



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년12월13일
(11) 등록번호 10-2740924
(24) 등록일자 2024년12월05일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01) C07K 14/725 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2833 (2013.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7011261
- (22) 출원일자(국제) 2018년09월20일
심사청구일자 2021년09월16일
- (85) 번역문제출일자 2020년04월17일
- (65) 공개번호 10-2020-0090151
- (43) 공개일자 2020년07월28일
- (86) 국제출원번호 PCT/CA2018/051174
- (87) 국제공개번호 WO 2019/056106
국제공개일자 2019년03월28일
- (30) 우선권주장
62/560,841 2017년09월20일 미국(US)
62/691,027 2018년06월28일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
KR1020200067845 A*
JP2013510836 A
Yusuke Nakauchi et al., Experimental Hematology, 2015, vol. 43, no. 2, pp.79-88(2014.10.29. 온라인 공개)
Satoshi Yamazaki et al., Journal of Immunological Methods, 2009, vol. 343, no. 1, pp.56-60
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
더 유니버시티 오브 브리티쉬 콜롬비아
캐나다 브리티쉬 콜롬비아 브이6티 1제트3 밴쿠버 #103-6190 애그로노미 로드 유니버시티 인더스트리 리에이중 오피스
상가모 테라퓨틱스 프랑스
프랑스 에프-06560 발본 알레 드 라 네르티에르 소피아 앙티폴리 레 카르둘랭
- (72) 발명자
저우 리
미국, 메사추세츠 02132, 웨스트 록스버리, 93 설로드
아벨 토비아스
프랑스, 06600 안티베스, 아파트먼트 에이 206, 레지던스 포트 보방, 애비뉴 드 라 리베라시옹, 1 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 14 항

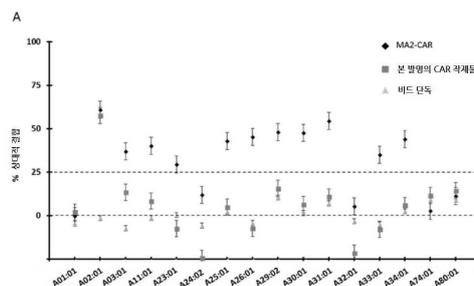
심사관 : 최홍석

(54) 발명의 명칭 신규한 항-HLA-A2 항체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 신규한 항-HLA-A2 항체, 및 상기 HLA-A2 항체를 포함하는 키메라 항원 수용체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 상기 키메라 수용체 항원을 발현하는 면역 세포, 및 특히 이식편 거부 또는 GVHD를 치료 또는 예방하기 위한 이의 치료적 용도에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

C07K 14/70517 (2013.01)

C07K 14/70578 (2013.01)

C12N 15/62 (2013.01)

A61K 2039/5156 (2023.05)

A61K 2039/5158 (2023.05)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/33 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2319/02 (2013.01)

(72) 발명자

메이어 프랑수아

스위스, 2900 포렌트루이, 세망 데 미누 27

레빙스 메간

캐나다, 브리티시 컬롬비아 브이6알 2제트2, 벤쿠버, 3435 웨스트 15 애비뉴

도슨 니콜라스

캐나다, 브리티시 컬롬비아 브이6피 6제트2, 벤쿠버, 304-995 웨스트 59 애비뉴

라마르세 캐롤라인

캐나다, 브리티시 컬롬비아 브이5제트 4엘7, 벤쿠버, 703-456 모벌리 애비뉴

명세서

청구범위

청구항 1

인간화 항-HLA-A2 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 중쇄 가변 도메인(VH) 및 경쇄 가변 도메인(VL)을 포함하되, VH 영역의 아미노산 서열이 서열번호: 9를 포함하고 VL 영역의 아미노산 서열이 서열번호: 13을 포함하는, 인간화 항-HLA-A2 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 전항체, 단쇄 항체, 이량체 단쇄 항체, Fv, scFv, Fab, F(ab)₂, 탈푸코실화(defucosylated) 항체, 이중-특이적 항체, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디; 또는 유니바디(unibody), 도메인 항체 및 나노바디로 구성된 군으로부터 선택되는 항체 단편인 것인, 인간화 항-HLA-A2 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 scFv인, 인간화 항-HLA-A2 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 서열번호: 72의 서열을 포함하는 scFv인, 인간화 항-HLA-A2 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 5

하기를 포함하는, 키메라 항원 수용체(CAR):

- (a) 제1항에 따른 인간화 항-HLA-A2 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 세포의 도메인,
- (b) 막횡단 도메인, 및
- (c) 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인.

청구항 6

제5항에 있어서, 인간화 항-HLA-A2 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 서열번호: 72의 아미노산 서열을 포함하는 scFv인, CAR.

청구항 7

제5항에 있어서, CAR이 HLA-A*02:01에 특이적으로 결합하는, CAR.

청구항 8

제5항에 있어서, 막횡단 도메인이 CD8 막횡단 도메인이고, 세포내 신호전달 도메인이 4-1BB 공동자극(costimulatory) 도메인 및 CD3 제타 일차 신호전달 도메인을 포함하는, CAR.

청구항 9

제5항에 따른 CAR을 암호화하는 핵산 분자.

청구항 10

제5항에 따른 CAR 또는 제9항에 따른 핵산 분자를 포함하는, 면역 세포.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 면역 세포가 조절 T 세포인, 면역 세포.

청구항 12

제10항에 따른 면역 세포 및 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는, 장기 또는 조직 이식 거부 또는 이식편대숙주질환(GVHD)의 예방 또는 치료를 필요로 하는 대상체에서 장기 또는 조직 이식 거부 또는 이식편대숙주질환(GVHD)을 예방 또는 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 13

제10항에 따른 면역 세포와 적어도 하나의 면역억제제의 조합을 포함하는, 장기 또는 조직 이식 거부 또는 이식편대숙주질환(GVHD)의 예방 또는 치료를 필요로 하는 대상체에서 장기 또는 조직 이식 거부 또는 이식편대숙주질환(GVHD)을 예방 또는 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 14

제1 부분으로 제10항에 따른 면역 세포 또는 제12항에 따른 약제학적 조성물 및 제2 부분으로 적어도 하나의 면역억제제를 포함하는, 키트.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 HLA-A2 결합 분자, 특히 인간화 항-HLA-A2 항체에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 예를 들면, 키메라 항원 수용체 (CAR)와 같은 상기 HLA-A2 결합 분자를 포함하는 재조합 분자에 관한 것이다. 본 발명의 또 다른 목적은 조작된 면역 세포, 예를 들어 상기 CAR을 포함하는 조절 T 세포, 및 치료 방법에서의 이들의 용도이다.

배경 기술

[0002] 클래스 I HLA 항원은 모든 핵형성 세포에서 발현되는 다형성 단백질이며 이식의 맥락에서 면역 인식을 위한 중요한 표적이다. 실제로, HLA 클래스 I 특이 T 세포 및/또는 항체의 개발은 동종 이식편의 급성 및 만성 거부의 주요 위험 인자이며, 사전-형성된 항-공여자 HLA 클래스 I 항체의 존재는 초급성 거부를 초래할 수 있다. 따라서, HLA 클래스 I 단백질에 대한 면역 반응을 제어하는 방법을 찾는 것이 이식에 있어 중대한 돌파구가 될 것이다.

[0003] 고전적 HLA 클래스 I 분자는 다형성이며 감염으로부터의 진화적 압력에 반응하여 진화된 여러 다른 대립유전자에 의해 암호화된다. 고전적 HLA 클래스 I 단백질을 암호화하는 세 개의 유전자좌가 있으며, A, B 및 C 유전자좌로 명명된다. HLA-A 유전자좌 내에서, HLA-A2 대립유전자 패밀리가 가장 크고 가장 다양한 패밀리이며, 적어도 31개의 상이한 HLA-A2 대립유전자가 인간에 존재하는 것으로 알려져 있다. 흥미롭게도, 다른 많은 HLA 대립유전자 패밀리와는 달리, HLA-A2는 모든 인종 그룹에서 빈번하며, 백인의 50% 및 아프리카계 미국인의 35%에서 발견된다. 많은 HLA-A2 대립유전자는 단지 1 내지 9개의 아미노산만이 상이하며, 다형성의 대부분은 펩티드 결합 그로브 주위에 집중되어 있다. HLA-A2 대립유전자는 두 가지 주요 분지로 분류된다: A*0201 또는 A*0205로부터의 대립유전자간 유전자 전환 사례를 통해 유도된 것들.

[0004] HLA 단백질, 및 이식 거부 (transplant rejection)를 유발하는 다른 항원에 대한 원치않는 면역력을 제어하는 방법으로서의 T 조절 (Treg) 세포를 이용한 입양 면역요법은 동종이식편 거부 (allograft rejection) 및 이식편 대숙주질환 (graft-versus-host disease; GVHD)에 대한 유망한 치료법이다. 동종이계 조혈 줄기세포 이식 (HSCT) 후 이식편대숙주질환 (GVHD)의 예방에 있어서의 다클론성 Treg 세포 전달의 사용이 보고되었다. 1형 당뇨병에서 c-펩티드 수준의 유지에 있어서의 Treg 세포 전달의 사용이 보고되었다. 그러나, 특히 이러한 세포 요법을 위한 다클론 Treg 세포의 사용과 관련된 전신 면역억제의 일시적 위험이 있을 수 있는 것으로 보고되었다.

[0005] 동물 연구로부터의 데이터는 Treg 세포를 이용한 세포 요법의 효능 및 특이성이 항원-특이 세포의 사용에 의해 상당히 향상될 수 있음을 나타낸다. 예를 들면, 자가면역 모델에서, 항원-특이 Treg 세포는 질환을 감소시키는 데 있어서 다클론 Treg 세포보다 우수하다: 췌장 림프절로부터 단리되거나 섬 항원으로 펠링된 Treg 세포는 다클론 Treg 세포보다 1형 당뇨병을 예방 또는 치료하는데 훨씬 우수하고, 자가항원-특이 형질전환 T 세포 수용체 (TCR)를 발현하는 Treg 세포는 실험적 자가면역 뇌척수염 (EAE)의 모델에서 중추 신경계 염증을 억제하는데 있어서 다 클론 Treg 세포보다 우수하다. 유사하게, 시험관내 동종항원-자극된 확장에 의해 풍부화되거나 TCR 전 이유전자를 발현하도록 조작된 동종항원-특이 Treg 세포는 기관 및 조직 이식편의 거부를 예방하는데 있어서 다 클론 Treg 세포보다 더 효과적이다. 동종항원으로 확장된 Treg 세포가 효과적으로 GVHD를 예방하고 항원-특이 Treg 세포의 생체내 유도가 GVHD 없이 조혈 동종이식편의 수용을 촉진한다는 일부 증거가 있다. 인간화된 마우스 모델은 유사한 결과를 보여 주었다: 동종항원-확장된 인간 Treg 세포는 다클론 Treg 세포보다 피부 이식편 거부의 더욱 강력한 억제제이다.

[0006] 항원-특이 T 세포를 풍부화하기 위한 과발현 형질전환 TCR 또는 항원-자극된 확장에 대한 대안적인 접근법은 키메라 항원 수용체 (CAR)의 사용이다. 세포-기반 입양 면역요법에서, 환자로부터 단리된 면역 세포는 세포가 후속적으로 환자에게 다시 전달된 후 세포가 새로운 치료 기능을 수행할 수 있게 하는 합성 단백질을 발현하도록 변형될 수 있다. 이러한 합성 단백질의 예가 CAR이다. 현재 사용되는 CAR의 예는 세포의 인식 도메인 (예를 들어, 항원-결합 도메인), 막횡단 도메인, 및 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인의 융합체이다. 항원 참여 (antigen engagement) 시, CAR의 세포내 신호전달 부분이 면역 세포에서 활성화-관련 반응을 개시할 수 있다.

[선행기술문헌]

[특허문헌]

WO2011/058321

[비특허문헌]

HILTON, H.G. *et al.* Direct binding to antigen-coated beads refines the specificity and cross-reactivity of four monoclonal antibodies that recognize polymorphic epitopes of HLA class I molecules. *Tissue Antigens*. April 2013, Vol. 81, No. 4, pages 212-20.

MACDONALD, K.G. *et al.* Alloantigen-specific regulatory T cells generated with a chimeric antigen receptor. *Journal of Clinical Investigation*. 21 March 2016, Vol. 126, No. 4, pages 1413-1424.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 HLA-A2에 특이적으로 결합하는 CAR을 발현하는 면역 세포, 특히 면역 조절 세포, 및 이의 치료적 용도에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 항체 BB7.2 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 항체와 비교하여 A03, A11, A23, A25, A26, A29, A30, A31, A33, A34 및 이들의 임의의 조합을 포함하는 그룹으로부터, 바람직하게는 A25, A29, A30 및 이들의 임의의 조합을 포함하는 그룹으로부터 선택된 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는 인간화 항-HLA-A2 항체에 관한 것이며, 여기서

[0009] - 중쇄의 가변 영역은 하기 CDR 중 적어도 하나를 포함하고:

[0010] **VH-CDR1:** SYHIQ (서열번호: 1) 또는 GYTFTSY (서열번호: 4)

[0011] **VH-CDR2:** WIYPGDGSTQYNEKFKG (서열번호: 2) 또는 YPGDGS (서열번호: 5)

[0012] **VH-CDR3:** EGTYYAMDY (서열번호: 3)

[0013] 또는 서열번호: 1-5와 적어도 60% 동일성을 공유하는 아미노산 서열을 갖는 임의의 CDR, 및/또는

[0014] - 경쇄의 가변 영역은 하기 CDR 중 적어도 하나를 포함한다:

[0015] **VL-CDR1:** RSSQSIVHSNGNTYLE (서열번호: 6)

[0016] **VL-CDR2:** KVSNRFS (서열번호: 7)

[0017] **VL-CDR3:** FQGSHPRT (서열번호: 8)

[0018] 또는 서열번호: 6-8과 적어도 60% 동일성을 공유하는 아미노산 서열을 갖는 임의의 CDR.

[0019] 하나의 실시양태에서, 중쇄의 가변 영역은 청구항 1에 정의된 CDR 중의 적어도 하나를 포함하고, 경쇄의 가변 영역은 청구항 1에 정의된 CDR 중의 적어도 하나를 포함한다.

[0020] 하나의 실시양태에서,

[0021] - 중쇄의 가변 영역은 다음의 CDR을 포함한다: SYHIQ (서열번호: 1), WIYPGDGSTQYNEKFKG (서열번호: 2) 및 EGTYYAMDY (서열번호: 3); 또는 GYTFTSY (서열번호: 4), YPGDGS (서열번호: 5) 및 EGTYYAMDY (서열번호: 3) 또는 상기 서열번호: 1-5와 적어도 60% 동일성을 공유하는 아미노산 서열을 갖는 임의의 CDR, 및

[0022] - 경쇄의 가변 영역은 다음의 CDR을 포함한다: RSSQSIVHSNGNTYLE (서열번호: 6), KVSNRFS (서열번호: 7) 및 FQGSHPRT (서열번호: 8) 또는 상기 서열번호: 6-8과 적어도 60% 동일성을 공유하는 아미노산 서열을 갖는 임의의 CDR.

[0023] 하나의 실시양태에서, 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호: 9, 또는 상기 서열번호: 9와 적어도 60% 동일성을 공유하는 임의의 아미노산 서열이다.

[0024] 하나의 실시양태에서, 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호: 10, 또는 상기 서열번호: 10과 적어도 60% 동일성을 공유하는 임의의 아미노산 서열이고, 여기서 X₁은 V 또는 I이고, X₂는 T 또는 S이고, X₃은 L 또는 S 또

는 A이고, X₄는 S 또는 T이고, X₅는 P 또는 S이고, X₆은 T 또는 S이고, X₇은 L 또는 P이고, X₈은 E 또는 D이고, X₉는 P 또는 R이고, X₁₀은 A 또는 V이고, X₁₁은 S 또는 T이고, X₁₂는 L 또는 Q이고, X₁₃은 S 또는 A이고, X₁₄는 V 또는 I이고, X₁₅는 K 또는 T이고, X₁₆은 V 또는 L이고, X₁₇은 A 또는 P이고, X₁₈은 L 또는 F이고, X₁₉는 G 또는 A이다.

- [0025] 하나의 실시양태에서, 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호: 11, 서열번호: 12 및 서열번호: 13 또는 상기 서열번호: 11-13과 적어도 60% 동일성을 공유하는 임의의 아미노산 서열을 포함하는 그룹으로부터 선택된다.
- [0026] 하나의 실시양태에서, 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호: 9 또는 상기 서열번호: 9와 적어도 60% 동일성을 공유하는 임의의 아미노산 서열이고, 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호: 10이고, 여기서 X₁은 V 또는 I이고, X₂는 T 또는 S이고, X₃은 L 또는 S 또는 A이고, X₄는 S 또는 T이고, X₅는 P 또는 S이고, X₆은 T 또는 S이고, X₇은 L 또는 P이고, X₈은 E 또는 D이고, X₉는 P 또는 R이고, X₁₀은 A 또는 V이고, X₁₁은 S 또는 T이고, X₁₂는 L 또는 Q이고, X₁₃은 S 또는 A이고, X₁₄는 V 또는 I이고, X₁₅는 K 또는 T이고, X₁₆은 V 또는 L이고, X₁₇은 A 또는 P이고, X₁₈은 L 또는 F이고, X₁₉는 G 또는 A이고, 바람직하게는 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호: 11, 서열번호: 12 및 서열번호: 13 또는 상기 서열번호: 10-13과 적어도 60% 동일성을 공유하는 임의의 아미노산 서열을 포함하는 그룹으로부터 선택된다.
- [0027] 하나의 실시양태에서, 상기 항체는 전 항체, 단쇄 항체, 이량체성 단쇄 항체, Fv, scFv, Fab, F(ab)'₂, 탈푸코실화 항체, 이중-특이 항체, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 유니바디, 도메인 항체 및 나노바디로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항체 단편, 또는 아피바디, 아필린, 아피틴, 아드넥틴, 아트리머, 에바신, DARPin, 안티칼린, 아비머, 피노머, 베르사바디 또는 듀오칼린으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항체 모방체이다.
- [0028] 또 다른 실시양태에서, 상기 항체는 전 항체, 단쇄 항체, 이량체성 단쇄 항체, Fv, scFv, Fab, F(ab)'₂, 탈푸코실화 항체, 이중-특이 항체, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 유니바디, 도메인 항체 및 나노바디로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항체 단편, 또는 아피바디, 알파바디, 아르마딜로 반복 단백질 기반 스캐폴드, 노턴, 쿠니츠 도메인 펩티드, 아필린, 아피틴, 아드넥틴, 아트리머, 에바신, DARPin, 안티칼린, 아비머, 피노머, 베르사바디 또는 듀오칼린으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항체 모방체이다.
- [0029] 하나의 실시양태에서, 상기 항체는 scFv, 바람직하게는 서열번호: 70-72 또는 74-76 서열을 갖는 scFv이다.
- [0030] 본 발명은 추가로 다음을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)에 관한 것이다:
- [0031] - 상기한 바와 같은 인간화 항-HLA-A2 항체를 포함하는 세포의 도메인,
- [0032] - 막횡단 도메인, 및
- [0033] - 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인.
- [0034] 본 발명의 또 다른 목적은 상기한 바와 같은 CAR을 암호화하는 핵산 서열이다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 목적은 상기한 바와 같은 CAR 또는 상기한 바와 같은 핵산 서열을 포함하는 면역 세포이고, 여기서 상기 면역 세포는 바람직하게는 조절 T 세포이다.
- [0036] 본 발명은 추가로 상기한 바와 같은 면역 세포를 포함하는 조성물에 관한 것이며, 여기서 바람직하게는 상기 조성물은 약제학적 조성물이며 약제학적으로 허용되는 부형제를 추가로 포함한다.
- [0037] 본 발명은 추가로 이를 필요로 하는 대상체에서 면역 관용 (immune tolerance)을 유도하는데 사용하기 위한 상기한 바와 같은 면역 세포에 관한 것이며, 여기서 바람직하게는 상기 관용은 이식된 장기 또는 조직에 대한 관용이다.
- [0038] 본 발명은 추가로 장기 또는 조직 이식 거부 또는 이식편대숙주질환 (GVHD)을 치료하는데 사용하기 위한 상기한 바와 같은 면역 세포에 관한 것이다.
- [0039] 하나의 실시양태에서, 대상체는 면역억제제를 추가로 제공받고 있다.
- [0040] 본 발명은 추가로 이를 필요로 하는 대상체에서 면역 관용을 유도하기 위한, 또는 이를 필요로 하는 대상체에서 장기 또는 조직 이식 거부 또는 이식편대숙주질환 (GVHD)을 치료하기 위한 본 발명에 기술된 바와 같은 면역 세

포와 적어도 하나의 면역억제제의 조합물에 관한 것이다.

- [0041] 본 발명은 추가로 제1 부분에 본 발명에 기술된 바와 같은 면역 세포 및/또는 이러한 면역 세포를 만들기 위한 시약 (예를 들어, 본 개시내용의 항-HLA-A 항체 또는 CAR을 암호화하는 핵산 또는 벡터)을 포함하고 제2 부분에 적어도 하나의 면역억제제를 포함하는 부분 키트에 관한 것이다.
- [0042] 본 발명은 추가로 본 발명에 따르는 면역 세포를 대상체에게 투여함을 포함하여, 이를 필요로 하는 대상체에서 면역 관용을 유도하는 방법에 관한 것이며, 여기서 바람직하게는 상기 관용은 이식된 장기 또는 조직에 대한 관용이다.
- [0043] 본 발명은 추가로 본 발명에 기술된 바와 같은 면역 세포를 대상체에게 투여함을 포함하여, 이를 필요로 하는 대상체에서 장기 또는 조직 이식 거부 또는 이식편대숙주질환 (GVHD)을 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0044] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 방법은 적어도 하나의 면역억제제를 대상체에게 투여함을 추가로 포함한다.
- [0045] **정의**
- [0046] 본 발명에서, 하기 용어들은 다음의 의미를 갖는다:
- [0047] 본 발명의 맥락에서, 일반적으로 발생하는 핵산 염기에 대해 다음의 약어가 사용된다. "A"는 아데닌을 나타내고, "C"는 사이토신을 나타내고, "G"는 구아닌을 나타내고, "T"는 티민을 나타내고, "U"는 우라실을 나타낸다.
- [0048] 용어 "a" 및 "an"은 글의 문법적 대상 중 하나 또는 하나 이상 (즉, 적어도 하나)을 지칭한다. 예를 들자면, "요소"는 하나의 요소 또는 하나 이상의 요소를 의미한다.
- [0049] 용어 "약"은, 양, 시간적 지속기간 등과 같은 측정 가능한 값을 언급할 때, 하기의 변동이 개시된 방법을 수행 하기에 적합하기 때문에 명시된 값으로부터 $\pm 20\%$ 또는 일부 경우 $\pm 10\%$, 또는 일부 경우 $\pm 5\%$, 또는 일부 경우 $\pm 1\%$, 또는 일부 경우에 $\pm 0.1\%$ 의 변동을 포함함을 의미한다.
- [0050] 본원에서 사용되는 용어 "**활성화**"는 검출 가능한 세포 반응을 유도하기 위해 충분히 자극된 T 세포 (예를 들어, 조절 T 세포)의 상태를 지칭한다. 활성화는 또한, 예를 들면, 사이토카인 생성 또는 억제 활성화와 같은 검출 가능한 효과기 기능(들)과 관련될 수 있다. 용어 "활성화된" 조절 T 세포는 다른 것들 중에서도 면역 반응을 억제할 수 있는 조절 T 세포를 지칭한다.
- [0051] 모노바디로도 알려진 "**아드넥틴 (Adnectin)**"은 당업계에 잘 알려져 있으며 높은 친화성 및 특이성으로 항원에 결합하도록 설계된 단백질을 지칭한다. 이들은 집합적으로 "항체 모방체 (antibody mimetics)"라고 불리는 분자의 종류에 속한다.
- [0052] 세포-침투성 알파바디라고도 할 수 있는 본원에서 사용되는 "**알파바디 (alphabody)**"는 다양한 항원에 결합하도록 조작된 작은 10 kDa 단백질로 구성된 항체 모방체의 한 유형을 지칭한다. 알파바디는 세포내 단백질 표적에 도달하여 이에 결합할 수 있다.
- [0053] "**아피바디 (affibody)**"는 당업계에 잘 알려져 있으며 포도상 구균 단백질 A의 IgG 결합 도메인 중 하나로부터 유래된 58개 아미노산 잔기 단백질 도메인을 기본으로 하는 친화성 단백질을 지칭한다.
- [0054] 본원에서 사용되는 용어 "**친화도**"는 두 개의 제제의 가역적 결합에 대한 평형 상수를 지칭하며 해리 상수 (Kd)로 표현된다. 친화도는 비관련된 아미노산 서열에 대한 항체의 친화도보다 적어도 1배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 적어도 10배, 적어도 20배, 적어도 30배, 적어도 40배, 적어도 50배, 적어도 60배, 적어도 70배, 적어도 80배, 적어도 90배, 적어도 100배, 또는 적어도 1000배, 또는 그 이상으로 클 수 있다. 표적 단백질에 대한 항체의 친화도는, 예를 들면, 약 100 나노몰 (nM) 내지 약 0.1 nM, 약 100 nM 내지 약 1 피코몰 (pM), 또는 약 100 nM 내지 약 1 펨토몰 (fM) 또는 그 이상일 수 있다.
- [0055] "**아필린 (Affilin)**"은 당업계에 잘 알려져 있으며 항원에 선택적으로 결합하도록 설계된 인공 단백질을 지칭한다. 이들은 항원에 대한 친화도 및 특이성에 있어서는 항체와 유사하지만 구조적으로는 유사하지 않아서 항체 모방체의 한 유형이 된다.
- [0056] 용어 "**동종이계 (allogeneic)**"는 물질이 도입된 개체와 동일한 종의 다른 개체로부터 유래된 임의의 물질을 지칭한다. 하나 이상의 유전자좌에서의 유전자가 동일하지 않을 때 둘 이상의 개체는 서로 동종이계라고 한다. 일부 측면에서, 동일한 종의 개체로부터의 동종이계 물질은 항원과 관련하여 상호작용하기에 유전적으로 충분히

다를 수 있다.

[0057] 용어 "항체" 및 "면역글로불린" (Ig)은 상호 교환적으로 사용되며, 항원과 특이적으로 결합하는 면역글로불린 분자로부터 유래된 단백질 또는 폴리펩티드 서열을 지칭한다. 항체는 다클론성 또는 단클론성, 다중 또는 단쇄, 또는 온전한 면역글로불린일 수 있고, 천연 공급원으로부터 또는 재조합 공급원으로부터 유래될 수 있다. 용어 "항체"는 또한, 이들이 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 다중특이 항체 (예를 들어, 이중특이 항체) 및 항체 단편을 포함한다. 항체는 또한 면역글로불린 분자의 사량체와 같은 면역글로불린 분자의 다량체일 수 있다.

[0058] 기본 4-쇄 항체 단위는 두 개의 동일한 경쇄 (L) 및 두 개의 동일한 중쇄 (H)로 구성된 이중사량체성 당단백질이다. 임의의 척추동물 종으로부터의 L 쇠는 이들의 불변 도메인 (CL)의 아미노산 서열에 기초하여 카파 (κ) 및 람다 (λ)로 불리는 두 개의 명확하게 구별되는 유형 중 하나에 할당될 수 있다. 이들의 중쇄 (CH)의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 면역글로불린은 상이한 부류 또는 이소타입에 할당될 수 있다. 면역글로불린의 5가지 부류가 있다: 각각 알파 (α), 델타 (δ), 엡실론 (ϵ), 감마 (γ) 및 뮤 (μ)로 지정된 중쇄를 갖는 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM. γ 및 α 부류는 CH 서열과 기능의 비교적 사소한 차이에 기초하여 하위부류로 세분되며, 예를 들어, 인간은 다음의 하위부류를 발현한다: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2. 각각의 L 쇠는 하나의 공유 이황화 결합에 의해 H 쇠에 연결되는 반면 두 개의 H 쇠는 H 쇠 이소타입에 따라 하나 이상의 이황화 결합에 의해 서로 연결된다. 각각의 H 및 L 쇠는 또한 규칙적으로 이격된 쇠내 이황화 브릿지를 갖는다. 각각의 H 쇠는 N-말단에 가변 도메인 (VH)에 이어 각각의 α 및 γ 쇠에 대해 3개의 불변 도메인 (CH) 및 μ 및 ϵ 이소타입에 대해 4개의 CH 도메인을 갖는다. 각각의 L 쇠는 N-말단에 가변 도메인 (VL)에 이어 이의 다른 말단에는 불변 도메인 (CL)을 갖는다. VL은 VH와 정렬되고 CL은 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)과 정렬된다. 특정 아미노산 잔기가 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 사이에 계면을 형성하는 것으로 여겨진다. VH 및 VL의 쌍은 함께 단일 항원-결합 부위를 형성한다. IgM 항체는 J쇄로 불리는 추가의 폴리펩티드와 함께 5개의 기본 이중사량체 단위로 구성되며, 따라서 10개의 항원 결합 부위를 함유하는 반면 분비된 IgA 항체는 중합되어 J 쇠와 함께 2-5개의 기본 4-쇄의 단위를 포함하는 다중 조립체를 형성할 수 있다. IgG의 경우에, 4-쇄 단위는 일반적으로 약 150,000 달톤이다. 상이한 부류의 항체의 구조 및 특성에 대해서는, 예를 들어, 문헌 [Basic and Clinical Immunology, 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994, page 71, and Chapter 6]을 참고한다.

[0059] 용어 "항체 단편"은 항원의 에피토프와 (예를 들어, 결합, 입체 장애, 안정화/불안정화, 공간 분포에 의해) 특이적으로 상호작용하는 능력을 보유하는 온전한 항체의 적어도 하나의 부분, 바람직하게는 온전한 항체의 항원 결합 영역 또는 가변 영역을 지칭한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 단편, 단쇄 항체 분자, 특히 scFv 항체 단편, 이황화-결합 Fvs (sdFv), VH 및 CHI 도메인으로 구성된 Fd 단편, 선형 항체, 단일 도메인 항체, 예를 들어 sdAb (VL 또는 VH), 낙타과 VHH 도메인, 항체 단편으로부터 형성된 다중특이 항체, 예를 들면, 힌지 영역에서 이황화 브릿지에 의해 연결된 두 개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편, 및 단리된 CDR 또는 항체의 다른 에피토프 결합 단편을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 항원 결합 단편은 또한 단일 도메인 항체, 맥시바디, 미니바디, 나노바디, 인트라바디, 디아바디, 트리야바디, 테트라바디, v-NAR 및 비스-scFv에 포함될 수 있다 (예를 들어, 참조; Hollinger and Hudson, Nature Biotechnology 23:1126-1136, 2005). 항원 결합 단편은 또한 피브로넥틴 타입 III와 같은 폴리펩티드에 기초한 스캐폴드 내에 이식될 수 있다 (피브로넥틴 폴리펩티드 미니바디를 기술한 미국 특허 제6,703,199호를 참조한다). 항체의 파파인 소화는 "Fab" 단편으로 불리는 두 개의 동일한 항원-결합 단편 및 잔류 "Fc" 단편을 생성하며, 명칭은 쉽게 결정화하는 능력을 반영한다. Fab 단편은 H 쇠의 가변 영역 도메인 (VH) 및 하나의 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)과 함께 전체 L 쇠로 구성된다. 각각의 Fab 단편은 항원 결합과 관련하여 1가이며, 즉 이것은 단일 항원-결합 부위를 갖는다. 항체의 펩신 처리는 2가 항원-결합 활성을 갖는 두 개의 이황화물 연결된 Fab 단편에 대략 상응하고 여전히 항원을 가교결합시킬 수 있는 단일의 큰 F(ab')₂ 단편을 생성한다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 포함하는 CH1 도메인의 카복시 말단에 추가로 소수의 잔기를 가짐으로써 Fab 단편과는 상이하다. Fab'-SH는 본원에서 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 유리 티올 그룹을 갖는 Fab'에 대한 명칭이다. F(ab')₂ 항체 단편은 원래 이들 사이에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로서 생성되었다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링도 알려져 있다.

[0060] 본원에서 사용되는 바와 같이, "항체의 기능적 단편 또는 유사체"는 전장 항체와 공통된 정성적 생물학적 활성을 갖는 화합물이다. 예를 들면, 항-IgE 항체의 기능적 단편 또는 유사체는 이러한 분자의 능력이 높은 친화도

수용체, FcεRI에 결합하는 능력을 방지하거나 실질적으로 감소시키는 방식으로 IgE 면역글로불린에 결합할 수 있는 것이다.

- [0061] 용어 "**항체 중쇄**"는 자연 발생 형태로 항체 분자에 존재하는 두 가지 유형의 폴리펩티드 쇄 중의 더 큰 것을 지칭하며, 이것이 일반적으로 항체가 속하는 부류를 결정한다.
- [0062] 용어 "**항체 경쇄**"는 자연 발생 형태로 항체 분자에 존재하는 두 가지 유형의 폴리펩티드 쇄 중의 더 작은 것을 지칭한다. 카파 (K) 및 람다 (λ) 경쇄는 두 개의 주요 항체 경쇄 이소타입을 지칭한다.
- [0063] "**안티칼린 (anticalin)**"은 당업계에 잘 알려져 있으며, 항체 모방 기술 (antibody mimetic technology)을 지칭하며, 여기서 결합 특이성은 리포칼린 (lipocalin)으로부터 유래된다. 안티칼린은 또한 듀오칼린 (Duocalin)이라고 하는 이중 표적화 단백질로서 포맷될 수 있다.
- [0064] 용어 "**항원**" 또는 "**Ag**"는 면역 반응을 유발하는 분자를 지칭한다. 이 면역 반응은 항체 생산, 또는 특정 면역학적-적격 세포의 활성화, 또는 둘 다를 포함할 수 있다. 숙련가는 거의 모든 단백질 또는 펩티드를 포함하는 임의의 거대분자가 항원으로서 작용할 수 있음을 이해할 것이다. 게다가, 항원은 재조합 또는 게놈 DNA로부터 유래될 수 있다. 숙련가는 면역 반응을 유발하는 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열 또는 부분 뉴클레오티드 서열을 포함하는 임의의 DNA가 본원에서 사용되는 용어 "항원"을 암호화한다는 것을 이해할 것이다. 게다가, 당업계의 숙련가는 항원이 반드시 유전자의 전장 뉴클레오티드 서열에 의해서만 암호화될 필요는 없음을 이해할 것이다. 본 발명은 하나 이상의 유전자의 부분 뉴클레오티드 서열의 사용을 포함하지만 이에 제한되지 않으며, 이러한 뉴클레오티드 서열은 원하는 면역 반응을 유발하는 폴리펩티드를 암호화하기 위해 다양한 조합으로 정렬된다는 것이 용이하게 자명하다. 더욱이, 숙련가는 항원이 반드시 "유전자"에 의해 암호화될 필요는 없음을 이해할 것이다. 항원은 합성될 수 있거나 생물학적 샘플로부터 유래될 수 있거나 폴리펩티드 이외의 거대분자일 수 있음이 용이하게 자명하다. 이러한 생물학적 샘플은 조직 샘플, 세포 또는 다른 생물학적 성분을 갖는 유체를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0065] 용어 "**항원 제시 세포**" 또는 "**APC**"는 이의 표면 상에 주 조직적합성 복합체 (MHC)와 착화된 외래 항원을 나타내는 보조 세포 (예를 들어, B 세포, 수지상 세포 등)와 같은 면역계 세포를 지칭한다. T-세포는 이들의 T-세포 수용체 (TCR)를 사용하여 이러한 복합체를 인식할 수 있다. APC는 항원을 처리하여 이들을 T-세포에 제시한다.
- [0066] 본원에서 사용되는 바와 같이, "**아르마딜로 반복 단백질-기반 스캐폴드 (armadillo repeat protein-based scaffold)**"는 아르마딜로 반복 단백질에 기초한 인공 펩티드 결합 스캐폴드에 상응하는 항체 모방체의 한 유형을 지칭한다. 아르마딜로 반복 단백질은 대략 42개 아미노산의 텐덤 아르마딜로 반복체로 구성된 아르마딜로 도메인을 특징으로 하며, 이것은 펩티드 또는 단백질과의 상호작용을 매개한다.
- [0067] "**아트리머 (atramer)**"는 당업계에 잘 알려져 있으며, 이들의 생물학적 활성에 대한 필수요소로서 삼량화하는 표적 단백질에 대한 결합 분자를 지칭한다. 이들은 다른 항체 모방체 스캐폴드에 비해 상대적으로 크다.
- [0068] 용어 "**자가조직 (autologous)**"은 나중에 재도입될 동일 개체로부터 유래된 임의의 물질을 지칭한다.
- [0069] "**아비머 (avimer)**"는 당업계에 잘 알려져 있으며 항체 모방 기술을 지칭한다.
- [0070] "**DARPin**" (Designed Ankyrin Repeat Proteins)은 당업계에 잘 알려져 있으며 비-항체 폴리펩티드의 결합 능력을 이용하기 위해 개발된 항체 모방 DRP (설계 반복 단백질) 기술을 지칭한다.
- [0071] 본원에서 사용되는 용어 "**BB7.2**"는 ATCC 기탁 HB-82로 확인된 무린 하이브리도마를 지칭한다. BB7.2 하이브리도마 세포는 Parham, P. 등과 Hilton 등에 의해 특징지어진 IgG2b 카파 이소타입 (예를 들어, BB7.2 항체)의 무린 단클론 항체를 분비한다 (Parham, P. *et al.*, 1981; Hilton *et al.*, 2013). BB7.2 항체는, 예를 들면, Abcam (카탈로그 참조 번호: ab74674), Thermo Fisher Scientific (카탈로그 참조 번호: 17-9876-42) 또는 Santa Cruz Biotechnology (카탈로그 참조 번호: sc-32236)로부터 상업적으로 이용 가능하다. BB7.2 항체의 6개의 상보성 결정 영역 (CDR)의 아미노산 서열은 다음과 같다:
 - [0072] - 중쇄 CDR1 (HCDR1): SYHIQ (서열번호: 62);
 - [0073] - 중쇄 CDR2 (HCDR2): WIYPGDGSTQYNEKFKG (서열번호: 63);
 - [0074] - 중쇄 CDR3 (HCDR3): EGTYYAMDY (서열번호: 64);
 - [0075] - 경쇄 CDR1 (LCDR1): RSSQSIVHSNGNTYLE (서열번호: 65)

- [0076] - 경쇄 CDR2 (LCDR2): KVSNRFS (서열번호: 66);
- [0077] - 경쇄 CDR3 (LCDR3): FQGSHVPRT (서열번호: 67).
- [0078] 본원에서 사용되는 바와 같이, "BB7.2 항체"는 BB7.2에 의해 분비된 단클론 항체의 VH (서열번호: 9) 및 VL (서열번호: 10)을 갖는 항체이다. BB7.2 항체는 BB7.2에 의해 분비된 단클론 항체의 VH 및 VL을 갖는 전 항체 또는 이의 단편, 예를 들어 BB7.2에 의해 분비된 단클론 항체의 VH 및 VL을 갖는 scFv일 수 있다.
- [0079] 용어 "**결합 (binding)**"은, 예를 들면, 염 브릿지 및 물 브릿지와 같은 상호작용을 포함한 공유, 정전기, 소수성 및 이온성 및/또는 수소-결합 상호작용으로 인한 두 분자 사이의 직접적인 연관을 지칭한다. 비특이 결합은 10^{-7} M 미만의 친화도를 갖는 결합, 예를 들어, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M 등의 친화도를 갖는 결합을 지칭한다.
- [0080] 본원에서 사용되는 바와 같이, "**5' 캡**" (RNA 캡, RNA 7-메틸구아노신 캡 또는 RNA m7G 캡이라고도 함)은 전사 개시 직후에 진핵생물 메신저 RNA의 "전방" 또는 5' 말단에 부가된 변형된 구아닌 뉴클레오티드이다. 5' 캡은 첫 번째 전사된 뉴클레오티드에 연결된 말단 그룹으로 구성된다. 이의 존재는 리보솜에 의한 인식 및 RNase로부터의 보호에 중요하다. 캡 부가는 전사에 커플링되고, 각각이 서로에 영향을 미치도록 공동-전사적으로 발생한다. 전사 개시 직후, 합성되는 mRNA의 5' 말단은 RNA 폴리머라제와 관련된 캡-합성 복합체에 의해 결합된다. 이 효소 복합체는 mRNA 캡핑에 필요한 화학 반응을 촉매한다. 합성은 다단계 생화학 반응으로 진행된다. 캡핑 모이어티는 안정성 또는 번역 효율과 같은 mRNA의 기능성을 조절하기 위해 변형될 수 있다.
- [0081] "**키메라 항체**"는 (a) 불변 영역 (즉, 중쇄 및/또는 경쇄) 또는 이의 일부가 항원 결합 부위 (가변 영역)가 다른 또는 변경된 클래스, 효과기 기능 및/또는 중의 불변 영역, 또는 키메라 항체에 새로운 특성을 부여하는 완전히 다른 분자, 예를 들어, 효소, 독소, 호르몬, 성장 인자, 약물 등에 연결되도록 변경, 교체 또는 교환되거나; (b) 가변 영역 또는 이의 일부가 다른 또는 변경된 항원 특이성을 갖는 가변 영역으로 변경, 교체 또는 교환된 항체 분자이다. 키메라 항체는 또한 영장류화 항체 및 특히 인간화 항체를 포함한다. 또한, 키메라 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 항체 성능을 추가로 개선하기 위해 수행된다. 추가의 상세한 설명에 대해서는, 문헌 [Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); and Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992). (see U.S. Pat. No. 4,816,567; and Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984))]을 참고한다.
- [0082] 용어 "**키메라 수용체**" 또는 "**키메라 항원 수용체**" 또는 "**CAR**"은 면역 세포에서 세포에 표적 리간드에 대한 특이성 및 세포내 신호 생성을 제공하는 하나의 폴리펩티드 또는 폴리펩티드의 세트, 전형적으로 가장 단순한 실시양태에서 두 개를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드의 세트는 서로 연속적이다. 일부 실시양태에서, 키메라 수용체는 폴리펩티드의 세트를 포함하는 키메라 융합 단백질이다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드의 세트는 이량체화 분자의 존재시, 폴리펩티드를 서로 커플링시킬 수 있는, 예를 들어, 리간드 결합 도메인을 세포내 신호전달 도메인에 커플링시킬 수 있는 이량체화 스위치를 포함한다. 하나의 실시양태에서, 키메라 수용체는 키메라 수용체 융합 단백질의 아미노-말단 (N-ter)에 임의의 리더 서열을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 키메라 수용체는 세포외 리간드 결합 도메인의 N-말단에 리더 서열을 추가로 포함하며, 여기서 리더 서열은 임의로 세포 처리 및 키메라 수용체의 세포막으로의 국소화 동안 리간드 결합 도메인으로부터 절단된다.
- [0083] 용어 "**보존적 서열 변형**"은 아미노산 서열을 함유하는 단백질의 생물학적 기능에 상당히 영향을 미치지 않거나 변경하지 않는 아미노산 변형을 지칭한다. 이러한 보존적 변형은 아미노산 치환, 부가 및 결실을 포함한다. 변형은 부위-지정 돌연변이유발 및 PCR-매개 돌연변이유발과 같은 당업계에서 공지된 표준 기술에 의해 단백질에 도입될 수 있다. "**보존적 치환**"은 펩티드 화학 분야의 숙련가가 폴리펩티드의 2차 구조 및 수치요법 특성이 실질적으로 변하지 않을 것으로 예상하도록 아미노산이 유사한 특성을 갖는 다른 아미노산으로 치환되는 것이다. 따라서, 아미노산 치환은 일반적으로 아미노산 측쇄 치환체의 상대적 유사성, 예를 들면, 이들의 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초한다. 전술한 다양한 특성을 고려한 예시적인 치환은 당업계의 숙련자들에게 잘 알려져 있으며, 아르기닌 및 리신; 글루타메이트 및 아스파르트레이트; 세린 및 트레오닌; 글루타민 및 아스파라긴; 및 발린, 류신 및 이소류신을 포함한다. 아미노산 치환은 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 잔기의 양친매성에 있어서의 유사성에 기초하여 추가로 이루어질 수 있다. 예를 들면, 음으로 하전된 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함하고; 양으로 하전된 아미노산은 리신 및 아르기닌을 포함하고; 유사한 친수성 값을 갖는 하전되지 않은 극성 헤드 그룹을 갖는 아미노산은 류신, 이소류신 및 발린; 글리신 및 알라닌; 아스파라긴 및 글루타민; 및 세린, 트레오닌, 페닐알라닌 및 티로신을 포함한다. 보존적 변화를 나타낼 수 있는 아미

노산의 또 다른 그룹은 다음을 포함한다: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; 및 (5) phe, tyr, trp, his. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 다른 계열이 당업계에 정의되어 있다. 이러한 계열은 염기성 측쇄 (예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄 (예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 하전되지 않은 극성 측쇄 (예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판), 비극성 측쇄 (예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), 베타-분지 측쇄 (예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄 (예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 갖는 아미노산을 포함한다. 따라서, 본 발명의 항체 또는 키메라 수용체 내의 하나 이상의 아미노산 잔기는 동일한 측쇄 계열로부터의 다른 아미노산 잔기로 대체될 수 있고, 변경된 항체 또는 키메라 수용체는 HLA-A2에 대한 결합에 대해 시험될 수 있다.

[0084] 용어 "**구성적 프로모터**"는, 유전자 산물을 암호화하거나 특정하는 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하게 연결될 때, 유전자 산물이 세포의 대부분의 또는 모든 생리적 조건하에 세포에서 생성되게 하는 뉴클레오티드 서열을 지칭한다.

[0085] 용어 "**공동자극 분자**"는 공동자극 리간드와 특이적으로 결합하여 증식과 같지만 이에 제한되지 않는 T 세포에 의한 공동자극 반응을 매개하는 T 세포 상의 동족 결합 파트너를 지칭한다. 공동자극 분자는 효율적인 면역 반응에 기여하는 항원 수용체 또는 이들의 리간드 이외의 세포 표면 분자이다. 공동자극 신호전달 도메인은 공동자극 분자의 세포내 부분일 수 있다. 공동자극 분자는 다음의 단백질 계열에서 나타날 수 있다: TNF 수용체 단백질, 면역글로불린-유사 단백질, 사이토카인 수용체, 인테그린, 신호전달 림프구성 활성화 분자 (SLAM 단백질), 및 활성화 NK 세포 수용체.

[0086] "**세포독성 세포**"는 세포독성 CD8⁺ T 세포, 자연 살해 (NK) 세포, 및 호중구를 포함함, 이들 세포는 세포독성 반응을 매개할 수 있다.

[0087] 본원에서 사용되는 용어 "**유래된 (derived from)**"은 제1 분자와 제2 분자 간의 관계를 나타낸다. 이것은 일반적으로 제1 분자와 제2 분자 사이의 구조적 유사성을 지칭하며, 제2 분자로부터 유래된 제1 분자에 대한 공정 또는 공급원 제한을 의미하거나 포함하지 않는다. 예를 들면, CD3제타 분자로부터 유래된 세포내 신호전달 도메인의 경우에, 세포내 신호전달 도메인은 필요한 기능, 즉 적절한 조건하에서 신호를 생성하는 능력을 갖도록 충분한 CD3제타 구조를 보유한다. 이것은 세포내 신호전달 도메인을 생성하는 특정 공정에 대한 제한을 의미하거나 포함하지 않으며, 예를 들어, 이것은 세포내 신호전달 도메인을 제공하기 위해, CD3제타 서열로 시작하여 원치 않는 서열을 결실시키거나 돌연변이를 도입하여 세포내 신호전달 도메인에 도달해야 한다는 것을 의미하지 않는다.

[0088] 용어 "**디아바디**"는 V 도메인의 쇠간 쌍형성은 달성되지만 쇠내 쌍형성은 달성되지 않아서 2가 단편, 즉, 두 개의 항원 결합 부위를 갖는 단편이 야기되도록 VH와 VL 도메인 사이에 짧은 링커 (약 5-10개 잔기)를 갖는 scFv 단편을 작제함으로써 제조된 작은 항체 단편을 지칭한다. 이중특이 디아바디는 두 개의 항체의 VH 및 VL 도메인이 상이한 폴리펩티드 쇠 상에 존재하는 두 개의 "교차(crossover)" scFv 단편의 이중이량체이다. 디아바디는, 예를 들면, 제EP 0404097호; 제WO 93/11161호; 및 문헌 [Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)]에 보다 상세히 기술되어 있다.

[0089] "**도메인 항체**"는 당업계에 잘 알려져 있으며 항체의 중쇄 또는 경쇄의 가변 영역에 상응하는 항체의 가장 작은 기능적 결합 단위를 지칭한다.

[0090] 용어 "**암호화 (encoding)**"는 뉴클레오티드 (예를 들어, rRNA, tRNA 및 mRNA)의 정의된 서열 또는 아미노산의 정의된 서열을 갖는 생물학적 공정 및 이로부터 생성된 생물학적 특성에서 다른 중합체 및 거대분자의 합성을 위한 주형으로서 작용하기 위한, 예를 들면, 유전자, cDNA 또는 mRNA와 같은 폴리뉴클레오티드 중의 뉴클레오티드의 특정 서열의 고유 특성을 지칭한다. 따라서, 유전자, cDNA, 또는 RNA는 그 유전자에 상응하는 mRNA의 전사 및 번역이 세포 또는 다른 생물학적 시스템에서 단백질을 생성한다면 단백질을 암호화한다. 이의 뉴클레오티드 서열이 mRNA 서열과 동일하고 서열 목록에 통상적으로 제공되는 코딩 가닥, 및 유전자 또는 cDNA의 전사를 위한 주형으로 사용되는 비-코딩 가닥 둘 다는 그 유전자 또는 cDNA의 단백질 또는 다른 생성물을 암호화한다고 할 수 있다. 달리 명시되지 않는 한, "**아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열**"은 서로의 번성된 버전이며 동일한 아미노산 서열을 암호화하는 모든 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 어구 "단백질 또는 RNA를 암호화하는 뉴클레오티드 서열"은 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 일부 버전에서 인트론(들)을 함유할 수 있는

정도로 인트론을 포함할 수 있다.

