



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0104217
(43) 공개일자 2022년07월26일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C07K 16/2803 (2013.01)
A61K 39/001112 (2018.08)</p> <p>(21) 출원번호 10-2022-7021059</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2020년11월25일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2022년06월21일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2020/062304</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2021/108613
국제공개일자 2021년06월03일</p> <p>(30) 우선권주장
62/940,600 2019년11월26일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
노파르티스 아게
스위스 체하-4056 바젤 리히트스트라제 35</p> <p>(72) 발명자
엔겔스, 보리스
미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 매사추세츠 애비뉴 250
길마레스, 카를라, 페트리시아, 핀토
미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 매사추세츠 애비뉴 250 노바티스 인스티튜츠 포 바이오메디칼 리서치, 인크.</p> <p>(74) 대리인
양영준, 이상영</p> |
|---|--|

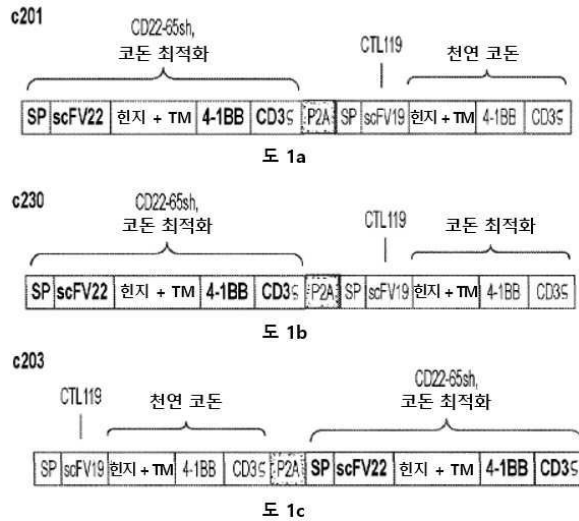
전체 청구항 수 : 총 33 항

(54) 발명의 명칭 CD19 및 CD22 키메라 항원 수용체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 CD22 CAR 및 CD19 CAR을 포함하는 재조합 T세포 또는 자연살해(NK) 세포를 투여함으로써, CD19 및/또는 CD22의 발현과 관련된 질환을 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 CD22 및/또는 CD19에 특이적인 CAR 분자, 이를 포함하는 세포의 제조 방법, 및 이를 암호화하는 벡터에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 39/001113 (2018.08)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 14/7051 (2013.01)

C07K 14/70575 (2013.01)

A61K 2039/5156 (2013.01)

A61K 2039/804 (2018.08)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2319/02 (2013.01)

C07K 2319/03 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

카메라 항원 수용체(CAR) 분자를 암호화하는 핵산 분자로서, 상기 CAR 분자는

(a) 제1 항원결합 도메인(CD22에 결합함) 및 제1 막관통 도메인, 제1 공동자극 신호전달 도메인, 및/또는 제1 일차 신호전달 도메인을 포함하는 제1 CAR; 및

(b) 제2 항원결합 도메인(CD19에 결합함) 및 제2 막관통 도메인, 제2 공동자극 도메인, 및/또는 제2 일차 신호전달 도메인을 포함하는 제2 CAR을 포함하고,

(i) 제1 막관통 도메인 및 제2 막관통 도메인은 서열번호 65의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고(제1 막관통 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열은 제2 막관통 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열과 상이함),

(ii) 제1 공동자극 신호전달 도메인 및 제2 공동자극 신호전달 도메인은 서열번호 70의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고/하거나(제1 공동자극 신호전달 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열은 제2 공동자극 신호전달 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열과 상이함),

(iii) 제1 일차 신호전달 도메인 및 제2 일차 신호전달 도메인은 서열번호 75의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는(일차 신호전달 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열은 제2 일차 신호전달 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열과 상이함), 핵산 분자.

청구항 2

제1항에 있어서, 제1 CAR은

제1 항원결합 도메인(CD22에 결합함), 제1 막관통 도메인, 및 제1 공동자극 신호전달 도메인;

제1 항원결합 도메인(CD22에 결합함), 제1 막관통 도메인, 및 제1 일차 신호전달 도메인; 또는

제1 항원결합 도메인(CD22에 결합함), 제1 막관통 도메인, 제1 공동자극 신호전달 도메인, 및 제1 일차 신호전달 도메인을 포함하는, 핵산 분자.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 제2 CAR은

제2 항원결합 도메인(CD19에 결합함), 제2 막관통 도메인, 및 제2 공동자극 신호전달 도메인;

제2 항원결합 도메인(CD19에 결합함), 제2 막관통 도메인, 및 제2 일차 신호전달 도메인; 또는

제2 항원결합 도메인(CD19에 결합함), 제2 막관통 도메인, 제2 공동자극 신호전달 도메인, 및 제2 일차 신호전달 도메인을 포함하는, 핵산 분자.

청구항 4

핵산 분자로서,

(a) 제1 항원결합 도메인(CD22에 결합함), 제1 막관통 도메인, 제1 공동자극 신호전달 도메인, 및/또는 제1 일차 신호전달 도메인을 포함하는 제1 CAR(CD22 결합 도메인은 중쇄 상보성 결정 영역 1(HC CDR1), 중쇄 상보성 결정 영역 2(HC CDR2), 및 중쇄 상보성 결정 영역 3(HC CDR3)을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH), 및 경쇄 상보성 결정 영역 1(LC CDR1), 경쇄 상보성 결정 영역 2(LC CDR2), 및 경쇄 상보성 결정 영역 3(LC CDR3)을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2, 및 LC CDR3은

(i) 각각 서열번호 20, 21, 22, 28, 29, 및 30,

(ii) 각각 서열번호 23, 24, 22, 31, 32, 및 33, 또는

(iii) 각각 서열번호 25, 26, 27, 34, 32, 및 30의 아미노산 서열을 포함함); 및

(b) 제2 항원결합 도메인(CD19에 결합함), 제2 막관통 도메인, 제2 공동자극 도메인, 및/또는 제2 일차 신호전달 도메인을 포함하는 제2 CAR(CD19 결합 도메인은 HC CDR1, HC CDR2, 및 HC CDR3을 포함하는 VH, 및 LC CDR1, LC CDR2, 및 LC CDR3을 포함하는 VL을 포함하고, HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2, 및 LC CDR3은

(i) 각각 서열번호 35, 36, 39, 40, 41, 및 42,

(ii) 각각 서열번호 35, 37, 39, 40, 41, 및 42, 또는

(iii) 각각 서열번호 35, 38, 39, 40, 41, 및 42의 아미노산 서열을 포함함)을 암호화하는 핵산 분자.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

(i) 제1 CAR의 CD22 결합 도메인은 서열번호 50의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 약 85%, 90%, 95%, 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고/하거나,

(ii) 제2 CAR의 CD19 결합 도메인은 서열번호 44의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 약 85%, 90%, 95%, 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 핵산 분자.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 막관통 도메인 및 제2 막관통 도메인은 서열번호 65의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 핵산 분자.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 막관통 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 제2 막관통 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 적어도 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 상이한, 핵산 분자.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 공동자극 신호전달 도메인 및 제2 공동자극 신호전달 도메인은 서열번호 70의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 핵산 분자.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 공동자극 신호전달 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 제2 공동자극 신호전달 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 적어도 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 상이한, 핵산 분자.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 일차 신호전달 도메인 및 제2 일차 신호전달 도메인은 서열번호 75의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 핵산 분자.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 일차 신호전달 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 제2 일차 신호전달 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 적어도 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 상이한, 핵산 분자.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

(i) 제1 CAR은 서열번호 13 또는 18의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산을 포함하고/하거나,

(ii) 제2 CAR은 서열번호 14 또는 17의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산을 포함하는, 핵산 분자.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, CAR 분자는 서열번호 12 또는 16의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산을 포함하는, 핵산 분자.

청구항 14

키메라 항원 수용체(CAR) 분자를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 세포(예를 들어, 면역 이펙터 세포)로서, 상기 CAR 분자는

(a) 제1 항원결합 도메인(CD22에 결합함), 제1 막관통 도메인, 제1 공동자극 신호전달 도메인, 및/또는 제1 일차 신호전달 도메인을 포함하는 제1 CAR; 및

(b) 제2 항원결합 도메인(CD19에 결합함), 제2 막관통 도메인, 제2 공동자극 도메인, 및/또는 제2 일차 신호전달 도메인을 포함하는 제2 CAR을 포함하고,

(i) 제1 막관통 도메인 및 제2 막관통 도메인은 서열번호 65의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고(제1 막관통 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열은 제2 막관통 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열과 상이함),

(ii) 제1 공동자극 신호전달 도메인 및 제2 공동자극 신호전달 도메인은 서열번호 70의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고/하거나(제1 공동자극 신호전달 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열은 제2 공동자극 신호전달 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열과 상이함),

(iii) 제1 일차 신호전달 도메인 및 제2 일차 신호전달 도메인은 서열번호 75의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는(일차 신호전달 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열은 제2 일차 신호전달 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열과 상이함), 세포.

청구항 15

키메라 항원 수용체(CAR) 분자를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 세포(예를 들어, 면역 이펙터 세포)로서, 상기 CAR 분자는

(a) 제1 항원결합 도메인(CD22에 결합함), 제1 막관통 도메인, 제1 공동자극 신호전달 도메인, 및/또는 제1 일차 신호전달 도메인을 포함하는 제1 CAR(CD22 결합 도메인은 HC CDR1, HC CDR2, 및 HC CDR3을 포함하는 VH, 및 LC CDR1, LC CDR2, 및 LC CDR3을 포함하는 VL을 포함하고, HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2, 및 LC CDR3은

(i) 각각 서열번호 20, 21, 22, 28, 29, 및 30,

(ii) 각각 서열번호 23, 24, 22, 31, 32, 및 33, 또는

(iii) 각각 서열번호 25, 26, 27, 34, 32, 및 30의 아미노산 서열을 포함함); 및

(b) 제2 항원결합 도메인(CD19에 결합함), 제2 막관통 도메인, 제2 공동자극 도메인, 및/또는 제2 일차 신호전달 도메인을 포함하는 제2 CAR(CD19 결합 도메인은 HC CDR1, HC CDR2, 및 HC CDR3을 포함하는 VH, 및 LC CDR1, LC CDR2, 및 LC CDR3을 포함하는 VL을 포함하고, HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2, 및 LC CDR3은

(i) 각각 서열번호 35, 36, 39, 40, 41, 및 42,

(ii) 각각 서열번호 35, 37, 39, 40, 41, 및 42, 또는

(iii) 각각 서열번호 35, 38, 39, 40, 41, 및 42의 아미노산 서열을 포함함)을 포함하는, 세포.

청구항 16

제14항 또는 제15항에 있어서,

(i) 제1 CAR의 CD22 결합 도메인은 서열번호 50의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 약 85%, 90%, 95%, 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고/하거나,

(ii) 제2 CAR의 CD19 결합 도메인은 서열번호 44의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 약 85%, 90%, 95%, 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 세포.

청구항 17

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

(i) 제1 CAR은 서열번호 13 또는 18의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산을 포함하고/하거나,

(ii) 제2 CAR은 서열번호 14 또는 17의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산을 포함하고,

(i) 제1 CAR의 CD22 결합 도메인은 서열번호 50의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 약 85%, 90%, 95%, 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고/하거나,

(ii) 제2 CAR의 CD19 결합 도메인은 서열번호 44의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 약 85%, 90%, 95%, 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 세포.

청구항 18

제14항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

(i) 제1 CAR은 서열번호 13 또는 18의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산을 포함하고/하거나,

(ii) 제2 CAR은 서열번호 14 또는 17의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산을 포함하는, 세포.

청구항 19

키메라 항원 수용체(CAR) 분자를 포함하는 세포(예를 들어, 면역 이펙터 세포)로서, 상기 CAR 분자는

(a) 제1 항원결합 도메인(CD22에 결합함) 및 제1 막관통 도메인, 제1 공동자극 신호전달 도메인, 및/또는 제1 일차 신호전달 도메인을 포함하는 제1 CAR; 및

(b) 제2 항원결합 도메인(CD19에 결합함) 및 제2 막관통 도메인, 제2 공동자극 도메인, 및/또는 제2 일차 신호전달 도메인을 포함하는 제2 CAR을 포함하고,

(i) 제1 막관통 도메인 및 제2 막관통 도메인은 서열번호 65의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고(제1 막관통 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열은 제2 막관통 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열과 상이함),

(ii) 제1 공동자극 신호전달 도메인 및 제2 공동자극 신호전달 도메인은 서열번호 70의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고/하거나(제1 공동자극 신호전달 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열은 제2 공동자극 신호전달 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열과 상이함),

(iii) 제1 일차 신호전달 도메인 및 제2 일차 신호전달 도메인은 서열번호 75의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는(일차 신호전달 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열은 제2 일차 신호전달 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열과 상

이함), 세포.

청구항 20

CAR 분자를 포함하는 세포(예를 들어, 면역 이펙터 세포)로서, CAR 분자는

(a) 제1 항원결합 도메인(CD22에 결합함), 제1 막관통 도메인, 제1 공동자극 신호전달 도메인, 및/또는 제1 일차 신호전달 도메인을 포함하는 제1 CAR(CD22 결합 도메인은 HC CDR1, HC CDR2, 및 HC CDR3을 포함하는 VH, 및 LC CDR1, LC CDR2, 및 LC CDR3을 포함하는 VL을 포함하고, HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2, 및 LC CDR3은

(i) 각각 서열번호 20, 21, 22, 28, 29, 및 30,

(ii) 각각 서열번호 23, 24, 22, 31, 32, 및 33, 또는

(iii) 각각 서열번호 25, 26, 27, 34, 32, 및 30의 아미노산 서열을 포함함); 및

(b) 제2 항원결합 도메인(CD19에 결합함), 제2 막관통 도메인, 제2 공동자극 도메인, 및/또는 제2 일차 신호전달 도메인을 포함하는 제2 CAR(CD19 결합 도메인은 HC CDR1, HC CDR2, 및 HC CDR3을 포함하는 VH, 및 LC CDR1, LC CDR2, 및 LC CDR3을 포함하는 VL을 포함하고, HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2, 및 LC CDR3은

(i) 각각 서열번호 35, 36, 39, 40, 41, 및 42,

(ii) 각각 서열번호 35, 37, 39, 40, 41, 및 42, 또는

(iii) 각각 서열번호 35, 38, 39, 40, 41, 및 42의 아미노산 서열을 포함함)을 포함하는, 세포.

청구항 21

제14항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

(i) 제1 CAR의 CD22 결합 도메인은 서열번호 50의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 약 85%, 90%, 95%, 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고/하거나,

(ii) 제2 CAR의 CD19 결합 도메인은 서열번호 44의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 약 85%, 90%, 95%, 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 세포.

청구항 22

제14항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서,

(i) 제1 CAR은 서열번호 13 또는 18의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산을 포함하고/하거나,

(ii) 제2 CAR은 서열번호 14 또는 17의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산을 포함하는, 세포.

청구항 23

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 CAR 분자를 암호화하는 핵산을 포함하고, 임의로 부형제, 담체, 희석제, 및/또는 안정화제를 포함하는 제약 조성물.

청구항 24

항종양 면역을 제공하는 방법으로서, 이를 필요로 하는 대상체에게 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 CAR 분자를 암호화하는 핵산을 포함하는, 예를 들어 발현하는 세포, 예를 들어 면역 이펙터 세포 집단의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 25

항원(예를 들어, CD19 및/또는 CD22)과 관련된 질환이 있는 대상체를 치료하는 방법으로서, 이를 필요로 하는 대상체에게 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 CAR 분자를 암호화하는 핵산을 포함하는, 예를 들어 발현하는 세포, 예를 들어 면역 이펙터 세포 집단의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 26

제24항 또는 제25항에 있어서, 세포는 T세포(예를 들어, CD4+ T세포 또는 CD8+ T세포) 또는 NK세포인, 방법.

청구항 27

제25항에 있어서, CD19 및/또는 CD22와 관련된 질환은 증식성 질환, 예를 들어 암 또는 악성종양, 전암성 병태, 예를 들어 골수이형성증, 골수이형성 증후군 또는 전백혈병, 또는 CD19 및/또는 CD22의 발현과 관련된 비암성 관련 적응증으로부터 선택되는, 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 질환은 암, 예를 들어 혈액암인, 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 혈액암은 급성 골수성 백혈병(AML), B세포 급성 림프모구성 백혈병(BALL), 소림프구성 백혈병(SLL), 급성 림프모구성 백혈병(ALL), 만성 골수성 백혈병(CML), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 맨틀세포 림프종(MCL), B세포 전림프구성 백혈병, 모구성 형질세포양 수지상 세포 신생물, 버킷 림프종, 확산성 거대 B세포 림프종(DLBCL), 여포성 림프종, 모발상 세포 백혈병, 소세포-림프종, 대세포-여포성 림프종, 악성 림프증식성 병태, MALT 림프종, 변연부 림프종, 다발성 골수종, 골수이형성증 또는 골수이형성 증후군, 골수증식성 신생물, 비호지킨 림프종(NHL), 호지킨 림프종, 형질모세포성 림프종, 형질세포양 수지상 세포 신생물, 발덴스트롬 마크로글로블린혈증, 전백혈병, 또는 이의 조합으로부터 선택되는, 방법.

청구항 30

제28항에 있어서, 혈액암은 소아 BALL인, 방법.

청구항 31

제28항에 있어서, 혈액암은 성인 BALL인, 방법.

청구항 32

제28항에 있어서, 혈액암은 NHL인, 방법.

청구항 33

제14항 내지 제22항 중 어느 한 항의 세포의 집단을 제조하는 방법으로서,

(i) 세포(예를 들어, T세포, 예를 들어 동결된 또는 신선한 백혈구 성분채집 산물로부터 단리된 T세포)의 집단을 CD3/TCR 복합체를 자극하는 제제 및/또는 세포 표면의 공동자극 분자를 자극하는 제제와 접촉(예를 들어, 결합)시키는 단계;

(ii) 세포(예를 들어, T세포)의 집단을 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 핵산 분자와 접촉시켜, 핵산 분자를 포함하는 세포(예를 들어, T세포)의 집단을 제공하는 단계; 및

(iii) 보관(예를 들어, 동결보존 배지에 세포의 집단을 재제형화) 또는 투여하기 위해 세포(예를 들어, T세포)의 집단을 채취하는 단계를 포함하되,

(a) 단계 (ii)는 단계 (i)과 함께 또는 단계 (i)의 시작 후 20시간 이내, 예를 들어 단계 (i)의 시작 후 12, 13, 14, 15, 16, 17, 또는 18시간 이내, 예를 들어 단계 (i)의 시작 후 18시간 이내에 수행되고,

단계 (iii)은 단계 (i)의 시작 후 30시간 이내(예를 들어, 26시간), 예를 들어 단계 (i)의 시작 후 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30시간 이내, 예를 들어 단계 (i)의 시작 후 24시간 이내에 수행되거나,

(b) 단계 (ii)는 단계 (i)과 함께 또는 단계 (i)의 시작 후 20시간 이내, 예를 들어 단계 (i)의 시작 후 12, 13, 14, 15, 16, 17, 또는 18시간 이내, 예를 들어 단계 (i)의 시작 후 18시간 이내에 수행되고,

단계 (iii)은 단계 (ii)의 시작 후 30시간 이내, 예를 들어 단계 (ii)의 시작 후 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30시간 이내에 수행되거나,

(c) 단계 (iii)으로부터의 세포의 집단은 단계 (i)의 시작시 세포의 집단과 비교하여, 예를 들어 살아있는 세포의 수로 평가할 때, 증식되지 않거나, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 또는 40% 이하, 예를 들어 10% 이하만큼 증식되고,

임의로 단계 (ii)의 핵산 분자는 바이러스 벡터 상에 있고, 임의로 단계 (ii)의 핵산 분자는 바이러스 벡터 상의 RNA 분자이고, 임의로 단계 (ii)는 CAR을 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 바이러스 벡터를 세포(예를 들어, T세포)의 집단에 형질도입하는 단계를 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조 및 서열 목록의 포함

[0002] 본 출원은 2019년 11월 26일에 출원된 미국 특허 가출원 62/940,600호에 대한 우선권을 주장하며, 그 전체 내용은 본 출원에 참조로 포함된다. 2020년 11월 24일에 생성된 182,837 바이트(운영 체제 MS-윈도우에서 측정)의 파일 "PAT058691-WO-PCT SQL_ST25"에 포함된 서열 목록은 본 명세서와 함께 제출되고 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 발명은 일반적으로, 분화 클러스터 19 단백질(CD19) 결합 도메인 및/또는 분화 클러스터 22 단백질(CD22) 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 조작된 T세포 또는 자연살해(NK) 세포의 CD19 및/또는 CD22의 발현과 관련된 질환 치료 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] B세포 악성종양이 있는 많은 환자는 표준 요법으로는 치유할 수 없다. 또한, 종래의 치료 옵션은 종종 심각한 부작용을 수반한다. 암 면역요법에 대한 시도가 있었지만, 여러 장애물로 인해 목표 임상 효과를 달성하기가 매우 어렵다. 수백 개의 소위 종양 항원이 확인되었지만, 이들은 일반적으로 자가유래되므로 면역원성이 낮다. 또한, 종양은 여러 메커니즘을 사용하여 면역 공격의 개시 및 확산을 어렵게 한다.

[0006] B세포 악성종양과 같은 암세포 상의 적합한 세포표면 분자에 T세포를 재지정(redirecting)하는 것에 의존하는 키메라 항원 수용체(CAR) 변형 자가 T세포(CART) 요법을 이용한 최근 개발은 면역계의 능력을 활용하여 B세포 악성종양 및 기타 암을 치료함에 있어 유망한 결과를 보여준다(예를 들어, 문헌[Sadelain et al., Cancer Discovery 3:388-398 (2013)] 참조). 뮤린 유래 CART19(즉, "CTL019")의 임상 결과는 CLL을 앓고 있는 환자뿐만 아니라 소아 ALL에서 완전 관해를 확립할 가능성을 보여주었다(예를 들어, 문헌[Kalos et al., Sci Transl Med 3:95ra73 (2011), Porter et al., NEJM 365:725-733 (2011), Grupp et al., NEJM 368:1509-1518 (2013)] 참조). 성공적인 치료적 T세포 요법은, 유전자 변형 T세포 상의 키메라 항원 수용체가 표적 세포를 인식하고 파괴하는 능력 외에도, 백혈병 재발을 조사하기 위해 시간 경과에 따른 증식 및 지속 능력이 있어야 한다. 무감작, 억제, 또는 고갈로 인한 T세포의 가변적인 품질은 CAR-형질전환 T세포의 성능에 영향을 미치며, 이때 이에 대한 숙련자의 제어는 제한된다. CAR-형질전환 환자 T세포가 효과적이기 위해서는 동족 항원에 반응하여 증식하는 능력이 지속되고 유지되어야 한다.

발명의 내용

[0007] 본 발명은 특히, CD22 CAR을 포함하는 제1 CAR 및 CD19 CAR을 포함하는 제2 CAR을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR) 분자, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 이중 CAR을 암호화하는 신규 핵산 분자를 특징으로 한다. 일부 구현예에서, CD22 CAR은 CD22 항원결합 도메인 및 제1 막관통 도메인, 제1 공동자극 신호전달 도메인, 및/또는 제1 일차 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CD19 CAR은 CD19 항원결합 도메인 및 제2 막관통 도메인, 제2 공동자극 신호전달 도메인, 및/또는 제2 일차 신호전달 도메인을 포함한다. 본원에 개시된 CAR 분자의 일부 구현예에서, CAR 분자는 예를 들어 폴리펩티드 서열이 서로 다른 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는, 제1 및 제2 막관통 도메인, 제1 및 제2 공동자극 도메인, 및/또는 제1 및 제2 일차 신호전달 도메인의 2개의 동일한 폴리펩티드 서열을 포함한다. 또한, 상기 CAR 분자를 사용하는 방법이 본원에 개시된다. 또한, CD22 항원결합 도메인 및 CD19 항원결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항원결합 도메인을 포함하는 CAR, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 탠덤 CAR이 본원에 개시된다. 조성물을 암호화하는 핵산, 숙주 세포, 벡터, 뿐만 아니라

제조 및 사용 방법이 또한 개시된다.

- [0008] 이중 CAR
- [0009] 일 양태에서, 본 발명은 키메라 항원 수용체(CAR) 분자를 암호화하는 핵산 분자를 제공하며, 상기 CAR 분자는
- [0010] (a) 제1 항원결합 도메인(CD22에 결합함), 제1 막관통 도메인, 제1 공동자극 신호전달 도메인, 및/또는 제1 일차 신호전달 도메인을 포함하는 제1 CAR; 및
- [0011] (b) 제2 항원결합 도메인(CD19에 결합함), 제2 막관통 도메인, 제2 공동자극 신호전달 도메인, 및/또는 제2 일차 신호전달 도메인을 포함하는 제2 CAR을 포함하고,
- [0012] (i) 제1 막관통 도메인 및 제2 막관통 도메인은 서열번호 65의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고(임의로, 제1 막관통 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열은 제2 막관통 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열과 상이함),
- [0013] (ii) 제1 공동자극 신호전달 도메인 및 제2 공동자극 신호전달 도메인은 서열번호 70 중 어느 하나의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고/하거나(임의로, 제1 공동자극 신호전달 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열은 제2 공동자극 신호전달 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열과 상이함),
- [0014] (iii) 제1 일차 신호전달 도메인 및 제2 일차 신호전달 도메인은 서열번호 75의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다(임의로, 일차 신호전달 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열은 제2 일차 신호전달 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열과 상이함).
- [0015] 일 구현예에서, 제1 CAR은 제1 항원결합 도메인(CD22에 결합함), 제1 막관통 도메인, 및 제1 공동자극 신호전달 도메인을 포함한다. 일 구현예에서, 제1 CAR은 제1 항원결합 도메인(CD22에 결합함), 제1 막관통 도메인, 및 제1 일차 신호전달 도메인을 포함한다. 일 구현예에서, 제1 CAR은 제1 항원결합 도메인(CD22에 결합함), 제1 막관통 도메인, 제1 공동자극 신호전달 도메인, 및/또는 제1 일차 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0016] 일 구현예에서, 제2 CAR은 제2 항원결합 도메인(CD19에 결합함), 제2 막관통 도메인, 및 제2 공동자극 신호전달 도메인을 포함한다. 일 구현예에서, 제2 CAR은 제2 항원결합 도메인(CD19에 결합함), 제2 막관통 도메인, 및 제2 일차 신호전달 도메인을 포함한다. 일 구현예에서, 제2 CAR은 제2 항원결합 도메인(CD19에 결합함), 제2 막관통 도메인, 제2 공동자극 신호전달 도메인, 및 제2 일차 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0017] 일 구현예에서, CD22 항원결합 도메인은 본원(예를 들어, 표 1A, 2A, 또는 3A)에 기재된 CD22 결합 도메인의 하나 이상(예를 들어, 3개 모두)의 경쇄 상보성 결정 영역 1(LC CDR1), 경쇄 상보성 결정 영역 2(LC CDR2), 및 경쇄 상보성 결정 영역 3(LC CDR3); 및/또는 본원(예를 들어, 표 1A, 2A, 또는 3A)에 기재된 CD22 결합 도메인의 하나 이상(예를 들어, 3개 모두)의 중쇄 상보성 결정 영역 1(HC CDR1), 중쇄 상보성 결정 영역 2(HC CDR2), 및 중쇄 상보성 결정 영역 3(HC CDR3)을 포함한다. 일 구현예에서, CD22 결합 도메인은 (i) 서열번호 20, 21, 22, 28, 29, 및 30 각각; (ii) 서열번호 23, 24, 22, 31, 32, 및 33 각각; 또는 (iii) 서열번호 25, 26, 27, 34, 32, 및 30 각각의 아미노산 서열을 포함하는 HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2, LC CDR3을 포함한다.
- [0018] 일 구현예에서, CD22 항원결합 도메인은 표 1A 또는 3A에 제공된 CD22 scFv 서열, 예를 들어 서열번호 50, 53, 또는 55의 1, 2, 또는 3개 이상의 변형(예를 들어, 치환), 30, 20, 또는 10개 이하의 변형(예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 scFv를 포함한다. 일 구현예에서, CD22 항원결합 도메인은 표 1A 또는 3A에 제공된 CD22 scFv 서열, 예를 들어 서열번호 50, 53, 또는 55에 대해 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 scFv를 포함한다. 일 구현예에서, CD22 항원결합 도메인은 표 1A 또는 3A에 제공된 CD22 scFv 서열, 예를 들어 서열번호 50, 53, 또는 55의 아미노산 서열을 포함하는 scFv를 포함한다.
- [0019] 일 구현예에서, CD22 항원결합 도메인은 표 1A 또는 3A에 제공된 CD22 scFv 서열, 예를 들어 서열번호 49, 51, 52, 54, 56, 또는 57에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 scFv를 포함한다.
- [0020] 일 구현예에서, CD19 항원결합 도메인은 본원(예를 들어, 표 1A, 2A, 3A, 또는 5A)에 기재된 CD19 항원결합 도메인의 하나 이상(예를 들어, 3개 모두)의 경쇄 상보성 결정 영역 1(LC CDR1), 경쇄 상보성 결정 영역 2(LC

CDR2), 및 경쇄 상보성 결정 영역 3(LC CDR3); 및/또는 본원(예를 들어, 표 1A, 2A, 3A, 또는 5A)에 기재된 CD19 항원결합 도메인의 하나 이상(예를 들어, 3개 모두)의 중쇄 상보성 결정 영역 1(HC CDR1), 중쇄 상보성 결정 영역 2(HC CDR2), 및 중쇄 상보성 결정 영역 3(HC CDR3)을 포함한다. 일 구현예에서, CD19 결합 도메인은 (i) 서열번호 35, 36, 39, 40, 41, 및 42 각각; (ii) 서열번호 35, 37, 39, 40, 41, 및 42 각각; 또는 (iii) 서열번호 35, 38, 39, 40, 41, 및 42 각각의 아미노산 서열을 포함하는 HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2, LC CDR3을 포함한다.

[0021] 일 구현예에서, CD19 항원결합 도메인은 표 1A, 3A, 또는 5A에 제공된 CD19 scFv 서열, 예를 들어 서열번호 44 또는 47의 1, 2, 또는 3개 이상의 변형(예를 들어, 치환), 30, 20, 또는 10개 이하의 변형(예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 scFv를 포함한다. 일 구현예에서, CD19 항원결합 도메인은 표 1A, 3A, 또는 5A에 제공된 CD19 scFv 서열, 예를 들어 서열번호 44 또는 47에 대해 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 scFv를 포함한다. 일 구현예에서, CD19 항원결합 도메인은 표 1A, 3A, 또는 5A에 제공된 CD19 scFv 서열, 예를 들어 서열번호 44 또는 47의 아미노산 서열을 포함하는 scFv를 포함한다. 일 구현예에서, CD19 항원결합 도메인은 표 1A, 3A, 또는 5A에 제공된 CD19 scFv 서열, 예를 들어 서열번호 43, 45, 46, 또는 48에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 scFv를 포함한다.

[0022] 본원에 개시된 CAR 분자를 암호화하는 핵산의 구현예에서, 제1 막관통 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 제2 막관통 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 적어도 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 상이하다. 일 구현예에서, 제1 막관통 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 제2 막관통 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 적어도 1개의 뉴클레오티드, 10개의 뉴클레오티드, 20개의 뉴클레오티드, 30개의 뉴클레오티드, 40개의 뉴클레오티드, 50개의 뉴클레오티드, 60개의 뉴클레오티드, 70개의 뉴클레오티드, 80개의 뉴클레오티드, 90개의 뉴클레오티드, 100개의 뉴클레오티드, 150개의 뉴클레오티드, 200개의 뉴클레오티드, 또는 모든 뉴클레오티드만큼 상이하다.

[0023] 본원에 개시된 CAR 분자를 암호화하는 핵산의 구현예에서, 제1 공동자극 신호전달 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 제2 공동자극 신호전달 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 적어도 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 상이하다. 일 구현예에서, 제1 공동자극 신호전달 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 제2 공동자극 신호전달 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 적어도 1개의 뉴클레오티드, 10개의 뉴클레오티드, 20개의 뉴클레오티드, 30개의 뉴클레오티드, 40개의 뉴클레오티드, 50개의 뉴클레오티드, 60개의 뉴클레오티드, 70개의 뉴클레오티드, 80개의 뉴클레오티드, 90개의 뉴클레오티드, 100개의 뉴클레오티드, 150개의 뉴클레오티드, 200개의 뉴클레오티드, 또는 모든 뉴클레오티드만큼 상이하다.

[0024] 본원에 개시된 CAR 분자를 암호화하는 핵산의 구현예에서, 제1 일차 신호전달 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 제2 일차 신호전달 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 적어도 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 상이하다. 일 구현예에서, 제1 일차 신호전달 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 제2 일차 신호전달 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 적어도 1개의 뉴클레오티드, 10개의 뉴클레오티드, 20개의 뉴클레오티드, 30개의 뉴클레오티드, 40개의 뉴클레오티드, 50개의 뉴클레오티드, 60개의 뉴클레오티드, 70개의 뉴클레오티드, 80개의 뉴클레오티드, 90개의 뉴클레오티드, 100개의 뉴클레오티드, 150개의 뉴클레오티드, 200개의 뉴클레오티드, 또는 모든 뉴클레오티드만큼 상이하다.

[0025] 본원에 개시된 CAR 분자를 암호화하는 핵산 서열의 양태에서, CAR 분자는 서열번호 11, 15, 또는 19의 뉴클레오티드 서열 또는 이에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된다.

[0026] 일 양태에서, 본원에 개시된 CAR 분자는 서열번호 12 또는 16의 아미노산 서열, 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0027] 일 양태에서, 본 발명은 키메라 항원 수용체(CAR) 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 세포(예를 들어, 면역 이펙터 세포)를 제공하며, 상기 CAR 분자는

[0028] (a) 제1 항원결합 도메인(CD22에 결합함) 및 제1 막관통 도메인, 제1 공동자극 신호전달 도메인, 및/또는 제1 일차 신호전달 도메인을 포함하는 제1 CAR; 및

[0029] (b) 제2 항원결합 도메인(CD19에 결합함) 및 제2 막관통 도메인, 제2 공동자극 신호전달 도메인, 및/또는 제2

일차 신호전달 도메인을 포함하는 제2 CAR을 포함하고,

- [0030] (i) 제1 막관통 도메인 및 제2 막관통 도메인은 서열번호 65의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고(임의로, 제1 막관통 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열은 제2 막관통 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열과 상이함),
- [0031] (ii) 제1 공동자극 신호전달 도메인 및 제2 공동자극 신호전달 도메인은 서열번호 70의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고/하거나(임의로, 제1 공동자극 신호전달 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열은 제2 공동자극 신호전달 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열과 상이함),
- [0032] (iii) 제1 일차 신호전달 도메인 및 제2 일차 신호전달 도메인은 서열번호 75의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다(임의로, 제1 일차 신호전달 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열은 제2 일차 신호전달 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열과 상이함).
- [0033] 일 양태에서, 제1 일차 신호전달 도메인 및 제2 일차 신호전달 도메인은 서열번호 108의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다(임의로, 제1 일차 신호전달 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열은 제2 일차 신호전달 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열과 상이함).
- [0034] 다른 양태에서, 키메라 항원 수용체(CAR) 분자를 포함하는 세포(예를 들어, 면역 이펙터 세포)가 본원에 제공되며, 상기 CAR 분자는
- [0035] (a) 제1 항원결합 도메인(CD22에 결합함) 및 제1 막관통 도메인, 제1 공동자극 신호전달 도메인, 및/또는 제1 일차 신호전달 도메인을 포함하는 제1 CAR; 및
- [0036] (b) 제2 항원결합 도메인(CD19에 결합함) 및 제2 막관통 도메인, 제2 공동자극 신호전달 도메인, 및/또는 제2 일차 신호전달 도메인을 포함하는 제2 CAR을 포함하고,
- [0037] (i) 제1 막관통 도메인 및 제2 막관통 도메인은 서열번호 65의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고(임의로, 제1 막관통 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열은 제2 막관통 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열과 상이함),
- [0038] (ii) 제1 공동자극 신호전달 도메인 및 제2 공동자극 신호전달 도메인은 서열번호 70의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고/하거나(임의로, 제1 공동자극 신호전달 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열은 제2 공동자극 신호전달 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열과 상이함),
- [0039] (iii) 제1 일차 신호전달 도메인 및 제2 일차 신호전달 도메인은 서열번호 75의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다(임의로, 제1 일차 신호전달 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열은 제2 일차 신호전달 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열과 상이함).
- [0040] 일 구현예에서, 세포는 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T세포(예: CD3+, CD4+, 또는 CD8+ T세포), 또는 NK세포이다. 일 구현예에서, 세포는 인간 세포이다.
- [0041] 일 양태에서, 항종양 면역을 제공하는 방법으로서, 이를 필요로 하는 대상체에게 본원에 개시된 CAR 분자, 예를 들어 본원에 개시된 이중 CAR 분자를 포함하는, 예를 들어 발현하는 세포, 예를 들어 면역 이펙터 세포 집단의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법이 본원에 제공된다.
- [0042] 다른 양태에서, 본 발명은 항원(예를 들어, CD19 및/또는 CD22)과 관련된 질환이 있는 대상체를 치료하는 방법으로서, 이를 필요로 하는 대상체에게 본원에 개시된 CAR 분자, 예를 들어 본원에 개시된 이중 CAR 분자를 포함하는, 예를 들어 발현하는 세포, 예를 들어 면역 이펙터 세포 집단의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0043] 탠덤 CAR
- [0044] 일 양태에서, 본 발명은 CD22에 결합하는 제1 항원결합 도메인 및 CD19에 결합하는 제2 항원결합 도메인을 포함

하는 이중특이적 항원결합 도메인을 제공한다.

- [0045] 다른 양태에서, 본원에 기재된 이중특이적 항원결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)가 본원에 제공된다.
- [0046] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 이중특이적 항원결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 핵산을 제공한다.
- [0047] 본원에 기재된 이중특이적 항원결합 도메인의 일부 구현예에서, 예를 들어 이중특이적 항원결합 도메인을 포함하는 CAR, 또는 이중특이적 항원결합 도메인을 포함하는 CAR을 암호화하는 핵산에서, 제1 항원결합 도메인은 제2 항원결합 도메인의 업스트림(예를 들어, N-말단 배향)일 수 있거나, 제1 항원결합 도메인은 제2 항원결합 도메인의 다운스트림(예를 들어, C-말단 배향)일 수 있다.
- [0048] 일부 구현예에서, 제1 항원결합 도메인 및 제2 항원결합 도메인 각각은 scFv, 예를 들어 경쇄 가변(VL) 도메인 및 중쇄 가변(VH) 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 항원결합 도메인은 제1 VH(VH1) 및 제1 VL(VL1)을 포함하는 scFv를 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 항원결합 도메인은 제2 VH(VH2) 및 제2 VL(VL2)을 포함하는 scFv를 포함한다.
- [0049] 일부 구현예에서, 이중특이적 항원결합 도메인은 N-말단에서 C-말단 방향으로 다음 배열 중 어느 하나를 갖는다: VL1-VH1-VH2-VL2; VH1-VL1-VH2-VL2; VL1-VH1-VL2-VH2; VH1-VL1-VL2-VH2, VH2-VL2-VL1-VH1; VL2-VH2-VL1-VH1; VH2-VL2-VH1-VL1; 또는 VL2-VH2-VH1-VL1.
- [0050] 일 양태에서, 이중특이적 항원결합 도메인을 포함하는 CAR은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하고 서열번호 1의 핵산 서열에 의해 암호화된다. 다른 양태에서, 이중특이적 항원결합 도메인을 포함하는 CAR은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하고 서열번호 3의 핵산 서열에 의해 암호화된다.
- [0051] 다른 양태에서, 이중특이적 항원결합 도메인을 포함하는 CAR은 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하고 서열번호 5의 핵산 서열에 의해 암호화된다.
- [0052] 다른 양태에서, 이중특이적 항원결합 도메인을 포함하는 CAR은 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하고 서열번호 7의 핵산 서열에 의해 암호화된다.
- [0053] 다른 양태에서, 이중특이적 항원결합 도메인을 포함하는 CAR은 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하고 서열번호 9의 핵산 서열에 의해 암호화된다.
- [0054] 일 양태에서, 본 발명은 본원에 개시된 CAR 분자를 암호화하는 핵산 분자, 본원에 개시된 이중특이적 항원결합 도메인을 암호화하는 핵산, 또는 본원에 개시된 이중특이적 항원결합 도메인을 포함하는 CAR을 암호화하는 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0055] 다른 양태에서, 본원에 개시된 CAR 분자를 암호화하는 핵산을 포함하는 제약 조성물 또는 본원에 개시된 CAR 분자를 포함하는 제약 조성물이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 제약 조성물은 부형제, 담체, 희석제, 및/또는 안정화제를 포함한다.
- [0056] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 개시된 이중특이적 항원결합 도메인, 본원에 개시된 이중특이적 항원결합 도메인을 포함하는 CAR, 또는 본원에 개시된 이중특이적 항원결합 도메인을 암호화하는 CAR 핵산을 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 일부 구현예에서, 제약 조성물은 부형제, 담체, 희석제, 및/또는 안정화제를 포함한다.
- [0057] 일 양태에서, 항종양 면역력을 제공하는 방법으로서, 이를 필요로 하는 대상체에게 본원에 개시된 CAR, 예를 들어 본원에 개시된 탠덤 CAR을 포함하는, 예를 들어 발현하는 세포, 예를 들어 면역 이펙터 세포 집단의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법이 본원에 제공된다.
- [0058] 다른 양태에서, 본 발명은 항원(예를 들어, CD19 및/또는 CD22)과 관련된 질환이 있는 대상체를 치료하는 방법으로서, 이를 필요로 하는 대상체에게 본원에 개시된 CAR, 예를 들어 본원에 개시된 탠덤 CAR을 포함하는, 예를 들어 발현하는 세포, 예를 들어 면역 이펙터 세포 집단의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0059] 당업자는 단지 통상적인 실험을 사용하여 본원에 기재된 발명의 특정 구현예에 대한 다수의 균등물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 이러한 균등물은 하기 열거된 구현예에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0060] 열거 구현예

- [0061] 1. 카메라 항원 수용체(CAR) 분자를 암호화하는 핵산 분자로서, 상기 CAR 분자는
- [0062] (a) 제1 항원결합 도메인(CD22에 결합함), 제1 막관통 도메인, 제1 공동자극 신호전달 도메인, 및/또는 제1 일차 신호전달 도메인을 포함하는 제1 CAR; 및
- [0063] (b) 제2 항원결합 도메인(CD19에 결합함), 제2 막관통 도메인, 제2 공동자극 도메인, 및/또는 제2 일차 신호전달 도메인을 포함하는 제2 CAR을 포함하고,
- [0064] (i) 제1 막관통 도메인 및 제2 막관통 도메인은 서열번호 65의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고(임의로, 제1 막관통 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열은 제2 막관통 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열과 상이함),
- [0065] (ii) 제1 공동자극 신호전달 도메인 및 제2 공동자극 신호전달 도메인은 서열번호 70의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고/하거나(임의로, 제1 공동자극 신호전달 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열은 제2 공동자극 신호전달 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열과 상이함),
- [0066] (iii) 제1 일차 신호전달 도메인 및 제2 일차 신호전달 도메인은 서열번호 75의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는(임의로, 일차 신호전달 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열은 제2 일차 신호전달 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열과 상이함), 핵산 분자.
- [0067] 2. 구현예 1에 있어서, 제1 CAR은
- [0068] 제1 항원결합 도메인(CD22에 결합함), 제1 막관통 도메인, 및 제1 공동자극 신호전달 도메인;
- [0069] 제1 항원결합 도메인(CD22에 결합함), 제1 막관통 도메인, 및 제1 일차 신호전달 도메인; 또는
- [0070] 제1 항원결합 도메인(CD22에 결합함), 제1 막관통 도메인, 제1 공동자극 신호전달 도메인, 및 제1 일차 신호전달 도메인을 포함하는, 핵산 분자.
- [0071] 3. 구현예 1 또는 2에 있어서, 제2 CAR은
- [0072] 제2 항원결합 도메인(CD19에 결합함), 제2 막관통 도메인, 및 제2 공동자극 신호전달 도메인;
- [0073] 제2 항원결합 도메인(CD19에 결합함), 제2 막관통 도메인, 및 제2 일차 신호전달 도메인; 또는
- [0074] 제2 항원결합 도메인(CD19에 결합함), 제2 막관통 도메인, 제2 공동자극 신호전달 도메인, 및 제2 일차 신호전달 도메인을 포함하는, 핵산 분자.
- [0075] 4. 상기 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, CD22 항원결합 도메인은
- [0076] 본원(예를 들어, 표 1A, 2A, 또는 3A)에 기재된 CD22 결합 도메인의 하나 이상(예를 들어, 3개 모두)의 경쇄 상보성 결정 영역 1(LC CDR1), 경쇄 상보성 결정 영역 2(LC CDR2), 및 경쇄 상보성 결정 영역 3(LC CDR3); 및/또는
- [0077] 본원(예를 들어, 표 1A, 2A, 또는 3A)에 기재된 CD22 결합 도메인의 하나 이상(예를 들어, 3개 모두)의 중쇄 상보성 결정 영역 1(HC CDR1), 중쇄 상보성 결정 영역 2(HC CDR2), 및 중쇄 상보성 결정 영역 3(HC CDR3)을 포함하는, 핵산 분자.
- [0078] 5. 구현예 4에 있어서, CD22 항원결합 도메인은 본원(예를 들어, 표 1A, 2A, 또는 3A)에 기재된 CD22 결합 도메인의 LC CDR1, LC CDR2, 및 LC CDR3; 및/또는 본원(예를 들어, 표 1A, 2A, 또는 3A)에 기재된 CD22 결합 도메인의 HC CDR1, HC CDR2, 및 HC CDR3을 포함하는, 핵산 분자.
- [0079] 6. 구현예 4 또는 5에 있어서, CD22 항원결합 도메인은 서열번호 28, 31, 또는 34의 LC CDR1, 서열번호 29 또는 32의 LC CDR2, 서열번호 30 또는 33의 LC CDR3; 및/또는 서열번호 20, 23, 또는 25의 HC CDR1, 서열번호 21, 24, 또는 26의 HC CDR2, 서열번호 22 또는 27의 HC CDR3을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 핵산 분자.
- [0080] 7. 구현예 4 내지 6 중 어느 한 구현예에 있어서, CD22 항원결합 도메인(예를 들어, scFv)은 본원(예를 들어, 표 1A 또는 3A)에 기재된 CD22 결합 도메인의 경쇄 가변(VL) 영역; 및/또는 본원(예를 들어, 표 1A 또는 3A)에

기재된 CD22 결합 도메인의 중쇄 가변(VH) 영역을 포함하는, 핵산 분자.

- [0081] 8. 구현예 7에 있어서, CD22 항원결합 도메인은
- [0082] 표 1A 또는 3A에 제공된 CD22 VL 영역 서열의 1, 2, 또는 3개 이상의 변형(예를 들어, 치환), 30, 20, 또는 10개 이하의 변형(예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;
- [0083] 표 1A 또는 3A에 제공된 CD22 VL 영역 서열에 대해 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역; 또는
- [0084] 표 1A 또는 3A에 제공된 CD22 VL 영역 서열의 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 VL 영역을 포함하는, 핵산 분자.
- [0085] 9. 구현예 7 또는 8에 있어서, CD22 항원결합 도메인은
- [0086] 표 1A 또는 3A에 제공된 CD22 VH 영역 서열의 1, 2, 또는 3개 이상의 변형(예를 들어, 치환), 30, 20, 또는 10개 이하의 변형(예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역;
- [0087] 표 1A 또는 3A에 제공된 CD22 VH 영역 서열에 대해 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 또는
- [0088] 표 1A 또는 3A에 제공된 CD22 VH 영역 서열의 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 VH 영역을 포함하는, 핵산 분자.
- [0089] 10. 구현예 7 내지 9 중 어느 한 구현예에 있어서, CD22 항원결합 도메인의 VH 및 VL 영역은 링커에 의해, 예를 들어 본원에 기재된 링커, 예를 들어 표 4A에 개시된 링커에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 링커에 의해 연결되는, 핵산 분자.
- [0090] 11. 상기 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, CD22 항원결합 도메인은
- [0091] 표 1A 또는 3A에 제공된 CD22 scFv 서열, 예를 들어 서열번호 50의 1, 2, 또는 3개 이상의 변형(예를 들어, 치환), 30, 20, 또는 10개 이하의 변형(예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 scFv;
- [0092] 표 1A 또는 3A에 제공된 CD22 scFv 서열, 예를 들어 서열번호 50에 대해 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 scFv;
- [0093] 표 1A 또는 3A에 제공된 CD22 scFv 서열, 예를 들어 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는 scFv;
- [0094] 표 1A 또는 3A에 제공된 CD22 scFv 서열, 예를 들어 서열번호 49 또는 51에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 scFv를 포함하는, 핵산 분자.
- [0095] 12. 상기 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, CD19 항원결합 도메인은
- [0096] 본원(예를 들어, 표 1A, 2A, 3A, 또는 5A)에 기재된 CD19 결합 도메인의 하나 이상(예를 들어, 3개 모두)의 경쇄 상보성 결정 영역 1(LC CDR1), 경쇄 상보성 결정 영역 2(LC CDR2), 및 경쇄 상보성 결정 영역 3(LC CDR3); 및/또는
- [0097] 본원(예를 들어, 표 1A, 2A, 3A, 또는 5A)에 기재된 CD19 결합 도메인의 하나 이상(예를 들어, 3개 모두)의 중쇄 상보성 결정 영역 1(HC CDR1), 중쇄 상보성 결정 영역 2(HC CDR2), 및 중쇄 상보성 결정 영역 3(HC CDR3)을 포함하는, 핵산 분자.
- [0098] 13. 구현예 12에 있어서, CD19 항원결합 도메인은 본원(예를 들어, 표 1A 또는 2A)에 기재된 CD19 결합 도메인의 LC CDR1, LC CDR2, 및 LC CDR3; 및/또는 본원(예를 들어, 표 1A, 2A, 또는 3A)에 기재된 CD19 결합 도메인의 HC CDR1, HC CDR2, 및 HC CDR3을 포함하는, 핵산 분자.
- [0099] 14. 구현예 12 또는 13에 있어서, CD19 항원결합 도메인은 서열번호 40의 LC CDR1, 서열번호 41의 LC CDR2, 및 서열번호 42의 LC CDR3; 및/또는 서열번호 35의 HC CDR1, 서열번호 36-38의 HC CDR2, 및 서열번호 39의 HC CDR3을 포함하는, 핵산 분자.
- [0100] 15. 구현예 12 내지 14 중 어느 한 구현예에 있어서, CD19 항원결합 도메인(예를 들어, scFv)은 본원(예를 들어, 표 1A, 3A, 또는 5A)에 기재된 CD19 결합 도메인의 경쇄 가변(VL) 영역; 및/또는 본원(예를 들어, 표 1A, 3A, 또는 5A)에 기재된 CD19 결합 도메인의 중쇄 가변(VH) 영역을 포함하는, 핵산 분자.

- [0101] 16. 구현예 15에 있어서, CD19 항원결합 도메인은
- [0102] 표 1A, 3A, 또는 5A에 제공된 CD19 VL 영역 서열의 1, 2, 또는 3개 이상의 변형(예를 들어, 치환), 30, 20, 또는 10개 이하의 변형(예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;
- [0103] 표 1A, 3A, 또는 5A에 제공된 CD19 VL 영역 서열에 대해 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역; 또는
- [0104] 표 1A, 3A, 또는 5A에 제공된 CD19 VL 영역 서열의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역을 포함하는, 핵산 분자.
- [0105] 17. 구현예 15 또는 16에 있어서, CD19 항원결합 도메인은
- [0106] 표 1A, 3A, 또는 5A에 제공된 CD19 VH 영역 서열의 1, 2, 또는 3개 이상의 변형(예를 들어, 치환), 30, 20, 또는 10개 이하의 변형(예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역;
- [0107] 표 1A, 3A, 또는 5A에 제공된 CD19 VH 영역 서열에 대해 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 또는
- [0108] 표 1A, 3A, 또는 5A에 제공된 CD19 VH 영역 서열의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역을 포함하는, 핵산 분자.
- [0109] 18. 구현예 15 내지 17 중 어느 한 구현예에 있어서, CD19 항원결합 도메인의 VH 및 VL 영역은 링커에 의해, 예를 들어 본원에 기재된 링커, 예를 들어 표 4A에 개시된 링커에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 링커에 의해 연결되는, 핵산 분자.
- [0110] 19. 상기 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, CD19 항원결합 도메인은
- [0111] 표 1A, 3A, 또는 5A에 제공된 CD19 scFv 서열, 예를 들어 서열번호 44의 1, 2, 또는 3개 이상의 변형(예를 들어, 치환), 30, 20, 또는 10개 이하의 변형(예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 scFv;
- [0112] 표 1A, 3A, 또는 5A에 제공된 CD19 scFv 서열, 예를 들어 서열번호 44에 대해 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 scFv;
- [0113] 표 1A, 3A, 또는 5A에 제공된 CD19 scFv 서열, 예를 들어 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 scFv;
- [0114] 표 1A, 3A, 또는 5A에 제공된 CD19 scFv 서열, 예를 들어 서열번호 43 또는 48에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 scFv를 포함하는, 핵산 분자.
- [0115] 20. 상기 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 막관통 도메인 및 제2 막관통 도메인은 서열번호 65의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 핵산 분자.
- [0116] 21. 상기 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 막관통 도메인 및 제2 막관통 도메인은 서열번호 65의 아미노산 서열에 대해 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7개의 변형(예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 핵산 분자.
- [0117] 22. 상기 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 막관통 도메인 및 제2 막관통 도메인은 서열번호 65의 아미노산 서열을 포함하는, 핵산 분자.
- [0118] 23. 상기 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 막관통 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 제2 막관통 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 적어도 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 상이한, 핵산 분자.
- [0119] 24. 상기 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 막관통 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 제2 막관통 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 적어도 1개의 뉴클레오티드, 10개의 뉴클레오티드, 20개의 뉴클레오티드, 30개의 뉴클레오티드, 40개의 뉴클레오티드, 50개의 뉴클레오티드, 60개의 뉴클레오티드, 70개의 뉴클레오티드, 80개의 뉴클레오티드, 90개의 뉴클레오티드, 100개의 뉴클레오티드, 150개의 뉴클레오티드, 200개의 뉴클레오티드, 또는 모든 뉴클레오티드만큼 상이한, 핵산 분자.
- [0120] 25. 상기 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 막관통 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 64 또는 66에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 서열로부터 선택되는, 핵산 분자.

- [0121] 26. 상기 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 제2 막관통 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 67 또는 68에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 서열로부터 선택되는, 핵산 분자.
- [0122] 27. 상기 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 공동자극 신호전달 도메인 및 제2 공동자극 신호전달 도메인은 서열번호 70의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 핵산 분자.
- [0123] 28. 상기 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 공동자극 신호전달 도메인 및 제2 공동자극 신호전달 도메인은 서열번호 70 중 어느 하나의 아미노산 서열에 대해 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 변형(예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 핵산 분자.
- [0124] 29. 상기 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 공동자극 신호전달 도메인 및 제2 공동자극 신호전달 도메인은 서열번호 70 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는, 핵산 분자.
- [0125] 30. 상기 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 공동자극 신호전달 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 제2 공동자극 신호전달 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 적어도 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 상이한, 핵산 분자.
- [0126] 31. 상기 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 공동자극 신호전달 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 제2 공동자극 신호전달 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 적어도 1개의 뉴클레오티드, 10개의 뉴클레오티드, 20개의 뉴클레오티드, 30개의 뉴클레오티드, 40개의 뉴클레오티드, 50개의 뉴클레오티드, 60개의 뉴클레오티드, 70개의 뉴클레오티드, 80개의 뉴클레오티드, 90개의 뉴클레오티드, 100개의 뉴클레오티드, 120개의 뉴클레오티드, 또는 모든 뉴클레오티드만큼 상이한, 핵산 분자.
- [0127] 32. 상기 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 공동자극 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 69 또는 72에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 서열로부터 선택되는, 핵산 분자.
- [0128] 33. 상기 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 제2 공동자극 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 71 또는 73에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 서열로부터 선택되는, 핵산 분자.
- [0129] 34. 상기 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 일차 신호전달 도메인 및 제2 일차 신호전달 도메인은 서열번호 75의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 핵산 분자.
- [0130] 35. 상기 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 일차 신호전달 도메인 및 제2 일차 신호전달 도메인은 서열번호 75의 아미노산 서열에 대해 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12개의 변형(예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 핵산 분자.
- [0131] 36. 상기 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 일차 신호전달 도메인 및 제2 일차 신호전달 도메인은 서열번호 75의 아미노산 서열을 포함하는, 핵산 분자.
- [0132] 37. 상기 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 일차 신호전달 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 제2 일차 신호전달 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 적어도 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 상이한, 핵산 분자.
- [0133] 38. 상기 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 일차 신호전달 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 제2 일차 신호전달 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 적어도 1개의 뉴클레오티드, 10개의 뉴클레오티드, 20개의 뉴클레오티드, 30개의 뉴클레오티드, 40개의 뉴클레오티드, 50개의 뉴클레오티드, 60개의 뉴클레오티드, 70개의 뉴클레오티드, 80개의 뉴클레오티드, 90개의 뉴클레오티드, 100개의 뉴클레오티드, 150개의 뉴클레오티드, 200개의 뉴클레오티드, 250개의 뉴클레오티드, 300개의 뉴클레오티드, 또는 모든 뉴클레오티드만큼 상이한, 핵산 분자.
- [0134] 39. 상기 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 일차 신호전달 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 74 또는 77에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 서열로부터 선택되는, 핵산 분자.

- [0135] 40. 상기 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 제2 일차 신호전달 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 76 또는 78에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 서열로부터 선택되는, 핵산 분자.
- [0136] 41. 상기 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 CAR 및/또는 제2 CAR은 신호 펩티드, 예를 들어 소수성 아미노산의 스트레치, 예를 들어 5~16개의 잔기를 포함하는 펩티드를 포함하는, 핵산 분자.
- [0137] 42. 구현예 41에 있어서, 신호 펩티드는 CD8알파 신호 펩티드, 인터류킨 2 신호 펩티드, 인간 알부민 신호 펩티드, 인간 키모트립시노젠 신호 펩티드, 인간 트립시노젠-2 신호 펩티드, 또는 문헌[Stern B. *et al.* "Improving mammalian cell factories : The selection of signal peptide has a major impact on recombinant protein synthesis and secretion in mammalian cells." (2007)]에 개시된 기타 유사한 신호 펩티드로부터 선택되는, 핵산 분자.
- [0138] 43. 구현예 41 또는 42에 있어서, 신호 펩티드는
- [0139] 표 4A에 제공된 신호 펩티드를 포함하거나;
- [0140] 서열번호 59의 아미노산을 포함하거나;
- [0141] 서열번호 58, 60, 61, 62, 또는 63 중 어느 하나의 핵산 또는 이에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 핵산에 의해 암호화되는, 핵산 분자.
- [0142] 44. 상기 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 5'에서 3' 방향으로 제1 CAR에 이어 제2 CAR을 포함하는 핵산 분자.
- [0143] 45. 구현예 1 내지 43 중 어느 한 구현예에 있어서, 5'에서 3' 방향으로 제2 CAR에 이어 제1 CAR을 포함하는 핵산 분자.
- [0144] 46. 상기 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 프로테아제 절단 부위(예를 들어, T2A, P2A, E2A, 또는 F2A 절단 부위) 또는 내부 리보솜 진입 부위를 추가로 포함하는 핵산 분자.
- [0145] 47. 구현예 46에 있어서, 프로테아제 절단 부위는 P2A 부위인, 핵산 분자.
- [0146] 48. 구현예 46 또는 47에 있어서, P2A 부위는 서열번호 86의 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열; 또는 서열번호 85 또는 87의 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 핵산 분자.
- [0147] 49. 구현예 46 내지 48 중 어느 한 구현예에 있어서, 프로테아제 절단 부위 또는 내부 리보솜 진입 부위는 제1 CAR과 제2 CAR 사이에 위치하는, 핵산 분자.
- [0148] 50. 구현예 46 내지 49 중 어느 한 구현예에 있어서, 프로테아제 절단 부위는 세포가 제1 CAR 및 제2 CAR을 포함하는 융합 단백질을 발현할 수 있도록 위치하고, 임의로 융합 단백질은 단백질 분해 절단에 의해 2개의 펩티드로 처리되는, 핵산 분자.
- [0149] 51. 상기 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, CAR 분자는 서열번호 11의 뉴클레오티드 서열 또는 이에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 핵산 분자.
- [0150] 52. 상기 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, CAR 분자는 서열번호 13의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산을 포함하는 제1 CAR, 및 서열번호 14의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산을 포함하는 제2 CAR을 포함하는, 핵산 분자.
- [0151] 53. 상기 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, CAR 분자는 서열번호 12의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산을 포함하는, 핵산 분자.
- [0152] 54. 구현예 1 내지 50 중 어느 한 구현예에 있어서, CAR 분자는 서열번호 15의 뉴클레오티드 서열 또는 이에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는, 핵산 분자.
- [0153] 55. 구현예 1 내지 50 또는 54 중 어느 한 구현예에 있어서, CAR 분자는 서열번호 17의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산을 포함하는 제1 CAR, 및 서열번호 18

의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산을 포함하는 제2 CAR을 포함하는, 핵산 분자.

- [0154] 56. 구현예 1 내지 50 또는 54 또는 55 중 어느 한 구현예에 있어서, CAR 분자는 서열번호 16의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산을 암호화하는 핵산에 의해 암호화되는, 핵산 분자.
- [0155] 57. 구현예 1 내지 50 중 어느 한 구현예에 있어서, CAR 분자는 서열번호 19의 뉴클레오티드 서열 또는 이에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는, 핵산 분자.
- [0156] 58. 구현예 1 내지 50 또는 57 중 어느 한 구현예에 있어서, CAR 분자는 서열번호 13의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산을 포함하는 제1 CAR, 및 서열번호 14의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산을 포함하는 제2 CAR을 포함하는, 핵산 분자.
- [0157] 59. 구현예 1 내지 50 또는 57 또는 58 중 어느 한 구현예에 있어서, CAR 분자는 서열번호 12의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산을 포함하는, 핵산 분자.
- [0158] 60. 키메라 항원 수용체(CAR) 분자를 암호화하는 핵산 분자로서, 상기 CAR 분자는 5'에서 3' 배향으로
- [0159] (a) 제1 신호 펩티드, 제1 항원결합 도메인(CD22에 결합함), 제1 막관통 도메인, 제1 공동자극 신호전달 도메인, 및 제1 일차 신호전달 도메인을 포함하는 제1 CAR;
- [0160] (b) P2A 프로테아제 절단 부위;
- [0161] (c) 제2 신호 펩티드, 제2 항원결합 도메인(CD19에 결합함), 제2 막관통 도메인, 제2 공동자극 도메인, 및 제2 일차 신호전달 도메인을 포함하는 제2 CAR을 포함하고,
- [0162] CAR 분자는 서열번호 11의 뉴클레오티드 서열에 의해, 또는 서열번호 12의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산에 의해 암호화되는, 핵산 분자.
- [0163] 61. 키메라 항원 수용체(CAR) 분자를 암호화하는 핵산 분자로서, 상기 CAR 분자는 5'에서 3' 배향으로
- [0164] (a) 제2 신호 펩티드, 제2 항원결합 도메인(CD19에 결합함), 제2 막관통 도메인, 제2 공동자극 도메인, 및 제2 일차 신호전달 도메인을 포함하는 제2 CAR;
- [0165] (b) P2A 프로테아제 절단 부위;
- [0166] (c) 제1 신호 펩티드, 제1 항원결합 도메인(CD22에 결합함), 제1 막관통 도메인, 제1 공동자극 신호전달 도메인, 및 제1 일차 신호전달 도메인을 포함하는 제1 CAR을 포함하고,
- [0167] CAR 분자는 서열번호 15의 뉴클레오티드 서열에 의해, 또는 서열번호 16의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산에 의해 암호화되는, 핵산 분자.
- [0168] 62. 키메라 항원 수용체(CAR) 분자를 암호화하는 핵산 분자로서, 상기 CAR 분자는 5'에서 3' 배향으로
- [0169] (a) 제1 신호 펩티드, 제1 항원결합 도메인(CD22에 결합함), 제1 막관통 도메인, 제1 공동자극 신호전달 도메인, 및 제1 일차 신호전달 도메인을 포함하는 제1 CAR;
- [0170] (b) P2A 프로테아제 절단 부위;
- [0171] (c) 제2 신호 펩티드, 제2 항원결합 도메인(CD19에 결합함), 제2 막관통 도메인, 제2 공동자극 도메인, 및 제2 일차 신호전달 도메인을 포함하는 제2 CAR을 포함하고,
- [0172] CAR 분자는 서열번호 19의 뉴클레오티드 서열에 의해, 또는 서열번호 12의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산에 의해 암호화되는, 핵산 분자.
- [0173] 63. 상기 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 프로모터 서열, 예를 들어 EF1 프로모터를 추가로 포함하는 핵산 분자.
- [0174] 64. 상기 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열 및 제2 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 단일 핵산 구성체 상에 배치되는, 핵산 분자.

- [0175] 65. 구현예 64에 있어서, 제1 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열 및 제2 CAR을 암호화하는 핵산은 동일한 벡터 상에 배치되는, 핵산 분자.
- [0176] 66. 상기 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열 및 제2 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 서로 다른 핵산 구성체 상에 배치되는(예를 들어, 제1 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 제1 핵산 구성체 상에 배치되고, 제2 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 제2 핵산 구성체 상에 배치되는), 핵산 분자.
- [0177] 67. 구현예 66에 있어서, 제1 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 제1 벡터 상에 배치되는, 핵산 분자.
- [0178] 68. 구현예 66에 있어서, 제2 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 제2 벡터 상에 배치되는, 핵산 분자.
- [0179] 69. 바이러스 요소, 예를 들어 바이러스 패키징 요소를 포함하는 핵산 분자.
- [0180] 70. 구현예 1 내지 69 중 어느 한 구현예의 핵산 분자를 포함하는 벡터.
- [0181] 71. 구현예 70에 있어서, DNA, RNA, 플라스미드, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 또는 레트로바이러스 벡터로부터 선택되는 벡터.
- [0182] 72. 구현예 70 또는 71의 벡터, 또는 구현예 1 내지 69 중 어느 한 구현예의 핵산 분자를 포함하는 세포(예를 들어, 면역 이펙터 세포).
- [0183] 73. 키메라 항원 수용체(CAR) 분자를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 세포(예를 들어, 면역 이펙터 세포)로서, 상기 CAR 분자는
- [0184] (a) 제1 항원결합 도메인(CD22에 결합함) 및 제1 막관통 도메인, 제1 공동자극 신호전달 도메인, 및/또는 제1 일차 신호전달 도메인을 포함하는 제1 CAR; 및
- [0185] (b) 제2 항원결합 도메인(CD19에 결합함) 및 제2 막관통 도메인, 제2 공동자극 도메인, 및/또는 제2 일차 신호전달 도메인을 포함하는 제2 CAR을 포함하고,
- [0186] (i) 제1 막관통 도메인 및 제2 막관통 도메인은 서열번호 65의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고(임의로, 제1 막관통 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열은 제2 막관통 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열과 상이함),
- [0187] (ii) 제1 공동자극 신호전달 도메인 및 제2 공동자극 신호전달 도메인은 서열번호 70의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고/하거나(임의로, 제1 공동자극 신호전달 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열은 제2 공동자극 신호전달 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열과 상이함),
- [0188] (iii) 제1 일차 신호전달 도메인 및 제2 일차 신호전달 도메인은 서열번호 75 중 어느 하나의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는(임의로, 일차 신호전달 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열은 제2 일차 신호전달 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열과 상이함), 세포.
- [0189] 74. 키메라 항원 수용체(CAR) 분자를 포함하는 세포(예를 들어, 면역 이펙터 세포)로서, 상기 CAR 분자는
- [0190] (a) 제1 항원결합 도메인(CD22에 결합함) 및 제1 막관통 도메인, 제1 공동자극 신호전달 도메인, 및/또는 제1 일차 신호전달 도메인을 포함하는 제1 CAR; 및
- [0191] (b) 제2 항원결합 도메인(CD19에 결합함) 및 제2 막관통 도메인, 제2 공동자극 도메인, 및/또는 제2 일차 신호전달 도메인을 포함하는 제2 CAR을 포함하고,
- [0192] (i) 제1 막관통 도메인 및 제2 막관통 도메인은 서열번호 65의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고(임의로, 제1 막관통 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열은 제2 막관통 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열과 상이함),
- [0193] (ii) 제1 공동자극 신호전달 도메인 및 제2 공동자극 신호전달 도메인은 서열번호 70의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고/하거나(임의로, 제1 공동자극 신호전달 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열은 제2 공동자극 신호전달 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열과 상이함),

- [0194] (iii) 제1 일차 신호전달 도메인 및 제2 일차 신호전달 도메인은 서열번호 75의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는(임의로, 일차 신호전달 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열은 제2 일차 신호전달 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열과 상이함), 세포.
- [0195] 75. 구현예 74에 있어서, CAR 분자를 암호화하는 핵산을 포함하는 세포.
- [0196] 76. 구현예 73 또는 75에 있어서, 구현예 1 내지 69 중 어느 한 구현예의 핵산 분자, 또는 구현예 70 또는 71의 벡터를 포함하는 세포.
- [0197] 77. 키메라 항원 수용체(CAR) 분자를 포함하는 세포로서, CAR 분자는
- [0198] (a) 제1 신호 펩티드, 제1 항원결합 도메인(CD22에 결합함), 제1 막관통 도메인, 제1 공동자극 신호전달 도메인, 및 제1 일차 신호전달 도메인을 포함하는 제1 CAR;
- [0199] (b) 제2 신호 펩티드, 제2 항원결합 도메인(CD19에 결합함), 제2 막관통 도메인, 제2 공동자극 도메인, 및 제2 일차 신호전달 도메인을 포함하는 제2 CAR을 포함하고,
- [0200] CAR 분자는 서열번호 11의 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되거나, 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는, 세포.
- [0201] 78. 키메라 항원 수용체(CAR) 분자를 포함하는 세포로서, CAR 분자는
- [0202] (a) 제2 신호 펩티드, 제2 항원결합 도메인(CD19에 결합함), 제2 막관통 도메인, 제2 공동자극 도메인, 및 제2 일차 신호전달 도메인을 포함하는 제2 CAR;
- [0203] (b) 제1 신호 펩티드, 제1 항원결합 도메인(CD22에 결합함), 제1 막관통 도메인, 제1 공동자극 신호전달 도메인, 및 제1 일차 신호전달 도메인을 포함하는 제1 CAR을 포함하고,
- [0204] CAR 분자는 서열번호 15의 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되거나, 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는, 세포.
- [0205] 79. 키메라 항원 수용체(CAR) 분자를 포함하는 세포로서, CAR 분자는
- [0206] (a) 제1 신호 펩티드, 제1 항원결합 도메인(CD22에 결합함), 제1 막관통 도메인, 제1 공동자극 신호전달 도메인, 및 제1 일차 신호전달 도메인을 포함하는 제1 CAR;
- [0207] (b) 제2 신호 펩티드, 제2 항원결합 도메인(CD19에 결합함), 제2 막관통 도메인, 제2 공동자극 도메인, 및 제2 일차 신호전달 도메인을 포함하는 제2 CAR을 포함하고,
- [0208] CAR 분자는 서열번호 19의 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되거나, 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는, 세포.
- [0209] 80. 구현예 72 내지 79 중 어느 한 구현예에 있어서, 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T세포(예: CD3+, CD4+, 또는 CD8+ T세포), 또는 NK세포인 세포.
- [0210] 81. 구현예 72 내지 80 중 어느 한 구현예에 있어서, 인간 세포인 세포.
- [0211] 82. 세포(예를 들어, 면역 이펙터 세포)의 제조 방법으로서, 구현예 70 또는 71의 벡터를 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T세포 또는 NK세포에 형질도입하는 단계를 포함하는 방법.
- [0212] 83. 세포(예를 들어, 면역 이펙터 세포)의 제조 방법으로서, 구현예 1 내지 69 중 어느 한 구현예의 핵산 분자를 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T세포 또는 NK세포 내로 도입하는 단계를 포함하는 방법.
- [0213] 84. RNA-조작 세포의 집단을 생성하는 방법으로서, 시험관내 전사된 RNA 또는 합성 RNA를 세포 내로 도입하는 단계를 포함하되, RNA는 구현예 1 내지 69 중 어느 한 구현예의 핵산 분자를 포함하는, 방법.
- [0214] 85. CD22에 결합하는 제1 항원결합 도메인 및 CD19에 결합하는 제2 항원결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항원결합 도메인.
- [0215] 86. 구현예 85에 있어서, 제1 항원결합 도메인은 제2 항원결합 도메인의 업스트림(예를 들어, N-말단 배향)일 수 있거나, 제1 항원결합 도메인은 제2 항원결합 도메인의 다운스트림(예를 들어, C-말단 배향)일 수 있는, 이중특이적 항원결합 도메인.

- [0216] 87. 구현예 85 또는 86에 있어서, 제1 항원결합 도메인 및 제2 항원결합 도메인 각각은 scFv, 예를 들어 경쇄 가변(VL) 도메인 및 중쇄 가변(VH) 도메인을 포함하는, 이중특이적 항원결합 도메인.
- [0217] 88. 구현예 87에 있어서, VH는 VL의 업스트림 또는 다운스트림일 수 있는, 이중특이적 항원결합 도메인.
- [0218] 89. 구현예 87 또는 88에 있어서, 제1 항원결합 도메인은 제1 VH(VH1) 및 제1 VL(VL1)을 포함하는 scFv를 포함하는, 이중특이적 항원결합 도메인.
- [0219] 90. 구현예 87 내지 89 중 어느 한 구현예에 있어서, 제2 항원결합 도메인은 제2 VH(VH2) 및 제2 VL(VL2)을 포함하는 scFv를 포함하는, 이중특이적 항원결합 도메인.
- [0220] 91. 구현예 87 내지 90 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 항원결합 도메인은 VH1이 VL1의 업스트림에 있도록 배열되는, 이중특이적 항원결합 도메인.
- [0221] 92. 구현예 87 내지 90 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 항원결합 도메인은 VL1이 VH1의 업스트림에 있도록 배열되는, 이중특이적 항원결합 도메인.
- [0222] 93. 구현예 87 내지 92 중 어느 한 구현예에 있어서, 제2 항원결합 도메인은 VH2가 VL2의 업스트림에 있도록 배열되는, 이중특이적 항원결합 도메인.
- [0223] 94. 구현예 87 내지 92 중 어느 한 구현예에 있어서, 제2 항원결합 도메인은 VL2가 VH2의 업스트림에 있도록 배열되는, 이중특이적 항원결합 도메인.
- [0224] 95. 구현예 87 내지 90, 92 또는 93 중 어느 한 구현예에 있어서, 항원결합 도메인은 N-말단에서 C-말단 방향으로 VL1-VH1-VH2-VL2의 배열을 갖는, 이중특이적 항원결합 도메인.
- [0225] 96. 구현예 87 내지 90, 91 또는 93 중 어느 한 구현예에 있어서, 항원결합 도메인은 N-말단에서 C-말단 방향으로 VH1-VL1-VH2-VL2의 배열을 갖는, 이중특이적 항원결합 도메인.
- [0226] 97. 구현예 87 내지 90, 92 또는 94 중 어느 한 구현예에 있어서, 항원결합 도메인은 N-말단에서 C-말단 방향으로 VL1-VH1-VL2-VH2의 배열을 갖는, 이중특이적 항원결합 도메인.
- [0227] 98. 구현예 87 내지 90, 91 또는 94 중 어느 한 구현예에 있어서, 항원결합 도메인은 N-말단에서 C-말단 방향으로 VH1-VL1-VL2-VH2의 배열을 갖는, 이중특이적 항원결합 도메인.
- [0228] 99. 구현예 85 내지 98 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 항원결합 도메인과 제2 항원결합 도메인의 사이에 링커가 배치되는, 이중특이적 항원결합 도메인.
- [0229] 100. 구현예 99에 있어서, 링커는 제1 항원결합 도메인의 scFv와 제2 항원결합 도메인의 scFv 사이에 배치되는, 이중특이적 항원결합 도메인.
- [0230] 101. 구현예 100에 있어서, 링커는
- [0231] 구성체가 VL1-VH1-VH2-VL2의 배열을 갖는 경우 VH1과 VH2 사이에,
- [0232] 구성체가 VH1-VL1-VH2-VL2의 배열을 갖는 경우 VL1과 VH2 사이에,
- [0233] 구성체가 VL1-VH1-VL2-VH2의 배열을 갖는 경우 VH1과 VL2 사이에, 또는
- [0234] 구성체가 VH1-VL1-VL2-VH2의 배열을 갖는 경우 VL1과 VL2 사이에 배치되는, 이중특이적 항원결합 도메인.
- [0235] 102. 구현예 99 내지 101 중 어느 한 구현예에 있어서, 링커는 2개의 scFv의 도메인 간의 미스페어링을 방지할 수 있을 만큼 충분히 긴, 이중특이적 항원결합 도메인.
- [0236] 103. 구현예 99 내지 102 중 어느 한 구현예에 있어서, 링커는 본원에 기재된 링커, 예를 들어 표 1A 또는 4A에 제공된 링커인, 이중특이적 항원결합 도메인.
- [0237] 104. 구현예 99 내지 103 중 어느 한 구현예에 있어서, 링커는 (Gly4-Ser)_n 링커이며, n은 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6인, 이중특이적 항원결합 도메인.
- [0238] 105. 구현예 104에 있어서, n=1인, 예를 들어 링커가 아미노산 서열 Gly4-Ser을 갖는, 이중특이적 항원결합 도메인.
- [0239] 106. 구현예 104에 있어서, n=3인(예를 들어, 서열번호 82), 이중특이적 항원결합 도메인.

- [0240] 107. 구현예 99 내지 103 중 어느 한 구현예에 있어서, 링커는 아미노산 서열 LAEAAAK(예를 들어, 서열번호 80)를 포함하는, 이중특이적 항원결합 도메인.
- [0241] 108. 구현예 99 내지 107 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 항원결합 도메인의 scFv의 VL과 VH 사이에 링커, 예를 들어 본원에 기재된 링커가 배치되는, 이중특이적 항원결합 도메인.
- [0242] 109. 구현예 99 내지 108 중 어느 한 구현예에 있어서, 제2 항원결합 도메인의 scFv의 VL과 VH 사이에 링커, 예를 들어 본원에 기재된 링커가 배치되는, 이중특이적 항원결합 도메인.
- [0243] 110. 구현예 99 내지 109 중 어느 한 구현예에 있어서, 표 1A 또는 4A에 제공된 항원결합 도메인의 아미노산 서열, 예를 들어 서열번호 2, 4, 6, 8, 10, 44, 47, 53, 또는 55 중 어느 하나, 또는 이에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 이중특이적 항원결합 도메인.
- [0244] 112. 구현예 99 내지 109 중 어느 한 구현예에 있어서, 표 1A 또는 4A에 제공된 항원결합 도메인의 뉴클레오티드 서열, 예를 들어 서열번호 1, 3, 5, 7, 9, 43, 45, 46, 52, 54, 56, 또는 57 중 어느 하나, 또는 이에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 이중특이적 항원결합 도메인.
- [0245] 113. 구현예 85 내지 112 중 어느 한 구현예의 이중특이적 항원결합 도메인을 포함하는 이중특이적 키메라 항원 수용체(CAR).
- [0246] 114. 이중특이적 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 핵산 구성체로서, 구현예 85 내지 112 중 어느 한 구현예의 이중특이적 항원결합 도메인을 암호화하는 핵산 구성체.
- [0247] 115. CD22에 결합하는 제1 항원결합 도메인 및 CD19에 결합하는 제2 항원결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항원결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)로서,
- [0248] 막관통 도메인, 공동자극 도메인, 및/또는 일차 신호전달 도메인을 포함하는 CAR.
- [0249] 116. 구현예 115에 있어서, 구현예 86 내지 112 중 어느 한 구현예의 이중특이적 항원결합 도메인을 포함하는 CAR.
- [0250] 117. 구현예 115 또는 116에 있어서,
- [0251] 이중특이적 항원결합 도메인, 막관통 도메인, 및 공동자극 신호전달 도메인;
- [0252] 이중특이적 항원결합 도메인, 막관통 도메인, 및 일차 신호전달 도메인; 또는
- [0253] 이중특이적 항원결합 도메인, 막관통 도메인, 공동자극 신호전달 도메인, 및 제1 일차 신호전달 도메인을 포함하는 CAR.
- [0254] 118. 구현예 115 내지 117 중 어느 한 구현예에 있어서, T세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 사슬, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD123, CD134, CD137, 또는 CD154로부터 선택되는 막관통 도메인을 포함하는 CAR.
- [0255] 119. 구현예 118에 있어서, 이중특이적 항원결합 도메인은 힌지 영역, 예를 들어 본원에 기재된 힌지 영역에 의해 막관통 도메인에 연결되는, CAR.
- [0256] 120. 구현예 115 내지 119 중 어느 한 구현예에 있어서, OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1(CD11a/CD18), ICOS(CD278), 또는 4-1BB(CD137)의 신호전달 도메인을 포함하는 공동자극 도메인을 포함하는 CAR.
- [0257] 121. 구현예 115 내지 120 중 어느 한 구현예에 있어서, 공동자극 도메인은 4-1BB 신호전달 도메인을 포함하는, CAR.
- [0258] 122. 구현예 115 내지 121 중 어느 한 구현예에 있어서, CD3 제타의 신호전달 도메인을 포함하는 일차 신호전달 도메인을 포함하는 CAR.
- [0259] 123. 구현예 115 내지 122 중 어느 한 구현예에 있어서, 표 4A에 제공된 아미노산 서열, 예를 들어 서열번호 2, 4, 6, 8, 10 중 어느 하나, 또는 이에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 CAR.

