(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년04월01일
(11) 등록번호 10-2652827
(24) 등록일자 2024년03월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 14/705* (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2803 (2013.01)
A61K 39/0011 (2023.05)
(21) 출원번호 10-2022-7040331(분할)
(22) 출원일자(국제) 2017년06월07일
심사청구일자 2022년12월16일
(85) 번역문제출일자 2022년11월17일
(65) 공개번호 10-2022-0162804
(43) 공개일자 2022년12월08일
(62) 원출원 특허 10-2019-7000376
원출원일자(국제) 2017년06월07일
심사청구일자 2020년06월05일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/036440
(87) 국제공개번호 WO 2017/214333
국제공개일자 2017년12월14일
(30) 우선권주장
62/347,503 2016년06월08일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
BLOOD. Vol.118, No.5 (2011.)*
국제공개공보 WO2012/079000(2012.06.14.)*
국제공개공보 WO2015/150526(2015.10.08.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
프레시전 인코포레이티드
미국, 메릴랜드 20876, 저먼타운, 20358 세네카 메도우스 파크웨이
(72) 발명자
샤 루툴 알.
미국, 메릴랜드 20841, 보이즈, 14302 하베스트 문 로드
찬 팀
미국, 메릴랜드 21702, 프레데릭, 유닛 2디, 2508 셀리 서클
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

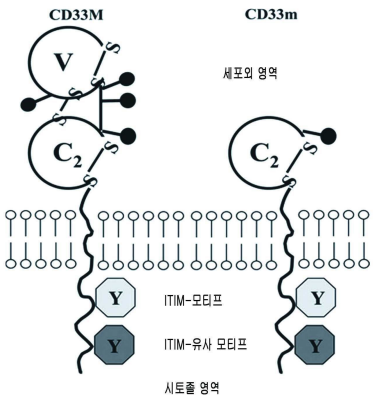
전체 청구항 수 : 총 45 항 심사관 : 고일영

(54) 발명의 명칭 **CD33 특이적 키메라 항원 수용체**

(57) 요 약

본원에는 암 요법을 위한 키메라 항원 수용체 (CAR), 보다 특히, CD33 모노클로날 항체로부터의 scFv를 함유하는 CAR이 제공된다. 이러한 CAR을 함유하는 면역 이펙터 세포, 및 증식성 장애 예컨대 급성 골수성 백혈병 (AML), 및 재발 또는 난치성 AML의 치료 방법이 제공된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 14/70521 (2013.01)
C07K 14/70575 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2319/02 (2013.01)
C07K 2319/03 (2013.01)
(72) 발명자
엠티지 피터
미국, 캘리포니아 94549, 라파예트, 아파트 47, 3573 테라스 웨이
야라가다 람야
미국, 메릴랜드 20878, 게이더스버그, 아파트 302, 327 웨스트 사이드 드라이브

명 세 서

청구범위

청구항 1

벡터로서,

(A) 주쇄(backbone);

(B) (1) CD33 항원 결합 도메인으로서,

(a) 서열번호: 1의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드 및 서열번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드;

(b) 서열번호: 9의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드 및 서열번호: 10의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드;

(c) 서열번호: 11의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드 및 서열번호: 12의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드; 또는

(d) 서열번호: 13의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드 및 서열번호: 14의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드

를 포함하는 CD33 항원 결합 도메인;

(2) 스톡 도메인(stalk domain);

(3) 막관통 도메인; 및

(4) 세포내 도메인(intracellular domain)

을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 코딩하는 핵산; 및

(C) 세포 태그를 코딩하는 핵산

을 포함하는 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, CD33 항원 결합 도메인이 서열번호: 8의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하는, 벡터.

청구항 3

제1항에 있어서, 스톡 도메인이 서열번호: 22의 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는, 벡터.

청구항 4

제1항에 있어서, 세포내 도메인이 서열번호: 24의 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는, 벡터.

청구항 5

제1항에 있어서, 세포내 도메인이 서열번호: 28의 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는, 벡터.

청구항 6

제1항에 있어서, 세포내 도메인이 서열번호: 26의 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는, 벡터.

청구항 7

제1항에 있어서, 세포 태그가 말단절단된(truncated) 표피 성장 인자 수용체, CD20, 또는 말단절단된 CD20을 포함하는, 벡터.

청구항 8

제7항에 있어서, 세포 태그가 서열번호: 32의 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는, 벡터.

청구항 9

제7항에 있어서, 세포 태그가 서열번호: 54의 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는, 벡터.

청구항 10

제1항에 있어서, CAR이 서열번호: 39, 41, 43, 47, 49, 또는 51 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하는, 벡터.

청구항 11

제1항에 있어서,

(a) 다음을 포함하는 CAR:

(i) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 CD33 항원 결합 도메인;

(ii) 서열번호: 22의 아미노산 서열을 포함하는 스톡 도메인;

(iii) 서열번호: 28의 아미노산 서열을 포함하는 공동자극 신호전달 도메인; 및

(iv) 서열번호: 26의 아미노산 서열을 포함하는 CD3 제타 신호전달 도메인, 및

(b) 서열번호: 32 또는 54의 아미노산 서열을 포함하는 세포 태그

를 코딩하는, 벡터.

청구항 12

제1항에 있어서,

(a) 다음을 포함하는 CAR:

(i) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 CD33 항원 결합 도메인;

(ii) 서열번호: 22의 아미노산 서열을 포함하는 스톡 도메인;

(iii) 서열번호: 24의 아미노산 서열을 포함하는 공동자극 신호전달 도메인; 및

(iv) 서열번호: 26의 아미노산 서열을 포함하는 CD3 제타 신호전달 도메인, 및

(b) 서열번호: 32 또는 54의 아미노산 서열을 포함하는 세포 태그

를 코딩하는, 벡터.

청구항 13

제1항에 있어서, 시토카인을 추가로 코딩하는, 벡터.

청구항 14

제13항에 있어서, 시토카인이 IL-2, IL-15, IL-12, 또는 IL-21인, 벡터.

청구항 15

제1항에 있어서, IL-15 및 IL-15Rα를 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 추가로 포함하는, 벡터.

청구항 16

제15항에 있어서, 융합 단백질이 서열번호: 37의 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 벡터.

청구항 17

제1항에 있어서, 세포내 도메인이

(a) 4-1BB 또는 CD28, 또는 이들 둘 다를 포함하는 공동자극 신호전달 도메인(costimulatory signaling domain); 및

(b) CD3 제타 신호전달 도메인

을 포함하는, 벡터.

청구항 18

제1항에 있어서, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 또는 비-바이러스성 벡터인, 벡터.

청구항 19

제1항에 있어서, 자기-절단 토세아 아시그나 바이러스(T2A) 펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 추가로 포함하는, 벡터.

청구항 20

제1항에 있어서, 주쇄가 슬리핑 뷰티 트랜스포존(*Sleeping Beauty* transposon) DNA 플라스미드 또는 pFUGW인, 벡터.

청구항 21

제1항에 있어서, 프로모터를 추가로 포함하는, 벡터.

청구항 22

제21항에 있어서, 프로모터가 hEF1a1인, 벡터.

청구항 23

제1항에 있어서, 플라스미드를 포함하는, 벡터.

청구항 24

제23항에 있어서, 발현 플라스미드를 포함하는, 벡터.

청구항 25

제1항에 있어서,

(a) (i) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 CD33 항원 결합 도메인;

(ii) 서열번호: 22의 아미노산 서열을 포함하는 스톡 도메인;

(iii) 서열번호: 28의 아미노산 서열을 포함하는 공동자극 신호전달 도메인; 및

(iv) 서열번호: 26의 아미노산 서열을 포함하는 CD3 제타 신호전달 도메인

을 포함하는, CAR;

(b) 서열번호: 54의 아미노산 서열을 포함하는 세포 태그; 및

(c) 서열번호: 37의 아미노산 서열을 포함하는 융합 단백질

을 코딩하는 벡터.

청구항 26

면역 이펙터 세포로서,

(A) 서열번호: 36, 54, 및 56 중 어느 하나와 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 세포 태그; 및

(B) (i) CD33 항원 결합 도메인으로서,

(a) 서열번호: 1의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드 및 서열번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드;

(b) 서열번호: 9의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드 및 서열번호: 10의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드;

(c) 서열번호: 11의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드 및 서열번호: 12의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드; 또는

(d) 서열번호: 13의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드 및 서열번호: 14의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드

를 포함하는 CD33 항원 결합 도메인;

(ii) 스톡 도메인;

(iii) 막관통 도메인; 및

(iv) 세포내 도메인

을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는, 면역 이펙터 세포.

청구항 27

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항의 벡터를 포함하는, 면역 이펙터 세포.

청구항 28

제27항에 있어서, 세포가 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 세포독성 T 림프구(CTL), 또는 조절성 T 세포인, 면역 이펙터 세포.

청구항 29

제27항에 있어서, 세포가 CD33 항원 결합 도메인이 CD33에 결합하는 경우 항-종양 면역성을 나타내는, 면역 이펙터 세포.

청구항 30

제27항의 면역 이펙터 세포를 포함하는, 암 치료를 필요로 하는 인간 대상체에서 암을 치료하기 위한 조성물.

청구항 31

제30항에 있어서, 대상체가 급성 골수성 백혈병(AML)으로 진단받은, 조성물.

청구항 32

제31항에 있어서, 급성 골수성 백혈병이 재발 또는 난치성 AML인, 조성물.

청구항 33

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항의 벡터를 포함하는, 면역 이펙터 세포에서 CAR을 발현하기 위한 시스템.

청구항 34

제33항에 있어서, 면역 이펙터 세포가 T 세포 또는 NK 세포인, 시스템.

청구항 35

제33항에 있어서, 슬리핑 뷰티 트랜스포사제를 추가로 포함하는, 시스템.

청구항 36

제35항에 있어서, 슬리핑 뷰티 트랜스포사제가 SB11, SB100X 또는 SB110인, 시스템.

청구항 37

제33항에 있어서, 면역 이펙터 세포가 포유동물 세포인, 시스템.

청구항 38

면역 이펙터 세포를 제33항의 시스템과 접촉시키는 것을 포함하는, 시험관 내(*in vitro*)에서 CAR을 상기 면역 이펙터 세포에서 발현하는 방법.

청구항 39

대상체로부터 수득된 샘플 중의 T-세포, T-세포 선조(progenitor), 또는 이들 둘 다를, (a) 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항의 벡터, 및 (b) 트랜스포사제를 코딩하는 벡터로 형질감염시켜, 가공된 T-세포를 생산하는 단계

를 포함하는, 가공된 T-세포를 생산하는 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 샘플 중의 세포를 시토카인을 코딩하는 벡터로 형질감염시키는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 41

제39항에 있어서, IL-15 및 IL-15Rα를 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 벡터로, 상기 샘플 중의 세포를 형질감염시키는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 42

제39항에 있어서, 상기 벡터 중 하나 이상이 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 또는 비-바이러스성 벡터인, 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 트랜스포사제가 슬리핑 뷰티 트랜스포사제인, 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 슬리핑 뷰티 트랜스포사제가 SB11, SB100X 또는 SB110인, 방법.

청구항 45

제39항에 있어서, 형질감염 후, 가공된 T 세포가 즉시 냉동-보존(cryo-preserved)되는, 방법.

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 상호-참조**

[0002] 본 출원은 2016년 6월 8일에 출원된 미국 가특허출원 번호 62/347,503을 우선권 주장하며, 이 가출원은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] **서열 목록에 대한 참조**

[0004] 본 출원은 ASCII 형식으로 전자적으로 제출된 서열 목록을 포함하며, 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 2017년 6월 6일에 만들어진 상기 ASCII 사본의 명칭은 50471_709_601_SL.txt이며 크기는 103,120 바이트이다.

배 경 기 술

[0005] 본원에는 인간에서 암을 치료하기 위한 조성물 및 방법이 제공한다. 본 발명은 추가로 골수 악성 종양, 예를 들어, 급성 골수구성 백혈병(acute myelogenous leukemia)을 치료하기 위한 특이적 키메라 항원 수용체 및 벡터에 관한 것이다.

[0006] 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia) (AML)은 골수가 비정상적인 골수모세포를 만드는 암의 유형이다. 이는 성인에서 급성 백혈병의 가장 흔한 형태이다 (Siegel, R., et al., Cancer Statistics, *CA Cancer J Clin,* 64(1):9-29 (2014)). AML은 65세 내지 70세의 발병에서 중위 연령(median age)을 가진 급성 진행성 질환이다. AML은 급성 골수세포 백혈병(acute myelocytic leukemia), 급성 골수구성 백혈병, 급성 과립구성 백혈병(acute granulocytic leukemia), 및 급성 비-림프구성 백혈병(acute non-lymphocytic leukemia)을 포함한, 많은 이름으로 공지되어 있다. "급성"은 신속히 진행될 수 있는 이 질환의 공격적인 성질을 나타내며, 치료되

지 않으면, 진단 수 개월 이내에 치명적이다. 암은 골수에서 유래하나 혈액을 통해 다른 해부학적 부위로 신속히 퍼진다. 상기 질환은 어린이 및 성인 둘 다에서 관찰되나, 노인에서는 더 흔한다. AML이 증가할 확률은 연령에 따라 증가하나, 인간은 어느 연령에서나 AML에 걸릴 수 있다. 급성 백혈병을 가진 성인 10명 중 약 8명은 AML을 가지며 백혈병을 가진 어린이 6명 중 약 1명이 AML을 가질 것이다. 평균 12,000건의 새로운 AML 사례가 1년 기준으로 예상되며 대략 30,000명의 환자가 현재 미국에서 관해 상태로 살고 있거나 관해 상태를 경험하고 있다.

[0007] 노인 AML 환자 (≥ 65세)에서, 중앙 생존(median survival)은 짧다 (범위가 65세 내지 74세의 환자의 경우 3.9개월에서 ≥ 85세의 환자의 경우 1.4개월까지 이른다). AML 환자에 대한 치료 옵션은 제한적이며, 결과는 5년 생존율이 평균 20%이며, 65세 초과 환자의 경우 5년 생존율이 5% 미만으로 통상 저조하다 (Thein, M. et al., Outcome of older patients with acute myeloid leukemia: an analysis of SEER data over 3 decades, *Cancer,* 119(15):2720-7 (2013)). AML의 특정 하위군은 염색체 7 이상, 복합 핵형(complex karyotype), 재발 및/또는 난치성 AML 및 이전의 골수이형성 증후군 (MDS) 또는 골수증식성 신생물 (MPN)에서 발생하는 AML을 가진 환자와 같이 특히 더 나쁜 결과를 갖는다. AML을 가진 65세 이상인 환자는 젊은 환자보다 유리하지 않은-위험 세포유전학을 가질 가능성이 더 높다. 이들 세포유전 인자는 화학요법에 대한 내성과 연관이 있으며 요법에 대해 상당히 더 낮은 반응률을 나타낸다. 반응률 외에도, AML을 가진 노인 환자는 흔히, 저조한 내약성 및 치료 결과 때문에 표준 유도 화학요법의 후보자로 간주되지 않거나 표준 유도 화학요법을 받지 않는 것으로 선택된다. 유도 화학요법은 환자의 이 하위집합에서 높은 치료-관련 사망률 및 낮은 완전 반응 (CR)률과 연관이 있다. 현재, 표준 유도 화학요법을 받지 않는 AML 환자에 대해 어떠한 승인된 요법도 없다. 요법의 부족 및 세포유전학과 연관된 저조한 반응률로 인해 AML은 유리한 안전성 프로파일로 임상적 이익을 나타내는 신규한 작용제에 대한 충족되지 않은 의학적 필요성을 갖게 된다.

[0008] 조혈은 다분화능(pluripotent) 줄기 세포로부터 더 성숙한 분화된 세포 표현형까지의 조직 특이적 계층적 분화를 특징으로 한다. 항상성 조혈과 유사하게, AML은 백혈병 줄기 세포 (LSC)를 일으키는 이 정지 줄기 세포 집단에 축적되는 돌연변이 형태로 발생한다고 믿어진다. 이 AML LSC 집단을 제거할 수 없으면 재발 및 치료 실패를 결과할 것이다.

[0009] 비록 대부분의 AML 환자가 유도 화학요법으로 관해를 달성하긴 할 것이지만; 사후-관해 강화 요법(post-remission consolidation therapy)의 투여에도 불구하고 많은 환자들이 재발할 것이다. 재발은 수주에서 오랜 세월 후에 발생할 수 있다. 환자의 10%까지는 유도 화학요법에도 난치성일 것이다. 이들 환자 군 (재발/난치성) 둘 다 특히 고위험군(poor risk group)을 구성한다. 비록 동종이형 줄기 세포 이식이 이들 환자의 대부분에게 권장되는 접근법으로 간주될 것이긴 하지만, 이는 소수의 환자에게만 실현 가능하며 상당한 이환률 및 사망률과 연관되어 있다 (Hamadani, M., Awan, F. & Copelan, E., Hematopoietic stem cell transplantation in adults with acute myeloid leukemia, *Biol Blood Marrow Transplant,* 5:556-67 (2008)). 게다가, 난치성 질환으로 이식된 환자의 결과는 저조하고 (Duval, M. et al., Hematopoietic stem-cell transplantation for acute leukemia in relapse or primary induction failure, *J Clin Oncol,* 28(23):3730-8 (2010)) 재발 질환을 가진 환자의 거의 절반이 화학요법불응성(chemorefractory)이므로 이식에 적합하지 않다 (Hamadani, M., Awan, F. & Copelan, E., Hematopoietic stem cell transplantation in adults with acute myeloid leukemia *Biol Blood Marrow Transplant,* 5:556-67 (2008)), (Estey, E., 2013. Acute myeloid leukemia: 2013 update on risk-stratification and management. *Am J Hematol,* 88(4), pp. 318-27). 많은 신규한 약물 및 접근법이 환자 군에 대해 조사되고 있다. 그러나, CR률은 일반적으로 30% 미만이었다 (Litzow, M. et al., Failure of three novel regimens to improve outcome for patients with relapsed or refractory acute myeloid leukaemia: a report from the Eastern Cooperative Oncology Group, *Br J Haemotol,* 148:217-25 (2010)), (Cortes, J. et al., Phase 2 randomized study of p53 antisense oligonucleotide (cenersen) plus idarubicin with or without cytarabine in refractory and relapsed acute myeloid leukemia, *Cancer,* 118(2):418-27 (2012)), (Kirschbaum, M. et al., A phase 1 trial dose-escalation study of tipifarnib on a week-on, week-off schedule in relapsed, refractory or high-risk myeloid leukemia, *Leukemia,* 25(10):1543-7 (2011)).

[0010] AML 환자에서, 세포유전학은 치료에 대한 반응 예측에 중요한 예후 인자이다 (Grimwade, D. et al., The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties, *Blood,* 92(7):2322-33 (1998)). 백혈병 세포가 전좌(translocation) t(8;21), t(15;17), t(16;16), 또는 inv(16)을

갖는 AML을 가진 환자는 유도 화학요법 및 집중적인 사후-관해 강화 화학요법으로 유리한 결과를 갖는다. 그러나, 염색체 5 또는 7,11q23의 이상 또는 복합 핵형은 현재 이용 가능한 유도 및 사후 관해 화학요법으로 매우 저조한 결과를 갖는다. 정상 핵형 또는 8번 삼염색체증을 가진 환자는 중간 예후를 가진다. AML을 가진 성인 중에서, t(9;22) 또는 t(4;11)는 매우 불량한 예후를 부여한다. t(9;22) AML을 가진 환자는 설사 화학요법 단독만으로 치유되더라도 극히 드물다. 백혈병 모세포(leukemic blast cell) 상에 발현되는 표면 항원의 면역표현형 결정은 진단에 도움이 될 수 있으며 골수성, T, 및 B 직계성(lineage) 백혈병의 치료 및 예후에 중요한 영향을 미친다. 장기적인 AML 생존의 증가가 통상적인 요법을 사용하여 달성하기 어려운 것으로 입증된 것을 고려하면, 신규한 치료 전략이 필요하다.

발명의 내용

[0011] 본 개시내용의 한 측면은 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 단리된 핵산에 관한 것이며, 여기서 CAR은 (a) CD33 항원 결합 도메인; (b) 스톡 도메인(stalk domain); (c) 막관통 도메인; (d) 4-1BB 및 CD28 중 적어도 하나, 또는 그의 단편을 포함하는 공동자극 신호전달 도메인(costimulatory signaling domain); (e) CD3 제타 신호전달 도메인; 그리고 임의로 (f) 말단절단된(truncated) 표피 성장 인자 수용체 (HER1t 또는 HER1t-1)를 포함한다.

[0012] 본원에는 주쇄(backbone) 및 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터가 제공되며, 여기서 CAR은 (a) CD33 항원 결합 도메인; (b) 스톡 도메인; (c) 막관통 도메인; (d) 4-1BB 또는 CD28, 또는 이들 둘 다를 포함하는 공동자극 신호전달 도메인; 및 (e) CD3 제타 신호전달 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서 말단절단된 표피 성장 인자 수용체 (HER1t 또는 HER1t-1) 또는 전장 또는 말단절단된 CD20을 코딩하는 핵산을 추가로 포함하는 벡터가 제공된다.

[0013] 본원에는 주쇄 및 (1) 말단절단된 표피 성장 인자 수용체 또는 그의 기능적 변이체; 및 (2) 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터가 제공되며, 여기서 CAR은 (a) CD33 항원 결합 도메인; (b) 스톡 도메인; (c) 막관통 도메인; (d) 4-1BB 또는 CD28, 또는 이들 둘 다를 포함하는 공동자극 신호전달 도메인; 및 (e) CD3 제타 신호전달 도메인을 포함한다.

[0014] 특정 실시양태에서 주쇄 및 (1) 전장 CD20 및 그의 기능적 변이체, 및 (2) 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터가 제공되며, 여기서 CAR은 (a) CD33 항원 결합 도메인; (b) 스톡 도메인; (c) 막관통 도메인; (d) 4-1BB 또는 CD28, 또는 이들 둘 다를 포함하는 공동자극 신호전달 도메인; 및 (e) CD3 제타 신호전달 도메인을 포함한다.

[0015] 특정 실시양태에서 주쇄 및 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하는 가공된(engineered) 세포, 예를 들어 면역 이펙터 세포(immune effector cell)가 제공되며, 여기서 CAR은 (a) CD33 항원 결합 도메인; (b) 스톡 도메인; (c) 막관통 도메인; (d) 4-1BB 또는 CD28, 또는 이들 둘 다를 포함하는 공동자극 신호전달 도메인; (e) CD3 제타 신호전달 도메인; 및 (f) 말단절단된 표피 성장 인자 수용체 (HER1t, 또는 HER1t-1), 전장 CD20 및 말단절단된 CD20 (CD20t-1) 중 적어도 하나를 포함한다.

[0016] 특정 실시양태에서 (1) 말단절단된 표피 성장 인자 수용체 (HER1t 또는 HER1t-1); 및 (2) 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함하는 가공된 세포, 예를 들어 면역 이펙터 세포가 제공되며, 여기서 CAR은 (a) CD33 항원 결합 도메인; (b) 스톡 도메인; (c) 막관통 도메인; (d) 4-1BB 또는 CD28, 또는 이들 둘 다를 포함하는 공동자극 신호전달 도메인; 및 (e) CD3 제타 신호전달 도메인을 포함한다.

[0017] 특정 실시양태에서 (1) 사멸 스위치(kill switch), 선택 마커, 바이오마커, 또는 그의 조합으로서 사용하기 위한 세포 태그; 및 (2) 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함하는 가공된 세포, 예를 들어 면역 이펙터 세포가 제공되며, 여기서 CAR은 (a) CD33 항원 결합 도메인; (b) 스톡 도메인; (c) 막관통 도메인; (d) 공동자극 신호전달 도메인; 및 (e) CD3 제타 신호전달 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 공동자극 신호전달 도메인은 4-1BB 및 CD28 중 적어도 하나를 포함한다. 실시양태에서, 세포 태그는 HER1t, HER1t-1, CD20 또는 CD20t-1이다.

[0018] 본원에는 인간에게 CAR을 발현하도록 유전자 변형된 세포의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 인간에서 표적 세포 집단 또는 조직에 대한 T 세포-매개 면역 반응을 자극하는 방법이 제공되며, 여기서 CAR은 (a) CD33 항원 결합 도메인; (b) 스톡 도메인; (c) 막관통 도메인; (d) 4-1BB 또는 CD28, 또는 이들 둘 다를 포함하는 공동자극 신호전달 도메인; (e) CD3 제타 신호전달 도메인; 및 (f) 말단절단된 표피 성장 인자 수용체 (HER1t 또는 HER1t-1)를 포함한다.

[0019] 본원에는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 단리된 핵산이 제공되며, 여기서 CAR은 (a) CD33 항원 결합 도메인; (b) 스톡 도메인; (c) 막관통 도메인; (d) 4-1BB 또는 CD28, 또는 이들 둘 다를 포함하는 공동자극 신호전달 도메인; (e) CD3 제타 신호전달 도메인을 포함한다.

[0020] 일부 실시양태에서, CD33 항원 결합 도메인은 다음 중 적어도 하나를 포함한다: (a) 서열번호: 8 (hM195scFv)의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드; (b) 서열번호: 9 및 10 (M2H12)의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드; (c) 서열번호: 11 및 12 (DRB2)의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드; 및 (d) 서열번호: 14 및 15 (My9-6)의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드.

[0021] 일부 경우에, CD33 항원 결합 도메인은 서열번호: 8 (hM195scFv)의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드이다. 일부 경우에, 스톡 도메인은 서열번호: 22 (CD8알파 힌지)의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드이다.

[0022] 일부 실시양태에서, 공동자극 신호전달 도메인은 4-1BB를 포함한다. 일부 경우에, 4-1BB의 공동자극 신호전달 도메인은 서열번호: 24의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 일부 경우에, 공동자극 신호전달 도메인은 CD28을 포함한다. 일부 실시양태에서, CD28의 공동자극 신호전달 도메인은 서열번호: 28의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함한다.

[0023] 일부 경우에, CD3 제타 신호전달 도메인은 서열번호: 26의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 핵산은 말단절단된 표피 성장 인자 수용체를 추가로 포함한다. 일부 경우에, 말단절단된 표피 성장 인자 수용체는 HER1t이며 서열번호: 32의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 일부 경우에, 말단절단된 표피 성장 인자 수용체는 HER1t-1이며 서열번호: 54의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함한다.

[0024] 일부 실시양태에서, CAR은 서열번호: 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 또는 55를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함한다.

[0025] 본원에는 주쇄 및 (1) HER1t, HER1t-1 또는 그의 기능적 변이체 중 적어도 하나를 포함하는 말단절단된 표피 성장 인자 수용체; 및 (2) 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터가 제공되며, 여기서 CAR은 (a) CD33 항원 결합 도메인; (b) 스톡 도메인; (c) 막관통 도메인; (d) 4-1BB 또는 CD28, 또는 이들 둘 다를 포함하는 공동자극 신호전달 도메인; 및 (e) CD3 제타 신호전달 도메인을 포함한다.

[0026] 본원에는 주쇄 및 (1) 전장 CD20, 말단절단된 CD20 (CD20t-1) 또는 그의 기능적 변이체; 및 (2) 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터가 제공되며, 여기서 CAR은 (a) CD33 항원 결합 도메인; (b) 스톡 도메인; (c) 막관통 도메인; (d) 4-1BB 또는 CD28, 또는 이들 둘 다를 포함하는 공동자극 신호전달 도메인; 및 (e) CD3 제타 신호전달 도메인을 포함한다.

[0027] 일부 실시양태에서, 벡터는 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 또는 비-바이러스성 벡터이다. 일부 경우에, 말단절단된 표피 성장 인자 수용체는 서열번호: 32 또는 서열번호: 54의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 일부 경우에, 벡터는 말단절단된 CD20 (CD20t-1), 또는 그의 기능적 변이체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 여기서 상기 CD20t-1은 서열번호: 56의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함한다.

[0028] 일부 실시양태에서, 전장 CD20은 서열번호: 36의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 일부 경우에, 벡터는 자기-절단(self-cleaving) 토세아 아시그나 바이러스(*Thosea asigna* virus) (T2A) 펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함한다. 일부 경우에, 벡터의 주쇄는 슬리핑 뷰티 트랜스포존(Sleeping Beauty transposon) DNA 플라스미드 또는 pFUGW이다.

[0029] 일부 경우에, 벡터는 프로모터를 추가로 포함한다. 일부 경우에, 프로모터는 hEF1a1이다. 일부 경우에, CD33 항원 결합 도메인은 다음 중 적어도 하나를 포함한다: (a) 서열번호: 8 (hM195scFv)의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드; (b) 서열번호: 9 및 10 (M2H12)의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드; (c) 서열번호: 11 및 12 (DRB2)의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드; 및 (d) 서열번호: 14 및 15 (My9-6)의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드.

[0030] 일부 실시양태에서, CD33 항원 결합 도메인은 서열번호: 8의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드이다. 일부 경우에, 스톡 도메인은 서열번호: 22 (CD8알파 힌지)의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 일부 경우에, 공동자극 신호전달 도메인은 4-1BB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 4-1BB의 공동자극 신호전달 도메인은 서열번호: 24의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다.

[0031] 일부 경우에, 벡터의 공동자극 신호전달 도메인은 CD28을 포함한다. 일부 경우에, CD28의 공동자극 신호전달 도메인은 서열번호: 28의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 경우에, CD3 제타 신호전달 도메인은 서열번호: 26의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다.

[0032] 일부 실시양태에서, 상기 벡터는 플라스미드를 포함한다. 일부 경우에, 각각의 상기 벡터는 발현 플라스미드를 포함한다. 일부 경우에, 비-바이러스성 벡터는 슬리핑 뷰티 트랜스포존이다. 일부 실시양태에서, 면역 이펙터 세포는 본원에 개시된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0033] 본원에는 주쇄 및 (1) 말단절단된 표피 성장 인자 수용체 (HER1t); 및 (2) 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하는 면역 이펙터 세포가 제공되며, 여기서 CAR은 (a) CD33 항원 결합 도메인; (b) 스톡 도메인; (c) 막관통 도메인; (d) 4-1BB 또는 CD28, 또는 이들 둘 다를 포함하는 공동자극 신호전달 도메인; 및 (e) CD3 제타 신호전달 도메인을 포함한다.

[0034] 추가로 본원에는 (1) 사멸 스위치, 선택 마커, 바이오마커, 또는 그의 조합으로서 사용하기 위한 세포 태그; 및 (2) 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함하는 면역 이펙터 세포가 제공되며, 여기서 CAR은 (a) CD33 항원 결합 도메인; (b) 스톡 도메인; (c) 막관통 도메인; (d) 4-1BB 또는 CD28, 또는 이들 둘 다를 포함하는 공동자극 신호전달 도메인; 및 (e) CD3 제타 신호전달 도메인을 포함한다.

[0035] 일부 실시양태에서, 세포 태그는 HER1t, HER1t-1, CD20t-1 또는 CD20을 포함한다. 일부 경우에, 세포 태그는 HER1t를 포함하며, 상기 HER1t는 서열번호: 32의 폴리펩티드 서열을 포함한다. 일부 경우에, 세포 태그는 HER1t-1을 포함하며, 상기 HER1t-1은 서열번호: 54의 폴리펩티드 서열을 포함한다. 일부 경우에, 면역 이펙터 세포는 본원에 개시된 벡터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포는 T 세포, 자연 살해 (NK) 세포, 세포독성 T 림프구 (CTL), 또는 조절성 T 세포이다. 일부 경우에, 세포는 CD33 항원 결합 도메인이 CD33에 결합하는 경우 항-종양 면역성을 나타낸다.

[0036] 본원에는 표적 세포 집단 또는 조직에 대한 T 세포-매개 면역 반응의 자극을 필요로 하는 인간 대상체(subject)에게 CAR을 발현하도록 유전자 변형된 세포의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 인간 대상체에서 표적 세포 집단 또는 조직에 대한 T 세포-매개 면역 반응을 자극하는 방법이 제공되며, 여기서 CAR은 (a) CD33 항원 결합 도메인; (b) 스톡 도메인; (c) 막관통 도메인; (d) 4-1BB 또는 CD28, 또는 이들 둘 다를 포함하는 공동자극 신호전달 도메인; (e) CD3 제타 신호전달 도메인, 및 (f) 말단절단된 표피 성장 인자 수용체 (HER1t)을 포함한다.

[0037] 일부 실시양태에서, 인간은 급성 골수성 백혈병 (AML)으로 진단받았다. 일부 경우에, 급성 골수성 백혈병은 재발 또는 난치성 AML이다.

[0038] 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 단리된 핵산이 제공되며, 여기서 CAR은 다음을 포함한다: (a) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 가진 CD33 항원 결합 도메인; (b) 서열번호: 22의 아미노산 서열을 가진 스톡 도메인; (c) 서열번호: 28의 아미노산 서열을 가진 CD28을 포함하는 공동자극 신호전달 도메인; (d) 서열번호: 32의 아미노산 서열을 가진 HER1t 및 서열번호: 54의 아미노산 서열을 가진 HER1t-1 중 적어도 하나를 포함하는 HER1 태그;

(e) 서열번호: 26의 아미노산 서열을 가진 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함한다.

[0039] 추가로 본원에는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 단리된 핵산이 제공되며, 여기서 CAR은 다음을 포함한다: (a) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 가진 CD33 항원 결합 도메인; (b) 서열번호: 22의 아미노산 서열을 가진 스톡 도메인; (c) 서열번호: 24의 아미노산 서열을 가진 4-1BB를 포함하는 공동자극 신호전달 도메인; (d) 서열번호: 32의 아미노산 서열을 가진 HER1t 및 서열번호: 54의 아미노산 서열을 가진 HER1t-1 중 적어도 하나를 포함하는 HER1 태그; (e) 서열번호: 26의 아미노산 서열을 가진 CD3 제타 신호전달 도메인.

[0040] 일부 실시양태에서, 벡터는 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드 중 하나 이상을 포함한다. 일부 경우에, 상기 벡터는 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 또는 비-바이러스성 벡터이다. 일부 경우에, 비-바이러스성 벡터는 슬리핑 뷰티 트랜스포존이다. 일부 실시양태에서, 상기 벡터는 복수개의 벡터이다.

[0041] 본원에 개시된 단리된 핵산을 코딩하는 하나 이상의 벡터를 포함하는, 면역 이펙터 세포에서 CAR을 발현하기 위한 시스템이 제공된다. 일부 실시양태에서, 상기 면역 이펙터 세포는 T 세포 또는 NK 세포이다. 일부 경우에, 상기 시스템은 적어도 하나의 추가적 유전자를 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 경우에, 상기 추가적 유전자는 시토카인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 시토카인은 IL-2, IL-15, IL-12, IL-21, 및 IL-15와 IL-15Rα의 융합물 중 적어도 하나를 포함한다. 일부 경우에, 상기 시토카인은 분리된 형태이다. 일부 실시양태에서, 상기 시토카인은 막 결합 형태이다.

[0042] 일부 경우에, 상기 시스템은 하나의 벡터를 포함한다. 일부 경우에, 상기 하나 이상의 벡터는 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 또는 비-바이러스성 벡터이다. 일부 실시양태에서, 비-바이러스성 벡터는 슬리핑 뷰티 트랜스포존이다. 일부 경우에, 상기 시스템은 슬리핑 뷰티 트랜스포사제(Sleeping Beauty transposase)를 추가로 포함한다. 일부 경우에, 슬리핑 뷰티 트랜스포사제는 SB11, SB100X 또는 SB110이다. 일부 경우에, 상기 면역 이펙터 세포는 포유동물 세포이다. 일부 실시양태에서, CAR을 면역 이펙터 세포에서 발현하는 방법은 상기 면역 이펙터 세포를 본원에 개시된 시스템과 접촉시키는 것을 포함한다.

[0043] 본원에는 (a) 대상체로부터 T-세포 또는 T-세포 선조(progenitor)를 포함하는, 세포의 샘플을 수득하는 단계; (b) 상기 세포를 청구항 1 내지 청구항 13 및 청구항 44 및 청구항 45 중 어느 한 항에 제공된 바와 같은 단리된 핵산을 코딩하는 하나 이상의 벡터 및 트랜스포사제를 코딩하는 벡터로 형질감염시켜, 가공된(engineered) CD33 CAR-발현 T-세포의 집단을 제공하는 단계; (c) 그리고 임의로, 2일 이하 동안 생체외에서 CD33CAR T-세포의 집단을 배양하는 단계를 포함하는, 가공된 T-세포의 증식 및/또는 생존을 자극하는 방법에 제공된다.

[0044] 일부 실시양태에서, 방법은 세포를 시토카인을 코딩하는 벡터로 형질감염시키는 것을 추가로 포함한다. 일부 경우에, 시토카인은 IL- 15 및 IL- 15Rα를 포함하는 융합 단백질이다. 일부 경우에, 상기 하나 이상의 벡터는 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 또는 비-바이러스성 벡터이다. 일부 실시양태에서, 비-바이러스성 벡터는 슬리핑 뷰티 트랜스포존이다. 일부 경우에, 방법은 슬리핑 뷰티 트랜스포사제를 추가로 포함한다. 일부 경우에, 슬리핑 뷰티 트랜스포사제는 SB11, SB100X 또는 SB110이다.

도면의 간단한 설명

[0045] 본 개시내용의 특색은 첨부된 청구범위에서 상세하게 설명된다. 본 개시내용의 특색 및 이점의 더 나은 이해는 본 개시내용의 원리가 이용되는 예시적인 실시양태를 설명하는 다음의 상세한 설명 및 첨부 도면을 참조하여 얻어질 것이다:

도 1은 CD33 이소형의 구조를 도시하는 개략도이다.

도 2는 CD33 CAR 렌티바이러스 벡터 지도를 도시한다.

도 3은 슬리빙 뷰티 트랜스포존 시스템의 예시적인 개략도이다.

도 4는 CAR-T 세포를 생성시키는 렌티바이러스 형질도입의 예시적인 개략도이다.

도 5는 입양 전달된(adoptively transferred) T-세포 상에서의 CD33 CAR 및 HER1t의 발현을 도시한다.

도 6은 웨스턴 블롯(Western Blot)에 의해 렌티바이러스로 형질도입된(lentivirally transduced) 세포로부터 CD33 CAR 발현의 확인을 나타낸다.

도 7은 CD3/D28 비드 자극 후, 형질도입되지 않은 T 세포 (UNT) 및 CD33 CAR-T 세포 (CD33 CAR LV)로부터 총 T 세포 집단의 시험관내 배양된 CD33 CAR-T 세포의 절대 및 배수 확장의 수치 확장의 동력학을 나타낸다.

도 8은 렌티바이러스 형질도입 후 CD33 CAR-T 세포의 카피 수 평가를 제공한다.

도 9A, 도 9B 및 도 9C는 CD33 CAR-T 세포의 표적 특이적 시험관내 세포독성을 나타낸다. CD33 특이적 세포독성은 유로퓸(Europium) 표지된 표적 세포 (EL4, EL4/CD33 및 MOLM-13)로부터 측정되었다. (**도 9A**) 유동 세포 계측법에 의해 측정한 바와 같은 시험된 세포주 중의 CD33 표면 발현 수준. 볼드체 음영 선은 이소형 대조군 항체 염색을 나타내며 더 연한 음영 선은 항-인간 CD33 항체 염색을 나타낸다. (**도 9B** 및 **도 9C**).

도 10A, 도 10B 및 도 10C는 생체외 확장된 CD33 CAR-T 세포로부터의 시토카인 생성 (IFNγ (**도 10A**), IL-2 (**도 10B**) 및 TNF (**도 10C**)을 나타낸다.

도 11은 HER1t를 발현하는 CD33 CAR-T 세포의 세툭시맙 유도된 항체 의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC)을 나타낸다.

도 12는 AML 종양 모델에서 처리 군에 대한 NSG 마우스 생존 곡선을 나타낸다.

도 13A 및 도 13B는 fLUC 생물발광에 의해 측정된 바와 같은 종양 부하(Tumor Burden)의 정량 분석을 제공한다. (**도 13A**) 복면도(Ventral view), 및 (**도 13B**) 배면도(Dorsal view).

도 14A 및 도 14B는 CD33 CAR-T 세포 처리된 NSG 마우스로부터의 혈액, 골수 및 비장 샘플의 유동 세포 계측법 분석을 제공한다.

도 15A 및 도 15B는 다양한 LV 형질도입된 인간 T-세포 상의 CD33 CAR 및 HER1t의 발현을 나타낸다.

도 16A, 도 16B 및 도 16C는 다양한 AML 세포주 상의 CD33 발현의 유동 세포 계측법 결과를 도시한 그래프 (**도 16A**)를 나타낸다. 다양한 CD33 발현 AML 세포주에서 다양한 LV CD33 CAR의 2시간 유로퓸 방출 검정의 결과를 도시한 그래프 (**도 16B**). LV CD33 CAR에 의한 다양한 CD33 발현 AML 세포주의 인식시 T 세포에 의해 방출된 시토카인 발현의 결과를 도시한 그래프 (**도 16C**).

도 17은 CD33 발현 백혈병 세포주를 사용한 CAR33-CD8a-CD28m-Z (슬리핑 뷰티) T 세포 용해를 도시한 그래프를 제공한다.

도 18은 CD33 발현 표적 세포의 존재하에 CD107a 탈과립화 및 IFNγ 생성에 미치는 CAR33-CD8a-CD28m-Z (슬리핑 뷰티) T 세포의 영향을 나타내는 유동 세포 계측법 결과를 도시한 그래프를 제공한다.

도 19는 유전자 변형된 T-세포 상의 CD33 CAR (슬리핑 뷰티) 및 HER1t의 발현을 나타내는 유동 세포 계측법 결과를 도시한 그래프를 제공한다.

도 20A 내지 도 20B는 CD33 발현 AML 세포에서 본원에 기재된 CAR의 효과를 도시한다. **도 20A**는 다양한 AML 세포주 상의 CD33 발현의 유동 세포 계측법 결과를 도시한 그래프를 제공한다. **도 20B**는 다양한 CD33 발현 AML 세포주에서 CAR33-CD8a-CD28m-Z (슬리핑 뷰티)의 2시간 유로퓸 방출 검정의 결과를 도시한 그래프를 제공한다.

도 21은 본원에 기재된 방법 및 조성물에 대한 폴리펩티드 서열 및 핵산의 서열을 나타내는 서열 표를 제공한다.

도 22A 내지 도 22C는 마우스에서의 생체내 결과를 포함한, 종양 세포와의 접촉시 본원에 기재된 조성물의 효과를 제공한다. **도 22A**는 연구 11일째 (CAR-T 세포 투여 3일 후)에 CAR-T 세포 투여 마우스의 혈장으로부터의 시토카인 분석을 도시한 그래프를 제공한다. 마우스로부터의 혈장을 수집하고, 인간 시토카인을 다중 피분석물 플랫폼(multiplex analyte platform)에 의해 평가하였다. 측정된 수개의 피분석물 (GM-CSF, IFNγ, TNFα, IL-10, IL-18 및 IP-10)의 평균 ± SEM을 나타냈다. N=11-15 마우스/군, 이는 정의된 시점에서 조직 수집을 위한 위성 군의 일부인 마우스를 포함하였음. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$; 각각의 처리 군에 대한 식염수, 형질도입되지 않은 T 세포 및 CD19-CAR-T 세포의 터키의 다중 비교 테스트(Tukey's multiple comparison testing)를 사용하는 일원 분산 분석 (ANOVA). **도 22B**는 CAR T 세포로 처리 후 AML 종양 보유 마우스로부터 취한 혈액 샘플의 대표적인 샘플링을 도시한 그래프를 제공한다. AML 보유 종양 마우스를 8일째에 식염수, 형질도입되지 않은 T 세포, CD19-CAR-T 세포 또는 CD33-CAR-T 세포의 단일 투여로 처리하였다. 2 용량으로 표시된 군은 연구 15일째에만 제2 등가 용량의 CD33-CAR-T 세포를 받았다. 혈액 샘플을 마우스로부터 수득하여 CAR T 세포의 존재 및 지속성 및 MOLM-13 종양 세포의 존재를 평가하였다 (CD123의 발현을 기준으로 함). (A) 마우스가 빈사 상태가 되었을 때, 16일째, 식염수 단독, 형질도입되지 않은 T 세포 또는 CD19-CAR-T 세포로 처리한 마우스로부터 혈액 샘플을 취하였다. (B) 18일째에 CD33-CAR-T 세포로 처리한 나머지 마우스로부터 혈액 샘플을 취하였다. 나타낸 데이터는 FSC/SSC/인간 CD45+ 세포 상에서 게이팅하였다. **도 22C.** ALM 종양 세포 주 (THP1

및 HL60)에 대한 세포독성 활성을 도시한 그래프.

도 23A 내지 도 23E는 AML 환자의 T 세포로부터 CD33-CAR-T 세포의 생성을 기재하며 AML 종양 세포에 대한 세포독성 활성을 나타낸다. **도 23A.** AML 공여자로부터의 PBMC를 수득하고 CD33 및 CD3 발현에 대해 표현형으로 특성화하였다. **도 23B.** 비드(bead) 기반 방법을 사용하여 PBMC 분획으로부터 T 세포를 단리하고, 본래 그대로의 분획을 CD33+ 종양 세포에 대해 특성화하였다. **도 23C.** T 세포를 LV-CD33-CAR 구축물로 형질도입시키고, CAR 발현을 배양 14일째에 나타냈다. **도 23D.** AML 공여자 CD33-CAR-T 세포와 MOLM-13 또는 AML 공여자 종양 세포의 공동-배양은 0일째 (검정 설정시) 및 3일째에 나타냈다. 모든 세포를 FSC/SSC/생존 가능한 세포 상에서 게이팅하였다. **도 23E.** CD33 발현 종양 세포를 가진 AML 환자로부터의 CD33-CAR-T 세포의 공동-배양 후의 시토카인 발현. 세포내 시토카인 염색은 CD33-CAR-T 세포 (AML 공여자 E261로부터 유래)와 18시간 기간후 지정된 종양 세포의 공동-배양 후에 수행하였다. T 세포를 세포 표면 염색한 다음에 고정/투과화한 후 IFNγ 및 IL-2 시토카인 염색하였다. 세포를 FSC/SSC/생존 가능한/CD3 T 세포를 기반으로 게이팅하였다. AML E261 세포는 샘플에 존재하는 환자의 자가 CD33 종양 세포를 지칭한다.

도 24는 NK 세포상의 CD33 CAR 및 HER1t의 발현을 기재한다.

도 25는 CD33CAR NK 세포상의 HER1t 및 HER1t-1 태그의 발현을 기재한다.

도 26은 CD33CAR NK 세포상의 CD20t-1 태그의 발현을 개시한다.

도 27은 CD33-CAR NK 세포가 NK 내성 CD33+ AML 세포 (ML-2, KG-1)를 효율적으로 용해시키는 것을 입증한다.

도 28은 CD33-CAR NK 세포가 NK 내성 AML 세포주 (KG-1)를 낮은 E:T 비로 효율적으로 용해시키는 것을 입증한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 과학 기술 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본 발명을 설명하고 청구할 때, 다음의 전문 용어가 사용될 것이다.

[0047] **정의**

[0048] 청구범위 및/또는 명세서에서 용어 "포함하는"과 함께 사용되는 경우 단어 "a" 또는 "an"의 사용은 "하나"를 의미할 수 있으나, 이는 또한 "하나 이상" "적어도 하나", 및 "하나 또는 하나 초과"의 의미와 일치한다.

[0049] 본원 전반에 걸쳐서, 용어 "약"은 값이 장치, 상기 값을 결정하기 위해 이용되는 방법에 대한 고유한 오류 편차, 또는 연구 대상체 사이에 존재하는 상기 편차를 포함한다는 것을 나타내는 데 사용된다. 전형적으로, 상기 용어는 상황에 따라 대략 또는 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% 또는 20% 미만의 가변성을 포괄하는 것으로 의도된다.

[0050] 청구범위에서 용어 "또는"의 사용은 대안만을 지칭하거나 대안이 상호 배타적인 것으로 명시적으로 나타내지 않는 한 "및/또는"을 의미하는 것으로 사용되지만, 본 개시내용은 단지 대안 그리고 "및/또는"을 지칭하는 정의를 뒷받침한다.

[0051] 본 명세서 및 청구항(들)에서 사용된 바와 같이, 용어 "포함하는(comprising)" (및 임의의 형태의 포함하는, 예컨대 "포함하다" 및 "포함한다"), "갖는" (및 임의의 형태의 "갖는", 예컨대 "갖는다" 및 "가진다"), "포함한(including)" (및 임의의 형태의 포함한, 예컨대 "포함하다" 및 "포함한다") 또는 "함유하는" (및 임의의 형태의 함유하는, 예컨대 "함유하다" 및 "함유한다")는 포괄적이거나 개방적이며 추가적인, 언급되지 않은 요소 또는 방법 단계를 배제하지 않는다. 본 명세서에서 논의된 임의의 실시양태는 본 발명의 임의의 방법 또는 조성물에 대해, 그리고 그 반대로도 구현될 수 있음이 고려된다. 더욱이, 본 발명의 조성물은 본 발명의 방법을 달성하는데 사용될 수 있다.

[0052] 본원에 사용된 바와 같은 "합성" 또는 "가공된"은 자연적 기원의 것들과는 반대로, 화학 공정을 통해 및/또는 인력(human agency)에 의해 형성되거나 발현되는 화합물을 지칭한다.

[0053] "단리된"이란 그 자연 환경으로부터 핵산을 제거하는 것을 의미한다. "정제된"이란 자연 (게놈 DNA 및 mRNA 포함)으로부터 제거되거나 합성 (cDNA 포함)되고/거나 실험실 조건하에 증폭된 것인지 여부에 따라, 주어진 핵산이 순도가 증가했는지 여부를 의미하며, 여기서 "순도"는 상대적인 용어이며, "절대적 순도"가 아니다.

그러나, 핵산 및 단백질은 희석제 또는 아주반트로 제제화될 수 있으며, 여전히 실용적인 목적으로 단리될 수 있음을 이해하여야 한다. 예를 들어, 핵산은 전형적으로는 세포내로 도입되는 경우 허용되는 담체 또는 희석제와 혼합된다.

[0054] 본원에 사용된 바와 같은 "폴리뉴클레오티드" 또는 "올리고뉴클레오티드"는 리보뉴클레오티드 또는 데옥시리보뉴클레오티드 중 임의의 길이의 뉴클레오티드의 중합체 형태를 지칭한다. 이 용어는 분자의 1차 구조만을 지칭한다. 따라서, 이 용어는 이중 및 단일 가닥 DNA, 삼중식 DNA, 뿐만 아니라 이중 및 단일 가닥 RNA를 포함한다. 이는 또한, 예를 들어, 메틸화에 의해 및/또는 캡핑에 의해 변형된, 및 변형되지 않은 형태의 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 상기 용어는 또한 비-자연 발생 또는 합성 뉴클레오티드뿐만 아니라 뉴클레오티드 유사체를 포함하는 분자를 포함시키고자 한다.

[0055] "폴리펩티드"는 용어 "폴리펩티드들", "펩티드(들)" 및 "단백질(들)"과 상호 교환적으로 사용되며, 아미노산 잔기의 중합체를 지칭한다. "성숙한 단백질"은 전장이며, 임의로, 주어진 세포 환경에서 단백질에 전형적인 글리코실화 또는 다른 변형을 포함하는 단백질이다.

[0056] 핵산 및/또는 핵산 서열은 이들이 공통 조상 핵산 또는 핵산 서열로부터, 자연적으로 또는 인위적으로 유래되는 경우, "상동"이다. 단백질 및/또는 단백질 서열은 그의 코딩 DNA가 공통 조상 핵산 또는 핵산 서열로부터, 자연적으로 또는 인위적으로 유래되는 경우 상동이다. 상동 분자는 동족체 (homolog)라고 칭할 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같이, 임의의 자연 발생 단백질은, 임의의 이용 가능한 돌연변이 유발 방법에 의해 변형될 수 있다. 발현되는 경우, 이 돌연변이유발 핵산은 원래 핵산에 의해 코딩된 단백질과 상동인 폴리펩티드를 코딩한다. 상동성은 일반적으로 둘 이상의 핵산 또는 단백질 (또는 그의 서열) 사이의 서열 동일성으로부터 추론된다. 상동성 확립에 유용한 서열 사이의 동일성의 정확한 백분율은 쟁점이 되고 있는 핵산 및 단백질에 따라 다르나, 25% 만큼 작은 서열 동일성이 상동성을 확립하는 데 일상적으로 사용된다. 보다 높은 수준의 서열 동일성, 예를 들어, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99% 또는 그 초과가 또한 상동성을 확립하는데 사용될 수 있다. 서열 동일성 백분율 (예를 들어, 디폴트 파라미터를 사용하는 BLASTP 및 BLASTN)을 결정하는 방법은 본원에 기재되어 있으며 일반적으로 이용 가능하다.

[0057] 두개의 핵산 서열 또는 폴리펩티드의 아미노산 서열의 맥락에서 용어 "동일한" 또는 "서열 동일성"은 특정된 비교 창(comparison window)에 걸쳐 최대의 일치를 위해 정렬되는 경우 동일한 두 서열 내의 잔기를 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같은 "비교 창"은 적어도 약 20개, 통상 약 50 내지 약 200개, 보다 통상 약 100 내지 약 150의 인접한 위치의 세그먼트를 지칭하며, 여기서 서열은 두개의 서열이 최적으로 정렬된 후에 동일한 수의 인접한 위치의 기준 서열과 비교될 수 있다. 비교를 위한 서열의 정렬 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 비교를 위한 서열의 최적 정렬은 문헌 [Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482 (1981)]의 국소 상동성 알고리즘에 의해; 문헌 [Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443 (1970)]의 정렬 알고리즘에 의해; 문헌 [Pearson and Lipman, *Proc. Nat. Acad. Sci U.S.A.*, 85:2444 (1988)]의 유사성 방법의 검색에 의해; 이들 알고리즘의 전산 구현 (인텔리전틱스(Intelligentics) (캘리포니아 마운틴 뷰)에 의한 PC/유전자 프로그램으로 CLUSTAL, 위스콘신 지네틱스 소프트웨어 패키지(Wisconsin Genetics Software Package) (지네틱스 컴퓨터 그룹 (GCG) (미국 위스콘신 매디슨, 사이언스 드라이브 575))로 GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, 및 TFASTA를 포함하나, 이에 제한되지 않음)에 의해 수행될 수 있으며; CLUSTAL 프로그램은 문헌 [Higgins and Sharp, *Gene*, 73:237-244 (1988)] 및 [Higgins and Sharp, *CABIOS*, 5:151-153 (1989)]; Corpet et al., *Nucleic Acids Res.*, 16:10881-10890 (1988)]; [Huang et al., *Computer Applications in the Biosciences*, 8:155-165 (1992)]; 및 [Pearson et al., *Methods in Molecular Biology*, 24:307-331 (1994)]에 잘 기재되어 있다. 정렬은 또한 종종 검사 및 수동 정렬에 의해 수행된다.

[0058] 실시양태의 한 부류에서, 본원의 폴리펩티드는, 예를 들어, 디폴트 파라미터를 사용하여 BLASTP (또는 CLUSTAL, 또는 임의의 다른 사용 가능한 정렬 소프트웨어)에 의해 측정된 바와 같이, 기준 폴리펩티드, 또는 그의 단편과 적어도 80%, 85%, 90%, 98%, 99% 또는 100% 동일하다. 유사하게, 핵산은 또한 출발 핵산을 참조로 하여 기재될 수 있으며, 예를 들어, 핵산은 디폴트 파라미터를 사용하여 BLASTN (또는 CLUSTAL, 또는 임의의 다른 사용 가능한 정렬 소프트웨어)에 의해 측정된 바와 같이, 기준 핵산 또는 그의 단편과 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 98%, 99% 또는 100% 동일하다. 한 분자가 더 큰 분자와 일정한 백분율의 서열 동일성을 갖는다고 하는 경우, 이는 두 분자가 최적으로 정렬되는 경우, 더 작은 분자의 잔기의 상기 백분율이 두 분자가 최적으로 정렬되는 순서에 따라 더 큰 분자에서 일치하는 잔기를 찾는다는 것을 의미한다.

[0059] 핵산 또는 아미노산 서열에 적용되는 바와 같은 용어 "실질적으로 동일한"은 핵산 또는 아미노산 서열이, 표준

파라미터를 사용하여, 상기 기재된 프로그램, 예를 들어, BLAST를 사용하는 참조 서열과 비교하여, 적어도 90% 서열 동일성 또는 그 초과, 적어도 95%, 적어도 98% 및 적어도 99%를 갖는 서열을 포함한다는 것을 의미한다. 예를 들어, BLASTN 프로그램 (뉴클레오티드 서열의 경우)은 11의 단어 길이 (W), 10의 기대치 (E), M=5, N=-4, 및 두 가닥의 비교를 디폴트로서 사용한다. 아미노산 서열의 경우, BLASTP 프로그램은 3의 단어 길이 (W), 10의 기대치 (E), 및 BLOSUM62 채점 매트릭스를 디폴트로서 사용한다 (문헌 [Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1992) 참조). 서열 동일성의 백분율은 비교 창에 걸쳐 두개의 최적으로 정렬된 서열을 비교함으로써 결정되며, 여기서 비교 창 내의 폴리뉴클레오티드 서열의 부분은 두 서열의 최적 정렬을 위한 (부가 또는 결실을 포함하지 않는) 기준 서열과 비교하여 부가 또는 결실 (즉, 갭)을 포함할 수 있다. 백분율은 동일한 핵산 염기 또는 아미노산 잔기가 두 서열 모두에서 발생하는 위치의 수를 결정하여 일치된 위치의 수를 산출하고, 일치된 위치의 수를 비교 창의 위치의 총 수로 나누고, 그 결과에 100을 곱하여 서열 동일성의 백분율을 산출함으로써 계산된다. 실시양태에서, 실질적인 동일성은 길이가 적어도 약 50개 잔기인 서열의 영역에 걸쳐, 적어도 약 100개 잔기의 영역에 걸쳐 존재하고, 실시양태에서, 서열은 적어도 약 150개 잔기에 걸쳐 실질적으로 동일하다. 실시양태에서, 서열은 코딩 영역의 전체 길이에 걸쳐 실질적으로 동일하다.

[0060] 본원에 개시된 단백질의 "기능적 변이체"는, 예를 들어, 적어도 또는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개 보존적 아미노산 치환을 가진 기준 단백질의 아미노산 서열을 포함한다. 어구 "보존적 아미노산 치환" 또는 "보존적 돌연변이"는 하나의 아미노산을 공통의 특성을 가진 또 다른 아미노산으로 대체하는 것을 지칭한다. 개별 아미노산 사이의 공통의 특성을 정의하는 기능적 방법은 동종 유기체의 상응하는 단백질 사이의 아미노산 변화의 정규화된 빈도를 분석하는 것이다 (Schulz, G. E. and Schirmer, R. H., Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, New York (1979)). 이러한 분석에 따르면, 군 내에 아미노산이 서로 우선적으로 교환되며, 따라서 전체 단백질 구조에 대한 그의 영향에서 서로 가장 비슷한 아미노산의 군을 정의할 수 있다 (Schulz, G. E. and Schirmer, R. H., supra). 보존적 돌연변이의 예는 상기 하위 그룹 내의 아미노산의 아미노산 치환, 예를 들어, 양전하가 유지될 수 있도록 아르기닌의 경우 리신 및 그 반대의 경우; 음전하가 유지될 수 있도록 아스파르트산의 경우 글루탐산 및 그 반대의 경우; 유리 --OH가 유지될 수 있도록 트레오닌의 경우 세린; 유리 $--NH_2$가 유지될 수 있도록 아스파라긴의 경우 글루타민을 포함한다

[0061] 대안적으로 또는 추가적으로, 기능적 변이체는 적어도 하나의 비-보존적 아미노산 치환을 가진 기준 단백질의 아미노산을 포함할 수 있다. "비-보존적 돌연변이"는 상이한 군 사이의 아미노산 치환, 예를 들어, 트립토판의 경우 리신, 또는 세린의 경우 페닐알라닌 등을 수반한다. 이 경우에, 비-보존적 아미노산 치환은 기능적 변이체의 생물학적 활성을 방해하거나 억제하지 않는 것이 바람직하다. 비-보존적 아미노산 치환은 기능적 변이체의 생물학적 활성을 증진시킬 수 있어, 기능적 변이체의 생물학적 활성이 부모 CAR과 비교하여 증가되도록 한다,

[0062] 본원에 개시된 단백질 (기능적 부분 및 기능적 변이체 포함)은 하나 이상의 자연 발생 아미노산 대신에 합성 아미노산을 포함할 수 있다. 이러한 합성 아미노산은 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 예를 들어, 아미노시클로헥산 카르복실산, 노르 류신, α-아미노 n-데칸산, 호모세린, S-아세틸아미노메틸-시스테인, 트랜스-3- 및 트랜스-4-히드록시프롤린, 4-아미노페닐알라닌, 4-니트로페닐알라닌, 4-클로로페닐알라닌, 4-카르복시페닐알라닌, β-페닐세린, β-히드록시페닐알라닌, 페닐글리신, α-나프틸알라닌, 시클로헥실알라닌, 시클로헥실글리신, 인돌린-2-카르복실산, 1,2,3,4-테트라히드로이소퀴놀린-3-카르복실산, 아미노말론산, 아미노말론산 모노아미드, N'-벤질-N'-메틸-리신, N',N'-디벤질-리신, 6-히드록시리신, 오르니틴, α-아미노시클로펜탄 카르복실산, α-아미노시클로헥산 카르복실산, α-아미노시클로헵탄 카르복실산, α-(2-아미노-2-노르보르난)-카르복실산, α,γ-디아미노부티르산, α,β-디아미노프로피온산, 호모페닐알라닌, 및 α-tert-부틸글리신을 포함한다.

[0063] "CD33"은 67kDa 단일 통과 막관통 당단백질이며 시알산-결합 면역글로불린-유사 렉틴 (Siglecs) 수퍼-패밀리의 구성원이다. CD33은 시알산 결합의 원인이 되는 V-세트 Ig-유사 도메인 및 그의 세포외 도메인에 C2-세트 Ig-유사 도메인을 특징으로 한다. CD33 mRNA의 대안적 스플라이싱은 도 1에 나타낸 바와 같이, V- 및 C2-세트 Ig-유사 도메인을 연결하는 이황화물 결합뿐만 아니라 V-세트 Ig-유사 도메인이 결여된 더 짧은 이소형 (CD33m)을 야기한다. 건강한 대상체에서, CD33은 정상 다능성(multipotent) 골수성 전구체, 단분화능(unipotent) 콜로니-형성 세포, 단핵구 및 성숙 과립구에서 발견되는 골수성 분화 항원으로서 주로 발현된다. CD33은 골수성 백혈병 세포의 80% 초과 상에서 발현되나 정상 조혈 줄기 세포 또는 성숙한 과립구 상에서는 발현되지 않는다. (Andrews, R. et al., The L4F3 antigen is expressed by unipotent and multipotent colony-forming cells but not by their precursors, *Blood,* 68(5):1030-5 (1986)). CD33은 악성 골수성 세포, 활성화된 T 세포 및

활성화된 NK 세포 상에서 발현되는 것으로 보고되었으며 대다수의 AML 환자의 모세포(blast)의 적어도 하위집합에서 발견된다 (Pollard, J. et al., Correlation of CD33 expression level with disease characteristics and response to gemtuzumab ozogamicin containing chemtotherapy in childhood AML, *Blood,* 119(16):3705-11 (2012)). AML 모세포 상의 광범위한 발현 이외에, CD33은 AML에 근원적인 줄기 세포상에서 발현될 수 있다.

[0064] 용어 "실질적으로 정제된"은 폴리뉴클레오티드, 단백질, 폴리펩티드, 및 핵산 서열, 폴리펩티드, 단백질 또는 다른 화합물이 자연적으로 회합되어(associated) 있는 다른 분자가 본질적으로 없는, 즉 약 50% 초과로 없는, 약 70% 초과로 없는, 약 90% 초과로 없는, 핵산 서열, 폴리펩티드, 단백질 또는 다른 화합물을 지칭한다.

[0065] 본원에 사용된 바와 같은 "코딩 서열"은 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 세그멘트를 지칭한다. 상기 영역 또는 서열은 시작 코돈에 의해 5' 말단에 더 가깝고 정지 코돈에 의해 3' 말단에 더 가깝게 결합되어 있다. 코딩 서열은 또한 개방 판독 프레임(open reading frame)으로서 지칭될 수 있다.

[0066] 본원에 사용된 바와 같은 "작동 가능하게 연결된"은 세그먼트(segment)가 그의 의도된 방식으로 기능하게 하는 방식으로 DNA 세그먼트의 또 다른 DNA 세그먼트로의 물리적 및/또는 기능적 연결을 지칭한다. 유전자 산물을 코딩하는 DNA 서열은 그것이 DNA 서열의 전사의 조정을 직접 또는 간접적으로 가능하게 하는 방식으로, 조절성 서열, 예컨대, 예를 들어, 프로모터, 인핸서 및/또는 사일런서에 연결되는 경우 조절성 서열에 작동 가능하게 연결된다. 예를 들어, DNA 서열은 전사 신장이 DNA 서열을 통해 진행될 수 있게 하며 전사 개시 부위에 대한 정확한 판독 프레임에서, 프로모터의 전사 개시 부위에 대해 하류 프로모토에 라이게이션(ligation)되는 경우 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 인핸서 또는 사일런서는 DNA 서열의 전사를 각각 증가시키거나 감소시키는 방식으로 DNA 서열에 라이게이션되는 경우 유전자 산물을 코딩하는 DNA 서열에 작동 가능하게 연결된다. 인핸서 및 사일런서는 DNA 서열의 코딩 영역 상류, 또는 하류에 위치하거나 DNA 서열의 코딩 영역 내에 포매될 수 있다. 신호 서열을 위한 DNA는 신호 서열이 폴리펩티드의 분비에 참여하는 프리단백질(preprotein)로서 발현되는 경우, 폴리펩티드를 코딩하는 DNA에 작동 가능하게 연결된다. DNA 서열과 조절성 서열의 연결은 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지된 제한 엔도뉴클레아제를 사용하여 서열에 삽입된 어댑터 또는 링커를 통해 또는 적합한 제한 부위에서의 라이게이션에 의해 전형적으로 완수된다.

