



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0163684  
(43) 공개일자 2024년11월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01) A61P 35/02 (2006.01)  
C07K 14/725 (2006.01) C12N 15/86 (2006.01)  
C12N 5/0783 (2010.01) G01N 33/574 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07K 16/2803 (2013.01)  
A61K 39/4611 (2023.05)
- (21) 출원번호 10-2024-7034123
- (22) 출원일자(국제) 2022년12월06일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2024년10월14일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2022/136785
- (87) 국제공개번호 WO 2023/185072  
국제공개일자 2023년10월05일
- (30) 우선권주장  
202210331478.7 2022년03월30일 중국(CN)
- (71) 출원인  
허베이 셴량 바이오테크놀로지 컴퍼니 리미티드  
중국 050000 허베이 스자좡 하이-테크 디벨롭먼트 존 황허 로드 넘버 136 빌딩 넘버 1 룸 512, 513
- (72) 발명자  
리, 지안치양  
중국, 050000 허베이, 스자좡, 하이-테크 디벨롭먼트 존, 황허 로드 넘버 136, 빌딩 넘버 1 513, 룸 512  
왕, 린  
중국, 050000 허베이, 스자좡, 하이-테크 디벨롭먼트 존, 황허 로드 넘버 136, 빌딩 넘버 1 513, 룸 512
- (74) 대리인  
특허법인정진

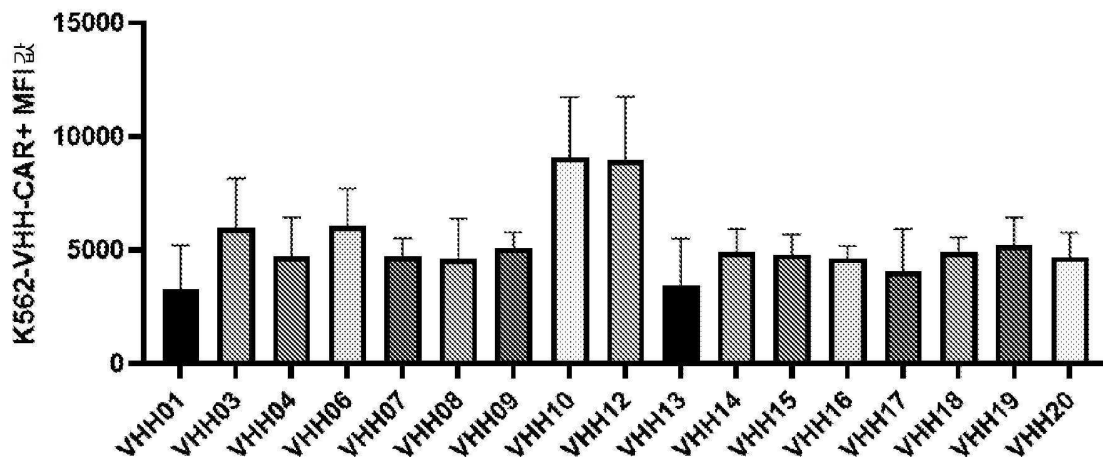
전체 청구항 수 : 총 126 항

(54) 발명의 명칭 항-CD7 나노바디와 이의 유도체 및 종양 치료에서 이의 용도

(57) 요약

항-CD7 나노바디 및 이의 유도체를 제공하며, 상기 유도체는 인간화 항-CD7 나노바디, 단일 나노바디 기반의 키메라 항원 수용체, 이중 나노바디 기반의 키메라 항원 수용체, 재조합 발현 벡터, 조작된 숙주 세포, 접합체, 약학적 조성물, 키트, 세포 표면의 CD7을 검출하는 시약을 포함한다. 상기 나노바디는 CD7과 좋은 친화도를 가지고 있으며, 제조된 CAR-T 세포는 종양 항원을 표적으로 인식하고 종양 세포에 대한 살상 활성이 높다.

대표도 - 도15



(52) CPC특허분류

*A61K 39/4631* (2023.05)  
*A61K 39/464402* (2023.05)  
*A61P 35/00* (2018.01)  
*A61P 35/02* (2018.01)  
*C07K 14/7051* (2013.01)  
*C12N 15/86* (2013.01)  
*C12N 5/0636* (2023.05)  
*G01N 33/57484* (2013.01)  
*C07K 2317/24* (2013.01)

---

명세서

청구범위

청구항 1

항-CD7 나노바디로서,

상기 나노바디는 VHH01, VHH03, VHH04, VHH06, VHH07, VHH08, VHH09, VHH10, VHH12, VHH13, VHH14, VHH15, VHH16, VHH17, VHH18, VHH19 또는 VHH20 중 임의의 하나이고;

상기 VHH01의 CDR1, CDR2, CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 3, 서열번호 5, 서열번호 7로 표시되거나, 각각 서열번호 3, 서열번호 5, 서열번호 7과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이며;

상기 VHH03의 CDR1, CDR2, CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 11, 서열번호 13, 서열번호 15로 표시되거나, 각각 서열번호 11, 서열번호 13, 서열번호 15와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이고;

상기 VHH04의 CDR1, CDR2, CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 19, 서열번호 21, 서열번호 23으로 표시되거나, 각각 서열번호 19, 서열번호 21, 서열번호 23과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이며;

상기 VHH06의 CDR1, CDR2, CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 27, 서열번호 29, 서열번호 31로 표시되거나, 각각 서열번호 27, 서열번호 29, 서열번호 31과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이고;

상기 VHH07의 CDR1, CDR2, CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 35, 서열번호 37, 서열번호 39로 표시되거나, 각각 서열번호 35, 서열번호 37, 서열번호 39와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이며;

상기 VHH08의 CDR1, CDR2, CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 43, 서열번호 45, 서열번호 47로 표시되거나, 각각 서열번호 43, 서열번호 45, 서열번호 47과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이고;

상기 VHH09의 CDR1, CDR2, CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 51, 서열번호 53, 서열번호 55로 표시되거나, 각각 서열번호 51, 서열번호 53, 서열번호 55로와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이며;

상기 VHH10의 CDR1, CDR2, CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 59, 서열번호 61, 서열번호 63으로 표시되거나, 각각 서열번호 59, 서열번호 61, 서열번호 63과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이고;

상기 VHH12의 CDR1, CDR2, CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 67, 서열번호 69, 서열번호 71로 표시되거나, 각각 서열번호 67, 서열번호 69, 서열번호 71과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이며;

상기 VHH13의 CDR1, CDR2, CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 75, 서열번호 77, 서열번호 79로 표시되거나,

각각 서열번호 75, 서열번호 77, 서열번호 79와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이고;

상기 VHH14의 CDR1, CDR2, CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 83, 서열번호 85, 서열번호 87로 표시되거나, 각각 서열번호 83, 서열번호 85, 서열번호 87과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이며;

상기 VHH15의 CDR1, CDR2, CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 91, 서열번호 93, 서열번호 95로 표시되거나, 각각 서열번호 91, 서열번호 93, 서열번호 95와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이고;

상기 VHH16의 CDR1, CDR2, CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 99, 서열번호 101, 서열번호 103으로 표시되거나, 각각 서열번호 99, 서열번호 101, 서열번호 103과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이며;

상기 VHH17의 CDR1, CDR2, CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 107, 서열번호 109, 서열번호 111로 표시되거나, 각각 서열번호 107, 서열번호 109, 서열번호 111과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이고;

상기 VHH18의 CDR1, CDR2, CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 115, 서열번호 117, 서열번호 119로 표시되거나, 각각 서열번호 115, 서열번호 117, 서열번호 119와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이며;

상기 VHH19의 CDR1, CDR2, CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 123, 서열번호 125, 서열번호 127로 표시되거나, 각각 서열번호 123, 서열번호 125, 서열번호 127과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이고;

상기 VHH20의 CDR1, CDR2, CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 131, 서열번호 133, 서열번호 135로 표시되거나, 각각 서열번호 131, 서열번호 133, 서열번호 135와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열인 것을 특징으로 하는, 항-CD7 나노바디.

## 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 VHH01의 CDR1, CDR2, CDR3의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 4, 서열번호 6, 서열번호 8로 표시되거나, 각각 서열번호 4, 서열번호 6, 서열번호 8과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이고;

상기 VHH03의 CDR1, CDR2, CDR3의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 12, 서열번호 14, 서열번호 16으로 표시되거나, 각각 서열번호 12, 서열번호 14, 서열번호 16과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이며;

상기 VHH04의 CDR1, CDR2, CDR3의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 20, 서열번호 22, 서열번호 24로 표시되거나, 각각 서열번호 20, 서열번호 22, 서열번호 24와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이고;

상기 VHH06의 CDR1, CDR2, CDR3의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 28, 서열번호 30, 서열번호 32로 표시되거나, 각각 서열번호 28, 서열번호 30, 서열번호 32와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이며;

상기 VHH07의 CDR1, CDR2, CDR3의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 36, 서열번호 38, 서열번호 40으로 표시되거나, 각각 서열번호 36, 서열번호 38, 서열번호 40과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이고;

상기 VHH08의 CDR1, CDR2, CDR3의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 44, 서열번호 46, 서열번호 48로 표시되거나, 각각 서열번호 44, 서열번호 46, 서열번호 48과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이며;

상기 VHH09의 CDR1, CDR2, CDR3의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 52, 서열번호 54, 서열번호 56으로 표시되거나, 각각 서열번호 52, 서열번호 54, 서열번호 56과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이고;

상기 VHH10의 CDR1, CDR2, CDR3의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 60, 서열번호 62, 서열번호 64로 표시되거나, 각각 서열번호 60, 서열번호 62, 서열번호 64와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이며;

상기 VHH12의 CDR1, CDR2, CDR3의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 68, 서열번호 70, 서열번호 72로 표시되거나, 각각 서열번호 68, 서열번호 70, 서열번호 72와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이고;

상기 VHH13의 CDR1, CDR2, CDR3의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 76, 서열번호 78, 서열번호 80으로 표시되거나, 각각 서열번호 76, 서열번호 78, 서열번호 80과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이며;

상기 VHH14의 CDR1, CDR2, CDR3의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 84, 서열번호 86, 서열번호 88로 표시되거나, 각각 서열번호 84, 서열번호 86, 서열번호 88과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이고;

상기 VHH15의 CDR1, CDR2, CDR3의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 92, 서열번호 94, 서열번호 96으로 표시되거나, 각각 서열번호 92, 서열번호 94, 서열번호 96과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이며;

상기 VHH16의 CDR1, CDR2, CDR3의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 100, 서열번호 102, 서열번호 104로 표시되거나, 각각 서열번호 100, 서열번호 102, 서열번호 104와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이고;

상기 VHH17의 CDR1, CDR2, CDR3의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 108, 서열번호 110, 서열번호 112로 표시되거나, 각각 서열번호 108, 서열번호 110, 서열번호 112와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이며;

상기 VHH18의 CDR1, CDR2, CDR3의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 116, 서열번호 118, 서열번호 120으로 표시되거나, 각각 서열번호 116, 서열번호 118, 서열번호 120과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%,

82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이고;

상기 VHH19의 CDR1, CDR2, CDR3의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 124, 서열번호 126, 서열번호 128로 표시되거나, 각각 서열번호 124, 서열번호 126, 서열번호 128과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이며;

상기 VHH20의 CDR1, CDR2, CDR3의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 132, 서열번호 134, 서열번호 136으로 표시되거나, 각각 서열번호 132, 서열번호 134, 서열번호 136과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열인 것을 특징으로 하는, 항-CD7 나노바디.

### 청구항 3

제2항에 있어서,

상기 VHH01, VHH03, VHH04, VHH06, VHH07, VHH08, VHH09, VHH10, VHH12, VHH13, VHH14, VHH15, VHH16, VHH17, VHH18, VHH19, VHH20의 아미노산 서열은 각각 서열번호 1, 서열번호 9, 서열번호 17, 서열번호 25, 서열번호 33, 서열번호 41, 서열번호 49, 서열번호 57, 서열번호 65, 서열번호 73, 서열번호 81, 서열번호 89, 서열번호 97, 서열번호 105, 서열번호 113, 서열번호 121, 서열번호 129로 표시되거나, 각각 서열번호 1, 서열번호 9, 서열번호 17, 서열번호 25, 서열번호 33, 서열번호 41, 서열번호 49, 서열번호 57, 서열번호 65, 서열번호 73, 서열번호 81, 서열번호 89, 서열번호 97, 서열번호 105, 서열번호 113, 서열번호 121, 서열번호 129와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열인 것을 특징으로 하는, 항-CD7 나노바디.

### 청구항 4

제3항에 있어서,

상기 VHH01, VHH03, VHH04, VHH06, VHH07, VHH08, VHH09, VHH10, VHH12, VHH13, VHH14, VHH15, VHH16, VHH17, VHH18, VHH19, VHH20의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 2, 서열번호 10, 서열번호 18, 서열번호 26, 서열번호 34, 서열번호 42, 서열번호 50, 서열번호 58, 서열번호 66, 서열번호 74, 서열번호 82, 서열번호 90, 서열번호 98, 서열번호 106, 서열번호 114, 서열번호 122, 서열번호 130으로 표시되거나, 각각 서열번호 2, 서열번호 10, 서열번호 18, 서열번호 26, 서열번호 34, 서열번호 42, 서열번호 50, 서열번호 58, 서열번호 66, 서열번호 74, 서열번호 82, 서열번호 90, 서열번호 98, 서열번호 106, 서열번호 114, 서열번호 122, 서열번호 130과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열인 것을 특징으로 하는, 항-CD7 나노바디.

### 청구항 5

인간화 항-CD7 나노바디로서,

상기 인간화 항-CD7 나노바디는 보편적인 인간화 프레임워크 h-NbBcII10FGLA를 기준으로, DP-47과 비교하여 제1항에 따른 나노바디의 핵심 위치에 있는 잔기를 인간화하여 얻어지는 것을 특징으로 하는, 인간화 항-CD7 나노바디.

### 청구항 6

제5항에 있어서,

상기 인간화 항-CD7 나노바디는 hVHH01, hVHH03, hVHH04, hVHH06, hVHH07, hVHH08, hVHH09, hVHH10, hVHH12, hVHH13, hVHH14, hVHH15, hVHH16, hVHH17, hVHH18, hVHH19 또는 hVHH20 중 임의의 하나인 것을 특징으로 하는, 인간화 항-CD7 나노바디.

### 청구항 7

제6항에 있어서,

상기 hVHH06의 CDR1, CDR2, CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 139, 서열번호 141, 서열번호 143으로 표시되거나, 각각 서열번호 139, 서열번호 141, 서열번호 143과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열인 것을 특징으로 하는, 인간화 항-CD7 나노바디.

**청구항 8**

제7항에 있어서,

상기 hVHH06의 CDR1, CDR2, CDR3의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 140, 서열번호 142, 서열번호 144로 표시되거나, 각각 서열번호 140, 서열번호 142, 서열번호 144와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열인 것을 특징으로 하는, 인간화 항-CD7 나노바디.

**청구항 9**

제7항에 있어서,

상기 hVHH06의 아미노산 서열은 서열번호 137로 표시되거나, 서열번호 137과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열인 것을 특징으로 하는, 인간화 항-CD7 나노바디.

**청구항 10**

제9항에 있어서,

상기 hVHH06의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 138로 표시되거나, 서열번호 138과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열인 것을 특징으로 하는, 인간화 항-CD7 나노바디.

**청구항 11**

단일 나노바디 기반의 키메라 항원 수용체로서,

상기 키메라 항원 수용체는 제1항에 따른 나노바디 또는 제5항에 따른 인간화 항-CD7 나노바디 중 임의의 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 12**

제11항에 있어서,

상기 키메라 항원 수용체는 막횡단 도메인을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 13**

제12항에 있어서,

상기 막횡단 도메인은 분자: CD8 α, CD28, IgG1, IgG4, 4-1BB, PD-1, CD34, OX40, CD3 ε, IL-2 수용체, IL-7 수용체, IL-11 수용체의 막횡단 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 14**

제13항에 있어서,

상기 막횡단 도메인은 CD8 α 막횡단 도메인인 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 15**

제12항에 있어서,

상기 키메라 항원 수용체는 세포내 신호전달 도메인을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 16**

제15항에 있어서,

상기 세포내 신호전달 도메인은 분자: CD3  $\zeta$ , FcR $\gamma$ , FcR $\beta$ , CD3  $\gamma$ , CD3  $\delta$ , CD3  $\epsilon$ , TCR  $\zeta$ , CD4, CD5, CD8, CD21, CD22, CD79a, CD79b, CD278, Fc  $\epsilon$  RI, DAP10, DAP12, CD66d의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 17**

제16항에 있어서,

상기 세포내 신호전달 도메인은 CD3  $\zeta$  세포내 신호전달 도메인인 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 18**

제15항에 있어서,

상기 키메라 항원 수용체는 힌지 영역을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 19**

제18항에 있어서,

상기 힌지 영역은 분자: CD8  $\alpha$ , CD28, IgG1, IgG4, 4-1BB, PD-1, CD34, OX40, CD3  $\epsilon$ , IL-2 수용체, IL-7 수용체, IL-11 수용체의 힌지 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 20**

제19항에 있어서,

상기 힌지 영역은 CD8  $\alpha$  힌지 영역인 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 21**

제18항에 있어서,

상기 키메라 항원 수용체는 신호 펩티드를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 22**

제21항에 있어서,

상기 신호 펩티드는 분자: T 세포 수용체의  $\alpha$  사슬 및  $\beta$  사슬, CD3  $\zeta$ , CD3  $\epsilon$ , CD4, CD5, CD8, CD9, CD28, CD16, CD22, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, GITR, GM-CSF의 신호 펩티드를 포함하는 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 23**

제21항에 있어서,

상기 키메라 항원 수용체는 공동자극 신호전달 도메인을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 24**

제23항에 있어서,

상기 공동자극 신호전달 도메인은 분자: 4-1BB(CD137), CD27, CD19, CD4, CD28, ICOS(CD278), CD8  $\alpha$ , CD8  $\beta$ , BAFRR, HVEM, LIGHT, KIRDS2, SLAMF7, NKp30, NKp46, CD40, CDS, ICAM-1, B7-H3, OX40, DR3, GITR, CD30, TIM1, CD2, CD7, CD226의 공동자극 신호전달 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 25**

제24항에 있어서,

상기 공동자극 신호전달 도메인은 4-1BB 공동자극 신호전달 도메인인 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 26**

제23항에 있어서,

상기 키메라 항원 수용체는 EF1 $\alpha$ , T2A, tEGFR을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 27**

제26항에 있어서,

상기 키메라 항원 수용체는 tEGFR 신호 펩티드를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 28**

제27항에 있어서,

상기 키메라 항원 수용체는 EF1 $\alpha$ , 신호 펩티드, 제1항에 따른 나노바디 또는 제5항에 따른 인간화 항-CD7 나노바디 중 임의의 하나, CD8 $\alpha$  힌지 영역, CD8 $\alpha$  막횡단 도메인, 4-1BB 공동자극 신호전달 도메인, CD3 $\zeta$  세포내 신호전달 도메인, T2A, tEGFR 신호 펩티드, tEGFR을 순차적으로 직렬 연결하여 얻어지는 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 29**

이중 나노바디 기반의 키메라 항원 수용체로서,

상기 키메라 항원 수용체는 제1항에 따른 나노바디 또는 제5항에 따른 인간화 항-CD7 나노바디 중 임의의 2개를 포함하는 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 30**

제29항에 있어서,

상기 키메라 항원 수용체는 막횡단 도메인을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 31**

제30항에 있어서,

상기 막횡단 도메인은 분자: CD8 $\alpha$ , CD28, IgG1, IgG4, 4-1BB, PD-1, CD34, OX40, CD3 $\epsilon$ , IL-2 수용체, IL-7 수용체, IL-11 수용체의 막횡단 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 32**

제31항에 있어서,

상기 막횡단 도메인은 CD8 $\alpha$  막횡단 도메인인 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 33**

제30항에 있어서,

상기 키메라 항원 수용체는 세포내 신호전달 도메인을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 34**

제33항에 있어서,

상기 세포내 신호전달 도메인은 분자: CD3 $\zeta$ , FcR $\gamma$ , FcR $\beta$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ , TCR $\zeta$ , CD4, CD5, CD8, CD21, CD22, CD79a, CD79b, CD278, Fc $\epsilon$ RI, DAP10, DAP12, CD66d의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 35**

제34항에 있어서,

상기 세포내 신호전달 도메인은 CD3  $\zeta$  세포내 신호전달 도메인것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 36**

제33항에 있어서,

상기 키메라 항원 수용체는 힌지 영역을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 37**

제36항에 있어서,

상기 힌지 영역은 분자: CD8  $\alpha$ , CD28, IgG1, IgG4, 4-1BB, PD-1, CD34, OX40, CD3  $\epsilon$ , IL-2, IL-7, IL-11 수용체의 힌지 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 38**

제37항에 있어서,

상기 힌지 영역은 CD8  $\alpha$  힌지 영역인 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 39**

제36항에 있어서,

상기 키메라 항원 수용체는 신호 펩티드를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 40**

제39항에 있어서,

상기 신호 펩티드는 분자: T 세포 수용체의  $\alpha$  사슬 및  $\beta$  사슬, CD3  $\zeta$ , CD3  $\epsilon$ , CD4, CD5, CD8, CD9, CD28, CD16, CD22, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, GITR, GM-CSF의 신호 펩티드를 포함하는 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 41**

제39항에 있어서,

상기 키메라 항원 수용체는 공동자극 신호전달 도메인을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 42**

제41항에 있어서,

상기 공동자극 신호전달 도메인은 분자: 4-1BB(CD137), CD27, CD19, CD4, CD28, ICOS(CD278), CD8  $\alpha$ , CD8  $\beta$ , BAFRR, HVEM, LIGHT, KIRDS2, SLAMF7, NKp30, NKp46, CD40, CDS, ICAM-1, B7-H3, OX40, DR3, GITR, CD30, TIM1, CD2, CD7, CD226의 공동자극 신호전달 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 43**

제42항에 있어서,

상기 공동자극 신호전달 도메인은 4-1BB 공동자극 신호전달 도메인인 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 44**

제41항에 있어서,

상기 키메라 항원 수용체는 EF1  $\alpha$ , T2A, tEGFR을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 45**

제44항에 있어서,

상기 키메라 항원 수용체는 tEGFR 신호 펩티드를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 46**

제29항에 있어서,

상기 제1항에 따른 나노바디 또는 제5항에 따른 인간화 항-CD7 나노바디 중 임의의 2개의 나노바디는 연결 펩티드 링커(Linker)를 통해 연결되는 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 47**

제46항에 있어서,

상기 키메라 항원 수용체는 EF1 $\alpha$ , 신호 펩티드, 제1항에 따른 나노바디 또는 제5항에 따른 인간화 항-CD7 나노바디 중 임의의 2개, CD8 $\alpha$  힌지 영역, CD8 $\alpha$  막횡단 도메인, 4-1BB 공동자극 신호전달 도메인, CD3 $\zeta$  세포내 신호전달 도메인, T2A, tEGFR 신호 펩티드, tEGFR을 순차적으로 직렬 연결하여 얻어지는 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 48**

제47항에 있어서,

상기 키메라 항원 수용체는 EF1 $\alpha$ , 신호 펩티드, 제1항에 따른 나노바디 중 임의의 하나, 링커, 제1항에 따른 나노바디 중 임의의 하나, CD8 $\alpha$  힌지 영역, CD8 $\alpha$  막횡단 도메인, 4-1BB 공동자극 신호전달 도메인, CD3 $\zeta$  세포내 신호전달 도메인, T2A, tEGFR 신호 펩티드, tEGFR을 순차적으로 직렬 연결하여 얻어지는 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 49**

제48항에 있어서,

상기 제1항에 따른 나노바디 중 임의의 하나는 VHH03, VHH06, VHH10 또는 VHH12인 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 50**

제49항에 있어서,

상기 키메라 항원 수용체는 EF1 $\alpha$ , 신호 펩티드, 제1항에 따른 VHH06, 링커, 제1항에 따른 VHH03, CD8 $\alpha$  힌지 영역, CD8 $\alpha$  막횡단 도메인, 4-1BB 공동자극 신호전달 도메인, CD3 $\zeta$  세포내 신호전달 도메인, T2A, tEGFR 신호 펩티드, tEGFR을 순차적으로 직렬 연결하여 얻어지는 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 51**

제49항에 있어서,

상기 키메라 항원 수용체는 EF1 $\alpha$ , 신호 펩티드, 제1항에 따른 VHH06, 링커, 제1항에 따른 VHH12, CD8 $\alpha$  힌지 영역, CD8 $\alpha$  막횡단 도메인, 4-1BB 공동자극 신호전달 도메인, CD3 $\zeta$  세포내 신호전달 도메인, T2A, tEGFR 신호 펩티드, tEGFR을 순차적으로 직렬 연결하여 얻어지는 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 52**

제49항에 있어서,

상기 키메라 항원 수용체는 EF1 $\alpha$ , 신호 펩티드, 제1항에 따른 VHH10, 링커, 제1항에 따른 VHH10, CD8 $\alpha$  힌지 영역, CD8 $\alpha$  막횡단 도메인, 4-1BB 공동자극 신호전달 도메인, CD3 $\zeta$  세포내 신호전달 도메인, T2A, tEGFR 신호 펩티드, tEGFR을 순차적으로 직렬 연결하여 얻어지는 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 53**

제49항에 있어서,

상기 키메라 항원 수용체는 EF1 $\alpha$ , 신호 펩티드, 제1항에 따른 VHH10, 링커, 제1항에 따른 VHH12, CD8 $\alpha$  힌지 영역, CD8 $\alpha$  막횡단 도메인, 4-1BB 공동자극 신호전달 도메인, CD3 $\zeta$  세포내 신호전달 도메인, T2A, tEGFR 신호 펩티드, tEGFR을 순차적으로 직렬 연결하여 얻어지는 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 54**

제49항에 있어서,

상기 키메라 항원 수용체는 EF1 $\alpha$ , 신호 펩티드, 제1항에 따른 VHH12, 링커, 제1항에 따른 VHH12, CD8 $\alpha$  힌지 영역, CD8 $\alpha$  막횡단 도메인, 4-1BB 공동자극 신호전달 도메인, CD3 $\zeta$  세포내 신호전달 도메인, T2A, tEGFR 신호 펩티드, tEGFR을 순차적으로 직렬 연결하여 얻어지는 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 55**

핵산 분자로서,

상기 핵산 분자는 제1항에 따른 나노바디, 제5항에 따른 인간화 항-CD7 나노바디, 제11항에 따른 키메라 항원 수용체 또는 제29항에 따른 키메라 항원 수용체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 핵산 분자.

