



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0007675
(43) 공개일자 2022년01월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/705 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61P 21/04 (2006.01) C07K 14/725 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/70571 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7040645
(22) 출원일자(국제) 2020년05월12일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년12월10일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/032486
(87) 국제공개번호 WO 2020/231999
국제공개일자 2020년11월19일
(30) 우선권주장
62/847,121 2019년05월13일 미국(US)

(71) 출원인
더 트러스티스 오브 더 유니버시티 오브 펜실바니아
미국, 19104 펜실바니아주, 필라델피아, 9층, 씨
빅 센터 블러바드 3600
(72) 발명자
페인 에이미 에스.
미국, 펜실베니아 19066, 메리온 스테이션, 536
해밀턴 로드
오 상욱
미국, 펜실베니아 19003, 아드모어, 아파트먼트
106, 20 더블유. 몽고메리 애비뉴
(74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 62 항

(54) 발명의 명칭 아세틸콜린 수용체 키메라 자가항체 수용체 세포의 조성물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 항-아세틸콜린 수용체(AChR) B 세포 수용체(BCR)에 대해 특이적인 키메라 자가항체 수용체(CAAR), CAAR을 포함하는 조성물, CAAR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, CAAR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터, 및 재조합 세포, 예컨대, CAAR을 포함하는 T 세포를 포함한다.

(52) CPC특허분류

A61P 21/04 (2018.01)

C07K 14/7051 (2013.01)

C07K 14/70517 (2013.01)

C07K 14/70578 (2013.01)

C07K 2319/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

키메라 자가항체 수용체(chimeric autoantibody receptor)(CAAR)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드로서, 여기서 CAAR이 아세틸콜린 수용체(AChR) 자가항원 또는 이의 단편, 및 임의로, 막관통 도메인(transmembrane domain), 공자극성 분자(costimulatory molecule)의 세포내 도메인(intracellular domain), 및/또는 신호전달 도메인(signaling domain)을 포함하는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 2

제1항에 있어서, AChR 자가항원 또는 이의 단편이 AChR의 알파 소단위(alpha subunit)로부터 유래되는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 3

제1항에 있어서, AChR 자가항원 또는 이의 단편이 서열 번호: 3, 5, 7, 22, 23, 29, 33, 및 42로 이루어진 그룹으로부터 선택된 핵산 서열을 포함하는 핵산 서열에 의해 암호화(encoding)되는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 4

제1항에 있어서, AChR 자가항원 또는 이의 단편이 서열 번호: 3, 5, 7, 22, 23, 29, 33, 및 42로 이루어진 그룹으로부터 선택된 핵산 서열에 대해 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성(sequence identity)을 갖는 핵산 서열을 포함하는 핵산 서열에 의해 암호화되는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 5

제1항에 있어서, AChR 자가항원 또는 이의 단편이 서열 번호: 13, 15, 17, 26, 27, 31, 35 및 44로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 6

제1항에 있어서, AChR 자가항원 또는 이의 단편이 서열 번호: 13, 15, 17, 26, 27, 31, 35 및 44로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열에 대해 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 CD8 알파 막관통 도메인을 포함하는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 8

제7항에 있어서, CD8 알파 막관통 도메인이 서열 번호: 9를 포함하는 핵산 서열에 의해 암호화되는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 9

제7항에 있어서, CD8 알파 막관통 도메인이 서열 번호: 19의 아미노산 서열 19를 포함하는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 공자극성 분자의 세포내 도메인이 4-1BB 세포내 도메인을 포함하는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 11

제10항에 있어서, 4-1BB 세포내 도메인이 서열 번호: 10 또는 16을 포함하는 핵산 서열에 의해 암호화되는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 12

제10항에 있어서, 4-1BB 세포내 도메인이 서열 번호: 20의 아미노산 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 신호전달 도메인이 CD3 제타(zeta) 신호전달 도메인을 포함하는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 14

제13항에 있어서, CD3 제타 신호전달 도메인이 서열 번호: 24 또는 서열 번호: 53을 포함하는 핵산 서열에 의해 암호화되는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 15

제13항에 있어서, CD3 제타 신호전달 도메인이 서열 번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, CAAR이 서열 번호: 1, 6, 21, 28, 32, 36, 41, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 및 52로 이루어진 그룹으로부터 선택된 핵산 서열을 포함하는 핵산 서열에 의해 암호화되는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 17

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, CAAR이 서열 번호: 11, 25, 30, 34, 39, 43 및 46으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, CAAR이 힌지(hinge)를 추가로 포함하는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 19

제18항에 있어서, 힌지가 서열 번호: 8을 포함하는 핵산 서열에 의해 암호화되는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 20

제18항에 있어서, 힌지가 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 21

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, CAAR이 아세틸콜린 수용체(AChR) 자가항원 또는 이의 단편, 킬러 면역글로불린-유사 수용체(killer immunoglobulin-like receptor)(KIR) 막관통 도메인 및 KIR 세포질성 도메인을 포함하는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 22

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터(vector).

청구항 23

제22항에 있어서, 벡터가 렌티바이러스 벡터인 벡터.

청구항 24

제23항에 있어서, 벡터가 RNA 벡터인 벡터.

청구항 25

제22항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터가 CAAR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 작동적으로 연결된 유도성 프로모터(inducible promoter)를 포함하는 벡터.

청구항 26

아세틸콜린 수용체(AChR) 자가항원 또는 이의 단편을 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 키메라 자가항체 수용체(CAAR).

청구항 27

아세틸콜린 수용체(AChR) 자가항원 또는 이의 단편, 및 임의로, 막관통 도메인, 공자극성 분자의 세포내 도메인, 및/또는 신호전달 도메인을 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 키메라 자가항체 수용체(CAAR).

청구항 28

제26항 또는 제27항에 있어서, AChR 자가항원 또는 이의 단편이 AChR의 알파 소단위(subunit)로부터 유래되는, CAAR.

청구항 29

제26항 또는 제27항에 있어서, AChR 자가항원 또는 이의 단편이 서열 번호: 3, 5, 7, 22, 23, 29, 33 및 42로 이루어진 그룹으로부터 선택된 핵산 서열에 의해 암호화되는, CAAR.

청구항 30

제26항 또는 제27항에 있어서, AChR 자가항원 또는 이의 단편이 서열 번호: 3, 5, 7, 22, 23, 29, 33 및 42로 이루어진 그룹으로부터 선택된 핵산 서열에 대해 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 암호화되는, CAAR.

청구항 31

제26항 또는 제27항에 있어서, AChR 자가항원 또는 이의 단편이 서열 번호: 13, 15, 17, 26, 27, 31, 35 및 44로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, CAAR.

청구항 32

제26항 또는 제27항에 있어서, AChR 자가항원 또는 이의 단편이 서열 번호: 13, 15, 17, 26, 27, 31, 35 및 44로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열에 대해 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, CAAR.

청구항 33

제27항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 CD8 알파 막관통 도메인을 포함하는, CAAR.

청구항 34

제33항에 있어서, CD8 알파 막관통 도메인이 서열 번호: 9를 포함하는 핵산 서열에 의해 암호화되는, CAAR.

청구항 35

제33항에 있어서, CD8 알파 막관통 도메인이 서열 번호: 19의 아미노산 서열을 포함하는, CAAR.

청구항 36

제27항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 공자극성 분자의 세포내 도메인이 4-1BB 세포내 도메인을 포함하는, CAAR.

청구항 37

제36항에 있어서, 4-1BB 세포내 도메인이 서열 번호: 10 또는 16을 포함하는 핵산 서열에 의해 암호화되는, CAAR.

청구항 38

제36항에 있어서, 4-1BB 세포내 도메인이 서열 번호: 20의 아미노산 서열을 포함하는, CAAR.

청구항 39

제27항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 신호전달 도메인이 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는, CAAR.

청구항 40

제39항에 있어서, CD3 제타 신호전달 도메인이 서열 번호: 24 또는 서열 번호: 53을 포함하는 핵산 서열에 의해 암호화되는, CAAR.

청구항 41

제39항에 있어서, CD3 제타 신호전달 도메인이 서열 번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는, CAAR.

청구항 42

제26항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, CAAR이 서열 번호: 1, 6, 21, 28, 32, 36, 41, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 및 52로 이루어진 그룹으로부터 선택된 핵산 서열에 의해 암호화되는, CAAR.

청구항 43

제26항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, CAAR이 서열 번호: 11, 25, 30, 34, 39, 43 및 46으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, CAAR.

청구항 44

제26항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, CAAR이 아세틸콜린 수용체 (AChR) 자가항원 또는 이의 단편, 킬러 면역글로불린-유사 수용체(KIR) 막관통 도메인 및 KIR 세포질성 도메인을 포함하는 세포의 도메인을 포함하는, CAAR.

청구항 45

제26항 내지 제44항 중 어느 한 항에 따른 CAAR을 포함하는 유전적으로 변형된 세포.

청구항 46

제45항에 있어서, 세포가 CAAR을 발현하고 B 세포에서 자가항체-기반 BCR에 대해 높은 친화성을 갖는 세포.

청구항 47

제45항 또는 제46항에 있어서, 세포가 CAAR을 발현하고 자가항체를 발현하는 B 세포 또는 항체-분비 세포로 성숙할 수 있는 B 세포의 사멸을 유도하는 세포.

청구항 48

제45항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 CAAR을 발현하고 건강한 세포에 대해 제한된 독성을 갖는 세포.

청구항 49

제45항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 헬퍼 T 세포, 세포독성 T 세포, 기억 T 세포, 조절성 T 세포, 감마 델타 T 세포, 천연 킬러 세포, 사이토킨 유도된 킬러 세포, 이의 세포주, T 기억 줄기 세포, 다능성 줄기로부터 유래된 T 세포 및 다른 효과기 세포(effector cell)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 세포.

청구항 50

(a) 제44항에 따른 키메라 자가항체 수용체; 및 (b) DAP12를 포함하는 유전적으로 변형된 세포.

청구항 51

제45항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 유도성 프로모터에 작동적으로 연결된 CAAR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 세포.

청구항 52

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 따른 폴리뉴클레오타이드, 제26항 내지 제44항 중 어느 한 항에 따른 CAAR, 또는 제45항 내지 제51항 중 어느 한 항에 따른 세포, 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 53

대상체(subject)에서 자가항체-매개된 신경근 연결(NMJ) 질환을 치료하는 방법으로서, 이러한 방법이 대상체에게 유효량의, 키메라 자가항체 수용체(CAAR)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(여기서, 폴리뉴클레오타이드는 AChR 자가항원 또는 이의 단편을 포함하는 세포의 도메인, 및 임의로, 막관통 도메인, 공자극성 분자의 세포내 도메인, 및/또는 신호전달 도메인을 암호화한다)를 포함하는 유전적으로 변형된 세포를 투여함으로써, 대상체에서 자가항체-매개된 NMJ 질환을 치료하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 54

자가항체-매개된 NMJ 질환의 위험이 있거나 이를 앓고 있는 대상체에서 신경근 연결(NMJ) 손상을 방지 또는 감소시키는 방법으로서, 이러한 방법이 대상체에게 유효량의, 키메라 자가항체 수용체(CAAR)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(여기서, 폴리뉴클레오타이드는 AChR 자가항원 또는 이의 단편을 포함하는 세포의 도메인, 및 임의로, 막관통 도메인, 공자극성 분자의 세포내 도메인, 및/또는 신호전달 도메인을 포함하는 세포의 도메인을 암호화한다)를 포함하는 유전적으로 변형된 세포를 투여함으로써, 대상체에서 NMJ 손상을 방지 또는 감소시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 55

대상체에서 자가항체-매개된 신경근 연결(NMJ) 질환을 치료하는 방법으로서, 이러한 방법이 대상체에게 유효량의, (a) 키메라 자가항체 수용체(CAAR)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(여기서, 폴리뉴클레오타이드는 AChR 자가항원 또는 이의 단편을 포함하는 세포의 도메인, 킬러 면역글로불린-유사 수용체(KIR) 막관통 도메인 및 KIR 세포질성 도메인을 암호화한다); 및 (b) DAP12를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 유전적으로 변형된 세포를 투여함으로써, 대상체에서 자가항체-매개된 NMJ 질환을 치료하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 56

자가항체-매개된 NMJ 질환의 위험이 있거나 이를 앓고 있는 대상체에서 신경근 연결(NMJ) 손상을 방지 또는 감소시키는 방법으로서, 이러한 방법이 대상체에게 유효량의, (a) 키메라 자가항체 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(CAAR)(여기서, 폴리뉴클레오타이드는 AChR 자가항원 또는 이의 단편을 포함하는 세포의 도메인, 킬러 면역글로불린-유사 수용체(KIR) 막관통 도메인 및 KIR 세포질성 도메인을 암호화한다); 및 (b) DAP12를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 유전적으로 변형된 세포를 투여함으로써, 대상체에서 자가항체-매개된

NMJ 질환을 치료하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 57

제53항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리뉴클레오타이드가 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 폴리뉴클레오타이드인, 방법.

청구항 58

제53항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, CAAR이 제25항 내지 제42항 중 어느 한 항의 CAAR인, 방법.

청구항 59

제53항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 자가항체-매개된 NMJ 질환이 중증 근무력증(myasthenia gravis; MG)인, 방법.

청구항 60

제53항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 사람인, 방법.

청구항 61

제53항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 유전적으로 변형된 세포가 T 세포인, 방법.

청구항 62

제53항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 세포가 B 세포를 표적화하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 전후 참고

[0002] 본 출원은 2019년 5월 13일자로 출원된 미국 가특허원 제62/847,121호에 대한 35 U.S.C. § 119(e) 하에서의 우선권을 주장하며, 이의 전문은 본원에 참고로 포함된다.

배경 기술

[0003] 발명의 배경

[0004] 중증 근무력증(Myasthenia gravis)(MG)은 사람에게서 가장 일반적인 자가항체-매개된 질환 중 하나이며, 매년 3,000명의 신규 환자가 발생하고 미국에서 유병률은 총 25,000 내지 50,000명의 환자이고; 거의 1백만명의 환자가 미국, 유럽, 및 아시아에서 중증 근무력증을 가진 것으로 추정된다. 신경근 연결(neuromuscular junction)(NMJ)에서 발현된 단백질의 항체 공격은 근육 약화를 초래하고, 눈 처짐 (neuromuscular junction)(NMJ), 복사(double vision), 불안정한 걸음걸이(unstable gait), 불분명한 발음(slurred speech), 및 연하 및 호흡 곤란증으로 나타난다. MG 환자에 의해 생산된 자가항체(autoantibody)는 보체(complement)를 고정시키거나 아세틸콜린 수용체(AChR) 군집을 숨겨서 NMJ를 파괴시킨다. AChR을 통한 신호 변환(signal transduction)에 필수적인, AChR 군집의 형성은 막관통 단백질(transmembrane protein)인, 근육-특이적인 키나제(muscle-specific kinase)(MuSK)의 활성화에 의존한다. 대부분의 MG 환자는 항-AChR 항체(85%) 또는 항-MuSK 항체(4%)를 나타낸다. 환자의 11%는 "혈청음성(seronegative)"으로 분류되며, 이는 AChR, MuSK, 또는 다른 NMJ 단백질, 예를 들면, LRP4에 대해 낮은 역가(titer) 항체에 기여한다. 호흡을 제어하는 근육의 생명을 위협하는 근육 약화로 인해 인공 호흡기(mechanical ventilation)가 요구되는 것으로 정의된, 근무력증 위기(Myasthenic crisis)는 MG 환자의 10 내지 20%에서 발생하며; 근무력증 위기로부터의 전반적인 사망률은 4.5%이다.

[0005] 현재, 경증의 MG는 아세틸콜린 붕괴(breakdown)를 억제하는 아세틸콜린에스테라제 억제제로 치료한다. 중간 내지 중증 MG는 프레드니손, 항-증식제, 예를 들면, 마이코페놀레이트 또는 아자티오프린, 상보체 억제제, 및 보다 진전된 질환에서는 면역 억제 및 다른 부작용으로 인한 감염과 관련된 수 있는 전략인, 리툭시맙으로 치료한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 당해 분야에서는 중증 근무력증에 대한 보다 특이적이고 효과적인 치료를 달성하기 위한 긴급한 요구가 존재한다. 본 발명은 이러한 요구에 초점을 맞추고 있다.

과제의 해결 수단

[0007] **발명의 요약**

[0008] 키메라 자가항체 수용체(chimeric autoantibody receptor)(CAAR)를 암호화(encoding)하는 폴리뉴클레오타이드가 제공되며, 여기서 CAAR은 아세틸콜린수용체(AChR) 자가항체 또는 이의 단편(fragment)을 포함하는 세포외 도메인(extracellular domain), 및 임의로, 막관통 도메인(transmembrane domain), 공자극성 분자의 세포내 도메인, 및/또는 신호전달 도메인(signaling domain)을 포함한다. 일부 구현예에서, AChR 자가항원(autoantigen) 또는 이의 단편은 AChR의 알파 소단위(subunit)로부터 유래된 것이다. 일부 구현예에서, AChR 자가항원 또는 이의 단편은 서열 번호: 3, 5, 7, 22, 23, 29, 33, 및 42로 이루어진 그룹으로부터 선택된 핵산 서열을 포함하는 핵산 서열에 의해 암호화된다. 일부 다른 구현예에서, AChR 자가항원 또는 이의 단편은 서열 번호: 3, 5, 7, 22, 23, 29, 33, 및 42로 이루어진 그룹으로부터 선택된 핵산 서열에 대해 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성(sequence identity)을 갖는 핵산 서열을 포함하는 핵산 서열에 의해 암호화(encoding)된다. 일부 구현예에서, AChR 자가항원 또는 이의 단편은 서열 번호: 13, 15, 17, 26, 27, 31, 35 및 44로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 여전히 다른 구현예에서, AChR 자가항원 또는 이의 단편은 서열 번호: 13, 15, 17, 26, 27, 31, 35 및 44로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열에 대해 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0009] 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 CD8 알파 막관통 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CD8 알파 막관통 도메인은 서열 번호: 9를 포함하는 핵산 서열에 의해 암호화된다. 일부 다른 구현예에서, CD8 알파 막관통 도메인은 서열 번호: 19의 아미노산 서열을 포함한다.

[0010] 일부 구현예에서, 공자극성 분자의 세포내 도메인은 4-1BB 세포내 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 4-1BB 세포내 도메인은 서열 번호: 10 또는 16을 포함하는 핵산 서열에 의해 암호화된다. 일부 구현예에서, 4-1BB 세포내 도메인은 서열 번호: 20의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 다른 구현예에서, 신호전달 도메인은 CD3 제타(zeta) 신호전달 도메인(signaling domain)을 포함한다. 일부 구현예에서, CD3 제타 신호전달 도메인은 서열 번호: 24 또는 서열 번호: 53을 포함하는 핵산 서열에 의해 암호화된다. 여전히 다른 구현예에서, CD3 제타 신호전달 도메인은 서열 번호: 38의 아미노산 서열을 포함한다.

[0011] 일부 구현예에서, CAAR은 서열 번호: 1, 6, 21, 28, 32, 36, 41, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 및 52로 이루어진 그룹으로부터 선택된 핵산 서열을 포함하는 핵산 서열에 의해 암호화된다. 일부 다른 구현예에서, CAAR은 서열 번호: 11, 25, 30, 34, 39, 43 및 46으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, CAAR은 힌지(hinge)를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 힌지는 서열 번호: 8을 포함하는 핵산 서열에 의해 암호화된다. 여전히 다른 구현예에서, 힌지는 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함한다.

[0012] 일부 구현예에서, CAAR은 아세틸콜린 수용체(AChR) 자가항원 또는 이의 단편, 킬러 면역글로불린-유사 수용체(killer immunoglobulin-like receptor)(KIR) 막관통 도메인 및 KIR 세포질성 도메인을 포함한다.

[0013] 앞서의 구현예 중 어느 하나의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터(vector)가 제공된다. 일부 구현예에서, 벡터는 렌티바이러스 벡터이다. 일부 다른 구현예에서, 벡터는 RNA 벡터이다. 일부 구현예에서, 벡터는 CAAR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 작동적으로 연결된 유도성 프로모터(inducible promoter)를 포함한다.

[0014] 아세틸콜린 수용체(AChR) 자가항원 또는 이의 단편, 및 임의로, 막관통 도메인, 공자극성 분자의 세포내 도메인, 및/또는 신호전달 도메인을 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 키메라 자가항체 수용체(CAAR)가 제공

된다. 일부 구현예에서, AChR 자가항원 또는 이의 단편은 AChR의 알파 소단위로부터 유래된 것이다. 일부 다른 구현예에서, AChR 자가항원 또는 이의 단편은 서열 번호: 3, 5, 7, 22, 23, 29, 33 및 42로 이루어진 그룹으로부터 선택된 핵산 서열에 의해 암호화된다. 여전히 다른 구현예에서, AChR 자가항원 또는 이의 단편은 서열 번호: 3, 5, 7, 22, 23, 29, 33 및 42로 이루어진 그룹으로부터 선택된 핵산 서열에 대해 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 암호화된다. 일부 구현예에서, AChR 자가항원 또는 이의 단편은 서열 번호: 13, 15, 17, 26, 27, 31, 35 및 44로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, AChR 자가항원 또는 이의 단편은 서열 번호: 13, 15, 17, 26, 27, 31, 35 및 44로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열에 대해 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0015] 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 CD8 알파 막관통 도메인을 포함한다. 일부 다른 구현예에서, CD8 알파 막관통 도메인은 서열 번호: 9를 포함하는 핵산 서열에 의해 암호화된다. 일부 구현예에서, CD8 알파 막관통 도메인은 서열 번호: 19의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 공자극성 분자의 세포내 도메인은 4-1BB 세포내 도메인을 포함한다. 일부 다른 구현예에서, 4-1BB 세포내 도메인은 서열 번호: 10 또는 16을 포함하는 핵산 서열에 의해 암호화된다. 여전히 다른 구현예에서, 4-1BB 세포내 도메인은 서열 번호: 20의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 신호전달 도메인은 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CD3 제타 신호전달 도메인은 서열 번호: 24 또는 서열 번호: 53을 포함하는 핵산 서열에 의해 암호화된다. 일부 다른 구현예에서, CD3 제타 신호전달 도메인은 서열 번호: 38의 아미노산 서열을 포함한다.

[0016] 일부 구현예에서, CAAR은 서열 번호: 1, 6, 21, 28, 32, 36, 41, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 및 52로 이루어진 그룹으로부터 선택된 핵산 서열에 의해 암호화된다. 여전히 다른 구현예에서, CAAR은 서열 번호: 11, 25, 30, 34, 39, 43 및 46으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, CAAR은 아세틸콜린 수용체(AChR) 자가항원 또는 이의 단편, 킬러 면역글로불린-유사 수용체(KIR) 막관통 도메인 및 KIR 세포질성 도메인을 포함하는 세포의 도메인을 포함한다.

[0017] 선행 구현예 중 어느 하나의 CAAR을 포함하는 유전적으로 변형된 세포가 제공된다. 일부 구현예에서, 세포는 CAAR을 발현하고 B 세포에서 자가항체-기반 BCR에 대해 높은 친화성(affinity)을 갖는다. 일부 다른 구현예에서, 세포는 CAAR을 발현하고 자가항체를 발현하는 B 세포 또는 항체-분비 세포로 성숙할 수 있는 B 세포의 사멸을 유도한다. 일부 구현예에서, 세포는 CAAR을 발현하고 건강한 세포에 대해 제한된 독성을 갖는다. 일부 구현예에서, 세포는 헬퍼 T 세포, 세포독성 T 세포, 기억 T 세포, 조절성 T 세포, 감마 델타 T 세포, 천연 킬러 세포, 사이토킨 유도된 킬러 세포, 이의 세포주, T 기억 줄기 세포, 다능성 줄기로부터 유래된 T 세포 및 다른 효과기 세포(effector cell)로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0018] (a) 선행 구현예 중 어느 하나의 키메라 자가항체 수용체; 및 (b) DAP12를 포함하는 유전적으로 변형된 세포가 제공된다. 일부 구현예에서, 세포는 유도성 프로모터에 작동적으로 연결된 CAAR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

[0019] 선행 구현예 중 어느 하나의 폴리뉴클레오타이드 선행 구현예 중 어느 하나의 CAAR, 또는 선행 구현예 중 어느 하나의 세포, 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.

[0020] 대상체(subject)에서 자가항체-매개된 신경근 연결(NMJ) 질환을 치료하는 방법이 제공되며, 이러한 방법은 대상체에게 유효량의, 키메라 자가항체 수용체(CAAR)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(여기서, 폴리뉴클레오타이드는 AChR 자가항원 또는 이의 단편을 포함하는 세포의 도메인, 및 임의로, 막관통 도메인, 공자극성 분자의 세포내 도메인, 및/또는 신호전달 도메인을 암호화한다)를 포함하는 유전적으로 변형된 세포를 투여함으로써, 대상체에서 자가항체-매개된 NMJ 질환을 치료하는 단계를 포함한다.

[0021] 자가항체-매개된 NMJ 질환의 위험이 있거나 이를 앓고 있는 대상체에서 신경근 연결(NMJ) 손상을 방지 또는 감소시키는 방법이 제공되며, 이러한 방법은 대상체에게 유효량의, 키메라 자가항체 수용체(CAAR)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(여기서, 폴리뉴클레오타이드는 AChR 자가항원 또는 이의 단편을 포함하는 세포의 도메인, 및 임의로, 막관통 도메인, 공자극성 분자의 세포내 도메인, 및/또는 신호전달 도메인을 포함하는 세포의 도메

인을 암호화한다)를 포함하는 유전적으로 변형된 세포를 투여함으로써, 대상체에서 NMJ 손상을 방지 또는 감소시키는 단계를 포함한다.

[0022] 대상체에서 자가항체-매개된 신경근 연결(NMJ) 질환을 치료하는 방법이 제공되며, 이러한 방법은 대상체에게 유효량의, (a) 키메라 자가항체 수용체(CAAR)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(여기서, 폴리뉴클레오타이드는 AChR 자가항원 또는 이의 단편을 포함하는 세포의 도메인, 킬러 면역글로불린-유사 수용체(KIR) 막관통 도메인 및 KIR 세포질성 도메인을 암호화한다); 및 (b) DAP12를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 유전적으로 변형된 세포를 투여함으로써, 대상체에서 자가항체-매개된 NMJ 질환을 치료하는 단계를 포함한다.

[0023] 자가항체-매개된 신경근 연결(NMJ) 질환의 위험이 있거나 이를 앓고 있는 대상체에서 신경근 연결(NMJ) 손상을 방지 또는 감소시키는 방법이 제공되며, 이러한 방법은 대상체에게 유효량의, (a) 키메라 자가항체 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(CAAR)(여기서, 폴리뉴클레오타이드는 AChR 자가항원 또는 이의 단편을 포함하는 세포의 도메인, 킬러 면역글로불린-유사 수용체(KIR) 막관통 도메인 및 KIR 세포질성 도메인을 암호화한다); 및 (b) DAP12를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 유전적으로 변형된 세포를 투여함으로써, 대상체에서 자가항체-매개된 NMJ 질환을 치료하는 단계를 포함한다.

[0024] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 선행 구현예 중 어느 하나의 폴리뉴클레오타이드이다. 일부 구현예에서, CAAR은 선행 구현예 중 어느 하나의 CAAR이다. 일부 구현예에서, 자가항체-매개된 NMJ 질환은 중증 근무력증(MG)이다. 일부 다른 구현예에서, 대상체는 사람이다. 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 세포는 T 세포이다. 일부 구현예에서, 변형된 세포는 B 세포를 표적화한다.

도면의 간단한 설명

[0025] 본 발명의 바람직한 구현예의 다음의 상세한 설명은 첨부된 도면과 함께 읽는 경우 보다 잘 이해될 것이다. 본 발명을 설명할 목적으로, 현재 바람직한 도면 구현예가 나타나 있다. 그러나, 본 발명은 도면에 나타난 구현예의 정밀한 재배열 및 방편에 한정되지 않는다.

도 1은 α 39P 및 α 65P AChR CAAR을 포함하는 개략적인 도해(diagram)이고, 이의 세포의 도메인(ECD)은 AChR의 알파 소단위의 주요 면역원성 영역(MIR), MG 내 자가항체의 주요 표적에 이어 스페이스(spacer)(CD8 힌지(hinge) 도메인), CD8 막관통 도메인, 및 탄뎀(tandem) 세포질성 신호전달 도메인 4-1BB 및 CD3 ζ (BBz)의 분절 모사체(segmental mimic)를 포함한다. α 65P는 α 39P와 비교시 추가의 EC1 도메인 서열을 혼입하며; 숫자는 신호 서열 절단 후 AChR 단백질내 아미노산 위치를 지칭한다.

도 2a 및 2b는 항-AChR 알파 소단위 모노클로날 항체 210(mAb 210)로 염색함으로써 나타난 바와 같이, 저켓(Jurkat) 및 1차 사람 T 세포의 표면에서 발현됨을 나타내는 일련의 그래프이다. 저켓 세포(Jurkat cell) 및 CD3+ T 세포는 렌티바이러스를 사용하여 형질도입(transduction)되었다. 유동 세포분석법 분석(flow cytometry analysis)은 형질도입 후 3일(저켓 세포) 또는 5일(1차 사람 CD3⁺ T 세포)에서 수행하였다. NTD: 형질도입되지 않은 세포.

도 3a 및 3b는 α 39P 및 α 65P CAAR 저켓 NFAT-GFP 세포가 표면 항-AChR B 세포 수용체를 발현하고 동물 모델에서 근무력증발생성(myasthenogenic)인 항체를 분비하는 TIB-175(ATCC, mAb 35 하이브리도마 세포, <https://www.atcc.org/Products/All/TIB-175.aspx>)와 함께 공-배양 후 CAAR 신호 형질도입을 활성화시킴을 나타낸다. "TIB-175" 및 "mAb35 하이브리도마 세포"는 TIB-175 세포를 지칭하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다. NTD: 형질도입되지 않음. 유동 세포분석법 분석은 mAb 35 하이브리도마 세포와 함께 공-배양 후 12시간 췌에 수행하였다. 저켓 NFAT-GFP 세포는 TCR 신호전달이 형질도입된 경우 GFP 발현을 유도한다.

도 4는 α 39P AChR CAAR 저켓 NFAT-GFP 세포가 상이한 에피토프(epitope)를 표적화하는 항-AChR B 세포 수용체를 발현하도록 가공된(engineered) 사람 B 세포주인, Nalm6 192가 아닌, Nalm6 195와 공-배양(co-culture) 후, CAAR 신호 형질도입을 활성화시킴을 나타낸다. 유동 세포분석법 분석을 Nalm6 대조군, Nalm6 192, 또는 Nalm6 195 세포와의 공-배양 후 12시간 췌에 수행하였다. 저켓 세포를 항-CD3-AF647 항체로 염색하여 이를 Nalm6 세포 집단(population)(GFP⁺CD3⁻)으로부터 구별하였다. Nalm6 세포는 클릭 딱정벌레 녹색 루시페라제(click beetle green luciferase) 및 GFP를 구성적으로 발현한다. CD3⁺ 저켓 세포 플롯은 하부 패널에 나타난다. 저켓 NFAT-GFP 세포는 TCR 신호전달이 형질도입된 경우 GFP 발현을 유도한다.

도 5는 α 65P AChR CAAR 저켓 NFAT-GFP 세포가 Nalm6 192 또는 Nalm6 195와의 공-배양 후 CAAR 신호 형질도입

을 활성화시킴을 나타내고, 이는 α39P AChR CAAR 저켓 NFAT-GFP 세포와 비교하여 보다 광범위한 에피토프 특이성을 나타낸다. 유동 세포분석법 분석은 Nalm6 192 또는 Nalm6 195 세포와의 공-배양 후 12시간째에 수행하였다. 저켓 세포를 항-CD3-AF647 항체로 염색하고 이를 Nalm6 세포 집단으로부터 구별하였다. Nalm6 세포는 클릭 딱정벌레 녹색 루시페라제 및 GFP를 구성적으로 발현한다. CD3⁺ 저켓 세포 플롯은 하단 패널에 나타낸다. 저켓 NFAT-GFP 세포는 TCR 신호전달이 형질도입된 경우 GFP 발현을 유도한다.

도 6은 나타난 항-AChR 표적 세포: TIB-175 세포, Nalm6 192, 및 Nalm6 195 세포에 대한 α39P AChR-CAART 및 α65P AChR-CAART 세포의 시험관내(*in vitro*) 세포분해 활성을 나타낸다. 루시페라제 활성을 나타난 표적 세포와 10:1의 효과기 대 표적 세포 비에서 공-배양 후 15 내지 24시간 째에 측정하였다. mAb 35 하이브리도마 세포 및 Nalm6 세포는 클릭 딱정벌레 녹색 루시페라제를 구성적으로 발현한다. 특이적인 분해 %는 다음의 수학적식을 사용하여 계산한다: 특이적인 분해 % = [(시험 세포 사멸 - 자발적인 세포 사멸)/(최대 세포 사멸 - 자발적인 세포 사멸)] * 100, 여기서 자발적인 세포 사멸은 T 세포만이 없는 배지 속에서 세포 사멸이고, 최대 세포 사멸은 검출 전 10% SDS와 1:1에서 처리 후 세포 사멸이다. NTD: 형질도입되지 않음, 쌍을 이루지 않은 스튜던츠 t-시험(Unpaired Student t-test)으로 측정하여, * <0.05, ** <0.005, *** <0.0005.

도 7은 상이한 아미노산 길이의 AChR 세포의 도메인 EC1에 이어, CD8 힌지 또는 글리신-세린(GS) 링커(linker), CD8 막관통 도메인 (TMD), 및 탄탄 세포질성 신호전달 도메인 4-1BB 및 CD3 ζ (BBz)를 발현하는 α208, α210, 및 α211 AChR CAAR의 개략적 도해이다.

도 8은 글리신-세린(GS) 링커를 혼입하는 α208.GS.BBz CAAR이 293T 세포의 표면에서 발현되지 않지만, GS 링커를 혼입하는 α210.GS.BBz 및 α211.GS.BBz CAAR은 세포 표면에서 발현됨을 나타낸다. 293T 세포를 패키징(packaging) DNA 플라스미드가 없는 렌티바이러스 플라스미드로 일시적으로 형질감염시켰다. 형질감염 2일째에, AChR CAAR의 표면 발현을 mAb 210을 사용하여 검출하였다. 숫자는 AChR CAAR 표면 양성 293T 세포 퍼센트를 나타낸다.

도 9a 내지 9c는 αAChR CAAR 저켓 NFAT-GFP 세포가 음성 대조군으로서 항-MuSK B 세포 수용체를 발현하는, Nalm6 3-28와의 공-배양 후 CAAR 신호 형질도입을 활성화시키지 않지만, 표면 항-AChR B 세포 수용체를 발현하는, Nalm6 192, Nalm6 195(도 9a), Nalm6 637 (도 9b) 또는 mAb 35 하이브리도마(도 9c)와 공-배양 후 CAAR 신호 형질도입을 활성화시키지 않음을 나타낸다. α208.GS.BBz CAAR은 저켓 세포 표면에서 발현되지 않으므로 음성 대조군으로 공급된다. 유동 세포분석법 분석을 표적 세포와 공-배양 후 12시간째에 수행하였다. CD3⁺ 세포 상에서 게이팅(gating) 후 저켓 세포내 GFP 발현이 나타나 있다. 저켓 NFAT-GFP 세포는 TCR 신호전달이 형질도입된 경우 GFP 발현을 유도한다. 숫자는 GFP⁺ AChR CAAR 저켓 세포 퍼센트를 나타낸다.

도 10은 항-AChR 알파 소단위 모노클로날 항체 210으로 염색함으로써 나타난 바와 같이, 렌티바이러스 형질도입 후 1차 사람 T 세포의 표면에서 α208.GS.BBz, α210.GS.BBz, 및 α211.GS.BBz CAAR 발현을 나타낸다. 유동 세포분석법 분석은 형질도입 후 5일째에 수행하였다. NTD: 형질도입되지 않음.

도 11은 나타난 표적 세포: Nalm6 야생형 대조군, Nalm6 192, Nalm6 195, 및 mAb 35 하이브리도마 세포에 대한 α210.GS.BBz CAART(담회색 바아(bar)) 및 α211.GS.BBz CAART(암회색 바아) 세포의 시험관내 세포분해 활성을 나타낸다. 루시페라제 활성을 나타난 표적 세포와 30:1의 효과기 대 표적 세포 비에서 공-배양 후 21시간 째에 측정하였다. mAb 35 하이브리도마 세포 및 Nalm6 세포는 클릭 딱정벌레 녹색 루시페라제를 구성적으로 발현한다. 특이적인 분해 %는 다음의 수학적식을 사용하여 계산한다: 특이적인 분해 % = [(시험 세포 사멸 - 자발적인 세포 사멸)/(최대 세포 사멸 - 자발적인 세포 사멸)] * 100, 여기서 자발적인 세포 사멸은 T 세포만이 없는 배지 속에서의 세포 사멸이고, 최대 세포 사멸은 검출 전 10% SDS와 1:1 비에서 처리 후 세포 사멸이다. NTD: 형질도입되지 않음.

