



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0046006
(43) 공개일자 2021년04월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/715 (2006.01) *A61K 35/17* (2014.01)
A61P 37/06 (2006.01) *C07K 14/705* (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01) *C12N 5/0783* (2010.01)
 (52) CPC특허분류
C07K 14/7151 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2021-7006566
 (22) 출원일자(국제) 2019년08월09일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2021년03월03일
 (86) 국제출원번호 PCT/IB2019/000907
 (87) 국제공개번호 WO 2020/030979
 국제공개일자 2020년02월13일
 (30) 우선권주장
 62/717,234 2018년08월10일 미국(US)

(71) 출원인
상가모 테라퓨틱스 프랑스
 프랑스 에프-06560 발본 알레 드 라 네르티에르
 소피아 앙티폴리 레 카르들랭
 (72) 발명자
아벨 토비아스
 프랑스, 06560 발본 소피아 앙티폴리, 레 카르들
 랭, 알리 드 라 네르티에르, 씨/오 상가모 테라퓨
 틱스 프랑스
페나드 데이비드
 프랑스, 06560 발본 소피아 앙티폴리, 레 카르들
 랭, 알리 드 라 네르티에르, 씨/오 상가모 테라퓨
 틱스 프랑스
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 36 항

(54) 발명의 명칭 **TNFR2 도메인을 포함하는 신규한 CAR 작제물**

(57) 요약

본 발명은, 인간 TNFR2 막관통 도메인(TM) 또는 이의 단편 또는 변이체 및/또는 인간 TNFR2 공자극 세포내 신호 전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR), 및 상기 CAR을 발현하는 면역 세포에 관한 것이다. 본 발명은 추가로, 인간 TNFR2 막관통 도메인(TM) 또는 이의 단편 또는 변이체 및/또는 인간 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 면역 세포의 투여를 포함하는 치료 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 14/70517 (2013.01)
C07K 14/70521 (2013.01)
C07K 16/2833 (2013.01)
C07K 16/2866 (2013.01)
C07K 16/2887 (2013.01)
C07K 16/2896 (2013.01)
C12N 15/62 (2013.01)
C12N 5/0637 (2013.01)

(72) 발명자

게트너-다텐느 줄리

프랑스, 06560 발본 소피아 앙티폴리, 레
카르둘랭, 알리 드 라 네르티에르, 씨/오 상가모
테라퓨틱스 프랑스

메이어 프랑수아

프랑스, 06560 발본 소피아 앙티폴리, 레
카르둘랭, 알리 드 라 네르티에르, 씨/오 상가모
테라퓨틱스 프랑스

명세서

청구범위

청구항 1

세포외 결합 도메인(extracellular binding domain), 막관통 도메인(transmembrane domain) 및 세포내 도메인을 포함하는, 키메라 항원 수용체(CAR)로서,

(i) 막관통 도메인은 인간 종양 괴사 인자 수용체 2(TNFR2) 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하거나,

(ii) 세포내 도메인은 인간 TNFR2 공자극 세포내 신호전달(signaling) 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하거나,

(iii) 항목 (i) 및 (ii) 둘 다인, 키메라 항원 수용체(CAR).

청구항 2

제1항에 있어서, 세포외 힌지(hinge) 도메인을 추가로 포함하는, CAR.

청구항 3

제2항에 있어서, 힌지 도메인이 인간 CD8 또는 CD28의 힌지 영역을 포함하는, CAR.

청구항 4

제3항에 있어서, 힌지 도메인이 서열번호 14의 서열 또는 서열번호 14와 적어도 약 70% 동일성(identity)을 갖는 서열을 포함하는, CAR.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 있어서, 세포내 도메인이 면역 세포 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는, CAR.

청구항 6

제5항에 있어서, 세포내 도메인이 인간 CD3의 T 세포 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는, CAR.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중의 어느 한 항에 있어서, 세포내 도메인이 인간 CD3 제타(zeta)의 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하고, 임의로 서열번호 28, 29, 30 또는 31의 서열, 또는 서열번호 28, 29, 30 또는 31과 적어도 약 70% 동일성을 갖는 서열을 포함하는, CAR.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중의 어느 한 항에 있어서, CAR이

세포외 결합 도메인,

인간 CD8 또는 CD28의 힌지 영역을 포함하는 세포외 힌지 도메인,

인간 TNFR2 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하는 막관통 도메인, 및

인간 CD3 제타의 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인

을 포함하는, CAR.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중의 어느 한 항에 있어서, CAR이

세포외 결합 도메인,

인간 CD8 또는 CD28의 힌지 영역을 포함하는 세포외 힌지 도메인,

막관통 도메인, 및

인간 TNFR2 공자극(costimulatory) 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 인간 CD3 제타의 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인

을 포함하는, CAR.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중의 어느 한 항에 있어서, CAR이

세포외 결합 도메인,

인간 CD8 또는 CD28의 힌지 영역을 포함하는 세포외 힌지 도메인,

인간 TNFR2 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하는 막관통 도메인, 및

인간 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 인간 CD3 제타의 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인

을 포함하는, CAR.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중의 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이, 서열번호 22 또는 서열번호 22와 적어도 약 70% 동일성을 갖는 서열의 적어도 8개의 연속 아미노산(contiguous amino acid)을 포함하는, CAR.

청구항 12

제11항에 있어서, 막관통 도메인이, TNFR2가 아닌 단백질의 막관통 도메인으로부터의 아미노산 잔기와 조합하여, 서열번호 22의 적어도 8개의 연속 아미노산 잔기를 포함하는, CAR.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중의 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 VNCVIMTQV(서열번호 63)의 아미노산 서열을 포함하는, CAR.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중의 어느 한 항에 있어서, 세포내 도메인이, 서열번호 34 또는 서열번호 34와 적어도 약 70% 동일성을 갖는 서열의 적어도 30개의 연속 아미노산 잔기를 포함하는, CAR.

청구항 15

제14항에 있어서, 세포내 도메인이, TNFR2가 아닌 단백질의 공자극 세포내 신호전달 도메인으로부터의 아미노산 잔기와 조합하여, 서열번호 34의 적어도 30개의 연속 아미노산 잔기를 포함하는, CAR.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중의 어느 한 항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인이, 서열번호 34의 잔기 1-70, 1-115 또는 1-156을 포함하는, CAR.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중의 어느 한 항에 있어서,

세포외 결합 도메인,

서열번호 14의 CD8 힌지 영역을 포함하는 세포외 힌지 도메인,

서열번호 22의 TNFR2 막관통 도메인을 포함하는 막관통 도메인, 및

- a) 서열번호 28, 29, 30 또는 31의 1차 인간 CD3 제타 세포내 신호전달 도메인 및
- b) 서열번호 34의 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인을 포함하는, 세포내 도메인을 포함하는, CAR.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중의 어느 한 항에 있어서, 세포외 결합 도메인이 항체 또는 이의 항원 결합 단편인, CAR.

청구항 19

제18항에 있어서, 세포외 결합 도메인이 일본쇄 가변 단편(scFv)인, CAR.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중의 어느 한 항에 있어서, 세포외 결합 도메인이

- (a) 자가항원으로서, 임의로 IL-23 수용체(IL-23R)인, 자가 항원;
 - (b) B 세포 항원으로서, 임의로 CD19 및 CD20으로부터 선택된 B 세포 항원; 또는
 - (c) 동종이계 HLA 클래스 I 또는 클래스 II 분자로서, 클래스 I 분자가 임의로 HLA-A2인, 동종이계 HLA 클래스 I 또는 클래스 II 분자
- 에 특이적으로 결합하는, CAR.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중의 어느 한 항에 따른 CAR을 코딩하는(encoding) 핵산 서열.

청구항 22

제21항에 따른 핵산 서열을 포함하는 벡터(vector).

청구항 23

제21항의 핵산 서열 또는 제22항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 24

제1항 내지 제20항 중의 어느 한 항에 따른 CAR을 발현하는 면역 세포의 집단(population).

청구항 25

제24항에 있어서, 면역 세포가 T 세포, 천연 킬러(NK) 세포, $\alpha\beta$ T 세포, $\gamma\delta$ T 세포, 이중 음성(DN) 세포, 조절 면역 세포, 조절 T(Treg) 세포, 효과기(effector) 면역 세포, 효과기 T 세포, B 세포, 및 골수-유래 세포, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 면역 세포가 임의로 인간 세포인, 면역 세포 집단.

청구항 26

제24항에 있어서, 집단이 Treg 세포를 포함하고, Treg 세포가 임의로 인간 세포인, 면역 세포 집단.

청구항 27

제26항에 있어서, 집단이 세포외 결합 도메인, 인간 CD8의 힌지 영역을 포함하는 힌지 도메인, 인간 TNFR2 막관통 도메인, 및

인간 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 및, 인간 CD3 제타의 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인

을 포함하는 CAR을 발현하는 인간 Treg 세포를 포함하는, 면역 세포 집단.

청구항 28

제1항 내지 제20항 중의 어느 한 항에 따른 CAR을 발현하는 면역 세포, 또는 제23항에 따른 숙주 세포, 또는 제24항 내지 제27항 중의 어느 한 항에 따른 면역 세포 집단, 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 29

이를 필요로 하는 인간 대상체에게 제28항에 따른 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 30

이를 필요로 하는 인간 대상체에서 질환 또는 장애의 치료에 사용하기 위한, 제1항 내지 제20항 중의 어느 한 항의 키메라 항원 수용체, 또는 제24항 내지 제27항 중의 어느 한 항에 따른 면역 세포 집단.

청구항 31

이를 필요로 하는 인간 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하기 위한 의약(medicament)의 제조를 위한, 제1항 내지 제20항 중의 어느 한 항에 따른 키메라 항원 수용체 또는 제24항 내지 제27항 중의 어느 한 항에 따른 면역 세포 집단의 용도.

청구항 32

제29항, 제30항, 또는 제31항에 있어서, 질환 또는 장애가 염증성 질환, 자가면역 질환, 알레르기성 질환, 장기 이식 상태, 암 및 감염성 질환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법, 사용하기 위한 CAR 또는 면역 세포 집단, 또는 용도.

청구항 33

제29항, 제30항, 또는 제31항에 있어서, 인간 대상체가 면역억제를 필요로 하고, CAR이 인간 대상체의 Treg 세포에서 발현되는, 방법, 사용하기 위한 CAR 또는 면역 세포 집단, 또는 용도.

청구항 34

제33항에 있어서, 질환 또는 장애가 염증성 질환, 자가면역 질환, 알레르기성 질환 또는 장기 이식 상태인, 방법, 사용하기 위한 CAR 또는 면역 세포 집단, 또는 용도.

청구항 35

제34항에 있어서, 장기 이식 상태가 이식편 거부(graft rejection) 또는 이식편 대 숙주 질환(graft-versus-host disease)인, 방법, 사용하기 위한 CAR 또는 면역 세포 집단, 또는 용도.

청구항 36

의약으로서 사용하기 위한, 제1항 내지 제20항 중의 어느 한 항의 키메라 항원 수용체, 또는 제24항 내지 제27항 중의 어느 한 항에 따른 면역 세포 집단.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호-참조

[0002] 본 출원은, 2018년 8월 10일에 출원된 미국 가특허출원 제62/717,234호로부터의 우선권을 주장한다. 해당 출원

의 개시는, 참조에 의해 그 전체가 본원에 도입된다.

- [0003] 서열 목록
- [0004] 본 출원은, ASCII 형식으로 전자적으로 제출된 서열 목록을 포함하고, 참조에 의해 그 전체가 본원에 도입된다. 2019년 8월 9일에 작성된 서열 목록의 전자 카피는, 025297_W0003_SL.txt로 명명되고, 크기는 195,578 바이트이다.
- [0005] 발명의 분야
- [0006] 본 발명은 면역요법(immunotherapy)의 분야에 관한 것이다. 특히, 본 발명은, TNFR2 막관통 도메인(transmembrane domain)(TM) 또는 이의 단편 또는 변이체 및/또는 TNFR2 세포내 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 상기 CAR을 발현하는 세포 집단(population) 및 질환 또는 장애를 치료하기 위한 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0007] 키메라 항원 수용체(CAR) 기술은, 특히 B 세포 림프종 및 백혈병과 관련하여, 최근, 암 치료에 혁명을 일으켰다. CAR 조작된 염증유발성 T 세포는 광범위하게 연구되고, 초기 임상 시험에서 혈액 악성종양의 치료에 유효성을 제공하는 것으로 제안되었지만, CAR 조작된 조절 T 세포(Treg)는 평가되어 있지 않다.
- [0008] 인간 Treg은 면역 항상성의 유지에 중요한 역할을 하고, 따라서 다양한 임상 조건에서 치료 수단으로 사용될 수 있다. 이들은 또한, 치료 환경에서의 항원-특이적 면역조절을 부여하기 위해 활용할 수 있는 강력한 면역 억제 특성을 갖는다. 이러한 이유로, Treg 세포 요법은, 예를 들면, 만성 염증성 질환, 자가면역 질환, 알레르기성 질환 및 이식편 거부(graft rejection) 또는 이식편 대 숙주 질환(graft-versus-host disease; GvHD) 등의 장기 이식 상태를 치료하기 위해 개발되었다.
- [0009] 당해 기술분야에서, CAR 작제물을 사용한 Treg 세포의 형질도입은, 예를 들면, PCT 특허 공개 WO 제2008/095141 호에서 제안되었다.
- [0010] 세포외, 막관통 및 세포질 도메인이 상이한 다양한 분자 포맷의 CAR이 개발되었다. T 효과기 세포 분야에서, 키메라 항원 수용체(CAR)의 세포내 모듈은 일반적으로 CD3 제타(zeta)와 탠덤(tandem)으로 CD28, ICOS 또는 4-1BB 도메인으로 구성된다. 그러나, 이러한 프로토타입 모듈을 사용하여 CAR Treg 세포를 설계하면, 제어되지 않은 구성적 신호전달(signaling)이 종종 발생하고, 이는 제어되지 않은 구성적 활성화를 초래한다. 이 긴장성 신호전달(tonic signaling)(활성화의 항원-독립적 배경에 상응)는, CAR Treg 세포의 조기 고갈을 유발하여 치료 용도를 제한할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 따라서, 면역 세포, 특히 Treg 세포에서 발현되는 경우, 더 낮은 긴장성 신호전달을 갖는 신규한 CAR 작제물에 대한 필요성이 있다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명은, TNFR2 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체, 및/또는 TNFR2 세포내 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하는 신규한 CAR 작제물을 제공한다. 본원에서 입증된 바와 같이, 상기 CAR 작제물을 발현하는 조작된 T 세포 및 조작된 Treg 세포는, 종래의 CAR을 발현하는 상기 세포와 비교하여, 긴장성 신호전달의 강력한 감소를 나타낸다. CAR 관여 후, 조작된 Treg 세포는, T 효과기 세포 증식에 대해 매우 효율적인 억제 활성을 나타냈고, 따라서 세포 치료를 위한 이들 Treg 세포의 이점을 입증했다.
- [0013] 일부 실시형태에서, 인간 Treg 세포는, 다음 특징 중의 하나 이상을 나타낸다: a) 인간 CD8 막관통 도메인 및 4-1BB 공자극(costimulatory) 세포내 신호전달 도메인을 갖는 CAR을 발현하는 Treg와 비교하여, 본 Treg 세포는, 세포 표면에 CAR을 더 낮은 수준으로 발현하지만, 동등한 수준의 CAR-특이적 활성화를 나타내고; b) 본 Treg 세포는, 1주 이상(예를 들면, 9일 배양 후) 후에도 Treg 표현형(예를 들면, FoxP3, Helios 및 CD62L의 높은 수준의 발현 및 CD127의 낮은 수준의 발현)을 유지하고; c) 본 Treg 세포는 생체내에서(예를 들면, 마우스 GvHD 모델에서) GvHD를 제어할 수 있다.

- [0014] 일부 실시형태에서, 본 발명은, 세포외 결합 도메인(extracellular binding domain), 막관통 도메인(transmembrane domain) 및 세포내 도메인을 포함하는 CAR을 제공하고, 여기서
- [0015] - 막관통 도메인은 인간 종양 괴사 인자 수용체 2(TNFR2) 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하거나,
- [0016] - 세포내 도메인은 인간 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하거나,
- [0017] - (i) 및 (ii) 둘 다이다.
- [0018] 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 CAR은, 세포외 힌지(hinge) 도메인, 예를 들면, 인간 CD8 또는 CD28의 힌지 영역을 추가로 포함한다. 특정 실시형태에서, 힌지 도메인은, 서열번호 14의 서열 또는 서열번호 14와 적어도 약 70% 동일성(identity)을 갖는 서열을 포함한다.
- [0019] 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 CAR의 세포내 도메인은, 면역 세포 1차 세포내 신호전달 도메인, 예를 들면, 인간 CD3의 T 세포 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 세포내 도메인은, 인간 CD3 제타의 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하고, 임의로, 서열번호 28, 29, 30 또는 31의 서열, 또는 서열번호 28, 29, 30 또는 31과 적어도 약 70% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.
- [0020] 특정 실시형태에서, CAR은
- [0021] - 세포외 결합 도메인,
- [0022] - 인간 CD8 또는 CD28의 힌지 영역을 포함하는 세포외 힌지 도메인,
- [0023] - 인간 TNFR2 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하는 막관통 도메인, 및
- [0024] - 인간 CD3 제타의 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인
- [0025] 을 포함한다.
- [0026] 특정 실시형태에서, CAR은
- [0027] - 세포외 결합 도메인,
- [0028] - 인간 CD8 또는 CD28의 힌지 영역을 포함하는 세포외 힌지 도메인
- [0029] - 막관통 도메인, 및
- [0030] - 인간 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 인간 CD3 제타의 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인
- [0031] 을 포함한다.
- [0032] 특정 실시형태에서, CAR은
- [0033] - 세포외 결합 도메인,
- [0034] - 인간 CD8 또는 CD28의 힌지 영역을 포함하는 세포외 힌지 도메인,
- [0035] - 인간 TNFR2 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하는 막관통 도메인, 및
- [0036] - 인간 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 인간 CD3 제타의 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인
- [0037] 을 포함한다.
- [0038] 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 CAR의 막관통 도메인은, 서열번호 22 또는 서열번호 22와 적어도 약 70% 동일성을 갖는 서열의 적어도 8개의 연속 아미노산(contiguous amino acid)을 포함한다. 특정 실시형태에서, 막관통 도메인은, TNFR2가 아닌 단백질의 막관통 도메인으로부터의 아미노산 잔기와 조합하여, 서열번호 22의 적어도 8개의 연속 아미노산 잔기를 포함한다. 특정 실시형태에서, 막관통 도메인은 VNCVIMTQV의 아미노산 서열(서열번호 63)을 포함한다.
- [0039] 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 CAR의 세포내 도메인은, 서열번호 34 또는 서열번호 34와 약 70% 이상의 동일성을 갖는 서열의 적어도 30개의 연속 아미노산 잔기를 포함한다. 특정 실시형태에서, 세포내 도메인은,

TNFR2가 아닌 단백질의 공자극 세포내 신호전달 도메인으로부터의 아미노산 잔기와 조합하여, 서열번호 34의 적어도 30개의 연속 아미노산 잔기를 포함한다. 특정 실시형태에서, 세포내 신호전달 도메인은, 서열번호 34의 잔기 1-70, 1-115 또는 1-156을 포함한다.

- [0040] 특정 실시형태에서, CAR은
- [0041] - 세포외 결합 도메인,
- [0042] - 서열번호 14의 CD8 힌지 영역을 포함하는 세포외 힌지 도메인,
- [0043] - 서열번호 22의 TNFR2 막관통 도메인을 포함하는 막관통 도메인, 및
- [0044] - 다음을 포함하는 세포내 도메인:
- [0045] - 서열번호 28, 29, 30 또는 31의 1차 인간 CD3 제타 세포내 신호전달 도메인, 및
- [0046] - 서열번호 34의 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인
- [0047] 을 포함한다.
- [0048] 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 CAR의 세포외 결합 도메인은, 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 특정 실시형태에서, 세포외 결합 도메인은 일본쇄 가변 단편(scFv)이다. 세포외 결합 도메인은, 예를 들면,
- [0049] - 자가 항원(여기서, 자가 항원은 임의로 IL-23 수용체(IL-23R)이다);
- [0050] - CD19 및 CD20에서 임의로 선택되는 B 세포 항원; 또는
- [0051] - 동종이계 HLA 클래스 I 또는 클래스 II 분자(여기서, 클래스 I 분자는 선택적으로 HLA-A2이다)
- [0052] 에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0053] 본 발명은 또한, 본원에 기재된 CAR을 코딩하는(encoding) 핵산 서열, 게다가 핵산 서열을 포함하는 벡터(vector), 및 핵산 서열 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.
- [0054] 본 발명은 또한, 본원에 기재된 CAR을 발현하는 면역 세포 집단을 제공한다. 일부 실시형태에서, 면역 세포는 T 세포, 천연 킬러(NK) 세포, $\alpha\beta$ T 세포, $\gamma\delta$ T 세포, 이중 음성(DN) 세포, 조절 면역 세포, 조절 T(Treg) 세포, 효과기 면역 세포, 효과기 T 세포, B 세포 및 골수-유래 세포 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 여기서 면역 세포는 임의로 인간 세포이다. 특정 실시형태에서, 집단은 Treg 세포를 포함하고, Treg 세포는 임의로 인간 세포이다.
- [0055] 특정 실시형태에서, 면역 세포 집단은, 다음을 포함하는 CAR을 발현하는 인간 Treg 세포를 포함한다:
- [0056] - 세포외 결합 도메인,
- [0057] - 인간 CD8의 힌지 영역을 포함하는 힌지 도메인,
- [0058] - 인간 TNFR2 막관통 도메인, 및
- [0059] - 인간 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 및 인간 CD3 제타의 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인.
- [0060] 본 발명은 또한, 본원에 기재된 CAR을 발현하는 면역 세포, 숙주 세포 또는 면역 세포 집단 및 억제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 억제학적 조성물을 제공한다. 또한, 억제학적 조성물을 이를 필요로 하는 인간 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 인간 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 제공된다.
- [0061] 본 발명은 또한, 이를 필요로 하는 인간 대상체에서 질환 또는 장애의 치료에 사용하기 위한, 본원에 기재된 키메라 항원 수용체 또는 면역 세포 집단을 제공한다.
- [0062] 본 발명은 또한, 이를 필요로 하는 인간 대상체에서 질환 또는 장애의 치료를 위한 약제의 제조를 위한, 본원에 기재된 키메라 항원 수용체 또는 면역 세포 집단의 용도를 제공한다.
- [0063] 일부 실시형태에서, 질환 또는 장애는 염증성 질환, 자가면역 질환, 알레르기성 질환, 장기 이식 상태, 암 및 감염성 질환으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0064] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 면역 억제를 필요로 하고, CAR은 인간 대상체의 Treg 세포에서 발현된다.

[0065] 일부 실시형태에서, 질환 또는 장애는, 염증성 질환, 자가면역 질환, 알레르기성 질환 또는 장기 이식 상태 (예를 들면, 이식편 거부 또는 이식편 대 숙주 질환)이다.

[0066] 본 발명은 또한, 약제로서 사용하기 위한, 본원에 기재된 키메라 항원 수용체 또는 면역 세포 집단을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0067] 도 1은, CD19-CAR, CD20-CAR 및 IL-23R-CAR 작제물의 개략도를 나타낸다. CAR은, 인간 CD8 리더 서열(CD8), 임의로 헤마글루티닌 태그(HA), scFv 서열(항-CD19, 항-CD20 또는 항-IL-23R), 임의로 스트렙트아비딘 태그(Tag), 힌지 도메인(링커), 막관통 도메인(TNFR2 또는 CD8), 공자극 세포내 신호전달 도메인(4-1BB 또는 TNFR2) 및 CD3 제타(CD3ζ)를 포함한다. CAR 작제물은 P2A-GFP 코딩 서열과 프레임 내에 있다.

도 2는, Tregs의 세포 표면에서 형질도입 효율 및 CAR 발현을 나타내는 유세포 분석 도트 플롯을 도시한다. 형질도입 효율은 GFP 발현에 의해 평가되었고, CAR 발현은 CD19-CAR(CD8TM/4-1BB 또는 TNFR2)의 경우 HA 발현 또는 CD20-CAR(CD8TM/4-1BB 또는 TNFR2)의 경우 단백질 L 염색에 의해 평가되었다. MFI: 평균 형광 강도.

도 3은, CD20-CAR(CD8TM/4-1BB 또는 TNFR2)로 형질도입되거나, 형질도입되지 않은("블랭크") 인간 Tregs에서 CAR 발현의 웨스턴 블롯 분석을 나타낸다. CD3 제타 특이적 항체로 염색하면, 16kD에서 내인성 CD3 제타, 약 62kD에서 CD20-CAR(CD8TM/4-1BB), 82kD에서 CD20-CAR(TNFR2)가 나타났다(패널 A, 좌측 상부). 이어서, 막을 세척하고, 로딩 대조군으로서 β-액틴 항체로 재프로빙했다(패널 A, 좌측 하단). 밴드 강도는 이미지 J를 사용하여 정량화되었고, 결과는 패널 B의 2인의 상이한 기준자로부터 제시되어 있다.

도 4는, TNFR2-유래 CAR이 CAR-특이적 활성화를 유지한다는 것을 나타내는 히스토그램을 도시한다. 9일째에, 형질도입된 FoxP3 Treg를 단독으로 또는 항-CD3/항-CD28 코팅된 비드의 존재하에, 또는 새롭게 해동된 자가 B 세포의 존재하에 접종했다. 24시간 후, CD19-CAR(좌측 상부), CD20-CAR(우측 상부) 및 IL-23R-CAR(하부)를 CD4 및 CD69 세포 표면 발현에 대해 염색했다. 오차 막대는 평균±SEM을 나타낸다. CTRL: CAR로 형질도입되지 않은 Treg 세포.

도 5는, TNFR2-유래 CAR이 효율적 CAR-매개 억제 활성을 나타내는 것을 나타내는 그래프이다. CD19-CAR Treg (패널 A), CD20-CAR Treg(패널 B) 또는 IL-23R-CAR Treg(패널 C)에 의해 매개되는 접촉 의존적 억제는, 활성화되지 않은 상태(점선) 또는 B 세포-유도된 CAR 활성화 후(실선)에 유세포 분석을 사용하여 종래 T 세포(Tconv)의 증식을 측정하여 평가했다. 원 선은 CD8TM/4-1BB CAR 작제물을 나타내고 정사각형 선은 TNFR2 CAR 작제물을 나타낸다. 오차 막대는 평균±SEM을 나타낸다.

도 6은, 본 발명의 CD19-CAR 작제물의 개략도를 도시한다. CAR은, 인간 CD8 리더 서열(CD8), scFv 서열(항-CD19), 스트렙트아비딘 태그(Tag), 힌지 도메인(링커), 막관통 도메인(CD8, TNFR2 또는 융합된 CD8/TNFR2), 공자극 세포내 신호전달 도메인(4-1BB, TNFR2 또는 TNFR2 단편) 및 CD3 제타(CD3z)를 포함한다. CAR 작제물은 P2A-GFP 코딩 서열과 프레임 내에 있다.

도 7은, TNFR2-C-말단 결실 작제물이 상이한 표면 발현 수준을 나타내고, 주르카트-NFAT 세포에서 CD3z 신호전달에서 기능적인 것을 나타내는 한 쌍의 그래프이다. 주르카트-NFAT 세포는 표시된 작제물로 형질도입되었다. 배양 1주일 후, CAR 표면 발현을 단백질 염색에 의해 측정하고(패널 A), 세포를 CD19 발현 다우디(Daudi) 세포에 의해 1:1의 비율로 활성화시켰다. 24시간 후, NFAT 의존성 루시퍼라제 분비를 글로우맥스 루미노미터(Glowmax luminometer)(패널 B)를 사용하여 측정했다.

도 8은, 세포 표면(좌측 상부 및 하부)에서 형질도입 효율 및 CAR 발현을 나타내는 도트 플롯 세트, 및 형질도입된 CAR-Treg 세포의 생존율(우측 하부)을 나타내는 그래프이다. 8일째에 형질도입 효율(%)은 GFP 발현 수준을 사용하여 평가하고, CAR 밀도(MFI)는 단백질-L 표지화를 사용하여 평가했다. 요오드화프로피듐 배제 방법을 사용하여 세포 생존율을 평가했다. 오차 막대는 평균±SD를 나타낸다.

도 9는, 항-CD20 CAR의 리간드-독립적 긴장성 신호전달 및 활성화 능력을 나타내는 그래프이다. 9일째에, 형질도입된 FoxP3 Treg를 단독으로("없음"), 항-CD3/항-CD28 코팅된 비드의 존재하에, 또는 새롭게 해동된 자가 B 세포("B 세포")의 존재하에 접종했다. 24시간 후, CD4 및 CD69 세포 표면 발현에 대해 세포를 염색했다. 오차 막대는 평균±SD를 나타낸다. "없음" 조건의 경우, GFP 조건을 대조군으로 사용하여 통계 분석을 수행했다(*p < 0.05, **p < 0.01 및 ***p < 0.001, 대응표본 T-검정).

도 10은, TNFR2-유래 CD20 CAR이 효율적 CAR-매개 억제 활성을 나타내지만, 4-1BB 및 TNFR1-유래 CD20 CAR을 나타내지 않는 것을 나타내는 그래프 세트를 도시한다. 활성화의 부재("없음") 또는 B 세포-유도 CAR 활성화 후("B 세포")의 CAR Treg 세포에 의해 매개되는 접촉-의존적 억제를 종래의 T 세포(Tconv)의 증식을 측정함으로써 평가했다.

도 11은, CAR-매개 억제 활성의 효능을 나타내는 그래프 세트이다. TNFR2 유래(상부) 또는 TNFR1 유래(하부) CAR을 사용하여 B 세포가 CAR 활성화를 유도한 후의 접촉 의존적 억제(%)는, 검정에서 CAR-Treg 세포 수의 함수로 표현되었다. 이 표현을 통해, 50% 억제를 유발하는데 필요한 CAR-Treg의 수를 계산할 수 있다.

도 12는, 실시예 5에서 사용된 HLA-A2-CAR 작제물의 개략도를 도시한다. CAR은, 인간 CD8 리더 서열(CD8), 항-HLA-A2 scFv 서열, 힌지 도메인(링커), 막관통 도메인(TNFR2 또는 CD8 TM), 공신호전달 도메인(CD28 또는 TNFR2 또는 TNFR2 + 4-1BB) 및 CD3 제타(CD3Z)를 포함한다. 이들 CAR 작제물은 P2A-GFP 코딩 서열과 프레임 내에 있다.

도 13은, Treg의 세포 표면에서 형질도입 효율 및 CAR 발현을 나타내는 유세포 분석 도트 플롯을 도시한다. 형질도입 효율은 GFP 발현에 의해 평가되었고, 세포 표면에서의 CAR 발현은 Dextramer[®] 발현에 의해 평가되었다.

도 14는, HLA*A2 CAR-Treg 상의 Treg 표현형 마커의 존재를 나타내는 유세포 분석 도트 플롯을 도시한다.

도 15는, TNFR2, CD28 또는 TNFR2+4-1BB 도메인을 포함하는 HLA*A2-CAR-Treg가 주사한 NSG 마우스에 대해 시간 경과에 따른 체중 변화(상부 좌측), GvHD 스코어(상부 우측) 및 무병생존률(하부)을 나타내는 그래프 세트이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0068] 정의

[0069] 본 발명에서 하기 용어는 하기의 의미를 갖는다:

[0070] 용어 "하나"("a" 및 "an")는, 관사의 문법적 목적어의 하나 이상(즉, 적어도 하나)을 지칭한다. 예를 들면, "요소"는 하나의 요소 또는 하나 이상의 요소를 의미한다.

[0071] 양, 시간적 지속시간 등 등의 측정가능한 값을 언급할 때의 용어 "약"은 명시된 값으로부터 ±20% 또는 일부 경우에 ±10%, 또는 일부 경우에 ±5%, 또는 일부 경우에 ±1%, 또는 일부 경우에 ±0.1%의 변동을 포함하는 것을 의미하고, 이는 이러한 변동이 개시된 방법을 수행하기에 적절하기 때문이다.

[0072] 본원에 사용된 용어 "활성화"는, 검출가능한 세포 반응을 유도하기에 충분히 자극된 T 세포(예를 들면, 조절 T 세포)의 상태를 지칭한다. 활성화는 또한 사이토카인 생성 또는 억제 활성 등의 검출가능한 효과기 기능(들)과 연관될 수 있다. 용어 "활성화된" 조절 T 세포는, 무엇보다도, 면역 반응을 억제할 수 있는 조절 T 세포를 지칭한다.

[0073] 용어 "아피타디"는 당해 기술분야에 공지되어 있으며, 스타필로코쿠스 단백질 A의 IgG 결합 도메인 중의 하나로부터 유래된 58개 아미노산 잔기의 단백질 도메인에 기초한 친화성 단백질을 지칭한다.

[0074] 용어 "동종이계"은, 물질이 도입된 개체와 동일한 종의 상이한 개체로부터 유래된 임의의 물질을 지칭한다. 하나 이상의 유전자좌의 유전자가 동일하지 않은 경우, 2개 이상의 개체는 서로 동종이계인 것으로 한다. 일부 국면에서, 동일한 종의 개체로부터의 동종이계 물질은 항원적으로 상호작용하기 위해 유전적으로 충분히 상이할 수 있다.

[0075] 본원에 사용된 용어 "항체" 또는 "면역글로불린"(Ig)은, 항원과 특이적으로 결합하는 면역글로불린 분자로부터 유래된 단백질 또는 폴리펩티드 서열을 지칭한다. 항체는, 폴리클로날 또는 모노클로날, 다중쇄 또는 일쇄, 또는 무손상 면역글로불린일 수 있으며, 천연 공급원 또는 재조합 공급원에서 유래할 수 있다. 용어 "항체"는 또한, 이들이 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 다중 특이적 항체(예를 들면, 이중특이적 항체) 및 항체 단편을 포함한다. 항체는 면역글로불린 분자의 사량체 등의 면역글로불린 분자의 다량체일 수 있다.

[0076] 기본적 4 본쇄 항체 단위는, 2개의 동일한 경쇄(L) 및 2개의 동일한 중쇄(H)로 구성된 헤테로사량체 당단백질이다. 척추동물 종의 L쇄는, 불변 도메인(CL)의 아미노산 서열을 기반으로, 카파(κ)와 람다(λ)라고 불리우는 2개의 분명하게 구별되는 유형 중의 하나에 할당될 수 있다. 중쇄(CH)의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 면역글로불린을 상이한 클래스 또는 이소형에 할당할 수 있다. 면역글로불린에는 각각 알파(α), 델타(δ), 엡실론(ϵ), 감마(γ) 및 뮤(μ)로 지정된 중쇄를 갖는 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM의 5개 클래스가 있다. γ 및

α 클래스는 CH 서열 및 기능의 상대적으로 작은 차이를 기준으로 서브클래스로 추가로 분류된다. 예를 들면, 인간은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2 서브클래스를 발현한다. 각 L 쇠는 하나의 공유 디설파이드 결합에 의해 H 쇠에 연결되는 반면, 2개의 H 쇠는 H 쇠 이소형에 따라 하나 이상의 디설파이드 결합에 의해 서로 연결된다. 각 H 및 L 쇠에는 또한 규칙적으로 간격을 둔 쇠내 디설파이드 브릿지가 있다. 각 H 쇠는 N-말단에 가변 도메인(VH), 이어서 α 및 γ 쇠 각각에 대한 3개의 불변 도메인(CH) 및 μ 및 ϵ 이소형에 대한 4개의 CH 도메인이 있다. 각 L 쇠는 N-말단에 가변 도메인(VL)이 있고, 다른 쪽 말단에 불변 도메인(CL)이 있다. VL은 VH와 정렬되고, CL은 중쇄의 최초 불변 도메인(CH1)과 정렬된다. 특정 아미노산 잔기는, 경쇄 및 중쇄의 가변 도메인 사이의 계면을 형성하는 것으로 여겨진다. VH와 VL의 쌍은 함께 단일 항원 결합 부위를 형성한다. IgM 항체는 J 쇠로 지칭되는 추가 폴리펩티드와 함께 5개의 기본 헤테로사량체 단위로 구성되며, 따라서 10개의 항원 결합 부위를 포함하는 반면, 분비된 IgA 항체는 중합되어 J 쇠와 함께 2 내지 5개의 기본 4 본쇄 단위를 포함하는 다가 어셈블리를 형성할 수 있다. IgG의 경우, 4 본쇄 단위는 일반적으로 약 150,000달톤이다. 다양한 클래스의 항체의 구조 및 특성에 대해서는, 예를 들면, 문헌[참조: Basic and Clinical Immunology, 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994, page 71, and Chapter 6]을 참조한다.

[0077] 본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 균질한 항체의 집단으로부터 획득된 항체를 지칭하며, 즉, 집단에 포함된 개별 항체는, 소량으로 존재할 수 있는 가능한 천연 존재 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 매우 특이적이고, 단일 항원 부위에 대해 지시된다. 또한, 상이한 결정인자(에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 대조적으로, 각각의 모노클로날 항체는 항원상의 단일 결정인자에 대해 지시된다. 이들의 특이성 외에도, 모노클로날 항체는 다른 항체에 의해 오염되지 않고 합성될 수 있다는 점에서 유리하다. 수식이 "모노클로날"은, 특정 방법에 의한 항체 생산을 요구하는 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들면, 모노클로날 항체는 문헌[참조: Kohler et al, Nature 256:495 (1975)]에 의해 처음 기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 세균, 진핵 동물 또는 식물 세포에서 재조합 DNA 방법을 사용하여 제조될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호). "모노클로날 항체"는 또한, 예를 들면, 문헌[참조: Clackson et al, Nature 352:624-628 (1991) and Marks et al, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)]에 기재된 기술을 사용하여 과지 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 본원에 기재된 모노클로날 항체는, 하나의 항체로부터 하나 이상의 영역(예를 들면, 비-인간 가변 도메인) 및 하나 이상의 다른 항체로부터 하나 이상의 영역(예를 들면, 인간 불변 영역)을 포함하는 "키메라" 항체를 포함한다.

[0078] 용어 "항체 단편"은, (예를 들면, 결합, 입체 장애, 안정화/불안정화에 의해) 항원의 에피토프와 특이적으로 상호작용하는 능력을 보유하는, 무손상 항체의 적어도 일부, 예를 들면, 무손상 항체의 항원 결합 영역 또는 가변 영역을 지칭한다. 항체 단편의 예에는, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 단편, scFv 항체 단편, 디설파이드 결합 Fv(sdFv), VH 및 CH1 도메인으로 구성된 Fd 단편, 선형 항체, sdAb(VL 또는 VH) 등의 단일 도메인 항체, 카멜리드(camelid) VHH 도메인, 항체 단편에서 형성된 다중 특이적 항체, 예를 들면, 힌지 영역에서 디설파이드 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편, 및 항체의 단리된 CDR 또는 다른 에피토프 결합 단편이 포함되나 이들로 제한되지 않는다. 항원 결합 단편은 또한, 단일 도메인 항체, 맥시바디, 미니바디, 나노바디, 인트라바디, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, v-NAR 및 비스-scFv에 도입될 수 있다[참조: 예를 들면, Hollinger and Hudson, Nature Biotechnology 23:1126-1136 (2005)]. 항원 결합 단편은 또한, 피브로넥틴 유형 III 등의 폴리펩티드를 기반으로 하는 스키펴드에 이식될 수 있다(예를 들면, 미국 특허 제6,703,199호, 이는 피브로넥틴 폴리펩티드 미니바디를 기재함). 항체의 파파인 소화는, "Fab" 단편으로 지칭되는 2개의 동일한 항원 결합 단편, 및 용이하게 결정화할 수 있는 능력을 반영하는 명칭인 잔류 "Fc" 단편을 생성한다. Fab 단편은, H 쇠의 가변 영역 도메인(VH), 및 하나의 중쇄(CH1)의 최초 불변 도메인과 함께 전체 L 쇠로 구성된다. 각각의 Fab 단편은, 항원 결합과 관련하여 1가, 즉 단일 항원 결합 부위를 갖는다. 항체의 펩신 처리는 단일 거대 F(ab')₂ 단편을 생성하고, 이는 2가의 항원 결합 활성을 갖고, 항원을 가교결합할 수 있는 2개의 2개의 디설파이드 결합 Fab 단편에 상응한다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 포함하는 CH1 도메인의 카복시 말단에 추가로 몇개의 잔기를 갖는 점에서 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는, 본 명세서에서 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 유리 티올 그룹을 보유하는 Fab'에 대한 명칭이다. F(ab')₂ 항체 단편은, 원래 이들 사이에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로 생성되었다. 항체 단편의 다른 화학적 결합도 공지되어 있다.

[0079] "무손상 항체"는, CL 및 적어도 중쇄 불변 도메인 CH1, CH2 및 CH3 뿐만 아니라, 항원 결합 부위를 포함하는 항체이다. 불변 도메인은 천연 서열 불변 도메인(예를 들면, 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 이의 아미노산 서열 변이체일 수 있다. "천연 서열" 폴리뉴클레오티드는 자연에서 유래된 폴리뉴클레오티드와 동일한 뉴클레

오티드 서열을 갖는 것이다. "천연 서열" 폴리펩티드는, 자연(예를 들면, 임의의 종으로부터) 유래된 폴리펩티드(예를 들면, 항체)와 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이다. 이러한 천연 서열의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드는 자연으로부터 단리될 수 있거나, 재조합 또는 합성 수단에 의해 생성될 수 있다.

- [0080] 본원에 사용된 바와 같이, "항체의 기능적 단편 또는 유사체"는 전장 항체와 공통되는 정성적 생물학적 활성을 갖는 화합물이다. 예를 들면, 항-IgE 항체의 기능적 단편 또는 유사체는, 이러한 분자가 고친화성 수용체, Fc ϵ RI에 결합하는 능력을 갖는 것을 방지하거나 실질적으로 감소시키는 방식으로 IgE 면역글로불린에 결합할 수 있는 것이다.
- [0081] 용어 "항체 중쇄"는, 천연 존재 입체형태로 항체 분자에 존재하는 2개 유형의 폴리펩티드 쇠 중의 보다 큰 것을 지칭하며, 통상 항체가 속하는 클래스를 결정한다.
- [0082] 용어 "항체 경쇄"는 천연 존재 입체형태로 항체 분자에 존재하는 2개 유형의 폴리펩티드 쇠 중의 보다 작은 것을 의미한다. 카파(κ) 및 람다(λ) 경쇄는 2개 주요 항체 경쇄 이소형을 지칭한다.
- [0083] "안티칼린"은 당해 기술분야에 공지되어 있으며, 결합 특이성이 리포칼린으로부터 유도되는 항체 모방 기술을 지칭한다. 안티칼린은 듀오칼린(Duocalins)으로 불리는 이중 표적화 단백질로 포맷될 수도 있다.
- [0084] 용어 "항원" 또는 "Ag"는 면역 반응을 유발하는 분자를 지칭한다. 이 면역 반응은 항체 생산, 특정 면역 적격 세포의 활성화 또는 이들 둘 다를 포함할 수 있다. 당업자는 사실상 모든 단백질 또는 펩티드를 포함한 임의의 거대분자가 항원으로 작용할 수 있음을 이해할 것이다. 더욱이, 항원은 재조합 또는 게놈 DNA로부터 유래될 수 있다. 따라서, 당업자는 면역 반응을 유발하는 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 부분 뉴클레오티드 서열을 포함하는 임의의 DNA가 본 명세서에서 사용되는 용어 "항원"을 코딩한다는 것을 이해할 것이다. 또한, 당업자는, 항원이 반드시 유전자의 전장 뉴클레오티드 서열에 의해서만 코딩될 필요가 없다는 것을 이해할 것이다. 본 발명이 하나 이상의 유전자의 부분 뉴클레오티드 서열의 사용을 포함하지만 이들로 한정되지 않고, 이러한 뉴클레오티드 서열이 다양한 조합으로 배열되어, 원하는 면역 반응을 유발하는 폴리펩티드를 코딩하는 것은 용이하게 명백하다. 게다가, 당업자는, 항원이 반드시 "유전자"에 의해 코딩될 필요가 없다는 것을 이해할 것이다. 항원이 합성될 수 있거나, 생물학적 샘플에서 유래될 수 있거나, 폴리펩티드 이외의 거대분자일 수 있다는 것은 용이하게 명백하다. 이러한 생물학적 샘플은, 예를 들면, 조직 샘플, 세포 또는 기타 생물학적 성분을 갖는 유체를 포함할 수 있지만, 이들로 한정되지는 않는다.
- [0085] 용어 "항원 제시 세포" 또는 "APC"는 이의 표면에 주요 조직적합성 복합체(MHC)와 복합체화된 외래 항원을 제시하는 보조 세포(예를 들어, B 세포, 수지상 세포 등) 등의 면역계 세포를 지칭한다. T 세포는, T 세포 수용체(TCR)를 사용하여 이러한 복합체를 인식할 수 있다. APC는 항원을 처리하여 T 세포에 제공한다.
- [0086] 용어 "자가"는 이후에 재도입될 동일한 개체로부터 유래된 임의의 재료를 의미한다.
- [0087] "아비머(Avimer)"는 당해 기술분야에 공지되어 있으며, 항체 모방 기술을 지칭한다.
- [0088] 용어 "키메라 수용체" 또는 "키메라 항원 수용체" 또는 "CR" 또는 "CAR"는, 하나의 폴리펩티드 또는 폴리펩티드의 세트, 전형적으로 가장 단순한 실시형태에서 2개를 지칭하고, 면역 세포 내에 있는 경우, 표적 리간드에 대한 특이성 및 세포내 신호 생성을 갖는 세포를 제공한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드 세트는 서로 인접해 있다. 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는, 폴리펩티드 세트를 포함하는 키메라 융합 단백질이다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드 세트는, 이량체화 분자의 존재시에, 폴리펩티드를 서로 결합시킬 수 있고, 예를 들면, 리간드 결합 도메인을 세포내 신호전달 도메인에 결합시킬 수 있는 이량체화 스위치를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는, 키메라 수용체 융합 단백질의 아미노-말단(N-ter)에 임의의 리더 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는 세포외 리간드 결합 도메인의 N-말단에 리더 서열을 포함하고, 리더 서열은 세포 프로세싱 및 세포막에 대한 키메라 수용체의 국재화 동안 리간드 결합 도메인으로부터 임의로 절단된다.
- [0089] 용어 "보존적 서열 변형"은, 아미노산 서열을 포함하는 단백질의 생물학적 기능에 유의하게 영향을 미치지거나 변경하지 않는 아미노산 변형을 지칭한다. 이러한 보존적 변형에는 아미노산 치환, 부가 및 결실이 포함된다. 변형은, 부위 지정 돌연변이유발 및 PCR 매개 돌연변이 유발 등의 당해 기술분야에 공지된 표준 기술에 의해 단백질에 도입될 수 있다. "보존적 아미노산 치환"은, 펩티드 화학 분야의 숙련가가 폴리펩티드의 2차 구조 및 친수성 성질이 실질적으로 변하지 않은 것을 기대하도록, 아미노산 잔기가 유사한 특성을 갖는 아미노산 잔기로 대체된 것이다. 따라서, 아미노산 치환은, 일반적으로, 아미노산 측쇄 치환기의 상대적 유사성, 예를 들면, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등을 기반으로 한다. 다양한 전술한 특징을 고려하는 예시적인 치환은 당업자에게 공지되어 있으며, 아르기닌 및 리신; 글루타메이트 및 아스파르테이트; 세린 및 트레오닌; 글루타민 및 아스파

라긴; 및 발린, 류신 및 이소류신을 포함한다. 아미노산 치환은, 극성, 전하, 용해성, 소수성, 친수성 및/또는 잔기의 양친매성 성질의 유사성에 기초하여 추가로 실시할 수 있다. 예를 들면, 음으로 하전된 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함하고; 양으로 하전된 아미노산은 라이신 및 아르기닌을 포함하고; 유사한 친수성 값을 갖는 비하전된 극성 헤드 그룹을 갖는 아미노산은 류신, 이소류신 및 발린을 포함하고; 글리신 및 알라닌; 아스파라긴 및 글루타민; 및 세린, 트레오닌, 페닐알라닌 및 티로신을 포함한다. 보존적 변화를 나타낼 수 있는 다른 아미노산 그룹은 다음을 포함한다: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; 및 (5) phe, tyr, trp, his. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 다른 패밀리는 당해 기술분야에 정의되어 있다. 이러한 패밀리에는 염기성 측쇄(예를 들어, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예를 들어, 아스파르트산, 글루타민산), 비하전된 극성 측쇄(예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판), 비극성 측쇄(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), 베타-분지형 측쇄(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 갖는 아미노산이 포함된다. 따라서, 본 발명의 키메라 수용체 내의 하나 이상의 아미노산 잔기는, 동일한 측쇄 패밀리로부터의 다른 아미노산 잔기로 대체될 수 있고, 변경된 키메라 수용체는 본원에 기재된 기능적 검정을 사용하여 시험될 수 있다.

[0090] 용어 "구성적 프로모터"는, 유전자 생성물을 코딩하거나 특정하는 폴리뉴클레오티드와 작동적으로 연결될 경우, 세포의 대부분 또는 모든 생리학적 조건하에서 유전자 생성물을 세포 내에서 생산하는 뉴클레오티드 서열을 지칭한다.

[0091] 용어 "공자극 분자"는, 공자극 리간드와 특이적으로 결합하고, 이에 의해 T 세포에 의한 공자극 반응, 예컨대, 증식을 매개하는 T 세포상의 동족 결합 파트너를 지칭한다. 공자극 분자는, 효율적 면역 반응에 기여하는 항원 수용체 또는 이들의 리간드 이외의 세포 표면 분자이다. 공자극 신호전달 도메인은, 공자극 분자의 세포내 부분일 수 있다. 공자극 분자는 하기 단백질 패밀리로 나타낼 수 있다: TNF 수용체 단백질, 면역글로불린 유사 단백질, 사이토카인 수용체, 인테그린, 신호전달 림프구 활성화 분자(SLAM 단백질) 및 활성화 NK 세포 수용체.

[0092] "세포독성 세포"는 세포독성 반응을 매개할 수 있는 임의의 세포를 포함한다.

[0093] 본원에서 사용된 용어 "유래하는"는 제1 분자와 제2 분자 사이의 관계를 나타낸다. 이는 일반적으로, 제1 분자와 제2 분자 사이의 구조적 유사성을 지칭하며, 제2 분자에서 유래된 제1 분자에 대한 프로세스 또는 공급원 제한을 내포하거나 포함하지 않는다. 예를 들면, CD3 제타 분자로부터 유래된 세포내 신호전달 도메인의 경우, 세포내 신호전달 도메인은, 필요한 기능, 즉 적절한 조건하에서 신호를 생성하는 능력을 갖도록, 충분한 CD3 제타 구조를 보유한다. 이는, 세포내 신호전달 도메인을 생성하는 특정 프로세스에 대한 제한을 암시하거나 포함하지 않고, 예를 들면, 세포내 신호전달 도메인을 제공하기 위해서는, CD3 제타 서열로 개시하고, 일치 않는 서열을 삭제하거나, 돌연변이를 부과하여 세포내 신호전달 도메인에 도달해야 한다는 것을 의미하지는 않는다.

[0094] 용어 "디아바디"는, V 도메인의 쇠간 페어링이 달성되지만 쇠내 페어링이 달성되지 않도록, VH 도메인과 VL 도메인 사이에 짧은 링커(약 5-10개 잔기)를 갖는 sFv 단편을 구축하여 2가 단편, 즉 2개의 항원 결합 부위를 갖는 단편을 제공함으로써 제조된 작은 항체 단편을 지칭한다. 이중특이적 디아바디는 2개의 "교차" sFv 단편의 헤테로이량체이고, 여기서 2개의 항체의 VH 및 VL 도메인이 상이한 폴리펩티드 쇠에 존재한다. 디아바디는, 예를 들면, EP 0404097; WO 93/11161; 및 문헌[참조: Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)]에 기재되어 있다.

[0095] "도메인 항체"는 당해 기술분야에 공지되어 있으며, 항체의 중쇄 또는 경쇄의 가변 영역에 상응하는, 항체의 최소 기능적 결합 단위를 지칭한다.

[0096] 용어 "코딩"는 유전자, cDNA 또는 mRNA 등의 폴리뉴클레오티드 중의 뉴클레오티드의 특정 서열의 고유한 특성을 지칭하며, 정의된 뉴클레오티드 서열(예를 들면, rRNA, tRNA 및 mRNA) 또는 정의된 아미노산 서열 및 이로부터 생성되는 생물학적 특성을 갖는 생물학적 프로세스에서 기타 폴리머 및 거대분자의 합성을 위한 주형으로서 작용한다. 따라서, 유전자, cDNA 또는 RNA는, 해당 유전자에 상응하는 mRNA의 전사 및 번역이 세포 또는 다른 생물학적 시스템에서 단백질을 생성하는 경우, 단백질을 코딩한다. 뉴클레오티드 서열이 mRNA 서열과 동일하고 통상 서열 목록에 기재되어 있는 코딩 쇠, 및 유전자 또는 cDNA의 전사를 위한 주형으로 사용되는 비코딩 쇠 둘 다는, 유전자 또는 cDNA의 단백질 또는 다른 생성물을 코딩하는 것으로 지칭할 수 있다. 달리 명시되지 않는 한, "아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열"은, 서로 축퇴된 버전이고, 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 모든 뉴클레오티드 서열을 포함한다. "단백질 또는 RNA를 코딩하는 뉴클레오티드 서열"이라는 문구는 또한,

단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 일부 버전에서 인트론(들)을 포함할 수 있는 정도로 인트론을 포함할 수 있다.

- [0097] 용어 "내인성"은 생물, 세포, 조직 또는 시스템으로부터 자연적으로 또는 그 내부에서 자연적으로 생성된 임의의 물질을 지칭한다.
- [0098] 용어 "조작된" 또는 "변형된"은 형질감염, 형질전환 또는 형질도입된 세포를 지칭한다.
- [0099] 용어 "외인성"은 생물, 세포, 조직 또는 시스템의 외부에 도입되거나 외부에서 생성된 임의의 물질을 의미한다.
- [0100] 용어 "발현"은 프로모터에 의해 구동되는 특정 뉴클레오타이드 서열의 전사 및/또는 번역을 지칭한다.
- [0101] 용어 "발현 벡터"는 발현될 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결된 발현 조절 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 지칭한다. 발현 벡터는 발현에 충분한 시스-작용 요소를 포함하고; 발현을 위한 다른 요소는 숙주 세포 또는 시험관내 발현 시스템에 의해 공급될 수 있다. 발현 벡터에는, 재조합 폴리뉴클레오타이드를 도입한, 코스미드, 플라스미드(예를 들어, 네이키드 또는 리포솜에 포함됨), 트랜스포존(예를 들어, 슬리핑 뷰티) 및 바이러스(예를 들어, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노 관련 바이러스)를 포함하여 당해 기술분야에 공지된 모든 것이 포함된다.
- [0102] 본원에 사용된 용어 폴리뉴클레오타이드 "단편"은, 전형적으로, 하나 이상의 결실에서 본원에 구체적으로 개시된 폴리뉴클레오타이드와 상이한 폴리뉴클레오타이드이다. 이러한 단편은 천연에 존재할 수 있거나, 예를 들면, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 서열 중의 하나 이상을 변형시키고 본원에 기재된 바와 같이 코딩된 단편의 하나 이상의 생물학적 활성을 평가함으로써 및/또는 당해 기술분야에 공지된 임의의 수의 기술을 사용함으로써 합성적으로 생성될 수 있다. 따라서, 본원에 사용된 용어 폴리펩티드 "단편"은, 전형적으로, 하나 이상의 결실에서 본원에 구체적으로 개시된 폴리펩티드와 상이한 폴리펩티드이다. 이러한 단편은 천연에 존재할 수 있거나, 예를 들면, 본 발명의 폴리펩티드 서열 중의 하나 이상을 변형시키고 본원에 기재된 폴리펩티드의 하나 이상의 생물학적 활성을 평가함으로써 및/또는 당해 기술분야에 공지된 임의의 수의 기술을 사용함으로써 합성적으로 생성될 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩티드의 구조에서 변형이 이루어질 수 있고, 생물학적 유용성 또는 활성의 현저한 손실없이, 바람직한 특성을 갖는 단편 폴리펩티드를 코딩하거나 단편 폴리펩티드인 기능성 분자를 생성할 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드 단편은 50, 40, 30, 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개 미만의 아미노산이 결실됨으로써 천연 서열과 상이하다. 단편은 또한(또는 대안적으로), 예를 들면, 폴리펩티드의 면역원성, 이차 구조 및 수치요법의 성질에 최소한의 영향을 미치는 아미노산의 결실에 의해 변형될 수 있다.
- [0103] 항체의 "Fc" 단편은, 디설파이드에 의해 함께 유지된 양쪽 H 쇄의 카복시-말단 부분을 포함한다. 항체의 효과 기 기능은 Fc 영역의 서열에 의해 결정되고, 이 영역은 특정 유형의 세포에서 발견되는 Fc 수용체(FcR)에 의해 인식되는 부분이다.
- [0104] "Fv"는, 완전한 항원 인식 및 결합 부위를 포함하는 최소 항체 단편이다. 이 단편은 긴밀하고 비공유 결합된 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 영역 도메인의 이량체로 구성된다. 이 2개 도메인의 폴딩으로부터, 항원 결합을 위한 아미노산 잔기에 기여하고, 항체에 항원 결합 특이성을 부여하는 6개의 초가변 루프(H 및 L 쇄에서 각각 3개의 루프)가 생성된다. 그러나, 단일 가변 도메인(또는 항원에 대해 특이적인 3개의 CDR만을 포함하는 Fv의 절반)조차도, 전체 결합 부위보다 친화성은 낮지만, 항원을 인식하여 결합하는 능력을 가질 수 있다.
- [0105] "프레임워크" 또는 "FR" 잔기는 본원에 정의된 초가변 영역 잔기 이외의 이들 가변 도메인 잔기이다.
- [0106] 본원에 사용된 용어 "이식편 대 숙주 질환" 또는 "GVHD"는 유전적으로 상이한 개인으로부터 이식된 조직을 수령한 후의 의학적 합병증을 지칭한다. 기증된 조직(이식편)의 면역 세포는, 수용자(숙주)를 이물질로 인식한다. 이식된 면역 세포는 숙주의 체세포를 공격한다. GVHD는 일반적으로 줄기 세포 이식과 관련이 있다. 그러나, 이 용어에는 다른 형태의 조직 이식편에서 발생하는 GVHD가 포함된다. GVHD는 수혈 후에도 발생할 수 있다.
- [0107] 용어 "상동성" 또는 "동일성"은 2개의 중합체 분자 사이, 예를 들면, 2개의 DNA 분자 또는 2개의 RNA 분자 등의 2개의 핵산 분자 사이 또는 2개의 폴리펩티드 분자 사이의 아단위 서열 동일성을 지칭한다. 2개 분자 모두의 아단위 위치가 동일한 단량체 아단위에 의해 점유되는 경우; 예를 들면, 2개의 DNA 분자 각각의 위치가 아데닌에 의해 점유되는 경우, 이들은 해당 위치에서 상동성이거나 동일하다. 2개 서열 사이의 상동성은 일치 또는 상동 위치 수의 직접적인 함수이고; 예를 들면, 2개의 서열에서 위치의 절반(예를 들면, 폴리머의 5개 위치의 길이가 10개 아단위)이 상동인 경우, 2개 서열은 50% 상동이고; 위치의 90%(예를 들어, 9/10)가 일치하거나 상

동인 경우, 2개 서열은 90% 상동이다. 따라서, 용어 "상동성" 또는 "동일성"은, 2개 이상의 폴리펩티드 또는 2개 이상의 핵산 분자의 서열 사이의 관계에서 사용되는 경우, 2개 이상의 아미노산 또는 뉴클레오티드 잔기의 스트링 사이의 정합 수에 의해 결정된 바와 같이, 폴리펩티드 또는 핵산 분자 사이의 서열 관련성의 정도를 지칭한다. "동일성"은, 특정 수학적 모델 또는 컴퓨터 프로그램(즉, "알고리즘")에 의해 처리되는 갭 정렬(존재하는 경우)을 갖는 2개 이상의 서열 중의 더 작은 서열 사이의 동일한 정합의 퍼센트를 측정한다. 관련 폴리펩티드의 동일성은 공지된 방법에 의해 용이하게 계산될 수 있다. 이러한 방법은 문헌[참조: Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; and Carillo et al., SIAM J. Applied Math. 48:1073 (1988)]에 기재된 것들을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다. 동일성을 결정하기 위한 바람직한 방법은, 시험된 서열 사이에서 가장 큰 정합을 제공하도록 설계되었다. 동일성을 확인하는 방법은, 공개적으로 사용가능한 컴퓨터 프로그램에 기재되어 있다. 2개 서열 사이의 동일성을 결정하기 위한 예시적인 컴퓨터 프로그램 방법은, GAP를 포함하는 GCG 프로그램 패키지를 포함한다[참조: Devereux et al., Nucl. Acid. Res. 12:387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN, and FASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)]. BLASTX 프로그램은 NCBI(National Center for Biotechnology Information) 및 기타 정보원[참조: (BLAST Manual, Altschul et al. NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul et al, supra)에서 공개적으로 이용가능하다. 공지된 스미스 워터맨(Smith Waterman) 알고리즘을 사용하여 동일성을 결정할 수도 있다.

[0108] 비-인간(예를 들면, 무린) 항체의 형태와 관련된 용어 "인간화"는, 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 포함하는, 키메라 면역글로불린, 면역글로불린쇄 또는 이의 단편(예를 들면, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 항체의 기타 항원-결합 서브서열)을 지칭한다. 대부분의 경우, 인간화 항체 및 이의 항체 단편은 수용자의 상보성 결정 영역(CDR)의 잔기가 비인간 종(공여체 항체), 예컨대, 목적하는 특이성, 친화성 및 능력을 갖는 마우스, 랫트 또는 래빗의 CDR의 잔기로 대체된 인간 면역글로불린(수용자 항체 또는 항체 단편)이다. 일부 예에서, 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 영역(FR) 잔기는, 상응하는 비-인간 잔기로 대체된다. 더욱이, 인간화 항체/항체 단편은 수용자 항체나 수입된 CDR 또는 프레임워크 서열에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은, 항체 또는 항체 단편 성능을 더욱 개선시키고 최적화할 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체 또는 이의 항체 단편은 적어도 1개, 전형적으로 2개의 가변 도메인을 전부 또는 실질적으로 포함하고, CDR 영역의 전부 또는 실질적으로 전부는 비-인간 면역글로불린의 것들에 상응하고, FR 영역의 전부 또는 상당 부분은 인간 면역글로불린 서열의 것들이다. 인간화 항체 또는 항체 단편은 또한, 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부, 전형적으로 인간 면역글로불린의 것을 포함할 수 있다. 상세에 대해서는, 예를 들면, 문헌[참조: Jones et al, Nature 321:522-525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332:323-329 (1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)]을 참조한다.

[0109] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "면역 세포"는 일반적으로 골수에서 생산된 조혈 줄기 세포(HSC)로부터 유래된 백혈구(백혈구)를 포함한다. 면역 세포의 예는 림프구(T 세포, B 세포 및 천연 킬러(NK) 세포) 및 골수 유래 세포(호중구, 호산구, 호염기구, 단핵구, 매크로파지 및 수지상 세포)를 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.

[0110] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "면역 효과기 세포"는 특정 면역 반응을 개시할 있는 형태인 면역계의 세포를 지칭한다.

[0111] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "면역 조절 세포"는 면역계의 활성화를 억제하고, 이에 의해 면역계의 항상성 및 자가 항원에 대한 내성을 유지하는 "조절" 방식으로 작용하는 면역 세포를 지칭한다. "조절 면역 세포"는 또한, 조직 수복 또는 재생 촉진 등의 개선된 임상 상태를 초래하는 비면역 세포에 영향을 미칠 수 있다. 조절 면역 세포는, 제한 없이, 조절 T 세포(예를 들어, CD4⁺ 조절 T 세포, CD8⁺ 조절 T 세포, 조절 $\gamma\delta$ T 세포 및/또는 조절 DN T 세포), 조절 B 세포, 조절 NK 세포, 조절 매크로파지 및 조절 수지상 세포를 포함할 수 있다.

[0112] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "면역 반응"은 T 세포 매개 및/또는 B 세포 매개 면역 반응을 포함한다. 예시적 면역 반응은 T 세포 반응, 예를 들면, 증식, 사이토카인 생산 및 세포 세포독성을 포함한다. 또한, 용어 면역 반응은, T 세포 활성화, 예를 들면, 항체 생산(체액성 반응) 및 사이토카인 반응 세포, 예를 들면, 매크로파

지의 활성화에 의해 간접적으로 영향을 받는 면역 반응을 포함한다. 면역 반응에 관여하는 면역 세포에는 B 세포 및 T 세포(CD4⁺, CD8⁺, Th1 및 Th2 세포); 항원 제시 세포(예를 들면, 수지상 세포, 마크로파지, B 림프구, 랑게르한스 세포 등의 전문적 항원 제시 세포 및 각질 세포, 내피 세포, 성상 세포, 섬유아세포, 희소 돌기아교 세포 등의 비전문적 항원 제시 세포); 천연 킬러 세포; 및 마크로파지, 호산구, 비만 세포, 호염기구 및 과립구 등의 골수 세포가 포함된다.

- [0113] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "면역 순응(immune accommodation)"은 장기 또는 조직 이식에 특이적인 항체가 수용자에게 존재하는 것에도 불구하고, 장기 또는 조직 이식이 정상적으로 기능하는 이식 수용자의 상태를 지칭한다.
- [0114] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "면역학적 관용" 또는 "면역 관용"은 a) 특정 면역학적 반응의 수준 저하(적어도 부분적으로 항원-특이적 효과가 T 림프구, B 림프구, 항체 또는 그 등가물에 의해 매개되는 것으로 생각됨); b) 특정 면역 반응의 개시 또는 진행의 지연; 또는 c) 대상체(예를 들어, 치료를 받지 않은 대상체)의 상이한 집단과 비교하여, 한 집단(예를 들면, 본원에 기재된 치료 등의 치료를 받은 대상체)에서 특정 면역학적 반응의 발병 또는 진행의 위험 감소를 지칭한다. "특정" 면역학적 또는 면역 관용은, 면역학적 또는 면역 관용이 다른 항원에 비해 특정 항원에 대해 우선적으로 호출되는 경우에 발생한다.
- [0115] 본원에 사용된 바와 같이, "시험관내 전사된 RNA"는 시험관내에서 합성된 RNA, 예를 들면, mRNA를 지칭한다. 일반적으로, 시험관내 전사된 RNA는 시험관내 전사 벡터로부터 생성된다. 시험관내 전사 벡터는 시험관내 전사된 RNA를 생성하기 위해 사용되는 주형을 포함한다.
- [0116] 용어 "유도성" 프로모터는, 유전자 생성물을 코딩하거나 특정하는 폴리뉴클레오티드와 작동적으로 연결되는 경우, 프로모터에 상응하는 유도인자가 세포 내에 존재하는 경우에만 실질적으로 세포 내에서 유전자 생성물을 생산하는 뉴클레오티드 서열을 지칭한다.
- [0117] 본원에 사용된 바와 같이, "5' 캡"(RNA 캡, RNA 7-메틸구아노신 캡 또는 RNA m7G 캡이라고도 함)은, "전면부" 또는 전사 개시 직후의 진행생물 메신저 RNA의 5' 말단에 부가된 변형된 구아닌 뉴클레오티드이다. 5' 캡은 최초 전사된 뉴클레오티드에 연결된 말단 그룹으로 구성된다. 이의 존재는, 리보솜에 의한 인식과 RNase로부터의 보호에 중요하다. 캡 추가는 전사와 결합되고, 각각이 서로 영향을 미치도록, 동시 전사적으로 발생한다. 전사가 개시된 직후, 합성되는 mRNA의 5' 말단은, RNA 폴리머라제와 관련된 캡-합성 복합체에 의해 결합된다. 이 효소 복합체는 mRNA 캡핑에 필요한 화학 반응을 촉매한다. 합성은 다단계의 생화학 반응으로 진행된다. 캡핑 모이어티는, 번역의 안정성 또는 효율 등의 mRNA의 기능을 조절하도록 변형될 수 있다.
- [0118] 본 발명의 맥락에서, 일반적으로 존재하는 핵산 염기에 대한 다음 약어가 사용된다. "A"는 아데닌을, "C"는 시토신을, "G"는 구아닌을, "T"는 티민을, "U"는 우라실을 지칭한다.
- [0119] 용어 "교재"는, 본 발명의 조성물 및 방법의 유용성 또는 사용을 전달하기 위해 사용될 수 있는 출판물, 기록물, 다이어그램, 또는 기타 표현 매체를 포함한다. 본 발명의 키트의 설명 자료는, 예를 들면, 본 발명의 핵산, 벡터, 세포 집단 또는 조성물을 포함하는 용기에 부착되거나, 핵산, 벡터, 세포 집단, 또는 본 발명의 조성물을 포함하는 용기와 함께 출하될 수 있다. 또는, 교재는, 사용자가 협력하여 사용하는 것을 의도하여, 용기와는 별도로 출하할 수 있다.
- [0120] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "세포내 신호전달 도메인"은 분자의 세포내 부분을 지칭한다. 세포내 신호전달 도메인은 키메라 수용체 함유 세포의 면역 효과기 기능을 촉진하는 신호를 생성한다. 키메라 수용체-T 세포에서 면역 효과기 기능의 예에는 세포용해 활성화, 억제 활성화, 조절 활성화 및 사이토카인 분비를 포함한 헬퍼 활성이 포함될 수 있다.
- [0121] 용어 "단리된"은 자연 상태에서부터 변화되거나 제거된 것을 의미한다. 예를 들면, 살아있는 동물에 자연적으로 존재하는 핵산 또는 펩티드는 "단리"되지 않지만, 그 자연 상태의 공존 물질로부터 부분적 또는 완전히 분리된 동일한 핵산 또는 펩티드는 "단리"된다. 단리된 핵산 또는 펩티드는 실질적으로 정제된 형태로 존재할 수 있거나, 예를 들면, 숙주 세포 등의 비-천연 환경에 존재할 수 있다. 전형적으로, 단리된 핵산 또는 펩티드의 조제물은 핵산 또는 펩티드를 적어도 약 80% 순도, 적어도 약 85% 순도, 적어도 약 90% 순도, 적어도 약 95% 순도, 95% 초과 순도, 약 96% 초과, 약 97% 초과, 약 98% 초과, 또는 약 99% 초과 순도로 함유한다. "단리된 폴리펩티드"는 그 자연 환경의 구성요소로부터 동정 및 분리 및/또는 회수된 것이다.
- [0122] "단리된 핵산" 또는 "단리된 핵산 서열"은, 천연 서열에 자연적으로 수반되는 리보솜 및 폴리머라제 등의 단백질

질 또는 복합체 뿐만 아니라, 다른 계놈 DNA 서열로부터 실질적으로 분리된 핵산이다. 이 용어는, 이의 천연에 존재하는 환경에서 제거된 핵산 서열을 포함하며, 재조합 또는 클로닝된 DNA 단리물 및 화학적으로 합성된 유사체 또는 이중 시스템에 의해 생물학적으로 합성된 유사체를 포함한다. 실질적으로 순수한 핵산은 단리된 형태의 핵산을 포함한다. 물론, 이것은 원래 단리된 핵산을 지칭하고, 이후에 사람의 손에 의해 단리된 핵산에 추가된 유전자 또는 서열을 제외하지 않는다. 일부 실시형태에서, 단리된 핵산 또는 단리된 핵산 서열은 자연계에 존재하지 않는다.