- [0091] 용어 "**내인성** (endogenous)"은 유기체, 세포, 조직 또는 시스템으로부터의 또는 그 내부에서 생성된 임의의 물질을 지칭한다.
- [0092] 용어 "**조작된**" 또는 "**변형된**"은 상호 교환적으로 사용되며 형질감염, 형질전환 또는 형질도입된 세포를 지칭한다.
- [0093] "**에바신** (Evasin)"은 당업계에 잘 알려져 있으며 케모카인-결합 단백질 부류를 지칭한다.
- [0094] 용어 "**외인성** (exogenous)"은 유기체, 세포, 조직 또는 시스템에 도입되거나 그 외부에서 생성된 임의의 물질을 지칭한다.
- [0095] 용어 "**발현**"은 프로모터에 의해 유도된 특정 뉴클레오티드 서열의 전사 및/또는 번역을 지칭한다.
- [0096] 용어 "**발현 벡터**"는 발현시키고자 하는 뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결된 발현 제어 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 지칭한다. 발현 벡터는 발현을 위한 충분한 시스-작용 요소를 포함하고; 발현을 위한 다른 요소는 숙주 세포에 의해 또는 *시험관내* 발현 시스템에서 공급될 수 있다. 발현 벡터는 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함하는 코스미드, 플라스미드 (예를 들어, 네이키드 또는 리포솜에 함유됨) 및 바이러스 (예를 들어, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-관련 바이러스)를 제한함이 없이 포함하는 당업계에 공지된 것들 모두를 포함한다.
- [0097] 항체의 "**Fc**" 단편은 이황화물에 의해 함께 유지되는 H 쇠 둘 다의 카복시-말단 부분을 포함한다. 항체의 효과 기 기능은 Fc 영역의 서열에 의해 결정되며, 이 영역은 또한 특정 유형의 세포에서 발견되는 Fc 수용체 (FcR)에 의해 인식되는 부분이다.
- [0098] "**골격** (framework)" 또는 "**FR**" 잔기는 본원에서 정의된 추가변 영역 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다.
- [0099] "**Fv**"는 완전한 항원-인식 및 -결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 이 단편은 단단한 비공유 결합의 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 영역 도메인의 이량체로 구성된다. 이러한 두 개의 도메인의 접힘으로부터, 항원 결합을 위한 아미노산 잔기에 기여하고 항체에 대한 항원 결합 특이성을 부여하는 6개의 추가변 루프 (각각 H 및 L 쇠로부터 3개의 루프)가 나온다. 그러나, 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 3개의 CDR만을 포함하는 Fv의 절반)조차도 전체 결합 부위보다 낮은 친화도에서도 항원을 인식하고 결합하는 능력을 갖는다.
- [0100] "**피노머** (Fynomer)"는 당업계에 잘 알려져 있으며 항체 모방체의 부류에 속하는 단백질을 지칭한다. 이들은 높은 열 안정성 및 감소된 면역원성으로 인해 매력적인 결합 분자이다.
- [0101] 본 발명에서 사용되는 용어 "**이식편대숙주질환**" 또는 "**GVHD**"는 유전자가 다른 사람으로부터 이식된 조직을 받은 후의 의학적 합병증을 지칭한다. 기증된 조직 (이식편)의 면역 세포는 수용자 (숙주)를 이물질로 인식한다. 그 후 이식된 면역 세포는 숙주의 신체 세포를 공격한다. GVHD는 일반적으로 줄기세포 이식물과 관련이 있다; 그러나, 용어는 다른 형태의 조직 이식편으로부터 발생하는 GVHD를 포함한다. GVHD는 또한 수혈 후 발생할 수 있다.
- [0102] 본원에서 사용되는 바와 같이 "**HLA-A 아형**"은 HLA-A 유전자의 대립유전자에 의해 암호화된 단백질을 지칭한다. 본원에서 사용되는 용어 "**HLA-A*25:01**"은 HLA 시스템의 인자에 대한 WHO 위원회에 의해 2010년에 개발된 HLA 명명 시스템에 따라 명칭 "**HLA-A*25:01**"을 갖는 HLA 단백질을 지칭한다. 용어 "**HLA-A*29:02**" 및 "**HLA-A*30:01**"은 각각 명칭 "**HLA-A*29:02**" 및 "**HLA-A*30:01**"을 갖는 HLA 단백질을 지칭한다.
- [0103] 본원에서 사용되는 용어 "**HLA-A2**"는 HLA 유전자 복합체의 HLA-A 유전자좌에서 HLA-A*02 대립유전자 패밀리에 의해 암호화된 세포 표면 단백질을 포함하는 인간 백혈구 항원 (HLA) 단백질을 지칭한다. 용어 "**HLA-A2**"에 포함된 HLA 단백질은 혈청학적 검사 또는 유전형 분석에 의해 HLA-A*02 항원 유형에 속하는 것으로 확인된 HLA 단백질을 포함한다. HLA-A*02 항원 유형에 대한 추가의 명칭은 "**HLA-A2**", "**HLA-A02**" 및 "**HLA-A*2**"를 포함한다. HLA 시스템의 인자에 대한 WHO 위원회에 의해 2010년에 개발된 HLA 명명 시스템을 포함하여 이러한 대립유전자 패밀리에 의해 암호화된 HLA 단백질을 확인하는 다양한 명명 시스템이 개발되었다. 용어 "**HLA-A2**"는 "**HLA-A*02:01**", "**HLA-A*02:02**", "**HLA-A*02:03**", "**HLA-A*02:04**", "**HLA-A*02:05**", "**HLA-A*02:06**", "**HLA-A*02:07**", "**HLA-A*02:08**", "**HLA-A*02:09**", "**HLA-A*02:10**", 및 "**HLA-A*02:11**"로 시작하는 명칭을 포함하지만 이에 제한되지 않는 "**HLA-A*02**"로 시작하는 이 명명 시스템에 따른 명칭을 갖는 대립유전자에 의해 암호화된 HLA 단백질을 지칭한다. 대립유전자 명칭은 이탤릭체로 표시될 수 있다. "**HLA-A*02:**"로 시작하고 2, 3 또는 4개의 추가 숫

자가 뒤따르는 대립유전자 명칭은 완전한 명칭 또는 명칭의 시작 부분을 구성할 수 있다. 용어 "HLA-A2"는 또한 명칭 "HLA-A*02:01", "HLA-A*02:02", "HLA-A*02:03", "HLA-A*02:04", "HLA-A*02:05", "HLA-A*02:06", "HLA-A*02:07", "HLA-A*02:08", "HLA-A*02:09", "HLA-A*02:10", 및 "HLA-A*02:11"을 포함하지만 이에 제한되지 않는 이 명명 시스템에 따른 "HLA-A*02"로 시작하는 명칭으로 확인된 HLA 단백질을 지칭한다.

- [0104] 본원에서 사용되는 용어 "**항-HLA-A2 항체**"는 HLA-A2에 우선적으로 또는 특이적으로 결합하는 항체를 지칭한다.
- [0105] 본원에서 사용되는 용어 "HLA-A*03"은 HLA 유전자 복합체의 HLA-A 유전자좌에서 HLA-A*03 대립유전자 패밀리에 의해 암호화된 세포 표면 단백질을 포함하는 HLA 단백질을 지칭한다. 용어 "HLA-A*03"에 포함된 HLA 단백질은 혈청학적 검사 또는 유전형 분석에 의해 HLA-A*03 항원 유형에 속하는 것으로 확인된 HLA 단백질을 포함한다. HLA-A*03 항원 유형에 대한 추가의 명칭은 "HLA-A03" 및 "HLA-A3"을 포함한다. 용어 "HLA-A*03"은 "HLA-A*03:"으로 시작하는 HLA 시스템의 인자에 대한 WHO 위원회에 의해 2010년에 개발된 HLA 명명 시스템에 따른 명칭을 갖는 대립유전자에 의해 암호화된 HLA 단백질을 지칭한다.
- [0106] 본원에서 사용되는 용어 "HLA-A*11", "HLA-A11" 및 "A11"은 각각 HLA 유전자 복합체의 HLA-A 유전자좌에서 HLA-A*11 대립유전자 패밀리에 의해 암호화되는 세포 표면 단백질을 포함하는 HLA 단백질을 지칭한다. 용어 "HLA-A*11", "HLA-A11" 및 "A11"에 포함되는 HLA 단백질은 혈청학적 검사 또는 유전형 분석에 의해 HLA-A*11 항원 유형에 속하는 것으로 확인된 HLA 단백질을 포함한다. HLA-A*11 항원 유형에 대한 추가의 명칭은 "HLA-A11"을 포함한다. 용어 "HLA-A*11", "HLA-A11" 및 "A11"은 "HLA-A*11:"로 시작하는 HLA 시스템의 인자에 대한 WHO 위원회에 의해 2010년에 개발된 HLA 명명 시스템에 따른 명칭을 갖는 대립유전자에 의해 암호화된 HLA 단백질을 지칭한다.
- [0107] 본원에서 사용되는 용어 "HLA-A*23", "HLA-A23" 및 "A23"은 각각 HLA 유전자 복합체의 HLA-A 유전자좌에서 HLA-A*23 대립유전자 패밀리에 의해 암호화되는 세포 표면 단백질을 포함하는 HLA 단백질을 지칭한다. 용어 "HLA-A*23", "HLA-A23" 및 "A23"에 포함되는 HLA 단백질은 혈청학적 검사 또는 유전형 분석에 의해 HLA-A*23 항원 유형에 속하는 것으로 확인된 HLA 단백질을 포함한다. HLA-A*23 항원 유형에 대한 추가의 명칭은 "HLA-A23"을 포함한다. 용어 "HLA-A*23", "HLA-A23" 및 "A23"은 "HLA-A*23:"으로 시작하는 HLA 시스템의 인자에 대한 WHO 위원회에 의해 2010년에 개발된 HLA 명명 시스템에 따른 명칭을 갖는 대립유전자에 의해 암호화된 HLA 단백질을 지칭한다.
- [0108] 본원에서 사용되는 용어 "HLA-A*25", "HLA-A25" 및 "A25"는 각각 HLA 유전자 복합체의 HLA-A 유전자좌에서 HLA-A*25 대립유전자 패밀리에 의해 암호화되는 세포 표면 단백질을 포함하는 HLA 단백질을 지칭한다. 용어 "HLA-A*25", "HLA-A25" 및 "A25"에 포함되는 HLA 단백질은 혈청학적 검사 또는 유전형 분석에 의해 HLA-A*25 항원 유형에 속하는 것으로 확인된 HLA 단백질을 포함한다. HLA-A*25 항원 유형에 대한 추가의 명칭은 "HLA-A25"를 포함한다. 용어 "HLA-A*25", "HLA-A25" 및 "A25"는 "HLA-A*25:"로 시작하는 HLA 시스템의 인자에 대한 WHO 위원회에 의해 2010년에 개발된 HLA 명명 시스템에 따른 명칭을 갖는 대립유전자에 의해 암호화된 HLA 단백질을 지칭한다.
- [0109] 본원에서 사용되는 용어 "HLA-A*26", "HLA-A26" 및 "A26"은 각각 HLA 유전자 복합체의 HLA-A 유전자좌에서 HLA-A*26 대립유전자 패밀리에 의해 암호화되는 세포 표면 단백질을 포함하는 HLA 단백질을 지칭한다. 용어 "HLA-A*26", "HLA-A26" 및 "A26"에 포함되는 HLA 단백질은 혈청학적 검사 또는 유전형 분석에 의해 HLA-A*26 항원 유형에 속하는 것으로 확인된 HLA 단백질을 포함한다. HLA-A*26 항원 유형에 대한 추가의 명칭은 "HLA-A26"을 포함한다. 용어 "HLA-A*26", "HLA-A26" 및 "A26"은 "HLA-A*26:"으로 시작하는 HLA 시스템의 인자에 대한 WHO 위원회에 의해 2010년에 개발된 HLA 명명 시스템에 따른 명칭을 갖는 대립유전자에 의해 암호화된 HLA 단백질을 지칭한다.
- [0110] 본원에서 사용되는 용어 "HLA-A*29", "HLA-A29" 및 "A29"는 각각 HLA 유전자 복합체의 HLA-A 유전자좌에서 HLA-A*29 대립유전자 패밀리에 의해 암호화되는 세포 표면 단백질을 포함하는 HLA 단백질을 지칭한다. 용어 "HLA-A*29", "HLA-A29" 및 "A29"에 포함되는 HLA 단백질은 혈청학적 검사 또는 유전형 분석에 의해 HLA-A*29 항원 유형에 속하는 것으로 확인된 HLA 단백질을 포함한다. HLA-A*29 항원 유형에 대한 추가의 명칭은 "HLA-A29"를 포함한다. 용어 "HLA-A*29", "HLA-A29" 및 "A29"는 "HLA-A*29:"로 시작하는 HLA 시스템의 인자에 대한 WHO 위원회에 의해 2010년에 개발된 HLA 명명 시스템에 따른 명칭을 갖는 대립유전자에 의해 암호화된 HLA 단백질을 지칭한다.
- [0111] 본원에서 사용되는 용어 "HLA-A*30", "HLA-A30" 및 "A30"은 각각 HLA 유전자 복합체의 HLA-A 유전자좌에서

HLA-A*30 대립유전자 패밀리에 의해 암호화되는 세포 표면 단백질을 포함하는 HLA 단백질을 지칭한다. 용어 "HLA-A*30", "HLA-A30" 및 "A30"에 포함되는 HLA 단백질은 혈청학적 검사 또는 유전형 분석에 의해 HLA-A*30 항원 유형에 속하는 것으로 확인된 HLA 단백질을 포함한다. HLA-A*30 항원 유형에 대한 추가의 명칭은 "HLA-A30"을 포함한다. 용어 "HLA-A*30", "HLA-A30" 및 "A30"은 "HLA-A*30:"으로 시작하는 HLA 시스템의 인자에 대한 WHO 위원회에 의해 2010년에 개발된 HLA 명명 시스템에 따른 명칭을 갖는 대립유전자에 의해 암호화된 HLA 단백질을 지칭한다.

[0112] 본원에서 사용되는 용어 "HLA-A*31", "HLA-A31" 및 "A31"은 각각 HLA 유전자 복합체의 HLA-A 유전자좌에서 HLA-A*31 대립유전자 패밀리에 의해 암호화되는 세포 표면 단백질을 포함하는 HLA 단백질을 지칭한다. 용어 "HLA-A*31", "HLA-A31" 및 "A31"에 포함되는 HLA 단백질은 혈청학적 검사 또는 유전형 분석에 의해 HLA-A*31 항원 유형에 속하는 것으로 확인된 HLA 단백질을 포함한다. HLA-A*31 항원 유형에 대한 추가의 명칭은 "HLA-A31"을 포함한다. 용어 "HLA-A*31", "HLA-A31" 및 "A31"은 "HLA-A*31:"로 시작하는 HLA 시스템의 인자에 대한 WHO 위원회에 의해 2010년에 개발된 HLA 명명 시스템에 따른 명칭을 갖는 대립유전자에 의해 암호화된 HLA 단백질을 지칭한다.

[0113] 본원에서 사용되는 용어 "HLA-A*33", "HLA-A33" 및 "A33"은 각각 HLA 유전자 복합체의 HLA-A 유전자좌에서 HLA-A*33 대립유전자 패밀리에 의해 암호화되는 세포 표면 단백질을 포함하는 HLA 단백질을 지칭한다. 용어 "HLA-A*33", "HLA-A33" 및 "A33"에 포함되는 HLA 단백질은 혈청학적 검사 또는 유전형 분석에 의해 HLA-A*33 항원 유형에 속하는 것으로 확인된 HLA 단백질을 포함한다. HLA-A*33 항원 유형에 대한 추가의 명칭은 "HLA-A33"을 포함한다. 용어 "HLA-A*33", "HLA-A33" 및 "A33"은 "HLA-A*33:"으로 시작하는 HLA 시스템의 인자에 대한 WHO 위원회에 의해 2010년에 개발된 HLA 명명 시스템에 따른 명칭을 갖는 대립유전자에 의해 암호화된 HLA 단백질을 지칭한다.

[0114] 본원에서 사용되는 용어 "HLA-A*34", "HLA-A34" 및 "A34"는 각각 HLA 유전자 복합체의 HLA-A 유전자좌에서 HLA-A*34 대립유전자 패밀리에 의해 암호화되는 세포 표면 단백질을 포함하는 HLA 단백질을 지칭한다. 용어 "HLA-A*34", "HLA-A34" 및 "A34"에 포함되는 HLA 단백질은 혈청학적 검사 또는 유전형 분석에 의해 HLA-A*34 항원 유형에 속하는 것으로 확인된 HLA 단백질을 포함한다. HLA-A*34 항원 유형에 대한 추가의 명칭은 "HLA-A34"를 포함한다. 용어 "HLA-A*34", "HLA-A34" 및 "A34"는 "HLA-A*34:"로 시작하는 HLA 시스템의 인자에 대한 WHO 위원회에 의해 2010년에 개발된 HLA 명명 시스템에 따른 명칭을 갖는 대립유전자에 의해 암호화된 HLA 단백질을 지칭한다.

[0115] 비-인간 (예를 들어, 무린) 항체의 "인간화된" 형태는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 면역글로불린, 면역글로불린 쇄 또는 이의 단편 (예를 들어, Fv, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 항체의 다른 항원-결합 하위서열)이다. 대부분의 경우, 인간화된 항체 및 이의 항체 단편은 수용자의 상보성 결정 영역 (CDR)의 잔기가 원하는 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 마우스, 래트 또는 토끼와 같은 비인간 종 (공여자 항체)의 CDR의 잔기로 대체된 인간 면역글로불린 (수용자 항체 또는 항체 단편)이다. 일부 경우에, 인간 면역글로불린의 Fv 골격 영역 (FR) 잔기는 상응하는 비-인간 잔기로 대체된다. 또한, 인간화된 항체/항체 단편은 수용자 항체 또는 도입된 CDR 또는 골격 서열 어디에도 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 항체는 결합 영역이 유래되는 비인간 항체의 결합 특이성을 유지하지만 비인간 항체에 대한 면역 반응을 피하도록 설계된다. 이러한 변형은 항체 또는 항체 단편 성능을 더욱 개선하고 최적화할 수 있다. 일반적으로, 인간화된 항체 또는 이의 항체 단편은 실질적으로 모든 적어도 하나, 전형적으로는 두 개의 가변 도메인을 포함할 것이며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역은 비-인간 면역글로불린의 영역에 상응하고 FR 영역의 전부 또는 상당 부분은 인간 면역글로불린 서열의 영역이다. 인간화된 항체 또는 항체 단편은 또한 면역글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부, 전형적으로 인간 면역글로불린의 일부를 포함할 수 있다. 추가의 상세한 설명에 대해서는, 문헌 [Jones et al., Nature, 321: 522-525, 1986; Reichmann et al., Nature, 332: 323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596, 1992]을 참고한다.

[0116] "완전한 인간 (Fully human)"은 전체 분자가 인간 기원이거나 항체 또는 면역글로불린의 인간 형태와 동일한 면역글로불린 서열로 구성되는, 예를 들면, 항체 또는 항체 단편과 같은 면역글로불린을 지칭한다. 이러한 항체는 형질전환 마우스 또는 항원 도전(antigenic challenge)에 대한 반응으로 특정 인간 항체를 생산하도록 조작된 다른 동물로부터 획득될 수 있다 (예를 들어, 참조; Green et al., (1994) Nature Genet 7: 13; Lonberg et al., (1994) Nature 368: 856; Taylor et al., (1994) Int Immun 6:579, 이의 전체 교시내용은 본원에 참고로 포함됨). 완전 인간 항체는 유전자 또는 염색체 형질감염 방법 뿐만 아니라 파지 디스플레이 기술에 의해

작제될 수 있으며, 이들 모두는 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어, 참조; McCafferty et al., (1990) Nature 348: 552-553). 인간 항체는 또한 시험관내 활성화된 B 세포에 의해 생성될 수 있다 (예를 들어, 전문이 참고로 포함된 미국 특허 제5,567,610호 및 제5,229,275호 참조).

[0117] 용어 "초가변 영역"은 본원에 사용될 때 항원 결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기를 지칭한다. 초가변 영역은 일반적으로 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기 (예를 들어, Kabat 번호매김 시스템 (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))에 따라 번호가 매겨질 때 VL에 대략 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3), 및 VH에 대략 31-35 (H1), 50-65 (H2) 및 95-102 (H3)); 및/또는 "초가변 루프"로부터의 아미노산 잔기 (예를 들어, Chothia 번호매김 시스템 (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987))에 따라 번호가 매겨질 때 VL에 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3), 및 VH에 26-32 (H1), 52-56 (H2) 및 95-15 101 (H3)); 및/또는 "초가변 루프"/CDR로부터의 아미노산 잔기 (예를 들어, IMGT 번호매김 시스템 (Lefranc, M. P. et al., Nucl. Acids Res. 27: 209-212 (1999), Ruiz, M. et al., Nucl. Acids Res. 28: 219-221 (2000))에 따라 번호가 매겨질 때 VL에 잔기 27-38 (L1), 56-65 (L2) 및 105-120 (L3), 및 VH에 27-38 (H1), 56-65 (H2) 및 105-120 (H3))을 포함한다. 임의로 항체는 AHo (Honneger, A. and Plunkthun, A. J. Mol. Biol. 309: 657-670 (2001))에 따라 번호가 매겨질 때 VL에 28, 36 (L1), 63, 74-75 (L2) 및 123 (L3), VH에 28, 36 (H1), 63, 74-75 (H2) 및 123 (H3) 중의 하나 이상에 대칭 삽입 (symmetrical insertion)을 갖는다.

[0118] 용어 "동일성" 또는 "상동성"은, 둘 이상의 폴리펩티드 또는 핵산 서열의 서열들 사이의 관계에서 사용될 때, 둘 이상의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드 잔기의 스트링 사이의 일치 수에 의해 결정되는 바와 같은 폴리펩티드 또는 핵산 서열 사이의 서열 관련성의 정도를 지칭한다. "동일성"은 특정 수학적 모델 또는 컴퓨터 프로그램 (즉, "알고리즘")에 의해 어드레스된 겹 정렬 (있다면)을 갖는 둘 이상의 서열 중 더 작은 서열 간의 동일한 일치의 퍼센트를 측정한다. 두 분자 모두에서 서브유닛 위치가 동일한 단량체 서브유닛에 의해 점유될 때; 예를 들어, 두 DNA 분자 각각의 위치가 아데닌에 의해 점유된다면, 이들은 그 위치에서 상동성이거나 동일하다. 두 서열 사이의 상동성은 일치하는 또는 상동성 위치의 수의 직접 함수이다; 예를 들어, 두 서열에서 위치의 절반 (예를 들어, 10개 서브유닛 길이의 중합체에서 5개 위치)이 상동성이라면, 두 서열은 50% 상동성이고; 위치의 90% (예를 들어, 10 중 9)가 일치하거나 상동성이라면, 두 서열은 90% 상동성이다. 관련 폴리펩티드 또는 핵산 서열의 동일성은 공지된 방법에 의해 쉽게 계산될 수 있다. 이러한 방법은 문헌 [Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New 10 Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; and Carillo et al., SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988)]에 기술된 것들을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 동일성을 결정하기 위해 바람직한 방법은 시험된 서열들 간에 가장 큰 일치를 제공하도록 설계된다. 동일성을 결정하는 방법은 공개적으로 이용 가능한 컴퓨터 프로그램에 기술되어 있다. 두 서열 간의 동일성을 결정하기 위한 바람직한 컴퓨터 프로그램 방법은 GAP (Devereux et al., Nucl. Acid. Res. #2, 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN, 및 FASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990))을 포함한 GCG 프로그램 패키지를 포함한다. BLASTX 프로그램은 미국 국립생물공학정보센터 (NCBI) 및 다른 소스 (BLAST Manual, Altschul et al., NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul et al., supra)로부터 공개적으로 이용 가능하다. 잘 알려진 Smith Waterman 알고리즘이 또한 동일성을 결정하는데 사용될 수 있다.

[0119] 본원에서 사용되는 용어 "면역 세포"는 일반적으로 골수에서 생성된 조혈 줄기세포 (HSC)로부터 유래된 백혈구 (leukocyte)를 포함한다. 면역 세포의 예는 림프구 (T 세포, B 세포, 및 자연 살해 (NK) 세포) 및 골수-유래 세포 (호중구, 호산구, 호염기구, 단핵구, 대식세포, 수지상 세포)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0120] 본원에서 사용되는 용어 "면역 효과기 세포"는 특정 면역 반응을 증가시킬 수 있는 형태로 존재하는 면역계의 세포를 지칭한다.

[0121] 본원에서 사용되는 용어 "면역 반응"은 T 세포 매개된 및/또는 B 세포 매개된 면역 반응을 포함한다. 예시적인 면역 반응은 T 세포 반응, 예를 들어, 사이토카인 생성 및 세포성 세포독성을 포함한다. 또한, 면역 반응이라는 용어는 T 세포 활성화, 예를 들어, 항체 생산 (체액 반응) 및 사이토카인 반응 세포, 예를 들어, 대식세포의

활성화에 의해 간접적으로 수행되는 면역 반응을 포함한다. 면역 반응에 관여하는 면역 세포는 림프구, 예를 들어 B 세포 및 T 세포 (CD4⁺, CD8⁺, Th1 및 Th2 세포); 항원 제시 세포 (예를 들어, 수지상 세포, 대식세포, B 림프구, 랑게르한스 세포와 같은 전문 항원 제시 세포, 및 각질형성세포, 내피 세포, 정상세포, 섬유아세포, 희소돌기아교세포와 같은 비전문 항원 제시 세포); 자연 살해 세포; 대식세포, 호산구, 비만 세포, 호염기구 및 과립구와 같은 골수 세포를 포함한다.

- [0122] 본원에서 사용되는 용어 "**면역 수용** (immune accommodation)"은 장기 또는 조직 이식물에 특이적인 수용자 내의 항체의 존재에도 불구하고 장기 또는 조직 이식물이 정상적으로 기능하는 이식물 수용자의 상태를 지칭한다.
- [0123] 본원에서 사용되는 용어 "**면역학적 관용** (immunological tolerance)" 또는 "**면역 관용** (immune tolerance)"은 치료되지 않은 대상체와 비교하여 치료된 대상체의 일부에 대해 수행되는 방법을 지칭하며, 여기서: a) 감소된 수준의 특이 면역학적 반응 (항원-특이 이펙터 T 림프구, B 림프구, 항체, 또는 이들의 등가물에 의해 적어도 부분적으로 매개되는 것으로 생각됨); b) 특이 면역학적 반응의 개시 또는 진행의 지연; 또는 c) 특이 면역학적 반응의 개시 또는 진행의 위험 감소. "특이" 면역학적 또는 면역 관용은 다른 항원과 비교하여 특정 항원에 대해 면역학적 또는 면역 관용이 우선적으로 유발될 때 일어난다.
- [0124] 용어 "**유도성 프로모터**"는, 유전자 산물을 암호화하거나 특징하는 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하게 연결될 때, 프로모터에 상응하는 유도제가 세포에 존재하는 경우에만 실질적으로 유전자 산물이 세포에서 생성되게 하는 뉴클레오티드 서열을 지칭한다.
- [0125] 본원에서 사용되는 바와 같이, "**지침 자료**"는 본 발명의 조성물 및 방법의 유용성을 전하는데 사용될 수 있는 출판물, 기록물, 도표 또는 임의의 다른 표현 매체를 포함한다. 본 발명의 키트의 지침 자료는, 예를 들면, 본 발명의 항체, 세포 및/또는 조성물을 함유하는 용기에 부착되거나 본 발명의 항체, 세포 및/또는 조성물을 함유하는 용기와 함께 선적될 수 있다. 대안적으로, 지침 자료는 수용자에 의해 지침 자료 및 항체, 세포 및/또는 조성물이 협력적으로 사용되도록 할 의도로 용기와 별도로 선적될 수 있다.
- [0126] "**온전한**" 항체는 항원 결합 부위 뿐만 아니라 CL 및 적어도 중쇄 불변 도메인, CH1, CH2 및 CH3을 포함하는 항체이다. 불변 도메인은 천연 서열 불변 도메인 (예를 들어, 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 이의 아미노산 서열 변이체일 수 있다.
- [0127] 본원에서 사용되는 용어 "**세포내 신호전달 도메인**"은 분자의 세포내 부분을 지칭한다. 세포내 신호전달 도메인은 키메라 수용체 함유 세포의 면역 기능을 촉진하는 신호를 생성한다. 키메라 수용체-T 세포에서 면역 기능의 예는 사이토카인의 분비를 포함하여 세포융해 활성화, 억제 활성화 및 헬퍼 활성을 포함할 수 있다.
- [0128] 본원에서 사용되는 바와 같이, "**시험관내 전사된 RNA**"는 시험관내에서 합성된 RNA, 바람직하게는 mRNA를 지칭한다. 일반적으로, 시험관내 전사된 RNA는 시험관내 전사 벡터로부터 생성된다. 시험관내 전사 벡터는 시험관내 전사된 RNA를 생성하는데 사용되는 주형을 포함한다.
- [0129] 용어 "**단리된**"은 자연 상태에서부터 변경 또는 제거됨을 의미한다. 예를 들면, 살아있는 동물에 자연적으로 존재하는 핵산 또는 펩티드는 단리되지 않지만, 이의 자연 상태의 공존 물질로부터 부분적으로 또는 완전히 분리된 동일 핵산 또는 펩티드는 단리된다. 단리된 핵산 또는 펩티드는 실질적으로 정제된 형태로 존재할 수 있거나, 예를 들면, 숙주 세포와 같은 비-천연 환경에서 존재할 수 있다. 전형적으로, 단리된 핵산 또는 펩티드의 제제는 적어도 약 80% 순수한, 적어도 약 85% 순수한, 적어도 약 90% 순수한, 적어도 약 95% 순수한, 95% 이상 순수한, 96% 이상 순수한, 97% 이상 순수한, 98% 이상 순수한, 또는 99% 이상 순수한 핵산 또는 펩티드를 함유한다.
- [0130] "**단리된 항체**"는 이의 자연 환경의 성분으로부터 분리 및/또는 복구된 것이다. 이의 자연 환경의 오염 성분은 항체의 진단적 또는 치료적 사용을 방해할 수 있는 물질이며, 효소, 호르몬 및 기타 단백질성 또는 비-단백질성 성분을 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 항체는 (1) 로리 법(Lowry method)에 의해 결정된 바와 같이 항체의 95중량% 이상, 및 가장 바람직하게는 99중량% 이상으로; (2) 스피닝 컵 배열결정장치 (spinning cup sequenator)를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개 잔기를 획득하기에 충분한 정도로; 또는 (3) 쿠마시 블루 또는, 바람직하게는, 은 염색을 사용하여 환원 또는 비-환원 조건하에서 SDS-PAGE에 의해 나타내어지는 바와 같은 균질도 (homogeneity)로 정제된다. 단리된 항체는, 항체의 자연환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문에, 재조합 세포 내에 계내 항체를 포함한다. 그러나 대개는, 단리된 항체는 적어도 하나의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.
- [0131] "**단리된 핵산**" 또는 "**단리된 핵산 서열**"은 천연 서열을 자연적으로 수반하는, 다른 게놈 DNA 서열 뿐만 아니라

리보솜 및 폴리머라제와 같은 단백질 또는 복합체로부터 실질적으로 분리된 핵산이다. 용어는 자연 발생 환경으로부터 제거된 핵산 서열을 포함하며, 재조합 또는 클로닝된 DNA 단리물 및 화학적으로 합성된 유사체 또는 이중 시스템에 의해 생물학적으로 합성된 유사체를 포함한다. 실질적으로 순수한 핵산은 핵산의 단리된 형태를 포함한다. 물론, 이것은 원래 단리된 핵산을 지칭하며, 인간의 손에 의해 단리된 핵산에 추후에 부가된 유전자 또는 서열을 배제하지 않는다.

[0132] "단리된 폴리펩티드"는 이의 자연 환경의 성분으로부터 동정되고 분리 및/또는 복구된 것이다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 폴리펩티드는 (1) 로리 법에 의해 결정된 바와 같이 폴리펩티드의 95중량% 이상, 및 가장 바람직하게는 99중량% 이상으로; (2) 스피닝 컵 배열결정장치를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개 잔기를 획득하기에 충분한 정도로; 또는 (3) 쿠마시 블루 또는, 바람직하게는, 은 염색을 사용하여 환원 또는 비-환원 조건하에서 SDS-PAGE에 의해 균질도 (homogeneity)로 정제될 것이다. 단리된 폴리펩티드는, 폴리펩티드의 자연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문에, 재조합 세포 내에 계내 폴리펩티드를 포함한다. 그러나, 대개는, 단리된 폴리펩티드는 적어도 하나의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

[0133] 본원에 사용되는 바와 같이, "노틴 (knottin)" (또한 억제제 시스템 매듭 (inhibitor cystine knot)이라고도 지칭될 수 있음)은 3개의 이황화 브릿지를 함유하는 단백질 구조 모티프를 포함하는 항체 모방체를 지칭한다.

[0134] 본원에 사용되는 바와 같이, "쿠니츠 도메인 펩티드 (kunitz domain peptide)"는 항체 모방체의 한 유형을 지칭하며, 프로테아제의 기능을 억제하는 단백질의 활성 도메인에 기초한다.

[0135] 용어 "렌티바이러스"는 레트로비리다에 (Retroviridae) 계열의 속을 지칭한다. 렌티바이러스는 비-분열 세포를 감염시킬 수 있다는 점에서 레트로바이러스 중에서 독특하다; 이들은 상당한 양의 유전자 정보를 숙주 세포의 DNA에 전달할 수 있어, 유전자 전달 벡터의 가장 효율적인 방법 중 하나이다. 렌티바이러스의 예는 HIV, SIV, 및 FIV를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0136] 용어 "렌티바이러스 벡터"는 문헌 [Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009)]에 제공된 바와 같이 특히 자가-불활성화 렌티바이러스 벡터를 포함하는 렌티바이러스 계통의 적어도 일부로부터 유래된 벡터를 지칭한다. 진료소에서 사용될 수 있는 렌티바이러스 벡터의 또 다른 예는 Oxford BioMedica로부터의 LENTIVECTOR® 유전자 전달 기술, Lentigen으로부터의 LENTIMAX™ 벡터 시스템 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 비임상 유형의 렌티바이러스 벡터가 또한 이용 가능하며 당업계의 숙련가에게 공지되어 있을 것이다.

[0137] 용어 "리간드"는 리간드/수용체 쌍의 구성원을 지칭하며, 쌍의 다른 구성원에 결합한다.

[0138] 본원에서 사용되는 용어 "단클론 항체"는 실질적으로 상동성인 항체의 집단으로부터 획득된 항체를 지칭하며, 즉 집단에 포함된 개별 항체는 소량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 단클론 항체는 단일 항원 부위에 대해 매우 특이적이다. 또한, 상이한 결정인자 (에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 포함하는 다클론 항체 제제와 달리, 각각의 단클론 항체는 항원 상의 단일 결정인자에 대한 지시된다. 이들의 특이성에 더하여, 단클론 항체는 다른 항체에 의해 오염되지 않고 합성될 수 있다는 점에서 유리하다. 수식어 "단클론"은 임의의 특정 방법에 의한 항체의 생산을 필요로 하는 것으로 해석되지 않아야 한다. 예를 들면, 단클론 항체는 문헌 [Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)]에 의해 처음 기술된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 박테리아, 진핵 생물 또는 식물 세포에서 재조합 DNA 방법을 사용하여 제조될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호 참조). "단클론 항체"는 또한 예를 들면, 문헌 [Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) and Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)]에 기술된 기법을 사용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 단클론 항체는 본원에서 "키메라" 항체를 포함한다.

[0139] 용어 "핵산" 또는 "폴리뉴클레오티드"는 단일- 또는 이중-가닥 형태의 데옥시리보핵산 (DNA) 또는 리보핵산 (RNA)과 같은 포스포디에스테르 결합에 의해 공유 연결된 뉴클레오티드의 중합체를 지칭한다. 구체적으로 제한되지 않는 한, 용어는 기준 핵산과 유사한 결합 특성을 갖고 자연 발생 뉴클레오티드와 유사한 방식으로 대사되는 천연 뉴클레오티드의 공지된 유사체를 함유하는 핵산을 포함한다. 달리 지시되지 않는 한, 특정 핵산 서열은 또한 이의 보존적으로 변형된 변이체 (예를 들어, 변성 코돈 치환), 대립유전자, 오르소로그, SNP 및 상보적 서열 뿐만 아니라 명시적으로 지시된 서열을 함축적으로 포함한다. 구체적으로, 변성 코돈 치환은 하나 이상의 선택된 (또는 모든) 코돈의 제3 위치가 혼합-염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환된 서열을 생성함으로써 달성될 수 있다 (Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); 및 Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)).

[0140] "나노바디 (nanobody)"는 당업계에 잘 알려져 있으며 자연-발생 중쇄 항체의 독특한 구조적 및 기능적 특성을

함유하는 항체-유래 치료 단백질을 지칭한다. 이들 중쇄 항체는 단일 가변 도메인 (VHH) 및 두 개의 불변 도메인 (CH2 및 CH3)을 함유한다.

- [0141] "천연 서열 (native sequence)" 폴리뉴클레오티드는 자연으로부터 유래된 폴리뉴클레오티드와 동일한 뉴클레오티드 서열을 갖는 것이다. "천연 서열" 폴리펩티드는 (예를 들어, 임의의 종으로부터) 자연으로부터 유래된 폴리펩티드 (예를 들어, 항체)와 동일한 아미노산 서열을 갖는 것이다. 이러한 천연 서열 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드는 자연으로부터 단리될 수 있거나 재조합 또는 합성 수단에 의해 생성될 수 있다.
- [0142] 용어 "작동 가능하게 연결된" 또는 "전사 조절 (transcriptional control)"은 이중 핵산 서열의 발현을 야기하는 조절 서열과 이중 핵산 서열 사이의 기능적 연결을 지칭한다. 예를 들면, 제1 핵산 서열이 제2 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 제1 핵산 서열은 제2 핵산 서열과 작동 가능하게 연결된다. 예를 들어, 프로모터가 코딩 서열의 전사 또는 발현에 영향을 미치는 경우, 프로모터는 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된다. 작동 가능하게 연결된 DNA 서열은 서로 인접할 수 있고, 예를 들어, 두 개의 단백질 코딩 영역을 결합하기 위해 필요한 경우, 동일한 해독틀에 있다.
- [0143] 본원에서 사용되는 용어 "작동 관용 (operational tolerance)"은 감염을 포함한 도전에 반응할 수 있는 면역적 격 숙주에서 적어도 1년 동안 면역억제 약물 요법의 부재하에 급성 또는 만성 거부를 포함한 거부의 조직학적 징후가 없는 안정한 이식편 기능이 있는 임상 상황을 지칭한다.
- [0144] 용어 "펩티드", "폴리펩티드" 및 "단백질"은 상호 교환적으로 사용되며, 펩티드 결합에 의해 공유 연결된 아미노산 잔기로 구성된 화합물을 지칭한다. 폴리펩티드는 특정 길이로 제한되지 않으며: 적어도 두 개의 아미노산을 함유해야 하고, 폴리펩티드의 서열을 포함할 수 있는 아미노산의 최대 개수에 대한 제한은 없다. 펩티드, 올리고펩티드, 및 단백질은 폴리펩티드의 정의 내에 포함되며, 이러한 용어는 달리 구체적으로 나타내지 않는 한 본원에서 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어는 당업계에서 펩티드, 올리고펩티드 및 올리고머로도 흔히 지칭되는 단쇄 및 당업계에서 단백질로 일반적으로 지칭되는 장쇄 둘 다를 가리키며, 이들에는 많은 유형이 있다. 하나의 실시양태에서, 본원에서 사용되는 용어 "펩티드"는 바람직하게는 약 50개 미만의 아미노산 잔기의 쇠 길이를 갖는 펩티드 결합에 의해 함께 연결된 아미노산의 선형 중합체를 지칭하고; "폴리펩티드"는 펩티드 결합에 의해 함께 연결된 적어도 50개의 아미노산의 선형 중합체를 지칭하고; 단백질은 구체적으로 하나 이상의 펩티드 또는 폴리펩티드로 형성되고, 임의로 글리코실화되고, 임의로 비-폴리펩티드 보조인자로 형성된 기능적 실체를 지칭한다. 이 용어는 또한 폴리펩티드의 발현후 변형, 예를 들면, 글리코실화, 아세틸화, 인산화 등 뿐만 아니라 당업계에 공지된 다른 자연 발생적 및 비-자연 발생적 변형 둘 다를 지칭하거나 배제하지 않는다. 폴리펩티드는 전체 단백질 또는 이의 하위서열일 수 있다. "폴리펩티드"는, 예를 들면, 생물학적 활성 단편, 실질적으로 상동성 폴리펩티드, 올리고펩티드, 동중이량체, 이종이량체, 폴리펩티드의 변이체, 변형된 폴리펩티드, 유도체, 유사체, 융합 단백질 등을 포함한다. 폴리펩티드는 천연 펩티드, 재조합 펩티드 또는 이들의 조합을 포함한다. 본 발명의 맥락에서 관심 있는 특정 폴리펩티드는 CDR을 포함하고 항원에 결합할 수 있는 아미노산 하위서열이다.
- [0145] 용어 "약제학적으로 허용되는 부형제" 또는 "약제학적으로 허용되는 담체"는 동물, 바람직하게는 인간에게 투여될 때 부작용, 알레르기 반응 또는 다른 원치않는 반응을 일으키지 않는 부형제를 지칭한다. 이것은 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 향균 및 향진균제, 등장성 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 인간 투여의 경우, 제제는 FDA 사무소 또는 EMA와 같은 규제 사무소에서 요구되는 바와 같이 무균성, 발열성, 일반적인 안전성 및 순도 표준을 충족해야 한다.
- [0146] 본원에서 사용되는 바와 같이, "폴리(A)"는 mRNA에 부착된 일련의 아데노신 모노포스페이트이다. 일과성 발현을 위한 작제물의 바람직한 실시양태에서, 폴리A는 50 내지 5000개 아데노신 모노포스페이트, 바람직하게는 64개 이상, 보다 바람직하게는 100개 이상, 가장 바람직하게는 300개 또는 400개 이상의 아데노신 모노포스페이트이다. 폴리(A) 서열은 국소화, 안정성 또는 번역 효율과 같은 mRNA 기능성을 조절하기 위해 화학적으로 또는 효소적으로 변형될 수 있다.
- [0147] 본원에서 사용되는 바와 같이, "폴리아데닐화"는 메신저 RNA 분자에 대한 폴리아데닐일 모이어티 또는 이의 변형된 변이체의 공유 결합을 지칭한다. 진핵 생물에서, 대부분의 메신저 RNA (mRNA) 분자는 3' 말단에서 폴리아데닐화된다. 3' 폴리(A) 꼬리는 효소 폴리아데닐레이트 폴리머라제의 작용을 통해 프리-mRNA에 부가된 (중중수백 개의) 아데닌 뉴클레오티드의 긴 서열이다. 고등 진핵 생물에서, 폴리(A) 꼬리는 특정 서열, 폴리아데닐화 신호를 함유하는 전사체에 부가된다. 폴리(A) 꼬리 및 이에 결합된 단백질은 mRNA를 엑소뉴클레아제에 의한 분해로부터 보호하는 것을 돕는다. 폴리아데닐화는 또한 전사 종결, 핵으로부터의 mRNA의 수출, 및 번역에 중

요하다. 폴리아데닐화는 DNA가 RNA로 전사된 직후 핵에서 발생하지만, 또한 나중에 세포질에서도 일어날 수 있다. 전사가 종결된 후, mRNA 세는 RNA 폴리머라제와 관련된 엔도뉴클레아제 복합체의 작용을 통해 절단된다. 절단 부위는 통상적으로 절단 부위 근처에 염기 서열 AAUAAA의 존재를 특징으로 한다. mRNA가 절단된 후, 아데노신 잔기가 절단 부위에서 유리 3' 말단에 부가된다.

[0148] 용어 "**프로모터/조절 서열**"은 세포의 합성 기구, 또는 폴리뉴클레오티드 서열의 특이 전사를 개시하는데 필요한 도입된 합성 기구에 의해 인식되어, 프로모터/조절 서열에 작동 가능하게 연결된 유전자 산물의 발현을 가능하게 하는 핵산 서열 (예를 들면, DNA 서열)를 지칭한다. 일부 경우에, 이 서열은 코어 프로모터 서열일 수 있고, 다른 경우에, 이 서열은 또한 인핸서 서열 및 유전자 산물의 발현에 필요한 다른 조절 요소를 포함할 수 있다. 프로모터/조절 서열은, 예를 들면, 조직 특이적 방식으로 유전자 산물을 발현하는 것일 수 있다.

[0149] 본원에서 사용되는 용어 "**반응성**"은 분자와 반응하는 (즉, 분자에 결합하는) 항체의 능력 (예를 들어, 분자에 특이적으로 결합하는)을 지칭한다. 제1 항체가 제2 항체와 비교하여 분자에 대한 감소된 결합을 나타내는 경우 제1 항체는 제2 항체보다 분자 (예를 들어, HLA 분자)에 대한 "더 적은 반응성 (less reactivity)"을 갖는다. 제1 및 제2 항체의 반응성을 하나 이상의 특정 HLA 분자와 쉽게 비교하기 위한 접근법이 공지되어 있다. 하나의 예시적인 접근법이 본원의 실시예 섹션에 제공되어 있으며, 여기서는 FlowPRA® 단일 항원 비드 (One Lambda)를 사용하여 특정 HLA 분자와 반응 (또는 결합)하는 능력에 대해 항체를 조사한다. 이러한 유세포 분석 접근법은 고처리량 항체 반응성 분석에 적합하다.

[0150] 용어 "**재조합 단백질 또는 펩티드**"는 박테리오파지 또는 효모 발현 시스템에 의해 발현되는, 예를 들면, 단백질 또는 펩티드 (예를 들어, 항체 또는 CAR)와 같은 재조합 DNA 기술을 사용하여 생성된 단백질 또는 펩티드 (예를 들어, 항체 또는 CAR)를 지칭한다. 용어는 또한 단백질 또는 펩티드 (예를 들어, 항체 또는 CAR)를 암호화하는 DNA 분자의 합성에 의해 생성되고 DNA 분자가 단백질 또는 펩티드 (예를 들어, 항체 또는 CAR), 또는 단백질 또는 펩티드 (예를 들어, 항체 또는 CAR)를 특정하는 아미노산 서열을 발현하는 단백질 또는 펩티드 (예를 들어, 항체 또는 CAR)를 의미하는 것으로 해석되어야 하며, 여기서 DNA 또는 아미노산 서열은 당업계에서 이용 가능하고 잘 알려진 재조합 DNA 또는 아미노산 서열 기술을 사용하여 수득되었다.

[0151] 본원에서 사용되는 용어 "**조절 면역 세포**"는 면역계의 활성화를 억제함으로써 면역계 항상성 및 자가-항원에 대한 내성을 유지하도록 "조절" 방식으로 작용하는 면역 세포를 지칭한다. "조절 면역 세포"는 또한 비-면역 세포에 영향을 미쳐 조직 복구 또는 재생 촉진과 같은 개선된 임상 상태를 초래할 수 있다. 조절 면역 세포는 조절 T 세포, CD4⁺ 조절 T 세포, CD8⁺ 조절 T 세포, 조절 $\gamma\delta$ T 세포, 조절 DN T 세포, 조절 B 세포, 조절 NK 세포, 조절 대식세포, 및 조절 수지상 세포를 제한함이 없이 포함할 수 있다.

[0152] 본 발명에서 사용되는 바와 같은 "**조절 T 림프구**", "**조절 T 세포**", "**T 조절 세포**", "**Treg 세포**" 또는 "**Treg**"는 동의어이며 당업계에서 사용되는 바와 같은 표준 정의를 갖는 것으로 의도된다. Treg 세포는 면역계의 활성화를 억제함으로써 면역계 항상성 및 자가-항원에 대한 내성을 유지하도록 "조절" 방식으로 작용하는 T 세포의 특수한 하위집단이다. Treg는 때때로 억제 T-세포로 지칭되었다. Treg 세포는 항상 그런 것은 아니지만 종종 포크헤드 패밀리 전사 인자 Foxp3 (포크헤드 박스 p3)의 발현을 특징으로 한다. 이들은 또한 CD4 또는 CD8 표면 단백질을 발현할 수 있다. 이들은 또한 CD25를 발현할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 바와 같이, 및 달리 명시되지 않는 한, Treg는 흉선에서 발달하는 "자연" Treg, 흉선 외부에서 (예를 들어, 조직 또는 이차 림프 기관에서, 또는 정해진 배양 조건하에서 실험실 환경에서) 일어나는 분화 과정을 통해 발생하는 유도/적응/말초 Treg, 및 재조합 DNA 기술을 사용하여 생성된 Treg를 포함한다. 자연-발생 Treg 세포 (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺)는 모든 다른 T 세포와 같이 흉선에서 발생한다. 대조적으로, 유도/적응/말초 Treg 세포 (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg, Tr1 세포, Th3 세포 등을 포함함)는 흉선 외부에서 발생한다. Treg를 유도하는 한 가지 방법은 T 효과기 세포를 IL-10 또는 TGF- β 에 노출시키는 것이다. T-세포는 또한 T-세포의 혼합 집단으로의 Foxp3 유전자의 형질감염 또는 형질도입에 의해 Treg 세포로 전환될 수 있다. Foxp3를 발현시키는 T-세포는 Treg 표현형을 채택하며 이러한 재조합 Treg는 또한 본원에서 "Treg"로 정의된다.

[0153] 용어 "**거부**"는 이식된 장기 또는 조직이 수용자의 신체에 의해 받아들여지지 않은 상태를 지칭한다. 거부는 이식된 장기 또는 조직을 공격하는 수용자의 면역계로부터 야기된다. 거부는 이식 후 수 일 내지 수 주에 (급성) 또는 이식 후 몇 개월 내지 수 년에 (만성) 발생할 수 있다.

[0154] 용어 "**단쇄 Fv**" 또는 "**scFv**"는 경쇄 (VL)의 가변 영역을 포함하는 적어도 하나의 항체 단편 및 중쇄 (VH)의 가변 영역을 포함하는 적어도 하나의 항체 단편을 포함하는 융합 단백질을 지칭하며, 여기서 경쇄 및 중쇄 가변

영역은 단일 폴리펩티드 쇄에 연속적으로 연결된다. 하나의 실시양태에서, scFv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합을 위한 원하는 구조를 형성할 수 있게 하는 폴리펩티드 링커, 예를 들어, 합성 링커, 예를 들어 짧은 가요성 폴리펩티드 링커를 VH 및 VL 도메인 사이에 추가로 포함한다. 따라서, scFv는 단쇄 폴리펩티드로서 발현될 수 있고, 이것이 유래된 온전한 항체의 특이성을 보유한다. 달리 명시되지 않는 한, 본원에서 사용된 바와 같이, scFv는 예를 들어 폴리펩티드의 N-말단 및 C-말단에 대해 어느 하나의 순서로 VL 및 VH 가변 영역을 가질 수 있으며, scFv는 VL-링커-VH를 포함할 수 있거나 VH-링커-VL을 포함할 수 있다.

[0155] 본원에서 사용되는 바와 같이, 항체 또는 CAR은 항원과 검출 가능한 수준으로 바랍직하게는 약 10^4 M^{-1} 이상, 또는 약 10^5 M^{-1} 이상, 또는 약 10^6 M^{-1} 이상, 또는 약 10^7 M^{-1} 이상, 또는 약 10^8 M^{-1} 이상, 또는 약 10^9 M^{-1} 이상, 또는 약 10^{10} M^{-1} 이상의 친화 상수, K_a 로 반응한다면 항원에 대해 "면역특이적", "특이적" 또는 "특이적으로 결합한다"고 한다. 이의 동족 항원에 대한 항체의 친화도는 일반적으로 해리 상수 K_d 로 표현되며, 특정 실시양태에서, 항체는 10^{-4} M 이하, 약 10^{-5} M 이하, 약 10^{-6} M 이하, 10^{-7} M 이하, 또는 10^{-8} M 이하, 또는 $5 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ 이하, 또는 10^{-9} M 이하, 또는 $5 \cdot 10^{-10} \text{ M}$ 이하, 또는 10^{-10} M 이하의 K_d 로 결합한다면 항원에 특이적으로 결합한다. 항체 또는 CAR의 친화도는, 예를 들면, 문헌 [Scatchard et al., (Ann. N.Y. Acad. Sci. USA 51:660 (1949))]에 기술된 것과 같은 통상의 기술을 사용하여 쉽게 결정될 수 있다. 항원, 세포 또는 이의 조직에 대한 항체의 결합 특성은 일반적으로, 예를 들면, 면역조직화학 (IHC) 및/또는 형광-활성화 세포 분류 (FACS)와 같은 면역형광-기반 분석법을 포함하는 면역검출 방법을 사용하여 결정되고 평가될 수 있다. 하나의 실시양태에서, 용어 "특이적으로 결합하는"은 샘플에 존재하는 결합 파트너를 인식하고 결합하지만 항체 또는 CAR 또는 리간드는 샘플 내의 다른 분자를 실질적으로 인식하거나 결합하지 않는 항체, CAR 또는 리간드를 지칭한다.

[0156] 용어 "신호 전달 경로 (signal transduction pathway)"는 세포의 한 부분으로부터 세포의 다른 부분으로 신호를 전달하는데 역할을 하는 다양한 신호 전달 분자들 사이의 생화학적 관계를 지칭한다.

[0157] 용어 "신호전달 도메인"은 제2 메신저를 생성하거나 이러한 메신저에 반응함으로써 효과기로서 기능함으로써 세포 내에서 정보를 전송하여 정의된 신호전달 경로를 통해 세포 활성을 조절함으로써 작용하는 단백질의 기능적 부분을 지칭한다.

[0158] 본원에서 사용되는 용어 "줄기세포"는 일반적으로 다분화능 또는 다능성 줄기세포를 포함한다. "줄기세포"는 제한함이 없이 배아 줄기세포 (ES); 간엽 줄기세포 (MSC); 유도-만능 줄기세포 (iPS); 및 수입된 전구세포 (조혈 줄기세포 (HSC); 골수 유래 세포 등)를 포함한다.

[0159] 용어 "자극"은 자극 분자 (예를 들어, TCR/CD3 복합체 또는 키메라 수용체)를 이의 동족 리간드와 결합시켜 TCR/CD3 복합체를 통한 신호 전달 또는 키메라의 신호전달 도메인을 통한 신호 전달과 같지만 이에 제한되지 않는 신호 전달 이벤트를 매개함으로써 유도된 일차 반응을 지칭한다. 자극은 특정 분자의 변경된 발현을 매개할 수 있다.

