



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년04월11일

(11) 등록번호 10-2795055

(24) 등록일자 2025년04월08일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/705 (2006.01) *A61K 35/17* (2025.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61P 19/02* (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01) *C07K 16/18* (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/705 (2013.01)
A61K 35/17 (2025.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7025997
- (22) 출원일자(국제) 2019년02월11일
 심사청구일자 2022년02월10일
- (85) 번역문제출일자 2020년09월09일
- (65) 공개번호 10-2020-0130292
- (43) 공개일자 2020년11월18일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2019/017532
- (87) 국제공개번호 WO 2019/157461
 국제공개일자 2019년08월15일
- (30) 우선권주장
 62/629,103 2018년02월11일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
 KR1020170042325 A*
 Raffin, C., et al., Journal of Immunology,
 2016, vol. 196, no. 1supp(2016.05.01.) 1부.*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
 더 리첸즈 오브 더 유니버시티 오브 캘리포니아
 미국 캘리포니아 94607-5200 오클랜드 12층 프랭클린 스트리트 1111
- (72) 발명자
 블루스톤, 제프리 에이.
 미국 94143-0540 캘리포니아 샌프란시스코 캠퍼스 박스 0540 파르나소스 애비뉴 513 에이치에스더블유1102
 라핀, 캐롤라인
 미국 94143-0540 캘리포니아 샌프란시스코 캠퍼스 박스 0540 파르나소스 애비뉴 513 에이치에스더블유1102
- (74) 대리인
 특허법인(유)남아이피그룹, 특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 21 항

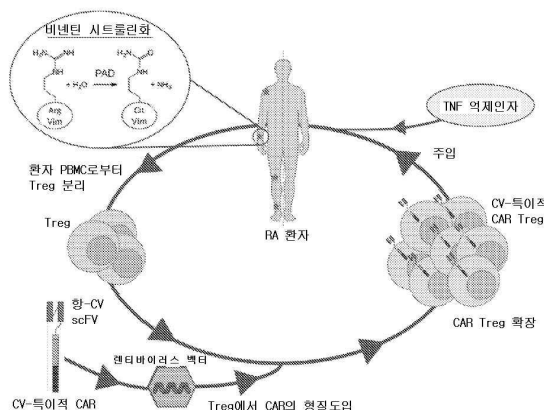
심사관 : 강덕희

(54) 발명의 명칭 CAR-T 세포 및 자가면역 질환

(57) 요약

키메라 항원 수용체(CAR)-발현 Treg는 특히 RA 환자의 관절에 존재하는 항원을 표적으로 하여 국소적이고 효과적인 면역억제 반응을 유도한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 19/02 (2018.01)

C07K 14/70503 (2013.01)

C07K 14/7051 (2013.01)

C07K 14/70521 (2013.01)

C07K 16/18 (2013.01)

C12N 5/0636 (2025.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2319/02 (2013.01)

C07K 2319/03 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

항원 특이적 결합 도메인, 힌지 도메인, 트랜스멤브레인 도메인, 공동-자극 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)로서, 상기 항원 특이적 결합 도메인은 비멘틴 폴리펩티드 또는 이의 펩티드를 포함하는 항원에 특이적으로 결합하며,

여기서 비멘틴 폴리펩티드 또는 이의 펩티드가 번역 후 변형되며, 시트룰린화된-비멘틴(CV) 폴리펩티드 또는 이의 펩티드를 포함하고,

공동-자극 도메인이 CD28 또는 41BB 폴리펩티드를 포함하며, CAR이 SEQ ID NO: 21 또는 22를 포함하는 CV 펩티드에 특이적으로 결합하고,

항원 특이적 결합 도메인이 단일 사슬 가변 단편(scFv)을 포함하는 단일 사슬 단편인 항체 단편을 포함하는, 키메라 항원 수용체.

청구항 2

제1항에 있어서,

a) 힌지 도메인이 SEQ ID NO: 8에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나;

b) 트랜스멤브레인 도메인이 SEQ ID NO: 9에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나;

c) CD3 ζ 신호전달 도메인이 SEQ ID NO: 10에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나;

d) CD28 공동-자극 도메인이 SEQ ID NO: 11에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩되는, 키메라 항원 수용체.

청구항 3

제1항에 있어서,

a) 힌지 도메인이 SEQ ID NO: 8의 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나;

b) 트랜스멤브레인 도메인이 SEQ ID NO: 9의 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나;

c) CD3 ζ 신호전달 도메인이 SEQ ID NO: 10의 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나;

d) CD28 공동-자극 도메인이 SEQ ID NO: 11의 핵산 서열에 의해 인코딩되는, 키메라 항원 수용체.

청구항 4

제1항에 있어서,

a) 힌지 도메인이 SEQ ID NO: 8에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나;

b) 트랜스멤브레인 도메인이 SEQ ID NO: 9에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나;

c) CD3 ζ 신호전달 도메인이 SEQ ID NO: 10에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나;

d) 41BB 공동-자극 도메인이 SEQ ID NO: 12에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해

인코딩되는, 키메라 항원 수용체.

청구항 5

제1항에 있어서,

- a) 힌지 도메인이 SEQ ID NO: 8의 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나;
- b) 트랜스멤브레인 도메인이 SEQ ID NO: 9의 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나;
- c) CD3 ζ 신호전달 도메인이 SEQ ID NO: 10의 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나;
- d) 41BB 공동-자극 도메인이 SEQ ID NO: 12의 핵산 서열에 의해 인코딩되는, 키메라 항원 수용체.

청구항 6

적어도 하나의 공동-자극 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인에 연결된 항원 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 변형된 단리된 T 세포로서, 상기 항원 결합 도메인은 시트룰린화된-비멘틴(CV)에 특이적으로 결합하는 단일 사슬 가변 단편(scFv)을 포함하며,

여기서 공동-자극 도메인이 CD28 또는 41BB 폴리펩티드를 포함하며, CAR이 SEQ ID NO: 21 또는 22를 포함하는 CV 펩티드에 특이적으로 결합하는, 단리된 T 세포.

청구항 7

제6항에 있어서,

- a) CAR이 SEQ ID NO: 8에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되는 힌지 도메인을 포함하고/거나;
- b) CAR이 SEQ ID NO: 9에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되는 트랜스멤브레인 도메인을 포함하고/거나;
- c) CD3 ζ 신호전달 도메인이 SEQ ID NO: 10에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나;
- d) CD28 공동-자극 도메인이 SEQ ID NO: 11에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되는, 단리된 T 세포.

청구항 8

제6항에 있어서,

- a) CAR이 SEQ ID NO: 8의 핵산 서열에 의해 인코딩되는 힌지 도메인을 포함하고/거나;
- b) CAR이 SEQ ID NO: 9의 핵산 서열에 의해 인코딩되는 트랜스멤브레인 도메인을 포함하고/거나;
- c) CD3 ζ 신호전달 도메인이 SEQ ID NO: 10의 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나;
- d) CD28 공동-자극 도메인이 SEQ ID NO: 11의 핵산 서열에 의해 인코딩되는, 단리된 T 세포.

청구항 9

제6항에 있어서,

- a) CAR이 SEQ ID NO: 8에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되는 힌지 도메인을 포함하고/거나;
- b) CAR이 SEQ ID NO: 9에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되는 트랜스멤브레인 도메인을 포함하고/거나;
- c) CD3 ζ 신호전달 도메인이 SEQ ID NO: 10에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나;
- d) 41BB 공동-자극 도메인이 SEQ ID NO: 12에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해

인코딩되는, 단리된 T 세포.

청구항 10

제6항에 있어서,

- a) CAR이 SEQ ID NO: 8의 핵산 서열에 의해 인코딩되는 힌지 도메인을 포함하고/거나;
- b) CAR이 SEQ ID NO: 9의 핵산 서열에 의해 인코딩되는 트랜스멤브레인 도메인을 포함하고/거나;
- c) CD3 ζ 신호전달 도메인이 SEQ ID NO: 10의 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나;
- d) 41BB 공동-자극 도메인이 SEQ ID NO: 12의 핵산 서열에 의해 인코딩되는, 단리된 T 세포.

청구항 11

제6항에 있어서, T 세포가 포유동물 조절 T 세포(Treg)인, 단리된 T 세포.

청구항 12

제11항에 있어서, Treg 세포가 CD4+CD25+ CD127-FOXP3+인, 단리된 T 세포.

청구항 13

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 발현 벡터.

청구항 14

제13항의 발현 벡터를 포함하는 단리된 숙주 세포.

청구항 15

항원 결합 도메인, 힌지 도메인, 트랜스멤브레인 도메인, 공동-자극 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)로서, 항원 특이적 결합 도메인은 항체 또는 항체 단편을 포함하며, 항체 단편이 시트룰린화된-비멘틴(CV) 폴리펩티드 또는 이의 펩티드를 포함하는 번역후 변형된 항원에 특이적으로 결합하는 단일 사슬 가변 단편(scFv)이며,

여기서 공동-자극 도메인이 CD28 또는 41BB 폴리펩티드를 포함하며, CAR이 SEQ ID NO: 21 또는 22를 포함하는 CV 펩티드에 특이적으로 결합하는, 키메라 항원 수용체.

청구항 16

제1항 내지 제5항 및 제15항 중 어느 한 항의 키메라 항원 수용체(CAR), 제6항 내지 제12항 중 어느 한 항의 단리된 T 세포, 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 발현 벡터, 또는 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 발현 벡터를 포함하는 단리된 숙주 세포를 포함하는, 류마티스 관절염을 치료하기 위한 약학적 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 하나 이상의 항염증제 및/또는 치료제를 추가로 포함하고, 여기서 항염증제는 전염증성 사이토카인에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 18

제1항 또는 제15항에 있어서, scFv가 SEQ ID NO:15의 아미노산 서열을 포함하는, 키메라 항원 수용체.

청구항 19

제6항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, scFv가 SEQ ID NO:15의 아미노산 서열을 포함하는, 단리된 T 세포.

청구항 20

제13항에 있어서, 항체 단편이 단일 사슬 가변 단편(scFv)을 포함하며, scFv가 SEQ ID NO:15의 아미노산 서열을

포함하는, 발현 벡터.

청구항 21

제14항에 있어서, 항체 단편이 단일 사슬 가변 단편(scFv)을 포함하며, scFv가 SEQ ID NO:15의 아미노산 서열을 포함하는, 단리된 숙주 세포.

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2018년 2월 11일에 출원된 미국 가출원 번호 62/629,103에 대한 35 U.S.C. § 119(e)에 따른 우선권의 혜택을 주장하며, 이는 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명의 구현에는 키메라 항원 수용체(CAR), 키메라 항원 수용체 T 세포(CAR-T) 및 자가면역 질환과 같은 질병 치료에서의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 배경

[0006] 전통적으로, 항원-특이적 T-세포는 표적 항원에 천연적으로 특이적인 말초 혈액 T-세포의 선택적 확장에 의해 생성되었다. 그러나, 대부분의 암 및 자가항원에 특이적인 많은 수의 T-세포를 선택하고 확장하는 것은 어렵고 종종 거의 불가능하다. 통합 벡터를 사용하는 유전자-요법은 이러한 문제에 대한 해결책을 제공하는데, 키메라 항원 수용체(CAR)의 전이유전자 발현이 말초혈 T-세포의 대량 집단의 생체외 바이러스 벡터 형질도입에 의해 임의의 표면 항원에 특이적인 많은 수의 T-세포의 생성을 허용하기 때문이다.

발명의 내용

[0007] 개요

[0008] 본 발명의 구현에는 부분적으로 자가면역 질환과 관련된 항원을 특이적으로 인식하는 키메라 항원 수용체(CAR)에 관한 것이다. 특히, CAR은 번역 후 변형된 항원에 특이적이다. CAR은 자가면역 반응 또는 세포독성 T 세포를 억제하는 조절 T 세포와 같은 T 세포내로 형질도입된다.

[0009] 따라서, 본 발명의 한 양태에서, 항원 특이적 결합 도메인, 힌지 도메인, 트랜스멤브레인 도메인, 공동-자극 도메인 및 CD3ζ 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)가 제공되며, 여기서 항원 특이적 결합 도메인은 시트룰린화된 세포외 기질 단백질 및 시트룰린화된 세포-표면 단백질과 같은 시트룰린화된 단백질을 포함하는 변형된 폴리펩티드 또는 이의 펩티드에 특이적으로 결합한다.

[0010] 본 발명의 제2 양태에서, 항원 특이적 결합 도메인, 힌지 도메인, 트랜스멤브레인 도메인, 공동-자극 도메인 및 CD3ζ 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)가 제공되며, 여기서 항원 특이적 결합 도메인은 시트룰린화된-비멘틴(CV) 폴리펩티드 또는 이의 펩티드에 특이적으로 결합한다.

[0011] 제3 양태에서, 본 발명은 적어도 하나의 공동-자극 도메인 및 CD3ζ 신호전달 도메인에 연결된 항원 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 변형된 단리된 T 세포를 제공하며, 여기서 항원 결합 도메인은 시트룰린화된-비멘틴(CV)에 특이적으로 결합하는 단일 사슬 가변 단편(scFv)을 포함한다. 특정 구현예에서, 항원 결합 도메인은 항체, 항체 단편, 낙타과 나노바디 또는 압타머를 포함한다.

[0012] 특정 구현예에서, 힌지 도메인은 SEQ ID NO: 8에 대해 적어도 50% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나; 트랜스멤브레인 도메인은 SEQ ID NO: 9에 대해 적어도 50% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나; CD3ζ 신호전달 도메인은 SEQ ID NO:10에 대해 적어도 50% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나; CD28 공동-자극 도메인은 SEQ ID NO:11에 대해 적어도 50% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩된다.

[0013] 특정 구현예에서, 힌지 도메인은 SEQ ID NO: 8에 대해 적어도 75% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나; 트랜스멤브레인 도메인은 SEQ ID NO: 9에 대해 적어도 75% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나; CD3ζ 신호전달 도메인은 SEQ ID NO:10에 대해 적어도 75% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나; CD28 공동-자극 도메인은 SEQ ID NO:11에 대해 적어도 75% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩된다.

[0014] 특정 구현예에서, 힌지 도메인은 SEQ ID NO: 8에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나; 트랜스멤브레인 도메인은 SEQ ID NO: 9에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나; CD3ζ 신호전달 도메인은 SEQ ID NO:10에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해

해 인코딩되고/거나; CD28 공동-자극 도메인은 SEQ ID NO:11에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩된다.

[0015] 특정 구현예에서, 힌지 도메인은 SEQ ID NO:8의 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나; 트랜스멤브레인 도메인은 SEQ ID NO:9의 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나; CD3 ζ 신호전달 도메인은 SEQ ID NO:10의 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나; CD28 공동-자극 도메인은 SEQ ID NO:11의 핵산 서열에 의해 인코딩된다.

[0016] 특정 구현예에서, 힌지 도메인은 SEQ ID NO: 8에 대해 적어도 50% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나; 트랜스멤브레인 도메인은 SEQ ID NO: 9에 대해 적어도 50% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나; CD3 ζ 신호전달 도메인은 SEQ ID NO:10에 대해 적어도 50% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나; 41BB 공동-자극 도메인은 SEQ ID NO:12에 대해 적어도 50% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩된다.

[0017] 특정 구현예에서, 힌지 도메인은 SEQ ID NO: 8에 대해 적어도 75% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나; 트랜스멤브레인 도메인은 SEQ ID NO: 9에 대해 적어도 75% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나; CD3 ζ 신호전달 도메인은 SEQ ID NO:10에 대해 적어도 75% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나; 41BB 공동-자극 도메인은 SEQ ID NO:12에 대해 적어도 75% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩된다.

[0018] 특정 구현예에서, 힌지 도메인은 SEQ ID NO: 8에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나; 트랜스멤브레인 도메인은 SEQ ID NO: 9에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나; CD3 ζ 신호전달 도메인은 SEQ ID NO:10에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나; 41BB 공동-자극 도메인은 SEQ ID NO:12에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩된다.

[0019] 특정 구현예에서, 힌지 도메인은 SEQ ID NO:8의 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나; 트랜스멤브레인 도메인은 SEQ ID NO:9의 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나; CD3 ζ 신호전달 도메인은 SEQ ID NO:10의 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나; 41BB 공동-자극 도메인은 SEQ ID NO:12의 핵산 서열에 의해 인코딩된다.

[0020] 특정 구현예에서, CV-CAR은 SEQ ID NO: 3 또는 4에 대해 적어도 50% 서열 동일성을 갖는 CV 펩티드에 특이적으로 결합한다. 특정 구현예에서, CV-CAR은 SEQ ID NO: 3 또는 4에 대해 적어도 75% 서열 동일성을 갖는 CV 펩티드에 특이적으로 결합한다.

[0021] 특정 구현예에서, CV-CAR은 SEQ ID NO: 3 또는 4에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 CV 펩티드에 특이적으로 결합한다.

[0022] 특정 구현예에서, CV-CAR은 SEQ ID NO: 3 또는 4를 포함하는 CV 펩티드에 특이적으로 결합한다.

[0023] 특정 구현예에서, CV-CAR은 SEQ ID NO: 21 또는 22에 대해 적어도 50% 서열 동일성을 갖는 CV 펩티드에 특이적으로 결합한다. 특정 구현예에서, CV-CAR은 SEQ ID NO: 21 또는 22에 대해 적어도 75% 서열 동일성을 갖는 CV 펩티드에 특이적으로 결합한다.

[0024] 특정 구현예에서, CV-CAR은 SEQ ID NO: 21 또는 22에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 CV 펩티드에 특이적으로 결합한다.

[0025] 특정 구현예에서, CV-CAR은 SEQ ID NO: 21 또는 22를 포함하는 CV 펩티드에 특이적으로 결합한다.

[0026] 제4 양태에서, 본 발명은 적어도 하나의 공동-자극 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인에 연결된 항원 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 변형된 단리된 T 세포를 제공하며, 여기서 항원 결합 도메인은 시트룰린화된-비멘틴(CV)에 특이적으로 결합하는 단일 사슬 가변 단편(scFv)을 포함한다. 특정 구현예에서, 공동-자극 도메인은 CD28 또는 41BB 폴리펩티드를 포함한다. 특정 구현예에서, CAR은 SEQ ID NO: 8에 대해 적어도 50% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되는 힌지 도메인을 포함하고/거나; CAR은 SEQ ID NO: 9에 대해 적어도 50% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되는 트랜스멤브레인 도메인을 포함하고/거나; CD3 ζ 신호전달 도메인은 SEQ ID NO:10에 대해 적어도 50% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나; CD28 공동-자극 도메인은 SEQ ID NO:11에 대해 적어도 50% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩된다. 특정 구현예에서, CAR은 SEQ ID NO: 8에 대해 적어도 75% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되는 힌지 도메인을 포함하고/거나; CAR은 SEQ ID NO: 9에 대해 적어도 75% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되는 트랜스멤브레인 도메인을 포함하고/거나; CD3 ζ 신호전달 도메인은 SEQ ID NO:10에

대해 적어도 75% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나; CD28 공동-자극 도메인은 SEQ ID NO:11에 대해 적어도 75% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩된다. 특정 구현예에서, CAR은 SEQ ID NO: 8에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되는 힌지 도메인을 포함하고/거나; CAR은 SEQ ID NO: 9에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되는 트랜스멤브레인 도메인을 포함하고/거나; CD3 ζ 신호전달 도메인은 SEQ ID NO:10에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나; CD28 공동-자극 도메인은 SEQ ID NO:11에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩된다. 특정 구현예에서, CAR은 SEQ ID NO:8의 핵산 서열에 의해 인코딩되는 힌지 도메인을 포함하고/거나; CAR은 SEQ ID NO:9의 핵산 서열에 의해 인코딩되는 트랜스멤브레인 도메인을 포함하고/거나; CD3 ζ 신호전달 도메인은 SEQ ID NO:10의 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나; CD28 공동-자극 도메인은 SEQ ID NO:11의 핵산 서열에 의해 인코딩된다. 특정 구현예에서, CAR은 SEQ ID NO: 8에 대해 적어도 50% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되는 힌지 도메인을 포함하고/거나; CAR은 SEQ ID NO: 9에 대해 적어도 50% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되는 트랜스멤브레인 도메인을 포함하고/거나; CD3 ζ 신호전달 도메인은 SEQ ID NO:10에 대해 적어도 50% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나; 41BB 공동-자극 도메인은 SEQ ID NO:12에 대해 적어도 50% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩된다. 특정 구현예에서, CAR은 SEQ ID NO: 8에 대해 적어도 75% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되는 힌지 도메인을 포함하고/거나; CAR은 SEQ ID NO: 9에 대해 적어도 75% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되는 트랜스멤브레인 도메인을 포함하고/거나; CD3 ζ 신호전달 도메인은 SEQ ID NO:10에 대해 적어도 75% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나; 41BB 공동-자극 도메인은 SEQ ID NO:12에 대해 적어도 75% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩된다. 특정 구현예에서, CAR은 SEQ ID NO: 8에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되는 힌지 도메인을 포함하고/거나; CAR은 SEQ ID NO: 9에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되는 트랜스멤브레인 도메인을 포함하고/거나; CD3 ζ 신호전달 도메인은 SEQ ID NO:10에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나; 41BB 공동-자극 도메인은 SEQ ID NO:12에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩된다. 특정 구현예에서, CAR은 SEQ ID NO:8의 핵산 서열에 의해 인코딩되는 힌지 도메인을 포함하고/거나; CAR은 SEQ ID NO:9의 핵산 서열에 의해 인코딩되는 트랜스멤브레인 도메인을 포함하고/거나; CD3 ζ 신호전달 도메인은 SEQ ID NO:10의 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나; 41BB 공동-자극 도메인은 SEQ ID NO:12의 핵산 서열에 의해 인코딩된다.

[0027] 특정 구현예에서, T 세포는 포유동물 조절 T 세포(Treg)이다. 특정 구현예에서, Treg 세포는 $CD4^{+}CD25^{+}CD127^{-}$, $FOXP3^{+}$ 이다.

[0028] 특정 구현예에서, 발현 벡터는 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩한다.

[0029] 제5 양태에서, 본 발명은 키메라 항원 수용체(CAR), 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 발현 벡터 또는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 변형된 단리된 T 세포를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0030] 제6 양태에서, 본 발명은 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 변형된 단리된 T 세포를 투여하는 것을 포함하는 류마티스 관절염으로 진단된 대상체를 치료하는 방법으로서, CAR은 시트룰린화된-비멘틴(CV) 항원에 특이적으로 결합하는, 방법을 제공한다. 특정 양태에서, 항염증제 및/또는 치료제가 또한 대상체에게 투여된다. 특정 구현예에서, 류마티스 관절염으로 진단된 대상체를 치료하는 방법은 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플로부터 T 림프구를 단리하는 단계; 통상적인 T 세포(Tconv)로부터 $CD4^{+}$ T 조절 세포(Treg)를 분리하는 단계로서, Treg 세포는 $CD4^{+}CD25^{+}CD127^{-}$ 이고 Tconv는 $CD4^{+}CD25^{-}CD127^{+}$ 인, 단계; 시트룰린화된-비멘틴(CV) 항원에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 발현 벡터로 Treg 세포를 형질도입하는 단계; 형질도입된 Treg를 항-CD3/CD28 비드로 생체외에서 적어도 1회 확장하여 CV 항원에 특이적인 확장된 Treg 세포를 수득하는 단계; 및 Treg를 대상체에 재주입함으로써 대상체를 치료하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, CAR은 적어도 하나의 공동-자극 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인에 연결된 항원 결합 도메인을 포함하고, 여기서 항원 결합 도메인은 시트룰린화된-비멘틴(CV)에 특이적으로 결합하는 단일 사슬 가변 단편(scFv)을 포함한다. 특정 구현예에서, 공동-자극 도메인은 CD28 또는 41BB 폴리펩티드를 포함한다. 특정 구현예에서, CAR은 SEQ ID NO: 8에 대해 적어도 50% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되는 힌지 도메인을 포함하고/거나; CAR은 SEQ ID NO: 9에 대해 적어도 50% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되는 트랜스멤브레인 도메인을 포함하고/거나; CD3 ζ 신호전달 도메인은 SEQ ID NO:10에 대해 적어도 50% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나; CD28 공동-자극 도메인은 SEQ ID NO:11에 대해 적어도 50% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩된다. 특정 구현예에서, CAR은 SEQ ID NO: 8에 대해 적어도 50% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인

코딩되는 힌지 도메인을 포함하고/거나; CAR은 SEQ ID NO: 9에 대해 적어도 50% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되는 트랜스멤브레인 도메인을 포함하고/거나; CD3ζ 신호전달 도메인은 SEQ ID NO:10에 대해 적어도 50% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되고/거나; 41BB 공동-자극 도메인은 SEQ ID NO:12에 대해 적어도 50% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩된다.

[0031] 제7 양태에서, 본 발명은 CAR이 T 세포, 예컨대 조절 T 세포(Treg), 세포독성 T 세포(CTL), 통상적인 T 세포; 면역계의 다른 유형의 세포 예컨대, 자연 살해 세포(NK); 줄기 세포, 세포주, 및 기타 등등을 포함하는 다양한 유형의 세포 내로 형질도입되는 키메라 항원 수용체(CAR)를 제공한다. CAR은 세포외 항원, 세포-표면 항원, 바이러스 항원, 번역 후 변형된 항원 등과 같은 특이적 질환 표적 항원에 대해 생성된 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0032] 다른 양태는 하기 설명되어 있다.

[0033] **정의**

[0034] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 용어(기술적 및 과학적 용어 포함)는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 사용되는 사전에서 정의된 용어와 같은 용어는 관련 기술의 맥락에서 그 의미와 일치하는 의미를 갖는 것으로 해석되어야 하며, 본원에 명시적으로 정의되지 않는 한 이상적이거나 지나치게 형식적인 의미로 해석되지 않을 것이므로 이해될 것이다.

[0035] 본원에 사용된 바와 같이, 단수 형태("a", "an" 및 "the")는 문맥상 달리 명확하게 나타내지 않는 한 복수 형태도 포함하도록 의도된다. 또한, 용어 "포함하는", "포함하다", "갖는", "갖는다", "함께" 또는 이의 변형이 상세한 설명 및/또는 청구 범위에서 사용되는 정도까지, 이러한 용어는 용어 "포함하는"과 유사한 방식으로 포함하는 것으로 의도된다.

[0036] 용어 "약" 또는 "대략"은 당업자에 의해 결정된 특정 값에 대해 허용가능한 오차 범위 내에 있음을 의미하며, 이는 값이 측정되거나 결정되는 방법, 즉 측정 시스템의 제한에 부분적으로 의존할 것이다. 예를 들어, "약"은 당업계의 실행에 따라 1 이내 또는 1초과의 표준 편차를 의미할 수 있다. 대안적으로, "약"은 주어진 값 또는 범위의 20% 이하, 10% 이하, 5% 이하 또는 1% 이하의 범위를 의미할 수 있다. 대안적으로, 특히 생물학적 시스템 또는 과정과 관련하여, 이 용어는 값의 5배 이내, 및/또한 2배 이내의 규모를 의미할 수 있다. 특정 값이 출원 및 청구범위에 설명되어 있는 경우, 달리 언급되지 않는 한, 용어 "약"은 특정 값에 대해 허용가능한 오차 범위내를 의미하는 것으로 간주되어야 한다.

[0037] 본원에 사용된 용어 "친화성"은 결합 강도의 척도를 의미한다. 이론에 얽매이지 않으면서, 친화성은 항체 조합 부위와 항원 결정부 사이의 입체화학적 적합성의 근접성, 이들 사이의 접촉 면적 크기, 및 하전된 소수성 그룹의 분포에 의존적이다. 친화성은 또한 용어 "항원항체결합력(avidity)"을 포함하며, 이는 가역적 복합체의 형성 후 항원-항체 결합의 강도를 나타낸다. 친화성을 계산하는 결합 실험의 사용을 포함하는 항원에 대한 항체의 친화성 계산 방법은 당업계에 공지되어 있다. 기능적 검정(예를 들어, 흐름세포측정 검정)에서 항체 활성은 또한 항체 친화성을 반영한다. 항체 및 친화성은 기능적 검정(예를 들어, 흐름세포측정 검정)을 사용하여 표현형적으로 특성규명되고 비교될 수 있다.

[0038] 본원에 사용된 용어 "제제"는 질병 또는 다른 의학적 병태를 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 임의의 분자, 화학 물질, 조성물, 약물, 치료제, 화학요법제 또는 생물학적 제제를 포함하는 것을 의미한다. 이 용어는 소분자 화합물, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA 시약, 항체, 에피토프 인지 부위를 갖는 항체 단편, 예컨대 Fab, Fab', F(ab')₂ 단편, Fv 단편, 단일 사슬 항체, 항체 모방체(예컨대, DARPins, 항체 분자, 어필린, 어피틴, 안티칼린, 아비머, 피노머, 쿠니츠 도메인 펩티드 및 모노바디), 펩타이드, 압타머; 효소, 펩티드 유기 또는 무기 분자, 천연 또는 합성 화합물 등을 포함한다. 제제는 임상 시험 동안, 시험전 테스트 동안 또는 FDA 승인 후에 임의의 단계에서 본 발명의 방법에 따라 검정될 수 있다.

[0039] "개선하다"는 질병의 발생 또는 진행을 감소, 억제, 약화, 저하, 저지 또는 안정화시키는 것을 의미한다.

[0040] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "항체"는 온전한 항체 분자뿐만 아니라 면역원-결합 능력을 보유하는 항체 분자의 단편을 의미한다. 이러한 단편은 또한 당업계에 공지되어 있으며, 시험관내 및 생체내 모두에서 자주 사용된다. 따라서, 본원에서 사용되는 용어 "항체"는 온전한 면역글로불린 분자뿐만 아니라 잘 알려진 활성 단편 F(ab')₂ 및 Fab를 의미한다. F(ab')₂ 및 온전한 항체의 Fc 단편이 결합된 Fab 단편은 순환에서 더 빠르게 제거되고, 온전한 항체의 비-특이적 조직 결합이 적을 수 있다(Wahl et al., J. Nucl. Med. 24:316-325 (1983)). 본

발명의 항체는 전체 천연 항체, 이중 특이적 항체; 키메라 항체; Fab, Fab', 단일 사슬 V 영역 단편(scFv), 융합 폴리펩티드 및 비통상적 항체를 포함한다.

[0041] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용된 바와 같이, 용어 "또는"은 일반적으로 그 내용이 명백하게 달리 지시하지 않는 한 "및/또는"을 포함하는 의미로 사용된다.

[0042] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR"은 면역 세포를 활성화 또는 자극할 수 있는 세포내 신호전달 도메인에 융합되는 항원-결합 도메인을 지칭하고, 특정 구현예에서, CAR은 또한 트랜스멤브레인 도메인을 포함한다. 특정 구현예에서, CAR의 세포외 항원-결합 도메인은 무린 또는 인간화된 모노클로날 항체의 가변 중쇄 및 경쇄 영역을 융합하여 유래된 단일 사슬 가변 단편(scFv)으로 구성된다. 대안적으로, (예를 들어, Fab 라이브러리로부터 수득된 항체 대신에) Fab's로부터 유래되는 scFv가 사용될 수 있다. 다양한 구현예에서, scFv는 트랜스멤브레인 도메인에 융합되고, 그 후 세포내 신호전달 도메인에 융합된다. "1-세대" CAR은 항원 결합시 CD3 ζ 신호를 단독으로 제공하는 것을 포함하고, '2-세대' CAR은 공동-자극(예를 들어, CD28 또는 CD137) 및 활성화(CD3 ζ) 둘 모두를 제공하는 것을 포함한다. "3-세대" CAR은 다중 공동-자극(예를 들어, CD28 및 CD137) 및 활성화(CD3 ζ)를 제공하는 것들을 포함한다. CAR의 4 세대가 기술되어 있는데, CAR 작제물을 포함하는 벡터가 사이토카인 카세트를 보유하는 사이토카인 치사(TRUCKS)를 위해 재지정된 CAR T 세포가 있다. CAR이 결합되는 경우, CAR T 세포는 염증유발성 사이토카인을 중앙 병변에 침착시킨다. CAR-T 세포는 키메라 항원 수용체를 발현하는 T 세포이다. 본원에서 사용되는 당업계에 일반적으로 사용되는 문구 "키메라 항원 수용체(CAR)"는 항원이 세포외 도메인에 결합시 세포가 특수 기능을 수행하도록 지시하는 세포내 도메인에 결합된 항원-특이적 세포외 도메인을 갖는 재조합 융합 단백질을 지칭한다. 용어 "인공 T-세포 수용체", "키메라 T-세포 수용체" 및 "키메라 면역수용체"는 각각 용어 "키메라 항원 수용체"와 본원에서 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0043] 본원에 사용된 바와 같이 항목, 조성물, 장치, 방법, 공정, 시스템 등의 정의되거나 기술된 요소와 관련하여 용어 "포함하는", "포함하다" 또는 "포함한" 및 이들의 변형은 추가적인 요소를 허용하는 포괄형 또는 개방형인 것을 의미하며, 이에 의해 정의된 또는 기술된 항목, 조성물, 장치, 방법, 공정, 시스템 등이 특정 요소 또는 적절한 경우 이의 등가물을 포함하며, 다른 요소가 포함될 수 있으며, 정의된 항목, 조성물, 장치, 방법, 공정, 시스템 등의 범위/정의 내에 여전히 포함됨을 나타낸다.

[0044] "진단" 또는 "진단된"은 병리학적 상태의 존재 또는 특성을 확인하는 것을 의미한다. 진단 방법은 이의 민감도 및 특이성에 있어서 상이하다. 진단 검정의 "민감성"은 양성("진 양성"의 퍼센트)으로 테스트된 질병에 걸린 개체의 백분율이다. 검정에 의해 검출되지 않은 질병에 걸린 개체는 "위음성"이다. 질환에 걸리지 않고, 검정에서 음성으로 테스트된 대상체는 "진 음성"으로 불린다. 진단 검정의 "특이성"은 1에서 위양성 비율을 뺀 값이며, 여기에서 "위 양성" 비율은 양성으로 테스트된 질병이 없는 대상체의 비율로서 정의된다. 특정 진단 방법이 상태에 대한 확실한 진단을 제공하지 못할 수 있지만, 상기 방법이 진단에 도움이 되는 긍정적인 표시를 제공하는 경우 이는 충분하다.

[0045] "질병"은 동물이 항상성을 유지할 수 없는 동물의 건강 상태이며, 질병이 개선되지 않으면 동물의 건강이 계속 악화된다. 질병의 예로는 자가면역 질환, 예컨대 류마티스 관절염(RA), 염증성 장 질환(IBD), 크론병(CD), 강직성 척추염(AS) 등을 포함한다.

[0046] 용어 "힌지" 또는 "힌지 영역"은 측면인접 폴리펩티드 영역에 구조적 유연성 및 간격을 제공하는, 유연한 커넥터 영역, 예를 들어 천연 또는 합성 폴리펩티드, 또는 임의의 다른 유형의 분자를 지칭한다.

[0047] 본원에 사용된 바와 같은 "렌티바이러스"는 레트로바이러스과(Retroviridae family)의 속을 나타낸다. 렌티바이러스는 비-분열 세포를 감염시킬 수 있다는 점에서 레트로바이러스 중에서 독특하다; 이들은 상당한 양의 유전자 정보를 숙주 세포의 DNA에 전달할 수 있어서, 이들은 유전자 전달 벡터의 가장 효율적인 방법 중 하나이다. HIV, SIV 및 FIV는 모두 렌티바이러스의 예이다.

[0048] 본원에 사용된 바와 같이 "스페이서" 또는 "스페이서 도메인"으로 또한 지칭되는 용어 "링커"는 본 발명의 융합 단백질에서 2개의 아미노산 서열 사이에 임의로 위치하는 아미노산 또는 아미노산의 서열을 나타낸다.

[0049] 면역원성 조성물의 "비경구" 투여는 예를 들어, 피하(s.c.), 정맥내(i.v.), 근육내(i.m.) 또는 흉골내 주사 또는 주입 기술을 포함한다.

[0050] 용어 "환자" 또는 "개체" 또는 "대상체"는 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 인간 환자가 선호되는 치료할 포유동물 대상체를 나타낸다. 일부 경우에, 본 발명의 방법은 실험 동물, 수의학 적용 및 마우스, 래트 및 햄스터

를 포함한 설치류 및 영장류를 포함하지만 이에 제한되지 않는 질병에 대한 동물 모델의 개발에 사용된다.

