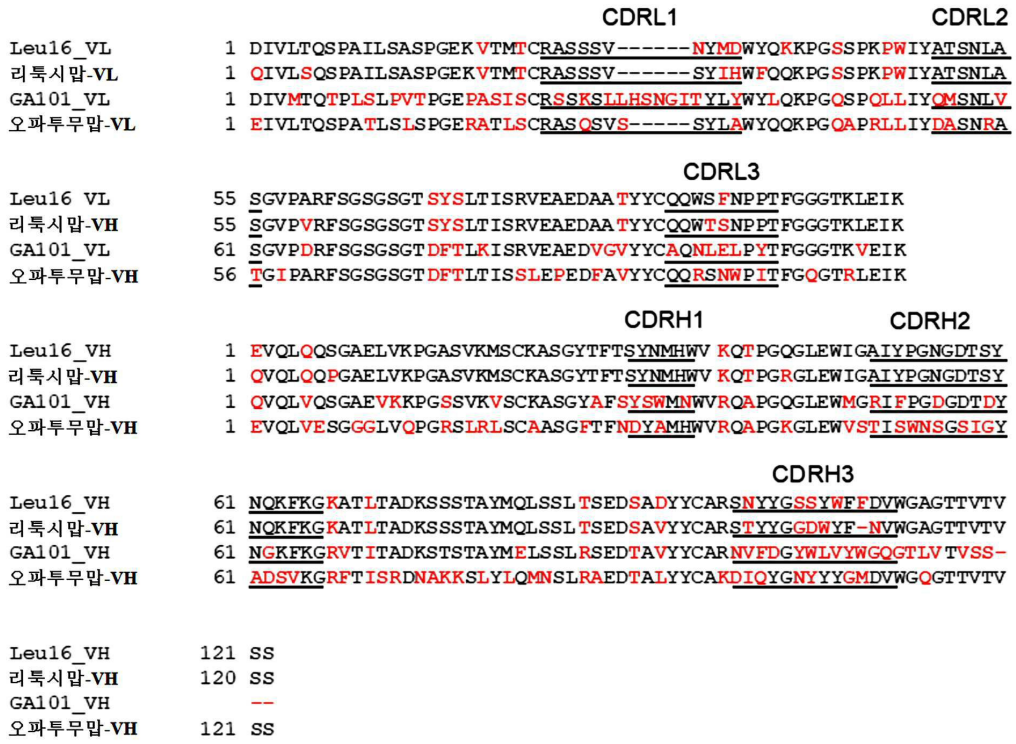
도면15c


농축 플롯:
HALLMARK_INTERFERON_GAMMA_RESPONSE
RFR-LCDR.AA
리툭시맙
농축 플롯: GNF2_ZAP70
RFR-LCDR.AA
리툭시맙
농축 플롯:
GO_POSITIVE_REGULATION_OF_LEUKOCYTE_MEDIATED_CYTOTOXICITY
RFR-LCDR.AA
리툭시맙
농축 플롯:
GO_ALPHA_BETA_T_CELL_ACTIVATION
RFR-LCDR.AA
리툭시맙

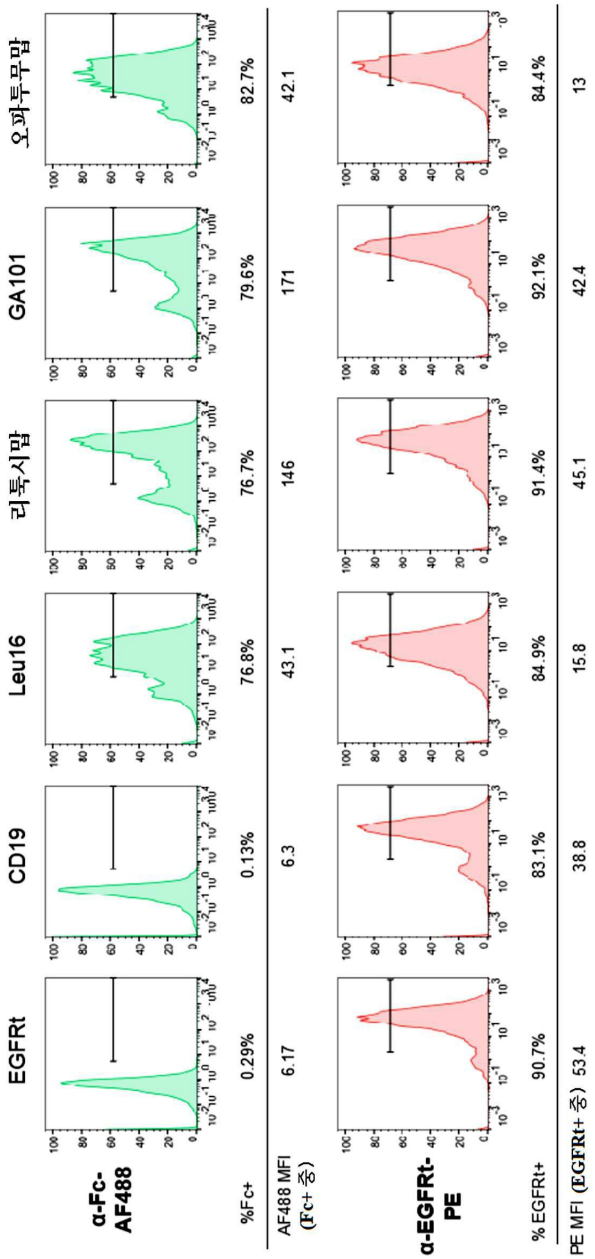
도면15d


농축 플롯: KEGG_CELL_CYCLE
농축 플롯: GO_CELL_CYCLE_DNA_REPLICATION
농축 플롯: HALLMARK_E2F_TARGETS
농축 플롯: MORF_DNMT1
RFR-LCDR.AA
리툭시맙

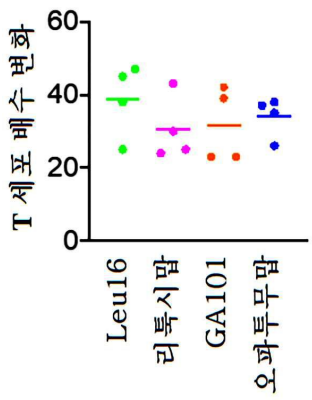
도면16a


CDRL1
CDRL2
Leu16_VL 1 DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSV------NYMDWYQKKPGSSPKPWIYATSNLA
리툭시맙-VL 1 QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSV------SYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLA
GA101_VL 1 DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLV
오파투무맙-VL 1 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVS-----SYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA
CDRL3
Leu16_VL 55 SGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIK
리툭시맙-VH 55 SGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIK
GA101_VL 61 SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGTKVEIK
오파투무맙-VH 56 TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIK
CDRH1
CDRH2
Leu16_VH 1 EVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWV KQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSY
리툭시맙-VH 1 QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWV KQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSY
GA101_VH 1 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWMNWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDTDY
오파투무맙-VH 1 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGY
CDRH3
Leu16_VH 61 NQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTV
리툭시맙-VH 61 NQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYF-NVWGAGTTVTV
GA101_VH 61 NGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTLVTVSS-
오파투무맙-VH 61 ADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVTV
Leu16_VH 121 SS
리툭시맙-VH 120 SS
GA101_VH --
오파투무맙-VH 121 SS

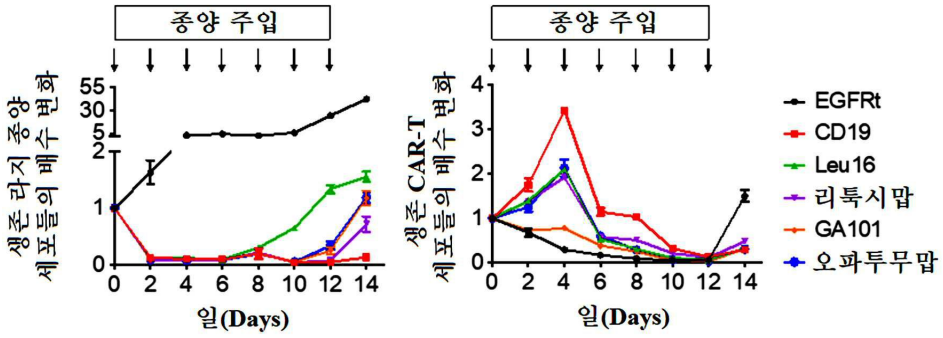
도면16b


EGFRt
CD19
Leu16
리툭시맙
GA101
오파투무맙
α-Fc-AF488
α-EGFRt-PE
%Fc+ 0.29% 0.13% 76.8% 76.7% 79.6% 82.7%
AF488 MFI (Fc+ 중) 6.17 6.3 43.1 146 171 42.1
% EGFRt+ 90.7% 83.1% 84.9% 91.4% 92.1% 84.4%
PE MFI (EGFRt+ 중) 53.4 38.8 15.8 45.1 42.4 13

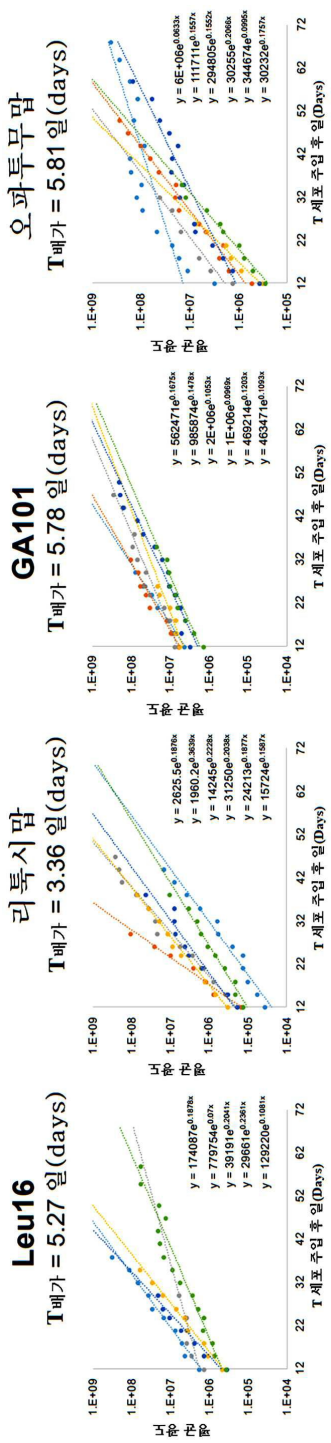
도면16c


T 세포 배수 변화
60
40
20
0
Leu16
리툭시맙
GA101
오파투무맙

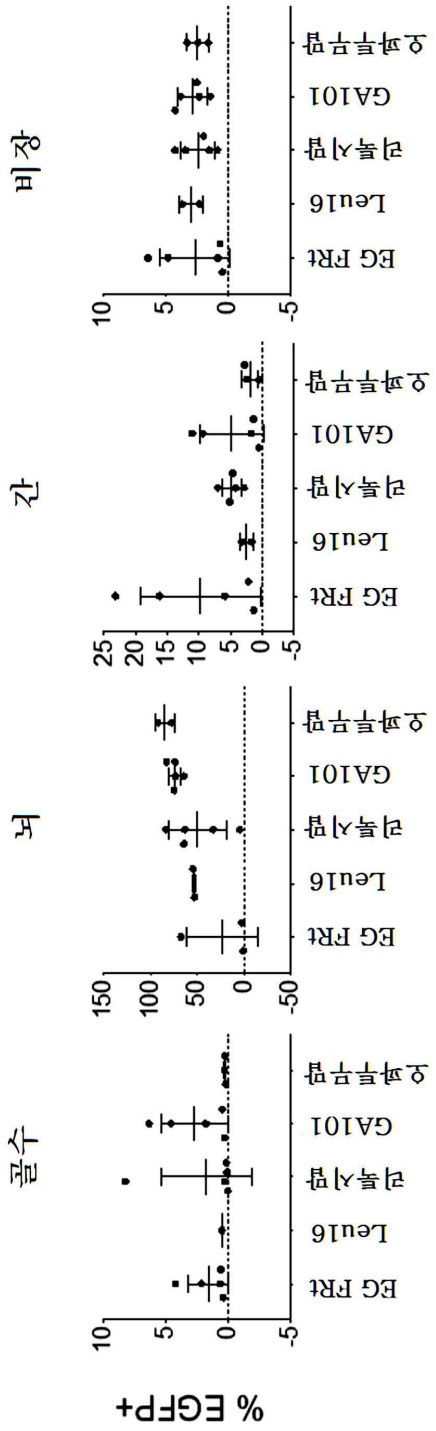
도면16d


종양 주입
생존 라지 종양 세포들의 배수 변화
55
30
5
2
1
0
0 2 4 6 8 10 12 14
일(Days)
종양 주입
생존 CAR-T 세포들의 배수 변화
4
3
2
1
0
0 2 4 6 8 10 12 14
일(Days)
EGFRt
CD19
Leu16
리툭시맙
GA101
오파투무맙

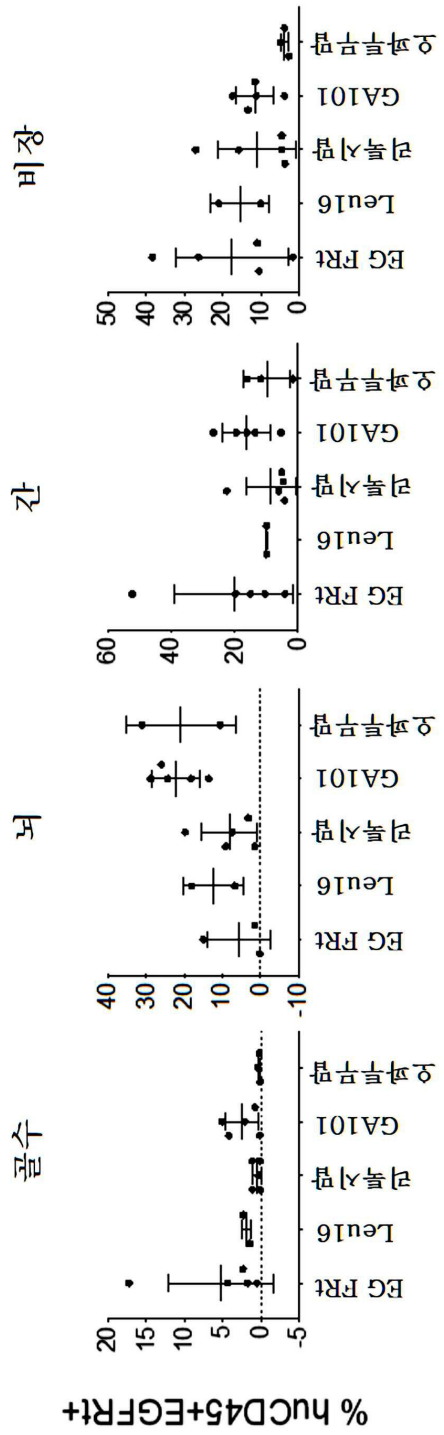
도면17a


Leu16
Tmedian = 5.27 일(days)
y = 1740876e^0.1878x
y = 779754e^0.07x
y = 39191e^0.2041x
y = 29661e^0.2361x
y = 1292206e^0.1081x
리툭시맙
Tmedian = 3.36 일(days)
y = 2625.5e^0.1876x
y = 1960.2e^0.3639x
y = 14245e^0.2223x
y = 31250e^0.2038x
y = 24213e^0.1877x
y = 15724e^0.1587x
GA101
Tmedian = 5.78 일(days)
y = 5624716e^0.1675x
y = 9858746e^0.1478x
y = 2E+06e^0.1053x
y = 1E+06e^0.0969x
y = 4692146e^0.1203x
y = 4634716e^0.1093x
오파투무맙
Tmedian = 5.81 일(days)
y = 6E+06e^0.0633x
y = 1111716e^0.1557x
y = 2948056e^0.1552x
y = 3025556e^0.2066x
y = 3446746e^0.0995x
y = 3023266e^0.1757x
평균 광도
T 세포 주입 후 일(Days)

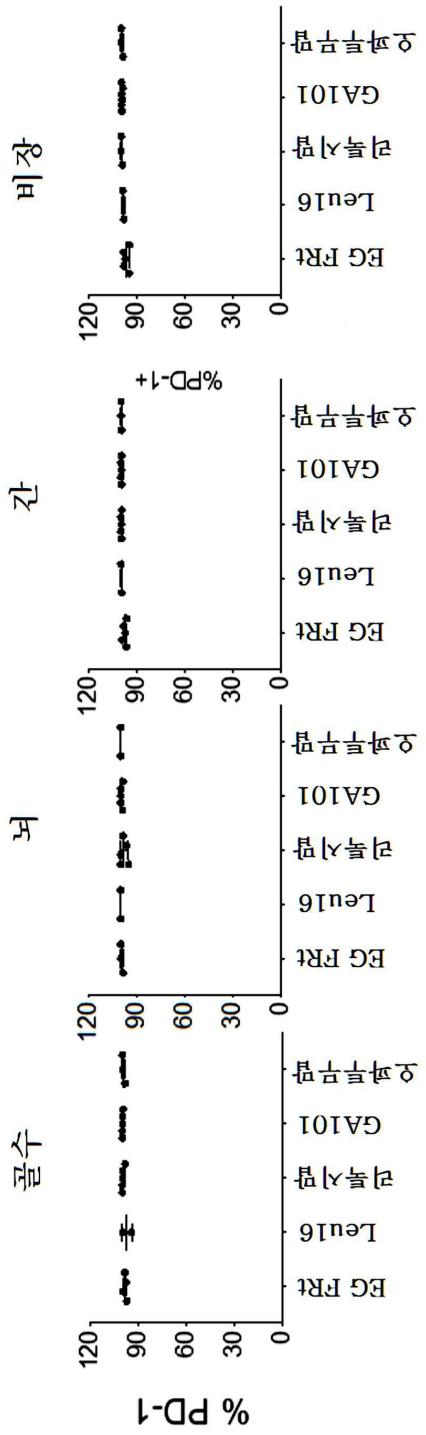
도면17b



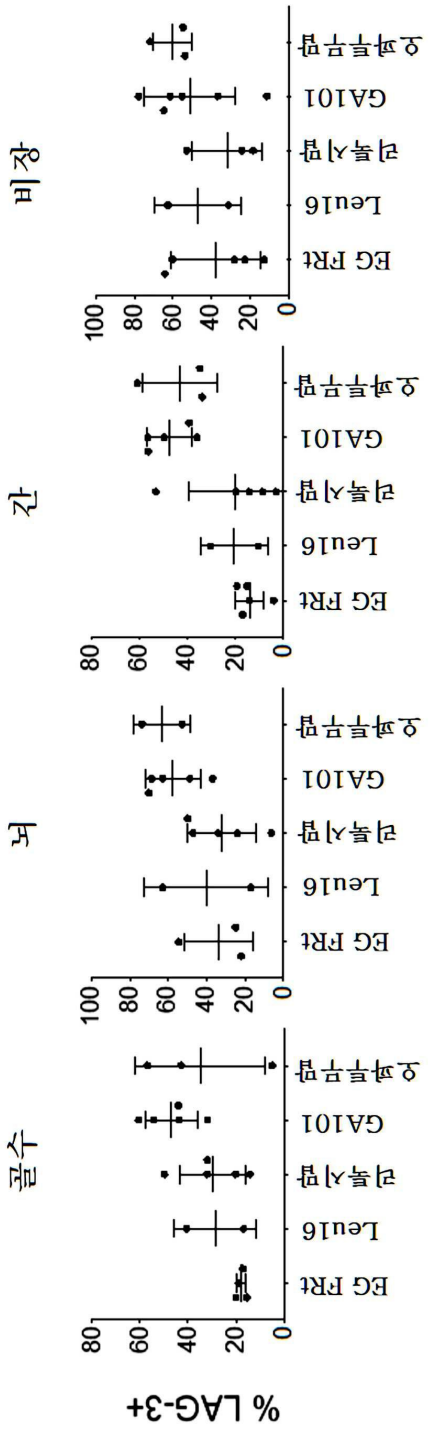
도면17c



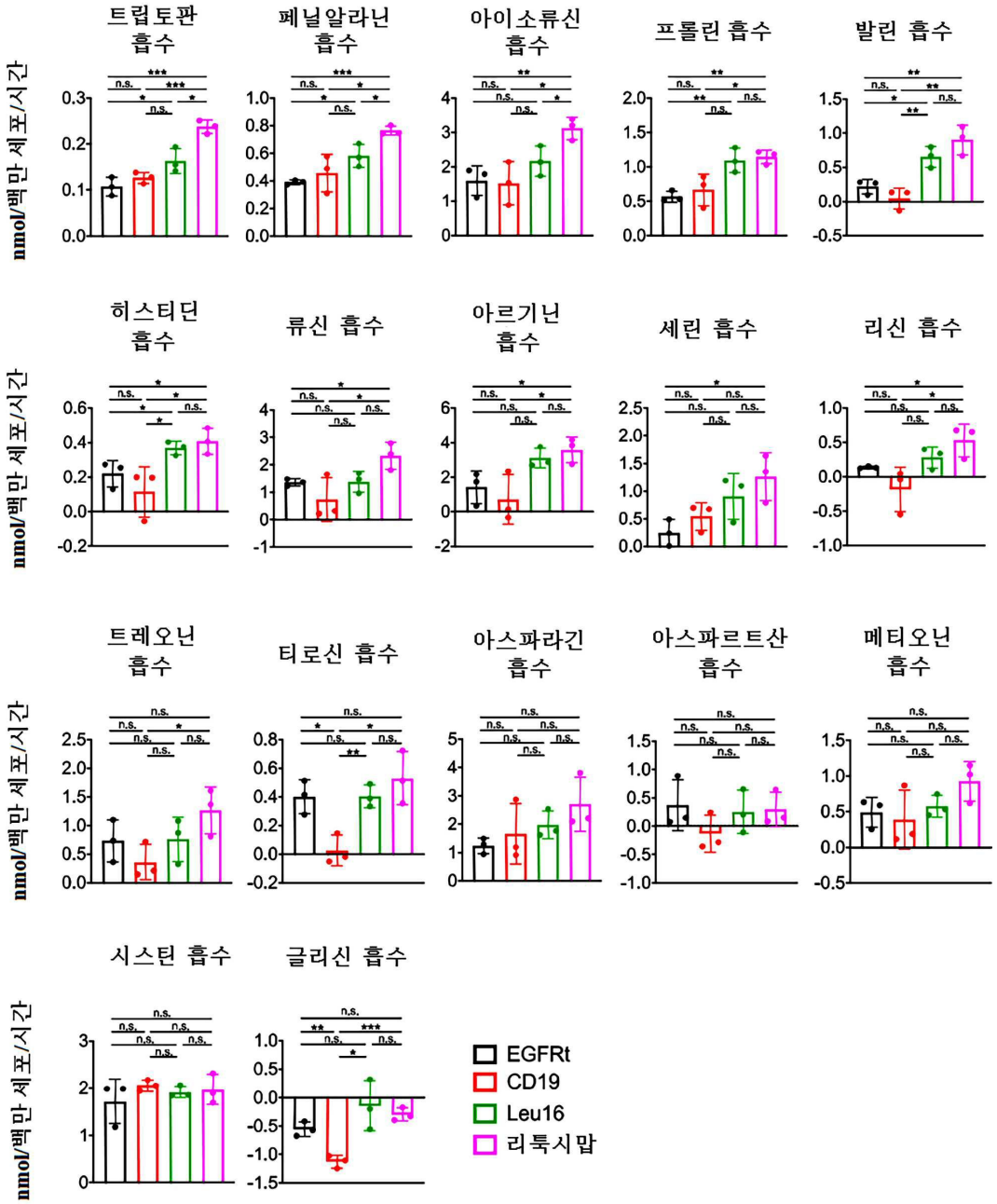
도면17d



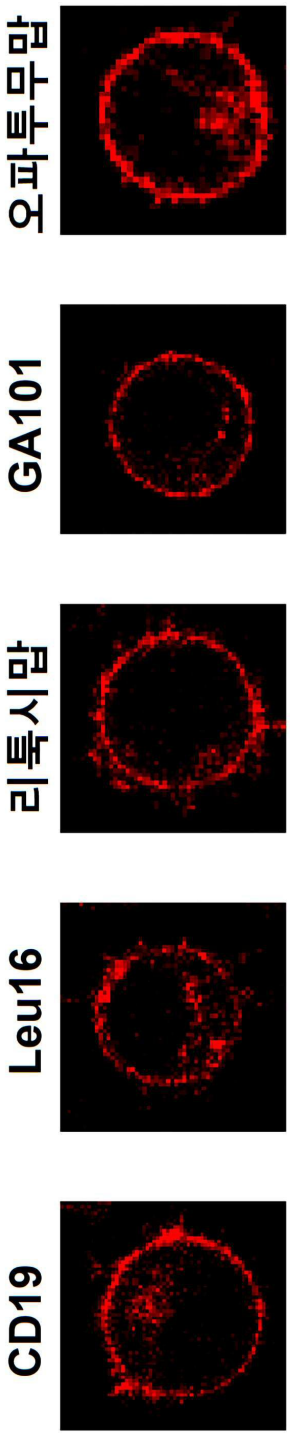
도면17e



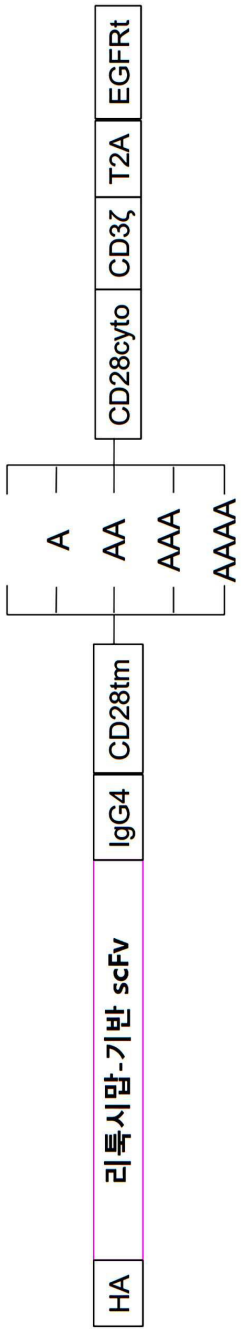
도면18


트립토판 흡수
페닐알라닌 흡수
아이소류신 흡수
프롤린 흡수
발린 흡수
히스티딘 흡수
류신 흡수
아르기닌 흡수
세린 흡수
리신 흡수
트레오닌 흡수
티로신 흡수
아스파라긴 흡수
아스파르트산 흡수
메티오닌 흡수
시스틴 흡수
글리신 흡수
nmol/백만 세포/시간
EGFRt
CD19
Leu16
리툭시맙