도 12는 도 11에 나타난 공-배양물의 상층액 속에서 사람 인터페론-감마(hIFNγ) 농도를 나타낸다. 막대 그래프(Nalm6 대조군 - 검정색 바아; Nalm6 192 - 배지 회색 바아; Nalm6 195 - 담회색 바아; TIB-175 - 암 회색 바아)는 중복 시험된 샘플의 평균을 나타낸다.

도 13a 및 13b는 Nalm6 대조군(도 13a) 또는 Nalm6 637(도 13b) 항-AChR 세포에 대한 α210.GS.BBz CAART 세포의 시험관내 세포분해 활성을 나타낸다. 루시페라제 활성을 나타난 효과기 대 표적(E/T) 세포 비에서 공-배양 후 24시간째에 측정하였다. Nalm6 세포는 클릭 딱정벌레 녹색 루시페라제를 구성적으로 발현한다. 특이적인 분해 [%]는 다음의 수학적식을 사용하여 계산한다: 특이적인 분해 [%] = [(시험 세포 사멸 - 자발적인 세포 사멸)/

(최대 세포 사멸 - 자발적인 세포 사멸)] * 100, 여기서 자발적인 세포 사멸은 T 세포만이 없는 배지 속에서의 세포 사멸이고, 최대 세포 사멸은 검출 전 10% SDS와 1:1 비에서 처리 후의 세포 사멸이다. NTD: 형질도입되지 않음.

도 14는 도 13에 나타난 공-배양물의 상층액 속에서의 사람 인터페론-감마(hIFN γ) 농도를 나타낸다. NTD: 형질도입되지 않음.

도 15a 및 15b는 Nalm6 192(A) 또는 Nalm6 195(B) 표적 세포에 대한 α 39P.CD8H.BBz CAART 및 α 210.GS.BBz CAART 세포의 생체 내(in vivo) 효능을 나타낸다. 0.3×10^6 Nalm6 192 또는 195 세포를 정맥 내 면역글로불린 (IVIG, Privigen)으로 2일 동안 예비-처리 후 NSG 마우스내로 주사하였다. 표적 세포 주사 후 4일째에, 3×10^6 CAART 또는 형질도입되지 않은(NTD) T 세포를 정맥 내 주사하였다. 생물발광성을 나타낸 시점에서 IVIS Lumina로 정량화하였다. 동시에, 600 mg/kg IVIG를 또한 2일마다 복강내 투여하였다. 총 플럭스(flux)를 Living Image 4.5 소프트웨어(PerkinElmer)를 사용하여 정량화하였다. 영상을 1분 간격에 걸쳐 연속적으로 취하고 최고 플럭스 값을 분석을 위해 선택하였다. 도 15a: 그룹 당 5마리의 마우스. 표적 세포: Nalm6 192. 도 15b: 그룹 당 5마리의 마우스. 표적 세포: Nalm6 195.

도 16은 Nalm6 192/195 세포(1:1 비)의 혼합물에 대한 α 210.GS.BBz CAART 및 α 211.GS.BBz CAART 세포의 생체 내 효능을 나타낸다. 총 0.3×10^6 개의 Nalm6 192/195 세포를 정맥 내 면역글로불린(IVIG, Privigen)으로 2일 동안 예비-처리 후 NSG 마우스내로 정맥 내 주사하였다. 주사 후 4일째에, 3×10^6 개의 CAART 또는 형질도입되지 않은(NTD) T 세포를 정맥 내 주사하였다. 생물발광성을 나타낸 날짜에 IVIS Lumina로 정량화하였다. 동시에, 600 mg/kg의 IVIG를 또한 2일마다 복강내 투여하였다. 총 플럭스를 Living Image 4.5 소프트웨어(PerkinElmer)를 사용하여 정량화하였다. 영상을 1분 간격에 걸쳐 연속적으로 포획하고 최대 플럭스 값을 분석을 위해 선택하였다.

그룹당 2마리의 마우스; 기호는 평균 생물발광성 플럭스를 나타낸다. 표적 세포: Nalm6 192/195 1:1 혼합물

도 17은 Nalm6 637 표적 세포에 대한 α 210.GS.BBz CAART 세포의 생체 내 효능을 나타낸다. 0.2×10^6 개의 Nalm6 637(84.3% sIgG⁺) 세포를 정맥 내 면역글로불린(IVIG, Privigen)으로 2일 동안 예비-처리한 후 NSG 마우스내로 복강내 주사하였다. 표적 세포 주사 후 5일째에, 6×10^6 개의 α 210.GS.BBz CAART 세포 또는 NTD T 세포를 복강내 주사하였다. 생물발광성을 나타낸 날에 IVIS Lumina로 정량화하였다. 동시에, 600 mg/kg의 IVIG를 또한 2일마다 13일까지 복강내 투여하였다. 총 플럭스를 Living Image 4.5 소프트웨어(PerkinElmer)를 사용하여 정량화하였다. 영상을 1분 간격에 걸쳐 연속적으로 취하고 최고 플럭스 값을 분석을 위해 선택하였다.

그룹 당 5마리의 마우스. 표적 세포: Nalm6 637

도 18a는 좌측에 천연의 킬러 면역글로불린-유사 수용체, 2개의 Ig 도메인 및 짧은 세포질성 테일 2(KIR2DS2) 및 DAP12 다중쇄 복합체, 및 AChR 세포의 도메인 1(EC1) KIR-CAAR(본원에서 AChR EC1 도메인과 KIR2DS2 막관통(transmembrane)(TM) 및 세포질성 도메인을 연결시키는 글리신-세린(GS) 링커로 나타냄)을 나타낸다. 도 18b는 긴 말단 반복체(long terminal repeat)(LTR)에 의해 플랭킹(flanking)되고 부분 gag 서열 및 사람 EF1 α 프로 모터에 이어 T2A와 같은 리보솜 스킵핑 부위(ribosome skipping site)에 의해 KIR-CAAR 서열에 연결된 DAP12 서열, 및 우드척 간염 바이러스 전사 후 조절 성분(woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element)(WHV PRE)으로 이루어진 렌티바이러스벡터 작제물의 개략도를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

상세한 설명

본 발명은 항-아세틸콜린 수용체(AChR) B 세포 수용체(BCR)에 대해 특이적인 키메라 자가항체 수용체(CAAR), CAAR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, CAAR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터, 및 재조합 세포, 예컨대, CAAR을 포함하는 T 세포를 포함한다.

본 발명은 또한 유전적으로 변형된 세포, 예컨대, AChR-CAAR을 발현하는 유전적으로 변형된 T 세포를 제조하는 방법을 포함하고, 여기서 발현된 CAAR은 AChR 세포의 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, AChR 세포의 도메인은 AChR 니코틴성 수용체의 알파 소단위로부터 유래된다.

- [0029] 본 발명은 또한 일반적으로 자기-항원(self-antigen)(예컨대, AChR)과 관련된 신경근 연결(NMJ) 질환(예컨대, 중증 근무력증(MG))을 치료하기 위해 CAAR을 발현하도록 가공된, 세포, 예컨대, T 세포의 용도에 관한 것이다. 일 구현예에서, 본 발명의 CAAR을 발현하는 세포, 예컨대, T 세포는 항-AChR BCR-발현 세포에 특이적으로 결합하여 이를 사멸시키지만, 건강한 B-세포, 즉, 자가항체-기반 BCR을 발현하지 않는 B-세포에 결합하여 이를 사멸시키지 않는다.
- [0030] 정의
- [0031] 달리 정의하지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속한 당해 분야의 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기술된 것과 유사하거나 등가의 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 실시 및/또는 시험에 사용될 수 있지만, 바람직한 물질 및 방법이 본원에 기술되어 있다. 본 발명을 설명하고 청구하는데 있어서, 다음의 전문용어가 정의가 제공된 정의된 방법에 따라 사용될 것이다.
- [0032] 본원에 사용된 전문용어는 특수한 구현에 만들 기술할 목적을 위한 것이며 제한하는 것으로 의도되지 않음이 또한 이해되어야 한다.
- [0033] 관사, 하나("a" 및 "an")는 본원에서 물품의 문법적 대상의 하나 또는 하나 이상(즉, 적어도 하나)을 지칭하기 위해 사용된다. 예로써, "성분"은 하나의 성분 또는 하나 이상의 성분을 의미한다.
- [0034] 본원에 사용된 바와 같은 "약"은, 양, 일시적 기간 등과 같은 측정가능한 값을 지칭하는 경우, 명시된 값으로부터 $\pm 20\%$ 또는 $\pm 10\%$ 의 변화, 일부 예에서 $\pm 5\%$, 일부 예에서 $\pm 1\%$, 및 일부 예에서 $\pm 0.1\%$ 의 변화를 포함하고, 이러한 변화는 개시된 방법을 수행하기에 적절하다.
- [0035] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "항체"는 항원과 결합하는 면역글로불린 분자를 지칭한다. 항체는 천연 공급원으로부터 또는 재조합 공급원으로부터 유래된 완전한 면역글로불린일 수 있고 완전한 면역글로불린의 면역반응성 부위일 수 있다. 항체는 전형적으로 면역글로불린 분자의 사량체(tetramer)이다. 항체는 다양한 형태로 존재할 수 있고 여기서 항체는 예를 들면, 단일 도메인 항체 단편(sdAb), 단일 쇄 항체(scFv) 및 사람화된 항체를 포함하는 연속적인 폴리펩타이드 쇄의 부분으로서 나타낸다(Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426).
- [0036] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "고 친화성"은 표적 분자에 대한 결합 분자의 결합 또는 상호작용 또는 유인에 있어서의 고 친화성을 지칭한다. 예를 들면, 일부 구현예에서, 결합 분자는 예컨대, 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정된 바와 같이, 표적 분자에 대해 100nM, 50 nM, 20 nM, 15 nM, 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 또는 1 nM 보다 큰 친화성을 가질 수 있다.
- [0037] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "항원" 또는 "Ag"는 면역 반응을 일으키는 분자로 정의된다. 이러한 면역 반응은 항체 생산, 또는 특이적인 면역학적으로 적격성인(competent) 세포의 활성화, 또는 둘 다를 포함할 수 있다. 기술자는 임의의 거대 분자, 예를 들면, 사실상 모든 단백질 또는 펩타이드가 항원으로서 제공될 수 있음을 이해할 것이다. 또한, 항원은 재조합 또는 게놈성 DNA로부터 유래될 수 있다. 당해 분야의 기술자는, 따라서, 면역 반응을 유발하는 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 또는 부분 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 임의의 DNA가 본원에 사용된 용어와 같이 "항원"을 암호화함을 이해할 것이다. 또한, 당해 분야의 기술자는 항원이 유전자의 전체 길이의 뉴클레오타이드 서열에 의해 단독으로 암호화될 필요가 없음을 이해할 것이다. 본 발명이 하나 이상의 항원의 부분 뉴클레오타이드 서열의 사용을 포함하나, 이에 한정되지 않고 이러한 뉴클레오타이드 서열이 다양한 조합으로 정렬되어 목적한 면역 반응을 유발하는 폴리펩타이드를 암호화함은 매우 명백하다. 더욱이, 기술자는 항원이 전적으로 "유전자"에 의해 암호화될 필요가 없음을 이해할 것이다. 항원이 합성으로 생성될 수 있거나 생물학적 샘플로부터 유래될 수 있음은 매우 명백하다. 이러한 생물학적 샘플은 조직 샘플, 종양 샘플, 세포 또는 생물학적 유액(biological fluid)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0038] "자가항원(autoantigen)"은 자가면역 반응의 생산, 예를 들면, 자가항체의 생산을 자극하는 내인성 항원을 의미한다. 자가항원은 또한 자기-항원(self-antigen) 또는, 자가면역 질환의 진행을 야기할 수 있는 세포-매개되거나 항체-매개된 면역 반응의 표적인 정상 조직으로부터의 항원을 포함한다. 자가항원의 예는 AChR, 및 이의 단편을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

- [0039] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "제한된 독성"은 시험관내 또는 생체 내에서 건강한 세포, 질환이 없는 세포, 비-표적 세포 또는 이러한 세포의 집단에 대해 실질적으로 음성의 생물학적 효과, 또는 실질적으로 음성의 생리학적 증상의 결여를 나타내는 본 발명의 펩타이드, 폴리뉴클레오타이드, 세포 및/또는 항체를 지칭한다.
- [0040] "자가항체(autoantibody)"는 자가항원에 대해 특이적인 항체를 지칭한다.
- [0041] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "자가면역 질환(autoimmune disease)"은 자기 항원에 대해 항체 매개된 자가면역 반응으로부터 야기되는 장애 또는 상태로 정의된다. 자가면역 질환은 자기-항원 또는 자가항원에 의해 부적절하게 생산되고/되거나 과도하게 생산되는 자가항체의 생산을 야기한다.
- [0042] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "자가(autologous)"는 이것이 후에 개체(individual) 내로 재-도입될 동일한 개체로부터 유래된 임의의 물질을 지칭함을 의미한다.
- [0043] "동종이계(allogeneic)"는 동일한 종(species)의 상이한 동물로부터 유래된 임의의 물질을 지칭한다.
- [0044] "이종발생(xenogeneic)"은 상이한 종의 동물로부터 유래된 임의의 물질을 지칭한다.
- [0045] "키메라 자가항체 수용체" 또는 "CAAR"은 세포, 예컨대, T 세포, 또는 임의의 다른 효과기 세포(effector cell), 예컨대, 세포-매개된 세포독성을 야기할 수 있는 효과기 세포형에서 발현되는 가공된 수용체(engineered receptor)를 지칭한다. 일부 구현예에서, CAAR은 Treg 세포에서 발현된다. CAAR은 BCR 및/또는 자가항체, 예컨대, 병원성 BCR 및/또는 자가항체에 대해 특이적인 항원 또는 이의 단편을 포함한다. CAAR은 임의로 또한 막관통 도메인, 세포내 도메인 및/또는 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0046] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "보존적 서열 변형"은 아미노산 서열을 함유하는 항체의 결합 특성에 유의적으로 영향을 미치지거나 이를 변경시키지 않는 아미노산 변형을 지칭하기 위해 의도된다. 이러한 보존적 변형은 아미노산 치환, 첨가 및 결실을 포함한다. 변형은 당해 분야에 공지된 표준 기술, 예를 들면, 부위-지시된 돌연변이 유발 및 RNA-매개된 돌연변이유발에 의해 본 발명의 항체내로 도입될 수 있다. 보존적인 아미노산 치환은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 가진 아미노산으로 대체된 것이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산의 계열은 당해 분야에 정의되었다. 이러한 계열은 염기성 측쇄(예컨대, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예컨대, 아스파르트산, 글루탐산), 하전되지 않은 극성 측쇄(uncharged polar side chain)(예컨대, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 타이로신, 시스테인, 트립토판), 비극성 측쇄(예컨대, 알라닌, 발린, 루이신, 이소류이신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), 베타-분지된 측쇄(예컨대, 트레오닌, 발린, 이소류이신) 및 방향족 측쇄(예컨대, 타이로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 지닌 아미노산을 포함한다. 따라서, 예를 들면, 본 발명의 CAAR의 세포의 영역 내 하나 이상의 아미노산 잔기는 유사한 측쇄 또는 전하를 갖는 다른 아미노산 잔기로 대체될 수 있고 변경된 CAAR은 본원에 기술된 기능성 검정을 사용하여 자가항체에 결합하는 능력에 대해 시험할 수 있다.
- [0047] 본원에 사용된 용어로서 "공-자극성 리간드"는 T 세포 상에서 동계의(cognate) 공-자극성 분자에 특이성을 결합함으로써 예를 들면, TCR/CD3 복합체와, 펩타이드와 함께 로딩된(loaded) MHC 분자의 결합에 의해 제공된 1차 신호 외에, T 세포 반응, 예를 들면, 그러나 이에 한정되지 않는, 증식, 활성화, 분화 등을 매개하는 신호를 제공하는 항원 제시 세포(antigen presenting cell)(예컨대, aAPC, 수지 세포, B 세포 등) 상의 분자를 포함한다.
- [0048] "공-자극성 분자"는 공-자극성 리간드와 특이적으로 결합함으로써 T 세포에 의한 공-자극성 반응, 예를 들면, 그러나 이에 한정되지 않는, 증식을 매개하는 T 세포 상의 동계 결합 파트너(cognate binding partner)를 지칭한다. 공-자극성 분자는 MHC 제I 부류 분자, BTLA 및 톨 리간드 수용체(Toll ligand receptor)를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0049] 용어 "CRISPR/CAS", "군집화된 일정하게 분포하는 짧은 팔린드롬성 반복체 시스템(clustered regularly interspaced short palindromic repeats system)", 또는 "CRISPR"은 염기 서열의 짧은 반복물을 함유하는 DNA 유전자자리(loci)를 지칭한다. 각각의 반복은 바이러스에 대한 이전 노출로부터 스페이서 DNA의 짧은 분절을 수반한다. 세균 및 고세균류(archaea)는 외부 핵산의 분해를 지시하는 짧은 RNA를 사용하는 CRISPR-CRISPR-관련된(Cas) 시스템으로 명명된 적응적 면역 방어(adaptive immune defense)를 진화시켰다. 세균에서, CRISPR 시스템은 RNA-안내된 DNA 절단을 통해 침입하는 외부 DNA에 대한 후천성 면역성을 제공한다.
- [0050] 제II형 CRISPR/Cas 시스템에서, "스페이서(spacer)"로 명명된, 외부 DNA의 짧은 분절은 CRISPR 게놈성 유전자자리 내에 통합되고 전사되어 짧은 CRISPR RNA(crRNA)로 프로세싱된다. 이러한 crRNA는 트랜스-활성화(trans-

activating) crRNA로 어닐링(annealing)하여 서열-특이적인 절단 및 Cas 단백질에 의한 병원성 DNA의 사일런싱(silencing)을 지시한다. 최근의 연구는 Cas9 단백질에 의한 표적 인식이 crRNA 내에 "씨드(seed)" 서열 및 crRNA-결합 영역의 상부에 보존된 디뉴클레오타이드-함유 광스페이스 인접한 모티프(conserved dinucleotide-containing protospacer adjacent motif)(PAM) 서열을 요구함이 밝혀졌다. Cas9가 목적인 서열을 절단하도록 하기 위해, 이후 "가이드 RNA" 또는 "gRNA"로 지칭된, crRNA-tracrRNA 융합 전사체를 사람 U6 폴리머라제 III 프로모터로부터 설계할 수 있다.

[0051] 용어 "CRISPRi"는 서열 특이적인 유전자 억제 또는 전사 수준에서 유전자 발현의 억제를 위한 CRISPR 시스템을 지칭한다.

[0052] "암호화(encoding)"는 뉴클레오타이드(즉, rRNA, tRNA 및 mRNA)의 정의된 서열 또는 아미노산의 정의된 서열 및 이로부터 생성된 생물학적 특성을 가진 생물학적 공정에서 다른 중합체 및 거대분자의 합성을 위한 주형(template)으로서 제공하기 위한, 폴리뉴클레오타이드내 뉴클레오타이드, 예컨대, 유전자, cDNA, 또는 mRNA내 뉴클레오타이드의 특이적인 서열의 고유 특성을 지칭한다. 따라서, 이러한 유전자에 상응하는 mRNA의 전사 및 해독이 세포 또는 다른 생물학적 시스템 내에서 단백질을 생산하는 경우에 유전자는 단백질을 암호화한다. 암호화 가닥 둘 다, 이의 뉴클레오타이드 서열은 mRNA 서열과 동일하고 일반적으로 서열 목록에 제공되며, 유전자 또는 cDNA의 전사용 주형으로서 사용된 비-암호화 가닥은 이러한 유전자 또는 cDNA의 단백질 또는 다른 생성물을 암호화하는 것으로 지칭될 수 있다.

[0053] "유효량" 또는 "치료학적 유효량"은 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 본원에 사용된 바와 같은, 특수한 생물학적 결과를 달성하기에 효과적인 화합물, 제형, 물질, 또는 조성물의 양을 지칭한다. 이러한 결과는 당해 분야에서 적합한 임의의 수단에 의해 측정된 바와 같은 바이러스 감염의 억제를 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0054] 용어 "효과기 기능"은 세포의 구체화된 기능을 지칭한다.

[0055] 본원에 사용된 바와 같은, "내인성"은 유기체, 세포, 조직 또는 시스템으로부터 또는 내에서 생산된 임의의 물질을 지칭한다.

[0056] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "외인성"은 유기체, 세포, 조직 또는 시스템 외부로부터 또는 외부에서 생산된 임의의 물질을 지칭한다.

[0057] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "발현"은 프로모터에 의해 유래된 특수한 뉴클레오타이드 서열의 전사 및/또는 해독으로 정의된다.

[0058] "발현 벡터"는 발현될 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결된 발현 제어 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 지칭한다. 발현 벡터는 발현을 위한 충분한 시스-작용 성분(cis-acting element)을 포함하고; 다른 발현 성분은 숙주 세포에 의해 또는 시험관내 발현 시스템에서 공급될 수 있다. 발현 벡터는 당해 분야에 공지된 모든 것, 예를 들면, 재조합 폴리뉴클레오타이드를 혼입하는, 코스미드, 플라스미드(예컨대, 리포솜 내에 네이크드(naked)되거나 함유됨), 레트로트랜스포손(retrotransposon)(예컨대, 피기백(piggyback), 슬피핑 뷰티(sleeping beauty)), 및 바이러스(예컨대, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 및 아데노-관련 바이러스)를 포함한다.

[0059] 본원에 사용된 바와 같은, "상동성"은 2개의 중합체성 분자 사이의, 예컨대, 2개의 핵산 분자 사이, 예를 들면, 2개의 DNA 분자 또는 2개의 RNA 분자 사이에, 또는 2개의 폴리펩타이드 분자 사이의 소단위 서열 동일성을 지칭한다. 2개의 분자 둘 다에서 소단위 위치가 동일한 단량체성 소단위에 의해 점유된 경우; 예컨대, 각각의 2개의 DNA 분자 내 위치가 아데닌에 의해 점유된 경우, 이들은 이러한 위치에서 상동성이다. 2개의 서열 사이의 상동성은 일치하는 또는 상동성 위치의 수의 직접적인 함수인데; 예컨대, 2개의 서열 내 위치 중 1/2(예컨대, 길이가 10개 소단위인 중합체 중 5개 위치)가 상동성인 경우, 2개의 서열은 50% 상동성이고, 위치의 90%(예컨대, 10개 중 9개)가 일치하거나 상동성인 경우, 2개의 서열은 90% 상동성이다.

[0060] 본원에 사용된 바와 같은, "동일성(identity)"은 2개의 중합체 분자 사이, 특히 2개의 아미노산 분자 사이, 예를 들면, 2개의 폴리펩타이드 분자 사이의 소단위 서열 동일성을 지칭한다. 2개의 아미노산 서열이 동일한 위치에서 동일한 잔기를 갖는 경우; 예컨대, 2개의 폴리펩타이드 분자 각각내 위치가 아르기닌에 의해 점유된 경우, 이는 이러한 위치에서 동일하다. 2개의 아미노산 서열이 정렬내 동일한 위치에서 동일한 잔기를 가지는 동일성 또는 정도는 흔히 퍼센트로 나타낸다. 2개의 아미노산 서열 사이의 동일성은 일치하는 또는 동일한 위치의 수의 직접적인 기능이며; 예컨대, 2개의 서열내 위치의 1/2(예컨대, 길이가 10개 아미노산인 중합체 내 5개 위치)이

동일한 경우, 2개의 서열은 50% 동일하고; 위치의 90%(예컨대, 10개 중 9개)가 일치하거나 동일한 경우, 아미노산 서열은 90% 동일하다.

- [0061] 본원에 사용된 바와 같은, "설명적 물질(instructional material)"은 본 발명의 조성물 및 방법의 유용성을 전달하는데 사용될 수 있는 표현의 공보, 기록, 다이어그램, 또는 임의의 다른 매체를 포함한다. 본 발명의 키트의 설명적 물질은 예를 들면, 본 발명의 핵산, 펩타이드, 및/또는 조성물을 함유하는 용기에 부착되거나 핵산, 펩타이드, 및/또는 조성물을 함유하는 용기와 함께 수송될 수 있다. 대안적으로, 설명적 물질은 설명적 물질 및 화합물이 수령자에 의해 협동적으로 사용될 의도로 용기로부터 별도로 수송될 수 있다.
- [0062] "세포내 도메인"은 세포 내부에 잔류하는 분자의 부위 또는 영역을 지칭한다.
- [0063] 용어 "세포내 신호전달 도메인"은 효과기 기능 신호를 형질도입하는데 충분한 세포내 도메인의 임의의 전체 길이 또는 절두된(truncated) 부위를 포함함을 의미한다.
- [0064] "단리된"은 천연 상태에서부터 변경되거나 제거됨을 의미한다. 예를 들면, 살아있는 동물 내에 천연적으로 존재하는 핵산 또는 펩타이드는 "단리"되지 않지만, 이의 천연 상태의 공존 물질로부터 부분적으로 또는 완전히 분리된 동일한 핵산 또는 펩타이드는 "단리"된다. 단리된 핵산 또는 단백질은 실질적으로 정제된 형태로 존재할 수 있거나, 예를 들면, 숙주 세포와 같은, 비-천연 환경에 존재할 수 있다.
- [0065] 본 발명의 맥락에서, 일반적으로 존재하는 핵산 염기에 대해 다음의 약어가 사용된다. "A"는 아데노신을 지칭하고, "C"는 사이토신을 지칭하고, "G"는 구아노신을 지칭하고, "T"는 티미딘을 지칭하고, "U"는 우리딘을 지칭한다.
- [0066] 달리 명시하지 않는 한, "아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열"은 서로 변성 버전(degenerate version)이고 동일한 아미노산 서열을 암호화하는 모든 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 단백질 또는 RNA를 암호화하는 어구(phrase) 뉴클레오타이드는 또한 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열이 일부 버전에서 인트론(들)을 함유할 수 있는 정도로 인트론을 포함할 수 있다.
- [0067] 본원에 사용된 바와 같은, "렌티바이러스"는 레트로비리다에 계열(Retroviridae family)의 속(genus)을 지칭한다. 렌티바이러스는 분열하지 않는 세포를 감염시킬 수 있는 레트로바이러스 중에서 유일하며; 이는 유의적인 양의 유전 정보를 숙주 세포의 DNA 내로 전달할 수 있으며, 따라서, 이는 유전자 전달 벡터의 가장 효율적인 방법 중 하나이다. HIV, SIV, 및 FIV는 렌티바이러스의 모든 예이다. 렌티바이러스로부터 유래된 벡터는 생체 내에서 유의적인 수준의 유전자 전달을 달성할 수단을 제공한다.
- [0068] 용어 "작동적으로 연결된"은 이중 핵산 서열의 발현을 야기하는 조절 서열과 이중 핵산 서열 사이의 기능적 연결을 지칭한다. 예를 들면, 제1의 핵산 서열이 제2의 핵산 서열과 기능적 관계로 위치하는 경우 제1의 핵산 서열은 제2의 핵산 서열과 작동적으로 연결된다. 예를 들면, 프로모터가 암호화 서열의 전사 또는 발현에 영향을 미치는 경우, 프로모터는 암호화 서열에 작동적으로 연결된다. 일반적으로, 작동적으로 연결된 DNA 서열은 연속적이고, 필요한 경우 동일한 판독 프레임(reading frame) 내에서, 2개의 단백질 암호화 영역을 연결시킨다.
- [0069] 면역원성 조성물의 "비경구" 투여는 예컨대, 피하((s.c.), 정맥 내(i.v.), 근육내(i.m.), 또는 흉골내 주사, 또는 주입 기술을 포함한다.
- [0070] 본원에 사용된 바와 같은, "혈장 세포"는 항체를 생산하고 이를 분비할 수 있는 백혈구(white blood cell)의 유형을 지칭한다. 혈장 세포는 또한 형질세포(plasmocyte), 플라스마세포(plasmacyte), 또는 효과기 B 세포를 지칭한다.
- [0071] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "폴리뉴클레오타이드"는 뉴클레오타이드의 쇄로 정의된다. 또한, 핵산은 뉴클레오타이드의 중합체이다. 따라서, 본원에 사용된 바와 같은 핵산 및 폴리뉴클레오타이드는 상호교환적이다. 당해 분야의 기술자는 핵산이 단량체성 "뉴클레오타이드"로 가수분해될 수 있는, 폴리뉴클레오타이드라는 일반적인 지식을 갖는다. 단량체성 뉴클레오타이드는 뉴클레오사이드로 가수분해될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은, 폴리뉴클레오타이드는 당해 분야에 이용가능한 임의의 수단, 예를 들면, 제한없이, 재조합 수단, 즉, 재조합 라이브러리 또는 세포 계놈으로부터 핵산의 클로닝에 의해, 통상적인 클로닝 기술 및 PCR[™] 등을 사용하여, 및 합성 수단에 의해 수득된 모든 핵산 서열을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 일부 구현예에서, 핵산 서열은 본원에 개시된 임의의 핵산 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성 또는 상동성을 갖는 것으로 고려된다.

- [0072] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "펩타이드", "폴리펩타이드", 및 "단백질"은 상호교환적으로 사용되고, 펩타이드 결합에 의해 공유결합으로 연결된 아미노산 잔기로 구성된 화합물을 지칭한다. 단백질 또는 펩타이드는 적어도 2개의 아미노산을 함유하여야만 하며, 단백질 또는 펩타이드의 서열을 포함할 수 있는 아미노산의 최대 수에 제한되지 않는다. 폴리펩타이드는 펩타이드 결합에 의해 서로 결합된 2개 이상의 아미노산을 포함하는 임의의 펩타이드 또는 단백질을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같은, 용어는 또한 일반적으로 당해 분야에서 예를 들면, 펩타이드, 올리고펩타이드 및 올리고머로 지칭되는 짧은 쇠, 및 이의 많은 유형이 존재하는, 당해 분야에서 단백질로 일반적으로 지칭되는, 보다 긴 쇠를 지칭한다. "폴리펩타이드"는 예를 들면, 다른 것들 중에서 생물학적으로 활성인 단편, 실질적으로 상동성인 폴리펩타이드, 올리고펩타이드, 단독이량체, 이종이량체, 폴리펩타이드의 변이체, 변형된 폴리펩타이드, 유도체, 유사체, 융합 단백질을 포함한다. 폴리펩타이드는 천연 펩타이드, 재조합 펩타이드, 합성 펩타이드, 또는 이의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 아미노산 서열은 본원에 기술된 임의의 아미노산 서열에 대해 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성 또는 상동성을 갖는 것으로 고려된다.
- [0073] 용어 "전염증성 사이토킨"은 염증 또는 염증성 반응을 촉진하는 사이토킨 또는 인자를 지칭한다. 전염증성 사이토킨의 예는 케모킨(CCL, CXCL, CX3CL, XCL), 인터류킨(예를 들면, IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL10 및 IL-15), 인터페론(IFN γ), 및 종양 괴사 인자(TNF α 및 TNF β)를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0074] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "프로모터"는 세포의 합성 기구(synthetic machinery)에 의해 인식되거나, 도입된 합성 기구에 의해 인식되고, 폴리뉴클레오타이드 서열의 특이적인 전사를 개시하는데 필요한 DNA 서열로서 정의된다.
- [0075] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "프로모터/조절성 서열"은 프로모터/조절성 서열에 작동적으로 연결된 유전자 생성물의 발현에 요구되는 핵산 서열을 의미한다. 일부 예에서, 이러한 서열은 코어 프로모터 서열일 수 있고 다른 예에서, 이러한 서열은 또한 인핸서(enhancer) 서열 및 유전자 생성물의 발현에 요구되는 다른 조성 성분을 포함할 수 있다. 프로모터/조절성 서열은 예를 들면, 조직 특이적인 방식으로 유전자 생성물을 발현하는 것일 수 있다.
- [0076] "구성적" 프로모터는, 유전자 생성물을 암호화하거나 이를 규정하는 폴리뉴클레오타이드와 작동적으로 연결되는 경우, 세포의 대부분 또는 모든 생리학적 조건 하에서 세포 내에서 유전자 생성물이 생산되도록 하는 뉴클레오타이드 서열이다.
- [0077] "유도성" 프로모터는 유전자 생성물을 암호화하거나 이를 규정하는 폴리뉴클레오타이드와 작동적으로 연결된 경우, 실질적으로 프로모터에 상응하는 유도인자(inducer)가 세포 내에 존재하는 경우에만 세포 내에서 유전자 생성물을 생산하도록 하는 뉴클레오타이드 서열이다.
- [0078] "조직-특이적인" 프로모터는 폴리뉴클레오타이드와 작동적으로 연결된 경우 유전자에 의해 암호화되거나 규정되고, 세포가 프로모터에 상응하는 조직 유형의 세포인 경우에만 실질적으로 세포내에서 유전자 생성물을 생산하도록 하는 뉴클레오타이드 서열이다.
- [0079] "신호 형질도입 경로"는 세포의 하나의 부위로부터 세포의 다른 부위로의 전파에 역할을 담당하는 다양한 신호 형질도입 분자 사이의 생화학적 관계를 지칭한다. 어구 "세포 표면 수용체"는 세포의 막에 걸쳐 신호를 수용하고 신호를 전달할 수 있는 분자 및 분자의 복합체를 포함한다.
- [0080] "신호전달 도메인"은 활성화 신호에 대한 반응시 특이적인 단백질을 순환시키고 이와 상호작용하는 분자의 부위 또는 영역을 지칭한다.
- [0081] 용어 "대상체"는 면역 반응이 유발될 수 있는 살아있는 유기체(예컨대, 포유동물)을 포함하는 것으로 의도된다.
- [0082] 본원에 사용된 바와 같은, "실질적으로 정제된" 세포는 다른 세포 유형을 필수적으로 함유하지 않는 세포이다. 실질적으로 정제된 세포는 또한 일반적으로 이의 천연적으로 존재하는 상태와 관련된 다른 세포형으로부터 분리된 세포를 지칭한다. 일부 예에서, 실질적으로 정제된 세포의 집단은 세포의 균질한 집단을 지칭한다. 다른 예에서, 당해 용어는 단순히 이것이 이의 천연 상태에서 천연적으로 관련된 세포로부터 분리된 세포를 지칭한다. 일부 구현예에서, 세포는 시험관 내에서 배양된다. 다른 구현예에서, 세포는 시험관 내에서 배양되지 않는다.
- [0083] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "치료학적"은 치료 및/또는 예방을 의미한다. 치료학적 효과는 질병 상태의 억제, 차도, 또는 근절에 의해 획득된다.
- [0084] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "형질감염된" 또는 "형질전환된" 또는 "형질도입된"은 외인성 핵산이 형질감염

되거나 숙주 세포내로 도입되는 공정을 지칭한다. "형질감염된" 또는 "형질전환된" 또는 "형질도입된" 세포는 외인성 핵산으로 형질감염, 형질전환 또는 형질도입된 것이다. 세포는 1차 대상체 세포 및 이의 후대세포(progeny)를 포함한다.

[0085] "막관통 도메인"은 지질 이중 막을 확장시키는 문자의 부위 또는 영역을 지칭한다.

[0086] 본원에 사용된 바와 같은, 어구 "전사 제어 하" 또는 "작동적으로 연결된"은 프로모터가 폴리뉴클레오타이드와 관련하여 정확한 위치 또는 배향에 존재하여 RNA 폴리머라제에 의한 전사의 개시 및 폴리뉴클레오타이드의 발현을 제어함을 의미한다.

[0087] "벡터"는 단리된 핵산을 세포의 내부로 전달하는데 사용될 수 있는 단리된 핵산을 포함하는 물질의 조성물이다. 다수의 벡터, 예를 들면, 그러나 이에 한정되지 않는, 선형 폴리뉴클레오타이드, 이온성 또는 양쪽성 화합물과 관련된 폴리뉴클레오타이드, 플라스미드, 및 바이러스가 당해 분야에 공지되어 있다. 따라서, 용어 "벡터"는 플라스미드 또는 바이러스를 자체적으로 복제하는 플라스미드를 포함한다. 용어는 또한 세포 내로 핵산의 전달을 촉진시키는 비-플라스미드 및 비-바이러스성 화합물, 예를 들면, 폴리라이신 화합물, 리포좀 등을 포함하는 것으로 고려될 수 있다. 바이러스 벡터의 예는 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스 벡터, 렌티로 바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0088] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "구체적으로 결합하다"는 샘플 속에 존재하는 동계 결합 파트너(예컨대, T 세포 상에 존재하는 자극성 및/또는 공자극성 분자)를 인식하고 이와 결합하는 항체, 또는 리간드를 의미하지만, 이러한 항체 또는 리간드는 샘플내 다른 분자를 실질적으로 인식하거나 이에 결합하지 않는다.

[0089] 용어 "자극"은 자극성 분자(예컨대, TCR/CD3 복합체)와 이의 동계 리간드의 결합에 의해 신호 형질도입 현상, 예를 들면, 그러나 이에 한정되지 않는 TCR/CD3 복합체를 통한 신호 형질도입을 매개함으로써 유도된 1차 반응을 의미한다. 자극은 특정 분자의 변경된 발현, 예를 들면, TGF- β 의 하향조절(downregulation), 및/또는 세포 골격 구조의 인식 등을 매개할 수 있다.