[0123] "단리된 폴리펩티드"는, 자연 환경의 구성요소로부터 동정 및 분리 및/또는 회수된 폴리펩티드이다. 특정 실시형태에서, 단리된 폴리펩티드는 (1) 로리(Lowry) 방법에 의해 결정된 경우에 폴리펩티드의 95중량% 초과, 특정 실시형태에서 99중량% 초과로 정제되거나, (2) 스피닝 컵 서열분석기를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개 잔기를 획득하기에 충분한 정도로 정제되거나, (3) 쿠마시에 블루(Coomassie blue) 또는 특정 실시형태에서 은 염색을 사용하는 환원 또는 비환원 조건하에서 SDS-PAGE에 의한 균질성으로 정제될 것이다. 단리된 폴리펩티드는, 폴리펩티드의 자연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문에, 재조합 세포내의 그 위치(*in situ*)의 폴리펩티드를 포함한다. 특정 실시형태에서, 단리된 폴리펩티드는 적어도 하나의 정제 단계에 의해 제조될 것이다. 일부 실시형태에서, 단리된 폴리펩티드는 자연계에 존재하지 않는다.

[0124] 용어 "렌티바이러스"는 레트로비리다에과의 속을 지칭한다. 렌티바이러스는, 분열하지 않는 세포를 감염시킬 수 있다는 점에서 레트로바이러스 중에서도 독특하다. 이들은, 숙주 세포의 DNA에 대량의 유전 정보를 전달할 수 있기 때문에, 가장 효율적 유전자 전달 벡터 중의 하나이다. HIV, SIV 및 FIV는 모두 렌티바이러스의 예이다.

[0125] 용어 "렌티바이러스 벡터"는, 예를 들면, 문헌[참조: Milone et al, Mol. Ther. 17 (8):1453-1464 (2009)]에 제공된 바와 같은 자가 불활성화 렌티바이러스 벡터를 포함하는, 렌티바이러스 계놈의 적어도 일부로부터 유래된 벡터를 지칭한다. 클리닉에서 사용될 수 있는 렌티바이러스 벡터의 다른 예는 옥스포드 바이오메디카(Oxford BioMedica)의 LENTIVECTOR[®] 유전자 전달 기술 및 렌티젠(Lentigen)의 LENTIMAX[™] 벡터 시스템을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다. 비임상 유형의 렌티바이러스 벡터도 이용가능하고, 당업자에게 공지되어 있을 것이다.

[0126] 용어 "리간드"는, 리간드/수용체 쌍의 구성원을 지칭하고, 쌍의 다른 구성원(수용체)에 결합한다.

[0127] 용어 "핵산" 또는 "폴리뉴클레오티드"는, 일본쇄 또는 이본쇄 형태의 데옥시리보핵산(DNA) 또는 리보핵산(RNA) 등의 포스포디에스테르 결합에 의해 공유적으로 연결된 뉴클레오티드의 폴리머를 지칭한다. 특별히 한정되지 않는 한, 이 용어는 참조 핵산과 유사한 결합 특성을 갖고, 천연 존재 뉴클레오티드와 유사한 방식으로 대사되는 천연 뉴클레오티드의 공지된 유사체를 포함하는 핵산을 포함한다. 달리 지시되지 않는 한, 특정 핵산 서열은 또한, 이의 보존적으로 변형된 변이체(예를 들면, 축중 코돈 치환), 대립유전자, 오소로그(ortholog), SNP 및 상보적 서열, 뿐만 아니라 명시적으로 표시된 서열을 암묵적으로 포함한다. 구체적으로, 축중 코돈 치환은, 하나 이상의 선택된(또는 모든) 코돈의 제3 위치가 혼합 염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환되는 서열을 생성함으로써 달성할 수 있다[참조: Batzer et al, Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al, J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); 및 Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)].

[0128] "나노바디"는 당해 기술분야에 공지되어 있고, 천연 존재 중쇄 항체의 독특한 구조적 및 기능적 특성을 포함하는 항체-유래 치료 단백질을 지칭한다. 이러한 중쇄 항체는 단일 가변 도메인(VHH)과 2개의 불변 도메인(CH2 및 CH3)을 포함한다.

[0129] "천연 서열" 폴리뉴클레오티드는, 자연으로부터 유래된 폴리뉴클레오티드와 동일한 뉴클레오티드 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드이다. "천연 서열" 폴리펩티드는, 자연(예를 들면, 임의의 종) 유래된 폴리펩티드(예를 들면, 항체)와 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이다. 이러한 천연 서열 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드는 자연으로부터 단리될 수 있거나, 재조합 또는 합성 수단에 의해 생성될 수 있다.

[0130] 용어 "작동적으로 연결된" 또는 "전사 조절"은, 조절 서열과 이중성 핵산 서열 사이의 기능적 연결을 지칭하고, 후자의 발현을 초래한다. 예를 들면, 제1 핵산 서열이 제2 핵산 서열과 기능적 관계에 위치하는 경우, 제1 핵산 서열은 제2 핵산 서열과 작동적으로 연결된다. 예를 들면, 프로모터가 코딩 서열의 전사 또는 발현에 영향을 미치는 경우, 프로모터는 코딩 서열에 작동적으로 연결된다. 작동적으로 연결된 DNA 서열은 서로 인접할 수 있으며, 예를 들면, 2개의 단백질 코딩 영역을 연결할 필요가 있는 경우, 동일한 판독 프레임 내에 있다.

[0131] 용어 "펩티드", "폴리펩티드" 및 "단백질"은 상호 교환적으로 사용되며, 펩티드 결합에 의해 공유 결합된 아미

노산 잔기로 구성된 화합물을 지칭한다. 단백질 또는 펩티드는 적어도 2개의 아미노산을 포함해야 하며, 단백질 또는 펩티드의 서열을 구성할 수 있는 최대 아미노산 수에는 제한이 없다. 폴리펩티드는, 펩티드 결합에 의해 서로 연결된 2개 이상의 아미노산을 포함하는 임의의 펩티드 또는 단백질을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 이 용어는, 예를 들면, 당해 기술분야에서 일반적으로 펩티드, 올리고펩티드 및 올리고머로도 지칭되는 단쇄 및 당해 기술분야에서 일반적으로 단백질로 지칭되는 장쇄 둘 다를 지칭하고, 이들 중에는 다수의 유형이 있다. "폴리펩티드"는, 예를 들면, 생물학적 활성 단편, 실질적으로 상동성 폴리펩티드, 올리고펩티드, 호모이량체, 헤테로이량체, 폴리펩티드의 변이체, 변형된 폴리펩티드, 유도체, 유사체 및 융합 단백질을 포함한다. 폴리펩티드는 천연 펩티드, 재조합 펩티드 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0132] 용어 "약제학적으로 허용되는 부형제" 또는 "약제학적으로 허용되는 담체"는 동물, 예를 들면, 인간에게 투여될 때 유해, 알레르기 또는 기타 비정상적 반응을 일으키지 않는 부형제를 지칭한다. 여기에는 임의의 및 모든 용매, 분산 매체, 코팅제, 항균제 및 항진균제, 등장제 및 흡수지연제 등이 포함된다. 인간 투여의 경우, 제제는 FDA 사무국 또는 EMA 등의 규제 당국이 요구하는 멸균성, 발열성, 일반 안전성 및 순도의 표준을 충족해야 한다.

[0133] 용어 "폴리 (A)"는, mRNA에 부착된 일련의 아데노신 모노포스페이트를 지칭한다. 일시적 발현을 위한 작제물의 일부 실시형태에서, 폴리 A는 50 내지 5000 아데노신 모노포스페이트, 예를 들면, 64 이상, 100 이상, 또는 300 또는 400 이상의 아데노신 모노포스페이트이다. 폴리 (A) 서열은 화학적으로 또는 효소적으로 변형되어, 국제화, 안정성 또는 번역 효율성 등의 mRNA 기능을 조절할 수 있다.

[0134] 용어 "폴리아데닐화"는 폴리아데닐릴 모이어티 또는 이의 변형된 변이체의 메신저 RNA 분자에 대한 공유 연결을 지칭한다. 진핵 생물에서, 대부분의 메신저 RNA(mRNA) 분자는 3' 말단에서 폴리아데닐화된다. 3' 폴리 (A) 테일은 효소인 폴리아데닐화 폴리머라제의 작용을 통해 프레-mRNA에 부가된 아데닌 뉴클레오티드의 긴 서열(종종 수백개)이다. 고등 진핵 생물에서는 폴리 (A) 테일이 특정 서열인 폴리아데닐화 신호를 포함하는 전사물에 부가된다. 폴리 (A) 테일과 이에 결합된 단백질은 엑소뉴클레아제에 의한 분해로부터 mRNA를 보호하는데 역할을 한다. 폴리아데닐화는, 전사 종결, 핵에서 mRNA의 수출 및 번역에도 중요하다. 폴리아데닐화는, DNA가 RNA로 전사된 직후에 핵에서 발생하지만, 추가로 세포질에서 이후에 발생할 수도 있다. 전사가 종료된 후, mRNA 쇄는 RNA 폴리머라제와 관련된 엔도뉴클레아제 복합체의 작용을 통해 절단된다. 절단 부위는 일반적으로, 절단 부위 근처에 염기 서열 AAUAAA의 존재를 특징으로 한다. mRNA가 절단된 후, 아데노신 잔기가 절단 부위의 유리 3' 말단에 부가된다.

[0135] 용어 "프로모터"는, 폴리뉴클레오티드 서열의 특이적 전사를 개시하는데 필요한, 세포의 합성 기구 또는 도입된 합성 기구에 의해 인식되는 DNA 서열을 지칭한다.

[0136] 용어 "프로모터/조절 서열"은, 프로모터/조절 서열에 작동적으로 연결된 유전자 생성물의 발현에 필요한 핵산 서열을 지칭한다. 일부 경우에, 이 서열은 코어 프로모터 서열일 수 있고, 다른 경우에, 이 서열은 또한 유전자 산물의 발현에 필요한 인핸서 서열 및 기타 조절 요소를 포함할 수 있다. 프로모터/조절 서열은, 예를 들면, 조직 특이적 방식으로 유전자 산물을 발현하는 것일 수 있다.

[0137] 용어 "재조합 단백질 또는 펩티드"는, 예를 들면, 박테리오파지 또는 효모 발현 시스템에 의해 발현되는 단백질 또는 펩티드(예를 들면, 항체) 등의 재조합 DNA 기술을 사용하여 생성된 단백질 또는 펩티드(예를 들면, 항체)를 지칭한다. 이 용어는 또한, 단백질 또는 펩티드(예를 들어, 항체)를 코딩하는 DNA 분자의 합성에 의해 생성된 단백질 또는 펩티드(예를 들어, 항체)를 의미하는 것으로 해석되어야 하며, 여기서 DNA 분자는, 단백질 또는 펩티드(예를 들어, 항체), 또는 단백질 또는 펩티드(예를 들면, 항체)를 특정하는 아미노산 서열을 발현하고, 여기서 DNA 또는 아미노산 서열은, 이용가능하고 당해 기술분야에 공지되어 있는 재조합 DNA 또는 아미노산 서열 기술을 사용하여 획득되었다.

[0138] 본 발명에서 사용된 용어 "조절 T 림프구", "조절 T 세포", "T 조절 세포", "Treg 세포" 및 "Treg"는 동의어이며, 당해 기술분야에서 사용된 표준 정의를 갖는 것으로 의도된다. Treg 세포는 면역계의 활성화를 억제하고, 이에 의해 면역계의 항상성과 자가-항원에 대한 내성을 유지하기 위해 "조절" 방식으로 작용하는 T 세포의 특수한 하위 집단이다. Treg는 때때로 억제인자 T 세포라고도 지칭된다. Treg 세포는 종종, 항상 그런 것은 아니지만, 포크헤드 패밀리(forkhead family) 전사 인자 FoxP3(포크헤드 박스 P3)의 발현을 특징으로 한다. 이들은 또한, CD4 또는 CD8 표면 단백질을 발현할 수 있다. 이들은 일반적으로 CD25를 발현한다. Treg는 종종, CD4⁺CD25⁺CD127^{lo}FoxP3⁺의 표현형으로 표시된다. 일부 실시형태에서, Treg는 또한 CD45RA⁺, CD62L^{hi} 및/또는

GITR⁺이다. 특정 실시형태에서, Treg는 CD4⁺CD25⁺CD127^{LO}CD62L⁺ 또는 CD4⁺CD45RA⁺CD25^{hi}CD127^{LO}로 표시된다. 본 발명에서 사용되고 달리 명시되지 않는 한, Treg는 흉선에서 발생하는 "천연" Treg, 흉선 외부에서 발생하는 분화 프로세스를 통해 발생하는 유도/적응/말초 Treg(예를 들어, 조직 또는 2차 림프 장기, 또는 정의된 배양 조건의 실험실 설정) 및 재조합 DNA 기술을 사용하여 생성된 Treg를 포함한다. 천연에 존재하는 Treg 세포(CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺)는 흉선의 다른 모든 T 세포처럼 발생한다. 대조적으로, 유도/적응/말초 Treg 세포(CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Tregs, Tr1 세포, Th3 세포 등을 포함)는 흉선 외부에서 발생한다. Treg를 유도하는 한 가지 방법은, T 효과기 세포를 IL-10 또는 TGF-β에 노출시키는 것이다. T 세포는 또한, FoxP3 유전자를 T 세포의 혼합 집단으로 형질감염 또는 형질도입함으로써 Treg 세포로 전환될 수 있다. FoxP3를 발현하도록 유도된 T 세포는 Treg 표현형을 채용하고, 이러한 재조합 Treg는 또한 본원에서 "Treg"로 정의된다.

- [0139] 용어 "거부"는, 이식된 장기 또는 조직이 수용자의 신체에 수용되지 않는 상태를 지칭한다. 거부 반응은, 이식된 장기 또는 조직을 공격하는 수용자의 면역계로 인해 발생한다. 거부 반응은, 이식 후 수일에서 수주(급성) 또는 이식 후 수개월에서 수년(만성)으로 발생할 수 있다.
- [0140] 본원에 사용된 바와 같이, 항체 또는 CAR은, 항원과 검출가능한 수준에서, 예를 들면, 약 10⁴ M⁻¹ 이상, 약 10⁵ M⁻¹ 이상, 10⁶ M⁻¹ 이상, 약 10⁷ M⁻¹ 이상, 10⁸ M⁻¹ 이상, 10⁹ M⁻¹ 이상, 또는 10¹⁰ M⁻¹ 이상의 친화성 상수 Ka로 반응하는 경우, 항원에 대해 "~에 대해 면역 특이성", "~에 대해 특이성"이다 라고 또는 "특이적으로 결합한다"라고 한다. 동족 항원에 대한 항체의 친화성은 또한 일반적으로 해리 상수 Kd로서 표현되고, 특정 실시형태에서, 항체는, 10⁻⁴ M 이하, 약 10⁻⁵ M 이하, 약 10⁻⁶ M 이하, 10⁻⁷ M 이하, 10⁻⁸ M 이하, 5×10⁻¹⁰ M 이하, 또는 10⁻¹⁰ M 이하의 Kd로 결합하는 경우, 항원에 특이적으로 결합한다. 항체 또는 CAR의 친화성은, 종래의 기술, 예를 들면, 문헌 [참조: Scatchard et al., (Ann. NY Acad. Sci. USA 51:660 (1949))]에 의해 기재된 것 등을 사용하여 용이하게 결정될 수 있다. 항체의 항원, 세포 또는 조직에 대한 결합 특성은 일반적으로, 예를 들면, 면역 조직 화학 (IHC) 및/또는 형광-활성화 세포 분류(FACS) 등의 면역 형광-기반 검정을 포함하는 면역검출 방법을 사용하여 결정 및 평가될 수 있다. 일부 실시형태에서, 용어 "특이적으로 결합하는"은, 샘플에 존재하는 결합 파트너를 인식하여 이와 결합하지만, 샘플 내의 다른 분자를 실질적으로 인식하거나 결합하지 않는 항체, CAR 또는 리간드를 지칭한다.
- [0141] 용어 "신호전달 경로"는, 세포의 한 부분에서 세포의 다른 부분으로 신호를 전달하는 역할을 하는 다양한 신호 전달 분자 사이의 생화학적 관계를 지칭한다.
- [0142] 용어 "신호전달 도메인"은, 세포내에서 정보를 전송함으로써 작용하고, 제2 메신저를 생성함으로써 정의된 신호 전달 경로를 통해 세포 활성을 조절하거나, 이러한 메신저에 응답함으로써 효과기로서 기능하는 단백질의 기능적 부분을 지칭한다.
- [0143] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "줄기 세포"는 일반적으로 다능성 또는 다능성 줄기 세포를 포함한다. "줄기 세포"는, 제한 없이, 배아 줄기 세포(ES); 중간엽 줄기 세포(MSC); 유도 다능성 줄기 세포(iPS); 및 수입된 전구 세포(조혈 줄기 세포(HSC), 골수 유래 세포 등)을 포함한다.
- [0144] 용어 "자극"은, 자극 분자(예를 들면, TCR/CD3 복합체 또는 키메라 수용체)와 이의 동족 리간드의 결합에 의해 유도된 1차 반응을 지칭하며, 이에 의해 TCR/CD3 복합체를 통한 신호 전달 또는 키메라 수용체의 신호 도메인을 통한 신호 전달 등(이들로 한정되지 않음)의 신호전달 이벤트를 매개한다. 자극은 특정 분자의 발현의 변화를 매개할 수 있다.
- [0145] 용어 "자극 분자"는, 면역 세포(예를 들면, T 세포, NK 세포 또는 B 세포)에 의해 발현되는 분자를 지칭하고, 이는 면역 세포 신호전달 경로의 적어도 일부 국면에서 면역 세포의 활성화를 자극적 방식으로 조절하는 세포질 신호전달 서열(들)을 제공한다. 한 국면에서, 신호는, 예를 들면, 펩티드가 로딩된 MHC 분자와 TCR/CD3 복합체의 결합에 의해 개시되는 1차 신호이고, 이는, 이들로 한정되지 않지만, 증식, 활성화, 분화, 억제 등을 포함하는 T 세포 반응의 매개를 유도한다. 자극 방식으로 작용하는 1차 세포질 신호전달 서열("1차 신호전달 도메인"이라고도 함)은, 면역수용체 티로신 기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로 공지된 신호전달 모티프를 포함할 수 있다.
- [0146] 용어 "대상체"는, 면역 반응을 유도할 수 있는 살아있는 생물(예를 들면, 인간 등의 포유동물)를 포함하는 것으로 의도된다. 일부 실시형태에서, 대상체는 "환자", 즉 의료 서비스를 받기를 기다리고 있거나, 받고 있거나,

의료 처치의 대상이었거나/대상이거나/대상으로 되거나, 또는, 예를 들면, 염증성 또는 자가면역 상태 등의 표적화된 질환 또는 상태에 대해 모니터링되는, 인간 등의 온혈 동물일 수 있다. 일부 실시형태에서, 대상체는 성인(예를 들면, 18세 이상의 대상체)이다. 일부 실시형태에서, 대상체는 어린이(예를 들면, 18세 미만의 대상체)이다. 일부 실시형태에서, 대상체는 남성이다. 일부 실시형태에서, 대상체는 여성이다. 일부 실시형태에서, 대상체는 자가항체-매개 자가면역 질환 등의 자가면역 질환에 걸려 있다(예를 들면, 진단됨). 일부 실시형태에서, 대상체는 자가항체 매개 자가면역 질환 등의 자가면역 질환을 발증할 위험이 있다. 위험 인자의 예에는 자가항체 매개 자가면역 질환의 유전적 소인과 가족력이 포함되지만, 이들로 한정되지 않는다.

[0147] 용어 "실질적으로 정제된 세포"는 본질적으로 다른 세포 유형을 포함하지 않는 세포를 지칭한다. 실질적으로 정제된 세포는 또한, 그것이 통상 천연에 존재하는 상태에서 통상 관련된 다른 세포 유형과 분리된 세포를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 실질적으로 정제된 세포는, 천연에 존재하는 상태에서 통상 관련된 다른 세포 유형으로부터 적어도 약 75% 유리, 80% 유리 또는 85% 유리, 또는 약 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 유리된 세포를 지칭한다. 일부 경우에, 실질적으로 정제된 세포 집단은 균질한 세포 집단을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 실질적으로 정제된 세포 집단은 적어도 약 75% 균질, 80% 균질 또는 85% 균질, 특히 약 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 균질한 세포의 집단을 지칭한다. 일부 경우에서, 실질적으로 정제된 세포는, 그것이 자연 상태에서 자연적으로 관련된 세포와 분리된 세포를 지칭한다. 일부 국면에서, 세포는 시험관내에서 배양된다. 다른 국면에서, 세포는 시험관내에서 배양되지 않는다. 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 세포는 다세포 생물을 생성하는데 사용될 수 없다.

[0148] 용어 "T 세포"는 CD4⁺ 세포(예를 들면, T 헬퍼 세포), CD8⁺ T 세포(예를 들면, 세포독성 CD8⁺ T 세포 및 조절 CD8⁺ T 세포), T 조절 세포(Treg), 감마 델타 T 세포 및 이중 음성 T 세포를 포함하여, CD3를 발현하는 모든 유형의 면역 세포를 포함한다.

[0149] 용어 "치료학적 유효량"은, 특정 생물학적 결과를 달성하는데 효과적인 약제(예를 들면, 본원에 기재된 CAR을 발현하는 세포)의 양을 지칭한다. 따라서, 용어 "치료학적 유효량"은, 표적에 심각한 부정적 또는 부작용을 일으키지 않고서, (1) 표적 질환 또는 상태의 발증을 지연 또는 예방하는 것; (2) 표적 질환 또는 상태의 하나 이상의 증상의 진행, 악화 또는 악화를 감속시키거나 중지시키는 것; (3) 표적 질환 또는 상태의 증상을 개선시키는 것; (4) 표적 질환 또는 상태의 중증도 또는 발생률 저하시키는 것; 또는 (5) 표적 질환 또는 상태를 치료하는 것을 목적으로 하는 약제의 수준 또는 양을 의미한다. 일부 실시형태에서, 치료학적 유효량은, 예후적 또는 예방적 작용을 위해, 표적 질환 또는 상태의 발증 전에 투여될 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 치료학적 유효량은, 치료적 작용을 위해, 표적 질환 또는 상태의 개시 후에 투여될 수 있다.

[0150] 용어 "형질감염된" 또는 "형질전환된" 또는 "형질도입된"은 외인성 핵산이 숙주 세포로 전달되거나 도입되는 프로세스를 지칭한다. "형질감염된" 또는 "형질전환된" 또는 "형질도입된" 세포는 외인성 핵산으로 형질감염, 형질전환 또는 형질도입된 세포이다. 세포는 일차 대상체 세포와 이의 자손을 포함한다.

[0151] 용어 "전달 벡터"는, 단리된 핵산을 포함하고 단리된 핵산을 세포 내부로 전달하기 위해 사용될 수 있는 물질의 구성물을 지칭한다. 선형 폴리뉴클레오티드, 이온성 또는 양친매성 화합물과 관련된 폴리뉴클레오티드, 플라즈미드 및 바이러스를 포함하지만 이들로 한정되지 않는 다수의 벡터가 당해 기술분야에 공지되어 있다. 따라서, 용어 "전달 벡터"는 자율 복제 플라즈미드 또는 바이러스를 포함한다. 이 용어는 또한, 예를 들면, 폴리 라이신 화합물, 리포솜 등의, 핵산의 세포로의 전달을 촉진하는 비-플라즈미드 및 비-바이러스 화합물을 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 바이러스 전달 벡터의 예는 아데노바이러스 벡터, 아데노 관련 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 등을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.

[0152] 본원에 사용된 바와 같이, "일시적"은 수시간, 수일 또는 수주의 기간 동안 비-통합 도입유전자의 발현을 지칭하고, 여기서 발현 기간은, 계놈에 통합되거나 숙주 세포의 안정한 플라즈미드 레플리콘 내에 포함되는 경우, 유전자의 발현 기간보다 짧다.

[0153] 본원에 사용된 바와 같이, "이식"은, 개체에게 도입되는 세포, 조직 또는 기관을 지칭한다. 이식된 물질의 공급원은 배양된 세포, 다른 개체의 세포 또는 동일한 개체의 세포일 수 있다(예를 들면, 세포가 시험관 내에서 배양되고 임의로 변경된 후). 예시적 장기 이식은 신장, 간, 심장, 폐 및 췌장이다. 예시적 조직 이식은 섬 세포이다. 예시적 세포 이식은 동종 조혈 줄기 세포 이식이다.

[0154] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료하는"은, 표적 질환 또는 상태, 예를 들면, 자가면역 상태의 진행, 중증도 및/또는 기간의 감소 또는 개선, 또는 표적 질환 또는 상태, 예를 들면, 자가면역 상태

의 하나 이상의 증상(예를 들면, 하나 이상의 식별가능한 증상)의 개선을 지칭하고, 여기서 상기 개선은 하나 이상의 요법(예를 들면, 하나 이상의 치료제, 예컨대, 본 발명의 Treg 세포)의 투여로부터 기인한다. 특정 실시형태에서, 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료하는"은, 표적 질환 또는 상태, 예를 들면, 자가면역 상태의 적어도 하나의 측정가능한 물리적 파라미터의 개선을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료하는"은, 예를 들면, 식별가능한 증상의 안정화에 의해 물리적으로 또는, 예를 들면, 물리적 파라미터의 안정화에 의한 생리학적으로, 또는 이들 둘 다로, 표적 질환 또는 상태, 예를 들면, 자가면역 상태의 진행의 억제 지칭한다. 일부 실시형태에서, 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료하는"은, 표적 질환 또는 상태, 예를 들면, 자가면역 질환의 진행, 중증도 및/또는 기간의 감소 또는 개선, 또는 표적 질환 또는 상태, 예를 들면, 자가면역 질환의 하나 이상의 증상의 개선을 지칭한다. "치료하는" 또는 "치료"는 치료적 치료 및 예후적 또는 예방적 조치를 모두 지칭하며; 여기서 목적은 표적 질환 또는 상태를 예방하거나 감소(경감)하는 것이다. 치료를 필요로 하는 개체는, 이미 질환을 갖는 개인, 그 상태를 갖기 쉬운 개인, 또는 그 상태를 예방할 필요가 있는 개인을 포함한다. 치료량의 약제(예를 들면, 본 발명에 따른 키메라 수용체를 포함하는 세포 집단)을 제공 받은 후, 대상체가 하기 중의 하나 이상에서 관찰가능한 및/또는 측정가능한 개선을 나타내는 경우, 대상체는 질환 또는 상태에 대해 성공적으로 "치료"된다: 병원성 세포 수의 감소; 병원성인 전체 세포의 비율 감소; 특정 상태와 관련된 하나 이상의 증상의 어느 정도의 경감; 이환율 및 사망률의 감소 및/또는 생활의 질 문제의 개선. 치료의 성공 및 상태의 개선을 평가하기 위한 상기 파라미터는 의사에게 익숙한 임상적 절차로 용이하게 측정할 수 있다.

[0155] 용어 "Treg 세포"는, 예를 들면, 자가면역 또는 알레르기 반응 등의 과도하거나 원치 않는 염증 반응을 억제, 저해 또는 예방할 수 있는 세포를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 Treg 세포 집단은 억제 활성을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 억제 활성은 접촉 독립적이다. 일부 실시형태에서, 상기 억제 활성은 접촉 의존적이다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 Treg 세포 집단은, 효과기 T 세포에 대한 억제 작용을 나타내고; 특정 실시형태에서, 상기 억제 작용은 TCR 발현 및/또는 활성화에 의존한다.

[0156] "유니바디"는 당해 기술분야에 공지되어 있으며, IgG4 항체의 힌지 영역을 결여하는 항체 단편을 지칭한다. 힌지 영역의 결실은 종래의 IgG4 항체의 본질적으로 절반 크기이고, IgG4 항체의 2가 결합 영역보다는 1가 결합 영역을 갖는 분자를 생성한다.

[0157] 용어 "가변"은 가변(V) 도메인의 특정 세그먼트가 항체 사이에서 서열이 광범위하게 상이하다는 사실을 지칭한다. V 도메인은 항원 결합을 매개하고, 특정 항원에 대한 특정 항체의 특이성을 정의한다. 그러나, 가변성은 가변 도메인의 110 내지 130개 아미노산 범위에 걸쳐 균등하게 분포되지 않는다. 대신, V 영역은, 15-30개 아미노산의 프레임워크 영역(FR)으로 지칭되는 비교적 불변의 스트레치로 구성되고, 각각 9-12개 아미노산 길이의 "초가변 영역" 또는 "CDR"으로 불리우는 극도로 가변성의 짧은 영역으로 분리된다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 각각 4개의 FR를 포함하고, 주로 β -시트 구성을 채용하고, 3개의 초가변 영역에 의해 연결되며, 이는 β -시트 구조를 연결하는 루프를 형성하고, 일부 경우에는 이의 일부를 형성한다. 각 쇠의 초가변 영역은 FR에 의해 매우 근접하게 함께 유지되고, 다른 쇠의 초가변 영역과 함께, 항체의 항원 결합 부위 형성에 기여한다[참조: Rabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]. 불변 도메인은 항체를 항원에 결합하는데 직접 관여하지 않지만, 항체 의존성 세포 세포독성(ADCC)에서 항체가 관여하는 것 등의 다양한 효과기 기능을 나타낸다.

[0158] 본원에 사용된 용어 폴리뉴클레오티드 "변이체"는 전형적으로 하나 이상의 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입에서 본원에 구체적으로 개시된 폴리뉴클레오티드와 상이한 폴리뉴클레오티드이다. 이러한 변이체는 천연 존재일 수 있거나, 예를 들면, 본 발명의 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 서열을 변형시키고, 본원에 기재된 코딩된 폴리펩티드의 하나 이상의 생물학적 활성을 평가함으로써, 및/또는 당해 기술분야에 공지된 임의의 기술을 사용함으로써 합성적으로 생성될 수 있다. 따라서, 본원에 사용된 용어 "폴리펩티드 변이체"는 전형적으로 하나 이상의 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입에서 본원에 구체적으로 개시된 폴리펩티드와 상이한 폴리펩티드이다. 이러한 변이체는 천연에 존재하거나, 또는 예를 들면, 본 발명의 하나 이상의 폴리펩티드 서열을 변형시키고, 본원에 기재된 폴리펩티드의 하나 이상의 생물학적 활성을 평가함으로써, 및/또는 당해 기술분야에 공지된 임의의 기술을 사용함으로써 합성적으로 생성될 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드의 구조에서 변형이 이루어질 수 있으며, 여전히 바람직한 특성을 갖는 변이체 또는 유도체 폴리펩티드를 코딩하거나 변이체 또는 유도체 폴리펩티드인 기능성 분자를 생성할 수 있다. 폴리펩티드의 아미노산 서열을 변경하여, 본 발명의 폴리펩티드의 동등하거나 심지어 개선된 변이체 또는 일부를 생성하는 것이 바람직한 경우, 당업자는 일반적으로 코딩 DNA 서열의 하나 이상의 코돈을 변경할 것이다. 예를 들면, 특정 아미노산은, 이의 기능(예를 들어,

다른 폴리펩티드(예를 들어, 항원) 또는 세포에 결합하는 능력)의 현저한 손실 없이, 단백질 구조에서 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 단백질의 생물학적 기능 활성을 정의하는 것은 단백질의 결합력과 특성이기 때문에, 특정 아미노산 서열 치환을 단백질 서열 및 물론 기본 DNA 코딩 서열에서 수행할 수 있고, 유사한 특성을 갖는 단백질을 생성한다. 따라서, 생물학적 유용성 또는 활성의 현저한 손실 없이, 본 발명의 펩티드 서열 또는 상기 펩티드를 코딩하는 상응하는 DNA 서열에서 다양한 변화가 이루어질 수 있다는 것이 고려된다. 다수의 경우, 폴리펩티드 변이체는 하나 이상의 보존적 치환을 포함할 것이다. 변이체는 또한 또는 대안적으로 비보존적 변경을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 변이체 폴리펩티드는 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 아미노산(들)의 치환, 결실 또는 부가에 의해 천연 서열과 상이하다. 변이체는 또한(또는 대안적으로), 예를 들면, 폴리펩티드의 면역원성, 이차 구조 및 수치요법의 성질에 최소한의 영향을 미치는 아미노산의 결실 또는 부가에 의해 변형될 수 있다.

- [0159] "베르사바디(Versabodies)"는 당해 기술분야에 공지되어 있으며, 또 다른 항체 모방 기술을 지칭한다. 이들은 15%를 초과하는 시스테인을 갖는 3-5kDa의 작은 단백질이고, 이는 전형적 단백질의 소수성 코어를 대체하는, 높은 디설파이드 스캐폴드를 형성한다.
- [0160] 용어 "이종"은 상이한 종의 개체로부터 유래된 임의의 물질을 지칭한다. 용어 "이종이식편"은 상이한 종의 개체로부터 유래된 이식편을 의미한다.
- [0161] 용어 "제타" 또는 대안적으로 "제타 쇠", "CD3 제타" 또는 "TCR-제타"는, GenBank 수탁 번호 BAG36664.1로서 제공된 단백질, 또는 비-인간 종, 예를 들면, 마우스, 설치류, 원숭이, 유인원 등의 동등한 잔기로서 정의되고, "제타 자극 도메인" 또는 대안적으로 "CD3 제타 자극 도메인" 또는 "TCR-제타 자극 도메인"은, 제타 쇠의 세포질 도메인으로부터의 아미노산 잔기 또는 이의 기능적 유도체로서 정의되고, 이는 T 세포 활성화에 필요한 초기 신호를 기능적으로 전달하기에 충분하다. 일부 실시형태에서, 제타의 세포질 도메인은 GenBank 수탁 번호 BAG36664.1의 잔기 52 내지 164, 또는 비-인간 종, 예를 들면, 마우스, 설치류, 원숭이, 유인원 등의 동등한 잔기를 포함하고, 이는 이의 기능적 오소로그이다.
- [0162] 키메라 항원 수용체(CAR)
- [0163] 본 발명은 다음을 포함하는 키메라 수용체를 제공한다:
- [0164] - 적어도 하나의 세포외 결합 도메인,
- [0165] - 임의로 적어도 하나의 세포외 힌지 도메인,
- [0166] - 적어도 하나의 막관통 도메인(예를 들면, 인간 TNFR2 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체, 임의의 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체, 또는 이들의 임의의 조합), 및
- [0167] - 하나 이상의 세포내 도메인(적어도 하나의 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하고, 임의로 적어도 하나의 공자극 세포내 신호전달 도메인을 포함하며, 여기서 적어도 하나의 공자극 세포내 신호전달 도메인은 인간 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체이다), 여기서 막관통 도메인은, TNFR2 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체이고/거나, 공자극 세포내 신호전달 도메인은 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체이다.
- [0168] 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는 하나 이상의 폴리펩티드를 포함한다.
- [0169] 일부 실시형태에서, 세포외 결합 도메인은 항원 결합 도메인이고, 따라서 키메라 수용체는 또한 키메라 항원 수용체(또는 CAR)로 지칭될 수 있다.
- [0170] *I. 세포외 결합 도메인*
- [0171] 일부 실시형태에서, 세포외 도메인은, 항원 결합 도메인, 예를 들면, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 본 발명의 키메라 수용체의 일부는, 리간드 결합 도메인이, 예를 들면, 단일 도메인 항체 단편(sdAb), 일본쇄 항체(scFv), 인간화 항체 또는 이종특이적 항체를 포함하는 인접한 폴리펩티드 쇠의 일부로서 발견되는 다양한 형태로 존재할 수 있다[참조: Harlow et al, 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al, 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); Bird et al, Science 242:423-426 (1988)]. 일부 국면에서, 본원에 기재된 키메라 수용체의 항원 결합 도메인은 항체 단편을 포함한다. 일부 국면에서, 키메라 수용체는 scFv를 포함하는 항체

단편을 포함한다.

- [0172] 일부 실시형태에서, 상기 항체는 전체 항체, 인간화 항체, 일본쇄 항체, 이량체 일본쇄 항체, Fv, scFv, Fab, a F(ab)₂, 탈푸코실화 항체, 이중특이적 항체, 디아바디, 트리아바디 및 테트라바디로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항체 분자이다.
- [0173] 일부 실시형태에서, 상기 항체는 유니바디, 단일 도메인 항체 및 나노바디로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항체 단편이다.
- [0174] 일부 실시형태에서, 상기 항체는 아피바디, 아필린, 아피틴, 아드넥틴, 아트리머, 에바신, DARPin, 안티칼린, 아비머, 피노머, 베르사바디 및 듀어칼린으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항체 모방체이다.
- [0175] DARPin(설계된 안키린 반복 단백질)는 당해 기술분야에 공지되어 있으며, 비-항체 폴리펩티드의 결합 능력을 이용하기 위해 개발된 항체 모방 DRP(설계된 반복 단백질) 기술을 지칭한다.
- [0176] 본 발명의 항체의 단편 및 유도체(달리 언급되거나 문맥에 의해 명확하게 모순되지 않는 한, 본 출원에서 사용되는 용어 "항체"에 포함됨)는 당해 기술분야에 공지된 기술에 의해 생성할 수 있다. "단편"은 무순상 항체의 일부, 일반적으로 항원 결합 부위 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ 및 Fv 단편; 디아바디; 연속 아미노산 잔기의 하나의 연속적 서열로 구성된 1차 구조를 갖는 폴리펩티드인 임의의 항체 단편(본원에서 "일본쇄 항체 단편" 또는 "일본쇄 폴리펩티드"로 지칭됨)을 포함하고, 제한 없이, (1) 일본쇄 Fv 분자, (2) 하나의 경쇄 가변 도메인만을 함유하는 일본쇄 폴리펩티드, 또는 연관된 중쇄 모이어티를 포함하지 않는 경쇄 가변 도메인의 3개의 CDR을 포함하는 이의 단편, 및 (3) 하나의 중쇄 가변 영역만을 함유하는 일본쇄 폴리펩티드, 또는 연관된 경쇄 모이어티를 포함하지 않는 중쇄 가변 영역의 CDR을 포함하는 이의 단편; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다. 본 항체의 단편은, 표준 방법을 사용하여 수득할 수 있다. 주어진 CDR의 정확한 아미노산 서열 경계는 문헌[참조: Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD ("Kabat" numbering scheme), Al-Lazikani et al., JMB 273:927-948 (1997) ("Chothia" numbering scheme)] 또는 이들의 조합에 기재된 것들을 포함하는 다수의 공지된 도식을 사용하여 결정할 수 있다.
- [0177] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR의 항원 결합 도메인은, 예를 들면, scFv 등의 항체 단편을 포함하거나 이들로 구성된다. 특정 실시형태에서, 항원 결합 도메인은 scFv이다.
- [0178] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR의 항원 결합 도메인은, 특정 항원 또는 이의 단편(예를 들면, 표적 세포와 관련된)을 인식한다. 따라서, CAR의 항원 결합 도메인은, 예를 들면, 감염된 세포, 손상된 세포 또는 기능부전 세포 등의 표적 세포를 인식할 수 있다. 이러한 표적 세포의 예는 기능부전 면역 반응에 관여하는 세포(예를 들어, 자가면역 질환 또는 알레르기에 관여하는 세포), 기능부전 활성화 염증 세포(예를 들어, 염증성 내피 세포), 암 세포 및 감염된(예를 들어, 바이러스, 세균 또는 기생충 감염) 세포를 포함할 수 있다.
- [0179] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 항원의 "단편"은 보다 짧은 펩티드로서 항원의 임의의 서브세트를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 항원의 단편은 적어도 6개 아미노산 길이의 펩티드이다. 일부 실시형태에서, 항원의 단편은 길이가 6개 내지 50개 아미노산, 6개 내지 30개 아미노산, 또는 길이가 6개 내지 20개 아미노산인 펩티드이다.
- [0180] 용어 항원의 "변이체"는, 본원에서, 천연 항원과 거의 동일하고 동일한 생물학적 활성을 공유하는 항원을 지칭한다. 천연 항원과 이의 변이체 사이의 최소 차이는, 예를 들면, 아미노산 치환, 결실 및/또는 부가에 있을 수 있다. 이러한 변이체는, 예를 들면, 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 항원의 변이체는 천연 항원의 서열과 적어도 또는 약 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99%의 서열 동일성을 나타낸다.
- [0181] 일부 실시형태에서, 항원은 자가 항원이다. 자가 항원의 예에는 염증성 신경계 상태와 관련된 항원(예를 들어, 다발성 경화증 관련 항원), 관절 관련 항원, 눈 관련 항원, 인간 HSP 항원, 피부 관련 항원 또는 이식편 거부 또는 GVHD에 관련된 항원이 포함되지만, 이들로 한정되지 않는다.
- [0182] 다발성 경화증 관련 항원의 예에는 미엘린 염기성 단백질(MBP), 미엘린 관련 당단백질(MAG), 미엘린 올리고덴드로사이트 당단백질(MOG), 프로테오지질 단백질(PLP), 올리고덴드로사이트 미엘린 올리고단백질(OMGP), 미엘린 관련 올리고덴드로사이트 염기성 단백질(MOBP), 올리고덴드로사이트 특이적 단백질(OSP/클라우딘-11), 열 충격

단백질, 올리고덴드로사이트 특이적 단백질(OSP), NOGO A, 당단백질 Po, 말초 미엘린 단백질 22(PMP22), 2'3'-사이클릭 뉴클레오티드 3'-포스포디에스테라제(CNPase), 또는 이들의 임의의 단편, 변이체 또는 혼합물이 포함되지만, 이들로 한정되지 않는다.

[0183] 관절-연관 항원의 예는 시트룰린 치환된 사이클릭 및 선형 필라그린 펩티드, II형 콜라겐 펩티드, 시트룰린화 비멘틴, 시트룰린화 II형 콜라겐, 시트룰린화 피브리노겐, 인간 연골 당단백질 39(HCgp39) 펩티드, HSP, 이중성 핵 리보핵 단백질(hnRNP) A2 펩티드, hnRNP B1, hnRNP D, Ro60/52, HSP60, HSP65, HSP70 및 HSP90, BiP, 케라틴, 비멘틴, 피브리노겐, 유형 I, III, IV 및 V 콜라겐 펩티드, 아넥신 V, 글루코즈 6 포스페이트 이소머라제(GPI), 아세틸-갈파스타틴, 피루베이트 데하이드로게나제(PDH), 알돌라제, 토포이소머라제 I, snRNP, PARP, Sc1-70, Sc1-100, 음이온성 카디오리핀 및 포스파티딜세린 포함한 인지질 항원, 중성 하전 포스파티딜에탄올아민 및 포스파티딜콜린, 매트릭스 메탈로프로테이나제, 피브릴린, 아그레칸 및 이들의 단편, 변이체 및 혼합물을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.

[0184] 눈 관련 항원의 예에는 II형 콜라겐, 시트룰린화 비멘틴, 시트룰린화 II형 콜라겐, 시트룰린화 피브로게닌, 레티날 어레스틴, S-아레스틴, 광수용체간 레티노이드 결합 단백질(IRBP1), 베타-크라이스탈린 B1, 망막 단백질, 맥락막 단백질 및 이들의 단편, 변이체 및 혼합물이 포함되지만, 이들로 한정되지 않는다.

[0185] 인간 HSP 항원의 예는, 제한 없이, 인간 HSP60, HSP70, HSP90 및 이들의 단편, 변이체 및 혼합물을 포함한다.

[0186] 일부 실시형태에서, 항원은, 염증성 신경계 질환 관련 항원, 예를 들면, 다발성 경화증 관련 항원이다. 염증성 신경계 질환 관련 항원(예를 들면, 다발성 경화증 관련 항원)의 예에는 미엘린 염기성 단백질(MBP), 미엘린 관련 당단백질(MAG), 미엘린 올리고덴드로사이트 단백질(MOG), 프로테오리피드 단백질(PLP), 올리고덴드로사이트 미엘린 당단백질(OMGP), 미엘린 관련 올리고덴드로사이트 염기성 단백질(MOBP), 올리고덴드로사이트 특이적 단백질(OSP/클라우딘-1), 열 충격 단백질, 올리고덴드로사이트 특이적 단백질(OSP), NOGO A, 당단백질 Po, 말초 미엘린 단백질 22(PMP22), 2'3'-사이클릭 뉴클레오티드 3'-포스포디에스테라제(CNPase) 및 이들의 단편, 변이체 및 혼합물을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.

[0187] 일부 실시형태에서, 항원은 관절-연관 항원이다. 관절 관련 항원의 예는 시트룰린 치환된 사이클릭 및 선형 필라그린 펩티드, 콜라겐 유형 II 펩티드, 인간 연골 당단백질 39(HCgp39) 펩티드, HSP, 이중성 핵 리보핵 단백질(hnRNP) A2 펩티드, hnRNP B1, hnRNP D, Ro60/52, HSP60, 65, 70 및 90, BiP, 케라틴, 비멘틴, 피브리노겐, 콜라겐 유형 I, III, IV 및 V 펩티드, 아넥신 V, 글루코즈 6 포스페이트 이소머라제(GPI), 아세틸-갈파스타틴, 피루베이트 데하이드로게나제(PDH), 알돌라제, 토포이소머라제 I, snRNP, PARP, Sc1-70, Sc1-100, 인지질 항원(음이온성 카디오리핀 및 포스파티딜세린 포함), 중성 하전된 포스파티딜에탄올아민 및 포스파티딜콜린, 매트릭스 메탈로프로테이나제, 피브릴린, 아그레칸 및 이들의 단편, 변이체 및 혼합물을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.

[0188] 일부 실시형태에서, 항원은 눈 관련 항원이다. 눈 관련 항원의 예는 II형 콜라겐, 망막 어레스틴, S-아레스틴, 광수용체간 레티노이드 결합 단백질(IRBP1), 베타 B1-크리스탈린, 망막 단백질, 맥락막 단백질 및 이들의 단편, 변이체 및 혼합물을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.

[0189] 일부 실시형태에서, 항원은 인간 HSP 항원이다. 인간 HSP 항원의 예는 인간 HSP60, HSP70, HSP90, 및 이들의 단편, 변이체 및 혼합물을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.

[0190] 일부 실시형태에서, 항원은 피부 관련 항원이다. 피부 관련 항원의 예에는 케라티노사이트 항원, 진피 또는 표피에 존재하는 항원, 멜라노사이트 항원(예를 들면, 멜라닌 또는 티로시나제), 데스모글레인(예를 들어, 데스모글레인 1 또는 3, 이는 또한 Dsg1/3으로 지칭될 수 있음), BP180, BP230, 플렉틴, 인테그린(예를 들어, 인테그린 a4b6), 콜라겐(예를 들어, 콜라겐 VII형), 라미닌(예를 들어, 라미닌 332 또는 라미닌 γ 1), 플라 킨(예를 들어, 엔보플라킨, 페리플라킨, 또는 데스모플라킨), 케라틴(예를 들면, KRT5, KRT8, KRT15, KRT17 및 KRT31), 케라틴 필라멘트 관련 단백질, 필라그린, 코모데모신 및 엘라스틴이 포함되지만, 이들로 한정되지 않는다.

[0191] 일부 실시형태에서, 항원은 이식편 거부 또는 GVHD에 관여하는 항원이다. 이러한 항원의 예에는 이식된 조직 또는 숙주에 특이적인 MHC, β 2-마이크로글로불린, ABO 시스템의 항원, 레수스(rhesus) 시스템의 항원(예를 들어, 항원 C, c, E, e 및 D) 및 이소헤마글루티닌이 포함되지만, 이들로 한정되지 않는다. 이식편 거부 또는 GVHD에 관여할 수 있는 항원의 다른 예에는 HLA-DR(특히 이식후 최초 6개월 동안), HLA-B(특히 이식후 최초 2년 동안), HLA-A, 소수 조직적합성 항원(miHA, 예를 들면, HLA-E, HLA-F 및 HLA-G), MHC 클래스 I에 상응하는 HLA(A, B 및 C), MHC 클래스 II에 상응하는 HLA(DP, DM, DOA, DOB, DQ 및 DR) 및 MHC 클래스 III에 상응하는

HLA(예를 들어, 보체 시스템의 구성요소)이 포함되지만, 이들로 한정되지 않는다.

[0192] 일부 실시형태에서, 항원은 HLA-A2 세포 표면 단백질이다. 일부 실시형태에서, 세포의 결합 도메인은 HLA-A2에 대해 지시된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 일부 실시형태에서, HLA-A2 결합 도메인은 HLA-A2에 대해 지시된 scFv를 포함한다.

[0193] 본원에 사용된 용어 "HLA-A2"는 HLA 유전자 복합체의 HLA-A 유전자좌에서 HLA-A*02 대립유전자 패밀리에 의해 코딩된, 세포 표면 단백질을 포함하는 인간 백혈구 항원(HLA) 단백질을 지칭한다. 용어 "HLA-A2"에 포함된 HLA 단백질은 혈청 학적 검사 또는 유전자형 분석에 의해 HLA-A*02 항원 유형에 속하는 것으로 동정된 HLA 단백질을 포함한다. HLA-A*02 항원 유형의 추가 명칭에는 "HLA-A2", HLA-A02 " 및 "HLA-A*2"가 포함된다. 2010년에 HLA 시스템의 인자에 관한 WHO 위원회에 의해 개발된 HLA 명명 시스템을 포함하여, 이 대립유전자 패밀리에 의해 코딩된 HLA 단백질을 식별하는 다른 명명 시스템이 개발되었다. 용어 "HLA-A2"는 "HLA-A*02"로 개시하는 이 명명 시스템에 따른 지정을 갖는 대립유전자에 의해 코딩된 HLA 단백질을 지칭하며, "HLA-A*02:01", "HLA-A*02:02", "HLA-A*02:03", "HLA-A*02:04", "HLA-A*02:05", "HLA-A*02:06", "HLA-A*02:07", "HLA-A*02:08", "HLA-A*02:09", "HLA-A*02:10" 및 "HLA-A*02:11"을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다. 대립유전자의 지정은 이탤릭체로 표시될 수 있다. "HLA-A*02:"로 개시하고, 이어서 2 또는 3자리 추가 수자가 계속된 대립유전자 지정은, 완전한 지정 또는 지정의 개시 부분을 구성할 수 있다. 용어 "HLA-A2"는 또한, 명칭 "HLA-A*02:01", "HLA-A*02:02", "HLA-A*02:03", "HLA-A*02:04", "HLA-A*02:05", "HLA-A*02:06", "HLA -A*02:07", "HLA-A*02:08", "HLA-A*02:09", "HLA-A*02:10" 및 "HLA-A*02:11"을 포함하지만 이들로 한정되지 않는, 이러한 명명 시스템에 의한 "HLA-A*02"로 개시하는 명칭으로 동정된 HLA 단백질을 지칭한다.

[0194] 일부 실시형태에서, HLA-A2 결합 도메인은 HLA-A2에 대해 지시된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 특정 실시형태에서, HLA-A2 결합 도메인은 HLA-A2에 대해 지시된 scFv를 포함한다. HLA-A2에 대해 지시된 scFv의 예는 서열번호 68, 서열번호 69, 서열번호 70, 서열번호 71, 서열번호 72, 서열번호 73, 서열번호 74, 서열번호 75, 서열번호 76, 서열번호 77, 서열번호 78, 서열번호 79, 서열번호 80, 서열번호 81, 서열번호 82, 서열번호 83, 서열번호 84, 서열번호 85, 서열번호 86, 서열번호 87, 서열번호 88, 서열번호 89, 서열번호 90, 서열번호 91, 서열번호 92, 서열번호 93, 서열번호 94, 서열번호 95, 서열번호 96, 서열번호 97, 서열번호 98, 서열번호 99, 서열번호 100, 서열번호 101, 서열번호 102, 서열번호 103, 서열번호 104, 서열번호 105, 서열번호 106, 서열번호 107, 및 이의 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열로 이루어지거나 이들을 포함하는 scFv; 및 PCT 특허 공보 제WO 2018/183293호 및 제WO 2019/056099호에 개시된 항-HLA-A2 scFv를 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다. 예를 들면, 본원에 기재된 CAR에서 사용되는 항-HLA-A2 scFv는 서열번호 68의 아미노산 서열로 구성되거나 이를 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 본원에 기재된 CAR에서 사용되는 항-HLA-A2 scFv는 서열번호 70의 아미노산 서열로 구성되거나 이를 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 본원에 기재된 CAR에서 사용되는 항-HLA-A2 scFv는 서열번호 92의 아미노산 서열로 구성되거나 이를 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 본원에 기재된 CAR에서 사용되는 항-HLA-A2 scFv는 서열번호 103의 아미노산 서열로 구성되거나 이를 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 본원에 기재된 CAR에서 사용되는 항-HLA-A2 scFv는 서열번호 107의 아미노산 서열로 구성되거나 이를 포함할 수 있다.

[0195] 자가 항원의 다른 예에는 아쿠아포린 물 채널(예를 들면, 아쿠아포린-4 물 채널(AQP4)), Hu, Ma2, 콜랩신 반응-매개인자 단백질 5(CRMP5), 암피피신, 전암- 게이트 칼슘 채널(VGKC), N-메틸-D-아스파르테이트 수용체(NMDAR), α-아미노-3-하이드록시-5-메틸-4-이속사졸프로프리온산(AMPA), 갑상선 퍼옥시다제, 티로글로불린, 항-N-메틸-D-아스파르테이트 수용체(NR1 아단위), Rh 혈액형 항원, I 항원, 데스모글레인 1 또는 3(Dsg1/3), BP180, BP230, 아세틸콜린 니코틴 시냅스후 수용체, 티로트로핀 수용체, 혈소판 인테그린, GpIIb:IIIa, 콜라겐(예를 들어, 예를 들면, 콜라겐 알파-3(IV) 쇄), 류마티스 인자, 칼파스타틴, 시트룰린화 단백질, 미엘린 염기성 단백질(MBP), 미엘린 올리고덴드로사이트 당단백질(MOG) 펩티드, 알파-베타-크리스탈린, DNA, 히스톤, 리보솜, RNP, 조직 트랜스글루타미나제(TG2), 내인성 인자, 65-kDa 항원, 포스포타일세린, 리보솜 인단백질, 항-호중구 세포질 항체, Sc1-70, U1-RNP, ANA, SSA, 항-SSB, 항핵 항체(ANA), 항호중구 세포질 항체(ANCA), Jo-1, 항 미토콘드리아 항체, gp210, p62, sp100, 항인지질 항체, U1-70 kd snRNP, GQ1b 강글리오사이드, GM1, 아시알로 GM1, GD1b, 항-평활근 항체(ASMA), 항-간-신장 마이크로솜-1 항체(ALKM-1), 항-간 세포질 항체-1(ALC-1), IgA 항내분비-항체, 호중구 과립 단백질, 스트렙토코쿠스 세포벽 항원, 위벽측 세포의 내인성 인자, 인슐린(IAA), 글루탐산 데카복실라제(GAA 또는 GAD), 단백질 티로신 포스파타제(예를 들면, IA2 또는 ICA512), PLA2R1 및 THSD7A1을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.

[0196] 일부 실시형태에서, 항원은 세포 표면에서 발현되는 IL-23 수용체(IL-23R)이다. 일부 실시형태에서, 세포의 결

합 도메인은 IL-23R에 대해 지시된 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

- [0197] 일부 실시형태에서, 항원은 가용성 IL-23R이다. 일부 실시형태에서, 세포의 결합 도메인은 가용성 IL-23R에 대해 지시된 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.
- [0198] 일부 실시형태에서, 항원은 IL-23R의 변이체이다. 일부 실시형태에서, 세포의 결합 도메인은 IL-23R의 변이체에 대해 지시된 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.
- [0199] 일부 실시형태에서, IL-23R의 변이체 펩티드는, 원래의 펩티드와 비교하여, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산이 결실, 부가 또는 치환된 변형된 IL-23R 펩티드이다.
- [0200] 일부 실시형태에서, 항원은 IL-23R의 스플라이스 변이체이다. 일부 실시형태에서, 세포의 결합 도메인은 IL-23R의 스플라이스 변이체에 대해 지시된 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.
- [0201] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 인간 IL-23R을 인식하고, 이에 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 뮤린 IL-23R을 인식하고 이에 결합할 수 있다.
- [0202] 일부 실시형태에서, IL-23R 결합 도메인은 IL-23R에 대해 지시된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 일부 실시형태에서, IL-23R 결합 도메인은 IL-23R에 대해 지시된 scFv를 포함한다. IL-23R에 대해 지시된 scFv의 예에는 서열번호 65, 서열번호 66, 서열번호 67, 및 이의 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열로 구성되거나 이들로 이루어진 scFv가 포함되지만, 이들로 한정되지는 않는다.
- [0203] 일부 실시형태에서, 항원은 흡입된 알레르겐, 섭취된 알레르겐 또는 접촉 알레르겐이다.
- [0204] 일부 실시형태에서, 항원은 일반적 인간 식이로부터의 식품 항원이다.
- [0205] 용어 "일반적 인간 식이로부터의 식품 항원"은 다음 비제한적 목록의 식품 항원 등의 인간에게 일반적인 식품에서 유래하는 면역원성 펩티드를 지칭한다: 난백알부민, 리포칼린 등의 소 항원, Ca-결합 S100, 알파-락트알부민, 베타-락토글로불린 등의 락토글로불린, 소 혈청 알부민, 및 카제인. 식품 항원은 또한 파르브알부민 등의 대서양 연어 항원, 오브뮤코이드, Ag22, 콘알부민, 리소자임 또는 치킨 혈청 알부민 등의 치킨 항원, 땅콩, 트로포미오신 등의 새우 항원, 아글루티닌 또는 글리아딘 등의 밀 항원, 셀러리 프로필린 등의 셀러리 항원, 당근 프로필린 등의 당근 항원, 타우마틴 등의 사과 항원, 사과 지질 전달 단백질, 사과 프로필린, 배 프로필린 등의 배 항원, 이소플라본 리덕타제, 엔도키티나제 등의 아보카도 항원, 살구 지질 전달 단백질 또는 살구 프로필린 등의 살구 항원, HPS, 대두 프로필린 또는 (SAM22) PR-10 프룻 등의 대두 항원, 이들의 단편, 변이체 및 혼합물일 수 있다.
- [0206] 일부 실시형태에서, 항원은 조직-특이적 단백질이다. 조직-특이적 단백질의 예는, 발현이 특정 조직 또는 기관으로 한정되는 인테그린 및 셀렉틴을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.
- [0207] 일부 실시형태에서, 항원은 B 세포의 표면에서 발현되는 B 세포 표면 마커이다. B 세포(예를 들어, 인간 B 세포)의 표면 마커의 예에는 CD19, CD20, BCMA, IgM, IgA, IgG, IgE, IgD, CD1, CD5, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD27, CD30, CD38, CD40, CD78, CD80, CD138, CD319, PDL-2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, Notch2, TLR4, IL-6, IL-10 및 TGF가 포함되지만, 이들로 한정되지 않는다. 특정 실시형태에서, B 세포 표면 마커는 CD19, CD20, BCMA, IgM, IgA, IgG, IgE, IgD, CD1, CD21, CD22, CD138로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, B 세포 표면 마커는 CD19 및 CD20으로부터 선택된다.
- [0208] 일부 실시형태에서, 항원은 proB 세포의 표면에서 발현되는 proB 세포 표면 마커이다. proB 세포(예를 들면, 인간 proB 세포)의 표면 마커의 예는 CD10, CD19, CD24, CD34 및 CD38을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다.
- [0209] 일부 실시형태에서, 항원은 preB 세포의 표면에서 발현되는 preB 세포 표면 마커이다. preB 세포(예를 들면, 인간 preB 세포)의 표면 마커의 예에는 CD5, CD10, CD19, CD20 및 CD34, CD38이 포함되지만, 이들로 한정되지 않는다.
- [0210] 일부 실시형태에서, 항원은 B 세포의 표면에서 발현되는 미성숙(또는 이행성) B 세포 표면 마커이다. 미성숙(또는 이행성) B 세포(예를 들어, 인간 미성숙 B 세포)의 표면 마커의 예에는 CD5, CD10, CD19, CD20, CD22, CD24, CD38 및 IgG이 포함되지만, 이들로 한정되지 않는다.
- [0211] 일부 실시형태에서, 항원은 B 세포의 표면에서 발현되는 변연부 B 세포 표면 마커이다. 변연부 B 세포(예를 들

면, 인간 변연부 B 세포)의 표면 마커의 예는 CD1, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD27, IgG 및 Notch2를 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.

- [0212] 일부 실시형태에서, 항원은 B 세포의 표면에서 발현되는 형질 세포 표면 마커이다. 형질 세포(예를 들면, 인간 형질 세포)의 표면 마커의 예는 CD19, CD27, CD38, CD138, IgG, MHCII 및 IL-6을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.
- [0213] 일부 실시형태에서, 항원은 B 세포의 표면에서 발현되는 형질모세포 세포 표면 마커이다. 형질모세포(예를 들면, 인간 형질모세포)의 표면 마커의 예는 CD19, CD20, CD27, CD38, IgG 및 MHCII를 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.
- [0214] 일부 실시형태에서, 항원은 B 세포의 표면에서 발현되는 기억 B 세포 표면 마커이다. 기억 B 세포(예를 들면, 인간 기억 B 세포)의 표면 마커의 예는 CD19, CD20, CD22, CD24, CD27, CD38, CD40, CD80, PD-L2, IgG, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, IgA, IgG 및 IgE를 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다.
- [0215] 일부 실시형태에서, 항원은 B 세포의 표면에서 발현되는 배아 중심 B 세포 표면 마커이다. 배아 중심 B 세포(예를 들면, 인간 배아 중심 B 세포)의 표면 마커의 예는 CD10, CD19, CD20, CD22, CD38 및 IgG를 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다.
- [0216] 일부 실시형태에서, 항원은 B 세포의 표면에서 발현되는 활성화된 B 세포 표면 마커이다. 활성화된 B 세포(예를 들면, 인간 활성화된 B 세포)의 표면 마커의 예는 CD19, CD25 및 CD30을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다.
- [0217] 일부 실시형태에서, 항원은 B 세포의 표면에서 발현되는 조절 B 세포 표면 마커이다. 조절 B 세포(Breg 세포)의 표면 마커의 예는 CD1, CD1d, CD5, CD19, CD21, CD23, CD24, CD40, Fas 리간드, IL-10, TLR4, TGF, IgD, IgM, PD-L1, PD-L2, TIM-1, TNFSF18 및 TRAIL을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다. 특정 실시형태에서, 인간 Breg 세포의 표면 마커의 예는 CD1, CD1, CD5, CD19, CD21, CD24, CD40, IL-10, TLR4, TGF, IgD 및 IgM을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.
- [0218] 일부 실시형태에서, 항원은 B 세포의 표면에서 발현된 비-분비 Ig를 갖는 B 세포 표면 마커이다. 비-분비 Ig를 갖는 B 세포(예를 들면, 인간 B 세포)의 표면 마커의 예는 CD138 및 Notch2를 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.
- [0219] 일부 실시형태에서, B 세포 표면 마커는 CD19이다. 일부 실시형태에서, CD19 결합 도메인은 CD19에 대해 지시된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD19 결합 도메인은 CD19에 대해 지시된 scFv를 포함한다. CD19에 대해 지시된 scFv의 예는 서열번호 1 및 FMC63(서열번호 2)을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.
- [0220] 일부 실시형태에서, B 세포 표면 마커는 CD20이다. 일부 실시형태에서, CD20 결합 도메인은 CD20에 대해 지시된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. CD20 항체의 예는 리톡시맙 또는 이의 단편 또는 변이체(예를 들면, 서열번호 3 또는 이의 단편 또는 변이체)를 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다. CD20에 대해 지시된 scFv의 예는 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6 및 이의 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열을 포함하거나 이들로 이루어진 scFv를 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.
- [0221] 일부 실시형태에서, 항원은 암 항원이다.
- [0222] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "암 항원"은 암 세포에 의해 차별적으로 발현되고, 따라서 암 세포를 표적화하기 위해 이용될 수 있는 항원을 지칭한다. 암 항원은, 명백하게 종양 특이적 면역 반응을 잠재적으로 자극할 수 있는 항원이다. 이들 항원 중의 일부는 반드시 발현되는 것은 아니지만, 정상 세포에 의해 코딩된다. 이들 항원은, 정상 세포에서는 통상 침묵하는(즉, 발현되지 않는) 항원, 특정 분화 단계에서만 발현되는 항원, 및 배아 및 태아 항원 등의 일시적으로 발현되는 항원으로 특성화될 수 있다. 다른 암 항원은, 종양 유전자(예를 들어, 활성화된 ras 종양 유전자), 억제 유전자(예를 들어, 돌연변이 p53) 및 내부 결실 또는 염색체 전좌로 인한 융합 단백질 등의 돌연변이 세포 유전자에 의해 코딩된다. 또 다른 암 항원은, RNA 및 DNA 종양 바이러스에 전달되는 것 등의 바이러스 유전자에 의해 코딩될 수 있다. 다수의 종양 항원은 복수의 고형 종양과 관련하여 정의될 수 있다: MAGE 1, 2 및 3(면역에 의해 정의됨), MART-1/Melan-A, gp100, 암 배아 항원(CEA), HER2, 뮤신(즉, MUC-1), 전립선 특이적 항원(PSA) 및 전립선 산 포스파타제(PAP). 또한, B형 간염(HBV), 엡스타인-바르(EBV) 및 인간 파필로마(HPV)에 의해 코딩되는 일부 바이러스 단백질은 각각 간세포 암종, 림프종 및 자궁경부

암의 발증에 중요한 것으로 나타났다.