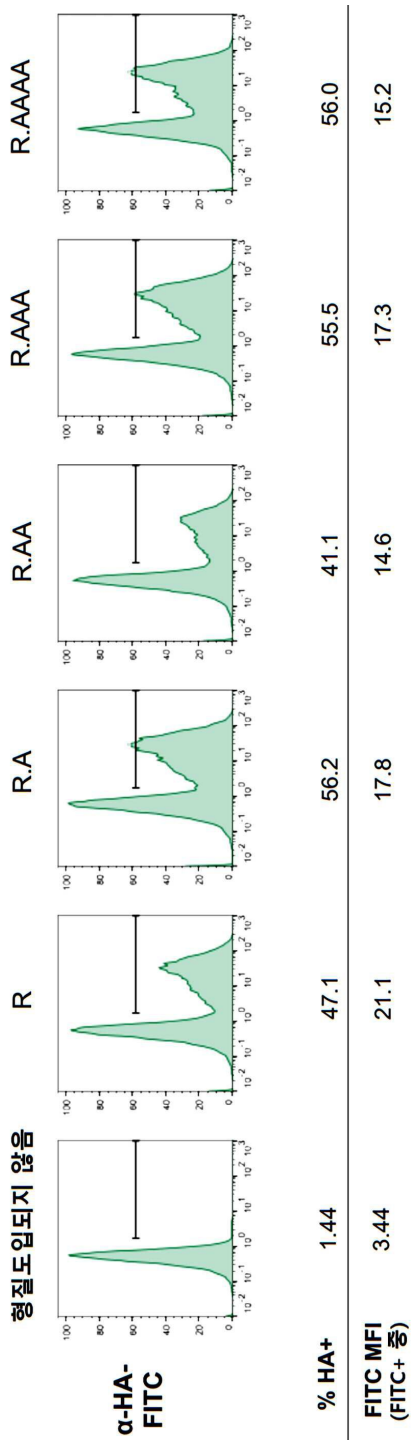
도면19



도면20a

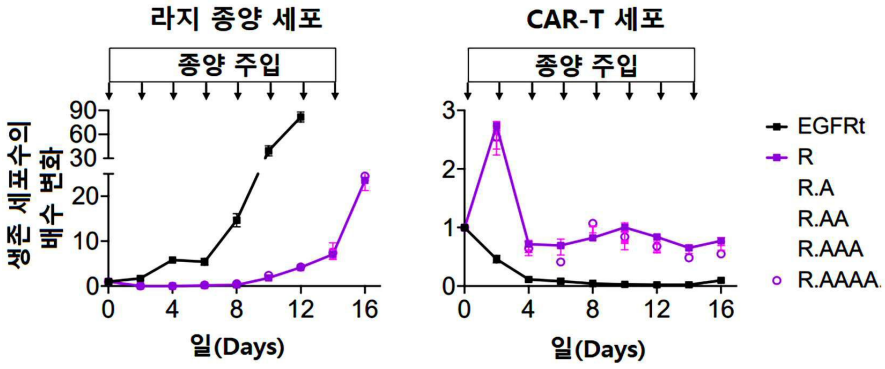

HA
리툭시맙-기반 scFv
IgG4
CD28tm
A
AA
AAA
AAAA
CD28cyto
CD3ζ
T2A
EGFRt

도면20b

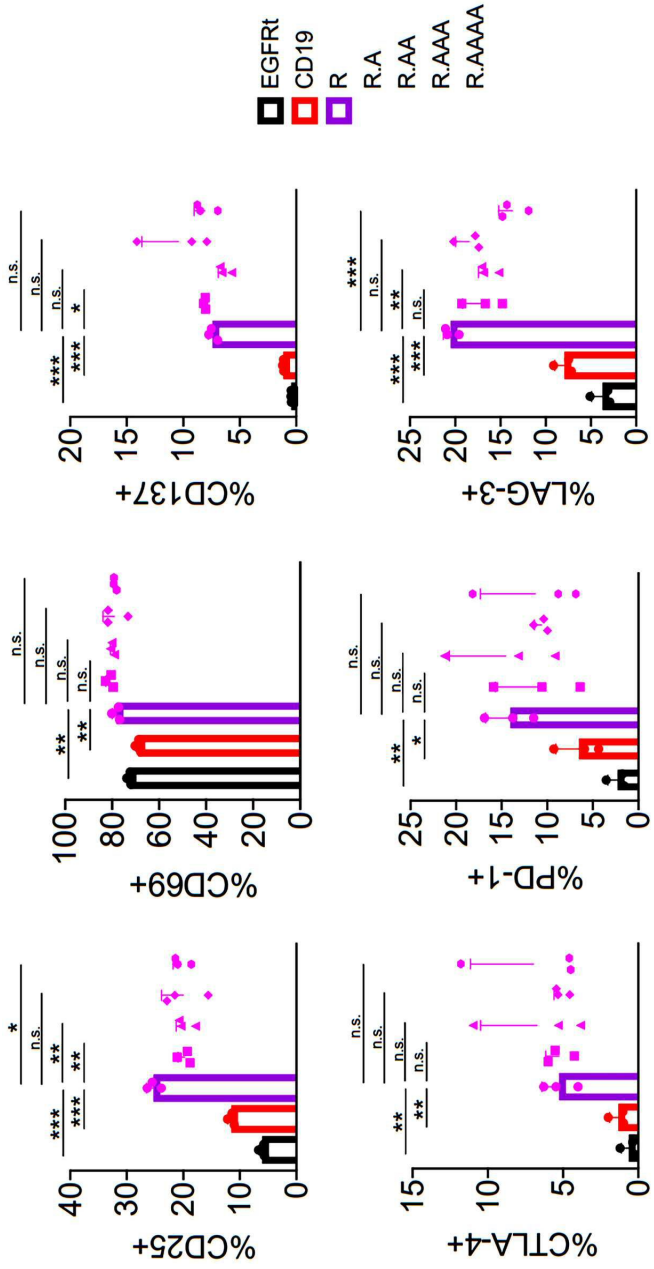


% HA+	1.44	47.1	56.2	41.1	55.5	56.0
FITC MFI (FITC+ 중)	3.44	21.1	17.8	14.6	17.3	15.2

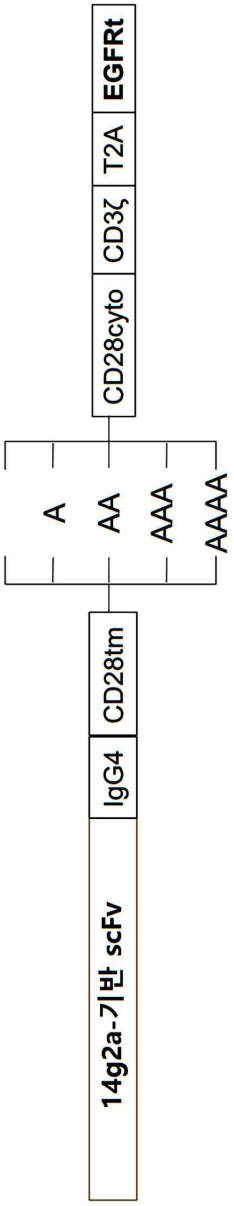
도면20c


라지 종양 세포
CAR-T 세포
종양 주입
종양 주입
생존 세포수의 배수 변화
일(Days)
일(Days)
EGFRt
R
R.A
R.AA
R.AAA
R.AAAA

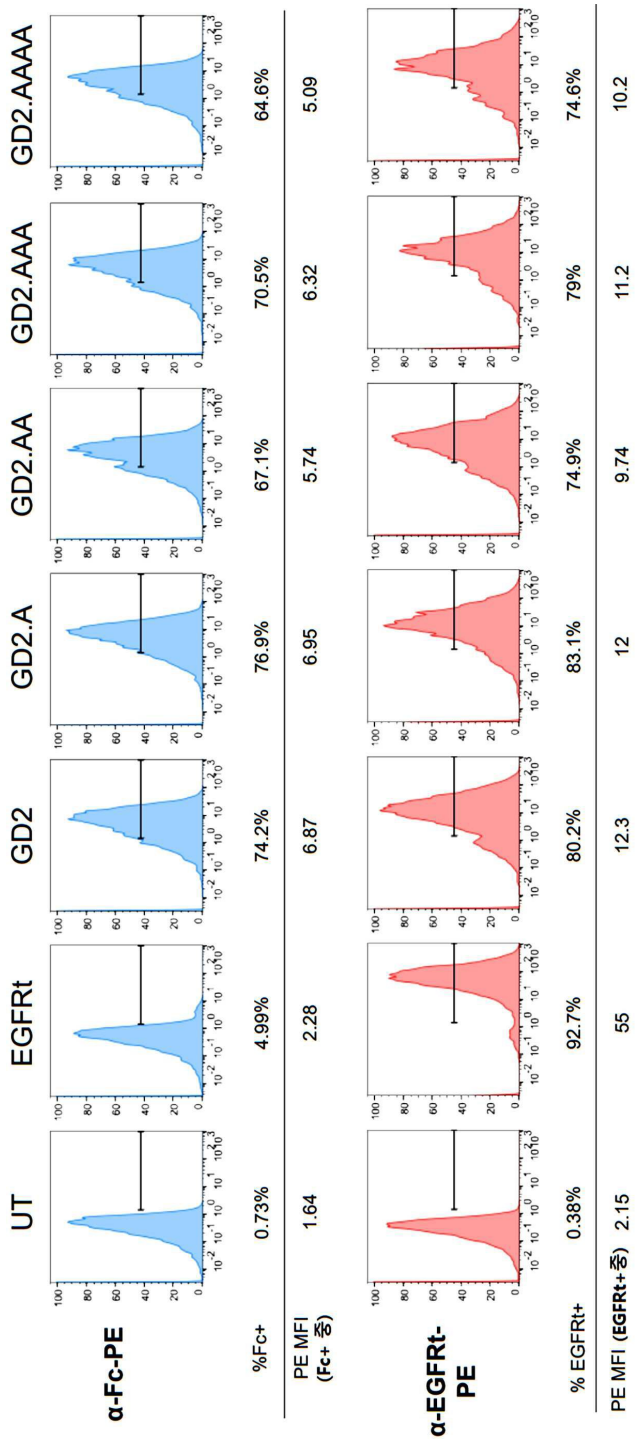
도면20d


EGFRt
CD19
R
R.A
R.AA
R.AAA
R.AAAA
%CD137+
%LAG-3+
%CD69+
%PD-1+
%CD25+
%CTLA-4+

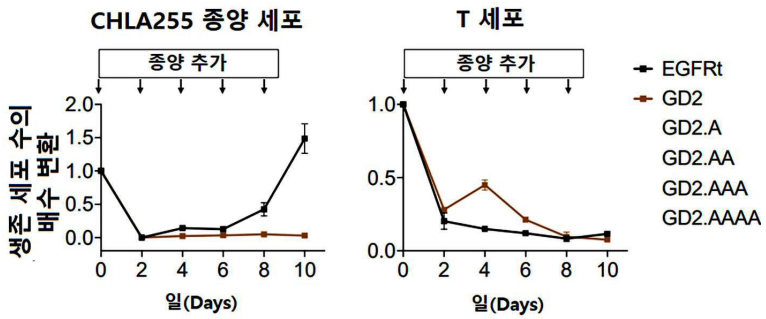
도면21a


14g2a-기반 scFv
IgG4
CD28tm
A
AA
AAA
AAAA
CD28cyto
CD3ζ
T2A
EGFRt

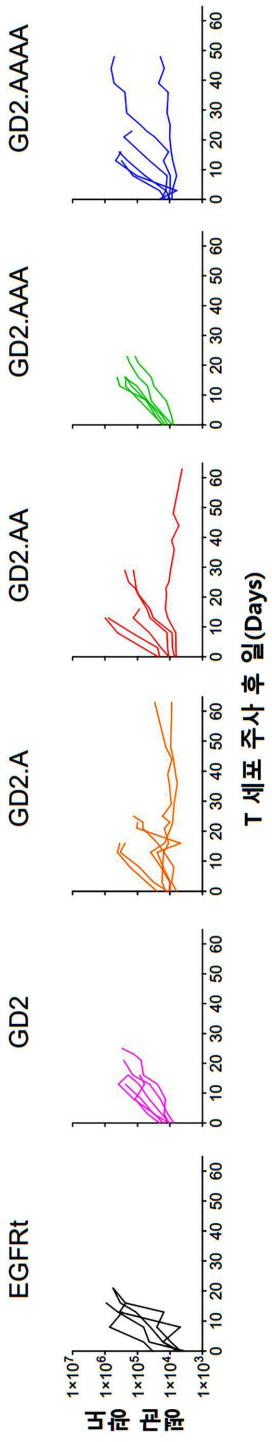
도면21b


UT
EGFRt
GD2
GD2.A
GD2.AA
GD2.AAA
GD2.AAAA
α-Fc-PE
%Fc+ 0.73% 4.99% 74.2% 76.9% 67.1% 70.5% 64.6%
PE MFI (Fc+ 중) 1.64 2.28 6.87 6.95 5.74 6.32 5.09
α-EGFRt-PE
% EGFRt+ 0.38% 92.7% 80.2% 83.1% 74.9% 79% 74.6%
PE MFI (EGFRt+중) 2.15 55 12.3 12 9.74 11.2 10.2

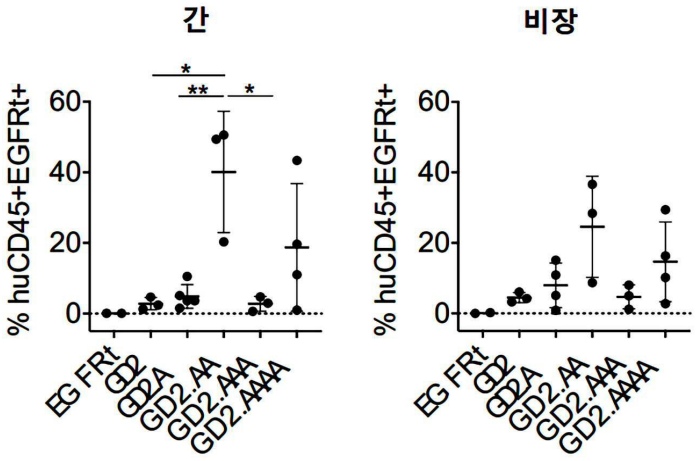
도면21c


CHLA255 종양 세포
T 세포
종양 추가
종양 추가
생존 세포 수의 변화 배수
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
2
4
6
8
10
일(Days)
일(Days)
EGFRt
GD2
GD2.A
GD2.AA
GD2.AAA
GD2.AAAA

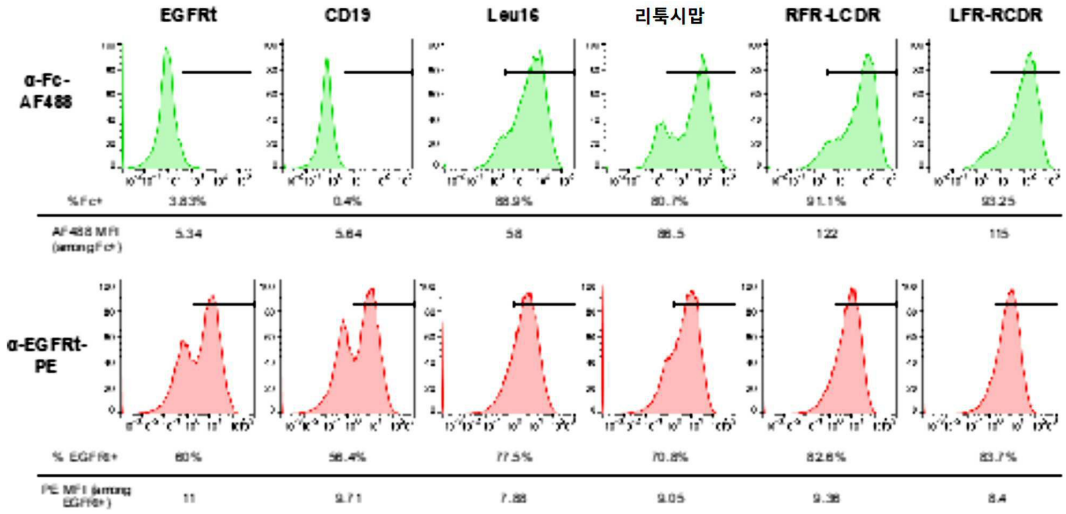
도면21d


EGFRt
GD2
GD2.A
GD2.AA
GD2.AAA
GD2.AAAA
평균 광도
1×10^7
1×10^6
1×10^5
1×10^4
1×10^3
0 10 20 30 40 50 60
T 세포 주사 후 일(Days)