- [0260] 124. CD22에 결합하는 제1 항원결합 도메인 및 CD19에 결합하는 제2 항원결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항원결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)로서,
- [0261] (i) 제1 및 제2 항원결합 도메인은 각각 scFv이고;
- [0262] (ii) 제2 항원결합 도메인은 제1 항원결합 도메인의 업스트림으로 배향되고;
- [0263] (iii) 제1 항원결합 도메인과 제2 항원결합 도메인 사이에 링커가 배치되고,
- [0264] CAR은 막관통 도메인, 공동자극 도메인, 및 일차 신호전달 도메인을 포함하고,
- [0265] CAR은 서열번호 2의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는, CAR.
- [0266] 125. CD22에 결합하는 제1 항원결합 도메인 및 CD19에 결합하는 제2 항원결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항원결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)로서,
- [0267] (i) 제1 및 제2 항원결합 도메인은 각각 scFv이고;
- [0268] (ii) 제1 항원결합 도메인은 제2 항원결합 도메인의 업스트림으로 배향되고;
- [0269] (iii) 제1 항원결합 도메인과 제2 항원결합 도메인 사이에 링커가 배치되고,
- [0270] CAR은 막관통 도메인, 공동자극 도메인, 및 일차 신호전달 도메인을 포함하고,
- [0271] CAR은 서열번호 4의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는, CAR.
- [0272] 126. CD22에 결합하는 제1 항원결합 도메인 및 CD19에 결합하는 제2 항원결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항원결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)로서,
- [0273] (i) 제1 및 제2 항원결합 도메인은 각각 scFv이고;
- [0274] (ii) 제1 항원결합 도메인은 제2 항원결합 도메인의 업스트림으로 배향되고;
- [0275] (iii) 제1 항원결합 도메인과 제2 항원결합 도메인 사이에 링커가 배치되고,
- [0276] CAR은 막관통 도메인, 공동자극 도메인, 및 일차 신호전달 도메인을 포함하고,
- [0277] CAR은 서열번호 6의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는, CAR.
- [0278] 127. CD22에 결합하는 제1 항원결합 도메인 및 CD19에 결합하는 제2 항원결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항원결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)로서,
- [0279] (i) 제1 및 제2 항원결합 도메인은 각각 scFv이고;
- [0280] (ii) 제1 항원결합 도메인은 제2 항원결합 도메인의 업스트림으로 배향되고;
- [0281] (iii) 제1 항원결합 도메인과 제2 항원결합 도메인 사이에 링커가 배치되고,
- [0282] CAR은 막관통 도메인, 공동자극 도메인, 및 일차 신호전달 도메인을 포함하고,
- [0283] CAR은 서열번호 8의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는, CAR.
- [0284] 128. CD22에 결합하는 제1 항원결합 도메인 및 CD19에 결합하는 제2 항원결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항원결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)로서,
- [0285] (i) 제1 및 제2 항원결합 도메인은 각각 scFv이고;
- [0286] (ii) 제1 항원결합 도메인은 제2 항원결합 도메인의 업스트림으로 배향되고;
- [0287] (iii) 제1 항원결합 도메인과 제2 항원결합 도메인 사이에 링커가 배치되고,
- [0288] CAR은 막관통 도메인, 공동자극 도메인, 및 일차 신호전달 도메인을 포함하고,

- [0289] CAR은 서열번호 10의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는, CAR.
- [0290] 129. 키메라 항원 수용체를 암호화하는 핵산(CAR 핵산)으로서, CAR은
- [0291] CD22에 결합하는 제1 항원결합 도메인 및 CD19에 결합하는 제2 항원결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항원결합 도메인을 포함하고,
- [0292] CAR은 막관통 도메인, 공동자극 도메인, 및/또는 일차 신호전달 도메인을 포함하는, 핵산.
- [0293] 130. 구현예 129에 있어서, 구현예 86 내지 112 중 어느 한 구현예의 이중특이적 항원결합 도메인을 암호화하는 핵산을 포함하는 CAR 핵산.
- [0294] 131. 구현예 129 또는 130에 있어서, CAR은
- [0295] 이중특이적 항원결합 도메인, 막관통 도메인, 및 공동자극 신호전달 도메인;
- [0296] 이중특이적 항원결합 도메인, 막관통 도메인, 및 일차 신호전달 도메인; 또는
- [0297] 이중특이적 항원결합 도메인, 막관통 도메인, 공동자극 신호전달 도메인, 및 제1 일차 신호전달 도메인을 포함하는, CAR 핵산.
- [0298] 132. 구현예 129 내지 131 중 어느 한 구현예에 있어서, CAR은 T세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 사슬, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD123, CD134, CD137, 또는 CD154로부터 선택되는 막관통 도메인을 포함하는, CAR 핵산.
- [0299] 133. 구현예 132에 있어서, 이중특이적 항원결합 도메인은 힌지 영역, 예를 들어 본원에 기재된 힌지 영역에 의해 막관통 도메인에 연결되는, CAR 핵산.
- [0300] 134. 구현예 129 내지 133 중 어느 한 구현예에 있어서, CAR은 OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1(CD11a/CD18), ICOS(CD278), 또는 4-1BB(CD137)의 신호전달 도메인을 포함하는 공동자극 도메인을 포함하는, CAR 핵산.
- [0301] 135. 구현예 134에 있어서, 공동자극 도메인은 4-1BB 신호전달 도메인을 포함하는, CAR 핵산.
- [0302] 136. 구현예 129 내지 135 중 어느 한 구현예에 있어서, CAR은 CD3 제타의 신호전달 도메인을 포함하는 일차 신호전달 도메인을 포함하는, CAR 핵산.
- [0303] 137. 구현예 129 내지 136 중 어느 한 구현예에 있어서, 표 4A에 제공된 뉴클레오티드 서열, 예를 들어 서열번호 1, 3, 5, 7, 또는 9 중 어느 하나, 또는 이에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 CAR 핵산.
- [0304] 138. 키메라 항원 수용체를 암호화하는 핵산(CAR 핵산)으로서, CAR은 CD22에 결합하는 제1 항원결합 도메인 및 CD19에 결합하는 제2 항원결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항원결합 도메인을 포함하고,
- [0305] (i) 제1 및 제2 항원결합 도메인은 각각 scFv이고;
- [0306] (ii) 제2 항원결합 도메인은 제1 항원결합 도메인의 업스트림으로 배향되고;
- [0307] (iii) 제1 항원결합 도메인과 제2 항원결합 도메인 사이에 링커가 배치되고,
- [0308] CAR은 막관통 도메인, 공동자극 도메인, 및 일차 신호전달 도메인을 포함하고,
- [0309] CAR은 서열번호 2의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는, CAR 핵산.
- [0310] 139. 키메라 항원 수용체를 암호화하는 핵산(CAR 핵산)으로서, CAR은 CD22에 결합하는 제1 항원결합 도메인 및 CD19에 결합하는 제2 항원결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항원결합 도메인을 포함하고,
- [0311] (i) 제1 및 제2 항원결합 도메인은 각각 scFv이고;
- [0312] (ii) 제1 항원결합 도메인은 제2 항원결합 도메인의 업스트림으로 배향되고;
- [0313] (iii) 제1 항원결합 도메인과 제2 항원결합 도메인 사이에 링커가 배치되고,

- [0314] CAR은 막관통 도메인, 공동자극 도메인, 및 일차 신호전달 도메인을 포함하고,
- [0315] CAR은 서열번호 4의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 80%, 85%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는, CAR 핵산.
- [0316] 140. 키메라 항원 수용체를 암호화하는 핵산(CAR 핵산)으로서, CAR은 CD22에 결합하는 제1 항원결합 도메인 및 CD19에 결합하는 제2 항원결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항원결합 도메인을 포함하고,
- [0317] (i) 제1 및 제2 항원결합 도메인은 각각 scFv이고;
- [0318] (ii) 제1 항원결합 도메인은 제2 항원결합 도메인의 업스트림으로 배향되고;
- [0319] (iii) 제1 항원결합 도메인과 제2 항원결합 도메인 사이에 링커가 배치되고,
- [0320] CAR은 막관통 도메인, 공동자극 도메인, 및 일차 신호전달 도메인을 포함하고,
- [0321] CAR은 서열번호 6의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는, CAR 핵산.
- [0322] 141. 키메라 항원 수용체를 암호화하는 핵산(CAR 핵산)으로서, CAR은 CD22에 결합하는 제1 항원결합 도메인 및 CD19에 결합하는 제2 항원결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항원결합 도메인을 포함하고,
- [0323] (i) 제1 및 제2 항원결합 도메인은 각각 scFv이고;
- [0324] (ii) 제1 항원결합 도메인은 제2 항원결합 도메인의 업스트림으로 배향되고;
- [0325] (iii) 제1 항원결합 도메인과 제2 항원결합 도메인 사이에 링커가 배치되고,
- [0326] CAR은 막관통 도메인, 공동자극 도메인, 및 일차 신호전달 도메인을 포함하고,
- [0327] CAR은 서열번호 8의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는, CAR 핵산.
- [0328] 142. 키메라 항원 수용체를 암호화하는 핵산(CAR 핵산)으로서, CAR은 CD22에 결합하는 제1 항원결합 도메인 및 CD19에 결합하는 제2 항원결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항원결합 도메인을 포함하고,
- [0329] (i) 제1 및 제2 항원결합 도메인은 각각 scFv이고;
- [0330] (ii) 제1 항원결합 도메인은 제2 항원결합 도메인의 업스트림으로 배향되고;
- [0331] (iii) 제1 항원결합 도메인과 제2 항원결합 도메인 사이에 링커가 배치되고,
- [0332] CAR은 막관통 도메인, 공동자극 도메인, 및 일차 신호전달 도메인을 포함하고,
- [0333] CAR은 서열번호 10의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는, CAR 핵산.
- [0334] 143. 구현예 85 내지 112 중 어느 한 구현예의 이중특이적 항원결합 도메인, 구현예 113 또는 115 내지 128 중 어느 한 구현예의 CAR, 또는 구현예 114 또는 129 내지 142 중 어느 한 구현예의 CAR 핵산을 포함하는 벡터.
- [0335] 144. 구현예 85 내지 112 중 어느 한 구현예의 이중특이적 항원결합 도메인, 구현예 113 또는 115 내지 128 중 어느 한 구현예의 CAR, 구현예 114 또는 129 내지 142 중 어느 한 구현예의 CAR 핵산, 또는 구현예 143의 벡터를 포함하는 세포(예를 들어, 면역 이펙터 세포).
- [0336] 145. 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 세포로서, CAR은
- [0337] CD22에 결합하는 제1 항원결합 도메인 및 CD19에 결합하는 제2 항원결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항원결합 도메인을 포함하고,
- [0338] CAR은 막관통 도메인, 공동자극 도메인, 및/또는 일차 신호전달 도메인을 포함하는, 세포.
- [0339] 146. 구현예 145에 있어서, 구현예 116 내지 123 중 어느 한 구현예의 CAR을 포함하는 세포.
- [0340] 147. 세포(예를 들어, 면역 이펙터 세포)의 제조 방법으로서,
- [0341] 구현예 143의 벡터를 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T세포 또는 NK세포에 형질도입하는 단계; 또는

- [0342] 구현예 129 내지 142 중 어느 한 구현예의 CAR 핵산 분자를 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T세포 또는 NK세포 내로 도입하는 단계를 포함하는 방법.
- [0343] 148. 구현예 1 내지 69 중 어느 한 구현예의 CAR 분자를 암호화하는 핵산, 구현예 85 내지 112 중 어느 한 구현예의 이중특이적 항원결합 도메인, 구현예 113 또는 115 내지 128 중 어느 한 구현예의 CAR, 또는 구현예 114 또는 129 내지 142 중 어느 한 구현예의 CAR 핵산을 포함하고, 임의로 부형제, 담체, 희석제, 및/또는 안정화제를 포함하는 제약 조성물.
- [0344] 149. 항종양 면역을 제공하는 방법으로서, 이를 필요로 하는 대상체에게 구현예 1 내지 69 중 어느 한 구현예의 CAR 분자를 암호화하는 핵산, 구현예 85 내지 112 중 어느 한 구현예의 이중특이적 항원결합 도메인, 구현예 113 또는 115 내지 128 중 어느 한 구현예의 CAR, 또는 구현예 114 또는 129 내지 142 중 어느 한 구현예의 CAR 핵산을 포함하는, 예를 들어 발현하는 세포, 예를 들어 면역 이펙터 세포 집단의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0345] 150. 대상체에게 항종양 면역을 제공하는 방법에 사용하기 위한, 구현예 1 내지 69 중 어느 한 구현예의 CAR 분자를 암호화하는 핵산, 구현예 85 내지 112 중 어느 한 구현예의 이중특이적 항원결합 도메인, 구현예 113 또는 115 내지 128 중 어느 한 구현예의 CAR, 또는 구현예 114 또는 129 내지 142 중 어느 한 구현예의 CAR 핵산을 포함하는, 예를 들어 발현하는 세포, 예를 들어 면역 이펙터 세포 집단.
- [0346] 151. 구현예 149의 방법 또는 구현예 150의 용도에 있어서, 세포는 T세포 또는 NK세포인, 방법 또는 용도.
- [0347] 152. 구현예 149 또는 151의 방법 또는 구현예 150 또는 151의 용도에 있어서, 세포는 자가 세포 또는 동종이체 세포인, 방법 또는 용도.
- [0348] 153. 구현예 149의 방법 또는 구현예 150의 용도에 있어서, 대상체는 인간인, 방법 또는 용도.
- [0349] 154. 항원(예를 들어, CD19 및/또는 CD22)과 관련된 질환이 있는 대상체를 치료하는 방법으로서, 이를 필요로 하는 대상체에게 구현예 1 내지 69 중 어느 한 구현예의 CAR 분자를 암호화하는 핵산, 구현예 85 내지 112 중 어느 한 구현예의 이중특이적 항원결합 도메인, 구현예 113 또는 115 내지 128 중 어느 한 구현예의 CAR, 또는 구현예 114 또는 129 내지 142 중 어느 한 구현예의 CAR 핵산을 포함하는, 예를 들어 발현하는 세포, 예를 들어 면역 이펙터 세포 집단의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0350] 155. 항원(예를 들어, CD19 및/또는 CD22)과 관련된 질환이 있는 대상체를 치료하는 방법에 사용하기 위한, 구현예 1 내지 69 중 어느 한 구현예의 CAR 분자를 암호화하는 핵산, 구현예 85 내지 112 중 어느 한 구현예의 이중특이적 항원결합 도메인, 구현예 113 또는 115 내지 128 중 어느 한 구현예의 CAR, 또는 구현예 114 또는 129 내지 142 중 어느 한 구현예의 CAR 핵산을 포함하는, 예를 들어 발현하는 세포, 예를 들어 면역 이펙터 세포 집단.
- [0351] 156. 구현예 154의 방법 또는 구현예 155의 용도에 있어서, 세포는 T세포 또는 NK세포인, 방법 또는 용도.
- [0352] 157. 구현예 154 또는 155의 방법 또는 구현예 154 또는 155의 용도에 있어서, 세포는 자가 세포 또는 동종이체 세포인, 방법 또는 용도.
- [0353] 158. 구현예 154의 방법 또는 구현예 155의 용도에 있어서, 대상체는 인간인, 방법 또는 용도.
- [0354] 159. 구현예 154 또는 155 내지 158 중 어느 한 구현예의 방법 또는 구현예 155 내지 158 중 어느 한 구현예의 용도에 있어서, CD19 및/또는 CD22와 관련된 질환은 증식성 질환, 예를 들어 암 또는 악성종양, 전암성 병태, 예를 들어 골수이형성증, 골수이형성 증후군 또는 전백혈병, 또는 CD19 및/또는 CD22의 발현과 관련된 비암성 관련 적응증으로부터 선택되는, 방법 또는 용도.
- [0355] 160. 구현예 159에 있어서, 질환은 암, 예를 들어 혈액암인, 방법 또는 용도.
- [0356] 161. 구현예 154 또는 155 내지 160 중 어느 한 구현예의 방법 또는 구현예 155 내지 160 중 어느 한 구현예의 용도에 있어서, 질환은 B세포 악성종양인, 방법 또는 용도.
- [0357] 162. 구현예 160 또는 161의 방법 또는 용도에 있어서, 혈액암은 급성 골수성 백혈병(AML), B세포 급성 림프모구성 백혈병(BALL), 소림프구성 백혈병(SLL), 급성 림프모구성 백혈병(ALL), 만성 골수성 백혈병(CML), 만성 림프구성 백혈병(PLL), 맨틀세포 림프종(MCL), B세포 전림프구성 백혈병, 모구성 형질세포양 수지상 세포 신생물, 버킷 림프종, 확산성 거대 B세포 림프종(DLBCL), 여포성 림프종, 모발상 세포 백혈병, 소세포-림프종, 대세포-

여포성 림프종, 악성 림프증식성 병태, MALT 림프종, 변연부 림프종, 다발성 골수종, 골수이형성증 또는 골수이형성 증후군, 골수증식성 신생물, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 형질모세포성 림프종, 형질세포양 수지상 세포 신생물, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 전백혈병, 또는 이의 조합으로부터 선택되는, 방법 또는 용도.

[0358] 163. 구현예 154 또는 155 내지 162 중 어느 한 구현예의 방법 또는 구현예 155 내지 162 중 어느 한 구현예의 용도에 있어서,

[0359] CAR 분자를 발현하는 세포의 효능을 증가시키는 제제;

[0360] CAR 분자를 발현하는 세포의 투여와 관련된 하나 이상의 부작용을 개선하는 제제; 또는

[0361] CD19 및/또는 CD22와 관련된 질환을 치료하는 제제를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법 또는 용도.

도면의 간단한 설명

[0362] **도 1a** 내지 **도 1c**는 본원에 개시된 이중 CAR 구성체의 개략도이다. 이중 CAR 구성체는 CD22 CAR 및 CD19 CAR을 포함한다. **도 1a**는 N 말단에서 C 말단 방향으로 CD22 CAR에 이어 CD19 CAR을 포함하는 이중 CAR 구성체를 보여준다. **도 1b**는 N 말단에서 C 말단 방향으로 CD22 CAR에 이어 CD19 CAR을 포함하는 다른 이중 CAR 구성체를 보여준다. **도 1c**는 N 말단에서 C 말단 방향으로 CD19 CAR에 이어 CD22 CAR을 포함하는 이중 CAR 구성체를 보여준다.

도 2는 본 발명의 탠덤 CD19/CD22 CAR 구성체의 개략도이다. 각각의 탠덤 CAR은 CD19 항원결합 도메인 및 CD22 항원결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항원결합 도메인을 포함한다.

도 3a 내지 **도 3d**는 CD19 및 CD22를 표적화하는 탠덤 및 이중 CAR T세포의 시험관내 활성을 보여준다. **도 3a**는 CD22-음성 ALL 세포주(CD22KO Na1m6-Luc)에 대한 다양한 구성체의 세포용해 활성(세포 사멸)을 나타내는 그래프이다. **도 3b**는 CD19-음성 ALL 세포주(CD19KO Na1m6-Luc)에 대한 다양한 구성체의 세포용해 활성(세포 사멸)을 나타내는 그래프이다. **도 3c** 및 **도 3d**는 CD22 및/또는 CD19-발현 표적 세포에 대한 반응으로서의 다양한 CAR 구성체에 의한 IFN γ 사이토카인 생성을 보여주는 그래프이다.

도 4a 및 **도 4b**는 B세포 급성 림프모구성 백혈병 이종이식 재발 모델에서 CD19 및 CD22를 표적화하는 탠덤 및 이중 CAR T세포의 생체내 활성을 보여준다. **도 4a**는 모든 처치군에 대한 총 플럭스(평균 생체발광)를 보여주는 그래프이다. **도 4b**는 다양한 CAR-T세포의 증식 동역학을 나타내는 그래프이다.

도 5a 내지 **도 5c**는 활성화 프로세스에 의해 제조된 CD19 및 CD22를 표적화하는 CAR19+, CAR22+, 및 이중 양성 CAR T세포의 백분율에 대한 유세포 분석을 보여준다. **도 5a** 및 **도 5b**는 각각 채취 72시간 후 및 채취 144시간 후의 소규모 제조 프로세스의 결과를 나타낸다. **도 5c**는 대규모 제조 프로세스의 결과를 나타낸다.

도 6a 및 **도 6b**는 B세포 급성 림프모구성 백혈병 이종이식 모델에서 CD19 및/또는 CD22를 표적화하는 단일 및 이중 CAR T세포의 생체내 활성을 보여준다. **도 6a**는 모든 처치군에 대한 총 플럭스(평균 생체발광)를 보여주는 그래프이다. **도 6b**는 0.3×10^6 ($0.3e6$) 용량군의 직접적인 비교를 보여준다. **도 6c**는 혈액 20 μ l당 CAR+ 세포의 수로 나타낸 다양한 CAR-T세포의 증식 동역학을 나타내는 그래프이다(CAR-T세포의 수, nCARtot).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0363] 정의

[0364] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자가 통상적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다.

[0365] 단수 명사는 하나 이상(예를 들어, 적어도 하나)의 해당 대상물을 나타낸다. 예를 들어, "요소"는 하나 이상의 요소를 의미한다.

[0366] 측정가능한 값, 예컨대 양, 기간 등을 지칭할 때, 용어 "약"은, 명시된 값으로부터 $\pm 20\%$, 또는 일부 경우에 $\pm 10\%$, 또는 일부 경우에 $\pm 5\%$, 또는 일부 경우에 $\pm 1\%$, 또는 일부 경우에 $\pm 0.1\%$ 의 편차를 포괄하는 의미이며, 이러한 편차는 개시된 방법의 수행에 적절하다.

[0367] 본원에서 사용되는 용어 "제약상 허용되는 염"은 타당한 의학적 판단의 범위 내에서, 과도한 독성, 자극, 알려지 반응 등 없이 대상체의 조직과 접촉시켜 사용하기에 적합하며 합리적 이익/위험 비에 부합하는 염을 지칭한다. 제약상 허용되는 염은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, Berge 등은 문헌[J. Pharmaceutical Sciences

(1977) 66:1-19]에 제약상 허용되는 염을 상세히 기재하고 있다.

[0368] 용어 "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR" 또는 "CAR 분자"는 면역 이펙터 세포 내에 존재할 때 표적 세포(일반적으로, 암세포)에 대한 특이성 및 세포내 신호 생성을 세포에 제공하는 폴리펩티드(가장 단순한 구현예에서 일반적으로 2개의 폴리펩티드)의 세트를 지칭한다. 일부 구현예에서, CAR은 적어도 세포의 항원결합 도메인, 막관통 도메인, 및 하기 정의된 바와 같은 자극 분자 및/또는 공동자극 분자로부터 유래된 기능적 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 신호전달 도메인(본원에서 "세포내 신호전달 도메인"으로도 지칭됨)을 포함한다. 일부 양태에서, 폴리펩티드의 세트는 서로 인접해 있고, 예를 들어 동일한 폴리펩티드 사슬에 있고, 예를 들어 키메라 융합 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드의 세트는 서로 인접하지 않고, 예를 들어 서로 다른 폴리펩티드 사슬에 있다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드의 세트는 이량체화 분자의 존재시 폴리펩티드를 서로 커플링시킬 수 있는, 예를 들어 항원결합 도메인을 세포내 신호전달 도메인에 커플링시킬 수 있는 이량체화 스위치를 포함한다. 일 양태에서, 자극 분자는 T세포 수용체 복합체와 관련된 제타 사슬이다. 일 양태에서, 세포질 신호전달 도메인은 하기 정의된 바와 같은 적어도 하나의 공동자극 분자로부터 유래된 하나 이상의 기능적 신호전달 도메인을 추가로 포함한다. 일 양태에서, 공동자극 분자는 본원에 기재된 공동자극 분자, 예를 들어 4-1BB(즉, CD137), CD27, 및/또는 CD28로부터 선택된다. 일 양태에서, CAR은 세포의 항원결합 도메인, 막관통 도메인, 및 자극 분자로부터 유래된 기능적 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 융합 단백질을 포함한다. 일 양태에서, CAR은 세포의 항원결합 도메인, 막관통 도메인, 및 공동자극 분자로부터 유래된 기능적 신호전달 도메인 및 자극 분자로부터 유래된 기능적 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 융합 단백질을 포함한다. 일 양태에서, CAR은 세포의 항원결합 도메인, 막관통 도메인, 및 하나 이상의 공동자극 분자로부터 유래된 2개의 기능적 신호전달 도메인 및 자극 분자로부터 유래된 기능적 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 융합 단백질을 포함한다. 일 양태에서, CAR은 세포의 항원결합 도메인, 막관통 도메인, 및 하나 이상의 공동자극 분자로부터 유래된 적어도 2개의 기능적 신호전달 도메인 및 자극 분자로부터 유래된 기능적 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 융합 단백질을 포함한다. 일 양태에서, CAR은 CAR 융합 단백질의 아미노-말단(N-ter)에 임의적 리더 서열을 포함한다. 일 양태에서, CAR은 세포의 항원결합 도메인의 N-말단에 리더 서열을 추가로 포함하고, 리더 서열은 임의로 세포 프로세싱 및 CAR의 세포막으로의 국제화 중에 항원결합 도메인(예를 들어, scFv)으로부터 절단된다.

[0369] 용어 "신호전달 도메인"은 제2 메신저를 생성하거나 또는 이러한 메신저에 반응하여 이펙터로서 기능함으로써 규정된 신호전달 경로를 통해 세포 활성을 조절하도록 세포 내에서 정보를 전달함으로써 작용하는 단백질의 기능적 부분을 지칭한다.

[0370] 본원에서 사용되는 용어 "CD19"는 백혈병 전구세포에서 검출가능한 항원 결정기인 분화 클러스터 19 단백질을 지칭한다. 인간 및 뮤린 아미노산 및 핵산 서열은 GenBank, UniProt, 및 Swiss-Prot와 같은 공개 데이터베이스에서 찾을 수 있다. 예를 들어, 인간 CD19의 아미노산 서열은 UniProt/Swiss-Prot 수탁번호 P15391로서 찾을 수 있고, 인간 CD19를 암호화하는 핵산 서열은 수탁번호 NM_001178098에서 찾을 수 있다. CD19는 예를 들어 급성 림프모구성 백혈병, 만성 림프구 백혈병, 및 비호지킨 림프종을 비롯한 대부분의 B 계통 암에서 발현된다. CD19를 발현하는 다른 세포가 하기 "CD19의 발현과 관련된 질환"의 정의에 제공된다. 이는 또한 B세포 전구세포의 초기 마커이다. 예를 들어, 문헌[Nicholson et al. Mol. Immun. 34 (16-17): 1157-1165 (1997)] 참조. 일 양태에서, CART의 항원결합 부분은 CD19 단백질의 세포의 도메인 내의 항원을 인식하고 이에 결합한다. 일 양태에서, CD19 단백질은 암세포에서 발현된다. 본원에서 사용되는 "CD19"는 전장 야생형 CD19의 돌연변이, 예를 들어 점 돌연변이, 단편, 삽입, 결실, 및 스플라이스 변이체를 포함하는 단백질을 포함한다.

[0371] 본원에서 사용되는 용어 "CD22"는 백혈병 전구세포에서 검출가능한 것으로 알려진 항원 결정기를 지칭한다. 인간 및 뮤린 아미노산 및 핵산 서열은 GenBank, UniProt, 및 Swiss-Prot와 같은 공개 데이터베이스에서 찾을 수 있다. 예를 들어, 아이소폼 1 내지 5 인간 CD22의 아미노산 서열은 각각 수탁번호 NP_001762.2, NP_001172028.1, NP_001172029.1, NP_001172030.1, 및 NP_001265346.1에서 찾을 수 있고, 인간 CD22의 변이체 1 내지 5를 암호화하는 핵산 서열은 각각 수탁번호 NM_001771.3, NM_001185099.1, NM_001185100.1, NM_001185101.1, 및 NM_001278417.1에서 찾을 수 있다. 일 양태에서, CAR의 항원결합 부분은 CD22 단백질의 세포 외 도메인 내의 항원을 인식하고 이에 결합한다. 일 양태에서, CD22 단백질은 암세포에서 발현된다. 본원에서 사용되는 "CD22"는 전장 야생형 CD22의 돌연변이, 예를 들어 점 돌연변이, 단편, 삽입, 결실, 및 스플라이스 변이체를 포함하는 단백질을 포함한다.

[0372] 본원에서 사용되는 용어 "결합 도메인"(예를 들어, "CD22 결합 도메인")은 적어도 하나의 면역글로불린 가변 도

메인 서열을 포함하는 단백질, 예를 들어 면역글로불린 사슬 또는 이의 단편을 지칭한다. 용어 "결합 도메인" (본원에서 "항체 분자"로도 지칭됨)은 항체 및 항체 단편을 포함한다. 일 구현예에서, 항체 분자는 다중특이적 항체 분자로서, 예를 들어 복수의 면역글로불린 가변 도메인 서열을 포함하며, 복수의 면역글로불린 가변 도메인 서열 중 제1 면역글로불린 가변 도메인 서열은 제1 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖고, 복수의 면역글로불린 가변 도메인 서열 중 제2 면역글로불린 가변 도메인 서열은 제2 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는다. 일 구현예에서, 다중특이적 항체 분자는 이중특이적 항체 분자이다. 이중특이적 항체는 2개 이하의 항원에 대해 특이성을 갖는다. 이중특이적 항체 분자는 제1 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 제1 면역글로불린 가변 도메인 서열, 및 제2 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 제2 면역글로불린 가변 도메인 서열을 특징으로 한다.

[0373] 용어 "항체 단편"은 항원의 에피토프와 (예를 들어, 결합, 입체 장애, 안정화/불안정화, 공간 분포에 의해) 특이적으로 상호작용하는 능력을 보유하는 항체의 적어도 일부분을 지칭한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 단편, scFv 항체 단편, 이황화 연결된 Fv(sdFv), VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편, 선형 항체, 단일 도메인 항체, 예컨대 sdAb(VL 또는 VH), 낙타류 VH8 도메인, 린지 영역에서 이황화 가교체에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편과 같은 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체, 및 항체의 단리된 CDR 또는 다른 에피토프 결합 단편을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 항원결합 단편은 또한 단일 도메인 항체, 맥시바디, 미니바디, 나노바디, 인트라바디, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, v-NAR, 및 비스-scFv 내에 통합될 수 있다(예를 들어, 문헌[Hollinger and Hudson, Nature Biotechnology 23:1126-1136, 2005] 참조). 항원결합 단편은 또한 피브로넥틴 III형(Fn3)과 같은 폴리펩티드를 기반으로 한 스캐폴드에 그래프팅될 수 있다(피브로넥틴 폴리펩티드 미니바디를 기술한 미국 특허 6,703,199호 참조). 용어 "scFv"는 경쇄의 가변 영역을 포함하는 적어도 하나의 항체 단편 및 중쇄의 가변 영역을 포함하는 적어도 하나의 항체 단편을 포함하는 융합 단백질을 지칭하며, 여기서 경쇄 및 중쇄 가변 영역은 예를 들어 합성 링커, 예를 들어 짧은 유연성 폴리펩티드 링커를 통해 인접하여 연결되고, 단쇄 폴리펩티드로서 발현될 수 있고, scFv는 그것이 유래된 온전한 항체의 특이성을 유지한다. 명시되지 않는 한, 본원에서 사용되는 scFv는 예를 들어 폴리펩티드의 N-말단 및 C-말단과 관련하여, VL 및 VH 가변 영역을 어느 순서로든 가질 수 있고, scFv는 VL-링커-VH 또는 VH-링커-VL을 포함할 수 있다.

[0374] 본원에서 사용되는 용어 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"은 항원 특이성 및 결합 친화성을 부여하는 항체 가변 영역 내의 아미노산의 서열을 지칭한다. 주어진 CDR의 정확한 아미노산 서열 경계는 문헌[Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD("Kabat" 넘버링 체계), Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273, 927-948("Chothia" 넘버링 체계) 및 ImMunoGenTics (IMGT) 넘버링(Lefranc, M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M.-P. et al., Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)("IMGT" 넘버링 체계)]에 기재된 것들을 비롯하여, 다수의 잘 알려진 체계 중 임의의 것을 이용해 결정될 수 있다. 예를 들어, 고전적인 형식의 경우, Kabat 하에서, 중쇄 가변 도메인(VH) 내의 CDR 아미노산 잔기는 31~35(HCDR1), 50~65(HCDR2), 및 95~102(HCDR3)로 넘버링되고, 경쇄 가변 도메인(VL) 내의 CDR 아미노산 잔기는 24~34(LCDR1), 50~56(LCDR2), 및 89~97(LCDR3)로 넘버링된다. Chothia 하에서, VH 내의 CDR 아미노산은 26~32(HCDR1), 52~56(HCDR2), 및 95~102(HCDR3)로 넘버링되고, VL 내의 아미노산 잔기는 26~32(LCDR1), 50~52(LCDR2), 및 91~96(LCDR3)으로 넘버링된다. Kabat 및 Chothia 둘 모두의 CDR 정의의 조합에 의하면, CDR은 인간 VH 내의 아미노산 잔기 26~35(HCDR1), 50~65(HCDR2), 및 95~102(HCDR3) 및 인간 VL 내의 아미노산 잔기 24~34(LCDR1), 50~56(LCDR2), 및 89~97(LCDR3)로 이루어진다. IMGT 하에서, VH 내의 CDR 아미노산 잔기는 대략 26~35(CDR1), 51~57(CDR2), 및 93~102(CDR3)로 넘버링되고, VL 내의 CDR 아미노산 잔기는 대략 27~32(CDR1), 50~52(CDR2), 및 89~97(CDR3)("IMGT"에 따른 넘버링)로 넘버링된다. IMGT에 하에서, 항체의 CDR 영역은 IMGT/DomainGap Align 프로그램을 사용하여 결정될 수 있다.

[0375] 항체 또는 이의 항체 단편을 포함하는 본 발명의 CAR의 부분은 다양한 형태로 존재할 수 있으며, 항원결합 도메인은 예를 들어 단일 도메인 항체 단편(sdAb), 단쇄 항체(scFv), 인간화 항체, 또는 이중특이적 항체를 포함하는 인접 폴리펩티드 사슬의 부분으로서 발현된다(Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426). 일 양태에서, 본 발명의 CAR 조성물의 항원결합 도메인은 항체 단편을 포함한다. 추가의 양태에서, CAR은 scFv를 포함하는 항체 단편을 포함한다.

[0376] 용어 "항체 중쇄"는 자연적으로 발생하는 형태로 항체 분자에 존재하는 두 가지 유형의 폴리펩티드 사슬 중 더

큰 것을 지칭하며 일반적으로 항체가 속하는 클래스를 결정한다.

- [0377] 용어 "항체 경쇄"는 자연적으로 발생하는 형태로 항체 분자에 존재하는 두 가지 유형의 폴리펩티드 사슬 중 더 작은 것을 지칭한다. 카파(κ) 및 람다(λ) 경쇄는 2가지의 주요 항체 경쇄 동형을 지칭한다.
- [0378] 용어 "재조합 항체"는 재조합 DNA 기술을 사용하여 생성된 항체, 예를 들어 박테리오파지 또는 효모 발현 시스템에 의해 발현된 항체를 지칭한다. 이 용어는 또한 항체를 암호화하는 DNA 분자의 합성에 의해 생성된 항체로서, DNA 분자가 항체 단백질, 또는 항체를 특정하는 아미노산 서열을 발현하며, DNA 또는 아미노산 서열이 당업계에서 이용가능한 잘 알려진 재조합 DNA 또는 아미노산 서열 기술을 사용하여 수득된, 항체를 의미하는 것으로 해석되어야 한다.
- [0379] 용어 "항원" 또는 "Ag"는 면역 반응을 유발하는 분자를 지칭한다. 이러한 면역 반응은 항체 생성, 또는 특정 면역세포의 활성화, 또는 둘 다를 수반할 수 있다. 당업자는 사실상 모든 단백질 또는 펩티드를 포함하는 임의의 마크로분자가 항원으로서의 역할을 할 수 있음을 이해할 것이다. 또한, 항원은 재조합 또는 게놈 DNA로부터 유래될 수 있다. 따라서, 당업자는 면역 반응을 유도하는 단백질을 암호화하는 핵산 서열 또는 부분 핵산 서열을 포함하는 임의의 DNA가, 본원에서 사용되는 용어 "항원"을 암호화함을 이해할 것이다. 또한, 당업자는 항원이 유전자의 전장 핵산 서열에 의해서만 암호화될 필요는 없음을 이해할 것이다. 본 발명은 1개 초과 유전자의 부분적인 핵산 서열의 사용을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니고, 이들 핵산 서열은 목적하는 면역 반응을 유도하는 폴리펩티드를 암호화하도록 다양한 조합으로 배열되는 것이 분명하다. 또한, 당업자는 항원이 "유전자"에 의해 암호화될 필요가 전혀 없음을 이해할 것이다. 항원은 생성되거나, 합성되거나, 또는 생물학적 샘플로부터 유래될 수 있거나, 또는 폴리펩티드 이외의 마크로분자일 수 있음이 분명하다. 이러한 생물학적 샘플은 조직 샘플, 종양 샘플, 세포 또는 다른 생물학적 성분을 갖는 유체를 포함할 수 있으나 이에 한정되지 않는다.
- [0380] 용어 "항암 효과"는, 예를 들어 종양 부피의 감소, 암세포 수의 감소, 전이 수의 감소, 기대 수명의 증가, 암세포 증식의 감소, 암세포 생존의 감소, 또는 암성 병태와 관련된 다양한 생리학적 증상의 개선을 포함하지만 이에 한정되지 않는, 다양한 수단에 의해 나타날 수 있는 생물학적 효과를 지칭한다. "항암 효과"는 또한 먼저 암 발생의 예방에서의 본 발명의 펩티드, 폴리뉴클레오티드, 세포 및 항체의 능력에 의해 나타날 수 있다. 용어 "항종양 효과"는, 예를 들어 종양 부피의 감소, 종양세포 수의 감소, 종양세포 증식의 감소, 또는 종양세포 생존의 감소를 포함하지만 이에 한정되지 않는, 다양한 수단에 의해 나타날 수 있는 생물학적 효과를 지칭한다. 용어 "자가"는 이후에 개체에게 재도입될, 동일한 개체로부터 유래된 임의의 물질을 지칭한다.
- [0381] 용어 "동종이계"는 물질이 도입되는 개체와 동일한 종의 상이한 동물로부터 유래된 임의의 물질을 지칭한다. 하나 이상의 유전자좌에서의 유전자가 동일하지 않은 경우 둘 이상의 개체는 서로 동종이계라 한다. 일부 양태에서, 동일한 종의 개체로부터의 동종이계 물질은 항원과 관련하여 상호작용하기에 유전적으로 충분히 다를 수 있다.
- [0382] 용어 "이종"은 상이한 종의 동물로부터 유래된 이식편을 지칭한다.
- [0383] 용어 "조합"은 하나의 투약 단위 형태의 고정 조합, 또는 본 발명의 화합물과 조합 파트너(예를 들어, "치료제" 또는 "공동 제제"라고도 하는 아래 설명된 다른 약물)가 독립적으로 동시에 또는 시간 간격, 특히 조합 파트너가 협동 효과, 예를 들어 시너지 효과를 나타낼 수 있는 시간 간격 내에서 개별적으로 투여될 수 있는 병용투여를 지칭한다. 각각의 구성요소는 키트로 또는 개별적으로 패키징될 수 있다. 구성요소(예: 분말 또는 액체) 중 하나 또는 모두는 투여 전에, 목적하는 용량으로 희석되거나 재구성될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "공동 투여" 또는 "병용투여" 등은 선택된 조합 파트너를 이를 필요로 하는 단일 대상체(예를 들어, 환자)에게 투여하는 것을 포함하는 것을 의미하며, 제제가 반드시 동일한 투여 경로로 또는 동시에 투여될 필요는 없는 치료 요법을 포함하는 것으로 의도된다. 본원에서 사용되는 용어 "제약 조합물"은 둘 이상의 치료제의 혼합 또는 조합으로부터 생성된 제품을 의미하며, 치료제의 고정 조합물 및 비고정 조합물을 모두 포함한다. 용어 "고정 조합물"은 치료제, 예를 들어 본 발명의 화합물 및 조합 파트너가 둘 다 단일 개체 또는 투약의 형태로 동시에 환자에게 투여됨을 의미한다. 용어 "비고정 조합물"은 치료제, 예를 들어 본 발명의 화합물 및 조합 파트너가 둘 다 동시에, 병행적으로, 또는 특정 시간 제한 없이 순차적으로 개별 개체로서 환자에게 투여되고, 이러한 투여가 환자의 신체에서 두 화합물의 치료적 유효 수준을 제공함을 의미한다. 후자는 각테일 요법, 예를 들어 3개 이상의 치료제의 투여에도 적용된다.
- [0384] 용어 "암"은 비정상 세포의 급속하고 제어되지 않은 성장을 특징으로 하는 질환을 지칭한다. 암세포는 국소적으

로 또는 혈류 및 림프계를 통해 신체의 다른 부분으로 확산될 수 있다. 다양한 암의 예는 본원에 기재되어 있으며, 유방암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 피부암, 췌장암, 대장암, 신장암, 간암, 뇌암, 림프종, 백혈병, 폐암 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 용어 "종양" 및 "암"은 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 예를 들어 두 용어는 모두 고형 및 액형 종양을 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "암" 또는 "종양"은 악성, 뿐만 아니라 전암성 암 및 종양을 포함한다.

[0385] 본원에서 사용되는 어구 "CD22의 발현과 관련된 질환"은 예를 들어 암 또는 악성종양과 같은 증식성 질환 또는 골수이형성증, 골수이형성 증후군 또는 전백혈병과 같은 전암성 병태, 또는 CD22(예를 들어, 야생형 또는 돌연변이 CD22)를 발현하는 세포와 관련된 비암성 관련 적응증을 비롯하여, CD22(예를 들어, 야생형 또는 돌연변이 CD22)의 발현과 관련된 질환 또는 CD22(예를 들어, 야생형 또는 돌연변이 CD22)를 발현하거나 또는 임의의 시간에 발현했던 세포와 관련된 병태를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 의심의 여지를 없애기 위해, CD22의 발현과 관련된 질환은 예를 들어 CD22를 표적화하는 분자(예를 들어, CD22 CAR)를 사용한 치료로 인해 CD22 발현이 하향조절되었기 때문에 현재 CD22를 발현하지 않지만 한때 CD22를 발현했던 세포와 관련된 병태를 포함할 수 있다. 일 양태에서, CD22의 발현과 관련된 암은 혈액암이다. 일 양태에서, 혈액암은 AML, 골수이형성 증후군, ALL, 모발상 세포 백혈병, 전립프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 호지킨 림프종, 모구성 형질세포양 수지상 세포 신생물 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. CD22의 발현과 관련된 추가 질환은 예를 들어 CD22의 발현과 관련된 비정형 및/또는 비전형적 암, 악성종양, 전암성 병태 또는 증식성 질환을 포함하나 이에 한정되지 않는다. CD22의 발현과 관련된 비암성 관련 적응증도 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, CD22-발현 세포는 CD22 mRNA를 발현하거나 임의의 시점에 발현하였다. 일 구현예에서, CD22-발현 세포는 CD22 단백질(예를 들어, 야생형 또는 돌연변이)을 생성하고, CD22 단백질은 정상 수준 또는 감소된 수준으로 존재할 수 있다. 일 구현예에서, CD22-발현 세포는 한때 검출가능한 수준의 CD22 단백질을 생성하였고, 이후에 실질적으로 검출가능한 CD22 단백질을 생성하지 않았다.

[0386] 어구 "CD19의 발현과 관련된 질환"은 예를 들어 암 또는 악성종양과 같은 증식성 질환 또는 골수이형성증, 골수이형성 증후군 또는 전백혈병과 같은 전암성 병태, 또는 CD19를 발현하는 세포와 관련된 비암성 관련 적응증을 비롯하여, CD19(예를 들어, 야생형 또는 돌연변이 CD19)의 발현과 관련된 질환 또는 CD19(예를 들어, 야생형 또는 돌연변이 CD19)를 발현하거나 또는 임의의 시간에 발현했던 세포와 관련된 병태를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 의심의 여지를 없애기 위해, CD19의 발현과 관련된 질환은 예를 들어 CD19를 표적화하는 분자(예를 들어, CD19 CAR)를 사용한 치료로 인해 CD19 발현이 하향조절되었기 때문에 현재 CD19를 발현하지 않지만 한때 CD19를 발현했던 세포와 관련된 병태를 포함할 수 있다. 일 양태에서, CD19의 발현과 관련된 암은 혈액암이다. 일 양태에서, 혈액암은 백혈병 또는 림프종이다. 일 양태에서, CD19의 발현과 관련된 암은 예를 들어 하나 이상의 급성 백혈병(예를 들어, B세포 급성 림프모구성 백혈병(BALL), T세포 급성 림프성 백혈병(TALL), 급성 림프모구성 백혈병(ALL)을 포함하나 이에 한정되지 않음); 하나 이상의 만성 백혈병(예를 들어, 만성 골수성 백혈병(CML), 만성 림프성 백혈병(CLL)을 포함하나 이에 한정되지 않음)을 포함하는(이에 한정되지 않음) 암 및 악성 종양을 포함한다. CD19의 발현과 관련된 추가적인 암 또는 혈액 병태는, 예를 들어 B세포 전립프구성 백혈병, 모구성 형질세포양 수지상 세포 신생물, 버킷 림프종, 확산성 거대 B세포 림프종, 여포성 림프종, 모발상 세포 백혈병, 소세포- 또는 대세포-여포성 림프종, 악성 림프증식성 병태, MALT 림프종, 맨틀세포 림프종(MCL), 변연부 림프종, 다발성 골수종, 골수이형성증 및 골수이형성 증후군, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 형질모세포 림프종, 형질세포양 수지상 세포 신생물, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 및 "전백혈병"(골수 혈액 세포의 비효과적 생성(또는 이형성증)에 의해 통합된 다양한 혈액 병태의 집합임) 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 또한, CD19의 발현과 관련된 질환은 예를 들어 CD19의 발현과 관련된 비정형 및/또는 비전형적 암, 악성종양, 전암성 병태 또는 증식성 질환을 포함하나 이에 한정되지 않는다. CD19의 발현과 관련된 비암성 관련 적응증은 예를 들어 자가면역 질환(예를 들어, 루푸스), 염증성 장애(알러지 및 천식) 및 이식을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 일부 구현예에서, CD19-발현 세포는 CD19 mRNA를 발현하거나 임의의 시점에 발현하였다. 일 구현예에서, CD19-발현 세포는 CD19 단백질(예를 들어, 야생형 또는 돌연변이)을 생성하고, CD19 단백질은 정상 수준 또는 감소된 수준으로 존재할 수 있다. 일 구현예에서, CD19-발현 세포는 한때 검출가능한 수준의 CD19 단백질을 생성하였고, 이후에 실질적으로 검출가능한 CD19 단백질을 생성하지 않았다.

[0387] 본원에서 사용되는 바와 같이, 달리 명시되지 않는 한, "예방"이란 용어는 대상체가 병태 또는 병태의 재발로 고통받기 시작하기 전에 일어나는 행위를 지칭한다. 예방은 병태를 완전히 예방할 필요는 없으며, 병태 또는 병태의 증상의 부분적 예방 또는 감소, 또는 병태의 발병 위험의 감소도 이 용어에 포함된다.

[0388] 본원에서 사용되는 바와 같이 "조합하여" 투여된다는 것은 대상체가 장애를 앓는 동안 2가지(또는 그 이상)의

상이한 치료가 대상체에게 전달된다는 것, 예를 들어 대상체가 장애로 진단된 후 및 장애가 치유 또는 제거되거나 다른 이유로 치료가 중단되기 전에 2가지 이상의 치료가 전달된다는 것을 의미한다. 일부 구현예에서, 하나의 치료의 전달은 제2 전달이 시작될 때 여전히 일어나고 있는 중이어서, 투여 면에서 중첩이 존재한다. 본원에서 이를 "동시" 또는 "병행 전달"이라고도 한다. 다른 구현예에서, 하나의 치료의 전달은 다른 치료의 전달이 시작되기 전에 종료된다. 어느 경우의 일부 구현예에서, 치료는 병용투여로 인해 더 효과적이다. 예를 들어 제2 치료가 보다 효과적이고, 예를 들어 더 적은 제2 치료에 의해 증가의 효과가 관찰되거나, 또는 제1 치료의 부재하에 제2 치료가 투여된 경우에 관찰되는 것보다 더 큰 정도로 제2 치료가 증상을 감소시키거나, 또는 제1 치료에 의해 유사한 상황이 관찰된다. 일부 구현예에서, 전달은 증상의 감소, 또는 장애와 관련된 다른 파라미터가 다른 치료의 부재하에 전달된 하나의 치료에서 관찰되는 것보다 더 크도록 이루어진다. 상기 2가지 치료의 효과는 부분적으로 상가적이거나, 완전히 상가적이거나, 상가적인 것보다 클 수 있다. 전달은 전달된 제1 치료의 효과가 제2 치료가 전달될 때 여전히 검출가능하도록 이루어질 수 있다. 일 구현예에서, CAR-발현 세포는 본원에 기재된 용량 및/또는 투여 스케줄로 투여되고, B세포 억제제, 또는 CD19 CAR-발현 세포의 활성을 강화하는 제제는 본원에 기재된 용량 및/또는 투여 스케줄로 투여된다.

[0389] 본원에서 사용되는 “~로부터 유래된”이란 용어는 제1 분자와 제2 분자 사이의 관계를 나타낸다. 이것은 일반적으로 제1 분자와 제2 분자 사이의 구조적 유사성을 지칭하며, 제2 분자로부터 유래되는 제1 분자에 대한 공정 또는 공급원 상의 제한은 내포하지 않거나 포함하지 않는다. 예를 들어, CD3제타 분자로부터 유래되는 세포내 신호전달 도메인의 경우, 세포내 신호전달 도메인은 요구되는 기능, 즉, 적절한 조건하에 신호를 생성하는 능력을 갖도록 하기에 충분한 CD3제타 구조를 유지한다. 이것은 세포내 신호전달 도메인의 특정한 생성 방법에 대한 제한을 내포하지 않거나 포함하지 않으며, 예를 들어 이것은 세포내 신호전달 도메인을 제공하기 위해 CD3제타 서열로 시작하여 원하지 않는 서열을 결실시키거나 돌연변이를 일으켜 세포내 신호전달 도메인에 도달해야 함을 의미하는 것이 아니다.

[0390] 용어 "보존적 서열 변형"은 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 항체 단편의 결합 특성에 대한 영향이나 변경이 크지 않은 아미노산 변형을 지칭한다. 이러한 보존적 변형은 아미노산 치환, 부가 및 결실을 포함한다. 변형은 당업계에 알려진 표준 기술, 예컨대 부위-지정 돌연변이유발 및 PCR 매개 돌연변이유발에 의해 본 발명의 항체 또는 항체 단편 내에 도입될 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 아미노산 잔기가 유사 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체되는 것이다. 유사 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리는 당해 분야에 정의되어 있다. 이들 패밀리는 염기성 측쇄(예를 들어, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 하전되지 않은 극성 측쇄(예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판), 비극성 측쇄(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), 베타 분지형 측쇄(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신), 및 방향족 측쇄(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 갖는 아미노산을 포함한다. 따라서, 본 발명의 CAR 내의 하나 이상의 아미노산 잔기는 동일한 측쇄 패밀리의 다른 아미노산 잔기로 대체될 수 있고, 변경된 CAR은 본원에 기재된 기능적 분석을 사용하여 시험될 수 있다.

[0391] 용어 "자극"은 자극 분자(예를 들어, TCR/CD3 복합체 또는 CAR)와 이의 동족 리간드(또는 CAR의 경우 종양 항원)의 결합에 의해 유도되어, TCR/CD3 복합체를 통한 신호 전달 또는 적절한 NK 수용체 또는 CAR의 신호전달 도메인을 통한 신호 전달과 같은(이에 한정되지 않음) 신호 전달 사건을 매개하는 일차 반응을 지칭한다. 자극은 특정 분자의 변경된 발현을 매개할 수 있다.

[0392] 용어 "자극 분자"는 적어도 일부 양태의 면역 세포 신호전달 경로에 대해 자극 방식으로 면역 세포의 활성화를 조절하는 세포질 신호전달 서열(들)을 제공하는, 면역 세포, 예를 들어 T세포, NK세포, 또는 B세포에 의해 발현되는 분자를 지칭한다. 일 양태에서, 신호는 예를 들어 펩티드가 로딩된 MHC 분자와 TCR/CD3 복합체의 결합에 의해 개시되고, 증식, 활성화, 분화 등을 포함하는(이에 한정되지 않음) T세포 반응의 매개를 야기하는 일차 신호이다. 자극 방식으로 작용하는 일차 세포질 신호전달 서열("일차 신호전달 도메인"으로도 지칭됨)은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로 알려진 신호전달 모티프를 포함할 수 있다. 본 발명에 특히 유용한 ITAM 함유 세포질 신호전달 서열의 예는 CD3 제타, 공통 FcR 감마(FCER1G), Fc 감마 RIIa, FcR 베타(Fc 엡실론 R1b), CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD79a, CD79b, DAP10, 및 DAP12로부터 유래된 것을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 특정 CAR에서, 본 발명의 임의의 하나 이상의 CAR 내의 세포내 신호전달 도메인은 세포내 신호전달 서열, 예를 들어 CD3-제타의 일차 신호전달 서열을 포함한다. 본 발명의 특정 CAR에서, CD3-제타의 일차 신호전달 서열은 서열번호 96으로서 제공된 서열, 또는 비인간 종, 예를 들어 마우스, 설치류, 원숭이, 유인원 등으로부터의 동등한 잔기이다.

- [0393] 용어 "항원 제시 세포" 또는 "APC"는 표면에 주요 조직적합성 복합체(MHC)와 복합체화된 외래 항원을 표시하는 면역계 세포, 예컨대 보조 세포(예를 들어, B세포, 수지상 세포 등)를 지칭한다. T세포는 T세포 수용체(TCR)를 사용하여 이러한 복합체를 인식할 수 있다. APC는 항원을 프로세싱하여 T세포에 제시한다.
- [0394] 본원에서 사용되는 용어 "면역 이펙터 세포"는 면역 반응, 예를 들어 면역 이펙터 반응의 촉진에 관여하는 세포를 지칭한다. 면역 이펙터 세포의 예는 T세포, 예를 들어 알파/베타 T세포 및 감마/델타 T세포, B세포, 자연살해(NK) 세포, 자연살해 T(NK-T) 세포, 비만 세포 및 골수-유래 식세포를 포함한다.
- [0395] 본원에서 사용되는 용어 "면역 이펙터 기능 또는 면역 이펙터 반응"은, 예를 들어 표적 세포의 면역 공격을 강화하거나 촉진하는 면역 이펙터 세포의 기능 또는 반응을 지칭한다. 예를 들어, 면역 이펙터 기능 또는 반응은 표적 세포의 사멸, 또는 이의 성장 또는 증식의 억제를 촉진하는 T세포 또는 NK세포의 특성을 지칭한다. T세포의 경우, 일차 자극 및 공동자극은 면역 이펙터 기능 또는 반응의 예이다.
- [0396] 본원에서 사용되는 용어 "세포내 신호전달 도메인"은 분자의 세포내 부분을 지칭한다. 세포내 신호전달 도메인은 CAR 함유 세포, 예를 들어 CART 세포 또는 CAR-발현 NK세포의 면역 이펙터 기능을 촉진하는 신호를 생성한다. 예를 들어 CART 세포 또는 CAR-발현 NK세포에서의 면역 이펙터 기능의 예는 사이토카인의 분비를 포함하는 세포용해 활성 및 헬퍼 활성을 포함한다.
- [0397] 일 구현예에서, 세포내 신호전달 도메인은 일차 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 예시적인 일차 세포내 신호전달 도메인은 일차 자극, 또는 항원 의존적 자극을 담당하는 분자로부터 유래된 것을 포함한다. 일 구현예에서, 세포내 신호전달 도메인은 공동자극 세포내 도메인을 포함할 수 있다. 예시적인 공동자극 세포내 신호전달 도메인은 공동자극 신호, 또는 항원 독립적 자극을 담당하는 분자로부터 유래된 것을 포함한다. 예를 들어 CART의 경우, 일차 세포내 신호전달 도메인은 T세포 수용체의 세포질 서열을 포함할 수 있고, 공동자극 세포내 신호전달 도메인은 공동수용체 또는 공동자극 분자로부터의 세포질 서열을 포함할 수 있다.
- [0398] 일차 세포내 신호전달 도메인은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로 알려진 신호전달 모티프를 포함할 수 있다. ITAM 함유 일차 세포질 신호전달 서열의 예는 CD3 제타, 공통 FcR 감마(FCER1G), Fc 감마 RIIa, FcR 베타(Fc 엡실론 R1b), CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD79a, CD79b, DAP10, 및 DAP12로부터 유래된 것을 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0399] 용어 "제타" 또는 대안적으로 "제타 사슬", "CD3-제타" 또는 "TCR-제타"는 GenBank 수탁번호 BAG36664.1로서 제공된 단백질, 또는 비인간 종, 예를 들어 마우스, 설치류, 원숭이, 유인원 등으로부터의 동등한 잔기로서 정의되고, "제타 자극 도메인" 또는 대안적으로 "CD3-제타 자극 도메인" 또는 "TCR-제타 자극 도메인"은 T세포 활성화에 필요한 초기 신호를 기능적으로 전달하기에 충분한 제타 사슬 또는 이의 기능적 유도체의 세포질 도메인으로부터의 아미노산 잔기로서 정의된다. 일 양태에서, 제타의 세포질 도메인은 GenBank 수탁번호 BAG36664.1의 잔기 52 내지 164, 또는 이의 기능적 동원체인, 비인간 종, 예를 들어 마우스, 설치류, 원숭이, 유인원 등으로부터의 동등한 잔기를 포함한다. 일 양태에서, "제타 자극 도메인" 또는 "CD3-제타 자극 도메인"은 서열번호 96 으로서 제공된 서열이다.
- [0400] 용어 "공동자극 분자"는 공동자극 리간드와 특이적으로 결합하여, T세포에 의한 공동자극 반응, 예컨대 증식(이에 한정되지 않음)을 매개하는 T세포 상의 동족 결합 파트너를 지칭한다. 공동자극 분자는 효율적인 면역 반응에 기여하는 항원 수용체 이외의 세포 표면 분자 또는 이의 리간드이다. 공동자극 분자는 MHC 클래스 I 분자, TNF 수용체 단백질, 면역글로불린-유사 단백질, 사이토카인 수용체, 인테그린, 신호전달 림프구성 활성화 분자(SLAM 단백질), 활성화 NK세포 수용체, BTLA, To11 리간드 수용체, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1(CD11a/CD18), 4-1BB(CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS 5(CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM(LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80(KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8알파, CD8베타, IL2R 베타, IL2R 감마, IL7R 알파, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1(CD226), SLAMF4(CD244, 2B4), CD84, CD96(Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9(CD229), CD160(BY55), PSGL1, CD100(SEMA4D), CD69, SLAMF6(NTB-A, Ly108), SLAM(SLAMF1, CD150(IPO-3), BLAME(SLAMF8), SELPLG(CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, 및 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드를 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0401] 공동자극 세포내 신호전달 도메인은 공동자극 분자의 세포내 부분일 수 있다. 공동자극 분자는 TNF 수용체 단백질, 면역글로불린-유사 단백질, 사이토카인 수용체, 인테그린, 신호전달 림프구성 활성화 분자(SLAM 단백질),

및 활성화 NK세포 수용체와 같은 단백질 패밀리에 해당할 수 있다. 이러한 분자의 예는 CD27, CD28, 4-1BB(CD137), OX40, GITR, CD30, CD40, ICOS, BAFRR, HVEM, ICAM-1, 림프구 기능-관련 항원-1(LFA-1), CD2, CSD, CD7, CD287, LIGHT, NKG2C, NKG2D, SLAMF7, NKp80, NKp30, NKp44, NKp46, CD160, B7-H3, 및 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드 등을 포함한다.

- [0402] 세포내 신호전달 도메인은 그것이 유래된 분자의 전체 세포내 부분, 또는 전체 고유 세포내 신호전달 도메인, 또는 이의 기능적 단편 또는 유도체를 포함할 수 있다.
- [0403] 용어 "4-1BB"는 GenBank 수탁번호 AAA62478.2로서 제공된 아미노산 서열, 또는 비인간 종, 예를 들어 마우스, 설치류, 원숭이, 유인원 등으로부터의 동등한 잔기를 갖는 TNFR 수퍼패밀리의 구성원을 지칭하며, "4-1BB 공동 자극 도메인"은 GenBank 수탁번호 AAA62478.2의 아미노산 잔기 214 내지 255, 또는 비인간 종, 예를 들어 마우스, 설치류, 원숭이, 유인원 등으로부터의 동등한 잔기로서 정의된다. 일 양태에서, "4-1BB 공동자극 도메인"은 서열번호 70로서 제공된 서열, 또는 비인간 종, 예를 들어 마우스, 설치류, 원숭이, 유인원 등으로부터의 동등한 잔기이다.
- [0404] 용어 "암호화"는 뉴클레오티드(예를 들어, rRNA, tRNA, 및 mRNA)의 규정된 서열 또는 아미노산의 규정된 서열을 갖는 생물학적 프로세스에서 다른 중합체 및 마크로분자의 합성을 위한 주형 역할을 하는, 유전자, cDNA, 또는 mRNA와 같은 폴리뉴클레오티드 내의 뉴클레오티드의 특정 서열의 고유 특성 및 이로부터 발생하는 생물학적 특성을 지칭한다. 따라서, 유전자, cDNA, 또는 RNA는 해당 유전자에 상응하는 mRNA의 전사 및 번역이 세포 또는 다른 생물계에서 단백질을 생성하는 경우 단백질을 암호화한다. 핵산 서열이 mRNA 서열과 동일하고 통상적으로 서열 목록에서 제공되는 암호화 가닥, 및 유전자 또는 cDNA의 전사를 위한 주형으로 사용되는 비암호화 가닥 둘 다는 해당 유전자 또는 cDNA의 단백질 또는 다른 생성물을 암호화하는 것으로서 언급될 수 있다.
- [0405] 달리 명시되지 않는 한, "아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열"은, 서로 축중성 버전이고 동일한 아미노산 서열을 암호화하는 모든 핵산 서열을 포함한다. 단백질 또는 RNA를 암호화하는 핵산 서열이란 어구는 또한 단백질을 암호화하는 핵산 서열이 일부 버전에서 인트론(들)을 함유할 수 있는 정도까지 인트론을 포함할 수 있다.
- [0406] 용어 "유효량" 또는 "치료 유효량"은 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 특정 생물학적 결과를 달성하는 데 유효한 본원에 기재된 바와 같은 화합물, 제형, 물질, 또는 조성물의 양을 지칭한다.
- [0407] 용어 "내인성"은 유기체, 세포, 조직 또는 시스템으로부터의, 또는 그 내부에서 생성된 임의의 물질을 지칭한다.
- [0408] 용어 "외인성"은 유기체, 세포, 조직 또는 시스템의 외부로부터 도입되거나 외부에서 생성된 임의의 물질을 지칭한다.
- [0409] 용어 "발현"은 프로모터에 의해 유도되는 특정 핵산 서열의 전사 및/또는 번역을 지칭한다.
- [0410] 용어 "전달 벡터"는 단리된 핵산을 포함하고 단리된 핵산을 세포의 내부에 전달하는 데 사용될 수 있는 물질의 조성물을 지칭한다. 선형 폴리뉴클레오티드, 이온성 또는 양친매성 화합물과 관련된 폴리뉴클레오티드, 플라스미드, 및 바이러스를 비롯한(이에 한정되지 않음) 많은 벡터가 당업계에서 공지되어 있다. 따라서, 용어 "전달 벡터"는 자가 복제 플라스미드 또는 바이러스를 포함한다. 이 용어는 또한 핵산의 세포 내로의 전달을 용이하게 하는 비플라스미드 및 비바이러스 화합물, 예를 들어 폴리리신 화합물, 리포솜 등을 추가로 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 바이러스 전달 벡터의 예는 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0411] 용어 "발현 벡터"는 발현될 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 발현 제어 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 지칭한다. 발현 벡터는 발현에 충분한 시스-작용 요소를 포함하며, 발현을 위한 다른 요소는 숙주 세포에 의해 또는 시험관내 발현 시스템에서 공급될 수 있다. 발현 벡터는 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함하는 코스미드, 플라스미드(예를 들어, 네이키드이거나 또는 리포솜 내에 포함됨) 및 바이러스(예를 들어, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 및 아데노-관련 바이러스)를 비롯하여, 당업계에 알려진 모든 것을 포함한다.
- [0412] 용어 "렌티바이러스"는 레트로바이러스과의 속을 지칭한다. 렌티바이러스는 비분열 세포를 감염시킬 수 있다는 점에서 레트로바이러스 중에서 독특한 것이고; 렌티바이러스는 유의한 양의 유전 정보를 숙주 세포의 DNA 내로 전달할 수 있어, 유전자 전달 벡터의 가장 효율적인 방법 중 하나가 된다. HIV, SIV, 및 FIV는 모두 렌티바이러스의 예이다.

- [0413] 용어 "렌티바이러스 벡터"는 특히, 문헌[Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009)]에 제공된 바와 같은 자가-비활성화 렌티바이러스 벡터를 비롯하여, 렌티바이러스 계통의 적어도 일부로부터 유래된 벡터를 지칭한다. 임상에서 사용될 수 있는 렌티바이러스 벡터의 다른 예는, 예를 들어 Oxford BioMedica의 LENTIVECTOR® 유전자 전달 기술, Lentigen의 LENTIMAX™ 벡터 시스템 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 비임상 유형의 렌티바이러스 벡터도 이용가능하고, 당업자에게 공지되어 있을 것이다.
- [0414] 용어 "상동성" 또는 "동일성"은 2개의 중합체 분자 사이, 예를 들어 2개의 핵산 분자, 예컨대 2개의 DNA 분자 또는 2개의 RNA 분자 사이, 또는 2개의 폴리펩티드 분자 사이의 서브유닛 서열 동일성을 지칭한다. 두 분자 모두에서 서브유닛 위치가 동일한 단량체 서브유닛에 의해 점유될 때, 예를 들어 2개의 DNA 분자 각각에서 하나의 위치가 아데닌에 의해 점유되는 경우, 이들은 그 위치에서 상동성이거나 동일하다. 두 서열 사이의 상동성은 매칭되거나 상동성인 위치의 수의 직접적인 함수이다; 예를 들어, 두 서열에서의 위치의 절반(예를 들어, 길이가 10개 서브유닛인 중합체에서 5개의 위치)이 상동성일 경우, 두 서열은 50% 상동성이고; 위치의 90%(예를 들어, 10개 중 9개)가 매칭되거나 상동성일 경우, 두 서열은 90% 상동성이다.
- [0415] 비인간(예를 들어, 뮤린) 항체의 "인간화" 형태는 비인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 면역글로불린, 면역글로불린 사슬 또는 이의 단편(예컨대, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, 또는 항체의 다른 항원결합 하위서열)이다. 대개, 인간화 항체 및 이의 항체 단편은 수여체의 상보성 결정 영역(CDR)으로부터의 잔기가 목적하는 특이성, 친화성 및 능력을 갖는 비인간 중(공여체 항체), 예컨대 마우스, 래트 또는 토끼의 CDR로부터의 잔기로 대체된 인간 면역글로불린(수여체 항체 또는 항체 단편)이다. 일부 예에서, 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 영역(FR) 잔기는 상응하는 비인간 잔기로 대체된다. 또한, 인간화 항체/항체 단편은 수여체 항체에서도, 도입 CDR 또는 프레임워크 서열에서도 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 항체 또는 항체 단편 성능을 추가로 개량하고 최적화할 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체 또는 이의 항체 단편은 적어도 1개, 일반적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이며, CDR 영역의 전부 또는 실질적으로 전부는 비인간 면역글로불린의 것에 상응하고, FR 영역의 전부 또는 상당 부분은 인간 면역글로불린 서열의 것이다. 인간화 항체 또는 항체 단편은 또한 면역글로불린 불변 영역(Fc), 일반적으로 인간 면역글로불린의 것의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 자세한 내용은 문헌[Jones et al., Nature, 321: 522-525, 1986; Reichmann et al., Nature, 332: 323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596, 1992] 참조.
- [0416] "완전 인간"은 전체 분자가 인간 기원이거나 항체 또는 면역글로불린의 인간 형태와 동일한 아미노산 서열로 이루어진 면역글로불린, 예컨대 항체 또는 항체 단편을 지칭한다.
- [0417] "뮤린"은 마우스 또는 래트를 지칭한다. 예를 들어, 뮤린 항체 또는 이의 단편은 뮤린 동물, 예를 들어 마우스 또는 래트로부터 단리된 항체 또는 이의 단편의 서열을 포함한다.
- [0418] 용어 "단리된"은 천연 상태에서부터 변경되거나 제거된 것을 의미한다. 예를 들어, 살아있는 동물에 천연적으로 존재하는 핵산 또는 펩티드는 "단리된" 것이 아니지만, 이의 천연 상태의 공존 물질로부터 부분적으로 또는 완전히 분리된 동일한 핵산 또는 펩티드는 "단리된" 것이다. 단리된 핵산 또는 단백질은 실질적으로 정제된 형태로 존재할 수 있거나, 예를 들어 숙주 세포와 같은 비천연 환경에 존재할 수 있다.
- [0419] 본 발명의 맥락에서, 통상적으로 발생하는 핵산 염기에 대해 다음의 약어가 사용된다. "A"는 아데노신을 지칭하고, "C"는 시토신을 지칭하고, "G"는 구아노신을 지칭하고, "T"는 티미딘을 지칭하고, "U"는 우리딘을 지칭한다.
- [0420] 용어 "작동가능하게 연결된" 또는 "전사 제어"는 조절 서열과 이중 핵산 서열 사이의 기능적 연결을 지칭하며, 이는 후자의 발현을 초래한다. 예를 들어, 제1 핵산 서열이 제2 핵산 서열과 기능적으로 관련되어 배치되는 경우, 제1 핵산 서열은 제2 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 것이다. 예를 들어, 프로모터가 암호화 서열의 전사 또는 발현에 영향을 미치는 경우, 프로모터는 해당 암호화 서열에 작동가능하게 연결된 것이다. 작동가능하게 연결된 DNA 서열은 서로 인접할 수 있고, 예를 들어 2개의 단백질 암호화 영역을 연결하는 것이 필요한 경우, 동일한 리딩 프레임 내에 존재한다.
- [0421] 면역원성 조성물의 "비경구" 투여라는 용어는, 예를 들어 피하(s.c.), 정맥내(i.v.), 근육내(i.m.), 또는 흉골 내 주사, 종양내, 또는 주입 기술을 포함한다.
- [0422] 용어 "핵산" 또는 "폴리뉴클레오티드"는 단일- 또는 이중-가닥 형태의 데옥시리보핵산(DNA) 또는 리보핵산(RNA) 및 이의 중합체를 지칭한다. 구체적으로 제한되지 않는 한, 이 용어는 기준 핵산과 유사한 결합 특성을 갖고 자연 발생 뉴클레오티드와 유사한 방식으로 대사되는 천연 뉴클레오티드의 알려져 있는 유사체를 함유하는 핵산을

포괄한다. 달리 나타내지 않는 한, 특정 핵산 서열은 또한 명시적으로 나타낸 서열뿐만 아니라 이의 보존적으로 변형된 변이체(예를 들어, 축중성 코돈 치환), 대립유전자, 동원체, SNP, 및 상보성 서열을 함축적으로 포함한다. 구체적으로, 축중성 코돈 치환은 하나 이상의 선택된(또는 모든) 코돈의 제3 위치가 혼합 염기 및/또는 테옥시노신 잔기로 치환된 서열을 생성함으로써 달성될 수 있다(Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); 및 Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

- [0423] 용어 "펩티드", "폴리펩티드", 및 "단백질"은 상호교환적 사용되고, 펩티드 결합에 의해 공유 결합된 아미노산 잔기로 구성된 화합물을 지칭한다. 단백질 또는 펩티드는 적어도 2개의 아미노산을 함유하여야 하고, 단백질 또는 펩티드 서열에 포함될 수 있는 아미노산의 최대 수에 대한 제한은 존재하지 않는다. 폴리펩티드는 펩티드 결합에 의해 서로 연결된 2개 이상의 아미노산을 포함하는 임의의 펩티드 또는 단백질을 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 이 용어는 당업계에서 예를 들어 펩티드, 올리고펩티드 및 올리고머로도 통상적으로 지칭되는 짧은 사슬, 및 많은 유형이 존재하는, 일반적으로 당업계에서 단백질로 지칭되는 더 긴 사슬 둘 다를 지칭한다. "폴리펩티드"는 예를 들어, 특히 생물학적 활성 단편, 실질적 상동성 폴리펩티드, 올리고펩티드, 동종이량체, 이종이량체, 폴리펩티드의 변이체, 변형된 폴리펩티드, 유도체, 유사체, 융합 단백질을 포함한다. 폴리펩티드는 천연 펩티드, 재조합 펩티드, 또는 이의 조합을 포함한다.
- [0424] 용어 "프로모터"는 폴리뉴클레오티드 서열의 특정 전사를 개시하는 데 필요한, 세포의 합성 기구 또는 도입된 합성 기구에 의해 인식되는 DNA 서열을 지칭한다.
- [0425] 용어 "프로모터/조절 서열"은 프로모터/조절 서열에 작동가능하게 연결된 유전자 산물의 발현에 필요한 핵산 서열을 지칭한다. 일부 예에서, 이 서열은 코어 프로모터 서열일 수 있고, 다른 예에서 이 서열은 또한 인핸서 서열, 및 유전자 산물의 발현에 필요한 다른 조절 요소를 포함할 수 있다. 프로모터/조절 서열은 예를 들어 조직 특이적 방식으로 유전자 산물을 발현하는 것일 수 있다.
- [0426] 용어 "항시적" 프로모터는, 유전자 산물을 암호화하거나 특정하는 폴리뉴클레오티드와 작동가능하게 연결된 경우 세포의 대부분의 또는 모든 생리학적 조건하에 세포에서 유전자 산물이 생성되도록 하는 핵산 서열을 지칭한다.
- [0427] 용어 "유도성" 프로모터는, 유전자 산물을 암호화하거나 특정하는 폴리뉴클레오티드와 작동가능하게 연결된 경우 실질적으로 프로모터에 상응하는 유도인자가 세포에 존재할 때에만 세포에서 유전자 산물이 생성되도록 하는 핵산 서열을 지칭한다.
- [0428] 용어 "조직-특이적" 프로모터는, 유전자 산물을 암호화하거나 특정하는 폴리뉴클레오티드와 작동가능하게 연결된 경우 실질적으로 세포가 프로모터에 상응하는 조직 유형의 세포인 경우에만 세포에서 유전자 산물이 생성되도록 하는 핵산 서열을 지칭한다.
- [0429] scFv와 관련하여 사용되는 용어 "유연성 폴리펩티드 링커" 또는 "링커"는 가변 중쇄 및 가변 경쇄 영역을 함께 연결하기 위해 단독으로 또는 조합하여 사용되는 글리신 및/또는 세린 잔기와 같은 아미노산으로 이루어진 펩티드 링커를 지칭한다. 일 구현예에서, 유연성 폴리펩티드 링커는 Gly/Ser 링커이고, n회 반복되는 아미노산 서열 (Gly-Gly-Gly-Ser)(서열번호 89)을 포함하며, n은 1 이상의 양의 정수이다. 예를 들어, n=1, n=2, n=3, n=4, n=5, n=6, n=7, n=8, n=9, n=10이다. 일 구현예에서, 유연성 폴리펩티드 링커는 (Gly₄ Ser)₃(서열번호 82)이다. 다른 구현예에서, 링커는 (Gly₂Ser) 및 (GlySer)의 다중 반복부를 포함한다. 다른 구현예에서, 폴리펩티드는 링커를 포함하지 않는다(예를 들어, n=0). 본원에 참조로 포함되는 WO2012/138475에 기재된 링커도 본 발명의 범위 내에 포함된다.
- [0430] 본원에서 사용되는 5' 캡(RNA 캡, RNA 7-메틸구아노신 캡, 또는 RNA m⁷G 캡으로도 지칭됨)은 전사 개시 직후에 진행 메신저 RNA의 "앞쪽" 또는 5' 말단에 부가된 변형된 구아닌 뉴클레오티드이다. 5' 캡은 제1 전사 뉴클레오티드에 연결되는 말단 기로 이루어진다. 이의 존재는 리보솜에 의한 인식 및 RNase로부터의 보호에 중요하다. 캡 부가는 전사와 커플링되고, 전사와 동시에 일어나서, 각각은 서로 영향을 미치게 된다. 전사 개시 직후에, 합성 중인 mRNA의 5' 말단에는 RNA 중합효소와 관련된 캡-합성 복합체가 결합된다. 이러한 효소 복합체는 mRNA 캡핑에 필요한 화학 반응을 촉매한다. 합성은 다단계 생화학 반응으로서 진행된다. 캡핑 모이어티는 mRNA의 기능성, 예컨대 이의 안정성 또는 번역 효율을 조절하기 위해 변형될 수 있다.
- [0431] 본원에서 사용되는 "시험관내 전사 RNA"는 시험관 내에서 합성된 RNA, 바람직하게는 mRNA를 지칭한다. 일반적으로, 시험관내 전사 RNA는 시험관내 전사 벡터로부터 생성된다. 시험관내 전사 벡터는 시험관내 전사 RNA를 생성

하는 데 사용되는 주형을 포함한다.

- [0432] 본원에서 사용되는 "폴리(A)"는 폴리아데닐화에 의해 mRNA에 부착되는 일련의 아데노신이다. 일시적 발현을 위한 구성체의 바람직한 구현예에서, 폴리A는 50 내지 5000개, 바람직하게는 64개 초과, 더 바람직하게는 100개 초과, 가장 바람직하게는 300 또는 400개 초과이다. 폴리(A) 서열은 mRNA 기능성, 예컨대 국소화, 안정성 또는 번역 효율을 조절하기 위해 화학적으로 또는 효소적으로 변형될 수 있다.
- [0433] 본원에서 사용되는 "폴리아데닐화"는 폴리아데닐릴 모이어티, 또는 이의 변형된 변이체의 메신저 RNA 분자에 대한 공유 결합을 지칭한다. 진핵 유기체에서, 대부분의 메신저 RNA(mRNA) 분자는 3' 말단에서 폴리아데닐화된다. 3' 폴리(A) 테일은 효소, 폴리아데닐레이트 중합효소의 작용을 통해 pre-mRNA에 부가된 아데닌 뉴클레오티드(대개 수백 개)의 긴 서열이다. 고등 진핵생물에서, 폴리(A) 테일은 특정 서열, 폴리아데닐화 신호를 함유하는 전사체 상에 부가된다. 폴리(A) 테일 및 이에 결합된 단백질은 엑소뉴클레아제에 의한 분해로부터 mRNA를 보호하는 데 도움이 된다. 폴리아데닐화는 또한 전사 종결, 핵으로부터 mRNA의 방출, 및 번역에 중요하다. 폴리아데닐화는 DNA가 RNA로 전사된 직후 핵에서 일어나지만, 추가적으로 이후에 세포질에서도 일어날 수 있다. 전사가 종결된 후, mRNA 사슬은 RNA 중합효소와 관련된 엔도뉴클레아제 복합체의 작용을 통해 절단된다. 절단 부위는 통상적으로 절단 부위 근처의 염기 서열 AAUAAA의 존재를 특징으로 한다. mRNA가 절단된 후, 아데노신 잔기는 절단 부위의 자유 3' 말단에 부가된다.
- [0434] 본원에서 사용되는 "일시적"은 수 시간, 수일 또는 수주의 기간 동안의 통합되지 않은 이식유전자의 발현을 지칭하고, 여기서 발현 기간은 계놈 내로 통합되거나 숙주 세포에서 안정한 플라스미드 레플리콘 내에 포함되는 경우 유전자의 발현 기간보다 짧다.
- [0435] 본원에서 사용되는 용어 "치료"는 하나 이상의 요법제(예를 들어, 본 발명의 CAR과 같은 하나 이상의 치료제)의 투여로 인해 발생하는, 증식성 장애의 진행, 중증도 및/또는 지속기간의 감소 또는 개선, 또는 이의 하나 이상의 증상(바람직하게는, 하나 이상의 식별가능한 증상)의 개선을 지칭한다. 특정 구현예에서, 용어 "치료"는 환자에 의해 반드시 식별가능할 필요는 없는, 종양의 성장과 같은, 증식성 장애의 적어도 하나의 측정가능한 물리적 파라미터의 개선을 지칭한다. 일부 구현예에서, 용어 "치료"는, 예를 들어 식별가능한 증상의 안정화에 의해 물리적으로, 예를 들어 물리적 파라미터의 안정화에 의해 생리학적으로, 또는 둘 다에 의해, 증식성 장애의 진행을 억제하는 것을 지칭한다. 일부 구현예에서, 용어 "치료"는 종양 크기 또는 암성 세포 수의 감소 또는 안정화를 지칭한다.
- [0436] 용어 "신호 전달 경로"는 세포의 한 부분으로부터 세포의 다른 부분으로 신호를 전달하는 데 역할을 하는 다양한 신호 전달 분자들 사이의 생화학적 관계를 지칭한다. 어구 "세포 표면 수용체"는 신호를 수신하고 세포막을 가로질러 신호를 전달할 수 있는 분자 및 분자의 복합체를 포함한다.
- [0437] 용어 "대상체"는 면역 반응이 유도될 수 있는 살아있는 유기체(예를 들어, 포유동물, 인간)를 포함하는 것으로 의도된다.
- [0438] "실질적으로 정제된" 세포라는 용어는 다른 세포 유형이 본질적으로 없는 세포를 지칭한다. 실질적으로 정제된 세포는 또한 이의 자연 발생 상태에서 보통 결합되어 있는 다른 세포 유형으로부터 분리된 세포를 지칭한다. 일부 예에서, 실질적으로 정제된 세포의 집단은 균질한 세포 집단을 지칭한다. 다른 예에서, 이 용어는 단순히 천연 상태에서 자연적으로 결합되어 있는 세포로부터 분리된 세포를 지칭한다. 일부 양태에서, 세포는 시험관 내에서 배양된다. 다른 양태에서, 세포는 시험관 내에서 배양되지 않는다.
- [0439] 본원에서 사용되는 용어 "치료적"은 치료를 의미한다. 치료적 효과는 질환 상태의 감소, 억제, 관해, 또는 근절에 의해 얻어진다.
- [0440] 본원에서 사용되는 용어 "예방"은 질환 또는 질환 상태의 방지 또는 보호적 처치를 의미한다.
- [0441] 본 발명의 맥락에서, "종양 항원" 또는 "과다증식성 장애 항원" 또는 "과다증식성 장애와 관련된 항원"은 특정 과다증식성 장애에 공통적인 항원을 지칭한다. 특정 양태에서, 본 발명의 과다증식성 장애 항원은 원발성 또는 전이성 흑색종, 흉선종, 림프종, 육종, 폐암, 간암, 비호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 백혈병, 자궁암, 자궁경부암, 방광암, 신장암, 및 선암종, 예컨대 유방암, 전립선암, 난소암, 췌장암 등을 포함하는(이에 한정되지 않음) 암으로부터 유래된다.
- [0442] 용어 "형질감염" 또는 "형질전환" 또는 "형질도입"은 외인성 핵산이 숙주 세포 내로 전달되거나 도입되는 프로세스를 지칭한다. "형질감염" 또는 "형질전환" 또는 "형질도입" 세포는 외인성 핵산으로 형질감염, 형질전환,

또는 형질도입된 세포이다. 세포는 일차 대상체 세포 및 그 자손을 포함한다.

- [0443] "특이적 결합"이라는 용어는 샘플에 존재하는 결합 파트너(예를 들어, 중앙 항원) 단백질을 인식하고 이와 결합하지만, 샘플 내의 다른 분자에 대한 인식 또는 결합은 실질적으로 없는 항체 또는 리간드를 지칭한다.
- [0444] 본원에서 사용되는 "난치성"은 치료에 반응하지 않는 질환, 예를 들어 암을 지칭한다. 구현예에서, 난치성 암은 치료 전 또는 치료 시작시에 치료에 내성을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 난치성 암은 치료 중에 내성을 갖게 될 수 있다. 난치성 암은 내성 암이라고도 한다.
- [0445] 대상체에서 암의 파라미터(예를 들어 혈액암, 예를 들어 암세포 성장, 증식 및/또는 생존)가 임의의 적절한 척도, 예를 들어 질량, 세포 수 또는 부피로 측정시 검출가능한 양만큼, 예를 들어 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상 지연 또는 감소되는 경우 대상체는 치료에 "반응한다". 한 예에서, 대상체가 어떠한 치료도 투여하지 않은 경우에 예측되는 기대 수명보다 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% 이상 연장된 기대 수명을 경험하는 경우 대상체는 치료에 반응한다. 다른 예에서, 대상체가 증가된 무질량 생존, 전체 생존 또는 증가된 진행까지의 시간을 갖는 경우 대상체는 치료에 반응한다. 예를 들어 종양학에서의 NCCN 임상 실시 가이드라인(NCCN Guidelines®)에 의해 제공되는 기준을 포함하는 여러 방법을 사용하여 환자가 치료에 반응하는지를 결정할 수 있다. 예를 들어, B-ALL과 관련하여, 완전 반응 또는 완전 반응자는 다음 중 하나 이상을 수반할 수 있다: 5% 미만의 BM 모세포, 1000개 초과 호중구/ANC(/ μL), 100,000개 초과 혈소판(/ μL)과 함께, 순환 모세포 또는 골수의 질환 부재(림프절병증, 비장비대, 피부/잇몸 침윤/고환 덩이/CNS 병발 부재), 3개월 조절 및 4주 동안 재발 부재. 부분 반응자는 BM 모세포의 50% 초과 감소, 1000개 초과 호중구/ANC(/ μL), 100,000개 초과 혈소판(/ μL) 중 하나 이상을 수반할 수 있다. 비반응자는 질환 진행, 예를 들어 25% 초과 BM 모세포를 나타낼 수 있다. 일 구현예에서, 완전 반응자는 CD8+ 집단에서 7% 이상의 CD27+ CD45RO-세포를 갖는 것으로 정의된다. 일 구현예에서, 사전-채취 수준의 CAR+ 세포의 백분율은 반응자(예를 들어, 완전 반응자 및 부분 반응자)를 비반응자(NR)와 구분 짓는다.
- [0446] 본원에서 사용되는 용어 "재발"은 초기 반응성(예를 들어, 완전 반응 또는 부분 반응) 기간 후 암의 재출현을 지칭한다. 초기 반응성 기간은 특정 역치 미만, 예를 들어 20%, 1%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만으로 떨어진 암세포 수준을 수반할 수 있다. 재출현은 특정 역치 초과, 예를 들어 20%, 1%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 초과로 상승한 암세포의 수준을 수반할 수 있다. 예를 들어 B-ALL과 관련하여, 재출현은 완전 반응 후 혈액, 골수(5% 초과), 또는 임의의 골수의 부위에서 예를 들어 모세포의 재출현을 수반할 수 있다. 이와 관련하여, 완전 반응은 5% 미만의 BM 모세포를 수반할 수 있다. 보다 일반적으로, 일 구현예에서, 반응(예를 들어, 완전 반응 또는 부분 반응)은 검출가능한 MRD(최소 잔류 질환)의 부재를 수반할 수 있다. 일 구현예에서, 초기 반응성 기간은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6일; 적어도 1, 2, 3, 또는 4주; 적어도 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 또는 12개월; 또는 적어도 1, 2, 3, 4, 또는 5년 지속된다.
- [0447] 본원에서 사용되는 용어 "조절성 키메라 항원 수용체(RCAR)"는 RCARX 세포에 존재하는 경우 표적 세포, 일반적으로 암세포에 대한 특이성 및 조절가능한 세포내 신호 생성 또는 증식을 RCARX 세포에 제공하는(이는 RCARX 세포의 면역 이펙터 특성을 최적화시킬 수 있음), 폴리펩티드(가장 단순한 구현예에서 일반적으로 2개)의 세트를 지칭한다. RCARX 세포는 적어도 부분적으로, 항원결합 도메인에 의존하여, 항원결합 도메인이 결합된 항원을 포함하는 표적 세포에 대한 특이성을 제공한다. 일 구현예에서, RCAR은 이량체화 분자의 존재시 세포내 신호전달 도메인을 항원결합 도메인에 커플링시킬 수 있는 이량체화 스위치를 포함한다.
- [0448] 본원에서 사용되는 용어 "막 앵커" 또는 "막 테더링 도메인"은 세포의 또는 세포내 도메인을 원형질막에 고정시키는 충분한 폴리펩티드 또는 모이어티, 예를 들어 미리스토일 기를 지칭한다.
- [0449] 본원에서 사용되는 용어 "스위치 도메인"은, 예를 들어 RCAR을 언급하는 경우, 이량체화 분자의 존재하에 또 다른 스위치 도메인과 결합하는 개체, 일반적으로 폴리펩티드-기반 개체를 지칭한다. 결합은 제1 스위치 도메인에 연결된, 예를 들어 융합된 제1 개체, 및 제2 스위치 도메인에 연결된, 예를 들어 융합된 제2 개체의 기능적 커플링을 생성한다. 제1 및 제2 스위치 도메인은 이량체화 스위치로 총칭된다. 구현예에서, 제1 및 제2 스위치 도메인은 서로 동일하고, 예를 들어 동일한 일차 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이고, 동종이량체화 스위치로 총칭된다. 구현예에서, 제1 및 제2 스위치 도메인은 서로 상이하고, 예를 들어 서로 다른 일차 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이고, 이종이량체화 스위치로 총칭된다. 구현예에서, 스위치는 세포 내에 존재한다. 구현예에서, 스위치는 세포 외에 존재한다. 구현예에서, 스위치 도메인은 폴리펩티드-기반의 개체, 예를 들어 FKBP 또는 FRB-기반의 것이고, 이량체화 분자는 소분자, 예를 들어 라파로그(rapalogue)이다. 구현예에서, 스위치 도메인은 폴리펩티드-기반의 개체, 예를 들어 myc 펩티드에 결합하는 scFv이고, 이량체화 분자는

폴리펩티드, 이의 단편, 또는 폴리펩티드의 다량체, 예를 들어 myc 리간드 또는 하나 이상의 myc scFv에 결합하는 myc 리간드의 다량체이다. 구현예에서, 스위치 도메인은 폴리펩티드-기반의 개체, 예를 들어 myc 수용체이고, 이량체화 분자는 항체 또는 이의 단편, 예를 들어 myc 항체이다.