[0090] 본원에 사용된 용어로서 "자극성 분자"는 항원 제시 세포 상에 존재하는 동계 자극성 리간드와 특이적으로 결합하는 T 세포 상의 분자를 의미한다.

[0091] 본원에 사용된 바와 같은 "자극성 리간드"는 항원 제시 세포(예컨대, aAPC, 수지 세포, B-세포 등) 상에 존재하는 경우 T 세포 상에서 동계 결합 파트너(본원에서 "자극성 분자"로서 지칭됨)와 특이적으로 결합함으로써, T 세포에 의한 1차 반응, 예를 들면, 그러나 이에 한정되지 않는 활성화, 면역 반응의 개시, 증식 등을 매개하는 리간드를 의미한다. 자극성 리간드는 당해 분야에 잘 공지되어 있고 특히 펩타이드, 항-CD3 항체, 초효능제(superagonist) 항-CD28 항체, 및 초효능제 항-CD2 항체로 로딩된 MHC 제I 부류 분자를 포함한다.

[0092] 범위: 본 개시내용 전체에서, 본 발명의 다양한 양태를 범위 양식으로 나타낼 수 있다. 범위 양식의 설명은 단시 편이성 및 간결성을 위한 것이며 본 발명의 범위에서 경직된 제한으로 고려되지 않아야 한다. 따라서, 범위의 설명은 구체적으로 개시된 모든 가능한 소범위 뿐만 아니라 이러한 범위내 개개 수치를 갖는 것으로 고려될 수 있다. 예를 들면, 1 내지 6과 같은 범위의 설명은 구체적으로 소범위 예를 들면, 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 6, 3 내지 6 등 뿐만 아니라 이러한 범위내 개개 수치, 예를 들면, 1, 2, 2.7, 3, 4, 5, 5.3, 및 6을 갖는 것을 고려될 수 있다. 이는 범위의 폭에 상관없이 적용된다.

[0093] 본원에 사용된 바와 같은, 폴리뉴클레오타이드, 단백질, 또는 수용체의 "단편"은 상응하는 전체 길이의 폴리뉴클레오타이드, 단백질, 또는 수용체의 생물학적 활성의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 100%를 보유하는 폴리뉴클레오타이드, 단백질, 또는 수용체의 단편을 지칭한다. 예를 들면, 아세틸콜린 수용체(AChR) 자가항원의 "기능성 단편"은 예를 들면, BCR 또는 자가항원에 대해 상응하는 전체 길이의 아세틸콜린 수용체(AChR) 자가항원의 결합 활성의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 100%를 보유하는 전체 길이의 아세틸콜린 수용체(AChR) 자가항원의 단편을 지칭한다.

[0094] 명세서 전체에서, 폴리뉴클레오타이드, 단백질, 수용체, 세포, 또는 조성물이 특이적인 구성성분을 갖거나, 포괄하거나(including), 포함하는 것으로 기술된 경우, 또는 공정 및 방법이 구체적인 단계를 갖거나, 포괄하거나, 포함하는 것으로 기술된 경우, 인용된 구성성분으로 필수적으로 이루어지거나 이로 이루어진 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 단백질, 수용체, 세포, 또는 조성물이 존재하고, 인용된 공정 단계로 필수적으로 이루어지거나 이로 이루어진 본 발명에 따른 공정 및 방법이 존재하는 것으로 고려된다.

- [0095] 설명
- [0096] 키메라 자가항체 수용체(CAAR)
- [0097] 본 발명은 부분적으로 활성화 및 자가항원 분비 후, 자가항체-매개된 신경근육 연결(NMJ) 질환(예컨대, 중증 근무력증(MG))을 유발할 수 있는, 자가항체-기반 B 세포 수용체를 발현하는 B 세포를 표적화하는데 사용될 수 있다는 발견을 기반으로 한다. 본 발명은 항-아세틸콜린 수용체(AChR) B 세포 수용체(BCR)에 대해 특이적인 키메라 자가항체 수용체(CAAR), CAAR을 포함하는 조성물, CAAR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, CAAR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터, 및 CAAR을 포함하는 재조합 세포, 예컨대, T 세포를 포함한다. 본 발명은 또한 AChR CAAR을 발현하는, 유전적으로 변형된 세포, 예컨대, 유전적으로 변형된 T 세포를 제조하는 방법을 포함하고 여기서 발현된 CAAR은 AChR 세포의 도메인을 포함한다.
- [0098] 본 발명은 자가항체-매개된 NMJ 질환을 치료하기 위한 기술을 포함한다. 특히, 궁극적으로 자기 항체를 생산하고 이의 세포 표면에서 자가항체를 나타내는 B세포를 표적화하는 기술은 이러한 B 세포를 치료학적 개입을 위한 질환-특이적인 표적으로서 표시한다. 따라서, 본 발명은 항원-특이적인(예컨대, AChR) 키메라 자가항체 수용체(또는 CAAR)를 사용하여 질환-유발 B 세포를 표적화함으로써 자가항체-매개된 질환에서 병원성 B 세포를 효율적으로 표적화하고 사멸하는 방법을 포함한다. 본 발명의 구현예에서, 특이적인 항-AChR BCR을 발현하는 B 세포만이 사멸되어, 유리한 B 세포 및 감염으로부터 보호하는 항체를 온전하게 남긴다.
- [0099] 일 양태에서, 본 발명은 아세틸콜린 수용체(AChR) 자가항원 또는 이의 단편을 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 키메라 자가항체 수용체(CAAR)를 포함한다. 일부 구현예에서, AChR 자가항원은 AChR의 알파 소단위 또는 이의 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, AChR 자가항원은 AChR의 알파 소단위이다.
- [0100] 일 양태에서, 본 발명은 AChR 자가항원 또는 이의 단편을 포함하는 키메라 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 AChR 자가항원 또는 이의 단편은 키메라 자가항체 수용체(CAAR)의 막관통 도메인에 연결된다.
- [0101] 일 양태에서, 본 발명은 키메라 자가항체 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(CAAR)를 포함하고, 여기서 폴리뉴클레오타이드는 AChR 자가항원 또는 이의 단편을 암호화한다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 또한 막관통 도메인, 공자극성 분자의 세포내 도메인, 및/또는 신호전달 도메인을 암호화한다.
- [0102] 일부 구현예에서, AChR CAAR은 서열 번호: 11, 25, 30, 34, 39, 43, 및 46으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 일 구현예에서, AChR CAAR은 서열 번호: 1, 6, 21, 28, 32, 36, 41, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 및 52로 이루어진 그룹으로부터 선택된 핵산 서열에 의해 암호화된다.
- [0103] 일부 구현예에서, AChR CAAR은 서열 번호: 11, 25, 30, 34, 39, 43, 및 46으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열에 대해 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, AChR CAAR은 서열 번호: 1, 6, 21, 28, 32, 36, 41, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 및 52로 이루어진 그룹으로부터 선택된 핵산 서열에 대해 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 암호화된다.
- [0104] 자가항원 모이어티(Moiety)
- [0105] 일 구현예에서, 본 발명의 CAAR은 자가항원 또는 이의 단편으로 또한 지칭된 자가항체 결합 도메인을 포함한다. 본 발명에서 사용하기 위한 자가항원의 선택은 표적화되는 자가항체 또는 BCR(예컨대, 항-AChR)의 유형에 의존한다. 예를 들면, 자가항원은 특수한 자가항체-매개된 질환 상태, 예컨대, 중증 근무력증(MG)과 관련된 표적 세포, 예를 들면, BCR을 발현하는 B 세포 상에서 BCR 또는 자가항체를 인식하므로, 이를 선택할 수 있다.
- [0106] 일부 예에서, 자가항체 결합 도메인이 동일한 종으로부터 유래되는 것이 유리하며, 여기서 CAAR이 궁극적으로 사용될 것이다. 예를 들면, 사람에서 사용하기 위해, CAAR의 자가항체 결합 도메인이 사람 BCR 또는 자가항체에 결합하는 사람 자가항원(또는 이의 단편)을 포함하는 것이 유리할 수 있다.
- [0107] 하나의 예시적인 구현예에서, 유전적으로 가공된 키메라 자가항체 수용체는 AChR 또는 이의 단편을 포함하고, 이는 항-AChR BCR, 예컨대, 대상체내 B 세포 상에서 항-AChR BCR에 결합한다.
- [0108] 일 구현예에서, CAAR은 AChR 자가항원 또는 이의 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, AChR 자가항원 또는 이의 단편은 서열 번호: 3, 5, 7, 22, 23, 29, 33, 및 42로 이루어진 그룹으로부터 선택된 핵산 서열에 의해 암호화된다. 자가항원 또는 이의 단편의 내성 변이체는 당해 분야의 기술자에게 잘 알려져 있을 것이다. 예를 들면,

일부 구현예에서, AChR 자가항원 또는 이의 단편은 서열 번호: 3, 5, 7, 22, 23, 29, 33, 및 42로 이루어진 그룹으로부터 선택된 핵산 서열에 대해 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 암호화된다. 특정의 구현예에서, AChR 자가항원 또는 이의 단편은 서열 번호: 3, 5, 7, 22, 및 23으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4 또는 5개)의 핵산 서열을 포함하는 핵산 서열에 의해 암호화된다. 특정의 구현예에서, AChR 자가항원 또는 이의 단편은 서열 번호: 3, 5, 7, 22, 및 23으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 핵산 서열에 대해 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 또는 5개)의 핵산 서열에 의해 암호화된다.

[0109] 다른 구현예에서, AChR 자가항원 또는 이의 단편은 서열 번호: 13, 15, 17, 26, 27, 31, 35, 및 44로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 여전히 다른 구현예에서, AChR 자가항원 또는 이의 단편은 서열 번호: 13, 15, 17, 26, 27, 31, 35, 및 44로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열에 대해 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 특정의 구현예에서, AChR 자가항원 또는 이의 단편은 서열 번호: 13, 15, 17, 26, 및 27로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4 또는 5개)의 아미노산 서열을 포함한다. 특정의 구현예에서, AChR 자가항원 또는 이의 단편은 서열 번호: 13, 15, 17, 26, 및 27로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열에 대해 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4 또는 5개)의 아미노산 서열을 포함한다.

[0110] 막관통 도메인

[0111] 일부 구현예에서, AChR CAAR은 AChR CAAR의 세포외 도메인에 융합된 막관통 도메인을 포함한다. 일 구현예에서, AChR CAAR은 AChR CAAR 내 도메인 중 하나와 천연적으로 관련된 막관통 도메인을 포함한다. 일부 예에서, 막관통 도메인을 선택하거나 아미노산 치환에 의해 변형시켜 동일하거나 상이한 막 단백질의 막관통 도메인에 대한 결합을 피함으로써 수용체 복합체의 다른 막과의 상호작용을 최소화한다.

[0112] 막관통 도메인은 천연 공급원으로부터 또는 합성 공급원으로부터 유래될 수 있다. 공급원이 천연인 경우, 도메인은 임의의 막-결합이 되거나 막관통 단백질로부터 유래될 수 있다. 일 구현예에서, 막관통 도메인은 합성일 수 있고, 이러한 경우에 이는 주로 소수성 잔기, 예를 들면, 루이신 및 발린을 포함할 것이다. 일 양태에서 페닐알라닌, 트립토판 및 발린의 삼중선(triplet)은 합성 막관통 도메인의 각각의 말단에서 발견될 것이다. 임의로, 길이가 2 내지 10개 아미노산인, 짧은 올리고- 또는 폴리펩타이드 링커는 AChR CAAR의 막관통 도메인과 세포질성 신호전달 도메인 사이에 연결을 형성할 수 있다. 글리신-세린(GS) 이중선(doublet)은 특히 적합한 링커를 제공한다.

[0113] 일부 예에서, 막관통 도메인 앞에 다양한 스페이서 도메인, 예를 들면, CD8 또는 사람 Ig(면역글로불린) 힌지, 또는 글리신-세린 링커가 또한 사용될 수 있다.

[0114] 힌지 및/또는 막관통 도메인의 예는 T-세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타쇄의 힌지 및/또는 막관통 도메인, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, KIR, OX40, CD2, CD27, LFA-1(CD11a, CD18), ICOS(CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFRR, HVEM(LIGHT), SLAMF7, NKp80(KLRP1), CD160, CD19, IL2R 베타, IL2R 감마, IL7R α, ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49d, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4(CD244, 2B4), CD84, CD96(Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9(CD229), CD160(BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6(NTB-A, Ly108), SLAM(SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME(SLAMF8), SELPLG(CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D, 및/또는 NKG2C를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

- [0115] 일 구현예에서, AChR CAAR은 막관통 도메인, 예를 들면, 그러나 이에 한정되지 않는, ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCTCTGTCAGTGGTTATCACCTTTACTGC (서열 번호: 9)에 의해 암호화된 CD8 알파 막관통 도메인: IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (서열 번호: 19)을 포함한다.
- [0116] 일부 구현예에서, CD8 알파 막관통 도메인은 서열 번호: 19의 아미노산 서열에 대해 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 추가의 구현예에서, CD8 알파 막관통 도메인은 서열 번호: 9의 서열에 대해 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 암호화된다.
- [0117] 다른 구현예에서, AChR CAAR은 GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTCC (서열 번호: 37)에 의해 암호화된 GS 링커 GGGSGGGGS(서열 번호: 40)를 포함한다.
- [0118] 일부 구현예에서, AChR CAAR는 TTCGTGCCGGTCTTCTGCCAGCGAAGCCAACCACGACGCCAGCCGCGACCACCAACACCTGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCTGTCCCTGCGCCCA GAGGCGTGCAGACCAGCAGCGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT (서열 번호: 8)에 의해 암호화된 CD8 힌지 영역:
- [0119] FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (서열 번호: 18)을 포함한다.
- [0120] 일부 구현예에서, 힌지 영역은 서열 번호: 18의 아미노산 서열에 대해 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖거나, 서열 번호: 8에 대해 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0121] 공자극성 분자의 세포내 도메인
- [0122] 일부 구현예에서, AChR CAAR은 공자극성 분자의 세포내 도메인을 포함한다. 본 발명의 AChR CAAR의 공자극성 분자의 세포내 도메인은 AChR CAAR이 위치한 면역 세포의 정상적인 효과기 기능 중 적어도 하나의 활성화에 관여하는 세포질성 도메인이다.
- [0123] 예를 들어, T 세포의 효과기 기능은 사이토킨의 분비를 포함하는 세포분해 활성 또는 헬퍼 활성일 수 있다. 따라서, 용어 "공자극성 분자의 세포내 도메인"은 효과기 기능 신호를 형질도입하고 세포가 구체화된 기능을 수행하도록 지시하는 단백질의 부위를 지칭한다. 공자극성 분자의 전체 세포내 도메인이 사용될 수 있지만, 많은 경우에 전체 도메인을 사용하는 것을 필수적이지 않다. 공자극성 분자의 세포내 도메인의 절두된 부위가 사용된 정도까지, 이러한 절두된 부위는 효과기 기능 신호를 형질도입하는 한 완전한 도메인 대신에 사용될 수 있다.
- [0124] 공자극성 분자의 세포내 도메인은 공자극성 분자의 세포내 도메인을 포함하는 CAAR의 부위를 지칭한다. 공자극성 분자는 항원에 대한 림프구의 효율적인 반응에 필요한 항원 수용체 또는 이의 리간드 이외의 세포 표면 분자이다. 이러한 분자의 예는 CD27, CD28, 4-1BB(CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능-관련 항원-1(LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 및 a ligand that specifically binds with CD83, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRP1), CD127, CD160, CD19, CD4, CD8 알파, CD8 베타, IL2R 베타, IL2R 감마, IL7R 알파, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1(CD226), SLAMF4(CD244, 2B4), CD84, CD96(Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160(BY55), PSGL1, CD100(SEMA4D), CD69, SLAMF6(NTB-A, Ly108), SLAM(SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME(SLAMF8), SELPLG(CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D, 본원에 기술된 다른 공-자극성 분자, 임의의 유도체, 변이체, 또는 이의 단편, 동일한 기능성 능력을 갖는 공-자극성 분

자의 임의의 합성 서열, 및 이의 임의의 조합을 포함한다. 따라서, 본 발명이 주로 공-자극성 신호전달 도메인으로서 4-1BB(CD137)를 사용하여 예시되어 있지만, 다른 공자극성 도메인도 본 발명의 영역 내에 있다.

- [0125] 일 구현예에서, 공자극성 분자의 세포내 도메인의 핵산 서열은 공자극성 분자 4-1BB(또한 CD137 세포내 도메인으로서 공지되고 지칭됨: KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL(서열 번호: 20)를 포함하는 아미노산 서열을 암호화한다.
- [0126] 일부 구현예에서, 공자극성 분자의 세포내 도메인은 서열 번호: 20에 대해 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 여전히 다른 구현예에서, 4-1BB 세포내 도메인을 암호화하는 핵산 서열은 AAGCGCGGTGCGAAGAACTGCTCTATATTTTAAACAGCCATTGAGACCTGTCCAGACCACTCAAGAGGAGGACGGATGTTCTGTAGATTTCCTGAA GAGGAAGAGGGGGGTGCGAGCTG(서열 번호: 10)(코돈 최적화됨)을 포함한다.
- [0127] 일부 구현예에서, 4-1BB 세포내 도메인을 암호화하는 핵산 서열은 AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATCAACAACCATTTATGAGACCACTCAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCAGAA GAAGAAGAAGGAGGATGTGAAGT(서열 번호: 16)를 포함한다.
- [0128] 일부 구현예에서, 4-1BB 세포내 도메인은 서열 번호: 20으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열에 대해 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 4-1BB 세포내 도메인은 서열 번호: 10 또는 16으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 핵산 서열에 대해 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 암호화된다.
- [0129] 사람 세포내 4-1BB 도메인은 이의 원래의 리간드의 요구없이, 세포의 자가항원, 예를 들면, AChR, 또는 이의 단편에 대한 결합시 공-자극성 세포내 신호전달을 제공한다.
- [0130] TCR 단독을 통해 생성된 신호가 T 세포의 완전한 활성화에 불충분하고 2차 또는 공자극성 신호가 또한 요구됨은 잘 인식되어 있다. 따라서, T 세포 활성화는 세포질성 신호전달 서열의 2개의 명백한 부류: TCR(1차 세포질성 신호전달 서열)을 통한 항원-의존성 1차 활성화를 개시하는 것 및 제2 또는 공-자극성 신호(제2 세포질성 신호전달 서열)을 제공하기 위해 항원-의존성 방식으로 작용하는 것에 의해 매개되는 것으로 일컬어질 수 있다.
- [0131] 신호전달 도메인
- [0132] 일부 구현예에서, AChR CAAR은 신호전달 도메인을 포함한다. 1차 세포질성 신호전달 서열은 자극성 방식 또는 억제성 방식으로 TCR 복합체의 1차 활성화를 조절한다. 자극성 방식으로 작용하는 1차 세포질성 신호전달 서열은 면역수용체 타이로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로 알려진 신호전달 모티프를 함유할 수 있다.
- [0133] 본 발명에서 특수하게 사용되는 1차 신호전달 서열을 함유하는 ITAM의 예는 TCR 제타, FcR 감마, FcR 베타, CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD5, CD22, CD79a, CD79b, 및 CD66d로부터 유래된 것을 포함한다. 본 발명의 CAAR 내 신호전달 분자가 CD3-제타로부터 유래된 신호전달 도메인을 포함하는 것이 특히 바람직하다.
- [0134] 일 구현예에서, CAAR의 신호전달 도메인은 자체적으로 또는 본 발명의 CAAR의 문맥에서 유용한 임의의 다른 목적한 세포질성 도메인(들)과 조합된 CD3-제타 신호전달 도메인을 포함하도록 설계될 수 있다. 예를 들면, CAAR의 신호전달 도메인은 CD3 제타 쉘 부위 및 공자극성 신호전달 도메인을 포함할 수 있다.
- [0135] 일부 구현예에서, AChR CAAR은 자체적으로 또는 본 발명의 AChR CAAR의 문맥에서 유용한 임의의 다른 목적한 세포질성 도메인(들)과 함께 CD3-제타 신호전달 도메인을 포함한다. 예를 들면, AChR CAAR은 CD3 제타 쉘 부위 및 공자극성 분자의 세포내 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CD3 제타 쉘 부위는 사람 T-세포 표면 당단백질 CD3 제타 쉘 동형 3 세포내 도메인(사람 CD247)을 포함한다. 사람 세포내 CD3 제타 도메인은 세포의 자가항원, 예를 들면, AChR 또는 이의 단편에 대한 결합시, HLA 제한없이 자극성 세포내 신호전달을 제공한다.
- [0136] 일 구현예에서, 신호전달 도메인의 핵산 서열은 CD3 제타 신호전달 도메인을 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.

다른 구현예에서, CD3 제타 신호전달 도메인의 핵산 서열은 RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQALPPR (서열 번호: 38)을 포함하는 아미노산 서열을 암호화한다.

[0137] 다른 구현예에서, CD3 제타 신호전달 도메인을 암호화하는 핵산 서열은 다음을 포함한다:

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACCAGCAGGG
CCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGAT
GTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGA
AGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATG
GCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAG
GGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACG
ACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (서열 번호: 24)

[0138]

[0139] 다른 구현예에서, CD3 제타 신호전달 도메인을 암호화하는 핵산 서열은 다음을 포함한다:

AGAGTAAAGTTCTCTAGAAGCGCCGATGCCCCAGCCTATCAACAGGG
GCAAAATCAACTCTACAACGAACCTAATCTGGGACGCCGAGAGGAGTACGAT
GTCTTGATAAGAGACGCGGCAGGGACCCTGAAATGGGCGGAAAGCCAAGA
CGGAAGAACCCCCAGGAAGGTCTGTACAATGAACTTCAGAAAGATAAGATG
GCCGAAGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAAGGAGAGAGGCGCCGCGGCAAA
GGGCATGATGGACTGTATCAGGGTCTCAGTACTGCTACTAAGGACACATATG
ATGCCCTCCACATGCAGGCCCTGCCACCAAGG (서열 번호: 53)

[0140]

[0141] 일부 구현예에서, 신호전달 도메인은 서열 번호: 38에 대해 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖거나, 서열 번호: 53에 대해 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열을 포함한다.

[0142] 다른 도메인

[0143] 일부 구현예에서, AChR CAAR 및 AChR CAAR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 사람 T 세포 표면 당단백질 CD8 알파쇄 신호 펩타이드를 포함한다. 사람 CD8 알파쇄 신호 펩타이드는 T 세포 표면에 대한 수용체의 전좌에 관여한다.

[0144] 다른 구현예에서, AChR CAAR 및 AChR CAAR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 IgG 신호 펩타이드를 포함한다. 일부 구현예에서, IgG 신호 펩타이드는 ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAGGTGCCAGTGC (서열 번호: 2)를 포함하는 핵산 서열에 의해 암호화된다. 다른 구현예에서, IgG 신호 펩타이드는 MEFGLSWLFLVAILKGVQC (서열 번호: 12)의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, IgG 신호 펩타이드는 서열 번호: 2의 핵산 서열에 대해 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 암호화된다. 일부 구현예에서, IgG 신호 펩타이드는 서열 번호: 12의 아미노산 서열에 대해 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

- [0145] 일 구현예에서, AChR CAAR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 펩타이드 링커의 핵산 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, AChR CAAR은 펩타이드 링커를 포함한다. 여전히 다른 구현예에서, AChR CAAR의 세포내 신호전달 도메인 내 세포질성 신호전달 서열은 무작위로 또는 구체적인 순서로 서로에 연결될 수 있다. 임의로, 예를 들면 2 내지 10개 아미노산 길이의 짧은 올리고- 또는 폴리펩타이드 링커는 연결을 형성할 수 있다. 글리신-세린(GS) 이중선은 특히 적합한 링커이다.
- [0146] 일부 구현예에서, CAAR은 킬러 면역글로불린-유사 수용체(KIR) 계열 단백질로부터의 막관통 도메인 및/또는 세포질성(세포내) 도메인을 포함한다(도 18a 및 18b). KIR 유전자 계열은 적어도 15개의 유전자 유전자자리(KIR2DL1, KIR2DL2/L3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DL1/S1, KIR3DL2, KIR3DL3) 및 염색체 19(19q13.4)에 위치한 백혈구 수용체 복합체(Leukocyte Receptor Complex)(LRC) 내에 암호화된 2개의 슈도유전자(pseudogene)(KIR2DP1 및 KIR3DP1)를 갖는다. LRC는 명백한 Ig-유사 세포의 도메인을 지닌 다른 세포 표면 분자를 암호화하는 유전자를 함유하는 신속하게 발달하는 면역 유전자의 큰, 1 Mb의, 밀집 군집(dense cluster)를 구성한다. 또한, 연장된 LRC는 막관통 어댑터 분자(transmembrane adaptor molecule) DAP10 및 DAP12를 암호화하는 유전자를 함유한다. 따라서, KIR 막관통 도메인 및/또는 세포질성 도메인을 포함하는 본 발명의 CAAR을 포함하는 세포는 또한 DAP10 또는 DAP12를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다(도 18a 및 18b). 특징의 구현예에서, KIR은 KIRS2 또는 KIR2DS2이다.
- [0147] AChR CAAR을 포함하는 벡터
- [0148] 일 양태에서, 본 발명은 키메라 자가항체 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(CAAR)를 포함하는 벡터를 포함하고, 여기서 폴리뉴클레오타이드는 사람 AChR 자가항원 또는 이의 단편을 포함하는 세포의 도메인, 및 임의로, 막관통 도메인, 및/또는 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일 구현예에서, 벡터는 본원에 기술된 바와 같은 CAAR을 암호화하는 임의의 핵산 서열을 포함한다.
- [0149] 벡터는 시험관내 또는 생체외(ex vivo)에서 세포, 예컨대, T 세포 내로 도입될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 생체 내 또는 생체외에서 형질도입된다. 일부 구현예에서, 세포는 생체 내에서 형질도입된다. 일부 구현예에서, 본 발명의 CAAR을 암호화하는 핵산을 함유하는 벡터는 대상체에게 투여되어 생체 내에서 대상체내 세포(예컨대, T 세포, NK 세포)를 형질도입시킴으로써 생체 내에서 대상체내에서 CAAR 세포를 생성한다. 세포의 생체 내 형질도입의 예 및 세포의 생체 내 형질도입 방법은 문헌: Pfeiffer et al., EMBO Mol Med. 2018 Nov; 10(11): e9158.; 및 Agarwal et al. (2019) OncoImmunology, 8:12, DOI: 10.1080/2162402X.2019.1671761에 기술된 것을 포함한다.
- [0150] 다른 구현예에서, 벡터는 플라스미드 벡터, 바이러스 벡터, 레트로트랜스포손(retrotransposon)(예컨대, 피기백(piggyback), 슬리핑 뷰티(sleeping beauty)), 부위 지시된 삽입 벡터(예컨대, CRISPR, 아연 핑거 뉴클레아제(Zinc finger nuclease), TALEN), 또는 자살 발현 벡터, 또는 당해 분야에 공지된 다른 것을 포함한다. CRISPR, 아연 핑거 뉴클레아제, 및 치료요법에 사용될 수 있는 세포를 유전적으로 변형시키는 TALEN 유전자 편집 시스템의 사용 예는 문헌: Hoban et al., Blood 2015 Apr 23; 125(17): 2597-2604; Pino-Barrio et al., Sci. Rep., 2020 Apr 24;10(1):6997. doi: 10.1038/s41598-020-63971-z. DeWitt et al., Methods, 2017 May 15; 121-122: 9-15; 및 Rui et al., Trends Biotechnol. 2019 Mar; 37(3): 281-293에 기술된 것을 포함한다.
- [0151] 일부 구현예에서, 제3 세대 자기-불활성화(self-inactivating) 렌티바이러스 벡터 플라스미드를 사용할 수 있으며 여기서 CAR의 발현은 사람 연장 인자 1 알파 프로모터에 의해 조절된다. 이는 숙주 세포, 예컨대, 숙주 T 세포 내에서 CAR의 안정한(영구적인) 발현을 야기한다. 대안의 시도로서, 암호화 mRNA를 숙주 세포 내로 전기천공시킬 수 있으며, 이는 바이러스적으로 형질도입된 숙주 세포를 달성할 수 있지만, mRNA가 세포 분열로 희석될 수 있으므로 영구적이지 않을 수 있다.
- [0152] 본원에 개시된 모든 작제물은 제3 세대 렌티바이러스 벡터 플라스미드, 다른 바이러스 벡터, 또는 사람 세포용으로 승인된 RNA와 함께 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 벡터는 바이러스 벡터, 예를 들면, 렌티바이러스 벡터이다. 다른 구현예에서, 벡터는 RNA 벡터이다.
- [0153] AChR CAAR의 발현은 서열분석으로 입증할 수 있다. 전체 길이의 CAAR 단백질의 발현은 면역블롯(immunoblot), 면역조직화학(immunohistochemistry), 유동 세포분석법(flow cytometry) 또는 당해 분야에 잘 공지되어 이용가능한 다른 기술을 사용하여 입증할 수 있다.
- [0154] 본 발명은 또한 본 발명의 CAAR을 암호화하는 DNA가 삽입된 벡터를 제공한다. 레트로바이러스, 예를 들면, 렌티바이러스로부터 유래된 것을 포함하는 벡터는 이식유전자의 장기간의, 안정한 통합 및 딸 세포내에서 이의 증식

을 허용하므로 장기간 유전자 전달을 달성하기에 적합한 도구이다. 렌티바이러스 벡터는 비-증식 세포, 예를 들면, 간 세포를 형질도입시킬 수 있다는 점에서, 중앙-레트로바이러스, 예를 들면, 쥐 백혈병 바이러스로부터 유래된 벡터보다 추가의 장점을 갖는다. 이는 또한 이것이 도입된 대상체 내에서 낮은 면역원성을 생성하는 추가의 장점을 갖는다.

[0155] 간단히 요약하면, CAAR을 암호화하는 천연 또는 합성 폴리뉴클레오타이드의 발현은 CAAR 폴리펩타이드 또는 이의 부위를 암호화하는 핵산을 프로모터(예컨대, EF1 알파 프로코너)에 작동적으로 연결시키고, 작제물을 발현 벡터내로 혼입시킴으로써 달성된다. 벡터는 일반적으로 포유동물 세포 내에서 복제할 수 있고/있거나 포유동물의 세포 계층 내로 통합될 수 있는 것이다. 대표적인 벡터는 전사 및 해독 터미네이터, 개시 서열, 및 목적한 핵산 서열의 발현을 조절하는데 유용한 프로모터를 함유한다.

[0156] 핵산은 임의의 수의 상이한 유형의 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 예를 들면, 핵산은 벡터, 예를 들면, 그러나 이에 한정되지 않는, 플라스미드, 파아지미드, 파이지 유도체, 동물 바이러스, 및 코스미드 내로 클로닝될 수 있다. 특수한 목적의 벡터는 발현 벡터, 복제 벡터, 프로브 생성 벡터, 및 서열분석 벡터를 포함한다.

[0157] 발현 벡터는 세포에 바이러스 벡터의 형태로 제공될 수 있다. 바이러스 벡터 기술은 당해 분야에 잘 공지되어 있고 예를 들면, 문헌; Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1 -4, Cold Spring Harbor Press, NY), 및 다른 바이러스학 및 분자 생물학 매뉴얼에 기술되어 있다. 벡터로서 유용한, 바이러스는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 헤르페스 바이러스, 및 렌티바이러스를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 일반적으로, 적합한 벡터는 적어도 하나의 유기체 내에서 기능성인 복제 오리진, 프로모터 서열, 편리한 제한 엔도뉴클레아제 부위, 및 하나 이상의 선택가능한 마커를 함유한다(예컨대, 제WO 01/96584호; 제WO 01/29058호; 및 미국 특허 제6,326,193호).

[0158] 일부 구현예에서, 벡터는 트랜스포손-기반 발현 벡터(transposon-based expression vector)이다. "트랜스포손" 또는 "수송가능한 성분(transposable element)"은 계층 내에서 이의 위치를 변경할 수 있는 DNA 서열이다. 2개의 명백한 유형의 트랜스포손이 존재한다: 여기 저기 위치로 직접 이동하는 DNA를 포함하는, 제II 부류 트랜스포손; 및 DNA를 RNA로 우선 전사한 다음 역전사효소를 사용하여 RNA의 DNA 카피를 제조하여 새로운 위치로 삽입시키는, 제I 부류 트랜스포손. 트랜스포손 시스템에서, 예컨대, CAAR을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 전사단위는 트랜스포손의 말단 반복 서열에 의해 플랭킹된다. 트랜스포손은 전형적으로 트랜스포사제와 상호작용하며, 이는 말단 반복 서열을 인식하고 트랜스포손의 이동을 매개한다. 트랜스포손은 예를 들면, 동일한 벡터 상에서 CAAR로서 암호화되거나, 별개의 벡터 상에 암호화된 단백질로서 공-전달될 수 있다. 트랜스포손/트랜스포사제 시스템의 비-제한적 예는 슬리핑 뷰티(Sleeping Beauty), 피기백(Piggybac), 프로그 프린스(Frog Prince), 및 프린스 차밍(Prince Charming)을 포함한다. 트랜스포손 시스템의 예는 문헌: Ivics et al., Cell 1997 Nov 14;91(4):501-10; Ding et al., Cell. 2005 Aug 12;122(3):473-83.; Li et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Feb 5;110(6):E478-87. doi: 10.1073/pnas.1121543109; Hudecek et al., Curr Opin Genet Dev. 2018 Oct;52:100-108. doi: 10.1016/j.gde.2018.06.003; Tipanee et al., Biosci Rep. 2017 Dec 5;37(6). pii: BSR20160614. doi: 10.1042/BSR20160614; 및 VandenDriessche et al., Blood. 2009 Aug 20;114(8):1461-8. doi: 10.1182/blood-2009-04-210427에 기술된 것을 포함한다.

[0159] 추가의 프로모터 성분, 예컨대, 인헨서는 전사 개시의 빈도를 조절한다. 전형적으로, 다수의 프로모터가 최근에 출발 부위의 하부의 기능성 성분을 또한 함유하는 것으로 밝혀졌지만, 이는 출발 부위의 상부로 30 내지 110 bp 영역에 위치한다. 프로모터 성분 사이의 공간은 흔히 유연하여(flexible), 성분이 서로에 대해 삽입되거나 이동되는 경우 프로모터 기능이 보존되도록 한다. 티미딘 키나제(tk) 프로모터에서, 프로모터 성분 사이의 공간은 활성이 감소되기 시작하기 전에 50 bp 이격하여 증가될 수 있다. 프로모터에 따라, 개개의 성분은 협동적으로 또는 독립적으로 기능하여 전사를 활성화시킬 수 있는 것으로 여겨진다.

[0160] 프로모터의 예는 이미디어트 얼리 사이토메갈로바이러스(immediate early cytomegalovirus)(CMV) 프로모터 서열이다. 이러한 프로모터 서열은 이에 작동적으로 연결된 임의의 폴리뉴클레오타이드 서열의 고 수준의 발현을 구동시킬 수 있는 강력한 구성적 프로모터 서열이다. 그러나, 다른 구성적 프로모터 서열, 예를 들면, 그러나 이에 한정되지 않는 시미안 바이러스(simian virus) 40(SV40) 얼리 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스(mouse mammary tumor virus)(MMTV), 사람 면역결핍성 바이러스(human immunodeficiency virus)(HIV) 긴 말단 반복체(long terminal repeat)(LTR) 프로모터, MoMuLV 프로모터, 조류 백혈병 바이러스(avian leukemia virus) 프로모터, 엡스테인-바르(Epstein-Barr virus) 이미디어트 얼리 프로모터, 로우스 육종 바이러스(Rous sarcoma virus) 프로모터, 연장 인자-1α 프로모터 뿐만 아니라, 사람 유전자 프로모터, 예를 들면, 그러나 이에 한정되

지 않는 액틴 프로모터, 미오신 프로모터, 헤모글로빈 프로모터, 및 크레아티닌 키나제 프로모터로 사용할 수 있다. 또한, 본 발명은 제한 프로모터의 사용에 제한되지 않을 수 있다. 유도성 프로모터 또한 본 발명의 부분으로 고려된다. 유도성 프로모터의 사용은 이러한 발현이 요구되는 경우 작동적으로 연결된, 폴리뉴클레오타이드 서열의 발현을 턴 온(turn on)시킬 수 있는 분자 스위치(molecular switch), 또는 이러한 발현이 요구되지 않는 경우 발현을 턴 오프(turn off)시킬 수 있는 분자 스위치를 제공한다. 유도성 프로모터의 예는 메탈로티오닌 프로모터, 글루코코르티코이드 프로모터, 프로그스테론 프로모터, 및 테트라사이클린 프로모터를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 일부 구현예에서, 유도성 프로모터는 세포의 리간드에 대한 반응시 활성화된다. 예를 들면, 일부 구현예에서, 유도성 프로모터는 합성 수용체에 결합하는 세포의 리간드에 의해 활성화된다(및 CAAR의 발현이 조절된다). 예를 들면, 일부 구현예에서, 합성 수용체, 예컨대, 합성 노치 수용체(synthetic Notch receptor)(즉, "synNotch")가 이의 리간드에 결합된 경우 CAAR을 암호화하는 핵산 서열이 작동적으로 연결된 프로모터를 활성화시키는 결합-개시된 전사 스위치(binding-triggered transcriptional switch)로서 사용될 수 있다. 따라서, 비-제한적인 예로서, 이러한 시스템은 면역 세포가 BCR 또는 자가항체(예컨대, 이에 대해 CAAR이 결합하는)에 대해 반응성이 되도록 하기 위한 리간드(예컨대, 이에 대해 synNotch가 결합하는)의 존재를 요구할 수 있다. 분자 회로(molecular circuit)에서 특정의 신호전달 결과를 생성하기 위한 특수한 조합의 요건은 논리 게이트(logic gate)를 생성한다. 예를 들면, 문헌: Roybal et al., 2016 Cell 164(4):770-9를 참고한다.