[0067] 용어 "전사 조절인자(transcriptional regulator)"는 특정 환경 조건 (예를 들어, 리프레서(repressor) 또는 핵 억제 단백질) 하에 프로모터-추진(driven) DNA 서열의 전사를 방지하거나 억제하거나, 특정 환경 조건 (예를 들어, 유도인자 또는 인핸서) 하에 프로모터-추진 DNA 서열의 전사를 가능하게 하거나 자극하도록 작용하는 생화학적 요소를 지칭한다.

[0068] 용어 "유도"는, 전사의 일부 기초 수준에 대하여, 전사 조절인자에 의해 야기된 발현, 프로모터 활성 및/또는 핵산 서열 전사의 증가를 지칭한다.

[0069] "프로모터"는 코딩 서열의 전사를 개시하는 폴리뉴클레오티드의 영역을 지칭한다. 프로모터는 유전자의 전사 시작 부위 근처, DNA의 동일 가닥 및 상류 (센스 가닥의 5' 영역 방향)에 위치한다. 일부 프로모터는 이들이 세포의 모든 상황에서 활성이기 때문에 구성적이며, 한편 다른 프로모터들, 예를 들어, 유도성(inducible) 프로모터는 특정 자극에 반응하여 활성이 되도록 조절된다.

[0070] 용어 "프로모터 활성"은 그의 활성이 측정되고 있는 프로모터에 작동 가능하게 연결되는 뉴클레오티드 서열의 발현 정도를 지칭한다. 프로모터 활성은, 예를 들어 노던 블롯 분석에 의해, 생성된 RNA 전사물의 양을 결정함으로써 직접적으로 측정할 수 있거나 연결된 핵산 서열, 예컨대 프로모터에 연결된 리포터 핵산 서열에 의해 코딩된 생성물의 양을 결정함으로써 간접적으로 측정할 수 있다.

[0071] 본원에 사용된 바와 같은 "유도성 프로모터"는 전사 조절인자, 예를 들어, 생물 또는 비생물 인자의 존재 또는 부재에 의해 활성으로 유도되는 프로모터를 지칭한다. 유도성 프로모터는 유기체의 특정 발달 단계 또는 특정 조직에서 그들에 작동 가능하게 연결된 유전자의 발현이 턴온(turn on)되거나 턴오프(turn off)될 수 있기 때문에 유용하다. 유도성 프로모터의 예는 알콜-조절 프로모터, 테트라시클린-조절 프로모터, 스테로이드-조절 프로모터, 금속-조절 프로모터, 발병기전-조절 프로모터, 온도-조절 프로모터 및 빛-조절 프로모터이다. 한 실시양태에서, 유도성 프로모터는 유전자 스위치의 부분이다.

[0072] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "인핸서"는, 예를 들어, 작동 가능하게 연결되는 핵산 서열의 전사를 증가시키는 DNA 서열을 지칭한다. 인핸서는 핵산 서열의 코딩 영역으로부터 수 킬로베이스 떨어진 곳에 위치할 수 있으며 조절성 인자의 결합, DNA 메틸화의 패턴, 또는 DNA 구조의 변화를 매개할 수 있다. 여러 가지의 상이한 공급원

으로부터의 대다수의 인핸서는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있으며 클론 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, ATCC와 같은 기탁기관 뿐만 아니라 다른 상업적 또는 산업적 공급원으로부터)로서 또는 클론 폴리뉴클레오티드 내에서 이용 가능하다. 프로모터 (예컨대 통상적으로-사용된 CMV 프로모터)를 포함하는 다수의 폴리뉴클레오티드는 인핸서 서열을 또한 포함한다. 인핸서는 코딩 서열의 상류, 내에 또는 하류에 위치할 수 있다. 용어 "Ig 인핸서"는 면역글로불린 (Ig) 유전자자리 내에 맵핑된 인핸서 영역으로부터 유래된 인핸서 요소를 지칭한다 (이러한 인핸서는 예를 들어, 중쇄 (mu) 5' 인핸서, 경쇄 (카파) 5' 인핸서, 카파 및 mu 인트론 인핸서, 및 3' 인핸서를 포함한다 (일반적으로 [Paul W. E. (ed), Fundamental Immunology, 3rd Edition, Raven Press, New York (1993), pages 353-363]; 및 미국 특허 번호 5,885,827 참조).

[0073] "발현 벡터" 또는 "벡터"는 세포내에서 폴리뉴클레오티드 복제의 자율적 단위로서 거동하거나 (즉, 그 자체 제어하에 복제가능함), 부착된 세그먼트의 복제 및/또는 발현을 야기하기 위해, 또 다른 폴리뉴클레오티드 세그먼트에 부착된 숙주 세포 염색체 내로의 삽입에 의한 복제를 가능하게 하는, 임의의 유전 요소(genetic element), 예를 들어, 플라스미드, 염색체, 바이러스, 트랜스포존이다. 적합한 벡터는 플라스미드, 트랜스포존, 박테리오파지 및 코스미드를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 벡터는 원하는 숙주 세포내로의 벡터의 라이게이션 또는 삽입을 수행하고 부착된 세그먼트의 발현을 수행하는데 필요한 폴리뉴클레오티드 서열을 함유할 수 있다. 이러한 서열은 숙주 유기체에 따라 상이하며; 이들은 전사를 수행하는 프로모터 서열, 전사를 증가시키는 인핸서 서열, 리보솜 결합 부위 서열 및 전사 및 번역 종결 서열을 포함한다. 대안적으로, 발현 벡터는 숙주 세포 DNA 서열 내로의 벡터의 라이게이션 또는 통합(integration) 없이 그 안에 코딩된 핵산 서열 생성물을 직접 발현할 수 있다.

[0074] 벡터는 "선택 가능 마커 유전자"를 또한 포함할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이 용어 "선택 가능 마커 유전자"는, 핵산 서열을 발현하는 세포가 상응하는 선택적 작용제의 존재하에, 그에 대해 또는 그에 대항하여 특이적으로 선택되게 하는 핵산 서열을 지칭한다. 적합한 선택 가능 마커 유전자는 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 예를 들어, 국제 특허 출원 공개 WO 1992/08796 및 WO 1994/28143; 문헌 [Wigler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 3567 (1980); O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 1527 (1981); Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 2072 (1981); Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol., 150:1 (1981); Santerre et al., Gene, 30: 147 (1984); Kent et al., Science, 237: 901-903 (1987); Wigler et al., Cell, 11: 223 (1977); Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48: 2026 (1962); Lowy et al., Cell, 22: 817 (1980)]; 및 미국 특허 번호 5,122,464 및 5,770,359에 기재되어 있다.

[0075] 일부 실시양태에서, 벡터는 숙주 세포에서 복제할 수 있으며, 적절한 선택적 압력의 존재하에 숙주 세포내에서 DNA의 염색체외 세그먼트로서 지속되는, "에피솜 발현 벡터" 또는 "에피솜"이다 (예를 들어, 문헌 [Conese et al., Gene Therapy, 11:1735-1742 (2004)] 참조). 대표적인 시판되는 에피솜 발현 벡터는 엡슈타인 바 핵 항원(Epstein Barr Nuclear Antigen 1) (EBNA1) 및 엡슈타인 바 바이러스(Epstein Barr Virus) (EBV) 복제 기점(oriP)을 이용하는 에피솜 플라스미드를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 인비트로겐(Invitrogen) (캘리포니아주 칼스바드)로부터의 벡터 pREP4, pCEP4, pREP7, 및 pcDNA3.1 및 스트라타진(Stratagene) (캘리포니아주 라 졸라)으로부터의 pBK-CMV는 EBNA1 및 oriP 대신에 T-항원 및 SV40 복제 기점을 사용하는 에피솜 벡터의 비제한적인 예를 나타낸다.

[0076] "트랜스포존" 또는 "전이 인자(transposable element)" (TE)는 게놈 내에서 그 위치를 변화시켜, 때로는 돌연변이를 생성시키거나 역전시키고 세포의 게놈 크기를 변경시킬 수 있는, 벡터 DNA 서열이다. 전위(Transposition)는 종종 TE의 중복을 결과한다. 부류 I TE는 두 단계로 카피된다: 먼저 이들은 DNA에서 RNA로 전사된 다음에 생성된 RNA는 DNA로 역전사된다. 그 다음에 이 카피된 DNA는 새로운 위치에서 게놈에 삽입된다. 역전사 단계는 역전사효소에 의해 촉매되며, 이는 TE 자체에 의해 코딩될 수 있다. 레트로트랜스포존의 특성은 HIV와 같은 레트로바이러스와 유사하다. 부류 II TE의 잘라 붙이기(cut-and-paste) 전위 메커니즘은 RNA 중간체를 수반하지 않는다. 전위는 수개의 트랜스포사제 효소에 의해 촉매된다. 일부 트랜스포사제는 DNA의 임의의 표적 부위에 비특이적으로 결합하며, 한편 다른 트랜스포사제는 특이적 DNA 서열 표적에 결합한다. 트랜스포사제는 표적 부위에서 엇갈린 절단(staggered cut)을 하여 단일-가닥 5' 또는 3' DNA 오버행(overhang) (점착 종단)을 결과한다. 이 단계는 DNA 트랜스포존을 잘라낸 다음에, 이를 새로운 표적 부위에 라이게이션하며; 이 과정은 갭을 채우는 DNA 폴리머라제 및 당-인산염 주쇄를 폐쇄하는 DNA 리가제의 활성을 수반한다. 이는 이중의 표적 부위를 결과한다. DNA 트랜스포존의 삽입 부위는 짧은 직접 반복부에 의해 확인될 수 있는데, 이 짧은 직접 반복부는 표적 DNA에서의 엇갈린 절단 및 DNA 폴리머라제에 의해 채우는 것에 의해 생성될 수 있으며, 트랜스포사제에 의한 TE 절제에 중요한 일련의 역 반복부(inverted repeat)가 뒤따른다. 잘라 붙이기 TE는 공

여자 부위가 이미 복제되었으나, 표적 부위가 아직 복제되지 않은 세포 주기의 S 기 동안에 그들의 전위가 발생하는 경우 중복될 수 있다. 전위는 부류 I 및 부류 II TE 둘 다에서 "자율적" 또는 "비자율적"으로서 분류될 수 있다. 자율적 TE는 스스로 이동할 수 있으며 한편 비자율적 TE는 이동하기 위해 또 다른 TE의 존재를 필요로 한다. 이는 종종 비자율적 TE가 트랜스포사제 (부류 II의 경우) 또는 역전사효소 (부류 I의 경우)가 없기 때문이다.

[0077] "트랜스포사제"는 트랜스포존의 말단에 결합하고 잘라 붙이기 메커니즘 또는 복제 전위 메커니즘에 의해 트랜스포존이 게놈의 또 다른 부분으로 이동하는 것을 촉매하는 효소를 지칭한다.

[0078] "슬리핑 뷰티 (SB) 트랜스포존 시스템"은 척추동물의 염색체에 DNA 염기 서열을 도입하기 위한 합성 DNA 트랜스포존 시스템을 지칭한다. 시스템의 일부 예시적인 실시양태는, 예를 들어, 미국 특허 번호 6,489,458, 8,227,432, 9,228,180 및 WO/2016/145146에 기재되어 있다. 슬리핑 뷰티 트랜스포존 시스템은 슬리핑 뷰티 (SB) 트랜스포사제 및 SB 트랜스포존으로 구성된다. 실시양태에서, 슬리핑 뷰티 트랜스포존 시스템은 SB11 트랜스포존 시스템, SB100X 트랜스포존 시스템, 또는 SB110 트랜스포존 시스템을 포함할 수 있다.

[0079] 본원에 개시되거나 고려되는 핵산 서열 및 벡터를 세포에 "형질감염", "형질전환", 또는 "형질도입"에 의해 도입할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 "형질감염", "형질전환", 또는 "형질도입"은 물리적 또는 화학적 방법을 사용함으로써 하나 이상의 외인성 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포에 도입하는 것을 지칭한다. 많은 형질감염 기술이 관련 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들어, 인산칼슘 DNA 공-침전 (예를 들어, 문헌 [Murray E. J. (ed.), Methods in Molecular Biology, Vol. 7, Gene Transfer and Expression Protocols, Humana Press (1991)] 참조); DEAE-덱스트란; 전기천공법; 양이온성 리포솜-매개 형질감염; 텅스텐 입자-촉진된 마이크로입자 충격(microparticle bombardment) (Johnston, Nature, 346: 776-777 (1990)); 및 인산스트론튬 DNA 공동-침전 (Brash et al., Mol. Cell Biol., 7: 2031-2034 (1987))을 포함한다. 파지 또는 바이러스 벡터는 이의 다수가 시판되는 적합한 패키징 세포에서 감염성 입자의 성장 후에 숙주 세포에 도입될 수 있다.

[0080] 본원에 사용된 바와 같은 "T 세포" 또는 "림프구"는 세포-매개 면역에서 중심 역할을 하는 일종의 림프구이다. 이들은 세포 표면 상의 T-세포 수용체 (TCR)의 존재에 의해, 다른 림프구, 예컨대 B 세포 및 자연 살해 세포 (NK 세포)와 구별될 수 있다.

[0081] "T 헬퍼 세포" (TH 세포)는 B 세포의 형질 세포 및 기억 B 세포로의 성숙, 및 세포독성 T 세포 및 대식세포의 활성화를 포함한, 면역학적 과정에서 다른 백혈구 세포를 돕는다. 이들 세포는 그 표면 상에 CD4 당단백질을 발현하기 때문에 CD4+ T 세포로도 공지되어 있다. 헬퍼 T 세포는 항원-제시 세포 (APC)의 표면상에 발현되는, MHC 부류 II 분자에 의해 헬퍼 T 세포가 펩티드 항원으로 제시될 때 활성화된다. 일단 활성화되면, 이들은 신속히 분열하고 시토카인이라고 칭해지는 작은 단백질을 분비하여 능동 면역 반응을 조절하거나 돕는다. 이들 세포는 TH1, TH2, TH3, TH17, Th9, 또는 TFH를 포함한, 몇몇 아형 중 하나로 분화할 수 있으며, 이들이 상이한 시토카인을 분비하여 상이한 유형의 면역 반응을 용이하게 한다. APC로부터의 신호전달은 T 세포를 특정한 아형으로 지향하게 한다.

[0082] "세포독성 T 세포" (TC 세포, 또는 CTL)는 바이러스-감염 세포 및 종양 세포를 파괴하고, 이식 거부 반응에 또한 연루된다. 이들 세포는 그의 표면 상에 CD8 당단백질을 발현하기 때문에 CD8+ T 세포로도 공지되어 있다. 이들 세포는 모든 유핵 세포의 표면 상에 존재하는, MHC 부류 분자와 회합하는 항원에 결합함으로써 그의 표적을 인식한다. IL-10, 아데노신, 및 조절성 T 세포에 의해 분비된 다른 분자를 통해, CD8+ 세포는 자가면역 질환을 예방하는 아네르기 상태(anergic state)로 불활성화될 수 있다.

[0083] "기억 T 세포"는 감염이 해소된 후 장기간 지속되는 항원-특이적 T 세포의 하위집합이다. 이들은 그의 동족 항원에 재노출시 대다수의 T 세포로 신속히 확장되어, 면역계에 과거의 감염에 대하여 "기억"을 제공한다. 기억 T 세포는 3가지 아형: 중앙 기억 T 세포 (T_{CM} 세포) 및 두 가지 유형의 이펙터 기억 T 세포 (T_{EM} 세포 및 T_{EMRA} 세포)를 포함한다. 기억 세포는 CD4+ 또는 CD8+일 수 있다. 기억 T 세포는 세포 표면 단백질 CD45RO, CD45RA 및/또는 CCR7을 전형적으로 발현시킨다.

[0084] 이전에 억제인자(suppressor) T 세포로 공지된 "조절성 T 세포" (Treg 세포)가 면역학적 관용의 유지에 중요한 역할을 한다. 그들의 주요 역할은 면역 반응의 종료에 대해 T 세포-매개 면역을 셧다운(shut down)하고 흉선에서 음성 선택의 과정을 벗어난 자가반응성 T 세포를 억제하는 것이다.

[0085] "자연 살해 T 세포" (NKT 세포 - 선천 면연계의 자연 살해 세포와 혼동하지 말 것)는 적응 면역계와 선천 면역계를 가교한다. 주요 조직적합성 복합체 (MHC) 분자에 의해 제시된 펩티드 항원을 인식하는 통상적인 T 세포와

달리, NKT 세포는 CD1d라고 칭해지는 분자에 의해 제시된 당지질 항원을 인식한다. 일단 활성화되면, 이들 세포는 Th 및 Tc 세포 둘 다에 기인한 기능 (즉, 시토카인 생산 및 세포용해/세포 사멸 분자의 방출)을 수행할 수 있다. 이들은 또한 헤르페스 바이러스에 감염된 일부 종양 세포 및 세포를 인식하고 제거할 수 있다.

[0086] 본원에서 사용된 바와 같은 "종양 항원"은 종양 세포에서 생성되거나 과발현된 임의의 항원 물질을 지칭한다. 그것은, 예를 들어, 숙주에서 면역 반응을 촉발할 수 있다. 대안적으로, 본 개시내용의 목적 상, 종양 항원은 건강 세포 및 종양 세포 둘 다에 의해 발현되는 단백질일 수 있으나, 이들은 특정 종양 유형을 확인하기 때문에, 적합한 치료 표적이다. 한 실시양태에서, 종양 항원은 골수 악성 종양, 예를 들어, 급성 골수구성 백혈병 (AML)의 치료를 위한 CAR T 세포 요법의 표적인 CD33이다.

[0087] 본원에 사용된 바와 같은 "AML"은, 급성 골수세포 백혈병, 급성 과립구성 백혈병, 및 급성 비-림프구성 백혈병으로도 공지된 급성 골수구성 백혈병을 지칭한다. AML은 백혈병이 발병한 세포 유형에 따라 8가지 상이한 아형을 갖기 때문에 다른 주요 형태의 백혈병과 구별된다. 따라서 용어 "AML"은 특수 분석에 대한 골수모세포성 (M0), 성숙 없이 골수모세포성 (M1)(myeloblastic (M1) without maturation), 성숙 골수모세포성 (M2)(myeloblastic (M2) with maturation), 전골수성(promyeloctic) (M3), 골수단핵구성 (M4), 단핵구성 (M5), 적백혈병 (M6) 및 거대핵세포(megakaryocytic) (M7)을 포함한, 모든 아형을 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같은 "AML"은 또한 골수가 비정상적인 골수모세포를 만드는 암인 급성 골수성 백혈병을 지칭한다. 그것은 성인에서 가장 흔한 형태의 급성 백혈병이다 (Siegel, R., Ma, J., Zou, Z. & Jemal, A., Cancer statistics, 2014, *CA Cancer J Clin*, 64(1):9-29 (2014)). "재발 AML"은 AML의 관해 간격을 경험한 대상체를 의미한다. "난치성 AML"은 초기 표준 유도 요법 (예를 들어, 안트라사이클린 및/또는 시타라빈-기반 요법)의 첫 번째 주기에 질환이 반응하지 않는 환자를 지칭한다. 실시양태에서, "난치성 AML"은 표준 유도 요법의 하나 또는 둘 또는 그 초과 주기에 반응하지 않는 환자를 지칭한다.

[0088] "입양 T 세포 전달"은 예방접종 단독 또는 환자의 자연 종양 반응에 의해 수득될 수 있는 것보다 많은 수의 T 세포를 달성하기 위해 종양 특이적 T 세포의 단리 및 생체외 확장을 지칭한다. 그 다음에 종양 특이적 T 세포는 면역계에게 암을 공격하고 사멸할 수 있는 T 세포를 통해 잔존 종양을 압도할 수 있는 능력을 제공하기 위한 시도로 암 환자에게 주입된다. 암 치료에 사용되고 있는 많은 형태의 입양 T 세포 요법이 있으며; 종양 침윤 림프구 또는 TIL을 배양하고, 특정 T 세포 또는 클론을 단리하고 확장시키며, 심지어 종양을 강력하게 인식하고 공격하도록 가공된 T 세포를 사용한다.

[0089] "항원 인식 모이어티 또는 도메인"은 항원에 특이적으로 결합하는 분자 또는 분자의 부분을 지칭한다. 한 실시양태에서, 항원 인식 모이어티는 항체, 항체 유사 분자 또는 그의 단편이며 항원은 종양 항원이다.

[0090] 본원에 사용된 바와 같은 "항체"는 모노클로날 또는 폴리클로날 항체를 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "모노클로날 항체는" B-세포의 단일 클론에 의해 생성되고 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 지칭한다. 대조적으로, "폴리클로날 항체"는 상이한 B-세포에 의해 생성되고 동일한 항원의 상이한 에피토프에 결합하는 항체의 집단을 지칭한다. 전체 항체는 전형적으로 네개의 폴리펩티드로 이루어진다: 중 (H) 쇄 폴리펩티드의 두개의 동일한 카피 및 경 (L) 쇄 폴리펩티드의 두개의 동일한 카피. 중쇄 각각은 하나의 N-말단 가변 (VH) 영역 및 세개의 C-말단 불변 (CH1, CH2 및 CH3) 영역을 함유하고, 각각의 경쇄는 하나의 N-말단 가변 (VL) 영역 및 하나의 C-말단 불변 (CL) 영역을 함유한다. 경쇄 및 중쇄의 각각의 쌍의 가변 영역은 항체의 항원 결합 부위를 형성한다. VH 및 VL 영역은 유사한 일반 구조를 가지며, 여기서 각각의 영역은 그 서열이 상대적으로 보존되는 네개의 프레임워크 영역을 포함한다. 프레임워크 영역은 세개의 상보성 결정 영역 (CDR)에 의해 연결된다. CDR1, CDR2 및 CDR3으로 공지된 세개의 CDR은 항원 결합의 원인이 되는 항체의 "초가변 영역"을 형성한다.

[0091] "항체 유사 분자"는 선택적으로 파트너에 결합할 수 있는 Ig-수퍼패밀리의 구성원인 예를 들어 단백질일 수 있다. MHC 분자 및 T 세포 수용체가 이러한 분자이다. 한 실시양태에서 항체-유사 분자는 TCR이다. 한 실시양태에서 TCR은 그의 MHC 결합 친화도를 증가시키도록 변형되어 있다.

[0092] 용어 "항체의 단편", "항체 단편", "항체의 기능적 단편", 및 "항원-결합 부분"은 본원에서 상호교환적으로 사용되어, 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 부분을 의미한다 (일반적으로, 문헌 [Holliger et al., Nat. Biotech., 23(9):1126-1129 (2005)] 참조). 항체 단편은 바람직하게는, 예를 들어, 하나 이상의 CDR, 가변 영역 (또는 그의 부분), 불변 영역 (또는 그의 부분), 또는 그의 조합을 포함한다. 항체 단편의 예는, (i) VL, VH, CL, 및 CH1 도메인으로 이루어진 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 스톡 영역에서 이황화물 가교에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')2 단편; (iii) 항체의 단일 아암의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (iv) 2개의 도메인이 단일 폴리펩티드 쇄로서 합성될 수 있게

하는 합성 링커에 의해 연결된 Fv 단편의 2개의 도메인 (즉, VL 및 VH)으로 이루어진 1가 분자인 단일 쇄 Fv (scFv) (예를 들어, 문헌 [Bird et al., Science, 242: 423-426 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5879-5883 (1988)]; 및 [Osbourn et al., Nat. Biotechnol., 16: 778 (1998)] 참조) 및 (v) 폴리펩티드 쇄의 이량체인 디아바디 (여기서 각각의 폴리펩티드 쇄는 동일한 폴리펩티드 쇄 상의 VH와 VL 사이의 쌍형성을 가능하게 하기에는 너무 짧은 펩티드 링커에 의해 VL에 연결된 VH를 포함하여, 이에 의해 상이한 VH-VL 폴리펩티드 쇄 상의 상보적인 도메인 사이의 쌍형성을 추진시켜 두개의 기능적 항원 결합 부위를 갖는 이량체 분자를 생성시킨다)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 항체 단편은 관련 기술 분야에 공지되어 있으며 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 2009/0093024 A1에 더 상세히 기재되어 있다.

[0093] "키메라 항원 수용체"는 인공 T 세포 수용체, 키메라 T 세포 수용체, 키메라 면역수용체로도 공지되어 있다. 키메라 항원 수용체 (CAR)는 가공된 수용체이며, 이는 면역 이펙터 세포에 임의의 특이성을 접목시킨다. CAR은 전형적으로 항원-결합 도메인 및 스톡 영역, 막관통 도메인 및 세포내 (엔도도메인) 도메인을 포함하는 세포외 도메인 (엑토도메인)을 갖는다.

[0094] 용어 "스페이서(spacer)" 또는 "힌지(hinge)" 영역을 포함하는 "스톡" 영역은 항원-결합 도메인을 막관통 도메인에 연결시키는데 사용된다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "스톡 도메인"은 일반적으로 폴리펩티드 쇄 내의 세포질 도메인, 또는 세포외 도메인 중 어느 하나에 막관통 도메인을 연결시키는 기능을 하는 임의의 올리고뉴클레오티드- 또는 폴리펩티드를 의미한다. 실시양태에서, 이는 항원 인식을 용이하게 하기 위해 항원-결합 도메인이 상이한 방향으로 배향되게 할 만큼 충분히 가변적(flexible)이다. 한 실시양태에서, 이는 IgG1로부터의 힌지 영역이다. 대안은 면역글로불린의 CH2CH3 영역 및 CD3의 부분을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 한 실시양태에서, 스톡 영역은 CD8알파 힌지 (서열번호: 22)이다. 용어 "기능적 부분"은, CAR과 관련하여 사용될 때, 본원에 기재된 CAR의 임의의 부분 또는 단편을 지칭하며, 이 부분 또는 단편은 그것이 부분인 CAR (부모 CAR)의 생물학적 활성을 보유한다. 부모 CAR을 코딩하는 핵산 서열과 관련하여, CAR의 기능적 부분을 코딩하는 핵산 서열은 부모 CAR의, 예를 들어, 약 10%, 25%, 30%, 50%, 68%, 80%, 90%, 95%, 또는 그 초과를 포함하는 단백질을 코딩할 수 있다.

[0095] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "기능적 변이체"는 폴리펩티드, 또는 기준 폴리펩티드와 실질적이거나 유의한 서열 동일성 또는 유사성을 갖는 단백질을 지칭하고, 그것이 변이체인 기준 폴리펩티드의 생물학적 활성을 보유한다. 기능적 변이체는, 예를 들어, 본원에 기재된 CAR (부모 CAR)과 유사한 정도, 동일한 정도, 또는 더 높은 정도로, 표적 세포를 인식하는 능력을 보유하는 부모 CAR의 그러한 변이체를 포괄한다. 부모 CAR을 코딩하는 핵산 서열과 관련하여, CAR의 기능적 변이체를 코딩하는 핵산 서열은 부모 CAR을 코딩하는 핵산 서열과, 예를 들어, 약 10% 동일, 약 25% 동일, 약 30% 동일, 약 50% 동일, 약 65% 동일, 약 70% 동일, 약 75% 동일, 약 80% 동일, 약 85% 동일, 약 90% 동일, 약 95% 동일, 또는 약 99% 동일할 수 있다.

[0096] 본원에 사용된 바와 같은 "유도성 프로모터"는 전사 조절인자, 예를 들어, 생물 또는 비생물 인자의 존재 또는 부재에 의해 활성으로 유도되는 프로모터를 지칭한다. 유도성 프로모터는 유기체의 특정 발달 단계 또는 특정 조직에서 그들에 작동 가능하게 연결된 유전자의 발현이 턴온되거나 턴오프될 수 있기 때문에 유용하다. 유도성 프로모터의 예는 알콜-조절 프로모터, 테트라시클린-조절 프로모터, 스테로이드-조절 프로모터, 금속-조절 프로모터, 발병기전-조절 프로모터, 온도-조절 프로모터 및 빛-조절 프로모터이다. 유도성 프로모터는 유전자 스위치의 부분일 수 있다. 유도성 프로모터는 유전자 스위치 리간드 유도성 프로모터일 수 있다. 일부 경우에, 유도성 프로모터는 소분자 리간드-유도성 두개의 폴리펩티드 엑디손(ecdysone) 수용체-기반 유전자 스위치, 예컨대 레오스위치(RHEOSWITCH)® 유전자 스위치일 수 있다. 일부 경우에, 유전자 스위치는 다음에 기재된 시스템 중 어느 한 시스템에 기재된 바와 같으나, 이에 제한되지는 않는, 엑디손-기반 수용체 성분으로부터 선택될 수 있다: PCT/US2001/009050 (WO 2001/070816); 미국 특허 번호 7,091,038; 7,776,587; 7,807,417; 8,202,718; PCT/US2001/030608 (WO 2002/029075); 미국 특허 번호 8,105,825; 8,168,426; PCT/1J52002/005235 (WO 2002/066613); 미국 출원 번호 10/468,200 (미국 공개 번호 20120167239); PCT/US2002/005706 (WO 2002/066614); 미국 특허 번호 7,531,326; 8,236,556; 8,598,409; PCT/U52002/005090 (WO 2002/066612); 미국 특허 번호 8,715,959 (미국 공개 번호 20060100416); PCT/US2002/005234 (WO 2003/027266); 미국 특허 번호 7,601,508; 7,829,676; 7,919,269; 8,030,067; PCT/U52002/005708 (WO 2002/066615); 미국 출원 번호 10/468,192 (미국 공개 번호 20110212528); PCT/US2002/005026 (WO 2003/027289); 미국 특허 번호 7,563,879; 8,021,878; 8,497,093; PCT/US2005/015089 (WO 2005/108617); 미국 특허 번호 7,935,510; 8,076,454; PCT/U52008/011270 (WO 2009/045370); 미국 출원 번호 12/241,018 (미국 공개 번호 20090136465); PCT/US2008/011563 (WO 2009/048560); 미국 출원 번호 12/247,738 (미국 공개 번호 20090123441);

PCT/US2009/005510 (WO 2010/042189); 미국 출원 번호 13/123,129 (미국 공개 번호 20110268766); PCT/US2011/029682 (WO 2011/119773); 미국 출원 번호 13/636,473 (미국 공개 번호 20130195800); PCT/US2012/027515 (WO 2012/122025); 및, 미국 특허 번호 9,402,919 (이들 각각은 그 전문이 참조로 포함된다).

[0097] 본원에서 언급된 바와 같은 "증식성 질환"은 세포의 과도한 증식과 세포 기질의 전환(turnover)이 암을 포함한 몇몇 질환의 발병기전에 상당히 기여한다는 통일된 개념을 의미한다.

[0098] 본원에서 사용된 바와 같은 "환자"는 암과 같은 증식성 장애로 진단받거나 증식성 장애를 갖거나 증식성 장애가 발병한 것으로 의심되는 포유동물 대상체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 용어 "환자"는 암과 같은 증식성 장애가 발병할 가능성이 평균 초과인 포유동물 대상체를 지칭한다. 예시적인 환자는 본원에 개시된 요법으로부터 이익을 얻을 수 있는 인간, 유인원, 개, 돼지, 소, 고양이, 말, 염소, 양, 설치류 및 기타 포유동물일 수 있다. 예시적인 인간 환자는 남성 및/또는 여성일 수 있다.

[0099] "투여"는 본원에 기재된 하나 이상의 조성물을 환자 또는 대상체에게 제공하는 것으로서 본원에서 언급된다. 예로서 그리고 제한 없이, 조성물 투여는, 예를 들어, 주사는 정맥내 (i.v.) 주사, 피하 (s.c.) 주사, 피내 (i.d.) 주사, 복강내 (i.p.) 주사, 또는 근육내 (i.m) 주사에 의해 수행될 수 있다. 하나 이상의 이러한 경로가 사용될 수 있다. 비경구 투여는, 예를 들어, 시간이 경과함에 따라 볼루스(bolus) 주사에 의해 또는 점진적 관류에 의한 것일 수 있다. 대안적으로, 또는 공동으로, 투여는 경구 투여에 의한 것일 수 있다. 게다가, 투여는 또한 세포의 볼루스 또는 펠렛(pellet)의 외과적 침착, 또는 의료 장치의 위치결정에 의한 것일 수 있다.

[0100] "이를 필요로 하는 환자" 또는 "이를 필요로 하는 대상체"는 암과 같은 증식성 장애로 진단받거나 증식성 장애를 갖는 것으로 의심되는 환자로서 본원에서 언급된다. 한 실시양태에서, 환자는 백혈병 예컨대 이에 제한되지는 않지만 급성 림프모구성 백혈병 (ALL), 급성 골수성 백혈병 (AML), 만성 림프구성 백혈병 (CLL) 및 만성 골수성 백혈병 (CML)을 갖거나 발병할 가능성이 있다.

[0101] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물은, 증식성 장애를 치료 또는 예방하는데 효과적인 양으로, 본원에 기재된 핵산 서열을 발현하는 가공된 세포 또는 숙주 세포, 또는 본원에 기재된 적어도 하나의 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "치료", "치료하는" 등은 원하는 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 수득하는 것을 지칭한다. 실시양태에서, 효과는 치료적이며, 즉, 질환 및/또는 질환에 기인하는 유해 증상을 부분적으로 또는 완전히 치유하는 효과이다. 이를 위해, 본 발명의 방법은 본 발명의 핵산 서열을 발현하는 숙주 세포, 또는 본 발명의 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하는 조성물의 "치료 유효량"을 투여하는 것을 포함한다.

[0102] "치료 유효량"은 원하는 치료 결과를 달성하기 위해, 필요한 투여량 및 기간 동안 효과적인 양을 지칭한다. 치료 유효량은 하나 이상의 대상체에서 원하는 반응을 도출하는데 본원에 기재된 조성물의 능력, 및 개체의 질환 상태, 연령, 성별, 및 체중과 같은 인자에 따라 다를 수 있다.

[0103] 대안적으로, 약리학적 및/또는 생리학적 효과는 "예방적"일 수 있으며, 즉 그 효과는 그의 질환 또는 증상을 완전히 또는 부분적으로 예방한다.

[0104] "예방적 유효량"은 원하는 예방적 결과 (예를 들어, 질환 발명의 예방)를 달성하기 위해, 필요한 투여량 및 기간 동안 효과적인 양을 지칭한다.

[0105] **키메라 항원 수용체**

[0106] 본원에 기재된 실시양태에서, CAR은 표적 인식을 위한 세포외 항체-유래 단일-쇄 가변 영역 (scFv)을 포함할 수 있으며, 여기서 scFv는 가변적 링커에 의해, 예를 들어, T-세포 활성화를 위한 CD3ζ를 포함하는, 막관통 도메인 및/또는 세포내 신호전달 도메인(들)에 연결될 수 있다. 통상적으로는 T 세포가 생체내에서 활성화되는 경우 이들은 시토카인 (IL-2 및 IL-21)의 생산을 유도하는 CD28로부터 2차 공동자극 신호전달로 1차 항원 유도된 TCR 신호를 받으며, 이는 그 다음에 신호전달 루프로 자가분비/측분비 방식으로 피드백된다. 이를 염두에 두고, CAR은 신호전달 도메인, 예를 들어, CD28 세포질 신호전달 도메인 또는 다른 공동자극 분자 신호전달 도메인 예컨대 4-1BB 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 키메라 CD28 공동-자극은 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)로부터 유래된 T 세포를 확장시키는 것뿐만 아니라, IL-2 생산 및 항-아폽토시스 분자의 상향 조절에 의한 T-세포 지속성을 개선시킨다.

[0107] 한 실시양태에서, CAR은 막관통 도메인 및 CD3-제타 엔도도메인에 융합된 종양 연관 항원, 예를 들어 CD33에 특

이적인 모노클로날 항체로부터 유래된 단일-쇄 가변 단편 (scFv)의 융합물이다. 이러한 분자는 그의 표적의 scFv에 의한 인식에 응하여 제타 신호의 전송을 결과한다.

[0108] 한 실시양태에서, CAR은 엑토도메인 (세포외), 막관통 도메인 및 엔도도메인 (세포내)을 가질 수 있다. CAR 엑토도메인의 한 실시양태에서, 신호 펩티드는 신생 단백질을 내형질 세망으로 지향하게 한다. 이는 수용체가 글리코실화되어 예를 들어 세포막에 고정되는 경우이다. 임의의 진핵생물 신호 펩티드 서열은 기능적일 것으로 예상된다. 일반적으로, 아미노-말단의 대부분의 성분에 선천적으로 부착된 신호 펩티드가 사용된다 (예를 들어 배향 경쇄 - 링커 - 중쇄를 가진 scFv에서, 경쇄의 고유 신호가 사용된다). 실시양태에서, 신호 펩티드는 GM-CSFRa (서열번호: 16) 또는 IgK (서열번호: 34)이다. 사용될 수 있는 다른 신호 펩티드는 CD8알파 및 CD28로부터의 신호 펩티드를 포함한다.

[0109] 항원 인식 도메인은 scFv일 수 있다. 그러나 대안이 있을 수 있다. 고유 T-세포 수용체 (TCR) 알파 및 베타 단일 쇄로부터의 항원 인식 도메인이 예상되는데, 그 이유는 이들이 단순 엑토도메인 (예를 들어 HIV 감염 세포를 인식하는 CD4 엑토도메인) 그리고 뿐만 아니라 다른 인식 성분 예컨대 연결된 예를 들어, 시토카인 (이는 시토카인 수용체 보유 세포의 인식을 야기한다)을 갖기 때문이다. 주어진 표적, 예컨대 예를 들어, 종양 연관 항원을 높은 친화도로 결합시키는 것은 거의 무엇이든 항원 인식 영역으로 사용될 수 있다.

[0110] 일반적으로, CAR은 이량체 형태로 존재하며, 세포외 scFv (VL에 연결된 VH) 영역, 스톡 도메인, 막관통 도메인, 및 세포내 신호전달 모티프를 연결하는 융합 단백질로서 표현된다. 제1 세대 CAR의 엔도도메인은 CD3-ζ 신호전달만을 통해 T 세포 활성화를 유도한다. 제2 세대 CAR은 CD3-ζ 및 CD28, 또는 다른 엔도도메인 예컨대 4-1BB 또는 OX40을 통한 활성화 신호전달을 제공한다. 제3 세대 CAR은 세가지 신호전달 모티프 예컨대 CD28, 4-1BB, 또는 OX40의 CD3-ζ-함유 조합을 통해 T 세포를 활성화시킨다.

[0111] 실시양태에서, 본 발명은 세포외 도메인, 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 제공한다. 실시양태에서, 세포외 도메인은 달리 항원 결합 모이어티 또는 scFv 및 스톡 도메인으로 언급된 표적-특이적 결합 요소를 포함한다. 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인 또는 달리 세포질 신호전달 도메인은 공동자극 신호전달 영역 및 제타 쇄 부분을 포함한다.

[0112] 공동자극 신호전달 영역은 공동자극 분자의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 CAR의 일부를 지칭한다. 공동자극 분자는 항원에 대한 림프구의 효율적인 반응에 필요한 항원 수용체 또는 그의 리간드 이외의 세포 표면 분자이다.

[0113] 실시양태에서, CAR의 세포외 도메인과 막관통 도메인 사이에, 스톡 도메인이 혼입된다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "스톡 도메인"은 일반적으로 scFv, 또는 폴리펩티드 쇄 내의 세포질 도메인 중 어느 하나에 막관통 도메인을 연결시키는 기능을 하는 임의의 올리고뉴클레오티드- 또는 폴리펩티드를 의미한다. 스톡 도메인은 가변적 힌지 예컨대 Fc 힌지 그리고 임의로 Fc의 하나 또는 둘의 불변 도메인을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 스톡 영역은 IgG1로부터의 힌지 영역을 포함한다. 대안적인 경우에, 스톡 영역은 면역글로불린의 CH2CH3 영역 그리고 임의로 CD3의 부분을 포함한다. 일부 경우에, 스톡 영역은 CD8α 힌지 영역, IgG4-Fc 12 아미노산 힌지 영역 (ESKYGPPCPPCP) (서열번호: 62) 또는 WO/2016/073755에 기재된 바와 같은 IgG4 힌지 영역을 포함한다.

[0114] 막관통 도메인은 천연 또는 합성 공급원으로부터 유래될 수 있다. 공급원이 천연인 경우, 도메인은 임의의 막-결합 또는 막관통 단백질로부터 유래될 수 있다. 적합한 막관통 도메인은 T-세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 쇄의 막관통 영역(들); 또는 CD28, CD3 엡실론, CD3ζ, CD45, CD4, CD5, CD8알파, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 또는 CD154로부터의 막관통 영역을 포함할 수 있다. 대안적으로 막관통 도메인은 합성일 수 있으며, 소수성 잔기 예컨대 류신 및 발린을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 페닐알라닌, 트립토판 및 발린의 삼중체는 합성 막관통 도메인의 하나 또는 둘 모두의 말단에서 발견된다. 임의로, 일부 실시양태에서, 길이가 2 내지 10개의 아미노산의, 짧은 올리고뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 링커가 CAR의 막관통 도메인과 세포질 신호전달 도메인 사이의 결합을 형성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는 글리신-세린 링커이다. 일부 실시양태에서, 막관통 도메인은 CD8α 막관통 도메인 또는 CD3ζ 막관통 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 막관통 도메인은 CD8α 막관통 도메인을 포함한다. 다른 실시양태에서, 막관통 도메인은 CD3ζ 막관통 도메인을 포함한다.

[0115] 세포내 도메인은 하나 이상의 공동자극 도메인을 포함할 수 있다. 예시적인 공동자극 도메인은 CD8, CD27, CD28, 4-1BB (CD137), ICOS, DAP10, DAP12, OX40 (CD134), CD3-제타 또는 그의 단편 또는 조합물을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 경우에, 본원에 기재된 CAR은 CD8, CD27, CD28, 4-1BB (CD137), ICOS, DAP10,

DAP12, OX40 (CD134) 또는 그의 단편 또는 조합물로부터 선택된 공동자극 도메인 중 하나 이상, 또는 둘 이상을 포함한다. 일부 경우에, 본원에 기재된 CAR은 CD27, CD28, 4-1BB (CD137), ICOS, OX40 (CD134) 또는 그의 단편 또는 조합물로부터 선택된 공동자극 도메인 중 하나 이상, 또는 둘 이상을 포함한다. 일부 경우에, 본원에 기재된 CAR은 CD8, CD28, 4-1BB (CD137), DAP10, DAP12 또는 그의 단편 또는 조합물로부터 선택된 공동자극 도메인 중 하나 이상, 또는 둘 이상을 포함한다. 일부 경우에, 본원에 기재된 CAR은 CD28, 4-1BB (CD137), 또는 그의 단편 또는 조합물로부터 선택된 공동자극 도메인 중 하나 이상, 또는 둘 이상을 포함한다. 일부 경우에, 본원에 기재된 CAR은 공동자극 도메인 CD28 및 4-1BB (CD137) 또는 그의 각각의 단편을 포함한다. 일부 경우에, 본원에 기재된 CAR은 공동자극 도메인 CD28 및 OX40 (CD134) 또는 그의 각각의 단편을 포함한다. 일부 경우에, 본원에 기재된 CAR은 공동자극 도메인 CD8 및 CD28 또는 그의 각각의 단편을 포함한다. 일부 경우에, 본원에 기재된 CAR은 공동자극 도메인 CD28 또는 그의 단편을 포함한다. 일부 경우에, 본원에 기재된 CAR은 공동자극 도메인 4-1BB (CD137) 또는 그의 단편을 포함한다. 일부 경우에, 본원에 기재된 CAR은 공동자극 도메인 OX40 (CD134) 또는 그의 단편을 포함한다. 일부 경우에, 본원에 기재된 CAR은 공동자극 도메인 CD8 또는 그의 단편을 포함한다. 일부 경우에, 본원에 기재된 CAR은 적어도 하나의 공동자극 도메인 DAP10 또는 그의 단편을 포함한다. 일부 경우에, 본원에 기재된 CAR은 적어도 하나의 공동자극 도메인 DAP12 또는 그의 단편을 포함한다.

[0116] 본 개시내용의 CAR의, 세포질 도메인으로도 공지된, 세포내 신호전달 도메인은, CAR이 배치된 면역 세포의 정상적인 이펙터 기능 중 적어도 하나의 활성화의 원인이 된다. 용어 "이펙터 기능"은 세포의 특수화된 기능을 지칭한다. T 세포의 이펙터 기능은, 예를 들어, 시토카인의 분비를 포함한 헬퍼 활성 또는 세포용해 활성일 수 있다. 따라서 용어 "세포내 신호전달 도메인"은 이펙터 기능 신호를 형질도입시키고 세포가 특수화된 기능을 수행하도록 지시하는 단백질의 부분을 지칭한다. 통상 전체 세포내 신호전달 도메인을 이용할 수 있지만, 많은 경우에 전체 쇄를 사용할 필요는 없다. 세포내 신호전달 도메인의 말단절단된 부분이 사용되는 정도까지, 이러한 말단절단된 부분은 이펙터 기능 신호를 형질도입시키는 동안은 무손상 쇄 대신에 사용될 수 있다. 따라서 용어 세포내 신호전달 도메인은 이펙터 기능 신호를 형질도입시키기에 충분한 세포내 신호전달 도메인의 임의의 말단절단된 부분을 포함시키는 것을 의도한다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 T-세포 활성화를 위한 신호전달 도메인을 추가로 포함한다. 일부 경우에, T-세포 활성화를 위한 신호전달 도메인은 TCR 제타, FcR 감마, FcR 베타, CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD5, CD22, CD79a, CD79b 또는 CD66d로부터 유래된 도메인을 포함한다. 일부 경우에, T-세포 활성화를 위한 신호전달 도메인은 CD3ζ로부터 유래된 도메인을 포함한다.

[0117] 실시양태에서, 본원에는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 단리된 핵산이 제공되며, 여기서 CAR은 (a) CD33 항원 결합 도메인; (b) 스톡 도메인; (c) 막관통 도메인; (d) 4-1BB 또는 CD28, 또는 이들 둘 다를 포함하는 공동자극 신호전달 도메인; (e) CD3 제타 신호전달 도메인; 그리고 임의로 (f) 말단절단된 표피 성장 인자 수용체 (HER1t 또는 HER1t-1)를 포함한다.

[0118] 본원에 기재된 CAR의 기능적 부분을 코딩하는 핵산 서열이 본 발명의 범위에 포함된다. 기능적 부분은, 예를 들어, 부모 CAR과 유사한 정도, 동일한 정도, 또는 더 높은 정도로, 표적 세포를 인식하거나, 질환을 검출, 치료, 또는 예방하는 능력을 보유하는 CAR의 그러한 부분을 포괄한다.

[0119] 실시양태에서, CAR은 그 부분의 아미노 또는 카르복시 말단에서, 또는 양쪽 말단에서 추가적 아미노산을 함유하며, 이 추가적 아미노산은 부모 CAR의 아미노산 서열에서는 발견되지 않는다. 바람직하게는, 추가적 아미노산은, 예를 들어, 표적 세포를 인식하거나, 암을 검출, 치료, 또는 예방하는 등, 기능적 부분의 생물학적 기능을 방해하지 않는다. 보다 바람직하게는, 추가적 아미노산은 부모 CAR의 생물학적 활성과 비교하여, CAR의 생물학적 활성을 증진시킨다.

[0120] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "기능적 변이체"는 CAR, 폴리펩티드, 또는 본 발명의 핵산 서열에 의해 코딩된 CAR과 실질적이거나 유의한 서열 동일성 또는 유사성을 갖는 단백질을 지칭하고, 이 기능적 변이체는 그것이 변이체인 CAR의 생물학적 활성을 보유한다. 기능적 변이체는, 예를 들어, 본원에 기재된 CAR (부모 CAR)과 유사한 정도, 동일한 정도, 또는 더 높은 정도로, 표적 세포를 인식하는 능력을 보유하는 부모 CAR의 그러한 변이체를 포괄한다. 부모 CAR을 코딩하는 핵산 서열과 관련하여, CAR의 기능적 변이체를 코딩하는 핵산 서열은 부모 CAR을 코딩하는 핵산 서열과, 예를 들어, 약 10% 동일, 약 25% 동일, 약 30% 동일, 약 50% 동일, 약 65% 동일, 약 80% 동일, 약 90% 동일, 약 95% 동일, 또는 약 99% 동일할 수 있다.

[0121] 본원에 기재된 CAR은 (기능적 부분 및 그의 기능적 변이체 포함) 글리코실화, 아미드화, 카르복실화, 인산화, 에스테르화, N-아실화, 고리화 (예를 들어, 이황화물 가교를 통해), 또는 산 부가 염으로 전환되고/거나 임의로

이량체화 또는 중합체화, 또는 접합된 것을 포함한다.

[0122] **항원 결합 모이어티**

[0123] 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR은 달리 항원-결합 모이어티로서 언급된 표적-특이적 결합을 포함한다. 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR은 종양 세포 상의 항원에 특이적으로 결합하는 원하는 항원-결합 모이어티를 조작함으로써 관심 종양 항원을 표적화하도록 가공된다. 본 발명의 맥락에서 "종양 항원"또는 "과증식성 장애 항원" 또는 "과증식성 장애와 연관된 항원"은 특정 과증식성 장애 예컨대 암에 공통적인 항원을 지칭한다.

[0124] 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR의 항원 결합 모이어티는 CD33에 특이적이다 (CD33 CAR). CD33-특이적 CAR은, 세포 표면 상에 발현될 때, T 세포의 특이성을 인간 CD33으로 재지향하게 한다. 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 가변적 링커, 예컨대 글리신-세린 링커 또는 휘트로우 링커(Whitlow linker)에 의해 연결된 표적 항원 특이적 모노클로날 항-CD33 항체의 가변 도메인 경쇄 (VL) 및 가변 도메인 중쇄 (VH)를 포함하는 단일 쇄 항체 단편 (scFv)을 포함한다. 실시양태에서, scFv는 M195, m2H12, DRB2, 및/또는 My9-6이다. 실시양태에서, scFv는 인간화, 예를 들어, hM195이다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 모이어티는 예를 들어, N으로부터 C 말단으로, 지향적으로 연결되는 VH 및 VL, VH-링커-VL 또는 VL-링커-VH를 포함할 수 있다.

[0125] 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR은 서열번호: 1 (hM195 VL)의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 VL 폴리펩티드를 포함하는 항원-결합 모이어티를 포함한다.

[0126] 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR은 서열번호: 3 (hM195 VH)의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 VH 폴리펩티드를 포함하는 항원-결합 모이어티를 포함한다.

[0127] 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR은 Gly-Ser 링커 (서열번호:6) 또는 상기 링커의 기능적 변이체를 가진 인간화 항-CD33 mAb 클론 hM195의 항원 결합 모이어티 VL (서열번호: 1) 및 VH (서열번호: 3)를 포함한다.

[0128] 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR은 서열번호: 8 (hM195 VH, VL 및 링커)의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 항원-결합 모이어티를 포함한다.

[0129] 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR은 서열번호: 9 (M2H12 VH)의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 VH 폴리펩티드를 포함하는 항원-결합 모이어티를 포함한다.

[0130] 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR은 서열번호: 10 (M2H12 VL)의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 VL 폴리펩티드를 포함하는 항원-결합 모이어티를 포함한다.

[0131] 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR은 서열번호: 11 (DRB2 VH)의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 VH 폴리펩티드를 포함하는 항원-결합 모이어티를 포함한다.

[0132] 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR은 서열번호: 12 (DRB2 VL)의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 VL 폴리펩티드를 포함하는 항원-결합 모이어티를 포함한다.

[0133] 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR은 서열번호: 13 (My9-6 VH)의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 VH 폴리펩티드를 포함하는 항원-결합 모이어티를 포함한다.

[0134] 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR은 서열번호: 14 (My9-6 VL)의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 VL 폴리펩티드를 포함하는 항원-결합 모이어티를 포함한다.

[0135] 실시양태에서, 항원 결합 모이어티는 서열번호: 16의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 GM-CSFRa 신호 펩티드를 갖는다.

[0136] **스톡 도메인**

[0137] 실시양태에서, 본 발명의 CD33 CAR은 항원 결합 모이어티와 T 세포막 사이의 분리를 제공하는 스톡 도메인을 포함한다. 실시양태에서, 스톡 도메인은 최적 이펙터-표적 막간(inter-membrane) 거리를 확립한다. 실시양태에서, 스톡 도메인은 항원 결합 도메인이 그 표적에 도달하기 위한 가변성을 제공한다. 한 실시양태에서, 스톡 도메인은 CD8알파 힌지 도메인이다.

[0138] 실시양태에서, CD8알파 힌지 도메인은 서열번호: 22의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함한다.

[0139] **막관통 도메인**

[0140] 실시양태에서, CAR은 CAR 스톡 도메인의 세포외 도메인에 융합되는 막관통 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 자연적으로 CAR의 도메인 중 하나와 회합된 막 관통 도메인이 사용된다. 실시양태에서, 막관통 도메인은 막에 걸친 소수성 알파 나선이다.

[0141] 막관통 도메인은 천연 또는 합성 공급원으로부터 유래될 수 있다. 공급원이 천연인 경우, 도메인은 임의의 막-결합 또는 막관통 단백질로부터 유래될 수 있다. 본 발명에서 특히 사용되는 막관통 영역은 T-세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 쇄, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8알파, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154로부터 유래될 수 있다 (즉 이들의 적어도 막관통 영역(들)을 포함한다). 대안적으로 막관통 도메인은 합성일 수 있으며, 이 경우에 그것은 주로 소수성 잔기 예컨대 류신 및 발린을 포함할 것이다. 실시양태에서, 페닐알라닌, 트립토판 및 발린의 삼중체가 합성 막관통 도메인의 각각의 말단에서 발견될 것이다. 임의로, 실시양태에서, 길이가 2 내지 10개의 아미노산의, 짧은 올리고뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 링커가 CAR의 막관통 도메인과 세포질 신호전달 도메인 사이의 결합을 형성할 수 있다. 실시양태에서, 링커는 글리신-세린 링커이다.

[0142] 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR에서 막관통 도메인은 CD8알파 막관통 도메인이다. 실시양태에서, CD8알파 막관통 도메인은 서열번호: 18의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함한다.

[0144] 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR에서 막관통 도메인은 CD28 막관통 도메인이다. 실시양태에서, CD28 막관통 도메인은 서열번호: 20의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함한다.

[0145] **세포질 도메인 (공동-자극 도메인 및 신호전달 도메인)**

[0146] 본원에 기재된 CAR의 세포내 신호전달 도메인으로도 공지된, 세포질 도메인은, CAR이 배치된 면역 세포의 정상적인 이펙터 기능 중 적어도 하나의 활성화의 원인이 된다. 용어 "이펙터 기능"은 세포의 특수화된 기능을 지칭한다. T 세포의 이펙터 기능은, 예를 들어, 시토카인의 분비를 포함한 헬퍼 활성 또는 세포용해 활성일 수 있다. 따라서 용어 "세포내 신호전달 도메인"은 이펙터 기능 신호를 형질도입시키고 세포가 특수화된 기능을 수행하도록 지시하는 단백질의 부분을 지칭한다. 통상 전체 세포내 신호전달 도메인을 이용할 수 있지만, 많은 경우에 전체 쇄를 사용할 필요는 없다. 세포내 신호전달 도메인의 말단절단된 부분이 사용되는 정도까지, 이러한 말단절단된 부분은 이펙터 기능 신호를 형질도입시키는 동안은 무손상 쇄 대신에 사용될 수 있다. 따라서 용어 세포내 신호전달 도메인은 이펙터 기능 신호를 형질도입시키기에 충분한 세포내 신호전달 도메인의 임의의 말단절단된 부분을 포함시키는 것을 의도한다.

[0147] 본원에 기재된 CAR에서 사용하기 위한 세포내 신호전달 도메인의 예는 항원 수용체 진입(engagement) 후 신호전달을 개시하기 위해 행동 통일을 하는 T 세포 수용체 (TCR) 및 공동-수용체의 세포질 서열, 뿐만 아니라 이들 서열의 임의의 유도체 또는 변이체 및 동일한 기능적 능력을 갖는 임의의 합성 서열을 포함할 수 있다.

[0148] TCR 단독을 통해 생성된 신호는 일반적으로 T 세포의 완전 활성화에 불충분하고, 이에 따라 2차 또는 공동-자극 신호가 또한 필요하다. 따라서, T 세포 활성화는 세포질 신호전달 서열의 두 가지 별개의 부류, 즉 TCR을 통해 항원-의존성 1차 활성화를 개시하는 것들 (1차 세포질 신호전달 서열) 및 항원-독립적 방식으로 작용하여 2차 또는 공동-자극 신호를 제공하도록 작용하는 것들 (2차 세포질 신호전달 서열)에 의해 매개된다고할 수 있다.

[0149] 1차 세포질 신호전달 서열은 자극적인 방식으로, 또는 억제적인 방식으로 TCR 복합체의 1차 활성화를 조절한다. 자극적인 방식으로 작용하는 1차 세포질 신호전달 서열은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로

공지된 신호전달 모티프를 함유할 수 있다.

[0150] 본 발명에서 특히 유용한 ITAM-함유 1차 세포질 신호전달 서열의 예는 TCR 제타, FcR 감마, FcR 베타, CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD5, CD22, CD79a, CD79b, 및 CD66d로부터 유래된 것들을 포함한다. 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR에서 세포질 신호전달 분자는 CD3 제타에서 유래된 세포질 신호전달 서열을 포함한다.

[0151] 실시양태에서, CAR의 세포질 도메인은 CD3-제타 신호전달 도메인을 그 자체로 또는 본원에 기재된 CAR의 맥락에서 유용한 임의의 다른 원하는 세포질 도메인(들)과 조합하여 포함하도록 설계될 수 있다. 예를 들어, CAR의 세포질 도메인은 CD3 제타 쇄 부분 및 공동자극 신호전달 영역을 포함할 수 있다. 공동자극 신호전달 영역은 공동자극 분자의 세포내 도메인을 포함하는 CAR의 부분을 지칭한다. 공동자극 분자는 항원에 대한 림프구의 효율적인 반응을 위해 필요한 항원 수용체 또는 그의 리간드 이외의 세포 표면 분자이다. 이러한 분자의 예는 CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능-연관 항원-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 및 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드 등을 포함한다. 실시양태에서, 공동자극 분자는, 예를 들어, CD28 및 4-1BB 또는 CD28 및 OX40과 함께 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 공동-자극 신호전달 요소로서 주로 4-1BB 및 CD28로 예시되어 있지만, 다른 공동자극 요소가 본 발명의 범위 내에 있다.

[0152] 본원에 기재된 CAR의 세포질 신호전달 부분 내의 세포질 신호전달 서열은 무작위 또는 특정된 순서로 서로 연결될 수 있다. 임의로, 길이가 2 내지 10개의 아미노산의, 짧은 올리고- 또는 폴리펩티드 링커가 결합을 형성할 수 있다. 글리신-세린 이중체는 특히 적합한 링커를 제공한다.

[0153] 한 실시양태에서, 세포질 도메인은 CD3-제타의 신호전달 도메인 및 CD28의 신호전달 도메인을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 세포질 도메인은 CD3-제타의 신호전달 도메인 및 4-1BB의 신호전달 도메인을 포함한다. 또한 또 다른 실시양태에서, 세포질 도메인은 CD3-제타의 신호전달 도메인 및 CD28 및 4-1BB의 신호전달 도메인을 포함한다.

[0154] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR에서 세포질 도메인은 4-1BB의 신호전달 도메인 및 CD3-제타의 신호전달 도메인을 포함하며, 여기서 4-1BB의 신호전달 도메인은 서열번호: 24의 폴리펩티드 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함하며, CD3-제타의 신호전달 도메인은 서열번호: 26의 핵산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함한다.

[0155] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR에서 세포질 도메인은 CD28의 신호전달 도메인 및 CD3-제타의 신호전달 도메인을 포함하도록 설계되며, 여기서 CD28의 신호전달 도메인은 서열번호: 28과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함하며, CD3-제타의 신호전달 도메인은 서열번호: 26과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함한다.

[0156] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR에서 세포질 도메인은 4-1BB의 신호전달 도메인 및 CD3-제타의 신호전달 도메인을 포함하며, 여기서 4-1BB의 신호전달 도메인은 서열번호: 24에 제시된 아미노산 서열을 포함하며 CD3-제타의 신호전달 도메인은 서열번호: 26에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0157] **추가적 유전자 요소**

[0158] 비록 세포 요법이 인간 질환의 치료에 대단한 장래성을 보유하긴 하지만, 세포 자체 또는 그의 트랜스진(transgene) 생성물로부터의 중대한 독성이 임상 조사를 방해하여 왔다. 본원에 기재된 실시양태에서, 포유동물 대상체, 예를 들어, 인간에게 주입된 본원에 기재된 CAR을 포함하는 면역 이펙터 세포는, 그의 사용으로부터의 독성이 발생한다면 이러한 면역 이펙터 세포의 효과를 조절하기 위해 제거될 수 있다. 따라서, 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 치료용 CD33-특이적 키메라 항원 수용체에 더하여, 제2 유전자가 본원에 기재된 가공된 면역 이펙터 세포에 또한 도입된다. 제2 유전자는 효과적으로 CD33 CAR 함유 세포의 고갈을 가능하게 하는 "사멸 스위치"이다. 특정 실시양태에서, "사멸 스위치"는 HER1 또는 CD20 또는 그의 기능적 단편의 적어도 항체 결합 에피토프, 그리고 임의로 신호 폴리펩티드 서열 또는 그의 단편을 포함하는 HER1 폴리펩티드 또는 CD20 폴리펩티드를 포함하는 HER1 태그 또는 CD20 태그이다.

[0159] 특정 실시양태에서, 제2 유전자는 표피 성장 인자 수용체 (HER1) 또는 그의 단편 또는 변이체인 HER1 태그이다. 실시양태에서, 제2 유전자는 말단절단된 인간 표피 성장 인자 수용체 1 (예를 들어 HER1t 또는 HER1t-1)인 HER1 태그이다. 일부 경우에, 제2 유전자는 말단절단된 인간 표피 성장 인자 수용체 1의 변이체이다. 실시양태에서, HER1, HER1t 및 HER1t-1 중 적어도 하나는 FDA가 승인한 세툭시맙 또는 HER1, HER1t 및/또는

HER1t-1을 인식하는 임의의 항체를 투여하는 것을 통해 주입된 CAR-T 세포의 고갈을 가능하게 함으로써 안전성 메커니즘을 제공한다. 실시양태에서, HER1t 유전자는 서열번호: 32의 핵산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 실시양태에서, HER1t-1 유전자는 서열번호: 54의 핵산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 말단절단된 HER1 서열, 예를 들어 HER1t 및 HER1t-1은 EGF 리간드 결합, EGFR의 호모- 및 헤테로- 이량체화, 및 EGFR 매개된 신호전달의 가능성을 제거하며 한편 수용체에 대한 세툭시맙 결합을 무손상으로 유지한다 (Ferguson, K., 2008. A structure-based view of Epidermal Growth Factor Receptor regulation. *Annu Rev Biophys*, Volume 37, pp. 353-373).

[0160] 추가 실시양태에서, 본 발명의 치료용 CD33-특이적 키메라 항원 수용체에 더하여, 도입된 제2 유전자는 CD20 태그이다. 일부 경우에, CD20 태그는 전장 CD20 폴리펩티드, 또는 말단절단된 CD20 폴리펩티드 (CD20t-1)이다. 일부 경우에, CD20 태그, 예를 들어 CD20 또는 CD20t-1은 FDA-승인 리툭시맙 요법을 투여하는 것을 통해 주입된 CAR-T 세포의 고갈을 가능하게 함으로써 안전성 메커니즘을 또한 제공한다. 특정 실시양태에서, CD20 태그는 서열번호: 36의 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열을 갖는다. 특정 실시양태에서, CD20 태그는 CD20t-1 태그이며 서열번호: 56의 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, CD20 태그는 서열번호: 35의 핵산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 CD20 유전자에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, CD20 태그는 서열번호: 57의 핵산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 CD20t-1 유전자에 의해 코딩된다.

[0161] 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR을 포함하는 CAR 벡터는 서열번호: 36의 핵산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 전장 CD20 태그를 추가로 포함한다.

[0162] 실시양태에서, 사멸 태그(kill tag), 예를 들어 HER1t, HER1t-1, CD20 또는 CD20t-1 태그를 코딩하는 유전자는, 예를 들어 토세아 아시그나(*Thosea asigna*) 바이러스 (T2A) 펩티드이나 이에 제한되지는 않는 자기-절단 펩티드로 인-프레임(in-frame)을 통해 3' 말단에서 CD33 CAR에 유전자 융합된다. 실시양태에서, T2A 펩티드는 서열번호: 30의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는다.

[0163] 실시양태에서, 사멸 태그 유전자는 CD33 CAR 유전자와 함께 프레임으로 pFUGW 렌티바이러스 플라스미드 주쇄로 클로닝된다. 다른 실시양태에서, 두 유전자 모두 슬리핑 뷰티 트랜스포존 벡터로 클로닝된다. 다른 실시양태에서, 사멸 태그는 별개의 렌티바이러스 벡터로 클로닝된다. 또 다른 실시양태에서, 사멸 태그 예컨대 HER1t, HER1t-1, CD20 또는 CD20t-1은 별개의 슬리핑 뷰티 트랜스포존 벡터로 클로닝된다. 특정 실시양태에서, 사멸 태그는 신호 펩티드, 예를 들어, GM-CSFRa 신호 펩티드를 가지며 여기서 GM-CSFRa 신호 펩티드는 서열번호: 16의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는다. 특정 실시양태에서, 신호 펩티드는 서열번호: 34의 핵산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 서열을 갖는 IgK이다. 일부 경우에 신호 펩티드는 IgE 및 CD8α, 그의 변이체 및 단편으로부터 선택될 수 있다.

[0164] 본원에 기재된 바와 같은 CAR 및 사멸 태그를 코딩하는 예시적인 벡터를 도 2에 나타냈다.

[0165] **예시적인 CAR 개방 판독 프레임**

[0166] 본원에 기재된 방법 및 조성물에 의해 포괄되는 CAR 및 인간 CD33 수용체 개방 판독 프레임이 표 1에 있다:

[0167] [표 1]

	CAR ORF
1	hM195scFv-CD8a-CD28m-Z (**서열번호: 39**)
2	hM195scFv-CD8a-Z (**서열번호: 41**)
3	hM195scFv-CD8a-CD28m-Z-T2A-GM-CSFRasp.HER1t (**서열번호: 43**)
4	hM195scFv (**서열번호: 45**)
5	hM195scFv-CD8a-4-1BB-Z (**서열번호: 47**)
6	hM195scFv-CD8a-4-1BB-Z-T2A-GM-CSFRasp.HER1t (**서열번호: 49**)
7	hM195scFv-CD8a-4-1BB-Z-T2A.FL CD20 (**서열번호: 51**)
8	**인간** CD33(M1-R287) (**서열번호: 53**)

[0168]

[0169] 실시양태에서, 본원에는 CAR을 코딩하는 단리된 핵산이 제공되며, 여기서 CAR은 서열번호: 39, 서열번호: 41, 서열번호: 43, 서열번호: 45, 서열번호: 47, 서열번호: 49, 서열번호: 51 또는 서열번호: 53의 아미노산과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함한다.