**청구항 56**

제55항에 있어서,

상기 뉴클레오티드 서열은 서열번호 2, 서열번호 10, 서열번호 18, 서열번호 26, 서열번호 34, 서열번호 42, 서열번호 50, 서열번호 58, 서열번호 66, 서열번호 74, 서열번호 82, 서열번호 90, 서열번호 98, 서열번호 106, 서열번호 114, 서열번호 122, 서열번호 130으로 표시되거나, 서열번호 2, 서열번호 10, 서열번호 18, 서열번호 26, 서열번호 34, 서열번호 42, 서열번호 50, 서열번호 58, 서열번호 66, 서열번호 74, 서열번호 82, 서열번호 90, 서열번호 98, 서열번호 106, 서열번호 114, 서열번호 122, 서열번호 130과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열인 것을 특징으로 하는, 핵산 분자.

**청구항 57**

제조합 발현 벡터로서,

상기 제조합 발현 벡터는 제55항에 따른 핵산 분자를 포함하는 것을 특징으로 하는, 제조합 발현 벡터.

**청구항 58**

제57항에 있어서,

상기 발현 벡터는 DNA 벡터, RNA 벡터, 플라스미드, 트랜스포존 벡터, CRISPR/Cas9 벡터, 또는 바이러스 벡터를 포함하는 것을 특징으로 하는, 제조합 발현 벡터.

**청구항 59**

제58항에 있어서,

상기 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터를 포함하는 것을 특징으로 하는, 제조합 발현 벡터.

**청구항 60**

조작된 숙주 세포로서,

상기 조작된 숙주 세포는 제1항에 따른 나노바디, 제5항에 따른 인간화 항-CD7 나노바디, 제11항에 따른 키메라 항원 수용체 또는 제29항에 따른 키메라 항원 수용체를 발현하고;

상기 조작된 숙주 세포는 조작된 숙주 세포 집단을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 조작된 숙주 세포.

**청구항 61**

제60항에 있어서,

상기 조작된 숙주 세포는 제57항에 따른 재조합 발현 벡터를 포함하는 것을 특징으로 하는, 조작된 숙주 세포.

**청구항 62**

제61항에 있어서,

상기 조작된 숙주 세포는 조작된 면역 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는, 조작된 숙주 세포.

**청구항 63**

제62항에 있어서,

상기 조작된 면역 세포는 T 세포, NK 세포, iNKT 세포, CTL 세포, 단핵구, 대식 세포, 수지상 세포, NKT 세포 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 것을 특징으로 하는, 조작된 숙주 세포.

**청구항 64**

접합체로서,

상기 접합체는 제1항에 따른 나노바디 또는 제5항에 따른 인간화 항-CD7 나노바디, 및 상기 나노바디에 연결된 변형 모이어티를 포함하고, 상기 변형 모이어티는 검출 가능한 마커, 치료제를 포함하는 것을 특징으로 하는, 접합체.

**청구항 65**

제64항에 있어서,

상기 검출 가능한 마커는 효소, 방사성 핵종, 형광 염료, 발광 물질, 비오틴을 포함하는 것을 특징으로 하는, 접합체.

**청구항 66**

제64항에 있어서,

상기 치료제는 항종양 활성을 갖는 약물 또는 세포 독성제를 포함하는 것을 특징으로 하는, 접합체.

**청구항 67**

약학적 조성물로서,

상기 약학적 조성물은 제1항에 따른 나노바디, 제5항에 따른 인간화 항-CD7 나노바디, 제11항에 따른 키메라 항원 수용체, 제29항에 따른 키메라 항원 수용체, 제55항에 따른 핵산 분자, 제57항에 따른 재조합 발현 벡터, 제60항에 따른 조작된 숙주 세포 또는 제64항에 따른 접합체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

**청구항 68**

키트로서,

상기 키트는 제1항에 따른 나노바디, 제5항에 따른 인간화 항-CD7 나노바디, 제11항에 따른 키메라 항원 수용체, 제29항에 따른 키메라 항원 수용체, 제55항에 따른 핵산 분자, 제57항에 따른 재조합 발현 벡터, 제60항에 따른 조작된 숙주 세포 또는 제64항에 따른 접합체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 키트.

**청구항 69**

CD7 단백질 또는 이의 항원 단편 검출용 시약으로서,

상기 CD7 단백질 또는 이의 항원 단편 검출용 시약은 제1항에 따른 나노바디, 제5항에 따른 나노바디 또는 제64항에 따른 접합체를 포함하는 것을 특징으로 하는, CD7 단백질 또는 이의 항원 단편 검출용 시약.

**청구항 70**

생물학적 제제로서,

상기 생물학적 제제는 제60항에 따른 조작된 숙주 세포 및/또는 제67항에 따른 약학적 조성물을 함유하는 것을 특징으로 하는, 생물학적 제제.

**청구항 71**

포유동물 내 표적 세포 집단 또는 조직에 대한 면역 반응 자극 방법으로서,

상기 방법은, 제60항에 따른 조작된 숙주 세포, 제64항에 따른 접합체, 제67항에 따른 약학적 조성물 또는 제70항에 따른 생물학적 제제의 유효량을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 포유동물 내 표적 세포 집단 또는 조직에 대한 면역 반응 자극 방법.

**청구항 72**

대상체 체내의 면역 반응 조절 방법으로서,

상기 방법은, 제60항에 따른 조작된 숙주 세포, 제64항에 따른 접합체, 제67항에 따른 약학적 조성물 또는 제70항에 따른 생물학적 제제의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 대상체 체내의 면역 반응 조절 방법.

**청구항 73**

제1항에 따른 나노바디 또는 제5항에 따른 인간화 항-CD7 나노바디의 생산 방법으로서,

상기 방법은, 제60항에 따른 조작된 숙주 세포를 배양하고, 배양물로부터 제1항에 따른 나노바디 또는 제5항에 따른 인간화 항-CD7 나노바디를 분리하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

**청구항 74**

CD7 활성을 특이적으로 억제하는 방법으로서,

상기 방법은, 제55항에 따른 핵산 분자를 생체 세포에 도입하고, 제1항에 따른 나노바디 또는 제5항에 따른 인간화 항-CD7 나노바디를 발현하여 CD7 활성을 억제하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, CD7 활성을 특이적으로 억제하는 방법.

**청구항 75**

CD7 관련 질병 또는 병증의 예방 및/또는 치료 방법으로서,

상기 방법은, 제1항에 따른 나노바디, 제5항에 따른 인간화 항-CD7 나노바디, 제55항에 따른 핵산 분자, 제57항에 따른 제조합 발현 벡터, 제60항에 따른 조작된 숙주 세포, 제64항에 따른 접합체, 제67항에 따른 약학적 조성물 또는 제70항에 따른 생물학적 제제의 유효량을 CD7 관련 질병 또는 병증이 있는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

**청구항 76**

제75항에 있어서,

상기 CD7 관련 질병 또는 병증은 CD7-발현 종양을 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

**청구항 77**

제76항에 있어서,

상기 종양은 T 림프구계 혈액 종양인 것을 특징으로 하는, 방법.

**청구항 78**

제77항에 있어서,

상기 종양은 급성 골수성 백혈병(AML), 급성 림프구성 백혈병(ALL), 림프구성 림프종(LBL), NKT 세포 백혈병, 말초 T 세포 림프종(NHL), NKT 세포 림프종, 역형성 대세포 림프종(ALCL)을 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

**청구항 79**

CD7 단백질 또는 이의 항원 단편 검출 방법으로서,

상기 방법은,

- (1) CD7 단백질 또는 이의 항원 단편을 함유하는 샘플을 얻는 단계;
- (2) 단계 (1)에서 수집된 샘플을 제1항에 따른 나노바디, 제5항에 따른 인간화 항-CD7 나노바디, 제64항에 따른 접합체, 제68항에 따른 키트 또는 제69항에 따른 CD7 단백질 또는 이의 항원 단편 검출용 시약과 접촉시키는 단계; 및
- (3) 항체-항원 복합체의 존재를 검출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

**청구항 80**

제79항에 있어서,

상기 나노바디는 검출 가능한 마커에 의해 마킹되는 나노바디인 것을 특징으로 하는, 방법.

**청구항 81**

제80항에 있어서,

상기 검출 가능한 마커는 형광 색소, 아비딘, 상자성 원자, 방사성 동위원소를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

**청구항 82**

제81항에 있어서,

상기 형광 색소는 플루오레세인, 로다민, 텍사스(Texas) 레드, 피코에리트린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, 폴리디노피코잔틴-클로로필린인 것을 특징으로 하는, 방법.

**청구항 83**

제81항에 있어서,

상기 아비딘은 비오틴, 오발부비딘, 스트렙타비딘, 비텔라비딘, 유사 아비딘인 것을 특징으로 하는, 방법.

**청구항 84**

제81항에 있어서,

상기 방사성 동위원소는 방사성 요오드, 방사성 세슘, 방사성 이리듐, 방사성 코발트인 것을 특징으로 하는, 방법.

**청구항 85**

제60항에 따른 조각된 숙주 세포의 제조 방법으로서,

상기 방법은 제57항에 따른 재조합 발현 벡터를 숙주 세포에 도입하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

**청구항 86**

제85항에 있어서,

상기 도입 방법은 지방 감염법, 미세 주입, 전기 천공, DNA 벡터, RNA 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 포क्स바이러스 벡터, 단순 포진 바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노 관련 바이러스 벡터를 포

함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

**청구항 87**

대상체가 CD7-발현 종양을 앓고 있는지 여부를 진단하는 방법으로서,  
상기 방법은,

- (1) CD7-발현 종양이 의심되는 대상체로부터의 샘플을 제공하는 단계;
- (2) 샘플을 제1항에 따른 나노바디, 제5항에 따른 인간화 항-CD7 나노바디, 제64항에 따른 접합체, 제68항에 따른 키트 또는 제69항에 따른 CD7 단백질 또는 이의 항원 단편 검출용 시약과 접촉시키는 단계; 및
- (3) 상기 나노바디와 항원을 포함하는 복합체의 형성을 검출하고, 상기 대상체로부터의 샘플 내 CD7의 양을 얻 으며, 상기 대상체로부터의 샘플 내 상기 CD7의 양을 알려진 표준품 또는 참조 샘플 내 상기 CD7의 양과 비교하 여 상기 대상체로부터의 샘플의 CD7 수준이 종양과 관련된 CD7 수준 내에 속하는지 여부를 결정하는 단계를 포 함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

**청구항 88**

제87항에 있어서,

단계 (1)에서 상기 샘플은 소변, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 복수, 순환 세포, 순환 종양 세포, 비조직 관련 세포, 조직 또는 조직학적 제조물을 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

**청구항 89**

제87항에 있어서,

상기 CD7-발현 종양은 T 림프구계 혈액 종양인 것을 특징으로 하는, 방법.

**청구항 90**

제89항에 있어서,

상기 종양은 급성 골수성 백혈병(AML), 급성 림프구성 백혈병(ALL), 림프구성 림프종(LBL), NKT 세포 백혈병, 말초 T 세포 림프종(NHL), NKT 세포 림프종, 역형성 대세포 림프종(ALCL)을 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

**청구항 91**

CD7 단백질 또는 이의 항원 단편을 검출하는 데 있어서 제1항에 따른 나노바디 또는 제5항에 따른 인간화 항-CD7 나노바디의 응용.

**청구항 92**

CD7 단백질 또는 이의 항원 단편 검출용 시약 또는 키트의 제조에 있어서 제1항에 따른 나노바디 또는 제5항에 따른 인간화 항-CD7 나노바디의 응용.

**청구항 93**

조작된 숙주 세포의 제조에 있어서 제55항에 따른 핵산 분자 또는 제57항에 따른 재조합 발현 벡터의 응용.

**청구항 94**

제93항에 있어서,

상기 조작된 숙주 세포는 제60항에 따른 조작된 숙주 세포인 것을 특징으로 하는, 응용.

**청구항 95**

항종양 약물의 제조에 있어서 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 나노바디, 제5항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 인간화 항-CD7 나노바디, 제11항 내지 제28항 중 어느 한 항에 따른 키메라 항원 수용체, 제29항 내

지 제54항 중 어느 한 항에 따른 키메라 항원 수용체, 제55항 또는 제56항에 따른 핵산 분자, 제57항 내지 제59항 중 어느 한 항에 따른 제조합 발현 벡터, 제60항 내지 제63항 중 어느 한 항에 따른 조작된 숙주 세포, 제64항 내지 제66항 중 어느 한 항에 따른 접합체, 제67항에 따른 약학적 조성물 또는 제70항에 따른 생물학적 제제의 응용.

**청구항 96**

제95항에 있어서,

상기 항종양 약물은 항종양 면역 세포 요법제, 항종양 유전자 요법 약물을 포함하는 것을 특징으로 하는, 응용.

**청구항 97**

제96항에 있어서,

상기 종양은 CD7-발현 종양인 것을 특징으로 하는, 응용.

**청구항 98**

제97항에 있어서,

상기 종양은 T 림프구계 혈액 종양인 것을 특징으로 하는, 응용.

**청구항 99**

제98항에 있어서,

상기 종양은 급성 골수성 백혈병(AML), 급성 림프구성 백혈병(ALL), 림프구성 림프종(LBL), NKT 세포 백혈병, 말초 T 세포 림프종(NHL), NKT 세포 림프종, 역형성 대세포 림프종(ALCL)을 포함하는 것을 특징으로 하는, 응용.

**청구항 100**

종양의 예방 및/또는 치료를 위한 면역 세포 제조용 키트의 제조에 있어서 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 나노바디, 제5항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 인간화 항-CD7 나노바디, 제11항 내지 제28항 중 어느 한 항에 따른 키메라 항원 수용체, 제29항 내지 제54항 중 어느 한 항에 따른 키메라 항원 수용체, 제55항 또는 제56항에 따른 핵산 분자, 제57항 내지 제59항 중 어느 한 항에 따른 제조합 발현 벡터, 제60항 내지 제63항 중 어느 한 항에 따른 조작된 숙주 세포, 제64항 내지 제66항 중 어느 한 항에 따른 접합체, 제67항에 따른 약학적 조성물 또는 제70항에 따른 생물학적 제제의 응용.

**청구항 101**

제100항에 있어서,

상기 종양은 CD7-발현 종양인 것을 특징으로 하는, 응용.

**청구항 102**

제101항에 있어서,

상기 종양은 T 림프구계 혈액 종양인 것을 특징으로 하는, 응용.

**청구항 103**

제102항에 있어서,

상기 종양은 급성 골수성 백혈병(AML), 급성 림프구성 백혈병(ALL), 림프구성 림프종(LBL), NKT 세포 백혈병, 말초 T 세포 림프종(NHL), NKT 세포 림프종, 역형성 대세포 림프종(ALCL)을 포함하는 것을 특징으로 하는, 응용.

**청구항 104**

종양의 예방 및/또는 치료를 위한 생물학적 제제의 제조에 있어서 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 나노

바디, 제5항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 인간화 항-CD7 나노바디, 제11항 내지 제28항 중 어느 한 항에 따른 키메라 항원 수용체, 제29항 내지 제54항 중 어느 한 항에 따른 키메라 항원 수용체, 제55항 또는 제56항에 따른 핵산 분자, 제57항 내지 제59항 중 어느 한 항에 따른 재조합 발현 벡터, 제60항 내지 제63항 중 어느 한 항에 따른 조작된 숙주 세포, 제64항 내지 제66항 중 어느 한 항에 따른 집합체 또는 제67항에 따른 약학적 조성물의 응용.

**청구항 105**

제104항에 있어서,  
상기 종양은 CD7-발현 종양인 것을 특징으로 하는, 응용.

**청구항 106**

제105항에 있어서,  
상기 종양은 T 림프구계 혈액 종양인 것을 특징으로 하는, 응용.

**청구항 107**

제106항에 있어서,  
상기 종양은 급성 골수성 백혈병(AML), 급성 림프구성 백혈병(ALL), 림프구성 림프종(LBL), NKT 세포 백혈병, 말초 T 세포 림프종(NHL), NKT 세포 림프종, 역형성 대세포 림프종(ALCL)을 포함하는 것을 특징으로 하는, 응용.

**청구항 108**

종양의 예방 및/또는 치료에 있어서 제60항 내지 제63항 중 어느 한 항에 따른 조작된 숙주 세포의 응용.

**청구항 109**

제108항에 있어서,  
상기 종양은 CD7-발현 종양인 것을 특징으로 하는, 응용.

**청구항 110**

제109항에 있어서,  
상기 종양은 T 림프구계 혈액 종양인 것을 특징으로 하는, 응용.

**청구항 111**

제110항에 있어서,  
상기 종양은 급성 골수성 백혈병(AML), 급성 림프구성 백혈병(ALL), 림프구성 림프종(LBL), NKT 세포 백혈병, 말초 T 세포 림프종(NHL), NKT 세포 림프종, 역형성 대세포 림프종(ALCL)을 포함하는 것을 특징으로 하는, 응용.

**청구항 112**

종양의 예방 및/또는 치료에 있어서 제64항 내지 제66항 중 어느 한 항에 따른 집합체의 응용.

**청구항 113**

제112항에 있어서,  
상기 종양은 CD7-발현 종양인 것을 특징으로 하는, 응용.

**청구항 114**

제113항에 있어서,

상기 종양은 T 림프구계 혈액 종양인 것을 특징으로 하는, 응용.

**청구항 115**

제114항에 있어서,

상기 종양은 급성 골수성 백혈병(AML), 급성 림프구성 백혈병(ALL), 림프구성 림프종(LBL), NKT 세포 백혈병, 말초 T 세포 림프종(NHL), NKT 세포 림프종, 역형성 대세포 림프종(ALCL)을 포함하는 것을 특징으로 하는, 응용.

**청구항 116**

종양의 예방 및/또는 치료에 있어서 제67항에 따른 약학적 조성물의 응용.

**청구항 117**

제116항에 있어서,

상기 종양은 CD7-발현 종양인 것을 특징으로 하는, 응용.

**청구항 118**

제117항에 있어서,

상기 종양은 T 림프구계 혈액 종양인 것을 특징으로 하는, 응용.

**청구항 119**

제118항에 있어서,

상기 종양은 급성 골수성 백혈병(AML), 급성 림프구성 백혈병(ALL), 림프구성 림프종(LBL), NKT 세포 백혈병, 말초 T 세포 림프종(NHL), NKT 세포 림프종, 역형성 대세포 림프종(ALCL)을 포함하는 것을 특징으로 하는, 응용.

**청구항 120**

종양의 예방 및/또는 치료를 위한 면역 세포의 제조에 있어서 제68항에 따른 키트의 응용.

**청구항 121**

제120항에 있어서,

상기 면역 세포는 제60항에 따른 조작된 숙주 세포인 것을 특징으로 하는, 응용.

**청구항 122**

CD7 단백질 또는 이의 항원 단편을 검출하는 데 있어서 제69항에 따른 CD7 단백질 또는 이의 항원 단편 검출용 시약의 응용.

**청구항 123**

종양의 예방 및/또는 치료에 있어서 제70항에 따른 생물학적 제제의 응용.

**청구항 124**

제123항에 있어서,

상기 종양은 CD7-발현 종양인 것을 특징으로 하는, 응용.

**청구항 125**

제124항에 있어서,

상기 종양은 T 림프구계 혈액 종양인 것을 특징으로 하는, 응용.

**청구항 126**

제125항에 있어서,

상기 종양은 급성 골수성 백혈병(AML), 급성 림프구성 백혈병(ALL), 림프구성 림프종(LBL), NKT 세포 백혈병, 말초 T 세포 림프종(NHL), NKT 세포 림프종, 역형성 대세포 림프종(ALCL)을 포함하는 것을 특징으로 하는, 응용.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001]

관련 출원의 상호 참조

[0002]

본 발명은 2022년 3월 30일에 제출된 출원 번호가 2022103314787이고, 명칭이 “항-CD7 나노바디, 유도체 및 종양 치료에 있어서 이의 응용” 인 발명 특허 출원의 우선권을 주장하는 바, 그 전체 내용은 참조로서 통합된다.

[0003]

본 발명은 생물의약 기술분야에 속하는 것으로, 구체적으로, 본 발명은 항-CD7 나노바디, 유도체 및 종양 치료에 있어서 이의 응용에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0004]

CD7 항원은 단일 사슬 당단백질로, T 세포 발달 과정에서의 특징적인 항원 분자이다. 건강한 인간 흉선 세포, T 세포 및 자연 살상 세포 외에, 림프구계, 골수계 전구 세포 등 조혈 줄기 및 전구 세포도 CD7을 발현한다. 수많은 연구에서는 다수의 인간 T 림프구 백혈병 및 림프종에서 CD7 분자를 발현하고(Karube K, Ohshima K, Tsuchiya T, et al. Non-B, non-T neoplasms with lymphoblast morphology: further clarification and classification[J]. The American journal of surgical pathology, 2003, 27(10): 1366-1374. Shiyong Li, Jonathan Juco, Karen P. Mann, et al. Flow Cytometry in the Differential Diagnosis of Lymphocyte-Rich Thymoma From Precursor T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia/Lymphoblastic Lymphoma[J]., American Journal of Clinical Pathology, 2004, 121: 268-274.), 약 10%의 급성 골수성 백혈병(Acute myeloidleukemia, AML)에서 CD7 항원을 발현하는 것으로 나타났다(Foon K A, Todd R F. Immunologic classification of leukemia and lymphoma[J]. Blood. 1986, 68: 1-31). 이 밖에, CD7 분자가 대응하는 항체에 결합한 후 세포내이입이 빠르게 발생하는데, 이러한 특성으로 인해 CD7은 다양한 기능성 분자를 CD7 양성 세포 내로 표적화하는 데 적합한 항원 수용체로 사용될 수 있으며; 관련 연구에서도 인체 내에 CD7 음성 T 림프구 집단이 존재한다는 것이 밝혀졌는 바, 이러한 집단의 세포는 인체의 정상적인 면역 기능을 유지할 수 있어, CD7 나노바디 관련 면역 세포를 사용하여 CD7 양성 세포를 모두 제거함으로써, 발생하는 면역 기능의 상실을 방지한다. 이로부터 CD7을 표적으로 하는 것이 유망한 항종양 방향임을 알 수 있다.

[0005]

키메라 항원 수용체 변형 T 세포(Chimeric antigen receptor modification T cells, CAR-T) 및 키메라 항원 수용체 변형 NK 세포(Chimeric antigen receptor modification NK cells, CAR-NK) 면역요법은 현재 연구 진도가 가장 빠른 두 가지 종양 세포 면역요법으로, CAR-T/CAR-NK 세포의 효과적인 활성화는 종양 관련 항원을 인식하는 항체의 특이성과 항원 결합의 친화도 강약 등 성질에 크게 의존한다. 따라서 현재 CAR-T/CAR-NK 세포 세포내 신호전달 영역 설계가 성숙해진 현 상황에서 항원 결합 영역의 설계는 새로운 CAR-T 기술 개발의 초점이자 핵심으로 되고 있다. 낙타과(낙타, 알파카) 또는 상어 체내에는 자연적으로 경쇄가 부족한 중쇄 항체(Heavy chain antibody, HCAb)가 존재하는데, 이 항체는 1개의 중쇄 가변 영역, 2개의 기존 CH2 및 CH3 영역만 포함한다. 중쇄 가변 영역은 중쇄 항체와 동일한 안정성과 항원 결합 활성을 가지며, 크기는 2.4×4 nm이고, 항원에 결합할 수 있는 가장 작은 단편으로, 단일 도메인 항체(Variable domain of heavy chain of heavy-chain antibody, VHh) 또는 나노바디로 지칭된다. 기존 항체와 비교하여, VHh 단일 도메인 항체는 분자량이 작고 발현량이 높으며, 화학적 안정성이 좋고, 친화도가 높으며, 인간화 항체와의 상동성이 높고, 면역원성이 낮다. 분자량이 작기 때문에 유전 공학 조작을 쉽게 수행하고, 이중 또는 다중 특이적 단일 도메인 항체 조합을 구축하여 하나의 분자로 여러 표적점 또는 다양한 기능 효과를 달성한다. VHh는 조직 침투성이 좋고, 종양 치료 시 기존 항체로는 접촉할 수 없는 비교적 은폐된 표적점에 접촉할 가능성이 있다. 이러한 장점 때문에 CAR 항원 결합 영역으로서 단일 도메인 항체를 이용하여 CAR 변형 및 CAR-T/CAR-NK 세포 요법을 수행하면 당업계에서 새로운 종양 치료 전략을 제공할 수 있다.