[0450] 본원에서 사용되는 용어 "이량체화 분자"는, 예를 들어 RCAR을 언급하는 경우, 제1 스위치 도메인과 제2 스위치 도메인의 결합을 촉진하는 분자를 지칭한다. 구현예에서, 이량체화 분자는 대상체에서 자연 발생되지 않거나, 또는 유의미한 이량체화를 초래할 농도로 발생되지 않는다. 구현예에서, 이량체화 분자는 소분자, 예를 들어 라파마이신 또는 라파로그, 예를 들어 RAD001이다.

[0451] 용어 "생물학적 등가(bioequivalent)"는 기준 용량 또는 기준량의 기준 화합물(예를 들어, RAD001)에 의해 생성된 효과와 동등한 효과를 생성하는 데 요구되는, 기준 화합물(예를 들어, RAD001) 이외의 체제의 양을 지칭한다. 일 구현예에서, 효과는 예를 들어 P70 S6 키나제 억제에 의해 측정되는, 예를 들어 생체내 또는 시험관내 분석으로 평가되는, 예를 들어 본원에 기재된 분석, 예를 들어 Boulay 분석에 의해, 또는 웨스턴 블롯에 의한 인산화 S6 수준의 측정에 의해 측정되는, mTOR 억제제의 수준이다. 일 구현예에서, 효과는 세포 분류에 의해 측정되는, PD-1 양성/PD-1 음성 T세포의 비의 변화이다. 일 구현예에서, mTOR 억제제의 생물학적 등가인 양 또는 용량은 기준 용량 또는 기준량의 기준 화합물과 동일한 수준의 P70 S6 키나제 억제를 달성하는 양 또는 용량이다. 일 구현예에서, mTOR 억제제의 생물학적 등가인 양 또는 용량은 기준 용량 또는 기준량의 기준 화합물과 동일한 수준의 PD-1 양성/PD-1 음성 T세포 비의 변화를 달성하는 양 또는 용량이다.

[0452] 용어 "낮은, 면역 강화 용량"은, mTOR 억제제, 예를 들어 알로스테릭 mTOR 억제제, 예를 들어 RAD001 또는 라파마이신, 또는 촉매적 mTOR 억제제와 함께 사용된 경우, 예를 들어 P70 S6 키나제 활성의 억제에 의해 측정시, mTOR 활성을 부분적으로 억제하지만 완전히 억제하지는 않는 mTOR 억제제의 용량을 지칭한다. 예를 들어 P70 S6 키나제의 억제에 의해 mTOR 활성을 평가하는 방법이 본원에서 논의된다. 상기 용량은 완전한 면역 억제를 초래하기에는 불충분하지만, 면역 반응을 강화하기에는 충분하다. 일 구현예에서, 낮은, 면역 강화 용량의 mTOR 억제제는 PD-1 양성 T세포의 수의 감소 및/또는 PD-1 음성 T세포의 수의 증가, 또는 PD-1 음성 T세포/PD-1 양성 T세포의 비의 증가를 초래한다. 일 구현예에서, 낮은, 면역 강화 용량의 mTOR 억제제는 나이브 T세포 수의 증가를 초래한다. 일 구현예에서, 낮은, 면역 강화 용량의 mTOR 억제제는

[0453] 예를 들어 기억 T세포, 예를 들어 기억 T세포 전구체 상의 마커: CD62L^{high}, CD127^{high}, CD27⁺, 및 BCL2 중 하나 이상의 발현의 증가;

[0454] 예를 들어 기억 T세포, 예를 들어 기억 T세포 전구체 상의 KLRG1의 발현의 감소; 및

[0455] 기억 T세포 전구체, 예를 들어 CD62L^{high}의 증가, CD127^{high}의 증가, CD27⁺의 증가, KLRG1의 감소, 및 BCL2의 증가 특성의 임의의 하나 또는 조합을 나타내는 세포 수의 증가

[0456] 중 하나 이상을 초래하고,

[0457] 상기 임의의 변화는, 예를 들어 비치로 대상체와 비교하여, 예를 들어 적어도 일시적으로 발생한다.

[0458] 범위: 본 개시내용 전반에 걸쳐, 본 발명의 다양한 양태는 범위 형식으로 제시될 수 있다. 범위 형식의 기재는 단지 편의와 간결함을 위한 것이며 본 발명의 범위에 대한 융통성 없는 제한으로 해석되어서는 안 된다는 것을 이해해야 한다. 따라서, 범위의 기재는 모든 가능한 하위범위와, 그 범위 내의 개별 수치를 구체적으로 개시한 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어, 1 내지 6과 같은 범위의 기재는 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 6, 3 내지 6 등과 같은 하위범위와, 그 범위 내의 개별 숫자, 예를 들어 1, 2, 2.7, 3, 4, 5, 5.3, 및 6을 구체적으로 개시한 것으로 간주되어야 한다. 또 다른 예로서, 95~99% 동일성과 같은 범위는 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 것을 포함하고, 96~99%, 96~98%, 96~97%, 97~99%, 97~98%, 및 98~99% 동일성과 같은 하위범위를 포함한다. 이는 범위의 폭에 관계없이 적용된다.

[0459] 이중 CAR

[0460] 본 발명은 적어도 부분적으로는, CD22 CAR을 포함하는 제1 CAR 및 CD19 CAR을 포함하는 제2 CAR을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR) 분자, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 이중 CAR을 암호화하는 신규 핵산 분자를 특징으로 한다. 일부 구현예에서, CD22 CAR은 CD22 항원결합 도메인 및 제1 막관통 도메인, 제1 공동자극 신호전달 도메인, 및/또는 제1 일차 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CD19 CAR은 CD19 항원결합 도메인 및 제2 막관통 도메인, 제2 공동자극 신호전달 도메인, 및/또는 제2 일차 신호전달 도메인을 포함한다. 본원에

개시된 CAR 분자의 일부 구현예에서, CAR 분자는 예를 들어 폴리펩티드 서열이 서로 다른 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는, 제1 및 제2 막관통 도메인, 제1 및 제2 공동자극 도메인, 및/또는 제1 및 제2 일차 신호전달 도메인의 2개의 동일한 폴리펩티드 서열을 포함한다. 또한, 상기 CAR 분자를 사용하는 방법이 본원에 개시된다.

- [0461] 이론에 구애됨이 없이, 일부 구현예에서, CAR 분자를 암호화하는 핵산 분자, 예를 들어 이중 CAR 분자는 재조합, 예를 들어 상동 재조합을 방지하도록 최적화, 예를 들어 코돈 최적화된다. 일부 구현예에서, CAR 분자, 예를 들어 이중 CAR 분자는 2개의 도메인, 예를 들어 제1 막관통 도메인 및 제2 막관통 도메인을 포함하고, 각각은 유사한 아미노산 서열을 포함하지만 서로 다른 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된다.
- [0462] 일 양태에서, 본원에 개시된 CAR 분자는 제1 항원결합 도메인(CD22에 결합함), 제1 막관통 도메인, 제1 공동자극 신호전달 도메인, 및/또는 제1 일차 신호전달 도메인을 포함하는 제1 CAR을 포함한다.
- [0463] 일 구현예에서, CD22 항원결합 도메인은 본원(예를 들어, 표 1A, 2A, 또는 3A)에 기재된 CD22 결합 도메인의 하나 이상(예를 들어, 3개 모두)의 경쇄 상보성 결정 영역 1(LC CDR1), 경쇄 상보성 결정 영역 2(LC CDR2), 및 경쇄 상보성 결정 영역 3(LC CDR3); 및/또는 본원(예를 들어, 표 1A, 2A, 또는 3A)에 기재된 CD22 결합 도메인의 하나 이상(예를 들어, 3개 모두)의 중쇄 상보성 결정 영역 1(HC CDR1), 중쇄 상보성 결정 영역 2(HC CDR2), 및 중쇄 상보성 결정 영역 3(HC CDR3)을 포함한다. 일 구현예에서, CD22 항원결합 도메인은 본원(예를 들어, 표 1A, 2A, 또는 3A)에 기재된 CD22 결합 도메인의 LC CDR1, LC CDR2, 및 LC CDR3; 및/또는 본원(예를 들어, 표 1A, 2A, 또는 3A)에 기재된 CD22 결합 도메인의 HC CDR1, HC CDR2, 및 HC CDR3을 포함한다.
- [0464] 일 구현예에서, CD22 결합 도메인은 서열번호 28의 LC CDR1, 서열번호 29의 LC CDR2, 및 서열번호 30의 LC CDR3을 포함한다. 일 구현예에서, CD22 결합 도메인은 서열번호 31의 LC CDR1, 서열번호 32의 LC CDR2, 및 서열번호 33의 LC CDR3을 포함한다. 일 구현예에서, CD22 결합 도메인은 서열번호 34의 LC CDR1, 서열번호 32의 LC CDR2, 및 서열번호 30의 LC CDR3을 포함한다.
- [0465] 일 구현예에서, CD22 결합 도메인은 서열번호 20의 HC CDR1, 서열번호 21의 HC CDR2, 및 서열번호 22의 HC CDR3을 포함한다. 일 구현예에서, CD22 결합 도메인은 서열번호 23의 HC CDR1, 서열번호 24의 HC CDR2, 및 서열번호 22의 HC CDR3을 포함한다. 일 구현예에서, CD22 결합 도메인은 서열번호 25의 HC CDR1, 서열번호 26의 HC CDR2, 및 서열번호 27의 HC CDR3을 포함한다.
- [0466] 일 구현예에서, CD22 결합 도메인은 서열번호 28의 LC CDR1, 서열번호 29의 LC CDR2, 및 서열번호 30의 LC CDR3; 및 서열번호 20의 HC CDR1, 서열번호 21의 HC CDR2, 및 서열번호 22의 HC CDR3을 포함한다.
- [0467] 일 구현예에서, CD22 결합 도메인은 서열번호 31의 LC CDR1, 서열번호 32의 LC CDR2, 및 서열번호 33의 LC CDR3; 및 서열번호 23의 HC CDR1, 서열번호 24의 HC CDR2, 및 서열번호 22의 HC CDR3을 포함한다.
- [0468] 일 구현예에서, CD22 결합 도메인은 서열번호 34의 LC CDR1, 서열번호 32의 LC CDR2, 및 서열번호 30의 LC CDR3; 및 서열번호 25의 HC CDR1, 서열번호 26의 HC CDR2, 및 서열번호 27의 HC CDR3을 포함한다.
- [0469] 일 구현예에서, CD22 항원결합 도메인(예를 들어, scFv)은 본원(예를 들어, 표 1A 또는 3A)에 기재된 CD22 결합 도메인의 경쇄 가변(VL) 영역; 및/또는 본원(예를 들어, 표 1A 또는 3A)에 기재된 CD22 결합 도메인의 중쇄 가변(VH) 영역을 포함한다. 일 구현예에서, CD22 항원결합 도메인은 표 1A 또는 3A에 제공된 CD22 VL 영역 서열의 1, 2, 또는 3개 이상의 변형(예를 들어, 치환), 30, 20, 또는 10개 이하의 변형(예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역을 포함한다. 일 구현예에서, CD22 항원결합 도메인은 표 1A 또는 3A에 제공된 CD22 VL 영역 서열에 대해 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역을 포함한다. 일 구현예에서, CD22 항원결합 도메인은 표 1A 또는 3A에 제공된 CD22 VL 영역 서열의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역을 포함한다. 일 구현예에서, CD22 항원결합 도메인은 표 1A 또는 3A에 제공된 CD22 VH 영역 서열의 1, 2, 또는 3개 이상의 변형(예를 들어, 치환), 30, 20, 또는 10개 이하의 변형(예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역을 포함한다. 일 구현예에서, CD22 항원결합 도메인은 표 1A 또는 3A에 제공된 CD22 VH 영역 서열에 대해 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역을 포함한다. 일 구현예에서, CD22 항원결합 도메인은 표 1A 또는 3A에 제공된 CD22 VH 영역 서열의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역을 포함한다.
- [0470] 일 구현예에서, CD22 항원결합은 표 1A 또는 3A에 제공된 CD22 scFv 서열, 예를 들어 서열번호 50의 1, 2, 또는 3개 이상의 변형(예를 들어, 치환), 30, 20, 또는 10개 이하의 변형(예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 scFv를 포함한다. 일 구현예에서, CD22 항원결합은 표 1A 또는 3A에 제공된 CD22 scFv 서열, 예를 들어 서열번호 50에 대해 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 scFv를 포함한다. 일

구현예에서, CD22 항원결합은 표 1A 또는 3A에 제공된 CD22 scFv 서열, 예를 들어 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는 scFv를 포함한다. 일 구현예에서, CD22 항원결합은 표 1A 또는 3A에 제공된 CD22 scFv 서열, 예를 들어 서열번호 49 또는 51에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 scFv를 포함한다.

[0471] 일 양태에서, 본원에 개시된 CAR 분자는 제2 항원결합 도메인(CD19에 결합함) 및 제2 막관통 도메인, 제2 공동 자극 도메인, 및/또는 제2 일차 신호전달 도메인을 포함하는 제2 CAR을 포함한다.

[0472] 일부 구현예에서, CD19 항원결합 도메인은 본원(예를 들어, 표 1A, 2A, 3A, 또는 5A)에 기재된 CD19 결합 도메인의 하나 이상(예를 들어, 3개 모두)의 경쇄 상보성 결정 영역 1(LC CDR1), 경쇄 상보성 결정 영역 2(LC CDR2), 및 경쇄 상보성 결정 영역 3(LC CDR3); 및/또는 본원(예를 들어, 표 1A, 2A, 3A, 또는 5A)에 기재된 CD19 결합 도메인의 하나 이상(예를 들어, 3개 모두)의 중쇄 상보성 결정 영역 1(HC CDR1), 중쇄 상보성 결정 영역 2(HC CDR2), 및 중쇄 상보성 결정 영역 3(HC CDR3)을 포함한다. 일부 구현예에서, CD19 항원결합 도메인은 본원(예를 들어, 표 1A 또는 2A)에 기재된 CD19 결합 도메인의 LC CDR1, LC CDR2, 및 LC CDR3; 및/또는 본원(예를 들어, 표 1A, 2A, 또는 3A)에 기재된 CD19 결합 도메인의 HC CDR1, HC CDR2, 및 HC CDR3을 포함한다. 일부 구현예에서, CD19 항원결합 도메인은 서열번호 40의 LC CDR1, 서열번호 41의 LC CDR2, 및 서열번호 42의 LC CDR3; 및/또는 서열번호 35의 HC CDR1, 서열번호 36-38의 HC CDR2, 및 서열번호 39의 HC CDR3을 포함한다.

[0473] 일부 구현예에서, CD19 항원결합 도메인(예를 들어, scFv)은 본원(예를 들어, 표 1A, 3A, 또는 5A)에 기재된 CD19 결합 도메인의 경쇄 가변(VL) 영역; 및/또는 본원(예를 들어, 표 1A, 3A, 또는 5A)에 기재된 CD19 결합 도메인의 중쇄 가변(VH) 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, CD19 항원결합 도메인은 표 1A, 3A, 또는 5A에 제공된 CD19 VL 영역 서열의 1, 2, 또는 3개 이상의 변형(예를 들어, 치환), 30, 20, 또는 10개 이하의 변형(예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, CD19 항원결합 도메인은 표 1A, 3A, 또는 5A에 제공된 CD19 VL 영역 서열에 대해 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, CD19 항원결합 도메인은 표 1A, 3A, 또는 5A에 제공된 CD19 VH 영역 서열의 1, 2, 또는 3개 이상의 변형(예를 들어, 치환), 30, 20, 또는 10개 이하의 변형(예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, CD19 항원결합 도메인은 표 1A, 3A, 또는 5A에 제공된 CD19 VH 영역 서열에 대해 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, CD19 항원결합 도메인은 표 1A, 3A, 또는 5A에 제공된 CD19 VH 영역 서열의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역을 포함한다.

[0474] 다른 구현예에서, CD19 항원결합 도메인은 표 1A, 3A, 또는 5A에 제공된 CD19 scFv 서열, 예를 들어 서열번호 44의 1, 2, 또는 3개 이상의 변형(예를 들어, 치환), 30, 20, 또는 10개 이하의 변형(예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 scFv를 포함한다. 다른 구현예에서, CD19 항원결합 도메인은 표 1A, 3A, 또는 5A에 제공된 CD19 scFv 서열, 예를 들어 서열번호 44에 대해 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 scFv를 포함한다. 다른 구현예에서, CD19 항원결합 도메인은 표 1A, 3A, 또는 5A에 제공된 CD19 scFv 서열, 예를 들어 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 scFv를 포함한다. 다른 구현예에서, CD19 항원결합 도메인은 표 1A, 3A, 또는 5A에 제공된 CD19 scFv 서열, 예를 들어 서열번호 43 또는 48에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 scFv를 포함한다.

[0475] 일 양태에서, 본원에 개시된 CAR 분자는 제1 막관통 도메인을 포함하는 제1 CAR 및 제2 막관통 도메인을 포함하는 제2 CAR을 포함한다. 일 구현예에서, 제1 막관통 도메인 및 제2 막관통 도메인은, 예를 들어 본원에 개시된 바와 같은, 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 제1 막관통 도메인 및 제2 막관통 도메인은 각각 제1 뉴클레오티드 서열 및 제2 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된다. 일부 구현예에서, 제1 뉴클레오티드 서열과 제2 뉴클레오티드 서열은 적어도 하나의 뉴클레오티드만큼 상이하다.

[0476] 일부 구현예에서, 제1 막관통 도메인과 제2 막관통 도메인은 예를 들어 T세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 사슬, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD123, CD134, CD137, 또는 CD154로부터 선택되는 동일한 막관통 도메인이다.

[0477] 일부 구현예에서, 제1 막관통 도메인과 제2 막관통 도메인은 예를 들어 T세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 사슬, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD123, CD134, CD137, 또는 CD154로부터 선택되는 서로 다른 막관통 도메인이다.

- [0478] 일 양태에서, 본원에 기재된 CAR 분자를 암호화하는 핵산 분자는 제1 막관통 도메인을 포함하는 제1 CAR 및 제2 막관통 도메인을 포함하는 제2 CAR을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 막관통 도메인 및 제2 막관통 도메인은 CD8 알파 막관통 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 막관통 도메인 및 제2 막관통 도메인은 서열번호 65의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0479] 일부 구현예에서, 제1 막관통 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열은 제2 막관통 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열과 상이하다.
- [0480] 일 양태에서, 본원에 개시된 CAR 분자는 제1 공동자극 도메인을 포함하는 제1 CAR 및 제2 공동자극 도메인을 포함하는 제2 CAR을 포함한다. 일 구현예에서, 제1 공동자극 도메인 및 제2 공동자극 도메인은, 예를 들어 본원에 개시된 바와 같은, 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 제1 공동자극 도메인 및 제2 공동자극 도메인은 각각 제1 뉴클레오티드 서열 및 제2 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된다. 일부 구현예에서, 제1 뉴클레오티드 서열과 제2 뉴클레오티드 서열은 적어도 하나의 뉴클레오티드만큼 상이하다.
- [0481] 일부 구현예에서, 제1 공동자극 도메인과 제2 공동자극 도메인은 예를 들어 OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1(CD11a/CD18), ICOS(CD278), 또는 4-1BB(CD137)의 신호전달 도메인으로부터 선택되는 동일한 공동자극 도메인이다.
- [0482] 일부 구현예에서, 제1 공동자극 도메인과 제2 공동자극 도메인은 예를 들어 OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1(CD11a/CD18), ICOS(CD278), 또는 4-1BB(CD137)의 신호전달 도메인으로부터 선택되는 서로 다른 공동자극 도메인이다.
- [0483] 일 양태에서, 본원에 기재된 CAR 분자를 암호화하는 핵산 분자는 제1 공동자극 도메인을 포함하는 제1 CAR 및 제2 공동자극 도메인을 포함하는 제2 CAR을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 공동자극 도메인 및 제2 공동자극 도메인은 4-1BB 공동자극 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 공동자극 도메인 및 제2 공동자극 도메인은 서열번호 65의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0484] 일부 구현예에서, 제1 공동자극 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열은 제2 공동자극 도메인을 암호화하고 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드 서열과 상이하다.
- [0485] 일부 양태에서, 본 발명은, 예를 들어 (i) CD22 항원결합 도메인을 포함하는 제1 CAR 및 (ii) CD19 항원결합 도메인을 포함하는 제2 CAR을 포함하는, CAR 분자를 암호화하는 핵산 분자를 제공한다. 구현예에서, 핵산은 RNA 또는 DNA를 포함한다. 구현예에서, (i) 및 (ii)를 암호화하는 핵산 서열은 동일한 배향으로 위치한다(예를 들어, (i) 및 (ii)를 암호화하는 핵산 서열의 전사는 동일한 방향으로 진행된다). 구현예에서, (i) 및 (ii)를 암호화하는 핵산 서열은 서로 다른 배향으로 위치한다. 구현예에서, 단일 프로모터가 (i) 및 (ii)를 암호화하는 핵산 서열의 발현을 조절한다. 구현예에서, 프로테아제 절단 부위(예컨대 T2A, P2A, E2A, 또는 F2A 절단 부위)를 암호화하는 핵산이 (i) 및 (ii)를 암호화하는 핵산 서열 사이에 위치한다. 구현예에서, 프로테아제 절단 부위는 세포가 (i) 및 (ii)를 포함하는 융합 단백질을 발현할 수 있도록 배치되며, 이 단백질은 후속적으로 단백질 분해 절단에 의해 2개의 펩티드로 처리된다. 일부 구현예에서, (i)을 암호화하는 핵산 서열은 (ii)를 암호화하는 핵산 서열의 업스트림이거나, (ii)를 암호화하는 핵산 서열은 (i)을 암호화하는 핵산 서열의 업스트림이다. 구현예에서, 제1 프로모터가 (i)을 암호화하는 핵산 서열의 발현을 조절하고, 제2 프로모터가 (ii)를 암호화하는 핵산 서열의 발현을 조절한다. 구현예에서, 핵산은 플라스미드이다. 구현예에서, 핵산은 바이러스 패키징 요소를 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 핵산, 예를 들어 상기 기재된 바와 같은 (i) 및 (ii)를 포함하는 핵산을 포함하는 세포, 예를 들어 면역 이펙터 세포를 제공한다. 세포는 T2A, P2A, E2A, 또는 F2A 절단 부위를 절단하는 프로테아제(예를 들어, 내인성 또는 외인성)를 포함할 수 있다.
- [0486] CAR 분자, 예를 들어 본원에 개시된 이중 CAR 분자의 예시적인 뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 표 1A에 제공된다.

[0487] [표 1A] 이중 및 텐덤 CD19-CD22 CAR 서열

식별기호	서열 번호	서열
텐덤 CD19-CD22 CAR		
CG#c171	1	atggccctccctgtcaccgccctgctgctccgctggctctctgtcaccgcccgtcggcccg aaattgtagatgacccagtcacccgccactcttagccttaccgccgtgagcgcgaaccctgtc ttgcagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattggtatcaacagaagcccggacagggc tcctgccctctgatacaccacaccagccggctccattctggaatccctgccagggtcagcgggt agcggatctgggaccgactacacccctactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtc tattctgtcagcaagggaacacccctgcccacaccttggacaggccaccaagctcagagatt aaagtgagagggtggcagcggaggggtgggtccggcggaggaggaagccaggtccaact ccaagaaaagcggaccgggtctgtgaaagccatcagaactcttcaactgactgtactgtgagc ggagtgctctccccgattacgggtgctgtggatcagacagccaccgggaaagggtctgga atggatggagtgattggggctctgagactactactaacaatcaccctcaagtcacgcgtca ccaatcaaggacaactctaagaatcagggtgactgaaactgtcatctgtaccgcagccg acaccgccgtgactatgctaaagcattactattatggcgggagctacccaatggattactg gggacaggggtactctgggtaccgtgtccagctggcagaagccgccgcaagaaagtgacg cttcaacaatcaggaccaggactgtcaaacatcagaccctctccctcacatgtgccatct ccggggactccatgttgagcaatccgacactggaaatggattagacaagcccgtcccggg gtctggaatgggtgggacgcactaccaccgggtctactgtgacgactacggctcatcgg tgcggggaagagtgatccatcaacgtggacacctccaagaaccagctacagcctgcagctaat gcccgtgactctgaggatacggcgtctactactgcccgcgtccgctgcaagacggga acagctggagcgaatgcattcgtatgtctggggccagggaactatggtcaccgtgctgtggg ggcgggtggatcgggtggcgggggttcggggggcggcggctctcagtcctcttaaccaac cggcctcagcctcggggagccccggcagagcgtgaccalltctgcaccggcacttcatcc gacgtggggcgtacaactacgtgctctggtaccaacagcaccgggaaaggcccccaag ctcatgatcagcagctgtccaacagccctcgggaggtgtccaaccggttctcgggttcgaaa tcgggaaacacagccagcctgaecatcagcggactgcagggtgaagatgaagccgaactac actgctcctctacacctcgtctaccacgctctactgttccgcaclggaactcagctgactgtg ctgaccactaccccagcaccgaggcccaccaccggctcctaccatcctcctccagcctct gtccctgcgtccggagcatgtagaccgcagctggggggccgtgcatacccgggtctt gacttcgctgcgatatctacattggcccctctggctggtacttgcgggctctgctcttca ctcgtgatcacttctactgtaagcgcggtcggaaagctgctgtacatcttaagcaaccct catgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccgttcccagaggag gaggaaaggcggctgcgaactcgcggtgaaatcagccgcagcagatctccagcctac cagcaggggcagaaccagcctctacaacgaactcaatcttggctggagagaggagtacgacg tctctgacaagcggagagggacgggaccagaatggcgggaaagccgcagaagaa tccccaaaggcctgtacaacgagctccaaaggataagatggcagaagcctatagcag atgggtatgaaagggaacgcagaagaggcaaggccacgacggaactgtaccagggactc agcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttccatgcaggccctgccgctcgg
	2	MALPVTALLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQDISKYLWYQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPAR FSGSGTIDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNLTPYTFGQGT KLEIKGGGSGGGSGGGSGVQLQESGPGLVKPSSETLSLT CTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVTWGSETTYQSS

[0488]

	<p>LKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYYYG GSYAMDYWGQGLVTVSSLAFAAAKEVQLQQSGPGLVKP SQTLSLTCASIGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTY HRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDT GVYYCARVRLQDGNWSDAFDVWQGMVTVSSGGGGS GGGGSGGGGSQSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGG YNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSG NTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVL TTTAPRPPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPF MRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR</p>
<p>CG#c182</p>	<p>3</p> <p>atggcctcctgtcaccgacctgctctccgctggctctctgctccacgccgctcgcccg aagtgagctcaacatcaggaccaggactcgtcaaacatcacagacctctccctcaat gtgccatctccgggactccatgttgagcaatccgacacttggaattggattagacaaagccc gtcccggggtctggaatggttgggacgcacctaccaccggtctacttggtagcagactagc cgtcatccgtgcggggaagagtgtccatcaacgtggacacctccaagaaccagtacagcctg cagcttaatgccgtgactcctgaggatagggcgtctactactgcccgcgctccgctgcaa gacgggaacagctggagcgcgatgcattcgtatctggggccagggaactatggcaccgtgctc gctctgggggctggatcgggtggcgggggttcgggggggggggctctcagctccgctctt acccaaccggcctcagcctcggggagcccggccagagcgtgaccatttctgaccggc acttaccgacgtggcgctacaactacgtgctcctgtaccaacagcaccgggaaagcc ccccaagctcatgatctacgacgtgtccaacagccctcgggagtgtccaaccggtctcgg gctggaatcgggaacacagccagcctgaccatcagcggactcagagctgaagatgaagc cgaactactgctcctcctacacctcgtcaccacgctctacgtgttcggaactggaactcagc tgaactgtgctggaggggaggagtgaaattgtgatgaccagctaccggcactcttagc ctftcaccggtagcgcgaacctgtcttgacagcctcccaagacatctcaaaatacctta attggtatcaacagaagccggacaggtcctcgccttctgatctaccacaccagcggtcctc attctggaatccctgccaggttcaagcggtagcggatctgggaccgactacacctcaatca gctcactgcagccagagacttcgctgtctattctgtcagcaagggaacacctgacctaca cctttggacagggcaccaagctcagatlaaagggtggaggtggcagcggagggaggtgggt ccggcgggtggggaagccaggtccaactccaagaaagcggaccgggtctgtgaaagccat cagaactcttactgactgtactgtgagcggagtgctctccccgattacgggggtctctgg atcagacagccaccgggaaagggtctggaatggattggagtgatttgggctctgagactac ttactaccaatcctcaagtcacgcgtcaccatctcaaggaactctaagaatcaggtg tcaactgaaactgtatctgaccgagccgacaccgccgtgactattgctaaagcattact attatggcggagctacgcaatggattactggggacagggtactctggtcaccgtgtccagca ccaactacccagcaccgagccaccaccccgcctctaccatcgcctccagcctctgtcc ctgctccggagggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcataccggggtcttgaact cgctgagatactcaatgggcccctctggctggfcttgcgggtctctgctcttctactctgt gatcactcttactgtaagcggctcggaagaagctgctgtacatcttaagcaaccttcatga ggctgtgcagactactcaagaggaggacggctgtcatgcccgttccagaggaggaggga agcggctcgaactgcgcgtgaaatcagccgacgcgagatgtccagcctaccagcag gggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggctcgagagaggatcagcgtgctgg</p>

[0489]

	<p>acaagcggagaggacgggaccagaaatgggggggaagccgcgcagaagaatccca agagggcctgtacaacgagctccaaaagataagatggcagaagcctatagcgagattggt atgaaaggggaacgcagaagaggcaaaagccacgacggactgtaccagggactagcac cggccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctcggcctcgg</p>
4	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGPGLVKPSQTLSL TC AISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWY DDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCA RVRLQDGNWSWDAFDVWVGQGTMTVTVSSGGGSGGGGSG GGGQSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVS WYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLT ISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVLGGGGSE IVMTQSPATLSLSPGERATLSRASQDISKYLNWYQQKPGQ APRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAV YFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSSQVQ LQESGPLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKG LEWIGVIWGSETYYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSV TAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLVTVSSTTT PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC DIYIWAPLAGTCGVLLL SLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQ GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGL STATKDYDALHMQALPPR</p>
CG#e188	<p>atggccctecctgtcaecgectgctctecgctgctctctctctcaecgectgctgccc agtecgctettaaccaecggectcagctcggggagccccggceagagcgtagaccattce tgaecgggaectteacgacgtggggcggtacaactaegtgtctctgtaaccaagcaec gggaaaaggcccccaagctcatgatctacgacgttccaacagggccctcgggagtgccaac cgggtctcggggtcgaatcgggaaacacagccagcctgaccatcagcggactgagggctg aagatgaaagccgactactactgctctctctacacctgctacacgctctactgctggcact ggaactcagctgactgtgctggggcgaggaggctcgaagtgcagctcaacaateaggac caggactcgtcaaacatcagaccctctccctcaccatgtgcaatctcggggactccatgtt gagcaattccgacacttgaattggattagacaaaagcccgctccggggctctggaatggtggg acgcacctaccaccggtctactgtgtacgacgactacgctcaccgtgcggggaagagtg ccatcaacgtggacacctcaagaaccagtacagcctgcagcttaatgccgtgactcctgag gatacgggctctactactgcgccgcgtccgctcgaagacgggaacagctggagcgatg cattcgtctctggccagggaaactatgtcaccgtgtctgtgagggggaggagtgaa attgtgatgaccagtcaccgccactctagccttaccgccgtgagcgcgaacctgtctt gcagagcctcccaagacatctcaaaatacttaattggtatcaacagaagcccggacaggctc ctgcccctctgatctaccacaccagccgctccattctggaatccctgcaaggctcagcgtag cggatctgggaccgactacacctcaatcagctcaetgcagccagaggactcgtctctata ttctgtcagaagggaacacctgccctacaccttggacagggcaccaagctcagaltta aggtggaggtgcagcggaggaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtccaactcc aagaaagcggaccgggtcttftgaagccatcagaaactcttactgactgtactgtgagcg gagtgtctctcccgaattacgggtgtctftggtatcagacaccaggggaagggtctgaa tgattggagtgattgggctctgagactactactcaaatcaatccctcaagtcacgctcac catctcaaggacaactetaagaatcagggtcactgaaactgtcatctgtaccgcagccga</p>

[0490]

	<p>caccgccgtgactaftgcctaagcattactaftatgcccggagctacgcaatggattactgg ggacaggggtactctgttcaccgtgtccagcaccactaccagcaecgagggcaccacc cggctctaccatcgctcccaagcctctgctccctgctcggagcatgtagaccgcagct ggtggggccgtcataccggggtctgactcgcctgcafaftactaftggcccctctgg ctggactgcccggctctgctcttctactctgacactcttactgtaagcgcggcgggag aagctgctgtacatcttaagcaaccctcatgaggcctgtgcagactactcaagaggagac ggctgtcatgccggtfcccagaggagggaaggcggctgcgaactcgcgctgaaaitca gccgcagcgcagatgctccagcctaccagcaggggcagaaccagctctacaacgaactca atcttggcggagagagggtacgacgtgctggacaagcggagaggagggaccagaaa tggcgggaaagccgcgcagaaaatccccagaggcctgtacaacgagctccaaaag gataagatgcagaagcctatagcgaattggtatgaaagggaacgcagaagaggcaaa ggccacgacggactgtaccaggactcagaccgccaccaagacacctatgacgctcttc acatgcaggcctcggcctcgg</p>
6	<p>MALPVTALLPLALLLHAARPQSALTQPASASGSPGQSVTI SCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSG VSNRFGSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSTLY VFGTGTQLTVLGGGGSEVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS GDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYA SSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARVRL QDGNSWSDAFDVWGQGTMTVTVSSGGGGSEIVMTQSPATL SLSPGERATLSCRASQDISKYLWYQKPGQAPRLLIYHTS RLHSGIPARFSGSGTDYTLTISLQPEDFAVYFCQQGNTL PYTFGQGKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLV KPSETLSLTCVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWG SETYYQSSLSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYY CAKHYYYGGSYAMDYWGQGLVTVSSTTTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGT CGVLLLSLITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN LGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDA LHMQALPPR</p>
CG#c224	<p>7 atggccctgcccgtgactgcgctcctgctccgttggccctgctctgcatgccccagacctc agtccgctctgactcagccggcctcagcttcggggctccctggcacaagcgtcactattctg taccggaaacctcaccagcgtggggcggctacaattacgtgctctggtaacacagaccgcc gaaaggctcctaagcctatgatctacgacgtgtccaaaccgcccgtcaggaggttccaacagat tctccggctccaagagcggaaacactgcccagcttgaccaltagcggctgtagggccgagga cgaagccgactactactgetetagtacacatcctcgtctaccctctactgttttgaacgggg acccagctgactgtgctcgggggtggaggatcagaggtgcaactccagcagctccggtcctg gctcgtgaaaccgtccaaaccctgctccctgactgcccacatcggggcactccatgctgt ccaattccgacacctggaactggattagacaatgcctagcccgggactcgaatggctgggc cggacctaccacgggtccacgtggtatgacgactacgcaagctccgctccgggaagggtgt ccaltaacgtcgatactccaagaaccagtacagccttcagctgaacgctgtgacccccgag gataccggcgtctactactgtcaagatgctgattgagggatgaaactcgtgtcgggacgc affcagctctggggacagggaaactatggtgacctgtcctcggggcggaggcgggagcggga ggaggaggctctggcggaggaggaaagcggagattgctactcagctcccccggccactct</p>

[0491]

	<p>ccctgtcaccggagaaagagcaacctgagctgcaggcgtccaggacatctgaagta cctgaactgtgtaccagcagaagcctggacaagcaccgccctctgactaccacacctgc ggctgcattcgggaatccccgccagattctcaggagcggatcaggaaccgactacacct gactatctcagcctgcaaccagaggattcggcgtgacttctgcccagcaaggaaacct gcccctacacctttgacagggaaccaagctcagattaaggggggtggtgatcgggagg gggtggatcaggaggaggcggctcacaagtcagctgcagaatccggccgggactgtga agccgtccgaaacctgtcactgactgactgtgtccgggtgtcattgcccgactacggcg tgagctggattcggcagccccctggaagggtatggaaatggatcggcgtgatctgggttcg gaaactacctatcagtcctcactgaagtcgccgtgaccatcagcaaggataaltccaaa accgaagtgtctcgaagctctcagcgtcactgccgccgatactgcccgtgactactgcgcca agcactactattacggcggctgtacgccatggactactgggccaagggaactcgtgacc gtgtcaccaccactaccagcaccgagccaccacccccggctcctaccatgcctccca gectctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgagctgggtgggcccgtgcafacccgg gggtttgactcgcctgcgatactacattgggcccctctgctggtacttgcggggtcctgct gctttcactgtgatcactcttactgaagcggctcgaagaagctgctgtacatcttaagca accttcatgagccctgtgagactactcaagaggaggacggctgttcatgccgttccaga ggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgacgagcagatgctccagc ctaccagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatctggctcggagagaggatc gacgtgtgacaagcggagaggacgggaccagaatggcggggaagccgcagcaga agaatcccgaaggggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatg cgagattggtatgaaagggaacgcagaaggcgaaggccacgagcactgtaccagg gactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctctcactcagggccctgccgctcgg</p>
8	<p>MALPVTALLPLALLHAAR PQSALTQPASASGSPGQSVTI SCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSG VSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSTLY VFGTGTQLTVLGGGGSEVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAIS GDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYA SSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGYYCARVRL QDGNWSDAFDVWQGTMVTVSSGGGGSGGGSGGGGS EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPG QAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSDYTLTISSLQPEDFA VYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGSGGGGSQV QLQESGPGLVKPSSETLSLCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGK GLEWIGVIWGSETTYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLS VTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLVTVSSTT TPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPSEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQ GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGL STATKDTYDALHMQALPPR</p>
CG#c227	<p>9 atggccctgccctgactcgcctcctgctccggtggccctgctcctgatgccccaaccte agtcctcctgactcagccggcctcagcttcgggggtcccctggfcaaaagctcactattctg taccggaacctatcagacgtggcggctacaattactgtcctgtaccacaagcaccgg gaaaggctcctaaagcttatgatctacgacgtgtccaaccggcctcaggagtgccaacagat tctccggctccaagagcgaacactgccagcttgaccattagcggcttcaggccgagga</p>

[0492]

	<p>cgaagccgactactactgctctagctacacatcctcgtctaccctctacgtgtttggaacgggg acccagctgactgtgctcgggggtggaggatcagaggtgcaactccagcagtcggctctg gctcgtgaaaccgtcccaaacctgtccctgacttgcgccatctggggcactccatgctgt ccaattccgacacctggaactggattagacaatgcctagccgggactcgaatgctgggg cggacctaccacggctccacgtggtatgacgactacgcaagctccgtccggggaagggtgt ccaftaacgtcgatacctccaagaaccagtaacgcttcagctgaacgtgtgacccccgag gataccggcgtctactactgtgcaagatgctgatgagatggaaactcgtgctcggacgc attcgtatgtggggacagggaactalggctactgtgtctccggcgggtggaggtctggggg gggcggtcagggaggggcggctcacaagtcacgtgcaagaatccggctcgggactgtg tgaagccgtccgaaacctgtcactgactgtgctcgggggtgtcattgccgactacg gctgtgagctggattggcagccccctgaaagggttggatggatcggcgtgatctgggg tggaaactacctatcagctcctcactgaagtcggcgtgacctcagcaaggataatcca aaaaccaagtgtctgaaagetctccagcgtcactgccgccgatactgccgttactactgcg ccaagcactactattacggcgggttcgtacgccatggactactggggacaaggcactcttga ctgtgtcaagcggcgggtgaggagcgggtggggcgggtcaggaggaggggatcagag atcgtgatgaccaateccccagccacctgtccctcagccctggagaagagccacctgag ctgccgggctccagatacagcaagtacttgaactggatccaacaaaagccggggcag ggeceggctctgactaaceaacctcggcctcacteaaggatceecgagattctca gggagcggctcgtactgactacacctgactatttctcactgcaagcaaggactttgcc gtgtacttctccagcagggaactctgccgtacacttggcgagggaaagcgaacttga aattaagaccactaacecagaccagggcaccacccccggetectaccategcctecag cctctgtccctcgtccggagcatgtagaccgccagctggggggcgtgcataccggg gtcttacttccctgcgatactatattggccctctggctgtacttgcgggctcgtctg ctftactcgtgactctttactgtaagcgggtcggagaagctgctgtacatctttaagca cctctcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgtcatgccggttccaga ggaggaggaaagcggctgcgaactgcgggtgaaattcagcgcagcagatgctccagc ctaccagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggcggagagaggatc gacgtgctggacaagcggagagggacgggacccagaatggcgggaaagccgcagaa agaatcccgaagggcctgtacaacgagctcaaaaggataagatggcagaagcctatag cgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaggccacggactgtaccagg gactcagcaccgcccaaggacacctatgagctcttcacatgagggccctgccctcggg</p>
10	<p>MALPVTALLPLALLLHARPQSALTQPASASGSPGQSVTI SCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSG VSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC SSYTSSSTLY VFGTGTQLTVLGGGGSEVQLQSGPGLVKPSQTL SLTCAIS GDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYA SSVRGRV SINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARVRL QDGNWSDAFDVWGQGMVTVSSGGGGSGGGSGGGGS QVQLQESGPGLVKPSSETLSLCTVSGVSLPDYGVSWIRQPP GKGLEWIGVIWGSETTYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKL SSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLVTVSS GGGSGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTRSLHSGIPARFSGSGS GTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKTT TPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFM</p>

[0493]

		RPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQ GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRKGHDGLYQGL STATKDTYDALHMQALPPR
이중 CD19-CD22 CAR		
CG#c201		
전장 CD19- CD22 이중 CAR 핵산	11	atggccctccctgtcaccgacctgctgctctccgctgctctctctctccacgcccgtcggccc aaagtgcagctgcagcagtcaggcctggcctggtaagcctgcagaccctctccctgac atggccattagcggggactccatgctgagcaactcggacacctggaactggattcgagct ccccctccggggactcggagtgctcggacgcacctaccatcggagcaactggtagcagca ctacgctctctcctgtagaggctcgtgctgatacaactggatacctcgaagaaccagtatg cttgaactgaacgectggaacctgaggatacggagtgactattgtgcgagagtcaggct gcaagacggaaactcctggtccgacgcattgtagtctggggacagggtactatggtaacgg gtcatctggaggcgggagatcgaagcgcctgactcagccgctcggctcagcaggttca ccggggcagctcctgactatctctgaccgggactctctcagctggggaggctacaattac gtgctctgtaaccagcaacaccccggcaaaagcccaagctgatgatctacgacgtcagcaa cagaccagcggagtgccaaccggtcagcggcctcaagtcggcaacaccgctccctg accatcagcgggctcaggccgaagatgagcgggattactactgctctctgtaacactcaag ctcaactctgactgttctggcaactgtaactcagctcaactgctgtaacactcaactcaag ggggcaccaccggctcctaccatcgcctccagcctctgctccctgctccggaggcag gtagaccgcagctgtggggcctgcataccggggtctgacttccctgctgatactaca ttggggccctctgctggtacttgcgggctctgctcttctcctgctgactctttactgtaa gctggctcggaaagctgctgatacttfaagcaaccctcatgaggcctgtgcagactac tcaaggaggagcggctgtcatgccgttccagaggaggaggaaggcggctcgaact gctcgtgaaattcagccgacgcagatgctccagcctaccagcggggcagaaccagct ctacaacgaaactcaatctgtcggagagaggagtagcagctgctgcagaagcggagagga cgggaccagaaatgggcgggaagccgcgagaagaalcccagaaggcctgtacaac agagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgaagattggtatgaaaggggaacgc agaagggcaagggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacac ctatgacgctctcacatgagggcctgcccctcggggaagcggagctactaactcagcct gctgaagcaggctggagacgtggaggagaacctgacatgacctaccagtaccgccc ttgctctcctgctgctgtgctcctcagcggcaggccggaaattgtagaccagtc cccggcaetctttagccttcaaccggtagcgcgcaacctgtctgagagcctcccaagac atctcaaaataccttaattgatacaacagaagcccggacagctctcgcctctgataca caccagccggctcattctggaatccctgcccaggtcagcggtagcggatcggaccgact acaacctcaactcagctcactgcagcagaggacttctgctctattctgcaagggaa caccctgcccacactttggacaggcaccaggctcgaagtaaaagggtggagtgccagc ggaggagggtgggtccggcgggtggagggaagccagggtccaactccaagaaagcggaccgg gtcttggaaagccatcagaaactcttcaactgactgtactgtgagcggagtctctcctccgatt acgggggtgtcttggatcagacagccaccggggaaaggctctggaatggattggagtattgg ggctctgagactacttaaccaateatccctcaagteacggteaccatcacaaggacaact ctaaagaatcagggtgactgaaactgcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgactattg cgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtactctggt caccgtgtccagcaccacgacgccagcggcggcaccaccaacaccggcggcccaccatcg cgtcgcagcccctgctccctgcccagaggctgcccggcagcggcggggggcagctg cacacgaggggctggacttccctgtgatactacatctgggcccttggccgggactgt

[0494]

		<p>ggggctctctctgtcactggttatcacccttactgcaaacggggcagaagaactcctgt atataffcacaacacattatgagaccagtacaaactactcaaggagagatggctgtagctg ccgattfccagaagaagaaggagatgtaactgagagtgaagttcagcaggagcgca gacgecececgctaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaa gagaggagtacgatgtttggacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggaaagc cgagaaggaagaacctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaagataagatggcgg aggcctacagtgagatgggatgaaaggcgagcggcggaggggcaaggggcacgatggc ctffaccagggctcagtagacgccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgagggcct gccccctcgc</p>
전장 CD19- CD22 이중 CAR 아미노산	12	<p>MALPVTALLLPLALLHAARPEVQLQQSGPGLVKPSQTLSTL TCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWY DDYASSVRGRVSNVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCA RVRLQDGNWSDAFDVWGQGTMTVTVSSGGGGSQSALTQP ASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPK LMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADY YCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVLTTTPAPRPPTPAPTIASQPL SLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYTWAPLAGTCGVLL LSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA EAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMALPVTALLLPLAL LLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSRASQDISKYLN WYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFAVYFCQQGNLTPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGG SGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLICTVSGVSLPDYGV WIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYQSSLKSRVTISKDNSKN QVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGT LVTVSSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH TRGLDFACDIYTWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRS ADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEM GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR</p>
CD22 CAR (P2A 부위 포함)	13	<p>MALPVTALLLPLALLHAARPEVQLQQSGPGLVKPSQTLSTL TCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWY DDYASSVRGRVSNVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCA RVRLQDGNWSDAFDVWGQGTMTVTVSSGGGGSQSALTQP ASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPK LMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADY YCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVLTTTPAPRPPTPAPTIASQPL SLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYTWAPLAGTCGVLL LSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA</p>

[0495]

		EAYSEIGMKGERRRGKGHDLGYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPRSGATNFSLLKQAGDVEENPG
CD19 CAR	14	PMALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPA RFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQG TKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSFTLSL TCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETYYQS SLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYYY GGSYAMDYWGQGLVTVSSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL RPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLS LVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDLGYQGLSTATKDTYDALHMQAL PPR
CG#e203		
전장 CD19- CD22 이중 CAR 백신	15	atggccttaccagtaccgcttctctctgctgctgctgctcaccgcccagggccg gaaattgtgatgaccagtcaccgccactcttagcttaccgggtgagcgcgcaacctg tcttgcagagcctccaagacatcctaaaataccttaattggatcaacagaagccggacag gctctcgccttctgatctaccacaccgctcctcattctggaatccctgcccaggttcagcg gtagcggatctgggaccgactacacctcactatcagctcactgcagccagaggacttctgct gtctatttctgctcagcaagggaacacctgcccctacacctttggacagggcaccagctcagag atfaaagggtgaggtggcagcggaggagggtgggtccggcgtgtagggaagccaggtcca actcaagaaaagcggaccgggtcttgtgagccatcagaaaactcttctactgactgtactgtg agcggagtgtctctcccgaattacgggggtcttggatcagacagccaccggggaagggtct ggaatggattggagtgattggggctctgagactactactaccaatcaacctcaagtcacgc gtcaccatctcaaggacaactcfaagaatcaggtgtcactgaaactgtcactgtgaccgag ccgacaccgccgtgtactattgcctaagcattactattatggcgggagctacgcaatgatta ctggggacagggactctgtcaccgtgtccagcaccacgacgcccagcggccgaccacc aacaccggcgcgccaccatcgcgtcgcagcccctgtccctgcgccagaggcgtgcccggcc agcggcggggggcgcagtgcaacaggggggctggaettgcctgtgatactacatctgg gcgccccttggccggacttgggggtctctctctgcaactggtatcaacctttactgcaaacg gggcagaaaagaaactcctgtatataatcaaacaccattatgagaccagtacaaactactcaa gaggaagatggctgtagctgccgattccagaagaagaagaggagatgtaactgagag tgaagttcagcaggagcgcagacccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctata acgagctcaatctaggacgaaagagaggatgaggtttggacaagagacgtggccggga ccctgagatgggggaaaaccgagaaggagaacctcaggaaggcctgtacaatgaact gcagaagataagatggcggaggcctacagtgaattgggafgaaaggcagcgcggcga ggggcaaggggcacgagtgcccttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacga cgcccctcacatgcagcgcctgccccctcgcggaagcggagctactaacttcagcctgctga agcaggtggagacgtggagagaaacctggacctatggccctccctgtcaccgccctgct gctfccgctgctctctctcaccgccctcggcccgaagtgcagctgcagcagtcaggggc ctggcctgtcaagccgtcgcagaccctctcctgacatgcccattagcggggactccatg ctgagcaactcggacacctggaactggattcggcagtcctccctccgggactcagtgct cggacgcacctaccatcggagcacttggtagcagactacgcctctcctcgtgagaggtcgc gtgtcgateaacgtggatactcgaagaaccagtatagcttgaactgaacgccgtgaccct

[0496]

		<p>gaggataccggagtgactattgtgcgagagtcaggctgcaagacggaaactctggtccga cgcatttgatgtctgggacaggggtactatggtcacgggtcactctggaggcggaggatcgca aagcgccctgactcagccgcttcggctagcgggttaccggggcagtcctgactatctct gcaccgggactctcctcgacgtgggaggtacaaffacgtgctctgtaccagcaacacccc ggcaaaagcccaagctgatgatctacgacgtcagcaacagaccagcggagtgtecaacc gggtcagcggctcgaagtcggcaacaccgcctcctgacatcagcgggctcaggccga agatgagcgggattactactgctcctgtacacctcaagctcaactctgtacgtgttcggcacc ggtactcagctcaccgtgctgaccaclaccccagcaccgaggccaaccccggctccta ccctcgcctcccagcctctgtcccgcgctcggaggcatgtagaccgcagctggggggcc gtgcatacccggggtcttgacttcgctcgcgatatctacattggcccctctgctggtactgt cggggtcctgctgcttctactcgtgatcactcttaactgtaagcggctcggaaagctgctgt acatcttaagcaacccttcatgagcctgtgcaactactcaagaggaggacggctgttcatg ccgggttccaagaggagggaagggcggctgcaactgcgctgaaatcagccgcagcgc agatctccaagcctaccagcaggggcaaacagctctacaacgaactcaatctggtcggga gagaggagtagcagctgctggacaagcggagagcgggaccagaaatgggctgggaa gccgcgcagaagaatcccgaagggcctgtacaacgagctccaaaaggaataagatggc agaagcctatagcagattggtatgaaaggggaacgcaagaaggcgaagccacgacg gactgtaccagggactcagcaccgcccaaggacacctatgacgctcttcaatgcaaggcc ctgccgcctcgg</p>
<p>전장 CD19- CD22 이중 CAR 아미노산</p>	<p>16</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPAR FSGSGSDYTLTISSLPEDFAVYFCQQGNLTPYTFGQGT KLEIKGGGGSGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLT CTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGETTYQSS LKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVVYCAKHYYYG GSYAMDYWGQGLVTVSSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAFLAGTCGVLLLSL VITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE EEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL PPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGMALPVTALLLPLALLL HAARPEVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSMLSNSDT WNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSN VDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGYYCARVRLQDGNWSDA FDVWGQGTMTVTVSSGGGGSQSALTQPASASGSPGQSVTIS CTGTSSDVGGYNYVSWYQHPGKAPKLMYDVSNRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSTLYVF GTGTQLTVLTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYIWAFLAGTCGVLLLSLITLYCKRGRK KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKF SRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAASEIGMKGERRR GKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR</p>

[0497]

<p>CD19 CAR (P2A 부위 포함)</p>	<p>17</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPAR FSGSGSGTDYTLTISSLPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGT KLEIKGGGGSGGGSSGGSSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLT CTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKLEWIGVIWGSETTYQSS LKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYYYG GSYAMDYWGQGTILVTVSSTTTPAPRPPTAPTIASQPLSLR PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSL VITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE EEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL PPRGSATNFSLLKQAGDVEENPG</p>
<p>CD22 CAR</p>	<p>18</p>	<p>PMALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGPGLVKPSQTL LTCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTW YDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYC ARVRLQDGNWSDAFDVWGQGTMTVTVSSGGGGSQSALT QPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKA PKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYCYSSYTSSTLYVFGTGTQLTVLTTTPAPRPPTAPTIAS QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCG VLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS CRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLG RREEYDVLDKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPR</p>
<p>CG#e230</p>		
<p>전장 CD19- CD22 이중 CAR 핵산</p>	<p>19</p>	<p>atggcacttccctcaccgacctgctgctcccactgacctctctgcacgccgcccgcc gaagtgcagctgcagcagtcaggaccggcctggtcaaaccttcgacagactctgacctgac ttgcgtataagcgggactecatgctgagcaatggacacttggaaactggattgccaaag ccccagcgggtctggaatggtgggaaggacctaccatcctctacttggtacgacgact acgccagctccgtgcgaggacgctgtccatcaactggacacctcaagaacagactc gttcaactcaacgeagtgacctgaagatacggagtactatggccgctgctggct ccaggacgggaactcctggtggacgcttctgatgctggggacagggaactatggtaecg tcagctcggcggcgggctagccaatcggcgctgacacagccggctccgctcgggac gctggacagtcggtgacctctcgtgactggaacctctccgacgtggcgctacaatta tgtgtcatggtaccagcagcaccgggaaaggcccctaagctgatgatctacgactgcca atagacctagcgggtgtcaaacagattctccggatccaatccggaacactgcctcctga ccattccggactgcaggccgaggacgaagccgattactctctcttacacctctc caccctctacgtgttggactggaccagctgaccgtcctcactaccacccggccccgc ggccccctacaccggcaccgactatggcagccagcctctctcgtcggccggaggcctg ccgccagccgcccggcggagccgtgcaacccgcggtctgactcgcgtcgatctac atctggctccgctgcccggactgtggcgtgctgctgctctctggtcatcacactgact gcaagcgcggaagaaagactgctctacatctcaagcaaccttcatcggcctgtgag accaccaggaagaggatgctgctctcctccggttcccggaggagaagaggcggatc gaaactgcgctgaagttagccgaagcgcggacgccccggcctaccagcaggccagaa</p>

[0498]

	<p>ccaactgtacaacgaactcaacctgggtcggagagaagagtagcgtgctggacaaaaga cgcggcagggacccccgagatggcggaagcctcgcgcgaagaaccgcagggaggcc tctacaacgagctgcagaaggacaagatggcgaagcctactcagagatcggcatgaagg ggagcggagcgcgggaaggccacgacggtttgacctaaaggactffccactgcgacaa ggacacctacgatcccctccatgcaagccctcccgggggtccggagctaccaact tctcgtgttaagcagccggagatgtcaggaaaaccgggacctatggccctgccagt gaccgcgtcctgctgcccctggctcgtgcttcaacgcgcccggcctgagattgtgatgac tcagagccccggcgacctgtcccctgtccccggggagagagcaaccctgctgtccgggc ctcccaagacatcfaaagtaacctcaattggtatcagcagaagccagagacgctccacggtt gctgatctaccacactcgaactgactcaggaatccccgcgcgggtttccggtccgctcc ggaccgactacacctgacctcagctcgtccagcctgaggtttcgcagtgtactctgtc agcaaggaaacaccttcatacacctcggacagggtaaccaagctgaaatcaaggagg agggagatctggggcgtggttccggaggcggggaagccaagtgcagctccaggaaa gcccggaccggcgtgtaagccgagcgaaacctctcactgactgtactgttccggagt tccctgctgactatgagatgctcgtgatccgacagccccggaaaaggctggagtgatt ggggtcatctgggctcgaactactactaccagagcagcctcaagagccgggtcaccat tcaaggataactcaagaatcaagtgtccctgaagctgtctcagtgacagccgagacac gccctgtaetactgcgcaagcaetactactaggaggctctacgcaatgactactggg gacaaggcaacttggctactgtgtaagcaccacaacctgcgcctcggcctctacccecg gctcccactatcgcgagccagccgctgagcctgcccctgaggcttgcgaccggcctg gggggcctgacatacgggctcgaatttgcctgtgacatctacatctgggccccctgg ccggaacgtgcggagtctgctgctgctgctggtcattaccctgattgcaaacgcggaagga agaagctgtgtacatttcaagcagccctcatgcgccgggtgcaaacactcaggaggag atggctgttctgtcgttccccgaagaggaagaagcgcgctcgcgagttgagggtcaagtct cccggctccgccgatctcccgcctaccaacaggggcagaaccagctttataacgaactgaac ctgggcaggaggaggaaatgatgtgttgataagcggggggccggaccagaaatg ggggaaagcccagaagaaagaacctcaagaggacttacaacgaatgcagaagac aaaatggccgaggctactccgagattggatgaaggcgaagacggagaggaagg gcacgagggctctaccaggactcagcaccgccaccaaagatactacgacgcctcat atgcaggcgtgccggcgcgc</p>
<p>전장 CD19- CD22 이중 CAR 아미노산</p>	<p>12 MALPVTALLPLALLHAARPEVQLQQSGPLVKPSQTLSTL TCAISGDSMLNSNDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWY DDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVIYCA RVRLQDGNWSWDAFDVWGQGTMTVTVSSGGGGSQSALTQP ASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPK LMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADY YCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVLTTTPAPRPPTPAPTIASQPL SLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYTWAPLAGTCGVLL LSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR PEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPMEGKPRRKNPQEGLYNELQDKMA EAYSEIGMKGERRRKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMALPVTALLPLAL LLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYL NYWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSDYTLTIS SLQPEDFAVYFCQQGNLTPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGG</p>

[0499]

		SGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKLEWIGVIWGSETYYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYYGGSYAMDYWGQGLVTVSSTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
CD22 CAR (P2A 부위 포함)	13	MALPVTALLPLALLLHAARPEVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSMLNSNDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSNVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARVRLQDGNWSDAFDVWGQGTMTVTVSSGGGGSQSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSTLYVFGTGTQLTVLTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPRSGATNFSLLKQAGDVEENPG
CD19 CAR	14	PMALPVTALLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKLEWIGVIWGSETYYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYYGGSYAMDYWGQGLVTVSSTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

[0500]

[0501]

본 발명의 이중 CAR 또는 탠덤 CAR의 CD22 및 CD19 CDR은 표 2A에 제공된다.

[0502] [표 2A] CD22 및 CD19 CDR 서열

식별기호	서열번호	서열
CD22 CDR		
HCDR1 (Kabat)	20	SNSDTWN
HCDR2 (Kabat)	21	RTYHRSTWYDDYASSVRG
HCDR3 (Kabat)	22	VRLQDGNSWSDAFDV
HCDR1 (Chothia)	23	GDSMLSNSD
HCDR2 (Chothia)	24	YHRSTWY
HCDR3 (Chothia)	22	VRLQDGNSWSDAFDV
HCDR1 (IMGT)	25	GDSMLSNSDT
HCDR2 (IMGT)	26	TYHRSTWYD
HCDR3 (IMGT)	27	ARVRLQDGNSWSDAFDV
LCDR1 (Kabat)	28	TGTSSDVGGYNYVS
LCDR2 (Kabat)	29	DVSNRPS
LCDR3 (Kabat)	30	SSYTSSSTLYV
LCDR1 (Chothia)	31	TSSDVGGYNY
LCDR2 (Chothia)	32	DVS
LCDR3 (Chothia)	33	YTSSSTLY
LCDR1 (IMGT)	34	SSDVGGYNY
LCDR2 (IMGT)	32	DVS
LCDR3 (IMGT)	30	SSYTSSSTLYV
CD19 CDR		
HCDR1 (Kabat)	35	GVSLPDYGVV
HCDR2 (Kabat)	36	VIWGSETTYYSSSLKS
	37	VIWGSETTYYQSSLKS
	38	VIWGSETTYYNSSLKS
HCDR3 (Kabat)	39	HYYYGGSYAMDY
LCDR1	40	RASQDISKYLN
LCDR2	41	HTSRLHS
LCDR3	42	QGNLTPYT

[0503]

[0504]

[0505]

표 3A는 본원에 개시된 이중 CAR 또는 탠덤 CAR의 CD19 및 CD22 결합 도메인에 대한 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 제공한다.

[표 3A] CD19 및 CD22 결합 도메인

식별기호	서열 번호	서열
c201, c203 및 탠덤 CAR c171, c182, c188 의 scFv CAR19	43	gaaattgtgatgaccagtcaccgcccactcttagcctttcaccgggtgagcgcgcaacctgtcttgacagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattggtatcaacaagaagcccggacaggtectctgectctgatctaccacacagccggctccattctggaatccctgacaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacaccctcaclatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatftctgtcagcaagggaacacctgcccctacacctttggacagggcaccagctcgagattaaagggtggaggtggcagcggaggagggtgggtccggcggtggagggaagccaggtccaactccaa gaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactcttctactgactgtactgtgagcggagtgtctctcccgattacggggtcttggatcagacagccaccggggaagggtctggaatggattggagtgatttggggctctgagactactactaccaatcaccctcaagtacgcctcacatctc aaaggacaactetaagaatcagggtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgc cgtgtactattgcetaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacaggg tactctggtcaccgtgtccagc
	44	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPG QAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSDTYTLTISSLQPEDFA VYFCQQGNLTPYTFGQGTKLEIKGGGSGGGSGGGGSQV QLQESGPNLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKG LEWIGVIWGSETTYYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVT AADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLVTVSS
c224 의 scFv CAR19	45	gagattgtcatgactcagtcaccggccacactctccctgtcaccggagaaagagcaacctg agctgcagggcgtcccaggacatctcgaagtacctgaactgtaccagcagaagcctggaca agcacecccgctcctgatctaccacactcgcggctgcattcgggaafcccgcagattctca gggagcggatcagggaaccgactacacctgactatctcagccctgcaaccaaggattctgc cgtgtactctgccagcaaggaaacacctgcccctacacctttggacaggggaaccaagctcga gattaagggggtgtggtgatcgggaggggtggtgatcaggaggagcggctcacaagtcca gctgcaagaatcgggtccgggactgtgaagcgtccgaaacctgtcactgactgtcactgtg tccggggtgtcattgcccactacggcgtgagctggattcggcagcccccggaaaggattg gaatggatcggcgtgatctgggttcggaaactactatcagctcctcactgaagtcccgctg accatcagcaagataaltccaaaaccaagtgtctctgaaactcaccagcgtcactgccgc cgatactgccgtgtactactgcgccaagcactactattacggcgggtctgtaccatggactact gggccaaaggacactcgtgaccgtgtcacc
	44	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPG QAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSDTYTLTISSLQPEDFA VYFCQQGNLTPYTFGQGTKLEIKGGGSGGGSGGGGSQV QLQESGPNLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKG LEWIGVIWGSETTYYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVT AADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLVTVSS
c227 의 scFv CAR19	46	caagtccagctgcaagaatccgggtccgggactgtgaagccgtccgaaacctgtcactgact gcaactgttccgggtgtcattgccgactacggcgtgagctggattcggcagccccctggaa agggattggaatggatcggcgtgatctgggttcggaaactactactatcagctcctcactgaa gtcccgtgaccatcagcaaggataattccaaaaccaagtgctctgaaactcctccagcgtc actgccgccgatactgccgtgtactactgcgccaagcactactattacggcgggtctgtaccat

[0507]

		ggactactgggacaaggcactctgtgactgtgcaagcggcgtggaggagcgggtggg ggcgggttcaggaggagcggaacagagatcgtgatgacccaatccccagccaacctgtccct cagccctggagaaaagaccacctgagctgccggcctcccagatalcagcaagtactga actggtaccaacaaaagccggggcagcgcceccggctctgatctaccaacctcggcctc cactcaggtatccccgccagattcagggagcggctccggactgactacacctgactatctc ctcactgcagccagaggactttccgtgactctgccagcagggaaacactctgccgtacacc ttcgggcagggaaacgaagcttgaattaag
	47	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPG KGLEWIGVIWGSETTYQSSLSKSRVTISKDNSKNQVSLKLS VTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLVTVVSSGG GGSGGGGGSGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDI SKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIK
c230 의 scFv CAR19	48	gagattgtgatgactcagagccccggcaccctgtccctgtccccggggagagcaacct gtcgtgccggcctcccaagacatctcaaagtacctcaattggtatcagcagaagccaggaca ggctccacgggtgtgatctaccacttcgagactgcactcaggaatccccggcgggtttcc ggttccggctccggaccgactacacctgaccatcagctcctccagcctgaggtttcga gtgactctgtcagcaaggaaacacctccatacaacctggacagggtaaccaagctggaaa tcaaggaggaggaggtatctggggcgggtgttccggagcgggtggaagccaagtgcagc tccaggaagcgggaccggcctggcgaagccgagcgaaacctctcactgacttactgtgt ccggagtgtccctgactatggagtgtcctggatccgacagccccggaaagggtctgg agtggattggggtatctgggctccgaaactaactactacagagcagcctcaagagcgg gtcaecatccaagataactcaagaatcaagtgctccgaagctgtcctcagtgacagcgg cagacaccgccgtgactactgcgccaaagcactactactacggaggtcctcagcaatggact actggggacaaggcactttgtcactgtgtcaagc
	44	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLWYQQKPG QAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFA VYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGSGGGGSQV QLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGK GLEWIGVIWGSETTYQSSLSKSRVTISKDNSKNQVSLKLS SVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLVTVVSS
c201 및 c203 의 SeFVCAR2 2	49	gaagtgcagctgcagcagtcagggcctggcctggtaagccgtcgcagaccctcctgac atgcgccafftagcgggactccatgctgagcaactggacacctggaactggaltcggcagtc cccttcccgggactcagtggtcggacgcaectaccatcggagcaattggtagcagacta cgctcctcctgagaggtcgcgtgctgatcaactggatactcgaagaaccagtatagcttg caactgaacgccgtgacctgaaggataccggagtgactattgtcgagagtcaggctgaa gaecggaaactcgtgtecgaecatttgatgtctgggacagggtaactatggtcaggtgcat ctggaggcggaggatcgaagcgcctgactcagccgcttcggctagcggttcaccggg gcagtcctgactatctctgcaccgggacttctccgacgtgggaggtacaattacgtgtct ggtaccagcaacccccggcaagccccaaagctgafgatctacgacgtcagcaacagacc cagcggagtgccaaccgggtcagcggctccaagtcggcaacaccgcctcctgaccatca gcgggcttcaggccgaagataggcgggattactactgtctctgtacaectcaagctcaactct gtactgttcggcaccgtactcagctaccgtctg
	50	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSMLSNSDTWNWIRQ SPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSNVDTSKNQ YSLQLNAVTPEDIGVYYCARVRLQDGNWSDAFDVWGQG

[0508]

		TMVTVSSGGGGSQSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVG GYNVYSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSG NTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSTLYVFGTGTQLTVL
230 의 ScFVCAR2 2	51	gaagtgagctgcagcagtcaggaccggcctggtcaaaccttcgagactctgtccctgact tgcgtataagcgggactecatctgagcaattcggacacttggaaactggattcgcctaaagc cccagccgggcttggaatggctgggaaggacctaccatcctclacttggtagcagactac gccagctccgtgcgaggacgcgtgtccatcaacgtggacacctccaaagaaaccagtactcgtt caactcaacgcagtgaccctgaagataccggagctactattgcgccgcgtgcggctccag gacgggaactcctggtggacgcttctgatgtctggggaacgggcaetattgtaaccgtcagc tcggcggcggggtgtaaccaatcggcgtgacaagccggcttccgctcgggagcgcctg gacagtcggtgaccatctctgctcactggaacctctcgcagctgggcggctacaattatgttc atggtaccagcagcaccgggaaaggccctaaagctgatgatctacgagctgtccaatagacc tagcggggtgtcaaacagattctccggatccaaatccggaaactgcctccctgaccattcc ggactgcagccgaggacgaagccgattactactgctctctttacacctctctatccaccteta cgtgttgggactgggaccagctgaccgtcctc
	50	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSMLSNSDTWNWIRQ SPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSNVDTSKNQ YSLQLNAVTPEDTGVYYCARVRLQDGNWSDAFDVWGQG TMVTVSSGGGGSQSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVG GYNVYSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSG NTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSTLYVFGTGTQLTVL
171, c182 의] ScFVCAR2 2	52	gaagtgagctcaacaatcaggaccaggactcgtcaaacatcaagaacctctctctacat gtgccatctccgggactecatgttgagcaattcggacacttggaaatggattagacaagccc gtcccggtcttggaatggttggagcgcacctaccaccggctacttggtagcagactacgc gtcatcctgtgcggggaagagtgtccatcaacgtggacacctcaagaaccagtaacagcctgc agcttaatgectgactcctgaggatacggcgtctactactgcgccgcgtccgctgcaag acgggaacagctggagcgtgctcattgatgtctggggccagggaactatgtaaccgtctgct ctggggcgggtggtatcgggtggcgggggttcggggggcggcggctctcagctccctctac ccaaccggcctcagcctcggggagccccggccagagcgtgaccattctgcaccggcactt catccgacgtggcggctacaactacgtgtctgtgtaccaacagcaccgggaaaggcccc aagctcatgatctacgactgttccaacagccctcgggagtggtccaaccggttctcgggttga aatcgggaaacacagccagcctgaccatcagcggactgcagcgtgaagatgaagccgacta ctactgctctctacaacctgctatccacgctctactgttgggcaactggaactcagctgactgt gctg
	53	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSMLSNSDTWNWIRQ SPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSNVDTSKNQ YSLQLNAVTPEDTGVYYCARVRLQDGNWSDAFDVWGQG TMVTVSSGGGSGGGGSGGGGSQSALTQPASASGSPGQSV TISCTGTSSDVGYNVYSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSG VSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSTLYV FGTGTQLTVL
c188 의] ScFVCAR2 2	54	cagtcgctctaccacaaccggcctcagcctcgggagccccggccagagcgtgaccattcc tgcaccggcactcaccgacgtggcggctacaactcgtgtctgtaccaacagcaccg ggaaaggcccccaagctcctgatctacgactgttccaacagccctcgggagtgccaaccg gttctcgggttgaaatcgggaaacacagccagcctgaccatcagcggactgcaggctgaag atgaagccgactactctctctctacacctcgtcaccacgctctactgttccgactgga

[0509]

		actcagctgactgtgctggcggaggagctccgaagtgcagcttcaacaatcaggaccagg actcgtcaaaecatcacagacctctcctcaccatgtgccatctccggggactccatgttgagca atccgacacttggattggattagacaaagcccctccggggtctggaatgggtgggacgca cctaceaceggctacttgggtacgactacgctcctccgtcggggaagagtgtccatcaa cgtggacacctcaagaaccagtacagctgcaactaatccgtgactctgaggafacggg cgtctactactgcccgcctccgctgcaagacgggaacagctggagc gatgcattc gatgt ctggggccagggaactatggtaaccgtgctct
	55	QSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQH PGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAE DEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVLGGGGSEVQLQSG PGLVKPSQTLSLTCAISGDSMLNSDTWNWIRQSPSRGLEW LGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAV TPEDTGVIYCARVRLQDGNWSDAFDVWGQGMVTVSS
c224 의 ScFVCAR2 2	56	cagtcctctgactcagccggcctcagcttggggctcccctgggtcaaaagctcactattctg taccggaaacctatcagactgtggcgctacaattacgtgctctggtaccaacagcaccgg aaaggctcctaagcttatgatctacgactgttcaaacggcgtcaggagtgtccaacagattc ccggctccaagagcggaaacctgccagctgaccattagcggcttcaggccgaggacga agccgactactactgctctagctacacatctcgtctacctctacgtgttggaaaggggacc agctgactgtctcgggggtggagatcagaggtgcaactecagcagtcggctctggctc gtgaaaccgtccaaaccctgctcctgacttgcacctctgggggaacctcctgtccaattc cgacacctggaactggattagacaatcgctagccggggaactgaatggctggccggacct accaccggccaactgtgtatgactacgcaagctccgtccgggaagggtgtccattaacg tgatactecaagaaccagtacagcctcagctgaacgtgtgacccccgaggataccggcg tctactactgtcgaagagtgcgattgcaggatggaaactcgtggctggagcattc gatgtctg gggacagggaactatggtaaccgtgctctc
	55	QSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQH PGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAE DEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVLGGGGSEVQLQSG PGLVKPSQTLSLTCAISGDSMLNSDTWNWIRQSPSRGLEW LGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAV TPEDTGVIYCARVRLQDGNWSDAFDVWGQGMVTVSS
c227 의 ScFVCAR2 2	57	cagtcctctgactcagccggcctcagcttggggctcccctgggtcaaaagctcactattctg taccggaaacctatcagactgtggcgctacaattacgtgctctggtaccaacagcaccgg aaaggctcctaagcttatgatctacgactgttcaaacggcgtcaggagtgtccaacagattc ccggctccaagagcggaaacctgccagctgaccattagcggcttcaggccgaggacga agccgactactactgctctagctacacatctcgtctacctctacgtgttggaaaggggacc agctgactgtctcgggggtggagatcagaggtgcaactecagcagtcggctctggctc gtgaaaccgtccaaaccctgctcctgacttgcacctctgggggaacctcctgtccaattc cgacacctggaactggattagacaatcgctagccggggaactgaatggctggccggacct accaccggccaactgtgtatgactacgcaagctccgtccgggaagggtgtccattaacg tgatactecaagaaccagtacagcctcagctgaacgtgtgacccccgaggataccggcg tctactactgtcgaagagtgcgattgcaggatggaaactcgtggctggagcattc gatgtctg gggacagggaactatggtaaccgtgctctc
	55	QSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQH PGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAE DEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVLGGGGSEVQLQSG PGLVKPSQTLSLTCAISGDSMLNSDTWNWIRQSPSRGLEW LGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAV TPEDTGVIYCARVRLQDGNWSDAFDVWGQGMVTVSS

[0510]

[0511]

표 4A는 추가 CAR 구성요소, 예를 들어 신호 펩티드, 링커, 및 P2A 부위에 대한 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 제공한다.

[0512] [표 4A] 추가 CAR 구성요소

식별기호	서열 번호	서열
c201, c203, 및 랜덤 CAR c171, c182, c188 의 CAR22 에 대한 신호 펩티드	58	atggccctccctgtcaccgcectgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcgccc
	59	MALPVTALLLPLALLLHAARP
신호 펩티드 랜덤 CAR c224, c227	60	atggccctgcccgtgactgcgctctctgcttccgttggccctgctctgcatgccgccagacct
	59	MALPVTALLLPLALLLHAARP
신호 펩티드 c201 및 c203 의 CAR19	61	atggccttaccagtgaccgcecttgcctctgctgctggccttgcctgctccacgccgccaggcc
	59	MALPVTALLLPLALLLHAARP
신호 펩티드 c230 의 CAR22	62	atggcacttcccgtcaccgcectgctgctcccactgccctccttctgcacgccgccgccccc
	59	MALPVTALLLPLALLLHAARP
신호 펩티드 c230 의 CAR19	63	atggccctgcccagtgaccgctcctgctgctgcccctggctctgctgcttccacggcccggc
	59	MALPVTALLLPLALLLHAARP
c201 및 c203, 및 랜덤 CAR c171, c182, c188, c224, c227 의 CD8 힌지 및 막관통 CAR22	64	accactaccagcaaccgagccaccaccgccctcctaccatcgctcccagcctctgtccctgctccggagcatgtagaccgacgtgggtgggcccgtgcataccggggtcttgaacttgcctgcatatcacttgggcccctctggctggtacttgcggggctctgctgttcactcgtgatcactcttactgt
	65	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD FACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
c230 의 CD8 힌지 및 막관통 CAR22	66	actaccaccccggccccggccccctacaccggcaccgactatgccagccagcctctctcgctgcggccggagcctgcccccagccgccggcggagccgtgcacaccgctgtctggacttcgctgcatatctacatctgggctcctgctggccgggacttgtggcgtgctgctgtctctgtctcatcactgtactgc
	65	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD FACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
CD8 힌지 및 막관통	67	accacgacgccagcgcgcgaccaccaacaccggcgcgccaccatcgctgcagcccctgtccctgcgccagagcgtgccggccagcggcggggggcgcagtgcacacgagggggctggacttcgctgtgatatacatctgggccccttggccgggacttgtggggtctctctgtcactggttacccttactgc

[0513]

c201 및 c203 의 CAR19	65	TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD FACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
c230 의 CD8 인지 및 막관통 CAR19	68	accaccaccctgcgcteggcctectaccccggtccactatcgcgagccagccgctga gcctgcggcctgaggcttgcgaccggcctgctggcgccctgcatactcggggcctc gactttgcctgtgacatctacatctgggccccctggccggaacgtgaggagtctgctgct gtcgtgctcattaccctgtattgc
	65	TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD FACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
4-1BB c201 및 c203, 및 랜덤 CAR c171, c182, c188, c224, c227 의 CAR22	69	aagcgcggcgggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgaggcctgtgcagac tactcaagaggaggacggctgtcatgccggttcccagaggagggaagcggtgctgcg aacgtg
	70	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC EL
4-1BB c201 및 c203 의 CAR19	71	aaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaacaaccattatgagaccagtacaaact actcaagagggaagatggctgtgctgcccattccagaagaagaagaggatgtaa ctg
	70	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC EL
4-1BB c230 의 CAR22	72	aagcgcgggaagaagaagctgctctacatctcaagcaaccctcatcgccgctgtgcaga ccaccagggaagaggatggctgctcctgcgggttcccggagggaagaagggcggtatgc gaactg
	70	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC EL
4-1BB c230 의 CAR19	73	aaacgcgggaagaagaagctgtgtacatttcaagcagccctcatgcgccgggtgcaaac tactcaggagggaagatggctgttctctgctgggtcccgaagagggaagaagcggtgca gttg
	70	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC EL
CD3 제타 c201 및 c203, 및 랜덤 CAR 171, c182, c188, c224, c227 의 CAR22	74	cgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctaccagcaggggcagaaaccagctc tacaacgaactcaatcttggctcgagagaggatgacagctgctggacaagcgagagga cgggaccagaaatggcggggaagccgcgcagaagaatccccaaagggcctgtaca acgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcagattggtatgaaaggggaac gcagaagaggcaaaagccacgacggactgtaccagggaactcagcaccgcccaagga cacctatgacgctcttcaatgcaggccctgcccgcctcgg
	75	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
CD3 제타	76	agagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtaccagcagggccagaaccagct ctafaacgagctcaatctaggacgaagagaggatgacgatgtttggacaagagacgtggc cgggaccctgagatgggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtaca atgaactgcagaaagataaagatggcgaggcctacagtgagattgggatgaaagcgagc

[0514]

c201 및 c203 의 CAR19		gcccggaggggcaaggggcaacgatggcctttaccagggtctcagtaacagccaccaaggac acctacgaagcccttcacatgcaggccctgccccctcgc
	75	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
CD3 제타 c230 의 CAR22	77	cgcgtgaagttcagccgaagcgcgcgacccccggcctaaccagcagggccagaaccaact gtacaacgaactcaacctgggtcggagagaagatcagacgtgctggacaaaagacgcg gcagggacccccgatggcggaaagcctcgccgcaagaacccgcaggagggcctcta caacgagctgcagaaggacaagatggccgaagcctactcagagatcggcatgaaggggg agcggaggcgcgggaaggccacgacgggtttgtaccaaggactttccactgcgaccaag gacacctcagatgccctccatgtcaagcctgcccggccgg
	75	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
CD3 제타 c230 의 CAR19	78	agggtaagttctccggctcgcgcgatgctcccgcctaccaacaggggcagaaccagcttt ataacgaactgaactcgggagggaggaggaatgatgtgttgataagcggggggcc gggaccagaaatggggggaagcccagaagaagaaccccaagaggactttacac gaattgcagaagacaaaatggccgagcctactcagagattgggatgaagggcgaaaaga cggagaggaaagggcagcagcggcctctaccagggactcagcaccgccacaaaagata cctacgacgccctgcatatgcaggcgtgcccggcgc
	75	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
c171 의 scFV 간의 링커	79	ttggcagaagccgcgcgaaa
	80	LAEEAAK
c182, c188 의 scFV 간의 링커	81	ggtggaggtggcagcggaggaggtgggtccggcgggtggaggaagc
	82	GGGGSGGGS
c224 의 scFV 간의 링커	83	ggcggaggcgggagcggaggaggagctctggcggaggaggaagc
	82	GGGGSGGGS
c227 의 scFV 간의 링커	84	ggcgggtggaggtcggggggggcggtcaggaggagggcggctca
	82	GGGGSGGGS
c201, c203 의 P2A	85	ggaagcggagctactaactcagcctgctgaagcaggctggagacgtggaggagaacct ggacct
	86	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP
c230 의 P2A	87	ggttcggagctaccaactctcgtgttgaagcaggccggagatgtcgagaaaaccgg gacct
	86	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP
Gly4Ser 링커	88	Ggtggaggtggcgc
	89	GGGGS

[0515]

[0516] [표 5A] 추가 CD19 결합 도메인 및 기타 서열

식별기호	서열 번호	서열
CAR19-1 scFv 도메인	90	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPG QAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFA VYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQ VQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPG KGLEWIGVIWGSETTYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLS SVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLVTVSS
CAR19-2 scFv 도메인	91	MALPVTALLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPAR FSGSGSGTDYTLTISSLPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGT KLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSL TCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYQ SSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYY YGGSYAMDYWGQGLVTVSSHHHHHHHH
CAR19-2 전체 CAR (신호 펩티드 포함)	92	MALPVTALLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPAR FSGSGSGTDYTLTISSLPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGT KLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSL TCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYQ SSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYY YGGSYAMDYWGQGLVTVSSSTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLL SLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA LPPR
CAR19-2 전체 CAR	93	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPG QAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFA VYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQ VQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPG KGLEWIGVIWGSETTYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLS SVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLVTVSSST TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA CDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPF MRPVQTTQEEDGCSCRPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY KQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR
CAR19-3 scFv 도메인	94	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPP GGLEWIGVIWGSETTYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLS SVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRAS

[0517]

		QDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGS GTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIK
CAR19-5 scFv 도메인	95	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPG QAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFA VYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWI RQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYSLSKSRVTISKDNSKNQV SLKLSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLV TVSS
CAR19-6 scFv 도메인	96	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPG QAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFA VYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWI RQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYSLSKSRVTISKDNSKNQV SLKLSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLV TVSS
CAR19-7 scFv 도메인	97	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPP GKGLEWIGVIWGSETTYYSLSKSRVTISKDNSKNQVSLKL SSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPAR FSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGT KLEIK
CAR19-8 scFv 도메인	98	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPP GKGLEWIGVIWGSETTYYSLSKSRVTISKDNSKNQVSLKL SSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPAR FSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGT KLEIK
CAR19-9 scFv 도메인	99	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPG QAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFA VYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGG GGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWI RQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYSLSKSRVTISKDNSKNQV LKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLV TVSS
CAR19-10 scFv 도메인	100	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPP GKGLEWIGVIWGSETTYYSLSKSRVTISKDNSKNQVSLKL SSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPAR FSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGT KLEIK
CAR19-11 scFv 도메인	101	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPG QAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFA

[0518]

		VYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQV QLQESGPGLVKPSSETLSLCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGK GLEWIGVIWGSETTYNSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLS VTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLVTVSS
CAR19-12 scFv 도메인	102	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLCTVSGVSLPDYGVSWIRQPP GKLEWIGVIWGSETTYNSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLS SSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGS GTDYTLTISSSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIK
CAR19-A 전체 CAR	103	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTI SCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRF SGSGSGTDYSLTISNLEQEDIAFYFCQQGNTLPYTFGGGTK LEITGTSVSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSV TCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYN SALKSRLTIKDNSKSKVFLKMNSLQTDDETAIYYCAKHYYY GGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAAIEVMYPPPYLDNEKSN GTHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFVWLVVVGGVLACYSLLVT VAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP RDFAAYSRVKFSRSADAPAYQQGQNLYNELNLRREE YDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDYDALHMQA LPPR
CAR19-A scFv 도메인	104	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPD GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDI ATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGTSVSGSGKPGSGEGSTK GEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPP PRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSKVFLK MNSLQTDDETAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVS S
CAR19-B 전체 CAR	105	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTI SCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRF SGSGSGTDYSLTISNLEQEDIAFYFCQQGNTLPYTFGGGTK LEITGTSVSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSV TCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYN SALKSRLTIKDNSKSKVFLKMNSLQTDDETAIYYCAKHYYY GGSYAMDYWGQGTSVTVSSSESKYGPPCPPCFWVWLVVV GGVLACYSLLVTVAFIIFWVWKRGRKLLYIFKQPFMRPVQT TQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNL LYNELNLRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTAT KDYDALHMQALPPR
CAR19-B scFv 도메인	106	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPD GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDI ATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGTSVSGSGKPGSGEGSTK GEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPP

[0519]

		PRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSKVFLK MNSLQTDDETAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVS S
신호 펩티드	107	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP
CD3 제타	108	RVKFSRSADAPAYKQGQNLYNELNLRREEYDVLDRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGDGLYQGLSTATKDYDALHMQALPPR

[0520]

[0521]

탠덤 CAR

[0522]

일 양태에서, 이중특이적 항원결합 도메인을 포함하는 CAR, 예를 들어 탠덤 CAR이 본원에 개시된다. 일부 구현 예에서, 이중특이적 항원결합 도메인은 2개의 항원결합 도메인, 예를 들어 제1 항원결합 도메인 및 제2 항원결합 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 탠덤 CAR은 CD22 항원결합 도메인 및 CD19 항원결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항원결합 도메인을 포함한다.