[0160] 용어 "자극 분자"는 면역 세포 신호전달 경로의 적어도 일부 측면을 위해 자극 방식으로 면역 세포의 활성화를 조절하는 세포질 신호전달 서열(들)을 제공하는 면역 세포 (예를 들어, T 세포, NK 세포 또는 B 세포)에 의해 발현되는 분자를 지칭한다. 하나의 측면에서, 신호는, 예를 들어, 펩티드가 부하된 MHC 분자와 TCR/CD3 복합체의 결합에 의해 개시되고 증식, 활성화, 분화 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 T 세포 반응의 매개를 야기하는 일차 신호이다. 자극 방식으로 작용하는 일차 세포질 신호전달 서열 ("일차 신호전달 도메인"이라고도 함)은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로 알려진 신호전달 모티프를 함유할 수 있다.

[0161] 용어 "대상체"는 면역 반응이 유도될 수 있는 살아있는 유기체를 포함하는 것으로 의도된다. 하나의 실시양태에서, 대상체는 온혈 동물, 바람직하게는 포유동물 (인간, 가축 및 농장 동물, 및 동물원, 스포츠 또는 애완 동물, 예를 들어 개, 고양이, 소, 말, 양, 돼지, 염소, 토끼 등), 보다 바람직하게는 인간이다. 하나의 실시양태에서, 대상체는 의학적 치료를 받으려고 기다리고 있거나, 의학적 치료를 받고 있거나 의학적 절차의 대상이었거나/대상이거나/대상이 될 것이거나, 표적화된 질환 또는 병태의 발병에 대해 모니터링되는 "환자", 즉 온혈 동물, 보다 바람직하게는 인간일 수 있다. 하나의 실시양태에서, 대상체는 성인 (예를 들면 18세 이상의 대상체)이다. 또 다른 실시양태에서, 대상체는 아동 (예를 들면, 18세 미만의 대상체)이다. 하나의 실시양태에서, 대상체는 남성이다. 또 다른 실시양태에서, 대상체는 여성이다.

[0162] 용어 "실질적으로 정제된 세포"는 다른 세포 유형을 본질적으로 함유하지 않는 세포를 지칭한다. 실질적으로 정제된 세포는 또한 일반적으로 자연 발생 상태와 관련된 다른 세포 유형으로부터 분리된 세포를 지칭한다. 하

나의 실시양태에서, 실질적으로 정제된 세포는 일반적으로 자연 발생 상태와 관련된 다른 세포 유형을 적어도 약 75% 함유하지 않거나, 80% 함유하지 않거나, 85% 함유하지 않고, 바람직하게는 약 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 함유하지 않는 세포를 지칭한다. 일부 경우에, 실질적으로 정제된 세포의 집단은 세포의 상동성 집단을 지칭한다. 하나의 실시양태에서, 실질적으로 정제된 세포의 집단은 적어도 약 75% 상동성, 80% 상동성, 또는 85% 상동성이고, 바람직하게는 약 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 상동성인 세포의 집단을 지칭한다. 또 다른 경우에, 이 용어는 단순히, 자연 상태에서 자연적으로 연관된 세포로부터 분리된 세포를 지칭한다. 일부 측면에서, 세포는 *시험관내에서* 배양된다. 또 다른 측면에서, 세포는 *시험관내에서* 배양되지 않는다.

[0163] 용어 "**T 세포**"는 T-도움 세포 (CD4⁺ 세포), CD8⁺ T-세포 (예를 들어, 세포독성 CD8⁺ T 세포, 조절 CD8⁺ T 세포), T-조절 세포 (Treg), 감마-델타 T 세포, 및 이중 음성 T 세포를 포함하여 CD3을 발현하는 모든 유형의 면역 세포를 포함한다.

[0164] 용어 "**치료학적 유효량**"은 특정 생물학적 결과를 달성하는데 효과적인 본원에 기술된 바와 같은 면역 세포 또는 조성물의 양을 지칭한다. 따라서, 용어 "유효량" 또는 "치료학적 유효량"은, 표적에 대한 상당한 부작용 또는 유해 작용을 야기하지 않으면서 (1) 표적화된 질환 또는 병태의 개시를 지연하거나 예방하는 것; (2) 표적화된 질환 또는 병태의 하나 이상의 증상의 진행, 악화 또는 저하를 늦추거나 중지시키는 것; (3) 표적화된 질환 또는 병태의 증상을 개선시키는 것; (4) 표적화된 질환 또는 병태의 중증도 또는 발병률을 감소시키는 것; 또는 (5) 표적화된 질환 또는 병태를 치료하는 것을 목표로 하는 세포 또는 조성물의 수준 또는 양을 의미한다. 치료학적 유효량은 예방적 또는 방지적 작용을 위해 표적화된 질환 또는 병태의 발병 전에 투여될 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 치료학적 유효량은 치료 작용을 위해 표적화된 질환 또는 병태의 개시 후 투여될 수 있다.

[0165] 용어 "**형질감염된**" 또는 "**형질전환된**" 또는 "**형질도입된**"은 외인성 핵산이 숙주 세포 내로 전달되거나 도입되는 과정을 지칭한다. "형질감염된" 또는 "형질전환된" 또는 "형질도입된" 세포는 외인성 핵산으로 형질감염, 형질전환 또는 형질도입된 세포이다. 세포는 일차 대상체 세포 및 이의 자손을 포함한다.

[0166] 용어 "**전달 벡터**"는 단리된 핵산을 포함하고 단리된 핵산을 세포 내부로 전달하는데 사용될 수 있는 물질의 조성물을 지칭한다. 선형 폴리뉴클레오티드, 이온성 또는 양친매성 화합물과 관련된 폴리뉴클레오티드, 플라스미드, 및 바이러스를 포함하지만 이에 제한되지 않는 수많은 벡터가 당업계에 공지되어 있다. 따라서, 용어 "전달 벡터"는 자율 복제 플라스미드 또는 바이러스를 포함한다. 용어는 또한, 예를 들면, 폴리 리신 화합물, 리포솜 등과 같은 세포 내로의 핵산의 전달을 용이하게 하는 비-플라스미드 및 비-바이러스 화합물을 추가로 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 바이러스 전달 벡터의 예는 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0167] 본원에서 사용되는 바와 같이, "**일시적 (transient)**"은 수 시간, 수 일 또는 수 주 동안의 비-통합된 이식유전자의 발현을 지칭하며, 여기서 발현의 시간은 개체에 통합되거나 숙주 세포에서 안정한 플라스미드 레플리콘 내에 함유된다면 유전자의 발현을 위한 시간보다 짧다.

[0168] 본원에서 사용되는 "**이식물 (transplant)**"은 개체에 도입된 세포, 조직 또는 장기를 지칭한다. 이식된 물질의 공급원은 배양된 세포, 다른 개체로부터의 세포 또는 동일한 개체로부터의 세포 (예를 들어, 세포가 *시험관내에서* 배양된 후)일 수 있다. 예시적인 장기 이식물은 신장, 간, 심장, 폐 및 췌장이다. 예시적인 조직 이식물은 섬 (islet)이다. 예시적인 세포 이식물은 동종이계 조혈 줄기세포 이식이다.

[0169] "**치료하는**" 또는 "**치료**"는 치료적 치료 및 예방적 또는 방지적 조치 둘 다를 지칭하며; 여기서 목적은 표적화된 병리학적 상태 또는 장애를 예방하거나 늦추는 (줄이는) 것이다. 따라서, 하나의 실시양태에서, 이러한 용어는 하나 이상의 치료제 (예를 들어, 본 발명의 Treg 세포와 같은 하나 이상의 치료제)의 투여로부터 야기되는, 표적화된 질환 또는 병태의 진행, 중증도 및/또는 지속기간의 감소 또는 개선, 또는 표적화된 질환 또는 병태의 하나 이상의 증상 (바람직하게는, 하나 이상의 식별 가능한 증상)의 개선을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 용어 "치료하는" 및 "치료"는 표적화된 질환 또는 병태의 적어도 하나의 측정 가능한 신체적 파라미터의 개선을 지칭한다. 또 다른 실시양태에서, 용어 "치료하는" 및 "치료"는 신체적으로, 예를 들어, 식별 가능한 증상의 안정화에 의한, 또는 생리적으로, 예를 들어, 신체적 파라미터의 안정화에 의한, 또는 둘 다에 의한 표적화된 질환 또는 병태의 진행의 억제를 지칭한다. 치료를 필요로 하는 사람은 이미 장애가 있는 사람 뿐만 아니라 장애에 걸리기 쉬운 사람 또는 장애를 예방하고자 하는 사람을 포함한다. 본 발명에 따르는 치료량의 세포 또는 조성물을 제공받은 후, 대상체가 병원성 세포의 수의 관찰 가능한 및/또는 측정 가능한 감소; 병원성인 전체 세포의 퍼센트의 감소; 특정 질환 또는 병태와 관련된 하나 이상의 증상의 어느 정도 완화; 이환율 및 사망률 감

소; 및/또는 삶의 질 문제 개선을 보인다면 대상체는 성공적으로 "치료된다". 질환의 성공적인 치료 및 개선을 평가하기 위한 상기 파라미터는 의사에게 친숙한 일상적인 절차에 의해 쉽게 측정될 수 있다.

[0170] "유니바디 (unibody)"는 당업계에 잘 알려져 있으며 IgG4 항체의 힌지 영역이 없는 항체 단편을 지칭한다. 힌지 영역의 결실은 통상적인 IgG4 항체의 본질적으로 절반 크기이고 IgG4 항체의 2가 결합 영역보다는 1가 결합 영역을 갖는 분자를 야기한다.

[0171] 용어 "가변 (variable)"은 V 도메인의 특정 세그먼트가 항체마다 서열이 광범위하게 상이하다는 사실을 지칭한다. V 도메인은 항원 결합을 매개하고 이의 특정 항원에 대한 특정 항체의 특이성을 정의한다. 그러나, 가변성은 가변 도메인의 110 내지 130개 아미노산 범위에 걸쳐 균일하게 분포되지 않는다. 대신에, V 영역은 각각 9-12개 아미노산 길이인 "초가변 영역"이라 불리는 극한 가변성의 보다 짧은 영역에 의해 분리된 15-30개 아미노산의 골격 영역 (FR)으로 불리는 비교적 불변의 분지로 구성된다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 각각 4개의 FR을 포함하고, 루프 연결을 형성하고, 일부 경우 [베타]-시트 구조의 일부를 형성하는 3개의 초가변 영역에 의해 연결된 [베타]-시트 구성을 주로 채택한다. 각 쇠의 초가변 영역은 FR에 의해 매우 근접하게 함께 유지되며, 다른 쇠로부터의 초가변 영역과 함께 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다 (참조; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). 불변 도메인은 항체를 항원에 결합시키는데 직접 관여하지는 않지만, 항체 의존적 세포성 세포독성 (ADCC)에서의 항체의 참여와 같은 다양한 효과기 기능을 나타낸다.

[0172] 항체의 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체의 중쇄 또는 경쇄의 아미노-말단 도메인을 지칭한다. 중쇄의 가변 도메인은 "VH" 또는 "V_H"로 지칭될 수 있다. 경쇄의 가변 도메인은 "VL" 또는 "V_L"로 지칭될 수 있다. 이들 도메인은 일반적으로 항체의 가장 가변적인 부분이며 항원-결합 부위를 함유한다.

[0173] 본원에서 사용되는 용어 폴리뉴클레오티드 "변이체"는 하나 이상의 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입에 있어서 본원에 구체적으로 개시된 폴리뉴클레오티드와는 전형적으로 상이한 폴리뉴클레오티드이다. 이러한 변이체는 자연 발생적일 수 있거나, 예를 들면, 본 발명의 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 서열을 변형시키고 본원에 기술된 바와 같은 및/또는 당업계에 널리 공지된 다수의 기술 중의 어느 것을 사용하여 암호화된 폴리펩티드의 하나 이상의 생물학적 활성을 평가함으로써 합성에 의해 생성될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 폴리펩티드 "변이체"는 하나 이상의 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입에 있어서 본원에 구체적으로 개시된 폴리펩티드와는 전형적으로 상이한 폴리펩티드이다. 이러한 변이체는 자연 발생적일 수 있거나, 예를 들면, 하나 이상의 상기 폴리펩티드 서열을 변형시키고 본원에 기술된 바와 같은 및/또는 당업계에 널리 공지된 다수의 기술 중의 어느 것을 사용하여 폴리펩티드의 하나 이상의 생물학적 활성을 평가함으로써 합성에 의해 생성될 수 있다. 변형은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드의 구조에서 이루어질 수 있으며, 여전히 바람직한 특성을 갖는 변이체 또는 유도체 폴리펩티드를 암호화하는 기능성 분자를 수득한다. 본 발명의 폴리펩티드의 동등하거나 심지어 개선된 변이체 또는 일부를 생성하기 위해 폴리펩티드의 아미노산 서열을 변경하고자 하는 경우, 당업계의 숙련가는 전형적으로 암호화 DNA 서열의 하나 이상의 코돈을 변화시킬 것이다. 예를 들면, 특정 아미노산은 다른 폴리펩티드 (예를 들어, 항원) 또는 세포에 결합하는 능력의 상당한 손실 없이 단백질 구조에서 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 단백질의 생물학적 기능적 활성을 정의하는 것은 단백질의 결합 능력 및 성질이기 때문에, 특정 아미노산 서열 치환은 단백질 서열 및, 물론, 이의 기본 DNA 코딩 서열에서 이루어질 수 있으며, 그럼에도 불구하고 유사한 특성을 갖는 단백질을 수득할 수 있다. 따라서, 생물학적 유용성 또는 활성의 상당한 손실 없이 상기 펩티드를 암호화하는 다양한 변화가 본 발명의 펩티드 서열 또는 상응하는 DNA 서열에서 이루어질 수 있는 것으로 고려된다. 많은 경우에, 폴리펩티드 변이체는 하나 이상의 보존적 치환을 함유할 것이다. 변이체는 또한, 또는 대안적으로, 비보존적 변화를 함유할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 변이체 폴리펩티드는 5개 이하의 아미노산의 치환, 결실 또는 부가에 의해 천연 서열과는 상이하다. 변이체는 또한 (또는 대안적으로), 예를 들면, 폴리펩티드의 면역원성, 이차 구조 및 친수성에 최소한의 영향을 미치는 아미노산의 결실 또는 부가에 의해 변형될 수 있다.

[0174] "베르사바디 (Verabody)"는 당업계에 잘 알려져 있으며 다른 항체 모방 기술을 지칭한다. 이들은 >15% 시스테인을 갖는 3-5 kDa의 작은 단백질이며, 이것은 높은 이황화물 밀도 스캐폴드를 형성하여, 전형적인 단백질이 갖는 소수성 코어를 대체한다.

[0175] 용어 "이종이계 (xenogeneic)"는 상이한 종의 개체로부터 유래된 임의의 물질을 지칭한다. 용어 "이종이식편 (xenograft)"은 상이한 종의 개체로부터 유래된 이식편을 지칭한다.

[0176] 용어 "제타" 또는 대안적으로 "제타 쇠", "CD3-제타" 또는 "TCR-제타"는 GenBank Acc. BAG36664.1로서 제공된

단백질, 또는 비인간 종, 예를 들어, 마우스, 설치류, 원숭이, 유인원 등으로부터의 등가의 잔기로서 정의되고, "제타 자극 도메인" 또는 대안적으로 "CD3-제타 자극 도메인" 또는 "TCR-제타 자극 도메인"은 T 세포 활성화에 필요한 초기 신호를 기능적으로 전달하기에 충분한 제타 쇄의 세포질 도메인으로부터의 아미노산 잔기 또는 이의 기능적 유도체로서 정의된다. 하나의 실시양태에서, 제타의 세포질 도메인은 GenBank Acc. No. BAG36664.1의 잔기 52 내지 164, 또는 이의 기능적 오르소로그인 비-인간 종, 예를 들어, 마우스, 설치류, 원숭이, 유인원 등으로부터의 등가의 잔기를 포함한다.

[0177] 상세한 설명

[0178] 본 발명의 제1 목적은 HLA-A2에 대해 지시된 항체이며, 바람직하게는 HLA-A2에 대해 지시된 인간화 항체이다.

[0179] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항체는 서열번호: 62의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HCDR1); 서열번호: 63의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HCDR2); 서열번호: 64의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HCDR3); 서열번호: 65의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LCDR1); 서열번호: 66의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LCDR2); 및 서열번호: 67의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LCDR3)을 포함하는 항체와 HLA-A2에 결합하기 위해 경쟁한다.

[0180] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항체는 서열번호: 62의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HCDR1); 서열번호: 63의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HCDR2); 서열번호: 64의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HCDR3); 서열번호: 65의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LCDR1); 서열번호: 66의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LCDR2); 및 서열번호: 67의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LCDR3)을 포함하는 항체와 동일한 HLA-A2 에피토프에 결합한다.

[0181] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 HLA-A2에 결합하기 위해 BB7.2 항체와 경쟁하고/하거나 BB7.2 항체와 동일한 HLA-A2 에피토프에 결합한다.

[0182] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 항체 BB7.2와 비교하여 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 항체와 비교하여, 바람직하게는 BB7.2 scFv와 비교하여 A03, A11, A23, A25, A26, A29, A30, A31, A33, A34 및 이들의 임의의 조합을 포함하는 그룹으로부터 선택된 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 항체 BB7.2와 비교하여 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 항체와 비교하여, 바람직하게는 BB7.2 scFv와 비교하여 A03:01, A11:01, A23:01, A25:01, A26:01, A29:02, A30:01, A31:01, A33:01, A34:01 및 이들의 임의의 조합을 포함하는 그룹으로부터 선택된 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다.

[0183] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 항체 BB7.2와 비교하여 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 항체와 비교하여, 바람직하게는 BB7.2 scFv와 비교하여 A03, A11, A23, A25, A26, A29, A30, A31, A33 및 A34 중의 하나 이상으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 항체 BB7.2와 비교하여 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 항체와 비교하여, 바람직하게는 BB7.2 scFv와 비교하여 A03:01, A11:01, A23:01, A25:01, A26:01, A29:02, A30:01, A31:01, A33:01 및 A34:01 중의 하나 이상으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다.

[0184] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 항체 BB7.2와 비교하여 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 항체와 비교하여, 바람직하게는 BB7.2 scFv와 비교하여 A03, A11, A23, A25, A26, A29, A30, A31, A33 및 A34 중의 2개 이상으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 항체 BB7.2와 비교하여 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 항체와 비교하여, 바람직하게는 BB7.2 scFv와 비교하여 A03:01, A11:01, A23:01, A25:01, A26:01, A29:02, A30:01, A31:01, A33:01 및 A34:01 중의 2개 이상으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다.

[0185] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 항체 BB7.2와 비교하여 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 항체와 비교하여, 바람직하게는 BB7.2 scFv와 비교하여 A03, A11, A23, A25, A26, A29, A30, A31, A33 및 A34 중의 3개 이상으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 항체 BB7.2와 비교하여 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 항체와 비교하여, 바람직하게는 BB7.2 scFv와 비교하여 A03:01, A11:01, A23:01, A25:01, A26:01, A29:02, A30:01, A31:01, A33:01 및 A34:01 중의 3개 이상으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다.

나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 항체 BB7.2와 비교하여 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 항체와 비교하여, 바람직하게는 BB7.2 scFv와 비교하여 HLA-A29:02에 대한 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 항체 BB7.2와 비교하여 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 항체와 비교하여, 바람직하게는 BB7.2 scFv와 비교하여 HLA-A30:01에 대한 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 항체 BB7.2와 비교하여 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 항체와 비교하여, 바람직하게는 BB7.2 scFv와 비교하여 HLA-A03:01에 대한 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 항체 BB7.2와 비교하여 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 항체와 비교하여, 바람직하게는 BB7.2 scFv와 비교하여 HLA-A11:01에 대한 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 항체 BB7.2와 비교하여 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 항체와 비교하여, 바람직하게는 BB7.2 scFv와 비교하여 HLA-A26:01에 대한 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 항체 BB7.2와 비교하여 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 항체와 비교하여, 바람직하게는 BB7.2 scFv와 비교하여 HLA-A31:01에 대한 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 항체 BB7.2와 비교하여 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 항체와 비교하여, 바람직하게는 BB7.2 scFv와 비교하여 HLA-A33:01에 대한 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 항체 BB7.2와 비교하여 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 항체와 비교하여, 바람직하게는 BB7.2 scFv와 비교하여 HLA-A34:01에 대한 더 적은 반응성을 갖는다.

[0199] HLA-A 아형에 대한 HLA-A2 항체의 반응성을 측정하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 예를 들면, ONE LAMBDA에 의해 제공된 FlowPRA 단일 항원 항체와 같은 단일 항원 분석을 제한함이 없이 포함한다.

[0200] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는, 시험 A의 조건에서 측정할 경우, 항체 BB7.2 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 항체와 비교하여 A03, A11, A23, A25, A26, A29, A30, A31, A33, A34 및 이들의 임의의 조합을 포함하는 그룹으로부터 선택된 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다.

[0201] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는, 시험 A의 조건에서 측정할 경우, 항체 BB7.2 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 항체와 비교하여 A25, A29, A30 및 이들의 임의의 조합을 포함하는 그룹으로부터 선택된 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다.

[0202] 시험 A:

[0203] 항-HLA-A2 항체 또는 BB7.2 항체, 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL (mAb CAR))을 포함하는 CAR을 발현하는 $0.25 \cdot 10^6$ 개 T 세포를 실온에서 30분 동안 FlowPRA 단일 항원 항체 비드 패널 (FL1HD01, FL1HD02, FL1HD03, FL1HD04, FL1HD06 및 FL1HD08, One Lambda) 및 고정 가능한 생존력 염료 (fixable viability dye; FVD, ThermoFisher, 65-0865-14, eBioscience)와 함께 배양한다. 샘플을 세척하고, 0.5% 포르말데히드로 고정하고, 유세포 분석을 통해 분석한다. 샘플 당 200개의 음성 대조군 비드가 획득된다. 비드 단독을 음성 대조군으로서 사용하였다. 분석을 위해, 고정 가능한 생존력 염료를 사용하여 죽은 세포를 먼저 제거한다. 그 후 죽은 세포 및 이중선의 배제 후 단일 항원 비드를 게이팅한다. 그 후, HLA 당 비드의 수를 이들 각각의 PE 강도 피크에 의해 결정한다. 각 HLA-피크에서 관심 있는 비드 수에 200을 곱한 다음 샘플의 음성 비드 수로 나누어 데이터를 정규화한다. 각각의 HLA-피크에 대해 대조군 (비-CAR-발현 세포)과 비교한 CAR Treg의 상대적 결합 퍼센트는 대조군 샘플의 비드 수로부터 CAR-Treg의 비드 수를 뺀 다음 비-CAR-발현 대조군에서의 비드의 평균 수로 나눈 것의 100배에 의해 결정된다.

[0204] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는, 시험 B의 조건에서 측정할 경우, 항체 BB7.2와 비교하여 또는 BB7.2의 VH 및 VL을 포함하는 항체와 비교하여 A03, A11, A23, A25, A26, A29, A30, A31, A33, A34 및 이들의 임의의 조합을 포함하는 그룹으로부터 선택된 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다.

[0205] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는, 시험 B의 조건에서 측정할 경우, 항체 BB7.2와 비교하여 또는 BB7.2의 VH 및 VL을 포함하는 항체와 비교하여 A25, A29, A30 및 이들의 임의의 조합을 포함하는 그룹으로부터 선택된 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다.

[0206] 시험 B:

[0207] 세포 표면 상에 (예를 들면, 본원에 기술된 바와 같은 키메라 항원 수용체의 일부로서) 항-HLA-A2 항체 또는 BB7.2 항체 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL 또는 절단된 NGFR 형질도입 마커 (NGFR)를 발현하는 $0.25 \cdot 10^6$ 개 T 세포를 FlowPRA 단일 항원 항체 비드 패널 (FL1HD, One Lambda) 및 고정 가능한 생존력 염료 (FVD, 65-0865-14,

eBioscience)와 함께 배양한 다음 0.5% 포름알데히드로 고정하고, 유세포 분석을 통해 분석한다. 분석을 위해, 고정 가능한 생존력 염료를 사용하여 죽은 세포를 먼저 제거한다. 그 후 죽은 세포 및 이중선의 배제 후 단일 비드를 게이팅한다. 그 후, HLA 당 비드의 수를 이들 각각의 PE 강도에 의해 결정한다. 샘플의 음성 비드 수를 Treg-NGFR 샘플의 음성 비드 수로 나누고 Treg-NGFR 표본의 음성 비드 수를 곱하여 데이터를 정규화한다. 상대적 결합 퍼센트는 하나의 특정 HLA에 대한 NGFR 표본의 비드 수에서 그 HLA에 대한 표본의 정규화된 비드 수를 빼고 NGFR 표본의 비드 수로 나눈 값의 100배이다.

[0208] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는, 시험 A 또는 시험 B의 조건에서 측정할 경우, 항체 BB7.2 중의 하나보다 통계적으로 열등하거나 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 항체보다 통계적으로 열등한 A03, A11, A23, A25, A26, A29, A30, A31, A33, A34를 포함하는 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 반응성을 갖는다.

[0209] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는, 시험 A 또는 시험 B의 조건에서 측정할 경우, 항체 BB7.2 중의 하나보다 통계적으로 열등하거나 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 항체보다 통계적으로 열등한 A25, A29, A30을 포함하는 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 반응성을 갖는다.

[0210] 하나의 실시양태에서, 용어 "통계적으로 열등한 (statistically inferior)"은 본 발명의 항-HLA-A2 항체에 대해 측정된 반응성 (즉, 예를 들면, 시험 A 또는 시험 B의 조건에서의 상대 결합)이, 특히 2원 ANOVA, Dunnett 사후 검정에 의해 분석될 때, 최대 약 0.05, 바람직하게는 최대 약 0.01, 보다 바람직하게는 최대 약 0.005, 및 훨씬 더 바람직하게는 최대 약 0.001의 *p* 값으로 BB7.2 항체에 대해 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 항체에 대해 측정된 반응성보다 열등하다는 것을 의미한다.

[0211] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2 항체 중의 하나 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 항체 중의 하나보다 열등한 A03, A11, A23, A25, A26, A29, A30, A31, A33, A34를 포함하는 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 반응성을 가지며, 바람직하게는 본 발명의 항-HLA-A2 항체는, 시험 A 또는 시험 B의 조건에서 측정될 때, BB7.2 항체 중의 하나 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 항체 중의 하나보다 열등한 A03, A11, A23, A25, A26, A29, A30, A31, A33, A34를 포함하는 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 상대 결합을 가지며, 보다 바람직하게는 본 발명의 항-HLA-A2 항체에 대해 측정된 상대 결합은 BB7.2 항체 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 항체에 대해 측정된 상대 결합의 최대 약 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% 또는 그 미만이다.

[0212] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2 항체 중의 하나 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 항체 중의 하나보다 열등한 A25, A29, A30을 포함하는 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 반응성을 가지며, 바람직하게는 본 발명의 항-HLA-A2 항체는, 시험 A 또는 시험 B의 조건에서 측정될 때, BB7.2 항체 중의 하나 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 항체 중의 하나보다 열등한 A25, A29, A30을 포함하는 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 상대 결합을 가지며, 보다 바람직하게는 본 발명의 항-HLA-A2 항체에 대해 측정된 상대 결합은 BB7.2 항체 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 항체에 대해 측정된 상대 결합의 최대 약 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% 또는 그 미만이다.

[0213] 하나의 실시양태에서, 상기 항체는 단클론 항체이다.

[0214] 또 다른 실시양태에서, 상기 항체는 다클론 항체이다.

[0215] 하나의 실시양태에서, 중쇄의 가변 영역은 다음의 CDR 중의 적어도 하나를 포함한다:

[0216] **VH-CDR1:** SYHIQ (서열번호: 1)

[0217] **VH-CDR2:** WIYPGDGSTQYNEKFKG (서열번호: 2)

[0218] **VH-CDR3:** EGTYYAMDY (서열번호: 3)

[0219] CDR 번호매김 및 정의는 Kabat 정의를 따른다.

[0220] 하나의 실시양태에서, 중쇄의 가변 영역은 다음의 CDR 중의 적어도 하나를 포함한다:

[0221] **VH-CDR1:** GYTFTSY (서열번호: 4)

[0222] **VH-CDR2:** YPGDGS (서열번호: 5)

[0223] **VH-CDR3:** EGTYYAMDY (서열번호: 3)

- [0224] CDR 번호매김 및 정의는 Chothia 정의를 따른다.
- [0225] 하나의 실시양태에서, 경쇄의 가변 영역은 다음의 CDR 중의 적어도 하나를 포함한다:
- [0226] **VL-CDR1**: RSSQSIVHSNGNTYLE (서열번호: 6)
- [0227] **VL-CDR2**: KVSNRFS (서열번호: 7)
- [0228] **VL-CDR3**: FQGSHPRT (서열번호: 8)
- [0229] CDR 번호매김 및 정의는 Kabat 또는 Chothia 정의를 따른다.
- [0230] 본 발명의 하나의 실시양태에서, 항-HLA-A2 항체는 이의 중쇄에 하나의 **VH-CDR1** (SYHIQ (서열번호: 1)), 하나의 **VH-CDR2** (WIYPGDGSTQYNEKFKG (서열번호: 2)) 및/또는 하나의 **VH-CDR3** (EGTYYAMDY (서열번호: 3))을 포함한다.
- [0231] 본 발명의 하나의 실시양태에서, 항-HLA-A2 항체는 이의 중쇄에 3개의 CDR을 포함한다: **VH-CDR1** (SYHIQ (서열번호: 1)), **VH-CDR2** (WIYPGDGSTQYNEKFKG (서열번호: 2)) 및 **VH-CDR3** (EGTYYAMDY (서열번호: 3)).
- [0232] 본 발명의 하나의 실시양태에서, 항-HLA-A2 항체는 이의 중쇄에 하나의 **VH-CDR1** (GYTFTSY (서열번호: 4)), 하나의 **VH-CDR2** (YPGDGS (서열번호: 5)) 및/또는 하나의 **VH-CDR3** (EGTYYAMDY (서열번호: 3))을 포함한다.
- [0233] 본 발명의 하나의 실시양태에서, 항-HLA-A2 항체는 이의 중쇄에 3개의 CDR을 포함한다: **VH-CDR1** (GYTFTSY (서열번호: 4)), **VH-CDR2** (YPGDGS (서열번호: 5)) 및 **VH-CDR3** (EGTYYAMDY (서열번호: 3)).
- [0234] 본 발명의 하나의 실시양태에서, 항-HLA-A2 항체는 이의 경쇄에 하나의 **VL-CDR1** (RSSQSIVHSNGNTYLE (서열번호: 6)), 하나의 **VL-CDR2** (KVSNRFS (서열번호: 7)) 및/또는 하나의 **VL-CDR3** (FQGSHPRT (서열번호: 8))을 포함한다.
- [0235] 본 발명의 하나의 실시양태에서, 항-HLA-A2 항체는 이의 경쇄에 3개의 CDR을 포함한다: **VL-CDR1** (RSSQSIVHSNGNTYLE (서열번호: 6)), **VL-CDR2** (KVSNRFS (서열번호: 7)) 및 **VL-CDR3** (FQGSHPRT (서열번호: 8)).
- [0236] 본 발명의 하나의 실시양태에서, 항-HLA-A2 항체는 다음을 포함한다:
- [0237] - 이의 중쇄에 3개의 CDR 서열번호: 1, 서열번호: 2 및 서열번호: 3; 및
- [0238] - 이의 경쇄에 3개의 CDR 서열번호: 6, 서열번호: 7 및 서열번호: 8.
- [0239] 본 발명의 하나의 실시양태에서, 항-HLA-A2 항체는 다음을 포함한다:
- [0240] - 이의 중쇄에 3개의 CDR 서열번호: 4, 서열번호: 5 및 서열번호: 3; 및
- [0241] - 이의 경쇄에 3개의 CDR 서열번호: 6, 서열번호: 7 및 서열번호: 8.
- [0242] 본 발명에 따르면, 중쇄 또는 경쇄의 CDR 1, 2 및 3 중의 어느 것은 상응하는 서열번호: 1-8에 열거된 특정 CDR 또는 CDR의 세트와 적어도 약 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 공유하는 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0243] 본 발명의 하나의 실시양태에서, 항체 항-HLA-A2는 서열번호: 9의 중쇄 가변 영역을 포함한다.

(서열 번호 9)

**QVQLVQSGPEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYHIQWVRQAPGQGLEWIGWIYP
GDGSTQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLTSEDYAVYYCAREGTYYAMD
YWGQGTSVTVSS**

- [0244]
- [0245] 본 발명의 하나의 실시양태에서, 항체 항-HLA-A2의 중쇄 가변 영역은 서열번호: 9와 적어도 약 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 서열을 갖는다.

[0246] 본 발명의 하나의 실시양태에서, 항체 항-HLA-A2는 서열번호: 10의 경쇄 가변 영역을 포함한다.

(서열 분석 10)

DX₁VMTQX₂PX₃X₄LX₅VX₆X₇GX₈X₉X₁₀X₁₁ISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYX₁₂QKP
GQX₁₃PRLLIYKVSNRFSGX₁₄PDRFSGSGSGTDFTLX₁₅ISRX₁₆EX₁₇EDX₁₈X₁₉VYY
CFQGSHPVPRTFGGGKLEIKR

[0247]

[0248] 여기서 X₁은 V 또는 I이고, X₂는 T 또는 S이고, X₃은 L 또는 S 또는 A이고, X₄는 S 또는 T이고, X₅는 P 또는 S이고, X₆은 T 또는 S이고, X₇은 L 또는 P이고, X₈은 E 또는 D이고, X₉는 P 또는 R이고, X₁₀은 A 또는 V이고, X₁₁은 S 또는 T이고, X₁₂는 L 또는 Q이고, X₁₃은 S 또는 A이고, X₁₄는 V 또는 I이고, X₁₅는 K 또는 T이고, X₁₆은 V 또는 L이고, X₁₇은 A 또는 P이고, X₁₈은 L 또는 F이고, X₁₉는 G 또는 A이다.

[0249] 본 발명의 하나의 실시양태에서, 항체 항-HLA-A2의 경쇄 가변 영역은 서열번호: 10과 적어도 약 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 서열을 갖는다.

[0250] 하나의 실시양태에서, 경쇄 영역은 서열번호: 11의 서열, 또는 서열번호: 11과 적어도 약 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 임의의 서열을 갖는다.

(서열 분석 11)

DVVMTQTPLSLPVTLGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPRLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPRTFGGGKTL
EIKR

[0251]

[0252] 하나의 실시양태에서, 경쇄 영역은 서열번호: 12의 서열, 또는 서열번호: 12와 적어도 약 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 임의의 서열을 갖는다.

(서열 분석 12)

DVVMTQSPSSLSVTLGDRVSIQRSSQSIVHSNGNTYLEWYQQKPGQSPRLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRVEPEDLGVYYCFQGSHPVPRTFGGGKLE
IKR

[0253]

[0254] 하나의 실시양태에서, 경쇄 영역은 서열번호: 13의 서열, 또는 서열번호: 13과 적어도 약 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 임의의 서열을 갖는다.

(서열 분석 13)

DIVMTQSPATLSVSPGERATISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYQQKPGQAPRLLIYK
VSNRFSGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCFQGSHPVPRTFGGGKLEI
KR

[0255]

[0256] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 HLA-A2 항체는 서열번호: 9의 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열번호: 10의 서열 (여기서, X₁은 V 또는 I이고, X₂는 T 또는 S이고, X₃은 L 또는 S 또는 A이고, X₄는 S 또는 T이고, X₅는 P 또는 S이고, X₆은 T 또는 S이고, X₇은 L 또는 P이고, X₈은 E 또는 D이고, X₉는 P 또는 R이고, X₁₀은 A 또는

V이고, X₁₁은 S 또는 T이고, X₁₂는 L 또는 Q이고, X₁₃은 S 또는 A이고, X₁₄는 V 또는 I이고, X₁₅는 K 또는 T이고, X₁₆은 V 또는 L이고, X₁₇은 A 또는 P이고, X₁₈은 L 또는 F이고, X₁₉는 G 또는 A이다)을 갖는 경쇄 가변 영역, 또는 서열번호: 9-10과 적어도 약 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 공유하는 임의의 서열을 포함한다.

[0257] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 HLA-A2 항체는 서열번호: 9의 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열번호: 11의 서열을 갖는 경쇄 가변 영역, 또는 서열번호: 9 및 11과 적어도 약 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 공유하는 임의의 서열을 포함한다.

[0258] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 HLA-A2 항체는 서열번호: 9의 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열번호: 12의 서열을 갖는 경쇄 가변 영역, 또는 서열번호: 9 및 12와 적어도 약 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 공유하는 임의의 서열을 포함한다.

[0259] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 HLA-A2 항체는 서열번호: 9의 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열번호: 13의 서열을 갖는 경쇄 가변 영역, 또는 서열번호: 9 및 13과 적어도 약 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 공유하는 임의의 서열을 포함한다.

[0260] 본 발명에 따르면, 중쇄 또는 경쇄 가변 영역의 아미노산 중의 1, 2, 3, 4개 또는 그 이상이 다른 아미노산으로 치환될 수 있다.

[0261] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항체에서, 명시된 가변 영역 및 CDR 서열은 보존적 서열 변형을 포함할 수 있다. 보존적 서열 변형은 아미노산 서열을 함유하는 항체의 결합 특성에 유의적인 영향을 미치지거나 변경하지 않는 아미노산 변형을 지칭한다. 이러한 보존적 변형은 아미노산 치환, 부가 및 결실을 포함한다. 변형은 부위-지정 돌연변이유발 및 PCR-매개 돌연변이유발과 같은 당업계에서 알려진 표준 기술에 의해 본 발명의 항체에 도입될 수 있다.

[0262] 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호: 9의 중쇄 가변 영역을 암호화하는 단리된 핵산 서열이다. 하나의 실시양태에서, 상기 핵산 서열은 서열번호: 86이다.

(서열 분석 86)

```
CAGGTCCAGCTAGTACAAAGCGGCCCTGAAGTAAAGAAACCTGGTGCTCT
GTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACACATC
CAGTGGGTTTCGACAGGCCCTGGACAGGGACTAGAGTGGATCGGCTGGATC
TATCCTGGCGACGGCAGCACCCAGTACAACGAGAAGTTCAAGGGCAGAGTT
ACCATCACCGCCGACAAGAGCACCCAGCACAGCCTATATGGAGCTGAGCAGC
CTGACCAGCGAGGACACAGCTGTTTACTATTGTGCCAGAGAGGGCACCTAC
TACGCAATGGATTATTGGGGCCAGGGGACCAGCGTGACCGTTTCTTCT
```

[0263]

[0264] 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호: 11의 경쇄 가변 영역을 암호화하는 단리된 핵산 서열이다. 하나의 실시양태에서, 상기 핵산 서열은 서열번호: 87이다.

(서열 분석 87)

```
GATGTTGTAATGACCCAGACACCTCTGAGCCTGCCTGTGACCCTGGGAGAA
CCAGCATCCATCAGCTGTCGGAGCAGCCAGAGCATCGTTCACAGCAACGGC
AACACCTACCTGGAATGGTATCTACAGAAGCCCGGACAGAGCCCCAGGCTG
CTGATCTACAAGGTGTCCAACCGCTTCAGTGGTGTGCCCGATAGATTTCTG
GCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCTCCAGAGTGAAGCCG
AGGACCTGGGCGTGTACTACTGCTTCCAAGGCAGCCATGTGCCAAGAACCT
TTGGTGGAGGCACAAAGCTGGAAATCAAGCGG
```

[0265]

[0266] 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호: 12의 경쇄 가변 영역을 암호화하는 단리된 핵산 서열이다. 하나의 실시양태에서, 상기 핵산 서열은 서열번호: 88이다.

(서열 분석 88)

GATGTTGTAATGACCCAGAGCCCTAGTAGCCTGTCTGTGACCCTGGGAGATC
 GAGTATCCATCAGCTGTCTCGGAGCAGCCAGAGCATCGTTCACAGCAACGGCA
 ACACCTACCTGGAATGGTATCAACAGAAGCCCGGACAGAGCCCCAGGCTGC
 TGATCTACAAGGTGTCCAACCGCTTCAGTGGTGTGCCCGATAGATTTTCTGG
 CAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACGATCTCCAGAGTGGAACCAGA
 GGACCTGGGCGTGTACTACTGCTTCCAAGGCAGCCATGTGCCAAGAACCTTT
 GGTGGAGGCACAAAGCTGGAATCAAGCGG

[0267]

[0268]

본 발명의 또 다른 목적은 서열번호: 13의 경쇄 가변 영역을 암호화하는 단리된 핵산 서열이다. 하나의 실시양태에서, 상기 핵산 서열은 서열번호: 89이다.

(서열 분석 89)

GATATTGTAATGACCCAGAGCCCTGCAACACTGTCTGTGTCCCCTGGAGAAC
 GAGCAACAATCAGCTGTCTCGGAGCAGCCAGAGCATCGTTCACAGCAACGGCA
 ACACCTACCTGGAATGGTATCAACAGAAGCCCGGACAGGCCCCAGGCTGC
 TGATCTACAAGGTGTCCAACCGCTTCAGTGGGAATACCCGATAGATTTTCTGG
 CAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACGATCTCCAGATTAGAACCAGA
 GGACTTTGCAGTGTACTACTGCTTCCAAGGCAGCCATGTGCCAAGAACCTTT
 GGTGGAGGCACAAAGCTGGAATCAAGCGG

[0269]

[0270]

본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 항-HLA-A2 항체를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터이다.

[0271]

본 발명의 또 다른 목적은 상기 벡터를 포함하는 단리된 숙주 세포이다. 상기 숙주 세포는 본 발명의 항체의 재조합 생산에 사용될 수 있다.

[0272]

하나의 실시양태에서, 상기 항체는 전 항체, 인간화 항체, 단쇄 항체, 이량체성 단쇄 항체, Fv, scFv, Fab, F(ab')₂, 탈푸코실화 항체, 이중-특이 항체, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항체 분자이다.

[0273]

또 다른 실시양태에서, 상기 항체는 유니바디, 도메인 항체, 및 나노바디로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항체 단편이다.

[0274]

또 다른 실시양태에서, 상기 항체는 아피바디, 알파바디, 아르마딜로 반복 단백질 기반 스캐폴드, 노틴, 쿠니츠 도메인 펩티드, 아필린, 아피틴, 아드넥틴, 아트머, 에바신, DARPIn, 안티칼린, 아비머, 피노머, 베르사바디 및 듀오칼린으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항체 모방체이다.

[0275]

본 발명의 항체의 단편 및 유도체 (문맥상 달리 언급되거나 명확하게 모순되지 않는 한 본 출원에 사용된 용어 "항체"에 의해 포함됨)는 당업계에 공지된 기술에 의해 생성될 수 있다. "단편"은 온전한 항체의 일부, 일반적으로 항원 결합 부위 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, 및 Fv 단편; 디아바디; (1) 단쇄 Fv 분자, (2) 단지 하나의 경쇄 가변 도메인을 함유하는 단쇄 폴리펩티드, 또는 관련된 중쇄 모이어티 없이 경쇄 가변 도메인의 3개의 CDR을 함유하는 이의 단편 및 (3) 단지 하나의 중쇄 가변 영역을 함유하는 단쇄 폴리펩티드, 또는 관련된 경쇄 모이어티 없이 중쇄 가변 영역의 3개의 CDR을 함유하는 이의 단편을 제한함이 없이 포함하는 인접 아미노산 잔기의 하나의 비차단된 서열로 구성된 일차 구조를 갖는 폴리펩티드(본원에서 "단쇄 항체 단편" 또는 "단쇄 폴리펩티드"라고 함)인 임의의 항체 단편; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이 항체를 포함한다. 본 항체의 단편은 표준 방법을 사용하여 획득될 수 있다.

[0276]

예를 들어, Fab 또는 F(ab')₂ 단편은 통상적인 기술에 따라 단리된 항체의 프로테아제 소화에 의해 생성될 수 있다. 면역반응성 단편은 공지된 방법을 사용하여 변형될 수 있음을 인지할 것이며, 예를 들면 생체내 클리어 런스를 늦추고 보다 바람직한 약동학적 프로파일을 얻기 위해 단편은 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)로 변형될 수 있다. PEG를 Fab' 단편에 커플링하고 부위-특이적으로 접합시키는 방법은, 예를 들면, 문헌 [Leong et al., Cytokines 16 (3): 106-119 (2001) and Delgado et al., Br. J. Cancer 5 73 (2): 175- 182 (1996), 이의 개시내용은 본원에 참조로 포함됨]에 기술되어 있다.

- [0277] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항체는 scFv 또는 scFab, 바람직하게는 scFv이다.
- [0278] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항체는 scFv의 N-말단 및 C-말단에 대한 어느 하나의 순서로 서열번호: 9 및 서열번호: 10 (여기서, X₁은 V 또는 I이고, X₂는 T 또는 S이고, X₃은 L 또는 S 또는 A이고, X₄는 S 또는 T이고, X₅는 P 또는 S이고, X₆은 T 또는 S이고, X₇은 L 또는 P이고, X₈은 E 또는 D이고, X₉는 P 또는 R이고, X₁₀은 A 또는 V이고, X₁₁은 S 또는 T이고, X₁₂는 L 또는 Q이고, X₁₃은 S 또는 A이고, X₁₄는 V 또는 I이고, X₁₅는 K 또는 T이고, X₁₆은 V 또는 L이고, X₁₇은 A 또는 P이고, X₁₈은 L 또는 F이고, X₁₉는 G 또는 A이다)을 포함하는 scFv이다. 바람직하게는, 본 발명의 항체는 scFv의 N-말단 및 C-말단에 대한 어느 하나의 순서로 서열번호: 9 및 서열번호: 11, 12 또는 13을 포함하는 scFv이다.
- [0279] 하나의 실시양태에서, 서열번호: 9는 N-말단이고, 서열번호: 10, 11, 12 또는 13은 C-말단이다.
- [0280] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 scFv는, N-말단에서 C-말단으로: 서열번호: 9, 임의의 링커, 서열번호: 10 (여기서, X₁은 V 또는 I이고, X₂는 T 또는 S이고, X₃은 L 또는 S 또는 A이고, X₄는 S 또는 T이고, X₅는 P 또는 S이고, X₆은 T 또는 S이고, X₇은 L 또는 P이고, X₈은 E 또는 D이고, X₉는 P 또는 R이고, X₁₀은 A 또는 V이고, X₁₁은 S 또는 T이고, X₁₂는 L 또는 Q이고, X₁₃은 S 또는 A이고, X₁₄는 V 또는 I이고, X₁₅는 K 또는 T이고, X₁₆은 V 또는 L이고, X₁₇은 A 또는 P이고, X₁₈은 L 또는 F이고, X₁₉는 G 또는 A이다) (바람직하게는 서열번호: 11-13 중의 하나)을 포함한다.
- [0281] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 scFv는, N-말단에서 C-말단으로: 서열번호: 10 (여기서, X₁은 V 또는 I이고, X₂는 T 또는 S이고, X₃은 L 또는 S 또는 A이고, X₄는 S 또는 T이고, X₅는 P 또는 S이고, X₆은 T 또는 S이고, X₇은 L 또는 P이고, X₈은 E 또는 D이고, X₉는 P 또는 R이고, X₁₀은 A 또는 V이고, X₁₁은 S 또는 T이고, X₁₂는 L 또는 Q이고, X₁₃은 S 또는 A이고, X₁₄는 V 또는 I이고, X₁₅는 K 또는 T이고, X₁₆은 V 또는 L이고, X₁₇은 A 또는 P이고, X₁₈은 L 또는 F이고, X₁₉는 G 또는 A이다) (바람직하게는 서열번호: 11-13 중의 하나), 임의의 링커, 서열번호: 9를 포함한다.
- [0282] 하나의 실시양태에서, scFv는 링커를 포함한다. 링커의 예는 본원에 기술된 바와 같은 GS 링커를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 하나의 실시양태에서, 링커는 서열 GGGGSGGGGSGGGGS (서열번호: 18)을 포함하거나 이들로 구성된다.
- [0283] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 scFv는 서열번호: 69, 또는 서열번호: 69와 적어도 약 95-99% 동일성을 갖는 임의의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 구성된다.

(서열 분석 69)

QVQLVQSGPEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYHIQWVRQAPGQGLEWIGWYIP
 GDGSTQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLTSEDTAVYYCAREGTYAMD
 YWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGGSDX₁VMTQX₂PX₃X₄LX₅VX₆X₇GX₈X₉X₁₀
 X₁₁ISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYX₁₂QKPGQX₁₃PRLLIYKVSNRFSGX₁₄PDRFSG
 SGGTDFTLX₁₅ISRX₁₆EX₁₇EDX₁₈X₁₉VYYCFQGSHPVPRTFGGGTKLEIKR

- [0284]
- [0285] 여기서, X₁은 V 또는 I이고, X₂는 T 또는 S이고, X₃은 L 또는 S 또는 A이고, X₄는 S 또는 T이고, X₅는 P 또는 S이고, X₆은 T 또는 S이고, X₇은 L 또는 P이고, X₈은 E 또는 D이고, X₉는 P 또는 R이고, X₁₀은 A 또는 V이고, X₁₁은 S 또는 T이고, X₁₂는 L 또는 Q이고, X₁₃은 S 또는 A이고, X₁₄는 V 또는 I이고, X₁₅는 K 또는 T이고, X₁₆은 V 또는 L이고, X₁₇은 A 또는 P이고, X₁₈은 L 또는 F이고, X₁₉는 G 또는 A이다. 서열번호: 69는, N-말단에서 C-말단으로, 서열번호: 9, 서열번호: 18 및 서열번호: 10으로 구성된다.
- [0286] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 scFv는 서열번호: 70, 71 또는 72, 또는 서열번호: 70, 71 또는 72와 적어도 약 95-99% 동일성을 갖는 임의의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 구성된다. 서열번호: 70-72는 각각, N-말단에서 C-말단으로, 서열번호: 9, 서열번호: 18 및 서열번호: 11-13으로 구성된다.

(서열 분석 70)

QVQLVQSGPEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYHIQWVRQAPGQGLEWIGWIYP
 GDGSTQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLTSEDTAVYYCAREGTYAMD
 YWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMQTPLSLPVTLGEPASISCRSS
 QSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPRLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS
 RVEAEDLGVYYCFQGSHPRTFGGGTKLEIKR

[0287]

(서열 분석 71)

QVQLVQSGPEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYHIQWVRQAPGQGLEWIGWIYP
 GDGSTQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLTSEDTAVYYCAREGTYAMD
 YWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPSSLVTLGDRVSISCRSS
 QSIVHSNGNTYLEWYQKPGQSPRLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS
 RVEPEDLGVYYCFQGSHPRTFGGGTKLEIKR

[0288]

(서열 분석 72)

QVQLVQSGPEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYHIQWVRQAPGQGLEWIGWIYP
 GDGSTQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLTSEDTAVYYCAREGTYAMD
 YWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPATLSVSPGERATISCRSSQ
 SIVHSNGNTYLEWYQKPGQAPRLLIYKVSNRFSGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR
 LEPEDFAVYYCFQGSHPRTFGGGTKLEIKR

[0289]

[0290] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 scFv는 임의의 리더 서열의 절단을 촉진하기 위해 N-말단에 S 잔기를 추가로 포함한다.

[0291] 따라서, 하나의 실시양태에서, 본 발명의 scFv는 서열번호: 73을 가지며, 여기서 X₁은 V 또는 I이고, X₂는 T 또는 S이고, X₃은 L 또는 S 또는 A이고, X₄는 S 또는 T이고, X₅는 P 또는 S이고, X₆은 T 또는 S이고, X₇은 L 또는 P이고, X₈은 E 또는 D이고, X₉는 P 또는 R이고, X₁₀은 A 또는 V이고, X₁₁은 S 또는 T이고, X₁₂는 L 또는 Q이고, X₁₃은 S 또는 A이고, X₁₄는 V 또는 I이고, X₁₅는 K 또는 T이고, X₁₆은 V 또는 L이고, X₁₇은 A 또는 P이고, X₁₈은 L 또는 F이고, X₁₉는 G 또는 A이다.

[0292] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 scFv는 서열번호: 74, 75 또는 76을 포함하거나 이들로 구성된다.