**발명의 내용**

- [0006] 이를 감안하여, 본 발명의 목적은 당업계에 항-CD7 나노바디, 유도체 및 종양 치료에 있어서 이의 응용을 제공하는 것이다.
- [0007] 본 발명의 상기 목적은 다음과 같은 기술적 해결수단을 통해 구현된다.
- [0008] 본 발명의 제1 양태는 항-CD7 나노바디를 제공한다.
- [0009] 나아가, 상기 나노바디는 VHH01, VHH03, VHH04, VHH06, VHH07, VHH08, VHH09, VHH10, VHH12, VHH13, VHH14, VHH15, VHH16, VHH17, VHH18, VHH19 또는 VHH20 중 임의의 하나이고;
- [0010] 바람직하게는, 상기 VHH01의 CDR1, CDR2, CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 3, 서열번호 5, 서열번호 7로 표시되거나, 각각 서열번호 3, 서열번호 5, 서열번호 7과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이며;
- [0011] 바람직하게는, 상기 VHH03의 CDR1, CDR2, CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 11, 서열번호 13, 서열번호 15로 표시되거나, 각각 서열번호 11, 서열번호 13, 서열번호 15와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이고;
- [0012] 바람직하게는, 상기 VHH04의 CDR1, CDR2, CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 19, 서열번호 21, 서열번호 23으로 표시되거나, 각각 서열번호 19, 서열번호 21, 서열번호 23과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이며;
- [0013] 바람직하게는, 상기 VHH06의 CDR1, CDR2, CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 27, 서열번호 29, 서열번호 31로 표시되거나, 각각 서열번호 27, 서열번호 29, 서열번호 31과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이고;
- [0014] 바람직하게는, 상기 VHH07의 CDR1, CDR2, CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 35, 서열번호 37, 서열번호 39로 표시되거나, 각각 서열번호 35, 서열번호 37, 서열번호 39와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이며;
- [0015] 바람직하게는, 상기 VHH08의 CDR1, CDR2, CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 43, 서열번호 45, 서열번호 47로 표시되거나, 각각 서열번호 43, 서열번호 45, 서열번호 47과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이고;
- [0016] 바람직하게는, 상기 VHH09의 CDR1, CDR2, CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 51, 서열번호 53, 서열번호 55로 표시되거나, 각각 서열번호 51, 서열번호 53, 서열번호 55와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이며;
- [0017] 바람직하게는, 상기 VHH10의 CDR1, CDR2, CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 59, 서열번호 61, 서열번호 63으로 표시되거나, 각각 서열번호 59, 서열번호 61, 서열번호 63과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이고;
- [0018] 바람직하게는, 상기 VHH12의 CDR1, CDR2, CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 67, 서열번호 69, 서열번호 71로 표시되거나, 각각 서열번호 67, 서열번호 69, 서열번호 71과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이며;
- [0019] 바람직하게는, 상기 VHH13의 CDR1, CDR2, CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 75, 서열번호 77, 서열번호 79

로 표시되거나, 각각 서열번호 75, 서열번호 77, 서열번호 79와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이고;

- [0020] 바람직하게는, 상기 VHH14의 CDR1, CDR2, CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 83, 서열번호 85, 서열번호 87로 표시되거나, 각각 서열번호 83, 서열번호 85, 서열번호 87과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이며;
- [0021] 바람직하게는, 상기 VHH15의 CDR1, CDR2, CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 91, 서열번호 93, 서열번호 95로 표시되거나, 각각 서열번호 91, 서열번호 93, 서열번호 95와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이고;
- [0022] 바람직하게는, 상기 VHH16의 CDR1, CDR2, CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 99, 서열번호 101, 서열번호 103으로 표시되거나, 각각 서열번호 99, 서열번호 101, 서열번호 103과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이며;
- [0023] 바람직하게는, 상기 VHH17의 CDR1, CDR2, CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 107, 서열번호 109, 서열번호 111로 표시되거나, 각각 서열번호 107, 서열번호 109, 서열번호 111과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이고;
- [0024] 바람직하게는, 상기 VHH18의 CDR1, CDR2, CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 115, 서열번호 117, 서열번호 119로 표시되거나, 각각 서열번호 115, 서열번호 117, 서열번호 119와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이며;
- [0025] 바람직하게는, 상기 VHH19의 CDR1, CDR2, CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 123, 서열번호 125, 서열번호 127로 표시되거나, 각각 서열번호 123, 서열번호 125, 서열번호 127과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이고;
- [0026] 바람직하게는, 상기 VHH20의 CDR1, CDR2, CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 131, 서열번호 133, 서열번호 135로 표시되거나, 각각 서열번호 131, 서열번호 133, 서열번호 135와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이며;
- [0027] 보다 바람직하게는, 상기 VHH01의 CDR1, CDR2, CDR3의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 4, 서열번호 6, 서열번호 8로 표시되거나, 각각 서열번호 4, 서열번호 6, 서열번호 8과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이고;
- [0028] 보다 바람직하게는, 상기 VHH03의 CDR1, CDR2, CDR3의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 12, 서열번호 14, 서열번호 16으로 표시되거나, 각각 서열번호 12, 서열번호 14, 서열번호 16과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이며;
- [0029] 보다 바람직하게는, 상기 VHH04의 CDR1, CDR2, CDR3의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 20, 서열번호 22, 서열번호 24로 표시되거나, 각각 서열번호 20, 서열번호 22, 서열번호 24와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이고;
- [0030] 보다 바람직하게는, 상기 VHH06의 CDR1, CDR2, CDR3의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 28, 서열번호 30, 서열번호 32로 표시되거나, 각각 서열번호 28, 서열번호 30, 서열번호 32와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동

일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이며;

- [0031] 보다 바람직하게는, 상기 VHH07의 CDR1, CDR2, CDR3의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 36, 서열번호 38, 서열번호 40으로 표시되거나, 각각 서열번호 36, 서열번호 38, 서열번호 40과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이고;
- [0032] 보다 바람직하게는, 상기 VHH08의 CDR1, CDR2, CDR3의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 44, 서열번호 46, 서열번호 48로 표시되거나, 각각 서열번호 44, 서열번호 46, 서열번호 48과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이며;
- [0033] 보다 바람직하게는, 상기 VHH09의 CDR1, CDR2, CDR3의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 52, 서열번호 54, 서열번호 56으로 표시되거나, 각각 서열번호 52, 서열번호 54, 서열번호 56과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이고;
- [0034] 보다 바람직하게는, 상기 VHH10의 CDR1, CDR2, CDR3의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 60, 서열번호 62, 서열번호 64로 표시되거나, 각각 서열번호 60, 서열번호 62, 서열번호 64와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이며;
- [0035] 보다 바람직하게는, 상기 VHH12의 CDR1, CDR2, CDR3의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 68, 서열번호 70, 서열번호 72로 표시되거나, 각각 서열번호 68, 서열번호 70, 서열번호 72와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이고;
- [0036] 보다 바람직하게는, 상기 VHH13의 CDR1, CDR2, CDR3의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 76, 서열번호 78, 서열번호 80으로 표시되거나, 각각 서열번호 76, 서열번호 78, 서열번호 80과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이며;
- [0037] 보다 바람직하게는, 상기 VHH14의 CDR1, CDR2, CDR3의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 84, 서열번호 86, 서열번호 88로 표시되거나, 각각 서열번호 84, 서열번호 86, 서열번호 88과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이고;
- [0038] 보다 바람직하게는, 상기 VHH15의 CDR1, CDR2, CDR3의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 92, 서열번호 94, 서열번호 96으로 표시되거나, 각각 서열번호 92, 서열번호 94, 서열번호 96과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이며;
- [0039] 보다 바람직하게는, 상기 VHH16의 CDR1, CDR2, CDR3의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 100, 서열번호 102, 서열번호 104로 표시되거나, 각각 서열번호 100, 서열번호 102, 서열번호 104와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이고;
- [0040] 보다 바람직하게는, 상기 VHH17의 CDR1, CDR2, CDR3의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 108, 서열번호 110, 서열번호 112로 표시되거나, 각각 서열번호 108, 서열번호 110, 서열번호 112와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이며;
- [0041] 보다 바람직하게는, 상기 VHH18의 CDR1, CDR2, CDR3의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 116, 서열번호 118, 서열번호 120으로 표시되거나, 각각 서열번호 116, 서열번호 118, 서열번호 120과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이고;
- [0042] 보다 바람직하게는, 상기 VHH19의 CDR1, CDR2, CDR3의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 124, 서열번호 126,

서열번호 128로 표시되거나, 각각 서열번호 124, 서열번호 126, 서열번호 128과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이며;

[0043] 보다 바람직하게는, 상기 VHH20의 CDR1, CDR2, CDR3의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 132, 서열번호 134, 서열번호 136으로 표시되거나, 각각 서열번호 132, 서열번호 134, 서열번호 136과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이고;

[0044] 가장 바람직하게는, 상기 VHH01, VHH03, VHH04, VHH06, VHH07, VHH08, VHH09, VHH10, VHH12, VHH13, VHH14, VHH15, VHH16, VHH17, VHH18, VHH19, VHH20의 아미노산 서열은 각각 서열번호 1, 서열번호 9, 서열번호 17, 서열번호 25, 서열번호 33, 서열번호 41, 서열번호 49, 서열번호 57, 서열번호 65, 서열번호 73, 서열번호 81, 서열번호 89, 서열번호 97, 서열번호 105, 서열번호 113, 서열번호 121, 서열번호 129로 표시되거나, 각각 서열번호 1, 서열번호 9, 서열번호 17, 서열번호 25, 서열번호 33, 서열번호 41, 서열번호 49, 서열번호 57, 서열번호 65, 서열번호 73, 서열번호 81, 서열번호 89, 서열번호 97, 서열번호 105, 서열번호 113, 서열번호 121, 서열번호 129와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이며;

[0045] 가장 바람직하게는, 상기 VHH01, VHH03, VHH04, VHH06, VHH07, VHH08, VHH09, VHH10, VHH12, VHH13, VHH14, VHH15, VHH16, VHH17, VHH18, VHH19, VHH20의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 2, 서열번호 10, 서열번호 18, 서열번호 26, 서열번호 34, 서열번호 42, 서열번호 50, 서열번호 58, 서열번호 66, 서열번호 74, 서열번호 82, 서열번호 90, 서열번호 98, 서열번호 106, 서열번호 114, 서열번호 122, 서열번호 130으로 표시되거나, 각각 서열번호 2, 서열번호 10, 서열번호 18, 서열번호 26, 서열번호 34, 서열번호 42, 서열번호 50, 서열번호 58, 서열번호 66, 서열번호 74, 서열번호 82, 서열번호 90, 서열번호 98, 서열번호 106, 서열번호 114, 서열번호 122, 서열번호 130과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이다.

[0046] 나아가, 상기 VHH01, VHH03, VHH04, VHH06, VHH07, VHH08, VHH09, VHH10, VHH12, VHH13, VHH14, VHH15, VHH16, VHH17, VHH18, VHH19 또는 VHH20 중 하나 이상의 CDR1, CDR2, CDR3의 아미노산 서열 또는 뉴클레오티드 서열의 임의의 조합에 의해 얻어진 나노바디 역시 본 발명의 보호 범위 내에 속한다.

[0047] 나아가, CD7은 T 세포 표면의 매우 안정적인 마커로, 미숙한 T 세포든 성숙한 T 세포든 모두 CD7을 발현하므로, 미숙한 T 세포 종양(T-ALL/LBL/NKT 세포 백혈병) 환자는 성숙한 T 세포 종양(말초 T 세포 림프종, NKT 세포 림프종, 역형성 대세포 림프종) 환자는 CD7은 기본적으로 모두 높게 발현된다. 따라서, T계 혈액 종양을 치료하기 위한 상기 표적점의 CAR-T는 현재 임상적으로 가장 빠르게 발전하는 기술 중 하나이다.

[0048] 본 발명의 제2 양태는 인간화 항-CD7 나노바디를 제공한다.

[0049] 나아가, 상기 인간화 항-CD7 나노바디는 보편적인 인간화 프레임워크 h-NbBcII10FGLA를 기준으로, DP-47과 비교하여 나노바디의 핵심 위치에 있는 잔기를 인간화하여 얻어지고;

[0050] 바람직하게는, 상기 인간화 항-CD7 나노바디는 hVHH01, hVHH03, hVHH04, hVHH06, hVHH07, hVHH08, hVHH09, hVHH10, hVHH12, hVHH13, hVHH14, hVHH15, hVHH16, hVHH17, hVHH18, hVHH19 또는 hVHH20 중 임의의 하나이며;

[0051] 보다 바람직하게는, 상기 hVHH06의 CDR1, CDR2, CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 139, 서열번호 141, 서열번호 143으로 표시되거나, 각각 서열번호 139, 서열번호 141, 서열번호 143과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이고;

[0052] 가장 바람직하게는, 상기 hVHH06의 CDR1, CDR2, CDR3의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 140, 서열번호 142, 서열번호 144로 표시되거나, 각각 서열번호 140, 서열번호 142, 서열번호 144와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이며;

[0053] 가장 바람직하게는, 상기 hVHH06의 아미노산 서열은 서열번호 137로 표시되거나, 서열번호 137과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이고;

- [0054] 가장 바람직하게는, 상기 hVHH06의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 138로 표시되거나, 서열번호 138과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이다.
- [0055] 본 발명의 제3 양태는 단일 나노바디 기반의 키메라 항원 수용체를 제공한다.
- [0056] 나아가, 상기 키메라 항원 수용체는 본 발명의 제1 양태에 따른 나노바디 또는 본 발명의 제2 양태에 따른 인간 화 항-CD7 나노바디 중 임의의 하나를 포함하고;
- [0057] 바람직하게는, 상기 키메라 항원 수용체는 막횡단 도메인을 더 포함하며;
- [0058] 바람직하게는, 상기 키메라 항원 수용체는 세포내 신호전달 도메인을 더 포함하고;
- [0059] 바람직하게는, 상기 키메라 항원 수용체는 힌지 영역을 더 포함하며;
- [0060] 바람직하게는, 상기 키메라 항원 수용체는 신호 펩티드를 더 포함하고;
- [0061] 바람직하게는, 상기 키메라 항원 수용체는 공동자극 신호전달 도메인을 더 포함하며;
- [0062] 바람직하게는, 상기 키메라 항원 수용체는 프로모터 EF1 $\alpha$ 를 더 포함하고;
- [0063] 바람직하게는, 상기 키메라 항원 수용체는 자가 절단 펩티드 T2A를 더 포함하며;
- [0064] 바람직하게는, 상기 키메라 항원 수용체는 검출 태그/보조 기능 요소 tEGFR을 더 포함하고;
- [0065] 보다 바람직하게는, 상기 막횡단 도메인은 분자: CD8 $\alpha$ , CD28, IgG1, IgG4, 4-1BB, PD-1, CD34, OX40, CD3 $\epsilon$ , IL-2 수용체, IL-7 수용체, IL-11 수용체의 막횡단 도메인을 포함하며;
- [0066] 보다 바람직하게는, 상기 세포내 신호전달 도메인은 분자: CD3 $\zeta$ , FcR $\gamma$ , FcR $\beta$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ , TCR $\zeta$ , CD4, CD5, CD8, CD21, CD22, CD79a, CD79b, CD278, Fc $\epsilon$ RI, DAP10, DAP12, CD66d의 세포내 신호전달 도메인을 포함하고;
- [0067] 보다 바람직하게는, 상기 힌지 영역은 분자: CD8 $\alpha$ , CD28, IgG1, IgG4, 4-1BB, PD-1, CD34, OX40, CD3 $\epsilon$ , IL-2 수용체, IL-7 수용체, IL-11 수용체의 힌지 영역을 포함하며;
- [0068] 보다 바람직하게는, 상기 신호 펩티드는 분자: T 세포 수용체의  $\alpha$  사슬 및  $\beta$  사슬, CD3 $\zeta$ , CD3 $\epsilon$ , CD4, CD5, CD8, CD9, CD28, CD16, CD22, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, GITR, GM-CSF의 신호 펩티드를 포함하고;
- [0069] 보다 바람직하게는, 상기 공동자극 신호전달 도메인은 분자: 4-1BB(CD137), CD27, CD19, CD4, CD28, ICOS(CD278), CD8 $\alpha$ , CD8 $\beta$ , BAFRR, HVEM, LIGHT, KIRDS2, SLAMF7, NKp30, NKp46, CD40, CDS, ICAM-1, B7-H3, OX40, DR3, GITR, CD30, TIM1, CD2, CD7, CD226의 공동자극 신호전달 도메인을 포함하며;
- [0070] 보다 바람직하게는, 상기 프로모터는 EF1 $\alpha$  프로모터에 한정되지 않으며, CMV 프로모터, EFS 프로모터, CAG 프로모터, CBh 프로모터, SFFV 프로모터, MSCV 프로모터, SV40 프로모터, mPGK 프로모터, hPGK 프로모터, UBC 프로모터를 더 포함하고;
- [0071] 보다 바람직하게는, 상기 자가 절단 펩티드는 T2A에 한정되지 않으며, P2A, E2A, F2A를 더 포함하고;
- [0072] 보다 바람직하게는, 상기 검출 태그/보조 기능 요소는 tEGFR에 한정되지 않으며, tCD34, tCD19, tCD20, tCD22, 면역 체크 포인트 억제제(CTLA-4, PD-1/PD-L1, LAG-3, TIM-3, TIGIT, CD226, CD155, CD47, B7-H3, B7-H4) 나노바디, 사이토카인 및 이의 수용체(IL2, IL2 수용체, IL7, IL7 수용체, IL15, IL15 수용체)를 더 포함하고;
- [0073] 가장 바람직하게는, 상기 막횡단 도메인은 CD8 $\alpha$  막횡단 도메인이며;
- [0074] 가장 바람직하게는, 상기 세포내 신호전달 도메인은 CD3 $\zeta$  세포내 신호전달 도메인이고;
- [0075] 가장 바람직하게는, 상기 힌지 영역은 CD8 $\alpha$  힌지 영역이며;
- [0076] 가장 바람직하게는, 상기 공동자극 신호전달 도메인은 4-1BB 공동자극 신호전달 도메인이고;
- [0077] 가장 바람직하게는, 상기 신호 펩티드의 아미노산 서열은 서열번호 145로 표시되거나, 서열번호 145와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이며;

- [0078] 가장 바람직하게는, 상기 신호 펩티드의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 146으로 표시되거나, 서열번호 146과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이고;
- [0079] 가장 바람직하게는, 상기 CD8  $\alpha$  힌지 영역의 아미노산 서열은 서열번호 147로 표시되거나, 서열번호 147과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이며;
- [0080] 가장 바람직하게는, 상기 CD8  $\alpha$  힌지 영역의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 148로 표시되거나, 서열번호 148과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이고;
- [0081] 가장 바람직하게는, 상기 CD8  $\alpha$  막횡단 도메인의 아미노산 서열은 서열번호 149로 표시되거나, 서열번호 149와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이며;
- [0082] 가장 바람직하게는, 상기 CD8  $\alpha$  막횡단 도메인의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 150으로 표시되거나, 서열번호 150과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이고;
- [0083] 가장 바람직하게는, 상기 4-1BB 공동자극 신호전달 도메인의 아미노산 서열은 서열번호 151로 표시되거나, 서열번호 151과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이며;
- [0084] 가장 바람직하게는, 상기 4-1BB 공동자극 신호전달 도메인의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 152로 표시되거나, 서열번호 152와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이고;
- [0085] 가장 바람직하게는, 상기 CD3  $\zeta$  세포내 신호전달 도메인의 아미노산 서열은 서열번호 153으로 표시되거나, 서열번호 153과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이며;
- [0086] 가장 바람직하게는, 상기 CD3  $\zeta$  세포내 신호전달 도메인의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 154로 표시되거나, 서열번호 154와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이고;
- [0087] 가장 바람직하게는, 상기 T2A의 아미노산 서열은 서열번호 155로 표시되거나, 서열번호 155와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이며;
- [0088] 가장 바람직하게는, 상기 T2A의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 156으로 표시되거나, 서열번호 156과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이고;
- [0089] 가장 바람직하게는, 상기 EF1  $\alpha$ 의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 157로 표시되거나, 서열번호 157과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이고;
- [0090] 가장 바람직하게는, 상기 tEGFR 신호 펩티드의 아미노산 서열은 서열번호 158로 표시되거나, 서열번호 158과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이며;
- [0091] 가장 바람직하게는, 상기 tEGFR 신호 펩티드의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 159로 표시되거나, 서열번호 159와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이고;
- [0092] 가장 바람직하게는, 상기 tEGFR의 아미노산 서열은 서열번호 160으로 표시되거나, 서열번호 160과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,

96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이며;

- [0093] 가장 바람직하게는, 상기 tEGFR의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 161로 표시되거나, 서열번호 161과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이고;
- [0094] 가장 바람직하게는, 상기 키메라 항원 수용체는 EF1  $\alpha$ , 신호 펩티드, 본 발명의 제1 양태에 따른 나노바디 또는 본 발명의 제2 양태에 따른 인간화 항-CD7 나노바디 중 임의의 하나, CD8  $\alpha$  힌지 영역, CD8  $\alpha$  막횡단 도메인, 4-1BB 공동자극 신호전달 도메인, CD3  $\zeta$  세포내 신호전달 도메인, T2A, tEGFR 신호 펩티드, tEGFR을 순차적으로 직렬 연결하여 얻어진다.
- [0095] 본 발명의 제4 양태는 이중 나노바디 기반의 키메라 항원 수용체를 제공한다.
- [0096] 나아가, 상기 키메라 항원 수용체는 본 발명의 제1 양태에 따른 나노바디 또는 본 발명의 제2 양태에 따른 인간화 항-CD7 나노바디 중 임의의 2개를 포함하고;
- [0097] 바람직하게는, 상기 키메라 항원 수용체는 막횡단 도메인을 더 포함하며;
- [0098] 바람직하게는, 상기 키메라 항원 수용체는 세포내 신호전달 도메인을 더 포함하고;
- [0099] 바람직하게는, 상기 키메라 항원 수용체는 힌지 영역을 더 포함하며;
- [0100] 바람직하게는, 상기 키메라 항원 수용체는 신호 펩티드를 더 포함하고;
- [0101] 바람직하게는, 상기 키메라 항원 수용체는 공동자극 신호전달 도메인을 더 포함하며;
- [0102] 바람직하게는, 상기 키메라 항원 수용체는 프로모터 EF1  $\alpha$ 를 더 포함하고;
- [0103] 바람직하게는, 상기 키메라 항원 수용체는 자가 절단 펩티드 T2A를 더 포함하며;
- [0104] 바람직하게는, 상기 키메라 항원 수용체는 검출 태그/보조 기능 요소 tEGFR을 더 포함하고;
- [0105] 보다 바람직하게는, 상기 막횡단 도메인은 분자: CD8  $\alpha$ , CD28, IgG1, IgG4, 4-1BB, PD-1, CD34, OX40, CD3  $\epsilon$ , IL-2 수용체, IL-7 수용체, IL-11 수용체의 막횡단 도메인을 포함하며;
- [0106] 보다 바람직하게는, 상기 세포내 신호전달 도메인은 분자: CD3  $\zeta$ , FcR  $\gamma$ , FcR  $\beta$ , CD3  $\chi$ , CD3  $\delta$ , CD3  $\epsilon$ , TCR  $\zeta$ , CD4, CD5, CD8, CD21, CD22, CD79a, CD79b, CD278, Fc  $\epsilon$  RI, DAP10, DAP12, CD66d의 세포내 신호전달 도메인을 포함하고;
- [0107] 보다 바람직하게는, 상기 힌지 영역은 분자: CD8  $\alpha$ , CD28, IgG1, IgG4, 4-1BB, PD-1, CD34, OX40, CD3  $\epsilon$ , IL-2 수용체, IL-7 수용체, IL-11 수용체의 힌지 영역을 포함하며;
- [0108] 보다 바람직하게는, 상기 신호 펩티드는 분자: T 세포 수용체의  $\alpha$  사슬 및  $\beta$  사슬, CD3  $\zeta$ , CD3  $\epsilon$ , CD4, CD5, CD8, CD9, CD28, CD16, CD22, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, GITR, GM-CSF의 신호 펩티드를 포함하고;
- [0109] 보다 바람직하게는, 상기 공동자극 신호전달 도메인은 분자: 4-1BB(CD137), CD27, CD19, CD4, CD28, ICOS(CD278), CD8  $\alpha$ , CD8  $\beta$ , BAFFR, HVEM, LIGHT, KIRDS2, SLAMF7, NKp30, NKp46, CD40, CDS, ICAM-1, B7-H3, OX40, DR3, GITR, CD30, TIM1, CD2, CD7, CD226의 공동자극 신호전달 도메인을 포함하며;
- [0110] 보다 바람직하게는, 상기 프로모터는 EF1  $\alpha$  프로모터에 한정되지 않으며, CMV 프로모터, EFS 프로모터, CAG 프로모터, CBh 프로모터, SFFV 프로모터, MSCV 프로모터, SV40 프로모터, mPGK 프로모터, hPGK 프로모터, UBC 프로모터를 더 포함하고;
- [0111] 보다 바람직하게는, 상기 자가 절단 펩티드는 T2A에 한정되지 않으며, P2A, E2A, F2A를 더 포함하고;
- [0112] 보다 바람직하게는, 상기 검출 태그/보조 기능 요소는 tEGFR에 한정되지 않으며, tCD34, tCD19, tCD20, tCD22, 면역 체크 포인트 억제제(CTLA-4, PD-1/PD-L1, LAG-3, TIM-3, TIGIT, CD226, CD155, CD47, B7-H3, B7-H4) 나노바디, 사이토카인 및 이의 수용체(IL2, IL2 수용체, IL7, IL7 수용체, IL15, IL15 수용체)를 더 포함하고;
- [0113] 가장 바람직하게는, 상기 막횡단 도메인은 CD8  $\alpha$  막횡단 도메인이며;
- [0114] 가장 바람직하게는, 상기 세포내 신호전달 도메인은 CD3  $\zeta$  세포내 신호전달 도메인이고;