- [0051] 본원에 사용된 용어 "단쇄 가변 단편" 또는 "scFv"는 면역글로불린의 중쇄(VH) 및 경쇄(VL)의 가변 영역의 융합 단백질이다. 중쇄(VH) 및 경쇄(VL)는 VH의 N-말단을 VL의 C-말단과 연결하거나 VH의 C-말단을 VL의 N-말단과 연결하는 펩티드-인코딩 링커(예를 들어, 10, 15, 20, 25개 아미노산)에 의해 연결되거나 직접 연결된다. 링커는 일반적으로 유연성을 위해 글리신이 풍부하고 용해도를 위해 세린 또는 트레오닌이 풍부하다. 불변 영역의 제거와 링커의 도입에도 불구하고 scFv 단백질은 원래의 면역글로불린의 특이성을 유지한다. 단일 사슬 Fv 폴리펩티드 항체는 휴스턴(Huston) 등에 의해 기술된 바와 같이 VH- 및 VL-인코딩 서열을 포함하는 핵산으로부터 발현될 수 있다(*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 85:5879-5883, 1988). 또한, 미국 특허 번호 5,091,513, 5,132,405 및 4,956,778; 및 미국 특허 공개 번호 20050196754 및 20050196754 참조. 억제 활성을 갖는 길항 scFv가 기술되었다(예를 들어, 문헌 [Zhao *et al.*, *Hybridoma* (Larchmt) 2008 27(6):455-51; Peter *et al.*, *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2012 August 12; Shieh *et al.*, *J Immunol* 2009 183(4):2277-85; Giomarelli *et al.*, *Thromb Haemost* 2007 97(6):955-63; Fife *et al.*, *J Clin Invest* 2006 116(8):2252-61; Brocks *et al.*, *Immunotechnology* 1997 3(3): 173-84; Moosmayer *et al.*, *Ther Immunol* 1995 2(10):31-40]) 참조). 자극 활성을 갖는 길항 scFvs가 기술되어 있다(예를 들어, 문헌 [Peter *et al.*, *J Biol Chem* 2003 278(38):36740-7; Xie *et al.*, *Nat Biotech* 1997 15(8):768-71; Ledbetter *et al.*, *Crit Rev Immunol* 1997 17(5-6):427-55; Ho *et al.*, *Biochim Biophys Acta* 2003 1638(3):257-66] 참조).
- [0052] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "치료하다", "치료하는", "치료" 및 기타 등등은 장애 및/또는 이와 관련된 증상을 감소시키거나 완화시키는 것을 나타낸다. 배제되지는 않지만, 장애 또는 병태를 치료하는 것은 장애, 병태 또는 이와 관련된 증상이 완전하게 제거될 것을 요구하지 않음을 이해할 것이다.
- [0053] "백터"는 단리된 핵산을 포함하고, 단리된 핵산을 세포 내부에 전달하는데 사용될 수 있는 물질의 조성물이다. 백터의 예는 비제한적으로 선형 폴리뉴클레오티드, 이온성 또는 양친매성 화합물과 관련된 폴리뉴클레오티드, 플라스미드 및 바이러스를 포함한다. 따라서, 용어 "백터"는 자체 복제 플라스미드 또는 바이러스를 포함한다. 이 용어는 또한, 핵산의 세포 내로의 전달을 촉진하는 비-플라스미드 및 비-바이러스 화합물, 예컨대, 폴리리신 화합물, 리포솜 및 기타 등등을 포함하는 것으로 해석된다. 바이러스 백터의 예는 비제한적으로, 아데노바이러스 백터, 아데노-관련 바이러스 백터, 레트로바이러스 백터 및 기타 등등을 포함한다.
- [0054] 본원에 개시된 모든 유전자, 유전자 명칭 및 유전자 생성물은 본원에 개시된 조성물 및 방법이 적용될 수 있는 임의의 종으로부터의 상동체에 상응하도록 의도된다. 따라서, 용어는 비제한적으로, 인간 및 마우스로부터의 유전자 및 유전자 생성물을 포함한다. 특정 종으로부터의 유전자 또는 유전자 생성물이 개시되는 경우, 이러한 개시는 단지 예시적인 것으로 의도되고, 이를 나타내는 문맥이 명확하게 지시하지 않는 한 제한으로서 해석되지 않아야 하는 것으로 이해된다. 따라서, 예를 들어, 일부 구현예에서, 포유동물 핵산 및 아미노산 서열에 관한 본원에 개시된 유전자 또는 유전자 생성물에 있어서, 비제한적으로, 다른 포유동물, 어류, 양서류, 파충류 및 조류를 포함하는 다른 동물로부터의 상동성 및/또는 이종상동성 유전자 및 유전자 생성물을 포함하는 것으로 의도된다. 바람직한 구현예에서, 유전자, 핵산 서열, 아미노산 서열, 펩티드, 폴리펩티드 및 단백질은 인간이다. 용어 "유전자"는 또한 변이체를 포함하는 것으로 의도된다.
- [0055] 본원에 제공된 범위는 범위 내의 모든 값에 대한 속기인 것으로 이해된다. 예를 들어, 1 내지 50의 범위는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50으로 구성된 군으로부터 임의의 숫자, 숫자의 조합 또는 하위 범위를 포함하는 것으로 이해된다.
- [0056] 본 발명의 실행은 달리 지시되지 않는 한, 당업계의 기술 내에 있는 화학, 분자 생물학, 미생물학, 재조합 DNA, 유전학, 면역학, 세포 생물학, 세포 배양 및 전이유전자 생물학의 통상적인 기술을 사용한다. 예를 들어, 문헌 [Maniatis *et al.*, 1982, *Molecular Cloning* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Sambrook *et al.*, 1989, *Molecular Cloning*, 2nd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Sambrook and Russell, 2001, *Molecular Cloning*, 3rd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Ausubel *et al.*, 1992), *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, including periodic updates); Glover, 1985, *DNA Cloning* (IRL Press, Oxford); Anand, 1992; Guthrie and Fink, 1991; Harlow and Lane, 1988, *Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Jakoby and Pastan, 1979; *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Transcription And Translation* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds.

1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu *et al.* eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); Riott, Essential Immunology, 6th Edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988; Hogan *et al.*, Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986); Westerfield, M., The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*), (4th Ed., Univ. of Oregon Press, Eugene, 2000)] 참조.

도면의 간단한 설명

[0057]

도 1은 일부 구현예에 따라 구현된 공정을 예시하는 개략도이다;

도 2는 (CV)-CAR Treg를 생성하기 위해 일부 구현예에 따라 구현되는 공정을 예시하는 개략도이다;

도 3은 환자에서 항원을 표적으로 하는 CV-CAR Treg를 예시하는 개략도이다;

도 4는 BVCA1 항체에서 합성된 단일-사슬 가변 단편(scFv)의 CV에 대한 특이성 및 친화성 평가. 인간 및 무린 샘플을 평가하였다. 효소-결합 면역 흡착 검정(ELISA)이 사용되었다. 결과는 BVCA1 항체(도 7에 기재됨)로서, BVCA1 scFv가 시트룰린화된 비멘틴에 대해 특이적임을 보여준다;

도 5a, 5b. BVCA1 항체에서 합성된 단일-사슬 가변 단편(scFv)의 CV에 대한 특이성 및 친화성 평가. 해리 상수(KD)는 표면 플라즈몬 공명(Biacore system)을 사용하여 측정되었다. 결과는 (도 5a) BVCA1 완전 인간 IgG와 인간 CV 펩티드 사이의 K_D 가 10 nM이고, (도 5b) BVCA1 scf와 인간 CV 펩티드 사이의 K_D 가 198 nM임을 보여준다. 결과는 BVCA1 항체로서 BVCA1 scFv가 시트룰린화된 비멘틴에 특이적임을 보여준다;

도 6. 인간과 무린 비멘틴 펩티드 60-75의 서열 비교는 서열이 매우 유사하고 시트룰린화 후 시트룰린으로 변형된 3개의 아르기닌 아미노산(약칭 R)이 두 중에서 동일한 위치에 있음을 보여준다.

도 7. BVCA1 항체에 의한 CV에 대한 특이성 및 친화성 평가. 효소-결합 면역 흡착 검정(ELISA)이 사용되었다. 결과는 인간 및 무린 BVCA1 항체 둘 모두가 인간 및 무린 시트룰린화된 비멘틴 둘 모두에 특이적임을 보여준다;

도 8a. CV-CAR의 도메인을 보여주는 CV-CAR의 개략도;

도 8b. 일부 구현예에 따라 생성된 CV-CAR의 특정 도메인의 한 예의 개략도. CV-CAR은 α CV scFv, 힌지 영역 및 트랜스메브레인 모티프(TM), 공동-자극 도메인(CD28 (CV.28z-CAR) 또는 41BB (CV.41BBz-CAR)), CD3 ζ 를 포함한다. CD28의 천연 TM 부분이 사용된다; 표피 성장 인자 수용체(EGFRt)의 절두된 버전은 리포터로 사용하기 위해 C-말단에 있으며, EGFRt 리포터의 절단을 가능하게 하는 T2A 펩티드에 의해 CAR 서열로부터 분리된다.

도 9는 Treg에 도입된 CV-특이적 CAR의 시험관내 생성, 확장 및 평가를 위한 타임라인의 예를 예시한다;

도 10a-10b. CAR 작제물의 다양한 길이 힌지의 분석. 형질도입 후 5일째에 CV-CAR⁺ Treg를 EGFRt의 발현을 기반으로 하는 흐름세포측정에 의해 분류하였다. 그 후, 분류된 CV-CAR Treg를 항-CD3/CD28 비드 또는 CV-펩티드/스트랩타비딘(CV-pep-SA) 비드의 존재 또는 부재하에 재자극하였다. 도 10a. 재자극 후 3일째에 활성화 마커 CD71 및 CD25의 발현 분석. 도 10b. 재자극 후 5일째에 세포 확장 분석.

도 11a-11d. 다양한 버전의 BVCA1 scFv를 갖는 CV-CAR 작제물의 비교 분석. Tconv 및 Treg 세포를 자극 후 2일째에 다양한 버전의 CV-CAR 작제물로 형질도입하였다. 형질도입 효율은 흐름세포측정에 의해 평가하였다. 세포 표면에서 CAR-리포터 유전자(도 11a) 및 CV-CAR(도 11b)을 발현하는 세포의 백분율이 제시된다. 상이한 자극 조건(IL-2 단독, 항-CD3/CD28 비드 및 CV-SA 비드)의 존재하에 2차 라운드 자극 후 2일째, 활성화 마커 CD69 및 CD71의 발현을 흐름세포측정에 의해 분석하였다(도 11c 및 11d);

도 12a-12c. Treg 및 Tconv에서 리포터 EGFRt의 표면 발현의 평가. 도 12a. 상이한 CAR 작제물로의 형질도입 후 4일째에 흐름세포측정에 의한 Treg 및 Tconv에서 리포터 EGFRt의 표면 발현의 평가. 모든 도너에 대한 데이터의 요약(n = 4) 도 12b. 다양한 CAR 작제물로의 형질도입 후 4일째에 흐름세포측정에 의한 Treg 및 Tconv에서 리포터 EGFRt의 표면 발현의 대표적인 점도표. 도 12c. 바이오틴화된-CV 펩티드(pep)/SA-FITC 복합물의 개략

도. 도 12d. Treg에서 리포터 EGFRt 및 CV-CAR의 표면 발현의 평가. Treg 세포는 형질도입 후 5일째에 FITC (CVpep-SA-FITC) 및 EGFRt 항체와 컨주게이션된 바이오틴화된-CV-펩티드/스트렙타비딘 테트라머를 사용하여 CV-CAR에 대해 염색하였다. 점도표는 4개의 독립된 실험을 나타낸다;

도 13은 바이오틴화된 CV 펩티드로 코팅된 SA DYNABEAD®로부터 형성된 바이오틴화된 CV-pep-SA 비드의 개략도이다;

도 14a-14c. 생성된 CV-CAR Treg를 활성화시키기 위해 CV-CAR을 통해 매개되는 신호의 능력 평가. 흐름세포측정에 의한 CV-특이적 CAR⁺ Treg의 풍부화 후, 세포를 항-CD3/CD28 비드 또는 바이오틴화된 CV(CV-pep-SA) 비드의 존재 또는 부재하에 재자극하였다. 도 14a. 1일째에 세포 클러스터링의 평가. 도 14b. 3일째에 활성화 마커 CD71 및 CD25의 발현 평가. 도 14c. 재자극 후 5일째에 측정된 모든 조건에서 상이한 CAR Treg 집단의 확장 배수 평가;

도 15a-15c. 시험관내 확장 후 CV-CAR Treg의 표현형 및 안정성 평가. 형질도입되지 않은 Treg 및 CV-CAR Treg는 2 라운드 자극으로 처리되었으며, 2 라운드 활성화는 항-CD3/CD28 비드 또는 CV-SA 비드를 사용하였다. 도 15a. 18일째에 CD25 및 CD127 표면 발현에 대한 흐름세포측정에 의한 세포 평가. 도 15b. 18일째에 FOXP3 및 Helios 핵내 발현에 대한 흐름세포측정에 의한 세포 평가. 도 15c. 세포를 PMA/이오노마이신으로 4시간 자극한 후(마지막 2시간은 브레펠딘 A의 존재하에) 확장된 Treg의 사이토카인 생성 프로파일의 평가. 그 후, 세포를 고정시키고, IFN- γ , IL-2, IL-10 및 IL-17을 표적으로 하는 항체로 염색하였다;

도 16a-16b. 류마티스 관절염(RA) 환자의 관절에서 수확한 활액의 존재하에 CV-CAR T 세포가 활성화되는 능력의 평가. 다양한 CAR 작제물을 발현하는 확장된 Treg는 물론 형질도입되지 않은 Treg를 RA 환자로부터의 활액 또는 CV-SA 비드를 갖거나 갖지 않는 IL-2의 존재하에 배양물에 넣었다. CD71의 발현은 3.5일의 배양 후 흐름세포측정에 의해 평가하였다. 도 16a. CD71 및 EGFRt의 발현 평가(점도표). 빨간색 숫자(각 그래프의 오른쪽 상단 모서리에 있음)는 EGFRt⁺ 분획 중 CD71⁺ 세포의 백분율을 나타낸다. 도 16b. 상이한 CAR Treg 집단에서 EGFRt⁻ 및 EGFRt⁺ 분획 중 CD71⁺ 세포의 백분율;

도 17a-17b. 렌티바이러스 형질도입 후 Treg의 표면에서 발현되는 CV-특이적 CAR의 능력 평가. CAR(항-인간 IgG(H + L) 항체 사용) 및 표피 성장 인자 수용체(EGFRt) 둘 모두는 흐름세포측정에 의해 검출하였다. 도 17a. 형질도입되지 않은 Treg, CV/CD28 ζ CAR⁺ Treg 및 CV/41BB ζ CAR⁺ Treg의 표면에서 CAR 및 EGFRt의 발현 평가.

도 17b. 다양한 실험에서 CAR⁺ 세포의 백분율;

도 18a-18c. 류마티스 관절염(RA) 환자의 관절에서 수확한 활액의 존재하에 CV-CAR T 세포가 활성화되는 능력의 평가. 다양한 CAR 작제물을 발현하는 확장된 Treg(19.28 ζ -CAR Treg, 19.41BB ζ -CAR Treg, CV.28 ζ -CAR Treg 및 19.41BB ζ -CAR Treg)뿐만 아니라 형질도입되지 않은(UTD) Treg는 3명의 다른 RA 환자의 활액(SF) 또는 대조군 통풍 환자의 SF, 또는 CV-SA 비드를 갖거나 갖지 않는 IL-2의 존재하에 배양물에 넣었다. 활성화 마커 CD71의 발현은 3.5일의 배양 후 흐름세포측정에 의해 평가하였다. 도 18a. 다양한 조건 하에 공동-배양 후 CV.28 ζ -CAR Treg 집단에서 CD71 및 EGFRt의 발현. 도 18b. 통풍 음성 대조군 환자의 SF 또는 RA SF의 존재하에 19.28 ζ -CAR Treg 및 CV.28 ζ -CAR Treg에서 EGFRt에 대한 CD71의 발현을 보여주는 대표적인 점도표. 도 18c. RA 환자의 SF의 존재하에 공동-배양 후 다양한 CAR Treg 집단에서 EGFRt⁻ 및 EGFRt⁺ 분획 중 CD71⁺ 세포의 백분율의 요약(n=4).

도 19. 형질감염 후 3일째에 흐름세포측정에 의한 HEK 293T 세포에서 EGFRt의 발현 평가. CV-CAR 작제물은 형질감염 후 HEK 293T 세포의 세포 표면에서 효율적으로 발현된다;

도 20a 및 20b. PAD2-GFP 렌티바이러스 플라스미드로 형질도입 후 SKNBE2c 종양 세포주에서 시트룰린화된 비멘틴의 발현 평가. 인간 효소 펩티딜 아르기닌 데아미나제(PAD2)의 유전자를 GFP 리포터를 갖는 렌티바이러스 벡터에 삽입한 다음, 세포 표면에서 비멘틴 단백질을 발현하는 것으로 알려진 종양 세포주인 SKNBE2c 세포에 형질도입하였다. 도 20a. 형질도입 후 3일째에, SKNBE2C 세포에서 GFP 발현을 흐름세포측정에 의해 평가하였다. 도 20b. 야생형(WT) 및 PAD2-GFP 형질도입된 SKNBE2C 세포에서 시트룰린화된 비멘틴의 존재는 면역형광 염색에 의해 평가하였다.

도 21. 직접 ELISA에 의한 활액 내 시트룰린화된 비멘틴의 검출. 시트룰린화된 비멘틴의 존재는 RA 및 음성 대조군 통풍 환자의 활액에서 ELISA에 의해 평가하였다. 시트룰린화된 및 비-시트룰린화된 비멘틴 단백질을 각각

양성 및 음성 대조군으로서 사용하였다.

도 22a-22b. RA 환자의 무세포 활액의 존재하에 CV-특이적 CAR Treg에서 CAR-매개된 자극의 평가. 도 22a. RA 환자의 전체 또는 무세포 활액 상청액의 존재하에 3일 배양 후 EGFRt에 대한 CD71의 발현을 나타내는 대표적인 점도표. 도 22b. RA 환자의 전체 또는 무세포 활액과의 공동-배양 후 CV.28z-CAR Treg에서 EGFRt- 및 EGFRt+ 분획 중 CD71⁺ 세포의 백분율.

도 23a-23b. TCR^{KO} CV.28z-CAR⁺ Treg 세포의 생성. 도 23a. TCR^{KO} CV.28z-CAR⁺ Treg를 생성하기 위한 프로토콜의 개략도. 도 23b. 9일째에 흐름세포측정에 의한 농축 후 CV.28z-CAR⁺ Treg 세포 순도. 상단 점도표는 0일째에 CRISPR/Cas9 TCR 녹아웃을 겪지 않은 세포를 보여주는 반면, 하단 점도표의 세포는 겪었다.

도 24a-24b. CAR-매개된 자극 후 CV-CAR Treg의 억제 기능 평가. 도 24a. TCR^{KO} CV.28z-CAR⁺ Treg는 플레이트 결합된 항-CD3 항체 및 CV-pep-SA 비드(CVb)의 존재하에 표시된 반응인자-대-억제인자 세포 비율로 반응인자 CD4⁺ T 세포와 공동-배양되었다. 3일째에 3H-티미딘을 첨가하였다. 결과는 반응인자 및 Treg 세포의 공동-배양에서 수득된 3H 티미딘 및 반응인자 단독 조건에서 수득된 3H 티미딘의 혼입에 의해 측정된 분당 평균 수(CPM)에 기초하여 계산된 억제율로 제시된다(실험은 중복 수행하였다). 도 24b. TCR^{KO} CV.28z-CAR⁺ Treg는 플레이트 결합된 항-CD3 항체 및 CVb 또는 비멘틴 비드의 존재하에 2:1 비율(반응인자:Treg)의 반응인자 CD4⁺ T 세포였다. CV.28z-CAR⁺ Treg는 플레이트 결합된 항-CD3 항체 및 CVb의 존재하에 2:1 비율(반응인자:Treg)로 CFSE-라벨링된 반응인자 CD4⁺ T 세포와 공동-배양하였다. 데이터는 도 24a에서와 같이 분석되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0058] 상세한 설명

[0059] 자가면역 질환에 대한 치료법을 제공해야 하는 충족되지 않은 요구가 있다. 예를 들어, 류마티스 관절염을 치료하는 치료법은 아직 발견되지 않았다. RA 환자는 평생 치료를 받는데, 모든 관련 비용, 부작용 및 불편의 가능성이 있다. 이러한 첫 번째 미충족된 요구는 적절한 면역 내성을 회복함으로써 RA 환자를 치료하기 위한 본원에서 구현화된 본 발명에 의해 해결된다. 더욱 일반적으로, 암에서 CAR T 세포의 사용이 집중적으로 연구되고, 임상 시험에서 매우 유망한 결과를 보였지만, CAR T 세포의 사용은 아직 자가면역 장애 또는 다른 질병 상태, 예컨대 시트롤린화된 비멘틴(CV)이 역할을 하는 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD) 또는 종양에서 테스트되지 않았다. 따라서, 본원에서 구현된 본 발명에 의해 해결된 두 번째 미충족된 요구는 T 이펙터 세포 대신에 Treg를 사용하여 자가면역 질환의 치료를 위해 CAR T 세포 요법을 적용하는 것이다.

[0060] 따라서, 다음 실시예 부문에서 상세히 설명되는 바와 같이, 키메라 항원 수용체(CAR)는 류마티스 관절염(RA)을 갖는 환자의 염증 관절의 세포의 기질 및 일부 종양 세포에서 발현되는 시트롤린화된 비멘틴(CV)이라는 번역후 변형된 단백질을 특이적으로 표적화하도록 조작되었다. CV-CAR의 단일 사슬 단편 가변(scFv) 부분은 RA 환자의 말초혈로부터 단리된 CV 단백질에 대해 매우 특이적인 항체로부터 수득되었다. CV-특이적 scFv 사슬을 렌티바이러스 벡터에 클로닝된 2-세대 CAR 작제물 내에 삽입시켰다. 이러한 CAR 작제물은 T 이펙터 세포 및 조절 T 세포 둘 모두에 도입하였다. CV-CAR Treg는 CV 펩티드 테트라머의 존재하에 RA 환자의 활액과 함께 공동-배양할 경우 이들의 표적 항원을 특이적으로 인식할 수 있었다. 항원의 인식 후, CAR-CV Treg는 Treg 표현형을 유지하면서 활성화되고 확장되었다.

[0061] 키메라 항원 수용체 및 T 세포

[0062] 키메라 항원 수용체(CAR)는 T-세포에 대한 항원 특이성을 할당하도록 설계된 조작된 트랜스멤브레인 키메라 단백질이다. 이들은 항원 결합 영역, 트랜스멤브레인 영역 및 세포내 신호전달 영역을 포함하는 재조합 수용체이다.

[0063] 일반적으로, CV-CAR Treg는 RA 환자를 위한 세포 치료법의 개발에 사용하기 위해 생성되었다. 예를 들어, 도 2 참조. 취해진 치료학적 요법은 혈액 샘플로부터 세포를 단리함으로써 환자(자가조직)의 Treg를 사용하는 것이다. 그 후, 단리된 Treg는 CV-CAR 전이유전자를 수반하는 렌티바이러스 벡터를 사용하여 유전자적으로 조작된다. CV-CAR Treg는 시험관내에서 2 라운드 확장을 거친 다음, 질병 부위에서 Treg의 효율성을 최적화시키기 위해 항-TNT 처리와 조합되거나 조합되지 않고 환자에게 주입된다. 예를 들어, 도 1 참조.

- [0064] CV-CAR에 의해 표적화된 항원은 번역 후 변형된 항원이며, 천연 형태가 아닌 단백질의 시트룰린화된 버전에 결합한다. CV-CAR은 시트룰린화된 항원을 표적으로 하는 개발된 최초의 CAR이다. 실시예 부문에서 기술된 결과는, 번역후 변형된 항원을 표적으로 하는 CAR이 이들의 표적을 성공적으로 인식하여 세포를 활성화시킬 수 있으며, 이는 번역후 변형된 항원이 자가면역 장애 및 심지어 일부 암에 있어서 신규한 치료학적 전략 개발에 매우 흥미로운 치료 도구를 나타낸다는 증거를 제공함을 보여준다. 게다가, 이러한 CAR은 멀티머 복합체 내에 일부 세포에 의해 분비된 세포의 기질 단백질을 표적으로 하며, 이는 CAR의 신규 용도를 나타낼 수 있다. 시트룰린화된 비멘틴(CV)은 류마티스 관절염(RA) 환자의 염증 관절의 세포의 기질에 존재하며, 일부 종양 세포에서 발견된다. 비멘틴은 타입 III 중간체 필라멘트 단백질이며, 이의 시트룰린화된 형태는 관절 미세환경에서 풍부하게 존재한다. CV 발현은 건강한 개체의 인간 비장, 태반으로 제한된다. RA 환자의 50%는 윤활 조직에 많이 존재하는 CV를 갖는다. 예를 들어, 도 3 참조.
- [0065] 따라서, 특정 구현예에서, 키메라 항원 수용체(CAR)는 항원 특이적 결합 도메인, 힌지 도메인, 트랜스멤브레인 도메인, 공동-자극 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하며, 여기서 항원 특이적 결합 도메인은 시트룰린화된-비멘틴(CV) 폴리펩티드 또는 이의 펩티드에 특이적으로 결합한다. CV 폴리펩티드 또는 이의 펩티드는 번역 후 변형된다. 특정 구현예에서, 공동-자극 도메인은 CD28 또는 41BB 폴리펩티드를 포함한다. 특정 구현예에서, 항원 특이적 결합 도메인은 항체, 항체 단편 또는 압타머를 포함한다. 특정 구현예에서, 항체 단편은 단일 사슬 단편이다. 예를 들어, 단일 사슬 단편은 단일 사슬 가변 단편(scFv)이다.
- [0066] 특정 구현예에서, 시트룰린화된-비멘틴(CV) 폴리펩티드 또는 펩티드에 특이적인 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 1 또는 2를 포함한다.
- [0067] 특정 구현예에서, CD28 공동-자극 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 1로 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 50% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩된다. 특정 구현예에서, CD28 공동-자극 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 1로 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 75% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩된다. 특정 구현예에서, CD28 공동-자극 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 1로 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩된다. 특정 구현예에서, CD28 공동-자극 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 1을 포함하는 핵산 서열에 의해 인코딩된다.
- [0068] 일부 구현예에서, CD28 공동-자극 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 1에 대해 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 갖는다.
- [0069] 다른 구현예에서, 41BB 공동-자극 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 2로 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 50% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩된다. 특정 구현예에서, 41BB 공동-자극 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 2로 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 75% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩된다. 특정 구현예에서, 41BB 공동-자극 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 2로 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩된다. 특정 구현예에서, 41BB 공동-자극 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 2를 포함하는 핵산 서열에 의해 인코딩된다.
- [0070] 일부 구현예에서, 41BB 공동-자극 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 2에 대해 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 갖는다.
- [0071] 특정 구현예에서, 시트룰린화된-비멘틴(CV) 폴리펩티드 또는 펩티드에 특이적인 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 1 또는 2 또는 이에 대해 적어도 약 70% (예컨대, 적어도 약 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 서열 동일성을 갖는 이의 변이체에 의해 인코딩되는 하나 이상의 키메라 항원 수용체 구성요소(예를 들어, CV-특이적 결합 도메인, 힌지 도메인, 트랜스멤브레인 도메인, 공동-자극 도메인 및/또는 CD3 ζ 신호전달 도메인)를 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 1 또는 2에 의해 인코딩되는 항-CV scFv, 예컨대, SEQ ID NO: 7의 핵산 서열 또는 이에 대해 적어도 약 70% (예컨대, 적어도 약 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 서열 동일성을 갖는 이의 변이체에 의해 인코딩되는 scFv를 포함한다. 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 1 또는 2에 의해 인코딩되는 인간 CD28 스페이스 도메인, 예컨대 SEQ ID NO: 8의 핵산 서열 또는 이에 대해 적어도 약 70% (예컨대, 적어도 약 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 서열 동일

성을 갖는 이의 변이체에 의해 인코딩되는 인간 CD28 스페이스 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 1 또는 2에 의해 인코딩되는 CD28 트랜스멤브레인 도메인, 예컨대 SEQ ID NO: 9의 핵산 서열 또는 이에 대한 적어도 약 70% (예컨대, 적어도 약 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 서열 동일성을 갖는 이의 변이체에 의해 인코딩되는 CD28 트랜스멤브레인 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 1 또는 2에 의해 인코딩되는 CD3 ζ 신호전달 도메인, 예컨대 SEQ ID NO: 10의 핵산 서열 또는 이에 대해 적어도 약 70% (예컨대, 적어도 약 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 서열 동일성을 갖는 이의 변이체에 의해 인코딩되는 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 1 또는 2에 의해 인코딩되는 공동-자극 도메인, 예컨대 SEQ ID NO: 11 또는 12의 핵산 서열 또는 이에 대해 적어도 약 70% (예컨대, 적어도 약 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 서열 동일성을 갖는 이의 변이체에 의해 인코딩되는 공동-자극 도메인을 포함한다.

[0072] 특정 구현예에서, CD28 공동-자극 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 1로 제시된 핵산 서열, 예컨대 SEQ ID NO: 5의 핵산 서열에 대해 적어도 50% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩된다. 따라서, 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 5에 대해 적어도 50% (예를 들어, 적어도 약 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩된다. 특정 구현예에서, CD28 공동-자극 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 5로 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 75% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩된다. 특정 구현예에서, CD28 공동-자극 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 5로 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩된다. 특정 구현예에서, CD28 공동-자극 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 5를 포함하는 핵산 서열에 의해 인코딩된다.

[0073] 일부 구현예에서, CD28 공동-자극 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 5에 대해 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩된다.

[0074] 특정 구현예에서, CD28 공동-자극 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 13에 대해 적어도 약 70% (예를 들어, 적어도 약 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 13에 대해 적어도 약 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 13에 대해 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 13에 대해 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 13의 아미노산 서열을 포함한다.

[0075] 다른 구현예에서, 41BB 공동-자극 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 2로 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 50% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열, 예컨대 SEQ ID NO: 6의 핵산 서열에 의해 인코딩된다. 따라서, 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 6에 대해 적어도 50% (예를 들어, 적어도 약 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩된다. 특정 구현예에서, 41BB 공동-자극 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 6으로 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 75% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩된다. 특정 구현예에서, 41BB 공동-자극 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 6으로 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩된다. 특정 구현예에서, 41BB 공동-자극 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 6을 포함하는 핵산 서열에 의해 인코딩된다.

[0076] 일부 구현예에서, 41BB 공동-자극 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 6에 대해 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩된다.

[0077] 특정 구현예에서, 41BB 공동-자극 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 14에 대해 적어도 약 70% (예를 들어, 적어도 약 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 14에 대해 적어도 약 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 14에 대해 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 14에 대해 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 키메라

항원 수용체는 SEQ ID NO: 14의 아미노산 서열을 포함한다.

- [0078] 특정 구현예에서, CAR은 CD28, ICOS, OX-40 또는 41BB를 포함하는 하나 이상의 공동-자극 도메인을 포함한다. 본 발명의 CAR 또는 세포의 세포내 신호전달 영역은 본원에 명시된 다른 영역에 추가하여 이들 단백질 중 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 모두로부터의 신호전달 영역을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, CD28 공동-자극 도메인은 SEQ ID NO:11의 핵산 서열 또는 SEQ ID NO: 11에 대해 적어도 약 50%(예를 들어, 적어도 임의의 약 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 서열 동일성을 갖는 이의 변이체에 의해 인코딩된다. 일부 구현예에서, CD28 공동-자극 도메인은 SEQ ID NO: 19의 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 19에 대해 적어도 약 70%(예를 들어, 적어도 약 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 갖는다. 일부 구현예에서, 41BB 공동-자극 도메인은 SEQ ID NO:12의 핵산 서열 또는 SEQ ID NO: 12에 대해 적어도 약 50%(예를 들어, 적어도 임의의 약 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 서열 동일성을 갖는 이의 변이체에 의해 인코딩된다. 일부 구현예에서, 41BB 공동-자극 도메인은 SEQ ID NO: 20의 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 20에 대해 적어도 약 70%(예를 들어, 적어도 약 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 갖는다.
- [0079] 본 발명의 CAR 또는 세포의 공동-자극 도메인은 41BB 및 CD28 둘 모두로부터의 공동-자극 도메인을 포함할 수 있다. 41BB 공동-자극 도메인은 CD28 공동-자극 도메인의 다운스트림일 수 있다.
- [0080] 특정 구현예에서, CAR은 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CD3 ζ 신호전달 도메인은 SEQ ID NO:10의 핵산 서열 또는 SEQ ID NO: 10에 대해 적어도 약 50%(예를 들어, 적어도 임의의 약 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 서열 동일성을 갖는 이의 변이체에 의해 인코딩된다. 일부 구현예에서, CD3 ζ 신호전달 도메인은 SEQ ID NO: 18의 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 18에 대해 적어도 약 70%(예를 들어, 적어도 약 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 갖는다.
- [0081] 특정 구현예에서, CAR은 CD28로부터의 트랜스멤브레인 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CD28 트랜스멤브레인 도메인은 SEQ ID NO: 9의 핵산 서열 또는 SEQ ID NO: 9에 대해 적어도 약 50%(예를 들어, 적어도 임의의 약 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 서열 동일성을 갖는 이의 변이체에 의해 인코딩된다. 일부 구현예에서, CD28 트랜스멤브레인 도메인은 SEQ ID NO: 17의 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 17에 대해 적어도 약 70%(예를 들어, 적어도 약 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 갖는다.
- [0082] CAR은 또한 항원 결합 영역과 T 세포 원형질막 사이에 위치한 스페이스 또는 힌지 영역을 포함할 수 있다. 일반적으로 스페이스 또는 힌지는 IgG 서브클래스 IgG1, IgG4, IgD 또는 CD8로부터 유래된 서열이다. 특정 구현예에서, 힌지 영역은 CD28 모티프를 포함한다. 힌지 영역은 임의의 길이를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 힌지 영역은 1개 아미노산 또는 10개 아미노산 또는 20개 아미노산 또는 50개 아미노산 또는 60개 아미노산 또는 70개 아미노산 또는 80개 아미노산 또는 100개 아미노산 또는 120개 아미노산 또는 140개 아미노산 또는 160개 아미노산 또는 180개 아미노산 또는 200개 아미노산 또는 250개 아미노산 또는 300개 아미노산 또는 그 사이의 임의의 수를 포함한다. 일부 구현예에서, 스페이스는 SEQ ID NO: 8의 핵산 서열 또는 SEQ ID NO: 8에 대해 적어도 약 50%(예를 들어, 적어도 임의의 약 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 서열 동일성을 갖는 이의 변이체에 의해 인코딩된다. 일부 구현예에서, 스페이스는 SEQ ID NO: 16의 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 16에 대해 적어도 약 70%(예를 들어, 적어도 약 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 갖는다.
- [0083] CAR은 링커 영역을 추가로 포함할 수 있다. 이는 유연성을 위해 글리신이 풍부할 수 있다. 링커 영역은 용해도를 위해 세린과 트레오닌이 풍부할 수 있다. 링커 영역은 가변 중쇄(VH)의 N-말단을 가변 경쇄(VL) 사슬의 C-말단에 연결시키거나 그 반대일 수 있다.
- [0084] 항원 결합 도메인
- [0085] 특정 구현예에서, 항원 결합 도메인은 항체 또는 항체 단편이거나 이를 포함한다. 특정 구현예에서, 항체는 표적화 분자에 결합하는 것으로 알려진 임의의 것을 포함하는 인간 항체이다. 본원에서 용어 "항체"는 가장 넓은

의미로 사용되며, 단일 사슬 가변 단편(scFv)을 포함하는 단일 사슬 항체 단편, 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 가변 중쇄(V_H) 영역, 재조합 IgG(rlgG) 단편, Fv 단편, Fab' 단편, $F(ab')_2$ 단편, 단편 항원 결합(Fab) 단편을 포함하는 기능적(항원-결합) 항체 단편 및 온전한 항체, 및 단일 도메인 항체(예를 들어, sdAb, sdFv, 나노바디, 낙타과 나노바디) 또는 단편을 포함하는 폴리클로날 및 모노클로날 항체를 포함한다. 이 용어는 유전자 조작되고/거나 달리 변형된 형태의 면역글로불린, 예컨대 인트라바디, 펩티바디, 키메라 항체, 완전 인간 항체, 인간화된 항체 및 헤테로코겐유게이트 항체, 다중특이적 예를 들어, 이중특이적 항체, 디아바디, 트리아바디 및 테트라바디, 텐덤 di-scFv, 텐덤 tri-scFv를 포함한다. 달리 언급되지 않는 한, 용어 "항체"는 이의 기능적 항체 단편을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 이 용어는 또한, IgG 및 이의 서브-클래스, IgM, IgE, IgA 및 IgD를 포함하는 임의의 클래스 또는 서브-클래스의 항체를 포함하는 온전한 또는 전장 항체를 포함한다.

[0086] 일부 구현예에서, 항원-결합 도메인은 이의 단편의 인간화된 항체이다. "인간화된" 항체는 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 아미노산 잔기가 인간화 CDR로부터 유래되고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 아미노산 잔기가 인간 FR로부터 유래되는 항체이다. 인간화된 항체는 임의로 인간 항체로부터 유래된 항체 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 비-인간 항체의 "인간화된 형태"는 비-인간 모 항체의 특이성 및 친화성을 유지하면서 전형적으로 인간에 대한 면역원성을 감소시키기 위해 인간화를 거친 비-인간 항체의 변이체를 지칭한다. 일부 구현예에서, 인간화된 항체 중 일부 FR 잔기는 예를 들어, 항체 특이성 또는 친화성을 복구하거나 개선하기 위해 비-인간 항체(예를 들어, CDR 잔기가 유래되는 항체)로부터의 상응하는 잔기로 치환된다.

[0087] 일부 구현예에서, 항체의 중쇄 및 경쇄는 전장일 수 있거나 항원-결합 부분(Fab, $F(ab')_2$, Fv 또는 단일 사슬 Fv 단편(scFv))일 수 있다. 다른 구현예에서, 항체 중쇄 불변 영역은 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD 및 IgE로부터 선택되며, 특히 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로부터 선택되며, 더욱 특히 IgG1(예를 들어, 인간 IgG1)이다. 또 다른 구현예에서, 항체 경쇄 불변 영역은 예를 들어, 카파 또는 람다, 특히 카파로부터 선택된다.

[0088] 제공된 항체 중에는 항체 단편이 있다. "항체 단편"은 온전한 항체가 결합하는 항원에 결합하는 온전한 항체의 일부를 포함하는 온전한 항체 이외의 분자를 지칭한다. 항체 단편의 예는 비제한적으로 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$; 디아바디; 선형 항체; 가변 중쇄(V_H) 영역, 단일-사슬 항체 분자, 예컨대 scFv 및 단일-도메인 V_H 단일 항체; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다. 특정 구현예에서, 항체는 가변 중쇄 영역 및/또는 가변 경쇄 영역, 예컨대 scFv를 포함하는 단일-사슬 항체 단편이다.

[0089] 항체, 예컨대 항체 단편과 관련하여 사용되는 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체를 항원에 결합시키는데 관여하는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 지칭한다. 천연 항체의 중쇄 및 경쇄(각각 V_H 및 V_L)의 가변 도메인은 일반적으로 유사한 구조를 가지며, 각각의 도메인은 4개의 보존된 프레임워크 영역(FR) 및 3개의 CDR을 포함한다. (예를 들어, 문헌 [Kindt *et al.* Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)] 참조). 단일 V_H 또는 V_L 도메인은 항원-결합 특이성을 부여하기에 충분할 수 있다. 더욱이, 특정 항원에 결합하는 항체는 각각 상보적 V_L 또는 V_H 도메인의 라이브러리를 스크리닝하기 위해 항원에 결합하는 항체로부터의 V_H 또는 V_L 도메인을 사용하여 분리될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Portolano *et al.*, *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson *et al.*, *Nature* 352:624-628 (1991)] 참조.

[0090] 단일-도메인 항체는 항체의 경쇄 가변 도메인 전부 또는 일부 또는 중쇄 가변 도메인 전부 또는 일부를 포함하는 항체 단편이다. 특정 구현예에서, 단일-도메인 항체는 인간 단일-도메인 항체이다.

[0091] 항체 단편은 비제한적으로 온전한 항체의 단백질 분해는 물론 재조합 숙주 세포에 의한 생산을 포함하는 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다. 일부 구현예에서, 항체는 재조합에 의해 생성된 단편, 예컨대 자연적으로 발생하지 않는 배열을 포함하는 단편, 예컨대 합성 링커, 예를 들어 펩티드 링커에 의해 결합된 2개 이상의 항체 영역 또는 사슬을 갖는 단편, 및/또는 자연적으로 발생하는 온전한 항체의 효소 분해에 의해 생성될 수 없는 배열을 포함하는 단편이다. 일부 양태에서, 항체 단편은 scFv이다.

[0092] 특정 구현예에서, CAR의 항체 또는 항체 단편은 특이적 표적 항원 또는 번역후 변형된 표적 항원에 대한 높은 결합 친화성을 갖는다. 구현예에서, 증가된 결합 친화성은 참조 항원에 의해 초래되는 것보다 크다.

[0093] 특정 구현예에서, 키메라 항원은 SEQ ID NO: 3 또는 4에 대해 적어도 50% 서열 동일성을 갖는 CV 펩티드에 특이적으로 결합한다. 특정 구현예에서, 키메라 항원은 SEQ ID NO: 3 또는 4에 대해 적어도 75% 서열 동일성을 갖는 CV 펩티드에 특이적으로 결합한다. 특정 구현예에서, 키메라 항원은 SEQ ID NO: 3 또는 4에 대해 적어도 95% 서

열 동일성을 갖는 CV 펩티드에 특이적으로 결합한다.