[0170] "hM195scFv"를 가진 표 1에 열거된 실시양태 각각에서, CAR 항원 결합 모이어티는 서열번호: 8의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 hM195scFV이다. 실시양태에서, hM195scFv는 서열번호: 16의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 GM-CSFRa 신호 펩티드를 갖는다.

[0171] "CD8a"를 가진 표 1에서의 실시양태 각각에서, CAR의 막관통 영역은 서열번호: 18의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 CD8알파 막관통 도메인을 포함하며, 스톡 도메인은 서열번호: 22의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 CD8a이다.

[0172] "CD28m"을 가진 표 1에서의 실시양태 각각에서, CAR의 세포내 도메인은 서열번호: 28의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 가진 CD28을 포함한다.

[0173] "T2A"를 가진 표 1에서의 실시양태 각각에서, CAR ORF는 단일 벡터로부터 다중 유전자 생성물의 생산을 가능하게 하는, 자기-절단 토세아 아시그나 바이러스 (T2A) 펩티드를 포함한다. 실시양태에서, T2A 펩티드는 서열번호: 30의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는다.

[0174] "HER1t"를 가진 표 1에서의 실시양태에서, CAR ORF는 FDA가 승인한 세툭시맙 요법을 투여하는 것을 통해 주입된 CAR-T 세포의 고갈을 가능하게 함으로써 안전성 메커니즘을 제공하는, 말단절단된 인간 표피 성장 인자 수용체 1 (HER1t)을 포함한다. 본원에 기재된 바와 같은 HER1t 유전자는 서열번호: 31의 아미노산 서열을 가진 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함할 수 있다. 표 1에서 달리 언급하지 않는 한, HER1t 태그는 GM-CSFRa 신호 펩티드 ("GM-CSFRsp") (서열번호: 16)를 갖는다. 특정 실시양태에서, HER1t는 또 다른 태그, 예를 들어, HER1t-1 또는 CD20t-1로 치환될 수 있다. "IgKsp"를 가진 표 1의 실시양태에서, 신호 펩티드는 서열번호: 34의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 IgK이다.

[0175] "4-1BB"를 가진 표 1에서의 실시양태에서, CAR ORF는 서열번호: 24의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열을 갖는 공동자극 분자를 포함한다.

[0176] "FL CD20"을 가진 표 1에서의 실시양태에서, CAR ORF은 서열번호: 36의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함하는 전장 CD20 태그를 포함한다. CD20은 FDA-승인 리툭시맙 요법을 투여하는 것을 통해 주입된 CAR-T 세포의 고갈을 가능하게 함으로써 안전성 메커니즘을 제공한다. 표 1에서의 특정 실시양태에서, CAR ORF는 유전자 전사를 위한 유도성 프로모터의 제어하에 있을 수 있다. 한 측면에서, 유도성 프로모터는 유전자 스위치 리간드 유도성 프로모터일 수 있다. 일부 경우에, 유도성 프로모터는 소분자 리간드-유도성 두개의 폴리펩티드 엑디손 수용체-기반 유전자 스위치, 예컨대 레오스위치® 유전자 스위치일 수 있다.

[0177] **시토카인**

[0178] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR을 대상체에게 시토카인을 포함하나 이에 제한되지는 않는 1종 이상의 추가적 치료제와 함께 투여한다. 일부 경우에, 시토카인은 적어도 하나의 케모카인, 인터페론, 인터류킨, 림포카인, 종양 괴사 인자, 또는 그의 변이체 또는 조합을 포함한다. 일부 경우에, 시토카인은 인터류킨이다. 일부 경우에 인터류킨은 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33 및 그의 기능적 변이체 및 단편 중 적어도 하나이다. 일부 실시양태에서, 시토카인은 막에 결합되거나 분비될 수 있다. 실시양태에서, 시토카인은 가용성 IL-15, 가용성 IL-15/IL-15Rα 복합체 (예를 들어, ALT-803)이다. 특정 경우에, 인터류킨은 막 결합 IL-15 (mbIL-15) 또는 IL-15와 IL-15Rα의 융합물을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, mbIL-15는 본원에 기재된 변형된 면역 이펙터 세포와 공동-발현될 수 있는 막-결합 키메라 IL-15이다. 일부 실시양태에서, mbIL-15는 전장 IL-15Rα, 그의 기능적 단편 또는 변이체와 프레임으로 융합된, 전장 IL-15 (예를 들어, 천연 IL-15 폴리펩티드) 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함한다. 일부 경우에, IL-15는 IL-15는 링커를 통해 IL-15Rα에 간접적으로 연결된다. 일부 경우에, mbIL-15는 문헌 [Hurton et al., "Tethered IL-15 augments antitumor activity and promotes a stem-cell memory subset in tumor-specific T cells," PNAS 2016]에 기재된 바와 같다. 일부 경우에, 시토카인은 CAR과 동일한 면역 이펙터 세포에서 발현된다. 일부 실시양태에서, 상기 기재된 시토카인은 유전자 전사를 위한 유도성 프로모터의 제어하에 있을 수 있다. 한 측면에서, 유도성 프로모터는 유전자 스위치 리간드 유도성 프로모터일 수 있다. 일부 경우에, 유도성 프로모터는 소분자 리간드-유도성 두개의 폴리펩티드 엑디손 수용체-기반 유전자 스위치, 예컨대 레오스위치® 유전자 스위치일 수 있다.

[0179] 추가 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR을 발현시키는 면역 이펙터 세포는 막-결합 IL-15 ("mIL-15 또는 mbIL-15")를 발현시킨다. 발명의 측면에서, mbIL-15는 IL-15와 IL-15Rα 사이의 융합 단백질을 포함한다. 추가 실시양태에서, mbIL-15는 서열번호: 37의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0180] 일부 실시양태에서, mbIL-15는 세포 태그 예컨대 본원에 기재된 바와 같은 HER1t, HER-1t-1, CD20t-1 또는 CD20으로 발현된다. mbIL-15는 HER1t, HER-1t-1, CD20t-1 또는 CD20으로 인-프레임 발현될 수 있다.

[0181] 일부 실시양태에서, mbIL-15는 유전자 전사를 위한 유도성 프로모터의 제어하에 있을 수 있다. 한 측면에서, 유도성 프로모터는 유전자 스위치 리간드 유도성 프로모터일 수 있다. 일부 경우에, 유도성 프로모터은 소분자 리간드-유도성 두개의 폴리펩티드 엑디손 수용체-기반 유전자 스위치, 예컨대 레오스위치® 유전자 스위치일 수 있다.

[0182] **바이러스 기반 전달 시스템(Viral Based Delivery System)**

[0183] 본 발명은 또한 본 발명의 핵산이 삽입되는, 전달 시스템, 예컨대 바이러스-기반 시스템을 제공한다. 대표적인 바이러스 발현 벡터는 아데노바이러스-기반 벡터 (예를 들어, 아데노바이러스-기반 Per.C6 시스템, 크루셀, 인크.(Crucell, Inc.) (네델란드 라이덴)로부터 입수 용이함), 렌티바이러스-기반 벡터 (예를 들어, 렌티바이러스-기반 pLPI, 라이프 테크놀로지즈(Life Technologies) (캘리포니아주 칼스바드)) 및 레트로바이러스 벡터 (예를 들어, pFB-ERV 플러스 pCFB-EGSH), 헤르페스 바이러스를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 한 실시양태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터이다. 레트로바이러스 예컨대 렌티바이러스로부터 유래된 벡터는 적합한 장기적인 유전자 전달을 달성하기 위한 도구인데 그 이유는 이들이 트랜스진(transgene)의 장기적이고 안정적인 통합 및 딸 세포에서의 그의 전파를 가능하게 하기 때문이다. 렌티바이러스 벡터는 이들이 비-증식성 세포, 즉 간세포를 형질도입시킬 수 있다는 점에서 온코-레트로바이러스(onco-retrovirus) 예컨대 뮤린 백혈병 바이러스로부터 유래된 벡터와 비교하여 부가적 이점을 갖는다. 이들은 면역원성이 낮다는 부가적 이점을 갖는다. 일반적으로, 그리고 실시양태에서, 적합한 벡터는 적어도 하나의 유기체에서 기능성인 복제 기점, 프로모터 서열, 편리한 제한 엔도뉴클레아제 부위, 및 하나 이상의 선택 가능 마커를 함유한다, (예를 들어, WO 01/96584; WO 01/29058; 및 미국 특허 번호 6,326,193).

[0184] 실시양태에서, 주쇄 및 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 렌티바이러스 벡터가 제공되며, 여기서 CAR은 (a) CD33 항원 결합 도메인; (b) 스톡 도메인; (c) 막관통 도메인; (d) 4-1BB 또는 CD28, 또는 이들 둘 다를 포함하는 공동자극 신호전달 도메인; (e) CD3 제타 신호전달 도메인을 포함한다. 임의로, 벡터는 말단절단된 표피 성장 인자 수용체 (HER1t 또는 HER1t-1), CD20t-1 또는 전장 CD20을 코딩하는 핵산을

추가로 포함한다.

[0185] 일부 경우에 주쇄 및 (1) 말단절단된 표피 성장 인자 수용체 예를 들어 HER1t 또는 HERt-1 또는 그의 기능적 변이체; 및 (2) 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터가 제공되며, 여기서 CAR은 (a) CD33 항원 결합 도메인; (b) 스톡 도메인; (c) 막관통 도메인; (d) 4-1BB 또는 CD28, 또는 이들 둘 다를 포함하는 공동자극 신호전달 도메인; 및 (e) CD3 제타 신호전달 도메인을 포함한다.

[0186] 일부 경우에 주쇄 및 (1) 전장 CD20, 말단절단된 CD20 또는 그의 기능적 변이체, 및 (2) 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터가 제공되며, 여기서 CAR은 (a) CD33 항원 결합 도메인; (b) 스톡 도메인; (c) 막관통 도메인; (d) 4-1BB 또는 CD28, 또는 이들 둘 다를 포함하는 공동자극 신호전달 도메인; 및 (e) CD3 제타 신호전달 도메인을 포함한다.

[0187] 실시양태에서, CD33 특이적 CAR을 코딩하는 핵산은 렌티바이러스 주쇄 성분을 포함하는 벡터로 클로닝된다. 예시적인 주쇄 성분은 pFUGW, 및 pSMPUW를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. pFUGW 렌티바이러스 벡터 주쇄는 자기 불활성화(self inactivating) (SIN) 렌티바이러스 벡터 주쇄가며 불필요한 HIV-1 바이러스 서열이 제거되어 신생물 발생, 해로운 돌연변이, 및 감염성 입자의 재생에 대한 잠재력이 감소한다. 실시양태에서, CD33 CAR을 코딩하는 벡터는 단일 구축물에서 mbIL-15를 또한 코딩한다. 실시양태에서, CD33 CAR 및 mbIL-15는 두개의 별개의 렌티바이러스 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, mbIL-15는 말단절단된 표피 성장 인자 수용체 태그로 발현된다. 실시양태에서, CD33 CAR은 단일 렌티바이러스 벡터로부터의 세포 태그 및 mbIL-15로 공동-발현된다. 추가 실시양태에서, CD33 CAR은 유도성 프로모터의 제어하에 있을 수 있다. 또 다른 실시양태에서, mbIL-15는 유도성 프로모터의 제어하에 있을 수 있다. 한 측면에서, 유도성 프로모터는 유전자 스위치 리간드 유도성 프로모터일 수 있다. 일부 경우에, 유도성 프로모터는 소분자 리간드-유도성 두개의 폴리펩티드 엑디손 수용체-기반 유전자 스위치, 예컨대 레오스위치® 유전자 스위치일 수 있다.

[0188] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 CD33 CAR은 항-CD33 scFv, 인간 CD8 힌지 및 막관통 도메인, 및 인간 4-1BB 및 CD3제타 신호전달 도메인을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 CD33 CAR은 항-CD33 scFv, 인간 CD8 힌지 및 막관통 도메인, 인간 4-1BB 및 CD3제타 신호전달 도메인 그리고 임의로, 말단절단된 표피 성장 인자 수용체 (HER1t 또는 HER1t-1) 태그를 포함한다. 다른 적합한 벡터는 발현 벡터를 통합하는 것을 포함하며, 이 발현 벡터는 숙주 세포의 DNA에 무작위로 통합될 수 있거나, 발현 벡터와 숙주 세포의 염색체 사이의 특이적 재조합을 가능하게 하는 재조합 부위를 포함할 수 있다. 이러한 통합 발현 벡터는 숙주 세포의 염색체의 내인성 발현 제어 서열을 이용하여 원하는 단백질의 발현을 수행할 수 있다. 부위 특이적 방식으로 통합되는 벡터의 예는, 예를 들어, 인비트로겐 (캘리포니아주 칼스바드)로부터의 flp-in 시스템의 성분 (예를 들어, pcDNA™5/FRT), 또는 스트라타진 (캘리포니아주 라 졸라)으로부터 p익스체인지(Exchange)-6 코어(Core) 벡터에서 발견될 수 있는 것과 같은 cre-lox 시스템의 성분을 포함한다. 숙주 세포 염색체에 무작위로 통합되는 벡터의 예는, 예를 들어, 인비트로겐 (캘리포니아주 칼스바드)으로부터의 pcDNA3.1 (T-항원의 부재하에 도입될 때), 및 프로메가(Promega) (위스콘신주 매디슨)로부터의 pCI 또는 pFN10A (ACT) FLEXI™을 포함한다. 추가적 프로모터 요소, 예를 들어, 인핸서는, 전사 개시의 빈도를 조절한다. 전형적으로, 이들은 시작 부위의 30-110 bp 상류에 위치하고 있긴 하지만, 다수의 프로모터가 시작 부위의 하류에도 기능적 요소를 함유하는 것으로 최근에 밝혀졌다. 프로모터 요소 사이의 간격은 빈번히 가변적이어서, 요소가 반전되거나 서로 상대적으로 이동하는 경우 프로모터 기능이 보존된다. 티미딘 키나제 (tk) 프로모터에서, 프로모터 요소 사이의 간격은 활성이 감소하기 시작하기 전에 50 bp 간격으로 증가될 수 있다. 프로모터에 따라, 개별 요소가 협력적으로 또는 독립적으로 기능하여 전사를 활성화시킬 수 있는 것으로 보인다.

[0189] 적합한 프로모터의 한 예는 즉시 조기 시토메칼로바이러스(immediate early cytomegalovirus) (CMV) 프로모터 서열이다. 이 프로모터 서열은 작동 가능하게 그에 연결된 임의의 폴리뉴클레오티드 서열의 높은 발현 수준을 추진할 수 있는 강한 구성적 프로모터 서열이다.

[0190] 적합한 프로모터의 또 다른 예는 인간 신장 성장 인자(human elongation growth factor) 1 알파 1 (hEF1a1)이다. 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR을 포함하는 벡터 구축물은 hEF1a1 기능적 변이체를 포함한다.

[0191] 그러나, 다른 구성적 프로모터 서열이 또한 사용될 수 있으며, 유인원 바이러스(simian virus) 40 (SV40) 조기 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스(mouse mammary tumor virus) (MMTV), 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 긴 말단 반복부(long terminal repeat) (LTR) 프로모터, MoMuLV 프로모터, 조류 백혈병 바이러스 프로모터, 엡슈타인-바 바이러스 즉시 조기 프로모터, 라우스(Rous) 육종 바이러스 프로모터, 뿐만 아니라 인간 유전자 프로모터 예컨대, 그러나 이에 제한되지는 않는, 액틴 프로모터, 미오신 프로모터, 헤모글로빈 프로모터, 및 크레아틴

키나제 프로모터를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 추가로, 본 발명은 구성적 프로모터의 사용에 제한되지 않아야 한다. 유도성 프로모터가 또한 발명의 일부로서 고려된다. 유도성 프로모터의 사용은 이러한 발현이 요구될 때 작동 가능하게 연결되는 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 턴온할 수 있거나, 발현이 요구되지 않을 때 발현을 턴오프할 수 있는 분자 스위치를 제공한다. 유도성 프로모터의 예는 메탈로티오닌 프로모터, 글루코코르티코이드 프로모터, 프로게스테론 프로모터, 및 테트라시클린 프로모터를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0192] 본원에 기재된 CAR 또는 그의 일부의 발현을 평가하기 위해, 세포에 도입될 발현 벡터는 선택 가능 마커 유전자 또는 리포터 유전자 또는 이들 둘 다를 또한 함유하여 바이러스 벡터를 통해 형질감염시키거나 감염시키려는 세포의 집단으로부터의 발현 세포의 동정 및 선택을 용이하게 한다. 다른 측면에서, 선택 가능 마커는 별개의 DNA 단편에 옮겨져 공동-형질감염 절차에서 사용될 수 있다. 선택 가능 마커 및 리포터 유전자 둘 다는 숙주 세포에서 발현을 가능하게 하는 적절한 조절성 서열과 플랭킹(flanked)될 수 있다. 유용한 선택 가능 마커는, 예를 들어, 항생제-내성 유전자, 예컨대 네오마이신 내성 유전자 (neo) 및 암피실린 내성 유전자 등을 포함한다. 일부 실시양태에서, 말단절단된 표피 성장 인자 수용체 (HER1t 또는 HER1t-1) 태그를 선택 가능 마커 유전자로서 사용할 수 있다.

[0193] 리포터 유전자는 잠재적으로 형질감염된 세포를 동정하고 조절성 서열의 기능성을 평가하는데 사용될 수 있다. 일반적으로, 리포터 유전자는 수용자 유기체 또는 조직에 존재하지 않거나 그에 의해 발현되지 않는 유전자이며, 그의 발현이 일부 쉽게 검출 가능한 특성, 예를 들어 효소 활성에 의해 나타내지는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자이다. 리포터 유전자의 발현은 DNA가 수용자 세포에 도입된 후에 적합한 때 검정된다. 적합한 리포터 유전자는 루시퍼라제, 베타-갈락토시다제, 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제, 분비된 알칼리 포스파타제, 또는 녹색 형광 단백질 유전자를 코딩하는 유전자를 포함한다 (예를 들어, 문헌 [Ui-Tei et al., FEBS Letters 479: 79-82 (2000)]). 적합한 발현 시스템은 널리 공지되어 있으며 공지된 기술을 사용하여 제조되거나 상업적으로 수득될 수 있다. 일반적으로, 리포터 유전자의 발현의 최고 수준을 나타내는 최소한의 5' 플랭킹(flanking) 영역을 가진 구축물은 프로모터로서 확인된다. 이러한 프로모터 영역은 리포터 유전자와 연결될 수 있으며, 프로모터-추진 전사를 조정하는 능력에 대해 작용제를 평가하는데 사용된다.

[0194] 실시양태에서, 본원에 기재된 벡터는 트랜스진의 발현을 추진하는 hEF1a1 프로모터, 전사를 증진시키는 소 성장 호르몬 폴리A 서열, 우드척 간염 바이러스 전사후 조절 요소(woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element) (WPRE), 뿐만 아니라 pFUGW 플라스미드로부터 유래된 LTR 서열을 포함할 수 있다.

[0195] 유전자를 세포로 도입 및 발현시키는 방법은 널리 공지되어 있다. 발현 벡터의 맥락에서, 벡터는 관련 기술분야의 임의의 방법에 의해 숙주 세포, 예를 들어, 포유동물, 박테리아, 효모 또는 곤충 세포에 용이하게 도입될 수 있다. 예를 들어, 발현 벡터는 물리적, 화학적 또는 생물학적 수단에 의해 숙주 세포로 전달될 수 있다.

[0196] 숙주 세포, 예를 들어 면역 이펙터 세포에 폴리뉴클레오티드를 도입하기 위한 물리적 방법은, 인산칼슘 침전법, 리포펙션, 입자 충격, 마이크로인젝션(microinjection), 전기천공법 등을 포함한다. 벡터 및/또는 외인성 핵산을 포함하는 세포를 생산하는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001))] 참조. 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포에 도입하는 방법은 인산칼슘 형질감염 또는 폴리에틸렌이민 (PEI) 형질감염이다.

[0197] 관심 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포, 예를 들어 면역 이펙터 세포에 도입하기 위한 생물학적 방법은 DNA 및 RNA 벡터의 사용을 포함한다. 바이러스 벡터, 특히 레트로바이러스 벡터는 포유동물, 예를 들어, 인간 세포에 유전자를 삽입하는 가장 널리 사용되는 방법이 되었다. 다른 바이러스 벡터는 렌티바이러스, 폭스바이러스, 단순 포진 바이러스 I, 아데노바이러스 및 아데노-연관 바이러스 등으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,350,674 및 5,585,362를 참조.

[0198] 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포에 도입하기 위한 화학적 수단은 콜로이드 분산 시스템, 예컨대 거대분자 복합체, 나노캡슐, 마이크로스피어, 비드, 및 수-중-유 에멀젼, 미셀, 혼합 미셀, 및 리포솜을 포함한 지질-기반 시스템을 포함한다. 시험관내 및 생체내에서 전달 비히클로 사용하기 위한 예시적인 콜로이드 시스템은 리포솜 (예를 들어, 인공 막 소포(artificial membrane vesicle))이다.

[0199] 바이러스 전달 시스템이 이용되는 경우에, 예시적인 전달 비히클은 리포솜이다. 지질 제제는 숙주 세포내로의 핵산의 도입 (시험관내, 생체외 또는 생체내)에 사용될 수 있다. 또 다른 측면에서, 핵산은 지질과 회합될 수

있다. 지질과 회합된 핵산은 리포솜의 수성 내부에서 캡슐화될 수 있거나, 리포솜의 지질 이중층 내에 산재될 수 있거나, 리포솜과 올리고뉴클레오티드 둘 다와 회합된 연결 분자를 통해 리포솜에 부착될 수 있거나, 리포솜에 포획될 수 있거나, 리포솜과 복합체를 형성할 수 있거나, 지질을 함유하는 용액에 분산될 수 있거나, 지질과 혼합될 수 있거나, 지질과 조합될 수 있거나, 지질 중 현탁액으로서 함유될 수 있거나, 미셀과 함유되거나 복합체화될 수 있거나, 또는 달리 지질과 회합될 수 있다. 지질, 지질/DNA 또는 지질/발현 벡터 연관 조성물은 용액 중의 임의의 특정 구조에 제한되지 않는다. 예를 들어, 이들은 이중층 구조에, 미셀로서, 또는 "붕괴된(collapsed)" 구조로 존재할 수 있다. 이들은 또한 단순히 용액에 산재되어 있어, 가능하게는 크기 또는 모양이 균일하지 않은 응집체를 형성할 수 있다. 지질은 자연 발생 또는 합성 지질일 수 있는 지방성 물질이다. 예를 들어, 지질은 세포질에서 자연 발생하는 지방 액적뿐만 아니라 장쇄 지방족 탄화수소 및 그의 유도체, 예컨대 지방산, 알콜, 아민, 아미노 알콜, 및 알데히드를 함유한 화합물의 부류를 포함한다.

[0200] 사용에 적합한 지질은 상업적 공급자로부터 입수할 수 있다. 예를 들어, 디미리스틸 포스파티딜콜린 ("DMPC")은 시그마(Sigma) (미주리주 세인트루이스)로부터 입수할 수 있으며; 디세틸 포스페이트 ("DCP")는 케이 앤드 케이 라보라토리즈(K & K Laboratories) (뉴욕주 플레인뷰)로부터 입수할 수 있으며; 콜레스테롤 ("Choi")은 칼바이오켐-베링(Calbiochem-Behring)으로부터 입수할 수 있으며; 디미리스틸 포스파티딜글리세롤 ("DMPG") 및 다른 지질은 아반티 폴라 리피즈, 인크.(Avanti Polar Lipids, Inc.) (앨라배마주 버밍햄)로부터 입수할 수 있다. 클로로포름 또는 클로로포름/메탄올 중 지질의 스톡 용액은 약 -20℃에서 보관할 수 있다. 클로로포름은 메탄올보다 더 쉽게 증발되기 때문에 유일한 용매로서 사용된다. "리포솜"은 밀폐(enclosed) 지질 이중층 또는 응집체의 생성에 의해 형성된 여러 가지의 단일 및 다층판(multilamellar) 지질 비히클을 포괄하는 일반적인 용어이다. 리포솜은 인지질 이중층 막 및 내부 수성 매질을 갖는 소포 구조를 갖는 것으로 특징지어질 수 있다. 다층판 리포솜은 수성 매질에 의해 분리된 다중 지질 층을 갖는다. 이들은 인지질이 과량의 수용액에 현탁되는 경우 자발적으로 형성된다. 지질 성분은 폐쇄 구조가 형성되기 전에 자기-재배열(self-rearrangement)을 겪고 지질 이중층 사이에 물과 용해된 용질을 포획한다 (Ghosh et al., Glycobiology 5: 505-10 (1991)). 그러나, 정상적인 소포 구조물보다 용액에서 상이한 구조를 갖는 조성물이 또한 포괄된다. 예를 들어, 지질은 미셀 구조를 취하거나 단지 지질 분자의 비균일 응집체로서 존재할 수 있다. 또한 리포펙타민-핵산 복합체가 고려된다.

[0201] **비-바이러스 기반 전달 시스템**

[0202] 본원에 기재된 CAR을 코딩하는 핵산은 또한 DNA 서열을 척추동물의 염색체로 도입하기 위한 합성 DNA 트랜스포존 시스템을 지칭하는, "슬리핑 뷰티 (SB) 트랜스포존 시스템"과 같은 비-바이러스 기반 전달 시스템을 사용하여 면역 이펙터 세포로 도입될 수 있다. 예시적인 SB 트랜스포존 시스템은 예를 들어, 미국 특허 번호 6,489,458 및 8,227,432에 기재되어 있으며, 도 3에 도시되어 있다. 슬리핑 뷰티 트랜스포존 시스템은 슬리핑 뷰티 (SB) 트랜스포사제 및 SB 트랜스포존으로 구성된다.

[0203] DNA 트랜스포존은 간단한, 잘라 붙이기 방식으로 하나의 DNA 부위를 또 다른 부위로 옮긴다. 전위(Transposition)는 규정된 DNA 세그먼트를 하나의 DNA 분자로부터 잘라내어 동일하거나 상이한 DNA 분자 또는 게놈의 또 다른 위치로 이동시키는 정확한 과정이다. 다른 Tc1/매리너-형(mariner-type) 트랜스포사제와 마찬가지로, SB 트랜스포사제는 수용자 DNA 서열의 TA 디뉴클레오티드 염기 쌍에 트랜스포존을 삽입한다. 삽입 부위는 동일한 DNA 분자, 또는 또 다른 DNA 분자 (또는 염색체)의 다른 곳에 있을 수 있다. 인간을 포함한 포유동물 게놈에는, 대략 2억개의 TA 부위가 있다. TA 삽입 부위는 트랜스포존 통합의 과정에서 중복된다. TA 서열의 중복은 전위의 특징이며 일부 실험에서 메커니즘을 확인하는 데 사용된다. 트랜스포사제는 트랜스포존 내에서 코딩될 수 있거나 트랜스포사제는 또 다른 공급자에 의해 공급될 수 있으며, 이 경우에 트랜스포존은 비자율적 요소가 된다. 비자율적 트랜스포존은 삽입 후 이들이 독립적으로 절제 및 재-삽입을 계속할 수 없기 때문에 유전자 툴(genetic tool)로서 가장 유용하다. SB 트랜스포존은 척추동물 게놈에 유전자를 도입하고 유전자 요법을 위해 비-바이러스성 벡터로서 사용되는 것이 예상된다. 간단히, 슬리핑 뷰티 (SB) 시스템 (Hackett et al., Mol Ther 18:674-83, (2010))을 채택하여 T 세포를 유전자 변형시킨다 (Cooper et al., Blood 105:1622-31, (2005)). 이들은 두 단계, 즉 (i) SB 트랜스포사제 및 T 세포 특이성을 재지향하게 하는 SB 트랜스포존 [즉, 키메라 항원 수용체 (CAR)을 발현하는 DNA 플라스미드의 전기-전달 (Jin et al., Gene Ther 18:849-56, (2011); Kebriaei et al., Hum Gene Ther 23:444-50, (2012)) 및 (ii) K562 세포주 (AaPC (활성화 및 전파 세포)로도 공지됨)로부터 유래된 설계자(designer) 인공 항원-제시 세포 (AaPC) 상에 구성 부분(integrant)을 안정적으로 발현하는 T 세포의 전파 및 확장을 수반하였다. 한 실시양태에서, SB 트랜스포존 시스템은 tdIL-15, IL-21 및/또는 키메라 항원 수용체를 코딩하는 코딩 서열을 포함한다. 이러한 시스템은 예를 들어 그 전문이

본원에 참조로 포함된 문헌 [Singh et al., Cancer Res (8):68 (2008). April 15, 2008] 및 [Maiti et al., J Immunother. 36(2): 112-123 (2013)]에 기재되어 있다.

[0204] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 CD33 CAR 및 mbIL-15가 트랜스포존 DNA 플라스미드 벡터에서 코딩되고, SB 트랜스포사제가 별개의 벡터에서 코딩된다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 CD33 CAR은 트랜스포존 DNA 플라스미드 벡터에서 코딩되고, mb-IL15는 제2 트랜스포존 DNA 플라스미드 벡터에서 코딩되고, SB 트랜스포사제는 제3 DNA 플라스미드 벡터에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, mbIL-15는 사멸 태그, 예를 들어, HER1t, HRt-1, CD20 또는 CD20t-1에서 코딩된다.

[0205] 외인성 핵산을 숙주 세포에 도입하거나 또는 달리 본 발명의 억제제에 세포를 노출시키는 데 사용되는 방법에 관계없이, 숙주 세포에서 재조합 DNA 서열의 존재를 확인하기 위해, 여러 가지의 검점을 수행할 수 있다. 이러한 검정은, 예를 들어, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 "분자 생물학적" 검정, 예컨대 서던 및 노던 블롯팅, RT-PCR 및 PCR; "생화학적" 검정, 예를 들어, 면역학적 수단 (ELISA 및 웨스턴 블롯)에 의해 또는 본 발명의 범위에 속하는 작용제를 동정하기 위해 본원에 기재된 검정에 의해, 예컨대 특정 펩티드의 존재 또는 부재를 검출하는 것을 포함한다.

[0206] 실시양태에서, CD33 CAR 및 다른 유전 요소는 SB11 트랜스포존 시스템, SB100X 트랜스포존 시스템, SB110 트랜스포존 시스템, piggyBac 트랜스포존 시스템 (예를 들어, 그 전문이 본원에 참조로 포함된, 문헌 [Wilson et al, "PiggyBac Transposon-mediated Gene Transfer in Human Cells," Molecular Therapy 15:139-145 (2007)] 참조) 및/또는 piggyBat 트랜스포존 시스템 (예를 들어, 문헌 [Mitra et al., "Functional characterization of piggyBat from the bat Myotis lucifugus unveils an active mammalian DNA transposon," Proc. Natl. Acad. Sci USA 110:234-239 (2013)] 참조)을 사용하여 세포에 전달된다. 추가적 트랜스포사제 및 트랜스포존 시스템은 미국 특허 번호 7,148,203; 8,227,432; 미국 특허 공개 번호 2011/0117072; 문헌 [Mates et al., *Nat Genet*, 41(6):753-61 (2009). doi: 10.1038/ng.343. Epub 2009 May 3, *Gene Ther.*, 18(9):849-56 (2011). doi: 10.1038/gt.2011.40. Epub 2011 Mar 31] 및 [Ivics et al., *Cell*. 91(4):501-10, (1997)]에 제공되어 있으며, 이들 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0207] 다른 실시양태에서, CD33 CAR 및 다른 유전 요소 예컨대 시토카인, mbIL-15 및/또는 HER1t/HER1t-1/CD20/CD20t-1 태그는, 재조합효소 및 통합 발현 벡터를 통해 면역 이펙터 세포의 DNA에 통합될 수 있다. 이러한 벡터는 숙주 세포의 DNA에 무작위로 통합될 수 있거나, 발현 벡터와 숙주 세포의 염색체 사이의 특이적 재조합을 가능하게 하는 재조합 부위를 포함할 수 있다. 이러한 통합 발현 벡터는 숙주 세포의 염색체의 내인성 발현 제어 서열을 이용하여 원하는 단백질의 발현을 수행할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 표적화된 통합(targeted integration)은 통합 부위에 플랭킹되는 서열에 상동인 공여자 폴리뉴클레오티드 상의 서열의 존재에 의해 촉진된다. 예를 들어, 본원에 기재된 공여자 폴리뉴클레오티드를 이용한 표적화된 통합은 통상적인 형질감염 기술, 예를 들어 상동 재조합에 의한 유전자 녹아웃(knockout) 또는 녹인(knockin)을 생성하는데 사용되는 기술에 따라 달성될 수 있다. 다른 실시양태에서, 표적화된 통합은 통합 부위에 플랭킹되는 서열에 상동인 공여자 폴리뉴클레오티드 상의 서열의 존재에 의해, 및 부위-특이적 재조합효소의 존재하에 세포를 공여자 폴리뉴클레오티드와 접촉시키는 것 둘 다에 의해 촉진된다. 부위-특이적 재조합효소, 또는 단지 재조합효소란, 그의 상용성 재조합 부위 사이에 보존적 부위-특이적 재조합을 촉매하는 폴리펩티드를 의미한다. 본원에 사용된 바와 같이, 부위-특이적 재조합효소는 활성을 보유하는 천연 폴리펩티드 뿐만 아니라, 유도체, 변이체 및/또는 단편, 및 활성을 보유하는 재조합효소를 코딩하는 천연 폴리뉴클레오티드, 유도체, 변이체 및/또는 단편을 포함한다.

[0208] 재조합효소는 표적화 벡터(targeting vector)의 도입 전, 도입과 공동으로, 또는 도입 후에 표적 세포에 도입될 수 있다. 재조합효소는 예를 들어, 리포좀, 코팅된 입자, 또는 마이크로인젝션을 사용하여, 단백질로서 세포에 직접 도입될 수 있다. 대안적으로, 재조합효소를 코딩하는 DNA 또는 메신저 RNA인 폴리뉴클레오티드는 적합한 발현 벡터를 사용하여 세포에 도입될 수 있다. 상기 기재된 표적화 벡터 성분은 관심 재조합효소를 코딩하는 서열을 함유하는 발현 카세트의 구출에 유용하다. 그러나, 재조합효소의 발현은, 예를 들어, 재조합효소의 발현을 조절 가능한 프로모터 (즉, 발현이 선택적으로 유도되거나 억압될 수 있는 프로모터)의 제어하에 놓음으로써, 다른 방식으로 조절될 수 있다.

[0209] 재조합효소는 인테그라제(Integrase) 또는 리솔바제(Resolvase) 패밀리로부터일 수 있다. 재조합효소의 인테그라제 패밀리는 100개 초과의 구성원을 가지며, 예를 들어, FLP, Cre, 및 람다 인테그라제를 포함한다. 티로신 패밀리 또는 람다 인테그라제 패밀리로도 언급되는, 인테그라제 패밀리는 DNA의 포스포디에스테르 결합에 대한

친핵성 공격에 대해 촉매적 티로신의 히드록실 기를 사용한다. 전형적으로, 티로신 패밀리의 구성원은 처음에 DNA를 니킹(nicking)하고, 이는 나중에 이중 가닥 파단을 형성한다. 티로신 패밀리 인테그라제의 예는 Cre, FLP, SSV1, 및 람다 (λ) 인테그라제를 포함한다. 세린 재조합효소 패밀리로도 공지된 리솔바제 패밀리에서, 보존된 세린 잔기는 DNA 표적 부위에 대한 공유 결합을 형성한다 (Grindley, et al., (2006) Ann Rev Biochem 16:16).

[0210] 한 실시양태에서, 재조합효소는 SPβc2 재조합효소, SF370.1 재조합효소, Bxb1 재조합효소, A118 재조합효소 및 ΦRv1 재조합효소로 이루어진 군으로부터 선택된 재조합효소를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드 서열이다. 세린 재조합효소의 예는 그 전문이 본원에 참조로 포함된, 미국 특허 번호 9,034,652에 상세히 기재되어 있다.

[0211] 본 발명의 실시에서 사용하기 위한 재조합효소는 전술한 바와 같이 재조합적으로 생성되거나 정제될 수 있다. 원하는 재조합효소 활성을 갖는 폴리펩티드는 크기 분별화, 친화도 크로마토그래피, HPLC, 이온 교환 크로마토그래피, 헤파린 아가로스 친화도 크로마토그래피를 포함하나, 이에 제한되지는 않는, 정제, 단백질 황산암모늄 침전의 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해 원하는 순도로 정제될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Thorpe & Smith, Proc. Nat. Acad. Sci. 95:5505-5510, 1998].)

[0212] 한 실시양태에서, 재조합효소는 재조합이 임의의 적합한 방법에 의해 요구되는 재조합 부착 부위를 함유하는 진핵 세포내로 도입될 수 있다. 예를 들어, 마이크로인젝션 또는 다른 방법에 의한 기능적 단백질을 세포내로 도입하는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 정제된 재조합효소 단백질의 도입은 단백질 및 그의 기능의 일시적인 존재를 보장하며, 이는 종종 바람직한 실시양태이다. 대안적으로, 재조합효소를 코딩하는 유전자는 재조합효소-코딩 폴리뉴클레오티드가 진핵 세포에서 폴리뉴클레오티드의 발현을 매개하는 프로모터에 작동가능하게 연결되는, 세포를 형질전환시키는데 사용되는 발현 벡터에 포함될 수 있다. 재조합효소 폴리펩티드는 재조합효소 폴리펩티드를 코딩하는 메신저 RNA에 의해 진핵 세포내로 또한 도입될 수 있다. 재조합효소가 변형되는 게놈 내로 핵산 단편을 삽입하는데 필요한 바와 같은 그러한 시간 동안만 존재하는 것이 일반적으로 바람직하다. 따라서, 대부분의 발현 벡터와 연관된 영속성의 결핍은 해로울 것으로 예상되지 않는다. 관심 외인성 폴리뉴클레오티드의 도입 전후, 또는 도입과 동시에 재조합효소 유전자를 세포내로 도입시킬 수 있다. 한 실시양태에서, 재조합효소 유전자는 삽입되는 폴리뉴클레오티드를 지닌 벡터 내에 존재하며; 재조합효소 유전자는 심지어 폴리뉴클레오티드 내에 포함될 수 있다.

[0213] 한 실시양태에서, 부위-특이적 재조합 방법은 제1 재조합 부위 및 제2 재조합 부위를 제공하는 단계; 상기 제1 및 제2 재조합 부위를 원핵생물 재조합효소 폴리펩티드과 접촉시켜, 재조합 부위 사이의 재조합을 결과하는 단계를 포함하며, 여기서 재조합효소 폴리펩티드는 제1 및 제2 재조합 부위 사이의 재조합을 매개할 수 있고, 제1 재조합 부위는 attP 또는 attB이고, 제2 재조합 부위는 attB 또는 attP이고, 재조합효소는 리스테리아 모노시토게네스(*Listeria monocytogenes*) 파지 재조합효소, 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*) 파지 재조합효소, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 파지 재조합효소, 미코박테리움 투베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) 파지 재조합효소 및 미코박테리움 스메그마티스(*Mycobacterium smegmatis*) 파지 재조합효소로 이루어진 군으로부터 선택되되, 단, 제1 재조합 부착 부위가 attB인 경우, 제2 재조합 부착 부위는 attP이고, 제1 재조합 부착 부위가 attP인 경우, 제2 재조합 부착 부위는 attB이다.

[0214] 추가 실시양태는 그의 게놈이 변형될 세포내로 부위-특이적 재조합효소를 도입하는 것을 제공한다. 한 실시양태는 진핵 세포에서 부위-특이적 재조합을 수득하는 방법에 관한 것으로, 제1 재조합 부착 부위 및 제2 재조합 부착 부위를 포함하는 진핵 세포를 제공하는 단계; 상기 제1 및 제2 재조합 부착 부위를 원핵생물 재조합효소 폴리펩티드와 접촉시켜, 재조합 부착 부위 사이의 재조합을 결과하는 단계를 포함하며, 여기서 재조합효소 폴리펩티드는 제 1 및 제2 재조합 부착 부위 사이의 재조합을 매개할 수 있고, 제1 재조합 부착 부위는 파지 게놈 재조합 부착 부위 (attP) 또는 박테리아 게놈 재조합 부착 부위 (attB)이고, 제2 재조합 부착 부위는 attB 또는 attP이고, 재조합효소는 리스테리아 모노시토게네스 파지 재조합효소, 스트렙토코커스 피오게네스 파지 재조합효소, 바실러스 서브틸리스 파지 재조합효소, 미코박테리움 투베르쿨로시스 파지 재조합효소 및 미코박테리움 스메그마티스 파지 재조합효소로 이루어진 군으로부터 선택되되, 단, 제1 재조합 부착 부위가 attB인 경우, 제2 재조합 부착 부위는 attP이고, 제1 재조합 부착 부위가 attP인 경우, 제2 재조합 부착 부위는 attB이다. 한 실시양태에서 재조합효소는 A118 재조합효소, SF370.1 재조합효소, SPβc2 재조합효소, ΦRv1 재조합효소, Bxb1 재조합효소로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서 재조합은 통합을 결과한다.

[0215] **CD33 CAR 및 벡터를 포함하는 세포**

[0216] 본원에는 본원에 기재된 CAR을 발현하는 가공된 세포가 제공된다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 가공된 세포는 면역 이펙터 세포이다. 실시양태에서, 본원에는 주쇄 및 (1) 말단절단된 표피 성장 인자 수용체 (HER1t 또는 HER1t-1) 및 (2) 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하는 면역 이펙터 세포가 제공되며, 여기서 CAR은 (a) CD33 항원 결합 도메인; (b) 스톡 도메인; (c) 막관통 도메인; (d) 4-1BB 또는 CD28, 또는 이들 둘 다를 포함하는 공동자극 신호전달 도메인; 및 e) CD3 제타 신호전달 도메인을 포함한다.

[0217] 특정 실시양태에서 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함하는 면역 이펙터 세포가 제공되며, 여기서 CAR은 (a) CD33 항원 결합 도메인; (b) 스톡 도메인; (c) 막관통 도메인; (d) 4-1BB 또는 CD28, 또는 이들 둘 다를 포함하는 공동자극 신호전달 도메인; e) CD3 제타 신호전달 도메인; 및 (f) 말단절단된 표피 성장 인자 수용체 (HER1t 또는 HER1t-1)를 포함한다.

[0218] 실시양태에서, 본원에는 (1) 사멸 스위치, 선택 마커, 바이오마커, 또는 그의 조합으로서 사용하기 위한 세포 태그, 및 (2) 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함하는 면역 이펙터 세포가 제공되며, 여기서 CAR은 (a) CD33 항원 결합 도메인; (b) 스톡 도메인; (c) 막관통 도메인; (d) 4-1BB 또는 CD28, 또는 이들 둘 다를 포함하는 공동자극 신호전달 도메인; 및 (e) CD3 제타 신호전달 도메인을 포함한다. 실시양태에서, 세포 태그는 HER1t, HER1t-1, CD20t-1 또는 CD20이다.

[0219] 실시양태에서, 면역 이펙터 세포는 T 세포, 자연 살해 (NK) 세포, 세포독성 T 림프구 (CTL), 및 조절성 T 세포이다. 실시양태에서, 세포는 CD33 항원 결합 도메인이 CD33에 결합하는 경우 항-종양 면역성을 나타낸다.

[0220] **변형된 면역 이펙터 세포**

[0221] 본원에 기재된 하나 이상의 이종 유전자 또는 폴리펩티드를 발현하도록 변형된 면역 이펙터 세포가 제공된다. HER1t, HER1t-1, CD20 및 CD20t-1 태그 중 적어도 하나 및 본원에 기재된 CD33 CAR을 발현하도록 변형된 면역 이펙터 세포가 제공된다. 일부 경우에 본원에 개시된 HER1t, HER1t-1, CD20 및 CD20t-1 태그 중 적어도 하나, CD33 CAR, 및 mbIL-15를 발현하도록 변형된 면역 이펙터 세포가 제공된다.

[0222] 본원에 사용된 바와 같은 "세포" 또는 "T 림프구"는 세포-매개 면역에 중심 역할을 하는 림프구의 유형이다. 이들은 세포 표면 상에 T-세포 수용체 (TCR)가 존재함으로써, 다른 림프구, 예컨대 B 세포 및 자연 살해 세포 (NK 세포)와 구별될 수 있다.

[0223] 일부 실시양태에서, 변형된 면역 이펙터 세포는 T 세포 및/또는 자연 살해 세포를 포함하는 변형된 면역 세포이다. T 세포 또는 T 림프구는 세포-매개 면역에 관여하는 백혈구의 아형이다. 예시적인 T 세포는 T 헬퍼 세포, 세포독성 T 세포, TH17 세포, 줄기 기억 T 세포 (TSCM), 나이브 T 세포, 기억 T 세포, 이펙터 T 세포, 조절성 T 세포, 또는 자연 살해 T 세포를 포함한다.

[0224] T 헬퍼 세포 (TH 세포)는 B 세포의 형질 세포 및 기억 B 세포로의 성숙, 및 세포독성 T 세포 및 대식세포의 활성화를 포함한, 면역학적 과정에서 다른 백혈구 세포를 돕는다. 일부 경우에, TH 세포는 세포 표면 상에 CD4 당단백질의 발현으로 인해 CD4+ T 세포로 공지되어 있다. 헬퍼 T 세포는 항원-제시 세포 (APC)의 표면상에 발현되는, MHC 부류 II 분자에 의해 헬퍼 T 세포가 펩티드 항원으로 제시될 때 활성화된다. 일단 활성화되면, 이들은 신속히 분열하고 시토카인이라고 칭해지는 작은 단백질을 분비하여 능동 면역 반응을 조절하거나 돕는다. 이들 세포는 TH1, TH2, TH3, TH17, Th9, 또는 TFH를 포함한, 몇몇 아형 중 하나로 분화할 수 있으며, 이들이 상이한 시토카인을 분비하여 상이한 유형의 면역 반응을 용이하게 한다. APC로부터의 신호전달은 T 세포를 특정한 아형으로 지향하게 한다.

[0225] 세포독성 T 세포 (TC 세포, 또는 CTL)는 바이러스-감염 세포 및 종양 세포를 파괴하고, 이식 거부 반응에 또한 연루된다. 이들 세포는 그의 표면 상에 CD8 당단백질을 발현하기 때문에 CD8+ T 세포로도 공지되어 있다. 이들 세포는 모든 유핵 세포의 표면 상에 존재하는, MHC 부류 I 분자와 회합하는 항원에 결합함으로써 그의 표적을 인식한다. IL-10, 아데노신, 및 조절성 T 세포에 의해 분비된 다른 분자를 통해, CD8+ 세포는 자가면역 질환을 예방하는 아네르기 상태(anergic state)로 불활성화될 수 있다.

[0226] 기억 T 세포는 감염이 해소된 후 장기간 지속되는 항원-특이적 T 세포의 하위집합이다. 이들은 그의 동족 항원에 재노출시 대다수의 T 세포로 신속히 확장되어, 면역계에 과거의 감염에 대하여 "기억"을 제공한다. 기억 T 세포는 아형: 줄기 기억 T 세포 (TSCM), 중앙 기억 T 세포 (TCM 세포) 및 두 가지 유형의 이펙터 기억 T 세포 (TEM 세포 및 TEMRA 세포)를 포함한다. 기억 세포는 CD4+ 또는 CD8+일 수 있다. 기억 T 세포는 세포 표면 단

백질 CD45RO, CD45RA 및/또는 CCR7을 발현할 수 있다.

[0227] 이전에 억제인자 T 세포로 공지된 조절성 T 세포 (Treg 세포)가 면역학적 관용의 유지에 중요한 역할을 한다. 그들의 주요 역할은 면역 반응의 종료에 대해 T 세포-매개 면역을 셧다운하고 흉선에서 음성 선택의 과정을 벗어난 자가반응성 T 세포를 억제하는 것이다.

[0228] 자연 살해 T 세포 (NKT 세포)는 적응 면역계와 선천 면역계를 가교한다. 주요 조직적합성 복합체 (MHC) 분자에 의해 제시된 펩티드 항원을 인식하는 통상적인 T 세포와 달리, NKT 세포는 CD1d라고 칭해지는 분자에 의해 제시된 당지질 항원을 인식한다. 일단 활성화되면, 이들 세포는 Th 및 Tc 세포 둘 다에 기인한 기능 (즉, 시토카인 생산 및 세포용해/세포 사멸 분자의 방출)을 수행할 수 있다. 이들은 또한 헤르페스 바이러스에 감염된 일부 종양 세포 및 세포를 인식하고 제거할 수 있다.

[0229] 자연 살해 (NK) 세포는 선천 면역계의 세포독성 림프구의 유형이다. 일부 경우에, NK 세포는 바이러스 감염 및/또는 종양 형성에 대하여 제일선의 방어를 제공한다. NK 세포는 감염 또는 암성 세포 상에 제시된 MHC를 검출하여, 시토카인 방출을 촉발하고, 후속적으로 용해 및 아폽토시스를 유도할 수 있다. NK 세포는 항체 및/또는 MHC의 부재하에 부하된 세포를 추가로 검출할 수 있으므로, 신속한 면역 반응을 가능하게 한다.

[0230] **변형된 면역 이펙터 세포 용량**

[0231] 일부 실시양태에서, 변형된 면역 이펙터 세포의 양을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하며 상기 양은 시토카인-연관된 독성을 유도하는 효능 및 잠재력에 기초하여 결정된다. 일부 경우에, 변형된 면역 이펙터 세포의 양은 약 10^5 내지 약 10^9개의 변형된 면역 이펙터 세포/kg를 포함한다. 일부 경우에, 변형된 면역 이펙터 세포의 양은 약 10^5 내지 약 10^8개의 변형된 면역 이펙터 세포/kg를 포함한다. 일부 경우에, 변형된 면역 이펙터 세포의 양은 약 10^5 내지 약 10^7개의 변형된 면역 이펙터 세포/kg를 포함한다. 일부 경우에, 변형된 면역 이펙터 세포의 양은 약 10^6 내지 약 10^9개의 변형된 면역 이펙터 세포/kg를 포함한다. 일부 경우에, 변형된 면역 이펙터 세포의 양은 약 10^6 내지 약 10^8개의 변형된 면역 이펙터 세포/kg를 포함한다. 일부 경우에, 변형된 면역 이펙터 세포의 양은 약 10^7 내지 약 10^9개의 변형된 면역 이펙터 세포/kg를 포함한다. 일부 경우에, 변형된 면역 이펙터 세포의 양은 를 포함한다 약 10^5 내지 약 10^6개의 변형된 면역 이펙터 세포/kg를 포함한다. 일부 경우에, 변형된 면역 이펙터 세포의 양은 약 10^6 내지 약 10^7개의 변형된 면역 이펙터 세포/kg를 포함한다. 일부 경우에, 변형된 면역 이펙터 세포의 양은 약 10^7 내지 약 10^8개의 변형된 면역 이펙터 세포/kg를 포함한다. 일부 경우에, 변형된 면역 이펙터 세포의 양은 약 10^8 내지 약 10^9개의 변형된 면역 이펙터 세포/kg를 포함한다. 일부 경우에, 변형된 면역 이펙터 세포의 양은 약 10^9개의 변형된 면역 이펙터 세포/kg를 포함한다. 일부 경우에, 변형된 면역 이펙터 세포의 양은 약 10^8개의 변형된 면역 이펙터 세포/kg를 포함한다. 일부 경우에, 변형된 면역 이펙터 세포의 양은 약 10^7개의 변형된 면역 이펙터 세포/kg를 포함한다. 일부 경우에, 변형된 면역 이펙터 세포의 양은 약 10^6개의 변형된 면역 이펙터 세포/kg를 포함한다. 일부 경우에, 변형된 면역 이펙터 세포의 양은 약 10^5개의 변형된 면역 이펙터 세포/kg를 포함한다.

[0232] 일부 실시양태에서, CD33-특이적 CAR-T 세포인 CAR-T 세포이다. 일부 경우에, CD33-특이적 CAR-T 세포의 양은 약 10^5 내지 약 10^9개의 CAR-T 세포/kg를 포함한다. 일부 경우에, CD33-특이적 CAR-T 세포의 양은 약 10^5 내지 약 10^8개의 CAR-T 세포/kg를 포함한다. 일부 경우에, CD33-특이적 CAR-T 세포의 양은 약 10^5 내지 약 10^7개의 CAR-T 세포/kg를 포함한다. 일부 경우에, CD33-특이적 CAR-T 세포의 양은 약 10^6 내지 약 10^9개의 CAR-T 세포/kg를 포함한다. 일부 경우에, CD33-특이적 CAR-T 세포의 양은 약 10^6 내지 약 10^8개의 CAR-T 세포/kg를 포함한다. 일부 경우에, CD33-특이적 CAR-T 세포의 양은 약 10^7 내지 약 10^9개의 CAR-T 세포/kg를 포함한다. 일부 경우에, CD33-특이적 CAR-T 세포의 양은 약 10^5 내지 약 10^6개의 CAR-T 세포/kg를 포함한다. 일부 경우에, CD33-특이적 CAR-T 세포의 양은 약 10^6 내지 약 10^7개의 CAR-T 세포/kg를 포함한다. 일부 경우에, CD33-특이적 CAR-T 세포의 양은 약 10^7 내지 약 10^8개의 CAR-T 세포/kg를 포함한다. 일부 경우에, CD33-특이적 CAR-T 세포

의 양은 약 10^8 내지 약 10^9개의 CAR-T 세포/kg를 포함한다. 일부 경우에, CD33-특이적 CAR-T 세포의 양은 약 10^9개의 CAR-T 세포/kg를 포함한다. 일부 경우에, CD33-특이적 CAR-T 세포의 양은 약 10^8개의 CAR-T 세포/kg를 포함한다. 일부 경우에, CD33-특이적 CAR-T 세포의 양은 약 10^7개의 CAR-T 세포/kg를 포함한다. 일부 경우에, CD33-특이적 CAR-T 세포의 양은 약 10^6개의 CAR-T 세포/kg를 포함한다. 일부 경우에, CD33-특이적 CAR-T 세포의 양은 약 10^5개의 CAR-T 세포/kg를 포함한다.

[0233] **면역 이펙터 세포 공급원**

[0234] 특정 측면에서, 본원에 기재된 실시양태는, 항원-특이적 재지향된 면역 이펙터 세포 (예를 들어, T-세포, NK-cell 또는 NK T-세포)를 제조하고/거나 확장하는 방법으로서, CAR을 코딩하는 DNA (또는 RNA)를 함유하는 발현 벡터로 상기 세포를 형질감염시키고, 그 다음에, 임의로 상기 세포를 피더(feeder) 세포, 재조합 항원, 또는 수용체에 대한 항체로 세포를 자극하여 세포를 증식시키는 것을 포함하는 방법을 포함한다. 특정 측면에서, CAR을 발현하도록 가공된 세포 (또는 세포 집단)는 줄기 세포, iPS 세포, 면역 이펙터 세포 또는 이들 세포의 전구체이다.

[0235] 면역 이펙터 세포의 공급원은 동종이형 및 자가 공급원 둘 다를 포함할 수 있다. 일부 경우에 면역 이펙터 세포는 줄기 세포 또는 유도된 다분화능 줄기 세포 (iPSC)로부터 분화될 수 있다. 따라서, 실시양태에 따른 조작을 위한 세포는 제대혈, 말초 혈액, 인간 배아 줄기 세포, 또는 iPSC로부터 단리될 수 있다. 예를 들어, 동종이형 T 세포를 변형시켜 키메라 항원 수용체를 포함하도록 한다 (그리고 임의로, 기능적 TCR이 없도록 한다). 일부 측면에서, 면역 이펙터 세포는 1차 인간 T 세포 예컨대 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)로부터 유래된 T 세포이다. PBMC는 말초 혈액으로부터 또는 골수 또는 제대혈로부터 G-CSF (과립구 콜로니 자극 인자)로 자극 후 수집할 수 있다. 형질감염 또는 형질도입 (예를 들어, CAR 발현 구축물로) 후에, 세포를 즉시 주입하거나 냉동-보존할 수 있다. 특정 측면에서, 형질감염 후, 세포는 세포내로 유전자 전달 후 약 1, 2, 3, 4, 5일 또는 그 초과 내에 벌크 집단으로서 수일, 수주, 또는 수개월 동안 생체외로 전파될 수 있다. 추가 측면에서, 형질감염 후, 형질감염체(transfectant)가 클로닝되고, 키메라 항원 수용체의 발현, 및 단일 통합되거나 에피솜적으로 유지된 발현 카세트 또는 플라스미드의 존재를 나타내는 클론이 생체외로 확장된다. 확장을 위해 선택된 클론은 항원-발현 표적 세포를 특이적으로 인식하고 용해시키는 능력을 나타낸다. 재조합 T 세포는 공통 감마-쇄 (예를 들어, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 등)에 결합하는 IL-2, 또는 다른 시토카인으로 자극함으로써 확장될 수 있다. 재조합 T 세포는 인공 항원 제시 세포로의 자극에 의해 확장될 수 있다. 재조합 T 세포는 인공 항원 제시 세포 상에 또는 T 세포 표면의 CD3를 교차 연결하는 항체, 예컨대 OKT3로 확장될 수 있다. 재조합 T 세포의 하위집합은 자기 비드 기반 단리(magnetic bead based isolation) 방법 및/또는 형광 활성화된 세포 분류 기술을 사용하여 추가로 선택될 수 있고 AaPC와 추가로 배양될 수 있다. 추가 측면에서, 유전자 변형된 세포는 냉동보존될 수 있다.

[0236] T 세포는 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직, 감염 부위로부터의 조직, 복수, 흉막 삼출액, 비장 조직, 및 종양을 포함한 다수의 출처로부터 또한 수득할 수 있다. 본 발명의 특정 실시양태에서, 관련 기술분야에서 이용 가능한 임의의 수의 T 세포주가 사용될 수 있다. 본 발명의 특정 실시양태에서, 통상의 기술자에게 공지된 임의의 수의 기술, 예컨대 피콜(Ficoll)® 분리를 사용하여 대상체로부터 수집된 혈액의 유닛으로부터 T 세포를 수득할 수 있다. 실시양태에서, 개인의 순환 혈액으로부터의 세포는 성분채집술(apheresis)에 의해 수득된다. 성분채집술 생성물은 전형적으로 T 세포, 단핵구, 과립구, B 세포, 다른 유핵 백혈구, 적혈구, 및 혈소판을 포함한, 림프구를 함유한다. 한 실시양태에서, 성분채집술에 의해 수집된 세포를 세척하여 혈장 분획을 제거하고 후속 처리 단계를 위해 세포를 세포를 적절한 완충제 또는 배지에 넣을 수 있다. 본 발명의 한 실시양태에서, 세포를 인산 완충 식염수 (PBS)로 세척한다. 대안적인 실시양태에서, 세척 용액은 칼슘이 결핍되거나 마그네슘이 결핍될 수 있거나, 모든 2가의 양이온이 아니라 하더라도 많은 것이 결핍될 수 있다. 칼슘의 부재하에 초기 활성화 단계는 확대된 활성화를 야기한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자가 쉽게 인식할 것인 바와 같이, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법, 예컨대 제조업자의 지시에 따라 반-자동 "병류(flow-through)" 원심분리기 (예를 들어, 코배(Cobe) 2991 세포 프로세서(cell processor), 박스터 시토메이트(Baxter CytoMate), 또는 헤모네틱스 세포 세이버(Haemonetics Cell Saver) 5)를 사용함으로써 세척 단계를 완수할 수 있다. 세척 후, 세포를 여러 가지의 생체적합성 완충제, 예컨대, 예를 들어, Ca^{2+}-미함유, Mg^{2+}-미함유 PBS, 플라스마라이트(PlasmaLyte) A, 또는 완충제가 있거나 없는 다른 식염수 용액에 재현탁시킬 수 있다. 대안적으로, 성분채집술 샘플의 바람직하지 않은 성분을 제거하고 세포를 배양 배지에 직접 재현탁시킬 수

있다.

[0237] 또 다른 실시양태에서, T 세포는 적혈구를 용해시키고 단핵구를 고갈시킴으로써, 예를 들어, 퍼콜(PERCOLL)® 구배를 통한 원심분리에 의해 또는 역류 원심 세정(counterflow centrifugal elutriation)에 의해, 말초 혈액 림프구로부터 단리된다. T 세포의 특정 부분모집단, 예컨대 $CD3^+$, $CD28^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD45RA^+$, 및 $CD45RO^+$ T 세포는 양성 또는 음성 선택 기술에 의해 추가로 단리될 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, T 세포는 원하는 T 세포의 양성 선택에 충분한 기간 동안, 항-CD3/항-CD28 (즉, 3x28)-접합 비드, 예컨대 디나비드(DYNABEAD)® M-450 CD3/CD28 T와의 인큐베이션에 의해 단리된다. 한 실시양태에서, 기간은 약 30분이다. 추가 실시양태에서, 기간은 범위가 30분에서 36시간 또는 그 초과 및 그 사이의 모든 정수 값에 이른다. 추가 실시양태에서, 기간은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6시간이다. 또한 또 다른 실시양태에서, 기간은 10 내지 24시간이다. 한 실시양태에서, 인큐베이션 기간은 24시간이다. 백혈병 환자로부터 T 세포를 단리하기 위해, 더 긴 인큐베이션 시간, 예컨대 24시간을 사용하면 세포 수율을 증가시킬 수 있다. 종양 조직 또는 면역-손상된 개체로부터 종양 침윤 림프구 (TIL)를 분리하는 데 있어서와 같이, 다른 세포 유형과 비교하여 T 세포가 거의 없는 임의의 상황에서 T 세포를 단리하는 데 더 긴 인큐베이션 시간이 사용될 수 있다. 추가로, 보다 긴 인큐베이션 시간을 사용하면 CD8+ T 세포의 포획 효율을 증가시킬 수 있다. 따라서, 단순히 시간을 단축하거나 연장함으로써 세포를 CD3/CD28 비드에 결합시키고/거나 T 세포에 대한 비드의 비를 증가시키거나 감소시킴으로써 (본원에서 추가로 기재된 바와 같이), T 세포의 부분모집단은 배양 개시시 또는 공정 중 다른 시점에서 이에 대하여 또는 이에 대항하여 우선적으로 선택될 수 있다. 게다가, 비드 또는 다른 표면 상에 항-CD3 및/또는 항-CD28 항체의 비를 증가시키거나 감소시킴으로써, T 세포의 부분모집단은 배양 개시시 또는 다른 원하는 시점에서 이에 대하여 또는 이에 대항하여 우선적으로 선택될 수 있다. 통상의 기술자는 선택의 다중 라운드(multiple round)가 또한 본 발명과 맥락에서 또한 사용될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 특정 실시양태에서, 활성화 및 확장 과정에서 선택 절차를 수행하고 "선택되지 않은" 세포를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. "선택되지 않은" 세포는 선택의 추가 라운드에 적용될 수 있다.

[0238] 음성 선택에 의한 T 세포 집단의 강화(enrichment)는 음성으로 선택된 세포에 특유한 표면 마커를 지향하는 항체의 조합으로 완수될 수 있다. 한 방법은 음성적으로 선택된 세포 상에 존재하는 세포 표면 마커를 지향하는 모노클로날 항체의 칵테일(cocktail)을 사용하는 음성 자기 면역부착(negative magnetic immunoadherence) 또는 유동 세포 계측법을 통한 세포 분류 및/또는 선택이다. 예를 들어, 음성 선택에 의해 $CD4^+$ 세포를 강화하기 위해, 모노클로날 항체 칵테일은 전형적으로 CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR, 및 CD8에 대한 항체를 포함한다. 특정 실시양태에서, 전형적으로 $CD4^+$, $CD25^+$, $CD62L^{hi}$, $GITR^+$, 및 $FoxP3^+$를 발현시키는 조절성 T 세포를 강화시키거나 양성적으로 선택하는 것이 바람직할 수 있다. 대안적으로, 특정 실시양태에서, T 조절성 세포는 항-CD25 접합 비드 또는 다른 유사한 선택 방법에 의해 고갈된다.

[0239] 양성 또는 음성 선택에 의해 원하는 세포 집단을 단리하기 위해, 세포와 표면 (예를 들어, 입자 예컨대 비드)의 농도를 다양화할 수 있다. 특정 실시양태에서, 세포와 비드의 최대 접촉을 보장하기 위해, 비드와 세포가 함께 혼합되는 부피를 상당히 감소시키는 것 (즉, 세포의 농도를 증가시키는 것)이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 20억개 세포/ml의 농도가 사용된다. 한 실시양태에서, 10억개 세포/ml의 농도가 사용된다. 추가 실시양태에서, 1억개 초과의 세포/ml가 사용된다. 추가 실시양태에서, 1천만, 1천5백만, 2천만, 2천5백만, 3천만, 3천5백만, 4천만, 4천5백만, 또는 5천만개 세포/ml의 세포 농도가 사용된다. 또한 또 다른 실시양태에서, 7천5백만, 8천만, 8천5백만, 9천만, 9천5백만, 또는 1억개 세포/ml의 세포 농도가 사용된다. 추가 실시양태에서, 1억2천5백만 또는 1억5천백만개 세포/ml의 농도가 사용될 수 있다. 높은 농도를 사용하면 세포 수율, 세포 활성화, 및 세포 확장의 증가를 결과할 수 있다. 추가로, 높은 세포 농도를 사용하면 종양 세포가 많은 샘플 (즉, 백혈병 혈액, 종양 조직 등)로부터, 또는 관심 표적 항원, 예컨대 CD28-음성 T 세포를 약하게 발현시킬 수 있는 세포를 보다 효율적으로 포획할 수 있게 한다. 이러한 세포 집단은 치료적 가치를 가질 수 있고 수득하는 것이 바람직할 것이다. 예를 들어, 고농도의 세포를 사용하면 통상적으로는 더 약한 CD28 발현을 갖는 $CD8^+$ T 세포를 보다 효율적으로 선택할 수 있게 한다.