- [0115] 가장 바람직하게는, 상기 힌지 영역은 CD8 α 힌지 영역이며;
- [0116] 가장 바람직하게는, 상기 공동자극 신호전달 도메인은 4-1BB 공동자극 신호전달 도메인이고;
- [0117] 가장 바람직하게는, 상기 본 발명의 제1 양태에 따른 나노바디 또는 본 발명의 제2 양태에 따른 인간화 항-CD7 나노바디 중 임의의 2개의 나노바디는 연결 펩티드 링커(Linker)를 통해 연결되며;
- [0118] 가장 바람직하게는, 상기 키메라 항원 수용체는 EF1 α, 신호 펩티드, 본 발명의 제1 양태에 따른 나노바디 또는 본 발명의 제2 양태에 따른 인간화 항-CD7 나노바디 중 임의의 2개, CD8 α 힌지 영역, CD8 α 막횡단 도메인, 4-1BB 공동자극 신호전달 도메인, CD3 ζ 세포내 신호전달 도메인, T2A, tEGFR 신호 펩티드, tEGFR을 순차적으로 직렬 연결하여 얻어지며;
- [0119] 가장 바람직하게는, 상기 키메라 항원 수용체는 EF1 α, 신호 펩티드, 본 발명의 제1 양태에 따른 나노바디 중 임의의 하나, 링커, 본 발명의 제1 양태에 따른 나노바디 중 임의의 하나, CD8 α 힌지 영역, CD8 α 막횡단 도메인, 4-1BB 공동자극 신호전달 도메인, CD3 ζ 세포내 신호전달 도메인, T2A, tEGFR 신호 펩티드, tEGFR을 순차적으로 직렬 연결하여 얻어지며;
- [0120] 가장 바람직하게는, 상기 본 발명의 제1 양태에 따른 나노바디 중 임의의 하나는 VHH03, VHH06, VHH10, VHH12이고;
- [0121] 가장 바람직하게는, 상기 키메라 항원 수용체는 EF1 α, 신호 펩티드, 본 발명의 제1 양태에 따른 VHH06, 링커, 본 발명의 제1 양태에 따른 VHH03, CD8 α 힌지 영역, CD8 α 막횡단 도메인, 4-1BB 공동자극 신호전달 도메인, CD3 ζ 세포내 신호전달 도메인, T2A, tEGFR 신호 펩티드, tEGFR을 순차적으로 직렬 연결하여 얻어지며;
- [0122] 가장 바람직하게는, 상기 키메라 항원 수용체는 EF1 α, 신호 펩티드, 본 발명의 제1 양태에 따른 VHH06, 링커, 본 발명의 제1 양태에 따른 VHH12, CD8 α 힌지 영역, CD8 α 막횡단 도메인, 4-1BB 공동자극 신호전달 도메인, CD3 ζ 세포내 신호전달 도메인, T2A, tEGFR 신호 펩티드, tEGFR을 순차적으로 직렬 연결하여 얻어지고;
- [0123] 가장 바람직하게는, 상기 키메라 항원 수용체는 EF1 α, 신호 펩티드, 본 발명의 제1 양태에 따른 VHH10, 링커, 본 발명의 제1 양태에 따른 VHH12, CD8 α 힌지 영역, CD8 α 막횡단 도메인, 4-1BB 공동자극 신호전달 도메인, CD3 ζ 세포내 신호전달 도메인, T2A, tEGFR 신호 펩티드, tEGFR을 순차적으로 직렬 연결하여 얻어지고;
- [0124] 가장 바람직하게는, 상기 키메라 항원 수용체는 EF1 α, 신호 펩티드, 본 발명의 제1 양태에 따른 VHH10, 링커, 본 발명의 제1 양태에 따른 VHH10, CD8 α 힌지 영역, CD8 α 막횡단 도메인, 4-1BB 공동자극 신호전달 도메인, CD3 ζ 세포내 신호전달 도메인, T2A, tEGFR 신호 펩티드, tEGFR을 순차적으로 직렬 연결하여 얻어지며;
- [0125] 가장 바람직하게는, 상기 키메라 항원 수용체는 EF1 α, 신호 펩티드, 본 발명의 제1 양태에 따른 VHH12, 링커, 본 발명의 제1 양태에 따른 VHH12, CD8 α 힌지 영역, CD8 α 막횡단 도메인, 4-1BB 공동자극 신호전달 도메인, CD3 ζ 세포내 신호전달 도메인, T2A, tEGFR 신호 펩티드, tEGFR을 순차적으로 직렬 연결하여 얻어지고;
- [0126] 가장 바람직하게는, 상기 신호 펩티드의 아미노산 서열은 서열번호 145로 표시되거나, 서열번호 145와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이며;
- [0127] 가장 바람직하게는, 상기 신호 펩티드의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 146으로 표시되거나, 서열번호 146과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이고;
- [0128] 가장 바람직하게는, 상기 CD8 α 힌지 영역의 아미노산 서열은 서열번호 147로 표시되거나, 서열번호 147과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이며;
- [0129] 가장 바람직하게는, 상기 CD8 α 힌지 영역의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 148로 표시되거나, 서열번호 148과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이고;
- [0130] 가장 바람직하게는, 상기 CD8 α 막횡단 도메인의 아미노산 서열은 서열번호 149로 표시되거나, 서열번호 149와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이며;

- [0131] 가장 바람직하게는, 상기 CD8 α 막횡단 도메인의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 150으로 표시되거나, 서열번호 150과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이고;
- [0132] 가장 바람직하게는, 상기 4-1BB 공동자극 신호전달 도메인의 아미노산 서열은 서열번호 151로 표시되거나, 서열번호 151과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이며;
- [0133] 가장 바람직하게는, 상기 4-1BB 공동자극 신호전달 도메인의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 152로 표시되거나, 서열번호 152와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이고;
- [0134] 가장 바람직하게는, 상기 CD3 ζ 세포내 신호전달 도메인의 아미노산 서열은 서열번호 153으로 표시되거나, 서열번호 153과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이며;
- [0135] 가장 바람직하게는, 상기 CD3 ζ 세포내 신호전달 도메인의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 154로 표시되거나, 서열번호 154와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이고;
- [0136] 가장 바람직하게는, 상기 T2A의 아미노산 서열은 서열번호 155로 표시되거나, 서열번호 155와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이며;
- [0137] 가장 바람직하게는, 상기 T2A의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 156으로 표시되거나, 서열번호 156과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이고;
- [0138] 가장 바람직하게는, 상기 EF1 α의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 157로 표시되거나, 서열번호 157과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이며;
- [0139] 가장 바람직하게는, 상기 tEGFR 신호 펩티드의 아미노산 서열은 서열번호 158로 표시되거나, 서열번호 158과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이고;
- [0140] 가장 바람직하게는, 상기 tEGFR 신호 펩티드의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 159로 표시되거나, 서열번호 159와 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이며;
- [0141] 가장 바람직하게는, 상기 tEGFR의 아미노산 서열은 서열번호 160으로 표시되거나, 서열번호 160과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열이고;
- [0142] 가장 바람직하게는, 상기 tEGFR의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 161로 표시되거나, 서열번호 161과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이다.
- [0143] 또한 본 명세서에 개시된 키메라 항원 수용체의 기능적 모이어티는 본 발명의 범위 내에 명백히 포함된다. 키메라 항원 수용체를 기준으로 사용하는 경우, 용어 “기능적 모이어티”는 본 명세서에 개시된 하나 이상의 키메라 항원 수용체의 하기 임의의 모이어티 또는 단편을 의미하며, 상기 모이어티 또는 단편은 키메라 항원 수용체 (상기 모이어티 또는 단편은 이의 일부임)(모 키메라 항원 수용체)의 생물학적 활성을 보유한다. 기능적 모이어티는 예를 들어 모 키메라 항원 수용체와 유사한 정도, 동일한 정도, 또는 더 큰 정도로 표적 세포의 인식, 검출, 치료 또는 예방 능력을 보유하는 키메라 항원 수용체의 모이어티를 내포한다. 모 키메라 항원 수용체를 기준으로, 기능적 모이어티는 예를 들어 모 키메라 항원 수용체의 약 10%, 25%, 30%, 50%, 68%, 80%, 90%, 95% 또는 그 이상을 포함할 수 있다.
- [0144] 기능적 모이어티는 상기 모이어티의 아미노 또는 카르복시 말단 또는 이 두 말단에 추가 아미노산을 포함할 수

있고, 상기 추가 아미노산은 모 키메라 항원 수용체의 아미노산 서열에 존재하지 않는다. 바람직하게는, 추가 아미노산은 기능적 모이어티의 생물학적 기능, 예를 들어 표적 세포 인식, 암 검출, 암 치료 또는 예방 등을 방해하지 않는다. 보다 바람직하게는, 모 키메라 항원 수용체의 생물학적 활성과 비교하여, 추가 아미노산은 생물학적 활성을 강화시킨다.

[0145] 본 명세서에 개시된 키메라 항원 수용체의 기능적 변이체는 본 개시내용의 범위 내에 포함된다. 본 명세서에 사용된 용어 “기능적 변이체”는 모 키메라 항원 수용체와 명백하거나 현저한 서열 동일성 또는 유사성을 갖는 키메라 항원 수용체, 폴리펩티드 또는 단백질을 의미하며, 상기 기능적 변이체는 키메라 항원 수용체(상기 기능적 변이체는 이의 변이체임)의 생물학적 활성을 보유한다. 기능적 변이체는 예를 들어 모 키메라 항원 수용체와 유사한 정도, 동일한 정도, 또는 더 큰 정도로 표적 세포 인식 능력을 보유하는 본 명세서에 기술된 키메라 항원 수용체(모 키메라 항원 수용체)의 변이체를 내포한다. 모 키메라 항원 수용체를 기준으로, 기능적 변이체는 예를 들어 모 키메라 항원 수용체와 아미노산 서열이 적어도 약 30%, 50%, 75%, 80%, 90%, 98% 또는 그 이상으로 동일할 수 있다.

[0146] 기능적 변이체는 예를 들어 적어도 하나의 보존적 아미노산 치환을 갖는 모 키메라 항원 수용체의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 기능적 변이체는 적어도 하나의 비보존적 아미노산 치환을 갖는 모 키메라 항원 수용체의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 이 경우, 비보존적 아미노산 치환은 바람직하게는 기능적 변이체의 생물학적 활성을 방해하거나 억제하지 않는다. 비보존적 아미노산 치환은 기능적 변이체의 생물학적 활성을 강화함으로써, 모 키메라 항원 수용체와 비교하여, 기능적 변이체의 생물학적 활성이 향상된다.

[0147] 키메라 항원 수용체의 아미노산 치환은 바람직하게는 보존적 아미노산 치환이다. 보존적 아미노산 치환은 당업계에서 공지되어 있으며, 특정 물리적 및/또는 화학적 특성을 갖는 하나의 아미노산이 동일하거나 유사한 화학적 또는 물리적 특성을 갖는 다른 아미노산으로 교환되는 치환을 포함한다. 예를 들어, 보존적 아미노산 치환은 산성/음전하를 띤 극성 아미노산이 다른 산성/음전하를 띤 극성 아미노산(예를 들어, Asp 또는 Glu)을 치환하는 것, 비극성 측쇄를 갖는 아미노산이 다른 비극성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, Ala, Gly, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Cys, Val 등)을 치환하는 것, 염기성/양전하를 띤 극성 아미노산이 다른 염기성/양전하를 띤 극성 아미노산(예를 들어, Lys, His, Arg 등)을 치환하는 것, 극성 측쇄를 갖는 전하를 띠지 않는 아미노산이 다른 극성 측쇄를 갖는 전하를 띠지 않는 아미노산(예를 들어, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr 등)을 치환하는 것, β-분지형 측쇄를 갖는 아미노산이 다른 β-분지형 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, Ile, Thr 및 Val)을 치환하는 것, 방향족 측쇄를 갖는 아미노산이 다른 방향족 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, His, Phe, Trp 및 Tyr)을 치환하는 것 등일 수 있다.

[0148] 키메라 항원 수용체는 기본적으로 본 명세서에 기술된 하나 이상의 특정 아미노산 서열로 구성될 수 있으므로, 기타 성분(예를 들어, 기타 아미노산)은 기능적 변이체의 생물학적 활성을 실질적으로 변경하지 않는다. 키메라 항원 수용체(기능적 모이어티 및 기능적 변이체 포함)는 임의의 길이를 가질 수 있는데, 즉 키메라 항원 수용체(또는 이의 기능적 모이어티 또는 기능적 변이체)가 그 생물학적 활성, 예를 들어 항원과 특이적으로 결합하는 능력, 포유동물에서 질병 세포를 검출하거나 포유동물에서 질병을 치료 또는 예방하는 능력 등을 보유하는 한 임의의 수의 아미노산을 포함할 수 있다. 예를 들어, 키메라 항원 수용체의 길이는 약 50 내지 약 5000개의 아미노산 길이일 수 있고, 예를 들어 길이는 50, 70, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 또는 그 이상의 아미노산 길이이다.

[0149] 키메라 항원 수용체(본 발명의 기능적 모이어티 및 기능적 변이체 포함)는 하나 이상의 자연 발생 아미노산을 치환하는 합성 아미노산을 포함할 수 있다. 이러한 합성 아미노산은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 아미노 사이클로헥산카복실산, 노르류신, 10-아미노노데칸산, 호모세린, S-아세트아미도메틸-시스테인, 트랜스-3-히드록시프로린 및 트랜스-4-히드록시프로린, 4-아미노페닐알라닌, 4-니트로페닐알라닌, 4-클로로페닐알라닌, 4-카르복시페닐알라닌, β-페닐세린, β-히드록시페닐알라닌, 페닐글리신, α-나프틸알라닌, 시클로헥실알라닌, 시클로헥실글리신, 인돌린-2-카르복실산, 1,2,3,4-테트라히드로이소퀴놀린-3-카르복실산, 아미노말론산, 아미노말론산 아미드, N'-벤질-N'-메틸-리신, N', N'-디벤질-리신, 6-히드록시리신, 오르니틴, α-아미노시클로헥탄카르복실산, α-아미노시클로헥탄카르복실산, α-(2-아미노-2-노르보르난)-카르복실산, γ-디아미노부티르산, β-디아미노프로피온산, 호모페닐알라닌 및 α-tert-부틸글리신을 포함한다.

[0150] 본 발명에 기술된 키메라 항원 수용체(기능적 모이어티 및 기능적 변이체 포함)는 글리코실화, 아미드화, 카르복실화, 인산화, 에스테르화, N-아실화, 고리화(예를 들어, 이황 가교에 의해)되거나 산부가염으로 전환되고 및

/또는 임의로 이량체 또는 다량체로 전환되거나 접합될 수 있다.

- [0151] 본 발명의 제5 양태는 핵산 분자를 제공한다.
- [0152] 나아가, 상기 핵산 분자는 본 발명의 제1 양태에 따른 나노바디, 본 발명의 제2 양태에 따른 인간화 항-CD7 나노바디, 본 발명의 제3 양태에 따른 키메라 항원 수용체 또는 본 발명의 제4 양태에 따른 키메라 항원 수용체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고;
- [0153] 바람직하게는, 상기 뉴클레오티드 서열은 서열번호 2, 서열번호 10, 서열번호 18, 서열번호 26, 서열번호 34, 서열번호 42, 서열번호 50, 서열번호 58, 서열번호 66, 서열번호 74, 서열번호 82, 서열번호 90, 서열번호 98, 서열번호 106, 서열번호 114, 서열번호 122, 서열번호 130으로 표시되거나, 서열번호 2, 서열번호 10, 서열번호 18, 서열번호 26, 서열번호 34, 서열번호 42, 서열번호 50, 서열번호 58, 서열번호 66, 서열번호 74, 서열번호 82, 서열번호 90, 서열번호 98, 서열번호 106, 서열번호 114, 서열번호 122, 서열번호 130과 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이다.
- [0154] 본 명세서에 사용된 “핵산 분자”는 천연, 비천연 또는 변경된 뉴클레오티드를 포함할 수 있고; 이는 변형되지 않은 올리고뉴클레오티드 디에스테르의 뉴클레오티드 사이에 존재하는 포스페이트 대신에 포스포라미데이트 연결 또는 포스포로티오에이트 연결과 같은 천연, 비천연 또는 변경된 뉴클레오티드 간 연결을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 핵산은 임의의 삽입, 결실, 역전 및/또는 치환을 포함하지 않는다. 그러나, 일부 경우에는 핵산이 하나 이상의 삽입, 결실, 역전 및/또는 치환을 포함하는 것이 적절할 수 있으므로, 이러한 삽입, 결실, 역전 및/또는 치환에 의해 형성된 핵산 역시 본 발명의 보호 범위 내에 속한다.
- [0155] 본 발명의 구체적인 실시형태에서, 상기 핵산 분자는 자연 발생 뉴클레오티드 또는 분자의 생물학적 안정성을 향상시키거나 또는 혼성화 후 형성된 이중선의 물리적 안정성을 향상시키도록 설계된 다양한 변형을 갖는 뉴클레오티드(예를 들어 티오-인산염 유도체 및 아크리딘-치환 뉴클레오티드)를 사용하여 화학적으로 합성하여 얻은 핵산 분자를 포함한다. 핵산을 생성하는 데 사용될 수 있는 변형된 뉴클레오티드의 일부 구현예에는 5-플루오로 우라실, 5-브로모우라실, 5-클로로우라실, 5-요오도우라실, 하이포크산틴, 크산틴, 4-아세틸시토신, 5-(카르복시히드록시메틸)우라실, 5-카르복시메틸아미노메틸-2-티오우리딘, 5-카르복시메틸아미노메틸우라실, 디히드로우라실, β-D-갈락토실피리딘(queosine), 이노신, N6-이소펜테닐아데닌, 1-메틸구아닌, 1-메틸이노신, 2,2-디메틸구아닌, 2-메틸아데닌, 2-메틸구아닌, 3-메틸시토신, 5-메틸시토신, N6-치환 아데닌, 7-메틸구아닌, 5-메틸아미노메틸우라실, 5-메톡시아미노메틸-2-티오우라실, β-D-만노실피리딘, 5'-메톡시카르복시메틸우라실, 5-메톡시우라실, 2-메틸티오-N6-이소펜테닐아데닌, 우라실-5-글리콜산(v), 와이부톡소신(wybutoxosine), 슈도우라실, 브라딘, 2-티오시토신, 5-메틸-2-티오우라실, 2-티오우라실, 4-티오우라실, 5-메틸우라실, 우라실-메틸 5-옥시아세테이트, 3-(3-아미노-3-N-2-카르복시프로필)우라실 및 2,6-디아미노퓨린이 포함되지만 이에 한정되지는 않는다.
- [0156] 본 발명의 제6 양태는 재조합 발현 벡터를 제공한다.
- [0157] 나아가, 상기 재조합 발현 벡터는 본 발명의 제5 양태에 따른 핵산 분자를 포함하고;
- [0158] 바람직하게는, 상기 발현 벡터는 DNA 벡터, RNA 벡터, 플라스미드, 트랜스포존 벡터, CRISPR/Cas9 벡터, 또는 바이러스 벡터를 포함하며;
- [0159] 보다 바람직하게는, 상기 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터를 포함한다.
- [0160] 일 실시형태에서, 재조합 발현 벡터는 임의의 적합한 재조합 발현 벡터일 수 있고, 임의의 적합한 숙주 세포를 형질전환 또는 형질감염시키는 데 사용될 수 있다. 적합한 벡터에는 플라스미드 및 바이러스와 같이 증식 및 증폭 또는 발현 또는 양자를 위해 설계된 것들이 포함된다. 벡터는 pUC 시리즈(Fermentas Life Sciences, GlenBurnie, MD), pBluescript 시리즈(Stratagene, LaJolla, CA), pET 시리즈(Novagen, Madison, WI), pGEX 시리즈(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 및 pEX 시리즈(Clontech, Palo Alto, CA)로부터 선택될 수 있다.
- [0161] λZapII(Stratagene), EMBL4 및 λNMI149와 같은 파지 벡터도 사용할 수 있다. 식물 발현 벡터의 일부 구현예에는 pBI01, pBI101.2, pBHO1.3, pBI121 및 pBIN19(Clontech)가 포함된다. 동물 발현 벡터의 일부 구현예에는 pEUK-C1, pMAM 및 pMAMneo(Clontech)가 포함된다. 재조합 발현 벡터는 레트로바이러스 벡터 또는 렌티와 같은 바이러스 벡터일 수 있다. 렌티바이러스 벡터는 Milone et al., Mol.Ther.17(8): 1453-1464(2009)에서 제공한

바와 같이 렌티바이러스 계놈으로부터의 적어도 일부 벡터로, 특히 자가 불활성화 렌티바이러스 벡터를 포함한다. 임상적으로 사용 가능한 렌티바이러스 벡터의 다른 구현예에는 예를 들어 Oxford BioMedica plc로부터의 LENTIVECTOR.RTM 유전자 전달 기술, Lentigen로부터의 LENTIMAX.TM 벡터 시스템 등이 포함되지만 이에 한정되지는 않는다. 렌티바이러스 벡터의 비임상 유형 역시 사용 가능하며 당업자에게 공지되어 있다.

- [0162] 상기 재조합 발현 벡터는 전사 및 번역 개시 및 종결 코돈과 같은 조절 서열을 포함할 수 있고, 상기 조절 서열은 벡터가 도입될 숙주 세포의 유형(예를 들어, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물)에 특이적인데, 이는 경우에 따라 결정되고 벡터가 DNA 기반인지 RNA 기반인지를 고려한다. 재조합 발현 벡터는 클로닝에 유리하도록 제한성 부위를 포함할 수 있다.
- [0163] 상기 재조합 발현 벡터는 형질전환되거나 형질감염된 숙주 세포의 선택을 허용하는 마커 하나 이상의 유전자를 포함할 수 있다. 마커 유전자에는 살생물제 저항성(예를 들어 항생제, 중금속 등에 대한 저항성); 영양요구성 숙주에서 원형양성을 제공하는 보완물 등이 포함된다. 본 발명의 발현 벡터에 사용하기에 적합한 마커 유전자에는 예를 들어 네오마이신/G418 저항성 유전자, 히그로마이신 저항성 유전자, 히스티딘올 저항성 유전자, 테트라사이클린 저항성 유전자, 암피실린 저항성 유전자, 카나마이신 저항성 유전자, 퓨로마이신 저항성 유전자 등이 포함된다.
- [0164] 상기 재조합 발현 벡터는 상기 키메라 항원 수용체(이의 기능적 모이어티 및 기능적 변이체 포함)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 상기 키메라 항원 수용체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 상보적이거나 혼성화하는 뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결된 천연 또는 비천연 프로모터를 포함할 수 있다. 프로모터의 선택(예를 들어, 강한 프로모터, 약한 프로모터, 유도성 프로모터, 조직 특이성 프로모터 및 발생 특이성 프로모터)은 당업자의 일반적인 기술 범위 내에 있다. 유사하게, 뉴클레오티드 서열과 프로모터의 조합도 당업자의 기술 내에 있다. 프로모터는 비바이러스 프로모터 또는 바이러스 프로모터, 예를 들어 III형 프로모터(U6 프로모터, H1 프로모터), 포유동물 구성형 프로모터(광범성 프로모터): CMV(사이토메갈로바이러스) 프로모터; EF1A(신장 인자-1 α) 프로모터; EFS 프로모터; CAG(사이토메갈로바이러스 인핸서 및 닭 β-액틴 프로모터로 구성됨) 프로모터; CBh 프로모터; SFFV 프로모터; MSCV 프로모터; SV40(유인원 바이러스 기원) 프로모터; mPGK 프로모터; hPGK(포스포글리세레이트 키나제) 프로모터; UBC(유비퀴틴 C) 프로모터, RSV 프로모터, 또는 쥐 줄기 세포 바이러스의 긴 말단 반복에서 발견되는 프로모터일 수 있다.
- [0165] 상기 재조합 발현 벡터는 일시적 발현, 안정한 발현 또는 둘 다에 사용되도록 설계될 수 있다. 또한, 재조합 발현 벡터는 구성형 또는 유도형 발현에 사용되도록 제조될 수 있다.
- [0166] 이 밖에, 상기 재조합 발현 벡터는 자살 유전자를 더 포함한다. 본 명세서에 사용된 용어 “자살 유전자”는 상기 자살 유전자를 발현하는 세포의 사망을 유발하는 유전자를 의미한다. 자살 유전자는 해당 유전자가 발현되는 세포에서 시약(예를 들어 약물)에 대한 민감성을 부여하고, 해당 세포가 해당 시약과 접촉하거나 해당 시약에 노출될 때 해당 세포의 사망을 유발하는 유전자일 수 있다. 자살 유전자는 당업계에 공지되어 있고(예를 들어, Suicide Gene Therapy: Methods and Reviews, Springer, Caroline J.(Cancer Research UK Centre for CancerTherapeutics at the Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey, UK), HumanaPress, 2004 참조), 예를 들어 단순 포진 바이러스(HSV) 티미딘 키나제(TK) 유전자, 시토신 데아미나제, 퓨린 뉴클레오시드 포스포릴라제 및 니트로리덕타제가 포함된다.
- [0167] 본 발명의 제7 양태는 조작된 숙주 세포를 제공한다.
- [0168] 나아가, 상기 조작된 숙주 세포는 본 발명의 제1 양태에 따른 나노바디, 본 발명의 제2 양태에 따른 인간화 항-CD7 나노바디, 본 발명의 제3 양태에 따른 키메라 항원 수용체 또는 본 발명의 제4 양태에 따른 키메라 항원 수용체를 발현하고;
- [0169] 바람직하게는, 상기 조작된 숙주 세포는 본 발명의 제6 양태에 따른 재조합 발현 벡터를 포함하며;
- [0170] 바람직하게는, 상기 조작된 숙주 세포는 조작된 면역 세포를 포함하고;
- [0171] 보다 바람직하게는, 상기 조작된 면역 세포는 T 세포, NK 세포, iNKT 세포, CTL 세포, 단핵구, 대식 세포, 수지상 세포, NKT 세포 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다.
- [0172] 본 명세서에 사용된 용어 “숙주 세포”는 임의의 유형의 세포를 의미한다. 숙주 세포는 식물, 동물, 진균 또는 조류와 같은 진핵 세포일 수 있거나, 박테리아 또는 원생 동물과 같은 원핵 세포일 수 있다. 숙주 세포는 배양된 세포 또는 일차 세포일 수 있는데, 즉 생체(예를 들어, 인간)로부터 직접 분리된다. 숙주 세포는 부착성 세

포 또는 현탁 세포, 즉 현탁액에서 성장하는 세포일 수 있다. 적합한 숙주 세포는 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 DH5a 대장균(E.coli) 세포, 중국 햄스터 난소 세포, 원숭이 VERO 세포, COS 세포, HEK293 세포 등이 포함된다. 재조합 발현 벡터를 증폭 또는 복제하기 위한 목적상, 숙주 세포는 원핵 세포, 예를 들어 DH5a 세포일 수 있다. 재조합 키메라 항원 수용체를 생성할 목적상, 숙주 세포는 포유동물 세포일 수 있다. 숙주 세포는 인간 세포일 수 있다. 숙주 세포는 임의의 세포 유형일 수 있고, 임의의 유형의 조직으로부터 유래할 수 있으며, 임의의 발달 단계에서 숙주 세포는 말초 혈액 림프구(peripheral blood lymphocyte, PBL) 또는 말초 혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)일 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시형태에서, 상기 숙주 세포는 T 세포이다.