[0161] 키메라 수용체의 발현을 발현 또는 조절하기 위한 다른 시스템의 예는 문헌: Wu et al. (2015) Science 350: aab4077; Fedorov et al. (2014) Cancer Journal 20:160-165; Kloss et al. (2013) Nature Biotechnology 31: 71-75; Sakemura et al. (2016) Cancer Immunol. Res. 4:658-668; Hill et al. (2018) Nature Chemical Biology 14:112-117; Di Stasi et al. (2011) N. Engl. J. Med. 365:1673-1683; Budde et al. (2013) PLoS One 8: e82742; Wei et al. (2012) Nature 488: 384-388; Ma et al. (2016) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 113: E450-458; Rodgers et al. (2016) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 113: E459-468; Kudo et al. (2014) Cancer Res. 74: 93-103, 및 Chen et al. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107, 8531-8536에 기술된 것을 포함한다.

[0162] CAAR 폴리펩타이드 또는 이의 부위의 발현을 평가하기 위하여, 세포 내로 도입될 발현 벡터는 또한 선택가능한 마커 유전자 또는 리포터 유전자 또는 둘 다를 함유함으로써 바이러스 벡터를 통해 형질감염되거나 감염되는 것으로 고려된 세포의 집단으로부터 발현 세포의 확인 및 선택을 촉진할 수 있다. 다른 양태에서, 선택가능한 마커는 DNA의 별도의 조각에서 수행될 수 있고 공-형질감염 과정에서 사용될 수 있다. 선택가능한 마커 및 리포터 유전자 둘 다는 적절한 조절 서열과 함께 플랜킹됨으로써 숙주 세포 내에서 발현이 가능하도록 할 수 있다. 유용한 선택가능한 마커는 예를 들면, 항생제-내성 유전자, 예를 들면, neo 등을 포함한다.

[0163] 리포터 유전자는 잠재적으로 형질감염된 세포를 확인하고 조절성 서열의 기능성을 평가하기 위해 사용한다. 일반적으로, 리포터 유전자는 수령 유기체 또는 조직 내에 존재하지 않거나 이에 의해 발현되고 이의 발현이 일부 용이하게 검출가능한 특성, 예컨대, 효소 활성에 의해 나타나는 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자이다. 리포터 유전자의 발현은 DNA가 수령 세포 내로 도입된 후 적합한 시간에 평가된다. 적합한 리포터 유전자는 루시페라제, 베타-갈락토시다제, 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제, 분비된 알칼린 포스파타제, 또는 녹색 형광성 단백질유전자를 암호화하는 유전자를 포함할 수 있다(예컨대, Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82). 적합한 발현 시스템이 또한 공지되어 있으며 공지된 기술을 사용하여 제조할 수 있거나 상업적으로 수득할 수 있다. 일반적으로, 고 수준의 리포터 유전자의 발현을 나타내는 최소의 5' 플랜킹 영역은 프로모터로서 확인된다. 이러한 프로모터 영역을 리포터 유전자에 연결하고 이를 사용하여 프로모터-구동된 전사를 조절하는 능력에 대해 체제를 평가한다.

[0164] 유전자를 세포 내로 도입하고 발현시키는 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 발현 벡터의 문맥에서, 벡터는 숙주 세포, 예컨대, 포유동물, 세균, 효모, 또는 곤충 세포 내로 당해 분야에서 임의의 방법에 의해 용이하게 도입될 수 있다. 예를 들면, 발현 벡터는 물리적, 화학적, 또는 생물학적 수단에 의해 숙주 세포 내로 형질감염될 수 있다.

[0165] 폴리뉴클레오타이드를 숙주 세포내로 도입시키기 위한 물리적 방법은 인산칼슘 침전, 지질감염, 입자 충격 (particle bombardment), 미세주입(microinjection), 전기천공(electroporation) 등을 포함한다. 벡터 및/또는 외인성 핵산을 포함하는 세포를 생산하는 방법은 당해 분야에 잘 공지되어 있다. 예를 들면, 문헌: Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1 -4, Cold Spring Harbor Press, NY를 참고한다.

- [0166] 목적한 폴리뉴클레오타이드를 숙주 세포 내로 도입시키는 생물학적 방법은 DNA 및 RNA 벡터의 사용을 포함한다. RNA 벡터는 RNA 프로모터를 갖는 벡터 및/또는 RNA 전사체의 생산을 위한 다른 관련 도메인을 포함한다. 바이러스 벡터, 및 필수적으로 레트로바이러스 벡터는 유전자를 포유동물, 예컨대, 사람 세포 내로 삽입시키는 가장 널리 사용된 방법이 되었다. 다른 바이러스 벡터는 렌티바이러스, 포크바이러스, 헤르페스 단성 바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-관련 바이러스 등으로부터 유래될 수 있다. 예를 들면, 미국 특허 제5,350,674호 및 제5,585,362호를 참고한다.
- [0167] 폴리뉴클레오타이드를 숙주 세포 내로 도입시키는 화학적 방법은 콜로이드성 분산 시스템, 예를 들면, 거대분자 복합체, 나노캡슐, 미세캡슐, 비드, 및 지질-기반 시스템, 예를 들면, 수 중 유 유액(oil-in-water emulsion), 미셀(micelle), 혼합된 미셀, 및 리포솜을 포함한다. 시험관내 및 생체 내에서 전달 비히클(vehicle)로서 사용하기 위한 예시적인 콜로이드성 시스템은 리포솜(예컨대, 인공 막 소낭)이다.
- [0168] 비-바이러스성 전달 시스템을 활용하는 경우에, 예시적인 전달 비히클은 리포솜이다. 지질 제형의 사용은 숙주 세포 내로(시험관내, 생체외 또는 생체 내) 핵산의 도입을 고려한다. 다른 양태에서, 핵산은 지질과 연합될 수 있다. 지질과 관련된 핵산은 리포솜의 수성 내부 내에 캡슐화되거나, 리포솜의 지질 이중층 내에 배치되거나, 리포솜 및 올리고뉴클레오타이드 둘 다와 관련된 연결 분자를 통해 리포솜에 부착되거나, 리포솜 내에 엔트랩(entrap)되거나, 리포솜과 복합체화되거나, 지질을 함유하는 용액 속에 분산되거나, 지질과 혼합되거나, 지질과 조합되거나, 지질 속 현탁액으로서 함유되거나, 미셀과 함께 함유 또는 복합체화되거나, 달리는 지질과 연합될 수 있다. 지질, 지질/DNA 또는 지질/발현 벡터 관련 조성물은 용액 속에 임의의 특수한 구조로 한정되지 않는다. 예를 들면, 이들은 미셀과 같은 이중 구조 속에, 또는 "붕괴된(collapsed)" 구조로 존재할 수 있다. 이는 또한 단순히 용액 속에 배치되어, 가능하게는 크기 및 형태에서 균일하지 않은 응집체를 형성할 수 있다. 지질은 지방 물질이며, 이는 천연적으로 존재하거나 합성 지질일 수 있다. 예를 들면, 지질은 세포질 속에 천연적으로 존재하는 지방 드롭렛(droplet) 뿐만 아니라 장쇄 지방족 탄화수소 및 이의 유도체, 예를 들면, 지방산, 알코올, 아민, 아미노 알코올, 및 알데하이드를 함유하는 화합물의 부류를 포함한다.
- [0169] 사용하기에 적합한 지질은 시판 공급원으로부터 입수할 수 있다. 예를 들면, 디미리스틸 포스파티딜콜린("DMPC")은 미주리주 세인트 루이스 소재의 Sigma로부터 입수할 수 있고; 디세틸 포스페이트("DCP")는 K & K Laboratories(뉴욕주 플레인뷰 소재)로부터 입수할 수 있고; 콜레스테롤("Choi")은 Calbiochem-Behring로부터 입수할 수 있고; 디미리스틸 포스파티딜글리세롤("DMPG") 및 다른 지질은 Avanti Polar Lipids, Inc.(알라바마주 버밍햄 소재)로부터 입수할 수 있다. 클로로포름 또는 클로로포름/메탄올 속의 지질의 스톱 용액은 약 -20℃에서 저장할 수 있다. 클로로포름은 메탄올보다 더 용이하게 증발하므로 유일한 용매로서 사용된다. "리포솜"은 봉입된 지질 이중층 또는 응집체의 생성에 의해 형성된 다양한 단일 및 다층라멜라 지질 비히클을 포함하는 일반적인 용어이다. 리포솜은 인지질 이중층 막 및 내부 수용 매질을 지닌 소낭 구조를 가진 것으로 특징화될 수 있다. 다층라멜라 리포솜은 수성 매질로 분리된 다층 지질 층을 가진다. 이는 인지질이 가량의 수용액 속에 현탁되는 경우 자발적으로 형성된다. 지질 구성성분은 밀폐된 구조의 형성 전에 자기-재정렬(self-rearrangement)을 겪고 지질 이중층 사이에 물 및 용해된 용질을 엔트랩한다(Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5: 505-10). 그러나, 정상의 소낭 구조보다는 용액 속에 상이한 구조를 갖는 조성물이 또한 고려된다. 예를 들면, 지질은 미셀 구조로 추정될 수 있거나 지질 분자의 비균일 응집체로서 단지 존재할 수 있다. 또한 리포펙타민-핵산 복합체가 고려된다.
- [0170] CAAR, 벡터, 및 프로모터의 임의의 도메인 및/또는 단편은 PCR 또는 당해 분야에 공지된 임의의 다른 수단에 의해 증폭된 합성된 유전자 단편일 수 있다.
- [0171] CAAR을 포함하는 세포
- [0172] 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 개시된 AChR 키메라 자가항체 수용체(CAAR)를 포함하는 유전적으로 변형된 세포를 포함한다.
- [0173] 다른 구현예에서, 유전적으로 변형된 세포는 AChR CAAR을 발현한다. 당해 구현예에서, 세포는 B 세포 또는 이의 BCR로 아직까지 하향조절되지 않은 혈장 세포로 분화된 B 세포 상에서 AChR 자가항체-기반 B 세포 수용체(BCR)에 대해 높은 친화성을 갖는다. 그 결과, 유전적으로 변형된 세포는 항-AChR B 세포의 직접적인 사멸 또는 AChR 자가항체를 발현하는 혈장 세포의 간접적인 사멸을 유도할 수 있다. 여전히 다른 구현예에서, 유전적으로 변형된 세포는 Fc 수용체에 결합된 항체에 대해 낮은 친화성을 갖는다.
- [0174] 일 구현예에서, 유전적으로 변형된 세포는 면역 세포, 예를 들면, T 세포, 단핵구, 천연 킬러(NK) 세포, 또는

사이토킨 유도된 킬러 세포이다. 일 구현예에서, 유전적으로 변형된 세포는 T 세포, 예를 들면, 헬퍼 T 세포, 세포독성 T 세포, 기억 T 세포, 조절성 T 세포, 감마 델타 T 세포, 이의 세포주, T 기억 줄기 세포, 또는 다른 T 효과기 세포이다.

[0175] 유전적으로 변형된 세포, 예컨대 T 세포가 건강한 세포에 대해 제한된 독성 및 자가항체를 발현하는 세포에 대해 특이성을 갖는 것이 또한 유용하다. 이러한 특이성은 자가항체에 대해 특이적이지 않은 현재의 치료요법에서 우세한 오프-표적 독성을 방지 또는 감소시킨다. 일 구현예에서, 유전적으로 변형된 세포, 예컨대, T 세포는 건강한 세포에 대해 제한된 독성을 갖는다. 일 구현예에서, 유전적으로 변형된 세포, 예컨대, T 세포는 자가 세포 (autologous cell)이다. 다른 구현예에서, 유전적으로 변형된 세포, 예컨대, T 세포는 동종이계 세포이다.

[0176] 일부 구현예에서, 본 발명은 시험관 내에서 분화된, 다능성 줄기 세포로부터 유래된 유전적으로 변형된 면역 세포를 포함한다. 다능성 줄기 세포의 예는 유도된 다능성 줄기 세포(induced pluripotent stem cell)(IPSC) 및 배아 줄기(ES) 세포를 포함한다. 일부 다른 구현예에서, 유전적으로 변형된 면역 세포는 다능성 줄기 세포, 예를 들면, 조혈 줄기 세포(HSC)로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 면역 세포는 유도된 다능성 줄기 세포(IPSC)로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 면역 세포는 조혈 줄기 세포(HSC) 또는 조혈 줄기 및 후대 세포(hematopoietic stem and progenitor cell)(HSPC)로부터 유래된다. 다능성 줄기 세포, 예를 들면, IPSC로부터 유래되거나 다능성 줄기 세포, 예를 들면, HSC로부터 유래된 면역 세포, 예컨대, T 세포 및 NK 세포는 문헌: Hermanson et al., Stem Cells, 2016 Jan;34(1):93-101. doi: 10.1002/stem.2230 ; Zeng et al., Stem Cell Reports. 2017 Dec 12;9(6):1796-1812. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.10.020; Equizabal et al., Front Immunol. 2014 Sep 15;5:439. doi: 10.3389/fimmu.2014.00439; Seet et al., Nat Methods. 2017 May;14(5):521-530. doi: 10.1038/nmeth.4237; Nianias et al., Curr Hematol Malig Rep. 2019; 14(4): 261-268에 기술된 것을 포함하고; 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 면역 세포는 다능성 줄기 세포로부터 유래된 T 세포 또는 NK 세포이다. 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 면역 세포는 다능성 줄기 세포로부터 유래된 T 세포 또는 NK 세포이다. 일부 구현예에서, 다능성 줄기 세포는 유도된 다능성 줄기 세포 (IPSC)이다. 일부 구현예에서, 다능성 줄기 세포는 조혈 줄기 세포(HSC)이다. 다른 구현예에서, 본 발명은 T 세포, 예를 들면, 1차 세포, 1차 T 세포로부터 유래된 확장된 T 세포, 시험관내에서 분화된 줄기 세포로부터 유래된 T 세포, T 세포주, 예를 들면, 저켓 세포, T 세포의 다른 공급원, 이의 조합, 및 다른 효과기 세포를 포함한다. 예를 들면, NFAT 반응 성분에 이어 GFP를 지닌 절두된 저켓 세포를 사용하여 AChR 특이적인 B 세포를 검출 및 단리하고 AChR 특이적인 항체 레퍼토리를 종합적이고 공평한 양식으로 클로닝할 수 있다. B 세포와 저켓 세포의 상호작용은 GFP 양성 이중선 또는 다량체로서 검출하고 유동 세포분석법으로 분류할 수 있다. B 세포 수용체 암호화 유전자의 발현 클로닝은 자가항체-매개된 신경근 연결(NMJ) 질환, 예를 들면, 중증 근무력증(MG)에서 자가면역성 및 자가항체의 역할에 대한 추가의 정보를 제공할 것이다.

[0177] 일부 구현예에서, 본 발명은 생체 내에서 유전적으로 변형된 세포, 예컨대, 대상체내에서 CAAR을 암호화하는 핵산을 함유하는 벡터를 표적 세포로 전달함으로써 생체 내에서 생성시킨 CAAR 세포를 포함한다.

[0178] 자가항체 및 혈청, 예를 들면, 그러나 이에 한정되지 않는, MG 혈청에 결합하는 CAAR의 기능적 능력은 저켓 리포터 세포주에서 평가될 수 있으며, 이는 혈소판-결합된 자가항체에 결합함에 의한 CAAR의 활성화에 의존한다 (여기에 함유된 NFAT-GFP 리포터 작제물로 인하여 활성화된 세포가 녹색으로 형광성을 띄는 반응에서). 이러한 방법은 기능성 결합능에 대한 유용하고 신뢰할만한 정성적 척도이다. 세포 표면에서 자가항원의 적절한 프로세싱이 또한 중요하며 모노클로날 항체를 사용하여 측정할 수 있다. 또한, 주요 질환 에피토프를 기반으로 한 AChR 의 트렁케이션(truncation) 또는 변형이 또한 유용하고 본원에 포함된다. 상이한 길이의 힌지 영역 또는 GS 링커를 사용한 버전이 또한 유용하다. 안전성과 관련하여, 절두된 세포 사이에 및 신경근 연결을 향한 가능한 호모필릭(homophilic) 및 헤테로필릭(heterophilic) 상호작용 및 활성화(예컨대, AChR - AChR)를 방지 또는 예방하는 것이 바람직하다.

[0179] CAAR의 효능 및 안전성의 추가의 평가를 예를 들면, 다음과 같이 수행할 수 있다:

[0180] 작제물을 사람 세포, 예를 들면, 293T/17 내로 일시적으로 형질감염시킬 수 있다. 표면 발현은 상술한 세포의 도메인, 도메인 사이의 링커, 또는 CAAR 내에 포함된 다른 구조물에 대해 특이적인 모노클로날 항체(IgG 또는 ScFv)로 검출할 수 있다. 결합은 특이적인 제2 항체로 입증하고 유동 세포분석법으로 정량할 수 있다.

[0181] 임의의 동형의 사람 항-AChR 항체의 막 발현된 작제물의 생산은 상이한 AChR-CAAR을 시험하기 위한 표적 세포로서 제공될 수 있다. 추가의 표적 세포주는 세포주(예컨대, Nalm6 또는 K562 세포)의 표면에서 사람 모노클로날 항체의 발현에 의해 요구되는 경우 생산할 수 있다.

[0182] 자가면역 질환

[0183] 본 발명은 또한 자가항체-매개된 신경근 연결(NMJ) 질환의 문맥에서 자가항체-발현 세포와 관련된 장애 또는 자가면역 질환을 방지, 치료 및/또는 관리하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 이를 필요로 하는 대상체에게 유전적으로 변형된 세포, 예컨대, 자가항체-발현 세포에 결합하는 본 발명의 CAAR을 포함하는 T 세포를 투여하는 단계를 포함한다. 일 양태에서, 대상체는 사람이다. 자가항체-매개된 NMJ 질환의 비-제한적인 예는 중증 근무력증(MG)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0184] 투여될 본 발명의 세포는 치료요법을 받는 대상체와 관련하여 자가(autologous), 동종이계 또는 이종발생성(xenogeneic)일 수 있다. 치료 방법에서, 세포, 예컨대, 대상체로부터 분리된 T 세포를 적절한 CAAR을 발현하도록 변형시킨 다음 동일한 대상체(예컨대, T 세포는 자가 T 세포이다) 내로 재주입할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포, 예컨대, T 세포는 원래의 T 세포 공여체 이외의 상이한 대상체 내로 재주입된다(예컨대, T 세포는 동종이계 T 세포이다). 변형된 세포, 예컨대, T 세포는 표적 세포, 예를 들면, AChR 자가항체를 생산하는 B 세포 또는 혈장 세포를 인식하고, 활성화되며, 자가면역 표적 세포의 사멸을 야기한다.

[0185] 재발이 자가면역 질환을 지닌 환자, 예를 들면, MG 환자에서 발생할 수 있다. 약물(예컨대, 프레드니손 또는 리톡시맵)로 처리한 환자에서, 재발은 동일한 자가항체 B 세포 클론의 지속성에 의해 매개될 수 있지만, 차도는 이러한 클론의 소멸(disappearance)과 관련되어 있다. AChR CAAR 세포, 예컨대, T 세포를 주입함으로써, 자가면역 세포를 고갈시켜, 가능하게는 AChR CAAR 세포의 오랜 지속성(longevity)으로 인하여, 예컨대, T 세포 및/또는 자가항원-반응성 클론이 다시 나타나지 않도록 함으로써 장기간 차도를 유발시킨다.

[0186] 시험관 내, 반응계내(in situ), 또는 생체 내에서 AChR CAAR을 발현하는 세포를 모니터링하기 위하여, AChR CAAR 세포는 검출가능한 마커를 추가로 발현할 수 있다. AChR CAAR이 표적에 결합하는 경우, 검출가능한 마커가 활성화되고 발현되며, 이는 당해 분야에 공지된 검정, 예를 들면, 유동 세포분석법으로 검출할 수 있다. 일 구현예에서, AChR CAAR은 NFAT 반응성 성분 및 검출가능한 마커, 예를 들면, 녹색 형광성 단백질(GFP)을 포함함으로써 AChR CAAR을 발현하는 세포를 검출 및 정량한다.

[0187] T 세포의 공급원

[0188] 일부 구현예에서, 세포, 예컨대, T 세포는 생체 외에서 형질도입된다. 확장 및 유전적 변형 이전에, T 세포(예컨대, 자가 또는 동종이계 T 세포)는 대상체로부터 취득된다. 대상체의 예는 사람, 개, 고양이, 랫트, 및 이의 유전자이식 종을 포함한다. T 세포는 다수의 공급원, 예를 들면, 피부, 말초 혈액 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직, 감염 부위로부터의 조직, 복수액, 흉막 삼출물, 비장 조직, 및 종양으로부터 취득될 수 있다. 본 발명의 특징의 구현예에서, 당해 분야에서 이용가능한 임의의 수의 T 세포주를 사용할 수 있다. 본 발명의 특징의 구현예에서, T 세포는 기술자에게 공지된 임의의 수의 기술, 예를 들면, Ficoll™ 분리를 사용하여 대상체로부터 수집한 혈액의 단위로부터 취득할 수 있다. 하나의 바람직한 구현예에서, 개체의 순환하는 혈액으로부터의 세포는 성분채집기(apheresis)로 수집된다. 성분채집기 생성물은 전형적으로 림프구, 예를 들면, T 세포, 단핵구, 과립구, B 세포, 다른 핵화된 백혈구, 적혈구, 및 혈소판을 함유한다. 일 구현예에서, 성분채집기에 의해 수집된 세포는 세척하여 혈장 분획을 제거하고 세포를 후속적인 공정 단계를 위해 적절한 완충제 또는 배지 속에 둘 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서, 세포는 인산염 완충된 염수(PBS)로 세척한다. 대안의 구현예에서, 세척 용액은 칼슘을 결여할 수 있고 마그네슘을 결여할 수 있거나 모든 이가 양이온이 아닌 경우 많은 것을 결여할 수 있다. 다시, 놀랍게도, 칼슘의 부재하에서 초기의 활성화 단계는 확대된 활성화를 초래한다. 당해 분야의 통상의 기술자가 용이하게 인식할 수 있으므로 세척 단계는 당해 분야의 기술자에게 공지된 방법에 의해, 예를 들면, 반-자동화된 "유동-통과(flow-through)" 원심분리(예를 들면, Cobe 2991 세포 프로세서, Baxter CytoMate, 또는 Haemonetics Cell Saver 5)를 제조업자의 설명서에 따라 사용함으로써 달성할 수 있다. 세척 후, 세포를 다양한 생체적합성 완충제, 예를 들면, Ca-유리된, Mg-유리된 PBS, PlasmaLyte A, 또는 완충제가 있거나 없는 염수 용액 속에 재현탁시킬 수 있다. 대안적으로, 성분채집술 샘플의 목적하지 않은 구성성분은 배양 배지 속에 직접 재현탁시킬 수 있다.

[0189] 다른 구현예에서, T 세포는 적혈구를 분해하고 단핵구를 예를 들면, PERCOLL™ 구배를 통한 원심분리에 의해 또는 역유동 원심 세정(counterflow centrifugal elutriation)에 의해 고갈시킴으로써 말초 혈액 림프구로부터 분리한다. T 세포의 구체적인 소집단, 예를 들면, CD3⁺, CD28⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺, 및 CD45RO⁺ T 세포를 양성 또는 음성 선택 기술에 의해 추가로 분리할 수 있다. 예를 들면, 일 구현예에서, T 세포는 항-CD3/항-CD28(즉, 3x28)-접합된 비드, 예를 들면, DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T와 함께 목적한 T 세포의 양성 선택에 충분한 기

간 동안 항온처리함으로써 단리한다. 일 구현예에서, 기간은 30분이다. 추가의 구현예에서, 기간은 30분 내지 36시간 또는 그 이상 및 이들 사이의 모든 정수 값이다. 추가의 구현예에서, 기간은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6시간이다. 여전히 다른 바람직한 구현예에서, 기간은 10 내지 24시간이다. 하나의 바람직한 구현예에서, 기간은 24시간이다. 일부 환자의 경우, 보다 긴 항온처리 시간, 예를 들면, 24시간의 사용은 세포 수율을 증가시킬 수 있다. 보다 긴 항온처리 시간을 사용하여 T 세포를 다른 세포형과 비교하여 T 세포가 거의 없는 어떠한 상황, 예를 들면, 면역결핍된 개체(immunocompromised individual) 내에서도 단리할 수 있다. 또한, 보다 긴 항온처리 시간의 사용은 $CD8^+$ T 세포의 포획 효율을 증가시킬 수 있다. 따라서, 시간을 단순히 단축 또는 연장 시킴으로써 T 세포가 CD3/CD28 비드에 결합하도록 하고/하거나 T 세포에 대한 비드의 비를 증가 또는 감소시킴으로써(본원에 추가로 기술된 바와 같이), T 세포의 소집단을 배양 개시에서 또는 공정 동안 다른 시점에서 우선적으로 선택할 수 있다. 또한, 비드 또는 다른 표면 상의 항-CD3 및/또는 항-CD28 항체의 비를 증가 또는 감소시킴으로써, T 세포의 소집단을 배양 시점에서 또는 다른 목적한 시점에서 우선적으로 선택할 수 있다. 기술자는 다수의 선택 라운드를 또한 본 발명의 문맥에서 사용할 수 있음을 인식할 수 있다. 특정의 구현예에서, 선택 과정을 수행하고 활성화 및 확장 공정에서 "선택되지 않은" 세포를 사용하는 것이 요구될 수 있다. "선택되지 않은" 세포는 또한 추가의 선택 라운드에 적용시킬 수 있다.

[0190] 음성 선택에 의한 T 세포 집단의 농축은 음성적으로 선택된 세포에 유일한 표면 마커로 지시된 항체의 조합을 사용하여 달성할 수 있다. 한가지 방법은 세포 분류 및/또는 음성적 자기 면역부착 또는 음성적으로 선택된 세포 상에 존재하는 세포 표면 마커로 지시된 모노클로날 항체의 각테일을 사용하는 유동 세포분석법이다. 예를 들면, 음성 선택에 의해 $CD4^+$ 세포를 농축시키기 위하여, 모노클로날 항체 각테일은 CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR, 및 CD8에 대한 항체를 포함한다. 특정의 구현예에서, 이는 $CD4^+$, $CD25^+$, $CD62L^+$, $GITR^+$, 및 $FoxP3^+$ 을 전형적으로 발현하는 조절성 T 세포에 대해 농축시키거나 이를 양성적으로 선택하는 것이 바람직할 수 있다. 대안적으로, 특정의 구현예에서, T 조절성 세포는 항-CD25 접합된 비드에 의해 또는 다른 유사한 선택 방법에 의해 고갈된다. 다른 구현예에서, T 세포의 소집단, 예를 들면, 그러나 이에 한정되지 않는 하나 이상의 표면 마커에 대해 양성이거나 이를 고 수준으로 발현하는 세포, 예컨대, $CD28^+$, $CD8^+$, $CCR7^+$, $CD27^+$, $CD127^+$, $CD45RA^+$, 및/또는 $CD45RO^+$ T 세포를 양성 또는 음성 선택 기술로 단리할 수 있다.

[0191] 양성 또는 음성 선택에 의한 세포의 목적한 집단의 단리를 위해, 세포 및 표면(예컨대, 비드와 같은 입자)의 농축을 변화시킬 수 있다. 특정의 구현예에서, 비드 및 세포가 함께 혼합되어 있는 용적을 유의적으로 감소(즉, 세포의 농도를 증가)시켜, 세포와 비드의 최대 접촉을 보증할 수 있다. 예를 들면, 일 구현예에서, 20억개의 세포/ml의 농도를 사용한다. 일 구현예에서, 10억개의 세포/ml의 농도를 사용한다. 추가의 구현예에서, 1억개 이상의 세포/ml의 농도를 사용한다. 추가의 구현예에서, 1 천만, 1천 5백만, 2천만, 2천 5백만, 3천만, 3천 5백만, 4천만, 4천 5백만, 또는 5천만개의 세포/ml의 농도를 사용한다. 여전히 다른 구현예에서, 7천 5백만, 8천만, 8천 5백만, 9천만, 9천 5백만, 또는 1억개의 세포/ml의 농도가 사용된다. 추가의 구현예에서, 1억 2천 5백만 또는 1억 5천만개의 세포/ml의 농도가 사용될 수 있다. 높은 농도의 사용은 세포 수율, 세포 활성화, 및 세포 확장을 증가시킬 수 있다. 또한, 높은 세포 농도의 사용은 목적한 표적 항원을 약하게 발현할 수 있는 세포, 예를 들면, CD28-음성 T 세포의, 또는 많은 종양 세포가 존재하는 샘플(즉, 백혈병 혈액, 종양 조직 등)로부터, 세포의 보다 효율적인 포획을 허용한다. 세포의 이러한 소집단은 치료학적 가치를 가질 수 있고 수득하기에 바람직할 수 있다. 예를 들면, 고 농도의 세포의 사용은 일반적으로 보다 약한 CD28 발현을 갖는 $CD8^+$ T 세포의 보다 효율적인 선택을 허용한다.

[0192] 관련된 구현예에서, 보다 낮은 세포의 농도를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. T 세포 및 표면(예컨대, 비드와 같은 입자)의 혼합물을 유의적으로 희석시킴으로써, 입자와 세포 사이의 상호작용을 최소화시킨다. 이는 입자에 결합될 목적한 항원을 높은 양으로 발현하는 세포를 선택한다. 예를 들면, $CD4^+$ T 세포는 고 수준의 CD28을 발현하며 희석 농도에서 및 $CD8^+$ T 세포보다 더 효율적으로 포획된다. 일 구현예에서, 사용된 세포의 농도는 5×10^6 /ml이다. 다른 구현예에서, 사용된 농도는 약 1×10^5 /ml 내지 1×10^6 /ml, 및 이들 사이의 임의의 정수 값일 수 있다.

[0193] 다른 구현예에서, 세포는 다양한 길이의 시간 동안 다양한 속도에서 2 내지 10°C 또는 실온에서 회전자(rotator) 상에서 항온처리될 수 있다.

- [0194] 자극용 T 세포는 또한 세척 단계 후 동결시킬 수 있다. 이론에 얽매이지는 않지만, 동결 및 후속적인 해동 단계는 세포 집단내 과립구 및 일부 정도까지 단핵구를 제거함으로써 보다 균일한 생성물을 제공한다. 혈장 및 혈소판을 제거하는 세척 단계 후, 세포를 동결 용액 속에서 현탁시킬 수 있다. 많은 동결 용액 및 매개변수가 당해 분야에 공지되어 있고 당해 맥락에서 유용할 것이지만, 하나의 방법은 20% DMSO 및 8% 사람 혈청 알부민을 함유하는 PBS, 또는 10% 텍스트란 40 및 5% 텍스트로스, 20% 사람 혈청 알부민 및 7.5% DMSO, 또는 31.25% Plasmalyte-A, 31.25% 텍스트로스 5%, 0.45% NaCl, 10% 텍스트란 40 및 5% 텍스트로스, 20% 사람 혈청 알부민, 및 7.5% DMSO를 함유하는 배양 배지 또는 예를 들면, Hespan 및 PlasmaLyte A를 함유하는 다른 적합한 세포 동결 배지를 사용하는 것을 포함하고, 세포는 이후 -80℃에서 분당 1°의 속도로 동결시키고 액체 질소 저장 탱크의 기체 상 속에 저장한다. 동결을 제어하는 다른 방법 뿐만 아니라 -20℃에서 또는 액체 질소 속에서 제어되지 않은 급속 동결을 사용할 수 있다.
- [0195] 특정의 구현예에서, 동결보존된 세포를 해독시키고 본원에 기술된 바와 같이 해동시키고 본 발명의 방법을 사용하여 활성화시키기 전에 실온에서 1시간 동안 정지시킨다.
- [0196] 또한 본 발명의 문맥에서 본원에 기술된 바와 같은 확장된 세포가 요구될 수 있기 전 기간에서 대상체로부터 혈액 샘플 또는 성분채집기 생성물의 수집이 고려된다. 따라서, 확장될 세포의 공급원, 및 본원에 기술된 바와 같은, T 세포 치료요법으로부터 이득이 될 수 있는 임의의 수의 질환 또는 상태에 대한 T 세포 치료요법에서 이후 사용하기 위해 분리되고 동결된, T 세포와 같은, 목적인 세포를 필요한 임의의 시점에서, 수집할 수 있다. 일 구현예에서, 혈액 샘플 또는 성분채집기를 일반적으로 건강한 대상체로부터 취한다. 특정의 구현예에서, 혈액 샘플 또는 성분채집기를 일반적으로 질환으로 진전될 위험이 있지만, 아직 질환으로 진전되지 않은 건강한 대상체로부터 취하며, 목적인 세포를 분리하여 이후 사용을 위해 동결시킨다. 특정의 구현예에서, T 세포는 후에 확장, 동결 및 사용할 수 있다. 특정의 구현예에서, 샘플은 본원에 기술된 바와 같은 특수한 질환의 진단 직후, 그러나 임의의 치료 전에 수집한다. 추가의 구현예에서, 세포는 혈액 샘플로부터 또는 임의의 수의 관련된 치료 양식, 예를 들면, 그러나 이에 한정되지 않는 제제, 예를 들면, 리툭시맙 또는 다른 항-CD20 또는 항-CD19 제제, 항-FcRn 제제, Btk 억제제, 혈장사혈(plasmapheresis), 코르티코스테로이드, 마이코페놀레이트, 아자티오프린, 메토트렉세이트, 사이클로스포린, 사이클로포스파미드를 사용한 처리 전에 대상체로부터 성분채집기로 분리한다. 이러한 약물은 예를 들면, 칼슘 의존성 포스파타제 칼시뉴린(사이클로스포린 및 FK506)을 억제할 수 있거나 성장 인자 유도된 신호전달에 중요한 p70S6 키나제(라파마이신)을 억제할 수 있다. (Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993). 다른 구현예에서, 세포는 B-세포 제거 치료요법(B-cell ablative therapy), 예컨대, 리툭산을 수반한 치료를 위해 미리 분리하여 후속 사용을 위해 동결시킬 수 있다. 추가의 구현예에서, 세포는 환자로부터 분리하고 보체 경로를 억제하는 것을 목표로 하는 치료요법을 현재 제공받는 환자에서 후속 사용을 위해 동결시킬 수 있다.
- [0197] 본 발명의 추가의 구현예에서, T 세포는 처리 이후에 환자로부터 직접 수득한다. 이와 관련하여, 특정 면역억제제 치료, 특히 면역계를 손상시키는 약물을 사용한 치료의 중지에도 이어서, 환자가 치료로부터 정상적으로 회복될 수 있는 기간 동안 치료 직후, 수득된 T 세포의 품질은 생체 외에서 확장하는 이의 능력이 최적이거나 증진될 수 있다. 유사하게, 본원에 기술된 방법을 사용한 생체 외 조작 이후에, 이러한 세포는 향상된 이식(engraftment) 및 생체 내 확장에 바람직한 상태일 수 있다. 따라서, 본 발명의 문맥 내에서, 혈액 세포, 예를 들면, T 세포, 수지 세포, 또는 조혈 계통의 다른 세포를 이러한 회복 상 동안 수집하는 것이 고려된다. 또한, 특정의 구현예에서, 가동화(mobilization)(예를 들면, GM-CSF를 사용한 가동화) 및 조건화 요법을 사용하여 특수한 세포 유형의 재집단화, 재순화, 재생, 및/또는 확장이 특히 치료요법을 수반한 정의된 시간 윈도우(window of time) 동안 선호되는 대상체에서 상태를 생성할 수 있다. 예시적인 세포형은 T 세포, B 세포, 수지 세포, 및 면역계의 다른 세포를 포함한다.
- [0198] T 세포의 활성화 및 확장
- [0199] T 세포는 예를 들면, 미국 특허 제6,352,694호; 제6,534,055호; 제6,905,680호; 제6,692,964호; 제5,858,358호; 제6,887,466호; 제6,905,681호; 제7,144,575호; 제7,067,318호; 제7,172,869호; 제7,232,566호; 제7,175,843호; 제5,883,223호; 제6,905,874호; 제6,797,514호; 제6,867,041호; 및 미국 특허원 공보 제20060121005호에 기술된 바와 같은 방법을 사용하여 일반적으로 활성화 및 확장시킨다.
- [0200] 일반적으로, 본 발명의 T 세포는 CD3/TCR 복합체 관련된 심호를 자극하는 제제 및 T 세포의 표면에서 공-자극성 분자를 자극하는 리간드에 대해 부착된 표면과 접촉시켜 확장시킨다. 특히, T 세포 집단은 본원에 기술된 바와

같이, 예를 들면, 표면에 고정된 항-CD3 항체, 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 항-CD2 항체와 접촉시키거나, 칼슘 이온투과담체(calcium ionophore)와 함께 단백질 키나제 C 활성화제(예컨대, 브리오스타틴)과 접촉시킴에 의해, 본원에 기술된 바와 같이 자극시킬 수 있다. T 세포의 표면에서 보조 분자의 공-자극을 위해, 보조 분자를 결합시키는 리간드를 사용한다. 예를 들면, T 세포의 집단을 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체와 T 세포의 증식을 자극하기에 적절한 조건 하에서 접촉시킬 수 있다. CD4⁺ T 세포 또는 CD8⁺ T 세포를 자극시키기 위해, 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체를 사용할 수 있다. 항-CD28 항체의 예는 당해 분야에 일반적으로 공지된 다른 방법(Berg *et al.*, *Transplant Proc.* 30(8):3975-3977, 1998; Haanen *et al.*, *J. Exp. Med.* 190(9):1319-1328, 1999; Garland *et al.*, *J. Immunol Meth.* 227(1-2):53-63, 1999)에서와 같이 사용될 수 있는, 9.3, B-T3, XR-CD28(Diaclone, 프랑스 베상코(Besançon) 소재)를 포함한다.