[0241] 관련 실시양태에서, 더 낮은 농도의 세포를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. T 세포와 표면의 혼합물 (예를 들어, 입자 예컨대 비드)을 상당히 희석함으로써, 입자와 세포 사이의 상호 작용이 최소화된다. 이것은 입자에 결합될 원하는 항원의 대량을 발현시키는 세포에 대해 선택한다. 예를 들어, $CD4^+$ T 세포는 CD28의 더 높은 수준을 발현시키고 묽은 농도에서 $CD8^+$ T 세포보다 더 효율적으로 포획된다. 한 실시양태에서, 사용된 세포의 농

도는 $5x10^6$개/ml이다. 다른 실시양태에서, 사용된 농도는 약 $1x10^5$개/ml 내지 $1x10^6$개/ml, 그리고 사이의 임의의 정수 값일 수 있다.

[0242] 다른 실시양태에서, 세포는 2-10 ℃에서, 또는 실온에서 다양한 속도로 다양한 시간의 길이 동안 로테이터에서 인큐베이션될 수 있다.

[0243] 자극을 위한 T 세포는 또한 세척 단계 후에 동결될 수 있다. 혈장과 혈소판을 제거하는 세척 단계 후에, 세포를 동결 용액에 현탁시킬 수 있다. 많은 동결 용액 및 파라미터가 관련 기술분야에 공지되어 있으며 이러한 맥락에서 유용할 것이지만, 한 방법은 20% DMSO 및 8% 인간 혈청 알부민을 함유하는 PBS, 또는 10% 덱스트란 40 및 5% 덱스트로스, 20% 인간 혈청 알부민 및 7.5% DMSO, 또는 31.25% 플라스마라이트-A, 31.25% 덱스트로스 5%, 0.45% NaCl, 10% 덱스트란 40 및 5% 덱스트로스, 20% 인간 혈청 알부민, 및 7.5% DMSO를 함유하는 배양 배지 또는 예를 들어, 헤스판(Hespan) 및 플라스마라이트 A를 함유하는 다른 적합한 세포 동결 배지를 사용하고, 그 다음에 세포를 분당 1°의 속도로 -80℃로 동결시켜 액체 질소 저장 탱크의 증기상(vapor phase)으로 저장하는 것을 수반한다. 제어 동결뿐만 아니라 -20℃에서 또는 액체 질소에서 즉시 비제어 동결의 다른 방법을 사용할 수 있다.

[0244] 특정 실시양태에서, 냉동보존된 세포를 본원에 기재된 바와 같이 해동하고 세척하며 본 발명의 방법을 사용하여 활성화되기 전에 실온에서 1시간 동안 방치한다.

[0245] 또한 특정 실시양태에서 본원에 기재된 바와 같이 확장된 세포가 필요할 수 있는 시기 이전에 대상체로부터 혈액 샘플 또는 성분채집술 생성물의 수집이 제공된다. 이와 같이, 확장될 세포의 원천은 필요한 어느 시점에서든지 수집될 수 있으며, 원하는 세포, 예컨대 T 세포는 본원에 기재된 것들과 같이, T 세포 요법으로부터 이익을 얻을 질환 또는 병태의 임의의 수에 대해 T 세포 요법에서 나중에 사용하기 위해 단리되고 동결된다. 한 실시양태에서 혈액 샘플 또는 성분채집술은 일반적으로 건강한 대상체로부터 취해진다. 특정 실시양태에서, 혈액 샘플 또는 성분채집술은 질환이 발병할 위험에 처해 있으나, 아직 질환이 발병하지 않은 일반적으로 건강한 대상체로부터 취해지며, 관심 세포는 나중에 사용하기 위해 단리되고 동결된다. 특정 실시양태에서, T 세포는 확장되고, 동결되고, 나중에 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 샘플은 본원에 기재된 바와 같은 특정 질환의 진단 직후이나 임의의 치료 전에 환자로부터 수집된다. 추가 실시양태에서, 세포는 작용제 예컨대 나탈리주맙, 에팔리주맙, 항바이러스제, 화학요법, 방사선, 면역억제제, 예컨대 사이클로스포린, 아자티오프린, 메토트렉세이트, 미코페놀레이트, 및 FK506, 항체, 또는 다른 면역절제제(immunoablative agent) 예컨대 CAMPATH, 항-CD3 항체, 시톡산, 플루다라빈, 시클로스포린, FK506, 라파마이신, 미코페놀산, 스테로이드, FR901228, 방사선조사로의 치료를 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 수의 관련 치료 양식 이전에 대상체로부터의 혈액 샘플 또는 성분채집술로부터 단리된다. 이들 약물은 칼슘 의존성 포스파타제 칼시뉴린 (시클로스포린 및 FK506)을 억제하거나 성장 인자 유도된 신호전달 (라파마이신)에 중요한 p70S6 키나제를 억제한다 (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)). 추가 실시양태에서, 세포는 환자에 대해 단리되고 골수 또는 줄기 세포 이식, 화학요법제 예컨대, 플루다라빈, 외부-빔 방사선 요법 (XRT), 시클로포스파미드, 또는 항체 예컨대 OKT3 또는 CAMPATH를 사용하는 T 세포 절제 요법(T cell ablative therapy)과 함께 (예를 들어, 전에, 동시에 또는 후에) 나중에 사용하기 위해 동결된다. 또 다른 실시양태에서, 세포는 이전에 단리되어 있으며 B-세포 절제 요법 예컨대 CD20과 반응하는 작용제, 예를 들어, 리툭산 이후의 치료를 위해 나중에 사용하기 위해 동결될 수 있다.

[0246] 본 발명의 추가 실시양태에서, T 세포는 치료 직후 환자로부터 수득한다. 이와 관련하여, 특정 암 치료, 특히 면역계를 손상시키는 약물로 치료한 후, 환자가 통상적으로는 치료로부터 회복 중일 기간 동안에 치료 직후, 수득된 T 세포의 품질은 생체외 확장하는 그의 능력에 최적이거나 개선될 수 있는 것으로 관찰되었다. 마찬가지로, 본원에 기재된 방법을 사용하여 생체외 조작 후, 이들 세포는 증진된 생착(engraftment) 및 생체내 확장을 위해 바람직한 상태에 있을 수 있다. 따라서, 이 회복기 동안에, T 세포, 수지상 세포, 또는 조혈 계통의 다른 세포를 포함한, 혈액 세포를 수집하는 것이 본 발명의 맥락에서 고려된다. 추가로, 특정 실시양태에서, 가동화(mobilization) (예를 들어, GM-CSF로의 가동화) 및 컨디셔닝 요법은 특히 요법 후 정의된 시간의 창 동안에, 특정 세포 유형의 재증식(repopulation), 재순환, 재생, 및/또는 확장이 선호되는 대상체에서 컨디션을 생성시키는데 사용될 수 있다. 예시적인 세포 유형은 T 세포, B 세포, 수지상 세포, 및 면역계의 다른 세포를 포함한다.

[0247] **T 세포의 활성화 및 확장**

[0248] 본원에 기재된 CAR을 발현시키기 위해 T 세포의 조작 전후에 관계없이, T 세포는 일반적으로, 예를 들어, 미국 특허 번호 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041; 및 미국 특허 출원 공개 번호 20060121005에 기재된 바와 같은 사용을 사용하여 활성화되고 확장될 수 있다.

[0249] 일반적으로, 본원에 기재된 T 세포는 CD3/TCR 복합체 연관 신호를 자극하는 작용제 및 T 세포의 표면상의 공동-자극성 분자를 자극하는 리간드를 그에 부착시킨 표면과의 접촉에 의해 확장된다. 특히, T 세포 집단은, 예컨대 항-CD3 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 또는 표면 상에 고정화된 항-CD2 항체와의 접촉에 의해, 또는 칼슘 이오노포어와 함께 단백질 키나제 C 활성화제 (예를 들어, 브리오스타틴)와의 접촉에 의해, 본원에 기재된 바와 같이 자극될 수 있다. T 세포의 표면 상의 보조(accessory) 분자의 공동-자극을 위해, 보조 분자를 결합하는 리간드가 사용된다. 예를 들어, T 세포의 집단은 T 세포의 증식을 자극하는데 적절한 조건 하에, 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체와 접촉될 수 있다. $CD4^+$ T 세포 또는 $CD8^+$ T 세포의 증식을 자극하기 위해, 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체. 항-CD28 항체의 예는 9.3, B-T3, XR-CD28 (디아클론(Diaclone), 프랑스 브장송)이며, 이는 관련 기술분야에 통상적으로 공지된 다른 방법과 같이 사용될 수 있다 (Berg et al., *Transplant Proc.* 30(8):3975-3977, (1998); Haanen et al., *J. Exp. Med.* 190(9):13191328, (1999); Garland et al., *J. Immunol Meth.* 227(1-2):53-63, (1999)).

[0250] 특정 실시양태에서, 세포에 대한 1차 자극 신호 및 공동-자극 신호는 상이한 프로토콜에 의해 제공될 수 있다. 예를 들어, 각각의 신호를 제공하는 작용제는 용액 중에 있거나 표면에 커플링될 수 있다. 표면에 커플링되는 경우, 작용제를 동일한 표면 (즉, "시스" 형성에서)에 커플링시킬 수 있거나, 표면 ("트랜스" 형성에서)을 분리할 수 있다. 대안적으로, 하나의 작용제를 표면에 커플링시킬 수 있고 다른 하나의 작용제를 용액 중에 커플링시킬 수 있다. 한 실시양태에서, 공동-자극 신호를 제공하는 작용제는 세포 표면에 결합되며, 1차 활성화 신호를 제공하는 작용제는 용액 중에 있거나 표면에 커플링된다. 특정 실시양태에서, 작용제 둘 다 용액 중에 있을 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 작용제는 가용성 형태로 있을 수 있으며, 그 다음에 표면, 예컨대 Fc 수용체 발현 세포 또는 항체 또는 작용제에 결합할 다른 결합체에 가교 결합될 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명에서 T 세포를 활성화시키고 확장하는데 사용하기 위해 고려되는 인공 항원 제시 세포 (aAPC)에 대해서는 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 20040101519 및 20060034810을 참조한다.

[0251] 한 실시양태에서, 두 작용제는 비드 상에, 동일한 비드, 즉 "시스" 상에, 또는 불리 비드, 즉 "트랜스"로 고정된다. 예를 들어, 1차 활성화 신호를 제공하는 작용제는 항-CD3 항체 또는 그의 항원-결합 단편이고, 공동-자극 신호를 제공하는 작용제는 항-CD28 항체 또는 그의 항원-결합 단편이며; 두 작용제는 동등한 분자량으로 동일한 비드에 공동-고정된다. 한 실시양태에서, $CD4^+$ T 세포 팽창 및 T 세포 성장을 위해 비드에 결합된 각각의 항체의 1:1 비가 사용된다. 본 발명의 특정 측면에서, 비드에 결합된 항 CD3:CD28 항체의 비는 T 세포 확장의 증가가 1:1의 비를 사용하여 관찰된 팽창과 비교하여 관찰되도록 사용된다. 한 특정 실시양태에서 약 1 내지 약 3 배수의 증가가 1:1의 비를 사용하여 관찰된 팽창과 비교하여 관찰된다. 한 실시양태에서, 비드에 결합된 CD3:CD28 항체의 비는 범위가 100:1 내지 1:100 및 그 사이의 모든 정수 값에 이른다. 본 발명의 한 측면에서, 더 많은 항-CD28 항체가 항-CD3 항체보다 입자에 결합되며, 즉, CD3:CD28의 비가 1 미만이다. 본 발명의 특정 실시양태에서, 비드에 결합된 항 CD3 항체에 대한 항 CD28 항체의 비는 2:1 초과이다. 한 특정 실시양태에서, 비드에 결합된 항체의 1:100 CD3:CD28 비가 사용된다. 또 다른 실시양태에서, 비드에 결합된 항체의 1:75 CD3:CD28 비가 사용된다. 추가 실시양태에서, 비드에 결합된 항체의 1:50 CD3:CD28 비가 사용된다. 또 다른 실시양태에서, 비드에 결합된 항체의 1:30 CD3:CD28 비가 사용된다. 실시양태에서, 비드에 결합된 항체의 1:10 CD3:CD28 비가 사용된다. 또 다른 실시양태에서, 비드에 결합된 항체의 1:3 CD3:CD28 비가 사용된다. 또한 또 다른 실시양태에서, 비드에 결합된 항체의 3:1 CD3:CD28 비가 사용된다.

[0252] 1:500 내지 500:1 및 그 사이의 임의의 정수 값의 세포에 대한 입자의 비를 사용하여 T 세포 또는 다른 표적 세포를 자극할 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자가 쉽게 인식할 수 있는 바와 같이, 세포에 대한 입자의 비는 표적 세포에 대한 입자 크기에 의존할 수 있다. 예를 들어, 작은 크기의 비드는 단지 몇 개의 세포를 결합할 수 있을 것이며, 한편 더 큰 비드는 많은 세포를 결합할 수 있을 것이다. 특정 실시양태에서 입자에 대한 세포의 비는 범위가 1:100 내지 100:1 및 그 사이의 임의의 정수 값에 이르며 추가 실시양태에서 상기 비는 1:9 내지 9:1 및 그 사이의 임의의 정수 값을 포함하며, T 세포를 자극하는데 또한 사용될 수 있다. T 세포 자극을 결과하는 T 세포에 대한 항-CD3- 및 항-CD28-커플링된 입자의 비는 위에서 언급한 바와 같이 다를 수 있지만, 그러나 특정 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 포함하며 여기서 하나의 비는 T 세포당 적어도 1:1 입자이다. 한 실시양태에서, 1:1 이하의 세포에 대한 입자의 비를 사용한다. 한 특정 실시양태에서, 입자:세포 비는 1:5이다. 추가 실시양태에서, 세포에 대한 입자의 비는 자극의 당일에 따라 다양할 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 세포에 대한 입자의 비는 제1일째 1:1 내지 10:1이며 추가적 입자를 매일 또는 그 이후 격일로 최대 10일 동안, 1:1 내지 1:10의 최종 비 (첨가 당일의 세포 카운트를 기준으로 함)로 첨가한다. 한 특정 실시양태에서, 세포에 대한 입자의 비는 자극의 제1일에 1:1이고 자극의 제3일 및 제5일에 1:5로 조정된다. 또 다른 실시양태에서, 입자는 자극의 제1일에 1:1, 및 제3일 및 제5일에 1:5의 최종 비로 매일 또는 격일 기준으로 첨가된다. 또 다른 실시양태에서, 세포에 대한 입자의 비는 자극의 제1일에 2:1이고 자극의 제3일 및 제5일에 1:10으로 조정된다. 또 다른 실시양태에서, 입자는 자극의 제1일에 1:1, 및 제3일 및 제5일에 1:10의 최종 비로 매일 또는 격일 기준으로 첨가된다. 통상의 기술자는 여러 가지의 다른 비가 본 발명에서 사용에 적합할 수 있음을 인식할 것이다. 특히, 비는 입자 크기 및 세포 크기 및 유형에 따라 달라질 것이다.

[0253] 본원에 기재된 추가 실시양태에서, 면역 이펙터 세포, 예컨대 T 세포는 작용제-코팅된 비드와 조합되며, 비드와 세포가 후속적으로 분리된 다음에, 세포가 배양된다. 대안적인 실시양태에서, 배양 전에, 항원-코팅된 비드와 세포는 분리되는 것이 아니라 함께 배양된다. 추가 실시양태에서, 비드와 세포는 먼저 힘, 예컨대 자기력을 가함으로써 농축시켜, 세포 표면 마커의 라이게이션의 증가를 결과하여, 세포 자극을 유도한다.

[0254] 예를 들어, 세포 표면 단백질은 항-CD3 및 항-CD28이 부착되는 상자성 비드 (3x28 비드)가 T 세포와 접촉하게 함으로써 라이게이션될 수 있다. 한 실시양태에서 세포 (예를 들어, 10^4 내지 10^9개 T 세포) 및 비드 (예를 들어, 1:1의 비의 디나비드® M-450 CD3/CD28 T 상자성 비드, 또는 미테티 바이오텍(Miltenyi Biotec)으로부터의 MACS® 마이크로비드(MicroBead))를 완충제, 예를 들어, PBS (2가 양이온 예컨대, 칼슘 및 마그네슘 없이)에서 조합한다. 게다가 또, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 임의의 세포 농도가 사용될 수 있음을 쉽게 인식할 것이다. 예를 들어, 표적 세포는 샘플에서 매우 드물 수 있으며 샘플의 단지 0.01 %만을 포함하거나 전체 샘플 (즉, 100 %)이 관심 표적 세포를 포함할 수 있다. 따라서, 임의의 세포 수는 본 발명의 맥락 내에 있다. 특정 실시양태에서, 입자와 비드의 최대 접촉을 보장하기 위해, 입자와 세포가 함께 혼합되는 부피를 상당히 감소시키는 것 (즉, 세포의 농도를 증가시키는 것)이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 20억개 세포/ml의 농도가 사용된다. 또 다른 실시양태에서, 1억개 초과의 세포/ml가 사용된다. 추가 실시양태에서, 1천만, 1천5백만, 2천만, 2천5백만, 3천만, 3천5백만, 4천만, 4천5백만, 또는 5천만개 세포/ml의 세포 농도가 사용된다. 또한 또 다른 실시양태에서, 7천5백만, 8천만, 8천5백만, 9천만, 9천5백만, 또는 1억개 세포/ml의 세포 농도가 사용된다. 추가 실시양태에서, 1억2천5백만 또는 1억5천백만개 세포/ml의 농도가 사용될 수 있다. 높은 농도를 사용하면 세포 수율, 세포 활성화, 및 세포 확장의 증가를 결과할 수 있다. 추가로, 높은 세포 농도를 사용하면 관심 표적 항원, 예컨대 CD28-음성 T 세포를 약하게 발현시킬 수 있는 세포를 보다 효율적으로 포획할 수 있게 한다. 이러한 세포 집단은 치료적 가치를 가질 수 있고 수득하는 것이 바람직할 것이다. 예를 들어, 고농도의 세포를 사용하면 통상적으로는 더 약한 CD28 발현을 갖는 CD8+ T 세포를 보다 효율적으로 선택할 수 있게 한다.

[0255] 본원에 기재된 한 실시양태에서, 혼합물을 수 시간 (약 3시간) 내지 약 14일 또는 그 사이의 임의의 시간상 정수 값 동안 배양할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 혼합물을 21일 동안 배양할 수 있다. 본 발명의 한 실시양태에서 비드 및 세포를 약 8일 동안 함께 배양한다. 또 다른 실시양태에서, 비드 및 T 세포를 2-3일 동안 함께 배양한다. T 세포의 배양 시간이 60일 이상이될 수 있도록 여러 주기의 자극이 또한 요구될 수 있다. T 세포 배양에 적절한 조건은 혈청 (예를 들어, 태아 소 또는 인간 혈청), 인터류킨-2 (IL-2), 인슐린, IFN-.감마., IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF베타, 및 TNF-알파 또는 통상의 기술자에게 공지된 세포 성장을 위한 임의의 다른 첨가제를 포함한, 증식 및 생존력에 필요한 인자를 함유할 수 있는 적절한 배지 (예를 들어, 최소 필수 배지(Minimal Essential Media) 또는 RPMI 배지 1640 또는, X-비보(vivo) 15, (론자(Lonza))를 포함한다. 세포 성장을 위한 다른 첨가제는 계면활성제, 플라스마네이트(plasmanate), 및 환원제 예컨대 N-아세틸-시스테인 및 2-메르캅토에탄올을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 배지는 아미노산, 피루브산나트륨 및 비타민이 첨가되며, 무혈청이거나 적절한 양의 혈청 (또는 혈장) 또는 규정된 세트의 호르몬, 및/또는 T 세포의 성장 및 확장에 충분한 양의 시토카인(들)으로 보충된, RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, 알파-MEM, F-12, X-비보 15, 및 X-비보 20, 옵티마이저(Optimizer)를 포함할 수 있다. 항생제, 예를 들어, 페니실린 및 스트렙토마이신은 단지 실험 배양에만 포함되며, 대상체에 주입할 세포의 배양에는 포함되지 않는다. 표적 세포는 성장을 뒷받침하는 데 필요한 조건, 예를 들어, 적절한 온도 (예를 들어, 37℃), 및 대기 (예를 들어, 공기 플러스 5% CO_2) 하에 유지된다.

[0256] 다양한 자극 시간에 노출된 T 세포는 상이한 특성을 나타낼 수 있다. 예를 들어, 전형적인 혈액 또는 성분채집술 처리된(apheresed) 말초 혈액 단핵 세포 생성물은 세포독성 또는 억제인자 T 세포 집단 (T_C, $CD8^+$)보다 큰 헬퍼 T 세포 집단 (T_H, $CD4^+$)을 갖는다. CD3 및 CD28 수용체 자극에 의한 T 세포의 생체외 확창은 약 8-9 일 전에 주로 T_H 세포로 이루어진 진 T 세포 집단을 생성하며, 한편 약 8-9 일 후에, T 세포 집단은 점점 더 많은 T_C 세포 집단을 포함한다. 치료 목적에 따라, 주로 T_H 세포를 포함하는 T 세포 집단을 대상체에게 주입하는 것이 유리할 수 있다. 유사하게, T_C 세포의 항원-특이적 하위집합이 단리된 경우, 이 하위집합을 더 크게 확장하는 것이 유익할 수 있다.

[0257] 추가로, CD4 및 CD8 마커 이외에, 다른 표현형 마커는 상당히 다르나, 대부분, 세포 확장 과정의 경과 동안에 재현 가능하다. 따라서, 이러한 재현성은 특정 목적을 위해 활성화된 T 세포 생성물을 맞춤화하는 능력을 가능하게 한다.

[0258] 일부 경우에, 실시양태의 면역 이펙터 세포 (예를 들어, T-세포)는 세포 확장을 돕기 위해, 활성화 및 전파 세포 (AaPC)와 공동-배양된다. AaPC는 또한 인공 항원 제시 세포 (aAPC)로 언급될 수 있다. 예를 들어, 항원 제시 세포 (APC)는 실시양태의 치료 조성물 및 세포 요법 생성물을 제조하는데 유용하다. 한 측면에서, AaPC는 트랜스제닉(transgenic) K562 세포일 수 있다. 항원-제시 시스템의 제조 및 사용에 관한 일반적인 지침은, 예를 들어, 그 각각이 참조로 포함된, 미국 특허 번호 6,225,042, 6,355,479, 6,362,001 및 6,790,662; 미국 특허 출원 공개 번호 2009/0017000 및 2009/0004142; 및 국제 공개 번호 WO2007/103009를 참조. 실시양태의 또 한 추가 측면에서, 트렌스제닉 CAR 세포를 배양하는 단계는 수지상 세포의 존재하에 트렌스제닉 CAR 세포 또는 CAR-발현 면역 이펙터 세포의 확장을 촉진시키는 활성화 및 전파 세포 (AaPC)를 배양하는 단계를 포함한다. 한층 더 추가 측면에서, AaPC는 AaPC의 표면 상에 발현된 CAR-결합 항체 또는 그의 단편을 포함한다. AaPC는 일부 경우에 T-세포를 활성화시키거나 공동-자극하는 추가적 분자를 포함할 수 있다. 추가적 분자는, 일부 경우에, 막-결합 $C\gamma$ 시토카인을 포함할 수 있다. 또한 한층 더 추가 측면에서, AaPC는 불활성화되거나 방사선조사되거나, 감염성 물질에 대해 시험되어 감염성 물질이 없는 것으로 확인되었다. 한층 더 추가 측면에서, AaPC의 존재하에 트렌스제닉 CAR 세포를 배양하는 단계는 가용성 시토카인, 예컨대 IL-15, IL-21 및/또는 IL-2를 포함하는 배지에서 트렌스제닉 CAR 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 세포는 약 10:1 내지 약 1:10; 약 3:1 내지 약 1:5; 약 1:1 내지 약 1:3 (면역 이펙터 세포 대 AaPC); 또는 그 안에 유도 가능한 임의의 범위의 비로 배양할 수 있다. 예를 들어, T 세포 및 AaPC의 공동-배양은 약 1:1, 약 1:2 또는 약 1:3의 비에서일 수 있다.

[0259] 한 측면에서, AaPC는 CD137L을 발현할 수 있다. 다른 측면에서, AaPC는 CD19, CD64, CD86, 또는 mIL15를 추가로 발현할 수 있다. 특정 측면에서, AaPC는 적어도 하나의 항-CD3 항체 클론, 예컨대, 예를 들어, OKT3 및/또는 UCHT1을 발현할 수 있다. 한 측면에서, AaPC는 불활성화 (예를 들어, 방사선조사)될 수 있다. 한 측면에서, AaPC는 감염성 물질에 대해 시험되어 감염성 물질이 없는 것으로 확인되었을 수 있다. 이러한 AaPC를 제조하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 한 측면에서, CAR-변형 T 세포 집단을 AaPC와 배양하는 단계는 세포를 약 10:1 내지 약 1:10; 약 3:1 내지 약 1:5; 약 1:1 내지 약 1:3 (T 세포 대 AaPC); 또는 그 안에 유도 가능한 임의의 범위의 비로 배양하는 단계를 포함할 수 있다. 예를 들어, T 세포 및 AaPC의 공동-배양은 약 1:1, 약 1:2 또는 약 1:3의 비에서일 수 있다. 한 측면에서, 배양 단계는 아미노비스포스포네이트 (예를 들어, 졸레드론산)과 배양하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0260] 추가 측면에서, 트랜스제닉 CAR 세포의 집단을 7, 14, 21, 28, 35, 42일, 49, 56, 63 또는 70일 이하 동안 배양하고/거나 자극한다. 한 실시양태에서, 자극은 CAR 양성 T 세포의 성장을 촉진하기 위한 트렌스제닉 CAR T 세포의 AaPC와의 공동-배양을 포함한다. 또 다른 측면에서, 트랜스제닉 CAR 세포의 집단은 하기 이하 동안 자극한다: 1X 자극, 2X 자극, 3X 자극, 4X 자극, 5X 자극, 5X 자극, 6X 자극, 7X 자극, 8X 자극, 9X 자극 또는 10X 자극. 일부 경우에, 트렌스제닉 세포는 AaPC의 존재하에 생체외에서 배양되지 않는다. 일부 구체적 경우에, 상기 실시양태의 방법은 형질감염 및/또는 배양 단계 후에 CAR-발현 면역 이펙터 세포 (예를 들어, T-세포)를 위해 세포 집단을 강화하는 것을 추가로 포함한다. 강화하는 것은 형광-활성화된 세포 분류 (FACS) 및 CAR-발현 세포를 위한 분류를 포함할 수 있다. 추가 측면에서, CAR-발현 세포를 위한 분류는 CAR-결합 항체의 사용을 포함한다. 강화는 또한 CD56+ 세포의 고갈을 포함할 수 있다. 상기 실시양태의 또 한층 더 추가 측면에서, 방법은 트랜스제닉 CAR 세포의 집단의 샘플을 냉동보존하는 것을 추가로 포함한다.

[0261] 일부 경우에, AaPC는 추가적 처리 없이 펩티드를 MHC 분자에 직접 결합시키는 최적 길이의 펩티드와 인큐베이션

된다. 대안적으로, 세포는 관심 항원을 발현할 수 있다 (즉, MHC-독립적 항원 인식의 경우에). 더욱이, 일부 경우에, APC는 특이적 CAR 폴리펩티드 또는 일반적으로 CAR 폴리펩티드 (예를 들어, 보편적인 활성화 및 전파 세포 (uAPC)에 결합하는 항체를 발현할 수 있다. 이러한 방법은 WO/2014/190273에 개시되어 있으며, 이는 본원에 참조로 포함된다. 펩티드-MHC 분자 또는 관심 항원 외에도, AaPC 시스템은 또한 적어도 하나의 외인성 보조 분자를 포함할 수 있다. 보조 분자의 임의의 적합한 수 및 조합을 이용할 수 있다. 보조 분자는 보조 분자 예컨대 공동-자극 분자 및 부착 분자로부터 선택될 수 있다. 예시적인 공동-자극 분자는 CD70 및 B7.1 (B7.1은 B7로 이전에 공지되고 CD80으로 또한 공지되었다)을 포함하며, 이는 다른 것들 중에서도, T 세포의 표면 상에 CD28 및/또는 CTLA-4 분자에 결합하여, 예를 들어, T-세포 확장, Th1 분화, 단기 T 세포 생존 및 시토카인 분비 예컨대 인터류킨 (IL)-2에 영향을 미친다. 부착 분자는 탄수화물-결합 당단백질 예컨대 셀렉틴, 막관통 결합 당단백질 예컨대 인테그린, 칼슘-의존성 단백질 예컨대 카데린, 및 단일-통과 막관통 면역글로불린 (Ig) 수퍼패밀리 단백질, 예컨대, 예를 들어, 세포-대-세포 또는 세포-대-매트릭스 접촉을 촉진시키는, 세포간 부착 분자 (ICAM)를 포함할 수 있다. 예시적인 부착 분자는 LFA-3 및 ICAMs, 예컨대 ICAM-1을 포함한다. 공동-자극 분자 및 부착 분자를 포함한, 예시적인 보조 분자의 선택, 클로닝, 제조 및 발현에 유용한 기술, 방법 및 시약은, 본원에 참조로 포함된, 예를 들어, 미국 특허 번호 6,225,042, 6,355,479, 및 6,362,001에 예시되어 있다.

[0262] AaPC가 되도록 선택되는 세포는, 바람직하게는 세포내 항원-처리, 세포내 펩티드 트래픽킹(trafficking), 및/또는 세포내 MHC 부류 I 또는 부류 II 분자-펩티드 로딩에 결핍을 가지거나, 또는 변온성(poikilothermic) (즉, 포유동물 세포주보다 온도 시험감염에 덜 민감하다)이거나, 결핍 및 변온성 특성 둘 다를 지니고 있다. 바람직하게는, AaPC가 되도록 선택된 세포는 또한 세포에 도입되는 외인성 MHC 부류 I 또는 부류 II 분자 및 보조 분자 성문에 대한 적어도 하나의 내인성 대응물 (예를 들어, 상기 기재된 바와 같은 내인성 MHC 부류 I 또는 부류 II 분자 및/또는 내인성 보조 분자)을 발현하는 능력이 결핍되어 있다. 더욱이, 또한, AaPC는 바람직하게는 AaPC를 생성하기 위해 그의 변형 전에 세포가 지니고 있는 결핍 및 변온 특성을 보유한다. 예시적인 AaPC는 항원 처리 (TAP)-결핍 세포주, 예컨대 곤충 세포주와 연관된 수송체를 구성하거나 이로부터 유래된다. 예시적인 변온 곤충 세포주는 초파리(Drosophila) 세포주, 예컨대 슈나이더(Schneider) 2 세포주이다 (예를 들어, Schneider 1972 [Illustrative methods for the preparation, growth, and culture of Schneider 2 cells], 미국 특허 번호 6,225,042, 6,355,479, 및 6,362,001 참조).

[0263] 한 실시양태에서, AaPC는 또한 동결-해동 주기에 적용된다. 예시적인 동결-해동 주기에서, AaPC는 AaPC를 함유하는 적합한 리셉터클(receptacle)를 적절한 양의 액체 질소, 고체 이산화탄소 (즉, 드라이 아이스), 또는 유사한 저온 물질과 접촉시킴으로써, 동결이 신속히 일어나도록 동결시킬 수 있다. 그 다음에 동결 APC는, 저온 물질로부터 AaPC를 제거하고 주위 실온 조건에 노출시키거나, 미온 수조 또는 따뜻한 손을 이용하여 더 짧은 해동 시간을 촉진하는 촉진 해동 과정에 의해 해동된다. 게다가, 해동하기 전에 AaPC를 동결시키고 장기간 동안 보관할 수 있다. 동결 AaPC는 또한 해동된 다음에 추가 사용 전에 동결건조될 수 있다. 바람직하게는 동결-해동 과정에 유해한 영향을 줄 수 있는 보존제, 예컨대 디메틸 술폭시드 (DMSO), 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 및 다른 보존제는, 예컨대 AaPC를 이러한 보존제가 본질적으로 없는 배지로 옮기는 것에 의해 본질적으로 제거되거나, 동결-해동 주기를 겪는 AaPC를 함유하는 배지에서 부재한다.

[0264] 추가 실시양태에서, 이종(xenogenic) 핵산 및 AaPC에 내인성인 핵산은 가교결합에 의해 불활성화될 수 있어, 불활성화 후에 본질적으로 어떠한 핵산의 세포 성장, 복제 또는 발현이 일어나지 않도록 한다. 한 실시양태에서, AaPC는 외인성 MHC 및 보조 분자의 발현, AaPC의 표면 상에 이러한 분자의 제시, 및 선택된 펩티드 또는 펩티드들로 제시된 MHC 분자의 로딩에 후속하는 시점에서 불활성화된다. 따라서, 이러한 불활성화 및 선택된 펩타이드 로딩된 AaPC는, 본질적으로 증식 또는 복제를 불가능하게 하면서, 선택된 펩티드 제시 기능을 보유한다. 바람직하게는, 가교 결합은 AaPC의 항원-제시 세포 기능을 실질적으로 감소시키지 않으면서, 박테리아 및 바이러스와 같은 오염 미생물이 본질적으로 없는 AaPC를 또한 산출한다. 따라서 가교결합은 AaPC를 사용하여 개발된 세포 요법 생성물의 안전성에 대한 우려를 완화시키는데 도움이 되면서 상기 중요한 AaPC 기능을 유지한다. 가교결합 및 AaPC와 관련된 방법에 대해서는, 예를 들어, 본원에 참조로 포함된 미국 특허 출원 공개 번호 20090017000을 참조한다.

[0265] 특정 실시양태에서 가공된 항원 제시 세포 (APC)가 추가로 제공된다. 이러한 세포는 예를 들어, 상기 기재된 바와 같이, 생체외 면역 이펙터 세포를 전파하기 위해 사용될 수 있다. 추가 측면에서, 가공된 APC 자체가 환자에게 투여되어 생체내 면역 이펙터 세포의 팽창을 자극할 수 있다. 실시양태의 가공된 APC는 그 자체가 치료제로서 사용될 수 있다. 다른 실시양태에서, 가공된 APC는 표적 항원에 특이적인 내인성 면역 이펙터 세포의 활성화를 자극할 수 있고/거나 표적 항원에 특이적인 입양 전달된 면역 이펙터 세포의 활성 또는 지속성을 증가

시키기 위해 치료제로서 사용될 수 있다.

[0266] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "가공된 APC"는 적어도 제1 트랜스진을 포함하는 세포(들)을 지칭하며, 여기서 제1 트랜스진이 HLA를 코딩한다. 이러한 가공된 APC는 항원의 발현을 위한 제2 트랜스진을 추가로 포함할 수 있어, 상기 항원이 HLA와 복합체로 APC상의 표면에 제시되도록 한다. 일부 측면에서, 가공된 APC는 항원 (예를 들어, 수지상 세포)을 제시한 세포 유형일 수 있다. 추가 측면에서, 가공된 APC는 T-세포 또는 T-세포 선조("T-APC"로 언급됨)와 같은 항원을 정상적으로 제시하지 않는 세포 유형으로부터 생성될 수 있다. 따라서, 일부 측면에서, 실시양태의 가공된 APC는 표적 항원을 코딩하는 제1 트랜스진 유전자 및 인간 백혈구 항원 (HLA)을 코딩하는 제2 트랜스진 유전자를 포함하여, HLA가 표적 항원의 에피토프와 복합체로 가공된 APC의 표면 상에 발현되도록 한다. 특정 구체적 측면에서, 가공된 APC에서 발현된 HLA는 HLA-A2이다.

[0267] 일부 측면에서, 실시양태의 가공된 APC는 공동-자극 분자를 코딩하는 적어도 제3 트랜스진을 추가로 포함할 수 있다. 공동-자극 분자는 막-결합된 Cɣ 시토카인일 수 있는 공동-자극 시토카인일 수 있다. 특정 측면에서, 공동-자극 시토카인은 IL-15, 예컨대 막-결합된 IL-15이다. 일부 추가 측면에서, 가공된 APC는 편집된 (또는 결실된) 유전자를 포함할 수 있다. 예를 들어, PD-1, LIM-3, CTLA-4 또는 TCR과 같은 억제 유전자를 편집하여 유전자의 발현을 감소시키거나 제거할 수 있다. 실시양태의 가공된 APC는 임의의 관심 표적 항원을 코딩하는 트랜스진 유전자를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 표적 항원은 감염성 질환 항원 또는 종양-연관 항원(TAA)일 수 있다.

[0268] 본 개시의 한 실시양태에서, 본원에 기재된 면역 이펙터 세포는 현장 진단 (point-of-care) 장소에서 변형된다. 일부 경우에, 현장 진단 장소는 병원 또는 대상체 근처의 시설 (예를 들어, 의료 시설)에 있다. 일부 경우에, 면역 이펙터 세포는 키메라 수용체 및/또는 시토카인을 면역 이펙터 세포에 조작/도입한 다음에 신속히 대상체에게 주입함으로써 변형된다. 일부 실시양태에서, 이러한 면역 이펙터 세포는 전기천공법을 통해 본원에 기재된 바와 같은 벡터에 의해 변형된다. 다른 실시양태에서, 벡터는 비-바이러스성 또는 바이러스 벡터이다. 한 경우에, 비-바이러스성 벡터는 슬리핑 뷰티 트랜스포존 시스템을 포함한다. 일부 경우에, 변형된 면역 이펙터 세포는 전파 및 활성화 단계를 겪지 않는다. 일부 경우에, 변형된 면역 이펙터 세포는 인큐베이션 또는 배양 단계를 겪지 않는다. 다른 경우에, 면역 이펙터 세포는 키메라 수용체 및 시토카인을 상기 면역 이펙터 세포에 조작/도입한 다음에 신속히 대상체에게 주입함으로써 변형된다. 다른 경우에, 면역 이펙터 세포는 키메라 수용체 및 시토카인을 상기 세포에 조작/도입한 다음에 적어도: 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24시간 내에 대상체에게 주입함으로써 변형된다. 다른 경우에, NK 또는 T 세포는 키메라 수용체 및 시토카인을 상기 세포에 조작/도입한 다음에 0일, <1일, <2일, <3일,<4일, <5일, <6일 또는 <7일로 대상체에게 주입함으로써 변형된다. 일부 경우에, 면역 이펙터 세포의 공급원은 동종이형 및 자가 공급원 둘 다를 포함할 수 있다. 한 경우에, 면역 이펙터 세포는 T 세포 또는 NK 세포일 수 있다. 한 경우에, 키메라 수용체는 CD33 CAR일 수 있다. 또 다른 경우에, 시토카인은 mbIL-15일 수 있다. 또 다른 경우에, CD33 CAR을 발현하는 면역은 HER1t 또는 HER1t-1 태그를 포함할 수 있다. 또 다른 경우에, HER1t 태그는 서열번호: 32 또는 54 또는 그의 변이체 또는 단편을 포함할 수 있다. 한 경우에, mbIL-15는 서열번호: 37, 또는 그의 변이체 또는 단편이다. 또 다른 경우에, mbIl-15는 HER1t 또는 HER1t-1 태그를 또한 포함할 수 있다. 또한 또 다른 경우에, CD33 CAR 및/또는 mbIL-15의 발현은 본원에 기재된 유전자-스위치 발현 시스템에 의해 조정될 수 있다.

[0269] **치료적 용도**

[0270] 본원에 기재된 실시양태에서는, 렌티바이러스 벡터 (LV)로 형질도입된 면역 이펙터 세포 (예를 들어, T 세포)가 있다. 예를 들어, LV는 CD33의 항원 인식 도메인과 CD8 알파 힌지 및 그의 변이체의 스톡 도메인, CD3-제타, CD28, 4-1BB, 또는 임의의 그의 조합물의 세포내 도메인 및 세포내 도메인 CD3제타를 조합하는 CAR을 코딩한다. 따라서, 일부 경우에, 형질도입된 T 세포는 CAR-매개 T-세포 반응을 도출할 수 있다.

[0271] 본원에 기재된 실시양태에서, 1차 T 세포의 특이성을 CD33 종양 항원으로 재지향시키는 CAR의 용도가 제공된다. 따라서, 본 발명은 또한 포유동물에게 CAR을 발현하는 T 세포를 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물에서 표적 세포 집단 또는 조직에 대한 T 세포-매개 면역 반응을 자극하는 방법을 제공하며, 여기서 CAR은 CD33과 특이적으로 상호작용하는 결합 모이어티, 스톡 도메인, 예를 들어 인간 CD3 제타의 세포내 도메인을 포함하는 제타 쇄 부분, 및 공동자극 신호전달 영역을 포함한다.

[0272] 한 실시양태에서, 본 개시내용은 T 세포가 본 발명의 CD33-특이적 CAR을 발현하도록 유전자 변형되고 CAR T 세포가 이를 필요로하는 수령자에게 주입되는 세포 요법의 한 유형을 포함한다. 주입된 세포는 수령자에서 종양

세포를 사멸시킬 수 있다. 항체 요법과는 달리, CAR T 세포는 생체내에서 복제 가능하여, 장기 지속성을 결과하여 지속적인 종양 제어를 야기할 수 있다.

[0273] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR T 세포는 강력한 생체내 T 세포 확장을 겪을 수 있고 연장된 시간 동안 지속될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 CAR T 세포는 임의의 추가적 종양 형성 또는 성장을 억제하기 위해 재활성화될 수 있는 특이적 기억 T 세포로 진화한다.

[0274] 본원에 기재된 CAR-변형 T 세포는 포유동물에서 생체내 요법 및/또는 생체외 면역화를 위한 백신 유형으로서의 역할을 또한 할 수 있다. 실시양태에서, 포유동물은 인간이다. 생체외 면역화와 관련하여, 다음 중 적어도 하나가 면역 이펙터 세포를 포유동물에 투여하기 전에 시험관내에서 발생한다: i) 세포의 확장, ii) CAR을 코딩하는 핵산을 세포에 도입하는 것, 및/또는 iii) 세포의 냉동보존.

[0275] 생체외 절차는 널리 공지되어 있으며 하기에서 보다 충분히 논의된다. 간단히, 세포는 포유동물 (예를 들어, 인간)로부터 단리되고 본원에 개시된 CAR을 발현하는 벡터로 유전자 변형된다 (즉, 시험관내 형질도입되거나 형질감염된다). CAR-변형 세포는 포유동물 수령자에게 투여되어 치료 효과를 제공할 수 있다. 포유동물 수령자는 인간일 수 있고 CAR-변형 세포는 수령자와 관련하여 자가유래일 수 있다. 대안적으로, 세포는 수령자와 관련하여 동종이형, 동계의, 이종발생성일 수 있다.

[0276] 조혈 줄기 및 선조 세포의 생체외 팽창에 대한 절차는 본원에 참조로 포함된 미국 특허 번호 5,199,942에 기재되어 있으며, 본 발명의 세포에 적용될 수 있다. 따라서 본 발명은 세포의 생체외 팽창의 임의의 특별한 방법에 제한되지 않는다. 간단히, T 세포의 생체외 배양 및 팽창은 다음을 포함한다: (1) 말초 혈액 수확물이나 골수로부터의 포유동물 체외 이식편으로부터 CD34+ 조혈 줄기 및 선조 세포를 수집하는 것; (2) 이러한 생체외 세포 확장시키는 것. 미국 특허 번호 5,199,942에 기재된 세포 성장 인자 이외에, 세포의 배양 및 확장을 위해 다른 인자 예컨대 flt3-L, IL-1, IL-3 및 c-kit 리간드가 사용될 수 있다.

[0277] 생체외 면역화의 면에서 세포-기반 백신을 사용하는 것 외에도, 본 발명은 환자에서 항원에 대항하여 지향하는 면역 반응을 도출하기 위한 생체내 면역화를 위한 조성물 및 방법을 또한 제공한다.

[0278] 일반적으로, 본원에 기재된 바와 같이 활성화되고 확장된 세포는 면역손상된 개체에서 발생하는 질환의 치료 및 예방에 이용될 수 있다. 특히, 본 발명의 CAR-변형 T 세포는 골수 악성 종양, 예컨대 예를 들어, 급성 골수성 백혈병 (AML)의 치료에 사용된다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 세포는 AML에 걸릴 위험이 있는 환자의 치료에서 사용된다. 따라서, 본 발명은 AML의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에게 치료 유효량의 본 발명의 CAR-변형 T 세포를 투여하는 것을 포함하는, AML의 치료 또는 예방 방법을 제공한다. 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같이 활성화되고 확장된 세포는 재발 또는 난치성 AML의 치료에서 이용될 수 있다.

[0279] 간단히, 본 발명의 제약 조성물은 제약상 또는 생리학상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 조합하여, 본원에 기재된 바와 같은 표적 세포 집단을 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 완충제 예컨대 중성 완충 식염수, 인산염 완충 식염수 등; 탄수화물 예컨대 글루코스, 만노스, 수크로스 또는 덱스트란, 만니톨; 단백질; 폴리펩티드 또는 아미노산 예컨대 글리신; 항산화제; 킬레이트화제 예컨대 EDTA 또는 글루타티온; 아주반트 (예를 들어, 수산화알루미늄); 및 보존제를 포함할 수 있다. 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 정맥 투여용으로 제형제화된다.

[0280] 본원에 기재된 제약 조성물은 치료될 (또는 예방될) 질환에 적절한 방식으로 투여될 수 있다. 적절한 투여량이 임상 시험에 의해 결정될 수 있긴 하지만, 투여의 양 및 빈도는 환자의 병태, 환자 질환의 유형 및 중증도와 같은 인자에 의해 결정될 것이다.

[0281] "면역학적 유효량", "항종양 유효량", "종양-억제 유효량", 또는 "치료량"이 지시되는 경우, 투여될 본 발명의 조성물의 정확한 양은 환자 (대상체)의 연령, 체중, 종양 크기, 감염 또는 전이의 정도, 및 병태의 개인차를 고려하여 의사가 결정할 수 있다. 일반적으로 본원에 기재된 T 세포를 포함하는 제약 조성물은 10^4 내지 10^9개 세포/kg 체중, 10^5 내지 10^6개 세포/kg 체중 및 이들 범위 내의 모든 정수 값을 포함하는 투여량으로 투여될 수 있다고 서술될 수 있다. T 세포 조성물은 또한 이들 투여량으로 다수회 투여될 수 있다. 세포는 면역요법에서 통상적으로 공지되어 있는 주입 기술을 사용하여 투여될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, (1988)] 참조). 특정 환자에 대한 최적의 투여량 및 치료 요법은 질환의 징후에 대해 환자를 모니터링하고 그에 따라 치료를 조정함으로써 의학 분야의 통상의 기술자가 쉽게 결정할 수 있다.

[0282] 특정 실시양태에서, 활성화된 T 세포를 대상체에게 투여한 다음에 후속적으로 혈액을 재채취 (또는 성분채집술

을 수행하고), 본 발명에 따라 T 세포를 활성화시키고, 이들 활성화되고 대상체 세포를 환자에게 재주입하는 것이 바람직할 수 있다. 이 과정은 몇 주마다 다수회 수행할 수 있다. 특정 실시양태에서, T 세포는 10 cc 내지 400 cc의 혈액 채취로부터 활성화될 수 있다. 특정 실시양태에서, T 세포는 20 cc, 30 cc, 40 cc, 50 cc, 60 cc, 70 cc, 80 cc, 90 cc 또는 100 cc의 혈액 채취로부터 활성화된다. 이론에 얽매이지 않기 위해, 이 다중 혈액 채취/다중 재관류 프로토콜을 사용하면, T 세포의 특정 집단을 선별하는 역할을 할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 방사선 또는 화학요법을 통해, 환자의 림프구제거(lymphodepletion) 후 대상 조성물의 활성화된 T 세포를 투여하는 것이 바람직할 수 있다.

[0283] 본원에 기재된 조성물의 투여는 에어로졸 흡입, 주사, 섭취, 수혈, 착상 또는 이식술을 포함한, 임의의 편리한 방식으로 수행될 수 있다. 본원에 기재된 조성물은 환자에게 피하, 피내, 종양내, 결절내, 척수내, 근육내, 정맥 (i.v.) 주사에 의해 또는 복강내 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 T 세포 조성물은 환자에게 피부 또는 피하 주사에 의해 환자에게 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 T 세포 조성물은 정맥 주입에 의해 투여된다. T 세포의 조성물은 종양, 림프절, 또는 감염 부위에 직접 주사될 수 있다.

[0284] 환자에게 투여될 상기 치료의 투여량은 치료 중인 병태의 정확한 성질 및 치료의 수령자에 따라 달라질 것이다. 인간 투여를 위한 투여량의 규모 조정은 관련 기술분야에서 인정된 관행에 따라 수행될 수 있다. 예를 들어, 상기 처리의 용량은 1 x 10^4개 CAR+ 세포/kg 내지 5 x 10^6개 CAR+ 세포/kg의 범위일 수 있다. 예시적인 용량은 1x10^4개 CAR+ 세포/kg, 1x10^5개 CAR+ 세포/kg, 3x10^5개 CAR+ 세포/kg, 1x10^6개 CAR+ 세포/kg 또는 5x10^6개 CAR+ 세포/kg일 수 있다. 따라서 적절한 용량은 성인 또는 소아 환자에 대해 조정할 수 있다.

[0285] 대안적으로, 포유동물 (예를 들어, 인간)에 투여되는 면역 이펙터 세포의 전형적인 양은, 예를 들어, 1백만에서 1000억개 세포의 범위일 수 있으나; 이 예시적인 범위 미만 또는 초과의 양은 본 발명의 범위 내에 있다. 예를 들어, 본 발명의 숙수 세포의 용량은 약 1백만 내지 약 500억개 세포 (예를 들어, 약 5백만개 세포, 약 2천5백만개 세포, 약 5억개 세포, 약 10억개 세포, 약 50억개 세포, 약 200억개 세포, 약 300억개 세포, 약 400억개 세포, 또는 상기 값들 중 임의의 2개에 의해 규정된 범위), 약 1천만 내지 약 1천억개 세포 (예를 들어, 약 2천만개 세포, 약 3천만개 세포, 약 4천만개 세포, 약 6천만개 세포, 약 7천만개 세포, 약 8천만개 세포, 약 9천만개 세포, 약 100억개 세포, 약 250 억개 세포, 약 500억개 세포, 약 750억개 세포 약 900억개 세포, 또는 상기 값들 중 임의의 2개에 의해 규정된 범위), 약 1억개 세포내지 약 500억개 세포 (예를 들어, 약 1억2천만개 세포, 약 2억5천만개 세포, 약 3억5천만개 세포, 약 4억5천만개 세포, 약 6억5천만개 세포, 약 8억만개 세포, 약 9억만개 세포, 약 30억개 세포, 약 300억개 세포, 약 450억개 세포, 또는 상기 값들 중 임의의 2개에 의해 규정된 범위)일 수 있다.

[0286] 치료 또는 예방적 효능은 치료 환자의 주기적인 평가를 통해 모니터링할 수 있다. 몇 일 또는 그 초과에 걸친 반복 투여의 경우, 증상에 따라, 질환 증상의 원하는 억제가 일어날 때까지 치료를 반복한다. 그러나, 다른 투여 요법이 유용할 수 있고 본 발명의 범위 내에 있다. 원하는 투여량은 조성물의 단일 볼루스 투여, 조성물의 다중 볼루스 투여, 또는 조성물의 연속 주입 투여에 의해 전달될 수 있다.

[0287] 개시된 핵산 서열을 발현하는 면역 이펙터 세포, 또는 그러한 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하는 조성물은 포유동물에 공동-투여될 수 있는 1종 이상의 추가적 치료제와 함께 투여될 수 있다. "공동-투여"란 1종 이상의 추가적 치료제 및 1종 이상의 추가적 치료제의 효과를 증진시키기에 충분히 가까운 시간에 본 발명의 숙주 세포 또는 본 발명의 벡터를 포함하는 조성물을 투여하는 것을 의미하며, 그 반대의 경우도 마찬가지이다. 이와 관련하여, 본원에 기재된 면역 이펙터 세포 또는 본원에 기재된 벡터를 포함하는 조성물은 1종 이상의 추가적 치료제와 동시에, 또는 먼저, 투여될 수 있고, 1종 이상의 추가적 치료제는 둘째로 투여되거나, 그 반대의 경우도 마찬가지이다. 대안적으로, 개시된 면역 이펙터 세포 또는 본원에 기재된 벡터 및 1종 이상의 추가적 치료제를 포함하는 조성물을 동시에 투여할 수 있다.

[0288] 본 발명의 숙주 세포 및/또는 본 발명의 벡터를 포함하는 조성물에 포함되거나 조성물과 함께 공동-투여될 수 있는 (또는 키트에 포함될 수 있는) 치료제의 예는 인터류킨, 시토카인, 인터페론, 아주반트 및 화학 요법제이다. 실시양태에서, 추가적 치료제는 IFN-알파, IFN-베타, IFN-감마, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, LT-베타, TNF-알파, 성장 인자, 및 hGH, 인간 톨(Toll)-유사 수용체 TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, 및 TLR10의 리간드이다.

[0289] Bcl-2, STAT3 또는 STAT5 억제제가 또한 조성물에 포함되거나 조성물과 함께 공동-투여될 수 있다 (또는 키트에 포함될 수 있다). 암 세포는 항-아폽토시스성 단백질 예컨대 Bcl-2를 과발현하거나 지속적으로 활성화된 경로

(즉, STAT5 및 STAT3)를 보유하여 천연 아폽토시스 매개체 또는 약제에 대한 비정상적으로 높은 내성을 결과할 수 있다. 하나 초과의 아폽토시스 경로를 이용하기 위해 약물 및 면역 요법의 접근법을 조합하는 것이 종양 세포 사멸을 증가시키고 치료 내성을 감소시키기 위해 예상된다. 소분자 억제제를 사용하면 종양 세포내의 아폽토시스-유발 분자와 항-아폽토시스성 분자 사이의 균형이 충분히 이동시켜 이들을 종양-특이적 T 세포와 직면하는 동안에 사멸에 대해 민감화시키거나 사멸에 대한 내성을 감소시킬 수 있다. Bcl-2 발현의 상승이 혈액학적 악성 종양 예컨대 급성 골수구성 백혈병 (AML) 및 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 및 고형 종양 (즉, 흑색종, 유방 및 난소 암)에서 발견되었다. 지속적으로 활성화된 STAT3 또는 STAT5가 AML, CLL, 만성 골수구성 백혈병, 거대 과립 림프성 백혈병, 및 백혈병 세포주에서 관찰되었다. Bcl-2, STAT3 또는 STAT5를 표적으로 하는 소분자 억제제가 본 발명의 조성물에 포함되거나, 본 발명의 조성물과 공동-투여되고/거나 공동-배양되는 것이 예상된다. 한 bcl-2 억제제는 ABT-737이다. 이 화합물은 BH3 모방(mimetic) 소분자 억제제 (SMI) 군의 일부이며, 이들 Bcl-2 패밀리 단백질을 표적으로 하나 A1 또는 Mcl-1은 표적으로 하지 않는다. ABT-737은 Bcl-2, Bcl-xL 및 Bcl-w에 대해 보다 높은 친 화도를 갖고 있기 때문에 이전의 BCL-2 억제제와 상이하다. 소위 BH3-모방 약물인 ABT-199를 설계하여 만성 림프구성 백혈병 환자에서, Bcl-2 단백질의 기능을 차단하였다.

[0290] STAT3 및 STAT5 억제제는 문헌 [Fagardet al., STAT3 inhibitors for cancer therapy, *JAK-STAT*, 2:1 (2013), e22882, DOI: 10.4161/jkst.22882] 및 [Furqan, et al., Journal of Hematology & Oncology 2013, 6:90 doi:10.1186/1756-8722-6-90]에 기재된 것들을 포함하가 이에 제한되는 것은 아니다. JAK/STAT 경로 이펙터 외에도, SOCS (시토카인 신호전달 억제제), PIAS (활성화된 stat의 단백질 억제제) 및 PTP의 세 가지 주요 부류의 음성 조절인자가 있다. 티로신 포스파타제는 JAK의 활성을 역전시킨다. 이들 중 가장 잘 특징지어지는 것은 마우스 좀 먹은 양(motheaten) 유전자의 산물인 SHP-1이다. SHP-1은 2개의 SH2 도메인을 함유하고, 이들 활성화된 신호전달 분자의 탈인산화를 촉진하기 위해 인산화 JAK 또는 인산화 수용체에 결합할 수 있다. CD45와 같은 다른 티로신 포스파타제는 수용체의 부분 집합을 통해 JAK/STAT 신호전달을 조절하는 역할을 하는 것으로 보인다. 이와 같이, JAK/STAT 경로는 본 개시내용의 조성물에 대한 약물 표적이 될 것으로 예상된다.

[0291] "소포제"는 수성 분산액의 응고, 완성된 필름의 기포, 일반적으로 처리 손상을 결과할 수 있는 처리 동안에 발포를 감소시킨다. 예시적인 소포제는 실리콘 에멀젼 또는 소르비탄 세스퀴올레에이트를 포함한다.

[0292] "항산화제"는, 예를 들어, 부틸화 히드록시톨루엔 (BHT), 소듐 아스코르베이트, 아스코르브산, 소듐 메타비술파이트 및 토코페롤을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항산화제는 필요한 경우 화학적 안정성을 증진시킨다.

[0293] 본원에 기재된 제제는 항산화제, 금속 킬레이트화제, 티올 함유 화합물 및 다른 일반적인 안정화제로부터 이익을 얻을 수 있다. 이러한 안정화제의 예는 다음을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다: (a) 약 0.5% 내지 약 2% w/v 글리세롤, (b) 약 0.1% 내지 약 1% w/v 메티오닌, (c) 약 0.1% 내지 약 2% w/v 모노티오글리세롤, (d) 약 1 mM 내지 약 10 mM EDTA, (e) 약 0.01% 내지 약 2% w/v 아스코르브산, (f) 0.003% 내지 약 0.02% w/v 폴리소르베이트 80, (g) 0.001% 내지 약 0.05% w/v. 폴리소르베이트 20, (h) 아르기닌, (i) 헤파린, (j) 덱스트란 술페이트, (k) 시클로덱스트린, (l) 펜토산 폴리술페이트 및 다른 헤파리노이드, (m) 2가 양이온 예컨대 마그네슘 및 아연; 또는 (n) 그의 조합물.

[0294] "결합제"는 응집력을 부여하며, 예를 들어, 알긴산 및 그의 염; 셀룰로스 유도체 예컨대 카르복시메틸셀룰로스, 메틸셀룰로스 (예를 들어, 메토셀(Methocel)®, 히드록시프로필메틸셀룰로스, 히드록시에틸셀룰로스, 히드록시프로필셀룰로스 (예를 들어, 글루셀(Klucel)®, 에틸셀룰로스 (예를 들어, 에토셀(Ethocel)®, 및 미세결정질 셀룰로스 (예를 들어, 아비셀(Avicel)®; 미세결정질 덱스트로스; 아밀로스; 마그네슘 알루미늄 실리케이트; 폴리사카라이드 산; 벤토나이트; 젤라틴; 폴리비닐피롤리돈/비닐 아세테이트 공중합체; 크로스포비돈; 포비돈; 전분; 전호화 전분; 트라가칸트, 덱스트린, 당, 예컨대 수크로스 (예를 들어, 디팍(Dipac)®, 글루코스, 덱스트로스, 당밀, 만니톨, 소르비톨, 크실리톨 (예를 들어, 크실리탭(Xylitab)®, 및 락토스; 천연 또는 합성 검 예컨대 아카시아, 트라가칸트, 가티 검, 이사폴 겉껍질의 점장제(mucilage of isapol husks), 폴리비닐피롤리돈 (예를 들어, 폴리비돈(Polyvidone)® CL, 콜리돈(Kollidon)® CL, 폴리플라스돈(Polyplasdone)® XL-10), 낙엽송 아라보갈락탄, 비검(Veegum)®, 폴리에틸렌 글리콜, 왁스, 알긴산나트륨 등을 포함한다.

[0295] "담체" 또는 "담체 물질"은 제약에서 임의의 통상적으로 사용되는 부형제를 포함하며 본원에 개시된 화합물, 예컨대 이브루티닙 및 항암제의 화합물, 및 원하는 투여 형태의 방출 프로파일 특성과의 상용성을 기초로 하여 선택되어야한다. 예시적인 담체 물질은, 예를 들어, 결합제, 현탁화제, 붕해제, 충전제, 계면활성제, 가용화제, 안정제, 윤활제, 습윤제, 희석제 등을 포함한다. "제약상 상용성 담체 물질"은 아카시아, 젤라틴, 콜로이드성 이산화규소, 칼슘 글리세로포스페이트, 칼슘 락테이트, 말토덱스트린, 글리세린, 마그네슘 실리케이트, 폴리비

닐피롤리돈 (PVP), 콜레스테롤, 콜레스테롤 에스테르, 소듐 카세이네이트, 대두 레시틴, 타우로콜린, 포스파티딜콜린, 염화나트륨, 인산삼칼슘, 인산이칼륨, 셀룰로스 및 셀룰로스 접합체, 당류 소듐 스테아로일 락틸레이트, 카라기난, 모노글리세라이드, 디글리세라이드, 전호화 전분 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 예를 들어, 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Nineteenth Ed (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995)]; [Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975]; [Liberman, H.A. and Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, New York, N.Y., 1980]; 및 [Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Seventh Ed. (Lippincott Williams & Wilkins1999)] 참조.

[0296] "분산제", 및/또는 "점도 조정제"는 액체 매질 또는 과립화 방법 또는 블렌드 방법을 통해 약물의 확산 및 균질성을 제어하는 물질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이들 작용제는 또한 코팅 또는 침식 매트릭스의 유효성을 촉진시킨다. 예시적인 확산 촉진제/분산제는, 예를 들어, 친수성 중합체, 전해질, 트윈® 60 또는 80, PEG, 폴리비닐피롤리돈 (PVP; 플라스돈(Plasdone)®으로 상업적으로 공지됨), 및 탄수화물-기반 분산제 예컨대, 예를 들어, 히드록시프로필 셀룰로스 (예를 들어, HPC, HPC-SL, HPC-L), 히드록시프로필 메틸셀룰로스 (예를 들어, HPMC K100, HPMC K4M, HPMC K15M, HPMC K100M), 카르복시메틸셀룰로스 소듐, 메틸셀룰로스, 히드록시에틸셀룰로스, 히드록시프로필셀룰로스, 히드록시프로필메틸셀룰로스 프탈레이트, 히드록시프로필메틸셀룰로스 아세테이트 스테아레이트 (HPMCAS), 비결정질 셀룰로스, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 트리에탄올아민, 폴리비닐 알콜 (PVA), 비닐 피롤리돈/비닐 아세테이트 공중합체 (S630), 에틸렌 옥사이드 및 포름알데히드와의 4-(1,1,3,3-테트라메틸부틸)-페놀 중합체 (틸록사폴로도 공지됨), 폴록사머 (예를 들어, 플루로닉(Pluronic) F68®, F88®, 및 F108® (이들은 에틸렌 옥사이드와 프로필렌 옥사이드의 공중합체이다); 및 폴록사민 (예를 들어, 프로필렌 옥사이드 및 에틸렌 옥사이드의 에틸렌디아민으로의 순차적 첨가로부터 유래된 사관능성 블록 공중합체인 폴록사민(Poloxamine) 908®로도 공지된 테트로닉(Tetronic) 908® (바스프 코포레이션(BASF Corporation), 뉴저지주 파시패니)), 폴리비닐피롤리돈 K12, 폴리비닐피롤리돈 K17, 폴리비닐피롤리돈 K25, 또는 폴리비닐피롤리돈 K30, 폴리비닐피롤리돈/비닐 아세테이트 공중합체 (S-630), 폴리에틸렌 글리콜 (예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜은 약 300 내지 약 6000, 또는 약 3350 내지 약 4000, 또는 약 7000 내지 약 5400의 분자량을 가질 수 있다), 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 메틸셀룰로스, 폴리소르베이트-80, 알긴산나트륨, 검, 예컨대, 예를 들어, 트라가칸트 검 및 아카시아 검, 구아 검, 크산탄 (크산탄 검 포함), 당류, 셀룰로스 화합물(cellulosic), 예컨대, 예를 들어, 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 메틸셀룰로스, 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 폴리소르베이트-80, 알긴산나트륨, 폴리에톡실화 소르비탄 모노라우레이트, 폴리에톡실화 소르비탄 모노라우레이트, 포비돈, 카르보머, 폴리비닐 알콜 (PVA), 알기네이트, 키토산 및 그의 조합물을 포함한다. 가소제 예컨대 셀룰로스 또는 트리에틸 셀룰로스를 또한 분산제로서 사용할 수 있다. 분산제는 리포좀 분산액에서 특히 유용하며 자기-유화 분산액은 디미리스토일 포스파티딜 콜린, 에그로부터의 천연 포스파티딜 콜린, 에그로부터의 천연 포스파티딜 글리세롤, 콜레스테롤 및 이소프로필 미리스테이트이다.

[0297] 하나 이상의 침식 촉진제와 하나 이상의 확산 촉진제와의 조합물이 본 발명의 조성물에서 또한 사용될 수 있다.

[0298] 용어 "희석제""는 전달 전에 화합물을 희석하기 위해 사용되는 화학적 화합물을 지칭한다. 희석제는 이들이 보다 안정한 환경을 제공할 수 있기 때문에 화합물을 안정화시키는 데 또한 사용될 수 있다. 완충 용액 (pH 제어 또는 유지를 또한 제공할 수 있는)에 용해된 염은 인산염 완충 식염수 용액을 포함하나, 이에 제한되지 않는 관련 기술분야의 희석제로서 이용된다. 특정 실시양태에서, 희석제는 압축을 촉진하거나 캡슐 충전을 위한 균질 블렌드를 위한 충분한 벌크(bulk)를 생성하기 위해 조성물의 부피를 증가시킨다. 이러한 화합물은 예를 들어, 락토스, 전분, 만니톨, 소르비톨, 덱스트로스, 미세결정질 셀룰로스 예컨대 아비셀® 이염기성 인산칼슘, 인산이칼슘 이수화물; 인산삼칼슘, 인산칼슘; 무수 락토스, 분무-건조된 락토스; 전호화 전분, 압축성 당, 예컨대 디-팍(Di-Pac)® (암스타(Amstar)); 만니톨, 히드록시프로필메틸셀룰로스, 히드록시프로필메틸셀룰로스 아세테이트 스테아레이트, 수크로스-기반 희석제, 가루 설탕; 일염기성 황산칼슘 일수화물, 황산칼슘 이수화물; 칼슘 락테이트 삼수화물, 덱스트레이트; 가수분해된 시리얼 고형물, 아밀로스; 분말화 셀룰로스, 탄산칼슘; 글리신, 카올린; 만니톨, 염화나트륨; 이노시톨, 벤토나이트 등을 포함한다.