- [0173] 나아가, 상기 조작된 숙주 세포는 조작된 숙주 세포 집단을 포함한다.
- [0174] 나아가, 상기 조작된 숙주 세포 집단은 본 발명의 제1 양태에 따른 나노바디, 본 발명의 제2 양태에 따른 인간화 항-CD7 나노바디, 본 발명의 제3 양태에 따른 키메라 항원 수용체 또는 본 발명의 제4 양태에 따른 키메라 항원 수용체를 발현하지 않는 숙주 세포를 포함한다.
- [0175] 나아가, 상기 숙주 세포는 면역 세포이다.
- [0176] 나아가, 상기 면역 세포는 T 세포, NK 세포, iNKT 세포, CTL 세포, 단핵구, 대식 세포, 수지상 세포, NKT 세포 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다.
- [0177] 본 발명의 제8 양태는 접합체를 제공한다.
- [0178] 나아가, 상기 접합체는 본 발명의 제1 양태에 따른 나노바디 또는 본 발명의 제2 양태에 따른 인간화 항-CD7 나노바디, 및 상기 나노바디에 연결된 변형 모이어티를 포함하고, 상기 변형 모이어티는 검출 가능한 마커, 치료제를 포함하며;
- [0179] 바람직하게는, 상기 검출 가능한 마커는 효소, 방사성 핵종, 형광 염료, 발광 물질, 비오틴을 포함하고,
- [0180] 바람직하게는, 상기 치료제는 항종양 활성을 갖는 약물 또는 세포 독성제를 포함한다.
- [0181] 본 발명의 제9 양태는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0182] 나아가, 상기 약학적 조성물은 본 발명의 제1 양태에 따른 나노바디, 본 발명의 제2 양태에 따른 인간화 항-CD7 나노바디, 본 발명의 제3 양태에 따른 키메라 항원 수용체, 본 발명의 제4 양태에 따른 키메라 항원 수용체, 본 발명의 제5 양태에 따른 핵산 분자, 본 발명의 제6 양태에 따른 재조합 발현 벡터, 본 발명의 제7 양태에 따른 조작된 숙주 세포 또는 본 발명의 제8 양태에 따른 접합체를 포함한다.
- [0183] 나아가, 상기 약학적 조성물은 추가 약학적 활성제를 더 포함하고;
- [0184] 바람직하게는, 상기 추가 약학적 활성제는 추가 항체, 용합 단백질 또는 약물(예: 방사 약물 또는 화학요법 약물에 사용되는 약물과 같은 항종양 약물)을 포함한다.
- [0185] 나아가, 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 부형제를 더 포함한다.
- [0186] 나아가, 상기 약학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 부형제는 Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)에 자세히 기재되어 있는데, 이러한 물질은 필요에 따라 약물의 안정성을 돕거나 유효 성분의 활성을 향상시키는 데 도움을 주기 위해 사용되며, 이러한 약학적 조성물에 사용 가능한 제제는 원래 화합물 자체의 형태일 수 있거나, 임의로 그의 약학적으로 허용 가능한 염의 형태일 수 있고, 이에 따라 제제화된 약학적 조성물은 필요에 따라 당업자에게 공지된 임의의 적절한 방식으로 투여될 수 있다.
- [0187] 약학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 보조제는 물, 생리식염수, 글리세린 및 에탄올과 같은 액체를 추가로 함유할 수 있다. 또한, 습윤제 또는 유화제 또는 pH 완충 물질과 같은 보조 물질이 상기 조성물에 존재할 수 있다. 이러한 담체는 약학적 조성물이 환자가 섭취하도록 정제, 알약, 당의정, 캡슐, 액체, 젤, 시럽, 슬러리 및 현탁액으로 제제화될 수 있다.
- [0188] 적합한 투여 형태에는 비경구 투여에 적용되는 형태, 예를 들어 주사 또는 주입, 예를 들어 볼루스 주사 또는 연속 주입, 정맥내, 흡입성 또는 피하 형태가 포함된다. 제품이 주사용 또는 주입용인 경우, 유성 또는 수성 비히클의 현탁액, 용액 또는 에멀전 형태를 취할 수 있으며, 현탁제, 보존제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 제제화 시약을 함유할 수 있다. 대안적으로, 본 발명에 따라 제공된 나노바디는 사용 전 적합한 멸균액으로 재구성하기 위한 건조 형태일 수 있다. 주사 전 액체 비히클에 용해 또는 현탁되기에 적합한 고체 형태도 제조할 수

있다.

- [0189] 본 발명의 제10 양태는 키트를 제공한다.
- [0190] 나아가, 상기 키트는 본 발명의 제1 양태에 따른 나노바디, 본 발명의 제2 양태에 따른 인간화 항-CD7 나노바디, 본 발명의 제3 양태에 따른 키메라 항원 수용체, 본 발명의 제4 양태에 따른 키메라 항원 수용체, 본 발명의 제5 양태에 따른 핵산 분자, 본 발명의 제6 양태에 따른 재조합 발현 벡터, 본 발명의 제7 양태에 따른 조작된 숙주 세포 또는 본 발명의 제8 양태에 따른 집합체를 포함한다.
- [0191] 본 발명의 제11 양태는 CD7 단백질 또는 이의 항원 단편 검출용 시약을 제공한다.
- [0192] 나아가, 상기 CD7 단백질 또는 이의 항원 단편 검출용 시약은 본 발명의 제1 양태에 따른 나노바디, 본 발명의 제2 양태에 따른 인간화 항-CD7 나노바디 또는 본 발명의 제8 양태에 따른 집합체를 포함한다.
- [0193] 본 발명의 제12 양태는 생물학적 제제를 제공한다.
- [0194] 나아가, 상기 생물학적 제제는 본 발명의 제7 양태에 따른 조작된 숙주 세포 및/또는 본 발명의 제9 양태에 따른 약학적 조성물을 함유한다.
- [0195] 나아가, 본 발명에 기술된 생물학적 제제는 생물학적 약물, 생물학적(의학적) 제품 또는 생물학적 제제로도 지칭되며, 생물학적 공급원으로부터 제조, 추출 또는 반합성된 임의의 약물 제품이다. 여기에는 백신, 혈액 또는 혈액 성분, 및 재조합 치료성 단백질(예를 들어 항체, 사이토카인, 케모카인 및 융합 단백질)이 포함되지만 이에 한정되지는 않으며, 생물학적 제제는 당, 단백질 또는 핵산 또는 이러한 물질의 복잡한 조합으로 구성될 수 있다.
- [0196] 본 명세서에서는 유전자 요법, 면역 요법 및/또는 세포 요법을 위한 약학적 조성물 또는 생물학적 제제 또는 이의 조성물을 제공하며, 이는 담체(예를 들어, 약학적으로 허용 가능한 담체)에서 본 명세서에 개시된 하나 이상의 항원에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 개시된 키메라 항원 수용체, 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포, 나노바디, 집합체를 포함한다. 상기 약학적 조성물 또는 생물학적 제제 또는 이의 조성물은 대상체에게 투여하기 위한 단위 투여 형태로 제조될 수 있다. 투여량과 시기는 원하는 결과를 얻기 위해 치료하는 임상 의에 의해 결정된다. 조성물은 시스템(예를 들어, 정맥내) 또는 국소(예를 들어, 종양내) 투여용으로 제제화될 수 있다. 일 구현예에서, 개시된 키메라 항원 수용체, 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포(특히, 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 T 세포), 나노바디, 집합체는 정맥내 투여와 같은 비경구 투여용으로 제제화된다. 본 명세서에 개시된 키메라 항원 수용체, 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포(특히, 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 T 세포), 집합체 또는 이의 조성물은 예를 들어 CD7-발현 종양을 포함하지만 이에 한정되지 않는 종양의 치료 및 검출에 사용된다. 일부 실시예에서, 상기 약학적 조성물 또는 생물학적 제제 또는 이의 조성물은 종양의 치료 및/또는 검출에 사용될 수 있다. 본 명세서에 개시된 바와 같은 키메라 항원 수용체, 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포(특히, 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 T 세포), 나노바디, 집합체 또는 이의 조성물은 예를 들어 CD7 항원의 검출에도 사용된다.
- [0197] 투여를 위한 약학적 조성물 또는 생물학적 제제 또는 이의 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체(예를 들어 수성 담체)에 용해된 키메라 항원 수용체, 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포(특히, 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 T 세포), 집합체, 나노바디의 용액을 포함할 수 있다. 완충 식염수와 같은 다양한 수성 담체를 사용할 수 있다. 이러한 용액은 멸균되어 있으며 일반적으로 바람직하지 않은 물질을 함유하지 않는다. 이러한 약학적 조성물 또는 생물학적 제제 또는 이의 조성물은 통상적으로 공지된 멸균 기술에 의해 멸균될 수 있다. 이러한 약학적 조성물 또는 생물학적 제제 또는 이의 조성물은 필요에 따라 아세트산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 젖산나트륨 등과 같은 pH 조절제 및 완충제, 독성 조절제, 보조제 등과 같은 생리학적 조건에 근접하도록 약학적으로 허용되는 보조 물질을 포함할 수 있다. 이러한 제제 중 키메라 항원 수용체, 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포(특히, 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 T 세포), 집합체, 나노바디의 농도는 광범위하게 변할 수 있고, 선택된 구체적인 투여 모드와 대상자의 필요에 따라 주로 유체 부피, 점도, 체중 등을 기반으로 선택된다. 유전자 요법, 면역 요법 및/또는 세포 요법을 위한 이러한 제형을 제조하는 실제 방법은 당업자에게 공지되어 있거나 명백할 것이다.
- [0198] 정맥내 투여를 위한 전형적인 조성물(약학적 조성물 또는 생물학적 제제 또는 이의 조성물)은 약 0.01 mg/kg 내지 약 30 mg/kg의 본 발명의 제1 양태에 따른 나노바디 또는 본 발명의 제2 양태에 따른 인간화 항-CD7 나노바디 또는 본 발명의 제7 양태에 따른 조작된 숙주 세포 또는 본 발명의 제8 양태에 따른 집합체/대상체/일을 포함한다. 투여 가능한 조성물을 제조하기 위한 실제 방법은 공지되어 있거나 명백할 것이며, 예를 들어

Remington's Pharmaceutical Science, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA(1995)와 같은 간행물에 더 자세히 설명되어 있다.

- [0199] 본 명세서에 기술된 키메라 항원 수용체, 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포(특히, 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 T 세포), 나노바디 또는 접합체는 동결건조 형태로 제공될 수 있고, 투여 전 멸균수로 재수화될 수 있지만, 공지된 농도의 멸균 용액으로도 제공된다. 그런 다음 키메라 항원 수용체, 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포(특히, 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 T 세포), 나노바디 또는 접합체 용액을 0.9% 염화나트륨(USP)이 함유된 주입 백에 첨가하고, 일부 경우에는 0.5 mg/kg 체중 내지 15 mg/kg 체중의 용량으로 투여한다.
- [0200] 당업계는 나노바디 및 접합체 관련 약물의 투여 측면에서 상당한 경험을 갖고 있는 바, 예를 들어 1997년 리투시맵(RITUXAN)이 승인된 이후, 항체 약물은 미국에서 줄곧 판매되고 있다. 키메라 항원 수용체, 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포, 항체, 항원 결합 단편 및 이의 접합체 등은 정맥내 푸시(push) 또는 볼루스(bolus)보다는 느린 주입에 의해 투여될 수 있다. 일 실시예에서, 높은 부하 용량을 투여한 후, 낮은 수준 유지 용량을 투여한다. 예를 들어, 약 90분간의 시간 내에 4 mg/kg 항체 또는 항원 결합 단편의 초기 부하 용량(또는 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 접합체의 대응하는 용량)을 주입한 후, 이전 용량의 내약성이 좋으면, 30분간의 시간 내에 2 mg/kg의 매주 유지 용량을 4주 내지 8주 동안 주입한다.
- [0201] 제어 방출 비경구 제제는 임플란트, 유성 주사제 또는 입자 시스템으로 제조될 수 있다. 단백질 전달 시스템의 개요에 대해서는 Banga, A.J., Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, PA, (1995)를 참조한다. 입자 시스템에는 미소구체, 미소입자, 마이크로캡슐제, 나노캡슐제, 나노구체 및 나노입자가 포함된다. 마이크로캡슐제는 치료성 단백질(예를 들어, 세포 독소 또는 약물)을 중심 코어로 포함한다. 미소구체에서, 치료제는 입자 전체에 분산된다. 약 1  $\mu\text{m}$  미만의 입자, 미소구체 및 마이크로캡슐제는 일반적으로 각각 나노입자, 나노구체 및 나노캡슐제를 의미한다. 모세혈관의 직경은 약 5  $\mu\text{m}$ 이므로, 나노입자만 정맥내로 투여된다. 미세입자의 직경은 일반적으로 약 100  $\mu\text{m}$ 이며 피하 또는 근육내로 투여된다. 예를 들어, Kreuter, J., Colloidal Drug Delivery Systems, J.Kreuter, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, NY, pp.219-342(1994); 및 Tice&Tabibi, Treatise on Controlled Drug Delivery, A.Kydonieus, ed., Marcel Dekker, Inc. New York, NY, pp.315-339, (1992)를 참조한다.
- [0202] 중합체는 본 명세서에 개시된 키메라 항원 수용체, 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포(특히, 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 T 세포), 나노바디, 접합체 또는 이의 조성물의 이온 제어 방출에 사용될 수 있다. 제어된 약물 전달을 위한 다양한 분해성 및 비분해성 중합체 매트릭스는 당업계에 공지되어 있다(Langer, Accounts Chem.Res.26: 537-542, 1993). 예를 들어, 블록 공중합체 폴록사머 407은 저온에서는 점성이 있는 이동성 액체로 존재하지만 체온에서는 반고체 겔을 형성한다. 기존 연구에서는 이가 재조합 인터루킨-2 및 우레아제의 제제화 및 지속적인 전달을 위한 효과적인 담체임을 보여주었다(Johnston et al., Pharm.Res.9: 425-434, 1992; 및 Pec et al., J.Parent.Sci.Tech.44(2): 58-65, 1990). 또는, 수산화인 회석은 단백질의 제어 방출을 위한 미세담체로 사용되어 왔다(Ijntema et al., Int.J.Pharm.112: 215-224, 1994). 다른 측면에서, 리포솜은 지질 캡슐화 약물의 제어 방출뿐만 아니라 약물 표적화에도 사용된다(Betageri et al., Liposome Drug Delivery Systems, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA(1993)). 치료성 단백질의 제어된 전달을 위한 많은 추가 시스템이 공지되어 있다(미국 특허 No.5,055,303; 미국 특허 No.5,188,837; 미국 특허 No.4,235,871; 미국 특허 No.4,501,728; 미국 특허 No.4,837,028; 미국 특허 No.4,957,735; 미국 특허 No.5,019,369; 미국 특허 No.5,055,303; 미국 특허 No.5,514,670; 미국 특허 No.5,413,797; 미국 특허 No.5,268,164; 미국 특허 No.5,004,697; 미국 특허 No.4,902,505; 미국 특허 No.5,506,206; 미국 특허 No.5,271,961; 미국 특허 No.5,254,342 및 미국 특허 No.5,534,496 참조).
- [0203] 본 발명의 제13 양태는 포유동물 내 표적 세포 집단 또는 조직에 대한 면역 반응 자극 방법을 제공한다.
- [0204] 나아가, 상기 방법은, 본 발명의 제7 양태에 따른 조작된 숙주 세포, 본 발명의 제8 양태에 따른 접합체, 본 발명의 제9 양태에 따른 약학적 조성물 또는 본 발명의 제12 양태에 따른 생물학적 제제의 유효량을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0205] 본 발명의 제14 양태는 대상체 체내의 면역 반응 조절 방법을 제공한다.
- [0206] 나아가, 상기 방법은, 본 발명의 제7 양태에 따른 조작된 숙주 세포, 본 발명의 제8 양태에 따른 접합체, 본 발

명의 제9 양태에 따른 약학적 조성물 또는 본 발명의 제12양태에 따른 생물학적 제제의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

- [0207] 본 발명의 제15 양태는 본 발명의 제1 양태에 따른 나노바디 또는 본 발명의 제5 양태에 따른 인간화 항-CD7 나노바디의 생산 방법을 제공한다.
- [0208] 나아가, 상기 방법은, 본 발명의 제7 양태에 따른 조작된 숙주 세포를 배양하고, 배양물로부터 본 발명의 제1 양태에 따른 나노바디 또는 본 발명의 제2 양태에 따른 인간화 항-CD7 나노바디를 분리하는 단계를 포함한다.
- [0209] 본 발명의 제16 양태는 CD7 활성을 특이적으로 억제하는 방법을 제공한다.
- [0210] 나아가, 상기 방법은, 본 발명의 제5 양태에 따른 핵산 분자를 생체 세포에 도입하고, 본 발명의 제1 양태에 따른 나노바디 또는 본 발명의 제2 양태에 따른 인간화 항-CD7 나노바디를 발현하여 CD7 활성을 억제하는 단계를 포함한다.
- [0211] 본 발명의 제17 양태는 CD7 관련 질병 또는 병증의 예방 및/또는 치료 방법을 제공한다.
- [0212] 나아가, 상기 방법은, 본 발명의 제1 양태에 따른 나노바디, 본 발명의 제2 양태에 따른 인간화 항-CD7 나노바디, 본 발명의 제5 양태에 따른 핵산 분자, 본 발명의 제6 양태에 따른 재조합 발현 벡터, 본 발명의 제7 양태에 따른 조작된 숙주 세포, 본 발명의 제8 양태에 따른 접합체, 본 발명의 제9 양태에 따른 약학적 조성물 또는 본 발명의 제12양태에 따른 생물학적 제제의 유효량을 CD7 관련 질병 또는 병증이 있는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0213] 나아가, 상기 CD7 관련 질병 또는 병증은 CD7-발현 종양을 포함한다.
- [0214] 나아가, 상기 종양은 T 림프구계 혈액 종양이다.
- [0215] 나아가, 상기 종양은 급성 골수성 백혈병(AML), 급성 림프구성 백혈병(ALL), 림프구성 림프종(LBL), NKT 세포 백혈병, 말초 T 세포 림프종(NHL), NKT 세포 림프종, 역형성 대세포 림프종(ALCL)을 포함한다.
- [0216] 나아가, 본 발명에 따른 CD7 관련 질병 또는 병증은 CD7 발현과 관련된 임의의 질병 또는 병증을 의미하며, 상기 나열된 질병 유형을 포함하지만 이에 한정되지는 않고, 상기 질병 또는 병증이 CD7의 발현과 관련된 한, 모두 본 발명의 보호 범위 내에 속한다.
- [0217] 나아가, 상기 “치료” 및 “예방” 및 이로부터 파생된 단어는 반드시 100% 또는 완전한 치료 또는 예방을 의미하는 것은 아니다. 오히려, 당업자가 잠재적으로 유익하거나 치료적으로 효과적이라고 간주할 다양한 정도의 치료 또는 예방이 존재한다. 이러한 측면에서, 상기 방법은 포유동물에서 임의의 양 또는 임의의 수준의 암 치료 또는 예방을 제공한다.
- [0218] 상기 방법에 의해 제공되는 치료 또는 예방은 치료 또는 예방될 질병(예를 들어, 암)의 하나 이상의 상태 또는 증상을 치료 또는 예방하는 것을 포함할 수 있다. 또한, 본 명세서의 목적상, “예방”은 질병 또는 그 증상 또는 상태의 발병을 지연시키는 것을 내포할 수 있다.
- [0219] 본 명세서에서 언급된 포유동물은 마우스 및 햄스터와 같은 설치목의 포유동물 및 토끼와 같은 라고모르파목의 포유동물을 포함하나 이에 제한되지 않는 임의의 포유동물일 수 있다. 포유동물은 고양이과(고양이)와 개과(개)를 포함하는 식육목으로부터 유래될 수 있다. 포유동물은 소과(소) 및 돼지과(돼지)를 포함하는 우제목으로부터 유래될 수 있거나, 말과(말)을 포함하는 말목으로부터 유래될 수 있다. 포유동물은 영장목, 세보이드(Ceboid)목 또는 시모이드(Simoid)목(원숭이); 또는 유인원목(인간 및 유인원)일 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 구체적인 실시형태에서, 상기 포유동물은 인간이다.
- [0220] 나아가, 상기 조작된 숙주 세포는 항-CD7을 발현하는 본 발명의 제3 양태에 따른 단일 나노바디 기반의 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 본 발명의 제4 양태에 따른 이중 나노바디 기반의 키메라 항원 수용체의 면역 세포를 포함하고;
- [0221] 바람직하게는, 상기 면역 세포는 T 세포, NK 세포, iNKT 세포, CTL 세포, 단핵구, 대식 세포, 수지상 세포, NKT 세포를 포함하며;
- [0222] 보다 바람직하게는, 상기 조작된 숙주 세포는 CAR-T 세포이다.
- [0223] 나아가, CD7 관련 질병 또는 병증을 앓고 있는 대상체에게 상기 조작된 숙주 세포를 다음에서 선택된 양으로 투

여한다.

