



등록특허 10-2508166



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년03월13일
(11) 등록번호 10-2508166
(24) 등록일자 2023년03월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 35/17* (2015.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01) *C12N 5/0783* (2010.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2896 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7031067
- (22) 출원일자(국제) 2015년04월08일
심사청구일자 2020년04월07일
- (85) 번역문제출일자 2016년11월07일
- (65) 공개번호 10-2016-0138298
- (43) 공개일자 2016년12월02일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2015/024882
- (87) 국제공개번호 WO 2015/157391
국제공개일자 2015년10월15일
- (30) 우선권주장
61/977,751 2014년04월10일 미국(US)
(뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌
Immunological reviews, 2014, 257(1), 107-126*
Clinical cancer research, 2013, 19(12), 3153-3164
WO2014031687 A1*
- *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

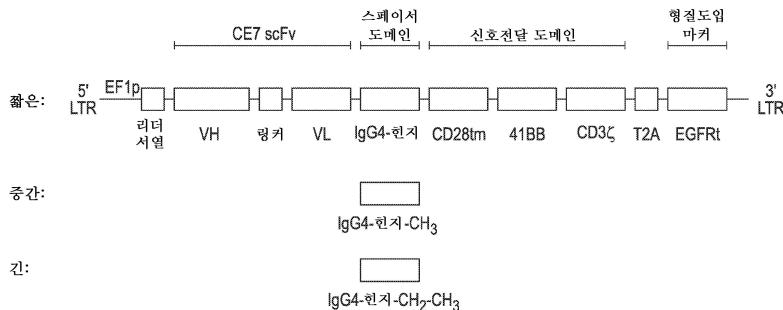
- (73) 특허권자
시애틀 첼드런즈 호스피탈 디/비/에이 시애틀 첼드런즈 리서치 인스티튜트
미국 98105 워싱턴 시애틀 4800 샌드 포인트 웨이 노스이스트
- (72) 발명자
제센, 마이클, 씨.
미국 98101 워싱턴주 시애틀 나인스 애비뉴 1900
- (74) 대리인
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 30 항

심사관 : 민경난

(54) 발명의 명칭 세포 면역요법을 위한 방법 및 조성물**(57) 요약**

본 발명은 세포 면역요법에 의해, 예컨대 CD8+ 중심 기억 T 세포 또는 키메라 수용체를 발현하도록 유전자 조작된 CD4+ T 세포와 중심 기억 T 세포의 조합을 입양 전달하는 것에 의해 매개되는 면역 반응을 부여하고/거나 증대시키기 위한 핵산, 벡터, 숙주 세포, 방법 및 조성물을 제공한다. 일부 대안에서 유전자 변형된 숙주 세포는
(뒷면에 계속)

대 표 도

리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 맞춤화된 스페이서 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 막횡단 도메인을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산을 포함한다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 CD171에 결합한다.

(52) CPC특허분류

A61K 39/395 (2013.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C12N 5/0636 (2013.01)
A61K 2039/5156 (2013.01)
A61K 2039/5158 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)

(30) 우선권주장

61/986,479	2014년04월30일	미국(US)
62/058,973	2014년10월02일	미국(US)
62/088,363	2014년12월05일	미국(US)
62/089,730	2014년12월09일	미국(US)
62/090,845	2014년12월11일	미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 서열식별번호: 54에 제시된 잔기 2150 내지 2875의 뉴클레오티드 서열을 포함하며 CD171에 특이적으로 결합하고 항체 CE7로부터 유래된 단일-쇄 항체 단편(scFv)을 포함하는 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드;

(b) (i) 폴리펩티드 스페이서가 서열식별번호: 59에 제시된 아미노산 서열을 포함하고 119개 이하의 연속된 아미노산의 길이를 갖는, IgG4 헌지 영역 서열 및 CH3 영역, 또는

(ii) 서열식별번호: 21에 제시된 아미노산 서열을 포함하고 15개 이하의 연속된 아미노산의 길이를 갖는, IgG4 헌지 영역 서열

을 포함하는 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드;

(c) 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및

(d) CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C, B7-H3, 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 CD3 제타의 모두 또는 일부를 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드

를 포함하는, 키메라 수용체를 코딩하는 핵산.

청구항 2

제1항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인이 CD28, 4-1BB, 또는 그의 조합으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 CD3 제타의 모두 또는 일부를 포함하는 것인 핵산.