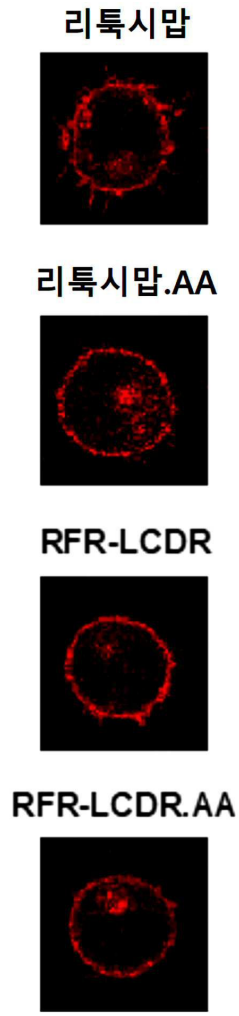
도면21e


간
비장
% huCD45+EGFRt+
60
40
20
0
*
**
*
EGFRt
GD2
GD2A
GD2.AA
GD2.AAA
GD2.AAAA

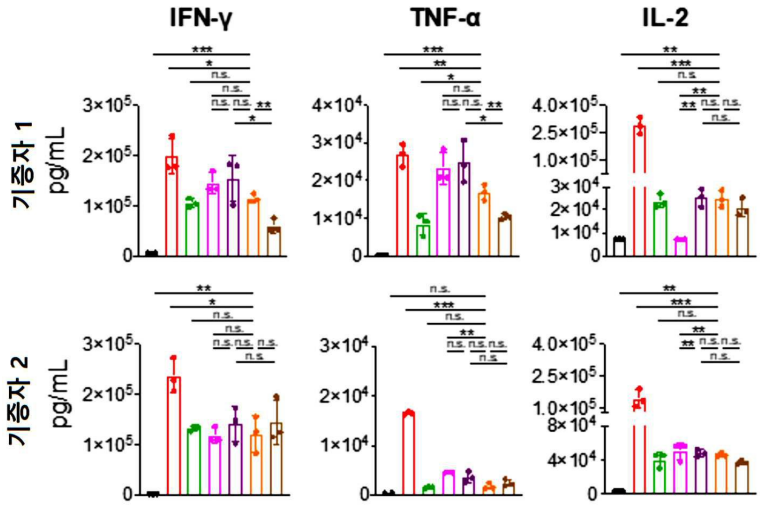
도면22a


EGFRt
CD19
Leu16
리툭시맙
RFR-LCDR
LFR-RCDR
α-Fc-AF488
α-EGFRt-PE

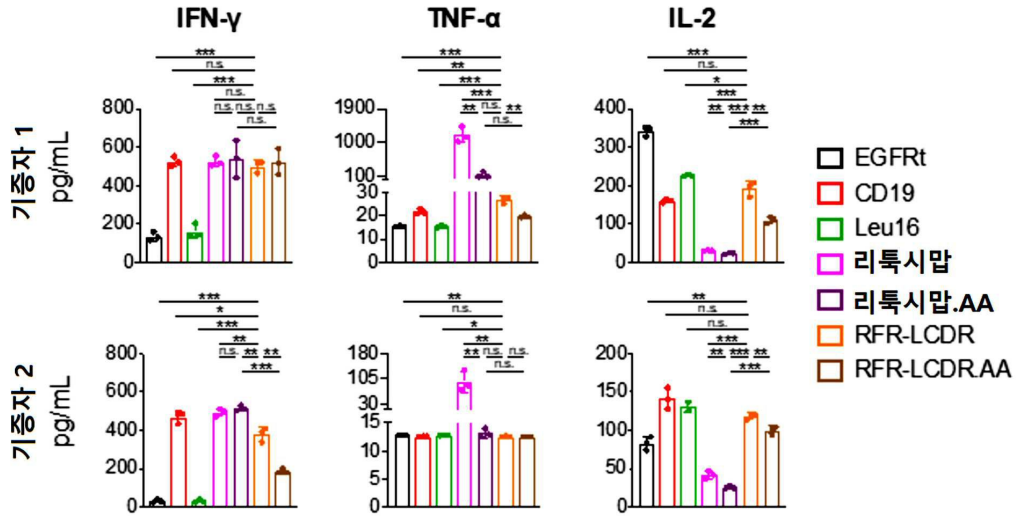
도면22b


리툭시맙
리툭시맙.AA
RFR-LCDR
RFR-LCDR.AA

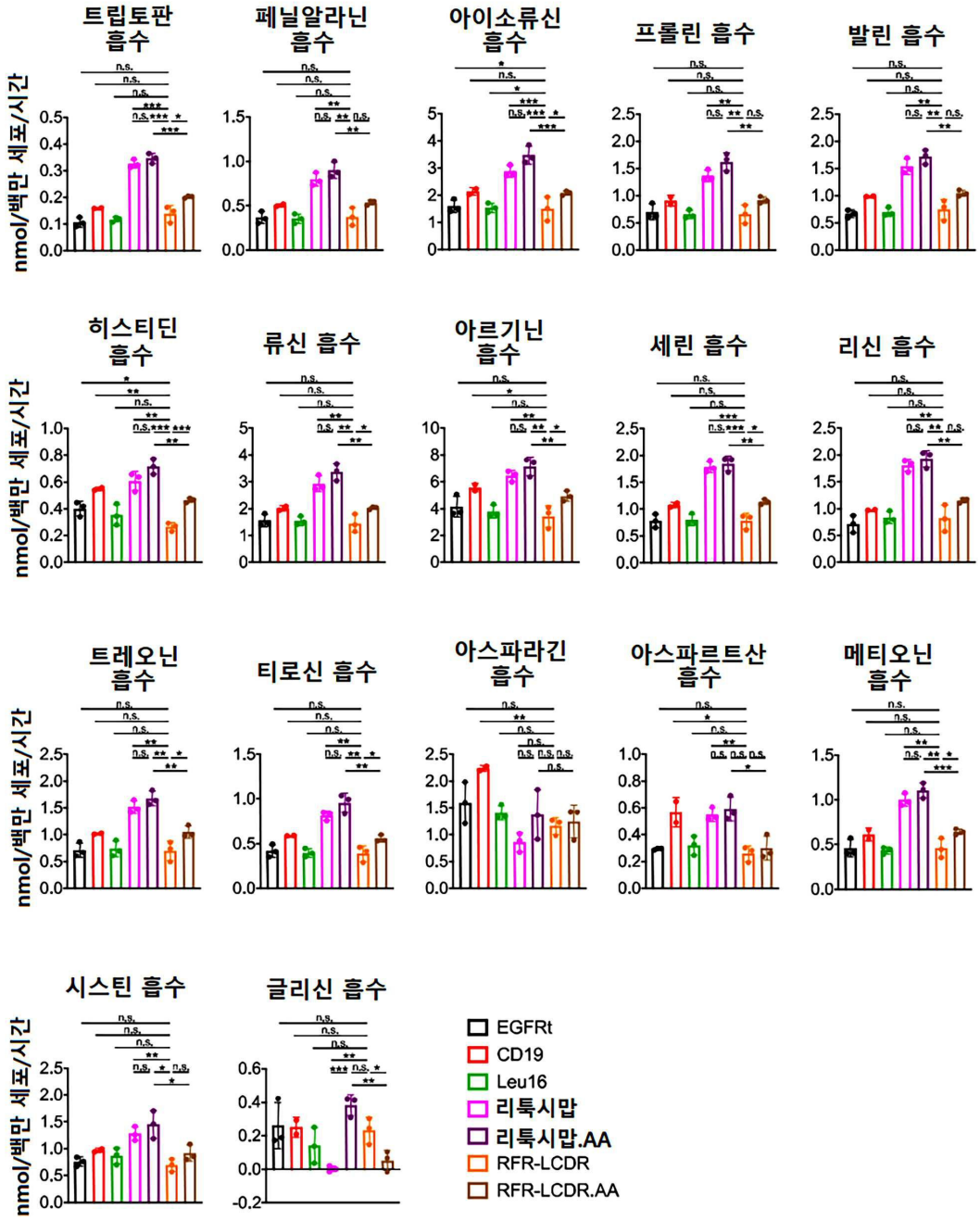
도면22c


IFN-γ
TNF-α
IL-2
기증자 1
pg/mL
기증자 2
pg/mL

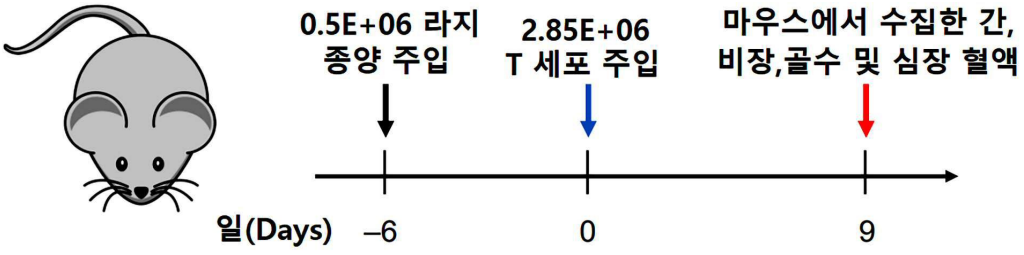
도면22d


IFN-γ
TNF-α
IL-2
기증자 1
pg/mL
기증자 2
pg/mL
EGFRt
CD19
Leu16
리툭시맙
리툭시맙.AA
RFR-LCDR
RFR-LCDR.AA

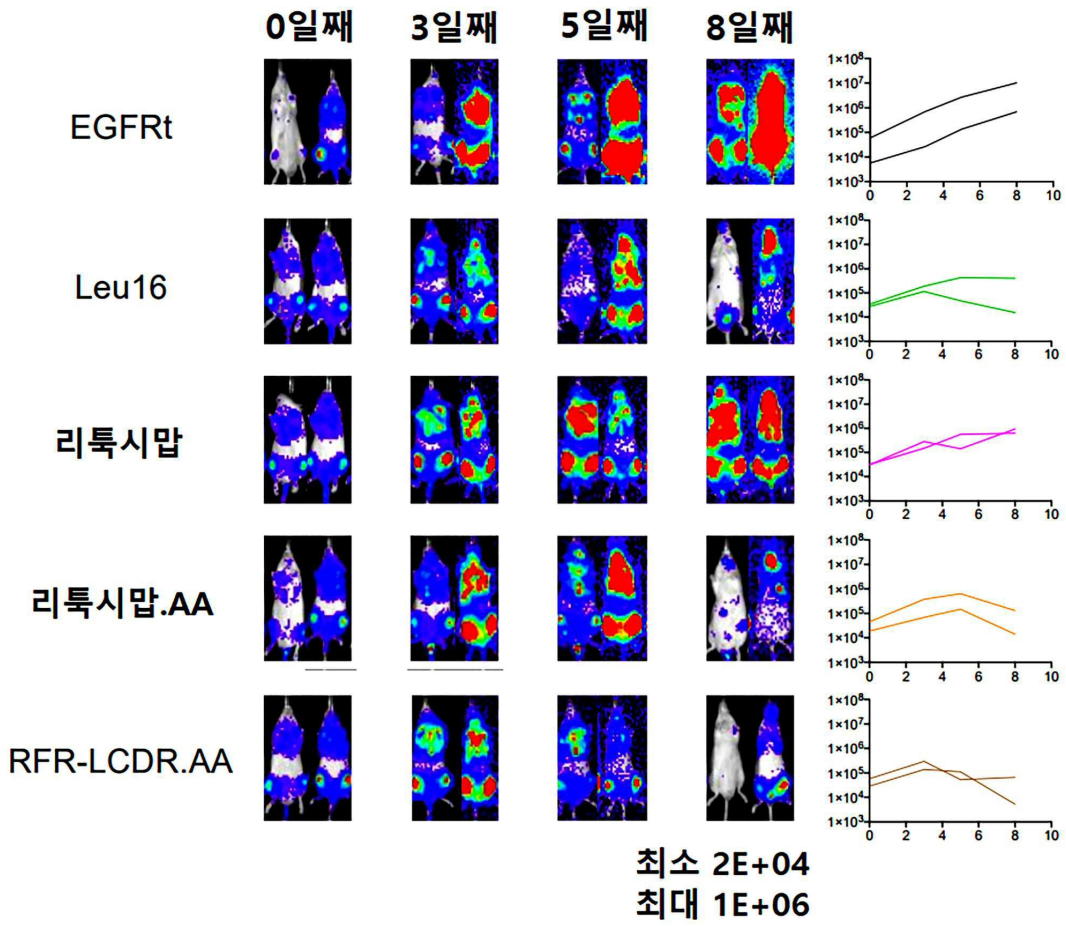
도면23


트립토판 흡수
페닐알라닌 흡수
아이소류신 흡수
프롤린 흡수
발린 흡수
히스티딘 흡수
류신 흡수
아르기닌 흡수
세린 흡수
리신 흡수
트레오닌 흡수
티로신 흡수
아스파라긴 흡수
아스파르트산 흡수
메티오닌 흡수
시스틴 흡수
글리신 흡수
nmol/백만 세포/시간
EGFRt
CD19
Leu16
리툭시맙
리툭시맙.AA
RFR-LCDR
RFR-LCDR.AA

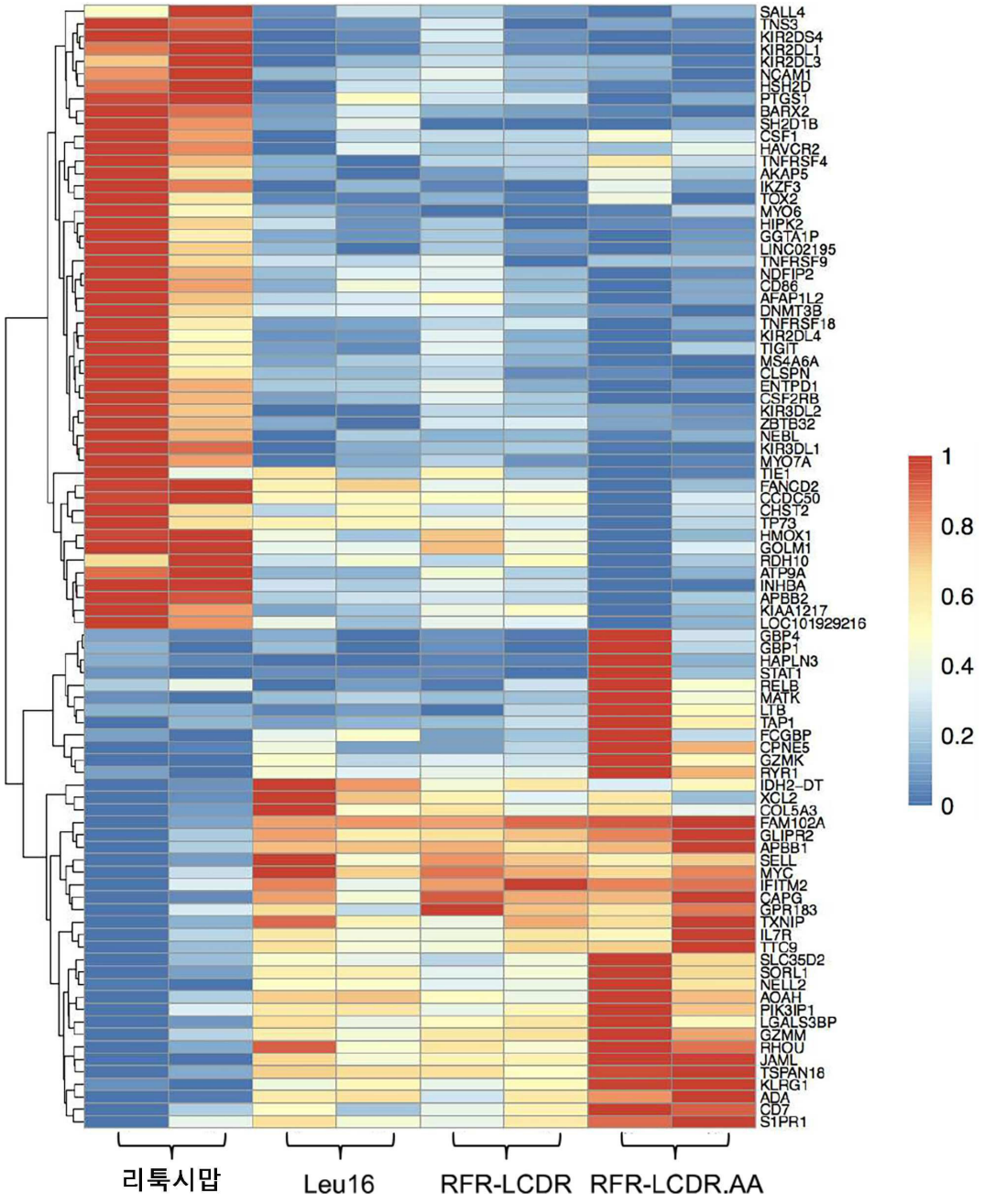
도면24a


0.5E+06 라지 종양 주입
2.85E+06 T 세포 주입
마우스에서 수집한 간, 비장,골수 및 심장 혈액
일(Days)
–6
0
9

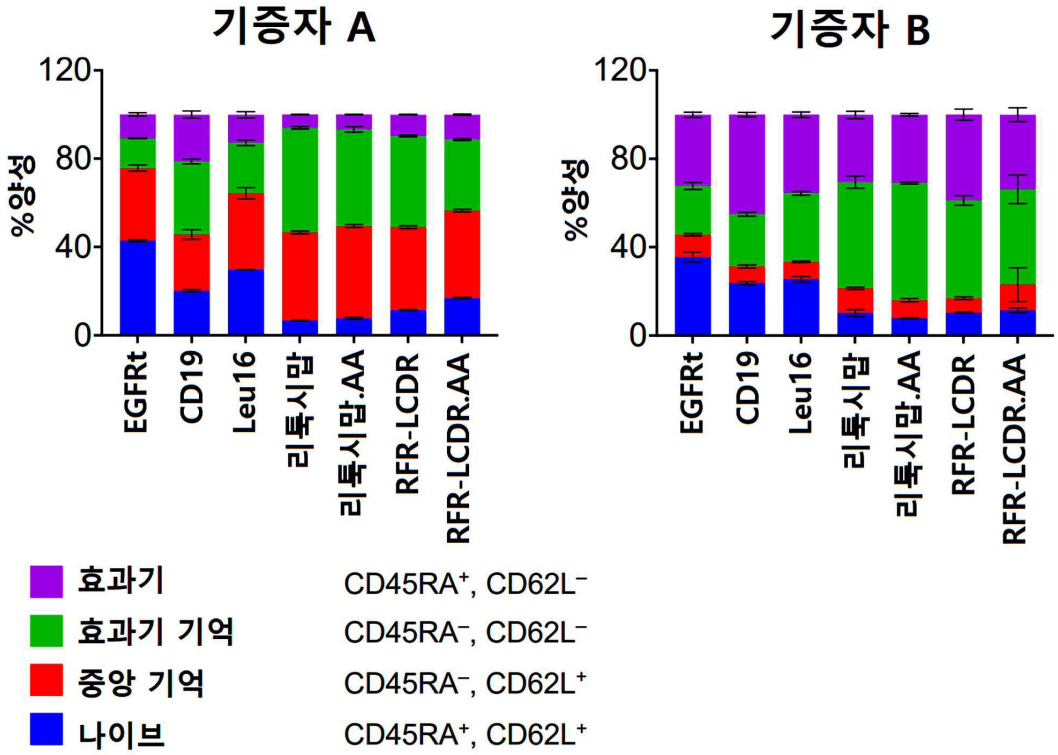
도면24b


0일째
3일째
5일째
8일째
EGFRt
Leu16
리툭시맙
리툭시맙.AA
RFR-LCDR.AA
최소 2E+04
최대 1E+06

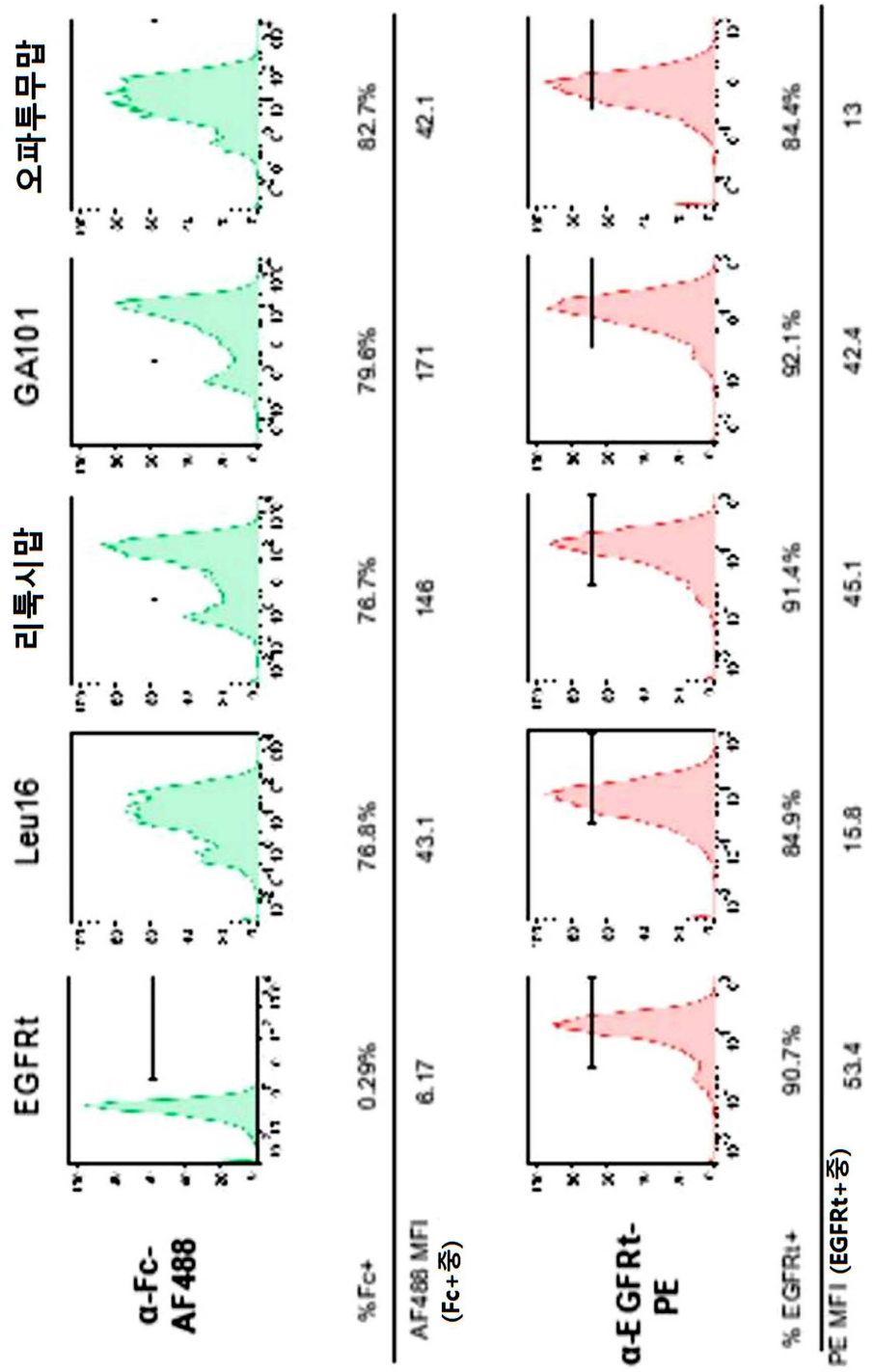
도면25


SALL4
TNS3
KIR2DS4
KIR2DL1
KIR2DL3
NCAM1
HSH2D
PTGS1
BARX2
SH2D1B
CSF1
HAVCR2
TNFRSF4
AKAP5
IKZF3
TOX2
MYO6
HIPK2
GGTA1P
LINC02195
TNFRSF9
NDFIP2
CD86
AFAP1L2
DNMT3B
TNFRSF18
KIR2DL4
TIGIT
MS4A6A
CLSPN
ENTPD1
CSF2RB
KIR3DL2
ZBTB32
NEBL
KIR3DL1
MYO7A
TIE1
FANCD2
CCDC50
CHST2
TP73
HMOX1
GOLM1
RDH10
ATP9A
INHBA
APBB2
KIAA1217
LOC101929216
GBP4
GBP1
HAPLN3
STAT1
RELB
MATK
LTB
TAP1
FCGBP
CPNE5
GZMK
RYR1
IDH2-DT
XCL2
COL5A3
FAM102A
GLIPR2
APBB1
SELL
MYC
IFITM2
CAPG
GPR183
TXNIP
IL7R
TTC9
SLC35D2
SORL1
NELL2
AOAH
PIK3IP1
LGALS3BP
GZMM
RHOU
JAML
TSPAN18
KLRG1
ADA
CD7
S1PR1
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
리툭시맙
Leu16
RFR-LCDR
RFR-LCDR.AA

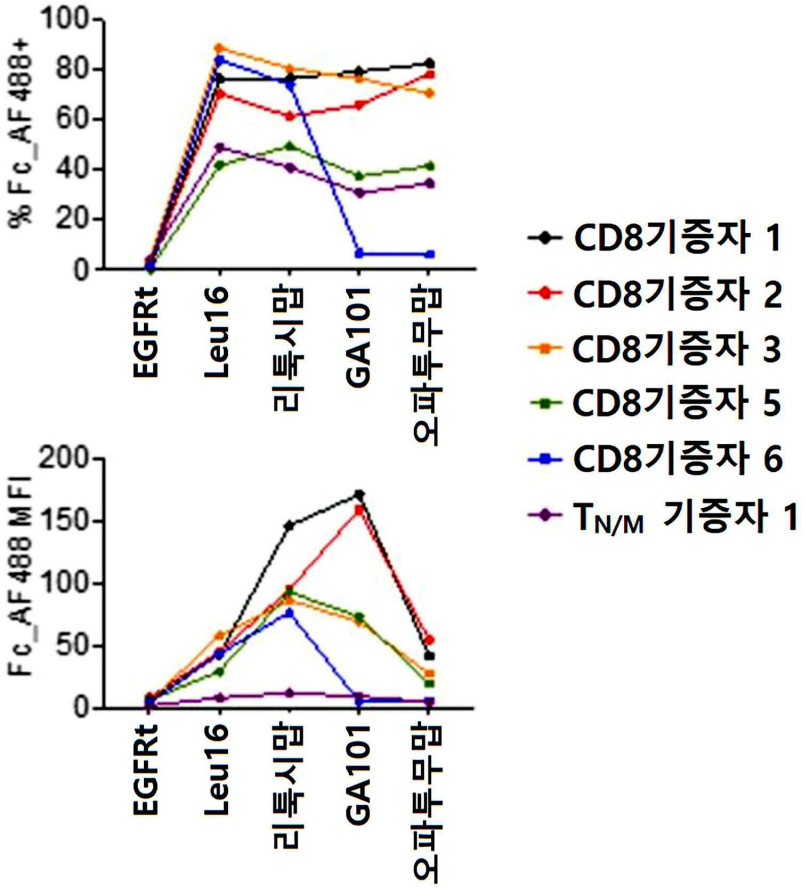
도면26


기증자 A
기증자 B
%양성
120
80
40
0
EGFRt
CD19
Leu16
리툭시맙
리툭시맙.AA
RFR-LCDR
RFR-LCDR.AA
효과기 CD45RA+, CD62L−
효과기 기억 CD45RA−, CD62L−
중앙 기억 CD45RA−, CD62L+
나이브 CD45RA+, CD62L+

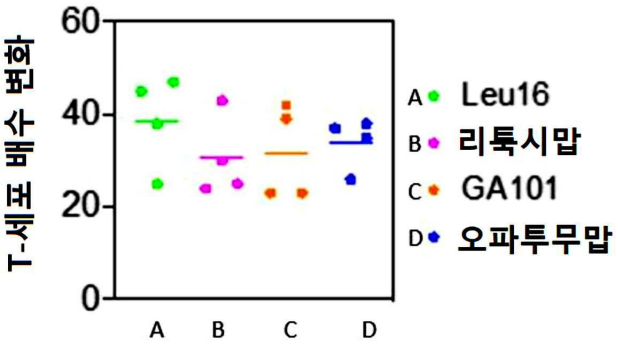
도면27a


EGFRt
Leu16
리툭시맙
GA101
오파투무맙
α-Fc-AF488
α-EGFRt-PE
%Fc+
0.29%
76.8%
76.7%
79.6%
82.7%
AF488 MFI (Fc+중)
6.17
43.1
146
171
42.1
% EGFRt+
90.7%
84.9%
91.4%
92.1%
84.4%
PE MFI (EGFRt+중)
53.4
15.8
45.1
42.4
13