(서열 분석 74)

SQVQLVQSGPEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYHIQWVRQAPGQGLEWIGWIY
 PGDGSTQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLTSEDTAVYYCAREGTYAM
 DYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPSSLVTLGDRVSISCRS
 QSIVHSNGNTYLEWYQKPGQSPRLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTI
 SRVEPEDLGVYYCFQGSHPRTFGGGTKLEIKR

[0293]

(서열 분석 75)

SQVQLVQSGPEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYHIQWVRQAPGQGLEWIGWIY
 PGDGSTQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLTSEDTAVYYCAREGTYIAM
 DYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMVMTQSPSSSVTLGDRVSI
 SCRS
 SQSIVHSNGNTYLEWYQQKPGQSPRLLIYK VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFLTI
 SRVEPEDLGVYYCFQGSHVPRTFGGGKLEIKR

(서열 분석 76)

SQVQLVQSGPEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYHIQWVRQAPGQGLEWIGWIY
 PGDGSTQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLTSEDTAVYYCAREGTYIAM
 DYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPATLSVSPGERATISCRSS
 QSIVHSNGNTYLEWYQQKPGQAPRLLIYK VSNRFSGIPDRFSGSGSGTDFLTIS
 RLEPEDFAVYYCFQGSHVPRTFGGGKLEIKR

[0294]

[0295]

[0296]

[0297]

[0298]

[0299]

[0300]

[0301]

[0302]

[0303]

[0304]

[0305]

[0306]

본 발명의 또 다른 목적은 적어도 하나의 본 발명의 항-HLA-A2 항체를 포함하거나 이들로 본질적으로 구성되거나 이들로 구성된 조성물이다.

본원에서 사용되는 바와 같이, 조성물과 관련하여 "본질적으로 구성되는"은 상기한 바와 같은 적어도 하나의 본 발명의 항-HLA-A2 항체가 상기 조성물 내에서 유일한 하나의 치료제 또는 생물학적 활성을 갖는 제제임을 의미한다.

본 발명의 또 다른 목적은 적어도 하나의 본 발명의 항-HLA-A2 항체, 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물이다.

약제학적으로 허용되는 담체의 예는 매질, 용매, 코팅, 등장성 및 흡수 지연 제제, 첨가제, 안정화제, 보존제, 계면활성제, 효소 분해를 억제하는 물질, 알코올, pH 조절제, 산화방지제; EDTA 또는 글루타티온과 같은 킬레이트제; 보조제 (예를 들어, 수산화알루미늄); 방부제 및 추진제를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

약제학적으로 허용되는 매질의 예는 물, 중성 완충 염수, 인산염 완충 염수, 생리 식염수 또는 다른 생리학적으로 완충 염수, 또는 다른 용매, 예를 들어 글리콜, 글리세롤, 및 올리브 오일과 같은 오일 또는 주사 가능한 유기 에스테르를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 약제학적으로 허용되는 매질은 또한 리포솜 또는 미셀을 함유할 수 있다.

코팅 물질의 예는 레시틴을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

등장성 제제의 예는 당, 염화나트륨 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

흡수를 지연시키는 제제의 예는 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

첨가제의 예는 만니톨, 텍스트란, 탄수화물 (예를 들면, 글루코스, 만노스, 수크로스 또는 텍스트란); 글리신, 락토스 또는 폴리비닐피롤리돈 또는 생체내 투여에 적합한 산화방지제 또는 불활성 기체, 안정제 또는 제조할 단백질 (예를 들어, 인간 혈청 알부민)과 같은 기타 첨가제를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

적합한 안정화제의 예는 수크로스, 젤라틴, 펩톤, 소화된 단백질 추출물, 예를 들어 NZ-아민 또는 NZ-아민 AS를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

이들 조성물에 사용될 수 있는 약제학적으로 허용되는 담체는 이온 교환제, 알루미늄, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질, 예를 들어 인간 혈청 알부민, 완충 물질, 예를 들어 포스페이트, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분 글리세리드 혼합물, 물, 염 또는 전해질, 예를 들어 프로타민 설페이트, 인산수소이나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨, 아연 염, 콜로이드성 실리카, 마그네슘 트리실리케이

트, 폴리비닐 피롤리돈, 셀룰로스 기반 물질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카복시메틸셀룰로스, 폴리아크릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌폴리옥시프로필렌 블록 중합체, 폴리에틸렌 글리콜 및 양모지를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

- [0307] 본 발명의 또 다른 목적은 상기한 바와 같은 적어도 하나의 본 발명의 항-HLA-A2 항체를 포함하거나 이들로 구성되어거나 이들로 본질적으로 구성된 약제이다.
- [0308] 본 발명의 또 다른 목적은 *시험관내* 또는 *생체내에서* 샘플에서, 바람직하게는 생물학적 샘플에서 HLA-A2를 검출하기 위한 적어도 하나의 본 발명의 항-HLA-A2 항체의 용도이다.
- [0309] 본 발명의 항-HLA-A2 항체가 사용될 수 있는 분석의 예는 ELISA, 샌드위치 ELISA, RIA, FACS, 조직 면역조직화학, 웨스턴 블롯 및 면역침전을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0310] 본 발명의 또 다른 목적은 샘플을 본 발명의 항-HLA-A2 항체와 접촉시키는 단계 및 HLA-A2에 결합된 항-HLA-A2 항체를 검출하여 샘플 중의 HLA-A2의 존재를 나타내는 단계를 포함하여, 샘플에서 HLA-A2를 검출하는 방법이다.
- [0311] 본 발명의 하나의 실시양태에서, 샘플은 생물학적 샘플이다. 생물학적 샘플의 예는 체액, 바람직하게는 혈액, 보다 바람직하게는 혈청, 혈장, 활액, 기관지 폐포 세척액, 가래, 림프, 복수, 뇨, 양수, 복막액, 뇌척수액, 흉막액, 심장막액 및 폐포 대식세포, 조직 용해물 및 병에 걸린 조직으로부터 또는 이식물로부터 제조된 추출물을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0312] 본 발명의 하나의 실시양태에서, 용어 "샘플"은 임의의 분석 전에 개체로부터 채취한 샘플을 의미하는 것으로 의도된다.
- [0313] 본 발명의 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 검출 가능한 표지로 직접 표지화되어 직접 검출될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 단백질은 비표지되고 (제1/일차 항체라고 함) 항-HLA-A2 항체에 결합할 수 있는 이차 항체 또는 다른 분자는 표지된다. 당업계에 잘 알려진 바와 같이, 이차 항체는 일차 항체의 특정 중 및 부류에 특이적으로 결합할 수 있도록 선택된다.
- [0314] 샘플 중의 항-HLA-A2 항체/HLA-A2 복합체의 존재는 표지된 이차 항체의 존재를 검출함으로써 검출 및 측정될 수 있다. 예를 들면, 일차 항체/항원 복합체를 포함하는 웰로부터 또는 복합체를 포함하는 막 (예를 들어 니트로셀룰로스 또는 나일론 막)으로부터 비결합된 이차 항체를 세척한 후, 결합된 이차 항체는 예를 들면 표지의 화학발광에 기초하여 개발되고 검출될 수 있다.
- [0315] 항-HLA-A2 항체 또는 이차 항체를 위한 표지는 다양한 효소, 보결 원자단, 형광 물질, 발광 물질, 자성 물질 및 방사성 물질을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 이러한 효소의 예는 호스래디쉬 퍼옥시다제, 알칼리 포스파타제, 베타-갈락토시다제 또는 아세틸콜린에스테라제를 포함하지만 이에 제한되지 않고; 보결 원자단 복합체의 예는 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴을 포함하지만 이에 제한되지 않고; 형광 물질의 예는 엄벨리페론 (umbelliferone), 플루오레세인 (fluorescein), 플루오레세인 이소티오시아네이트 (fluorescein isothiocyanate), 로다민 (rhodamine), 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인 (dichlorotriazinylamine fluorescein), 단신 클로라이드 (dansyne chloride) 또는 피코에리트린 (phycoerythrin)을 포함하지만 이에 제한되지 않고; 발광 물질의 예는 루미날 (luminol)을 포함하지만 이에 제한되지 않고; 자성 제제의 예는 가돌리늄 (gadolinium)을 포함하지만 이에 제한되지 않고; 적합한 방사성 물질의 예는 ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S 또는 ³H를 포함한다.
- [0316] 본 발명의 또 다른 목적은 적어도 하나의 본 발명의 항-HLA-A2 항체, 바람직하게는 단클론성 항-HLA-A2 항체를 포함하는 키트이다.
- [0317] "키트"란 HLA-A2의 발현을 특이적으로 검출하기 위한 적어도 하나의 시약, 바람직하게는 항체를 포함하는 임의의 제품 (예를 들어, 패키지 또는 용기)를 의도한다.
- [0318] 키트는 본 발명의 방법을 수행하기 위한 유닛으로서 홍보, 배포 또는 판매될 수 있다. 또한, 임의의 또는 모든 키트 시약은 밀봉된 용기에서와 같이 외부 환경으로부터 이들을 보호하는 용기 내에 제공될 수 있다.
- [0319] 키트는 또한 키트 및 이의 사용 방법을 설명하는 패키지 삽입물을 포함할 수 있다.
- [0320] 샌드위치 ELISA를 수행하기 위한 키트는 일반적으로 고체 지지체 (예를 들어, 미세역가 플레이트) 상에 임의로 고정된 포획 항체, 및 검출 가능한 물질, 예를 들어 HRP, 형광 표지, 방사성 동위원소, 베타-갈락토시다제, 및

알칼리 포스파타제와 커플링된 계시 항체 (revelation antibody)를 포함한다.

- [0321] 또 다른 실시양태에서, 검출 가능한 물질은 고체 지지체 (예를 들어, 미세역가 플레이트) 상에 고정된다.
- [0322] 본 발명은 추가로 HLA-A2에 특이적인 키메라 항원 수용체 (CAR)에 관한 것이다. CAR은 표적 항원에 대한 항체-기반 특이성과 면역 세포 수용체-활성화 세포내 도메인을 구비한 키메라 단백질 분자이다.
- [0323] 본 발명에 따르면, CAR은, 하나 이상의 폴리펩티드에, (i) 세포의 HLA-A2 결합 도메인 (여기서, 상기 세포의 도메인은 본 발명의 항-HLA-A2 항체 (바람직하게는 항-HLA-A2 scFv)를 포함하거나 이들로 구성된다), (ii) 임의로 세포의 힌지 도메인, (iii) 임의로 막횡단 도메인, 및 (iv) 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 키메라 수용체는 추가로 Tag 및/또는 리더 서열을 포함한다.
- [0324] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR은 HLA-A2에 결합하기 위해 서열번호: 62의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HCDR1); 서열번호: 63의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HCDR2); 서열번호: 64의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HCDR3); 서열번호: 65의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LCDR1); 서열번호: 66의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LCDR2); 및 서열번호: 67의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LCDR3)을 포함하는 항체와 경쟁한다.
- [0325] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR은 서열번호: 62의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HCDR1); 서열번호: 63의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HCDR2); 서열번호: 64의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HCDR3); 서열번호: 65의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LCDR1); 서열번호: 66의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LCDR2); 및 서열번호: 67의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LCDR3)을 포함하는 항체와 동일한 HLA-A2 에피토프에 결합한다.
- [0326] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR은 HLA-A2에 결합하기 위해 BB7.2 항체와 경쟁하고/하거나 BB7.2 항체와 동일한 HLA-A2 에피토프에 결합한다.
- [0327] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR은 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 A03, A11, A23, A25, A26, A29, A30, A31, A33, A34 및 이들의 임의의 조합을 포함하는 그룹으로부터 선택된 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR은 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 A03:01, A11:01, A23:01, A25:01, A26:01, A29:02, A30:01, A31:01, A33:01, A34:01 및 이들의 임의의 조합을 포함하는 그룹으로부터 선택된 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다.
- [0328] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 A03, A11, A23, A25, A26, A29, A30, A31, A33 및 A34 중의 하나 이상으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 A03:01, A11:01, A23:01, A25:01, A26:01, A29:02, A30:01, A31:01, A33:01 및 A34:01 중의 하나 이상으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다.
- [0329] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 A03, A11, A23, A25, A26, A29, A30, A31, A33 및 A34 중의 2개 이상으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 A03:01, A11:01, A23:01, A25:01, A26:01, A29:02, A30:01, A31:01, A33:01 및 A34:01 중의 2개 이상으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다.
- [0330] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 A03, A11, A23, A25, A26, A29, A30, A31, A33 및 A34 중의 3개 이상으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 A03:01, A11:01, A23:01, A25:01, A26:01, A29:02, A30:01, A31:01, A33:01 및 A34:01 중의 3개 이상으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다.
- [0331] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 A03, A11, A23, A25, A26, A29, A30, A31, A33 및 A34 중의 4개 이상으로부터 선택된 적어도

도 하나의 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 A03:01, A11:01, A23:01, A25:01, A26:01, A29:02, A30:01, A31:01, A33:01 및 A34:01 중의 4개 이상으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다.

[0332] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 A03, A11, A23, A25, A26, A29, A30, A31, A33 및 A34 중의 5개 이상으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 A03:01, A11:01, A23:01, A25:01, A26:01, A29:02, A30:01, A31:01, A33:01 및 A34:01 중의 5개 이상으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다.

[0333] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 A03, A11, A23, A25, A26, A29, A30, A31, A33 및 A34 중의 6개 이상으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 A03:01, A11:01, A23:01, A25:01, A26:01, A29:02, A30:01, A31:01, A33:01 및 A34:01 중의 6개 이상으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다.

[0334] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 A03, A11, A23, A25, A26, A29, A30, A31, A33 및 A34 중의 7개 이상으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 A03:01, A11:01, A23:01, A25:01, A26:01, A29:02, A30:01, A31:01, A33:01 및 A34:01 중의 7개 이상으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다.

[0335] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 A03, A11, A23, A25, A26, A29, A30, A31, A33 및 A34 중의 8개 이상으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 A03:01, A11:01, A23:01, A25:01, A26:01, A29:02, A30:01, A31:01, A33:01 및 A34:01 중의 8개 이상으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다.

[0336] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 A03, A11, A23, A25, A26, A29, A30, A31, A33 및 A34 중의 9개 이상으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 A03:01, A11:01, A23:01, A25:01, A26:01, A29:02, A30:01, A31:01, A33:01 및 A34:01 중의 9개 이상으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다.

[0337] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 A03, A11, A23, A25, A26, A29, A30, A31, A33 및 A34를 포함하는 그룹으로부터 선택된 각각의 HLA-A 아형으로부터 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 A03:01, A11:01, A23:01, A25:01, A26:01, A29:02, A30:01, A31:01, A33:01 및 A34:01을 포함하는 그룹으로부터 선택된 각각의 HLA-A 아형으로부터 더 적은 반응성을 갖는다.

[0338] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR은 항체 BB7.2와 비교하여, 바람직하게는 BB7.2 scFv와 비교하여 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 항체와 비교하여 A25, A29, A30 및 이들의 임의의 조합을 포함하는 그룹으로부터 선택된 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR은 항체 BB7.2와 비교하여, 바람직하게는 BB7.2 scFv와 비교하여 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 항체와 비교하여 A25:01, A29:02, A30:01 및 이들의 임의의 조합을 포함하는 그룹으로부터 선택된 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다.

[0339] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하

는 CAR과 비교하여 A25, A29 및 A30 중의 하나 이상으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 A25:01, A29:02 및 A30:01 중의 하나 이상으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다.

[0340] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 A25, A29 및 A30 중의 2개 이상으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 A25:01, A29:02 및 A30:01 중의 2개 이상으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다.

[0341] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 A25, A29 및 A30을 포함하는 그룹으로부터 선택된 각각의 HLA-A 아형으로부터 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 A25:01, A29:02 및 A30:01을 포함하는 그룹으로부터 선택된 각각의 HLA-A 아형으로부터 더 적은 반응성을 갖는다.

[0342] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 HLA-A25에 대한 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 HLA-A29에 대한 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 HLA-A30에 대한 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 HLA-A31에 대한 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 HLA-A32에 대한 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 HLA-A33에 대한 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 HLA-A34에 대한 더 적은 반응성을 갖는다.

[0343] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 HLA-A25:01에 대한 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 HLA-A29:02에 대한 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 HLA-A30:01에 대한 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 HLA-A11:01에 대한 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 HLA-A26:01에 대한 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 HLA-A31:01에 대한 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 HLA-A33:01에 대한 더 적은 반응성을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-HLA-A2 항체는 BB7.2를 포함하는 CAR 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 HLA-A34:01에 대한 더 적은 반응성을 갖는다.

[0344] HLA-A 아형에 대한 CAR의 반응성을 측정하기 위한 방법은 숙련가에게 잘 알려져 있으며, 제한함이 없이, 예를 들면, ONE LAMBDA에 의해 제공되는 FlowPRA 단일 항원 항체와 같은 단일 항원 분석을 포함한다.

[0345] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR은, 시험 A의 조건에서 측정할 경우, 항체 BB7.2를 포함하는 CAR과 비교하

여 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 A03, A11, A23, A25, A26, A29, A30, A31, A33, A34 및 이들의 임의의 조합을 포함하는 그룹으로부터 선택된 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다.

[0346] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR은, 시험 A의 조건에서 측정할 경우, 항체 BB7.2와 비교하여 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 항체와 비교하여 A25, A29, A30 및 이들의 임의의 조합을 포함하는 그룹으로부터 선택된 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다.

[0347] 시험 A:

[0348] 항-HLA-A2 항체 또는 BB7.2 항체, 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL (mA2 CAR))을 포함하는 CAR을 발현하는 $0.25 \cdot 10^6$ 개 T 세포를 실온에서 30분 동안 FlowPRA 단일 항원 항체 비드 패널 (FL1HD01, FL1HD02, FL1HD03, FL1HD04, FL1HD06 및 FL1HD08, One Lambda) 및 고정 가능한 생존력 염료 (fixable viability dye; FVD, ThermoFisher, 65-0865-14, eBioscience)와 함께 배양한다. 샘플을 세척하고, 0.5% 포르말데히드로 고정하고, 유세포 분석을 통해 분석한다. 샘플 당 200개의 음성 대조군 비드가 획득된다. 비드 단독을 음성 대조군으로서 사용하였다. 분석을 위해, 고정 가능한 생존력 염료를 사용하여 죽은 세포를 먼저 제거한다. 그 후 죽은 세포 및 이중선의 배제 후 단일 항원 비드를 게이팅한다. 그 후, HLA 당 비드의 수를 이들 각각의 PE 강도 피크에 의해 결정한다. 각 HLA-피크에서 관심 있는 비드 수에 200을 곱한 다음 샘플의 음성 비드 수로 나누어 데이터를 정규화한다. 각각의 HLA-피크에 대해 대조군 (비-CAR-발현 세포)과 비교한 CAR Treg의 상대적 결합 퍼센트는 대조군 샘플의 비드 수로부터 CAR-Treg의 비드 수를 뺀 다음 비-CAR-발현 대조군에서의 비드의 평균 수로 나눈 것의 100배에 의해 결정된다.

[0349] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR은, 시험 B의 조건에서 측정할 경우, 항체 BB7.2를 포함하는 CAR과 비교하여 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR과 비교하여 A03, A11, A23, A25, A26, A29, A30, A31, A33, A34 및 이들의 임의의 조합을 포함하는 그룹으로부터 선택된 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다.

[0350] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR은, 시험 B의 조건에서 측정할 경우, 항체 BB7.2와 비교하여 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 항체와 비교하여 A25, A29, A30 및 이들의 임의의 조합을 포함하는 그룹으로부터 선택된 HLA-A 아형에 대한 더 적은 반응성을 갖는다.

[0351] 시험 B:

[0352] 세포 표면 상에 (예를 들면, 본원에 기술된 바와 같은 키메라 항원 수용체의 일부로서) 항-HLA-A2 항체 또는 BB7.2 항체 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL 또는 절단된 NGFR 형질도입 마커 (NGFR)를 발현하는 $0.25 \cdot 10^6$ 개 T 세포를 FlowPRA 단일 항원 항체 비드 패널 (FL1HD, One Lambda) 및 고정 가능한 생존력 염료 (FVD, 65-0865-14, eBioscience)와 함께 배양한 다음 0.5% 포르말데히드로 고정하고, 유세포 분석을 통해 분석한다. 분석을 위해, 고정 가능한 생존력 염료를 사용하여 죽은 세포를 먼저 제거한다. 그 후 죽은 세포 및 이중선의 배제 후 단일 비드를 게이팅한다. 그 후, HLA 당 비드의 수를 이들 각각의 PE 강도에 의해 결정한다. 샘플의 음성 비드 수를 Treg-NGFR 샘플의 음성 비드 수로 나누고 Treg-NGFR 표본의 음성 비드 수를 곱하여 데이터를 정규화한다. 상대적 결합 퍼센트는 하나의 특정 HLA에 대한 NGFR 표본의 비드 수에서 그 HLA에 대한 표본의 정규화된 비드 수를 빼고 NGFR 표본의 비드 수로 나눈 값의 100배이다.

[0353] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR은, 바람직하게는 시험 A 또는 시험 B의 조건에서 측정할 경우, 항체 BB7.2를 포함하는 CAR 중의 하나 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR 중의 하나보다 통계적으로 열등한 A03, A11, A23, A25, A26, A29, A30, A31, A33, A34를 포함하는 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 반응성을 갖는다.

[0354] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR은, 바람직하게는 시험 A 또는 시험 B의 조건에서 측정할 경우, 항체 BB7.2 중의 하나 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 항체 중의 하나보다 통계적으로 열등한 A25, A29, A30을 포함하는 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 반응성을 갖는다.

[0355] 하나의 실시양태에서, 용어 "통계적으로 열등한"은 본 발명의 CAR에 대해 측정된 반응성 (즉, 예를 들면, 시험 A 또는 시험 B의 조건에서의 상대 결합)이, 특히 2원 ANOVA, Dunnett 사후 검정에 의해 분석될 때, 최대 약 0.05, 바람직하게는 최대 약 0.01, 보다 바람직하게는 최대 약 0.005, 및 보다 바람직하게는 최대 약 0.001의 p 값으로 BB7.2 항체에 대해 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 항체에 대해 측정된 반응성보다 열등하다는 것을 의미한다.

- [0356] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR은 BB7.2 항체를 포함하는 CAR 중의 하나 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR 중의 하나보다 열등한 A03, A11, A23, A25, A26, A29, A30, A31, A33, A34를 포함하는 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 반응성을 가지며, 바람직하게는 본 발명의 CAR은, 시험 A 또는 시험 B의 조건에서 측정될 때, BB7.2 항체를 포함하는 CAR 중의 하나 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR 중의 하나보다 열등한 A03, A11, A23, A25, A26, A29, A30, A31, A33, A34를 포함하는 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 상대 결합을 가지며, 보다 바람직하게는 본 발명의 항-HLA-A2 항체에 대해 측정된 상대 결합은 BB7.2 항체에 대해 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 항체에 대해 측정된 상대 결합의 최대 약 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% 또는 그 미만이다.
- [0357] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR은 BB7.2 항체를 포함하는 CAR 중의 하나 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR 중의 하나보다 열등한 A25, A29, A30을 포함하는 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 반응성을 가지며, 바람직하게는 본 발명의 CAR은, 시험 A 또는 시험 B의 조건에서 측정될 때, BB7.2 항체를 포함하는 CAR 중의 하나 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR 중의 하나보다 열등한 A25, A29, A30을 포함하는 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 HLA-A 아형에 대한 상대 결합을 가지며, 보다 바람직하게는 본 발명의 항-HLA-A2 항체에 대해 측정된 상대 결합은 BB7.2 항체에 대해 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 항체에 대해 측정된 상대 결합의 최대 약 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% 또는 그 미만이다.
- [0358] 본 발명은 추가로 상기한 바와 같은 CAR을 암호화하는 핵산 서열에 관한 것이며, 여기서 상기 핵산 서열은 (i) HLA-A2 결합 도메인의 핵산 서열 (바람직하게는 여기서 상기 HLA-A2 결합 도메인은 항-HLA-A2 항체, 바람직하게는 상기한 바와 같은 항-HLA-A2 scFv이다), (ii) 임의로 세포외 힌지 도메인의 핵산 서열, (iii) 임의로 막횡단 도메인의 핵산 서열, (iv) 세포내 신호전달 도메인의 하나 이상의 핵산 서열(들)을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 핵산 서열은 Tag를 암호화하는 서열 및/또는 리더 서열을 추가로 포함한다.
- [0359] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR에 포함된 HLA-A2 결합 도메인은 scFv의 N-말단 및 C-말단에 대한 어느 하나의 순서로 서열번호: 9 및 서열번호: 10 (여기서, X₁은 V 또는 I이고, X₂는 T 또는 S이고, X₃은 L 또는 S 또는 A이고, X₄는 S 또는 T이고, X₅는 P 또는 S이고, X₆은 T 또는 S이고, X₇은 L 또는 P이고, X₈은 E 또는 D이고, X₉는 P 또는 R이고, X₁₀은 A 또는 V이고, X₁₁은 S 또는 T이고, X₁₂는 L 또는 Q이고, X₁₃은 S 또는 A이고, X₁₄는 V 또는 I이고, X₁₅는 K 또는 T이고, X₁₆은 V 또는 L이고, X₁₇은 A 또는 P이고, X₁₈은 L 또는 F이고, X₁₉는 G 또는 A이다)을 포함하는 scFv이다. 바람직하게는, 본 발명의 CAR에 포함된 HLA-A2 결합 도메인은 scFv의 N-말단 및 C-말단에 대한 어느 하나의 순서로 서열번호: 9 및 서열번호: 11, 12 또는 13을 포함하는 scFv이다.
- [0360] 하나의 실시양태에서, 서열번호: 9는 N-말단이고, 서열번호: 10, 11, 12 또는 13은 C-말단이다.
- [0361] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR에 포함된 HLA-A2 결합 도메인은, N-말단에서 C-말단으로: 서열번호: 9, 임의의 링커, 서열번호: 10 (여기서, X₁은 V 또는 I이고, X₂는 T 또는 S이고, X₃은 L 또는 S 또는 A이고, X₄는 S 또는 T이고, X₅는 P 또는 S이고, X₆은 T 또는 S이고, X₇은 L 또는 P이고, X₈은 E 또는 D이고, X₉는 P 또는 R이고, X₁₀은 A 또는 V이고, X₁₁은 S 또는 T이고, X₁₂는 L 또는 Q이고, X₁₃은 S 또는 A이고, X₁₄는 V 또는 I이고, X₁₅는 K 또는 T이고, X₁₆은 V 또는 L이고, X₁₇은 A 또는 P이고, X₁₈은 L 또는 F이고, X₁₉는 G 또는 A이다) (바람직하게는 서열번호: 11-13 중의 하나)을 포함한다.
- [0362] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR에 포함된 HLA-A2 결합 도메인은, N-말단에서 C-말단으로: 서열번호: 10 (여기서, X₁은 V 또는 I이고, X₂는 T 또는 S이고, X₃은 L 또는 S 또는 A이고, X₄는 S 또는 T이고, X₅는 P 또는 S이고, X₆은 T 또는 S이고, X₇은 L 또는 P이고, X₈은 E 또는 D이고, X₉는 P 또는 R이고, X₁₀은 A 또는 V이고, X₁₁은 S 또는 T이고, X₁₂는 L 또는 Q이고, X₁₃은 S 또는 A이고, X₁₄는 V 또는 I이고, X₁₅는 K 또는 T이고, X₁₆은 V 또는 L이고, X₁₇은 A 또는 P이고, X₁₈은 L 또는 F이고, X₁₉는 G 또는 A이다) (바람직하게는 서열번호: 11-13 중의 하나), 임의의 링커, 서열번호: 9를 포함한다.
- [0363] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR에 포함된 HLA-A2 결합 도메인은 링커를 포함한다. 링커의 예는 본원에 기술된 바와 같은 GS 링커를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 하나의 실시양태에서, 링커는 서열 GGGGSGGGSGGGGS (서열번호: 18)을 포함하거나 이들로 구성된다.
- [0364] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR에 포함된 HLA-A2 결합 도메인은 서열번호: 69를 포함하거나 이들로 구성되

고, 여기서, X_1 은 V 또는 I이고, X_2 는 T 또는 S이고, X_3 은 L 또는 S 또는 A이고, X_4 는 S 또는 T이고, X_5 는 P 또는 S이고, X_6 은 T 또는 S이고, X_7 은 L 또는 P이고, X_8 은 E 또는 D이고, X_9 는 P 또는 R이고, X_{10} 은 A 또는 V이고, X_{11} 은 S 또는 T이고, X_{12} 는 L 또는 Q이고, X_{13} 은 S 또는 A이고, X_{14} 는 V 또는 I이고, X_{15} 는 K 또는 T이고, X_{16} 은 V 또는 L이고, X_{17} 은 A 또는 P이고, X_{18} 은 L 또는 F이고, X_{19} 는 G 또는 A이다. 서열번호: 69는, N-말단에서 C-말단으로, 서열번호: 9, 서열번호: 18 및 서열번호: 10으로 구성된다.

[0365] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR에 포함된 HLA-A2 결합 도메인은 서열번호: 70, 71 또는 72를 포함하거나 이들로 구성된다. 서열번호: 70-72는 각각, N-말단에서 C-말단으로, 서열번호: 9, 서열번호: 18 및 서열번호: 11-13으로 구성된다.

[0366] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR에 포함된 HLA-A2 결합 도메인은 임의의 리더 서열의 절단을 촉진하기 위해 N-말단에 S 잔기를 추가로 포함한다.

[0367] 따라서, 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR에 포함된 HLA-A2 결합 도메인은 서열번호: 73을 가지며, 여기서 X_1 은 V 또는 I이고, X_2 는 T 또는 S이고, X_3 은 L 또는 S 또는 A이고, X_4 는 S 또는 T이고, X_5 는 P 또는 S이고, X_6 은 T 또는 S이고, X_7 은 L 또는 P이고, X_8 은 E 또는 D이고, X_9 는 P 또는 R이고, X_{10} 은 A 또는 V이고, X_{11} 은 S 또는 T이고, X_{12} 는 L 또는 Q이고, X_{13} 은 S 또는 A이고, X_{14} 는 V 또는 I이고, X_{15} 는 K 또는 T이고, X_{16} 은 V 또는 L이고, X_{17} 은 A 또는 P이고, X_{18} 은 L 또는 F이고, X_{19} 는 G 또는 A이다.

[0368] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR에 포함된 HLA-A2 결합 도메인은 서열번호: 74, 75 또는 76을 포함하거나 이들로 구성된다.

[0369] 하나의 실시양태에서, HLA-A2 결합 도메인은 힌지 도메인에 의해 막횡단 도메인에 연결될 수 있다.

[0370] 하나의 실시양태에서, 바람직하게는 2 내지 10개 아미노산 범위의 길이를 갖는 짧은 올리고- 또는 폴리펩티드 링커가 힌지 도메인을 형성할 수 있다. 하나의 실시양태에서, 용어 "링커"는 가요성 폴리펩티드 링커를 지칭한다.

[0371] 예를 들면, 글리신-세린 이중선은 특히 적합한 힌지 도메인 (GS 링커)을 제공한다. 하나의 실시양태에서, 힌지 도메인은 Gly/Ser 링커이다. Gly/Ser 링커의 예는 GS 링커, G_2S 링커, G_3S 링커, G_4S 링커를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0372] G_2S 링커의 예는 GGS를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0373] G_3S 링커는 $(GGGS)_n$ 또는 (서열번호: 14)_n이라고도 하는 아미노산 서열 $(Gly-Gly-Gly-Ser)_n$ 을 포함하며, 여기서 n은 1 이상의 양의 정수 (예를 들면, n=1, n=2, n=3, n=4, n=5, n=6, n=7, n=8, n=9 or n=10)이다. G_3S 링커의 예는 GGGSGGGSGGGSGGGGS (서열번호: 15)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0374] G_4S 링커의 예는 GGGGS (서열번호: 16)에 상응하는 $(Gly_4 Ser)_1$; GGGSGGGGS (서열번호: 17)에 상응하는 $(Gly_4 Ser)_2$; GGGSGGGSGGGGS (서열번호: 18)에 상응하는 $(Gly_4 Ser)_3$; 및 GGGSGGGSGGGSGGGGS (서열번호: 19)에 상응하는 $(Gly_4 Ser)_4$ 를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0375] 본원에 참고로 포함된 제W02012/138475호에 기술된 힌지 도메인이 또한 본 발명의 범위내에 포함된다.

[0376] 하나의 실시양태에서, 힌지 도메인은 아미노산 서열 AGSSSSGGSTGGSTT (서열번호: 20), 아미노산 서열 GTTAASGSSGSSSSGA (서열번호: 21), 아미노산 서열 SSATATAGTGSSTGST (서열번호: 22), 및/또는 아미노산 서열 TSGSTGTAASSTSTST (서열번호: 23)을 포함한다.

[0377] 하나의 실시양태에서, 힌지 도메인은 GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTCC (서열번호: 24)의 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된다.

[0378] 또 다른 실시양태에서, 힌지 도메인은 KIRRDSS (서열번호: 25)에 상응하는 KIR_2DS_2 힌지이다.

[0379] 하나의 실시양태에서, 힌지 도메인은 CD8 힌지 (서열번호: 26)의 아미노산 서열 또는 서열번호: 26과 95-99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 구성된다. 하나의 실시양태에서, 힌지 도메인은 서열번호: 27

의 핵산 서열 또는 서열번호: 27과 95-99% 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 암호화되는 CD8 힌지이다.

(서열 분석 26)

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

(서열 분석 27)

ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCG
 CAGCCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGCGCA
 GTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT

[0380]

[0381]

또 다른 실시양태에서, 힌지 도메인은 IgG4 힌지 (서열번호: 28)의 아미노산 서열, 또는 서열번호: 28과 95-99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 구성된다. 하나의 실시양태에서, 힌지 도메인은 서열번호: 29의 핵산 서열 또는 서열번호: 29와 95-99% 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 암호화되는 IgG4 힌지이다.

(서열 분석 28)

ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV
 QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 NKGLEPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
 EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL
 HNHYTQKSLSLGKM

[0382]

(서열 분석 29)

GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCCGAGTTCCTGG
 GCGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGAT
 CAGCCGGACCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGA
 CCCCAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGC
 CAAGACCAAGCCCCGGGAGGAGCAGTTCAATAGCACCTACCGGGTGGTGTG
 CGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTG
 TAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAA
 GGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCCA
 AGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTT
 CTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGA
 ACAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTT
 GTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGGGCAACGTCTT
 TAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAG
 CCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG

[0383]

[0384]

또 다른 실시양태에서, 힌지 도메인은 IgD 힌지 (서열번호: 30)의 아미노산 서열 또는 서열번호: 30과 95-99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 구성된다. 하나의 실시양태에서, 힌지 도메인은 서열번호: 31의 핵산 서열 또는 서열번호: 31과 95-99% 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 암호화되는 IgD 힌지이다.

(서열 분석 30)

RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQ
 EERETKTPECPSTHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTW
 EVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPPLPP
 QRLMALREPAAQAPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQ
 REVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQATYTCVVSHEDSRTLL
 NASRSLEVSyvTDH

[0385]

(서열 분석 31)

AGGTGGCCCGAAAGTCCCAAGGCCAGGCATCTAGTGTTCTACTGCACAG
 CCCCAGGCAGAAAGCAGCCTAGCCAAAGCTACTACTGCACCTGCCACTACG
 CGCAATACTGGCCGTGGCGGGGAGGAGAAGAAAAAGGAGAAAGAGAAAG
 AAGAACAGGAAGAGAGGGAGACCAAGACCCCTGAATGTCCATCCCATAACC
 CAGCCGCTGGGCGTCTATCTCTTGACTCCCGCAGTACAGGACTTGTGGCTTA
 GAGATAAGGCCACCTTTACATGTTTCGTCGTGGGCTCTGACCTGAAGGATGC
 CCATTTGACTTGGGAGGTTGCCGAAAGGTACCCACAGGGGGGTTGAGGA
 AGGGTTGCTGGAGCGCCATTCCAATGGCTCTCAGAGCCAGCACTCAAGACT
 CACCCTCCGAGATCCCTGTGGAACGCCGGGACCTCTGTCACATGTACTCTA
 AATCATCCTAGCCTGCCCCACAGCGTCTGATGGCCCTTAGAGAGCCAGCC
 GCCCAGGCACCAGTTAAGCTTAGCCTGAATCTGCTCGCCAGTAGTGATCCCC
 CAGAGGCCCGCCAGCTGGCTCTTATGCGAAGTGTCCGGCTTTAGCCCCGCCA
 ACATCTTGCTCATGTGGCTGGAGGACCAGCGAGAAGTGAACACCAGCGGCT
 TCGCTCCAGCCCCGCCCCACCCCAGCCGGGTTCTACCACATTCTGGGCCTG
 GAGTGTCTTAAGGGTCCCAGCACCTAGCCCCAGCCAGCCACATACAC
 CTGTGTTGTGTCCCATGAAGATAGCAGGACCCTGCTAAATGCTTCTAGGAGT
 CTGGAGGTTTCTACGTGACTGACCATT

[0386]

[0387]

또 다른 실시양태에서, 힌지 영역은 CD28 힌지 (서열번호: 32)의 아미노산 서열 또는 서열번호: 32와 95-99% 동
 일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 구성된다. 하나의 실시양태에서, 힌지 도메인은 서열번호: 33
 의 핵산 서열 또는 서열번호: 33과 95-99% 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 암호화되는 CD28 힌지이다.

(서열 분석 32)

IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKP

(서열 분석 33)

ATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGA
 ACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCG
 GACCTTCTAAGCCC

[0388]

[0389]

본 발명의 키메라 수용체에서 사용될 수 있는 막횡단 도메인의 예는 T-세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 쇠
 의 막횡단 도메인, 또는 CD28, CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD3 제타, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16,
 CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD1 la,
 CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), CD160,

CD19, IL2R 베타, IL2R 감마, IL7Ra, ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, PD1, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D, 및/또는 NKG2C의 막횡단 도메인을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0390] 하나의 실시양태에서, 막횡단 도메인은 CD8 막횡단 도메인 (서열번호: 34)의 아미노산 서열, 또는 서열번호: 34와 95-99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 구성된다. 또 다른 실시양태에서, 막횡단 도메인은 서열번호: 34의 아미노산 서열 또는 서열번호: 34와 95-99% 동일성을 갖는 아미노산 서열의 적어도 1개, 2개 또는 3개이지만 20개, 10개 또는 5개 미만의 변형을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 구성된다.

(서열 분석 34)

IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC

[0391]

[0392] 또 다른 실시양태에서, 막횡단 도메인은 CD8 막횡단 도메인 (서열번호: 35)의 뉴클레오티드 서열 또는 서열번호: 35와 95-99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된다.

(서열 분석 35)

ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCAC
TGGTTATCACCCCTTACTGC

[0393]

[0394] 또 다른 실시양태에서, 막횡단 도메인은 CD28 막횡단 도메인 (서열번호: 36)의 아미노산 서열 또는 서열번호: 36과 95-99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 구성된다. 하나의 실시양태에서, 막횡단 도메인은 서열번호: 37의 핵산 서열 또는 서열번호: 37과 95-99% 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 암호화되는 CD28 막횡단 도메인이다.

(서열 분석 36)

FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV

(서열 분석 37)

TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAG
TAACAGTGGCCTTTATTATTTCTGGGTG

[0395]

[0396] 하나의 실시양태에서, 막횡단 도메인은 재조합체일 수 있으며, 이 경우 이것은 주로 발린 또는 류신과 같은 소수성 아미노산을 포함할 것이다.

[0397] CAR의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인은 CAR이 위치된 면역 세포 (예를 들어, 조절 T 세포)의 효과기 기능 중의 적어도 하나의 활성화를 담당한다. 용어 "효과기 기능"은 면역 세포의 특수 기능을 지칭한다. 예를 들면, 조절 T 세포의 효과기 기능은 다른 면역 세포의 유도 및/또는 증식을 억제하거나 하향조절함을 포함할 수 있다. 또한, Treg의 효과기 기능은 조직 복구 또는 재생을 촉진시키는 것과 같은 개선된 임상 상태를 초래하는 비-면역 세포에 대한 효과를 포함할 수 있다. 따라서, 용어 "세포내 신호전달 도메인"은 효과기 기능 신호를 형질도입하고 면역 세포가 이의 특수화된 기능을 수행하도록 지시하는 단백질의 부분을 지칭한다. 통상적으로 전체 세포내 신호전달 도메인이 사용될 수 있지만, 다수의 경우 전체 쇄를 사용할 필요는 없다. 세포내 신호전달 도메인의 절단된 부분이 사용될 정도까지, 이러한 절단된 부분은 효과기 기능 신호를 형질도입하

는 한 온전한쇄 대신에 사용될 수 있다. 따라서, 용어 세포내 신호전달 도메인은 효과기 기능 신호를 형질도입하기에 충분한 세포내 신호전달 도메인의 임의의 절단된 부분을 포함하는 것을 의미한다.

- [0398] 하나의 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 이것이 유래되는 분자의 전체 세포내 부분 또는 전체 천연 세포내 신호전달 도메인, 또는 이의 기능적 단편 또는 유도체를 포함할 수 있다.
- [0399] 하나의 실시양태에 따르면, 세포내 신호전달 도메인은 적어도 하나의 (예를 들면, 하나의) T 세포 일차 신호전달 도메인 (또는 이로부터 유래된 서열) 및 임의로 T 세포 공동자극 분자의 하나 이상의 세포내 도메인(들) (또는 이로부터 유래된 서열(들))을 포함한다.
- [0400] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체의 세포내 신호전달 도메인은 적어도 하나의 (예를 들면, 하나의) 일차 신호전달 도메인으로 구성된다.
- [0401] 하나의 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 T 세포 공동자극 분자의 하나 이상의 세포내 도메인(들)을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 T 세포 공동자극 분자의 하나 이상의 세포내 도메인(들)으로 구성된다.
- [0402] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체의 세포내 신호전달 도메인은 적어도 하나의 공동자극 도메인 및 적어도 하나의 (예를 들면, 하나의) 일차 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0403] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체의 세포내 신호전달 도메인은 적어도 2개의 공동자극 도메인 및 적어도 하나의 (예를 들면, 하나의) 일차 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0404] 본 발명의 하나의 실시양태에서, T 세포 일차 신호전달 도메인은 CD3 제타, CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, 공통 FcR 감마 (FCER1G), FcR 베타 (Fc Epsilon Rib), CD79a, CD79b, Fc감마 RIIa, DAP10, 및 DAP 12의 그룹에서 선택된 단백질의 신호전달 도메인 및 이로부터 유래된 서열을 포함한다.
- [0405] 하나의 실시양태에서, T 세포 일차 신호전달 도메인은 CD3 제타의 기능적 신호전달 도메인을 포함하거나 이들로 구성된다.
- [0406] 하나의 실시양태에서, T 세포 일차 신호전달 도메인은 서열번호: 38, 39, 40 또는 41의 CD3-제타 도메인의 아미노산 서열, 또는 서열번호: 38-41과 95-99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 구성된다.

(서열 분석 38)

RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK
 NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL
 HMQALPPR

[0407]

(서열 분석 39)

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK
 NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL
 HMQALPPR

[0408]

(서열 분석 40)

RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK
 KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD
 ALHMALPPR

[0409]

(서열 분석 41)

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPQRR
 KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYD
 ALHMQALPPR

[0410]

[0411]

또 다른 실시양태에서, CD3 제타 일차 신호전달 도메인은 서열번호: 38-41의 아미노산 서열 또는 서열번호: 38-41과 95-99% 동일성을 갖는 아미노산 서열의 적어도 1개, 2개 또는 3개이지만 20, 10 또는 5개 미만의 변형을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 구성된다.

[0412]

따라서, 하나의 실시양태에서, T 세포 일차 신호전달 도메인을 암호화하는 핵산 서열은 서열번호: 42 또는 서열번호: 43의 CD3-제타 도메인의 핵산 서열, 또는 서열번호: 42 또는 서열번호: 43과 95-99% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 이들로 구성된다.

(서열 분석 42)

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACAAGCAGGGCCA
 GAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGT
 TTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAA
 GGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATG
 GCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAA
 GGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTA
 CGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

[0413]

(서열 분석 43)

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACCAGCAGGGCCA
 GAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGT
 TTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAA
 GGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATG
 GCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAA
 GGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTA
 CGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

[0414]

[0415]

자극 방식으로 작용하는 T 세포 일차 신호전달 도메인은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 (ITAMS)로 알려진 신호전달 모티프를 포함할 수 있다.

[0416]

본 발명에서 특히 사용되는 T 세포 일차 세포내 신호전달 도메인을 함유하는 ITAM의 예는 CD3 제타, 공통 FcR 감마 (FCER1G), Fc 감마 RIIa, FcR 베타 (Fc Epsilon R1b), CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD5, CD22, CD66b, CD79a, CD79b, DAP10 및 DAP12의 (또는 이들로부터 유래하는) 것들을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0417]

하나의 실시양태에서, T 세포 일차 신호전달 도메인은 변형된 ITAM 도메인, 예를 들어 천연 ITAM 도메인과 비교하여 변경된 (예를 들어, 증가되거나 감소된) 활성을 갖는 돌연변이된 ITAM 도메인을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 일차 신호전달 도메인은 변형된 ITAM-함유 일차 세포내 신호전달 도메인, 예를 들어, 최적화된 및/또는 절단된 ITAM-함유 일차 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 일차 신호전달 도메인은 1, 2, 3, 4개 또는 그 이상의 ITAM 모티프를 포함한다.

[0418]

하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체의 세포내 신호전달 도메인은 하나 이상의 공동자극 신호전달 도메인과 조합된 T 세포 일차 신호전달 도메인 (예를 들면, CD3-제타 신호전달 도메인)을 포함한다. 공동자극 신

호전달 도메인(들)은 공동자극 분자의 적어도 하나의 세포내 도메인을 포함하는 키메라 수용체의 부분을 지칭한다. 공동자극 분자는 항원에 대한 림프구의 효율적인 반응에 필요한 항원 수용체 또는 이의 리간드 이외의 세포 표면 분자이다.

[0419] T 세포 공동자극 분자의 세포내 도메인의 예는 CD27, CD28, 4-1BB (CD137), MHC 클래스 I 분자, BTLA, 톨 리간드 수용체, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS (CD278), 림프구 기능-관련 항원-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, CD83, CDS, ICAM-1, GITR, ARHR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD160 (BY55), CD19, CD19a, CD4, CD8알파, CD8베타, IL2ra, IL6Ra, IL2R 베타, IL2R 감마, IL7R 알파, IL-13RA1/RA2, IL-33R(IL1RL1), IL-10RA/RB, IL-4R, IL-5R (CSF2RB), IL-21R, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a/CD18, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, ITGB7, NKG2D, NKG2C, CTLA-4 (CD152), CD95, TNFR1 (CD120a/TNFRSF1A), TNFR2 (CD120b/TNFRSF1B), TGFbR1/2/3, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, 공통 감마 쇠와 특이적으로 결합하는 리간드, CD83, NKp44, NKp30, NKp46, 또는 NKG2D와 특이적으로 결합하는 리간드, 및 이들의 임의의 조합의 그룹에서 선택된 단백질의 신호전달 도메인을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0420] 본 발명의 하나의 실시양태에서, 키메라 수용체는 4-1BB, ICOS, CD27, OX40, CD28, CTLA4 및 PD-1 및 이들의 임의의 조합을 포함하는 그룹으로부터 선택된 T 세포 공동자극 분자의 적어도 하나의 세포내 도메인을 포함한다.

[0421] 하나의 실시양태에서, T 세포 공동자극 신호전달 도메인은 4-1BB 세포내 도메인 (서열번호: 44)의 아미노산 서열 또는 서열번호: 44와 95-99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 구성된다. 또 다른 실시양태에서, T 세포 공동자극 신호전달 도메인은 서열번호: 44의 아미노산 서열의 적어도 1개, 2개 또는 3개이지만 20개, 10개 또는 5개 미만의 변형을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 구성된다.

(서열 분석 44)

KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEGGCEL

[0422]

[0423] 하나의 실시양태에서, T 세포 공동자극 신호전달 도메인은 CD27 세포내 도메인 (서열번호: 45)의 아미노산 서열 또는 서열번호: 45와 95-99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 구성된다. 또 다른 실시양태에서, T 세포 공동자극 신호전달 도메인은 서열번호: 45의 아미노산 서열의 적어도 1개, 2개 또는 3개이지만 20개, 10개 또는 5개 미만의 변형을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 구성된다.

(서열 분석 45)

QRRKYRSNKGESPVPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP

[0424]

[0425] 하나의 실시양태에서, T 세포 공동자극 신호전달 도메인은 CD28 세포내 도메인 (서열번호: 46)의 아미노산 서열 또는 서열번호: 46과 95-99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 구성된다. 또 다른 실시양태에서, T 세포 공동자극 신호전달 도메인은 서열번호: 46의 아미노산 서열의 적어도 1개, 2개 또는 3개이지만 20개, 10개 또는 5개 미만의 변형을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 구성된다.

(서열 분석 46)

RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS

[0426]

[0427] 본 발명의 하나의 실시양태에서, 키메라 수용체는 CD28의 세포내 도메인, CD27의 세포내 도메인 및 4-1BB의 세포내 도메인으로부터 바람직하게 선택되는 T 세포 공동자극 분자의 적어도 두 개의 세포내 도메인의 조합을 포

함한다.

- [0428] 하나의 실시양태에서, 키메라 수용체는 4-1BB 세포내 도메인 (서열번호: 44)의 아미노산 서열 또는 서열번호: 44와 95-99% 동일성을 갖는 아미노산 서열 및 CD27 세포내 도메인 (서열번호: 45)의 아미노산 서열 또는 서열번호: 45와 95-99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0429] 또 다른 실시양태에서, 키메라 수용체는 4-1BB 세포내 도메인 (서열번호: 44)의 아미노산 서열 또는 서열번호: 44와 95-99% 동일성을 갖는 아미노산 서열 및 CD28 세포내 도메인 (서열번호: 46)의 아미노산 서열 또는 서열번호: 46과 95-99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0430] 또 다른 실시양태에서, 키메라 수용체는 CD27 세포내 도메인 (서열번호: 45)의 아미노산 서열 또는 서열번호: 45와 95-99% 동일성을 갖는 아미노산 서열 및 CD28 세포내 도메인 (서열번호: 46)의 아미노산 서열 또는 서열번호: 46과 95-99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0431] 하나의 실시양태에서, 키메라 수용체는 4-1BB 세포내 도메인 (서열번호: 44)의 아미노산 서열 또는 서열번호: 44와 95-99% 동일성을 갖는 아미노산 서열 및 CD27 세포내 도메인 (서열번호: 45)의 아미노산 서열 또는 서열번호: 45와 95-99% 동일성을 갖는 아미노산 서열 및 CD28 세포내 도메인 (서열번호: 46)의 아미노산 서열 또는 서열번호: 46과 95-99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0432] 따라서, 하나의 실시양태에서, T 세포 공동자극 신호전달 도메인을 암호화하는 핵산 서열은 4-1BB 세포내 도메인 (서열번호: 47)의 핵산 서열 또는 서열번호: 47과 95-99% 동일성을 갖는 핵산 서열, 및/또는 CD27 세포내 도메인 (서열번호: 48)의 핵산 서열 또는 서열번호: 48과 95-99% 동일성을 갖는 핵산 서열, 및/또는 CD28 세포내 도메인 (서열번호: 49)의 핵산 서열, 또는 서열번호: 49과 95-99% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다.

(서열 분석 47)

AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGAC
 CCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAA
 GAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG

[0433]

(서열 분석 48)

CAACGAAGGAAATATAGATCAAACAAAGGAGAAAGTCCTGTGGAGCCTGC
 AGAGCCTTGTCTTACAGCTGCCCCAGGGAGGAGGAGGGCAGCACCATCCC
 CATCCAGGAGGATTACCGAAAACCGGAGCCTGCCTGCTCCCCC

[0434]

(서열 분석 49)

AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCC
 CGCCGCCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGC
 GACTTCGCAGCCTATCGCTCC

[0435]

하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체의 세포내 신호전달 도메인은 다음을 포함한다:

[0436]

- 서열번호: 44의 4-1BB 세포내 도메인의 아미노산 서열 또는 서열번호: 44와 95-99% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 및/또는 서열번호: 45의 CD27 세포내 도메인의 아미노산 서열 또는 서열번호: 45와 95-99% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 및/또는 서열번호: 46의 CD28 세포내 도메인의 아미노산 서열 또는 서열번호: 46과 95-99% 동일성을 갖는 아미노산 서열; 및

[0437]

- 서열번호: 38-41의 CD3-제타 세포내 도메인의 아미노산 서열, 또는 서열번호: 38-41과 95-99% 동일성을 갖는 아미노산 서열;

[0438]

여기서, 세포내 도메인에 포함된 서열은 동일한 프레임에 단일 폴리펩티드 채로서 발현된다.