청구항 3

제2항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인이 CD3 제타의 적어도 일부 및 4-1BB의 적어도 일부를 포함하는 것인 핵산.

청구항 4

제1항에 있어서, 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함하는 핵산.

청구항 5

제1항에 있어서, 서열식별번호: 55의 잔기 2084 내지 3778, 서열식별번호: 56의 잔기 2084 내지 3457, 또는 서열식별번호: 57의 잔기 2084 내지 3580의 뉴클레오티드 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산.

청구항 6

제1항에 있어서, 서열식별번호: 55의 잔기 2084 내지 3778, 서열식별번호: 56의 잔기 2084 내지 3457, 또는 서열식별번호: 57의 잔기 2084 내지 3580의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 핵산에 의해 코딩된 키메라 수용체 폴리펩티드.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 핵산을 포함하는 발현 벡터.

청구항 9

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 핵산을 포함하는 생체외(*ex vivo*) 숙주 세포.

청구항 10

제9항에 있어서, 전구체 T 세포인 숙주 세포.

청구항 11

제9항에 있어서, 조혈 줄기 세포인 숙주 세포.

청구항 12

제9항에 있어서, 나이브 CD8+ T 세포, 중심 기억 CD8+ T 세포, 이펙터 기억 CD8+ T 세포 및 벌크 CD8+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD8+ T 세포독성 림프구 세포인 숙주 세포.

청구항 13

제12항에 있어서, CD8+ 세포독성 T 림프구 세포가 CD45RO 및 CD62L에 대해 양성인 중심 기억 T 세포인, 숙주 세포.

청구항 14

제9항에 있어서, 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포인 숙주 세포.

청구항 15

제14항에 있어서, CD4+ 헬퍼 림프구 세포가 CD45RA 및 CD62L에 대해 양성이고 CD45RO에 대해 음성인 나이브 CD4+ T 세포인, 숙주 세포.

청구항 16

제9항의 숙주 세포 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는, 암 또는 종양의 치료 또는 억제에 사용하기 위한 조성물.

청구항 17

(a) 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 키메라 수용체를 코딩하는 복수개의 핵산을 제공하는 단계이며, 여기서 각각의 복수개의 핵산은 길이가 상이한 키메라 수용체를 코딩하는 것인 단계;

(b) 각각의 복수개의 핵산을 별개의 단리된 T 림프구 집단에 도입시키고 각각의 T 림프구 집단을 시험관내에서 확장시킴으로써, 복수개의 유전자 변형된 T 림프구 집단을 생성하는 단계;

(c) 각각의 유전자 변형된 T 림프구 집단을 CD171을 포함하는 종양을 보유하는 동물 모델에 투여하고, 유전자 변형된 T 림프구 집단이 항종양 반응을 갖는지 여부를 결정하는 단계; 및

(d) 항종양 반응을 제공하는 키메라 수용체를 코딩하는 핵산을 선택하는 단계
를 포함하는, 숙주 세포를 제조하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 림프구 집단이 CD8+ 또는 CD4+인 방법.

청구항 19

제17항에 있어서, 키메라 수용체를 코딩하는 선택된 핵산을 숙주 세포에 도입시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 20

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 핵산을 CD45RA-, CD45RO+, 및 CD62L+ 표현형을 갖는 림프구 집단에 도입시키

는 단계; 및

림프구 집단을 항-CD3 항체 또는 항 CD28 항체, 및 적어도 1종의 항상성 시토카인의 존재 하에 림프구 집단이 세포 주입물로서 사용하기에 충분히 확장될 때까지 배양하는 단계

를 포함하는, 세포 주입물을 제조하는 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 림프구 집단이 CD8+ 또는 CD4+인 방법.

청구항 22

제9항에 있어서, CD171을 발현하는 암 또는 고형 종양의 치료 또는 억제에 사용하기 위한 숙주 세포.

청구항 23

제22항에 있어서, 암이 신경모세포종인 숙주 세포.

청구항 24

제22항에 있어서, 암이 유방암, 뇌암, 결장암, 신암, 췌장암 및 난소암으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 숙주 세포.

청구항 25

제9항에 있어서, CD171을 포함하는 암을 갖는 대상체에서 세포 면역요법을 수행하는 데 사용하기 위한 숙주 세포.

청구항 26

제25항에 있어서, 암이 신경모세포종인 숙주 세포.