[0223] 다른 암 항원은, 707-AP(707 알라닌 프롤린), AFP(알파(a)-태아단백질), ART-4(T4 세포에 의해 인식되는 선암종 항원), BAGE(B 항원; b-카테닌/m, b-카테닌/돌연변이), BCMA(B 세포 성숙 항원), Bcr-abl(중단점 클러스터 영역-Abelson), CAIX(탄산 안하이드라제 IX), CD19 (분화 클러스터 19), CD20(분화 클러스터 20), CD22(분화 클러스터 22), CD30(분화 클러스터 30), CD33(분화 클러스터 33), CD44v7/8(분화 클러스터 44, 엑손 7/8), CAMEL(흑색종 상의 CTL 인식 항원), CAP-1(암 배아 항원 펩티드-1), CASP-8(카스파제-8), CDC27m(세포-분열 사이클 27 돌연변이), CDK4/m(사이클린-의존성 키나제 4 돌연변이), CEA(암 배아 항원), CT(암/정소(항원)), Cyp-B(사이클로필린 B), DAM(분화 항원 흑색종), EGFR(상피 성장 인자 수용체), EGFRvIII(상피 성장 인자 수용체, 변이체 III), EGP-2(상피 당단백질 2), EGP-40(상피 당단백질 40), Erbb2, 3, 4(적혈구 백혈병 바이러스 종양 유전자 동족체-2, -3, 4), ELF2M(신장 인자 2 돌연변이), ETV6-AML1(Ets 변이 유전자 6/급성 골수성 백혈병 1 유전자 ETS), FBP(엽산 결합 단백질), fAchR(태아 아세틸콜린 수용체), G250(당단백질 250), GAGE(G 항원), GD2(디시알로강글리오시드 2), GD3(디시알로강글리오시드 3), GnT-V(N-아세틸글루코사미닐트랜스페라제 V), Gp100(당단백질 100kD), HAGE(헬리코즈 항원), HER-2/neu(인간 표피 수용체-2/신경학; 또한 EGFR2라고도 함), HLA-A(인간 백혈구 항원-A) HPV(인간 파필로마 바이러스), HSP70-2M(열 쇼크 단백질 70-2 돌연변이), HST-2(인간 시그넷 환 종양-2), hTERT 또는 hTRT(인간 텔로머라제 역전사효소), iCE(장 카복실 에스테라제), IL-13R-a2(인터루킨-13 수용체 아단위 알파-2), KIAA0205, KDR(키나제 삽입 도메인 수용체), k-경쇄, LAGE(L 항원), LDLR/FUT(저밀도 지질 수용체/GDP-L-푸코스: bD-갈 락토시다 2-a-L푸코실트랜스페라제), LeY(Lewis-Y 항체), L1 CAM(L1 세포 접착 분자), MAGE(흑색종 항원), MAGE-A1(흑색종 관련 항원 1), 메조텔린, 무린 CMV 감염 세포, MART-1/Melan-A(T 세포에 의해 인식되는 흑색종 항원-1/흑색종 항원 A), MC1 R(멜라노코르틴 1 수용체), yosin/m(미오신 돌연변이), MUC1(뮤신 1), MUM-1, -2, -3(편재성 흑색종 돌연변이-1, -2, -3), NA88-A(환자 M88의 NA cDNA 클론), NKG2D(천연 킬러 그룹 2, 멤버 D) 리간드, NY-BR-1(뉴욕 유방 분화 항원 1), NY-ESO-1(뉴욕 식도 편평 세포 암종-1), 암태아 항원(h5T4), P15(단백질 15), p90 소수 bcr-abl(190KD bcr-abl의 단백질), Pml/RARa (전골수성 백혈병/레티노산 수용체 a), PRAME(우선적으로 발현되는 흑색종 항원), PSA(전립선-특이적 항원), PSCA(전립선 줄기 세포 항원), PSMA(전립선 특이적 막 항원), RAGE(신장 항원), RU1 또는 RU2(신장 편재성 1 또는 2), SAGE(육종 항원), SART-1 또는 SART-3(편평 항원 거부 종양 1 또는 3), 활액 육종 X-1, -2, -3, -4(SSX-1, -2, -3, -4), TAA(종양 관련 항원), TAG-72(종양 관련 당단백질 72), TEL/AML1(전위 Ets-패밀리 백혈병/급성 골수성 백혈병 1), TPI/m(돌연변이된 트리오세포스페이트 이소머라제), TRP-1(티로시나제 관련 단백질 1 또는 gp75), TRP-2(티로시나제 관련 단백질 2), TRP-2/INT2(TRP-2/인트론 2), VEGF-R2(혈관 내피 성장 인자 수용체 2) 또는 WT1(빌름 종양 유전자)를 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.

[0224] 일부 실시형태에서, 항원은 감염된 세포와 관련된다.

[0225] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "감염된 세포"는 이들의 품질, 특성 또는 상태에 불리하게 영향을 미치는 무언가로 오염된 세포를 의미한다.

[0226] 일부 실시형태에서, 항원은 바이러스로 감염된 세포와 관련된다. 일부 실시형태에서, 항원은 세균으로 감염된 세포와 관련된다. 일부 실시형태에서, 항원은 진균으로 감염된 세포와 관련된다. 일부 실시형태에서, 항원은 기생충으로 감염된 세포와 관련된다.

[0227] 일부 실시형태에서, 세포의 결합 도메인은 단백질 또는 이의 단편 또는 변이체이다.

[0228] 일부 실시형태에서, 세포의 결합 도메인은 B 세포상의 자가항체를 인식한다.

[0229] 일부 실시형태에서, 세포의 결합 도메인은 자가항원이다.

[0230] 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는 자가항원(자기-항원으로도 지칭될 수 있음) 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하고, 따라서 상기 자가항원에 대해 지시된 항체를 인식할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "자가항원" 또는 "자기-항원"은 자가항체의 생산을 자극하는 내인성 항원을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 자가항원은 자가면역 질환에 관여한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 면역 세포는 상기 자가항원에 대해 지시된 항체를 생산하는 B 세포에 대해 세포독성이다.

[0231] 용어 "자가항원의 변이체"는, 본원에서, 천연 자가항원과 거의 동일하고 동일한 생물학적 활성을 공유하는 자가항원을 지칭한다. 천연 자가항원과 이의 변이체 사이의 최소 차이는, 예를 들면, 아미노산 치환, 결실 및/또는 부가에서 나타날 수 있다. 이러한 변이체는, 예를 들면, 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체되는 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리는, 염기성 측

쇄(예를 들면, 리신, 아르기닌 및 히스티딘), 산성 측쇄(예를 들면, 아스파르트산 및 글루탐산), 하전되지 않은 극성 측쇄(예를 들면, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신 및 시스테인), 비극성 측쇄(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌 및 트립토판), 베타-분지형 측쇄(예를 들어, 트레오닌, 발린 및 이소류신) 및 방향족 측쇄(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판 및 히스티딘)를 포함하여 당해 기술분야에 정의되어 있다. 일부 실시형태에서, 자가항원의 변이체는 천연 자가항원의 서열과 적어도 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99%의 서열 동일성을 제시한다.

[0232] 자가 항원의 예에는 아쿠아포린 물 채널(예를 들면, 아쿠아포린-4 물 채널(AQP4)), Hu, Ma2, 콜랩신 반응-매개 인자 단백질 5(CRMP5), 암피피신, 전압-게이트 칼륨 채널(VGKC), N-메틸-D-아스파르테이트 수용체(NMDAR), α-아미노-3-하이드록시-5-메틸-4-이속사졸 프로프리온산(AMPA), 갑상선 퍼옥시다제, 티로글로불린, 항-N-메틸-D-아스파르테이트 수용체(NR1 아단위), Rh 혈액형 항원, I 항원, 데스모글레인 1 또는 3(Dsg1/3), BP180, BP230, 아세틸콜린 니코틴 시냅스후 수용체, 티로트로핀 수용체, 혈소판 인테그린, GpIIb:IIIa, 콜라겐(예를 들면, 콜라겐 알파-3(IV) 쇄), 류마티스 인자, 칼파스타틴, 시트룰린화 단백질, 미엘린 염기성 단백질(MBP), 미엘린 올리고덴드로사이트 당단백질(MOG) 펩티드, 알파-베타-크리스탈린, DNA, 히스톤, 리보솜, RNP, 조직 트랜스글루타미나제(TG2), 내인성 인자, 65-kDa 항원, 포스파티딜세린, 리보솜 인단백질, 항-호중구 세포질 항체, Sc1-70, U1-RNP, ANA, SSA, 항-SSB, 항핵 항체(ANA), 항호중구 세포질 항체(ANCA), Jo-1, 항미토콘드리아 항체, gp210, p62, sp100, 항인지질 항체, U1-70 kd snRNP, GQ1b 강글리오사이드, GM1, 아시아로 GM1, GD1b, 항-평활근 항체(ASMA), 항-간-신장 마이크로솜-1 항체(ALKM-1), 항-간 세포질 항체-1(ALC-1), IgA 항내분비-항체, 호중구 과립 단백질, 스트렙토코쿠스 세포벽 항원, 위벽 세포의 내인성 인자, 인슐린(IAA), 글루탐산 데카복실라제(GAA 또는 GAD), 단백질 티로신 포스파타제(예를 들어, IA2 또는 ICA512), PLA2R1 및 THSD7A1을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.

[0233] 자가항원의 다른 예는 본원에 수록되고, 제한 없이, 다발성 경화증-관련 항원(예를 들면, 미엘린 염기성 단백질(MBP), 미엘린 관련 당단백질(MAG), 미엘린 올리고덴드로사이트 당단백질(MOG), 프로테오리피드 단백질(PLP), 올리고덴드로사이트 미엘린 당단백질(OMGP), 미엘린 관련 올리고덴드로사이트 염기성 단백질(MOBP), 올리고덴드로사이트 특이적 단백질(OSP/클라우딘-11), 열 충격 단백질, 올리고덴드로사이트 특이적 단백질(OSP), NOGO A, 당단백질 Po, 말초 미엘린 단백질 22(PMP22), 2'3'-사이클릭 뉴클레오티드 3'-포스포디에스테라제(CNPase), 및 이들의 단편, 변이체 및 혼합물); 관절 관련 항원(예를 들어, 시트룰린-치환 사이클릭 및 선형 펩타이드, II형 콜라겐 펩티드, 인간 연골 당단백질 39(HCgp39) 펩티드, HSP, 이중성 핵 리보핵단백질(hnRNP) A2 펩티드, hnRNP B1, hnRNP D, Ro60/52, HSP60, HSP65, HSP70 및 HSP90, BiP, 케라틴, 비멘틴, 피브리노겐, 유형 I, III, IV 및 V 콜라겐 펩티드, 아넥신 V, 글루코즈 6 포스페이트 이소머라제(GPI), 아세틸-칼파스타틴, 피루베이트 데하이드로게나제(PDH), 알돌라제, 토포이소머라제 I, snRNP, PARP, Sc1-70, Sc1-100, 음이온성 카디올리핀 및 포스파티딜세린을 포함한 인지질 항원, 중성 하전된 포스파티딜에탄올아민 및 포스파티딜콜린, 매트릭스 메탈로프로테이나제, 피브릴린, 아그레칸, 시트룰린화 비멘틴, 시트룰린화 II형 콜라겐, 시트룰린화 피브리노겐, 및 이들의 단편, 변이체 및 혼합물); 눈 관련 항원(예를 들어, II형 콜라겐, 망막 어레스틴, S-어레스틴, 광수용체간 레티노이드-결합 단백질(IRBP1), 베타-크라이스톨린 B1, 망막 단백질, 맥락막 단백질, 시트룰린화 비멘틴, 시트룰린화 II형 콜라겐, 시트룰린화 피브리노겐 및 이들의 단편 및 변이체 및 혼합물); 및 인간 HSP 항원(예를 들면, 인간 HSP60, HSP70, HSP90 및 이들의 단편, 변이체 및 혼합물)을 포함한다.

[0234] 일부 실시형태에서, 자가항원은 데스모글레인 1 또는 데스모글레인 3 또는 이의 변이체 또는 단편, 예를 들면, 데스모글레인 1 또는 3의 세포의 도메인이다. 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는 데스모글레인 3의 세포의 도메인 1 내지 4, 예를 들면, 서열번호 7을 포함하거나 이로 이루어진 서열을 포함한다.

[0235] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은, 제1 항원에 대한 세포의 결합 도메인 및 또 다른 항원에 대한 적어도 하나의 다른 세포의 결합 도메인을 포함한다. 이러한 CAR은 적어도 2개의 상이한 항원에 결합할 수 있다. 특정 실시형태에서, 상기 적어도 하나의 다른 세포의 결합 도메인은 특정 항원 또는 이의 항원 결합 단편에 대해 지시된 항체이다. 특정 실시형태에서, 상기 적어도 하나의 다른 세포의 결합 도메인은, 예를 들면, scFv 등의 항체 단편을 포함하거나 이들로 구성된다.

[0236] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR에 포함된 항체는 다중 특이적 항체 분자이고, 예를 들면, 복수의 면역글로불린 가변 도메인 서열을 포함하고, 여기서 복수의 제1 면역글로불린 가변 도메인 서열은 제1 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖고, 복수의 제2 면역글로불린 가변 도메인 서열은 제2 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는다. 일부 실시형태에서, 다중 특이적 항체 분자는 이중특이적 항체 분자이다. 이중특이적 항체는 2개의 항원에 대한 특이성을 갖고, 제1 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 제1 면역글로불린 가변 도메인 서열, 및 제2 에피

토프에 대한 결합 특이성을 갖는 제2 면역글로불린 가변 도메인 서열을 특징으로 한다.

- [0237] II. 스페이서 및 힌지 도메인
- [0238] 일부 실시형태에서, 세포외 결합 도메인은 스페이서 도메인 또는 힌지 도메인에 의해 막관통 도메인에 연결된다. 링커의 예는 본원에 기재된 GS 링커를 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다. 특정 실시형태에서, 링커는 서열 GGGGSGGGSGGGGS(서열번호 111)를 포함하거나 이들로 이루어질 수 있다.
- [0239] 일부 실시형태에서, 예를 들면, 2 내지 10개 아미노산 범위의 길이를 갖는 짧은 올리고- 또는 폴리펩티드 링커는 힌지 도메인을 형성할 수 있다. 일부 실시형태에서, 용어 "링커"는 유연한 폴리펩티드 링커를 지칭한다.
- [0240] 예를 들면, 글리신-세린 이중선은 적합한 힌지 도메인(GS 링커)을 제공할 수 있다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 Gly/Ser 링커이다. Gly/Ser 링커의 예는 GS 링커, G2S 링커, G3S 링커 및 G4S 링커를 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.
- [0241] G2S 링커의 예는 GGS를 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다.
- [0242] G3S 링커는, $(GGGS)_n$ 또는 $(서열번호\ 112)_n$ (여기서, n 은 1 이상의 양의 정수(예를 들면, $n=1, n=2, n=3, n=4, n=5, n=6, n=7, n=8, n=9$ 또는 $n=10$)이다)로도 지칭되는, 아미노산 서열 $(Gly-Gly-Gly-Ser)_n$ 을 포함한다. G3S 링커의 예에는 GGS GGS GGS GGS(서열번호 113)가 포함되지만, 이들로 한정되지 않는다.
- [0243] G4S 링커의 예는, GGGGS(서열번호 114)에 상응하는 $(Gly_4\ Ser)_1$; GGGSGGGGS(서열번호 115)에 상응하는 $(Gly_4\ Ser)_2$; GGGSGGGSGGGGS(서열번호 116)에 상응하는 $(Gly_4\ Ser)_3$; 및 GGGSGGGSGGGSGGGGS(서열번호 117)에 상응하는 $(Gly_4\ Ser)_4$ 를 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.
- [0244] 일부 실시형태에서, 스페이서 도메인은 최대 300개 아미노산, 예를 들면, 10-100개 아미노산, 25-50개 아미노산 또는 2-10개 아미노산의 길이를 가질 수 있다.
- [0245] 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은, 예를 들면, 본원에 기재된 바와 같이 2 내지 10개 아미노산 범위의 길이를 갖는, 짧은 올리고- 또는 폴리펩티드 링커이다. 본 발명에서 사용될 수 있는 힌지 도메인의 예는, 참조에 의해 본원에 도입되는, PCT 특허 공보 제W02012/138475호에 기재되어 있다.
- [0246] 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 아미노산 서열 AGSSSSGGSTTGGSTT(서열번호 8), 아미노산 서열 GTTAASGSSGSSGA(서열번호 9), 아미노산 서열 SSATATAGTGSSTGST(서열번호 10) 및 아미노산 서열 TSGSTGTAASSTTST(서열번호 11)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0247] 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTCC(서열번호 12)의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된다.
- [0248] 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 KIRRDSS(서열번호 13)에 상응하는 KIR2DS2 힌지이다.
- [0249] 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은, CD8 힌지의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 서열번호 14와 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 서열번호 15의 핵산 서열, 또는 서열번호 15와 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩된 CD8 힌지이다.
- [0250] 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 IgG4 힌지의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐), 또는 서열번호 16과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 서열번호 17의 핵산 서열, 또는 서열번호 17과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩된 IgG4 힌지이다.
- [0251] 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 IgD 힌지의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐), 또는 서열번호 18과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 서열번호 19의 핵산 서열, 또는 서열번호 19와 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩된 IgD 힌지이다.

- [0252] 일부 실시형태에서, 힌지 영역은 CD28 힌지의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 서열번호 20과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 서열번호 21의 핵산, 또는 서열번호 21과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩된 CD28 힌지이다.
- [0253] *III. 막관통 도메인*
- [0254] 본 발명의 키메라 수용체에 사용될 수 있는 막관통 도메인의 예는 TNFR2, CD28, CD8의 막관통 도메인, 또는 T 세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 쇄의 막관통 도메인, 또는 CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD3 제타, CD45, CD4, CD5, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1(CD11a, CD18), ICOS(CD278), 4-1BB(CD137), GITR, CD40, BAFFR, HYEM(LIGHTR), SLAMF7, NKp80(KLRF1), CD160, CD19, IL2R 베타, IL2R 감마, IL7Ra, ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, PD1, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, DNAM1(CD226), SLAMF4(CD244, 2B4), CD84, CD96(촉각), CEACAM1, CRT AM, Ly9(CD229), CD160(BY55), PSGL1, CD100(SEMA4D), SLAMF6(NTB-A, Ly108), SLAM(SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME(SLAMF8), SELPLG(CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D 및/또는 NKG2C의 막관통 도메인을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.
- [0255] 일부 실시형태에서, 막관통 도메인은 이것이 유래된 분자의 전체 막관통 도메인을 포함할 수 있거나, 이는 이의 기능적 단편 또는 변이체를 포함할 수 있다.
- [0256] 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는 TNFR2의 막관통 도메인, CD8의 막관통 도메인 및 CD28의 막관통 도메인으로부터 선택된 적어도 하나의 막관통 도메인을 포함한다.
- [0257] 일부 실시형태에서, 막관통 도메인은 TNFR2 막관통 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐), 또는 서열번호 22와 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 막관통 도메인은, 서열번호 22의 아미노산 서열과 비교하여, 적어도 1개, 2개 또는 3개의 변형을 갖지만 20, 10 또는 5개 이하의 변형을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열번호 22와 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 이루어진다.
- [0258] 일부 실시형태에서, TNFR2 막관통 도메인은 서열번호 23의 뉴클레오티드 서열, 또는 서열번호 23과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된다.
- [0259] 일부 실시형태에서, TNFR2 막관통 도메인은 서열번호 22의 서열, 또는 서열번호 22와 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열로부터 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개 아미노산, 예를 들면, 서열번호 22의 서열로부터 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개의 연속 아미노산을 포함한다. 특정 실시형태에서, TNFR2 막관통 도메인은 CVIMTQV(서열번호 62), VNCVIMTQV(서열번호 63) 또는 TALGLLIIGVNCVIMTQV(서열번호 64)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, TNFR2 막관통 도메인은 VNCVIMTQV(서열번호 63)의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0260] 일부 실시형태에서, TNFR2 막관통 도메인은 서열번호 23의 서열, 또는 서열번호 23과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열로부터 적어도 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 78, 81, 84 또는 87개 뉴클레오티드, 예를 들면, 서열번호 23의 서열로부터 적어도 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 78, 81, 84 또는 87개의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된다.
- [0261] 일부 실시형태에서, 막관통 도메인은 CD8 막관통 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐), 또는 서열번호 24와 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%,

93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 막관통 도메인은, 서열번호 24의 아미노산 서열과 비교하여, 적어도 1개, 2개 또는 3개의 변형을 갖지만 20, 10 또는 5개 이하의 변형을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열번호 24와 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 이루어진다.

[0262] 일부 실시형태에서, CD8 막관통 도메인은 서열번호 25의 뉴클레오티드 서열, 또는 서열번호 25와 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된다.

[0263] 일부 실시형태에서, CD8 막관통 도메인은, 서열번호 24의 서열, 또는 서열번호 24와 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열로부터 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24개의 아미노산, 예를 들면, 서열번호 24의 서열로부터 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24개의 연속 아미노산을 포함한다.

[0264] 일부 실시형태에서, CD8 막관통 도메인은 서열번호 25의 서열, 또는 서열번호 25와 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열로부터 적어도 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69 또는 72개 뉴클레오티드, 예를 들면, 서열번호 25의 서열로부터 적어도 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69 또는 72개의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된다.

[0265] 일부 실시형태에서, 막관통 도메인은 CD28 막관통 도메인(예를 들면, 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐)의 아미노산 서열, 또는 서열번호 26과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 막관통 도메인은, 서열번호 26의 아미노산 서열과 비교하여, 적어도 1, 2 또는 3개의 변형을 갖지만 20, 10 또는 5개 이하의 변형을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열번호 26과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 이루어진다.

[0266] 일부 실시형태에서, 막관통 도메인은 서열번호 27의 핵산 서열, 또는 서열번호 27과 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩된 CD28 막관통 도메인이다. 일부 실시형태에서, CD28 막관통 도메인은 서열번호 26의 서열, 또는 서열번호 26과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열로부터 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 또는 27개 아미노산, 예를 들면, 서열번호 26의 서열로부터 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 또는 27개의 연속 아미노산 서열을 포함한다.

[0267] 일부 실시형태에서, CD28 막관통 도메인은 서열번호 27의 서열, 또는 서열번호 27과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열로부터 적어도 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 78 또는 81개 뉴클레오티드, 예를 들면, 서열번호 27의 서열로부터 적어도 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 78 또는 81개의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된다.

[0268] 본 발명의 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는 예를 들면, TNFR2의 막관통 도메인, CD8의 막관통 도메인 및 CD28의 막관통 도메인으로부터 선택된 적어도 2개의 막관통 도메인의 조합을 포함할 수 있다. 상기 막관통 도메인은 전체 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체일 수 있고, 랜덤으로 또는 특정 순서로 서로 연결될 수 있다. 특정 실시형태에서, 적어도 2개의 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체의 조합은 적어도 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50개 아미노산을 포함한다.

[0269] 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는 TNFR2 막관통 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 CD8 막관통 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다.

특정 실시형태에서, 키메라 수용체는 서열번호 59 및 62, 서열번호 60 및 63, 또는 서열번호 61 및 64의 아미노산 서열을 포함하는 융합 막관통 도메인을 포함한다.

- [0270] 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는 TNFR2 막관통 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체 및 CD28 막관통 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다.
- [0271] 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는 CD8 막관통 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체 및 CD28 막관통 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다.
- [0272] 본 발명의 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는, 예를 들면, TNFR2의 막관통 도메인, CD8의 막관통 도메인 및 CD28의 막관통 도메인으로부터 선택된 적어도 3개의 막관통 도메인의 조합을 포함할 수 있다. 상기 막관통 도메인은 전체 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체일 수 있다. 특정 실시형태에서, 적어도 3개의 막관통 도메인, 이의 단편 또는 변이체의 조합은 적어도 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50개 아미노산을 포함한다.
- [0273] 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는 TNFR2 막관통 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체, 예를 들면, (서열번호 24)의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어진 CD8 막관통 도메인의 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 CD28 막관통 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다.
- [0274] 따라서, 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR의 막관통 도메인을 코딩하는 핵산 서열은, TNFR2 막관통 도메인의 핵산 서열(예를 들면, 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및/또는 CD8 막관통 도메인의 핵산 서열(예를 들어, 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및/또는 핵산 CD28 막관통 도메인의 핵산 서열(예를 들면, 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다.
- [0275] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR의 막관통 도메인은 TNFR2 막관통 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및/또는 CD8 막관통 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및/또는 CD28 막관통 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하고; 여기서, 막관통 도메인에 포함된 서열은 동일한 프레임에서 단일 폴리펩티드 쇄로서 발현된다.
- [0276] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR의 막관통 도메인은, 랜덤으로 지정된 순서로 서로 연결될 수 있는 적어도 2개의 상이한 도메인(예를 들면, TNFR2 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체 및 적어도 1개의 다른 막관통 도메인(예를 들면, CD8 또는 CD28 막관통 도메인) 또는 이의 단편 또는 변이체)를 포함한다.
- [0277] 임의로, 예를 들면, 길이 2개 내지 10개 아미노산(예를 들면, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아미노산) 사이의 짧은 올리고- 또는 폴리펩티드 링커가 별개의 막관통 도메인 사이의 연결을 형성할 수 있다.
- [0278] 일부 실시형태에서, 막관통 도메인은 재조합될 수 있다. 특정 실시형태에서, 재조합 막관통 도메인은 발린 또는 류신 등의 주로 소수성 아미노산을 포함한다.
- [0279] *IV. 세포내 도메인*
- [0280] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR의 세포내 도메인은, T 세포 1차 신호전달 도메인(또는 이로부터 유래된 서열) 및 임의로 하나 이상의 T 세포 공자극 분자(또는 이로부터 유래된 서열(들))를 포함한다.
- [0281] 일부 실시형태에서, 세포내 도메인은, 그것이 유래된 분자의 전체 세포내 부분, 또는 전체 천연 세포내 신호전달 도메인, 또는 이의 기능적 단편 또는 변이체를 포함할 수 있다.
- [0282] 일부 실시형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 적어도 하나의 1차 신호전달 도메인(예를 들면, T 세포 1차 신호전달 도메인) 또는 이의 단편 또는 변이체로 이루어진다.
- [0283] 일부 실시형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 적어도 하나의 공자극 신호전달 도메인(예를 들면, T 세포 공자

극 분자 세포내 도메인) 또는 이의 단편 또는 변이체로 이루어진다.

- [0284] 일부 실시형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 T 세포 공자극 분자의 하나 이상의 세포내 도메인(들) 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 T 세포 공자극 분자의 하나 이상의 세포내 도메인(들) 또는 이의 단편 또는 변이체로 이루어진다.
- [0285] 다른 실시형태에서, 본 발명의 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 적어도 하나의 공자극 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체 및 적어도 하나의 1차 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다.
- [0286] 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 하나의 공자극 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체 및 하나의 1차 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체로 이루어진다.
- [0287] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 적어도 1, 2, 3 또는 4개의 공자극 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체 및 적어도 하나의 1차 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 공자극 도메인은 T 세포 공자극 분자의 세포내 도메인이다. 특정 실시형태에서, 적어도 하나의 1차 신호전달 도메인은 T 세포 1차 신호전달 도메인이다.
- [0288] 본 발명의 일부 실시형태에서, 1차 신호전달 도메인은 CD3 제타, CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, 공통 FcR 감마(FCER1G), FcR 베타(Fc 엡실론 Rib), CD79a, CD79b, Fc감마 RIIa, DAP10 및 DAP1 및 이로부터 유래된 서열로 이루어진 그룹으로부터 선택된 단백질의 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0289] 일부 실시형태에서, 1차 신호전달 도메인은 CD3 제타의 적어도 하나의 기능적 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하거나 이들로 이루어진 T 세포 1차 신호전달 도메인이다.
- [0290] 일부 실시형태에서, T 세포 1차 신호전달 도메인은 서열번호 28, 29, 30 또는 31의 CD3 제타 아미노산 서열, 또는 서열번호 28, 29, 30 또는 31과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어진다.
- [0291] 일부 실시형태에서, CD3 제타 1차 신호전달 도메인은, 서열번호 28, 29, 30 또는 31의 아미노산 서열과 비교하여, 적어도 1, 2 또는 3개의 변형을 갖지만 20, 10 또는 5개 이하의 변형을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열번호 28, 29, 30 또는 31과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어진다.
- [0292] 따라서, 일부 실시형태에서, T 세포 1차 신호전달 도메인을 코딩하는 핵산 서열은 서열번호 32 또는 서열번호 33의 CD3 제타 도메인 핵산 서열, 또는 서열번호 32 또는 서열번호 33과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이들로 이루어진다.
- [0293] 일부 실시형태에서, CD3 제타 1차 신호전달 도메인은, 서열번호 28, 29, 30 또는 31의 서열, 또는 서열번호 28, 29, 30 또는 31과 적어도 약 70% 동일성을 갖는 서열로부터 적어도 2, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 또는 112개 아미노산, 예를 들면, 서열번호 28, 29, 30 또는 31로부터 적어도 2, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 또는 112개의 연속 아미노산을 포함한다.
- [0294] 일부 실시형태에서, CD3 제타 1차 신호전달 도메인은, 서열번호 32 또는 서열번호 33의 서열, 또는 서열번호 32 또는 서열번호 33과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열로부터 적어도 6, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 또는 336개의 뉴클레오티드, 예를 들면, 서열번호 32 또는 서열번호 33으로부터 적어도 6, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 또는 336개의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된다.
- [0295] 일부 실시형태에서, 자극 방식으로 작용하는 T 세포 1차 신호전달 도메인은 면역 수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAMS)로서 공지된 신호전달 모티프를 포함할 수 있다. 본 발명에서 특히 사용되는 ITAM-함유 T 세포 1차 세포내 신호전달 도메인의 예는 CD3 제타, 공통 FcR 감마(FCER1G), Fc 감마 RIIa, FcR 베타(Fc 엡실론 Rib), CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD5, CD22, CD66b, CD79a, CD79b, DAP 10 및 DAP 12의 것들(또는 이로부터 유래된)을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.
- [0296] 일부 실시형태에서, T 세포 1차 신호전달 도메인은 변형된 ITAM 도메인, 예를 들면, 천연 ITAM 도메인과 비교하여 변경된(예를 들면, 증가 또는 감소된) 활성을 갖는 돌연변이된 ITAM 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 1차 신호전달 도메인은 변형된 ITAM-함유 1차 세포내 신호전달 도메인, 예를 들면, 최적화 및/또

는 절두된 ITAM-함유 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 1차 신호전달 도메인은 1, 2, 3, 4개 이상의 ITAM 모티프를 포함할 수 있다.

- [0297] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 하나 이상의 공자극 신호전달 도메인과 조합된 T 세포 1차 신호전달 도메인(예를 들면, CD3 제타 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체)을 포함하고, 여기서 상기 공자극 신호전달 도메인은 전체 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체이다.
- [0298] T 세포 공자극 분자의 세포내 도메인의 예는 TNFR2(CD 120b/TNFRSF1B), 4-1BB(CD137), ICOS(CD278), CD27, CD28, CTLA-4(CD152), PD-1, MHC 클래스 I 분자, BTLA, 톨(Toll) 리간드 수용체, OX40, CD30, CD40, 림프구 기능 관련 항원-1(LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, CD83, CDS, ICAM-1, GITR, ARHR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, Nkp80(KLRF1), Nkp44, Nkp30, Nkp46과 특이적으로 결합하는 리간드, CD160(BY55), CD19, CD19a, CD4, CD8알파, CD8베타, IL2ra, IL6Ra, IL2R 베타, IL2R 감마, IL7R 알파, IL-13RA1/RA2, IL-33R(IL1RL1), IL-10RA/RB, IL-4R, IL-5R(CSF2RB), IL-21R, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD 11a/CD18, ITGAM,CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, ITGB7, NKG2D, NKG2C, CD95, TNFR1(CD 120a/TNFRSF 1A), TGFbR1/2/3, TRAN CE/RANKL, DNAM1(CD226), SLAMF4(CD244, 2B4), CD84, CD96(촉각), CEACAM1, CRT AM, Ly9(CD229), PSGL1, CD100(SEMA4D), CD69, SLAMF6(NTB-A, Ly108), SLAM(SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME(SLAMF8), SELPLG(CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, 공통 감마 채, CD83, Nkp44, Nkp30, Nkp46, NKG2D 및 이들의 임의의 조합과 특이적으로 결합하는 리간드로 이루어진 그룹으로부터 선택된 단백질의 신호전달 도메인을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.
- [0299] 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는 TNFR2, 4-1BB, ICOS, CD27, OX40, CD28, CTLA4 및 PD-1로 이루어진 그룹으로부터 선택된 T 세포 공자극 분자의 적어도 하나의 세포내 도메인을 포함한다.
- [0300] 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는 적어도 하나의 공자극 신호전달 도메인을 포함하고, 여기서 상기 공자극 신호전달 도메인은 전체 공자극 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체이다.
- [0301] 일부 실시형태에서, T 세포 공자극 신호전달 도메인은 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인(예를 들면, 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐), 또는 서열번호 34와 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 공자극 신호전달 도메인은, 서열번호 34의 아미노산 서열과 비교하여, 적어도 1, 2 또는 3개의 변형을 갖지만 20, 10 또는 5개 이하의 변형을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어진다.
- [0302] 일부 실시형태에서, T 세포 공자극 신호전달 도메인은 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인(예를 들면, 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐)의 뉴클레오티드 서열, 또는 서열번호 35와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된다.
- [0303] 일부 실시형태에서, TNFR2 세포내 공자극 신호전달 도메인은 서열번호 34의 서열, 또는 서열번호 34와 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열로부터 적어도 2, 6, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 또는 174개의 아미노산, 예를 들면, 서열번호 34로부터 적어도 2, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 또는 174개의 연속 아미노산을 포함한다.
- [0304] 일부 실시형태에서, TNFR2 세포내 공자극 신호전달 도메인은 서열번호 35의 서열, 또는 서열번호 35와 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열로부터 적어도 6, 18, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 260, 270, 300, 330, 360, 390, 420, 450, 480, 510 또는 522개 뉴클레오티드, 예를 들면, 서열번호 35로부터 적어도 6, 18, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 260, 270, 300, 330, 360, 390, 420, 450, 480, 510 또는 522개의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된다.
- [0305] 일부 실시형태에서, 세포내 공자극 신호전달 도메인은 TNFR2 세포내 공자극 신호전달 도메인(예를 들면, 서열번호 34)의 도메인 I 및 II, 도메인 I-III, 도메인 I-IV 또는 도메인 I-V를 포함한다. 특정 실시형태에서, 세포내 공자극 신호전달 도메인은 TNFR2 세포내 공자극 도메인의 도메인 I 및 II를 포함한다.
- [0306] 일부 실시형태에서, 세포내 공자극 신호전달 도메인은 서열번호 34의 잔기 1-20(Δ 151), 1-70(Δ 104), 1-115(Δ

59) 또는 1-156(△18)을 포함한다.

- [0307] 일부 실시형태에서, T 세포 공자극 신호전달 도메인은 4-1BB 공자극 세포내 신호전달 도메인(예를 들면, 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐)의 아미노산 서열, 또는 서열번호 36과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 이루어진다. 일부 실시형태에서, T 세포 공자극 신호전달 도메인은, 서열번호 36의 아미노산 서열과 비교하여, 적어도 1, 2 또는 3개의 변형을 갖지만 20, 10 또는 5개 이하의 변형을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어진다.
- [0308] 일부 실시형태에서, T 세포 공자극 신호전달 도메인은 4-1BB 공자극 세포내 신호전달 도메인 뉴클레오티드 서열(예를 들면, 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐), 또는 서열번호 37과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된다.
- [0309] 일부 실시형태에서, 4-1BB 공자극 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 36의 서열, 또는 서열번호 36의 서열과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열로부터 적어도 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 또는 42개의 아미노산, 예를 들면, 서열번호 36으로부터 적어도 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39 또는 42개의 연속 아미노산을 포함한다.
- [0310] 일부 실시형태에서, 4-1BB 공자극 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 37의 서열, 또는 서열번호 37의 서열과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열로부터 적어도 6, 18, 27, 36, 45, 54, 63, 72, 81, 96, 99, 108, 117 또는 126개 뉴클레오티드, 예를 들면, 서열번호 37로부터 적어도 6, 18, 27, 36, 45, 54, 63, 72, 81, 96, 99, 108, 117 또는 126개의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된다.
- [0311] 일부 실시형태에서, T 세포 공자극 신호전달 도메인은 CD27 공자극 세포내 신호전달 도메인(예를 들면, 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐)의 아미노산 서열, 서열번호 38과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산을 포함하거나 이들로 이루어진다. 일부 실시형태에서, T 세포 공자극 신호전달 도메인은, 서열번호 38의 아미노산 서열과 비교하여, 적어도 1, 2 또는 3개의 변형을 갖지만 20, 10 또는 5개 이하의 변형을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어진다.
- [0312] 일부 실시형태에서, T 세포 공자극 신호전달 도메인은 CD27 공자극 세포내 신호전달 도메인 뉴클레오티드 서열(예를 들면, 서열번호 39의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐), 또는 서열번호 39와 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된다.
- [0313] 일부 실시형태에서, CD27 공자극 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 38의 서열, 또는 서열번호 38과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열로부터 적어도 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45 또는 48개 아미노산, 예를 들면, 서열번호 38로부터 적어도 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45 또는 48개의 연속 아미노산을 포함한다.
- [0314] 일부 실시형태에서, CD27 공자극 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 39의 서열, 또는 서열번호 39와 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열로부터 적어도 6, 18, 27, 36, 45, 54, 63, 72, 81, 96, 99, 108, 117, 126, 135 또는 144개 뉴클레오티드, 예를 들면, 서열번호 39로부터 적어도 6, 18, 27, 36, 45, 54, 63, 72, 81, 96, 99, 108, 117, 126, 135 또는 144개의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된다.
- [0315] 일부 실시형태에서, T 세포 공자극 신호전달 도메인은 CD28 공자극 세포내 신호전달 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 40의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐), 또는 서열번호 40과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어진다. 일부 실시형태에서, T 세포 공자극 신호전달 도메인은, 서열번호 40의 아미노산 서열과 비교하여, 적어도 1, 2 또는 3개의 변형을 갖지만 20, 10 또는 5개 이하의 변형을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어진다.

- [0316] 일부 실시형태에서, T 세포 공자극 신호전달 도메인은 CD28 공자극 세포내 신호전달 도메인 뉴클레오티드 서열 (예를 들면, 서열번호 41을 포함하거나 이들로 이루어짐), 또는 서열번호 41과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된다.
- [0317] 일부 실시형태에서, CD28 공자극 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 40의 서열, 또는 서열번호 40과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열로부터 적어도 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39 또는 41개의 아미노산, 예를 들면, 서열번호 40으로부터 적어도 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39 또는 41개의 연속 아미노산을 포함한다.
- [0318] 일부 실시형태에서, CD28 공자극 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 41의 서열, 또는 서열번호 41과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열로부터 적어도 6, 18, 27, 36, 45, 54, 63, 72, 81, 96, 99, 108, 117 또는 123개 뉴클레오티드, 예를 들면, 서열번호 41로부터 적어도 6, 18, 27, 36, 45, 54, 63, 72, 81, 96, 99, 108, 117 또는 123개의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된다.
- [0319] 본 발명의 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는 T 세포 공자극 분자의 적어도 2개의 세포내 도메인의 조합을 포함한다. 특정 실시형태에서, 적어도 2개의 세포내 도메인은 TNFR2의 세포내 도메인, 4-1BB의 세포내 도메인, CD27의 세포내 도메인 및 CD28의 세포내 도메인으로부터 선택될 수 있다. 특정 실시형태에서, 상기 공자극 세포내 신호전달 도메인은 전체 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체이다.
- [0320] 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 4-1BB 공자극 세포내 신호전달 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다.
- [0321] 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 CD27 공자극 세포내 신호전달 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다.
- [0322] 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 CD28 공자극 세포내 신호전달 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 40의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다.
- [0323] 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는 4-1BB 공자극 세포내 신호전달 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 CD27 공자극 세포내 신호전달 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다.
- [0324] 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는 4-1BB 공자극 세포내 신호전달 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 CD28 공자극 세포내 신호전달 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 40의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다.
- [0325] 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는 CD27 공자극 세포내 신호전달 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 CD28 공자극 세포내 신호전달 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 40의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다.
- [0326] 본 발명의 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는, 예를 들면, TNFR2의 세포내 도메인, 4-1BB의 세포내 도메인, CD27의 세포내 도메인 및 CD28의 세포내 도메인으로부터 선택된 T 세포 공자극 분자의 적어도 3개의 세포내 도메인의 조합을 포함한다.
- [0327] 본 발명의 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는 적어도 3개의 공자극 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있으며, 여기서 상기 도메인은 전체 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체이다.
- [0328] 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호

호 34의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 4-1BB 공자극 세포내 신호전달 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 CD27 공자극 세포내 신호전달 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다.

[0329] 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 4-1BB 공자극 세포내 신호전달 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 CD28 공자극 세포내 신호전달 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 40의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다.

[0330] 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 CD27 공자극 세포내 신호전달 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 CD28 공자극 세포내 신호전달 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 40의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다.

[0331] 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는 4-1BB 공자극 세포내 신호전달 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 CD27 공자극 세포내 신호전달 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 CD28 공자극 세포내 신호전달 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 40의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다.

[0332] 본 발명의 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는, 예를 들면, TNFR2의 세포내 도메인, 4-1BB의 세포내 도메인, CD27의 세포내 도메인 및 CD28의 세포내 도메인으로부터 선택된, T 세포 공자극 분자의 적어도 4개의 세포내 도메인의 조합을 포함한다.

[0333] 본 발명의 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는 T 세포 공자극 분자의 적어도 4개의 세포내 도메인의 조합을 포함할 수 있으며, 여기서 상기 공자극 세포내 신호전달 도메인은 전체 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체이다.

[0334] 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 4-1BB 공자극 세포내 신호전달 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 CD27 공자극 세포내 신호전달 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 CD28 공자극 세포내 신호전달 도메인의 아미노산 서열(예를 들면, 서열번호 40의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다.

[0335] 따라서, 일부 실시형태에서, T 세포 공자극 신호전달 도메인을 코딩하는 핵산 서열은 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인의 핵산 서열(예를 들면, 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및/또는 4-1BB 공자극 세포내 신호전달 도메인의 핵산 서열(예를 들면, 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및/또는 CD27 공자극 세포내 신호전달 도메인의 핵산 서열(예를 들면, 서열번호 39의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및/또는 CD28 공자극 세포내 신호전달 도메인의 핵산 서열(예를 들면, 서열번호 41의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐) 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다.

[0336] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 다음을 포함한다:

[0337] - 서열번호 34의 아미노산 서열을 갖는 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인, 또는 이의 단편 또는 변이체, 및/또는 서열번호 36의 아미노산 서열을 갖는 4-1BB 공자극 세포내 신호전달 도메인, 또는 이의 단편 또는 변이체, 및/또는 서열번호 38의 아미노산 서열을 갖는 CD27 공자극 세포내 신호전달 도메인, 및/또는 서열번호 40의 아미노산 서열을 갖는 CD28 공자극 세포내 신호전달 도메인; 및/또는

[0338] - 서열번호 28, 29, 30 또는 31의 아미노산 서열을 갖는 CD3 제타 1차 세포내 신호전달 도메인, 또는 이의 단편 또는 변이체;

- [0339] 여기서, 세포내 도메인에 포함된 서열은 동일한 프레임에서 단일 폴리펩티드 쇄로서 발현된다.
- [0340] 따라서, 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR의 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 핵산 서열은 다음을 포함한다:
- [0341] - 서열번호 35의 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 핵산 서열 또는 이의 단편 또는 변이체, 및/또는 서열번호 37의 4-1BB 공자극 세포내 신호전달 도메인 핵산 서열 또는 이의 단편 또는 변이체, 및/또는 서열번호 39의 CD27 공자극 세포내 신호전달 도메인 핵산 서열 또는 이의 단편 또는 변이체, 및/또는 서열번호 41의 CD28 공자극 세포내 신호전달 도메인 핵산 서열 또는 이의 단편 또는 변이체; 및/또는
- [0342] - 서열번호 32 또는 서열번호 33의 CD3 제타 1차 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체.
- [0343] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR의 세포내 신호전달 도메인은, 랜덤으로 또는 지정된 순서로 서로 연결될 수 있는 적어도 2개의 상이한 도메인(예를 들면, 1차 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체 및 T 세포 공자극 분자의 적어도 하나의 세포내 도메인 또는 단편 또는 이의 변이체)를 포함한다.
- [0344] 임의로, 예를 들면, 길이 2 내지 10개의 아미노산(예를 들면, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아미노산) 사이의 짧은 올리고- 또는 폴리펩티드 링커는 상이한 신호전달 도메인 사이의 연결을 형성할 수 있다. 일부 실시형태에서, 글리신-세린 이중선(GS)이 적합한 링커로서 사용된다. 일부 실시형태에서, 단일 아미노산, 예를 들면, 알라닌(A), 글리신(G)이 적합한 링커로서 사용된다. 링커의 다른 예는 본원에 기재되어 있다.
- [0345] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 2개 이상(예를 들면, 2, 3, 4, 5개 이상)의 공자극 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 2개 이상(예를 들면, 2, 3, 4, 5개 또는 그 이상)의 공자극 신호전달 도메인 중의 임의의 것 또는 모두는 링커 분자, 예를 들면, 본원에 기재된 링커 분자에 의해 분리된다.
- [0346] 일부 실시형태에서, 본 발명의 키메라 수용체의 세포내 신호전달 도메인은, CD3 제타의 1차 세포내 신호전달 도메인(예를 들면, 서열번호 28, 29, 30 또는 31) 및 TNFR2의 공자극 세포내 신호전달 도메인(예를 들면, 서열번호 34)을 포함한다.
- [0347] 일부 실시형태에서, 본 발명의 키메라 수용체의 세포내 신호전달 도메인은, CD3 제타의 1차 세포내 신호전달 도메인(예를 들면, 서열번호 28, 29, 30 또는 31) 및 4-1BB의 공자극 세포내 신호전달 도메인(예를 들면, 서열번호 36)을 포함한다.
- [0348] 일부 실시형태에서, 본 발명의 키메라 수용체의 세포내 신호전달 도메인은, CD3 제타의 1차 세포내 신호전달 도메인(예를 들면, 서열번호 28, 29, 30 또는 31) 및 CD27의 공자극 세포내 신호전달 도메인(예를 들면, 서열번호 38)을 포함한다.
- [0349] 일부 실시형태에서, 본 발명의 키메라 수용체의 세포내 신호전달 도메인은, CD3 제타의 1차 세포내 신호전달 도메인(예를 들면, 서열번호 28, 29, 30 또는 31) 및 CD28의 공자극 세포내 신호전달 도메인(예를 들면, 서열번호 40)을 포함한다.
- [0350] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 본원에 기재된 세포의 결합 도메인, 본원에 기재된 막관통 도메인, 본원에 기재된 세포내 신호전달 도메인, 및 임의로 본원에 기재된 스페이서 또는 힌지 도메인의 임의의 조합을 포함한다.
- [0351] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 특정 세포의 결합 도메인으로부터 N-말단에 위치한 리더 서열을 추가로 포함한다. 비제한적인 예는 서열번호 42의 서열을 포함하거나, 이들로 이루어질 수 있는 CD8의 리더 서열이다.
- [0352] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은, 예를 들면, 품질 관리, 농축, 생체내 추적 등을 위한 태그 등의 태그를 추가로 포함한다. 상기 태그는 N-말단, C-말단 및/또는 내부적으로 국재화될 수 있다. 본 발명의 CAR에 사용될 수 있는 태그의 예는 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들면, 제한 없이, 본 발명에서 사용되는 태그는, 스트렙타비딘 태그(예를 들어, 서열번호 47), 헤마글루티닌 태그, 폴리 아르기닌 태그, 폴리 히스티딘 태그, Myc 태그, strep로 태그, S-태그, HAT 태그, 3x 플래그 태그, 갈모듈린-결합 펩티드 태그, SBP 태그, 키틴 결합 도메인 태그, GST 태그, 말토오스-결합 단백질 태그, 형광 단백질 태그, T7 태그, V5 태그 및 Xpress 태그로 이루어진 그룹으로부터 선택된 태그일 수 있다. 태그의 다른 예는, 제한 없이, NWSHPQFEK(서열번호 43) 또는 SAWSHQPFEK(서열번호 44)를 포함한다.

- [0353] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 P2A(서열번호 45) 및/또는 GFP(서열번호 46) 서열을 추가로 포함한다.
- [0354] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 다음을 포함한다:
- [0355] - 적어도 하나의 세포외 결합 도메인,
- [0356] - 임의로 세포외 힌지 도메인,
- [0357] - 적어도 하나의 TNFR2 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체, 및
- [0358] - 적어도 하나의 세포내 1차 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체.
- [0359] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 다음을 포함한다:
- [0360] - 적어도 하나의 세포외 결합 도메인;
- [0361] - 적어도 하나의 TNFR2 막관통 도메인(예를 들면, 서열번호 22) 또는 이의 단편 또는 변이체; 및
- [0362] - 적어도 하나의 CD3 제타 1차 세포내 신호전달 도메인(예를 들면, 서열번호 28, 29, 30 또는 31) 또는 이의 단편 또는 변이체.
- [0363] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 다음을 포함한다:
- [0364] - 적어도 하나의 세포외 결합 도메인;
- [0365] - CD8(예를 들어, 서열번호 14) 또는 이의 단편 또는 변이체, CD28(예를 들어, 서열번호 20) 또는 이의 단편 또는 변이체, IgG4(예를 들면, 서열번호 16) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 IgD(예를 들어, 서열번호 18) 또는 이의 단편 또는 변이체;
- [0366] - TNFR2의 적어도 하나의 막관통 도메인(예를 들면, 서열번호 22) 또는 이의 단편 또는 변이체; 및
- [0367] - 적어도 하나의 CD3 제타 1차 세포내 신호전달 도메인(예를 들면, 서열번호 28, 29, 30 또는 31) 또는 이의 단편 또는 변이체. 특정 실시형태에서, 적어도 하나의 힌지 도메인은 CD8 힌지 도메인(예를 들면, 서열번호 14)이다.
- [0368] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 다음을 포함한다:
- [0369] - 적어도 하나의 세포외 결합 도메인,
- [0370] - 임의로 적어도 하나의 세포외 힌지 도메인,
- [0371] - 적어도 하나의 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체, 및
- [0372] - 적어도 하나의 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체, 여기서 막관통 도메인 및 공자극 세포내 신호전달 도메인 중의 하나 이상은 TNFR2 막관통 또는 TNFR2 공자극 세포내 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체이다.
- [0373] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 다음을 포함한다:
- [0374] - 적어도 하나의 세포외 결합 도메인;
- [0375] - TNFR2 막관통 도메인(예를 들어, 서열번호 22) 또는 이의 단편 또는 변이체, CD8 막관통 도메인(예를 들어, 서열번호 24) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 CD28 막관통 도메인(예를 들면, 서열번호 26) 또는 이의 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 막관통 도메인; 및
- [0376] - TNFR2 세포내 도메인(예를 들면, 서열번호 34) 또는 이의 단편 또는 변이체, 4-1BB 세포내 도메인(예를 들면, 서열번호 36) 또는 이의 단편 또는 변이체, CD27 세포내 도메인(예를 들어, 서열번호 38) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 CD28 세포내 도메인(예를 들어, 서열번호 40) 또는 이의 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 공자극 세포내 신호전달 도메인,
- [0377] 여기서, 막관통 도메인 및 공자극 세포내 신호전달 도메인 중의 적어도 하나는 TNFR2 막관통 또는 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체이다.
- [0378] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 다음을 포함한다:

- [0379] - 적어도 하나의 세포외 결합 도메인;
- [0380] - CD8(예를 들어, 서열번호 14) 또는 이의 단편 또는 변이체, CD28(예를 들어, 서열번호 20) 또는 이의 단편 또는 변이체, IgG4(예를 들면, 서열번호 16) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 IgD(예를 들어, 서열번호 18) 또는 이의 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 힌지 도메인;
- [0381] - TNFR2 막관통 도메인(예를 들어, 서열번호 22) 또는 이의 단편 또는 변이체, CD8 막관통 도메인(예를 들어, 서열번호 24) 또는 단편 또는 변이체, 및 CD28 막관통 도메인(예를 들면, 서열번호 26) 또는 이의 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 막관통 도메인; 및
- [0382] - TNFR2 세포내 도메인(예를 들면, 서열번호 34) 또는 이의 단편 또는 변이체, 4-1BB 세포내 도메인(예를 들면, 서열번호 36) 또는 이의 단편 또는 변이체, CD27 세포내 도메인(예를 들어, 서열번호 38) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 CD28 세포내 도메인(예를 들어, 서열번호 40) 또는 이의 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 공자극 세포내 신호전달 도메인,
- [0383] 여기서, 막관통 도메인 및 공자극 세포내 신호전달 도메인 중의 적어도 하나는 TNFR2 막관통 또는 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체이다. 특정 실시형태에서, 적어도 하나의 힌지 도메인은 CD8 힌지 도메인(예를 들면, 서열번호 14)이다.
- [0384] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 다음을 포함한다:
- [0385] - 적어도 하나의 세포외 결합 도메인,
- [0386] - 임의로 적어도 하나의 세포외 힌지 도메인,
- [0387] - 적어도 하나의 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체,
- [0388] - 적어도 하나의 세포내 공자극 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체, 및
- [0389] - 적어도 하나의 T 세포 1차 신호전달 세포내 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체, 여기서, 막관통 도메인 및 공자극 세포내 신호전달 도메인 중의 하나 이상은 TNFR2 막관통 또는 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체이다.
- [0390] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 다음을 포함한다:
- [0391] - 적어도 하나의 세포외 결합 도메인;
- [0392] - TNFR2 막관통 도메인(예를 들어, 서열번호 22) 또는 이의 단편 또는 변이체, CD8 막관통 도메인(예를 들어, 서열번호 24) 또는 단편 또는 변이체, CD28 막관통 도메인(예를 들면, 서열번호 26) 또는 이의 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 막관통 도메인;
- [0393] - TNFR2 세포내 도메인(예를 들면, 서열번호 34) 또는 이의 단편 또는 변이체, 4-1BB 세포내 도메인(예를 들면, 서열번호 36) 또는 이의 단편 또는 변이체, CD27 세포내 도메인(예를 들어, 서열번호 38) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 CD28 세포내 도메인(예를 들어, 서열번호 40) 또는 이의 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 공자극 세포내 신호전달 도메인; 및
- [0394] - 적어도 하나의 CD3 제타 1차 세포내 신호전달 도메인(예를 들면, 서열번호 28, 29, 30 또는 31) 또는 이의 단편 또는 변이체;
- [0395] 여기서, 막관통 도메인 및 공자극 세포내 신호전달 도메인 중의 적어도 하나는 TNFR2 막관통 또는 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체이다.
- [0396] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 다음을 포함한다:
- [0397] - 적어도 하나의 세포외 결합 도메인;
- [0398] - CD8(예를 들어, 서열번호 14) 또는 이의 단편 또는 변이체, CD28(예를 들어, 서열번호 20) 또는 이의 단편 또는 변이체, IgG4(예를 들어, 서열번호 16) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 IgD(예를 들어, 서열번호 18) 또는 이의 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 힌지 도메인;
- [0399] - TNFR2(예를 들면, 서열번호 22) 또는 이의 단편 또는 변이체, CD8 막관통 도메인(예를 들면, 서열번호 24) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 CD28 막관통 도메인(예를 들면, 서열번호 26) 또는 이의 단편 또는 변이체로 이

루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 막관통 도메인;

- [0400] - TNFR2 세포내 도메인(예를 들면, 서열번호 34) 또는 이의 단편 또는 변이체, 4-1BB 세포내 도메인(예를 들면, SEQ ID NO 36) 또는 이의 단편 또는 변이체, CD27 세포내 도메인(예를 들어, 서열번호 38) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 CD28 세포내 도메인(예를 들어, 서열번호 40) 또는 이의 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나의 공자극 세포내 신호전달 도메인; 및
- [0401] - 적어도 하나의 CD3 제타 1차 세포내 신호전달 도메인(예를 들면, 서열번호 28, 29, 30 또는 31) 또는 이의 단편 또는 변이체;
- [0402] 여기서, 막관통 도메인 및 공자극 세포내 신호전달 도메인 중의 적어도 하나는 TNFR2 막관통 또는 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체이다. 특정 실시형태에서, 적어도 하나의 힌지 도메인은 CD8 힌지 도메인(예를 들면, 서열번호 14)이다.
- [0403] 일부 실시형태에 따르면, 본 발명의 CAR은 다음을 포함한다:
- [0404] - 적어도 하나의 세포외 결합 도메인,
- [0405] - 임의로 적어도 하나의 세포외 힌지 도메인,
- [0406] - 적어도 하나의 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체,
- [0407] - 적어도 2개의 세포내 공자극 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체, 및
- [0408] - 임의로 적어도 하나의 T 세포 1차 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체, 여기서 막관통 도메인 및/또는 공자극 세포내 신호전달 도메인 중의 적어도 하나는 TNFR2 막관통 또는 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체이다.
- [0409] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 다음을 포함한다:
- [0410] - 적어도 하나의 세포외 결합 도메인;
- [0411] - TNFR2(예를 들어, 서열번호 22) 또는 이의 단편 또는 변이체, CD8 막관통 도메인(예를 들어, 서열번호 24) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 CD28 막관통 도메인(예를 들면, 서열번호 26) 또는 이의 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 막관통 도메인;
- [0412] - TNFR2 세포내 도메인(예를 들면, 서열번호 34) 또는 이의 단편 또는 변이체, 4-1BB 세포내 도메인(예를 들면, 서열번호 36) 또는 이의 단편 또는 변이체, CD27 세포내 도메인(예를 들어, 서열번호 38) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 CD28 세포내 도메인(예를 들어, 서열번호 40) 또는 이의 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 2개의 공자극 세포내 신호전달 도메인; 및
- [0413] - 임의로 적어도 하나의 CD3 제타 1차 세포내 신호전달 도메인(예를 들면, 서열번호 28, 29, 30 또는 31) 또는 이의 단편 또는 변이체;
- [0414] 여기서, 막관통 도메인 및/또는 공자극 세포내 신호전달 도메인 중의 적어도 하나는 TNFR2 막관통 또는 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체이다.
- [0415] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 다음을 포함한다:
- [0416] - 적어도 하나의 세포외 결합 도메인;
- [0417] - CD8(예를 들어, 서열번호 14) 또는 이의 단편 또는 변이체, CD28(예를 들어, 서열번호 20) 또는 이의 단편 또는 변이체, IgG4(예를 들면, 서열번호 16) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 IgD(예를 들어, 서열번호 18) 또는 이의 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 힌지 도메인;
- [0418] - TNFR2(예를 들면, 서열번호 22) 또는 이의 단편 또는 변이체, CD8 막관통 도메인(예를 들면, 서열번호 24) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 CD28 막관통 도메인(예를 들면, 서열번호 26) 또는 이의 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 막관통 도메인;
- [0419] - TNFR2 세포내 도메인(예를 들면, 서열번호 34) 또는 이의 단편 또는 변이체, 4-1BB 세포내 도메인(예를 들면, 서열번호 36) 또는 이의 단편 또는 변이체, CD27 세포내 도메인(예를 들어, 서열번호 38) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 CD28 세포내 도메인(예를 들어, 서열번호 40) 또는 이의 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터

선택된 적어도 2개의 공자극 세포내 신호전달 도메인; 및

- [0420] - 임의로 적어도 하나의 CD3 제타 1차 세포내 신호전달 도메인(예를 들면, 서열번호 28, 29, 30 또는 31) 또는 이의 단편 또는 변이체;
- [0421] 여기서, 막관통 도메인 및/또는 공자극 세포내 신호전달 도메인 중의 적어도 하나는 TNFR2 막관통 또는 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체이다. 특정 실시형태에서, 적어도 하나의 힌지 도메인은 CD8 힌지 도메인(예를 들면, 서열번호 14)이다.
- [0422] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 다음을 포함한다:
- [0423] - 적어도 하나의 세포외 결합 도메인,
- [0424] - 임의로 적어도 하나의 세포외 힌지 도메인,
- [0425] - 적어도 하나의 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체,
- [0426] - 적어도 3개의 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체, 및
- [0427] - 임의로 적어도 하나의 T 세포 1차 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체,
- [0428] 여기서, 막관통 도메인 및/또는 공자극 세포내 신호전달 도메인 중의 적어도 하나는 TNFR2 막관통 또는 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체이다.
- [0429] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 다음을 포함한다:
- [0430] - 적어도 하나의 세포외 결합 도메인;
- [0431] - TNFR2(예를 들어, 서열번호 22) 또는 이의 단편 또는 변이체, CD8 막관통 도메인(예를 들어, 서열번호 24) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 CD28 막관통 도메인(예를 들면, 서열번호 26) 또는 이의 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 막관통 도메인;
- [0432] - TNFR2 세포내 도메인(예를 들면, 서열번호 34) 또는 이의 단편 또는 변이체, 4-1BB 세포내 도메인(예를 들면, 서열번호 36) 또는 이의 단편 또는 변이체, CD27 세포내 도메인(예를 들어, 서열번호 38) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 CD28 세포내 도메인(예를 들어, 서열번호 40) 또는 이의 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 3개의 공자극 세포내 신호전달 도메인; 및
- [0433] - 임의로 적어도 하나의 CD3 제타 1차 세포내 신호전달 도메인(예를 들면, 서열번호 28, 29, 30 또는 31) 또는 이의 단편 또는 변이체;
- [0434] 여기서, 막관통 도메인 및/또는 공자극 세포내 신호전달 도메인 중의 적어도 하나는 TNFR2 막관통 또는 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체이다.
- [0435] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 다음을 포함한다:
- [0436] - 적어도 하나의 세포외 결합 도메인;
- [0437] - CD8(예를 들어, 서열번호 14) 또는 이의 단편 또는 변이체, CD28(예를 들어, 서열번호 20) 또는 이의 단편 또는 변이체, IgG4(예를 들면, 서열번호 16) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 IgD(예를 들어, 서열번호 18) 또는 이의 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 힌지 도메인;
- [0438] - TNFR2(예를 들어, 서열번호 22) 또는 이의 단편 또는 변이체, CD8 막관통 도메인(예를 들어, 서열번호 24) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 CD28 막관통 도메인(예를 들면, 서열번호 26) 또는 이의 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 막관통 도메인;
- [0439] - TNFR2 세포내 도메인(예를 들어, 서열번호 34) 또는 이의 단편 또는 변이체, 4-1BB 세포내 도메인(예를 들어, 서열번호 36) 또는 이의 단편 또는 변이체, CD27 세포내 도메인(예를 들어, 서열번호 38) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 CD28 세포내 도메인(예를 들어, 서열번호 40) 또는 이의 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 3개의 공자극 세포내 신호전달 도메인; 및
- [0440] - 임의로 적어도 하나의 CD3 제타 1차 세포내 신호전달 도메인(예를 들면, 서열번호 28, 29, 30 또는 31) 또는 이의 단편 또는 변이체;
- [0441] 여기서, 막관통 도메인 및/또는 공자극 세포내 신호전달 도메인 중의 적어도 하나는 TNFR2 막관통 또는 공자극

세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체이다. 특정 실시형태에서, 적어도 하나의 힌지 도메인은 CD8 힌지 도메인(예를 들면, 서열번호 14)이다.

- [0442] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 다음을 포함한다:
- [0443] - 적어도 하나의 세포외 결합 도메인,
- [0444] - 임의로 적어도 하나의 세포외 힌지 도메인,
- [0445] - 적어도 하나의 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체,
- [0446] - 적어도 4개의 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체, 및
- [0447] - 임의로 적어도 하나의 T 세포 1차 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체,
- [0448] 여기서, 막관통 도메인 및/또는 공자극 세포내 신호전달 도메인 중의 적어도 하나는 TNFR2 막관통 또는 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체이다.
- [0449] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 다음을 포함한다:
- [0450] - 적어도 하나의 세포외 결합 도메인;
- [0451] - TNFR2(예를 들어, 서열번호 22) 또는 이의 단편 또는 변이체, CD8 막관통 도메인(예를 들어, 서열번호 24) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 CD28 막관통 도메인(예를 들면, 서열번호 26) 또는 이의 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 막관통 도메인;
- [0452] - TNFR2 세포내 도메인(예를 들면, 서열번호 34) 또는 이의 단편 또는 변이체, 4-1BB 세포내 도메인(예를 들면, 서열번호 36) 또는 이의 단편 또는 변이체, CD27 세포내 도메인(예를 들어, 서열번호 38) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 CD28 세포내 도메인(예를 들어, 서열번호 40) 또는 이의 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 4개의 공자극 세포내 신호전달 도메인; 및
- [0453] - 임의로 적어도 하나의 CD3 제타 1차 세포내 신호전달 도메인(예를 들면, 서열번호 28, 29, 30 또는 31) 또는 이의 단편 또는 변이체;
- [0454] 여기서, 막관통 도메인 및/또는 공자극 세포내 신호전달 도메인 중의 적어도 하나는 TNFR2 막관통 또는 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체이다.
- [0455] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 다음을 포함한다:
- [0456] - 적어도 하나의 세포외 결합 도메인;
- [0457] - CD8(예를 들어, 서열번호 14) 또는 이의 단편 또는 변이체, CD28(예를 들어, 서열번호 20) 또는 이의 단편 또는 변이체, IgG4(서열번호 16) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 IgD(예를 들어, 서열번호 18) 또는 이의 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 힌지 도메인;
- [0458] - TNFR2 막관통 도메인(예를 들어, 서열번호 22) 또는 이의 단편 또는 변이체, CD8 막관통 도메인(예를 들어, 서열번호 24) 또는 단편 또는 변이체, 및 CD28 막관통 도메인(예를 들면, 서열번호 26) 또는 이의 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 막관통 도메인;
- [0459] - TNFR2 세포내 도메인(예를 들면, 서열번호 34) 또는 이의 단편 또는 변이체, 4-1BB 세포내 도메인(예를 들면, 서열번호 36) 또는 이의 단편 또는 변이체, CD27 세포내 도메인(예를 들어, 서열번호 38) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 CD28 세포내 도메인(예를 들어, 서열번호 40) 또는 이의 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 4개의 공자극 세포내 신호전달 도메인; 및
- [0460] - 임의로 적어도 하나의 CD3 제타 1차 세포내 신호전달 도메인(예를 들면, 서열번호 28, 29, 30 또는 31) 또는 이의 단편 또는 변이체;
- [0461] 여기서, 막관통 도메인 및/또는 공자극 세포내 신호전달 도메인 중의 적어도 하나는 TNFR2 막관통 또는 TNFR2 공자극 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체이다. 특정 실시형태에서, 적어도 하나의 힌지 도메인은 CD8 힌지 도메인(예를 들면, 서열번호 14)이다.
- [0462] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 다음을 포함한다:

- [0463] - 적어도 하나의 세포외 결합 도메인,
- [0464] - 임의로 적어도 하나의 세포외 힌지 도메인,
- [0465] - 적어도 1, 2 또는 3개의 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체, 및
- [0466] - 임의로 적어도 하나의 T 세포 1차 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체,
- [0467] 여기서, 막관통 도메인 중의 적어도 하나는 TNFR2 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체이다.
- [0468] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 다음을 포함한다:
- [0469] - 적어도 하나의 세포외 결합 도메인;
- [0470] - TNFR2 막관통 도메인(예를 들면, 서열번호 22) 또는 이의 단편 또는 변이체, CD8 막관통 도메인(예를 들면, 서열번호 24) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 CD28 막관통 도메인(예를 들어, 서열번호 26) 또는 이의 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 1, 2 또는 3개의 막관통 도메인; 및
- [0471] - 임의로 적어도 하나의 CD3 제타 1차 세포내 신호전달 도메인(예를 들면, 서열번호 28, 29, 30 또는 31) 또는 이의 단편 또는 변이체;
- [0472] 여기서, 막관통 도메인 중 적어도 하나는 TNFR2 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체이다.
- [0473] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 다음을 포함한다:
- [0474] - 적어도 하나의 세포외 결합 도메인;
- [0475] - CD8(예를 들어, 서열번호 14) 또는 이의 단편 또는 변이체, CD28(예를 들어, 서열번호 20) 또는 이의 단편 또는 변이체, IgG4(예를 들면, 서열번호 16) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 IgD(예를 들어, 서열번호 18) 또는 이의 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 힌지 도메인;
- [0476] - TNFR2(예를 들어, 서열번호 22) 또는 이의 단편 또는 변이체, CD8 막관통 도메인(예를 들어, 서열번호 24) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 CD28 막관통 도메인(예를 들어, 서열번호 26) 또는 이의 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 1, 2 또는 3개의 막관통 도메인; 및
- [0477] - 임의로 적어도 하나의 CD3 제타 1차 세포내 신호전달 도메인(예를 들면, 서열번호 28, 29, 30 또는 31) 또는 이의 단편 또는 변이체;
- [0478] 여기서, 막관통 도메인 중의 적어도 하나는 TNFR2 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체이다. 특정 실시 형태에서, 적어도 하나의 힌지 도메인은 CD8 힌지 도메인(예를 들면, 서열번호 14)이다.
- [0479] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 다음을 포함한다:
- [0480] - 적어도 하나의 세포외 결합 도메인,
- [0481] - 임의로 적어도 하나의 세포외 힌지 도메인,
- [0482] - 적어도 1, 2 또는 3개의 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체,
- [0483] - 적어도 1, 2, 3 또는 4개의 세포내 공자극 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체, 및
- [0484] - 임의로 적어도 하나의 T 세포 1차 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체,
- [0485] 여기서, 막관통 도메인 및/또는 공자극 세포내 신호전달 도메인 중의 적어도 하나는 TNFR2 막관통 또는 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체이다.
- [0486] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 다음을 포함한다:
- [0487] - 적어도 하나의 세포외 결합 도메인;
- [0488] - TNFR2 막관통 도메인(예를 들면, 서열번호 22) 또는 이의 단편 또는 변이체, CD8 막관통 도메인(예를 들면, 서열번호 24) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 CD28 막관통 도메인(예를 들어, 서열번호 26) 또는 이의 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 1, 2 또는 3개의 막관통 도메인;
- [0489] - TNFR2 세포내 도메인(예를 들면, 서열번호 34) 또는 이의 단편 또는 변이체, 4-1BB 세포내 도메인(예를 들면, 서열번호 36) 또는 이의 단편 또는 변이체, CD27 세포내 도메인(예를 들면, 서열번호 38) 또는 이의 단편 또는

변이체, 및 CD28 세포내 도메인(예를 들어, 서열번호 40) 또는 이의 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3 또는 4개의 공자극 세포내 신호전달 도메인; 및

- [0490] - 임의로 적어도 하나의 CD3 제타 1차 신호전달 도메인(예를 들면, 서열번호 28, 29, 30 또는 31) 또는 이의 단편 또는 변이체;
- [0491] 여기서, 막관통 도메인 및/또는 공자극 세포내 신호전달 도메인 중의 적어도 하나는 TNFR2 막관통 또는 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체이다.
- [0492] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 다음을 포함한다:
- [0493] - 적어도 하나의 세포외 결합 도메인;
- [0494] - CD8(예를 들어, 서열번호 14) 또는 이의 단편 또는 변이체, CD28(예를 들어, 서열번호 20) 또는 이의 단편 또는 변이체, IgG4(예를 들면, 서열번호 16) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 IgD(예를 들어, 서열번호 18) 또는 이의 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 힌지 도메인;
- [0495] - TNFR2 막관통 도메인(예를 들어, 서열번호 22) 또는 이의 단편 또는 변이체, CD8 막관통 도메인(예를 들어, 서열번호 24) 또는 이의 단편 또는 변이체, 또는 CD28 막관통 도메인(예를 들면, 서열번호 26) 또는 이의 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 1, 2 또는 3개의 막관통 도메인;
- [0496] - TNFR2 세포내 도메인(예를 들면, 서열번호 34) 또는 이의 단편 또는 변이체, 4-1BB 세포내 도메인(예를 들면, 서열번호 36) 또는 이의 단편 또는 변이체, CD27 세포내 도메인(예를 들어, 서열번호 38) 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 CD28 세포내 도메인(예를 들어, 서열번호 40) 또는 이의 단편 또는 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3 또는 4개의 공자극 세포내 신호전달 도메인; 및
- [0497] - 임의로 적어도 하나의 CD3 제타 1차 신호전달 도메인(예를 들면, 서열번호 28, 29, 30 또는 31) 또는 이의 단편 또는 변이체;
- [0498] 여기서, 막관통 도메인 및/또는 공자극 세포내 신호전달 도메인 중의 적어도 하나는 TNFR2 막관통 또는 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체이다. 특정 실시형태에서, 적어도 하나의 힌지 도메인은 CD8 힌지 도메인(예를 들면, 서열번호 14)이다.
- [0499] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 다음을 포함한다:
- [0500] - 적어도 하나의 세포외 결합 도메인,
- [0501] - 임의로 적어도 하나의 세포외 힌지 도메인,
- [0502] - 적어도 하나의 막관통 도메인,
- [0503] - 적어도 하나의 세포내 도메인, 여기서 적어도 하나의 세포내 도메인은 적어도 하나의 1차 세포내 신호전달 도메인 및 임의로 적어도 하나의 공자극 세포내 신호전달 도메인을 포함하고,
- [0504] 적어도 하나의 막관통 도메인은 인간 TNFR2 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체 또는 임의의 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체 또는 이들의 조합이고/이거나, 적어도 하나의 공자극 세포내 신호전달 도메인은 인간 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체 또는 임의의 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체 또는 이들의 조합이고, 여기서 막관통 도메인 및 공자극 세포내 신호전달 도메인 중의 적어도 하나는 TNFR2 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체 또는 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체이다.
- [0505] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은, 인간 CD8의 힌지 영역, 인간 TNFR2의 막관통 도메인, 인간 TNFR2의 공자극 세포내 신호전달 도메인, 및 인간 CD3 ζ 쇄의 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 서열을 포함하고, 여기서 상기 서열은 서열번호 48의 아미노산 서열, 또는 서열번호 48과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열에 상응한다.
- [0506] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은, 서열번호 48의 아미노산 서열 또는 서열번호 48과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열에 연결된, 항-HLA-A2 scFv(예를 들면, 서열번호 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106 또는 107의 결합

도메인 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐)를 포함한다.