- [0094] 특정 구현예에서, 키메라 항원은 SEQ ID NO: 21 또는 22에 대해 적어도 50% 서열 동일성을 갖는 CV 펩티드에 특이적으로 결합한다. 특정 구현예에서, 키메라 항원은 SEQ ID NO: 21 또는 22에 대해 적어도 75% 서열 동일성을 갖는 CV 펩티드에 특이적으로 결합한다. 특정 구현예에서, 키메라 항원은 SEQ ID NO: 21 또는 22에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 CV 펩티드에 특이적으로 결합한다.
- [0095] 특정 구현예에서, 키메라 항원은 CV 펩티드에 특이적으로 결합한다.
- [0096] *T 세포*: 조절 T 세포(Treg)는 Treg 집단의 유전자 또는 물리적 절제의 치명적인 결과에 의해 입증된 바와 같이 면역 세포 항상성의 유지에 중요하다. 특히, Treg 세포는 다른 면역 세포에 대한 우세한 음성 조절을 시행함으로써 면역계의 질서를 유지한다. 자연적 또는 후천적(유발된) Treg로 광범위하게 분류됨; 천연 Treg는 $CD4^+CD25^+$ T-세포로서, 흉선에서 발달하고 이동하여 면역 항상성에서 핵심 역할을 수행한다. 후천성 Treg는 흉선 외부에서 CD25(IL-2R 알파) 발현을 획득하고, 염증 및 질병 과정, 예컨대 자가면역 및 암에 의해 전형적으로 유발되는 비-조절 $CD4^+$ T-세포이다.
- [0097] Treg가 IL-9, IL-10 및 TGF 베타와 같은 면역억제 용해성 인자의 분비, 고친화성 TCR 및 다른 공동자극 분자, 예컨대 CTLA-4, GITR을 통한 세포-접촉-매개된 조절 및 세포용해 활성을 포함하는 많은 메커니즘을 통해 이들의 기능을 나타낸다는 증거가 증가하고 있다. TGF 베타의 영향하에, 후천성 Treg 세포는 점막-결합 림프 조직(MALT)을 포함한 말초 부위에서 $CD4^+$ Treg 전구체로부터 성숙해지며, 여기서 이들은 CD25, CTLA4 및 GITR/AITR을 포함한 Treg의 전형적인 마커 발현을 획득한다. 전사 인자 Foxp3의 상향-조절시, Treg 세포는 이들의 억제 효과를 시작한다. 이는 이펙터 T 세포에서의 세포-주기 저지 또는 아포토시스를 유발할 수 있는 IL-10 및 TGF 베타를 포함하는 사이토카인의 분비, 및 수지상 세포의 공동-자극 및 성숙의 차단을 포함할 수 있다.
- [0098] *생존가능한 Treg 세포의 분리*
- [0099] Treg 세포를 분리하는데 사용되는 절차는 뒤따르는 실시예 부문에서 상세하게 제공된다.
- [0100] 일반적으로, T 조절 세포는 면역 반응을 억제할 수 있는 능력을 지닌 $CD4^+CD25^+$ T 세포 집단으로서 원래 확인되었다. Treg의 "마스터-조절인자"로서 Foxp3의 식별은 Treg를 별개의 T 세포 계열로서 정의하는데 있어서 중요한 단계였다. Treg의 표면 상에서 추가적인 항원 마커의 식별은 더 높은 순도로 생존가능한 Treg의 식별 및 FACS 분류를 가능하게 하며, 더욱 고도로 풍부화되고 억제된 Treg 집단을 발생시킨다. CD4 및 CD25 이외에, 마우스 및 인간 Treg 둘 모두가 GITR/AITR, CTLA-4를 발현하나, CD127(IL-7Ra)의 낮은 수준만을 발현한다는 것은 이제 공지되어 있다. 또한, Treg는 표면 마커의 발현을 기반으로 하여 식별될 수 있는 다양한 상태로 존재할 수 있다. $CD4^+$ 흉선세포로부터 흉선에서 발달하는 Treg는 "천연" Treg로서 알려져 있으나, Treg는 또한 TCR, TGF 베타 및 IL-2의 저용량 결합에 반응하여 나이브 $CD4^+$ T 세포의 주변에서 유도될 수 있다. 이들 "유도된" Treg는 면역억제성 사이토카인 IL-10을 분비한다. Treg의 표현형은 활성화됨에 따라 다시 변하고, 마우스에서 CD103 및 마우스와 인간에서 GARP를 포함하는 마커는 활성화된 Treg의 식별에 유용한 것으로 나타났다. CD45RO 및 CD45RA는 인간 CD4 세포의 별개의 서브세트에 의해 독점적으로 발현되며, 인간 $CD4^+FoxP3^+$ T 세포를 3개의 표현형적으로 및 기능적으로 구별되는 서브집단으로 분할하는데 사용될 수 있다: $CD45RA^+CD25^+FoxP3^{지}$ 휴면 Treg 세포 및 $CD45RO^+CD25^{고}FoxP3^{고}$ 활성화된 Treg 세포(이들 모두는 시험관내에서 억제성이었음), 및 염증유발성 사이토카인-생성 $CD45RO^+CD25^+FoxP3^{지}$ 비억제성 이펙터 T 세포(Teff).
- [0101] 따라서, 특정 구현예에서, 단리된 T 세포는 적어도 하나의 공동-자극 도메인 및 CD3ζ 신호전달 도메인에 연결된 항원 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 변형되며, 여기서 항원 결합 도메인은 시트룰리화된-비멘틴(CV)에 특이적으로 결합하는 단일 사슬 가변 단편(scFv)을 포함한다. 특정 구현예에서, 공동-자극 도메인은 CD28 또는 41BB 폴리펩티드를 포함한다. 특정 구현예에서, CD28 공동-자극 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 1에 대해 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 41BB 공동-자극 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 2에 대해 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 갖는다. 특정 구현예에서, CD28 공동-자극 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체는

SEQ ID NO: 5에 대해 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되는 하나 이상의 CAR 구성요소(예를 들어, CV-특이적 결합 도메인, 힌지 도메인, 트랜스멤브레인 도메인, 공동-자극 도메인 및/또는 CD3ζ 신호전달 도메인)을 포함한다. 특정 구현예에서, CD28 공동-자극 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 13에 대해 적어도 70% (예컨대, 적어도 약 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로부터 선택되는 하나 이상의 CAR 구성요소(예를 들어, CV-특이적 결합 도메인, 힌지 도메인, 트랜스멤브레인 도메인, 공동-자극 도메인 및/또는 CD3ζ 신호전달 도메인)을 포함한다. 일부 구현예에서, 41BB 공동-자극 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 6에 대해 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩되는 하나 이상의 CAR 구성요소(예를 들어, CV-특이적 결합 도메인, 힌지 도메인, 트랜스멤브레인 도메인, 공동-자극 도메인 및/또는 CD3ζ 신호전달 도메인)을 포함한다. 일부 구현예에서, 41BB 공동-자극 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 14에 대해 적어도 70% (예컨대, 적어도 약 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로부터 선택되는 하나 이상의 CAR 구성요소(예를 들어, CV-특이적 결합 도메인, 힌지 도메인, 트랜스멤브레인 도메인, 공동-자극 도메인 및/또는 CD3ζ 신호전달 도메인)을 포함한다. 특정 구현예에서, CD28 공동-자극 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 5에 대해 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩된다. 특정 구현예에서, CD28 공동-자극 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 13에 대해 적어도 약 70%(예를 들어, 적어도 약 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 41BB 공동-자극 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 6에 대해 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 인코딩된다. 일부 구현예에서, 41BB 공동-자극 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체는 SEQ ID NO: 14에 대해 적어도 약 70%(예를 들어, 적어도 약 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0102] 특정 구현예에서, T 세포는 포유동물 조절 T 세포(Treg)이고, 여기서 Treg 세포는 $CD4^{+}$, $CD25^{+}$, $CD127^{-}$, $FOXP3^{+}$ 및/또는 Helios^{+/−}이다. 기타 구현예에서, T 세포는 포유동물 조절 T 세포(Treg)이고, 여기서 Treg 세포는 $CD4^{+}$, $CD25^{+}$, $CD127^{-}$ 및/또는 $FOXP3^{+}$ 이다.

[0103] 세포 단리 방법

[0104] 당업계에 공지된 임의의 수의 방법을 사용하여 세포, 예컨대 Treg 또는 대상체의 치료를 수행하는데 사용될 수 있는 임의의 다른 세포 유형을 분리할 수 있다. 따라서, 또한 키메라 항원 수용체, 예를 들어 CAR을 발현하는 다양한 다른 유전자 조작된 세포가 제공된다. 세포는 일반적으로 진핵 세포, 예컨대 포유동물 세포이며, 일반적으로 인간 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 혈액, 골수, 림프 또는 림프 기관으로부터 유래되고, 면역계의 세포, 예를 들어 선천성 또는 후천성 면역 세포, 예를 들어 림프구를 포함하는 골수성 또는 림프계 세포, 전형적으로 T 세포 및/또는 NK 세포이다. 다른 예시적인 세포는 유도된 만능성 줄기 세포(iPSC)를 포함하는 줄기 세포, 예컨대 다능성 및 만능성 줄기 세포를 포함한다. 세포는 전형적으로 일차 세포, 예컨대 대상체로부터 직접적으로 분리되고/거나 대상체로부터 분리되고 냉동된 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 T 세포 또는 다른 세포 유형의 하나 이상의 서브세트, 예컨대 전체 T 세포 집단, CD4⁺ 세포, CD8⁺ 세포 및 이의 서브집단, 예컨대 기능, 활성화 상태, 성숙도, 분화 잠재성, 확장, 재순환, 국소화 및/또는 지속 능력, 항원-특이성, 항원 수용체의 유형, 특정 기관 또는 구획에서의 존재, 마커 또는 사이토카인 분비 프로파일 및/또는 분화 정도에 의해 규정된 것을 포함한다. 치료할 대상체와 관련하여, 세포는 동종 및/또는 자가성일 수 있다. 방법에는 기존 방법이 포함된다. 기존 기술과 같은 일부 양태에서, 세포는 만능성 및/또는 다능성이며, 예컨대 줄기 세포, 예컨대 유도된 만능성 줄기 세포(iPSC)이다. 일부 구현예에서, 방법은 본원에 기재된 바와 같이 대상체로부터 세포를 분리하고, 이들을 준비하고, 처리하고, 배양하고/거나 조작하고, 동결보존 전 또는 후에 동일한 환자에 이들을 재도입하는 것을 포함한다.

[0105] T 세포 및/또는 $CD4^+$ 및/또는 $CD8^+$ T 세포의 서브-유형 및 서브집단에는 나이브 T(T_N) 세포, 이펙터 T 세포 (T_{EFF}), 메모리 T 세포 및/또는 이의 서브-유형, 예컨대 줄기 세포 메모리 T(T_{SCMX}) 중심 메모리 T(T_{CM}) 이펙터 메모리 T(T_{EM}) 및/또는 T 세포의 다른 서브-유형 및 서브집단이 포함될 수 있다.

리 T(T_{EM}) 또는 말단 분화된 이펙터 메모리 T 세포, 종양-침윤 림프구(TIL), 미성숙 T 세포, 성숙 T 세포, 헬퍼 T 세포, 세포독성 T 세포, 점막-결합 불변 T(MAIT) 세포, 자연 발생 및 후천성 조절 T(Treg) 세포, 헬퍼 T 세포, 예컨대 T_H1 세포, T_H2 세포, T_H3 세포, T_H17 세포, T_H9 세포, T_H22 세포, 소포 헬퍼 T 세포, 알파/베타 T 세포 및 델타/감마 T 세포가 있다.

[0106] 일부 구현예에서, 세포는 자연 살해(NK) 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 단핵구 또는 과립구, 예를 들어 골수 세포, 대식세포, 호중구, 수지상 세포, 비만 세포, 호산구 및/또는 호염기구이다.

[0107] 일부 구현예에서, 세포는 유전자 조작을 통해 도입된 하나 이상의 핵산을 포함하며, 이에 의해 이러한 핵산의 제조합 또는 유전자 조작된 생성물을 발현한다. 일부 구현예에서, 핵산은 이중성으로 즉, 일반적으로 세포 또는 이러한 세포로부터 수득된 샘플에 존재하지 않으며, 예컨대 또 다른 유기체 또는 세포로부터 수득된 것으로, 이는 예를 들어, 이러한 세포가 유래되는 유기체 및/또는 조작되는 세포에서 통상적으로 발견되지 않는다. 일부 구현예에서, 핵산은 자연적으로 발생하지 않는데, 예컨대 여러 상이한 세포 유형으로부터 다양한 도메인을 인코딩하는 핵산의 키메라 조합물을 포함하는 것을 포함하여 자연에서 발견되지 않는 핵산이다.

[0108] 세포를 단리하고 이들 세포를 CAR로 조작하는 예시적인 방법은 하기 실시예 부문에 기술되어 있다.

[0109] 일부 구현예에서, 조작된 세포의 제조는 하나 이상의 배양 및/또는 제조 단계를 포함한다. CAR의 도입을 위한 세포는 샘플, 예컨대 생물학적 샘플로부터 분리될 수 있거나, 예를 들어 대상체로부터 수득되거나 유래된 것일 수 있다. 일부 구현예에서, 세포가 분리되는 대상체는 질병 또는 병태를 갖는 대상체이거나 세포 요법이 요구되거나 세포 요법제가 투여될 대상체이다. 일부 구현예에서 대상체는 세포가 단리되고/거나 처리되고/거나 조작되는 입양 세포 요법과 같은 특정 치료학적 개입이 필요한 인간이다.

[0110] 따라서, 일부 구현예에서 세포는 일차 세포, 예를 들어 일차 인간 세포이다. 샘플은 대상체로부터 직접 취한 조직, 유체 및 기타 샘플은 물론 하나 이상의 처리 단계, 예컨대 분리, 원심분리, 유전자 조작(예를 들어, 바이러스 벡터로의 형질도입), 세척 및/또는 인큐베이션으로부터 발생된 샘플을 포함한다. 생물학적 샘플은 처리되는 생물학적 공급원 또는 샘플로부터 직접 수득된 샘플일 수 있다. 생물학적 샘플은 비제한적으로, 체액, 예컨대 혈액, 혈장, 혈청, 뇌척수액, 활액, 소변 및 땀, 조직 및 기관 샘플을 포함하며, 이로부터 유래된 처리된 샘플 포함한다.

[0111] 일부 양태에서, 세포가 유래되거나 단리되는 샘플은 혈액 또는 혈액-유래된 샘플이거나 성분채집 또는 백혈구성분채집 생성물로부터 유래된다. 예시적인 샘플은 전혈, 말초혈 단핵 세포(PBMC), 백혈구, 골수, 흉선, 조직 생검, 종양, 백혈병, 림프종, 림프절, 소화기 연관 림프 조직, 점막 관련 림프 조직, 비장, 기타 림프 조직, 간, 폐, 위, 장, 대장, 신장, 췌장, 유방, 뼈, 전립선, 자궁경부, 고환, 난소, 편도선 또는 다른 기관, 및/또는 이로부터 유래된 세포를 포함한다. 세포 요법 예를 들어, 입양 세포 요법의 맥락에서 샘플은 자가 및 동종 공급원으로부터의 세포를 포함한다.

[0112] 일부 구현예에서, 세포는 세포주, 예를 들어 T 세포주로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 세포는 이중 공급원, 예를 들어 마우스, 래트, 인간외 영장류 또는 돼지로부터 수득된다.

[0113] 일부 구현예에서, 세포의 단리는 하나 이상의 제조 및/또는 비-친화성-기반 세포 분리 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 시약의 존재하에 세척, 원심분리 및/또는 인큐베이션되어 예를 들어, 원하지 않는 구성요소를 제거하거나, 요망되는 구성요소를 풍부화시키거나, 특정 시약에 민감한 세포를 용해시키거나 제거한다. 일부 예에서, 세포는 하나 이상의 특성, 예컨대 밀도, 점착성, 크기, 특정 성분에 대한 민감성 및/또는 내성을 기반으로 하여 분리된다.

[0114] 일부 예에서, 대상체의 순환 혈액으로부터의 세포는 예를 들어, 성분채집 또는 백혈구성분채집에 의해 수득된다. 일부 양태에서, 샘플은 T 세포, 단핵구, 과립구, B 세포, 기타 유핵 백혈구, 적혈구 및/또는 혈소판을 포함하는 림프구를 포함하며, 일부 양태에서 적혈구 및 혈소판 이외의 세포를 포함한다.

[0115] 일부 구현예에서, 대상체로부터 수집된 혈액 세포를 세척하여 예를 들어, 혈장 분획을 분리하고, 후속 처리 단계에 적절한 완충액 또는 배지 중에 세포를 넣는다. 일부 구현예에서, 세포는 인산염 완충 염수(PBS)로 세척된다. 일부 구현예에서, 세척 용액은 칼슘 및/또는 마그네슘 및/또는 많은 또는 모든 이가 양이온이 결여된다. 일부 양태에서, 세척 단계는 제조업체의 지시에 따라 반-자동 "유동형" 원심분리기(예를 들어, Cobe 2991 cell processor, Baxter)로 달성된다. 일부 양태에서, 세척 단계는 제조업체의 지침에 따라 접선 흐름 여과(TFF)에 의해 수행된다. 일부 구현예에서, 세포는 세척 후 예를 들어, Ca^{++}/Mg^{++} 비함유 PBS와 같은 다양한 생체적합성

완충액에 재현탁된다. 특정 구현예에서, 혈액 세포 샘플의 성분을 분리하고, 세포를 배양 배지에 직접 재현탁한다.

- [0116] 일부 구현예에서, 방법은 적혈구를 용해시키고 Percoll 또는 Ficoll 구배를 통해 원심분리함으로써 말초혈로부터의 백혈구 제조와 같은 밀도-기반 세포 분리 방법을 포함한다.
- [0117] 일부 구현예에서, 분리 방법은 하나 이상의 특이적 분자 예컨대 표면 마커 예를 들어, 표면 단백질, 세포내 마커 또는 핵산의 세포에서의 발현 또는 존재에 기초한 다양한 세포 유형의 분리를 포함한다. 일부 구현예에서, 이러한 마커에 기초한 임의의 공지된 분리 방법이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 분리는 친화성- 또는 면역친화성-기반 분리이다. 예를 들어, 일부 양태에서 분리는 하나 이상의 마커, 전형적으로 세포 표면 마커의 발현 수준 또는 세포 발현에 기초하여 세포 및 세포 집단을 분리하는 것을 포함하는데, 이는 예를 들어 이러한 마커에 특이적으로 결합하는 항체 또는 결합 파트너와 인큐베이션한 후, 일반적으로 항체 또는 결합 파트너에 결합되지 않은 세포로부터 항체 또는 결합 파트너에 결합된 세포의 세척 단계 및 분리에 의한 것이다.
- [0118] 이러한 분리 단계는 시약에 결합된 세포가 추가 사용을 위해 보유되는 양성 선택 및/또는 항체 또는 결합 파트너에 결합되지 않은 세포가 보유되는 음성 선택을 기반으로 할 수 있다. 일부 예에서, 두 분획 모두 추가 사용을 위해 보유된다. 일부 양태에서, 음성 선택은 이중 집단에서 세포 유형을 특정하게 식별하는 항체가 이용가능하지 않은 경우 특히 유용할 수 있어, 분리는 요망되는 집단 이외의 세포에 의해 발현된 마커에 기초하여 가장 잘 수행된다.
- [0119] 분리는 특정 마커를 발현하는 특정 세포 집단 또는 세포의 100% 풍부화 또는 제거를 초래할 필요는 없다. 예를 들어, 마커를 발현하는 것과 같은 특정 유형의 세포에 대한 양성 선택 또는 풍부화는 이러한 세포의 수 또는 백분율을 증가시키는 것을 의미하지만, 마커를 발현하지 않는 세포의 완전한 부재를 발생시킬 필요는 없다. 마찬가지로, 마커를 발현하는 세포와 같은 특정 유형의 세포의 음성 선택, 제거 또는 고갈은 이러한 세포의 수 또는 백분율을 감소시키는 것을 나타내지만, 모든 이러한 세포의 완전한 제거를 발생시킬 필요는 없다.
- [0120] 일부 예에서, 여러 라운드의 분리 단계가 수행되며, 여기에서 한 단계로부터 양성 또는 음성으로 선택된 분획은 후속 양성 또는 음성 선택과 같은 또 다른 분리 단계로 처리된다. 일부 예에서, 단일 분리 단계는 예컨대, 세포와 복수의 항체 또는 결합 파트너(각각은 음성 선택을 위해 표적화되는 마커에 대해 특이적임)를 인큐베이션함으로써 동시에 다중 마커를 발현하는 세포를 고갈시킬 수 있다. 마찬가지로, 다양한 세포 유형에서 발현되는 복수의 항체 또는 결합 파트너와 세포를 인큐베이션함으로써 다수의 세포 유형을 동시에 양성으로 선택할 수 있다. 예를 들어, 일부 양태에서, 하나 이상의 마커 예를 들어, $CD4^+$, $CD25^+$, $CD127^-$, $FOXP3^+$ 및/또는 $Helios^+$ 를 발현하거나 양성인 세포와 같은 T 세포의 특정 서브집단.
- [0121] T 세포는 양성 또는 음성 선택 기술에 의해 분리된다. 예를 들어, $CD3^+$, $CD28^+$ T 세포는 항- $CD3$ /항- $CD28$ 컨주게이션된 자기 비드(예를 들어, DYNABEADS® M-450 $CD3/CD28$ T Cell Expander)를 사용하여 양성으로 선택될 수 있다.
- [0122] 일부 구현예에서, 분리는 양성 선택에 의한 특정 세포 집단에 대한 풍부화 또는 음성 선택에 의한 특정 세포 집단의 고갈에 의해 수행된다. 일부 구현예에서, 양성 또는 음성 선택은 각각 양성으로 또는 음성으로 선택된 세포에 대해 상대적으로 더 높은 수준(마커 "1"^고)에서 발현되거나(마커 "1") 발현된 하나 이상의 표면 마커에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체 또는 다른 결합제와 세포를 인큐베이션함으로써 달성된다.
- [0123] 일부 구현예에서, T 세포는 비-T 세포 예컨대, B 세포, 단핵구 또는 다른 백혈구 예컨대, $CD14$ 에서 발현되는 마커의 음성 선택에 의해 PBMC 샘플로부터 분리된다. 일부 양태에서, $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ 선택 단계는 $CD4^+$ 헬퍼 및 $CD8^+$ 세포독성 T 세포를 분리하는데 사용된다. 이러한 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ 집단은 하나 이상의 나이브, 메모리 및/또는 이펙터 T 세포 서브집단에서 상대적으로 더 높은 수준으로 발현되거나 발현되는 마커에 대한 양성 또는 음성 선택에 의해 서브-집단으로 추가로 분류될 수 있다.
- [0124] 일부 구현예에서, $CD8^+$ 세포는 예컨대, 각각의 서브집단과 관련된 표면 항원에 기초한 양성 또는 음성 선택에 의해 나이브, 중심 메모리, 이펙터 메모리 및/또는 중심 메모리 줄기 세포에 대해 추가로 풍부해지거나 고갈된다. 일부 구현예에서, 투여 후 장기 생존, 확장 및/또는 생착을 개선하는 것과 같이 효능을 증가시키기 위해 중심 메모리 T(T_{CM}) 세포에 대한 풍부화가 수행되며, 이는 일부 양태에서 이러한 서브-집단에서 특히 강하다. 문헌 [Terakura *et al.* (2012) *Blood*.1:72-82; Wang *et al.* (2012) *J Immunother.* 35(9):689-701] 참조. 일부 구현

예에서, T_{CM} -풍부 $CD8^+$ T 세포 및 $CD4^+$ T 세포를 조합하면 효능이 추가로 향상된다.

- [0125] 일부 구현예에서, 중심 메모리 T(T_{CM}) 세포에 대한 풍부화는 $CD45RO$, $CD62L$, $CCR7$, $CD28$, $CD3$ 및/또는 $CD127$ 의 양성 또는 높은 표면 발현을 기반으로 하며; 일부 양태에서, 이는 $CD45RA$ 및/또는 그랜자임 B를 발현하거나 고도로 발현하는 세포에 대한 음성 선택을 기반으로 한다.
- [0126] 일부 양태에서, $CD4$ 발현-기반 선택 단계는 $CD4^+$ 세포 집단 또는 서브-집단을 생성하기 위해 사용되어, $CD4$ -기반 분리로부터의 양성 및 음성 분획 둘 모두가 보유하고, 선택적으로 하나 이상의 추가 양성 또는 음성 선택 단계 후 방법의 후속 단계에서 사용된다.
- [0127] 한 예에서, PBMC의 샘플 또는 다른 백혈구 샘플은 $CD4^+$ 세포의 선택으로 처리되며, 여기에서 음성 및 양성 분획 둘 모두가 보유된다. 그 후, 음성 분획은 예를 들어, $CD14$ 및 $CD45RA$ 에 대한 발현에 기초한 음성 선택, 및 $CD62L$ 또는 $CCR7$ 과 같은 중심 메모리 T 세포의 마커 특징에 기초한 양성 선택으로 처리되며, 여기에서 양성 및 음성 선택은 어느 순서로든 수행된다.
- [0128] $CD4^+$ T 헬퍼 세포는 세포 표면 항원을 갖는 세포 집단을 식별함으로써 나이브, 중심 메모리 및 이펙터 세포로 분류된다. $CD4^+$ 림프구는 표준 방법으로 얻을 수 있다. 일부 구현예에서, 나이브 $CD4^+$ T 림프구는 $CD45RO^+$, $CD45RA^+$, $CD62L^+$, $CD4^+$ T 세포이다. 일부 구현예에서, 중심 메모리 $CD4^+$ 세포는 $CD62L^+$ 및 $CD45RO^+$ 이다.
- [0129] 한 예에서, 음성 선택에 의해 $CD4^+$ 세포를 풍부하게 하기 위해, 모노클로날 항체 콕테일은 전형적으로 $CD14$, $CD20$, $CD11b$, $CD16$, $HLA-DR$ 및 $CD8$ 에 대한 항체를 포함한다. 일부 구현예에서, 항체 또는 결합 파트너는 양성 및/또는 음성 선택을 위한 세포의 분리를 허용하도록 자성 비드 또는 상자성 비드와 같은 고정 지지체 또는 매트릭스에 결합된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 세포 및 세포 집단은 면역자성(또는 친화성 자성) 분리 기술을 사용하여 분리되거나 단리된다(문헌 [Methods in Molecular Medicine, vol. 58: Metastasis Research Protocols, Vol. 2: Cell Behavior In Vitro and In Vivo, p 17-25 Edited by: S. A. Brooks and U. Schumacher © Humana Press Inc., Totowa, NJ]에서 검토됨).
- [0130] 일부 양태에서, 분리될 세포의 샘플 또는 조성물은 작은 자성화가능한 또는 자성 반응 물질, 예컨대 자성 반응 입자 또는 미세입자, 예컨대 상자성입자 비드(예컨대, Dynabead 또는 MACS 비드)와 인큐베이션된다. 자성 반응 물질 예를 들어, 입자는 일반적으로, 분리되는 것이 바람직한 예를 들어, 음성으로 또는 양성으로 선택되는 것이 바람직한 세포, 세포들 또는 세포 집단 상에 존재하는 분자 예를 들어, 표면 마커에 특이적으로 결합하는 결합 파트너, 예를 들어 항체에 직접적으로 또는 간접적으로 부착된다.
- [0131] 일부 구현예에서, 자성 입자 또는 비드는 항체 또는 다른 결합 파트너와 같은 특이적 결합 구성원에 결합된 자성 반응 물질을 포함한다. 자성 분리 방법에 사용되는 많은 잘 알려진 자성 반응 물질이 존재한다. 적합한 자성 입자는 미국 특허 번호 4,452,773(Molday) 및 유럽 특허 명세서 EP 452342 B에 기술된 것을 포함하며, 이는 참조로서 본원에 통합된다. 콜로이드 크기 입자 예컨대, 미국 특허 번호 4,795,698(Owen) 및 미국 특허 번호 5,200,084(Liberti *et al.*)에 기술된 것은 다른 예이다.
- [0132] 항체 또는 결합 파트너, 또는 자성 입자 또는 비드에 부착된 이러한 항체 또는 결합 파트너에 특이적으로 결합하는 분자 예컨대, 이차 항체 또는 다른 시약은 세포 표면 분자가 샘플 내의 세포 상에 존재하는 경우 세포 표면 분자에 특이적으로 결합하는 조건 하에서 일반적으로 인큐베이션이 수행된다.
- [0133] 일부 양태에서, 샘플은 자기장에 배치되고, 여기에 부착된 자성 반응 또는 자성화가능한 입자를 갖는 그러한 세포는 자석에 부착되어 비라벨링된 세포로부터 분리될 것이다. 양성 선택에 있어서, 자석에 부착되는 세포는 보유되며; 음성 선택에 있어서 부착되지 않은 세포(비라벨링된 세포)가 보유된다. 일부 양태에서, 양성 및 음성 선택의 조합은 동일한 선택 단계 동안 수행되며, 여기에서 양성 및 음성 분획은 보유되며, 추가 분리 단계로 추가로 진행되거나 처리된다.
- [0134] 일부 구현예에서, 자성 반응 입자는 일차 항체 또는 다른 결합 파트너, 이차 항체, 렉틴, 효소 및 스트렙타비딘으로 코팅된다. 특정 구현예에서, 자성 입자는 하나 이상의 마커에 특이적인 일차 항체의 코팅을 통해 세포에 부착된다. 특정 구현예에서, 비드 이외의 세포는 일차 항체 또는 결합 파트너로 라벨링되며, 그 후, 세포-유형 특이적 이차 항체- 또는 다른 결합 파트너(예를 들어, 스트렙타비딘)-코팅된 자성 입자가 첨가된다. 특정 구현예에서, 스트렙타비딘-코팅된 자성 입자는 바이오티닐화된 일차 또는 이차 항체 또는 바이오티닐화된 펩티드와

함께 사용된다.

- [0135] 일부 구현예에서, 자성 반응 입자는 세포에 부착된 채로 남아 있고 후속하여 인큐베이션되고/거나 배양되고/거나 조작되며; 일부 양태에서, 입자는 환자에 투여하기 위해 세포에 부착된 채로 남아있게 된다. 일부 구현예에서, 자화가능한 또는 자성 반응 입자는 세포로부터 제거된다. 세포로부터 자화가능 입자를 제거하기 위한 방법은 공지되어 있으며, 예를 들어, 경쟁하는 비-라벨링된 항체, 자화가능 입자 또는 절단가능 링커에 컨쥬게이션된 항체 등의 사용을 포함한다. 일부 구현예에서, 자화가능한 입자는 생분해성이다.
- [0136] 일부 구현예에서, 친화성-기반 선택은 자성-활성화 세포 분류(MACS)(Miltenyi Biotec, Auburn, CA)를 통해 이루어진다. 자성 활성화 세포 분류(MACS) 시스템은 자화된 입자가 부착된 세포를 고순도로 선택할 수 있다. 특정 구현예에서, MACS는 외부 자기장의 인가 후 비-표적 및 표적 종이 순차적으로 용리되는 모드로 작동한다. 즉, 자화된 입자에 부착된 세포는 제자리에 고정되고 비부착된 종은 용리된다. 그 후, 이러한 첫 번째 용리 단계가 완료된 후, 자기장에 간헐 용리가 방지된 종은 이들이 용리되고 회수될 수 있는 어떠한 방식으로 유리된다. 특정 구현예에서, 비-표적 세포가 라벨링되고 이중성 세포 집단으로부터 고갈된다.
- [0137] 특정 구현예에서, 단리 또는 분리는 방법 중 단리, 세포 제조, 분리, 처리, 인큐베이션, 배양 및/또는 제형화 단계 중 하나 이상을 수행하는 시스템, 디바이스 또는 장치를 사용하여 수행된다. 일부 양태에서, 시스템은 예를 들어, 오류, 사용자 취급 및/또는 오염을 최소화하기 위해 폐쇄 또는 멸균 환경에서 이러한 단계 각각을 수행하는데 사용된다. 한 예에서, 시스템은 국제 특허 출원 공개 번호 WO2009/072003 또는 US 20110003380 A1에 기술된 바와 같은 시스템이다.
- [0138] 일부 구현예에서, 시스템 또는 장치는 통합 또는 자체-포함 시스템에서 및/또는 자동화 또는 프로그래밍 가능한 방식으로 분리, 처리, 조작 및 제형화 단계 중 하나 이상 예를 들어, 모두를 수행한다. 일부 양태에서, 시스템 또는 장치는 사용자가 처리, 분리, 조작 및 제형화 단계의 결과를 프로그래밍하고/거나 제어하고/거나 평가하고/거나 이의 다양한 양태를 조절할 수 있게 하는 시스템 또는 장치와 통신하는 컴퓨터 및/또는 컴퓨터 프로그램을 포함한다.
- [0139] 일부 양태에서, 분리 및/또는 다른 단계는 예를 들어, 폐쇄 및 멸균 시스템에서 임상-규모 수준에서 세포의 자동화된 분리를 위해 CliniMACS 시스템(Miltenyi Biotec)을 사용하여 수행된다. 구성요소는 통합된 마이크로컴퓨터, 자성 분리 유닛, 연동 펌프 및 다양한 핀치 밸브를 포함할 수 있다. 일부 양태에서 통합 컴퓨터는 기기의 모든 구성요소를 제어하고, 시스템이 표준화된 순서로 반복된 절차를 수행하도록 지시한다. 일부 양태에서 자성 분리 유닛은 이동형 영구 자석 및 선택 칼럼용 홀더를 포함한다. 연동 펌프는 튜빙 세트 전체에 걸쳐 유속을 제어하며, 핀치 밸브와 함께 시스템을 통한 완충액의 제어된 흐름 및 세포의 지속적인 현탁을 보장한다.
- [0140] 일부 양태에서 CliniMACS 시스템은 멸균의 비-발열성 용액에 공급되는 항체-결합된 자성화가능 입자를 사용한다. 일부 구현예에서, 세포를 자성 입자로 라벨링시킨 후, 세포를 세척하여 과량의 입자를 제거한다. 그 후, 세포 제조 백을 튜빙 세트에 연결하고, 이어서 튜빙 세트는 완충액을 함유하는 백 및 세포 수집 백에 연결된다. 튜빙 세트는 사전-칼럼 및 분리 칼럼을 포함하는 사전-어셈블링된 멸균 튜빙으로 구성되며, 단지 일회용이다. 분리 프로그램의 시작 후, 시스템은 자동으로 세포 샘플을 분리 칼럼에 적용시킨다. 라벨링된 세포는 칼럼 내에 보유되는 반면, 비라벨링된 세포는 일련의 세척 단계에 의해 제거된다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 방법에 사용하기 위한 세포 집단은 라벨링되지 않으며, 칼럼 내에 보유되지 않는다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 방법에 사용하기 위한 세포 집단은 라벨링되며, 칼럼 내에 보유된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 방법으로 사용하기 위한 세포 집단은 자기장의 제거 후 칼럼으로부터 용리되고, 세포 수집 백 내에 수집된다.
- [0141] 특정 구현예에서, 분리 및/또는 기타 단계는 CliniMACS Prodigy 시스템(Miltenyi Biotec)을 사용하여 수행된다. 일부 양태에서 CliniMACS Prodigy 시스템에는 원심분리에 의한 세포의 자동 세척 및 분획화를 허용하는 세포 처리 유닛이 장착되어 있다. CliniMACS Prodigy 시스템은 또한 소스 세포 생성물의 거시적 층을 포착하여 최적의 세포 분획화 중점을 결정하는 이미지 인식 소프트웨어 및 온보드 카메라를 포함할 수 있다. 예를 들어, 말초 혈액은 자동으로 적혈구, 백혈구 및 혈장 층으로 분리될 수 있다. CliniMACS Prodigy 시스템은 또한 예를 들어, 세포 분화 및 확장, 항원 로딩 및 장기 세포 배양과 같은 세포 배양 프로토콜을 수행하는 통합 세포 컬티베이션(cultivation) 챔버를 포함할 수 있다. 입력 포트는 멸균 제거 및 배지 보충을 허용할 수 있으며, 세포는 통합 현미경을 사용하여 모니터링될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Klebanoff *et al.* (2012) *J Immunother.* 35(9): 651-660, Terakura *et al.* (2012) *Blood.* 1:72-82, and Wang *et al.* (2012) *Immunother.* 35(9):689-701] 참조.