청구항 27

제25항에 있어서, 암이 유방암, 뇌암, 결장암, 신암, 췌장암 및 난소암으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 숙주 세포.

청구항 28

제9항에 있어서, 암을 갖는 대상체에서 세포 면역요법을 수행하는 데 사용하기 위한 숙주 세포.

청구항 29

제28항에 있어서, 암이 신경모세포종인 숙주 세포.

청구항 30

제28항에 있어서, 암이 유방암, 뇌암, 결장암, 신암, 췌장암 및 난소암으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 숙주 세포.

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

발명의 설명**기술 분야**

관련 출원

[0001] 본원은 2014년 4월 10일에 출원된 미국 특허 가출원 번호 61/977,751, 2014년 4월 30일에 출원된 미국 특허 가출원 번호 61/986,479, 2014년 10월 2일에 출원된 미국 특허 가출원 번호 62/058,973, 2014년 12월 5일에 출원된 미국 특허 가출원 번호 62/088,363, 2014년 12월 9일에 출원된 미국 특허 가출원 번호 62/089,730, 및 2014년 12월 11일에 출원된 미국 특허 가출원 번호 62/090,845의 우선권의 이익을 청구한다. 상기 언급된 출원의 전체 개시내용은 그 전문이 참조로 명백히 포함된다.

[0003] 서열 목록에 대한 참조

[0004] 본 출원은 전자 형식의 서열 목록과 함께 출원한다. 서열 목록은 114kb 크기의 2014년 4월 1일에 생성된 파일 명칭 SCRI-065WO_SEQUENCE_LISTING.TXT로서 제공된다. 전자 포맷의 서열 목록 내 정보는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0005] 발명의 분야

[0006] 본 출원은 생물의약의 분야 및 구체적으로 암 요법에 유용한 것들을 포함한, 세포 면역요법에 사용하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 특히, 본 발명의 대안은 종양 표적화 수용체로 변형된 T 세포를 포함하는 세포 면역요법을 수행하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] 암 면역요법에 대한 접근법은, 그에 의해 T 세포가 유전자 변형되어 합성 키메라 항원 수용체 (CAR)가 발현되며, 상당히 초기의 인간 임상 시험의 대상이다. B 세포 계통 악성종양, 예컨대 급성 림프모구성 백혈병 및 비-호지킨 림프종의 경우에 CD19-특이적 또는 CD19-표적화 CAR T 세포로 처리된 환자에서 극적인 항종양 효력이 관찰되었지만, 고령 종양을 보유하는 환자에서 유사한 반응을 달성하기 위한 도전은 상당하다. 최근, 암 환자에서의 CAR 재지시된 T 세포 입양 요법의 개발 및 임상 시험은 대부분 실험적이고, 거대 불응성 종양을 갖는 과도하게 사전치료된 환자를 수반하는 임상 I상 시험 실행의 실현 가능성에 영향을 미치는 다양한 기술적 파라미터에 의해 제약을 받는다. 보다 큰 정밀도로 규정될 수 있는 세포 생성물과 관련된 2종의 파라미터는 T 림프구 하위세트 조성물 및 그의 항종양 활성을 최대화하는 기능적 아웃풋을 위한 CAR 신호전달의 조율이다. 일부 대안에서, CAR-발현 중심 기억 T 세포의 치료 활성을 검사하였고, 줄기 세포 유사 특색을 갖는 T 세포 래피토리의 안정한 항원-경험 구성요소가 입양 전달 후에 오래 계속되는 기능적 기억 위치를 재생하는 능력을 갖는다는 것이 제시된 바 있다. 항-CD19 CAR-발현 세포는 생산되고, 면역자기 선택을 사용한 $CD45RO^+CD62L^+T_{CM}$ 세포에 대한 풍부화 후에, 임상에서 평가된 바 있다.

[0008] CD19 발현 B 세포 악성종양의 표적화를 넘어, 기술분야의 도전과제는 허용되는 "온(on)" 표적 "오프(off)" 종양 반응성으로 CAR T 세포 인식을 수정할 수 있는 종양 세포 상의 세포 표면 표적 분자를 확인하고 조사하는 것일 것이다. 그러나, 일단 확인되면, CD4 및 CD8 T 세포 활성화와 상용성인 신호전달 아웃풋을 위한 새로운 CAR을 조율하는 접근법은 전적으로 만족스럽지 않았다. 일반적으로 CAR 개발에 중요한 것으로서 인지되는 파라미터는 표적 분자 CAR 항원 결합 도메인 (전형적으로 그러나 항체 scFv 및 세포질 도메인의 신호전달 모듈만으로 독점되는 것은 아님)의 친화도이다.