- [0507] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은, 서열번호 48의 아미노산 서열, 또는 서열번호 48과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열에 연결된, 항-IL-23R scFv(예를 들면, 서열 65, 66 또는 67의 결합 도메인 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐)를 포함한다.
- [0508] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은, 서열번호 48의 아미노산 서열, 또는 서열번호 48과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열에 연결된, 항-CD19 scFv(예를 들면, 서열번호 1 또는 2의 결합 도메인 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐)를 포함한다.
- [0509] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은, 서열번호 48의 아미노산 서열, 또는 서열번호 48과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열 또는 아미노산 서열에 연결된, 항-CD20 scFv(예를 들면, 서열번호 4, 5 또는 6의 결합 도메인을 포함하거나 이들로 이루어짐)를 포함한다.
- [0510] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은, 인간 CD8의 힌지 영역, 인간 TNFR2의 막관통 도메인, 인간 TNFR2의 공자극 세포내 신호전달 도메인 및 인간 CD3 ζ 쇠의 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 서열을 포함하고, 여기서 상기 서열은 서열번호 49, 50, 51 또는 110의 아미노산 서열, 또는 서열번호 49, 50, 51 또는 110과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열에 상응한다.
- [0511] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은, 서열번호 49, 50, 51 또는 110의 아미노산 서열, 또는 서열번호 49, 50, 51 또는 110과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열에 연결된, 항-HLA-A2 scFv(예를 들면, 서열번호 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106 또는 107의 결합 도메인 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐)을 포함한다.
- [0512] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은, 서열번호 49, 50, 51 또는 110의 아미노산 서열, 또는 서열번호 49, 50, 51 또는 110과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열에 연결된, 항-IL-23R scFv(예를 들면, 서열번호 65, 66 또는 67의 결합 도메인 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐)를 포함한다.
- [0513] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은, 서열번호 49, 50, 51 또는 110의 아미노산 서열, 또는 서열번호 49, 50, 51 또는 110과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열에 연결된, 항-CD19 scFv(예를 들면, 서열번호 1 또는 2의 결합 도메인 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐)를 포함한다.
- [0514] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은, 서열번호 49, 50, 51 또는 110의 아미노산 서열, 또는 서열번호 49, 50, 51 또는 110과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열에 연결된 항-CD20 scFv(예를 들면, 서열번호 4, 5 또는 6의 결합 도메인 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐)를 포함한다.
- [0515] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은, 인간 CD8의 힌지 영역, 인간 TNFR2의 막관통 도메인 및 인간 CD3 ζ 쇠의 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 서열을 포함하며, 여기서 상기 서열은 서열번호 52의 아미노산 서열, 또는 서열번호 52와 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열에 상응한다.
- [0516] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은, 서열번호 52의 아미노산 서열, 또는 서열번호 52와 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열에 연결된 항-HLA-A2 scFv(예를 들면, 서열번호 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106 또는 107의 결합 도메인 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐)를 포함한다.
- [0517] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은, 서열번호 52의 아미노산 서열, 또는 서열번호 52와 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열에 연결된 항-IL-23R scFv(예를 들면, 서열 65, 66 또는 67의 결합 도메인 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐)를 포함한다.
- [0518] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은, 서열번호 52의 아미노산 서열, 또는 서열번호 52와 적어도 약 70%, 75%,

80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열에 연결된 항-CD19 scFv(예를 들면, 서열번호 1 또는 2의 결합 도메인 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐)를 포함한다.

- [0519] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은, 서열번호 52의 아미노산 서열, 또는 서열번호 52와 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열에 연결된 항-CD20 scFv(예를 들면, 서열번호 4, 5 또는 6의 결합 도메인 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐)를 포함한다.
- [0520] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은, 인간 CD8의 힌지 영역, 인간 CD8의 막관통 도메인, 인간 CD3 ζ 3개의 1차 세포내 신호전달 도메인 및 인간 TNFR2의 공자극 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 서열을 포함하고, 여기서 상기 서열은 서열번호 53의 아미노산 서열 또는 서열번호 53과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열에 상응한다.
- [0521] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은, 서열번호 53의 아미노산 서열, 또는 서열번호 53과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열에 연결된 항-HLA-A2 scFv(예를 들면, 서열번호 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106 또는 107의 결합 도메인 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐)을 포함한다.
- [0522] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은, 서열번호 53의 아미노산 서열, 또는 서열번호 53과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열에 연결된 항-IL-23R scFv(예를 들면, 서열 65, 66 또는 67의 결합 도메인 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐)를 포함한다.
- [0523] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은, 서열번호 53의 아미노산 서열, 또는 서열번호 53과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열에 연결된 항-CD19 scFv(예를 들면, 서열번호 1 또는 2의 결합 도메인 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐)를 포함한다.
- [0524] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은, 서열번호 53의 아미노산 서열, 또는 서열번호 53과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열에 연결된 항-CD20 scFv(예를 들면, 서열번호 4, 5 또는 6의 결합 도메인 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐)를 포함한다.
- [0525] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은, 인간 CD8의 힌지 영역, 인간 CD8의 막관통 도메인, 인간 TNFR2의 공자극 세포내 신호전달 도메인 및 인간 CD3 ζ 3개의 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 서열을 포함하고, 여기서 상기 서열은 서열번호 54의 아미노산 서열, 또는 서열번호 54와 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열에 상응한다.
- [0526] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은, 서열번호 54의 아미노산 서열, 또는 서열번호 54와 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열에 연결된 항-HLA-A2 scFv(예를 들면, 서열번호 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106 또는 107의 결합 도메인 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐)를 포함한다.
- [0527] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은, 서열번호 54의 아미노산 서열, 또는 서열번호 54와 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열에 연결된 항-IL-23R scFv(예를 들면, 서열 65, 66 또는 67의 결합 도메인 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐)를 포함한다.
- [0528] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은, 서열번호 54의 아미노산 서열, 또는 서열번호 54와 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열에 연결된 항-CD19 scFv(예를 들면, 서열번호 1 또는 2의 결합 도메인 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐)를 포함한다.
- [0529] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은, 서열번호 54의 아미노산 서열, 또는 서열번호 54와 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열에 연결된 항-CD20 scFv(예를 들면, 서열번호 4, 5 또는 6의 결합 도메인 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐)를 포함한다.
- [0530] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은, 인간 CD8의 힌지 영역, 인간 CD8 막관통 도메인 및 인간 TNFR2 막관통 도메인의 조합, 인간 TNFR2의 공자극 세포내 신호전달 도메인 및 인간 CD3 ζ 3개의 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 서열을 포함하고, 여기서, 상기 서열은 서열번호 55, 56 또는 57의 아미노산 서열, 또는 서열번호 55, 56 또는 57과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성

을 갖는 아미노산 서열에 상응한다.

- [0531] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은, 서열번호 55, 56 또는 57의 아미노산 서열, 또는 서열번호 55, 56 또는 57과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열에 연결된 항-HLA-A2 scFv(예를 들면, 서열번호 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106 또는 107의 결합 도메인 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐)을 포함한다.
- [0532] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은, 서열번호 55, 56 또는 57의 아미노산 서열, 또는 서열번호 55, 56 또는 57과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열에 연결된 항-IL-23R scFv(예를 들면, 서열번호 65, 66 또는 67의 결합 도메인 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐)를 포함한다.
- [0533] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은, 서열번호 55, 56 또는 57의 아미노산 서열, 또는 서열번호 55, 56 또는 57과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열에 연결된 항-CD19 scFv(예를 들면, 서열번호 1 또는 2의 결합 도메인 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐)를 포함한다.
- [0534] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은, 서열번호 55, 56 또는 57의 아미노산 서열, 또는 서열번호 55, 56 또는 57과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열에 연결된 항-CD20 scFv(예를 들면, 서열번호 4, 5 또는 6의 결합 도메인 서열을 포함하거나 이들로 이루어짐)를 포함한다.
- [0535] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR(예를 들면, TNFR2 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체 및/또는 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 본원에 기재된 임의의 CAR)은 적어도 하나의 다음 특성을 갖는다:
- [0536] a) 막관통 도메인이 CD8 막관통 도메인이고, 공자극 세포내 신호전달 도메인이 4-1BB 공자극 세포내 신호전달 도메인인 것을 제외하고는, 동일한 서열을 갖는 CAR보다 세포 표면에서 보다 낮은 발현을 나타내고;
- [0537] b) 막관통 도메인이 CD8 막관통 도메인이고, 공자극 세포내 신호전달 도메인이 4-1BB 공자극 세포내 신호전달 도메인인 것을 제외하고는, 동일한 서열을 갖는 CAR과 유사한 수준의 CAR-특이적 활성화를 나타내고;
- [0538] c) 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20일 이상의 배양일 후에, FoxP3, Helios 및 CD62L 중의 하나 이상(예를 들면, 모두) 등의 조절 T 세포 마커의 세포 표면 수준을 감소시키지 않고;
- [0539] d) 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20일 이상의 배양일 후에, CD127 등의 비-조절 T 세포 마커의 세포 표면 수준을 증가시키지 않는다.
- [0540] 면역 세포
- [0541] 본 발명은 또한, 본원에 기재된 CAR을 발현하는 면역 세포 및 이러한 면역 세포의 집단에 관한 것이다.
- [0542] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR을 코딩하는 핵산은, 면역 세포에 도입되어 세포 표면에서 CAR을 발현하는 조작된 세포를 생성한다.
- [0543] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "면역 세포"는 일반적으로 골수에서 생산된 조혈 줄기 세포(HSC)로부터 유래된 백혈구(백혈구)를 포함한다. 면역 세포의 예는 림프구(T 세포, B 세포 및 천연 킬러(NK) 세포) 및 골수 유래 세포(호중구, 호산구, 호염기구, 단핵구, 마크로파지, 수지상 세포)를 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.
- [0544] 일부 실시형태에서, 본 발명의 면역 세포는 TNFR2 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체 및/또는 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하는 키메라 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된다.
- [0545] 일부 실시형태에서, 본 발명의 면역 세포는, 포유동물 면역 세포, 예를 들면, 인간 면역 세포, 농장 동물(예를 들면, 소, 돼지 또는 말)의 면역 세포, 또는 애완동물(예를 들어, 고양이 또는 개)의 면역 세포이다.
- [0546] 일부 실시형태에서, 면역 세포는 림프구, 골수-유래 세포 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선

택된다. 특정 실시형태에서, 면역 세포는, 림프구이고, 예를 들면, T 세포, B 세포, 천연 킬러(NK) 세포 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 면역 세포는 T 세포이고, 특정 실시형태에서 $CD4^+$ T 세포, $CD8^+$ T 세포, $\gamma \delta$ T 세포, 이중 음성(DN) T 세포, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 면역 세포는 $CD4^+$ T 세포, 예를 들면, T 헬퍼 세포, 조절 T 세포, 효과기 T 세포 및 이들의 임의의 조합이다. 일부 실시형태에서, 면역 세포는 $CD8^+$ T 세포, 예를 들면, 세포 독성 $CD8^+$ T 세포 또는 $CD8^+$ 조절 T 세포이다. 일부 실시형태에서, 면역 세포는 $\gamma \delta$ T 세포이다. 일부 실시형태에서, 면역 세포는 정의된 감마 델타 TCR(TEG $\gamma \delta$) 세포를 발현하도록 조작된 T 세포이다. 일부 실시형태에서, 면역 세포는 DN T 세포이다. 일부 실시형태에서, 면역 세포는 B 세포이다. 일부 실시형태에서, 면역 세포는 NK 세포이다.

- [0547] 일부 실시형태에서, 면역 세포는 골수-유래 세포이고, 예를 들면, 호중구, 호산구, 호염기구, 단핵구, 마크로파지, 수지상 세포, 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 면역 세포는 마크로파지이다. 특정 실시형태에서, 면역 세포는 수지상 세포이다.
- [0548] 일부 실시형태에서, 면역 세포는 조절 면역 세포, 예를 들면, 세포 요법에 사용하기에 적합한 임의의 조절 면역 세포이다. 특정 실시형태에서, 조절 면역 세포는 조절 T 세포, $CD4^+$ 조절 T 세포, $CD8^+$ 조절 T 세포, 조절 $\gamma \delta$ T 세포, 조절 DN T 세포, 조절 B 세포, 조절 NK 세포, 조절 마크로파지, 조절 수지상 세포, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다,
- [0549] 일부 실시형태에서, 조절 면역 세포는 조절 T 세포(Treg), 특히 흉선 유래 Treg 또는 적응성 또는 유도성 Treg이다. 특정 실시형태에서, 면역 세포는 $CD4^+$ 조절 T 세포(Treg)이다. 특정 실시형태에서, Treg는 흉선 유래 Treg 또는 적응성 또는 유도성 Treg이다. 특정 실시형태에서, Treg는 $CD4^+$ FoxP3⁺ 조절 T 세포 또는 $CD4^+$ FoxP3 조절 T 세포(Tr1 세포)이다. 특정 실시형태에서, 면역 세포는 $CD4^+$ FoxP3⁺ 조절 T 세포이다.
- [0550] 일부 실시형태에서, 면역 세포는 $CD8^+$ 조절 T 세포이다. $CD8^+$ 조절 T 세포는 $CD8^+$ $CD28^-$ 조절 T 세포, $CD8^+$ $CD103^+$ 조절 T 세포, $CD8^+$ Foxp3⁺ 조절 T 세포, $CD8^+$ $CD122^+$ 조절 T 세포 및 이들의 임의의 조합을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.
- [0551] 일부 실시형태에서, 조절 면역 세포는 조절 $\gamma \delta$ T 세포이다.
- [0552] 일부 실시형태에서, 조절 면역 세포는 조절 DN T 세포이다.
- [0553] 일부 실시형태에서, 조절 면역 세포는 조절 B 세포이다. 조절 B 세포의 예는 $CD19^+$ $CD24^{hi}$ $CD38^{hi}$ B 세포를 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.
- [0554] 일부 실시형태에서, 조절 면역 세포는 조절 NK 세포이다.
- [0555] 일부 실시형태에서, 조절 면역 세포는 조절 마크로파지이다.
- [0556] 일부 실시형태에서, 조절 면역 세포는 조절 수지상 세포이다.
- [0557] 일부 실시형태에서, 면역 세포는 효과기 면역 세포, 예를 들면, 세포 요법에 사용하기에 적합한 임의의 효과기 면역 세포이다. 특정 실시형태에서, 효과기 면역 세포는 효과기 T 세포, $CD4^+$ 효과기 T 세포, $CD8^+$ 효과기 T 세포, 효과기 $\gamma \delta$ T 세포, 효과기 DN T 세포, 효과기 B 세포, 효과기 NK 세포, 효과기 마크로파지, 효과기 수지상 세포 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0558] 일부 실시형태에서, 면역 세포는 효과기 T 세포이다. 특정 실시형태에서, 효과기 면역 세포는 $CD4^+$ 효과기 T 세포이다. $CD4^+$ 효과기 T 세포의 예는 Th1 세포, Th2 세포, Th9 세포, Th17 세포, Th22 세포, $CD4^+$ T 여포 헬퍼(Tfh) 세포, 및 이들의 임의의 조합을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다. 일부 실시형태에서, 효과기 면역 세포는 $CD8^+$ 효과기 T 세포이다. $CD8^+$ 효과기 T 세포의 예는 $CD8^+$ $CD45RO^+$ $CCR7^-$ $CD62L^-$ 효과기 T 세포, $CD8^+$ $CD45RA^+$ $CCR7^-$ $CD62L^-$ 효과기 T 세포, 및 이들의 임의의 조합을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.

- [0559] 한 가지 실시형태에서, 면역 세포는 효과기 $\gamma \delta$ T 세포이다.
- [0560] 한 가지 실시형태에서, 면역 세포는 효과기 DN T 세포이다.
- [0561] 한 가지 실시형태에서, 면역 세포는 효과기 B 세포이다. 효과기 B 세포의 예는 $CD19^+ CD25^{hi}$ B 세포, 활성화된 B 세포 및 형질 세포, 및 이들의 임의의 조합을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.
- [0562] 일부 실시형태에서, 면역 세포는 효과기 NK 세포이다.
- [0563] 일부 실시형태에서, 면역 세포는 효과기 마크로파지이다.
- [0564] 일부 실시형태에서, 면역 세포는 효과기 수지상 세포이다.
- [0565] 일부 실시형태에서, 면역 세포는 T 세포, 천연 킬러(NK) 세포, $\gamma \delta$ T 세포, 이중 음성(DN) 세포, 조절 면역 세포, 조절 T 세포, 효과기 면역 세포, 효과기 T 세포, B 세포 및 골수-유래 세포, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0566] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR을 코딩하는 핵산은 다능성 줄기 세포(PSC)에 도입되고, 이어서 이는 T 세포로 분화될 수 있다. PSC는 체내의 모든 세포 유형을 생성할 수 있는 세포이며, 예를 들면, 배아 줄기 세포(ESC), 체세포 핵 전달에 의해 유도된 PSC 및 유도된 PSC(iPSC)를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "배아 줄기 세포"는 초기 배아로부터 수득된 다능성 줄기 세포를 지칭하고; 일부 실시형태에서, 이 용어는 이전에 확립된 배아 줄기 세포주로부터 수득된 ESC를 지칭하고, 인간 배아의 최근의 파괴에 의해 수득된 줄기 세포를 제외한다.
- [0567] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR을 코딩하는 핵산은, 조혈 줄기 세포(골수 또는 제대혈로부터 단리된 것 등의 HSC), 조혈 전구 세포(예를 들면, 림프구 전구세포 세포) 또는 중간엽 줄기 세포(MSC) 등의 다능성 세포에 도입된다. 다능성 세포는 하나 이상의 세포 유형으로 발달할 수 있지만, 다능 세포보다 세포형 잠재력보다 더 제한적이다. 다능성 세포는, 확립된 세포주에서 유래하거나, 인간 골수 또는 제대에서 단리될 수 있다. 예를 들면, HSC는 G-CSF-유도 동원, 플렉타사포-유도 동원, 또는 이들의 조합 후에, 환자 또는 건강한 공여자로부터 단리될 수 있다. 혈액 또는 골수에서 HSC를 단리하기 위해, 혈액 또는 골수의 세포는 CD4 및 CD8(T 세포), CD45(B 세포), GR-1(과립구) 및 Iad(분화된 항원 제시 세포)에 대한 항체 등의 원하지 않는 세포에 결합하는 항체에 의해 패닝될 수 있다. HSC는 CD34에 대한 항체에 의해 양성으로 선택될 수 있다.
- [0568] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR을 코딩하는 핵산은, 계놈 편집 후에 Treg 세포로 분화되는 비-Treg 림프구 세포로 도입된다. 편집된 비-Treg 세포는, 전술한 바와 같이 환자에게 이식하기 전에 Treg 세포로 분화될 수 있다. 대안적으로, 편집된 비-Treg 세포는, 환자에게 이식된 후, Treg 세포로 분화하도록 유도될 수 있다.
- [0569] 일부 실시형태에서, 분자의 발현 수준은, 유세포 분석, 면역 형광 또는 이미지 분석, 예를 들면, 고품량 분석에 의해 결정된다. 특정 실시형태에서, 분자의 발현 수준은 유세포 분석에 의해 결정된다. 특정 실시예에서, 유세포 분석을 수행하기 전에, 세포를 고정 및 투과 처리하고, 이에 의해 세포내 단백질의 검출을 가능하게 한다.
- [0570] 일부 실시형태에서, 세포 집단에서 분자의 발현 수준을 결정하는 것은, 분자를 발현하는 세포 집단의 세포의 백분율을 결정하는 것을 포함한다(즉, 분자에 대해 세포 "+"). 특정 실시형태에서, 분자를 발현하는 세포의 상기 백분율은 FACS에 의해 측정된다.
- [0571] 용어 "발현하는", "양성" 또는 "+" 및 "발현하지 않는", "음성" 또는 "-"는 당해 기술분야에 공지되어 있으며, 목적의 세포 마커의 발현 수준을 지칭하고, "+"에 상응하는 세포 마커의 발현 수준은 높거나 중등도("+/-"라고도 지칭됨)이고, "-"에 상응하는 세포 마커의 발현 수준은 낮(null)이다.
- [0572] 용어 "낮은" 또는 "lo" 또는 "lo/-"는 당해 기술분야에 공지되어 있으며, 전체적으로 분석되는 세포 집단에서 그 세포 마커의 발현 수준과 비교하여, 세포 마커의 발현 수준이 낮다는 점에서 목적 세포 마커의 발현 수준을 지칭한다. 보다 구체적으로, 용어 "lo"는 하나 이상의 다른 별개의 세포 집단보다 낮은 수준으로 세포 마커를 발현하는 별개의 세포 집단을 지칭한다.
- [0573] 용어 "높은" 또는 "hi" 또는 "밝은"은 당해 기술분야에 공지되어 있으며, 전체적으로 분석되는 세포 집단에서 그 세포 마커의 발현 수준과 비교하여, 세포 마커의 발현 수준이 높다는 점에서 목적 세포 마커의 발현 수준을 지칭한다.
- [0574] 일반적으로, 염색 강도의 상위 2, 3, 4 또는 5%의 세포는 "hi"로 지정되며, 집단의 상위 절반에 속하는 세포는

"+"로 분류된다. 형광 강도의 50% 미만을 하회하는 세포는 "lo" 세포로 지정되고, 5% 미만은 "-" 세포로 지정된다.

- [0575] 목적 세포 마커의 발현 수준은, 이 마커에 특이적인 형광 표지된 항체로 염색된 세포 집단으로부터의 세포의 중앙 형광 강도 또는 평균 형광 강도(MFI)를, 특이성은 무관하지만 동일한 이소형, 동일한 형광 프로브를 갖고 동일한 중으로부터 유래하는 형광 표지된 항체로 염색한 동일한 세포 집단으로부터의 세포(이소형 대조군으로 지칭됨)의 형광 강도(FI)와 비교함으로써 결정된다. 이 마커에 특이적인 형광 표지된 항체로 염색되고 이소형 대조군으로 염색된 세포보다 동등한 MFI 또는 보다 낮은 MFI를 나타내는 집단의 세포는, 이 마커를 발현하지 않는 것으로 간주되고, (-) 또는 음성으로 지정된다. 이 마커에 특이적인 형광 표지된 항체로 염색되고 이소형 대조군으로 염색한 세포보다 우수한 MFI 값을 나타내는 집단으로부터의 세포는 이 마커를 발현하는 것으로 간주되고, (+) 또는 양성으로 지정된다.
- [0576] 본 발명은 또한, 본원에 정의된 바와 같은 단리 및/또는 실질적으로 정제된 면역 세포 집단에 관한 것이다.
- [0577] 따라서, 본 발명은 단리 및/또는 실질적으로 정제된 면역 세포 집단을 제공하며, 여기서 집단의 세포는 본원에 기재된 CAR, 예를 들면, TNFR2 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체, 및/또는 TNFR2 공자극 세포내 신호 전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하는 CAR을 포함한다.
- [0578] 본원에 사용된 바와 같이, "단리된 집단"은, 이의 자연 환경(예를 들어, 말초 혈액)에서 제거되고 단리, 정제 또는 분리되고, 자연에 존재하지만 세포가 단리되는 것에 기초한 세포 표면 마커를 결여하는 다른 세포로부터 적어도 약 75% 유리, 80% 유리, 85% 유리, 및 특정 실시형태에서 약 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 유리된 세포 집단을 지칭한다.
- [0579] 본 발명은 추가로, 본원에 정의된 면역 세포의 풍부한 집단에 관한 것이다.
- [0580] 일부 실시형태에서, 본 발명의 단리된, 정제된 및/또는 풍부화된 면역 세포 집단은 동결 및 해동되었다.
- [0581] 일부 실시형태에서, 본 발명의 면역 세포 집단의 T 세포는, 본원에 기재된 키메라 수용체(CAR)를 발현하고, 따라서 CAR-단일특이성으로 정의될 수 있다(즉, 모든 Treg 세포는 이들이 발현하는 CAR로 동일한 항원을 인식한다). 일부 실시형태에서, Treg 세포 집단은 TCR-단일특이성이다(즉, 모든 Treg 세포는 이들의 TCR로 동일한 항원을 인식한다). 일부 실시형태에서, Treg 세포 집단은, TCR-다중특이성이다(즉, Treg 세포는 이들의 TCR로 상이한 항원을 인식할 수 있다).
- [0582] 일부 실시형태에서, T 세포 집단은 TCR-단일특이성이고, TCR은 항원, 항원의 단편, 항원의 변이체 또는 이들의 혼합물을 인식한다.
- [0583] 일부 실시형태에서, T 세포 집단은 TCR-단일특이성이고, TCR은 일반적 인간 식이로부터의 식품 항원에 대해 특이적이다.
- [0584] 일부 실시형태에서, T 세포 집단은 TCR-단일특이성이고, TCR은, 예를 들면, 다발성 경화증 관련 항원, 관절 관련 항원, 안구 관련 항원, 인간 HSP 항원, 피부 관련 항원 또는 이식편 거부 반응 또는 GVHD에 관련된 항원 등의 자가항원에 대해 특이적이다. 이러한 자가항원의 예가 본원에 제공된다.
- [0585] 일부 실시형태에서, T 세포 집단은 TCR-단일특이성이고, TCR은 흡입된 알레르겐, 섭취된 알레르겐 또는 접촉 알레르겐에 대해 특이적이다.
- [0586] 일부 실시형태에서, T 세포 집단은 TCR-단일특이성이고, TCR은 난백알부민, MOG, II형 콜라겐, 시트룰린화 비멘틴, 시트룰린화 II형 콜라겐, 시트룰린화 피브리노겐, 이들의 단편, 변이체 및 혼합물로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항원에 대해 특이적이다.
- [0587] 일부 실시형태에서, T 세포 집단은 TCR-단일특이성이고, TCR은 난백알부민 또는 이들의 단편, 변이체 또는 혼합물에 대해 특이적이다.
- [0588] 일부 실시형태에서, T 세포 집단은 TCR-단일특이성이고, TCR은 MOG 또는 이들의 단편, 변이체 또는 혼합물에 특이적이다.
- [0589] 일부 실시형태에서, T 세포 집단은 TCR-단일특이성이고, TCR은 II형 콜라겐 또는 이들의 단편, 변이체 또는 혼합물에 특이적이다.
- [0590] 일부 실시형태에서, T 세포 집단은 TCR-단일특이성이고, TCR은 시트룰린화 비멘틴, 시트룰린화 II형 콜라겐, 시

트룰린화 피브리노겐, 또는 이들의 단편, 변이체 또는 혼합물에 특이적이다.

- [0591] 일부 실시형태에서, T 세포 집단은 TCR-단일특이성이고, TCR은 HLA-A2 또는 이들의 단편, 변이체 또는 혼합물에 특이적이다(예를 들면, 본원에 기재된 바와 같음).
- [0592] 일부 실시형태에서, T 세포 집단은 TCR-단일특이성이고, TCR은 IL-23R 또는 이들의 단편, 변이체 또는 혼합물에 특이적이다(예를 들면, 본원에 기재된 바와 같음).
- [0593] 일부 실시형태에서, T 세포 집단은 TCR-단일특이성이고, TCR은 B 세포 표면 마커, 예를 들면, CD19 또는 CD20 또는 이들의 단편, 변이체 또는 혼합물에 특이적이다(예를 들어, 본원에 기재된 바와 같음).
- [0594] 일부 실시형태에서, T 세포 집단은 TCR-단일특이성이고, TCR은 본원에 기재된 바와 같이 암 항원 또는 이의 단편, 변이체 또는 혼합물에 특이적이다.
- [0595] 일부 실시형태에서, T 세포 집단은 TCR-단일특이성이고, TCR은 감염된 세포를 인식한다. 일부 실시형태에서, T 세포 집단은 TCR-단일특이성이고, TCR은 세균 항원 또는 이들의 단편, 변이체 또는 혼합물에 특이적이다. 일부 실시형태에서, T 세포 집단은 TCR-단일특이성이고, TCR은 바이러스 항원 또는 이들의 단편, 변이체 또는 혼합물에 특이적이다. 일부 실시형태에서, T 세포 집단은 TCR-단일특이성이고, TCR은 진균 항원 또는 이들의 단편, 변이체 또는 혼합물에 대해 특이적이다. 일부 실시형태에서, T 세포 집단은 TCR-단일특이성이고, TCR은 기생성 항원 또는 이들의 단편, 변이체 또는 혼합물에 대해 특이적이다.
- [0596] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR을 발현하는 면역 세포는 CAR에 의해 인식되는 세포에 대해 억제적이다. 특정 실시형태에서, 면역 세포는 T 세포이다. 특정 실시형태에서, 면역 세포는 Treg 세포이다. 일부 실시형태에서, Treg 세포는 나이브 T 세포의 시험관내 분화에 의해 획득된다.
- [0597] 일부 실시형태에서, 본 발명의 면역 세포는 세포 독성이 아니다. 특정 실시형태에서, 면역 세포는 T 세포이다. 특정 실시형태에서, 면역 세포는 Treg 세포이다.
- [0598] 일부 실시형태에서, 본 발명의 조절 면역 세포는 $CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$ Treg, Tr1 세포, TGF- β 분비 Th3 세포, 조절 NK T 세포, 조절 $\gamma \delta$ T 세포, 조절 $CD8^+$ T 세포 및 이중 음성 조절 T 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다.
- [0599] 일부 실시형태에서, 본 발명의 면역 세포는 세포독성이다. 특정 실시형태에서, 면역 세포는, 본원에 기재된 바와 같이, 암 항원 또는 이의 단편 또는 변이체를 발현하는 세포에 대해 세포독성이다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 면역 세포는 암 세포에 대해 세포독성이다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 면역 세포는 감염된 세포에 대해 세포독성이다.
- [0600] 일부 실시형태에서, 본 발명의 면역 세포는 세포독성 면역 세포이다. 세포독성 면역 세포는, 예를 들면, 세포독성 T 세포, $CD8^+$ T 세포, 천연 킬러(NK) 세포, 세포독성 B 세포, 마크로파지 및 단핵구이다. 활성화되면, 이러한 세포독성 면역 세포 각각은 표적 세포의 파괴를 유발한다. 예를 들면, 세포독성 면역 세포는 하기 수단 중의 하나 또는 둘 모두에 의해 표적 암 세포의 파괴를 유발한다. 첫째, 활성화되면, 면역 세포가 퍼포린, 그랜자임 및 그레놀리신 등의 세포독소를 방출한다. 퍼포린과 그레놀리신은 표적 세포에 세공을 만들고, 그랜자임은 세포로 들어가고, 세포질에서 카스파제 캐스케이드를 유발하여 세포의 아포토시스(프로그램된 세포 사멸)을 유도한다. 둘째, 아포토시스는, 면역 세포와 표적 종양 세포 사이의 FAS-FAS 리간드 상호작용을 통해 유도될 수 있다.
- [0601] 일부 실시형태에서, 세포독성 면역 세포는 자가 세포이다.
- [0602] 일부 실시형태에서, 세포독성 면역 세포는 이중 세포이다.
- [0603] 일부 실시형태에서, 세포독성 면역 세포는 동종이계 세포이다.
- [0604] 일부 실시형태에서, 본 발명의 면역 세포는 proB 세포, preB 세포, 미성숙(또는 이행성) B 세포, 성숙한 나이브 B 세포, 활성화된 B 세포, 기억 B 세포, 형질 세포, 림프모세포, 변연부 B 세포, 배아 중심 B 세포, 형질모세포 및/또는 조절 B 세포(Breg 세포)에 대해 세포독성이다.
- [0605] 일부 실시형태에서, 본 발명의 면역 세포는 Breg 세포에 대해 세포독성이 아니다.
- [0606] 일부 실시형태에서, 본 발명의 단일특이적 Treg 세포 집단은, 이들의 표면에서 면역글로불린을 발현 및 제시하

는 B 세포에 대해 세포독성이다. 이들의 표면에서 면역글로불린을 발현하고 제시하는 B 세포의 예에는 preB 세포, 미성숙(또는 이행) B 세포, 성숙 나이브 B 세포, 활성화된 B 세포, 기억 B 세포, 변연부 B 세포, 배아 중심 B 세포 및 조절 B 세포(Breg 세포)가 포함되지만, 이들로 한정되지 않는다.

- [0607] 일부 실시형태에서, 본 발명의 단일특이적 Treg 세포 집단은 성숙 B 세포, 예를 들면, 성숙 활성화된 B 세포에 대해 세포독성이다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 단일특이적 Treg 세포 집단은, 단일특이적 Treg 세포 집단의 세포에 의해 발현된 키메라 수용체에 의해 인식되는 B 세포 표면 마커를 표면에서 발현하는 성숙 B 세포(예를 들면, 성숙 활성화된 B 세포)에 대해 세포독성이다.
- [0608] 일부 실시형태에서, 본 발명의 단일특이적 Treg 세포 집단은 proB 세포, preB 세포, 미성숙(또는 이행) B 세포, 성숙 나이브 B 세포, 활성화된 B 세포, 기억 B 세포, 형질 세포, 림프모세포, 변연부 B 세포, 배아 중심 B 세포, 형질모세포 및 조절 B 세포(Breg 세포)로부터 선택된 적어도 하나의 세포 유형에 대해 세포독성이다. 특정 실시형태에서, 단일특이적 Treg 세포 집단은 preB 세포, 미성숙(또는 이행) B 세포, 성숙 나이브 B 세포, 활성화된 B 세포, 기억 B 세포, 변연부 B 세포, 배아 중심 B 세포 및 조절 B 세포(Breg 세포)로부터 선택된 적어도 하나의 세포 유형에 대해 세포 독성이다.
- [0609] 일부 실시형태에서, 본 발명의 단일특이적 Treg 세포 집단은 proB 세포, preB 세포, 미성숙(또는 이행) B 세포, 성숙 나이브 B 세포, 활성화된 B 세포, 기억 B 세포, 형질 세포, 림프모세포, 변연부 B 세포, 배아 중심 B 세포 및 형질 아세포로부터 선택된 적어도 하나의 세포 유형에 대해 세포독성이다. 특정 실시형태에서, 단일특이적 Treg 세포 집단은 preB 세포, 미성숙(또는 이행) B 세포, 성숙 나이브 B 세포, 활성화된 B 세포, 기억 B 세포, 변연부 B 세포 및 배아 중심 B 세포로부터 선택된 적어도 하나의 세포 유형에 대해 세포독성이다.
- [0610] 일부 실시형태에서, 본 발명의 면역 세포 집단은, 이의 세포 표면에서, 본 발명의 CAR(본원에서 "제1 수용체"로 지칭됨) 및 다른 별개의 리간드에 결합하는 또 다른 수용체(본원에서 "제2 수용체"로 지칭됨)를 발현한다. 특정 실시형태에서, 제2 수용체는, 예를 들면, 본원에 기재된 바와 같이, 세포외 리간드 결합 도메인, 임의로 힌지 도메인, 적어도 하나의 막관통 도메인, 및 적어도 하나의 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0611] 일부 실시형태에서, 제2 수용체는 내인성(예를 들면, 내인성 TCR)이다. 일부 실시형태에서, 제2 수용체는 외인성이고, 이의 발현은 이를 코당하는 핵산의 형질전환 또는 형질도입에 의해 본 발명의 면역 세포 집단에서 유도된다. 상기 외인성 수용체는 외인성 TCR 또는 CAR일 수 있다. 따라서, 일부 실시형태에서, 본 발명의 면역 세포 집단은 2개의 CAR을 발현하고, 여기서 제1 CAR 및 제2 CAR은 각각 별개의 리간드를 인식한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 면역 세포 집단은 2개의 CAR을 발현하고, 여기서 제1의 것은 항원상의 제1 에피토프를 인식하고, 제2의 것은 동일한 항원상의 제2 별개 에피토프를 인식한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 면역 세포 집단은 2개의 CAR을 발현하고, 여기서 제1의 것은 항원을 인식하고, 제2의 것은 제2의 별개 항원(예를 들면, 항원 변이체)을 인식한다.
- [0612] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR 및 제2 수용체(예를 들면, 제2 CAR) 중의 적어도 하나는 유도성이며, 즉, 세포 표면에서의 이의 발현을 유도할 수 있다.
- [0613] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR 및 제2 수용체(예를 들면, 제2 CAR) 중의 적어도 하나의 발현은 다른 수용체의 활성화에 의해 유도된다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 CAR의 발현은 제2 수용체의 활성화에 의해 유도된다. 유도성 CAR은, 예를 들면, 문헌[참조: Roybal et al (Cell 167 (2):419-432(2016))] 등과 같이 당해 기술분야에 기재되어 있다.
- [0614] 일부 실시형태에서, 제2 수용체(예를 들면, 제2 CAR)는 항원, 항원의 단편, 항원의 변이체 또는 이들의 혼합물에 특이적이다.
- [0615] 일부 실시형태에서, 제2 수용체(예를 들면, 제2 CAR)는 일반적 인간 식이로부터의 식품 항원에 특이적이다.
- [0616] 일부 실시형태에서, 제2 수용체(예를 들면, 제2 CAR)는 자가항원(예를 들면, 본원에 기재된 자가항원), 예를 들면, 다발성 경화증 관련 항원, 관절 관련 항원, 눈 관련 항원, 인간 HSP 항원, 피부 관련 항원 또는 이식편 거부 반응 또는 GVHD에 관련된 항원에 대해 특이적이다. 특정 실시형태에서, 항원은 피부 관련 항원이다. 특정 실시형태에서, 항원은 이식편 거부 또는 GVHD에 관련된 항원이다.
- [0617] 일부 실시형태에서, 제2 수용체(예를 들면, 제2 CAR)는 흡입된 알레르겐, 섭취된 알레르겐 또는 접촉 알레르겐에 특이적이다.
- [0618] 일부 실시형태에서, 제2 수용체(예를 들면, 제2 CAR)는 난백알부민, MOG, II형 콜라겐 단편, 시트룰린화

비멘틴, 시트룰린화 II형 콜라겐, 시트룰린화 피브리노겐 및 이들의 단편, 변이체 및 혼합물로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항원에 특이적이다.

- [0619] 일부 실시형태에서, 제2 수용체(예를 들면, 제2 CAR)는 난백알부민 또는 이의 단편, 변이체 또는 혼합물에 특이적이다.
- [0620] 일부 실시형태에서, 제2 수용체(예를 들면, 제2 CAR)는 MOG 또는 이의 단편, 변이체 또는 혼합물에 특이적이다.
- [0621] 일부 실시형태에서, 제2 수용체(예를 들면, 제2 CAR)는 II형 콜라겐 또는 이들의 단편, 변이체 또는 혼합물에 특이적이다.
- [0622] 일부 실시형태에서, 제2 수용체(예를 들면, 제2 CAR)는 시트룰린화 비멘틴, 시트룰린화 II형 콜라겐, 시트룰린화 피브리노겐 또는 이들의 단편, 변이체 또는 혼합물에 특이적이다.
- [0623] 일부 실시형태에서, 제2 수용체(예를 들면, 제2 CAR)는 HLA-A2 또는 이의 단편, 변이체 또는 혼합물에 특이적이다.
- [0624] 일부 실시형태에서, 제2 수용체(예를 들면, 제2 CAR)는 IL-23R 또는 이의 단편, 변이체 또는 혼합물에 특이적이다.
- [0625] 일부 실시형태에서, 제2 수용체(예를 들면, 제2 CAR)는 B 세포 표면 마커, 예를 들면, CD19 또는 CD20, 또는 이들의 단편, 변이체 또는 혼합물에 특이적이다.
- [0626] 일부 실시형태에서, 제2 수용체(예를 들면, 제2 CAR)는, 본원에 기재된 바와 같이, 암 항원 또는 이의 단편, 변이체 또는 혼합물에 특이적이다.
- [0627] 일부 실시형태에서, 제2 수용체(예를 들면, 제2 CAR)는 감염된 세포를 인식한다. 일부 실시형태에서, 제2 수용체(예를 들면, 제2 CAR)는 세균 항원 또는 이의 단편, 변이체 또는 혼합물에 특이적이다. 일부 실시형태에서, 제2 수용체(예를 들면, 제2 CAR)는 바이러스 항원 또는 이들의 단편, 변이체 또는 혼합물에 특이적이다. 일부 실시형태에서, 제2 수용체(예를 들면, 제2 CAR)는 진균 항원 또는 이의 단편, 변이체 또는 혼합물에 특이적이다.
- [0628] 일부 실시형태에서, 제2 수용체의 세포의 결합 도메인은 단백질 또는 이의 단편 또는 변이체, 예를 들면, 자가항원 또는 이의 단편 또는 변이체이다.
- [0629] 일부 실시형태에서, 제2 수용체(예를 들면, 제2 CAR)는 자가항체, 예를 들면, B 세포 또는 이의 단편, 변이체 또는 혼합물에서 발현된 자가항체에 특이적이다.
- [0630] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 제1 세포내 신호전달 도메인을 포함하고, 제2 수용체는 별개의 제2 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 T 세포 1차 신호전달 도메인(예를 들면, CD3 제타 등)을 포함하고, 제2 수용체는 공자극 신호전달 도메인(예를 들면, TNFR2 또는 CD8의 공자극 도메인 또는 TNFR2 및 CD8의 조합 공자극 신호전달 도메인)을 포함한다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 공자극 세포내 신호전달 도메인(예를 들면, TNFR2, 4-1BB, CD27 또는 CD28의 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 TNFR2 및 4-1BB의 조합 공자극 세포내 신호전달 도메인)을 포함하고, 제2 수용체는 T 세포 1차 세포내 신호전달 도메인(예를 들면, CD3 제타 등)을 포함한다. 이들 실시형태에 따르면, 본 발명의 면역 세포 집단의 완전한 활성화는 본 발명의 CAR의, 이것이 지향되는 리간드에 대한 본 발명의 CAR의 결합 및 이것이 지향되는 리간드에 대한 제2 수용체의 결합 둘 다를 필요로 한다.
- [0631] 일부 실시형태에서, 제2 수용체에 의해 인식되는 리간드는 발병 조직 또는 기관, 또는 자가면역 반응 부위에서 발현되거나 존재한다. 결과적으로, 본 발명의 제1 CAR의 리간드를 발현하는 세포에 대한 억제 활성화는, 상기 리간드가 존재하고 면역 세포(예를 들어, Treg) 집단의 세포 상의 제2 수용체에 의해 인식되는 경우, 발병 조직 또는 기관 또는 자가면역 반응 부위에서만 유도될 것이다.
- [0632] 일부 실시형태에서, 제2 키메라 수용체는, 본 발명의 제1 키메라 수용체에 의해 인식되는 리간드와 상이한 리간드를 인식하는 세포의 리간드 결합 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 리간드 결합 도메인은 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일부 실시형태에서, 제2 키메라 수용체는, 제1 키메라 수용체에 의해 인식되는 동일한 항원의 별개의 에피토프를 인식하는 세포의 리간드 결합 도메인을 추가로 포함한다.
- [0633] 일부 실시형태에서, 본 발명의 키메라 수용체는, 제1 리간드에 결합하는 제1 리간드 결합 도메인 및 상기 제1

리간드와 상이한 제2 리간드에 결합하는 제2 리간드 결합 도메인을 포함하는 세포외 리간드 결합 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 리간드 결합 도메인은 제1 및 제2 리간드를 모두 인식하는 이기능성 항체이다. 일부 실시형태에서, 상기 리간드 결합 도메인은 동일한 항원의 2개의 별개의 에피토프를 인식하는 이기능성 항체이다.

- [0634] 핵산, 벡터, 및 CAR 제조
- [0635] 본 발명은 또한, 본원에 기재된 CAR을 코딩하는 핵산 서열에 관한 것으로, 상기 핵산 서열은 다음을 포함한다:
- [0636] - 세포외 결합 도메인의 적어도 하나의 핵산 서열,
- [0637] - 임의로 세포외 인지 도메인의 적어도 하나의 핵산 서열, 막관통 도메인의 적어도 하나의 핵산 서열,
- [0638] - 세포내 도메인의 적어도 하나의 핵산 서열, 여기서 세포내 도메인의 적어도 하나의 핵산 서열은 1차 세포내 신호전달 도메인의 적어도 하나의 핵산 서열 및 임의로 공자극 세포내 신호전달 도메인의 적어도 하나의 핵산 서열을 포함하고,
- [0639] 여기서, 막관통 도메인의 핵산 서열은 인간 TNFR2 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체의 핵산 서열, 또는 임의의 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체의 핵산 서열 또는 이들의 조합이고/이거나, 공자극 세포내 신호전달 도메인의 핵산 서열은 인간 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체의 핵산 서열 또는 임의의 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체의 핵산 서열 또는 이들의 조합이고, 여기서 막관통 도메인의 핵산 서열은 TNFR2 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체의 핵산 서열 이고/이거나, 공자극 세포내 신호전달 도메인의 핵산 서열은 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체이다.
- [0640] 본 발명은 또한, 본원에 기재된 CAR-코딩 핵산 서열을 포함하는 벡터를 제공한다. 본 발명에서 사용될 수 있는 벡터의 예로는 DNA 벡터, RNA 벡터, 플라스미드, 파지미드, 파지 유도체, 바이러스 및 코스미드가 포함되지만, 이들로 한정되지 않는다.
- [0641] 바이러스 벡터 기술은 당해 기술분야에 공지되어 있으며, 예를 들면, 문헌[참조: Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)] 및 기타 바이러스학 및 분자 생물학 매뉴얼에 기재되어 있다. 벡터로서 유용한 바이러스는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스, 헤르페스 바이러스 및 렌티바이러스를 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.
- [0642] 일반적으로, 적합한 벡터는 적어도 하나의 생물에서 기능하는 복제 기점, 프로모터 서열, 편리한 제한 엔도뉴클레아제 부위 및 하나 이상의 선택가능한 마커를 포함한다(예를 들면, PCT 특허 공보 제WO 01/96584호 및 제WO 01/29058호 및 미국 특허 제6,326,193호, 본원에 참조로 도입됨).
- [0643] 포유동물 세포로의 유전자 전달을 위해, 다수의 바이러스 기반 시스템이 개발되었다. 예를 들면, 레트로바이러스는 유전자 전달 시스템에 편리한 플랫폼을 제공한다. 선택된 유전자는, 당해 기술분야에 공지된 기술을 사용하여, 벡터에 삽입하고, 레트로바이러스 입자에 패키징할 수 있다. 이어서, 재조합 바이러스를 단리하여, 생체 내 또는 생체외에서 대상체의 세포로 전달될 수 있다. 다수의 레트로바이러스 시스템이 당해 기술분야에 공지되어 있다. 일부 실시형태에서, 아데노바이러스 벡터가 사용된다. 또한, 다수의 아데노바이러스 벡터가 당해 기술분야에 공지되어 있다. 일부 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터가 사용된다.
- [0644] 추가의 전사 활성 요소, 예를 들면, 프로모터 및 인핸서는 전사 개시의 빈도를 조절한다. 일반적으로, 코어 프로모터인 이들은 개시 부위의 30-110bp 상류 영역에 위치하지만, 최근, 다수의 프로모터가 개시 부위의 하류에도 기능적 요소를 포함하는 것으로 나타났고, 인핸서 요소는 일반적으로 개시 부위의 500-2000bp 상류에 위치한다. 프로모터 요소 사이의 간격은 종종 유연하므로, 요소가 서로 반전되거나 상대적으로 이동할 때에 프로모터 기능이 보존된다. 티미딘 키나제(tk) 프로모터에서는, 활성이 감소하기 시작하기 전에, 프로모터 요소 사이의 간격을 50bp 간격으로 증가시킬 수 있다. 프로모터에 따라, 개개 요소가 협조적 또는 독립적으로 기능하여, 전사를 활성화할 수 있다.
- [0645] 적합한 프로모터의 한 가지 예는 즉시 초기 사이토포갈로바이러스(CMV) 프로모터 서열이다. 이 프로모터 서열은, 이에 작동적으로 연결된 임의의 폴리뉴클레오티드 서열의 높은 수준의 발현을 유도할 수 있는 강력한 구성적 프로모터 서열이다. 적합한 프로모터의 또 다른 예는 신장 성장 인자-Ia(EF-Ia)이다. 적합한 프로모터의 또 다른 예는 포스포글리세레이트 키나제(PGK) 프로모터이다. 그러나, 유인원 바이러스 40(SV40) 초기 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV), 인간 면역 결핍 바이러스(HIV) 긴 말단 반복(LTR) 프로모터, MoMuLV 프

로모터, 조류 백혈병 바이러스 프로모터, 엡스타인-바르(Epstein-Barr) 바이러스 전초기 프로모터 및 라우스 육종 바이러스 프로모터, 게다가 액틴 프로모터, 미오신 프로모터, 헤모글로빈 프로모터 및 크레아틴 키나제 프로모터 등을 포함하지만 이들로 한정되지 않는 인간 유전자 프로모터를 포함하지만 이들로 한정되지 않는 다른 구성적 프로모터도 사용될 수 있다. 또한, 본 발명은 구성적 프로모터의 사용으로 한정되어서는 안된다. 유도성 프로모터도 본 발명의 일부로 고려된다. 유도성 프로모터의 사용은, 이러한 발현이 바람직할 때에 이것이 작동적으로 연결된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 온으로 하건, 발현을 원하지 않을 때에 발현을 오프로 할 수 있는 분자 스위치를 제공한다. 유도성 프로모터의 예는 메탈로티오닌 프로모터, 글루코코르티코이드 프로모터, 프로게스테론 프로모터 및 테트라사이클린 프로모터를 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다. 또한, 2개 이상의 유전자의 효율적이고 협조적인 발현을 가능하게 하는 양방향 프로모터도 본 발명에서 흥미로울 수 있다. 양방향 프로모터의 예는, 참조에 의해 본원에 도입되는, 미국 특허 공보 제2006/200869호에서 루이기 날디니(Luigi Naldini)에 의해 기재된 프로모터를 포함하지만 이들로 한정되지 않고, 이는 i) 사이토메갈로바이러스(CMV) 또는 마우스 유선 종양 바이러스(MMTV) 게놈에서 유래된 최초 최소 프로모터 서열 및 ii) 동물 유전자에서 유래된 완전 효율적인 프로모터 서열을 개시한다.

[0646] CAR 폴리펩티드 또는 이의 일부의 발현을 평가하기 위해, T 세포에 도입될 발현 벡터는 또한, 바이러스 벡터를 통해 형질감염되거나 감염되는 세포 집단으로부터 발현 세포의 동정 및 선택을 용이하게 하기 위해, CD34, CD271 또는 리포터 유전자 등의 선별가능한 마커 유전자 중의 어느 하나 또는 둘 모두를 포함할 수 있다. 다른 국면에서, 선별가능한 마커는 별도의 DNA 조각에 운반될 수 있고 동시-형질감염 절차에 사용될 수 있다. 선별가능한 마커 및 리포터 유전자는 모두 숙주 세포에서 발현을 가능하게 하는 적절한 조절 서열을 인접시킬 수 있다. 유용한 선별가능한 마커는, 예를 들면, 네오마이신 등의 항생제-내성 유전자를 포함한다.

[0647] 본 발명의 일부 실시형태에서, 자살 유전자 기술이 사용될 수 있다. 상이한 자살 유전자 기술은, 이들의 작용 메카니즘에 따라 당해 기술분야에 기술되어 있다[참조: 예를 들면, Jones et al, *Frontiers in Pharmacology* 5:254 (2014)]. 무독성 약물을 독성 약물로 전환하는 유전자-지향된 효소 프로드러그 요법(GDEPT)의 예로는 단순 헤르페스 바이러스 티미딘 키나제(HSV-TK) 및 시토신 데아미나제(CD)가 포함된다. 다른 예는, 예를 들면, 유도성 Fas(iFas) 또는 유도성 카스파제 9(iCasp9) 시스템 등의 아폽토시스 성분에 연결된 약물 결합 도메인으로 구성된 키메라 단백질이다. 다른 예는, 조작된 세포의 표면에서 c-myc의 과발현을 유도하여 항-c-myc 항체의 투여에 의해 결실을 유도하는 것 등의 치료용 항체에 의해 매개되는 시스템을 포함한다. EGFR의 사용은 c-myc 시스템과 비교하여 유사한 시스템으로 설명된다.

[0648] 리포터 유전자는, 잠재적으로 형질감염된 세포를 동정하고 조절 서열의 기능을 평가하기 위해 사용된다. 일반적으로, 리포터 유전자는 수용자 생물 또는 조직에 존재하지 않거나 발현되지 않는 유전자이고, 예를 들면, 효소 활성 등의 이의 발현을 용이하게 검출할 수 있는 특성에 의해 나타나는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자이다. 리포터 유전자의 발현은 DNA가 수용자 세포에 도입된 후의 적절한 시간에 검정된다. 적합한 리포터 유전자는 루시페라제, 베타-갈락토시다제, 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제, 분비된 알칼리성 포스파타제 또는 녹색 형광 단백질 유전자를 코딩하는 유전자를 포함할 수 있다[참조: 예를 들면, Ui-Tei et al, *FEBS Letters* 479:79-82(2000)]. 적합한 발현 시스템은 공지되어 있으며, 공지된 기술을 사용하여 제조하거나 상업적으로 수득할 수 있다. 일반적으로, 가장 높은 수준의 리포터 유전자 발현을 나타내는 최소 5' 플랭킹 영역을 갖는 작제물이 프로모터로 동정된다. 이러한 프로모터 영역은 리포터 유전자에 연결되어, 프로모터 구동 전사를 조절하는 능력에 대해 약제를 평가하기 위해 사용될 수 있다.

[0649] 유전자를 세포에 도입하고 발현하는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있다. 발현 벡터의 문맥에서, 벡터는 당해 기술분야의 임의의 방법에 의해 숙주 세포, 예를 들면, 포유동물, 세균, 효모 또는 곤충 세포내로 용이하게 도입될 수 있다. 예를 들면, 발현 벡터는 물리적, 화학적 또는 생물학적 수단에 의해 숙주 세포로 전달될 수 있다.

[0650] 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포에 도입하기 위한 물리적 방법은 인산칼슘 침전, 리포펙션, 입자 충격, 미세주입, 전기천공 등을 포함한다. 벡터 및/또는 외인성 핵산을 포함하는 세포를 생산하는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들면, 문헌[참조: Sambrook et al. (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)]을 참조한다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 인산칼슘 형질감염을 사용하여 폴리뉴클레오티드가 숙주 세포로 도입된다.

[0651] 목적 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포로 도입하기 위한 생물학적 방법은 DNA 및 RNA 벡터의 사용을 포함한다. 바이러스 벡터, 특히 레트로바이러스 벡터는 인간 세포 등의 포유동물에 유전자를 삽입하는 가장 광범위하게 사용

되는 방법이 되었다. 다른 바이러스 벡터는 렌티바이러스, 폭스바이러스, 단순 헤르페스 바이러스 I, 아데노바이러스 및 아데노 관련 바이러스 등에서 유래될 수 있다. 예를 들면, 미국 특허 제5,350,674호 및 제5,585,362호를 참조한다.

[0652] 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포에 도입하기 위한 화학적 수단은 고분자 복합체, 나노캡슐, 마이크로스피어, 비드 등의 콜로이드 분산 시스템, 및 수중유 에멀전, 미셀, 혼합 미셀 및 리포솜을 포함하는 지질 기반 시스템 등을 포함한다. 시험관내 및 생체내 전달 비히클로서 사용하기 위한 예시적 콜로이드 시스템은 리포솜(예를 들면, 인공 막 소포)이다. "리포솜"은, 봉입된 지질 이중층 또는 응집체의 생성에 의해 형성된 다양한 단일 및 다중층 지질 비히클을 포함하는 일반적 용어이다. 리포솜은 인지질 이중층 막 및 내부 수성 매질을 갖는 소포 구조를 갖는 것으로 특성화될 수 있다. 다중층 리포솜은, 수성 매질에 의해 분리된 다중 지질 층을 갖는다. 이는, 인지질이 과량의 수용액에 현탁되면, 자발적으로 형성된다. 지질 성분은, 폐쇄 구조를 형성하기 전에 자가-재배열을 거치고, 지질 이중층 사이에 물과 용해된 용질을 포획한다[참조: Ghosh et al, Glycobiology 5:505-10 (1991)]. 그러나, 용액에서 통상의 소포 구조와는 상이한 구조를 갖는 조성물도 포함된다. 예를 들면, 지질은 미셀 구조를 가정하거나, 단순히 지질 분자의 불균일 응집체로서 존재할 수 있다. 또한, 리포펙타민-핵산 복합체도 고려된다.

[0653] 지질 제형의 사용은, 숙주 세포(시험관내, 생체외 또는 생체내)로 핵산을 도입하기 위해 고려된다. 또 다른 국면에서, 핵산은 지질과 연관될 수 있다. 지질과 관련된 핵산은 리포솜의 수성 내부에 캡슐화되고, 리포솜의 지질 이중층 내에 산재되고, 리포솜 및 올리고 뉴클레오티드 둘 모두와 연관된 연결 분자를 통해 리포솜에 부착되고, 리포솜에 포획되고, 리포솜과 복합체화되거나, 지질을 포함하는 용액에 분산되거나, 지질과 혼합되거나, 지질과 조합되거나, 지질에 현탁액으로 포함되거나, 미셀과 복합체화되거나, 달리는 지질과 결합된다. 지질, 지질/DNA 또는 지질/발현 벡터 관련 조성물은 용액 중의 특정 구조로 한정되지 않는다. 예를 들면, 이들은 미셀로서 또는 "붕괴된" 구조를 갖는 이중층 구조로 존재할 수 있다. 이들은 또한, 단순히 용액에 산재되고, 크기 또는 형상이 균일하지 않은 응집체를 형성할 수 있다. 지질은, 천연에 존재하는 지질 또는 합성 지질일 수 있는 지방 물질이다. 예를 들면, 지질에는 세포질에서 자연적으로 존재하는 지방 액적, 게다가 지방산, 알콜, 아민, 아미노 알콜 및 알데히드 등의 장쇄 지방족 탄화수소 및 이의 유도체를 포함하는 화합물 클래스가 포함된다.

[0654] 사용하기에 적합한 지질은 상업적 공급원으로부터 취득할 수 있다. 예를 들면, 디미리스틸 포스파티딜콜린 ("DMPC")은 시그마(Sigma, St. Louis, MO)로부터 취득할 수 있고; 디세틸 포스페이트("DCP")는 케이 앤드 케이 라보라토리즈(K & K Laboratories, Plainview, NY)에서 취득할 수 있고; 콜레스테롤("Choi")은 칼바이오켄-베링(Calbiochem-Behring)에서 취득할 수 있고; 및 디미리스틸 포스파티딜글리세롤("DMPG") 및 기타 지질은 아방티 폴라 리피드스, 인코포레이티드(Avanti Polar Lipids, Inc., Birmingham, AL)에서 취득할 수 있다. 클로로포름 또는 클로로포름/메탄올 중의 지질 스톱 용액은 약 -20°C에서 보관할 수 있다. 클로로포름은 메탄올보다 쉽게 증발하기 때문에, 유일한 용매로서 사용된다.

[0655] 외인성 핵산을 숙주 세포에 도입하기 위해 사용된 방법에 관계없이, 숙주 세포에서 재조합 DNA 서열의 존재를 확인하기 위해, 다양한 검정을 수행할 수 있다. 이러한 검정은, 예를 들면, 서던 블롯팅 및 노던 블롯팅, RT-PCR 및 PCR 등의 당업자에게 공지된 "분자 생물학적" 검정; 특정 펩티드의 존재 또는 부재를 검출하는 것, 예를 들면, 면역학적 수단(ELISA 및 웨스턴 블롯)에 의해 또는 본 발명의 범위 내에 있는 약제를 동정하기 위한 본원에 기재된 검정에 의해 검출하는 것 등의 "생화학적" 검정을 포함한다.

[0656] 일부 실시형태에서, 본 발명의 면역 세포는 RNA의 도입을 통해 변형된다. 일부 실시형태에서, 시험관내 전사된 RNA CAR은 일시적 형질감염의 형태로서 세포에 도입될 수 있다. RNA는 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)으로 생성된 주형을 사용하여 시험관내 전사에 의해 생성된다. 임의의 공급원으로부터 목적 DNA는, 적절한 프라이머와 RNA 폴리머라제를 사용하여, PCR에 의해 시험관내 mRNA 합성을 위한 주형으로서 직접 변환할 수 있다. DNA의 공급원은, 예를 들면, 게놈 DNA, 플라스미드 DNA, 과지 DNA, cDNA, 합성 DNA 서열 또는 기타 적절한 DNA 공급원일 수 있다. 특정 실시형태에서, 시험관내 전사를 위한 주형은 본 발명의 CAR이다.

[0657] 일부 실시형태에서, PCR에 사용되는 DNA는 개방 판독 프레임을 포함한다. DNA는, 예를 들면, 생물의 게놈으로부터 천연에 존재하는 DNA 서열로부터 유래될 수 있다. 일부 실시형태에서, DNA는 목적의 전장 유전자 또는 유전자의 일부이다. 유전자는 5' 및/또는 3' 비-번역 영역(UTR)의 일부 또는 전부를 포함할 수 있다. 유전자에는 엑손과 인트론이 포함될 수 있다. 일부 실시형태에서, PCR에 사용되는 DNA는 인간 유전자이다. 일부 실시형태에서, PCR에 사용되는 DNA는 5' 및 3' UTR을 포함하는 인간 유전자이다. DNA는 천연에 존재하는 생물에서

정상적으로 발현되지 않는 인공 DNA 서열일 수도 있다. 예시적 인공 DNA 서열은, 융합 단백질을 코딩하는 개방 관독 프레임을 형성하기 위해 함께 결합되는 유전자의 부분을 포함하는 것이다. 함께 결합되는 DNA의 부분은 단일의 생물로부터의 것 또는 하나 이상의 생물로부터의 것일 수 있다.

[0658] PCR을 사용하여, 형질감염에 사용되는 mRNA의 시퀀스 전사를 위한 주형을 생성할 수 있다. PCR을 수행하는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있다. PCR에 사용하기 위한 프라이머는, PCR의 주형으로서 사용되는 DNA 영역과 실질적으로 상보적인 영역을 갖도록 설계되었다. 본원에 사용된 "실질적으로 상보적"은, 프라이머 서열 중의 염기의 대부분 또는 전부가 상보적이거나, 하나 이상의 염기가 비상보적이거나 부정합하는 뉴클레오티드의 서열을 지칭한다. 실질적으로 상보적 서열은, PCR에 사용되는 어닐링 조건하에서 목적 DNA 표적과 어닐링 또는 하이브리드화할 수 있다. 프라이머는, DNA 주형의 임의 부분에 실질적으로 상보적이라도 설계될 수 있다. 예를 들면, 프라이머는, 세포 내에서 통상 전사되는 유전자의 부분(개방 관독 프레임)을 증폭하도록 설계되고, 이는 5' 및 3' UTR을 포함할 수 있다. 프라이머는 또한, 목적의 특정 도메인을 코딩하는 유전자의 일부를 증폭하도록 설계될 수 있다. 일부 실시형태에서, 프라이머는 5' 및 3' UTR의 전부 또는 일부를 포함하는 인간 cDNA의 코딩 영역을 증폭하도록 설계된다. PCR에 유용한 프라이머는 당해 기술분야에 공지되어 있는 합성 방법에 의해 생성된다.