[0523]

이중특이적 항원결합 도메인의 일부 구현예에서, 제1 항원결합 도메인은 항체 분자, 예를 들어 항체결합 도메인 (예를 들어, scFv)이다. 이중특이적 항원결합 도메인의 일부 구현예에서, 제2 항원결합 도메인은 항체 분자, 예를 들어 항체결합 도메인(예를 들어, scFv)이다. 이중특이적 항원결합 도메인의 각 항체 분자, 예를 들어 scFv

내에서, VH는 VL의 업스트림 또는 다운스트림일 수 있다.

- [0524] 일부 구현예에서, 업스트림 항체 또는 항체 단편(예를 들어, scFv)은 VH(VH1)가 VL(VL1)의 업스트림에 있도록 배열되고, 다운스트림 항체 또는 항체 단편(예를 들어, scFv)은 VL(VL2)이 VH(VH2)의 업스트림에 있도록 배열되어, 전체 이중특이적 항체 분자는 N-말단에서 C-말단 배향으로 배열 VH1-VL1-VL2-VH2를 갖는다.
- [0525] 일부 구현예에서, 업스트림 항체 또는 항체 단편(예를 들어, scFv)은 VL(VL1)이 VH(VH1)의 업스트림에 있도록 배열되고, 다운스트림 항체 또는 항체 단편(예를 들어, scFv)은 VH(VH2)가 VL(VL2)의 업스트림에 있도록 배열되어, 전체 이중특이적 항체 분자는 N-말단에서 C-말단 배향으로 배열 VL1-VH1-VH2-VL2를 갖는다.
- [0526] 일부 구현예에서, 업스트림 항체 또는 항체 단편(예를 들어, scFv)은 VL(VL1)이 VH(VH1)의 업스트림에 있도록 배열되고, 다운스트림 항체 또는 항체 단편(예를 들어, scFv)은 VL(VL2)이 VH(VH2)의 업스트림에 있도록 배열되어, 전체 이중특이적 항체 분자는 N-말단에서 C-말단 배향으로 배열 VL1-VH1-VL2-VH2를 갖는다.
- [0527] 또 다른 일부 구현예에서, 업스트림 항체 또는 항체 단편(예를 들어, scFv)은 VH(VH1)가 VL(VL1)의 업스트림에 있도록 배열되고, 다운스트림 항체 또는 항체 단편(예를 들어, scFv)은 VH(VH2)가 VL(VL2)의 업스트림에 있도록 배열되어, 전체 이중특이적 항체 분자는 N-말단에서 C-말단 배향으로 배열 VH1-VL1-VH2-VL2를 갖는다.
- [0528] 상기 배열 중 임의의 배열에서, 임의로, 2개의 항체 또는 항체 단편(예를 들어, scFv) 사이에, 예를 들어 구성체가 VH1-VL1-VL2-VH2로 배열되는 경우 VL1과 VL2 사이에; 구성체가 VL1-VH1-VH2-VL2로 배열되는 경우 VH1과 VH2 사이에; 구성체가 VL1-VH1-VL2-VH2로 배열되는 경우 VH1과 VL2 사이에; 또는 구성체가 VH1-VL1-VH2-VL2로 배열되는 경우 VL1과 VH2 사이에 링커가 배치된다. 일반적으로, 2개의 scFv 사이의 링커는 2개의 scFv의 도메인 간의 미스페이어링을 방지할 수 있을 만큼 충분히 길어야 한다. 링커는 본원에 기재된 바와 같은 링커일 수 있다. 일부 구현예에서, 링커는 (Gly4-Ser)_n 링커이며, n은 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6이다. 일부 구현예에서, 링커는 (Gly4-Ser)_n이며, n=1이다(예를 들어, 링커는 아미노산 서열 Gly4-Ser이다). 일부 구현예에서, 링커는 (Gly4-Ser)_n이며, n=4이다(서열번호 82). 일부 구현예에서, 링커는 아미노산 서열 LAEAAAK(예를 들어, 서열번호 80)를 포함한다(예를 들어, 이로 이루어진다).
- [0529] 상기 배열 중 임의의 배열에서, 임의로, 제1 scFv의 VL과 VH 사이에 링커가 배치된다. 임의로, 제2 scFv의 VL과 VH 사이에 링커가 배치된다. 다수의 링커를 갖는 구성체에서, 임의의 2개 이상의 링커는 동일하거나 상이할 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 이중특이적 CAR은 VL, VH, 및 임의로 하나 이상의 링커를 본원에 기재된 바와 같은 배열로 포함한다.
- [0530] 일부 구현예에서, 각각의 항체 분자, 예를 들어 각각의 항원결합 도메인(예를 들어, 각각의 scFv)은 VH 영역과 VL 영역 사이에 링커를 포함한다. 일부 구현예에서, VH 영역과 VL 영역 사이의 링커는 (Gly4-Ser)_n 링커이며, n은 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6이다. 일부 구현예에서, 링커는 (Gly4-Ser)_n이며, n=1이다(예를 들어, 링커는 아미노산 서열 Gly4-Ser이다). 일부 구현예에서, 링커는 (Gly4-Ser)_n이며, n=4이다(서열번호 82). 일부 구현예에서, VH 영역과 VL 영역은 링커 없이 연결된다.
- [0531] 스플릿 CAR
- [0532] 일부 구현예에서, CAR-발현 세포는 스플릿 CAR을 사용한다. 스플릿 CAR 접근법은 본원에 참조로 포함되는 PCT 공개 WO2014/055442호 및 WO2014/055657호에 보다 상세하게 설명되어 있다. 간략하게, 스플릿 CAR 시스템은 제1 항원결합 도메인 및 공동자극 도메인(예를 들어, 4-1BB)을 갖는 제1 CAR을 발현하는 세포를 포함하고, 세포는 또한 제2 항원결합 도메인 및 세포내 신호전달 도메인(예를 들어, CD3 제타)을 갖는 제2 CAR을 발현한다. 세포가 제1 항원을 만나면, 공동자극 도메인이 활성화되고 세포는 증식한다. 세포가 제2 항원을 만나면, 세포내 신호전달 도메인이 활성화되고 세포사멸 활성이 시작된다. 따라서, CAR-발현 세포는 두 항원이 모두 존재할 때만 완전히 활성화된다.
- [0533] RNA 트랜스팩션
- [0534] 시험관내 전사된 RNA CAR을 생성하는 방법이 본원에 개시된다. 본 발명은 또한 세포에 직접 형질주입될 수 있는 CAR 암호화 RNA 구성체를 포함한다. 트랜스팩션에 사용하기 위한 mRNA를 생성하는 방법은 특수 설계된 프라이머를 사용한 주형의 시험관내 전사(IVT)에 이온 폴리 A 부가를 수반하여, 3' 및 5' 비번역 서열("UTR"), 5' 캡 및 /또는 내부 리보솜 진입 부위(IRES), 발현될 핵산, 및 일반적으로 50-2000개 염기 길이인 폴리A 테일을 포함하는 구성체를 생성할 수 있다. 이렇게 생성된 RNA는 다양한 종류의 세포를 효율적으로 형질감염시킬 수 있다. 일 양태에서, 주형은 CAR에 대한 서열을 포함한다.

- [0535] 일 양태에서, CAR, 예를 들어 이중 CAR 또는 탠덤 CAR은 메신저 RNA(mRNA)에 의해 암호화된다. 일 양태에서, CAR, 예를 들어 이중 CAR 또는 탠덤 CAR을 암호화하는 mRNA는 CAR-발현 세포, 예를 들어 CART세포 또는 CAR NK 세포의 생성을 위해 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T세포 또는 NK세포 내로 도입된다.
- [0536] 일 구현예에서, CAR의 시험관내 전사된 RNA는 일시적 트랜스펙션의 형태로 세포에 도입될 수 있다. RNA는 증합 효소 연쇄반응(PCR)-생성 주형을 사용하여 시험관내 전사에 의해 생성된다. 임의의 공급원으로부터의 관심 DNA는 적절한 프라이머 및 RNA 증합효소를 사용하여 PCR에 의해 시험관내 mRNA 합성을 위한 주형으로 직접 변환될 수 있다. DNA의 공급원은 예를 들어 게놈 DNA, 플라스미드 DNA, 파지 DNA, cDNA, 합성 DNA 서열, 또는 임의의 다른 적절한 DNA 공급원일 수 있다. 목적하는 시험관내 전사용 주형은 본 발명의 CAR이다. 예를 들어, RNA CAR을 위한 주형은 항종양 항체의 단쇄 가변 도메인을 포함하는 세포의 영역, 힌지 영역, 막관통 도메인(예를 들어, CD8a의 막관통 도메인), 및 세포질 영역(예를 들어, CD3-제타의 신호전달 도메인 및 4-1BB의 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함함)을 포함한다.
- [0537] 일 구현예에서, PCR에 사용되는 DNA는 오픈 리딩 프레임에 포함한다. DNA는 유기체의 게놈으로부터 천연 DNA로부터 유래될 수 있다. 일 구현예에서, 핵산은 5' 및/또는 3' 비번역 영역(UTR)의 일부 또는 전부를 포함할 수 있다. 핵산은 엑손 및 인트론을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, PCR에 사용되는 DNA는 인간 핵산 서열이다. 다른 구현예에서, PCR에 사용되는 DNA는 5' 및 3' UTR을 포함하는 인간 핵산 서열이다. 대안적으로 DNA는 천연 유기체에서 정상적으로는 발현되지 않는 인공 DNA 서열일 수 있다. 예시적인 인공 DNA 서열은, 함께 연결되어 융합 단백질을 암호화하는 오픈 리딩 프레임에 형성하는 유전자의 부분을 포함하는 서열이다. 함께 연결되는 DNA의 부분은 단일 유기체로부터 또는 둘 이상의 유기체로부터 유래될 수 있다.
- [0538] PCR은 트랜스펙션에 사용되는 mRNA의 시험관내 전사를 위한 주형을 생성하는 데 사용된다. PCR을 수행하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. PCR에 사용하기 위한 프라이머는 PCR을 위한 주형으로서 사용될 DNA의 영역에 실질적으로 상보적인 영역을 갖도록 설계된다. 본원에서 사용되는 "실질적으로 상보적인"은 프라이머 서열의 대부분의 또는 모든 염기가 상보적이거나 하나 이상의 염기가 비상보적이거나 불일치하는 뉴클레오티드의 서열을 나타낸다. 실질적으로 상보적인 서열은 PCR에 사용되는 어닐링 조건에서, 의도된 DNA 표적과 어닐링 또는 혼성화할 수 있다. 프라이머는 DNA 주형의 임의의 부분에 실질적으로 상보성을 갖도록 설계될 수 있다. 예를 들어 프라이머는 5' 및 3' UTR을 포함하는, 세포에서 정상적으로 전사되는 핵산의 부분(오픈 리딩 프레임)을 증폭하도록 설계될 수 있다. 프라이머는 또한 특정 관심 도메인을 암호화하는 핵산의 부분을 증폭하도록 설계될 수 있다. 일 구현예에서, 프라이머는 5' 및 3' UTR의 전부 또는 일부를 포함하는 인간 cDNA의 암호화 영역을 증폭하도록 설계된다. PCR에 유용한 프라이머는 당업계에 잘 알려진 합성 방법에 의해 생성될 수 있다. "정방향 프라이머"는 증폭될 DNA 서열의 업스트림인 DNA 주형 상의 뉴클레오티드에 실질적으로 상보적인 뉴클레오티드의 영역을 포함하는 프라이머이다. "업스트림"은 암호화 가닥과 관련하여 증폭될 DNA 서열에 대해 5' 위치를 지칭하기 위해 본원에서 사용된다. "역방향 프라이머"는 증폭될 DNA 서열의 다운스트림인 이중가닥 DNA 주형에 실질적으로 상보적인 뉴클레오티드의 영역을 포함하는 프라이머이다. "다운스트림"은 암호화 가닥과 관련하여 증폭될 DNA 서열에 대해 3' 위치를 지칭하기 위해 본원에서 사용된다.
- [0539] PCR에 유용한 임의의 DNA 증합효소가 본원에 개시된 방법에 사용될 수 있다. 시약 및 증합효소는 여러 공급처로부터 상업적으로 입수가능하다.
- [0540] 안정성 및/또는 번역 효율을 촉진하는 능력을 갖는 화학 구조도 사용될 수 있다. RNA는 바람직하게 5' 및 3' UTR을 갖는다. 일 구현예에서, 5' UTR은 1 내지 3000개 뉴클레오티드 길이이다. 암호화 영역에 부가될 5' 및 3' UTR 서열의 길이는 UTR의 상이한 영역에 어닐링하는 PCR용 프라이머의 설계를 비롯한(이에 한정되지 않음) 상이한 방법에 의해 변경될 수 있다. 이러한 접근법을 사용하여, 당업자는 전사된 RNA의 트랜스펙션 후 최적 번역 효율을 달성하는 데 필요한 5' 및 3' UTR 길이를 수정할 수 있다.
- [0541] 5' 및 3' UTR은 관심 핵산에 대한 천연, 내인성 5' 및 3' UTR일 수 있다. 대안적으로, 관심 핵산에 내인성이 아닌 UTR 서열이 정방향 및 역방향 프라이머에 해당 UTR 서열을 통합시켜 부가되거나 주형의 임의의 다른 변형에 의해 부가될 수 있다. 관심 핵산에 내인성이 아닌 UTR 서열의 사용은 RNA의 안정성 및/또는 번역 효율을 수정하는 데 유용할 수 있다. 예를 들어, 3' UTR 서열의 AU-풍부 요소는 mRNA의 안정성을 감소시킬 수 있는 것으로 알려져 있다. 따라서, 3' UTR은 당업계에 잘 알려진 UTR의 특성에 기초하여 전사 RNA의 안정성을 증가시키도록 선택되거나 설계될 수 있다.
- [0542] 일 구현예에서, 5' UTR은 내인성 핵산의 Kozak 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로, 관심 핵산에 내인성이 아닌 5' UTR이 전술한 바와 같이 PCR에 의해 부가되는 경우, 5' UTR 서열을 부가함으로써 공통 Kozak 서열이 재설계

될 수 있다. Kozak 서열은 일부 RNA 전사체의 번역 효율을 증가시킬 수 있지만, 모든 RNA에 대해 효율적인 번역을 가능하게 하기 위해 필요한 것으로 보이지는 않는다. 많은 mRNA에 있어서 Kozak 서열에 대한 요건은 당업계에 알려져 있다. 일부 구현예에서, 5' UTR은 RNA 게놈이 세포에서 안정한 RNA 바이러스의 5' UTR일 수 있다. 일부 구현예에서, 다양한 뉴클레오티드 유사체가 3' 또는 5' UTR에 사용되어 mRNA의 엑소뉴클레아제 분해를 지연시킬 수 있다.

[0543] 유전자 클로닝 필요 없이 DNA 주형으로부터 RNA 합성을 가능하게 하기 위해, 전사될 서열의 업스트림 DNA 주형에 전사 프로모터가 부착되어야 한다. RNA 중합효소에 대한 프로모터로서 기능하는 서열이 정방향 프라이머의 5' 말단에 부가되는 경우, RNA 중합효소 프로모터는 전사될 오픈 리딩 프레임의 업스트림 PCR 산물에 통합된다. 바람직한 일 구현예에서, 프로모터는 본원의 다른 부분에 기재된 바와 같은 T7 중합효소 프로모터이다. 다른 유용한 프로모터는 T3 및 SP6 RNA 중합효소 프로모터를 포함하나 이에 한정되지 않는다. T7, T3, 및 SP6에 대한 공통 핵산 서열은 당업계에 알려져 있다.

[0544] 바람직한 구현예에서, mRNA는 세포에서 리보솜 결합, 번역의 개시, 및 mRNA의 안정성을 결정하는 5' 말단 상의 캡 및 3' 폴리(A) 테일 둘 다를 갖는다. 원형 DNA 주형, 예를 들어 플라스미드 DNA에서, RNA 중합효소는 진핵 세포에서의 발현에 적합하지 않은 긴 콘카테머 산물을 생성한다. 3' UTR의 말단에서 선형화된 플라스미드 DNA의 전사는 전사 후에 폴리아데닐화되는 경우에도 진핵생물 트랜스펙션에 효과적이지 않은 정상 크기의 mRNA를 초래한다.

[0545] 선형 DNA 주형에서, 파지 T7 RNA 중합효소는 주형의 마지막 염기를 넘어서 전사체의 3' 말단을 연장할 수 있다 (Schenborn and Mierendorf, *Nuc Acids Res.*, 13:6223-36 (1985); Nacheva and Berzal-Herranz, *Eur. J. Biochem.*, 270:1485-65 (2003)).

[0546] 폴리A/T 스트레치를 DNA 주형에 통합하는 통상적인 방법은 분자 클로닝이다. 그러나, 플라스미드 DNA에 통합된 폴리A/T 서열은 플라스미드 불안정성을 유발할 수 있으며, 이는 박테리아 세포에서 얻은 플라스미드 DNA 주형이 종종 결실 및 기타 이상으로 심하게 오염되는 이유이다. 이로 인해 클로닝 절차가 어려워지고 시간이 많이 소요될 뿐만 아니라 신뢰할 수 없는 경우가 많다. 이러한 이유 때문에, 클로닝 없이 폴리A/T 3' 스트레치로 DNA 주형을 구성할 수 있는 방법이 매우 바람직하다.

[0547] 전사 DNA 주형의 폴리A/T 분절은 100T 테일(크기는 50-5000 T일 수 있음)과 같은 폴리T 테일을 포함하는 역방향 프라이머를 사용하여 PCR 중에 생성되거나, DNA 라이게이션 또는 시험관내 재조합을 비롯한(이에 한정되지 않음) 임의의 다른 방법에 의해 PCR 후에 생성될 수 있다. 폴리(A) 테일은 또한 RNA에 안정성을 제공하고 RNA 분해를 감소시킨다. 일반적으로, 폴리(A) 테일의 길이는 전사된 RNA의 안정성과 양(+의 상관관계가 있다. 일 구현예에서, 폴리(A) 테일은 100 내지 5000개 아데노신이다.

[0548] RNA의 폴리(A) 테일은 E. 콜라이 폴리A 중합효소(E-PAP)와 같은 폴리(A) 중합효소를 사용하여 시험관내 전사 후 추가로 연장될 수 있다. 일 구현예에서, 폴리(A) 테일의 길이를 100개 뉴클레오티드에서 300-400개 뉴클레오티드로 증가시키면 RNA의 번역 효율이 약 2배 증가된다. 또한, 3' 말단에 다른 화학기를 부착하면 mRNA 안정성을 증가시킬 수 있다. 이러한 부착은 변형/인공 뉴클레오티드, 압타머, 및 기타 화합물을 포함할 수 있다. 예를 들어, 폴리(A) 중합효소를 사용하여 폴리(A) 테일에 ATP 유사체를 통합할 수 있다. ATP 유사체는 RNA의 안정성을 더욱 증가시킬 수 있다.

[0549] 5' 캡이 또한 RNA 분자에 안정성을 제공한다. 바람직한 구현예에서, 본원에 개시된 방법에 의해 생성된 RNA는 5' 캡을 포함한다. 5' 캡은 당업계에 알려지고 본원에 설명된 기술을 이용해 제공된다(Cougot, et al., *Trends in Biochem. Sci.*, 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., *RNA*, 7:1468-95 (2001); Elango, et al., *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 330:958-966 (2005)).

[0550] 본원에 개시된 방법에 의해 생성된 RNA는 또한 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 서열을 포함할 수 있다. IRES 서열은 mRNA에 대한 캡-독립적 리보솜 결합을 개시하고 번역 개시를 촉진하는 임의의 바이러스 서열, 염색체 서열, 또는 인공적 설계 서열일 수 있다. 당, 펩티드, 지질, 단백질, 항산화제, 및 계면활성제와 같이 세포 투과성 및 생존력을 촉진하는 인자를 함유할 수 있는, 세포 전기천공에 적합한 임의의 용질이 포함될 수 있다.

[0551] RNA는 여러 다양한 방법, 예를 들어 전기천공(Amaxa Nucleofector-II(Amaxa Biosystems, Cologne, Germany), ECM 830(BTX)(Harvard Instruments, Boston, Mass.) 또는 Gene Pulser II(BioRad, Denver, Colo.), Multiporator(Eppendorf, Hamburg Germany)), 리포펙션을 이용한 양이온성 리포솜 매개 트랜스펙션, 폴리머 캡슐화, 펩티드 매개 트랜스펙션, 또는 "유전자 총"과 같은 생물학적 입자 전달 시스템을 비롯한(이에 한정되지

않음) 상업적으로 이용 가능한 방법 중 임의의 방법을 사용하여 표적 세포 내로 도입될 수 있다(예를 들어, Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12(8):861-70 (2001) 참조).

[0552] 비바이러스성 전달 방법

[0553] 일부 양태에서, 본원에 기재된 CAR을 암호화하는 핵산을 세포 또는 조직 또는 대상체 내로 전달하기 위해 비바이러스성 방법이 사용될 수 있다.

[0554] 일부 구현예에서, 비바이러스성 방법은 트랜스포존(전위 요소라고도 함)의 사용을 포함한다. 일부 구현예에서, 트랜스포존은 게놈 내 위치에 자신을 삽입할 수 있는 DNA 조각, 예를 들어 자기복제가 가능하고 자신의 카피를 게놈에 삽입할 수 있는 DNA 조각, 또는 보다 긴 핵산에서 스플라이싱되어 게놈 내 다른 위치에 삽입될 수 있는 DNA 조각이다. 예를 들어, 트랜스포존은 전위를 위한 유전자를 플랭킹하는 역위 반복부로부터 이루어진 DNA 서열을 포함한다.

[0555] 트랜스포존을 이용한 예시적인 핵산 전달 방법은 슬리핑 뷰티 트랜스포존 시스템(SBTS) 및 피기백(PB) 트랜스포존 시스템을 포함한다. 예를 들어, 본원에 참조로 포함되는 문헌[Aronovich et al. Hum. Mol. Genet. 20.R1(2011):R14-20; Singh et al. Cancer Res. 15(2008):2961-2971; Huang et al. Mol. Ther. 16(2008):580-589; Grabundzija et al. Mol. Ther. 18(2010):1200-1209; Kebriaei et al. Blood. 122.21(2013):166; Williams. Molecular Therapy 16.9(2008):1515-16; Bell et al. Nat. Protoc. 2.12(2007):3153-65; 및 Ding et al. Cell. 122.3(2005):473-83] 참조.

[0556] SBTS는 2개의 구성요소 즉, 1) 이식유전자를 함유하는 트랜스포존 및 2) 트랜스포사제 효소의 공급원을 포함한다. 트랜스포사제는 트랜스포존을 운반체 플라스미드(또는 다른 공여체 DNA)로부터 숙주 세포 염색체/게놈과 같은 표적 DNA로 전위시킬 수 있다. 예를 들어 트랜스포사제는 운반체 플라스미드/공여체 DNA에 결합하고, 플라스미드로부터 트랜스포존(이식유전자(들) 포함)을 절단하고, 이를 숙주 세포의 게놈에 삽입한다. 예를 들어, 문헌 [Aronovich et al.] 참조. 예시적인 트랜스포존은 pT2 기반 트랜스포존을 포함한다.

[0557] 예를 들어, 본원에 참조로 포함되는 문헌[Grabundzija et al. Nucleic Acids Res. 41.3(2013):1829-47; 및 Singh et al. Cancer Res. 68.8(2008): 2961-2971] 참조. 예시적인 트랜스포사제는 Tc1/마리너형 트랜스포사제, 예를 들어 SB10 트랜스포사제 또는 SB11 트랜스포사제(예를 들어, 사이토메갈로바이러스 프로모터로부터 발현될 수 있는 과활성 트랜스포사제)를 포함한다. 예를 들어, 본원에 참조로 포함되는 문헌 [Aronovich et al.; Kebriaei et al.; 및 Grabundzija et al.] 참조.

[0558] SBTS를 사용하면 이식유전자, 예를 들어 본원에 기재된 CAR을 암호화하는 핵산의 효율적인 통합 및 발현이 가능하다. 예를 들어 SBTS와 같은 트랜스포존 시스템을 사용하여 본원에 기재된 CAR을 안정적으로 발현하는 세포, 예를 들어 T세포 또는 NK세포를 생성하는 방법이 본원에 제공된다.

[0559] 본원에 기재된 방법에 따르면, 일부 구현예에서, SBTS 구성요소를 포함하는 하나 이상의 핵산, 예를 들어 플라스미드가 세포(예를 들어, T세포 또는 NK세포)에 전달된다. 예를 들어, 핵산(들)은 핵산(예를 들어, 플라스미드 DNA) 전달의 표준 방법, 예를 들어 본원에 기재된 방법, 예를 들어 전기천공, 트랜스펙션, 또는 리포펙션에 의해 전달된다. 일부 구현예에서, 핵산은 이식유전자, 예를 들어 본원에 기재된 CAR을 암호화하는 핵산을 포함하는 트랜스포존을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산은 이식유전자(예를 들어, 본원에 기재된 CAR을 암호화하는 핵산)뿐만 아니라 트랜스포사제 효소를 암호화하는 핵산 서열도 포함하는 트랜스포존을 포함한다. 일부 구현예에서, 2종의 핵산을 갖는 시스템, 예를 들어 이중 플라스미드 시스템(예를 들어, 제1 플라스미드는 이식유전자를 포함하는 트랜스포존을 포함하고, 제2 플라스미드는 트랜스포사제 효소를 암호화하는 핵산 서열을 포함함)이 제공된다. 예를 들어, 제1 및 제2 핵산은 숙주 세포 내로 공동 전달된다.

[0560] 일부 구현예에서, SBTS를 이용한 유전자 삽입과 뉴클레아제(예를 들어, 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화자-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN), CRISPR/Cas 시스템, 또는 조작된 메가뉴클레아제 재조작된 호밍 엔도뉴클레아제)를 이용한 유전자 편집의 조합을 사용하여 본원에 기재된 CAR을 발현하는 세포, 예를 들어 T세포 또는 NK 세포가 생성된다.

[0561] 일부 구현예에서, 비바이러스성 전달 방법을 사용하면 세포, 예를 들어 T세포 또는 NK세포의 재프로그래밍, 및 대상체 내로의 세포의 직접 주입이 가능하다. 비바이러스 벡터의 장점은 환자 집단을 충족시키는 데 필요한 충분한 양의 생산에 대한 용이성 및 상대적으로 낮은 비용, 보관 중의 안정성, 및 면역원성의 결여를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

- [0562] CAR을 암호화하는 핵산 구성체
- [0563] 본 발명은 또한 본원에 기재된 하나 이상의 CAR 구성체를 암호화하는 핵산 분자를 제공한다. 일 양태에서, 핵산 분자는 메신저 RNA 전사체로서 제공된다. 일 양태에서, 핵산 분자는 DNA 구성체로서 제공된다.
- [0564] 목적하는 분자를 암호화하는 핵산 서열은 당업계에서 알려진 재조합 방법을 사용하여, 예를 들어 해당 유전자를 발현하는 세포로부터 라이브러리를 스크리닝하거나, 해당 유전자를 포함하는 것으로 알려진 벡터로부터 해당 유전자를 유도하거나, 표준 기술을 사용하여 해당 유전자를 함유하는 세포 및 조직으로부터 직접 단리함으로써 취득될 수 있다. 대안적으로, 관심 유전자는 클로닝이 아닌 합성으로 생성될 수 있다.
- [0565] 본 발명은 또한 본 발명의 DNA가 삽입된 벡터를 제공한다. 렌티바이러스와 같은 레트로바이러스에서 유래된 벡터는 딸세포에서의 이식유전자의 장기적이고 안정적인 통합 및 그 증식을 가능하게 하므로 장기적인 유전자 전달을 달성하는 데 적합한 도구이다. 렌티바이러스 벡터는 간세포와 같은 비증식성 세포의 형질도입을 가능하게 할 수 있다는 점에서 무린 백혈병 바이러스와 같은 중앙-레트로바이러스에서 유래된 벡터에 비해 추가적인 장점을 갖는다. 렌티바이러스 벡터는 또한 낮은 면역원성의 추가 장점을 갖는다.
- [0566] 다른 구현예에서, 본 발명의 목적하는 CAR을 암호화하는 핵산을 포함하는 벡터는 아데노바이러스 벡터(A5/35)이다. 다른 구현예에서, CAR을 암호화하는 핵산의 발현은 슬리핑 뷰티, crisper, CAS9, 및 징크 핑거 뉴클레아제와 같은 트랜스포존을 사용하여 달성될 수 있다. 본원에 참조로 포함되는 문헌[June et al. 2009*Nature Reviews Immunology* 9.10: 704-716] 참조.
- [0567] 간략히 요약하면, CAR을 암호화하는 천연 또는 합성 핵산의 발현은 일반적으로, CAR 폴리펩티드 또는 그 일부를 암호화하는 핵산을 프로모터에 작동가능하게 연결하고 구성체를 발현 벡터에 통합함으로써 달성된다. 벡터는 진핵생물의 복제 및 통합에 적합할 수 있다. 전형적인 클로닝 벡터는 전사 및 번역 종결인자, 개시 서열, 및 목적하는 핵산 서열의 발현 조절에 유용한 프로모터를 포함한다.
- [0568] 본 발명의 발현 구성체는 또한 표준 유전자 전달 프로토콜을 사용하여 핵산 면역화 및 유전자 치료에 사용될 수 있다. 유전자 전달 방법은 당업계에서 알려져 있다. 예를 들어, 본원에 전문이 참조로 포함되는 미국 특허 5,399,346호, 5,580,859호, 5,589,466호 참조. 다른 구현예에서, 본 발명은 유전자 치료 벡터를 제공한다.
- [0569] 핵산은 여러 유형의 벡터에 클로닝될 수 있다. 예를 들어, 핵산은 플라스미드, 파지미드, 파지 유도체, 동물 바이러스, 및 코스미드를 비롯한(이에 한정되지 않음) 벡터에 클로닝될 수 있다. 특히 관심 있는 벡터는 발현 벡터, 복제 벡터, 프로브 생성 벡터, 및 시퀀싱 벡터를 포함한다.
- [0570] 또한, 발현 벡터는 바이러스 벡터의 형태로 세포에 제공될 수 있다. 바이러스 벡터 기술은 당업계에서 잘 알려져 있으며, 예를 들어 문헌[Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY], 및 기타 바이러스학 및 분자생물학 매뉴얼에 기재되어 있다. 벡터로서 유용한 바이러스는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 헤르페스 바이러스, 및 렌티바이러스를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 일반적으로, 적합한 바이러스는 적어도 하나의 유기체에서 기능적인 복제 기점, 프로모터 서열, 편리한 제한 엔도뉴클레아제 부위, 및 하나 이상의 선별 마커를 포함한다(예를 들어, WO 01/96584호; WO 01/29058호; 및 미국 특허 6,326,193호).
- [0571] 포유동물 세포 내로 유전자를 전달하기 위한 다수의 바이러스 기반 시스템이 개발된 바 있다. 예를 들어 레트로바이러스는 유전자 전달 시스템을 위한 편리한 플랫폼을 제공한다. 선택된 유전자는 당업계에 알려진 기술을 이용해 벡터에 삽입되고 레트로바이러스 입자에 패키징될 수 있다. 이어서, 재조합 바이러스는 단리되고, 생체 내 또는 생체 외에서 대상체의 세포로 전달될 수 있다. 다수의 레트로바이러스 시스템이 당업계에 알려져 있다. 일부 구현예에서, 아데노바이러스 벡터가 사용된다. 다수의 아데노바이러스 벡터가 당업계에 알려져 있다. 일 구현예에서, 렌티바이러스 벡터가 사용된다.
- [0572] 추가의 프로모터 요소, 예를 들어 인핸서는 전사 개시의 빈도를 조절한다. 다수의 프로모터가 시작 부위의 다운스트림에도 기능적 요소를 포함하는 것으로 나타났지만, 일반적으로 프로모터 요소는 시작 부위의 30~110 bp 업스트림 영역에 위치한다. 프로모터 요소 사이의 간격은 흔히 탄력적이므로, 요소들이 역전되거나 서로에 대해 이동할 때 프로모터 기능은 보존된다. 티미딘 키나제(tk) 프로모터에서, 활성이 감소하기 시작하기 전에 프로모터 요소 사이의 간격을 50 bp까지 늘릴 수 있다. 프로모터에 따라, 개별 요소들이 협동적으로 또는 독립적으로 기능하여 전사를 활성화할 수 있는 것으로 보인다. 예시적인 프로모터는 CMV IE 유전자, EF-1 α , 유비퀴틴 C, 또는 포스포글리세로키나제(PGK) 프로모터를 포함한다.

- [0573] 포유동물 T세포에서 CAR 이식유전자를 발현할 수 있는 프로모터의 예는 EF-1 알파(EF1a) 프로모터이다. 고유 EF1a 프로모터는 아미노아실 tRNA의 리보솜으로의 효소적 전달을 담당하는 신장 인자-1 복합체의 알파 서브유닛의 발현을 유도한다. EF1a 프로모터는 포유동물 발현 플라스미드에서 광범위하게 사용되었으며, 렌티바이러스 벡터에 클로닝된 이식유전자로부터 CAR 발현을 유도하는 데 효과적인 것으로 나타났다. 예를 들어, 문헌[Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009)] 참조. 일 양태에서, EF1a 프로모터는 당업계에 알려진 서열을 포함한다.
- [0574] 프로모터의 또 다른 예는 극초기발현 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터 서열이다. 이 프로모터 서열은 이 서열에 작동가능하게 연결된 임의의 폴리뉴클레오티드 서열의 높은 수준의 발현을 유도할 수 있는 강력한 항시적 프로모터 서열이다. 그러나, 액틴 프로모터, 미오신 프로모터, 신장 인자-1a 프로모터, 헤모글로빈 프로모터, 및 크레아틴 키나제 프로모터와 같은(이에 한정되지 않음) 인간 유전자 프로모터, 및 시미안 바이러스 40(SV40) 초기발현 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV), 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 긴 말단 반복부(LTR) 프로모터, MoMuLV 프로모터, 조류 백혈병 바이러스 프로모터, 엡스타인바(Epstein-Barr) 바이러스 극초기발현 프로모터, 라우스 육종 바이러스 프로모터를 비롯한(이에 한정되지 않음) 다른 항시적 프로모터 서열이 또한 사용될 수 있다. 또한, 본 발명은 항시적 프로모터의 사용으로 제한되어서는 안 된다. 유도성 프로모터도 본 발명의 일부로서 고려된다. 유도성 프로모터의 사용은 발현이 요망되는 경우 작동가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 활성화할 수 있거나, 또는 발현이 요망되지 않는 경우 발현을 비활성화할 수 있는 분자 스위치를 제공한다. 유도성 프로모터의 예는 메탈로티오닌 프로모터, 글루코코르티코이드 프로모터, 프로게스테론 프로모터, 및 테트라사이클린 프로모터를 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0575] CAR 폴리펩티드 또는 그 일부의 발현을 평가하기 위해, 세포 내로 도입될 발현 벡터는 바이러스 벡터를 통해 형질감염 또는 감염시키려는 세포 집단으로부터의 발현 세포의 식별 및 선택을 용이하게 하기 위한 선별 마커 유전자 또는 리포터 유전자 또는 둘 다를 또한 포함할 수 있다. 다른 양태에서, 선별 마커는 별도의 DNA 조각에 운반되어 공동 트랜스펙션 절차에 사용될 수 있다. 선별 마커 및 리포터 유전자는 둘 다 숙주 세포에서 발현을 가능하게 하는 적절한 조절 서열로 플랭킹될 수 있다. 유용한 선별 마커는 예를 들어 neo 등과 같은 항생제 내성 유전자를 포함한다.
- [0576] 리포터 유전자는 잠재적으로 형질감염된 세포를 식별하고 조절 서열의 기능을 평가하기 위해 사용된다. 일반적으로, 리포터 유전자는 수여 유기체 또는 조직에 존재하지 않거나 이에 의해 발현되지 않는 유전자로서, 일부 용이하게 검출가능한 특성, 예를 들어 효소 활성에 의해 발현이 나타나는 폴리펩티드를 암호화하는 유전자이다. 리포터 유전자의 발현은 DNA가 수여체 세포 내로 도입된 후 적합한 시점에 분석된다. 적합한 리포터 유전자는 루시페라제, 베타-갈락토시다제, 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제, 분비형 알칼리 포스파타제를 암호화하는 유전자, 또는 녹색 형광 단백질 유전자를 포함할 수 있다(예를 들어, Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82). 적합한 발현 시스템은 잘 알려져 있으며, 공지기술을 사용하여 제조하거나 상업적으로 획득할 수 있다. 일반적으로, 리포터 유전자의 가장 높은 수준의 발현을 나타내는 최소 5' 플랭킹 영역을 갖는 구성체가 프로모터로서 확인된다. 이러한 프로모터 영역은 리포터 유전자에 연결될 수 있으며, 프로모터에 의한 전사를 조절하는 능력에 대해 제제를 평가하는 데 사용될 수 있다.
- [0577] 유전자를 세포 내로 도입하고 발현시키는 방법은 당업계에 알려져 있다. 발현 벡터와 관련하여, 벡터는 당업계의 임의의 방법에 의해 숙주 세포, 예를 들어 포유동물, 박테리아, 효모, 또는 곤충 세포 내로 용이하게 도입될 수 있다. 예를 들어, 발현 벡터는 물리적, 화학적, 또는 생물학적 수단에 의해 숙주 세포 내로 전달될 수 있다.
- [0578] 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 도입하기 위한 물리적 방법은 인산칼슘 침전법, 리포펙션, 입자충격, 미세주사, 전기천공 등을 포함한다. 벡터 및/또는 외인성 핵산을 포함하는 세포를 생성하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 문헌[Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY] 참조. 숙주 세포 내로 폴리뉴클레오티드를 도입하기 위한 바람직한 방법은 인산칼슘 트랜스펙션이다.
- [0579] 숙주 세포 내로 관심 폴리뉴클레오티드를 도입하기 위한 생물학적 방법은 DNA 및 RNA 벡터의 사용을 포함한다. 바이러스 벡터, 특히 레트로바이러스 벡터는 유전자를 포유동물, 예를 들어 인간 세포 내로 삽입하기 위한 가장 널리 사용되는 방법이 되었다. 다른 바이러스 벡터는 렌티바이러스, 폭스바이러스, 단순 포진 바이러스 I, 아데노바이러스, 및 아데노-관련 바이러스 등으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 5,350,674호 및 5,585,362호 참조.
- [0580] 숙주 세포 내로 폴리뉴클레오티드를 도입하기 위한 화학적 수단은 콜로이드성 분산 시스템, 예컨대 마크로분자

복합체, 나노캡슐, 미소구체, 비드, 및 수중유 에멀전, 미셀, 혼합 미셀, 및 리포솜을 비롯한 지질 기반 시스템을 포함한다. 시험관내 및 생체내 전달 비히클로 사용하기 위한 예시적인 콜로이드성 시스템은 리포솜(예를 들어, 인공 막소포)이다. 표적화된 나노입자 또는 기타 적합한 서브마이크론 크기의 전달 시스템을 사용한 폴리뉴클레오티드의 전달과 같은, 핵산의 최신 표적화된 전달의 다른 방법이 이용 가능하다.

[0581] 비바이러스성 전달 시스템이 사용되는 경우, 예시적인 전달 비히클은 리포솜이다. 핵산을 숙주 세포 내로 도입(시험관내, 생체외, 또는 생체내 도입)하기 위해 지질 제형의 사용이 고려된다. 다른 양태에서, 핵산은 지질과 관련될 수 있다. 지질과 관련된 핵산은 리포솜의 수성 내부에 캡슐화되거나, 리포솜의 지질 이중층 내에 산재되거나, 리포솜 및 올리고뉴클레오티드 둘 모두와 관련된 연결 분자를 통해 리포솜에 부착되거나, 리포솜에 포획되거나, 리포솜과 복합체화되거나, 지질 함유 용액에 분산되거나, 지질과 혼합되거나, 지질과 결합되거나, 지질 내에 현탁액으로서 함유되거나, 미셀과 함께 함유되거나 복합체화되거나, 달리 지질과 관련될 수 있다. 지질, 지질/DNA, 또는 지질/발현 벡터 관련 조성물은 용액 중의 임의의 특정한 구조로 제한되지 않는다. 예를 들어, 이들은 이중층 구조로 존재하거나, 미셀로 존재하거나, 또는 "붕괴된" 구조로 존재할 수 있다. 이들은 또한 단순히 용액 중에 산재되어서, 가능하게는 크기 또는 형상이 균일하지 않은 응집체를 형성할 수 있다. 지질은 천연 또는 합성 지질일 수 있는 지방 물질이다. 예를 들어, 지질은 세포질에서 자연적으로 발생하는 지방구(fatty droplet) 뿐만 아니라, 지방산, 알코올, 아민, 아미노 알코올, 및 알데히드와 같은 장쇄 지방족 탄화수소 및 그 유도체를 함유하는 화합물 부류를 포함한다.

[0582] 사용하기에 적합한 지질은 상업적 공급처로부터 입수할 수 있다. 예를 들어, 디미리스틸 포스파티딜콜린("DMPC")은 Sigma(St. Louis, MO)로부터 입수할 수 있고, 디세틸 포스페이트("DCP")는 K & K Laboratories(Plainview, NY)로부터 입수할 수 있고, 콜레스테롤("Choi")은 Calbiochem-Behring로부터 입수할 수 있고, 디미리스틸 포스파티딜글리세롤("DMPG") 및 다른 지질은 Avanti Polar Lipids, Inc.(Birmingham, AL.)로부터 입수할 수 있다. 클로로포름 또는 클로로포름/메탄올 중의 지질 스톡 용액은 약 -20°C에서 보관될 수 있다. 클로로포름은 메탄올보다 더 용이하게 증발되기 때문에 유일한 용매로서 사용된다. "리포솜"은 둘러싸인 지질 이중층 또는 응집체의 생성에 의해 형성된 다양한 단일 및 다중층 지질 비히클을 포괄하는 일반용어이다. 리포솜은 인지질 이중층 막과 내부 수성 매질을 갖는 소포 구조를 갖는 것을 특징으로 할 수 있다. 다중층 리포솜은 수성 매질에 의해 분리된 여러 지질층을 갖는다. 다중층 리포솜은 인지질이 과량의 수용액에 현탁될 때 자발적으로 형성된다. 지질 성분은 폐쇄형 구조를 형성하기 전에 자가 재배열을 거쳐 지질 이중층 사이에 물 및 용해된 용질을 포획한다(Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5: 505-10). 그러나, 용액에서 정상 소포 구조와 다른 구조를 갖는 조성물도 포함된다. 예를 들어, 지질은 미셀 구조를 취하거나, 단순히 지질 분자의 불균일 응집체로서 존재할 수 있다. 또한, 리포펙타민-핵산 복합체가 고려된다.

[0583] 외인성 핵산을 숙주 세포 내로 도입하거나 세포를 본 발명의 억제제에 노출시키는 데 사용되는 방법에 관계없이, 숙주 세포 내 재조합 DNA 서열의 존재를 확인하기 위해 다양한 분석이 수행될 수 있다. 이러한 분석은, 예를 들어 서던 및 노던 블롯팅, RT-PCR 및 PCR과 같이 당업자에게 잘 알려진 "분자 생물학적" 분석; 예를 들어 면역학적 수단(ELISA 및 웨스턴 블롯) 또는 본원에 기재된 분석에 의해 특정 펩티드의 존재 여부를 검출하여 본 발명의 범위 내에 속하는 제제를 확인하는 것과 같은 "생화학적" 분석을 포함한다.

[0584] 본 발명은 CAR 암호화 핵산 분자를 포함하는 벡터를 추가로 제공한다. 일 양태에서, CAR 벡터는 세포, 예를 들어 T세포 또는 NK세포 내로 직접 형질도입될 수 있다. 일 양태에서, 벡터는 클로닝 또는 발현 벡터, 예를 들어 하나 이상의 플라스미드(예를 들어, 발현 플라스미드, 클로닝 벡터, 미니서클, 미니벡터, 이중 미세 염색체), 레트로바이러스 및 렌티바이러스 벡터 구성체를 포함하는(이에 한정되지 않음) 벡터이다. 일 양태에서, 벡터는 포유동물 T세포 또는 NK세포에서 CAR 구성체를 발현할 수 있다. 일 양태에서, 포유동물 T세포는 인간 T세포이다.

[0585] 제조/생산 방법

[0586] 본 발명은 또한 본원에 개시된 세포를 제조하는 방법, 예를 들어 본원에 기재된 하나 이상의 CAR 구성체를 암호화하는 핵산 분자를 발현하도록 T세포 또는 NK세포를 조작하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 제조 방법은 본원에 개시된 2종의 CAR(예를 들어, 본원에 개시된 CD19/CD22 탠덤 및/또는 이중 CAR)을 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 세포를 제조하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 제조 방법은 본원에 개시된 디아바디 CAR, 예를 들어 본원에 개시된 항-CD22/항-CD19 디아바디 CAR을 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 세포를 제조하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 제조 방법은 2종의 핵산 분자(각각은 본원에 개시된 CAR을 암호화함(예를 들어, 하나의 핵산 분자는 항-CD22 CAR을 암호화하고 하나의 핵산 분자는 항-

CD19 CAR을 암호화함))를 포함하는 세포를 제조하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 임의의 제조 프로세스에 의해 제조된 세포(예를 들어, 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T세포 또는 NK세포)의 집단이 본원에 제공된다.

[0587] *활성화 프로세스*

[0588] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 방법은 24시간 미만 내에 하나 이상의 CAR을 발현하도록 조작된 면역 이펙터 세포를 제조할 수 있다. 이론에 구애됨이 없이, 본원에 제공된 방법은 제조 프로세스 중에 나이브 T세포와 같은 T세포의 미분화 표현형을 보존한다. 미분화 표현형을 가진 이러한 CAR-발현 세포는 주입 후 생체 내에서 더 오래 지속되고/되거나 증식될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 제조 방법에 의해 생성된 CART세포는, 예를 들어 당업계에 알려진 마커를 사용하여 단일세포 또는 bulk RNA-seq 또는 유세포 분석을 이용해 측정시, 종래의 제조 프로세스에 의해 생성된 CART세포와 비교하여 더 높은 백분율의 줄기세포 기억 T세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 제조 방법에 의해 생성된 CART세포는 예를 들어 단일세포 RNA-seq를 이용해 측정시 종래의 제조 프로세스에 의해 생성된 CART세포와 비교하여 더 낮은 백분율의 이펙터 T세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 제조 방법에 의해 생성된 CART세포는 예를 들어 scRNA-seq를 이용해 측정시 종래의 제조 프로세스에 의해 생성된 CART세포와 비교하여 더 낮은 수준의 저산소증을 나타낸다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 제조 방법에 의해 생성된 CART세포는 예를 들어 scRNA-seq를 이용해 측정시 종래의 제조 프로세스에 의해 생성된 CART세포와 비교하여 더 낮은 수준의 자가포식을 나타낸다. 일부 구현예에서, 면역 이펙터 세포는 본원에 개시된 탠덤 또는 이중 CAR(예를 들어, 본원에 개시된 CD19/CD22 탠덤 또는 이중 CAR)을 암호화하는 핵산 분자를 포함하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 면역 이펙터 세포는 본원에 개시된 탠덤 또는 이중 CAR, 예를 들어 본원에 개시된 항-CD22/항-CD19 탠덤 또는 이중 CAR을 암호화하는 핵산 분자를 포함하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 면역 이펙터 세포는 2종의 핵산 분자(각각은 본원에 개시된 CAR을 암호화함(예를 들어, 하나의 핵산 분자는 항-CD22 CAR을 암호화하고 하나의 핵산 분자는 항-CD19 CAR을 암호화함))를 포함하도록 조작된다. 다른 구현예에서, 면역 이펙터 세포는 본원에 개시된 1 또는 2종의 CAR을 암호화하는 하나의 핵산 분자(예를 들어, 항-CD22/항-CD19 탠덤 또는 항-CD22/항-CD19 CAR을 암호화하는 하나의 핵산 분자)를 포함하도록 조작된다.

[0589] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 방법은 Dynabeads[®](예를 들어, CD3/CD28 Dynabeads[®])와 같은 비드를 사용하는 단계를 포함하지 않고, 비드제거(de-beading) 단계를 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 방법에 의해 제조된 CART세포는 예를 들어 2일 미만, 1일 미만, 12시간 미만, 8시간 미만, 6시간 미만, 4시간 미만, 3시간 미만, 2시간 미만, 1시간 미만의 최소한의 생체의 증식과 함께 또는 생체의 증식 없이 대상체에게 투여될 수 있다. 따라서, 본원에 기재된 방법은 대상체의 질환 치료에 사용하기 위한 개선된 CAR-발현 세포 산물을 제조하는 신속 제조 프로세스를 제공한다.

[0590] 일부 구현예에서, 본 발명은 키메라 항원 수용체(CAR)(예를 들어, 하나 이상의 CAR, 예를 들어 2종의 CAR)를 발현하는 세포(예를 들어, T세포)의 집단을 제조하는 방법으로서, (i) 세포(예를 들어, T세포, 예를 들어 동결된 또는 신선한 백혈구 성분채집 산물로부터 단리된 T세포)의 집단을 CD3/TCR 복합체를 자극하는 제제 및/또는 세포 표면의 공동자극 분자를 자극하는 제제와 접촉시키는 단계; (ii) 세포(예를 들어, T세포)의 집단을 CAR(들)을 암호화하는 핵산 분자(들)(예를 들어, DNA 또는 RNA 분자)와 접촉시켜, 핵산 분자를 포함하는 세포(예를 들어, T세포)의 집단을 제공하는 단계; 및 (iii) 보관(예를 들어, 동결보존 배지에 세포의 집단을 재제형화) 또는 투여하기 위해 세포(예를 들어, T세포)의 집단을 채취하는 단계를 포함하되, (a) 단계 (ii)는 단계 (i)과 함께 또는 단계 (i)의 시작 후 20시간 이내, 예를 들어 단계 (i)의 시작 후 12, 13, 14, 15, 16, 17, 또는 18시간 이내, 예를 들어 단계 (i)의 시작 후 18시간 이내에 수행되고, 단계 (iii)은 단계 (i)의 시작 후 26시간 이내, 예를 들어 단계 (i)의 시작 후 22, 23, 또는 24시간 이내, 예를 들어 단계 (i)의 시작 후 24시간 이내에 수행되고/되거나; (b) 단계 (ii)는 단계 (i)과 함께 또는 단계 (i)의 시작 후 20시간 이내, 예를 들어 단계 (i)의 시작 후 12, 13, 14, 15, 16, 17, 또는 18시간 이내, 예를 들어 단계 (i)의 시작 후 18시간 이내에 수행되고, 단계 (iii)은 단계 (ii)의 시작 후 30시간 이내, 예를 들어 단계 (ii)의 시작 후 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30시간 이내에 수행되고/되거나; (c) 단계 (iii)으로부터의 세포의 집단은 단계 (i)의 시작시 세포의 집단과 비교하여, 살아있는 세포의 수로 평가할 때, 증식되지 않거나, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 또는 40% 이하, 예를 들어 10% 이하만큼 증식되거나; (d) 단계 (iii)으로부터의 세포의 집단은 단계 (i)의 시작시 세포의 집단과 비교하여, 예를 들어 살아있는 세포의 수로 평가할 때, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 또는 70%만큼 더 적은, 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 단계 (ii)의 핵산

분자는 DNA 분자이다. 일부 구현예에서, 단계 (ii)의 핵산 분자는 RNA 분자이다. 일부 구현예에서, 단계 (ii)의 핵산 분자는 바이러스 벡터, 예를 들어 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 또는 레트로바이러스 벡터로부터 선택된 바이러스 벡터 상에 있다. 일부 구현예에서, 단계 (ii)의 핵산 분자는 비바이러스 벡터 상에 있다. 일부 구현예에서, 단계 (ii)의 핵산 분자는 플라스미드 상에 있다. 일부 구현예에서, 단계 (ii)의 핵산 분자는 어떠한 벡터 상에도 있지 않다. 일부 구현예에서, 단계 (ii)는 CAR(들)을 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 바이러스 벡터(들)를 세포(예를 들어, T세포)의 집단에 형질도입하는 단계를 포함한다.

[0591] 상기 방법의 일부 구현예에서, 방법은 형질도입 효율을 향상시키기 위해 세포 배양 배지에 아주반트 또는 형질도입 강화 시약을 첨가하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 아주반트 또는 형질도입 강화 시약은 양이온성 중합체를 포함한다. 일부 구현예에서, 아주반트 또는 형질도입 강화 시약은 LentiBOOST™(Sirion Biotech), vectofusin-1, F108(Poloxamer 338 또는 Pluronic® F-38), 헥사디메틸렌 브로마이드(Polybrene), PEA, Pluronic F68, Pluronic F127, 프로타민 설페이트, Synperonic 또는 LentiTrans™로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 아주반트는 LentiBOOST™(Sirion Biotech)이다. 다른 구현예에서, 아주반트는 F108(Poloxamer 338 또는 Pluronic® F-38)이다.

[0592] 일부 구현예에서, 세포(예를 들어, T세포)의 집단은 대상체의 성분채집 샘플(예를 들어, 백혈구 성분채집 샘플)로부터 수집된다.

[0593] 일부 구현예에서, 성분채집 샘플(예를 들어, 백혈구 성분채집 샘플)은 대상체로부터 수집되어 동결 샘플(예를 들어, 동결보존 샘플)로서 세포 제조 시설로 수송된다. 이후, 동결된 성분채집 샘플은 해동되고, 예를 들어 세포 분류기(예를 들어, CliniMACS® Prodigy® 장치)를 이용해 성분채집 샘플로부터 T세포(예를 들어, CD4+ T세포 및/또는 CD8+ T세포)가 선택된다. 선택된 T세포(예를 들어, CD4+ T세포 및/또는 CD8+ T세포)는 이후, 본원에 기재된 활성화 프로세스를 이용해 CART 제조를 위해 시딩된다. 일부 구현예에서, 선택된 T세포(예를 들어, CD4+ T세포 및/또는 CD8+ T세포)는 CART 제조를 위해 시딩되기 전에 1회 이상의 동결-해동을 거친다.

[0594] 일부 구현예에서, 성분채집 샘플(예를 들어, 백혈구 성분채집 샘플)은 대상체로부터 수집되어 신선한 제품(예를 들어, 동결되지 않은 제품)으로서 세포 제조 시설로 수송된다. 예를 들어 세포 분류기(예를 들어, CliniMACS® Prodigy® 장치)를 이용해 성분채집 샘플로부터 T세포(예를 들어, CD4+ T세포 및/또는 CD8+ T세포)가 선택된다. 선택된 T세포(예를 들어, CD4+ T세포 및/또는 CD8+ T세포)는 이후, 본원에 기재된 활성화 프로세스를 이용해 CART 제조를 위해 시딩된다. 일부 구현예에서, 선택된 T세포(예를 들어, CD4+ T세포 및/또는 CD8+ T세포)는 CART 제조를 위해 시딩되기 전에 1회 이상의 동결-해동을 거친다.

[0595] 일부 구현예에서, 성분채집 샘플(예를 들어, 백혈구 성분채집 샘플)은 대상체로부터 수집된다. 예를 들어 세포 분류기(예를 들어, CliniMACS® Prodigy® 장치)를 이용해 성분채집 샘플로부터 T세포(예를 들어, CD4+ T세포 및/또는 CD8+ T세포)가 선택된다. 선택된 T세포(예를 들어, CD4+ T세포 및/또는 CD8+ T세포)는 이후 동결 샘플(예를 들어, 동결보존 샘플)로서 세포 제조 시설로 수송된다. 선택된 T세포(예를 들어, CD4+ T세포 및/또는 CD8+ T세포)는 이후 해동되어, 본원에 기재된 활성화 프로세스를 이용해 CART 제조를 위해 시딩된다.

[0596] 일부 구현예에서, 세포(예를 들어, T세포)는 항-CD3 및 항-CD28 항체와 접촉되고, 예를 들어 즉시 이어서, CAR(예를 들어, 하나 이상의 CAR)을 암호화하는 벡터(예를 들어, 렌티바이러스 벡터)(예를 들어, 하나 이상의 벡터)를 이용한 형질도입이 이루어진다. 배양 개시 24시간 후, 세포는 세척되고, 보관 또는 투여를 위해 제형화된다.

[0597] 이론에 구애됨이 없이, 짧은 CD3 및 CD28 자극은 자가재생 T세포의 효율적인 형질도입을 촉진할 수 있다. 종래의 CART 제조 접근법과 비교하여, 본원에 제공된 활성화 프로세스는 장기간의 생체외 증식을 포함하지 않는다. 사이토카인 프로세스와 유사하게, 본원에 제공된 활성화 프로세스는 또한 CART 제조 중에 미분화된 T세포를 보존한다.

[0598] 일부 구현예에서, 세포(예를 들어, T세포)는 항-CD3 및 항-CD28 항체와 예를 들어 12시간 동안 접촉된 후, CAR(예를 들어, 하나 이상의 CAR)을 암호화하는 벡터(예를 들어, 렌티바이러스 벡터)(예를 들어, 하나 이상의 벡터)를 이용한 형질도입이 이루어진다. 배양 개시 24시간 후, 세포는 세척되고, 보관 또는 투여를 위해 제형화된다.

[0599] 이론에 구애됨이 없이, 짧은 CD3 및 CD28 자극은 자가재생 T세포의 효율적인 형질도입을 촉진할 수 있다. 종래

의 CART 제조 접근법과 비교하여, 본원에 제공된 활성화 프로세스는 장기간의 생체의 증식을 포함하지 않는다. 사이토카인 프로세스와 유사하게, 본원에 제공된 활성화 프로세스는 또한 CART 제조 중에 미분화된 T세포를 보존한다.

- [0600] 일부 구현예에서, 세포의 집단은 CD3/TCR 복합체를 자극하는 제제 및/또는 세포 표면의 공동자극 분자를 자극하는 제제와 접촉된다.
- [0601] 일부 구현예에서, T세포는 예를 들어 세포 분류기(예를 들어, CliniMACS[®] Prodigy[®])를 이용해 양성 선택에 의해 항-CD4 및 항-CD8 비드를 사용하여 선택된다.
- [0602] 일부 구현예에서, T세포는 예를 들어 세포 분류기(예를 들어, CliniMACS[®] Prodigy[®])를 이용해 양성 선택에 의해 항-CD45RA 및 항-CCR7 비드를 사용하여 선택된다.
- [0603] 일부 구현예에서, T세포는 예를 들어 세포 분류기(예를 들어, CliniMACS[®] Prodigy[®])를 이용해 양성 선택에 의해 항-CD45RA 및 항-CD27 비드를 사용하여 선택된다.
- [0604] 일부 구현예에서, T세포는 예를 들어 세포 분류기(예를 들어, CliniMACS[®] Prodigy[®])를 이용해 양성 선택에 의해 항-CD3 및 항-CD28 비드를 사용하여 선택된다.
- [0605] 일부 구현예에서, T세포는 예를 들어 세포 분류기(예를 들어, CliniMACS[®] Prodigy[®])를 이용해 음성 선택에 의해 항-계열 비드(T세포 제외)를 사용하여 선택된다.
- [0606] 일부 구현예에서, CD3/TCR 복합체를 자극하는 제제는 CD3을 자극하는 제제이다. 일부 구현예에서, 공동자극 분자를 자극하는 제제는 CD28, ICOS, CD27, HVEM, LIGHT, CD40, 4-1BB, OX40, DR3, GITR, CD30, TIM1, CD2, CD226, 또는 이의 임의의 조합을 자극하는 제제이다. 일부 구현예에서, 공동자극 분자를 자극하는 제제는 CD28을 자극하는 제제이다. 일부 구현예에서, CD3/TCR 복합체를 자극하는 제제는 항체(예를 들어, 단일 도메인 항체(예를 들어, 중쇄 가변 도메인 항체), 펩티바디, Fab 단편, 또는 scFv), 소분자, 또는 리간드(예를 들어, 천연, 재조합, 또는 키메라 리간드)로부터 선택된다. 일부 구현예에서, CD3/TCR 복합체를 자극하는 제제는 항체이다. 일부 구현예에서, CD3/TCR 복합체를 자극하는 제제는 항-CD3 항체이다. 일부 구현예에서, 공동자극 분자를 자극하는 제제는 항체(예를 들어, 단일 도메인 항체(예를 들어, 중쇄 가변 도메인 항체), 펩티바디, Fab 단편, 또는 scFv), 소분자, 또는 리간드(예를 들어, 천연, 재조합, 또는 키메라 리간드)로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 공동자극 분자를 자극하는 제제는 항체이다. 일부 구현예에서, 공동자극 분자를 자극하는 제제는 항-CD28 항체이다. 일부 구현예에서, CD3/TCR 복합체를 자극하는 제제 또는 공동자극 분자를 자극하는 제제는 비드를 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, CD3/TCR 복합체를 자극하는 제제는 콜로이드 고분자 나노기질에 공유 부착된 항-CD3 항체를 포함한다. 일부 구현예에서, 공동자극 분자를 자극하는 제제는 콜로이드 고분자 나노기질에 공유 부착된 항-CD28 항체를 포함한다. 일부 구현예에서, CD3/TCR 복합체를 자극하는 제제 및 공동자극 분자를 자극하는 제제는 T Cell TransAct[™]를 포함한다.
- [0607] 일부 구현예에서, 기질은 고분자, 예를 들어 생분해성 또는 생체적합성 비활성 물질, 예를 들어 세포에 비독성인 물질을 포함하거나 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 기질은 친수성 고분자 사슬로 구성되며, 이는 사슬의 수화로 인해 수용액에서 최대의 이동성을 얻는다. 일부 구현예에서, 이동성 기질은 콜라겐, 정제된 단백질, 정제된 펩티드, 다당류, 글리코사미노글리칸, 또는 세포의 기질 조성물로 구성될 수 있다. 다당류는 예를 들어, 셀룰로스 에테르, 전분, 아라빅검, 아가로스, 텍스트란, 키토산, 히알루론산, 펙틴, 잔탄, 구아검, 또는 알긴산염을 포함할 수 있다. 다른 중합체는 폴리에스테르, 폴리에테르, 폴리아크릴레이트, 폴리아크릴아미드, 폴리아민, 폴리에틸렌 이민, 폴리쿼터늄 중합체, 폴리포스파젠, 폴리비닐알코올, 폴리비닐아세테이트, 폴리비닐피롤리돈, 블록 공중합체, 또는 폴리우레탄을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 이동성 기질은 텍스트란 중합체이다.
- [0608] 일부 구현예에서, 세포의 집단은 CAR(예를 들어, 하나 이상의 CAR)을 암호화하는 핵산 분자(예를 들어, 하나 이상의 핵산 분자)와 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 CAR(예를 들어, 하나 이상의 CAR)을 암호화하는 DNA 분자(예를 들어, 하나 이상의 DNA 분자)로 형질도입된다.
- [0609] 일부 구현예에서, 세포의 집단을 CAR(들)을 암호화하는 핵산 분자(들)와 접촉시키는 단계는 세포의 집단을 전술한 CD3/TCR 복합체를 자극하는 제제 및/또는 세포 표면의 공동자극 분자를 자극하는 제제와 접촉시키는 단계와 동시에 일어난다. 일부 구현예에서, 세포의 집단을 CAR(들)을 암호화하는 핵산 분자(들)와 접촉시키는 단계는

시작 후 1시간 이내에 일어난다. 일부 구현예에서, 세포의 집단을 CAR(들)을 암호화하는 핵산 분자(들)와 접촉시키는 단계는 세포의 집단을 전술한 CD3/TCR 복합체를 자극하는 제제 및/또는 세포 표면의 공동자극 분자를 자극하는 제제와 접촉시키는 단계의 시작 후 30분 이내에 일어난다.

[0610] 일부 구현예에서, 세포의 집단은 보관 또는 투여를 위해 채취된다.

[0611] 일부 구현예에서, 세포의 집단은 세포의 집단을 전술한 CD3/TCR 복합체를 자극하는 제제 및/또는 세포 표면의 공동자극 분자를 자극하는 제제와 접촉시키는 단계의 시작 후 72, 60, 48, 36, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 또는 18시간 이내에 보관 또는 투여를 위해 채취된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 세포의 집단을 전술한 CD3/TCR 복합체를 자극하는 제제 및/또는 세포 표면의 공동자극 분자를 자극하는 제제와 접촉시키는 단계의 시작 후 26시간 이내에 보관 또는 투여를 위해 채취된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 세포의 집단을 전술한 CD3/TCR 복합체를 자극하는 제제 및/또는 세포 표면의 공동자극 분자를 자극하는 제제와 접촉시키는 단계의 시작 후 25시간 이내에 보관 또는 투여를 위해 채취된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 세포의 집단을 전술한 CD3/TCR 복합체를 자극하는 제제 및/또는 세포 표면의 공동자극 분자를 자극하는 제제와 접촉시키는 단계의 시작 후 24시간 이내에 보관 또는 투여를 위해 채취된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 세포의 집단을 전술한 CD3/TCR 복합체를 자극하는 제제 및/또는 세포 표면의 공동자극 분자를 자극하는 제제와 접촉시키는 단계의 시작 후 23시간 이내에 보관 또는 투여를 위해 채취된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 세포의 집단을 전술한 CD3/TCR 복합체를 자극하는 제제 및/또는 세포 표면의 공동자극 분자를 자극하는 제제와 접촉시키는 단계의 시작 후 22시간 이내에 보관 또는 투여를 위해 채취된다.

[0612] 일부 구현예에서, 세포의 집단은 생체 외에서 증식되지 않는다.

[0613] 일부 구현예에서, 세포의 집단은 전술한 CD3/TCR 복합체를 자극하는 제제 및/또는 세포 표면의 공동자극 분자를 자극하는 제제와 접촉되기 전의 세포의 집단과 비교하여, 예를 들어 살아있는 세포의 수로 평가할 때, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 또는 60% 이하만큼 증식된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 전술한 CD3/TCR 복합체를 자극하는 제제 및/또는 세포 표면의 공동자극 분자를 자극하는 제제와 접촉되기 전의 세포의 집단과 비교하여, 예를 들어 살아있는 세포의 수로 평가할 때, 5% 이하만큼 증식된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 전술한 CD3/TCR 복합체를 자극하는 제제 및/또는 세포 표면의 공동자극 분자를 자극하는 제제와 접촉되기 전의 세포의 집단과 비교하여, 예를 들어 살아있는 세포의 수로 평가할 때, 10% 이하만큼 증식된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 전술한 CD3/TCR 복합체를 자극하는 제제 및/또는 세포 표면의 공동자극 분자를 자극하는 제제와 접촉되기 전의 세포의 집단과 비교하여, 예를 들어 살아있는 세포의 수로 평가할 때, 15% 이하만큼 증식된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 전술한 CD3/TCR 복합체를 자극하는 제제 및/또는 세포 표면의 공동자극 분자를 자극하는 제제와 접촉되기 전의 세포의 집단과 비교하여, 예를 들어 살아있는 세포의 수로 평가할 때, 20% 이하만큼 증식된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 전술한 CD3/TCR 복합체를 자극하는 제제 및/또는 세포 표면의 공동자극 분자를 자극하는 제제와 접촉되기 전의 세포의 집단과 비교하여, 예를 들어 살아있는 세포의 수로 평가할 때, 25% 이하만큼 증식된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 전술한 CD3/TCR 복합체를 자극하는 제제 및/또는 세포 표면의 공동자극 분자를 자극하는 제제와 접촉되기 전의 세포의 집단과 비교하여, 예를 들어 살아있는 세포의 수로 평가할 때, 30% 이하만큼 증식된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 전술한 CD3/TCR 복합체를 자극하는 제제 및/또는 세포 표면의 공동자극 분자를 자극하는 제제와 접촉되기 전의 세포의 집단과 비교하여, 예를 들어 살아있는 세포의 수로 평가할 때, 35% 이하만큼 증식된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 전술한 CD3/TCR 복합체를 자극하는 제제 및/또는 세포 표면의 공동자극 분자를 자극하는 제제와 접촉되기 전의 세포의 집단과 비교하여, 예를 들어 살아있는 세포의 수로 평가할 때, 40% 이하만큼 증식된다.

[0614] 일부 구현예에서, 세포의 집단은 전술한 하나 이상의 사이토카인과 접촉되기 전의 세포의 집단과 비교하여, 예를 들어 살아있는 세포의 수로 평가할 때, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 20, 24, 36, 또는 48시간 이내에 증식된다.

[0615] 일부 구현예에서, 활성화 프로세스는 무혈청 세포 배지에서 수행된다. 일부 구현예에서, 활성화 프로세스는 IL-2, IL-15(예를 들어, het IL-15(IL15/sIL-15Ra)), 또는 IL-6(예를 들어, IL-6/sIL-6Ra)로부터 선택된 하나 이상의 사이토카인을 포함하는 세포 배지에서 수행된다. 일부 구현예에서, het IL-15는 NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCVKVTAMKCFLELQVLSLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQS FVHIVQMFINTSITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAPPSTVTAGVTPQPE SLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPSPSTGTTEISSHESHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQG(서열번호 109)의 아미

노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, hetIL-15는 서열번호 109에 대해 적어도 약 70, 75, 80, 85, 90, 95, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 활성화 프로세스는 LSD1 억제제를 포함하는 세포 배지에서 수행된다. 일부 구현예에서, 활성화 프로세스는 MALT1 억제제를 포함하는 세포 배지에서 수행된다. 일부 구현예에서, 무혈청 세포 배지는 혈청 대체물을 포함한다. 일부 구현예에서, 혈청 대체물은 CTS™ 면역 세포 혈청 대체물(ICSR)이다. 일부 구현예에서, ICSR의 수준은 예를 들어 최대 5%, 예를 들어 약 1%, 2%, 3%, 4%, 또는 5%일 수 있다. 이론에 구애됨이 없이, ICSR, 예를 들어 2% ICSR을 포함하는 세포 배지, 예를 들어 Rapid Media를 사용하면 본원에 기재된 제조 프로세스 중 세포 생존력이 개선될 수 있다.

[0616] 일부 구현예에서, 본 발명은 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 세포(예를 들어, T세포)의 집단을 제조하는 방법으로서, (a) 대상체로부터 수집된 성분채집 샘플(예를 들어, 신선한 또는 동결보존된 백혈구 성분채집 샘플)을 제공하는 단계; (b) (예를 들어, 음성 선택, 양성 선택, 또는 무비드 선택을 사용하여) 성분채집 샘플로부터 T세포를 선택하는 단계; (c) 단리된 T세포를 예를 들어 1×10^6 내지 1×10^7 개 세포/mL로 시딩하는 단계; (d) T세포를 자극하는 제제, 예를 들어 CD3/TCR 복합체를 자극하는 제제 및/또는 세포 표면의 공동자극 분자를 자극하는 제제와 T세포를 접촉시키는 단계(예를 들어, T세포를 항-CD3 및/또는 항-CD28 항체와 접촉시키는 단계, 예를 들어 T세포를 TransAct와 접촉시키는 단계); (e) T세포를, 예를 들어 6~48시간, 예를 들어 20~28시간 동안, CAR(들)을 암호화하는 핵산 분자(들)(예를 들어, DNA 또는 RNA 분자)와 접촉시키는 단계(예를 들어, T세포를 CAR(들)을 암호화하는 핵산 분자(들)를 포함하는 바이러스와 접촉시키는 단계); 및 (f) 보관(예를 들어, 동결보존 배지에 T세포를 재제형화) 또는 투여를 위해 T세포를 세척 및 채취하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 단계 (f)는 단계 (d) 또는 (e)의 시작 후 30시간 이내, 예를 들어 단계 (d) 또는 (e)의 시작 후 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30시간 이내에 수행된다.

[0617] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 임의의 제조 프로세스(예를 들어, 본원에 기재된 활성화 프로세스)에 의해 제조된 세포(예를 들어, 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T세포 또는 NK세포)의 집단이 본원에 제공된다.

[0618] 일부 구현예에서, 제조 프로세스의 종료시(예를 들어, 본원에 기재된 사이토카인 프로세스 또는 활성화 프로세스의 종료시) 세포의 집단 중 나이브 세포, 예를 들어 나이브 T세포, 예를 들어 CD45RA+ CD45RO- CCR7+ T세포의 백분율은 제조 프로세스의 시작시(예를 들어, 본원에 기재된 사이토카인 프로세스 또는 활성화 프로세스의 시작시) 세포의 집단 중 나이브 세포, 예를 들어 나이브 T세포, 예를 들어 CD45RA+ CD45RO- CCR7+ 세포의 백분율과 비교하여, (1) 동일하거나, (2) 예를 들어 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15% 이하만큼 상이하거나, (3) 예를 들어 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25%만큼 증가된다. 일부 구현예에서, 제조 프로세스의 종료시(예를 들어, 본원에 기재된 사이토카인 프로세스 또는 활성화 프로세스의 종료시) 세포의 집단은, 예를 들어 26시간을 초과하여 지속(예를 들어, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12일을 초과하여 지속)되는 다른 유사한 방법, 또는 예를 들어 3일을 초과하여 시험관 내에서 세포의 집단을 증식시키는 단계(예를 들어, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15일 동안 시험관 내에서 세포의 집단을 증식시키는 단계)를 포함하는 다른 유사한 방법에 의해 제조된 세포와 비교하여, 나이브 세포, 예를 들어 나이브 T세포, 예를 들어 CD45RA+ CD45RO- CCR7+ T세포의 더 높은(예를 들어, 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 50% 더 높은) 백분율을 나타낸다.

[0619] 일부 구현예에서, 제조 프로세스의 종료시(예를 들어, 본원에 기재된 사이토카인 프로세스 또는 활성화 프로세스의 종료시) 세포의 집단 중 나이브 세포, 예를 들어 나이브 T세포, 예를 들어 CD45RA+ CD45RO- CCR7+ T세포의 백분율은 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 또는 60% 이상이다.

[0620] 일부 구현예에서, 제조 프로세스의 종료시(예를 들어, 본원에 기재된 사이토카인 프로세스 또는 활성화 프로세스의 종료시) 세포의 집단 중 중심 기억 세포, 예를 들어 중심 기억 T세포, 예를 들어 CD95+ 중심 기억 T세포, CD45RO+ 중심 기억 T세포, 및/또는 CCR7+ 중심 기억 T세포의 백분율은 제조 프로세스의 시작시(예를 들어, 본원에 기재된 사이토카인 프로세스 또는 활성화 프로세스의 시작시) 세포의 집단 중 중심 기억 세포, 예를 들어 중심 기억 T세포, 예를 들어 CD95+ 중심 기억 T세포의 백분율과 비교하여, (1) 동일하거나, (2) 예를 들어 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15% 이하만큼 상이하거나, (3) 예를 들어 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25%만큼 감소된다. 일부 구현예에서, 제조 프로세스의 종료시(예를 들어, 본원에 기재된 사이토카인 프로세스 또는 활성화 프로세스의 종료시) 세포의 집단은, 예를 들어 26시간을 초과하여 지속(예를 들어, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12일을 초과하여 지속)되는 다른 유사한 방법, 또는 예를 들어 3일을 초과하여 시험관 내에서 세포의 집단을 증식시키는 단계(예를 들어, 3,

4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15일 동안 시험관 내에서 세포의 집단을 증식시키는 단계)를 포함하는 다른 유사한 방법에 의해 제조된 세포와 비교하여, 중심 기억 세포, 예를 들어 중심 기억 T세포, 예를 들어 CD95+ 중심 기억 T세포의 더 낮은(예를 들어, 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 50% 더 낮은) 백분율을 나타낸다.

[0621] 일부 구현예에서, 제조 프로세스의 종료시(예를 들어, 본원에 기재된 사이토카인 프로세스 또는 활성화 프로세스의 종료시) 세포의 집단 중 중심 기억 세포, 예를 들어 중심 기억 T세포, 예를 들어 CD95+ 중심 기억 T세포의 백분율은 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 또는 80% 이하이다.

[0622] 일부 구현예에서, 제조 프로세스의 종료시(예를 들어, 본원에 기재된 사이토카인 프로세스 또는 활성화 프로세스의 종료시) 세포의 집단은, 예를 들어 26시간을 초과하여 지속(예를 들어, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12일을 초과하여 지속)되는 다른 유사한 방법, 또는 예를 들어 3일을 초과하여 시험관 내에서 세포의 집단을 증식시키는 단계(예를 들어, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15일 동안 시험관 내에서 세포의 집단을 증식시키는 단계)를 포함하는 다른 유사한 방법에 의해 제조된 세포와 비교하여, 생체내 투여된 후 더 오래 지속하거나 더 높은(예를 들어, 적어도 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 또는 90% 더 높은) 수준으로 증식된다.

[0623] 일부 구현예에서, 세포의 집단은 제조 프로세스의 시작 전에(예를 들어, 본원에 기재된 사이토카인 프로세스 또는 활성화 프로세스의 시작 전)에 IL6R-발현 세포(예를 들어, IL6R α 및/또는 IL6R β 에 대해 양성인 세포)에 대해 강화되었다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 제조 프로세스의 시작시(예를 들어, 본원에 기재된 사이토카인 프로세스 또는 활성화 프로세스의 시작시) 예를 들어, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 또는 80% 이상의 IL6R-발현 세포(예를 들어, IL6R α 및/또는 IL6R β 에 대해 양성인 세포)를 포함한다.

[0624] *사이토카인 프로세스*

[0625] 일부 구현예에서, 본 발명은 키메라 항원 수용체(CAR)(예를 들어, 하나 이상의 CAR, 예를 들어 2종의 CAR)를 발현하는 세포(예를 들어, T세포)의 집단을 제조하는 방법으로서, (1) 세포의 집단을 IL-2, IL-7, IL-15, IL-21, IL-6, 또는 이의 조합으로부터 선택된 사이토카인과 접촉시키는 단계; (2) 세포(예를 들어, T세포)의 집단을 CAR(들)을 암호화하는 핵산 분자(들)(예를 들어, DNA 또는 RNA 분자)와 접촉시켜, 핵산 분자를 포함하는 세포(예를 들어, T세포)의 집단을 제공하는 단계; 및 (3) 보관(예를 들어, 동결보존 배지에 세포의 집단을 재제형화) 또는 투여하기 위해 세포(예를 들어, T세포)의 집단을 채취하는 단계를 포함하되, (a) 단계 (2)는 단계 (1)과 함께 또는 단계 (1)의 시작 후 5시간 이내, 예를 들어 단계 (1)의 시작 후 1, 2, 3, 4, 또는 5시간 이내에 수행되고, 단계 (3)은 단계 (1)의 시작 후 26시간 이내, 예를 들어 단계 (1)의 시작 후 22, 23, 또는 24시간 이내, 예를 들어 단계 (1)의 시작 후 24시간 이내에 수행되거나, (b) 단계 (3)으로부터의 세포의 집단은 단계 (1)의 시작시 세포의 집단과 비교하여, 예를 들어 살아있는 세포의 수로 평가할 때, 증식되지 않거나, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 또는 40% 이하, 예를 들어 10% 이하만큼 증식되는, 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 단계 (2)의 핵산 분자는 DNA 분자이다. 일부 구현예에서, 단계 (2)의 핵산 분자는 RNA 분자이다. 일부 구현예에서, 단계 (2)의 핵산 분자는 바이러스 벡터, 예를 들어 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 또는 레트로바이러스 벡터로부터 선택된 바이러스 벡터 상에 있다. 일부 구현예에서, 단계 (2)의 핵산 분자는 비바이러스 벡터 상에 있다. 일부 구현예에서, 단계 (2)의 핵산 분자는 플라스미드 상에 있다. 일부 구현예에서, 단계 (2)의 핵산 분자는 어떠한 벡터 상에도 있지 않다. 일부 구현예에서, 단계 (2)는 CAR(들)을 암호화하는 핵산 분자(들)를 포함하는 바이러스 벡터를 세포(예를 들어, T세포)의 집단에 형질도입하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 본원에 개시된 탠덤 또는 이중 CAR(예를 들어, 본원에 개시된 CD19/CD22 탠덤 또는 이중 CAR)을 암호화하는 핵산 분자를 포함하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 본원에 개시된 디아바디 CAR, 예를 들어 본원에 개시된 항-CD22/항-CD19 디아바디 CAR을 암호화하는 핵산 분자를 포함하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 2종의 핵산 분자(각각은 본원에 개시된 CAR을 암호화함(예를 들어, 하나의 핵산 분자는 항-CD22 CAR을 암호화하고 하나의 핵산 분자는 항-CD19 CAR을 암호화함))를 포함하도록 조작된다.

[0626] 일부 구현예에서, 세포(예를 들어, T세포)의 집단은 대상체의 성분채집 샘플(예를 들어, 백혈구 성분채집 샘플)로부터 수집된다.

[0627] 일부 구현예에서, 성분채집 샘플(예를 들어, 백혈구 성분채집 샘플)은 대상체로부터 수집되어 동결 샘플(예를 들어, 동결보존 샘플)로서 세포 제조 시설로 수송된다. 동결된 성분채집 샘플은 이후 해동되고, 예를 들어 세포 분류기(예를 들어, CliniMACS[®] Prodigy[®] 장치)를 이용해 성분채집 샘플로부터 T세포(예를 들어, CD4+ T세포 및/또는 CD8+ T세포)가 선택된다. 선택된 T세포(예를 들어, CD4+ T세포 및/또는 CD8+ T세포)는 이후, 본원에 기재

된 사이토카인 프로세스를 이용해 CART 제조를 위해 시딩된다. 일부 구현예에서, 사이토카인 프로세스의 종료시, CAR T세포는 동결보존되고, 후에 해동되어 대상체에게 투여된다. 일부 구현예에서, 선택된 T세포(예를 들어, CD4+ T세포 및/또는 CD8+ T세포)는 CART 제조를 위해 시딩되기 전에 1회 이상의 동결-해동을 거친다.

[0628] 일부 구현예에서, 성분채집 샘플(예를 들어, 백혈구 성분채집 샘플)은 대상체로부터 수집되어 신선한 제품(예를 들어, 동결되지 않은 제품)으로서 세포 제조 시설로 수송된다. 예를 들어 세포 분류기(예를 들어, CliniMACS[®] Prodigy[®] 장치)를 이용해 성분채집 샘플로부터 T세포(예를 들어, CD4+ T세포 및/또는 CD8+ T세포)가 선택된다. 선택된 T세포(예를 들어, CD4+ T세포 및/또는 CD8+ T세포)는 이후, 본원에 기재된 사이토카인 프로세스를 이용해 CART 제조를 위해 시딩된다. 일부 구현예에서, 선택된 T세포(예를 들어, CD4+ T세포 및/또는 CD8+ T세포)는 CART 제조를 위해 시딩되기 전에 1회 이상의 동결-해동을 거친다.

[0629] 일부 구현예에서, 성분채집 샘플(예를 들어, 백혈구 성분채집 샘플)은 대상체로부터 수집된다. 예를 들어 세포 분류기(예를 들어, CliniMACS[®] Prodigy[®] 장치)를 이용해 성분채집 샘플로부터 T세포(예를 들어, CD4+ T세포 및/또는 CD8+ T세포)가 선택된다. 선택된 T세포(예를 들어, CD4+ T세포 및/또는 CD8+ T세포)는 이후 동결 샘플(예를 들어, 동결보존 샘플)로서 세포 제조 시설로 수송된다. 선택된 T세포(예를 들어, CD4+ T세포 및/또는 CD8+ T세포)는 이후 해동되어, 본원에 기재된 사이토카인 프로세스를 이용해 CART 제조를 위해 시딩된다.

[0630] 일부 구현예에서, 세포(예를 들어, T세포)가 시딩된 후, 하나 이상의 사이토카인(예를 들어, IL-2, IL-7, IL-15(예를 들어, het IL-15(IL15/sIL-15Ra)), IL-21, 또는 IL-6(예를 들어, IL-6/sIL-6R)로부터 선택된 하나 이상의 사이토카인) 및 CAR(예를 들어, 하나 이상의 CAR)을 암호화하는 벡터(예를 들어, 렌티바이러스 벡터)(예를 들어, 하나 이상의 벡터)가 세포에 첨가된다. 20~24시간 동안의 인큐베이션 후, 세포는 세척되고 보관 또는 투여를 위해 제형화된다.

[0631] 종래의 CART 제조 접근법과 달리, 본원에 제공된 사이토카인 프로세스는 CD3 및/또는 CD28 자극, 또는 생체의 T 세포 증식을 포함하지 않는다. 항-CD3 및 항-CD28 항체와 접촉되고 생체 외에서 광범위하게 증식되는 T세포는 중심 기억 표현형으로의 분화를 보이는 경향이 있다. 이론에 구애됨이 없이, 본원에 제공된 사이토카인 프로세스는 CART 제조 중에 T세포의 미분화된 표현형을 보존하거나 증가시켜 대상체에 주입된 후에 더 오래 지속할 수 있는 CART 산물을 생성한다.

[0632] 일부 구현예에서, 세포의 집단은 하나 이상의 사이토카인(예를 들어, IL-2, IL-7, IL-15(예를 들어, het IL-15(IL15/sIL-15Ra)), IL-21, 또는 IL-6(예를 들어, IL-6/sIL-6Ra)로부터 선택된 하나 이상의 사이토카인)과 접촉된다.

[0633] 일부 구현예에서, 세포의 집단은 IL-2와 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 IL-7과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 IL-15(예를 들어, het IL-15(IL15/sIL-15Ra))와 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 IL-21과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 IL-6(예를 들어, IL-6/sIL-6Ra)와 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 IL-2 및 IL-7과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 IL-2 및 IL-15(예를 들어, het IL-15(IL15/sIL-15Ra))와 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 IL-2 및 IL-21과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 IL-2 및 IL-6(예를 들어, IL-6/sIL-6Ra)와 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 IL-7 및 IL-15(예를 들어, het IL-15(IL15/sIL-15Ra))와 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 IL-7 및 IL-21과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 IL-7 및 IL-6(예를 들어, IL-6/sIL-6Ra)와 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 IL-15(예를 들어, het IL-15(IL15/sIL-15Ra)) 및 IL-21과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 IL-15(예를 들어, het IL-15(IL15/sIL-15Ra)) 및 IL-6(예를 들어, IL-6/sIL-6Ra)와 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 IL-21 및 IL-6(예를 들어, IL-6/sIL-6Ra)와 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 IL-7, IL-15(예를 들어, het IL-15(IL15/sIL-15Ra)), 및 IL-21과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 LSD1 억제제와 추가로 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 MALT1 억제제와 추가로 접촉된다.