[0439]

따라서, 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 암호화하는 핵산 서열은

[0440]

다음을 포함한다:

- [0441] - 서열번호: 47의 4-1BB 세포내 도메인의 핵산 서열 또는 서열번호: 47과 95-99% 동일성을 갖는 핵산 서열, 및/또는 서열번호: 48의 CD27 세포내 도메인의 핵산 서열 또는 서열번호: 48과 95-99% 동일성을 갖는 핵산 서열, 및/또는 서열번호: 49의 CD28 세포내 도메인의 핵산 서열 또는 서열번호: 49와 95-99% 동일성을 갖는 핵산 서열; 및
- [0442] - 서열번호: 42 또는 서열번호: 43의 CD3-제타 세포내 도메인의 핵산 서열, 또는 서열번호: 42 또는 서열번호: 43과 95-99% 동일성을 갖는 서열.
- [0443] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체의 세포내 신호전달 도메인은 무작위로 또는 지정된 순서로 서로 연결될 수 있는 적어도 두 개의 상이한 도메인 (예를 들어, T 세포 공동자극 분자의 일차 신호전달 도메인 및 적어도 하나의 세포내 도메인)을 포함한다.
- [0444] 임의로, 예를 들면, 2 내지 10개 아미노산 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 아미노산) 길이의 짧은 올리고- 또는 폴리펩티드 링커가 별개의 신호전달 도메인 사이에 연결을 형성할 수 있다. 하나의 실시양태에서, 글리신-세린 이중신 (GS)이 적합한 링커로서 사용된다. 하나의 실시양태에서, 단일 아미노산, 예를 들어 알라닌 (A), 글리신 (G)이 적합한 링커로서 사용된다.
- [0445] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체의 세포내 신호전달 도메인은 둘 이상, 예를 들어, 2, 3, 4, 5 개, 또는 그 이상의 공동자극 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0446] 또 다른 실시양태에서, 둘 이상, 예를 들어, 2, 3, 4, 5개, 또는 그 이상의 공동자극 신호전달 도메인은 링커 분자, 예를 들어, 상이한 바와 같은 링커 분자에 의해 분리된다.
- [0447] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체의 세포내 신호전달 도메인은 CD3-제타의 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41) 및 CD28의 공동자극 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 46)을 포함한다.
- [0448] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체의 세포내 신호전달 도메인은 CD3-제타의 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41) 및 4-1BB의 공동자극 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 44)을 포함한다.
- [0449] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체의 세포내 신호전달 도메인은 CD3-제타의 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41) 및 CD27의 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 45)을 포함한다.
- [0450] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인으로부터 N-말단에 위치한 리더 서열을 추가로 포함한다. 리더 서열의 비제한적인 예는 서열번호: 50을 포함하거나 이들로 구성될 수 있는 CD8의 리더 서열이다.

(서열 분석 50)

MALPVTALLLPLALLLHAARP

- [0451]
- [0452] 하나의 실시양태에서, 키메라 수용체는, 예를 들면, 품질 관리, 풍부, 생체 내 추적 등을 위한 태그와 같은 태그를 추가로 포함한다. 상기 태그는 N-말단, C-말단 및/또는 내부에 국재화될 수 있다. 본 발명의 키메라 수용체에서 사용될 수 있는 태그의 예는 숙련가에 의해 잘 알려져 있다. 예를 들면, 그러나 제한함이 없이, 본 발명에서 사용되는 태그는 헤마글루티닌 태그, 폴리 아르기닌 태그, 폴리 히스티딘 태그, Myc 태그, 스트랩 태그, S-태그, HAT 태그, 3x 플래그 태그, 칼모듈린-결합 펩티드 태그, SBP 태그, 키틴 결합 도메인 태그, GST 태그, 말토스-결합 단백질 태그, 형광 단백질 태그 (예를 들어, 서열번호: 68을 갖는 eGFP), T7 태그, V5 태그 및 Xpress 태그를 포함하거나 이들로 구성된 그룹으로부터 선택된 태그일 수 있다. 태그의 또 다른 예는, 제한함이 없이, NWSHPQFEK (서열번호: 51) 또는 SAWSHPQFEK (서열번호: 52)를 포함한다.

(서열 분석 51)

NWSHPQFEK

(서열 분석 52)

SAWSHPQFEK

[0453]

(서열 분석 68)

MVSKGEELFTGVVPIVVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKL
PVPWPVLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNY
KTRAEVKFEGDILVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKN
GIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHVYLSQSALSKDPNE
KRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK

[0454]

[0455]

하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 세포내 신호전달 도메인으로부터 C-말단에 위치한 리보솜 절단 부위를 추가로 포함한다. 리보솜 절단 부위의 비제한적인 예는 P2A 리보솜 절단 부위 서열 ASGSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (서열번호: 61)이다.

[0456]

제1 실시양태에 따르면, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인 (바람직하게는 서열번호: 69 또는 73 (여기서 X₁은 V 또는 I이고, X₂는 T 또는 S이고, X₃은 L 또는 S 또는 A이고, X₄는 S 또는 T이고, X₅는 P 또는 S이고, X₆은 T 또는 S이고, X₇은 L 또는 P이고, X₈은 E 또는 D이고, X₉는 P 또는 R이고, X₁₀은 A 또는 V이고, X₁₁은 S 또는 T이고, X₁₂는 L 또는 Q이고, X₁₃은 S 또는 A이고, X₁₄는 V 또는 I이고, X₁₅는 K 또는 T이고, X₁₆은 V 또는 L이고, X₁₇은 A 또는 P이고, X₁₈은 L 또는 F이고, X₁₉는 G 또는 A이다), 보다 바람직하게는 서열번호: 70-72 또는 74-76 중의 하나), 임의로 세포의 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 및 T 세포 일차 신호전달 도메인을 포함한다.

[0457]

하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 마커 결합 도메인; CD8의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 34); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다.

[0458]

하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 마커 결합 도메인; CD28의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 36); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다.

[0459]

또 다른 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 마커 결합 도메인; CD8의 힌지 도메인 (바람직하게는 서열번호: 26); CD8의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 34); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인; CD8의 힌지 도메인 (바람직하게는 서열번호: 26); CD28의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 36); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다.

[0460]

또 다른 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인; IgG4의 힌지 도메인 (바람직하게는 서열번호: 28); CD8의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 34); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인; IgG4의 힌지 도메인 (바람직하게는 서열번호: 28); CD28의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 36); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다.

[0461]

또 다른 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인; IgD의 힌지 도메인 (바람직하게는 서열번호: 30); CD8의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 34); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인; IgD의 힌지 도메인 (바람직하게는 서열번호: 30); CD28의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 36);

및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다.

[0462] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인; CD28의 힌지 도메인 (바람직하게는 서열번호: 32); CD8의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 34); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인; CD28의 힌지 도메인 (바람직하게는 서열번호: 32); CD28의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 36); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다.

[0463] 제2 실시양태에 따르면, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인 (바람직하게는 서열번호: 69 또는 73 (여기서, X₁은 V 또는 I이고, X₂는 T 또는 S이고, X₃은 L 또는 S 또는 A이고, X₄는 S 또는 T이고, X₅는 P 또는 S 이고, X₆은 T 또는 S이고, X₇은 L 또는 P이고, X₈은 E 또는 D이고, X₉는 P 또는 R이고, X₁₀은 A 또는 V이고, X₁₁은 S 또는 T이고, X₁₂는 L 또는 Q이고, X₁₃은 S 또는 A이고, X₁₄는 V 또는 I이고, X₁₅는 K 또는 T이고, X₁₆은 V 또는 L이고, X₁₇은 A 또는 P이고, X₁₈은 L 또는 F이고, X₁₉는 G 또는 A이다), 보다 바람직하게는 서열번호: 70-72 또는 74-76 중의 하나), 임의로 세포의 힌지 도메인, 막횡단 도메인, T 세포 공동자극 분자의 단일 세포내 도메인 및 T 세포 일차 신호전달 도메인을 포함한다.

[0464] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인; CD8의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 34); 4-1BB의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 44); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인; CD8의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 34); CD27의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 45); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인; CD8의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 34); CD28의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 46); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다.

[0465] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인; CD28의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 36); 4-1BB의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 44); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인; CD28의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 36); CD27의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 45); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인; CD28의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 36); CD28의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 46); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다.

[0466] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인; CD8의 힌지 도메인 (바람직하게는 서열번호: 26); CD8의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 34); 4-1BB의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 44); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인; CD8의 힌지 도메인 (바람직하게는 서열번호: 26); CD8의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 34); CD27의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 45); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인; CD8의 힌지 도메인 (바람직하게는 서열번호: 26); CD8의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 34); CD28의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 46); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다.

[0467] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인; CD8의 힌지 도메인 (바람직하게는 서열번호: 26); CD28의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 36); 4-1BB의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 44); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인; CD8의 힌지 도메인 (바람직하게는 서열번호: 26); CD28의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 36); CD27의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 45); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인; CD8의 힌지 도메인 (바람직하게는 서열번호: 26); CD28의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 36); CD28의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 46); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다.

서열번호: 32); CD28의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 36); CD27의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 45); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인; CD28의 힌지 도메인 (바람직하게는 서열번호: 32); CD28의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 36); CD28의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 46); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다.

[0474] 제3 실시양태에 따르면, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인 (바람직하게는 서열번호: 69 또는 73 (여기서, X₁은 V 또는 I이고, X₂는 T 또는 S이고, X₃은 L 또는 S 또는 A이고, X₄는 S 또는 T이고, X₅는 P 또는 S 이고, X₆은 T 또는 S이고, X₇은 L 또는 P이고, X₈은 E 또는 D이고, X₉는 P 또는 R이고, X₁₀은 A 또는 V이고, X₁₁은 S 또는 T이고, X₁₂는 L 또는 Q이고, X₁₃은 S 또는 A이고, X₁₄는 V 또는 I이고, X₁₅는 K 또는 T이고, X₁₆은 V 또는 L이고, X₁₇은 A 또는 P이고, X₁₈은 L 또는 F이고, X₁₉는 G 또는 A이다), 보다 바람직하게는 서열번호: 70-72 또는 74-76 중의 하나), 임의로 세포의 힌지 도메인, 막횡단 도메인, T 세포 공동자극 분자의 두 개의 세포내 도메인 및 T 세포 일차 신호전달 도메인을 포함한다.

[0475] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인; CD8의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 34); 4-1BB의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 44); CD27의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 45); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인; CD8의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 34); 4-1BB의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 44); CD28의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 46); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인; CD8의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 34); CD27의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 45); CD28의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 46); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다.

[0476] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인; CD28의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 36); 4-1BB의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 44); CD27의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 45); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인; CD28의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 36); 4-1BB의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 44); CD28의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 46); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인; CD28의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 36); CD27의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 45); CD28의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 46); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다.

[0477] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인; CD8의 힌지 도메인 (바람직하게는 서열번호: 26); CD8의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 34); 4-1BB의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 44); CD27의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 45); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인; CD8의 힌지 도메인 (바람직하게는 서열번호: 26); CD8의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 34); 4-1BB의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 44); CD28의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 46); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인; CD8의 힌지 도메인 (바람직하게는 서열번호: 26); CD8의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 34); CD27의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 45); CD28의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 46); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다.

[0478] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인; CD8의 힌지 도메인 (바람직하게는 서열번호: 26); CD28의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 36); 4-1BB의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 44); CD27의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 45); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인; CD8의 힌지 도메인 (바람직하게는 서열번호: 26); CD28의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 36); 4-1BB의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 44); CD28의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 46); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다. 하나의 실시양태에

열번호: 34); CD8의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 36); 4-1BB의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 44); CD27의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 45); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인; CD28의 힌지 도메인 (바람직하게는 서열번호: 32); CD8의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 34); 4-1BB의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 44); CD28의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 46); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인; CD28의 힌지 도메인 (바람직하게는 서열번호: 32); CD8의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 34); CD27의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 45); CD28의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 46); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다.

[0484] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인; CD28의 힌지 도메인 (바람직하게는 서열번호: 32); CD28의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 36); 4-1BB의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 44); CD27의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 45); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인; CD28의 힌지 도메인 (바람직하게는 서열번호: 32); CD28의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 36); 4-1BB의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 44); CD28의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 46); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 HLA-A2 결합 도메인; CD28의 힌지 도메인 (바람직하게는 서열번호: 32); CD28의 막횡단 도메인 (바람직하게는 서열번호: 36); CD27의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 45); CD28의 세포내 도메인 (바람직하게는 서열번호: 46); 및 CD3-제타 일차 신호전달 도메인 (바람직하게는 서열번호: 38, 39, 40 또는 41)을 포함한다.

[0485] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 (i) HLA-A2 결합 도메인 (바람직하게는 서열번호: 69 또는 73 (여기서, X_1 은 V 또는 I이고, X_2 은 T 또는 S이고, X_3 은 L 또는 S 또는 A이고, X_4 는 S 또는 T이고, X_5 는 P 또는 S 이고, X_6 은 T 또는 S이고, X_7 은 L 또는 P이고, X_8 은 E 또는 D이고, X_9 는 P 또는 R이고, X_{10} 은 A 또는 V이고, X_{11} 은 S 또는 T이고, X_{12} 는 L 또는 Q이고, X_{13} 은 S 또는 A이고, X_{14} 는 V 또는 I이고, X_{15} 는 K 또는 T이고, X_{16} 은 V 또는 L이고, X_{17} 은 A 또는 P이고, X_{18} 은 L 또는 F이고, X_{19} 는 G 또는 A이다), 보다 바람직하게는 서열번호: 70-72 또는 74-76 중의 하나), (ii) 인간 CD28의 힌지 영역, (iii) 인간 CD28의 막횡단 도메인, (iv) 인간 CD28의 세포내 도메인 및 (v) 인간 CD3 ζ 쇄의 세포내 도메인을 포함한다.

[0486] 하나의 실시양태에서, 인간 CD28의 힌지 영역, 인간 CD28의 막횡단 도메인, 인간 CD28의 세포내 도메인 및 인간 CD3 ζ 쇄의 세포내 도메인을 포함하는 키메라 수용체의 부분은 서열번호: 53 또는 54의 아미노산 서열 또는 서열번호: 53 또는 54와 95-99% 동일성을 갖는 아미노산 서열에 상응한다.

(서열 분석 53)

AAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWLVVVVGGVLA
 CYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAY
 RSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPR
 RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTY
 DALHMQALPPR

[0487]

(서열 분석 54)

AAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWLVVVVGGVLA
 CYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAY
 RSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPK
 RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTY
 DALHMQALPPR

[0488]

[0489] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 서열번호: 53 또는 54의 아미노산 서열 또는 서열번호: 53 또는 54와 95-99% 동일성을 갖는 아미노산 서열에 연결된 HLA-A2 결합 도메인 (바람직하게는 서열번호: 69 또는 73 (여기서, X₁은 V 또는 I이고, X₂는 T 또는 S이고, X₃은 L 또는 S 또는 A이고, X₄는 S 또는 T이고, X₅는 P 또는 S이고, X₆은 T 또는 S이고, X₇은 L 또는 P이고, X₈은 E 또는 D이고, X₉는 P 또는 R이고, X₁₀은 A 또는 V이고, X₁₁은 S 또는 T이고, X₁₂는 L 또는 Q이고, X₁₃은 S 또는 A이고, X₁₄는 V 또는 I이고, X₁₅는 K 또는 T이고, X₁₆은 V 또는 L이고, X₁₇은 A 또는 P이고, X₁₈은 L 또는 F이고, X₁₉는 G 또는 A이다), 보다 바람직하게는 서열번호: 70-72 또는 74-76 중의 하나)을 포함한다.

[0490] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 (i) HLA-A2 결합 도메인 (바람직하게는 서열번호: 69 또는 73 (여기서, X₁은 V 또는 I이고, X₂는 T 또는 S이고, X₃은 L 또는 S 또는 A이고, X₄는 S 또는 T이고, X₅는 P 또는 S이고, X₆은 T 또는 S이고, X₇은 L 또는 P이고, X₈은 E 또는 D이고, X₉는 P 또는 R이고, X₁₀은 A 또는 V이고, X₁₁은 S 또는 T이고, X₁₂는 L 또는 Q이고, X₁₃은 S 또는 A이고, X₁₄는 V 또는 I이고, X₁₅는 K 또는 T이고, X₁₆은 V 또는 L이고, X₁₇은 A 또는 P이고, X₁₈은 L 또는 F이고, X₁₉는 G 또는 A이다), 보다 바람직하게는 서열번호: 70-72 또는 74-76 중의 하나), (ii) 인간 CD8의 힌지 영역, (iii) 인간 CD8의 막횡단 도메인, (iv) 인간 4-1BB의 세포내 도메인 및 (v) 인간 CD3 ζ의 세포내 도메인을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 인간 CD8의 힌지 영역, 인간 CD8의 막횡단 도메인, 인간 4-1BB의 세포내 도메인 및 인간 CD3 ζ의 세포내 도메인을 포함하는 키메라 수용체의 부분은 서열번호: 55, 56, 57 또는 58의 아미노산 서열, 또는 서열번호: 55-58과 95-99% 동일성을 갖는 임의의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 구성된다.

(서열 분석 55)

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGT
CGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCE
LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPRR
KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD
ALHMQUALPPR

[0491]

(서열 분석 56)

NWSPQFEKMHTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA
CDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC
SCRFPEEEEEGGCELTRRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK
RRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDG
LYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

[0492]

(서열 분석 57)

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGT
CGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCE
LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPRR
RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY
DALHMQUALPPR

[0493]

(서열 분석 58)

NWSHPQFEKMHTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA
 CDIYIWAPLAGTCGVLLLSL VITL YCKRGRKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGC
 SCRFPEEEEEGGCELTRRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK
 RRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDH
 GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0494]

[0495]

하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 서열번호: 55-58의 아미노산 서열 또는 서열번호: 55-58과 95-99% 동일성을 갖는 아미노산 서열에 연결된 HLA-A2 결합 도메인 (바람직하게는 서열번호: 69 또는 73 (여기서, X₁은 V 또는 I이고, X₂는 T 또는 S이고, X₃은 L 또는 S 또는 A이고, X₄는 S 또는 T이고, X₅는 P 또는 S이고, X₆은 T 또는 S이고, X₇은 L 또는 P이고, X₈은 E 또는 D이고, X₉는 P 또는 R이고, X₁₀은 A 또는 V이고, X₁₁은 S 또는 T이고, X₁₂는 L 또는 Q이고, X₁₃은 S 또는 A이고, X₁₄는 V 또는 I이고, X₁₅는 K 또는 T이고, X₁₆은 V 또는 L이고, X₁₇은 A 또는 P이고, X₁₈은 L 또는 F이고, X₁₉는 G 또는 A이다), 보다 바람직하게는 서열번호: 70-72 또는 74-76 중의 하나)을 포함한다.

[0496]

하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 서열번호: 77에 제시된 바와 같은 서열, 또는 서열번호: 77과 95-99% 동일성을 갖는 임의의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 구성된다.

(서열 분석 77)

SQVQLVQSGPEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYHIQWVRQAPGQGLEWIGWYI
 PGDGSTQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLTSED TAVYYCAREGTYIAM
 DYWGQGTISVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDX₁VMTQX₂PX₃X₄LX₅VX₆X₇GX₈X₉
 X₁₀X₁₁ISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYX₁₂QKPGQX₁₃PRLLIYKVSNRFSGX₁₄PDRF
 SGGSGGTDFTLX₁₅ISRX₁₆EX₁₇EDX₁₈X₁₉VYYCFQGSHVPRTFGGGKLEIKRRTT
 TPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCG
 VLLLSL VITL YCKRGRKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL
 VKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN
 PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDHGLYQGLSTATKDTYDALH
 MQALPPR

[0497]

[0498]

여기서, X₁은 V 또는 I이고, X₂는 T 또는 S이고, X₃은 L 또는 S 또는 A이고, X₄는 S 또는 T이고, X₅는 P 또는 S이고, X₆은 T 또는 S이고, X₇은 L 또는 P이고, X₈은 E 또는 D이고, X₉는 P 또는 R이고, X₁₀은 A 또는 V이고, X₁₁은 S 또는 T이고, X₁₂는 L 또는 Q이고, X₁₃은 S 또는 A이고, X₁₄는 V 또는 I이고, X₁₅는 K 또는 T이고, X₁₆은 V 또는 L이고, X₁₇은 A 또는 P이고, X₁₈은 L 또는 F이고, X₁₉는 G 또는 A이다.

[0499]

하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 N-말단에, 바람직하게는 서열번호: 50을 갖는 리더 서열을 추가로 포함하며, 서열번호: 81의 서열 (여기서 X₁은 V 또는 I이고, X₂는 T 또는 S이고, X₃은 L 또는 S 또는 A이고, X₄는 S 또는 T이고, X₅는 P 또는 S이고, X₆은 T 또는 S이고, X₇은 L 또는 P이고, X₈은 E 또는 D이고, X₉는 P 또는 R이고, X₁₀은 A 또는 V이고, X₁₁은 S 또는 T이고, X₁₂는 L 또는 Q이고, X₁₃은 S 또는 A이고, X₁₄는 V 또는 I이고, X₁₅는 K 또는 T이고, X₁₆은 V 또는 L이고, X₁₇은 A 또는 P이고, X₁₈은 L 또는 F이고, X₁₉는 G 또는 A이다), 또는 서열번호: 81과 95-99% 동일성을 갖는 임의의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 구성된다.

(서열 분석 81)

MALPVTALLLPLALLLHAARPSQVQLVQSGPEVKKPGASVKVSCASGYTFTS
 YHIQWVRQAPGQGLEWIGWIYPGDGSTQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELS
 SLTSEDTAVYYCAREGTYIAMDYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGSGGGSDX₁
 VMTQX₂PX₃X₄LX₅VX₆X₇GX₈X₉X₁₀X₁₁ISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYX₁₂QKPGQ
 X₁₃PRLLIYKVSNRFSGX₁₄PDRFSGSGSGTDFTLX₁₅ISRX₁₆EX₁₇EDX₁₈X₁₉VYY
 CFQGSHPRTFGGGTKLEIKRRTTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA
 VHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSL VITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPV
 QTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
 EYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR
 RGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

[0500]

[0501]

하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 서열번호: 78에 제시된 바와 같은 서열, 또는 서열번호: 78과 95-99% 동일성을 갖는 임의의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 구성된다.

(서열 분석 78)

SQVQLVQSGPEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYHIQWVRQAPGQGLEWIGWIY
 PGDGSTQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLTSEDTAVYYCAREGTYIAM
 DYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGSGGGSDVVMQTPLSLPVTLGEPASISCRS
 QSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPRLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI
 SRVEAEDLGVYYCFQGSHPRTFGGGTKLEIKRRTTTTAPRPPTPAPTIASQPLS
 LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSL VITLYCKRGRKK
 LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQN
 QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE
 AYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

[0502]

[0503]

하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 N-말단에, 바람직하게는 서열번호: 50을 갖는 리더 서열을 추가로 포함하며, 서열번호: 82의 서열, 또는 서열번호: 82와 95-99% 동일성을 갖는 임의의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 구성된다.

(서열 분석 82)

MALPVTALLLPLALLLHAARPSQVQLVQSGPEVKKPGASVKVSCASGYTFTS
 YHIQWVRQAPGQGLEWIGWIYPGDGSTQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELS
 SLTSEDTAVYYCAREGTYIAMDYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGSGGGSDV
 VMTQTPLSLPVTLGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPRLLIYKVS
 NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPRTFGGGTKLEIK
 RRTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLA
 GTCGVLLLSL VITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEG
 GCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGK
 PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDT
 YDALHMQUALPPR

[0504]

[0505]

하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 서열번호: 79에 제시된 바와 같은 서열, 또는 서열번호: 79와 95-99% 동일성을 갖는 임의의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 구성된다.

(서열 분석 79)

SQVQLVQSGPEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYHIQWVRQAPGQGLEWIGWIY
 PGDGSTQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLTSEDVAVYYCAREGTYAM
 DYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDVMTQSPSSLSVTLGDRVSI
 SCRSQSIVHSNGNTYLEWYQKPGQSPRLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTI
 SRVEPEDLGVYYCFQGSHPVPRTFGGGKLEIKRRTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL
 RPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLL
 LYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNL
 YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY
 SEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMALPPR

[0506]

[0507]

하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 N-말단에, 바람직하게는 서열번호: 50을 갖는 리더 서열을 추가로 포함하며, 서열번호: 83의 서열, 또는 서열번호: 83과 95-99% 동일성을 갖는 임의의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 구성된다.

(서열 분석 83)

MALPVTALLLPLALLLHAARPSQVQLVQSGPEVKKPGASVKVSCASGYTFTSY
 HIQWVRQAPGQGLEWIGWIYPGDGSTQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSS
 LTTSEDVAVYYCAREGTYAMDYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDV
 VMTQSPSSLSVTLGDRVSISSCRSSQSIVHSNGNTYLEWYQKPGQSPRLLIYKVS
 NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRVEPEDLGVYYCFQGSHPVPRTFGGGKLEIK
 RRTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLA
 GTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEE
 GGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNLNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGK
 PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDT
 YDALHMALPPR

[0508]

[0509]

하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 서열번호: 80에 제시된 바와 같은 서열, 또는 서열번호: 80과 95-99% 동일성을 갖는 임의의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 구성된다.

(서열 분석 80)

SQVQLVQSGPEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYHIQWVRQAPGQGLEWIGWIY
 PGDGSTQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLTSEDVAVYYCAREGTYAM
 DYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPATLSVSPGERATISCRSS
 QSIVHSNGNTYLEWYQKPGQAPRLLIYKVSNRFSGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR
 LLEPEDFAVYYCFQGSHPVPRTFGGGKLEIKRRTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
 PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLL
 YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNL
 YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY
 SEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMALPPR

[0510]

[0511]

하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 N-말단에, 바람직하게는 서열번호: 50을 갖는 리더 서열을 추가로 포함하며, 서열번호: 84의 서열, 또는 서열번호: 84와 95-99% 동일성을 갖는 임의의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 구성된다.

(서열 분석 84)

MALPVTALLLPLALLLHAARPSQVQLVQSGPEVKKPGASVKVSCASGYTFTS
 YHIQWVRQAPGQGLEWIGWIYPGDGSTQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELS
 SLTSEDVAVYYCAREGTYAMDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIV
 MTQSPATLSVSPGERATISCRSSQSIHNSGNTYLEWYQQKPGQAPRLLIYKVS
 NRFSGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCFQGSHPRTFGGGTKLEIKR
 RTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAG
 TCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC
 ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPR
 RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTY
 DALHMQALPPR

[0512]

[0513]

또 다른 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 (i) HLA-A2 결합 도메인 (바람직하게는 서열번호: 69 또는 73 (여기서, X₁은 V 또는 I이고, X₂는 T 또는 S이고, X₃은 L 또는 S 또는 A이고, X₄는 S 또는 T이고, X₅는 P 또는 S이고, X₆은 T 또는 S이고, X₇은 L 또는 P이고, X₈은 E 또는 D이고, X₉는 P 또는 R이고, X₁₀은 A 또는 V이고, X₁₁은 S 또는 T이고, X₁₂는 L 또는 Q이고, X₁₃은 S 또는 A이고, X₁₄는 V 또는 I이고, X₁₅는 K 또는 T이고, X₁₆은 V 또는 L이고, X₁₇은 A 또는 P이고, X₁₈은 L 또는 F이고, X₁₉는 G 또는 A이다), 보다 바람직하게는 서열번호: 70-72 또는 74-76 중의 하나), (ii) 인간 CD8의 힌지 영역, (iii) 인간 CD8의 막횡단 도메인, (iv) 인간 CD28의 세포내 도메인 및 (v) 인간 CD3 ζ 의 세포내 도메인을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 인간 CD8의 힌지 영역, 인간 CD8의 막횡단 도메인, 인간 CD28의 세포내 도메인 및 인간 CD3 ζ 의 세포내 도메인을 포함하는 키메라 수용체의 부분은 서열번호: 59 또는 60의 아미노산 서열, 또는 서열번호: 59 또는 60과 95-99% 동일성을 갖는 임의의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 구성된다.

(서열 분석 59)

MHTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLA
 GTCGVLLLSLVITLYCRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAA
 YRSTRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGG
 KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKD
 TYDALHMQALPPR

[0514]

(서열 분석 60)

MHTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLA
 GTCGVLLLSLVITLYCRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAA
 YRSTRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGG
 KPQRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATK
 DTYDALHMQALPPR

[0515]

[0516]

하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 수용체는 서열번호: 59-60의 아미노산 서열 또는 서열번호: 59-60과 95-99% 동일성을 갖는 아미노산 서열에 연결된 HLA-A2 결합 도메인 (바람직하게는 서열번호: 69 또는 73 (여기서, X₁은 V 또는 I이고, X₂는 T 또는 S이고, X₃은 L 또는 S 또는 A이고, X₄는 S 또는 T이고, X₅는 P 또는 S이고, X₆은 T 또는 S이고, X₇은 L 또는 P이고, X₈은 E 또는 D이고, X₉는 P 또는 R이고, X₁₀은 A 또는 V이고, X₁₁은 S 또는 T이고, X₁₂는 L 또는 Q이고, X₁₃은 S 또는 A이고, X₁₄는 V 또는 I이고, X₁₅는 K 또는 T이고, X₁₆은 V 또는 L이고, X₁₇은 A 또는 P이고, X₁₈은 L 또는 F이고, X₁₉는 G 또는 A이다), 보다 바람직하게는 서열번호: 70-72 또는 74-76 중의 하나)을 포함한다.

[0517]

본 발명은 추가로 상기한 바와 같은 CAR을 발현하는 면역 세포, 및 이러한 면역 세포의 집단에 관한 것이다.

[0518]

하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR을 암호화하는 핵산을 면역 세포에 도입함으로써 세포 표면 상에 본 발명의 CAR을 발현하는 조작된 세포를 생성한다.

- [0519] 본 발명에 따르면, 본 발명의 면역 세포는 HLA-A2를 인식하는 키메라 수용체를 발현하도록 유전자 변형된다. 따라서 본 발명의 면역 세포는 재지향된 (redirected) 면역 세포로 정의될 수 있다.
- [0520] 본원에서 사용되는 용어 "재지향된"은 본원에 기술된 바와 같은 키메라 수용체를 보유하는 면역 세포를 지칭하며, 이것은 하나의 면역 세포와는 상이하거나 이에 특이적이거나 이에 의해 활성화되는 리간드 (즉, HLA-A2)에 결합하고 이에 의해 활성화되는 능력을 면역 세포에 부여한다. 하나의 실시양태에서, 키메라 수용체는 면역 세포가 HLA-A2에 의해 활성화되도록 면역 세포에서 발현될 수 있다.
- [0521] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 면역 세포는 포유동물 면역 세포, 바람직하게는 인간 면역 세포이다.
- [0522] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 면역 세포는 동결 및 해동되었다.
- [0523] 하나의 실시양태에서, 면역 세포는 림프구, 골수 유래 세포, 및 이들의 임의의 조합을 포함하는 그룹으로부터 선택된다.
- [0524] 하나의 실시양태에서, 면역 세포는 T 세포, B 세포, 자연 살해 (NK) 세포, 및 이들의 임의의 조합을 포함하는 그룹으로부터 선택된 림프구이다.
- [0525] 하나의 실시양태에서, 면역 세포는 T 세포이다. 하나의 실시양태에서, T 세포는 CD4⁺ T 세포, CD8⁺ T 세포, γ δ T 세포, 이중 음성 (DN) T 세포, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0526] 하나의 실시양태에서, 면역 세포는 CD4⁺ T 세포, 예를 들면, T 도움 세포, 조절 T 세포, 및 이들의 임의의 조합이다.
- [0527] 하나의 실시양태에서, 면역 세포는 CD4⁺ 조절 T 세포 (Treg)이다. 하나의 실시양태에서, Treg는 흉선 유래 Treg 또는 적응 또는 유도 Treg이다. 하나의 실시양태에서, Treg는 CD4⁺FOXP3⁺ 조절 T 세포 또는 CD4⁺FOXP3⁻ 조절 T 세포 (Tr1 세포), 바람직하게는 CD4⁺FOXP3⁺ 조절 T 세포이다.
- [0528] 하나의 실시양태에서, 면역 세포는 CD8⁺ T 세포, 예를 들면, 세포독성 CD8⁺ T 세포 또는 CD8⁺ 조절 T 세포이다.
- [0529] 바람직하게는, 면역 세포는 CD8⁺ 조절 T 세포 (Treg)이다. 하나의 실시양태에서, CD8⁺ 조절 T 세포는 CD8⁺CD28⁻ 조절 T 세포, CD8⁺CD103⁺ 조절 T 세포, CD8⁺FoxP3⁺ 조절 T 세포, CD8⁺CD122⁺ 조절 T 세포, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0530] 하나의 실시양태에서, 면역 세포는 INF γ ⁺IL10⁺IL34⁺CD8⁺CD45RC^{low} 조절 T 세포이다.
- [0531] 하나의 실시양태에서, 면역 세포는 γ δ T 세포, 바람직하게는 조절 γ δ T 세포이다.
- [0532] 하나의 실시양태에서, 면역 세포는 DN T 세포, 바람직하게는 조절 DN T 세포이다.
- [0533] 하나의 실시양태에서, 면역 세포는 B 세포, 바람직하게는 조절 B 세포이다. 하나의 실시양태에서, 조절 B 세포는 CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B 세포이다.
- [0534] 하나의 실시양태에서, 면역 세포는 NK 세포, 바람직하게는 조절 NK 세포이다.
- [0535] 하나의 실시양태에서, 면역 세포는 골수-유래 세포, 바람직하게는 호중구, 호산구, 호염기구, 단핵구, 대식세포, 수지상 세포, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 그룹으로부터 선택된다.
- [0536] 하나의 실시양태에서, 면역 세포는 대식세포, 바람직하게는 조절 대식세포이다.
- [0537] 하나의 실시양태에서, 면역 세포는 수지상 세포, 바람직하게는 조절 수지상 세포이다.
- [0538] 바람직하게는, 면역 세포는 조절 면역 세포, 예를 들면, 세포 요법에서 사용하기에 적합한 임의의 조절 면역 세포이다.
- [0539] 하나의 실시양태에서, 조절 면역 세포는 조절 T 세포, CD4⁺ 조절 T 세포, CD8⁺ 조절 T 세포, 조절 γ δ T 세포, 조절 DN T 세포, 조절 B 세포, 조절 NK 세포, 조절 대식세포, 조절 수지상 세포, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

- [0540] 하나의 실시양태에서, 조절 면역 세포는 $CD8^+$ 조절 T 세포이다. $CD8^+$ 조절 T 세포의 예는 $CD8^+CD28^-$ 조절 T 세포, $CD8^+CD103^+$ 조절 T 세포, $CD8^+FoxP3^+$ 조절 T 세포, $CD8^+CD122^+$ 조절 T 세포, 및 이들의 임의의 조합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0541] 하나의 실시양태에서, 조절 면역 세포는 조절 $\gamma\delta$ T 세포이다.
- [0542] 하나의 실시양태에서, 조절 면역 세포는 조절 DN T 세포이다.
- [0543] 하나의 실시양태에서, 조절 면역 세포는 조절 B 세포이다. 조절 B 세포의 예는 $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$ B 세포를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0544] 하나의 실시양태에서, 조절 면역 세포는 조절 NK 세포이다.
- [0545] 하나의 실시양태에서, 조절 면역 세포는 조절 대식세포이다.
- [0546] 하나의 실시양태에서, 조절 면역 세포는 조절 수지상 세포이다.
- [0547] 하나의 실시양태에서, 조절 면역 세포는 조절 T 세포, 특히 흉선 유래 Treg 또는 적응 또는 유도 Treg이다. Tregs의 예는 $CD4^+FOXP3^+$ 조절 T 세포 또는 $CD4^+FOXP3^-$ 조절 T 세포 (Tr1 세포)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0548] 하나의 실시양태에서, 조절 면역 세포는 다음의 표현형을 갖는다: $CD4^+CD25^+$, 예를 들면, $CD4^+CD25^+CD127^-$, 예를 들면, $CD4^+CD25^+CD127^-CD45RA^+$. 바람직하게는, 조절 면역 세포는 다음의 표현형을 갖는다: $FoxP3^+CD4^+CD25^+$, 예를 들면, $FoxP3^+CD4^+CD25^+CD127^-$, 예를 들면, $FoxP3^+CD4^+CD25^+CD127^-CD45RA^+$.
- [0549] 하나의 실시양태에서, 면역 조절 세포는 다음의 표현형 중의 적어도 하나를 제시한다: $CD4^+CD25^+$, $FoxP3^+$, $CD127^{lo/-}$, $CTLA-4^+$, $CD39^+$, $Helios^+$, $CD62L^{+/hi}$, $VLA4^+$, $LFA1^+$, $CD49b^{int}$, $ITGb7^{int}$, $PSGL-1^+$, $ICOS^+$, $GITR^+$, $PD-1^{int}$, $Perf^{lo/-}$, $CCR7^+$. 하나의 실시양태에서, 면역 조절 세포는 그랜자임 A 및/또는 그랜자임 B를 발현하지 않는다.
- [0550] 하나의 실시양태에서, 분자의 발현 수준의 결정은 유세포 분석, 면역형광 또는 이미지 분석, 예를 들면 고 함량 분석에 의해 수행된다. 바람직하게는, 분자의 발현 수준의 결정은 유세포 분석에 의해 수행된다. 하나의 실시양태에서, 유세포 분석을 수행하기 전에, 세포를 고정하고 투과시킴으로써 세포내 단백질을 검출할 수 있다.
- [0551] 하나의 실시양태에서, 세포 집단에서 분자의 발현 수준의 결정은 분자를 발현하는 세포 집단의 세포의 백분율 (즉, 분자에 대한 세포 "+")을 결정함을 포함한다. 바람직하게는, 분자를 발현하는 세포의 상기 백분율은 FACS에 의해 측정된다.
- [0552] 용어 "발현하는 (또는 +)" 및 "발현하지 않는 (또는 -)"은 당업계에 잘 알려져 있으며, "+"에 상응하는 세포 마커의 발현 수준은 높거나 중간이고 "+/-"라고도 하며 "-"에 상응하는 세포 마커의 발현 수준은 null이라는 점에서 관심 있는 세포 마커의 발현 수준을 지칭한다.
- [0553] 용어 "low" 또는 "lo" 또는 "lo/-"는 당업계에 잘 알려져 있으며, 세포 마커의 발현 수준이 전체적으로 분석되는 세포 집단에서 그 세포 마커의 발현 수준과 비교하여 낮다는 점에서 관심 있는 세포 마커의 발현 수준을 지칭한다. 보다 특히, 용어 "lo"는 하나 이상의 다른 별개의 세포 집단보다 낮은 수준으로 세포 마커를 발현하는 별개의 세포 집단을 지칭한다.
- [0554] 용어 "high" 또는 "hi" 또는 "bright"는 당업계에 잘 알려져 있으며, 세포 마커의 발현 수준이 전체적으로 분석되는 세포 집단에서 그 세포 마커의 발현 수준과 비교하여 높다는 점에서 관심 있는 세포 마커의 발현 수준을 지칭한다.
- [0555] 일반적으로, 염색 강도의 상위 2, 3, 4 또는 5%의 세포는 "hi"로 표시되고, 집단의 상위 절반에 드는 세포는 "+"로 분류된다. 형광 강도의 50% 미만에 드는 세포는 "lo" 세포로 표시되고, 5% 미만은 "-" 세포로 표시된다.
- [0556] 관심 있는 세포 마커의 발현 수준은 이 마커에 특이적인 형광 표지된 항체로 염색된 세포 집단으로부터의 세포의 중간 형광 강도 (Median Fluorescence Intensity; MFI)를 무관한 특이성을 갖지만 동일한 이소타입, 동일한

형광 프로브를 갖고 동일한 종에서 유래된 형광 표지된 항체 (이소타입 대조군으로 지칭됨)로 염색된 동일한 세포 집단으로부터의 세포의 형광 강도 (FI)와 비교함으로써 결정된다. 이 마커에 특이적인 형광 표지된 항체로 염색되고 이소타입 대조군으로 염색된 세포와 동등한 MFI 또는 더 낮은 MFI를 나타내는 집단으로부터의 세포는 이 마커를 발현하지 않으며 (-) 또는 음성으로 표시된다. 이 마커에 특이적인 형광 표지된 항체로 염색되고 이소타입 대조군으로 염색된 세포보다 우수한 MFI 값을 나타내는 집단으로부터의 세포는 이 마커를 발현하며 (+) 또는 양성으로 표시된다.

- [0557] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 면역 세포는 이의 세포 표면에서 본 발명의 CAR, 및 HLA-A2 이외의 다른 리간드에 결합하는 다른 수용체 (본원에서는 "제2 수용체"라고 함)를 발현한다. 본 발명에 따르면, 이러한 제2 수용체는 전술한 바와 같이 세포의 리간드 결합 도메인, 임의로 힌지, 임의로 막횡단 도메인, 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0558] 하나의 실시양태에서, 제2 수용체는 내인성 (예를 들면, 내인성 TCR)이다. 또 다른 실시양태에서, 제2 수용체는 외인성이며, 이의 발현은 이것을 암호화하는 핵산의 형질전환 또는 형질도입에 의해 본 발명의 면역 세포에서 유도된다. 상기 외인성 수용체는 외인성 TCR 또는 키메라 항원 수용체일 수 있다. 따라서, 하나의 실시양태에서, 본 발명의 면역 세포는 두 개의 키메라 항원 수용체를 발현하며, 여기서 제1 키메라 항원 수용체는 HLA-A2를 인식하고, 제2 키메라 항원 수용체는 별개의 리간드를 인식한다.
- [0559] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 면역 세포는 이의 세포 표면에서 본 발명의 CAR, 및 HLA-A2의 또 다른 에피토프에 결합하는 다른 수용체 (본원에서는 "제2 수용체"라고 함)를 발현한다. 본 발명에 따르면, 이러한 제2 수용체는 전술한 바와 같이 세포의 리간드 결합 도메인, 임의로 힌지, 임의로 막횡단 도메인, 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0560] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 면역 세포는 두 개의 CAR을 발현하며, 여기서 제1 CAR은 HLA-A2의 제1 에피토프를 인식하고, 제2 CAR은 HLA-A2의 별개의 에피토프를 인식한다.
- [0561] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR은 제1 세포내 신호전달 도메인을 포함하고, 제2 수용체는 별개의 제2 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 제1 실시양태에서, 본 발명의 CAR은 T 세포 일차 신호전달 도메인 (예를 들면, CD3제타)을 포함하고, 제2 수용체는 공동자극 신호전달 도메인 (예를 들면, 4-1BB, CD28 또는 4-1BB 및 CD28의 공동자극 신호전달 도메인의 조합)을 포함한다. 제2 실시양태에서, 본 발명의 CAR은 공동자극 신호전달 도메인 (예를 들면, 4-1BB, CD28 또는 4-1BB 및 CD28의 공동자극 신호전달 도메인의 조합)을 포함하고, 제2 수용체는 T 세포 일차 신호전달 도메인 (예를 들면, CD3제타)을 포함한다.
- [0562] 그 결과, 이러한 실시양태에 따르면, 본 발명의 면역 세포의 완전 활성화는 HLA-A2에 대한 본 발명의 CAR의 결합, 및 제2 수용체가 지시되는 리간드에 대한 제2 수용체의 결합을 필요로 한다.
- [0563] 하나의 실시양태에서, 제2 수용체에 의해 인식된 리간드는 질병에 걸린 조직 또는 장기, 또는 자가면역 반응 부위에서 발현되거나 존재한다.
- [0564] 제2 수용체에 의해 인식될 수 있는 리간드의 예는 일반적인 인간 식이로부터의 식품 항원, 자가항원, 흡입된 알레르겐, 섭취된 알레르겐 또는 접촉 알레르겐을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0565] 용어 "일반적인 인간 식이로부터의 식품 항원"은 면역원성 펩티드를 지칭하며, 이것은 다음의 비제한적인 목록의 식품 항원과 같은 인간에게 일반적인 식품으로부터 유래된다: 소 항원, 예를 들어 리포칼린, Ca-결합 S100, 알파-락트알부민, 락토글로불린, 예를 들어 베타-락토글로불린, 소 혈청 알부민, 카제인. 식품-항원은 또한 대서양 연어 항원, 예를 들어 파브알부민; 닭 항원, 예를 들면, 오보뮤코이드, 난백알부민, Ag22, 콘알부민, 리소자임 또는 닭 혈청 알부민; 땅콩 항원; 새우 항원, 예를 들어 트로포미오신; 밀 항원, 예를 들어 응집소 또는 글리아딘; 셀러리 항원, 예를 들어 셀러리 프로필린; 당근 항원, 예를 들어 당근 프로필린; 사과 항원, 예를 들어 타우마틴, 사과 지질 전이 단백질, 또는 사과 프로필린; 배 항원, 예를 들어 배 프로필린 또는 이소플라본 리덕타제; 아보카도 항원, 예를 들어 엔도키티나제; 살구 항원, 예를 들어 살구 지질 전달 단백질; 복숭아 항원, 예를 들어 복숭아 지질 전이 단백질 또는 복숭아 프로필린; 대두 항원, 예를 들어 HPS, 대두 프로필린 또는 (SAM22) PR-10 단백질; 이의 단편, 변이체 및 혼합물일 수 있다.
- [0566] 하나의 실시양태에서, 상기 자가항원은 다발성 경화증-관련 항원, 관절-관련 항원, 눈-관련 항원, 인간 HSP 항원, 피부-관련 항원 또는 이식편 거부 또는 GVHD에 관여하는 항원이다.
- [0567] 용어 "다발성 경화증-관련 항원"은 수초 염기성 단백질 (MBP), 수초 관련 당단백질 (MAG), 수초 희소돌기아교세포

포 당단백질 (MOG), 단백질질 단백질 (PLP), 희소돌기아교세포 수초 올리고프로테인 (OMGP), 수초 관련 희소돌기아교세포 염기성 단백질 (MOBP), 희소돌기아교세포 특이 단백질 (OSP/Claudin1 1), 열 충격 단백질, 희소돌기아교세포 특이 단백질 (OSP), NOGO A, 당단백질 Po, 말초 수초 단백질 22 (PMP22), 2'3'-사이클릭 뉴클레오티드 3'-포스포디에스테라제 (CNPase), 이의 단편, 변이체 및 혼합물을 지칭한다.

[0568] 용어 "관절-관련 항원"은 시트룰린-치환된 사이클릭 및 선형 펩타이드, 타입 II 콜라겐 펩타이드, 인간 연골 당단백질 39 (HCgp39) 펩타이드, HSP, 이중 핵 리보핵산단백질 (hnRNP) A2 펩타이드, hnRNP B1, hnRNP D, Ro60/52, HSP60, HSP65, HSP70 및 HSP90, BiP, 케라틴, 비멘틴, 피브리노겐, 타입 I, III, IV 및 V 콜라겐 펩타이드, 아넥신 V, 글루코스 6 인산 이성질화 효소 (GPI), 아세틸-칼파스타틴, 피루베이트 탈수소 효소 (PDH), 알돌라제, 토포이소머라제 I, snRNP, PARP, Sc1-70, Sc1-100, 음이온성 카디오피린 및 포스파티딜세린, 중성으로 하전된 포스파티딜에탄올아민 및 포스파티딜콜린을 포함한 인지질 항원, 매트릭스 메탈로프로테이나제, 피브릴린, 아그레칸, 이의 단편, 변이체 및 혼합물을 지칭한다.

[0569] 용어 "눈-관련 항원"은 타입 II 콜라겐, 레티날 어레스틴, S-아레스틴, 광수용체간 레티노이드-결합 단백질 (IRBP1), 베타-크리스탈린 B1, 레티날 단백질, 맥락막 단백질 및 이의 단편, 변이체 및 혼합물을 지칭한다.

[0570] 용어 "인간 HSP 항원"은 인간 HSP60, HSP70, HSP90, 이의 단편, 변이체 및 혼합물을 지칭한다.

[0571] 피부-관련 항원의 예는 케라티노사이트 항원, 진피 또는 표피에 존재하는 항원, 멜라노사이트 항원 (예를 들면, 멜라닌 또는 티로시나제), 데스모글레인 (예를 들어, 데스모글레인 1 또는 3, 이것은 Dsg1/3으로 지칭될 수 있음), BP180, BP230, 플렉틴, 인테그린 (예를 들어, 인테그린 $\alpha 4\beta 6$), 콜라겐 (예를 들어, 콜라겐 타입 VII), 라미닌 (예를 들어, 라미닌 332 또는 라미닌 $\gamma 1$), 플라킨 (예를 들어, 엔보플라킨, 페리플라킨 또는 데스모플라킨), 케라틴 (예를 들어, KRT5, KRT8, KRT15, KRT17 및 KRT31), 케라틴 필라멘트-관련 단백질, 필라그린, 코네오데스모신 및 엘라스틴을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0572] 하나의 실시양태에서, 리간드는 이식편 거부 또는 GVHD에 관여하는 항원이다. 이러한 항원의 예는 이식된 조직 또는 숙주에 특이적인 MHC, $\beta 2$ -마이크로글로불린, ABO 시스템으로부터의 항원, 레서스 시스템 (rhesus system)으로부터의 항원 (특히 C, c, E et e 및 D 시스템으로부터의 항원) 및 동종적혈구응집소를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 이식편 거부 또는 GVHD에 관여할 수 있는 항원의 또 다른 예는 HLA-DR (특히 이식 후 처음 6 개월 동안), HLA-B (특히 이식 후 처음 2년 동안), 부 조직적합성 항원 (miHA, 예를 들어, HLA-E, HLA-F 및 HLA-G), MHC 클래스 I (B 및 C)에 해당하는 HLA, MHC 클래스 II (DP, DM, DOA, DOB, DQ 및 DR)에 해당하는 HLA 및 MHC 클래스 III에 해당하는 HLA (예를 들어 보체 시스템의 성분)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0573] 자가항원의 또 다른 예는 아쿠아포린 수분 채널 (예를 들면, 아쿠아포린-4 수분 채널 (AQP4)), Hu, Ma2, 콜랩신 응답-매개체 단백질 5 (CRMP5), 및 암피피신, 전압 개폐 칼륨 채널 (VGKC), N-메틸-d-아스파르테이트 수용체 (NMDAR), α -아미노-3-하이드록시-5-메틸-4-이속사졸프로피온산 (AMPA), 갑상선 퍼옥시다제, 티로글로불린, 항-N-메틸-D-아스파르테이트 수용체 (NR1 서브유닛), Rh 혈액형 항원, I 항원, 데스모글레인 1 또는 3 (Dsg1/3), BP180, BP230, 아세틸콜린 니코틴성 시냅스후 수용체, 갑상선 자극 호르몬 수용체, 혈소판 인테그린, GpIIb:IIIa, 콜라겐 (예를 들면, 콜라겐 알파-3(IV) 쇄), 류마티스 인자, 칼파스타틴, 시트룰린화 단백질, 수초 염기성 단백질 (MBP), 수초 희소돌기아교세포 당단백질 (MOG) 펩타이드, 알파-베타-크리스탈린, DNA, 히스톤, 리보솜, RNP, 조직 트랜스글루타미나제 (TG2), 내재성 인자, 65-kDa 항원, 포스파티딜세린, 리보솜 인단백질, 항-호중구 세포질 항체, Sc1-70, U1-RNP, ANA, SSA, 항-SSB, 항핵 항체 (ANA), 항호중구 세포질 항체 (ANCA), Jo-1, 항미토콘드리아 항체, gp210, p62, sp100, 항인지질 항체, U1-70 kd snRNP, GQ1b 강글리오시드, GM1, 아시알로 GM1, GD1b, 항-평활근 항체 (ASMA), 항-간-신장 마이크로솜-1 항체 (ALKM-1), 항-간 시토졸 항체-1 (ALC-1), IgA 항근내막 항체, 호중구 과립 단백질, 연쇄상 구균 세포벽 항원, 위 벽세포의 내재성 인자, 인슐린 (IAA), 글루탐산 탈탄산 효소 (GAA 또는 GAD) 및 단백질 티로신 포스파타제 (예를 들면, IA2 또는 ICA512), PLA2R1 및 THSD7A1을 제한함이 없이 포함한다.

[0574] 하나의 실시양태에서, 상기 리간드는 난백 알부민, MOG, 타입 II 콜라겐, 이의 단편, 변이체 및 혼합물을 포함하는 그룹으로부터 선택된다.

[0575] 하나의 실시양태에서, 상기 리간드는 난백 알부민, 이의 단편, 변이체 및 혼합물이다.

[0576] 또 다른 실시양태에서, 상기 리간드는 MOG, 이의 단편, 변이체 및 혼합물이다.