- [0142] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 세포 집단은 흐름세포측정을 통해 수집되고 풍부화되고(또는 고갈되고), 여기에서 다중 세포 표면 마커에 대해 염색된 세포는 유체 스트림으로 운반된다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 세포 집단은 분취 규모(FACS)-분류를 통해 수집되고 풍부화(또는 고갈)된다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 세포 집단은 FACS-기반 검출 시스템과 조합된 미세전자기계 시스템(MEMS) 칩을 사용하여 수집되고 풍부화(또는 고갈)된다(예를 들어, 문헌 [WO 2010/033140, Cho *et al.* (2010) *Lab Chip* 10, 1567-1573; and Godin *et al.* (2008) *J Biophoton.* 1(5):355-376] 참조). 두 경우 모두에, 세포는 다중 마커로 라벨링될 수 있어, 고순도의 잘-정의된 T 세포 서브세트의 분리를 허용한다.
- [0143] 일부 구현예에서, 항체 또는 결합 파트너는 하나 이상의 검출가능한 마커로 라벨링되어 양성 및/또는 음성 선택을 위한 분리를 용이하게 한다. 예를 들어, 분리는 형광 라벨링된 항체에 대한 결합을 기반으로 할 수 있다. 일부 예에서, 하나 이상의 세포 표면 마커에 특이적인 항체 또는 다른 결합 파트너의 결합을 기반으로 하는 세포의 분리는 유체 스트림에서 예컨대, 분취 규모(FACS)를 포함하는 형광-활성화 세포 분류법(FACS) 및/또는 미세전자기계 시스템(MEMS) 칩에 의해 예를 들어, 흐름-세포측정 검출 시스템과 조합되어 수행된다. 이러한 방법은 다중 마커를 기반으로 하여 동시에 양성 및 음성 선택을 허용한다.
- [0144] 일부 구현예에서, 제조 방법은 단리, 인큐베이션 및/또는 조작 전 또는 후에 세포를 냉동 예를 들어, 동결보존하기 위한 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동 및 후속 해동 단계는 세포 집단에서 과립구 및 어느 정도까지는 단핵구를 제거한다. 일부 구현예에서, 세포는 예를 들어, 혈장 및 혈소판을 제거하기 위한 세척 단계 후 냉동 용액에 현탁된다. 일부 양태에서 임의의 다양한 공지된 냉동 용액 및 파라미터가 사용될 수 있다. 한 예는 20% DMSO 및 8% 인간 혈청 알부민(HSA)을 포함하는 PBS, 또는 다른 적합한 세포 냉동 배지를 사용하는 것을 포함한다. 그 후, 이는 배지로 1:1 희석하여 DMSO 및 HSA의 최종 농도는 각각 10% 및 4%이다. 그 후 세포는 분당 1°의 속도로 -80℃로 냉동되고, 액체 질소 저장 탱크의 증기 상에서 저장된다.
- [0145] 일부 구현예에서, 제공된 방법은 컬티베이션, 인큐베이션, 배양 및/또는 유전자 조작 단계를 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 고갈된 세포 집단 및 배양-개시 조성물을 인큐베이션하고/거나 조작하기 위한 방법이 제공된다.
- [0146] 따라서, 일부 구현예에서, 세포 집단은 배양-개시 조성물에서 인큐베이션된다. 인큐베이션 및/또는 조작은 배양 용기, 예컨대 유닛, 챔버, 웰, 칼럼, 튜브, 튜빙 세트, 밸브, 바이알, 배양 접시, 백 또는 배양 또는 컬티베이션 세포를 위한 기타 용기에서 수행될 수 있다.
- [0147] 일부 구현예에서, 세포는 유전자 조작 전에 또는 이와 관련하여 인큐베이션되고/거나 배양된다. 인큐베이션 단계는 배양, 컬티베이션, 자극, 활성화 및/또는 증식을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 조성물 또는 세포는 자극 조건 또는 자극제의 존재하에 인큐베이션된다. 이러한 조건은 집단에서 세포의 증식, 확장, 활성화 및/또는 성장을 유도하여 항원 노출을 모방하고/거나 예컨대, 재조합 항원 수용체의 도입을 위한 유전자 조작을 위해 세포를 프라이밍하도록 설계되는 조건을 포함한다.
- [0148] 조건은 특정 배지, 온도, 산소 함량, 이산화탄소 함량, 시간, 제제, 예를 들어, 영양분, 아미노산, 항생제, 이온 및/또는 자극 인자, 예컨대, 사이토카인, 케모카인, 항원, 결합 파트너, 융합 단백질, 재조합 가용성 수용체, 및 세포를 활성화하도록 설계된 임의의 기타 제제 중 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0149] 일부 구현예에서, 자극 조건 또는 제제는 TCR 복합체의 세포내 신호전달 도메인을 활성화시킬 수 있는 하나 이상의 제제, 예를 들어 리간드를 포함한다. 일부 양태에서, 제제는 T 세포에서 TCR/CD3 세포내 신호전달 캐스케이드를 켜거나 개시한다. 이러한 제제는 항체, 예컨대 TCR 예를 들어, 항-CD3에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 자극 조건은 공동자극 수용체, 예를 들어 항-CD28을 자극할 수 있는 하나 이상의 제제, 예를 들어 리간드를 포함한다. 일부 구현예에서, 이러한 제제 및/또는 리간드는 비드 및/또는 하나 이상의 사이토카인과 같은 고형 지지체에 결합될 수 있다. 선택적으로, 확장 방법은 항-CD3 및/또는 항 CD28 항체를 배양 배지에 첨가하는 단계를 추가로 포함할 수 있다(예를 들어, 적어도 약 0.5 ng/ml의 농도). 일부 구현예에서, 자극제는 IL-2, IL-15 및/또는 IL-7을 포함한다. 일부 양태에서, IL-2 농도는 적어도 약 10 유닛/mL이다.
- [0150] 일부 양태에서, 인큐베이션은 문헌 [US Patent No. 6,040,177 to Riddell *et al.*; Klebanoff *et al.* (2012) *J Immunother.* 35(9): 651-660, Terakura *et al.* (2012) *Blood.* 1:72-82, and/or Wang *et al.* (2012) *J Immunother.* 35(9):689-701]에 기술된 것과 같은 기술에 따라 수행된다.
- [0151] 일부 구현예에서, T 세포는 배양-개시 조성물 피더(feeder) 세포, 예컨대 비-분할 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)에 첨가하고(예를 들어, 생성된 세포 집단은 확장될 초기 집단에서 각 T 림프구에 대한 적어도 약 5, 10, 20 또는

40개 이상의 PBMC 피더 세포를 포함하도록); (예를 들어, T 세포의 수를 확장시키기에 충분한 시간 동안) 배양 물을 인큐베이션함으로써 확장된다. 일부 양태에서, 비-분할 피더 세포는 감마-방사된 PBMC 피더 세포를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, PBMC는 세포 분열을 방지하기 위해 약 3000 내지 3600 rad 범위의 감마선으로 조사된다. 일부 양태에서, 피더 세포가 T 세포 집단의 첨가 전에 배양 배지에 첨가된다.

[0152] 일부 구현예에서, 자극 조건은 인간 T 림프구의 성장에 적합한 온도, 예를 들어, 적어도 약 25°C, 일반적으로 적어도 약 30°C 및 일반적으로 37°C 또는 약 37°C를 포함한다. 선택적으로, 인큐베이션은 피더 세포로서 비-분할 EBV-형질전환된 림프모세포(LCL)를 첨가하는 것을 추가로 포함할 수 있다. LCL은 약 6000 내지 10,000 rad 범위의 감마선으로 조사될 수 있다. 일부 양태에서 LCL 피더 세포는 적어도 약 10:1의 LCL 피더 세포 대 초기 T 림프구의 비율과 같은 임의의 적합한 양으로 제공된다.

[0153] 치료 방법

[0154] 특정 구현예에서, 류마티스 관절염으로 진단된 대상체를 치료하는 방법은 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플로부터 T 림프구를 분리하는 단계; 통상적인 T 세포(Tconv)로부터 $CD4^{+}$ T 조절 세포(Treg)를 분리하는 단계로서, Treg 세포는 $CD4^{+}CD25^{+}CD127^{-}$ 이고 Tconv는 $CD4^{+}CD25^{-}CD127^{+}$ 인, 단계; 시트룰린화된-비멘틴(CV) 항원에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 발현 벡터로 Treg 세포를 형질도입하는 단계; 형질도입된 Treg를 CV 항원으로 적어도 일회 생체외에서 자극하여 CV 항원에 특이적인 Treg 세포를 수득하는 단계; 및 Treg를 대상체에 재주입함으로써 대상체를 치료하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, Treg 세포는 자가 세포이다. CAR-T 세포는 비제한적으로, 대상체로부터 수집된 T 세포를 포함하는 당업계에 공지된 T 세포의 임의의 적합한 공급원으로부터 생성될 수 있다. 대상체는 CAR-T 세포 요법을 필요로 하는 류마티스 관절염과 같은 자가면역 질환을 갖는 환자, 또는 CAR-T 세포 요법을 필요로 하는 자가면역 질환을 갖는 대상체와 동일한 종의 대상체일 수 있다. 수집된 T 세포는 CAR-T 세포를 생성하기 위해 CAR로 형질도입되기 전에 당업계에 일반적으로 공지된 방법을 사용하여 생체외에서 확장될 수 있다.

[0155] 시트룰린화된-비멘틴(CV) 항원은 또한 중양 및 COPD와 관련이 있으며, 따라서, 특정 구현예에서, 중양 또는 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD)을 치료하는 방법은 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플로부터 T 림프구를 분리하는 단계; 통상적인 T 세포(Tconv)로부터 $CD4^{+}$ T 조절 세포(Treg)를 분리하는 단계로서, Treg 세포는 $CD4^{+}CD25^{+}CD127^{-}$ 이고 Tconv는 $CD4^{+}CD25^{-}CD127^{+}$ 인, 단계; 시트룰린화된-비멘틴(CV) 항원에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 발현 벡터로 Treg 세포를 형질도입하는 단계; 형질도입된 Treg를 CV 항원으로 적어도 일회 생체외에서 자극하여 CV 항원에 특이적인 Treg 세포를 수득하는 단계; 및 Treg를 대상체에 재주입함으로써 대상체를 치료하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, Treg 세포는 자가 세포이다. CAR-T 세포는 비제한적으로, 대상체로부터 수집된 T 세포를 포함하는 당업계에 공지된 T 세포의 임의의 적합한 공급원으로부터 생성될 수 있다.

[0156] CAR 설계, T 세포에서의 전달 및 발현, 및 임상 등급 CAR-T 세포 집단을 제조하기 위한 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로 통합된 문헌 [Lee *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 2012, 18(10): 2780-90] 참조. 예를 들어, 조작된 CAR은 레트로바이러스를 사용하여 T 세포 내에 도입될 수 있으며, 이는 키메라 항원 수용체를 인코딩하는 핵산 서열을 표적 세포 게놈 내로 효과적이고 안정하게 통합한다. 렌티바이러스 벡터를 사용하는 예시적인 방법은 다음의 실시예 부문에서 기술된다.

[0157] CAR은 벡터에 의해 인코딩될 수 있으며/거나 하기 상세히 기술된 바와 같이 하나 이상의 전달 비히클 및 제형에 포함될 수 있다.

[0158] 당업계에 공지된 다른 방법은 비제한적으로, 렌티바이러스 형질도입, 트랜스포손-기반 시스템, 직접 RNA 형질감염 및 CRISPR/Cas 시스템(예를 들어, 적합한 Cas 단백질 예컨대, Cas3, Cas4, Cas5, Cas5e (또는 CasD), Cas6, Cas6e, Cas6f, Cas7, Cas8a1, Cas8a2, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas10d, CasF, CasG, CasH, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1 (또는 CasA), Cse2 (또는 CasB), Cse3 (또는 CasE), Cse4 (또는 CasC), Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csz1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, 및 Cu1966, 등등을 사용한 타입 I, 타입 II 또는 타입 III 시스템)을 포함한다.

[0159] 벡터는 예를 들어, 복제 기점, 스캐폴드 부착 영역(SAR) 및/또는 마커를 포함할 수 있다. 마커 유전자는 숙주 세포에 선택가능한 표현형을 부여할 수 있다. 예를 들어, 마커는 항생제(예를 들어, 카나마이신, G418, 블레오

마이신 또는 하이그로마이신)에 대한 내성과 같은 살생물제 내성을 부여할 수 있다. 발현 벡터는 발현된 폴리펩티드의 조작 또는 검출(예를 들어, 정제 또는 국소화)을 용이하게 하도록 설계된 tag 서열을 포함할 수 있다. Tag 서열, 예컨대 녹색 형광 단백질(GFP), 글루타티온 S-트랜스퍼라제(GST), 폴리히스티딘, c-myc, 헤마글루티닌 또는 FLAG™ tag (Kodak, New Haven, CT) 서열은 전형적으로 인코딩되는 폴리펩티드와의 융합물로서 표현된다. 이러한 tag는 카복실 또는 아미노 말단을 포함하여 폴리펩티드 내의 어디라도 삽입될 수 있다. 또 다른 예는 EGFRt 리포터 및 자가-절단가능한 T2A 서열이며, 이는 절단되어 EGFRt 단백질이 결합된 CAR을 생성한다. 일부 구현예에서, EGFRt는 필요하지 않다.

[0160] 추가적인 발현 벡터는 또한 예를 들어, 크로모솜, 비-크로모솜 및 합성 DNA 서열의 세그먼트를 포함할 수 있다. 적합한 벡터는 SV40의 유도체 및 공지된 박테리아 플라스미드, 예를 들어, E. 콜라이 플라스미드 col EI, pCR1, pBR322, pMal-C2, pET, pGEX, pMB9 및 이들의 유도체, RP4와 같은 플라스미드; 파지 DNA, 예를 들어, 파지 1의 많은 유도체, 예를 들어, NM989 및 다른 파지 DNA, 예를 들어 M13 및 필라멘트형 단일 가닥 파지 DNA; 효모 플라스미드, 예컨대 2μ 플라스미드 또는 이의 유도체, 진핵 세포에 유용한 벡터, 예컨대 곤충 또는 포유동물 세포에 유용한 벡터; 플라스미드와 파지 DNA의 조합물로부터 유래된 벡터, 예컨대 파지 DNA 또는 다른 발현 조정 서열을 사용하도록 변형된 플라스미드를 포함한다.

[0161] 여러 전달 방법이 시험관내(세포 배양) 및 생체내(동물 및 환자) 시스템을 위한 분리된 핵산 서열과 함께 활용될 수 있다. 일 구현예에서, 렌티바이러스 유전자 전달 시스템이 활용될 수 있다. 이러한 시스템은 넓은 항성 및 큰 DNA 삽입 능력을 갖는 분열 및 비-분열 세포에서 안정적이고 장기적인 유전자 존재를 제공한다. (Dull *et al*, *J Virol*, 72:8463-8471 1998). 구현예에서, 아데노-관련 바이러스(AAV)가 전달 방법으로서 활용될 수 있다. AAV는 시험관내 및 생체내 시스템에서 치료학적 유전자를 전달하기 위해 최근 몇 년 동안 적극적으로 사용된 비-병원성 단일-가닥 DNA 바이러스이다(Choi *et al*, *Curr Gene Ther*, 5:299-310, 2005). AAV는 혈청형 1 내지 9를 포함한다. 비-바이러스 전달 방법의 예는 나노입자 기술을 활용할 수 있다. 이러한 플랫폼은 생체내 약제로서의 유용성을 입증하였다. 나노기술은 단단한 상피 및 내피 장벽을 통한 약물의 트랜스사이토시스를 개선하였다. 이는 특정 방식으로 세포 및 조직에 페이로드(payload)의 표적화된 전달을 제공한다(Allen and Cullis, *Science*, 303:1818-1822, 1998).

[0162] 벡터는 또한 조절 영역을 포함할 수 있다. 용어 "조절 영역"은 전사 또는 번역 개시 및 속도, 및 전사 또는 번역 생성물의 안정성 및/또는 이동성에 영향을 미치는 뉴클레오티드를 지칭한다. 조절 영역은 비제한적으로, 프로모터 서열, 인핸서 서열, 반응 요소, 단백질 인식 부위, 유도성 요소, 단백질 결합 서열, 5' 및 3' 비-번역 영역(UTR), 전사 시작 부위, 종결 서열, 폴리아데닐화 서열, 핵 위치 신호 및 인트론을 포함한다.

[0163] 용어 "작동가능하게 연결된"은 이러한 서열의 전사 또는 번역에 영향을 미치도록 핵산에서 전사될 서열 및 조절 영역을 위치화시키는 것을 지칭한다. 예를 들어, 프로모터의 조절 하에 코딩 서열을 가져오기 위해, 폴리펩티드의 번역 관독 프레임의 번역 개시 부위는 전형적으로 프로모터의 한개 내지 약 50개 뉴클레오티드 다운스트림 사이에 전형적으로 위치한다. 그러나, 프로모터는 번역 개시 부위의 약 5,000개 뉴클레오티드 다운스트림 또는 전사 출발 부위의 약 2,000개 뉴클레오티드 업스트림 정도에 위치할 수 있다. 프로모터는 전형적으로 적어도 코어(기본) 프로모터를 포함한다. 프로모터는 또한 적어도 하나의 조절 요소, 예컨대 인핸서 서열, 업스트림 요소 또는 업스트림 활성화 영역(UAR)을 포함할 수 있다. 포함될 프로모터의 선택은 비제한적으로, 효율성, 선택성, 유도성, 원하는 발현 수준 및 세포- 또는 조직-우선적 발현을 포함하는 여러 요인에 의존적이다. 코딩 서열에 대해 프로모터 및 다른 조절 영역을 적절하게 선택하고 위치시킴으로써 코딩 서열의 발현을 조절하는 것은 당업자에게 관례적인 일이다.

[0164] 벡터는 예를 들어, 바이러스 벡터(예컨대, 아데노바이러스 Ad, AAV, 렌티바이러스 및 소포성 구내염 바이러스(VSV) 및 레트로바이러스), 리포솜 및 기타 지질-함유 복합물, 및 숙주 세포에의 폴리뉴클레오티드의 전달을 매개할 수 있는 기타 거대분자 복합물을 포함한다. 벡터는 또한, 유전자 전달 및/또는 유전자 발현을 추가로 조절하거나, 표적화된 세포에 달리 유익한 특성을 제공하는 다른 구성요소 또는 기능을 포함할 수 있다. 하기 더욱 상세히 기술되고 예시된 바와 같이, 이러한 기타 구성요소는 예를 들어, 세포에 대한 결합 또는 표적화에 영향을 미치는 구성요소(세포-유형 또는 조직-특이적 결합을 매개하는 구성요소를 포함); 세포에 의한 벡터 핵산의 흡수에 영향을 미치는 구성요소; 흡수 후 세포 내 폴리뉴클레오티드의 국소화에 영향을 미치는 구성요소(예컨대, 핵 국소화를 매개하는 제제); 및 폴리뉴클레오티드의 발현에 영향을 미치는 구성요소를 포함한다. 이러한 구성요소는 또한 벡터에 의해 전달된 핵산을 흡수하고 발현하는 세포를 검출하거나 선택하는데 사용될 수 있는 검출가능한 및/또는 선택가능한 마커와 같은 마커를 포함할 수 있다. 이러한 구성요소는 벡터의

자연적 특징(예컨대, 결합 및 흡수를 매개하는 구성요소 또는 기능을 갖는 특정 바이러스 벡터의 사용)으로서 제공될 수 있거나, 벡터는 이러한 기능을 제공하도록 변형될 수 있다. 다른 벡터는 문헌 [Chen *et al.*; *BioTechniques*, 34: 167-171 (2003)]에 기술된 것을 포함한다. 매우 다양한 이러한 벡터는 당업자에게 공지되어 있으며, 일반적으로 이용가능하다. "재조합 바이러스 벡터"는 하나 이상의 이중 유전자 생성물 또는 서열을 포함하는 바이러스 벡터를 지칭한다. 많은 바이러스 벡터는 패키징과 관련된 크기-제약을 나타내기 때문에, 이중 유전자 생성물 또는 서열이 전형적으로 바이러스 게놈의 하나 이상의 부분을 대체함으로써 도입된다. 이러한 바이러스는 복제-결합성이 될 수 있어서, 이러한 결합된 기능(들)이 (예를 들어, 복제 및/또는 캡슐화에 필요한 유전자 생성물을 수반하는 패키징 세포 또는 헬퍼 바이러스를 사용하여) 바이러스 복제 및 캡슐화 동안 트랜스로 제공되어야 한다. 전달될 폴리뉴클레오티드를 바이러스 입자의 외부로 운반하는 변형된 바이러스 벡터가 또한 기술되어 있다(예를 들어, 문헌 [Curiel, D T, *et al.* *PNAS* 88: 8850-8854, 1991] 참조).

[0165] 추가의 벡터는 바이러스 벡터, 융합 단백질 및 화학적 컨주게이트를 포함한다. 레트로바이러스 벡터는 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스 및 HIV-기반 바이러스를 포함한다. 한 HIV 기반 바이러스 벡터는 적어도 2개의 벡터를 포함하며, 여기에서 *gag* 및 *pol* 유전자는 HIV 게놈으로부터 비롯되며, *env* 유전자는 또 다른 바이러스로부터 비롯된다. DNA 바이러스 벡터는 pox 벡터, 예컨대 오르토폭스 또는 아비포스 벡터, 헤르페스바이러스 벡터, 예컨대 헤르페스 심플렉스 I 바이러스(HSV) 벡터 [Geller, A.I. *et al.*, *J. Neurochem*, 64: 487 (1995); Lim, F., *et al.*, in *DNA Cloning: Mammalian Systems*, D. Glover, Ed. (Oxford Univ. Press, Oxford England) (1995); Geller, A.I. *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci.*: U.S.A.:90 7603 (1993); Geller, A.I., *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci USA*: 87:1149 (1990)], 아데노바이러스 벡터[LeGal LaSalle *et al.*, *Science*, 259:988 (1993); Davidson, *et al.*, *Nat. Genet.* 3: 219 (1993); Yang, *et al.*, *J. Virol.* 69: 2004 (1995)] 및 아데노-관련 바이러스 벡터[Kaplitt, M.G., *et al.*, *Nat. Genet.* 8:148 (1994)]를 포함한다.

[0166] 본원에 구현된 폴리뉴클레오티드는 양이온성 리포솜 및 아데노바이러스 벡터와 같은 미세전달 비히클과 함께 사용될 수 있다. 리포솜 제조, 표적화 및 내용물 전달을 위한 절차에 대한 검토는 문헌 [Mannino and Gould-Fogerite, *BioTechniques*, 6:682 (1988)]을 참조한다. 또한, 문헌 [Felgner and Holm, *Bethesda Res. Lab. Focus*, 11(2):21 (1989) and Maurer, R.A., *Bethesda Res. Lab. Focus*, 11(2):25 (1989)] 참조.

[0167] 복제-결합 재조합 아데노바이러스 벡터는 공지된 기술에 따라 생성될 수 있다. 문헌 [Quantin, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:2581-2584 (1992); Stratford-Perricadet, *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 90:626-630 (1992); and Rosenfeld, *et al.*, *Cell*, 68:143-155 (1992)] 참조.

[0168] 또 다른 방법은 발현된 생성물을 세포내에서 생성할 수 있는 단일 가닥 DNA 생산 벡터를 사용하는 것이다. 예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로 통합된 문헌 [Chen *et al.*, *BioTechniques*, 34: 167-171 (2003)] 참조.

[0169] 본 발명의 핵산 서열은 대상체의 적절한 세포에 전달될 수 있다. 이는 예를 들어, 대식세포와 같은 식세포에 의해 식세포 작용을 최적화하도록 크기 조정된 중합성의 생분해성 마이크로입자 또는 마이크로캡슐 전달 비히클의 사용에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 약 1-10 μm 직경의 PLGA(폴리-락토-코-글리콜리드) 마이크로입자가 사용될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 이러한 마이크로입자에 캡슐화되는데, 이는 대식세포에 의해 흡수되고 세포 내부에서 점차적으로 생분해되어 폴리뉴클레오티드를 방출한다. 일단 방출되면, DNA가 세포 내에서 발현된다. 두 번째 유형의 마이크로입자는 세포에 의해 직접적으로 흡수되는 것이 아니라, 주로 생분해를 통해 마이크로-입자로부터 방출될 때에만 세포에 의해 흡수되는 핵산의 서방형 저장소 역할을 하는 것으로 의도된다. 따라서, 이러한 중합성 입자는 식균작용을 방지하기에 충분히 커야 한다(즉, 5 μm 보다 크고, 바람직하게는 20 μm 보다 큼). 핵산의 흡수를 달성하는 또 다른 방법은 표준 방법으로 제조된 리포솜을 사용하는 것이다. 핵산은 이들 전달 비히클 내에 단독으로 혼입될 수 있거나 예를 들어, Treg 세포에 특이적이거나 표적으로서의 종양 세포에 전달하기 위한, 세포- 또는 조직-특이적 항체와 공동-혼입될 수 있다. 대안적으로, 정전기력 또는 공유력에 의해 폴리-L-리신에 부착된 플라스미드 또는 다른 벡터로 구성된 분자 복합물을 제조할 수 있다. 폴리-L-리신은 표적 세포 상의 수용체에 결합할 수 있는 리간드에 결합된다. 근육내, 피내 또는 피하 부위에서의 "네이키드 DNA"(즉, 전달 비히클 없이)의 전달은 생체내 발현을 달성하기 위한 또 다른 수단이다. 관련 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 발현 벡터)에서, 단리된 핵산 서열을 인코딩하는 핵산 서열은 상기 기술된 바와 같이 CAR을 인코딩하는 서열을 포함한다.

[0170] 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물은 나노입자, 예를 들어 DNA와 복합되고 폴리에틸렌글리콜 변형된(PEG화) 저분자량 LPEI의 셀로 둘러싸인 고분자량 선형 폴리에틸렌이민(LPEI)의 코어를 포함하는 나노입자로서 제형화될 수 있다. 핵산 및 벡터는 또한, 디바이스(예를 들어, 카테터)의 표면에 적용될 수 있거나 펌프, 패치 또는 다른

약물 전달 디바이스 내에 함유될 수 있다. 본원에 기재된 핵산 및 벡터는 약학적으로 허용되는 부형제 또는 담체(예를 들어, 생리학적 염수)의 존재하에 단독으로 또는 혼합물로 투여될 수 있다. 부형제 또는 담체는 투여 방식 및 경로에 기초하여 선택된다. 적합한 약학적 담체는 물론 약학적 제형에 사용하기 위한 약학적 필요성은 이 분야에 잘 공지된 참고 문헌인 Remington's Pharmaceutical Sciences (E. W. Martin) 및 USP/NF (United States Pharmacopeia and the National Formulary)에 기술되어 있다.

[0171] 일부 구현예에서, 조성물은 본원에 구현된 조성물을 캡슐화하는 나노입자로서 제형화될 수 있다.

[0172] 조성물이 핵산 또는 폴리펩티드로서 투여되는지의 여부에 관계없이, 이들은 포유동물 세포에 의한 흡수를 촉진하는 방식으로 제형화된다. 유용한 벡터 시스템 및 제형은 상기 기술되어 있다. 일부 구현예에서, 벡터는 특이적 세포 유형에 조성물을 전달할 수 있다. 그러나, 본 발명은 이에 제한되지 않으며, 예를 들어, 칼슘 포스페이트, DEAE 텍스트란, 리포솜, 리포플렉스, 계면활성제 및 퍼플루오로 화학 액체를 사용하는 화학적 형질감염과 같은 DNA 전달의 다른 방법이 또한 고려되며, 물리적 전달 방법, 예컨대 전기천공, 미세주입, 탄도입자 및 "유전자 총" 시스템이 고려된다.

[0173] 다른 구현예에서, 조성물은 하나 이상의 CAR을 인코딩하는 핵산 또는 하나 이상의 벡터로 형질전환되거나 형질감염된 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 방법은 생체외에서 적용될 수 있다. 즉, 대상체의 세포는 몸체로부터 제거되고, 요망되는 표적 항원과의 배양에서 조성물로 형질도입되고, 표적-항원 특이적 예를 들어, T 세포로 확장되고, 확장된 세포가 대상체의 몸체로 복귀될 수 있다. 세포는 대상체 세포일 수 있거나 이들은 일치된 일배체형 또는 세포주일 수 있다. 세포는 복제를 방지하기 위해 조사될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 인간 백혈구 항원(HLA)-일치되는 자가 세포주 또는 이의 조합물이다. 다른 구현예에서, 세포는 줄기 세포일 수 있다. 예를 들어, 배아 줄기 세포 또는 인공 만능 줄기 세포(유도된 만능 줄기 세포(iPS 세포)). 배아 줄기 세포(ES 세포) 및 인공 만능 줄기 세포(유도된 만능 줄기 세포, iPS 세포)는 인간을 포함하는 많은 동물 종으로부터 확립되었다. 이들 유형의 만능 줄기 세포는 재생 의학에 가장 유용한 세포 공급원일 것인데, 왜냐하면 이들 세포는 적절한 분화 유도에 의해 거의 모든 기관으로 분화할 수 있으면서, 이들의 만능성을 유지하면서 실제로 이들의 분열 능력을 유지하기 때문이다. 특히, iPS 세포는 자가-유래된 체세포로부터 확립될 수 있으며, 따라서 배아 파괴에 의해 생성되는 ES 세포와 비교하여 윤리적 및 사회적 문제를 야기할 가능성이 낮다. 또한, 자가-유래된 세포인 iPS 세포는 재생 의학 또는 이식 요법에 가장 큰 장애인 거부 반응을 피할 수 있게 해준다.

[0174] CAR은 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 siRNA를 전달하는 방법에 의해 대상체에 용이하게 전달될 수 있다. 따라서, CAR 분자는 현재 유전자 요법에 의해 취해진 접근법과 유사하게 임상적으로 사용될 수 있다. 특히, 세포 이식 요법뿐만 아니라 백신화를 위한 CAR 안정 발현 줄기 세포 또는 iPS 세포는 대상체에서 사용하기 위해 개발될 수 있다.

[0175] 일단 CAR-T 세포가 생체외에서 확장되면, 이들은 치료학적 유효량으로 대상체에게 재주입될 수 있다. 일 구현예에서, CAR-T 세포는 시험관내 확장을 위해 항-CD3/CD28 비드를 사용하여 자극된다. CAR-T 세포는 자가면역 질환 항원(예를 들어, 시트룰리화된 비멘틴(CV))에 반응하여 사용될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "치료학적 유효량"은 CAR T 세포의 양이 이러한 치료를 필요로 하는 포유동물 특히, 인간에 투여되는 경우 류마티스 관절염과 같은 자가면역 질환을 치료하는데 충분함을 의미한다.

[0176] 투여될 CAR T 세포의 정확한 양은 대상체의 연령, 체중, 질병 정도 및 병태의 개인차를 고려하여 의사가 결정할 수 있다.

[0177] 전형적으로, T 세포 요법제의 투여는 체중 킬로그램 당 세포 수로 정의된다. 그러나, T 세포는 전달 후 복제 및 확장될 것이기 때문에, 투여 세포 용량은 세포의 최종 정상 상태 수와 유사하지 않을 것이다.

[0178] 구현예에서, 본 발명의 CAR T 세포를 포함하는 약학적 조성물은 10^4 내지 10^9 세포/kg 체중의 투여량으로 투여될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 CAR T 세포를 포함하는 약학적 조성물은 10^5 내지 10^6 세포/kg 체중의 투여량으로 투여될 수 있으며, 이들 범위 내의 모든 정수 값을 포함한다.

[0179] 본 발명의 CAR T 세포를 포함하는 조성물은 또한 이들 투여량으로 여러번 투여될 수 있다. 세포는 당업계에 공지된 주입 기술을 사용함으로써 투여될 수 있다(예를 들어, 문헌 [Rosenberg *et al.*, 1988, *New England Journal of Medicine*, 319: 1676] 참조). 특정 대상체에 대한 최적의 투여량 및 치료 요법은 질병의 징후에 대해 환자를 모니터링하고 이에 따라 치료를 조정함으로써 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0180] 특정 구현예에서, 자가면역 질환의 치료를 위한 본원에 구현된 임의의 조성물, 예를 들어 CV-CAR T 세포의 투여

는 다른 세포-기반 요법, 예를 들어 줄기 세포, 항원 제시 세포 등과 조합될 수 있다.

- [0181] 본 발명의 조성물은 당업계에 공지된 방식으로 제조될 수 있으며, 치료학적 유효량의 조성물 단독을 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제와 포함하는, 포유동물, 특히 인간에 비경구 투여하기에 적합한 조성물이다.
- [0182] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "약학적으로 허용되는 담체"는 임의의 적합한 담체, 희석제 또는 부형제를 의미한다. 이들은 조성물을 의도된 수용자의 혈액과 등장성이 되게 하는 항산화제, 완충액 및 용질을 포함할 수 있는 모든 수성 및 비수성 등장성 멸균 주사 용액; 현탁제 및 증점제를 포함할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 현탁액, 분산 매질, 항진균제, 항박테리아제, 등장제 및 흡수제 등을 포함한다. 본 발명의 조성물이 또한 다른 보충적인 생리학적 활성제를 포함할 수 있음이 이해될 것이다.
- [0183] 담체는 조성물의 다른 성분과 양립할 수 있으며 대상체에 해롭지 않다는 점에서 약학적으로 "허용"되어야 한다. 조성물은 피하, 근육내, 관절내, 정맥내 및 피내 투여를 포함하는 비경구 투여에 적합한 것들을 포함한다. 조성물은 편리하게는 단위 투여 형태로 제공될 수 있으며, 약학 분야에 널리 공지된 임의의 방법으로 제조될 수 있다. 이러한 방법은 CAR T 세포와의 회합을 위한 담체를 제조하는 것을 포함한다. 일반적으로, 조성물은 임의의 활성 성분을 액체 담체와 균일하고 친밀하게 결합시킴으로써 제조된다.
- [0184] 구현예에서, 조성물은 비경구 투여에 적합하다. 또 다른 구현예에서, 조성물은 정맥내 투여에 적합하다. 또 다른 구현예에서, 조성물은 관절내 투여에 적합하다.
- [0185] 비경구 투여에 적합한 조성물은 조성물이 의도된 수용자의 혈액과 등장성이 되게 하는 항산화제, 완충액, 살균제 및 용질을 포함할 수 있는 수성 및 비수성 등장성 멸균 주사 용액; 및 현탁제 및 증점제를 포함할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 현탁액을 포함한다.
- [0186] 본 발명은 또한 수술과 같은 다른 치료 요법 또는 양식에 더하여 및/또는 다른 약물과 본 발명의 조성물의 조합을 고려한다. 본 발명의 조성물이 공지된 치료제와 조합되어 사용되는 경우, 조합은 순서대로(연속적으로 또는 비치료 기간에 의해 분할하여) 또는 동시에 또는 혼합물로서 투여될 수 있다. 자가면역 질환, 예를 들어 류마티스 관절염의 경우, 치료는 본원에서 구현된 조성물, 예를 들어 시트룰린화된-비멘틴(CV)에 특이적인 CAR로 형질 도입된 자가 T 세포 및 하나 이상의 항-염증제 및/또는 치료제를 대상체에 투여하는 것을 포함한다. 항염증제는 전-염증 사이토카인, 예를 들어 IL-1, TNF, IL-6, GM-CSF, 및 IFN- γ 과 같은 전-염증 사이토카인에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체를 포함한다. 특정 구현예에서, 항체는 항-TNF α , 항-IL-6 또는 이의 조합물이다. 특정 구현예에서, 전-염증 사이토카인, 예를 들어 비-스테로이드 항염증 약물(NSAID)을 감소시키는 항체 이외의 하나 이상의 제제가 투여될 수 있다. 전-염증 사이토카인을 감소시키는 항체와 하나 이상의 제제의 임의의 조합물이 투여될 수 있다.
- [0187] 조합 치료는 또한 예를 들어, 유지 요법으로서 본 발명의 조성물로의 처리에 이어서 공지된 치료제로의 처리, 또는 공지된 제제로의 처리에 이어서 본 발명의 조성물의 처리를 포함하는 것으로 고려된다. 예를 들어, 자가면역 질환의 치료에서, 면역 세포, 예컨대 T 및 B 림프구의 과도하고 연장된 활성화, 및 다른 매개인자, 예컨대 인터류킨-6(IL-6), 인터류킨-1(IL-1) 및 인터페론 감마(IFN- γ)와 함께 마스터 염증유발성 사이토카인 종양 괴사 인자 알파(TNF)의 과발현은 류마티스 관절염(RA), 염증성 장 질환(IBD), 크론병(CD) 및 강직성 척추염(AS)에서 자가면역 염증 반응의 발병기전에서 중심 역할을 한다.
- [0188] 비-스테로이드성 항-염증 약물(NSAID), 글루코코르티코이드, 질병-조절 항-류마티스 약물(DMARD)은 전통적으로 자가면역 염증 질환의 치료에 사용된다. NSAID 및 글루코코르티코이드는 통증 완화 및 염증 억제에 효과적인 반면, DMARD는 염증 반응으로 인한 조직 및 기관 손상을 줄이는 능력을 갖는다. 더욱 최근에, RA 및 기타 자가면역 질환의 치료는 TNF가 질병 발달에 매우 중요하다는 발견으로 혁신을 일으켰다. 항-TNF 생물학적 제제(예컨대, 인플릭시맙, 아달리무맙, 에타너셉트, 골리무맙 및 세트물리주맙 페폴)는 자가면역 염증 질환의 관리 결과를 현저하게 개선하였다.
- [0189] 비-스테로이드 항-염증 약물은 관절염 및 두통과 같은 병태의 치료에 자주 사용되는 진통제, 해열제 및 항-염증 효과를 갖는다. NSAID는 사이클로옥시게나제(COX) 효소 차단을 통해 통증을 완화시킨다. COX는 염증 및 통증을 유발하는 매개인자인 프로스타글란딘의 생성을 촉진한다. NSAID는 상이한 화학 구조를 갖지만, 이들 모두는 유사한 치료학적 효과, 예를 들어 자가면역 염증 반응 억제를 갖는다. 일반적으로, NSAID는 두 가지 광범위한 범주로 나눌 수 있다: 기존의 비-선택적 NSAID 및 선택적 사이클로옥시게나제-2(COX-2) 억제제(검토를 위해 문헌 [P. Li et al. *Front Pharmacol.* 2017; 8: 460] 참조).