- [0224] (1) 상기 대상체 체중이 100킬로그램(kg) 미만이고 연령이 18세 미만인 경우, 상기 대상체 체중의  $0.05 \times 10^6$  CAR-T 세포/kg 또는 약  $0.05 \times 10^6$  CAR-T 세포/kg 내지 상기 대상체 체중의  $5.0 \times 10^7$  CAR-T 세포/kg 또는 약  $5.0 \times 10^7$  CAR-T 세포/kg;
- [0225] (2) 상기 대상체 체중이 100킬로그램(kg) 이상이거나 연령이 18세 초과인 경우, 상기 대상체 체중의  $0.05 \times 10^6$  CAR-T 세포/kg 또는 약  $0.05 \times 10^6$  CAR-T 세포/kg 내지 상기 대상체 체중의  $5.0 \times 10^8$  CAR-T 세포/kg 또는 약  $5.0 \times 10^8$  CAR-T 세포/kg.
- [0226] 본 발명의 일부 실시형태에서, 상기 CAR-T 세포 요법은 자가 이식에 의해 수행되며, 여기서 세포는 세포 요법을 받는 대상체 또는 이러한 대상체로부터 유래된 샘플로부터 분리 및/또는 기타 방식으로 제조된다. 따라서, 일부 측면에서, 세포는 치료가 필요한 대상체(예를 들어, 환자)로부터 유래되며, 분리 및 처리 후 세포는 동일한 대상체에게 투여된다.
- [0227] 본 발명의 다른 일부 실시형태에서, 상기 CAR-T 세포 요법은 동종 이식에 의해 수행되며, 여기서 세포는 세포 요법을 받을 또는 최종적으로 받을 대상체 이외의 대상체(예를 들어, 제1 대상체)로부터 분리 및/또는 기타 방식으로 제조된다. 이러한 실시형태에서, 세포는 그 후 동일한 개의 다른 대상체, 예를 들어 제2 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 상기 제1 대상체와 제2 대상체는 유전적으로 동일하다. 일부 실시형태에서, 상기 제1 대상체와 제2 대상체는 유전적으로 유사하다. 일부 실시형태에서, 상기 제2 대상체와 상기 제1 대상체는 동일한 HLA 클래스 또는 상위 유형을 발현한다.
- [0228] 본 발명의 구체적인 실시형태에서, 상기 CAR-T 세포는 임의의 적합한 방식, 예를 들어 볼루스 주입, 정맥내 또는 피하 주사, 안내 주사, 안주위 주사, 망막하 주사, 유리체내 주사, 경중격 주사, 공막하 주사, 맥락막내 주사, 전방 주사, 결막하(Subconjunctival) 주사, 테논하(Sub-Tenon) 주사, 안구뒤 주사, 안구주위 주사 또는 후방 공막엽(Posterior juxtасcleral) 전달과 같은 주사를 통해 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 이들은 비경구, 폐내 및 비강내 및 (예: 국소 치료가 필요한 경우) 병변 투여를 통해 투여된다. 비경구 주입에는 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여가 포함된다. 일부 실시형태에서, 주어진 용량은 상기 세포의 단일 볼루스 투여에 의해 투여된다. 일부 실시형태에서, 주어진 용량은 예를 들어 3일 이하의 시간대 내에 걸쳐 세포를 여러 회 볼루스 투여하거나, 세포를 연속적으로 주입함으로써 투여된다. 일부 실시형태에서, 세포 용량 또는 임의의 기타 요법(예를 들어, 림프구 고갈 요법, 중재 요법 및/또는 병용 요법)의 투여는 외래 전달을 통해 수행된다.
- [0229] 나아가, 질병의 예방 또는 치료에 있어서, 적절한 용량은 치료할 질병 유형, 세포 유형, 질병의 중증도 및 경과, 예방 또는 치료 목적으로 세포를 투여하는지 여부, 이전 치료, 대상체의 임상 병력 및 세포에 대한 반응, 주치의의 재량에 따라 결정된다. 일부 실시형태에서, 적합하게는, 약학적 조성물 및/또는 CAR-T 세포는 대상체에게 1회 또는 일련의 치료로 투여된다.
- [0230] 일부 실시형태에서, 상기 CAR-T 세포는 병용 요법의 일부로서 투여될 수 있는 바, 예를 들어 다른 치료 개입 또는 추가 치료성 개입(예: 항체 또는 조작된 세포 또는 수용체 또는 세포 독성제 또는 치료제와 같은 약제)과 함께 동시 또는 임의의 순서로 순차적으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 상기 CAR-T 세포는 하나 이상의 추가 치료제와 공동 투여되거나 다른 치료성 개입과 병용 투여(동시 또는 임의의 순서로 순차적으로 투여됨)된다. 일부 실시형태에서, 상기 추가 치료제는 종래 기술에서 당업자에게 공지되어 있고 종양 개입 치료에 사용될 수 있는 임의의 개입 제제 또는 약제이며, 일부 실시형태에서, 상기 세포는 상기 하나 이상의 추가 치료제 이전에 투여된다. 일부 실시형태에서, 상기 세포는 상기 하나 이상의 추가 치료제 이후 투여된다. 일부 실시형태에서, 상기 하나 이상의 추가 약제에는 예를 들어 지속성을 향상시키기 위해 IL-2와 같은 사이토카인이 포함된다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은, 화학요법제를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은, 예를 들어 종양 부하를 감소시키기 위해 상기 투여 전에 화학요법제(예를 들어, 컨디셔닝 화학요법제)를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 면역 고갈(예를 들어, 림프구 고갈) 요법으로 대상체를 사전 컨디셔닝하면 세포 요법의 효과를 개선할 수 있다.
- [0231] 일부 실시형태에서, 제공되는 방법 및 응용에 관련된 CAR-T 세포 또는 약학적 조성물의 전부 또는 일부의 투여에 있어서, 상기 세포는 예를 들어 본 발명의 제2 양태에 따른 키메라 항원 수용체 CAR 또는 본 발명의 제3 양태에 따른 키메라 항원 수용체를 발현하는 조작된 면역 세포이고, 일부 실시형태에서, 대상체에게 특정 양 또는

수의 세포, 또는 상기 특정 양 또는 수의 세포를 함유하는 특정 양의 약학 조성물을 투여한다. 일부 실시형태에서, 대상체에게 특정 양 또는 수의 세포를 함유하는 하나 이상의 세포 용량 또는 상기 특정 양 또는 수의 세포를 함유하는 특정 양의 약학 조성물을 투여한다. 일부 실시형태에서, 제공된 방법에 따라 및/또는 제공된 제제 또는 조성물을 사용하여 일정 용량의 세포를 대상체에게 투여한다. 일부 실시형태에서, 용량의 크기, 양 또는 시간은 상기 대상체의 연령에 따라 결정된다. 일부 실시형태에서, 용량의 크기, 양 또는 시간은 상기 대상체의 체중에 따라 결정된다. 일부 실시형태에서, 용량의 크기, 양 또는 시간은 상기 대상체 종양의 특정 유형에 따라 결정된다.

- [0232] 본 발명의 제18 양태는 CD7 단백질 또는 이의 항원 단편 검출 방법을 제공한다.
- [0233] 나아가, 상기 방법은,
- [0234] (1) CD7 단백질 또는 이의 항원 단편을 함유하는 샘플을 얻는 단계;
- [0235] (2) 단계 (1)에서 수집된 샘플을 본 발명의 제1 양태에 따른 나노바디, 본 발명의 제2 양태에 따른 인간화 항-CD7 나노바디, 본 발명의 제8 양태에 따른 접합체, 본 발명의 제10 양태에 따른 키트 또는 본 발명의 제11 양태에 따른 CD7 단백질 또는 이의 항원 단편 검출용 시약과 접촉시키는 단계; 및
- [0236] (3) 항체-항원 복합체의 존재를 검출하는 단계를 포함한다.
- [0237] 나아가, 상기 나노바디는 검출 가능한 마커에 의해 마킹되는 나노바디이다.
- [0238] 나아가, 상기 검출 가능한 마커는 형광 색소, 아비딘, 상자성 원자, 방사성 동위원소를 포함한다.
- [0239] 나아가, 상기 형광 색소는 플루오레세인, 로다민, 텍사스(Texas) 레드, 피코에리트린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, 폴리디노피코잔틴-클로로필린이다.
- [0240] 나아가, 상기 아비딘은 비오틴, 오발부비딘, 스트렙타비딘, 비텔라비딘, 유사 아비딘이다.
- [0241] 나아가, 상기 방사성 동위원소는 방사성 요오드, 방사성 세슘, 방사성 이리듐, 방사성 코발트이다.
- [0242] 본 발명의 제19 양태는 본 발명의 제7 양태에 따른 조작된 숙주 세포의 제조 방법을 제공한다.
- [0243] 나아가, 상기 방법은, 본 발명의 제6 양태에 따른 재조합 발현 벡터를 숙주 세포에 도입하는 단계를 포함한다.
- [0244] 나아가, 상기 도입 방법은, 지방 감염법, 미세 주입, 전기 천공, DNA 벡터, RNA 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터, 단순 포진 바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노 관련 바이러스 벡터를 포함한다.
- [0245] 본 발명의 제20 양태는 대상체가 CD7-발현 종양을 앓고 있는지 여부를 진단하는 방법을 제공한다.
- [0246] 나아가, 상기 방법은,
- [0247] (1) CD7-발현 종양이 의심되는 대상체로부터의 샘플을 제공하는 단계;
- [0248] (2) 샘플을 본 발명의 제1 양태에 따른 나노바디, 본 발명의 제2 양태에 따른 인간화 항-CD7 나노바디, 본 발명의 제8 양태에 따른 접합체, 본 발명의 제10 양태에 따른 키트 또는 본 발명의 제11 양태에 따른 CD7 단백질 또는 이의 항원 단편 검출용 시약과 접촉시키는 단계; 및
- [0249] (3) 상기 나노바디와 항원을 포함하는 복합체의 형성을 검출하고, 상기 대상체로부터의 샘플 내 CD7의 양을 얻 으며, 상기 대상체로부터의 샘플 내 상기 CD7의 양을 알려진 표준품 또는 참조 샘플 내 상기 CD7의 양과 비교하여 상기 대상체로부터의 샘플의 CD7 수준이 종양과 관련된 CD7 수준 내에 속하는지 여부를 결정하는 단계를 포함한다.
- [0250] 나아가, 단계 (1)에서 상기 샘플은 소변, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 복수, 순환 세포, 순환 종양 세포, 비조직 관련 세포, 조직 또는 조직학적 제조물을 포함한다.
- [0251] 나아가, 상기 CD7-발현 종양은 T 림프구계 혈액 종양이다.
- [0252] 나아가, 상기 종양은 급성 골수성 백혈병(AML), 급성 림프구성 백혈병(ALL), 림프구성 림프종(LBL), NKT 세포 백혈병, 말초 T 세포 림프종(NHL), NKT 세포 림프종, 역형성 대세포 림프종(ALCL)을 포함한다.
- [0253] 본 발명의 제21 양태는 CD7 단백질 또는 이의 항원 단편을 검출하는 데 있어서 본 발명의 제1 양태에 따른 나노

바디 또는 본 발명의 제2 양태에 따른 인간화 항-CD7 나노바디의 응용을 제공한다.

- [0254] 본 발명의 제22 양태는 CD7 단백질 또는 이의 항원 단편 검출용 시약 또는 키트의 제조에 있어서 본 발명의 제1 양태에 따른 나노바디 또는 본 발명의 제2 양태에 따른 인간화 항-CD7 나노바디의 응용을 제공한다.
- [0255] 본 발명의 제23 양태는 조작된 숙주 세포의 제조에 있어서 본 발명의 제5 양태에 따른 핵산 분자 또는 본 발명의 제6 양태에 따른 재조합 발현 벡터의 응용을 제공한다.
- [0256] 나아가, 상기 조작된 숙주 세포는 본 발명의 제7 양태에 따른 조작된 숙주 세포이다.
- [0257] 본 발명의 제24 양태는 항종양 약물의 제조에 있어서 본 발명의 제1 양태에 따른 나노바디, 본 발명의 제2 양태에 따른 인간화 항-CD7 나노바디, 본 발명의 제3 양태에 따른 키메라 항원 수용체, 본 발명의 제4 양태에 따른 키메라 항원 수용체, 본 발명의 제5 양태에 따른 핵산 분자, 본 발명의 제6 양태에 따른 재조합 발현 벡터, 본 발명의 제7 양태에 따른 조작된 숙주 세포, 본 발명의 제8 양태에 따른 접합체, 본 발명의 제9 양태에 따른 약학적 조성물 또는 본 발명의 제12 양태에 따른 생물학적 제제의 응용을 제공한다.
- [0258] 나아가, 상기 항종양 약물은 항종양 면역 세포 요법제, 항종양 유전자 요법 약물을 포함한다.
- [0259] 나아가, 상기 종양은 CD7-발현 종양이다.
- [0260] 나아가, 상기 종양은 T 림프구계 혈액 종양이다.
- [0261] 나아가, 상기 종양은 급성 골수성 백혈병(AML), 급성 림프구성 백혈병(ALL), 림프구성 림프종(LBL), NKT 세포 백혈병, 말초 T 세포 림프종(NHL), NKT 세포 림프종, 역형성 대세포 림프종(ALCL)을 포함한다.
- [0262] 본 발명의 제25 양태는 종양의 예방 및/또는 치료를 위한 면역 세포 제조용 키트의 제조에 있어서 본 발명의 제1 양태에 따른 나노바디, 본 발명의 제2 양태에 따른 인간화 항-CD7 나노바디, 본 발명의 제3 양태에 따른 키메라 항원 수용체, 본 발명의 제4 양태에 따른 키메라 항원 수용체, 본 발명의 제5 양태에 따른 핵산 분자, 본 발명의 제6 양태에 따른 재조합 발현 벡터, 본 발명의 제7 양태에 따른 조작된 숙주 세포, 본 발명의 제8 양태에 따른 접합체, 본 발명의 제9 양태에 따른 약학적 조성물 또는 본 발명의 제12 양태에 따른 생물학적 제제의 응용을 제공한다.
- [0263] 나아가, 상기 종양은 CD7-발현 종양이다.
- [0264] 나아가, 상기 종양은 T 림프구계 혈액 종양이다.
- [0265] 나아가, 상기 종양은 급성 골수성 백혈병(AML), 급성 림프구성 백혈병(ALL), 림프구성 림프종(LBL), NKT 세포 백혈병, 말초 T 세포 림프종(NHL), NKT 세포 림프종, 역형성 대세포 림프종(ALCL)을 포함한다.
- [0266] 본 발명의 제26 양태는 종양의 예방 및/또는 치료를 위한 생물학적 제제의 제조에 있어서 본 발명의 제1 양태에 따른 나노바디, 본 발명의 제2 양태에 따른 인간화 항-CD7 나노바디, 본 발명의 제3 양태에 따른 키메라 항원 수용체, 본 발명의 제4 양태에 따른 키메라 항원 수용체, 본 발명의 제5 양태에 따른 핵산 분자, 본 발명의 제6 양태에 따른 재조합 발현 벡터, 본 발명의 제7 양태에 따른 조작된 숙주 세포, 본 발명의 제8 양태에 따른 접합체 또는 본 발명의 제9 양태에 따른 약학적 조성물의 응용을 제공한다.
- [0267] 나아가, 상기 종양은 CD7-발현 종양이다.
- [0268] 나아가, 상기 종양은 T 림프구계 혈액 종양이다.
- [0269] 나아가, 상기 종양은 급성 골수성 백혈병(AML), 급성 림프구성 백혈병(ALL), 림프구성 림프종(LBL), NKT 세포 백혈병, 말초 T 세포 림프종(NHL), NKT 세포 림프종, 역형성 대세포 림프종(ALCL)을 포함한다.
- [0270] 본 발명의 제27 양태는 종양의 예방 및/또는 치료에 있어서 본 발명의 제7 양태에 따른 조작된 숙주 세포의 응용을 제공한다.
- [0271] 나아가, 상기 종양은 CD7-발현 종양이다.
- [0272] 나아가, 상기 종양은 T 림프구계 혈액 종양이다.
- [0273] 나아가, 상기 종양은 급성 골수성 백혈병(AML), 급성 림프구성 백혈병(ALL), 림프구성 림프종(LBL), NKT 세포 백혈병, 말초 T 세포 림프종(NHL), NKT 세포 림프종, 역형성 대세포 림프종(ALCL)을 포함한다.
- [0274] 본 발명의 제28 양태는 종양의 예방 및/또는 치료에 있어서 본 발명의 제8 양태에 따른 접합체의 응용을 제공한

다.

- [0275] 나아가, 상기 종양은 CD7-발현 종양이다.
- [0276] 나아가, 상기 종양은 T 림프구계 혈액 종양이다.
- [0277] 나아가, 상기 종양은 급성 골수성 백혈병(AML), 급성 림프구성 백혈병(ALL), 림프구성 림프종(LBL), NKT 세포 백혈병, 말초 T 세포 림프종(NHL), NKT 세포 림프종, 역형성 대세포 림프종(ALCL)을 포함한다.
- [0278] 본 발명의 제29 양태는 종양의 예방 및/또는 치료에 있어서 본 발명의 제9 양태에 따른 약학적 조성물의 응용을 제공한다.
- [0279] 나아가, 상기 종양은 CD7-발현 종양이다.
- [0280] 나아가, 상기 종양은 T 림프구계 혈액 종양이다.
- [0281] 나아가, 상기 종양은 급성 골수성 백혈병(AML), 급성 림프구성 백혈병(ALL), 림프구성 림프종(LBL), NKT 세포 백혈병, 말초 T 세포 림프종(NHL), NKT 세포 림프종, 역형성 대세포 림프종(ALCL)을 포함한다.
- [0282] 본 발명의 제30 양태는 종양의 예방 및/또는 치료를 위한 면역 세포의 제조에 있어서 본 발명의 제10 양태에 따른 키트의 응용을 제공한다.
- [0283] 나아가, 상기 면역 세포는 본 발명의 제7 양태에 따른 조작된 숙주 세포이다.
- [0284] 본 발명의 제31 양태는 CD7 단백질 또는 이의 항원 단편을 검출하는 데 있어서 본 발명의 제11 양태에 따른 CD7 단백질 또는 이의 항원 단편 검출용 시약의 응용을 제공한다.
- [0285] 본 발명의 제32 양태는 종양의 예방 및/또는 치료에 있어서 본 발명의 제12 양태에 따른 생물학적 제제의 응용을 제공한다.
- [0286] 나아가, 상기 종양은 CD7-발현 종양이다.
- [0287] 나아가, 상기 종양은 T 림프구계 혈액 종양이다.
- [0288] 나아가, 상기 종양은 급성 골수성 백혈병(AML), 급성 림프구성 백혈병(ALL), 림프구성 림프종(LBL), NKT 세포 백혈병, 말초 T 세포 림프종(NHL), NKT 세포 림프종, 역형성 대세포 림프종(ALCL)을 포함한다.
- [0289] [발명의 효과]
- [0290] 종래 기술과 비교하여 본 발명이 갖는 장점 및 유익한 효과는 다음과 같다.
- [0291] 본 발명은 항-CD7 나노바디를 제공하며, 상기 나노바디는 CD7과 좋은 친화도를 갖고 있어, 상기 나노바디를 키메라 항원 수용체의 항원 결합 영역으로 사용하여 키메라 항원 수용체 변형을 수행하고 CAR-T 세포 요법에 사용함으로써, 단일 클론 항체(scFv)를 기반으로 구축된 기존의 CAR-T 세포와 비교하여, 본 발명의 단일 나노바디 또는 이중 나노바디를 기반으로 구축된 CAR-T 세포는 다양한 장점을 갖고 있으므로, scFv를 기반으로 설계된 기존의 CAR-T에 존재하는 발현 어려움, 낮은 안정성 등 결함을 효과적으로 방지할 뿐만 아니라, 면역 세포가 종양 항원을 표적으로 인식하는 능력을 현저히 증가시키고, 종양 세포에 대한 살상 활성을 강화하여 광범위한 응용 전망을 갖는다.

**도면의 간단한 설명**

- [0292] 도 1은 CD7 항원 정제의 SDS-PAGE 결과도이다.
- 도 2는 알파카 면역 흐름도이다.
- 도 3은 나노바디 라이브러리 구축 과정에서 1차 PCR 증폭 결과도이다.
- 도 4는 나노바디 라이브러리 구축 과정에서 2차 PCR 증폭 결과도이다.
- 도 5는 나노바디 라이브러리 다양성 검출의 PCR 결과도이다.
- 도 6은 파지 패닝 후 양성군 대 음성군의 비율 결과도이다.
- 도 7은 단일 클론 스크리닝 OD값의 통계 결과도이다.

- 도 8은 단일 클론 스크리닝 및 동정의 통계 결과도이다.
- 도 9는 단일 VHH CAR-T의 구조 모식도이다.
- 도 10은 렌티바이러스 패키징 흐름도이다.
- 도 11은 CAR-T 세포 배양 흐름도이다.
- 도 12는 단일 VHH CAR-T 세포 유세포 분석 검출의 대표적인 결과도이다.
- 도 13은 단일 VHH CAR-T 세포 CD7+평균 MFI 결과 통계도이다.
- 도 14는 단일 VHH CAR-T 세포 살상 비율의 통계 결과도이다.
- 도 15는 단일 VHH K562 세포주 평균 MFI값의 통계 결과도이다.
- 도 16은 단일 VHH 특이성 검출 결과도이다.
- 도 17은 단일 VHH CAR-T 세포 유세포 분석 검출의 대표적인 결과도이다.
- 도 18은 단일 VHH CAR-T 세포 CD7+평균 MFI 결과도이다.
- 도 19는 공급된 서열과 DP-47, 주형 h-NbBcII10PGLA 및 원래 서열의 비교 결과도로서, 여기서 강조 표시된 부위는 돌연변이 부위이다.
- 도 20은 이중 VHH CAR-T의 구조 모식도이다.
- 도 21은 이중 VHH CAR-T 세포 유세포 분석 검출의 대표적인 결과도이다.
- 도 22는 단일 VHH CAR-T 세포, 이중 VHH CAR-T 세포 CD7+평균 MFI 결과 통계도이다.
- 도 23은 dVHH-D CAR-T 세포 증폭 곡선 결과도이다.
- 도 24는 dVHH-D CAR-T 세포 살상 결과도이다.
- 도 25는 dVHH-E CAR-T 세포 증폭 곡선 결과도이다.
- 도 26은 dVHH-E CAR-T 세포 살상 결과도이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0293] 이하 구체적인 실시예를 결합하여 본 발명을 추가로 설명한다. 이들 실시예는 본 발명을 해석하기 위한 것일 뿐 본 발명을 제한하는 것으로 이해되어서는 안된다. 당업자는 본 발명의 원리 및 요지를 벗어나지 않고 이러한 실시예에 대해 다양한 변경, 수정, 교체 및 변형이 이루어질 수 있음을 이해할 수 있을 것이며, 본 발명의 범위는 특허청구범위 및 그 균등물에 의해 한정된다. 하기 실시예에 사용된 실험 방법은 달리 명시되지 않는 한 모두 통상적인 방법이며; 하기 실시예에 사용된 시약 및 재료 등은 달리 명시되지 않는 한 모두 상업적 경로를 통해 얻을 수 있다.

[0294] **실시예 1: 항원 제조**

[0295] 1. 실험 방법

[0296] RNA 추출 키트를 이용하여 T 세포 내의 RNA를 추출하였다. SuperScript™ II Reverse Transcriptase 사용 설명서를 참조하고, random primers 프라이머를 이용하여 역전사를 수행하여 cDNA를 얻었다. cDNA를 주형으로 사용하여 PCR을 통해 항원 CD7의 세포의 영역 유전자 서열을 얻었다. CD7세포의 영역 유전자 서열을 단백질 발현 벡터에 연결하여 발현시키고, Ni 칼럼 정제를 수행하여 정제된 CD7-His 단백질을 얻었다.

[0297] 2. 실험 결과

[0298] 결과를 도 1에 나타내었으며, 결과는 SDS-PAGE 동정을 거쳐 본 발명이 후속 알파카 면역에 사용할 수 있는 크기 17.2kDa, 순도 >90%인 CD7 항원을 성공적으로 제조하였음을 보여준다.

[0299] **실시예 2: 나노바디 라이브러리 구축**

[0300] 1. 실험 방법

[0301] (1) 실시예 1의 자가 정제된 본 발명의 CD7-His 단백질을 이용하여 알파카 면역화 수행하였으며, 구체적인 알파카 면역 흐름도는 도 2에 나타내었다. 매주 1회 면역화 수행하고, 연속적으로 총 6회 면역화 수행하였으며; (3) 마지막 면역 7일 후 말초 혈액 100 mL를 채취하고, Ficoll 밀도 구배 원심분리법으로 말초 혈액 단핵구를 분리한 후, RNA를 추출하고, 역전사 키트를 이용하여 cDNA를 제조하였으며; (4) SOE-PCR을 이용하여 VHH 단편을 얻고, 이를 pMES4 파지 디스플레이 벡터에 연결하였으며, (5) 연결 생성물을 전기 천공 수용성 세포 TG1로 전기 변환하여 얻은 박테리아 라이브러리는 바로 라이브러리 용량이  $3.37 \times 10^8$ 인 구축된 CD7의 단일 도메인 중쇄 항체 파지 디스플레이 라이브러리이고; (6) 라이브러리 구축이 완료된 후, 라이브러리의 삽입 효율을 검출하기 위해, 무작위로 25개의 클론을 선택하고, 프라이머 MP57 및 GIII를 이용하여 콜로니 PCR을 수행한 후, PCR 생성물을 생어 시퀀싱하였다.

[0302] 2. 실험 결과

[0303] 1차 PCR 증폭 결과도는 도 3에 나타내었으며, 결과는 1차 PCR 종료 후, 크기가 약 700 bp인 DNA 단편이 회수되었음을 보여주고, 2차 PCR 증폭 결과도는 도 4에 나타내었으며, 결과는 2차 PCR 종료 후, 크기가 약 400 bp인 DNA 단편이 회수되었음을 보여주고, 라이브러리 구축 완료 후, 라이브러리의 삽입 효율을 검출하기 위해, 무작위로 25개의 클론을 선택하고, 프라이머 MP57 및 GIII를 이용하여 콜로니 PCR을 수행한 후, PCR 생성물을 생어 시퀀싱한 결과, 삽입률이 95%에 근접한 것으로 나타났다(도 5 참조).

[0304] **실시예 3: 나노바디의 농축 스크리닝**

[0305] 1. 파지 나노바디 라이브러리의 증폭

[0306] (1) TG1 대장균 나노바디 라이브러리를 취하여 2-YT 액체 배지에 옮기고, 37°C, 200 rpm에서 OD값이 0.5가 될 때까지 배양한 후, 헬퍼 파지 VCSM13을 첨가하여 세포를 감염시켰다. 부드럽게 혼합한 후 37°C에서 30분간 배양하였다. 박테리아액을 원심분리하여 미량의 포도당을 제거한 후, 침전물을 암피실린 및 키나마이신 저항성을 동시에 갖는 2-YT 배지에 재현탁하고, 37°C, 200 rpm에서 밤새 흔들어 배양하여 나노바디를 표시하는 파지를 증폭시켰으며; (2) 밤새 배양물을 50 mL 원심분리 튜브에 옮기고, 원심분리하여 상층액을 취한 후, 20%(wt/vol) PEG6000/2.5 M NaCl 용액을 첨가하여 파지를 침전시켰다. 원심분리하여 상층액을 버리고, PBS로 침전물을 재현탁한 후, 원심분리하여 상층액을 취하고, 이를 새로운 원심분리 튜브로 옮기고 20%(wt/vol) PEG6000/2.5 M NaCl 용액을 첨가하여 파지를 재침전시켰다. 원심분리하여 상층액을 버리고, 침전물을 1 mL PBS에 재현탁시켰다. 원심분리한 후 상층액을 새로운 원심분리 튜브로 옮기고, 글리세롤을 최종 농도 20%로 첨가한 후 -80°C에 보관하였으며; (3) 파지 나노바디 라이브러리의 역가를 측정하고, 파지를 10배 구배로 희석한 후, 희석 비율이 다른 파지를 취하여 대수 성장 단계의 TG1 박테리아를 감염시키고, 37°C에서 밤새 배양하였으며, 다음날 플라크 수를 통해 파지 나노바디 라이브러리의 역가를 추정하였다.