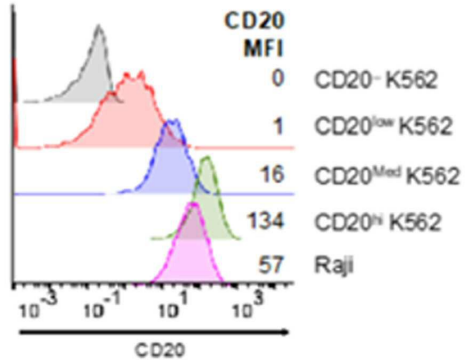
도면27b


% Fc_AF 488+
100
80
60
40
20
0
EGFRt
Leu16
리툭시맙
GA101
오파투무맙
Fc_AF 488 MFI
200
150
100
50
0
EGFRt
Leu16
리툭시맙
GA101
오파투무맙
CD8기증자 1
CD8기증자 2
CD8기증자 3
CD8기증자 5
CD8기증자 6
TN/M 기증자 1

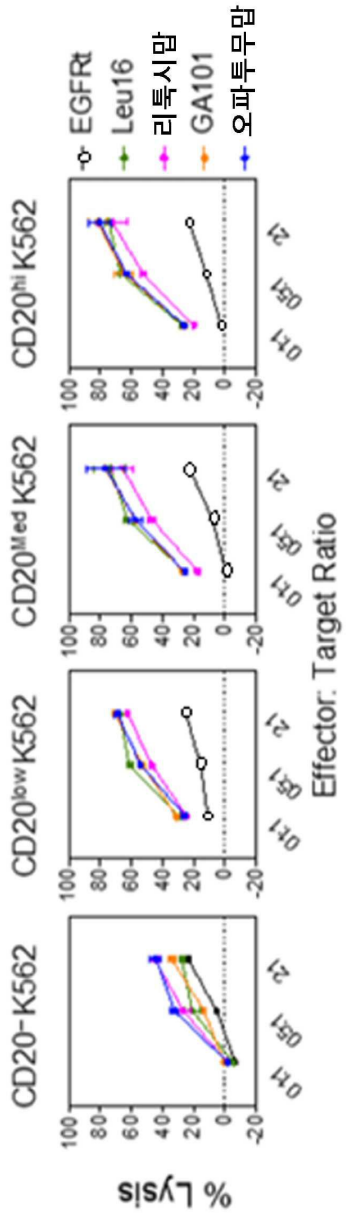
도면27c


T-세포 배수 변화
60
40
20
0
A
B
C
D
A Leu16
B 리툭시맙
C GA101
D 오파투무맙

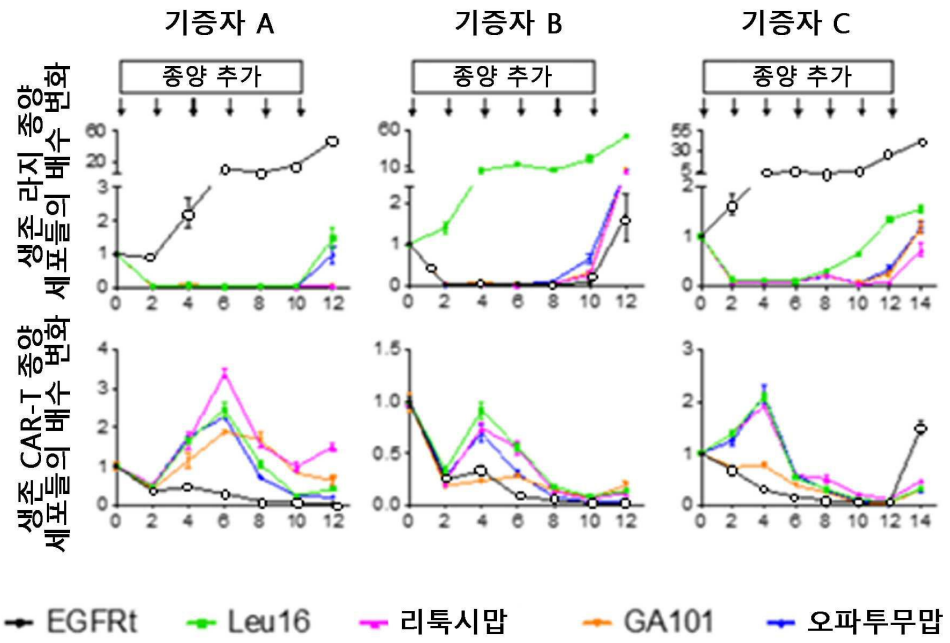
도면28a


CD20
MFI
0
1
16
134
57
CD20- K562
CD20low K562
CD20Med K562
CD20hi K562
Raji
10-3
10-1
101
103
CD20

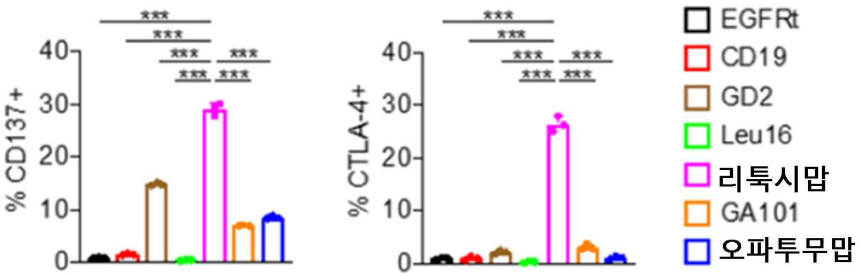
도면28b


EGFRt
Leu16
리툭시맙
GA101
오파투무맙
CD20hi K562
CD20Med K562
CD20low K562
CD20- K562
100
80
60
40
20
0
-20
2:1
0.5:1
0.1:1
Effector: Target Ratio
% Lysis

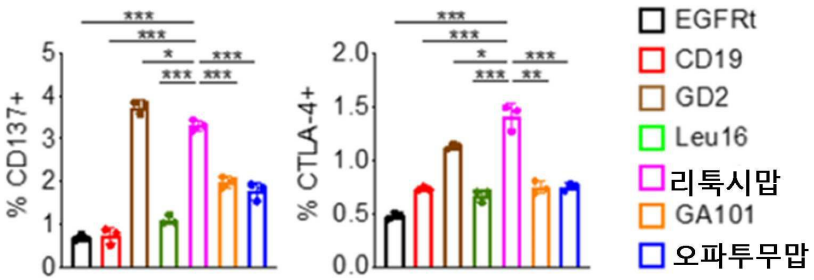
도면28c



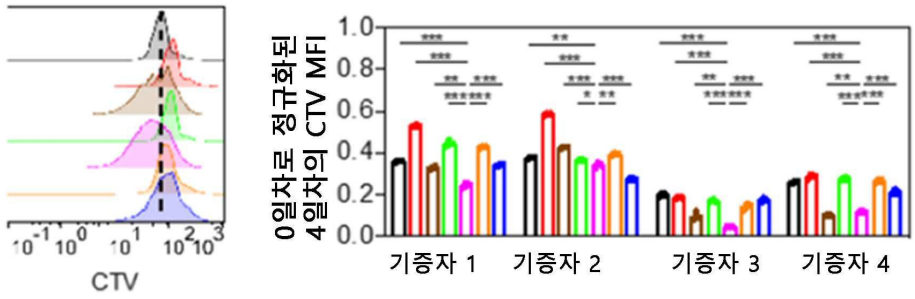
도면29a



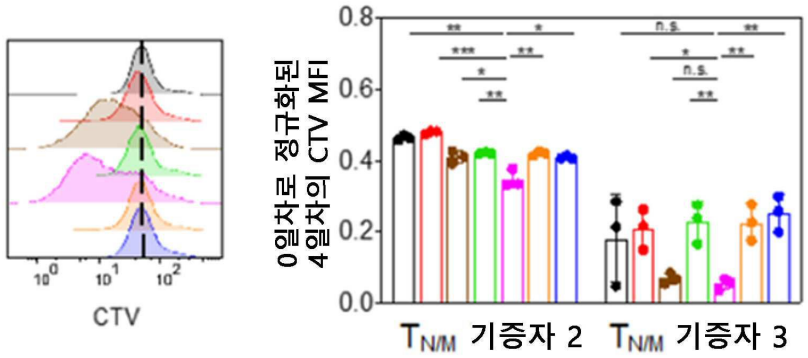
도면29b



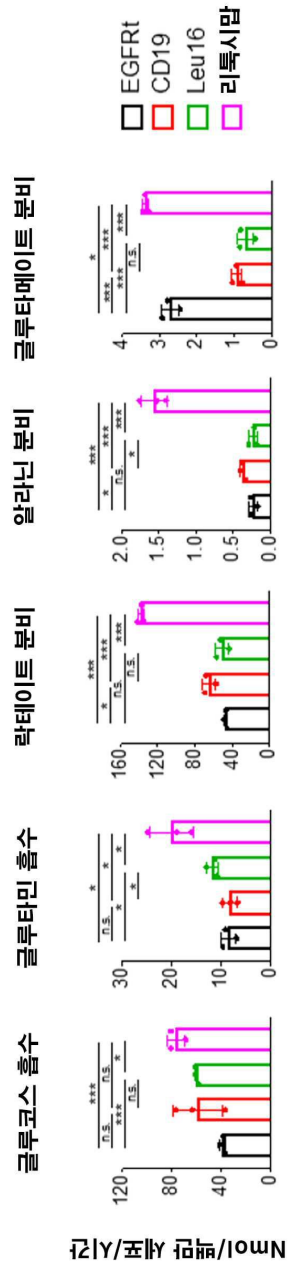
도면29c


CTV
0일차로 정규화된
4일차의 CTV MFI
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
기증자 1
기증자 2
기증자 3
기증자 4

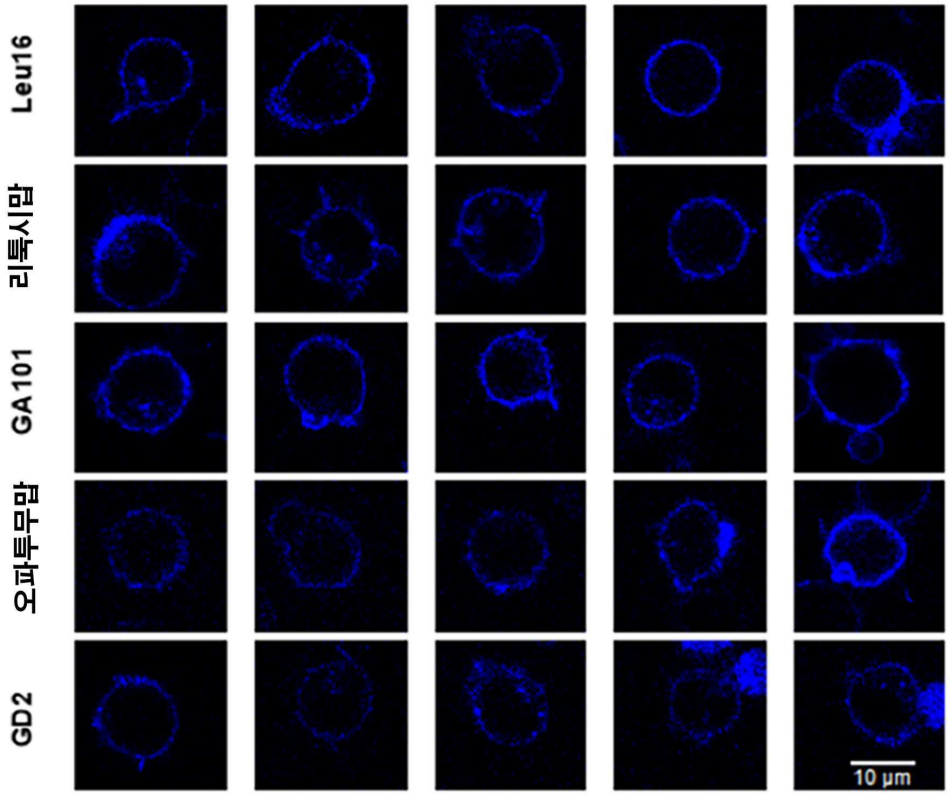
도면29d


CTV
0일차로 정규화된
4일차의 CTV MFI
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
n.s.
TN/M 기증자 2
TN/M 기증자 3

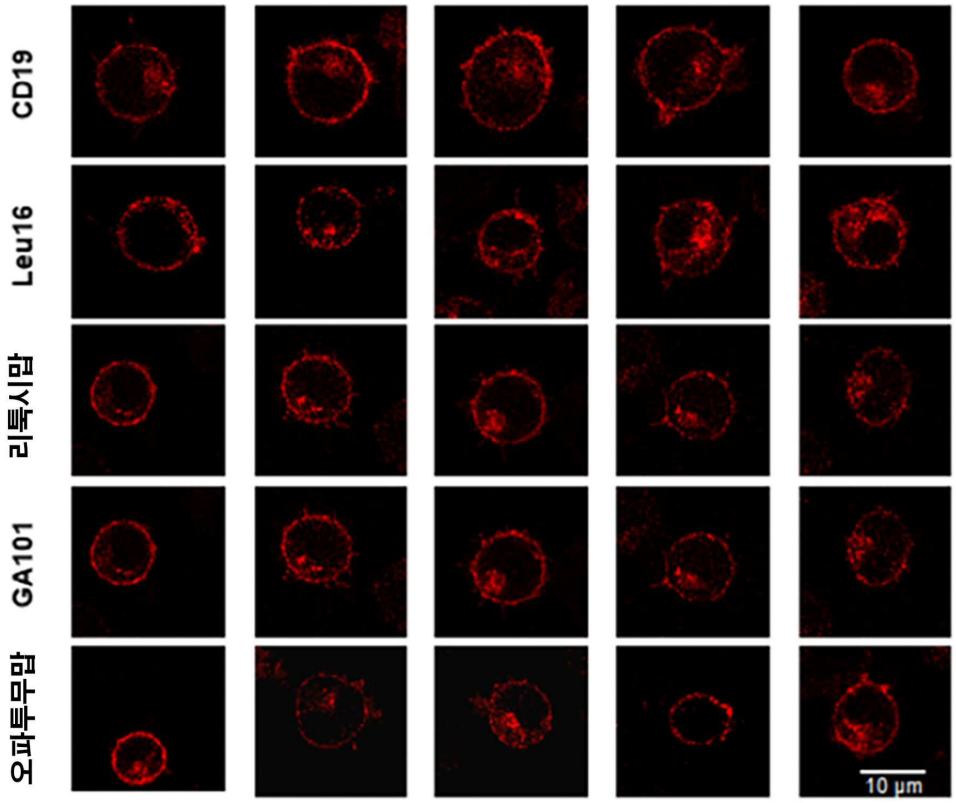
도면30


EGFRt
CD19
Leu16
리툭시맙
글루코스 흡수
글루타민 흡수
락테이트 분비
알라닌 분비
글루타메이트 분비
Nmol/백만 세포/시간

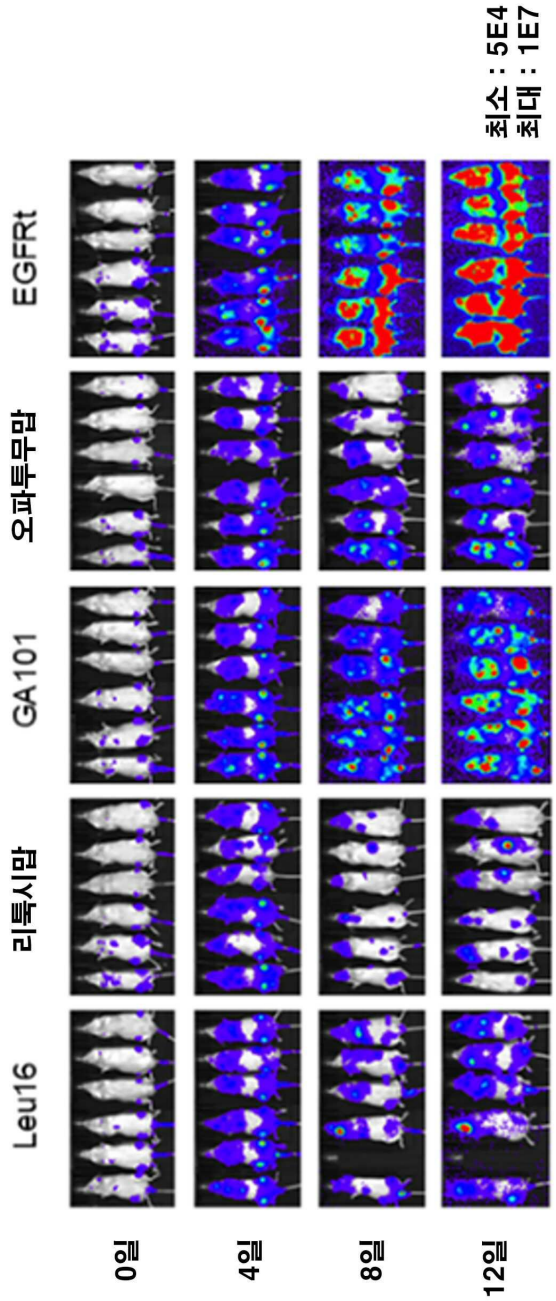
도면31a



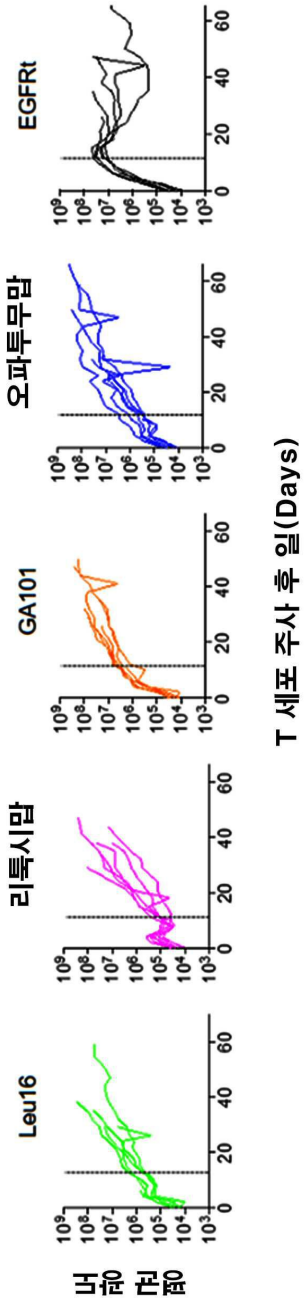
도면31b



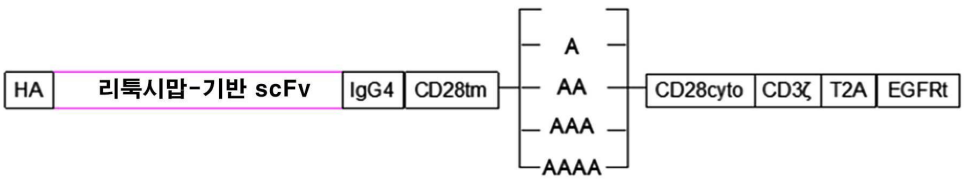
도면32a



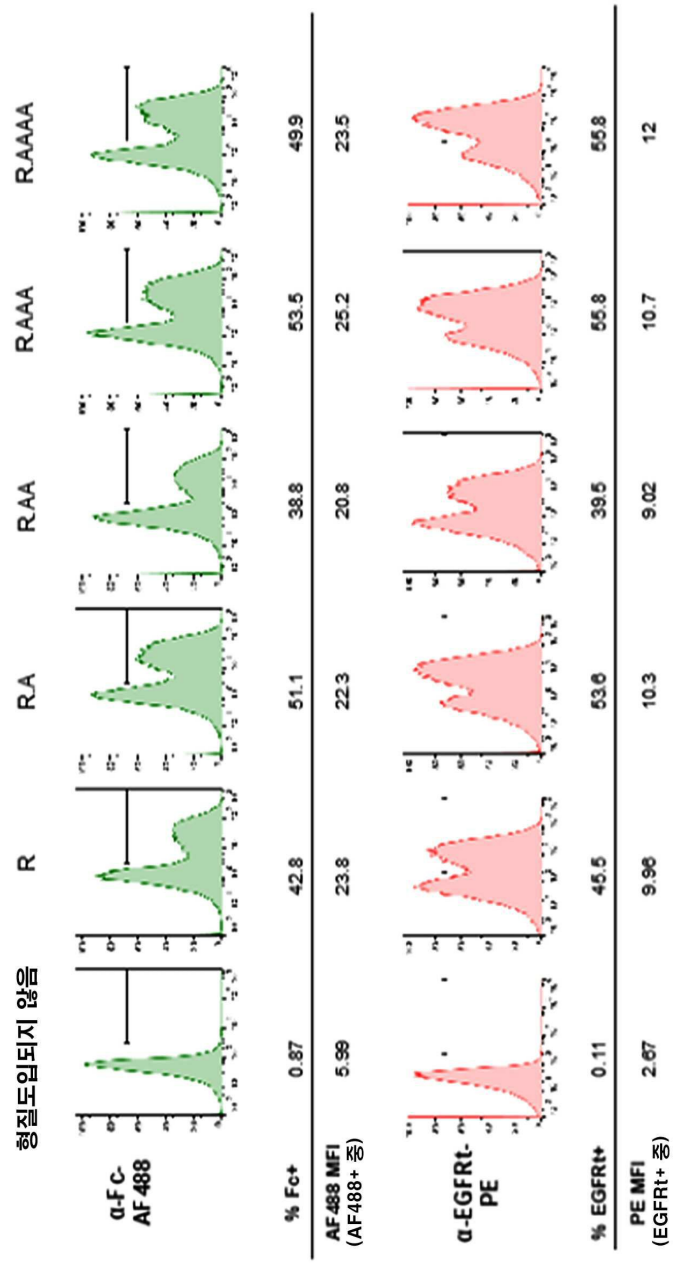
도면32b


EGFRt
오파투무맙
GA101
리툭시맙
Leu16
평균 형광
T 세포 주사 후 일(Days)