[0299] "충전제"는 화합물 예컨대 락토스, 탄산칼슘, 인산칼슘, 이염기성 인산칼슘, 황산칼슘, 미세결정질 셀룰로스, 셀룰로스 분말, 덱스트로스, 덱스트레이트, 덱스트란, 전분, 전호화 전분, 수크로스, 크실리톨, 락티톨, 만니톨, 소르비톨, 염화나트륨, 폴리에틸렌 글리콜 등을 포함한다.

[0300] "윤활제"및 "활주제"는 물질의 부착 또는 마찰을 방지, 감소 또는 억제하는 화합물이다. 예시적인 윤활제는, 예를 들어, 스테아르산, 수산화칼슘, 활석, 소듐 스테아릴 푸마레이트, 탄화수소 예컨대 광유, 또는 수소첨가

식물성유 예컨대 수소첨가 대두유 (스테로텍스(Sterotex)®, 고 지방산 및 그의 알칼리-금속 및 알칼리 토금속 염, 예컨대 알루미늄, 칼슘, 마그네슘, 아연, 스테아르산, 소듐 스테아레이트, 글리세롤, 활석, 왁스, 스테아로웨트(Stearowet)® 붕산, 소듐 벤조에이트, 아세트산나트륨, 염화나트륨, 류신, 폴리에틸렌 글리콜 (예를 들어, PEG-4000) 또는 메톡시폴리에틸렌 글리콜 예컨대 카르보왁스™, 소듐 올레에이트, 소듐 벤조에이트, 글리세릴 베헤네이트, 폴리에틸렌 글리콜, 마그네슘 또는 소듐 라우릴 술페이트, 콜로이드성 실리카 예컨대 실로이드(Syloid)™, Cab-O-Sil®, 전분 예컨대 옥수수 전분, 실리콘유, 계면활성제 등을 포함한다.

[0301] "가소제"는 미세캡슐화 물질 또는 필름 코팅을 연질화하여 이들을 덜 취성으로 만들기 위해 사용되는 화합물이다. 적합한 가소제는, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 예컨대 PEG 300, PEG 400, PEG 600, PEG 1450, PEG 3350, 및 PEG 800, 스테아르산, 프로필렌 글리콜, 올레산, 트리에틸 셀룰로스 및 트리아세틴을 포함한다. 일부 실시양태에서, 가소제는 분산제 또는 습윤제로서 또한 기능한다.

[0302] "가용화제"는 화합물 예컨대 트리아세틴, 트리에틸시트레이트, 에틸 올레에이트, 에틸 카프릴레이트, 소듐 라우릴 술페이트, 소듐 독큐세이트, 비타민 E TPGS, 디메틸아세트아미드, N-메틸피롤리돈, N-히드록시에틸피롤리돈, 폴리비닐피롤리돈, 히드록시프로필메틸 셀룰로스, 히드록시프로필 시클로덱스트린, 에탄올, n-부탄올, 이소프로필 알콜, 콜레스테롤, 담즙염, 폴리에틸렌 글리콜 200-600, 글리코푸롤, 트랜스큐톨, 프로필렌 글리콜, 및 디메틸 이소소르비드 등을 포함한다.

[0303] "안정화제"는 화합물 예컨대 임의의 항산화제, 완충제, 산, 보존제 등을 포함한다.

[0304] "현탁화제"는 화합물 예컨대 폴리비닐피롤리돈, 예를 들어, 폴리비닐피롤리돈 K12, 폴리비닐피롤리돈 K17, 폴리비닐피롤리돈 K25, 또는 폴리비닐피롤리돈 K30, 비닐 피롤리돈/비닐 아세테이트 공중합체 (S630), 폴리에틸렌 글리콜 (예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜은 약 300 내지 약 6000, 또는 약 3350 또는 약 4000, 또는 약 7000 내지 약 5400의 분자량을 가질 수 있다), 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 메틸셀룰로스, 히드록시프로필메틸셀룰로스, 히드록시메틸셀룰로스 아세테이트 스테아레이트, 폴리소르베이트-80, 히드록시에틸셀룰로스, 알긴산나트륨, 검, 예컨대, 예를 들어, 트라가칸트 검 및 아카시아 검, 구아 검, 크산탄 (크산탄 검 포함), 당류, 셀룰로스 화합물, 예컨대, 예를 들어, 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 메틸셀룰로스, 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 히드록시프로필메틸셀룰로스, 히드록시에틸셀룰로스, 폴리소르베이트-80, 알긴산나트륨, 폴리에톡실화 소르비탄 모노라우레이트, 폴리에톡실화 소르비탄 모노라우레이트, 포비돈 등을 포함한다.

[0305] "계면활성제"는 화합물 예컨대 소듐 라우릴 술페이트, 소듐 도큐세이트, 트윈 60 또는 80, 트리아세틴, 비타민 E TPGS, 소르비탄 모노올레에이트, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레에이트, 폴리소르베이트, 폴락소머, 담즙염, 글리세릴 모노스테아레이트, 에틸렌 옥사이드와 프로필렌 옥사이드의 공중합체, 예를 들어, "플루로닉®" (바스프) 등을 포함한다. 일부 다른 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 지방산 글리세라이드 및 식물성유, 예를 들어, 폴리옥시에틸렌 (60) 수소첨가 피마자유; 및 폴리옥시에틸렌 알킬에테르 및 알킬페닐 에테르, 예를 들어, 옥톡시놀 10, 옥톡시놀 40을 포함한다. 일부 실시양태에서, 물리적 안전성을 증진시키거나 다른 목적으로 계면활성제를 포함시킬 수 있다.

[0306] "점도 증진제"는, 예를 들어, 메틸 셀룰로스, 크산탄 검, 카르복시메틸 셀룰로스, 히드록시프로필 셀룰로스, 히드록시프로필메틸 셀룰로스, 히드록시프로필메틸 셀룰로스 아세테이트 스테아레이트, 히드록시프로필메틸 셀룰로스 프탈레이트, 카르보머, 폴리비닐 알콜, 알기네이트, 아카시아, 키토산 및 그의 조합물을 포함한다.

[0307] "습윤제"는 화합물 예컨대 올레산, 글리세릴 모노스테아레이트, 소르비탄 모노올레에이트, 소르비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민 올레에이트, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레에이트, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레이트, 소듐 도큐세이트, 소듐 올레에이트, 소듐 라우릴 술페이트, 소듐 독큐세이트, 트리아세틴, 트윈 80, 비타민 E TPGS, 암모늄 염 등을 포함한다.

[0308] **키트(kit) 및 조성물**

[0309] 본 발명의 한 측면은 본 발명의 CD33-특이적 CAR을 코딩하는 코딩 영역을 포함하는 제1 벡터 그리고 임의로 안전성 이유로 포함된 유전자, 예를 들어, HER1t 또는 HER1t-1 및 그의 기능적 변이체, 또는 CD20 또는 CD20t-1, 및 그의 기능적 변이체를 포함하는 키트 및 조성물에 관한 것이다. 이들 키트 및 조성물은 각각이 상이한 단백질 또는 단백질의 하위집합을 코딩하는 다수의 벡터를 포함할 수 있다. 이러한 벡터는 바이러스성, 비-바이러스 성, 에피솜성, 또는 통합성일 수 있다. 일부 실시양태에서, 벡터는 트랜스포손, 예를 들어, 슬리핑 뷰티 트랜스포존이다.

[0310] 일부 실시양태에서, 키트 및 조성물은 벡터뿐만 아니라 세포 및 작용제 예컨대 인터류킨, 시토카인, 인터류킨

및 화학요법제, 아주반트, 습윤제, 또는 유화제도 포함한다. 한 실시양태에서 세포는 T 세포이다. 한 실시양태에서 키트 및 조성물은 IL-2를 포함한다. 한 실시양태에서, 키트 및 조성물은 IL-21을 포함한다. 한 실시양태에서, 키트 및 조성물은 Bcl-2, STAT3 또는 STAT5 억제제를 포함한다. 실시양태에서, 키트는 IL-15, 또는 mbIL-15를 포함한다.

[0311] 본원에는, 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 하나 이상의 방법으로 사용하기 위한 키트 및 제조 물품이 개시된다. 이러한 키트는 하나 이상의 용기 예컨대 바이알, 관(tube)을 수용하도록 구획화되는 담체, 패키지, 또는 용기를 포함하며, 용기 (들) 각각은 본원에 기재된 방법에서 사용되는 별개의 요소 중 하나를 포함한다. 적합한 용기는, 예를 들어, 병, 바이알, 주사기, 및 시험관을 포함한다. 한 실시양태에서, 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 여러 가지의 재료로부터 형성된다.

[0312] 본원에 제공된 제조 물품은 포장재를 함유한다. 약제 포장재의 예는 블리스터 팩, 병, 튜브, 백, 용기, 병, 및 선택된 제제 및 의도된 투여 및 치료 양식에 적합한 임의의 포장 재료를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0313] 예를 들어, 용기(들)는 CAR-T 세포 (예를 들어, 본원에 기재된 CD33-특이적 CAR-T 세포)를, 그리고 임의로 본원에 개시된 시토카인 및/또는 화학 요법과 함께, 포함한다. 이러한 키트는 본원에 기재된 방법에서 그의 사용과 관련된 식별 설명 또는 표지 또는 지침을 임의로 포함한다.

[0314] 키트는 내용물 및/또는 사용 지침을 열거하는 표지 및 사용 지침과 함께 패키지 삽입물을 전형적으로 포함한다. 일련의 지침이 또한 전형적으로 포함될 것이다.

[0315] 일부 실시양태에서, 표지가 용기 상에 있거나 용기와 회합되어 있다. 한 실시양태에서, 표지를 형성하는 문자, 숫자 또는 다른 캐릭터가 용기 자체에 부착, 성형 또는 에칭되는 경우 표지는 용기 상에 있으며; 표지가, 예를 들어, 패키지 삽입물로서, 용기를 또한 보유하고 있는 리셉터클 또는 담체 내에 제시되는 경우 표지는 용기와 회합된다. 한 실시양태에서, 내용물이 특정 치료 용도에 사용되어야 함을 나타내기 위해 표지가 사용된다. 라벨은 또한, 예컨대 본원에 기재된 방법에서 내용물의 사용에 관한 지시를 나타낸다.

[0316] **서열**

[0317] 표 2에는 본원에 제공된 실시양태에 포함된 특정 서열의 대표적인 목록이 제공되어 있다.

[0318] [표 2]

서열명	서열 번호	서열
hM195 VL (aa)	1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGKAPKL LIYAASNQGSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPDDFATYYCQQSKEVPW TFGQGTKVEIK
hM195 VL (nt)	2	Gacattcagatgacccagtctccgagctctctgtccgcatcagtaggagac agggtcaccatcacatgcagagccagcgaaagtgtcgacaattatggcatt agctttatgaactggttccaacagaaacccgggaaggctcctaagcttctg atttacgctgcatccaaccaaggctccggggtaccctctcgcttctcaggc agtggatctgggacagacttcactctcaccatttcatctctgcagcctgat gacttcgcaacctattactgtcagcaaagtaaggaggttccgtggacgttc ggtcaagggaccaaggtggagatcaaa
hM195 VH (aa)	3	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQGLEWIGY IYPYNGGTGYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGR PAMDYWGQGTLVTVSS
hM195 VH (nt)	4	Caggttcagctggtgcagtctggagctgaggtgaagaagcctgggagctca gtgaaggtttcctgcaaagcttctggctacaccttcactgactacaacatg cactgggtgaggcaggctcctggccaaggcctggaatggattggatatatt tatccttacaatggtggtaccggctacaaccagaagttcaagagcaaggcc acaattacagcagacgagagtactaacacagcctacatggaactctccagc ctgaggtctgaggacactgcagtctattactgcgcaagagggcgccccgct atggactactggggccaagggactctggtcactgtctcttca
(G4S)3 링커 (nt)	5	Ggtggcggtggctcgggcggtggtgggtcgggtggcggcggatct
(G4S)3 링커 (aa)	6	GGGGSGGGGSGGGGS
	7	Gacattcagatgacccagtctccgagctctctgtccgcatcagtaggagac agggtcaccatcacatgcagagccagcgaaagtgtcgacaattatggcatt

[0319]

[0320]

서열명	서열 번호	서열
링커를 가진 **hM195 scFv (nt)**		agctttatgaactggttccaacagaaacccgggaaggctcctaagcttctg atttacgctgcatccaaccaaggctccggggtaccctctcgcttctcaggc agtggatctgggacagacttcactctcaccatttcatctctgcagcctgat gacttcgcaacctattactgtcagcaaagtaaggaggttccgtggacgttc ggtcaagggaccaaggtggagatcaaaGgtggcggtggctcgggcggtggt gggtcgggtggcggcggatctcaggttcagctggtgcagtctggagctgag gtgaagaagcctgggagctcagtgaaggtttcctgcaaagcttctggctac accttcactgactacaacatgcactgggtgaggcaggctcctggccaaggc ctggaatggattggatatatttatccttacaatggtggtaccggctacaac cagaagttcaagagcaaggccacaattacagcagacgagagtactaacaca gcctacatggaactctccagcctgaggtctgaggacactgcagtctattac tgcgcaagagggcgccccgctatggactactggggccaagggactctggtc actgtctcttca
링커를 가진 **hM195 scFv** (aa)	8	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGKAPKL LIYAASNQGSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPDDFATYYCQQSKEVPW TFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGYTFTDYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIYPYNGGTGYNQKFKSKATITADE STNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRPAMDYWGQGTLVTVSS
M2H12 VH (aa)	9	QVQLQQSGPELVRPGTFVKISCKASGYTFTNYD INWVNQRPGQGLEWIGWIYPGDGSTKYNEKF KAKATLTADKSSSTAYLQLNNLTSENSAVYFCAS GYEDAMDYWGQGTSVTVSS
M2H12 VL (aa)	10	DIKMTQSPSSMYASLGERVIINCKASQDINSYLS WFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSG SGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGA GTKLELKR
DRB2 VH (aa)	11	EVKLQESGPELVKPGASVKMSCKASGYKFTDYV VHWLKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTKYNEKF KGKATLTSDKSSSTAYMEVSSLTSEDSAVYYCA

서열명	서열 번호	서열
		RDYRYEVYGMDYWGQGTSVTVSS
DRB2 VL (aa)	12	DIVLTQSPTIMSASPGERVTMTCTASSSVNYIH WYQQKSGDSPLRWIFDTSKVASGVPARFSGSG SGTSYSLTISTMEAEDAATYYCQQWRSYPLTFG DGTRLELKRADAAPTVS
My9-6 VH (aa)	13	QVQLQQPGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTS YYIHWIKQTPGQGLEWVGVIYPGNDDISYNQK FKGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYC AREVRLRYFDVWGAGTTVTVSS
My9-6 VL (aa)	14	NIMLTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVFFSS SQKNYLAWYQQIPGQSPKLLIYWASTRESGVP DRFTGSGSGTDFTLTISSVQSEDLAIYYCHQYLS SRTFGGGTKLEIKR
GM-CSFRa 신호 펩티드 (nt)	15	Atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgtgagctgccccaccccgcc tttctgctgatcccc
GM-CSFRa 신호 펩티드 (aa)	16	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP
CD8알파 TM (nt)	17	Atctacatctgggcccctctggccggcacctgtggcgtgctgctgctgagc ctggtcatcaccctgtactgcaaccaccggaat
CD8알파 TM (aa)	18	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN
CD28 TM (nt)	19	Ttttgggtgctggtggtggttggtggagtcctggcttgctatagcttgcta gtaacagtggcctttattattttctgggtg
CD28 TM (aa)	20	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV

[0321]

[0322]

서열명	서열 번호	서열
CD8알파 힌지 (nt)	21	Aagcccaccaccaccctgcccctagacctccaaccccagcccctacaatc gccagccagcccctgagcctgaggcccgaagcctgtagacctgccgctggc ggagccgtgcacaccagaggcctggatttcgcctgcgac
CD8알파 힌지 (aa)	22	KPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD
4-1BB 신호전달 도메인 (nt)	23	Aagagaggccggaagaaactgctgtacatcttcaagcagcccttcatgcgg cccgtgcagaccacccaggaagaggacggctgcagctgccggttccccgag gaagaggaaggcggctgcgaactg
4-1BB 신호전달 도메인 (aa)	24	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
CD3ζ 신호전달 도메인 (nt)	25	Cgggtgaagttcagccggagcgccgacgcccctgcctaccagcagggccag aaccagctgtacaacgagctgaacctgggccggagggaggagtacgacgtg ctggacaagcggagaggccgggaccctgagatgggcggcaagccccggaga aagaaccctcaggagggcctgtataacgaactgcagaaagacaagatggcc gaggcctacagcgagatcggcatgaagggcgagcggcggaggggcaagggc cacgacggcctgtaccagggcctgagcaccgccaccaaggatacctacgac gccctgcacatgcaggccctgcccccaga
CD3ζ 신호전달 도메인 (aa)	26	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR
CD28 신호전달 도메인 (nt)	27	Aggagcaagcggagcagaggcggccacagcgactacatgaacatgaccccc cggaggcctggccccacccggaagcactaccagccctacgcccctcccagg gacttcgccgcctaccggagc
CD28 신호전달 도메인	28	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS

[0323]

서열명	서열번호	서열
(aa)		
T2A (nt)	29	GAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCT
T2A (aa)	30	EGRGSLLTCGDVEENPGP
HER1t (nt)	31	Cgcaaagtgtgtaacggaataggtattggtgaatttaaagactcactctccataaatgctacgaatattaaacacttcaaaaactgcacctccatcagtggcgatctccacatcctgccggtggcatttaggggtgactccttcacacatactcctcctctggatccacaggaactggatattctgaaaaccgtaaaggaaatcacagggtttttgctgattcaggcttggcctgaaaacaggacggacctccatgcctttgagaacctagaaatcatacgcggcaggaccaagcaacatggtcagttttctcttgcagtcgtcagcctgaacataacatccttgggattacgctcctctcaaggagataagtgatggagatgtgataatttcaggaaacaaaaatttgtgctatgcaaatacaataaactggaaaaaactgtttgggacctccggtcagaaaaccaaaattataagcaacagaggtgaaaacagctgcaaggccacaggccaggtctgccatgccttgtgctcccccgagggctgctggggcccggagcccagggactgcgtctcttgccggaatgtcagccgaggcagggaatgcgtggacaagtgcaaccttctggagggtgagccaagggagtttgtggagaactctgagtgcatacagtgccacccagagtgcctgcctcaggccatgaacatcacctgcacaggacggggaccagacaactgtatccagtgtgcccactacattgacggccccactgcgtcaagacctgcccggcaggagtcatgggagaaaacaacacctctggtctggaagtacgcagacgccggccatgtgtgccacctgtgccatccaaactgcacctacggatgcactgggccaggtcttgaaggctgtccaacgaatgggcctaagatcccgtccatcgccactgggatggtgggggccctcctcttgctgctggtggtggccctggggatcggcctcttcatg
HER1t (aa)	32	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM

서열명	서열 번호	서열
IgK 신호 펩티드 (nt)	33	Atgaggctccctgctcagctcctggggctgctaatgctctgggtcccagga tccagtggg
IgK 신호 펩티드 (aa)	34	MRLPAQLLGLLMLWVPGSSG
FL CD20 (nt)	35	Atgacaacacccagaaattcagtaaatgggactttcccggcagagccaatg aaaggccctattgctatgcaatctggtccaaaaccactcttcaggaggatg tcttcactggtgggccccacgcaaagcttcttcatgagggaatctaagact ttgggggctgtccagattatgaatgggctcttccacattgccctgggggt cttctgatgatcccagcagggatctatgcacccatctgtgtgactgtgtgg taccctctctggggaggcattatgtatattatttccggatcactcctggca gcaacggagaaaaactccaggaagtgtttggtcaaaggaaaaatgataatg aattcattgagcctctttgctgccatttctggaatgattctttcaatcatg gacatacttaatattaaaatttcccatttttttaaaaatggagagtctgaat tttattagagctcacacaccatatattaacatatacaactgtgaaccagct aatccctctgagaaaaactccccatctacccaatactgttacagcatacaa tctctgttcttgggcattttgtcagtgatgctgatctttgccttcttccag gaacttgtaatagctggcatcgttgagaatgaatggaaaagaacgtgctcc agacccaaatctaacatagttctcctgtcagcagaagaaaaaaaagaacag actattgaaataaaagaagaagtggttgggctaactgaaacatcttcccaa ccaaagaatgaagaagacattgaaattattccaatccaagaagaggaagaa gaagaaacagagacgaactttccagaacctccccaagatcaggaatcctca ccaatagaaaatgacagctctcct
FL CD20 (aa)	36	MTTPRNSVNGTFPAEPMKGPIAMQSGPKPLFRRMSSLVGPTQSFFMRESK TLGAVQIMNGLFHIALGGLLMIPAGIYAPICVTVWYPLWGGIMYIISGSL LAATEKNSRKCLVKGKMIMNSLSLFAAISGMILSIMDILNIKISHFLKME SLNFIRAHTPYINIYNCEPANPSEKNSPSTQYCYSIQSLFLGILSVMLIF AFFQELVIAGIVENEWKRTCSRPKSNIVLLSAEEKKEQTIEIKEEVVGLT ETSSQPKNEEDIEIIPIQEEEEEETETNFPEPPQDQESSPIENDSSP
mbIL-15 (aa)	37	MDWTWILFLVAAATRVHSNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHP SCKVTAMKC FLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEE

[0324]

서열명	서열 번호	서열
		KNIKEFLQS FVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITCPPPMSVEHAD IWVKSYSLY SRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQR PAPPSTVTT AGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSKSPSTGTT EISSHESSH GTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSL LACYLKSRQ TPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDLENCSHHL
hM195scFv-CD8a-CD28m-Z	38	atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgtgagctgccccaccccgcc tttctgctgatcccgacattcagatgacccagtctccgagctctctgtcc gcatcagtaggagacagggtcaccatcacatgcagagccagcgaaagtgtc gacaattatggcattagctttatgaactggttccaacagaaacccgggaag gctcctaagcttctgatttacgctgcatccaaccaaggctccggggtaccc tctcgcttctcaggcagtggatctgggacagacttcactctcaccatttca tctctgcagcctgatgacttcgcaacctattactgtcagcaaagtaaggag gttccgtggacgttcggtcaagggaccaaggtggagatcaaaggtggcggt ggctcgggcggtggtgggtcgggtggcggcggatctcaggttcagctggtg cagtctggagctgaggtgaagaagcctgggagctcagtgaaggtttcctgc aaagcttctggctacaccttcactgactacaacatgcactgggtgaggcag gctcctggccaaggcctggaatggattggatatatttatccttacaatggt ggtaccggctacaaccagaagttcaagagcaaggccacaattacagcagac gagagtactaacacagcctacatggaactctccagcctgaggtctgaggac actgcagtctattactgcgcaagagggcgccccgctatggactactggggc caagggactctggtcactgtctcttcaaagcccaccaccacccctgcccct agacctccaaccccagccctacaatcgccagccagcccctgagcctgagg cccgaagcctgtagacctgccgctggcggagccgtgcacaccagaggcctg gatttcgcctgcgacatctacatctgggcccctctggccggcacctgtggc gtgctgctgctgagcctggtcatcaccctgtactgcaaccaccggaatagg agcaagcggagcagaggcggccacagcgactacatgaacatgacccccgg aggcctggccccacccggaagcactaccagccctacgcccctcccagggac ttcgccgcctaccggagccgggtgaagttcagccggagcgccgacgcccct gcctaccagcagggccagaaccagctgtacaacgagctgaacctgggccgg agggaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggccgggaccctgagatg ggcggcaagccccggagaaagaaccctcaggagggcctgtataacgaactg cagaaagacaagatggccgaggcctacagcgagatcggcatgaagggcgag cggcggaggggcaagggccacgacggcctgtaccagggcctgagcaccgcc accaaggatacctacgacgccctgcacatgcaggccctgcccccaga
hM195scFv-CD8a-	39	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASES VDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQGSGVPSRFSGSGSGTDFTLT

[0325]

서열명	서열 번호	서열
CD28m-Z		ISSLQPDDFATYYCQQSKEVPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQV QLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIY PYNGGTGYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRPA MDYWGQGTLVTVSSKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRGGHSD YMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQL YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
hM195scFv-CD8a-Z	40	atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgtgagctgccccaccccgcc tttctgctgatcccgacattcagatgacccagtctccgagctctctgtcc gcatcagtaggagacagggtcaccatcacatgcagagccagcgaaagtgtc gacaattatggcattagctttatgaactggttccaacagaaacccgggaag gctcctaagcttctgatttacgctgcatccaaccaaggctccggggtaccc tctcgcttctcaggcagtggatctgggacagacttcactctcaccatttca tctctgcagcctgatgacttcgcaacctattactgtcagcaaagtaaggag gttccgtggacgttcggtcaagggaccaaggtggagatcaaaggtggcggt ggctcgggcggtggtgggtcgggtggcggcggatctcaggttcagctggtg cagtctggagctgaggtgaagaagcctgggagctcagtgaaggtttcctgc aaagcttctggctacaccttcactgactacaacatgcactgggtgaggcag gctcctggccaaggcctggaatggattggatatatttatccttacaatggt ggtaccggctacaaccagaagttcaagagcaaggccacaattacagcagac gagagtactaacacagcctacatggaactctccagcctgaggtctgaggac actgcagtctattactgcgcaagagggcgccccgctatggactactggggc caagggactctggtcactgtctcttcaaagcccaccaccaccctgcccct agacctccaaccccagccccctacaatcgccagccagccccctgagcctgagg cccgaagcctgtagacctgccgctggcggagccgtgcacaccagaggcctg gatttcgcctgcgacatctacatctgggcccctctggccggcacctgtggc gtgctgctgctgagcctggtcatcaccctgtactgcaaccaccggaatcgg gtgaagttcagccggagcgccgacgcccctgcctaccagcagggccagaac cagctgtacaacgagctgaacctgggccggagggaggagtacgacgtgctg gacaagcggagaggccgggaccctgagatgggcggcaagccccggagaaag aaccctcaggagggcctgtataacgaactgcagaaagacaagatggccgag gcctacagcgagatcggcatgaagggcgagcggcggaggggcaagggccac gacggcctgtaccagggcctgagcaccgccaccaaggatacctacgacgcc ctgcacatgcaggccctgcccccaga
hM195scFv-CD8a-Z	41	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASES VDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQGSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPDDFATYYCQQSKEVPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQV QLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIY PYNGGTGYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRPA

[0326]

서열명	서열 번호	서열
		MDYWGQGTLVTVSSKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRVKFSRSADAP AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP R
hM195scFv-CD8a-CD28m-Z-T2A-GM-CSFRasp.HER1t	42	ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGTGAGCTGCCCCACCCCGCC TTTCTGCTGATCCCCGACATTCAGATGACCCAGTCTCCGAGCTCTCTGTCC GCATCAGTAGGAGACAGGGTCACCATCACATGCAGAGCCAGCGAAAGTGTC GACAATTATGGCATTAGCTTTATGAACTGGTTCCAACAGAAACCCGGGAAG GCTCCTAAGCTTCTGATTTACGCTGCATCCAACCAAGGCTCCGGGGTACCC TCTCGCTTCTCAGGCAGTGGATCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATTTCA TCTCTGCAGCCTGATGACTTCGCAACCTATTACTGTCAGCAAAGTAAGGAG GTTCCGTGGACGTTCGGTCAAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAGGTGGCGGT GGCTCGGGCGGTGGTGGGTCGGGTGGCGGCGGATCTCAGGTTCAGCTGGTG CAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGAGCTCAGTGAAGGTTTCCTGC AAAGCTTCTGGCTACACCTTCACTGACTACAACATGCACTGGGTGAGGCAG GCTCCTGGCCAAGGCCTGGAATGGATTGGATATATTTATCCTTACAATGGT GGTACCGGCTACAACCAGAAGTTCAAGAGCAAGGCCACAATTACAGCAGAC GAGAGTACTAACACAGCCTACATGGAACTCTCCAGCCTGAGGTCTGAGGAC ACTGCAGTCTATTACTGCGCAAGAGGGCGCCCCGCTATGGACTACTGGGGC CAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCAAAGCCCACCACCACCCCTGCCCCT AGACCTCCAACCCCAGCCCCTACAATCGCCAGCCAGCCCCTGAGCCTGAGG CCCGAAGCCTGTAGACCTGCCGCTGGCGGAGCCGTGCACACCAGAGGCCTG GATTTCGCCTGCGACATCTACATCTGGGCCCCTCTGGCCGGCACCTGTGGC GTGCTGCTGCTGAGCCTGGTCATCACCCTGTACTGCAACCACCGGAATAGG AGCAAGCGGAGCAGAGGCGGCCACAGCGACTACATGAACATGACCCCCCGG AGGCCTGGCCCCACCCGGAAGCACTACCAGCCCTACGCCCCTCCCAGGGAC TTCGCCGCCTACCGGAGCCGGGTGAAGTTCAGCCGGAGCGCCGACGCCCCT GCCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCCGG AGGGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGCCGGGACCCTGAGATG GGCGGCAAGCCCCGGAGAAAGAACCCTCAGGAGGGCCTGTATAACGAACTG CAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAG CGGCGGAGGGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCC ACCAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCCAGACTC GAGGGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAG GAGAATCCCGGCCCTAGGATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGT GAGTTACCACACCCAGCATTCCTCCTGATCCCACGCAAAGTGTGTAACGGA ATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTCACTCTCCATAAATGCTACGAATATT AAACACTTCAAAAACTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCACATCCTGCCG GTGGCATTTAGGGGTGACTCCTTCACACATACTCCTCCTCTGGATCCACAG GAACTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTTTTGCTGATT CAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCTTTGAGAACCTAGAA

[0327]

서열명	서열 번호	서열
		ATCATACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTGCAGTCGTC AGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGAT GGAGATGTGATAATTTCAGGAAACAAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATA AACTGGAAAAAACTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAAATTATAAGC AACAGAGGTGAAAACAGCTGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTG TGCTCCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCGGAGCCCAGGGACTGCGTCTCTTGC CGGAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGTGGACAAGTGCAACCTTCTGGAG GGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCATACAGTGCCACCCA GAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGGGGACCAGAC AACTGTATCCAGTGTGCCCACTACATTGACGGCCCCCACTGCGTCAAGACC TGCCCGGCAGGAGTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGCA GACGCCGGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAAACTGCACCTACGGATGC ACTGGGCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCAACGAATGGGCCTAAGATCCCGTCC ATCGCCACTGGGATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCCCTG GGGATCGGCCTCTTCATG
hM195scFv-CD8a-CD28m-Z-T2A-GM-CSFRasp.HER1t	43	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASES VDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQGSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPDDFATYYCQQSKEVPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQV QLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIY PYNGGTGYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRPA MDYWGQGTLVTVSSKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRGGHSD YMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQL YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRLEGGGEGR GSLLTCGDVEENPGPRMLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEF KDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDIL KTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNI TSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRG ENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGE PREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTC

[0328]

[0329]

서열명	서열 번호	서열
		PAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIPS IATGMVGALLLLLVVALGIGLFM
hM195scFv	44	Atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgtgagctgccccaccccgcc tttctgctgatccccgacattcagatgacccagtctccgagctctctgtcc gcatcagtaggagacagggtcaccatcacatgcagagccagcgaaagtgtc gacaattatggcattagctttatgaactggttccaacagaaacccgggaag gctcctaagcttctgatttacgctgcatccaaccaaggctccggggtaccc tctcgcttctcaggcagtggatctgggacagacttcactctcaccatttca tctctgcagcctgatgacttcgcaacctattactgtcagcaaagtaaggag gttccgtggacgttcggtcaagggaccaaggtggagatcaaaggtggcggt ggctcgggcggtggtgggtcgggtggcggcggatctcaggttcagctggtg cagtctggagctgaggtgaagaagcctgggagctcagtgaaggtttcctgc aaagcttctggctacaccttcactgactacaacatgcactgggtgaggcag gctcctggccaaggcctggaatggattggatatatttatccttacaatggt ggtaccggctacaaccagaagttcaagagcaaggccacaattacagcagac gagagtactaacacagcctacatggaactctccagcctgaggtctgaggac actgcagtctattactgcgcaagagggcgccccgctatggactactggggc caagggactctggtcactgtctcttca
hM195scFv	45	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASES VDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQGSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPDDFATYYCQQSKEVPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQV QLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIY PYNGGTGYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRPA MDYWGQGTLVTVSS
hM195scFv-CD8a-4-1BB-Z	46	atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgtgagctgccccaccccgcc tttctgctgatccccgacattcagatgacccagtctccgagctctctgtcc gcatcagtaggagacagggtcaccatcacatgcagagccagcgaaagtgtc gacaattatggcattagctttatgaactggttccaacagaaacccgggaag gctcctaagcttctgatttacgctgcatccaaccaaggctccggggtaccc tctcgcttctcaggcagtggatctgggacagacttcactctcaccatttca tctctgcagcctgatgacttcgcaacctattactgtcagcaaagtaaggag gttccgtggacgttcggtcaagggaccaaggtggagatcaaaggtggcggt ggctcgggcggtggtgggtcgggtggcggcggatctcaggttcagctggtg cagtctggagctgaggtgaagaagcctgggagctcagtgaaggtttcctgc

서열명	서열 번호	서열
		aaagcttctggctacaccttcactgactacaacatgcactgggtgaggcag gctcctggccaaggcctggaatggattggatatatttatccttacaatggt ggtaccggctacaaccagaagttcaagagcaaggccacaattacagcagac gagagtactaacacagcctacatggaactctccagcctgaggtctgaggac actgcagtctattactgcgcaagagggcgccccgctatggactactggggc caagggactctggtcactgtctcttcaaagcccaccaccacccctgcccct agacctccaaccccagcccctacaatcgccagccagcccctgagcctgagg cccgaagcctgtagacctgccgctggcggagccgtgcacaccagaggcctg gatttcgcctgcgacatctacatctgggcccctctggccggcacctgtggc gtgctgctgctgagcctggtcatcaccctgtactgcaaccaccggaataag agaggccggaagaaactgctgtacatcttcaagcagcccttcatgcggccc gtgcagaccacccaggaagaggacggctgcagctgccggttccccgaggaa gaggaaggcggctgcgaactgcgggtgaagttcagccggagcgccgacgcc cctgcctaccagcagggccagaaccagctgtacaacgagctgaacctgggc cggagggaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggccgggaccctgag atgggcggcaagccccggagaaagaaccctcaggagggcctgtataacgaa ctgcagaaagacaagatggccgaggcctacagcgagatcggcatgaagggc gagcggcggaggggcaagggccacgacggcctgtaccagggcctgagcacc gccaccaaggatacctacgacgccctgcacatgcaggccctgcccccaga
hM195scFv-CD8a-4-1BB-Z	47	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASES VDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQGSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPDDFATYYCQQSKEVPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQV QLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIY PYNGGTGYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRPA MDYWGQGTLVTVSSKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNKRGRKKLLYIF KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQ LYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
hM195scFv-CD8a-4-1BB-Z-T2A-GM-CSFRasp.HER1t	48	atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgtgagctgccccaccccgcc tttctgctgatccccgacattcagatgacccagtctccgagctctctgtcc gcatcagtaggagacagggtcaccatcacatgcagagccagcgaaagtgtc gacaattatggcattagctttatgaactggttccaacagaaacccgggaag gctcctaagcttctgatttacgctgcatccaaccaaggctccggggtaccc tctcgcttctcaggcagtggatctgggacagacttcactctcaccatttca tctctgcagcctgatgacttcgcaacctattactgtcagcaaagtaaggag gttccgtggacgttcggtcaagggaccaaggtggagatcaaaggtggcggt ggctcgggcggtggtgggtcgggtggcggcggatctcaggttcagctggtg cagtctggagctgaggtgaagaagcctgggagctcagtgaaggtttcctgc aaagcttctggctacaccttcactgactacaacatgcactgggtgaggcag gctcctggccaaggcctggaatggattggatatatttatccttacaatggt

[0330]

[0331]

서열명	서열 번호	서열
		ggtaccggctacaaccagaagttcaagagcaaggccacaattacagcagac gagagtactaacacagcctacatggaactctccagcctgaggtctgaggac actgcagtctattactgcgcaagagggcgccccgctatggactactggggc caagggactctggtcactgtctcttcaaagcccaccaccacccctgcccct agacctccaaccccagcccctacaatcgccagccagcccctgagcctgagg cccgaagcctgtagacctgccgctggcggagccgtgcacaccagaggcctg gatttcgcctgcgacatctacatctgggcccctctggccggcacctgtggc gtgctgctgctgagcctggtcatcaccctgtactgcaaccaccggaataag agaggccggaagaaactgctgtacatcttcaagcagcccttcatgcggccc gtgcagaccacccaggaagaggacggctgcagctgccggttccccgaggaa gaggaaggcggctgcgaactgcgggtgaagttcagccggagcgccgacgcc cctgcctaccagcagggccagaaccagctgtacaacgagctgaacctgggc cggagggaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggccgggaccctgag atgggcggcaagccccggagaaagaaccctcaggagggcctgtataacgaa ctgcagaaagacaagatggccgaggcctacagcgagatcggcatgaagggc gagcggcggaggggcaagggccacgacggcctgtaccagggcctgagcacc gccaccaaggatacctacgacgccctgcacatgcaggccctgcccccaga ctcgagggcggcggagagggcagaggaagtcttctaacatgcggtgacgtg gaggagaatcccggccctaggatgcttctcctggtgacaagccttctgctc tgtgagttaccacacccagcattcctcctgatcccacgcaaagtgtgtaac ggaataggtattggtgaatttaaagactcactctccataaatgctacgaat attaaacacttcaaaaactgcacctccatcagtggcgatctccacatcctg ccggtggcatttaggggtgactccttcacacatactcctcctctggatcca caggaactggatattctgaaaaccgtaaaggaaatcacagggtttttgctg attcaggcttggcctgaaaacaggacggacctccatgcctttgagaaccta gaaatcatacgcggcaggaccaagcaacatggtcagttttctcttgcagtc gtcagcctgaacataacatccttgggattacgctccctcaaggagataagt gatggagatgtgataatttcaggaaacaaaaatttgtgctatgcaaataca ataaactggaaaaaactgtttgggacctccggtcagaaaaccaaaattata agcaacagaggtgaaaacagctgcaaggccacaggccaggtctgccatgcc ttgtgctcccccgagggctgctggggcccggagcccagggactgcgtctct tgccggaatgtcagccgaggcagggaatgcgtggacaagtgcaaccttctg gagggtgagccaagggagtttgtggagaactctgagtgcatacagtgccac ccagagtgcctgcctcaggccatgaacatcacctgcacaggacggggacca gacaactgtatccagtgtgcccactacattgacggcccccactgcgtcaag acctgcccggcaggagtcatgggagaaaacaacaccctggtctggaagtac gcagacgccggccatgtgtgccacctgtgccatccaaactgcacctacgga tgcactgggccaggtcttgaaggctgtccaacgaatgggcctaagatcccg tccatcgccactgggatggtgggggccctcctcttgctgctggtggtggcc ctggggatcggcctcttcatg
hM195scFv-CD8a-4-1BB-Z-T2A-GM-	49	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASES VDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQGSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPDDFATYYCQQSKEVPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQV QLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIY PYNGGTGYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRPA

서열명	서열 번호	서열
CSFRasp.HER1t		MDYWGQGTLVTVSSKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNKRGRKKLLYIF KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQ LYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRLEGGGEG RGSLLTCGDVEENPGPRMLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGE FKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDI LKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLN ITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNR GENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEG EPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKT CPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIP SIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM
hM195scFv-CD8a-4-1BB-Z-T2A.FL CD20	50	ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGTGAGCTGCCCCACCCCGCC TTTCTGCTGATCCCCGACATTCAGATGACCCAGTCTCCGAGCTCTCTGTCC GCATCAGTAGGAGACAGGGTCACCATCACATGCAGAGCCAGCGAAAGTGTC GACAATTATGGCATTAGCTTTATGAACTGGTTCCAACAGAAACCCGGGAAG GCTCCTAAGCTTCTGATTTACGCTGCATCCAACCAAGGCTCCGGGGTACCC TCTCGCTTCTCAGGCAGTGGATCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATTTCA TCTCTGCAGCCTGATGACTTCGCAACCTATTACTGTCAGCAAAGTAAGGAG GTTCCGTGGACGTTCGGTCAAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAGGTGGCGGT GGCTCGGGCGGTGGTGGGTCGGGTGGCGGCGGATCTCAGGTTCAGCTGGTG CAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGAGCTCAGTGAAGGTTTCCTGC AAAGCTTCTGGCTACACCTTCACTGACTACAACATGCACTGGGTGAGGCAG GCTCCTGGCCAAGGCCTGGAATGGATTGGATATATTTATCCTTACAATGGT GGTACCGGCTACAACCAGAAGTTCAAGAGCAAGGCCACAATTACAGCAGAC GAGAGTACTAACACAGCCTACATGGAACTCTCCAGCCTGAGGTCTGAGGAC ACTGCAGTCTATTACTGCGCAAGAGGGCGCCCCGCTATGGACTACTGGGGC CAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCAAAGCCCACCACCACCCCTGCCCCT AGACCTCCAACCCCAGCCCCTACAATCGCCAGCCAGCCCCTGAGCCTGAGG CCCGAAGCCTGTAGACCTGCCGCTGGCGGAGCCGTGCACACCAGAGGCCTG GATTTCGCCTGCGACATCTACATCTGGGCCCCTCTGGCCGGCACCTGTGGC GTGCTGCTGCTGAGCCTGGTCATCACCCTGTACTGCAACCACCGGAATAAG AGAGGCCGGAAGAAACTGCTGTACATCTTCAAGCAGCCCTTCATGCGGCCC GTGCAGACCACCCAGGAAGAGGACGGCTGCAGCTGCCGGTTCCCCGAGGAA GAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGGGTGAAGTTCAGCCGGAGCGCCGACGCC CCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGC CGGAGGGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGCCGGGACCCTGAG ATGGGCGGCAAGCCCCGGAGAAAGAACCCTCAGGAGGGCCTGTATAACGAA CTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGC GAGCGGCGGAGGGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACC GCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCCAGA CTCGAGGGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTG GAGGAGAATCCCGGCCCTAGGATGACAACACCCAGAAATTCAGTAAATGGG

[0332]

[0333]

서열명	서열 번호	서열
		ACTTTCCCGGCAGAGCCAATGAAAGGCCCTATTGCTATGCAATCTGGTCCA AAACCACTCTTCAGGAGGATGTCTTCACTGGTGGGCCCCACGCAAAGCTTC TTCATGAGGGAATCTAAGACTTTGGGGGCTGTCCAGATTATGAATGGGCTC TTCCACATTGCCCTGGGGGGTCTTCTGATGATCCCAGCAGGGATCTATGCA CCCATCTGTGTGACTGTGTGGTACCCTCTCTGGGGAGGCATTATGTATATT ATTTCCGGATCACTCCTGGCAGCAACGGAGAAAAACTCCAGGAAGTGTTTG GTCAAAGGAAAAATGATAATGAATTCATTGAGCCTCTTTGCTGCCATTTCT GGAATGATTCTTTCAATCATGGACATACTTAATATTAAAATTTCCCATTTT TTAAAAATGGAGAGTCTGAATTTTATTAGAGCTCACACACCATATATTAAC ATATACAACTGTGAACCAGCTAATCCCTCTGAGAAAAACTCCCCATCTACC CAATACTGTTACAGCATACAATCTCTGTTCTTGGGCATTTTGTCAGTGATG CTGATCTTTGCCTTCTTCCAGGAACTTGTAATAGCTGGCATCGTTGAGAAT GAATGGAAAAGAACGTGCTCCAGACCCAAATCTAACATAGTTCTCCTGTCA GCAGAAGAAAAAAAAGAACAGACTATTGAAATAAAAGAAGAAGTGGTTGGG CTAACTGAAACATCTTCCCAACCAAAGAATGAAGAAGACATTGAAATTATT CCAATCCAAGAAGAGGAAGAAGAAGAAACAGAGACGAACTTTCCAGAACCT CCCCAAGATCAGGAATCCTCACCAATAGAAAATGACAGCTCTCCT
hM195scFv-CD8a-4-1BB-Z-T2A.FL CD20	51	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASES VDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQGSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPDDFATYYCQQSKEVPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQV QLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIY PYNGGTGYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRPA MDYWGQGTLVTVSSKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNKRGRKKLLYIF KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQ LYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRLEGGGEG RGSLLTCGDVEENPGPRMTTPRNSVNGTFPAEPMKGPIAMQSGPKPLFR RMSSLVGPTQSFFMRESKTLGAVQIMNGLFHIALGGLLMIPAGIYAPICV TVWYPLWGGIMYIISGSLLAATEKNSRKCLVKGKMIMNSLSLFAAISGMI LSIMDILNIKISHFLKMESLNFIRAHTPYINIYNCEPANPSEKNSPSTQY CYSIQSLFLGILSVMLIFAFFQELVIAGIVENEWKRTCSRPKSNIVLLSA EEKKEQTIEIKEEVVGLTETSSQPKNEEDIEIIPIQEEEEEETETNFPEP PQDQESSPIENDSSP
인간 CD33(M1-R287)	52	Atgccgctgctgctactgctgcccctgctgtgggcaggggccctggctatg gatccaaatttctggctgcaagtgcaggagtcagtgacggtacaggagggt ttgtgcgtcctcgtgccctgcactttcttccatcccataccctactacgac aagaactccccagttcatggttactggttccgggaaggagccattatatcc agggactctccagtggccacaaacaagctagatcaagaagtacaggaggag actcagggcagattccgcctccttggggatcccagtaggaacaactgctcc ctgagcatcgtagacgccaggaggagggataatggttcatacttctttcgg

[0334]

서열명	서열 번호	서열
		atggagagaggaagtaccaaatacagttacaaatctccccagctctctgtg catgtgacagacttgacccacaggcccaaaatcctcatccctggcactcta gaacccggccactccaaaaacctgacctgctctgtgtcctgggcctgtgag cagggaacacccccgatcttctcctggttgtcagctgcccccacctccctg ggccccaggactactcactcctcggtgctcataatcaccccacggccccag gaccacggcaccaacctgacctgtcaggtgaagttcgctggagctggtgtg actacggagagaaccatccagctcaacgtcacctatgttccacagaaccca acaactggtatctttccaggagatggctcagggaaacaagagaccagagca ggagtggttcatggggccattggaggagctggtgttacagccctgctcgct ctttgtctctgcctcatcttcttcatagtgaagacccacaggagg
인간 CD33(M1-R287)	53	MPLLLLLPLLWAGALAMDPNFWLQVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHPIPYY DKNSPVHGYWFREGAIISRDSPVATNKLDQEVQEETQGRFRLLGDPSRNN CSLSIVDARRRDNGSYFFRMERGSTKYSYKSPQLSVHVTDLTHRPKILIP GTLEPGHSKNLTCSVSWACEQGTPPIFSWLSAAPTSLGPRTTHSSVLIIT PRPQDHGTNLTCQVKFAGAGVTTERTIQLNVTYVPQNPTTGIFPGDGSGK QETRAGVVHGAIGGAGVTALLALCLCLIFFIVKTHRR
HER1t- 1	54	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTH TPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQH GQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGT SGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRS
HER1t-1	55	cgcaaagtgtgtaacggaataggtattggtgaatttaaagactcactctcc ataaatgctacgaatattaaacacttcaaaaactgcacctccatcagtggc gatctccacatcctgccggtggcatttaggggtgactccttcacacatact cctcctctggatccacaggaactggatattctgaaaaccgtaaaggaaatc acagggtttttgctgattcaggcttggcctgaaaacaggacggacctccat gcctttgagaacctagaaatcatacgcggcaggaccaagcaacatggtcag ttttctcttgcagtcgtcagcctgaacataacatccttgggattacgctcc ctcaaggagataagtgatggagatgtgataatttcaggaaacaaaaatttg tgctatgcaaatacaataaactggaaaaaactgtttgggacctccggtcag aaaaccaaaattataagcaacagaggtgaaaacagctgcaaggccacaggc caggtctgccatgccttgtgctcccccgagggctgctggggcccggagccc agggactgcgtctctggtggcggtggctcgggcggtggtgggtcgggtggc ggcggatctggtggcggtggctcgttttgggtgctggtggtggttggtgga gtcctggcttgctatagcttgctagtaacagtggcctttattattttctgg gtgaggagtaagaggagc
CD20t-1	56	MTTPRNSVNGTFPAEPMKGPIAMQSGPKPLFRRMSSLVGPTQSFFMRESK TLGAVQIMNGLFHIALGGLLMIPAGIYAPICVTVWYPLWGGIMYIISGSL LAATEKNSRKCLVKGKMIMNSLSLFAAISGMILSIMDILNIKISHFLKME SLNFIRAHTPYINIYNCEPANPSEKNSPSTQYCYSIQSLFLGILSVMLIF AFFQELVIAGIVENEWKRTCSRPKSNIVLLSAEEKKEQTIEIKEEVVGLT ETSSQPKNEEDIE

서열명	서열 번호	서열
Cd20t-1	57	atgaccacaccacggaactctgtgaatggcaccttcccagcagagccaatg aagggaccaatcgcaatgcagagcggacccaagcctctgtttcggagaatg agctccctggtgggcccaacccagtccttctttatgagagagtctaagaca ctgggcgccgtgcagatcatgaacggactgttccacatcgccctgggagga ctgctgatgatcccagccggcatctacgcccctatctgcgtgaccgtgtgg taccctctgtggggcggcatcatgtatatcatctccggctctctgctggcc gccacagagaagaacagcaggaagtgtctggtgaagggcaagatgatcatg aatagcctgtccctgtttgccgccatctctggcatgatcctgagcatcatg gacatcctgaacatcaagatcagccacttcctgaagatggagagcctgaac ttcatcagagcccacacccctacatcaacatctataattgcgagcctgcc aacccatccgagaagaattctccaagcacacagtactgttattccatccag tctctgttcctgggcatcctgtctgtgatgctgatctttgccttctttcag gagctggtcatcgccggcatcgtggagaacgagtggaagaggacctgcagc cgccccaagtccaatatcgtgctgctgtccgccgaggagaagaaggagcag acaatcgagatcaaggaggaggtggtgggcctgaccgagacatctagccag cctaagaatgaggaggatatcgag
DNAX-활성화 단백질 10 (DAP 10) 신호전달 도메인	58	ctgtgcgcacgcccacgccgcagccccgcccaagaagatggcaaagtctac atcaacatgccaggcaggggc
DNAX-활성화 단백질 10 (DAP 10) 신호전달 도메인	59	LCARPRRSPAQEDGKVYINMPGRG
DNAX-활성화 단백질 12 (DAP 12) 신호전달 도메인	60	tacttcctgggccggctggtccctcgggggcgaggggctgcggaggcagcg acccggaaacagcgtatcactgagaccgagtcgccttatcaggagctccag ggtcagaggtcggatgtctacagcgacctcaacacacagaggccgtattac aaa
DNAX-활성화 단백질 12 (DAP 12) 신호전달 도메인	61	YFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYY K

[0335]

[0336] **실시예**

[0337] 이들 실시예는 단지 실례가 되는 목적으로만 제공되는 것이며 본원에 제공된 청구범위의 범위를 제한하기 위해 제공되는 것이 아니다.

[0338] **실시예 1**

[0339] 렌티바이러스 벡터를 통한 CD33 CAR의 전달. CD33 CAR 렌티바이러스 벡터를 HIV-1 유래 벡터 주쇄를 기반으로 하여 구축하였다. HER1t 유전자는 인-프레임 자기-절단 토세아 아시그나 바이러스 2A 펩티드 (T2A)를 통해 3' 말단에서 CD33 CAR에 유전자 융합시켰다. 유전자 둘 다를 하기 기재된 바와 같이 pFUGW 렌티바이러스 플라스미드 주쇄로 클로닝하였다.

[0340] CD33 CAR 렌티바이러스의 경우, VSV-G (수포성 구내염 바이러스 (VSV-G)의 당 단백질)를 HIV-1 외피 단백질의 대체물로 사용하여 벡터 안정성, 표적 세포 향성(tropism), 및 형질도입 효율을 개선시켰다 (Cronin, J., Zhang, X. & Reiser, J., Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping, *Curr Gene Ther*, 5(4):387-98 (2005)).

[0341] 생성 동안에, CD33 CAR 바이러스 입자는 어셈블리되고, 형질감염된 HEK293T 세포의 표면으로부터 출아(bud out)하였다. VSV-G 단백질은 pMND-VSVG 헬퍼 플라스미드에 의해 제공되고, 벡터 코어 및 효소 단백질은 pΔ8.9so (GagPol) 헬퍼 플라스미드에 의해 제공되고, 효율적인 RNA 게놈 수송 및 바이러스 입자 내로의 패키징에 필

요한 Rev 단백질은 pRSV-Rev 플라스미드에 의해 제공되었다. Vpu, Vif, Vpr, Nef 및 Tat를 포함한, 모든 다른 HIV-1 보조 단백질은 CD33 CAR 벡터로부터 삭제되었다.

[0342] pFUGW 렌티바이러스 벡터 주쇄는 SIN 렌티바이러스 벡터 주쇄이다.

[0343] 조절 요소

[0344] LV-CD33 CAR 벡터는 트랜스진의 발현을 추진하는 인간 신장 인자 1 알파 1 (EF1A1) 프로모터 및 소 성장 호르몬 폴리A 서열, 및 코작(Kozak) 리보솜 개시 서열을 함유하였다. 벡터는 우드척 간염 바이러스 전사후 조절 요소(WPRE)뿐만 아니라 pFUGW 플라스미드로부터 유래된 LTR 서열을 사용하였다. 복제의 기원은 pUC19 플라스미드를 기반으로하였다. 도 2는 CD33 CAR의 렌티바이러스 벡터 지도이다.

[0345] **실시예 2**

[0346] CD33 CAR 벡터 제조 방법

[0347] LV-CD33 CAR 벡터는 세 가지 공급원으로부터 어셈블리되었다:

[0348] (1) 다음을 제한 효소 PacI 및 BlpI로 소화되는, 이전에 구축된 벡터로부터 수득하였다:

[0349] (a) pFUGW 주쇄 성분

[0350] (b) 항-CD33 scFv를 GM-CSFR 알파 신호 펩티드로 추진하는 인간 신장 인자 1 알파 1 프로모터 (EF1A1) 프로모터 및 인핸서

[0351] (c) CD8α 힌지 및 막관통 영역.

[0352] (2) 4-1BB 신호전달 도메인 모듈은 합성 유전자로부터 수득하였다.

[0353] (3) CD3ζ, T2A 전사 링커, GM-CSFR 알파 신호 펩티드, HER1t 결실 마커, 소 성장 호르몬 폴리A, 및 플랭킹 클로닝 부위를 함유하는 영역을 PCR에 의해 증폭시켰다.

[0354] 3개의 DNA 카세트는 각각의 카세트에 제공된 상동성 영역을 사용하여, 시험관내 어셈블리 반응으로 함께 어닐링하였다. 생성된 렌티바이러스 벡터는 렌티바이러스 게놈에 대해 역방향(reverse orientation)으로 관심의 트랜스진 (CD33 CAR 및 HER1t)을 함유하였다. Stbl4 이.콜라이(*E.coli*) 균주로의 형질전환 후, 콜로니 PCR에 의해 양성 콜로니를 동정하고, 생어 염기서열 결정(Sanger sequencing)에 의해 3-절편(three-piece) 삽입물을 확인하였다. 전체 플라스미드 서열은 일루미나 차세대 염기서열 결정(Illumina Next Generation Sequencing)에 의해 확인하였다.

[0355] 벡터는 4개의 플라스미드, LV-CD33 CAR 벡터 플라스미드 및 3개의 헬퍼 플라스미드, pΔ8.9 so (GagPol); pMND-VSVG; 및 pRSV-Rev의 인산칼슘 침전 형질감염을 사용하여, 10% FBS를 가진 DMEM 중 HEK-293T 세포에서 생성되었다.

[0356] 플라스마 형질감염 후 대략 18시간에, 벤조나제 (50 U/mL)를 함유하는 배양 배지를 사용하여 완전한 배지 교환을 수행하였다. 배지 교환 후 대략 24시간에, 배양 상청액을 함유하는 벡터를 수확하고, 이를 수확(Harvest) #1로 표지하였다. 세포에 신선한 배지로 다시 공급하고 인큐베이터로 복귀시켰다. 수확 1 상청액을 필터를 사용하여 정화하고 2 - 8℃에서 밤새 보관하였다.

[0357] 다음 날, 세포를 현미경으로 검사하고 벡터 함유 상청액을 수확 #2로 다시 수확였으며, 이는 이전과 같이 여과하였다. 수확 1 상청액을 여과된 수확 2 상청액과 합하고, 풀링된 상청액을 0.45 μm 필터를 통해 추가로 정화하였다. 정화된 벡터 수확물을 음이온 교환 막 크로마토그래피를 사용하여 정제하고, 중공 섬유 장치를 사용하여 농축하고 선택 배지에 투석여과하였다. 정제된 LV-CD33 CAR 벡터를 충전하고 < -80℃에서 동결 보관하였다.

[0358] **실시예 3**

[0359] **전달 시스템 효율**

[0360] 건강한 공여자로부터의 T 세포의 LV-CD33 CAR 렌티바이러스 벡터로의 형질도입은 전형적으로 형질도입 후 12-14일에 CD33 CAR 및 HER1t를 안정적으로 공동-발현하는 25-50% 세포를 결과하였다. 도 4는 CAR-T 세포의 생성을 위한 전형적인 렌티바이러스 형질도입 개략도를 기재한다. 도 5는 하나의 건강한 공여자 T 세포로부터 렌티바이러스 형질도입 12일 후 CD33 CAR 및 HER1t 발현의 대표적인 데이터를 나타낸다. 정제된 인간 CD3+ T 세포를 디나비드®인간 T-활성화제 CD3/CD28 비드를 사용하여 활성화시킨 다음에, 감염 다중도 (MOI) 5로 CD33 CAR 렌

티바이러스 벡터로 형질도입시켰다. IL-2를 함유하는 배지에서 세포를 형질도입 후 12일 동안 성장시켰다. 단백질 L 및 세툭시맙 mAb 각각에 의해 측정된 바와 같이 CD33 CAR 및 HER1t 발현을 평가하기 위해 유동 세포 계측 분석을 형질도입 후 12일에 수행하였다.

[0361] 도 6은 렌티바이러스로 형질도입된 세포로부터 CD33 CAR 발현을 웨스턴 블롯에 의해 확인한다. 확장된 형질도입되지 않은 또는 렌티바이러스로 형질도입된 CD33 CAR-T 세포를 배양하고, 세포 용해액을 프로테아제 억제제를 가진 RIPA 완충제를 사용하여 생성시켰다. BCA 검정은 또한 환원 조건으로 겔 상에 로딩된 단백질의 양을 정규화하기 위해 공여자 생성 샘플 상에서 수행하였다. 단백질 전달 후, 막을 차단한 다음에 1 μg/ml의 항-CD3ζ 항체 (클론 8D3)에 뒤이어 염소 항-마우스 호스 래디시 퍼옥시다제 검출 항체로 탐침하였다. 밴드는 화학발광에 의해 검출되어 디지털 영상화 시스템 상에 포착되었다. 16kDa 밴드는 내인성으로 발현된 CD3ζ를 나타내며, 한편 60kDa 밴드는 CD3ζ 신호전달 모이어티를 발현하는 CD33 CAR을 나타낸다. 단지 CD33 CAR-T 세포 만이 내인성 CD3ζ 밴드 외에도 60kDa 밴드를 나타내며, 한편 형질도입되지 않은 세포 및 주르카트(Jurkat) T 세포에는 단지 내인성 CD3ζ만이 존재한다.

[0362] 도 7은 렌티바이러스 벡터 형질도입 후 배양물에서 CD33 CAR-T 세포의 생체외 성장을 나타낸다. 시작 세포 집단은 $2.5x10^5$개이었고 데이터는 4명의 독립적인 T 세포 공여자로부터의 평균 ± SEM이었다. CD33 CAR-T 세포는 달성하는 임상적으로 관련된 용량을 번역하는 수준으로 생체외에서 효율적으로 형질도입되고 확장되었다.

[0363] **실시예 4**

[0364] 유전 물질 통합

[0365] 전달된 유전 물질은 프로바이러스 게놈의 형태로 통합되었다. 렌티바이러스 형질도입을 사용하여 T 세포에 도입된 트랜스진은 연구된 시간의 길이 동안 안정적이었다. 도 8은 렌티바이러스 형질도입 후 CD33-CAR-T 세포의 카피 수 평가이다. 5의 MOI를 사용하여, 건강한 공여자 270169 (D270169)로부터 인간 SUPT1 T 세포 또는 T 세포 중 어느 하나의 렌티바이러스 형질도입 후 숙주 게놈에 통합된 유전자 카피의 수를 결정하는데 액적 디지털 PCR (ddPCR)을 이용하였다. 게놈 DNA (gDNA)를 형질도입 후 적어도 14일 후에 수득하였다. ddPCR 반응은 CD33 CAR 검출용으로 설정된 타크만(Taqman) 기반 프라이머 및 프로브를 갖춘 바이오-라드(Bio-Rad)의 ddPCR 시스템 (QX200TM AutoDG ddPCR 시스템)을 사용하여 설정되었다. RNaseP는 모든 세포가 RNaseP 유전자의 2개의 카피를 가질 것이라는 가정에 근거하여 카피 수 변이 (CNV)의 평가를 위한 규정화 기준 유전자로서 사용되었다. SUPT1/CD33 CAR 및 D270169/CD33 CAR-T 세포 상에서의 CD33 CAR 발현은 유동 세포 계측법에 의해 확인되었으며 각각 ~80% 및 ~30%로 보고되었다 (데이터는 나타내지 않음). D270169/CD33 CAR-T 세포의 경우, 검정에서 측정된 샘플 (측정된 바와 같이 지정)은 혼합 집단으로부터의 것이며, 추가적 계산을 수행하여 CAR 발현 T 세포에 대한 카피 수 삽입을 결정하였다 (역계산으로서 언급됨). 나타낸 데이터는 2회 실험으로부터 세포당 평균 카피 수 ± SD이다.

[0366] **실시예 5**

[0367] 유전자 전달 시스템의 효능을 평가하는 동물 및 배양 세포 모델

[0368] 전달된 유전자의 발현에 의해 측정된 바와 같은 렌티바이러스 매개된 유전자 전달의 효율을 형질도입된 세포의 유동 세포 계측법으로 평가하였다 (도 5). 형질도입된 T 세포의 확장은 형질도입 후 12-14 일에 걸쳐 배양 배지에서 생체외로 수행하여 관련 용량을 달성하였다 (도 7).

[0369] 전임상 분석 동안에 렌티바이러스 형질도입된 T 세포 표면 상에서 관찰된 CD33 CAR의 수준 (도 8)은 시험관내에서 상이한 CD33 양성 표적 종양 세포주를 효율적으로 그리고 특이적으로 제거하기에 (도 9) 뿐만 아니라 대조군에 비해 CD33 양성 종양 보유 마우스의 생존을 통계적으로 유의하게 증진시키기에 (도 12) 충분하였다. 추가의 뒷받침 데이터에 대해서는 도 5 및 6을 또한 참조.

[0370] CD33 CAR-T 세포의 기능적 능력을 시험관내 및 생체내 모델 둘 다에서 시험하였다.

[0371] CD33 CAR-T 세포의 시험관내 시험은 CD33 양성 표적 세포와의 공동-배양시, 표면 상에 인간 CD33을 발현하도록 형질도입된 마우스 EL4 세포주뿐만 아니라 CD33을 발현하는 AML 세포주의 세포독성, 및 IFN-γ, IL-2 및 TNF-α 시토카인의 분비를 포함하였다. CD33 CAR-T 세포는 HER1t 단백질을 공동-발현하여 세툭시맙의 투여에 의해 주입된 CAR-T 세포의 고갈을 가능하게 하였다. ADCC에 의해 CD33 CAR-T 세포를 제거하는 세툭시맙의 능력을 시험관내에서 또한 평가하였다.

[0372] CD33 CAR-T 세포는 표적 세포에 대해 용량 의존적으로 특이적으로 세포독성이었다 (도 9). 2시간 유로퓸 방출 검정에 의해 측정된 바와 같은 이펙터:표적 (E:T) 비 10:1 (B) 및 E:T 비 1:1 (B)에서의 CD33 CAR-T 세포의 세포독성. CD33 CAR-T 세포에 의한 표적 세포의 용량 의존성 세포독성은 E:T 비 10:1 대 1:1 비에서 관찰되었으나; 표적 세포가 표면 상에서 CD33을 발현할 때만 유의한 세포독성이 관찰되었다. 형질도입되지 않은 T 세포는 시험된 임의의 표적 세포의 유의한 세포독성을 나타내지 않았다. 그래프에 표시된 데이터는 4명의 상이한 공여자로부터의 평균 ± SEM이며, ** p 값은 <0.01이며, *** p 값은 <0.001이다.

[0373] CD33 CAR-T 세포는 형질도입되지 않은 T 세포와 비교하여 상이한 표적 세포주와의 공동-배양시 상승된 수준의 다양한 시토카인을 특이적으로 분비하였다 (도 10). CD33을 발현하는 다양한 표적 AML 세포주와의 공동-배양 후 형질도입되지 않은 T 세포 및 CD33 CAR-T 세포로부터 시토카인 생산에 대한 평가. 뮤린 EL4 세포주를 인간 CD33 발현에 대한 음성 대조군으로 사용하였다. T 세포를 이펙터:표적 (E:T) 비 10:1로 밤새 공동-배양하고 Q 비드 (인텔리시트(Intellicyt))를 사용하여 다중 시토카인 분석을 위해 배양 상청액을 수집하였다. 다중 분석은 배양 배지 내로의 인간 IFNγ, IL-2 및 TNF 분비의 발현에 대해 검정하였다. 높은 수준의 IFNγ, IL-2 및 TNF 시토카인이, 동일한 표적 세포를 가진 형질도입되지 않은 T 세포의 기본 발현 수준과 비교하여, CD33을 발현한 표적 세포와 CD33 CAR-T 세포의 공동-배양 후 검출되었다. 플롯팅된 값은 이중으로 시험된 샘플의 평균 ± SD를 나타낸다.