[0577] 또 다른 실시양태에서, 상기 리간드는 타입 II 콜라겐, 이의 단편, 변이체 및 혼합물이다.

- [0578] 또 다른 실시양태에서, 상기 리간드는 IL23R, 이의 단편, 변이체 및 혼합물이다.
- [0579] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR은 HLA-A2와는 별개의 리간드를 인식하는 세포의 리간드 결합 도메인을 추가로 포함한다. 하나의 실시양태에서, 상기 리간드 결합 도메인은 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.
- [0580] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR의 리간드 결합 도메인은 HLA-A2 상의 다수의 별개의 에피토프를 인식하는 다기능성 항체이다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR의 리간드 결합 도메인은 HLA-A2 상의 두 개의 별개의 에피토프를 인식하는 이기능성 항체이다.
- [0581] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR은 HLA-A2 결합 도메인을 포함하는 세포의 리간드 결합 도메인 및 HLA-A2와는 별개의 리간드를 인식하는 또 다른 리간드 결합 도메인을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 상기 리간드 결합 도메인은 HLA-A2와 별개의 리간드 둘 다를 인식하는 이기능성 항체이다.
- [0582] 본 발명의 CAR에 의해 인식될 수 있는 HLA-A2와는 별개의 리간드의 예는 상기 열거되어 있다.
- [0583] 본 발명은 또한 상기 정의된 바와 같은 단리된 및/또는 실질적으로 정제된 면역 세포 집단에 관한 것이다.
- [0584] 따라서, 본 발명의 하나의 목적은 단리된 및/또는 실질적으로 정제된 면역 세포 집단이며, 여기서 집단의 세포는 CAR을 포함하고, 여기서 상기 CAR은 HLA-A2를 인식한다.
- [0585] 본원에서 사용되는 바와 같이, "단리된 집단"은 이의 자연적 환경 (예를 들어 말초 혈액)으로부터 제거되고 단리, 정제 또는 분리되며 자연적으로 존재하지만 세포를 단리하는데 기반하는 세포 표면 마커가 없는 다른 세포를 적어도 약 75%, 80%, 85% 및 바람직하게는 약 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 함유하지 않는 세포 집단을 지칭한다.
- [0586] 본 발명은 추가로 상기 정의된 바와 같은 면역 세포의 풍부화된 집단에 관한 것이다.
- [0587] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 단리된, 정제된 및/또는 풍부화된 면역 세포 집단은 동결 및 해동되었다.
- [0588] 본 발명의 또 다른 목적은 상기한 바와 같은 키메라 항원 수용체 (CAR)를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 벡터이다.
- [0589] 본 발명에서 사용될 수 있는 벡터의 예는 DNA 벡터, RNA 벡터, 플라스미드, 파지미드, 파지 유도체, 동물 바이러스 및 코스미드를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0590] 바이러스 벡터 기술은 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 문헌 [Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)] 및 기타 바이러스 및 분자 생물학 매뉴얼에 기술되어 있다. 벡터로서 유용한 바이러스는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 헤르페스 바이러스 및 렌티바이러스를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0591] 일반적으로, 적합한 벡터는 적어도 하나의 유기체에서 기능적인 복제 기점, 프로모터 서열, 통상의 제한 엔도뉴클레아제 부위, 및 하나 이상의 선택 가능한 마커, (예를 들어, 본원에 참고로 포함된 제W001/96584호; 제W001/29058호; 및 제US6,326,193호에 기술된 바와 같음)를 함유한다.
- [0592] 다수의 바이러스 기반 시스템은 포유동물 세포로의 유전자 전이를 위해 개발되었다. 예를 들면, 레트로바이러스는 유전자 전달 시스템을 위한 편리한 플랫폼을 제공한다. 선택된 유전자를 벡터에 삽입하고 당업계에 공지된 기술을 사용하여 레트로바이러스 입자에 패키징할 수 있다. 그 후 재조합 바이러스를 단리하고 *생체내* 또는 *생체외*에서 대상체의 세포로 전달할 수 있다. 다수의 레트로바이러스 시스템이 당업계에 공지되어 있다. 일부 실시양태에서, 아데노바이러스 벡터가 사용된다. 다수의 아데노바이러스 벡터가 당업계에 공지되어 있다. 하나의 실시양태에서, 렌티바이러스 벡터가 사용된다.
- [0593] 추가의 전사 활성 요소, 예를 들어 프로모터 및 인핸서는 전사 개시의 빈도를 조절할 수 있다. 전형적으로, 코어 프로모터와 관련하여, 이들은 시작 부위의 영역 30-110 bp 업스트림에 위치하지만 다수의 프로모터가 최근에 시작 부위의 다운스트림에 기능적 요소를 함유하는 것으로 나타났으며, 인핸서 요소는 일반적으로 시작 부위의 500-2000 bp 업스트림에 위치한다. 프로모터 요소들 사이의 간격은 종종 유연하여, 요소들이 서로에 대해 반전되거나 이동될 때 프로모터 기능이 유지된다. 티미딘 키나제 (tk) 프로모터에서, 프로모터 요소들 사이의 간격은 활성이 감소하기 시작하기 전에 50 bp 간격으로 증가될 수 있다. 프로모터에 따라, 개별 요소가 전사를 활성화하기 위해 협동적으로 또는 독립적으로 기능할 수 있는 것으로 보인다.
- [0594] 적합한 프로모터의 한 예는 극초기 사이토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터 서열이다. 이러한 프로모터 서열은

작동 가능하게 연결된 임의의 폴리뉴클레오티드 서열의 높은 수준의 발현을 유도할 수 있는 강력한 구성적 프로모터 서열이다. 적합한 프로모터의 또 다른 예는 연장 성장 인자-1a (EF-1a)이다. 적합한 프로모터의 또 다른 예는 포스포글리세레이트 키나제 (PGK) 프로모터이다. 그러나, 시미안 바이러스 40 (SV40) 초기 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스 (MMTV), 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 긴 말단 반복순서 (LTR) 프로모터, MoMuLV 프로모터, 조류 백혈병 바이러스 프로모터, 엡스타인-바 바이러스 극초기 프로모터, 라우스 육종 바이러스 프로모터 뿐만 아니라 액틴 프로모터, 미오신 프로모터, 헤모글로빈 프로모터 및 크레아틴 키나제 프로모터와 같은 인간 유전자 프로모터를 포함하지만 이에 제한되지 않는 또 다른 구성적 프로모터 서열이 또한 사용될 수 있다. 또한, 본 발명은 구성적 프로모터의 사용에 제한되지 않아야 한다. 유도성 프로모터도 본 발명의 일부로서 고려된다. 유도성 프로모터의 사용은 발현이 요구될 때에는 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 켜거나 발현이 요구되지 않을 때에는 발현을 끌 수 있는 분자 스위치를 제공한다. 유도성 프로모터의 예는 메탈로티오닌 프로모터, 글루코코르티코이드 프로모터, 프로게스테론 프로모터, 및 테트라사이클린 프로모터를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 또한, 둘 이상의 유전자의 효율적이고 조화된 발현을 가능하게 하는 양방향 프로모터도 본 발명에서 관심이 있을 수 있다. 양방향 프로모터의 예는 i) 사이토메갈로바이러스 (CMV) 또는 마우스 유선 종양 바이러스 (MMTV) 계놈으로부터 유래된 제1 최소 프로모터 서열 및 ii) 동물 유전자로부터 유래된 완전 효율적인 프로모터 서열을 포함하는 양방향 프로모터를 개시하는 본원에 참고로 포함된 제 US2006200869호에 기술된 프로모터를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0595] CAR 폴리펩티드 또는 이의 일부의 발현을 평가하기 위해, 면역 세포에 도입될 발현 벡터는 또한 예를 들면 CD34 또는 리포터 유전자 또는 둘 다와 같은 선택 가능한 마커 유전자를 함유하여, 바이러스 벡터를 통해 형질감염시키거나 감염시키고자 하는 세포 집단으로부터의 발현 세포의 동정 및 선택을 용이하게 할 수 있다. 또 다른 측면에서, 선택 가능한 마커는 별도의 DNA 조각에 담겨 공동-형질감염 절차에 사용될 수 있다. 선택 가능한 마커 및 리포터 유전자 둘 다는 숙주 세포에서의 발현을 가능하게 하기 위해 적절한 조절 서열이 측면에 있을 수 있다. 유용한 선택 가능한 마커는, 예를 들면, 네오(neo) 등과 같은 항생제-내성 유전자를 포함한다.

[0596] 본 발명의 일부 실시양태에서, 자살 유전자 기술이 사용될 수 있다. 다른 자살 유전자 기술이 이들의 작용 메커니즘에 따라 당업계에서 기술되어 있다 (Jones et al. *Frontiers in Pharmacology*, 2014 (5): 254). 무독성 약물을 독성 약물로 전환시키는 유전자-지향적 효소 프로드럭 요법 (GDEPT)의 예는 단순 헤르페스 바이러스 티미딘 키나제 (HSV-TK) 및 사이토신 데아미나제 (CD)를 포함한다. 또 다른 예는, 예를 들면, 유도성 Fas (iFas) 또는 유도성 카스파제 9 (iCasp9) 시스템과 같은 아토포시스 성분에 연결된 약물 결합 도메인으로 구성된 키메라 단백질이다. 또 다른 예는 항-c-myc 항체의 투여에 의해 이들의 결실을 유도하기 위해 조작된 세포의 표면에서 c-myc의 과발현을 유도하는 것과 같은 치료 항체에 의해 매개되는 시스템을 포함한다. EGFR의 사용은 c-myc 시스템과 비교하여 유사한 시스템으로 설명된다.

[0597] 리포터 유전자는 잠재적으로 형질감염된 세포를 동정하고 조절 서열의 기능성을 평가하기 위해 사용된다. 일반적으로, 리포터 유전자는 수용자 유기체 또는 조직에 존재하지 않거나 발현되지 않으며 발현이 일부 쉽게 검출할 수 있는 특성, 예를 들어, 효소 활성에 의해 나타나는 폴리펩티드를 암호화하는 유전자이다. 리포터 유전자의 발현은 DNA가 수용자 세포로 도입된 후 적절한 시간에 분석된다. 적합한 리포터 유전자는 루시페라제, 베타-갈락토시다제, 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제, 분비된 알칼리성 포스파타제를 암호화하는 유전자, 또는 녹색 형광 단백질 유전자 (예를 들어, Ui-Tei et al., 2000 *FEBS Letters* 479: 79-82)를 포함할 수 있다. 적합한 발현 시스템은 잘 알려져 있으며 공지된 기술을 사용하여 제조되거나 상업적으로 획득될 수 있다. 일반적으로, 리포터 유전자의 최고 발현 수준을 보이는 최소 5' 플랭킹 영역을 갖는 작제물이 프로모터로서 동정된다. 이러한 프로모터 영역은 리포터 유전자에 연결될 수 있고 프로모터-유도된 전사를 조절하는 능력에 대해 체제를 평가하는데 사용될 수 있다.

[0598] 유전자를 세포 내로 도입 및 발현시키는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 발현 벡터와 관련하여, 벡터는 당업계의 임의의 방법에 의해 숙주 세포, 예를 들어 포유동물, 박테리아, 효모 또는 곤충 세포에 용이하게 도입될 수 있다. 예를 들면, 발현 벡터는 물리적, 화학적 또는 생물학적 수단에 의해 숙주 세포로 전달될 수 있다.

[0599] 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 도입하기 위한 물리적 방법은 인산칼슘 침전, 리포펙션, 입자 충격, 미세주입, 전기천공, 막 파괴 등을 포함한다. 벡터 및/또는 외인성 핵산을 포함하는 세포를 생산하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들면, 문헌 [Sambrook et al. (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)]을 참고한다. 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 도입하기 위한 바람직한 방법은 인산칼슘 형질감염이다.

- [0600] 관심 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 도입하기 위한 생물학적 방법은 DNA 및 RNA 벡터의 사용을 포함한다. 바이러스 벡터, 특히 레트로바이러스 벡터가 유전자를 포유류, 예를 들어 인간 세포에 삽입하는데 가장 널리 사용되는 방법이 되었다. 또 다른 바이러스 벡터는 렌티바이러스, 폭스바이러스, 단순 헤르페스 바이러스 I, 아데노바이러스 및 아데노-관련 바이러스 등으로부터 유래될 수 있다. 예를 들면, 제US5,350,674호 및 제 5,585,362호를 참고한다.
- [0601] 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 도입하기 위한 화학적 수단은 콜로이드 분산 시스템, 예를 들어 거대분자 복합체, 나노입자 (나노구체, 나노캡슐), 미소구체, 비드, 및 수중유 에멀전, 미셀, 혼합 미셀 및 리포솜을 포함한 지질-기반 시스템을 포함한다. 시험관내 및 생체내 전달 비히클로서 사용하기 위한 예시적인 콜로이드 시스템은 리포솜 (예를 들어, 인공 막 소포)이다.
- [0602] 비-바이러스성 전달 시스템이 사용되는 경우, 예시적인 전달 비히클은 리포솜이다. 숙주 세포 내로 (시험관내, 생체의 또는 생체내) 핵산의 도입을 위해 지질 제형의 사용이 고려된다. 또 다른 측면에서, 핵산은 지질과 연관될 수 있다. 지질과 관련된 핵산은 리포솜의 수성 내부에 캡슐화되거나, 리포솜의 지질 이중층 내에 산재되거나, 리포솜과 올리고뉴클레오티드 둘 다와 관련된 연결 분자를 통해 리포솜에 부착되거나, 리포솜에 포획되거나, 리포솜과 착화되거나, 지질을 함유하는 용액에 분산되거나, 지질과 혼합되거나, 지질과 조합되거나, 지질 중의 현탁액으로서 함유되거나, 미셀을 함유하거나 미셀과 착화되거나, 달리 지질과 연관될 수 있다. 지질, 지질/DNA 또는 지질/발현 벡터 관련 조성물은 용액 중 임의의 특정 구조로 제한되지 않는다. 예를 들면, 이들은 이중층 구조, 미셀 또는 "붕괴된" 구조로 존재할 수 있다. 이들은 또한 용액에 단순히 산재되어, 가능하게는 크기 또는 형태가 균일하지 않은 응집체를 형성할 수 있다. 지질은 자연 발생 또는 합성 지질일 수 있는 지방 물질이다. 예를 들면, 지질은 세포질에서 자연적으로 발생하는 지방 점적 뿐만 아니라 지방산, 알코올, 아민, 아미노 알코올 및 알데히드와 같은 장쇄 지방족 탄화수소 및 이들의 유도체를 함유하는 화합물 부류를 포함한다.
- [0603] 사용하기에 적합한 지질은 상업적 공급원으로부터 입수할 수 있다. 예를 들면, 디미리스틸 포스파티딜콜린 ("DMPC")은 미주리주 세인트 루이스 소재의 Sigma로부터 입수할 수 있고; 디세틸 포스페이트 ("DCP")는 K & K Laboratories (Plainview, NY)로부터 입수할 수 있고; 콜레스테롤 ("Choi")은 Calbiochem-Behring으로부터 입수할 수 있고; 디미리스틸 포스파티딜글리세롤 ("DMPG") 및 기타 지질은 Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL)로부터 입수할 수 있다. 클로로포름 또는 클로로포름/메탄올 중의 지질의 스탁 용액은 약 -20 °C에서 저장될 수 있다. 클로로포름은 메탄올보다 더 쉽게 증발되기 때문에 클로로포름이 유일한 용매로서 사용된다. "리포솜"은 밀폐된 지질 이중층 또는 응집체의 생성에 의해 형성된 다양한 단일 및 다중층 지질 비히클을 포함하는 일반 용어이다. 리포솜은 인지질 이중층 막 및 내부 수성 매질을 갖는 소포 구조를 갖는 것을 특징으로 할 수 있다. 다중층 리포솜은 수성 매질에 의해 분리된 다중 지질 층을 갖는다. 이들은 인지질이 과량의 수용액에 현탁될 때 자발적으로 형성된다. 지질 성분은 밀폐 구조의 형성 전에 자가-재배열을 거치고 지질 이중층 사이에 물 및 용해된 용질을 포획한다 (Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5: 505-10). 그러나, 정상 소포 구조와 다른 용액 중의 구조를 갖는 조성물이 또한 포함된다. 예를 들면, 지질은 미셀 구조를 취하거나 단순히 지질 분자의 불균일한 응집체로서 존재할 수 있다. 리포펙타민-핵산 복합체가 또한 고려된다.
- [0604] 외인성 핵산을 숙주 세포 내로 도입하기 위해 사용된 방법에 관계 없이, 숙주 세포에서 재조합 DNA 서열의 존재를 확인하기 위해 다양한 분석이 수행될 수 있다. 이러한 분석은, 예를 들면, 서던 및 노던 블로팅, RT-PCR 및 PCR과 같은 당업계의 숙련자들에게 잘 알려진 "분자 생물학적" 분석; 예를 들어 면역학적 수단 (ELISA 및 웨스턴 블롯) 또는 본 발명의 범주 내에 속하는 체제를 확인하기 위해 본원에 기술된 분석에 의해 특정 펩티드의 존재 또는 부재를 검출하는 것과 같은 "생화학적" 분석을 포함한다.
- [0605] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 유전자 변형된 면역 세포는 RNA의 도입을 통해 변형된다. 하나의 실시양태에서, 시험관내 전사된 RNA CAR은 일시적 형질감염의 형태로 세포에 도입될 수 있다. RNA는 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)-생성된 주형을 사용하여 시험관내 전사에 의해 생성될 수 있다. 임의의 공급원으로부터의 관심 DNA는 적절한 프라이머 및 RNA 폴리머라제를 사용하여 시험관내 mRNA 합성을 위한 주형으로 PCR에 의해 직접 전환될 수 있다. DNA의 공급원은, 예를 들면, 게놈 DNA, 플라스미드 DNA, 파지 DNA, cDNA, 합성 DNA 서열 또는 임의의 다른 적합한 DNA 공급원일 수 있다. 시험관내 전사를 위한 바람직한 주형은 본 발명의 CAR이다.
- [0606] 하나의 실시양태에서, PCR에 사용될 DNA는 개방형 해독틀을 포함한다. DNA는 유기체의 게놈으로부터 자연적으로 발생하는 DNA 서열로부터 유래될 수 있다. 하나의 실시양태에서, DNA는 전장 관심 유전자 또는 유전자의 일부이다. 유전자는 5' 및/또는 3' 비번역 영역 (UTR)의 일부 또는 전부를 포함할 수 있다. 유전자는 엑손 및

인트론을 포함할 수 있다. 하나의 실시양태에서, PCR에 사용될 DNA는 인간 유전자이다. 또 다른 실시양태에서, PCR에 사용될 DNA는 5' 및 3' UTR을 포함하는 인간 유전자이다. DNA는 대안적으로 자연 발생 유기체에서는 정상적으로 발현되지 않는 인공 DNA 서열일 수 있다. 예시적인 인공 DNA 서열은 융합 단백질을 암호화하는 개방형 해독틀을 형성하기 위해 함께 결합되는 유전자의 일부를 함유하는 것이다. 함께 결합되는 DNA의 일부는 단일 유기체로부터 또는 하나 이상의 유기체로부터 유래될 수 있다. PCR은 형질감염에 사용되는 mRNA의 시험관내 전사를 위한 주형을 생성하는데 사용될 수 있다. PCR을 수행하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. PCR에 사용하기 위한 프라이머는 PCR의 주형으로서 사용될 DNA의 영역에 실질적으로 상보적인 영역을 갖도록 설계된다. "실질적으로 상보적인"은, 본원에 사용되는 바와 같이, 프라이머 서열에서 염기의 대부분 또는 전부가 상보적이거나, 또는 하나 이상의 염기가 상보적이지 않거나 불일치하는 뉴클레오티드의 서열을 지칭한다. 실질적으로 상보적인 서열은 PCR에 사용된 어닐링 조건하에서 의도된 DNA 표적과 어닐링 또는 혼성화될 수 있다. 프라이머는 DNA 주형의 임의의 부분에 실질적으로 상보적하도록 설계될 수 있다. 예를 들면, 프라이머는 5' 및 3' UTR을 포함하여 세포에서 정상적으로 전사되는 유전자의 일부 (개방형 해독틀)를 증폭시키도록 설계될 수 있다. 프라이머는 또한 특정 관심 도메인을 암호화하는 유전자의 일부를 증폭시키도록 설계될 수 있다. 하나의 실시양태에서, 프라이머는 5' 및 3' UTR의 전부 또는 일부를 포함하여 인간 cDNA의 암호화 영역을 증폭시키도록 설계된다. PCR에 유용한 프라이머는 당업계에 잘 알려져 있는 합성 방법에 의해 생성된다.

[0607] "정방향 프라이머"는 증폭시키고자 하는 DNA 서열의 업스트림에 있는 DNA 주형 상의 뉴클레오티드에 실질적으로 상보적인 뉴클레오티드의 영역을 함유하는 프라이머이다. "업스트림"은 암호화 가닥을 기준으로 증폭시키고자 하는 DNA 서열에 대한 위치 5'를 지칭하기 위해 본원에서 사용된다. "역방향 프라이머"는 증폭시키고자 하는 DNA 서열의 다운스트림에 있는 이중-가닥 DNA 주형에 실질적으로 상보적인 뉴클레오티드의 영역을 함유하는 프라이머이다. "다운스트림"은 암호화 가닥을 기준으로 증폭시키고자 하는 DNA 서열에 대한 위치 3'를 지칭하기 위해 본원에서 사용된다.

[0608] PCR에 유용한 임의의 DNA 폴리머라제가 본원에 개시된 방법에서 사용될 수 있다. 시약 및 폴리머라제는 다수의 공급원으로부터 상업적으로 이용 가능하다.

[0609] 안정성 및/또는 번역 효율을 증진시키는 능력을 갖는 화학 구조가 또한 사용될 수 있다. RNA는 바람직하게는 5' 및 3' UTR을 갖는다. 하나의 실시양태에서, 5' UTR은 0 내지 3000개 뉴클레오티드의 길이이다. 암호화 영역에 부가될 5' 및 3' UTR 서열의 길이는 UTR의 상이한 영역에 어닐링하는 PCR을 위한 프라이머를 설계하는 것을 포함하지만 이에 제한되지 않는 상이한 방법에 의해 변경될 수 있다. 이 접근법을 사용하여, 통상의 숙련가는 전사된 RNA의 형질감염 후 최적의 번역 효율을 달성하는데 필요한 5' 및 3' UTR 길이를 변형시킬 수 있다. 5' 및 3' UTR은 관심 유전자에 대한 자연 발생적, 내인성 5' 및 3' UTR일 수 있다. 대안적으로, UTR 서열을 정방향 및 역방향 프라이머에 삽입함으로써 또는 주형의 임의의 다른 변형에 의해 관심 유전자에 내인성이 아닌 UTR 서열을 부가할 수 있다. 관심 유전자에 내인성이 아닌 UTR 서열의 사용은 RNA의 안정성 및/또는 번역 효율을 변경하는데 유용할 수 있다. 예를 들면, 3' UTR 서열의 AU-풍부 요소는 mRNA의 안정성을 감소시킬 수 있는 것으로 알려져 있다. 따라서, 3' UTR은 당업계에 잘 알려져 있는 UTR의 특성에 기초하여 전사된 RNA의 안정성을 증가시키도록 선택되거나 설계될 수 있다.

[0610] 하나의 실시양태에서, 5' UTR은 내인성 유전자의 Kozak 서열을 함유할 수 있다. 대안적으로, 관심 유전자에 내인성이 아닌 5' UTR이 상기 기술된 바와 같이 PCR에 의해 부가될 때, 컨센서스 Kozak 서열은 5' UTR 서열을 부가함으로써 재설계될 수 있다. Kozak 서열은 일부 RNA 전사체의 번역 효율을 증가시킬 수 있지만, 모든 RNA가 효율적인 번역을 가능하게 하기 위해 필요한 것은 아닌 것으로 보인다. 다수의 mRNA를 위한 Kozak 서열에 대한 요건은 당업계에 공지되어 있다. 또 다른 실시양태에서, 5' UTR은 RNA 게놈이 세포에서 안정한 RNA 바이러스로부터 유래될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, mRNA의 엑소뉴클레아제 분해를 방해하기 위해 다양한 뉴클레오티드 유사체가 3' 또는 5' UTR에 사용될 수 있다.

[0611] 유전자 클로닝을 필요로 하지 않으면서 DNA 주형으로부터 RNA를 합성할 수 있도록 하기 위해, 전사의 프로모터는 전사시키고자 하는 서열의 업스트림에 있는 DNA 주형에 부착되어야 한다. RNA 폴리머라제에 대한 프로모터로서 기능하는 서열이 정방향 프라이머의 5' 말단에 부가될 때, RNA 폴리머라제 프로모터는 전사시키고자 하는 개방형 해독틀의 업스트림에 있는 PCR 산물에 통합된다. 하나의 바람직한 실시양태에서, 프로모터는 본원의 다른 곳에 기술된 바와 같은 T7 폴리머라제 프로모터이다. 또 다른 유용한 프로모터는 T3 및 SP6 RNA 폴리머라제 프로모터를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. T7, T3 및 SP6 프로모터에 대한 컨센서스 뉴클레오티드 서열은 당업계에 공지되어 있다.

- [0612] 바람직한 실시양태에서, mRNA는 5' 말단 상의 캡과 3' 폴리(A) 꼬리 둘 다를 가지며, 이것은 세포에서 리보솜 결합, 번역의 개시 및 안정성 mRNA를 결정한다. 원형 DNA 주형, 예를 들어 플라스미드 DNA에서, RNA 폴리머라제는 진핵 세포에서의 발현에 적합하지 않은 긴 연쇄동일서열 산물(concatemeric product)을 생성한다. 3' UTR의 말단에 선형화된 플라스미드 DNA의 전사는 정상 크기의 mRNA를 초래하며, 이것은 전사 후 폴리아데닐화된 경우에도 진핵 형질감염에 효과적이지 않다.
- [0613] 선형 DNA 주형에서, 파지 T7 RNA 폴리머라제는 전사체의 3' 말단을 주형의 마지막 염기를 넘어 연장시킬 수 있다 (Schenborn and Mierendorf, *Nuc Acids Res.*, 13: 6223-36 (1985); Nacheva and Berzal-Herranz, *Eur. J. Biochem.*, 270: 1485-65 (2003)).
- [0614] DNA 주형 내로 폴리A/T 분지를 통합하는 통상적인 방법은 분자 클로닝이다. 그러나, 플라스미드 DNA에 통합된 폴리A/T 서열은 플라스미드 불안정성을 야기할 수 있으며, 이것이 박테리아 세포로부터 수득된 플라스미드 DNA 주형이 종종 결실 및 다른 수차로 매우 오염되는 이유이다. 이것이 클로닝 절차를 힘들고 시간이 많이 걸릴 뿐만 아니라 종종 신뢰할 수 없게 만든다. 이것이 클로닝 없이 폴리A/T 3' 분지를 가진 DNA 주형의 구성을 가능하게 하는 방법이 매우 바람직한 이유이다.
- [0615] 전사 DNA 주형의 폴리A/T 세그먼트는 폴리T 꼬리, 예를 들어 100T 꼬리 (크기는 50-5000 T일 수 있다)를 함유하는 역방향 프라이머를 사용함으로써 PCR 동안에 또는 DNA 결찰 또는 시험관내 제조함을 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 다른 방법에 의해 PCR 후에 생성될 수 있다. 폴리(A) 꼬리는 또한 RNA에 안정성을 제공하고 이들의 분해를 감소시킨다. 일반적으로, 폴리(A) 꼬리의 길이는 전사된 RNA의 안정성과 양의 상관관계가 있다. 하나의 실시양태에서, 폴리(A) 꼬리는 100 내지 5000개의 아데노신이다.
- [0616] RNA의 폴리(A) 꼬리는 대장균 폴리A 폴리머라제 (E-PAP)와 같은 폴리(A) 폴리머라제를 사용한 시험관내 전사 후에 추가로 연장될 수 있다. 하나의 실시양태에서, 폴리(A) 꼬리의 길이를 100개 뉴클레오티드로부터 300 내지 400개 뉴클레오티드로 증가시키면 RNA의 번역 효율이 약 2배 증가된다. 또한, 3' 말단에 대한 상이한 화학 그룹의 부착은 mRNA 안정성을 증가시킬 수 있다. 이러한 부착은 변형된/인공 뉴클레오티드, 앵타머 및 다른 화학물을 함유할 수 있다. 예를 들면, ATP 유사체는 폴리(A) 폴리머라제를 사용하여 폴리(A) 꼬리에 통합될 수 있다. ATP 유사체는 RNA의 안정성을 더욱 증가시킬 수 있다.
- [0617] RNA 상의 5' 캡은 또한 RNA 분자에 안정성을 제공한다. 바람직한 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에 의해 생성된 RNA는 5' 캡을 포함한다. 5' 캡은 당업계에 공지되고 본원에 기술된 기술을 사용하여 제공된다 (Cougot, et al., *Trends in Biochem. Sci.*, 29: 436-444 (2001); Stepinski, et al., *RNA*, 7: 1468-95 (2001); Elango, et al., *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 330: 958-966 (2005)).
- [0618] 본원에 개시된 방법에 의해 생성된 RNA는 또한 내부 리보솜 진입 부위 (IRES) 서열을 함유할 수 있다. IRES 서열은 mRNA에 대한 캡-비의존성 리보솜 결합을 개시하고 번역의 개시를 용이하게 하는 임의의 바이러스성, 염색체성 또는 인공적으로 설계된 서열일 수 있다. 당, 펩티드, 지질, 단백질, 산화방지제 및 계면활성제와 같은 세포 투과성 및 생존력을 촉진시키는 인자를 함유할 수 있는 세포 전기천공에 적합한 임의의 용질이 포함될 수 있다.
- [0619] RNA는 다수의 다른 방법들, 예를 들어, 전기천공 (Amaxa Nucleofector-II (Amaxa Biosystems, Cologne, Germany)), (ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.) 또는 Gene Pulser II (BioRad, Denver, Colo.), Multiporator (Eppendorf, Hamburg Germany), 리포펙션, 중합체 캡슐화, 펩티드 매개된 형질감염, 또는 "유전자 건(gene gun)"과 같은 유전자총법 입자 전달 시스템 (예를 들면, 참조; Nishikawa, et al. *Hum Gene Ther.*, 12(8): 861-70 (2001)을 사용한 양이온성 리보솜 매개된 형질감염을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 상업적으로 이용 가능한 방법 중 어느 하나를 사용하여 표적 세포에 도입될 수 있다.
- [0620] 하나의 실시양태에서, CAR 서열은 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터를 사용하여 세포 내로 전달된다. CAR-발현 레트로바이러스 및 렌티바이러스 벡터는 캡슐화, 결합 또는 네이키드 벡터의 담체 또는 무세포 국소 또는 전신 전달로서 형질도입된 세포를 사용하여 다른 유형의 진핵 세포 내에 뿐만 아니라 조직 및 전체 유기체 내에 전달될 수 있다. 사용된 방법은 안전한 발현이 요구되거나 충분한 모든 목적을 위한 것일 수 있다.
- [0621] 또 다른 실시양태에서, CAR 서열은 시험관내 전사된 mRNA를 사용하여 세포 내로 전달된다. 시험관내 전사된 mRNA CAR는 캡슐화, 결합 또는 네이키드 벡터의 담체 또는 무세포 국소 또는 전신 전달로서 형질감염된 세포를 사용하여 다른 유형의 진핵 세포 내에 뿐만 아니라 조직 및 전체 유기체 내에 전달될 수 있다. 사용된 방법은 일시적인 발현이 요구되거나 충분한 모든 목적을 위한 것일 수 있다.

- [0622] 또 다른 실시양태에서, 목적하는 CAR은 트랜스포손에 의해 세포에서 발현될 수 있다.
- [0623] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 면역 세포는 T 세포이다. 본 발명의 T 세포의 확장 및 유전자 변형 전에, T 세포의 공급원을 대상체로부터 입수한다. T 세포는 말초 혈액 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직, 감염 부위의 조직, 복수, 흉막 삼출액, 비장 조직, 및 종양을 포함한 다수의 공급원으로부터 수득될 수 있다. 본 발명의 특정 실시양태에서, 당업계에서 이용 가능한 임의의 수의 T 세포주가 사용될 수 있다. 본 발명의 특정 실시양태에서, T 세포는 숙련가에게 공지된 임의의 수의 기술, Ficol1™ 분리 또는 Sepax 분리 시스템을 사용하여 대상체로부터 수집된 혈액 단위로부터 수득될 수 있다. 하나의 바람직한 실시양태에서, 개체의 순환 혈액으로부터의 세포는 분리반출법(apheresis)에 의해 수득된다. 분리반출 산물은 전형적으로 T 세포를 포함한 림프구, 단핵구, 과립구, B 세포, 다른 핵형성된 백혈구, 적혈구, 및 혈소판을 함유한다. 하나의 실시양태에서, 분리반출법에 의해 수집된 세포는 세척하여 혈장 분획을 제거하고 세포를 후속 처리 단계를 위한 적합한 완충제 또는 배지에 넣을 수 있다. 본 발명의 하나의 실시양태에서, 세포는 인산염 완충 염수 (PBS)로 세척된다. 대안적인 실시양태에서, 세척액은 칼슘이 없고 마그네슘이 없을 수 있거나 전부는 아니지만 다수의 양이온이 없을 수 있다. 세척 후, 세포는 다양한 생체적합성 완충액, 예를 들면, Ca²⁺-비함유, Mg²⁺-비함유 PBS, PlasmaLyte A, 또는 완충액이 있거나 없는 다른 염수 용액에 재현탁될 수 있다. 대안적으로, 분리반출 샘플의 바람직하지 않은 성분은 제거될 수 있으며 세포는 배양 배지에 직접 재현탁될 수 있다.
- [0624] 또 다른 실시양태에서, T 세포는 적혈구를 용해시키고, 예를 들면, PERCOLL™ 구배를 통한 원심분리에 의해 또는 역류 원심분리 용출에 의해 단핵구를 고갈시킴으로써 말초 혈액 림프구로부터 단리된다. T 세포의 특정 소집단, 예를 들어 CD4⁺CD25⁺, 특히, CD4⁺CD25⁺CD127^{lo}, 예를 들면, CD4⁺CD25⁺CD127^{lo}CD45RA⁺는 양성 또는 음성 선택 기술에 의해 추가로 단리될 수 있다. 예를 들면, 하나의 실시양태에서, T 세포는 원하는 T 세포의 양성 선택을 위해 충분한 시간 동안 DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T와 같은 항-CD3/항-CD28 (즉, 3x28)-접합된 비드와 함께 배양함으로써 단리된다. 하나의 실시양태에서, 기간은 약 30분이다. 추가의 실시양태에서, 기간은 30분 내지 36시간 또는 이상 및 그 사이의 모든 정수 값에 이른다. 추가의 실시양태에서, 기간은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6시간이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 기간은 10 내지 24시간이다. 하나의 바람직한 실시양태에서, 배양 기간은 24시간이다. 백혈병 환자로부터의 T 세포의 단리를 위해, 24시간과 같이 더 긴 배양 시간을 사용하면 세포 수율을 증가시킬 수 있다. 종양 침윤 림프구 (TIL)를 종양 조직으로부터 또는 면역력이 약화된 개체로부터 단리하는데 있어서와 같이 다른 세포 유형에 비해 적은 수의 T 세포가 있는 임의의 상황에서 T 세포를 단리하기 위해 더 긴 배양 시간이 사용될 수 있다. 따라서, T 세포가 CD3/CD28 비드에 결합하게 하는 시간을 단순히 단축 또는 연장시킴으로써 및/또는 (본원에 추가로 기술된 바와 같이) 비드 대 T 세포의 비를 증가 또는 감소시킴으로써, T 세포의 소집단이 배양 개시시 또는 과정 중 다른 시점에서 우선적으로 선택될 수 있다. 추가로, 비드 또는 다른 표면 상의 항-CD3 및/또는 항-CD28 항체의 비를 증가 또는 감소시킴으로써, T 세포의 소집단이 배양 개시시 또는 다른 원하는 시점에서 우선적으로 선택될 수 있다. 숙련가는 본 발명의 맥락에서 다수 라운드의 선택이 사용될 수 있음을 인지할 것이다.
- [0625] 또 다른 실시양태에서, 선택 절차를 수행하고 활성화 및 확장 과정에서 "선택되지 않은" 세포를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. "선택되지 않은" 세포는 또한 추가 라운드의 선택을 거칠 수 있다. 음성 선택에 의한 T 세포 집단의 풍부화는 음성 선택된 세포에 고유한 표면 마커에 대해 지시된 항체의 조합으로 달성될 수 있다. 한 가지 방법은 음성 선택된 세포 상에 존재하는 세포 표면 마커에 대해 지시된 단클론 항체의 콕테일을 사용하는 음성 자기 면역-부착 또는 유세포 분석을 통한 세포 분류 및/또는 선택이다. 예를 들면, 음성 선택에 의해 CD4⁺ 세포를 풍부화하기 위해, 단클론 항체 콕테일은 전형적으로 CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR 및 CD8에 대한 항체를 포함한다. 특정 실시양태에서, 전형적으로 다음의 표현형 CD4⁺, CD25⁺, CD62L^{hi}, GITR⁺, 및 FoxP3⁺를 갖는 조절 T 세포를 풍부화하거나 양성 선택하는 것이 바람직할 수 있다. 대안적으로, 특정 실시양태에서, T 조절 세포는 항-CD25 접합 비드 또는 다른 유사한 선택 방법에 의해 고갈된다.
- [0626] 양성 또는 음성 선택에 의해 원하는 세포 집단을 단리하기 위해, 세포 및 표면 (예를 들어, 비드와 같은 입자)의 농도를 변화시킬 수 있다. 특정 실시양태에서, 세포와 비드의 최대 접촉을 보장하기 위해 비드와 세포가 함께 혼합되는 용적을 상당히 감소시키는 것 (즉, 세포의 농도를 증가시키는 것)이 바람직할 수 있다. 예를 들면, 하나의 실시양태에서, 20억 개 세포/ml의 농도가 사용된다. 하나의 실시양태에서, 10억 개 세포/ml의 농도가 사용된다. 추가의 실시양태에서, 1억 개 세포/ml 이상이 사용된다. 추가의 실시양태에서, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 50 백만 개 세포/ml의 세포 농도가 사용된다. 또 다른 실시양태에서, 75, 80, 85, 90, 95, 또는 100 백만 개 세포/ml의 세포 농도가 사용된다. 추가의 실시양태에서, 125 또는 150 백만 개 세포

/ml의 농도가 사용될 수 있다. 높은 농도를 사용하면 증가된 세포 수율, 세포 활성화, 및 세포 확장이 야기될 수 있다. 또한, 높은 세포 농도의 사용은 CD28-음성 T 세포와 같은 관심 있는 표적 항원을 약하게 발현할 수 있는 세포의, 또는 다수의 종양 세포가 존재하는 샘플 (즉, 백혈병 혈액, 종양 조직 등)로부터 보다 효율적인 포획을 가능하게 한다. 이러한 세포 집단은 치료적 가치를 가질 수 있으며 획득하는 것이 바람직할 것이다.

[0627] 자극을 위한 T 세포는 또한 세척 단계 후에 동결될 수 있다. 이론에 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 동결 및 후속 해동 단계는 세포 집단에서 과립구 및 어느 정도의 단핵구를 제거함으로써 보다 균일한 생성물을 제공한다. 혈장 및 혈소판을 제거하는 세척 단계 후, 세포는 동결 용액에 현탁될 수 있다. 다수의 동결 용액 및 파라미터가 당업계에 공지되어 있고 이러한 맥락에서 유용할 것이지만, 한 가지 방법은 20% DMSO 및 8% 인간 혈청 알부민을 함유하는 PBS, 또는 10% 텍스트란 40 및 5% 텍스트로스, 20% 인간 혈청 알부민 및 7.5% DMSO, 또는 31.25% Plasmalyte-A, 31.25% 텍스트로스 5%, 0.45% NaCl, 10% 텍스트란 40 및 5% 텍스트로스, 20% 인간 혈청 알부민, 및 7.5% DMSO를 함유하는 배양 배지 또는, 예를 들면, Hespan 및 PlasmaLyte A를 함유하는 다른 적합한 세포 동결 배지를 사용하는 것을 포함하며, 그 후 세포는 분당 1°C의 속도로 -80°C로 동결되고 액체 질소 저장 탱크의 기상에서 저장된다. -20°C에서 즉시 또는 액체 질소에서 제어되지 않는 동결 뿐만 아니라 제어된 동결의 또 다른 방법이 사용될 수 있다.

[0628] 특정 실시양태에서, 저온보존된 세포는 본원에 기술된 바와 같이 해동 및 세척하고 활성화 전에 실온에서 1시간 동안 정치시킨다.

[0629] 본 발명의 맥락에서 본원에 기술된 바와 같이 확장된 세포가 필요할 수 있는 시간 이전에 대상체로부터 혈액 샘플 또는 분리반출 산물의 수집이 또한 고려된다. 이와 같이, 확장시키고자 하는 세포의 공급원은 필요한 임의의 시점에 수집될 수 있고, T 세포와 같은 원하는 세포는 본원에 기술된 것과 같은 T 세포 요법으로부터 혜택을 받는 임의의 수의 질환 또는 병태에 대해 T 세포 요법에서 나중에 사용하기 위해 단리되고 동결될 수 있다. 하나의 실시양태에서, 혈액 샘플 또는 분리반출은 일반적으로 건강한 대상체로부터 채취된다. 특정 실시양태에서, 혈액 샘플 또는 분리반출은 질환이 발병할 위험이 있지만 아직 질환이 발병하지는 않은 일반적으로 건강한 대상체로부터 채취되고 관심 세포는 나중에 사용하기 위해 단리 및 동결된다. 특정 실시양태에서, T 세포는 확장, 동결 및 추후에 사용될 수 있다.

[0630] 바람직한 CAR을 발현하기 위해 T 세포 (바람직하게는 Treg 세포)의 유전자 변형 전이든 또는 후이든, T 세포는, 예를 들면, 본원에 참고로 포함된 제US6,352,694호; 제6,534,055호; 제6,905,680호; 제6,692,964호; 제5,858,358호; 제6,887,466호; 제6,905,681호; 제7,144,575호; 제7,067,318호; 제7,172,869호; 제7,232,566호; 제7,175,843호; 제5,883,223호; 제6,905,874호; 제6,797,514호; 제6,867,041호; 및 제US20060121005호에 기술된 바와 같은 방법을 사용하여 일반적으로 활성화되고 확장될 수 있다.

[0631] 일반적으로, 본 발명의 T 세포 (바람직하게는 Treg 세포) 집단은 CD3/TCR 복합체 관련 신호를 자극하는 제제 및 T (바람직하게는 Treg) 세포 집단의 세포 표면 상의 공동-자극 분자를 자극하는 리간드가 부착된 표면과의 접촉에 의해 확장된다. 특히, T (바람직하게는 Treg) 세포 집단은 본원에 기술된 바와 같이, 예를 들어 항-CD3 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 표면 상에 고정된 항-CD2 항체와의 접촉에 의해, 또는 칼슘 운반체 (calcium ionophore)와 함께 단백질 키나제 C 활성화제 (예를 들어, 브리오스타틴)와의 접촉에 의해 자극될 수 있다. T 세포의 표면 상의 보조 분자의 공동-자극을 위해, 보조 분자에 결합하는 리간드가 사용된다. 예를 들면, T 세포의 집단은 T 세포의 증식을 자극하기에 적합한 조건하에서 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체와 접촉될 수 있다. CD4⁺ T 세포의 증식을 자극하기 위해, 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체가 사용될 수 있다. 항-CD28 항체의 예는 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diaclone, Besancon, France)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 당업계에 통상적으로 알려진 다른 확장 방법이 사용될 수 있다 (Berg et al., Transplant Proc. 30(8): 3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9): 1319-1328, 1999; Garland et al., J. Immunol Meth. 227(1-2): 53-63, 1999).

[0632] 특정 실시양태에서, T (바람직하게는 Treg) 세포 집단의 세포에 대한 일차 자극 신호 및 공동-자극 신호는 상이한 프로토콜에 의해 제공될 수 있다. 예를 들면, 각 신호를 제공하는 제제는 용액 상태일 수 있거나 표면에 결합될 수 있다. 표면에 결합될 때, 제제는 동일한 표면에 (즉, "시스" 형성) 또는 별도의 표면에 (즉, "트랜스" 형성) 결합될 수 있다. 대안적으로, 하나의 제제는 표면에 결합되고 다른 제제는 용액 상태일 수 있다. 하나의 실시양태에서, 공동-자극 신호를 제공하는 제제는 세포 표면에 결합되고 일차 활성화 신호를 제공하는 제제는 용액 상태이거나 표면에 결합된다. 특정 실시양태에서, 제제 둘 다는 용액 상태에 있을 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 제제는 가용성 형태일 수 있으며, 그 후 Fc 수용체를 발현하는 세포 또는 제제에 결합하는 항체

또는 다른 결합제와 같은 표면에 가교결합될 수 있다. 이와 관련하여, 예를 들면, 본 발명에서 T 세포를 활성화 및 확장하는데 사용하기 위해 고려되는 인공 항원 제시 세포 (aAPC)에 대해서는 본원에 참고로 포함된 제 US20040101519호 및 제20060034810호를 참고한다.

[0633] 하나의 실시양태에서, 두 제제는 비드 상에, 동일한 비드 상에, 즉 "시스" 또는 별도의 비드 상에, 즉 "트랜스"로 고정된다. 예로서, 일차 활성화 신호를 제공하는 제제는 항-CD3 항체 또는 이의 항원-결합 단편이고, 공동-자극 신호를 제공하는 제제는 항-CD28 항체 또는 이의 항원-결합 단편이며; 제제 둘 다는 동등한 분자량으로 동일한 비드에 공동-고정화된다. 하나의 실시양태에서, CD4+ T 세포 확장 및 T 세포 성장을 위해 비드에 결합된 각각의 항체의 1:1 비가 사용된다. 본 발명의 특정 측면에서, 비드에 결합된 항 CD3:CD28 항체의 비는 1:1의 비를 사용하여 관찰된 확장과 비교하여 T 세포 확장의 증가가 관찰되도록 사용된다. 하나의 특정 실시양태에서 1:1의 비를 사용하여 관찰된 확장과 비교하여 약 1 내지 약 3배의 증가가 관찰된다. 하나의 실시양태에서, 비드에 결합된 CD3:CD28 항체의 비는 100:1 내지 1:100 및 이들 사이의 모든 정수 값의 범위이다. 본 발명의 하나의 측면에서, 항-CD3 항체보다 더 많은 항-CD28 항체가 입자에 결합되며, 즉 CD3:CD28의 비는 1 미만이다. 본 발명의 특정 실시양태에서, 비드에 결합된 항 CD28 항체 대 항 CD3 항체의 비는 2:1보다 크다. 하나의 특정 실시양태에서, 비드에 결합된 항체의 1:100 CD3:CD28 비가 사용된다. 또 다른 실시양태에서, 비드에 결합된 항체의 1:75 CD3:CD28 비가 사용된다. 추가의 실시양태에서, 비드에 결합된 항체의 1:50 CD3:CD28 비가 사용된다. 또 다른 실시양태에서, 비드에 결합된 항체의 1:30 CD3:CD28 비가 사용된다. 하나의 바람직한 실시양태에서, 비드에 결합된 항체의 1:10 CD3:CD28 비가 사용된다. 또 다른 실시양태에서, 비드에 결합된 항체의 1:3 CD3:CD28 비가 사용된다. 또 다른 실시양태에서, 비드에 결합된 항체의 3:1 CD3:CD28 비가 사용된다.

[0634] 1:500 내지 500:1 및 그 사이의 임의의 정수 값의 입자 대 세포의 비가 T 세포 또는 다른 표적 세포를 자극하는데 사용될 수 있다. 당업계의 통상의 숙련가들이 쉽게 인지할 수 있는 바와 같이, 입자 대 세포의 비는 표적 세포에 대한 입자 크기에 따라 좌우될 수 있다. 예를 들면, 작은 크기의 비드는 소수의 세포에만 결합할 수 있는 반면 보다 큰 비드는 많은 세포에 결합할 수 있다. 특정 실시양태에서, 1:100 내지 100:1 및 그 사이의 임의의 정수 값 범위의 세포 대 입자의 비, 추가의 실시양태에서 1:9 내지 9:1 및 그 사이의 임의의 정수 값 범위의 비가 또한 T 세포를 자극하는데 사용될 수 있다. T 세포 자극을 야기하는 항-CD3- 및 항-CD28-결합된 입자 대 T 세포의 비는 상기 주지된 바와 같이 변할 수 있지만, 특정의 바람직한 값은 1:100, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 및 15:1을 포함하고 바람직한 하나의 비는 T 세포당 적어도 1:1 입자이다. 하나의 실시양태에서, 1:1 이하의 입자 대 세포의 비가 사용된다. 하나의 특정 실시양태에서, 바람직한 입자:세포 비는 1:5이다. 추가의 실시양태에서, 입자 대 세포의 비는 자극 입자에 따라 변할 수 있다. 예를 들면, 하나의 실시양태에서, 입자 대 세포의 비는 첫날에 1:1 내지 10:1이고, 그 후 최대 10일 동안 매일 또는 격일로 추가 입자가 세포에 첨가되며, 최종 비는 1:1 내지 1:10 (첨가 당일의 세포 수에 기초함)이다. 하나의 특정 실시양태에서, 입자 대 세포의 비는 자극 첫날에 1:1이고 자극한지 세 번째 및 다섯 번째 날에 1:5로 조정된다. 또 다른 실시양태에서, 입자는 매일 또는 격일 기준으로 첫날에 1:1, 및 자극한지 세 번째 및 다섯 번째 날에 1:5의 최종 비로 첨가된다. 또 다른 실시양태에서, 입자 대 세포의 비는 자극 첫날에 2:1이고 자극한지 세 번째 및 다섯 번째 날에 1:10으로 조정된다. 또 다른 실시양태에서, 입자는 매일 또는 격일 기준으로 첫날에 1:1, 및 자극한지 세 번째 및 다섯 번째 날에 1:10의 최종 비로 첨가된다. 당업계의 숙련가는 다양한 다른 비가 본 발명에 사용하기에 적합할 수 있음을 인지할 것이다. 특히, 비는 입자 크기 및 세포 크기와 유형에 따라 달라질 수 있다.

[0635] 본 발명의 추가의 실시양태에서, T 세포 (바람직하게는 Treg 세포)를 제제-코팅된 비드와 조합하고, 이어서 비드 및 세포를 분리한 다음 세포를 배양한다. 대안적인 실시양태에서, 배양 전에, 제제-코팅된 비드 및 세포를 분리되지 않고 함께 배양한다. 추가의 실시양태에서, 비드 및 세포를 먼저 자기력과 같은 힘의 적용에 의해 농축시켜, 세포 표면 마커의 결합을 증가시킴으로써 세포 자극을 유도한다.

[0636] 예로서, 항-CD3 및 항-CD28이 부착된 상자성 비드 (3x28 비드)가 Treg 세포 집단의 세포와 접촉하게 함으로써 세포 표면 단백질을 결합시킬 수 있다. 하나의 실시양태에서, 세포 (예를 들면, 10⁴ 내지 10⁹개 T 세포) 및 비드 (예를 들면, 1:1 비의 DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T 상자성 비드)를 완충제, 바람직하게는 (갈슘 및 마그네슘과 같은 양이온이 없는) PBS에서 조합한다. 다시, 당업계의 통상의 숙련가들은 임의의 세포 농도가 사용될 수 있음을 쉽게 인지할 수 있다. 예를 들면, 표적 세포는 샘플에서 매우 드물고 샘플의 0.01% 만을 포함할 수 있거나 전체 샘플 (즉, 100%)이 관심 표적 세포를 포함할 수 있다. 따라서, 임의의 세포 수는 본 발명의 맥락 내에 있다. 특정 실시양태에서, 세포와 입자의 최대 접촉을 보장하기 위해 입자와 세포가 함께 혼합되는 용적

을 상당히 감소시키는 것 (즉, 세포의 농도를 증가시키는 것)이 바람직할 수 있다. 예를 들면, 하나의 실시양태에서, 약 20억 개 세포/ml의 농도가 사용된다. 또 다른 실시양태에서, 1억 개 세포/ml 이상이 사용된다. 추가의 실시양태에서, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 50 백만 개 세포/ml의 세포 농도가 사용된다. 또 다른 실시양태에서, 75, 80, 85, 90, 95, 또는 100 백만 개 세포/ml의 세포 농도가 사용된다. 추가의 실시양태에서, 125 또는 150 백만 개 세포/ml의 농도가 사용될 수 있다. 높은 농도를 사용하면 증가된 세포 수율, 세포 활성화, 및 세포 확장이 야기될 수 있다. 또한, 높은 세포 농도의 사용은 CD28-음성 T 세포와 같은 관심 있는 표적 항원을 약하게 발현할 수 있는 세포의 보다 효율적인 포획을 가능하게 한다. 이러한 세포 집단은 치료적 가치를 가질 수 있으며 특정 실시양태에서 획득하는 것이 바람직할 것이다.