[0201] 특정의 구현예에서, T 세포에 대한 1차 자극성 신호 및 공-자극성 신호가 상이한 프로토콜에 의해 제공될 수 있다. 예를 들면, 이러한 신호를 제공하는 제제는 용액 속에 존재하거나 표면에 커플링(coupling)될 수 있다. 표면에 커플링된 경우, 제제는 동일한 표면(즉, "시스" 형성)에 또는 별도의 표면(즉, "트랜스" 형성)에 커플링될 수 있다. 대안적으로, 하나의 제제를 표면 및 용액 속의 다른 제제에 커플링시킬 수 있다. 일 구현예에서, 공-자극성 신호를 제공하는 제제는 세포 표면에 결합되며 1차 활성화 신호를 제공하는 제제는 용액 속에 존재하거나 표면에 커플링된다. 특정의 구현예에서, 제제 둘 다는 용액 속에 존재할 수 있다. 다른 구현예에서, 제제는 용해된 형태일 수 있고, 이후 표면, 예를 들면, 제제에 결합할 Fc 수용체 또는 항체 또는 다른 결합제를 발현하는 세포에 가교-결합될 수 있다. 이와 관련하여, 예를 들면, 본 발명에서 T 세포를 활성화 및 확장시키는데 사용하기 위해 고려된 인공 항원 제시 세포(artificial antigen presenting cell)(aAPC)에 대한 미국 특허원 공보 제20040101519호 및 제20060034810호를 참고한다.

[0202] 특정의 구현예에서, T 세포의 활성화 및 확장은 비-비드-기반 방법을 사용하여 수행한다. 일부 구현예에서, 방법은 T 세포 수용체 신호전달 및 공-자극을 통한 동시 자극을 기반으로 한다. 특정의 구현예에서, 방법은 용해 가능한 매트릭스(matrices)를 사용하여 가교결합을 유도한다. T 세포의 활성화 및 확장을 위한 비-비드-기반 방법의 예는 T 세포 TransActTM (Miltenyi Biotec)(<https://www.miltenyibiotec.com/upload/assets/IM0020239.PDF>); CloudzTM 세포 활성화(<https://www.rndsystems.com/products/cloudz-cell-selection-kits>); 및 가용성 항체, 예를 들면, 문헌: Li *et al.*, *Journal of Translational Medicine* volume 8, Article number: 104 (2010)에 기술된 것을 포함한다.

[0203] 일 구현예에서, 2개의 제제가 비드, 동일한 비드 상에, 즉, "시스"로 또는 별도의 비드 상에, 즉 "트랜스"로 고정된다. 예로서, 1차 활성화 신호를 제공하는 제제는 항-CD3 항체 또는 이의 항원-결합 단편이고, 공-자극성 신호를 제공하는 제제는 항-CD28 항체 또는 이의 항원-결합 단편이고; 제제 둘 다는 등가의 몰량으로 동일한 비드에 동시-고정된다. 일 구현예에서, CD8⁺ T 세포 확장 및 T 세포 성장용 비드에 결합된 각각의 항체 1:1 비가 사용된다. 일 구현예에서, CD4⁺ T 세포 확장 및 T 세포 성장용 비드에 결합된 각각의 항체 1:1 비가 사용된다. 본 발명의 특정의 양태에서, 결합된 항 CD3:CD28 항체의 비가 사용됨으로써 T 세포 확장에서의 증가가 1:1의 비를 사용하여 관찰된 확장과 비교하여 관찰된다. 하나의 특수한 구현예에서, 약 1 대 약 3배의 증가가 1:1의 비를 사용하여 관찰된 확장과 비교하여 관찰된다. 일 구현예에서, 비드에 결합된 CD3:CD28 항체의 비는 100:1 내지 1:100의 범위 및 이들 사이의 모든 정수 값이다. 본 발명의 일 양태에서, 항-CD3 항체보다 보다 많은 항-CD28 항체가 입자에 결합되는데, 즉, CD3:CD28의 비는 1 미만이다. 본 발명의 특정의 구현예에서, 비드에 결합된 항 CD28 항체 대 항 CD3 항체의 비는 2:1 이상이다. 하나의 바람직한 구현예에서, 1:100의 비드에 결합된 항체의 CD3:CD28 비가 사용된다. 다른 구현예에서, 1:75의 비드에 결합된 항체의 CD3:CD28 비가 사용된다. 추가의 구현예에서, 1:50의 비드에 결합된 항체의 CD3:CD28 비가 사용된다. 다른 구현예에서, 1:30의 비드에 결합된 항체의 CD3:CD28 비가 사용된다. 다른 바람직한 구현예에서, 1:10의 비드에 결합된 항체의 CD3:CD28 비가 사용된다. 다른 구현예에서, 1:3의 비드에 결합된 항체의 CD3:CD28 비가 사용된다. 여전히 다른 구현예에서, 3:1의 비드에 결합된 항체의 CD3:CD28 비가 사용된다.

[0204] 1:500 내지 500:1 및 이들 사이의 임의의 정수 값의 입자 대 세포의 비를 사용하여 T 세포 또는 다른 표적 세포를 자극시킬 수 있다. 당해 분야의 통상의 기술자가 용이하게 인지할 수 있는 바와 같이, 입자 대 세포의 비는 표적 세포에 대한 입자 크기에 의존할 것이다. 예를 들면, 작은 크기의 입자는 약간의 세포에만 결합할 수 있기

만, 보다 큰 입자는 많은 세포에 결합할 수 있다. 특정의 구현예에서, 세포 대 입자의 비는 1:100 내지 100:1 및 이들 사이의 임의의 정수 값이고 추가의 구현예에서, 비는 1:9 내지 9:1 및 이들 사이의 임의의 정수 값을 포함하고, T 세포를 자극시키는데 또한 사용될 수 있다. 항-CD3- 및 항-CD28-커플링된 입자 대 T 세포 자극을 야기하는 T 세포의 비는 상기 나타낸 바와 같이 변할 수 있지만, 특정의 바람직한 값은 1:100, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 및 15:1을 포함하고 하나의 바람직한 비는 세포 당 적어도 1:1 입자이다. 일 구현예에서, 1:1 이하의 입자 대 세포의 비가 사용된다. 하나의 바람직한 구현예에서, 바람직한 입자:세포 비는 1:5이다. 추가의 구현예에서, 입자 대 세포의 비는 자극 일수에 따라 변할 수 있다. 예를 들면, 일 구현예에서, 입자 대 세포의 비는 첫날에 1:1 내지 10:1이고 추가의 입자를 매일 또는 격일로 이후 10일 이하 동안 세포에 1:1 내지 1:10의 비(첨가 일에 세포 수를 기반으로 함)로 가한다. 하나의 특수한 구현예에서, 입자 대 세포의 비는 자극 첫날에 1:1이고 자극 세째날 및 다섯째 날에 1:5로 조정한다. 다른 구현예에서, 입자는 매일 또는 격일 기준으로 첫날에 1:1의 최종 비로, 및 세번째 및 다섯번째 날에 1:5의 최종 비로 가해진다. 다른 구현예에서, 입자 대 세포의 비는 자극 첫날에 2:1이고 자극 세째날 및 다섯째 날에 1:10으로 조정된다. 다른 구현예에서, 입자는 매일 또는 격일 기준으로 첫날에 최종 1:1의 비로, 및 세째날 및 다섯째날에 1:10의 비로 가해진다. 당해 분야의 기술자는 다양한 다른 비가 본 발명에서 사용하기에 적합할 수 있음을 인식할 것이다. 특히, 비는 입자 크기 및 세포 크기 및 유형에 따라 변할 것이다.

[0205] 본 발명의 추가의 구현예에서, T 세포와 같은 세포는 제제-코팅된 비드와 조합되며, 비드 및 세포는 후속적으로 분리된 다음, 세포가 배양된다. 대안의 구현예에서, 배양 전에, 제제-코팅된 비드 및 세포는 분리되지 않지만 함께 배양된다. 추가의 구현예에서, 비드 및 세포는 힘, 예를 들면, 자기력의 적용으로 추진 농축되어, 세포 표면 마커의 증가된 연결을 야기함으로써, 세포 자극을 유도한다.

[0206] 예로서, 세포 표면 단백질은 항-CD3 및 항-CD28가 부착된 상자성 비드(3x28 비드)가 T 세포와 접촉하도록 함으로써 연결될 수 있다. 일 구현예에서, 세포(예를 들면, 10^4 내지 10^9 개의 T 세포) 및 비드(예를 들면, 1:1 비에서 DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T 상자성 비드)를 완충제, 예를 들면 PBS(2가 양이온, 예를 들면, 칼슘 및 마그네슘)와 조합시킨다. 다시, 당해 분야의 통상의 기술자는 임의의 세포 농도가 사용될 수 있음을 인식할 수 있다. 예를 들면, 표적 세포는 샘플 속에서 매우 드물 수 있고 단지 0.01%의 샘플을 포함하거나 전체 샘플(즉, 100%)은 목적인 표적 세포를 포함할 수 있다. 따라서, 임의의 세포 수가 본 발명의 문맥 내에 존재한다. 특정의 구현예에서, 입자 및 세포가 함께 혼합되어(즉, 세포의 농도를 증가시켜), 세포와 입자의 최대 접촉을 보증하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들면, 일 구현예에서, 약 20억개의 세포/ml의 농도가 사용된다. 다른 구현예에서, 1억개 이상의 세포/ml가 사용된다. 추가의 구현예에서, 1천만, 1천 5백만, 2천만, 2천 5백만, 3천만, 3천 5백만, 4천만, 4천 5백만, 또는 5천만개의 세포/ml의 세포 농도가 사용된다. 여전히 다른 구현예에서, 7천 5백만, 8천만, 8천 5백만, 9천만, 9천 5백만, 또는 1억개의 세포/ml의 세포 농도가 사용된다. 추가의 구현예에서, 1억 2천 5백만 또는 1억 5천만개의 세포/ml의 농도가 사용될 수 있다. 고 농도를 사용하는 것은 증가된 세포 수율, 세포 활성화, 및 세포 확장을 야기할 수 있다. 또한, 높은 세포 농도의 사용은 목적인 표적 항원을 약하게 발현할 수 있는 세포, 예를 들면, CD28-음성 T 세포의 보다 효율적인 포획을 허용한다. 이러한 세포 집단은 치료학적 가치를 가질 수 있고 특정 구현예에서 수득하기에 바람직할 수 있다. 예를 들면, 고 농도의 세포를 사용하는 것은 일반적으로 보다 약한 CD28 발현을 가진 $CD8^+$ T 세포의 보다 효율적인 선택을 허용한다.

[0207] 본 발명의 일 구현예에서, 혼합물은 수시간(약 3시간) 내지 약 14일 또는 이들 사이의 시간 정수 값 동안 배양될 수 있다. 다른 구현예에서, 혼합물은 21일 동안 배양될 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서, 비드 및 T 세포는 약 8일 동안 함께 배양된다. 다른 구현예에서, 비드 및 T 세포는 2 내지 3일 동안 함께 배양된다. 수개의 자극 주기가 또한 요구될 수 있으므로 T 세포의 배양 시간은 60일 이상일 수 있다. T 세포 배양에 적절한 조건은 증식 및 생존에 필수적인 인자, 예를 들면, 혈청(예컨대, 태아 소 또는 사람 혈청), 인터류킨-2(IL-2), 인슐린, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF β , 및 TNF- α 또는 기술자에게 공지된 세포 성장을 위한 임의의 다른 첨가제를 함유할 수 있는 적절한 배지(예컨대, 최소 필수 배지(Minimal Essential Media) 또는 RPMI 배지 1640 또는, X-vivo 15, (Lonza))를 포함한다. 세포 성장을 위한 다른 첨가제는 표면활성제, 플라즈마네이트(plasmanate), 및 환원제, 예를 들면, N-아세틸-시스테인 및 2-머캅토에탄올을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 배지는 아미노산, 피루브산나트륨, 및 비타민이 첨가되고, 혈청이 유리되거나 적절한 양의 혈청(또는 혈장) 또는 정의된 세트의 호르몬, 및/또는 T 세포의 성장 및 확장에 충분한 양의 사이토킨(들)과 함께, RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 15, 및 X-Vivo 20, Optimizer를 포함할 수 있다. 항생제, 예컨대, 페니실린 및 스트렙토마이신이 실험 배양물 속에만 포함되며, 대상체내로 주입될 세포의 배양물에는 포

함되지 않는다. 표적 세포는 성장을 지지하기에 필수적인 조건, 예를 들면, 적절한 온도(예컨대, 37℃) 및 대기(예컨대, 공기 및 5% CO₂) 하에서 유지된다.

[0208] 다양한 자극 시간에 노출된 T 세포는 상이한 특성을 나타낼 수 있다. 예를 들면, 대표적인 혈액 또는 성분채집 기처리된 말초 혈액 단핵 세포 생성물은 세포독성 또는 억제제 T 세포 집단(T_C, CD8⁺) 보다 더 많은 헬퍼 T 세포 집단(T_H, CD4⁺)을 갖는다. CD3 및 CD28을 자극함에 의한 T 세포의 생체외(*Ex vivo*) 확장은 약 8 내지 9일 전에 T_H 세포로 주로 이루어진 T 세포의 집단을 생산하지만, 약 8 내지 9일 후, T 세포의 집단은 증가된 보다 큰 집단의 T_C 세포를 포함한다. 따라서, 처리 목적에 따라, T_C 세포 또는 T_H 세포를 주로 포함하는 T 세포 집단을 대상체에게 주입하는 것이 유리할 수 있다. 유사하게, T_C 세포의 항원-특이적인 소세트를 분리한 경우, 이러한 소세트를 보다 큰 정도로 확장시키는 것이 유리할 수 있다.

[0209] 또한, CD4 및 CD8 마커 외에, 다른 표현형적 마커는 유의적으로, 그러나 큰 부분에서, 세포 확장 과정의 과정 동안 재생적으로 변한다. 따라서, 이러한 재생산은 특수한 목적을 위해 활성화된 T 세포 생성물을 조율하는 능력이 가능하도록 한다.

[0210] 치료학적 적용

[0211] 일 양태에서, 본 발명은 대상체에서 자가항체-매개된 NMJ 질환을 치료하는 방법을 포함한다. 이러한 방법은 대상체에게 유효량의 유전적으로 변형된 세포, 예컨대, 키메라 자가항체 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(CAAR)를 포함하는 T 세포를 투여함으로써, 대상체에서 자가항체-매개된 NMJ 질환을 치료함을 포함하고, 여기서 폴리뉴클레오타이드는 아세틸콜린 수용체(AChR) 자가항원 또는 이의 단편, 및 임의로, 막관통 도메인, 공자극성 분자의 세포내 도메인, 및/또는 신호전달 도메인을 암호화한다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 KIR 성분을 추가로 암호화한다.

[0212] 다른 양태에서, 본 발명은 자가항체-매개된 NMJ 질환을 앓을 위험이 있거나 이를 앓고 있는 대상체에서 NMJ 손상을 방지 또는 감소시키는 방법을 포함한다. 이러한 방법은 대상체에게 유효량의 유전적으로 변형된 세포, 예컨대, CAAR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 T 세포를 투여함으로써 대상체에서 NMJ 손상을 방지 또는 감소시킴을 포함하고, 여기서 폴리뉴클레오타이드는 AChR 자가항원 또는 이의 단편, 및 임의로, 막관통 도메인, 공자극성 분자의 세포내 도메인, 및/또는 신호전달 도메인을 암호화한다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 KIR 성분을 추가로 암호화한다.

[0213] 일 구현예에서, 자가항체-매개된 NMJ 질환은 중증 근무력증(MG)이다. 다른 구현예에서, 대상체는 사람이다.

[0214] 어떠한 특수한 이론에 얽매이지 않고, CAAR-변형된 세포, 예컨대, T 세포에 의해 유발된 항-자가항체 면역 반응은 능동적 또는 수동적 면역 반응일 수 있다. 여전히 다른 구현예에서, 변형된 세포, 예컨대, T 세포는 B 세포를 표적화한다. 예를 들면, 자가항체를 발현하는 B 세포는 인접한 자가항체를 발현하는 세포와 이미 반응한, CAAR-제지시킨 세포, 예를 들면, T 세포에 의한 간접적인 파괴에 민감할 수 있다.

[0215] 일 구현예에서, 유전적으로 변형된 세포, 예컨대, 본 발명의 T 세포는 완전한 사람 CAAR에 의해 변형된다. 일 구현예에서, 완전한 사람 CAAR-유전적으로 변형된 세포, 예컨대, T 세포는 포유동물에서 생체 외 면역화 및/또는 생체 내 치료요법을 위한 백신 유형일 수 있다. 일 구현예에서, 포유동물은 사람이다.

[0216] 생체 외 면역화와 관련하여, 다음 중 적어도 하나가 세포를 포유동물 내로 투여하기 전에 시험관 내에서 발생한 다: i) 세포의 확장, ii) 세포 내로 CAAR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 도입, iii) 세포의 동결보존.

[0217] 생체 외 과정은 당해 분야에 잘 공지되어 있고 하기에 보다 충분히 논의된다. 요약하면, 세포를 포유동물(예컨대, 사람)로부터 분리하고 본원에 개시된 CAAR을 발현하는 핵산(예컨대, 벡터)으로 유전적으로 변형(즉, 시험관 내 형질도입 또는 형질감염)시킨다. CAAR-변형된 세포는 포유동물 수령체에게 투여되어 치료학적 이점을 제공할 수 있다. 포유동물 수령체는 사람일 수 있고 CAAR-변형된 세포는 수령체와 관련하여 자가일 수 있다. 대안적으로, 세포는 수령체와 관련하여 동종이게, 동계 또는 이종발생성일 수 있다.

[0218] 조혈 줄기 및 후대 세포의 생체 외 확장을 위한 과정은 본원에 참고로 포함된 미국 특허 제5,199,942호에 기술되어 있고, 본 발명의 세포에 적용될 수 있다. 다른 적합한 방법은 당해 분야에 공지되어 있으므로, 본 발명은 세포의 생체 외 확장의 임의의 특수한 방법에 한정되지 않는다. 요약하면, T 세포의 생체 외 배양 및 확장은:

(1) 포유동물로부터의 CD34⁺ 조절 줄기 및 후대 세포를 말초 혈액 수거물 또는 골수 이식체로부터 수집하는 단계; 및 (2) 이러한 세포를 생체 외에서 확장시키는 단계를 포함한다. 미국 특허 제5,199,942호에 기술된 세포 성장 인자 외에, 다른 인자, 예를 들면, flt3-L, IL-1, IL-3 및 c-kit 리간드를 세포의 배양 및 확장에 사용할 수 있다.

[0219] 생체 외 면역화의 측면에서 세포-기반 백신을 사용하는 것 외에, 본 발명은 또한 생체 내 면역화로 환자내에서 항체에 대해 지시된 면역 반응을 유발하기 위한 조성물 및 방법을 포함한다.

[0220] 일반적으로, 본원에 기술된 바와 같이 활성화되고 확장된 세포를 면역절충된 개체 내에서 발생하는 질환의 치료 및 방지에 활용할 수 있다. 특히, AChR CAAR-변형된 세포, 예컨대, 본 발명의 T 세포를 자가항체의 발현과 관련된 질환, 장애 및 상태의 치료에 사용한다. 특정의 구현예에서, 본 발명의 세포는 자가항체의 발현과 관련된 자가면역 NMJ 질환, 장애 및 상태로 진전될 위험이 있는 환자의 치료에 사용된다. 따라서, 본 발명은 이를 필요로 하는 대상체에게 치료학적 유효량의 본 발명의 CAAR-변형된 세포, 예컨대, T 세포를 투여함을 포함하여, 자가항체(항-AChR)의 발현과 관련된 자가면역 NMJ 질환, 장애 및 상태의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.

[0221] 본 발명의 CAAR-변형된 세포, 예컨대, T 세포는 단독으로, 또는 희석제 및/또는 다른 구성성분, 예를 들면, IL-2 또는 다른 사이토킨 또는 세포 집단과 함께 약제학적 조성물로서 투여될 수 있다. 요약하면, 본 발명의 약제학적 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 또는 생리학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 함께, 본원에 기술된 바와 같은 표적 세포 집단을 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 완충제, 예를 들면, 중성의 완충된 염수, 포스페이트 완충된 염수 등; 탄수화물, 예를 들면, 글루코스, 만토스, 슈크로스 또는 텍스트람, 만니톨; 단백질; 폴리펩타이드 또는 아미노산, 예를 들면, 글리신; 항산화제; 킬레이트제, 예를 들면, EDTA 또는 글루타티온; 보조제(adjuvant)(예컨대, 수산화알루미늄); 및 방부제를 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 일 양태에서 정맥 내 투여용으로 제형화된다.

[0222] 본 발명의 약제학적 조성물은 치료될(방지할) 질환에 대해 적절한 방식으로 투여될 수 있다. 투여량 및 빈도는, 적절한 투여량이 임상 시험에 의해 결정될 수 있지만, 환자의 상태, 및 환자 질환의 유형 및 중증도와 같은 인자에 의해 결정될 것이다.

[0223] "면역학적 유효량", "항-자가항체 유효량", "항-BCR 유효량", "자가면역 질환-억제 유효량", 또는 "치료학적 양"이 나타난 경우, 투여될 본 발명의 조성물의 정밀한 양은 환자(대상체)의 연령, 체중, 및 상태에서 개개의 차이를 고려하여 주치의에 의해 결정될 수 있다. 본원에 기술된 세포, 예컨대, T 세포를 포함하는 약제학적 조성물은 10⁴ 내지 10⁹ 개의 세포/kg의 체중, 일부 예에서 10⁵ 내지 10⁶ 개의 세포/kg의 체중, 예를 들면, 이들 범위 내의 모든 정수 값의 투여량으로 투여될 수 있다. 세포, 예컨대, T 세포, 조성물은 이러한 투여량에서 수회 투여될 수 있다. 세포는 면역치료요법에 일반적으로 공지된 주입 기술(참고, 예컨대, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988)를 사용하여 투여될 수 있다. 특수한 환자에 대한 최적의 투여량 및 치료 요법은 질환의 신호에 대해 환자를 모니터링하고 치료를 상응하게 조절함으로써 의학 분야의 기술자가 용이하게 결정할 수 있다.

[0224] 특정의 구현예에서, 활성화된 세포, 예컨대, T 세포가 대상체에게 투여된다. 투여에 이어, 혈액을 채취하거나, 성분채집기를 수행하고, 세포, 예컨대, T 세포를 활성화시키고 이로부터 본원에 기술된 방법을 사용하여 확장시킨 다음, 이를 환자에게 다시 재주입한다. 이러한 공정은 수주마다 다중 횟수로 수행할 수 있다. 특정의 구현예에서, 세포, 예컨대, T 세포는 10cc 내지 400cc의 채혈 혈액으로부터 활성화시킬 수 있다. 특정의 구현예에서, 세포, 예컨대, T 세포는 20cc, 30cc, 40cc, 50cc, 60cc, 70cc, 80cc, 90cc, 또는 100cc의 채혈 혈액으로부터 활성화된다. 이론에 얽매이지 않고, 이러한 다중 채혈/다중 재주입 프로토콜을 사용하여, 세포, 예컨대, T 세포의 특정 집단을 선택할 수 있다.

[0225] 투여될 본 발명의 세포는 치료요법을 진행 중인 대상체와 관련하여 자가, 동종이계 또는 이종발생성일 수 있다.

[0226] 본 발명의 세포의 투여는 임의의 편리한 수단, 예를 들면, 에어로졸 흡입, 주사, 섭취, 수혈, 이식(implantation) 또는 이식수술(transplantation)에 의해 수행할 수 있다. 본원에 기술된 조성물은 환자에게 경동맥으로, 피하로, 피내로, 결절내로(intramedullary), 근육내로, 피내(i.v.) 주사로, 또는 복강내로 투여될 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명의 세포, 예컨대, T 세포 조성물은 환자에게 피내 주사 또는 피하 주사로 투여된다. 다른 구현예에서, 본 발명의 세포, 예컨대, T 세포 조성물은 피하 주사로 투여된다. 세포, 예컨대, T 세포의 조성물은 림프절 내로, 또는 병리생리학적 활성의 다른 부위 내로 직접 주사될 수 있다.

- [0227] 본 발명의 특징의 구현예에서, 본원에 기술된 방법, 또는 당해 분야에 공지된 다른 방법을 사용하여 활성화되고 확장된 세포, 예컨대, 치료학적 수준으로 확장된 T 세포는 환자에게 임의의 수와 관련된 치료 양상, 예를 들면, 그러나 이에 한정되지 않는 항바이러스 치료요법, 인터류킨-2, 리툭시맵(또는 Btk 억제제 또는 다른 항-CD20/CD19 또는 B 세포 표적화제와 같은 임의의 다른 일반화된 B 세포 고갈제) 및/또는 Soliris[®] (에콜리주맵, 말단 상보성 억제제)와 같은 제제를 사용한 치료와 함께 환자에게 투여된다. 추가의 구현예에서, 본 발명의 세포, 예컨대, T 세포는 항체 항-FcRn, IVIg, 또는 혈장사혈과 함께 사용되어 치료요법 전에 항-AChR 항체 농도를 감소시킬 수 있다. 여전히 다른 구현예에서, 온화한 림프고갈 요법(예컨대, 저-용량의 플루다라빈 또는 사이토산)이 본 발명의 세포, 예컨대, T 세포를 사용한 치료에 선행될 수 있다.
- [0228] 환자에게 투여될 상기 치료의 투여량은 치료되는 상태 및 치료의 수명체의 정밀한 특성에 따라 변할 것이다. 사람 투여용의 투여량의 규모는 당해 분야에 허용된 실시예에 따라 수행될 수 있다. 예를 들어, CAMPATH에 대한 용량은 성인 환자의 경우 1 내지 약 100mg의 범위일 것이고, 일반적으로 1 내지 30일 사이의 기간 동안 매일 투여될 것이다. 바람직한 1일 용량은, 일부 예에서 1일 당 40 mg 이하에서 보다 적거나 보다 많은 용량이 사용될 수 있지만(미국 특허 제6,129,766호에 기술됨), 1일 당 1 내지 10 mg이다.
- [0229] **실험 실시예**
- [0230] 본 발명은 다음의 실험 실시예를 참고로 추가로 설명된다. 이러한 실시예는 단지 나열의 목적으로 제공되며, 달리 규정하지 않는 한 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 따라서, 본 발명은 어떠한 방식으로든 다음의 실시예에 한정되는 것으로 고려되지 않지만, 오히려 본원에 제공된 교시의 결과로서 명확해지는 임의의 및 모든 변화를 포함하는 것으로 고려되어야 한다.
- [0231] 추가의 설명없이, 당해 분야의 통상의 기술자는 선행의 설명 및 다음의 나열 실시예를 사용하여 본 발명의 화합물을 제조 및 활용할 수 있고 청구된 방법을 실시할 수 있는 것으로 여겨진다. 따라서, 다음의 작업 실시예는 본 발명의 바람직한 구현예를 구체적으로 지적하며, 본 개시내용의 나머지를 어떠한 방식으로든 제한하는 것으로 고려되지 않아야 한다.
- [0232] 본원에 개시된 실시예의 수행시 사용된 물질 및 방법이 이제 기술된다.
- [0233] **-AChR CAAR 작제물(도 1에 나타낸 바와 같음)**

[0234] #1 *pTRPE. α39P AChR.CD8H.BBz CAAR (Nucleic acid Sequence, 서열 번호: 1)*

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCA
GTGCTCCGAACATGAGACCCGCTCTGGTGGCAAAGCTATTTGGTGGCGGCT
CTCTAAAATGGAATCCAGATGACTATGGCGGTGTGAAAAAATTACGGC
TCTCTGAGTACACTGGCCACgctagcTTCTGTGCCGGTCTTCTGCCAGCGAAGC
CAACCACGACGCCAGCACCGCGACCAACACCTGCGCCACCATCGCGTC
GCAGCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCAGACCAGCAGCGGGGGGCGC
AGTGACACAGAGGGGGCTGGACTTCGCCGTGTGATATCTACATCTGGGCGGCC
TTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGC
AAGCGCGGTGCGAAGAACTGCTCTATATTTTAAACAGCCATTCATGAGAC
CTGTCCAGACCACTCAAGAGGAGGACGGATGTTCTGTAGATTTCCTGAAGA
GGAAGAGGGGGGTGCGAGCTGAGAGTAAAGTTCTCTAGAAGCGCCGATGC
CCCAGCTATCAACAGGGGCAAAATCAACTCTACACGAACCTAATCTGGGA
CGCCGAGAGGAGTACGATGTCTTGGATAAGAGACGCGGCAGGGACCCTGAA
ATGGGCGGAAAGCCAAAGACGGAAGAACCCCAAGGAAGGTCGTACAATGAA
CTTCAGAAAGATAAGATGGCCGAAGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAAGGA
GAGAGGCGCCGCGGCAAGGGCATGATGGACTGTATCAGGGTCTCAGTACTG
CTACTAAGGACACATATGATGCCCTCCACATGCAGGCCCTGCCACCAAGGTG
A (서열 번호: 1)

IgG 신호 펩타이드: 1-57 (서열 번호: 2)

α39P 분절 1: 58-93 (서열 번호: 3)

링커 1: 94-105 (서열 번호: 4)

α39P 분절 2: 106-150 (서열 번호: 5)

링커 2: 151-156

α39P 분절 3: 157-174 (서열 번호: 7)

CD8 힌지 영역: 181-345 (서열 번호: 8)

CD8 TMD (최적화된 코돈): 346-417 (서열 번호: 9)

4-1BB 도메인 (최적화된 코돈): 418-543 (서열 번호: 10)

CD3 제타 도메인 (최적화된 코돈): 544-879 (서열 번호: 53)

정지 코돈: 880-882

정지 코돈이 없는 pTRPE. α39P AChR.CD8H.BBz CAAR: 1-879 (서열 번호: 47)

[0235]

#1 pTRPE. *a39P AChR.CD8H.BBz CAAR* (아미노산 서열, 서열 번호: 11)

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSSEHEITRLVAKLFGGGSSLKWNPDDDYGGVKKIHGS
LOYTGHASFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR
 GLDFACDIYTWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKOPFMRPVQTTQE
EDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL
KRRGRDPEMGGKPRKPNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDG
 LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

IgG 신호 펩타이드: 1-19 (서열 번호: 12)

a39P 분절 1: 20-31 (서열 번호: 13)

링커 1: 32-35 (서열 번호: 14)

a39P 분절 2: 36-50 (서열 번호: 15)

링커 2: 51-52

a39P 분절 3: 53-58 (서열 번호: 17)

CD8 힌지 영역: 61-115 (서열 번호: 18)

CD8 TMD: 116-139 (서열 번호: 19)

4-1BB 도메인: 140-181 (서열 번호: 20)

CD3 제타 도메인: 182-293 (서열 번호: 38)

#2 pTRPE. *a65P AChR.CD8H.BBz CAAR* (핵산 서열, 서열 번호: 21)

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTCTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCA
 GTGCTCCGAACATGAGACCCGCTCTGGTGGCAAAGCTATTTAAAAGACTACA
GCAGCGTGGTGCGGCCAGTGGAAAGACCACCGCCAGGTCGTGGAGGTCA
C CGGTGGCGGCTCTTGGGTGGATTACAACCTAAAATGGAATCCAGATGAC
TATGGCGGTGTGAAAAAATTCACATIGGCTCTCTGCAGTACACTGGCCAC
GCTAGCTTCGTGCCGGTCTTCTGCCAGCGAAGCCAACACGACGCCAGCAC
 CGCGACCACCAACACCTGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCTGTCCCTGCG
 CCCAGAGGCGTGACAGCCAGCAGCGGGGGGCGCAGTGACACAGAGGGGGCT
 GGACTTCGCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTGGCCGGGACTGTGGGG
 TCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAAGCGCGGTGCAAGAAA
CTGCTCTATATTTTAAACAGCCATTCATGAGACCTGTCCAGACCACTCAAGA
GGAGGACGGATGTTCTGTAGATTTCCTGAAGAGGAAGAGGGGGGGTGCGA
GCTGAGAGTAAAGTTCTCTAGAAGCGCCGATGCCCCAGCCTATCAACAGGGG
 CAAAATCAACTCTACAACGAACCTAATCTGGGACGCCGAGAGGAGTACGATG
 TCTTGGATAAGAGACGCGGCAGGGACCCTGAAATGGGCGGAAAGCCAAGAC
 GGAAGAACCCCCAGGAAGGTCTGTACAATGAACCTCAGAAAAGATAAGATGG

[0236]

CCGAAGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAAGGAGAGAGGCGCCGCGGCAAAG
GGCATGATGGACTGTATCAGGGTCTCAGTACTGCTACTAAGGACACATATGA
TGCCCTCCACATGCAGGCCCTGCCACCAAGGTGA (서열 번호: 21)

IgG 신호 펩타이드: 1-57 (서열 번호: 2)

α 65P 분절 1: 58-153 (서열 번호: 22)

링커 1: 154-165 (서열 번호: 4)

α 65P 분절 2: 166-228 (서열 번호: 23)

링커 2: 229-234

α 65P 분절 3: 235-252 (서열 번호: 7)

CD8 힌지 영역: 259-423 (서열 번호: 8)

CD8 TMD (최적화된 코돈): 424-495 (서열 번호: 9)

4-1BBz 도메인 (최적화된 코돈): 496-621 (서열 번호: 10)

CD3 제타 도메인 (최적화된 코돈): 622-957 (서열 번호: 24)

정지 코돈: 958-960

정지 코돈이 없는 pTRPE. α 65P AChR.CD8H.BBz CAAR: 1-957 (서열 번호: 48)

#2 pTRPE. α 65P AChR.CD8H.BBz CAAR (*아미노산 서열, 서열 번호: 25*)

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSEHEIRLVAKLFKDYSSVVRPVEDHRQVVEVTG
GGSWYDYNLKWNPDDYGGYKKIHIGSLQYTGHASFVPVFLPAKPTITTPAPRPP
TPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYTWAPLAGTCGVLLLSLVI
TLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVOTTOEFEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSAD
APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKPNPQGLYNE
LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
(서열 번호: 25)

IgG 신호 펩타이드: 1-19 (서열 번호: 12)

α 65P 분절 1: 20-51 (서열 번호: 26)

링커 1: 52-55 (서열 번호: 14)

α 65P 분절 2: 56-76 (서열 번호: 27)

링커 2: 77-78

α 65P 분절 3: 79-84 (서열 번호: 17)

CD8 힌지 영역: 87-141 (서열 번호: 18)

[0237]

CD8 TMD: 142-165 (서열 번호: 19)

4-1BB 도메인: 166-207 (서열 번호: 20)

CD3제타 도메인: 208-319 (서열 번호: 38)

#3 pTRPE. α208 AChR CD8H.BBz CAAR (핵산 서열, 서열 번호: 28)