[0374] 세툭시맙은 용량 의존적으로 표면 상에 HER1t를 발현하는 CD33 CAR-T 세포를 제거할 수 있었다 (도 11). ADCC는 24시간 동안 E:T 비 5:1에서 정제된 이펙터 NK 세포와 공동-인큐베이션된 PKH26 표지된 표적 세포를 사용하여 7-AAD 흡수의 유동 세포 계측 분석에 의해 결정되었다. CD33 CAR-T 세포의 특이적 용량 의존성 ADCC는 세툭시맙으로 관찰되었다. 플롯팅된 값은 이중으로 시험된 샘플의 평균 ± SD를 나타낸다.

[0375] 종양 부하를 특이적으로 감소시키는 CD33 CAR-T 세포의 능력은 생물발광 영상화에 의한 종양 부하를 모니터링하기 위해 fLUC (MOLM-13/fLUC)를 발현하도록 형질도입된 AML 세포주 MOLM-13을 사용하여 면역 결핍 NSG (NOD.Cg-PrkdcscidIL2rgtm1Wjl/SzJ, NOD scid 감마) 마우스에서 생체내 이종 이식 모델에서 또한 시험하였다 연구 설계의 세부 사항은 표 2에 도시되어 있다. MOLM-13/fLUC 종양 보유 NSG 마우스에서 CD33 CAR-T 세포의 투여는 CD33 CAR-T 세포와 동일한 건강한 T 세포 공여자로부터 생성된 식염수, 형질도입되지 않은 T 세포 및 비-특이적 CD19 CAR-T 세포로 이루어진 대조군 처리군과 비교시 통계적으로 유의한 수준으로 종양 부하를 감소시키고 평균 생존을 증가시켰다 (P<0.001). CD33 CAR-T 세포가 종양 보유 마우스에서 생체내에서 증식하였다 (도 14). NSG 마우스에 주사하기 전의 CD33 CAR-T 세포의 유동 세포 계측 분석 및 처리된 마우스의 다양한 조직에서의 CD33 CAR-T 세포의 검출을 수행하여 생체내에서 CAR-T 세포의 지속성 및 팽창을 문서화하였다. (도 14A) 건강한 공여자 T 세포를 CD33 CAR 렌티바이러스로 형질도입시키고 생체외에서 확장시켰다. 치료를 위해 CD33 CAR-T 세포를 주사하기 전에, CD33 CAR 발현 수준을 평가하기 위해 유동 세포 계측 분석을 수행하였다. 나타낸 집단은 FSC/SSC/생존 가능한/CD3+ 세포 상에서 게이팅하였다 (도 14B). 유동 세포 계측 분석을 CD33 CAR-T 세포의 존재를 검출하기 위해 MOLM-13 종양 보유, CD33 CAR-T 처리된 마우스로부터 회수된 혈액, 골수 및 비장 샘플 상에서 18일째 (꼬리 정맥 내로 전신 IV 주사에 의해 CD33 CAR-T 세포 주사 후 10일)에 수행하였다. 상기 집단을 가진 한 대표적인 마우스로부터의 데이터를 FSC/SSC/hCD45/hCD3 발현에 기초하여 게이팅하였다.

[0376] 면역 결핍된 NSG 마우스에게 0일째에 반딧불이 루시퍼라제(firefly luciferase) (fLUC) 유전자 (MOLM-13/fLUC)를 발현하도록 변형된 5 x 10^5 MOLM-13 세포주를 정맥 내로 (IV) 주사하였다. 종양 보유 마우스는 7일째에 IVIS 영상화를 통해 생물발광 발현에 의해 확인한 다음에, 상이한 처리 군으로 무작위화하였다. 8일째에, 마우스를 식염수 단독, 형질도입되지 않은 T 세포 (10^7개의 총 T 세포/마우스), 어떠한 세포 태그도 갖지 않거나 HER1t 세포 태그 (10^7개의 CD33 CAR-T 세포/마우스)를 가진 CD33 CAR-T 세포 또는 CD19 CAR T 세포 (10^7개의 CD19 CAR-T 세포/마우스)로 IV 주사에 의해 처리하였다. 게다가, 또 다른 군의 마우스는 15일째에 HER1t 세포 태그 (10^7개의 CD33 CAR+T 세포/마우스)를 가진 CD33 CAR T 세포의 제2 용량을 받았다. 전체 종양 부하는 연구 과정에 걸쳐 생물발광 영상화를 사용하여 fLUC 발현에 의해 평가되었다. 상이한 처리 군으로부터의 생존 곡선을 도 12에 나타냈다. 식염수, 형질도입되지 않은 T 세포 및 CD19 CAR-T 세포에서 마우스의 중앙 생존 기간은 15일이었다. 어떠한 세포 태그도 함유하지 않는 CD33 CAR T 세포로 처리된 마우스는 생존이 증진되었으며 한편 CD33 CAR-T 세포 (1 또는 2 용량)로 처리된 모든 마우스는 29일째까지 완전 생존율을 가졌다.

[0377] 복면도 및 배면도로부터의 평균 플럭스 값(mean flux value)을 상이한 군에 대해 도 13에 플롯팅하였다. 나타낸 값은 각각의 군에 대해 표시된 평균 ± SEM과 함께 광자/초로 표시되는 총 플럭스 값이다. 실선 상향 화살

표는 각각의 군에 대한 CAR-T 투여의 일을 나타내며, 15일째에 점선으로 된 상향 화살표는 2 용량 군에 대한 제 2 CD33 CAR-T 용량을 나타낸다.

표 3

[0378] NSG 마우스에서 CD33 CAR-T 세포의 생체내 효능을 평가하기 위한 연구 설계

N	종양 세포주	0일째 종양 세포 용량 (투여 경로)	처리	동물당 용량 (세포수)	CAR T 세포 용량 투여 (일)
12	MOLM-13/fLUC	$5x10^5$개 세포 (IV)	식염수	N/A	D8
12	MOLM-13/fLUC	$5x10^5$개 세포 (IV)	비-형질도입 T 세포	10^7	D8
11	MOLM-13/fLUC	$5x10^5$개 세포 (IV)	CD33 CAR-T (세포 태그 없음)	10^7	D8
11	MOLM-13/fLUC	$5x10^5$개 세포 (IV)	세포 태그를 가진 CD33 CAR-T (1 용량)	10^7	D8
11	MOLM-13/fLUC	$5x10^5$개 세포 (IV)	세포 태그를 가 진 CD33 CAR-T (2 용량)	각각의 용량 당 10^7	D8 및 D15
12	MOLM-13/fLUC	$5x10^5$개 세포 (IV)	CD19 CAR-T	10^7	D8

[0379] **실시예 6**

[0380] **시토카인 분석**: 마우스로부터의 혈장 샘플을 프로토콜의 특정 시점에서 수집하거나 마우스가 빈사 상태가 되어 인도적인 이유로 안락사시켰을 때 수집하였다. 혈장을 수득하기 위해, 혈액을 EDTA 수집관에서 수집한 다음에 실온에서 15분 동안 5,000xg에서 회전시킨 다음에 생성된 혈장을 깨끗한 수집관에 옮겼다. 혈장을 동결시키고 검정할 때까지 -80℃에서 보관하였다. 프로카르타플렉스(ProcartaPlex)® 인간 시토카인/케모카인/성장 인자 패널 1 키트 (e바이오사이언스)는 하기 피분석물의 다중 검출을 위한 45-플렉스 자기 비드 기반 키트이다: 뇌 유래 신경 영양 인자 (BDNF), 표피 성장 인자 (EGF), 에오탁신, 섬유모세포 성장 인자-2 (FGF-2), 과립구/대식세포-콜로니 자극 인자 (GM-CSF), GRO 알파 (CXCL1), 간세포 성장 인자 (HGF), 인터페론 (IFN) 알파, IFN감마 (IFNg), 인터류킨 (IL)-1수용체 알파 (IL-1RA), IL-1 알파, IL-1 베타, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-31, 인터페론 감마-유도 단백질 10 (IP-10; CXCL10로도 공지됨), 백혈병 억제 인자 (LIF), 단핵구 주화성 단백질-1 (MCP-1, CCL2로 공지됨), 대식세포 염증성 단백질-1 알파 (MIP-1 알파; CCL3으로도 공지됨), MIP-1 베타 (CCL4로도 공지됨), 베타-신경 성장 인자 (NGF 베타), 활성화시 조절 정상 T 세포 발현 및 분비(Regulated upon Activation Normal T cell Expressed and Secreted) (RANTES, CCL5로도 공지됨), 혈소판 유래 성장 인자-BB (PDGF-BB), 태반 성장 인자-1 (PIGF-1), 줄기 세포 인자 (SCF), 간질 유래 인자-1 알파 (SDF-1 알파, CXCL12 알파로도 공지됨), 종양 괴사 인자 알파 (TNF 알파), TNF 베타 (림프독소 알파로도 공지됨), 혈관 내피 성장 인자-알파 (VEGF-A) 및 혈관 내피 성장 인자-D (VEGF-D). 검정은 제조업자의 구체적 프로토콜에 따라 수행하였다. 바이오-플렉스 매니저(Bio-Plex Manager) 소프트웨어 버전 6.1을 실행하는 바이오-라드 바이오-플렉스(Bio-Plex)® 200 기기 (바이오-라드, 캘리포니아주 헤라클레스, CA) 상에서 데이터를 수집하였다.

[0381] 인간 시토카인 및 성장 인자 발현을 11일째에 마우스로부터 취한 혈장을 사용하여 평가하였다. 도 22A 참조. MOLM-13 및 NSG 마우스에 전달된 T 세포가 인간 기원이기 때문에, 인간 시토카인의 측정은 종양 세포에 작용하는 CAR-T 세포에 대한 작용 기전에 대한 세부 사항을 추가로 조사할 수 있게 하였다. 단지 식염수 처리를 받은 MOLM-13 종양 보유 마우스에서, 일부 인간 전신성 시토카인 예컨대 MCP-1 및 MIP1-베타 (데이터는 나타내지 않음) 뿐만 아니라 몇 가지 다른 성장 인자가 검출되었으나, 시토카인 예컨대 IFNγ 및 TNFα의 수준은 검출 범위 미만이었다 (도 22A). 형질도입되지 않은 T 세포로 처리한 MOLM-13 종양 보유 마우스는 또한 식염수 단독 처리군과 비교하여 유사한 패턴의 시토카인 및 성장 인자 발현을 계속 나타냈다. 형질도입되지 않은 T 세포 군에서 보이는 시토카인 및 성장 인자 수준은 이 마우스 모델 시스템에서 인간 T 세포 및 종양 세포의 혼합물에 대한 기준치 값을 제공한다. (CAR T 세포가 세포 태그를 공동-발현하였는지 여부에 상관없이) CD33-CAR-T 세포로부터의 시토카인 발현 데이터의 분석은 GM-CSF, IL-10, IL-18 및 IP-10과 함께 유의한 수준의 IFNγ 및 TNF 생성을 나타냈다. 대조적으로, MOLM-13 종양 보유 마우스에 대한 CD19-CAR-T 세포의 투여는 마우스의 식염수 단독

또는 형질도입되지 않은 T 세포 군과 비교하여 시토카인 예컨대 GM-CSF, IFNɣ, IL-18에 대해 약간 상승된 수준을 나타냈으나; 이들 시토카인의 발현 수준은 CD33-CAR-T (세포 태그 없음) 또는 CD33-CAR-T (세포 태그 가짐) 또는 CD33-CAR-T (세포 태그 가짐, 2 용량)가 투여된 마우스에서 검출된 동일한 시토카인의 수준과 비교하여 유의하게 상등된 정도는 아니었다.

[0382] 연구에서 특정 시간에 혈액 샘플을 취하여 유동 세포 계측법에 의해 입양 전달된 T 세포뿐만 아니라 종양 세포의 존재를 평가하였다. MOLM-13/fLUC 세포의 존재는 도 22B에 나타낸 바와 같이, 16일째에 마우스의 말초 혈액에서 검출될 수 있었다. MOLM-13 세포에서 과소 평가 또는 CD33 항원 손실 가능성을 피하기 위해, CD123 항체를 이용하여 종양 세포를 확인하였다. MOLM-13 종양 세포는 식염수 단독, 형질도입되지 않은 T 세포 또는 CD19-CAR-T 세포로부터 수득된 말초 혈액 샘플에서 검출되었다. 게다가, 형질도입되지 않은 T 세포 또는 CD19-CAR-T 세포가 제공된 마우스로부터의 전달된 T 세포는 혈액의 세포 분석이 시작된, 11일째 만큼 일찍 및 16일째에 혈액에서 검출되었다. CD33-CAR-T 세포를 투여한 마우스의 혈액은 MOLM-13 종양 세포 존재를 거의 또는 전혀 나타내지 않았으며, 한편 T 세포 집단은 분명히 존재하였다.

[0383] 도 22C는 추가적인 AML 종양 세포주 (THP1 및 HL60)에 대항하는 세포독성 활성을 나타낸다. CD33-CAR-T 세포의 재지향된 세포독성 기능에 대한 추가적인 증거는 CD33 종양 세포와의 공동-배양시 면역 이펙터 세포에 의한 시토카인 발현을 조사함으로써 제공되었다. 몇몇 CD33 발현 종양 세포주를 CD33-CAR-T 세포와의 공동-배양 후, IFNɣ, TNF (TNFα로도 언급됨) 및 IL-2 발현의 유도에 대해 평가하였다. CD33-CAR-T 세포와 CD33 발현 종양 세포의 공동-배양은 동일한 공여자로부터의 형질도입되지 않은 T 세포와 비교하여, IFNɣ, TNF 및 IL-2의 발현을 현저히 증가시켰다 (도 10). 더욱이, 음성 종양 표적 대조군으로서 역할을 한, 부모 EL4 세포주로부터는 어떠한 시토카인 발현이 검출되지 않았다. 표적 특이성에 대한 추가적인 확인으로서 세포내 시토카인 염색 (ICS)을 수행하였다. CD33-CAR-T 세포는 CD33을 발현하는 MOLM-13, THP-1, 또는 HL-60 종양 세포와 밤새 공동-배양 후에 세포 수준에서 IFNɣ 및 IL-2 발현 둘 다를 나타냈으며, 한편 마우스 EL4 세포와의 공동-배양은 T 세포 단독에서만 보이는 수준 초과로 어떠한 유의한 시토카인 발현을 나타내지 않았다 (도 23E).

[0384] 재발 AML 질환을 가진 AML 환자 (공여자 E261)로부터 수득된 세포로부터 CD33-CAR-T 세포를 생성하였다. 간단히, AML 공여자로부터의 냉동보존된 PBMC를 해동시키고 T 세포를 선택하고 항-CD3/항-CD28 비드를 사용하여 확창시켰다. T 세포를 CD33-CAR LV 입자로 형질도입시키고 T 세포를 배양물에서 확장시켰다. 해동된 PMBC 샘플의 특성화는 이 공여자로부터 PBMC 샘플에 존재하는 T 세포의 빈도가 낮았으며 주로 CD33+ 세포로 이루어짐을 밝혀냈다 (도 23A). T 세포를 단리하고, 활성화시키고 LV 형질도입을 위해 확창시켜 CD33-CAR-T 세포를 생성시켰다. T 세포 단리 후 잔존 세포는 CD33+ (도 E-B)이었고 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF) 시토카인을 사용하여 배양에서 유지시켰다. 이 AML 공여자의 경우, LV 형질도입 후 12일 배양 후 평가된 바와 같이, T 세포의 ~41%가 CD33-CAR을 세포 표면 상에 발현시켰다 (도 23C). 세포독성 활성은 이 공여자로부터의 CD33-CAR-T 세포와, MOLM-13 종양 세포 또는 환자 자신의 CD33 발현 종양 세포 중 어느 하나와의 유동 세포 계측에 기반한 공동-배양 검정에서 입증되었다. 세포 상에 CD3 (T 세포) 및 CD33 발현 (종양)을 염색함으로써 조사한 시점 (0일 및 3일째)에서의 잔존 세포 집단의 평가는, CD33-CAR-T 세포와의 공동-배양만으로 CD33 발현 종양 세포를 제거할 수 있었으며, 한편 형질도입되지 않은 (UNT) T 세포로 설정된 공동-배양에서는 어떠한 세포 사멸도 관찰되지 않았다 (도 23D).

[0385] 게다가, AML 공여자로부터 생성된 CD33-CAR-T 세포는, 세포내 시토카인 염색을 사용하여 유동 세포 계측법에 의해 평가된 바와 같이, IFNɣ 및 IL-2 발현을 또한 유도하였다. 세포내 시토카인 염색은 CD33-CAR-T 세포 (AML 공여자 E261로부터 유래)와 18시간 기간후 지정된 종양 세포의 공동-배양 후에 수행하였다. T 세포를 세포 표면 염색한 다음에 고정/투과화한 후 IFNɣ 및 IL-2 시토카인 염색하였다. 세포를 FSC/SSC/생존 가능한/CD3 T 세포를 기반으로 게이팅하였다. 단독 또는 뮤린 EL4 종양 세포와의 CD33-CAR-T 세포의 공동-배양은 IFNɣ 또는 IL-2의 어떠한 발현도 나타내지 않았으며; 한편 두 시토카인 모두의 발현 증가는 MOLM-13과 또는 특정 공여자 세포로부터의 종양 세포와의 공동-배양 후 관찰되었다 (도 23E). 게다가, 시토카인 발현은 CD33-CAR을 발현한 세포로부터 특이적으로 유도되었으며, 한편 CAR을 발현하지 않는 T 세포는 어떠한 시토카인 발현도 나타내지 않았다.

[0386] **실시예 7**

[0387] 다양한 신호전달 도메인을 가진 렌티바이러스 CD33 CAR을 구축하고 발현을 시험하였다. CD3ζ 신호전달 도메인만을 가진 CD33 CAR, CD28-CD3z (CD28z로 언급됨) 신호전달 도메인을 가진 CD33 CAR, 또는 HER1t의 공동-발현을 가진 CD28-CD3z 도메인을 가진 렌티바이러스 입자를 도 4에 개략적으로 나타낸 개략도에 따라 예비-활성화된

인간 T 세포 내로 형질도입하였다. 형질도입 후 12-14 일 후에 T 세포 상에서 유동 세포 계측 분석을 수행하였다. CD33 CAR 발현은 단백질 L 염색을 통해 검출되었고 HER1t는 세툭시맙 염색을 통해 검출되었다 (도 15A 및 도 15B).

[0388] 표적을 인식하는 CD33 CAR (상이한 신호전달 도메인을 가진)의 특이성을 입증하기 위해, 다양한 종양 세포주에 대해 공동-배양 검정을 수행하였다. CD33 발현이 시험된 세포주 상에 표시되었다 (도 16A). K562 세포는 내인성으로 CD33을 발현하므로 K562/CD123에서 발현이 관찰되며; K562/CD33 주는 CD33을 과발현시키기 위해 형질도입되었다는 점을 주목한다. EL4는 인간 CD33을 발현하지 않는 뮤린 세포주이다. 세포독성은 DELFIA BATDA 시약 (DELFIA EuTDA 세포독성 분석; 퍼킨 엘머(Perkin Elmer)을 사용하여 다양한 종양 표적 세포주를 표지한 다음에, CD33 CAR T 세포 또는 형질도입되지 않은 T 세포 (UNT)를 표지된 종양 세포와 20:1 이펙터:표적 (E:T) 비에서 공동-배양함으로써 결정하였다. 2시간 후, 검정으로부터의 상청액을 수확하고, DELFIA 유로퓸 검정을 첨가하여 전개하고 시간-분해(time-resolved) 형광 기기 상에서 판독하였다. (도 16B) 20:1 이펙터:표적 (E:T) 비를 이용하여, CD33 CAR T 세포와 CD33을 발현하는 종양 세포의 공동-배양으로 강력한 IFNγ 생성물을 18시간 동안 배양하고, 배양 상청액을 수확하고 제조업자의 지침에 따라 ELISA에 의해 IFNγ 생성을 검정하였다. 형질도입되지 않은 T 세포 (UNT)는 공동-배양에서 IFNγ의 검출이 거의 또는 전혀 없었다 (도 16C).

[0389] AML로 진단된 환자의 냉동보존된 PBMC 샘플로부터 유래된 T 세포의 렌티바이러스 형질도입을 건강한 공여자 T 세포로부터의 T 세포의 형질도입에 대해 상기 개략적으로 설명한 공정과 유사하게 수행하였다. 간단히, PBMC 샘플로부터의 단리된 T 세포는 항-CD3/CD28 비드를 사용하여 활성화시킨 후에 다양한 MOI에서 CD33 CAR-41BBz-T2A-HER1t로 렌티바이러스 형질도입시켰다. 형질도입된 T 세포 배양물은 14 일 배양 기간 동안 확장되었다. 단백질 L 염색에 의해 결정된 바와 같은 CAR 발현은 배양 확장 기간 전반에 걸쳐 평가되었다. CD33 CAR의 수준을 T 세포 표면 상에서 관찰하였다 (데이터는 나타내지 않았다). CD33 CAR T 세포의 세포독성 활성은 공여자의 자가 CD33+ 발현 종양 세포뿐만 아니라 AML 종양 세포주를 이용하여 입증되었다. 한 경우에, 공동-배양은 낮은 E:T 비를 사용하여 설정되었다. 유동 세포 계측 분석을 다양한 시점에서 수행하여 T 세포의 존재 및 빈도를 결정하였고 다양한 시점에서 공동-배양물에 존재하는 CD33 발현 종양 세포를 평가하였다. CD33 CAR-T 세포와 자가 CD33 발현 종양 세포의 공동-배양은 CD33+ 종양 세포의 감소 또는 부재에 의해 결정된 바와 같은 세포독성 활성을 나타냈다 (데이터는 나타내지 않음). 유사한 연구결과가 시험된 공지된 AML 종양 세포주 예컨대 MOLM-13에서 관찰되었다.

[0390] **실시예 8**

[0391] 슬리핑 뷰티 CD33 CAR

[0392] 상이한 CD33 CAR 구축물을 슬리핑 뷰티 트랜스포사제-트랜스포존 시스템에서 구축하고 생성시켰다 (도 3). 예를 들어, CD33-CD8a-CD28TM-CD3z 구축물은 EF1a 프로모터 길이 (짧은 것, 중간 것 및 긴 것)로 제조하였다. HER1t 세포 태그를 가진 CD33 CAR 구축물을 또한 제조하고 시험하였다.

[0393] CAR 구축물을, 구축물의 게놈 통합을 매개하는 슬리핑 뷰티-기반 트랜스포존 시스템을 사용하여, 전기천공법을 통해 세포에 도입하였다. 0일째에, 2천만개의 PBMC를 15 μg의 트랜스포존 및 5 μg의 트랜스포사제 (pKan-CMV-SB11)와 혼합한 100 μL의 아막사(Amaxa) 인간 T 세포 뉴클레오펙터(Nucleofector) 용액 (카탈로그 번호 VPA-1002; 론자, 스위스 바젤)에 재현탁시키고, 프로그람(Program) U-14를 사용하여 전기천공시켰다. 다음날 (1일째) 세포를 계수하고, 세툭시맙을 사용하여 단백질 L 및 HER1t 염색에 의해 CAR 발현을 위해 표면 염색하였다. 세포를 γ-방사선조사 (100 Gy) 또는 미토마이신 C 처리된 AaPC 중 어느 하나로 1:1 비로 자극하였다. 사용된 AaPC 세포는 내인성으로 발현된 CD33과 함께 CD64-CD86-41BBL-CD19-mbIL-15/IL15Ra-ROR1 항원을 발현하는 K562-AaPC이었다. CAR T 세포를 1 : 1의 비로 AaPC로 자극하였다. 배양물을 자극의 제1 라운드에 대해서만 IL-21 (30 ng/ml)로 보충하고 후속적으로 나머지 자극에 대해서는 재조합 인간 IL-2 (50 IU/ml) 및 IL-21 (30 ng/ml) (페프로 테크(Pepro Tech))로 보충하였다. T 세포 배양물은 전형적으로 7일 지속되는, 각각의 자극 주기의 말미에 표현형이 결정되었다. 배양물은 다중-파라미터 유동 세포 계측법에 의해 검출된 바와 같이 단백질 L 염색 또는 재조합 CD33/Fc 단백질 염색 중 어느 하나를 이용하여, CAR 발현에 대해 표현형이 결정되었다. 배양물은 NK 세포의 증식물(outgrowth) (CD3negCD56+ 집단으로서 정의됨)에 대해 또한 면밀히 모니터링하였으며 제조업자의 지침에 따라, CD56에 대해 자기 비드 (스템 셀 테크놀로지즈(Stem Cell Technologies) 및/또는 미테티 바이오텍)를 사용하여 백분율이 총 세포 집단의 10%를 초과할 때 CAR T 세포 배양물로부터 제거하였다. AaPC에 의한 자극 후 다중 공여자 PBMC로부터의 CD33 CAR 발현을 유동 세포 계측법을 사용하여 조사하였다.

[0394] 표적을 인식하는 CD33 CAR (상이한 신호전달 도메인을 가진)의 특이성을 입증하기 위해, 다양한 종양 세포주에

대해 공동-배양 검정을 수행하였다. K562 세포는 내인성으로 CD33을 발현하며 EL4는 인간 CD33을 발현하지 않는 뮤린 세포주라는 점을 주목한다. 세포독성은 DELFIA BATDA 시약 (DELFIA EuTDA 세포독성 분석; 퍼킨 엘머)을 사용하여 다양한 종양 표적 세포주를 표지한 다음에, CD33 CAR T 세포 또는 형질도입되지 않은 T 세포 (UNT)를 표지된 종양 세포와 10:1 이펙터:표적 (E:T) 비 및 2:1 E:T 비에서 공동-배양함으로써 결정하였다. 2시간 후, 검정으로부터의 상청액을 수확하고, DELFIA 유로퓸 검정을 첨가하여 전개하고 시간-분해 형광 기기 상에서 판독하였다. (도 17)

[0395] 탈과립화 검정 및 IFNɣ 세포내 시토카인 염색.

[0396] 리소좀-결합 막 단백질-1(lysosomal-associated membrane protein-1) (LAMP-1)로도 공지된 CD107a는 세포의 후기 엔도좀-리소좀에서 구성적으로 발현되나, 탈과립 세포의 세포 표면 상에 일시적으로 발현된다. 탈과립화 검정은 CD33 CAR T가 세포당 기준으로 공동(concurrent) 세포내 IFNɣ 검출과 함께 CD33 발현이 있거나 없는 상이한 표적 세포를 인식하는 능력을 평가하기 위해 확립되었다. 간단히, CD33 CAR T 세포를 96 웰 플레이트에서 10:1 E:T 비로 표적 세포와 공동-배양하였다. 표적 세포는 K562/CD19 (내인성 CD33 발현을 가짐), THP-1 및 EL-4 (뮤린 세포주)를 포함하였다. 공동-배양의 시작에서, 형광 접합된 CD107a 또는 이소형 항체를 수송 억제제 칵테일(Transport Inhibitor Cocktail) (모네신 및 브레펠딘 함유, 1X; eBioscience)과 함께 첨가하고 37℃에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 기간의 말미에, 세포를 플레이트에서 펠렛화하고 세포 표면 항원을 CAR 발현 및 T 세포 마커의 검출을 위해 염색하였다. 세포 표면 염색 후, 세포는 또한 제조업사의 지침에 따라 고착성 세포 생존력(Fixable Cell viability) 염료 (eBioscience)로 염색한 다음에, 세척하고, 고정(Fix)/투과(Perm) 용액 (BD 바이오사이언시즈(BD Biosciences))으로 고정시켰다. 샘플을 고정시킨 후, 세포를 투과/세척 용액 (BD 바이오사이언시즈)에서 세척한 다음에, 형광 접합된 항-인간 IFNɣ 항체로 세포내로 염색하였다. 그 다음에 샘플을 적절한 염색 완충제에서 재현탁시키고 데이터를 LSR II 유동 세포 계측기 (BD 바이오사이언시즈) 상에서 획득하였다. 도 18에 나타낸 바와 같이, CD107a 탈과립의 유의한 발현이 K562 유도체 및 CD33을 발현하는 THP-1 세포주에서만 관찰되었으며, 한편 면역 이펙터 세포 단독 및 EL-4와의 공동-배양은 최소 탈과립화가 관찰되었다. 유사한 패턴이 세포내 IFNɣ 발현에 대해 관찰되었다.

[0397] **실시예 9**

[0398] CAR 구축물을, 구축물의 게놈 통합을 매개하는 슬리핑 뷰티-기반 트랜스포존 시스템을 사용하여, 전기천공법을 통해 세포에 도입하였다. 0일째에, 2천만개의 PBMC를 15 μg의 트랜스포존(CD33의 경우 CAR-CD8-CD28z) 및 5 μg의 트랜스포사제(pKan-CMV-SB11)와 혼합한 100 μL의 아막사 인간 T 세포 뉴클레오펙터 용액 (카탈로그 번호 VPA-1002; 론자, 스위스 바젤)에 재현탁시키고, 프로그람 U-14를 사용하여 전기천공시켰다. 다음날 (1일째) 세포를 계수하고, 세툭시맙을 사용하여 단백질 L 및 HER1t 염색에 의해 CAR 발현을 위해 표면 염색하였다. 세포를 ɣ-방사선조사 (100 Gy) 또는 미토마이신 C 처리된 AaPC 중 어느 하나로 1:1 비로 자극하였다. 사용된 AaPC 세포는 CD64-CD8641BBL-CD19-mbIL-15/IL15Ra-ROR1 항원을 발현하는 K562-AaPC이었다. CAR T 세포를 1 : 1의 비로 AaPC로 자극하였다. 배양물을 자극의 제1 라운드에 대해서만 IL-21 (30 ng/ml)로 보충하고 후속적으로 나머지 자극에 대해서는 재조합 인간 IL-2 (50 IU/ml) 및 IL-21 (30 ng/ml) (페프로 테크)로 보충하였다. T 세포 배양물은 전형적으로 7일 지속되는, 각각의 자극 주기의 말미에 표현형이 결정되었다. 배양물은 다중-파라미터 유동 세포 계측법에 의해 검출된 바와 같이 단백질 L 염색 또는 재조합 CD33/Fc 단백질 염색 중 어느 하나를 이용하여, CAR T 세포 발현에 대해 표현형이 결정되었다. 배양물은 NK 세포의 증식물 (CD3negCD56+ 집단으로서 정의됨)에 대해 또한 면밀히 모니터링하였으며 제조업자의 지침에 따라, CD56에 대해 자기 비드 (스템 셀 테크놀로지즈 및/또는 미테티 바이오텍)를 사용하여 백분율이 총 세포 집단의 10%를 초과할 때 CAR T 세포 배양물로부터 제거하였다. AaPC에 의한 자극 후 다양한 공여자 PBMC로부터의 CD33 CAR 발현을 유동 세포 계측법을 사용하여 조사하였다. 대표적인 공여자로부터의 데이터는 HER1t 세포 태그를 갖거나 갖지 않는, CD33 CAR-CD8-CD28z에 대한 표 3 및 CD33-CAR-CD8-4-1BBz에 대한 표 4에 요약되어 있다. 도 19는 HER1t 태그를 가진 슬리핑 뷰티 CD33 CAR-CD28z 구조물의 발현을 추가로 나타낸다.

[0399] 표 4는 상이한 PBMC 공여자에서 예시적인 슬리핑 뷰티 CD33-CD8a-CD28z CAR 발현을 나타낸다.

[0400] [표 4]

PBMC 공여자	CD33 CAR (CAR33-CD8a-CD8m-Z) 발현				
	1일째	7일째	14일째	21일째	28일째
#205	4%	22%	79%	96%	99%
#309	11%	61%	90%	98%	99%
#309R	15%	52%	89%	94%	94%

[0401]

[0402] 표 5는 상이한 PBMC 공여자에서 HER1t 태그를 갖거나 갖지 않는 예시적인 슬리핑 뷰티 CD33-CD8-41BBz CAR 발현을 나타낸다.

표 5

[0403]

PBMC 공여자	CD33 CAR (CAR33-CD8-41BBz) 발현				
	1일째	7일째	14일째	21일째	28일째
공여자 309	68.9	78.1	79.5	91.2	95
공여자 270169	60.1	65.4	76.2	84.2	94.3
공여자 6507	64.1	52.5	26.8	26.1	40.4
공여자 163890	47.4	63.9	64.2	7022	95.3
PBMC 공여자	CD33 CAR/Her1t (CAR33-CD8-41BBz-HER1t) 발현				
	1일째	7일째	14일째	21일째	28일째
공여자 309	46.7	78.6	86.9	92.4	98.5
공여자 270169	35.7	80.5	89.4	92.4	88.9
공여자 6507	36.7	80.1	79.2	89.1	83.7
공여자 163890	39.7	77.3	85.5	92.8	86.9

[0404] **실시예 10**

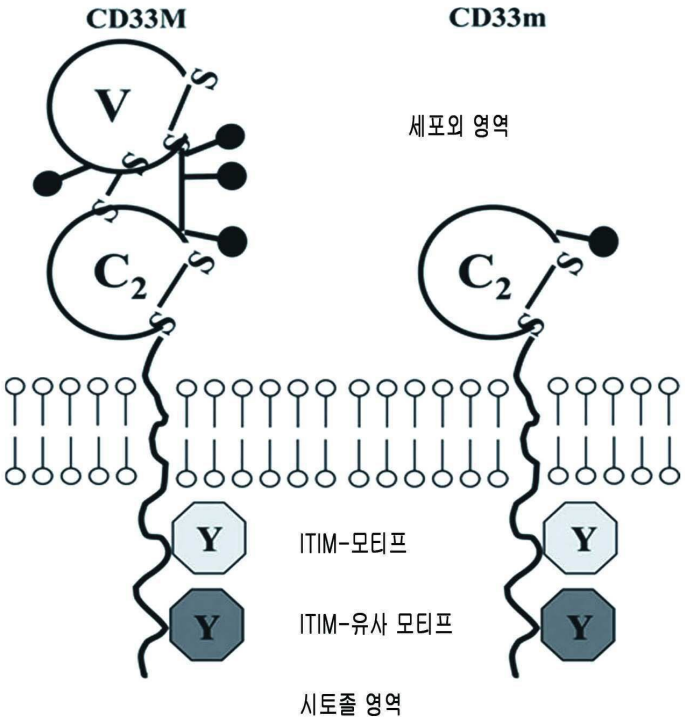
[0405] NK 세포의 렌티바이러스 형질도입은 다양한 HER1t 태그 (서열번호: 32 및 54) 및 C20t 태그에 커플링된 CD33CAR로 수행하였다. 도 25 내지 도 27은 NK 세포 상에 CD33 CAR 및 HER1t 및 CD20t-1 태그의 발현을 나타낸다. 도 28-도 29는 또한 CD33 CAR NK 세포가 상이한 E:T 비에서 NK 내성 CD33+AML 세포를 효율적으로 용해시켰다는 것을 나타낸다. 시토카인 (예를 들어 IFNɣ, TNF-a, IL-6, RANTES, GM-CSF, IL-10, MIP-1a 및 MIP-1b)은을 상이한 표적 세포과 공동배양시 CD33CAR NK 세포에 의해 생성되었다 (데이터는 나타내지 않음)

[0406] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 과학 기술 용어 및 임의의 약어는 본 발명의 분야에서 관련 기술분야의 통상의 기술자가 일반적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다.

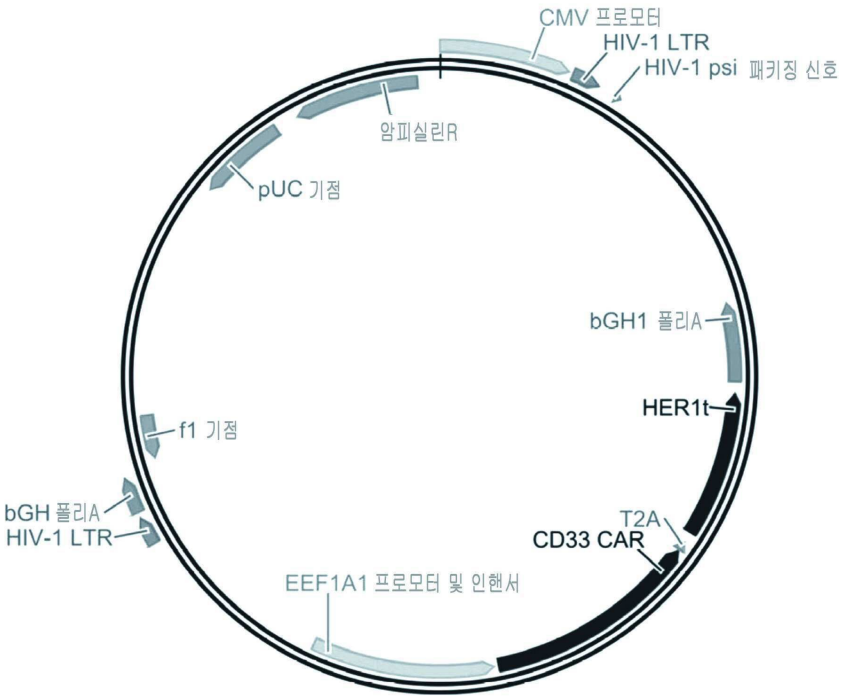
[0407] 본 개시내용의 바람직한 실시양태가 본원에 나타내지고 기재되었지만, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게는 이러한 실시양태가 단지 예로서 제공된다는 것이 자명할 것이다. 수많은 변형, 변화 및 치환이 본 개시내용으로부터 벗어나지 않고 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 이제 일어날 것이다. 본원에 기재된 실시양태에 대한 대안, 또는 본원에 기재된 이들 실시양태 또는 측면 중 하나 이상의 조합이 본 개시내용을 실시하는데 이용될 수 있음을 이해하여야 한다. 하기 청구범위는 본 개시내용의 범위를 정의하며 이들 청구항 및 그의 등가물의 범위 내에 있는 방법 및 구조가 그에 의해 포함되는 것으로 의도된다.

도면

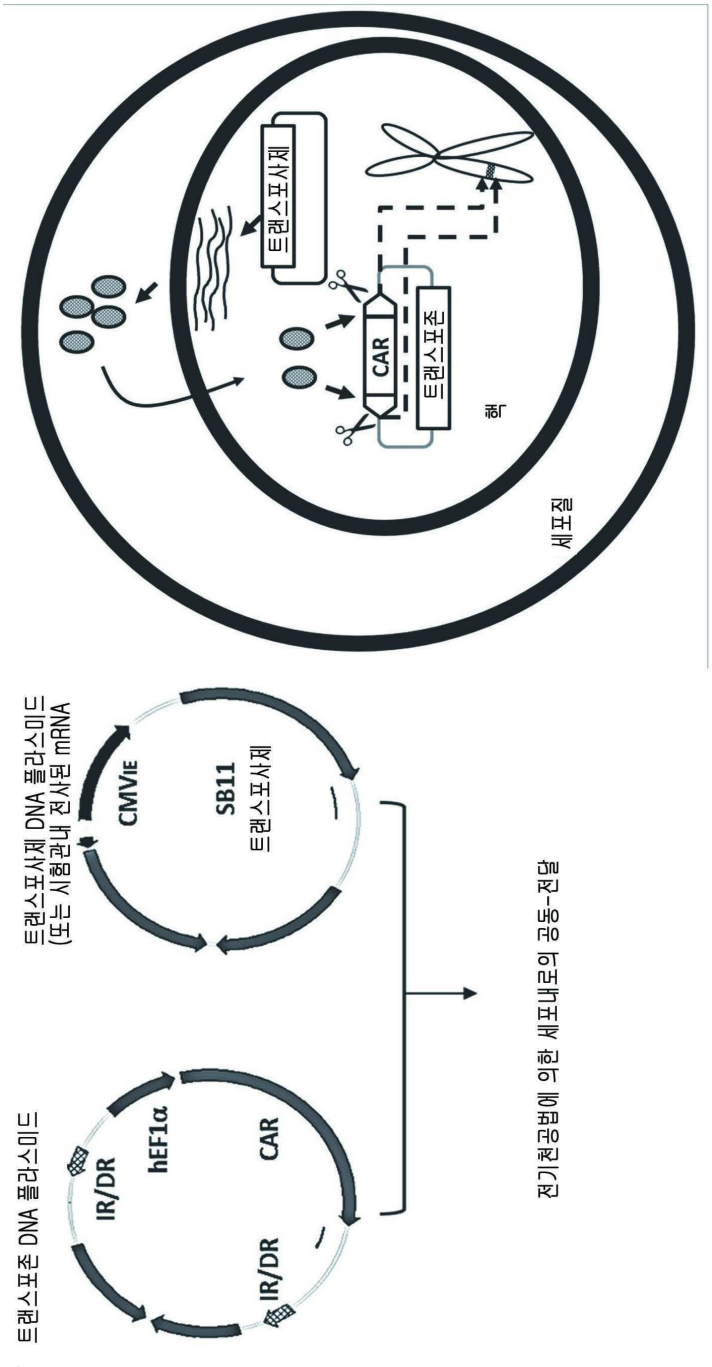
도면1


CD33M
CD33m
V
세포외 영역
C2
C2
Y
Y
ITIM-모티프
ITIM-유사 모티프
Y
Y
시토졸 영역

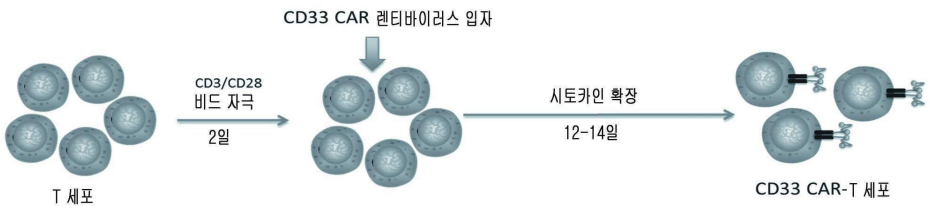
도면2


CMV 프로모터
HIV-1 LTR
HIV-1 psi 패키징 신호
암피실린R
pUC 기점
bGH1 폴리A
HER1t
f1 기점
bGH 폴리A
HIV-1 LTR
T2A
CD33 CAR
EEF1A1 프로모터 및 인핸서

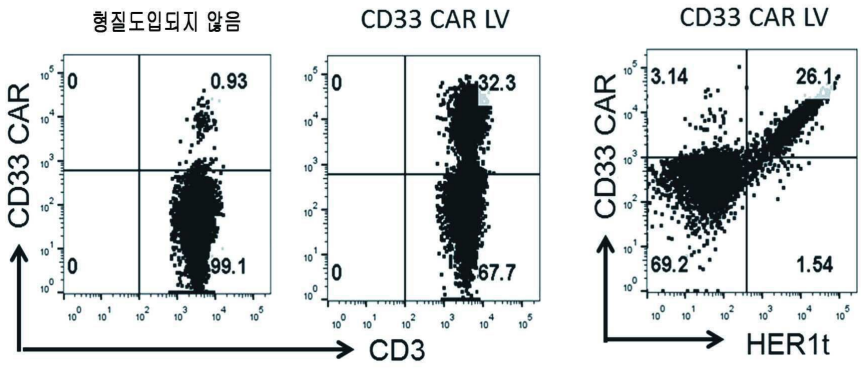
도면3


세포질
핵
트랜스포사제
CAR
트랜스포존
트랜스포사제 DNA 플라스미드
(또는 시험관내 전사된 mRNA
CMVIE
SB11
트랜스포사제
트랜스포존 DNA 플라스미드
IR/DR
hEF1α
CAR
IR/DR
전기천공법에 의한 세포내로의 공동-전달

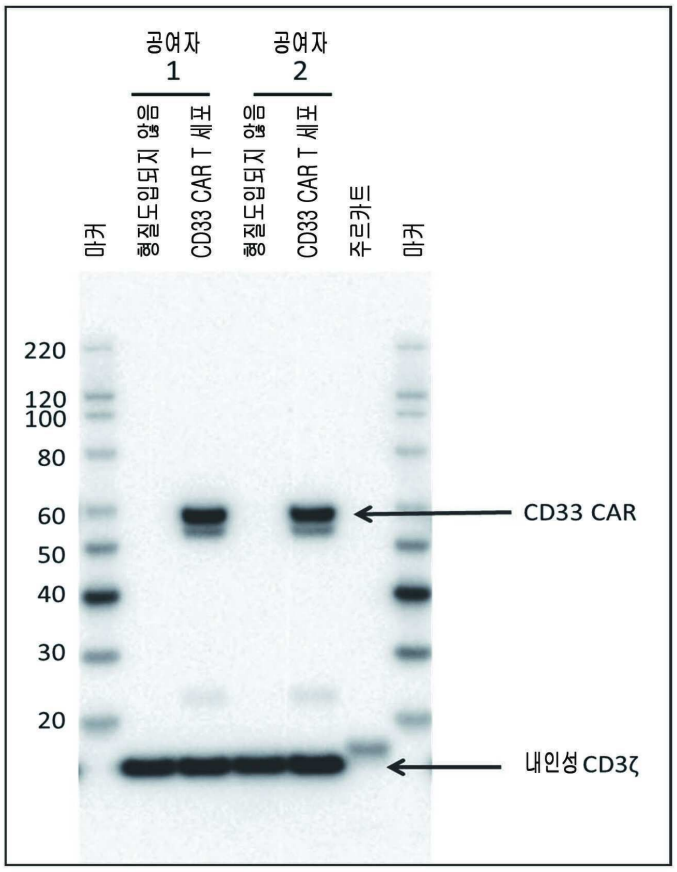
도면4


CD33 CAR 렌티바이러스 입자
CD3/CD28
비드 자극
2일
시토카인 확장
12-14일
T 세포
CD33 CAR-T 세포

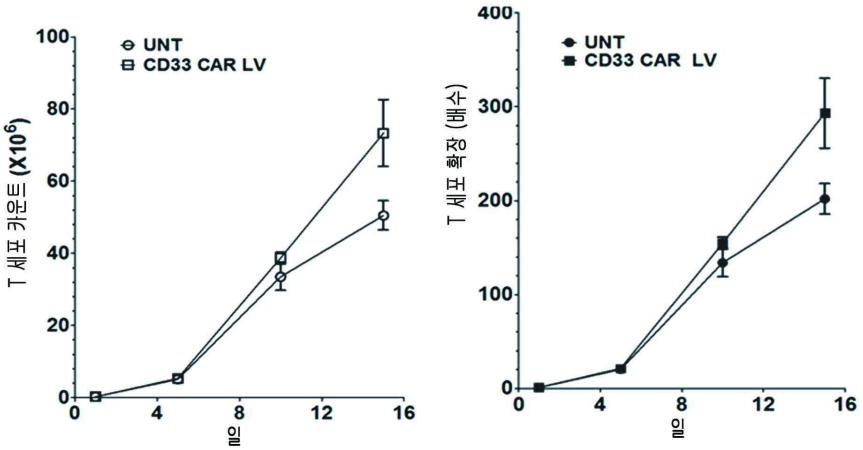
도면5


형질도입되지 않음
CD33 CAR LV
CD33 CAR LV
CD33 CAR
CD3
HER1t
0
0.93
99.1
32.3
67.7
3.14
26.1
69.2
1.54

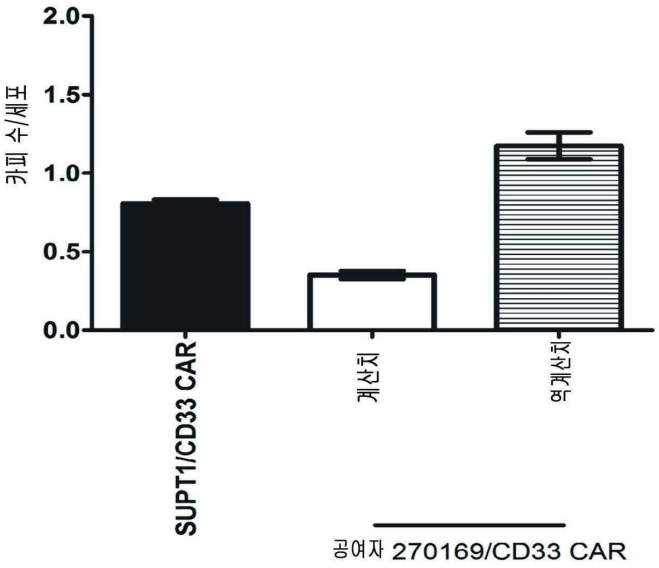
도면6


암여자 1
암여자 2
마커
형질도입되지 않음
CD33 CAR T 세포
형질도입되지 않음
CD33 CAR T 세포
주르카트
마커
220
120
100
80
60
50
40
30
20
CD33 CAR
내인성 CD3ζ