[0009] 치료 활성에 중요한 키메라 수용체 설계의 요소를 결정하는 방법을 확인하고, 특이적 항원 및 생체내에서 증진된 생존 및 효능을 제공하는 유전자 변형되고 입양 전달된 세포 집단을 표적화하기 위한 키메라 수용체를 증진 또는 개선시키는 것이 필요하다. 특히 이러한 필요를 다루는 대안이 제공된다.

발명의 내용

[0010]

백혈병 및 럼프종 환자에서 키메라 항원 수용체 (CAR) 재지시된 T 세포 면역요법의 치료 효능에도 불구하고, 방법 및 조성물은 고형 종양에서 유사한 임상 반응을 달성할 필요가 있다. CAR 개발은 일부 경우에 예를 들어 시험관내 관독을 기반으로 하여 가장 높은 크기의 T 세포 기능적 아웃풋을 도출하는 구축물을 선택하는 것에 대해 편향될 수 있다. 상이한 CAR 세포와 스페이서 및 세포질 신호전달 도메인 변이체는 종양 세포 세포용해 및 시토카인 분비를 위한 CD8+ CTL 활성화의 크기를 조율하기 위해 조합될 수 있다. 본원에 기재된 연구에서, 이러한 시험관내 검정에서 가장 높은 활성을 나타낸 CAR 구축물은 또한 생체내에서 가장 낮은 항종양 활성을 나타낸 반면에, CAR은 중간 정도의 신호전달 효력 매개 종양 불활성화 및/또는 근절을 조율하였다. 재귀적 CAR 촉발은 아마도 증대된 FasL 발현의 결과로서 과다활성 CAR을 발현하는 CTL이 활성화 유도된 세포 사멸 (AICD)에 매우 감수성 이게 할 수 있다는 것이 관찰되었다. AICD를 제한하기 위해 세포와 스페이서 및 세포질 신호전달 모듈의 조합을 사용하여, 예를 들어 이러한 부분의 특성을 독립적으로 달리함으로써 CAR을 조율하는 것은, 고형 종양에 대해 증진 또는 개선된 임상 활성을 촉진할 수 있다. CAR T 세포 성능에 기여하는, 항원 결합 및 막횡단 도메인을 연결하는 세포와 스페이서의 특색, 예컨대 스페이서의 길이의 영향이 본원에 기재되어 있다. 일부 대안에서, CAR 스페이서는, CAR-발현 세포, 예를 들어 T 세포와 표적화된 세포, 예를 들어 종양 세포 사이의 생물물리학적 시냅스 거리를 조정 및/또는 증진 또는 개선시켜 면역 세포, 예를 들어 T 세포 활성화와 상용성이고/거나 그에 최적인 시냅스 거리를 달성하기 위해 선택된다.

[0011]

본원에 기재된 대안은 모노클로날 항체 CE7에 의해 인식되고 임상 파일럿 실험에서 제1 세대 CAR로서 시험된 바 있는 CD171 상의 종양 선택적 에피토프 (L1-CAM)를 표적화할 수 있고/거나 그에 특이적인 CAR의 성능에 대한 세포와 스페이서 길이 및 세포질 신호전달 모이어티 선택 둘 다의 각각의 기여에 관한 것이다. CAR 재지시된 이펙터 효력에 대한 시험관내 기능적 검정을 사용할 때, 제2 및 제3 세대 세포질 신호전달 도메인과 관련하여 스페이서 치수를 기반으로 한 이펙터 아웃풋의 정량적 계층이 관찰되었다. 하나의 대안에서, 시험관내 대 생체내 CAR T 세포 성능에서의 현저한 비부합성은 가장 기능적으로 강력한 CAR 포맷의 활성화 유도된 세포 사멸 (AICD)로 인한 것으로 제시되었다. 이들 대안은 고형 종양에 대한 CAR T 세포 면역요법의 개발에서의 검사를 위한 임상적으로 적절한 파라미터를 밝힌다. 각각의 새로운 scFv 및 표적 분자가 종양 세포 형질 막으로부터의 고유한 거리를 규정한다는 것을 고려하면, CAR 스페이서의 조정은 각 구축물에 대해 고유하고, 스페이서 길이 변이체의 라이브러리의 경험적 시험을 통해 유래한다.