[0659] "전방향 프라이머"는, 증폭될 DNA 서열의 상류에 있는 DNA 주형 상의 뉴클레오티드에 실질적으로 상보적인 뉴클레오티드 영역을 포함하는 프라이머이다. "상류"는, 본원에서, 코딩 쇠에 대해 증폭될 DNA 서열의 5' 위치를 지칭하기 위해 사용된다. "역방향 프라이머"는, 증폭될 DNA 서열의 하류에 있는 이분쇄 DNA 주형에 실질적으로 상보적인 뉴클레오티드 영역을 포함하는 프라이머이다. "하류"는, 본원에서, 코딩 쇠에 대해 증폭될 DNA 서열의 3' 위치를 지칭하기 위해 사용된다.

[0660] PCR에 유용한 임의의 DNA 폴리머라제가 본원에 개시된 방법에서 사용될 수 있다. 시약과 폴리머라제는 다수의 공급원에서 시판되고 있다.

[0661] 안정성 및/또는 번역 효율을 촉진하는 능력을 갖는 화학 구조도 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, RNA는 5' 및 3' UTR을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 5' UTR은 0개 내지 3000개 뉴클레오티드 길이이다. 코딩 영역에 추가될 5' 및 3' UTR 서열의 길이는 UTR의 다른 영역에 어닐링하는 PCR용의 프라이머를 설계하는 것을 포함하지만 이들로 한정되지 않는 다른 방법에 의해 변경될 수 있다. 이 접근법을 사용하여, 당업자는 전사된 RNA의 형질감염 후에 최적 번역 효율을 달성하는데 필요한 5' 및 3' UTR 길이를 변형할 수 있다. 5' 및 3' UTR은, 목적 유전자에 대해 천연에 존재하는 내인성 5' 및 3' UTR일 수 있다. 또는, 목적 유전자에 내인성이 아닌 UTR 서열은, UTR 서열을 전방향 및 역방향 프라이머에 도입하거나 주형의 다른 변형에 의해 부가될 수 있다. 목적 유전자에 내인성이 아닌 UTR 서열의 사용은 RNA의 안정성 및/또는 번역 효율을 변형시키는데 유용할 수 있다. 예를 들면, 3' UTR 서열에서 AU가 풍부한 요소는, mRNA의 안정성을 감소시킬 수 있는 것으로 공지되어 있다. 따라서, 당해 기술분야에 공지된 UTR의 특성에 기초하여, 전사된 RNA의 안정성을 증가시키도록 3' UTR을 선택하거나 설계할 수 있다.

[0662] 일부 실시형태에서, 5' UTR은 내인성 유전자의 Kozak 서열을 포함할 수 있다. 또는, 목적 유전자에 내인성이 아닌 5' UTR이 전술한 바와 같이 PCR에 의해 부가되는 경우, 컨센서스 Kozak 서열은 5' UTR 서열을 추가하여 재 설계할 수 있다. Kozak 서열은 일부 RNA 전사물의 번역 효율을 높일 수 있지만, 효율적인 번역을 가능하게 하기 위해 모든 RNA가 필요한 것으로 보이지는 않다. 다수의 mRNA에 대한 Kozak 서열에 대한 요건은 당해 기술분야에 공지되어 있다. 다른 실시형태에서, 5' UTR은, RNA 계놈이 세포에서 안정한 RNA 바이러스로부터 유래될 수 있다. 다른 실시형태에서, 다양한 뉴클레오티드 유사체를 3' 또는 5' UTR에서 사용하여, mRNA의 엑소뉴클레아제 분해를 방해할 수 있다.

[0663] 유전자 클로닝 없이 DNA 주형으로부터 RNA의 합성을 가능하게 하기 위해, 전사 프로모터는, 전사될 서열의 상류에 있는 DNA 주형에 부착되어야 한다. RNA 폴리머라제에 대한 프로모터로서 기능하는 서열이 전방향 프라이머의 5' 말단에 부가되면, RNA 폴리머라제 프로모터는, 전사될 개방 관독 프레임의 상류에 있는 PCR 산물에 도입된다. 일부 실시형태에서, 프로모터는, 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같이, T7 폴리머라제 프로모터이다. 다른 유용한 프로모터는 T3 및 SP6 RNA 폴리머라제 프로모터를 포함하지만 이들로 한정되지 않는다. T7, T3 및 SP6 프로모터에 대한 컨센서스 뉴클레오티드 서열은 당해 기술분야에 공지되어 있다.

[0664] 일부 실시형태에서, mRNA는 세포에서 mRNA의 리보솜 결합, 번역 개시 및 안정성을 결정하는 5' 말단 및 3' 폴리(A) 테일 모두에 캡을 갖는다. 예를 들면, 플라스미드 DNA 등의 환상 DNA 주형에서, RNA 폴리머라제는 진핵 세포에서 발현하기에 적합하지 않은 긴 연쇄 생성물을 생성한다. 3' UTR의 말단에 선형화된 플라스미드 DNA의 전

사는, 전사 후에 폴리아데닐화되더라도, 진핵생물 형질감염에 효과적이지 않은 정상 크기의 mRNA를 초래한다.

- [0665] 선형 DNA 주형에서, 파지 T7 RNA 폴리머라제는 전사물의 3' 말단을 주형의 최후 염기를 초과하여 확장할 수 있다[참조: Schenbom and Mierendorf, *Nuc Acids Res.*, 13:6223-36 (1985); Nacheva and Berzal-Herranz, *Eur. J. Biochem.*, 270:1485-65 (2003)].
- [0666] polyA/T 스트레치를 DNA 주형으로 통합하는 종래의 방법은 분자 클로닝이다. 그러나, 플라스미드 DNA에 통합된 polyA/T 서열은 플라스미드 불안정성을 유발할 수 있으며, 이 때문에, 세균 세포에서 수득된 플라스미드 DNA 주형은 종종 결실 및 기타 이상으로 고도로 오염된다. 이는, 클로닝 절차를 어렵고 시간 소모적일 뿐만 아니라, 종종 신뢰할 수 없게 한다. 이 때문에, 클로닝 없이 polyA/T 3' 스트레치로 DNA 주형을 구성할 수 있는 방법이 매우 바람직하다.
- [0667] 전사 DNA 주형의 polyA/T 세그먼트는 100T 테일(크기는 50-5000 T일 수 있음) 등의 polyT 테일을 포함하는 역방향 프라이머를 사용하여 PCR 동안 또는, DNA 결합 또는 시험관내 재조합을 포함하지만 이들로 한정되지 않는 다른 방법으로 PCR 후에 생성할 수 있다. 폴리(A) 테일은 RNA에 안정성을 제공하고 RNA의 분해를 감소시킨다. 일반적으로, 폴리(A) 테일의 길이는 전사된 RNA의 안정성과 양의 상관 관계가 있다. 일부 실시형태에서, 폴리(A) 테일은 100 내지 5000개의 아데노신이다.
- [0668] RNA의 폴리(A) 테일은, 이. 콜라이 폴리A 폴리머라제(E-PAP) 등의 폴리(A) 폴리머라제를 사용하여, 시험관내 전사 후에 추가로 신장될 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리(A) 테일의 길이를 100개 뉴클레오티드에서 300 내지 400개 뉴클레오티드로 증가시키면, RNA의 번역 효율이 약 2배 증가한다. 또한, 3' 말단에 상이한 화학 그룹을 부착하면, mRNA 안정성을 증가시킬 수 있다. 이러한 부착은 변형/인공 뉴클레오티드, 앵타머 및 기타 화합물을 포함할 수 있다. 예를 들면, ATP 유사체는, 폴리(A) 폴리머라제를 사용하여 폴리(A) 테일에 도입될 수 있다. ATP 유사체는 RNA의 안정성을 추가로 증가시킬 수 있다.
- [0669] RNA의 5' 캡은 또한 RNA 분자에 안정성을 제공할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 방법에 의해 생성된 RNA는 5' 캡을 포함한다. 5' 캡은 당해 기술분야에 공지되고 본원에 기재된 기술을 사용하여 제공된다[참조: Cougot et al., *Trends in Biochem. Sci.* 29:436-444 (2001); Stepinski et al., *RNA* 7:1468-95 (2001); Elango, et al., *Biochemistry. Biophys. Res. Commun.* 330:958-966 (2005)].
- [0670] 본원에 개시된 방법에 의해 생성된 RNA는 또한, 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 서열을 함유할 수 있다. IRES 서열은 mRNA에 대한 캡-독립성 리보솜 결합을 개시하고 번역 개시를 촉진하는 임의의 바이러스, 염색체 또는 인공적으로 설계된 서열일 수 있다. 당, 펩티드, 지질, 단백질, 항산화제 및 계면활성제 등의 세포 투과성과 생존율을 촉진하는 인자를 포함할 수 있는, 세포 전기천공에 적합한 모든 용질이 포함될 수 있다.
- [0671] RNA는 다수의 상이한 방법의 어느 하나를 사용하여 표적 세포에 도입될 수 있고, 예를 들면, 전기천공[예를 들면, Amaxa Nucleofector-II (Amaxa Biosystems, Cologne, Germany), ECM 830(BTX)(Harvard Instruments, Boston, Mass.), Gene Pulser II(BioRad, Denver, Colo.) 또는 Multiporator(Eppendorf, Hamburg Germany)], 리포펙션을 사용한 양이온성 리포좀 매개 형질감염, 폴리머 캡슐화, 펩티드 매개된 형질감염 또는 "유전자 총" 등의 생물학적 입자 전달 시스템[참조: 예를 들면, Nishikawa et al. *Hum Gene Ther.* 12(8):861-70 (2001)]을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.
- [0672] 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 CAR 서열은 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터를 사용하여 본 발명의 면역 세포내로 전달된다. CAR-발현 레트로바이러스 및 렌티바이러스 벡터는 형질도입된 세포를 담체로서 사용하거나 캡슐화, 결합 또는 네이키드 벡터의 무세포 국소 또는 전신 전달을 사용하여, 조직 및 전체 생물 뿐만 아니라 다양한 유형의 진핵 세포로 전달될 수 있다. 사용되는 방법은 안정된 발현이 필요하거나 충분한 임의 목적을 위한 것일 수 있다.
- [0673] 일부 실시형태에서, CAR 서열은 시험관내 전사된 mRNA를 사용하여 본 발명의 면역 세포로 전달된다. 시험관내 전사된 mRNA CAR는 형질감염된 세포를 담체로서 사용하거나 캡슐화, 결합 또는 네이키드 mRNA의 무세포 국소 또는 전신 전달을 사용하여, 조직 및 전체 생물 뿐만 아니라 다양한 유형의 진핵 세포로 전달될 수 있다. 사용되는 방법은 일시적 발현이 필요하거나 충분한 임의의 목적을 위한 것일 수 있다.
- [0674] 일부 실시형태에서, 원하는 CAR은 트랜스포존을 통해 세포에서 발현될 수 있다.
- [0675] 일부 실시형태에서, 본 발명의 면역 세포는, 예를 들면, T 세포이다. 본원에 기재된 바와 같이, T 세포(예를 들면, Treg 세포)의 확장 및 유전적 변형 전에, 세포는 대상체로부터 수득된다. T 세포는 말초 혈액 단핵

세포, 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직, 감염 부위의 조직, 복수, 흉막 삼출, 비장 조직 및 종양을 포함하여 다수의 공급원으로부터 입수할 수 있다. 본 발명의 특정 실시형태에서, 당해 기술분야에서 이용가능한 임의의 수의 T 세포주를 사용할 수 있다. 본 발명의 특정 실시형태에서, T 세포는 피콜(Ficoll™) 분리, 적혈구 용해 및 단핵구 고갈 후의 퍼콜(PERCOLL™) 구배를 통한 원심 분리, 역류 원심 용출, 백혈구 제거, 및 후속 세포 표면 마커-기반 자기 또는 유세포 분석 단리 등의 당업자에게 공지된 임의의 수의 기술을 사용하여 대상체로부터 수집된 혈액 단위로부터 획득될 수 있다. 일부 실시형태에서, 개인의 순환 혈액으로부터의 세포는 채집에 의해 획득된다. 채집 생성물은 일반적으로 T 세포, 단핵구, 과립구, B 세포, 기타 유핵 백혈구, 적혈구 및 혈소판을 포함한 림프구를 포함한다. 일부 실시형태에서, 개체의 순환 혈액으로부터의 세포는 백혈구채집에 의해 획득된다.

[0676] 일부 실시형태에서, 백혈구채집에 의해 수집된 세포는 세척하여, 혈장 분획을 제거하고, 후속 처리 단계를 위해 적절한 완충액 또는 배지에 세포를 배지할 수 있다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 세포는 인산염 완충 생리식염수(PBS)로 세척된다. 일부 실시형태에서, 세척 용액은 칼슘을 결여하고 마그네슘을 결여할 수 있거나, 모두는 아니지만 다수의 2가 양이온을 결여할 수 있다. 세척 후, 세포는 다양한 생체적합성 완충액, 예를 들면, Ca²⁺-비함유, Mg²⁺-비함유 PBS, PlasmaLyte A 또는 완충액을 포함하거나 포함하지 않는 기타 생리식염수 용액 중의 임의의 것에 재현탁될 수 있다. 대안적으로, 백혈구채집의 바람직하지 않은 성분을 제거하고, 세포를 배양 배지에 직접 재현탁할 수 있다.

[0677] T 세포의 특정 하위 집단은 양성 또는 음성 선택 기술에 의해 추가로 단리될 수 있다. 예를 들면, 일부 실시형태에서, T 세포는 원하는 T 세포의 양성 선택에 충분한 시간 동안, DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T 등의 항-CD3/항-CD28(즉, 3x28)-접합된 비드와의 인큐베이션에 의해 단리된다. 일부 실시형태에서, 시간은 약 30분이다. 추가 실시형태에서, 시간은 30분 내지 36시간 이상 범위이고, 이들 사이의 모든 정수 값이다. 추가 실시형태에서, 시간은 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6시간이다. 일부 실시형태에서, 시간은 10 내지 24시간이다. 특정 실시형태에서, 인큐베이션 시간은 24시간이다. 다른 세포 유형과 비교하여 T 세포가 거의 없는 모든 상황에서는, 보다 긴 배양 시간을 사용하여 T 세포를 단리할 수 있다. 따라서, T 세포가 항-CD3/항-CD28 비드에 결합하도록 허용되는 시간을 단순히 단축 또는 연장시키고/시키거나 비드 대 T 세포의 비율을 증가 또는 감소시킴으로써(본원에 추가로 기재된 바와 같이), T 세포의 하위 집단은 배양 개시시 또는 프로세스 동안의 다른 시점에서 우선적으로 선택될 수 있다. 추가적으로, 비드 또는 다른 표면 상의 항-CD3 및/또는 항-CD28 항체의 비율을 증가 또는 감소시킴으로써, T 세포의 하위 집단을, 배양 개시시 또는 다른 원하는 시점에서 또는 이와 반대로 우선적으로 선택될 수 있다. 당업자는, 본 발명의 문맥에서, 복수 라운드의 선택을 사용할 수 있음을 인식한다.

[0678] 일부 실시형태에서, 선택 절차를 수행하고, 활성화 및 확장 프로세스에서 "선택되지 않은" 세포를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. "선택되지 않은" 세포는 추가 라운드의 선택을 수행할 수 있다. 음성 선택에 의한 T 세포 집단의 풍부화는 음성으로 선택된 세포에 고유한 표면 마커에 대해 지시된 항체의 조합으로 달성될 수 있다. 한 가지 방법은, 음성으로 선택된 세포에 존재하는 세포 표면 마커에 대해 지시된 모노클로날 항체의 카테일을 사용하는, 음성 자기 면역-부착 또는 유세포 분석을 통한 세포 선별 및/또는 선택이다. 예를 들면, 음성 선택에 의해 CD4⁺ 세포를 풍부하게 하기 위해, 모노클로날 항체 카테일은 일반적으로 CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR 및 CD8에 대한 항체를 포함한다. 특정 실시형태에서, T 조절 세포는 항-CD25 접합된 비드 또는 다른 유사한 선택 방법에 의해 고갈된다.

[0679] 양성 또는 음성 선택에 의해 원하는 세포 집단을 단리하기 위해, 세포 및 표면(예를 들면, 비드 등의 입자)의 농도가 달라질 수 있다. 특정 실시형태에서, 세포 및 비드의 최대 접촉을 보장하기 위해, 비드 및 세포가 함께 혼합되는 용적을 상당히 감소시키는 것이 바람직할 수 있다(즉, 세포의 농도 증가). 예를 들면, 일부 실시형태에서, 20억 세포/mL의 농도가 사용된다. 일부 실시형태에서, 10억 세포/mL의 농도가 사용된다. 추가 실시형태에서, 1억 초과 세포/mL가 사용된다. 추가 실시형태에서, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 5천만 세포/mL의 세포 농도가 사용된다. 일부 실시형태에서, 75, 80, 85, 90, 95 또는 1억 세포/mL의 세포 농도가 사용된다. 추가 실시형태에서, 1억 2천 5백만 또는 1억 5천만 세포/mL의 농도가 사용될 수 있다. 고농도를 사용하면, 세포 수율, 세포 활성화 및 세포 확장이 증가할 수 있다. 또한, 높은 세포 농도를 사용하면, CD28-음성 T 세포 등의 목적 표적 항원을 약하게 발현할 수 있는 세포, 또는 다수의 종양 세포가 존재하는 샘플(즉, 백혈병 혈액, 종양 조직 등)로부터 세포를 보다 효율적으로 포획할 수 있다. 이러한 세포 집단은 치료적 가치를 가질 수 있으며, 획득하는 것이 바람직할 수 있다.

- [0680] 자극을 위한 T 세포는 또한 세척 단계 후에 동결될 수 있다. 이론에 얽매이지 않기를 바라면서, 동결 및 후속 해동 단계는 세포 집단에서 과립구를 제거하고 어느 정도 단핵구를 제거함으로써 보다 균일한 생성물을 제공한다. 혈장과 혈소판을 제거하는 세척 단계 후, 세포를 동결 용액에 현탁시킬 수 있다. 다수의 동결 용액 및 파라미터가 당해 기술분야에 공지되어 있고, 이러한 맥락에서 유용할 것이지만, 한 가지 방법은 20% DMSO 및 8% 인간 혈청 알부민을 포함하는 PBS 또는, 10% 텍스트란 40 및 5% 텍스트로즈, 20% 인간 혈청 알부민 및 7.5% DMSO, 또는 31.25% Plasmalyte-A, 31.25% 텍스트로즈 5%, 0.45% NaCl, 10% 텍스트란 40 및 5% 텍스트로즈, 20% 인간 혈청 알부민, 및 7.5% DMSO를 함유하는 배양 배지 또는, 예를 들면, 헤스판 및 PlasmaLyte A를 함유하는 기타 적합한 세포 동결 배지를 사용하는 것을 수반하고, 이어서 세포를 분당 1°의 속도로 -80°C로 동결하고, 액체 질소 저장 탱크의 기상에 저장한다. 조절된 동결의 다른 방법, 추가로 -20°C 또는 액체 질소에서 조절되지 않은 즉시 동결을 사용할 수 있다.
- [0681] 특정 실시형태에서, 동결보존된 세포는, 본원에 기재된 바와 같이 해동 및 세척되고, 활성화 전에 실온에서 1시간 동안 휴지시킨다.
- [0682] 본 발명의 문맥에서 또한, 본원에 기재된 바와 같이 확장된 세포가 필요할 수 있기 전의 기간에서 대상체로부터의 혈액 샘플 또는 백혈구채집 생성물의 수집이 고려된다. 따라서, 확장된 세포의 공급원은 필요한 임의의 시점에서 수집할 수 있으며, T 세포 등의 원하는 세포를 단리하고 동결하여, 이후에 본원에 기재된 것 등의 T 세포 요법으로부터 혜택을 받을 수 있는 임의의 수의 질환 또는 상태의 T 세포 요법에서 사용할 수 있다. 일부 실시형태에서, 혈액 샘플 또는 백혈구채집 생성물은 일반적으로 건강한 대상체로부터 채취된다. 특정 실시형태에서, 혈액 샘플 또는 백혈구채집 생성물은 질환을 발증할 위험이 있지만 아직 질환을 발증하지 않는 일반적으로 건강한 대상체로부터 채취한다. 목적 세포를 단리하고, 이후에 사용하기 위해 동결한다. 특정 실시형태에서, T 세포는 확장되고, 동결되고, 이후에 사용될 수 있다.
- [0683] 바람직한 CAR을 발현하기 위한 Treg 세포의 유전자 변형 전 또는 후에, T 세포는, 예를 들면, 미국 특허 제 6,352,694호; 제6,534,055호; 제6,905,680호; 제6,692,964호; 제5,858,358호; 제6,887,466호; 제6,905,681호; 제7,144,575호; 제7,067,318호; 제7,172,869호; 제7,232,566호; 제7,175,843호; 제5,883,223호; 제6,905,874호; 제6,797,514호; 및 제6,867,041호; 및 미국 특허 공보 제2006/0121005호(본원에 참조로 도입됨)에 기재된 방법을 일반적으로 사용하여 활성화 및 확장될 수 있다.
- [0684] 일반적으로, 본 발명의 T 세포(예를 들면, Treg 세포)는 CD3/TCR 복합체 관련 신호를 자극하는 약제 및 세포 표면 상의 공자극 분자를 자극하는 리간드를 부착시킨 표면과의 접촉에 의해 확장된다. 특히, T 세포(예를 들면, Treg 세포)는 항-CD3 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 표면에 고정된 항-CD2 항체와의 접촉에 의해, 또는 칼슘 이오노포어와 함께 단백질 키나제 C 활성화인자(예를 들어, 브리오스타틴)과의 접촉에 의해 본원에 기재된 바와 같이 자극될 수 있다. T 세포 표면 상의 보조 분자의 공자극을 위해, 보조 분자에 결합하는 리간드가 사용된다. 예를 들면, T 세포 집단은, T 세포의 증식을 자극하기에 적절한 조건하에서, 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체와 접촉시킬 수 있다. CD4⁺ T 세포의 증식을 자극하기 위해, 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체를 사용할 수 있다. 항-CD28 항체의 예는 9.3, B-T3, XR-CD28(Diacclone, Besancon, France)을 포함하지만 이들로 한정되지 않는다. 당해 기술분야에 일반적으로 공지되어 있는 다른 확장 방법을 사용할 수 있다[참조: Berg et al, Transplant Proc. 30 (8):3975-3977 (1998); Haanen et al, J. Exp. Med. 190 (9):1319-1328 (1999); Garland et al., J. Immunol Meth. 227 (1-2):53-63 (1999)].
- [0685] 특정 실시형태에서, 본 발명의 T 세포(예를 들면, Tregs)에 대한 1차 자극 신호 및 공자극 신호는 상이한 프로토콜에 의해 제공될 수 있다. 예를 들면, 각 신호를 제공하는 약제는 용액 상태 중에 존재할 수 있고/있거나 표면에 결합될 수 있다. 표면에 결합하는 경우, 약제는 동일한 표면(즉, "시스" 형성) 또는 분리된 표면(즉, "트랜스" 형성)에 결합될 수 있다. 대안적으로, 하나의 약제를 표면에 결합시키고, 다른 약제를 용액 중에서 결합시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 공자극 신호를 제공하는 약제는 세포 표면에 결합시키고, 1차 활성화 신호를 제공하는 약제는 용액 중에 존재하거나 표면에 결합시킨다. 특정 실시형태에서, 두 약제는 용액 중에 존재할 수 있다. 일부 실시형태에서, 약제는 가용성 형태일 수 있고, 이어서, 예를 들면, Fc 수용체를 발현하는 세포 또는 약제에 결합하는 항체 또는 다른 결합제 등의 표면에 가교-결합할 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명에서 T 세포의 활성화 및 확장에 사용하기 위해 고려되는 인공 항원 제시 세포(aAPC)에 대해서는, 예를 들면, 참조에 의해 본원에 도입되는 미국 특허 공보 제2004/0101519호 및 제2006/0034810호를 참조한다.
- [0686] 일부 실시형태에서, 2개의 약제는 동일한 비드, 즉 "시스" 상에 또는 분리된 비드, 즉 "트랜스" 상에 고정화시킨다. 예를 들면, 1차 활성화 신호를 제공하는 약제는 항-CD3 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고, 공자극 신

호를 제공하는 약제는 항-CD28 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고; 두 약제는 동일한 분자량으로 동일한 비드에 공동 고정화시킨다. 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T 세포 확장 및 T 세포 성장을 위해 비드에 결합된 각 항체의 1:1 비율이 사용된다. 본 발명의 특정 국면에서, 비드에 결합된 항 CD3:항-CD28 항체의 비율은, 1:1의 비율을 사용하여 관찰된 확장과 비교하여, T 세포 확장의 증가가 관찰되도록 사용된다. 일부 실시형태에서, 1:1의 비율을 사용하여 관찰된 확장과 비교하여, 약 1 내지 약 3배의 증가가 관찰된다. 일부 실시형태에서, 비드에 결합된 항-CD3:항-CD28 항체의 비율은 100:1 내지 1:100 범위 및 이들 사이의 모든 정수 값이다. 일부 실시형태에서, 항-CD3 항체보다 많은 항-CD28 항체가 입자에 결합되고, 즉 CD3:CD28의 비는 1 미만이다. 본 발명의 특정 실시형태에서, 비드에 결합된 항-CD28 항체 대 항 CD3 항체의 비율은 2:1보다 크다. 한 가지 특정 실시형태에서, 비드에 결합된 항체의 1:100 CD3:CD28 비가 사용된다. 일부 실시형태에서, 비드에 결합된 항체의 1:75 CD3:CD28 비가 사용된다. 추가 실시형태에서, 비드에 결합된 항체의 1:50 CD3:CD28 비가 사용된다. 일부 실시형태에서, 비드에 결합된 항체의 1:30 CD3:CD28 비가 사용된다. 특정 실시형태에서, 비드에 결합된 항체의 1:10 CD3:CD28 비가 사용된다. 일부 실시형태에서, 비드에 결합된 항체의 1:3 CD3:CD28 비가 사용된다. 일부 실시형태에서, 비드에 결합된 항체의 3:1 CD3:CD28 비가 사용된다.

[0687] 1:500 내지 500:1의 입자 대 세포의 비율 및 이들 사이의 임의의 정수 값을 사용하여, T 세포 또는 다른 표적 세포를 자극할 수 있다. 당업자가 용이하게 이해할 수 있는 바와 같이, 입자 대 세포의 비율은 표적 세포에 대한 입자 크기에 의존할 수 있다. 예를 들면, 작은 크기의 비드는 소수의 세포에만 결합할 수 있는 반면, 큰 비드는 다수의 세포에 결합할 수 있다. 특정 실시형태에서, T 세포는 1:100 내지 100:1 범위의 세포 대 입자의 비율 및 이들 사이의 임의의 정수 값으로 자극시킬 수 있다. 특정 실시형태에서, 비율은 1:9 내지 9:1 및 이들 사이의 임의의 정수 값을 포함한다. T 세포 자극을 초래하는 T 세포에 대한 항-CD3- 및 항-CD28-결합 입자의 비율은, 상기에서 언급한 바와 같이 다양할 수 있고; 그러나, 값의 특정 실시형태는 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 15:1이고, 하나의 특정 비율은 T 세포당 적어도 1:1의 입자이다. 일부 실시형태에서, 1:1 이하의 입자 대 세포의 비가 사용된다. 특정 실시형태에서, 입자:세포 비는 1:5이다. 추가 실시형태에서, 입자 대 세포의 비는 자극 일수에 따라 달라질 수 있다. 예를 들면, 일부 실시형태에서, 입자 대 세포의 비는 초일에 1:1 내지 10:1이고, 추가 입자가, 1:1 내지 1:10(추가 일의 세포 수에 기초)의 최종 비율로, 최대 10일 동안, 매일 또는 격일로 세포에 첨가된다. 한 가지 특정 실시형태에서, 입자 대 세포의 비는 자극의 초일에 1:1이고, 자극의 3일차 및 5일차에 1:5로 조정된다. 일부 실시형태에서, 입자는 매일 또는 격일 기준으로 자극의 초일에 1:1, 및 자극 3일차 및 5일차에 1:5의 최종 비율로 추가된다. 일부 실시형태에서, 입자 대 세포의 비율은 자극 초일에 2:1이고, 자극의 3일차 및 5일차에 1:10으로 조정된다. 일부 실시형태에서, 입자는 자극의 1일차에 1:1, 및 자극의 3일차 및 5일차에 1:10의 최종 비율로 매일 또는 격일로 첨가된다. 당업자는 다양한 다른 비율이 본 발명에서 사용하기에 적합할 수 있음을 이해할 것이다. 특히 비율은 입자 크기 및 세포 크기 및 유형에 따라 상이하다.

[0688] 본 발명의 추가 실시형태에서, 면역 세포는 약제-코팅된 비드와 조합되고, 비드 및 세포는 후속적으로 분리된 다음, 세포가 배양된다. 대안적 실시형태에서, 배양 전에, 약제-코팅된 비드 및 세포는 분리되지 않고, 함께 배양된다. 일부 실시형태에서, 비드 및 세포는, 자기력 등의 힘의 적용에 의해 먼저 농축되어, 세포 표면 마커의 결찰을 증가시키고, 이에 의해 세포 자극을 유도한다.

[0689] 예를 들면, 세포 표면 단백질은, 항-CD3 및 항-CD28 항체가 부착된 상자성(paramagnetic) 비드(3x28 비드)를 본 발명의 Treg 세포와 접촉시킴으로써 결찰시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포(예를 들어, 10^4 내지 10^9 T 세포) 및 비드(예를 들면, 1:1 비율의 DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T 상자성 비드)는, PBS 등의 완충액(예를 들어, 칼슘 및 마그네슘 등의 2가 양이온 부재)에서 결합된다. 이 경우에도, 당업자는, 상황에 따라 임의의 세포 농도를 사용할 수 있음을 용이하게 이해할 수 있다. 예를 들면, 표적 세포는, 샘플에서 매우 드물고, 샘플의 0.01%만을 포함하거나, 전체 샘플(즉, 100%)이 목적 표적 세포를 포함할 수 있다. 따라서, 임의의 세포 수는 본 발명의 문맥 내에 있다. 특정 실시형태에서, 세포 및 입자의 최대 접촉을 보장하기 위해, 입자 및 세포가 함께 혼합되는 용적을 현저히 감소시키는 것이 바람직할 수 있다(즉, 세포의 농도 증가). 예를 들면, 한 가지 실시형태에서, 약 20억 세포/mL의 농도가 사용된다. 다른 실시형태에서, 1억개 초과 세포/mL가 사용된다. 추가 실시형태에서, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 4천5백만 또는 5천만 세포/mL의 세포 농도가 사용된다. 또 다른 실시형태에서, 75, 80, 85, 90, 95 또는 1억 세포/mL의 세포 농도가 사용된다. 추가 실시형태에서, 1억2천5백만 또는 1억5천만 세포/mL의 농도가 사용될 수 있다. 고농도를 사용하면, 세포 수율, 세포 활성화 및/또는 세포 확장이 증가할 수 있다. 또한, 높은 세포 농도를 사용하면, CD28 음성 T 세포 등의 목적 표적 항원을 약

하게 발현할 수 있는 세포를 보다 효율적으로 포획할 수 있다. 이러한 세포 집단은 치료적 가치를 가질 수 있고, 특정 실시형태에서 수득하는 것이 바람직할 수 있다.

[0690] 본 발명의 일부 실시형태에서, 혼합물은 수시간(예를 들면, 약 3시간) 내지 약 14일 동안, 또는 이들 사이의 임의의 시간 정수 값 동안 배양될 수 있다. 일부 실시형태에서, 혼합물은 21일 동안 배양될 수 있다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 비드 및 T 세포는 약 8일 동안 함께 배양된다. 일부 실시형태에서, 비드 및 T 세포는 2-3일 동안 함께 배양된다. T 세포의 배양 시간이 60일 이상이 되도록, 자극의 몇몇 사이클이 또한 바람직할 수 있다. T 세포 배양에 적합한 조건에는, 혈청(예를 들어, 태소 또는 인간 혈청), 인터류킨-2(IL-2), 인슐린, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF β 및 TNF- α 또는 당업자에게 공지된 세포의 성장을 위한 임의의 다른 첨가제를 포함하여 증식 및 생존에 필요한 인자를 포함할 수 있는 적절한 배지(예를 들어, 최소 필수 배지 또는 RPMI 배지 1640 또는 X-vivo 15, (Lonza))가 포함된다. 세포 성장을 위한 다른 첨가제는, N-아세틸-시스테인 및 2-머캅토에탄올 등의 계면활성제, 플라즈마네이트 및 환원제를 포함하지만 이들로 한정되지 않는다. 배지에는 RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, a-MEM, F-12, X-Vivo 15 및 X-Vivo 20, 옵티마이저(Optimizer)가 포함될 수 있으며, 아미노산, 나트륨 피루브베이트 및 비타민이 무혈청으로 첨가되거나, 또는 적절한 양의 혈청(또는 혈장) 또는 정의된 호르몬 세트 및/또는 T 세포의 성장 및 확장에 충분한 양의 사이토카인(들)이 보충된다. 페니실린 및 스트렙토마이신 등의 항생제는, 실험 배양에만 포함되며, 대상체에게 주입될 세포 배양에는 포함되지 않는다. 표적 세포는 성장을 서포트하는데 필요한 조건하, 예를 들면, 적절한 온도(예를 들어, 37°C) 및 대기(예를 들어, 공기 + 5% CO₂)에서 유지된다.

[0691] 다양한 자극 시간에 노출된 T 세포는 상이한 특성을 나타낼 수 있다. 예를 들면, 전형적 혈액 또는 말초 혈액 단핵 세포 생성물은, 세포독성 또는 억제인자 T 세포 집단(Tc, CD8⁺)보다 더 많은 헬퍼 T 세포 집단(Th, CD4⁺)을 갖고 있다. CD3 및 CD28 수용체를 자극함으로써 T 세포의 생체외 확장은, 약 8 내지 9일 이전에는 주로 Th 세포로 이루어진 T 세포 집단을 생성하는 반면, 약 8 내지 9일 후, T 세포 집단은 점점 더 많은 Tc 세포의 집단을 포함한다. 치료 목적에 따라, 일부 실시형태에서, 주로 Th 세포를 포함하는 T 세포 집단을 대상체에 주입하는 것이 유리할 수 있다. 일부 실시형태에서, Tc 세포의 항원-특이적 서브세트가 단리된 경우, 이 서브세트를 더 크게 확장하는 것이 유리할 수 있다.

[0692] 또한, CD4 및 CD8 마커에 추가하여, 다른 표현형 마커는 현저히 다양하지만, 대부분은 세포 확장 프로세스의 과정에서 재현 가능하다. 이러한 재현성은 특정 목적을 위해 활성화된 T 세포 생성물을 조정할 수 있게 한다.

[0693] 본 발명의 일부 실시형태에서, T 세포는, 예를 들면, PCT 특허 공보 제WO 2007/110785호(본원에 참조로 도입됨)에 기재된 바와 같이, 조절 T 세포를 수득하기 위해 라파마이신의 존재하에 배양될 수 있다. 조절 T 세포를 생성하는 또 다른 방법은 미국 특허 공보 제2016/024470호(본원에 참조로 도입됨)에 기재되어 있으며, 여기서 T 세포는, 예를 들면, TCR/CD3 항체, TCR 공자극 활성화인자, 예를 들면, CD28, CD137(4-1 BB), GITR, B7-1/2, CD5, ICOS, OX40, CD40 또는 CD137 항체, 및 라파마이신 등의 T 세포 수용체(TCR)/CD3 활성화제와 함께 배양된다.

[0694] 본 발명의 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 CAR의 발현에 의해 유전적으로 변형된 T 세포는 또한, ROR-C, FoxP3, Foxo1, T-bet 또는 Gata 3, c-Maf 또는 AhR 등의 적어도 하나의 세포내 인자의 발현에 의해 유전적으로 변형될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 유전적으로 변형된 면역 세포는 FoxP3을 발현한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 유전적으로 변형된 면역 세포는 Foxo1을 발현한다.

[0695] 일부 실시형태에서, 본 발명의 유전적으로 변형된 면역 세포는 동종이계 면역 세포일 수 있다. 이러한 경우, 세포는, 세포에 대한 숙주 거부(이식편 거부) 및/또는 숙주에 대한 세포의 잠재적 공격(이식편 대 숙주 질환)을 감소시키도록 조작될 수 있다. 예를 들면, 세포는 다음 중 하나 이상에 대해 높 유전자형을 갖도록 조작될 수 있다: (i) T 세포 수용체(TCR 알파 사슬 또는 베타 쇄); (ii) 다형성 주요 조직적합성 복합체(MHC) 클래스 I 또는 II 분자(예를 들어, HLA-A, HLA-B 또는 HLA-C; HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ 또는 HLA-DR, 또는 β 2-마이크로글로불린(B2M)); (iii) 항원 처리와 관련된 수송체(예를 들어, TAP-1 또는 TAP-2); (iv) 클래스 II MHC 트랜스활성화제(CUTA); (v) 소수 조직적합성 항원(MiHA; 예를 들면, HA-1/A2, HA-2, HA-3, HA-8, HB-1H, 또는 HB-1Y); 및 (vi) 이들의 임의의 조합. 동종이계 조작된 세포는 또한, 조작된 Treg 세포를 숙주 거부로부터 보호하기 위해 불변 HLA 또는 CD47을 발현할 수 있다. 이러한 추가 유전자 변형은 당해 기술분야에 공지된 유전자 편집 기술 및 본원에 기재된 기술에 의해 수행될 수 있다.

[0696] 추가로 편집된 동종이계 세포는, 적합성 문제없이 복수 환자에서 사용할 수 있기 때문에 특히 유용하다. 따라

서, 동종이계 세포는 "범용"이라고 불릴 수 있으며, "기성"으로 사용할 수 있다. "범용" 세포를 사용하면, 효율성이 크게 향상되고, 채용된 세포 요법의 비용이 절감된다.

- [0697] 특정 실시형태에서, 동종이계 면역 세포는, 이의 표면 상에 임의의 기능적 TCR도 발현하지 않도록 조작될 수 있고, 기능적 TCR을 포함하는 하나 이상의 아단위를 발현하지 않도록 조작되거나, 각각이 이의 표면 상에 기능적 TCR을 거의 생성하지 않도록 조작될 수 있다. 예를 들면, 본원에 기재된 면역 세포는, TCR 분자의 세포 표면 발현이 하향조절되도록 조작될 수 있다. 대안적으로, T 세포는, 예를 들면, TCR의 하나 이상의 아단위의 돌연변이되거나 절두된 형태의 발현에 의해 실질적으로 손상된 TCR을 발현할 수 있다. 용어 "실질적으로 손상된 TCR"은, 이 TCR이 숙주에서 유해한 면역 반응을 유발하지 않는 것을 의미한다.
- [0698] 특정 실시형태에서, 동종이계 면역 세포는, 이들의 표면에서 기능적 HLA를 발현하지 않도록 조작될 수 있다. 예를 들면, 본원에 기재된 면역 세포는, HLA, 예를 들면, HLA 클래스 I 및/또는 HLA 클래스 II 및/또는 비-고전적 HLA 분자의 세포 표면 발현이 하향조절되도록 조작될 수 있다.
- [0699] 특정 실시형태에서, T 세포는 기능적 TCR 및 HLA 클래스 I 및/또는 HLA 클래스 II 등의 기능적 HLA를 결여할 수 있다.
- [0700] 기능적 TCR 및/또는 HLA의 발현을 결여하는 변형된 면역 세포는, TCR 및/또는 HLA의 하나 이상의 아단위의 녹아웃 또는 녹다운을 포함하는, 임의의 적합한 수단에 의해 수득될 수 있다. 예를 들면, Treg 세포는, siRNA, shRNA, 클러스터링된 규칙적 간격의 짧은 회문 반복(CRISPR), 전사 활성화인자 유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), 징크 핑거 엔도뉴클레아제(ZFN), 메가뉴클레아제(mn, 호밍 엔도뉴클레아제라고도 공지됨) 또는 megaTAL(TAL 효과기와 mn 절단 도메인의 조합)을 사용하는 TCR 및/또는 HLA의 녹다운을 포함할 수 있다.
- [0701] 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 바와 같은 CAR을 코딩하는 핵산은, 예를 들면, 결실될 유전자의 유전자좌 등의 면역 세포 계놈의 특정 유전자좌에 삽입된다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 CAR을 코딩하는 핵산은, TCR 및/또는 HLA 유전자좌 내에 삽입되고, 이에 의해 TCR 및/또는 HLA 발현의 억제를 초래한다.
- [0702] 일부 실시형태에서, TCR 및/또는 HLA 발현은, T 세포에서 TCR 및/또는 HLA를 코딩하는 핵산을 표적화하는 siRNA 또는 shRNA를 사용하여 억제될 수 있다. T 세포에서 siRNA 및 shRNA의 발현은, 예를 들면, 렌티바이러스 발현 시스템 등의 임의의 종래의 발현 시스템을 사용하여 달성될 수 있다. HLA 클래스 I 및/또는 HLA 클래스 II 유전자의 발현을 하향조절하는 예시적 siRNA 및 shRNA는, 예를 들면, 미국 특허 공보 제2007/0036773호에 기재되어 있다. TCR 성분의 발현을 하향조절하는 예시적 shRNA는, 예를 들면, 미국 특허 공보 제2012/0321667호에 기재되어 있다.
- [0703] 본원에 사용된 "CRISPR" 또는 "TCR 및/또는 HLA에 대한 CRISPR" 또는 "TCR 및/또는 HLA를 억제하기 위한 CRISPR"은, 클러스터링된 규칙적 간격의 짧은 회문 반복의 세트, 또는 이러한 반복 세트를 포함하는 시스템을 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, "Cas"는 CRISPR-연관 단백질을 지칭한다. "CRISPR/Cas" 시스템은, TCR 및/또는 HLA 유전자를 사일런싱 또는 돌연변이시키기 위해 사용할 수 있는 CRISPR 및 Cas에서 파생된 시스템을 지칭한다.
- [0704] 천연에 존재하는 CRISPR/Cas 시스템은, 서열결정된 진정세균 계놈의 약 40% 및 서열결정된 고세균의 90%에서 발견된다[참조: 예를 들면, Grissa et al. (BMC Bioinformatics 8:172(2007))]. 이 시스템은, 플라스미드 및 파지 등의 외래 유전 요소에 대한 내성을 부여하고, 획득 면역의 한 형태를 제공하는 원핵생물 면역계의 일종이다[참조: 예를 들면, Barrangou et al, Science 315:1709-1712(2007); Marragini et al., Science 322:1843-1845 (2008)]. CRISPR/Cas 시스템은, 마우스 또는 영양류 등의 진핵생물의 유전자 편집(특정 유전자 사일런싱, 증강 또는 변경)에 사용하기 위해 변형되었다[참조: 예를 들면, Wiedenheft et al., Nature 482:331-8 (2012)]. 이것은, 특별히 설계된 CRISPR 및 하나 이상의 적절한 Cas-코딩 서열을 포함하는 플라스미드를 진핵 세포에 도입함으로써 달성된다. CRISPR 유전자좌라고 종종 불리우는 CRISPR 서열은, 교호하는 반복체 및 스페이서를 포함한다. 천연 존재 CRISPR에서, 스페이서는 통상, 플라스미드 또는 파지 서열 등의 세균에 대해 외래의 서열을 포함하고; TCR 및/또는 HLA CRISPR/Cas 시스템에서, 스페이서는 TCR 및/또는 HLA 유전자 서열에서 유래된다. CRISPR 유전자좌의 RNA는, Cas 단백질에 의해 구성적으로 발현 및 처리되어 작은 RNA로 된다. 이들은, 반복 서열에 인접하는 스페이서를 포함한다. RNA는, 다른 Cas 단백질을 유도하여, RNA 또는 DNA 수준에서 외인성 유전 요소를 사일런싱시킨다[참조: 예를 들면, Horvath et al, Science 327:167-170 (2010); Makarova et al, Biology Direct 1:7 (2006)]. 따라서, 스페이서는, siRNA와 유사하게, RNA 분자의 주형으로서 작용한다[참조: 예를 들면, Pennisi, Science 341:833-836 (2013)]. 따라서, CRISPR/Cas 시스템을 사용하

여, TCR 및/또는 HLA 유전자를 편집(염기 쌍을 부가 또는 결실)하거나, TCR 및/또는 HLA의 발현을 저하시키는 조속 정지를 도입할 수 있다. CRISPR/Cas 시스템은, 대안적으로 또는 추가적으로 RNA 간섭과 같이 사용되어, TCR 및/또는 HLA 유전자를 가역적 방식으로 오프로 할 수 있다. 예를 들면, 포유동물 세포에서, RNA는 Cas 단백질에 TCR 및/또는 HLA 프로모터로 안내하여, RNA 폴리머라제를 입체적으로 차단할 수 있다.

[0705] 당해 기술분야에 공지된 기술, 예를 들면, 미국 특허 공보 제2014/0068797호 및 문헌[참조: Cong, Science 339:819-823 (2013)]에 기재된 기술을 사용하여, TCR 및/또는 HLA를 억제하는 인공 CRISPR/Cas 시스템을 생성할 수 있다. 당해 기술분야에 공지된 다른 인공 CRISPR/Cas 시스템은 또한, TCR 및/또는 HLA를 억제하기 위해 생성될 수 있다[참조: 예를 들면, 문헌(Tsai, Nature Biotechnol. 32:6569-576 (2014)) 및 미국 특허 제 8,871,445호; 제8,865,406호; 제8,795,965호; 제8,771,945호; 및 제8,697,359호에 기재된 것들].

[0706] 상기 절차는 Cpf1 및 C2c1/2/3 등의 Cas 이외의 엔도뉴클레아제를 이용하는 CRISPR 시스템에 의해 또한 수행될 수 있음이 이해된다.

[0707] "TALEN" 또는 "TCR 및/또는 HLA에 대한 TALEN" 또는 "TCR 및/또는 HLA를 억제하기 위한 TALEN"은, TCR 및/또는 HLA 유전자를 편집하는데 사용될 수 있는 인공 뉴클레아제인 전사 활성화인자-유사 효과기 뉴클레아제를 지칭한다. TALEN은, TAL 효과기 DNA 결합 도메인을 DNA 절단 도메인에 융합시킴으로써 인공적으로 생산된다. 전사 활성화인자 유사 효과기(TALE)는, TCR 및/또는 HLA 유전자의 일부를 포함하여 임의의 원하는 DNA 서열에 결합하도록 조작될 수 있다. 조작된 TALE를 DNA 절단 도메인과 조합함으로써, TCR 및/또는 HLA 서열을 포함하는 임의의 원하는 DNA 서열에 특이적인 제한 효소를 생산할 수 있다. 이어서, 이들을 세포에 도입하여, 게놈 편집에 사용할 수 있다[참조: 예를 들면, Boch, Nature Biotech. 29:135-6 (2011); Boch et al., Science 326:1509-12(2009); and Moscou et al., Science 326: 3501 (2009)].

[0708] TALE는 크산토모나스 세균에 의해 분비되는 단백질이다. DNA 결합 도메인은, 12번째 및 13번째 아미노산을 제외하고, 고도로 보존된 반복된 33-34ro 아미노산 서열을 포함한다. 이들 2개 위치는 매우 가변적이며, 특정 뉴클레오티드 인식과 강력한 상관관계를 나타낸다. 따라서, 이들은, 원하는 DNA 서열에 결합하도록 조작할 수 있다. TALEN을 생산하기 위해, TALE 단백질을 뉴클레아제(N)에 융합시키고, 이 뉴클레아제(N)은 야생형 또는 돌연변이된 FokI 엔도뉴클레아제이다. TALEN에서 사용하기 위해, FokI에 대한 몇몇 돌연변이가 이루어졌고, 이들은, 예를 들면, 절단 특이성 또는 활성을 개선한다[참조: 예를 들면, Cermak et al., Nucl. Acids Res. 39:e82(2011); Miller et al., Nature Biotech. 29:143-8 (2011); Hockemeyer et al., Nature Biotech. 29:731-734 (2011); Wood et al., Science 333:307 (2011); Doyon et al., Nature Methods 8:74-79 (2010); Szczepek et al., Nature Biotech. 25:786-793 (2007); and Guo et al., J. Mol. Biol. 200:96 (2010)]. FokI 도메인은 이량체로서 기능하며, 적절한 방향과 간격으로 표적 게놈 내의 부위에 고유한 DNA 결합 도메인을 갖는 2개 작제물을 필요로 한다. TALE DNA 결합 도메인과 FokI 절단 도메인 사이의 아미노산 잔기 수와 2개 개별 TALEN 결합 부위 사이의 염기 수는 모두 높은 수준의 활성을 달성하는데 중요한 파라미터인 것으로 보인다 [참조: Miller et al, Nature Biotech. 29:143-8 (2011)]. TCR 및/또는 HLA TALEN을 세포 내부에서 사용하여, 이분쇄 절단(DSB)을 생성할 수 있다. 수복 메커니즘이 비상동 말단 결합을 통해 절단을 부적절하게 수복하는 경우, 절단 부위에 돌연변이가 도입될 수 있다. 예를 들면, 부적절한 수복은 프레임 이동 돌연변이를 유발할 수 있다. 또는, 외래 DNA를 TALEN과 함께 세포에 도입할 수 있다. 외래 DNA의 서열 및 염색체 서열에 따라, 이 프로세스를 사용하여, TCR 및/또는 HLA 유전자의 결합을 수정하거나, 이러한 결합을 wt HLA 유전자에 도입하여, TCR 및/또는 HLA의 발현을 감소시킬 수 있다. TCR 및/또는 HLA의 서열에 특이적인 TALEN은, 모듈 구성요소를 사용하는 다양한 도식을 포함하여 당해 기술분야에 공지되어 있는 임의의 방법을 사용하여 작제될 수 있다 [참조: Zhang et al, Nature Biotech. 29:149-53 (2011); Geibler et al., PLoS). ONE 6:e19509 (2011)].

[0709] "ZFN" 또는 "징크 핑거 뉴클레아제" 또는 "TCR 및/또는 HLA에 대한 ZFN" 또는 "TCR 및/또는 HLA를 억제하기 위한 ZFN"은 징크 핑거 뉴클레아제, TCR 및/또는 HLA 유전자를 편집하는데 사용될 수 있는 인공 뉴클레아제를 지칭한다. TALEN과 마찬가지로, ZFN은 DNA 결합 도메인에 융합된 FokI 뉴클레아제 도메인(또는 이의 유도체)을 포함한다. ZFN의 경우, DNA-결합 도메인은 하나 이상의 징크 핑거를 포함한다[참조: 예를 들면, Carroll et al, Genetics Society of America 188:773-782(2011); and Kim et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:1156-1160 (1996)]. 징크 핑거는 하나 이상의 아연 이온에 의해 안정화된 작은 단백질 구조 모티프이다. 징크 핑거는, 예를 들면, Cys₂His₂를 포함할 수 있으며, 대략 3bp 서열을 인식할 수 있다. 공지된 특이성의 다양한 징크 핑거를 조합하여, 약 6, 9, 12, 15 또는 18bp 서열을 인식하는 다중-핑거 폴리펩티드를 생성할 수 있다. 파지 디스플레이, 효모 원-하이브리드 시스템, 세균 원-하이브리드 및 투-하이브리드 시스템, 포유동물 세포를 포함

하여, 특정 서열을 인식하는 징크 핑거(및 이들의 조합)를 생성하기 위해 다양한 선택 및 모듈식 어셈블리 기술을 사용할 수 있다.

- [0710] TALEN과 마찬가지로, ZFN은, DNA를 절단하기 위해 이량체화되어야 한다. 따라서, 비-회문 DNA 부위를 표적화하기 위해서는 한 쌍의 ZFN이 필요하다. 2개의 개별 ZFN은, 뉴클레아제가 적절한 간격으로 떨어져 있는 DNA의 반대측 쇠에 결합해야 한다[참조: Bitinaite et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:10570-5 (1998)]. 또한, TALEN과 마찬가지로, ZFN은 DNA에서 이분쇄 절단을 생성할 수 있으며, 이는 부적절하게 수복될 경우에 프레임-이동 돌연변이를 생성하여, 세포에서 TCR 및/또는 HLA의 발현과 양을 감소시킬 수 있다. ZFN은 또한, TCR 및/또는 HLA 유전자를 돌연변이시키기 위해 상동성 재조합과 함께 사용될 수 있다. TCR 및/또는 HLA의 서열에 특이적인 ZFN은, 당해 기술분야에 공지된 임의의 방법을 사용하여 구축할 수 있다[참조: 예를 들면, Provasi, Nature Med. 18:807-815 (2011); Torikai, Blood 122:1341-1349 (2013); Cathomen et al., Mol. Ther. 16:1200-7 (2008); Quo et al., J. Mol. Biol. 400:96 (2010); 및 미국 특허 공보 제2011/0158957호 및 제2012/0060230호].
- [0711] "메가뉴클레아제" 또는 "TCR 및/또는 HLA에 대한 메가뉴클레아제" 또는 "TCR 및/또는 HLA를 억제하기 위한 메가뉴클레아제"는, 큰(>14개 염기쌍) 인식 부위를 갖는 단량체형 엔도뉴클레아제를 지칭하며, 이를 사용하여, TCR 및/또는 HLA 유전자를 편집할 수 있다. 메가뉴클레아제(mn)는, 세균 호밍 엔도뉴클레아제에서 유래하고 고유한 표적 부위를 위해 조작된, 타고난 뉴클레아제 활성을 갖는 단량체 단백질이다. 호밍 엔도뉴클레아제는 숙주 게놈의 개별 유전자좌에서 이분쇄 절단을 생성하고, 이에 의해 부위 특이적 유전자 전환 이벤트를 유도할 수 있는 DNA 절단 효소이다[참조: Stoddard, Structure 19 (1):7-15 (2011)]. 작은 크기에도 불구하고, 호밍 엔도뉴클레아제는 긴 DNA 서열(일반적으로 20 내지 30개 염기쌍)을 인식한다. 호밍 엔도뉴클레아제는 매우 광범위하게 보급되어 있고, 미생물 뿐만 아니라 파지 및 바이러스에서도 발견된다. LAGLIDADG 및 His-Cys 박스 효소(이들 효소 중에서 가장 서열-특이적이다)는, DNA 표적 부위의 주요 그루브에 도킹하는 역평행 β -시트에 의존한다[참조: Flick et al., Nature 394 (6688):96-101 (1998); Jurica et al., Mol. Cell. 2(4):469-76 (1998)]. 이들은, 복수의 연속 염기쌍에 걸쳐 불균일하게 분포된 서열 특이적 및 비특이적 접촉의 콜렉션을 확립한다[참조: Chevalier et al, J Mol Biol 329 (2):253-269 (2003); Scalley-Kim et al., J Mol Biol. 372(5):1305-19 (2007)].
- [0712] LAGLIDADG 호밍 엔도뉴클레아제(LHE) 패밀리는, 유전자 표적화 적용에 사용되는 조작된 효소의 주요 공급원이다. LHE 패밀리는 주로 고세균 내 및 조류와 진균의 엽록체 및 미토콘드리아 게놈에서 코딩된다[참조: Chevalier et al, in Homing Endonucleases and Inteins. Nucleic Acids and Molecular Biology, vol. 16 (2005); Dalgaard et al, Nucleic Acids Res 25 (22):4626-38 (1997); Sethuraman et al., Mol Biol Evol. 26 (10):2299-315 (2009)]. 단백질 쇠당 단일 보존된 LAGLIDADG 모티프(서열번호 58)를 갖는 메가뉴클레아제는, 회문 및 거의 회문 DNA 표적 서열을 절단하는 호모이량체 단백질을 형성하는 반면, 단백질 쇠당 2개의 이러한 모티프를 포함하는 것은, 완전히 비대칭 DNA 서열을 표적화할 수 있는 보다 큰 유사 대칭 모노머를 형성한다.
- [0713] 메가뉴클레아제는, TCR 및/또는 HLA를 표적화하도록 조작될 수 있고, 따라서, DNA에서 이분쇄 절단을 생성할 수 있으며, 이는, 부적절하게 수복되는 경우에 프레임-이동 돌연변이를 생성하여, 세포에서 TCR 및/또는 HLA의 발현 및 양을 감소시킬 수 있다.
- [0714] "MegaTAL" 또는 "TCR 및/또는 HLA에 대한 megaTAL" 또는 "TCR 및/또는 HLA를 억제하기 위한 megaTAL"은, TCR 및/또는 HLA 유전자를 편집하는데 사용될 수 있는 인공 뉴클레아제를 지칭한다. MegaTAL은, 최소 TAL(전사 활성화인자 유사) 효과가 도메인을 LAGLIDADG 호밍 엔도뉴클레아제 패밀리에서 유래된 메가뉴클레아제의 N-말단에 융합시킴으로써 수득된 하이브리드 단량체 뉴클레아제이다[참조: Boissel et al, Nucleic Acids Res. 42(4):2591-601 (2014); Takeuchi et al, Methods Mol Biol. 1239:105-32(2015)]. 따라서, MegaTAL은, TAL 효과가 DNA 결합 도메인에 의해 제공되는 추가 친화성 및 특이성을 갖는 부위-특이적 메가뉴클레아제 절단 헤드 로 이루어진다.
- [0715] MegaTAL은, TCR 및/또는 HLA를 표적화하도록 조작될 수 있고, 따라서, DNA에서 이분쇄 절단을 생성할 수 있으며, 이는, 부적절하게 수복되는 경우에 프레임-이동 돌연변이를 생성하여, 세포에서 TCR 및/또는 HLA의 발현 및 양의 감소를 유도할 수 있다. I-Onu1 메가뉴클레아제(mn)의 변이체를 사용하여, T-세포 수용체 알파(TCR α) 유전자를 녹아웃시키는 TCR α -megaTAL을 설계했다. TCR α mn은, TCR α mn 결합 부위의 상류에 있는 DNA 서열에 결합하도록 설계된 10.5 반복 TALE 어레이에 융합시켰다. TCR α 를 표적화하는 megaTAL은, 인간 초대 T 세포

에서 검출가능한 오프-타겟 절단을 수반하지 않고서 매우 높은 유전자 파괴를 달성한 것으로 밝혀졌다[참조: Boissel et al, Nucleic Acids Res 42(4):2591-601 (2014)].

- [0716] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR을 발현하는 T 세포 집단은, 내인성 T 세포 수용체(TCR)를 결여하거나, 내인성 TCR의 발현 또는 활성을 감소 또는 제거하도록 변경된 것이다. HLA 발현을 억제 또는 제거하기 위한 본원에 기재된 임의의 방법을 또한 사용하여, 내인성 TCR의 하나 이상의 성분을 표적화할 수 있음이 이해된다.
- [0717] 일부 실시형태에서, 텔로머라제 유전자를 사용한 형질감염은, T 세포의 텔로미어를 연장시키고, 환자에서 T 세포의 지속성을 개선시킬 수 있다[참조: 예를 들면, June, Journal of Clinical Investigation 117:1466-1476 (2007)]. 따라서, 일부 실시형태에서, 본 발명의 유전적으로 변형된 Treg 세포는, 텔로머라제 아단위, 예를 들면, 텔로머라제의 촉매 아단위, 예를 들면, TERT, 예를 들면, hTERT를 이소적으로 발현한다. 일부 국면에서, 본 개시는, 텔로머라제 아단위, 예를 들면, 텔로머라제의 촉매 아단위, 예를 들면, TERT, 예를 들면, hTERT를 코딩하는 핵산과 세포를 접촉시키는 것을 포함하는, 본 발명의 키메라 수용체-발현 세포를 생산하는 방법을 제공한다. 세포는, 키메라 수용체(예를 들면, 본원에 기재된 CAR)을 코딩하는 작제물과 접촉하기 전, 접촉과 동시에, 또는 접촉한 후에, 핵산과 접촉시킬 수 있다.
- [0718] 본 발명은 또한, 본 발명의 면역 세포를 수득하는 방법에 관한 것이고, 상기 방법은, 본원에 기재된 CAR을 코딩하는 핵산으로 적어도 하나의 면역 세포를 형질도입하고, 임의로 형질도입된 세포를 확장시키는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 생체의 방법이다.
- [0719] 일부 실시형태에서, 본 발명의 면역 세포를 수득하는 방법은 다음을 포함한다:
- [0720] - PBMC 집단으로부터 면역 세포를 단리/풍부화시키는 단계(예를 들면, 백혈구채집에 의해 회수됨),
- [0721] - 임의로 활성화 단계,
- [0722] - 본원에 기재된 CAR을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터를 사용한 형질도입 단계,
- [0723] - 임의로 확장 단계,
- [0724] - 임의로 세척 단계, 및
- [0725] - 임의로 동결 단계.
- [0726] 일부 실시형태에서, 본 발명의 조작된 Treg 세포는, Treg 표현형을 유지하기 위해 및/또는 FoxP3 및 도입유전자의 발현을 증가시키기 위해, 라파마이신 및/또는 고농도의 IL-2를 함유하는 조직 배양 배지에서 배양될 수 있다.
- [0727] 조성물
- [0728] 본 발명의 또 다른 목적은, 본원에 기재된 바와 같은 본 발명의 적어도 하나의 면역 세포 또는 면역 세포 집단을 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 본질적으로 이들로 이루어진 조성물이다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 상기 면역 세포 또는 면역 세포 집단은, T 세포, 천연 킬러(NK) 세포, $\gamma \delta$ T 세포, 이중 음성(DN) 세포, 조절 면역 세포, 조절 T 세포, 효과기 면역 세포, 효과기 T 세포, B 세포 및 골수-유래 세포 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0729] 본원에 사용된 바와 같이, 약제학적 조성물 또는 약제와 관련하여 용어 "본질적으로 이루어진"은, 본 발명의 적어도 하나의 면역 세포 또는 세포 집단이 상기 약제학적 조성물 또는 약제 내에서 생물학적 활성을 갖는 유일한 치료제 또는 약제임을 의미한다.
- [0730] 일부 실시형태에서, 상기 조성물은, 본원에 기재된 바와 같이 본 발명의 적어도 하나의 단리된 및/또는 실질적으로 정제된 면역 세포 집단을 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 이들로 본질적으로 이루어진다.
- [0731] 일부 실시형태에서, 상기 조성물은, 본원에 기재된 CAR(예를 들면, 적어도 하나의 세포의 결합 도메인, 임의로 적어도 하나의 세포의 힌지 도메인, 적어도 하나의 막관통 도메인, 및 적어도 하나의 세포내 도메인을 포함하는 CAR, 여기서 적어도 하나의 세포내 도메인은 적어도 하나의 1차 세포내 신호전달 도메인 및 임의로 적어도 하나의 공자극 세포내 신호전달 도메인을 포함한다)을 세포 표면에서 발현하도록 조작된, 본원에 기재된 바와 같은 본 발명의 적어도 하나의 면역 세포 집단을 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 이들로 본질적으로 이루어지고, 여기서 적어도 하나의 막관통 도메인은, 인간 TNFR2 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체 또는 임의의 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체 또는 이의 조합이고/이거나, 적어도 하나의 공자극 세포내 신호전달

도메인은, 인간 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체 또는 임의의 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체 또는 이들의 조합이고, 여기서 막관통 도메인 및 공자극 세포내 신호전달 도메인 중의 적어도 하나는 TNFR2 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체 또는 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체이다.

- [0732] 일부 실시형태에서, 상기 조성물은 동결 및 해동되었다.
- [0733] 본 발명의 또 다른 목적은, 본원에 기재된 적어도 하나의 면역 세포 또는 집단 및 적어도 하나의 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 이들로 본질적으로 이루어진 약제학적 조성물이다.
- [0734] 본 발명의 또 다른 목적은, 본원에 기재된 적어도 하나의 면역 세포 집단을 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 이들로 본질적으로 이루어진 의약이다.
- [0735] 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물 또는 의약은, 본원에 기재된 바와 같이, 본 발명의 적어도 하나의 단리 및 /또는 실질적으로 정제된 면역 세포 집단을 포함한다.
- [0736] 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물 또는 의약은, 본원에 기재된 바와 같은 면역 세포 집단의 조합(즉, 본 발명의 적어도 2개의 별개의 면역 세포 집단)을 포함한다.
- [0737] 일부 실시형태에서, 본 발명의 조성물, 약제학적 조성물 또는 의약은 적어도 제2의 별개의 면역 세포 집단을 추가로 포함하고, 여기서 상기 제2 면역 세포 집단의 세포는, 항원, 항원의 단편, 항원의 변이체 또는 이들의 혼합물에 특이적인 제2의 별개의 CAR을 세포 표면 상에서 발현한다. 일부 실시형태에서, 제2 CAR은 일반적 인간 식이로부터의 식품 항원에 특이적이다. 일부 실시형태에서, 제2 CAR은, 예를 들면, 다발성 경화증 관련 항원, 관절 관련 항원, 눈 관련 항원, 인간 HSP 항원, 피부 관련 항원 또는 이식편 거부 또는 GVHD에 관련된 항원 등의 자가항원에 특이적이다. 일부 실시형태에서, 제2 CAR은, 흡입된 알레르겐, 섭취한 알레르겐 또는 접촉 알레르겐에 특이적이다. 일부 실시형태에서, 제2 CAR은 난백알부민, MOG, II형 콜라겐, 시트룰린화 비멘틴, 시트룰린화 II형 콜라겐, 시트룰린화 피브리노겐 및 이들의 단편, 변이체 및 혼합물로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항원에 특이적이다.
- [0738] 일부 실시형태에서, 제2 CAR은 난백알부민 또는 이들의 단편, 변이체 또는 혼합물에 특이적이다. 일부 실시형태에서, 제2 CAR은 MOG 또는 이의 단편, 변이체 또는 혼합물에 특이적이다. 일부 실시형태에서, 제2 CAR은 II형 콜라겐 또는 이들의 단편, 변이체 또는 혼합물에 특이적이다. 일부 실시형태에서, 제2 CAR은 시트룰린화 비멘틴, 시트룰린화 II형 콜라겐 또는 시트룰린화 피브리노겐, 또는 이들의 단편, 변이체 및 혼합물에 특이적이다. 일부 실시형태에서, 제2 CAR은 HLA-A2 또는 이의 단편, 변이체 또는 혼합물에 특이적이다. 일부 실시형태에서, 제2 CAR은 IL-23R 또는 이의 단편, 변이체 또는 혼합물에 특이적이다. 일부 실시형태에서, 제2 CAR은 B 세포 표면 마커, 예를 들면, CD19, CD20 또는 이들의 단편, 변이체 및 혼합물에 특이적이다. 일부 실시형태에서, 제2 CAR은 본원에 기재된 암 항원 또는 이들의 단편, 변이체 또는 혼합물에 특이적이다.
- [0739] 일부 실시형태에서, 제2 CAR은 감염된 세포를 인식한다. 일부 실시형태에서, 제2 CAR은 바이러스 항원 또는 이의 단편, 변이체 또는 혼합물; 세균 항원 또는 이들의 단편, 변이체 또는 혼합물; 또는 진균 항원 또는 이들의 단편, 변이체, 또는 혼합물에 특이적이다.
- [0740] 일부 실시형태에서, 상기 제2 면역 세포 집단의 세포는 세포 표면 상에서 CAR을 발현하고, 여기서 상기 CAR의 세포의 결합 도메인은 단백질 또는 이의 단편 또는 변이체, 예를 들면, 자가항원 또는 이들의 단편 또는 변이체이다.
- [0741] 일부 실시형태에서, 상기 다른 면역 세포 집단의 세포는, 예를 들면, B 세포 상에서 발현된 자가항체 등의 자가항체에 특이적인 CAR을 세포 표면 상에서 발현한다.
- [0742] 본원에 기재된 조성물 및 약제는, 예를 들면, 멸균수, 생리식염수, 중성 완충 생리식염수, 인산염 완충 생리식염수 등의 완충제; 염류; 항생제; 등장제; 글루코즈, 만노스, 수크로스, 텍스트란 및 만니톨 등의 탄수화물; 인간 혈청 알부민 등의 단백질; 폴리펩티드; 글리신 및 아르기닌 등의 아미노산; 황산화제; EDTA 또는 글루타티온 등의 킬레이트제; 보조제(예를 들어, 수산화알루미늄); 및 방부제를 포함할 수 있다. 조성물 및 의약은 Treg 표현형 및 성장을 지지하는 인자(예를 들어, IL-2 및 라파마이신 또는 이의 유도체), 항-염증 사이토카인(예를 들어, IL-10, TGF- β 및 IL-35) 및 세포 치료를 위한 다른 세포(예를 들면, 암 치료를 위한 CAR T 효과기 세포 또는 재생 치료를 위한 세포)를 추가로 포함할 수 있다. 저장 및 운송을 위해, 세포는 임의로 동결 보존될 수 있다. 사용 전에, 세포를 해동하고, 약제학적으로 허용되는 담체에 희석할 수 있다.