- [0190] 항-TNF 제제 이외에, 다른 염증유발성 사이토카인 또는 면역 적격 분자를 표적으로 하는 생물학적 물질은 또한 광범위하게 연구되고 적극적으로 개발되었다. 예를 들어, CTLA-4의 세포외 도메인과 IgG1의 Fc 분획의 완전히 인간화된 융합 단백질인 아바타셉트는 항-TNF 요법에 대한 부적절한 반응을 갖는 RA 환자에 대해 승인되었다. 아바타셉트의 주요 면역학적 메커니즘은 공동-자극 경로(CD80 및 CD86)의 선택적 억제 및 T 세포의 활성화이다. 인간화된 항-IL-6 수용체 모노클로날 항체인 토실리주맙은 DMARD 및/또는 항-TNF 생물학적 물질에 내성인 RA 환자에 대해 승인되었다. 이러한 치료학적 mAb는 가용성의 막 형태의 IL-6 수용체와의 결합을 통해 IL-6의 트랜스 멤브레인 신호전달을 차단한다. IL-1(아나킨라), Th1 면역 반응(IL-12/IL-23, 우스테키누맙), Th17 면역 반응(IL-17, 세쿠키누맙) 및 CD20(리툰시맙)을 표적으로 하는 생물학적 약물은 또한 자가면역 질환의 치료를 위해 승인되었다(검토에 있어서 문헌 [P. Li *et al.* *Front Pharmacol.* 2017; 8: 460] 참조).
- [0191] 본원에 기술된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 재료가 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 재료가 하기 기술된다. 본원에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허 및 기타 참고문헌은 그 전체가 참고로 포함된다. 상충되는 경우, 정의를 포함하는 본 명세서가 우선할 것이다. 또한, 재료, 방법 및 실시에는 단지 예시적인 것이며 제한하고자 하는 것은 아니다.
- [0192] **실시예**
- [0193] *실시예 1: CV-CAR을 발현하는 렌티바이러스 벡터의 생성.*
- [0194] CAR의 효과에 중요한 역할을 하는 다양한 요소를 평가하였다. 따라서, 일부 구현예에서, scFv의 3개의 상이한 버전을 비교하였으며, 2개의 힌지 길이를 평가하고, 2개의 상이한 공동-자극 도메인을 분석하였다. 이러한 단계 각각에서, 최고의 T 세포 활성화 프로파일을 제공하는 CV-CAR 후보 중 하나를 선택하였다.
- [0195] *CV-특이적 scFv의 생성:* BVCA1 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 시퀀싱하고, V_H-링커-V_L 포맷의 CV-특이적 scFv 유전자를 생성하는데 사용하였다. scFv 단백질은 서열을 pSYN 플라스미드 내에 삽입함으로써 생성되었으며, DH5-알파 E. 콜라이 적격 세포에 접종하였다. 단일 콜로니는 진탕기에서 30°C에서 밤새 100 µg/ml의 암피실린 및 2% 글루코스가 보충된 5 ml의 2YT 배지에서 성장시켰다. 5 ml의 O/N 배양물을 500 ml의 신선한 2YT 배지(0.1% 글루코스 및 100 µg/ml의 암피실린 포함) 내에 접종하고, OD₆₀₀=0.9가 될 때까지 37°C에서 2.5시간 동안 인큐베이션하였다. scFv의 발현은 250 µl의 이소프로필-β-D-티오갈락토피라노시드(IPTG)를 첨가함으로써 유도하고, 그 후 진탕시키면서 30°C에서 4hr 동안 인큐베이션하였다. 5000 rpm에서 20분 원심분리 후, 박테리아 펠렛을 12.5 ml의 빙냉 세포형질 추출 완충액(PBP, 200 g/L 수크로스, 30 mM Tris-HCl, pH 8.0)으로 재-현탁시키고, 빙 O/N에서 유지시켰다. 다음날 박테리아를 30 min 동안 10,000 rpm에서 원심분리하고, 상청액을 유지하고, 펠렛을 12.5 ml의 5 mM 빙냉 Mg₂SO₄로 재현탁시키고, 30분 동안 얼음 상에 보관하여 삼투성 쇼크를 유도하였다. 용해된 박테리아를 30 min 동안 10,000 rpm에서 원심분리하고, 상청액을 이전 것과 조합시켰다. 그 후, CV-특이적 scFv를 Ni-NTA 크로마토그래피에 의해 정제하였다.
- [0196] *CV 펩티드에 대한 BVCA1 항체 및 scFv의 결합 특이성 및 친화성 평가:* BVCA1 IgG 및 scFv의 결합 특이성은 ELISA에 의해 평가하였다. 96-웰 ELISA 플레이트를 10 µg/ml로 50 µl 스트렙타비딘으로 4°C에서 O/N 코팅하였다. 웰을 3회 세척하고, RT에서 1h 동안 200 µl의 1X PBS 1%BSA으로 차단하고, 다시 세척하였다. PBS 1% BSA에 10 µg/ml로 희석시킨 100 µl의 바이오티닐화된 펩티드를 첨가하고, 1h 동안 RT에서 인큐베이션하였다. 그 후, 웰을 3회 세척하였다. 100 µl의 BVCA1 IgG 또는 scFv 또는 아이소형 대조군을 다양한 농도로 첨가하였다(연속 희석). RT에서 1.5h 인큐베이션 후, 웰을 3회 세척하고, 알칼리 포스파타제(AP)에 컨쥬게이션된 적절한 이차 항체를 웰에 첨가하였다: 완전 인간 BVCA1 IgG에 있어서, 염소 항-인간 IgG Ab - AP (Life Technologies # 62-8422)를 1/5000 희석으로 사용하였으며, 마우스 IgG2a CH2 및 CH3 도메인을 갖는 BVCA1 Ab의 키메라 버전에 있어서, 염소 항-마우스 IgG(전체 분자) Ab - AP(Sigma #A3562)를 1/10000 희석으로 사용하고, BVCA1의 scFv에 있어서, 항-c-Myc Ab(클론 9E10, 마우스 IgG1; Santa Cruz Biotech, sc-40)를 1/200 희석 후 1/10000 희석으로 항-마우스 IgG - AP (Sigma, A3562)로 희석하였다. 웰을 3회 세척하고, 100 µl의 Step pNPP 기질 용액을 첨가하였다. 15 내지 30 min 후 50 µl의 NaOH 3M으로 반응을 중단시키고, 흡광도를 405 nm에서 마이크로 플레이트 판독기에서 판독하였다. CV 펩티드에 대한 BVCA1 Ig 및 scFv의 동역학 및 친화성은 Biacore T100 (GE healthcare)을 사용하여 표면 플라즈몬 공명에 의해 분석하였다. 바이오티닐화된 CV 펩티드는 스트렙타비딘-코팅된 센서 칩(CM5) 상에서 고정시켰다. 다양한 항체 농도를 30 µl/min의 유속으로 주입하였다.
- [0197] *CV-특이적 CAR 작제물의 생성:* Gibson 조립 방법(제조업체의 지침에 따라 Gibson Assembly Master Mix, BioLabs)을 사용함으로써, 항-CD19 scFv 서열을 CV-특이적 scFv 서열로 대체하여 p10001 렌티바이러스 플라스미드

드에 클로닝된 기존의 19-CAR 작제물내에 복제하였으며, CD28z 또는 41BBz 세포내 도메인에 이어서 CD3ζ 도메인 및 절두된 버전의 EGFR(EGFRt)은 수용체로서 사용하고, T2A 도메인에 의해 CAR로부터 분리하였다(CAR 작제물은 Juno Therapeutics에 의해 제공됨). 이러한 CAR 작제물 둘 모두는 짧은 힌지(IgG4 - 36 bp)를 가졌으므로, Gibson 어셈블리 방법을 다시 사용하여 짧은 힌지를 긴 힌지(인간 CD28 서열의 세포외 도메인 117bp)로 대체하였다. 따라서, 짧은 또는 긴 힌지 및 41BB 또는 CD28 공동-자극 도메인을 갖는 다중 CV-특이적 CAR 작제물을 생성시켰다.

[0198] *HEK 293T 세포 형질감염 및 렌티바이러스 입자 적정*: HEK 293T 세포를 10% FBS(항생제 없이)가 보충된 2 ml DMEM 고 글루코스 배지를 갖는 6-웰 플레이트에 웰당 800,000개 세포로 플레이팅하고 37°C 5% CO₂에서 밤새 두었다. 웰에서 80% 컨플루언스에서, 1.33 ug의 패키징 벡터 p8.91, 0.168 μg의 VSV 엔벨로프 벡터 pMD2.G 및 9 μg의 FuGENE HD 형질감염 시약(Promega)과 1.5ug의 CV-CAR p10001의 혼합물을 각 웰에 한 방울씩 부드럽게 첨가하였다. 바이러스 입자 생성의 효율성을 개선하기 위해, 배지를 14시간 후 ViralBoost 시약으로 보충된 신선한 10% FBS-DMEM 고 글루코스 배지(1/500로 희석됨; VC-100, Alstem)로 교체하였다. 바이러스 상청액을 2일 후 수확하고, 렌티바이러스 침전 용액을 사용하여 100배 농축시켰다(VP100, Alstem, 제조업체의 지침에 따랐다). HEK 293T 세포의 형질감염 효율성은 항-EGFRt Ab를 사용하여 흐름세포측정에 의해 평가하였다(Erbix, Juno Therapeutics). 렌티바이러스 입자를 적정하기 위해, Jrukat 세포(96-웰 플레이트에서 10,000/웰)를 4일 동안 바이러스의 연속 희석으로 배양물에 위치시키고, 그 후 항-EGFRt Ab로 염색시키고, 흐름세포측정에 의해 분석하였다(LSR II; BD Biosciences). 1% 내지 20%의 양성 세포를 생산하는 희석을 이용하여 하기 방식식에 따라 바이러스 역가를 결정하였다: [표적 세포의 수 x (EGFRt⁺ 세포/100의 %)] / 상청액의 부피(ml).

[0199] 도 19는 형질감염 후 3일째에 HEK 293T 세포의 세포 표면에서 CV-특이적 CAR 발현의 평가를 보인다. HEK 293T 세포 형질감염에 사용된 기술 및 렌티바이러스 입자 적정은 상기 기술되어 있다.

[0200] *실시예 2: CV-CAR을 발현하는 렌티바이러스 벡터의 생성*

[0201] *CV-CAR 작제물 생성*: 렌티바이러스 벡터에서 발현되는 CV-CAR 작제물을 생성하기 위해, 렌티바이러스 벡본 플라스미드 p10001(Juno Therapeutics, Inc.에서 입수 가능)에 존재하는 CD19-CAR 작제물의 단일-사슬 가변 단편(scFv)을 Gibson 어셈블리 방법을 사용하여 BVCA1 scFv로 대체하였다(도 8a 및 8b). 인간과 무린 비멘틴의 아미노산 서열 사이에 단지 약간의 차이가 관찰되기 때문에, 항-CV 항체는 인간 및 무린 펩티드 둘 모두에 대해 높은 특이성을 보인다. 이는 시험관내 인간 샘플 및 생체내 RA 마우스 모델 둘 모두에 대한 평가를 수행가능하게 한다. 인간 비멘틴 펩티드 및 무린 비멘틴 펩티드의 부분 정렬을 예시하는 도 6은 BVCA1 모노클로날 항체가 인간 및 무린 시트룰린화된 비멘틴 둘 모두에 대해 특이적인 이유를 설명해준다. 도 7은 항-CV 항체(BVCA1)의 특이성 평가를 입증한다. 도 4는 BVCA1 항체로부터 합성된 단일-사슬 가변 단편(scFv)의 CV에 대한 특이성 및 친화성 평가를 보여준다. 도 5는 (도 5a) BVCA1 완전 인간 IgG와 인간 CV 펩티드 사이의 해리 상수(K_D)가 약 10 nM이고, (도 5b) BVCA1 scFv와 인간 CV 펩티드 사이의 K_D가 약 198 nM임을 보여준다. 결과는 BVCA1 항체로서 BVCA1 scFv가 시트룰린화된 비멘틴에 특이적임을 보여준다.

[0202] 도 8b에 도시된 바와 같이, CV-특이적 CAR의 2개 버전을 생성시켰으며, 이들 각각은 CD3ζ와 CD28 (CV.28z-CAR) 또는 41BB (CV.41BBz-CAR) 공동-자극 도메인을 포함한다. 설명된 구현예에 따른 CV-CAR 작제물은 공동-자극 도메인의 임의의 적합한 유형(들)을 가질 수 있다. T2A 펩티드에 의해 CAR로부터 분리된 EGFR 유전자의 절두된 버전은 리포터 유전자로서 사용되었다. 렌티바이러스 입자는 HEK 293 T 세포를 형질감염시킴으로써 생성되었다. 상청액을 3일째에 수집하고, 바이러스 입자를 침전시켜 농축시켰다.

[0203] 도 9는 CV-CAR 작제물의 생성 타임라인 및 생성된 작제물의 후속 평가의 예를 예시한다. 작제물 생성 및 평가의 다양한 단계의 상세한 사항 및 예는 본 개시 전반에 걸쳐 설명된다.

[0204] *상이한 길이의 CV-CAR 작제물 힌지의 평가*: 2개의 상이한 길이의 힌지를 갖는 작제물을 비교하였다: (1) IgG4 모티프로부터 유래된 짧은 힌지, 및 (2) 인간 CD28의 세포외 도메인의 일부인 긴 힌지. CV.28z-CAR 및 CV.41BBz-CAR 둘 모두에 있어서, 긴 힌지의 존재는 CV-CAR T 세포의 더욱 효율적인 활성화를 유도하였음이 관찰되었다. CAR 작제물의 표적 항원에 따라, 적절한 항원-결합을 허용하는 최적의 힌지 길이가 결정될 수 있다. 어떤 힌지 길이가 CV-특이적 CAR Treg 활성화에 최적인지를 평가하기 위해, 2개의 상이한 힌지를 비교하였다 - 짧은 힌지 IgG4(36bp) 및 인간 CD28의 세포외 도메인의 일부를 사용하여 생성된 긴 힌지(117bp). CD28z 세포내 도메인을 갖는 CV-CAR 및 41BBz 세포내 도메인을 갖는 CV-CAR 둘 모두에서 이들 2개의 상이한 힌지를 연구하기 위해, 4개 버전의 CV-CAR 작제물을 생성시켰다: 짧은 힌지를 갖는 2개(CV-IgG4-28z 및 CV-IgG4-41BBz) 및 긴 힌

지를 갖는 2개(CV-CD28-28z 및 CV-CD28-41BBz). 이러한 다양한 CV-CAR 작제물의 Treg 내로의 발현은 렌티바이러스 형질도입에 의해 유도하였으며, CV-SA 비드의 존재하에 재-자극한 후 CV-CAR Treg의 활성화 프로파일을 분석하였다. 도 10a에 도시된 바와 같이, 3일째에, 더 높은 백분율의 세포가 짧은 힌지를 갖는 CAR 작제물과 비교하여 긴 힌지를 갖는 CAR 작제물을 발현하는 CV-CAR Treg의 집단에서 활성화 마커 CD71을 발현하였다. 3일째에 CD25 평균 형광 강도(MFI)를 평가할 때 동일하게 관찰되었다. 또한, 긴 힌지를 갖는 CV-CAR Treg가 짧은 힌지를 갖는 것보다 더욱 효율적으로 확장되었다(도 10b).

[0205] **다양한 버전의 scFv 평가:** 본 발명자들은 시트룰린화된 비멘틴 단백질에 특이적으로 결합하는 신규한 scFv, BVCA1을 개발하였다. RA 환자에서 발견된 시트룰린화된 단백질을 표적으로 하는 항체 대부분은 덜 특이적이며, 다수의 시트룰린화된 단백질과 교차-반응하였다. 따라서, 추가 분석은 BVCA1을 사용하였다. 그러나, 이러한 단일 IgG로부터, 3개 버전의 scFv를 생성시켰다: (1) 24개 아미노산 링커를 갖는 기점의 뉴클레오티드 서열을 갖는 V_L 및 V_H 사슬을 갖는 scFv(scFv #1), (2) (GGGGS)₃ 링커 및 기점의 뉴클레오티드 서열을 갖는 scFv (scFv #2), 및 (3) (GGGGS)₃ 링커를 갖는 V_L 및 V_H 의 코돈-최적화된 서열을 갖는 세 번째 scFv(scFv #3).

[0206] 도 11a-11d에 도시된 바와 같이, scFv #1을 갖는 CV-CAR만이 형질도입 후 3일째에 Treg 및 T conv의 세포 표면에서 효율적으로 발현된 반면, 리포터 유전자의 발현은 3개의 상이한 CAR 작제물 사이에 유사한 형질도입 효율을 시사하였다(도 11a 및 11b). CV-pep-SA 비드(CV 비드)의 존재하에 재-자극 후 2일째에 CV-CAR scFv #1으로 이전에 형질도입된 Treg 집단에서 활성화 마커 CD71 및 CD69를 발현하는 세포가 CV-CAR Treg의 2개의 다른 군과 비교하여 더 높은 백분율로 관찰되었다(도 11c 및 11d). 이들 결과에 기초하여, scFv #1을 갖는 CV-CAR 작제물을 CV-CAR 작제물의 개발을 계속하기 위해 선택하였다.

[0207] **실시예 3: CV-CAR-형질도입된 인간 Treg 및 Tconv의 생성**

[0208] **샘플, 세포 분류 및 시험관내 자극:** 신선한 전혈 유닛은 캘리포니아 유니버시티(University of California, San Francisco)에서 일반 집단에서 모집하거나 StemCell Technologies에 의해 제공된 건강한 혈액 도너로부터 취득하였다. PBMC는 Ficoll Paque 배지(GE healthcare)를 사용하여 밀도 구배 침강에 의해 분리하였다(GE Healthcare). $CD4^+$ T 세포를 자성 세포 분류(Miltenyi Biotec)에 의해 PBMC로부터 양성 선택에 의해 풍부화시켰다. 그 후, $CD4^+$ T 세포를 $CD4$, $CD25$ 및 $CD127$ 에 특이적인 형광색소-라벨링된 mAb로 염색시키고, 흐름세포측정(FACSaria; BD Biosciences)에 의해 2개의 서브셋으로 분리하였다: 97% 보다 높은 순도의 $CD4^+CD25^+CD127^-$ ($CD4^+$ 조절 T 세포; Treg) 및 $CD4^+CD25^-CD127^+$ ($CD4^+$ T 통상적 세포; Tconv). 그 후, 분류된 세포 집단을 T 세포 배지에서 인터류킨-2(IL-2; Proleukin, Prometheus Laboratories; Tconv에 있어서 100 U/ml 및 Treg에 있어서 300 U/ml)의 존재하에 Tconv에 있어서 1:1 비율로 및 Treg에 있어서 2개 비드 당 1개 세포로 항-CD3/항-CD28-코팅된 Dynabead (ThermoFisher Scientific)로 자극하였다: 5mMHEPES, 2mM L-글루타민, 각각 50 mg/ml 페니실린/스트렙토마이신(Invitrogen, Carlsbad, CA), 5 mM 비필수 아미노산, 5 mM 소듐 피루베이트(Mediatech), 및 10% FBS(Invitrogen)가 보충된 RPMI 1640 배지. IL-2를 포함하는 신선한 배지를 2일마다 첨가하고, 필요할 때 세포를 분할하였다.

[0209] **Tconv 및 Treg 집단의 렌티바이러스 형질도입 및 형질도입 효율성 평가:** 분류된 $CD4^+$ 집단의 자극 후 2일째에 세포를 계수하고 24웰-플레이트에 웰당 250,000 내지 500,000개 세포로 시딩하고, 인큐베이터에서 37°C에서 적어도 1시간 동안 위치시켰다. 그 후, 바이러스 입자와 프로타민 설페이트의 혼합물(100 μ g/ml)을 웰에 첨가하여 세포 당 1개 입자의 감염다중도(MOI)에 도달시켰다. 그 후, 세포를 32°C에서 1200xg에서 30분 동안 스핀집중하였다. 그 후, 플레이트를 37°C에서 90분 동안 다시 위치시켰다. 세포를 5분 동안 스핀 다운시키고, 집중 배지를 IL-2를 포함하는 새로운 배지로 교체하였다. 3일 후, 형질도입의 효율성은 항-EGFRt Ab를 사용하여 흐름세포측정에 의해 결정하였다. EGFRt⁺ 세포 백분율이 이들 세포의 세포 표면에서 CAR의 발현을 대표하는지 확인하기 위해, 세포를 APC 또는 PED 컨쥬게이션된 EGFRt Ab 및 CV-스트렙타비딘(SA)-AF488 테트라머로 공동-염색시키고, 진탕 하에 4°C에서 2시간 동안 인큐베이션하고, 형질도입 후 4일째에 흐름세포측정에 의해 분석하였다. CV-SA-AF488 복합물을 진탕 하에 4°C에서 15분 동안 4개 바이오티닐화된 펩티드 당 1개 SA 단백질의 비율로 컨쥬게이션된 SA-AF488 (Life Technologies)와 바이오티닐화된 CV 펩티드(Innovagen)를 공동-배양하고 5분 동안 고 14000xg에서 튜브를 스핀 다운시킴으로써 세포 염색 직전에 제조하였다.

[0210] **결과**

- [0211] CV-CAR 렌티바이러스 벡터를 사용하여, 인간 T CD4⁺ 조절 세포(Treg) 및 통상적 세포(Tconv)를 1개 세포 당 1개 바이러스 비율로 형질도입시켰다. 이들 세포는 건강한 도너(HD)의 말초혈로부터 분리하고, CD4, CD25 및 CD127 (Treg: CD4⁺CD25⁺CD127⁻; Tconv: CD4⁺CD25⁻CD127⁺)의 발현에 기초하여 흐름세포측정에 의해 분류하고, 형질도입 전에 항-CD3/CD28 비드로 2일 동안 자극하였다. 또한, 세포를 CD19.28z-CAR 및 CD19.41BBz-CAR로 형질도입하여 대조군으로서 사용하였다.
- [0212] 형질도입 후 4일째에, EGFRt⁺ 세포의 백분율을 항-EGFRt 항체를 사용하여 결정하였다. 데이터는 CV-CAR 및 CD19-CAR로의 형질도입이 Treg 중에서 및 Tconv 집단 중에서 EGFRt⁺의 유사한 백분율을 발생시켰음을 보여주었다(도 12a). 게다가, Treg가 Tconv보다 더욱 효율적으로 형질도입되었음이 테스트된 모든 CAR로 관찰되었다. 따라서, 한 실험에서, Treg의 약 74% 내지 약 80%는 Tconv 집단의 약 53 내지 약 59%와 비교하여, CAR 작제물에 따라 EGFRt⁺이었다(도 12a). 평균 형광 강도(MFI)는 또한 도 12b의 예에 나타난 바와 같이 EGFRt⁺ Tconv와 비교하여 EGFRt⁺ Treg에서 더 높았다.
- [0213] EGFRt 발현이 세포 표면에서의 CAR 발현을 대표하는지를 확인하고, CV-CAR 작제물이 이들의 표적 항원에 결합하는 능력을 평가하기 위해, 세포를 도 12c에 예시된 FITC 및 EGFRt 항체와 컨주게이션된 바이오티닐화된-CV-펩티드/스트렙타비딘 테트라머로 염색하였다. 데이터는 EGFRt 발현이 Treg의 표면에서 CV-CAR 발현과 상관관계가 있음을 확인하고, CV에 결합하는 BVCA1 scFv의 능력을 CV-CAR 작제물에서의 삼입 후 보존되었음을 입증하였다(도 12d). 유사한 결과가 Tconv 세포로 얻어졌다. 결과는 Treg의 표면에서 발현된 CV-특이적 CAR이 CV 펩티드에 특이적으로 결합함을 입증한다.
- [0214] 실시예 4: 시험관내 Treg 활성화 및 확장에 대한 CV-CAR 신호전달의 효과 분석
- [0215] 2차 라운드 자극을 위한 세포의 제조: 항-CD3/항-CD28-코팅된 Dynabead의 존재로 인한 세포의 임의의 잔여 활성화를 회피하기 위해, 이들 비드를 7일째에 세포 배양물로부터 자석을 사용함으로써 제거하였다(ThermoFisher Scientific, 제조업체의 지침에 따름). 추가로, 지시된 경우, CAR⁺ Treg 및 Tconv 집단을 7일째에 흐름세포측정에 의해 EGFRt의 발현에 기초하여 분류하였다.
- [0216] CV-CAR T 세포의 재-자극: 첫 번째 자극 후 9일 또는 10일째에, CAR⁺ T 세포를 재-자극하였다. CAR을 통해 또는 이들의 내인성 TCR을 통해 자극할 경우 CV-CAR T 세포의 활성화 프로파일을 비교하기 위해 다양한 자극 조건을 사용하였다. CV-SA 비드로서 언급된 Dynabead M-280 스트렙타비딘(Invitrogen, 제조업체의 지침에 따름)과 바이오티닐화된-CV 펩티드(Innovagen)를 결합시킴으로써 CV 펩티드를 제시하는 비드를 생성하였다. 1:1 비율의 항-CD3/항-CD28-코팅된 Dynabead 또는 1개 세포 당 2개 비드 비율의 CV-SA 비드의 존재하에 또는 부재하에 IL-2(Tconv에 있어서 100 U/ml 및 Treg에 있어서 300 U/ml)의 존재하에 세포를 재-자극하였다. IL-2를 포함하는 신선한 배지를 2일마다 첨가하고, 필요할 때 세포를 분할하였다.
- [0217] 2차 라운드 자극 후 CV-CAR T 세포의 활성화 프로파일 및 확장의 연구: 세포의 재-자극 후 1일째에, 세포 배양물을 명시야 현미경을 사용하여 시각화하였다. 2일 및 3일째에, 각 자극 조건으로부터 세포의 작은 분획을 수확하고, CD4, CD25, CD69, CD71, EGFRt 및 LIVE/DEAD 고정형 청색 염색(Invitrogen)에 대한 항체로 염색시키고, 4°C에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 세포는 LIVE CD4⁺ 세포에 게이팅함으로써 흐름세포측정에 의해 분석하였다. 재-자극 후 CV-CAR Treg의 배수 확장을 측정하기 위해, CV-CAR⁺ 세포는 2차 라운드 자극 전에 흐름세포측정에 의해 풍부화시켰다(첫 번째 자극 후 7일째에). 이들 분류된 CV-CAR⁺ Treg를 재-자극 후 5일째에 계수하고, 배수 확장을 계산하였다(5일째에 세포 수/0일째에 세포 수).
- [0218] 생성된 CV-CAR Treg의 CAR을 통해 매개된 신호가 세포를 활성화시키는 능력을 평가하였다. 항-CD3/CD28 비드를 형질도입 후 5일째에 제거하고, 형질도입된 Treg를 IL-2 단독의 존재하에서 2일 동안 배양물 중에 두어 이들이 휴지기가 되게 하여 임의의 잔여 활성화 신호를 피하도록 하였다. 그 후, CAR-Treg의 다른 집단은 IL-2 단독(음성 대조군) 또는 항-CD3/CD28 비드와 조합된 IL-2(양성 대조군) 또는 바이오티닐화된 CV 펩티드로 코팅된 SA Dynabeads® (CV-SA 비드, 도 13)의 존재하에 재-자극시켰다.
- [0219] 재-자극 후 1일째에, 웰에서 클러스터의 존재를 세포와 비드 사이의 상호작용의 표시로서 평가하였다. 도 14a에 도시된 바와 같이, IL-2 단독의 조건(비드 비함유)에서 형질도입된 CAR의 특이성과 무관하게 모든 웰에 클러스

터가 존재하지 않았다. 또한, 도 14a에 도시된 바와 같이, 항-CD3/CD28 비드 조건에서, 클러스터는 모든 Treg 집단에서 관찰되었다. 이 실시예에서, 클러스터는 세포를 CV-SA 비드의 존재하에 배양하는 경우 CV-CAR Treg 웰에서만 볼 수 있으며, 이는 CV-CAR이 CV-SA 비드와 특이적으로 상호작용하였음을 나타낼 수 있다.

[0220] 3일째에 세포의 세포 표면에서 활성화 마커 CD71 및 CD25의 발현을 흐름세포측정에 의해 평가하였다. IL-2 단독 조건에서 세포가 CD71을 발현하지 않고, CD25 MFI가 낮은 반면, 항-CD3/CD28 비드로의 자극은 대부분의 CAR Treg(CD19 및 CV 특이적)에서 CD71 발현은 물론 CD25 MFI에서의 강한 증가를 유도하였다(도 14b). CD71 발현의 유도는 CV-SA 비드 조건에서만 CV-CAR Treg에서 관찰되었다. CD71⁺ 세포의 백분율은 항-CD3/CD28 비드 특히, CV.41BBz-CAR Treg를 갖는 것으로 관찰된 것보다 낮았다. 유사하게는, CD25 MFI는 CV.28z-CAR Treg에서 약간 더 높은 MFI를 갖는 CV-CAR Treg에서만 CV-SA 비드 조건에서 증가하였다(도 14c).

[0221] 도 14a-14c는 CV-SA 비드의 존재하에 자극되었을 경우 CV-특이적 CAR을 발현하는 Treg만이 활성화 징후를 나타내었음을 보여준다.

[0222] 그 후, CV-SA 비드의 존재하에 유도된 CV-특이적-CAR-매개된 자극이 세포의 확장을 촉발하기에 충분한지를 평가하였다. 재자극 후 5일째에 모든 조건에서 다양한 CAR Treg 집단의 확장 배수를 측정하였다(도 14c). 결과 데이터는 CV-SA 비드에 의해 유도된 배수 확장이 항-CD3/CD28 비드의 존재하에 관찰된 것보다 낮더라도, CV-CAR Treg는 CV-특이적-CAR을 통해 매개된 자극 후 효율적으로 증식되었음을 보여주었다. 도 14b에서 도시된 데이터와 일치하여, CV.41BBz-CAR Treg는 CV.28z-CAR Treg보다 덜 효율적으로 확장되는 것으로 보이며, 이는 CV.28z-CAR 신호전달이 세포를 활성화시키는데 있어서 더욱 강력할 수 있음을 시사한다. 또한, 이러한 실험은 Tconv 세포에서 수행되었으며, 유사한 결과를 제공하였다.

[0223] 게다가, CV-SA 비드를 사용하여 유도된 활성화가 CV₆₀₋₇₅ 펩티드의 존재하에 유도되었음을 입증하기 위해, 아르긴-비멘틴₆₀₋₇₅(ArgVim) 펩티드-SA 비드 및 시트룰린화된-피브리노겐 베타 사슬₃₆₋₅₂(CitFib) 펩티드-SA 비드를 또한 생성시켰다. CV-CAR Treg를 비코팅된 SA-비드, ArgVim SA 비드 또는 CitFib SA 비드의 존재하에 공동-배양하였을 때, 활성화 징후는 관찰되지 않았다.

[0224] 실시예 5: 시험관내 확장 후 CV-CAR Treg의 표현형 및 안정성 평가.

[0225] 확장된 CV-CAR Treg에서 사이토카인 생성의 표현형 분석 및 평가: 18일째에 2차 라운드 자극의 말단에, 다양한 Treg 집단의 분석은 4°C에서 20분 동안 CD4, CD25, CD127, EGFRt 및 LIVE/DEAD 고정가능한 블루에 특이적인 형광색소-라벨링된 Ab로 염색된 표면이었다. 동시에, 세포의 또 다른 샘플을 CD4, CD127, EGFRt 및 LIVE/DEAD 고정가능한 블루로 염색시키고, 이어서 제조업체의 지침에 따라 Foxp3 염색 완충액 세트(eBioscience)를 사용하여 FOXP3 및 Helios의 핵내 염색을 수행하였다. 사이토카인 생성 평가를 위해, 세포를 4h 동안 PMA(100 ng/ml) 및 아이노마이신(1 µg/ml)으로 자극하였으며, 브레펠딘 A(1X, Invitrogen)를 인큐베이션 시작 후 2시간째에 첨가하였다. 그 후, 세포를 LIVE/DEAD 고정형 블루 및 항-CD4, -CD127, -EGFRt Ab로 염색하고, 2%의 D-글루코스를 갖는 1X PBS 중의 1% 파라포름알데하이드(PFA)로 고정시키고, PBS 5% FBS 중의 0.1% 사포닌으로 투과시키고, IFN-γ, IL-2, IL-17 및 IL-10에 특이적인 Ab로 염색하였다. 세포를 흐름세포측정(LSR II; BD Biosciences)에 의해 분석하였다.

[0226] 2차 라운드 확장 후 CV-CAR Treg의 표현형 안정성을 평가하기 위해, 18일째에 주요 Treg 표면 마커(CD25, CD127) 및 전사 인자(FOXP3 및 Helios)의 발현 프로파일을 물론 사이토카인 생성 발현을 시험하였다. 형질도입되지 않은 CV-CAR Treg는 2차 라운드의 자극으로 처리하였으며, 2차 라운드의 활성화는 항-CD3/CD28 비드 또는 CV-SA 비드를 사용하였다. 18일째에, 세포를 CD25 및 CD127 표면 발현(도 15a) 및 FOXP3 및 Helios 핵내 발현(도 15b)에 대해 흐름세포측정에 의해 평가하였다. 도 17a 및 15b에 도시된 바와 같이, CV-CAR Treg는 시험관내 두 라운드의 자극 후 이들의 Treg 표현형을 유지하였다.

[0227] 이들 확장된 Treg의 사이토카인 생성 프로파일을 평가하기 위해, 세포를 PMA/이노마이신으로 4시간 자극하였으며, 마지막 2시간은 브레펠딘 A의 존재하에 수행하였다. 그 후, 세포를 고정시키고, IFN-g, IL-2, IL-10 및 IL-17을 표적으로 하는 항체로 염색하였다(도 15c).

[0228] 3개의 서브세트: 도 15a 및 15b에 도시된 바와 같이, 형질도입되지 않은 Treg, CV.28z-CAR Treg 및 CV.41BBz-CAR Treg는 Treg 표현형(즉, CD25⁺CD127⁻, FOXP3⁺)을 유지하였다. Treg 중 어느 것도 확장 후 IL-2 또는 염증성 사이토카인, INF-g 및 IL-17을 발현하지 않는 것으로 관찰되었다(도 15c). 형질도입되지 않은 Treg와 CV-CAR Treg 간의 차이는 관찰되지 않았다. 재-자극의 두 조건은 2차 라운드에서 평가되었다: 항-CD3/CD28 비드 또는

CV-SA 비드. Treg가 CV-CAR-매개된 활성화 후 표현형을 유지한다는 개념을 뒷받침하는 두 조건 모두에서 유사한 프로파일이 얻어졌다.

[0229] 실시예 6: RA에서 CV-CAR Treg의 치료 잠재력을 평가하기 위한 시험관내 검정의 개발

[0230] RA 환자의 활액과 CV-CAR Treg의 공동-배양: 시트룰린화된 비멘틴의 더욱 질환-관련된 공급원을 이용함으로써 조나단 그라프(Jonathan Graf)가 제공한 RA 환자의 활액(SF) 샘플을 사용하여 CAR을 통해 활성화되는 CV-CAR Treg의 능력을 평가하였다. 1차 라운드 자극 후 9일째에 활액 샘플(신선 또는 해동)을 1:8, 1:16 또는 1:32 비율(SF:세포 배지)로 IL-2가 보충된 T 세포 배지와 혼합하였다. CAR T 세포를 96-웰 플레이트에 웰당 50,000개 세포로 시딩하고, 각 웰에 SF 및 T 세포 배양 배지의 혼합물 200 μ l를 첨가하였다. 3일 후, 세포를 이전에 기술된 바와 같이 CD4, CD71, CD25 및 LIVE/DEAD 고정형 블루 염색에 특이적인 항체로 염색하였다. CD71을 발현하는 세포의 백분율 및 CD25의 MFI는 LIVE CD4⁺ 집단을 게이팅하여 흐름세포측정에 의해 측정하였다.

[0231] 시트룰린화된 비멘틴을 발현하는 중앙 세포주의 생성 및 특징규명: SKNBE2c는 세포 표면에서 비멘틴을 발현하는 것으로 알려진 신경모세포종 중앙 세포주이다. SKNBE2c 세포(ATCC로부터)를 해동하고, Glutamax, 10% FBS, HEPES 및 P/S와 함께 RPMI에서 배양하였다. Gibson 어셈블리 방법(Gibson Assembly Master Mix, BioLabs)을 이용하여, pCDH-EF1-T2A-GFP 렌티바이러스 벡터(Addgene)에 인간 효소 캠퍼딘 아르기닌 테이미나제 2(PAD2)의 유전자를 삽입하였다. HEK 293T 세포를 형질감염시킴으로써 바이러스 입자를 생성하였으며, SKNBE2c는 세포 당 1개 입자의 MOI로 형질도입하였다. 형질감염 및 형질도입 효율은 흐름세포측정에 의해 GFP의 발현을 검출함으로써 평가하였다. 시트룰린화 과정에 관여하는 효소 PAD2의 발현의 인공적 유도가 SKNBE2c에서 시트룰린화된 비멘틴 단백질의 생성을 촉발시키는지의 여부를 결정하기 위해, 면역형광 염색을 수행하였다. 간단히 말해서, 야생형(WT) 및 PAD-GFP 형질도입된 SKNBE2C 세포주 둘 모두를 8-웰 챔버 보로실리케이트 커버글래스(Lab-Tek)에 시딩하였다. 컨플루언스에 도달하면, 세포를 차가운 1X PBS 중의 2% PFA로 30분 동안 고정하고, RT에서 30분 동안 1X PBS 중의 2% BSA로 차단하고, 일차 항체(마우스 IgG2a를 갖는 키메라 BVCA1 Ab, 항-비멘틴 Ab 또는 아이소형 대조군)와 밤새 4°C 인큐베이션하였다. 그런 다음 2차 항체를 어둠 하에 RT에서 1시간 동안 첨가하고 세포를 10분 동안 DAPI로 카운터염색하였다. 세포는 형광 현미경(BZ-X700 시리즈, Keyence)을 사용하여 시각화하였다. 결과는 도 20a 및 도 20b에 도시되어 있다.

[0232] PAD2-GFP SKNBE2C 세포주와 CV-CAR Treg의 공동 배양: WT 및 PAD2-GFP SKNBE2C 세포를 평판 바닥 96-웰 플레이트에 시딩하였다. 일단 컨플루언스에 도달하면, 형질도입되지 않은 Treg, CD19-CAR Treg 및 CV-CAR Treg를 이들의 1차 라운드 자극 10일째에 300U/ml로 IL-2가 보완된 T 세포 배지의 존재하에 웰에 첨가하였다. 공동-배양 3일 후, 세포를 수확하고, 이전에 기술된 바와 같이 CD4, CD71, CD25 및 LIVE/DEAD 고정형 블루 염색에 특이적인 항체로 염색하였다. CD71을 발현하는 세포의 백분율 및 CD25의 MFI는 LIVE CD4⁺ 집단을 게이팅하여 흐름세포측정에 의해 측정하였다.

[0233] CV-CAR T 세포가 더욱 질병-관련된 시트룰린화된 비멘틴 공급원을 사용하여 활성화되는 능력을 입증하기 위해 여러 시험관내 접근법을 사용하였다. RA 환자의 활액 또는 CV-발현 중앙 세포주를 CV 공급원으로 사용하여 얻은 데이터는 CV.41BBz-CAR로 형질도입된 Treg가 이러한 조건에서 활성화되지 않은 반면 CV.28z-CAR로 형질도입된 Treg는 효율적으로 활성화되었음을 보여주었다. 이는 두 CV-CAR 작제물 모두가 CV-SA 비드(표적 항원의 인공적 제시)의 존재하에 CAR-발현 T 세포에 대한 효율적인 활성화 신호를 촉발하더라도 CV.28z-CAR만이 더욱 생리적 맥락에서 세포를 활성화시킴을 입증한다.

[0234] 시험관내 접근법 중 하나는 RA에서 시트룰린화된 비멘틴의 주요 공급원 중 하나인 호중구 세포외 트랩(NET) 및 호중구가 풍부한 것으로 알려진 RA 환자의 관절에서 채취한 활액의 존재하에 CV-CAR Treg를 공동 배양하는 것이다. 다양한 CAR 작제물을 발현하는 확장된 Treg는 물론 형질도입되지 않은 Treg를 RA 환자로부터의 활액 또는 CV-SA 비드를 갖거나 갖지 않는 IL-2의 존재하에 배양물에 넣었다. CD71의 발현은 3.5일의 배양 후 흐름세포측정에 의해 평가하였다(도 16a). 도 16b는 상이한 CAR Treg 집단에서 EGFRt⁻ 및 EGFRt⁺ 분획 중 CD71⁺ 세포의 백분율을 보여준다.

[0235] RA 활액의 존재하에 3.5일의 공동-배양 후 CD71 Ab로 세포를 염색함으로써, CV.28z-CAR Treg의 EGFRt⁺ 분획만이 높은 백분율의 CD71 활성화 마커를 발현하였음이 관찰되었다(도 16a 및 16b). 도 16b는 4명의 상이한 RA 환자로부터 SF로 얻은 데이터의 요약이며, 형질도입되지 않은 Treg, CD19.28z-CAR Treg 및 CD19.41BBz는 활액의 존재하에 활성화의 어떠한 징후도 나타내지 않았다. 이 실험은 또한 Tconv 세포에서도 수행하였으며, 유사한 결과가

생성되었다(데이터는 도시되지 않음). 상이한 RA 환자로부터의 3개의 활액 샘플을 시험하고, 이들 모두는 EGFRt⁺ CV.28z-CAR Treg(도 18a) 및 Tconv(데이터 미도시)에서 CD71 발현을 특이적으로 유도하였다. 이들 데이터는 이러한 시험관내 활액-매개 활성화가 CV-CAR 의존적임을 시사한다. 중요한 것은 CD71의 약한 발현만이 3.5 일에 EGFRt⁺ CV.41BBz-CAR의 표면에서 유도되었다(도 16b). 이러한 관찰은 CV.41BBz-CAR-매개 신호가 도 14a 내지 도 14c에 도시된 바와 같이 CV.28z-CAR을 통해 유도된 신호보다 세포를 덜 활성화시킬 수 있다는 점과 관련이 있을 수 있다.

[0236] 실시예 7: RA의 CV-CAR Treg로 인간 대상체 치료

[0237] 다시 도 1을 참조하여, CV-CAR Treg는 류마티스 관절염 환자를 위한 세포 요법의 개발에 사용되는 기재된 기술에 따라 생성되었다. 이러한 치료학적 접근법은 환자의 혈액 샘플에서 세포를 분리하여 환자 자체(자가 조직)의 Treg를 사용하는 것을 포함한다. 분리된 Treg는 CV-CAR 전이유전자를 수반하는 렌티바이러스 벡터를 사용하여 유전자적으로 재조합하였다. CV-CAR Treg는 시험관내에서 2차 라운드의 확장을 거친 다음 환자에게 주입하였다. 이는 질병 부위에서 Treg의 효율성을 최적화하기 위해 항-TNF 치료와 함께 수행될 수 있다.