[0012]

한 측면에서, 본 개시내용은 세포 면역요법에 의해, 예컨대 종양-특이적, 유전자 변형된 면역 세포의 집단, 예컨대 CD8+ 또는 CD4+ T 세포 단독, 또는 조합의 유전자 변형된 하위세트를 입양 전달하는 것에 의해 매개되는 면역 반응을 부여하고/거나 증대시키기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 본 개시내용은 키메라 수용체 핵산, 및 이러한 핵산을 포함하는 벡터 및 숙주 세포, 뿐만 아니라 이에 의해 코딩된 키메라 수용체를 제공한다. 이러한 키메라 수용체를 코딩하는 핵산 서열은 일반적으로, 효율적인 세포 활성화 및 특이적 표적 분자 또는 표적 분자 상의 에피토프의 인식을 위해 표적화할 수 있고/거나 특이적인 키메라 수용체를 맞춤화하기 위해, 절제될 수 있고 다른 구성요소로 대체될 수 있는 수많은 모듈화된 구성요소와 함께 연결된다.

[0013]

키메라 항원 수용체 (CAR) 발현 세포를 사용하는 입양 면역요법은 암의 치료, 호전 및/또는 증식 억제에 유용할 수 있다. 일부 대안에서, 항원 CD171 (L1CAM)의 에피토프에 대해 지시된 CAR이 사용된다. 이러한 CAR 구축물은 세포가 CD171을 발현하는 임의의 질환 또는 장애 또는 악성종양을 치료, 호전 또는 억제하는데 유용하다. 일부 대안에서, 질환 또는 장애는 CD171 (L1CAM)을 발현하는 암 또는 종양이다. 일부 대안에서, CD171을 발현하는 암은 신경모세포종 (NB)이다. CD171은 고위험 NB의 100%에서 발현된다. CD171을 발현하는 다른 암은 흑색종, 자궁경부 암종, 난소암, 자궁 암종, 퀘장암, 결장 암종, 신암종 및 교모세포종을 포함한다.

[0014]

L1CAM으로도 공지된 CD171은 200-kDa 막횡단 당단백질이다. 이는 축삭 안내 및 세포 이동에 수반되는 뉴런 세포 부착 분자로, 치료-저항성 암에서 강력한 연관성을 갖는다. CD171은 인식 분자의 이뮤노글로불린 슈퍼페밀리에 속하고, 다른 부착 분자 예컨대 라미닌, 인테그린, 프로테오글리칸 및 CD24와의 이종친화성 상호작용에 참여한다. 일부 대안에서, CD171은 종양 세포 상에서 우세하게 발견되는 에피토프를 포함하거나, 그로 본질적으로 이루어지거나 또는 그로 이루어진다. 일부 대안에서, 에피토프는 글리코실화 CD171의 세포외 도메인 상에서는 발견되고 비글리코실화 CD171 상에서는 발견되지 않는다. 일부 대안에서, 에피토프는 CE7, 또는 CE7로 간주되는 항체에 의해 인식되는 에피토프를 지칭한다.

[0015]

신경모세포종은 영아기 동안 발생하는 가장 흔한 두개외 고형 종양이다. 이는 신경모세포 (만능 교감신경 세포)로부터 발생하는 교감 신경계의 배아성 악성종양이다. 발생 중인 배아에서, 이들 세포는 함입하고, 신경

축을 따라 이동하고, 교감 신경절, 부신 수질 및 다른 부위로 이주한다. 이들 세포의 분포의 패턴은 원발성 신경모세포종 제시의 부위와 상관된다. 연령, 병기 및 종양 세포 내에서 직면하는 생물학적 특색은 중요한 예후 인자이고, 위험도 계층화 및 치료 할당에 사용된다. 신경모세포종을 갖는 환자에 대한 결과의 차이는 현저하다. 저위험 및 중간 위험 신경모세포종을 갖는 환자는 탁월한 예후 및 결과를 갖는다. 그러나, 고위험 질환을 갖는 이들은 집중 요법에도 불구하고 계속 매우 불량한 결과를 갖는다. 불행하게도, 18개월령 초과의 환자의 대략 70-80%는 통상적으로 림프절, 간, 골 및 골수에서 전이성 질환을 나타낸다. 심지어 고용량 요법에 이어서 자가 골수 또는 줄기 세포 구출의 사용에도 이들 환자의 절반 미만이 치유된다. 따라서, 본원에 기재된 CAR 형질도입된 림프구는 대상체에서의 신경모세포종의 치료, 호전 또는 억제에 유용하다.