- [0743] 본 발명의 조성물은 일부 실시형태에서 정맥내 투여용으로 제형화된다.
- [0744] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR을 발현하는 세포는, TNFR2 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체 없이 및/또는 TNFR2 세포내 공자극 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체 없이, CAR을 발현하는 세포와 비교하여, 감소된 긴장성 신호전달을 나타낸다.
- [0745] 본원에 사용된 용어 "긴장성 신호전달"은 항원-독립적 활성화 배경을 지칭한다.
- [0746] 긴장성 신호전달을 측정하는 방법은 당업자에게 공지되어 있으며, 제한 없이, CAR-발현 세포의 대사 활성의 측정, 수용체에 인식되는 항원에 의한 자극의 부재하에 세포 활성화의 하나 이상의 지표 측정, 세포 노화 또는 세포 노화와 관련된 하나 이상의 표현형 변화의 측정, 항원 자극의 부재하에 세포 사이클 진행의 결정, 및 비변형 세포의 크기와 비교하여, 수용체를 발현하는 세포의 크기 측정을 포함한다.
- [0747] 일부 실시형태에서, TNFR2 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체 및/또는 TNFR2 세포내 공자극 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체를 발현하는 CAR-조작된 면역 세포는, 시험 A의 조건에서 측정된 경우, TNFR2 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체 및/또는 TNFR2 세포내 공자극 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체를 발현하지 않는 CAR-조작된 면역 세포와 비교하여 감소된 긴장성 신호전달을 갖는다.
- [0748] 시험 A:
- [0749] T 세포 활성화의 지표는, 긴장성 신호전달을 측정하기 위해 사용된다. 시험 A의 조건에서, CD69 양성 세포의 수준은, 본 발명의 CAR의 활성화 전후에 세포 집단에서 측정된다. 활성화 검정은 면역 세포 배양의 9일차에 수행된다. 간단히 설명하면, 0.05×10^6 면역 세포를, 96 U 바닥 플레이트 단독으로, 또는 항-CD28/항-CD3 코팅된 비드의 존재하(1:1 면역 세포 대 비드 비율) 또는 새롭게 해동된 자가 B 세포(1:1 면역 세포 대 B 세포의 비율)의 존재하에 $200 \mu\text{l}$ 최종 용적으로 파종한다. 37°C , 5% CO_2 에서 24시간 후, 세포를 CD69 및 특정 면역 세포 집단과 관련된 마커(예를 들어, B 세포의 경우 CD19, 또는 T 세포의 경우 CD4 또는 CD8)로 염색하고, 유세포 분석을 사용하여 분석했다. 본원에 기재된 CAR을 발현하는 세포(예를 들면, TNFR2 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체 및/또는 TNFR2 세포내 공자극 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함함)에 의한 CD69 자발적 발현의 모니터링(임의의 항원 시뮬레이션이 없는 것을 의미함)은, 형질도입되지 않은 세포와 비교하여, 긴장성 신호전달 강도의 결정을 가능하게 한다. TNFR2 막관통 또는 TNFR2 세포내 공자극 신호전달 도메인을 포함하지 않는 CAR로 형질도입된 세포는 대조군으로서 사용된다.
- [0750] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR 작제물은, 감소된 긴장성 신호전달을 갖는 조작된 면역 세포를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명은, 감소된 긴장성 신호전달을 갖는 조작된 면역 세포(즉, CAR을 발현하는 세포)를 생산하는 방법을 제공한다. 현재 이용가능한 CAR 작제물, 특히 CAR 효과기 분야에서 사용되는 작제물은, 종종, 높은 긴장성 신호전달과 연관되어 CAR 조작된 세포의 효능을 제한한다. 실제로, 이러한 긴장성 신호전달은, CAR 조작된 세포의 구성적 활성화와 연관되고, 이들의 조기 고갈 또는 심지어 사망을 유래한다. 본 발명의 CAR 작제물(TNFR2 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체, 및/또는 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함)은, 세포의 긴장성 신호전달 및 구성적 활성화의 저하를 제공한다.
- [0751] 치료적 용도
- [0752] 본 발명은, 이를 필요로 하는 대상체에서 하나 이상의 질환, 장애, 증상 또는 상태를 치료하는 방법을 제공하고, 여기서 상기 방법은 본원에 기재된 CAR-조작된 면역 세포 또는 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 본 발명은 또한, 약제로서 사용하기 위한, 본원에 기재된 적어도 하나의 면역 세포 집단(예를 들면, 본원에 기재된 조성물, 약제학적 조성물 또는 의약)을 제공한다. 본 발명은 또한, 약제의 제조에 사용하기 위한, 본원에 기재된 적어도 하나의 면역 세포 집단(예를 들면, 본원에 기재된 조성물, 약제학적 조성물 또는 의약)을 제공한다. 본 발명의 조작된 면역 세포로 치료될 수 있는 질환은 염증성 질환, 자가면역 질환, 알레르기성 질환, 장기 이식 상태, 암 및 감염성 질환을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.
- [0753] 일부 실시형태에서, 이를 필요로 하는 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법은, 본원에 기재된 적어도 하나의 면역 세포 집단, 예를 들면, 조작된 조절 면역 세포 집단(예컨대, Treg 세포 집단)을 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 여기서 상기 질환 또는 장애는 염증성 질환, 자가면역 질환, 알레르기성 질환 또는 장기 이식 상태이다. 특정 실시형태에서, 질환 또는 장애는 이식편 거부 또는 이식편 대 숙주 질환이다.

- [0754] 일부 실시형태에서, 이를 필요로 하는 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법은, 본원에 기재된 적어도 하나의 면역 세포 집단, 예를 들면, 조작된 효과기 면역 세포 집단(예컨대, Treg 세포 집단)을 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 여기서 상기 질환 또는 장애는 암 또는 감염성 질병이다.
- [0755] 일부 실시형태에서, 이를 필요로 하는 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법은, 본원에 기재된 적어도 하나의 면역 세포 집단, 예를 들면, 조작된 효과기 면역 세포 집단(예를 들면, Treg 세포 집단)을 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 여기서 상기 대상체는 상기 질환 또는 장애에 대한 유전자 요법(예를 들면, AAV 기반 유전자 요법)을 필요로 한다.
- [0756] 일부 실시형태에서, 이 방법은 세포 치료 방법이다.
- [0757] 일부 실시형태에서, 세포 요법은 자가이다.
- [0758] 일부 실시형태에서, 세포 요법은 이중성이다.
- [0759] 일부 실시형태에서, 세포 요법은 동종이계이다.
- [0760] 일부 실시형태에서, 이 방법은 유전자 치료 방법이고, 본원에 기재된 핵산 또는 벡터의 투여를 포함한다.
- [0761] 1. *염증성 질환*
- [0762] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포는 이를 필요로 하는 대상체에서 하나 이상의 염증성 질환, 장애, 증상 또는 상태의 치료에 사용될 수 있다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포는, 이러한 맥락에서 면역 관용을 촉진하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명은, 이를 필요로 하는 대상체에서 염증성 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공하고, 여기서 상기 방법은 본원에 기재된 바와 같이 적어도 하나의 면역 세포 집단의 치료학적 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 본 발명은 또한, 염증성 질환 또는 장애의 치료에 사용하기 위한, 본원에 기재된 적어도 하나의 면역 세포 집단(예를 들면, 본원에 기재된 조성물, 약제학적 조성물 또는 의약)에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 염증성 질환 또는 장애를 치료하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위해, 본원에 기재된 적어도 하나의 면역 세포 집단(예를 들면, 본원에 기재된 조성물, 약제학적 조성물 또는 의약)을 제공한다.
- [0763] 용어 "염증성 장애" 및 "염증성 질환"은 상호 교환적으로 사용되고, 본원에서 사용되는 바와 같이, 염증과 관련된 임의의 이상을 지칭한다.
- [0764] 일부 실시형태에서, 염증성 상태는 염증성 질환 및 감염과 연관되거나 암과 연관된 염증을 포함한다.
- [0765] 일부 실시형태에서, 염증성 상태는 염증성 질환 및 자가면역 질환과 관련된 염증을 포함한다.
- [0766] 예시적인 염증성 질환, 장애 또는 병태는 관절염(arthritis), 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 강직성 척추염(ankylosing spondylitis), 골관절염(osteoarthritis), 건선성 관절염(psoriatic arthritis), 청소년 특발성 관절염(, juvenile idiopathic arthritis), 청소년 류마티스 관절염(juvenile rheumatoid arthritis), 관절염 유라티카(arthritis uratica), 통풍(gout), 만성 다발성관절염(chronic polyarthritis), 상완골 관절염(peri-arthritis humeroscapularis), 자궁경부 관절염(cervical arthritis), 요추 관절염(lumbosacral arthritis), 장병성 관절염(enteropathic arthritis) 및 강직성 척추염(ankylosing spondylitis), 천식(asthma), 피부염(dermatitis), 건선(psoriasis), 경피증(scleroderma), 다발성근염(polymyositis), 피부근염(dermatomyositis), 청소년 피부근염(juvenile dermatomyositis), 원발성 담즙성 간경변증(primary biliary cirrhosis), 섬유증(fibrosis), 낭포성 섬유증(cystic fibrosis), 폐 섬유증(pulmonary fibrosis), 경화증(cirrhosis), 심내막 섬유증(endomyocardial fibrosis), 운명성 섬유증(mediastinal fibrosis), 골수섬유증(myelofibrosis), 후복막 섬유증(retroperitoneal fibrosis), 신성 섬유증(nephrogenic fibrosis), 켈로이드(keloids), 경피증(scleroderma), 관절섬유증(arthrofibrosis), 이식후 후기 및 만성 고형 기관 거부(post transplantation late and chronic solid organ rejection), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 전신성 홍반성 루푸스(systemic lupus erythematosus), 루푸스 신염(lupus nephritis), 천포창(pemphigus), 심상성 천포창(pemphigus vulgaris), 천포창 포진(pemphigus herpetiformis), 천포창 베지터스(pemphigus vegetans), IgA 천포창, 천포창 홍반(pemphigus erythematosus), 수포성 천포창(bullous pemphigoid), 임신성 천포창(pemphigoid gestationis), 점막 피부병증(mucous membrane dermatosis), 천포창 결절(pemphigoid nodularis), 선형 IgA 수포성 피부병(linear IgA bullous dermatosis), 수포성 편평 태선(bullous lichen planus), 후천성 표피용해 수포(epidermolysis bullosa acquisita), 자가면역 당뇨병(autoimmune diabetes), 당뇨병성 망막병증(diabetic retinopathy), 당뇨병성 신병증(diabetic nephropathy), 당뇨병성 혈관병증(diabetic vasculopathy), 안 염증

(ocular inflammation), 포도막염(uveitis), 비염(rhinitis), 허혈-재관류 손상(ischemia-reperfusion injury), 혈관성형후 재협착(post-angioplasty restenosis), 만성 폐쇄성 폐 질환(chronic obstructive pulmonary disease (COPD)), 사구체신염(glomerulonephritis), 그레이브스병(Graves disease), 위장 알레르기(gastrointestinal allergies), 결막염(conjunctivitis), 죽상경화증(atherosclerosis), 관상 동맥 질환(coronary artery disease), 협심증(angina), 소동맥 질환(small artery disease), 급성 파종성 뇌척수염(acute disseminated encephalomyelitis), 특발성 혈소판 감소성 자반병(idiopathic thrombocytopenic purpura), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 전신 경화증(systemic sclerosis), 항인지질 증후군(antiphospholipid syndrome), 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 자가면역 용혈성 빈혈(autoimmune hemolytic anemia), 대장염(colitis), 크론병(Crohn's disease), 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 염증성장 질환(inflammatory bowel disease)(IBD), 색전증(embolism), 폐 색전증(pulmonary embolism), 동맥 색전증(arterial embolism), 정맥 색전증(venous embolism), 알레르기성 염증(allergic inflammation), 심혈관 질환(cardiovascular disease), 이식편 관련 질환(graft-related diseases), 이식편 대 숙주 질환(graft versus host disease)(GVHD), 이식편 이식 거부, 만성 거부(chronic rejection) 및 조직 또는 세포 동종이식 또는 이종이식과 관련된 장애, 자가면역 질환(autoimmune diseases), 외상후 변성(degeneration after trauma), 뇌졸중(stroke), 이식편 거부(transplant rejection), 알레르기 상태(allergic conditions) 및 과민성(hypersensitivity), 예를 들면, 알레르기성 비염(allergic rhinitis), 알레르기성 습진(allergic eczema) 등, 피부 질환(skin diseases), 피부 염증성 장애(dermal inflammatory disorders) 및 이들의 임의의 조합을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.

[0767] 피부 질환의 예는 여드름(acne); 광선 각화증(actinic keratosis); 아토피성 피부염(atopic dermatitis); 접촉성 피부염(contact dermatitis); 욕창 궤양(decubitus ulcers)(욕창(bedsore)); 습진(eczema); 적혈구종(erythroderma); 예를 들면, 어린 시절의 혈관종(hemangioma of childhood) 등의 혈관종(hemangioma); 비대성 흉터(hypertrophic scarring); 편평 태선(lichen planus); 태선 장애(lichenoid disorders); 림프관 형성(lymphangiogenesis); 건선(psoriasis); 화농성 육아종(pyogenic granulomas); 전염성 연속종(molluscum contagious); 신경섬유종증(neurofibromatosis); 주사(rosacea); 열성 영양장애 표피용해 수포(recessive dystrophic epidermolysis bullosa); 흉터(scars)(켈로이드); 경피증(scleroderma); 지루성 각화증(seborrheic keratosis); 혈관육종(angiosarcoma), 기저 세포 암종(basal cell carcinoma), 혈관내피종(hemangioendothelioma), 카포시 육종(Karposi's sarcoma), 악성 흑색종(malignant melanoma), 흑색종(melanoma), 편평 세포 암종(squamous cell carcinoma) 등의 피부암(skin cancers); 피부 궤양(skin ulcers); 자가이식(autotransplantation) 및 동종이식(allograft transplantation) 등의 피부 이식 후의 피부 손상; 스티븐-존슨(Steven-Johnson) 증후군 및 독성 표피 괴사(toxic epidermal necrolysis); 스투르게-웨버(Sturge-Weber) 증후군; 결절성 경화증(tuberous sclerosis); 정맥 궤양(venous ulcers); 심상성 우체(verruca vulgaris); 예를 들면, 바이러스성 사마귀(viral warts) 등의 사마귀(warts); 창상 등을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.

[0768] 진피 염증성 장애의 예는 건선(psoriasis), 거테이트 건선(guttate psoriasis), 역 건선(inverse psoriasis), 농포성 건선(pustular psoriasis), 적혈구 건선(erythroderma psoriasis), 급성 열성 호중구 피부병(acute febrile neutrophilic dermatosis), 습진(eczema), 무균성 습진(asteatotic eczema), 발한이상성 습진(dyshidrotic eczema), 수포 손바닥 평면 습진(vesicular palmoplantar eczema), 여드름성 습진(acne vulgaris), 아토피성 피부염(atopic dermatitis), 접촉성 피부염(contact dermatitis), 알레르기성 접촉성 피부염(allergic contact dermatitis), 피부근염(dermatomyositis), 박리성 피부염(exfoliative dermatitis), 손 습진(hand eczema), 한포진(pompholyx), 주사(rosacea), 유육종증(sarcoidosis)에 의한 주사비, 경피증(scleroderma)에 의한 주사비(rosacea), 스위트 증후군(Sweet's syndrome)에 의한 주사(rosacea), 전신성 홍반성 루푸스(systemic lupus erythematosus)에 의한 주사, 두드러기(urticaria)에 의한 주사, 대상 포진 관련 통증(zoster-associated pain), 스위트병(Sweet's disease), 호중구 한선염(neutrophilic hidradenitis), 멸균 농포증(sterile pustulosis), 약물 분출(drug eruptions), 지루성 피부염(seborrheic dermatitis), 장미색 비강진(pityriasis rosea), 피부 키쿠치병(cutaneous kikuchi disease), 임신의 소양성 두드러기 구진(pruritic urticarial papules) 및 플라크, 스티븐스-존슨 증후군(Stevens-Johnson syndrome) 및 독성 표피 괴사(toxic epidermal necrolysis), 문신 반응(tattoo reactions), 웰스 증후군(Wells syndrome)(호산구성 붕와직염(eosinophilic cellulitis)), 반응성 관절염(reactive arthritis)(라이터 증후군(Reiter's syndrome)), 장 관련 피부병-관절염 증후군(bowel-associated dermatosis-arthritis syndrome), 류마티스성 호중구성 피부병(rheumatoid neutrophilic dermatosis), 호중구성 엑크린 한선염(neutrophilic eccrine hidradenitis), 배측 손의 호중구성 피부증(neutrophilic dermatosis of the dorsal hands), 플라즈마셀룰라리스를 제외한 귀두염

(balanitis circumscripta plasmacellularis), 귀두포피염(balanoposthitis), 베체트병(Behcet's disease), 환상 홍반 원심분리기(erythema annulare centrifugum), 색소이상성 고정홍반 지속(erythema dyschromicum perstans), 다형 홍반(erythema multiforme), 환형 육아종(granuloma annulare), 손 피부염(hand dermatitis), 편평 태선(lichen nitidus), 편평 태선(lichen planus), 태선 공막 및 위축(lichen sclerosus et atrophicus), 만성 단순 태선(lichen simplex chronicus), 극상 태선(lichen spinulosus), 수액성 피부염(nummular dermatitis), 표피 괴저(pyoderma gangrenosum), 유육종증(sarcoidosis), 각막 농피성 피부염(subcorneal pustular dermatosis), 두드러기(urticaria) 및 일과성 가시세포분리 피부병(transient acantholytic dermatosis)을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.

[0769] 2. 자가면역 질환

[0770] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포는, 이를 필요로 하는 대상체에서 하나 이상의 자가면역 질환, 장애, 증상 또는 상태의 치료에 사용될 수 있다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 CAR-변형된 면역 세포는, 이러한 맥락에서 면역 관용을 촉진하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은, 이를 필요로 하는 대상체에서 자가면역 질환을 치료하는 방법을 제공하고, 여기서 상기 방법은 본원에 기재된 적어도 하나의 면역 세포 집단의 치료학적 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 본 발명은 또한, 자가면역 질환의 치료에 사용하기 위한, 본원에 기재된 적어도 하나의 면역 세포 집단(예를 들면, 본원에 기재된 조성물, 약제학적 조성물 또는 의약)을 제공한다. 본 발명은 또한, 자가면역 질환을 치료하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한, 본원에 기재된 적어도 하나의 면역 세포 집단(예를 들면, 본원에 기재된 조성물, 약제학적 조성물 또는 의약)을 제공한다.

[0771] 자가면역 질환의 예는 루푸스(예를 들면, 홍반성 루푸스(lupus erythematosus), 루푸스 신염(lupus nephritis) 등), 하시모토 갑상선염(Hashimoto's thyroiditis), 원발성 점액종(primary myxedema), 그레이브스병(Graves' disease), 악성 빈혈(percious anemia), 자가면역 위축성 위염(autoimmune atrophic gastritis), 애디슨병(Addison's disease), 당뇨병(diabetes)(예를 들어, 인슐린 의존성 진성당뇨병(insulin dependent diabetes mellitus), I형 진성 당뇨병(type I diabetes mellitus), II형 진성 당뇨병(type II diabetes mellitus) 등), 굿파스퇴르 증후군(Goodpasture's syndrome), 중증 근무력증(myasthenia gravis), 천포창(pemphigus), 크론병(Crohn's disease), 교감성 안염(sympathetic ophthalmia), 자가면역 포도막염(autoimmune uveitis), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 자가면역 용혈성 빈혈(autoimmune hemolytic anemia), 특발성 혈소판감소증(idiopathic thrombocytopenia), 일차 담즙성 담즙 간경변(primary biliary cirrhosis), 만성 활동성 간염(chronic action hepatitis), 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 류마티스 질환(rheumatic diseases)(예를 들면, 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis)), 다발근염(polymyositis), 경피증(scleroderma), 건선(psoriasis), 혼합 결합 조직 질환(mixed connective tissue disease) 등을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.

[0772] 3. 알레르기성 질환

[0773] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포는, 이를 필요로 하는 대상체에서 하나 이상의 알레르기성 질환, 장애, 증상 또는 상태의 치료에 사용될 수 있다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 CAR-변형된 면역 세포는, 이러한 맥락에서 면역 관용을 촉진하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은, 이를 필요로 하는 대상체에서 알레르기성 질환, 장애, 증상 또는 상태를 치료하는 방법을 제공하고, 여기서 상기 방법은 본원에 기재된 적어도 하나의 면역 세포 집단의 치료학적 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 본 발명은 또한, 알레르기성 질환, 장애, 증상 또는 상태의 치료에 사용하기 위한, 본원에 기재된 적어도 하나의 면역 세포 집단(예를 들면, 본원에 기재된 조성물, 약제학적 조성물 또는 의약)을 제공한다. 본 발명은 또한, 알레르기성 질환, 장애, 증상 또는 상태를 치료하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한, 본원에 기재된 적어도 하나의 면역 세포 집단(예를 들면, 본원에 기재된 조성물, 약제학적 조성물 또는 의약)을 제공한다.

[0774] 알레르기성 질환의 예로는 흡입된 알레르겐, 섭취된 알레르겐 또는 접촉 알레르겐에 대한 알레르기성 질환이 포함되지만 이들로 한정되지 않는다. 알레르기성 질환의 다른 예는 알레르기성 천식(allergic asthma), 과민성 폐 질환(hypersensitivity lung diseases), 식품 알레르기(food allergy), 아토피성 피부염(atopic dermatitis), 알레르기성 비염(allergic rhinitis), 알레르기성 비결막염(allergic rhinoconjunctivitis), 만성 두드러기(chronic urticaria), 지연형 과민성 장애(delayed-type hypersensitivity disorders) 및 전신 아나필락시스(systematic anaphylaxis)를 포함하지만 이들로 한정되지 않는다.

[0775] 4. 이식

- [0776] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포는, 장기 또는 조직 이식과 관련된 하나 이상의 질환, 장애, 증상 또는 상태의 치료에 사용될 수 있다(예를 들면, 장기 또는 조직 거부/기능부전, GVHD 및/또는 이와 관련된 상태). 이식편 거부는, 면역 반응을 통해 수용자의 면역 세포에 의해 공여자의 이식 조직이 파괴되는 것을 수반한다. 면역 반응은 GVHD에도 관여한다. 그러나, 이 경우, 수용자의 조직은, 이식에 의해 수용자에게 전달된 공여자의 면역 세포에 의해 파괴된다. 따라서, CAR-매개된 면역 세포의 방향전환 및 활성화는, 이식 수용자에서 면역 효과기 세포에 의한 부정합 세포 및/또는 조직의 거부를 억제하거나, GVHD의 경우에 이식된 면역 적격 세포의 병원성 작용을 억제하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 부정합 세포 및/또는 조직은, HLA-A2 부정합 세포 및/또는 조직을 포함한다. 본 발명의 CAR-변형된 면역 세포는, 특히 장기 또는 조직 이식 후에 대상체에서 면역 관용, 조작상의 관용 및/또는 면역 순응을 촉진하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은, 대상체에서 면역 관용, 조작상의 관용 및/또는 면역 순응을 촉진하는 방법을 제공하고, 이 방법은 본원에 기재된 바와 같이, CAR-조작된 면역 세포 또는 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 이 방법은 대상체에서 이식된 기관 또는 조직에 대한 면역 관용, 조작상의 관용 및/또는 면역 순응을 촉진하기 위한 것일 수 있다. 본 발명은 또한, 대상체 또는 대상체의 이식된 장기 또는 조직에서 이식된 장기 또는 조직에 대한 면역 관용, 조작상의 관용 및/또는 면역 순응을 촉진하는데 사용하기 위한, 본원에 기재된 적어도 하나의 면역 세포 집단(예를 들면, 본원에 기재된 조성물, 약제학적 조성물 또는 약제)을 제공한다. 본 발명은 또한, 대상체 또는 대상체의 이식된 기관 또는 조직, 또는 대상체의 이식된 기관 조직에 대한 면역 관용, 조작상의 관용 및/또는 면역 순응을 촉진하기 위한, 본원에 기재된 적어도 하나의 면역 세포 집단(예를 들면, 본원에 기재된 조성물, 약제학적 조성물 또는 의약)을 제공한다.
- [0777] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포(예를 들면, CAR-조작된 Treg 세포)는 장기 또는 조직의 이식과 동시에, 그 전에 또는 후에 투여된다.
- [0778] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포(예를 들면, CAR-조작된 Treg 세포)는, 이식된 기관 또는 조직의 거부 반응을 예방하거나 치료하기 위해 사용될 수 있다. 이식된 장기 또는 조직의 거부의 예에는 이식된 장기 또는 조직의 초급성 거부 및 이식된 장기 또는 조직의 항체 매개성 거부가 포함되지만, 이들로 한정되지 않는다.
- [0779] 일부 실시형태에서, 본 발명의 방법은, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포(예를 들면, CAR-조작된 Treg 세포)를 이식된 기관 또는 조직에 노출된 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0780] 일부 실시형태에서, 이식된 장기 또는 조직은 골수 이식, 장기 이식, 수혈 또는 의도적으로 대상체에 도입되는 임의의 다른 외래 조직 또는 세포를 포함할 수 있다.
- [0781] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포(예를 들면, CAR-조작된 Treg 세포)는, 동종이식편 거부 또는 이종이식편 거부를 포함하지만, 이들로 한정되지 않는, 이식 후의 이식편 거부를 억제하기 위한 요법으로서 사용될 수 있다.
- [0782] 본 발명의 또 다른 목적은, 대상체에서 장기 또는 조직 이식편 거부 반응을 예방 또는 치료하는 방법이고, 이 방법은, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포(예를 들면, CAR-조작된 Treg 세포) 또는 상기 면역 세포를 포함하는 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0783] 본 발명의 또 다른 목적은, 대상체에서 이식편 생존 기간을 증가시키는 방법이고, 이 방법은, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포(예를 들면, CAR-조작된 Treg 세포) 또는 이를 포함하는 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0784] 일부 실시형태에서, 이 방법은 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 1년, 2년, 3년, 4년, 5년, 6년, 7년, 8년, 9년, 10년, 20년, 30년, 40년, 50년, 60년, 70년, 80년, 90년, 100년 또는 대상의 수명의 이식편 생존 기간을 제공한다.
- [0785] 일부 실시형태에서, 본 발명의 면역 세포 또는 조성물의 투여는 대상체에 의해 수용되는 면역 억제제 요법의 양의 감소를 가능하게 한다. 일부 실시형태에서, 대상체는 임의의 면역 억제제 요법을 필요로 하지 않고/않거나 받고 있지 않다.
- [0786] 일부 실시형태에서, 이식편은 동종이식편이다. 일부 실시형태에서, 이식편은 이식편을 수용자에게 이식하는 것과 동시에, 이식하기 전에 또는 후에, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포(예를 들면, CAR-조작된 Treg 세포)에 노출될 수 있다. 일부 실시형태에서, 장기 또는 조직 이식은, 심장, 심장 판막, 폐, 신장, 간, 췌장, 장, 피부,

혈관, 골수, 줄기 세포, 뼈 또는 섬 세포일 수 있다. 그러나, 본 발명은 특정 유형의 이식에 한정되지 않는다.

- [0787] 일부 실시형태에서, 공여자 이식은, 수용자에 대한 이식편의 면역원성을 감소시키기 위해 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포로 수용자에게 이식하기 전에 장기 또는 조직 이식편을 처리함으로써 "전조절" 또는 "전처리"될 수 있고, 이에 의해 이식편 거부를 감소 또는 예방한다.
- [0788] 일부 실시형태에서, 이식 숙주 또는 수용자는 HLA-A2 음성이다. 일부 실시형태에서, 이식 숙주 또는 수용자는 HLA-A2 음성이고, HLA-A25, HLA-A29 및 HLA-A30으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 HLA-A 하위유형에 대해 양성이다.
- [0789] 일부 실시형태에서, 이식편은 HLA-A2 양성이다.
- [0790] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포(예를 들면, CAR-조작된 Treg 세포)는 이식편 대 숙주 질환(GVHD)을 예방 또는 치료하기 위해 사용될 수 있다. 특정 실시형태에서, GVHD는 조혈 줄기 세포 이식 후에 발생할 수 있다. 일부 실시형태에서, 이 방법은 이식된 장기 또는 조직에 노출된 대상체에게, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포(예를 들면, CAR-조작된 Treg 세포)를 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 이식된 장기 또는 조직은 골수 이식, 장기 이식, 수혈, 또는 의도적으로 대상체에 도입되는 임의의 다른 외래 조직 또는 세포를 포함할 수 있다. 예를 들면, GVHD는 심장, 심장 판막, 폐, 신장, 간, 췌장, 장, 피부, 혈관, 골수, 줄기 세포, 뼈 또는 섬 세포 이식 후에 발생할 수 있다. 그러나, 본 발명은 특정 유형의 이식에 한정되지 않는다.
- [0791] 본 발명의 또 다른 목적은, 대상체에서 이식편 대 숙주 질환(GVHD)을 예방 또는 치료하는 방법이고, 상기 방법은 대상체에게 본원에 기재된 CAR-조작된 면역 세포(예를 들면, CAR-조작된 Treg 세포) 또는 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함한다.
- [0792] 일부 실시형태에서, 본 발명은, 공여자 이식편, 예를 들면, 생체적합성 격자 또는 공여자 조직, 기관 또는 세포를, 수용자로의 이식편의 이식과 동시에, 전에 또는 후에, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포(예를 들면, CAR-조작된 Treg 세포)와 접촉시키는 방법을 제공한다.
- [0793] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포(예를 들면, CAR-조작된 Treg 세포)를 사용하여, 수용자에 대한 공여자 이식에 의한 부작용을 개선, 억제 또는 감소시키고, 이에 의해 GVHD를 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0794] 본 발명의 또 다른 목적은, 대상체에서 GVHD의 발증을 예방 또는 지연시키는 방법이며, 상기 방법은 대상체에게 본원에 기재된 CAR-조작된 면역 세포(예를 들면, CAR-조작된 Treg 세포) 또는 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함한다.
- [0795] 일부 실시형태에서, GVHD의 발증은 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 1년, 2년, 3년, 4년, 5년, 6년, 7년, 8년, 9년, 10년, 20년, 30년, 40년, 50년, 60년, 70년, 80년, 90년, 100년 또는 대상의 수명 동안 지연된다.
- [0796] 일부 실시형태에서, 본 발명의 면역 세포 또는 조성물의 투여는, 대상체가 받는 면역 억제제 요법의 양을 감소시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 대상체는 임의의 면역 억제제 요법을 필요로 하지 않고/않거나 받고 있지 않다.
- [0797] 일부 실시형태에서, GVHD는 급성 GVHD 또는 만성 GVHD일 수 있다.
- [0798] 일부 실시형태에서, 공여자 이식은 수용자에게 이식하기 전에, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포(예를 들면, CAR-조작된 Treg 세포)로 이식편을 처리함으로써 "전조절" 또는 "전처리"하여, 수용자에 대한 이식편의 면역원성을 감소시키고, 이에 의해 GVHD를 감소시키거나 예방한다. 일부 실시형태에서, 이식과 연관될 수 있는 T 세포를 활성화하기 위해, 이식 전에, 이식편을 수용자로부터의 세포 또는 조직과 접촉시킬 수 있다. 수용자의 세포 또는 조직으로 이식편을 치료한 후, 세포 또는 조직을 이식편으로부터 제거할 수 있다. 이어서, 치료된 이식편은 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포(예를 들면, CAR-조작된 Treg 세포)와 접촉시켜, 수용자로부터 세포 또는 조직을 사용한 처리에 의해 활성화된 면역 효과기 세포의 활성을 감소, 억제 또는 제거한다. 이러한 치료 후, CAR-조작된 면역 세포는 수용자에게 이식하기 전에 이식편으로부터 제거될 수 있다. 그러나, 일부 CAR-조작된 면역 세포는 이식편에 부착될 수 있으므로, 이식편과 함께 수용자에게 도입될 수 있다. 이 상황에서, 수용자에게 도입된 CAR-조작된 면역 세포는, 이식과 관련된 세포에 의해 유발되는 수용자에 대한 면역 반응을 억

제할 수 있다.

[0799] 일부 실시형태에서, 이식 숙주 또는 수용자는 HLA-A2 음성이다. 일부 실시형태에서, 이식 숙주 또는 수용자는 HLA-A2 음성이고, HLA-A25, HLA-A29 및 HLA-A30으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 HLA-A 하위유형에 대해 양성이다.

[0800] 일부 실시형태에서, 이식은 HLA-A2 양성이다.

[0801] 면역 세포는 임의의 공급원으로부터 획득할 수 있다. 예를 들면, 일부 실시형태에서, 면역 세포는, 본 발명의 CAR-변형 면역 세포의 생성을 위해, 조직 공여자, 이식 수용자 또는 달리 관련되지 않은 공급원(예를 들면, 상이한 개체 또는 종 모두)으로부터 획득될 수 있다. 따라서, 본 발명의 CAR-변형된 면역 세포는, 이식 수용자에 대해, 자가, 동종이계 또는 이종일 수 있거나, 달리 관련되지 않은 공급원으로부터 유래될 수 있다. 일부 실시형태에서, CAR-변형된 면역 세포는, 이식 수용자에 대해, 자가, 동종이계 또는 이종일 수 있는 CAR-Treg 세포이다. 일부 실시형태에서, CAR-Treg 세포는 이식 수용자에 대해 자가일 수 있다.

[0802] 5. 암

[0803] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포는, 이를 필요로 하는 대상체에서 하나 이상의 암의 치료에 사용될 수 있다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포는, 암 세포에 대한 특정 면역 반응을 촉진하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은, 이를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공하고, 여기서 상기 방법은, 본원에 기재된 적어도 하나의 면역 세포 집단의 치료학적 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 본 발명은 또한, 암 치료에 사용하기 위한, 본원에 기재된 적어도 하나의 면역 세포 집단(예를 들면, 본원에 기재된 조성물, 약제학적 조성물 또는 의약)을 제공한다. 본 발명은 또한, 암 치료용 약제의 제조에 사용하기 위한, 본원에 기재된 적어도 하나의 면역 세포 집단(예를 들면, 본원에 기재된 조성물, 약제학적 조성물 또는 약제)을 제공한다.

[0804] 본원에 사용된 바와 같이, "암"은 표면 항원 또는 암 마커와 관련된 임의의 암일 수 있다.

[0805] 암의 예는 급성 림프모구 백혈병(acute lymphoblastic leukemia)(ALL), 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia)(AML), 선상 암종(adenoid cystic carcinoma), 부신피질 암종(adrenocortical, carcinoma), AIDS-관련 암, 항문암(anal cancer), 충수암(appendix cancer), 성상세포종(astrocytomas), 비정형 기형양/횡문근양종양(atypical teratoid/rhabdoid tumor), B-세포 백혈병, 림프종 또는 기타 B 세포 악성 종양, 기저 세포 암종(basal cell carcinoma), 담관암(bile duct cancer), 방광암(bladder cancer), 골암(bone cancer), 골육종(osteosarcoma) 및 악성 섬유성 조직구종(malignant fibrous histiocytoma), 뇌간 교종(brain stem glioma), 뇌 종양(brain tumors), 유방암(breast cancer), 기관지 종양(bronchial tumors), 버킷 림프종(Burkitt lymphoma), 유암 종양(carcinoid tumor), 중추 신경계 암(central nervous system cancers), 자궁 경부암(cervical cancer), 척색종(chordoma), 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia)(CLL), 만성 골수성 백혈병(chronic myelogenous leukemia)(CML), 만성 골수증식성 장애(chronic myeloproliferative disorders), 결장암(colon cancer), 결장 직장암(colorectal cancer), 두개인두종(craniopharyngioma), 피부 T-세포 림프종(cutaneous T-cell lymphoma), 배아성 종양(embryonal tumors), 자궁 내막암(endometrial cancer), 뇌실막모세포종(ependymoblastoma), 뇌실막종(ependymoma), 식도암(esophageal cancer), 감각신경모세포종(esthesioneuroblastoma), 유잉 육종 계열의 종양(Ewing sarcoma family of tumors), 두개의 생식 세포 종양(extracranial germ cell tumor), 성선의 생식 세포 종양(extragonadal germ cell tumor), 간의 담관암(extrahepatic bile duct cancer), 안암(eye cancer), 뼈의 섬유 조직구종(fibrous histiocytoma of bone), 및 골육종(osteosarcoma), 담낭암(gallbladder cancer), 위암, 위장 카르시노이드 종양(gastrointestinal carcinoid tumor), 위장 간질 종양(gastrointestinal stromal tumors)(GIST), 연조직 육종(soft tissue sarcoma), 생식 세포 종양(germ cell tumor), 임신 영양막 종양(gestational trophoblastic tumor), 신경교종(glioma), 모발상 세포 백혈병(hairy cell leukemia), 두경부암(head and neck cancer), 심장암(heart cancer), 간세포(간) 암(hepatocellular (liver) cancer), 조직구종(histiocytosis), 호지킨 림프종(Hodgkin lymphoma), 하인두암(hypopharyngeal cancer), 안내 흑색종(intraocular melanoma), 섬세포 종양(islet cell tumors)(내분비 췌장), 카포시 육종(Kaposi sarcoma), 신장암(kidney cancer), 랑게르한스 세포 조직구종(Langerhans cell histiocytosis), 후두암(laryngeal cancer), 백혈병(leukemia), 입술 및 구강 암(lip and oral cavity cancer), 간암(liver cancer)(원발성), 소엽성 상피내 암종(lobular carcinoma in situ)(LCIS), 폐암(lung cancer), 림프종(lymphoma), 마크로글로불린혈증(macroglobulinemia), 남성 유방암(male breast cancer), 뼈의 악성 섬유 조직구종(malignant fibrous histiocytoma of bone), 수모세포종(medulloblastoma),

수질피종(medulloepithelioma), 흑색종(melanoma), 머켈 세포 암종(Merkel cell carcinoma), 중피종(mesothelioma), NUT 유전자를 포함하는 잠재성 원발성 정중선 암종을 동반한 전이성 편평 경부암(metastatic squamous neck cancer with occult primary midline tract carcinoma involving NUT gene), 구강암(mouth cancer), 다발성 내분비 신생물 증후군(multiple endocrine neoplasia syndromes), 다발성 골수종(multiple myeloma)/형질 세포 신생물(plasma cell neoplasm), 균상식육종(mycosis fungoides), 골수이형성 증후군(myelodysplastic syndromes), 골수이형성/ 골수증식 신생물(myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms), 골수성 백혈병, 만성(CML), 골수성 백혈병, 급성 골수성 백혈병(AML), 다발성 골수종(multiple myeloma), 골수증식성 장애(multiple, myeloproliferative disorders), 비강 및 부비동 암(nasal cavity and paranasal sinus cancer), 비인두암(nasopharyngeal cancer), 신경모세포종(neuroblastoma), 비-호지킨 림프종 (non-Hodgkin lymphoma), 비-소세포 폐암(non-small cell lung cancer), 구강암(oral cancer), 구강암(oral cavity cancer), 구강인두암(oropharyngeal cancer), 뼈의 골육종(osteosarcoma), 난소암(ovarian cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 유두종증(papillomatosis), 부신경절종(paraganglioma), 부비동 및 비강 암(paranasal sinus and nasal cavity cancer), 부갑상선암(parathyroid cancer), 음경암(penile cancer), 인두암(pharyngeal cancer), 크롬 친화성 세포종(pheochromocytoma), 중간 분화의 송과체 실질 종양(pineal parenchymal tumors of intermediate differentiation), 송과체모세포종(pineoblastoma) 및 천막위 원시 신경외배엽 종양(supratentorial primitive neuroectodermal tumors), 뇌하수체 종양(pituitary tumor), 형질 세포 신생물/다발성 골수종(plasma cell neoplasm/multiple myeloma), 흉막 폐 모세포종(pleuropulmonary blastoma), 및 유방암(breast cancer), 원발성 중추 신경계(CNS) 림프종(primary central nervous system(CNS) lymphoma), 전립선암(prostate cancer), 직장암(rectal cancer), 신장 세포 (신장) 암(renal cell (kidney) cancer), 신우뇨관, 이행 세포 암(renal pelvis and ureter, transitional cell cancer), 망막모세포종(retinoblastoma), 횡문근육종(rhabdomyosarcoma), 침샘 암(salivary gland cancer), 육종(sarcoma), 세자리 증후군(Sezary syndrome), 소세포 폐암(small cell lung cancer), 소장암(small intestine cancer), 연조직 육종(soft tissue sarcoma), 편평 세포 암종(squamous cell carcinoma), 편평 경부암(squamous neck cancer), 위암, 천막위 원시 신경외배엽 종양(supratentorial primitive neuroectodermal tumors), T-세포 림프종, 피부암, 고환암(testicular cancer), 인후암(throat cancer), 흉선종(thymoma) 및 흉선 암종(thymic carcinoma), 갑상선암(thyroid cancer), 신우뇨관의 이행 세포 암(transitional cell cancer of the renal pelvis and ureter), 영양막 종양(trophoblastic tumor), 요관 및 신우 암(ureter and renal pelvis cancer), 요도암(urethral cancer), 자궁암(uterine cancer), 자궁 육종(uterine sarcoma), 질암(vaginal cancer), 외음부 암(vulvar cancer), 발텐스트롬 마크로글로불린혈증(Waldenstrom macroglobulinemia), 및 윌름스 종양(Wilms Tumor)을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.

[0806] 일부 국면에서, 암은 B 세포 악성종양이다. B 세포 악성종양의 예는 비호지킨 림프종(NHL), 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL), 소 림프구성 림프종(SLL/CLL), 외부 세포 림프종(MCL), 여포성 림프종(FL), 변연부 림프종(MZL), 결절외(예를 들면, MALT) 림프종, 결절(예를 들면, 단세포 B 세포) 림프종, 비장 림프종, 미만성 거대 세포 림프종, B 세포 만성 림프구성 백혈병/림프종, 버킷 림프종 및 림프 모세포 림프종을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.

[0807] 6. 감염성 질환

[0808] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포는, 이를 필요로 하는 대상체에서 하나 이상의 감염성 질환, 장애, 증상 또는 상태의 치료에 사용될 수 있다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 CAR-변형된 면역 세포는, 이러한 맥락에서 면역 반응을 촉진하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명은, 이를 필요로 하는 대상체에서 감염성 질환을 치료하는 방법을 제공하고, 여기서 상기 방법은 본원에 기재된 바와 같은 적어도 하나의 면역 세포 집단의 치료학적 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 본 발명은 또한, 감염성 질환의 치료에 사용하기 위한, 본원에 기재된 적어도 하나의 면역 세포 집단(예를 들면, 본원에 기재된 조성물, 약제학적 조성물 또는 의약)을 제공한다. 본 발명은 또한, 감염성 질환을 치료하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한, 본원에 기재된 적어도 하나의 면역 세포 집단(예를 들면, 본원에 기재된 조성물, 약제학적 조성물 또는 의약)을 제공한다.

[0809] 일부 실시형태에서, 감염성 질환은 바이러스성 감염성 질환이다. 본원에 사용된 바와 같이, "바이러스 감염성 질환"은 숙주에서 질환 또는 병리학적 상태를 유발하는 임의의 바이러스에 의해 유발되는 감염일 수 있다.

[0810] 바이러스 감염성 질환의 예는 엡스타인-바 바이러스(EBV)에 의해 유발된 바이러스 감염; A형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스 또는 C형 간염 바이러스에 의해 유발된 바이러스 감염; 단순 헤르페스 1형 바이러스, 단순 헤

르페스 2형 바이러스 또는 단순 헤르페스 8형 바이러스에 의해 유발된 바이러스 감염; 사이토메갈로 바이러스(CMV)에 의해 유발된 바이러스 감염; 인간 면역 결핍 바이러스(HIV)에 의해 유발된 바이러스 감염; 인플루엔자 바이러스에 의해 유발된 바이러스 감염; 홍역 또는 유행성 이하선염 바이러스에 의해 유발된 바이러스 감염; 인간 유두종 바이러스(HPV)에 의해 유발된 바이러스 감염; 파라인플루엔자 바이러스에 의해 유발된 바이러스 감염; 풍진 바이러스에 의해 유발된 바이러스 감염; 호흡기 합포체 바이러스(RSV)에 의해 유발된 바이러스 감염; 또는 수두-대상포진 바이러스에 의해 유발된 바이러스 감염을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다. 일부 국면에서, 바이러스 감염은, 바이러스 감염을 갖는 대상체에서 암의 발증을 유발하거나 초래할 수 있다(예를 들면, HPV 감염은 자궁경부, 외음부, 질암, 음경암, 항문암 및 구인두암을 포함하는 몇몇 암을 유발하거나 이와 관련될 수 있고, HIV 감염은 카포시 육종의 발증을 유발할 수 있다).

[0811] 일부 실시형태에서, 감염성 질환은 세균성 감염성 질환이다. 본원에 사용된 바와 같이, "박테리아 감염성 질환"은 숙주에서 질환 또는 병리학적 상태를 유발하는 임의의 세균에 의해 유발되는 감염일 수 있다.

[0812] 세균 감염성 질환의 예에는, 폐렴 연쇄상 구균(*Streptococcus pneumoniae*), 헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*), 모락셀라 카타랄리스(*Moraxella catarrhalis*), 황색 스태필로코쿠스(*Staphylococcus aureus*) 또는 펩토스트렙토코쿠스 속(genus *Peptostreptococcus*)에 의한 감염과 관련된 폐렴, 중이염, 부비동염, 기관지염, 편도선염 및 유방염; 스트렙토코쿠스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*), 그룹 C 및 G 스트렙토코쿠스(Group C 및 G streptococcus), 클로스트리디움 디프테리아에(*Clostridium diphtheriae*) 또는 악티노바실루스 헤모리티쿰(*Actinobacillus haemolyticum*)에 의한 감염으로 유발된 인두염, 류마티스 열 및 사구체 신염; 마이코플라스마 뉴모니아에(*Mycoplasma pneumoniae*), 레지오넬라 뉴모필라(*Legionella pneumophila*), 스트렙토코쿠스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*), 헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*) 또는 클라미디아 뉴모니아(*Chlamydia pneumoniae*)에 의한 감염과 관련된 기도 감염; 황색 스태필로코쿠스(*Staphylococcus aureus*), 코아글라제-양성 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*) (예를 들면, 에스 에피데르미디스(*S. epidermidis*), 에스 헤모리티쿠스(*S. hemolyticus*) 등), 스트렙토코쿠스 피로게네스(*Streptococcus pyogenes*), 스트렙토코쿠스 아갈락티에(*Streptococcus agalactiae*), 스트렙토코쿠스 그룹 C-F(*Streptococcus group C-F*) (마이크로-콜로니 *Streptococcus*), 비리단스 스트렙토코쿠스(*Viridans streptococcus*), 코리네박테리움 미누티씨뭉(*Corynebacterium minutissimum*), 클로스트리디움 속(genus *Clostridium*) 또는 바르토넬라 헨셀라에(*Bartonella henselae*)에 의한 감염과 관련된 복잡하지 않은 피부 및 연조직 감염, 종기, 골수염 및 산후 열; 복잡하지 않은 급성 요로 감염; 스태필로코쿠스 사프로피티쿠스(*Staphylococcus saprophyticus*) 또는 엔테로코쿠스 속(genus *Enterococcus*)에 의한 감염과 관련된 요도염 및 자궁 경부염; 및 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*), 헤모필루스 두크레이(*Haemophilus ducreyi*), 트레포네마 팔리둠(*Treponema pallidum*), 우레아플라스마 우레아피티쿰(*Ureaplasma urealyticum*) 또는 네이세리아 고노르헤아에(*Neisseria gonorrhoeae*)에 의한 감염과 관련된 성병; 에스 아우레우스(*S. aureus*) (식중독 및 독성 쇼크 증후군), 그룹 A, B 및 C 스트렙토코쿠스에 의한 감염과 관련된 독성 질환; 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 의한 감염과 관련된 궤양; 보렐리아 레쿠렌티스(*Borrelia recurrentis*)에 의한 감염과 관련된 진신 열 증후군; 보렐리아 부르그도르페리(*Borrelia burgdorferi*)에 의한 감염과 관련된 라임병(Lyme disease); 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*), 네이세리아 고노르호에아에(*Neisseria gonorrhoeae*), 에스. 아우레우스(*S. aureus*), 에스. 뉴모니아에(*S. pneumoniae*), 에스. 피오게네스(*S. pyogenes*), 에이치. 인플루엔자(*H. influenzae*) 또는 속 리스테리아(genus *Listeria*)에 의한 감염과 관련된 결막염, 각막염 및 누낭염(dacryocystitis); 마이코박테리움 아비움(*Mycobacterium avium*), 마이코박테리움 인트라셀룰라레(*Mycobacterium intracellulare*)에 의한 감염과 관련된 미만성 마이코박테리움 아비움 증후군(MAC); 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*)에 의한 감염과 관련된 위장염; 비리단스 스트렙토코쿠스(*Viridans streptococcus*)에 의한 감염과 관련된 치과 감염; 보르데텔라 페르투스시스(*Bordetella pertussis*)에 의한 감염과 관련된 지속적인 기침; 클로스트리디움 페르프링디움(*Clostridium perfringens*) 또는 박테로이데스 속(genus *Bacteroides*)에 의한 감염과 관련된 가스 괴저; 및 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 또는 클라미디아 뉴모니아(*Chlamydia pneumoniae*)에 의한 감염을 수반하는 즉상 경화증을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다. 특정 실시형태에서, 세균 감염은, 예를 들면, 에스케리 키아 속, 리스테리아 속, 살모넬라 속 또는 스태필로 코쿠스 속 세균에 의해 유발될 수 있다.

[0813] 일부 실시형태에서, 감염성 질환은 진균 감염성 질환이다. 본원에 사용된 바와 같이, "진균 감염성 질병"은 숙주에서 질환 또는 병리학적 상태를 유발하는 임의의 진균에 의해 야기되는 감염일 수 있다.

[0814] 진균에 의해 야기되는 감염성 질환의 예는, 예를 들면, 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 크립토코쿠스 네오포르만스(*Cryptococcus neoformans*), 아스페르길루스 플라버스(*Aspergillus flavus*), 아스페르길루스 푸미가투

스(*Aspergillus fumigatus*), 콕시디오이드(*Coccidioides*), 파라코시디오이드(*Paracoccidioides*), 히스토플라스마(*Histoplasma*) 또는 블라스토마이세스(*Blastomyces*)에 의해 야기되는 국소, 점막 및/또는 전신 진균 감염을 포함하지만 이들로 한정되지 않는다. 다른 예시적 진균 관련 장애로는, 동물(예를 들어, 인간)에서 구강 아구창(thrush), 질 칸디다증(vaginal candidiasis), 아스페르길루스증(aspergillosis), 칸디다증(candidosis), 염색체증(chromomycosis), 콕시디오이디시코시스증(coccidioidiocyosis), 크립토크코코시스증(cryptococcosis), 엔토모프토로마이코시스증(entomophthoromycosis), 후생동물성 림프관염(epizootic lymphangitis), 지오텐리코시스증(geotrichosis), 히스토플라스마증(histoplasmosis), 점액균증(mucormycosis), 균종증(mycetoma), 북아메리카 분아균증(North American blastomycosis), 난균증(oomycosis), 페실리균증(paecilomycosis), 페니실리아증(penicilliosis), 코벨소포리디움증(rhinosporidiosis) 및 발아증(sporotrichosis)을 포함한다.

- [0815] 일부 실시형태에서, 감염성 질환은 기생충 감염성 질환이다. 본원에 사용된 바와 같이, "기생충 감염성 질환"은 숙주에서 질환 또는 병리학적 상태를 유발하는 임의의 원생 동물, 연충(helminth) 또는 외부 기생충(ectoparasite)에 의해 유발되는 감염일 수 있다.
- [0816] 인간에게 감염될 수 있는 원생동물의 예는 엔타메바(*Entamoeba*); 지아르디아(*Giardia*), 레이쉬마니아 발란티디움(*Leishmania balantidium*), 플라스모디움(*Plasmodium*) 및 크립토스포리디움(*Cryptosporidium*)을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.
- [0817] 인간에게 감염될 수 있는 연충의 예는 필라리아시스(*Filariasis*), 온코세르시아시스(*Onchocerciasis*), 아스카리아시스(*Ascariasis*), 트리쿠리아시스(*Trichuriasis*), 네카토리아시스(*Necatoriasis*), 트리코스트롱길리아시스(*Trichostrongyliasis*), 드라쿤쿨리아시스(*Dracunculiasis*), 바일리사스카리스(*Baylisascaris*), 에키노코코시스(*Echinococcosis*), 히메노레피아시스(*Hymenolepiasis*), 타에니아시스(*Taeniasis*), 클로노르키소미소시스(*Clonorchisomiosis*), 타에니아시스(*Taeniasis*), 시스티카시스코시스(*Cysticascosis*), 코에누로시스(*Coenurosis*), 파스시오리아시스(*Fascioliasis*), 파스시오로피아시스(*Fasciolopsiasis*), 오피스토르키아시스(*Opisthorchiasis*), 파라고니미아시스(*Paragonimiasis*), 슈스토소미아시스(*Schistosomiasis*) 및 빌하르지아시스(*Bilharziasis*)를 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.
- [0818] 인간에게 감염될 수 있는 외부 기생충의 예에는 곤충(6개 다리의 절지동물) 및 거미류(8개 다리의 절지동물)가 포함되지만, 이들로 한정되지 않는다.
- [0819] CAR 투여
- [0820] 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포는, 단독으로 또는 본원에 기재된 약제학적 조성물로서(예를 들면, 희석제 및/또는 IL-2 또는 다른 사이토카인 또는 세포 집단을 포함하지만 이들로 한정되지 않는 다른 성분과 조합하여) 투여할 수 있다.
- [0821] 본 발명의 약제학적 조성물은, 에어로졸 흡입, 주사, 섭취, 수혈, 이식(implantation) 또는 이식(transplantation)을 포함하는 임의의 적절한 방식으로 대상에게 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 약제학적 조성물은 비경구 투여에 의해 대상체에게 투여될 수 있다. 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 약제학적 조성물은 피하, 피부내, 종양내, 결절내, 골수내, 근육내, 흉골내, 정맥내(iv) 주사, 주입 기술 또는 복강내로 대상체에게 투여될 수 있다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 CAR-변형된 면역 세포 조성물은 피내 주사 또는 피하 주사에 의해 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR-변형된 면역 세포 조성물은 정맥 주사에 의해 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, CAR-변형된 면역 세포의 조성물은 림프절, 감염 부위, 염증 부위 또는 조직 또는 기관 거부 부위에 직접 주사될 수 있다. 일부 실시형태에서, CAR-변형된 면역 세포의 조성물은 자가면역 및/또는 염증성 질환의 부위에 직접 주사될 수 있다.
- [0822] 일부 실시형태에서, 대상체는 자가 세포와 함께 투여된다(또는 투여될 것이다).
- [0823] 일부 실시형태에서, 대상체는 동종이계 세포와 함께 투여된다(또는 투여될 것이다).
- [0824] 일부 실시형태에서, 대상체는 포유동물일 수 있다. 특정 실시형태에서, 대상체는 인간일 수 있다.
- [0825] 본 발명의 약제학적 조성물은, 예방 또는 치료하고자 하는 질환에 적합한 방식으로 투여될 수 있다. 투여량 및 빈도는 대상체의 상태 및 대상체 질환의 유형 및 중증도 등의 요인에 의해 결정되지만, 적절한 투여량은 임상 시험에 의해 결정될 것이다.
- [0826] "유효량" 또는 "치료량"이 표시되는 경우, 투여될 본 발명의 조성물의 정확한 양은 대상체의 연령, 체중, 항체

역가 및 상태의 개인차를 고려하여 결정될 수 있다. 일반적으로, 본원에 기재된 CAR-조작된 면역 세포를 포함하는 약제학적 조성물은, 적어도 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 또는 1×10^9 세포/kg 체중 또는 1×10^5 내지 100×10^5 세포/kg 체중(해당 범위 내의 모든 정수 값 포함)의 투여량으로 투여될 수 있다고 언급할 수 있다. CAR-조작된 면역 세포 조성물은 또한, 이들 투여량 중의 임의의 것 또는 이들의 임의의 조합으로 복수회 투여될 수 있다. CAR-조작된 면역 세포는 면역 요법에서 일반적으로 공지된 주입 기술을 사용하여 투여할 수 있다. 특정 대상체에 대한 최적의 투여량 및 치료 요법은 대상체의 질환의 징후를 모니터링하고, 이에 따라 치료를 조정함으로써 용이하게 결정될 수 있다.

[0827] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포는, 항바이러스 요법, 화학 요법(즉, 화학요법제), 알킬화제, 방사선, 면역억제제, 항체, 면역억제제, 사이토카인, 방사선조사 및 항감염제 등의 약제를 사용한 치료를 포함하지만 이들로 한정되지 않는, 임의의 수의 관련 치료 방식과 함께 (예를 들면, 이전에, 동시에 또는 이후에) 대상체에게 투여될 수 있다.

[0828] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포는 화학요법제와 함께 투여될 수 있다. 당해 기술분야에 공지된 임의의 화학요법제가 사용될 수 있다. 화학요법제의 예에는 안트라사이클린(예를 들어, 독소루비신(예를 들어, 리포솜 독소루비신)), 빈카 알칼로이드(예를 들어, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신 또는 비노렐빈), 알킬화제(예를 들어, 사이클로포스파미드, 데카르바진, 멜팔란, 이포스파미드 또는 테모졸로미드), 면역 세포 항체(예를 들어, 알렘투자맙, 켈투주맙, 리톡시맙, 오파투무맙, 토시투모맙 또는 브렌톡시맙), 항대사산물(예를 들어, 엽산 길항제, 피리미딘 유사체, 퓨린 유사체 및 아데노신 데아미나제 억제제(예를 들어, 플루다라빈) 포함), mTOR 억제제, TNFR 글루코코르티코이드 유도된 TNFR 관련 단백질(GITR) 작용제, 프로테아좀 억제제(예를 들어, 아클라시노마이신 A, 글리오톡신 또는 보르테조밐), 탈리도마이드 또는 탈리도마이드 유도체(예를 들어, 레날리도마이드) 등의 면역조절제가 포함되지만 이들로 한정되지 않는다.

[0829] 본 발명의 병용 요법에 사용하기 위해 고려되는 다른 화학요법제는 아나스트로졸(Arimidex®), 비칼루타마이드(Casodex®), 블레오마이신 설페이트(Blenoxane®), 부숴판(Myleran®), 부숴판 주사(Busulfex®), 카페시타빈(Xeloda®), N4-벤 톡시카보닐-5-데옥시-5-플루오로시티딘, 카보플라틴(Paraplatin®), 카르무스틴(BiCNU®), 클로람부실(Leukeran®), 시스플라틴(Platinol®), 클라드리빈(Leustatin®), 사이클로포스파미드(Cytoxan® 또는 Neosar®), 시타라빈, 시토신 아라비노사이드(Cytosar-U®), 시타라빈 리포솜 주사(DepoCyt®), 다카르바진(DTIC-Dome®), 닥티노마이신(약티노마이신 D, 코스메간), 다우노루비신 하이드로클로라이드(Cerubidine®), 다우노루비신 시트레이트 리포솜 주사(DaunoXome®), 텍사메타손, 도세탁셀(Taxotere®), 독소루비신 하이드로클로라이드(Adriamycin®, Rubex®), 에토포사이드(Vepesid®), 플루다라빈 포스페이트(Fludara®), 5-플루오로우라실(Adrucil®, Efudex®), 플루타미드(Eulexin®), 테자시티빈, 켈시타빈(디플루오로데옥시시딘), 하이드록시우레아(Hydrea®), 이다루비신(Idamycin®), 이포스파미드(IFEX®), 이리노테칸(Camptosar®), L-아스파라기나제(ELSPAR®), 류코보린 갈슘, 멜팔란 (Alkeran®), 6-머캅토피린(Purinethol®), 메토티렉세이트(Folex®), 미복산트론(Novantrone®), 마일로타르그, 파클리탁셀(Taxol®), 피닉스(Yttrium90/MX-DTPA), 펜토스타틴, 카무스틴 임플란트(Gliadel®), 타목시펜 시트레이트(Nolvadex®), 테니포사이드(Vumon®), 6-티오구아닌, 티오테파, 티라과 자민(Tirazone®), 주사용 토포테칸 하이드로클로라이드(Hycamptin®), 빈블라스틴(Velban®), 빈크리스틴(Oncovin®) 및 비노렐빈(Navelbine®)을 포함하지만 이들로 한정되지 않는다.

[0830] 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포는 화학요법제의 이전, 이후 또는 동시에 대상체에게 투여될 수 있다.

[0831] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포는 알킬화제와 함께 투여될 수 있다. 당해 기술분야에 공지된 임의의 알킬화제를 사용할 수 있다. 알킬화제의 예로는 질소 머스타드, 에틸렌이민 유도체, 알킬 설포네이트, 니트로소우레아 및 트리아젠, 우라실 머스타드(Aminouracil Mustard®, Chlorethaminacil®, Demethylodopan®, Desmethylodopan®, Haemanthamine®, Nordopan®, Uracil nitrogen mustard®, Uracillost®), Uracilmostaza®, Uramustin® 및 Uramustine®), 클로르메틴(Mustargen®), 사이클로포스파미드(Cytoxan®, Neosar®, Clafen®, Endoxan®, Procytox® 및 Revimmune™), 이포스파미드(Mitoxana®), 멜팔란(Alkeran®), 클로람부실(Leukeran®), 피포브로만(Amedel®, Vercyte®), 트리 에틸렌멜라민(Hemel®, Hexalen® 및 Hexastat®), 트리에틸렌티오포스포라민, 테모졸로미드(Temodar®), 티오테파(Thioplex®), 부설판(Busilvex® 및 Myleran®), 카르무스틴(BiCNU®), 로무스틴(CeeNU®), 스트랩토조신(Zanosar®) 및 다카르바진(DTIC-Dome®)가 제한 없이 포함된다. 추가의 예시적 알킬화제에는 옥살리플라틴(Eloxatin®); 테모졸로미드(Temodar® 및 Temodal®); 닥티노마이신(약티노마이신-D, Cosmegen®으로도 알려짐); 멜팔란(L-PAM, L-살코라이신(sarcylsin) 및 페닐알라닌 머스타드으로도 알려짐, Alkeran®); 알트레타민(헥사메틸멜라민(HMM),

Hexalen®이라고도 함); 카르무스틴(BicNU®); 벤다무스틴(Treanda®); 부설판(Busulfex® 및 Myleran®); 카보플라틴(Paraplatin®); 로무스틴(CCNU, CeeNU®라고도 함); 시스플라틴(CDDP, Platinol® 및 Platinol®-AQ라고도 함); 클로람부실(Leukeran®); 사이클로포스파미드(Cytoxan® 및 Neosar®); 다카르바진(DTIC, DIC 및 이미다졸 카복시아미드로도 알려짐, DTIC-Dome®); 알트레타민(헥사메틸멜라민(HMM)으로도 알려짐, Hexalen®); 이포스파미드(Ifix®); 프레드누무스틴; 프로카르바진(Matulane®); 메클로레타민(질소 머스타드, 머스틴 및 메클로로에타민 하이드로클로라이드로도 알려져 있음, Mustargen®); 스트렙토조신(Zanosar®); 티오테파(티오포스포아미드, TESPА 및 TSPA라고도 함, 및 Thioplex®); 사이클로포스파미드(Endoxan®, Cytoxan®, Neosar®, Procytox® 및 Revimmune®); 및 벤다무스틴 HCl(Treanda®)을 제한 없이 포함한다.

- [0832] 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포는, 알킬화제를 투여하기 전에, 후에 또는 동시에 대상체에게 투여될 수 있다.
- [0833] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포는 면역억제제와 함께 투여될 수 있다. 당해 기술분야에 공지된 임의의 면역억제제가 사용될 수 있다. 면역억제제의 예에는 사이클로스포린, 아자티오프린, 메토트렉세이트, 메톡살렌, 라파마이신, 마이코페놀레이트 모페틸, 마이코페놀산, 리툽시맵, 시롤리무스, 바실 렉시맵, 다클리주맵 스테로이드, 뮤로모나브-CD3 및 타크로리무스, 글루코코르티코 스테로이드, 프로르니손 및 프레르니솔론 등의 부신피질 스테로이드 및 이들의 조합이 포함되지만 이들로 한정되지 않는다.
- [0834] 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포는 면역억제제 전에, 후에 또는 동시에 대상체에게 투여될 수 있다.
- [0835] 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포 및/또는 면역억제제(들)는 이식 후에 대상체에게 투여될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포 및/또는 면역억제제(들)는 이식 전에 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포 및/또는 면역억제제는 이식 수술 동안 대상체에게 투여될 수 있다.
- [0836] 일부 실시형태에서, 대상체에 대한 CAR-조작된 면역 세포의 투여는 면역억제 요법이 개시된 후에 수행된다.
- [0837] 일부 실시형태에서, 이 방법은, 예를 들면, 이식 수용자를 경시적으로 모니터링하기 위해, 및 적용가능한 경우, 상이한 면역억제 요법 섭생에서 1회 이상 수행된다.
- [0838] 일부 실시형태에서, 이식 수용자가 이식에 대해 내성이 있는 것으로 예측되는 경우, 면역억제 요법이 감소된다. 일부 실시형태에서, 면역억제 요법은 처방되지 않고, 예를 들면, 이식 수용자가 이식에 대해 내성이 있는 것으로 예측되는 경우, 면역억제 요법은 중단된다.
- [0839] 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포는 이식 기관 또는 조직 거부 진단 후에 투여될 수 있고, 이어서 기관 또는 조직 거부의 증상이 진정될 때까지, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포 및 면역억제제(들) 둘 다의 용량이 투여될 수 있다.
- [0840] 추가 실시형태에서, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포 조성물은, 골수 이식 과 함께 (예를 들면, 이전에, 동시에 또는 이후에) 대상체에게 투여될 수 있다.
- [0841] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포는, CD20과 반응하는 약제, 예를 들면, 리툽시맵 등의 B 세포 절제 요법의 후에 투여될 수 있다. 예를 들면, 일부 실시형태에서, 대상체는 고용량 화학 요법 및 그에 이어서 말초 혈액 줄기 세포 이식으로 표준 치료를 받을 수 있다. 특정 실시형태에서, 이식 후, 대상체는 본 발명의 확장된 CAR-조작된 면역 세포의 주입을 받을 수 있다. 특정 실시형태에서, 확장된 CAR-조작된 면역 세포는 수술 전 또는 후에 투여될 수 있다.
- [0842] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR-조작된 면역 세포는 항감염제와 함께 투여될 수 있다. 당해 기술분야에 공지된 임의의 항감염제가 사용될 수 있다. 항감염제의 예는 살아메바제, 아미노글리코사이드, 구충제, 항기생충제, 항진균제(아졸 항진균제, 에키노칸딘, 기타 항진균제 및 폴리엔), 항말라리아제(항말라리아제 조합, 항말라리아 퀴놀린 및 기타 항말라리아제), 항결핵제(아미노살리실레이트, 항결핵제 조합, 디아릴퀴놀린, 하이드라지드 유도체, 기타 항결핵제, 니코틴산 유도체, 리파마이신 유도체 및 스트렙토마이세스 유도체), 항바이러스제(아다만탄 항바이러스, 항바이러스 부스터, 항바이러스제 조합, 항바이러스 인터페론, 케모킨 수용체 길항제, 인테그라제 쇄 전달 억제제, 기타 항바이러스제, 뉴라미니다제 억제제, NNRTI, NS5A 억제제, 뉴클레아제 역전사 억제제(NRTI), 프로테아제 억제제 및 퓨린 뉴클레오사이드), 카르바페넴, 카르바페넴/베타-락타마제 억제제, 세팔로스포린(세팔로스포린/베타-락타마제 억제제, 1세대 세팔로스포린, 4세대 세팔로스포린, 차세대 세팔로스포린, 2세대 세팔로스포린, 및 3세대 세팔로스포린), 항생제, 글리코펩티드 항생제, 글리실사이클린, 렘로스타틱, 린코마이신 유도체, 마크롤리드 유도체(케톨리드 및 마크롤리드), 기타 항생제, 옥사졸리디논 항생

제, 페니실린(아미노페니실린, 안티슈도모날 페니실린, 베타-락타마제 억제제, 천연 페니실린, 페니 실리나제 및 내성 페니실린), 퀴놀론, 설펜아미드, 테트라사이클린 및 소변 항감염제를 포함하지만 이들로 한정되지 않는다.