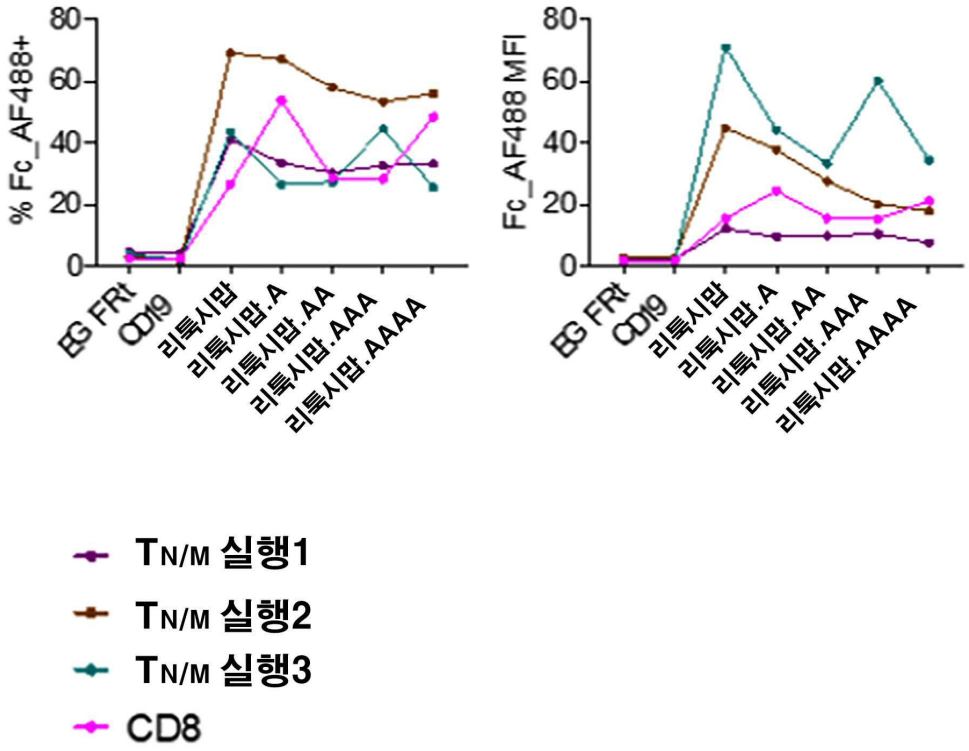
도면33a


HA
리툭시맙-기반 scFv
IgG4
CD28tm
A
AA
AAA
AAAA
CD28cyto
CD3ζ
T2A
EGFRt

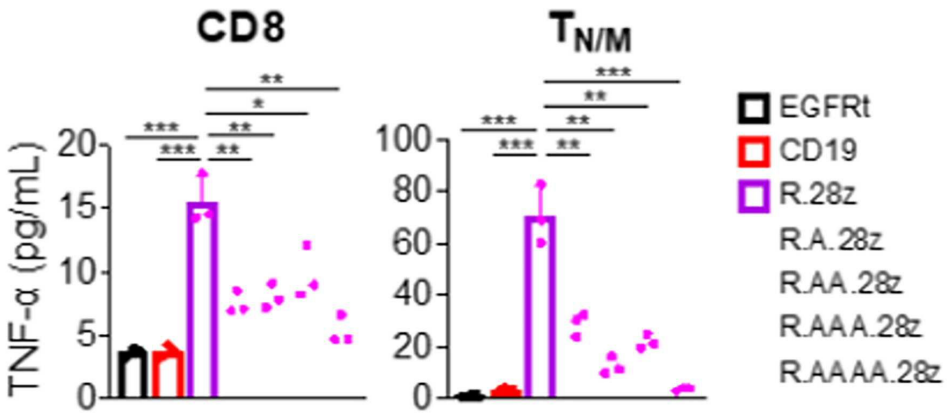
도면33b


형질도입되지 않음
R
RA
RAA
RAAA
RAAAA
α-Fc-AF488
α-EGFRt-PE
% Fc+ 0.87 42.8 51.1 38.8 53.5 49.9
AF488 MFI (AF488+ 중) 5.99 23.8 22.3 20.8 25.2 23.5
% EGFRt+ 0.11 45.5 53.6 39.5 55.8 55.8
PE MFI (EGFRt+ 중) 2.67 9.96 10.3 9.02 10.7 12

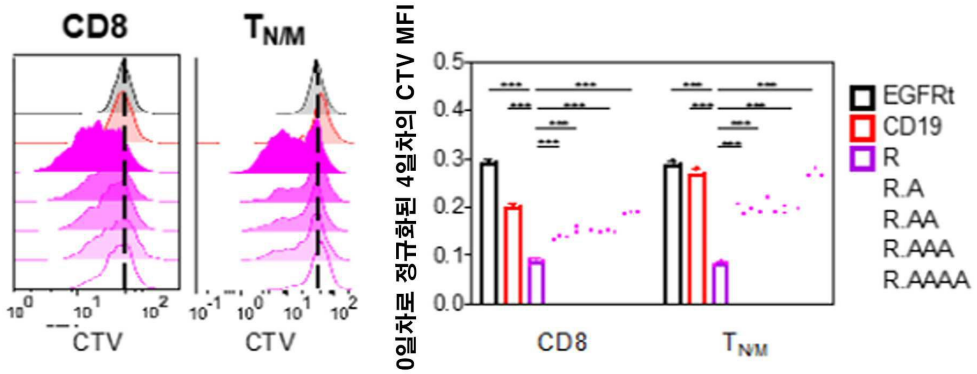
도면33c


% Fc_AF488+
Fc_AF488 MFI
80
60
40
20
0
EG FRt
CD19
리툭시맙
리툭시맙.A
리툭시맙.AA
리툭시맙.AAA
리툭시맙.AAAA
TN/M 실행1
TN/M 실행2
TN/M 실행3
CD8

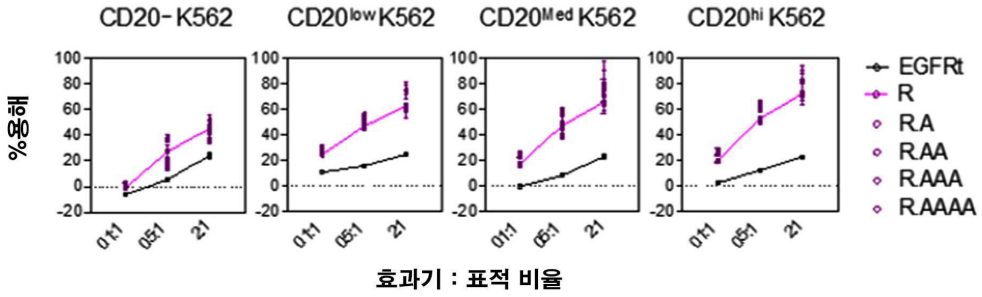
도면34a


CD8
TN/M
TNF-α (pg/mL)
20
15
10
5
0
100
80
60
40
20
0
***
**
*
EGFRt
CD19
R.28z
R.A.28z
R.AA.28z
R.AAA.28z
R.AAAA.28z

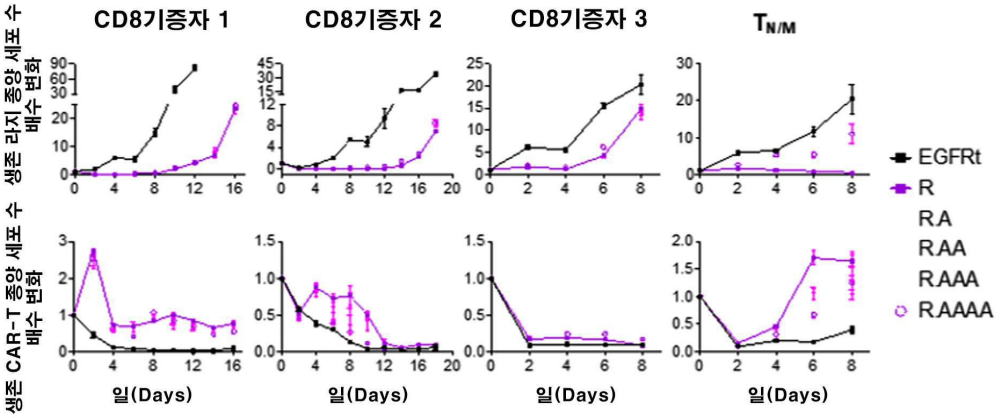
도면34b



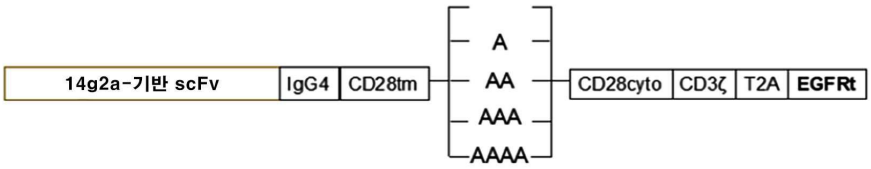
도면35a



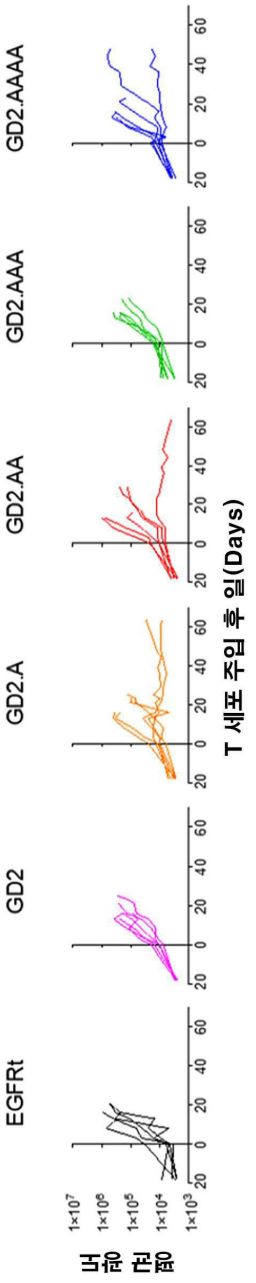
도면35b



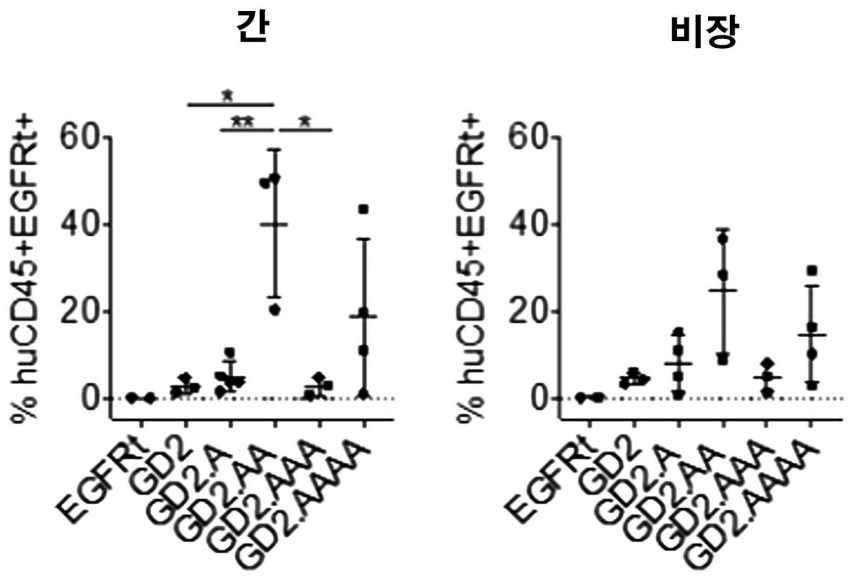
도면36a



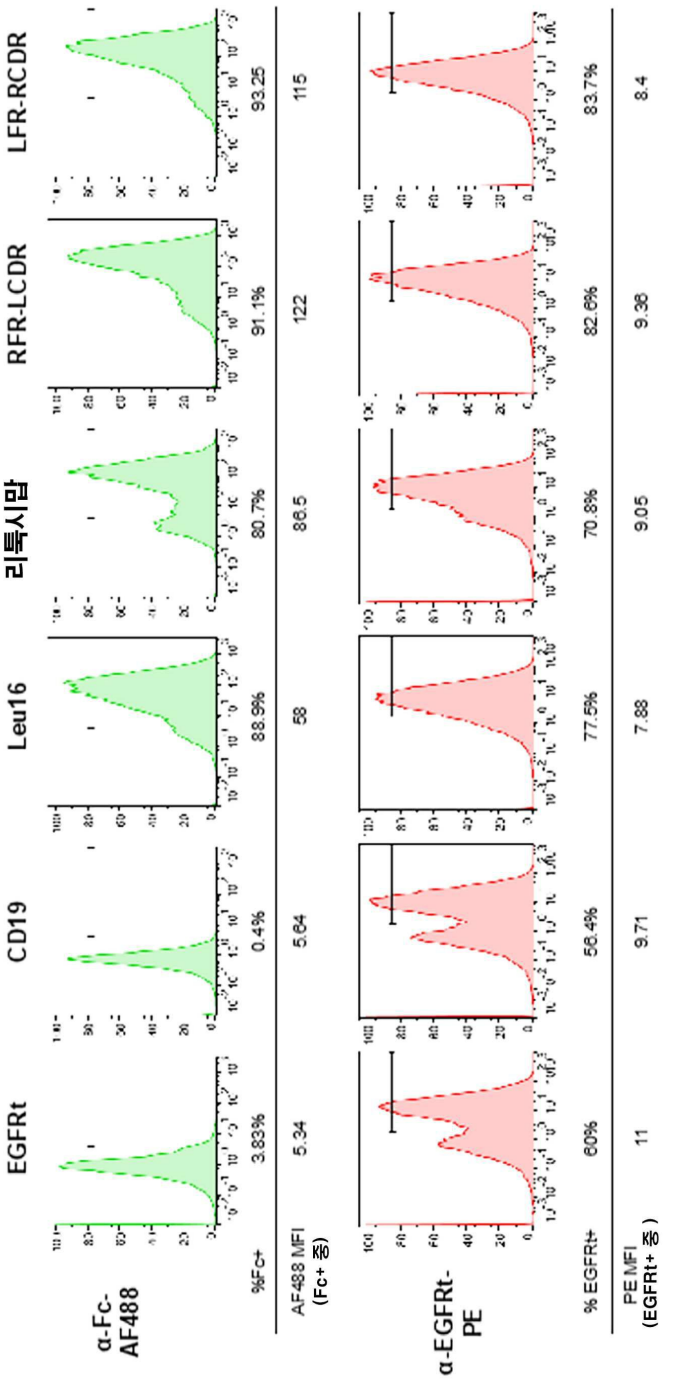
도면36b



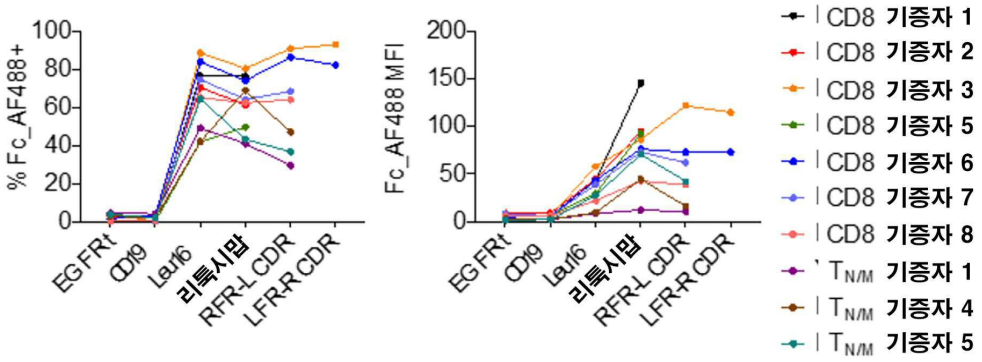
도면36c


간
비장
% huCD45+EGFRt+
60
40
20
0
*
**
*
EGFRt
GD2
GD2.A
GD2.AA
GD2.AAA
GD2.AAAA

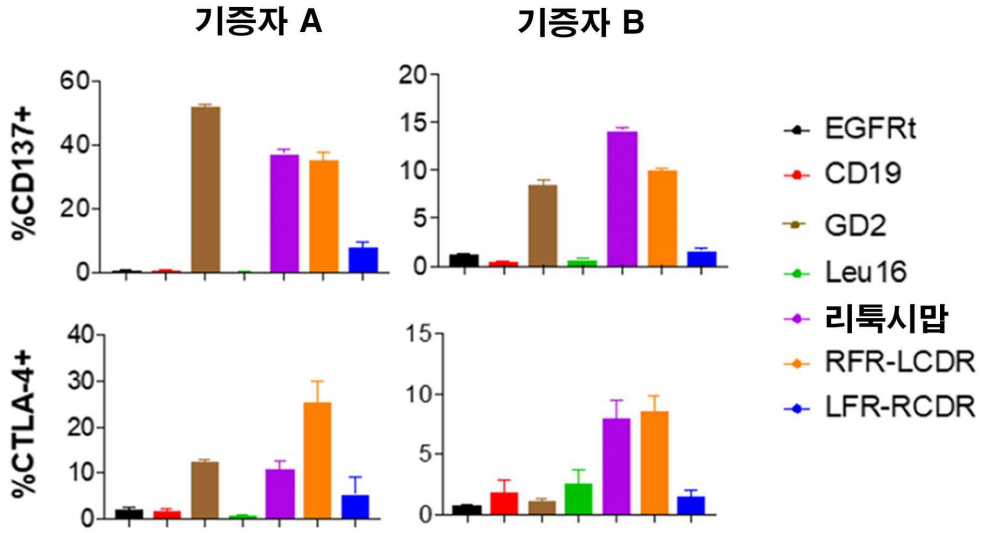
도면37a


EGFRt
CD19
Leu16
리툭시맙
RFR-LCDR
LFR-RCDR
α-Fc-AF488
%Fc+
3.83%
0.4%
88.9%
80.7%
91.1%
93.25
AF488 MFI (Fc+ 중)
5.34
5.64
58
86.5
122
115
α-EGFRt-PE
% EGFRt+
60%
58.4%
77.5%
70.8%
82.6%
83.7%
PE MFI (EGFRt+ 중)
11
9.71
7.88
9.05
9.36
8.4

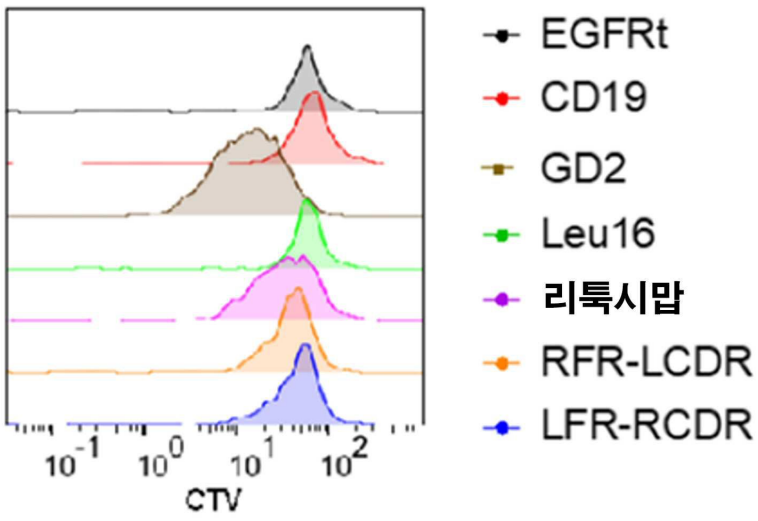
도면37b



도면38a



도면38b



도면39

K_D (M)	Leu16	리툭시맙	하이브리드
실행 1	1.57E-07	1.10E-07	7.55E-08
실행 2	1.27E-07	1.23E-07	9.55E-08
실행 3	1.31E-07	1.22E-07	8.22E-08
평균	1.38E-07	1.19E-07	8.44E-08
SD	1.63E-08	7.13E-09	1.02E-08

$p = 0.131$ $p = 0.009$

$p = 0.008$

k_a (1/Ms)	Leu16	리툭시맙	하이브리드
실행 1	3.99E+03	5.76E+03	9.22E+03
실행 2	5.41E+03	6.50E+03	7.36E+03
실행 3	3.87E+03	5.02E+03	8.73E+03
평균	4.42E+03	5.76E+03	8.44E+03
SD	8.56E+02	7.39E+02	9.65E+02

$p = 0.110$ $p = 0.019$

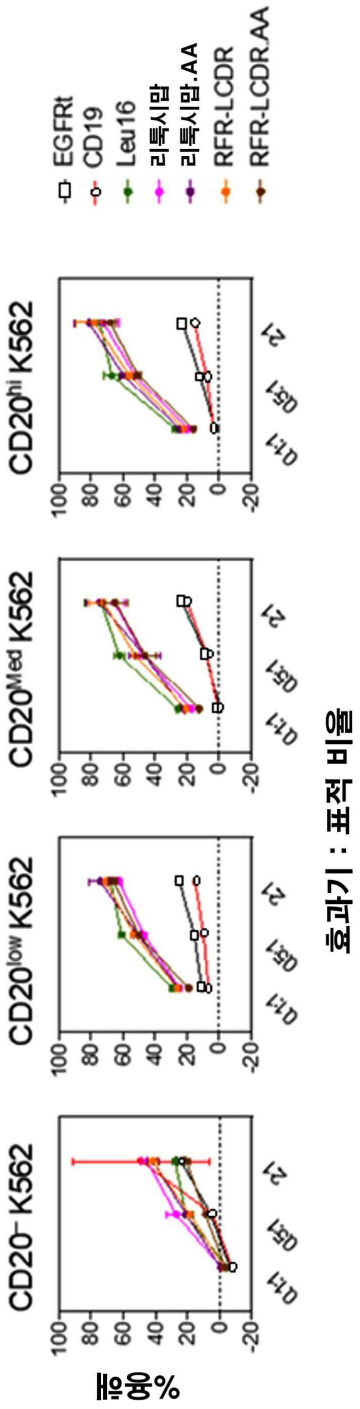
$p = 0.006$

k_{dis} (1/s)	Leu16	리툭시맙	하이브리드
실행 1	6.26E-04	6.35E-04	6.96E-04
실행 2	6.85E-04	7.99E-04	7.03E-04
실행 3	5.06E-04	6.15E-04	7.17E-04
평균	6.05E-04	6.83E-04	7.05E-04
SD	9.08E-05	1.01E-04	1.09E-05

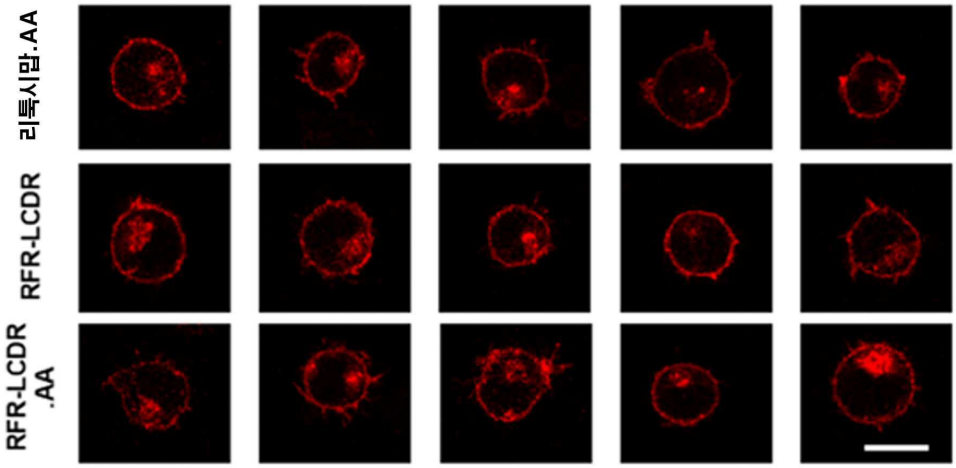
$p = 0.380$ $p = 0.720$

$p = 0.131$

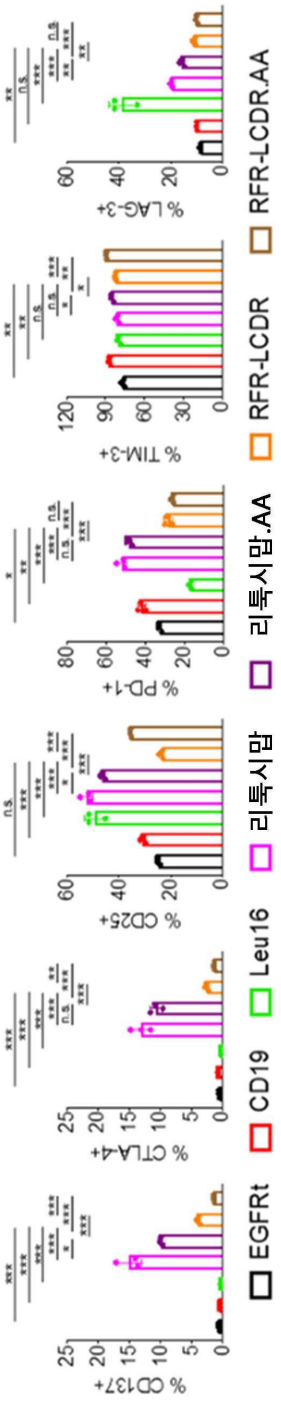
도면40a


EGFRt
CD19
Leu16
리툭시맙
리툭시맙.AA
RFR-LCDR
RFR-LCDR.AA
CD20hi K562
CD20Med K562
CD20low K562
CD20- K562
%용해
효과기 : 표적 비율
0:1
0.5:1
2:1
100
80
60
40
20
0
-20