[0634] 일부 구현예에서, 세포의 집단은 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 또는 300 U/ml의 IL-2와 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20 ng/ml의 IL-7과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20 ng/ml의 IL-15와 접촉된다.

- [0635] 일부 구현예에서, 세포의 집단은 CAR(예를 들어, 하나 이상의 CAR)을 암호화하는 핵산 분자(예를 들어, 하나 이상의 핵산 분자)와 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 CAR(예를 들어, 하나 이상의 CAR)을 암호화하는 DNA 분자(예를 들어, 하나 이상의 DNA 분자)로 형질도입된다.
- [0636] 일부 구현예에서, 세포의 집단을 CAR(들)을 암호화하는 핵산 분자와 접촉시키는 단계는 세포의 집단을 전술한 하나 이상의 사이토카인과 접촉시키는 단계와 동시에 일어난다. 일부 구현예에서, 세포의 집단을 CAR(들)을 암호화하는 핵산 분자와 접촉시키는 단계는 세포의 집단을 전술한 하나 이상의 사이토카인과 접촉시키는 단계의 시작 후 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 또는 10시간 이내에 일어난다. 일부 구현예에서, 세포의 집단을 CAR(들)을 암호화하는 핵산 분자와 접촉시키는 단계는 세포의 집단을 전술한 하나 이상의 사이토카인과 접촉시키는 단계의 시작 후 5시간 이내에 일어난다. 일부 구현예에서, 세포의 집단을 CAR(들)을 암호화하는 핵산 분자와 접촉시키는 단계는 세포의 집단을 전술한 하나 이상의 사이토카인과 접촉시키는 단계의 시작 후 4시간 이내에 일어난다. 일부 구현예에서, 세포의 집단을 CAR(들)을 암호화하는 핵산 분자와 접촉시키는 단계는 세포의 집단을 전술한 하나 이상의 사이토카인과 접촉시키는 단계의 시작 후 3시간 이내에 일어난다. 일부 구현예에서, 세포의 집단을 CAR(들)을 암호화하는 핵산 분자와 접촉시키는 단계는 세포의 집단을 전술한 하나 이상의 사이토카인과 접촉시키는 단계의 시작 후 2시간 이내에 일어난다. 일부 구현예에서, 세포의 집단을 CAR(들)을 암호화하는 핵산 분자와 접촉시키는 단계는 세포의 집단을 전술한 하나 이상의 사이토카인과 접촉시키는 단계의 시작 후 1시간 이내에 일어난다.
- [0637] 일부 구현예에서, 세포의 집단은 보관 또는 투여를 위해 채취된다.
- [0638] 일부 구현예에서, 세포의 집단은 세포의 집단을 전술한 하나 이상의 사이토카인과 접촉시키는 단계의 시작 후 72, 60, 48, 36, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 또는 18시간 이내에 보관 또는 투여를 위해 채취된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 세포의 집단을 전술한 하나 이상의 사이토카인과 접촉시키는 단계의 시작 후 26시간 이내에 보관 또는 투여를 위해 채취된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 세포의 집단을 전술한 하나 이상의 사이토카인과 접촉시키는 단계의 시작 후 25시간 이내에 보관 또는 투여를 위해 채취된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 세포의 집단을 전술한 하나 이상의 사이토카인과 접촉시키는 단계의 시작 후 24시간 이내에 보관 또는 투여를 위해 채취된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 세포의 집단을 전술한 하나 이상의 사이토카인과 접촉시키는 단계의 시작 후 23시간 이내에 보관 또는 투여를 위해 채취된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 세포의 집단을 전술한 하나 이상의 사이토카인과 접촉시키는 단계의 시작 후 22시간 이내에 보관 또는 투여를 위해 채취된다.
- [0639] 일부 구현예에서, 세포의 집단은 생체 외에서 증식되지 않는다.
- [0640] 일부 구현예에서, 세포의 집단은 전술한 하나 이상의 사이토카인과 접촉되기 전의 세포의 집단과 비교하여, 예를 들어 살아있는 세포의 수로 평가할 때, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 또는 60% 이하만큼 증식된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 전술한 하나 이상의 사이토카인과 접촉되기 전의 세포의 집단과 비교하여, 예를 들어 살아있는 세포의 수로 평가할 때, 5% 이하만큼 증식된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 전술한 하나 이상의 사이토카인과 접촉되기 전의 세포의 집단과 비교하여, 예를 들어 살아있는 세포의 수로 평가할 때, 10% 이하만큼 증식된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 전술한 하나 이상의 사이토카인과 접촉되기 전의 세포의 집단과 비교하여, 예를 들어 살아있는 세포의 수로 평가할 때, 15% 이하만큼 증식된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 전술한 하나 이상의 사이토카인과 접촉되기 전의 세포의 집단과 비교하여, 예를 들어 살아있는 세포의 수로 평가할 때, 20% 이하만큼 증식된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 전술한 하나 이상의 사이토카인과 접촉되기 전의 세포의 집단과 비교하여, 예를 들어 살아있는 세포의 수로 평가할 때, 25% 이하만큼 증식된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 전술한 하나 이상의 사이토카인과 접촉되기 전의 세포의 집단과 비교하여, 예를 들어 살아있는 세포의 수로 평가할 때, 30% 이하만큼 증식된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 전술한 하나 이상의 사이토카인과 접촉되기 전의 세포의 집단과 비교하여, 예를 들어 살아있는 세포의 수로 평가할 때, 35% 이하만큼 증식된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 전술한 하나 이상의 사이토카인과 접촉되기 전의 세포의 집단과 비교하여, 예를 들어 살아있는 세포의 수로 평가할 때, 40% 이하만큼 증식된다.
- [0641] 일부 구현예에서, 세포의 집단은 전술한 하나 이상의 사이토카인과 접촉되기 전의 세포의 집단과 비교하여, 예를 들어 살아있는 세포의 수로 평가할 때, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 20, 24, 36, 또는 48시간 이내에 증식된다.
- [0642] 일부 구현예에서, 세포의 집단은 CD3/TCR 복합체(예를 들어, 항-CD3 항체)를 자극하는 제제 및/또는 세포 표면

의 공동자극 분자를 자극하는 제제(예를 들어, 항-CD28 항체)와 시험관 내에서 접촉되지 않거나, 또는 접촉되는 경우 접촉 단계는 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 또는 5시간 미만이다.

[0643] 일부 구현예에서, 세포의 집단은 CD3/TCR 복합체(예를 들어, 항-CD3 항체)를 자극하는 제제 및/또는 세포 표면의 공동자극 분자를 자극하는 제제(예를 들어, 항-CD28 항체)와 시험관 내에서 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 또는 28시간 동안 접촉된다.

[0644] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 사이토카인 프로세스를 이용하여 제조된 세포의 집단은, 세포의 집단을 예를 들어, CD3/TCR 복합체에 결합하는 제제(예를 들어, 항-CD3 항체) 및/또는 세포 표면의 공동자극 분자에 결합하는 제제(예를 들어, 항-CD28 항체)와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 다른 유사한 방법에 의해 제조된 세포와 비교하여, CAR-발현 세포 중 나이브 세포의 더 높은(예를 들어, 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 또는 60% 더 높은) 백분율을 나타낸다.

[0645] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 사이토카인 프로세스는 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 또는 8% 이하의 혈청을 포함하는 세포 배지에서 수행된다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 사이토카인 프로세스는 LSD1 억제제, MALT1 억제제, 또는 이의 조합을 포함하는 세포 배지에서 수행된다.

[0646] *추가적 예시적인 제조 방법*

[0647] 일부 구현예에서, 세포, 예를 들어 T세포 또는 NK세포는 예를 들어 항-CD3/항-CD28 항체 코팅된 Dynabeads[®]를 사용하여 활성화되고, CAR(예를 들어, 하나 이상의 CAR)을 암호화하는 하나 이상의 핵산 분자와 접촉된 후, 시험관 내에서 예를 들어 7, 8, 9, 10, 또는 11일 동안 증식된다. 일부 구현예에서, 세포, 예를 들어 T세포 또는 NK세포는 예를 들어 양성 또는 음성 선택을 사용하여 신선한 또는 동결보존된 백혈구 성분채집 샘플로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 세포는 CAR(예를 들어, 하나 이상의 CAR)을 암호화하는 핵산 분자(예를 들어, 하나 이상의 핵산 분자)와 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포는 본원에 개시된 탠덤 또는 이중 CAR(예를 들어, CD19/CD22 탠덤 또는 이중 CAR)을 암호화하는 핵산 분자와 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포는 2종의 핵산 분자와 접촉된다(하나는 제1 CAR(예를 들어, 항-CD22 CAR)을 발현하고, 다른 하나는 제2 CAR(예를 들어, 항-CD19 CAR)을 발현함). 일부 구현예에서, 세포는 디아바디 CAR(예를 들어, 본원에 개시된 항-CD22/항-CD19 디아바디 CAR)을 암호화하는 핵산 분자와 접촉된다.

[0648] *세정*

[0649] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 방법은 원치 않는 세포, 예를 들어 단핵구 및 모세포를 제거하여 CAR 발현에 적합한 목적하는 면역 이펙터 세포의 강화를 개선시키는 세정 방법을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 세정 방법은 이전에 동결된 샘플, 예를 들어 해동된 샘플로부터의 CAR 발현에 적합한 목적하는 면역 이펙터 세포의 강화를 위해 최적화되어 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 세정 방법은 당업계에 알려진 세정 프로토콜로부터 수집된 세포의 제조와 비교하여 개선된 순도를 갖는 세포의 제조를 제공한다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 세정 방법은 특정 등장액(예를 들어, PBS)으로 희석함으로써 출발 샘플, 예를 들어 세포 샘플, 예를 들어 해동된 세포 샘플의 최적화된 점도를 사용하는 것과 세정 장치에 의해 수집된 각 분획에 대한 유속 및 수집 부피의 최적화된 조합을 사용하는 것을 포함한다. 본 발명에 적용될 수 있는 예시적인 세정 방법은 본원에 전문이 참조로 포함되는 WO 2017/117112호의 48~51 페이지에 기재되어 있다.

[0650] *밀도 구배 원심분리*

[0651] 임상 세포 치료제의 제조는 말초혈액 성분채집 출발물질에 존재하는 혈액 세포 및 혈액 요소의 복합적 혼합물로부터 벗어나 목적하는 세포, 예를 들어 면역 이펙터 세포를 처리하는 것을 필요로 한다. 말초혈액 유래 림프구 샘플은 Ficoll 용액을 통한 밀도 구배 원심분리를 사용하여 성공적으로 분리되었다. 그러나 Ficoll은 임상 용도에 적합하지 않기 때문에, Ficoll은 치료 용도로 세포를 분리하는 데 바람직한 시약이 아니다. 또한, Ficoll에는 세포에 독성 가능성이 있는 글리콜이 함유되어 있다. 또한, 동결보존 후 해동된 성분채집 산물의 Ficoll 밀도 구배 원심분리는, 예를 들어 본원의 실시예에 설명된 바와 같이, 최적이지 않은 T세포 산물을 생성한다. 예를 들어, Ficoll 용액을 통한 밀도 구배 원심분리에 의해 분리된 세포 제제에서 비-T세포, 특히 바람직하지 않은 B 세포, 모세포, 및 단핵구의 상대적인 증가와 함께 최종 산물에서의 T세포 소실이 관찰되었다.

[0652] 이론에 구애됨이 없이, 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T세포는 동결보존 중에 탈수되어 신선한 세포보다 밀도가 높아지는 것으로 여겨진다. 이론에 구애됨이 없이, 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T세포는 다른 혈액 세포보다 더 오래 높은 밀도를 유지하므로, 다른 세포와 비교하여 Ficoll 밀도 구배 분리 중에 더 용이하게 소실되는 것

으로 또한 여겨진다. 따라서, 이론에 구애됨이 없이, Ficoll보다 더 큰 밀도를 갖는 배지는 Ficoll 또는 Ficoll과 동일한 밀도(예를 들어, 1.077 g/ml)를 갖는 다른 배지와 비교하여, 목적하는 면역 이펙터 세포의 개선된 당리를 제공하는 것으로 여겨진다.

[0653] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 밀도 구배 원심분리 방법은 요오디사놀을 포함하는 밀도 구배 매질의 사용을 포함한다. 일부 구현예에서, 밀도 구배 배지는 물 중 약 60% 요오디사놀을 포함한다.

[0654] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 밀도 구배 원심분리 방법은 Ficoll보다 더 큰 밀도를 갖는 밀도 구배 매질의 사용을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 밀도 구배 원심분리 방법은 1.077 g/mL 초과, 예를 들어 1.077 g/mL 초과, 1.1 g/mL 초과, 1.15 g/mL 초과, 1.2 g/mL 초과, 1.25 g/mL 초과, 1.3 g/mL 초과, 1.31 g/mL 초과를 갖는 밀도 구배 배지의 사용을 포함한다. 일부 구현예에서, 밀도 구배 배지는 약 1.32 g/mL의 밀도를 갖는다.

[0655] 밀도 구배 원심분리의 추가 구현예는 본원에 전문이 참조로 포함되는 WO 2017/117112호의 51~53 페이지에 기재되어 있다.

[0656] 선택에 의한 강화

[0657] CAR 발현에 적합한 목적하는 면역 이펙터 세포의 강화를 개선하기 위한 특정 세포의 선택 방법이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 선택은 양성 선택, 예를 들어 목적하는 면역 이펙터 세포에 대한 선택을 포함한다. 일부 구현예에서, 선택은 음성 선택, 예를 들어 원치 않는 세포에 대한 선택, 예를 들어 원치 않는 세포의 제거를 포함한다. 구현예에서, 본원에 기재된 양성 또는 음성 선택 방법은 예를 들어, 관류(flow-through) 장치, 예를 들어 본원에 기재된 관류 장치를 사용하여 유동 조건에서 수행된다. 예시적인 양성 및 음성 선택은 본원에 전문이 참조로 포함되는 WO 2017/117112호의 53~57 페이지에 기재되어 있다. 선택 방법은 CAR 발현에 적합한 목적하는 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T세포의 세포 제제를 추가로 강화하기 위해, 예를 들어 세포 처리 시스템이라고도 하는 관류 장치를 사용하여 유동 조건에서 수행될 수 있다. 예시적인 관류 장치는 본원에 전문이 참조로 포함되는 WO 2017/117112호의 57~70 페이지에 기재되어 있다. 예시적인 세포 분리 및 비드제거 방법은 본원에 전문이 참조로 포함되는 WO 2017/117112호의 70~78 페이지에 기재되어 있다.

[0658] 선택 절차는 WO 2017/117112호의 57~70 페이지에 기재된 것에 한정되지 않는다. 컬럼 기술(CliniMACS[®] Plus 또는 CliniMACS[®] Prodigy[®])과 조합한 CD19, CD14, 및 CD26 Miltenyi 비드를 이용한 원치 않는 세포의 제거를 통한 음성 T세포 선택, 또는 CD4 및 CD8 Miltenyi 비드와 컬럼 기술(CliniMACS[®] Plus 또는 CliniMACS[®] Prodigy[®])의 조합을 이용한 양성 T세포 선택이 사용될 수 있다. 대안적으로, 방출 가능한 CD3 비드(GE Healthcare)를 이용한 무컬럼(column-free) 기술이 사용될 수 있다.

[0659] 또한, ThermoGenesis X 시리즈 장치와 같은 무비드(bead-free) 기술도 활용될 수 있다.

[0660] 본원에 개시된 세포 제조 방법은 당업계에 알려진 방법, 예를 들어 CN 108103105, CN 108085342, CN 108018312, CN 107287164, WO 18052947, WO 17123956, WO 17114497, WO 17103596, WO 17068421, WO 17023803, WO 17015427, WO 16196388, WO 16168595, WO 14186469, WO 17165245, WO 18106732, WO 17015490, WO 18075813, WO 18102761, WO 17127755, WO 17214333, WO 18059549, WO 17190100, WO 16180778, WO 18057823, 및/또는 CN 106957822에 기재된 방법을 포함하며, 각각의 전문은 본원에 참조로 포함된다.

[0661] 세포의 공급원

[0662] 증식 및 유전자 변형 또는 기타 변형 이전에, 세포, 예를 들어 T세포 또는 자연살해(NK) 세포의 공급원을 대상체로부터 얻을 수 있다. 용어 "대상체"는 면역 반응이 유도될 수 있는 살아있는 유기체(예를 들어, 포유동물)를 포함하는 것으로 의도된다. 대상체의 예는 인간, 원숭이, 침팬지, 개, 고양이, 마우스, 래트, 및 이의 유전자이식 종을 포함한다. T세포는 말초혈액 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직, 감염 부위의 조직, 복수, 흉막 삼출액, 비장 조직, 및 종양을 비롯한 여러 공급원으로부터 얻을 수 있다. 본 발명의 특정 양태에서, 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T세포는 Ficoll[™] 분리와 같은, 당업자에게 알려진 여러 기술을 사용하여 대상체로부터 수집된 혈액 단위로부터 얻을 수 있다. 바람직한 일 양태에서, 개체의 순환 혈액으로부터의 세포는 성분 채집에 의해 얻어진다. 성분채집 산물은 일반적으로 T세포, 단핵구, 과립구, B세포를 포함한 림프구, 다른 유핵 백혈구, 적혈구, 및 혈소판을 함유한다. 일 양태에서, 성분채집에 의해 수집된 세포를 세척하여 혈장 분획을 제거하고, 필요에 따라 후속 처리 단계를 위해 세포를 적절한 완충액 또는 배지에 넣을 수 있다. 본 발명의 일 양

태에서, 세포는 인산염 완충 식염수(PBS)로 세척된다. 대안적 양태에서, 세척액에는 칼슘이 없고, 마그네슘이 없을 수 있거나, 전부는 아니지만 많은 2가 양이온이 없을 수 있다. 칼슘 부재하의 초기 활성화 단계는 활성화를 확대할 수 있다. 당업자가 용이하게 이해할 수 있는 바와 같이, 세척 단계는 당업자에게 알려진 방법에 의해, 예컨대 반자동 "관류" 원심분리기(예를 들어, Cobe 2991 세포 처리기, Baxter CytoMate, 또는 Haemonetics Cell Saver 5)를 제조업체의 지침에 따라 사용함으로써 달성될 수 있다. 세척 후, 세포는 다양한 생체적합성 완충액, 예를 들어 Ca-무함유, Mg-무함유 PBS, PlasmaLyte A, 또는 완충액이 있거나 없는 기타 식염수에 재현탁될 수 있다. 대안적으로, 성분채집 샘플의 바람직하지 않은 성분을 제거하고, 세포를 배양 배지에 직접 재현탁시킬 수 있다.

[0663] 일 양태에서, 적혈구를 용해하고, 예를 들어 PERCOLL™ 구배를 통한 원심분리에 의해 또는 역류 원심분리 세정에 의해 단핵구를 고갈시켜 말초혈액 림프구로부터 T세포가 단리된다.

[0664] 본원에 기재된 방법은 예를 들어 본원에 기재된, 예를 들어 음성 선택 기술을 이용한, 예를 들어 T 조절 세포-고갈 집단, CD25+ 고갈 세포인 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T세포의 특정 하위집단의 선택을 포함할 수 있다. 바람직하게는, T 조절 고갈 세포의 집단은 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 CD25+ 세포를 함유한다.

[0665] 일 구현예에서, T 조절 세포, 예를 들어 CD25+ T세포는 항-CD25 항체 또는 이의 단편, 또는 CD25-결합 리간드, IL-2를 사용하여 집단으로부터 제거된다. 일 구현예에서, 항-CD25 항체, 또는 이의 단편, 또는 CD25-결합 리간드 또는 이의 단편은 본원에 기재된 바와 같은 기질에 접합된다.

[0666] 일 구현예에서, T 조절 세포, 예를 들어 CD25+ T세포는 Militenyi™의 CD25 고갈 시약을 사용해 집단으로부터 제거된다. 일 구현예에서, 세포 대 CD25 고갈 시약의 비는 1e7개 세포 대 20 uL, 또는 1e7개 세포 대 15 uL, 또는 1e7개 세포 대 10 uL, 또는 1e7개 세포 대 5 uL, 또는 1e7개 세포 대 2.5 uL, 또는 1e7개 세포 대 1.25 uL이다.

[0667] 일 구현예에서, 고갈될 면역 이펙터 세포의 집단은 약 6×10^9 개의 CD25+ T세포를 포함한다. 다른 양태에서, 고갈될 면역 이펙터 세포의 집단은 약 1×10^9 내지 1×10^{10} 개, 및 그 사이의 임의의 정수값의 CD25+ T세포를 포함한다. 일 구현예에서, 생성된 T 조절 고갈 세포 집단은 2×10^9 개 이하의 T 조절 세포, 예를 들어 CD25+ 세포(예를 들어, 1×10^9 , 5×10^8 , 1×10^8 , 5×10^7 , 1×10^7 개 이하의 CD25+ 세포)를 갖는다.

[0668] 일 구현예에서, T 조절 세포, 예를 들어 CD25+ 세포는 예를 들어 튜빙 162-01과 같은 고갈 튜빙 세트가 구비된 CliniMAC 시스템을 사용하여 집단으로부터 제거된다. 일 구현예에서, CliniMAC 시스템은 예를 들어 DEPLETION2.1과 같은 고갈 세팅에서 실행된다.

[0669] 본원에 기재된 방법은 둘 이상의 선택 단계, 예를 들어 둘 이상의 고갈 단계를 포함할 수 있다. 음성 선택에 의한 T세포 집단의 강화는 예를 들어 음성 선택된 세포에 고유한 표면 마커에 대한 항체의 조합을 이용하여 달성될 수 있다. 한 가지 방법은 음성 선택된 세포에 존재하는 세포 표면 마커에 대한 단클론 항체의 각테일을 사용하는 음성 자기 면역부착 또는 유세포 분석을 통한 세포 분류 및/또는 선택이다. 예를 들어 음성 선택에 의해 CD4+ 세포를 강화하기 위해, 단클론 항체 각테일은 CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR, 및 CD8에 대한 항체를 포함할 수 있다.

[0670] 또한, 체크포인트 억제제, 예를 들어 본원에 기재된 체크포인트 억제제를 발현하는 세포, 예를 들어 PD1+ 세포, LAG3+ 세포, 및 TIM3+ 세포 중 하나 이상을 집단으로부터 제거하여, T 조절 고갈, 예를 들어 CD25+ 고갈 세포 및 체크포인트 억제제 고갈 세포, 예를 들어 PD1+, LAG3+, 및/또는 TIM3+ 고갈 세포의 집단을 제공하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 예시적인 체크 포인트 억제제는 B7-H1, B&-1, CD160, P1H, 2B4, PD1, TIM3, CEACAM(예를 들어, CEACAM-1, CEACAM-3, 및/또는 CEACAM-5), LAG3, TIGIT, CTLA-4, BTLA, 및 LAIR1을 포함한다. 일 구현예에서, 체크포인트 억제제 발현 세포는 T 조절, 예를 들어 CD25+ 세포와 동시에 제거된다. 예를 들어, 항-CD25 항체 또는 이의 단편, 및 항-체크포인트 억제제 항체 또는 이의 단편은 세포를 제거하는 데 사용될 수 있는 동일한 비드에 부착될 수 있거나, 항-CD25 항체 또는 이의 단편, 및 항-체크포인트 억제제 항체 또는 이의 단편은 개별 비드에 부착될 수 있고, 이들의 혼합물이 세포를 제거하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, T 조절 세포, 예를 들어 CD25+ 세포의 제거와 체크포인트 억제제 발현 세포의 제거는 순차적이고, 예

를 들어 어느 순서로든 발생할 수 있다.

- [0671] 본원에 기재된 방법은 양성 선택 단계를 포함할 수 있다. 예를 들어, T세포는 목적하는 T세포의 양성 선택에 충분한 기간 동안 항-CD3/항-CD28(예를 들어, 3x28)-접합 비드, 예컨대 DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T와 함께 인큐베이션함으로써 단리될 수 있다. 일 양태에서, 기간은 약 30분이다. 추가의 양태에서, 기간은 30분 내지 36시간 이상 및 그 사이의 모든 정수값의 범위이다. 추가의 양태에서, 기간은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6시간이다. 또 다른 바람직한 양태에서, 기간은 10 내지 24시간이다. 일 양태에서, 인큐베이션 기간은 24시간이다. 다른 세포 유형에 비해 T세포가 거의 없는 임의의 상황에서, 예컨대 종양 조직 또는 면역손상 개체로부터 종양 침윤 림프구(TIL)를 단리하는 데 있어서, T세포를 분리하기 위해 더 긴 인큐베이션 시간이 사용될 수 있다. 또한, 더 긴 인큐베이션 시간을 사용하면 CD8+ T세포의 포획 효율을 증가시킬 수 있다. 따라서, T세포가 CD3/CD28 비드에 결합할 수 있는 시간을 단순히 단축하거나 연장하고/하거나, (본원에 추가로 기재된 바와 같이) T세포에 대한 비드의 비를 증가 또는 감소시킴으로써, T세포의 하위집단을 우선적으로 배양 개시 시점 또는 프로세스 중 다른 시점에 그에 대해 또는 그에 반해 선택할 수 있다. 추가로, 비드 또는 다른 표면 상의 항-CD3 및/또는 항-CD28 항체의 비를 증가 또는 감소시킴으로써, T세포의 하위집단을 우선적으로 배양 개시 시점 또는 다른 원하는 시점에 그에 대해 또는 그에 반해 선택할 수 있다.
- [0672] 일 구현예에서, IFN- γ , TNF α , IL-17A, IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, IL-10, IL-13, 그랜자임 B, 및 퍼포린, 또는 다른 적절한 분자, 예를 들어 다른 사이토카인 중 하나 이상을 발현하는 T세포 집단이 선택될 수 있다. 세포 발현에 대한 스크리닝 방법은 예를 들어 PCT 공개 WO 2013/126712호에 기재된 방법에 의해 결정될 수 있다.
- [0673] 양성 또는 음성 선택에 의한 목적하는 세포 집단의 단리에 있어서, 세포 농도 및 표면(예를 들어, 비드와 같은 입자)은 달라질 수 있다. 특정 양태에서, 세포와 비드의 최대 접촉을 보장하기 위해, 비드와 세포가 함께 혼합되는 부피를 유의하게 감소시키는(예를 들어, 세포의 농도를 증가시키는) 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어 일 양태에서, 약 100억개 세포/ml, 90억개/ml, 80억개/ml, 70억개/ml, 60억개/ml, 또는 50억개/ml의 농도가 사용된다. 일 양태에서, 10억개 세포/ml의 농도가 사용된다. 일 양태에서, 7500만, 8000만, 8500만, 9000만, 9500만, 또는 1억개 세포/ml의 세포 농도가 사용된다. 추가의 양태에서, 1억 2500만 또는 1억 5000만개 세포/ml의 농도가 사용될 수 있다.
- [0674] 높은 농도를 사용하면 세포 수율, 세포 활성화, 및 세포 증식을 증가시킬 수 있다. 또한, 높은 세포 농도를 사용하면, 많은 종양세포가 존재하는 샘플(예를 들어, 백혈병 혈액, 종양 조직 등)로부터, 또는 CD28-음성 T세포와 같이 관심 표적 항원을 약하게 발현할 수 있는 세포를 보다 효율적으로 포획할 수 있다. 이러한 세포 집단은 치료적 가치를 가질 수 있고, 수득하는 것이 바람직할 것이다. 예를 들어 높은 농도의 세포를 사용하면, 보통은 더 약한 CD28 발현을 갖는 CD8+ T세포를 보다 효율적으로 선택할 수 있다.
- [0675] 관련 양태에서, 더 낮은 농도의 세포를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. T세포와 표면(예를 들어, 비드와 같은 입자)의 혼합물을 상당히 희석함으로써, 입자와 세포 사이의 상호작용이 최소화된다. 이에 따라, 입자에 결합되는 다량의 목적 항원을 발현하는 세포가 선택된다. 예를 들어, CD4+ T세포는 희석 농도에서 더 높은 수준의 CD28을 발현하고 CD8+ T세포보다 더 효율적으로 포획된다. 일 양태에서, 사용되는 세포의 농도는 5×10^6 /ml이다. 다른 양태에서, 사용되는 농도는 약 1×10^5 개/ml 내지 1×10^6 개/ml, 및 그 사이의 임의의 정수값일 수 있다.
- [0676] 다른 양태에서, 세포는 2~-10°C 또는 실온에서 다양한 속도로 다양한 기간 동안 회전장치에서 인큐베이션될 수 있다.
- [0677] 자극을 위한 T세포는 세척 단계 후에 동결될 수도 있다. 이론에 구애됨이 없이, 동결 및 후속 해동 단계는 세포 집단에서 과립구 및 어느 정도까지의 단핵구를 제거함으로써 보다 균일한 생성물을 제공한다. 혈장 및 혈소판을 제거하는 세척 단계 후, 세포는 동결 용액에 현탁될 수 있다. 많은 동결 용액 및 파라미터가 당업계에 알려져 있고 이러한 맥락에서 유용할 것이지만, 한 가지 방법은 20%의 DMSO 및 8%의 인간 혈청 알부민을 함유하는 PBS, 또는 10%의 텍스트란 40 및 5%의 텍스트로스, 20%의 인간 혈청 알부민 및 7.5%의 DMSO, 또는 31.25%의 Plasmalyte-A, 31.25%의 텍스트로스 5%, 0.45%의 NaCl, 10%의 텍스트란 40 및 5%의 텍스트로스, 20%의 인간 혈청 알부민, 및 7.5%의 DMSO를 함유하는 배양 배지, 또는 예를 들어 Hespan 및 PlasmaLyte A를 함유하는 기타 적합한 세포 동결 배지를 사용하는 것을 수반하고, 이어서 세포는 분당 1°C의 속도로 -80°C까지 동결되고 액체 질소 저장 탱크의 증기상에 보관된다. -20°C 또는 액체 질소에서의 즉각적인 제어되지 않은 동결뿐만 아니라 다른 제어된 동결 방법이 사용될 수 있다.

- [0678] 특정 양태에서, 동결보존된 세포는 본원에 기재된 바와 같이 해동 및 세척되고, 실온에서 1시간 동안 정치된 후, 본 발명의 방법을 사용하여 활성화된다.
- [0679] 또한, 본 발명과 관련하여 본원에 기재된 바와 같은 증식 세포가 필요한 시기 이전에 대상체로부터 혈액 샘플 또는 성분채집 산물을 수집하는 것이 고려된다. 이와 같이, 증식될 세포의 공급원은 필요한 임의의 시점에 수집될 수 있으며, T세포와 같은 목적하는 세포는 면역 이펙터 세포 요법으로부터 이익을 얻을 수 있는 본원에 기재된 바와 같은 많은 질환 또는 병태에 대한 면역 이펙터 세포 요법에서의 차후 사용을 위해 단리되고 동결된다. 일 양태에서, 혈액 샘플 또는 성분채집은 대체로 건강한 대상체로부터 채취된다. 특정 양태에서, 혈액 샘플 또는 성분채집은 질환 발병 위험이 있지만 아직 질환이 발병하지 않은 대체로 건강한 대상체로부터 채취되며, 관심 세포는 차후 사용을 위해 단리되고 동결된다. 특정 양태에서, 세포는 증식, 동결되어, 차후 사용될 수 있다. 특정 양태에서, 샘플은 본원에 기재된 바와 같은 특정 질환의 진단 직후에, 그러나 임의의 치료 전에 환자로부 터 수집된다. 추가의 양태에서, 세포는 많은 관련 치료 방식(나탈리주맙, 에팔리주맙, 항바이러스제와 같은 제제, 화학요법, 방사선, 면역억제제, 예컨대 시클로스포린, 아자티오프린, 메토트렉세이트, 미코페놀레이트, 및 FK506, 항체, 또는 기타 면역억제제, 예컨대 CAMPATH, 항-CD3 항체, 시톡산, 플루다라빈, 시클로스포린, FK506, 라파마이신, 미코페놀산, 스테로이드, FR901228, 및 방사선조사를 이용한 치료를 포함하나 이에 한정되지 않음) 이전에 대상체의 혈액 샘플 또는 성분채집으로부터 단리된다.
- [0680] 본 발명의 추가 양태에서, T세포는 기능적 T세포를 사용한 대상체의 치료 직후에 환자로부 터 획득된다. 이와 관련하여, 특정 암치료, 특히 면역계를 손상시키는 약물을 사용한 치료 후, 환자가 치료로부터 정상적으로 회복되는 기간 중의 치료 직후에, 획득된 T세포의 품질이 생체의 증식 능력에 대해 최적이거나 개선될 수 있는 것으로 관찰되었다. 마찬가지로, 본원에 기재된 방법을 사용한 생체의 조작 후에, 이들 세포는 강화된 생착 및 생체내 증식을 위한 바람직한 상태로 존재할 수 있다. 따라서, 이러한 회복기 동안 T세포, 수지상 세포, 또는 조혈 계통의 다른 세포를 포함하는 혈액 세포를 수집하는 것이 본 발명의 맥락 내에서 고려된다. 또한, 특정 양태에서, 특히 요법 후의 규정된 시간 윈도우 중에, 특정 세포 유형의 재증식, 재순환, 재생, 및/또는 증식이 유리한 대상체 상태를 생성하기 위해 동원(예를 들어, GM-CSF를 사용한 동원) 및 킨디서닝 요법이 사용될 수 있다. 예시적인 세포 유형은 T세포, B세포, 수지상 세포, 및 면역계의 다른 세포를 포함한다.
- [0681] 일 구현예에서, CAR 분자, 예를 들어 본원에 기재된 CAR 분자를 발현하는 면역 이펙터 세포는 낮은, 면역 강화 용량의 mTOR 억제제를 투여받은 대상체로부터 획득된다. 일 구현예에서, CAR를 발현하도록 조작된 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T세포 또는 NK세포의 집단은, 예컨대 대상체 내의, 또는 대상체로부터 채취된, PD1 음성 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T세포 또는 NK세포의 수준, 또는 PD1 음성 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T세포/NK세포/PD1 양성 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T세포 또는 NK세포의 비가 적어도 일시적으로 증가된, 충분한 시간 후, 또는 낮은, 면역 강화 용량의 mTOR 억제제의 충분한 투약 후에 채취된다.
- [0682] 일부 구현예에서, CAR을 발현하도록 조작되었거나 조작될 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T세포 또는 NK세포의 집단은, PD1 음성 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T세포의 수를 증가시키거나, PD1 음성 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T세포/NK세포/PD1 양성 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T세포 또는 NK세포의 비를 증가시키는 양의 mTOR 억제제와 접촉시켜 생체의 처리될 수 있다.
- [0683] 일 구현예에서, T세포 집단은 디아글리세롤 키나제(DGK)가 결핍되어 있다. DGK-결핍 세포는 DGK RNA 또는 단백질을 발현하지 않는 세포, 또는 DGK 활성이 감소되거나 억제된 세포를 포함한다. DGK-결핍 세포는 유전적 접근법에 의해, 예를 들어 RNA 간섭제, 예를 들어 siRNA, shRNA, miRNA를 투여하여 DGK 발현을 감소 또는 예방함으로써 생성될 수 있다. 대안적으로, DGK-결핍 세포는 본원에 기재된 DGK 억제제를 이용한 처치에 의해 생성될 수 있다.
- [0684] 일 구현예에서, T세포 집단은 Ikaros가 결핍되어 있다. Ikaros-결핍 세포는 Ikaros RNA 또는 단백질을 발현하지 않는 세포, 또는 Ikaros 활성이 감소되거나 억제된 세포를 포함하며, Ikaros-결핍 세포는 유전적 접근법에 의해, 예를 들어 RNA 간섭제, 예를 들어 siRNA, shRNA, miRNA를 투여하여 Ikaros 발현을 감소 또는 예방함으로써 생성될 수 있다. 대안적으로, Ikaros-결핍 세포는 Ikaros 억제제, 예를 들어 레날리도미드를 이용한 처치에 의해 생성될 수 있다.
- [0685] 구현예에서, T세포 집단은 DGK-결핍 및 Ikaros-결핍 집단이며, 예를 들어 DGK 및 Ikaros를 발현하지 않거나, 감소되거나 억제된 DGK 및 Ikaros 활성을 갖는다. 이러한 DGK 및 Ikaros-결핍 세포는 본원에 기재된 임의의 방법에 의해 생성될 수 있다.

- [0686] 일 구현예에서, NK세포는 대상체로부터 수득된다. 다른 구현예에서, NK세포는 NK세포주, 예를 들어 NK-92 세포주(Conkwest)이다.
- [0687] 동종이계 CART
- [0688] 본원에 기재된 구현예에서, 면역 이펙터 세포는 동종이계 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T세포 또는 NK세포일 수 있다. 예를 들어 세포는 동종이계 T세포, 예를 들어 기능적 T세포 수용체(TCR) 및/또는 인간 백혈구 항원(HLA), 예를 들어 HLA 클래스 I 및/또는 HLA 클래스 II의 발현이 결여된 동종이계 T세포일 수 있다.
- [0689] 기능적 TCR이 결여된 T세포는, 예를 들어 표면에 어떠한 기능적 TCR도 발현하지 않도록 유전자 변형되거나, 기능적 TCR을 포함하는 하나 이상의 서브유닛을 발현하지 않도록 유전자 변형되거나, 표면에 기능적 TCR을 거의 생성하지 않도록 유전자 변형될 수 있다. 대안적으로, T세포는 예를 들어 TCR의 서브유닛 중 하나 이상의 돌연변이되거나 절단된 형태의 발현에 의해 실질적으로 손상된 TCR을 발현할 수 있다. "실질적으로 손상된 TCR"이라는 용어는 이러한 TCR이 숙주에서 유해한 면역 반응을 일으키지 않는다는 것을 의미한다. 이러한 세포는 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 유전자 편집 시스템의 사용을 통해 생성될 수 있다. 구현예에서, 유전자 편집 시스템은 TCR의 구성요소를 암호화하는 서열, 예를 들어 TCR 알파 불변 사슬 유전자(TRAC) 또는 이의 조절 요소의 서열을 표적화한다. 구현예에서, 유전자 편집 시스템은 TCR의 구성요소를 암호화하는 서열, 예를 들어 TCR 베타 불변 사슬 유전자(TRBC) 또는 이의 조절 요소의 서열을 표적화한다.
- [0690] 본원에 기재된 T세포는 예를 들어 표면에 기능적 HLA를 발현하지 않도록 조작될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 T세포는 세포 표면 발현 HLA, 예를 들어 HLA 클래스 I 및/또는 HLA 클래스 II가 하향조절되도록 조작될 수 있다. 이러한 세포는 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 유전자 편집 시스템의 사용을 통해 생성될 수 있다. 구현예에서, 유전자 편집 시스템은 하나 이상의 HLA 분자의 구성요소를 암호화하는 서열을 표적화한다. 구현예에서, 유전자 편집 시스템은 하나 이상의 HLA 분자의 발현에 영향을 미치는 인자를 암호화하는 서열을 표적화한다. 구현예에서, 유전자 편집 시스템은 MHC 클래스 I 발현의 조절제, 예를 들어 베타-2 마이크로글로불린(B2M)을 암호화하는 서열을 표적화한다. 구현예에서, 유전자 편집 시스템은 MHC 클래스 II 분자 발현의 조절제, 예를 들어 CIITA를 암호화하는 서열을 표적화한다. 구현예에서, 적어도 MHC 클래스 I 분자 및 적어도 하나의 MHC 클래스 II 분자 발현이 하향조절되도록, MHC 클래스 I 발현의 조절제(예를 들어, B2M) 및 MHC 클래스 II 분자 발현의 조절제(예를 들어, CIITA) 둘 모두를 표적화하는 유전자 편집 시스템이 세포 내로 도입된다.
- [0691] 일부 구현예에서, T세포는 기능적 TCR 및 기능적 HLA, 예를 들어 HLA 클래스 I 및/또는 HLA 클래스 II가 결여될 수 있다.
- [0692] 기능적 TCR 및/또는 HLA의 발현이 결여된 변형된 T세포는 TCR 또는 HLA의 하나 이상의 서브유닛의 녹아웃 또는 녹다운을 포함한 임의의 적합한 수단에 의해 수득될 수 있다. 예를 들어 T세포는 siRNA, shRNA, 클러스터링된 규칙적 간격의 짧은 회문식 반복부(CRISPR), 전사-활성자 유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN), 또는 징크 핑거 엔도뉴클레아제(ZFN)를 사용한 TCR 및/또는 HLA의 녹다운을 포함할 수 있다.
- [0693] 일부 구현예에서, 동종이계 세포는 예를 들어 본원에 기재된 임의의 방법에 의해 억제성 분자를 발현하지 않거나 낮은 수준으로 발현하는 세포일 수 있다. 예를 들어, 세포는 예를 들어 면역 이펙터 반응을 일으키는 CAR-발현 세포의 능력을 감소시킬 수 있는 억제성 분자를 발현하지 않거나 낮은 수준으로 발현하는 세포일 수 있다. 억제성 분자의 예는 PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM(예를 들어, CEACAM-1, CEACAM-3, 및/또는 CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, 및 TGF 베타를 포함한다. 예를 들어 DNA, RNA 또는 단백질 수준에서의 억제에 의한 억제성 분자의 억제는 CAR-발현 세포 성능을 최적화할 수 있다. 구현예에서, 억제성 핵산, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 억제성 핵산, 예를 들어 dsRNA, 예를 들어 siRNA 또는 shRNA, 클러스터링된 규칙적 간격의 짧은 회문식 반복부(CRISPR), 전사-활성자 유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN), 또는 징크 핑거 엔도뉴클레아제(ZFN)가 사용될 수 있다.
- [0694] 예를 들어 TCR 또는 HLA를 억제하는 siRNA 및 shRNA
- [0695] 일부 구현예에서, TCR 발현 및/또는 HLA 발현은 T세포에서 TCR 및/또는 HLA를 암호화하는 핵산을 표적화하는 siRNA 또는 shRNA를 사용하여 억제될 수 있다.
- [0696] T세포에서 siRNA 및 shRNA의 발현은 임의의 통상적인 발현 시스템, 예를 들어 렌티바이러스 발현 시스템을 사용하여 달성될 수 있다.
- [0697] TCR 구성요소의 발현을 하향조절하는 예시적인 shRNA는 예를 들어 미국 특허 공개 2012/0321667호에 기재되어

있다. HLA 클래스 I 및/또는 HLA 클래스 II 유전자의 발현을 하향조절하는 예시적인 siRNA 및 shRNA는 예를 들어 미국 특허 공개 US 2007/0036773호에 기재되어 있다.

- [0698] 예를 들어, TCR 또는 HLA를 억제하는 CRISPR
- [0699] 본원에서 사용되는 "CRISPR" 또는 "TCR 및/또는 HLA에 대한 CRISPR" 또는 "TCR 및/또는 HLA를 억제하는 CRISPR"은 클러스터링된 규칙적 간격의 짧은 회문식 반복부의 세트, 또는 이러한 반복부의 세트를 포함하는 시스템을 지칭한다. 본원에서 사용되는 "Cas"는 CRISPR-관련 단백질을 지칭한다. "CRISPR/Cas" 시스템은 TCR 및/또는 HLA 유전자를 침묵시키거나 돌연변이시키기 위해 사용될 수 있는 CRISPR 및 Cas로부터 유래된 시스템을 지칭한다.
- [0700] 자연발생적 CRISPR/Cas 시스템은 서열결정된 진정세균 계통의 약 40% 및 서열결정된 고세균의 90%에서 발견된다. Grissa *et al.* (2007) *BMC Bioinformatics* 8: 172. 이러한 시스템은 플라스미드 및 파지와 같은 외래 유전 요소에 대한 내성을 부여하고 후천성 면역 형태를 제공하는 원핵 면역 시스템 유형이다. Barrangou *et al.* (2007) *Science* 315: 1709-1712; Marragani *et al.* (2008) *Science* 322: 1843-1845.
- [0701] CRISPR/Cas 시스템은 마우스 또는 영장류와 같은 진핵생물에서의 유전자 편집(특정 유전자의 침묵화, 강화, 또는 변경)에 사용하기 위해 변형된 바 있다. Wiedenheft *et al.* (2012) *Nature* 482: 331-8. 이는 특별히 설계된 CRISPR 및 하나 이상의 적절한 Cas를 포함하는 플라스미드를 진핵 세포 내로 도입함으로써 달성된다.
- [0702] 때때로 CRISPR 유전자좌로 불리는 CRISPR 서열은 교번 반복부 및 스페이서를 포함한다. 자연발생적 CRISPR에서 스페이서는 통상적으로 플라스미드 또는 파지 서열과 같은 박테리아에 이질적인 서열을 포함하고, TCR 및/또는 HLA CRISPR/Cas 시스템에서 스페이서는 TCR 또는 HLA 유전자 서열로부터 유래된다.
- [0703] CRISPR 유전자좌로부터의 RNA는 항시적으로 발현되고 Cas 단백질에 의해 작은 RNA로 프로세싱된다. 이들은 반복 서열에 의해 플랭킹된 스페이서를 포함한다. RNA는 RNA 또는 DNA 수준에서 외인성 유전 요소를 침묵시키도록 다른 Cas 단백질을 가이드한다. Horvath *et al.* (2010) *Science* 327: 167-170; Makarova *et al.* (2006) *Biology Direct* 1: 7. 따라서, 스페이서는 siRNA와 유사하게 RNA 분자의 주형 역할을 한다. Pennisi (2013) *Science* 341: 833-836.
- [0704] 이들은 여러 다른 유형의 박테리아에서 자연적으로 발생하기 때문에, CRISPR의 정확한 배열 및 Cas 유전자와 그 생성물의 구조, 기능, 및 수는 종에 따라 다소 상이하다. Haft *et al.* (2005) *PLoS Comput. Biol.* 1: e60; Kunin *et al.* (2007) *Genome Biol.* 8: R61; Mojica *et al.* (2005) *J. Mol. Evol.* 60: 174-182; Bolotin *et al.* (2005) *Microbiol.* 151: 2551-2561; Pourcel *et al.* (2005) *Microbiol.* 151: 653-663; 및 Stern *et al.* (2010) *Trends. Genet.* 28: 335-340. 예를 들어 Cse(Cas 하위유형, E. 콜라이) 단백질(예를 들어, CasA)은 기능적 복합체인 Cascade를 형성하며, 이는 CRISPR RNA 전사체를 Cascade가 보유하는 스페이서-반복부 단위로 프로세싱한다. Brouns *et al.* (2008) *Science* 321: 960-964. 다른 원핵생물에서, Cas6은 CRISPR 전사체를 프로세싱한다. E. 콜라이에서의 CRISPR 기반 파지 불활성화는 Cascade 및 Cas3을 필요로 하지만, Cas1 또는 Cas2는 필요로 하지 않는다. 피로코쿠스 푸리오수스(*Pyrococcus furiosus*) 및 다른 원핵생물에서 Cmr(Cas RAMP 모듈) 단백질은 상보성 표적 RNA를 인식하고 절단하는 작은 CRISPR RNA와 기능적 복합체를 형성한다. 보다 단순한 CRISPR 시스템은 이중 나선의 각각의 가닥에 대해 1개씩, 2개의 활성 절단 부위를 갖는 뉴클레아제인 단백질 Cas9에 의존한다. Cas9 및 변형된 CRISPR 유전자좌 RNA의 조합이 유전자 편집을 위한 시스템에서 사용될 수 있다. Pennisi (2013) *Science* 341: 833-836.
- [0705] 따라서, CRISPR/Cas 시스템은 TCR 및/또는 HLA 유전자의 편집(하나 이상의 염기쌍의 부가 또는 결실), 또는 표적 유전자 또는 염색체 서열, 예컨대 TCR 및/또는 HLA의 발현을 감소시키는 사전성숙 중단의 도입을 위해 사용될 수 있다. CRISPR/Cas 시스템은 대안적으로 RNA 간섭처럼 사용되어, TCR 및/또는 HLA 유전자를 가역적인 방식으로 턴오프할 수 있다. 포유동물 세포에서, 예를 들어 RNA는 Cas 단백질, 예를 들어 뉴클레아제 활성이 결여된 Cas 단백질(예를 들어, dCas9)을 TCR 및/또는 HLA 프로모터로 가이드하여, RNA 중합효소를 입체적으로 차단할 수 있다.
- [0706] 당업계에 알려진, 예를 들어 미국 공개 20140068797호에 기재된 기술을 사용하여, 예를 들어 TCR 및/또는 HLA를 억제하는 인공 CRISPR/Cas 시스템이 생성될 수 있다. 본원에 기재된 본 발명에 유용할 수 있는 CRISPR 시스템은 예를 들어 본원에 전문이 참조로 포함되는 PCT 출원 공개 WO2017/093969호에 기재된 것들을 포함한다.
- [0707] 예를 들어 TCR 및/또는 HLA를 억제하는 TALEN

- [0708] "TALEN" 또는 "HLA 및/또는 TCR에 대한 TALEN" 또는 "HLA 및/또는 TCR을 억제하는 TALEN"은 HLA 및/또는 TCR 유전자를 편집하기 위해 사용될 수 있는 인공 뉴클레아제인 전사 활성화자-유사 이펙터 뉴클레아제를 지칭한다.
- [0709] TALEN은 TAL 이펙터 DNA 결합 도메인을 DNA 절단 도메인에 융합함으로써 인공적으로 생성된다. 전사 활성화자-유사 이펙터(TALE)는 HLA 또는 TCR 유전자의 부분을 포함하는 임의의 목적하는 DNA 서열에 결합하도록 조작될 수 있다. 조작된 TALE를 DNA 절단 도메인과 조합함으로써, HLA 또는 TCR 서열을 포함하는 임의의 목적하는 DNA 서열에 특이적인 제한 효소가 생성될 수 있다. 이어서, 이들은 세포 내로 도입되어 게놈 편집에 사용될 수 있다. Boch (2011) *Nature Biotech.* 29: 135-6; 및 Boch et al. (2009) *Science* 326: 1509-12; Moscou et al. (2009) *Science* 326: 3501.
- [0710] TALE는 잔토모나스(*Xanthomonas*) 박테리아에 의해 분비되는 단백질이다. DNA 결합 도메인은 제12 및 제13 아미노산을 제외하고, 반복적인 고도로 보존된 33-34개 아미노산 서열을 포함한다. 이들 2개의 위치는 매우 가변적으로, 특정 뉴클레오티드 인식과의 강한 상관관계를 보여준다. 따라서, 이들은 목적하는 DNA 서열에 결합하도록 조작될 수 있다.
- [0711] TALEN을 생성하기 위해, TALE 단백질은 야생형 또는 돌연변이 FokI 엔도뉴클레아제인 뉴클레아제(N)에 융합된다. TALEN에서의 사용을 위해 FokI에 대한 여러 돌연변이가 만들어졌으며, 이들은 예를 들어 절단 특이성 또는 활성을 개선한다. Cermak et al. (2011) *Nucl. Acids Res.* 39: e82; Miller et al. (2011) *Nature Biotech.* 29: 143-8; Hockemeyer et al. (2011) *Nature Biotech.* 29: 731-734; Wood et al. (2011) *Science* 333: 307; Doyon et al. (2010) *Nature Methods* 8: 74-79; Szczepek et al. (2007) *Nature Biotech.* 25: 786-793; 및 Guo et al. (2010) *J. Mol. Biol.* 200: 96.
- [0712] FokI 도메인은 이량체로서 기능하며, 적절한 배향 및 간격으로 표적 게놈 내 부위에 대해 고유한 DNA 결합 도메인을 갖는 2개의 구성체를 필요로 한다. TALE DNA 결합 도메인과 FokI 절단 도메인 사이의 아미노산 잔기의 수와 2개의 개별 TALEN 결합 부위 사이의 염기의 수는 둘 다 높은 수준의 활성을 달성하기 위한 중요한 파라미터인 것으로 보인다. Miller et al. (2011) *Nature Biotech.* 29: 143-8.
- [0713] 이중가닥 절단(DSB)을 생성하기 위해 세포 내에서 HLA 또는 TCR TALEN이 사용될 수 있다. 복구 메커니즘이 비상동 말단 연결을 통해 절단을 부적절하게 복구하는 경우, 절단 부위에 돌연변이가 도입될 수 있다. 예를 들어, 부적절한 복구는 프레임 이동 돌연변이를 도입할 수 있다. 대안적으로, TALEN과 함께 외래 DNA가 세포 내로 도입될 수 있으며, 외래 DNA의 서열 및 염색체 서열에 따라, 이러한 프로세스는 HLA 또는 TCR 유전자 내의 결함을 교정하는 데 사용되거나, 이러한 결함을 wt HLA 또는 TCR 유전자 내에 도입하여 HLA 또는 TCR의 발현을 감소시키는 데 사용될 수 있다.
- [0714] HLA 또는 TCR 내의 서열에 특이적인 TALEN은 모듈 구성요소를 사용하는 다양한 방식을 비롯하여 당업계에 알려진 임의의 방법을 사용하여 구성될 수 있다. Zhang et al. (2011) *Nature Biotech.* 29: 149-53; Geibler et al. (2011) *PLoS ONE* 6: e19509.
- [0715] 예를 들어 HLA 및/또는 TCR을 억제하는 징크 핑거 뉴클레아제
- [0716] "ZFN" 또는 "징크 핑거 뉴클레아제" 또는 "HLA 및/또는 TCR에 대한 ZFN" 또는 "HLA 및/또는 TCR을 억제하는 ZFN"은 HLA 및/또는 TCR 유전자를 편집하기 위해 사용될 수 있는 인공 뉴클레아제인 징크 핑거 뉴클레아제를 지칭한다.
- [0717] 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. Carroll et al. (2011) *Genetics Society of America* 188: 773-782; 및 Kim et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 1156-1160.
- [0718] 징크 핑거는 하나 이상의 아연 이온에 의해 안정화된 작은 단백질 구조 모티프이다. 징크 핑거는 예를 들어 Cys2His2를 포함할 수 있고, 약 3-bp 서열을 인식할 수 있다. 특이성이 알려진 다양한 징크 핑거를 조합하여 약 6, 9, 12, 15, 또는 18-bp 서열을 인식하는 다중-핑거 폴리펩티드를 생성할 수 있다. 파지 디스플레이, 효모 1-하이브리드 시스템, 박테리아 1-하이브리드 및 2-하이브리드 시스템, 및 포유동물 세포를 비롯하여, 특정 서열을 인식하는 징크 핑거(및 이의 조합)를 생성하기 위한 다양한 선택 및 모듈 어셈블리 기술이 이용 가능하다.
- [0719] TALEN과 마찬가지로, ZFN은 DNA를 절단하기 위해 이량체화되어야 한다. 따라서, 한 쌍의 ZFN이 비회문식 DNA 부위를 표적화하는 데 필요하다. 2개의 개별 ZFN은 DNA의 대향하는 가닥에 결합해야 하고, 이때 이들의 뉴클레아제는 적절하게 이격된다. Bitinaite et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 10570-5.

- [0720] 또한 TALEN과 마찬가지로, ZFN은 DNA에 이중가닥 절단을 생성할 수 있고, 이는 부적절하게 복구되는 경우 프레임-시프트 돌연변이를 생성하여 세포 내 HLA 및/또는 TCR의 발현 및 양의 감소로 이어질 수 있다. ZFN은 또한 상동 재조합과 함께 사용되어 HLA 또는 TCR 유전자에서 돌연변이를 일으킬 수 있다.
- [0721] HLA 및/또는 TCR 내의 서열에 특이적인 ZFN은 당업계에 알려진 임의의 방법을 사용하여 구성될 수 있다. Cathomen et al. (2008) *Mol. Ther.* 16: 1200-7; 및 Guo et al. (2010) *J. Mol. Biol.* 400: 96.
- [0722] 면역 이펙터 세포(예를 들어, T세포)의 활성화 및 증식
- [0723] T세포와 같은 면역 이펙터 세포는 일반적으로 예를 들어 미국 특허 6,352,694호; 6,534,055호; 6,905,680호; 6,692,964호; 5,858,358호; 6,887,466호; 6,905,681호; 7,144,575호; 7,067,318호; 7,172,869호; 7,232,566호; 7,175,843호; 5,883,223호; 6,905,874호; 6,797,514호; 6,867,041호; 및 미국 특허 출원 공개 20060121005호에 기재된 바와 같은 방법을 사용하여 활성화되고 증식될 수 있다.
- [0724] 일반적으로, 본 발명의 면역 이펙터 세포 집단은 CD3/TCR 복합체 관련 신호를 자극하는 제제 및 T세포 표면의 공동자극 분자를 자극하는 리간드가 부착된 표면과의 접촉에 의해 증식될 수 있다. 특히, T세포 집단은 본원에 기재된 바와 같이, 예컨대 표면에 고정된 항-CD3 항체 또는 이의 항원결합 단편, 또는 항-CD2 항체와의 접촉에 의해, 또는 칼슘 이오노포어와 함께 단백질 키나제 C 활성화제(예를 들어, 브리오스타틴)와의 접촉에 의해 자극될 수 있다. T세포 표면의 보조 분자의 공동자극의 경우, 보조 분자에 결합하는 리간드가 사용된다. 예를 들어, T세포 집단은 T세포의 증식을 자극하기에 적절한 조건에서 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체와 접촉될 수 있다. CD4+ T세포 또는 CD8+ T세포의 증식을 자극하기 위해, 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체. 항-CD28 항체의 예는 9.3, B-T3, XR-CD28(Diaclone, 프랑스 브장송)을 포함하며, 당업계에 일반적으로 알려진 다른 방법과 같이 사용될 수 있다(Berg et al., *Transplant Proc.* 30(8):3975-3977, 1998; Haanen et al., *J. Exp. Med.* 190(9):13191328, 1999; Garland et al., *J. Immunol Meth.* 227(1-2):53-63, 1999).
- [0725] 특정 양태에서, T세포에 대한 일차 자극 신호 및 공동자극 신호는 상이한 프로토콜에 의해 제공될 수 있다. 예를 들어, 각각의 신호를 제공하는 제제는 용액 중에 존재하거나 표면에 커플링될 수 있다. 표면에 커플링되는 경우, 제제는 동일한 표면에 커플링되거나(즉, "시스" 형성) 개별 표면에 커플링될 수 있다(즉, "트랜스" 형성). 대안적으로, 한 제제는 표면에 커플링되고 다른 제제는 용액 중에 존재할 수 있다. 일 양태에서, 공동자극 신호를 제공하는 제제는 세포 표면에 결합되고, 일차 활성화 신호를 제공하는 제제는 용액 중에 존재하거나 표면에 커플링된다. 특정 양태에서, 두 제제 모두 용액 중에 존재할 수 있다. 일 양태에서, 제제는 가용성 형태로 존재하며, 이어서, Fc 수용체 또는 항체 또는 제제에 결합할 다른 결합체를 발현하는 세포와 같은 표면에 가교될 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명에서 T세포를 활성화하고 증식시키는 데 사용하기 위해 고려되는 인공 항원 제시 세포(aAPC)에 대해서는, 예를 들어 미국 특허 출원 공개 20040101519호 및 20060034810호를 참조한다.
- [0726] 일 양태에서, 두 제제는 동일한 비드 상에(즉 "시스") 고정되거나 개별 비드에(즉 "트랜스") 고정된다. 예로서, 일차 활성화 신호를 제공하는 제제는 항-CD3 항체 또는 이의 항원결합 단편이고, 공동자극 신호를 제공하는 제제는 항-CD28 항체 또는 이의 항원결합 단편이며, 두 제제 모두 동등한 분자의 양으로 동일한 비드에 공동 고정된다. 일 양태에서, CD4+ T세포 증식 및 T세포 성장을 위해 비드에 결합된 1:1 비의 각각의 항체가 사용된다. 본 발명의 특정 양태에서, 비드에 결합된 항 CD3:CD28 항체의 비는 1:1의 비를 사용하여 관찰된 증식과 비교하여 T세포 증식의 증가가 관찰되도록 사용된다. 하나의 특정 양태에서, 1:1의 비를 사용하여 관찰된 증식과 비교하여 약 1 내지 약 3배의 증가가 관찰된다. 일 양태에서, 비드에 결합된 CD3:CD28 항체의 비는 100:1 내지 1:100 및 그 사이의 모든 정수값의 범위이다. 본 발명의 일 양태에서, 항-CD3 항체보다 더 많은 항-CD28 항체가 입자에 결합한다(즉, CD3:CD28의 비는 1 미만이다). 본 발명의 특정 양태에서, 비드에 결합된 항 CD28 항체 대 항 CD3 항체의 비는 2:1보다 크다. 하나의 특정 양태에서, 비드에 결합된 1:100의 CD3:CD28 비의 항체가 사용된다. 일 양태에서, 비드에 결합된 1:75의 CD3:CD28 비의 항체가 사용된다. 추가의 양태에서, 비드에 결합된 1:50의 CD3:CD28 비의 항체가 사용된다. 일 양태에서, 비드에 결합된 1:30의 CD3:CD28 비의 항체가 사용된다. 바람직한 일 양태에서, 비드에 결합된 1:10의 CD3:CD28 비의 항체가 사용된다. 일 양태에서, 비드에 결합된 1:3의 CD3:CD28 비의 항체가 사용된다. 또 하나의 양태에서, 비드에 결합된 3:1의 CD3:CD28 비의 항체가 사용된다.
- [0727] T세포 또는 다른 표적 세포를 자극하기 위해 1:500 내지 500:1 및 그 사이의 임의의 정수값의 입자 대 세포 비가 사용될 수 있다. 당업자가 용이하게 이해할 수 있는 바와 같이, 입자 대 세포의 비는 표적 세포에 대한 입자 크기에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 작은 크기의 비드는 적은 수의 세포에만 결합할 수 있지만, 보다 큰 비드는 많은 세포에 결합할 수 있다. 특정 양태에서, 세포 대 입자의 비는 1:100 내지 100:1 및 그 사이의 임의의 정수값의 범위이고, 추가의 양태에서 1:9 내지 9:1 및 그 사이의 임의의 정수 값을 포함하는 비가 또한 T세포

포를 자극하는 데 사용될 수 있다. T세포 자극을 유발하는 항-CD3 및 항-CD28-커플링된 입자 대 T세포의 비는 상기 언급된 바와 같이 다양할 수 있지만, 바람직한 특정 값은 1:100, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 및 15:1을 포함하고, 하나의 바람직한 비는 적어도 1:1의 입자/T세포이다. 일 양태에서, 1:1 이하의 입자 대 세포의 비가 사용된다. 하나의 특정 양태에서, 바람직한 입자:세포의 비는 1:5이다. 추가의 양태에서, 입자 대 세포의 비는 자극 일에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어 일 양태에서, 입자 대 세포의 비는 1일째에 1:1 내지 10:1이고, 이후 최대 10일 동안 매일 또는 격일로 추가의 입자가 1:1 내지 1:10의 최종 비(첨가 일의 세포 수 기준)로 세포에 첨가된다. 하나의 특정 양태에서, 입자 대 세포의 비는 자극 1일째에 1:1이고, 자극 3일째 및 5일째에 1:5로 조정된다. 일 양태에서, 입자는 매일 또는 격일로 자극 1일째에 1:1, 3일째 및 5일째에 1:5의 최종 비로 첨가된다. 일 양태에서, 입자 대 세포의 비는 자극 1일째에 2:1이고, 자극 3일째 및 5일째에 1:10으로 조정된다. 일 양태에서, 입자는 매일 또는 격일로 자극 1일째에 1:1, 3일째 및 10일째에 1:5의 최종 비로 첨가된다. 당업자는 다양한 다른 비가 본 발명에 사용하기에 적합할 수 있음을 이해할 것이다. 특히, 비는 입자의 크기 및 세포의 크기 및 유형에 따라 달라질 것이다. 일 양태에서, 사용하기에 가장 일반적인 비는 1일째에 대략 1:1, 2:1, 및 3:1이다.

[0728] 본 발명의 추가 양태에서, T세포와 같은 세포는 제제-코팅된 비드와 결합되고, 이후에 비드와 세포가 분리된 후, 세포가 배양된다. 대안적인 양태에서, 배양 전에, 제제-코팅된 비드와 세포는 분리되지 않고 함께 배양된다. 추가의 양태에서, 자기력과 같은 물리력을 적용하여 비드와 세포를 먼저 농축하여 세포 표면 마커의 라이게이션을 증가시켜 세포 자극을 유도한다.

[0729] 예를 들어, 세포 표면 단백질은 항-CD3 및 항-CD28이 부착되는 상자성 비드(3x28 비드)가 T세포와 접촉하도록 함으로써 라이게이션될 수 있다. 일 양태에서, 세포(예를 들어, 10^4 내지 10^9 개 T세포)와 비드(예를 들어, 1:1 비의 DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T 상자성 비드)는 완충액, 예를 들어 PBS(칼슘 및 마그네슘과 같은 2가 양이온 미함유)에서 결합된다. 또한, 당업자는 임의의 세포 농도가 사용될 수 있음을 쉽게 이해할 수 있다. 예를 들어, 표적 세포는 샘플에 매우 드물 수 있고 단지 샘플의 0.01%만을 이루거나, 또는 전체 샘플(즉, 100%)이 관심 표적 세포를 포함할 수 있다. 따라서, 임의의 세포 수가 본 발명의 맥락 내에 있다. 특정 양태에서, 세포와 입자의 최대 접촉을 보장하기 위해, 입자와 세포가 함께 혼합되는 부피를 유의하게 감소시키는(즉, 세포의 농도를 증가시키는) 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어 일 양태에서, 약 100억개 세포/ml, 90억개/ml, 80억개/ml, 70억개/ml, 60억개/ml, 또는 50억개/ml의 농도가 사용된다. 일 양태에서, 1억개 세포/ml 초과 농도가 사용된다. 추가의 양태에서, 1000만, 1500만, 2000만, 2500만, 3000만, 3500만, 4000만, 4500만, 또는 5000만개 세포/ml의 세포 농도가 사용된다. 또 하나의 양태에서, 7500만, 8000만, 8500만, 9000만, 9500만, 또는 1억 개 세포/ml의 세포 농도가 사용된다. 추가의 양태에서, 1억 2500만 또는 1억 5000만개 세포/ml의 농도가 사용될 수 있다. 높은 농도를 사용하면 세포 수율, 세포 활성화, 및 세포 증식을 증가시킬 수 있다. 또한, 높은 세포 농도를 사용하면 관심 표적 항원을 약하게 발현할 수 있는 세포, 예컨대 CD28-음성 T세포를 보다 효율적으로 포획할 수 있다. 이러한 세포 집단은 치료적 가치를 가질 수 있고, 특정 측면에서 수득하는 것이 바람직할 것이다. 예를 들어 높은 농도의 세포를 사용하면, 보통은 더 약한 CD28 발현을 갖는 CD8+ T세포를 보다 효율적으로 선택할 수 있다.

[0730] 일 구현예에서, CAR(예를 들어, 본원에 기재된 CAR)을 암호화하는 핵산이 형질도입된 세포가 예를 들어 본원에 기재된 방법에 의해 증식된다. 일 구현예에서, 세포는 수 시간(예를 들어, 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 18, 21시간) 내지 약 14일(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14일)의 기간 동안 배양 중에 증식된다. 일 구현예에서, 세포는 4 내지 9일의 기간 동안 증식된다. 일 구현예에서, 세포는 8일 이하, 예를 들어 7, 6, 또는 5일의 기간 동안 증식된다. 일 구현예에서, 세포, 예를 들어 본원에 기재된 이중 CAR 또는 탠덤 CAR을 포함하는, 예를 들어 발현하는 세포는 5일 동안 배양 중에 증식되고, 생성된 세포는 동일한 배양 조건에서 9일 동안 배양 중에 증식된 동일한 세포보다 더 강력하다. 효능은 예를 들어 다양한 T세포 기능, 예를 들어 증식, 표적 세포 사멸, 사이토카인 생성, 활성화, 이동, 또는 이의 조합에 의해 규정될 수 있다. 일 구현예에서, 5일 동안 증식된 세포, 예를 들어 본원에 기재된 CD19 CAR 세포는 동일한 배양 조건에서 9일 동안 배양 중에 증식된 동일한 세포와 비교하여 항원 자극시 세포 배가의 적어도 1, 2, 3, 또는 4배 증가를 보인다. 일 구현예에서, 세포, 예를 들어 본원에 기재된 이중 CAR 또는 탠덤 CAR을 포함하는, 예를 들어 발현하는 세포는 5일 동안 배양 중에 증식되고, 생성된 세포는 동일한 배양 조건에서 9일 동안 배양 중에 증식된 동일한 세포와 비교하여 더 높은 염증촉진 사이토카인 생성, 예를 들어 IFN- γ 및/또는 GM-CSF 수준을 나타낸다. 일 구현예에서, 5일 동안 증식된 세포, 예를 들어 본원에 기재된 이중 CAR 또는 탠덤 CAR을 포함하는, 예를 들어 발

현하는 세포는 동일한 배양 조건에서 9일 동안 배양 중에 증식된 동일한 세포와 비교하여 염증촉진 사이토카인 생성(pg/ml), 예를 들어 IFN- γ 및/또는 GM-CSF 수준의 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10배 이상의 증가를 보인다.

- [0731] 본 발명의 일 양태에서, 혼합물은 수 시간(약 3시간) 내지 약 14일 또는 그 사이의 임의의 시간상 정수값 동안 배양될 수 있다. 일 양태에서, 혼합물은 21일 동안 배양될 수 있다. 본 발명의 일 양태에서, 비드와 T세포는 약 8일 동안 함께 배양된다. 일 양태에서, 비드와 T세포는 2~3일 동안 함께 배양된다. 또한, T세포의 배양 시간이 60일 이상이 될 수 있도록 여러 사이클의 자극이 요구될 수 있다. T세포 배양에 적절한 조건은 혈청(예를 들어, 우태아 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 알려진 세포의 성장을 위한 임의의 다른 첨가제를 비롯하여, 증식 및 생존에 필요한 인자를 포함할 수 있는 적절한 배지(예를 들어, Minimal Essential Media 또는 RPMI Media 1640 또는 X-vivo 15, (Lonza))를 포함한다. 세포의 성장을 위한 다른 첨가제는 계면활성제, 플라스마네이트, 및 환원제, 예컨대 N-아세틸-시스테인 및 2-머캅토에탄올을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 배지는 아미노산, 피루브산나트륨, 및 비타민이 첨가된, 무혈청이거나 또는 적절한 양의 혈청(또는 혈장) 또는 규정된 세트의 호르몬, 및/또는 T세포의 성장 및 증식에 충분한 양의 사이토카인(들)이 보충된 RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-vivo 15, 및 X-vivo 20, Optimizer를 포함할 수 있다. 항생제(예를 들어, 페니실린 및 스트렙토마이신)는 실험 배양에만 포함되고, 대상체에 주입되어야 하는 세포의 배양물에는 포함되지 않는다. 표적 세포는 성장을 지지하는 데 필요한 조건, 예를 들어 적절한 온도(예를 들어, 37°C) 및 분위기(예를 들어, 공기 + 5% CO₂) 하에 유지된다.
- [0732] 일 구현예에서, 세포는, 예를 들어 유세포 분석과 같은 본원에 기재된 방법에 의해 측정시 14일의 증식 기간에 걸쳐 적어도 200배(예를 들어, 200배, 250배, 300배, 350배) 세포를 증가시키는 1종 이상의 인터류킨을 포함하는 적절한 배지(예를 들어, 본원에 기재된 배지)에서 증식된다. 일 구현예에서, 세포는 IL-15 및/또는 IL-7(예를 들어, IL-15 및 IL-7)의 존재하에 증식된다.
- [0733] 상이한 자극 횟수에 노출된 T세포는 상이한 특징을 나타낼 수 있다. 예를 들어, 전형적인 혈액 또는 성분채집을 거친 말초혈액 단핵 세포 산물은 세포독성 또는 억제인자 T세포 집단(TC, CD8+)보다 더 큰 헬퍼 T세포 집단(TH, CD4+)을 갖는다. CD3 및 CD28 수용체를 자극하는 것에 의한 T세포의 생체의 증식은 약 8~9일째 이전에는 주로 TH 세포로 이루어진 T세포 집단을 생성하는 반면, 약 8~9일째 이후 T세포 집단은 점점 더 큰 TC 세포 집단을 포함한다. 따라서, 치료의 목적에 따라, 대상체에게 주로 TH 세포를 포함하는 T세포 집단을 주입하는 것이 유리할 수 있다. 이와 유사하게, TC 세포의 항원-특이적 하위세트가 단리된 경우, 이 하위세트를 더 큰 정도로 증식시키는 것이 유리할 수 있다.
- [0734] 또한, CD4 및 CD8 마커 외에도, 다른 표현형 마커는 크게 다르지만, 대부분 세포 증식 과정 중에 재현 가능하다. 따라서, 이러한 재현성은 활성화된 T세포 산물을 특정 목적에 맞게 조정할 수 있는 능력을 가능하게 한다.
- [0735] CAR(예를 들어, 이중 CD CAR 또는 탠덤 CAR)이 구성되면, 항원 자극 후 T세포를 증식시키는 능력, 재자극 없이 T세포 증식을 지속시키는 능력, 및 적절한 시험관내 및 동물 모델에서의 항암 활성과 같은(이에 한정되지 않음) 분자의 활성을 평가하기 위해 다양한 분석이 사용될 수 있다. CAR, 예를 들어 이중 CAR 또는 탠덤 CAR의 효과를 평가하기 위한 분석은 아래에 더 자세히 설명되어 있다.
- [0736] 일차 T세포에서의 CAR 발현의 웨스턴 블롯 분석을 사용하여 단량체 및 이량체의 존재를 검출할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Milone *et al.*, Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)] 참조. 아주 간략하게 요약하면, CAR을 발현하는 T세포(CD4⁺ 및 CD8⁺ T세포의 1:1 혼합물)를 10일 넘게 시험관 내에서 증식시킨 후, 환원 조건에서 용해 및 SDS-PAGE를 수행한다. 전장 TCR- ζ 세포질 도메인 및 내인성 TCR- ζ 사슬을 포함하는 CAR은 TCR- ζ 사슬에 대한 항체를 사용하는 웨스턴 블롯팅에 의해 검출된다. 공유 이량체 형성의 평가를 할 수 있는 비환원 조건에서의 SDS-PAGE 분석을 위해 동일한 T세포 하위세트가 사용된다.
- [0737] 항원 자극 후 CAR⁺ T세포의 시험관내 증식은 유세포 분석으로 측정될 수 있다. 예를 들어, CD4⁺ 및 CD8⁺ T세포의 혼합물을 α CD3/ α CD28 aAPC로 자극한 후, 분석할 프로모터의 제어하에 GFP를 발현하는 렌티바이러스 벡터를 이용하여 형질도입한다. 예시적인 프로모터는 CMV IE 유전자, EF-1 α , 유비퀴틴 C, 또는 포스포글리세로키나제(PGK) 프로모터를 포함한다. GFP 형광은 CD4⁺ 및/또는 CD8⁺ T세포 하위세트에서 배양 6일째에 유세포 분석에 의해 평가된다. 예를 들어, 문헌[Milone *et al.*, Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)] 참조.

대안적으로, CD4⁺ 및 CD8⁺ T세포의 혼합물을 0일째에 αCD3/αCD28 코팅된 자성 비드로 자극하고, 2A 리보솜 스킵핑 서열을 사용하여 eGFP와 함께 CAR을 발현하는 바이시스트론 렌티바이러스 벡터를 사용하여 1일째에 CAR을 이용하여 형질도입한다. 배양물을 세척 후 항CD3 및 항-CD28 항체(K562-BBL-3/28)의 존재하에 CD19⁺ K562 세포(K562-CD19), 야생형 K562 세포(K562 야생형), 또는 hCD32 및 4-1BBL을 발현하는 K562 세포로 재자극한다. 외인성 IL-2를 배양물에 격일로 100 IU/ml로 첨가한다. GFP⁺ T세포는 비드 기반 계수를 이용하여 유세포 분석에 의해 계수된다. 예를 들어, 문헌[Milone *et al.*, *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009)] 참조. 항-CD20 T세포를 사용하거나(예를 들어, 문헌[Gill *et al* *Blood* 2014;123:2343] 참조) 또는 항-CD20 CAR T세포에 의해 유사한 분석을 수행할 수 있다.

[0738] 재자극 없이 지속되는 CAR⁺ T세포 증식도 측정될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Milone *et al.*, *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009)] 참조. 간략하게 요약하면, 0일째의 αCD3/αCD28 코팅된 자기 비드를 사용한 자극 및 1일째의 표시된 CAR을 이용한 형질도입 후, Coulter Multisizer III 입자 계수기, Nexcelom Cellometer Vision, 또는 Millipore Scepter를 사용하여 배양 8일째에 평균 T세포 부피(f1)를 측정한다.

[0739] 동물 모델을 사용하여 CART 활성을 측정할 수도 있다. 예를 들어, 면역결핍 마우스에서 원발성 인간 pre-B ALL을 치료하기 위해 인간 CD19-특이적 CAR⁺ T세포를 사용하는 이종이식 모델을 사용할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Milone *et al.*, *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009)] 참조. 아주 간략하게 요약하면, ALL의 확립 후, 처치군에 대해 마우스를 무작위 배정한다. B-ALL를 보유하는 NOD-SCID-γ^{-/-} 마우스 내에 상이한 수의 αCD19-ζ 및 αCD19-BB-ζ 조작된 T세포를 1:1 비로 동시주사한다. 마우스의 비장 DNA에 있는 αCD19-ζ 및 αCD19-BB-ζ 벡터의 카피수를 T세포 주사 후 다양한 시간에 평가한다. 매주 간격으로 동물을 백혈병에 대해 평가한다. αCD19-ζ CAR⁺ T세포 또는 모의-형질도입된 T세포를 주사한 마우스에서 말초혈액 CD19⁺ B-ALL 모세포 수를 측정한다. 로그 순위 검정을 사용하여 그룹에 대한 생존 곡선을 비교한다. 또한, NOD-SCID-γ^{-/-} 마우스에서 T세포 주사 4주 후 절대 말초혈액 CD4⁺ 및 CD8⁺ T세포 수를 분석할 수도 있다. 마우스에 백혈병 세포를 주사하고 3주 후에, eGFP에 연결된 CAR을 암호화하는 바이시스트론 렌티바이러스 벡터에 의해 CAR을 발현하도록 조작된 T세포를 주사한다. T세포를 주사 전에 모의-형질도입 세포와 혼합하여 45~50% 투입 GFP⁺ T세포로 정규화하고, 유세포 분석으로 확인한다. 1주 간격으로 동물을 백혈병에 대해 평가한다. 로그 순위 검정을 사용하여 CAR⁺ T세포 그룹에 대한 생존 곡선을 비교한다. 이중 CART 또는 탠덤 CART로 유사한 실험을 수행할 수 있다.

[0740] 용량 의존적 CAR 처치 반응을 평가할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Milone *et al.*, *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009)] 참조. 예를 들어, 21일째에 CAR T세포, 동등한 수의 모의-형질도입된 T세포를 주사하거나 또는 T세포를 주사하지 않은 마우스에서 백혈병 발생 35~70일 후에 말초혈액을 채취한다. 말초혈액 CD19⁺ ALL 모세포 수를 측정하기 위해 각 그룹의 마우스를 무작위로 채혈한 후, 35일째 및 49일째에 처사시킨다. 나머지 동물을 57일째 및 70일째에 평가한다. 이중 CART 또는 탠덤 CART로 유사한 실험을 수행할 수 있다.

[0741] 세포 증식 및 사이토카인 생성의 평가는 이전에 예를 들어 문헌[Milone *et al.*, *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009)]에서 설명된 바 있다.간략하게, CAR-매개 증식의 평가는 세척된 T세포를 CD19(K19) 또는 CD32 및 CD137(KT32-BBL)을 발현하는 K562 세포와 2:1의 최종 T세포:K562 비로 혼합하여 마이크로타이터 플레이트에서 수행된다. K562 세포는 사용 전에 감마선으로 조사된다. 항-CD3(클론 OKT3) 및 항-CD28(클론 9.3) 단클론 항체는 KT32-BBL 세포를 포함하는 배양물에 첨가되어, 이들 신호가 생체 외에서 장기간 CD8⁺ T세포 증식을 지지한다는 점에서 T세포 증식을 자극하기 위한 양성 대조군으로의 역할을 한다. T세포는 제조업체가 설명하는 바와 같이 CountBright™ 형광 비드(Invitrogen, Carlsbad, CA) 및 유세포 분석을 사용하여 배양물에서 계수된다. CAR⁺ T세포는 eGFP-2A 연결된 CAR-발현 렌티바이러스 벡터로 조작된 T세포를 사용한 GFP 발현에 의해 확인된다. GFP를 발현하지 않는 CAR⁺ T세포의 경우, CAR⁺ T세포는 비오틴화 제조합 CD19 단백질 및 2차 아비딘-PE 접합체로 검출된다. T세포 상의 CD4⁺ 및 CD8⁺ 발현은 또한 특정 단클론 항체(BD Biosciences)로 동시에 검출된다. 사이토카인 측정은 제조업체의 지침에 따라 인간 TH1/TH2 사이토카인 세포측정 비드 어레이 키트(BD Biosciences, San Diego, CA)를 사용하거나 Luminex 30-플렉스 키트(Invitrogen)를 사용하여 재자극 24시간 후에 수집된 상청액에 대해 수행된다. BD Fortessa 유세포 분석기를 사용하여 형광을 평가하고 제조업체의 지침에

따라 데이터를 분석한다. 이중 CART 또는 탠덤 CART로 유사한 실험을 수행할 수 있다.

[0742] 세포독성은 표준 51Cr-방출 분석에 의해 평가될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Milone *et al.*, Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)] 참조. 간략하게 요약하면, 표적 세포(K562 계통 및 원발성 pro-B-ALL 세포)를 37°C에서 2시간 동안 빈번하게 교반하면서 51Cr(NaCrO₄, New England Nuclear, Boston, MA)을 로딩하고, 완전 RPMI에서 2회 세척하고, 마이크로타이터 플레이트에 플레이팅한다. 이펙터 T세포를 완전 RPMI에서 다양한 이펙터 세포:표적 세포(E:T) 비로 웰 내의 표적 세포와 혼합한다. 배지만 함유하거나(자연 방출, SR) 트리톤-X 100 세제의 1% 용액을 함유하는(총 방출, TR) 추가의 웰을 또한 제조한다. 37°C에서 4시간 인큐베이션 후, 각각의 웰로부터 상청액을 채취한다. 이어서, 방출된 51Cr을 감마 입자 계수기(Packard Instrument Co., Waltham, MA)를 사용하여 측정한다. 각각의 조건은 적어도 삼중으로 수행되고, 용해 백분율은 다음의 식: 용해(%) = (ER - SR) / (TR - SR)을 사용하여 계산되며, ER은 각 실험 조건에 대해 방출된 평균 51Cr을 나타낸다.

[0743] 종양-보유 동물 모델에서 CAR의 특정 이동(trafficking) 및 증식을 평가하기 위해 이미징 기술이 사용될 수 있다. 이러한 분석은 예를 들어 문헌[Barrett *et al.*, Human Gene Therapy 22:1575-1586 (2011)]에 설명되어 있다. 간략하게 요약하면, NOD/SCID/ $\gamma c^{-/-}$ (NSG) 마우스에게 NaIm-6 세포를 정맥내 주사하고, 7일 후 CAR 구성체를 사용한 전기천공 4시간 후에 T세포를 주사한다. 발광 루시페라제를 발현하도록 T세포를 렌티바이러스 구성체로 안정적으로 형질감염시키고, 마우스를 생체발광에 대해 이미징한다. 대안적으로, NaIm-6 이종이식 모델에서 CAR⁺ T세포의 단회 주사의 치료 효능 및 특이성은 다음과 같이 측정될 수 있다. 발광 루시페라제를 안정적으로 발현하도록 형질도입된 NaIm-6을 NSG 마우스에 주사한 다음, 7일 후에 CAR로 전기천공된 T세포를 단회 꼬리-정맥 주사한다. 주사 후 다양한 시점에 동물을 이미징한다. 예를 들어, 5일째(치료 2일 전) 및 8일째(CAR⁺ PBL 24시간 후)에 대표적인 마우스에서 발광 루시페라제 양성 백혈병의 광자-밀도 히트 맵을 생성할 수 있다.

[0744] 본원의 실시예 섹션에서 기재된 것 및 당업계에 알려진 것을 비롯한 다른 분석도 본원에 개시된 이중 CART 또는 탠덤 CART 구성체를 평가하는 데 사용될 수 있다.