[0016]

일부 대안에서, CD171에 대해 지시된 CAR은 CAR 또는 그를 발현하는 세포의 생체내 활성 및/또는 생존 및/또는 또는 지속성을 증진시키는 구성요소를 포함한다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 CD171의 에피토프, 예컨대 건강한 세포보다 종양 세포 상에서 더 자주 발견되는 것에 특이적으로 결합하고/거나 그를 표적화하는 항체 또는 항원 결합 단편을 포함한다. 다른 대안에서, 스페이서 영역이 포함되며, 이는 짧은 세포외 스페이서이다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 단일 공동-자극 도메인 및 단일 세포내 신호전달 도메인을 함유하고, 다른 신호전달 도메인을 제외한다.

[0017]

일부 대안은 리간드 결합 도메인 및/또는 동일한 것에 의해 코딩된 키메라 수용체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 리간드는 암 또는 종양 세포 상에 발현된 문자임), 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 키메라 수용체 핵산에 관한 것이다. 일부 대안에서, 스페이서는 리간드 결합 도메인과 막횡단 도메인을 연결하거나 또는 그 사이에서 발견된다. 일부 대안에서, 폴리펩티드 스페이서는 힌지 영역, 예컨대 항체 분자로부터의 힌지 영역, 예컨대 아미노산 서열 X₁PPX₂P를 함유하는 힌지 영역을 포함한다. 이러한 힌지 영역은 CH₂ 및 CH₃ 영역을 포함하나 이에 제한되지는 않는 항체의 1개 이상의 불변 영역, 예를 들어 Ig Fc의 CH₃ 단독 서열을 포함하는, 다른 아미노산 서열에 연결될 수 있다. 놀랍게도, 스페이서 영역의 길이는, 특히 생체내에서 수용체를 발현하는 세포의 더 나은 종양 또는 표적 세포 인식 및/또는 이펙터 기능 및/또는 지속성을 위해 개별 표적 분자에 대해 맞춤화될 수 있다는 것이 발견된 바 있다.

[0018]

일부 대안에서, 스페이서의 길이는 229, 200, 150, 120, 119, 100, 50, 40, 30, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13 또는 12개 아미노산 길이 (그러나 2 또는 1개 이상 아미노산 길이) 또는 상기 언급된 길이 중 임의의 2개에 의해 규정된 범위 내의 길이 미만이거나 또는 그러한 길이이다. 일부 대안에서, 스페이서 길이는 15 또는 12개 아미노산 길이이다. 일부 대안에서, 스페이서 길이는 짧거나, 중간형이거나 (또한 "중간"으로서 본원에 지칭됨), 또는 길다. 일부 대안에서, 짧은, 중간형 또는 긴 스페이서는 표 7 및 8에 제시된 바와 같은 짧은, 중간형 또는 긴 스페이서이다.

[0019]

일부 대안에서, 링커의 길이는 표적화되는 세포, 예컨대 종양 세포의 표면 형질 막과 관련하여, 키메라 수용체가 결합하는 항원의 에피토프의 거리에 의해 결정되거나 영향을 받는다.

[0020]

일부 대안에서, CD171로 지시된 CAR은 15개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상), 예컨대 15, 14, 13 또는 12개 아미노산 또는 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 또는 2개 아미노산 또는 상기 언급된 길이 중 임의의 2개에 의해 규정된 범위 내의 길이를 갖는 짧은 스페이서 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 짧은 스페이서는 X₁PPX₂P의 아미노산 서열을 포함하거나, 그로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그로 이루어진다. 일부 대안에서, CE7에 의해 인식되는 CD171의 에피토프 또는 표면 형질 막과 관련하여 CD171에 대해 유사한 거리를 갖는 에피토프에 대해 지시된 CAR은 100, 50, 40, 20, 15 또는 12개 아미노산 미만 길이의 스페이서 영역, 예컨대 15개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상), 예컨대 15, 14, 13 또는 12개 아미노산 또는 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 또는 2개 아미노산 또는 상기 언급된 길이 중 임의의 2개에 의해 규정된 범위 내의 길이를 갖는 짧은 스페이서 영역을 포함한다.