[0238] 따라서, 일부 구현예에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플로부터 T 림프구를 분리시키는 단계, 통상적인 T 세포(Tconv)로부터 CD4⁺ T 조절 세포(Treg)를 분리하는 단계로서, Treg 세포는 CD4⁺CD25⁺CD127⁻이고 Tconv는 CD4⁺CD25⁻CD127⁺인, 단계, 시트룰린화된-비멘틴(CV) 항원에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 발현 벡터로 Treg 세포를 형질도입하는 단계, 형질도입된 Treg를 항-CD3/항-CD28 비드로 생체외에서 적어도 1회 자극하여 CV 항원에 특이적인 충분한 수의 Treg 세포를 수득하는 단계, 및 Treg를 대상체에 재주입함으로써 대상체를 치료하는 단계를 포함하는 류마티스 관절염으로 진단된 대상체를 치료하는 방법이 제공된다.

[0239] 실시예 8: CV-CAR의 표면 발현

[0240] 일부 구현예에서, Treg의 표면에서 발현되는 CV-특이적 CAR의 능력을 도 17a-17b에 도시된 바와 같이 항-인간 IgG(H+L) Ab를 사용하여 평가하였다. 이는 렌티바이러스 형질도입 후에 수행하였다. CAR 및 표피 성장 인자 수용체(EGFRt) 둘 모두를 흐름세포측정에 의해 검출하였다. 도 17a는 형질도입되지 않은 Treg, CV/CD28 ζ CAR⁺ Treg 및 CV/41BB ζ CAR⁺ Treg의 표면에서 CAR 및 EGFRt의 발현 평가를 보여준다. 도 17b는 다양한 실험에서 CAR⁺ 세포의 백분율을 보여준다.

[0241] 실시예 9: CV.28z-CAR Treg는 RA 환자로부터의 활액의 존재하에 활성화된다.

[0242] CV-CAR-발현 Treg가 시트룰린화된 비멘틴의 보다 임상적으로 관련된 공급원의 존재를 인식하고 신호를 보내는 능력을 입증하기 위해, 본 발명자들은 RA에서 CV의 주요 생산자 중 하나인 호중구 세포의 트랩(NET)과 호중구에서 풍부화되는 것으로 알려진 RA 환자의 관절에서 채취한 활액의 존재하에 CV-CAR Treg를 공동배양하였다. 오히려 가장 최신의 것은 음성 대조군으로 사용된 RA 또는 통풍이 있는 환자의 활액과의 공동-배양 3일 후, CD71의 발현을 Treg 세포 사이에서 분석하였다. 통풍 환자로부터의 활액의 존재하에, CD71 발현의 유도는 어떠한 Treg 서브세트에서도 관찰되지 않았다(도 18b). 그러나, RA 환자로부터의 활액과 공동-배양할 경우, CV.28z-CAR EGFRt⁺ Treg는 높은 백분율의 활성화 마커 CD71을 발현한 반면, 동일한 웰에 존재하는 EGFRt⁻ Treg 또는 CD19.28z-CAR Treg 및 CD19.41BBz-CAR Treg는 활성화의 어떠한 징후도 보이지 않았다(도 18b 및 도 18c). 이러한 데이터와 일치하여 시트룰린화된 비멘틴은 RA 환자의 활액에서 검출되었지만 통풍 환자의 활액에서는 검출되지 않았다(도 21).

[0243] 실시예 10: CV.28z-CAR Treg는 RA 환자로부터의 무세포 활액의 존재하에 활성화된다.

[0244] 시트룰린화된 비멘틴은 염증 관절의 세포외 기질에 주로 존재하는 것으로 설명되었으며, 이는 CV.28z-CAR Treg가 이들의 표적 항원에 효율적으로 결합할 수 있게 하기 위해 세포 대 세포 상호작용이 필요하지 않을 수 있음을 시사한다. 그 가설을 검증하기 위해, 본 발명자들은 밀도 구배 원심분리 후 얻은 상층을 사용함으로써 RA 환자의 전체 활액 또는 무세포 활액의 존재하에 공동-배양 후 CV.28z-CAR Treg의 활성화 프로파일을 비교하였다. 본 발명자의 데이터는 유사한 백분율의 CV.28z-CAR Treg가 활액내 세포의 존재 또는 부재하에 RA 환자의 활액과의 공동-배양에 반응하여 CD71을 발현하고 있음을 보여주었다(도 22a 및 도 22b). 종합적으로 이들 데이터는 CV.28z-CAR-발현 Treg가 RA 환자의 염증 관절에 위치한 세포외 기질에서 이들의 표적 항원에 결합할 것이라는 개념을 강력하게 뒷받침한다.

[0245] 실시예 11: CAR-매개 자극 후 CV.28z-CAR Treg 세포 억제 기능

[0246] CAR-매개 자극 후 CV.28z-CAR Treg 세포의 억제 능력을 평가하기 위해, CRISPR/Cas9 기술을 사용하여 TCR^{KO} CV.28z-CAR⁺ Treg를 생성하기 위해 Treg에서 내인성 TCR을 녹아아웃시켰다(도 23a 및 도 23b). 반응인자로서 플레이트 결합된 항-CD3 항체로 자극된 $CD4^{+}$ T 이펙터 세포를 사용하여 억제 검정을 수행하였다. CV-pep-SA 비드(CVb)(도 24a 및 도 24b) 또는 비멘틴 비드(도 24b)의 존재하에 이들 TCR-자극된 반응인자 T 세포를 억제하는 TCR^{KO} CV.28z-CAR⁺ Treg의 능력은 다른 반응인자 대 억제인자 세포 비율에서 평가하였다. 본 발명자들의 데이터는 TCR^{KO} CV.28z-CAR⁺ Treg가 CV-SA 비드의 존재 하에서 CAR-매개 자극 후에 억제되는 반면 TCR^{KO} CD19.28z-CAR⁺ Treg는 CV-SA 비드의 존재 하에서 억제되지 않았음을 보여준다.

[0247] 실시예 12: 재료 및 방법

[0248] RA 환자의 활액과 CV-CAR Treg의 공동-배양: 시트룰린화된 비멘틴의 더욱 질환-관련 공급원을 이용함으로써 조나단 그라프(Jonathan Graf)가 제공한 RA 환자 또는 음성 대조군 통풍 환자의 활액(SF) 샘플을 사용하여 CAR을 통해 활성화되는 CV-CAR Treg의 능력을 평가하였다. 활액 샘플이 충분한 양으로 존재하는 경우, 활액의 일부를 1X PBS로 희석하고 밀도 구배 원심분리로 처리하였다. 원심분리 후 상층(무세포)을 수집하여 -80도에서 보관하였다. 1차 라운드 자극 후 9일째에 전체 활액 샘플과 무세포 활액 샘플을 해동하고 다양한 비율로 IL-2가 보충된 T 세포 배지와 혼합하였다. CAR T 세포를 96-웰 플레이트에 웰당 50,000개 세포로 시딩하고, 각 웰에 SF와 T 세포 배양 배지의 혼합물 200 μ l를 첨가하였다. 3일 후, 세포를 이전에 기술된 바와 같이 CD4, CD71, CD25 및 LIVE/DEAD 고정형 블루 염색에 특이적인 항체로 염색하였다. CD71을 발현하는 세포의 백분율 및 CD25의 MFI는 LIVE $CD4^{+}$ 집단을 게이팅하여 흐름세포측정에 의해 측정하였다.

[0249] 직접 ELISA에 의한 활액내 시트룰린화된 비멘틴의 존재 검출: 96-웰 ELISA 플레이트를 4°C에서 10 μ g/ml의 닭 항-비멘틴 Ab로 O/N 코팅하였다. 웰을 3회 세척하고, RT에서 200 μ l의 1X PBS 1%BSA으로 1시간 동안 차단하고, 다시 세척하였다. PBS 1% BSA 0.1% Tween 20에 희석된 활액 상청액의 다른 샘플을 첨가하고 RT에서 1.5시간 동안 인큐베이션하였다. 일부 다른 웰에서는 활액 대신 비멘틴 단백질과 시트룰린화된 비멘틴 단백질을 첨가하여 각각 음성 및 양성 대조군으로 사용하였다. 웰을 3회 세척하였다. 10 μ g/ml로 100 μ l의 마우스 키메라 BVCA1 IgG(마우스 CH2 및 CH3 도메인 포함) 또는 아이소타입 대조군을 첨가하였다. RT에서 1시간 인큐베이션 후, 웰을 3회 세척하고, 염소 항-마우스 IgG2a 2차 Ab-AP 컨쥬게이션(Abcam, ab98695)을 1/1000 희석으로 웰에 첨가하였다. 웰을 3회 세척하고, 100 μ l의 Step pNPP 기질 용액을 첨가하였다. 45분 후 50 μ l의 NaOH 3M으로 반응을 중단시키고, 흡광도를 405 nm에서 마이크로플레이트 판독기에서 판독하였다.

[0250] CRISPR/Cas9 기술을 사용한 TCR 녹아아웃 CV-CAR⁺ Treg 세포의 생성. Treg 세포를 실시예 3에 기재된 바와 같이 흐름세포측정에 의해 선정한 PBMC로부터 단리하고, 90g에서 10분 동안 원심분리하고, 일백만 세포 당 20 μ l 완충액을 사용하여 Lonza 전기천공 완충액 P3에 재현탁시켰다. 그 후, Treg 세포는 펄스 코드가 EH115인 Lonza 4D 96-웰 전기천공 시스템을 사용하여 CRISPR-Cas9 리보핵단백질(RNP) 복합물로 전기천공하였다. 전기천공 직후, 80 μ l의 예열된 배지를 각 웰에 첨가하고 세포를 37°C에서 15분 동안 휴지시켰다. 이어서 Treg 세포를 실시예 3에 상세히 설명된 바와 같이 ml 당 300 UI의 IL-2 존재하에 1:1 비율로 항-D3/CD28 비드로 자극하였다. 분류 및 전기천공 후 2일째에, Treg 세포를 실시예 3에 기재된 바와 같이 상이한 CAR 작제물로 형질도입시켰다. 7일 후, TCR^{KO} CAR⁺ 또는 TCR⁺ CAR⁺ 집단으로의 EGFRt 및 CD3 발현에 기초하여 세포를 분류하였다. 이어서 세포를 5 내지 6일 동안 ml 당 300 UI의 IL-2 존재하에 1:1 비율로 항-D3/CD28 비드로 재-자극하였다.

[0251] TCR^{KO} CAR⁺ Treg를 사용한 억제 검정. Treg 억제는 [³H] 티미딘 혼입을 기반으로 한 증식을 측정하여 평가하였다. 12일 확장 후, 항-CD3/CD28 비드는 TCR^{KO} CV.28z-CAR⁺ Treg 및 TCR^{KO} 19.28z-CAR⁺ Treg 배양물에서 제거하였다. 억제 검정 전에 세포를 2일 동안 휴지기에 있게 하였다. 검정 전날, $CD4^{+}$ T 이펙터 세포(반응인자 세포)를 해동하고 IL-2 30 UI/ml의 존재하에 37°C 5% CO₂에서 밤새 유지하였다. 둥근 바닥 96-웰 플레이트를 5 mg/ml의 항-CD3 항체로 밤새 코팅하고 1X PBS로 세척하였다. 검정 당일, TCR^{KO} CAR⁺ Treg 집단 및 반응인자 세포를 2회 세척하여 배지에서 잔여 IL-2를 제거하였다. 이어서 세포를 웰당 50,000개의 반응인자 세포로 항-CD3 Ab 코팅된 웰에 플레이트팅하고, 비멘틴-SA-비드, CV-SA-비드 또는 CD19-비드의 존재하에 또는 비드의 부재하에 TCR^{KO}

CAR⁺ Treg를 상이한 반응인자:Treg 비율(2:1 내지 64:1)로 첨가하였다. 3일 후, 20 μ l의 [³H] 티미딘(1 μ Ci)을 각 웰에 첨가하였다. 16시간 후, 플레이트를 -20도에서 냉동시켰다. 플레이트를 Packard FilterMate Harvester에서 수확하고 각 웰에 대한 분당 카운트(CPM)를 Packard TopCount 섬광 및 발광 계수기(Perkin Elmer, Waltham, MA)에서 판독하였다. 두 검정 모두에 있어서, 억제율을 다음과 같이 계산하였다: 억제율 % = 1 - [평균CPM(Treg+반응인자)/평균CPM(반응인자 단독)] x100%.

[0252] 서열 목록

SEQ ID NO	서열	설명
1	gttagaccagatctgagcctgggagctcttggtactaggggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgcttgagtgctcaagtagtggtgccgctc tgttctgtgactctggaactagagatccctcagaccccttttagtcagtggtgaaatctctagcagtgccgcccgaacaggagactgaaagcgaaaggga accagagagctctctcagcagcagcctggcttgctgaagcgcgcacggcgaagaggcagggggcggcagctggtgagtagcgcacaaatcttgactagc ggaggctagaaggagagagatgggtgcgagagcgtcagtttaagcgggggagaattagatcgatgggaaaaaatcggtaaggccaggggggaaga aaaaataataaataacatagtagtggaagcagcagggagctagaacgattcgagttatcctggcctgttagaaacatcagaaggctgtagacaaata ctgggacagctacacaccccttcagacagagctcagaagaactagatcattataatacagtagcaaccccttattgtgtcatcaaaaggatagagata aatggacaccaaaggagcttttagacaagtagaggagagcaaaacaaagtaagaaaaagcacagcagcagctgacacaggacacagcaatc aggtcagccaaaattaccctatagtcagacatccaggggcaaatggtacatcagccatcacctagaacttaaatgcatgggtaaaagtagtagaa gagaaggctttcagccagaagtagtaccatgttttcagcattatcagaaggacaccccaagatttaaacaccatgctaaacacagtggggggaca tcaagcagcctgcaaatgttaaagagacatcaatgaggaagctgcagggcaagagagagtggtgcagagagaaaaagagcagtggggaataggga gctttgttcttggttcttgaggagcagcaggaagcctatggcgagcgtcaatgacgtgacggtcagggcagacaattattgtctgtatagtcagc agcagaacaatttctgagggctattgaggcgcaacagcatctgtgcaactcacagctctggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtgaa agatacctaagagatcaacagctcctgggatttgggtgtcctctgaaactcattgaccactgctgtgcttggtatcaaatggcagttatcatccac aattttaaagaaaagggggagtgagggggtacagtcagggggaagaatagtagacataatagcaacagacatacaaaactaagaattacaaaaaca aattacaaaaattcaaaatttctgggtttattacaggggacagcagatccagtttggggatcaattgcatgaagaatctgcttaggggttaggcgtttgcgct gcttcgcggagatctcgatcgtccggtgcccgtcagtgaggcagcgcacatcggccacagtcggcggagagtggtgggggaggggtcggaattgaacc ggtgcctagagaagggtgctgggggttaactgggaagtgatgtctgtactgctcgccttttccgaggggtgggggagaaaccgtatataagtcagc agtcgcgtgaaagcttcttttgcacgggtttgcccgcgaacacagctgaagcttcgaggggctgcgtctctcctcacgcgccgccgcctacctgag gccccatccacgcgggtgagtcgcttctccgctccgctgtggtcctcctgaactgcgtcgcgctgtaggtaagtttaaagctcaggtcgagacgg ggcccttgccggcgtccttgagcctacctaagctcagcggcgtctccagcttgcctgacccgtgtgctcaactctacgtctttttctgttctgtctg cgccgttaacagatcaagctgtgaccggcgctacgctagcggcggccacatgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtcgagctgccccccccc tttctgctgacccccGAGGTGAACTAATAGAACTGAGGAGGCTGTGTTGAGCCAGGGCGGTCTCTGAGACTCGGTGTA CAACGTCTGATTACCTTTGCCGACTACGTTTGTCTGTTCCGCCAGGGTCCCGGCAAGGGCCTTGAATGGGTAGG TTCACTGAGACCGAAACACCTCGGTGAGACAACAGAATGCGCCCCGTCTGTGGAAGACAGATGCACCATCTCAAGAGAT GATTCAAAAGCACCGTCTATCTGCAGATGCACAGGCTCCAACACGAAGACACAGCCGTGTACTTCTGTGTTGGACCTT GGTTCGGCGACTTATTAATGTGGGGGCGAGGAACCTGGTACCGTCTCTCAGCTAGCTCCGGAGGCTCAACTTCTGG GTCCGGTAAGCCAGGACGCGAGAGGTAGTAGTGATCCGCGCGCCATCCAGATGACCCAGCTCTCCATCCTCCCTG TCTGATCTGTTGGAGACAGAGTCTCATCACTTGCCGGGCAACTCAGGACATCAGACATCTTAGGCTGGTATACCA GAGACCCGGGAAAGCCCCAGGCTCCTGATCTATGTTGCTCGAAGGTACAACTGGGGTCCCATCAGATTACGCGG CAATGGGTCTGGCACAGAGTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGACGCTGAAGATATAGGAGCTTATTATTGTCTACAAG ATGATGTTTCCCGTTCACCTGTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGACATCAAACGCGCGCGCAATTGAAGTTATGTATCCT CCTCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACATTATCCATGTGAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCTATT TCCCGGACCTTCTAAGCCCTcttggtgctggtggtggtcggagcgtgctgctgctcagcctgctgacagctggtcacctggcctcatctctttgggt gaggagtaaggagcagcgtctctgacagtgactacatgaacatgactccccgcggccggggccacccgcaagcattaccagccctatccccacca cgcgacttccagcctatcgtccgggtgaagttcagcagaagcggcagcctcctcctcagcagggccagaatcagctgtaaacgagctgaacct gggcagaagggaagtagtcagcgtcctggataaaggcgaagcggcggacccctgagatggggcgcaagcctggcggaagaacccccagggaaggcctgt ataacgaactgcagaagaagcagatggcggcctacagcagagatcggcatgaaggcgagcggagggcggggcaaggccacgagcctgtatcag ggctgtccaccgccaccaagagatacctacgacgctgacatgagcagcctgcccccaaggctcgagggcgcgagagggcagaggaagctcttaa catgctgtagcgtgaggagaatccccgcttaggagcttctcgtggaagccttctgctgtgagttaccacccagcattcctcctgacccacgc aaagtgtgaacggaataggtattgtgaattaaagactcactctcataaatgctacgaatataaacacttcaaaactgcacctccatcagtgccgac tccacatctcgggtgcatattagggtgactccttcacacatactcctcctggtatccaggaactggatattctgaaaacgtaaaggaaatcacagg gtttttctgattcaggttggcctgaaacaggacggacccctcatgctttgagaacctagaaatcatacgggcaggacaaagcaacatggctgatttct ctgagctcagcctgaacataacatcctgggattacgctccctcaaggagataagtgatggagatgtgataattcagggaacaaaaattgtgctatg caaatacaataaactgaaacaaactgtttgggacccctcggtcagaaaccaaattataagcaacagaggtgaaacagctgcaaggccacaggccagg tctgcatgcttctgctccccgagggctgctggggcccgagccacggagctgctcttccgggaatgtcagccgagggcagggaatgctgggacaagt gcaacctcttgagggtgagcgaagggtttgtggagaactctgagtcatacagtcgccaccagagtgctgctcagggcatgaacatcacctgcaca	항-CV CAR- CD28z 발현 벡터

[0253]

ggacggggaccagacaactgtatccagtgtccactacattgacggccccactgctcaagacctgcccggcaggagtcaggagaaaacacccc tggctcggaaagtagcagacgcccggccatgtgtgcccactgtgccaactgacactcaggatgacactgggcccaggcttgaggctgtccaacgaatg ggcctaagatccctcatccactgggatgtggggccctctctgtgctggtggccctggggatcgcccttctatgtgagcgccgtctaga ccggggctgcaggaaatcagatcaagcttatcagatacaaccttgattacaaaatttgtaaaagattgactggtattcttaactatgtgtccttttacgc tatgtggatcgcgtcttaagtccctttgtatcgtatgtcttccgtatggcttctatttctctctgtataaatcctggtgtctcttctataggaggttg tggccgtgttcaggcaacgtggcggtgtgtgactgtgttctgacgaacccccactggtggggcattgccaccactgtacgtctctccgggacttcc gctttccccctctattgccaggggaactcatcgccctgcttggccgtgctggacaggggctcggtgttgggcaactgacaattccgtggtgtgtc ggggaaatcatcgtcttcttggctgtcgtctgtgttccacctggtattcgcgaggagctcctctgctacgtcccttggccctcaatccagcgacgtt ccttcccgccgtgctgcccgtctgcccctctccgcttctgctcgtccctcagacgagtggtatccttggggccctcccgcatcgataccgt cgactagccgtaccttaagcaatgactacaaggcagctgtagatcttagccactttttaaagaaaaggggggactggaagggtcaattactcccaa agaagacaagatctgcttttgcctgtactgggtctctgtgttagaccagatctgagcctgggagctctgtgctaactagggaacccactgcttaagcctca ataaagctgctttagtgcctcaagtagtgtgtgcccgtctgtgtgtgactctggaactagagatccctcagaccctttagtgcgtgtgaaaatctctagc agaattcgatataagcttatcagctgaccccgagggggggccggtaaccaattccctctatgagtgatgtattacaattcactgcccgtctgttta caacgtcgtgactgggaaaacccctggcgttaccacctaattcgccttcgagcaacatcccccttcccgagctggcgtaatagcgaaggcccgcaacgat cgccctcccaacagttgctgagcctgaatggcaatggaatgtaagcgttaattttgttaaaatcgcgtaaaattttgttaaaacagctcatttttaa ccaataggccgaatcgcaaaatccctataaatcaaaagatagaccgagataggggtgagttgttccagtttggaaacaagagctcaattataaagaa cgtggacccaacgtcaaaaggcgaaaacccgtctatcaggggcgatggccactacgtgaacacccaatcaagatttttggggtcaggggtccgttaa agcaactaaatcggaacccctaaaggagccccgatttagagcttgacggggaagccggcgaaagctggcgagaaaggaaagggaagaaagcgaaggga cgggcgctagggcgctggcagatgtgagcggtcacgtgctgacccaacaccccgccgcttaattgcccgtacagggcgctcaggtggcacttt tcggggaaatgtgcgggaacccctattgttttttttcaataatcaaatatgtatccgtcatgagacaataacccgtataatgttcaataatattg aaaaagggaagtagatgattcaacatttcgtgtcccttattcccttttttggcattttgcttctgttttgcaccagaaacgtggtgaaagta aaagatgctgaagatcagttgggtgcagcaggtgttacatgaactggatctcaacagcggttaagatccttgagagtttcccccgaagaaacgttttccaa tgatgagcacttttaaaagttctgctatgtggtgctgctattatccgtattgacggcggaagacactcgtgctgcatcactatttctagatgacttg gttgatgactaccagtcacagaaaagatcttaccggtgcatgacagtaagaaatattgagtgctccataacatgagtgataacactgcccgaac ttaacttgcacaacgacgagggagcgaaggagctaacgctttttgcaacatggggagatcatgtaactcgttgatgttgggaaacgggagctgaatg aagccataccaaaacgagcagcgtagacacacgatcctgtagcaatggcaaacgttgcgcaaaatttaactggcgaaacttacttctagcttccggc aacaataatagactgtagggaggggataaagtgcaggaccacttctgctgccccttccggctggtgttattgtctgataatctggagccggtga gcgtgggtctcgggtatcattgcagcactggggcagatgtaagccctccgtatcgtatctacacgagggagtcaggaactatggatgaacg aaatagacagatcgtgagataggtgctcactgattgaacgttgtaactgtcagacaaagttactatatacttttagattgattaaactcatttttaa tttaaaaggatctagggaagatccttttgataatctatgacaaaatcccttaactgtagtttcttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaa aggatcttctgagactcttttttctgctgtaactgtcgtctgcaacaaaacacacgctaccagcggtgtgtttgttccggatcaagagctaccaac tctttttccgaaggtactggtctcagcagagcgagataccaaatactgttcttctgtgtagcgtgtagtgccaccactcaagaactctgtagcaccgc ctacatacctcgtctgtaactcgttaccagtggtgctgctccagtgagataagtcgtgttaccgggttgagactcaagacgatagttaccggataaggcg cagcggtcgggtgaacgggggggttctgcaacagcccagcttgagcgaacgacctaaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaagcg ccacgtctccgaagggaaggaaggcgagcaggtatccgtaagcgcgagggtcgggaacagagagcgacagggagcttccagggggaaacgctgg tactttatagctcgtggttccacacctgactgagcgtcgtatgtgtgagtcgtcagggggggggagcctatggaaaacggcgaacagcggc ctttttacggttctgcttctgtggtgcttctgcatgttcttctgcttaccctgattctgtgataaccgtattaccgctttagtgagctgatacc gctcgcgcagcgaaacgacgagcgcagcagtgatgagcgaaggagcggaagcgcccaatagcaaacgcttcccccgcgttggccgattc attaatgcagctggcagcaggttccgactggaagcgggcagtgagcgcaacgaattatgtgagtgactactattaggcaccacaggctttac actttatgcttccgctcgtatgttgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaacagctatgacctgattacgcaagctcgaattaacct cactaaagggaacaaaagctggagctccaccggtgcccgtcggaggtcagatcggctgacagcaacatagctccgccccttaactccgcccctc ccgccccttaactcccccagctcggccattctccgcccctggtgactaatttttttattatgacagggccgagggccctcggcctctgagctattccaga agtagtgaggaggttttttggaggcctaggcttttgcaaaagccttcagcggatcgttggtcctatgtccaaattaccgcatgttgacattgattgac tagttattaatagtaatactacggggctcattgttcatagccatataatggagttccggttacataacttaccggaataggccgctggctgacgcccc acgacccccccattgacgtcaataatgacgtatgttccatagtaacgcaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagatttaccgtaactgc ccacttgacgtacatcaagtgatcatatgccaagtacgcccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgtgattatgcccagtcacatgaccttat gggactttctacttggcagtagatctacgtattatgctgctattacatggtgagtcggttttggcagtagatcaatgggctggatagcgggttgactcac ggggatttccaaagctccacccattgacgtcaatgggagttgttttggcaccaaaacacgggagctttccaaatgtcgtacaaactccgccccattgag caaatggcggtaggcgtgacgaattcggagtgagcgccctcagatcctgcataaagcagctgcttttgcgtgactgggtctctctg	
---	--

[0254]

- 43 -

[0256]

3	tttaccgctatgtggatacgcgtcttaatacgctttgtatcatgctattgcttccgattggctttcattttctcccttgataaatacctgggtgtgctctcttaftga ggagttgtgcccgttgtcaggcaacgtggcggtgtgtgcaactgttttctgtagcaacccccactgggtggggcattgccacacactgtcagctctttccg ggactttcgtcttccctcctattgccagcgaggaaactcatccgctgcttggccgctgtctggaacaggggctcgtgctgtgggactgacaattccgtg gtgtgtcgggggaacatcatgctcttcttgggtgtcgtcgtgtgtgtgaccactggattctgcgcgggaagctcttctgtcagctccctccgcccataacag cggagactttcaacgtcggcgctgcgtgcaaaaccttgcggctcttccgcgtcttccgctccctcagacagagctggagactcccttggccgctcccccgcac gataccgctgactagcgttaccttaagaccaatgacttaacaggcagctgtagactttagaccacttttaaaagaaaaggggggactggaagggctaattc actccaaagaaagacaagaatctgctttttgctgactgggtctctctgtgtagacagatctgagcctgggaagctctctggctaactagggaacccactgctt aagcctcaataaagcttgccttgagtgcttcaagtagtgtgtgcccgtctgtgtgtgactctggttaactagagatccctcagacaccttttagtcaggttgga atctctagacagaattgatacaagcttctgataccgtgacctcagggggggcccggtaccaatctgccttagtgagtgctattacaactcattggcc gtcgttttcaacgtctgtgactggtgcaaaaccttgcggcttaccacctaattacgcttcagcacacaccccttccgcttgcgttcgactggaagagagcc gacacgctgccccttccaaacagtgcgcagctcgaatggcgaatggaaattgtagcgttaattttgtttaaattcgcgttaattttgttaaactcagctc atttttaacaaataggccgaatcggcaaaaccttataataacaaagaatagaccgagatagggttgaggtgtgttccagtgtggaacaagagctcacta ttaaagaaactgggacttcaacgtcgaaggggcgaaaaacctctatcagggcgatggccactcgtgaacatcaccttatacaagtttttggggctgagg tgccgtaaagactaatacggaaacctaaaggggagccccgattagagctgacgggggaaagcgccggaactggcgagaagaaagggaagaaagc gaaaggagcggcgctgaggcgctggcgaacgttagcgcttcacgtgcgtgataaccacacaccccgcgcttaactcagctacaggcgcgctcaggt ggcacttttcggggaatgtgcgcggaacccctattgtttatttttaataatcatcaaatatgtatcgcgtcatgagacaataacctgataaatgcttcaat aatattgaaaaaggaagagtagtagtatcaaacatttccgtgtgcgccttattcccttttttgcggcatttgccttctgttttgcctacacagaacgctgtgt aaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgacaggtgggttatcagactggaactcaacagcggtgaagatctctgagagtttgcggcgaagaaact tttcaactgatgagcattttaagttctgtatgtggcgcggtattatccgtattagcagcgggcgaagcaactcggctgcgcgcatacattctcagaat gacttgggtgagatcttaccggtcacagaaaaacgatcttaccgtaggcatgacgagataagaaattgtagctgcgtacataacatgagctgataacactgag gccaaacttactctgacaacgactggaggagccgaaggagtaaccgcttttgcacaaatgggggatctgtaactcgccttgatcgttgggaaccggag ctgaatgaaggcataccaacgacgagcgtgacacacagctgctgtagcaatggcacaacagttgcgcaactataactggcgacactattactctagct tcccggaacaataatagactggatggaggcgagataaagttgcaggacactctctgcctgcgccttccgctggctgtgttatgtctgataaactctggag ccggtgagcgtgggtctcgcggtatctgtagcagctggggggcagatggtaagccccctccgtatctgtagttatctacagcgggggagtcaggcaactatg atgaacgaatagacagatgctgtagatagtgctgtactcgtatgaactgtgtaactgtcagacaagaattatctcatatatacttctggaataaact catttttaattaaaaggatcaggtgaagatctcttttgataatctcatgacaaaatctccttaaactgtagtttctgttcaactgagctcagacccctgagaa agatcaaaaggatcttctgagatctcttttctgcgcgtaactctgctgttgcacaaacaaaacacccgctaccagcggtgtgttggctgggatcaagag ctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaataactgttcttctagtgtgacggtataggccacactcaagaactctgt agccagcctcatatacctgctctgtaactctgttaccagtggtgctgtccagtgggataagtgtgttcttaccgggttgactcaacagcagatgattaccgg ataaggcgagcgtcgtcgttcgagatcagggggggtctgcacacagcccgctgagcaacgacactacaggaactgagatctacagcgtgagtagt agaaaagcgcacgcttccgaagggaagggagcgaaggtatccggttaagcggcagggctggaaacaggagagcgacagaggaggttccaggggga aacgcctggtatctttatgctcgtctgggttcccaacctgacttgagcgtcgaattttgtgatgctcgtcaagggggcgagcctatgaaaaaacgcca caacgcgccctttttagcgttctggccttttctgctgcttttgcctacatgttcttctgcttatccccgtattctgtgataaccgtattaccgctttgagtg gctgataccgctcgcgcagcgcgaacgagcgcagcagtgtagcaggggaaagcgggaagagcgccaatacgcacaaacgccttccccgcgctt ggcgagcttaataatgacgttcgcagcagcagaggttcccgactggaaagcggcgagcgcgaacgcaatattgtagtagtactgataactgagccaccc aggcctttacattatgttcggcctgtatgtgttggaattgtgagcggataacaatttccacagggaacagctatgacctgattacgccaagctgaa attaacctcactaaagggaacaaaagctgagagctccaccgggtggcgccctcgaggtcgagatccggctgacagcaacatagttccgccttaact cgccactccgccccttaactccgccaggttcgcccaattctccgccacttgctgactaattttttattatgacagagccgagccgctcggcctctgagct attccgaagtagtgaggaggcttggaggcctaggccttttgcaaaaagcttcgacggatcagttggctctgctcaacattacgcgactgtgactgt attattgtagtattatgataatcaactagggtctattgttcatgcccataatggaatcgggttacataactggttaaacgaataggccgctcgtgctg accgcccacagcccccccacttgacgtcaataatgacgtatgttccatagtaacgcaatagggactttccattgacgtcaattgggtggagtagtattacg taaacctgccacttggcagtagcatcaatgttatcatatgccaaagtagcccccattagcgtcaatgacggtaaatggccgctcgtgcttattgccagtag tagcttattgggacttctacttggcagtagcatctacgtattatgctatctacatggtgtagtcggttttggcagtagcatatggcgtgggtgtagcggct tgactcaggggatttcaagctccaccccaatgacgtcaatgggagttgttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtaaactccggcc cattgacgcaaatggcggttaggcgtgtacggaattcggagtggcagccctcagactctgataaacagcgtcttcttgcgtactgggtctctctg	인간 비멘트 펠트 60
---	--	-----------------

		75
4	AYVTRSSAVRLRSSVP	유린 비멘틴 펩티드 60-75
5	gagggtgaactaataagaatctgggggaggcttggttagccaggcggtctctgagactcgcgtgtacaacgtctggattcacctttccgactacggtttgt cctggttcgccagggtcccgcaaggcccttgatgggtagggttcactggaccgaaacacctcggtagacaacagaatgcgcccgtctgtggaagac agatgcacattctcaagagatgattccaaagcaccgtctatctgcagatgcacaggctccaacacgaagacacagccgtgtacttctgttggtgaccttgg tcggcgacttattaatgiggggccagggaacccctggtcaccgtctcctcagctagctccggaggctcaactctgggtcggtaagccaggcagcggaag gtagtgtggtaccgcgcgccatccagatgaccagtcctcctctgtctgcatctgttgagacagagatcctcatcacttggggcaactcaggac atcagcacatctttaggctgtatcaccagagaccgggaagcccgaggctcctgactatgtgtcttgaaggtaacaaactgggtcccatcagattc agcgcaatgggtctggcacagagttcacttccatcagcagcctgcagcctgaagatatagggaacttattgtctacaagatgatttccgttcac tgttgccaggccacaagctggacatcaaacgcgcggccgcaattgaagtatgtatcctcctcttaccatagacaatgagaagcaatggaaaccattat ccatgtgaagggaacaacaccttggcacaagctccctatttccggaccttcaagcccttctgggtgctggtggttcggaggcgtgctggcctgtacagcc tgcgtgtaacggtgcttcatctcttgggtgagggaaggaaggagcaggctcctgcacagtactacatgaacatgactccccgcgcggccgcca cccgcaagcattaccagccctatgccaccacgcgacttcgagcctatcgtctccgggtgaagttcagcagaagcggcagccctgctcctcagcag ggccaagatcagctgtacaacgagctgaacctgggcagaaagggaagagtagcagctcctgtaagcggagggccgggaacccagagatgggcggcaa gcctcggcggaagaaaccccggaaggcctgtataacgaactgcagaaagacaagatggccgagggcctacagcgagatcgcatgaaggcgagcggga ggcggggcaaggccacgagcgtgtatcaggccgtgtccaccgcccaaggatacctacgacgcccctgcacatgcaggccctgcccccaagg	항-CV CAR- CD28z, 뉴클레오티드
6	gagggtgaactaataagaatctgggggaggcttggttagccaggcggtctctgagactcgcgtgtacaacgtctggattcacctttccgactacggtttgt cctggttcgccagggtcccgcaaggcccttgatgggtagggttcactggaccgaaacacctcggtagacaacagaatgcgcccgtctgtggaagac agatgcacattctcaagagatgattccaaagcaccgtctatctgcagatgcacaggctccaacacgaagacacagccgtgtacttctgttggtgaccttgg tcggcgacttattaatgiggggccagggaacccctggtcaccgtctcctcagctagctccggaggctcaacttctgggtcggtaagccaggcagcggaag gtagtgtggtaccgcgcgccatccagatgaccagtcctcctctgtctgcatctgttgagacagagatcctcatcacttggggcaactcaggac atcagcacatctttaggctgtatcaccagagaccgggaagcccgaggctcctgactatgtgtcttgaaggtaacaaactgggtcccatcagattc agcgcaatgggtctggcacagagttcacttccatcagcagcctgcagcctgaagatatagggaacttattgtctacaagatgatttccgttcac tgttgccaggccacaagctggacatcaaacgcgcggccgcaattgaagtatgtatcctcctcttaccatagacaatgagaagcaatggaaaccattat ccatgtgaagggaacaacaccttggcacaagctccctatttccggaccttcaagcccttctgggtgctggtggttcggaggcgtgctggcctgtcagcc tgcgtgtaacggtgcttcatctcttgggtgaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaaaacacatttatgagaccagtacaactactca agggaagatggctgtgctgctgctgattccagaagaagaaggaggatgtgaactcgggtgaagttcagcagaagcggcagccctgcctaccag caggggcagaatcagctgtacaacgagctgaacctgggcagaaagggaagagtagcagctcctggataagcgggaaggccgggacccctgagatgggcgg caagcctcggcggaagaaccccggaaggcctgtatacgaactgcagaaagacaagatggccgagggcctacagcgagatcgcatgaaggcgagc ggaggcggggcaaggccacgagcgtgtatcaggccgtgtccaccgcccaaggatacctacgacgcccctgcacatgcaggccctgcccccaagg	항-CV CAR- 41BBz, 뉴클레오티드
7	gagggtgaactaataagaatctgggggaggcttggttagccaggcggtctctgagactcgcgtgtacaacgtctggattcacctttccgactacggtttgt cctggttcgccagggtcccgcaaggcccttgatgggtagggttcactggaccgaaacacctcggtagacaacagaatgcgcccgtctgtggaagac agatgcacattctcaagagatgattccaaagcaccgtctatctgcagatgcacaggctccaacacgaagacacagccgtgtacttctgttggtgaccttgg tcggcgacttattaatgiggggccagggaacccctggtcaccgtctcctcagctagctccggaggctcaacttctgggtcggtaagccaggcagcggaag gtagtgtggtaccgcgcgccatccagatgaccagtcctcctctgtctgcatctgttgagacagagatcctcatcacttggggcaactcaggac atcagcacatctttaggctgtatcaccagagaccgggaagcccgaggctcctgactatgtgtcttgaaggtaacaaactgggtcccatcagattc agcgcaatgggtctggcacagagttcacttccatcagcagcctgcagcctgaagatatagggaacttattgtctacaagatgatttccgttcac tgttgccaggccacaagctggacatcaaacgcgcggccgca	항-CV scFv, 뉴클레오티드
8	attgaagttagtatcctcctcttaccatagacaatgagaagcaatggaaaccattatccatgtgaagggaacaacaccttgcgaagctccctatttccgg accttcaagccc	hCD28 스페이서, 뉴클레오티드

[0257]