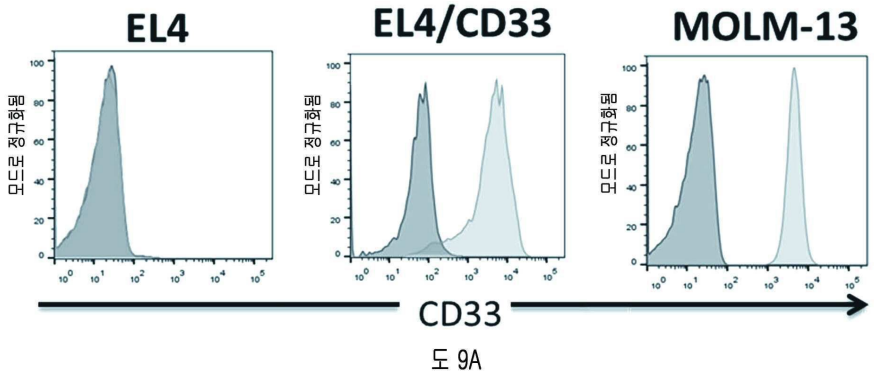
도면7



도면8

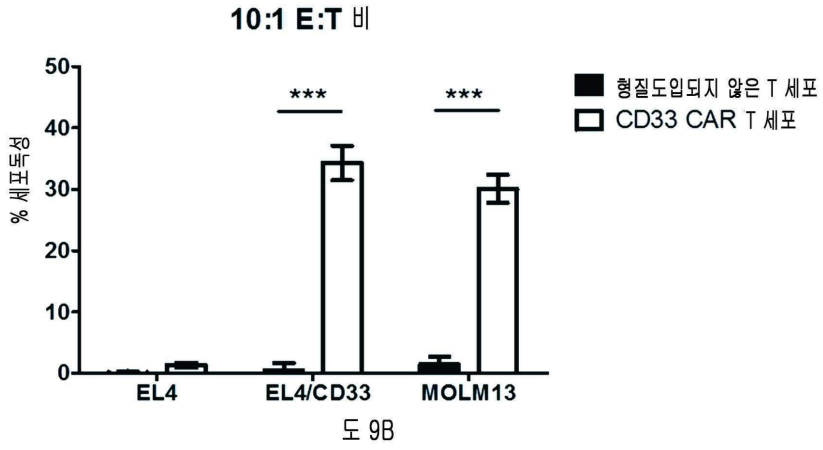


도면9a



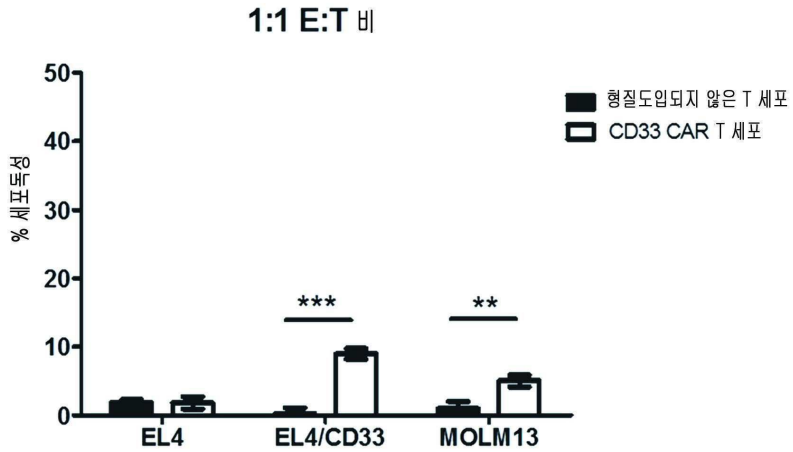
도 9A

도면9b



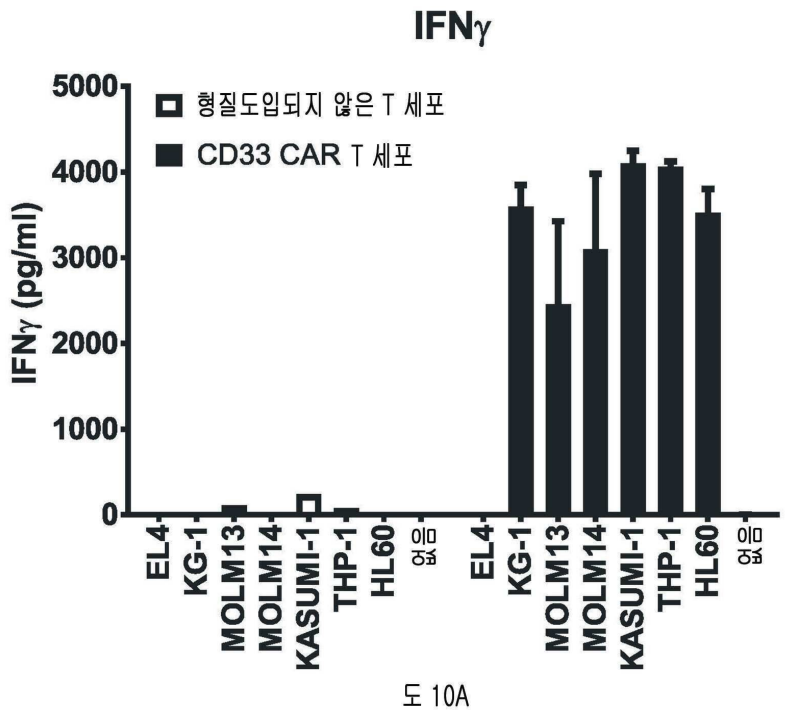
도 9B

도면9c



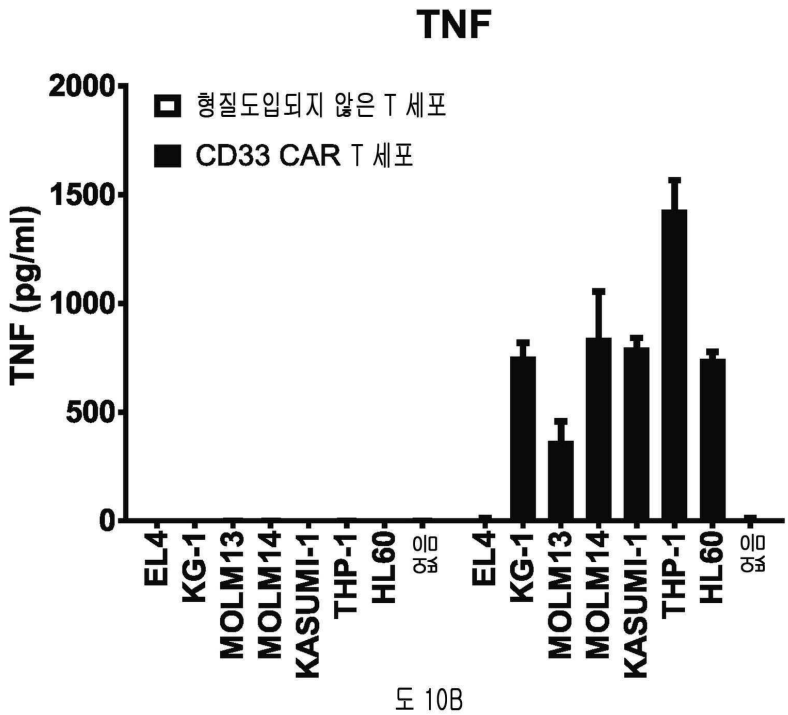
도 9C

도면10a



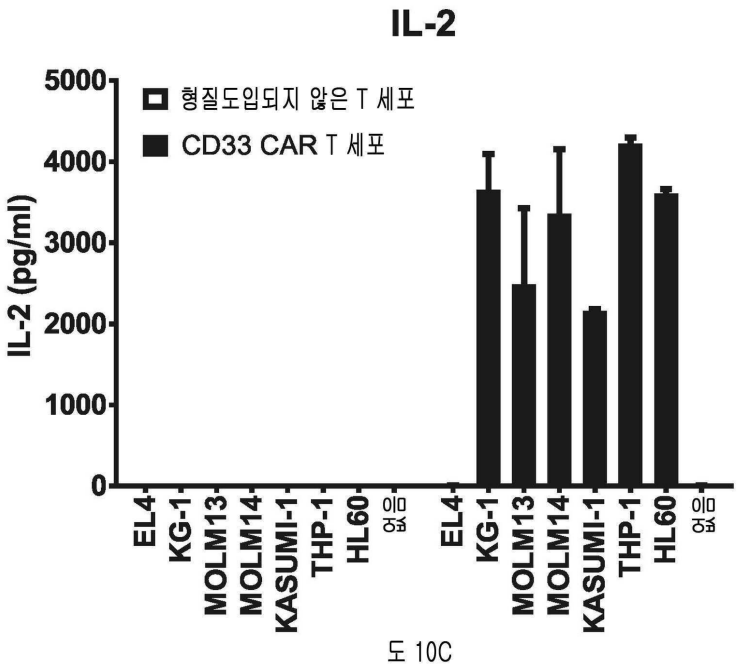
도 10A

도면10b



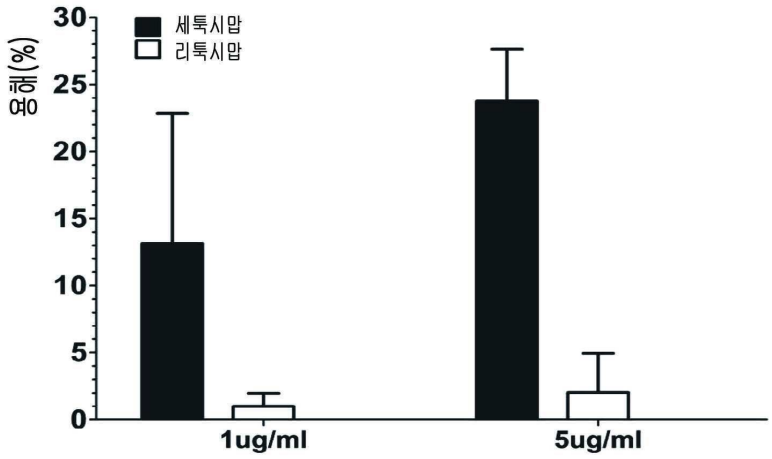
도 10B

도면10c

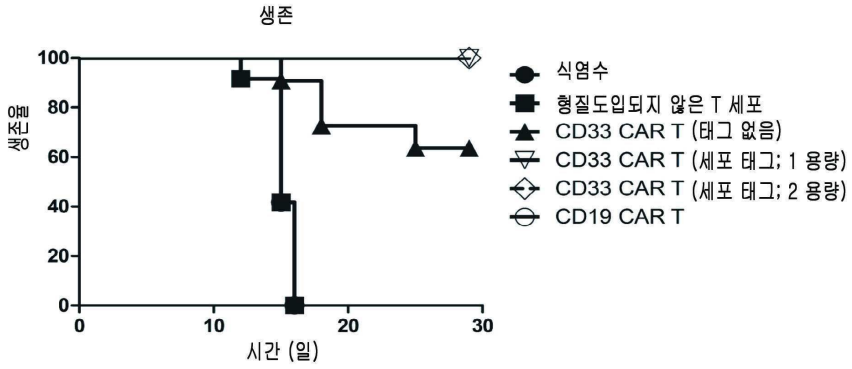


도 10C

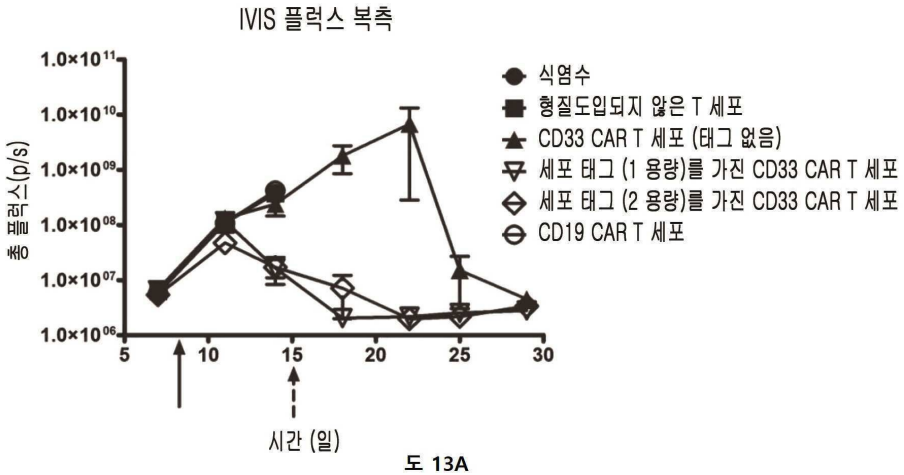
도면11



도면12

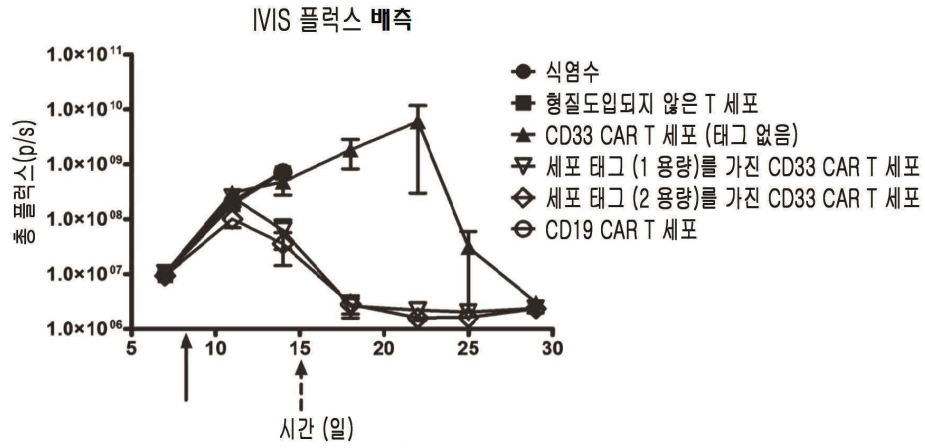


도면13a



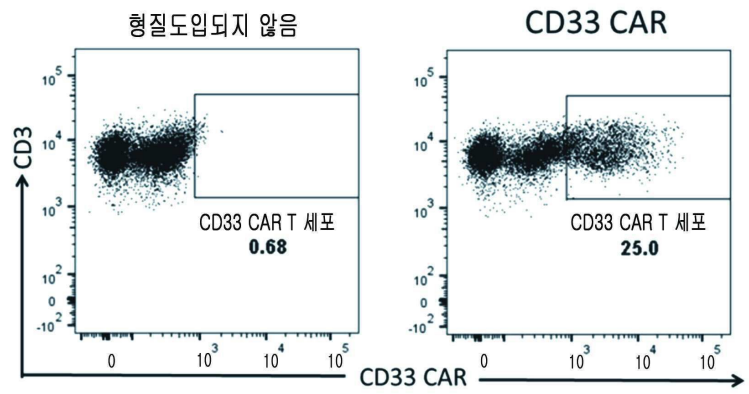
도 13A

도면13b



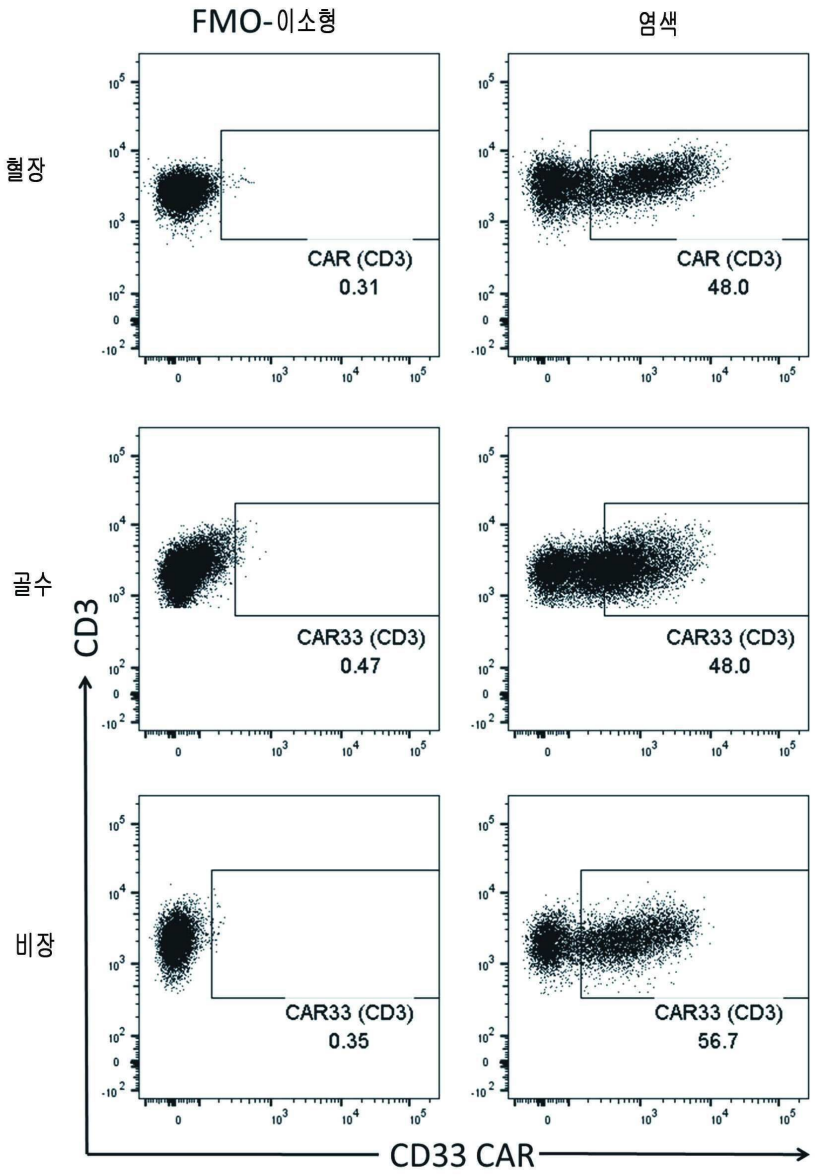
도 13B

도면14a



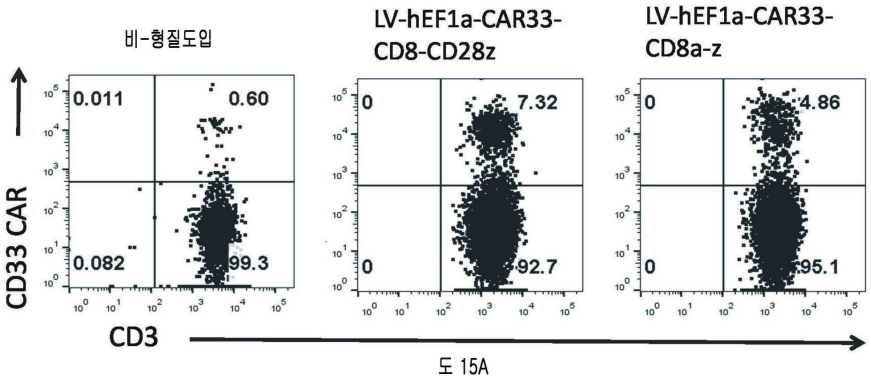
도 14A

도면14b



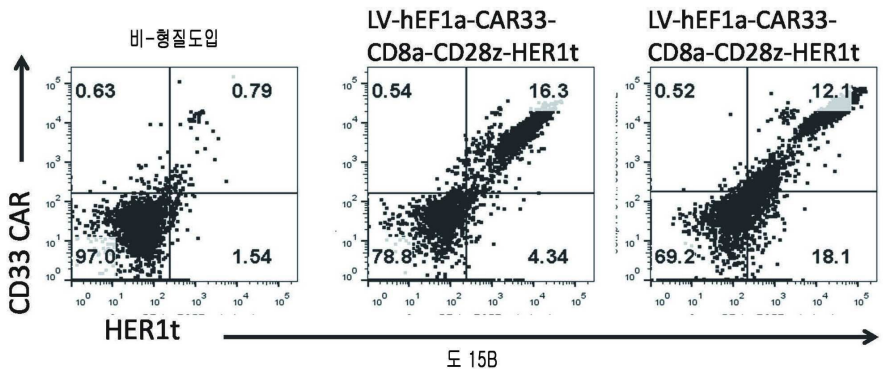
도 14B

도면15a



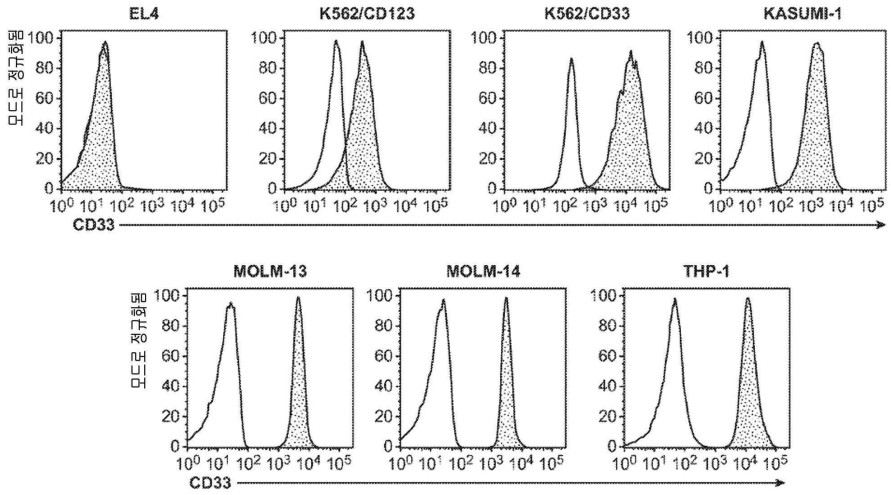
도 15A

도면15b



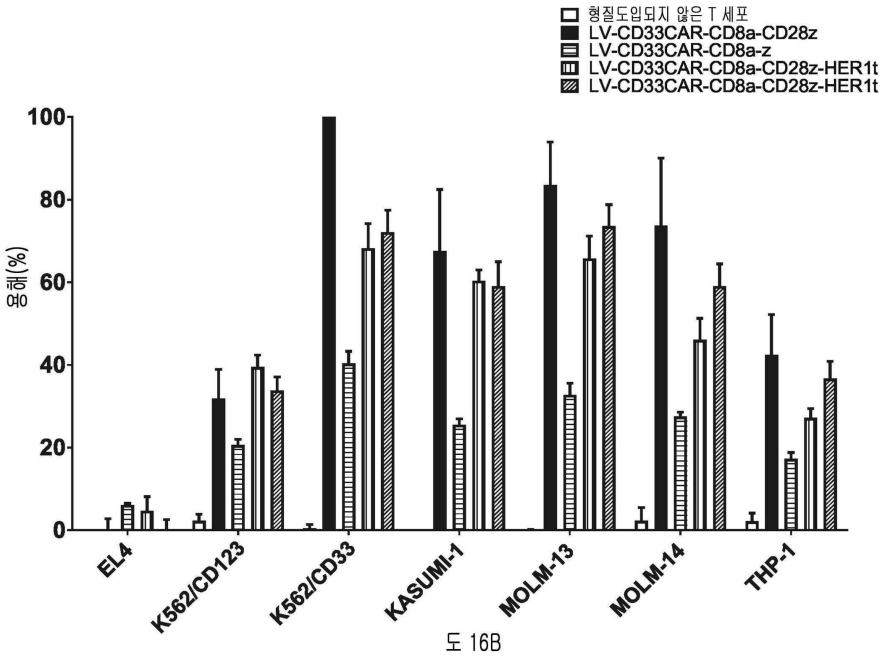
도 15B

도면16a



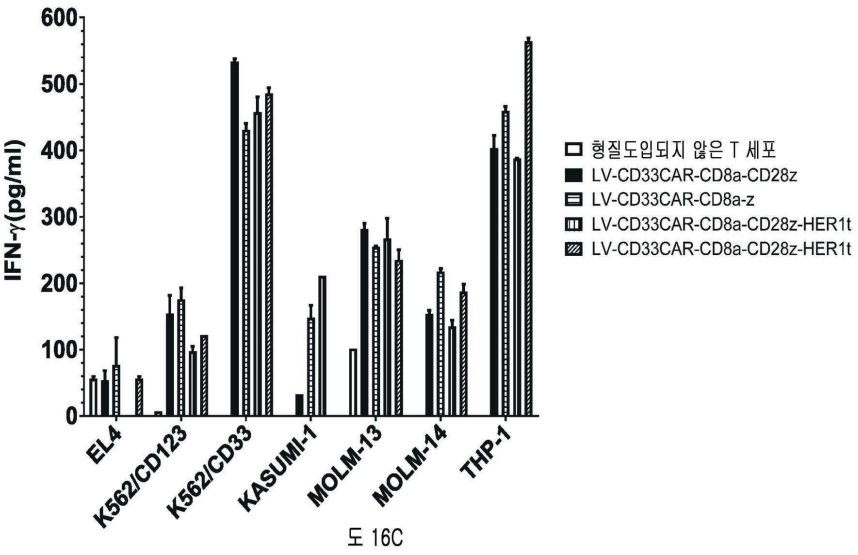
도 16A

도면16b



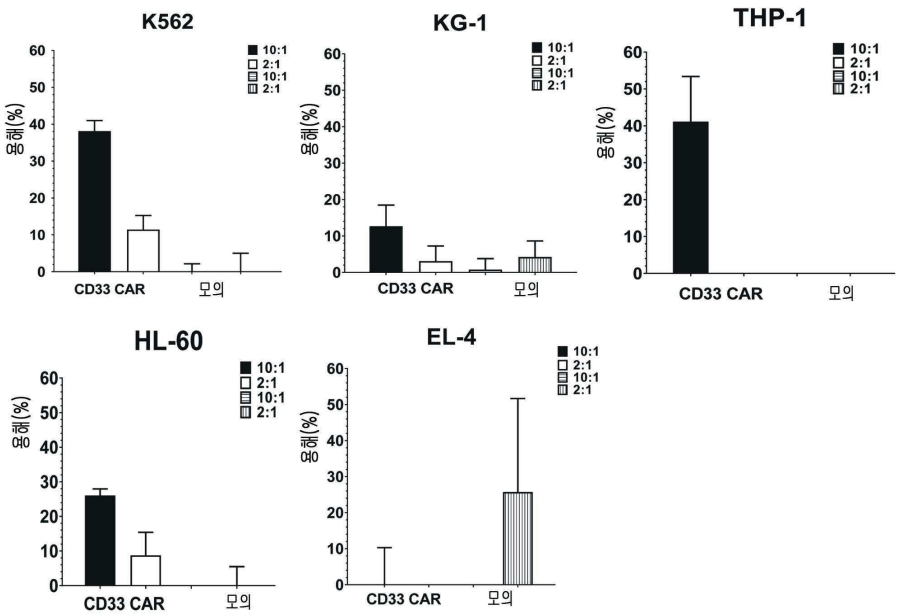
도 16B

도면16c

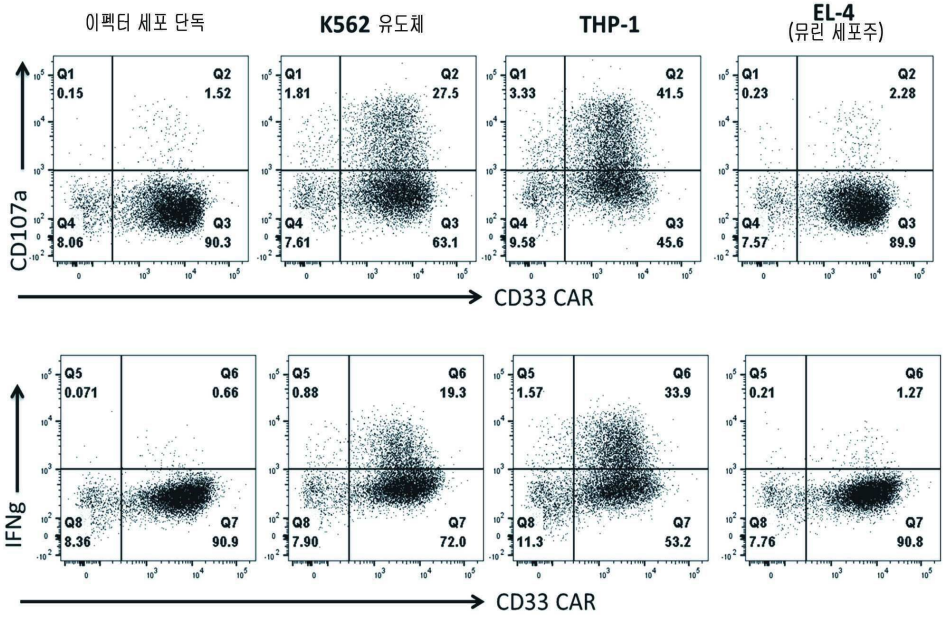


도 16C

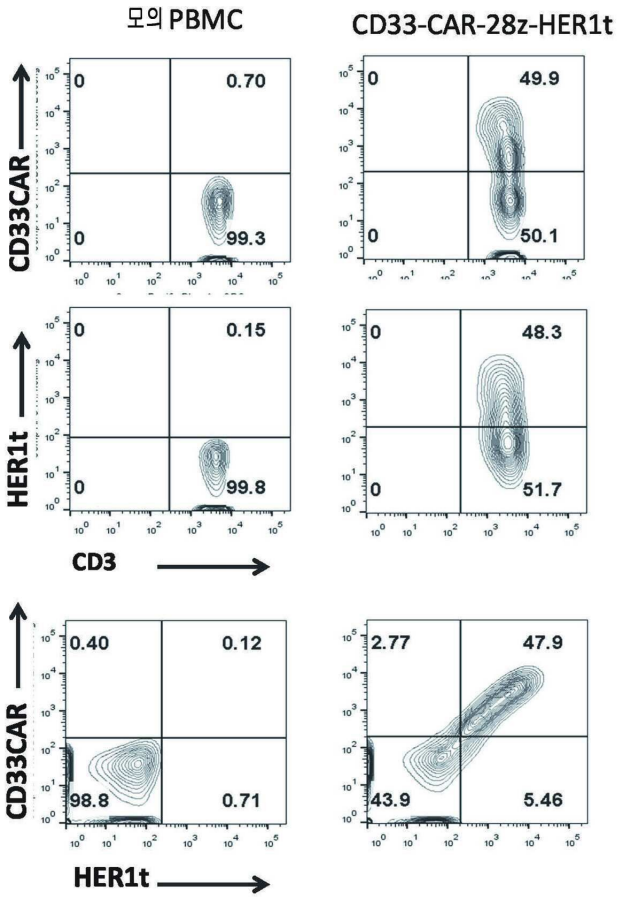
도면17


K562
KG-1
THP-1
HL-60
EL-4
10:1
2:1
10:1
2:1
용해(%)
CD33 CAR
모의

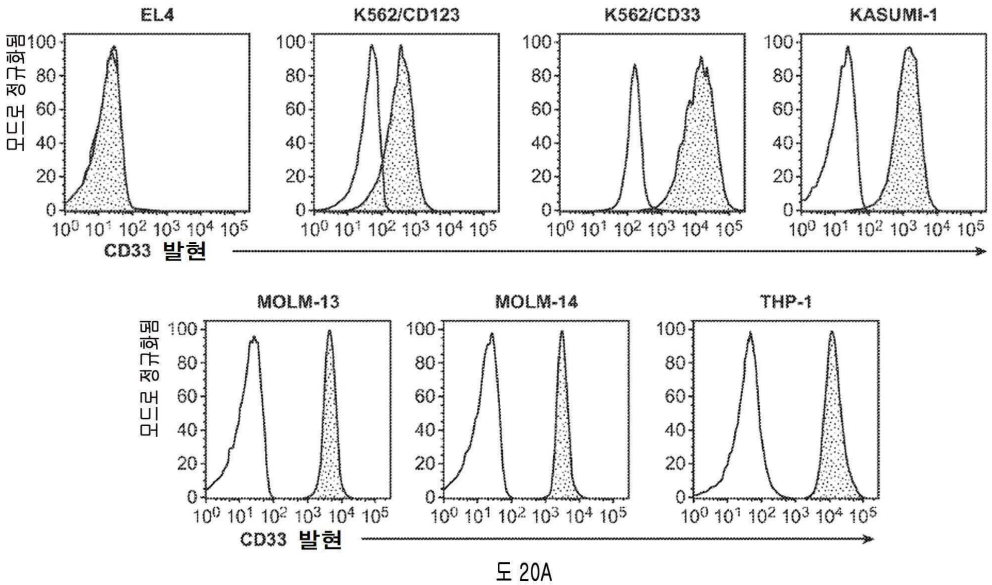
도면18


이펙터 세포 단독
K562 유도체
THP-1
EL-4
(뮤린 세포주)
CD107a
IFNg
CD33 CAR
Q1 0.15
Q2 1.52
Q4 8.06
Q3 90.3
Q1 1.81
Q2 27.5
Q4 7.61
Q3 63.1
Q1 3.33
Q2 41.5
Q4 9.58
Q3 45.6
Q1 0.23
Q2 2.28
Q4 7.57
Q3 89.9
Q5 0.071
Q6 0.66
Q8 8.36
Q7 90.9
Q5 0.88
Q6 19.3
Q8 7.90
Q7 72.0
Q5 1.57
Q6 33.9
Q8 11.3
Q7 53.2
Q5 0.21
Q6 1.27
Q8 7.76
Q7 90.8

도면19

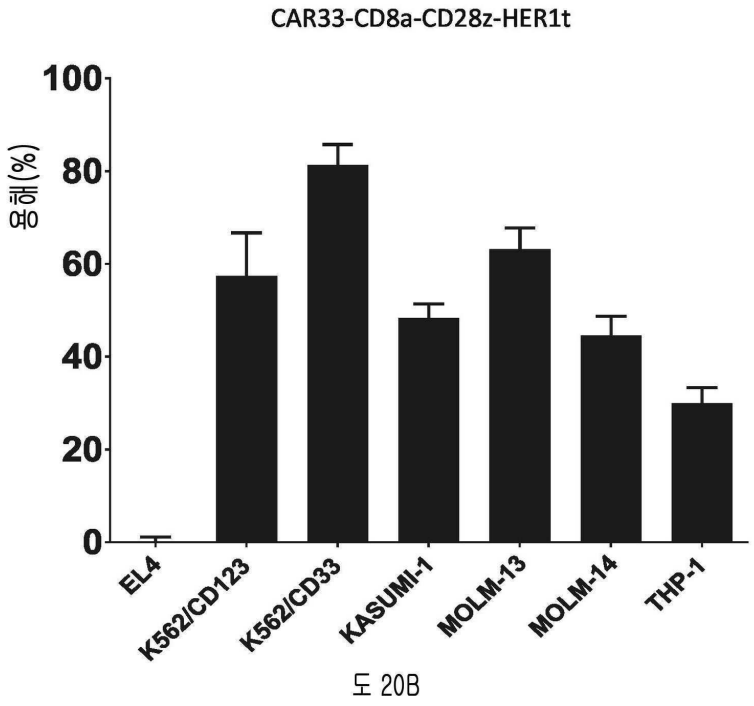


도면20a



도 20A

도면20b


CAR33-CD8a-CD28z-HER1t
용해(%)
100
80
60
40
20
0
EL4
K562/CD123
K562/CD33
KASUMI-1
MOLM-13
MOLM-14
THP-1

도 20B

도면21a

서열명	서열 번호	서열
hM195 VL (aa)	1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGKAPKL LIYAASNQGSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPDDFATYYCQQSKEVPW TFGQGTKVEIK
hM195 VL (nt)	2	Gacattcagatgacccagtctccgagctctctgtccgcatcagtaggagacaggg tcaccatcacatgcagagccagcgaaagtgtcgacaattatggcattagctttat gaactggttccaacagaaacccgggaaggctcctaagcttctgatttacgctgca tccaaccaaggctccggggtaccctctcgcttctcaggcagtggatctgggacag acttcactctcaccatttcatctctgcagcctgatgacttcgcaacctattactg tcagcaaagtaaggaggttccgtggacgttcggtcaagggaccaaggtggagatc aaa
hM195 VH (aa)	3	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQGLEWIGY IYPYNGGTGYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGR PAMDYWGQGTLVTVSS
hM195 VH (nt)	4	Caggttcagctggtgcagtctggagctgaggtgaagaagcctgggagctcagtga aggtttcctgcaaagcttctggctacaccttcactgactacaacatgcactgggt gaggcaggctcctggccaaggcctggaatggattggatatatttatccttacaat ggtggtaccggctacaaccagaagttcaagagcaaggccacaattacagcagacg agagtactaacacagcctacatggaactctccagcctgaggtctgaggacactgc agtctattactgcgcaagagggcgccccgctatggactactggggccaagggact ctggtcactgtctcttca
(G4S)3 링커 (nt)	5	Ggtggcggtggctcgggcggtggtgggtcgggtggcggcggatct
(G4S)3 링커 (aa)	6	GGGGSGGGGSGGGGS
링커를 가진 hM195 scFv (nt)	7	Gacattcagatgacccagtctccgagctctctgtccgcatcagtaggagacaggg tcaccatcacatgcagagccagcgaaagtgtcgacaattatggcattagctttat gaactggttccaacagaaacccgggaaggctcctaagcttctgatttacgctgca tccaaccaaggctccggggtaccctctcgcttctcaggcagtggatctgggacag acttcactctcaccatttcatctctgcagcctgatgacttcgcaacctattactg tcagcaaagtaaggaggttccgtggacgttcggtcaagggaccaaggtggagatc aaaGgtggcggtggctcgggcggtggtgggtcgggtggcggcggatctcaggttc agctggtgcagtctggagctgaggtgaagaagcctgggagctcagtgaaggtttc ctgcaaagcttctggctacaccttcactgactacaacatgcactgggtgaggcag gctcctggccaaggcctggaatggattggatatatttatccttacaatggtggta ccggctacaaccagaagttcaagagcaaggccacaattacagcagacgagagtac taacacagcctacatggaactctccagcctgaggtctgaggacactgcagtctat

도면21b

서열명	서열번호	서열
		tactgcgcaagagggcgccccgctatggactactggggccaagggactctggtca ctgtctcttca
링커를 가진 hM195 scFv (aa)	8	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGKAPKL LIYAASNQGSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPDDFATYYCQQSKEVPW TFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGYTFTDYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIYPYNGGTGYNQKFKSKATITADE STNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRPAMDYWGQGTLVTVSS
M2H12 VH (aa)	9	QVQLQQSGPELVRPGTFVKISCKASGYTFTNYD INWVNQRPGQGLEWIGWIYPGDGSTKYNEKF KAKATLTADKSSSTAYLQLNNLTSENSAVYFCAS GYEDAMDYWGQGTSVTVSS
M2H12 VL (aa)	10	DIKMTQSPSSMYASLGERVIINCKASQDINSYLS WFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSG SGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGA GTKLELKR
DRB2 VH (aa)	11	EVKLQESGPELVKPGASVKMSCKASGYKFTDYV VHWLKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTKYNEKF KGKATLTSDKSSSTAYMEVSSLTSEDSAVYYCA RDYRYEVYGMDYWGQGTSVTVSS
DRB2 VL (aa)	12	DIVLTQSPTIMSASPGERVTMTCTASSSVNYIH WYQQKSGDSPLRWIFDTSKVASGVPARFSGSG SGTSYSLTISTMEAEDAATYYCQQWRSYPLTFG DGTRLELKRADAAPTVS
My9-6 VH (aa)	13	QVQLQQPGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTS YYIHWIKQTPGQGLEWVGVIYPGNDDISYNQK FKGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYC AREVRLRYFDVWGAGTTVTVSS
My9-6 VL (aa)	14	NIMLTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVFFSS SQKNYLAWYQQIPGQSPKLLIYWASTRESGVP DRFTGSGSGTDFTLTISSVQSEDLAIYYCHQYLS SRTFGGGTKLEIKR
GM-CSFRa 신호 펩티드 (nt)	15	Atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgtgagctgccccaccccgcctttc tgctgatcccc
GM-CSFRa 신호 펩티드 (aa)	16	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP
CD8알파 TM (nt)	17	Atctacatctgggcccctctggccggcacctgtggcgtgctgctgctgagcctgg tcatcaccctgtactgcaaccaccggaat

도면21c

서열명	서열번호	서열
CD8알파 TM (aa)	18	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN
CD28 TM (nt)	19	Ttttgggtgctggtggtggttggtggagtcctggcttgctatagcttgctagtaacagtggcctttattattttctgggtg
CD28 TM (aa)	20	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
CD8알파 힌지(nt)	21	Aagcccaccaccaccccctgccccctagacctccaaccccagcccctacaatcgccagccagccccctgagcctgaggcccgaagcctgtagacctgccgctggcggagccgtgcacaccagaggcctggatttcgcctgcgac
CD8알파 힌지 (aa)	22	KPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD
4-1BB 신호전달 도메인(nt)	23	Aagagaggccggaagaaactgctgtacatcttcaagcagcccttcatgcggcccgtgcagaccacccaggaagaggacggctgcagctgccggttccccgaggaagaggaaggcggctgcgaactg
4-1BB 신호전달 도메인 (aa)	24	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
CD3ζ 신호전달 도메인(nt)	25	Cgggtgaagttcagccggagcgccgacgcccctgcctaccagcagggccagaaccagctgtacaacgagctgaacctgggccggagggaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggccgggaccctgagatgggcggcaagccccggagaaagaaccctcaggagggcctgtataacgaactgcagaaagacaagatggccgaggcctacagcgagatcggcatgaagggcgagcggcggaggggcaagggccacgacggcctgtaccagggcctgagcaccgccaccaaggatacctacgacgccctgcacatgcaggccctgccccccaga
CD3ζ 신호전달 도메인 (aa)	26	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
CD28 신호전달 도메인(nt)	27	Aggagcaagcggagcagaggcggccacagcgactacatgaacatgaccccccggaggcctggccccacccggaagcactaccagccctacgcccctcccagggacttcgccgcctaccggagc
CD28 신호전달 도메인 (aa)	28	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS
T2A (nt)	29	GAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCT
T2A (aa)	30	EGRGSLLTCGDVEENPGP

도면21d

서열명	서열번호	서열
HER1t (nt)	31	Cgcaaagtgtgtaacggaataggtattggtgaatttaaagactcactctccataa atgctacgaatattaaacacttcaaaaactgcacctccatcagtggcgatctcca catcctgccggtggcatttaggggtgactccttcacacatactcctcctctggat ccacaggaactggatattctgaaaaccgtaaaggaaatcacagggtttttgctga ttcaggcttggcctgaaaacaggacggacctccatgcctttgagaacctagaaat catacgcggcaggaccaagcaacatggtcagttttctcttgcagtcgtcagcctg aacataacatccttgggattacgctccctcaaggagataagtgatggagatgtga taatttcaggaaacaaaaatttgtgctatgcaaatacaataaactggaaaaaact gtttgggacctccggtcagaaaaccaaaattataagcaacagaggtgaaaacagc tgcaaggccacaggccaggtctgccatgccttgtgctcccccgagggctgctggg gcccggagcccagggactgcgtctcttgccggaatgtcagccgaggcagggaatg cgtggacaagtgcaaccttctggagggtgagccaagggagtttgtggagaactct gagtgcatacagtgccacccagagtgcctgcctcaggccatgaacatcacctgca caggacggggaccagacaactgtatccagtgtgcccactacattgacggccccca ctgcgtcaagacctgcccggcaggagtcatgggagaaaacaacaccctggtctgg aagtacgcagacgccggccatgtgtgccacctgtgccatccaaactgcacctacg gatgcactgggccaggtcttgaaggctgtccaacgaatgggcctaagatcccgtc catcgccactgggatggtgggggccctcctcttgctgctggtggtggccctgggg atcggcctcttcatg
HER1t (aa)	32	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTH TPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQH GQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGT SGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGR ECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCA HYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGL EGCPTNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM
IgK 신호 펩티드 (nt)	33	Atgaggctccctgctcagctcctggggctgctaatgctctgggtcccaggatcca gtggg
IgK 신호 펩티드 (aa)	34	MRLPAQLLGLLMLWVPGSSG
FL CD20 (nt)	35	Atgacaacacccagaaattcagtaaatgggactttcccggcagagccaatgaaag gccctattgctatgcaatctggtccaaaaccactcttcaggaggatgtcttcact ggtgggccccacgcaaagcttcttcatgagggaatctaagactttgggggctgtc cagattatgaatgggctcttccacattgccctgggggtcttctgatgatcccag cagggatctatgcacccatctgtgtgactgtgtggtaccctctctggggaggcat tatgtatattatttccggatcactcctggcagcaacggagaaaaactccaggaag tgtttggtcaaaggaaaaatgataatgaattcattgagcctctttgctgccattt ctggaatgattctttcaatcatggacatacttaatattaaaatttcccatttttt aaaaatggagagtctgaattttattagagctcacacaccatatattaacatatac

도면21e

서열명	서열 번호	서열
		aactgtgaaccagctaatccctctgagaaaaactccccatctacccaatactgtt acagcatacaatctctgttcttgggcattttgtcagtgatgctgatctttgcctt cttccaggaacttgtaatagctggcatcgttgagaatgaatggaaaagaacgtgc tccagacccaaatctaacatagttctcctgtcagcagaagaaaaaaaagaacaga ctattgaaataaaagaagaagtggttgggctaactgaaacatcttcccaaccaaa gaatgaagaagacattgaaattattccaatccaagaagaggaagaagaagaaaca gagacgaactttccagaacctccccaagatcaggaatcctcaccaatagaaaatg acagctctcct
FL CD20 (aa)	36	MTTPRNSVNGTFPAEPMKGPIAMQSGPKPLFRRMSSLVGPTQSFFMRESK TLGAVQIMNGLFHIALGGLLMIPAGIYAPICVTVWYPLWGGIMYIISGSL LAATEKNSRKCLVKGKMIMNSLSLFAAISGMILSIMDILNIKISHFLKME SLNFIRAHTPYINIYNCEPANPSEKNSPSTQYCYSIQSLFLGILSVMLIF AFFQELVIAGIVENEWKRTCSRPKSNIVLLSAEEKKEQTIEIKEEVVGLT ETSSQPKNEEDIEIIPIQEEEEEETETNFPEPPQDQESSPIENDSSP
mbIL-15 (aa)	37	MDWTWILFLVAAATRVHSNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKV TAMKC FLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIK EFLQS FVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITCPPPMSVEHADIWVK SYSLY SRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAPP STVTT AGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISS HESSH GTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLLACY LKSRQ TPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDLENCSHHL
hM195scFv- CD8a- CD28m-Z	38	atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgtgagctgccccaccccgcctttc tgctgatccccgacattcagatgacccagtctccgagctctctgtccgcatcagt aggagacagggtcaccatcacatgcagagccagcgaaagtgtcgacaattatggc attagctttatgaactggttccaacagaaacccgggaaggctcctaagcttctga tttacgctgcatccaaccaaggctccggggtaccctctcgcttctcaggcagtgg atctgggacagacttcactctcaccatttcatctctgcagcctgatgacttcgca acctattactgtcagcaaagtaaggaggttccgtggacgttcggtcaagggacca aggtggagatcaaaggtggcggtggctcgggcggtggtgggtcgggtggcggcgg atctcaggttcagctggtgcagtctggagctgaggtgaagaagcctgggagctca gtgaaggtttcctgcaaagcttctggctacaccttcactgactacaacatgcact gggtgaggcaggctcctggccaaggcctggaatggattggatatatttatccttta caatggtggtaccggctacaaccagaagttcaagagcaaggccacaattacagca gacgagagtactaacacagcctacatggaactctccagcctgaggtctgaggaca ctgcagtctattactgcgcaagagggcgccccgctatggactactggggccaagg

도면21f

서열명	서열번호	서열
		gactctggtcactgtctcttcaaagcccaccaccacccctgcccctagacctcca accccagcccctacaatcgccagccagcccctgagcctgaggcccgaagcctgta gacctgccgctggcggagccgtgcacaccagaggcctggatttcgcctgcgacat ctacatctgggcccctctggccggcacctgtggcgtgctgctgctgagcctggtc atcaccctgtactgcaaccaccggaataggagcaagcggagcagaggcggccaca gcgactacatgaacatgaccccccggaggcctggccccacccggaagcactacca gccctacgccccctcccagggacttcgccgcctaccggagccgggtgaagttcagc cggagcgccgacgcccctgcctaccagcagggccagaaccagctgtacaacgagc tgaacctgggccggagggaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggccggga ccctgagatgggcggcaagccccggagaaagaaccctcaggagggcctgtataac gaactgcagaaagacaagatggccgaggcctacagcgagatcggcatgaagggcg agcggcggaggggcaagggccacgacggcctgtaccagggcctgagcaccgccac caaggatacctacgacgccctgcacatgcaggccctgcccccaga
hM195scFv-CD8a-CD28m-Z	39	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASES VDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQGSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPDDFATYYCQQSKEVPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQV QLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIY PYNGGTGYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRPA MDYWGQGTLVTVSSKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRGGHSD YMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQL YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
hM195scFv-CD8a-Z	40	atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgtgagctgccccaccccgcctttc tgctgatccccgacattcagatgacccagtctccgagctctctgtccgcatcagt aggagacagggtcaccatcacatgcagagccagcgaaagtgtcgacaattatggc attagctttatgaactggttccaacagaaacccgggaaggctcctaagcttctga tttacgctgcatccaaccaaggctccggggtaccctctcgcttctcaggcagtgg atctgggacagacttcactctcaccatttcatctctgcagcctgatgacttcgca acctattactgtcagcaaagtaaggaggttccgtggacgttcggtcaagggacca aggtggagatcaaaggtggcggtggctcgggcggtggtgggtcgggtggcggcgg atctcaggttcagctggtgcagtctggagctgaggtgaagaagcctgggagctca gtgaaggtttcctgcaaagcttctggctacaccttcactgactacaacatgcact gggtgaggcaggctcctggccaaggcctggaatggattggatatatttatcctta caatggtggtaccggctacaaccagaagttcaagagcaaggccacaattacagca gacgagagtactaacacagcctacatggaactctccagcctgaggtctgaggaca ctgcagtctattactgcgcaagagggcgccccgctatggactactggggccaagg gactctggtcactgtctcttcaaagcccaccaccacccctgcccctagacctcca accccagcccctacaatcgccagccagcccctgagcctgaggcccgaagcctgta gacctgccgctggcggagccgtgcacaccagaggcctggatttcgcctgcgacat ctacatctgggcccctctggccggcacctgtggcgtgctgctgctgagcctggtc atcaccctgtactgcaaccaccggaatcgggtgaagttcagccggagcgccgacg

도면21g

서열명	서열번호	서열
		cccctgcctaccagcagggccagaaccagctgtacaacgagctgaacctgggccg gagggaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggccgggaccctgagatgggc ggcaagccccggagaaagaaccctcaggagggcctgtataacgaactgcagaaag acaagatggccgaggcctacagcgagatcggcatgaagggcgagcggcggaggggg caagggccacgacggcctgtaccagggcctgagcaccgccaccaaggatacctac gacgccctgcacatgcaggccctgcccccaga
hM195scFv-CD8a-Z	41	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASES VDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQGSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPDDFATYYCQQSKEVPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQV QLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIY PYNGGTGYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRPA MDYWGQGTLVTVSSKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRVKFSRSADAP AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP R
hM195scFv-CD8a-CD28m-Z-T2A-GM-CSFRasp.HER1t	42	ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGTGAGCTGCCCCACCCCGCCTTTC TGCTGATCCCCGACATTCAGATGACCCAGTCTCCGAGCTCTCTGTCCGCATCAGT AGGAGACAGGGTCACCATCACATGCAGAGCCAGCGAAAGTGTCGACAATTATGGC ATTAGCTTTATGAACTGGTTCCAACAGAAACCCGGGAAGGCTCCTAAGCTTCTGA TTTACGCTGCATCCAACCAAGGCTCCGGGGTACCCTCTCGCTTCTCAGGCAGTGG ATCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATTTCATCTCTGCAGCCTGATGACTTCGCA ACCTATTACTGTCAGCAAAGTAAGGAGGTTCCGTGGACGTTCGGTCAAGGGACCA AGGTGGAGATCAAAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTCGGGTGGCGGCGG ATCTCAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGAGCTCA GTGAAGGTTTCCTGCAAAGCTTCTGGCTACACCTTCACTGACTACAACATGCACT GGGTGAGGCAGGCTCCTGGCCAAGGCCTGGAATGGATTGGATATATTTATCCTTA CAATGGTGGTACCGGCTACAACCAGAAGTTCAAGAGCAAGGCCACAATTACAGCA GACGAGAGTACTAACACAGCCTACATGGAACTCTCCAGCCTGAGGTCTGAGGACA CTGCAGTCTATTACTGCGCAAGAGGGCGCCCCGCTATGGACTACTGGGGCCAAGG GACTCTGGTCACTGTCTCTTCAAAGCCCACCACCACCCCTGCCCCTAGACCTCCA ACCCCAGCCCCTACAATCGCCAGCCAGCCCCTGAGCCTGAGGCCCGAAGCCTGTA GACCTGCCGCTGGCGGAGCCGTGCACACCAGAGGCCTGGATTTCGCCTGCGACAT CTACATCTGGGCCCCTCTGGCCGGCACCTGTGGCGTGCTGCTGCTGAGCCTGGTC ATCACCCTGTACTGCAACCACCGGAATAGGAGCAAGCGGAGCAGAGGCGGCCACA GCGACTACATGAACATGACCCCCCGGAGGCCTGGCCCCACCCGGAAGCACTACCA GCCCTACGCCCCTCCCAGGGACTTCGCCGCCTACCGGAGCCGGGTGAAGTTCAGC CGGAGCGCCGACGCCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGC TGAACCTGGGCCGGAGGGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGCCGGGA CCCTGAGATGGGCGGCAAGCCCCGGAGAAAGAACCCTCAGGAGGGCCTGTATAAC GAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCG AGCGGCGGAGGGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCAC

도면21h

서열명	서열번호	서열
		CAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCCAGACTCGAGGGC GGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCG GCCCTAGGATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCC AGCATTCCTCCTGATCCCACGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTT AAAGACTCACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAAACACTTCAAAAACTGCACCT CCATCAGTGGCGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATTTAGGGGTGACTCCTTCAC ACATACTCCTCCTCTGGATCCACAGGAACTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAA ATCACAGGGTTTTTGCTGATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATG CCTTTGAGAACCTAGAAATCATACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTC TCTTGCAGTCGTCAGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAG ATAAGTGATGGAGATGTGATAATTTCAGGAAACAAAAATTTGTGCTATGCAAATA CAATAAACTGGAAAAAACTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAAATTATAAG CAACAGAGGTGAAAACAGCTGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTGC TCCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCGGAGCCCAGGGACTGCGTCTCTTGCCGGAATG TCAGCCGAGGCAGGGAATGCGTGGACAAGTGCAACCTTCTGGAGGGTGAGCCAAG GGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCATACAGTGCCACCCAGAGTGCCTGCCTCAG GCCATGAACATCACCTGCACAGGACGGGGACCAGACAACTGTATCCAGTGTGCCC ACTACATTGACGGCCCCCACTGCGTCAAGACCTGCCCGGCAGGAGTCATGGGAGA AAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGCAGACGCCGGCCATGTGTGCCACCTGTGC CATCCAAACTGCACCTACGGATGCACTGGGCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCAACGA ATGGGCCTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCT GCTGGTGGTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCATG
hM195scFv-CD8a-CD28m-Z-T2A-GM-CSFRasp.HER1t	43	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASES VDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQGSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPDDFATYYCQQSKEVPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQV QLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIY PYNGGTGYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRPA MDYWGQGTLVTVSSKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRGGHSD YMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQL YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRLEGGGEGR GSLLTCGDVEENPGPRMLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEF KDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDIL KTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNI TSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRG ENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGE PREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTC PAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIPS IATGMVGALLLLLVVALGIGLFM
hM195scFv	44	Atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgtgagctgccccaccccgcctttc tgctgatccccgacattcagatgacccagtctccgagctctctgtccgcatcagt

도면21i

서열명	서열번호	서열
		aggagacagggtcaccatcacatgcagagccagcgaaagtgtcgacaattatggc attagctttatgaactggttccaacagaaacccgggaaggctcctaagcttctga tttacgctgcatccaaccaaggctccggggtaccctctcgcttctcaggcagtgg atctgggacagacttcactctcaccatttcatctctgcagcctgatgacttcgca acctattactgtcagcaaagtaaggaggttccgtggacgttcggtcaagggacca aggtggagatcaaaggtggcggtggctcgggcggtggtgggtcgggtggcggcgg atctcaggttcagctggtgcagtctggagctgaggtgaagaagcctgggagctca gtgaaggtttcctgcaaagcttctggctacaccttcactgactacaacatgcact gggtgaggcaggctcctggccaaggcctggaatggattggatatatttatcctta caatggtggtaccggctacaaccagaagttcaagagcaaggccacaattacagca gacgagagtactaacacagcctacatggaactctccagcctgaggtctgaggaca ctgcagtctattactgcgcaagagggcgccccgctatggactactggggccaagg gactctggtcactgtctcttca
hM195scFv	45	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASES VDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQGSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPDDFATYYCQQSKEVPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQV QLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIY PYNGGTGYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRPA MDYWGQGTLVTVSS
hM195scFv-CD8a-4-1BB-Z	46	atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgtgagctgccccaccccgcctttc tgctgatccccgacattcagatgacccagtctccgagctctctgtccgcatcagt aggagacagggtcaccatcacatgcagagccagcgaaagtgtcgacaattatggc attagctttatgaactggttccaacagaaacccgggaaggctcctaagcttctga tttacgctgcatccaaccaaggctccggggtaccctctcgcttctcaggcagtgg atctgggacagacttcactctcaccatttcatctctgcagcctgatgacttcgca acctattactgtcagcaaagtaaggaggttccgtggacgttcggtcaagggacca aggtggagatcaaaggtggcggtggctcgggcggtggtgggtcgggtggcggcgg atctcaggttcagctggtgcagtctggagctgaggtgaagaagcctgggagctca gtgaaggtttcctgcaaagcttctggctacaccttcactgactacaacatgcact gggtgaggcaggctcctggccaaggcctggaatggattggatatatttatcctta caatggtggtaccggctacaaccagaagttcaagagcaaggccacaattacagca gacgagagtactaacacagcctacatggaactctccagcctgaggtctgaggaca ctgcagtctattactgcgcaagagggcgccccgctatggactactggggccaagg gactctggtcactgtctcttcaaagcccaccaccaccccctgcccctagacctcca accccagccccctacaatcgccagccagccccctgagcctgaggcccgaagcctgta gacctgccgctggcggagccgtgcacaccagaggcctggatttcgcctgcgacat ctacatctgggcccctctggccggcacctgtggcgtgctgctgctgagcctggtc atcaccctgtactgcaaccaccggaataagagaggccggaagaaactgctgtaca tcttcaagcagcccttcatgcggcccgtgcagaccacccaggaagaggacggctg cagctgccggttccccgaggaagaggaaggcggctgcgaactgcgggtgaagttc agccggagcgccgacgcccctgcctaccagcagggccagaaccagctgtacaacg agctgaacctgggccggagggaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggccg

도면21j

서열명	서열번호	서열
		ggaccctgagatgggcggcaagccccggagaaagaaccctcaggagggcctgtat aacgaactgcagaaagacaagatggccgaggcctacagcgagatcggcatgaagg gcgagcggcggaggggcaagggccacgacggcctgtaccagggcctgagcaccgc caccaaggatacctacgacgccctgcacatgcaggccctgcccccaga
hM195scFv-CD8a-4-1BB-Z	47	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASES VDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQGSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPDDFATYYCQQSKEVPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQV QLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIY PYNGGTGYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRPA MDYWGQGTLVTVSSKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNKRGRKKLLYIF KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQ LYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
hM195scFv-CD8a-4-1BB-Z-T2A-GM-CSFRasp.HER1t	48	atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgtgagctgccccaccccgcctttc tgctgatccccgacattcagatgacccagtctccgagctctctgtccgcatcagt aggagacagggtcaccatcacatgcagagccagcgaaagtgtcgacaattatggc attagctttatgaactggttccaacagaaacccgggaaggctcctaagcttctga tttacgctgcatccaaccaaggctccggggtaccctctcgcttctcaggcagtgg atctgggacagacttcactctcaccatttcatctctgcagcctgatgacttcgca acctattactgtcagcaaagtaaggaggttccgtggacgttcggtcaagggacca aggtggagatcaaaggtggcggtggctcgggcggtggtgggtcgggtggcggcgg atctcaggttcagctggtgcagtctggagctgaggtgaagaagcctgggagctca gtgaaggtttcctgcaaagcttctggctacaccttcactgactacaacatgcact gggtgaggcaggctcctggccaaggcctggaatggattggatatatttatcctta caatggtggtaccggctacaaccagaagttcaagagcaaggccacaattacagca gacgagagtactaacacagcctacatggaactctccagcctgaggtctgaggaca ctgcagtctattactgcgcaagagggcgccccgctatggactactggggccaagg gactctggtcactgtctcttcaaagcccaccaccaccccctgccctagacctcca accccagcccctacaatcgccagccagcccctgagcctgaggcccgaagcctgta gacctgccgctggcggagccgtgcacaccagaggcctggatttcgcctgcgacat ctacatctgggcccctctggccggcacctgtggcgtgctgctgctgagcctggtc atcaccctgtactgcaaccaccggaataagagaggccggaagaaactgctgtaca tcttcaagcagcccttcatgcggcccgtgcagaccacccaggaagaggacggctg cagctgccggttccccgaggaagaggaaggcggctgcgaactgcgggtgaagttc agccggagcgccgacgcccctgcctaccagcagggccagaaccagctgtacaacg agctgaacctgggccggagggaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggccg ggaccctgagatgggcggcaagccccggagaaagaaccctcaggagggcctgtat aacgaactgcagaaagacaagatggccgaggcctacagcgagatcggcatgaagg gcgagcggcggaggggcaagggccacgacggcctgtaccagggcctgagcaccgc caccaaggatacctacgacgccctgcacatgcaggccctgcccccagactcgag ggcggcggagagggcagaggaagtcttctaacatgcggtgacgtggaggagaatc

도면21k

서열명	서열 번호	서열
		ccggccctaggatgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccaca cccagcattcctcctgatcccacgcaaagtgtgtaacggaataggtattggtgaa tttaaagactcactctccataaatgctacgaatattaaacacttcaaaaactgca cctccatcagtggcgatctccacatcctgccggtggcatttaggggtgactcctt cacacatactcctcctctggatccacaggaactggatattctgaaaaccgtaaag gaaatcacagggtttttgctgattcaggcttggcctgaaaacaggacggacctcc atgcctttgagaacctagaaatcatacgcggcaggaccaagcaacatggtcagtt ttctcttgcagtcgtcagcctgaacataacatccttgggattacgctccctcaag gagataagtgatggagatgtgataatttcaggaaacaaaaatttgtgctatgcaa atacaataaactggaaaaaactgtttgggacctccggtcagaaaaccaaaattat aagcaacagaggtgaaaacagctgcaaggccacaggccaggtctgccatgccttg tgctcccccgagggctgctggggcccggagcccagggactgcgtctcttgccgga atgtcagccgaggcagggaatgcgtggacaagtgcaaccttctggagggtgagcc aagggagtttgtggagaactctgagtgcatacagtgccacccagagtgcctgcct caggccatgaacatcacctgcacaggacggggaccagacaactgtatccagtgtg cccactacattgacggcccccactgcgtcaagacctgcccggcaggagtcatggg agaaaacaacaccctggtctggaagtacgcagacgccggccatgtgtgccacctg tgccatccaaactgcacctacggatgcactgggccaggtcttgaaggctgtccaa cgaatgggcctaagatcccgtccatcgccactgggatggtgggggccctcctctt gctgctggtggtggccctggggatcggcctcttcatg
hM195scFv-CD8a-4-1BB-Z-T2A-GM-CSFRasp.HER1t	49	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASES VDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQGSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPDDFATYYCQQSKEVPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQV QLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIY PYNGGTGYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRPA MDYWGQGTLVTVSSKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNKRGRKKLLYIF KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQ LYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRLEGGGEG RGSLLTCGDVEENPGPRMLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGE FKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDI LKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLN ITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNR GENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEG EPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKT CPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIP SIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM
hM195scFv-CD8a-4-1BB-Z-T2A.FL	50	ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGTGAGCTGCCCCACCCCGCCTTTC TGCTGATCCCCGACATTCAGATGACCCAGTCTCCGAGCTCTCTGTCCGCATCAGT AGGAGACAGGGTCACCATCACATGCAGAGCCAGCGAAAGTGTCGACAATTATGGC ATTAGCTTTATGAACTGGTTCCAACAGAAACCCGGGAAGGCTCCTAAGCTTCTGA

도면211

서열명	서열번호	서열
CD20		TTTACGCTGCATCCAACCAAGGCTCCGGGGTACCCTCTCGCTTCTCAGGCAGTGG ATCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATTTCATCTCTGCAGCCTGATGACTTCGCA ACCTATTACTGTCAGCAAAGTAAGGAGGTTCCGTGGACGTTCGGTCAAGGGACCA AGGTGGAGATCAAAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTCGGGTGGCGGCGG ATCTCAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGAGCTCA GTGAAGGTTTCCTGCAAAGCTTCTGGCTACACCTTCACTGACTACAACATGCACT GGGTGAGGCAGGCTCCTGGCCAAGGCCTGGAATGGATTGGATATATTTATCCTTA CAATGGTGGTACCGGCTACAACCAGAAGTTCAAGAGCAAGGCCACAATTACAGCA GACGAGAGTACTAACACAGCCTACATGGAACTCTCCAGCCTGAGGTCTGAGGACA CTGCAGTCTATTACTGCGCAAGAGGGCGCCCCGCTATGGACTACTGGGGCCAAGG GACTCTGGTCACTGTCTCTTCAAAGCCCACCACCACCCCTGCCCCTAGACCTCCA ACCCCAGCCCCTACAATCGCCAGCCAGCCCCTGAGCCTGAGGCCCGAAGCCTGTA GACCTGCCGCTGGCGGAGCCGTGCACACCAGAGGCCTGGATTTCGCCTGCGACAT CTACATCTGGGCCCCTCTGGCCGGCACCTGTGGCGTGCTGCTGCTGAGCCTGGTC ATCACCCTGTACTGCAACCACCGGAATAAGAGAGGCCGGAAGAAACTGCTGTACA TCTTCAAGCAGCCCTTCATGCGGCCCGTGCAGACCACCCAGGAAGAGGACGGCTG CAGCTGCCGGTTCCCCGAGGAAGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGGGTGAAGTTC AGCCGGAGCGCCGACGCCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACG AGCTGAACCTGGGCCGGAGGGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGCCG GGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCCCGGAGAAAGAACCCTCAGGAGGGCCTGTAT AACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGG GCGAGCGGCGGAGGGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACCGC CACCAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCCAGACTCGAG GGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATC CCGGCCCTAGGATGACAACACCCAGAAATTCAGTAAATGGGACTTTCCCGGCAGA GCCAATGAAAGGCCCTATTGCTATGCAATCTGGTCCAAAACCACTCTTCAGGAGG ATGTCTTCACTGGTGGGCCCCACGCAAAGCTTCTTCATGAGGGAATCTAAGACTT TGGGGGCTGTCCAGATTATGAATGGGCTCTTCCACATTGCCCTGGGGGGTCTTCT GATGATCCCAGCAGGGATCTATGCACCCATCTGTGTGACTGTGTGGTACCCTCTC TGGGGAGGCATTATGTATATTATTTCCGGATCACTCCTGGCAGCAACGGAGAAAA ACTCCAGGAAGTGTTTGGTCAAAGGAAAAATGATAATGAATTCATTGAGCCTCTT TGCTGCCATTTCTGGAATGATTCTTTCAATCATGGACATACTTAATATTAAAATT TCCCATTTTTTAAAAATGGAGAGTCTGAATTTTATTAGAGCTCACACACCATATA TTAACATATACAACTGTGAACCAGCTAATCCCTCTGAGAAAAACTCCCCATCTAC CCAATACTGTTACAGCATACAATCTCTGTTCTTGGGCATTTTGTCAGTGATGCTG ATCTTTGCCTTCTTCCAGGAACTTGTAATAGCTGGCATCGTTGAGAATGAATGGA AAAGAACGTGCTCCAGACCCAAATCTAACATAGTTCTCCTGTCAGCAGAAGAAAA AAAAGAACAGACTATTGAAATAAAAGAAGAAGTGGTTGGGCTAACTGAAACATCT TCCCAACCAAAGAATGAAGAAGACATTGAAATTATTCCAATCCAAGAAGAGGAAG AAGAAGAAACAGAGACGAACTTTCCAGAACCTCCCCAAGATCAGGAATCCTCACC AATAGAAAATGACAGCTCTCCT
hM195scFv-CD8a-4-	51	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASES VDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQGSGVPSRFSGSGSGTDFTLT

도면21m

서열명	서열 번호	서열
1BB-Z-T2A.FL CD20		ISSLQPDDFATYYCQQSKEVPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQV QLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIY PYNGGTGYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRPA MDYWGQGTLVTVSSKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNKRGRKKLLYIF KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQ LYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRLEGGGEG RGSLLTCGDVEENPGPRMTTPRNSVNGTFPAEPMKGPIAMQSGPKPLFR RMSSLVGPTQSFFMRESKTLGAVQIMNGLFHIALGGLLMIPAGIYAPICV TVWYPLWGGIMYIISGSLLAATEKNSRKCLVKGKMIMNSLSLFAAISGMI LSIMDILNIKISHFLKMESLNFIRAHTPYINIYNCEPANPSEKNSPSTQY CYSIQSLFLGILSVMLIFAFFQELVIAGIVENEWKRTCSRPKSNIVLLSA EEKKEQTIEIKEEVVGLTETSSQPKNEEDIEIIPIQEEEEEETETNFPEP PQDQESSPIENDSSP
인간 CD33(M1-R287)	52	Atgccgctgctgctactgctgcccctgctgtgggcaggggccctggctatggatc caaatttctggctgcaagtgcaggagtcagtgacggtacaggagggtttgtgcgt cctcgtgccctgcactttcttccatcccataccctactacgacaagaactcccca gttcatggttactggttccgggaaggagccattatatccagggactctccagtgg ccacaaacaagctagatcaagaagtacaggaggagactcagggcagattccgcct ccttggggatcccagtaggaacaactgctccctgagcatcgtagacgccaggagg agggataatggttcatacttctttcggatggagagaggaagtaccaaatacagtt acaaatctccccagctctctgtgcatgtgacagacttgacccacaggcccaaaat cctcatccctggcactctagaacccggccactccaaaaacctgacctgctctgtg tcctgggcctgtgagcagggaacacccccgatcttctcctggttgtcagctgccc ccacctccctgggcccaggactactcactcctcggtgctcataatcaccccacg gccccaggaccacggcaccaacctgacctgtcaggtgaagttcgctggagctggt gtgactacggagagaaccatccagctcaacgtcacctatgttccacagaacccaa caactggtatctttccaggagatggctcagggaaacaagagaccagagcaggagt ggttcatggggccattggaggagctggtgttacagccctgctcgctctttgtctc tgcctcatcttcttcatagtgaagacccacaggagg
인간 CD33(M1-R287)	53	MPLLLLLPLLWAGALAMDPNFWLQVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHPIPYY DKNSPVHGYWFREGAIISRDSPVATNKLDQEVQEETQGRFRLLGDPSRNN CSLSIVDARRRDNGSYFFRMERGSTKYSYKSPQLSVHVTDLTHRPKILIP GTLEPGHSKNLTCSVSWACEQGTPPIFSWLSAAPTSLGPRTTHSSVLIIT PRPQDHGTNLTCQVKFAGAGVTTERTIQLNVTYVPQNPTTGIFPGDGSGK QETRAGVVHGAIGGAGVTALLALCLCLIFFIVKTHRR
HER1t- 1	54	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTH TPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQH GQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGT SGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSGGGGSGGG

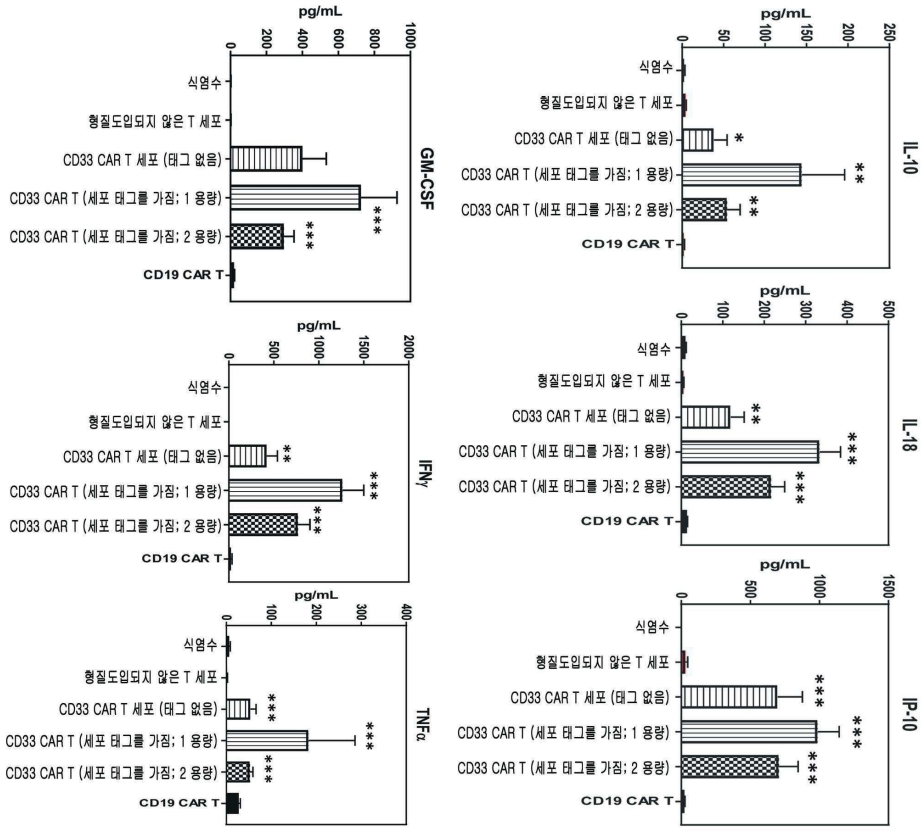
도면21n

서열명	서열번호	서열
		GSGGGGSGGGGSFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRS
HER1t-1	55	cgcaaagtgtgtaacggaataggtattggtgaatttaaagactcactctccataa atgctacgaatattaaacacttcaaaaactgcacctccatcagtggcgatctcca catcctgccggtggcatttaggggtgactccttcacacatactcctcctctggat ccacaggaactggatattctgaaaaccgtaaaggaaatcacagggtttttgctga ttcaggcttggcctgaaaacaggacggacctccatgcctttgagaacctagaaat catacgcggcaggaccaagcaacatggtcagttttctcttgcagtcgtcagcctg aacataacatccttgggattacgctccctcaaggagataagtgatggagatgtga taatttcaggaaacaaaaatttgtgctatgcaaatacaataaactggaaaaaact gtttgggacctccggtcagaaaaccaaaattataagcaacagaggtgaaaacagc tgcaaggccacaggccaggtctgccatgccttgtgctcccccgagggctgctggg gcccggagcccagggactgcgtctctggtggcggtggctcgggcggtggtgggtc gggtggcggcggatctggtggcggtggctcgttttgggtgctggtggtggttggt ggagtcctggcttgctatagcttgctagtaacagtggcctttattattttctggg tgaggagtaagaggagc
CD20t-1	56	MTTPRNSVNGTFPAEPMKGPIAMQSGPKPLFRRMSSLVGPTQSFFMRESK TLGAVQIMNGLFHIALGGLLMIPAGIYAPICVTVWYPLWGGIMYIISGSL LAATEKNSRKCLVKGKMIMNSLSLFAAISGMILSIMDILNIKISHFLKME SLNFIRAHTPYINIYNCEPANPSEKNSPSTQYCYSIQSLFLGILSVMLIF AFFQELVIAGIVENEWKRTCSRPKSNIVLLSAEEKKEQTIEIKEEVVGLT ETSSQPKNEEDIE
Cd20t-1	57	atgaccacaccacggaactctgtgaatggcaccttcccagcagagccaatgaagg gaccaatcgcaatgcagagcggacccaagcctctgtttcggagaatgagctccct ggtgggcccaacccagtccttctttatgagagagtctaagacactgggcgccgtg cagatcatgaacggactgttccacatcgccctgggaggactgctgatgatcccag ccggcatctacgcccctatctgcgtgaccgtgtggtaccctctgtggggcggcat catgtatatcatctccggctctctgctggccgccacagagaagaacagcaggaag tgtctggtgaagggcaagatgatcatgaatagcctgtccctgtttgccgccatct ctggcatgatcctgagcatcatggacatcctgaacatcaagatcagccacttcct gaagatggagagcctgaacttcatcagagcccacacccttacatcaacatctat aattgcgagcctgccaacccatccgagaagaattctccaagcacacagtactgtt attccatccagtctctgttcctgggcatcctgtctgtgatgctgatctttgcctt ctttcaggagctggtcatcgccggcatcgtggagaacgagtggaagaggacctgc agccgccccaagtccaatatcgtgctgctgtccgccgaggagaagaaggagcaga caatcgagatcaaggaggaggtggtgggcctgaccgagacatctagccagcctaa gaatgaggaggatatcgag
DNAX-활성화 단백질 10 (DAP10) 신호전달 도메인	58	ctgtgcgcacgcccacgccgcagccccgcccaagaagatggcaaagtctacatca acatgccaggcaggggc

도면21o

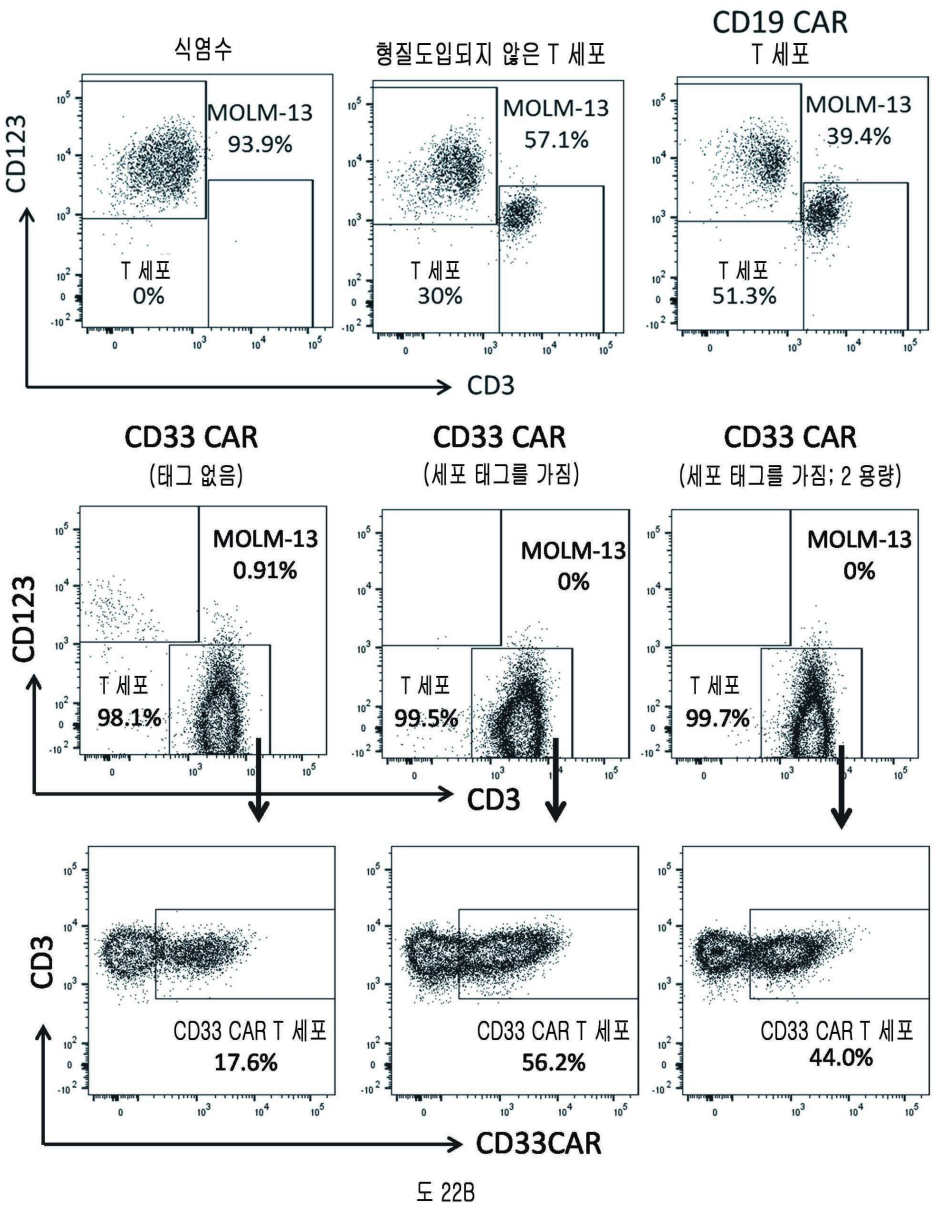
서열명	서열 번호	서열
DNAX-활성화 단백질 10 (DAP10) 신호전달 도메인	59	LCARPRRSPAQEDGKVYINMPGRG
DNAX-활성화 단백질 12 (DAP12) 신호전달 도메인	60	tacttcctgggccggctggtccctcgggggcgaggggctgcggaggcagcgacccggaaacagcgtatcactgagaccgagtcgccttatcaggagctccagggtcagaggtcggatgtctacagcgacctcaacacacagaggccgtattacaaa
DNAX-활성화 단백질 12 (DAP12) 신호전달 도메인	61	YFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK

도면22a



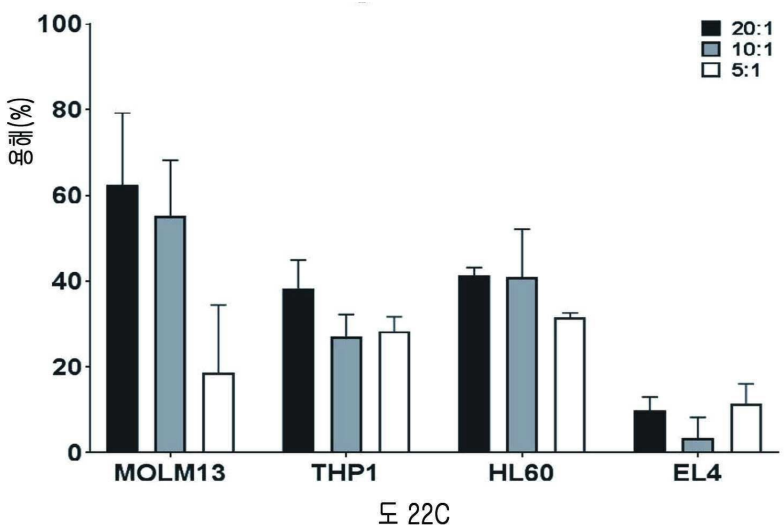
도 22A

도면22b


식염수
형질도입되지 않은 T 세포
CD19 CAR
T 세포
CD123
MOLM-13
93.9%
T 세포
0%
MOLM-13
57.1%
T 세포
30%
MOLM-13
39.4%
T 세포
51.3%
CD3
CD33 CAR
(태그 없음)
CD33 CAR
(세포 태그를 가짐)
CD33 CAR
(세포 태그를 가짐; 2 용량)
MOLM-13
0.91%
T 세포
98.1%
MOLM-13
0%
T 세포
99.5%
MOLM-13
0%
T 세포
99.7%
CD123
CD3
CD3
CD33 CAR T 세포
17.6%
CD33 CAR T 세포
56.2%
CD33 CAR T 세포
44.0%
CD33CAR