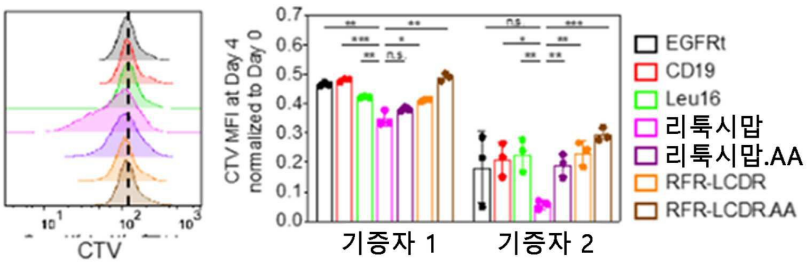
도면40b



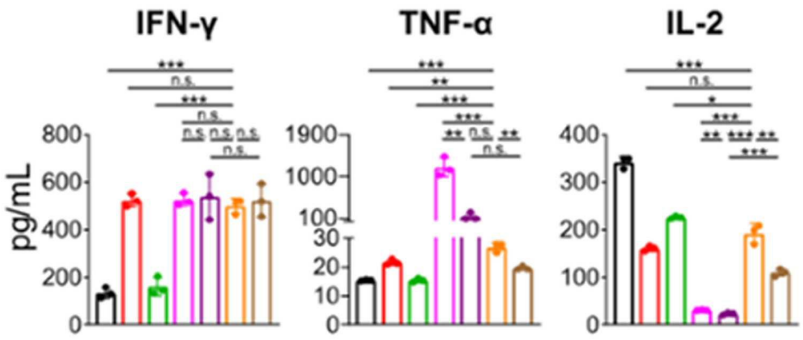
도면41a


% CD137+
% CTLA-4+
% CD25+
% PD-1+
% TIM-3+
% LAG-3+
EGFRt
CD19
Leu16
리툭시맙
리툭시맙.AA
RFR-LCDR
RFR-LCDR.AA

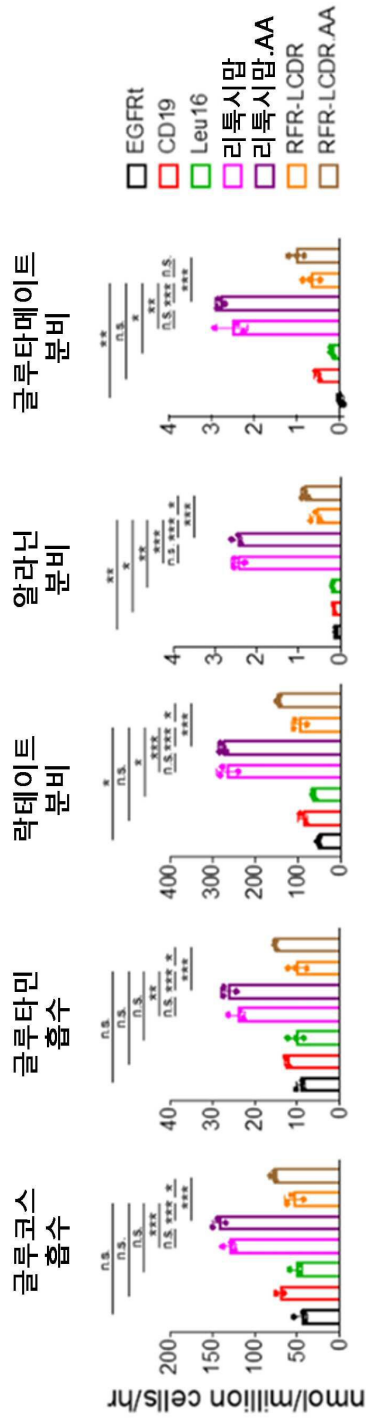
도면41b


CTV
CTV MFI at Day 4 normalized to Day 0
기증자 1
기증자 2
EGFRt
CD19
Leu16
리툭시맙
리툭시맙.AA
RFR-LCDR
RFR-LCDR.AA

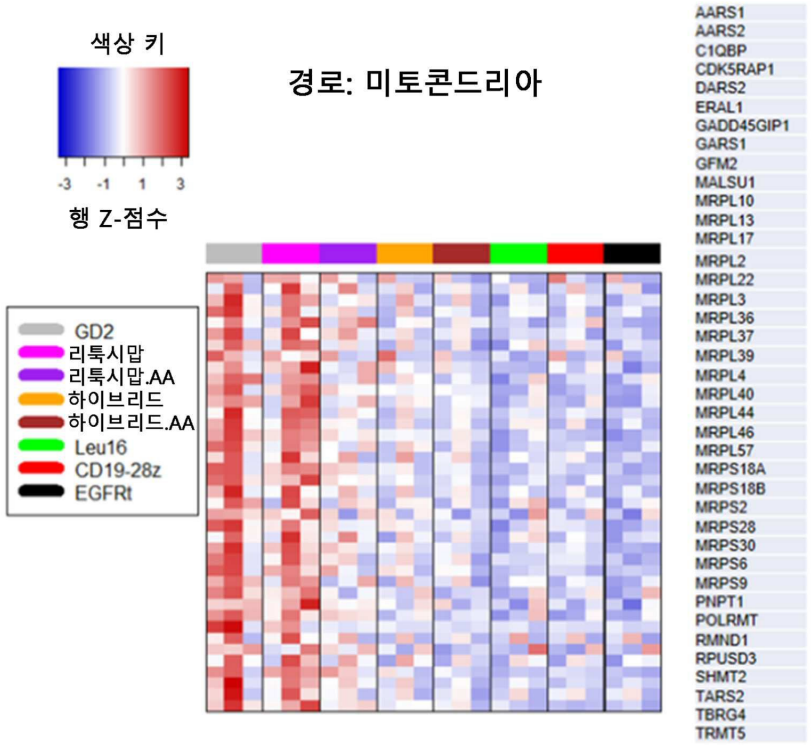
도면41c


IFN-γ
TNF-α
IL-2
pg/mL
800
600
400
200
0
1900
1000
100
30
20
10
0
400
300
200
100
0
***
n.s.
**
*

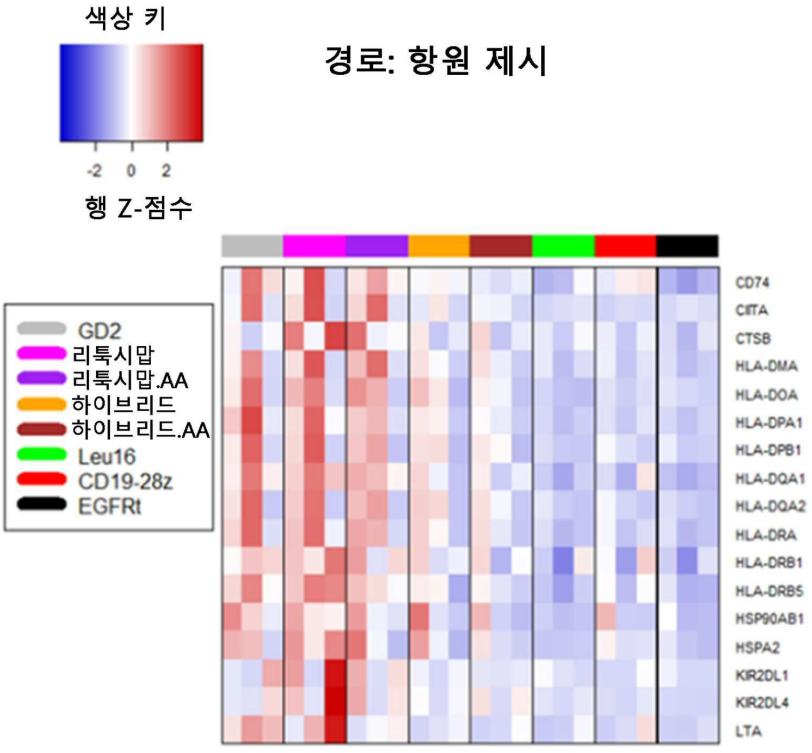
도면42


글루코스 흡수
글루타민 흡수
락테이트 분비
알라닌 분비
글루타메이트 분비
nmol/million cells/hr
EGFRt
CD19
Leu16
리툭시맙
리툭시맙.AA
RFR-LCDR
RFR-LCDR.AA

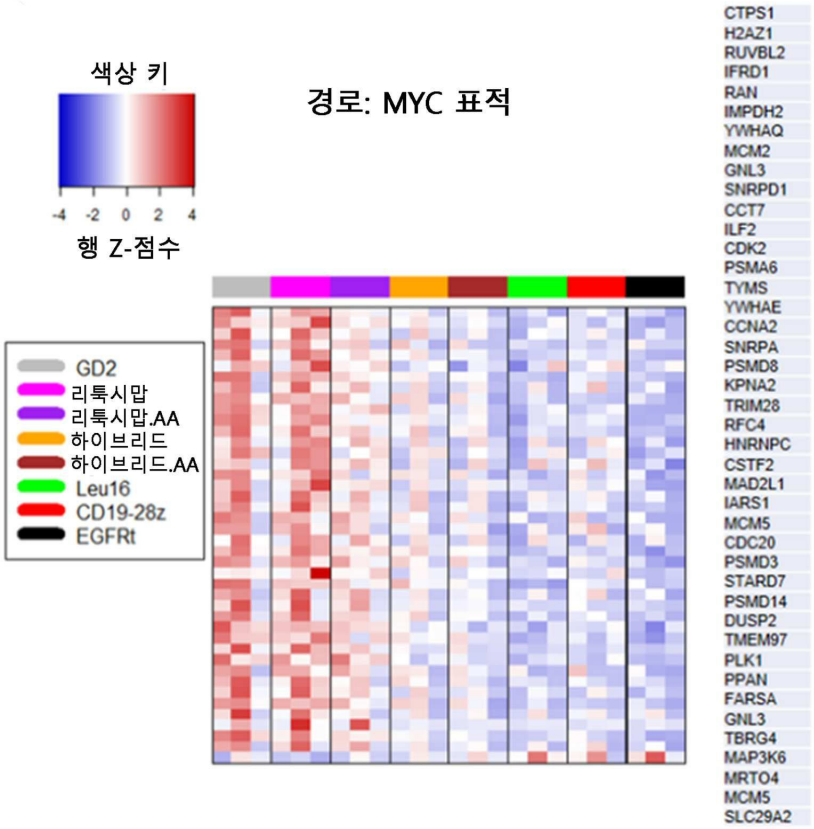
도면43a


색상 키
-3 -1 1 3
행 Z-점수
경로: 미토콘드리아
GD2
리툭시맙
리툭시맙.AA
하이브리드
하이브리드.AA
Leu16
CD19-28z
EGFRt
AARS1
AARS2
C1QBP
CDK5RAP1
DARS2
ERAL1
GADD45GIP1
GARS1
GFM2
MALSU1
MRPL10
MRPL13
MRPL17
MRPL2
MRPL22
MRPL3
MRPL36
MRPL37
MRPL39
MRPL4
MRPL40
MRPL44
MRPL46
MRPL57
MRPS18A
MRPS18B
MRPS2
MRPS28
MRPS30
MRPS6
MRPS9
PNPT1
POLRMT
RMND1
RPUSD3
SHMT2
TARS2
TBRG4
TRMT5

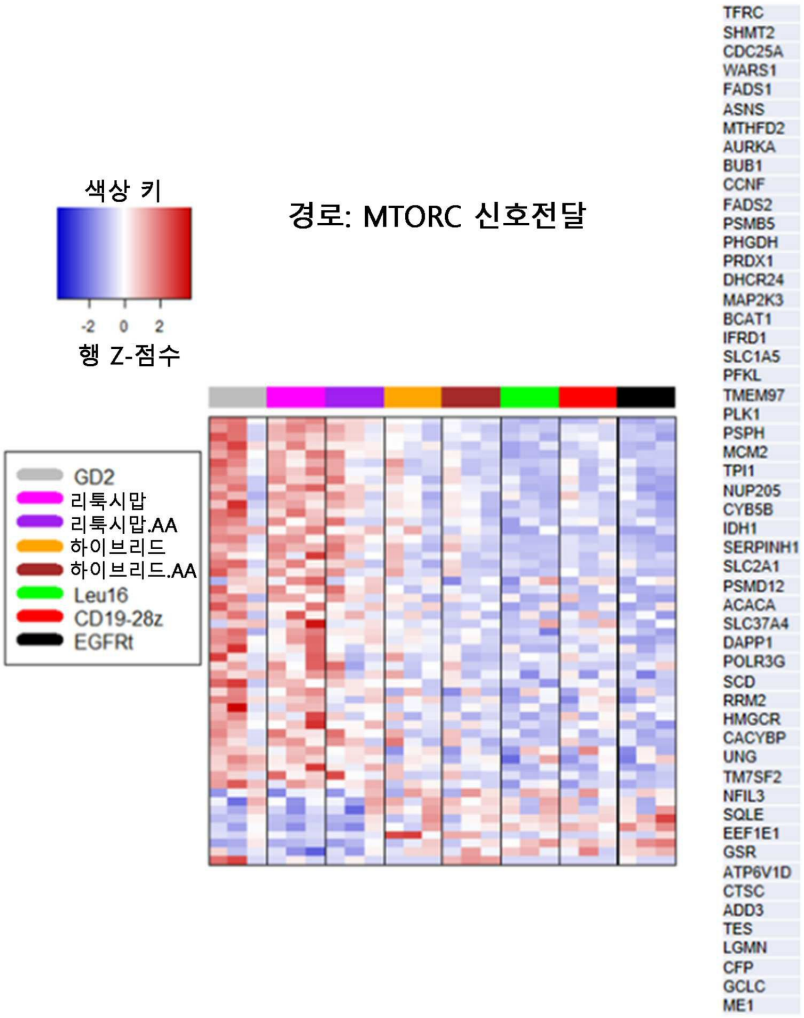
도면43b


색상 키
-2 0 2
행 Z-점수
경로: 항원 제시
GD2
리툭시맙
리툭시맙.AA
하이브리드
하이브리드.AA
Leu16
CD19-28z
EGFRt
CD74
CIITA
CTSB
HLA-DMA
HLA-DOA
HLA-DPA1
HLA-DPB1
HLA-DQA1
HLA-DQA2
HLA-DRA
HLA-DRB1
HLA-DRB5
HSP90AB1
HSPA2
KIR2DL1
KIR2DL4
LTA

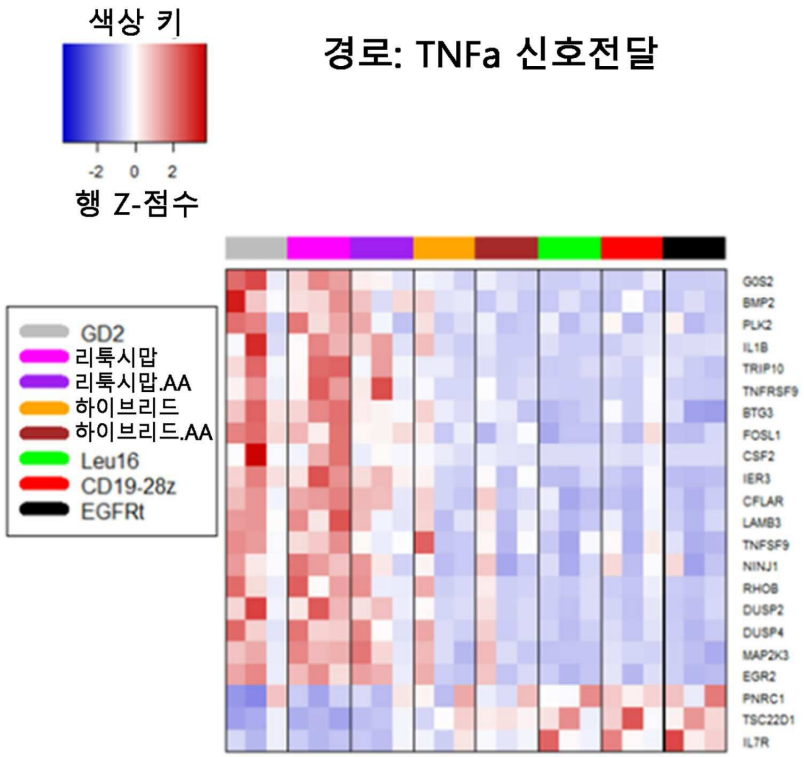
도면43c


색상 키
-4 -2 0 2 4
행 Z-점수
경로: MYC 표적
GD2
리툭시맙
리툭시맙.AA
하이브리드
하이브리드.AA
Leu16
CD19-28z
EGFRt
CTPS1
H2AZ1
RUVBL2
IFRD1
RAN
IMPDH2
YWHAQ
MCM2
GNL3
SNRPD1
CCT7
ILF2
CDK2
PSMA6
TYMS
YWHAE
CCNA2
SNRPA
PSMD8
KPNA2
TRIM28
RFC4
HNRNPC
CSTF2
MAD2L1
IARS1
MCM5
CDC20
PSMD3
STARD7
PSMD14
DUSP2
TMEM97
PLK1
PPAN
FARSA
GNL3
TBRG4
MAP3K6
MRTO4
MCM5
SLC29A2

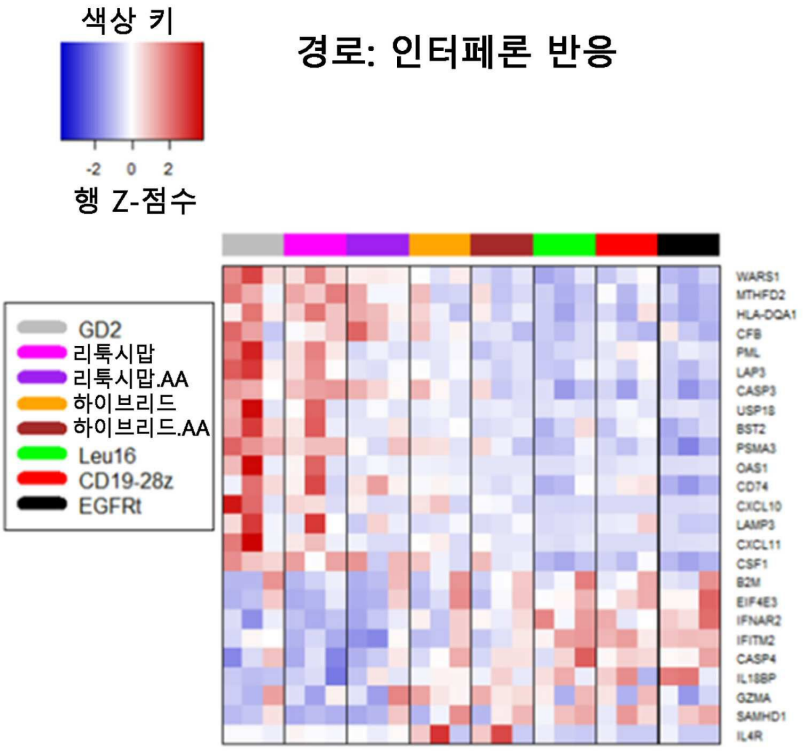
도면43d


색상 키
-2 0 2
행 Z-점수
경로: MTORC 신호전달
GD2
리툭시맙
리툭시맙.AA
하이브리드
하이브리드.AA
Leu16
CD19-28z
EGFRt
TFRC
SHMT2
CDC25A
WARS1
FADS1
ASNS
MTHFD2
AURKA
BUB1
CCNF
FADS2
PSMB5
PHGDH
PRDX1
DHCR24
MAP2K3
BCAT1
IFRD1
SLC1A5
PFKL
TMEM97
PLK1
PSPH
MCM2
TPI1
NUP205
CYB5B
IDH1
SERPINH1
SLC2A1
PSMD12
ACACA
SLC37A4
DAPP1
POLR3G
SCD
RRM2
HMGCR
CACYBP
UNG
TM7SF2
NFIL3
SQLE
EEF1E1
GSR
ATP6V1D
CTSC
ADD3
TES
LGMN
CFP
GCLC
ME1

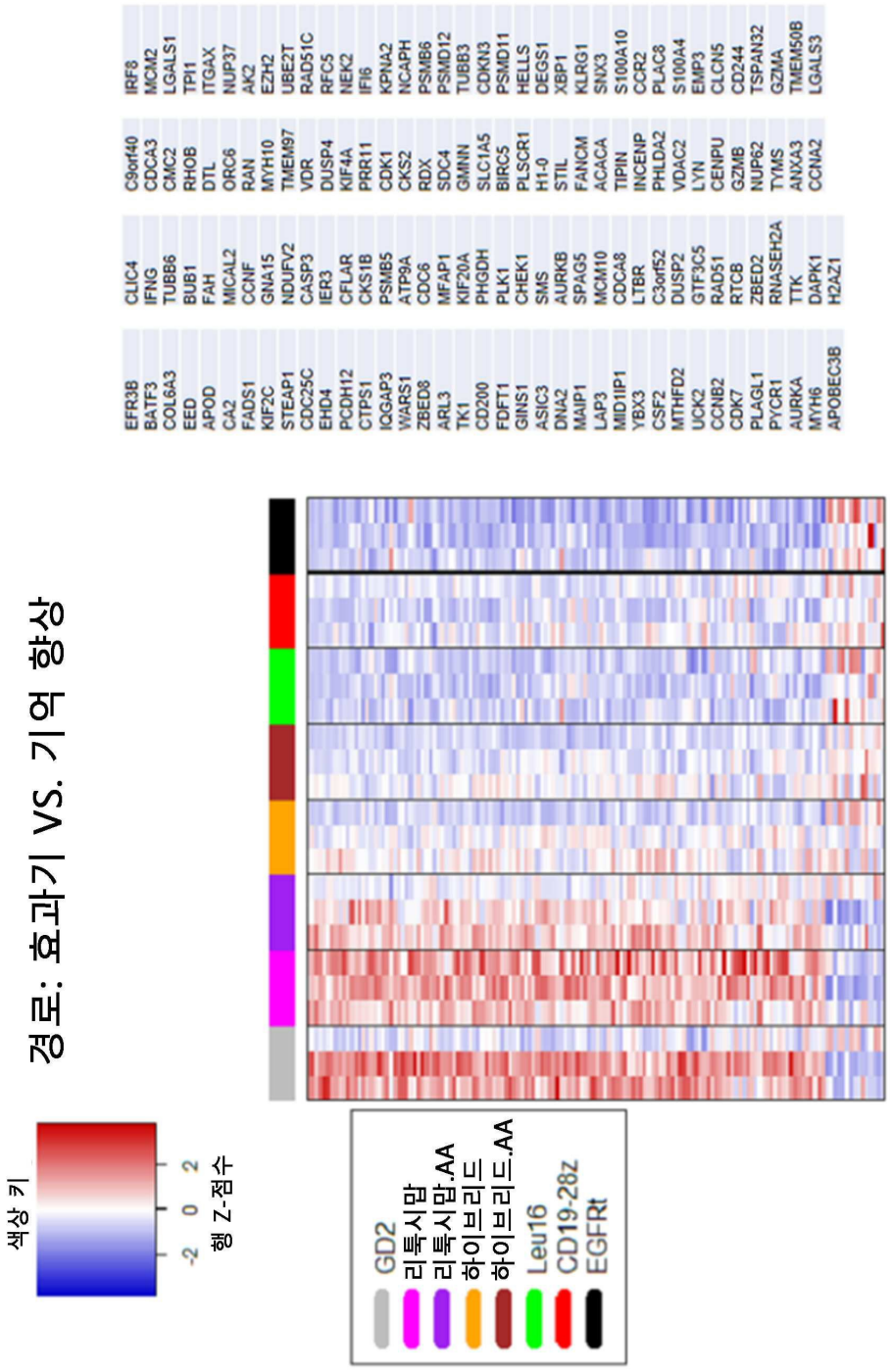
도면43e


색상 키
-2 0 2
행 Z-점수
경로: TNFa 신호전달
GD2
리툭시맙
리툭시맙.AA
하이브리드
하이브리드.AA
Leu16
CD19-28z
EGFRt
G0S2
BMP2
PLK2
IL1B
TRIP10
TNFRSF9
BTG3
FOSL1
CSF2
IER3
CFLAR
LAMB3
TNFSF9
NINJ1
RHOB
DUSP2
DUSP4
MAP2K3
EGR2
PNRC1
TSC22D1
IL7R