- [0843] 일부 실시형태에서, 대상체(예를 들면, 인간)는, 본 발명의 면역 세포 또는 집단의 초기 투여 및 1회 이상의 후속 투여를 제공받고, 여기서 1회 이상의 후속 투여는 이전 투여 후에 15일 미만, 예를 들면, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 또는 2일에 투여된다.
- [0844] 일부 실시형태에서, 치료 유효량의 본 발명의 면역 세포가 대상체에게 투여되거나 투여될 것이다.
- [0845] 일부 실시형태에서, 대상체에게 투여되는 본 발명의 면역 세포 집단의 면역 세포의 수는 적어도 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 또는 10^9 개 세포이다.
- [0846] 몇몇 실시형태에서, 대상체에게 투여되는 본 발명의 면역 세포 집단의 면역 세포의 수는 약 10^2 내지 약 10^9 , 약 10^3 내지 약 10^8 , 약 10^4 내지 약 10^7 , 또는 약 10^5 내지 약 10^6 개 세포의 범위이다.
- [0847] 일부 실시형태에서, 대상체에게 투여된 본 발명의 면역 세포 집단의 면역 세포의 수는 약 10^2 내지 약 10^9 , 약 10^2 내지 약 10^8 , 약 10^2 내지 10^7 , 약 10^2 내지 10^6 , 약 10^2 내지 10^5 , 약 10^2 내지 10^4 , 또는 약 10^2 내지 10^3 개 세포의 범위이다. 일부 실시형태에서, 환자에게 투여된 본 발명의 면역 집단의 면역 세포의 수는 약 10^2 , 약 10^3 , 약 10^4 , 약 10^5 , 약 10^6 , 약 10^7 , 약 10^8 또는 약 10^9 개 세포이다.
- [0848] 일부 실시형태에서, 대상체에게 투여된 본 발명의 면역 세포 집단의 면역 세포의 수는 적어도 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 또는 10^9 개 세포/kg 체중이다.
- [0849] 일부 실시형태에서, 대상체에게 투여된 본 발명의 면역 세포 집단의 면역 세포의 수는 약 10^2 내지 10^9 세포/kg 체중 또는 10^3 내지 10^8 세포/kg 체중이고, 이들 범위 이하의 모든 정수 값을 포함한다.
- [0850] 일부 실시형태에서, 대상체는 본 발명의 면역 세포 집단의 매주 1회 초과 투여, 예를 들면, 대상체에게 매주 투여되는 본 발명의 Treg 세포 집단의 2, 3 또는 4회 투여를 제공받는다.
- [0851] 일부 실시형태에서, Treg 세포 집단은, 이를 필요로 하는 대상체에게, 활성제와 조합하여 투여된다. 일부 실시형태에 따르면, 면역 세포 집단은 활성제의 투여 전, 동시에 또는 후에 투여된다.
- [0852] 일부 실시형태에서, 본 발명의 활성화된 면역 세포를 대상체에게 투여한 다음, 후속적으로 혈액을 다시 채취하고(또는 채집을 수행하고), 본 발명에 따라 이로부터 면역 세포를 활성화하고, 이들 활성화된 및 확장된 면역 세포를 대상체에게 재주입하는 것이 바람직할 수 있다. 이 프로세스는, 수주마다 수회 수행할 수 있다. 특정 실시형태에서, 면역 세포는 10cc 내지 400cc의 혈액 채취로부터 활성화될 수 있다. 특정 실시형태에서, 면역 세포는 20cc, 30cc, 40cc, 50cc, 60cc, 70cc, 80cc, 90cc 또는 100cc의 채혈로부터 활성화된다. 이론에 얽매이지 않고, 이 복수회 채혈/복수회 재주입 프로토콜을 사용하면, 특정 면역 세포 집단을 선택하는데 역할을 할 수 있다.
- [0853] 본원에 기재된 CAR, 세포 집단 및 조성물은 본원에 기재된 치료 방법에 사용될 수 있고, 본원에 기재된 약제로서 사용하기 위한 것일 수 있으며, 본원에 기재된 치료에 사용될 수 있고/있거나, 본원에 기재된 치료를 위한 의약(medicament)의 제조에 사용하기 위한 것일 수 있다.
- [0854] 제조품 및 키트
- [0855] 본 발명은 또한, 본원에 기재된 임의의 핵산, 벡터, 세포 집단 또는 조성물을 포함하는 제조 물품 및 상기 물품을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0856] 또한, 본 발명은, 적합한 용기에, 본원에 기재된 임의의 핵산, 벡터, 세포 집단 또는 조성물을 포함하는 키트를 제공한다.
- [0857] 실시형태

- [0858] 본 발명의 특정 실시예는 다음과 같다:
- [0859] 1. 다음을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR):
- [0860] - 적어도 하나의 세포외 결합 도메인,
- [0861] - 임의로 적어도 하나의 세포외 힌지 도메인,
- [0862] - 적어도 하나의 막관통 도메인,
- [0863] - 적어도 하나의 세포내 도메인,
- [0864] 여기서, 적어도 하나의 세포내 도메인은 임의로 적어도 하나의 공자극 세포내 신호전달 도메인 및 적어도 하나의 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하고,
- [0865] 여기서,
- [0866] - 적어도 하나의 막관통 도메인은 인간 TNFR2 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체 또는 임의의 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체 또는 이들의 조합이고/이거나,
- [0867] - 적어도 하나의 공자극 세포내 신호전달 도메인은 인간 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체 또는 임의의 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체 또는 이들의 조합이고,
- [0868] 여기서, 막관통 도메인 및 공자극 세포내 신호전달 도메인 중의 적어도 하나는 TNFR2 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체 또는 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체이다.
- [0869] 2. 실시형태 1에 있어서, 상기 인간 TNFR2 막관통 도메인은 서열번호 22의 서열, 또는 서열번호 22와 약 70% 이상의 동일성을 갖는 서열로부터 적어도 2개 아미노산, 바람직하게는 서열번호 22 또는 서열번호 22와 적어도 약 70% 동일성을 갖는 서열로부터의 적어도 2개의 연속 아미노산을 포함하는, CAR.
- [0870] 3. 실시형태 1 또는 실시형태 2에 있어서, 상기 인간 TNFR2 막관통 도메인은 적어도 하나의 다른 막관통 도메인과 조합되는, CAR.
- [0871] 4. 실시형태 1 내지 3 중의 어느 하나에 있어서, 상기 인간 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 34, 또는 서열번호 34와 적어도 약 70% 동일성을 갖는 서열로부터 적어도 2개의 아미노산, 바람직하게는 서열번호 34로부터 또는 서열번호 34와 적어도 약 70% 동일성을 갖는 서열로부터의 적어도 2개의 연속 아미노산을 포함하는, CAR.
- [0872] 5. 실시형태 1 내지 4 중의 어느 하나에 있어서, 상기 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인은 적어도 하나의 다른 공자극 세포내 신호전달 도메인과 조합되는, CAR.
- [0873] 6. 실시형태 1 내지 5 중의 어느 하나에 있어서, 1차 세포내 신호전달 도메인은 면역 세포 1차 세포내 신호전달 도메인, 바람직하게는 인간 CD3의 T 세포 1차 세포내 신호전달 도메인, 더욱 바람직하게는 서열번호 28, 29, 30 또는 31의 서열, 또는 서열번호 28, 29, 30 또는 31과 적어도 약 70% 동일성을 갖는 서열을 갖는 인간 CD3 제타의 T 세포 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는, CAR.
- [0874] 7. 실시형태 1 내지 6 중의 어느 하나에 있어서, 힌지 도메인은 인간 CD8의 힌지 영역, 바람직하게는 서열번호 14 또는 서열번호 14와 적어도 약 70% 동일성을 갖는 서열인, CAR.
- [0875] 8. 실시형태 1 내지 7 중의 어느 하나에 있어서, CAR은 적어도 하나의 TNFR2 막관통 도메인 및 적어도 하나의 세포내 도메인을 포함하고, 상기 세포내 도메인은 임의로 적어도 하나의 공자극 세포내 신호전달 도메인 및 적어도 하나의 면역 세포 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는, CAR.
- [0876] 9. 실시형태 1 내지 7 중의 어느 하나에 있어서, CAR은 적어도 하나의 막관통 도메인 및 적어도 하나의 세포내 도메인을 포함하고, 상기 세포내 도메인은 적어도 하나의 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 및 적어도 하나의 면역 세포 1차 세포내 신호전달을 포함하는, CAR. 도메인.
- [0877] 10. 실시형태 1 내지 9 중 어느 하나에 따른 CAR을 코딩하는 핵산 서열.
- [0878] 11. 실시형태 10에 따르는 핵산 서열을 포함하는 벡터.
- [0879] 12. 실시형태 10의 핵산 서열 또는 실시형태 11의 벡터를 포함하거나, 실시형태 1 내지 9 중의 어느 하나에 따르는 CAR 발현하는 면역 세포 집단.

- [0880] 13. 실시형태 12에 있어서, 상기 면역 세포 집단은 T 세포, 천연 킬러(NK) 세포, γ δ T 세포, 이중 음성(DN) 세포, 조절 면역 세포, 조절 T 세포, 효과기 면역 세포, 효과기 T 세포, B 세포 및 골수 유래 세포 및 이들의 임의의 조합을 포함하는 그룹으로부터 선택되는, 면역 세포 집단.
- [0881] 14. 실시형태 12 내지 13 중의 어느 하나에 따른 적어도 하나의 세포 집단을 포함하는 조성물.
- [0882] 15. 실시형태 14에 있어서, 약제학적 조성물이고, 적어도 하나의 약제학적으로 허용되는 부형제를 추가로 포함하는, 조성물.
- [0883] 16. 실시형태 12 또는 13에 따르는 적어도 하나의 면역 세포 집단 또는 실시형태 14 또는 15에 따르는 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법.
- [0884] 17. 실시형태 16에 있어서, 상기 방법은 세포 치료 방법인, 방법.
- [0885] 18. 실시형태 16 또는 17에 있어서, 상기 질환 또는 장애는 염증성 질환, 자가면역 질환, 알레르기성 질환, 장기 이식 상태, 암 및 감염성 질환을 포함하는, 방법.
- [0886] 19. 실시형태 16 내지 18 중의 어느 하나에 있어서, 면역 세포 집단이 조절 면역 세포 집단 또는 Treg 세포 집단이고, 상기 질환 또는 장애가 염증성 질환, 자가면역 질환, 알레르기성 질환, 또는 장기 이식 상태, 바람직하게는 이식편 거부 및 이식편 대 숙주 질환으로부터 선택된 장기 이식 상태인, 방법.
- [0887] 20. 실시형태 16 내지 18 중의 어느 하나에 있어서, 면역 세포 집단이 T 효과기 세포 집단, NK 세포 집단 또는 γ δ 세포 집단이고, 상기 질환 또는 장애가 암 또는 감염성 질병인, 방법.
- [0888] 본 발명은, 다음을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)에 관한 것이다:
- [0889] - 적어도 하나의 세포외 결합 도메인,
- [0890] - 임의로 적어도 하나의 세포외 힌지 도메인,
- [0891] - 적어도 하나의 막관통 도메인(예를 들면, 인간 TNFR2 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체, 임의의 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체, 또는 이들의 임의의 조합), 및
- [0892] - 적어도 하나의 세포내 도메인(적어도 하나의 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하고, 임의로 적어도 하나의 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하며, 여기서 적어도 하나의 공자극 세포내 신호전달 도메인은 인간 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체, 임의의 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체, 또는 이들의 임의의 조합이다),
- [0893] 여기서, 막관통 도메인은, TNFR2 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체이고/이거나, 공자극 세포내 신호전달 도메인은 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체이다.
- [0894] 일부 실시형태에서, 상기 인간 TNFR2 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체는 서열번호 22의 서열 또는 서열번호 22와 적어도 약 70% 동일성을 갖는 서열로부터의 적어도 2개의 아미노산(예를 들면, 적어도 2개의 연속 아미노산)을 포함한다.
- [0895] 일부 실시형태에서, 상기 인간 TNFR2 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체는 적어도 하나의 다른 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체와 조합된다.
- [0896] 일부 실시형태에서, 상기 인간 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 변이체 또는 단편은 서열번호 34의 서열 또는 서열번호 34와 적어도 약 70% 동일성을 갖는 서열로부터 적어도 2개 아미노산(예를 들면, 적어도 2개의 연속 아미노산)을 포함한다.
- [0897] 일부 실시형태에서, 상기 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 그의 변이체 또는 단편은 적어도 하나의 다른 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체와 조합된다.
- [0898] 일부 실시형태에서, 1차 세포내 신호전달 도메인은 면역 세포 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 1차 세포내 신호전달 도메인은 인간 CD3의 T 세포 1차 세포내 신호전달 도메인이다. 특정 실시형태에서, 1차 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 28, 29, 30 또는 31의 서열 또는 서열번호 28, 29, 30 또는 31과 적어도 약 70% 동일성을 갖는 서열을 갖는 인간 CD3 제타의 T 세포 1차 세포내 신호전달 도메인이다.
- [0899] 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 인간 CD8의 힌지 영역, 바람직하게는 서열번호 14 또는 서열번호 14와 적어

도 약 70% 동일성을 갖는 서열이다.

- [0900] 일부 실시형태에서, CAR은 적어도 하나의 TNFR2 막관통 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 적어도 하나의 세포내 도메인을 포함하고, 여기서 상기 세포내 도메인은 적어도 하나의 면역 세포 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하고, 임의로 적어도 하나의 공자극 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0901] 일부 실시형태에서, CAR은 적어도 하나의 막관통 도메인 및 적어도 하나의 세포내 도메인을 포함하고, 여기서 상기 세포내 도메인은 적어도 하나의 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체 및 적어도 하나의 면역 세포 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0902] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 CAR을 코딩하는 핵산 서열에 관한 것이다.
- [0903] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 핵산 서열을 포함하는 벡터에 관한 것이다.
- [0904] 본 발명은 또한, 본 발명에 따른 핵산 서열 또는 본 발명에 따른 벡터를 포함하거나 본 발명에 따른 CAR을 발현하는 면역 세포 집단에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 면역 세포 집단은 T 세포, 천연 킬러(NK) 세포, γ δ T 세포, 이중 음성(DN) 세포, 조절 면역 세포, 조절 T 세포, 효과기 면역 세포, 효과기 T 세포, B 세포 및 골수 유래 세포, 및 이들의 임의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0905] 본 발명은 또한, 본 발명에 따른 하나 이상의 세포 집단을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 조성물은 약제학적 조성물이고, 적어도 하나의 약제학적으로 허용되는 부형제를 추가로 포함한다.
- [0906] 본 발명은 또한, 본 발명에 따른 적어도 하나의 세포 집단 또는 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 이 방법은 세포 치료 방법이다. 일부 실시형태에서, 상기 질환 또는 장애는 염증성 질환, 자가면역 질환, 알레르기성 질환, 장기 이식 상태, 암 및 감염성 질환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포 집단은 조절 면역 세포 집단 또는 Treg 세포 집단이고, 상기 질환 또는 장애는 염증성 질환, 자가면역 질환, 알레르기성 질환 또는 장기 이식 상태(예를 들면, 이식편 거부 또는 이식편- 대 숙주 질병)이다. 일부 실시형태에서, 면역 세포 집단은 T 효과기 세포 집단, NK 세포 집단 또는 γ δ T 세포 집단이고, 상기 질환 또는 장애는 암 또는 감염성 질환이다.
- [0907] 본원에서 달리 정의되지 않는 한, 본 발명과 관련하여 사용되는 과학적 및 기술적 용어는 당업자가 일반적으로 이해하는 의미를 갖는 것이다. 예시적 방법 및 물질이 하기에 설명되지만, 본원에 기재된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 물질이 본 개시의 실시 또는 시험에 사용될 수도 있다. 모순되는 경우, 정의를 포함한 본 명세서가 우선한다. 일반적으로, 세포 및 조직 배양, 분자 생물학, 면역학, 미생물학, 유전학, 분석 화학, 합성 유기 화학, 의약 및 제약 화학, 본원에 기재된 단백질 및 핵산 화학 및 하이브리드화와 관련하여 사용되는 명명법은 당해 기술분야에 공지되어 있고, 일반적으로 사용되는 것들이다. 효소 반응 및 정제 기술은 당해 기술분야에서 일반적으로 달성되거나 본원에 기재된 바와 같이 제조업자의 사양에 따라 수행된다. 또한 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단수 용어는 복수를 포함하고, 복수 용어는 단수를 포함해야 한다. 본 명세서 및 실시형태 전반에 걸쳐, "갖는다" 및 "포함한다"라는 단어 또는 "갖는다", "갖는다", "포함한다" 또는 "포함하는" 등의 변형은 언급된 정수 또는 정수 그룹을 포함하는 것을 의미하는 것으로 이해되지만, 다른 정수 또는 정수 그룹을 배제하는 것은 아니다. 본원에 기재된 본 발명의 국면 및 변형에는 "이루어지는" 및/또는 "본질적으로 이루어진" 국면 및 변형예를 포함하는 것으로 이해된다. 본원에서 언급된 모든 간행물 및 기타 참고문헌은 그 전체가 참조에 의해 도입된다. 본원에서 다수의 문서가 인용되어 있지만, 이러한 인용은 이들 문서가 해당 분야의 통상의 일반 지식의 일부를 형성한다는 것을 인정하는 것으로 간주되지 않는다.
- [0908] 실시예
- [0909] 본 발명은 하기 실시예에 의해 추가로 설명된다.
- [0910] **실시예 1: TNFR2-유래 CAR-Treg**
- [0911] 재료 및 방법
- [0912] *PBMC 분리*
- [0913] 익명의 건강한 공여자의 혈액 세포는, EFS 가이드라인 및 공여자의 사전 동의에 따라 에타블리쉴망 프랑카이즈 뒤 상(Etablissement Francais du Sang)(EFS)에 의해 수집되었다. 혈액 채취 다음 날, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 피콜(Ficoll) 구배 원심분리에 의해 버퍼(buffy) 코트에서 분리하고, 이는 파립구, 혈소판 및 잔류 적

혈구 오염물질 등의 원하지 않는 혈액 생성물 분획을 제거할 수 있다. 이어서, 세포를 하기 설명된 바와 같이 단리했다.

- [0914] *FoxP3 Treg 단리*
- [0915] $CD4^+ CD25^+ CD127^{low}$ Treg는 제조업자의 지시에 따라 인간 $CD4^+ CD127^{low} CD25^+$ 조절 T 세포 단리 키트(StemCell)를 사용하여 단리했다. 간단히 말하면, $CD25^+$ 세포는, EasySep™ Releasable RapidSpheres™를 사용하여 컬럼 비 함유, 면역자기 양성 선택에 의해 400 내지 500×10^6 PBMC에서 먼저 단리했다. 이어서, EasySep™ 단리 $CD25^+$ 세포에서 결합된 자성 입자를 제거하고, 원치 않는 비-Treg를 고갈에 대해 표적화했다. 최종 단리된 분획은 높은 수준의 FoxP3을 발현하는 고도로 정제된 $CD4^+ CD127^{low} CD25^+$ 세포를 함유했고, 즉시 다운스트림 적용에 사용했다. 자가 B 세포 단리
- [0916] 자가 $CD19^+ CD20^+$ B 세포는, 제조업자의 지시에 따라, 인간 B 세포 단리 키트(StemCell)를 사용하여 단리했다. 간단히 설명하면, $CD19^+ CD20^+$ B 세포는 면역자기 음성 선택에 의해 200×10^6 PBMC 로부터 단리되었다. 단리 후, $CD19^+ CD20^+$ 체서 세포로서 추가 사용하기 위해, 세포를 즉시 동결시켰다.
- [0917] *$CD4^+ CD25^-$ 기준 T 세포 단리*
- [0918] $CD4^+ CD25^-$ T 세포는, 조절 T 세포 단리 키트(StemCell)의 임의의 프로토콜을 수행하여 단리하고, Treg와 병행하여 기능 연구에 사용하기 위한 $CD4^+ CD25^-$ T 세포의 단리를 가능하게 한다.
- [0919] *단리된 Treg의 활성화 및 배양*
- [0920] 단리된 Treg 세포를 활성화하고, 9일 동안 배양했다. 간단히 설명하면, 0일차에 Treg 세포(0.5×10^6)를, 인간 트랜스페린(OZYME)을 포함하고, 1000U/mL IL-2(Euromedex) 및 100nM 라파마이신(Sigma-Aldrich)가 보충된 Xvivo15 혈청-비함유 배지에서 24 웰 플레이트(Costar)에 배양했다. 폴리클로날 활성화는 라이프 테크놀로지(Life Technology)의 항-CD3/항-CD28 다이아비드(Dynabeads)(웰당 0.5×10^6 비트)를 사용하여 수행했다. 2일, 4일 또는 5일, 7일 또는 8일차에, 1000U/mL IL-2가 보충된 신선한 배양 배지를 세포에 공급했다. 마지막으로, 8일 또는 9일차에, 세포를 회수하고, 계수하고, 재활성화했다.
- [0921] *형질도입 프로토콜*
- [0922] Treg는, 활성화 2일 후에 키메라 항원 수용체(하기 참조)로 형질도입되었다. 간단히 설명하면, 형질도입은 각 웰에 mL당 0.5×10^7 형질도입 단위(TU)를 로딩하여 수행했다. 37°C에서 6시간 후, 바이러스 입자를 세척에 의해 제거했다. 이어서, 플레이트를 5% CO₂와 함께 37°C에서 인큐베이팅했다. 5일 후, 유세포 분석에서 GFP 양성 세포의 백분율을 측정하여 형질도입 효율을 분석했다.
- [0923] *CAR 발현의 정량화*
- [0924] 세포 표면 CAR 발현의 정량화는, CAR을, HA-태그된 CAR에 대한 APC-접합된 단백질 L 또는 APC-접합된 항-헤마글루티닌(HA) 항체로 표지함으로써 수행하고, 유세포 분석을 사용하여 분석했다.
- [0925] 총 CAR 발현의 정량화는, 웨스턴 블롯 분석에 의해 수행했다. 간단히 설명하면, 5×10^4 개의 형질도입된 Treg 또는 형질도입되지 않은("블랭크") Treg를 RIPA-완충액에서 용해시키고, 변성 조건에서 SDS-PAGE에 적용하고, PVDF-막에 블롯팅했다. 이어서, CAR-발현된 CD3ζ 및 내인성 CD3ζ를 CD3ζ 특이적 항체(항-CD247, BD Pharmingen)로 염색했다. 마지막으로, 막을 세척하고, 로딩 대조군으로서 β-액틴 항체로 재프로빙했다. Image J 소프트웨어를 사용하여 밴드 강도를 정량화했다.
- [0926] *형질도입에 사용되는 CAR 작제물*
- [0927] TNFR2, TNFR1 또는 CD8 막관통(TM) 및 CD3ζ와 함께 공자극 세포내 신호전달 도메인으로 구성되고 CD19(FMC63), CD20(B9E9) 및/또는 IL-23R(14-11-D07; PCT 특허 공보 WO 2016/184570; 서열번호 65)에 대해 지시된 전형적 scFv와 관련된 CAR가 설계되었다. 이 연구에서 사용된 작제물은 표 1 및 도 1에 수록되고 기재되

어 있다.

표 1

CAR 작제물

CAR의 명칭	scFv	TM	공자극 세포내 신호전달 도메인	CD3 ζ
CD19-CAR (CD8TM/4-1BB)	FMC63	CD8	4-1BB	예
CD19-CAR (TNFR2)	FMC63	TNFR2	TNFR2	예
CD20-CAR (CD8TM/4-1BB)	B9E9	CD8	4-1BB	예
CD20-CAR (TNFR2)	B9E9	TNFR2	TNFR2	예
CD20-CAR (TNFR1)	B9E9	TNFR1	TNFR1	예
IL-23R-CAR (CD8TM/4-1BB)	14-11-D07	CD8	4-1BB	예
IL-23R-CAR (TNFR2)	14-11-D07	TNFR2	TNFR2	예

[0928]

[0929]

보다 정확하게는, 항-CD19 CAR은 인간 CD8 리더 서열(aa1-22), 헤마글루티닌 태그, 인간 CD19에 대해 지시된 FMC63 scFv, 및 인간 CD8 알파로부터 유래된 링커(aa1 38-182)로 구성되어 있다.

[0930]

링커에 이어서, CD19-CAR(CD8TM/4-1BB) 작제물은, 인간 CD8 알파(aa183-206)의 막관통(TM) 도메인 및 인간 4-1BB(aa214-255) 및 CD3 제타(aa52-164)의 공자극 세포내 신호전달 도메인으로 구성되고; CD19-CAR(TNFR2) 작제물은 TM 및 인간 TNFR2(aa258-461) 및 CD3 제타의 세포내 도메인으로 구성된다.

[0931]

항-CD20 CAR은 인간 CD8 리더 서열(aa1-22), 인간 CD20에 대해 지시된 B9E9 scFv, 스트렙트아비딘 태그 및 인간 CD8 알파(aa138-182)로부터 유래된 링커로 구성된다.

[0932]

링커에 이어서, CD20-CAR(CD8TM/4-1BB) 작제물은, 인간 CD8 알파(aa1 83-206)의 TM 도메인 및 인간 4-1BB(aa214-255) 및 CD3 제타(aa52-164)의 공자극 세포내 신호전달로 구성되고;

[0933]

- CD20-CAR(TNFR2) 작제물은 인간 TNFR2(aa258-461) 및 CD3 제타의 세포내 신호전달 도메인으로 구성되고;

[0934]

- CD20-CAR(TNFR1)은 인간 TNFR1(aa212-455) 및 CD3 제타의 TM 및 공자극 세포내 신호전달 도메인으로 구성된다.

[0935]

항-IL-23R CAR은, 인간 CD8 리더 서열(aa1-22), 인간 IL-23R에 대해 지시된 scFv 및 인간 CD8 알파(aa138-182)로부터 유래된 링커로 구성된다.

[0936]

링커에 이어서, IL-23R-CAR(CD8TM/4-1BB) 작제물은 인간 CD8 알파(aa183-206)의 막관통 도메인 및 인간 4-1BB의 공자극 세포내 신호전달 도메인(aa214-255) 및 CD3 제타(aa52-164)로 구성되고; IL-23R-CAR(TNFR2) 작제물은 인간 TNFR2(aa258-461) 및 CD3 제타의 막관통 및 공자극 세포내 신호전달 도메인으로 구성된다.

[0937]

모든 CAR 작제물은, P2A 링커 및 강화된 녹색 형광 단백질(GFP)의 개방 판독 프레임과 함께 위상에서 클로닝된다.

[0938]

형질도입된 Treg의 표현형 분석

[0939]

배양 9일차에, Treg 표현형을 유세포 분석에 의해 분석하여, 형질도입 절차가 Treg 상태에 영향을 미치지 않았음을 확인했다. 이 분석에 사용된 마커는 표 2에 수록되어 있다.

표 2

재료 및 시약

시약	제조사	카탈로그 번호
CD4 VioGreen	Miltenyi	130-096-900
Helios eF450 (HamIgG)	eBioscience	48-9883-42
CD25 PE	Miltenyi	130-109-020
CD152 (CTLA-4) PE/Cy7 (mIgG2a)	Biologend	369614
FoxP3 AF647 (mIgG1; 2 µl)	BD	560045
CD127-APC-Vio770	Miltenyi	130-109-438

[0940]

[0941]

CAR의 활성화 분석

[0942]

CAR 활성화는, 주르카트-루시아(Jurkat-Lucia)-NFAT 세포주(Invivogen) 또는 인간 1차 Treg에서 평가했다. 리포터 세포주의 경우, CAR이 CD19⁺ 다우디 세포(1:1 비율)와 결합한 후, 루시아 루시퍼라제 활성을 모니터링하고 (제조사사의 지침 참조), GloMax 발광계(Promega)를 사용하여 NFAT 활성화를 평가했다.

[0943]

Tregs의 경우, 활성화 검정을 배양 9일차에 수행했다. 간단히 설명하면, 0.05×10^6 Treg를 96 U 바닥 플레이트에 단독으로 또는 항-CD28/항-CD3 코팅된 비드의 존재(1:1 Treg 대 비드 비율로) 또는 최종 용적 200 µL에서 새롭게 해동된 자가 B 세포 또는 CD19⁺ 다우디 B 세포(1:1 Treg 대 B 세포 비율)의 존재하에 파종했다. 37°C, 5% CO₂에서 24시간 후, 세포를 CD4 및 CD69에 대해 염색하고, 이어서 유세포 분석을 사용하여 분석했다. 형질도입되지 않은 Treg 세포와 비교하여 CAR Treg 세포에 의한 CD69 자발적 발현의 모니터링은 긴장 신호전달 강도의 결정을 가능하게 한다.

[0944]

T 세포 증식의 억제 검정

[0945]

억제 검정은 배양 9일차에 수행했다. 간단히 설명하면, Treg는 항-CD28/항-CD3 코팅된 비드(1:1 Treg 대 비드 비율)를 사용하는 TCR을 통해 또는 새롭게 해동된 자가 B 세포를 사용하는 CAR(1:1 Treg 대 비드 비율)을 통해 회수, 계수 및 활성화시키거나, 활성화 없이 유지하여 자발적 억제 활성을 평가했다.

[0946]

동시에, 동종이계 Tconv(종래의 T 세포)를 해동하고, 염료 450으로 염색하고, 항-CD28/항-CD3 코팅된 비드(3:1 Tconv 대 비드 비율)로 활성화시켰다. 다음날, 비드는, 활성화되지 않았거나 활성화된 Treg(비형질도입 또는 형질도입)와의 공배양 전에 Tconv에서 제거했다.

[0947]

3일차에, 세포를 수거하고, Tconvs의 증식을, Dye 450 회색의 결정에 의해 유세포 분석으로 평가했다. Tconv 증식 억제 백분율은 다음과 같이 계산되었다:

$$100 - \frac{\text{CAR-Treg의 존재하의 Tconv 증식 \%}}{\text{CAR-Treg의 부재하의 Tconv 증식 \%}} \times 100$$

[0948]

결과

[0950]

세포 표면에서의 형질도입 효율 및 CAR 발현

[0951]

형질도입 효율은, GFP 양성 세포의 백분율을 평가하여 결정하고, CAR 발현은 재조합 단백질 L, CD20-CAR(CD8TM/4-1BB 및 TNFR2) 및 IL-23R CAR(CD8TM/4-1BB 및 TNFR2)에 대한 면역글로불린 카파 경쇄 결합 단백질, 또는 CD19-CAR(CD8TM/4-1BB 및 TNFR2)에 대한 HA 태그에 대해 지시된 항체를 평가하여 모니터링했다.

[0952]

형질도입 효율의 백분율 및 세포 표면에서 CAR을 발현하는 형질도입된 세포의 백분율에 대한 결과는, 이 실시예에서 시험된 모든 공여자의 개요로서 표 3에 제시한다(도 2는 미가공 데이터의 예를 나타낸다)(n = 5).

표 3

세포 표면에서의 형질도입 효율 및 CAR 발현

CAR 작제물	CD19-CAR (CD8TM/ 4-1BB)	CD19-CAR (TNFR2)	CD20-CAR (CD8TM/ 4-1BB)	CD20-CAR (TNFR2)	IL-23R-CAR (CD8TM/ 4-1BB)	IL-23R- CAR (TNFR2)
형질도입을 위한 TU/mL	5x10 ⁶		2x10 ⁶		2x10 ⁶	5x10 ⁶
형질도입 효율 %	71.4 ± 2.4	65.3 ± 2.0	62 ± 2.7	66 ± 0.1	54.4 ± 7.7	47.2 ± 4.1
세포 표면에서의 CAR 발현 %	96.2 ± 0.15	46.8 ± 2.5	98 ± 0.1	74.3 ± 8	97.2 ± 1.4	74.1 ± 8.9
CAR의 MFI	47.9 ± 0.3	3.2 ± 0.4	92.5 ± 13.5	16.5 ± 6.4	191.1 ± 53.2	20.5 ± 3.4

[0953]

[0954]

도 2 및/또는 표 3에 제시된 바와 같이, CD19-CAR(CD8TM/4-1BB), CD20-CAR(CD8TM/4-1BB) 및 IL-23R-CAR(CD8TM/4-1BB) 형질도입된 세포는 세포 표면에서 CAR의 95%를 보유하고, CD19-CAR(TNFR2), CD20-CAR(TNFR2) 및 IL-23R-CAR(TNFR2) 형질도입 세포는 세포 표면에서 CAR의 46% 내지 75%를 발현했다. 또한, 세포당 CAR의 수를 나타내는 평균 형광 강도(MFI)는 CD19-CAR(TNFR2)에서 약 15배, CD20-CAR(TNFR2)에서 약 6배, IL-23R-CAR(TNFR2)에서 약 9배 감소했다. 세포 표면에서 CAR 발현의 이러한 강력한 감소는, GFP 발현이 모든 실험 조건에서 유사하기 때문에, 낮은 형질도입 효율의 결과는 아니었다.

[0955]

또한, 도 3, 패널 A에 제시된 바와 같이, CD20-CAR(CD8TM/4-1BB)로 형질도입된 세포는 CD3 ζ 항체 및 CD20-CAR(TNFR2)로 형질도입된 세포에 대해 82kD 단백질로 염색한 후에 CAR에 상응하는 62kD 단백질을 발현시켰고, 형질도입되지 않은 세포는 내인성 CD3 ζ 에 상응하는 16kD의 밴드로만 표지되었다. 흥미롭게도, 밴드 강도의 정량화는, 유세포 분석(도 2)을 사용하여 관찰된 바와 같이, CD20-CAR(CD8TM/4-1BB)(도 3, 패널 B)와 비교하여 CD20-CAR(TNFR2)의 보다 낮은 발현을 나타냈다.

[0956]

요약하면, 결과는 TNFR2 세포내 도메인 및 TNFR2 막관통 도메인이, 특히 세포 표면에서, 놀랍게도 CAR의 전체 발현을 감소시켰음을 입증했다.

[0957]

CAR-특이적 활성화

[0958]

항원-독립성 긴장성 신호전달의 완전한 감소는, 고전적 4-1BB/CD3 ζ 작제물과 비교하여, 3개의 상이한 scFv 표적(CD19, CD20 및 IL-23R)에 대한 TNFR2 도메인을 포함하는 CAR로 형질도입된 Treg 세포에서 관찰된다(도 4, 패널 A-C). 또한, 세포 표면에서 TNFR2 유래 CAR 발현(CD19, CD20 또는 IL-23R)의 강력한 감소에도 불구하고(표 3), CAR-특이적 활성화는 유지된다.

[0959]

따라서, 이러한 결과는, TNFR2 막관통 및 TNFR2 세포내 도메인의 존재가, 놀랍게도, CAR Treg 세포에서 활성화 배경의 강력한 감소를 유도하고, 결과적으로 CAR 특이적 활성화와 리간드-독립적 긴장성 신호전달 사이의 비율을 증가시켰음을 입증한다. 3개의 상이한 scFv가 시험되고 동일한 방식(CD19, CD20 및 IL-23R)으로 거동했기 때문에, 이 현상은 목적 scFv와는 무관한 것이다.

[0960]

CAR 매개 억제 활성화

[0961]

TNFR2 유래 도메인을 갖는 CD19-CAR 작제물의 경우, 세포 표면에서 CAR 발현이 15배 감소하더라도, 4-1BB 유래 작제물의 것에 필적하는 억제 활성화의 CAR-특이적 유발이 관찰되었다(도 5, 패널 A).

[0962]

가장 흥미롭게도, CD20-CAR 및 IL-23R-CAR 작제물의 경우, 4-1BB 유래 작제물의 자발적 억제 활성화는 너무 강력하여 CAR-매개 억제 활성을 강조하지 않지만, TNFR2 유래 CAR 작제물은 억제 활성화의 배경을 대폭 저하시켜, 특정 CAR-매개 억제 활성화의 관찰을 최초로 가능하게 했다(도 5, 패널 B 및 5C).

[0963]

결론적으로, TNFR2/CD3 ζ 유래 CAR에서 리간드-독립성 긴장성 신호전달의 감소는 최초로 CD20-CAR- 및 IL-23R-CAR-매개 억제 활성화의 관찰을 가능하게 한 반면, 4-1BB/CD3 ζ 도메인에 융합된 동일한 scFv는 배경에 걸쳐 관찰 가능한 활성화가 없었다.

- [0964] 실시예 2: TNFR2 유래 CD19-CAR의 비교
- [0965] 재료 및 방법
- [0966] CAR 작제물을 제외하고, 재료 및 방법은 실시예 1에 기재된 것과 동일하다. 여기서, 2개 유형의 세포를 CAR 작제물로 형질도입시켰다: 인간 Treg 및 주르카트-루시아-NFAT 세포.
- [0967] 형질도입에 사용되는 CAR 작제물
- [0968] 이 연구에서 사용된 CAR 작제물은 표 4 및 도 6에 수록되고 기재되어 있다.

표 4

CD19-CAR 작제물

CAR의 명칭	scFv	TM	공자극 세포내 신호전달 도메인	CD3 ζ
CD19-CAR (CD8TM/4-1BB)	FMC63	CD8	4-1BB	예
CD19-CAR (TNFR2)	FMC63	TNFR2	TNFR2	예
CD19-CAR (TNFR2 Δ18)	FMC63	TNFR2	TNFR2 Δ18	예
CD19-CAR (TNFR2 Δ59)	FMC63	TNFR2	TNFR2 Δ59	예
CD19-CAR (TNFR2 Δ104)	FMC63	TNFR2	TNFR2 Δ104	예
CD19-CAR (TNFR2 Δ151)	FMC63	TNFR2	TNFR2 Δ151	예
CD19-CAR (없음)	FMC63	TNFR2	없음	예
CD19-CAR (CD8TM/TNFR2)	FMC63	CD8	TNFR2	예
CD19-CAR (융합 1+ TNFR2)	FMC63	융합 1 CD8/TNFR2 R2	TNFR2	예
CD19-CAR (융합 2+ TNFR2)	FMC63	융합 2 CD8/TNFR2 R2	TNFR2	예
CD19-CAR (융합 3 +TNFR2)	FMC63	융합 3 CD8/TNFR2 R2	TNFR2	예

- [0969]
- [0970] 항-CD19 CAR은, 인간 CD8 리더 서열(aa1-22), 인간 CD19에 대해 지시된 FMC63 scFv, 스트렙트아비딘 태그, 및 인간 CD8 알파(aa138-182)로부터 유래된 링커로 구성된다.
- [0971] 일부 경우에, TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인은, 18, 59, 104 또는 151개 아미노산 잔기가 각각 C-말단에서 제거된 TNFR2 도메인의 단편이다(각각 Δ18, Δ59, Δ104 또는 Δ151). TNFR2 신호전달 도메인은 5개 도메인으로 세분될 수 있으며, 각 도메인은 다양한 신호전달 경로를 유발하기 위해 상이한 신호전달 분자와의 상호작용에 중요하다. 추가로, 특정 도메인은 TNFR2의 세포내이입을 조절하는 것으로 기재되어 있다[참조: Ji et al, Arterioscler Thromb Vase Biol. 32(9):2271-9 (2012)]. 특정 도메인이 각각의 표현형에 관여하는지의 여부를 분석하기 위해, 몇몇 결실 돌연변이체가 작제되었다. 결실은, 맵핑된 세포내 도메인과 함께 수행하고, C-말단으로부터 TNFR2 도메인이 결실되었다. 상세하게는, 도메인 V는 작제물 TNFR2Δ18에서 결실되었고; 도메인 V 및 IV는 TNFR2Δ59에서 결실되었고; 도메인 V, IV 및 III은 TNFR2Δ104에서 및 도메인 V, IV, III 및 II는 TNFR2Δ151에서 결실되었다. 도메인의 추정 기능은 표 5에 수록되어 있다.

표 5

TNFR2 도메인

도메인	추정 기능
I	미공지
II	JNK 활성화, 국제화
III	JNK 활성화, 국제화; TRAF2 열화
IV	TRAF1/2/3 결함
V	Bmx, 티로신 키나제/Akt-활성화/기여 Traf2 결함/NFκB 신호전달

- [0972]
- [0973] TNFR2 막관통 도메인의 영향을 추가로 해석하기 위해, CD8 TM, 및 이어서 TNFR2 막관통 도메인을 포함하는 작제물 뿐만 아니라 TNFR2 TM 단독, 및 이어서 CD3z 또는 상이한 양의 CD8 및 TNFR2 유래 아미노산으로 이루어진 막하이브리드를 갖는 작제물을 생성했다.

[0974] 막관통 도메인의 융합은 인간 TNFR2 막관통 도메인의 일부와 융합된 인간 CD8 알파 막관통 도메인의 전체 또는 일부로 구성된다. 실시예 2에서 사용된 융합 아미노산 서열은 표 6에 기재되어 있다.

표 6

CD19-CAR 막관통 융합 서열

융합 서열의 명칭	CD8 서열	TNFR2 서열
융합 1	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT (서열번호 59)	CVIMTQV (서열번호 62)
융합 2	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT (서열번호 60)	VNCVIMTQV (서열번호 63)
융합 3	IYIWAPLAG (서열번호 61)	TALGLLIIGVVNCVIMTQV (서열번호 64)

[0975]

[0976] 결과

[0977] 인간 Treg의 세포 표면에서 CD19-CAR 발현

[0978] TNFR2 막관통 도메인 및 임의로 전체 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편을 포함하는 CD19-CAR을 사용하여, TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인이 세포 표면에서 CAR 발현을 감소시키는데 관여하는지를 결정했다. CD8 막관통 도메인 및 4-1BB 세포내 도메인을 포함하는 CD19-CAR을 대조군으로 사용했다.

[0979] TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 및 임의로 TNFR2 막관통 도메인 또는 CD8/TNFR2 융합 막관통 도메인을 포함하는 CD19-CAR를 사용하여, TNFR2 막관통 도메인이 세포 표면에서 CAR 발현을 감소시키는데 관여하는지를 결정했다. TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 및 CD8 막관통 도메인을 포함하는 CD19-CAR을 대조군으로 사용했다.

[0980] 표 7에 제시된 바와 같이, 세포 표면에서 CAR 발현의 감소는 TNFR2 막관통 도메인을 포함하는 CARS, 뿐만 아니라 TNFR2 세포내 도메인을 포함하는 CAR에서 관찰되었지만, TNFR2 도메인의 부재하에 CD8 막관통 도메인 및 4-1BB 세포내 도메인을 포함하는 CAR에서는 관찰되지 않았다.

표 7

활성화 부재하에 인간 Treg의 세포 표면에서의 CD19-CAR 발현

CAR 작제물	형질도입 세포 (% GFP ⁺)	표면 CAR 발현 % (MFI)
CD19-CAR (CD8TM/4-1BB)	52%	76% (33)
CD19-CAR (TNFR2)	59%	22% (2)
CD19-CAR (TNFR2 Δ18)	73%	30% (3)
CD19-CAR (TNFR2 Δ59)	73%	25% (2)
CD19-CAR (TNFR2 Δ104)	78%	23% (3)
CD19-CAR (TNFR2 Δ151)	82%	52% (12)
CD19-CAR (없음)	84%	70% (17)
CD19-CAR (CD8TM/TNFR2)	74%	80% (25)
CD19-CAR (융합 1+ TNFR2)	73%	78% (19)
CD19-CAR (융합 2+TNFR2)	64%	28% (2)
CD19-CAR (융합 3+TNFR2)	70%	27% (2)

[0981]

[0982] 전체적으로, 이러한 결과는, TNFR2 막관통 도메인 및 공자극 세포내 신호전달 도메인 둘 다가 인간 Treg의 세포 표면에서 CAR 발현의 저하에 관여하는 것을 입증한다.

[0983] 인간 Treg에서 CD19-CAR-특이적 활성화

[0984] TNFR2 막관통 도메인 및 임의로 전체 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편을 포함하는 CD19-CAR를 사용하여, TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인이 CAR 활성화에 관여하는지를 결정했다. 4-1BB 공자극

세포내 신호전달 도메인 및 CD8 막관통 도메인을 포함하는 CD19-CAR을 대조군으로 사용했다.

[0985] TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 및 임의로 TNFR2 막관통 도메인 또는 CD8/TNFR2 융합 막관통 도메인을 포함하는 CD19-CAR를 사용하여, TNFR2 막관통 도메인이 CAR 활성화에 관여하는지를 결정했다. 4-1BB 공자극 세포내 신호전달 도메인 및 CD8 막관통 도메인을 포함하는 CD19-CAR을 대조군으로 사용했다.

[0986] 표 8에 제시된 바와 같이, CD69 초기 활성화 마커의 발현 수준에 의해 평가된 긴장성 신호전달의 감소는, TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 및 CD8/TNFR2 융합 막관통 도메인을 포함하는 CAR에서 관찰되었지만, CD8 막관통 도메인/4-1BB 공자극 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 CAR에서는 관찰되지 않았다. 낮은 수준의 발현에도 불구하고, TNFR2 유래 CAR은 CD19⁺ 다우디 세포로 효율적으로 활성화되었다. 형질도입되지 않은 세포에서는, CD69 발현 배경은 다우디 세포의 부재시 9%, 또는 다우디 세포 존재시 32%이다.

표 8

인간 Treg 에서 CD19-CAR 활성화

CAR 작제물	CAR-리간드 결합의 전후 %CD69 ⁺
CD19-CAR (CD8TM/4-1BB)	20% / 79%
CD19-CAR (TNFR2)	12% / 59%
CD19-CAR (TNFR2 Δ 18)	11% / 59%
CD19-CAR (TNFR2 Δ 59)	16% / 65%
CD19-CAR (TNFR2 Δ 104)	19% / 81%
CD19-CAR (TNFR2 Δ 151)	23% / 74%
CD19-CAR (없음)	20% / 75%
CD19-CAR (CD8TM/TNFR2)	13% / 70%
CD19-CAR (융합 1+ TNFR2)	14% / 70%
CD19-CAR (융합 2+TNFR2)	8% / 67%
CD19-CAR (융합 3+TNFR2)	11% / 61%

[0987]

[0988] 주르카트(Jurkat)-T 세포의 세포 표면에서 CD19-CAR 발현

[0989] 인간 Treg 세포와 마찬가지로, CD19-CAR 발현은 또한, 표 5에 기재된 CAR 작제물을 사용하여, 주르카트-루시아 (Jurkat-Lucia)-NFAT 세포에서 분석했다. 이 리포터 세포주는 불멸화된 인간 T 림프구 주르카트 세포로부터 유래된다.

[0990] 표 9에 제시된 바와 같이, 세포 표면에서 CAR 발현의 감소는 또한, TNFR2 막관통 도메인을 포함하는 CAR, 뿐만 아니라 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 CAR을 갖는 주르카트-T 세포에서 관찰되었지만, CD8 막관통 도메인/4-1BB 공자극 세포내 신호전달 도메인 작제물을 포함하는 CAR에서는 관찰되지 않았다.

표 9

활성화 부재하에 주르카트-T 세포의 세포 표면에서 CD19-CAR 발현

CAR 작제물	형질도입 세포 (% GFP ⁺)	GFP ⁺ 세포 사이의 CAR 표지화 % (MFI)
CD19-CAR (CD8TM/4-1BB)	88%	81% (104)
CD19-CAR (TNFR2)	89%	31% (7)
CD19-CAR (TNFR2 Δ 19)	83%	20% (6)
CD19-CAR (TNFR2 Δ 59)	90%	34% (5)
CD19-CAR (TNFR2 Δ 104)	95%	29% (10)
CD19-CAR (TNFR2 Δ 151)	94%	52% (37)
CD19-CAR (없음)	95%	77% (53)
CD19-CAR (CD8TM/TNFR2)	80%	54% (51)
CD19-CAR (융합 1+ TNFR2)	77%	45% (34)
CD19-CAR (융합 2+TNFR2)	75%	19% (6)
CD19-CAR (융합 3+TNFR2)	72%	16% (5)

[0991]

- [0992] 이러한 결과는, TNFR2 막관통 및 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인 둘 다가 주르카트-T 세포의 세포 표면에 서 감소된 CAR 발현에 관여함을 입증한다.
- [0993] TNFR-c-말단 결실 작제물은 상이한 표면 발현 패턴을 나타내고, 주르카트-NFAT 세포에서 CD3z 신호전달에서 기 능적이다.
- [0994] 생성된 CD19-CAR 작제물의 완전성을 시험하기 위해, 표면 발현 수준 및 NFAT 신호전달을 주르카트 NFAT-루시아 T 세포주에서 검정했다.
- [0995] 세포 표면 발현의 강력한 감소가, CD8TM-41BB CAR과 비교하여 완전한 TNFR2 CAR에서 관찰되었다(도 7). 이러한 발현 수준의 감소는, TNFR2-TM 도메인이 CD8TM 도메인으로 치환되었을 때, 부분적으로 취소되었다. 또한, TNFR2 도메인 V, IV 및 III의 결실은, 완전한 TNFR2 도메인으로부터 검출가능하게 세포 표면 발현을 변화시키지 않았다. 그러나, 도메인 II 및 I의 결실 후, 발현 수준은 4-1BB 작제물에서 관찰된 수준의 절반으로 증가했다. 동시에, 모든 작제물은 표적 의존적 NFAT 신호전달을 계속 나타냈다. 이러한 결과는 함께, TNFR2 도메인 I 및 II가 TNFR2-유래 CAR에서 세포 표면 발현 감소에 기여하고, CAR이 여전히 CD3z 의존성 NFAT 신호전달을 나타낼 수 있기 때문에, 결실 돌연변이의 감소된 효과는 비-폴딩 단백질로 인한 것이 아니라는 것을 나타낸다.
- [0996] 주르카트-T 세포에서 CD19-CAR-특이적 활성화
- [0997] CD19-CAR 특이적 활성화는 또한, CD19⁺ 다우디 세포와의 인큐베이션 후에 CAR-리간드 결합 후의 NFAT 활성화를 측정함으로써 주르카트-루시아-NFAT 세포에서 분석했다.
- [0998] 표 10에 제시된 바와 같이, 낮은 수준의 발현에도 불구하고, 모든 TNFR2-유래 CAR은 CD19⁺ 다우디 세포로 효율 적으로 활성화된다.

표 10

CD19-CAR 활성화 주르카트-루시아(Jurkat-Lucia)-NFAT 세포

CAR 작제물	CAR-리간드 결합 후의 NFAT 활성화 (정규화 광 단위)
CD19-CAR (CD8TM /4-1BB)	100
CD19-CAR (TNFR2)	73
CD19-CAR (TNFR2 Δ 19)	72
CD19-CAR (TNFR2 Δ 59)	73
CD19-CAR (TNFR2 Δ 104)	114
CD19-CAR (TNFR2 Δ 151)	103
CD19-CAR (없음)	96
CD19-CAR (CD8TM/ TNFR2)	101
CD19-CAR (융합 1+ TNFR2)	74
CD19-CAR (융합 2+TNFR2)	51
CD19-CAR (융합 3+TNFR2)	64

- [0999]
- [1000] 실시예 3: 다양한 TNFR 수용체(4-1BB, TNFR1 및 TNFR2)로부터 유래된 상이한 막관통 및 세포내 신호전달 도메인 을 갖는 항-CD20 CAR의 평가
- [1001] 재료 및 방법
- [1002] 사용된 재료 및 방법은 실시예 1에 기재된 것과 동일했다.
- [1003] 결과
- [1004] 상이한 TNFR 세포내 도메인을 갖는 항-CD20 CAR의 발현 수준
- [1005] 이전 및 본 연구에서, 항-CD20 CAR 발현의 감소는, 4-1BB 세포내 도메인을 갖는 작제물과 비교하여, TNFR2 막관

통 및 세포내 도메인을 갖는 작제물에 대해 관찰되었다(도 8). 이 연구에서는, TNFR 유래 신호전달 도메인을 포함하는 새로운 CAR이, 인간 TNFR1의 막관통 및 세포내 도메인을 사용하여 설계했다(CD20-CAR(TNFR1TM-TNFR1-CD3z)-P2A-GFP의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 108 및 109임). 도 8에 제시된 바와 같이, 이러한 새로운 CAR은 또한, 4-1BB-유래 CAR과 비교하여, 세포 표면에서 낮은 수준으로 발현된다. 그러나, TNFR1 유래 서열을 포함하는 CAR은 독성이 있고, FoxP3 Treg의 생존(63% 생존)에 강력하게 영향을 미친다. 더욱이, 생세포/아포토시스 세포는 확산 패턴으로 TNFR1-유래 CAR을 발현한다(도 8, 좌측 하단 패널).

[1006] 상이한 TNFR 세포내 도메인을 갖는 항-CD20 CAR의 리간드-독립성 긴장성 신호전달 및 활성화 능력

[1007] 활성화되지 않은 CAR-Treg 세포에서 CD69 마커 발현을 모니터링함으로써, 강력한 리간드-독립적 긴장 신호전달이, 4-1BB 세포내 도메인을 갖는 항-CD20 CAR 작제물에서 이전에 관찰되었다. 대조적으로, 이 긴장성 신호전달은, TNFR2 막관통 및 세포내 도메인을 포함하는 항-CD20 CAR에서는 강력하게 감소되었다. 본 연구는, 모든 TNFR-유래 CAR(도 9) 중에서, TNFR2-유래 CAR만이 긴장성 신호전달을 강력하게 감소시킬 수 있는 반면(대조군의 11%에 대하여 15%), 4-1BB 및 TNFR1 서열은, 각각 약 40% 및 32%의 긴장성 신호전달을 갖는다. 이 결과는, TNFR2 유래 CAR이 리간드 독립적 긴장성 신호전달을 특이적으로 감소시키는 능력을 강조한다.

[1008] CAR 활성화를 평가하기 위해, CAR-Treg 세포를, CD20 CAR 리간드를 발현하는 자가 B 세포와 함께 24시간 동안 인큐베이션했다. 도 9에 제시된 바와 같이, 가장 강력한 CAR 활성화는 TNFR2 유래 CAR(2.5배)에서 관찰되는 반면, 다른 모든 CAR-Treg는 불충분하게 활성화되었다(1.8배 미만).

[1009] CAR-Treg 세포의 억제 활성화는, B 세포(B 세포)의 부재 또는 존재하에 CAR-Treg와 공배양된 Tconv 세포의 증식을 모니터링함으로써 평가했다(도 10). 이 경우에도, 고전적 항-CD20 CAR 작제물(CD8 TM/4-1BB)의 자발적 억제 활성화는 너무 강력해서, CAR 매개 억제 활성을 강조할 수 없다. 대조적으로, TNFR2로부터 유래된 항-CD20 CAR은 CAR 매개 억제 활성화의 관찰을 가능하게 했다. TNFR1로부터 유래된 항-CD20 CAR은 매우 약한 억제 활성을 나타냈다.

[1010] 다양한 TNFR-유래 CAR의 CAR 효능을 보다 잘 정의하고 비교하기 위해, Tconv 증식을 억제하는 능력을, 공배양 중에 존재하는 CAR-Treg 세포의 절대수의 함수로서 표시했다. 도 11에 제시된 바와 같이, TNFR1-유래 CAR은 매우 비효율적이었다(억제의 50%를 유발하는 14750 CAR-Treg).

[1011] 이들 결과는, 상이한 인간 TNFR 후보 중에서, CAR에서 TNFR2 막관통 및 TNFR2 공자극 세포내 신호전달 도메인의 사용이, 매우 낮은 리간드-독립성 긴장성 신호전달 및 최적의 CAR-의존적 Treg 활성화 및 억제 활성을 갖는 CAR-Treg의 설계를 위한 최적 조합임을 입증한다.

[1012] **실시예 4: Treg 마커/표현형**

[1013] 재료 및 방법

[1014] 사용된 재료 및 방법은 실시예 1에 기재된 것과 동일했다.

[1015] 결과

[1016] *배양에서 항-IL-23R CAR-Treg 표현형*

[1017] 9일차의 IL-23R CAR-Treg 표현형에 대한 결과는 다음 표에 제시되어 있다(표 11). 결과는, 각 마커에 대해 양성인 세포의 백분율로 표시된다.

표 11

9 일차에 IL-23R CAR-Treg 표현형

Treg	형질도입	CD4	CD25	FoxP3	헬리오스 (Helios)	CD62L	CD127
1132	GFP	85,8	96,2	93,9	72,2	89,5	3,7
	CAR (4-1BB/CD3z)	47,62	95,5	81,9	18,2	75,9	23,9
1133	GFP	65,6	95,0	87,9	68,3	89,5	3,6
	CAR (4-1BB/CD3z)	57,7	97,8	89,2	59,8	71,2	15,2
1137	GFP	94,48	97,8	94,8	55,1	93,9	3,1
	CAR (TNFR2/CD3z)	94,25	98,5	96,3	66,6	93,3	3,3
1139	GFP	90,53	97,6	94,9	51,4	95,4	2,1
	CAR (TNFR2/CD3z)	92,73	97,8	95,3	54,5	94,1	2,8
1142	GFP	93,9	94,8	85,8	30,6	82,6	11
	CAR (4-1BB/CD3z)	88,7	96,0	64,8	34,6	76,4	22
	CAR (TNFR2/CD3z)	93,7	65,6	74,9	38,0	79,5	14,5
1144	GFP	93,2	96,4	78,0	31,8	96,6	10,8
	CAR (4-1BB/CD3z)	86,7	95,9	50,8	23,7	70,7	25,9
	CAR (TNFR2/CD3z)	92,7	96,0	62,5	31,1	89,0	10,7
1148	GFP	89,4	95	95,3	63,4	ND	3,7
	CAR (4-1BB/CD3z)	81,1	94,1	95,1	60,4		5,1
	CAR (TNFR2/CD3z)	90	94,7	95,0	64,6		4,2
1149	GFP	89,5	95,2	95,1	66,3		3,4
	CAR (4-1BB/CD3z)	73,3	93,3	92,8	66,0		9,8
	CAR (TNFR2/CD3z)	91,2	95,5	92,5	61,2		5,7

[1018]

[1019]

흥미롭게도, 세포 표면에서 고도로 발현되는 IL-23R-CAR(4-1BB/CD3z)로 형질도입된 Treg는, FoxP3, Helios 및 CD62L(볼드체)의 감소 및 CD127의 증가(볼드체)에 의해 강조된 안정성의 상실을 나타내는 것이 관찰되었다. 그러나, IL-23R-CAR(TNFR2/CD3z)로 형질도입된 Treg는, 세포 표면 발현에서 9배 감소를 나타내고(4-1BB 유래 CAR에서는 191.1±53.2, TNFR2 유래 CAR에서는 20.5±3.4; 표 3 참조), 배양 9일 후에 강력한 Treg 표현형을 강조한다.

[1020]

배양에서 항-CD20 CAR-Treg 표현형

[1021]

15일차에 항-CD20 CAR-Treg 표현형에 대한 결과는 하기 표에 제시되어 있다(표 12). 결과는, 각 마커에 대한 양성 세포의 백분율 또는 평균 형광으로 표시된다.

표 12

항-CD20 CAR-Treg 표현형

15 일차 (n=3)	CD25 % (CD4+ pop)	CD127 % (CD4+ CD25+ pop)	FoxP3 MFI (CD4+ pop)	% Helios+ (FoxP3+ pop)	% CTLA-4+ (CD4+ CD25+ pop)
UT	79.5 ± 6.4	0.8 ± 0.1	11.5 ± 1.5	62.1 ± 4.4	75.4 ± 7.3
GFP	80.6 ± 3.8	0.9 ± 0.1	11.1 ± 1.3	61.3 ± 2.7	74.7 ± 9.1
4-1BB	69.9 ± 4.9	0.9 ± 0.1	10.9 ± 1.0	67.2 ± 1.2	60.4 ± 5.3
TNFR2	72.9 ± 2.5	0.8 ± 0.0	11.3 ± 1.3	72.9 ± 2.4	63.0 ± 5.4

[1022]

[1023]

흥미롭게도, Treg 표현형은, 상이한 CAR-Treg 작제물과 GFP 단독으로 형질도입된 대조군 사이에 통계적으로 상이하지 않다.

[1024]

실시예 5: CAR-Treg의 생체내 사용

[1025]

재료 및 방법

[1026]

GvHD

[1027]

인간 HLA-A2⁺ PBMC 주사 1일 전, 총 23마리의 NSG 마우스(8주)를, 인간 세포 생착을 촉진하기 위해 부설관 30mg/kg의 IP 주사로 조정했다. 1일 후(0일차), 마우스에 HLA-A*02⁺ 인간 PBMC(마우스당 5×10⁶ PBMC)를 IV 주사하고, 인간 HLA-A2 CAR Treg를 1:1 PBMC:CAR-Treg 비율로 주사했다. 1주일에 3회, 마우스 체중을 측정하고(BW), GvHD 스코어를 평가했다. 혈액 샘플을 매주 채취했다. 희생시, 비장과 폐도 분석했다. 인간 Treg는, HLA-A2 음성의 건강한 지원자로부터 단리하고, 이전에 기재된 바와 같이 형질도입시켰다.

[1028]

결과

[1029]

CD28, TNFR2 또는 TNFR2⁺ 4-1BB 공신호전달 도메인을 포함하는 CAR Treg를, GvHD 마우스 모델에서 생체내 활성화에 대해 시험했다. 3개의 상이한 CAR 작제물(도 12)는, 이전에 기재된 바와 같이, CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low}, CD45RA⁺ 인간 Treg에서 형질도입시켰다.

[1030]

형질도입 효율은, GFP 양성 세포 발현의 백분율로 평가하고, CAR 발현은 Dextramer®를 사용하여 모니터링했다. 도 13에 제시된 바와 같이, Treg는 각각 CD28 또는 TNFR2 또는 TNFR2⁺ 4-1BB HLA*A2 CAR로 27%, 56% 및 34%에서 형질도입시켰다.

[1031]

3개의 상이한 HLA*A2 CAR-Treg는 CD4⁺ CD45RA⁺ FoxP3⁺ CTLA-4⁺의 강력한 Treg 표현형을 나타냈다(도 14).

[1032]

HLA*A2 CAR-Treg를 1:1 비율로 NSG 마우스에 주입했다(PBMC:CAR-Treg). TNFR2, TNFR2⁺ 4-1BB 또는 CD28 공신호전달 도메인을 포함하는 HLA*A2 CAR-Treg는 모두 GvHD를 조절할 수 있었다(도 15).