[0307] 2. 파지 농축 스크리닝

[0308] (1) ELISA 방법으로 나노바디를 패닝하고, 재조합 CD7-His 단백질을 마이크로플레이트에 코팅한 후, 4°C에서 밤새 배양하고; (2) 250 µL PBST로 마이크로플레이트를 3회 세척하고, 200 µL 차단 용액을 첨가하여 실온에서 마이크로플레이트를 2 h 동안 배양하였으며; (3) 각 웰에 해당 파지를 첨가하여 실온에서 2 h 동안 배양하고; (4) 250 µL PBST로 마이크로플레이트를 15회 세척하였으며; (5) 각 웰에 0.25mg/mL 농도의 트립신 100 µL를 첨가하여 실온에서 700 rpm으로 0.5 h 동안 배양하고; (6) AEBSF로 파지를 용출하였으며; (7) 용출된 파지의 역가를 측정하고 파지를 감염 및 증폭하였으며; (8) 용출된 파지 수의 양성:음성  $\geq 100$ 이면, 패닝을 중지하였다.

[0309] 3. 실험 결과

[0310] 패닝 결과를 표 1 및 도 6에 나타내었으며, 2회 패닝 후, 양성군 대 음성군의 비율은 438배에 달해, 단일클론 스크리닝 표준에 도달하였다. 따라서 2회 패닝 후, 패닝을 중지하고 다음 단계의 단일 클론 스크리닝 및 동정을 수행하였다.

표 1

표 1. 파지 패닝 결과

스크리닝 횟수	CD7	블랭크	비율
1차 스크리닝	$8 \times 10^6$	$2 \times 10^5$	40
2차 스크리닝	$3.51 \times 10^8$	$8 \times 10^5$	438

[0311]

[0312]

실시예 4: 양성 단일 클론의 스크리닝 및 동정

[0313]

1. 실험 방법

[0314]

(1) 2~3회 스크리닝을 거쳐 얻은 TG1 대장균 라이브러리에서 단일 클론을 선택하여 확대 배양을 수행하고, 헬퍼 파지 VCSM13을 이용하여 감염시킨 후, 단일 클론 파지를 제조하였다. (2) 적당량의 나노바디 파지와 K562-CD7 양성 세포를 사용하여 실온에서 2 h 동안 배양하고; (3) PBST로 플레이트를 세척한 후, HA-HRP 항체를 첨가하고, 실온에서 1 h 동안 배양하였으며; (4) PBST로 플레이트를 세척한 후, 100  $\mu$ L TMB 단일 성분 발색 용액을 첨가하고, 실온에서 30 min 동안 배양한 후 100  $\mu$ L 정지 용액을 첨가하였으며; (5) 마이크로플레이트 리더를 이용하여 450 nm의 흡광도를 검출하고; (6) 샘플 웰의 OD450값 대 블랭크 대조군의 비율이 2보다 큰 경우 양성 클론으로 판정하였으며; (7) 양성 클론에 대해 박테리아액 PCR을 수행하고, 생어 시퀀싱을 수행하였으며; (8) 생어 시퀀싱을 거친 단일 클론을 소프트웨어 DNAMAN을 이용하여 서열 정렬을 수행하였다. 또한 서열 특이적 클론을 스크리닝하였다.

[0315]

2. 실험 결과

[0316]

본 실시예에서는 9개의 96 웰 플레이트에 있는 총 864개의 단일 클론을 스크리닝하고, 단일 클론 OD값 결과도 7에 나타내었으며, 계산 원칙에 따라 계산하여 양성 클론 231개, 서열 특이적 클론 17개를 스크리닝하고, 그 결과를 도 8에 나타내었으며, 상기 서열 특이적 나노바디의 번호는 각각 VHH01-VHH20(VHH02, VHH05 및 VHH11은 포함되지 않음), VHH01, VHH03, VHH04, VHH06, VHH07, VHH08, VHH09, VHH10, VHH12, VHH13, VHH14, VHH15, VHH16, VHH17, VHH18, VHH19, VHH20이고, 이에 대응하는 가변 영역 아미노산 서열은 각각 서열번호 1, 서열번호 9, 서열번호 17, 서열번호 25, 서열번호 33, 서열번호 41, 서열번호 49, 서열번호 57, 서열번호 65, 서열번호 73, 서열번호 81, 서열번호 89, 서열번호 97, 서열번호 105, 서열번호 113, 서열번호 121, 서열번호 129로 표시되며, 이에 각각 대응하는 가변 영역 핵산 서열은 각각 서열번호 2, 서열번호 10, 서열번호 18, 서열번호 26, 서열번호 34, 서열번호 42, 서열번호 50, 서열번호 58, 서열번호 66, 서열번호 74, 서열번호 82, 서열번호 90, 서열번호 98, 서열번호 106, 서열번호 114, 서열번호 122, 서열번호 130으로 표시된다.

[0317]

실시예 5: 단일 VHH CAR-T 세포의 제조 및 시험관 내 기능 검증

[0318]

1. 단일 VHH CAR 구조 구축

[0319]

(1) 서열 특이적 클론에 대해 단일 VHH CAR 구조 구축을 수행하였다. 먼저, PCR 방법을 이용하여 양성 클론주의 VHH 서열을 증폭하였으며, 1차 PCR 프라이머는 다음과 같다.

[0320]

NCAR-F1: 5'-CTGCAGGAGTCTGGRGGAGG-3'

[0321]

NCAR-R1: 5'-TGAGGAGACGGTGACCTGGG-3'

[0322]

1차 PCR 종료 후, 1차 PCR 생성물을 주형으로 사용하여 2차 PCR을 수행하였으며, 2차 PCR 프라이머는 다음과 같다.

[0323]

NCAR-F2: 5'-TTTCTGCTGATCCCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGRGGAGG-3'

[0324]

NCAR-R2: 5'-TAGGAGCCGGGTGGGCGGCCGGTCTGGGGTAGTTGAGGAGACGGTGACCTGGG-3'

[0325]

(2) 2차 PCR 생성물을 상동 재조합 방식을 통해 벡터 Sen1-S88BZ에 연결하고, 벡터를 Not I 단일 효소로 절단하였다. 이 시점에서 CD7을 표적으로 하는 단일 VHH가 함유된 CAR 구조가 성공적으로 구축되었다. 각각 VHH01 내지 VHH20(여기에는 02, 05 및 11이 포함되지 않음)으로 명명된 총 17종의 단일 VHH 서열이 구축되고, 구축된 단일 VHH CAR-T의 구조 모식도는 도 9에 나타내었으며, 여기서, EF1 $\alpha$ 는 신장 인자 1 $\alpha$ 의 프로모터이고, leader는

신호 펩티드의 코딩 서열이며, VHH는 항-CD7 나노바디의 코딩 서열이고, CD8H+TM은 CD8 힌지 영역 및 막횡단 영역이며, 4-1BB 및 CD3 ζ 세포내 신호전달 영역은 세포내 공동자극 도메인이고, 바이러스 형질도입 후 CAR 발현의 검출을 용이하게 하기 위해, T2A 펩티드 연결을 통해 tEGFR 세포의 영역을 발현하였다.

[0326] 2. 단일 VHH CAR-T 세포의 제조

[0327] CAR-T 세포를 제조하기 전에, 먼저 다음과 같이 렌티바이러스 패키징을 수행한다. (1) 표적 플라스미드와 3개의 헬퍼 플라스미드(pMD2.G, pRSV-REV, pMDLg)를 PEI-Pro 작용 하에 293FT 세포에 공동 형질감염시키고; (2) 6시간 동안 포장하여 액체를 교체하였으며; (3) 패키징 48시간 후 렌티바이러스를 수확하고; (4) 수확한 렌티바이러스 원액을 초원심분리하여 농축하였으며, DMEM 고글루코스 배지로 렌티바이러스 입자를 재현탁하고, 배포하여 준비해두었으며; 렌티바이러스 패키징 흐름을 도 10에 나타내고;

[0328] 렌티바이러스 패키징 완료 후, 다음과 같이 CAR-T 세포를 제조하였다. (1) 환자 또는 건강한 공여자로부터 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 수집하고; (2) CD3 자기 비드를 통해 α β T 세포를 분류하였으며; (3) 분류가 완료된 α β T 세포를 TexMACS GMP 배지(MACS)에서 배양하고; (4) 2일 후 렌티바이러스의 형질도입을 수행하였으며; (5) 12~14일 동안 계속 배양하여 CAR-T 세포를 수확하여 CD7을 표적으로 하는 VHH NS CAR-T 세포(VHH01-VHH20으로 명명, 여기에는 VHH02, VHH05 및 VHH11이 포함되지 않음)를 얻고, CAR-T 세포 배양 흐름을 도 11에 나타내었으며; (6) 배양 과정에서 유세포 분석 검출을 수행하여 CAR+ 세포의 비율 및 CD7+ 세포의 평균 MFI값을 측정하였다.

[0329] 3. 단일 VHH CAR-T 세포의 시험관 내 기능 검증

[0330] 본 실시예에서 제조된 항-CD7 VHH CAR-T 세포의 시험관 내 생물학적 활성을 검증하기 위해, 배양 과정에서 다음과 같이 시험관 내 살상 실험 검증을 수행하였다. 먼저 표적 세포 KG-1a-GFP-Luc를 수집하고, 2000 rpm 에서 5 min 동안 원심분리한 후, DPBS에 재현탁하여 계수하고,  $1 \times 10^5$  /웰의 양으로 96 웰 플레이트에 첨가하였다. 그런 다음 E:T=3:1에 따라 표적 세포에 적당량의 이펙터 세포를 첨가하고, 혼합한 후 4시간 동안 배양하고, 그런 다음 해당 루시퍼라제 기질을 첨가하고, 96 웰 플레이트를 전기화학발광 마이크로플레이트 리더로 루시퍼라제 수치를 읽었다. 수치 변화에 따라 살상 비율을 계산하였다. 또한, 17종의 단일 VHH CAR-T 세포 배양 12일째에 17종의 단일 VHH CAR-T 세포, 블랭크 T 세포를 채취하여 각각 CD7 발현 양성 세포주 KG-1a-GFP-Luc와 E:T=3:1의 비율에 따라 세포 살상 실험을 수행하였다.

[0331] 4. 실험 결과

[0332] 단일 VHH CAR-T 세포의 유세포 분석 검출의 대표적인 결과, 및 이의 CD7+평균 MFI결과를 각각 도 12 및 도 13에 나타내었으며, 결과는 VHH01 내지 VHH20(VHH02, VHH05 및 VHH11은 포함되지 않음)의 CAR 양성률은 각각 61.04%, 96.2%, 78.9%, 83%, 85%, 72.72%, 89%, 95.6%, 90.98%, 68.38%, 65%, 84.1%, 79.6%, 54.4%, 89.2%, 72.6%, 62.15%이고; 블랭크 T 세포 CD7 양성 세포의 평균 MFI값은 2588이며, VHH01 내지 VHH20(VHH02, VHH05 및 VHH11은 포함되지 않음)의 CAR-T 세포 CD7 양성 세포의 평균 MFI값은 각각 2257, 694, 1281, 498, 1566, 2362, 841, 197, 190, 2010, 1473, 1077, 1300, 2054, 1117, 1391, 2041임을 보여주고;

[0333] 시험관 내 기능 검증 결과들도 14에 나타내었으며, 결과는 블랭크 T 세포의 살상 비율은 13.65%이고, VHH01 내지 VHH20(VHH02, VHH05 및 VHH11은 포함되지 않음) 대 CAR-T 세포의 살상 비율은 각각 4.79%, 75.7%, 57%, 62.19%, 61.63%, 68.52%, 71.47%, 91.36%, 78.18%, 1.18%, 60.44%, 56.77%, 72.87%, 8.58%, 74.52%, 61.71%, 9.38%임을 보여준다.

[0334] **실시예 6: 나노바디 친화도, 특이성 검출**

[0335] 1. 친화도 검출

[0336] 실시예 4에서 스크리닝을 거쳐 동정된 17종의 단일 VHH에 대응하는 VHH CAR 구조를 인간 골수성 백혈병 세포주 K562에 형질도입하고, 형질도입 후 4일째에 CD7-His 단백질질을 이용하여 유세포 분석 검출을 수행하여 양성 세포의 평균 MFI값을 통계하였다. 각 VHH와 CD7 간의 친화도 차이에 따라 양성 세포의 평균 MFI값이 달라지는데, MFI값이 높을수록 항원 CD7에 대한 대응하는 나노바디의 친화도가 높아지며, 총 3회의 병렬 실험을 수행하였다.

[0337] 2. 특이성 검출

[0338] (1) 시퀀싱을 통해 얻은 다양한 클론주의 VHH 단편을 원핵 발현 벡터 PET-28a-SUMO에 클로닝하고; (2) 시퀀싱이 정확한 후 플라스미드를 추출하고, 그런 다음 대장균 균주 BL21로 형질전환하였으며, IPTG 유도 하에 단백질 발

현을 수행하고; (3) 초음파로 박테리아를 용해하여 조단백질을 얻었으며; (4) 니켈 컬럼 이온 친화성 크로마토그래피로 나노바디를 정제하고; (5) 정제된 나노바디를 1차 항체로 사용하고, HIS-FITC 항체를 2차 항체로 사용하여 유세포 분석 검출을 통해 17종의 나노바디와 K562 및 K562-CD7 세포주의 결합을 검출하였다.

[0339] 3. 실험 결과

[0340] 나노바디 친화도 검출 결과를 도 15에 나타내었으며, 결과는 17종의 단일 VHH 구조 모두 CD7-His에 특이적으로 결합함을 보여주고, 여기서 VHH03, VHH06, VHH10, VHH12는 강한 친화도를 보여주는데, 이는 본 발명의 실시예 4에서 스크리닝을 거쳐 동정된 17종의 단일 VHH가 모두 CD7과 좋은 친화도를 가짐을 의미하며;

[0341] 나노바디 특이성 검출 결과를 도 16에 나타내고, 결과는 17종의 VHH가 모두 CD7에 특이적으로 결합할 수 있음을 보여주는데, 이는 본 발명의 실시예 4에서 스크리닝을 거쳐 동정된 17종의 단일 VHH가 좋은 특이성을 가짐을 의미한다.

[0342] **실시예 7: 인간화 나노바디(hVHH06)의 구축**

[0343] 1. 실험 방법

[0344] (1) 문헌에 보고된 보편적인 인간화 프레임워크 h-NbBcII10FGLA를 참조하고(자세한 문헌: Vincke, C., et al., General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold. J Biol Chem, 2009. 284(5): p. 3273-3284), DP-47과 비교하여 VHH06의 핵심 위치에 있는 잔기를 인간화 조작하였으며, 조작된 나노바디를 hVHH06으로 명명하고, 3 가지 구조(인간화 서열 및 DP-47, 주형 h-NbBcII10PGLA 및 원래 서열)의 서열을 비교하여 그 결과를 도 19에 나타내었으며, 상기 hVHH06의 CDR1, CDR2, CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 139, 서열번호 141, 서열번호 143으로 표시되고, CDR1, CDR2, CDR3의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 140, 서열번호 142, 서열번호 144로 표시되며, 상기 hVHH06의 아미노산 서열은 서열번호 137로 표시되고, 뉴클레오티드 서열은 서열번호 138로 표시되며; (2) hVHH06 및 VHH06을 전술한 방법에 따라 렌티바이러스 패키징을 동시에 수행하여 CAR-T 세포를 제조하고; (3) CAR-T 배양 6일째에 유세포 분석 검출을 수행하였으며; (4) CAR-T 배양 10일째에 KG-1a-GFP-Luc를 표적 세포로 사용하고, 전술한 방법에 따라 효과-표적 비율을 E:T=5:1, 10:1, 20:1로 설정하여 살상 실험을 수행하였다.

[0345] 2. 실험 결과

[0346] 유세포 분석 검출 결과를 도 17에 나타내었으며, 결과는 VHH06 및 hVHH06의 형질도입율은 각각 12.4%, 21%이고, CD7 양성률은 각각 0.249%, 0.157%임을 보여주고; 살상 실험 결과를 도 18에 나타내었으며, 결과는 E:T=5:1, 10:1, 20:1인 경우, KG-1a-GFP-Luc 세포에 대한 블랭크 T 세포의 평균 살상값은 각각 27.40%, 28.00%, 26.80%이고; KG-1a-GFP-Luc 세포에 대한 VHH06의 평균 살상값은 각각 69.90%, 79.80%, 79.70%이며, KG-1a-GFP-Luc 세포에 대한 hVHH06의 평균 살상값은 각각 70.80%, 81.20%, 89.60%임을 보여주는데, 상기 결과로부터, 인간화가 항체의 특성에 영향을 미치지 않음을 알 수 있으며, 이는 본 실시예가 VHH06을 성공적으로 인간화했음을 의미한다.

[0347] **실시예 8: 이중 VHH CAR-T 세포의 제조**

[0348] 1. 이중 VHH CAR 구조 구축

[0349] (1) 실시예 6에서 스크리닝된 좋은 기능을 갖는 VHH(VHH03, VHH06, VHH10, VHH12)을 사용하여 이중 VHH의 CAR 구조의 표적 플라스미드 구축에 사용하고, 구조 모식도를 도 20에 나타내었다. 먼저, PCR 방법을 이용하여 양성 클론주의 VHH 서열을 증폭하고, 1차 PCR 프라이머는 다음과 같다.

[0350] dNCAR-F1: 5'-CAGGTGCAGCTGCAGGAG-3'

[0351] dNCAR-R1: 5'-TGAGGAGACGGTGACCTGG-3'

[0352] 1차 PCR 종료 후, 1차 PCR 생성물을 주형으로 사용하여 2차 PCR을 수행하였으며, 2차 PCR 프라이머는 다음과 같다.

[0353] dNCAR-F2: 5'-  
CCAGGTACCGTCTCCTCAGGAGGAGGAGGATCCGGAGGAGGAGGATCTGGCGGCGGCAGTGGCGGCGGCTCCGGCGGCGGCTCTCAGGTGCA  
GCTGCAGGAG-3'

[0354] dNCAR-R2: 5'-TAGGAGCCGGGTGGCGGCGCGGTGCTGGGGTAGTTGAGGAGACGGTGACCTGG-3'

- [0355] 그런 다음, 2차 PCR 생성물을 상동 재조합 방식을 통해 벡터 VHH-XX(XX는 CD7 단일 VHH를 표적으로 하는 CAR 구조의 서열번호를 나타냄)에 연결하고, 벡터를 Not I 단일 효소로 절단하였다. 여기서, VHH-06을 벡터로 사용하여 각각 VHH03, VHH12와 함께 구축된 이중 VHH 구조를 각각 dVHH-B, dVHH-C로 명명하였다. VHH-10을 벡터로 사용하여 각각 VHH12, VHH10과 함께 구축된 이중 VHH 구조를 각각 dVHH-D, dVHH-E로 명명하였다. VHH12를 벡터로 사용하여 VHH12와 함께 구축된 이중 VHH 구조를 dVHH-F로 명명하였다.
- [0356] 2. 이중 VHH CAR-T 세포의 제조
- [0357] 이중 VHH CAR-T 세포의 제조 흐름은 실시예 5에서 단일 VHH CAR-T 세포의 제조 흐름과 일치하고, 렌티바이러스 패키징 과정을 도 10에 나타내었으며, 배양 흐름을 도 11에 나타내었다. 5개의 이중 VHH 구조 및 형질도입된 T 세포로 제조된 CAR-T 세포, VHH10 CAR-T 세포, VHH12 CAR-T 세포를 6일 동안 배양한 후 유세포 분석 검출을 수행하였다.
- [0358] 3. 실험 결과
- [0359] 본 실시예에서는 각각 dVHH-B 내지 dVHH-F(VHH-06+VHH-03, VHH-06+VHH-12, VHH-10+VHH-12, VHH-10+VHH-10, VHH-12+VHH-12)로 명명된 총 5개의 이중 VHH 구조를 구축하였으며, 구조를 도 20에 나타내고, EF1 $\alpha$ 는 신장 인자 1 $\alpha$ 의 프로모터이며, leader는 신호 펩티드의 코딩 서열이고, VHH는 항-CD7 나노바디의 코딩 서열이며, CD8H+TM은 CD8 힌지 영역 및 막횡단 영역이고, 4-1BB 및 CD3 $\zeta$  세포내 신호전달 영역은 세포내 공동자극 도메인이며, 바이러스 형질도입 후 CAR 발현의 검출을 용이하게 하기 위해, T2A 펩티드 연결을 통해 tEGFR 세포의 영역을 발현하고;
- [0360] CAR+ 세포의 비율 및 CD7 MFI값에 대응하는 결과도를 각각 도 21 및 도 22에 나타내었으며, 결과는 dVHH-B 내지 dVHH-F의 CAR 양성률은 각각 22.59%, 53.6%, 68.68%, 55.34%이고, VHH10의 양성률은 72.2%이며, VHH12의 양성률은 86.7%이고; 블랭크 T 세포 CD7 양성 세포의 평균 MFI값은 10109이며, dVHH-B 내지 dVHH-F의 CAR-T 세포 CD7 양성 세포의 평균 MFI값은 각각 708, 797, 648, 577, 1057이고, VHH10의 CAR-T 세포 CD7 양성 세포의 평균 MFI값은 2302이며, VHH12의 CAR-T 세포 CD7 양성 세포의 평균 MFI값은 1238임을 보여준다.
- [0361] **실시예 9: 이중 VHH CAR-T 세포(dVHH-D)의 배양 및 시험관 내 기능 실험 검증**
- [0362] 1. dVHH-D 이중 VHH CAR-T 세포의 제조
- [0363] 실시예 8에 기술된 CAR-T 세포의 제조 방법을 사용하여 dVHH-D, VHH10, VHH12 구조를 시험관 내 배양하고, 배양 과정에서 세포 증폭 배율을 통계하였다.
- [0364] 2. dVHH-D 이중 VHH CAR-T 세포의 시험관 내 기능 실험 검증
- [0365] dVHH-D와 단일 VHH CAR-T의 시험관 내 기능을 비교하기 위해, dVHH-D, VHH10, VHH12 CAR-T 세포 배양 12일째에 CAR-T 세포 및 블랭크 T 세포를 각각 CD7 발현 양성 세포주 CCRF-CEM(백혈병T 림프종 세포)와 E:T=2:1의 비율에 따라 다음과 같이 세포 살상 실험을 수행하였다. 먼저 표적 세포를 수집하고, 2000 rpm 에서 5 min 동안 원심분리한 후, DPBS에 재현탁하여 계수하고, CFSE로 염색한 후, 1E5/웰의 양으로 96 웰 플레이트에 첨가하였다. 그런 다음 다양한 효과-표적 비율(E:T=0.5:1, 1:1, 2:1)에 따라 표적 세포에 적당량의 이펙터 세포를 첨가하고, 혼합한 후 4시간 동안 배양한 후, 유세포 분석을 통해 세포 살상 비율을 검출하였다.
- [0366] 3. 실험 결과
- [0367] dVHH-D 증폭 곡선을 도 23에 나타내었으며, 결과는 증폭 14일째에 dVHH-D의 평균 증폭 배율은 46.35이고, VHH-12의 평균 증폭 배율은 26.3이며, VHH-10의 평균 증폭 배율은 22.75임을 보여주는데, 이로부터 dVHH-D의 증폭 배율은 단일 VHH CAR-T보다 현저히 우수함을 알 수 있고;
- [0368] dVHH-D시험관 내 기능 검증 결과를 도 24에 나타내었으며, 결과는 살상 비율이 0.5:1, 1:1, 2:1일 때, CCRF-CEM에 대한 dVHH-D의 평균 살상값은 각각 86.925%, 92.115%, 94.465%이고, CCRF-CEM에 대한 VHH10의 평균 살상값은 각각 45.55%, 69.95%, 85.85%이며, CCRF-CEM에 대한 VHH12의 평균 살상값은 각각 58.65%, 80.9%, 82.95%임을 보여주는데, 이로부터 dVHH-D가 CCRF-CEM에 대해 높은 살상력을 가짐을 알 수 있다.
- [0369] **실시예 10: 이중 VHH CAR-T 세포(dVHH-E)의 배양 및 시험관 내 기능 실험 검증**
- [0370] 1. dVHH-E 이중 VHH CAR-T 세포의 제조
- [0371] 실시예 8에 기술된 CAR-T 세포의 제조 방법을 사용하여 dVHH-E, VHH10, VHH12 구조를 시험관 내 배양하고, 배양

과정에서 세포 증폭 배율을 통계하였다.

[0372] 2. dVHH-E 이중 VHH CAR-T 세포의 시험관 내 기능 실험 검증

[0373] 실시예 9에서 설명된 방법을 사용하여 dVHH-E 이중 VHH CAR-T 시험관 내 기능 실험 검증을 수행하였다.

[0374] 3. 실험 결과

[0375] dVHH-E 증폭 곡선을 도 25에 나타내었으며, 결과는 증폭 13일째에 dVHH-E의 평균 증폭 배율은 45.875이고, VHH-12의 평균 증폭 배율은 19.775이며, VHH-10의 평균 증폭 배율은 21.36임을 보여주는데, 이로부터 dVHH-E의 증폭 배율은 단일 VHH CAR-T보다 현저히 우수함을 알 수 있고;

[0376] dVHH-E 시험관 내 기능 검증 결과를 도 26에 나타내었으며, 결과는 살상 비율이 0.5:1, 1:1, 2:1일 때, CCRF-CEM에 대한 dVHH-E의 평균 살상값은 각각 58.15%, 84.385%, 91.775%이고, CCRF-CEM에 대한 VHH10의 평균 살상값은 각각 45.55%, 69.95%, 85.85%이며, CCRF-CEM에 대한 VHH12의 평균 살상값은 각각 58.65%, 80.9%, 82.95%임을 보여주는데, 이로부터 dVHH-E는 CCRF-CEM에 대해 상대적으로 높은 살상력을 나타냄을 알 수 있다.