		드
9	ttctgggtgctgggtgggtcggagggcgtgctggcctgctacagcctgctgggtaccgtggccttcattcttttgggtg	CD28 TM 도메인, 뉴클레오티드
10	cgggtgaagttcagcagaagcgcgcgacgccccctgctaccagcgggccaatcagctgtacaacagagctgaacctgggcagaagggaagagtagcacgtcctgtataagcggagagccgggacccctgagatgggcggaagcctcggcggaagaacccccaggagggcctgtataacgaactgcagaagacaaagatggccgagggcctacagcgagatcggcatgaaggcgagcggaagcggggcaaggccacgacggcctgtatcaggcgctgtccaccgccaccaaggatacctacgacgccccgcacatgcaggccctgcccccaagg	CD3ζ 세포내 도메인, 뉴클레오티드
11	aggagtaagagagcaggcctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccggcccccgggcccacccgcaagcattaccagccctatgccccaccgagcacttcgacgctatcgctcc	CD28 세포내 도메인, 뉴클레오티드
12	aaacggggcagaagaactcctgtatatattcaacaaccattatgagaccagtacaactactcaaggagaagatggctgtagtccgatttcagaagaagaagaaggagatgtgaactg	41Bb 세포내 도메인, 뉴클레오티드
13	EVKLIESGGGLVEPGRSLRLACTTSGFTFADYGLSWFRQGPKGLEWVGFTGPKHLGETTECAPSVEDRCTISRDDSKSTVYLQMHRLQHEDTAVYFCVGPWFGLLMMWGQGLVTVSSASSGGSTSGSGKPGSGEGSSGSARAIQMTQSPSSLSASVGDRV SITCRATQDISTSLGWYHQRPGKAPRLIYGASKVQTVPSRFSNGSGTEFTLTISLQPEDIGTYICLQDDGFPTVGQGTK LDIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSLHSD YMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNLQYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	항-CV CAR- CD28z, 아미노산
14	EVKLIESGGGLVEPGRSLRLACTTSGFTFADYGLSWFRQGPKGLEWVGFTGPKHLGETTECAPSVEDRCTISRDDSKSTVYLQMHRLQHEDTAVYFCVGPWFGLLMMWGQGLVTVSSASSGGSTSGSGKPGSGEGSSGSARAIQMTQSPSSLSASVGDRV SITCRATQDISTSLGWYHQRPGKAPRLIYGASKVQTVPSRFSNGSGTEFTLTISLQPEDIGTYICLQDDGFPTVGQGTK LDIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNLQYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	항-CV CAR- 41Bb, 아미노산
15	EVKLIESGGGLVEPGRSLRLACTTSGFTFADYGLSWFRQGPKGLEWVGFTGPKHLGETTECAPSVEDRCTISRDDSKSTVYLQMHRLQHEDTAVYFCVGPWFGLLMMWGQGLVTVSSASSGGSTSGSGKPGSGEGSSGSARAIQMTQSPSSLSASVGDRV SITCRATQDISTSLGWYHQRPGKAPRLIYGASKVQTVPSRFSNGSGTEFTLTISLQPEDIGTYICLQDDGFPTVGQGTK LDIKRAAA	항-CV scFv, 아미노산
16	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSK	hCD28 스페이서,

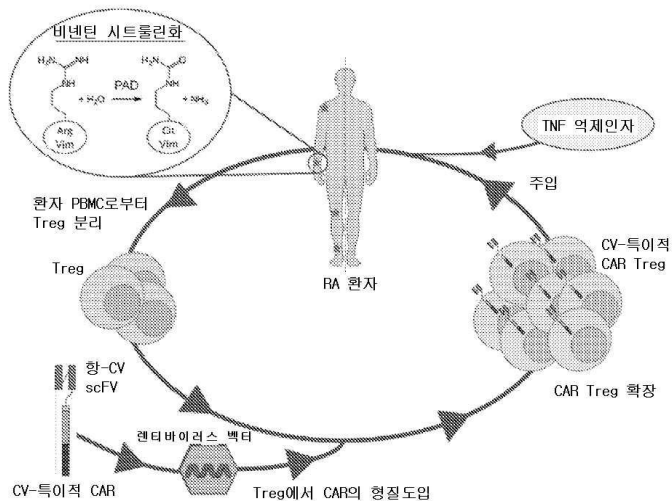
[0258]

		아미노산
17	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 TM 도메인, 아미노산
18	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGE RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3ζ 세포내 도메인, 아미노산
19	RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	CD28 세포내 도메인, 아미노산
20	KRGKRLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	41BB 세포내 도메인, 아미노산
21	ValTyrAlaThrCitSerSerAlaValCitLeuCitSerSerValPro Cit = 시트룰린	인간 CV 펩티드 60- 75
22	AlaTyrValThrCitSerSerAlaValCitLeuCitSerSerValPro Cit = 시트룰린	무린 CV 펩티드 60- 75

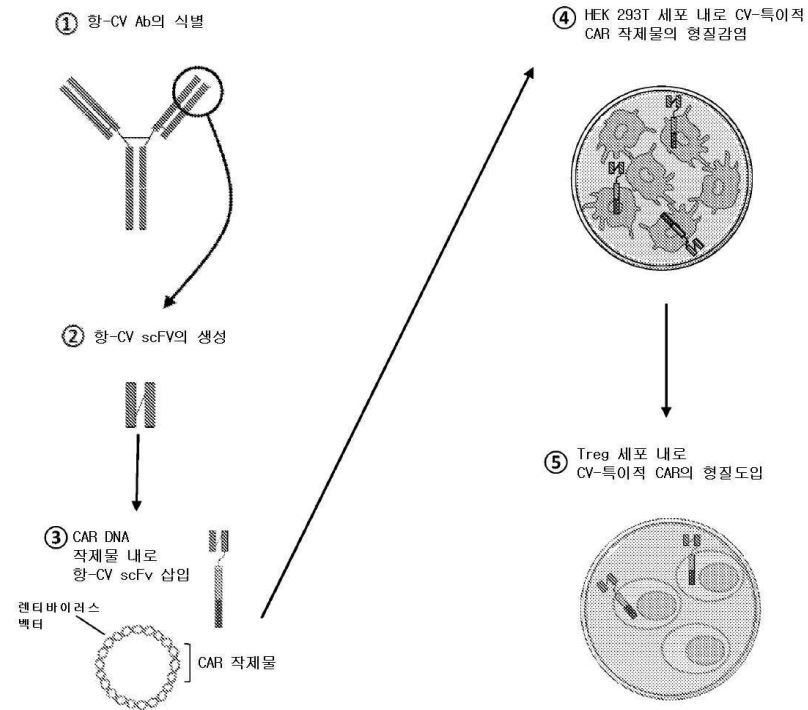
[0259]

도면

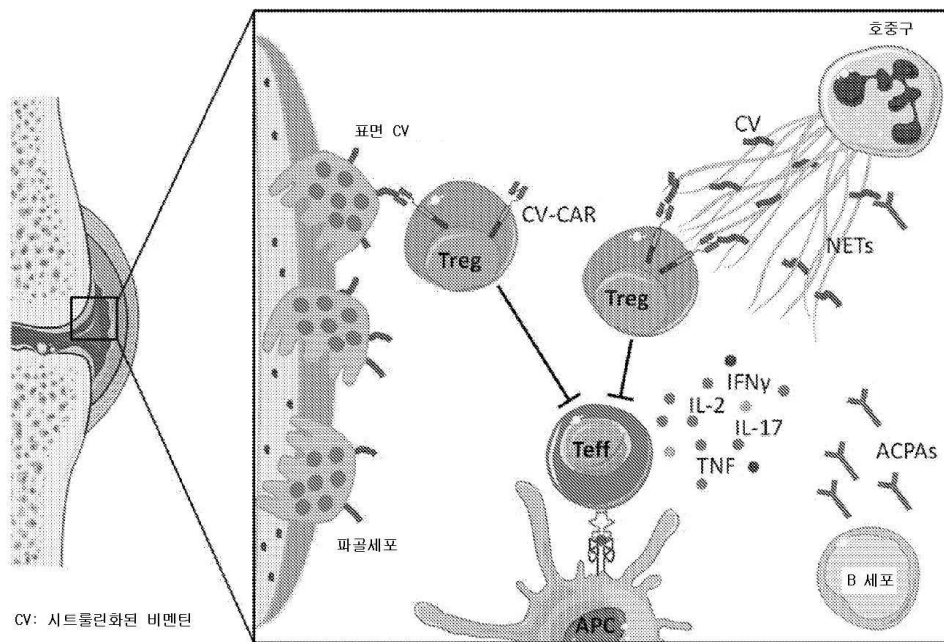
도면1



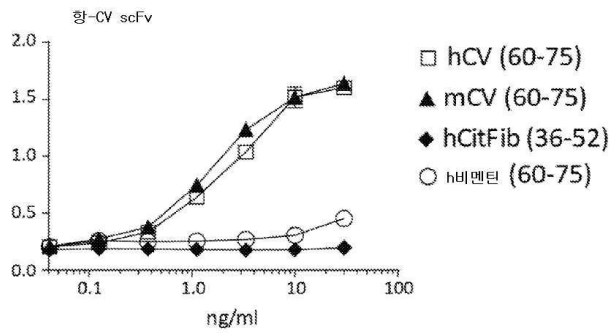
도면2



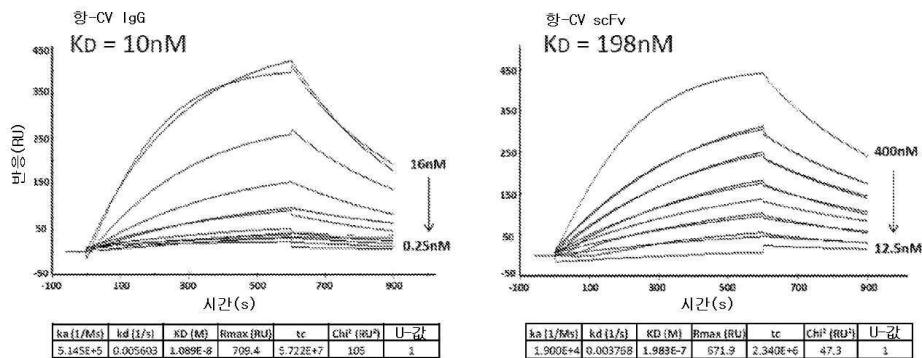
도면3



도면4



도면5



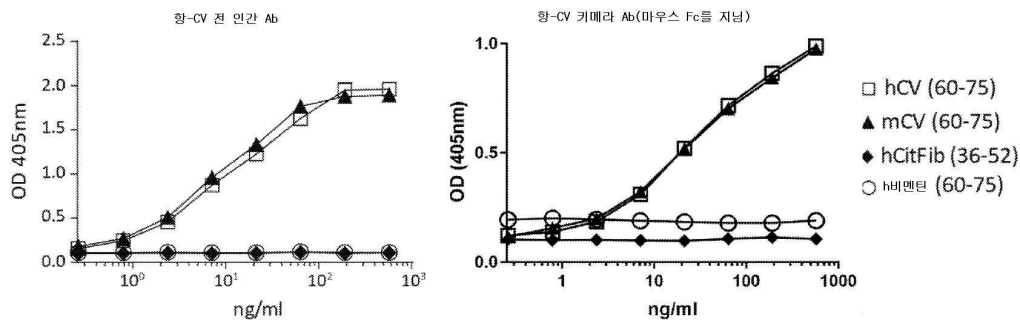
도 5a

도 5b

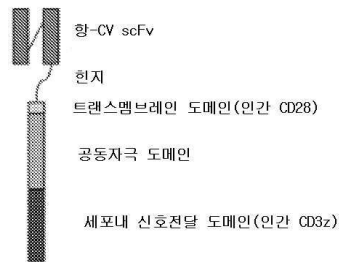
도면6

인간 비멘틴 펩티드	60-75	VYATRSSAVRLRSSVP
류린 비멘틴 펩티드	60-75	AYVTRSSAVRLRSSVP

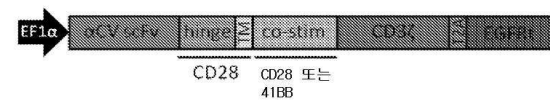
도면7



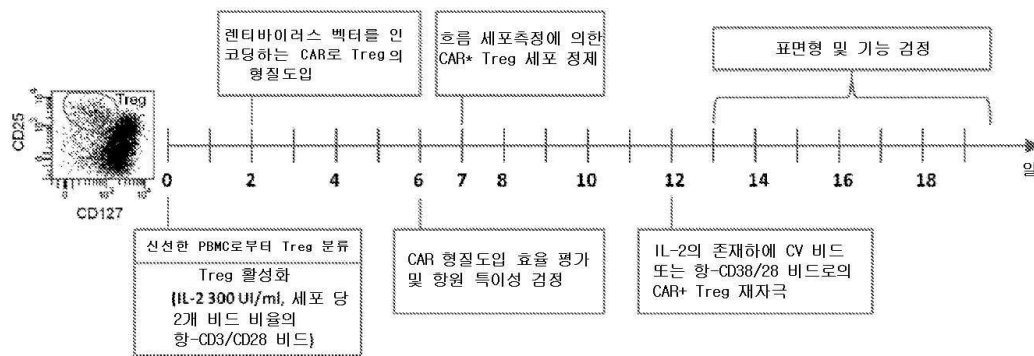
도면8a



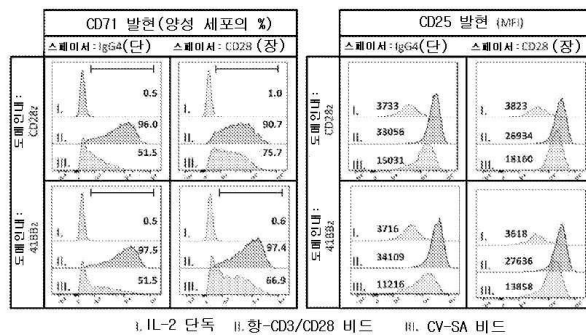
도면8b



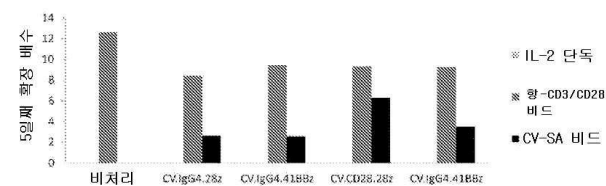
도면9



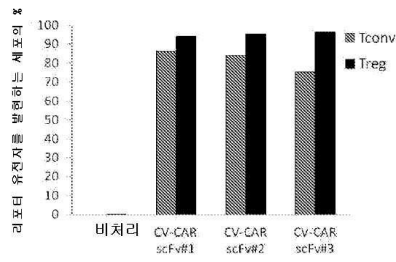
도면10a



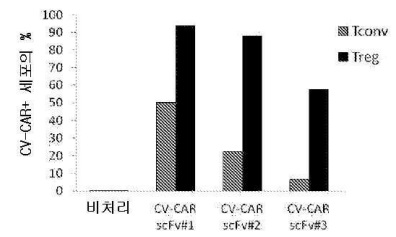
도면10b



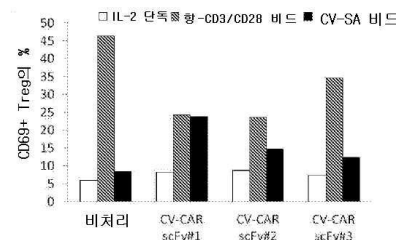
도면11a



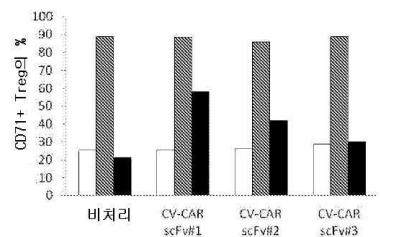
도면11b



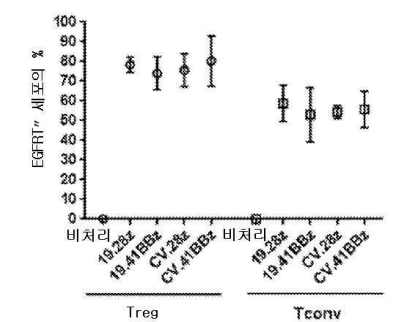
도면11c



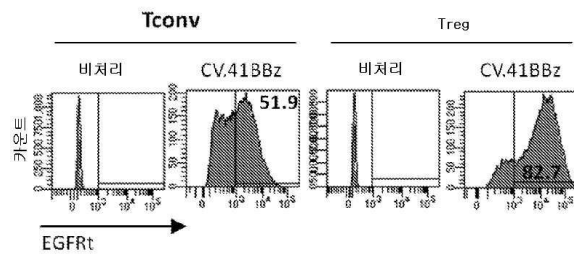
도면11d



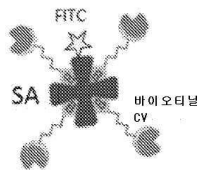
도면12a



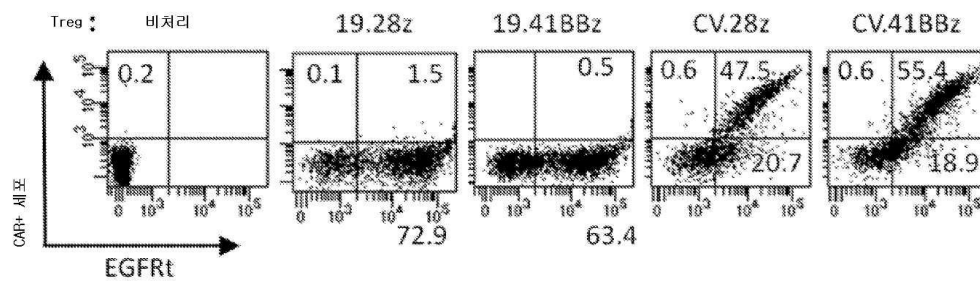
도면12b



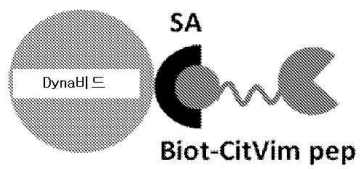
도면12c



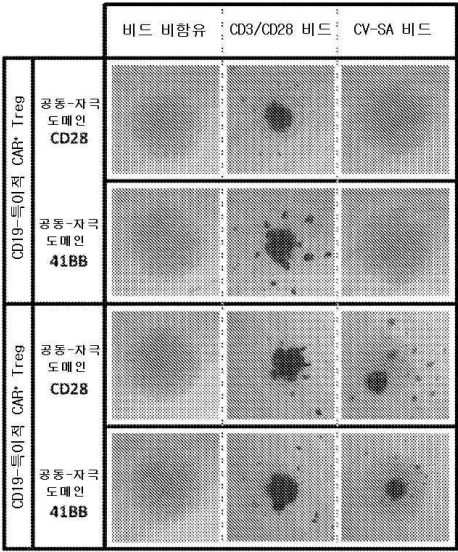
도면12d



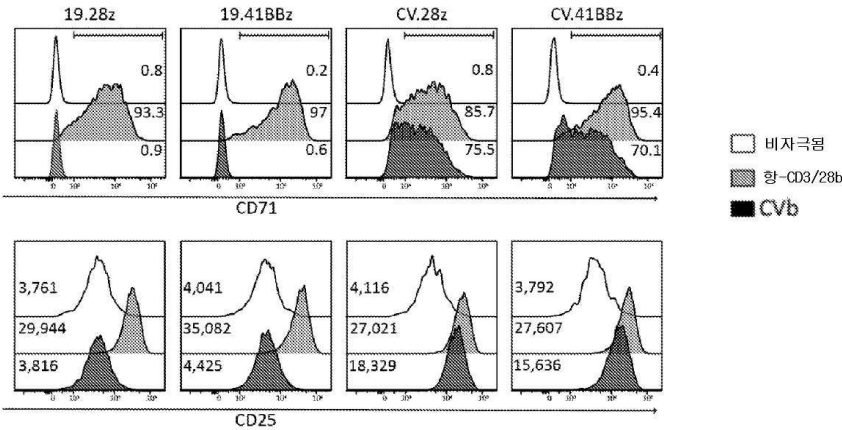
도면13



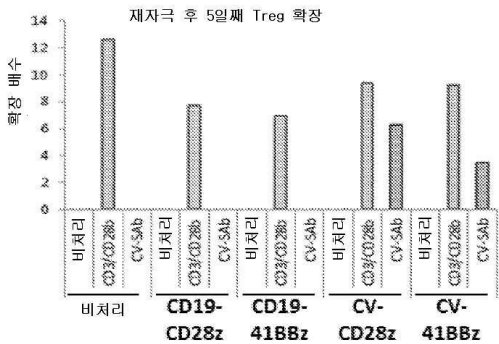
도면14a



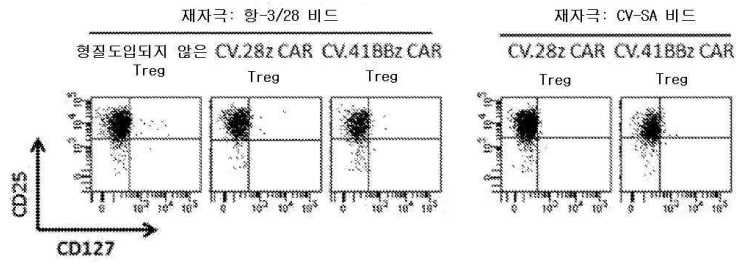
도면14b



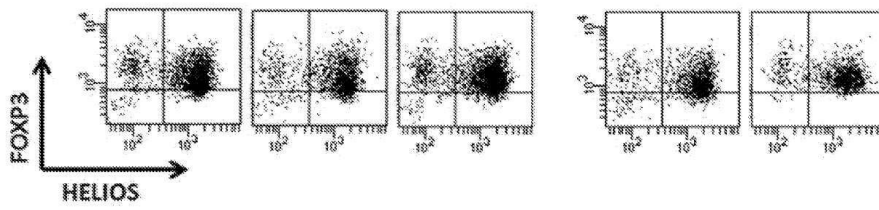
도면14c



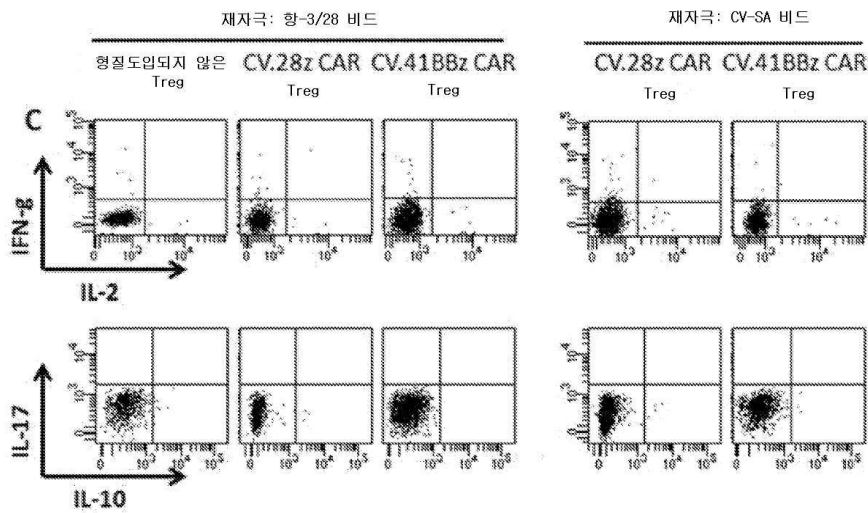
도면15a



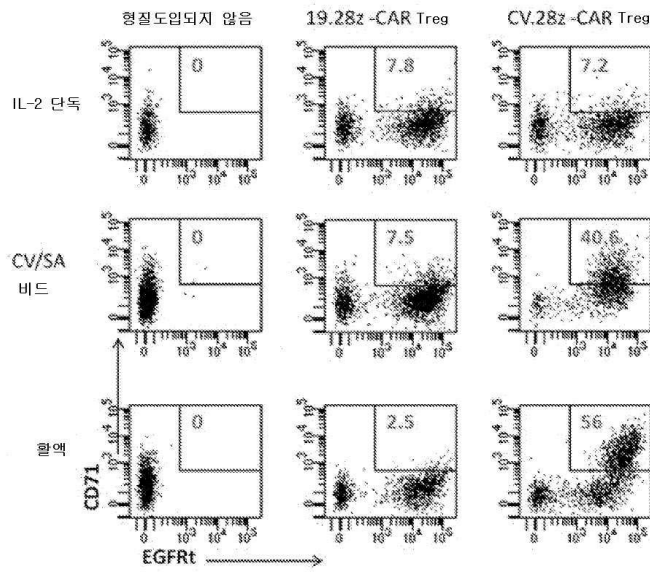
도면15b



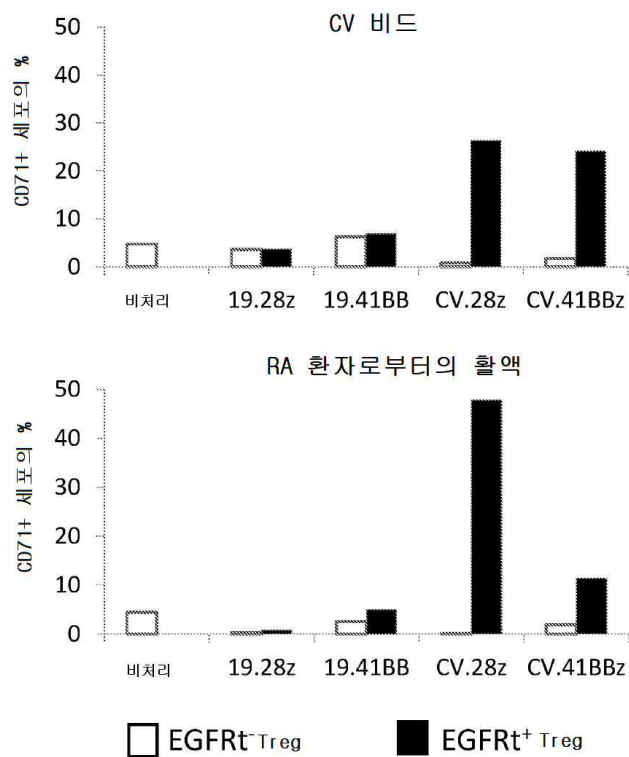
도면15c



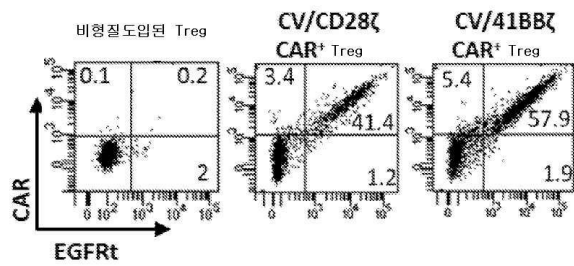
도면16a



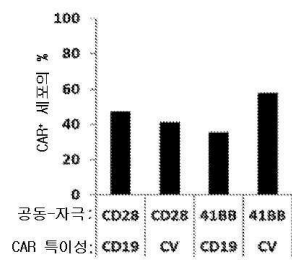
도면16b



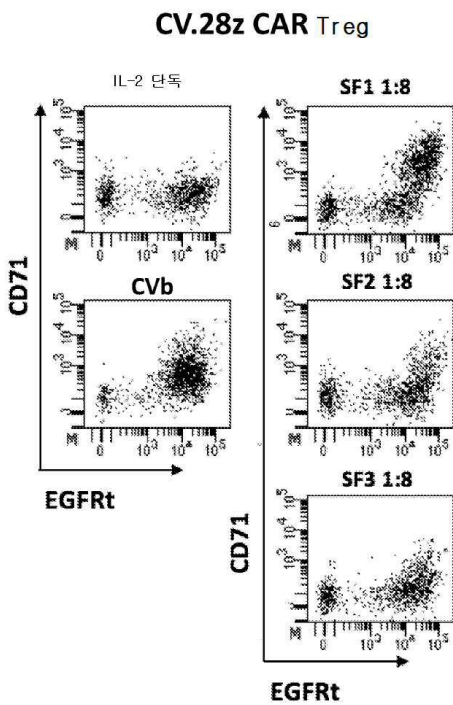
도면17a



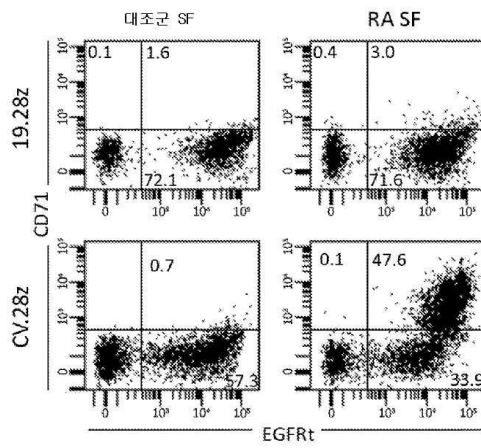
도면17b



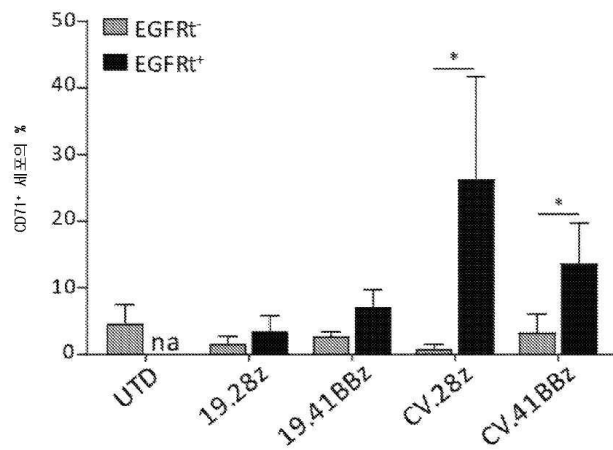
도면18a



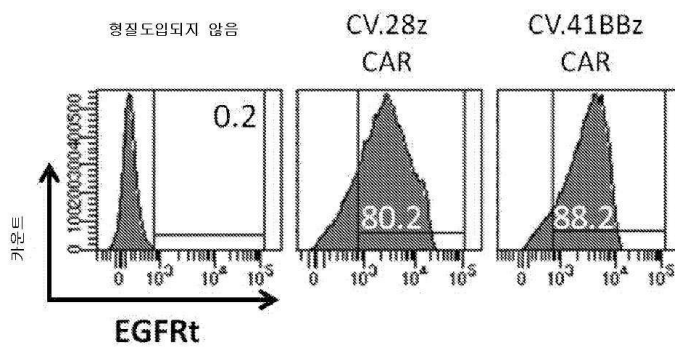
도면18b



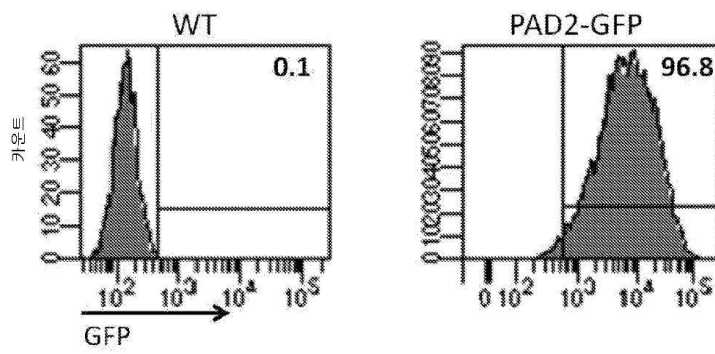
도면18c



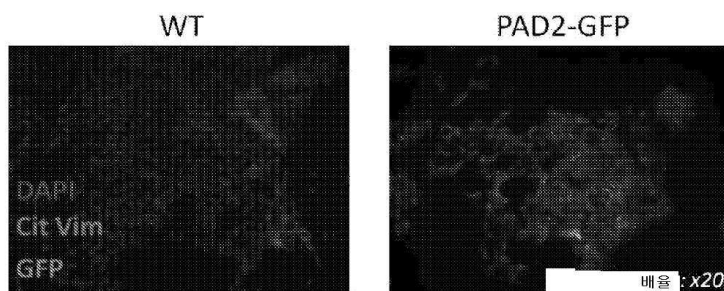
도면19



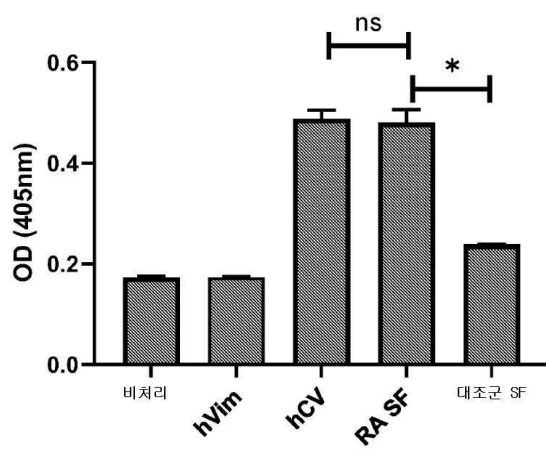
도면20a



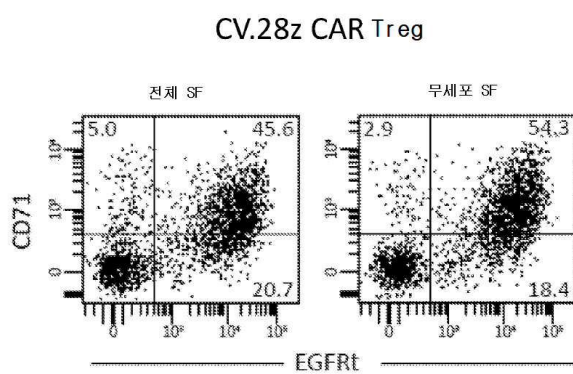
도면20b



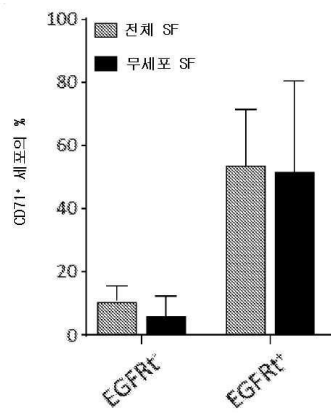
도면21



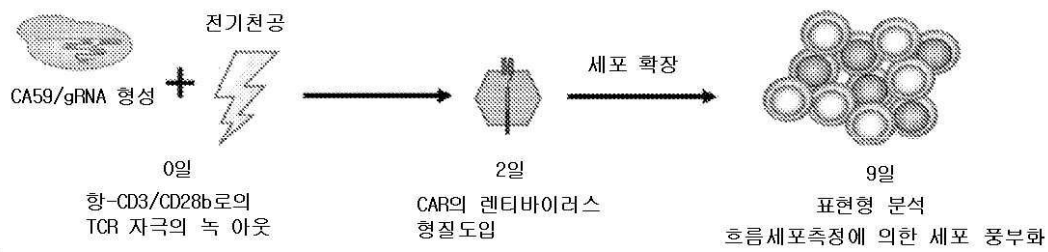
도면22a



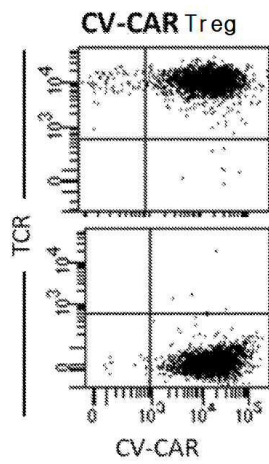
도면22b



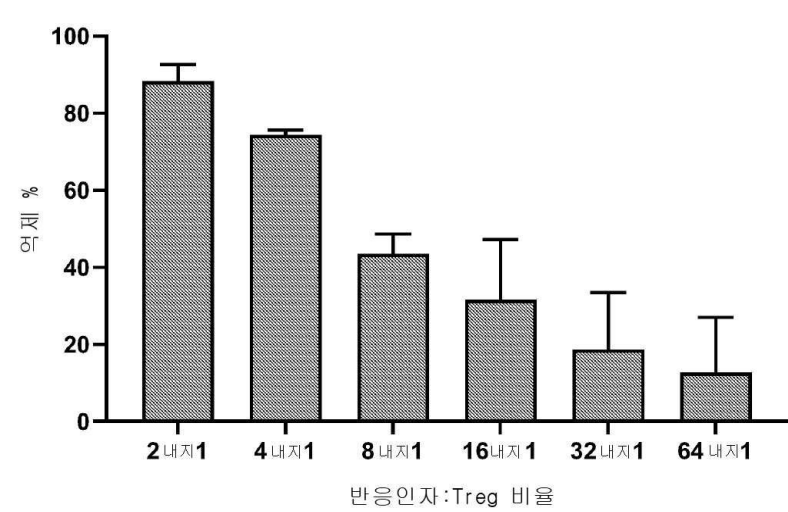
도면23a



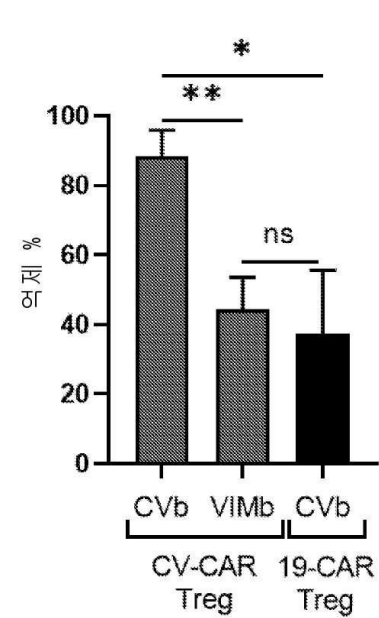
도면23b



도면24a



도면24b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA

<120> CAR-T CELLS AND AUTOIMMUNE DISEASES

<130> 048536-613001WO

<140> PCT/US2019/017532

<141> 2019-02-11

<150> 62/629,103

<151> 2018-02-11

<160> 23

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9484

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 1

gttagaccag atctgagcct gggagctctc tggctaacta gggaaccac tgcttaagcc	60
tcaataaagc ttgccttgag tgcttcaagt agtgtgtgcc cgtctgttgt gtgactctgg	120
taactagaga tcctcagac ccttttagtc agtgtgaaa atctctagca gtggcgcccg	180
aacagggact tgaagcgaa agggaaacca gaggagctct ctgcagcag gactcggctt	240
gctgaagcgc gcacggcaag aggcgagggg cggcgactgg tgagtacgcc aaaaattttg	300
actagcggag gctagaagga gagagatggg tgcgagagcg tcagtattaa gcgggggaga	360
attagatcga tgggaaaaaa ttcggttaag gccaggggga aagaaaaat ataaattaaa	420
acatatagta tgggcaagca gggagctaga acgattcgca gttaatctg gcctgttaga	480
aacatcagaa ggctgtagac aaatactggg acagctacaa ccatcccttc agacaggatc	540
agaagaactt agatcattat ataatacagt agcaaccctc tattgtgtgc atcaaaggat	600
agagataaaa gacaccaagg aagctttaga caagatagag gaagagcaaa acaaaagtaa	660
gaaaaagca cagcaagcag cagctgacac aggacacagc aatcaggtca gccaaaatta	720
ccctatagtg cagaacatcc aggggcaa at ggtacatcag gccatcac ctagaacttt	780
aatgcatgg gtaaaagtag tagaagagaa ggctttcagc ccagaagtga tacccatgtt	840
ttcagcatta tcagaaggag ccaccccaca agatttaa accatgctaa acacagtggg	900
gggacatcaa gcagccatgc aaatgttaaa agagaccatc aatgaggaag ctgcaggcaa	960
agagaagagt ggtgcagaga gaaaaagag cagtgggaat aggagctttg ttccttgggt	1020
tcttgggagc agcaggaagc actatgggag cagcgtcaat gacgtgacg gtacaggcca	1080
gacaattatt gtctggtata gtgcagcagc agaacaattt gctgagggtt attgaggcgc	1140
aacagcatct gtgcaactc acagtctggg gcatcaagca gctccaggca agaatcctgg	1200
ctgtggaag atacctaa gatcaacagc tcttggggat ttgggggtgc tctggaaaac	1260
tcatttgac cactgctgtg ccttggatct acaaatggca gtattcatcc acaattttaa	1320
aagaaaaggg gggattgggg ggtacagtgc aggggaaaga atagtagaca taatagcaac	1380