[0637] 본 발명의 하나의 실시양태에서, 혼합물은 수 시간 (약 3시간) 내지 약 14일 또는 그 사이의 임의의 시간당 정수 값 동안 배양될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 혼합물은 21일 동안 배양될 수 있다. 본 발명의 하나의 실시양태에서 비드 및 T 세포는 약 8일 동안 함께 배양된다. 또 다른 실시양태에서, 비드 및 T 세포는 2-3일 동안 함께 배양된다. T 세포의 배양 시간이 60일 이상일 수 있도록 여러 주기의 자극이 또한 바람직할 수 있다. T 세포 배양에 적합한 조건은 혈청 (예를 들어, 태아 소 또는 인간 혈청), 인터류킨-2 (IL-2), 인슐린, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF β , 및 TNF- α 를 포함하는 증식 및 생존력을 위해 필요한 인자를 함유할 수 있는 적합한 배지 (예를 들어, 최소 필수 배지 또는 RPMI 배지 1640 또는, X-vivo 15, (Lonza)) 또는 숙련자에게 공지된 세포의 성장을 위한 임의의 다른 첨가제를 포함한다. 세포의 성장을 위한 다른 첨가제는 계면활성제, 플라즈마네이트 (plasmanate), 및 환원제, 예를 들어 N-아세틸-시스테인 및 2-머캅토에탄올을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 배지는 아미노산, 나트륨 피루베이트, 및 비타민이 첨가되고 무혈청이거나 적절한 양의 혈청 (또는 혈장) 또는 정해진 세트의 호르몬, 및/또는 T 세포의 성장 및 확장에 충분한 양의 사이토카인(들)이 보충된 RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, a-MEM, F-12, X-Vivo 15, 및 X-Vivo 20, 옵티마이저 (Optimizer)를 포함할 수 있다. 항생제, 예를 들어, 페니실린 및 스트렙토마이신은 실험 배양물에만 포함되며 대상체에게 주입하고자 하는 세포의 배양물에는 포함되지 않는다. 표적 세포는 성장을 뒷받침하는데 필요한 조건, 예를 들면, 적절한 온도 (예를 들어, 37°C) 및 대기 (예를 들어, 공기 + 5% CO₂) 하에서 유지된다.

[0638] 다양한 자극 시간에 노출된 T 세포는 상이한 특성을 나타낼 수 있다. 예를 들면, 전형적인 혈액 또는 분리반출된 말초 혈액 단핵 세포 산물은 세포독성 또는 억제 T 세포 집단 (Tc, CD8⁺)보다 큰 헬퍼 T 세포 집단 (Th, CD4⁺)을 갖는다. CD3 및 CD28 수용체의 자극에 의한 T 세포의 생체의 확장은 약 8-9일 전에는 주로 Th 세포로 구성되지만 약 8-9일 후에는 T 세포의 집단이 점점 더 많은 Tc 세포의 집단을 포함하는 T 세포의 집단을 생성한다. 따라서, 치료의 목적에 따라, Th 세포를 주로 포함하는 T 세포 집단을 대상체에게 주입하는 것이 유리할 수 있다. 유사하게, Tc 세포의 항원-특이 서브세트가 단리된 경우, 이 서브세트를 더 크게 확장시키는 것이 유리할 수 있다. 또한, CD4 및 CD8 마커 이외에도, 다른 표현형 마커는 세포 확장 과정의 과정 동안 상당히, 그러나 재현 가능하게 변한다. 따라서, 이러한 재현성은 특정 목적을 위해 활성화된 T 세포 산물을 맞춤형하는 능력을 가능하게 한다.

[0639] 본 발명의 하나의 실시양태에서, T 세포는 예를 들면 본원에 참고로 포함된 제W02007110785호에 기술된 바와 같이 조절 T 세포를 수득하기 위해 라파마이신의 존재하에서 배양될 수 있다. 조절 T 세포를 생성하기 위한 또 다른 방법은 본원에 참고로 포함된 제US2016024470호에 기술되어 있으며, 여기서는 T 세포를 T 세포 수용체 (TCR)/CD3 활성화제, 예를 들면 TCR/CD3 항체, TCR 공동-자극인자 활성화제, 예를 들면 CD28, CD137 (4-1 BB), GITR, B7-1/2, CD5, ICOS, OX40, CD40 또는 CD137 항체, 및 라파마이신과 배양한다.

[0640] 본 발명의 하나의 실시양태에서, CAR의 발현에 의해 유전자 변형된 T 세포는 또한 적어도 하나의 세포내 인자, 예를 들어 ROR-C, Foxo1, T-bet, 또는 Gata 3, c-Maf, AhR의 발현에 의해 유전자 변형되었을 수 있다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 유전자 변형된 면역 세포는 Foxo1을 발현한다.

[0641] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 유전자 변형된 세포는 동종이계 면역 세포, 예를 들면, 동종이계 T 또는 Treg 세포일 수 있다. 예를 들면, 동종이계 면역 세포는 기능성 인간 백혈구 항원 (HLA), 예를 들어, HLA 클래스 I 및/또는 HLA 클래스 II의 발현이 없거나 기능성 T 세포 수용체 (TCR)의 발현이 없는 면역 세포일 수 있다.

[0642] 하나의 실시양태에서, 기능적 TCR이 없는 T 세포는 이의 표면 상에 임의의 기능적 TCR을 발현하지 않도록 조작되거나, 기능적 TCR을 포함하는 하나 이상의 서브유닛을 발현하지 않도록 조작되거나, 이의 표면 상에 기능적 TCR을 거의 생성하지 않도록 조작될 수 있다. 대안적으로, T 세포는, 예를 들어, TCR의 하나 이상의 서브유닛

의 돌연변이되거나 절단된 형태의 발현에 의해 실질적으로 손상된 TCR을 발현할 수 있다. 용어 "실질적으로 손상된 TCR"은 이 TCR이 숙주에서 불리한 면역 반응을 야기하지 않을 것을 의미한다.

- [0643] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기술된 유전자 변형된 세포는 이의 표면 상에 기능성 HLA를 발현하지 않도록 조작될 수 있다. 예를 들면, 본원에 기술된 면역 세포는 세포 표면 발현 HLA, 예를 들어, HLA 클래스 I 및/또는 HLA 클래스 II 또는 비-전형 HLA 분자가 하향조절되도록 조작될 수 있다.
- [0644] 또 다른 실시양태에서, T 세포는 기능적 TCR 및 기능적 HLA, 예를 들어 HLA 클래스 I 및/또는 HLA 클래스 II가 없을 수 있다.
- [0645] 기능적 TCR 및/HLA의 발현이 결여된 변형된 면역 세포 (예를 들면, 변형된 T 또는 Treg 세포)는 TCR 및/또는 HLA의 하나 이상의 서브유닛의 녹아웃 또는 녹다운을 포함하는 임의의 적합한 수단에 의해 획득될 수 있다. 예를 들면, 면역 세포는 siRNA, shRNA, 이펙터 뉴클레아제 (TALEN), 아연 집게 엔도뉴클레아제 (ZFN), 메가뉴클레아제 (mn, 호밍 엔도뉴클레아제라고도 함) 또는 (TAL 이펙터를 mn 절단 도메인과 조합한) megaTAL과 같은 크리스퍼 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats; CRISPR) 전사-활성화제를 사용한 TCR 및/또는 HLA의 녹다운을 포함할 수 있다 (Osborn et al, "Evaluation of TCR Gene Editing Achieved by TALENs, CRISPR/Cas9, and megaTAL Nucleases" Mol Ther. 2016 Mar; 24(3): 570-81).
- [0646] 하나의 실시양태에서, TCR 발현 및/또는 HLA 발현은 T 세포에서 TCR 및/또는 HLA를 암호화하는 핵산을 표적으로 하는 siRNA 또는 shRNA를 사용하여 억제될 수 있다. T 세포에서 siRNA 및 shRNA의 발현은 임의의 통상적인 발현 시스템, 예를 들어, 렌티바이러스 발현 시스템을 사용하여 달성될 수 있다. HLA 클래스 I 및/또는 HLA 클래스 II 유전자의 발현을 하향조절하는 예시적인 siRNA 및 shRNA는, 예를 들어, 제US2007/0036773호에 기술되어 있다. TCR의 성분의 발현을 하향조절하는 예시적인 shRNA는, 예를 들어, 제US2012/0321667호에 기술되어 있다.
- [0647] 본원에서 사용되는 "CRISPR" 또는 "TCR 및/또는 HLA에 대한 CRISPR" 또는 "TCR 및/또는 HLA를 억제하는 CRISPR"은 주기적으로 간격을 띠고 군집화된 짧은 회문구조 반복체의 세트 또는 이러한 반복체 세트를 포함하는 시스템을 지칭한다. 본원에서 사용되는 "Cas"는 CRISPR-관련 단백질을 지칭한다. "CRISPR/Cas" 시스템은 TCR 및/또는 HLA 유전자를 침묵시키거나 돌연변이시키는데 사용될 수 있는 CRISPR 및 Cas로부터 유래된 시스템을 지칭한다.
- [0648] 자연-발생 CRISPR/Cas 시스템은 서열분석된 박테리아 게놈의 대략 40% 및 서열분석된 고세균(archaea)의 90%에서 발견된다 (Grissa et al. (2007) BMC Bioinformatics 8: 172). 이 시스템은 플라스미드 및 파지와 같은 외래 유전자 요소에 대한 내성을 부여하고 획득 면역의 형태를 제공하는 일종의 원핵 면역 시스템이다 (Barrangou et al. (2007) Science 315: 1709-1712; Marragini et al. (2008) Science 322: 1843-1845). CRISPR/Cas 시스템은 마우스 또는 영장류와 같은 진핵생물에서 유전자 편집 (특정 유전자 침묵, 강화 또는 변화)에 사용하기 위해 변형되었다 (Wiedenheft et al. (2012) Nature 482: 331-8). 이것은 특수하게 설계된 CRISPR 및 하나 이상의 적절한 Cas를 함유하는 플라스미드를 진핵 세포 내로 도입함으로써 달성된다. 때때로 CRISPR 유전자좌라고 불리는 CRISPR 서열은 교번 반복체 및 스페이서를 포함한다. 자연-발생 CRISPR에서, 스페이서는 통상적으로 플라스미드 또는 파지 서열과 같은 박테리아에 외래성인 서열을 포함하고; TCR 및/또는 HLA CRISPR/Cas 시스템에서, 스페이서는 TCR 또는 HLA 유전자 서열로부터 유래된다. CRISPR 유전자좌로부터의 RNA는 Cas 단백질에 의해 구성적으로 발현되고 작은 RNA로 가공된다. 이들은 반복 서열이 측면에 있는 스페이서를 포함한다. RNA는 RNA 또는 DNA 수준에서 외인성 유전자 요소를 침묵시키도록 다른 Cas 단백질을 안내한다 (Horvath et al. (2010) Science 327: 167-170; Makarova et al. (2006) Biology Direct 1: 7). 따라서 스페이서는 siRNA와 유사하게 RNA 분자의 주형으로 작용한다 (Pennisi (2013) Science 341: 833-836). 따라서 CRISPR/Cas 시스템은 TCR 및/또는 HLA 유전자를 편집하거나 (염기 쌍 부가 또는 결실), 조기 정지를 도입하여 TCR 및/또는 HLA의 발현을 감소시키는데 사용될 수 있다. CRISPR/Cas 시스템은 RNA 간섭처럼 대안적으로 사용될 수 있어, 가역적인 방식으로 HLA 유전자를 끈다. 포유동물 세포에서, 예를 들면, RNA는 Cas 단백질을 TCR 및/또는 HLA 프로모터로 안내하여 RNA 폴리머라제를 입체적으로 차단할 수 있다.
- [0649] 예를 들어, 제US20140068797호, 및 문헌(Cong (2013) Science 339: 819-823)에 기술되어 있는 당업계에 공지된 기술을 사용하여 TCR 및/또는 HLA를 억제하는 인공 CRISPR/Cas 시스템을 생성할 수 있다. 예를 들어, 문헌 (Tsai (2014) Nature Biotechnol., 32:6 569-576), 제US8,871,445호; 제8,865,406호; 제8,795,965호; 제8,771,945호; 및 제8,697,359호에 기술되어 있는 TCR 및/또는 HLA를 억제하는 당업계에 공지된 다른 인공 CRISPR/Cas 시스템을 또한 생성할 수 있다.

- [0650] "TALEN" 또는 "TCR 및/또는 HLA에 대한 TALEN" 또는 "TCR 및/또는 HLA를 억제하는 TALEN"은 TCR 및/또는 HLA를 편집하는데 사용될 수 있는 인공 뉴클레아제인 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제를 지칭한다. TALEN은 TAL 이펙터 DNA 결합 도메인을 DNA 절단 도메인에 융합시킴으로써 인공적으로 생성된다. 전사 활성화제-유사 이펙터 (TALE)는 TCR 및/또는 HLA 유전자의 일부를 포함하여 임의의 원하는 DNA 서열에 결합하도록 조작될 수 있다. 조작된 TALE를 DNA 절단 도메인과 조합함으로써, TCR 및/또는 HLA 서열을 포함하는 임의의 원하는 DNA 서열에 특이적인 제한 효소가 생성될 수 있다. 그 후 이들은 세포 내로 도입되며, 여기서 이들은 게놈 편집에 사용될 수 있다 (Boch (2011) *Nature Biotech.* 29: 135-6; 및 Boch et al. (2009) *Science* 326: 1509-12; Moscou et al. (2009) *Science* 326: 3501).
- [0651] TALE는 크산토모나스 (*Xanthomonas*) 박테리아에 의해 분비되는 단백질이다. DNA 결합 도메인은 12번째 및 13번째 아미노산을 제외한 반복되고 고도로 보존된 33-34개 아미노산 서열을 함유한다. 이들 두 위치는 매우 가변적이어서, 특정 뉴클레오티드 인식과 강한 상관관계를 나타낸다. 따라서 이들은 원하는 DNA 서열에 결합하도록 조작될 수 있다. TALEN을 생성하기 위해, TALE 단백질은 뉴클레아제 (N)에 융합되며, 이것은 야생형 또는 돌연변이된 FokI 엔도뉴클레아제이다. TALEN에 사용하기 위해 FokI에 대한 몇 가지 돌연변이가 만들어졌다; 이들은, 예를 들면, 절단 특이성 또는 활성을 개선시킨다 (Cermak et al. (2011) *Nucl. Acids Res.* 39: e82; Miller et al. (2011) *Nature Biotech.* 29: 143-8; Hockemeyer et al. (2011) *Nature Biotech.* 29: 731-734; Wood et al. (2011) *Science* 333: 307; Doyon et al. (2010) *Nature Methods* 8: 74-79; Szczepek et al. (2007) *Nature Biotech.* 25: 786-793; and Guo et al. (2010) *J. Mol. Biol.* 200: 96). FokI 도메인은 이량체로서 기능하며, 적절한 배향 및 간격을 갖는 표적 게놈의 부위에 대해 독특한 DNA 결합 도메인을 갖는 두 개의 작제물을 필요로 한다. TALE DNA 결합 도메인과 FokI 절단 도메인 사이의 아미노산 잔기의 수 및 두 개의 개별 TALEN 결합 부위 사이의 염기의 수 둘 다가 높은 수준의 활성을 달성하기 위한 중요한 파라미터인 것으로 보인다 (Miller et al. (2011) *Nature Biotech.* 29: 143-8). TCR 및/또는 HLA TALEN은 이중-가닥 절단 (double-stranded break; DSB)을 생성하기 위해 세포 내부에서 사용될 수 있다. 복구 메커니즘이 비-상동 말단 결합을 통해 절단을 부적절하게 복구하는 경우, 절단 부위에 돌연변이가 도입될 수 있다. 예를 들면, 부적절한 복구는 해독틀 이동 돌연변이를 도입할 수 있다. 대안적으로, 외래 DNA는 TALEN과 함께 세포 내로 도입될 수 있으며; 외래 DNA의 서열 및 염색체 서열에 따라, 이 공정은 TCR 및/또는 HLA 유전자의 결합을 교정하거나 이러한 결합을 wt TCR 및/또는 HLA 유전자에 도입하여 TCR 및/또는 HLA의 발현을 감소시키는데 사용될 수 있다. TCR 및/또는 HLA의 서열에 특이적인 TALEN은 모듈식 성분을 사용하는 다양한 방식을 포함하여 당 업계에 공지된 임의의 방법을 사용하여 작제될 수 있다 (Zhang et al. (2011) *Nature Biotech.* 29: 149-53; Geibler et al. (2011) *PLoS ONE* 6: e19509).
- [0652] "ZFN" 또는 "아연 집게 뉴클레아제" 또는 "TCR 및/또는 HLA에 대한 ZFN" 또는 "TCR 및/또는 HLA를 억제하는 ZFN"은 TCR 및/또는 HLA 유전자를 편집하는데 사용될 수 있는 인공 뉴클레아제인 아연 집게 뉴클레아제를 지칭한다. TALEN과 같이, ZFN은 DNA-결합 도메인에 융합된 FokI 뉴클레아제 도메인 (또는 이의 유도체)을 포함한다. ZFN의 경우에, DNA-결합 도메인은 하나 이상의 아연 집게를 포함한다 (Carroll et al. (2011) *Genetics Society of America* 188: 773-782; and Kim et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 1156-1160). 아연 집게는 하나 이상의 아연 이온에 의해 안정화된 작은 단백질 구조 모티프이다. 아연 집게는, 예를 들면, Cys₂His₂를 포함할 수 있고, 대략 3-bp 서열을 인식할 수 있다. 공지된 특이성의 다양한 아연 집게를 조합하여 약 6, 9, 12, 15 또는 18-bp 서열을 인식하는 다중-집게 폴리펩티드를 생성할 수 있다. 파지 디스플레이, 효모 1-하이브리드 시스템, 박테리아 1-하이브리드 및 2-하이브리드 시스템, 및 포유동물 세포를 포함하는 특정 서열을 인식하는 아연 집게 (및 이들의 조합)를 생성하기 위해 다양한 선택 및 모듈식 조립 기술이 이용 가능하다.
- [0653] TALEN과 같이, ZFN은 이량체화되어 DNA를 절단해야 한다. 따라서, 한 쌍의 ZFN이 비-회문 DNA 부위를 표적으로 하는데 필요하다. 두 개의 개별 ZFN은 이들의 뉴클레아제가 적절히 이격된 상태로 DNA의 반대 가닥에 결합해야 한다 (Bitinaite et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 10570-5). 또한, TALEN과 같이, ZFN은 DNA에 이중-가닥 절단을 생성할 수 있으며, 이것은 부적절하게 복구되는 경우 해독틀-이동 돌연변이를 생성하여 세포에서 TCR 및/또는 HLA의 발현 및 양의 감소를 야기할 수 있다. ZFN은 또한 상동 재조합과 함께 사용되어 TCR 및/또는 HLA 유전자에 돌연변이를 만들 수 있다. TCR 및/또는 HLA의 서열에 특이적인 ZFN은 당 업계에 공지된 임의의 방법을 사용하여 작제될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Provani (2011) *Nature Med.* 18: 807-815; Torikai (2013) *Blood* 122: 1341-1349; Cathomen et al. (2008) *Mol. Ther.* 16: 1200-7; Quo et al. (2010) *J. Mol. Biol.* 400: 96; US2011/0158957; and US2012/0060230]을 참고한다.

- [0654] "메가뉴클레아제" 또는 "TCR 및/또는 HLA에 대한 메가뉴클레아제" 또는 "TCR 및/또는 HLA를 억제하는 메가뉴클레아제"는 TCR 및/또는 HLA 유전자를 편집하는데 사용될 수 있는 큰 (>14개 염기 쌍) 인식 부위를 갖는 단량체성 엔도뉴클레아제를 지칭한다. 메가뉴클레아제 (mn)는 박테리아 호밍 엔도뉴클레아제로부터 유래되고 독특한 표적 부위를 위해 조작된 선천적 뉴클레아제 활성을 갖는 단량체성 단백질이다. 호밍 엔도뉴클레아제는 이들의 숙주 게놈의 개별 유전자좌에서 이중 가닥 절단을 생성함으로써 부위-특이 유전자 전환 이벤트를 유도할 수 있는 DNA-절단 효소이다 (Stoddard, Structure. 2011 Jan 12; 19(1): 7-15). 작은 크기에도 불구하고, 호밍 엔도뉴클레아제는 긴 DNA 서열 (전형적으로 20 내지 30개 염기 쌍)을 인식한다. 호밍 엔도뉴클레아제는 매우 널리 퍼져 있으며, 미생물 뿐만 아니라 파지 및 바이러스에서도 발견된다. LAGLIDADG 및 His-Cys 박스 효소 (이들 효소 중 가장 서열-특이적임)는 이들의 DNA 표적 부위의 주요 홈에 도킹되는 역평행 β -시트에 의존한다 (Flick et al., 1998; Jurica et al., 1998). 그곳에서 이들은 다중 연속 염기쌍을 가로질러 불균일하게 분포되는 서열-특이적 및 비-특이적 접촉의 수집을 확립한다 (Chevalier et al., 2003; Scalley-Kim et al., 2007).
- [0655] LAGLIDADG 호밍 엔도뉴클레아제 (LHE) 계열은 유전자 표적화 용도에 사용되는 조작된 효소의 주요 공급원이다. LHE 계열은 주로 고세균 내에서 및 조류와 곰팡이의 염록체 및 미토콘드리아 게놈에서 암호화된다 (Chevalier et al., 2005; Dalgaard et al., 1997; Sethuraman et al., 2009). 단백질 쇠 당 단일 보존된 LAGLIDADG 모티프 (서열번호: 85)를 갖는 메가뉴클레아제는 회문 및 거의 회문 DNA 표적 서열을 절단하는 동종이량체 단백질을 형성하는 반면 단백질 쇠 당 두 개의 이러한 모티프를 함유하는 것은 완전 비대칭 DNA 서열을 표적화할 수 있는 더 큰 가짜-대칭형 단량체를 형성한다.
- [0656] 메가뉴클레아제는 TCR 및/또는 HLA를 표적화하도록 조작될 수 있고, 따라서 DNA에 이중-가닥 절단을 생성하며, 이것은 부적절하게 복구되는 경우 해독틀-이동 돌연변이를 생성하여 세포에서 TCR 및/또는 HLA의 발현 및 양의 감소를 초래할 수 있다.
- [0657] "MegaTAL" 또는 "TCR 및/또는 HLA에 대한 megaTAL" 또는 "TCR 및/또는 HLA를 억제하는 megaTAL"는 TCR 및/또는 HLA 유전자를 편집하는데 사용될 수 있는 인공 뉴클레아제를 지칭한다. MegaTAL은 LAGLIDADG 호밍 엔도뉴클레아제 계열로부터 유래된 메가뉴클레아제의 N-말단에의 최소 TAL (전자 활성화제-유사) 효과기 도메인의 융합을 통해 수득된 하이브리드 단량체성 뉴클레아제이다 (Nucleic Acids Res. 2014 Feb; 42(4): 2591-601; Takeuchi et al, Methods Mol Biol. 2015; 1239: 105-32. doi: 10.1007/978-1-4939-1862-1_6). 따라서 MegaTAL은 TAL 효과기 DNA 결합 도메인에 의해 제공되는 추가적인 친화성 및 특이성을 갖는 부위-특이 메가뉴클레아제 절단 헤드로 구성된다. MegaTAL은 TCR 및/또는 HLA를 표적화하도록 조작될 수 있고, 따라서 DNA에 이중-가닥 절단을 생성하며, 이것은 부적절하게 복구되는 경우 해독틀-이동 돌연변이를 생성하여 세포에서 HLA의 발현 및 양의 감소를 초래할 수 있다. I-OnuI 메가뉴클레아제 (mn)의 변이체를 사용하여 T-세포 수용체 알파 (TCR α) 유전자를 녹아웃시키도록 TCR α -megaTAL을 설계하였다. TCR α mn을 TCR α mn 결합 부위의 업스트림에 있는 DNA 서열에 결합하도록 설계된 10.5개 반복 TALE 어레이에 융합시켰다. TCR α 를 표적화하는 megaTAL은 인간 일차 T-세포에서 검출 가능한 표적의 절단 없이 매우 높은 유전자 파괴를 달성하는 것으로 밝혀졌다 (Boissel et al, Nucleic Acids Res. 2014 Feb; 42(4): 2591-601).
- [0658] 임의의 특정 이론에 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 일부 실시양태에서, 치료적 T 세포는 T 세포의 단축된 텔로머로 인해 환자에서 단기 지속성을 가지며; 따라서, 텔로머라제 유전자로의 형질감염은 T 세포의 텔로머를 연장시키고 환자에서 T 세포의 지속성을 개선시킬 수 있다. 문헌 [Carl June, "Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic", Journal of Clinical Investigation, 117: 1466-1476 (2007)]을 참고한다. 따라서, 하나의 실시양태에서, 본 발명의 유전자 변형된 면역 세포는 텔로머라제 서브유닛, 예를 들어, 텔로머라제의 촉매적 서브유닛, 예를 들어, TERT, 예를 들어, hTERT를 이소성으로 발현한다. 일부 측면에서, 본 개시내용은 면역 세포를 텔로머라제 서브유닛, 예를 들어, 텔로머라제의 촉매적 서브유닛, 예를 들어, TERT, 예를 들어, hTERT를 암호화하는 핵산과 접촉시킴을 포함하여 CAR-발현 면역 세포를 생성하는 방법을 제공한다. 세포는 CAR을 암호화하는 작제물과 접촉하기 전에, 접촉과 동시에 또는 접촉한 후에 핵산과 접촉될 수 있다.
- [0659] 본 발명의 또 다른 목적은 적어도 하나의 본 발명의 면역 세포 또는 집단을 포함하거나, 이들로 구성되거나, 이들로 본질적으로 구성된 조성물이다.
- [0660] 하나의 실시양태에서, 상기 조성물은 적어도 하나의 본 발명의 단리된 및/또는 실질적으로 정제된 면역 세포 집단을 포함하거나, 이들로 구성되거나, 이들로 본질적으로 구성된다.

- [0661] 하나의 실시양태에서, 상기 조성물은 동결 및 해동되었다.
- [0662] 본 발명의 또 다른 목적은 상기한 바와 같은 적어도 하나의 면역 세포 또는 집단 및 적어도 하나의 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하거나, 이들로 구성되거나, 이들로 본질적으로 구성된 약제학적 조성물이다.
- [0663] 본 발명의 또 다른 목적은 상기한 바와 같은 적어도 하나의 면역 세포 집단을 포함하거나, 이들로 구성되거나, 이들로 본질적으로 구성된 약제이다.
- [0664] 하나의 실시양태에서, 약제학적 조성물 또는 약제는 본 발명의 단리된 및/또는 실질적으로 정제된 면역 세포 집단을 포함한다.
- [0665] 본원에서 사용되는 바와 같이, 약제학적 조성물 또는 약제와 관련하여 용어 "본질적으로 구성된"은 적어도 하나의 본 발명의 면역 세포 또는 집단이 상기 약제학적 조성물 또는 약제 내에서 유일한 치료제 또는 생물학적 활성을 갖는 제제임을 의미한다.
- [0666] 이러한 조성물 및 약제는 중성 완충 염수, 인산염 완충 염수 등과 같은 완충제; 글루코스, 만노스, 수크로스 또는 텍스트란, 만니톨과 같은 탄수화물; 단백질; 글리신과 같은 폴리펩티드 또는 아미노산; 산화방지제; EDTA 또는 글루타티온과 같은 킬레이트제; 보조제 (예를 들어, 수산화알루미늄); 및 보존제를 포함할 수 있다.
- [0667] 조성물의 투여는 에어로졸 흡입, 주사, 섭취, 수혈, 이식 (implantation) 또는 이식 (transplantation)을 포함한 임의의 편리한 방식으로 수행될 수 있다. 본원에 기술된 조성물은 동맥, 피하, 피내, 종양내, 결절내, 골수내, 근육내, 정맥내 (i.v.) 주사, 또는 복강 내로 환자에게 투여될 수 있다. 하나의 측면에서, 본 발명의 면역 세포 조성물은 피내 또는 피하 주사에 의해 환자에게 투여된다.
- [0668] 하나의 실시양태에서, 적어도 하나의 본 발명의 면역 세포 또는 집단은 i.v. 주사에 의해 투여된다.
- [0669] 따라서 본 발명의 조성물은, 하나의 실시양태에서, 정맥내 투여용으로 제형화된다.
- [0670] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 조작된 면역 세포는 상기 면역 세포를 특정 면역 또는 염증 반응 부위로 동원하고 면역 세포를 활성화시켜 이들 부위에서 면역 효과기 세포의 면역 활성을 억제하는 수단으로서 사용될 수 있다. 따라서 면역 세포의 CAR-매개된 동원 및 활성화는 이러한 면역 억제 활성이 유리한 다수의 면역학적 질환 또는 장애를 예방 또는 치료하는 방법을 제공할 수 있다.
- [0671] 하나의 실시양태에서, 면역 세포는 바람직하게는 조절 T 세포, CD4⁺ 조절 T 세포, CD8⁺ 조절 T 세포, 조절 γ δ T 세포, 조절 DN T cell, 조절 B 세포, 조절 NK 세포, 조절 대식세포, 조절 수지상 세포, 및 이들의 임의의 조합을 포함하는 그룹으로부터 선택된 상기한 바와 같은 조절 면역 세포이다.
- [0672] 하나의 실시양태에서, 면역 세포는 조절 T 세포이다. 조절 T 세포의 활성화는 항원-의존적이지만, 이들 세포의 억제 작용은 항원-, TCR-, 및 MHC-비의존적이다. 따라서, 조절 T 세포에서 CAR의 발현은 이들이 항원-특이적 방식으로 활성화되도록 이들 세포 및 이들의 활성화를 적절한 표적 조직에 재지시한다; 그러나, 이들의 억제 효과는 질환-관련-항원의 추가 인식을 필요로 하지 않으면서 일어난다. 따라서, 조절 T 세포가 면역 효과기 세포가 위치하고 이들의 바람직하지 않은 효과를 매개하는 정확한 부근에 있는 한, 재지시된 조절 T 세포는 그 위치에서 유발되거나 활성화되어 이들의 억제 효과를 제공할 수 있다.
- [0673] 하나의 실시양태에서, 표적 HLA-A2 항원은 면역 효과기 세포에 의해 매개되는 바람직하지 않은 면역 또는 염증 반응의 부위 또는 표적 조직에 존재하거나 발현될 수 있다.
- [0674] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포는 장기 또는 조직 이식과 관련된 하나 이상의 질환, 장애, 증상 또는 병태 (예를 들어, 장기 또는 조직 거부/기능장애, GVHD, 및/또는 이와 관련된 병태)의 치료에 사용될 수 있다. 이식 거부는 면역 반응을 통한 수용자의 면역 세포에 의한 공여자의 이식된 조직의 파괴를 포함한다. 면역 반응은 GVHD에도 관여한다; 그러나, 이 경우, 수용자의 조직은 이식을 통해 수용자에게 전달된 공여자의 면역 세포에 의해 파괴된다. 따라서, 면역 세포의 CAR-매개된 재지시 및 활성화는 이식 수용자에서 면역 효과기 세포에 의한 불일치된 세포 및/또는 조직의 거부를 억제하거나 GVHD의 경우에 이식된 면역적격 세포의 병원성 작용을 억제하는 방법을 제공한다. 하나의 실시양태에서, 불일치된 세포 및/또는 조직은 HLA-A2 불일치된 세포 및/또는 조직을 포함한다.
- [0675] 따라서 본 발명의 또 다른 목적은 대상체에서 장기 또는 조직 이식과 관련된 하나 이상의 질환, 장애, 증상 또는 병태 (예를 들어, 장기 또는 조직 거부/기능장애, GVHD 및/또는 이와 관련된 병태)를 치료하는 방법이며, 여

기서 상기 방법은 대상체에게 본원에 기술된 바와 같은 CAR-조작된 면역 세포 또는 조성물을 투여함을 포함한다.

- [0676] 하나의 실시양태에서, 방법은 세포 치료 방법이다. 하나의 실시양태에서, 세포 요법은 자가조직성이다. 하나의 실시양태에서, 세포 요법은 이종조직성이다. 하나의 실시양태에서, 세포 요법은 동종이계이다. 하나의 실시양태에서, 방법은 유전자 치료 방법이다.
- [0677] 따라서, 본 발명의 또 다른 목적은 대상체에서 장기 또는 조직 이식과 관련된 하나 이상의 질환, 장애, 증상 또는 병태 (예를 들어, 장기 또는 조직 거부/기능장애, GVHD, 및/또는 이와 관련된 병태)를 치료하는데 사용하기 위한 본원에 기술된 바와 같은 CAR-조작된 면역 세포 또는 조성물이다.
- [0678] 본 발명의 CAR-변형된 면역 세포는 대상체에서, 특히 장기 또는 조직 이식 후 면역 관용 (immune tolerance), 작동 관용 (operational tolerance) 및/또는 면역 수용 (immune accommodation)을 촉진하기 위해 추가로 사용될 수 있다.
- [0679] 따라서, 본 발명의 또 다른 목적은 대상체에게 본원에 기술된 바와 같은 CAR-조작된 면역 세포 또는 억제학적 조성물을 투여함을 포함하여 대상체에서 면역 관용, 작동 관용 및/또는 면역 수용을 촉진하는 방법이다. 하나의 실시양태에서, 상기 방법은 대상체에서 이식된 장기 또는 조직에 대한 면역 관용, 작동 관용 및/또는 면역 수용을 촉진하기 위한 것일 수 있다.
- [0680] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포 (바람직하게는 CAR-조작된 Treg 세포)는 장기 또는 조직의 이식과 동시에, 이식 전에 또는 이식 후에 투여된다.
- [0681] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포 (바람직하게는 CAR-조작된 Treg 세포)는 이식된 장기 또는 조직의 거부를 예방 또는 치료하는데 사용될 수 있다. 이식된 장기 또는 조직의 거부의 예는 이식된 장기 또는 조직의 초급성 거부, 및 이식된 장기 또는 조직의 항체-매개된 거부를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0682] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 방법은 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포 (바람직하게는 CAR-조작된 Treg 세포)를 이식된 장기 또는 조직에 노출된 대상체에게 투여함을 포함한다.
- [0683] 하나의 실시양태에서, 이식된 장기 또는 조직은 골수 이식물, 장기 이식물, 수혈 또는 의도적으로 대상체에 도입된 임의의 다른 외래 조직 또는 세포를 포함할 수 있다.
- [0684] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포 (바람직하게는 CAR-조작된 Treg 세포)는 이식 후 동종 이식편 거부 또는 이종 이식편 거부를 제한함이 없이 포함하는 이식편 거부를 억제하기 위한 요법으로서 사용될 수 있다.
- [0685] 본 발명의 또 다른 목적은 대상체에게 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포 (바람직하게는 CAR-조작된 Treg 세포) 또는 상기 면역 세포를 포함하는 억제학적 조성물을 투여함을 포함하여, 대상체에서 장기 또는 조직 이식 거부를 예방 또는 치료하는 방법이다.
- [0686] 따라서 본 발명의 또 다른 목적은 대상체에서 장기 또는 조직 이식 거부를 예방 또는 치료하는데 사용하기 위한, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포 (바람직하게는 CAR-조작된 Treg 세포) 또는 상기 면역 세포를 포함하는 억제학적 조성물이다.
- [0687] 본 발명의 또 다른 목적은 대상체에게 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포 (바람직하게는 CAR-조작된 Treg 세포) 또는 이를 포함하는 억제학적 조성물을 투여함을 포함하여, 대상체에서 이식편 생존 기간을 증가시키는 방법이다.
- [0688] 하나의 실시양태에서, 상기 방법은 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 1년, 2년, 3년, 4년, 5년, 6년, 7년, 8년, 9년, 10년, 20년, 30년, 40년, 50년, 60년, 70년, 80년, 90년, 100년 또는 대상체의 일생의 이식편 생존 기간을 제공한다.
- [0689] 하나의 실시양태에서, 대상체는 어떠한 면역억제제 요법도 받지 않고 있다.
- [0690] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 면역 세포 또는 조성물의 투여는 대상체에 의해 수용된 면역억제제 요법의 양을 감소시키게 한다.
- [0691] 하나의 실시양태에서, 이식편은 동종 이식편이다. 하나의 실시양태에서, 이식물은 수용자에게 이식물을 이식함과 동시에, 이식하기 전 또는 이식한 후에 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포 (바람직하게는 CAR-조작된 Treg 세

포)에 노출될 수 있다. 하나의 실시양태에서, 장기 또는 조직 이식물은 심장, 심장 판막, 폐, 신장, 간, 췌장, 장, 피부, 혈관, 골수, 줄기세포, 뼈 또는 섬 세포일 수 있다. 그러나, 본 발명은 특정 유형의 이식에 제한되지 않는다.

- [0692] 하나의 실시양태에서, 공여자 이식물은 수용자에 대한 이식물의 면역원성을 감소시킴으로써 이식편 거부를 감소 또는 예방하기 위해 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포를 사용하여 이식 전에 장기 또는 조직 이식을 치료함으로써 "사전컨디셔닝" 또는 "전처리"될 수 있다.
- [0693] 하나의 실시양태에서, 이식물 숙주 또는 수용자는 HLA-A2 음성이다. 하나의 실시양태에서, 이식물 숙주 또는 수용자는 HLA-A2 음성이고 HLA-A03, HLA-A11, HLA-A23, HLA-A25, HLA-A26, HLA-A29, HLA-A30, HLA-A31, HLA-A33, 및 HLA-A34로 이루어진 그룹으로부터 선택된 HLA-A 아형에 대해 양성이다. 하나의 실시양태에서, 이식물 숙주 또는 수용자는 HLA-A2 음성이고 HLA-A25, HLA-A29 및 HLA-A30으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 HLA-A 아형에 대해 양성이다.
- [0694] 하나의 실시양태에서, 이식물은 HLA-A2 양성이다.
- [0695] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포 (바람직하게는 CAR-조작된 Treg 세포)는 이식편대숙주질환 (GVHD)을 예방 또는 치료하는데 사용될 수 있다. 하나의 실시양태에서, 상기 방법은 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포 (바람직하게는 CAR-조작된 Treg 세포)를 이식된 장기 또는 조직에 노출된 대상체에게 투여함을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 이식된 장기 또는 조직은 골수 이식물, 기관 이식물, 수혈, 또는 대상체에게 의도적으로 도입된 임의의 다른 외래 조직 또는 세포를 포함할 수 있다. 예를 들면, GVHD는 심장, 심장 판막, 폐, 신장, 간, 췌장, 장, 피부, 혈관, 골수, 줄기세포, 뼈 또는 섬 세포 이식 후에 일어날 수 있다. 그러나, 본 발명은 특정 유형의 이식에 제한되지 않는다.
- [0696] 하나의 실시양태에서, GVHD는 조절 줄기세포 이식 후 일어날 수 있다.
- [0697] 따라서, 본 발명의 또 다른 목적은 대상체에게 본원에 기술된 바와 같은 CAR-조작된 면역 세포 (바람직하게는 CAR-조작된 Treg 세포)를 투여함을 포함하여, 대상체에서 이식편대숙주질환 (GVHD)을 예방 또는 치료하는 방법이다.
- [0698] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 공여자 이식물, 예를 들면, 생체적합성 격자 또는 공여자 조직, 장기 또는 세포를 이식물을 수용자에게 이식함과 동시에, 이식하기 전에, 또는 이식한 후에 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포 (바람직하게는 CAR-조작된 Treg 세포)와 접촉시키는 방법을 제공한다.
- [0699] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포 (바람직하게는 CAR-조작된 Treg 세포)는 수용자에 대한 공여자 이식물에 의한 부작용을 개선, 억제 또는 감소시킴으로써 GVHD를 예방 또는 치료하는데 사용될 수 있다.
- [0700] 따라서, 본 발명의 또 다른 목적은 대상체에게 본원에 기술된 바와 같은 CAR-조작된 면역 세포 (바람직하게는 CAR-조작된 Treg 세포) 또는 약제학적 조성물을 투여함을 포함하여, 대상체에서 GVHD의 개시를 예방 또는 지연시키는 방법이다.
- [0701] 하나의 실시양태에서, GVHD의 개시는 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 1년, 2년, 3년, 4년, 5년, 6년, 7년, 8년, 9년, 10년, 20년, 30년, 40년, 50년, 60년, 70년, 80년, 90년, 100년 또는 대상체의 일생 동안 지연된다.
- [0702] 하나의 실시양태에서, 대상체는 어떠한 면역억제제 요법도 받지 않고 있다.
- [0703] 하나의 실시양태에서, 대상체는 면역억제 요법을 받고 있다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 면역 세포는 치료학적 유효량의 상기 면역억제 요법을 감소시킬 목적으로 대상체에게 투여된다.
- [0704] 하나의 실시양태에서, GVHD는 급성 GVHD 또는 만성 GVHD일 수 있다.
- [0705] 하나의 실시양태에서, 공여자 이식물은 수용자에 대한 이식물의 면역원성을 감소시킴으로써 GVHD를 감소 또는 예방하기 위해 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포 (바람직하게는 CAR-조작된 Treg 세포)를 이용하여 수용자에게 이식 전에 이식물을 치료함으로써 "사전컨디셔닝" 또는 "전처리"될 수 있다. 하나의 실시양태에서, 이식물은 이식물과 관련된 수 있는 T 세포를 활성화시키기 위해 이식 전에 수용자로부터의 세포 또는 조직과 접촉될 수 있다. 수용자로부터의 세포 또는 조직으로 이식물을 치료한 후, 세포 또는 조직은 이식물로부터 제거될 수 있다. 그 후 치료된 이식물은 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포 (바람직하게는 CAR-조작된 Treg 세포)와 추가로 접촉되어, 수용자로부터의 세포 또는 조직의 치료에 의해 활성화된 면역 효과기 세포의 활성을 감소, 억제 또는

제거할 수 있다. 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포 (바람직하게는 CAR-조작된 Treg 세포)를 사용한 이식물의 이러한 치료 후, CAR-변형된 면역 세포는 수용자에게 이식하기 전에 이식물로부터 제거될 수 있다. 그러나, 일부 CAR-조작된 면역 세포 (예를 들어, CAR-조작된 Treg 세포)는 이식물에 부착될 수 있고, 따라서 이식물과 함께 수용자에게 도입될 수 있다. 이러한 상황에서, 수용자에게 도입된 CAR-조작된 면역 세포 (예를 들어, CAR-조작된 Treg 세포)는 이식물과 관련된 세포에 의해 야기된 수용자에 대한 면역 반응을 억제할 수 있다.

[0706] 하나의 실시양태에서, 이식물 숙주 또는 수용자는 HLA-A2 음성이다. 하나의 실시양태에서, 이식물 숙주 또는 수용자는 HLA-A2 음성이고 HLA-A03, HLA-A11, HLA-A23, HLA-A25, HLA-A26, HLA-A29, HLA-A30, HLA-A31, HLA-A33, 및 HLA-A34로 이루어진 그룹으로부터 선택된 HLA-A 아형에 대해 양성이다. 하나의 실시양태에서, 이식물 숙주 또는 수용자는 HLA-A2 음성이고 HLA-A25, HLA-A29 및 HLA-A30으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 HLA-A 아형에 대해 양성이다.

[0707] 하나의 실시양태에서, 이식물은 HLA-A2 양성이다.

[0708] 본 발명의 또 다른 목적은 대상체에서 면역 세포의 집단을 확장시키는 방법이며, 여기서 면역 세포는 본 발명에 따라 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하도록 변형되고, 상기 방법은 대상체에게 본원 어디에나 기술된 바와 같은 조작된 면역 세포를 투여함을 포함하며, 여기서 투여된 조작된 면역 세포는 대상체에서 자손 면역 세포의 집단을 생성한다.

[0709] 하나의 실시양태에서, 면역 세포는 바람직하게는 조절 T 세포, $CD4^+$ 조절 T 세포, $CD8^+$ 조절 T 세포, 조절 $\gamma \delta$ T 세포, 조절 DN T 세포, 조절 B 세포, 조절 NK 세포, 조절 대식세포, 조절 수지상 세포, 및 이들의 임의의 조합, 및 보다 바람직하게는 조절 T 세포를 포함하는 그룹으로부터 선택된 조절 면역 세포이다.

[0710] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR-조작된 Treg 세포는 생체내에서 복제됨으로써 표적화된 세포의 면역 반응의 지속적인 억제 및 면역 관용을 야기할 수 있는 장기 지속성을 초래할 수 있다.

[0711] 따라서, 본 발명의 또 다른 목적은 대상체에서 조절 T 세포의 지속적인 집단을 생성하는 방법이며, 여기서 조절 T 세포는 본 발명의 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하도록 변형되고, 상기 방법은 대상체에게 본원 어디에나 기술된 바와 같은 조절 T 세포를 투여함을 포함하고, 여기서 변형된 조절 T 세포의 지속적인 집단은 투여 후 적어도 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 30일, 40일, 50일, 60일, 70일, 80일, 90일, 100일, 200일, 300일, 400일, 500일, 600일, 700일, 800일, 900일, 또는 1000일 동안 대상체에서 지속된다.

[0712] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR-Treg 세포는 표적화된 세포의 면역 반응을 억제하기 위해 *생체내에서* 자가-재생 및 재활성화될 수 있다. 하나의 실시양태에서, CAR-Treg 세포는 표적화된 세포의 면역 반응을 억제하기 위해 재활성화될 수 있는 기억 CAR-Treg 세포일 수 있다.

[0713] 면역 세포는 임의의 공급원으로부터 취득될 수 있다. 예를 들면, 하나의 실시양태에서, 면역 세포는 본 발명의 CAR-변형된 면역 세포의 생성을 위해 조직 공여자, 이식물 수용자 또는 다른 비관련 공급원 (전적으로 다른 개체 또는 종)으로부터 취득될 수 있다. 따라서, 본 발명의 CAR-변형된 면역 세포는 이식물 수용자 또는 다른 비관련 공급원에 대해 자가조직, 동종이계 또는 이종이계일 수 있다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR-Treg 세포는 이식물 수용자에 대해 자가조직, 동종이계 또는 이종이계일 수 있다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR-Treg 세포는 이식물 수용자에 대해 자가조직성일 수 있다.

[0714] 하나의 실시양태에서, 대상체는 포유동물일 수 있다. 하나의 실시양태에서, 대상체는 인간일 수 있다.

[0715] 하나의 실시양태에서, 활성화된 T 세포를 대상체에게 투여한 다음 혈액을 다시 채취하고(또는 분리반출법을 수행하고), 본 발명에 따라 이로부터 T 세포를 활성화시키고, 이러한 활성화되고 확장된 T 세포를 대상체에 재주입하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 공정은 몇 주마다 다수회 수행될 수 있다. 특정 실시양태에서, T 세포는 10 cc 내지 400 cc의 혈액 채취물로부터 활성화될 수 있다. 특정 실시양태에서, T 세포는 20 cc, 30 cc, 40 cc, 50 cc, 60 cc, 70 cc, 80 cc, 90 cc, 또는 100 cc의 혈액 채취물로부터 활성화된다. 이론에 결부됨이 없이, 이러한 다중 혈액 채취/다중 재주입 프로토콜을 사용하는 것은 T 세포의 특정 집단을 선택하는 역할을 할 수 있다.

[0716] 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포는 단독으로 투여되거나 희석제 및/또는 IL-2 또는 다른 사이토카인 또는 세포 집단을 제한함이 없이 포함하는 다른 성분과 조합하여 약제학적 조성물로서 투여될 수 있다.

- [0717] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 하나 이상의 약제학적 또는 생리학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 함께 본원 어디에나 기술된 바와 같은 CAR-조작된 면역 세포 또는 세포 집단을 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 중성 완충 염수, 인산염 완충 염수 등과 같은 완충제; 글루코스, 만노스, 수크로스 또는 텍스트란, 만니톨과 같은 탄수화물; 단백질; 글리신과 같은 폴리펩티드 또는 아미노산; 산화방지제; EDTA 또는 글루타티온과 같은 킬레이트제; 보조제 (예를 들어, 수산화알루미늄); 및 보존제를 포함할 수 있다.
- [0718] 본 발명의 약제학적 조성물은 에어로졸 흡입, 주사, 섭취, 수혈, 이식(implantation) 또는 이식(transplantation)을 포함한 임의의 적합한 방식으로 대상체에게 투여될 수 있다. 본원 어디에나 기술된 약제학적 조성물은 비경구 투여에 의해 대상체에게 투여될 수 있다. 본원 어디에나 기술된 약제학적 조성물은 피하, 피내, 종양내, 결절내, 골수내, 근육내, 흉골내, 정맥내 (i.v.) 주사에 의해, 주입 기술에 의해 또는 복강내로 대상체에게 투여될 수 있다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR-변형된 면역 세포 조성물은 피내 또는 피하 주사에 의해 대상체에게 투여될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 CAR-변형된 면역 세포 조성물은 i.v. 주사에 의해 투여될 수 있다. 하나의 실시양태에서, CAR-변형된 면역 세포의 조성물은 림프절, 감염 부위, 염증 부위, 또는 조직 또는 장기 거부 부위에 직접 주사될 수 있다.
- [0719] 본 발명의 약제학적 조성물은 예방 또는 치료하고자 하는 질환에 적절한 방식으로 투여될 수 있다. 투여 양 및 빈도는 대상체의 상태, 및 대상체 질환의 유형 및 중증도와 같은 인자에 의해 결정될 것이지만, 적절한 투여량은 임상 시험에 의해 결정될 수 있다.
- [0720] "유효량" 또는 "치료량"이 지시될 때, 투여하고자 하는 본 발명의 조성물의 정확한 양은 연령, 체중, 항체 역가, 및 대상체의 상태에 있어서의 개인차를 고려하여 결정될 수 있다. 본원 어디에나 기술된 바와 같은 CAR-조작된 면역 세포를 포함하는 약제학적 조성물은 해당 범위 내의 모든 정수 값을 포함하여 1×10^4 내지 1×10^9 개 세포/kg 체중 또는 1×10^5 내지 100×10^5 개 세포/kg의 투여량으로 투여될 수 있다고 일반적으로 언급될 수 있다. CAR-조작된 면역 세포 조성물은 또한 이러한 투여량으로 다수회 투여될 수 있다. CAR-조작된 면역 세포는 면역요법에서 일반적으로 알려진 주입 기술을 사용함으로써 투여될 수 있다. 특정 대상체에 대한 최적 투여량 및 치료 섭생은 질환의 징후에 대해 대상체를 모니터링하고 그에 따라 치료를 조정함으로써 용이하게 결정될 수 있다.
- [0721] 하나의 실시양태에서, 적어도 하나의 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포는 다른 활성제와 병용하여 이를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 하나의 실시양태에 따르면, 적어도 하나의 면역 세포 집단은 다른 활성제의 투여 전, 투여와 동시에 또는 투여 후에 투여된다.
- [0722] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포는 항바이러스 요법, 화학요법, 방사선, 면역억제제, 항체, 면역억제제 (immunoablative agent), 사이토카인 및 조사와 같은 제제로의 치료를 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 수의 관련 치료 양식과 함께 (예를 들어, 전에, 동시에 또는 후에) 대상체에게 투여될 수 있다.
- [0723] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포는 면역억제제와 함께 투여될 수 있다. 당업계에 공지된 임의의 면역억제제가 사용될 수 있다.
- [0724] 면역억제제의 예는 칼시뉴린 억제제, 예를 들어 사이클로스포린, 타크롤리무스, 아자티오프린, 메토포렉세이트, 메톡살렌, 라파마이신, 미코페놀레이트 모페틸, 미코페놀산, 미코페놀레이트 나트륨, 6-머캅토포린, 6-티오구아닌, 리톡시맙, mTOR 억제제, 예를 들어 시롤리무스, 에베롤리무스, 바실릭시맙, 다클리주맙, 벨라타셉트, 알렘투주맙, 무로모나브-CD3, 항-흉선세포 글로불린, 글루코코르티코스테로이드, 또는 부신피질 스테로이드, 예를 들어 프레드니손 및 프레드니솔론, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0725] 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포는 면역억제제 전에, 후에, 또는 수반하여 대상체에게 투여될 수 있다.
- [0726] 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포 및/또는 면역억제제는 이식 후 대상체에게 투여될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포 및/또는 면역억제제는 이식 전에 대상체에게 투여될 수 있다. 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포 및/또는 면역억제제는 이식 수술 동안 대상체에게 투여될 수 있다.
- [0727] 하나의 실시양태에서, CAR-조작된 면역 세포를 대상체에게 투여하는 본 발명의 방법은 일단 면역억제 요법이 개시되면 수행된다.
- [0728] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 이식물 수용자를 시간 경과에 따라 모니터링하기 위해 1회 이상, 및 적용 가능한 경우에, 다른 면역억제 요법 섭생으로 수행된다.