[0745] 치료적 응용

[0746] 본 발명은 특히, CD19 및/또는 CD22의 발현과 관련된 암 또는 질환, 또는 CD19 및/또는 CD22를 발현하는 세포와 관련된 병태를 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 암 또는 질환은 예를 들어 암 또는 악성종양과 같은 증식성 질환 또는 골수이형성증, 골수이형성 증후군 또는 전백혈병과 같은 전암성 병태, 또는 CD19 및/또는 CD22를 발현하는 세포와 관련된 비암성 관련 적응증을 포함한다. 일 양태에서, CD22의 발현과 관련된 암 또는 질환은 혈액암이다. 일 양태에서, 혈액암은 B세포 악성종양을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 일 양태에서, 혈액암은 백혈병 또는 림프종이다. 일 양태에서, 암, 예를 들어 CD19 및/또는 CD22의 발현과 관련된 암은 예를 들어 B세포 급성 림프모구성 백혈병(BALL), 예를 들어 소아 BALL 및/또는 성인 BALL, T세포 급성 림프성 백혈병(TALL), 소림프구성 백혈병(SLL), 급성 림프모구성 백혈병(ALL)을 포함하는(이에 한정되지 않음) 하나 이상의 급성 백혈병; 만성 골수성 백혈병(CML), 만성 림프구성 백혈병(CLL)을 포함하는(이에 한정되지 않음) 하나 이상의 만성 백혈병; 맨틀세포 림프종(MCL), B세포 전림프구성 백혈병, 모구성 형질세포양 수지상 세포 신생물, 버킷 림프종, 확산성 거대 B세포 림프종, 여포성 림프종, 모발상 세포 백혈병, 소세포- 또는 대세포-여포성 림프종, 악성 림프증식성 병태, MALT 림프종, 변연부 림프종, 다발성 골수종, 골수이형성증 및 골수이형성 증후군, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 형질모세포성 림프종, 형질세포양 수지상 세포 신생물, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 및 "전백혈병"(골수 혈액 세포의 비효과적 생성(또는 이형성증)에 의해 통합된 다양한 혈액 병태의 집합)을 포함하는(이에 한정되지 않음) 추가의 혈액암 또는 혈액 병태를 포함하는(이에 한정되지 않음) 암 및 악성종양을 포함한다. 일부 구현예에서, CD19 및/또는 CD22 발현과 관련된 질환은 CD19 및/또는 CD22를 발현하는 비정형 및/또는 비전형적 암, 악성종양, 전암성 병태 또는 증식성 질환, 및 이의 임의의 조합을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0747] CD22의 발현과 관련된 비암성 관련 적응증도 포함될 수 있다. CD22의 발현과 관련된 비암성 관련 적응증은 예를 들어 자가면역 질환(예를 들어, 루푸스, 류마티스 관절염, 다발성 경화증 자가면역 용혈성 빈혈, 순적혈구 무형성증, 특발성 혈소판감소성 자반증, 에반스 증후군, 혈관염, 수포성 피부 장애, 제1형 당뇨병, 쇼그렌 증후군, 항-NMDA 수용체 뇌염 및 데빅 질환, 그레이브스 안병증, 및 자가면역 췌장염), 염증성 장애(알러지 및 천식) 및 이식을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0748] 일 양태에서, 본 발명은 CD19 및/또는 CD22 발현과 관련된 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 일 양태에서, 본 발명은 종양의 일부가 CD19 및/또는 CD22에 대해 음성이고 종양의 일부가 CD19 및/또는 CD22에 대해 양성인 질

환을 치료하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 발명의 CAR은 CD19 및/또는 CD22의 발현과 관련된 치료를 받은 대상체가 CD19 및/또는 CD22의 발현과 관련된 질환을 나타내는, CD19 및/또는 CD22의 발현과 관련된 질환의 치료를 받은 대상체를 치료하는 데 유용하다.

[0749] 일 양태에서, 본 발명은 포유동물 T세포 또는 NK세포에서의 발현을 위한 프로모터에 작동가능하게 연결된 본원에 기재된 바와 같은 CAR을 포함하는 벡터에 관한 것이다. 일 양태에서, 본 발명은 CD19 및/또는 CD22-발현 종양을 치료하는 데 사용하기 위한 CAR을 발현하는 재조합 T세포를 제공하며, CD19 CAR 및 CD22 CAR을 발현하는 재조합 T세포는 이중 CART로 지칭된다. 일 양태에서, 본 발명은 CD19 및/또는 CD22-발현 종양을 치료하는 데 사용하기 위한 CAR을 발현하는 재조합 T세포를 제공하며, CD19 항원결합 도메인 및 CD22 항원결합 도메인을 발현하는 재조합 T세포는 탠덤 CART로 지칭된다. 일 양태에서, 본 발명의 이중 CART 또는 탠덤 CART는 CART가 종양 세포를 표적화하고 종양의 성장이 억제되도록 종양세포를 표면 상에 발현된 본 발명의 적어도 하나의 CD19 CAR 또는 CD22 CAR과 접촉시킬 수 있다.

[0750] 일 양태에서, 본 발명은 CD19 및/또는 CD22-발현 종양세포의 성장을 억제하는 방법으로서, CAR-발현 세포가 항원에 반응하여 활성화되고 암세포를 표적화하여 종양의 성장이 억제되도록 종양세포를 본 발명의 CAR-발현 세포, 예를 들어 이중 CAR 또는 탠덤 CAR-발현 NK세포와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.

[0751] 일 양태에서, 본 발명은 대상체의 암을 치료하는 방법에 관한 것이다. 이 방법은 암이 대상체에서 치료되도록 본 발명의 CAR-발현 세포, 예를 들어 이중 CAR 또는 탠덤 CAR-발현 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명의 CAR-발현 세포, 예를 들어 이중 CAR 또는 탠덤 CAR-발현 세포에 의해 치료가능한 암의 예는 CD22의 발현과 관련된 암이다. 본 발명의 CAR-발현 세포, 예를 들어 이중 CAR 또는 탠덤 CAR-발현 세포에 의해 치료가능한 암의 예는 본원에 기재된 혈액암을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 본 발명은 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 세포를 유전자 변형시키고, CAR-발현 세포를 이를 필요로 하는 수여체에게 주입하는 세포 요법 유형을 포함한다. 주입된 세포는 수여체의 종양세포를 사멸시킬 수 있다. 항체 요법과 달리, CAR-변형 세포는 생체 내에서 복제할 수 있어 장기간 지속되어 지속적인 종양 제어로 이어질 수 있다. 다양한 양태에서, 환자에게 투여된 T세포 또는 이의 자손은 환자에게 세포를 투여한 후 적어도 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 13개월, 14개월, 15개월, 16개월, 17개월, 18개월, 19개월, 20개월, 21개월, 22개월, 23개월, 2년, 3년, 4년, 또는 5년 동안 환자에서 지속된다.

[0752] 본 발명은 또한 키메라 항원 수용체(CAR)를 일시적으로 발현하도록 예를 들어 시험관내 전사된 RNA에 의해 면역억제 세포, 예를 들어 NK세포 또는 T세포를 변형시키고, CAR-발현(예를 들어, CART 또는 CAR-발현 NK) 세포를 이를 필요로 하는 수여체에게 주입하는 세포 요법 유형을 포함한다. 주입된 세포는 수여체의 암세포를 사멸시킬 수 있다. 따라서, 다양한 양태에서, 환자에게 투여된 CAR-발현 세포, 예를 들어 T세포 또는 NK세포는 환자에게 CAR-발현 세포, 예를 들어 T세포 또는 NK세포를 투여한 후 1개월 미만, 예를 들어 3주, 2주, 1주 동안 존재한다.

[0753] 일 양태에서, 본 발명의 CAR-변형 세포, 예를 들어 완전 인간 CAR-발현 세포는 포유동물에서 생체의 면역화 및/또는 생체내 요법을 위한 백신의 유형일 수 있다. 일 양태에서, 포유동물은 인간이다.

[0754] 생체의 면역화와 관련하여, 세포를 포유동물 내로 투여하기 전에 다음 중 적어도 하나가 시험관 내에서 일어난다: i) 세포의 증식, ii) CAR을 암호화하는 핵산을 세포에 도입, 또는 iii) 세포의 동결보존.

[0755] 생체의 절차는 당업계에 잘 알려져 있으며, 이하 더 상세하게 논의된다. 간략하게 요약하면, 포유동물(예를 들어, 인간)로부터 세포가 단리되고, 이 세포는 본원에 개시된 CAR을 발현하는 벡터로 유전자 변형된다(즉, 시험관 내에서 형질도입되거나 형질감염된다). CAR-변형 세포는 포유동물 수여체에 투여되어 치료적 이점을 제공할 수 있다. 포유동물 수여체는 인간일 수 있고, CAR-변형 세포는 수여체와 관련하여 자가유래일 수 있다. 대안적으로, 세포는 수여체와 관련하여 동종이계, 동계 또는 이종일 수 있다.

[0756] 조혈 줄기세포 및 전구세포의 생체의 증식을 위한 절차는 본원에 참조로 포함된 미국 특허 5,199,942에 기재되어 있으며, 본 발명의 세포에 적용될 수 있다. 다른 적합한 방법이 당업계에 알려져 있으며, 따라서 본 발명은 세포의 생체의 증식의 임의의 특정한 방법에 한정되지 않는다. 간략하게, T세포의 생체의 배양 및 증식은 (1) 말초혈액 채취물 또는 골수 이식편으로부터 포유동물의 CD34+ 조혈 줄기세포 및 전구세포 수집; 및 (2) 이러한 세포의 생체의 증식을 포함한다. 미국 특허 5,199,942호에 기재된 세포 성장 인자 외에도, flt3-L, IL-1, IL-3, 및 c-kit 리간드와 같은 다른 인자가 세포의 배양 및 증식에 사용될 수 있다.

[0757] 생체의 면역화와 관련하여 세포 기반 백신을 사용하는 것 외에도, 본 발명은 또한 환자에서 항원에 대한 면역

반응을 일으키는 생체내 면역화를 위한 조성물 및 방법을 제공한다.

- [0758] 일반적으로, 본원에 기재된 바와 같이 활성화되고 증식된 세포는 면역손상된 개체에서 발생하는 질환의 치료 및 예방에 사용될 수 있다. 특히, 본 발명의 CAR-변형 세포는 CD22 및/또는 CD19의 발현과 관련된 질환, 장애 및 병태의 치료에 사용된다. 특정 양태에서, 본 발명의 세포는 CD22 및/또는 CD19의 발현과 관련된 질환, 장애 및 병태의 발병 위험이 있는 환자의 치료에 사용된다. 따라서, 본 발명은 CD22 및/또는 CD19의 발현과 관련된 질환, 장애 및 병태의 치료 또는 예방 방법으로서, 이를 필요로 하는 대상체에게 본 발명의 CAR-변형 세포의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0759] 일 양태에서, 본 발명의 CAR-발현 세포는 암 또는 악성종양과 같은 증식성 질환 또는 골수이형성증, 골수이형성 증후군 또는 전백혈병과 같은 전암성 병태를 치료하는 데 사용될 수 있다. 일 양태에서, CD22 및/또는 CD19의 발현과 관련된 암은 세포의 비정상적 성장을 특징으로 하는 혈액암, 전백혈병, 과다증식성 장애, 증식증 또는 이형성증이다.
- [0760] 일 양태에서, 본 발명의 CAR-발현 세포는 암을 치료하는 데 사용되며, 암은 혈액암이다. 혈액암 병태는 혈액, 골수 및 림프계에 영향을 미치는 암의 유형, 예컨대 백혈병 및 악성 림프증식성 병태이다.
- [0761] 백혈병은 급성 백혈병 및 만성 백혈병으로 분류될 수 있다. 급성 백혈병은 급성 골수성 백혈병(AML) 및 급성 림프모구성 백혈병(ALL)으로 더 분류될 수 있다. 만성 백혈병은 만성 골수성 백혈병(CML) 및 만성 림프성 백혈병(CLL)을 포함한다. 다른 관련 병태는 골수 혈액 세포의 비효과적 생성(또는 이형성증)과 AML로의 변형 위험이 통합된 다양한 혈액 병태의 집합인 골수이형성 증후군(MDS, 이전에는 "전백혈병"으로 알려짐)을 포함한다.
- [0762] 림프종은 림프구에서 발생하는 혈액 세포 종양의 그룹이다. 예시적인 림프종은 비호지킨 림프종 및 호지킨 림프종을 포함한다.
- [0763] 일 양태에서, 본 발명의 조성물 및 CAR-발현 세포는 비호지킨 림프종, 예를 들어 DLBCL, 여포성 림프종, 또는 CLL과 같은 B세포 악성종양을 치료하는 데 특히 유용하다.
- [0764] 비호지킨 림프종(NHL)은 B세포 또는 T세포로부터 형성되는 림프구 암의 그룹이다. NHL은 임의의 연령에서 발생하며, 흔히 정상보다 큰 림프절, 체중 감소, 및 발열을 특징으로 한다. 상이한 유형의 NHL은 공격형(빠른 성장) 및 무통형(느린 성장)으로 분류된다. B세포 비호지킨 림프종은 버킷 림프종, 만성 림프구성 백혈병/소림프구성 림프종(CLL/SLL), 확산성 거대 B세포 림프종(DLBCL), 여포성 림프종, 면역모세포성 대세포 림프종, 전구 B-림프모구성 림프종, 및 맨틀세포 림프종을 포함한다. T세포 비호지킨 림프종의 예는 균상 식육종, 역형성 대세포 림프종, 및 전구 T-림프모구성 림프종을 포함한다. 골수 또는 줄기세포 이식 후에 발생하는 림프종은 일반적으로 B세포 비호지킨 림프종이다. 예를 들어, 문헌[Maloney. NEJM. 366.21(2012):2008-16] 참조.
- [0765] 확산성 거대 B세포 림프종(DLBCL)은 B세포에서 발생하는 NHL의 한 형태이다. DLBCL은 림프절 내 또는 림프계 외부, 예를 들어 위장관, 고환, 갑상선, 피부, 유방, 골, 또는 뇌에서 발생할 수 있는 공격성 림프종이다. DLBCL에서 일반적으로 세포 형태의 세 가지 변형(중심모세포성, 면역모세포성 및 역형성)이 관찰된다. 중심모세포성 형태가 가장 일반적이고, 최소한의 세포질을 가진 중대형 림프구의 외양을 가지고 있다. DLBCL의 여러 하위유형이 존재한다. 예를 들어, 원발성 중추신경계 림프종은 뇌에만 영향을 미치는 DLBCL의 유형으로, 뇌의 외부 영역에 영향을 미치는 DLBCL과는 다르게 치료된다. 또 다른 유형의 DLBCL은 원발성 종격 B세포 림프종으로, 대개 젊은 환자에서 발생하고 흉부에서 빠르게 성장한다. DLBCL의 증상은 림프절 비대로 인해 발생하는 목, 겨드랑이 또는 사타구니에서의 무통증의 급속한 부종을 포함한다. 일부 대상체의 경우, 부종은 통증을 수반할 수 있다. DLBCL의 다른 증상은 식은땀, 설명할 수 없는 발열, 및 체중 감소를 포함한다. 대부분의 DLBCL 환자는 성인이지만, 이 질환은 때때로 소아에서 발생한다. DLBCL에 대한 치료는 화학요법(예를 들어, 시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴, 프레드니손, 에토포시드), 항체(예를 들어, 리툭산), 방사선, 또는 줄기세포 이식을 포함한다.
- [0766] 여포성 림프종은 비호지킨 림프종의 유형으로, 적어도 부분적으로 여포성 패턴을 갖는 여포 중심 B세포(중심세포 및 중심모세포)의 림프종이다. 여포성 림프종 세포는 B세포 마커 CD10, CD19, CD20, 및 CD22를 발현한다. 여포성 림프종 세포는 일반적으로 CD5에 대해 음성이다. 형태학적으로 여포성 림프종 종양은 중심세포(분할 여포 중심세포 또는 소세포라고도 함) 및 중심모세포(거대 비분할 여포 중심세포 또는 대세포라고도 함)의 혼합물을 포함하는 여포로 구성된다. 여포는 비악성 세포, 주로 T세포에 의해 둘러싸인다. 여포는 소수의 중심모세포와 함께 주로 중심세포를 포함한다. 세계보건기구(WHO)는 질병을 형태학적으로 다음과 같이 분류한다: 등급 1(hpf(high-power field)당 5개 미만의 중심모세포); 등급 2(6~15개의 중심모세포/hpf); 등급 3(15개 초과)

중심모세포/hpf). 등급 3은 다음의 등급으로 더 세분화된다: 등급 3A(중심세포가 여전히 존재함); 등급 3B(여포는 거의 전적으로 중심모세포로 구성됨). 여포성 림프종의 치료는 화학요법, 예를 들어 알킬화제, 뉴클레오시드 유사체, 안트라사이클린-함유 요법, 예를 들어 CHOP-시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴, 프레드니손/프레드니솔론, 항체(예를 들어, 리툭시맵), 방사선면역요법, 및 조절 줄기세포 이식을 포함한다.

[0767] CLL은 골수, 혈액, 림프절, 및 비장에서 신생물성 세포 증식 및 축적을 특징으로 하는 B세포 악성종양이다. CLL의 진단 시점의 중위 연령은 약 65세이다. 현행 치료는 화학요법, 방사선 요법, 생물학적 요법, 또는 골수 이식을 포함한다. 때때로 증상은 외과적으로(예를 들어, 비대해진 비장의 비장절제술 제거) 또는 방사선 요법(예를 들어, 부은 림프절의 용적축소)에 의해 치료된다. CLL을 치료하기 위한 화학요법제는, 예를 들어 플루다라빈, 2-클로로데옥시아데노신(클라드리빈), 클로람부실, 빈크리스틴, 펜토스타틴, 시클로포스파미드, 알렘투주맵(캄파트-1H), 독소루비신, 및 프레드니손을 포함한다. CLL을 위한 생물학적 요법은 항체, 예를 들어 알렘투주맵, 리툭시맵, 및 오프투무맵, 뿐만 아니라 티로신 키나제 억제제 요법을 포함한다. Rai 또는 Binet 시스템과 같은 여러 기준을 사용하여 CLL 병기를 분류할 수 있다. Rai 시스템은 CLL이 5개의 병기를 갖는 것으로 설명한다: 림프구증가증만이 존재하는 병기 0; 림프절병증이 존재하는 병기 I; 비장비대, 림프절병증, 또는 둘 다 존재하는 병기 II; 빈혈, 기관비대, 또는 둘 다 존재하는 병기 III(진행은 체중 감소, 피로, 발열, 대규모 기관비대, 및 급속하게 증가하는 림프구 수에 의해 정의됨); 및 빈혈, 혈소판감소증, 기관비대, 또는 이의 조합이 존재하는 병기 IV. Binet 병기결정 시스템에는 다음의 세 가지 카테고리가 있다: 림프구증가증이 존재하고, 3개 미만의 림프절이 비대된 병기 A(이 병기는 모든 Rai 병기 0 환자, Rai 병기 I 환자의 1/2, 및 Rai 병기 II 환자의 1/3을 포함함); 3개 이상의 림프절이 수반된 병기 B; 및 빈혈 또는 혈소판감소증, 또는 둘 다 존재하는 병기 C. 이러한 분류 시스템은 면역글로불린 유전자의 돌연변이 측정과 조합되어 질병 상태의 보다 정확한 특성화를 제공할 수 있다. 돌연변이된 면역글로불린 유전자의 존재는 개선된 예후와 상관관계가 있다.

[0768] 다른 구현예에서, 본 발명의 CAR-발현 세포는, 예를 들어 백혈병 줄기세포를 사용하여 암 또는 백혈병을 치료하는 데 사용된다. 예를 들어, 백혈병 줄기세포는 CD34⁺/CD38⁻ 백혈병 세포이다.

[0769] 본 발명은 특히, 암을 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 일 양태에서, 암은 B세포 급성 림프모구성 백혈병(BALL), 예를 들어 소아 BALL 및/또는 성인 BALL, T세포 급성 림프성 백혈병(TALL), 소림프구성 백혈병(SLL), 급성 림프모구성 백혈병(ALL)을 포함하는(이에 한정되지 않음) 하나 이상의 급성 백혈병; 만성 골수성 백혈병(CML), 만성 림프구성 백혈병(CLL)을 포함하는(이에 한정되지 않음) 하나 이상의 만성 백혈병; 맨틀세포 림프종(MCL), B세포 전림프구성 백혈병, 모구성 형질세포양 수지상 세포 신생물, 버킷 림프종, 확산성 거대 B세포 림프종, 여포성 림프종, 모발상 세포 백혈병, 소세포- 또는 대세포-여포성 림프종, 악성 림프증식성 병태, MALT 림프종, 변연부 림프종, 다발성 골수종, 골수이형성증 및 골수이형성 증후군, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 형질모세포성 림프종, 형질세포양 수지상 세포 신생물, 발덴스트롬 마크로글로블린혈증, 및 "전백혈병"(골수 혈액 세포의 비효과적 생성(또는 이형성증)에 의해 통합된 다양한 혈액 병태의 집합)을 포함하는(이에 한정되지 않음) 추가의 혈액암 또는 혈액 병태를 포함하는(이에 한정되지 않음) 혈액암이며, CD22 발현과 관련된 질환은 CD22를 발현하는 비정형 및/또는 비전형적 암, 악성종양, 전암성 병태 또는 증식성 질환, 및 이의 임의의 조합을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0770] 본 발명의 CAR-변형 세포는 단독으로 투여되거나, 또는 희석제 및/또는 다른 성분, 예컨대 IL-2 또는 다른 사이토카인 또는 세포 집단과 조합하여 제약 조성물로서 투여될 수 있다.

[0771] 다른 양태에서, 본 발명의 CAR-발현 세포, 예를 들어 이중 CAR 또는 탠덤 CAR-발현 세포는 이전에 CD19 CAR-발현 세포로 치료받은 대상체의 치료를 위해 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 CAR-발현 세포는 이전에 CD19 CAR-발현 세포로 치료받은 암 또는 다른 병태의 재발 후 투여된다.

[0772] 일부 구현예에서, 암 또는 다른 병태는 CD19를 발현한다. 일부 구현예에서, 암 또는 다른 병태는 CD22를 발현한다. 일부 구현예에서, 암 또는 다른 병태는 CD19 및 CD22를 발현한다.

[0773] 일부 구현예에서, 암 또는 다른 병태는 이전에 CD19 CAR-발현 세포에 대해 반응성이 없었다. 일부 구현예에서, 대상체 암 또는 다른 병태는 CD19 CAR-발현 세포를 사용한 치료에 대해 반응성이 있다. 일부 구현예에서, 암 또는 다른 병태는 CD19 CAR-발현 세포를 사용한 치료에 대해 현재보다 더 반응성이 있었다. 일부 구현예에서, 암 또는 다른 병태는 CD19 CAR-발현 세포를 사용한 치료에 대해 반응성이 있었다. 일부 구현예에서, 암 또는 다른 병태는 CD19 CAR-발현 세포를 사용한 치료에 대해 반응성이 있었으며, CD19 CAR-발현 세포에 대해 더 이상 반응성이 없다.

- [0774] 일부 구현예에서, CAR, 예를 들어 이중 CAR 또는 탠덤 CAR(예를 들어, 본원에 기재된 것)은 CD19 CAR-발현 세포에 대한 반응성의 감소 또는 소실 때문에 투여된다. 일부 구현예에서, CD19 CAR-발현 세포 요법은 중단되었다. 일부 구현예에서, CD19 CAR 요법은 CD19 CAR-발현 세포에 대한 반응성의 감소 또는 소실로 인해 중단되었다.
- [0775] 일부 구현예에서, CAR, 예를 들어 이중 CAR 또는 탠덤 CAR(예를 들어, 본원에 기재된 것)은 CD22 CAR-발현 세포에 대한 반응성의 감소 또는 소실 때문에 투여된다. 일부 구현예에서, CD22 CAR-발현 세포 요법은 중단되었다. 일부 구현예에서, CD22 CAR 요법은 CD22 CAR-발현 세포에 대한 반응성의 감소 또는 소실로 인해 중단되었다.
- [0776] 본 발명은 또한 CD22-발현 세포와 관련된 질환(예를 들어, CD22를 발현하는 혈액암 또는 비정형 암)의 예방, 치료, 및/또는 관리 방법으로서, 이를 필요로 하는 대상체에게 CD22-발현 세포에 결합하는 본 발명의 CD22 CAR-발현 세포를 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일 양태에서, 대상체는 인간이다. CD22-발현 세포와 관련된 장애의 비제한적인 예는 자가면역 질환(예를 들어, 루푸스, 류마티스 관절염, 다발성 경화증 자가면역 용혈성 빈혈, 순적혈구 무형성증, 특발성 혈소판감소성 자반증, 에반스 증후군, 혈관염, 수포성 피부 장애, 제1형 당뇨병, 쇼그렌 증후군, 항-NMDA 수용체 뇌염 및 데빅 질환, 그레이브스 안병증, 및 자가면역 췌장염), 염증성 장애(알러지 및 천식), 이식, 및 암(예컨대 CD22를 발현하는 혈액암 또는 비정형 암)을 포함한다.
- [0777] 본 발명은 또한 CD22-발현 세포와 관련된 질환의 예방, 치료, 및/또는 관리 방법으로서, 이를 필요로 하는 대상체에게 CD22-발현 세포에 결합하는 본 발명의 이중 CAR 또는 탠덤 CAR-발현 세포를 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일 양태에서, 대상체는 인간이다.
- [0778] 일부 구현예에서, 대상체는 CD19 CAR 요법에 대해 무반응자이다. 일부 구현예에서, 대상체는 CD19 CAR 요법에 대해 부분 반응자이다. 일부 구현예에서, 대상체는 CD19 CAR 요법에 대해 완전 반응자이다. 일부 구현예에서, 대상체는 CD19 CAR 요법에 대해 비재발자이다. 일부 구현예에서, 대상체는 CD19 CAR 요법에 대해 재발자이다.
- [0779] 일부 구현예에서, CD19 CAR-발현 세포를 사용한 치료에 대해 이전에 반응성이 있었던 암 또는 다른 병태는 CD19를 발현하지 않는다. 일부 구현예에서, CD19 CAR-발현 세포를 사용한 치료에 대해 이전에 반응성이 있었던 암 또는 다른 병태는 암 또는 다른 병태가 CD19 CAR-발현 세포를 사용한 치료에 대해 반응성이 있었던 때에 비해 10%, 20%, 30%, 40%, 50% 이상 감소된 CD19 발현 수준을 갖는다. 일부 구현예에서, CD19 CAR-발현 세포를 사용한 치료에 대해 이전에 반응성이 있었던 암 또는 다른 병태는 CD22를 발현한다.
- [0780] 일부 구현예에서, CAR-발현 세포, 예를 들어 본 발명의 이중 CAR 또는 탠덤 CAR-발현 세포는 이전에 CD19 CAR-발현 세포로 치료받은 암 또는 다른 병태의 재발 후 투여된다.
- [0781] 골수 절제
- [0782] 일 양태에서, 본 발명은 골수 절제를 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 예를 들어 일 양태에서, 본 발명은 대상체에서 기존 골수의 적어도 일부를 근절하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 특정 예에서, CAR-발현 세포, 예를 들어 본 발명의 CD22 CAR 및 CD19 CAR을 포함하는 이중 CAR 또는 탠덤 CAR-발현 세포는 CD19 및/또는 CD22 양성 골수 전구세포를 근절한다.
- [0783] 일 양태에서, 본 발명은 골수 절제를 필요로 하는 대상체에게 본 발명의 CAR-발현 세포, 예를 들어 이중 CAR 또는 탠덤 CAR-발현 세포를 투여하는 단계를 포함하는 골수 절제 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 발명의 방법은 골수 이식 또는 골수 재컨디셔닝이 유익한 치료 전략인 질환 또는 장애가 있는 대상체의 기존 골수의 일부 또는 전부를 근절하기 위해 사용될 수 있다. 일 양태에서, 본원의 다른 부분에 기재된 CAR-발현 세포, 예를 들어 이중 CAR 또는 탠덤 CAR-발현 세포를 투여하는 단계를 포함하는 본 발명의 골수 절제 방법은 골수 이식 전에 대상체에서 수행된다. 따라서, 일 양태에서, 본 발명의 방법은 골수 또는 줄기세포 이식 전 세포 컨디셔닝 요법을 제공한다. 일 양태에서, 골수 이식은 줄기세포의 이식을 포함한다. 골수 이식은 자가 또는 동종이계 세포의 이식을 포함할 수 있다.
- [0784] 본 발명은 본 발명의 CAR-발현 세포, 예를 들어 이중 CAR 또는 탠덤 CAR-발현 세포를 투여하여 기존 골수의 적어도 일부를 근절하는 단계를 포함하는 질환 또는 장애의 치료 방법을 제공한다. 이 방법은 골수 이식이 유익한 임의의 질환 또는 장애를 치료하기 위한 치료 요법의 적어도 일부로서 사용될 수 있다. 즉, 본 발명의 방법은 골수 이식을 필요로 하는 임의의 대상체에서 사용될 수 있다. 일 양태에서, CAR-발현 세포, 예를 들어 이중 CAR 또는 탠덤 CAR-발현 세포의 투여를 포함하는 골수 절제는 AML의 치료에 유용하다. 특정 양태에서, 본 발명의 방법에 의한 골수 절제는 혈액암, 고형 종양, 혈액 질환, 대사 장애, HIV, HTLV, 리소솜 축적 장애, 및 면역결핍을 치료하는 데 유용하다.

- [0785] 본원에 개시된 조성물 및 방법은 기존 골수의 적어도 일부를 근절하여 본원에 기재된 암, 예를 들어 백혈병, 림프종, 골수종, ALL, AML, CLL, CML, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종(예를 들어, DLBCL 또는 여포성 림프종), 및 다발성 골수종을 포함하는(이에 한정되지 않음) 혈액암을 치료하는 데 사용될 수 있다.
- [0786] 본원에 개시된 조성물 및 방법은, 특히 골수이형성증, 빈혈, 발작성 야간 혈색소뇨증, 재생불량성 빈혈, 후천성 순적혈구 빈혈, 다이아몬드-블랙판 빈혈, 판코니 빈혈, 혈구감소증, 무거핵구성 혈소판감소증, 골수증식성 장애, 진성다혈구혈증, 본태 혈소판증가증, 골수섬유증, 혈색소병증, 겸상세포질환, 중증성 β 지중해빈혈을 포함하는(이에 한정되지 않음) 혈액 질환을 치료하는 데 사용될 수 있다.
- [0787] 일 양태에서, 본 발명은 본 발명의 CAR-발현 세포, 예를 들어 이중 CAR 또는 탠덤 CAR-발현 세포에 의해 대상체의 골수의 적어도 일부가 근절되는, 골수 컨디셔닝을 포함하는 암의 치료 방법을 제공한다. 예를 들어 특정 예에서, 대상체의 골수는 CAR-발현 세포, 예를 들어 이중 CAR 또는 탠덤 CAR-발현 세포의 활성화에 의해 표적화 및 제거될 수 있는 악성 전구세포를 포함한다. 일 양태에서, 골수 컨디셔닝 요법은 천연 골수의 근절 후 대상체에 골수 또는 줄기세포 이식편을 투여하는 것을 포함한다. 일 양태에서, 골수 재컨디셔닝 요법은 항종양 CAR 요법, 화학요법, 방사선 등을 포함하는(이에 한정되지 않음) 하나 이상의 다른 항암 요법과 조합된다.
- [0788] 일 양태에서, 투여된 CAR-발현 세포의 근절은 골수 또는 줄기세포 이식편의 주입 전에 필요할 수 있다. CAR-발현 세포의 근절은 자살 유전자의 사용, RNA 암호화된 CAR을 사용한 제한된 CAR 지속성, 또는 항체 또는 화학요법을 포함하는 항-T세포 방식을 비롯한(이에 한정되지 않음) 임의의 적합한 전략 또는 치료를 사용하여 달성될 수 있다.
- [0789] *CD22 관련 질환 및/또는 장애*
- [0790] 본 발명은 특히, CD22의 발현과 관련된 질환 또는 예를 들어, 암 또는 악성종양과 같은 증식성 질환 또는 전암성 병태를 포함하는 CD22를 발현하는 세포와 관련된 병태, 또는 CD22를 발현하는 세포와 관련된 비암성 관련 적응증을 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 일 양태에서, CD22의 발현과 관련된 암은 혈액암이다. 일 양태에서, 혈액암은 B세포 악성종양을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 일 양태에서, 혈액암은 백혈병 또는 림프종이다. 일 양태에서, CD22의 발현과 관련된 암은 예를 들어 B세포 급성 림프모구성 백혈병(BALL), 예를 들어 소아 BALL 및/또는 성인 BALL, T세포 급성 림프성 백혈병(TALL), 소림프구성 백혈병(SLL), 급성 림프모구성 백혈병(ALL)을 포함하는(이에 한정되지 않음) 하나 이상의 급성 백혈병; 만성 림프구성 백혈병(CLL)을 포함하는(이에 한정되지 않음) 하나 이상의 만성 백혈병; 맨틀세포 림프종(MCL), B세포 전림프구성 백혈병, 모구성 형질세포양 수지상 세포 신생물, 버킷 림프종, 확산성 거대 B세포 림프종, 여포성 림프종, 모발상 세포 백혈병, 소세포- 또는 대세포-여포성 림프종, 악성 림프증식성 병태, MALT 림프종, 변연부 림프종, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 형질모세포성 림프종, 형질세포양 수지상 세포 신생물, 및 발덴스트롬 마크로글로불린혈증을 포함하는(이에 한정되지 않음) 추가의 혈액암 또는 혈액 병태를 포함하는(이에 한정되지 않음) 암 및 악성종양을 포함한다. 다른 구현예에서, CD22 발현과 관련된 질환은 CD22를 발현하는 비정형 및/또는 비전형적 암, 악성종양, 전암성 병태 또는 증식성 질환, 및 이의 임의의 조합을 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0791] CD22의 발현과 관련된 비암성 관련 적응증도 포함될 수 있다. CD22의 발현과 관련된 비암성 관련 적응증은 예를 들어 자가면역 질환(예를 들어, 루푸스, 류마티스 관절염, 다발성 경화증 자가면역 용혈성 빈혈, 순적혈구 무형성증, 특발성 혈소판감소성 자반증, 에반스 증후군, 혈관염, 수포성 피부 장애, 제1형 당뇨병, 쇼그렌 증후군, 항-NMDA 수용체 뇌염 및 데빅 질환, 그레이브스 안병증, 및 자가면역 췌장염), 염증성 장애(알러지 및 천식) 및 고형장기 또는 조혈세포 이식을 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0792] 일 양태에서, 본 발명은 CD22 발현과 관련된 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 일 양태에서, 본 발명은 종양의 일부가 CD22에 대해 음성이고 종양의 일부가 CD22에 대해 양성인 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 발명의 CAR은 CD22의 발현과 관련된 치료를 받은 대상체가 CD22의 발현과 관련된 질환을 나타내는, CD22의 발현과 관련된 질환의 치료를 받은 대상체를 치료하는 데 유용하다.
- [0793] 일 양태에서, 본 발명은 포유동물 세포(예를 들어, T세포 또는 NK세포)에서의 발현을 위해 프로모터에 작동가능하게 연결된 CAR, 예를 들어 이중 CAR 또는 탠덤 CAR을 포함하는 벡터에 관한 것이다. 일 양태에서, 본 발명은 CD22-발현 종양을 치료하는 데 사용하기 위한 CAR, 예를 들어 이중 CAR 또는 탠덤 CAR을 발현하는 재조합 T세포를 제공한다. 일 양태에서, 본 발명의 CAR-발현 T세포 또는 NK세포는 CAR-발현 T세포 또는 NK세포가 종양세포를 표적화하고 종양의 성장이 억제되도록 종양세포를 표면 상에 발현된 본 발명의 적어도 하나의 CAR과 접촉시킬 수 있다.

- [0794] 일 양태에서, 본 발명은 CD22-발현 종양세포의 성장을 억제하는 방법으로서, CART가 항원에 반응하여 활성화되고 암세포를 표적화하여 종양의 성장이 억제되도록 종양세포를 본 발명의 CAR 세포(예를 들어, T세포 또는 NK세포)와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.
- [0795] 일 양태에서, 본 발명은 대상체의 암을 치료하는 방법에 관한 것이다. 이 방법은 암이 대상체에서 치료되도록 본 발명의 CAR-발현 세포(예를 들어, T세포 또는 NK세포)를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명의 CAR-발현 세포(예를 들어, T세포 또는 NK세포)에 의해 치료가능한 암의 예는 CD22의 발현과 관련된 암이다. 본 발명의 CAR-발현 세포(예를 들어, T세포 또는 NK세포)에 의해 치료가능한 암의 예는 본원에 기재된 혈액암을 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0796] 본 발명은 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 세포(예를 들어, T세포 또는 NK세포)를 유전자 변형시키고, CAR-발현 세포(예를 들어, T세포 또는 NK세포)를 이를 필요로 하는 수여체에게 주입하는 세포 요법 유형을 포함한다. 주입된 세포는 수여체의 종양세포를 사멸시킬 수 있다. 항체 요법과 달리, CAR-변형 세포(예를 들어, T세포 또는 NK세포)는 생체 내에서 복제할 수 있어 장기간 지속되어 지속적인 종양 제어에 이어질 수 있다. 다양한 양태에서, 환자에게 투여된 세포(예를 들어, T세포 또는 NK세포) 또는 이의 자손은 환자에게 T세포를 투여한 후 적어도 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 13개월, 14개월, 15개월, 16개월, 17개월, 18개월, 19개월, 20개월, 21개월, 22개월, 23개월, 2년, 3년, 4년, 또는 5년 동안 환자에서 지속된다.
- [0797] 본 발명은 또한 키메라 항원 수용체(CAR)를 일시적으로 발현하도록 예를 들어 시험관내 전사된 RNA에 의해 면역억제 세포, 예를 들어 NK세포 또는 T세포를 변형시키고, CAR-발현 세포(예를 들어, CART 또는 CAR-발현 NK세포)를 이를 필요로 하는 수여체에게 주입하는 세포 요법 유형을 포함한다. 주입된 세포는 수여체의 암세포를 사멸시킬 수 있다. 따라서, 다양한 양태에서, 환자에게 투여된 CAR-발현 세포, 예를 들어 T세포 또는 NK세포는 환자에게 CAR-발현 세포, 예를 들어 T세포 또는 NK세포를 투여한 후 1개월 미만, 예를 들어 3주, 2주, 1주 동안 존재한다.
- [0798] 임의의 특정한 이론에 구애됨이 없이, CAR-변형 세포(예를 들어, T세포 또는 NK세포)에 의해 유발된 항종양 면역 반응은 능동 또는 수동 면역 반응일 수 있거나, 대안적으로 직접 대 간접 면역 반응으로 인한 것일 수 있다. 일 양태에서, CAR 형질도입된 세포(예를 들어, T세포 또는 NK세포)는 CD22를 발현하는 인간 암세포에 반응하여 특이적 염증촉진 사이토카인 분비 및 강력한 세포용해 활성을 나타내고, 가용성 CD22 억제에 저항하고, 방관자 사멸을 매개하고, 확립된 인간 종양의 퇴행을 매개한다. 예를 들어, CD22-발현 종양의 이중 영역 내의 항원이 없는 종양세포는 인접한 항원-양성 암세포에 대해 이전에 반응한 CD22-제지성 T세포에 의해 간접적으로 파괴될 수 있다.
- [0799] 일 양태에서, 본 발명의 CAR 세포(예를 들어, T세포 또는 NK세포), 예를 들어 완전 인간 CAR-발현 세포는 포유동물에서 생체의 면역화 및/또는 생체내 요법을 위한 백신의 유형일 수 있다. 일 양태에서, 포유동물은 인간이다.
- [0800] 생체의 면역화와 관련하여, 세포를 포유동물 내로 투여하기 전에 다음 중 적어도 하나가 시험관 내에서 일어난다: i) 세포의 증식, ii) CAR을 암호화하는 핵산을 세포에 도입, 또는 iii) 세포의 동결보존.
- [0801] 생체의 절차는 당업계에 잘 알려져 있으며, 이하 보다 상세하게 논의된다. 간략하게 요약하면, 포유동물(예를 들어, 인간)로부터 세포가 분리되고, 이 세포는 본원에 개시된 CAR을 발현하는 벡터로 유전자 변형된다(즉, 시험관 내에서 형질도입되거나 형질감염된다). CAR 세포는 포유동물 수여체에 투여되어 치료적 이점을 제공할 수 있다. 포유동물 수여체는 인간일 수 있고, CAR 세포는 수여체와 관련하여 자가유래일 수 있다. 대안적으로, 세포는 수여체와 관련하여 동종이계, 동계 또는 이종일 수 있다.
- [0802] 조혈 줄기세포 및 전구세포의 생체의 증식을 위한 절차는 본원에 참조로 포함된 미국 특허 5,199,942에 기재되어 있으며, 본 발명의 세포에 적용될 수 있다. 다른 적합한 방법이 당업계에 알려져 있으며, 따라서 본 발명은 세포의 생체의 증식의 임의의 특정한 방법에 한정되지 않는다. 간략하게, T세포의 생체의 배양 및 증식은 (1) 말초혈액 채취물 또는 골수 이식편으로부터 포유동물의 CD34+ 조혈 줄기세포 및 전구세포 수집; 및 (2) 이러한 세포의 생체의 증식을 포함한다. 미국 특허 5,199,942호에 기재된 세포 성장 인자 외에도, flt3-L, IL-1, IL-3, 및 c-kit 리간드와 같은 다른 인자가 세포의 배양 및 증식에 사용될 수 있다.
- [0803] 생체의 면역화와 관련하여 세포 기반 백신을 사용하는 것 외에도, 본 발명은 또한 환자에서 항원에 대한 면역 반응을 일으키는 생체내 면역화를 위한 조성물 및 방법을 제공한다.

- [0804] 일반적으로, 본원에 기재된 바와 같이 활성화되고 증식된 세포는 면역손상된 개체에서 발생하는 질환의 치료 및 예방에 사용될 수 있다. 특히, 본 발명의 CAR-변형 세포(예를 들어, T세포 또는 NK세포)는 CD22의 발현과 관련된 질환, 장애 및 병태의 치료에 사용된다. 특정 양태에서, 본 발명의 세포는 CD22의 발현과 관련된 질환, 장애 및 병태의 발병 위험이 있는 환자의 치료에 사용된다. 따라서, 본 발명은 CD22의 발현과 관련된 질환, 장애 및 병태의 치료 또는 예방 방법으로서, 이를 필요로 하는 대상체에게 본 발명의 CAR 세포(예를 들어, T세포 또는 NK세포)의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0805] 일 양태에서, 본 발명의 CAR-발현 세포는 암 또는 악성종양과 같은 증식성 질환 또는 전암성 병태를 치료하는 데 사용될 수 있다. 일 양태에서, CD22의 발현과 관련된 암은 세포의 비정상적 성장을 특징으로 하는 혈액암, 전백혈병, 과다증식성 장애, 증식증 또는 이형성증이다.
- [0806] 일 양태에서, 본 발명의 CAR-발현 세포는 암을 치료하는 데 사용되며, 암은 혈액암이다. 혈액암 병태는 혈액, 골수 및 림프계에 영향을 미치는 암의 유형, 예컨대 백혈병 및 악성 림프증식성 병태이다.
- [0807] 백혈병은 급성 백혈병 및 만성 백혈병으로 분류될 수 있다. 급성 백혈병은 급성 골수성 백혈병(AML) 및 급성 림프모구성 백혈병(ALL)으로 더 분류될 수 있다. 만성 백혈병은 만성 골수성 백혈병(CML) 및 만성 림프성 백혈병(CLL)을 포함한다. 다른 관련 병태는 골수 혈액 세포의 비효과적 생성(또는 이형성증)과 AML로의 변형 위험이 통합된 다양한 혈액 병태의 집합인 골수이형성 증후군(MDS, 이전에는 "전백혈병"으로 알려짐)을 포함한다.
- [0808] 림프종은 림프구에서 발생하는 혈액 세포 종양의 그룹이다. 예시적인 림프종은 비호지킨 림프종 및 호지킨 림프종을 포함한다.
- [0809] 일 양태에서, 본 발명의 조성물 및 CART세포 또는 CAR-발현 NK세포는 비호지킨 림프종, 예를 들어 DLBCL, 여포성 림프종, 또는 CLL과 같은 B세포 악성종양을 치료하는 데 특히 유용하다.
- [0810] 비호지킨 림프종(NHL)은 B세포 또는 T세포로부터 형성되는 림프구 암의 그룹이다. NHL은 임의의 연령에서 발생하며, 흔히 정상보다 큰 림프절, 체중 감소, 및 발열을 특징으로 한다. 상이한 유형의 NHL은 공격형(빠른 성장) 및 무통형(느린 성장)으로 분류된다. B세포 비호지킨 림프종은 버킷 림프종, 만성 림프구성 백혈병/소림프구성 림프종(CLL/SLL), 확산성 거대 B세포 림프종(DLBCL), 여포성 림프종, 면역모세포성 대세포 림프종, 전구 B-림프모구성 림프종, 및 맨틀세포 림프종을 포함한다. T세포 비호지킨 림프종의 예는 균상 식육종, 역형성 대세포 림프종, 및 전구 T-림프모구성 림프종을 포함한다. 골수 또는 줄기세포 이식 후에 발생하는 림프종은 일반적으로 B세포 비호지킨 림프종이다. 예를 들어, 문헌[Maloney, NEJM. 366.21(2012):2008-16] 참조.
- [0811] 확산성 거대 B세포 림프종(DLBCL)은 B세포에서 발생하는 NHL의 한 형태이다. DLBCL은 림프절 내 또는 림프계 외부, 예를 들어 위장관, 고환, 갑상선, 피부, 유방, 골, 또는 뇌에서 발생할 수 있는 공격성 림프종이다. DLBCL에서 일반적으로 세포 형태의 세 가지 변형(중심모세포성, 면역모세포성 및 역형성)이 관찰된다. 중심모세포성 형태가 가장 일반적이고, 최소한의 세포질을 가진 중대형 림프구의 외양을 가지고 있다. DLBCL의 여러 하위유형이 존재한다. 예를 들어, 원발성 중추신경계 림프종은 뇌에만 영향을 미치는 DLBCL의 유형으로, 뇌의 외부 영역에 영향을 미치는 DLBCL과는 다르게 치료된다. 또 다른 유형의 DLBCL은 원발성 종격 B세포 림프종으로, 대개 젊은 환자에서 발생하고 흉부에서 빠르게 성장한다. DLBCL의 증상은 림프절 비대로 인해 발생하는 목, 겨드랑이 또는 사타구니에서의 무통증의 급속한 부종을 포함한다. 일부 대상체의 경우, 부종은 통증을 수반할 수 있다. DLBCL의 다른 증상은 식은땀, 설명할 수 없는 발열, 및 체중 감소를 포함한다. 대부분의 DLBCL 환자는 성인이지만, 이 질환은 때때로 소아에서 발생한다. DLBCL에 대한 치료는 화학요법(예를 들어, 시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴, 프레드니손, 에토포시드), 항체(예를 들어, 리투산), 방사선, 또는 줄기세포 이식을 포함한다.
- [0812] 여포성 림프종은 비호지킨 림프종의 유형으로, 적어도 부분적으로 여포성 패턴을 갖는 여포 중심 B세포(중심세포 및 중심모세포)의 림프종이다. 여포성 림프종 세포는 B세포 마커 CD10, CD19, CD20, 및 CD22를 발현한다. 여포성 림프종 세포는 일반적으로 CD5에 대해 음성이다. 형태학적으로 여포성 림프종 종양은 중심세포(분할 여포 중심세포 또는 소세포라고도 함) 및 중심모세포(거대 비분할 여포 중심세포 또는 대세포라고도 함)의 혼합물을 포함하는 여포로 구성된다. 여포는 비악성 세포, 주로 T세포에 의해 둘러싸인다. 여포는 소수의 중심모세포와 함께 주로 중심세포를 포함한다. 세계보건기구(WHO)는 질병을 형태학적으로 다음과 같이 분류한다: 등급 1(hpf(high-power field)당 5개 미만의 중심모세포); 등급 2(6~15개의 중심모세포/hpf); 등급 3(15개 초과 중심모세포/hpf). 등급 3은 다음의 등급으로 더 세분화된다: 등급 3A(중심세포가 여전히 존재함); 등급 3B(여포는 거의 전적으로 중심모세포로 구성됨). 여포성 림프종의 치료는 화학요법, 예를 들어 알킬화제, 뉴클레오시드

유사체, 안트라사이클린-함유 요법, 예를 들어 CHOP-시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴, 프레드니손/프레드니솔론, 항체(예를 들어, 리툭시맵), 방사선면역요법, 및 조절 줄기세포 이식을 포함한다.

[0813] CLL은 골수, 혈액, 림프절, 및 비장에서 신생물성 세포 증식 및 축적을 특징으로 하는 B세포 악성종양이다. CLL의 진단 시점의 중위 연령은 약 65세이다. 현행 치료는 화학요법, 방사선 요법, 생물학적 요법, 또는 골수 이식을 포함한다. 때때로 증상은 외과적으로(예를 들어, 비대해진 비장의 비장절제술 제거) 또는 방사선 요법(예를 들어, 부은 림프절의 용적축소)에 의해 치료된다. CLL을 치료하기 위한 화학요법제는, 예를 들어 플루다라빈, 2-클로로데옥시아데노신(클라드리빈), 클로람부실, 빈크리스틴, 펜토스타틴, 시클로포스파미드, 알렘투주맵(캄파트-1H), 독소루비신, 및 프레드니손을 포함한다. CLL을 위한 생물학적 요법은 항체, 예를 들어 알렘투주맵, 리툭시맵, 및 오파투무맵, 뿐만 아니라 티로신 키나제 억제제 요법을 포함한다. Rai 또는 Binet 시스템과 같은 여러 기준을 사용하여 CLL 병기를 분류할 수 있다. Rai 시스템은 CLL이 5개의 병기를 갖는 것으로 설명한다: 림프구증가증만이 존재하는 병기 0; 림프절병증이 존재하는 병기 I; 비장비대, 림프절병증, 또는 둘 다 존재하는 병기 II; 빈혈, 기관비대, 또는 둘 다 존재하는 병기 III(진행은 체중 감소, 피로, 발열, 대규모 기관비대, 및 급속하게 증가하는 림프구 수에 의해 정의됨); 및 빈혈, 혈소판감소증, 기관비대, 또는 이의 조합이 존재하는 병기 IV. Binet 병기결정 시스템에는 다음의 세 가지 카테고리가 있다: 림프구증가증이 존재하고, 3개 미만의 림프절이 비대된 병기 A(이 병기는 모든 Rai 병기 0 환자, Rai 병기 I 환자의 1/2, 및 Rai 병기 II 환자의 1/3을 포함함); 3개 이상의 림프절이 수반된 병기 B; 및 빈혈 또는 혈소판감소증, 또는 둘 다 존재하는 병기 C. 이러한 분류 시스템은 면역글로불린 유전자의 돌연변이 측정과 조합되어 질병 상태의 보다 정확한 특성화를 제공할 수 있다. 돌연변이된 면역글로불린 유전자의 존재는 개선된 예후와 상관관계가 있다.

[0814] 다른 구현예에서, 본 발명의 CAR-발현 세포는, 예를 들어 백혈병 줄기세포를 사용하여 암 또는 백혈병을 치료하는 데 사용된다. 예를 들어, 백혈병 줄기세포는 CD34⁺/CD38⁻ 백혈병 세포이다.

[0815] 본 발명은 특히, 암을 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 일 양태에서, 암은 B세포 급성 림프모구성 백혈병(BALL), 예를 들어 소아 BALL 및/또는 성인 BALL, T세포 급성 림프성 백혈병(TALL), 소림프구성 백혈병(SLL), 급성 림프모구성 백혈병(ALL)을 포함하는(이에 한정되지 않음) 하나 이상의 급성 백혈병; 만성 림프구성 백혈병(CLL)을 포함하는(이에 한정되지 않음) 하나 이상의 만성 백혈병; 맨틀세포 림프종(MCL), B세포 전림프구성 백혈병, 모구성 형질세포양 수지상 세포 신생물, 버킷 림프종, 확산성 거대 B세포 림프종, 여포성 림프종, 모발상 세포 백혈병, 소세포- 또는 대세포-여포성 림프종, 악성 림프증식성 병태, MALT 림프종, 변연부 림프종, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 형질모세포성 림프종, 형질세포양 수지상 세포 신생물, 및 발덴스트롬 마크로글로블린혈증을 포함하는(이에 한정되지 않음) 추가의 혈액암 또는 혈액 병태를 포함하는(이에 한정되지 않음) 혈액암이며, CD22 발현과 관련된 질환은 CD22를 발현하는 비정형 및/또는 비전형적 암, 악성종양, 전암성 병태 또는 증식성 질환, 및 이의 임의의 조합을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0816] 본 발명의 CAR 세포는 단독으로 투여되거나, 또는 희석제 및/또는 다른 성분, 예컨대 IL-2 또는 다른 사이토카인 또는 세포 집단과 조합하여 제약 조성물로서 투여될 수 있다.

[0817] 본 발명은 또한 CD22-발현 세포 집단을 감소시키거나 증식을 억제하는 방법으로서, CD22-발현 세포를 포함하는 세포의 집단을 CD22-발현 세포에 결합하는 본 발명의 CAR-발현 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일 양태에서, 본 발명은 CD22를 발현하는 암세포 집단을 감소시키거나 증식을 억제하는 방법으로서, CD22-발현 암세포 집단을 CD22-발현 세포에 결합하는 본 발명의 CAR-발현 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일 양태에서, 본 발명은 CD22를 발현하는 암세포 집단을 감소시키거나 증식을 억제하는 방법으로서, CD22-발현 암세포 집단을 CD22-발현 세포에 결합하는 본 발명의 CART와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 특정 양태에서, 본 발명의 CAR-발현 세포는 B세포 악성종양 또는 CD22-발현 세포와 관련된 또 다른 암을 갖는 대상체 또는 그에 대한 동물 모델에서 음성 대조군에 비해 세포 및/또는 암세포의 수량, 수, 양 또는 백분율을 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 65%, 적어도 75%, 적어도 85%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 감소시킨다. 일 양태에서, 대상체는 인간이다.

[0818] 본 발명은 또한 CD22-발현 세포와 관련된 질환(예를 들어, CD22를 발현하는 혈액암 또는 비정형 암)의 예방, 치료, 및/또는 관리 방법으로서, 이를 필요로 하는 대상체에게 CD22-발현 세포에 결합하는 본 발명의 CAR-발현 세포를 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일 양태에서, 대상체는 인간이다. CD22-발현 세포와 관련된 장애의 비제한적인 예는 자가면역 질환(예를 들어, 루푸스, 류마티스 관절염, 다발성 경화증 자가면역 용혈성 빈혈, 순적혈구 무형성증, 특발성 혈소판감소성 자반증, 에반스 증후군, 혈관염, 수포성 피부 장애, 제1형 당뇨병, 쇼그렌 증후군, 항-NMDA 수용체 뇌염 및 테빅 질환, 그레이브스 안병증, 및 자가면역 췌장염), 염증성 장애

(알러지 및 천식), 이식, 및 암(예컨대 CD22를 발현하는 혈액암 또는 비정형 암)을 포함한다.

- [0819] 본 발명은 또한 CD22-발현 세포와 관련된 질환의 예방, 치료, 및/또는 관리 방법으로서, 이를 필요로 하는 대상체에게 CD22-발현 세포에 결합하는 본 발명의 CAR-발현 세포를 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일 양태에서, 대상체는 인간이다.
- [0820] 본 발명은 CD22-발현 세포와 관련된 암의 재발을 예방하는 방법으로서, 이를 필요로 하는 대상체에게 CD22-발현 세포에 결합하는 본 발명의 CAR-발현 세포를 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일 양태에서, 이 방법은 CD22-발현 세포에 결합하는 본원에 기재된 CAR-발현 세포의 유효량을 다른 요법의 유효량과 조합하여 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0821] 일부 구현예에서, CD22-발현 세포는 CD19, CD123, FLT-3, ROR-1, CD79b, CD179b, CD79a, CD10, CD34, 및/또는 CD20을 발현한다. 특정 구현예에서, CD22-발현 세포는 CD19를 발현한다. 일부 구현예에서, CD22-발현 세포는 CD19를 발현하지 않는다.
- [0822] 일부 구현예에서, 대상체는 CD19 CAR 요법에 대해 무반응자이다. 일부 구현예에서, 대상체는 CD19 CAR 요법에 대해 부분 반응자이다. 일부 구현예에서, 대상체는 CD19 CAR 요법에 대해 완전 반응자이다. 일부 구현예에서, 대상체는 CD19 CAR 요법에 대해 비재발자이다. 일부 구현예에서, 대상체는 CD19 CAR 요법에 대해 부분 재발자이다. 일부 구현예에서, 대상체는 CD19 CAR 요법에 대해 완전 재발자이다.
- [0823] 일부 구현예에서, CD19 CAR-발현 세포를 사용한 치료에 대해 이전에 반응성이 있었던 암 또는 다른 병태는 CD19를 발현하지 않는다. 일부 구현예에서, CD19 CAR-발현 세포를 사용한 치료에 대해 이전에 반응성이 있었던 암 또는 다른 병태는 암 또는 다른 병태가 CD19 CAR-발현 세포를 사용한 치료에 대해 반응성이 있었던 때에 비해 10%, 20%, 30%, 40%, 50% 이상 감소된 CD19 발현 수준을 갖는다. 일부 구현예에서, CD19 CAR-발현 세포를 사용한 치료에 대해 이전에 반응성이 있었던 암 또는 다른 병태는 CD22를 발현한다.
- [0824] 일부 구현예에서, 본 발명의 CAR-발현 세포는 이전에 CD19 CAR-발현 세포로 치료받은 암 또는 다른 병태의 재발 후 투여된다.
- [0825] 다발성 골수종 치료에 사용하기 위한 CD19 CAR T세포
- [0826] 현재의 화학치료, 표적치료, 및 자가 줄기세포 이식의 요법에도 불구하고, 골수종은 난치병으로 간주된다. 한 연구(개시되지 않음)에서, 키메라 항원 수용체를 갖는 CD19에 대한 자가 T세포(렌티바이러스/CD19:4-1BB:CD3제타; "CART19" 또는 CTL019로도 알려짐)를 사용한 다발성 골수종(MM)의 치료가 설명된다. 이 예는 CD19-지정 CAR 요법이 매우 낮은(대부분의 방법으로 검출할 수 없는) 수준의 CD19를 발현하는 골수종 줄기세포 및/또는 종양세포를 표적화하는 것에 기초하여 깊은, 장기간 지속되는 관해를 확립할 가능성이 있음을 보여준다.
- [0827] 호지킨 림프종에 대한 CAR19 T세포 요법
- [0828] CAR19 T세포 요법은 호지킨 림프종(HL) 치료에도 사용될 수 있다. 호지킨 림프종은 클론 배 중심 B세포에서 유래하는 악성 호지킨 리드-스턴버그(HRS) 세포의 존재를 특징으로 한다. HL에 대한 CAR19 T세포 요법의 치료 효능을 나타내는 몇 가지 인자가 있다. HL 종양의 CD19 염색은 종양 및 종양 미세환경 내의 CD19-발현(CD19⁺) 세포를 보여준다. 연구는 CD19를 발현하는 클론 B세포 집단(CD20⁺CD27⁺ALDH⁺)이 호지킨 림프종 세포주의 생성 및 유지를 담당하고, 또한 대부분의 HL 환자의 혈액에서 순환함을 보여주었다(Jones et al., Blood, 2009, 113(23):5920-5926). 이러한 클론 B세포 집단은 또한 악성 HRS 세포의 생성을 발생시키거나 생성에 기여하는 것으로 제시되었다. 따라서, CART19 요법은 종양발생 또는 종양세포의 유지에 기여하는 이러한 B세포 집단을 고갈시킬 것이다. 또 다른 연구는 B세포 고갈이 여러 무린 모델에서 고형 종양 성장을 지연시킴을 보여주었다(Kim et al., J Immunotherapy, 2008, 31(5):446-57). HL 종양 미세환경에서의 B세포의 고갈이 일부 항종양 효과를 발생시킨다는 아이디어를 뒷받침하기 위해, 리톡산과 같은 현재 치료법이 HL에서의 종양 B세포의 표적화 및 고갈에 대해 임상 시험되고 있다(Younes et al., Blood, 2012, 119(18):4123-8). 만성 염증과 관련된 새로운 발암성 또한 B세포 의존적인 것으로 나타났다(de Visser, et al., Cancer Cell, 2005, 7(5):411-23). 이들 연구의 결과는 특히 HL 종양 미세환경에서의 B세포 집단의 표적화가 질병 진행 또는 종양 성장을 감소 또는 억제함으로써 HL을 치료하는 데 유용할 것임을 나타낸다.
- [0829] CLL 환자의 비반응자 하위세트는 면역 체크포인트 억제제 분자의 증가된 발현을 나타낸다
- [0830] 한 연구(데이터 미공개)에서, 34명의 CLL 환자의 임상 제조된 CART19 세포를 PD-1, LAG3, 및 TIM3과 같은 면역

체크포인트 억제제 분자의 발현에 대해 평가하였다. CART19에 대한 이러한 코호트의 반응은 알려져 있으므로 반응과 바이오마커 발현 패턴 간의 상관관계를 평가할 수 있다.

- [0831] 고령에서 면역노화에 대한 mTOR 억제의 효과
- [0832] 면역노화에 대한 mTOR 억제의 효능은 예를 들어 국제 출원 WO/2015/073644호의 실시예 1에 기재되어 있고, 출원의 전문은 본원에 참조로 포함된다.
- [0833] 고령 대상체에서 백신에 대한 면역 반응의 강화
- [0834] 면역 반응 강화에 대한 mTOR 억제의 효능은 예를 들어 국제 출원 WO/2015/073644호의 실시예 2에 기재되어 있고, 출원의 전문은 본원에 참조로 포함된다.
- [0835] 저용량 mTOR 억제는 에너지와 운동을 증가시킨다;
- [0836] 에너지와 운동에 대한 mTOR 억제의 효과는 예를 들어 국제 출원 WO/2015/073644호의 실시예 3에 기재되어 있고, 출원의 전문은 본원에 참조로 포함된다.
- [0837] RAD001에 의한 p70 S6 키나제 억제
- [0838] p70 S6 키나제 억제에 대한 mTOR 억제의 효과는 예를 들어 국제 출원 WO/2015/073644호의 실시예 4에 기재되어 있고, 출원의 전문은 본원에 참조로 포함된다.
- [0839] 외인성 IL-7은 CAR T세포의 기능을 강화한다.
- [0840] CAR T세포의 입양 전달 후, 일부 환자는 항종양 활성의 준최적 수준을 발생시킬 수 있는 CAR T세포의 제한된 지속을 경험한다. 이 실시예에서, 외인성 인간 IL-7의 투여 효과는 CAR T세포에 대해 초기 준최적 반응이 관찰된 마우스 이종이식 모델에서 평가된다.
- [0841] 병용요법
- [0842] 본원에 기재된 CAR-발현 세포는 다른 공지된 제제 및 요법과 조합하여 사용될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이 "조합하여" 투여된다는 것은 대상체가 장애를 앓는 동안 2가지(또는 그 이상)의 상이한 치료가 대상체에게 전달된다는 것, 예를 들어 대상체가 장애로 진단된 후 및 장애가 치유 또는 제거되거나 다른 이유로 치료가 중단되기 전에 2가지 이상의 치료가 전달된다는 것을 의미한다. 일부 구현예에서, 하나의 치료의 전달은 제2 전달이 시작될 때 여전히 일어나고 있는 중이어서, 투여 면에서 중첩이 존재한다. 본원에서 이를 "동시" 또는 "병행 전달"이라고도 한다. 일부 구현예에서, 하나의 치료의 전달은 다른 치료의 전달이 시작되기 전에 종료된다. 어느 경우의 일부 구현예에서, 치료는 병용투여로 인해 더 효과적이다. 예를 들어 제2 치료가 보다 효과적이고, 예를 들어 더 적은 제2 치료에 의해 등가의 효과가 관찰되거나, 또는 제1 치료의 부재하에 제2 치료가 투여된 경우에 관찰되는 것보다 더 큰 정도로 제2 치료가 증상을 감소시키거나, 또는 제1 치료에 의해 유사한 상황이 관찰된다. 일부 구현예에서, 전달은 증상의 감소, 또는 장애와 관련된 다른 파라미터가 다른 치료의 부재하에 전달된 하나의 치료에서 관찰되는 것보다 더 크도록 이루어진다. 상기 2가지 치료의 효과는 부분적으로 상가적이거나, 완전히 상가적이거나, 상가적인 것보다 클 수 있다. 전달은 전달된 제1 치료의 효과가 제2 치료가 전달될 때 여전히 검출가능하도록 이루어질 수 있다.
- [0843] 본원에 기재된 CAR-발현 세포 및 적어도 하나의 추가의 치료제는 동시에, 동일한 조성물로 또는 개별 조성물로, 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 순차적 투여의 경우, 본원에 기재된 CAR-발현 세포가 먼저 투여되고 추가 제제가 두 번째로 투여되거나, 투여 순서가 바뀔 수 있다.
- [0844] CAR 요법 및/또는 다른 치료제, 절차 또는 방식은 활성 장애의 기간 동안, 또는 관해 또는 더 낮은 활성 질환의 기간 동안 투여될 수 있다. CAR 요법은 장애의 다른 치료 전, 치료와 동시에, 치료 후, 또는 관해 중에 투여될 수 있다.
- [0845] 병용투여시, CAR 요법 및 추가 제제(예를 들어, 제2 또는 제3 제제), 또는 이들 전부는 개별적으로(예를 들어, 단일요법으로서) 사용되는 각 제제의 양 또는 투여량과 비교하여 많거나, 적거나 또는 동일한 양 또는 용량으로 투여될 수 있다. 특정 구현예에서, CAR 요법, 추가 제제(예를 들어, 제2 또는 제3 제제), 또는 이들 전부의 투여되는 양 또는 투여량은 개별적으로(예를 들어, 단일요법으로서) 사용되는 각 제제의 양 또는 투여량보다 적다(예를 들어, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 또는 적어도 50% 적다). 다른 구현예에서, 목적하는 효과(예를 들어, 암의 치료)를 발생시키는 CAR 요법, 추가 제제(예를 들어, 제2 또는 제3 제제), 또는 이들 전부의 양

또는 투여량은 개별적으로(예를 들어, 단일요법으로서) 사용되는 각 제제가 동일한 치료 효과를 달성하는 데 필요한 양 또는 투여량보다 적다(예를 들어, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 또는 적어도 50% 적다).

- [0846] 추가의 양태에서, 본원에 기재된 CAR-발현 세포는 수술, 사이토카인, 방사선, 또는 화학요법, 예컨대 시톡신, 플루다라빈, 히스톤 탈아세틸화효소 억제제, 탈메틸화제, 또는 켈티드 백신, 예컨대 문헌[Izumoto et al. 2008 J Neurosurg 108:963-971]에 기재된 것과 조합하여 치료 요법에 사용될 수 있다.
- [0847] 특정 예에서, 본 발명의 화합물은 다른 치료제, 예컨대 다른 항암제, 항알리지제, 항오심제(또는 항구토제), 통증 완화제, 세포보호제, 및 이의 조합과 조합된다.
- [0848] 병용요법에 사용하기 위해 고려되는 일반적인 화학요법제는 아나스트로졸(Arimidex®), 비칼루타미드(Casodex®), 블레오마이신 설페이트(Blenoxane®), 부설판(Myleran®), 부설판 주사(Busulfex®), 카페시타빈(Xeloda®), N4-벤톡시카보닐-5-데옥시-5-플루오로시티딘, 카보플라틴(Paraplatin®), 카르무스틴(BiCNU®), 클로람부실(Leukeran®), 시스플라틴(Platinol®), 클라드리빈(Leustatin®), 시클로포스파미드(Cytoxan® 또는 Neosar®), 시타라빈, 시토신 아라비노시드(Cytosar-U®), 시타라빈 리포솜 주사(DepoCyt®), 다카르바진(DTIC-Dome®), 닥티노마이신(Actinomycin D, Cosmegen), 다우노루비신 하이드로클로라이드(Cerubidine®), 다우노루비신 시트레이트 리포솜 주사(DaunoXome®), 텍사메타손, 도세탁셀(Taxotere®), 독소루비신 하이드로클로라이드(Adriamycin®, Rubex®), 에토포시드(Vepesid®), 플루다라빈 포스페이트(Fludara®), 5-플루오로우라실(Adrucil®, Efidex®), 플루타미드(Eulexin®), 테자시티빈, 겐시타빈(디플루오로데옥시시티딘), 하이드록시우레아(Hydrea®), 이다루비신(Idamycin®), 이포스파미드(IFEX®), 이리노테칸(Camptosar®), L-아스파라기나제(ELSPAR®), 류코보린 칼슘, 멜팔란(Alkeran®), 6-머캅토피린(Purinethol®), 메토크세이트(FoLex®), 미톡산트론(Novantrone®), 밀로타르그, 파클리탁셀(Taxol®), 냅-파클리탁셀(Abraxane®), 피닉스(Yttrium90/MX-DTPA), 펜토스타틴, 카르무스틴 이식편을 가진 폴리페프로산 20(Gliadel®), 타목시펜 시트레이트(Nolvadex®), 테니포시드(Vumon®), 6-티오구아닌, 티오테파, 티라파자민(Tirazone®), 주사용 토포테칸 하이드로클로라이드(Hycamptin®), 빈블라스틴(Velban®), 빈크리스틴(Oncovin®), 및 비노렐빈(Navelbine®)을 포함한다.
- [0849] 본 발명의 화합물과의 조합에 대해 특히 관심 있는 항암제는 항종양 항생제; 티로신 키나제 억제제; 알킬화제; 항미세소관제 또는 항유사분열제; 또는 종양 용해성 바이러스를 포함한다.
- [0850] 예시적인 티로신 키나제 억제제는 에를로티닙 하이드로클로라이드(Tarceva®); 리니파닙(N-[4-(3-아미노-1H-인다졸-4-일)페닐]-N'-(2-플루오로-5-메틸페닐)우레아, ABT 869로도 알려져 있고, Genentech에서 입수가능함); 수니티닙 말레이트(Sutent®); 보수티닙(4-[(2,4-디클로로-5-메톡시페닐)아미노]-6-메톡시-7-[3-(4-메틸피페라진-1-일)프로폭시]퀴놀린-3-카보니트릴, SKI-606으로도 알려져 있고, 미국 특허 6,780,996호에 기재되어 있음); 다사티닙(Sprycel®); 파조파닙(Votrient®); 소라페닙(Nexavar®); 작티마(ZD6474); 및 이마티닙 또는 이마티닙 메실레이트(Gilvec® 및 Gleevec®)를 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0851] 예시적인 알킬화제는 옥살리플라틴(Eloxatin®); 테모졸로미드(Temodar® 및 Temodal®); 닥티노마이신(악티노마이신-D로도 알려짐, Cosmegen®); 멜팔란(L-PAM, L-사르콜린, 및 페닐알라닌 머스타드로도 알려짐, Alkeran®); 알트레타민(헥사메틸멜라민(HMM)으로도 알려짐, Hexalen®); 카르무스틴(BiCNU®); 벤다무스틴(Treanda®); 부설판(Busulfex® 및 Myleran®); 카보플라틴(Paraplatin®); 로무스틴(CCNU로도 알려짐, CeeNU®); 시스플라틴(CDDP로도 알려짐, Platinol® 및 Platinol®-AQ); 클로람부실(Leukeran®); 시클로포스파미드(Cytoxan® 및 Neosar®); 다카르바진(DTIC, DIC, 및 이미다졸 카복사미드로도 알려짐, DTIC-Dome®); 알트레타민(헥사메틸멜라민(HMM)으로도 알려짐, Hexalen®); 이포스파미드(Ifex®); 프레드누무스틴; 프로카바진(Matulane®); 메클로레타민(질소 머스타드, 무스틴, 및 메클로로에타민 하이드로클로라이드로도 알려짐, Mustargen®); 스트렙토조신(Zanosar®); 티오테파(티오포스포아미드, TESPА 및 TSPA로도 알려짐, Thioplex®); 시클로포스파미드(Endoxan®, Cytoxan®, Neosar®, Procytox®, Revimmune®); 및 벤다무스틴 HCl(Treanda®)을 제한 없이 포함한다.
- [0852] 예시적인 항종양 항생제는 예를 들어 독소루비신(Adriamycin® 및 Rubex®); 블레오마이신(Blenoxane®); 다우노루비신(다우노루비신 하이드로클로라이드, 다우노마이신, 및 루비도마이신 하이드로클로라이드, Cerubidine®); 다우노루비신 리포솜(다우노루비신 시트레이트 리포솜, DaunoXome®); 미톡산트론(DHAD, Novantrone®); 에피루비신(Ellence™); 이다루비신(Idamycin®, Idamycin PFS®); 미토마이신 C (Mutamycin®); 겐다마이신; 허비마이신; 라비도마이신; 및 데스아세틸라비도마이신을 포함한다.

- [0853] 예시적인 항미세소관제 또는 항유사분열제는 빈카 알칼로이드(예컨대, 비노렐빈 타르트레이트(Navelbine®), 빈 크리стин(Oncovin®), 및 빈데신(Eldisine®)); 탁산(예컨대 파클리탁셀 및 도세탁셀); 및 에스트라무스틴(Emcy1® 또는 Estracyt®)을 제한 없이 포함한다.
- [0854] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 CAR-발현 세포는 종양용해 바이러스와 조합하여 투여된다. 구현예에서, 종양용해 바이러스는 암세포에서 선택적으로 복제할 수 있고, 암세포의 사멸을 유발하거나 성장을 늦출 수 있다. 일부 경우에, 종양용해 바이러스는 비암세포에 대해서는 전혀 효과를 갖지 않거나 최소 효과를 갖는다. 종양용해 바이러스는 종양용해 아데노바이러스, 종양용해 단순 포진 바이러스, 종양용해 레트로바이러스, 종양용해 파르보 바이러스, 종양용해 백시니아 바이러스, 종양용해 신드비스 바이러스, 종양용해 인플루엔자 바이러스, 또는 종양용해 RNA 바이러스(예를 들어, 종양용해 레오바이러스, 종양용해 뉴캐슬병 바이러스(NDV), 종양용해 홍역 바이러스, 또는 종양용해 수포성 구내염 바이러스(VSV))를 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0855] 일부 구현예에서, 종양용해 바이러스는 본원에 전문이 참조로 포함되는 US2010/0178684 A1에 기재된 바이러스, 예를 들어 재조합 종양용해 바이러스이다. 일부 구현예에서, 재조합 종양용해 바이러스는, 예를 들어 본원에 전문이 참조로 포함되는 US2010/0178684 A1에 기재된 바와 같은, 면역 또는 염증 반응의 억제제를 암호화하는 핵산 서열(예를 들어, 이중 핵산 서열)을 포함한다. 구현예에서, 재조합 종양용해 바이러스, 예를 들어 종양용해 NDV는 아포토시스촉진 단백질(예를 들어, 아포틴), 사이토카인(예를 들어, GM-CSF, 인터페론-감마, 인터류킨-2(IL-2), 종양 괴사 인자-알파), 면역글로불린(예를 들어, ED-B 피브로넥틴에 대한 항체), 종양 관련 항원, 이 중특이적 어댑터 단백질(예를 들어, NDV HN 단백질 및 CD3 또는 CD28과 같은 T세포 공동자극 수용체에 대한 이 중특이적 항체 또는 항체 단편; 또는 인간 IL-2와 NDV HN 단백질에 대한 단쇄 항체 간의 융합 단백질)을 포함한다. 예를 들어, 본원에 전문이 참조로 포함되는 문헌[Zamarin et al. Future Microbiol. 7.3(2012):347-67] 참조. 일부 구현예에서, 종양용해 바이러스는 US 8591881 B2, US 2012/0122185 A1, 또는 US 2014/0271677 A1에 기재된 키메라 종양용해 NDV이며, 각각의 전문은 본원에 참조로 포함된다.
- [0856] 일부 구현예에서, 종양용해 바이러스는 암세포에서만 복제하도록 설계된 조건부 복제 아데노바이러스(CRAd)를 포함한다. 예를 들어, 문헌[Alemanly et al. Nature Biotechnol. 18(2000):723-27] 참조. 일부 구현예에서, 종양용해 아데노바이러스는 본원에 전문이 참조로 포함되는 문헌[Alemanly et al.]의 페이지 725의 표 1에 기재된 것을 포함한다.
- [0857] 예시적인 종양용해 바이러스는 다음을 포함하나 이에 한정되지 않는다:
- [0858] 그룹 B 종양용해 아데노바이러스(ColoAd1)(PsiOxus Therapeutics Ltd.)(예를 들어, 임상 시험 식별자: NCT02053220 참조);
- [0859] 파립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF)를 포함하는 아데노바이러스인 ONCOS-102(이전 명칭 CGTG-102)(Oncos Therapeutics)(예를 들어, 임상 시험 식별자: NCT01598129 참조);
- [0860] 인간 PH20 히알루로니다제를 암호화하는 유전자 변형 종양용해 인간 아데노바이러스인 VCN-01(VCN Biosciences, S.L.)(예를 들어, 임상 시험 식별자: NCT02045602 및 NCT02045589 참조);
- [0861] 망막모세포종/E2F 경로 조절능력이 상실된 암세포에서 선택적으로 복제하도록 변형된 야생형 인간 아데노바이러스 항원형 5(Had5)에서 유래된 바이러스인 조건부 복제성 아데노바이러스 ICOVIR-5(Institut Catala d'Oncologia)(예를 들어, 임상 시험 식별자: NCT01864759 참조);
- [0862] 종양용해 아데노바이러스 ICOVIR5에 감염된 골수유래 자가 간엽 줄기세포(MSC)를 포함하는 Celyvir(Hospital Infantil Universitario Nino Jesus, Madrid, Spain/ Ramon Alemany)(예를 들어, 임상 시험 식별자: NCT01844661 참조);
- [0863] 인간 E2F-1 프로모터가 필수 E1a 바이러스 유전자의 발현을 유도함으로써 Rb 경로-결손 종양세포에 대한 바이러스 복제 및 세포독성을 제한하는 조건부 복제성 종양용해 혈청형 5 아데노바이러스(Ad5)인 CG0070(Cold Genesys, Inc.)(예를 들어, 임상 시험 식별자: NCT02143804 참조); 또는
- [0864] 망막모세포종(Rb)-경로 결핍 세포에서 선택적으로 복제하도록 조작되고 특정 RGD-결합 인테그린을 보다 효율적으로 발현하는 세포를 감염시키도록 조작된 아데노바이러스인 DNX-2401(이전 명칭 델타-24-RGD)(Clinica Universidad de Navarra, Universidad de Navarra/ DNATRIX, Inc.)(예를 들어, 임상 시험 식별자: NCT01956734 참조).
- [0865] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 종양용해 바이러스는 주사, 예를 들어 피하, 동맥내, 정맥내, 근육내, 척수강

내, 또는 복강내 주사에 의해 투여된다. 구현예에서, 본원에 기재된 종양용해 바이러스는 종양내, 경피, 경점막, 경구, 비강내, 또는 폐 투여를 통해 투여된다.

- [0866] 일 구현예에서, 본원에 기재된 CAR-발현 세포는 G1TR을 표적화하고/하거나 G1TR 기능을 조절하는 분자, 예컨대 G1TR 작용제 및/또는 조절 T세포(Treg)를 고갈시키는 G1TR 항체와 조합하여 대상체에게 투여된다. 일 구현예에서, G1TR 결합 분자 및/또는 G1TR 기능을 조절하는 분자(예를 들어, G1TR 작용제 및/또는 Treg-고갈 G1TR 항체)는 CAR-발현 세포 이전에 투여된다. 예를 들어 일 구현예에서, G1TR 작용제는 세포 성분채집 전에 투여될 수 있다. 일 구현예에서, 대상체는 CLL을 갖는다. 예시적인 G1TR 작용제는 예를 들어 G1TR 융합 단백질 및 항-G1TR 항체(예를 들어, 2가 항-G1TR 항체), 예컨대 미국 특허 6,111,090호, 유럽 특허 090505B1호, 미국 특허 8,586,023호, PCT 공개 WO 2010/003118호 및 2011/090754호에 기재된 G1TR 융합 단백질, 또는 예를 들어 미국 특허 7,025,962호, 유럽 특허 1947183B1호, 미국 특허 7,812,135호, 미국 특허 8,388,967호, 미국 특허 8,591,886호, 유럽 특허 EP 1866339호, PCT 공개 WO 2011/028683호, PCT 공개 WO 2013/039954호, PCT 공개 WO2005/007190호, PCT 공개 WO 2007/133822호, PCT 공개 WO2005/055808호, PCT 공개 WO 99/40196호, PCT 공개 WO 2001/03720호, PCT 공개 WO99/20758호, PCT 공개 WO2006/083289호, PCT 공개 WO 2005/115451호, 미국 특허 7,618,632호, 및 PCT 공개 WO 2011/051726호에 기재된 항-G1TR 항체를 포함한다.
- [0867] 일 구현예에서, 본원에 기재된 CAR-발현 세포는 mTOR 억제제, 예를 들어 본원에 기재된 mTOR 억제제, 예를 들어 에버롤리무스와 같은 라파로그와 조합하여 대상체에게 투여된다. 일 구현예에서, mTOR 억제제는 CAR-발현 세포 이전에 투여된다. 예를 들어 일 구현예에서, mTOR 억제제는 세포 성분채집 전에 투여될 수 있다.
- [0868] 일 구현예에서, 본원에 기재된 CAR-발현 세포는 G1TR 작용제, 예를 들어 본원에 기재된 G1TR 작용제와 조합하여 대상체에게 투여된다. 일 구현예에서, G1TR 작용제는 CAR-발현 세포 이전에 투여된다. 예를 들어 일 구현예에서, G1TR 작용제는 세포 성분채집 전에 투여될 수 있다.
- [0869] 일 구현예에서, 본원에 기재된 CAR-발현 세포는 단백질 티로신 포스파타제 억제제, 예를 들어 본원에 기재된 단백질 티로신 포스파타제 억제제와 조합하여 대상체에게 투여된다. 일 구현예에서, 단백질 티로신 포스파타제 억제제는 SHP-1 억제제, 예를 들어 본원에 기재된 SHP-1 억제제, 예컨대 스티보글루루산나트륨이다. 일 구현예에서, 단백질 티로신 포스파타제 억제제는 SHP-2 억제제이다.
- [0870] 일 구현예에서, 본원에 기재된 CAR-발현 세포는 키나제 억제제와 조합하여 사용될 수 있다.
- [0871] 일 구현예에서, 이러한 접근법은 대상체에서 본원에 기재된 CAR 세포의 성능을 최적화하는 데 사용될 수 있다. 이론에 구애됨이 없이, 일 구현예에서, 내인성 비변형 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T세포 또는 NK세포의 성능이 개선되는 것으로 여겨진다. 이론에 구애됨이 없이, 일 구현예에서, CAR-발현 세포의 성능이 개선되는 것으로 여겨진다. 일부 구현예에서, CAR을 발현하도록 조작되었거나 조작될 세포, 예를 들어 T세포 또는 NK세포는, PD1 음성 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T세포/NK세포의 수를 증가시키거나, PD1 음성 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T세포/NK세포/ PD1 양성 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T세포 또는 NK세포의 비를 증가시키는 양의 mTOR 억제제와 접촉시켜 생체의 처리될 수 있다.
- [0872] 일 구현예에서, 낮은, 면역 강화 용량의 mTOR 억제제, 예를 들어 알로스테릭 억제제, 예를 들어 RAD001, 또는 촉매 억제제의 투여는 본원에 기재된 CAR-발현 세포, 예를 들어 T세포 또는 NK세포의 투여 전에 개시된다. 일 구현예에서, CAR 세포는, 예컨대 PD1 음성 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T세포/NK세포의 수준, 또는 PD1 음성 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T세포/NK세포/ PD1 양성 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T세포 또는 NK세포의 비가 적어도 일시적으로 증가된, 충분한 시간 후, 또는 mTOR 억제제의 충분한 투약 후에 투여된다.
- [0873] 일 구현예에서, CAR를 발현하도록 조작될 세포, 예를 들어 T세포 또는 NK세포는, 예컨대 대상체 내의, 또는 대상체로부터 채취된, PD1 음성 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T세포 또는 NK세포의 수준, 또는 PD1 음성 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T세포/NK세포/ PD1 양성 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T세포 또는 NK세포의 비가 적어도 일시적으로 증가된, 충분한 시간 후, 또는 낮은, 면역 강화 용량의 mTOR 억제제의 충분한 투약 후에 채취된다.
- [0874] 일부 구현예에서, mTOR 억제제는 대상체의 말초혈액에서, 또는 대상체로부터 단리된 T세포의 체제에서 PD-1 양성 T세포의 비를 감소시키거나, PD-1 음성 T세포의 비를 증가시키거나, 또는 PD-1 음성 T세포/PD-1 양성 T세포의 비를 증가시키기에 충분한 시간 동안 투여된다.
- [0875] 일부 구현예에서, mTOR 억제제의 용량은 예를 들어 p70 S6K 억제에 의해 측정시, 5% 이상 내지 90% 이하의 mTOR 억제제와 관련된다. 일부 구현예에서, mTOR 억제제의 용량은 예를 들어 p70 S6K 억제에 의해 측정시, 10% 이상

내지 40% 이하의 mTOR 억제와 관련된다.

[0876] 일 구현예에서, 키나제 억제제는 CDK4 억제제, 예를 들어 본원에 기재된 CDK4 억제제, 예를 들어 CD4/6 억제제, 예컨대 6-아세틸-8-시클로펜틸-5-메틸-2-(5-피페라진-1-일-피리딘-2-일아미노)-8H-피리도[2,3-d]피리미딘-7-온, 하이드로클로라이드(팔보시클립 또는 PD0332991이라고도 함)이다. 일 구현예에서, 키나제 억제제는 BTK 억제제, 예를 들어 본원에 기재된 BTK 억제제, 예컨대 이브루티닙이다. 일 구현예에서, 키나제 억제제는 mTOR 억제제, 예를 들어 본원에 기재된 mTOR 억제제, 예컨대 라파마이신, 라파마이신 유사체, OSI-027이다. mTOR 억제제는 예를 들어 mTORC1 억제제 및/또는 mTORC2 억제제, 예를 들어 본원에 기재된 mTORC1 억제제 및/또는 mTORC2 억제제 일 수 있다. 일 구현예에서, 키나제 억제제는 MNK 억제제, 예를 들어 본원에 기재된 MNK 억제제, 예컨대 4-아미노-5-(4-플루오로아닐리노)-피라졸로[3,4-d] 피리미딘이다. MNK 억제제는 예를 들어 MNK1a, MNK1b, MNK2a 및/또는 MNK2b 억제제일 수 있다. 일 구현예에서, 키나제 억제제는 DGK 억제제, 예를 들어 본원에 기재된 DGK 억제제, 예컨대 DGKinh1(D5919) 또는 DGKinh2(D5794)이다. 일 구현예에서, 키나제 억제제는 알로이신 A; 플라보피리돌 또는 HMR-1275, 2-(2-클로로페닐)-5,7-디하이드록시-8-[(3S,4R)-3-하이드록시-1-메틸-4-피페리디닐]-4-크로메논; 크리조티닙(PF-02341066; 2-(2-클로로페닐)-5,7-디하이드록시-8-[(2R,3S)-2-(하이드록시메틸)-1-메틸-3-피롤리디닐]-4H-1-벤조피란-4-온, 하이드로클로라이드(P276-00); 1-메틸-5-[[2-[5-(트리플루오로메틸)-1H-이미다졸-2-일]-4-피리디닐]옥시]-N-[4-(트리플루오로메틸)페닐]-1H-벤즈이미다졸-2-아민(RAF265); 인디솔람(E7070); 로스코비틴(CYC202); 팔보시클립(PD0332991); 디나시클립(SCH727965); N-[5-[[5-tert-부틸옥사졸-2-일)메틸]티오]티아졸-2-일]피페리딘-4-카복사미드(BMS 387032); 4-[[9-클로로-7-(2,6-디플루오로페닐)-5H-피리미도[5,4-d][2]벤즈아제핀-2-일]아미노]-벤조산(MLN8054); 5-[3-(4,6-디플루오로-1H-벤즈이미다졸-2-일)-1H-인다졸-5-일]-N-에틸-4-메틸-3-피리딘메탄아민(AG-024322); 4-(2,6-디클로로벤조일아미노)-1H-피라졸-3-카복실산 N-(피페리딘-4-일)아미드(AT7519); 4-[2-메틸-1-(1-메틸에틸)-1H-이미다졸-5-일]-N-[4-(메틸설포닐)페닐]-2-피리미딘아민(AZD5438); 및 XL281(BMS908662)로부터 선택된 CDK4 억제제이다.