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCA
GTGCTCCGAACATGAGACCCGCTCTGGTGGCAAAGCTATTTAAAGACTACA
GCAGCGTGGTGC GGCCAGTGGGAAGACCACCGCCAGGTCTGGAGGTCA
CCGTGGGCCCTGCAGCTGATACAGCTCATCAATGTGGATGAAGTAAATCA
GATCGTGACAACCAATGTGCGTCTGAAACAGCAATGGGTGGATTACAAC
CTAAAATGGAATCCAGATGACTATGGCGGTGTGAAAAAAATTCACATTTC
CTTCAGAAAAGATCTGGCGCCAGACCTTGTCTCTATAACATGCAGAT
GGTGACTTTGCTATTGTCAAGTTCACCAAAAGTCTCTGCAGTACACTGG
CCACATCAGTGGACACCTCCAGCCATCTTAAAAAGCTACTGTGAGATCA
TCGTCACCCACTTTCCCTTTGATGAACAGAAGTGCAGCATGAAGCTGGG
CACCTGGACCTACGACGGCTCTGTCGTGGCCATCAACCCGGAAGCGGAC
CAGCCAGACCTGAGCAACTTCATGGAGAGCGGGGAGTGGGTGATCAAG
GAGTCCCGGGGCTGGAAGCACTCCGTGACCTATTCCTGCTGCCCCGACA
CCCCCTACCTGGACATCACCTACCATTTCGTATGCAGGCTAGCTTCGTG
CCGCTCTTCCTGCCAGCGAAGCCAACACGACGCCAGCACCCGCGACCAACAA
CACCTGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTG
CAGACCAGCAGCGGGGGCGCAGTGACACAGAGGGGGCTGGACTTCGCCTG
TGATATCTACATCTGGCGCCCTTGGCCGGACTTGTGGGTCTTCTCCTGT
CACTGGTTATCACCCTTTACTGCAAGCGGGTGCAGAAAGAACTGCTCTATATT
TTTAAACAGCCATTTCATGAGACCTGTCCAGACCACTCAAGAGGAGGACGGAT
GTTCTGTAGATTTCTGAAGAGGAAGAGGGGGGTGCGAGCTGAGAGTAAA
GTTCTCTAGAAGCGCCGATGCCCCAGCCTATCAACAGGGGCAAAATCAACTC
TACAACGAACCTTAATCTGGGACGCCGAGAGGAGTACGATGTCTTGGATAAGA
GACGCGGCAGGGACCCTGAAATGGCGGAAAGCCAAGACGGAAGAACCCCC
AGGAAGGTCTGTACAATGAACCTCAGAAAGATAAGATGGCCGAAGCCTACA
GCGAGATCGGCATGAAAGGAGAGAGCGCCGCGCAAAGGGCATGATGGAC
TGTATCAGGGTCTCAGTACTGCTACTAAGGACACATATGATGCCCTCCACATG
CAGGCCCTGCCACCAAGGTGA (서열 번호: 28)

IgG 신호 펩타이드: 1-57 (서열 번호: 2)

α208 AChR ECD: 58-681 (서열 번호: 29)

CD8 힌지 영역: 688-852 (서열 번호: 8)

CD8 TMD (최적화된 코돈): 853-924 (서열 번호: 9)

[0238]

4-1BB 도메인 (최적화된 코돈): 925-1050 (서열 번호: 10)

CD3 제타 도메인 (최적화된 코돈): 1051-1386 (서열 번호: 24)

정지 코돈: 1387-1389

정지 코돈이 없는 pTRPE. α208 AChR.CD8H.BBz CAAR: 1-1386 (서열 번호: 49)

#3 pTRPE. α208 AChR.CD8H.BBz CAAR (*아미노산 서열, 서열 번호: 30*)

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSEHETRLVAKLFKDYSSVVRPVEDHRQVVEVTY
GLQLIQLINVDEVNQIVTINVRKQQWVDYNLKWNPDDYGGVKKIHIPSEK
IWRPDLVLYNADGDFAIKFKTKVLLQYTGHIWTPPAIFKSYCEIIVTHFPF
DEQNC~~SMKLGTWYDGSVVA~~INPESDQPDLSNFMESGEWVIKESRGWKHS
VTYSCCPDTPYLDITYHFVMQASFPVPFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYTWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLL
YIFKOPFMRPVQITQEEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQL
YNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS
EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (서열 번호: 30)

IgG 신호 펩타이드: 1-19 (서열 번호: 12)

α208 AChR ECD: 20-227 (서열 번호: 31)

CD8 힌지 영역: 230-284 (서열 번호: 18)

CD8 TMD: 285-308 (서열 번호: 19)

4-1BB 도메인: 309-350 (서열 번호: 20)

CD3 제타 도메인: 351-462 (서열 번호: 38)

#4 pTRPE. α210 AChR.CD8H.BBz CAAR (*핵산 서열, 서열 번호: 32*)

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTCTTGTTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCA
GTGCTCCGAACATGAGACCCGCTCTGGTGGCAAAGCTATTTAAAAGACTACA
GCAGCGTGGTGGCGCCAGTGGAAGACCACCGCCAGGTCTGTGGAGGTCA
CCGTGGGCTGCGCTGATACAGCTCATCAATGTGGATGAAGTAAATCA
GATCGTGACAACCAATGTGCGTCTGAAACAGCAATGGGTGGATTACAAC
CTAAATGGAATCCAGATGACTATGGCGGTGTGAAAAAATTCACATTC
CTTCAGAAAAGATCTGGCGCCAGACCTTGTCTCTATAACAATGCAGAT
GGTGACTTTGCTATTGTCAAGTTCACCAAAGTGCTCCTGCAGTACACTGG
CCACATCACGTGGACACCTCCAGCCATCTTTAAAAGCTACTGTGAGATCA

[0239]

TCGTCACCCACTTTCCCTTTTGATGAACAGAACTGCAGCATGAAGCTGGG
CACCTGGACCTACGACGGCTCTGTCTGGCCATCAACCCGAAAAGCGAC
CAGCCAGACCTGAGCAACTTCATGGAGAGCGGGGAGTGGGTGATCAAG
GAGTCCCGGGGCTGGAAGCACTCCGTGACCTATTCTGTGCCCCGACA
CCCCCTACCTGGACATCACCTACCCTTCGTCATGCAGCGCTGGCTAGC
 TTCGTGCCGGTCTTCTGCCAGCGAAGCCAACCACGACGCCAGCACCCGCGAC
 CACCAACACCTGCGCCCAACATCGCGTCCGAGCCCTGTCCCTGCGCCAGA
 GGCGTGCAGACCAGCAGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTT
 CGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGTCTTC
 TCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAAGCGCGGTCCGAAGAACTGCTC
TATATTTTAAACAGCCATTCATGAGACCTGTCCAGACCACTCAAGAGGAGG
ACGGATGTTCTGTAGATTTCCTGAAGAGGAAGAGGGGGGTGCGAGCTGAG
 AGTAAAGTTCTCTAGAAGCGCCGATGCCCCAGCCTATCAACAGGGGCAAAAT
 CAACTCTACAACGAACCTTAATCTGGGACGCCGAGAGGAGTACGATGCTTGG
 ATAAGAGACGCGGCAGGGACCTGAAATGGGCGGAAAGCCAAGACGGAAGA
 ACCCCCAGGAAGGTCTGTACAATGAATTCAGAAAGATAAGATGGCCGAAGC
 CTACAGCGAGATCGCATGAAAGGAGAGAGCGCCGCGCAAGGGCATGA
 TGGACTGTATCAGGGTCTCAGTACTGCTACTAAGGACACATATGATGCCCTCC
 ACATGCAGGCCCTGCCACCAAGGTGA (서열 번호: 32)

IgG 신호 펩타이드: 1-57 (서열 번호: 2)

α210 AChR ECD: 58-687 (서열 번호: 33)

CD8 힌지 영역: 694-858 (서열 번호: 8)

CD8 TMD (최적화된 코돈): 859-930 (서열 번호: 9)

4.1BB 도메인 (최적화된 코돈): 931-1056 (서열 번호: 10)

CD3 제타 도메인 (최적화된 코돈): 1057-1392 (서열 번호: 24)

정지 코돈: 1393-1395

정지 코돈이 없는 pTRPE. α210 AChR.CD8H.BBz CAAR: 1-1392 (서열 번호: 50)

#4 pTRPE. α210 AChR.CD8H.BBz CAAR (*아미노산 서열, 서열 번호: 34*)

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSEHETRLVAKLFKDYSSVVRPVEDHRQVVEVTV
GLQLIQLINLDEVNQIVTINVRLKQQWVDYNLKWNPDDYGGVKKIHIPSEK
IWRPDLVLYNNADGDFAIKFKVLLQYTGHIITWTPPAIFKSYCEIIVTHFPF
DEQNCSMKLGTWYDGSVVAINPESDQPDLSNFMESGEWVIKESRGWKHS
VTYSCCPDTPYLDITYHFVMQRLASFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS
LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVIITLYCKRGRKKL
LYIFKQPFMRPVQITQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQL

[0240]

YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS
EIGMKGERRRRGKGDGLYQGLSTATKDYDALHMQALPPR (서열 번호: 34)

IgG 신호 펩타이드: 1-19 (서열 번호: 12)

α210 AChR ECD: 20-229 (서열 번호: 35)

CD8 힌지 영역: 232-286 (서열 번호: 18)

CD8 TMD: 287-310 (서열 번호: 19)

4-1BB 도메인: 311-352 (서열 번호: 20)

CD3 제타 도메인: 353-464 (서열 번호: 38)

#5 pTRPE. α210 AChR gs.BBz CAAR (**핵산 서열, 서열 번호: 36**)

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCA
GTGC**TCCGAACATGAGACCCGCTGGTGGCAAAGCTATTTAAAGACTACA**
GCAGCGTGGTGGCGCCAGTGGAAAGACCACCGCCAGGTGCTGGAGGTCA
CCGTGGGCGCTGAGCTGATACAGCTCATCAATGTGGATGAAGTAAATCA
GATCGTGACAACCAATGTGCGTCTGAAAACAGCAATGGGTGGATTACAAC
CTAAAATGGAATCCAGATGACTATGGCGGTGTGAAAAAAATTCACATTC
CTTCAGAAAAGATCTGGCGCCAGACCTTGTTCTCTATAACAATGCAGAT
GGTGAATTTGCTATTTGTCAAGTTCACCAAAGTGCTCCTGCAGTACACTGG
CCACATCACGTGGACACCTCCAGCCATCTTTAAAAGCTACTGTGAGATCA
TCGTCACCCACTTTCCCTTTGATGAACAGAACTGCAGCATGAAGCTGGG
CACCTGGACCTACGACGGCTCTGTCGTGGCCATCAACCCGAAAAGCGAC
CAGCCAGACCTGAGCAACTTCATGGAGAGCGGGGAGTGGGTGATCAAG
GAGTCCCGGGGCTGGAAGCACTCCGTGACCTATTCCTGTGCTGCCCCGACA
CCCCCTACCTGGACATCACCTACCACTTCGTCATGCAGCGCCTGGCTAGC
GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCCGCCGAATCTACATCTGGGCGC
CCTTGGCCGGGACTTGTGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACT
GCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCAATTTATGAG
ACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAA
GAAGAAGAAGGAGGATGTGAAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGAC
GCCCCCGGTACACGACGGGCCAGAACCCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAG
GACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCCTG
AGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATG
AACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAAG
GCGAGCGCCGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTA
CAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCG
CTAA (서열 번호: 36)

IgG 신호 펩타이드: 1-57 (서열 번호: 2)

[0241]

α210 AChR ECD: 58-687 (서열 번호: 33)

GS 링커: 694-723 (서열 번호: 37)

CD8 TMD: 730-801 (서열 번호: 9)

4-1BB 도메인: 802-927 (서열 번호: 16)

CD3 zeta 도메인: 928-1263 (서열 번호: 24)

정지 코돈: 1264-1266

정지 코돈이 없는 pTRPE. α210 AChR_{gs.BBz} CAAR: 1-1263 (서열 번호: 51)

#5 pTRPE. α210 AChR_{gs.BBz} CAAR (*아미노산 서열, 서열 번호: 39*)

MEFGLSWLFLVAILKGVQCS**EHETRLVAKLFKDYSSVVRPVEDHRQVVEVTV**
GLQLIQLINVDEYNQIVTINVRLKQQWVDYNLKWNPDDYGGVKKIHIPSEK
IWRPDLVLYNNADGDEAIVKFKVLLQYTGHIWTPPAIFKSYCEIIVTHFPE
DEQNCSMKLGITWYDGSVVAINPESDQPDLSNFMESGEWVIKESRGWKHS
VTYSCCPDIPYLDITYHFVMQRLASGGGGSGGGSSGIYIWAPLAGTCGVLLL
SLVTILYCKRGRKKLLYIFKOPFMRPVQTTQEEFGCSCRFEEEEGGCELRVKFSR
SADAPAYQQGQNLNLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG
YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP
PR (서열 번호: 39)

IgG 신호 펩타이드: 1-19 (서열 번호: 12)

α210 AChR ECD: 20-229 (서열 번호: 35)

GS 링커: 232-241 (서열 번호: 40)

CD8 TMD: 244-265 (서열 번호: 19)

4-1BB 도메인: 266-309 (서열 번호: 20)

CD3 제타 도메인: 310-421 (서열 번호: 38)

#6 pTRPE. α211 AChR_{CD8H.BBz} CAAR (*핵산 서열, 서열 번호: 41*)

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCA
GTGCTCCGAACATGAGACCCGTCTGGTGGCAAAGCTATTTAAAGACTACA
GCAGCGTGGTGGCGCCAGTGGAAGACCACCGCCAGGTCGTGGAGGTCA
CCGTGGGCGCTGCAGCTGATACAGCTCATCAATGTGGATGAAGTAAATCA
GATCGTGACAACCAATGTGCGTCTGAAACAGCAATGGGTGGATTACAAC

[0242]

CTAAATGGAATCCAGATGACTATGGCGGTGTGAAAAAATTCACATT
CTTCAGAAAAATCTGGCGCCAGACCTTGTCTCTATAACAATGCAGAT
GGTGACTTTTGCTATTGTCAAGTTCACCAAAGTGCTCCTGCAGTACACTGG
CCACATCACGTGGACACCTCCAGCCATCTTTAAAAGCTACTGTGAGATCA
TCGTACCCCACTTTCCCTTTGATGAACAGAACTGCAGCATGAAGCTGGG
CACCTGGACCTACGACGGCTCTGTCTGGCCATCAACCCGGAAGCGAC
CAGCCAGACCTGAGCAACTTCATGGAGAGCGGGGAGTGGGTGATCAAG
GAGTCCCGGGGGCTGGAAGCACTCCGTGACCTATTCCTGCTGCCCCGACA
CCCCCTACCTGGACATCACCTACCACCTTCGTATGCAGCGCCTGCCCGCT
AGCTTCGTGCCGGTCTTCCTGCCAGCGAAGCCAACACGACGCCAGCACCGC
GACCACCAACACCTGCGCCACCAATCGCGTTCGACGCCCTGTCCCTGCGCCC
AGAGGCGTGCAGACCAGCAGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGA
CTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGTCC
TTCCTCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACTGCAAGCGCGGTTCGCAAGAACTG
CTCTATATTTTTAAACAGCCATTTCATGAGACCTGTCCAGACCACTCAAGAGGA
GGACGGATGTTCTGTAGATTTCCTGAAGAGGAAGAGGGGGGGTGCAGCTG
AGAGTAAAGTTCTCTAGAAAGCGCCGATGCCCGAGCCTATCAACAGGGGCAAA
ATCAACTCTACAACTTAATCTGGGACGCCGAGAGGAGTACGATGTCTT
GGATAAGAGACGCGGCAGGGACCCTGAAATGGGCGGAAAGCCAAGACGGAA
GAACCCCAAGGAAGGTCTGTACAATGAACCTCAGAAAAGATAAGATGGCCGA
AGCTACAGCGAGATCGGCATGAAAGGAGAGAGGCGCCGCGCAAGGGCA
TGATGGACTGTATCAGGGTCTCAGTACTGCTACTAAGGACACATATGATGCC
CTCCACATGCAGGCCCTGCCACCAAGGTGA (서열 번호: 41)

IgG 신호 펩타이드: 1-57 (서열 번호: 2)

α211 AChR ECD: 58-690 (서열 번호: 42)

CD8 힌지 영역: 697-861 (서열 번호: 8)

CD8 TMD (최적화된 코돈): 862-933 (서열 번호: 9)

4-1BB 도메인 (최적화된 코돈): 934-1059 (서열 번호: 10)

CD3 제타 도메인 (최적화된 코돈): 1060-1395 (서열 번호: 53)

정지 코돈: 1396-1398

정지 코돈이 없는 pTRPE. α211 AChR.CD8H.BBz CAAR: 1-1395 (서열 번호: 52)

#6 pTRPE. α211 AChR.CD8H.BBz CAAR (*아미노산 서열, 서열 번호: 43*)

MEFGLSWLFLVAILKGVQCS**SEHE**IRLVAKLFKDYSSVVRPVEDHROVVEVTY
GLQLIQLINVDENVQIVTINVRKQQWYDYNLKWNPDDYGGVKKIHIPSEK
IWRPDLVLYNNADGDFAIVKFKVLLQYTGHTWTPPAIFKSYCEIIVTHFPF
DEQNCSMKLGWTYDGSVVAINPESDQPDLSNFMESGEWVIKESRGWKHS

[0243]

VTYSCCPDTPYLDITYHFVMQRLPASFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTASQP
LSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRK
KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEFGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQN
QLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRKPNQEGLYNELQKDKMAEA
 YSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (서열 번호: 43)

IgG 신호 펩타이드: 1-19 (서열 번호: 12)

α211 AChR ECD: 20-230 (서열 번호: 44)

CD8 힌지 영역: 233-287 (서열 번호: 18)

CD8 TMD: 288-311 (서열 번호: 19)

4-1BB 도메인: 312-353 (서열 번호: 20)

CD3 제타 도메인: 354-465 (서열 번호: 38)

#7 pTRPE. α211 AChR_{gs}.BBz CAAR (핵산 서열, 서열 번호: 45)

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCA
 GTGCTCCGAACATGAGACCCGCTCTGGTGGCAAAGCTATTTAAAGACTACA
 GCAGCGTGGTGGCGCCAGTGGGAAGACCACCGCCAGGTCGTGGAGGTCA
CCGTGGGCTGACGCTGATACAGCTCATCAATGTGGATGAAGTAAATCA
GATCGTGACAACCAATGTGCGTCTGAAACAGCAATGGGTGGATTACAAC
CTAAAATGGAATCCAGATGACTATGGCGGTGTGAAAAAATTCACATTC
CTTCAGAAAAGATCTGGCGCCAGACCTTGTCTCTATAACAATGCAGAT
GGTGACTTTTGCTAATGTCAAGTTCACCAAAGTGCTCCTGCAGTACACTGG
CCACATCAGTGACACCTCCAGCCATCTTTAAAAGCTACTGTGAGATCA
TCGTACCCCACTTTCCCTTTGATGAACAGAACTGCAGCATGAAGCTGGG
CACCTGGACCTACGACGGCTCTGTCTGGCCATCAACCCGGAAGCGAC
CAGCCAGACCTGAGCAACTTCATGGAGAGCGGGGAGTGGGTGATCAAG
GAGTCCCGGGGCTGGAAGCACTCCGTGACCTATTCCTGCTGCCCGACA
CCCCCTACCTGGACATCACCTACCACTTCGTCAATGCAGCGCCTGCCCGCT
 AGCGGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCTCCGGAATCTACATCTGGG
 CGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCTCTGCACTGGTTATCACCCCTT
 ACTGCAAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATTTCAAACAACCATTTAT
 GAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCTCA
 GAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAAGTGAAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCA
 GACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACAGCTCTATAACGAGCTCAATC
 TAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACC
 CTGAGATGGGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCTGTACA
 ATGAAGTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGA
 AAGCGAGCGCCGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTACCAGGGTCTCA

[0244]

GTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCC
TCGCTAA (서열 번호: 45)

IgG 신호 펩타이드: 1-57 (서열 번호: 2)

α 211 AChR ECD: 58-690 (서열 번호: 42)

GS 링커: 697-726 (서열 번호: 37)

CD8 TMD: 733-804 (서열 번호: 9)

4-1BB 도메인: 805-930 (서열 번호: 16)

CD3 제타 도메인: 931-1266 (서열 번호: 24)

정지 코돈: 1267-1269

정지 코돈이 없는 pTRPE. α 211 AChR_{gs}.BBz CAAR: 1-1266 (서열 번호: 6)

#7 pTRPE. α 211 AChR_{gs}.BBz CAAR (*아미노산 서열, 서열 번호: 46*)

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSEHEITRLVAKLFKDYSSVVRPVEDHRQVVEVTV
GLQLIQLINVDEVNQIVTINVRLKQOWVDYNLKWNPDDYGGVKKIHIPSEK
IWRPDLVLYNNADGDFAIKFKIKVLLQYTGHIWTPPAIFKSYCEIIVTHFPF
DEQNC~~SMKLG~~ITWYDGSVVAINPESDQPDLSNFMESGEWVIKESRGWKHS
VTYSCCPDTPYLDITYHFVMQRLPASGGGGSGGGSGGGSGIYIWAPLAGTCGVLL
LSLVITLYC~~KRGRKKLL~~YIFKQPFMRPVOTTQEFEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFS
RSADAPAYQGGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPMMGGKPRRKNPQEG
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL
PPR (서열 번호: 46)

IgG 신호 펩타이드: 1-19 (서열 번호: 12)

α 211 AChR ECD: 20-230 (서열 번호: 44)

GS 링커: 233-242 (서열 번호: 40)

CD8 TMD: 245-268 (서열 번호: 19)

4-1BB 도메인: 269-310 (서열 번호: 20)

CD3 제타 도메인: 311-422 (서열 번호: 38)

[0245]

[0246] [표 1]

항-AChR 항체의 설명 (약 결합된 B 세포 수용체 +/- 분비된 항체로서 표적 세포

내에서 발현됨)

	속 주	면역원	에피토프 ($\alpha 1$)	결합 친화 성 (K_D , nM)	AChR 반응성	EAMG
mAb 35	랫 트	엘렉트로포루스 엘렉트리쿠스(<i>Electrophorus electricus</i>) 근육 ¹	MIR (1-14, 66-76) ²	2.06 ³	사람, 마우스, 랫트, 닭	랫트/마우스
mAb 192	랫 트	사람 근육 ²	1-32, 66-76 MIR에 부분 의존성(mA b 35와 경쟁함) ³	0.007 ³	사람, 마우스 >>랫 트	
mAb 195	랫 트	사람 근육 ²	MIR ² (23, 66-76)	0.01 ⁴	사람, 소	랫트 ⁵
mAb 637	사 람 홍 선	MG 환자-유래됨 ⁶	MIR (1-32, 66-76) ³	0.005 ³	사람	원숭이 ⁷

1. Tzartos et al, 1981. JBC, 256:8635-8645.
2. Tzartos et al, 1983. FEBS Letters, 157:116-118.
3. Luo et al, 2009. J Neurosci, 29:13898-13908.
4. Kontou et al, 1996. FEBS Letters, 389:195-198
5. Papanastasiou et al, J Neuroimmunol, 104:124-32.
6. Graus et al, 1997. Immunol Lett. 57:59-62.
7. Van der Neut Kolfchoten et al, 2007. Science, 317:1554-1557.

[0247]

[0248] 엘렉트로포루스 엘렉트리쿠스(*Electrophorus electricus*) 전기 기관 근육형 니코틴성 AChR로 면역화시킨 후 하 이브리도마로서 단리한, 하이브리도마 mAb35를 AChR의 알파 소단위의 주요 면역원성 영역(MIR)에 결합시키고 닭, 랫트, 마우스 및 사람 AChR과 교차-반응시켰다. 이는 천연의 알파 1 AChR 소단위에 대해 2.06 nM의 K_D 로 결합하였지만 변형된 AChR에는 결합하지 않았다. 이는 랫트 및 마우스 숙주 둘 다에서 수동적 전달 실험적 자가면역 중증 근무력증(EAMG) 모델에서 근무력증발생 유전성(myasthenogenic)이다.

[0249] mAbs 192 및 195를 정제된 사람 근육 추출물로 면역화시킨 후 랫트로부터 단리하였다. mAb 192는 알파 1 AChR 소단위에 대해 0.007 nM의 K_D 로 천연의 AChR와 결합하였지만 변형된 AChR과는 결합하지 않았다. mAb 195는 알파 1 AChR 소단위에 대해 0.01 nM의 K_D 로 결합하며 랫트 수동적 전달 모델에서 근무력증발생유전성이다.

[0250] mAb 637는 단리된 림프구의 파아지 디스플레이(phage display)에 의해 MG 환자로부터 단리하였다. 이는 알파 1 AChR 소단위에 대해 0.005 nM의 K_D 로 결합한다.

[0251] 실험의 결과를 이제 기술한다.

[0252] 본 발명은 MG를 치료하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

- [0253] 실시예 1: α 39P 및 α 65P AChR CAART 세포
- [0254] MG 환자로부터의 자가항체는 AChR 군집 및 NMJ를 파괴하는 것으로 알려져 있다. 항-AChR 항체는 AChR 군집을 방해한다. AChR는 다중소단위 구조이다. 병원성 자가항체는 주요 면역원성 영역(main immunogenic region)(MIR)으로 불리는 알파 소단위의 아미노-말단 도메인 내 정의된 영역을 주로 표적화한다.
- [0255] 도 1은 본 발명의 CAAR 중 일부의 개략도이고, 이의 세포외 도메인(ECD)은 AChR의 알파 소단위의 주요 면역원성 영역(Main Immunogenic Region)(MIR)의 분절 모사체(segmental mimic), MG 내 자가항체의 주요 표적에 이어, CD8 힌지 도메인, CD8 막관통 도메인(TMD), 및 탄뎀 세포질성 신호전달 도메인 4-1BB 및 CD3 ζ (BBZ)를 포함한다. α 65P는 α 39P와 비교하여 추가의 EC1 도메인 서열을 혼입한다.
- [0256] 도 2a 및 2b에 나타낸 바와 같이, α 39P 및 α 65P AChR CAAR은 항-AChR 알파 소단위 모노클로날 항체 210(mAb 210)을 사용한 염색에 의해 나타난 바와 같이, 저켓 및 T 세포의 표면에서 발현되었다. 저켓 및 CD3⁺ T 세포는 렌티바이러스를 사용하여 형질도입시켰다. 유동 세포분석법 분석을 형질도입 후 3일째(저켓 세포) 또는 5일째(주요 사람 CD3⁺ T 세포)에서 수행하였다.
- [0257] α 39P 및 α 65P AChR CAAR 저켓 NFAT-GFP 세포는 TIB-175(ATCC, mAb 35 하이브리도마 세포, <https://www.atcc.org/Products/All/TIB-175.aspx>)를 인식하였으며, 이는 도 3a 및 3b에 나타낸 바와 같이, 표면 항-AChR IgG를 발현하고 동물 모델에서 근무력증발생유전성인 항체를 분비한다. "TIB-175" 및 "mAb 35 하이브리도마 세포"는 TIB-175 세포를 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 유동 세포분석법 분석을 mAb 35 하이브리도마 세포와의 공-배양 후 12시간째에 수행하였다. 저켓 NFAT-GFP 세포는 TCR 신호전달이 형질도입된 경우 GFP 발현을 유도한다.
- [0258] α 39P AChR CAAR 저켓 NFAT-GFP 세포는 도 4에 나타낸 바와 같이, Nalm6 195를 인식하였지만, 상이한 에피토프를 표적화하는 항-AChR 항체를 발현하도록 가공된 사람 B 세포주인 Nalm6 192를 인식하지 않았다. 유동 세포분석법 분석을 Nalm6, Nalm6 192, 또는 Nalm6 195 세포와 공-배양 후 12시간째에 수행하였다. 저켓 세포를 항-CD3-AF647 항체로 염색하여 이를 Nalm6 세포 집단으로부터 구별하였다. Nalm6 세포는 CBG(클릭 딱정벌레 녹색 루시페라제, 이의 방출 스펙트럼은 GFP 채널내로 오버랩된다) 및 GFP를 구성적으로 발현한다. CD3⁺(저켓 세포)-게이팅된 플롯(gated plot)은 하단 패널에 나타난다. 저켓 NFAT-GFP 세포는 TCR 신호전달이 형질도입된 경우 GFP 발현을 유도한다.
- [0259] α 65P AChR CAAR 저켓 NFAT-GFP 세포는 도 5에 나타낸 바와 같이, Nalm6 195 및 Nalm6 192 둘 다를 인식하였다. 유동 세포분석법 분석을 Nalm6 192 또는 Nalm6 195 세포와 공-배양 후 12시간째에 수행하였다. 저켓 세포를 항-CD3-AF647 항체로 염색하여 이를 Nalm6 세포 집단으로부터 구별하였다. Nalm6 세포는 CBG(클릭 딱정벌레 녹색 루시페라제, 이의 방출 스펙트럼은 GFP 채널 내로 오버랩된다) 및 GFP를 구성적으로 발현한다. CD3⁺(저켓 세포)-게이팅된 FACS 플롯은 하단 패널에 나타난다. 저켓 NFAT-GFP 세포는 TCR 신호전달이 형질도입된 경우 GFP 발현을 유도한다.
- [0260] 실시예 2: α 39P 및 α 65P AChR CAART 사멸 검정
- [0261] α 39P AChR-CAART 및 α 65P AChR-CAART 세포는 도 6에 나타낸 바와 같이, 루시페라제-기반 사멸 검정에서, mAb 35 하이브리도마 세포 및 Nalm6 195 세포를 사멸시켰지만, α 65P AChR-CAART 세포 만은 Nalm6 192 세포를 사멸시킬 수 있다. 루시페라제-기반 사멸 검정은 다음과 같이 수행하였다: T 세포(NTD, α 39P, 및 α 65P)를 15 내지 24시간 동안 각각의 표적 세포(mAb 35 하이브리도마 세포, Nalm6 192, 및 Nalm6 195)와 10:1 E:T의 비에서 공-배양하였다. 특이적인 분해 % = [(시험 세포 사멸 - 자발적인 세포 사멸)/(최대 세포 사멸 - 자발적인 세포 사멸)] * 100. 자발적인 세포 사멸: T 세포 만이 없는 배지. 최대 세포 사멸: 검출 전에 10% SDS와 1:1의 비로 처리함.
- [0262] 실시예 3: α 208, α 210, 및 α 211 AChR CAART 세포
- [0263] α 208, α 210, 및 α 211 AChR CAAR의 개략도를 도 7에 나타낸다. α 208, α 210, 및 α 211 AChR CAAR은 상이한 아미노산 길이의 AChR 세포외 도메인에 이어, CD8 힌지 또는 글리신-세린(GS) 링커, CD8 막관통 도메인(TMD), 및 탄뎀 세포질성 신호전달 도메인 4-1BB 및 CD3 ζ (BBZ)를 발현한다.
- [0264] 도 8에 나타낸 바와 같이, GS 링커를 혼입한 α 208.GS.BBz AChR CAAR은 293T 세포의 표면에서 발현되지 않았지만, GS 링커를 혼입한 α 210.GS.BBz 및 α 211.GS.BBz AChR CAAR은 세포 표면에서 발현되었다. 293T 세포를 패

키징 DNA 없이 렌티바이러스 플라스미드로 일시적으로 형질감염시켰다. 형질감염 후 2일째에, AChR ECD의 표면 발현을 mAb 210을 사용하여 검출하였다.

[0265] αAChR CAAR 저켓 NFAT-GFP 세포는 음성 대조군으로서 항-MuSK B 세포를 발현하는, Nalm6 3-28과의 공-배양 후 CAAR 신호 형질도입을 활성화시키지 않지만, 표면 항-AChR B 세포 수용체를 발현하는, Nalm6 192, Nalm6 195(도 9a), Nalm6 637(도 9b) 또는 mAb 35 하이브리도마(도 9c)와의 공-배양 후 CAAR 신호 형질도입을 활성화시키지 않는다. α208.GS.BBz CAAR은 저켓 세포 표면에서 발현되지 않으므로 음성 대조군으로서 제공된다.

[0266] 도 10은, 항-AChR 알파 소단위 모노클로날 항체 210을 사용한 염색에 의해 나타난 바와 같이, α210.GS.BBz, 및 α211.GS.BBz CAAR이 렌티바이러스 형질도입 후 1차 사람 T 세포의 표면에서 발현됨을 나타낸다.

[0267] 실시예 4: α210 및 α211 AChR CAART 사멸 및 사이토킨 분비 검정

[0268] α210.GS.BBz CAART 및 α211.GS.BBz AChR CAART 세포는 도 11에 나타난 바와 같이, 루시퍼라제-기반 사멸 검정에서 mAb 35 하이브리도마 세포, Nalm6 192 및 Nalm6 195 표적 세포(공-배양 후 21시간째에)를 사멸시켰다. α210.GS.BBz CAART 및 α211.GS.BBz AChR CAART 세포와 mAb 35 하이브리도마 세포, Nalm6 192 및 Nalm6 195 표적 세포의 공-배양물의 상층액은 배지만, NTD, 또는 Nalm6 WT 대조군과 비교하여 증가된 hIFN γ 농도를 갖는다(도 12). 루시퍼라제-기반 사멸 검정은 다음과 같이 수행하였다. T 세포(NTD, α210, 및 α211)를 표적 세포(Nalm6 대조군, Nalm6 192, Nalm6 195, 및 mAb 35 하이브리도마 세포)와 30:1의 E:T 비에서 21시간 동안 공-향온처리하였다. 특이적인 분해 % = [(시험 세포 사멸 - 자발적인 세포 사멸)/(최대 세포 사멸 - 자발적인 세포 사멸)] * 100. 자발적인 세포 사멸: T 세포가 없이 배지만. 최대 세포 사멸: 검출 전에 10% SDS와 1:1 비로 처리함.

[0269] α210.GS.BBz CAART 세포는 도 13a 및 13b에 나타난 바와 같이, Nalm6 637 항-AChR 세포를 사멸시킨다. α210.GS.BBz CAART와 Nalm6 637 항-AChR 세포의 공-배양물의 상층액은 NTD 대조군과 비교하여 증가된 hIFN γ 농도를 갖는다(도 14). 루시퍼라제 활성을 나타낸 효과기 대 표적(E/T) 세포 비에서 공-배양 후 24시간째에 측정하였다. Nalm6 세포는 클릭 딱정벌레 녹색 루시퍼라제를 구성적으로 발현한다. 특이적인 분해 [%]는 다음의 수학적식을 사용하여 계산한다: 특이적인 분해 [%] = [(시험 세포 사멸 - 자발적인 세포 사멸)/(최대 세포 사멸 - 자발적인 세포 사멸)] * 100. 자발적인 세포 사멸: T 세포가 없이 배지만. 최대 세포 사멸: 검출 전 10% SDS와 1:1의 비로 처리함.

[0270] 실시예 5: α210 및 α211 AChR CAART 세포 생체 내 효능

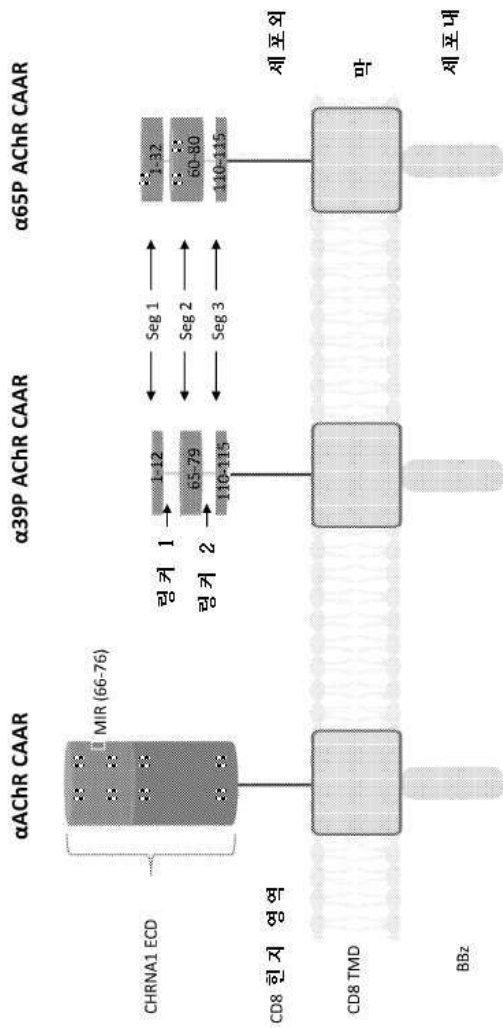
[0271] 도 15a 및 15b는 Nalm6 192(도 15a) 또는 Nalm6 195(도 15b) 표적 세포에 대한 α39P.CD8H.BBz CAART 및 α210.GS.BBz CAART 세포의 생체 내 효능을 나타낸다. 도 16은 Nalm6 192/195 세포의 혼합물(1:1 비)에 대한 α210.GS.BBz CAART 및 α211.GS.BBz CAART 세포의 생체 내 효능을 나타낸다. Nalm6 637 표적 세포에 대한 α210.GS.BBz CAART 세포의 생체 내 효능은 도 17에 나타낸다.