- [0729] 일부 실시양태에서, 이식물 수용자가 이식물에 내성이 있는 것으로 예측되면 면역억제 요법은 감소된다. 일부 실시양태에서, 이식물 수용자가 이식에 대해 내성이 있는 것으로 예측되면 어떠한 면역억제 요법도 처방되지 않으며, 예를 들어 면역억제 요법은 중단된다.
- [0730] 따라서, 본 발명은 추가로 제1 부분에 본 발명의 면역 세포 또는 면역 세포 집단을 포함하고, 제2 부분에 항바 이러스 요법, 화학요법, 방사선, 면역억제제, 항체, 면역제거제, 사이토카인 및 조사를 제한함이 없이 포함하는 다른 활성제를 포함하는 부분 키트에 관한 것이다. 바람직하게는, 본 발명의 부분 키트는 제1 부분에 본 발명의 면역 세포 또는 면역 세포 집단, 및 제2 부분에 하나 이상의 면역억제제를 포함한다.
- [0731] 하나의 실시양태에서, 부분 키트는 본 발명의 세포를 제조하기 위한 하나 이상의 시약 (예를 들어, 본 개시내용의 항-HLA-A 항체 또는 CAR을 암호화하는 핵산 또는 발현 벡터)을 포함한다.
- [0732] 본 발명의 키트에 존재할 수 있는 면역억제제의 예는 칼시뉴린 억제제, 예를 들어 사이클로스포린, 타크롤리무스, 아자티오프린, 메토트렉세이트, 메톡살렌, 라파마이신, 미코페놀레이트 모페틸, 미코페놀산, 미코페놀레이트 나트륨, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 리툭시맵, mTOR 억제제, 예를 들어 시롤리무스, 에베롤리무스, 바실릭 시맵, 다클리주맵, 벨라타셉트, 알렘투주맵, 무로모나브-CD3, 항-흉선세포 글로불린, 글루코코르티코스테로이드, 또는 부신피질 스테로이드, 예를 들어 프레드니손 및 프레드니솔론, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0733] 본 발명의 또 다른 목적은 대상체에게 (i) 적어도 하나의 면역억제제 및 (ii) 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포 (바람직하게는 CAR-조작된 Treg 세포), 또는 상기 면역 세포를 포함하는 약제학적 조성물을 투여함을 포함하여, 대상체에서 장기 또는 조직 이식 거부를 예방 또는 치료하는 방법이다.
- [0734] 따라서, 본 발명의 또 다른 목적은 대상체에서 장기 또는 조직 이식 거부를 예방 또는 치료하는데 사용하기 위한, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포 (바람직하게는 CAR-조작된 Treg 세포), 또는 상기 면역 세포를 포함하는 약제학적 조성물, 및 적어도 하나의 면역억제제의 조합물이다.
- [0735] 본 발명의 또 다른 목적은 대상체에게 적어도 하나의 면역억제제 및 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포 (바람직하게는 CAR-조작된 Treg 세포), 또는 이를 포함하는 약제학적 조성물을 투여함을 포함하여, 대상체에서 이식편 생존 기간을 증가시키는 방법이다.
- [0736] 하나의 실시양태에서, 적어도 하나의 면역억제제와 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포 (바람직하게는 CAR-조작된 Treg 세포)의 조합물은 이식편대숙주질환 (GVHD)을 예방 또는 치료하는데 사용된다.
- [0737] 하나의 실시양태에서, GVHD는 조혈 줄기세포 이식 후 일어날 수 있다.
- [0738] 따라서, 본 발명의 또 다른 목적은 대상체에게 적어도 하나의 면역억제제 및 본원에 기술된 바와 같은 CAR-조작된 면역 세포 (바람직하게는 CAR-조작된 Treg 세포) 또는 약제학적 조성물을 투여함을 포함하여, 대상체에서 이식편대숙주질환 (GVHD)을 예방 또는 치료하는 방법이다.
- [0739] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 공여자 이식물, 예를 들면, 생체적합성 격자 또는 공여자 조직, 장기 또는 세포를 이식물을 수용자에게 이식함과 동시에, 이식하기 전, 또는 이식한 후 적어도 하나의 면역억제제 및 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포 (바람직하게는 CAR-조작된 Treg 세포)와 접촉시키는 방법을 제공한다.
- [0740] 하나의 실시양태에서, 적어도 하나의 면역억제제와 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포 (바람직하게는 CAR-조작된 Treg 세포)의 조합물은 수용자에 대한 공여자 이식물에 의한 부작용을 개선, 억제 또는 감소시킴으로써 GVHD를 예방 또는 치료하는데 사용될 수 있다.
- [0741] 따라서, 본 발명의 또 다른 목적은 대상체에게 적어도 하나의 면역억제제 및 본원에 기술된 바와 같은 CAR-조작된 면역 세포 (바람직하게는 CAR-조작된 Treg 세포)를 투여함을 포함하여, 대상체에서 GVHD를 예방하거나 개시를 지연시키는 방법이다.
- [0742] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포 및 적어도 하나의 면역억제제는 동시에 또는 순차적으로 투여된다.
- [0743] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포, 및 임의로 적어도 하나의 다른 활성제, 바람직하게는 면역억제제는 이식과 함께 (예를 들어, 전에, 동시에 또는 후에) 투여된다.
- [0744] 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포는 이식물 장기 또는 조직 거부의 진단 후에 투여된 다음 장기 또는 조직 거부

의 증상이 진정될 때까지 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포 및 면역억제제 둘 다의 용량이 투여될 수 있다.

- [0745] 추가의 실시양태에서, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포 조성물은 골수 이식과 함께 (예를 들어, 전에, 동시에 또는 후에) 대상체에게 투여될 수 있다.
- [0746] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포는 CD20과 반응하는 제제, 예를 들어, 리툽시맙과 같은 B-세포 절제 요법 후에 투여될 수 있다. 예를 들면, 하나의 실시양태에서, 대상체는 고용량 화학요법에 이은 말초 혈액 줄기세포 이식을 갖는 표준 치료를 받을 수 있다. 특정 실시양태에서, 이식 후에, 대상체는 본 발명의 확장된 CAR-조작된 면역 세포의 주입을 받을 수 있다. 추가의 실시양태에서, 확장된 CAR-조작된 면역 세포는 수술 전 또는 후에 투여될 수 있다.
- [0747] 하나의 실시양태에서, 대상체 (예를 들어, 인간)는 본 발명의 적어도 하나의 면역 세포 또는 집단의 초기 투여, 및 하나 이상의 후속 투여를 받으며, 여기서 하나 이상의 후속 투여는 이전 투여 후 15일 미만, 예를 들어, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 또는 2일에 투여된다.
- [0748] 하나의 실시양태에서, 치료학적 유효량의 본 발명의 면역 세포가 대상체에게 투여되거나 투여될 것이다.
- [0749] 하나의 실시양태에서, 대상체에게 투여되는 적어도 하나의 본 발명의 면역 세포 집단의 면역 세포의 양은 적어도 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 또는 10^9 개 세포이다.
- [0750] 하나의 실시양태에서, 대상체에게 투여되는 본 발명의 면역 세포의 양은 약 10^2 내지 약 10^9 , 약 10^3 내지 약 10^8 , 약 10^4 내지 약 10^7 , 또는 약 10^5 내지 약 10^6 개 세포의 범위이다.
- [0751] 또 다른 실시양태에서, 대상체에게 투여되는 본 발명의 면역 세포의 양은 약 10^6 내지 약 10^9 , 약 10^6 내지 10^7 , 약 10^6 내지 10^8 , 약 10^7 내지 10^9 , 약 10^7 내지 10^8 , 약 10^8 내지 10^9 개의 범위이다. 또 다른 실시양태에서 대상체에게 투여되는 본 발명의 면역 세포의 양은 약 10^6 , 약 10^7 , 약 10^8 , 또는 약 10^9 개이다.
- [0752] 하나의 실시양태에서, 대상체에게 투여되는 적어도 하나의 본 발명의 면역 세포 집단의 면역 세포의 양은 적어도 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 또는 10^9 개 세포/kg 체중이다.
- [0753] 하나의 실시양태에서, 대상체에게 투여되는 본 발명의 면역 세포의 양은 이들 범위 내의 모든 정수 값을 포함하여 약 10^4 내지 10^9 개 세포/kg 체중 또는 10^5 내지 10^8 개 세포/kg 체중의 범위이다.
- [0754] 하나의 실시양태에서, 적어도 하나의 본 발명의 면역 세포 또는 집단의 1회 이상의 투여가 주당 대상체 (예를 들어, 인간)에게 투여되며, 예를 들어, 본 발명의 유전자 변형된 면역 세포 또는 집단의 2, 3, 또는 4회 투여가 주당 투여된다.
- [0755] 본 발명의 또 다른 목적은 이식 거부 또는 GVHD의 예방 및/또는 치료에 유용한 물질을 함유하는 제조 물품이다.
- [0756] 제조 물품은 용기, 및 용기 상에 또는 용기와 관련된 라벨 또는 포장 삽입물을 포함할 수 있다. 적합한 용기는, 예를 들면, 병, 바이알, 주사기 등을 포함한다. 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 물질로부터 형성될 수 있다. 용기는 이식 거부 또는 GVHD와 같은 면역학적 병태를 예방 및/또는 치료하는데 효과적인 조성물을 보유하고, 멸균 접근 포트를 가질 수 있다 (예를 들면 용기는 정맥내 용액 백 또는 피하 주사 바늘에 의해 관통될 수 있는 마개를 갖는 바이알일 수 있다). 조성물 중의 적어도 하나의 활성제는 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포, 바람직하게는 CAR-조작된 Treg이다.
- [0757] 라벨 또는 포장 삽입물은 조성물이 이식 거부 또는 GVHD를 예방 또는 치료하는데 사용된다는 것을 나타낼 수 있다.
- [0758] 제조 물품, 라벨 또는 포장 삽입물은 CAR-조작된 면역 세포 조성물을 환자에게 투여하기 위한 지침 자료 (instructional material)를 추가로 포함할 수 있다. 추가로, 제조 물품은 약제학적으로 허용되는 완충제, 예를 들면, 정균 주사용수 (BWF1), 인산염-완충 염수, 링거액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2 용기를 추가로 포함할 수 있다. 이것은 다른 완충제, 희석제, 충전제, 바늘 및 주사기를 포함하여 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질을 추가로 포함할 수 있다.
- [0759] 다양한 목적 (예를 들어, 이식 거부 또는 GVHD 예방 또는 치료)에 유용한 키트가 또한 제공된다. CAR-조작된 면역 세포를 함유하는 키트가 제공될 수 있다. 제조 물품과 마찬가지로, 키트는 용기, 및 용기 상에 또는 용기

와 관련된 라벨 또는 포장 삽입물을 포함할 수 있다. 용기는 적어도 하나의 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포, 바람직하게는 CAR-조작된 Treg를 포함하는 조성물을 보유한다. 예를 들어, 희석제 및 완충제를 함유하는 추가 용기가 포함될 수 있다. 라벨 또는 포장 삽입물은 조성물에 대한 설명 및 사용 목적에 대한 지침을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0760] **도 1**은 본 발명의 항-HLA-A2 CAR 작제물과 일반적인 HLA-A 및 HLA-B 대립유전자 변이체의 교차-반응성을 보여주는 그래프의 조합이다. 본 발명의 CAR 작제물 (또는 유린 항-HLA-A2 CAR 작제물)을 발현하는 GFP⁺ Treg 세포를 플로우 패널 반응성 단일 항원 비드 및 고정 가능한 생존력 염료와 함께 실온에서 30분 동안 배양하였다. 그 후 샘플을 세척하고, 고정하고, 유세포 분석을 통해 분석하였다. 방법에 기술된 바와 같이 데이터를 분석하였다. A 및 B의 데이터는 세포측정기에 의해 수집된 HLA 음성 비드의 수에 대해 정규화된 GFP만을 발현하는 대조군 Treg 세포와 비교한 결합 퍼센트를 보여준다. 선 위의 데이터 포인트는 비드-단독 대조군의 평균으로부터 2 이상의 표준 편차인 값을 나타내며, 따라서 통계적으로 유의하다 (p < 0.05). 데이터는 두 개의 독립적인 실험의 평균이다. 평균 ± SEM.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0761] **실시에**

[0762] 본 발명은 하기 실시예에 의해 추가로 예시된다.

[0763] **실시예 1:**

[0764] **재료 및 방법**

[0765] **인간화 HLA-A2-특이 scFv의 생성.** HLA-A2 특이 scFv에 대한 서열은 특허 출원 제US2013/0078243 A1호에 개시된 서열로부터 유래되었다. 인간화 scFv를 암호화하는 코돈 최적화된 유전자 서열은 공급업체에 의해 제공된 코돈 최적화 알고리즘을 사용하여 GeneArt, Life Technologies (Regensburg)에 의해 "문자열"로 합성되었다. ScFv에는 Kozak 서열 및 CD8-신호 서열이 N-말단에서 측면에 위치하였다. 작제물에는 자가-불활성화, 렌티바이러스 CAR-발현 플라스미드의 CD8-힌지 영역으로의 프레임 클로닝을 가능하게 하는 BamHI 및 MfeI 제한 부위가 추가로 측면에 위치하였다. PGK-프로모터 유도된 CAR-발현 플라스미드는 인간 CD8 힌지 및 CD8 막횡단 도메인에 이어 인간 CD3 ζ 에 융합된 세포내 인간 41BB 공동자극 도메인을 함유하였다. CAR-서열 후 EGFP 리포터 단백질을 세포에서 유전자 전달의 검출을 위해 자가-절단 가능한 2A-부위를 통해 프레임에서 연결시켰다.

[0766] **HLA-A2-CAR의 생성.** 바이러스 벡터는 3세대 포장 플라스미드 (Trono lab, EPFL (*Ecole polytechnique federale de Lausanne*))를 사용하여 HEK 293T 세포에서 폴리에틸렌이민 기반 일시적 형질감염에 의해 생성하였다.

[0767] **Jurkat NFAT.** Jurkat-Lucia NFAT-리포터 세포주를 10% 태아 송아지 혈청이 보충된 RPMI (Gibco, Life Technologies)에서 배양하였다. 다중 벡터 통합을 피하기 위해 형질 30-50%의 형질도입을 달성하도록 상이한 농도의 바이러스 벡터에서 배양을 사용하여 세포를 형질도입하였다. 정확하게 접힌 CAR의 발현 및 표시는 APC-접합된 HLA-A2-다량체에 결합함으로써 입증되었다 (Dextramer, WB2666, Immudex; Copenhagen, Denmark). CAR을 통한 활성화는 HLA-A2 양성 또는 HLA-A2 음성 세포주와 HLA-A2-특이 CAR의 공동배양에 의해 달성되었다. 배지에서의 NFAT-활성화 의존성 루시페라제 분비는 QUANTI-Luc 기질 (Invivogen)을 사용하여 발광 측정기 (Glowmax, Promega)에서 분석하였다.

[0768] **Treg 분류, 형질도입, 및 확장.** CD4⁺ T 세포를 RosetteSep (Stemcell)를 통해 HLA-A2-공여자로부터 분리하고, FACSria II (BD Biosciences)를 사용하여 살아있는 CD4⁺CD127^{lo}CD25^{hi} Treg를 분류하기 전에 CD25⁺ 세포 (Miltenyi)를 풍부화하였다. 분류된 Treg를 1000U/ml의 IL-2에서 L 세포 및 α CD3 mAb (OKT3; 200ng/mL)로 자극하였다. 하루 후, 세포를 10 바이러스 입자:1 세포의 감염 다중도에서 렌티바이러스로 형질도입하였다. 7일째에, 세포를 상기와 같이 L 세포로 재자극하고 5일간 확장시켰다. HLA-A2-매개된 자극의 효과를 시험하기 위해, Treg를 제한 IL-2 (100U/mL)와 밤새 배양한 다음 조사된 항-CD3/항-CD28 부하된 K562.64 세포 또는 K562.64.HLA-A2 세포로 24시간 동안 1:2 (K562:T 세포) 비로 재자극하였다.

[0769] **유세포 분석.** 표현형 분석을 위해, 세포를 FOXP3/전사 인자 염색 완충제 세트 (eBioscience)로 고정/perm

및 세포내 단백질에 대한 염색 전에 표면 마커에 대해 고정 가능한 생존력 염료 (FVD, 65-0865-14, eBioscience; 423102, Biolegend)로 염색하였다. 샘플을 Cytotflex (Beckman-Coulter)에서 판독하고 FlowJo 소프트웨어 버전 9.9.4 및 10.3 (Tree Star)을 사용하여 결과를 분석하였다. CD3 (564465, BD Biosciences), CD4 (317410, Biolegend), CD25 (130-091-024, Miltenyi), LAP (25-9829-42, eBioscience), CD69 (310946, Biolegend), CD154 (555702, BD Biosciences), 및 CD127 (48-1278-42, eBiosciences)에 대해 표면 염색을 수행하였다. 사랑체 염색은 스트렙트아비딘-알로피코시아닌 (PJ27S, Prozyme)과 함께 사랑체로 만들어진 HLA-A*02:01 단량체로 수행하였다. CTLA-4 (369606, Biolegend)에 대해 세포내 염색을 수행하였다.

[0770] **HLA 대립유전자 교차 반응성 분석.** 본 발명에 따르는 CAR, 또는 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 CAR (mA2 CAR)을 발현하는 0.25×10^6 개 Treg를 실온에서 30분 동안 FlowPRA® 단일 항원 항체 비드 패널 (FL1HD01, FL1HD02, FL1HD03, FL1HD04, FL1HD06 및 FL1HD08, One Lambda) 및 고정 가능한 생존력 염료 (FVD, ThermoFisher, 65-0865-14, eBioscience)와 함께 배양한다. 샘플을 세척하고, 0.5% 포름알데히드로 고정하고, 유세포 분석을 통해 분석하였다. 샘플 당 200개의 음성 대조군 비드가 획득되었다. 비드 단독을 음성 대조군으로서 사용하였다. 분석을 위해, 고정 가능한 생존력 염료를 사용하여 죽은 세포를 먼저 제거하였다. 그 후 죽은 세포 및 이중선의 배제 후 단일 항원 비드를 게이팅하였다. 그 후, HLA 당 비드의 수를 이들 각각의 PE 강도 피크에 의해 결정하였다. 각 HLA-피크에서 관심 있는 비드 수에 200을 곱한 다음 샘플의 음성 비드 수로 나누어 데이터를 정규화하였다. 각각의 HLA-피크에 대해 대조군 (비-CAR-발현 세포)과 비교한 CAR Treg의 상대적 결합 퍼센트는 대조군 샘플의 비드 수로부터 CAR-Treg의 비드 수를 뺀 다음 비-CAR-발현 대조군에서의 비드의 평균 수로 나눈 것의 100배에 의해 결정하였다.

[0771] **결과:**

[0772] **인간화 HLA-A2-특이 CAR의 작제**

[0773] 1개의 인간화 중쇄와 3개의 상이한 인간화 경쇄를 생성하고, 인간화 중쇄 및 경쇄를 조합함으로써 총 3개의 상이한 키메라 항원 수용체를 생성하였다.

[0774] CAR의 발현 및 정확한 접합은 Jurkat NFAT-리포터 세포주를 사용하여 확인하였다.

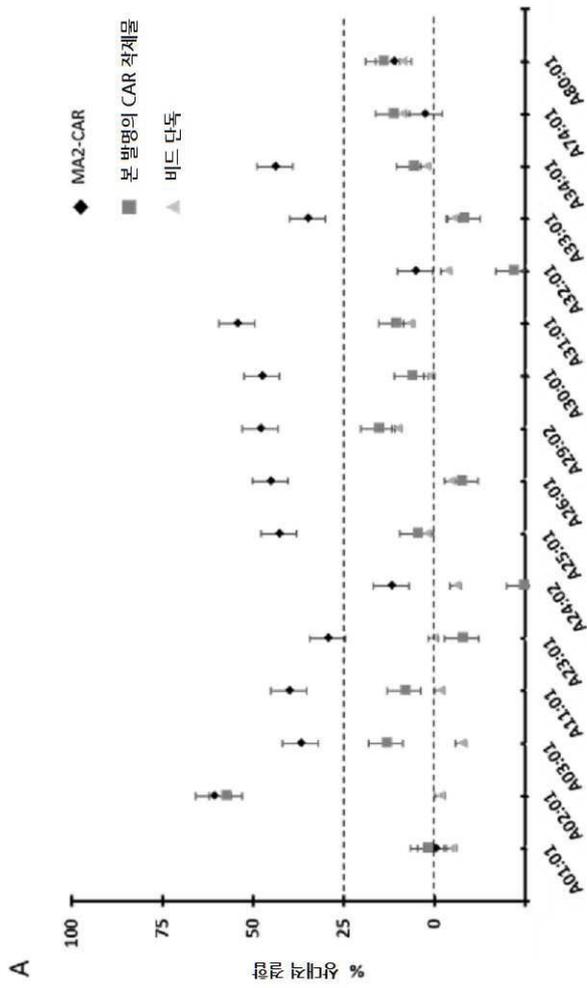
[0775] **다른 클래스 I HLA 대립유전자에 대한 HLA-A2-CAR 작제물의 교차 반응성**

[0776] 보다 적은 수의 조상 대립유전자로부터 시간이 지남에 따라 진화한 다수의 상이한 HLA 대립유전자가 있다. 결과적으로, 단지 몇 개의 아미노산 만이 상이할 수 있는 대립유전자 패밀리가 있으며, 단일 항-HLA 항체는 진화-관련 패밀리 내에서 다중 대립유전자를 인식할 수 있다. 마우스 단클론 항체 (BB7.2)는 추가의 HLA-A 대립유전자에 대한 교차 반응성을 갖는 것으로 알려져 있다 (Hilton & Parham, 2013). 구체적으로, 고체상 분석으로 시험할 경우, BB7.2는 HLA-A2의 5 가지 아형 (*02:01, *02:02, *02:03, *02:05, *02:06)을 인식하고 HLA-A*69:01과 교차 반응성이며, 고농도로 시험할 경우, 또한 HLA-A*23:01, A*24:02, A*24:03, A*68:01, 및 A*68:02를 인식하는 것으로 밝혀졌다 (Hilton & Parham, 2013). 본 발명의 인간화 항-HLA-A2 항체의 교차 반응성을 평가하고 BB7.2 항체의 VH 및 VL을 포함하는 항체와 비교하기 위해, 본 발명자들은 혈청에서 항-HLA-항체를 측정하기 위해 설계된 ONE Lambda 고체상 분석을 조정하여 관심 있는 인간화 CAR에 대한 HLA-코팅된 비드 결합을 측정하였다. 지시된 인간화 CAR을 발현하는 GFP⁺ Treg를 플로우 패널 반응성 단일 항원 비드와 배양하고, 단일 부류의 비드에 대한 결합은 전방/측면 산점도에서 비드 게이트의 신호 손실로서 정량하였다. 데이터를 샘플 중의 음성 대조군 비드의 수에 대해 정규화하였으며, hCAR-발현 Treg에 대한 상대 결합의 양은 GFP 표본에서 음성 비드의 수에 의한 GFP⁺-대조군 Treg에 의한 결합의 양을 GFP 표본의 음성 비드 수와 곱한 것 관련하여 계산하였다.

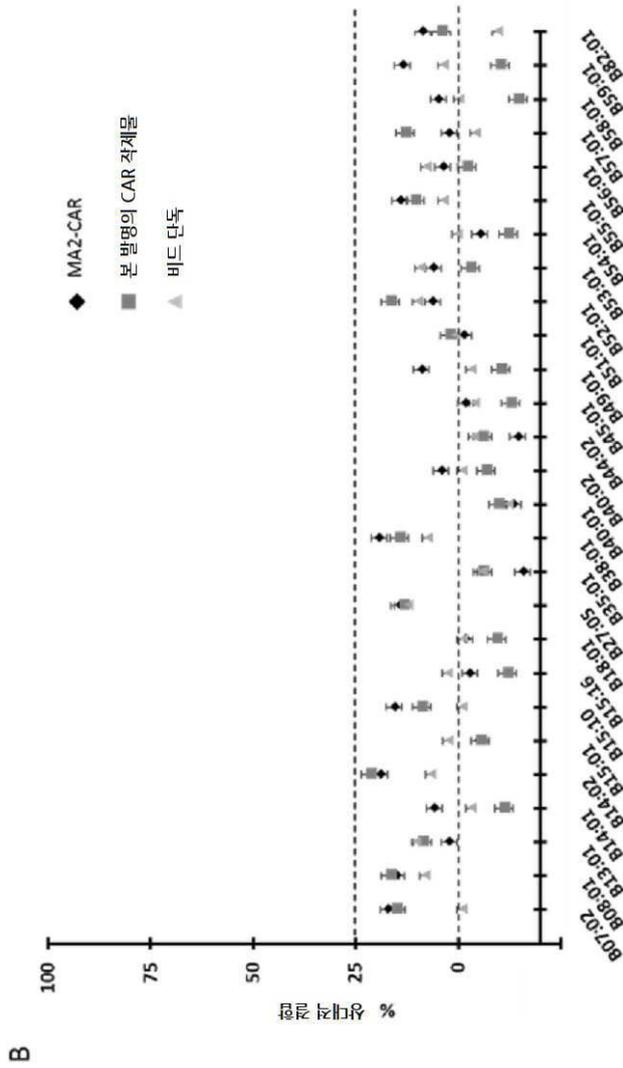
[0777] 서열번호: 72의 서열을 갖는 scFv를 포함하는 작제물에 대한 결과가 도 1에 나타내어져 있다. 이러한 HLA-A2-CAR 작제물은 HLA-A*02:01에 유의하게 결합하였다 (도 1a). 놀랍게도, 본 발명의 CAR 작제물에 대해, 본 발명자들은 A*02:01 이외의 시험된 다른 HLA-A 또는 B 대립유전자에 대한 어떠한 통계적으로 유의한 결합도 관찰하지 못했다 (도 1a-b).

도면

도면1a



도면1b



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA

TXCELL

<120> NOVEL ANTI-HLA-A2 ANTIBODIES AND USES THEREOF

<130> IPA200329-FR

<140> NOT YET ASSIGNED

<141> 2018-09-20

<150> US 62/560,841

<151> 2017-09-20

<150> US 62/691,027

<151> 2018-06-28

<160> 89

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VH-CDR1

<400> 1

Ser Tyr His Ile Gln

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

>

<223> VH-CDR2

<400> 2

Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Gln Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VH-CDR3

<400> 3

Glu Gly Thr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VH-CDR1

<400> 4

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

1 5

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VH-CDR2

<400> 5

Tyr Pro Gly Asp Gly Ser

1 5

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VL-CDR1

<400> 6

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VL-CDR2

<400> 7

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VL-CDR3

<400> 8

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Arg Thr

1 5

<210> 9

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VH

<400> 9

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

 20 25 30

His Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

 35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Gln Tyr Asn Glu 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 Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

 85 90 95

Ala Arg Glu Gly Thr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

 100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser

 115

<210> 10

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VL

<220>

<221> SITE

<222> 2

<223> X is V or I

<220>

<221> SITE

<222> 7

<223> X is T or S

<220>

<221> SITE

<222> 9

<223> X is L or S or A

<220>

<221> SITE

<222> 10

<223> X is S or T

<220>

<221> SITE

<222> 12

<223> X is P or S

<220>

<221> SITE

<222> 14

<223> X is T or S

<220>

<221> SITE

<222> 15

<223> X is L or P

<220>

<221> SITE

<222> 17

<223> X is E or D

<220>

<221> SITE

<222> 18

<223> X is P or R

<220>

<221> SITE

<222> 19

<223> X is A or V

<220>

<221> SITE

<222> 20

<223> X is S or T

<220>

<221> SITE

<222> 42

<223> X is L or Q

<220>

<221> SITE

<222> 48

<223> X is S or A

<220>

<221> SITE

<222> 63

<223> X is V or I

<220>

<221> SITE

<222> 79

<223> X is K or T

<220>

<221> SITE

<222> 83

<223> X is V or L

<220>

<221> SITE

<222> 85

<223> X is A or P

<220>

<221> SITE

<222> 88

<223> X is L or F

<220>

<221> SITE

<222> 89

<223> X is G or A

<400> 10

Asp Xaa Val Met Thr Gln Xaa Pro Xaa Xaa Leu Xaa Val Xaa Xaa Gly
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

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

Ser His Val Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 11

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VL

<400> 11

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr 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 Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Val Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg

<210> 12

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VL

<400> 12

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

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

Arg

<210> 13

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VL

<400> 13

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

Arg

<210> 14

<211> 4

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

<220>

<223> G3S linker

<400> 14

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 15

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> G3S linker

<400> 15

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

1

5

10

15

<210> 16

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> G4S linker

<400> 16

Gly Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

<210> 17

<211> 10

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> G4S linker

<400> 17

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> G4S linker

<400> 18

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

1 5 10 15

<210> 19

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> G4S linker

<400> 19

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> 20

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hinge domain

<400> 20

Ala Gly Ser Ser Ser Ser Gly Gly Ser Thr Thr Gly Gly Ser Thr Thr

1 5 10 15

<210> 21

<211> 16

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Hinge domain
 <400> 21
 Gly Thr Thr Ala Ala Ser Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ser Ser Gly Ala
 1 5 10 15

<210> 22
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Hinge domain
 <400> 22
 Ser Ser Ala Thr Ala Thr Ala Gly Thr Gly Ser Ser Thr Gly Ser Thr
 1 5 10 15

<210> 23
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Hinge domain
 <400> 23
 Thr Ser Gly Ser Thr Gly Thr Ala Ala Ser Ser Thr Ser Thr Ser Thr
 1 5 10 15

<210> 24
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Hinge domain
 <400> 24
 ggtggcggag gttctggagg tggaggttcc

<211> 230

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IgG4 Hinge domain

<400> 28

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe

1 5 10 15

Leu 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 Asn 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 Met

225 230

<210> 29

<211> 690

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IgG4 Hinge domain

<400> 29

gagagcaagt acggcctcc ctgccccct tgcctgccc ccgagttcct gggcggacc 60

agcgtgttcc tgttcccc caagccaag gacacctga tgatcagccg gacccccgag 120

gtgacctgtg tgggtggtgga cgtgtcccag gaggaccg aggtccagtt caactggtac 180

gtggacggcg tggagggtgca caagccaag accaagcccc gggaggagca gttcaatagc 240

acctaccggg tgggtgtccgt gctgacctg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggaa 300

tacaagtgta aggtgtccaa caagggcctg cccagcagca tcgagaaaac catcagcaag 360

gccaaaggcc agcctcggga gccccagggtg tacacctgc cccctagcca agaggagatg 420

accaagaacc aggtgtcctt gacctgcctg gtgaagggt tctaccccag cgacatcgcc 480

gtggagtggg agagcaacgg ccagcccag aacaactaca agaccacccc cctgtgctg 540

gacagcgacg gcagcttctt cctgtacagc cggctgaccg tggacaagag cgggtggcag 600

gagggcaacg tctttagctg ctccgtgatg cacgaggccc tgcacaacca ctacaccag 660

aagagcctga gcctgtcctt gggcaagatg 690

<210> 30

<211> 282

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IgD Hinge domain

<400> 30

Arg Trp Pro Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro Thr Ala

1 5 10 15

Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala
 20 25 30

Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys
 35 40 45

Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro
 50 55 60

Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Tyr Leu Leu Thr Pro Ala Val Gln
 65 70 75 80

Asp Leu Trp Leu Arg Asp Lys Ala Thr Phe Thr Cys Phe Val Val Gly
 85 90 95

Ser Asp Leu Lys Asp Ala His Leu Thr Trp Glu Val Ala Gly Lys Val
 100 105 110

Pro Thr Gly Gly Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Arg His Ser Asn Gly
 115 120 125

Ser Gln Ser Gln His Ser Arg Leu Thr Leu Pro Arg Ser Leu Trp Asn
 130 135 140

Ala Gly Thr Ser Val Thr Cys Thr Leu Asn His Pro Ser Leu Pro Pro
 145 150 155 160

Gln Arg Leu Met Ala Leu Arg Glu Pro Ala Ala Gln Ala Pro Val Lys
 165 170 175

Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser Asp Pro Pro Glu Ala Ala Ser
 180 185 190

Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe Ser Pro Pro Asn Ile Leu Leu
 195 200 205

Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu Val Asn Thr Ser Gly Phe Ala Pro
 210 215 220

Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro Gly Ser Thr Thr Phe Trp Ala Trp Ser
 225 230 235 240

Val Leu Arg Val Pro Ala Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Thr Tyr Thr
 245 250 255

Cys Val Val Ser His Glu Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn Ala Ser Arg

260

265

270

Ser Leu Glu Val Ser Tyr Val Thr Asp His

275

280

<210> 31

<211> 847

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IgD Hinge domain

<400> 31

aggtggcccc aaagtcccaa ggcccaggca tctagtgttc ctactgcaca gcccaggca 60
 gaaggcagcc tagccaaagc tactactgca cctgccacta cgcgcaatac tggccgtggc 120
 ggggaggaga agaaaaagga gaaagagaaa gaagaacagg aagagagga gaccaagacc 180
 cctgaatgtc catccatac ccagccgctg ggcgtctatc tcttgactcc cgcagtacag 240
 gacttgtggc ttagagataa ggccaccttt acatgtttcg tcgtgggctc tgacctgaag 300

gatgcccatt tgacttggga ggttgccgga aaggtaccca caggggggggt tgaggaaggg 360
 ttgctggagc gccattccaa tggtctctcag agccagcact caagactcac ccttccgaga 420
 tcctgtgga acgccgggac ctctgtcaca tgtactctaa atcatcctag cctgccccca 480
 cagcgtctga tggcccttag agagccagcc gccaggcac cagttaagct tagcctgaat 540
 ctgctcgcca gtagtgatcc cccagaggcc gccagctggc tcttatgcga agtgtccggc 600
 tttagcccgc ccaacatctt gctcatgtgg ctggaggacc agcgagaagt gaacaccagc 660
 ggcttcgctc cagccccggc cccaccccag cgggttcta ccacattctg ggcctggagt 720

gtcttaaggg tcccagcacc acctagcccc cagccagcca catacacctg tgttgtgtcc 780
 catgaagata gcaggaccct gctaaatgct tctaggagtc tggaggtttc ctactgact 840
 gaccatt 847

<210> 32

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD28 Hinge domain

<400> 32

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn
 1 5 10 15
 Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu

 20 25 30
 Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro

 35

<210> 33

<211> 117

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD28 Hinge domain

<400> 33

attgaagtta tgtatcctcc tccttacctg gacaatgaga agagcaatgg aaccattatc 60

catgtgaaag ggaaacacct ttgtccaagt ccctatttc cggaccttc taagccc 117

<210> 34

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD8 transmembrane domain

<400> 34

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

1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys

 20

<210> 35

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD8 transmembrane domain

<400> 35

atctacatct gggcgccctt ggccgggact tgtggggtcc ttctcctgtc actggttatc 60
 accctttact gc 72
 <210> 36
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CD28 transmembrane domain
 <400> 36

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> 37
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CD28 transmembrane domain
 <400> 37

ttttgggtgc tgggtgggtg tgggtggagtc ctggcttgct atagcttgct agtaacagtg 60
 gcctttatta ttttctgggt g 81
 <210> 38
 <211> 112

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CD3zeta
 <400> 38

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys 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> 39

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD3zeta

<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> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD3zeta

<400> 40

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys 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 Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
 50 55 60
 Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu

 65 70 75 80
 Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
 85 90 95
 Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
 100 105 110
 Arg

<210> 41

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD3zeta

<400> 41

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 Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
 50 55 60
 Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
 65 70 75 80

Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
 85 90 95
 Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
 100 105 110

Arg

<210> 42

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD3zeta

<400> 42

agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtaca agcagggcca gaaccagctc 60
 tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttgacaa gagacgtggc 120

cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 180
 gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240
 cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 300
 tacgacgcc ttcacatgca ggccctgccc cctcgc 336

<210> 43

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD3zeta

<400> 43

agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc 60
 tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttggacaa gagacgtggc 120

 cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 180
 gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240
 cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 300
 tacgacgccc ttcacatgca ggccctgecc cctcgc 336

<210> 44

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 4-1BB intracellular domain

<400> 44

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> 45

<211> 48

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD27 intracellular domain

<400> 45

Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu Pro
 1 5 10 15

Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Thr
 20 25 30

Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro
 35 40 45

<210> 49
 <211> 123
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CD28 intracellular domain
 <400> 49
 aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc cgcgccccc 60
 gggcccaccc gcaagcatta ccagccctat gcccaccac gcgacttcgc agcctatcgc 120

 tcc 123
 <210> 50
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CD8 leader sequence
 <400> 50
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro
 20
 <210> 51
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Tag
 <400> 51
 Asn Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 1 5

 <210> 52
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Tag

<400> 52

Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

1 5 10

<210> 53

<211> 222

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CAR

<400> 53

Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

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

 100 105 110

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

 115 120 125

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

 130 135 140

Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg

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

180 185 190
 Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr
 195 200 205
 Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 210 215 220

<210> 55

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CAR

<400> 55

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

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

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
 85 90 95

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg
 100 105 110
 Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln
 115 120 125
 Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
 130 135 140

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

 Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 210 215 220
 <210> 56
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CAR
 <400> 56
 Asn Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Met His Thr Thr Thr Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser
 20 25 30
 Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
 35 40 45
 Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
 50 55 60
 Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys

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

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

Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
 65 70 75 80

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
 85 90 95

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg
 100 105 110

Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln
 115 120 125

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
 130 135 140

Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro
 145 150 155 160

Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 165 170 175

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 180 185 190

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 195 200 205

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 210 215 220

<210> 58

<211> 237

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CAR

<400> 58

Asn Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Met His Thr Thr Thr Pro Ala

1 5 10 15

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

 20 25 30

Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr

 35 40 45

Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala

 50 55 60

Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys

65 70 75 80

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met

 85 90 95

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe

 100 105 110

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Thr Arg Arg Val Lys Phe

 115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg

 165 170 175

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

 180 185 190

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

195 200 205

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

 210 215 220

Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

225 230 235

<210> 59

<211> 226

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CAR

<400> 59

Met His Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr
 1 5 10 15

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

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

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

Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His
 65 70 75 80

Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys
 85 90 95

His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 100 105 110

Thr Arg Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln
 115 120 125

Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu
 130 135 140

Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly
 145 150 155 160

Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu
 165 170 175

Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly
 180 185 190

Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser

145 150 155 160

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

 165 170 175

Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys

 180 185 190

Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu

 195 200 205

Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu

 210 215 220

Pro Pro Arg

225

<210> 61

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> P2A ribosomal cleavage site

<400> 61

Ala Ser Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly

1 5 10 15

Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 62

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy chain CDR1 of BB7.2

<400> 62

Ser Tyr His Ile Gln

1 5

<210

> 63

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy chain CDR2 of BB7.2

<400> 63

Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Gln Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy chain CDR3 of BB7.2

<400> 64

Glu Gly Thr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 65

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<

<220>

<223> Light chain CDR1 of BB7.2

<400> 65

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 66

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Light chain CDR2 of BB7.2

<400> 66

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Light chain CDR3 of BB7.2

<400> 67

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Arg Thr

1 5

<210> 68

<211> 239

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> eGFP

<400> 68

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu

1 5 10 15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly

20 25 30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile

35 40 45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu

<221> SITE

<222> 142

<223> X is for L or S or A

<220>

<221> SITE

<222> 143

<223> X is for S or T

<220>

<221> SITE

<222> 145

<223> X is for P or S

<220>

<221> SITE

<222> 147

<223> X is for T or S

<220>

<221> SITE

<222> 148

<223> X is for L or P

<220>

<221> SITE

<222> 150

<223> X is for E or D

<220>

<221> SITE

<222> 151

<223> X is for P or R

<220>

<221> SITE

<222> 152

<223> X is for A or V

<220>

<221> SITE

<222> 153

<223> X is for S or T
<220>
<221> SITE
<222> 175
<223> X is for L or Q
<220>
<221> SITE
<222> 181
<223> X is for S or A
<220>
<221> SITE
<222> 196
<223> X is for V or I
<220>
<221> SITE
<222> 212
<223> X is for K or T
<220>
<221> SITE
<222> 216
<223> X is for V or L
<220>
<221>
> SITE
<222> 218
<223> X is for A or P
<220>
<221> SITE
<222> 221
<223> X is for L or F
<220>
<221> SITE
<222> 222
<223> X is for G or A
<400> 69

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Gln Tyr Asn Glu 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 Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Gly Thr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Xaa Val Met Thr Gln Xaa Pro Xaa Xaa Leu
 130 135 140

Xaa Val Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln
 145 150 155 160

Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Xaa Gln
 165 170 175

Lys Pro Gly Gln Xaa Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
 180 185 190

Phe Ser Gly Xaa Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 195 200 205

Phe Thr Leu Xaa Ile Ser Arg Xaa Glu Xaa Glu Asp Xaa Xaa Val Tyr
 210 215 220

Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 225 230 235 240

Lys Leu Glu Ile Lys Arg

245

<210> 70

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> scFv

<400> 70

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

 20 25 30

His Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

 35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Gln Tyr Asn Glu 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 Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

 85 90 95

Ala Arg Glu Gly Thr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

 100 105 110

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

 115 120 125

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

 130 135 140

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

145 150 155 160

Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln

 165 170 175

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg

 180 185 190

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

Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 245

<210> 71

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> scFv

<400> 71

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Gln Tyr Asn Glu 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 Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Gly Thr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125

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

130 135 140
 Ser Val Thr Leu Gly Asp Arg Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln
 145 150 155 160
 Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln
 165 170 175

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

Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 245

<210> 72

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> scFv

<400> 72

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Gln Tyr Asn Glu 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 Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Gly Thr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

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

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

Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 245

<210> 73

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> scFv

<220>

<221> SITE

<222> 136

<223> X is V or I

<220>

<221> SITE

<222> 141

<223> X is for T or S

<220>

<221> SITE

<222> 143

<223> X is for L or S or A

<220>

<221> SITE

<222> 144

<223> X is for S or T

<220>

<221> SITE

<222> 146

<223> X is for P or S

<220>

<221> SITE

<222> 148

<223> X is for T or S

<220>

<221> SITE

<222

> 149

<223> X is for L or P

<220>

<221> SITE

<222> 151

<223> X is for E or D

<220>

<221> SITE

<222> 152

<223> X is for P or R

<220>

<221> SITE

<222> 153

<223> X is for A or V

<220>

<221> SITE

<222> 154

<223> X is for S or T

<220>

<221> SITE

<222> 176

<223> X is for L or Q

<220>

<221> SITE

<222> 182

<223> X is for S or A

<220>

<221> SITE

<222> 197

<223> X is for V or I

<220>

<221> SITE

<222> 213

<223> X is for K or T

<220>

<221> SITE

<222> 217

<223> X is for V or L

<220>

<221> SITE

<222> 219

<223> X is for A or P

<220>

<221> SITE

<222> 222

<223> X is for L or F

<220>

<221> SITE

<222> 223

<223> X is for G or A

<400> 73

Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser
 20 25 30
 Tyr His Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Gln Tyr Asn Glu Lys
 50 55 60
 Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala
 65 70 75 80
 Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Glu Gly Thr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Xaa Val Met Thr Gln Xaa Pro Xaa Xaa
 130 135 140
 Leu Xaa Val Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Ser Cys Arg Ser Ser
 145 150 155 160
 Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Xaa
 165 170 175
 Gln Lys Pro Gly Gln Xaa Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn
 180 185 190
 Arg Phe Ser Gly Xaa Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 195 200 205
 Asp Phe Thr Leu Xaa Ile Ser Arg Xaa Glu Xaa Glu Asp Xaa Xaa Val

Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu
 165 170 175
 Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn
 180 185 190
 Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 195 200 205
 Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val
 210 215 220
 Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 245
 <210> 75
 <211> 247
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> scFv
 <400> 75
 Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser
 20 25 30
 Tyr His Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Gln Tyr Asn Glu Lys
 50 55 60
 Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala
 65 70 75 80
 Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Gly Thr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

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

115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser

130 135 140

Leu Ser Val Thr Leu Gly Asp Arg Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser

145 150 155 160

Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln

165 170 175

Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn

180 185 190

Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr

195 200 205

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Pro Glu Asp Leu Gly Val

210 215 220

Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly

225 230 235 240

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

245

<210> 76

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> scFv

<400> 76

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

1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser

20 25 30

Tyr His Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Ile Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Gln Tyr Asn Glu Lys

50 55 60

Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Ala Arg Glu Gly Thr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ser Ser

145 150 155 160

Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln

165 170 175

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

180 185 190

Arg Phe Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr

195 200 205

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val

210 215 220

Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly

225 230 235 240

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

245

<210> 77

<211> 471

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CAR

<220>

<221> SITE

<222> 136

<223> X is for V or I

<220>

<221> SITE

<222> 141

<223> X is for T or S

<220>

<221> SITE

<222> 143

<223> X is for L or S or A

<220>

<221> SITE

<222> 144

<223> X is for S or T

<220>

<221> SITE

<222> 146

<223> X is for P or S

<220>

<221> SITE

<222> 148

<223> X is for T or S

<220>

<221> SITE

<222> 149

<223> X is for L or P

<220>

<221> SITE

<222> 151

<223> X is for E or D
<220>
<221> SITE
<222> 152
<223> X is for P or R
<220>
<221> SITE
<222> 153
<223> X is for A or V
<220>
<221> SITE
<222> 154
<223> X is for S or T
<220>
<221> SITE
<222> 176
<223> X is for L or Q
<220>
<221> SITE
<222> 182
<223> X is for S or A
<220>
<221> SITE
<222> 197
<223> X is for V or I

<220>
<221> SITE
<222> 213
<223> X is for K or T
<220>
<221> SITE
<222> 217
<223> X is for V or L
<220>

<221> SITE

<222> 219

<223> X is for A or P

<220>

<221> SITE

<222> 222

<223> X is for L or F

<220>

<221> SITE

<222> 223

<223> X is for G or A

<400> 77

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

1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser

 20 25 30

Tyr His Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp

 35 40 45

Ile Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Gln Tyr Asn Glu Lys

 50 55 60

Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala

65 70 75 80

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

 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Gly Thr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

 100 105 110

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

 115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Xaa Val Met Thr Gln Xaa Pro Xaa Xaa

 130 135 140

Leu Xaa Val Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Ser Cys Arg Ser Ser

145 150 155 160

Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Xaa
 165 170 175

Gln Lys Pro Gly Gln Xaa Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn
 180 185 190

Arg Phe Ser Gly Xaa Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 195 200 205

Asp Phe Thr Leu Xaa Ile Ser Arg Xaa Glu Xaa Glu Asp Xaa Xaa Val
 210 215 220

Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly
 225 230 235 240

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Arg Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro
 245 250 255

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

Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu
 275 280 285

Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys
 290 295 300

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

Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val
 325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 465 470

<210> 79

<211> 471

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CAR

<400> 79

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

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

Tyr His Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Gln Tyr Asn Glu Lys
 50 55 60

Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 465 470

<210> 80

<211> 471

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CAR

<400> 80

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

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

Tyr His Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Gln Tyr Asn Glu Lys

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

Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val
 325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

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

Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 465 470

<210> 81

<211> 492

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CAR

<220>

<221> SITE

<222> 157

<223> X is for V or I

<220>

<221> SITE

<222> 162

<223> X is for T or S

<220>

<221> SITE

<222> 164

<223> X is for L or S or A

<220>

<221> SITE

<222> 165

<223> X is for S or T

<220>

<221> SITE

<222> 167

<223> X is for P or S

<220>

<221> SITE

<222> 169

<223> X is for T or S

<220>

<221> SITE

<222> 170

<223> X is for L or P

<220>

<221> SITE

<222> 172

<223> X is for E or D

<220>

<221> SITE

<222> 173

<223> X is for P or R

<220>

<221> SITE

<222> 174

<223> X is for A or V

<220>

<221> SITE

<222> 175

<223> X is for S or T

<220>

<221> SITE

<222> 197

<223> X is for L or Q

<220>

<221> SITE

<222> 203

<223> X is for S or A

<220>

<221> SITE

<222> 218

<223> X is for V or I

<220>

<221> SITE

<222> 234

<223> X is for Kor T

<220>

<221> SITE

<222> 238

<223> X is for V or L

<220>

<221> SITE

<222> 240

<223> X is for A or P

<220>

<221> SITE

<222> 243

<223> X is for L or F

<220>

<221> SITE

<222> 244

<223> X is for G or A

<400> 81

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly

35 40 45

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr His Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

50 55 60

Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr

65 70 75 80

Gln Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys

85 90 95

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp

100 105 110

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Thr Tyr Tyr Ala Met Asp

115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly

130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Xaa Val Met Thr

145 150 155 160

Gln Xaa Pro Xaa Xaa Leu Xaa Val Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Ile

165 170 175

Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr

180 185 190

Leu Glu Trp Tyr Xaa Gln Lys Pro Gly Gln Xaa Pro Arg Leu Leu Ile

195 200 205

Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Xaa Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 210 215 220
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Xaa Ile Ser Arg Xaa Glu Xaa
 225 230 235 240
 Glu Asp Xaa Xaa Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Arg
 245 250 255
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Arg Thr Thr Thr
 260 265 270
 Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro
 275 280 285
 Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val
 290 295 300
 His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro
 305 310 315 320
 Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu
 325 330 335
 Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro
 340 345 350
 Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys
 355 360 365
 Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe
 370 375 380
 Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu
 385 390 395 400
 Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp
 405 410 415
 Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys
 420 425 430
 Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala
 435 440 445
 Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys

Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp
 405 410 415

Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys
 420 425 430

Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala
 435 440 445

Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys
 450 455 460

Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr
 465 470 475 480

Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485 490

<210> 83

<211> 492

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CAR

<400> 83

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu
 20 25 30

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 35 40 45

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr His Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 50 55 60

Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr
 65 70 75 80

Gln Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys
 85 90 95

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
 100 105 110
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Thr Tyr Tyr Ala Met Asp
 115 120 125
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr
 145 150 155 160
 Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly Asp Arg Val Ser Ile
 165 170 175
 Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
 180 185 190
 Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 195 200 205
 Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 210 215 220
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Pro
 225 230 235 240
 Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Arg
 245 250 255
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Arg Thr Thr Thr
 260 265 270
 Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro
 275 280 285
 Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val
 290 295 300
 His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro
 305 310 315 320
 Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu
 325 330 335
 Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro

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

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

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

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

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

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

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

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

465 470 475 480
Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

485 490

<210> 84

<211> 492

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CAR

<400> 84

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu
20 25 30

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly

Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val
 290 295 300

His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro
 305 310 315 320

Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu
 325 330 335

Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro
 340 345 350

Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys
 355 360 365

Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe
 370 375 380

Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu
 385 390 395 400

Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp
 405 410 415

Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys
 420 425 430

Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala
 435 440 445

Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys
 450 455 460

Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr
 465 470 475 480

Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485 490

<210> 85

<211

> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VL

<400> 88

gatgttgtaa tgaccagag ccctagtagc ctgtctgtga ccctgggaga tcgagtatcc 60
 atcagctgtc ggagcagcca gagcatcgtt cacagcaacg gcaacaccta cctggaatgg 120
 tatcaacaga agccccgaca gagccccagg ctgctgatct acaaggtgtc caaccgcttc 180
 agtgggtgtc ccgatagatt ttctggcagc ggctctggca ccgacttcac cctgacgatc 240

tccagagtgg aaccagagga cctgggcgtg tactactgct tccaaggcag ccatgtgcca 300
 agaacctttg gtggaggcac aaagctggaa atcaagcgg 339

<210> 89

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VL

<400> 89

gatattgtaa tgaccagag ccctgcaaca ctgtctgtgt cccctggaga acgagcaaca 60
 atcagctgtc ggagcagcca gagcatcgtt cacagcaacg gcaacaccta cctggaatgg 120
 tatcaacaga agccccgaca ggccccagg ctgctgatct acaaggtgtc caaccgcttc 180
 agtgggaatac ccgatagatt ttctggcagc ggctctggca ccgacttcac cctgacgatc 240

tccagattag aaccagagga ctttgcagtg tactactgct tccaaggcag ccatgtgcca 300
 agaacctttg gtggaggcac aaagctggaa atcaagcgg 339