표 13

서열

SID ¹	유형 ²	설명
1-2	aa	항-CD19 scFv
3-6	aa	항-CD20 scFv
7	aa	항-데스모 3 (도메인 1-4)
8-11	aa	링커
12	nt	링커
13	aa	KIR ₂ DS ₂ 힌지 도메인
14	aa	CD8 힌지 도메인
15	nt	CD8 힌지 도메인
16	aa	IgG4 힌지 도메인
17	nt	IgG4 힌지 도메인
18	aa	IgD 힌지 도메인
19	nt	IgD 힌지 도메인
20	aa	CD28 힌지 도메인
21	nt	CD28 힌지 도메인
22	aa	TNFR2 막관통 도메인
23	nt	TNFR2 막관통 도메인
24	aa	CD8 막관통 도메인
25	nt	CD8 막관통 도메인
26	aa	CD28 막관통 도메인
27	nt	CD28 막관통 도메인
28-31	aa	CD3 제타 세포내 신호전달 도메인
32-33	nt	CD3 제타 세포내 신호전달 도메인
34	aa	TNFR2 세포내 도메인
35	nt	TNFR2 세포내 도메인
36	aa	4-1BB 세포내 도메인
37	nt	4-1BB 세포내 도메인
38	aa	CD27 세포내 도메인
39	nt	CD27 세포내 도메인
40	aa	CD28 세포내 도메인
41	nt	CD28 세포내 도메인
42	aa	CD8 리더 서열
43-44	aa	TAG
45	aa	P2A TAG
46	aa	GFP TAG
47	aa	스트렙타비딘 태그
48	aa	CD8 H-TNFR2 TM-TNFR2-3z
49	aa	CD8 H-TNFR2 TM-TNFR2 Δ 18-3z
50	aa	CD8 H-TNFR2 TM-TNFR2 Δ 59-3z
51	aa	CD8 H-TNFR2 TM-TNFR2 Δ 104-3z
52	aa	CD8 H-TNFR2 TM-3z
53	aa	CD8 H-3z-TNFR2 TM

¹ SID: 서열번호

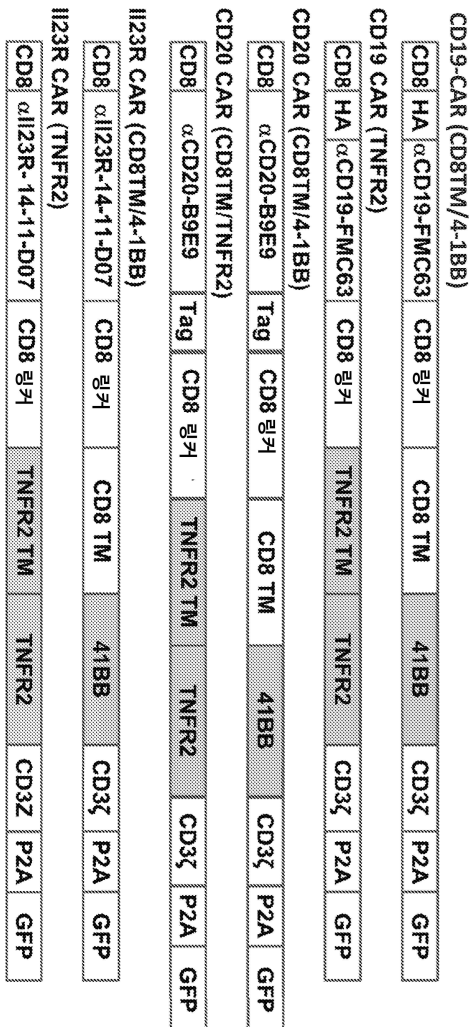
² aa: 아미노산, nt: 뉴클레오티드

54	aa	CD8 H-CD8 TM- TNFR2-3z
55	aa	CD8 H-FUSED 1 TM- TNFR2-3z
56	aa	CD8 H-FUSED 2 TM- TNFR2-3z
57	aa	CD8 H-FUSED 3 TM- TNFR2-3z
58	aa	LAGLIDADG 모티프
59	aa	융합 1 - CD8 SEQ
60	aa	융합 2 - CD8 SEQ
61	aa	융합 3 - CD8 SEQ
62	aa	융합 1 - TNFR2 SEQ
63	aa	융합 2 - TNFR2 SEQ
64	aa	융합 3 - TNFR2 SEQ
65-67	aa	항-IL-23R scFv
68-107	aa	항-HLA-A2 scFv
108	nt	CD20-CAR (TNFR1TM-TNFR1-CD3z)-P2A-GFP
109	aa	CD20-CAR (TNFR1TM-TNFR1-CD3z)-P2A-GFP
110	aa	CD8 H-TNFR2 TM-TNFR2 Δ 151-3z
111-117	aa	링커

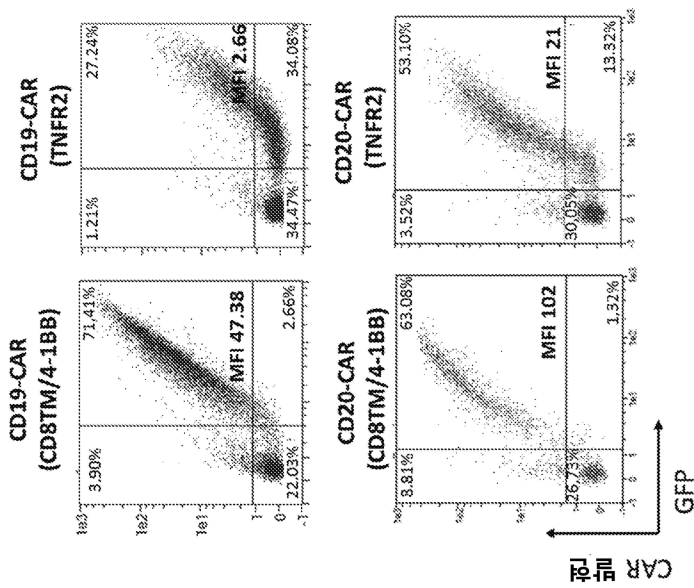
[1034]

도면

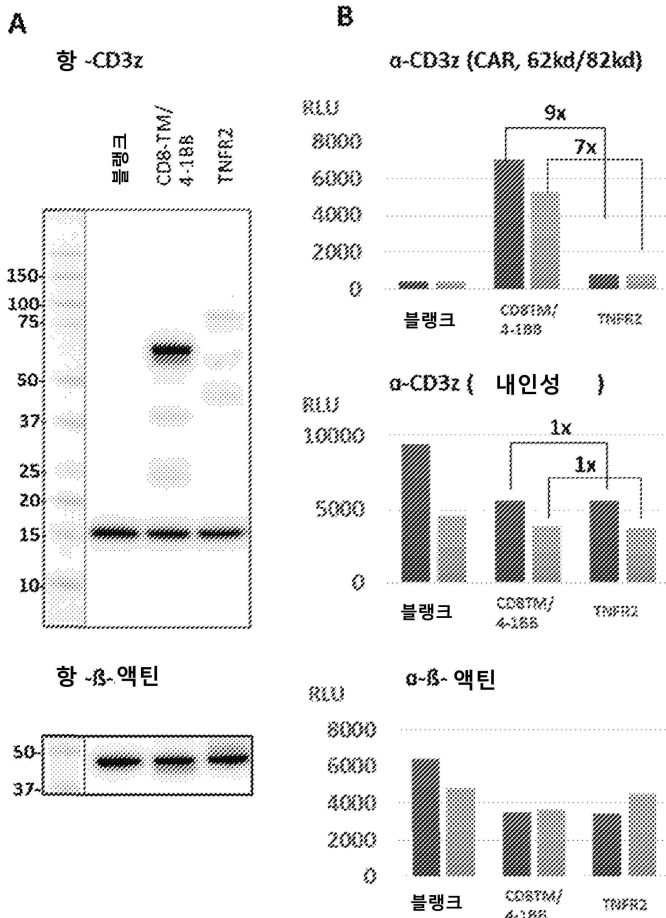
도면1



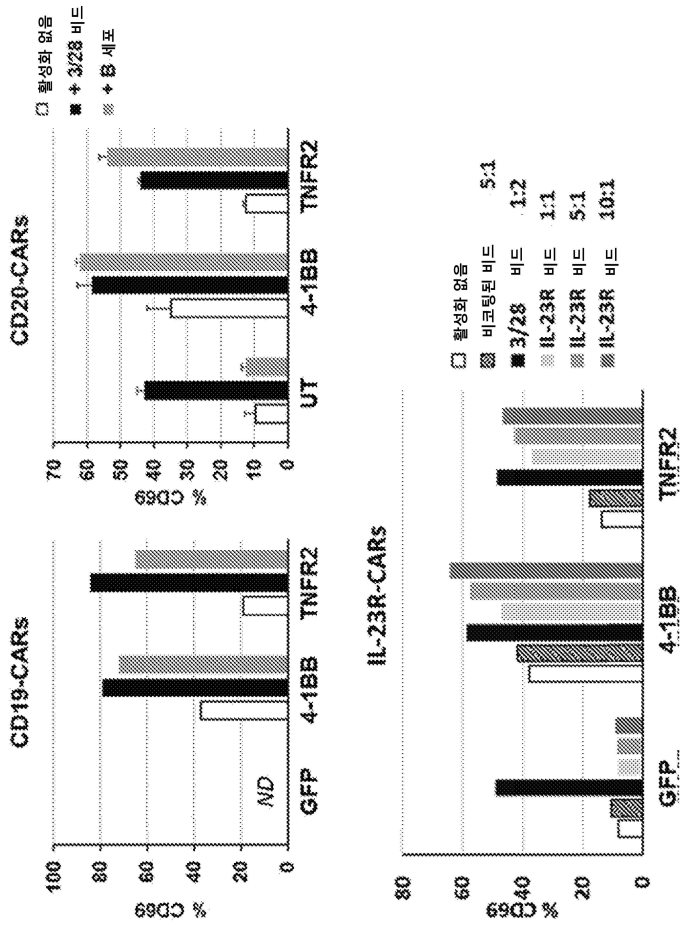
도면2



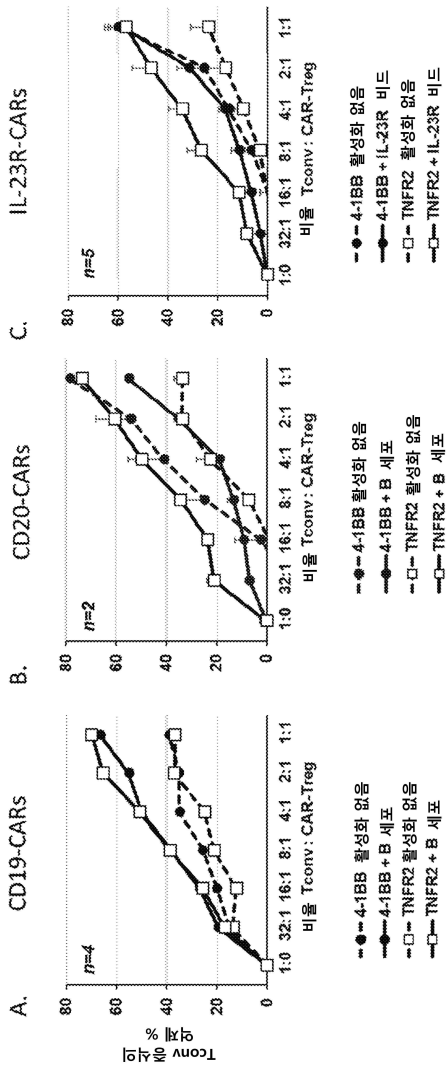
도면3



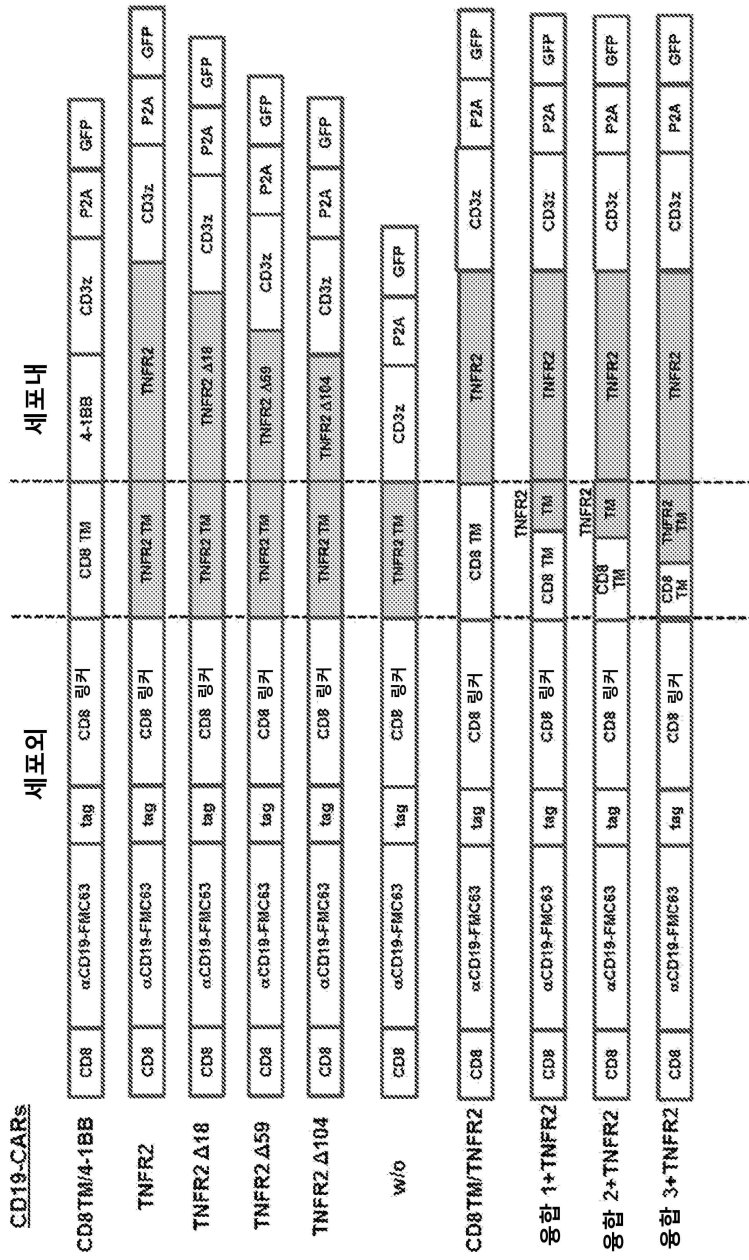
도면4



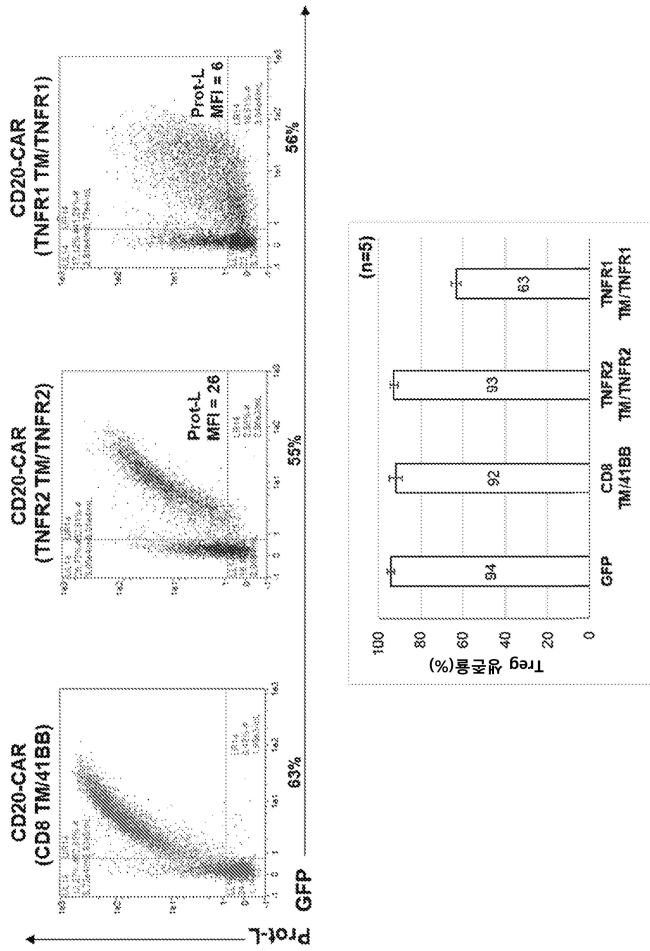
도면5



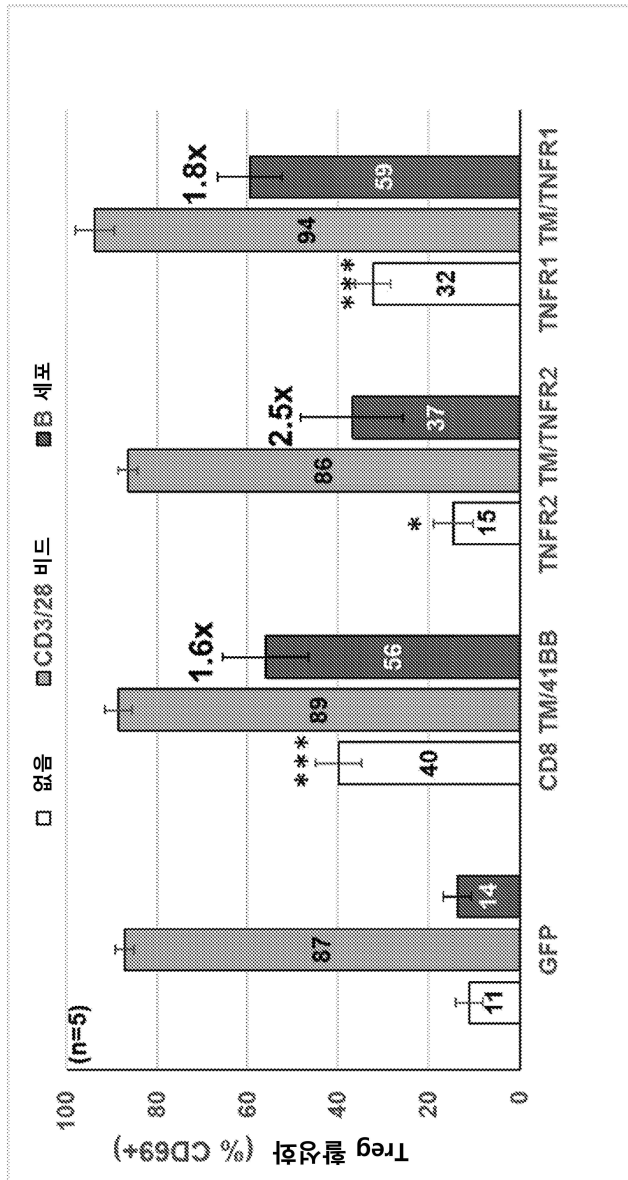
도면6



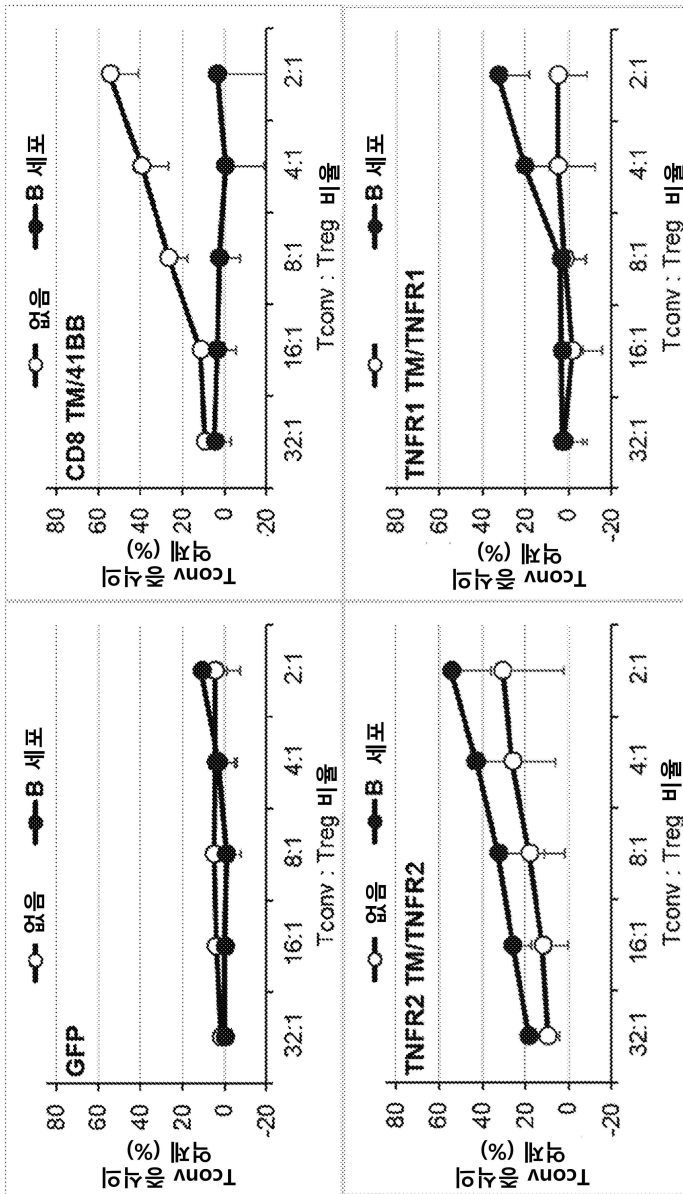
도면8



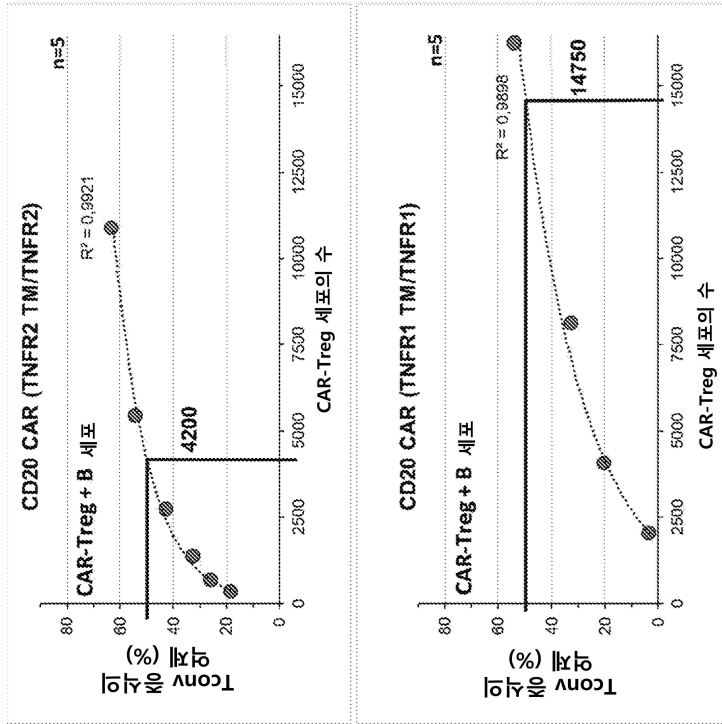
도면9



도면10



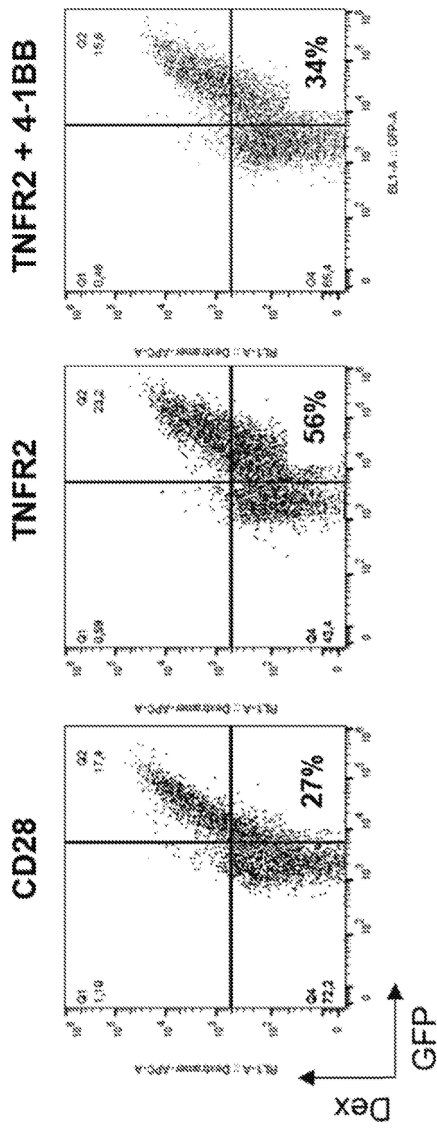
도면11



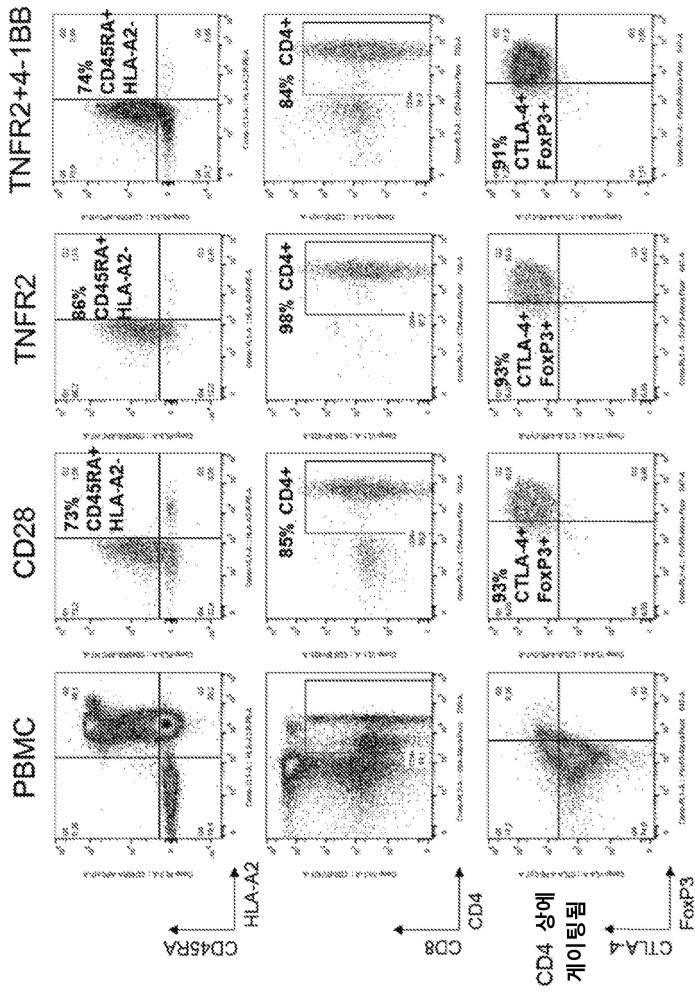
도면12

CD28	PGK	CD8	HLA2 scFv	CD8 링커	CD8 TM	CD28	CD3Z	P2A	GFP
	PGK	CD8	HLA2 scFv	CD8 링커	TNFR2-TM	TNFR2	CD3Z	P2A	GFP
	PGK	CD8	HLA2 scFv	CD8 링커	TNFR2-TM	TNFR2	4-1BB	CD3Z	P2A GFP

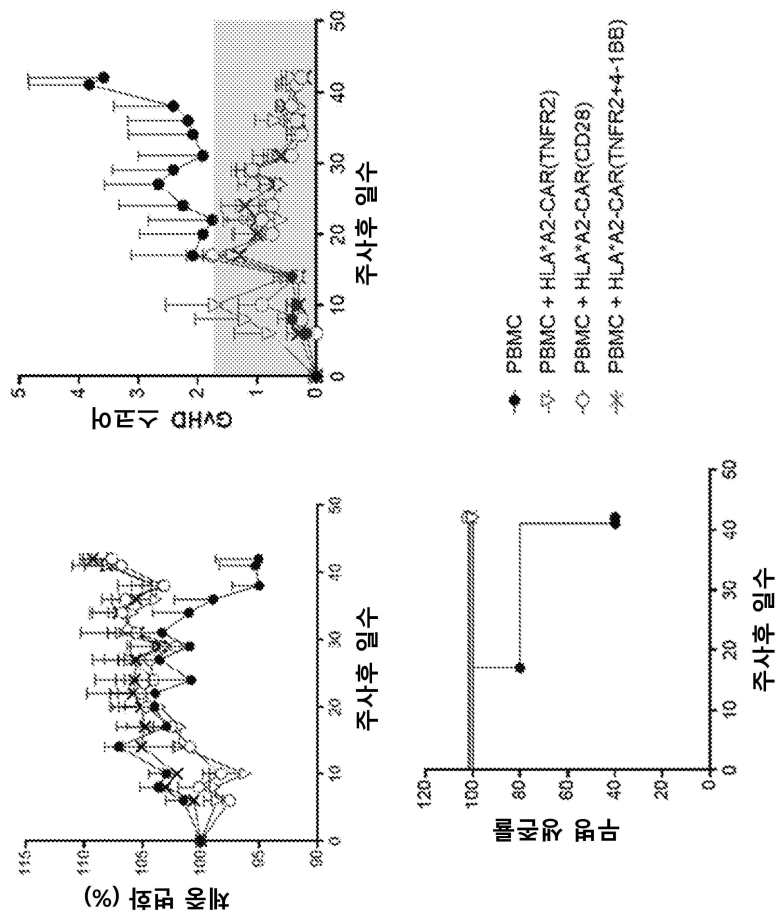
도면13



도면14



도면15



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> SANGAMO THERAPEUTICS FRANCE

<120> NEW CAR CONSTRUCTS COMPRISING TNFR2 DOMAINS

<130> IPA210151-FR

<150> US 62/717,234

<151> 2018-08-10

<160> 117

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<220><221> source

<223> /note="anti-CD19 ScFv"

<400> 1

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Gly Gly Gly Ser
 100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu
 115 120 125

Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys
 130 135 140

Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg
 145 150 155 160

Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser
 165 170 175

Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile
 180 185 190

Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln
 195 200 205

Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly

210 215 220
 Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val
 225 230 235 240
 Ser Ser

<210> 2
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <220><221> source
 <223> /note="FMC63"
 <400> 2

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

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

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

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

195 200 205
 Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr
 210 215 220
 Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 225 230 235 240
 Val Thr Val Ser Ser
 245

<210> 3
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"
 <220><221> source
 <223> /note="RITUXIMAB"
 <400> 3
 Ser Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro
 1 5 10 15
 Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Leu Ser Phe
 20 25 30
 Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly

<220><221> source

<223> /note="anti-CD20 ScFv"

<400> 4

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Leu Ser Phe Met

 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr

 85 90 95

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

 100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asp Val Met Gly Val Asp Ser Gly Gly Gly

 115 120 125

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Pro Gly

 130 135 140

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu

145 150 155 160

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

 165 170 175

His Tyr Ala Asp Arg Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn

 180 185 190

Pro Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met Lys Leu Pro Ser Leu Cys Tyr

 195 200 205

Gly Leu Leu Gly Pro Arg Asp His Val His Arg Leu Leu Lys His His

 210 215 220

His His His His Leu Glu Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Thr
 225 230 235 240
 Thr Asp Ala Ala His Pro Gly Arg Ser Val Val Pro Ala Leu Leu Pro
 245 250 255
 Leu Leu Ala Gly Thr Leu Leu Leu Leu Glu Thr Ala Thr Ala Pro
 260 265 270
 <210> 5
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <220><221> source
 <223>
 /note="anti-CD20 ScFv"
 <400> 5
 Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser
 20 25 30
 Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys
 50 55 60

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

```

115          120          125
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ser Asp
130          135          140
Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu
145          150          155          160
Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
165          170          175
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala
180          185          190

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

```

<210> 6

<211> 245

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="anti-CD20 ScFv"

<400> 6

```

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

```

Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile

35 40 45

Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala

65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ser Gly Gly Gly

100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gln Val

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Ser His Tyr Gly Ser Asn Tyr Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

225 230 235 240

Leu Thr Val Ser Ser

245

<210> 7

<211> 441

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="anti-desmo 3 (domain 1-4)"

<400> 7

Glu Trp Val Lys Phe Ala Lys Pro Cys Arg Glu Gly Glu Asp Asn Ser

1 5 10 15

Lys Arg Asn Pro Ile Ala Lys Ile Thr Ser Asp Tyr Gln Ala Thr Gln

20 25 30

Lys Ile Thr Tyr Arg Ile Ser Gly Val Gly Ile Asp Gln Pro Pro Phe

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Ile Leu Asp Ile Asn Asp Asn Pro Pro Val Phe Ser Gln Gln Ile

100 105 110

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

115 120 125

Ile Leu Asn Ala Thr Asp Ala Asp Glu Pro Asn His Leu Asn Ser Lys

130 135 140

Ile Ala Phe Lys Ile Val Ser Gln Glu Pro Ala Gly Thr Pro Met Phe

145 150 155 160

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

165 170 175

Asp Arg Glu Gln Ala Ser Ser Tyr Arg Leu Val Val Ser Gly Ala Asp

180 185 190

Lys Asp Gly Glu Gly Leu Ser Thr Gln Cys Glu Cys Asn Ile Lys Val

<210> 8
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <220><221> source
 <223> /note="Linker"
 <400> 8
 Ala Gly Ser Ser Ser Ser Gly Gly Ser Thr Thr Gly Gly Ser Thr Thr

1 5 10 15

<210> 9
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <220><221> source
 <223> /note="Linker"
 <400> 9
 Gly Thr Thr Ala Ala Ser Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ser Ser Gly Ala

1 5 10 15

<210> 10
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <220><221> source
 <223> /note="Linker"

<400> 10
 Ser Ser Ala Thr Ala Thr Ala Gly Thr Gly Ser Ser Thr Gly Ser Thr
 1 5 10 15

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="Linker"

<400> 11

Thr Ser Gly Ser Thr Gly Thr Ala Ala Ser Ser Thr Ser Thr Ser Thr
 1 5 10 15

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="Linker"

<400> 12

ggtggcggag gtcttgagg tggaggttcc 30

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> source

<223> /note="KIR2DS2 hinge domain"

<400> 13

Lys Ile Arg Arg Asp Ser Ser

1 5

<210> 14

<211> 45

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> source

<223> /note="CD8 hinge domain"

<400> 14

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

1 5 10 15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly

20 25 30

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

35 40 45

<210> 15

<211> 135

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> source

<223> /note="CD8 hinge domain"

<400> 15

accacgacgc cagcgccgcg accaccaaca cggcgcccca ccatcgcgtc gcagcccctg 60

tccttgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg 120

gacttcgct gtgat 135

<210> 16

<211> 230

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> source

<223> /note="IgG4 hinge domain"

<400> 16

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

1 5 10 15

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

 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 85 90 95
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
 100 105 110
 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 115 120 125
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 130 135 140

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

 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220
 Leu Ser Leu Gly Lys Met
 225 230
 <210> 17
 <211> 690

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> source

<223> /note="IgG4 hinge domain"

<400> 17

gagagcaagt acggccctcc ctgccccct tgcctgccc ccgagttcct gggcggacce 60
 agcgtgttcc tgttcccccc caagccaag gacacctga tgatcagccg gacccccgag 120
 gtgacctgtg tgggtgggga cgtgtcccag gaggaccccg aggtccagtt caactggtac 180

gtggacggcg tggaggtgca caagccaag accaagcccc gggaggagca gttcaatagc 240
 acctaccggg tgggtgccgt gctgacctg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggaa 300
 tacaagtgtg aggtgtccaa caagggcctg cccagcagca tcgagaaaac catcagcaag 360
 gccaaaggcc agcctcggga gccccagggtg tacacctgc cccctagcca agaggagatg 420
 accaagaacc aggtgtccct gacctgcctg gtgaagggt tctaccccag cgacatcgcc 480
 gtggagtggg agagcaacgg ccagccccgag aacaactaca agaccacccc cctgtgctg 540
 gacagcgacg gcagcttctt cctgtacagc cggctgaccg tggacaagag cgggtggcag 600

gagggcaacg tctttagctg ctccgtgatg cacgaggccc tgcacaacca ctacaccag 660
 aagacctga gcctgtccct gggcaagatg 690

<210> 18

<211> 282

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> source

<223> /note="IgD hinge domain"

<400> 18

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

<213> Homo sapiens

<220><221> source

<223> /note="IgD hinge domain"

<400> 19

```

aggtggcccc aaagtcccaa ggcccaggca tctagtgttc ctactgcaca gccccaggca      60
gaaggcagcc tagccaaagc tactactgca cctgccacta cgcgcaatac tggccgtggc      120
ggggaggaga agaaaaagga gaaagagaaa gaagaacagg aagagaggga gaccaagacc      180
cctgaatgtc catccatac ccagccgctg ggcgtctatc tcttgactcc cgcagtacag      240
gacttgtggc ttagagataa ggccaccttt acatgtttcg tcgtgggctc tgacctgaag      300
gatgccatt  tgacttggga ggttgccgga aaggtaccca caggggggggt tgaggaaggg      360

```

```

ttgctggagc gccattccaa tggctctcag agccagcact caagactcac ctttccgaga      420
tcctgtgga  acgccgggac ctctgtcaca tgtactctaa atcatcctag cctgccccca      480
cagcgtctga tggcccttag agagccagcc gcccaggcac cagttaagct tagcctgaat      540
ctgctcgcca gtagtgatcc cccagaggcc gccagctggc tcttatgcga agtgtccggc      600
tttagccgc  ccaacatctt gctcatgtgg ctggaggacc agcgagaagt gaacaccagc      660
ggcttcgctc cagccccggc cccaccccag cgggttcta ccacattctg ggcttgaggt      720
gtcttaaggg tcccagcacc acctagcccc cagccagcca catacacctg tgttgtgtcc      780

```

```

catgaagata gcaggacct gctaaatgct tctaggagtc tggaggtttc ctacgtgact      840
gaccatt                                           847

```

<210> 20

<211> 39

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> source

<223> /note="CD28 hinge domain"

<400> 20

```

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn
1           5           10           15
Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu
                20           25           30

```

Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro

35

<210> 21
 <211> 117
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> source
 <223> /note="CD28 hinge domain"
 <400> 21
 attgaagtta tgtatcctcc tccttacct gacaatgaga agagcaatgg aaccattatc 60
 catgtgaaag ggaaacacct ttgtccaagt ccctatttc cggaccttc taagecc 117

<210> 22
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220><221> source
 <223> /note="TNFR2 TM domain"
 <400> 22
 Phe Ala Leu Pro Val Gly Leu Ile Val Gly Val Thr Ala Leu Gly Leu

1 5 10 15
 Leu Ile Ile Gly Val Val Asn Cys Val Ile Met Thr Gln Val
 20 25 30

<210> 23
 <211> 90
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> source
 <223> /note="TNFR2 TM domain"
 <400> 23
 ttcgctcttc cagttggact gattgtgggt gtgacagcct tgggtctact aataatagga 60
 gtggngaact gtgtcatcat gaccagggtg 90

<210> 24
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>

<221> source

<223> /note="CD8 TM"

<400> 24

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

1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys

20

<210> 25

<211> 72

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> source

<223> /note="CD8 TM"

<400> 25

atctacatct gggcgccctt ggccgggact tgtggggtcc ttctcctgic actggttatc 60

accctttact gc 72

<210> 26

<211> 27

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> source

<223> /note="CD28 TM"

<400> 26

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> 27

<211> 81

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> source

<223> /note="CD28 TM"

<400> 27

ttttgggtgc tgggtgggtg tgggtggagtc ctggcttgct atagcttgct agtaacagtg 60

gcctttatta ttttctgggt g 81

<210> 28

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> source

<223> /note="CD3 zeta"

<400> 28

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

1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 29

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> source

<223> /note="CD3 zeta"

<400> 29

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> 30

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> source

<223> /note="CD3 zeta"

<400> 30

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly
 1 5 10 15
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 20 25 30
 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 35 40 45
 Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln

 50 55 60
 Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
 65 70 75 80
 Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
 85 90 95
 Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro

100 105 110

Arg

<210> 31

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> source

<223> /note="CD3 zeta"

<400> 31

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

1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Arg

<210> 32

<211> 336

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> source

<223> /note="CD3 zeta"

<400> 32
 agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtaca agcagggcca gaaccagctc 60
 tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttgacaa gagacgtggc 120
 cgggacacctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 180
 gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240
 cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 300
 tacgacgcc ttcacatgca ggccctgccc cctcgc 336

<210> 33

<211> 336

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> source

<223> /note="CD3 zeta"

<400> 33

agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc 60
 tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttgacaa gagacgtggc 120
 cgggacacctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 180
 gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240
 cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 300
 tacgacgcc ttcacatgca ggccctgccc cctcgc 336

<210> 34

<211> 174

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> source

<223> /note="TNFR2 intracellular"

<400> 34

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

tgtgcctttc ggicacagct ggagacgccca gagacctgc tggggagcac cgaagagaag 480
 ccctgcccc ttggagtgcc tgatgctggg atgaagccca gt 522
 <210> 36
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220><221> source
 <223> /note="4-1BB intracellular"
 <400> 36
 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> 37
 <211> 126
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> source
 <223> /note="4-1BB intracellular"
 <400> 37
 aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaacaac catttatgag accagtacaa 60
 actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt 120
 gaactg 126
 <210> 38
 <211> 48
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220><221> source
 <223> /note="CD27 intracellular"
 <400> 38
 Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu Pro

1 5 10 15
 Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Thr
 20 25 30
 Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro
 35 40 45

<210

> 39

<211> 144

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> source

<223> /note="CD27 intracellular"

<400> 39

caacgaagga aatatagatc aaacaaagga gaaagtctg tggagcctgc agagccttgt 60
 cgttacagct gccccaggga ggaggagggc agcaccatcc ccatccagga ggattaccga 120
 aaaccggagc ctgctgctc cccc 144

<210> 40

<211> 41

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> source

<223> /note="CD28 intracellular"

<400> 40

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu 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> 41

<211> 123

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> source

<223> /note="CD28 intracellular"

<400> 41

aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc cgcgcgcccc 60

gggccccacc gcaagcatta ccagccctat gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc 120

tcc 123

<210> 42

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="Leader sequence CD8"

<400> 42

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro

20

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="tag"

<400> 43

Asn Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

1 5

<210> 44

<211> 10

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> source

<223> /note="tag"

<400> 44

Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

1 5 10

<210> 45

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="P2A tag"

<400> 45

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

1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 46

<211> 239

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="GFP tag"

<400> 46

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

 50 55 60
 Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65 70 75 80
 Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95
 Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 100 105 110
 Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly

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

 180 185 190
 Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
 195 200 205
 Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
 210 215 220
 Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 225 230 235
 <210> 47

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="Streptavidin tag"

<400> 47

Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Ser Gly

1 5 10

<210> 48

<211> 365

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="CD8 H-TNFR2TM-TNFR2-3z"

<400> 48

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

1 5 10 15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly

20 25 30

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

35 40 45

Pro Val Gly Leu Ile Val Gly Val Thr Ala Leu Gly Leu Leu Ile Ile

50 55 60

Gly Val Val Asn Cys Val Ile Met Thr Gln Val Lys Lys Lys Pro Leu

65 70 75 80

Cys Leu Gln Arg Glu Ala Lys Val Pro His Leu Pro Ala Asp Lys Ala

85 90 95
 Arg Gly Thr Gln Gly Pro Glu Gln Gln His Leu Leu Ile Thr Ala Pro
 100 105 110
 Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser Ala Leu Asp Arg
 115 120 125
 Arg Ala Pro Thr Arg Asn Gln Pro Gln Ala Pro Gly Val Glu Ala Ser
 130 135 140
 Gly Ala Gly Glu Ala Arg Ala Ser Thr Gly Ser Ser Asp Ser Ser Pro
 145 150 155 160
 Gly Gly His Gly Thr Gln Val Asn Val Thr Cys Ile Val Asn Val Cys
 165 170 175
 Ser Ser Ser Asp His Ser Ser Gln Cys Ser Ser Gln Ala Ser Ser Thr
 180 185 190
 Met Gly Asp Thr Asp Ser Ser Pro Ser Glu Ser Pro Lys Asp Glu Gln
 195 200 205
 Val Pro Phe Ser Lys Glu Glu Cys Ala Phe Arg Ser Gln Leu Glu Thr
 210 215 220
 Pro Glu Thr Leu Leu Gly Ser Thr Glu Glu Lys Pro Leu Pro Leu Gly
 225 230 235 240
 Val Pro Asp Ala Gly Met Lys Pro Ser Gly Ser Arg Val Lys Phe Ser
 245 250 255
 Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
 260 265 270
 Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
 275 280 285
 Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
 290 295 300
 Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
 305 310 315 320
 Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
 325 330 335

His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
 340 345 350

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Ala Ser
 355 360 365

<210> 49
 <211> 347
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <220><221> source
 <223> /note="CD8 H-TNFR2 TM-TNFR2del118-3z"

<400> 49

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

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

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

Pro Val Gly Leu Ile Val Gly Val Thr Ala Leu Gly Leu Leu Ile Ile
 50 55 60

Gly Val Val Asn Cys Val Ile Met Thr Gln Val Lys Lys Lys Pro Leu
 65 70 75 80

Cys Leu Gln Arg Glu Ala Lys Val Pro His Leu Pro Ala Asp Lys Ala
 85 90 95

Arg Gly Thr Gln Gly Pro Glu Gln Gln His Leu Leu Ile Thr Ala Pro
 100 105 110

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser Ala Leu Asp Arg
 115 120 125

Arg Ala Pro Thr Arg Asn Gln Pro Gln Ala Pro Gly Val Glu Ala Ser
 130 135 140

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

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

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

 Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
 325 330 335
 Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Ala Ser
 340 345

 <210> 50
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<220><221> source

<223> /note="CD8 H-TNFR2 TM-TNFR2del159-3z"

<400> 50

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

1 5 10 15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly

 20 25 30

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

 35 40 45

Pro Val Gly Leu Ile Val Gly Val Thr Ala Leu Gly Leu Leu Ile Ile

 50 55 60

Gly Val Val Asn Cys Val Ile Met Thr Gln Val Lys Lys Lys Pro Leu

65 70 75 80

Cys Leu Gln Arg Glu Ala Lys Val Pro His Leu Pro Ala Asp Lys Ala

 85 90 95

Arg Gly Thr Gln Gly Pro Glu Gln Gln His Leu Leu Ile Thr Ala Pro

 100 105 110

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser Ala Leu Asp Arg

 115 120 125

Arg Ala Pro Thr Arg Asn Gln Pro Gln Ala Pro Gly Val Glu Ala Ser

130 135 140

Gly Ala Gly Glu Ala Arg Ala Ser Thr Gly Ser Ser Asp Ser Ser Pro

145 150 155 160

Gly Gly His Gly Thr Gln Val Asn Val Thr Cys Ile Val Asn Val Cys

 165 170 175

Ser Ser Ser Asp His Ser Ser Gln Cys Ser Ser Gln Ala Ser Gly Ser

 180 185 190

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

195 200 205

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr

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

260 265 270
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
275 280 285
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
290 295 300
Ala Ser
305
<210> 51
<211> 261
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<220><221> source
<223> /note="CD8 H-TNFR2 TM-TNFR2del104-3z"
<400> 51
Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
1 5 10 15
Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
20 25 30
Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Phe Ala Leu
35 40 45
Pro Val Gly Leu Ile Val Gly Val Thr Ala Leu Gly Leu Leu Ile Ile

50 55 60
Gly Val Val Asn Cys Val Ile Met Thr Gln Val Lys Lys Lys Pro Leu

<220><221> source

<223> /note="CD8 H-TNFR2 TM-3z"

<400> 52

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

1 5 10 15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly

20 25 30

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

35 40 45

Pro Val Gly Leu Ile Val Gly Val Thr Ala Leu Gly Leu Leu Ile Ile

50 55 60

Gly Val Val Asn Cys Val Ile Met Thr Gln Val Arg Val Lys Phe Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185

<210> 53

<211> 361

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="CD8 H-3z-TNFR2 TM"

<400> 53

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

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

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

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

Ile Thr Leu Tyr Cys Thr Arg Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp
65 70 75 80

Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
 85 90 95

Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg
 100 105 110

Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
 115 120 125

Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
 130 135 140

Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
145 150 155 160

Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His
 165 170 175

Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Ala Ser Lys Lys Lys Pro Leu Cys Leu
 180 185 190

Gln Arg Glu Ala Lys Val Pro His Leu Pro Ala Asp Lys Ala Arg Gly
 195 200 205

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

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

Phe Ser Lys Glu Glu Cys Ala Phe Arg Ser Gln Leu Glu Thr Pro Glu
 325 330 335
 Thr Leu Leu Gly Ser Thr Glu Glu Lys Pro Leu Pro Leu Gly Val Pro
 340 345 350
 Asp Ala Gly Met Lys Pro Ser Ala Ser
 355 360

<210> 54

<211> 359

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220>

<221> source

<223> /note="CD8 H-CD8 TM- TNFR2-3z"

<400> 54

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

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
 20 25 30
 Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile
 35 40 45
 Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val
 50 55 60
 Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Lys Lys Pro Leu Cys Leu Gln Arg Glu Ala
 65 70 75 80
 Lys Val Pro His Leu Pro Ala Asp Lys Ala Arg Gly Thr Gln Gly Pro
 85 90 95
 Glu Gln Gln His Leu Leu Ile Thr Ala Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser
 100 105 110
 Leu Glu Ser Ser Ala Ser Ala Leu Asp Arg Arg Ala Pro Thr Arg Asn
 115 120 125
 Gln Pro Gln Ala Pro Gly Val Glu Ala Ser Gly Ala Gly Glu Ala Arg
 130 135 140
 Ala Ser Thr Gly Ser Ser Asp Ser Ser Pro Gly Gly His Gly Thr Gln
 145 150 155 160
 Val Asn Val Thr Cys Ile Val Asn Val Cys Ser Ser Ser Asp His Ser
 165 170 175
 Ser Gln Cys Ser Ser Gln Ala Ser Ser Thr Met Gly Asp Thr Asp Ser
 180 185 190
 Ser Pro Ser Glu Ser Pro Lys Asp Glu Gln Val Pro Phe Ser Lys Glu
 195 200 205
 Glu Cys Ala Phe Arg Ser Gln Leu Glu Thr Pro Glu Thr Leu Leu Gly
 210 215 220
 Ser Thr Glu Glu Lys Pro Leu Pro Leu Gly Val Pro Asp Ala Gly Met
 225 230 235 240
 Lys Pro Ser Gly Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro
 245 250 255
 Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly

Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp
 325 330 335

Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
 340 345 350

Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Ala Ser
 355 360

<210> 56
 <211> 365
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223>
 /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <220><221> source
 <223> /note="CD8 H-FUSED 2TM- TNFR2-3z"
 <400> 56

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

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

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

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

Ile Thr Val Asn Cys Val Ile Met Thr Gln Val Lys Lys Lys Pro Leu
 65 70 75 80

Cys Leu Gln Arg Glu Ala Lys Val Pro His Leu Pro Ala Asp Lys Ala
 85 90 95

Arg Gly Thr Gln Gly Pro Glu Gln Gln His Leu Leu Ile Thr Ala Pro
 100 105 110

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser Ala Leu Asp Arg
 115 120 125

Arg Ala Pro Thr Arg Asn Gln Pro Gln Ala Pro Gly Val Glu Ala Ser
 130 135 140

Gly Ala Gly Glu Ala Arg Ala Ser Thr Gly Ser Ser Asp Ser Ser Pro
 145 150 155 160

Gly Gly His Gly Thr Gln Val Asn Val Thr Cys Ile Val Asn Val Cys
 165 170 175

Ser Ser Ser Asp His Ser Ser Gln Cys Ser Ser Gln Ala Ser Ser Thr
 180 185 190

Met Gly Asp Thr Asp Ser Ser Pro Ser Glu Ser Pro Lys Asp Glu Gln
 195 200 205

Val Pro Phe Ser Lys Glu Glu Cys Ala Phe Arg Ser Gln Leu Glu Thr
 210 215 220

Pro Glu Thr Leu Leu Gly Ser Thr Glu Glu Lys Pro Leu Pro Leu Gly
 225 230 235 240

Val Pro Asp Ala Gly Met Lys Pro Ser Gly Ser Arg Val Lys Phe Ser
 245 250 255

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
 260 265 270

Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
 275 280 285

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
 290 295 300

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

Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
 325 330 335

His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
 340 345 350

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Ala Ser
 355 360 365

<210> 57

<211> 363

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="CD8 H-FUSED 3 TM- TNFR2-3z"

<400> 57

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

1 5 10 15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly

 20 25 30

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

 35 40 45

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

50 55 60

Val Asn Cys Val Ile Met Thr Gln Val Lys Lys Lys Pro Leu Cys Leu

65 70 75 80

Gln Arg Glu Ala Lys Val Pro His Leu Pro Ala Asp Lys Ala Arg Gly

 85 90 95

Thr Gln Gly Pro Glu Gln Gln His Leu Leu Ile Thr Ala Pro Ser Ser

 100 105 110

Ser Ser Ser Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser Ala Leu Asp Arg Arg Ala

115 120 125

Pro Thr Arg Asn Gln Pro Gln Ala Pro Gly Val Glu Ala Ser Gly Ala

130 135 140

Gly Glu Ala Arg Ala Ser Thr Gly Ser Ser Asp Ser Ser Pro Gly Gly

145 150 155 160

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

 165 170 175

Ser Asp His Ser Ser Gln Cys Ser Ser Gln Ala Ser Ser Thr Met Gly

180 185 190
 Asp Thr Asp Ser Ser Pro Ser Glu Ser Pro Lys Asp Glu Gln Val Pro
 195 200 205
 Phe Ser Lys Glu Glu Cys Ala Phe Arg Ser Gln Leu Glu Thr Pro Glu
 210 215 220
 Thr Leu Leu Gly Ser Thr Glu Glu Lys Pro Leu Pro Leu Gly Val Pro

 225 230 235 240
 Asp Ala Gly Met Lys Pro Ser Gly Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser
 245 250 255
 Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu
 260 265 270
 Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg
 275 280 285
 Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln

 290 295 300
 Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
 305 310 315 320
 Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp
 325 330 335
 Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
 340 345 350
 Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Ala Ser
 355 360

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="LAGLIDADG motif"

<400> 58

Leu Ala Gly Leu Ile Asp Ala Asp Gly

1 5

<210> 59

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="Fusion 1 - CD8 SEQ"

<400> 59

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

20

<210> 60

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="Fusion 2 - CD8 SEQ"

<400> 60

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

20

<210> 61

<211> 9

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
 <220><221> source
 <223> /note="Fusion 3 - CD8 SEQ"
 <400> 61
 Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly
 1 5
 <210> 62
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
 <220><221>
 > source
 <223> /note="Fusion 1 - TNFR2 SEQ"
 <400> 62
 Cys Val Ile Met Thr Gln Val
 1 5
 <210> 63
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
 <220><221> source
 <223> /note="Fusion 2 - TNFR2 SEQ"
 <400> 63
 Val Asn Cys Val Ile Met Thr Gln Val
 1 5

<210> 64
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> source
 <223> /note="Fusion 3 - TNFR2 SEQ"
 <400> 64

Thr Ala Leu Gly Leu Leu Ile Ile Gly Val Val Asn Cys Val Ile Met
 1 5 10 15
 Thr Gln Val

<210> 65
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<220><221> source
 <223> /note="scFv anti-IL-23R"
 <400> 65

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 Gln Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Phe
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Lys Leu Ala Ala Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

<220><221> source

<223> /note="scFv anti-IL-23R"

<400> 66

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 Gln Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Phe
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Lys Leu Ala Ala Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Arg Tyr Ser Asn
 85 90 95
 Pro Asp Ile Tyr Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110
 Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 130 135 140
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Asp Phe Asn Ser Asn
 145 150 155 160
 Tyr Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 165 170 175
 Ile Gly Cys Ile Tyr Val Gly Ser His Val Asn Thr Tyr Tyr Ala Asn
 180 185 190
 Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 195 200 205
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 210 215 220
 Tyr Cys Ala Thr Ser Gly Ser Ser Val Leu Tyr Phe Lys Phe Trp Gly

145 150 155 160
 Tyr Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

 165 170 175
 Ile Gly Cys Ile Tyr Val Gly Ser His Val Asn Thr Tyr Tyr Ala Asn

 180 185 190
 Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr

 195 200 205
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr

 210 215 220
 Tyr Cys Ala Thr Ser Gly Ser Ser Val Leu Tyr Phe Lys Phe Trp Gly

225 230 235 240
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 68

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="anti-HLA-A2 scFv"

<400> 68

Gln Val Gln Leu Gln Gln 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 Thr Phe Thr Ser Tyr

 20 25 30
 His Ile Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

 35 40 45
 Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Gln Tyr Asn Glu Lys Phe

 50 55 60
 Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

<400

> 69

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

245 250

<210> 70

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="anti-HLA-A2 scFv"

<400> 70

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Ser Asp Ile Val Met Thr

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile

180 185 190

Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly

195 200 205

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

210 215 220

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Arg

225 230 235 240

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

245 250

<210> 71

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="anti-HLA-A2 scFv"

<400> 71

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

<223> /note="anti-HLA-A2 scFv"

<400> 72

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 His Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Gln Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Gly Thr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser Val Asp Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Ser Asp Val Val Met Thr
 130 135 140
 Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile
 145 150 155 160
 Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
 165 170 175
 Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 180 185 190
 Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 195 200 205
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala
 210 215 220
 Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Arg
 225 230 235 240

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 245 250

<210> 73

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="anti-HLA-A2 scFv"

<400> 73

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

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

165 170 175

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

180 185 190

Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly

195 200 205

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

210 215 220

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Arg

225 230 235 240

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

245 250

<210> 74

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="anti-HLA-A2 scFv"

<400> 74

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

<223> /note="anti-HLA-A2 scFv"

<400> 75

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 His Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Gln Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Leu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Gly Thr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser Val Asp Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Ser Asp Ile Val Met Thr
 130 135 140
 Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile
 145 150 155 160
 Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
 165 170 175
 Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile
 180 185 190
 Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 195 200 205
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala
 210 215 220
 Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Arg
 225 230 235 240

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

245

250

<210> 76

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="anti-HLA-A2 scFv"

<400> 76

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Phe Lys Gly Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val 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 Glu Gly Thr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

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

115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Ser Asp Ile Val Met Thr

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile

180 185 190

Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly

195 200 205

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

210 215 220

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Arg

225 230 235 240

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

245 250

<210> 77

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="anti-HLA-A2 scFv"

<400> 77

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Phe Lys Gly Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

<223> /note="anti-HLA-A2 scFv"

<400> 78

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 His Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Gln Tyr Asn Glu Lys
 50 55 60
 Phe Lys Gly Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val 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 Glu Gly Thr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser Val Asp Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Ser Asp Val Val Met Thr
 130 135 140
 Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile
 145 150 155 160
 Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
 165 170 175
 Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 180 185 190
 Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 195 200 205
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala
 210 215 220
 Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Arg
 225 230 235 240

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

245

250

<210> 79

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="anti-HLA-A2 scFv"

<400> 79

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Phe Lys Gly Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val 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 Glu Gly Thr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

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

115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Ser Asp Ile Val Met Thr

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly

195 200 205

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

210 215 220

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Arg

225 230 235 240

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

245 250

<210> 80

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="anti-HLA-A2 scFv"

<400> 80

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

<223> /note="anti-HLA-A2 scFv"

<400> 81

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 His Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Gln Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Gly Thr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser Val Asp Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Ser Asp Ile Val Met Thr
 130 135 140
 Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile
 145 150 155 160
 Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
 165 170 175
 Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile
 180 185 190
 Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 195 200 205
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala
 210 215 220
 Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Arg
 225 230 235 240

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 245 250

<210> 82

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="anti-HLA-A2 scFv"

<400> 82

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Ser Asp Ile Val Met Thr

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile

180 185 190

Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly

195 200 205

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

210 215 220

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Arg

225 230 235 240

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

245 250

<210> 83

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="anti-HLA-A2 scFv"

<400> 83

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

<223> /note="anti-HLA-A2 scFv"

<400> 84

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 His Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Gln Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Gly Thr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser Val Asp Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Ser Asp Ile Val Met Thr
 130 135 140
 Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile
 145 150 155 160
 Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
 165 170 175
 Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile
 180 185 190
 Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 195 200 205
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala
 210 215 220
 Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Arg
 225 230 235 240

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 245 250

<210> 85

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="anti-HLA-A2 scFv"

<400> 85

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Ser Asp Ile Val Met Thr

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly

195 200 205

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

210 215 220

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Arg

225 230 235 240

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

245 250

<210> 86

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="anti-HLA-A2 scFv"

<400> 86

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

<223> /note="anti-HLA-A2 scFv"

<400> 87

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 His Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Gln Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Gly Thr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser Val Asp Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Ser Asp Ile Val Met Thr
 130 135 140
 Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile
 145 150 155 160
 Ser Phe Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
 165 170 175
 Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile
 180 185 190
 Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 195 200 205
 Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala
 210 215 220
 Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Arg
 225 230 235 240

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

245

250

<210> 88

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="anti-HLA-A2 scFv"

<400> 88

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Ser Asp Ile Val Met Thr

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile

180 185 190

Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly

195 200 205

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

210 215 220

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Arg

225 230 235 240

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

245 250

<210> 89

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="anti-HLA-A2 scFv"

<400> 89

Glu 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 Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

<223> /note="anti-HLA-A2 scFv"

<400> 90

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

 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Arg Glu Glu Leu Leu Ala Leu Phe Gly Gly Met Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ala

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

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

Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Gln

245

<210> 91

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="anti-HLA-A2 scFv"

<400> 91

Glu 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 Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Pro Gln Ser Arg Trp Leu Gln Ser Gly Asp Ala Phe Asp Ile

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ala

115 120 125

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

130 135 140

Leu Thr Gln Pro Arg Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Val Thr

145 150 155 160

Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Arg Val

165 170 175

Ser Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr

180 185 190

Glu Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser

195 200 205

Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu

210 215 220

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Val

225 230 235 240

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

245 250

<210> 92

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="anti-HLA-A2 scFv"

<400> 92

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

<223> /note="anti-HLA-A2 scFv"

<400> 93

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 Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Asn His Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys
 195 200 205
 Phe Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp
 210 215 220
 Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Tyr

225 230 235 240
 Val Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 245 250

<210> 94
 <211> 244

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <220><221> source
 <223> /note="anti-HLA-A2 scFv"
 <400> 94

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

145 150 155 160
 Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly

 165 170 175
 Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly

 180 185 190
 Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu

 195 200 205
 Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala

 210 215 220
 Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys

225 230 235 240
 Leu Thr Val Leu

<210> 95

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="anti-HLA-A2 scFv"

<400> 95

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

 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

<400> 96

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 Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Phe Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Glu Ile Ile Pro Met Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Leu

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Glu Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Val Pro Arg Ser Ser Ser Gly Tyr Asn Tyr Gly Met Asp Val

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ala

115 120 125

Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg Val Asp Ile Gln

130 135 140

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

145 150 155 160

Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Ala Trp

165 170 175

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

180 185 190

Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser

195 200 205

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

210 215 220

Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Arg Thr Phe Gly

225 230 235 240

Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

245

<210> 97

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<220><221> source

<223> /note="anti-HLA-A2 scFv"

<400> 97

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Asp Ser Val Ser Thr Asn

20 25 30

Ser Gly Ala Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu

35 40 45

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

50 55 60

Leu Ser Leu Gln Ser Arg Val Thr Ile Lys Ser Asp Arg Ser Lys Asn

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asn Trp Asn Ser Gly Gly Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Pro Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser
 165 170 175
 Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Glu
 180 185 190
 Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys
 195 200 205
 Ser Gly Ser Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp
 210 215 220
 Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Ala Gly Ser Asn Asn Tyr Val
 225 230 235 240
 Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 245 250

<210> 98

<211> 249

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="anti-HLA-A2 scFv"

<400> 98

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ala Ala Ser Arg Trp Glu Pro Gly Asp Ala Phe Asp Ile Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro
 115 120 125
 Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg Val Gln Pro Val Leu
 130 135 140
 Thr Gln Ser Ser Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala Arg Val
 145 150 155 160
 Thr Cys Gly Gly Asp Asn Ile Gly Gly Lys Ser Val His Trp Tyr Gln
 165 170 175
 Gln Arg Ala Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Ser His Asp Thr Asp
 180 185 190
 Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr
 195 200 205
 Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp
 210 215 220
 Tyr Tyr Cys Ala Val Trp Asp Ala Ser Leu Gly Gly Ser Trp Leu Phe
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 245

<210> 99
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <220><221> source
 <223> /note="anti-HLA-A2 scFv"
 <400> 99

245 250

<210> 100
 <211> 251
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
 <220><221> source
 <223> /note="anti-HLA-A2 scFv"

<400> 100

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

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

 Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg Val Leu Pro Val
 130 135 140
 Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr
 145 150 155 160
 Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Pro Val His

165 170 175
 Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Val Tyr Arg
 180 185 190

Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys
 195 200 205

Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp
 210 215 220

Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Val Ser Leu Ser Gly Val
 225 230 235 240

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 245 250

<210> 101

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="anti-HLA-A2 scFv"

<400> 101

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

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

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

35 40 45

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

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

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

85 90 95
 Ala Arg Glu Gly Thr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110
 Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu

130 135 140
 Pro Val Thr Leu Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln

145 150 155 160
 Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln

165 170 175
 Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg

180 185 190
 Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

195 200 205
 Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr

210 215 220
 Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr

225 230 235 240
 Lys Leu Glu Ile Lys Arg

245

<210> 102

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="anti-HLA-A2 scFv"

<400> 102

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

1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

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

 85 90 95
 Ala Arg Glu Gly Thr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 130 135 140
 Ser Val Thr Leu Gly Asp Arg Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln

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

 210 215 220
 Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 225 230 235 240
 Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 245

<210> 103
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<220><221> source
 <223> /note="anti-HLA-A2 scFv"

<400> 103
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

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

 35 40 45
 Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Gln Tyr Asn Glu Lys Phe

 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

 85 90 95
 Ala Arg Glu Gly Thr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

 100 105 110
 Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu

 130 135 140
 Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln

145 150 155 160
 Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln

 165 170 175

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
 180 185 190
 Phe Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 195 200 205
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr
 210 215 220
 Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 225 230 235 240
 Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 245

<210> 104

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<220><221> source

<223> /note="anti-HLA-A2 scFv"

<400> 104

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

Cys Ala Arg Glu Gly Thr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 130 135 140
 Leu Ser Val Thr Leu Gly Asp Arg Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
 145 150 155 160
 Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln
 165 170 175
 Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn
 180 185 190
 Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 195 200 205
 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Pro Glu Asp Leu Gly Val
 210 215 220
 Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 245

<210> 105
 <211> 247
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <220><221> source
 <223> /note="anti-HLA-A2 scFv"
 <400> 105
 Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly
 1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser
 20 25 30
 Tyr His Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Gln Tyr Asn Glu Lys
 50 55 60
 Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala
 65 70 75 80
 Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Glu Gly Thr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 130 135 140
 Leu Ser Val Thr Leu Gly Asp Arg Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
 145 150 155 160
 Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln
 165 170 175
 Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn
 180 185 190
 Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 195 200 205
 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Pro Glu Asp Leu Gly Val
 210 215 220
 Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 245

<210> 106

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="anti-HLA-A2 scFv"

<400> 106

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190
 Arg Phe Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr

195 200 205
 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val

210 215 220
 Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly

225 230 235 240
 Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

245

<210> 107

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="anti-HLA-A2 scFv"

<400> 107

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15
 Ser Leu Arg Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Thr Leu Ser Asp Tyr

20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45
 Ala Phe Ile Arg Asn Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Lys Thr Val Ser

65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
 Ala Lys Asn Gly Glu Ser Gly Pro Leu Asp Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu

100 105 110
 Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser

130 135 140
 Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

145 150 155 160
 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys

165 170 175
 Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu

180 185 190
 Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

195 200 205
 Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr

210 215 220
 Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys

225 230 235 240
 Val Asp Ile Lys Arg

245

<210> 108

<211> 2853

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polynucleotide"

<220><221> source

<223> /note="CD20-CAR (TNFR1TM-TNFR1-CD3z)-P2A-GFP"

<400> 108

atggctctgc ctgtgacagc tctgtctgtg cctctggctc tgcttctgca tgccgccaga 60

ccttctcagg tgcagctggt tcagctctggc gccgagcttg tgaaacctgg cgcctctgtg 120

aagatgagct gcaaggccag cggctacacc ttaccagct acaacatgca ctgggtcaag 180

cagaccctg gacaggact cgagtggatc ggagccatct atcccggcaa tggcgacacc 240
 tcctacaacc agaagttaaa gggcaaagcc aactgaccg cgcacaagag cagcagcaca 300
 gcctacatgc agctgagcag cctgaccagc gaagatagcg ccgtgtacta ctgcgctaga 360

 gccagctga ggccaacta ctggtacttc gatgtgtggg gagccggcac caccgtgacc 420
 gtgtcaaaaa tttctggcgg cggaggatct ggcggagggt gaagcggagg cggaggaagc 480
 ggtggatctt ctgacatcgt gctgtctcag agcccccca tcctttcagc tagccctggc 540
 gagaaagtga ccatgacctg tagagccagc agcagcgtgt cctatatgca ctggtatcag 600
 cagaagcccc gcagcagccc taagccttgg atctacgcca caagcaatct ggccagcggc 660
 gtgcctgcca gattttctgg ctctggcagc ggcacaagct actcctgac aatcagcaga 720
 gtggaagccg aggatgccgc cacctactac tgtcagcagt ggatcagcaa cctcctacc 780

 ttggcgctg gcaccaagct ggaactgaag tetgcatggt cccatcctca gttcgagaag 840
 tctggaatgc atacaacaac ccctgctcct cggcctccta caccagctcc tacaattgcc 900
 agccagccac tgtctctgag gcccaagct ttagacctg ctgctggcgg agccgtgcat 960
 acaagaggac tggatttcgc ctgagcagtg ctgttgcgcc tggtcatttt ctttggcttt 1020
 tgccitttat ccctcctctt cattggttta atgtatcgt accaacgggt gaagtccaag 1080
 ctctactcca ttgtttgtgg gaaatcgaca cctgaaaaag agggggagct tgaaggaact 1140
 actactaage ccctggcccc aaaccaagc ttcagtccca ctcaggctt cacccccacc 1200

 ctgggcttca gtcccgtgcc cagttccacc ttcacctcca gtcacaccta taccctcggc 1260
 gactgtccca actttgcggc tccccgaga gaggtggcac caccctatca gggggtgac 1320
 cccatccttg cgacagccct cgcctccgac cccatccca accccttca gaagtgggag 1380
 gacagcgcac acaagccaca gacctagac actgatgacc ccgcgacgt gtacgccgtg 1440
 gtggagaacg tgccccgtt gcgctggaag gaattcgtgc ggcgccttgg getgagcagc 1500
 cacgagatag atcggctgga gctacagaac gggcgctgcc tgcgcgagc gcaatacagt 1560
 atgctggcga cctggaggcg gcgcacgcca cggcgcgagg ccacgtgga gctgctgggt 1620

 cgcgtgctcc gcgacatgga cctgctgggc tgctggagg acatcgagga ggcgctttgc 1680
 ggccccgcc ccctcccgc gcgcccagt ctctcagaa cgcgtagagt gaagttcagc 1740
 agatccgcc acgtcctgc ctatcagcag ggccaaaacc agctgtacaa cgagctgaac 1800
 ctggggagaa gagaagagta cgacgtgctg gacaagcggg gaggcagaga tcctgaaatg 1860
 ggccgcaagc ccagacggaa gaatcctca gagggcctgt ataafgagct gcagaaagac 1920
 aagatggccg aggcctacag cgagatcgga atgaagggcg agcgcagaag aggcaaggga 1980

cacgatggac tgiaccaggg cctgagcacc gccaccaagg atacctatga tgccctgcac 2040

atgcaggccc tgcctccaag agctagcggga agcggagcta ctaacttcag cctgctgaag 2100

caggctggag acgtggagga gaacctgga cctatggtga gcaagggcga ggagctgttc 2160

accggggtgg tgcccatcct ggtcgagctg gacggcgacg taaacggcca caagttcagc 2220

gtgtccggcg agggcgaggg cgatgccacc tacggcaagc tgacctgaa gttcatctgc 2280

accaccggca agctgcccgt gccctggccc accctcgtga ccacctgac ctacggcgtg 2340

cagtgttca gccgctacc cgaccacatg aagcagcacg acttcttcaa gtccgcatg 2400

cccgaaggct acgtccagga ggcaccatc ttcttcaagg acgacggcaa ctacaagacc 2460

cgcgccgagg tgaagttcga gggcgacacc ctggtgaacc gcctcgagct gaaggcctc 2520

gacttcaagg aggacggcaa catcctgggg cacaagctgg agtacaacta caacagccac 2580

aacgtctata tcatggccc caagcagaag aacggcatca aggtgaactt caagatccgc 2640

cacaacatcg aggacggcag cgtgcagctc gccgaccact accagcagaa caccccatc 2700

ggcgacggcc ccgtgctgct gcccgacaac cactacctga gcaccagtc cgcctgagc 2760

aaagacccca acgagaagcg cgatcacatg gtctctgtgg agttcgtgac cgccgccggg 2820

atcactctcg gcatggacga gctgtacaag taa 2853

<210> 109

<211> 950

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> source

<223> /note="CD20-CAR (TNFR1TM-TNFR1-CD3z)-P2A-GFP"

<400> 109

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly

35 40 45

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly
 50 55 60
 Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr
 65 70 75 80
 Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys
 85 90 95

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

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

 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg
 225 230 235 240
 Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ile Ser
 245 250 255
 Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Ser Ala
 260 265 270
 Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Ser Gly Met His Thr Thr Thr Pro
 275 280 285

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

Asp Met Asp Leu Leu Gly Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys
 545 550 555 560
 Gly Pro Ala Ala Leu Pro Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg Thr Arg Arg
 565 570 575
 Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln
 580 585 590
 Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
 595 600 605

 Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro
 610 615 620
 Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp
 625 630 635 640
 Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg
 645 650 655
 Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr
 660 665 670

 Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Ala
 675 680 685
 Ser Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp
 690 695 700
 Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe
 705 710 715 720
 Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly
 725 730 735

 His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly
 740 745 750
 Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro
 755 760 765
 Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser
 770 775 780
 Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met

<400> 110

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

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

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

Pro Val Gly Leu Ile Val Gly Val Thr Ala Leu Gly Leu Leu Ile Ile
 50 55 60

Gly Val Val Asn Cys Val Ile Met Thr Gln Val Lys Lys Lys Pro Leu
 65 70 75 80

Cys Leu Gln Arg Glu Ala Lys Val Pro His Leu Pro Ala Asp Lys Ala
 85 90 95

Arg Gly Gly Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala
 100 105 110

Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg
 115 120 125

Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu
 130 135 140

Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
 145 150 155 160

Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
 165 170 175

Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
 180 185 190

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

Leu Pro Pro Arg Ala Ser
 210

<210> 111

<211> 15

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artifical Sequence: Synthetic peptide"
 <220>
 <221> source
 <223> ./note="Linker"
 <400> 111
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 <210> 112
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artifical Sequence: Synthetic peptide"
 <220>
 <221> source
 <223> ./note="Linker"
 <400> 112
 Gly Gly Gly Ser
 1
 <210> 113
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artifical Sequence: Synthetic peptide"
 <220>
 <221> source
 <223> ./note="Linker"

<400> 113
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 114
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source
 <223> /note="Description of Artifical Sequence: Synthetic
 peptide"

<220>
 <221> source
 <223> ./note="Linker"

<400> 114
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 115
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source
 <223> /note="Description of Artifical Sequence: Synthetic
 peptide"

<220>
 <221> source
 <223> ./note="Linker"

<400> 115
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10

<210> 116
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220>

<221> source

<223> ./note="Linker"

<400> 116

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

1 5 10 15

<210> 117

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220>

<221> source

<223> ./note="Linker"

<400> 117

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

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

 20