agacatacaa actaaagaat tacaaaaaca aattacaaaa attcaaaatt ttcgggttta 1440
 ttacaggac agcagagatc cagtttgggg atcaattgca tgaagaatct gcttagggtt 1500
 aggcgttttg cgtcgttcg cgaggatctg cgatcgctcc ggtgcccgtc agtgggcaga 1560
 gcgcacatcg cccacagtc ccgagaagt gggtggagg gtcggcaatt gaaccgggtgc 1620
 ctagagaagg tggcgcgggg taaactggga aagtgatgtc gtgtactggc tccgcctttt 1680
 tcccagggtt gggggagaac cgtatataag tgcagtagtc gccgtgaacg ttctttttcg 1740
 caacgggttt gccgccagaa cacagctgaa gcttcgaggg gctcgcatct ctcttcacg 1800

 cgcccgcgc cctacctgag gccgccatcc acgccggtt agtcgcgttc tgccgcctcc 1860
 cgctgtggt gcctcctgaa ctgcgtccgc cgtctaggta agtttaaagc tcaggtcgag 1920
 accgggcctt tgcgcggcg tcccttgag cctacctaga ctgagccggc tctccacgt 1980
 ttgctgacc ctgcttgct aactctacgt cttgttttcg ttttctgttc tgcgcgtta 2040
 cagatccaag ctgtgaccgg cgcctacggc tagcgccgcc accatgctgc tgctggtgac 2100
 cagcctgctg ctgtgcgagc tgccccacc cgctttctg ctgatcccc aggtgaaact 2160
 aatagaatct gggggaggct tggttgagcc agggcggtct ctgagactcg cgtgtacaac 2220

 gtcctggattc acctttgccg actacggttt gtcttggttc cgccagggtc ccggcaaggg 2280
 ccttgaatgg gtaggtttca ctggaccgaa acacctcggg gagacaacag aatgcgcccc 2340
 gtcgttgaa gacagatgca ccatctcaag agatgattcc aaaagcacgg tctatctgca 2400
 gatgcacagg ctccaacacg aagacacagc cgtgtacttc tgtgttgac cttggttcgg 2460
 cgacttatta atgtggggcc agggaaacct ggtcaccgtc tctcagcta gtcgggagg 2520
 ctcaacttct ggctccgta agccaggcag cggagaaggt agtagtgat ccgcgcgcgc 2580
 catccagatg acccagtcct catctcct gtctgcatct gttggagaca gagtctccat 2640

 cacttgccgg gcaactcagg acatcagcac atcttttaggc tggatcacc agagaccgg 2700
 gaaagccccg aggtcctga tctatggtgc ttcaaggta caaactgggg tcccatcacg 2760
 attcagcggc aatgggtctg gcacagagt cactctcacc atcagcagcc tgcagcctga 2820
 agatataggg acttattatt gtctacaaga tgatggttc ccgttactg ttggccaggg 2880
 caccaagctg gacatcaaac gcgcggccgc aattgaagt atgtatctc ctcttacct 2940
 agacaatgag aagagcaatg gaaccattat ccatgtgaaa gggaaacacc tttgtccaag 3000
 tcccctatth cccggacctt ctaagccctt ctgggtgctg gtggtggtcg gaggcgtgct 3060

 ggctgctac agcctgctgg tcaccgtggc ctctcatc ttttgggtga ggagtaagag 3120
 gagcaggctc ctgcacagt actacatgaa catgactccc cgccgcccc ggcccaccg 3180
 caagcattac cagccctatg ccccaccacg cgacttcgca gcctatcgt cccgggtgaa 3240

gttcagcaga agcgccgacg cccctgccta ccagcagggc cagaatcagc tgtacaacga 3300

gctgaacctg ggcagaaggg aagagtacga cgtcctggat aagcggagag gccgggaccc 3360

tgagatgggc ggcaagcctc ggcggaagaa cccccaggaa ggctgtata acgaactgca 3420

gaaagacaag atggccgagg cctacagcga gatcggcatg aagggcgagc ggaggcgggg 3480

caagggccac gacggcctgt atcagggcct gtccaccgcc accaaggata cctacgacgc 3540

cctgcacatg caggccctgc cccaaggct cgagggcggc ggagagggca gaggaagtct 3600

tctaactatg ggtgacgtgg aggagaatcc cgccctagg atgcttctcc tggtgacaag 3660

ccttctgtct tgtgagttac cacaccagc attcctctg atcccacga aagtgtgtaa 3720

cggaataggt attggtgaat ttaaagactc actctccata aatgctacga atattaaaca 3780

cttcaaaaac tgcacctcca tcagtggcga tctccacatc ctgccggtgg catttagggg 3840

tgactccttc acacatactc ctctctgga tccacaggaa ctggatatc tgaaaaccgt 3900

aaaggaaatc acagggtttt tgctgattca ggcttggcct gaaaacagga cggacctcca 3960

tgcttttag aacctagaaa tcatacgcgg caggaccaag caacatggc agttttctct 4020

tgcatcgtc agcctgaaca taacatcctt gggattacgc tccctcaagg agataagtga 4080

tggagatgtg ataatttcag gaaacaaaaa ttgtgtctat gcaaatacaa taaactggaa 4140

aaaactgttt gggacctccg gtcagaaaac caaaattata agcaacagag gtgaaaacag 4200

ctgaaggcc acaggccagg tctgccatgc ctgtgtctcc ccgagggtc gctggggccc 4260

ggagcccagg gactgcgtct cttgccgga tgtcagccga ggcagggaat gcgtggacaa 4320

gtgcaacctt ctggagggtg agccaaggga gtttgtggag aactctgagt gcatacagtg 4380

ccaccagag tgctgcctc aggccatgaa catcacctgc acaggacggg gaccagacaa 4440

ctgtatccag tgtgccact acattgacgg ccccaactgc gtcaagacct gcccgccagg 4500

agtcatggga gaaaacaaca ccctggtctg gaagtacga gacgccggcc atgtgtgcca 4560

cctgtgcat ccaaactgca cctacggatg cactgggcca ggtcttgaag gctgtccaac 4620

gaatgggcct aagatccgt ccatgccac tgggatgggt ggggccctcc tcttctgtct 4680

ggtggtggcc ctggggatcg gcctcttcat gtgagcggcc gctctagacc cgggctgcag 4740

gaattcgata tcaagcttat cgataatcaa cctctggatt acaaaatttg tgaaagattg 4800

actggtatc ttaactatg tctcctttt acgctatgtg gatacgtgc tttaatgcct 4860

ttgtatcat ctattgctc ccgtatggct ttcattttct cctccttgta taaatcctgg 4920

ttgtgtctc tttatgagga gttgtggccc gttgtcaggc aacgtggcgt ggtgtgcact 4980

gtgtttgctg acgcaacccc cactggttgg ggcattgcca ccacctgtca gctcctttcc 5040

gggactttcg ctttccccct ccctattgcc acggcggaac tcacgccgc ctgccttgcc 5100

cgctgctgga caggggctcg gctgttgggc actgacaatt ccgtggtgtt gtcggggaaa 5160

tcacgtcctt ttccttggct gctgcctgti gttgccacct ggattctgcg cgggacgtcc 5220

ttctgtacg tcccttcggc cctcaateca gcggaccttc cttcccgcgg cctgctgccg 5280

gctctgcggc ctcttcgcg tcttcgcctt cgcctcaga cgagtcggat ctccctttgg 5340

gccgcctccc cgcacgata ccgtcgacta gccgtacctt taagaccaat gacttacaag 5400

gcagctgtag atcttagcca ctttttaaaa gaaaaggggg gactggaagg gctaattcac 5460

tcccaaagaa gacaagatct gctttttgcc tgtactgggt ctctctggtt agaccagatc 5520

tgagcctggg agctctctgg ctaactaggg aaccactgc ttaagcctca ataaagcttg 5580

cccttagtgct ttcaagtagt gtgtgcccgt ctgttgtgtg actctggtaa ctagagatcc 5640

ctcagaccct tttagtcagt gtggaaaatc tctagcagaa ttcgatatca agcttatcga 5700

taccgtgcac ctcgaggggg ggcccggtag ccaattcgcc ctatagttag tcgtattaca 5760

attcactggc cgtcgtttta caacgtcgtg actgggaaaa ccttggcgtt acccaactta 5820

atcgcttgc agcacatccc cttttcgcca gctggcgtaa tagcgaagag gcccgaccg 5880

atcgcccttc ccaacagtig cgcagcctga atggcgaatg gaaattgtaa gcgttaatat 5940

tttgtaaaaa ttcgcgttaa atttttgtta aatcagctca tttttaacc aataggccga 6000

aatcgcaaaa atcccttata aatcaaaaga atagaccgag atagggttga gtgttgttcc 6060

agtttgaac aagagtccac tattaaagaa cgtggactcc aacgtcaaag ggcgaaaaac 6120

cgtctatcag ggcgatggcc cactacgtga accatacccc taatcaagtt ttttggggtc 6180

gaggtgccgt aaagcaactaa atcggaaccc taaagggagc ccccgattta gagcttgacg 6240

gggaaagccg gcgaacgtgg cgagaaagga agggaagaaa gcgaaaggag cgggcgctag 6300

ggcgctggca agttagtcgg tcacgtgcg cgtaaccacc acaccgcgg cgcttaatgc 6360

gccgctacag ggcgctcag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg 6420

tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgtcatg agacaataac cctgataaat 6480

gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gattattcaa catttcctg tcgcccttat 6540

tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt 6600

aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaaactgg atctcaacag 6660

cggtaagatc cttgagagtt ttgcctccga agaactttt ccaatgatga gcacttttaa 6720

agttctgcta tgtggcgcggt tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc aactcggtcg 6780

ccgcatacac tattctcaga atgacttgggt tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct 6840

tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgtgcc ataaccatga gtgataaac	6900
tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca	6960
caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat	7020
accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact	7080
attaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc	7140
ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgtc ggcccttcg gctggctggt ttattgtga	7200
taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg	7260
taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg	7320
aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac tgtcagacca	7380
agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta	7440
ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt ttctgttcca	7500
ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg	7560
cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgtacca gcggtgggtt gtttgccgga	7620
tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agataccaaa	7680
tactgttctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcacgcc	7740
tacatacttc gctctgctaa tctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg	7800
tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggg cgggctgaac	7860
gggggggttc tgcacacagc ccagcttga gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct	7920
acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgt tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc	7980
ggtaacgggc agggctggaa caggagagcg cagcaggag cttccagggg gaaacgcctg	8040
glatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg	8100
ctcgtcaggg ggcgggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct	8160
ggccttttgc tggccttttg ctacatgtt ctttctgcg ttatcccctg attctgtgga	8220
taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgtctgc cgcagccgaa cgaccgagcg	8280
cagcagtgca gtgagcgagg aagcggaaga gcgccaata cgcaaaccgc ctctccccgc	8340
gcgttggccg attcattaat gcagctggca cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag	8400
tgagcgaac gcaattaat tgagttagct cactcattag gcaccccagg ctttacattt	8460
tatgcttccg gctcgtatgt tgtgtggaat tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa	8520
cagctatgac catgattacg ccaagctcga aattaaccct cactaaaggg aacaaaagct	8580
ggagctccac cgcggtggcg gcctcgaggt cgagatccgg tcgaccagca accatagtec	8640
cgcccctaac tccgcccac cgcgccctaa ctccgcccag ttccgcccac tctccgcccc	8700

atggctgact aatttttttt atttatgcag aggccgaggc cgcctcggcc tctgagctat 8760
tccagaagta gtgaggaggc ttttttggag gcctaggttt ttgcaaaaag cttcgacggt 8820
atcgattggc tcatgtccaa cattaccgcc atgttgacat tgattattga ctagttatta 8880
atagtaatca attacggggg cattagttca tagcccatat atggagttcc gcgttacata 8940

acttacggtta aatggccgcg ctggctgacc gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat 9000
aatgacgtat gttcccatag taacccaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga 9060
glattttacgg taaactgccc acttggcagc acatcaagt tatcatatgc caagtacgcc 9120
ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat tatgccagc acatgacctt 9180
atgggacttt cctacttggc agtacatctc cgtattagtc atcgctatta ccatggtgat 9240
gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg gatttccaag 9300
tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaaatcaac gggactttcc 9360

aaaatgtcgt aacaactccg ccccatgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacggaattc 9420
ggagtggcga gccctcagat cctgcatata agcagctgct ttttgctgt actgggtctc 9480
tctg 9484

<210> 2
<211> 9487
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 2

gttagaccag atctgagcct gggagctctc tggctaacta gggaaccac tgcttaagcc 60
tcaataaagc ttgccttgag tgcttcaagt agtgtgtgcc cgtctgttgt gtgactctgg 120

taactagaga tccctcagac ccttttagtc agtgtggaat atctctagca gtggcgcccc 180
aacagggact tgaaagcgaa agggaaacca gaggagctct ctcgacgcag gactcggctt 240
gctgaagcgc gcacggcaag aggcgagggg cggcgactgg tgagtlacgc aaaaattttg 300
actagcggag gctagaagga gagagatggg tgcgagagcg tcagtattaa gcggggggaga 360
attagatcga tgggaaaaaa ttcggttaag gccaggggga aagaaaaat ataaattaaa 420
acatatagta tgggcaagca gggagctaga acgattcgca gttaatcctg gcctgttaga 480
aacatcagaa ggctgtagac aaatactggg acagctacaa ccatcccttc agacaggatc 540

agaagaactt agatcattat ataatacagt agcaaccctc tattgtgtgc atcaaaggat 600

agagataaaa gacaccaagg aagctttaga caagatagag gaagagcaaa acaaaagtaa 660
 gaaaaaagca cagcaagcag cagctgacac aggacacagc aatcaggtca gccaaaatta 720
 ccctatagtg cagaacatcc aggggcaaat ggtacatcag gccatatcac ctagaacttt 780
 aaatgcatgg gtaaaagtag tagaagagaa ggctttcagc ccagaagtga tacccatgtt 840
 ttcagcatta tcagaaggag ccaccccaca agatttaaac accatgctaa acacagtggg 900
 gggacatcaa gcagccatgc aaatgttaaa agagaccatc aatgaggaag ctgcaggcaa 960

 agagaagagt ggtgcagaga gaaaaagag cagtgggaat aggagctttg ttccttgggt 1020
 tcttgggagc agcaggaagc actatgggag cagcgtcaat gacgctgacg gtacaggcca 1080
 gacaattatt gtctggata gtgcagcagc agaacaattt gctgagggtt attgaggcgc 1140
 aacagcatct gtgcaactc acagtctggg gcatcaagca gctccaggca agaatcctgg 1200
 ctgtggaaag atacctaag gatcaacagc tcttggggat ttgggggttc tctggaaaac 1260
 tcatttgac cactgctgtg ccttggatct acaaatggca gtattcatcc acaattttaa 1320
 aagaaaagg gggattgggg ggtacagtgc aggggaaaga atagtagaca taatagcaac 1380

 agacatacaa actaaagaat taaaaaaca aattacaaaa attcaaaatt ttcgggttta 1440
 ttacagggac agcagagatc cagtttgggg atcaattgca tgaagaatct gcttaggggt 1500
 aggcgttttg cgtgcttcg cgaggatctg cgatcgctcc ggtgcccgtc agtgggcaga 1560
 gcgcacatcg cccacagtc ccgagaagt gggtggggagg gtcggcaatt gaaccggtgc 1620
 ctagagaagg tggcgcgagg taaactggga aagtgatgtc gtgtactggc tccgcctttt 1680
 tcccagggtt gggggagaac cgtatataag tgcagtagtc gccgtgaacg ttctttttcg 1740
 caacgggttt gccgcagaa cacagctgaa gcttcgagg gctcgcatct ctccttcacg 1800

 cgcccgcgc cctacctgag gccgcatcc acgcccgttg agtcgcgttc tgccgcctcc 1860
 cgctgtggt gcctcctgaa ctgcgtccgc cgtctaggta agtttaaagc tcaggtcgag 1920
 accgggcctt tgcggcgcc tcccttgag cctacctaga ctgagccgc tctccacgt 1980
 ttgctgacc ctgcttgc cactctacgt ctttgtttcg ttttctgttc tgcgcccgtta 2040
 cagatccaag ctgtgaccg gcctacggc tagcgccgc accatgctgc tgctggtgac 2100
 cagcctgctg ctgtgcgagc tgccccacc cgctttctg ctgatcccc aggtgaaact 2160
 aatagaatct gggggaggct tggttgagc agggcggtct ctgagactcg cgtgtacaac 2220

 gtctggattc acctttgcc actacggttt gtctgtgttc cgccagggtc cggcaagggt 2280
 ccttgaatgg gtaggtttca ctggaccgaa acacctcgtt gagacaacag aatgcgcccc 2340
 gtctgtggaa gacagatgca ccatctcaag agatgattcc aaaagcacg tctatctgca 2400
 gatgcacagg ctccaacacg aagacacagc cgtgtacttc tgtgttgac cttggttcgg 2460

cgacttatta atgtggggcc aggggaaccct ggtcaccgtc tcctcagcta gctccggagg	2520
ctcaacttct ggctccgcta agccaggcag cggagaaggt agtagtggat ccgcgcgcgc	2580
catccagatg acccagtctc catcctccct gtcctgcatct gttggagaca gagtctccat	2640
cacttgccgg gcaactcagg acatcagcac atcttttaggc tggatcacc agagaccgg	2700
gaaagcccc aggtctctga tctatggtgc ttcgaaggta caaactgggg tcccatcacg	2760
attcagcggc aatgggtctg gcacagagtt cactctcacc atcagcagcc tgcagcctga	2820
agatataggg acttattatt gtctacaaga tgatggtttc ccgttactg ttggccaggg	2880
caccaagctg gacatcaaac gcgcggccgc aattgaagtt atgtatectc ctctttacct	2940
agacaatgag aagagcaatg gaaccattat ccatgtgaaa gggaacacc ttgtccaag	3000
tcccctattt cccggacctt ctaagccctt ctgggtgctg gtggtggtcg gaggcgtgct	3060
ggcctgctac agcctgtctg tcaccgtggc ctctcatc ttttgggtga aacggggcag	3120
aaagaaactc ctgtatatat tcaacaacc atttatgaga ccagtaaaaa ctactcaaga	3180
ggaagatggc ttagctgcc gatttccaga agaagaagaa ggaggatgtg aactgcgggt	3240
gaagttcagc agaagcgccg acgcccctgc ctaccagcag ggccagaatc agctgtacaa	3300
cgagctgaac ctgggcagaa gggaagagta cgacgtcctg gataagcgga gaggcggga	3360
ccctgagatg ggcggaagc ctgcggcgaa gaacccccag gaaggcctgt ataacgaact	3420
gcagaaagac aagatggccg aggcctacag cgagatcggc atgaaggcg agcggaggcg	3480
gggcaagggc cagcagggc tgtatcagg cctgtccacc gccaccaagg atacctacga	3540
cgccctgcac atgcaggccc tgcccccaag gctcgagggc ggcgagagg gcagaggaag	3600
tcttctaaca tgcggtgacg tggaggagaa tcccggccct aggatgcttc tcctggtgac	3660
aagccttctg ctctgtgagt taccacacc agcattctc ctgatccac gcaaagtgtg	3720
taacggaata ggtattggtg aatttaaaga ctactctcc ataatgcta cgaatattaa	3780
acacttcaaa aactgcacct ccatcagtgg cgatctccac atcctgccgg tggcatttag	3840
gggtgactcc ttacacata ctctctctt ggatccacag gaactggata ttctgaaaac	3900
cgtaaaggaa atcacagggt ttttctgat tcaggcttgg cctgaaaaca ggacggacct	3960
ccatgccttt gagaacctag aaatcatag cggcaggacc aagcaacatg gtcagttttc	4020
tcttgacgc gtcagccta acataacatc ctgggatta cgctccctca aggagataag	4080
tgatggagat gtgataattt caggaaacaa aaatttgtgc tatgcaaata caataaactg	4140
gaaaaaactg tttgggacct ccggtcagaa aaccaaatt ataagcaaca gaggtgaaaa	4200
cagctgcaag gccacaggcc aggtctgcc tgccttgtgc tccccgagg gctgctgggg	4260

cccggagccc agggactgcg tctcttgccg gaatgtcagc cgaggcaggg aatgcgtgga 4320

 caagtgaac ctcttgagg gtgagccaag ggagtttgtg gagaactctg agtgcataca 4380
 gtgccacca gagtgcctgc ctcaggccat gaacatcacc tgcacaggac ggggaccaga 4440
 caactgtatc cagtgtgccc actacattga cggccccac tgcgtcaaga cctgcccggc 4500
 aggagtcagt ggagaaaaca acacctggt ctggaagtac gcagacgccg gccatgtgtg 4560
 ccacctgtgc catccaaact gcacctacgg atgcactggg ccaggtcttg aaggtgtcc 4620
 aacgaatggg cctaagatcc cgtccatcgc cactgggatg gtgggggccc tctcttgct 4680
 gctggtggtg gccctgggga tcggcctctt catgtgagcg gccgctctag acccgggctg 4740

 caggaattcg atatcaagct tatcgataat caacctctgg attacaaaat ttgtgaaaga 4800
 ttgactggta ttcttaacta tgttgcctct ttacgctat gtggatacgc tgctttaatg 4860
 cctttgtatc atgctattgc ttcccgatg gctttcattt tctcctcctt gtataaatcc 4920
 tggttgctgt ctctttatga ggagtgtggt cccgttgtca ggcaacgtgg cgtggtgtgc 4980
 actgtgtttg ctgacgaac cccactggt tggggcattg ccaccacctg tcagtcctt 5040
 tccgggactt tcgctttccc cctccctatt gccacggcgg aatcatcgc cgcctgcctt 5100
 gcccgtgct ggacaggggc tcggctgttg ggcaactgaca attccgtggt gttgtcgggg 5160

 aaatcatcgt cctttccttg gctgctgcc tgtgttgcca cctggattct gcgcgggacg 5220
 tccttctgct acgtcccttc ggccctcaat ccagcggacc ttccttcccg cggcctgctg 5280
 ccggctctgc ggctcttcc gcgtcttcgc ctgcgccctc agacgagtcg gatctccctt 5340
 tgggcgcct cccgcacgc ataccgtcga ctagccgtac ctttaagacc aatgacttac 5400
 aaggcagctg tagatcttag ccacttttta aaagaaaagg ggggactgga agggctaatt 5460
 cactcccaaa gaagacaaga tctgcttttt gcctgtactg ggtctctctg gtttagaccag 5520
 atctgagcct gggagctctc tggctaacta gggaaccac tgcttaagcc tcaataaagc 5580

 ttgccttgag tgcttcaagt agtgtgtgcc cgtctgttgt gtgactctgg taactagaga 5640
 tccctcagac ccttttagtc agtgtggaaa atctctagca gaattcgata tcaagcttat 5700
 cgataaccgtc gacctcagg gggggcccgg tacccaattc gccctatagt gagtctgatt 5760
 acaattcact ggccgtcgtt ttacaacgtc gtgactggga aaacctggc gttaccaac 5820
 ttaatcgct tcgacacat ccccttttcg ccagctggcg taatagcgaa gaggcccga 5880
 ccgatcgccc ttccaacag ttgcgcagcc tgaatggcga atggaaattg taagcgtaa 5940
 tattttgtta aaattcgct taaatttttg ttaaatcagc tcatttttta accaataggc 6000

cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa agaatagacc gagatagggt tgagtgttgt	6060
tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa gaacgtggac tccaacgtca aaggcgcaaa	6120
aaccgtctat caggcgcatg gccactacg tgaacatca ccctaatcaa gttttttggg	6180
gtcgaggtgc cgtaaagcac taaatcggaa ccctaaaggg agcccccgat ttagagcttg	6240
acggggaaag ccggcgaacg tggcgagaaa ggaagggaag aaagcgaaag gagcgggcgc	6300
tagggcgctg gcaagtgtag cggtcacgct gcgcgtaacc accacaccg ccgcgcttaa	6360
tgcgccgcta caggcgcgct cagggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg gaaccctat	6420
ttgtttatth ttttaaatac attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aaccctgata	6480
aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgccct	6540
tattcccttt ttigcggcat ttigccttcc tgtttttgct caccagaaa cgctggtgaa	6600
agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa	6660
cagcggtaaag atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt	6720
taaagttctg ctatgtggcg cggattatc ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg	6780
tcgccgata cactattctc agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca	6840
tcttacggat ggcatgacag taagagaatt atgcagtgtc gccataacca tgagtataa	6900
cactcgggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt	6960
gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc	7020
catacctaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgtagca atggcaaca cgttgcgcaa	7080
actattaact ggcgaactac ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga	7140
ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctcgccctt ccggttggtt ggtttattgc	7200
tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga	7260
tggtaaagccc tcccgtatcg tagttatcta cagcaggggg agtcaggcaa ctatggatga	7320
acgaaataga cagatcgtg agatagggtc ctactgatt aagcattggt aactgtcaga	7380
ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt catthttaat ttaaaaggat	7440
ctaggtgaag atcctttttg ataatctcat gacaaaaac ccttaacgtg agttttcgtt	7500
ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc cttttttct	7560
gcgcgtaate tgcgtcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcggtgg tttgtttgcc	7620
ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc	7680
aaatactgtt cttctagtg agccgtagt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc	7740
gcctacatac ctgcctctgc taatcctgtt accagtggct gctgccagt gcgataagtc	7800
gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccgat aaggcgcagc ggtcgggctg	7860

aacggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata 7920
 cctacagcgt gagctatgag aaagcgccac gcttcccgaa gggagaaaagg cggacaggta 7980
 tccggtaaagc ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc 8040
 ctggtatctt tatagtctcg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatTTTTgtg 8100

 atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcgcct ttttacggtt 8160
 cctggccttt tgcctggcctt ttgctcacat gtcttttctt gcgttatccc ctgattctgt 8220
 ggataaccgt attaccgcct ttgagttagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga 8280
 gcgcagcgag tcagttagcg aggaagcgga agagcgccca atacgcaaac cgcctctccc 8340
 cgcgcttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg tttcccgact ggaaagcggg 8400
 cagttagcgc aacgcaatta atgtgagtt gctcactcat taggcacccc aggccttaca 8460
 ctttatgctt ccggctcgta tgttgtgtgg aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg 8520

 aaacagctat gaccatgatt acgccaagct cgaaattaac ctcactaaa gggaacaaaa 8580
 gctggagctc caccgcggtg gcggcctcga ggtcgagatc cggtcgacca gcaaccatag 8640
 tcccgcctt aactccgcc atcccgcctc taactccgcc cagttccgcc cattctccgc 8700
 cccatggctg actaattttt tttatttatg cagaggccga ggccgcctcg gcctctgagc 8760
 tattccagaa gtagtgagga ggcttttttg gaggcctagg cttttgcaa aagcttcgac 8820
 ggtatcgatt ggctcatgct caacattacc gccatgttga cattgattat tgactagtta 8880
 ttaatagtaa tcaattacgg ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac 8940

 ataacttacg gtaaatggcc cgctggctg accgccaac gaccccgcc cattgacgtc 9000
 aataatgacg taigtccca tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt 9060
 ggagtattta cggtaaacgt cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac 9120
 gccccctatt gacgtcaatg acggtaaatg gcccgctgg cattatgccc agtacatgac 9180
 cttatgggac ttctctactt ggcagtacat ctacgtatta gtcacgcta ttaccatggt 9240
 gatcggtttt tggcagtaca tcaatgggcg tggatagcgg tttgactcac ggggatttcc 9300
 aagtctccac cccattgacg tcaatgggag tttgttttgg caccaaaatc aacgggactt 9360

 tccaaaatgt cgtaacaact ccgccccatt gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacggaa 9420
 ttcggagtgg cgagccctca gatcctgcat ataagcagct gctttttgcc tgtactgggt 9480
 ctctctg 9487

 <210> 3
 <211> 16
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Val Tyr Ala Thr Arg Ser Ser Ala Val Arg Leu Arg Ser Ser Val Pro

1 5 10 15

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 4

Ala Tyr Val Thr Arg Ser Ser Ala Val Arg Leu Arg Ser Ser Val Pro

1 5 10 15

<210> 5

<211> 1419

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 5

gaggtgaaac taatagaatc tgggggaggc ttggttgagc cagggcggtc tctgagactc 60
gcgtgtacaa cgtctggatt cacctttgcc gactacggtt tgtcctggtt ccgccagggt 120
cccggcaagg gccttgaatg ggtaggtttc actggaccga aacacctcgg tgagacaaca 180
gaatgcgccc cgtctgtgga agacagatgc accatctcaa gagatgattc caaaagcacc 240

gtctatctgc agatgcacag gctccaacac gaagacacag ccgtgtactt ctgtgttgga 300
ccttggttcg gcgacttatt aatgtggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctcagct 360
agctccggag gctcaacttc tggctccggt aagccaggca gcggagaagg tagtagtgga 420
tccgcgcgcg ccatccagat gacccagtct ccctctccc tgtctgcatc tgttgagac 480
agagtctcca tcaactgccg ggcaactcag gacatcagca catctttagg ctggtatcac 540
cagagaccgg ggaagcccc gaggtcctg atctatggtg cttcgaaggt acaaactggg 600
gtcccatcac gattcagcgg caatgggtct ggcacagagt tcactctcac catcagcagc 660

ctgcagcctg aagatatagg gacttattat tgtctacaag atgatggttt cccgttcact 720
gttggccagg gcaccaagct ggacatcaaa cgcgcggccg caattgaagt tatgtatcct 780
ctccttacc tagacaatga gaagagcaat ggaaccatta tccatgtgaa agggaaacac 840

ctttgtccaa gtcccttatt tcccggacct tctaagccct tctgggtgct ggtgggtggtc 900
ggaggcgtgc tggcctgcta cagcctgctg gtcaccgtgg ccttcacatc cttttgggtg 960
aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgccgcccc 1020
gggccccccc gcaagcatta ccagccctat gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc 1080

tcccggtga agttcagcag aagcgccgac gccctgcct accagcaggg ccagaatcag 1140
ctgtacaacg agctgaacct gggcagaagg gaagagtacg acgtcctgga taagcggaga 1200
ggccgggacc ctgagatggg cggcaagcct cggcggaaga acccccagga aggcctgtat 1260
aacgaactgc agaaagacaa gatggccgag gcctacagcg agatcgcat gaaggcgag 1320
cggaggcggg gcaagggccca cgacggcctg tatcagggcc tgtccaccgc caccaaggat 1380
acctacgacg ccctgcacat gcaggccctg cccccaagg 1419

<210> 6

<211> 1422

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 6

gaggtgaaac taatagaatc tgggggaggc ttggttgagc cagggcggtc tctgagactc 60
gcgtgtacaa cgtctggatt cacctttgcc gactacggtt tgtcctggtt ccgccagggt 120
cccggcaagg gccttgaatg ggtaggtttc actggaccga aacacctcgg tgagacaaca 180
gaatgcgcc cgtctgtgga agacagatgc accatctcaa gagatgattc caaaagcacc 240
gtctatctgc agatgcacag gctccaacac gaagacacag ccgtgtactt ctgtgttga 300
ccttggttcg gcgacttatt aatgtggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctcagct 360

agctccggag gctcaacttc tggctccggt aagccaggca gcggagaagg tagtagtgga 420
tccgcgcgcg ccattccagat gaccagctct ccactctccc tgtctgcatc tgttgagac 480
agagtctcca tcaattgccg ggcaactcag gacatcagca catctttagg ctggtatcac 540
cagagacccc ggaagcccc gaggtcctg atctatggtg cttcgaaggt aaaaactggg 600
gtcccatcac gattcagcgg caatgggtct ggcacagagt tcaactctac catcagcagc 660
ctgcagcctg aagatatagg gacttattat tgtctacaag atgatggttt cccgttcact 720
gttggccagg gcaccaagct ggacatcaaa cgcgcggccg caattgaagt tatgtatcct 780

cctccttacc tagacaatga gaagagcaat ggaaccatta tccatgtgaa agggaaacac 840

ctttgtccaa gtcccttatt tcccggacct tctaagccct tctgggtgct ggtgggtggtc 900
ggaggcgtgc tggcctgcta cagcctgctg gtcaccgtgg ccttcatcat cttttgggtg 960
aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa 1020
actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt 1080
gaactgctgg tgaagttcag cagaagcgcc gacgccctg cctaccagca gggccagaat 1140
cagctgtaca acgagctgaa cctgggcaga aggaagagt acgacgtcct ggataagcgg 1200

agaggccggg accctgagat gggcggcaag cctcggcgga agaaccacca ggaaggcctg 1260
tataacgaac tgcagaaaga caagatggcc gaggcctaca gcgagatcgg catgaagggc 1320
gagcggaggc ggggcaaggc ccacgacggc ctgtatcagg gcctgtccac cgccaccaag 1380
gatacctacg acgccctgca catgcaggcc ctgccccaa gg 1422

<210> 7

<211> 762

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 7

gaggtgaaac taatagaatc tgggggaggc ttggttgagc cagggcggtc tctgagactc 60

gcgtgtacaa cgtctggatt cacctttgcc gactacggtt tgtcctggtt ccgccagggt 120
cccggaagg gccttgaatg ggtaggtttc actggaccga aacacctcgg tgagacaaca 180
gaatgcgcc cgtctgtgga agacagatgc accatctcaa gagatgattc caaaagcacc 240
gtctatctgc agatgcacag gctccaacac gaagacacag ccgtgtactt ctgtgttgga 300
ccttggttcg gcgacttatt aatgtggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctcagct 360
agctccggag gctcaacttc tggctccggt aagccaggca gcggagaagg tagtagtgga 420
tccgcgcgcg ccattccagat gaccagctct ccattctccc tgtctgcac tggttgagac 480

agagtctcca tcaattgccg ggcaactcag gacatcagca catctttagg ctggtatcac 540
cagagacccg ggaagcccc gaggtcctg atctatggtg cttcgaaggt aaaaactggg 600
gtcccatcac gattcagcgg caatgggtct ggcacagagt tcactctcac catcagcagc 660
ctgcagcctg aagatatagg gacttattat tgtctacaag atgatggttt cccgttcact 720
gttggccagg gcaccaagct ggacatcaaa cgcgcggccg ca 762

<210> 8

<211> 117

<212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 8
 attgaagtta tgiatcctcc tccttiaccta gacaatgaga agagcaatgg aaccattatc 60

 catgtgaaag ggaacacact ttgtccaagt cccctatttc ccggaccttc taagccc 117
 <210> 9
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 ttctgggtgc tgggtgggtg cggaggcgtg ctggcctgct acagcctgct ggtcaccgtg 60
 gccttcatca tcttttgggt g 81
 <210> 10
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 cgggtgaagt tcagcagaag cgccgacgcc cctgcctacc agcagggcca gaatcagctg 60
 tacaacgagc tgaacctggg cagaagggaa gactacgacg tcctggataa gcggagaggc 120

 cgggaccctg agatgggcgg caagcctcgg cggaagaacc cccaggaagg cctgtataac 180
 gaactgcaga aagacaagat ggccgaggcc tacagcgaga tcggcatgaa gggcgagcgg 240
 aggcggggca agggccacga cggcctgtat cagggcctgt ccaccgccac caaggatacc 300
 tacgacgccc tgcacatgca ggccctgccc ccaagg 336
 <210> 11
 <211> 123
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 11
 aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgccgcccc 60
 gggccccacc gcaagcatta ccagccctat gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc 120

 tcc 123
 <210> 12

<211> 126

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa	60
actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt	120
gaactg	126

<210> 13

<211> 473

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 13

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

Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
145 150 155 160
Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Thr Gln Asp Ile Ser Thr Ser Leu
165 170 175
Gly Trp Tyr His Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
180 185 190
Gly Ala Ser Lys Val Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Asn
195 200 205
Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
210 215 220
Asp Ile Gly Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Asp Gly Phe Pro Phe Thr
225 230 235 240
Val Gly Gln Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Ile Glu
245 250 255
Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr
260 265 270
Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro
275 280 285
Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu
290 295 300
Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
305 310 315 320
Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
325 330 335
Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
340 345 350
Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser
355 360 365
Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu
370 375 380
Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg

385 390 395 400
 Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln
 405 410 415
 Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
 420 425 430
 Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp
 435 440 445

 Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
 450 455 460
 Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 465 470
 <210> 14
 <211> 474
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide
 <400> 14
 Glu Val Lys Leu Ile Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Glu Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ala Cys Thr Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ala Asp Tyr

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

 85 90 95
 Phe Cys Val Gly Pro Trp Phe Gly Asp Leu Leu Met Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Ser Gly Gly Ser Thr Ser Gly
 115 120 125
 Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Ser Gly Ser Ala Arg Ala
 130 135 140
 Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp

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

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

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

 340 345 350
 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg

355 360 365
 Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
 370 375 380
 Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
 385 390 395 400
 Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro

405 410 415
 Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
 420 425 430
 Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
 435 440 445
 Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
 450 455 460
 Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 465 470

<210> 15

<211> 254

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide

<400> 15

Glu Val Lys Leu Ile Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Glu Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ala Cys Thr Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ala Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Leu Ser Trp Phe Arg Gln Gly Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Phe Thr Gly Pro Lys His Leu Gly Glu Thr Thr Glu Cys Ala Pro
 50 55 60
 Ser Val Glu Asp Arg Cys Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Thr
 65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met His Arg Leu Gln His Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Phe Cys Val Gly Pro Trp Phe Gly Asp Leu Leu Met Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Ser Gly Gly Ser Thr Ser Gly
115 120 125

Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Ser Gly Ser Ala Arg Ala
130 135 140

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

Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Thr Gln Asp Ile Ser Thr Ser Leu
165 170 175

Gly Trp Tyr His Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
180 185 190

Gly Ala Ser Lys Val Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Asn
195 200 205

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
210 215 220

Asp Ile Gly Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Asp Gly Phe Pro Phe Thr
225 230 235 240

Val Gly Gln Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala
245 250

<210> 16

<211> 39

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn
1 5 10 15

Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu
20 25 30

Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro

35

<210

> 17

<211> 27

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val

20 25

<210> 18

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 19

<211> 41

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr

1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro

20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

35 40

<210> 20

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

35 40

<210> 21

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Citrulline

<220><221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Citrulline

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> Citrulline

<400> 21

Val Tyr Ala Thr Xaa Ser Ser Ala Val Xaa Leu Xaa Ser Ser Val Pro

1 5 10 15

<210> 22

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Citrulline

<220><221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Citrulline

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> Citrulline

<400> 22

Ala Tyr Val Thr Xaa Ser Ser Ala Val Xaa Leu Xaa Ser Ser Val Pro

1 5 10 15

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 23

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

1 5 10 15