[0377] 실시예 11: SPR방법에 의한 항체(dVHH-D, dVHH-E, VHH10, VHH12) 친화도 측정

[0378] 1. 실험 방법

[0379] 본 실시예에서는 SPR방법(표면 플라즈몬 공명법)을 사용하여 항체의 친화도를 측정하고, 아미노 커플링 방법을 통해 CM5칩에 실시예 1에서 제조한 CD7-His 단백질을 고정화한 후, 항체(dVHH-D, dVHH-E, VHH10, VHH12)를 분석물로 사용하여 실험을 수행함으로써 각 항체와 CD7 항원 사이의 친화도를 검출하였다.

[0380] 2. 실험 결과

[0381] 결과는 dVHH-D와 CD7-His 단백질 사이의 친화도 상수는 3.35E-09 M이고, dVHH-E와 CD7-His 단백질 사이의 친화도 상수는 4.51E-09 M이며, VHH10과 CD7-His 단백질 사이의 친화도 상수는 9.99E-08 M이고, VHH12와 CD7-His 단백질 사이의 친화도 상수는 1.34E-09 M(표 2 참조)임을 보여주는데, 상기 결과는 dVHH-D, dVHH-E, VHH10, VHH12 모두 CD7 항원에 특이적으로 결합할 수 있고, 강한 친화도를 가질 수 있음을 추가로 나타낸다.

**표 2**

표 2. SPR 방법에 의한 항체 친화도 측정 결과 통계

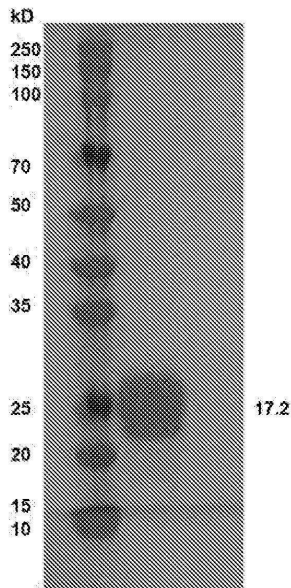
리간드	분석물	결합 속도 상수 Ka(1/Ms)	해리 속도 값 kd(1/s)	친화도 KD(M)	Chi <sup>2</sup> (RU <sup>2</sup> )	U-value
CD7-His 단백질	dVHH-D	2.25E+05	7.54E-04	3.35E-09	0.0644	2
	dVHH-E	1.23E+05	5.57E-04	4.51E-09	0.0747	2
	VHH10	1.64E+05	0.01643	9.99E-08	0.5200	12
	VHH12	7.42E+04	9.95E-05	1.34E-09	0.0480	15

[0382]

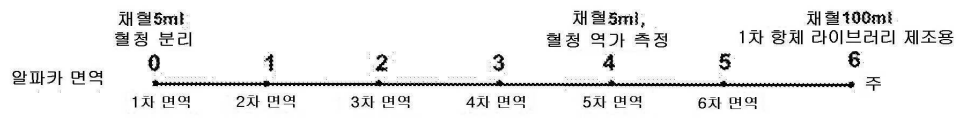
[0383] 상기 실시예에 대한 설명은 본 발명의 방법 및 그 핵심 사상을 이해하기 위한 것일 뿐이고, 본 발명에 대한 여러 개선 및 변형이 이루어질 수도 있으며, 이러한 개선 및 변형 역시 본 발명의 특허 청구 범위 내에 속할 것이다.

도면

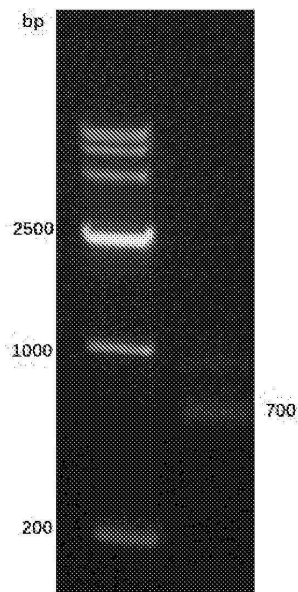
도면1



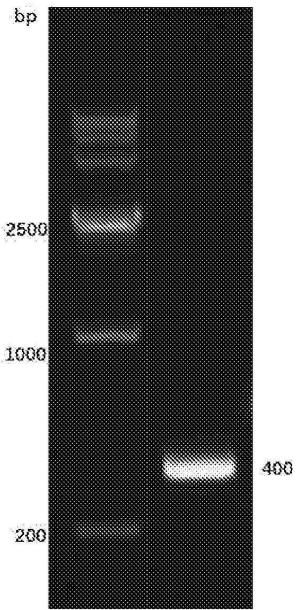
도면2



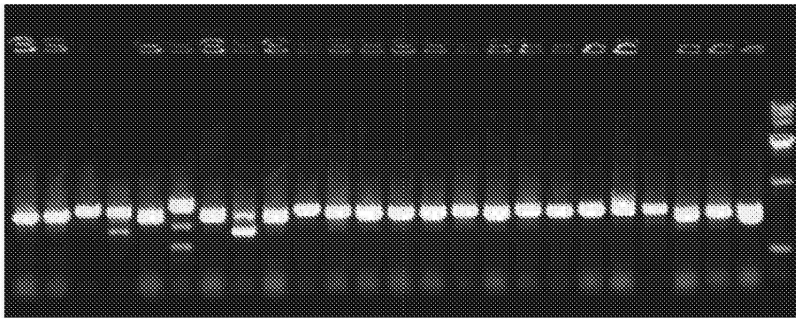
도면3



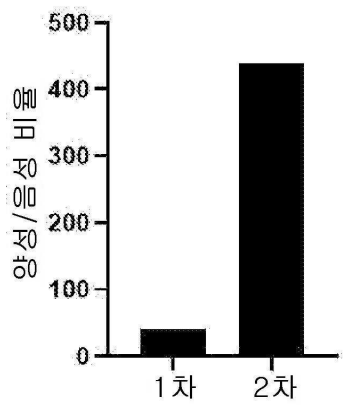
도면4



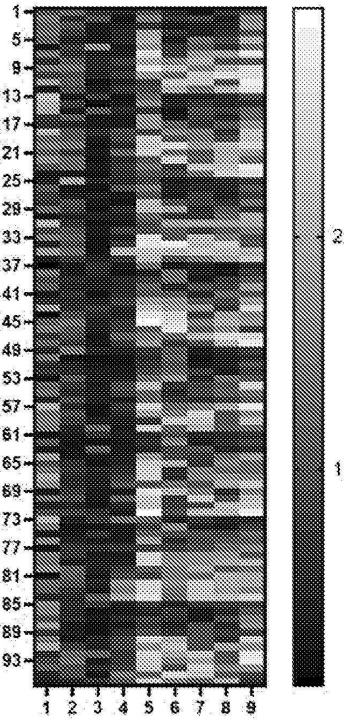
도면5



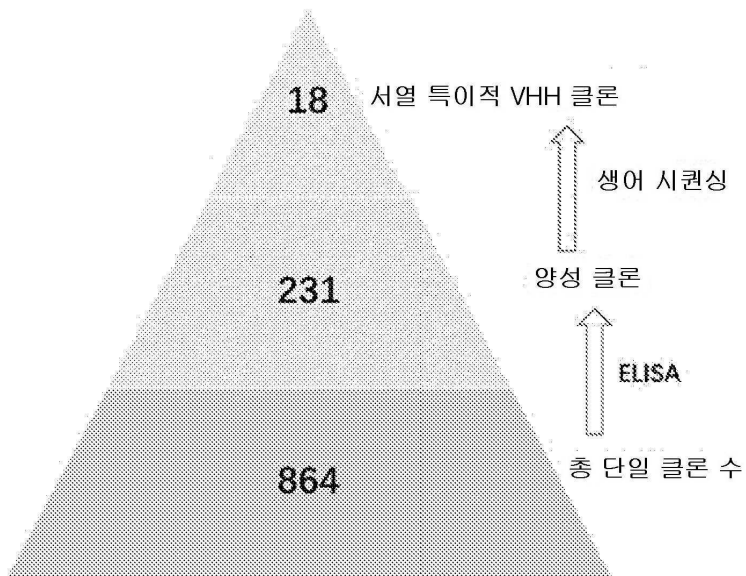
도면6



도면7



도면8



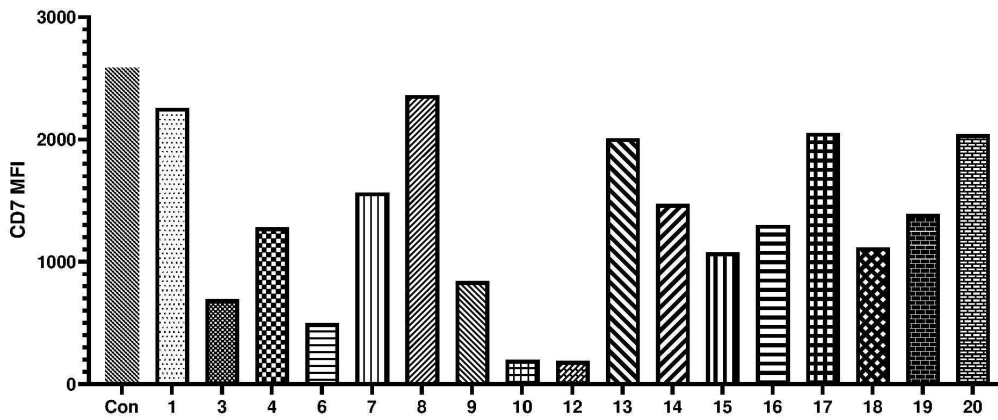
도면9

나노바디 시리즈

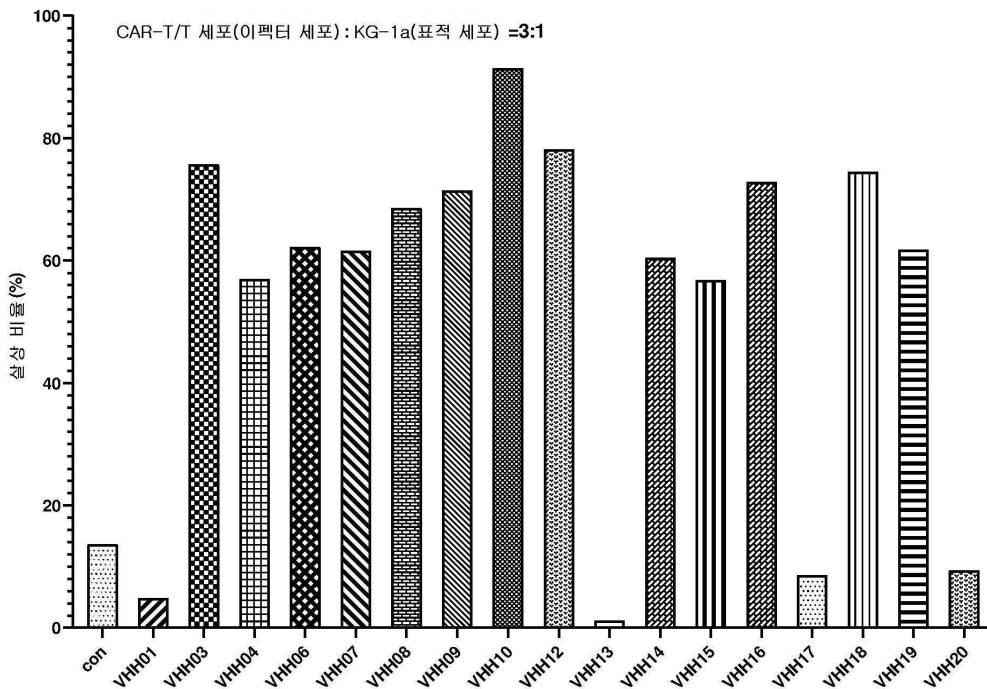
EF1 $\alpha$	Leader	VHH	CD8 H+TM	4-1BB	CD3Z	T2A	tEGFR
--------------	--------	-----	----------	-------	------	-----	-------



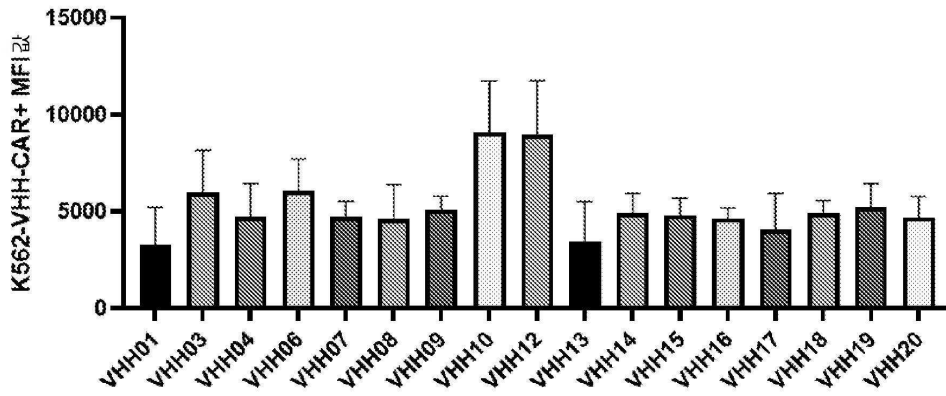
도면13



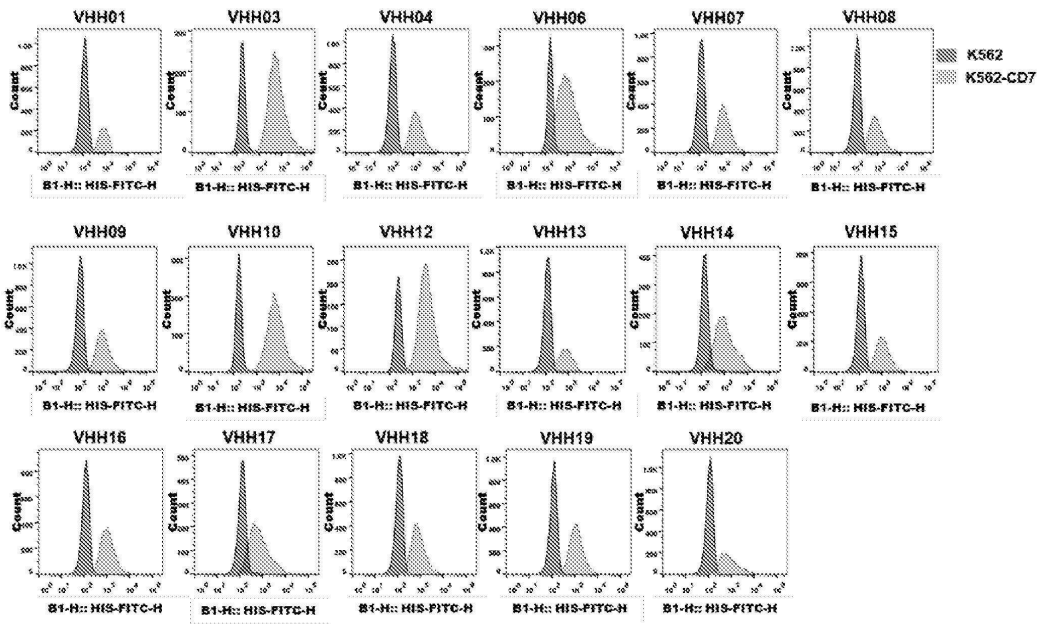
도면14



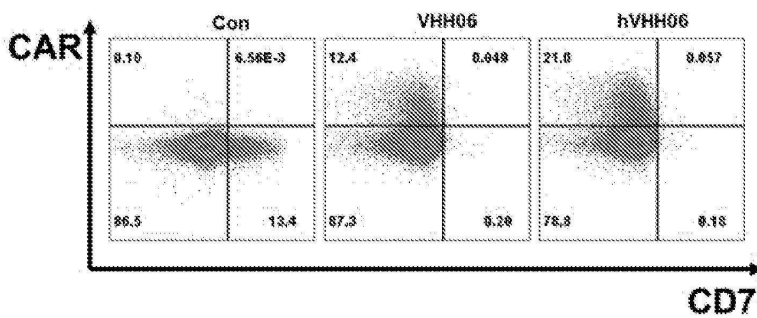
도면15



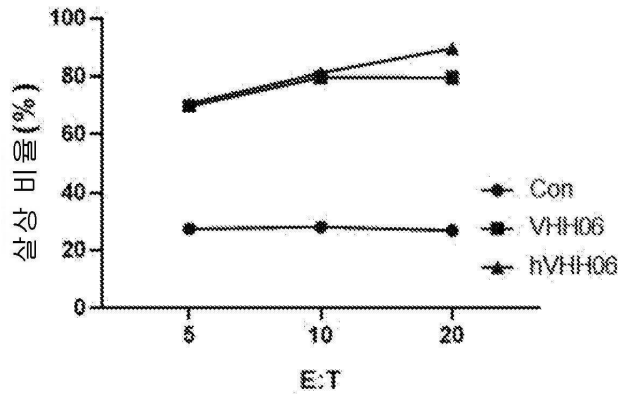
도면16



도면17



도면18



도면19

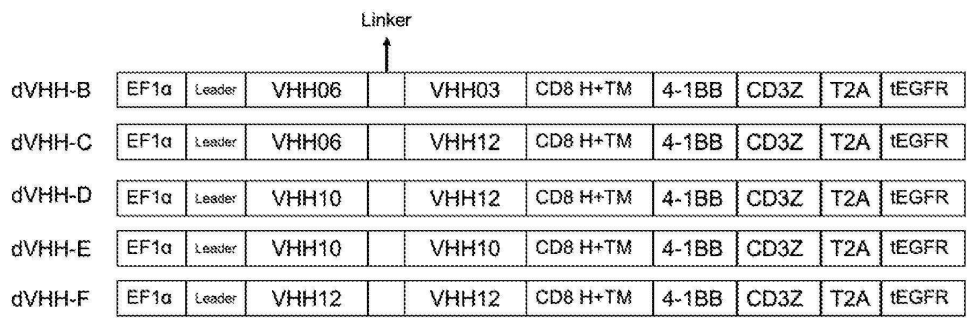
```

DP-47.seq      EVQLLESGG GLVQPGGSLR LSCAASGFTF SSYAMSWVRQ APGKGLEWVS
VHH06.seq      QVQLQES--GG GLVQAGGSLR LSCAASGRTF SSYNGSWFRQ APGAERE FVA
hVHH06.seq     QVQLQES--GG GLVQPGGSLR LSCAASGRTF SSYNGSWFRQ APQQGLEAVA

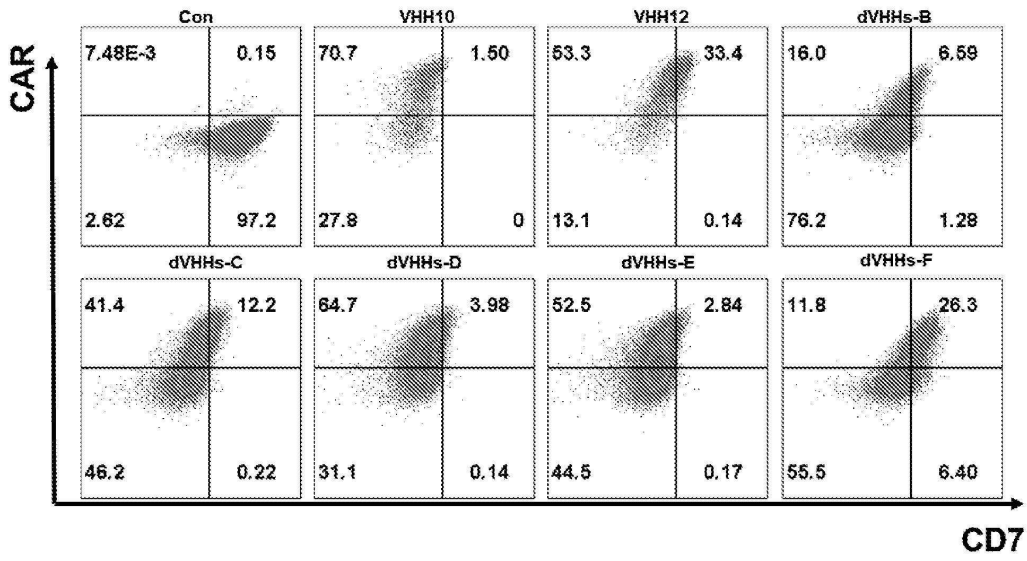
DP-47.seq      AISGSGGSTY YADSVKGRFT ISRDNSKNTL YLQMNSLRAE DTAVYYCAKS
VHH06.seq      AISRGGGSTY YADSVKGRFT ISRDNAKNTV YLQMNSLRPE DTAVYYCADS
hVHH06.seq     AISRGGGSTY YADSVKGRFT ISRDNSKNTL YLQMNSLRAE DTAVYYCADS

DP-47.seq      -----YG AFDYWGQGTL VTVSS
VHH06.seq      GARAYSGSYL DFGSWGQGTQ VTVSS
hVHH06.seq     GARAYSGSYL DFGSWGQGTQ VTVSS
    
```

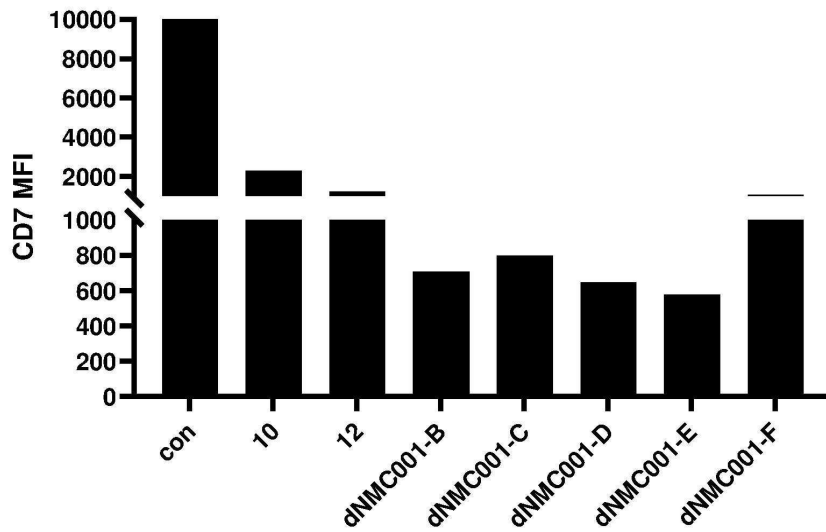
도면20



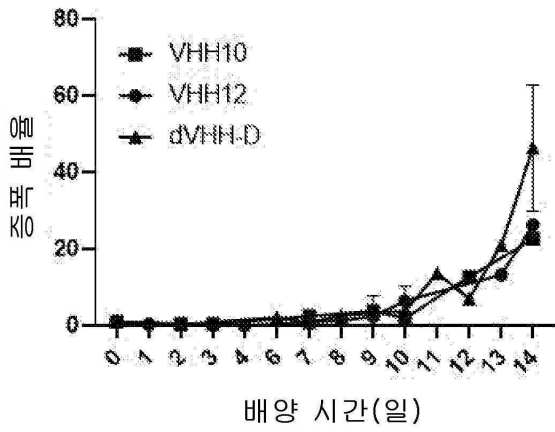
도면21



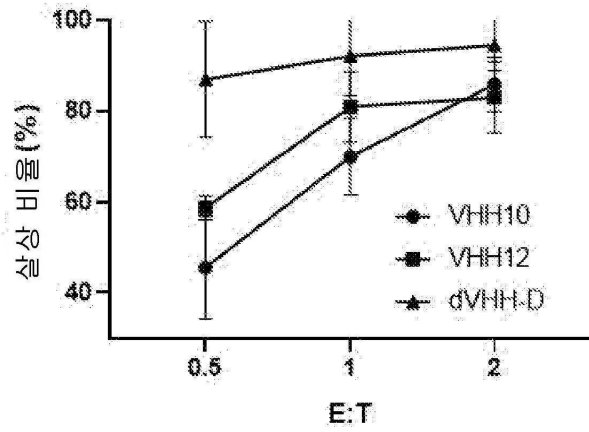
도면22



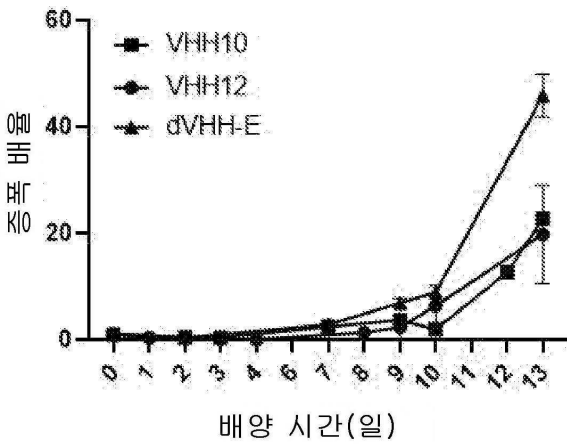
도면23



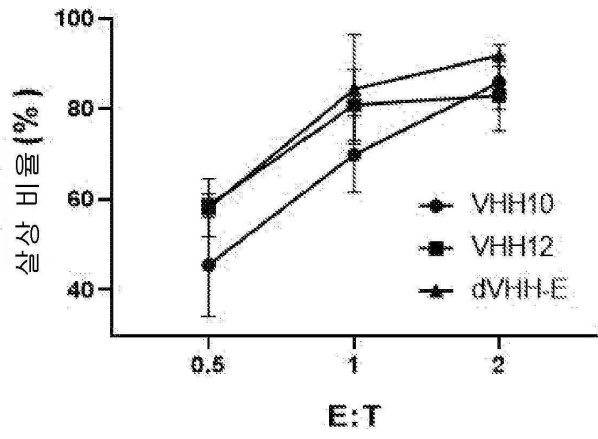
도면24



도면25



도면26



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.