[0877] 일 구현예에서, 키나제 억제제는 CDK4 억제제, 예를 들어 팔보시클립(PD0332991)이고, 팔보시클립은 일정 기간 동안 매일, 예를 들어 28일 사이클의 14-21일 동안 매일 또는 21일 사이클의 7-12일 동안 매일 약 50 mg, 60 mg, 70 mg, 75 mg, 80 mg, 90 mg, 100 mg, 105 mg, 110 mg, 115 mg, 120 mg, 125 mg, 130 mg, 135 mg(예를 들어, 75 mg, 100 mg, 또는 125 mg)의 용량으로 투여된다. 일 구현예에서, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12회 이상 사이클의 팔보시클립이 투여된다.

[0878] 일 구현예에서, 키나제 억제제는 이브루티닙(PCI-32765); GDC-0834; RN-486; CGI-560; CGI-1764; HM-71224; CC-292; ONO-4059; CNX-774; 및 LFM-A13으로부터 선택된 BTK 억제제이다.

[0879] 일 구현예에서, 키나제 억제제는 BTK 억제제, 예를 들어 이브루티닙(PCI-32765)이고, 이브루티닙은 일정 기간 동안 매일, 예를 들어 21일 사이클 동안 매일, 또는 28일 사이클 동안 매일 약 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 420 mg, 440 mg, 460 mg, 480 mg, 500 mg, 520 mg, 540 mg, 560 mg, 580 mg, 600 mg(예를 들어, 250 mg, 420 mg, 또는 560 mg)의 용량으로 투여된다. 일 구현예에서, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12회 이상 사이클의 이브루티닙이 투여된다.

[0880] 일 구현예에서, 키나제 억제제는 템시롤리무스; 리다포롤리무스 (1R,2R,4S)-4-[(2R)-2[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-디하이드록시-19,30-디메톡시-15,17,21,23,29,35-헥사메틸-2,3,10,14,20-펜타옥소-11,36-디옥사-4-아자트리시클로[30.3.1.0^{4,9}]헥사트리아코타-16,24,26,28-테트라엔-12-일]프로필]-2-메톡시시클로헥실 디메틸포스포네이트, AP23573 및 MK8669로도 알려짐; 에버롤리무스(RAD001); 라파마이신(AY22989); 세마피모드; (5-{2,4-비스[(3S)-3-메틸모르폴린-4-일]피리도[2,3-d]피리미딘-7-일}-2-메톡시페닐)메탄올(AZD8055); 2-미노-8-[트랜스-4-(2-하이드록시에톡시)시클로헥실]-6-(6-메톡시-3-피리디닐)-4-메틸-피리도[2,3-d]피리미딘-7(8H)-온(PF04691502); 및 N²-[1,4-디옥소-4-[[4-(4-옥소-8-페닐-4H-1-벤조피란-2-일)모르폴리늄-4-일]메톡시]부틸]-L-아르기닐글리실-L-α-아스파틸-L-세린-, 내부 염(SF1126); 및 XL765로부터 선택된 mTOR 억제제이다.

[0881] 일 구현예에서, 키나제 억제제는 mTOR 억제제, 예를 들어 라파마이신이고, 라파마이신은 일정 기간 동안 매일, 예를 들어 21일 사이클 동안 매일, 또는 28일 사이클 동안 매일 약 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, 10 mg(예를 들어, 6 mg)의 용량으로 투여된다. 일 구현예에서, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12회 이상 사이클의 라파마이신이 투여된다. 일 구현예에서, 키나제 억제제는 mTOR 억제제, 예를 들어 에버롤리무스이고, 에버롤리무스는 일정 기간 동안 매일, 예를 들어 28일 사이클 동안 매일 약 2 mg, 2.5 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, 10 mg, 11 mg, 12 mg, 13 mg, 14 mg, 15 mg(예를 들어, 10 mg)의 용량으로 투여

된다. 일 구현예에서, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12회 이상 사이클의 에버롤리무스가 투여된다.

- [0882] 일 구현예에서, 키나제 억제제는 CGP052088; 4-아미노-3-(p-플루오로페닐아미노)-피라졸로[3,4-d] 피리미딘 (CGP57380); 세르코스포라미드; ETC-1780445-2; 및 4-아미노-5-(4-플루오로아닐리노)-피라졸로[3,4-d] 피리미딘으로부터 선택된 MNK 억제제이다.
- [0883] 칼슘 의존성 포스포타제 칼시뉴린을 억제하거나(시클로스포린 및 FK506) 또는 성장 인자 유도 신호전달에 중요한 p70S6 키나제를 억제하는(라파마이신) 약물(Liu *et al.*, Cell 66:807-815, 1991; Henderson *et al.*, Immun. 73:316-321, 1991; Bierer *et al.*, Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993)이 또한 사용될 수 있다. 추가의 양태에서, 본 발명의 세포 조성물은 골수 이식, 플루다라빈과 같은 화학요법제를 사용하는 T세포 제거 요법, 외부방사선 요법(XRT), 시클로포스포미드, 및/또는 OKT3 또는 CAMPATH와 같은 항체와 함께(예를 들어 이전에, 동시에 또는 이후에) 환자에게 투여될 수 있다. 일 양태에서, 본 발명의 세포 조성물은 CD20과 반응하는 체제(예를 들어, 리툭산)와 같은 B세포 제거 요법 후에 투여된다. 예를 들어 일 구현예에서, 대상체는 고용량 화학요법에 이은 말초혈액 줄기세포 이식을 이용한 표준 치료를 받을 수 있다. 특정 구현예에서, 이식 후에, 대상체는 본 발명의 증식된 면역 세포의 주입을 받는다. 추가 구현예에서, 증식된 세포는 수술 전 또는 수술 후에 투여된다.
- [0884] 일부 환자는 투여 중에 또는 투여 후에 본 발명의 화합물 및/또는 다른 항암제(들)에 대해 알리지 반응을 경험할 수 있으므로, 알리지 반응 위험을 최소화하기 위해 항알리지제가 종종 투여된다. 적합한 항알리지제는 코르티코스테로이드, 예컨대 덱사메타손(예를 들어, Decadron®), 베클로메타손(예를 들어, Beclovent®), 하이드로코르티손(코르티손, 하이드로코르티손 소듐 숙시네이트, 하이드로코르티손 소듐 포스페이트로도 알려져 있고, 상표명 Ala-Cort®, 하이드로코르티손 포스페이트, Solu-Cortef®, Hydrocort Acetate®, 및 Lanacort®로 판매됨), 프레드니솔론(상표명 Delta-Cortel®, Orapred®, Pediapred®, 및 Prelone®으로 판매됨), 프레드니손(상표명 Deltasone®, Liquid Red®, Meticorten®, 및 Orasone®으로 판매됨), 메틸프레드니솔론(6-메틸프레드니솔론, 메틸프레드니솔론 아세테이트, 메틸프레드니솔론 소듐 숙시네이트로도 알려져 있고, 상표명 Duralone®, Medralone®, Medrol®, M-Prednisol®, 및 Solu-Medrol®로 판매됨); 항히스타민제, 예컨대 디펜히드라민(예를 들어, Benadryl®), 하이드록시진, 및 시프로헵타딘; 및 기관지확장제, 예컨대 베타-아드레날린성 수용체 작용제, 알부테롤(예를 들어, Proventil®), 및 터부탈린(Brethine®)을 포함한다.
- [0885] 일부 환자는 본 발명의 화합물 및/또는 다른 항암제(들)의 투여 중 및 투여 후에 오심을 경험할 수 있으므로, 항구토제가 오심(상부 위) 및 구토를 방지하는 데 사용된다. 적합한 항구토제는 아프레피탄트(Emend®), 온단세트론(Zofran®), 그라니세트론 HCl(Kytril®), 로라제팜(Ativan®), 덱사메타손(Decadron®), 프로클로르페라진(Compazine®), 카소피탄트(Rezonic® 및 Zunrisa®), 및 이의 조합을 포함한다.
- [0886] 치료 기간 중에 경험하는 통증을 완화시키는 의약이 환자를 더 편안하게 하기 위해 종종 처방된다. Tylenol®과 같은 통상의 일반의약품 진통제가 흔히 사용된다. 그러나, 하이드로코돈/파라세타몰 또는 하이드로코돈/아세트아미노펜(예를 들어, Vicodin®), 모르핀(예를 들어, Astramorph® 또는 Avinza®), 옥시코돈(예를 들어, OxyContin® 또는 Percocet®), 옥시모르폰 염산염(Opana®), 및 펜타닐(예를 들어, Duragesic®)과 같은 오피오이드 진통제도 중등도 또는 중증 통증에 유용하다.
- [0887] 정상 세포를 치료 독성으로부터 보호하고 기관 독성을 제한하기 위한 노력의 일환으로, 세포보호제(예컨대 신경보호제, 자유라디칼 제거제, 심장보호제, 안트라사이클린 혈관외유출 중화제, 영양소 등)가 보조 요법으로서 사용될 수 있다. 적합한 세포보호제는 아미포스틴(Ethyol®), 글루타민, 디메스나(Tavocept®), 메스나(Mesnex®), 텍스라죽산(Zinecard® 또는 Totect®), 잘리프로텐(XapriLa®), 및 류코보린(칼슘 류코보린, 시트로보름 인자, 및 폴린산으로도 알려져 있음)을 포함한다.
- [0888] 코드 번호, 일반명 또는 상품명에 의해 식별되는 활성 화합물의 구조는 표준 일람["The Merck Index"]의 현행판 또는 데이터베이스, 예를 들어 Patents International(예를 들어, IMS World Publications)로부터 입수할 수 있다.
- [0889] 본 발명의 화합물과 조합하여 사용될 수 있는 상기 화합물들은 상기 인용된 문헌에서와 같이 해당 분야에 기재된 바와 같이 제조 및 투여될 수 있다.
- [0890] 일 구현예에서, 본 발명은 단독으로 또는 다른 항암제와 함께 인간 또는 동물 대상체에게 투여하는 데 적합한 제약상 허용되는 담체와 함께 본 발명의 적어도 하나의 화합물(예를 들어, 본 발명의 화합물) 또는 이의 제약상 허용되는 염을 포함하는 제약 조성물을 제공한다.
- [0891] 일 구현예에서, 본 발명은 암과 같은 세포 증식성 질환을 앓고 있는 인간 또는 동물 대상체를 치료하는 방법을

제공한다. 본 발명은 이러한 치료를 필요로 하는 인간 또는 동물 대상체를 치료하는 방법으로서, 치료 유효량의 본 발명의 화합물(예를 들어, 본 발명의 화합물) 또는 이의 제약상 허용되는 염을 단독으로 또는 다른 항암제와 조합하여 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

- [0892] 특히, 조성물은 조합 치료제로서 함께 제형화되거나 또는 개별적으로 투여될 것이다.
- [0893] 병용요법에서, 본 발명의 화합물 및 다른 항암제(들)는 동시에, 병행적으로, 또는 특정 시간 제한 없이 순차적으로 투여될 수 있으며, 이러한 투여는 환자의 체내에서 2가지 화합물의 치료 유효 수준을 제공한다.
- [0894] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 화합물 및 다른 항암제(들)는 일반적으로 주입에 의해 또는 경구로 임의의 순서로 순차적으로 투여된다. 투약 요법은 질환의 병기, 환자의 신체 적성, 개별 약물의 안전성 프로파일, 및 개별 약물의 내약성, 뿐만 아니라 조합물을 투여하는 주치의 및 개업의(들)에게 잘 알려진 다른 기준에 따라 달라질 수 있다. 본 발명의 화합물 및 다른 항암제(들)는 치료에 사용되는 특정한 사이클에 따라 서로 수 분, 수 시간, 수일, 또는 심지어 수주 내로 간격을 두고 투여될 수 있다. 또한, 사이클은 치료 사이클 동안 하나의 약물을 다른 것보다 더 자주 투여하는 것 및 약물의 투여당 상이한 용량으로 투여하는 것을 포함할 수 있다.
- [0895] 본 발명의 다른 양태에서, 본 발명의 하나 이상의 화합물 및 본원에 개시된 바와 같은 조합 파트너를 포함하는 키트가 제공된다. 대표적인 키트는 (a) 본 발명의 화합물 또는 이의 제약상 허용되는 염, (b) 예를 들어 상기 나타낸 바와 같은 적어도 하나의 조합 파트너를 포함하며, 이러한 키트는 투여 지침서를 포함한 패키지 인서트 또는 다른 라벨링을 포함할 수 있다.
- [0896] 본 발명의 화합물은 또한 공지된 치료 방법, 예를 들어 호르몬의 투여 또는 특히 방사선과 조합하여 유리하게 사용될 수 있다. 본 발명의 화합물은 특히 방사선요법에 대한 민감도가 낮은 종양의 치료를 위한 방사선증감제로서 특별히 사용될 수 있다.
- [0897] 일 구현예에서, 대상체는 CAR-발현 세포의 투여와 관련된 부작용을 감소 또는 개선시키는 제제를 투여받을 수 있다. CAR-발현 세포의 투여와 관련된 부작용은 CRS, 및 대식세포 활성화 증후군(MAS)이라고도 하는 혈구포식성 림프조직구증식증(HLH)을 포함하나 이에 한정되지 않는다. CRS의 증상은 고열, 오심, 일시적 저혈압, 저산소증 등을 포함한다. CRS는 열, 피로, 식욕부진, 근육통, 관절통, 오심, 구토, 및 두통과 같은 임상적 체질 징후 및 증상을 포함할 수 있다. CRS는 발진과 같은 임상적 피부 징후 및 증상을 포함할 수 있다. CRS는 오심, 구토, 및 설사와 같은 임상적 위장 징후 및 증상을 포함할 수 있다. CRS는 빈호흡 및 저산소증과 같은 임상적 호흡 징후 및 증상을 포함할 수 있다. CRS는 빈맥, 확장된 맥압, 저혈압, 심박출량 증가(조기) 및 잠재적으로 감소된 심박출량(후기)과 같은 임상적 심혈관 징후 및 증상을 포함할 수 있다. CRS는 상승된 d-이량체, 출혈이 있거나 없는 저섬유소원혈증과 같은 임상적 응고 징후 및 증상을 포함할 수 있다. CRS는 질소혈증과 같은 임상적 신장 징후 및 증상을 포함할 수 있다. CRS는 아미노전이염 및 고빌리루빈혈증과 같은 임상적 간 징후 및 증상을 포함할 수 있다. CRS는 두통, 정신상태 변화, 혼동, 섬망, 단어찾기 장애 또는 프랭크 실어증, 환각, 진전, 거리조절이상, 보행이상, 및 발작과 같은 임상적 신경 징후 및 증상을 포함할 수 있다. 따라서, 본원에 기재된 방법은 본원에 기재된 CAR-발현 세포를 대상체에게 투여하는 단계 및 CAR-발현 세포를 사용한 치료로 인한 가용성 인자의 상승된 수준을 관리하기 위해 하나 이상의 제제를 추가로 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 대상체에서 상승되는 가용성 인자는 IFN- γ , TNF α , IL-2, 및 IL-6 중 하나 이상이다. 일 구현예에서, 대상체에서 상승되는 인자는 IL-1, GM-CSF, IL-10, IL-8, IL-5, 및 프랙트알킨 중 하나 이상이다. 따라서, 이러한 부작용을 치료하기 위해 투여되는 제제는 이러한 가용성 인자 중 하나 이상을 중화시키는 제제일 수 있다. 일 구현예에서, 이러한 가용성 형태 중 하나 이상을 중화시키는 제제는 항체 또는 이의 항원결합 단편이다. 이러한 제제의 예는 스테로이드(예를 들어, 코르티코스테로이드), TNF α 의 억제제, 및 IL-6의 억제제를 포함하나 이에 한정되지 않는다. TNF α 억제제의 예는 인플릭시맙, 아달리무맙, 세르톨리주맙 폐골, 및 골리무맙과 같은 항-TNF α 항체 분자이다. TNF α 억제제의 다른 예는 에타너셉트와 같은 융합 단백질이다. TNF α 의 소분자 억제제는 잔틴 유도체(예를 들어, 펜톡시필린) 및 부프로피온을 포함하나 이에 한정되지 않는다. IL-6 억제제의 예는 토실리주맙(toc), 사릴리주맙, 엘실리모맙, CNTO 328, ALD518/BMS-945429, CNTO 136, CPSI-2364, CDP6038, VX30, ARGX-109, FE301, 및 FM101과 같은 항-IL-6 항체 분자이다. 일 구현예에서, 항-IL-6 항체 분자는 토실리주맙이다. IL-1R 기반 억제제의 예는 아나킨라이드.
- [0898] 일부 구현예에서, 대상체는 특히 예를 들어 메틸프레드니솔론, 하이드로코르티손과 같은 코르티코스테로이드를 투여받는다.
- [0899] 일부 구현예에서, 대상체는 예를 들어 노르에피네프린, 도파민, 페닐레프린, 에피네프린, 바소프레신, 또는 이

의 조합과 같은 혈관수축제를 투여받는다.

[0900] 일 구현예에서, 대상체는 해열제를 투여받을 수 있다. 일 구현예에서, 대상체는 진통제를 투여받을 수 있다.

[0901] 일 구현예에서, 대상체는 CAR-발현 세포의 활성을 강화하는 제제를 투여받을 수 있다. 예를 들어 일 구현예에서, 제제는 억제성 분자를 억제하는 제제일 수 있다. 억제성 분자, 예를 들어 예정사 1(PD1)은 일부 구현예에서 면역 이펙터 반응을 일으키는 CAR-발현 세포의 능력을 감소시킬 수 있다. 억제성 분자의 예는 PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM(예를 들어, CEACAM-1, CEACAM-3, 및/또는 CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, 및 TGF 베타를 포함한다. 예를 들어 DNA, RNA 또는 단백질 수준에서의 억제에 의한 억제성 분자의 억제는 CAR-발현 세포 성능을 최적화할 수 있다. 구현예에서, 억제성 핵산, 예를 들어 억제성 핵산, 예를 들어 dsRNA, 예를 들어 siRNA 또는 shRNA, 또는 클러스터링된 규칙적 간격의 짧은 회문식 반복부(CRISPR), 전사-활성자 유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN), 또는 징크 핑거 엔도뉴클레아제(ZFN)가 CAR-발현 세포에서 억제성 분자의 발현을 억제하기 위해 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 억제제는 shRNA이다. 일 구현예에서, 억제성 분자는 CAR-발현 세포 내에서 억제된다. 이들 구현예에서, 억제성 분자의 발현을 억제하는 dsRNA 분자는 CAR의 구성요소, 예를 들어 모든 구성요소를 암호화하는 핵산에 연결된다. 일 구현예에서, 억제 신호의 억제제는 예를 들어 억제성 분자에 결합하는 항체 또는 항체 단편일 수 있다. 예를 들어, 제제는 PD1, PD-L1, PD-L2, 또는 CTLA4에 결합하는 항체 또는 항체 단편일 수 있다(예를 들어, 이필리무맙(MDX-010 및 MDX-101이라고도 하며, Yervoy®로 판매됨; Bristol-Myers Squibb); 트레멜리무맙(Pfizer에서 입수가 가능한 IgG2 단클론 항체, 이전에 티실리무맙, CP-675,206으로 알려짐)). 일 구현예에서, 제제는 TIM3에 결합하는 항체 또는 항체 단편이다. 일 구현예에서, 제제는 LAG3에 결합하는 항체 또는 항체 단편이다. 일 구현예에서, 제제는 CEACAM(예를 들어, CEACAM-1, CEACAM-3, 및/또는 CEACAM-5)에 결합하는 항체 또는 항체 단편이다.

[0902] PD-1은 CD28, CTLA-4, ICOS, 및 BTLA를 또한 포함하는 CD28 수용체 패밀리의 억제성 구성원이다. PD1은 활성화된 B세포, T세포, 및 골수 세포에서 발현된다(Agata et al. 1996 Int. Immunol 8:765-75). PD1에 대한 2개의 리간드, PD-L1 및 PD-L2는 PD1에 대한 결합시 T세포 활성화를 하향조절하는 것으로 나타났다(Freeman et al. 2000 J Exp Med 192:1027-34; Latchman et al. 2001 Nat Immunol 2:261-8; Carter et al. 2002 Eur J Immunol 32:634-43). PD-L1은 인간 암에 풍부하다(Dong et al. 2003 J Mol Med 81:281-7; Blank et al. 2005 Cancer Immunol. Immunother 54:307-314; Konishi et al. 2004 Clin Cancer Res 10:5094). 면역 억제는 PD1과 PD-L1의 국소 상호작용을 억제함으로써 역전될 수 있다. PD1, PD-L1, 및 PD-L2의 항체, 항체 단편, 및 기타 억제제는 당업계에서 입수가 가능하고, 본원에 기재된 CAR과 조합하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 니볼루맙(BMS-936558 또는 MDX1106이라고도 함; Bristol-Myers Squibb)은 PD1을 특이적으로 차단하는 완전 인간 IgG4 단클론 항체이다. 니볼루맙(클론 5C4), 및 PD1에 특이적으로 결합하는 기타 인간 단클론 항체는 US 8,008,449 및 WO2006/121168에 개시되어 있다. 피달리주맙(CT-011; Cure Tech)은 PD1에 결합하는 인간화 IgG1k 단클론 항체이다. 피달리주맙 및 기타 인간화 항-PD1 단클론 항체는 WO2009/101611에 개시되어 있다. 램브롤리주맙(이전에 램브롤리주맙으로도 알려져 있고, Keytruda, MK03475라고도 함; Merck)은 PD1에 결합하는 인간화 IgG4 단클론 항체이다. 램브롤리주맙 및 기타 인간화 항-PD1 항체는 US 8,354,509 및 WO2009/114335에 개시되어 있다. MEDI4736(Medimmune)은 PDL1에 결합하며, 리간드와 PD1의 상호작용을 억제하는 인간 단클론 항체이다. MDPL3280A(Genentech/Roche)는 PD-L1에 결합하는 인간 Fc 최적화된 IgG1 단클론 항체이다. MDPL3280A, 및 PD-L1에 대한 기타 인간 단클론 항체는 미국 특허 7,943,743호 및 미국 특허출원공개 20120039906호에 개시되어 있다. 기타 항-PD-L1 결합제는 YW243.55.S70(중쇄 및 경쇄 가변 영역은 WO2010/077634에 서열번호 20 및 21로 표시됨) 및 MDX-1 105(BMS-936559라고도 함, 예를 들어 WO2007/005874에 개시된 항-PD-L1 결합제)를 포함한다. AMP-224(B7-DCIg; Amplimmune; 예를 들어 WO2010/027827 및 WO2011/066342에 개시됨)는 PD1과 B7-H1 간의 상호작용을 차단하는 PD-L2 Fc 융합 가용성 수용체이다. 기타 항-PD1 항체는 AMP 514(Amplimmune), 특히 예를 들어 US 8,609,089, US 2010028330, 및/또는 US 20120114649에 개시된 항-PD1 항체를 포함한다.

[0903] TIM3(T세포 면역글로불린-3)은 또한 특히 IFN-g-분비 CD4+ T 헬퍼 1 및 CD8+ T 세포독성 1 세포에서 T세포 기능을 음성적으로 조절하고, T세포 고갈에 중요한 역할을 한다. TIM3과 이의 리간드, 예를 들어 갈렉틴-9(Gal9), 포스포티달세린(PS), 및 HMGB1 사이의 상호작용의 억제는 면역 반응을 증가시킬 수 있다. TIM3 및 이의 리간드의 항체, 항체 단편, 및 기타 억제제는 당업계에서 입수가 가능하고, 예를 들어 본원에 기재된 CAR과 조합하여 사용될 수 있다. 예를 들어, TIM3을 표적화하는 항체, 항체 단편, 소분자, 또는 펩티드 억제제는 TIM3의 IgV 도메인에 결합하여 이의 리간드와의 상호작용을 억제한다. TIM3을 억제하는 항체 및 펩티드는 WO2013/006490 및 US20100247521에 개시되어 있다. 기타 항-TIM3 항체는 RMT3-23의 인간화 버전(문헌[Ngiow et al., 2011, Cancer Res, 71:3540-3551]에 개시됨), 및 클론 8B.2C12(문헌[Monney et al., 2002, Nature, 415:536-541]에

개시됨)를 포함한다. TIM3 및 PD-1을 억제하는 이중특이적 항체는 US20130156774에 개시되어 있다.

[0904] 일부 구현예에서, CAR-발현 세포의 활성을 강화하는 제제는 CEACAM 억제제(예를 들어, CEACAM-1, CEACAM-3, 및/또는 CEACAM-5 억제제)이다. 일 구현예에서, CEACAM의 억제제는 항-CEACAM 항체 분자이다. 예시적인 항-CEACAM-1 항체는 WO 2010/125571, WO 2013/082366 WO 2014/059251, 및 WO 2014/022332에 기재되어 있다(예를 들어, 단클론 항체 34B1, 26H7, 및 5F4; 또는 예를 들어 US 2004/0047858, US 7,132,255, 및 WO 99/052552에 기재된 바와 같은 이의 제조합 형태). 일부 구현예에서, 항-CEACAM 항체는 예를 들어 문헌[Zheng et al. PLoS One. 2010 Sep 2;5(9). pii: e12529 (DOI:10:1371/journal.pone.0021146)]에 기재된 바와 같이 CEACAM-5에 결합하거나, 예를 들어 WO 2013/054331 및 US 2014/0271618에 기재된 바와 같이 CEACAM-1 및 CEACAM-5와 교차 반응한다.

[0905] 이론에 구애됨이 없이, 암배아성 항원 세포 부착 분자(CEACAM), 예컨대 CEACAM-1 및 CEACAM-5는 적어도 부분적으로 항종양 면역 반응의 억제를 매개하는 것으로 여겨진다(예를 들어, 문헌[Markel et al. J Immunol. 2002 Mar 15;168(6):2803-10; Markel et al. J Immunol. 2006 Nov 1;177(9):6062-71; Markel et al. Immunology. 2009 Feb;126(2):186-200; Markel et al. Cancer Immunol Immunother. 2010 Feb;59(2):215-30; Ortenberg et al. Mol Cancer Ther. 2012 Jun;11(6):1300-10; Stern et al. J Immunol. 2005 Jun 1;174(11):6692-701; Zheng et al. PLoS One. 2010 Sep 2;5(9). pii: e12529] 참조). 예를 들어, CEACAM-1은 TIM-3에 대한 이중친화성 리간드로 설명되어 있고, TIM-3-매개 T세포 내성 및 고갈에 역할을 하는 것으로 설명되어 있다(예를 들어, 문헌[WO 2014/022332; Huang, et al. (2014) Nature doi:10.1038/nature13848] 참조). 구현예에서, CEACAM-1과 TIM-3의 공동차단은 이중이식 대장암 모델에서 항종양 면역 반응을 강화하는 것으로 밝혀졌다(예를 들어, 상기 문헌[WO 2014/022332; Huang, et al. (2014)] 참조). 일부 구현예에서, CEACAM-1과 PD-1의 공동차단은 예를 들어 WO 2014/059251에 기재된 바와 같이 T세포 내성을 감소시킨다. 따라서, CEACAM 억제제는 본원에 기재된 다른 면역조절제(예를 들어, 항-PD-1 및/또는 항-TIM-3 억제제)와 함께 사용되어 암, 예를 들어 흑색종, 폐암(예를 들어, NSCLC), 방광암, 결장암, 난소암, 및 본원에 기재된 바와 같은 기타 암에 대한 면역 반응을 강화할 수 있다.

[0906] LAG3(림프구 활성화 유전자-3 또는 CD223)은 CD8+ T세포 고갈에 역할을 하는 것으로 밝혀진 활성화된 T세포 및 B세포에서 발현되는 세포 표면 분자이다. LAG3 및 이의 리간드의 항체, 항체 단편, 및 기타 억제제는 당업계에서 입수가능하고, CAR, 예를 들어 본원에 기재된 CAR과 조합하여 사용될 수 있다. 예를 들어, BMS-986016(Bristol-Myers Squib)은 LAG3을 표적화하는 단클론 항체이다. IMP701(Immutep)은 길항제 LAG3 항체이고, IMP731(Immutep 및 GlaxoSmithKline)은 고갈 LAG3 항체이다. 기타 LAG3 억제제는, MHC 클래스 II 분자에 결합하고 항원 제시 세포(APC)를 활성화시키는 LAG3의 가용성 부분과 Ig의 제조합 융합 단백질인 IMP321(Immutep)을 포함한다. 기타 항체는 예를 들어 WO2010/019570에 개시되어 있다.

[0907] 일부 구현예에서, CAR-발현 세포의 활성을 강화하는 제제는 예를 들어 제1 도메인 및 제2 도메인을 포함하는 융합 단백질로서, 제1 도메인은 억제성 분자 또는 이의 단편이고, 제2 도메인은 양성 신호와 관련된 폴리펩티드, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 폴리펩티드인, 융합 단백질일 수 있다. 일부 구현예에서, 양성 신호와 관련된 폴리펩티드는 CD28, CD27, ICOS의 공동자극 도메인, 예를 들어 CD28, CD27, 및/또는 ICOS의 세포내 신호전달 도메인, 및/또는 예를 들어 본원에 기재된, 예를 들어 CD3 제타의 일차 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 융합 단백질은 CAR을 발현하는 동일한 세포에 의해 발현된다.

[0908] 일 구현예에서, 본원에 기재된 CAR-발현 세포의 활성을 강화하는 제제는 miR-17-92이다.

[0909] *제약 조성물 및 치료*

[0910] 본 발명의 제약 조성물은, 본원에 기재된 바와 같은 CAR-발현 세포, 예를 들어 복수의 CAR-발현 세포를 하나 이상의 제약상 또는 생리학상 허용되는 담체, 희석제, 또는 부형제와 조합하여 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 완충제, 예컨대 중성 완충 식염수, 인산염 완충 식염수 등; 탄수화물, 예컨대 글루코스, 만노스, 수크로스 또는 텍스트란, 만니톨; 단백질; 폴리펩티드 또는 아미노산, 예컨대 글리신; 항산화제; 킬레이팅제, 예컨대 EDTA 또는 글루타티온; 아주반트(예를 들어, 수산화알루미늄); 및 보존제를 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 일 양태에서 정맥내 투여용으로 제형화된다.

[0911] 본 발명의 제약 조성물은 치료할(또는 예방할) 질환에 적절한 방식으로 투여될 수 있다. 적절한 투여량은 임상 시험에 의해 결정될 수 있지만, 투여의 양 및 빈도는 환자의 상태, 환자의 질환의 유형 및 중증도와 같은 인자에 의해 결정될 것이다.

- [0912] 일 구현예에서, 제약 조성물은 예를 들어 내독소, 미코플라스마, 복제가능 렌티바이러스(RCL), p24, VSV-G 핵산, HIV gag, 잔류 항-CD3/항-CD28 코팅 비드, 마우스 항체, 폴딩된 인간 혈청, 소혈청 알부민, 소혈청, 배양 배지 성분, 박터 패키징 세포 또는 플라스미드 성분, 박테리아 및 진균으로 이루어진 군으로부터 선택된 오염물이 실질적으로 없다(예를 들어, 검출가능한 수준으로 존재하지 않는다). 일 구현예에서, 박테리아는 알칼리계네스 파에칼리스(*Alcaligenes faecalis*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 에세리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenza*), 네이세리아 메닝기티데스(*Neisseria meningitides*), 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 스트렙토코쿠스 뉴모니아(*Streptococcus pneumonia*), 및 스트렙토코쿠스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*) 그룹 A로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나이다.
- [0913] "면역학적 유효량", "항종양 유효량", "종양억제 유효량", 또는 "치료량"이 표시되는 경우, 투여할 본 발명의 조성물의 정확한 양은 연령, 체중, 종양 크기, 감염 또는 전이의 정도, 및 환자(대상체) 상태의 개인차를 고려하여 의사가 결정할 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 세포, 예를 들어 T세포 또는 NK세포를 포함하는 제약 조성물은 10^4 내지 10^9 개 세포/kg(체중), 일부 예에서 10^5 내지 10^6 개 세포/kg(체중)의 투여량(상기 범위 내의 모든 정수값 포함)으로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 세포, 예를 들어 T세포는 3×10^4 , 1×10^6 , 3×10^6 , 또는 1×10^7 개 세포/kg(체중)으로 투여될 수 있다. 세포 조성물은 또한 이러한 투여량으로 다회 투여될 수 있다. 세포는 면역요법에서 일반적으로 알려져 있는 주입 기술을 사용하여 투여될 수 있다(예를 들어, 문헌[Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988] 참조).
- [0914] 특정 양태에서, 활성화된 세포, 예를 들어 T세포 또는 NK세포를 대상체에게 투여한 후, 후속적으로 재채혈하고(또는 성분채집을 수행하고), 본 발명에 따라 그로부터 세포를 활성화하고, 이러한 활성화되고 증식된 세포를 환자에게 재주입하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 프로세스는 수주마다 다회 수행될 수 있다. 특정 양태에서, 세포, 예를 들어 T세포 또는 NK세포는 10 cc 내지 400 cc의 채혈로부터 활성화될 수 있다. 특정 양태에서, 세포, 예를 들어 T세포 또는 NK세포는 20 cc, 30 cc, 40 cc, 50 cc, 60 cc, 70 cc, 80 cc, 90 cc, 또는 100 cc의 채혈로부터 활성화된다.
- [0915] 본 발명의 조성물의 투여는 에어로졸 흡입, 주사, 섭취, 수혈, 피하삽입 또는 이식에 의한 것을 포함하는 임의의 편리한 방식으로 수행될 수 있다. 본원에 기재된 조성물은 경동맥으로, 피하로, 피내로, 종양내로, 결절내로, 수질내로, 근육내로, 정맥내(i.v.) 주사에 의해, 또는 복강내로 환자에게 투여될 수 있다. 일 양태에서, 본 발명의 세포 조성물, 예를 들어 T세포 또는 NK세포 조성물은 피내 또는 피하 주사에 의해 환자에게 투여된다. 일 양태에서, 본 발명의 세포 조성물, 예를 들어 T세포 또는 NK세포 조성물은 정맥내 주사에 의해 투여된다. 세포 조성물, 예를 들어 T세포 또는 NK세포 조성물은 종양, 림프절, 또는 감염 부위 내로 직접 주사될 수 있다.
- [0916] 특정 예시적 양태에서, 대상체는 백혈구를 생체의 수집, 강화, 또는 고갈시켜 관심 세포, 예를 들어 T세포 또는 NK세포를 선택 및/또는 단리하는 백혈구 성분채집을 거칠 수 있다. 이들 세포 단리물, 예를 들어 T세포 또는 NK세포 단리물은 당업계에 알려진 방법에 의해 증식될 수 있고, 본 발명의 하나 이상의 CAR 구성체가 도입되어 본 발명의 CAR-발현 세포, 예를 들어 CAR T세포 또는 CAR-발현 NK세포를 생성할 수 있도록 처리될 수 있다. 이를 필요로 하는 대상체는 후속적으로 고용량 화학요법에 이은 말초혈액 줄기세포 이식을 이용한 표준 치료를 받을 수 있다. 특정 양태에서, 이식 후 또는 이식과 동시에, 대상체는 본 발명의 증식된 CAR-발현 세포의 주입을 받는다. 추가의 양태에서, 증식된 세포는 수술 전 또는 후에 투여된다.
- [0917] 구현예에서, 예를 들어 본원에 기재된 CAR을 발현하는 하나 이상의 세포를 투여하기 전에 대상체에서 림프구 제거가 수행된다. 구현예에서, 림프구 제거는 멜팔란, 시톡산, 시클로포스파미드, 및 플루다라빈 중 하나 이상을 투여하는 것을 포함한다.
- [0918] 환자에게 투여할 상기 치료제의 투여량은 치료 중인 병태의 정확한 속성 및 치료제의 수여자에 따라 달라질 것이다. 인간 투여를 위한 투여량의 스케일링은 당업계에서 허용되는 관행에 따라 수행될 수 있다. 치료제, 예를 들어 항체, 예를 들어 CAMPATH에 대한 용량은 예를 들어 일반적으로 성인 환자의 경우, 예를 들어 1 내지 약 100 mg 범위일 수 있고, 예를 들어 1 내지 30일의 기간 동안 매일 투여될 수 있다. 일부 예에서 1일 최대 40 mg의 더 많은 용량이 사용될 수 있지만, 적합한 1일 용량은 1일 1 내지 10 mg이다(미국 특허 6,120,766호에 기재되어 있음).
- [0919] 일 구현예에서, CAR은 예를 들어 시험관내 전사를 사용하여 세포, 예를 들어 T세포 또는 NK세포 내로 도입되고,

대상체(예를 들어, 인간)는 본 발명의 CAR-발현 세포, 예를 들어 CAR T세포 또는 CAR-발현 NK세포의 초기 투여를 받고, 본 발명의 CAR-발현 세포, 예를 들어 CAR T세포 또는 CAR-발현 NK세포의 1회 이상의 후속 투여를 받으며, 1회 이상의 후속 투여는 이전 투여 후 15일 미만, 예를 들어 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 또는 2일째 투여된다. 일 구현예에서, 본 발명의 CAR-발현 세포, 예를 들어 CAR T세포 또는 CAR-발현 NK세포가 대상체(예를 들어, 인간)에게 매주 1회 초과로 투여된다(예를 들어, 본 발명의 CAR-발현 세포, 예를 들어 CAR T세포 또는 CAR-발현 NK세포가 매주 2, 3, 또는 4회 투여된다). 일 구현예에서, 대상체(예를 들어, 인간 대상체)는 CAR-발현 세포, 예를 들어 CAR T세포 또는 CAR-발현 NK세포를 매주 1회 초과로 투여받고(예를 들어, 매주 2, 3, 또는 4회 투여)(본원에서 사이클이라고도 함), 이후 CAR-발현 세포, 예를 들어 CAR T세포 또는 CAR-발현 NK세포를 1주일간 투여하지 않고, 이어서 대상체에게 CAR-발현 세포, 예를 들어 CAR T세포 또는 CAR-발현 NK세포를 1회 이상 추가 투여한다(예를 들어, CAR-발현 세포, 예를 들어 CAR T세포 또는 CAR-발현 NK세포의 매주 1회 초과 투여). 다른 구현예에서, 대상체(예를 들어, 인간 대상체)는 CAR-발현 세포, 예를 들어 CAR T세포 또는 CAR-발현 NK세포의 1회 초과 사이클을 투여받고, 각 사이클 사이의 시간은 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 또는 3일 미만이다. 일 구현예에서, CAR-발현 세포, 예를 들어 CAR T세포 또는 CAR-발현 NK세포는 매주 3회 투여를 위해 격일로 투여된다. 일 구현예에서, 본 발명의 CAR-발현 세포, 예를 들어 CAR T세포 또는 CAR-발현 NK세포는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8주 이상 동안 투여된다.

- [0920] 일부 구현예에서, 대상체는 성인 대상체(즉, 18세 이상)일 수 있다. 특정 구현예에서, 대상체는 1~30세일 수 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 16세 이상이다. 특정 구현예에서, 대상체는 16~30세이다. 일부 구현예에서, 대상체는 소아 대상체(즉, 1~18세)이다.
- [0921] 일 양태에서, CAR-발현 세포는 렌티바이러스와 같은 렌티바이러스 바이러스 벡터를 사용하여 생성된다. 이러한 방식으로 생성된 CAR-발현 세포, 예를 들어 CART는 안정적인 CAR 발현을 가질 것이다.
- [0922] 일 양태에서, CAR-발현 세포, 예를 들어 CART는 형질도입 후 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15일 동안 CAR 벡터를 일시적으로 발현한다. CAR의 일시적 발현은 RNA CAR 벡터 전달에 의해 달성될 수 있다. 일 양태에서, CAR RNA는 전기천공에 의해 세포, 예를 들어 NK세포 또는 T세포 내로 형질도입된다.
- [0923] 일시적으로 발현하는 CAR T세포 또는 CAR-발현 NK세포(특히, 무린 scFv 보유 CAR-발현 세포)를 사용하여 치료 중인 환자에서 발생할 수 있는 잠재적인 문제는 여러 치료 후의 아나필락시스이다.
- [0924] 이러한 이론에 구애됨이 없이, 이러한 아나필락시스 반응은 체액성 항-CAR 반응, 즉, 항-IgE 동형을 갖는 항-CAR 항체를 발생시키는 환자에 의해 유발될 수 있는 것으로 여겨진다. 환자의 항체 생성 세포는 항원에 대한 노출이 10~14일간 중단될 때 IgG 동형(아나필락시스를 유발하지 않음)으로부터 IgE 동형으로 클래스 전환을 거치는 것으로 여겨진다.
- [0925] 환자가 일시적 CAR 요법(예컨대, RNA 형질도입에 의해 생성된 것)의 과정 동안 항-CAR 항체 반응을 생성할 위험이 높은 경우, CART 주입 중단은 10~14일 넘게 지속되어서는 안 된다.
- [0926] *생체고분자 전달 방법*
- [0927] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 CAR-발현 세포는 생체고분자 스캐폴드, 예를 들어 생체고분자 임플란트를 통해 대상체에게 투여되거나 전달될 수 있다. 생체고분자 스캐폴드는 본원에 개시된 CAR-발현 세포의 전달, 증식, 및/또는 분산을 지지하거나 또는 강화할 수 있다. 생체고분자 스캐폴드는 자연발생적 또는 합성적일 수 있는 생체적합성(예를 들어, 염증 또는 면역 반응을 실질적으로 유도하지 않음) 및/또는 생체분해성 고분자를 포함한다.
- [0928] 적합한 생체고분자의 예는 한천, 아가로스, 알기네이트, 알기네이트/칼슘 포스페이트 시멘트(CPC), 베타-갈락토시다제(β -GAL), (1,2,3,4,6-펜타아세틸 α -D-갈락토스), 셀룰로스, 키틴, 키토산, 콜라겐, 엘라스틴, 젤라틴, 히알루론산 콜라겐, 하이드록시아파타이트, 폴리(3-하이드록시부티레이트-코-3-하이드록시-헥사노에이트)(PHBHHx), 폴리(락티드), 폴리(카프로락톤)(PCL), 폴리(락티드-코-글리콜리드)(PLG), 폴리에틸렌 옥사이드(PEO), 폴리(락탄산-코-글리콜산)(PLGA), 폴리프로필렌 옥사이드(PPO), 폴리비닐 알코올(PVA), 실크, 대두 단백질, 및 대두 단백질 단리물을, 단독으로 또는 임의의 농도 및 임의의 비로 임의의 다른 고분자 조성물과 조합하여 포함하나 이에 한정되지 않는다. 생체고분자는 부착- 또는 이동-촉진 분자, 예를 들어 림프구의 콜라겐 수용체에 결합하는 콜라겐-유사 펩티드, 및/또는 자극 분자에 의해 증대 또는 변형되어, 전달될 세포의 전달, 증식, 또는 기능, 예를 들어 항암 활성을 강화할 수 있다. 생체고분자 스캐폴드는 주사가 가능한, 예를 들어 겔 또는 반고체, 또는 고체 조성물일 수 있다.

- [0929] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 CAR-발현 세포는 대상체에 전달되기 전에 생체고분자 스캐폴드에 시딩된다. 구현예에서, 생체고분자 스캐폴드는 예를 들어 스캐폴드의 생체고분자에 통합되거나 접합된, 본원에 기재된 하나 이상의 추가 치료제(예를 들어, 또 다른 CAR-발현 세포, 항체, 또는 소분자) 또는 CAR-발현 세포의 활성을 강화하는 제제를 추가로 포함한다. 구현예에서, 생체고분자 스캐폴드는 예를 들어 종양 내로 주사되거나, 외과적으로 종양에 또는 항종양 효과를 매개하기에 충분한 종양의 근접 내에 이식된다. 생체고분자 조성물 및 이의 전달 방법의 추가의 예는 문헌[Stephan et al., *Nature Biotechnology*, 2015, 33:97-101; 및 W02014/110591]에 기재되어 있다.
- [0930] **실시예**
- [0931] 본 발명은 하기 실험 실시예를 참조하여 더욱 상세히 설명된다. 이들 실시예는 단지 예시의 목적으로 제공되고, 달리 명시되지 않는 한 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 따라서, 본 발명은 하기 실시예로 제한되는 것으로 해석되어서는 안 되며, 오히려 본원에 제공된 교시의 결과로서 명백해지는 임의의 모든 변형을 포함하는 것으로 해석되어야 한다.
- [0932] 실시예 1: CD19 및 CD22를 표적화하는 탠덤 및 이중 CAR T세포의 시험관내 활성화
- [0933] 이 실시예는 탠덤 및 이중 CAR T세포의 시험관내 활성을 보여준다.
- [0934] 탠덤 키메라 항원 수용체(CAR)는 2개의 별개의 scFv 도메인을 동일한 단백질의 일부로서 함께 발현한다. 이중 CAR은 2개의 전장 CAR로 구성된다. 여기서, 이들 두 CAR은 P2A 리보솜 스킵 요소에 의해 분리된 단일 렌티바이러스 벡터에 의해 암호화된다. 여기에 설명된 탠덤 및 이중 CAR은 둘 다 동일한 4-1BB 및 CD3제타 자극 도메인을 사용한다. 일차 T세포의 형질도입을 위해 탠덤 및 이중 CAR을 렌티바이러스 발현 벡터(Pelps)에 클로닝하였다.
- [0935] 이 실시예에 사용된 탠덤 CAR은 c171, c182, c224, 및 c227이다. 이 실시예에서 시험된 이중 CAR은 c201과 c230(둘 다 CD19 CAR의 업스트림에 CD22 CAR이 있음), 및 c203(CD22 CAR의 업스트림에 CD19 CAR이 있음)이다. C230은 c201과 동일한 아미노산 서열을 가지지만, 다른 코돈을 사용하여 생성되었기 때문에 DNA 서열이 다르다. 관련 단일 CAR, 즉 CD22를 인식하는 CD22-65s, 및 CD19를 인식하는 c206이 이 실시예에서 또한 사용된다.
- [0936] CD19 및 CD22 발현(Nalm6), CD22 발현(CD19KO), 또는 CD19 발현(CD22KO) 표적에 대한 반응으로서의 탠덤 및 이중 CAR-형질도입 T세포의 이펙터 T세포 반응을 시험함으로써 구성체를 비교하였다. 이펙터 T세포 반응은 세포 증식(expansion, proliferation), 배가, 사이토카인 생성, 및 표적 세포 사멸 또는 세포용해 활성화(탈과립화)을 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0937] 결과
- [0938] CAR T세포의 생성
- [0939] CAR 암호화 Pelps 렌티바이러스 전달 벡터를 사용하여 VSVg 슈도타입형 렌티바이러스 입자 내로 패키징되는 게놈 바이러스 물질을 생성하였다. CAR을 암호화하는 렌티바이러스 벡터 DNA를 리포펙타민 시약과 함께 3가지 패키징 구성요소 VSVg, gag/pol, 및 rev와 혼합하여 Lenti-X 293T 세포(Clontech)를 형질감염시킨 후, 12-18시간 후에 배지를 교체하였다. 배지 교체 30시간 후, 배지를 수집하고, 여과하고, 침전에 의해 농축하고, -80°C에 보관하였다.
- [0940] 음성 선택에 의해 T세포를 강화한 건강한 성분채집된 공여체의 혈액으로 시작하여 CAR T세포를 생성하였다(Pan T세포 단리, Miltenyi). CD3/CD28 비드(Dynabeads® Human T-Expander CD3/CD28, ThermoFisher Scientific)를 1:3의 비(T세포 대 비드)로 첨가하여 T세포를 활성화하고, 37°C, 5% CO₂의 T세포 배지(RPMI1640, 10% 열-비활성화 우태아 혈청(FCS), 2 mM L-글루타민, 1x 페니실린/스트렙토마이신, 100 mM 비필수 아미노산, 1 mM 피루브산 나트륨, 10 mM HEPES, 및 55 mM 2-머캅토에탄올)에서 배양하였다. 24-웰 플레이트의 웰당 1 ml 배지에 0.5x10⁶ 개 T세포로 T세포를 배양하였다. 24시간 후, T세포가 파열할 때 바이러스 상청액을 첨가하고, T세포를 5의 감염 다중도(MOI)로 형질도입시켰다. T세포가 증식하기 시작했고, 이는 세포 농도(ml당 수)를 측정함으로써 모니터링 되었으며, T세포를 2일마다 신선한 T세포 배지에 희석하였다. 약 10일 후 T세포가 안정되기 시작하면서, 대수 성장이 약해진다. 성장 속도의 둔화 및 T세포 크기의 감소(350 F1에 근접)의 조합은 T세포가 이후 분석을 위해 동결보존되는 시간을 결정한다. 모든 CAR T세포는 연구 등급(즉, 임상 등급이 아님)의 제조 조건에서 생성되었다. 동결보존하기 전에, 형질도입된 세포(세포 표면에서 CD22-특이적 및/또는 CD19-특이적 CAR을 발현하는

세포)의 백분율을 FACS Fortessa(BD)에서 유세포 분석으로 측정하였다. 바이러스 형질도입은 유사한 발현 수준을 보였으며, 이는 각 CAR의 유사한 형질도입 효율을 나타낸다. CAR T세포 배양물의 세포 수는 형질도입되지 않은 T세포("UTD")와 비교할 때 T세포의 증식 능력에 대한 CAR의 검출가능한 음성 효과가 없음을 나타낸다.

[0941] CAR-제지정 T세포의 효능 평가

[0942] 이러한 이중 CAR T세포의 기능적 능력을 평가하기 위해, 전술한 바와 같이 생성된 CAR-T를 해동하고, 계수하고, 암세포와 공동배양하여 이들의 사멸 능력 및 사이토카인 분비를 관독하였다. 한 실험에서, 이중 CAR-T c201 및 c203을 단일 CAR 대응물 c206(CART19) 및 CD22-65s와 비교하였다. 두 번째 실험은 이중 CAR-T c201 및 c230을 탠덤 CAR-T c171, c182, c188, c224, 및 c227과 비교하고, 단일 CAR 대응물 c206(CART19) 및 CD22-65s와 비교하였다. 형질도입되지 않은 T세포(UTD)를 두 실험 모두에서 비표적화 T세포 대조군으로 사용하였다.

[0943] T세포 사멸은 급성 림프모구성 백혈병(ALL) 계통 Nalm6(RRID: CVCL_0092) 및 Nalm6의 CRISPR 변형에 의해 생성된 각각의 CD22-음성 계통(CD22KO) 뿐만 아니라 CD19-음성 계통(CD19KO)에 대한 것이었다. 모든 세포주는 생존 생존력/사멸에 대한 리포터로서 루시페라제를 발현하도록 형질도입되었다. CAR-T의 세포용해 활성은 10:1, 5:1, 2.5:1, 1.25:1, 0.63:1, 및 0.31:1의 이펙터:표적 세포 비(E:T)의 적정에서 측정되었다. 각각의 수의 T세포를 일정한 수의 표적 세포(96-웰 플레이트의 웰당 25,000개 세포)와 혼합하여 분석을 시작하였다. 20시간 후, Bright-Glo™ 루시페라제 분석 시스템(Promega) 시약을 첨가하여 웰에 남아 있는 세포를 용해하여, 각 웰에 남아 있는 Luc-발현 암세포를 정량화하였다. "사멸 %"는 표적 세포만을 함유하는 웰(0% 사멸, 최대 Luc 신호)에 대해 계산되었다. CD22KO Nalm6-Luc 데이터는 이중 또는 c206 CART 암호화 렌티바이러스를 사용한 형질도입이 항-CD19 사멸 활성을 T세포로 전달함을 보여준다(도 3a). CD19KO Nalm6-Luc 데이터는 이중, 탠덤, 또는 CD22-65s CART 암호화 렌티바이러스를 사용한 형질도입이 항-CD22 사멸 활성을 T세포로 전달함을 보여준다(도 3b). UTD T세포는 백그라운드 사멸만을 나타낸다. 3개의 이중 CAR-T 모두 KO Nalm6 표적 세포 둘 다의 약간 더 높은 CD19- 및 CD22-매개 사멸을 나타냈다.

[0944] CD22 및/또는 CD19-발현 표적 세포에 대한 반응으로서의 이들 CAR T세포의 사이토카인 생성을 측정하기 위해, CAR T세포를 상기와 동일한 ALL 계통과 공동배양하였다. 또한, CAR-T를 ALL 계통 SEM과 공동배양하였다. 세포를 1:1의 이펙터:표적 비 및 96-웰 플레이트의 웰당 25,000개 세포로 24시간 동안 배양한 후, V-PLEX 인간 IFN-g 키트(Meso Scale Diagnostics)를 사용하여 사이토카인 분석을 하기 위해 배지를 제거하였다. 모든 이중, 탠덤, 단일 CAR-T는 CD19를 발현하는 표적 세포에 의해 강하게 자극되었다(Nalm6, CD22KO Nalm6, 및 SEM; 도 3c 및 도 3d). 그러나, CD22 단독을 통해 자극된 CAR-T에 의해 분비된 IFN-g 수준에 대한 데이터(CD19KO Nalm6)는 c203 및 탠덤 CAR-T와 비교하여 c201 및 c230 이중 CAR-T의 개선된 자극을 보여주었다. c201 및 c230은 CD22-65s 단일 CAR-T에 필적하는 수준의 IFN-g를 분비했다(도 3c 및 도 3d).

[0945] 이 연구에서 이중 CAR-T c201, c203, 및 c230은 탠덤 및 단일 CAR-T보다 더 우수한 사멸 활성을 나타냈다. 이중 CAR-T는 CD19-발현 표적 세포와의 공동배양시 IFN-g 분비와 관련하여 유사하게 활성인 반면, c201은 c203에 비해 우수한 활성화를 나타냈다. c201 및 c230은 모두 이 연구에서 시험된 탠덤 CAR-T에 비해 더 우수한 활성화를 나타냈다.

[0946] 실시예 2: CD19 및 CD22를 표적화하는 이중 및 탠덤 CAR-T의 생체내 활성

[0947] 이 실시예는 이중 및 탠덤 CAR-T세포의 생체내 활성을 보여준다.

[0948] 탠덤 키메라 항원 수용체(CAR)는 2개의 별개의 scFv 도메인을 동일한 단백질의 일부로서 함께 발현한다. 이중 CAR은 2개의 전장 CAR로 구성된다. 이 실시예에서, 이들 두 CAR은 P2A 리보솜 스킵 요소에 의해 분리된 단일 렌티바이러스 벡터에 의해 암호화된다. 여기에 설명된 탠덤 및 이중 CAR은 둘 다 동일한 4-1BB 및 CD3제타 자극 도메인을 사용한다. 일차 T세포의 형질도입을 위해 탠덤 및 이중 CAR을 렌티바이러스 발현 벡터(PeIps)에 클로닝하였다.

[0949] 이 실시예에 사용된 탠덤 CAR은 c171, c182, c224, 및 c227이다. 이 실시예에 사용된 이중 CAR은 CD19 CAR의 업스트림에 CD22 CAR이 있는 c201 및 c230이다. C230은 c201과 동일한 아미노산 서열을 가지지만, 다른 코돈을 사용하여 생성되었기 때문에 DNA 서열이 다르다. 이 연구에 사용된 관련 단일 CAR은 CD22를 인식하는 CD22-65s, 및 CD19를 인식하는 c206이다. 이중 및 탠덤 CAR T세포의 항종양 활성을 ALL 이중이식 재발 모델에서 생체내 평가하였다.

[0950] 물질 및 방법

- [0951] 세포주: Nalm6(RRID: CVCL_0092)은 인간 급성 림프모구성 백혈병(ALL) 세포주이다. CRISPR 기술을 사용하여, CD19 유전자를 녹아웃하였다(CD19KO). 세포를 10% 우태아 혈청을 함유하는 RPMI 배지에서 성장시키고 둘 다 현탁액에서 성장시켰다. 정맥내 이식했을 때 세포는 마우스에서 지속되었고 증식되었다. 세포는 루시페라제를 발현하도록 변형되었으므로, 기질 루시페린을 주사한 후 마우스를 이미징함으로써 종양세포 성장을 모니터링할 수도 있다.
- [0952] 마우스: Jackson Laboratory(등록번호 005557)로부터 6주령 NSG(NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) 마우스를 입수하였다. 실험 전 적어도 3일 동안 동물을 적응시켰다. 관련 규정 및 지침에 따라 동물을 다루었다. 동물 식별을 위한 전자 트랜스폰더를 종양 이식 1일 전에 좌측 옆구리에 이식하였다.
- [0953] 종양 이식: 대수 성장기의 Nalm6 및 CD19KO Nalm6 세포를 채취하고, 50 ml 팔콘 튜브에서 1200 rpm으로 5분 동안 세척하였다(성장 배지에서 1회, 이어서 저온 멸균 PBS에서 2회). 세포를 5×10^6 /ml의 농도 및 20:1의 Nalm6 대 CD19KO Nalm6 비로 PBS에 재현탁시키고 얼음 위에 놓고 마우스에 주사하였다. 암세포를 꼬리 정맥을 통해 $200 \mu\text{l}$ 로 정맥내 주사하였다. 이 모델은 마우스에 정맥내 이식될 때 잘 성장하며, 종양 부담 측정을 위해 이미징될 수 있다. 1×10^6 개의 암세포를 주사하면, 종양이 형성되어 3일 이내에 정확하게 측정될 수 있다. 기준선 측정치는 $4 \sim 6 \times 10^5$ 광자/초(p/s)이다. 7일 이내에, 평균 생체발광 측정치는 $2 \sim 4 \times 10^6$ p/s이며, 미처치 종양은 20~30 일쯤에 평가변수 측정치($2 \sim 3 \times 10^9$)에 도달한다. 치료제의 항종양 활성은 대개 종양이 완전히 생착되면 시험된다. 따라서, 이러한 모델에는 CAR T세포의 항종양 활성이 관찰될 수 있는 큰 윈도우가 존재한다.
- [0954] CAR T세포 생성: 모든 CAR T세포는 연구 등급(즉, 임상 등급이 아님)의 제조 조건에서 생성되었다. 종래의 제조: 음성 선택에 의해 T세포를 강화한 건강한 성분채집된 공여체의 혈액으로 시작하여 CAR T세포를 생성하였다(Pan T세포 단리, Miltenyi). CD3/CD28 비드(Dynabeads® Human T-Expander CD3/CD28, ThermoFisher Scientific)를 1:3의 비(T세포 대 비드)로 첨가하여 T세포를 활성화하고, 37°C, 5% CO₂의 T세포 배지(RPMI1640, 10% 열-비활성화 우태아 혈청(FCS), 2 mM L-글루타민, 1x 페니실린/스트렙토마이신, 100 mM 비필수 아미노산, 1 mM 피루브산 나트륨, 10 mM Hepes, 및 55 mM 2-머캅토에탄올)에서 배양하였다. 24-웰 플레이트의 웰당 1 mL 배지에 0.5×10^6 개 T세포로 T세포를 배양하였다. 24시간 후, T세포가 과열할 때 바이러스 상청액을 첨가하고, T세포를 5의 감염다중도(MOI)로 형질도입시켰다. T세포가 증식하기 시작했고, 이는 세포 농도(mL당 수)를 측정함으로써 모니터링되었으며, T세포를 2일마다 신선한 T세포 배지에 희석하였다. 약 10일 후 T세포가 안정되기 시작하면서, 대수 성장이 약해진다. 성장 속도의 둔화 및 T세포 크기의 감소(350 F1에 근접)의 조합은 T세포가 이후 분석을 위해 동결보존되는 시간을 결정한다. 동결보존하기 전에, 형질도입된 세포(세포 표면에서 CD22-특이적 및/또는 CD19-특이적 CAR을 발현하는 세포)의 백분율을 FACS Fortessa(BD)에서 유세포 분석으로 측정하였다. 바이러스 형질도입은 유사한 발현 수준을 보였으며, 이는 각 CAR의 유사한 형질도입 효율을 나타낸다. CAR T세포 배양물의 세포 수는 형질도입되지 않은 T세포("UTD")와 비교할 때 T세포의 증식 능력에 대한 CAR의 검출가능한 음성 효과가 없음을 나타낸다.
- [0955] CAR T세포 투여: Nalm6 연구에서, 종양 이식 7일 후 마우스에 투여하였다. 종래의 제조에 의해 생성된 CAR T세포는 1×10^6 개 CAR+ T세포로 투여되었다. 신속 프로세스로 생성된 세포는 0.3 및 0.1×10^6 개 CAR+ T세포로 투여되었다. 혼합 투여의 경우, c206 및 CD22-65s 단일 CAR-T를 하기 표시된 용량에서 1:1 비로 혼합하였다. TMD8 연구에서, 종양 이식 9일 후 1×10^6 또는 3×10^6 개 CAR+ T세포를 마우스에 투여하였다. 대조군으로서 비히클(PBS) 또는 UTD를 마우스에 투여하였다. 투여를 위해, 세포를 37°C 수조에서 부분 해동한 후, 가온된 T세포 배지 1 ml를 첨가하여 완전히 해동하였다. 해동된 세포를 50 ml 팔콘 튜브로 옮기고, T세포 배지를 사용하여 12 ml의 최종 부피로 조정하였다. 세포를 2회 세척하고, 300 g로 10분 동안 회전시킨 후, Cellometer(Nexcelom)로 계수하였다. 이어서, T세포를 차가운 PBS에 각각의 농도로 재현탁시키고, 마우스에 투여할 때까지 얼음 위에 두었다. CAR-T를 꼬리 정맥을 통해 $200 \mu\text{l}$ 로 정맥내 주사하였다. 모든 세포는 동일한 공여체로부터 동시에 제조되었다.
- [0956] 동물 모니터링: 주 2회의 체중 측정을 포함하여 마우스의 건강 상태를 매일 모니터링하였다. Nalm6 연구의 경우 이미징에 의해 주 2회 종양을 또한 모니터링하였다.
- [0957] 결과
- [0958] 이중 및 탠덤 CAR T세포의 항종양 활성을 B세포 급성 림프모구성 백혈병 이중이식 재발 모델에서 평가하였다. CD19-음성, CD22-양성 Nalm6 세포(CD19KO)의 5%를 CD22와 CD19를 모두 발현하는 Nalm6 야생형 세포에 혼합하였

다. 암세포를 계수하고, 합하고, 혼합 집단으로서 주사하였다. 0일째의 종양세포 이식 후, 종양 보유 마우스를 처치군에 무작위 배정하고, 종양 이식 후 7일째에 측면 꼬리 정맥을 통해 CAR T세포를 정맥내 투여하였다. 동물이 평가변수를 달성할 때까지 종양 성장 및 동물 건강을 모니터링하였다.

[0959] 종래방식으로 제조된 CAR-T를 사용한 연구에서, c171, c182, c224, 및 c227 탠덤 CAR-T를 c201 및 c230 이중 CAR-T와 비교하였다. 참고로, c206 및 CD22-65s 단일 CAR-T는 단독으로 또는 1:1 혼합으로 주사되었다. 모든 단일 CAR-T 집단은 1×10^6 개 CAR+ 용량으로 주사된 반면, 혼합 CAR-T는 각각 1×10^6 개 CAR+ 세포(2×10^6 개 총 CAR-T, 1e6 Mix)의 용량 또는 각각 0.5×10^6 개 CAR+ 세포(1×10^6 개 총 CAR-T, 5e5 Mix)의 용량으로 주사되었다. PBS 또는 UTD T세포를 투여받은 마우스는 종양이 뒷다리 운동성을 감소시키기 전에 3주차에 안락사시켰다. 다른 그룹은 4-7주차에 안락사시켰다. 모든 처치군에 대한 평균 생체발광은 도 4a에 도식화되어 있다.

[0960] T세포를 투여받지 않은 PBS 처치군은 정맥내 주사된 NSG 마우스에서 기준선 Nalm6 종양 성장 동역학을 보여준다. UTD 처치군은 검출되지 않은 이 모델에서의 인간 공여체 T세포의 비특이적 반응을 보여주기 위해 T세포 대조군으로 사용되었다. c206, CD22-65s 단일 CAR-T는 사용된 용량에서, 이 재발 모델에서 최소 반응을 나타냈다. 모든 탠덤 CAR-T는 훨씬 더 느린 종양 성장을 나타냈지만, 결국 종양 부담으로 인해 마우스를 안락사시켰다. 이중 CAR-T, c201 및 c230은 처치군의 여러 마우스에서 완전한 종양 근절을 나타냈다(도 4a 참조). 1e6 Mix 그룹은 유사한 효능을 나타냈지만, 이중체에 비해 2배 많은 CAR+ T세포를 필요로 했다. 이중체와 동일한 총 수의 CAR-T를 투여받은 5e5 Mix 그룹은 여기에서 시험된 탠덤 CAR-T와 비교했을 때 성능이 좋지 않았다.

[0961] 이들 동물에서 혈액을 매주 유세포 분석하여 CAR-T의 증식 및 지속의 동역학을 측정하였다. 대표적인 데이터는 CAR-T 주사 2주 후의 분석에 대해 표시되어 있다(도 4b). 이중 CAR-T와 탠덤 CART c182, c224, 및 c227은 모두 1e6 Mix 그룹과 유사한 수의 순환 T세포를 나타냈다. 이 수치는 단일 CAR-T 및 5e5 Mix 그룹에 비해 더 높았다.

[0962] 처음 두 연구는 이중 CAR T세포 c201 및 c230이 NALM6 암 및 이의 CD19-음성 변이체를 근절할 수 있음을 보여주었다. 효능은 여기에서 시험된 각 단일 CAR-T 및 탠덤 CAR-T보다 우수했다.

[0963] 실시예 3: 소규모 활성화 프로세스를 이용한 c201 세포의 제조

[0964] 이 실시예는 소규모 활성화 프로세스를 이용한 CD19- 및 CD22-표적화 이중 CAR-T세포의 제조가능성 평가를 설명한다.

[0965] 동결된 T세포의 분취량을 37°C 수조에서 해동하고, Optimizer CM(보충물 + 100U/mL 인간 IL2가 있는 Gibco Optimizer 배지)에 넣고, 1500 rpm으로 5분 동안 회전시켰다. 세포를 계수하고, 24-웰 플레이트에 3×10^6 개 세포/mL로 플레이팅하였다(1 mL/웰). 각 웰에 TransAct를 1/100으로 첨가하였다(10 µL/웰). GMP 등급 c201 바이러스를 qPCR 역가에 기초한 다양한 감염다중도(MOI)로 첨가하였다. 형질도입되지 않은 대조군(UTD)도 플레이팅하였다. 배양 24시간 후, 세포를 채취하고 PBS + 1% HSA에서 3회 세척하였다. 이어서, 세포를 계수하고, 24-웰 플레이트에 최종 1×10^6 개 세포/mL로 재플레이팅하였다.

[0966] 재플레이팅 72시간 후, 세포를 채취하고, 계수하고, 유세포 분석을 위해 각 샘플로부터 5×10^5 개 세포의 분취량을 취했다. 세포를 100 µl/웰에서 15분 동안 Live/Dead Aqua(BV510)로 염색한 후, 2회 세척하였다. 이어서, 항체 혼합물(표 6)을 4°C에서 25분 동안 50 µl/웰로 첨가하였다. 세포를 다시 2회 세척한 후, PBS 중 1.6% PFA(100 µl/웰)에서 15분 동안 고정시켰다. 고정 후, 세포를 전술한 바와 같이 세척하고, 유세포 분석 완충액에 150 µl/샘플의 최종 부피로 재현탁시켰다. BD LSRFortessa(BD Biosciences, San Jose CA) 상의 각 샘플의 Live CD3 양성 게이트에서 5e4개 세포를 획득하고, FlowJo v.10 소프트웨어(Ashland, OR)를 사용하여 데이터를 분석하였다. 이 절차를 재플레이팅 144시간 후 반복하였다.

[0967] [표 6] 항체 및 기타 시약

마커	클론	형광색소	판매회사	카탈로그 번호	희석
Live/Dead		BV510	Biologend	423102	1/500
CD3	SK7	BUV395	BD	564001	1/200
CAR19	항-Id	PE	자가제조 시약		1/160
CD4	SK3	PerCP 5.5	Biologend	344608	1/100
CAR22	항-Id	AF647	자가제조 시약		1/800
CD8	SK1	APC H7	BD	560179	1/200
FACS 완충액			Miltenyi Biotec	130-091-222	
BSA 저장 용액			Miltenyi Biotec	130-091-376	
인산염 완충 식염수(PBS)			Gibco	14190-144	
파라 포름알데히드(PFA)			Polysciences Inc.	18814-10	

[0968]

[0969] 유세포 분석 결과, 각각의 항-이디오타입 항체에 의해 검출되는 바와 같이 대부분의 CAR+ 세포가 CD19 및 CD22 표적화 CAR을 둘 다 발현하고 있는 것으로 나타났다(도 5a 및 도 5b). 이중 CAR 발현에 대한 단일 CAR 발현의 비는 시간이 지남에 따라 이중 CAR 발현 쪽으로 이동했고 144시간 후에 안정화되었다. 동시에, 총 CAR 발현도 증가했다. 두 시점 모두에서, CAR 발현은 MOI가 높을수록 증가를 보이며 MOI에 의존적이었다. 여러 공여체 중 한 대표자의 데이터가 여기 표시되어 있다.

[0970] 실시예 4: 대규모 활성화 프로세스를 이용한 c201 세포의 제조

[0971] 이 실시예는 전체 임상적 규모의 활성화 프로세스를 이용한 CD19- 및 CD22-표적화 이중 CAR-T세포의 제조가능성 평가를 설명한다.

[0972] CAR-T세포의 활성화 프로세스는 표 7에 요약된 바와 같이 배지의 제조로 시작한다. 동결보존된 백혈구 성분채집 산물을 출발물질로 사용하고 T세포 강화를 위해 처리하였다.

[0973] [표 7] 배지 및 완충액 유형 및 CART 제조 중 사용 시점

배지 유형	공급원	사용 시점
CliniMACS® 완충액/인간 혈청 알부민(HSA)(작용 농도의 0.5%)	0일째에 조작자가 제조	세포 세척/분리기에서의 0일째 프로세싱
Rapid 배지	0일째에 조작자가 제조	세포 시딩을 위한 0일째
PBS/HSA(작용 농도의 1% 또는 2%)	0일째에 조작자가 제조	채취 및 배양물 세척 배지(1일째)
Cryostor10 (CS10)	상업적으로 입수가 가능	채취물 제형화

[0974]

[0975] 동결보존된 성분채집물을 해동하고, 세척한 후, CliniMACS® 마이크로비드 기술을 이용해 T세포 선택 및 강화를 수행하였다. Miltenyi 마이크로비드로 선택된 생존가능한 세포를 비가습 인큐베이션 챔버인 Prodigy®의 centricult에 시딩하였다. 배양하는 동안, T세포 활성화 및 형질도입을 촉진하기 위해 구성요소 중 CTS™ 보충물(ThermoFisher), Glutamax, IL-2, 및 2% 면역 세포 혈청 대체물을 함유하는 OpTmizer™ CTS™ 기반의 배지인 Rapid 배지에 세포를 현탁시켰다. 생존가능한 유핵 세포(VNC)를 TransACT(Miltenyi)로 활성화시키고, 두 CAR을 모두 암호화하는 c201 렌티바이러스 벡터를 사용하여 형질도입시켰다. TransACT를 배양 배지에 희석된 세포에 첨가한 후, 시딩 당일에 렌티바이러스 형질도입을 수행하였다. GMP 등급 c201 바이러스를 qPCR 역가에 기초하여 1의 감염다중도(MOI)로 첨가하여 세포에 형질도입하였다. 렌티바이러스 벡터를 실온에서 최대 30분 동안 사용 직전에 해동하였다.

[0976] 0일째 프로세스 시작부터 배양물 세척 및 채취 개시까지, CAR-T세포를 시딩 후 20시간 동안 배양하였다. 배양 후, 세포 현탁액은 centricult 챔버 내에서 2회의 배양물 세척과 1회의 채취물 세척을 거쳤다.

[0977] 1일째에 CliniMACS® Prodigy®에서 채취물을 세척한 후, 세포 현탁액을 샘플링하여 생존가능한 세포 수 및 생존

력을 측정하였다. 이어서, 세포 현탁액을 원심분리기로 옮겨 수동으로 펠릿화하였다. 상청액을 제거하고, 세포 펠릿을 CS10(BioLife Solution)에 재현탁시켜, 최종 DMSO 농도가 약 10%인 생성물 제형을 생성하였다. 이어서, 세포를 개별 냉동백에 분배하고 분석 샘플링을 냉동바이알에 넣었다.

[0978] 센티넬 바이알을 해동한 후, 세포를 계수하고, 24-웰 플레이트에 최종 1×10^6 개 세포/mL로 재플레이트하였다. 재플레이트 72시간 후, 세포를 채취하고, 계수하고, 유세포 분석을 위해 각 샘플로부터 5×10^5 개 세포의 분취량을 취했다. 세포를 100 μ l/웰에서 15분 동안 Live/Dead Aqua(BV510)로 염색한 후, 2회 세척하였다. 이어서, 항체 혼합물(표 5)을 4°C에서 25분 동안 50 μ l/웰로 첨가하였다. 세포를 다시 2회 세척한 후, PBS 중 1.6% PFA(100 μ l/웰)에서 15분 동안 고정시켰다. 고정 후, 세포를 전술한 바와 같이 세척하고, 유세포 분석 완충액에 150 μ l/샘플의 최종 부피로 재현탁시켰다. BD LSRFortessa(BD Biosciences, San Jose CA) 상의 각 샘플의 Live CD3 양성 게이트에서 5e4개 세포를 획득하고, FlowJo v.10 소프트웨어(Ashland, OR)를 사용하여 데이터를 분석하였다. 이 절차를 재플레이트 144시간 후 반복하였다.

[0979] 전체 규모의 ARM 프로세스는 형질도입 144시간 후 측정시 총 CAR 발현이 12%인 CAR-T 산물을 생성하였다; 9% 이중 CAR+ 세포 및 3% 단일 CAR22+ 세포(도 5c). 소규모 활성화 프로세스 실험에서 알 수 있듯이, 총 CAR%와 단일 CAR에 대한 이중 CAR의 비율은 시간이 지남에 따라 증가했다.

[0980] 실시예 5: CD19 및/또는 CD22를 표적화하는 이중 및 단일 CAR-T의 생체내 활성화

[0981] 이 실시예는 종래의 방법(TM) 및 활성화 프로세스(AP)에 따라 제조된 이중 및 단일 CAR-T세포의 생체내 활성을 보여준다. 이 실시예에 사용된 이중 CAR-T는 활성화 프로세스에 의해 생성된, CD19 CAR의 업스트림에 CD22 CAR이 있는 c201이다. 이 연구에 사용된 관련 단일 CAR-T는 CD22를 인식하고 TM에 의해 생성된 CD22-65s, 및 CD19를 인식하고 TM 및 AP에 의해 생성된 CAR19(뮤런 scFv)이다. 이중 및 단일 CAR-T세포의 항종양 활성을 ALL 이중 이식 모델에서 생체내 평가하였다.

[0982] 물질 및 방법

[0983] 동물 연구의 개요는 실시예 2에 있다. 이 실시예에서는, 야생형 Nalm6(RRID: CVCL_0092), 인간 급성 림프모구성 백혈병(ALL) 세포주를 사용하였다.

[0984] CAR T세포 투여: 종양 이식 7일 후 마우스에 투여하였다. 종래의 제조에 의해 생성된 CD22-65s CAR-T세포는 3, 1, 및 0.3×10^6 개 CAR+ T세포로 투여되었다. AP로 생성된 CAR19 세포는 1 및 0.3×10^6 개 CAR+ T세포로 투여되었고, TM에 의해 생성된 CAR19는 1, 0.3, 및 0.1×10^6 개 CAR+ T세포로 투여되었다. AP로 생성된 c201 이중 CAR-T세포는 0.3, 0.1, 및 0.03×10^6 개 CAR+ T세포로 투여되었다. 대조군으로서 비히클(PBS) 또는 UTD를 마우스에 투여하였다.

[0985] 결과

[0986] 이중 및 단일 CAR T세포의 항종양 활성을 B세포 급성 림프모구성 백혈병 이중이식 모델에서 평가하였다(Nalm6 세포는 CD19와 CD22를 모두 발현함). 0일째의 종양세포 이식 후, 종양 보유 마우스를 처치군에 무작위 배정하고, 종양 이식 후 7일째에 측면 꼬리 정맥을 통해 CAR T세포를 정맥내 투여하였다. 동물이 평가변수를 달성할 때까지 종양 성장 및 동물 건강을 모니터링하였다.

[0987] PBS 또는 UTD T세포를 투여받은 마우스는 종양이 뒷다리 운동성을 감소시키기 전에 3주차에 안락사시켰다. 다른 그룹은 4~7주차에 안락사시켰다. 모든 처치군에 대한 평균 생체발광은 도 6a에 도식화되어 있다. T세포를 투여받지 않은 PBS 처치군은 정맥내 주사된 NSG 마우스에서 기준선 Nalm6 종양 성장 동역학을 보여준다. UTD 처치군은 검출되지 않은 이 모델에서의 인간 공여체 T세포의 비특이적 반응을 보여주기 위해 T세포 대조군으로 사용되었다. 더 나은 비교를 위해, 0.3×10^6 용량 그룹의 상이한 CAR-T를 도 6b에 함께 그래프로 나타냈다. 두 TM 생성 CAR-T 모두 CAR19(TM)에 대한 종양 성장의 약간의 지연과 함께 더 낮은 활성을 나타냈다. 대조적으로, 두 AP CAR-T는 모두 종양 부담을 현저히 감소시켰고, c201(AP) CAR-T는 5마리 중 4마리에서 종양 근절(BLI 기준선 수준)로 이어졌다.

[0988] 이들 동물에서 혈액을 매주 유세포 분석하여 CAR-T의 증식 및 지속의 동역학을 측정하였다. 컴파일된 데이터는 도 6c에 표시되어 있다. 0.3×10^6 용량의 CAR-T 그룹에 걸쳐 비교하면, AP 처리된 CAR-T가 더 나은 증식을 나타

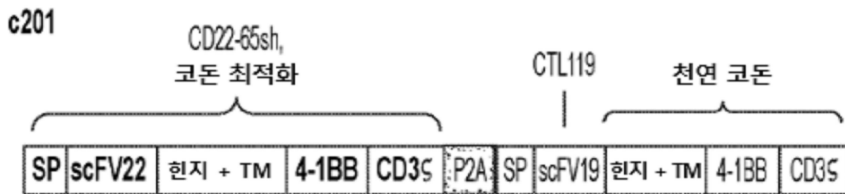
냈다. c201과 CAR19(둘 다 AP)의 비교는 0.3 및 1×10^6 용량 각각에 대해 CAR-T의 유사한 증식을 보여준다.

[0989] 이 연구는 AP로 제조된 경우에도 c201의 효능을 강조한다. c201 AP는 생체내 항종양 활성 및 세포 증식과 관련하여 CAR19 및 CD22-65s(TM) 뿐만 아니라 CAR19(AP)보다 우수했다.

[0990] 본 발명을 상세하게 설명하였지만, 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 기재된 바와 같은 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않으면서 수정, 변형, 및 균등한 양태가 가능하다는 것이 명백할 것이다. 또한, 본 발명의 모든 예는 비제한적인 예로서 제공됨을 이해해야 한다.