[0272] 다른 구현예

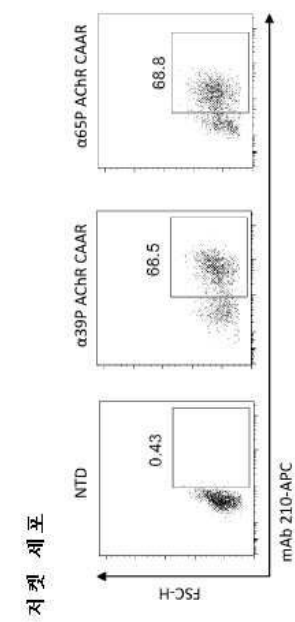
[0273] 본원에 인용된 각각의 및 모든 특허, 특허원, 및 공보의 개시내용은 이의 전문이 본원에 참고로 포함된다. 본 발명이 구체적인 구현예를 참고로 개시되었지만, 본 발명의 다른 구현예 및 변화가 본 발명의 실제 취지 및 영역에 벗어나지 않고 당해 분야의 다른 기술자에 의해 고안될 수 있다. 첨부된 청구범위는 모든 이러한 구현예 및 등가의 변화를 포함하는 것으로 의도된다.

도면

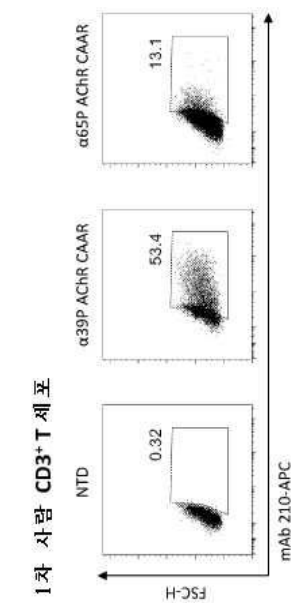
도면1



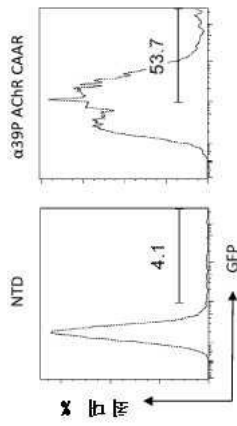
도면2a



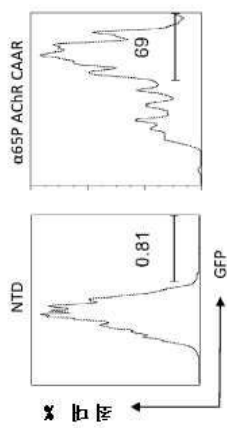
도면2b



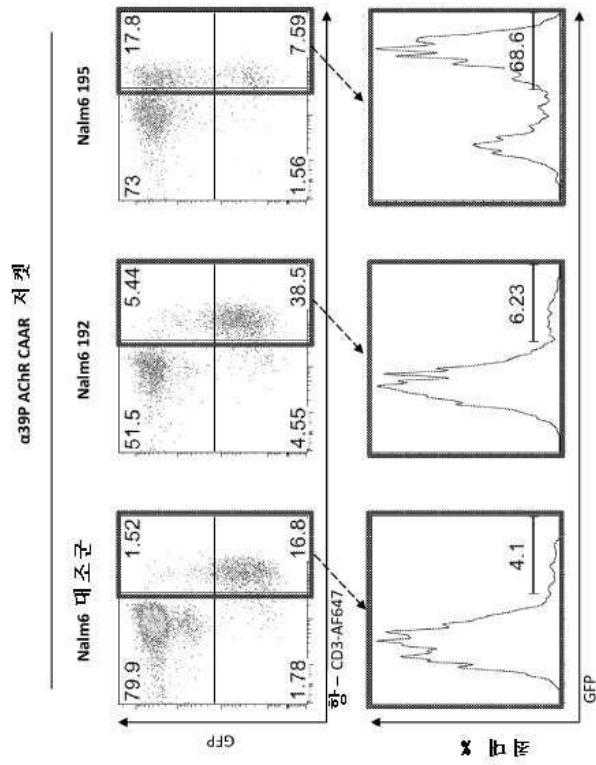
도면3a



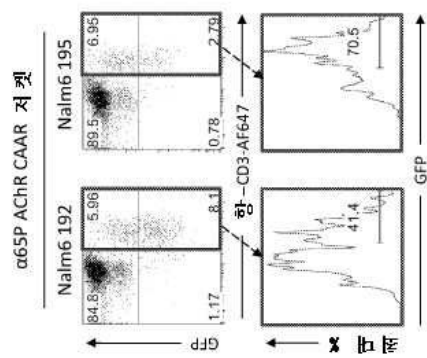
도면3b



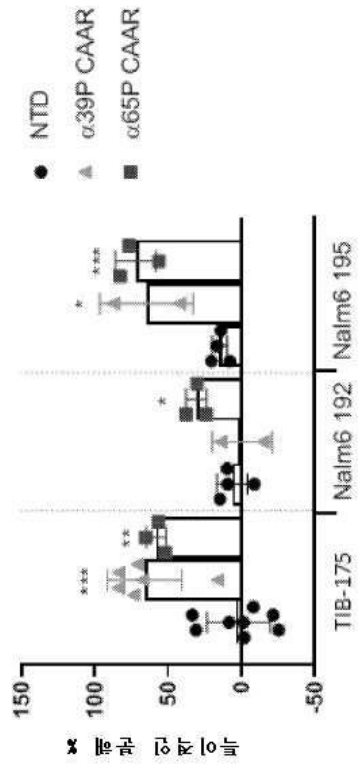
도면4



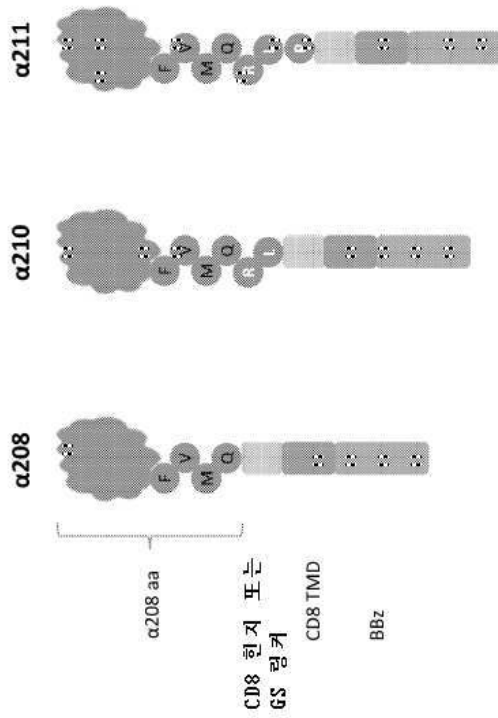
도면5



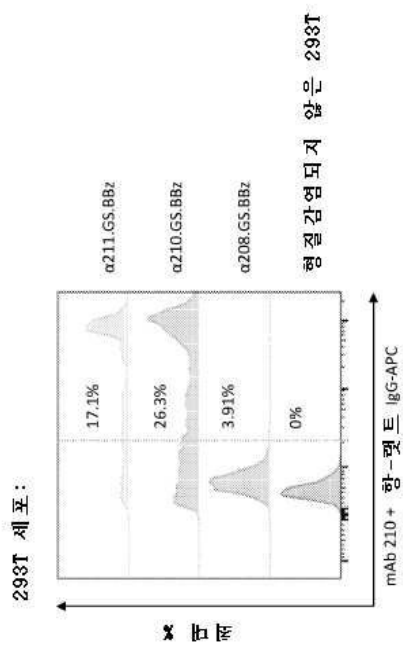
도면6



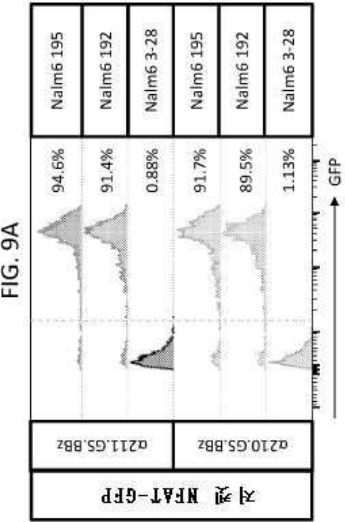
도면7



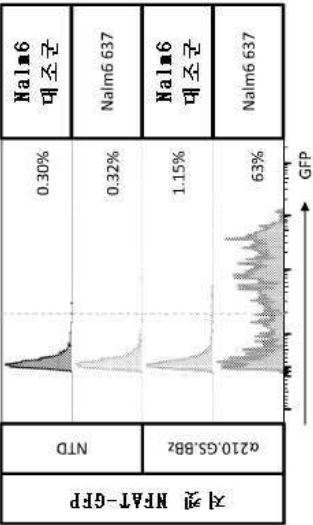
도면8



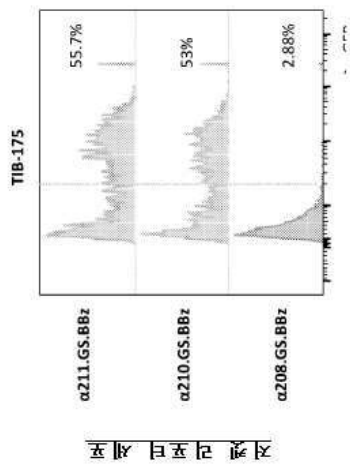
도면9a



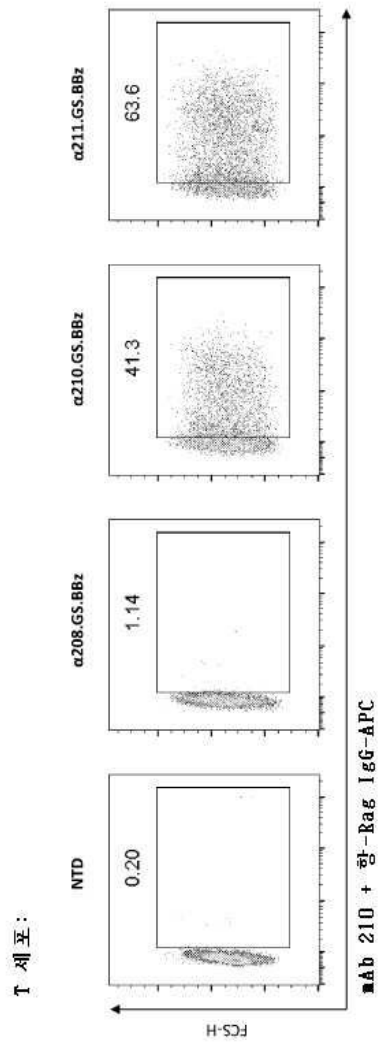
도면9b



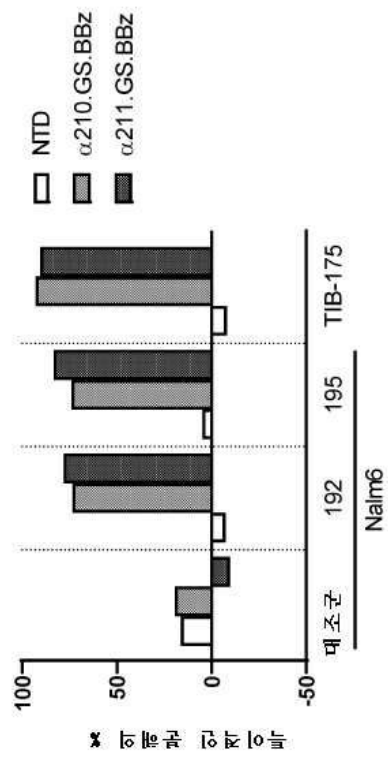
도면9c



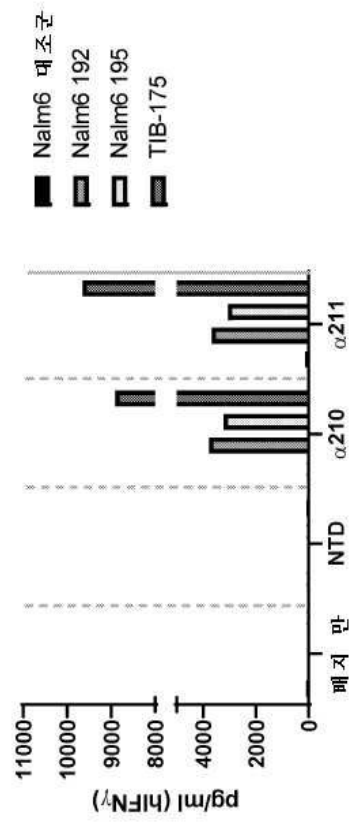
도면10



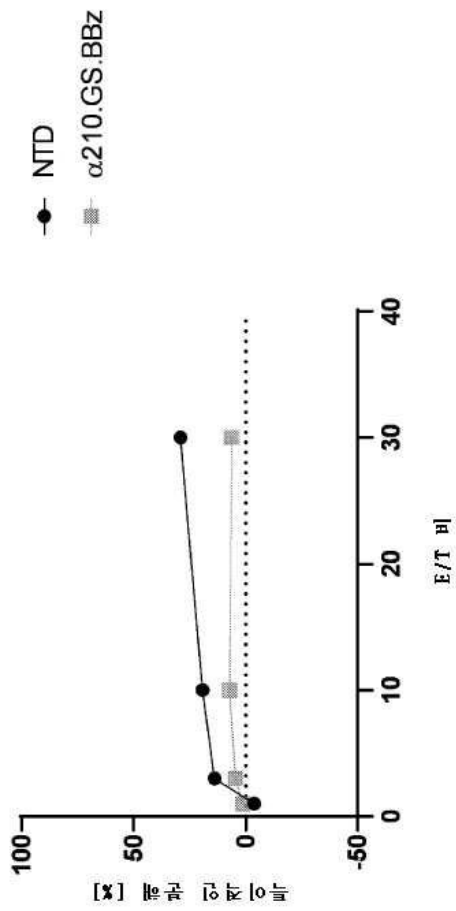
도면11



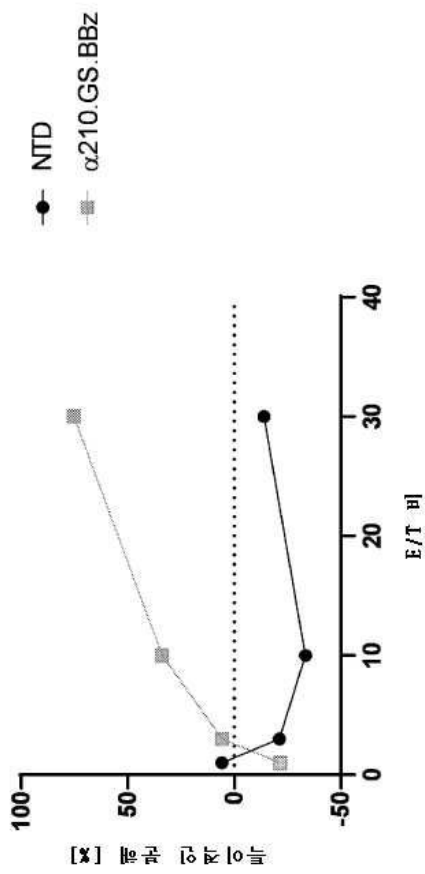
도면12



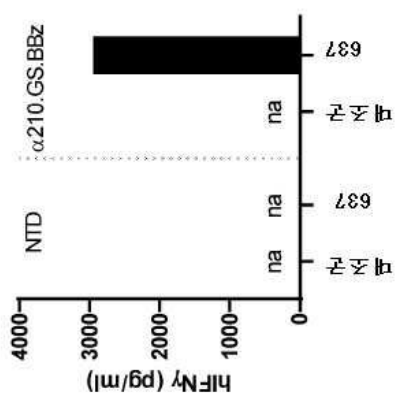
도면13a



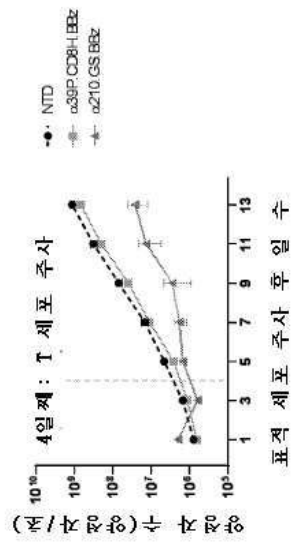
도면13b



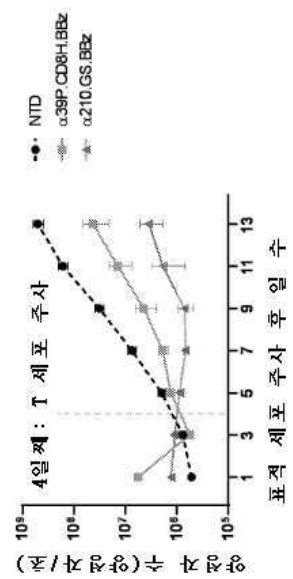
도면14



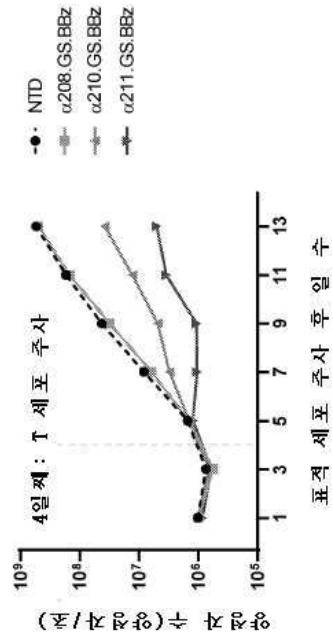
도면15a



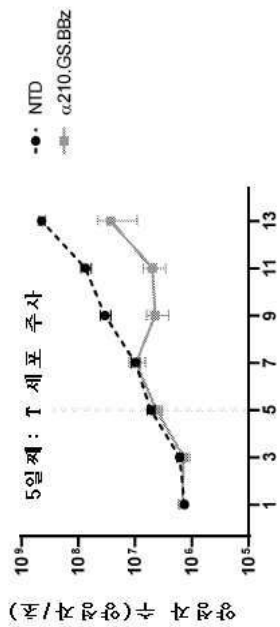
도면15b



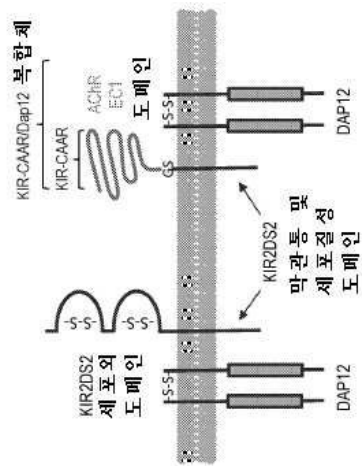
도면16



도면17

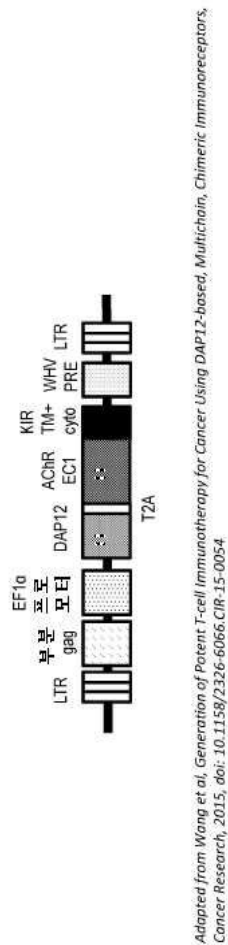


도면18a



Adapted from Wang et al, Generation of Patent T-cell Immunotherapy for Cancer Using DAP12-based, Multichain, Chimeric Immunoreceptors, Cancer Research, 2015, doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0054

도면18b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Trustees of the University of Pennsylvania

Payne, Aimee S

Oh, Sangwook

<120> COMPOSITIONS AND METHODS OF ACETYLCHOLINE RECEPTOR CHIMERIC
AUTOANTIBODY RECEPTOR CELLS

<130> 046483-7253W01(02320)

<150> 62/847,121

<151> 2019-05-13

<160> 53

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 882

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pTRPE. a39P AChR.CD8H.BBz CAAR

<400> 1

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctattt taaaagggtg ccagtgcctc	60
gaacatgaga cccgtctggt ggcaaagcta ttggtggcg gctctctaaa atggaatcca	120
gatgactatg gcggtgtgaa aaaaattcac ggctctctgc agtacactgg ccacgctagc	180
ttcgtgccgg tcttctgcc agcgaagcca accacgacgc cagcaccgag accaccaaca	240
cctgcgcccc ccatcgctgc gcagcccctg tcctgcgcc cagaggcgtg cagaccagca	300
gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg gacttcgcct gtgatataca catctgggag	360
cccttggcgg ggacttgggg ggtccttctc ctgtcactgg ttatcacctt ttactgcaag	420
cgcggtcgca agaaactgct ctatatTTTT aaacagccat tcatgagacc tgtccagacc	480
actcaagagg aggacggatg ttccctgtaga ttccctgaag aggaagaggg ggggtgagag	540
ctgagagtaa agttctctag aagcgccgat gccccagcct atcaacaggg gcaaaatcaa	600
ctctacaacg aacttaactt gggacgccga gaggagtacg atgtcttgga taagagacgc	660
ggcaggagacc ctgaaatggg cggaagcca agacggaaga acccccagga aggtctgtac	720
aatgaacttc agaaagataa gatggccgaa gcctacagcg agatcgccat gaaaggagag	780
aggcgccgag gcaaaggcca tgatggactg taccagggtc tcatgactgc tactaaggac	840
acatatgatg cctccacat gcaggccctg ccaccaaggt ga	882

<210> 2

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG Signal peptide

<400> 2

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctattt taaaagggtg ccagtgc	57
--	----

<210> 3

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> a39P segment 1

<400> 3	
tccgaacatg agacccgtct ggtggcaaag ctat	36
<210> 4	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Linker	
<400> 4	
ggtggcggct ct	12
<210> 5	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> a39P segment 2	
<400> 5	
ctaaaatgga atccagatga ctatggcgggt gtgaaaaaaa ttcac	45
<210> 6	
<211> 1266	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> pTRPE. a211 AChR.gs.BBz CAAR	
<400> 6	
atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctat	60
gaacatgaga cccgtctggt ggcaaagcta tttaaagact acagcagcgt ggtgcggcca	120
gtggaagacc accgccaggt cgtggaggtc accgtgggcc tgcagctgat acagctcatc	180
aatgtggatg aagtaaatca gatcgtgaca accaatgtgc gtc	240
gattacaacc taaaatggaa tccagatgac tatggcgggtg tg	300
tcagaaaaga tctggcgccc agaccttggt ctcataaaca atgcagatgg tgactttgct	360
attgtcaagt tcaccaaagt gctcctgcag tacactggcc acatcacgtg gacacctcca	420
gccatcttta aaagctactg tgagatcatc gtcacccact ttc	480
tgcagcatga agctgggcac ctggacctac gacggctctg t	540
agcgaccagc cagacctgag caacttcatg gagagcgggg agtgggtgat caaggagtcc	600

cggggctgga agcactccgt gacctattcc tctgccccg acacccccta cctggacatc 660
acctaccact tctgcatgca ggcctgccc gctagcgtg gcggagggtt tggagggtga 720
ggttcctccg gaattcatat ctgggcgccc ttggccggga cttgtgggtt ctttctcctg 780
tactgggtta tcacccctta ctgcaaacgg ggcagaaaga aactcctgta tatattcaaa 840
caaccattta tgagaccagt acaactact caagaggaag atggctgtag ctgccgattt 900
ccagaagaag aagaaggagg atgtgaactg agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc 960
cccgcgtacc agcagggccca gaaccagctc tataacgagc tcaatctagg acgaagagag 1020

gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga 1080
aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat gaactgcaga aagataagat ggccggaggcc 1140
tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc cggaggggca aggggcacga tggcctttac 1200
cagggtctca gtacagccac caaggacacc tacgacgcc ttcacatgca ggccctgccc 1260
cctcgc 1266

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> a39P segment 3

<400> 7

ctgcagtaca ctggccac 18

<210> 8

<211> 165

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD8 Hinge region

<400> 8

ttcgtgccgg tcttctgcc agcgaagcca accacgacgc cagcacccgc accaccaaca 60

cctgcgccca ccatcgctgc gcagcccctg tcctgcgcc cagaggcgtg cagaccagca 120

gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg gacttcgcct gtgat 165

<210> 9

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD8 TMD

<400> 9

atctacatct gggcgccctt ggccgggact tgtgggggtcc ttctcctgtc actggttatac 60

accctttact gc 72

<210> 10

<211> 126

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4-lBB domain

<400> 10

aagcgcggtc gcaagaaact gctctatatt tttaaacagc cattcatgag acctgtccag 60

accactcaag aggaggacgg atgttcctgt agatttcctg aagaggaaga ggggggggtgc 120

gagctg 126

<210> 11

<211> 293

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> pTRPE. a39P AChR.CD8H.BBz CAAR

<400> 11

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys Ser Glu His Glu Thr Arg Leu Val Ala Lys Leu Phe Gly

20 25 30

Gly Gly Ser Leu Lys Trp Asn Pro Asp Asp Tyr Gly Gly Val Lys Lys

35 40 45

Ile His Gly Ser Leu Gln Tyr Thr Gly His Ala Ser Phe Val Pro Val

50 55 60

Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr

145 150 155 160

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

165 170 175

Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro

180 185 190

Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Ala Leu Pro Pro Arg

290

<210> 12

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG Signal peptide

<400> 12

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> a39P segment 1

<400> 13

Ser Glu His Glu Thr Arg Leu Val Ala Lys Leu Phe

1 5 10

<210> 14

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 14

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> a39P segment 2

<400> 15

Leu Lys Trp Asn Pro Asp Asp Tyr Gly Gly Val Lys Lys Ile His

1 5 10 15

<210> 16

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 41BB ICD

<400> 16

Ala Ala Ala Cys Gly Gly Gly Gly Cys Ala Gly Ala Ala Ala Gly Ala
 1 5 10 15
 Ala Ala Cys Thr Cys Cys Thr Gly Thr Ala Thr Ala Thr Ala Thr Thr
 20 25 30
 Cys Ala Ala Ala Cys Ala Ala Cys Cys Ala Thr Thr Thr Ala Thr Gly
 35 40 45

Ala Gly Ala Cys Cys Ala Gly Thr Ala Cys Ala Ala Ala Cys Thr Ala
 50 55 60
 Cys Thr Cys Ala Ala Gly Ala Gly Gly Ala Ala Gly Ala Thr Gly Gly
 65 70 75 80
 Cys Thr Gly Thr Ala Gly Cys Thr Gly Cys Cys Gly Ala Thr Thr Thr
 85 90 95
 Cys Cys Ala Gly Ala Ala Gly Ala Ala Gly Ala Ala Gly Ala Ala Gly
 100 105 110

Gly Ala Gly Gly Ala Thr Gly Thr Gly Ala Ala Cys Thr Gly
 115 120 125

<210> 17

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> a39P segment 3

<400> 17

Leu Gln Tyr Thr Gly His

1 5

<210> 18

<211> 55

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD8 Hinge region

<400> 18

Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro

1 5 10 15

Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu
20 25 30

Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg
35 40 45

Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
50 55

<210> 19

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD8 TMD

<400> 19

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
20

<210> 20

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 41BB ICD

<400> 20

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
35 40

<210> 21

<211> 960

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pTRPE. a65P AChR.CD8H.BBz CAAR

<400> 21

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctatth taaaaggtgt ccagtgtctc	60
gaacatgaga cccgtcttgt ggcaaagcta tttaaagact acagcagcgt ggtgcggcca	120
gtggaagacc accgccaggt cgtggaggct accggtggcg gctcttggtt ggattacaac	180
ctaaaatgga atccagatga ctatggcgtt gtgaaaaaaaa ttacattgg ctctctgcag	240
tacactggcc acgttagctt cgtgccgtt ttcttgccag cgaagccaac cagcagcca	300
gcaccgcgac caccaacacc tgcgccacc atcgctcgc agccctgtc cctgcgcca	360

gaggcgtgca gaccagcagc ggggggcgca gtgcacacga gggggctgga ctgcctgt	420
gatatctaca tctggcgcc cttggccggg acttgtggg tcttctctct gtcactggtt	480
atcaccttt actgcaagcg cgttcgcaag aaactgtct atattttta acagccattc	540
atgagacctg tccagaccac tcaaggagg gacggatgt cctgtagatt tctgaagag	600
gaagaggggg ggtgcgagct gagagtaaag ttctctagaa gcgccgatgc cccagcctat	660
caacaggggc aaaatcaact ctacaacgaa cttaatctgg gacgccgaga ggagtacgat	720
gtcttgata agagacgagg cagggacct gaaatggcg gaaagccaag acggaagaac	780

ccccaggaag gtctgtacaa tgaacttcag aaagataaga tggccgaagc ctacagcgag	840
atcgcatga aaggagagag gcgccggc aaaggcatg atggactgta tcagggtctc	900
agtactgcta ctaaggacac atatgatgcc ctccacatgc aggcctgcc accaaggtga	960

<210> 22

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> a65P segment 1

<400> 22

tccgaacatg agaccgtct ggtggcaaag ctatttaaag actacagcag cgtggtgcgg	60
ccagtggaag accaccgcca ggtcgtggag gtcacc	96

<210> 23

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> a65P segment 2

<400> 23

tgggtggatt acaacctaaa atggaatcca gatgactatg gcggtgtgaa aaaaattcac	60
---	----

att 63

<210> 24

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3zeta

<400> 24

agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc 60

tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttgacaa gagacgtggc 120

cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 180

gaactgcaga aagataagat ggccgaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240

cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 300

tacgacgcc ttcacatgca ggccctgccc cctcgc 336

<210> 25

<211> 319

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> pTRPE. a65P AChR.CD8H.BBz CAAR

<400> 25

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys Ser Glu His Glu Thr Arg Leu Val Ala Lys Leu Phe Lys

20 25 30

Asp Tyr Ser Ser Val Val Arg Pro Val Glu Asp His Arg Gln Val Val

35 40 45

Glu Val Thr Gly Gly Gly Ser Trp Val Asp Tyr Asn Leu Lys Trp Asn

50 55 60

Pro Asp Asp Tyr Gly Gly Val Lys Lys Ile His Ile Gly Ser Leu Gln

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110
 Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
 115 120 125
 Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile
 130 135 140
 Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val

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

 210 215 220
 Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
 225 230 235 240
 Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro
 245 250 255
 Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp
 260 265 270
 Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg

 275 280 285
 Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr
 290 295 300
 Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 305 310 315
 <210> 26
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> a65P segment 1

<400> 26

Ser Glu His Glu Thr Arg Leu Val Ala Lys Leu Phe Lys Asp Tyr Ser
1 5 10 15

Ser Val Val Arg Pro Val Glu Asp His Arg Gln Val Val Glu Val Thr
20 25 30

<210> 27

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> a65P segment 2

<400> 27

Trp Val Asp Tyr Asn Leu Lys Trp Asn Pro Asp Asp Tyr Gly Gly Val
1 5 10 15

Lys Lys Ile His Ile
20

<210> 28

<211> 1389

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pTRPE. a208 AChR.CD8H.BBz CAAR

<400> 28

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctattt taaaaggtgt ccagtgtctc 60
gaacatgaga cccgtctggt ggcaaagcta tttaaagact acagcagcgt ggtgcggcca 120
gtggaagacc accgccaggt cgtggaggct accgtgggcc tgcagctgat acagctcatc 180
aatgtggatg aagtaaatca gatcgtgaca accaatgtgc gtctgaaaca gcaatgggtg 240
gattacaacc taaaatggaa tccagatgac tatggcgggtg tgaaaaaaat tcacattcct 300
tcagaaaaga tctggcgccc agacctgtt ctctataaca atgcagatgg tgactttgct 360
attgtcaagt tcacaaagt gctcctgcag tacactggcc acatcacgtg gacacctcca 420

gccatcttta aaagctactg tgagatcatc gtcaccact ticcctttga tgaacagaac 480
tgcagcatga agctgggcac ctggacctac gacggctctg tcgtggccat caaccggaa 540
agcgaccagc cagacctgag caacttcatg gagagcgggg agtgggtgat caaggagtcc 600
cggggctgga agcactccgt gacctattcc tgctgccccg acaccacctc cctggacatc 660

acctaccact tcgtcatgca ggctagcttc gtgccggtct tcctgccagc gaagccaacc 720
acgacgccag caccgcgacc accaacacct gcgccacca tcgcgtcgca gcccctgtcc 780
ctgcgccag aggcgtgcag accagcagcg gggggcgagc tgcacacgag ggggctggac 840

ttcgcctgtg atatctacat ctgggcgccc ttggccggga cttgtggggt ctttctctg 900
tcaactgtta tcaccttta ctgcaagcg ggtcgcaaga aactgctcta tatttttaaa 960
cagccattca tgagacctgt ccagaccact caagaggagg acggatgttc ctgtagattt 1020
cctgaagagg aagagggggg gtgcgagctg agagtaaagt tctctagaag cgccgatgcc 1080
ccagcctatc aacaggggca aaatcaactc tacaacgaac ttaatctggg acgccgagag 1140
gagtacgatg tcttggataa gagacgcggc agggaccctg aaatgggcgg aaagccaaga 1200
cggaagaacc ccaggaagg tctgtacaat gaacttcaga aagataagat ggccgaagcc 1260

tacagcgaga tcggcatgaa aggagagagg cgccgaggca aaggcatga tggactgtat 1320
cagggtctca gtactgtac taaggacaca tatgatgcc tccacatgca ggccctgcc 1380
ccaagtgta 1389

<210> 29
<211> 624
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> a208 AChR ECD
<400> 29

tccgaacatg agaccctgtc ggtggcaaag ctatttaaag actacagcag cgtggtgcgg 60
ccagtggaag accaccgcca ggtcgtggag gtcaccgtgg gcctgcagct gatacagctc 120
atcaatgtgg atgaagtaaa tcagatcgtg acaaccaatg tgcgtctgaa acagcaatgg 180

gtggattaca acctaaaatg gaatccagat gactatggcg gtgtgaaaa aattcacatt 240
ccttcagaaa agatctggcg cccagacctt gttctctata acaatgcaga tggtgacttt 300
gctattgtca agttcacaa agtgcctctg cagtacactg gccacatcac gtggacacct 360
ccagccatct ttaaaagcta ctgtgagatc atcgtcacc acttccctt tgatgaacag 420
aactgcagca tgaagctggg cacctggacc tacgacggct ctgtcgtggc catcaaccg 480
gaaagcgacc agccagacct gagcaacttc atggagagcg gggagtgggt gatcaaggag 540
tcccggggct ggaagcactc cgtgacctat tcctgctgcc ccgacacccc ctacctggac 600

atcacctacc acttcgtcat gcag 624

<210> 30

<211> 462

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> pTRPE. a208 AChR.CD8H.BBz CAAR

<400> 30

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys Ser Glu His Glu Thr Arg Leu Val Ala Lys Leu Phe Lys

20 25 30

Asp Tyr Ser Ser Val Val Arg Pro Val Glu Asp His Arg Gln Val Val

35 40 45

Glu Val Thr Val Gly Leu Gln Leu Ile Gln Leu Ile Asn Val Asp Glu

50 55 60

Val Asn Gln Ile Val Thr Thr Asn Val Arg Leu Lys Gln Gln Trp Val

65 70 75 80

Asp Tyr Asn Leu Lys Trp Asn Pro Asp Asp Tyr Gly Gly Val Lys Lys

85 90 95

Ile His Ile Pro Ser Glu Lys Ile Trp Arg Pro Asp Leu Val Leu Tyr

100 105 110

Asn Asn Ala Asp Gly Asp Phe Ala Ile Val Lys Phe Thr Lys Val Leu

115 120 125

Leu Gln Tyr Thr Gly His Ile Thr Trp Thr Pro Pro Ala Ile Phe Lys

130 135 140

Ser Tyr Cys Glu Ile Ile Val Thr His Phe Pro Phe Asp Glu Gln Asn

145 150 155 160

Cys Ser Met Lys Leu Gly Thr Trp Thr Tyr Asp Gly Ser Val Val Ala

165 170 175

Ile Asn Pro Glu Ser Asp Gln Pro Asp Leu Ser Asn Phe Met Glu Ser

180 185 190

Gly Glu Trp Val Ile Lys Glu Ser Arg Gly Trp Lys His Ser Val Thr

195 200 205

Tyr Ser Cys Cys Pro Asp Thr Pro Tyr Leu Asp Ile Thr Tyr His Phe

210 215 220
 Val Met Gln Ala Ser Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr

 225 230 235 240
 Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser

 245 250 255
 Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly

 260 265 270
 Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp

 275 280 285
 Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile

 290 295 300
 Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys
 305 310 315 320
 Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys

 325 330 335
 Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val

 340 345 350
 Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn

 355 360 365
 Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val

 370 375 380
 Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
 385 390 395 400
 Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys

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

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

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

 450 455 460

<210> 31

<211> 208

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> a208 AChR ECD

<400> 31

Ser Glu His Glu Thr Arg Leu Val Ala Lys Leu Phe Lys Asp Tyr Ser
1 5 10 15

Ser Val Val Arg Pro Val Glu Asp His Arg Gln Val Val Glu Val Thr
20 25 30

Val Gly Leu Gln Leu Ile Gln Leu Ile Asn Val Asp Glu Val Asn Gln
35 40 45

Ile Val Thr Thr Asn Val Arg Leu Lys Gln Gln Trp Val Asp Tyr Asn
50 55 60

Leu Lys Trp Asn Pro Asp Asp Tyr Gly Gly Val Lys Lys Ile His Ile
65 70 75 80

Pro Ser Glu Lys Ile Trp Arg Pro Asp Leu Val Leu Tyr Asn Asn Ala
85 90 95

Asp Gly Asp Phe Ala Ile Val Lys Phe Thr Lys Val Leu Leu Gln Tyr
100 105 110

Thr Gly His Ile Thr Trp Thr Pro Pro Ala Ile Phe Lys Ser Tyr Cys
115 120 125

Glu Ile Ile Val Thr His Phe Pro Phe Asp Glu Gln Asn Cys Ser Met
130 135 140

Lys Leu Gly Thr Trp Thr Tyr Asp Gly Ser Val Val Ala Ile Asn Pro
145 150 155 160

Glu Ser Asp Gln Pro Asp Leu Ser Asn Phe Met Glu Ser Gly Glu Trp
165 170 175

Val Ile Lys Glu Ser Arg Gly Trp Lys His Ser Val Thr Tyr Ser Cys
180 185 190

Cys Pro Asp Thr Pro Tyr Leu Asp Ile Thr Tyr His Phe Val Met Gln

195	200	205
<210> 32		
<211> 1395		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> pTRPE. a210 AChR.CD8H.BBz CAAR		
<400> 32		
atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctatatt taaaagggtg ccagtgcctc	60	
gaacatgaga cccgtctggg ggcaaagctt tttaaagact acagcagcgt ggtgcggcca	120	
gtggaagacc accgccaggt cgtggagggt accgtgggcc tgcagctgat acagctcatc	180	
aatgtggatg aagtaaatca gatcgtgaca accaatgtgc gtctgaaaca gcaatgggtg	240	
gattacaacc taaatggaa tccagatgac tatggcgggtg tgaaaaaaat tcacattcct	300	
tcagaaaaga tctggcgccc agacctgtt cttataaca atgcagatgg tgactttgct	360	
atgtcaagt tcacaaagt gctcctgcag tacactggcc acatcacgtg gacacctcca	420	
gccatcttta aaagctactg tgagatcatc gtcaccact ttccttttga tgaacagaac	480	
tgcagcatga agctgggcac ctggacctac gacggctctg tcgtggccat caaccggaa	540	
agcgaccagc cagacctgag caacttcatg gagagcgggg agtgggtgat caaggagtcc	600	
cggggctgga agcactcgt gacctattcc tgctgccccg acaccacctt cctggacatc	660	
acctaccact tcgtcatgca gcgcctggct agcttcgtgc cggctttcct gccagcgaag	720	
ccaaccacga cgccagcacc gcgaccacca acacctgcgc ccaccatcgc gtcgcagccc	780	
ctgtccctgc gccagaggc gtgcagacca gcagcggggg gcgcagtga cagagggggg	840	
ctggacttcg cctgtgatat ctacatctgg gcgcccttgg ccgggacttg tggggtcctt	900	
ctcctgtcac tggttatcac cctttactgc aagcgcgggtc gcaagaaact gctctatatt	960	
tttaaacagc cattcatgag acctgtccag accactcaag aggaggacgg atgttcctgt	1020	
agatttcctg aagaggaaga ggggggggtgc gagctgagag taaagtcttc tagaagcgcc	1080	
gatgccccag cctatcaaca ggggcaaaat caactctaca acgaacttaa tctgggacgc	1140	
cgagaggagt acgatgtctt ggataagaga cgcggcaggg acctgaaat gggcggaag	1200	
ccaagacgga agaaccacca ggaaggctctg tacaatgaac ttcagaaaga taagatggcc	1260	
gaagcctaca gcgagatcgg catgaaagga gagaggcgcc gcggcaaagg gcatgatgga	1320	
ctgtatcagg gtctcagtac tgctactaag gacacatatg atgcctcca catgcaggcc	1380	
ctgccaccaa ggtaga	1395	

<210> 33

<211> 630

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> a210 AChR ECD

<400> 33

tccgaacatg agaccctgtct ggtggcaaag ctatttaaag actacagcag cgtggcgcgg 60
ccagtggaag accaccgcca ggtcgtggag gtcaccgtgg gcctgcagct gatacagctc 120

atcaatgtgg atgaagtaaa tcagatcgtg acaaccaatg tgcgtctgaa acagcaatgg 180
gtggattaca acctaaaatg gaatccagat gactatggcg gtgtgaaaaa aattcacatt 240
ccttcagaaa agatctggcg cccagacctt gttctctata acaatgcaga tggcgtgacttt 300
gctattgtca agttcaccaa agtgcctcctg cagtacactg gccacatcac gtggacacct 360
ccagccatct ttaaaagcta ctgtgagatc atcgtcacc actttccctt tgatgaacag 420
aactgcagca tgaagctggg cacctggacc tacgacggct ctgtcgtggc catcaaccg 480
gaaagcgacc agccagacct gagcaacttc atggagagcg gggagtgggt gatcaaggag 540

tcccggggct ggaagcactc cgtgacctat tctgtctgcc ccgacacccc ctacctggac 600
atcacctacc acttcgtcat gcagcgctg 630

<210> 34

<211> 464

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> pTRPE. a210 AChR.CD8H.BBz CAAR

<400> 34

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys Ser Glu His Glu Thr Arg Leu Val Ala Lys Leu Phe Lys
20 25 30

Asp Tyr Ser Ser Val Val Arg Pro Val Glu Asp His Arg Gln Val Val
35 40 45
Glu Val Thr Val Gly Leu Gln Leu Ile Gln Leu Ile Asn Val Asp Glu
50 55 60
Val Asn Gln Ile Val Thr Thr Asn Val Arg Leu Lys Gln Gln Trp Val

65				70				75				80			
Asp	Tyr	Asn	Leu	Lys	Trp	Asn	Pro	Asp	Asp	Tyr	Gly	Gly	Val	Lys	Lys
				85				90				95			
Ile	His	Ile	Pro	Ser	Glu	Lys	Ile	Trp	Arg	Pro	Asp	Leu	Val	Leu	Tyr
				100				105				110			
Asn	Asn	Ala	Asp	Gly	Asp	Phe	Ala	Ile	Val	Lys	Phe	Thr	Lys	Val	Leu
				115				120				125			
Leu	Gln	Tyr	Thr	Gly	His	Ile	Thr	Trp	Thr	Pro	Pro	Ala	Ile	Phe	Lys
				130				135				140			
Ser	Tyr	Cys	Glu	Ile	Ile	Val	Thr	His	Phe	Pro	Phe	Asp	Glu	Gln	Asn
145				150				155				160			
Cys	Ser	Met	Lys	Leu	Gly	Thr	Trp	Thr	Tyr	Asp	Gly	Ser	Val	Val	Ala
				165				170				175			
Ile	Asn	Pro	Glu	Ser	Asp	Gln	Pro	Asp	Leu	Ser	Asn	Phe	Met	Glu	Ser
				180				185				190			
Gly	Glu	Trp	Val	Ile	Lys	Glu	Ser	Arg	Gly	Trp	Lys	His	Ser	Val	Thr
				195				200				205			
Tyr	Ser	Cys	Cys	Pro	Asp	Thr	Pro	Tyr	Leu	Asp	Ile	Thr	Tyr	His	Phe
210				215				220							
Val	Met	Gln	Arg	Leu	Ala	Ser	Phe	Val	Pro	Val	Phe	Leu	Pro	Ala	Lys
225				230				235				240			
Pro	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile
				245				250				255			
Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala
				260				265				270			
Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr
275				280				285							
Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu
290				295				300							
Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile
305				310				315				320			

Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp
325 330 335
Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
340 345 350
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
355 360 365
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
370 375 380
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
385 390 395 400
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
405 410 415
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
420 425 430
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
435 440 445
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
450 455 460
<210> 35
<211> 210
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> a210 AChR ECD
<400> 35
Ser Glu His Glu Thr Arg Leu Val Ala Lys Leu Phe Lys Asp Tyr Ser
1 5 10 15
Ser Val Val Arg Pro Val Glu Asp His Arg Gln Val Val Glu Val Thr
20 25 30
Val Gly Leu Gln Leu Ile Gln Leu Ile Asn Val Asp Glu Val Asn Gln
35 40 45
Ile Val Thr Thr Asn Val Arg Leu Lys Gln Gln Trp Val Asp Tyr Asn
50 55 60

Leu Lys Trp Asn Pro Asp Asp Tyr Gly Gly Val Lys Lys Ile His Ile

65 70 75 80

Pro Ser Glu Lys Ile Trp Arg Pro Asp Leu Val Leu Tyr Asn Asn Ala

85 90 95

Asp Gly Asp Phe Ala Ile Val Lys Phe Thr Lys Val Leu Leu Gln Tyr

100 105 110

Thr Gly His Ile Thr Trp Thr Pro Pro Ala Ile Phe Lys Ser Tyr Cys

115 120 125

Glu Ile Ile Val Thr His Phe Pro Phe Asp Glu Gln Asn Cys Ser Met

130 135 140

Lys Leu Gly Thr Trp Thr Tyr Asp Gly Ser Val Val Ala Ile Asn Pro

145 150 155 160

Glu Ser Asp Gln Pro Asp Leu Ser Asn Phe Met Glu Ser Gly Glu Trp

165 170 175

Val Ile Lys Glu Ser Arg Gly Trp Lys His Ser Val Thr Tyr Ser Cys

180 185 190

Cys Pro Asp Thr Pro Tyr Leu Asp Ile Thr Tyr His Phe Val Met Gln

195 200 205

Arg Leu

210

<210> 36

<211> 1266

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pTRPE. a210 AChR.gs.BBz CAAR

<400> 36

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctatatt taaaaggtgt ccagtgtcc 60

gaacatgaga cccgtctggt ggcaaagctt tttaaagact acagcagcgt ggtgcggcca 120

gtggaagacc accgccaggt cgtggagggt accgtgggcc tgcagctgat acagctcatc 180

aatgtggatg aagtaaatca gatcgtgaca accaatgtgc gtctgaaaca gcaatgggtg 240

gattacaacc taaaatggaa tccagatgac tatggcgggtg tgaaaaaaat tcacattcct 300

tcagaaaaga tctggcgccc agaccttggt cttataaca atgcagatgg tgactttgct 360
attgtcaagt tcaccaaagt gctcctgcag tacactggcc acatcacgtg gacacctcca 420
gccatcttta aaagctactg tgagatcatt gtcaccact ttcctttga tgaacagaac 480
tgcagcatga agctgggcac ctggacctac gacggctctg tctgggcat caaccggaa 540
agcgaccagc cagacctgag caacttcatt gagagcgggg agtgggtgat caaggagtcc 600
cggggctgga agcactccgt gacctattcc tctgccccg acaccccta cctggacatc 660

acctaccact tctcatgca ggcctggct agcgggtggc gaggttctgg aggtggaggt 720
tcctccgaa tctacatctg ggcgccttg gccgggactt gtggggtcct tctcctgca 780
ctggttatca cctttactg caaacggggc agaaagaaac tctgtatat attcaaaaa 840
ccatttatga gaccagtaca aactactca gaggaagatg gctgtagctg ccgatttcca 900
gaagaagaag aaggaggatg tgaactgaga gtgaagtca gcaggagcgc agacgcccc 960
gcgtaccagc agggccagaa ccagctctat aacgagctca atctaggacg aagagaggag 1020
tacgatgttt tggacaagag acgtggccgg gacctgaga tggggggaaa gccgagaagg 1080

aagaaccctc aggaaggcct gtacaatgaa ctgcagaaag ataagatggc ggaggcctac 1140
agtgagattg ggatgaaagg cgagcgccgg aggggcaagg ggcacgatgg cttttaccag 1200
ggtctcagta cagccaccaa ggacacctac gacgccttc acatgcagc cctgccccct 1260
cgctaa 1266

<210> 37

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 37

ggtggcggag gttctggagg tggaggttcc 30

<210> 38

<211> 112

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3 zeta

<400> 38

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

1 5 10 15

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

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

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

50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

<210> 39

<211> 421

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> pTRPE. a210 AChR.gs.BBz CAAR

<400> 39

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Ser Glu His Glu Thr Arg Leu Val Ala Lys Leu Phe Lys
20 25 30

Asp Tyr Ser Ser Val Val Arg Pro Val Glu Asp His Arg Gln Val Val
35 40 45

Glu Val Thr Val Gly Leu Gln Leu Ile Gln Leu Ile Asn Val Asp Glu

50 55 60

Val Asn Gln Ile Val Thr Thr Asn Val Arg Leu Lys Gln Gln Trp Val
65 70 75 80

Asp Tyr Asn Leu Lys Trp Asn Pro Asp Asp Tyr Gly Gly Val Lys Lys
85 90 95

Ile His Ile Pro Ser Glu Lys Ile Trp Arg Pro Asp Leu Val Leu Tyr
100 105 110

Asn Asn Ala Asp Gly Asp Phe Ala Ile Val Lys Phe Thr Lys Val Leu

115 120 125
Leu Gln Tyr Thr Gly His Ile Thr Trp Thr Pro Pro Ala Ile Phe Lys

130 135 140
Ser Tyr Cys Glu Ile Ile Val Thr His Phe Pro Phe Asp Glu Gln Asn

145 150 155 160
Cys Ser Met Lys Leu Gly Thr Trp Thr Tyr Asp Gly Ser Val Val Ala

165 170 175
Ile Asn Pro Glu Ser Asp Gln Pro Asp Leu Ser Asn Phe Met Glu Ser

180 185 190
Gly Glu Trp Val Ile Lys Glu Ser Arg Gly Trp Lys His Ser Val Thr

195 200 205
Tyr Ser Cys Cys Pro Asp Thr Pro Tyr Leu Asp Ile Thr Tyr His Phe

210 215 220
Val Met Gln Arg Leu Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

225 230 235 240
Ser Ser Gly Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val

245 250 255
Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys

260 265 270
Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr

275 280 285
Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu

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

305 310 315 320
Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly

325 330 335
Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro

340 345 350
Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr

355 360 365
Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly

370 375 380
Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln
385 390 395 400
Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln
405 410 415
Ala Leu Pro Pro Arg

420

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 40

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 41

<211> 1398

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pTRPE. a211 AChR.CD8H.BBz CAAR

<400> 41

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctatatt taaaaggtgt ccagtgtctcc 60
gaacatgaga cccgtctggt ggcaaagcta tttaaagact acagcagcgt ggtgcggcca 120
gtggaagacc accgccaggt cgtggagggt accgtgggcc tgcagctgat acagtcctc 180
aatgtggatg aagtaaatca gatcgtgaca accaatgtgc gtctgaaaca gcaatgggtg 240
gattacaacc taaaatggaa tccagatgac tatggcgggtg tgaaaaaaat tcacattcct 300

tcagaaaaga tctggcgccc agaccttggt cttataaca atgcagatgg tgactttgct 360
attgtcaagt tcaccaaagt gtcctgcag tacactggcc acatcacgtg gacacctcca 420
gccatcttta aaagctactg tgagatcctc gtcaccact ttcctttga tgaacagaac 480
tgcagcatga agctgggcac ctggacctac gacggctctg tcgtggccat caaccggaa 540

agcgaccagc cagacctgag caacttcatg gagagcgggg agtgggtgat caaggagtcc 600
 cggggctgga agcactccgt gacctattcc tgctgccccg acacccccta cctggacatc 660
 acctaccact tcgtcatgca gcgcctgccc gctagcttcg tgccggtctt cctgccagcg 720

aagccaacca cgacgccagc accgcgacca ccaacacctg cgcccacat cgcgctcgag 780
 cccctgtccc tgcgccaga ggctgtcaga ccagcagcgg ggggcgcagt gcacacgagg 840
 gggtctggact tcgcctgtga tatctacatc tgggcgcctt tggccgggac ttgtggggtc 900
 cttctcctgt cactggttat caccctttac tgcaagcgcg gtcgcaagaa actgctctat 960
 atttttaaac agccattcat gagacctgtc cagaccactc aagaggagga cggatgttcc 1020
 tgtagatttc ctgaagagga agaggggggg tgcgagctga gagtaaagtt ctctagaagc 1080
 gccgatgccc cagcctatca acaggggcaa aatcaactct acaacgaact taatctggga 1140

cgccgagagg agtacgatgt cttggataag agacgcggca gggacctga aatgggcgga 1200
 aagccaagac ggaagaacct ccaggaaggt ctgtacaatg aacttcagaa agataagatg 1260
 gccgaagcct acagcgagat cggcatgaaa ggagagaggc gccgcggcaa agggcatgat 1320
 ggactgtatc aggtctctag tactgtctact aaggacacat atgatgccct ccacatgcag 1380
 gccctgccac caaggtga 1398

<210> 42
 <211> 633
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> a211 AChR ECD
 <400> 42

tccgaacatg agaccctgtc ggtggcaaag ctatttaaag actacagcag cgtggtgcgg 60

ccagtggaag accaccgcca ggtcgtggag gtcaccgtgg gcctgcagct gatacagctc 120
 atcaatgtgg atgaagtaaa tcagatcgtg acaaccaatg tgcgtctgaa acagcaatgg 180
 gtggattaca acctaaaatg gaatccagat gactatggcg gtgtgaaaaa aattcacatt 240
 ctttcagaaa agatctggcg cccagacctt gtctctata acaatgcaga tgggtgacttt 300
 gctattgtca agttcaccaa agtgcctctg cagtacactg gccacatcac gtggacacct 360
 ccagccatct ttaaaagcta ctgtgagatc atcgtcaccc actttccctt tgatgaacag 420
 aactgcagca tgaagctggg cacctggacc tacgacggct ctgtcgtggc catcaaccg 480

gaaagcgacc agccagacct gagcaacttc atggagagcg gggagtgggt gatcaaggag 540
 tccccgggct ggaagcactc cgtgacctat tctgtctgcc ccgacacccc ctacctggac 600

atcacctacc acttcgtcat gcagcgccctg ccc

633

<210> 43

<211> 465

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> pTRPE. a211 AChR.CD8H.BBz CAAR

<400> 43

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys Ser Glu His Glu Thr Arg Leu Val Ala Lys Leu Phe Lys

20 25 30

Asp Tyr Ser Ser Val Val Arg Pro Val Glu Asp His Arg Gln Val Val

35 40 45

Glu Val Thr Val Gly Leu Gln Leu Ile Gln Leu Ile Asn Val Asp Glu

50 55 60

Val Asn Gln Ile Val Thr Thr Asn Val Arg Leu Lys Gln Gln Trp Val

65 70 75 80

Asp Tyr Asn Leu Lys Trp Asn Pro Asp Asp Tyr Gly Gly Val Lys Lys

85 90 95

Ile His Ile Pro Ser Glu Lys Ile Trp Arg Pro Asp Leu Val Leu Tyr

100 105 110

Asn Asn Ala Asp Gly Asp Phe Ala Ile Val Lys Phe Thr Lys Val Leu

115 120 125

Leu Gln Tyr Thr Gly His Ile Thr Trp Thr Pro Pro Ala Ile Phe Lys

130 135 140

Ser Tyr Cys Glu Ile Ile Val Thr His Phe Pro Phe Asp Glu Gln Asn

145 150 155 160

Cys Ser Met Lys Leu Gly Thr Trp Thr Tyr Asp Gly Ser Val Val Ala

165 170 175

Ile Asn Pro Glu Ser Asp Gln Pro Asp Leu Ser Asn Phe Met Glu Ser

180 185 190

Gly Glu Trp Val Ile Lys Glu Ser Arg Gly Trp Lys His Ser Val Thr

195 200 205
Tyr Ser Cys Cys Pro Asp Thr Pro Tyr Leu Asp Ile Thr Tyr His Phe

210 215 220
Val Met Gln Arg Leu Pro Ala Ser Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala
225 230 235 240

Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr
245 250 255

Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala
260 265 270

Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile

275 280 285
Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser
290 295 300

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

Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu
325 330 335

Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu

340 345 350
Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln
355 360 365

Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
370 375 380

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

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

405 410 415
Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
420 425 430

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

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

Arg
465

<210> 44
<211> 211
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220><223> a211 AChR ECD
<400> 44

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

Val Ile Lys Glu Ser Arg Gly Trp Lys His Ser Val Thr Tyr Ser Cys

180 185 190
Cys Pro Asp Thr Pro Tyr Leu Asp Ile Thr Tyr His Phe Val Met Gln

195 200 205
Arg Leu Pro

210

<210> 45

<211> 1269

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pTRPE. a211 AChR.gs.BBz CAAR

<400> 45

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctatatt taaaaggtgt ccagtgtctcc 60
gaacatgaga cccgtctggt ggcaaagcta tttaaagact acagcagcgt ggtgcggcca 120
gtggaagacc accgccaggt cgtggaggct accgtgggcc tgcagctgat acagctcatc 180

aatgtggatg aagtaaatca gatcgtgaca accaatgtgc gtctgaaaca gcaatgggtg 240
gattacaacc taaaatggaa tccagatgac tatggcgggtg tgaaaaaaat tcacattcct 300
tcagaaaaga tctggcgccc agaccttgtt ctctataaca atgcagatgg tgactttgct 360
attgtcaagt tcaccaaagt gtcctgcag tacactggcc acatcacgtg gacacctcca 420
gccatcttta aaagctactg tgagatcatc gtcaccact ttccctttga tgaacagaac 480
tgcagcatga agctgggcac ctggacctac gacggctctg tcgtggccat caaccggaa 540
agcgaccagc cagacctgag caacttcatg gagagcgggg agtgggtgat caaggagtcc 600

cggggctgga agcactccgt gacctattcc tgctgccccg acacccccta cctggacatc 660
acctaccact tcgtcatgca gcgcctgccc gctagcgggtg gcggagggttc tggaggtgga 720
ggttctctcg gaatctacat ctgggcgccc ttggccggga cttgtgggtt ctttctctg 780
tactgggtta tcaccttta ctgcaaacgg ggcagaaaga aactcctgta tatattcaaa 840
caaccattta tgagaccagt acaactact caagaggaag atggctgtag ctgccgattt 900
ccagaagaag aagaaggagg atgtgaactg agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc 960
cccgctacc agcagggccga gaaccagctc tataacgagc tcaatctagg acgaagagag 1020

gagtacgatg ttttggacaa gagactggc cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga 1080
aggaagaacc ctgaggaagg cctgtacaat gaactgcaga aagataagat ggccggaggcc 1140

tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc cggaggggca aggggcacga tggcctttac 1200
cagggtctca gtacagccac caaggacacc tacgacgccc ttcacatgca ggccctgccc 1260
cctcgctaa 1269

<210> 46

<211> 422

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> pTRPE. a211 AChR.gs.BBz CAAR

<400> 46

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

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

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

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

180 185 190
Gly Glu Trp Val Ile Lys Glu Ser Arg Gly Trp Lys His Ser Val Thr

195 200 205
Tyr Ser Cys Cys Pro Asp Thr Pro Tyr Leu Asp Ile Thr Tyr His Phe

210 215 220
Val Met Gln Arg Leu Pro Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

225 230 235 240
Gly Ser Ser Gly Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly

245 250 255
Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg

260 265 270
Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln

275 280 285
Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu

290 295 300
Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala

305 310 315 320
Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu

325 330 335
Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp

340 345 350
Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu

355 360 365
Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile

370 375 380
Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr

385 390 395 400
Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met

405 410 415
Gln Ala Leu Pro Pro Arg

420

<210> 47

<211> 879

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pTRPE. a39P AChR.CD8H.BBz CAAR

<400> 47

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctattt taaaaggtgt ccagtgtctcc 60
gaacatgaga cccgtctggt ggcaaagcta ttgggtggcg gctctctaaa atggaatcca 120

gatgactatg gcggtgtgaa aaaaattcac ggctctctgc agtacactgg ccacgctagc 180
ttcgtgccgg tcttctgcc agcgaagcca accacgacgc cagcaccgcg accaccaaca 240
cctgcgcccc ccacgcgcgc gcagccctg tccttcgccc cagaggcgtg cagaccagca 300
gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg gacttcgcct gtgatattcta catctgggcg 360
cccttggcgg ggacttgggg ggtccttctc ctgtcactgg ttatcacctt ttactgcaag 420
cgcggtcgca agaaactgct ctatatTTTT aaacagccat tcatgagacc tgtccagacc 480
actcaagagg aggacggatg ttctcttaga ttctctgaag aggaagaggg ggggtgagag 540

ctgagagtaa agttctctag aagcgccgat gccccagcct atcaacaggg gcaaaatcaa 600
ctctacaacg aacttaatct gggacgcccga gaggagtacg atgtcttgga taagagacgc 660
ggcaggggacc ctgaaatggg cggaaagcca agacgggaaga acccccagga aggtctgtac 720
aatgaacttc agaaagataa gatggccgaa gcctacagcg agatcgcat gaaaggagag 780
aggcgccgcg gcaaagggca tgatggactg taccagggtc tcagtactgc tactaaggac 840
acatatgatg ccctccacat gcaggccctg ccaccaagg 879

<210> 48

<211> 957

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pTRPE. a65P AChR.CD8H.BBz CAAR

<400> 48

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctattt taaaaggtgt ccagtgtctcc 60
gaacatgaga cccgtctggt ggcaaagcta tttaaagact acagcagcgt ggtgcggcca 120
gtggaagacc accgccaggt cgtggaggtc accggtggcg gctcttgggt ggattacaac 180
ctaaaatgga atccagatga ctatggcggg gtgaaaaaaa ttacatttgg ctctctgcag 240
tacactggcc acgctagctt cgtgccggtc ttctgtccag cgaagccaac cagcagcca 300

gcaccgcgac caccaacacc tgcgccacc atcgctcgc agccctgtc cctgcgcca 360

gaggcgtgca gaccagcagc ggggggcgca gtgcacacga gggggctgga cttcgctgt 420

gatatctaca tctggcgcc cttggccggg acttgtggg tcttctctct gtcactggtt 480

atcacccctt acigcaagcg cggtcgcaag aaactgctct atattttaa acagccattc 540

atgagacctg tccagaccac tcaagaggag gacggatgtt cctgtagatt tctgaagag 600

gaagaggggg ggtgcgagct gagagtaaag ttctctagaa gcgccgatgc cccagcctat 660

caacaggggc aaaatcaact ctacaacgaa cttaatctgg gacgccgaga ggagtacgat 720

gtcttgata agagacgcgg cagggaccct gaaatggcg gaaagccaag acggaagaac 780

ccccaggaag gtctgtacaa tgaacttcag aaagataaga tggccgaagc ctacagcgag 840

atcggcata aaggagagag gcgcccgcc aaaggcatg atggactgta tcagggtctc 900

agtactgcta ctaaggacac atatgatgcc ctccatgc agccctgcc accaagg 957

<210> 49

<211> 1386

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pTRPE. a208 AChR.CD8H.BBz CAAR

<400> 49

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctatgt taaaaggtgt ccagtgtcc 60

gaacatgaga cccgtctggt ggcaaagcta tttaaagact acagcagcgt ggtgcggcca 120

gtggaagacc accgccaggt cgtggaggtc accgtgggcc tgcagctgat acagtcac 180

aatgtggatg aagtaaatca gatcgtgaca accaatgtgc gtctgaaaca gcaatgggtg 240

gattacaacc taaaatggaa tccagatgac tatggcgggtg tgaaaaaat tcacattcct 300

tcagaaaaga tctggcgccc agacctgtt ctctataaca atgcagatgg tgactttgct 360

attgtcaagt tcacaaagt gtcctgcag tacactggcc acatcacgtg gacacctcca 420

gccatcttta aaagctactg tgagatcatc gtcacccact ttcctttga tgaacagaac 480

tgcagcatga agctgggcac ctggacctac gacggctctg tcgtggccat caaccggaa 540

agcgaccagc cagacctgag caacttcacg gagagcgggg agtgggtgat caaggagtcc 600

cggggctgga agcactccgt gacctattcc tgctgccccg acaccccta cctggacatc 660

acctaccact tcgtcatgca ggctagcttc gtgccgtct tctgccagc gaagccaacc 720

acgacccag caccgcgacc accaacacct gcgccacca tcgcgtcgca gccctgtcc 780

ctgcgcccag aggcgtgcag accagcagcg gggggcgag tgacacagag ggggctggac 840

ttcgcctgtg atatctacat ctgggcgccc ttggccggga cttgtgggt ctttctcctg 900
 tcaactgtta tcacccctta ctgcaagcgc ggtcgcaaga aactgctcta tatttttaa 960
 cagccattca tgagacctgt ccagaccact caagaggagg acggatgttc ctgtagattt 1020

cctgaagagg aagagggggg gtgcgagctg agagtaaagt tctctagaag cgccgatgcc 1080
 ccagcctatc aacaggggca aaatcaactc tacaacgaac ttaatctggg acgccgagag 1140
 gagtacgatg tcttgataa gagacgcggc agggaccctg aaatgggcgg aaagccaaga 1200
 cggaagaacc cccaggaagg tctgtacaat gaacttcaga aagataagat ggccgaagcc 1260
 tacagcgaga tcggcatgaa aggagagagg cgccgcggca aaggcatga tggactgtat 1320
 cagggtctca gtactgtac taaggacaca tatgatcccc tccacatgca ggccctgcca 1380
 ccaagg 1386

<210> 50

<211> 1392

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pTRPE. a210 AChR.CD8H.BBz CAAR

<400> 50

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctatit taaaagggtg ccagtgtctc 60
 gaacatgaga cccgtctggt ggcaaagcta tttaaagact acagcagcgt ggtgcggcca 120
 gtggaagacc accgccaggt cgtggaggtc accgtgggcc tgcagctgat acagctcatc 180
 aatgtggatg aagtaaatca gatcgtgaca accaatgtgc gtctgaaaca gcaatgggtg 240
 gattacaacc taaaatggaa tccagatgac tatggcgggtg tgaaaaaaat tcacattcct 300
 tcagaaaaga tctggcgccc agacctgtt ctctataaca atgcagatgg tgactttgct 360

attgtcaagt tcaccaaagt gctcctgcag tacactggcc acatcacgtg gacacctcca 420
 gccatcttta aaagctactg tgagatcatc gtcaccact ttccttttga tgaacagaac 480
 tgcagcatga agctgggcac ctggacctac gacggctctg tcgtggccat caaccggaa 540
 agcgaccagc cagacctgag caacttcatg gagagcgggg agtgggtgat caaggagtcc 600
 cggggctgga agcactccgt gacctattcc tgctgccccg acaccctta cctggacatc 660
 acctaccact tcgtcatgca gcgcctggct agcttcgtgc cggttcttct gccagcgaag 720
 ccaaccacga cgccagcacc gcgaccacca acacctgcgc ccaccatcgc gtcgcagccc 780

ctgtccctgc gccagaggc gtgcagacca gcagcggggg gcgcagtga cagaggggg 840
 ctggacttcg cctgtgatat ctacatctgg gcgcccttgg ccgggacttg tggggctctt 900

ctcctgtcac tggttatcac cctttactgc aagcgcggtc gcaagaaact gctctatatt 960
 tttaaacagc cattcatgag acctgtccag accactcaag aggaggacgg atgttcctgt 1020
 agatttcttg aagaggaaga gggggggtgc gagctgagag taaagtcttc tagaagcgcc 1080
 gatgccccag cctatcaaca ggggcaaaat caactctaca acgaacttaa tctgggacgc 1140
 cgagaggagt acgatgtctt ggataagaga cgcggcaggg accctgaaat gggcggaag 1200

ccaagacgga agaaccacca ggaaggcttg tacaatgaac ttcagaaaga taagatggcc 1260
 gaagcctaca gcgagatcgg catgaaagga gagaggcgcc gcggcaaagg gcatgatgga 1320
 ctgtatcagg gtctcagtag tctactaag gacacatatg atgccctcca catgcaggcc 1380
 ctgccaccaa gg 1392

<210> 51
 <211> 1263
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pTRPE. ?210 AChR.gs.BBz CAAR
 <400> 51

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctattt taaaaggtgt ccagtgtccc 60
 gaacatgaga cccgtctggt ggcaaagcta tttaaagact acagcagcgt ggtgcggcca 120

gtggaagacc accgccaggt cgtggaggtc accgtgggcc tgcagctgat acagctcatc 180
 aatgtggatg aagtaaatca gatcgtgaca accaatgtgc gtctgaaaca gcaatgggtg 240
 gattacaacc taaaatggaa tccagatgac tatggcgggtg tgaaaaaaat tcacattcct 300
 tcagaaaaga tctggcgccc agaccttgtt ctctataaca atgcagatgg tgactttgct 360
 attgtcaagt tcaccaaagt gctcctgcag tacactggcc acatcacgtg gacacctcca 420
 gccatcttta aaagctactg tgagatcatc gtcacccact ttccttttga tgaacagaac 480
 tgcagcatga agctgggcac ctggacctac gacggctctg tcgtggccat caaccggaa 540

agcgaccagc cagacctgag caacttcatg gagagcgggg agtgggtgat caaggagtec 600
 cggggctgga agcactccgt gacctattcc tgctgccccg acaccacctc cctggacatc 660
 acctaccact tcgtcatgca gcgcctggct agcgggtggcg gaggttctgg aggtggaggt 720
 tcctccggaa tctacatctg ggcgccttg gccgggactt gtgggtctct tctcctgtca 780
 ctggttatca ccctttactg caaacggggc agaaagaaac tcctgtatat attcaacaa 840
 ccatttatga gaccagtaca aactactcaa gaggaagatg gctgtagctg ccgatttcca 900
 gaagaagaag aaggaggatg tgaactgaga gtgaagtcca gcaggagcgc agacgcccc 960

gcgtaccagc agggccagaa ccagctctat aacgagctca atctaggacg aagagaggag 1020
 tacgatgttt tggacaagag acgtggccgg gaccctgaga tggggggaaa gccgagaagg 1080
 aagaacctc aggaaggcct gtacaatgaa ctgcagaaag ataagatggc ggaggcctac 1140
 agtgagattg ggatgaaagg cgagcgccgg aggggcaagg ggcacgatgg cctttaccag 1200
 ggtctcagta cagccaccaaa ggacacctac gacgcccttc acatgcaggc cctgccccct 1260
 cgc 1263

<210> 52

<211> 1395

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pTRPE. a211 AChR.CD8H.BBz CAAR

<400> 52

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctattt taaaagggtg ccagtgcctc 60
 gaacatgaga cccgtctggt ggcaaagcta tttaaagact acagcagcgt ggtgcggcca 120
 gtggaagacc accgccaggt cgtggaggct accgtgggcc tgcagctgat acagctcatc 180
 aatgtggatg aagtaaatca gatcgtgaca accaatgtgc gtctgaaaca gcaatgggtg 240
 gattacaacc taaaatggaa tccagatgac tatggcgggtg tgaaaaaaat tcacattcct 300
 tcagaaaaga tctggcgccc agaccttgtt ctctataaca atgcagatgg tgactttgct 360

attgtcaagt tcaccaaagt gtccttcag tacactggcc acatcacgtg gacacctcca 420
 gccatcttta aaagctactg tgagatcatc gtcaccact ttccctttga tgaacagaac 480
 tgcagcatga agctgggcac ctggacctac gacggctctg tcgtggccat caaccggaa 540
 agcgaccagc cagacctgag caacttcatg gagagcgggg agtgggtgat caaggagtcc 600
 cggggctgga agcactccgt gacctattcc tctgccccg acacccccta cctggacatc 660
 acctaccact tcgtcatgca gcgcctgccc gctagcttcg tgccggtctt cctgccagcg 720
 aagccaacca cgacgccagc acccgacca ccaacacctg cgcccacat cgcgtcgag 780

cccctgtccc tgcgccaga ggcgtgcaga ccagcagcgg ggggcgcagt gcacacgagg 840
 gggctggact tcgcctgtga tatctacatc tgggcgcctt tggccgggac ttgtggggtc 900
 ctctcctgt cactggttat caccctttac tgcaagcgcg gtcgcaagaa actgctctat 960
 atttttaaac agccattcat gagacctgtc cagaccactc aagaggagga cggatgttcc 1020
 tgtagatttc ctgaagagga agaggggggg tgcgagctga gactaaagt ctctagaagc 1080
 gccgatgccc cagcctatca acaggggcaa aatcaactct acaacgaact taatctggga 1140

cgccgagagg agtacgatgt cttggataag agacgcggca gggaccctga aatgggcgga	1200
aagccaagac ggaagaaccc ccaggaaggt ctgtacaatg aacttcagaa agataagatg	1260
gccgaagcct acagcgagat cggcatgaaa ggagagaggc gccgcggcaa agggcatgat	1320
ggactgtatc aggttctcag tactgctact aaggacacat atgatgccct ccacatgcag	1380
gccctgccac caagg	1395
<210> 53	
<211> 336	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CD3 zeta (codon optimized)	
<400> 53	
agagtaaagt tccttagaag cgccgatgcc ccagcctatc aacaggggca aaatcaactc	60
tacaacgaac ttaatctggg acgccgagag gactacgatg tcttggataa gagacgcggc	120
agggaccctg aatgggcgg aaagccaaga cggaagaacc ccaggaagg tctgtacaat	180
gaacttcaga aagataagat ggccaagcc tacagcgaga tcggcatgaa aggagagagg	240
cgccgcggca aaggcatga tggactgtat cagggtctca gtactgctac taaggacaca	300
tatgatgcc tccacatgca ggccctgcc ccaagg	336