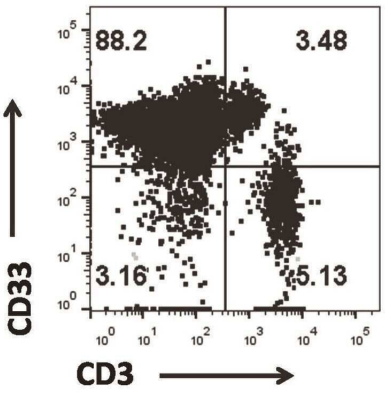
도 22B

도면22c



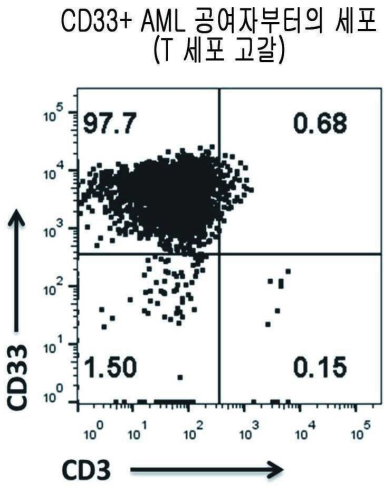
도 22C

도면23a



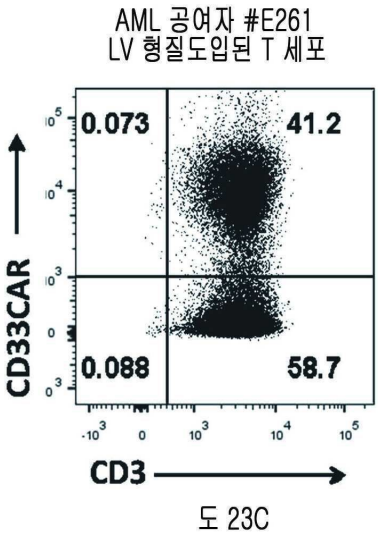
도 23A

도면23b



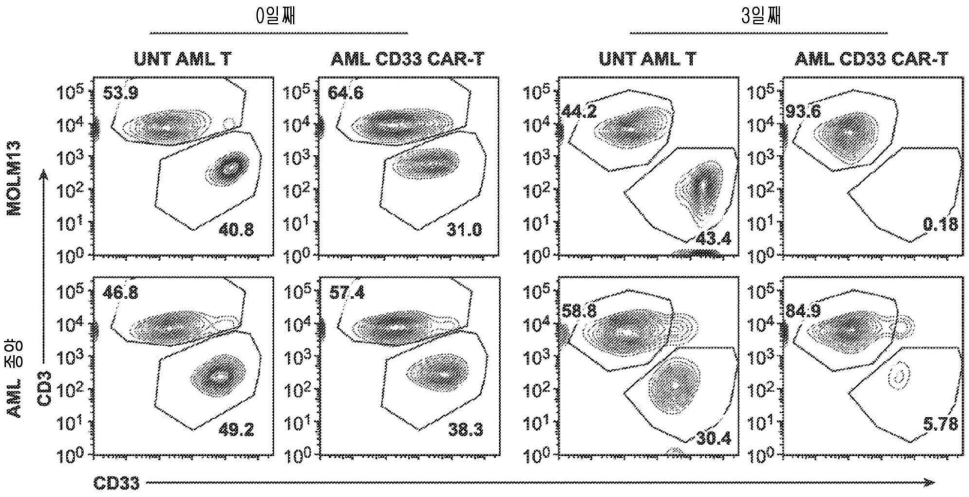
도 23B

도면23c



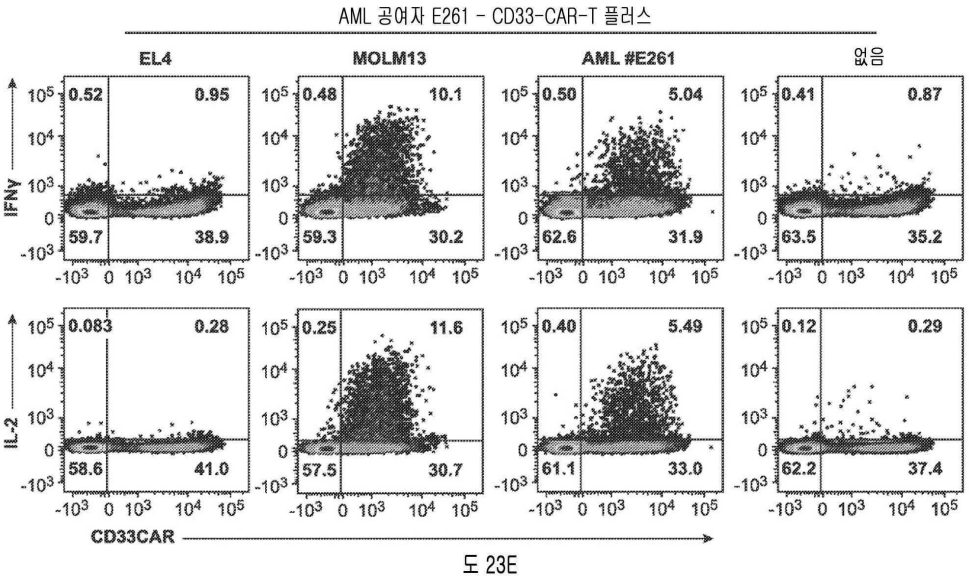
도 23C

도면23d



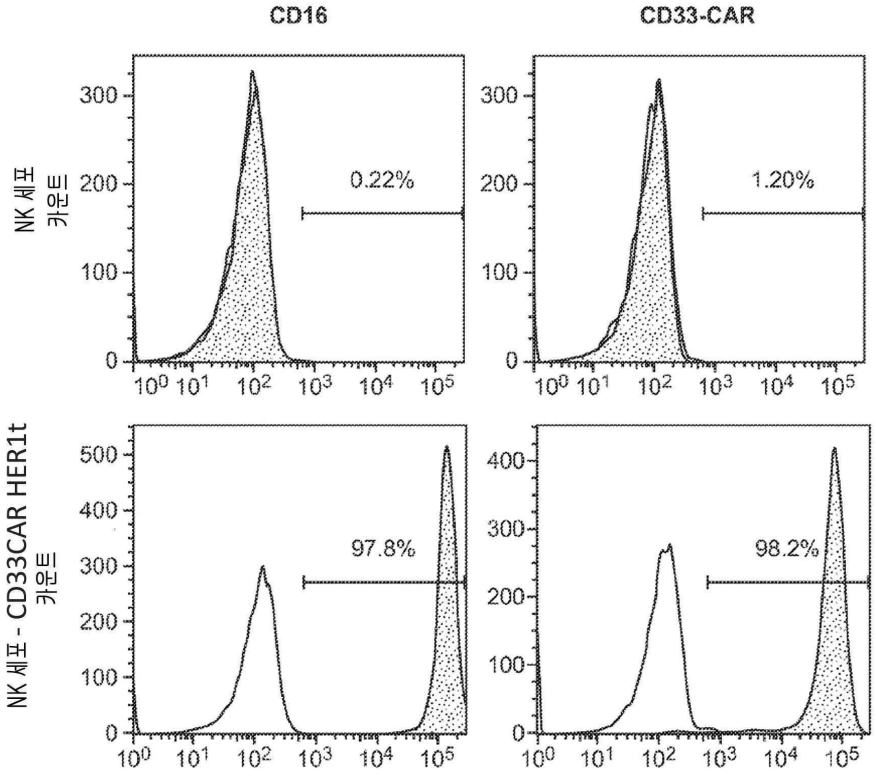
도 23D

도면23e

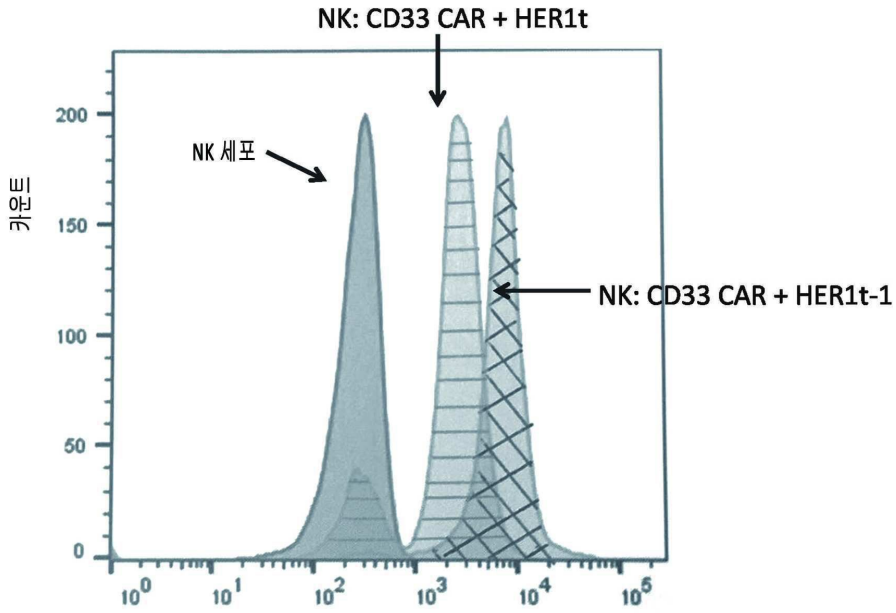


도 23E

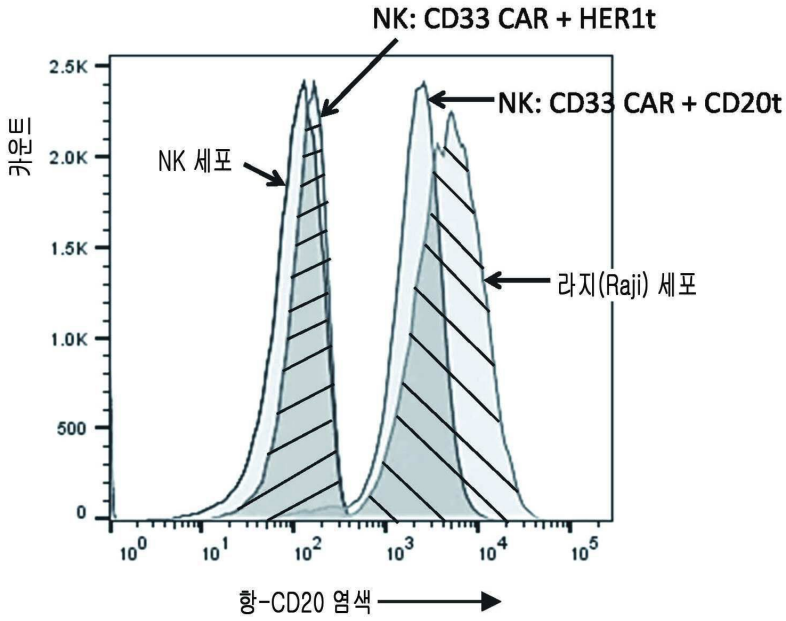
도면24



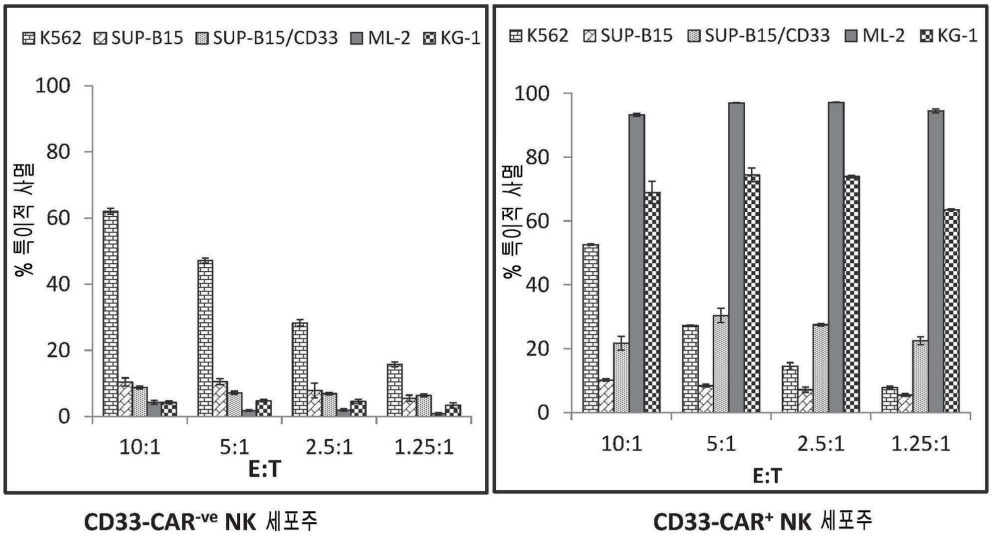
도면25


NK: CD33 CAR + HER1t
NK 세포
NK: CD33 CAR + HER1t-1
카운트
200
150
100
50
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5

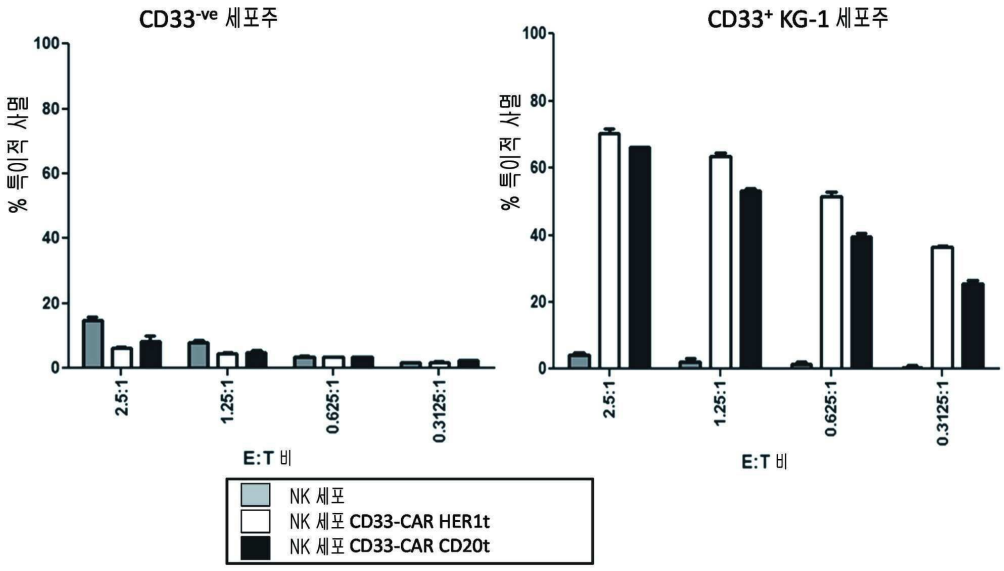
도면26


NK: CD33 CAR + HER1t
NK: CD33 CAR + CD20t
NK 세포
라지(Raji) 세포
카운트
2.5K
2.0K
1.5K
1.0K
500
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
항-CD20 염색

도면27



도면28



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> PRECIGEN, INC.

<120> CD33 SPECIFIC CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS

<130> IPA181477-US-D1

<150> US 62/347,503

<151> 2016-06-08

<160> 62

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 1

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

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

Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 2

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 2

gacattcaga tgacccagtc tccgagctct ctgtccgcat cagtaggaga cagggtcacc 60

atcacatgca gagccagcga aagtgtcgac aattatggca ttagctttat gaactggttc 120

caacagaaac ccgggaaggc tcctaagctt ctgatttacg ctgcatccaa ccaaggctcc 180

ggggtaccct ctcgcttctc aggcagtgga tctgggacag acttcactct caccatttca 240

tctctgcagc ctgatgactt cgcaacctat tactgtcagc aaagtaagga ggttccgtgg 300

acgttcggtc aagggaccaa ggtggagatc aaa 333

<210> 3

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Arg Pro Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 4

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polynucleotide"

<400> 4

caggttcagc tggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctgggagctc agtgaaggtt 60

tcctgcaaag cttctggcta caccttcact gactacaaca tgcactgggt gaggcaggct 120

cctggccaag gcctggaatg gattggatat atttatcctt acaatggtgg taccggctac 180

aaccagaagt tcaagagcaa ggccacaatt acagcagacg agagtactaa cacagcctac 240

atggaactct ccagcctgag gtctgaggac actgcagtct attactgcgc aagagggcgc 300

cccgctatgg actactgggg ccaagggact ctggtcactg tctcttca 348

<210> 5

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

oligonucleotide"

<400> 5

ggtggcggtg gctcgggcgg tggtgggtcg ggtggcggcg gatct 45

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 6

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

1 5 10 15

<210> 7

<211> 726

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 7

gacattcaga tgacccagtc tccgagctct ctgtccgcat cagtaggaga cagggtcacc 60

atcacatgca gagccagcga aagtgtcgac aattatggca ttagctttat gaactggttc 120

caacagaaac ccgggaaggc tcctaagctt ctgatttacg ctgcatccaa ccaaggctcc 180

ggggtaccct ctcgcttctc aggcagtgga tctgggacag acttcactct caccatttca 240

tctctgcagc ctgatgactt cgcaacctat tactgtcagc aaagtaagga ggttccgtgg 300

acgttcggtc aagggaccaa ggtggagatc aaaggtggcg gtggctcggg cggtggtggg 360

tcgggtggcg gcggatctca ggttcagctg gtgcagtctg gagctgaggt gaagaagcct 420

gggagctcag tgaaggtttc ctgcaaagct tctggctaca ccttcactga ctacaacatg 480

cactgggtga ggcaggctcc tggccaaggc ctggaatgga ttggatatat ttatccttac 540

aatggtggta ccggctacaa ccagaagttc aagagcaagg ccacaattac agcagacgag 600

agtactaaca cagcctacat ggaactctcc agcctgaggt ctgaggacac tgcagtctat 660

tactgcgcaa gagggcgccc cgctatggac tactggggcc aagggactct ggtcactgtc 720

tcttca 726

<210> 8

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 8

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

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

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80
Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
100 105 110
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val
115 120 125
Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val
130 135 140
Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Met
145 150 155 160

His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr
165 170 175
Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Ser
180 185 190
Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu
195 200 205
Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
210 215 220

Gly Arg Pro Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
225 230 235 240
Ser Ser

<210> 9
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 9

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
1 5 10 15
Phe Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

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

85 90 95
Ala Ser Gly Tyr Glu Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 10

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 10

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

50 55 60

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

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 11

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 11

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

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

Met Glu Val Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 12

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 12

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

1 5 10 15

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

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Asp Ser Pro Leu Arg Trp Ile Phe

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Thr Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Arg Ser Tyr Pro Leu Thr

85 90 95

Phe Gly Asp Gly Thr Arg Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro

100 105 110

Thr Val Ser

115

<210> 13

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 13

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Ile His Trp Ile Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Ile Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Val Arg Leu Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr

100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 14

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 14

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe Ser

20 25 30

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

35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys His Gln

85 90 95

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

100 105 110

Arg

<210> 15

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 15

atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgtgagctgc cccaccccgc ctttctgctg 60

atcccc 66

<210> 16

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 16

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro

20

<210> 17

<211> 84

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 17

atctacatct gggcccctct ggccggcacc tgtggcgtgc tgctgctgag cctggtcatc 60

accctgtact gcaaccaccg gaat 84

<210> 18

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 18

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 Asn His Arg Asn
20 25

<210> 19

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400
> 19

ttttgggtgc tggtggtggt tggtggagtc ctggcttgct atagcttgct agtaacagtg 60

gcctttatta ttttctgggt g 81

<210> 20

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 20

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
20 25

<210> 21

<211> 141

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 21

aagcccacca ccacccctgc ccctagacct ccaaccccag cccctacaat cgccagccag 60

cccctgagcc tgaggcccga agcctgtaga cctgccgctg gcggagccgt gcacaccaga 120

ggcctggatt tcgcctgcga c 141

<210> 22

<211> 47

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 22

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

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

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

<210> 23

<211> 126

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polynucleotide"

<400> 23

aagagaggcc ggaagaaact gctgtacatc ttcaagcagc ccttcatgcg gcccgtgcag 60

accacccagg aagaggacgg ctgcagctgc cggttccccg aggaagagga aggcggctgc 120

gaactg 126

<210> 24

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 24

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> 25

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polynucleotide"

<400> 25

cgggtgaagt tcagccggag cgccgacgcc cctgcctacc agcagggcca gaaccagctg 60

tacaacgagc tgaacctggg ccggagggag gagtacgacg tgctggacaa gcggagaggc 120

cgggaccctg agatgggcgg caagccccgg agaaagaacc ctcaggaggg cctgtataac 180
gaactgcaga aagacaagat ggccgaggcc tacagcgaga tcggcatgaa gggcgagcgg 240
cggaggggca agggccacga cggcctgtac cagggcctga gcaccgccac caaggatacc 300
tacgacgccc tgcacatgca ggccctgccc cccaga 336

<210> 26
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 26

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

<210> 27
<211> 123
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source

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

<400> 27

aggagcaagc ggagcagagg cggccacagc gactacatga acatgacccc ccggaggcct 60

ggccccaccc ggaagcacta ccagccctac gcccctccca gggacttcgc cgcctaccgg 120

agc 123

<210> 28

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 28

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
35 40

<210> 29

<211> 54

<212> DNA

<213> Thosea asigna virus

<400> 29

gagggcagag gaagtcttct aacatgcggt gacgtggagg agaatcccgg ccct 54

<210> 30

<211> 18

<212> PRT

<213> Thosea asigna virus

<400> 30

Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro
1 5 10 15

Gly Pro

<210> 31

<211> 1005

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 31

cgcaaagtgt gtaacggaat aggtattggt gaatttaaag actcactctc cataaatgct 60

acgaatatta aacacttcaa aaactgcacc tccatcagtg gcgatctcca catcctgccg 120

gtggcattta ggggtgactc cttcacacat actcctcctc tggatccaca ggaactggat 180

attctgaaaa ccgtaaagga aatcacaggg tttttgctga ttcaggcttg gcctgaaaac 240

aggacggacc tccatgcctt tgagaaccta gaaatcatac gcggcaggac caagcaacat 300

ggtcagtttt ctcttgcagt cgtcagcctg aacataacat ccttgggatt acgctccctc 360

aaggagataa gtgatggaga tgtgataatt tcaggaaaca aaaatttgtg ctatgcaaat 420

acaataaact ggaaaaaact gtttgggacc tccggtcaga aaaccaaaat tataagcaac 480

agaggtgaaa acagctgcaa ggccacaggc caggtctgcc atgccttgtg ctcccccgag 540

ggctgctggg gcccggagcc cagggactgc gtctcttgcc ggaatgtcag ccgaggcagg 600

gaatgcgtgg acaagtgcaa ccttctggag ggtgagccaa gggagtttgt ggagaactct 660

gagtgcatac agtgccaccc agagtgcctg cctcaggcca tgaacatcac ctgcacagga 720

cggggaccag acaactgtat ccagtgtgcc cactacattg acggccccca ctgcgtcaag 780

acctgcccgg caggagtcat gggagaaaac aacaccctgg tctggaagta cgcagacgcc 840

ggccatgtgt gccacctgtg ccatccaaac tgcacctacg gatgcactgg gccaggtctt 900

gaaggctgtc caacgaatgg gcctaagatc ccgtccatcg ccactgggat ggtgggggcc 960

ctcctcttgc tgctggtggt ggccctgggg atcggcctct tcatg 1005

<210> 32

<211> 335

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 32

Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu
1 5 10 15

Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile
20 25 30

Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe
35 40 45

Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr
50 55 60

Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn
65 70 75 80

Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg
85 90 95

Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile
100 105 110

Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val
115 120 125

Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp
130 135 140

Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn
145 150 155 160

Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu
165 170 175

Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser
180 185 190

Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu
195 200 205

Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln
210 215 220

Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly
225 230 235 240
Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro
245 250 255

His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr
260 265 270
Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His
275 280 285
Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro
290 295 300
Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala
305 310 315 320

Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met
325 330 335

<210> 33
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 33
atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct gggtcccagg atccagtggg 60
<210> 34
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"
<400> 34
Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Ser Gly

20

<210> 35

<211> 891

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 35

atgacaacac ccagaaattc agtaaatggg actttcccgg cagagccaat gaaaggccct 60

attgctatgc aatctggtcc aaaaccactc ttcaggagga tgtcttcact ggtgggcccc 120

acgcaaagct tcttcatgag ggaatctaag actttggggg ctgtccagat tatgaatggg 180

ctcttccaca ttgccctggg gggtcttctg atgatcccag cagggatcta tgcacccatc 240

tgtgtgactg tgtggtaccc tctctgggga ggcattatgt atattatttc cggatcactc 300

ctggcagcaa cggagaaaaa ctccaggaag tgtttggtca aaggaaaaat gataatgaat 360

tcattgagcc tctttgctgc catttctgga atgattcttt caatcatgga catacttaat 420

attaaaattt cccatttttt aaaaatggag agtctgaatt ttattagagc tcacacacca 480

tatattaaca tatacaactg tgaaccagct aatccctctg agaaaaactc cccatctacc 540

caatactgtt acagcataca atctctgttc ttgggcattt tgtcagtgat gctgatcttt 600

gccttcttcc aggaacttgt aatagctggc atcgttgaga atgaatggaa aagaacgtgc 660

tccagaccca aatctaacat agttctcctg tcagcagaag aaaaaaaaga acagactatt 720

gaaataaaag aagaagtggt tgggctaact gaaacatctt cccaaccaaa gaatgaagaa 780

gacattgaaa ttattccaat ccaagaagag gaagaagaag aaacagagac gaactttcca 840

gaacctcccc aagatcagga atcctcacca atagaaaatg acagctctcc t 891

<210> 36

<211> 297

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 36

Met Thr Thr Pro Arg Asn Ser Val Asn Gly Thr Phe Pro Ala Glu Pro
1 5 10 15

Met Lys Gly Pro Ile Ala Met Gln Ser Gly Pro Lys Pro Leu Phe Arg
20 25 30

Arg Met Ser Ser Leu Val Gly Pro Thr Gln Ser Phe Phe Met Arg Glu
35 40 45

Ser Lys Thr Leu Gly Ala Val Gln Ile Met Asn Gly Leu Phe His Ile

50 55 60

Ala Leu Gly Gly Leu Leu Met Ile Pro Ala Gly Ile Tyr Ala Pro Ile
65 70 75 80

Cys Val Thr Val Trp Tyr Pro Leu Trp Gly Gly Ile Met Tyr Ile Ile
85 90 95

Ser Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Glu Lys Asn Ser Arg Lys Cys Leu
100 105 110

Val Lys Gly Lys Met Ile Met Asn Ser Leu Ser Leu Phe Ala Ala Ile

115 120 125

Ser Gly Met Ile Leu Ser Ile Met Asp Ile Leu Asn Ile Lys Ile Ser
130 135 140

His Phe Leu Lys Met Glu Ser Leu Asn Phe Ile Arg Ala His Thr Pro
145 150 155 160

Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn
165 170 175

Ser Pro Ser Thr Gln Tyr Cys Tyr Ser Ile Gln Ser Leu Phe Leu Gly

180 185 190

Ile Leu Ser Val Met Leu Ile Phe Ala Phe Phe Gln Glu Leu Val Ile
195 200 205

Ala Gly Ile Val Glu Asn Glu Trp Lys Arg Thr Cys Ser Arg Pro Lys
210 215 220

Ser Asn Ile Val Leu Leu Ser Ala Glu Glu Lys Lys Glu Gln Thr Ile
225 230 235 240

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

245 250 255

Lys Asn Glu Glu Asp Ile Glu Ile Ile Pro Ile Gln Glu Glu Glu Glu

260 265 270

Glu Glu Thr Glu Thr Asn Phe Pro Glu Pro Pro Gln Asp Gln Glu Ser

275 280 285

Ser Pro Ile Glu Asn Asp Ser Ser Pro

290 295

<210> 37

<211> 395

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 37

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val

1 5 10 15

His Ser Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp

20 25 30

Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp

35 40 45

Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu

50 55 60

Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr

65 70 75 80

Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly

85 90 95

Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys

100 105 110

Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe

115 120 125

Ile Asn Thr Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Leu Gln Ile Thr
145 150 155 160
Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser
165 170 175
Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys
180 185 190

Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala
195 200 205
Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg Asp
210 215 220
Pro Ala Leu Val His Gln Arg Pro Ala Pro Pro Ser Thr Val Thr Thr
225 230 235 240
Ala Gly Val Thr Pro Gln Pro Glu Ser Leu Ser Pro Ser Gly Lys Glu
245 250 255

Pro Ala Ala Ser Ser Pro Ser Ser Asn Asn Thr Ala Ala Thr Thr Ala
260 265 270
Ala Ile Val Pro Gly Ser Gln Leu Met Pro Ser Lys Ser Pro Ser Thr
275 280 285
Gly Thr Thr Glu Ile Ser Ser His Glu Ser Ser His Gly Thr Pro Ser
290 295 300
Gln Thr Thr Ala Lys Asn Trp Glu Leu Thr Ala Ser Ala Ser His Gln
305 310 315 320

Pro Pro Gly Val Tyr Pro Gln Gly His Ser Asp Thr Thr Val Ala Ile
325 330 335
Ser Thr Ser Thr Val Leu Leu Cys Gly Leu Ser Ala Val Ser Leu Leu
340 345 350
Ala Cys Tyr Leu Lys Ser Arg Gln Thr Pro Pro Leu Ala Ser Val Glu
355 360 365

Met Glu Ala Met Glu Ala Leu Pro Val Thr Trp Gly Thr Ser Ser Arg
370 375 380

Asp Glu Asp Leu Glu Asn Cys Ser His His Leu
385 390 395

<210> 38

<211> 1476

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 38

atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgtgagctgc cccaccccgc ctttctgctg 60

atccccgaca ttcagatgac ccagtctccg agctctctgt ccgcatcagt aggagacagg 120

gtcaccatca catgcagagc cagcgaaagt gtcgacaatt atggcattag ctttatgaac 180

tggttccaac agaaacccgg gaaggctcct aagcttctga tttacgctgc atccaaccaa 240

ggctccgggg taccctctcg cttctcaggc agtggatctg ggacagactt cactctcacc 300

atttcatctc tgcagcctga tgacttcgca acctattact gtcagcaaag taaggaggtt 360

ccgtggacgt tcggtcaagg gaccaaggtg gagatcaaag gtggcggtgg ctcgggcggt 420

ggtgggtcgg gtggcggcgg atctcaggtt cagctggtgc agtctggagc tgaggtgaag 480

aagcctggga gctcagtgaa ggtttcctgc aaagcttctg gctacacctt cactgactac 540

aacatgcact gggtgaggca ggctcctggc caaggcctgg aatggattgg atatatttat 600

ccttacaatg gtggtaccgg ctacaaccag aagttcaaga gcaaggccac aattacagca 660

gacgagagta ctaacacagc ctacatggaa ctctccagcc tgaggtctga ggacactgca 720

gtctattact gcgcaagagg gcgccccgct atggactact ggggccaagg gactctggtc 780

actgtctctt caaagcccac caccaccct gcccctagac ctccaacccc agcccctaca 840

atcgccagcc agcccctgag cctgaggccc gaagcctgta gacctgccgc tggcggagcc 900

gtgcacacca gaggcctgga tttcgcctgc gacatctaca tctgggcccc tctggccggc 960

acctgtggcg tgctgctgct gagcctggtc atcaccctgt actgcaacca ccggaatagg 1020

agcaagcgga gcagaggcgg ccacagcgac tacatgaaca tgaccccccg gaggcctggc 1080

cccacccgga agcactacca gccctacgcc cctcccaggg acttcgccgc ctaccggagc 1140

cgggtgaagt tcagccggag cgccgacgcc cctgcctacc agcagggcca gaaccagctg 1200

tacaacgagc tgaacctggg ccggagggag gagtacgacg tgctggacaa gcggagaggc 1260

cgggaccctg agatgggcgg caagccccgg agaaagaacc ctcaggaggg cctgtataac 1320

gaactgcaga aagacaagat ggccgaggcc tacagcgaga tcggcatgaa gggcgagcgg 1380

cggaggggca agggccacga cggcctgtac cagggcctga gcaccgccac caaggatacc 1440

tacgacgccc tgcacatgca ggccctgccc cccaga 1476

<210> 39

<211> 492

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 39

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

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

Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln
65 70 75 80

Gly Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr
100 105 110

Tyr Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
145 150 155 160
Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
165 170 175

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

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Pro Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
245 250 255
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro
260 265 270
Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu
275 280 285
Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg
290 295 300

Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly
305 310 315 320
Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn
325 330 335
His Arg Asn Arg Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met
340 345 350
Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro
355 360 365

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490

<210> 40

<211

> 1353

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polynucleotide"

<400> 40

atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgtgagctgc cccaccccgc ctttctgctg 60

atccccgaca ttcagatgac ccagtctccg agctctctgt ccgcatcagt aggagacagg 120

gtcaccatca catgcagagc cagcgaaagt gtcgacaatt atggcattag ctttatgaac 180

tggttccaac agaaacccgg gaaggctcct aagcttctga tttacgctgc atccaaccaa 240

ggctccgggg taccctctcg cttctcaggc agtggatctg ggacagactt cactctcacc 300

atttcatctc tgcagcctga tgacttcgca acctattact gtcagcaaag taaggaggtt 360

ccgtggacgt tcggtcaagg gaccaaggtg gagatcaaag gtggcggtgg ctcgggcggt 420

ggtgggtcgg gtggcggcgg atctcaggtt cagctggtgc agtctggagc tgaggtgaag 480

aagcctggga gctcagtgaa ggtttcctgc aaagcttctg gctacacctt cactgactac 540

aacatgcact gggtgaggca ggctcctggc caaggcctgg aatggattgg atatatttat 600

ccttacaatg gtggtaccgg ctacaaccag aagttcaaga gcaaggccac aattacagca 660

gacgagagta ctaacacagc ctacatggaa ctctccagcc tgaggtctga ggacactgca 720

gtctattact gcgcaagagg gcgccccgct atggactact ggggccaagg gactctggtc 780

actgtctctt caaagcccac caccaccccc gcccctagac ctccaacccc agcccctaca 840

atcgccagcc agcccctgag cctgaggccc gaagcctgta gacctgccgc tggcggagcc 900

gtgcacacca gaggcctgga tttcgcctgc gacatctaca tctgggcccc tctggccggc 960

acctgtggcg tgctgctgct gagcctggtc atcaccctgt actgcaacca ccggaatcgg 1020

gtgaagttca gccggagcgc cgacgccccc gcctaccagc agggccagaa ccagctgtac 1080

aacgagctga acctgggccg gagggaggag tacgacgtgc tggacaagcg gagaggccgg 1140

gaccctgaga tgggcggcaa gccccggaga aagaaccctc aggagggcct gtataacgaa 1200

ctgcagaaag acaagatggc cgaggcctac agcgagatcg gcatgaaggg cgagcggcgg 1260

aggggcaagg gccacgacgg cctgtaccag ggcctgagca ccgccaccaa ggatacctac 1320

gacgccctgc acatgcaggc cctgcccccc aga 1353

<210> 41

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 41

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr

100 105 110

Tyr Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr

115 120 125

Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Phe Thr Asp Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly

180 185 190

Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr

195 200 205

Asn Gln Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr

210 215 220

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

225 230 235 240

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Pro Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

245 250 255

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

His Arg Asn Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
340 345 350

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

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

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

385 390 395 400

Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys
405 410 415

Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu
420 425 430

Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu
435 440 445

Pro Pro Arg
450

<210> 42

<211> 2619

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 42

atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgtgagctgc cccaccccgc ctttctgctg 60

atccccgaca ttcagatgac ccagtctccg agctctctgt ccgcatcagt aggagacagg 120

gtcaccatca catgcagagc cagcgaaagt gtcgacaatt atggcattag ctttatgaac 180

tggttccaac agaaacccgg gaaggctcct aagcttctga tttacgctgc atccaaccaa 240

ggctccgggg taccctctcg cttctcaggc agtggatctg ggacagactt cactctcacc 300

atttcatctc tgcagcctga tgacttcgca acctattact gtcagcaaag taaggaggtt 360

ccgtggacgt tcggtcaagg gaccaaggtg gagatcaaag gtggcggtgg ctcgggcggt 420

ggtgggtcgg gtggcggcgg atctcaggtt cagctggtgc agtctggagc tgaggtgaag 480

aagcctggga gctcagtgaa ggtttcctgc aaagcttctg gctacacctt cactgactac 540

aacatgcact gggtgaggca ggctcctggc caaggcctgg aatggattgg atatatttat 600

ccttacaatg gtggtaccgg ctacaaccag aagttcaaga gcaaggccac aattacagca 660

gacgagagta ctaacacagc ctacatggaa ctctccagcc tgaggtctga ggacactgca 720

gtctattact gcgcaagagg gcgccccgct atggactact ggggccaagg gactctggtc 780

actgtctctt caaagcccac caccaccccc gcccctagac ctccaacccc agcccctaca 840

atcgccagcc agcccctgag cctgaggccc gaagcctgta gacctgccgc tggcggagcc 900

gtgcacacca gaggcctgga tttcgcctgc gacatctaca tctgggcccc tctggccggc 960

acctgtggcg tgctgctgct gagcctggtc atcaccctgt actgcaacca ccggaatagg 1020

agcaagcgga gcagaggcgg ccacagcgac tacatgaaca tgaccccccg gaggcctggc 1080

cccacccgga agcactacca gccctacgcc cctcccaggg acttcgccgc ctaccggagc 1140

cgggtgaagt tcagccggag cgccgacgcc cctgcctacc agcagggcca gaaccagctg 1200

tacaacgagc tgaacctggg ccggagggag gagtacgacg tgctggacaa gcggagaggc 1260

cgggaccctg agatgggcgg caagccccgg agaaagaacc ctcaggaggg cctgtataac 1320

gaactgcaga aagacaagat ggccgaggcc tacagcgaga tcggcatgaa gggcgagcgg 1380

cggaggggca agggccacga cggcctgtac cagggcctga gcaccgccac caaggatacc 1440

tacgacgccc tgcacatgca ggccctgccc cccagactcg agggcggcgg agagggcaga 1500

ggaagtcttc taacatgcgg tgacgtggag gagaatcccg gccctaggat gcttctcctg 1560

gtgacaagcc ttctgctctg tgagttacca cacccagcat tcctcctgat cccacgcaaa 1620

gtgtgtaacg gaataggtat tggtgaattt aaagactcac tctccataaa tgctacgaat 1680

attaaacact tcaaaaactg cacctccatc agtggcgatc tccacatcct gccggtggca 1740

tttaggggtg actccttcac acatactcct cctctggatc cacaggaact ggatattctg 1800

aaaaccgtaa aggaaatcac agggtttttg ctgattcagg cttggcctga aaacaggacg 1860

gacctccatg cctttgagaa cctagaaatc atacgcggca ggaccaagca acatggtcag 1920

ttttctcttg cagtcgtcag cctgaacata acatccttgg gattacgctc cctcaaggag 1980

ataagtgatg gagatgtgat aatttcagga aacaaaaatt tgtgctatgc aaatacaata 2040

aactggaaaa aactgtttgg gacctccggt cagaaaacca aaattataag caacagaggt 2100

gaaaacagct gcaaggccac aggccaggtc tgccatgcct tgtgctcccc cgagggctgc 2160

tggggcccgg agcccaggga ctgcgtctct tgccggaatg tcagccgagg cagggaatgc 2220

gtggacaagt gcaaccttct ggagggtgag ccaagggagt ttgtggagaa ctctgagtgc 2280

atacagtgcc acccagagtg cctgcctcag gccatgaaca tcacctgcac aggacgggga 2340

ccagacaact gtatccagtg tgcccactac attgacggcc cccactgcgt caagacctgc 2400

ccggcaggag tcatgggaga aaacaacacc ctggtctgga agtacgcaga cgccggccat 2460

gtgtgccacc tgtgccatcc aaactgcacc tacggatgca ctgggccagg tcttgaaggc 2520

tgtccaacga atgggcctaa gatcccgtcc atcgccactg ggatggtggg ggccctcctc 2580

ttgctgctgg tggtggccct ggggatcggc ctcttcatg 2619

<210> 43

<211> 873

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 43

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr

100 105 110

Tyr Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr

115 120 125

Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

130 135 140

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

195 200 205
Asn Gln Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr
210 215 220
Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
225 230 235 240
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Pro Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
245 250 255
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro

260 265 270
Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu
275 280 285
Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg
290 295 300
Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly
305 310 315 320
Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Leu Glu Gly Gly

485 490 495

Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn

500 505 510

Pro Gly Pro Arg Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu

515 520 525

Leu Pro His Pro Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly

530 535 540

Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn

545 550 555 560

Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile

565 570 575

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

580 585 590

Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly

595 600 605

Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala

610 615 620

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

625 630 635 640

Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg

645 650 655

Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys

660 665 670

Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr

675 680 685

Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys

690 695 700

Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys

705 710 715 720

Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg

725 730 735

Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg

740 745 750

Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu

755 760 765

Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys

770 775 780

Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys

785 790 795 800

Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala

805 810 815

Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly

820 825 830

Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile

835 840 845

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

850 855 860

Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met

865 870

<210> 44

<211> 792

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 44

atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgtgagctgc cccaccccgc ctttctgctg 60

atccccgaca ttcagatgac ccagtctccg agctctctgt ccgcatcagt aggagacagg 120

gtcaccatca catgcagagc cagcgaaagt gtcgacaatt atggcattag ctttatgaac 180

tggttccaac agaaacccgg gaaggctcct aagcttctga tttacgctgc atccaaccaa 240

ggctccgggg taccctctcg cttctcaggc agtggatctg ggacagactt cactctcacc 300

atttcatctc tgcagcctga tgacttcgca acctattact gtcagcaaag taaggaggtt 360

ccgtggacgt tcggtcaagg gaccaaggtg gagatcaaag gtggcggtgg ctcgggcggt 420

ggtgggtcgg gtggcggcgg atctcaggtt cagctggtgc agtctggagc tgaggtgaag 480

aagcctggga gctcagtgaa ggtttcctgc aaagcttctg gctacacctt cactgactac 540

aacatgcact gggtgaggca ggctcctggc caaggcctgg aatggattgg atatatttat 600

ccttacaatg gtggtaccgg ctacaaccag aagttcaaga gcaaggccac aattacagca 660

gacgagagta ctaacacagc ctacatggaa ctctccagcc tgaggtctga ggacactgca 720

gtctattact gcgcaagagg gcgccccgct atggactact ggggccaagg gactctggtc 780

actgtctctt ca 792

<210> 45

<211> 264

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 45

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr

100 105 110

Tyr Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr

115 120 125

Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Phe Thr Asp Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly

180 185 190

Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr

195 200 205

Asn Gln Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr

210 215 220

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

225 230 235 240

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Pro Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

245 250 255

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

260

<210> 46

<211> 1479

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 46

atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgtgagctgc cccaccccgc ctttctgctg 60

atccccgaca ttcagatgac ccagtctccg agctctctgt ccgcatcagt aggagacagg 120

gtcaccatca catgcagagc cagcgaaagt gtcgacaatt atggcattag ctttatgaac 180

tggttccaac agaaacccgg gaaggctcct aagcttctga tttacgctgc atccaaccaa 240

ggctccgggg taccctctcg cttctcaggc agtggatctg ggacagactt cactctcacc 300

atttcatctc tgcagcctga tgacttcgca acctattact gtcagcaaag taaggaggtt 360

ccgtggacgt tcggtcaagg gaccaaggtg gagatcaaag gtggcggtgg ctcgggcggt 420

ggtgggtcgg gtggcggcgg atctcaggtt cagctggtgc agtctggagc tgaggtgaag 480

aagcctggga gctcagtgaa ggtttcctgc aaagcttctg gctacacctt cactgactac 540

aacatgcact gggtgaggca ggctcctggc caaggcctgg aatggattgg atatatttat 600

ccttacaatg gtggtaccgg ctacaaccag aagttcaaga gcaaggccac aattacagca 660

gacgagagta ctaacacagc ctacatggaa ctctccagcc tgaggtctga ggacactgca 720

gtctattact gcgcaagagg gcgccccgct atggactact ggggccaagg gactctggtc 780

actgtctctt caaagcccac caccaccccc gcccctagac ctccaacccc agcccctaca 840

atcgccagcc agcccctgag cctgaggccc gaagcctgta gacctgccgc tggcggagcc 900

gtgcacacca gaggcctgga tttcgcctgc gacatctaca tctgggcccc tctggccggc 960

acctgtggcg tgctgctgct gagcctggtc atcaccctgt actgcaacca ccggaataag 1020

agaggccgga agaaactgct gtacatcttc aagcagccct tcatgcggcc cgtgcagacc 1080

acccaggaag aggacggctg cagctgccgg ttccccgagg aagaggaagg cggctgcgaa 1140

ctgcgggtga agttcagccg gagcgccgac gcccctgcct accagcaggg ccagaaccag 1200

ctgtacaacg agctgaacct gggccggagg gaggagtacg acgtgctgga caagcggaga 1260

ggccgggacc ctgagatggg cggcaagccc cggagaaaga accctcagga gggcctgtat 1320

aacgaactgc agaaagacaa gatggccgag gcctacagcg agatcggcat gaagggcgag 1380

cggcggaggg gcaagggcca cgacggcctg taccagggcc tgagcaccgc caccaaggat 1440

acctacgacg ccctgcacat gcaggccctg ccccccaga 1479

<210> 47

<211> 493

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 47

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

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

Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln
65 70 75 80

Gly Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr
100 105 110

Tyr Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
145 150 155 160

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

165 170 175

Phe Thr Asp Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly

180 185 190

Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr

195 200 205

Asn Gln Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr

210 215 220

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

225 230 235 240

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Pro Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

245 250 255

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

His Arg Asn Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

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

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

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

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

<210> 48

<211> 2622

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 48

atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgtgagctgc cccaccccgc ctttctgctg 60

atccccgaca ttcagatgac ccagtctccg agctctctgt ccgcatcagt aggagacagg 120

gtcaccatca catgcagagc cagcgaaagt gtcgacaatt atggcattag ctttatgaac 180

tggttccaac agaaacccgg gaaggctcct aagcttctga tttacgctgc atccaaccaa 240

ggctccgggg taccctctcg cttctcaggc agtggatctg ggacagactt cactctcacc 300

atttcatctc tgcagcctga tgacttcgca acctattact gtcagcaaag taaggaggtt 360

ccgtggacgt tcggtcaagg gaccaaggtg gagatcaaag gtggcggtgg ctcgggcggt 420

ggtgggtcgg gtggcggcgg atctcaggtt cagctggtgc agtctggagc tgaggtgaag 480

aagcctggga gctcagtgaa ggtttcctgc aaagcttctg gctacacctt cactgactac 540

aacatgcact gggtgaggca ggctcctggc caaggcctgg aatggattgg atatatttat 600

ccttacaatg gtggtaccgg ctacaaccag aagttcaaga gcaaggccac aattacagca 660

gacgagagta ctaacacagc ctacatggaa ctctccagcc tgaggtctga ggacactgca 720

gtctattact gcgcaagagg gcgccccgct atggactact ggggccaagg gactctggtc 780

actgtctctt caaagcccac caccacccct gcccctagac ctccaacccc agcccctaca 840

atcgccagcc agcccctgag cctgaggccc gaagcctgta gacctgccgc tggcggagcc 900

gtgcacacca gaggcctgga tttcgcctgc gacatctaca tctgggcccc tctggccggc 960

acctgtggcg tgctgctgct gagcctggtc atcaccctgt actgcaacca ccggaataag 1020

agaggccgga agaaactgct gtacatcttc aagcagccct tcatgcggcc cgtgcagacc 1080

acccaggaag aggacggctg cagctgccgg ttccccgagg aagaggaagg cggctgcgaa 1140

ctgcgggtga agttcagccg gagcgccgac gcccctgcct accagcaggg ccagaaccag 1200

ctgtacaacg agctgaacct gggccggagg gaggagtacg acgtgctgga caagcggaga 1260

ggccgggacc ctgagatggg cggcaagccc cggagaaaga accctcagga gggcctgtat 1320

aacgaactgc agaaagacaa gatggccgag gcctacagcg agatcggcat gaagggcgag 1380

cggcggaggg gcaagggcca cgacggcctg taccagggcc tgagcaccgc caccaaggat 1440

acctacgacg ccctgcacat gcaggccctg cccccagac tcgagggcgg cggagagggc 1500

agaggaagtc ttctaacatg cggtgacgtg gaggagaatc ccggccctag gatgcttctc 1560

ctggtgacaa gccttctgct ctgtgagtta ccacacccag cattcctcct gatcccacgc 1620

aaagtgtgta acggaatagg tattggtgaa tttaaagact cactctccat aaatgctacg 1680

aatattaaac acttcaaaaa ctgcacctcc atcagtggcg atctccacat cctgccggtg 1740

gcatttaggg gtgactcctt cacacatact cctcctctgg atccacagga actggatatt 1800

ctgaaaaccg taaaggaaat cacagggttt ttgctgattc aggcttggcc tgaaaacagg 1860

acggacctcc atgcctttga gaacctagaa atcatacgcg gcaggaccaa gcaacatggt 1920

cagttttctc ttgcagtcgt cagcctgaac ataacatcct tgggattacg ctccctcaag 1980

gagataagtg atggagatgt gataatttca ggaaacaaaa atttgtgcta tgcaaataca 2040

ataaactgga aaaaactgtt tgggacctcc ggtcagaaaa ccaaaattat aagcaacaga 2100

ggtgaaaaca gctgcaaggc cacaggccag gtctgccatg ccttgtgctc ccccgagggc 2160

tgctggggcc cggagcccag ggactgcgtc tcttgccgga atgtcagccg aggcagggaa 2220

tgcgtggaca agtgcaacct tctggagggt gagccaaggg agtttgtgga gaactctgag 2280

tgcatacagt gccacccaga gtgcctgcct caggccatga acatcacctg cacaggacgg 2340

ggaccagaca actgtatcca gtgtgcccac tacattgacg gcccccactg cgtcaagacc 2400

tgcccggcag gagtcatggg agaaaacaac accctggtct ggaagtacgc agacgccggc 2460

catgtgtgcc acctgtgcca tccaaactgc acctacggat gcactgggcc aggtcttgaa 2520

ggctgtccaa cgaatgggcc taagatcccg tccatcgcca ctgggatggt gggggccctc 2580

ctcttgctgc tggtggtggc cctggggatc ggcctcttca tg 2622

<210> 49

<211> 874

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 49

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

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

245 250 255
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro
260 265 270
Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu
275 280 285
Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg
290 295 300
Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly

305 310 315 320
Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn
325 330 335
His Arg Asn Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln
340 345 350
Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser
355 360 365
Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys

370 375 380
Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
385 390 395 400
Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
405 410 415
Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
420 425 430
Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

Asn Pro Gly Pro Arg Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys

515 520 525

Glu Leu Pro His Pro Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn

530 535 540

Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr

545 550 555 560

Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His

565 570 575

Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro

580 585 590

Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr

595 600 605

Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His

610 615 620

Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly

625 630 635 640

Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu

645 650 655

Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn

660 665 670

Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly

675 680 685

Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser

690 695 700

Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly

705 710 715 720

Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser

725 730 735

Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro

740 745 750

Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys

755 760 765

Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn

770 775 780

Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr

785 790 795 800

Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr

805 810 815

Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr

820 825 830

Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys

835 840 845

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

850 855 860

Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met

865 870

<210> 50

<211> 2442

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polynucleotide"

<400> 50

atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgtgagctgc cccaccccgc ctttctgctg 60

atccccgaca ttcagatgac ccagtctccg agctctctgt ccgcatcagt aggagacagg 120

gtcaccatca catgcagagc cagcgaaagt gtcgacaatt atggcattag ctttatgaac 180

tggttccaac agaaacccgg gaaggctcct aagcttctga tttacgctgc atccaaccaa 240

ggctccgggg taccctctcg cttctcaggc agtggatctg ggacagactt cactctcacc 300

atttcatctc tgcagcctga tgacttcgca acctattact gtcagcaaag taaggaggtt 360

ccgtggacgt tcggtcaagg gaccaaggtg gagatcaaag gtggcggtgg ctcgggcggt 420

ggtgggtcgg gtggcggcgg atctcaggtt cagctggtgc agtctggagc tgaggtgaag 480

aagcctggga gctcagtgaa ggtttcctgc aaagcttctg gctacacctt cactgactac 540

aacatgcact gggtgaggca ggctcctggc caaggcctgg aatggattgg atatatttat 600

ccttacaatg gtggtaccgg ctacaaccag aagttcaaga gcaaggccac aattacagca 660

gacgagagta ctaacacagc ctacatggaa ctctccagcc tgaggtctga ggacactgca 720

gtctattact gcgcaagagg gcgccccgct atggactact ggggccaagg gactctggtc 780

actgtctctt caaagcccac caccaccccc gcccctagac ctccaacccc agcccctaca 840

atcgccagcc agcccctgag cctgaggccc gaagcctgta gacctgccgc tggcggagcc 900

gtgcacacca gaggcctgga tttcgcctgc gacatctaca tctgggcccc tctggccggc 960

acctgtggcg tgctgctgct gagcctggtc atcaccctgt actgcaacca ccggaataag 1020

agaggccgga agaaactgct gtacatcttc aagcagccct tcatgcggcc cgtgcagacc 1080

acccaggaag aggacggctg cagctgccgg ttccccgagg aagaggaagg cggctgcgaa 1140

ctgcgggtga agttcagccg gagcgccgac gcccctgcct accagcaggg ccagaaccag 1200

ctgtacaacg agctgaacct gggccggagg gaggagtacg acgtgctgga caagcggaga 1260

ggccgggacc ctgagatggg cggcaagccc cggagaaaga accctcagga gggcctgtat 1320

aacgaactgc agaaagacaa gatggccgag gcctacagcg agatcggcat gaagggcgag 1380

cggcggaggg gcaagggcca cgacggcctg taccagggcc tgagcaccgc caccaaggat 1440

acctacgacg ccctgcacat gcaggccctg cccccagac tcgagggcgg cggagagggc 1500

agaggaagtc ttctaacatg cggtgacgtg gaggagaatc ccggccctag gatgacaaca 1560

cccagaaatt cagtaaatgg gactttcccg gcagagccaa tgaaaggccc tattgctatg 1620

caatctggtc caaaaccact cttcaggagg atgtcttcac tggtgggccc cacgcaaagc 1680

ttcttcatga gggaatctaa gactttgggg gctgtccaga ttatgaatgg gctcttccac 1740

attgccctgg ggggtcttct gatgatccca gcagggatct atgcacccat ctgtgtgact 1800

gtgtggtacc ctctctgggg aggcattatg tatattattt ccggatcact cctggcagca 1860

acggagaaaa actccaggaa gtgtttggtc aaaggaaaaa tgataatgaa ttcattgagc 1920

ctctttgctg ccatttctgg aatgattctt tcaatcatgg acatacttaa tattaaaatt 1980

tcccattttt taaaaatgga gagtctgaat tttattagag ctcacacacc atatattaac 2040

atatacaact gtgaaccagc taatccctct gagaaaaact ccccatctac ccaatactgt 2100

tacagcatac aatctctgtt cttgggcatt ttgtcagtga tgctgatctt tgccttcttc 2160

caggaacttg taatagctgg catcgttgag aatgaatgga aaagaacgtg ctccagaccc 2220

aaatctaaca tagttctcct gtcagcagaa gaaaaaaaag aacagactat tgaaataaaa 2280

gaagaagtgg ttgggctaac tgaaacatct tcccaaccaa agaatgaaga agacattgaa 2340

attattccaa tccaagaaga ggaagaagaa gaaacagaga cgaactttcc agaacctccc 2400

caagatcagg aatcctcacc aatagaaaat gacagctctc ct 2442

<210> 51

<211> 814

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 51

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

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

Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln
65 70 75 80

Gly Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr

100 105 110

Tyr Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr

115 120 125

Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Phe Thr Asp Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly

180 185 190

Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr

195 200 205

Asn Gln Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr

210 215 220

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

225 230 235 240

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Pro Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

245 250 255

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

His Arg Asn Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln

340 345 350

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

370 375 380
Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
385 390 395 400
Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
405 410 415
Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
420 425 430
Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met

435 440 445
Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
450 455 460
Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
465 470 475 480
Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Leu Glu Gly
485 490 495
Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu

500 505 510
Asn Pro Gly Pro Arg Met Thr Thr Pro Arg Asn Ser Val Asn Gly Thr
515 520 525
Phe Pro Ala Glu Pro Met Lys Gly Pro Ile Ala Met Gln Ser Gly Pro
530 535 540
Lys Pro Leu Phe Arg Arg Met Ser Ser Leu Val Gly Pro Thr Gln Ser
545 550 555 560
Phe Phe Met Arg Glu Ser Lys Thr Leu Gly Ala Val Gln Ile Met Asn

565 570 575
Gly Leu Phe His Ile Ala Leu Gly Gly Leu Leu Met Ile Pro Ala Gly
580 585 590
Ile Tyr Ala Pro Ile Cys Val Thr Val Trp Tyr Pro Leu Trp Gly Gly

595 600 605

Ile Met Tyr Ile Ile Ser Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Glu Lys Asn

610 615 620

Ser Arg Lys Cys Leu Val Lys Gly Lys Met Ile Met Asn Ser Leu Ser

625 630 635 640

Leu Phe Ala Ala Ile Ser Gly Met Ile Leu Ser Ile Met Asp Ile Leu

645 650 655

Asn Ile Lys Ile Ser His Phe Leu Lys Met Glu Ser Leu Asn Phe Ile

660 665 670

Arg Ala His Thr Pro Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys Glu Pro Ala Asn

675 680 685

Pro Ser Glu Lys Asn Ser Pro Ser Thr Gln Tyr Cys Tyr Ser Ile Gln

690 695 700

Ser Leu Phe Leu Gly Ile Leu Ser Val Met Leu Ile Phe Ala Phe Phe

705 710 715 720

Gln Glu Leu Val Ile Ala Gly Ile Val Glu Asn Glu Trp Lys Arg Thr

725 730 735

Cys Ser Arg Pro Lys Ser Asn Ile Val Leu Leu Ser Ala Glu Glu Lys

740 745 750

Lys Glu Gln Thr Ile Glu Ile Lys Glu Glu Val Val Gly Leu Thr Glu

755 760 765

Thr Ser Ser Gln Pro Lys Asn Glu Glu Asp Ile Glu Ile Ile Pro Ile

770 775 780

Gln Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Thr Glu Thr Asn Phe Pro Glu Pro Pro

785 790 795 800

Gln Asp Gln Glu Ser Ser Pro Ile Glu Asn Asp Ser Ser Pro

805 810

<210> 52

<211> 861

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 52

atgccgctgc tgctactgct gcccctgctg tgggcagggg ccctggctat ggatccaaat 60

ttctggctgc aagtgcagga gtcagtgacg gtacaggagg gtttgtgcgt cctcgtgccc 120

tgcactttct tccatcccat accctactac gacaagaact ccccagttca tggttactgg 180

ttccgggaag gagccattat atccagggac tctccagtgg ccacaaacaa gctagatcaa 240

gaagtacagg aggagactca gggcagattc cgcctccttg gggatcccag taggaacaac 300

tgctccctga gcatcgtaga cgccaggagg agggataatg gttcatactt ctttcggatg 360

gagagaggaa gtaccaaata cagttacaaa tctccccagc tctctgtgca tgtgacagac 420

ttgacccaca ggcccaaaat cctcatccct ggcactctag aacccggcca ctccaaaaac 480

ctgacctgct ctgtgtcctg ggcctgtgag cagggaacac ccccgatctt ctcctggttg 540

tcagctgccc ccacctccct gggccccagg actactcact cctcggtgct cataatcacc 600

ccacggcccc aggaccacgg caccaacctg acctgtcagg tgaagttcgc tggagctggt 660

gtgactacgg agagaaccat ccagctcaac gtcacctatg ttccacagaa cccaacaact 720

ggtatctttc caggagatgg ctcagggaaa caagagacca gagcaggagt ggttcatggg 780

gccattggag gagctggtgt tacagccctg ctcgctcttt gtctctgcct catcttcttc 840

atagtgaaga cccacaggag g 861

<210> 53

<211> 287

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala

1 5 10 15

Met Asp Pro Asn Phe Trp Leu Gln Val Gln Glu Ser Val Thr Val Gln

20 25 30

Glu Gly Leu Cys Val Leu Val Pro Cys Thr Phe Phe His Pro Ile Pro

35 40 45

Tyr Tyr Asp Lys Asn Ser Pro Val His Gly Tyr Trp Phe Arg Glu Gly

50 55 60

Ala Ile Ile Ser Arg Asp Ser Pro Val Ala Thr Asn Lys Leu Asp Gln

65 70 75 80

Glu Val Gln Glu Glu Thr Gln Gly Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asp Pro
85 90 95
Ser Arg Asn Asn Cys Ser Leu Ser Ile Val Asp Ala Arg Arg Arg Asp
100 105 110

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

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

Gly Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Gly Lys Gln Glu Thr Arg Ala Gly
245 250 255
Val Val His Gly Ala Ile Gly Gly Ala Gly Val Thr Ala Leu Leu Ala
260 265 270
Leu Cys Leu Cys Leu Ile Phe Phe Ile Val Lys Thr His Arg Arg
275 280 285

<210> 54

<211> 244

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 54

Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu
1 5 10 15

Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile
20 25 30

Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe
35 40 45

Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr
50 55 60

Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn
65 70 75 80

Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg
85 90 95

Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile
100 105 110

Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val
115 120 125

Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp
130 135 140

Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn
145 150 155 160

Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu
165 170 175

Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser
180 185 190

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
195 200 205

Gly Gly Gly Ser Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala
210 215 220

Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg
225 230 235 240
Ser Lys Arg Ser

<210> 55
<211> 732
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"
<400> 55
cgcaaagtgt gtaacggaat aggtattggt gaatttaaag actcactctc cataaatgct 60
acgaatatta aacacttcaa aaactgcacc tccatcagtg gcgatctcca catcctgccg 120
gtggcattta ggggtgactc cttcacacat actcctcctc tggatccaca ggaactggat 180
attctgaaaa ccgtaaagga aatcacaggg tttttgctga ttcaggcttg gcctgaaaac 240
aggacggacc tccatgcctt tgagaaccta gaaatcatac gcggcaggac caagcaacat 300
ggtcagtttt ctcttgcagt cgtcagcctg aacataacat ccttgggatt acgctccctc 360

aaggagataa gtgatggaga tgtgataatt tcaggaaaca aaaatttgtg ctatgcaaat 420
acaataaact ggaaaaaact gtttgggacc tccggtcaga aaaccaaaat tataagcaac 480
agaggtgaaa acagctgcaa ggccacaggc caggtctgcc atgccttgtg ctcccccgag 540
ggctgctggg gcccggagcc cagggactgc gtctctggtg gcggtggctc gggcggtggt 600
gggtcgggtg gcggcggatc tggtggcggt ggctcgtttt gggtgctggt ggtggttggt 660
ggagtcctgg cttgctatag cttgctagta acagtggcct ttattatttt ctgggtgagg 720
agtaagagga gc 732

<210> 56
<211> 263
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 56

Met Thr Thr Pro Arg Asn Ser Val Asn Gly Thr Phe Pro Ala Glu Pro
1 5 10 15

Met Lys Gly Pro Ile Ala Met Gln Ser Gly Pro Lys Pro Leu Phe Arg
20 25 30

Arg Met Ser Ser Leu Val Gly Pro Thr Gln Ser Phe Phe Met Arg Glu
35 40 45

Ser Lys Thr Leu Gly Ala Val Gln Ile Met Asn Gly Leu Phe His Ile
50 55 60

Ala Leu Gly Gly Leu Leu Met Ile Pro Ala Gly Ile Tyr Ala Pro Ile
65 70 75 80

Cys Val Thr Val Trp Tyr Pro Leu Trp Gly Gly Ile Met Tyr Ile Ile
85 90 95

Ser Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Glu Lys Asn Ser Arg Lys Cys Leu
100 105 110

Val Lys Gly Lys Met Ile Met Asn Ser Leu Ser Leu Phe Ala Ala Ile
115 120 125

Ser Gly Met Ile Leu Ser Ile Met Asp Ile Leu Asn Ile Lys Ile Ser
130 135 140

His Phe Leu Lys Met Glu Ser Leu Asn Phe Ile Arg Ala His Thr Pro
145 150 155 160

Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn
165 170 175

Ser Pro Ser Thr Gln Tyr Cys Tyr Ser Ile Gln Ser Leu Phe Leu Gly
180 185 190

Ile Leu Ser Val Met Leu Ile Phe Ala Phe Phe Gln Glu Leu Val Ile
195 200 205

Ala Gly Ile Val Glu Asn Glu Trp Lys Arg Thr Cys Ser Arg Pro Lys
210 215 220

Ser Asn Ile Val Leu Leu Ser Ala Glu Glu Lys Lys Glu Gln Thr Ile
225 230 235 240

Glu Ile Lys Glu Glu Val Val Gly Leu Thr Glu Thr Ser Ser Gln Pro
245 250 255

Lys Asn Glu Glu Asp Ile Glu
260

<210> 57

<211> 789

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 57

atgaccacac cacggaactc tgtgaatggc accttcccag cagagccaat gaagggacca 60

atcgcaatgc agagcggacc caagcctctg tttcggagaa tgagctccct ggtgggccca 120

acccagtcct tctttatgag agagtctaag acactgggcg ccgtgcagat catgaacgga 180

ctgttccaca tcgccctggg aggactgctg atgatcccag ccggcatcta cgcccctatc 240

tgcgtgaccg tgtggtaccc tctgtggggc ggcatcatgt atatcatctc cggctctctg 300

ctggccgcca cagagaagaa cagcaggaag tgtctggtga agggcaagat gatcatgaat 360

agcctgtccc tgtttgccgc catctctggc atgatcctga gcatcatgga catcctgaac 420

atcaagatca gccacttcct gaagatggag agcctgaact tcatcagagc ccacacccct 480

tacatcaaca tctataattg cgagcctgcc aacccatccg agaagaattc tccaagcaca 540

cagtactgtt attccatcca gtctctgttc ctgggcatcc tgtctgtgat gctgatcttt 600

gccttctttc aggagctggt catcgccggc atcgtggaga acgagtggaa gaggacctgc 660

agccgcccca agtccaatat cgtgctgctg tccgccgagg agaagaagga gcagacaatc 720

gagatcaagg aggaggtggt gggcctgacc gagacatcta gccagcctaa gaatgaggag 780

gatatcgag 789

<210> 58

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

oligonucleotide"

<400> 58

ctgtgcgcac gcccacgccg cagccccgcc caagaagatg gcaaagtcta catcaacatg 60

ccaggcaggg gc 72

<210> 59

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 59

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

1 5 10 15

Tyr Ile Asn Met Pro Gly Arg Gly

20

<210> 60

<211> 156

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polynucleotide"

<400> 60

tacttcctgg gccggctggt ccctcggggg cgaggggctg cggaggcagc gacccggaaa 60

cagcgtatca ctgagaccga gtcgccttat caggagctcc agggtcagag gtcggatgtc 120

tacagcgacc tcaacacaca gaggccgtat tacaaa 156

<210> 61

<211> 52

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><

221> source

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

polypeptide"

<400> 61

Tyr Phe Leu Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala Ala Glu Ala
1 5 10 15

Ala Thr Arg Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu
20 25 30

Leu Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Arg
35 40 45

Pro Tyr Tyr Lys

50

<210> 62

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 62

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10