도면

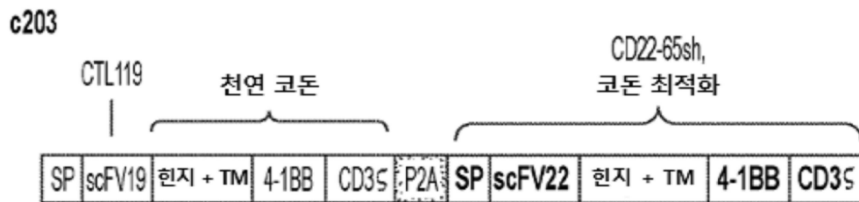
도면1a



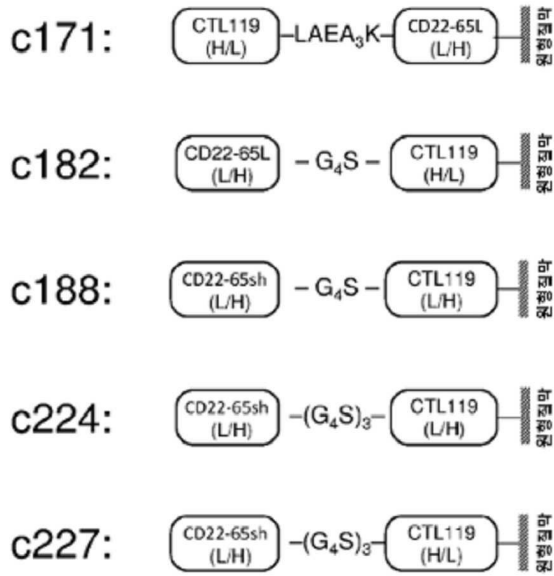
도면1b



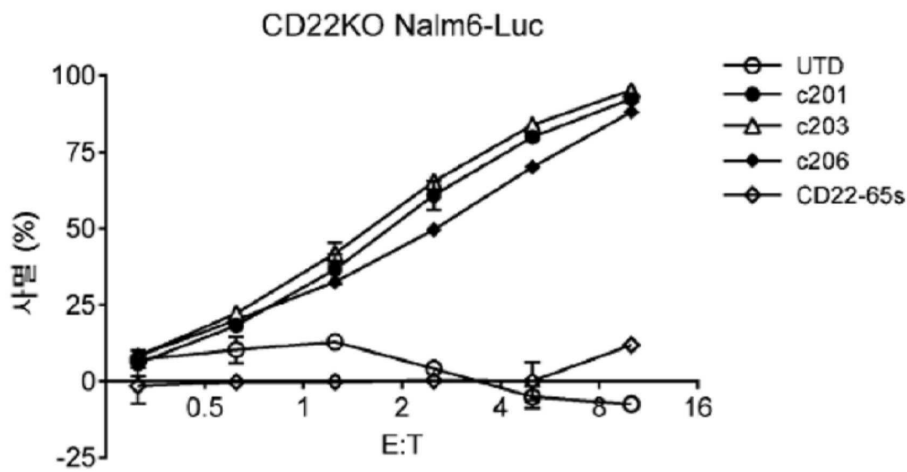
도면1c



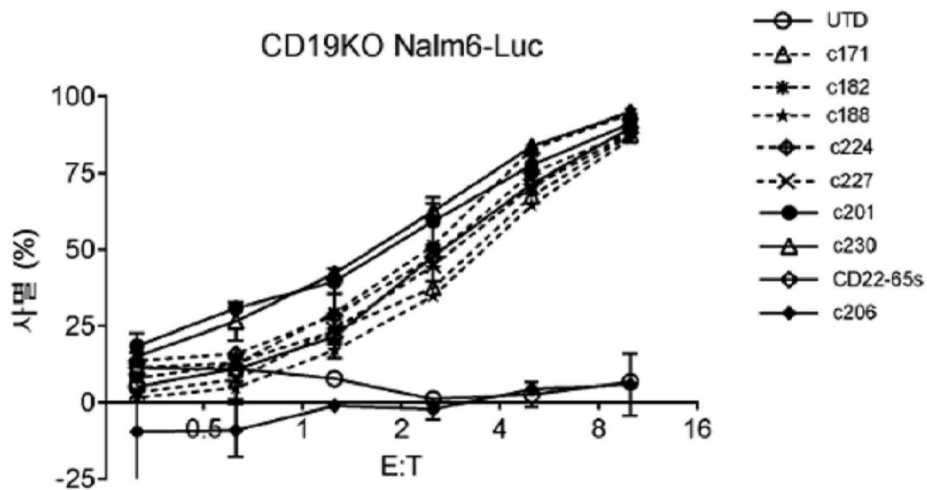
도면2



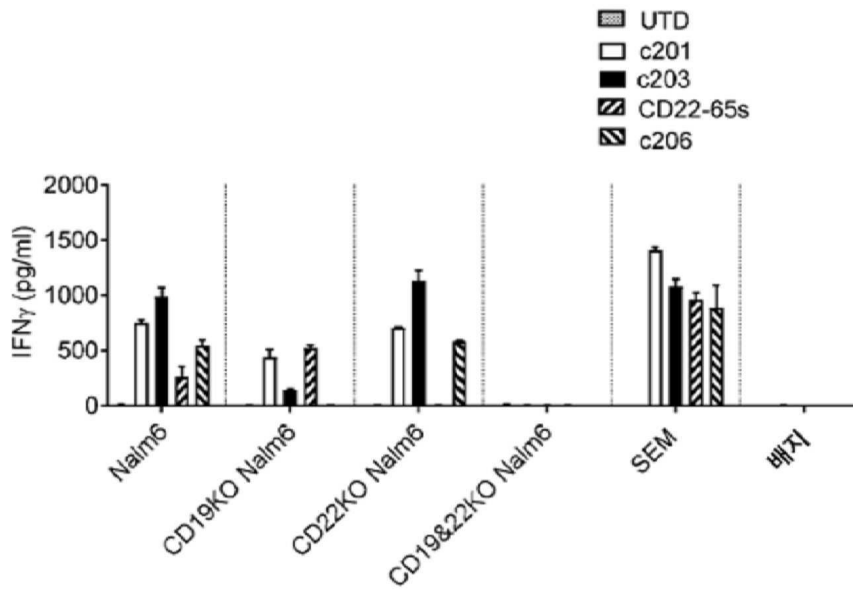
도면3a



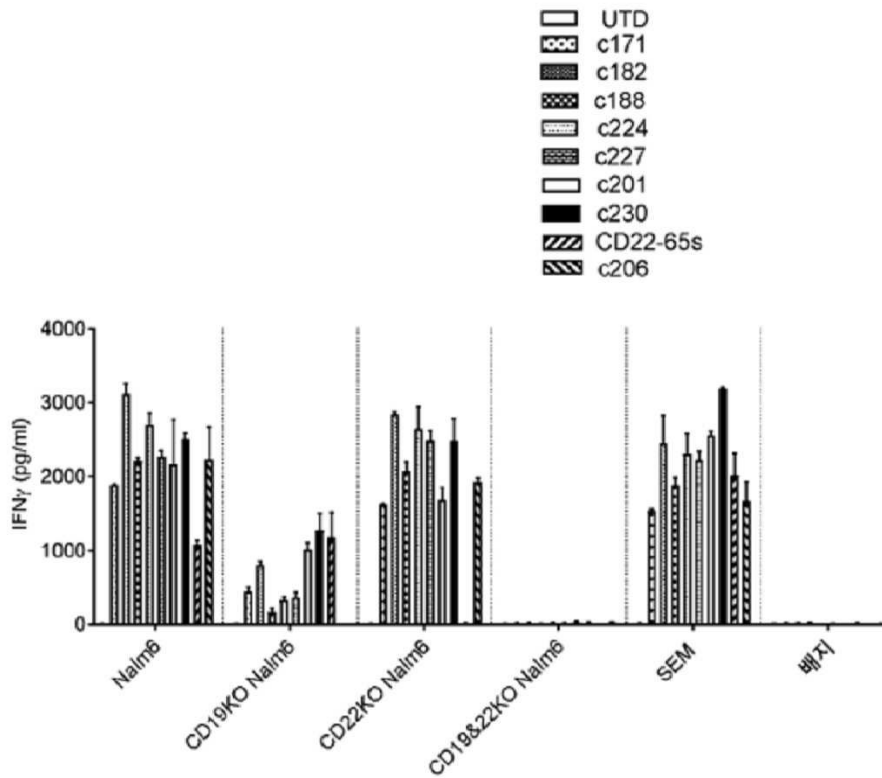
도면3b



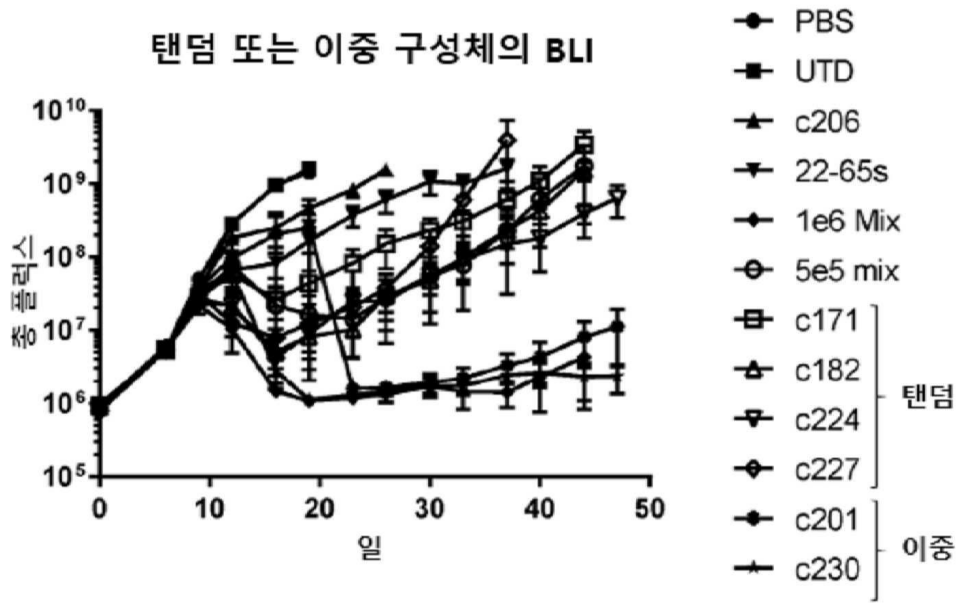
도면3c



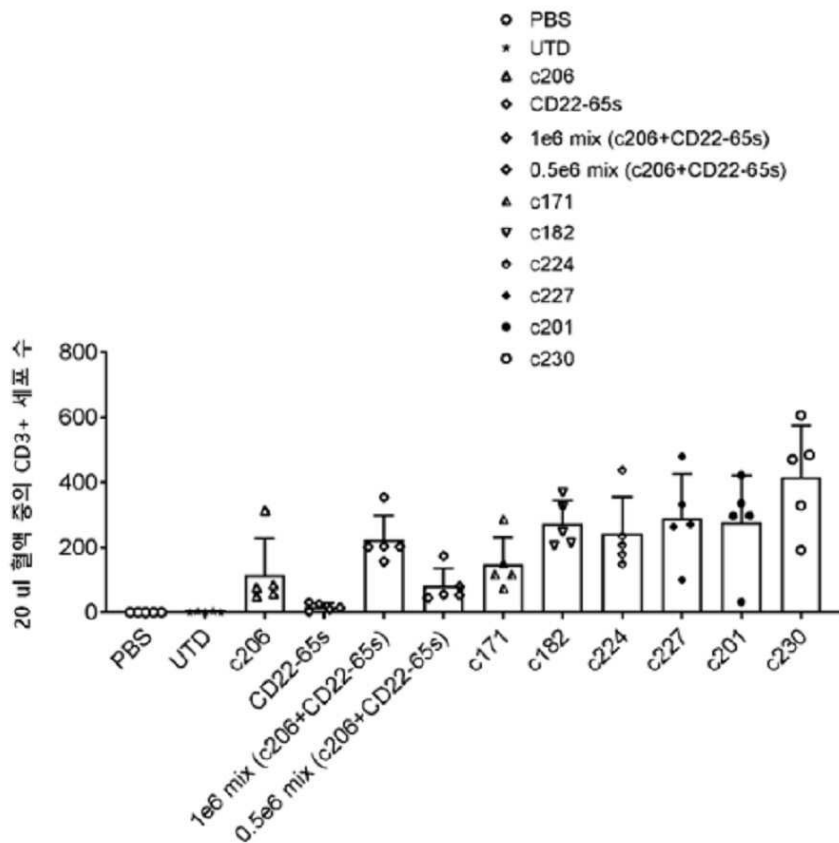
도면3d



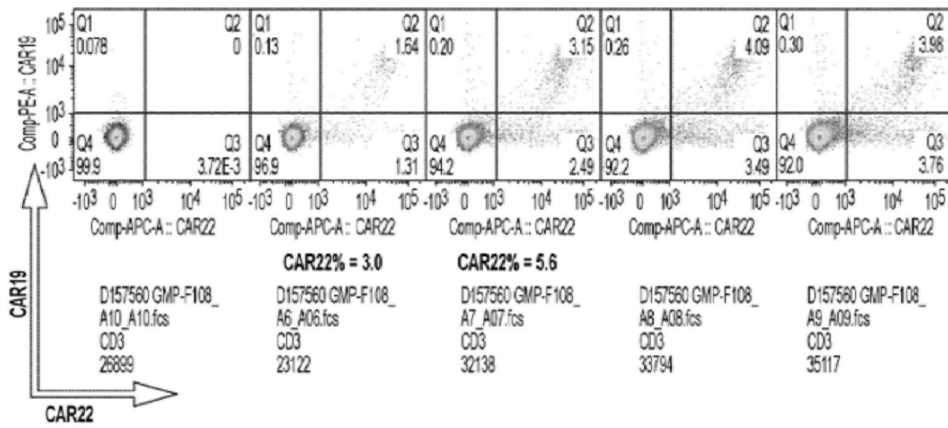
도면4a



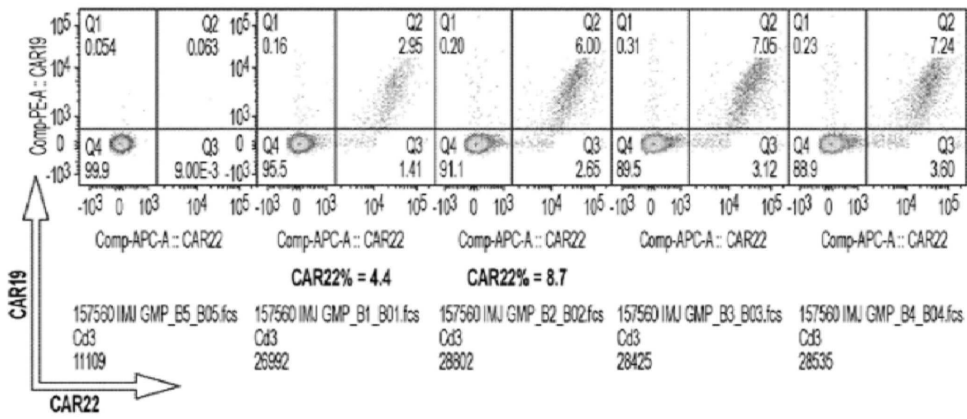
도면4b



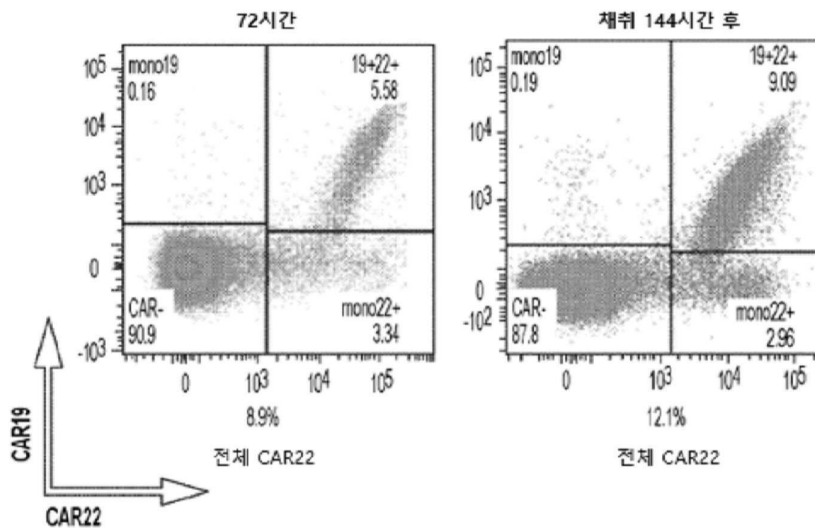
도면5a



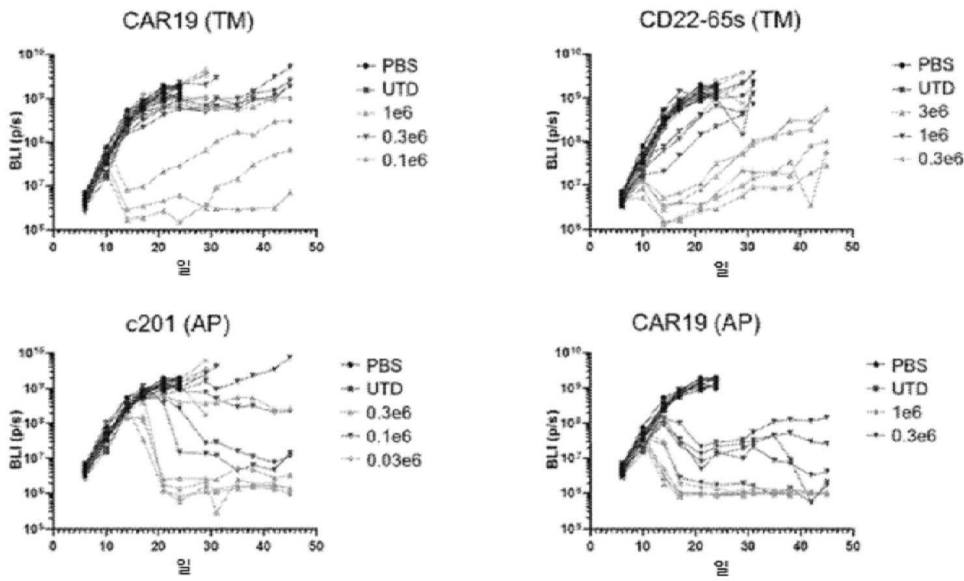
도면5b



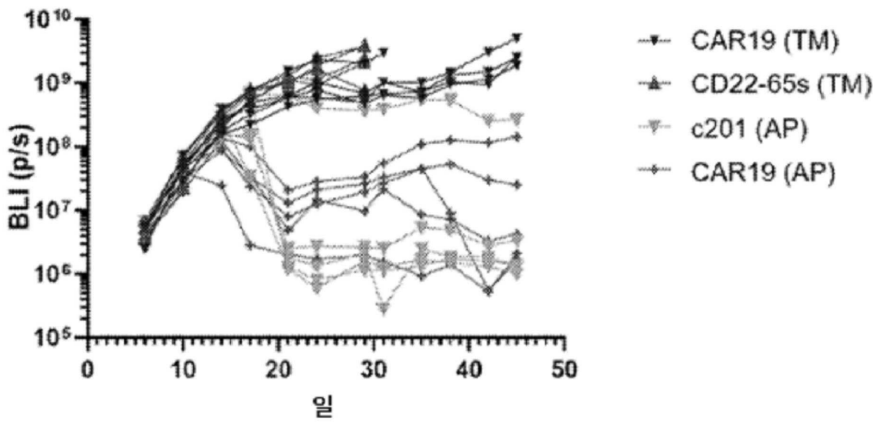
도면5c



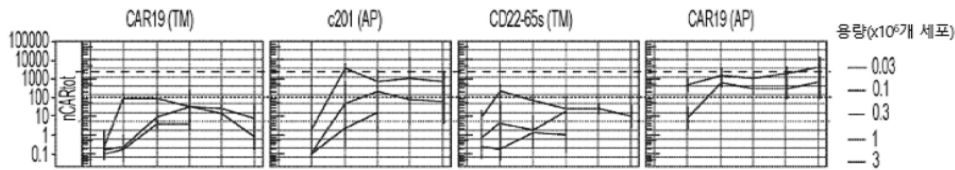
도면6a



도면6b



도면6c



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Novartis AG

<120> CD19 AND CD22 CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS AND USES THEREOF

<130> PAT058691-WO-PCT

<160> 109

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2238

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 1

```

atggccctcc ctgtaccgc cctgtctctt ccgtggctc ttctgtcca cgccctcgg      60
cccgaaattg tgatgacca gtcaccgcc actcttagcc tttcaccgg tgagcgcga      120
accctgtctt gcagagctc ccaagacatc taaaatacc ttaattgta tcaacagaag      180

cccggacagg ctctcgctt tctgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatccct      240
gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacacc tcactatcag ctcactgcag      300
ccagaggact tcgtgtcta tttctgtcag caagggaaca ccctgcccta cacctttgga      360
cagggcacca agctcgagat taaaggtgga ggtggcagcg gaggaggagg gtccggcggg      420
ggaggaagcc aggtccaact ccaagaaagc ggaccgggtc ttgtgaagcc atcagaaact      480
ctttcactga cttgtactgt gagcggagtg tctctccccg attacggggg gtcttggatc      540
agacagccac cggggaaggg tctggaatgg attggagtga tttggggctc tgagactact      600

tactaccaat catccctcaa gtcacgcgtc accatctcaa aggacaactc taagaatcag      660
gtgtcactga aactgtcacc tgtgaccgca gccgacaccg ccgtgtacta ttgcgctaag      720
cattactatt atggcgggag ctacgcaatg gattactggg gacagggtac tctggtcacc      780
gtgtccagct tggcagaagc cgcccgaaa gaagtgcagc ttcaacaatc aggaccagga      840
ctcgtcaaac catcacagac cctctccctc acatgtgcca tctccgggga ctccatgttg      900
agcaattccg aactttgaa ttggattaga caaagcccgt cccggggctc ggaatggttg      960
ggacgcacct accaccggtc tacttggtag gacgactacg cgtcatccgt gcggggaaga      1020

gtgtccatca acgtggacac ctccaagaac cagtacagcc tgcagcttaa tgccgtgact      1080
cctgaggata cggcgtctca ctactgcgcc cgcgtccgcc tgcaagacgg gaacagctgg      1140
agcgaigcat tcgatgtctg gggccaggga actatggtca ccgtgtctc tggggcggg      1200
ggatcgggtg gcgggggttc gggggcggc ggctctcagt ccgctcttac ccaaccggcc      1260
tcagcctcgg ggagccccgg ccagagcgtg accatttctt gcaccggcac ttcacccgac      1320
gtggcgggct acaactacgt gtcttggtag caacagcacc cgggaaaggc ccccaagctc      1380
atgatctacg acgtgtcaa caggccctcg ggagtgtcca accggttctc gggttcgaaa      1440

```

tcgggaaca cagccagcct gaccatcagc ggactgcagg ctgaagatga agccgactac 1500
 tactgtctct cctacacctc gtcattccacg ctctacgtgt tcggcactgg aactcagctg 1560
 actgtgctga ccaactacccc agcaccgagg ccacccaccc cggtctctac catcgcctcc 1620
 cagcctctgt ccttgcgtcc ggaggcatgt agaccgcag ctggtggggc cgtgcatacc 1680
 cgggtcttg atttcgctg cgatatctac atttgggccc ctctggctgg tacttgctgg 1740
 gtctgtctgc ttctactcgt gatcactctt tactgtaagc gcggtcggaa gaagctgctg 1800
 tacatcttta agcaaccctt catgaggcct gtgcagacta ctcaagagga ggacggctgt 1860

tcatgccggt tcccagagga ggaggaaggc ggctgcgaac tgcgcgtgaa attcagccgc 1920
 agcgcagatg ctccagccta ccagcagggg cagaaccagc tctacaacga actcaatctt 1980
 ggtcggagag aggagtacga cgtgctggac aagcggagag gacgggaccc agaaatgggc 2040
 gggaagccgc gcagaaagaa tcccgaagag ggctgtaca acgagctcca aaagataag 2100
 atggcagaag cctatagcga gattggtatg aaaggggaac gcagaagagg caaagccac 2160
 gacggactgt accagggact cagcaccgcc accaaggaca cctatgacgc tcttcacatg 2220
 caggccctgc cgcctcgg 2238

<210> 2

<211> 746

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 2

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 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro

65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile

85 90 95

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

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
 595 600 605
 Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
 610 615 620
 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
 625 630 635 640
 Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
 645 650 655
 Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
 660 665 670
 Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
 675 680 685
 Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala

690 695 700
 Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
 705 710 715 720
 Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
 725 730 735
 Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 740 745

- <210> 3
- <211> 2232
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 3
 atggccctcc ctgtaccgc cctgtctgtt ccgttgctc ttctgtcca cgccgtcgg 60
 cccgaagtgc agettcaaca atcaggacca ggactcgtca aaccatcaca gaccctctcc 120
 ctcatatgtg ccatctccgg ggactccatg ttgagcaatt cgcacacttg gaattggatt 180
 agacaagacc cgtccccggg tctggaatgg ttgggacgca cctaccaccg gtctacttgg 240
 tacgacgact acgcgtcatc cgtgcgggga agagtgtcca tcaactgga cacctccaag 300
 aaccagtaca gcctgcagct taatgccgtg actcctgagg atacggcgt ctactactgc 360

gccccgctcc gcctgcaaga cgggaacagc tggagcgatg cattcgatgt ctggggccag 420

ggaactatgg tcaccgtgtc gtctgggggc gttggatcgg gtggcggggg ttcggggggc 480

ggcggtcttc agtccgtctt tacccaaccg gcctcagcct cggggagccc cggccagagc 540

gtgaccattt ccigcaccgg cacttcatcc gacgtgggcg gctacaacta cgtgtcctgg 600

taccaacagc acccgggaaa ggcccccaag ctcatgatct acgacgtgtc caacaggccc 660

tcgggagtgt ccaaccggtt ctcggttcg aaatcgggaa acacagccag cctgaccatc 720

agcggactgc aggctgaaga tgaagccgac tactactgct cctcctacac ctctcatcc 780

acgtctacg tgttcggcac tggaaactcag ctgactgtgc tgggaggggg agggagtgaa 840

attgtgatga cccagtcacc cgccactctt agcctttcac ccggtgagcg cgcaaccctg 900

tcttgacag cctccaaga catctcaaaa taccttaatt ggtatcaaca gaagcccgga 960

caggctcttc gccttctgat ctaccacacc agccggtctc attctggaat ccttgccagg 1020

ttcagcggta gcgatctgg gaccgactac accctacta tcagctcact gcagccagag 1080

gacttcgctg tetatttctg tcagcaaggg aacaccctgc cctacacctt tggacagggc 1140

accaagctcg agattaaagg tggaggtggc agcggaggag gtgggtccgg cgggtggagga 1200

agccaggctc aactccaaga aagcggaccg ggtcttgtga agccatcaga aactctttca 1260

ctgacttgta ctgtgagcgg agtgtctctc cccgattacg ggggtgtctg gatcagacag 1320

ccaccgggga agggctctgga atggattgga gtgatttggg gctctgagac tacttactac 1380

caatcatccc tcaagtcacg cgtcaccatc tcaaaggaca actctaagaa tcaggtgtca 1440

ctgaaactgt catctgtgac cgcagccgac accgccgtgt actatgctc taagcattac 1500

tattatggcg ggagctacg aatggattac tggggacagg gtactctggt caccgtgtcc 1560

agcaccacta cccagcacc gaggccacc accccgctc ctaccatgc ctcccagcct 1620

ctgtccctgc gtccggaggc atgtagacc gcagctggtg gggccgtgca tacccggggt 1680

cttgacttcg cctgcgatat ctacatttgg gccctctgg ctggtacttg cggggtcctg 1740

ctgctttcac tcgtgatcac tctttactgt aagcgcggtc ggaagaagct gctgtacatc 1800

tttaagcaac cttcatgag gcctgtgac actactcaag aggaggacgg ctgttcatgc 1860

cggttcccag aggaggagga aggcggctgc gaactgcgcg tgaattcag ccgcagcgca 1920

gatgtcccag cctaccagca ggggcagaac cagctctaca acgaactcaa tcttggtcgg 1980

agagaggagt acgacgtgct ggacaagcgg agaggacggg acccagaaat gggcgggaag 2040

ccgcgcagaa agaatccca agaggcctg tacaacgagc tccaaaagga taagatggca 2100

gaagcctata gcgagattgg tatgaaaggg gaacgcagaa gaggcaaagg ccacgacgga 2160
 ctgtaccagg gactcagcac cgccaccaag gacacctatg acgctcttca catgcaggcc 2220
 ctgccgcctc gg 2232

<210> 4

<211> 744

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 4

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 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu

20 25 30

Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp

35 40 45

Ser Met Leu Ser Asn Ser Asp Thr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro

50 55 60

Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly Arg Thr Tyr His Arg Ser Thr Trp

65 70 75 80

Tyr Asp Asp Tyr Ala Ser Ser Val Arg Gly Arg Val Ser Ile Asn Val

85 90 95

Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu Gln Leu Asn Ala Val Thr Pro

100 105 110

Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Arg Leu Gln Asp Gly

115 120 125

Asn Ser Trp Ser Asp Ala Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val

130 135 140

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

145 150 155 160

Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Ala Ser Gly Ser

165 170 175

Pro Gly Gln Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val

180 185 190
 Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala
 195 200 205
 Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser

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

 275 280 285
 Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala
 290 295 300
 Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 305 310 315 320
 Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly
 325 330 335
 Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu

 340 345 350
 Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln
 355 360 365
 Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
 370 375 380
 Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 385 390 395 400
 Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser

 405 410 415
 Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp
 420 425 430

Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 435 440 445
 Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Gln Ser Ser Leu
 450 455 460
 Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser
 465 470 475 480
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 485 490 495
 Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 500 505 510
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg
 515 520 525
 Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg
 530 535 540
 Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly
 545 550 555 560
 Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr
 565 570 575
 Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg
 580 585 590
 Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro
 595 600 605
 Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu
 610 615 620
 Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala
 625 630 635 640
 Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
 645 650 655
 Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
 660 665 670
 Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu

675 680 685
 Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
 690 695 700
 Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
 705 710 715 720
 Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
 725 730 735
 His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 740
 <210> 5
 <211> 2202
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 5
 atggcctcc ctgtaccgc cctgctgctt cgctggctc ttctgctcca gcccgtcgg 60
 cccagtcgg ctcttaccca accggcctca gcctcgggga gccccggcca gacgtgacc 120
 atttctgca ccggcacttc atccgacgtg ggcggtaca actacgtgtc ctggtaccaa 180
 cagcaccgg gaaaggcccc caagctcatg atctacgacg tgtccaacag gcctcggga 240
 gtgtccaacc ggttctcggg ttcgaaatcg ggaaacacag ccagcctgac catcagcggg 300
 ctgcaggctg aagatgaagc cgactactac tgctctctct acacctcgtc atccagctc 360
 tacgtgttcg gcaactggaac tcagctgact gtgctgggcg gaggaggctc cgaagtgcag 420
 cttcaacaat caggaccagg actcgtcaaa ccatcacaga ccctctccct cacatgtgcc 480
 atctccgggg actccatgtt gagcaattcc gacacttga attggattag acaaagcccc 540
 tcccggggtc tggaatggtt gggacgcacc taccaccggt ctacttggta cgacgactac 600
 gcgtcatccg tgcggggaag agtgtccatc aacgtggaca cctccaagaa ccagtacagc 660
 ctgcagctta atgccgtgac tctgaggat acgggcgtct actactgcgc ccgctccgc 720
 ctgcaagacg ggaacagctg gagcgatgca ttcgatgtct ggggccaggg aactatggtc 780
 accgtgtcgt ctggaggggg agggagtgaa attgtgatga cccagtcacc cgccactctt 840
 agcctttcac ccggtgagcg gcgaacctg tcttcagag cctccaaga catctcaaaa 900
 taccttaatt ggiatcaaca gaagcccgga caggctctc gccttctgat ctaccacacc 960
 agccgctcc attctggaat ccctgccagg ttcagcggta gcgatctgg gaccgactac 1020

accctcacta tcagctcact gcagccagag gacttcgctg tctatttctg tcagcaaggg 1080

aacaccctgc cctacacctt tggacagggc accaagctcg agattaaagg tggaggtggc 1140

agcggaggag gtgggtccgg cgggtggagga agccaggtcc aactccaaga aagcggaccg 1200

ggtcttgtga agccatcaga aactctttca ctgacttgta ctgtgagcgg agtgtctctc 1260

cccgattacg ggggtgtcttg gatcagacag ccaccgggga agggcttgga atggattgga 1320

gtgatttggg gctctgagac tacttactac caatcatccc tcaagtcacg cgtcaccatc 1380

tcaaaggaca actctaagaa tcaggtgtca ctgaaactgt catctgtgac cgcagccgac 1440

accgccgtgt actattgcgc taagcattac tattatggcg ggagctacgc aatggattac 1500

tggggacagg gtactctggg caccgtgtcc agcaccacta ccccagcacc gaggccaccc 1560

accccgctc ctaccatcgc ctcccagcct ctgtccctgc gtccggagc atgtagacce 1620

gcagctgggtg gggccgtgca taccgggggt ctgacttcg cctgcgatat ctacatttgg 1680

gcccctctgg ctggtacttg cggggtcctg ctgctttcac tcgtgatcac tctttactgt 1740

aagcgcggtc ggaagaagct gctgtacatc ttaagcaac cttcatgag gcctgtgcag 1800

actactcaag aggaggacgg ctgttcatgc cggttcccag aggaggagga aggcggctgc 1860

gaactgcgcg tgaattcag cgcagcgcga gatgctccag cctaccagca ggggcagaac 1920

cagctctaca acgaactcaa tcttggtcgg agagaggagt acgacgtgct ggacaagcgg 1980

agaggacggg acccagaaat gggcgggaag ccgcgcagaa agaatcccca agagggcctg 2040

tacaacgagc tccaaaagga taagatggca gaagcctata gcgagattgg tatgaaaggg 2100

gaacgcagaa gaggcaaagg ccacgacgga ctgtaccagg gactcagcac cgccaccaag 2160

gacacctatg acgctcttca catgcaggcc ctgccctc gg 2202

<210> 6

<211> 734

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 6

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 Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Ala Ser

 20 25 30

Gly Ser Pro Gly Gln Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser

Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp
 290 295 300
 Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr
 305 310 315 320
 Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 325 330 335
 Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe
 340 345 350
 Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly
 355 360 365
 Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 370 375 380
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro
 385 390 395 400
 Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
 405 410 415
 Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro
 420 425 430
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr
 435 440 445
 Tyr Tyr Gln Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn
 450 455 460
 Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp
 465 470 475 480
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr
 485 490 495
 Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Thr
 500 505 510
 Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser
 515 520 525
 Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly

530 535 540
 Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp
 545 550 555 560
 Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile
 565 570 575
 Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys

 580 585 590
 Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys
 595 600 605
 Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val
 610 615 620
 Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn
 625 630 635 640
 Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val

 645 650 655
 Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
 660 665 670
 Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
 675 680 685
 Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
 690 695 700
 Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys

705 710 715 720
 Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 725 730

<210> 7

<211> 2232

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 7

atggccctgc ccgtgactgc gctcctgctt ccgttgcccc tgctcctgca tgccgccaga

60

cctcagtcg ctctgactca gccggcctca gcttcgggggt cccctggtca aagcgtcact 120
 atttctgta ccggaacctc atcagacgtg ggcggctaca attacgtgtc ctggtaccaa 180

 cagcacccecg gaaaggetcc taagettatg atctacgacg tgtccaaccg gccgtcagga 240
 gtgtccaaca gattctccgg ctccaagagc gaaaacactg ccagcttgac cattagcggc 300
 ttgcaggccc aggacgaagc cgactactac tgccttagct acacatcctc gcttacctc 360
 tactgtttg gaacggggac ccagetgact gtgctcgggg gtggaggatc agaggtgcaa 420
 ctccagcagt ccggtcctgg cctcgtgaaa ccgtccaaa ccctgtccct gacttgcgcc 480
 atctcggggc actccatgct gtccaattcc gacacctgga actggattag acaatcgct 540
 agccggggac tcgaatggct gggccggacc taccaccggt ccacgtggtg tgacgactac 600

 gcaagctccg tccggggaag ggtgtccatt aacgtcgata cctccaagaa ccagtacagc 660
 cttcagctga acgtgtgac ccccgaggat accggcgtct actactgtgc aagagtgcga 720
 ttgcaggatg gaaactctg gtcggacgca ttcgatgtct ggggacaggg aactatggtg 780
 accgtgtcct cgggcccagg cgggagcggg ggaggaggct ctggcggagg aggaagcgag 840
 attgtcatga ctcagtccecg gccacactc tcctgtcac ccggagaaag agcaaccctg 900
 agctgcaggg cgtcccagga catctcgaag tacctgaact ggtaccagca gaagcctgga 960
 caagcaccce gctcctgat ctaccacacc tcgggctgc attcgggaat ccccgcaga 1020

 ttctcaggga gcggatcagg aaccgactac accctgacta tctcagcct gcaaccagag 1080
 gatttcgccg tgtacttctg ccagcaagga aacacctgc cctacacctt tggacagga 1140
 accaagctcg agattaaggg ggggtggtgga tcgggagggg gtggatcagg aggaggcggc 1200
 tcacaagtcc agctgcaaga atccggtccg ggacttgtga agccgtccga aacctgtca 1260
 ctgacttgca ctgtgtccgg ggtgtcattg cccgactacg gcgtgagctg gattcggcag 1320
 cccctggaa agggattgga atggatcggc gtgatctggg gttcggaaac tacctactat 1380
 cagtcctcac tgaagtcccg cgtgaccatc agcaaggata attcaaaaa ccaagtgtct 1440

 ctgaagctct ccagcgtcac tgccccgat actgccgtgt actactgcgc caagcactac 1500
 tattacggcg gttcgtacgc catggactac tggggccaag ggacactcgt gaccgtgtca 1560
 tccaccacta cccagcacc gaggccacc accccgctc ctaccatcgc ctcccagcct 1620
 ctgtcctcgc gtccggagge atgtagacce gcagctggtg gggccgtgca taccgggggt 1680
 cttgacttcc cctcgcgatat ctacatttgg gccctctgg ctggtacttg cggggtcctg 1740
 ctgctttcac tcgtgatcac tctttactgt aagcgcggtc ggaagaagct gctgtacac 1800

tttaagcaac ccttcatgag gcctgtgcag actactcaag aggaggacgg ctgttcatgc 1860
 cggttcccag aggaggagga aggcggctgc gaactgcgcg taaaattcag cgcagcgcga 1920
 gatgctccag cctaccagca ggggcagaac cagctctaca acgaactcaa tcttggtcgg 1980
 agagaggagt acgacgtgct ggacaagcgg agaggacggg acccagaaat gggcgggaag 2040
 ccgcgcagaa agaatcccca agagggcctg tacaacgagc tccaaaagga taagatggca 2100
 gaagcctata gcgagattgg tatgaaaggg gaacgcagaa gaggcaaagg ccacgacgga 2160
 ctgtaccagg gactcagcac cgccaccaag gacacctatg acgctcttca catgcaggcc 2220
 ctgccgcctc gg 2232

<210> 8

<211> 744

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 8

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 Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Ala Ser
 20 25 30
 Gly Ser Pro Gly Gln Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser
 35 40 45
 Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly
 50 55 60
 Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly
 65 70 75 80
 Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu
 85 90 95
 Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser
 100 105 110
 Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Gln
 115 120 125
 Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser

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

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

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

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

 370 375 380

Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 385 390 395 400
 Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
 405 410 415
 Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp
 420 425 430
 Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 435 440 445
 Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Gln Ser Ser Leu
 450 455 460
 Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser
 465 470 475 480
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 485 490 495
 Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 500 505 510
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg
 515 520 525
 Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg
 530 535 540
 Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly
 545 550 555 560
 Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr
 565 570 575
 Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg
 580 585 590
 Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro
 595 600 605
 Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu
 610 615 620
 Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala

625 630 635 640
 Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
 645 650 655
 Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
 660 665 670
 Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
 675 680 685
 Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser

690 695 700
 Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
 705 710 715 720
 Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
 725 730 735
 His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 740

<210> 9

<211> 2232

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 9

atggccctgc ccgtgactgc gtcctctgctt ccgttggccc tgctcctgca tgccgccaga 60
 cctcagtcgg ctctgactca gccggcctca gcttcggggg cccctgggtca aagcgtcact 120
 atttctgtga ccggaacctc atcagacgtg ggcggctaca attacgtgtc ctggtaccaa 180
 cagcacccecg gaaaggetcc taagcttatg atctacgacg tgtccaaccg gccgtcagga 240
 gtgtccaaca gattctccgg ctccaagagc ggaaacactg ccagcttgac cattagcggc 300
 ttgcaggccc aggacgaagc cgactactac tgctctagct acacatcctc gcttacctc 360
 tactgttttg gaacggggac ccagctgact gtgctcgggg gtggaggatc agaggtgcaa 420

 ctccagcagt ccggtcctgg cctcgtgaaa ccgtcccaa cctgtccct gacttgcgcc 480
 atctcggggc actccatgct gtccaattcc gacacctgga actggattag acaatcgct 540
 agccggggac tcgaatggct gggccggacc taccaccggt ccacgtggta tgacgactac 600
 gcaagctccg tccggggaag ggtgtccatt aacgtcgata cctccaagaa ccagtacagc 660

cttcagctga acgctgtgac ccccaggat accggcgtct actactgtgc aagagtgcga 720
 ttgcaggatg gaaactcgtg gtcggacgca ttcgatgtct ggggacaggg aactatggtc 780
 actgtgtcct ccggcgggtgg aggctcgggg gggggcggct caggaggagg cggtcacia 840

gtccagctgc aagaatccgg tccgggactt gtgaagccgt ccgaaaccct gtcactgact 900
 tgcaactgtgt ccgggtgtgc attgcccgac tacggcgtga gctggattcg gcagcccct 960
 ggaaagggat tggaatggat cggcgtgac tggggttcgg aaactaccta ctatcagtec 1020
 tcaactgaagt cccgcgtgac catcagcaag gataattcca aaaaccaagt gtctctgaag 1080
 ctctccagcg tcaactgccg cgatactgcc gtgtactact gcgccaagca ctactattac 1140
 ggccggttcgt acgccatgga ctactgggga caaggcactc ttgtgactgt gtcaagcggc 1200
 ggtggaggga gcggtggggg cggttcagga ggaggcggat cagagatcgt gatgacccaa 1260

tccccagcca cctgtccct cagccctgga gaaagagcca cctgagctg ccgggcctec 1320
 caggatatca gcaagtactt gaactggtac caacaaaagc cggggcaggc gccccggctc 1380
 ctgatctacc acacctcgg cctccactca ggtatccccg ccagattctc agggagcggc 1440
 tccggtactg actacacct gactatitcc tcaactgcagc cagaggactt tgccgtgtac 1500
 ttctgccagc agggaaacac tctgccgtac accttcgggc agggaaacgaa gcttgaatt 1560
 aagaccacta cccagcacc gaggccacc accccggctc ctaccatcgc ctcccagcct 1620
 ctgtccctgc gtccggaggc atgtagacc gcagctggtg gggccgtgca tacccggggt 1680

cttgacttcg cctgcgatat ctacatttg gccctctgg ctggtacttg cggggtcctg 1740
 ctgctttcac tegtgatcac tctttactgt aagcgcggtc ggaagaagct gctgtacatc 1800
 ttaagaac ccttcatgag gcctgtgag actactcaag aggaggacgg ctgttcatgc 1860
 cggttccag aggaggagga aggcggctgc gaactgcgcg tgaattcag ccgcagcga 1920
 gatgtccag cctaccagca ggggcagaac cagctctaca acgaactcaa tcttggtcgg 1980
 agagaggagt acgacgtgct ggacaagcgg agaggacggg acccagaaat gggcgggaag 2040
 ccgcgcagaa agaatccca agaggcctg tacaacgagc tcaaaaagga taagatggca 2100

gaagcctata gcgagattgg tatgaaagg gaacgcagaa gaggcaaagg ccacgacgga 2160
 ctgtaccagg gactcagcac cgccaccaag gacacctatg acgctcttca catgcaggcc 2220
 ctgccgcctc gg 2232

<210> 10
 <211> 744
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 10

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

225 230 235 240
 Leu Gln Asp Gly Asn Ser Trp Ser Asp Ala Phe Asp Val Trp Gly Gln
 245 250 255
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 260 265 270
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro

 275 280 285
 Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
 290 295 300
 Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro
 305 310 315 320
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr
 325 330 335
 Tyr Tyr Gln Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn

 340 345 350
 Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp
 355 360 365
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr
 370 375 380
 Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
 385 390 395 400
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile

 405 410 415
 Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg
 420 425 430
 Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn
 435 440 445
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His
 450 455 460
 Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly

 465 470 475 480

Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
 485 490 495

Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe
 500 505 510

Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg
 515 520 525

Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg
 530 535 540

Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly
 545 550 555 560

Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr
 565 570 575

Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg
 580 585 590

Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro
 595 600 605

Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu
 610 615 620

Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala
 625 630 635 640

Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
 645 650 655

Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
 660 665 670

Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
 675 680 685

Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
 690 695 700

Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
 705 710 715 720

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

	725	730	735			
His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg						
	740					
<210>	11					
<211>	2985					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220><223>	Synthetic polynucleotide					
<400>	11					
atggcctcc	ctgtcaccgc	cctgctgctt	ccgctggctc	ttctgctcca	cgccgctcgg	60
cccgaagtgc	agctgcagca	gtcagggcct	ggcctgttca	agccgtcgca	gaccctctcc	120
ctgacatgcg	ccattagcgg	ggactccatg	ctgagcaact	cggacacctg	gaactggatt	180
cggcagtccc	cttcccgggg	actcgagtgg	ctcggacgca	cctaccatcg	gagcacttgg	240
tacgacgact	acgcctcttc	cgtgagaggt	cgcgtgtcga	tcaacgtgga	tacctcgaag	300
aaccagtata	gcttgcaact	gaaccccgtg	accctgagg	ataccggagt	gtactattgt	360
gcgagagtca	ggctgcaaga	cggaaactcc	tggtccgacg	catttgatgt	ctggggacag	420
ggtactatgg	tcacggtgtc	atctggaggc	ggaggatcgc	aaagcgcct	gactcagccg	480
gcttcggcta	gcggttcacc	ggggcagtcc	gtgactatct	cctgcaccgg	gacttctctc	540
gacgtgggag	gctacaatta	cgtgtcctgg	taccagcaac	accccggcaa	agccccaaag	600
ctgatgatct	acgacgtcag	caacagacc	agcggagtgt	ccaaccggtt	cagcggctcc	660
aagtccgca	acaccgctc	cctgaccatc	agcgggcttc	aggccgaaga	tgaggcggat	720
tactactgct	cctcgtacac	ctcaagctca	actctgtacg	tgttcggcac	cggtactcag	780
ctcacctgic	tgaccactac	cccagcaccg	aggccacca	ccccggctcc	taccatcgcc	840
tcccagctc	tgtccctgcg	tccggaggca	tgtagaccg	cagctggtgg	ggcctgcat	900
acccggggtc	ttgacttcgc	ctgcgatac	tacattggg	ccctctggc	tggtacttgc	960
gggtcctgc	tgctttcact	cgtgatcact	ctttactgta	agcgcggtcg	gaagaagctg	1020
ctgtacatct	ttaagcaacc	cttcatgagg	cctgtgcaga	ctactcaaga	ggaggacggc	1080
tgttcatgcc	ggttcccaga	ggaggaggaa	ggcggctgcg	aactgcgct	gaaattcagc	1140
cgcagcgag	atgctccagc	ctaccagcag	gggcagaacc	agctctaaa	cgaactcaat	1200
cttggctcga	gagaggagta	gcacgtgctg	gacaagcgga	gaggacggga	cccagaaatg	1260
ggcgggaagc	cgcgcagaaa	gaatcccaa	gagggcctgt	acaacgagct	ccaaaaggat	1320
aagatggcag	aagcctatag	cgagattggt	atgaaagggg	aacgcagaag	aggcaaaggc	1380

cacgacggac tgiaccaggg actcagcacc gccaccaagg acacctatga cgctcttcac 1440
atgcaggccc tgccgcctcg gggaagcgga gctactaact tcagcctgct gaagcaggct 1500

ggagacgtgg aggagaacce tggacctatg gccttaccag tgaccgcctt getcctgceg 1560
ctggccttgc tgctccacgc cgccaggccg gaaattgtga tgaccagtc acccgccact 1620
cttagccttt cacccggtga gcgcgcaacc ctgtcttgca gaggctccca agacatctca 1680
aaatacctta attggtatca acagaagccc ggacaggctc ctgccttct gatctaccac 1740
accagccggc tccattctgg aatccctgcc aggttcagcg gtagcggatc tgggaccgac 1800
tacacctca ctatcagctc actgcagcca gaggacttcg ctgtctatct ctgtcagcaa 1860
gggaacaccc tgcctacac ctttggacag ggcaccaagc tcgagattaa aggtggaggt 1920

ggcagcggag gaggtgggtc cggcgggtga ggaagccagg tccaactcca agaaagcgga 1980
ccgggtcttg tgaagccatc agaaactctt tcaactgactt gtactgtgag cggagtgtct 2040
ctccccgatt acggggtgtc ttggatcaga cagccaccgg ggaagggctc ggaatggatt 2100
ggagtgattt ggggctctga gactacttac taccaatcat ccctcaagtc acgcgtcacc 2160
atctcaaagg acaactctaa gaatcagggt tcaactgaaac tgtcatctgt gaccgcagcc 2220
gacaccgccg tgiactattg cgctaagcat tactattatg gcgggagcta cgcaatggat 2280
tactggggac aggttactct ggtcaccgtg tccagcacca cgacgccagc gccgcgacca 2340

ccaacaccgg cgcccacat cgcgtcgcag ccctgtccc tgcgccaga ggcgtgccgg 2400
ccagcggcgg ggggcgcagt gcacacgagg gggctggact tcgcctgtga tatctacatc 2460
tgggcgccct tggccgggac ttgtggggtc ctctctctgt cactggttat caccctttac 2520
tgcaaacggg gcagaaagaa actcctgtat atattcaaac aaccatttat gagaccagta 2580
caactactc aagaggaaga tggctgtagc tgccgatttc cagaagaaga agaaggagga 2640
tgtgaactga gagtgaagtt cagcaggagc gcagacgccc ccgctacca gcagggccag 2700
aaccagctct ataacgagct caatctagga cgaagagagg agtacgatgt tttggacaag 2760

agacgtggcc gggaccctga gatgggggga aagccgagaa ggaagaacce tcaggaaggc 2820
ctgtacaatg aactgcagaa agataagatg gcggaggcct acagtgagat tgggatgaaa 2880
ggcagcgcgc ggaggggcaa ggggcacgat ggctttacc aggtctcag tacagccacc 2940
aaggacacct acgacccct tcaatgcag gcctgcccc ctgcg 2985

<210> 12

<211> 995

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 12

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 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu
 20 25 30

Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp
 35 40 45

Ser Met Leu Ser Asn Ser Asp Thr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro
 50 55 60

Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly Arg Thr Tyr His Arg Ser Thr Trp
 65 70 75 80

Tyr Asp Asp Tyr Ala Ser Ser Val Arg Gly Arg Val Ser Ile Asn Val
 85 90 95

Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu Gln Leu Asn Ala Val Thr Pro
 100 105 110

Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Arg Leu Gln Asp Gly
 115 120 125

Asn Ser Trp Ser Asp Ala Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
 130 135 140

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro
 145 150 155 160

Ala Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr
 165 170 175

Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln
 180 185 190

Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn
 195 200 205

Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn
 210 215 220

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

225 230 235 240
 Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Val Phe Gly
 245 250 255
 Thr Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro
 260 265 270

 Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro
 275 280 285
 Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu
 290 295 300
 Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys
 305 310 315 320
 Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly
 325 330 335

 Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val
 340 345 350
 Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu
 355 360 365
 Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp
 370 375 380
 Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
 385 390 395 400

 Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg
 405 410 415
 Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
 420 425 430
 Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
 435 440 445
 Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
 450 455 460

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

Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu
 485 490 495

Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala Leu
 500 505 510

Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His Ala Ala
 515 520 525

Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser
 530 535 540

Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser
 545 550 555 560

Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
 565 570 575

Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe
 580 585 590

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 595 600 605

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu
 610 615 620

Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly
 625 630 635 640

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu
 645 650 655

Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu
 660 665 670

Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp
 675 680 685

Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp
 690 695 700

Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Gln Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr
 705 710 715 720

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

	725		730		735	
Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr						
	740		745		750	
Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val						
	755		760		765	
Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala						
	770		775		780	
Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg						
785		790		795		800
Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys						
	805		810		815	
Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu						
	820		825		830	
Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu						
	835		840		845	
Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln						
	850		855		860	
Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly						
865		870		875		880
Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr						
	885		890		895	
Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg						
	900		905		910	
Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met						
	915		920		925	
Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu						
	930		935		940	
Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys						
945		950		955		960
Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu						
	965		970		975	

Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu
 980 985 990

Pro Pro Arg
 995

<210> 13

<211> 508

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 13

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 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu
 20 25 30

Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp
 35 40 45

Ser Met Leu Ser Asn Ser Asp Thr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro
 50 55 60

Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly Arg Thr Tyr His Arg Ser Thr Trp
 65 70 75 80

Tyr Asp Asp Tyr Ala Ser Ser Val Arg Gly Arg Val Ser Ile Asn Val
 85 90 95

Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu Gln Leu Asn Ala Val Thr Pro
 100 105 110

Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Arg Leu Gln Asp Gly
 115 120 125

Asn Ser Trp Ser Asp Ala Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
 130 135 140

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro
 145 150 155 160

Ala Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr
 165 170 175

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

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

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

 Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu
 355 360 365
 Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp
 370 375 380
 Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
 385 390 395 400
 Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg
 405 410 415

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

Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp
 370 375 380
 Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
 385 390 395 400
 Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg
 405 410 415
 Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
 420 425 430
 Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
 435 440 445
 Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
 450 455 460
 Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His

465 470 475 480
 Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485

<210> 15

<211> 2985

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 15

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60
 ccggaattg tgatgaccga gtcaccgcc actcttagcc tttcaccgg tgagcgcgca 120
 acctgtctt gcagagcctc ccaagacatc tcaaaatacc ttaattgta tcaacagaag 180
 cccggacagg ctctcgcct tctgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatcct 240

 gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacacc tcaactatcag ctcaactgcag 300
 ccagaggact tcgctgtcta tttctgtcag caagggaaca cctgccecta cacctttgga 360
 cagggcacca agctcgagat taaaggtgga ggtggcagcg gaggaggtgg gtccggcgg 420
 ggaggaagcc aggtccaact ccaagaaagc ggaccgggtc ttgtgaagcc atcagaaact 480
 ctttcaactga cttgtactgt gagcggagtg tctctccccg attacgggtg gtcttggatc 540
 agacagccac cggggaaggg tctggaatgg attggagtga tttggggctc tgagactact 600

tactaccaat catccctcaa gtcacgcgtc accatctcaa aggacaactc taagaatcag 660

gigtactga aactgtcatc tgtgaccgca gccgacaccg ccgtgtacta ttgcgctaag 720

cattactatt atggcgggag ctacgcaatg gattactggg gacagggtac tetggtcacc 780

gigtccagca ccacgacgcc agcgcgcgca ccaccaacac cggcgccac catcgctcg 840

cagccctgt cctgcgccc agaggcgtgc cggccagcgg cggggggcgc agtgcacacg 900

agggggctgg acttcgctg tgatatctac atctgggcgc ccttggccgg gacttgtggg 960

gtccttctcc tgtcactggt tatcacctt tactgcaaac ggggcagaaa gaaactcctg 1020

tatatattca aacaaccatt tatgagacca gtacaaacta ctcaagagga agatggctgt 1080

agctgccgat ttccagaaga agaagaagga ggatgtgaac tgagagtga gttcagcagg 1140

agcgcagacg cccccgcta ccagcagggc cagaaccagc tctataacga gctcaatcta 1200

ggacgaagag aggagtacga tgttttgac aagagacgtg gccgggacc tgagatgggg 1260

ggaaagccga gaaggaagaa ccctcaggaa ggctgtaca atgaactgca gaaagataag 1320

atggcggagg cctacagtga gattgggatg aaaggcgagc gccggagggg caaggggcac 1380

gatggccttt accagggtct cagtacagcc accaaggaca cctacgacgc cettcacatg 1440

caggccctgc ccctcgcgg aagcggagct actaactca gcctgctgaa gcaggctgga 1500

gacgtggagg agaaccctgg acctatggcc ctccctgtca ccgcctgct gcttccgctg 1560

gctcttctgc tccacgccgc tcggcccga gtcagctgc agcagtcagg gcctggcctg 1620

gtcaagccgt cgcagacct ctccctgaca tgcgccatta gcggggactc catgctgagc 1680

aactcggaca cctggaactg gattcggcag tccccttccc ggggactcga gtggctcgga 1740

cgcacctacc atcggagcac ttggtacgac gactacgct cctccgtgag aggtcgcgtg 1800

tcgatcaacg tggatacctc gaagaaccag tatagcttgc aactgaacgc cgtgaccct 1860

gaggataccg gagtgtacta ttgtgcgaga gtcaggetgc aagacggaaa ctctggtec 1920

gacgcatttg atgtctgggg acagggtact atggtcacgg tgtcatctgg aggcggagga 1980

tcgcaaagcg cctgactca gccggttcg gctagcggtt caccggggca gtcctgact 2040

atctctgca ccgggacttc ctccgacgtg ggaggctaca attacgtgc ctggtaccag 2100

caacaccccg gcaaagcccc aaagctgatg atctacgac tcagcaacag acccagcgg 2160

gigtccaacc gggtcagcgg ctccaagtcc ggcaacaccg cctcctgac catcagcggg 2220

cttcaggccg aagatgaggg ggattactac tgctcctcgt acacctcaag ctcaactctg 2280

tacgtgttcg gcaccgtac tcagctcacc gtgctgacca ctacccagc accgaggcca 2340

cccaccccg ctctacat cgcctcccag cctctgtccc tgcgtccgga ggcattaga 2400
 cccgcagctg gtggggccgt gcatacccg ggtcttgact tcgcctgcga tatctacatt 2460
 tgggcccctc tggttggtac ttgcggggtc ctgctgcttt cactcgtgat cactctttac 2520
 tgtaagcgcg gtcggaagaa gctgctgtac atctttaagc aacccttcat gaggcctgtg 2580
 cagactactc aagaggagga cggctgttca tgcctgttcc cagaggagga ggaaggcggc 2640
 tgccaactgc gcgtgaaatt cagccgcagc gcagatgctc cagcctacca gcaggggcag 2700
 aaccagctct acaacgaact caatcttggc cggagagagg agtacgacgt gctggacaag 2760

cggagaggac gggaccaga aatgggcccgg aagccgcgca gaaagaatcc ccaagagggc 2820
 ctgtacaacg agctccaaaa ggataagatg gcagaaccc atagcgagat tggtatgaaa 2880
 ggggaacgca gaagaggcaa aggccacgac ggactgtacc agggactcag caccgccacc 2940
 aaggacacct atgacgctct tcacatgcag gcctgccgc ctcgg 2985

<210> 16

<211> 995

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 16

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 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro

65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile

85 90 95

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly

100 105 110

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

Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
 370 375 380
 Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
 385 390 395 400

 Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp
 405 410 415
 Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
 420 425 430
 Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
 435 440 445
 Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
 450 455 460

 Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
 465 470 475 480
 Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu
 485 490 495
 Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala Leu Pro
 500 505 510
 Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His Ala Ala Arg
 515 520 525

 Pro Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
 530 535 540
 Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Met Leu Ser
 545 550 555 560
 Asn Ser Asp Thr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu
 565 570 575
 Glu Trp Leu Gly Arg Thr Tyr His Arg Ser Thr Trp Tyr Asp Asp Tyr
 580 585 590

 Ala Ser Ser Val Arg Gly Arg Val Ser Ile Asn Val Asp Thr Ser Lys
 595 600 605
 Asn Gln Tyr Ser Leu Gln Leu Asn Ala Val Thr Pro Glu Asp Thr Gly

610 615 620
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Arg Leu Gln Asp Gly Asn Ser Trp Ser
 625 630 635 640
 Asp Ala Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 645 650 655

 Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Ala Ser
 660 665 670
 Gly Ser Pro Gly Gln Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser
 675 680 685
 Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly
 690 695 700
 Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly
 705 710 715 720

 Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu
 725 730 735
 Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser
 740 745 750
 Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Gln
 755 760 765
 Leu Thr Val Leu Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
 770 775 780

 Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
 785 790 795 800
 Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
 805 810 815
 Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu
 820 825 830
 Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu
 835 840 845

 Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln
 850 855 860

Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly
 865 870 875 880
 Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
 885 890 895
 Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
 900 905 910

 Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
 915 920 925
 Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu
 930 935 940
 Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys
 945 950 955 960
 Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu
 965 970 975

 Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu
 980 985 990
 Pro Pro Arg
 995
 <210> 17
 <211> 507
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <400> 17
 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 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
 20 25 30

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

305 310 315 320
 Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg
 325 330 335
 Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln
 340 345 350

 Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
 355 360 365
 Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
 370 375 380
 Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
 385 390 395 400
 Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp
 405 410 415

 Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
 420 425 430
 Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
 435 440 445
 Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
 450 455 460
 Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
 465 470 475 480

 Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu
 485 490 495
 Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly
 500 505

 <210> 18
 <211> 488
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <400> 18
 Pro Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu

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

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

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

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

 210 215 220
 Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala
 225 230 235 240
 Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Val Phe
 245 250 255

Gly Thr Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg
 260 265 270

Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg
 275 280 285

Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly
 290 295 300

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

Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg
 325 330 335

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

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

Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala
 370 375 380

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

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

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

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

Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
 450 455 460

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

His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485

<210> 19

<211> 2985

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 19

```

atggcacttc ccgtcacgc cctgctgctc ccaactcggc tccttctgca cgccgccgc 60
cccgaagtgc agctgcagca gtcaggaccg ggctgtgtca aaccttcgca gactctgtcc 120
ctgacttgcc ctataagcgg ggactccatg ctgagcaatt cggacacttg gaactggatt 180
cgccaaagcc ccagccgggg tctggaatgg ctgggaagga cctaccatcg ctctacttgg 240

tacgacgact acgccagctc cgtgcgagga cgcgtgtcca tcaactgga cacctccaag 300
aaccagtact cgttcaact caacgcagtg acccctgaag ataccggagt ctactattgc 360
gcccgcgtgc ggctccagga cgggaactcc tggtcggacg ctttcgatgt ctggggacag 420
ggcactatgg tcaccgtcag ctccggcggc ggcggtagcc aatcggcgct gacacagccg 480
gcttcgcct cgggatcgc tggacagtgc gtgaccatct cgtgcaactg aacctcctcc 540
gacgtggcgc gctacaatta tgtgtcatgg taccagcagc acccgggaaa ggcccctaag 600
ctgatgatct acgacgtgct caatagacct agcggggtgt caaacagatt ctccgatcc 660

aaatccgga aactgcctc cctgaccatt tccgactgc agcccgagga cgaagccgat 720
tactactgct cctttacac ctctcatcc accctctacg tgtttgggac tgggaccag 780
ctgaccgtcc tcaactacc cccggccccg cggcccccta caccggcacc gactattgcc 840
agccagcctc tctcgtcgc gccggaggcc tgcgccag ccgccggcgg agccgtgcac 900
accgcggtc tggacttcgc gtgcgatac tacatctggg ctccgctggc cgggacttgt 960
ggcgtgctgc tctgtctct ggtcatcaca ctgtactgca agcgcggaag aaagaagctg 1020
ctctacatct tcaagcaacc ctctatcggg cctgtgcaga ccaccagga agaggatggc 1080

tgctcctgcc ggttcccga ggaagaagag ggcggatgcg aactgcgct gaagttcagc 1140
cgaagcgccg acgccccgc ctaccagcag gcccagaacc aactgtaca cgaactcaac 1200
ctgggtcggg gagaagagta cgacgtgctg gacaaaagac gcggcaggga ccccagatg 1260
ggcggaaagc ctgcccga gaaccgcag gaggcctct acaacgagct gcagaaggac 1320
aagatggccg aagcctactc agagatcggc atgaaggggg agcggaggcg cgggaagggc 1380
cacgacggtt tgiaccaagg actttccact gcgaccaagg acacctacga tgcctccat 1440
atgcaagccc tgcgccccg ggttccgga gctaccaact tctcgtgtt gaagcaggcc 1500

ggagatgtcg aggaaaacc gggacctatg gcctgccag tgaccgcgct cctgctgccc 1560

```

ctggctctgc tgcctcacgc ggccccgcct gagattgtga tgactcagag cccggcgacc 1620
ctgtccctgt cccccgggga gagagcaacc ctgtcgtgcc gggcctcca agacatctca 1680
aagtacctca attggtatca gcagaagcca ggacaggctc cacggttgct gatctaccac 1740
acttcgagac tgcactcagg aatccccgcg cggttttccg gttccggctc ggggaccgac 1800
tacacctga ccatcagctc gctccagcct gaggatttcg cagtgtactt ctgtcagcaa 1860
ggaaacaccc ttccatacac ctccggacag ggtaccaagc tggaaatcaa gggaggagga 1920

ggatctgggg gcggtggttc cggaggcggf ggaagccaag tgcagctcca ggaaagcggga 1980
ccccggctgg tcaagccgag cgaaacctc tactgactt gtactgtgtc cggagtgtcc 2040
ctgcctgact atggagtgtc ctggatccga cagccccccg gaaagggtct ggagtggatt 2100
ggggtcatct ggggctccga aactacctac taccagagca gcctcaagag ccgggtcacc 2160
atltcaaagg ataactcaa gaatcaagtg tcctgaagc tgtcctcagt gacagccgca 2220
gacaccgccc tgiactactg cgcaagcac tactactacg gaggtccta cgcaatggac 2280
tactggggac aaggcacttt ggtcactgtg tcaagcacca ccaccctgc gcctcggcct 2340

cctacccccg ctcccactat cgcgagccag ccgctgagcc tgcggcctga ggcttgccga 2400
ccggccgctg gcggcgccgt gcatactcgg ggctcactt ttgcctgtga catctacatc 2460
tgggccccc tggccggaac gtgcggagtg ctgctgctgt cgttggtcat taccctgtat 2520
tgcaaacgcg gaaggaagaa gctgtgttac atttcaage agcccttcat gcgcccgtg 2580
caactactc aggaggaaga tggctgttcc tgtcggttcc ccgaagagga agaaggcggc 2640
tgcgagtga gggtaagtt ctcccgttc gccgatgtc ccgctacca acaggggcag 2700
aaccagcttt ataacgaact gaacctgggc aggaggagg aatatgatgt gttggataag 2760

cgccggggcc gggaccaga aatgggggga aagcccagaa gaaagaacc tcaagagga 2820
ctttacaacg aattgcagaa agacaaaatg gccgagcct actccgagat tgggatgaag 2880
ggcgaagac ggagaggaaa ggggcacgac ggctctacc agggactcag caccgccacc 2940
aaagatacct acgagccct gcatatgcag gcctgccgc cgcgc 2985

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 20

Ser Asn Ser Asp Thr Trp Asn

1

5

<210> 21
 <211> 18
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <400> 21

Arg Thr Tyr His Arg Ser Thr Trp Tyr Asp Asp Tyr Ala Ser Ser Val
 1 5 10 15
 Arg Gly

<210> 22
 <211> 15
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <400> 22

Val Arg Leu Gln Asp Gly Asn Ser Trp Ser Asp Ala Phe Asp Val
 1 5 10 15

<210> 23
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide
 <400> 23

Gly Asp Ser Met Leu Ser Asn Ser Asp
 1 5

<210> 24
 <211> 7
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <400> 24

Tyr His Arg Ser Thr Trp Tyr

1 5
 <210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <400> 25

Gly Asp Ser Met Leu Ser Asn Ser Asp Thr

1 5 10

<210> 26

<211>

> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 26

Thr Tyr His Arg Ser Thr Trp Tyr Asp

1 5

<210> 27

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 27

Ala Arg Val Arg Leu Gln Asp Gly Asn Ser Trp Ser Asp Ala Phe Asp

1 5 10 15

Val

<210> 28

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 28

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 29

Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser

1 5

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 30

Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Val

1 5 10

<210

> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 31

Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr

1 5 10

<210> 32

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 32

Asp Val Ser

1

<210> 33

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 33

Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr

1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 34

Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr

1 5

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 35

Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser

1 5 10

<210> 36

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 36

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

1 5 10 15

<210> 37

<211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <400> 37
 Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Gln Ser Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 38
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <400> 38
 Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 39
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <400> 39
 His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 40
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <400> 40
 Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn
 1 5 10

<210> 41
 <211> 7
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 41

His Thr Ser Arg Leu His Ser

1 5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 42

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 43

<211> 726

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 43

gaaattgtga tgacceagtc acccccaact cttagccttt cacccggtga gcgcgcaacc 60

ctgtcttgca gagcctcca agacatctca aaatacctta attggtatca acagaagccc 120

ggacaggctc ctgccttct gatctaccac accagccggc tccattctgg aatccctgcc 180

aggttcagcg gtagcggatc tgggaccgac tacacctca ctatcagctc actgcagcca 240

gaggacttcg ctgtctatct ctgtcagcaa gggaacaccc tgcctacac ctttgacag 300

ggcaccaagc tcgagattaa aggtggaggt ggcagcggag gaggtgggtc cggcgggtgga 360

ggaagccagg tccaactcca agaaagcggg ccgggtcttg tgaagccatc agaaactctt 420

tcactgactt gtactgtgag cggagtgtct ctccccgatt acggggtgtc ttggatcaga 480

cagccaccgg ggaagggctc ggaatggatt ggagtgattt ggggctctga gactacttac 540

taccaatcat ccctcaagtc acgcgtcacc atctcaaagg acaactctaa gaatcaggtg 600

tcactgaaac tgtcatctgt gaccgcagcc gacaccgccg tgtactattg cgctaagcat 660

tactattatg gcgggageta cgcaatggat tactggggac aggggtactct ggtcaccgtg 720

tccagc 726

<210> 44

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 44

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

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

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

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

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

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

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

Glu Thr Thr Tyr Tyr Gln Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser
 180 185 190

Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr

195

200

205

Ala Ala Asp Thr Ala Val 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 Leu Val Thr Val

225

230

235

240

Ser Ser

<210> 45

<211> 726

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 45

gagattgtca tgactcagtc cccggccaca ctctccctgt caccgggaga aagagcaacc 60

ctgagctgca gggcgtccca ggacatctcg aagtacctga actggtacca gcagaagcct 120

ggacaagcac cccgcctcct gatctaccac acctcgcggc tgcattcggg aatccccgcc 180

agattctcag ggagcggatc aggaaccgac tacacctga ctatctcgag cctgcaacca 240

gaggatttcg ccgtgtactt ctgccagcaa gaaacaccc tgcctacac ctttgacag 300

ggaaccaagc tcgagattaa ggggggtggt ggatcgggag ggggtggatc aggaggaggc 360

ggctcacaag tccagctgca agaatccggt ccgggacttg tgaagccgtc cgaaaccctg 420

tcactgactt gcactgtgtc cgggggtgtca ttccccgact acggcgtgag ctggattcgg 480

cagccccctg gaaagggatt ggaatggatc ggcgtgatct ggggttcgga aactacctac 540

tatcagtctt cactgaagtc ccgcgtgacc atcagcaagg ataattcaa aaaccaagtg 600

tctctgaage tetccagcgt cactgccgcc gatactgccg tgtactactg cgccaagcac 660

tactattacg gcggttcgta cgccatggac tactggggcc aagggacact cgtgaccgtg 720

tcatcc 726

<210> 46

<211> 726

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 46

caagtccagc tgcaagaatc cggtcggga cttgtgaagc cgtccgaaac cctgtcactg 60
 acttgactg tgtccgggt gtcattgcc gactacggcg tgagctggat tcggcagccc 120

 cctggaaagg gattggaatg gatcggcgtg atctggggtt cggaaactac ctactatcag 180
 tcctcactga agtcccgcgt gaccatcagc aaggataatt ccaaaaacca agtgtctctg 240
 aagctctcca gcgtcactgc cgccgatact gccgtgtact actgcgcaa gcactactat 300
 tacggcgggt cgtacgcat ggactactgg ggacaaggca ctcttgtgac tgtgtcaagc 360
 ggcggtggag ggagcggtag gggcggttca ggaggaggcg gatcagagat cgtgatgacc 420
 caatccccag ccacctgtc cctcagcct ggagaaagag ccacctgag ctgccgggcc 480
 tcccaggata tcagcaagta cttgaactgg taccaacaaa agccggggca ggcgccccgg 540

 ctctgatct accacacctc gcgctccac tcaggtatcc ccgccagatt ctcaggagc 600
 ggctccgta ctgactaac cctgactatt tcctcactgc agccagagga ctttgcctg 660
 tacttctgcc agcagggaaa cactctgccg tacacctcg ggcagggaac gaagcttga 720
 attaag 726

<210> 47

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 47

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr

20 25 30

Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Gln Ser Ser Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

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

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

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

<210> 48

<211> 726

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 48

gagattgtga tgactcagag cccggcgacc ctgtccctgt cccccgggga gagagcaacc 60
 ctgtcgtgcc gggcctccca agacatctca aagtacctca attggtatca gcagaagcca 120

 ggacaggctc cacggttct gatctaccac acttcgagac tgcactcagg aatccccgcg 180
 cgtttttccg gttccggctc cgggaccgac tacacctga ccatcagctc gctccagcct 240
 gaggatttcg cagtgtactt ctgtcagcaa ggaaacaccc ttccatacac cttcggacag 300
 ggtaccaagc tggaaatcaa gggaggagga ggatctgggg gcggtggttc cggaggcgg 360

ggaagccaag tgcagctcca ggaaagcgga cccgggctgg tcaagccgag cgaaacctc 420
 tctactgactt gtactgtgtc cggagtgtcc ctgctgact atggagtgtc ctggatccga 480
 cagccccccg gaaagggctt ggagtggatt ggggtcatct ggggctccga aactacctac 540

taccagagca gcctcaagag ccgggtcacc atttcaaagg ataactcaa gaatcaagt 600
 tcctgaage tgtcctcagt gacagccgca gacaccgccg tgtactactg cgccaagcac 660
 tactactacg gaggtccta cgcaatggac tactggggac aaggcacttt ggtcactgtg 720
 tcaagc 726

<210> 49

<211> 729

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 49

gaagtgcagc tgcagcagtc agggcctggc ctggtcaagc cgtcgcagac cctctccctg 60
 acatgcgcca ttagcgggga ctccatgctg agcaactcgg acacctggaa ctggattcgg 120

cagtccctt cccggggact cgagtggctc ggacgcacct accatcggag cacttggtag 180
 gacgactacg cctcctcctg gagaggctgc gtgtcgatca acgtggatag ctggaagaac 240
 cagtatagct tgcaactgaa cgccgtgacc cctgaggata ccggagtgtg ctattgtgctg 300
 agagttaggc tgcaagacgg aaactcctgg tccgacgcat ttgatgtctg gggacagggt 360
 actatggtca cggtgtcatc tggaggcggg ggatcgcaaa gcgccctgac tcagccggct 420
 tcggctagcg gttcaccggg gcagtccgtg actatctcct gcaccgggac ttcctccgac 480
 gtgggaggct acaattacgt gtcttggtag cagcaacacc ccggcaaagc cccaaagctg 540

atgatctacg acgtcagcaa cagaccagc ggagtgtcca accggttcag cggctccaag 600
 tccggaaca ccgctcctt gaccatcagc ggcttcagg ccgaagatga ggcggattac 660
 tactgtcctt cgtacacctc aagctcaact ctgtacgtgt tcggcaccgg tactcagctc 720
 accgtgctg 729

<210> 50

<211> 243

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 50

<210> 51
 <211> 729
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 51

gaagtgcagc tgcagcagtc aggaccgggc ctggtcaaac cttgcagac tctgtccctg 60
 acttgcgcta taagcgggga ctccatgctg agcaattcgg acaacttgaa ctggattcgc 120

caaagcccca gccgggtct ggaatggctg ggaaggacct accatcgctc tacttggtac 180
 gacgactacg ccagctccgt gcgaggacgc gtgtccatca acgtggacac ctccaagaac 240
 cagtactcgc ttcaactcaa cgcagtgacc cctgaagata ccggagtcta ctattgcgcc 300
 cgcgtcggc tccaggacgg gaactcctgg tcggacgctt tcgatgtctg gggacagggc 360
 actatggtea ccgtcagctc cggcggcggc ggtagccaat cggcgtgac acagccggct 420
 tccgcctcgg gatcgctgg acagtcggtg accatctcgt gcaactggaac ctctccgac 480
 gtggcggct acaattaigt gtcatggtac cagcagcacc cgggaaaggc ccctaagctg 540

atgatctacg acgtgtccaa tagacctagc ggggtgtcaa acagattctc cggatccaaa 600
 tccggaaca ctgcctcct gaccatttc ccgactgcagg ccgaggacga agccgattac 660
 tactgtcct cttacacctc ctcatccacc ctctacgtgt ttgggactgg gaccagctg 720
 accgtcctc 729

<210> 52
 <211> 759
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 52

gaagtgcagc ttcaacaatc aggaccagga ctggtcaaac catcacagac cctctccctc 60
 acatgtgcca tctccgggga ctccatgttg agcaattcgg acaacttgaa ttggattaga 120

caaagcccgt cccgggtct ggaatggttg ggacgcacct accaccggtc tacttggtac 180
 gacgactacg cgtcatccgt gcggggaaga gtgtccatca acgtggacac ctccaagaac 240
 cagtacagcc tgcagcttaa tgccgtgact cctgaggata cggcgttcta ctactgcgcc 300
 cgcgtccgcc tgcaagacgg gaacagctgg agcgtatcat tcgatgtctg gggccaggga 360

actatggtca ccgtgtcgtc tggggcggt ggatcgggtg gcgggggttc gggggcggc 420
 ggctctcagt ccgtcttac ccaaccggcc tcagcctcgg ggagccccgg ccagagcgtg 480
 accatttctt gcaccggcac ttcattccgac gtgggcggct acaactacgt gtcttggtac 540

caacagcacc cgggaaaggc cccaagctc atgatctacg acgtgtccaa caggccctcg 600
 ggagtgtcca accggttctc gggttcgaaa tcgggaaaca cagccagcct gaccatcagc 660
 ggactgcagg ctgaagatga agccgactac tactgtctct cctacacctc gtcattcaag 720
 ctctacgtgt tcggcactgg aactcagctg actgtgctg 759

<210> 53

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 53

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Met Leu Ser Asn
 20 25 30

Ser Asp Thr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr His Arg Ser Thr Trp Tyr Asp Asp Tyr Ala
 50 55 60

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

Gln Tyr Ser Leu Gln Leu Asn Ala Val Thr Pro Glu Asp Thr Gly Val
 85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Arg Leu Gln Asp Gly Asn Ser Trp Ser Asp
 100 105 110

Ala Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly
 115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser
 130 135 140

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

Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala
 210 215 220
 Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr
 225 230 235 240
 Leu Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu
 245 250

<210> 54

<211> 729

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 54

cagtccgctc ttaccaacc ggcctcagcc tcggggagcc cggccagag cgtgaccatt 60

tcttgaccg gcacttcac cgacgtgggc ggctacaact acgtgtcctg gtaccaacag 120

caccgggaa aggccccaa gctcatgac tacgacgtgt ccaacaggcc ctcgggagtg 180

tccaaccgt tctcgggttc gaaatcggga aacacagcca gcctgacat cagcggactg 240

caggctgaag atgaagccga ctactactgc tctctctaca cctcgtcacc cagcgtctac 300

gtgttcggca ctggaactca gctgactgtg ctgggcggag gaggtccga agtgcagctt 360

caacaatcag gaccaggact cgtcaaacca tcacagacc tctccctcac atgtgccac 420

tccggggact ccatgttgag caattccgac acttgggaatt ggattagaca aagcccgtcc 480

cggggtctgg aatggttggg acgcacctac caccggtcta cttggtacga cgactacgcg 540

tcatccgtgc ggggaagagt gtccatcaac gtggacacct ccaagaacca gtacagcctg 600

cagcttaatg ccgtgactcc tgaggatacg ggcgtctact actgcgccg cgtccgcctg 660

caagacggga acagctggag cgatgcattc gatgtctggg gccaggaac tatggtcacc 720

gtgtcgtct

729

<210> 55

<211> 243

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 55

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15
Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr

 20 25 30
Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

 35 40 45
Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe

 50 55 60
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu

65 70 75 80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser

 85 90 95
Ser Thr Leu Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly

 100 105 110
Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val

 115 120 125
Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser

 130 135 140
Met Leu Ser Asn Ser Asp Thr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser

145 150 155 160
Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly Arg Thr Tyr His Arg Ser Thr Trp Tyr

 165 170 175
Asp Asp Tyr Ala Ser Ser Val Arg Gly Arg Val Ser Ile Asn Val Asp

 180 185 190

Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu Gln Leu Asn Ala Val Thr Pro Glu

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

<210> 56

<211> 729

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 56

cagtcgcctc tgactcagcc ggcctcagct tcgggggtccc ctgggtcaaag cgtcactatt 60

tctgtaccg gaacctcacc agacgtgggc ggctacaatt acgtgtcctg gtaccaacag 120

caccccgaa aggtcctaa gcttatgac tacgacgtgt ccaaccggcc gtcaggagtg 180

tccaacagat tctccggctc caagagcggg aacactgcca gcttgaccat tagcggcttg 240

caggccgagg acgaagccga ctactactgc tctagctaca catcctcgtc taccctctac 300

gtgtttgaa cggggaccga gctgactgtg ctcggggggtg gaggatcaga ggtgcaactc 360

cagcagtcgg gtctggcct cgtgaaaccg tccaaacc tgtccctgac ttgcgccatc 420

tcgggcgact ccatgctgtc caattccgac acctggaact ggattagaca atcgcctagc 480

cggggactcg aatggctggg ccggacctac caccggtcca cgtggtatga cgactacgca 540

agtcctgtcc ggggaagggt gtccattaac gtcgatacct ccaagaacca gtacagcctt 600

cagctgaacg ctgtgacccc cgaggatacc ggcgtctact actgtgcaag agtgcgattg 660

caggatggaa actcgtggtc ggacgcattc gatgtctggg gacagggaac tatggtgacc 720

gtgtcctcg 729

<210> 57

<211> 729

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 57

cagtccgctc tgactcagcc ggcctcagct tcggggtccc ctgggtcaaag cgtcactatt 60

tcctgtaccg gaacctcadc agacgtgggc ggetacaatt acgtgtcctg gtaccaacag 120

caccccggaa aggctcctaa gcttatgac tacgacgtgt ccaaccggcc gtcaggagtg 180

tccaacagat tctccgctc caagagcggg aacctgcca gcttgacat tagcggcttg 240

caggccgagg acgaagccga ctactactgc tctagctaca catcctcgtc taccctctac 300

gtgtttggaa cggggaccca gctgactgtg ctccgggggtg gaggatcaga ggtgcaactc 360

cagcagtcgg gtctctggcct cgtgaaaccg tcccaaacc tgctcctgac ttgcgccatc 420

tcgggcgact ccatgctgtc caattccgac acctggaact ggattagaca atcgcctagc 480

cggggactcg aatggctggg ccggacctac caccggtcca cgtggtatga cgactacgca 540

agctccgtcc ggggaagggt gtccattaac gtcgatacct ccaagaacca gtacagcctt 600

cagctgaacg ctgtgacccc cgaggatacc ggcgtctact actgtgcaag agtgcgattg 660

caggatggaa actcgtggtc ggacgcattc gatgtctggg gacagggaac tatggctact 720

gtgtcctcc 729

<210> 58

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 58

atggccctcc ctgtaccgc cctgtgctt ccgctggctc ttctgtcca ccccgtcgg 60

ccc 63

<210> 59

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 59

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> 60
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 60
 atggcctgc ccgtgactgc gctcctgctt ccgttgccc tgctcctgca tgccgccaga 60

 cct 63
 <210> 61
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 61
 atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60
 ccg 63
 <210> 62
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 62
 atggcacttc ccgtcaccgc cctgctgctc ccaactgccc tccttctgca cgccgccgcg 60

 ccc 63
 <210> 63
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 63
 atggcctgc cagtgaccgc gctcctgctg ccctggctc tgctgcttca cgccgccgg 60
 cct 63
 <210> 64

<211> 207

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 64

accactacc cagcaccgag gccaccacc cgggtccta ccatcgctc ccagcctctg 60

tcctcgctc cggaggcatg tagaccgca gctggtgggg ccgtgcatac ccgggtctt 120

gattcgctc gcgatatcta cattgggcc cctctggctg gtacttgcgg ggtcctgctg 180

ctttcactcg tgatcactct ttactgt 207

<210> 65

<211> 69

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 65

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

65

<210> 66

<211> 207

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 66

actaccacc cggccccgcg gccccctaca ccggcaccga ctattgccag ccagcctctc 60

tcgctgcggc cggaggcctg ccgcccagcc gccggcggag ccgtgcacac ccgcggtctg 120
gacttcgcgt gcgatatcta catctgggct ccgctggccg ggacttgtgg cgtgctgctg 180
ctgtctctgg tcatcacact gtactgc 207
<210> 67
<211> 207
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic polynucleotide
<400> 67
accacgacgc cagcggcgcg accaccaaca ccggcgccca ccatcgcgtc gcagccctg 60
tccttcgcc cagaggcgtg ccggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg 120
gacttcgcct gtgatatcta catctgggcg cccttggccg ggacttgtgg ggtccttctc 180
ctgtcactgg ttatcacct ttactgc 207
<210> 68
<211> 207
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic polynucleotide
<400> 68
accaccacc ctgcgctcg gcctectacc ccggctccca ctatcgcgag ccagccgctg 60
agcctgcggc ctgaggcttg ccgaccggcc gctggcggcg ccgtgcatac tcggggcctc 120
gactttgcct gtgacatcta catctgggcc cccttggccg gaacgtcgg agtgctgctg 180
ctgtcgtggtg teattacct gtattgc 207
<210> 69
<211> 126
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic polynucleotide
<400> 69
aagcgcggtc ggaagaagct gctgtacatc ttaagcaac cttcatgag gcctgtgcag 60
actactcaag aggaggacgg ctgttcatgc cgttccag aggaggagga aggcggctgc 120
gaactg 126
<210> 70

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 70

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> 71

<211> 126

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 71

aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaacaac catttatgag accagtacaa	60
actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt	120

gaactg	126
--------	-----

<210> 72

<211> 126

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 72

aagcgcggaa gaaagaagct gctctacatc ttcaagcaac cttcatgcg gcctgtgcag	60
accacccagg aagaggatgg ctgctcctgc cggttcccgg aggaagaaga gggcggatgc	120
gaactg	126

<210> 73

<211> 126

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 73

aaacgcggaa ggaagaagct gttgtacatt ttcaagcagc cttcatgcg cccggtgcaa 60
 actactcagg aggaagatgg ctgttcctgt cggttccccg aagaggaaga aggcggctgc 120
 gagttg 126

<210> 74

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 74

cgcgtgaaat tcagccgag cgcagatgct ccagcctacc agcaggggca gaaccagctc 60
 tacaacgaac tcaatcttgg tcggagagag gactacgacg tgctggacaa gcggagagga 120

 cgggaccag aaatgggcgg gaagccgcgc agaaagaatc cccaagaggg cctgtacaac 180
 gagctccaaa aggataagat ggcagaagcc tatagcgaga ttggtatgaa aggggaacgc 240
 agaagaggca aaggccacga cggactgtac cagggactca gcaccgccac caaggacacc 300
 tatgacgctc ttcacatgca ggccctgccg cctcgg 336

<210> 75

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 75

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

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 78
 aggggtcaagt tctcccggtc cgccgatgct cccgcctacc aacaggggca gaaccagctt 60
 tataacgaac tgaacctggg caggagggag gaatatgatg tgttggataa gcgccggggc 120

 cgggaccag aatgggggg aaagcccaga agaaagaacc ctcaagaggg actttacaac 180
 gaattgcaga aagacaaat ggccgaggcc tactccgaga ttgggatgaa gggcgaaga 240
 cggagaggaa aggggcacga cgggctctac cagggactca gcaccgccac caagatacc 300
 tacgacgcc tgcatatgca ggcgctgccg ccgcgc 336
 <210> 79
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 79
 ttggcagaag ccgcccgaa a 21
 <210> 80

 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <400> 80
 Leu Ala Glu Ala Ala Ala Lys
 1 5
 <210> 81
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 81
 ggtggaggtg gcagcggagg aggtgggtcc ggcggtggag gaagc 45
 <210> 82
 <211> 15

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <400> 82
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 83
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 83
 ggcggaggcg ggagcggagg aggaggctct ggcggaggag gaagc 45

<210> 84
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 84
 ggcggtggag gctcgggggg ggcggctca ggaggaggcg gctca 45

<210> 85
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 85
 ggaagcggag ctactaactt cagcctgctg aagcaggctg gagacgtgga ggagaaccct 60
 ggacct 66

<210> 86
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide

<400> 86

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> 87

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 87

ggttccggag ctaccaactt ctcgctgttg aagcaggccg gagatgtcga ggaaaacccg 60

ggacct 66

<210> 88

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 88

ggtggaggtg gcagc 15

<210> 89

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 89

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 90

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 90

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

Ser Ser

<210> 91

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 91

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 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu

 20 25 30

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

 35 40 45

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

50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro

65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile

 85 90 95

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly

 100 105 110

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

115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly

 165 170 175

Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly

180 185 190

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Gln Ser Ser Leu Lys Ser
 195 200 205

Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys
 210 215 220

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
 225 230 235 240

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 245 250 255

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser His His His His His His His His
 260 265 270

<210> 92
 <211> 486
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <400> 92

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 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
 20 25 30

Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 35 40 45

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

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro
 65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile
 85 90 95

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
 100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
 130 135 140

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

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

 Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu
 275 280 285
 Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp
 290 295 300
 Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly
 305 310 315 320
 Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg
 325 330 335

 Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln
 340 345 350
 Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
 355 360 365
 Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala

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

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

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

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

Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
 405 410 415

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

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

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

Arg
 465

<210> 94

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 94

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

<210> 96

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 96

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr

85 90 95

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

100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln

115 120 125

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

130 135 140

Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly

145 150 155 160

Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly

165 170 175

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Gln Ser Ser Leu Lys Ser

180 185 190

Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys

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

<210> 97

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 97

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met
 130 135 140
 Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr

145 150 155 160
 Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr
 165 170 175

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

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 245

<210> 98

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 98

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

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

	100		105		110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly					
	115		120		125
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met					
	130		135		140
Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr					
	145		150		155
Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr					
	165		170		175
Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser					
	180		185		190
Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly					
	195		200		205
Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala					
	210		215		220
Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln					
	225		230		235
					240

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
245

<210> 99

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 99

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245

<210> 100

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 100

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

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

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

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

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

245

<210> 101

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 101

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr

 20 25 30

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

 35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

 50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr

 85 90 95

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

 100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu

 115 120 125

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

 165 170 175

Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser

 180 185 190

Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr

145 150 155 160
 Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 165 170 175

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

Ile Lys

<210> 103

<211> 489

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 103

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

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

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
 355 360 365

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser
 370 375 380

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

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

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

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

Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp
 450 455 460

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

Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485

<210> 104

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 104

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

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

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

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

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

 245 250 255

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Glu Ser Lys Tyr Gly
 260 265 270

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Met Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly
 275 280 285

Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile
 290 295 300

Phe Trp Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln
 305 310 315 320

Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser
 325 330 335

Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys
 340 345 350

Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
 355 360 365

Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
 370 375 380

Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
 385 390 395 400

Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
 405 410 415

Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
 420 425 430

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

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

<210> 106
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <400> 106

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> 107

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 107

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

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro

20

<210> 108

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 108

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> 109

<211> 284

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 109

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

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

 100 105 110

Thr Ser Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile

 115 120 125

Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn

 130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys

 165 170 175

Cys Ile Arg Asp Pro Ala Leu Val His Gln Arg Pro Ala Pro Pro Ser

 180 185 190

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

 195 200 205

Ser Gly Lys Glu Pro Ala Ala Ser Ser Pro Ser Ser Asn Asn Thr Ala