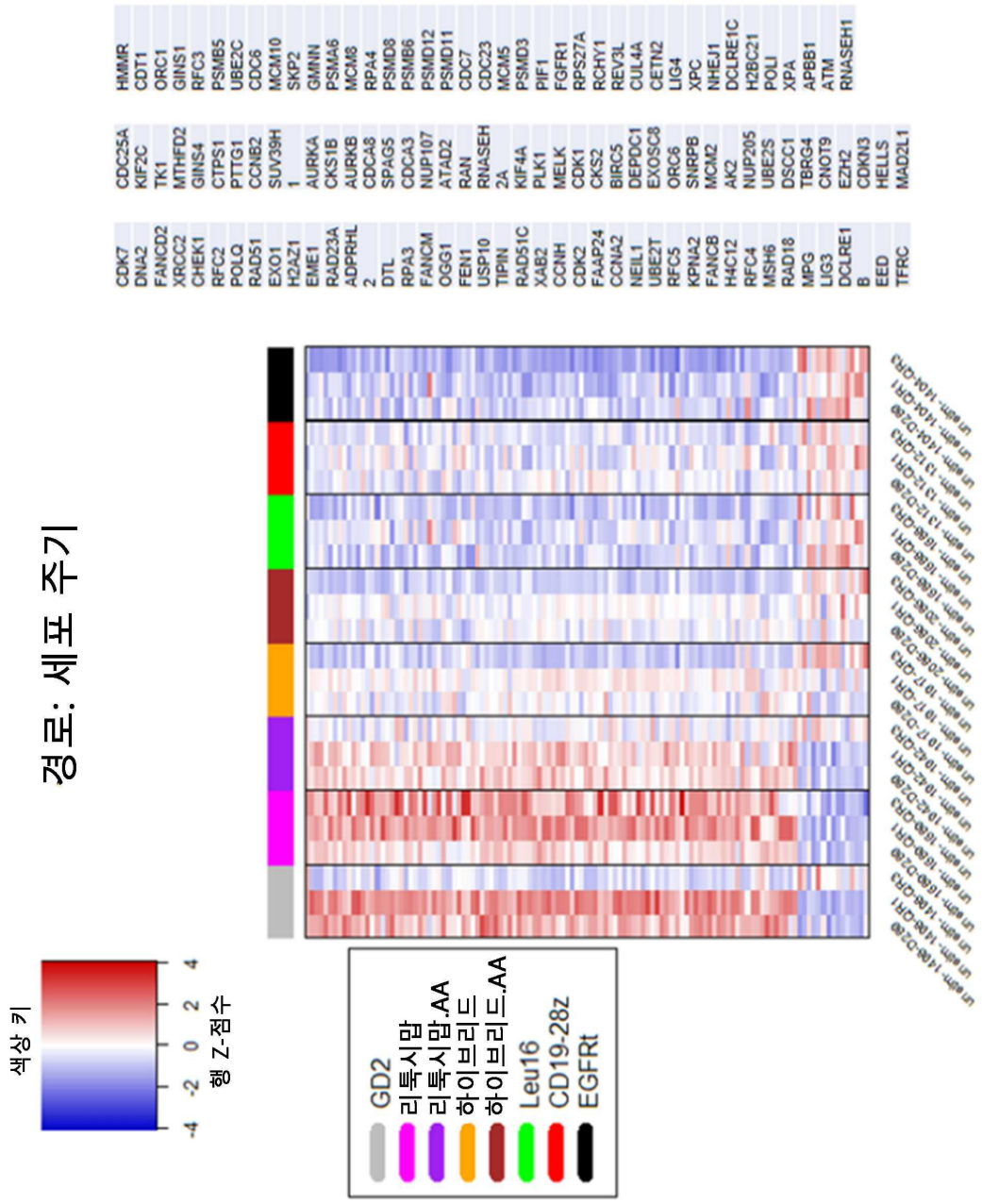
도면43f


색상 키
-2 0 2
행 Z-점수
경로: 인터페론 반응
GD2
리툭시맙
리툭시맙.AA
하이브리드
하이브리드.AA
Leu16
CD19-28z
EGFRt
WARS1
MTHFD2
HLA-DQA1
CFB
PML
LAP3
CASP3
USP18
BST2
PSMA3
OAS1
CD74
CXCL10
LAMP3
CXCL11
CSF1
B2M
EIF4E3
IFNAR2
IFITM2
CASP4
IL18BP
GZMA
SAMHD1
IL4R

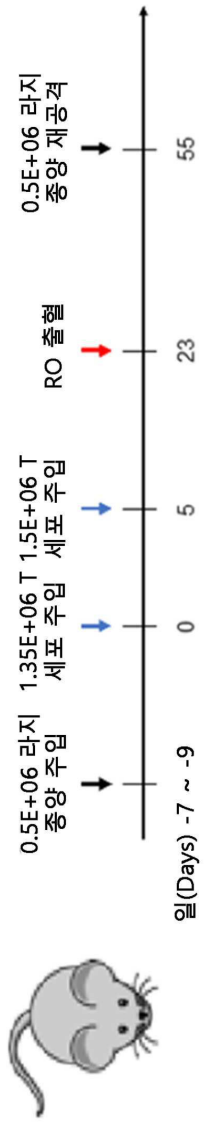
도면43g


경로: 효과기 VS. 기억 향상
색상 키
-2 0 2
행 Z-점수
GD2
리툭시맙
리툭시맙.AA
하이브리드
하이브리드.AA
Leu16
CD19-28z
EGFRt

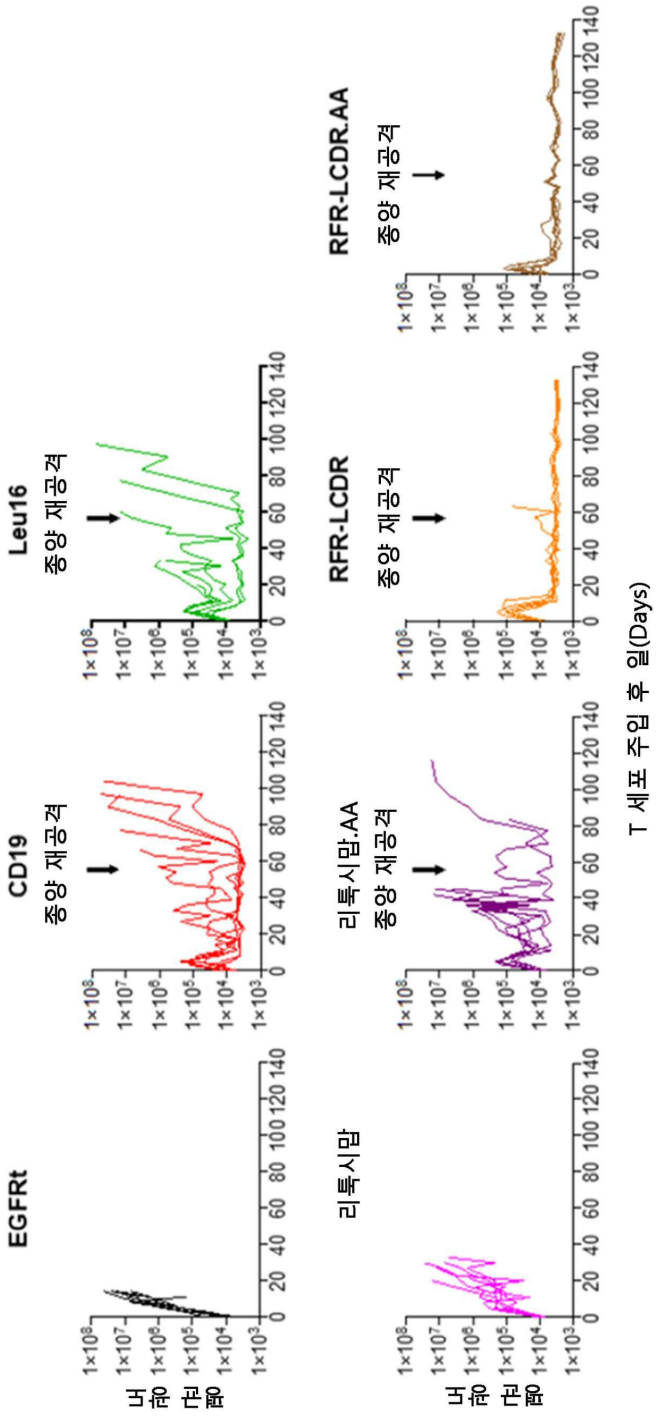
도면43h


경로: 세포 주기
색상 키
행 Z-점수
-4 -2 0 2 4
GD2
리툭시맙
리툭시맙.AA
하이브리드
하이브리드.AA
Leu16
CD19-28z
EGFRt
HMMR CDT1 ORC1 GINS1 RFC3 PSMB5 UBE2C CDC6 MCM10 SKP2 GMNN PSMA6 MCM8 RPA4 PSMD8 PSMB6 PSMD12 PSMD11 CDC7 CDC23 MCM5 PSMD3 PIF1 FGFR1 RPS27A RCHY1 REV3L CUL4A CETN2 LIG4 XPC NHEJ1 DCLRE1C H2BC21 POLI XPA APBB1 ATM RNASEH1
CDC25A KIF2C TK1 MTHFD2 GINS4 CTPS1 PTTG1 CCNB2 SUV39H1 AURKA CKS1B AURKB CDCA8 SPAG5 CDCA3 NUP107 ATAD2 RAN RNASEH2A KIF4A PLK1 MELK CDK1 CKS2 BIRC5 DEPDC1 EXOSC8 ORC6 SNRPB MCM2 AK2 NUP205 UBE2S DSCC1 TBRG4 CNOT9 EZH2 CDKN3 HELLS MAD2L1
CDK7 DNA2 FANCD2 XRCC2 CHEK1 RFC2 POLQ RAD51 EXO1 H2AZ1 EME1 RAD23A ADPRHL2 DTL RPA3 FANCM OGG1 FEN1 USP10 TIPIN RAD51C XAB2 CCNH CDK2 FAAP24 CCNA2 NEIL1 UBE2T RFC5 KPNA2 FANCB H4C12 RFC4 MSH6 RAD18 MPG LIG3 DCLRE1B EED TFRC

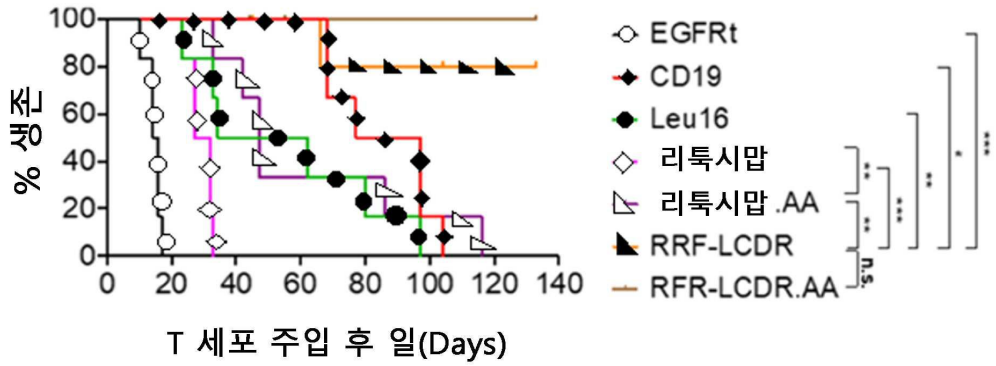
도면44a


0.5E+06 라지 종양 주입
1.35E+06 T 세포 주입
1.5E+06 T 세포 주입
RO 출혈
0.5E+06 라지 종양 재공격
일(Days) -7 ~ -9
0
5
23
55

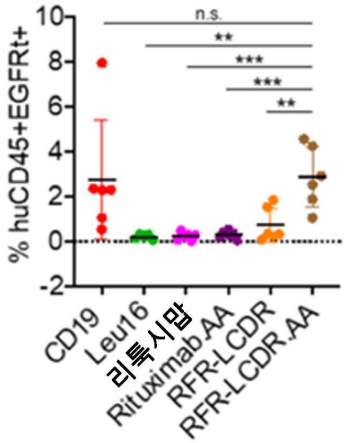
도면44b


EGFRt
CD19
Leu16
리툭시맙
리툭시맙.AA
RFR-LCDR
RFR-LCDR.AA
종양 재공격
평균 광자
T 세포 주입 후 일(Days)

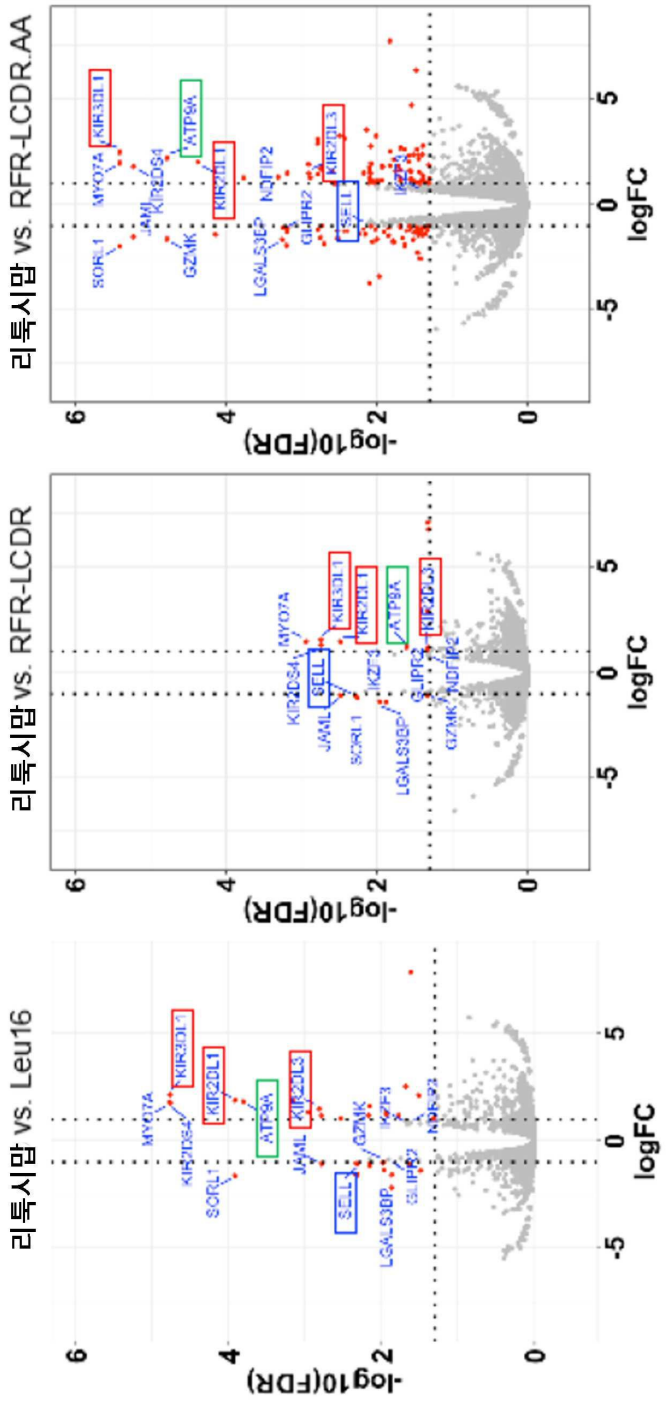
도면44c


% 생존
100
80
60
40
20
0
0 20 40 60 80 100 120 140
T 세포 주입 후 일(Days)
EGFRt
CD19
Leu16
리툭시맙
리툭시맙 .AA
RRF-LCDR
RFR-LCDR.AA
n.s.
*
**
***

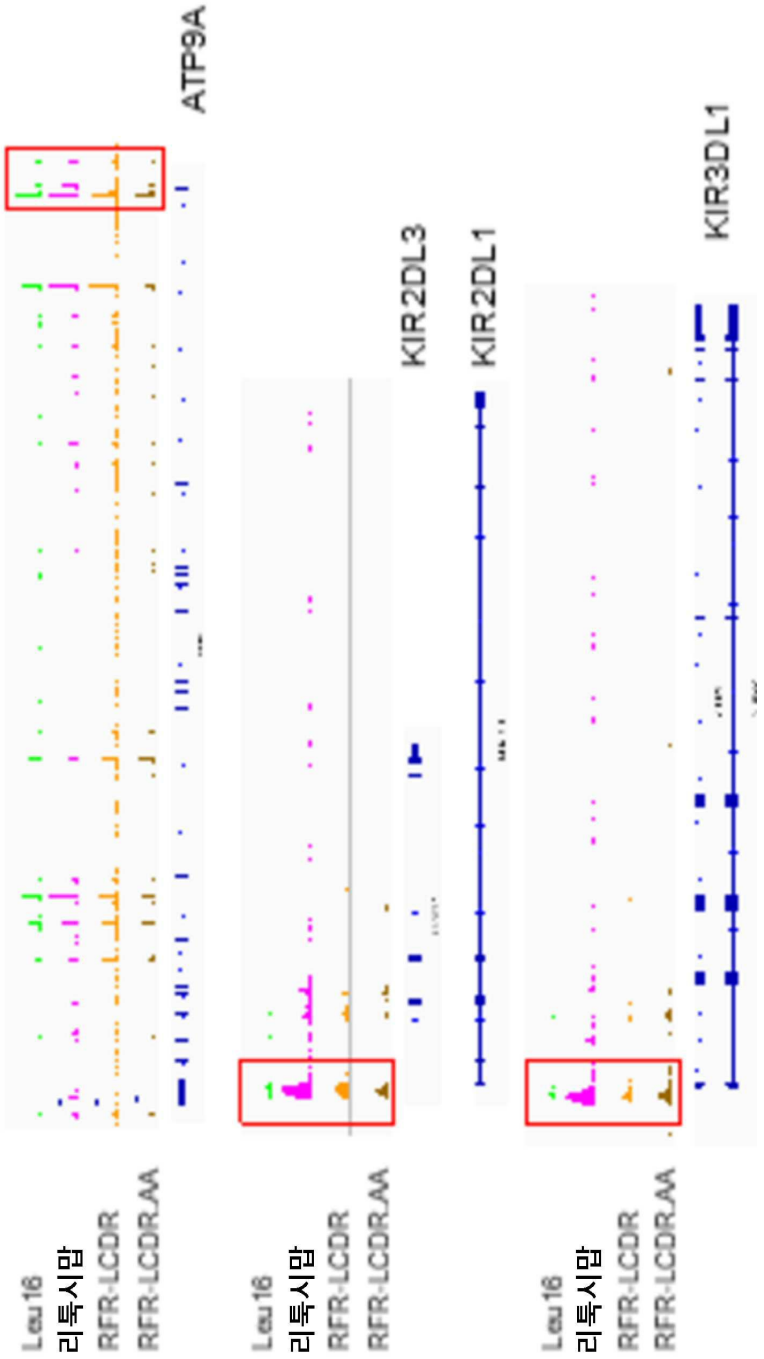
도면44d


% huCD45+EGFRt+
10
8
6
4
2
0
-2
n.s.
**
***
***
**
CD19
Leu16
리툭시맙
Rituximab.AA
RFR-LCDR
RFR-LCDR.AA

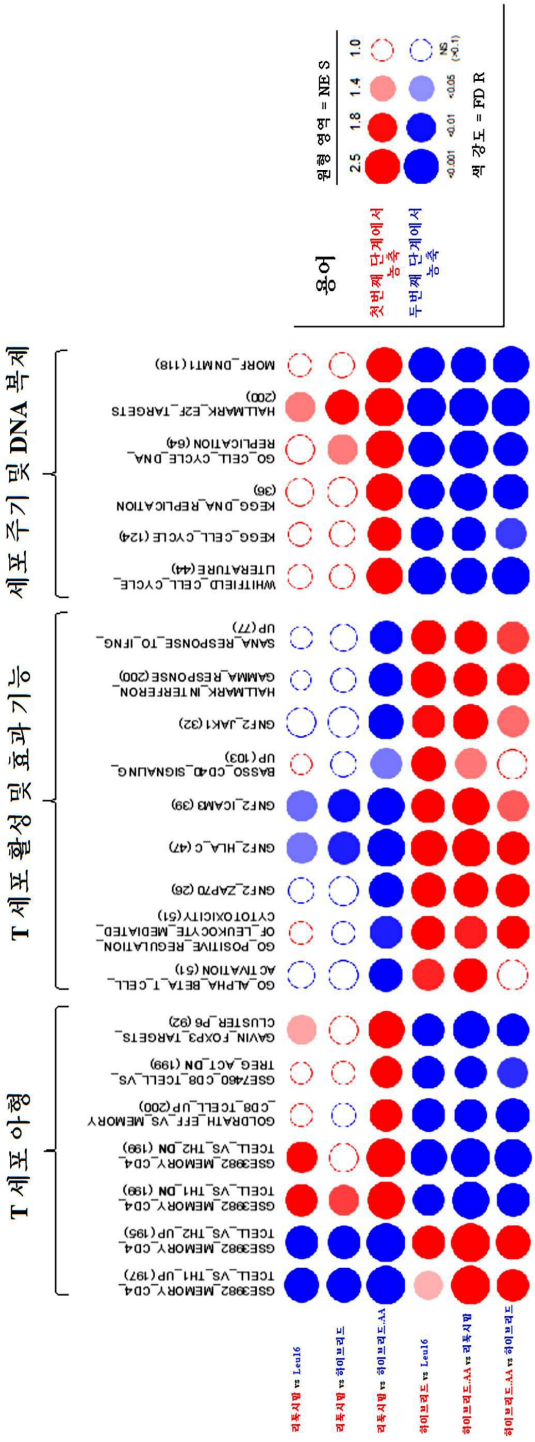
도면45a


리툭시맙 vs. RFR-LCDR.AA
리툭시맙 vs. RFR-LCDR
리툭시맙 vs. Leu16
-log10(FDR)
logFC
KIR3DL1
KIR2DL1
ATP8A
KIR2DL3
SELL
MYO7A
JAML
KIR2DS4
SORL1
GZMK
LGALS3BP
NDFIP2
GLIPR2
IKZF3

도면45b


ATP9A
KIR2DL3
KIR2DL1
KIR3DL1
Leu16
리툭시맙
RFR-LCDR
RFR-LCDR.AA
Leu16
리툭시맙
RFR-LCDR
RFR-LCDR.AA
Leu16
리툭시맙
RFR-LCDR
RFR-LCDR.AA

도면45c



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA

<120> CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS AND RELATED METHODS AND COMPOSITIONS FOR THE TREATMENT OF CANCER

<130> UCLA.P0112WO-1001151943

<140> PCT/US2021/020511

<141> 2021-03-02

<150> 63/084,138

<151> 2020-09-28

<150> 62/984,139

<151> 2020-03-02

<160> 160

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 1

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

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

Asp Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

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

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

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

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

<210> 2

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Phe Phe Asp Val Trp

100 105 110

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 3

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 3

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile

20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45

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

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

<210> 4
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide
<400> 4
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

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

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

<210> 5

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 5

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

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

Asp Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

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

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

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

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

<210> 6

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 6

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

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

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Phe Phe Asp Val Trp

100 105 110

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 7

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 7

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile

20 25 30

His Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 8

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 8

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly

100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 9

Ser Tyr Asn Met His

1 5

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 10

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 11

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 11

Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Phe Phe Asp Val
1 5 10

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 12

Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met Asp
1 5 10

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 13

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 14

Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr

1 5

<210> 15

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 15

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 16

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 16

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

1 5 10

<210> 17

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 17

Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 18

Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 19

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 19

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys
20

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 20

Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 21

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 21

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 22

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 23

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 23

Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val

1 5 10

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 24

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His

1 5 10

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 25

Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr

1 5

<210> 26

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 26

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 27

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 27

Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly

1 5 10

<210> 28

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 28

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 29

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 29

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys

20

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 30

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 31

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 31

Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 32

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 32

Gly Ser Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5 10 15

Ser Ser

<210> 33

<211> 1060

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 33

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

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

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

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

210 215 220
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

225 230 235 240

Ala Arg Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Phe Phe Asp Val Trp

245 250 255

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

260 265 270

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val

275 280 285

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

290 295 300

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

305 310 315 320

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

325 330 335

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

340 345 350

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

355 360 365

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile

370 375 380

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

385 390 395 400

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

405 410 415

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

420 425 430

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

435 440 445

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

450 455 460

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

465 470 475 480

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Met
485 490 495
Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
500 505 510
Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser
515 520 525
Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly

530 535 540
Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala
545 550 555 560
Ala Tyr Arg Ser Gly Gly Gly Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp
565 570 575
Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
580 585 590
Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg

595 600 605
Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
610 615 620
Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
625 630 635 640
Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
645 650 655
Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His

660 665 670
Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly
675 680 685
Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg Met
690 695 700
Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro Ala
705 710 715 720
Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu

725 730 735

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

740 745 750

Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe

755 760 765

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

770 775 780

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

785 790 795 800

Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu

805 810 815

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

820 825 830

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

835 840 845

Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala

850 855 860

Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr

865 870 875 880

Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln

885 890 895

Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro

900 905 910

Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val

915 920 925

Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn

930 935 940

Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn

945 950 955 960

Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His

965 970 975

Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met

980 985 990

Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val

995 1000 1005

Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro

1010 1015 1020

Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile

1025 1030 1035

Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala

1040 1045 1050

Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met

1055 1060

<210> 34

<211> 1059

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 34

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser

35 40 45

Val Ser Tyr Ile His Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys

50 55 60

Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg

65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg

85 90 95

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

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

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

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

340 345 350

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
355 360 365
Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
370 375 380
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
385 390 395 400
Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
405 410 415

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

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Met Phe
485 490 495
Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu
500 505 510
Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg
515 520 525
Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro
530 535 540

Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala
545 550 555 560
Tyr Arg Ser Gly Gly Gly Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
565 570 575
Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
580 585 590

Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp
595 600 605

Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
610 615 620

Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
625 630 635 640

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
645 650 655

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
660 665 670

Gln Ala Leu Pro Pro Arg Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser
675 680 685

Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg Met Leu
690 695 700

Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro Ala Phe
705 710 715 720

Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe
725 730 735

Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn
740 745 750

Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg
755 760 765

Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp
770 775 780

Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala
785 790 795 800

Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile
805 810 815

Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val
820 825 830

Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser

835 840 845

Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn

850 855 860

Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys

865 870 875 880

Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val

885 890 895

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

900 905 910

Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp

915 920 925

Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser

930 935 940

Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile

945 950 955 960

Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr

965 970 975

Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly

980 985 990

Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys

995 1000 1005

His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly

1010 1015 1020

Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala

1025 1030 1035

Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu

1040 1045 1050

Gly Ile Gly Leu Phe Met

1055

<210> 35

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 35

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly
20

<210> 36

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 36

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1 5 10 15

Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser
65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
100 105 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
115 120 125

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

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
195 200 205
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
210 215 220
Leu Ser Leu Gly Lys
225

<210> 37
<211> 28
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide
<400> 37
Met Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser

1 5 10 15
Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
20 25

<210> 38
<211> 41
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
<400> 38
Arg Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly 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> 39

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 39

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> 40

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 40

Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp
1 5 10 15

Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg
20

<210> 41

<211> 357

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 41

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

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly
20 25 30

Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe
35 40 45

Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala
50 55 60

Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu
65 70 75 80

Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile
85 90 95

Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu
100 105 110

Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala
115 120 125

Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu
130 135 140

Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr
145 150 155 160

Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys
165 170 175

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

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

Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro
305 310 315 320
Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala
325 330 335
Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly
340 345 350
Ile Gly Leu Phe Met
355

<210> 42

<211> 1040

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 42

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

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

Asp Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

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

50 55 60

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

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

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

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

115 120 125

Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met
130 135 140

Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp
145 150 155 160

Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr
165 170 175

Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala

180 185 190

Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser
195 200 205

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

Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr
225 230 235 240

Thr Val Thr Val Ser Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro

245 250 255

Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro

260 265 270

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr

275 280 285

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn

290 295 300

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg

305 310 315 320

Glu Glu Gln Phe Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val

325 330 335

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

340 345 350

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys

355 360 365

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

370 375 380

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe

385 390 395 400

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu

405 410 415

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe

420 425 430

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly

435 440 445

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

450 455 460

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Met Phe Trp Val Leu

465 470 475 480

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

485 490 495

Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly His

500 505 510

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

515 520 525

His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys

610 615 620

Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu

625 630 635 640

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

645 650 655

Pro Pro Arg Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr

660 665 670

Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg Met Leu Leu Leu Val

675 680 685

Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro Ala Phe Leu Leu Ile

690 695 700

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

705 710 715 720

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

725 730 735

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

740 745 750

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

755 760 765

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

770 775 780

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

785 790 795 800

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

805 810 815

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

820 825 830

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

835 840 845

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

850 855 860

Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala

865 870 875 880

Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val

885 890 895

Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn

900 905 910

Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile

915 920 925

Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr

930 935 940

Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly

945 950 955 960

Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn

965 970 975

Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys

980 985 990

His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys

995 1000 1005

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

1010 1015 1020

Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu

1025 1030 1035

Phe Met

1040

<210> 43

<211> 1039

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 43

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile

20 25 30

His Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met
130 135 140
Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp

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

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

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

340 345 350
Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
355 360 365
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu

370 375 380

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

385 390 395 400

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

405 410 415

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Met Phe Trp Val Leu Val

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser
625 630 635 640
Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro
645 650 655
Pro Arg Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys

660 665 670
Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg Met Leu Leu Leu Val Thr
675 680 685
Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro Ala Phe Leu Leu Ile Pro
690 695 700
Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu
705 710 715 720
Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile

725 730 735
Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe
740 745 750
Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr
755 760 765
Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn
770 775 780
Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg

785 790 795 800
Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile
805 810 815
Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val
820 825 830
Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp
835 840 845
Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn

850 855 860
Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu

865 870 875 880

Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser

885 890 895

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

900 905 910

Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln

915 920 925

Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly

930 935 940

Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro

945 950 955 960

His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr

965 970 975

Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His

980 985 990

Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro

995 1000 1005

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

1010 1015 1020

Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe

1025 1030 1035

Met

<210> 44

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 44

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg

1 5 10 15

<210> 45

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 45

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr

1 5 10

<210> 46

<211> 10

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 46

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro

1 5 10

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 47

Lys Cys Cys Val Asp Cys Pro

1 5

<210> 48

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 48

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro

1 5

<210> 49

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 49

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

<210> 50

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 50

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys

1 5 10 15

Pro

<210> 51

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 51

Ser Pro Asn Met Val Pro His Ala His His Ala Gln

1 5 10

<210> 52

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 52

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

1 5 10

<210> 53

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 53

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr Tyr Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

<210> 54

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 54

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

<210> 55

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 55

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr

35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

85 90 95

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys

100 105 110

<210> 56

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 56

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

1 5 10 15

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe

20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu

35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe

50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly

65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

100 105

<210> 57

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 57

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> 58

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 58

Leu Gly Leu Leu Val Ala Gly Val Leu Val Leu Leu Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Val Ala Ile His Leu Cys Cys

20

<210> 59

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 59

Ala Leu Ile Val Leu Gly Gly Val Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile Gly
1 5 10 15

Leu Gly Ile Phe Phe Cys Val Arg Cys
20 25

<210> 60

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 60

Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu
1 5 10 15

Thr Ala Leu Phe Leu Arg Val
20

<210> 61

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 61

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

Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
20 25

<210> 62

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 62

Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val Leu Gly Leu Leu Gly Pro
1 5 10 15

Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu
20 25

<210> 63

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 63

Ala Leu Pro Ala Ala Leu Ala Val Ile Ser Phe Leu Leu Gly Leu Gly
1 5 10 15

Leu Gly Val Ala Cys Val Leu Ala
20

<210> 64

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 64

Met Gly Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ala Val Ser Gly Leu Arg Pro Val Gln Ala Gln Ala Gln Ser Asp
20 25 30

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

35 40 45

Gly Asp Leu Val Leu Thr Val Leu Ile Ala Leu Ala Val Tyr Phe Leu

50 55 60

Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala Ala Glu Ala Ala Thr Arg

65 70 75 80

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

85 90 95

Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Arg Pro Tyr Tyr

100 105 110

Lys

<210> 65

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 65

Met Gly Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Asp Leu Val Leu Thr Val Leu Ile Ala Leu Ala Val Tyr Phe Leu

50 55 60

Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala Ala Glu Ala Thr Arg Lys

65 70 75 80

Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly Gln

85 90 95

Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Arg Pro Tyr Tyr Lys

100 105 110

<210> 66

<211> 102

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 66

Met Gly Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu
1 5 10 15
Leu Ala Val Ser Asp Cys Ser Cys Ser Thr Val Ser Pro Gly Val Leu
20 25 30
Ala Gly Ile Val Met Gly Asp Leu Val Leu Thr Val Leu Ile Ala Leu
35 40 45
Ala Val Tyr Phe Leu Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala Ala
50 55 60
Glu Ala Ala Thr Arg Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr
65 70 75 80
Gln Glu Leu Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr
85 90 95
Gln Arg Pro Tyr Tyr Lys
100

<210> 67

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 67

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

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

<210> 68
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223
> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide
<400> 68
Met Ile Pro Ala Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu Val Glu Gln Ala
1 5 10 15
Ala Ala Leu Gly Glu Pro Gln Leu Cys Tyr Ile Leu Asp Ala Ile Leu
20 25 30
Phe Leu Tyr Gly Ile Val Leu Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Leu Lys Ile
35 40 45
Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser Tyr Glu Lys Ser Asp Gly Val

50 55 60
Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu Thr Leu Lys
65 70 75 80
His Glu Lys Pro Pro Gln
85

<210> 69
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 69

Asp Gly Val Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu
1 5 10 15

Thr Leu Lys His Glu
20

<210> 70

<211> 171

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 70

Met Glu His Ser Thr Phe Leu Ser Gly Leu Val Leu Ala Thr Leu Leu
1 5 10 15

Ser Gln Val Ser Pro Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg
20 25 30

Val Phe Val Asn Cys Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val
35 40 45

Gly Thr Leu Leu Ser Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile
50 55 60

Leu Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys
65 70 75 80

Asp Lys Glu Ser Thr Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Gln Ser Cys
85 90 95

Val Glu Leu Asp Pro Ala Thr Val Ala Gly Ile Ile Val Thr Asp Val
100 105 110

Ile Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Gly Val Phe Cys Phe Ala Gly His
115 120 125

Glu Thr Gly Arg Leu Ser Gly Ala Ala Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg
130 135 140

Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr
145 150 155 160

Ser His Leu Gly Gly Asn Trp Ala Arg Asn Lys
165 170

<210> 71
<211> 127
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
<400> 71
Met Glu His Ser Thr Phe Leu Ser Gly Leu Val Leu Ala Thr Leu Leu
1 5 10 15
Ser Gln Val Ser Pro Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg
20 25 30
Val Phe Val Asn Cys Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val
35 40 45

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

Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Trp Ala Arg Asn Lys
115 120 125
<210> 72
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide
<400> 72

Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr Ser
1 5 10 15
His Leu Gly Gly Asn
20

<210> 73
<211> 207
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 73
Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
1 5 10 15
Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr
20 25 30
Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
35 40 45
Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys

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

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

165 170 175

Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg

180 185 190

Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile

195 200 205

<210> 74

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 74

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

1 5 10 15

Gly Leu Asn Gln Arg

20

<210> 75

<211> 182

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 75

Met Glu Gln Gly Lys Gly Leu Ala Val Leu Ile Leu Ala Ile Ile Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Glu Ala Lys Asn Ile Thr Trp Phe Lys Asp Gly Lys Met Ile Gly Phe

50 55 60

Leu Thr Glu Asp Lys Lys Lys Trp Asn Leu Gly Ser Asn Ala Lys Asp

65 70 75 80

Pro Arg Gly Met Tyr Gln Cys Lys Gly Ser Gln Asn Lys Ser Lys Pro

85 90 95

Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met Cys Gln Asn Cys Ile Glu Leu Asn Ala

100 105 110

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

115 120 125

Leu Ala Val Gly Val Tyr Phe Ile Ala Gly Gln Asp Gly Val Arg Gln

130 135 140

Ser Arg Ala Ser Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr

145 150 155 160

Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly

165 170 175

Asn Gln Leu Arg Arg Asn

180

<210> 76

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 76

Asp Gln Leu Tyr Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser

1 5 10 15

His Leu Gln Gly Asn

20

<210> 77

<211> 163

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 77

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

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

Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu
130 135 140
Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu
145 150 155 160
Pro Pro Arg

<210> 78
<211> 164
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide
<400> 78
Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu

1 5 10 15

Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys
20 25 30
Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala
35 40 45
Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
50 55 60
Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg

65 70 75 80
Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
85 90 95
Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
100 105 110
Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
115 120 125
Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly

130 135 140
Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
145 150 155 160
Leu Pro Pro Arg

<210> 79
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide
<400> 79
Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
1 5 10 15

Val Leu Asp Lys Arg
20
<210> 80

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 80

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

1 5 10 15

Ser Glu Ile Gly Met Lys

20

<210> 81

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 81

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

1 5 10 15

Ala Leu His Met Gln

20

<210> 82

<211> 226

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 82

Met Pro Gly Gly Pro Gly Val Leu Gln Ala Leu Pro Ala Thr Ile Phe

1 5 10 15

Leu Leu Phe Leu Leu Ser Ala Val Tyr Leu Gly Pro Gly Cys Gln Ala

20 25 30

Leu Trp Met His Lys Val Pro Ala Ser Leu Met Val Ser Leu Gly Glu

35 40 45

Asp Ala His Phe Gln Cys Pro His Asn Ser Ser Asn Asn Ala Asn Val

50 55 60

Thr Trp Trp Arg Val Leu His Gly Asn Tyr Thr Trp Pro Pro Glu Phe

65 70 75 80

Leu Gly Pro Gly Glu Asp Pro Asn Gly Thr Leu Ile Ile Gln Asn Val

85 90 95

Asn Lys Ser His Gly Gly Ile Tyr Val Cys Arg Val Gln Glu Gly Asn

100 105 110

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

115 120 125

Pro Pro Arg Pro Phe Leu Asp Met Gly Glu Gly Thr Lys Asn Arg Ile

130 135 140

Ile Thr Ala Glu Gly Ile Ile Leu Leu Phe Cys Ala Val Val Pro Gly

145 150 155 160

Thr Leu Leu Leu Phe Arg Lys Arg Trp Gln Asn Glu Lys Leu Gly Leu

165 170 175

Asp Ala Gly Asp Glu Tyr Glu Asp Glu Asn Leu Tyr Glu Gly Leu Asn

180 185 190

Leu Asp Asp Cys Ser Met Tyr Glu Asp Ile Ser Arg Gly Leu Gln Gly

195 200 205

Thr Tyr Gln Asp Val Gly Ser Leu Asn Ile Gly Asp Val Gln Leu Glu

210 215 220

Lys Pro

225

<210> 83

<211> 188

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 83

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

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

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

165 170 175
Ser Leu Asn Ile Gly Asp Val Gln Leu Glu Lys Pro
180 185

<210> 84
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide
<400> 84
Glu Asn Leu Tyr Glu Gly Leu Asn Leu Asp Asp Cys Ser Met Tyr Glu

1 5 10 15

Asp Ile Ser Arg Gly

20

<210> 85

<211> 68

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 85

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 Arg Ser Lys Arg Ser

20 25 30

Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly

35 40 45

Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala

50 55 60

Ala Tyr Arg Ser

65

<210> 86

<211> 68

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 86

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 Arg Ser Lys Arg Ser

20 25 30

Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly

35 40 45

Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala

50 55 60

Ala Tyr Arg Ser

65

<210> 87

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400

> 87

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> 88

<211> 44

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 88

Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

35 40

<210> 89

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 89

Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro Asn Gly Glu Tyr

1 5 10 15

Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser Arg Leu Thr Asp
20 25 30

Val Thr Leu
35

<210> 90

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 90

Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly

1 5 10 15

Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser
20 25 30

Thr Leu Ala Lys Ile
35

<210> 91

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 91

Cys Cys Leu Arg Arg His Gln Gly Lys Gln Asn Glu Leu Ser Asp Thr

1 5 10 15

Ala Gly Arg Glu Ile Asn Leu Val Asp Ala His Leu Lys Ser Glu Gln

20 25 30

Thr Glu Ala Ser Thr Arg Gln Asn Ser Gln Val Leu Leu Ser Glu Thr

35 40 45

Gly Ile Tyr Asp Asn Asp Pro Asp Leu Cys Phe Arg Met Gln Glu Gly

50 55 60

Ser Glu Val Tyr Ser Asn Pro Cys Leu Glu Glu Asn Lys Pro Gly Ile

65 70 75 80

Val Tyr Ala Ser Leu Asn His Ser Val Ile Gly Pro Asn Ser Arg Leu

85 90 95

Ala Arg Asn Val Lys Glu Ala Pro Thr Glu Tyr Ala Ser Ile Cys Val

100 105 110

Arg Ser

<210> 92

<211> 49

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 92

His Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu

1 5 10 15

Pro Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser

20 25 30

Thr Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser

35 40 45

Pro

<210> 93

<211> 187

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 93

Arg Arg Ala Cys Arg Lys Arg Ile Arg Gln Lys Leu His Leu Cys Tyr
1 5 10 15

Pro Val Gln Thr Ser Gln Pro Lys Leu Glu Leu Val Asp Ser Arg Pro
20 25 30

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

Val Ala Glu Glu Arg Gly Leu Met Ser Gln Pro Leu Met Glu Thr Cys
50 55 60

His Ser Val Gly Ala Ala Tyr Leu Glu Ser Leu Pro Leu Gln Asp Ala
65 70 75 80

Ser Pro Ala Gly Gly Pro Ser Ser Pro Arg Asp Leu Pro Glu Pro Arg
85 90 95

Val Ser Thr Glu His Thr Asn Asn Lys Ile Glu Lys Ile Tyr Ile Met
100 105 110

Lys Ala Asp Thr Val Ile Val Gly Thr Val Lys Ala Glu Leu Pro Glu
115 120 125

Gly Arg Gly Leu Ala Gly Pro Ala Glu Pro Glu Leu Glu Glu Glu Leu
130 135 140

Glu Ala Asp His Thr Pro His Tyr Pro Glu Gln Glu Thr Glu Pro Pro
145 150 155 160

Leu Gly Ser Cys Ser Asp Val Met Leu Ser Val Glu Glu Glu Gly Lys
165 170 175

Glu Asp Pro Leu Pro Thr Ala Ala Ser Gly Lys
180 185

<210> 94

<211> 54

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 94

His Ile Trp Gln Leu Arg Ser Gln Cys Met Trp Pro Arg Glu Thr Gln

1 5 10 15

Leu Leu Leu Glu Val Pro Pro Ser Thr Glu Asp Ala Arg Ser Cys Gln

20 25 30

Phe Pro Glu Glu Glu Arg Gly Glu Arg Ser Ala Glu Glu Lys Gly Arg

35 40 45

Leu Gly Asp Leu Trp Val

50

<210> 95

<211> 60

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 95

Cys Val Lys Arg Arg Lys Pro Arg Gly Asp Val Val Lys Val Ile Val

1 5 10 15

Ser Val Gln Arg Lys Arg Gln Glu Ala Glu Gly Glu Ala Thr Val Ile

20 25 30

Glu Ala Leu Gln Ala Pro Pro Asp Val Thr Thr Val Ala Val Glu Glu

35 40 45

Thr Ile Pro Ser Phe Thr Gly Arg Ser Pro Asn His

50 55 60

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 96

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala

1 5

<210> 97

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 97

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 98

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 98

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

1 5 10

<210> 99

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 99

Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 100

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 100

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 101

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 101

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 102

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 102

Gly Gly Ser Gly Gly

1 5

<210> 103

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 103

Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 104

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 104

Gly Ser Gly Gly Gly

1 5

<210> 105

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 105

Gly Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 106

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 106

Gly Ser Ser Ser Gly

1 5

<210> 107

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 107

Glu Ala Ala Ala Lys

1 5

<210> 108

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 108

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

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

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

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

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

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

Lys Arg Ser Asp Asp Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 109

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 109

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

Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105

<210> 110

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 110

Ser Tyr Asn Ile His

1 5

<210> 111

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 111

Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser

1 5 10 15

<210> 112

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 112

Arg Ser Asp Asp Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 113

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 113

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His
1 5 10

<210> 114

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 114

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 115

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 115

Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro Ile Thr
1 5

<210> 116

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 116

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

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

<210> 117

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 117

Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly
1 5 10

<210> 118

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 118

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Phe Leu Lys
1 5 10 15

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

<210> 119

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 119

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 120

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 120

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Met Thr Cys

20

<210> 121

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 121

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

1 5 10 15

<210> 122

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 122

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

20 25 30

<210> 123

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 123

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 124

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 124

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

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

65 70 75 80
Met His Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Val Ser Gly Met Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser

100 105 110

Ser

<210> 125

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 125

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

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile His Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser

85 90 95

Thr His Val Pro Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu

100 105 110

Lys Arg Ala

115

<210> 126

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 126

Gly Tyr Asn Met Asn

1 5

<210> 127

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 127

Ala Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 128

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 128

Gly Met Glu Tyr

1

<210> 129

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 129

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 130

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 130

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 131

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 131

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Leu Thr
1 5 10

<210> 132

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 132

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

Ser Val Met Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Ser Ser Phe Thr

20 25 30

<210> 133

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 133

Trp Val Arg Gln Asn Ile Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 134

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 134

Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met His

1 5 10 15

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

<210> 135

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 135

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 136

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223
> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 136

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

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys

20

<210> 137

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 137

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile His

1 5 10 15

<210> 138

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 138

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

1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys

20 25 30

<210> 139

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 139

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala

1 5 10

<210> 140

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 140

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

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

Asn Ile His Trp Val Arg Gln Asn Ile Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Ser Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
65 70 75 80

His Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Val
85 90 95

Ser Arg Ser Asp Asp Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 141

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 141

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

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

20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro

85 90 95

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

100 105 110

<210> 142

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 142

Asp Lys Thr His Thr

1 5

<210> 143

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 143

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu

35 40 45

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

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

<210> 144
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide
<400> 144
Glu Asn Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Lys Ala
35 40 45
Pro Lys Val Trp Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

<210> 145

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 145

Cys Pro Pro Cys

1

<210> 146

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><221> SITE

<222> (1)..(12)

<223> This sequence may encompass 1-12 residues

<400> 146

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

1 5 10

<210> 147

<211> 50

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<220><221> SITE

<222> (1)..(50)

<223> This sequence may encompass 1-10 "Gly Gly Gly Gly Ser"

repeating units

<400> 147

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
35 40 45

Gly Ser
50

<210> 148
<211> 50
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
<220><221> SITE
<222> (1)..(50)
<223> This sequence may encompass 1-10 "Glu Ala Ala Ala Lys" repeating units
<400> 148
Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu
1 5 10 15
Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala
20 25 30

Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala
35 40 45
Ala Lys
50

<210> 149
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 149

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 150

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 150

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

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 151

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><221> SITE

<222> (1)..(10)

<223> This sequence may encompass 1-10 residues

<400> 151

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

1 5 10

<210> 152

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 152

Ala Ala Ala Ala

1

<210> 153

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 153

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 Asn 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 Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 154

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 154

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 155

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:
"LAGLIDADG" Family motif peptide

<400> 155

Leu Ala Gly Leu Ile Asp Ala Asp Gly

1 5

<210> 156

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<220><221> SITE

<222> (1)..(30)

<223> This sequence may encompass 1-6 "Gly Gly Gly Gly Ser"
repeating units

<400> 156

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30

<210> 157

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<220><221> SITE

<222> (1)..(30)

<223> This sequence may encompass 1-6 "Glu Ala Ala Ala Lys" repeating units

<400> 157

Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu
1 5 10 15
Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys
20 25 30

<210> 158

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 158

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

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

<210> 159

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 159

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile
85 90 95

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

<210> 160

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 160

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115