[0021]

본 개시내용의 또 다른 측면은 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 리간드는 림프구에 의한 인식, 불활성화 및/또는 제거를 매개하는데 적합한 종양 특이적 항원, 또는 표적 세포 집단 상에 발현된 임의의 다른 문자임); 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 폴리펩티드 스페이서는 맞춤화된 길이를 갖고, 여기서 스페이서는 최적화됨); 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 1개 이상의 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 단리된 키메라 수용체 핵산을 제공한다. 본 개시내용은 또한, 본원에 기재된 바와 같은 단리된 키메라 수용체를 포함하는 발현 백터 및 숙주 세포를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 참조 키메라 수용체와 비교 시 리간드에 반응하여 증가된 T 세포 증식

및/또는 시토카인 생산을 위해 최적화된다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 전구체 T 세포이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 조혈 줄기 세포이다.

[0022] 본 개시내용의 또 다른 측면은 리간드 결합 도메인 (여기서 리간드는 종양 특이적 항원 또는 표적 세포 집단 상에 발현된 임의의 다른 문자이며, 표적화되어 림프구에 의한 인식 및 제거를 매개할 수 있음); 15개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상), 예컨대 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 또는 2개 아미노산 또는 상기 언급된 길이 중 임의의 2개에 의해 규정된 범위 내의 길이인 폴리펩티드 스페이서; 막횡단 도메인; 및 1개 이상의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 수용체 폴리펩티드를 제공한다. 일부 대안에서, 폴리펩티드 스페이서는 아미노산 서열 X₁PPX₂P를 함유하는 한지 영역을 포함한다.

[0023] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 세포 면역요법에 의해, 예컨대 종양-특이적, 하위세트 특이적 유전자 변형된 CD4+ 발현 T 세포를 입양 전달하는 것에 의해 매개되는 면역 반응을 부여하고/거나 증대시키는 조성물을 제공하며, 여기서 CD4+ 발현 T 세포는 CD8+ 발현 T 세포가 항종양 반응성을 유지하고 종양-특이적 증식을 증가 및/또는 최대화하는 능력을 부여하고/거나 증대시킨다. 일부 대안에서, CD4+ 발현 T 세포는 본원에 기재된 바와 같이 키메라 수용체 핵산 및/또는 키메라 수용체 폴리펩티드를 발현하도록 유전자 변형된다.

[0024] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 세포 면역요법에 의해, 예컨대 종양-특이적, 하위세트 특이적 유전자 변형된 CD8+ 발현 T 세포를 입양 전달하는 것에 의해 매개되는 면역 반응을 부여하고/거나 증대시키기 위한 조성물을 제공한다. 일부 대안에서, CD8+ 발현 T 세포는 본원에 기재된 바와 같은 키메라 수용체 핵산 및/또는 키메라 수용체 폴리펩티드를 발현한다.

[0025] 또 다른 대안에서, 본 발명의 측면은 면역 반응을 부여하고/거나 증대시키기 위한 유전자 변형된 CD8+ 발현 세포독성 T 림프구 세포 제제 (여기서 세포독성 T 림프구 세포 제제는 질환 또는 장애와 연관된 리간드에 대한 리간드 결합 도메인, 맞춤화된 스페이서 영역, 막횡단 도메인; 및 T 세포 및 또는 다른 수용체의 세포내 신호전달 도메인, 예컨대 공동-자극 도메인을 포함하는 키메라 수용체를 발현하는 CD8+ 발현 T 세포를 포함함) 및/또는 유전자 변형된 헬퍼 T 림프구 세포 제제 (여기서 헬퍼 T 림프구 세포 제제는 질환 또는 장애와 연관된 리간드를 표적화할 수 있고/거나 그에 특이적인 항체 가변 도메인, 맞춤화된 스페이서 영역, 막횡단 도메인; 및 1개 이상의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 수용체를 발현하는 CD4+ 발현 T 세포를 가짐)를 갖는 입양 세포 면역요법 조성물을 제공한다.

[0026] 일부 대안에서, 본 개시내용은 환자에서 암, 예컨대 NB를 치료, 개선 또는 억제하는 방법, 환자에서, 암, 예컨대 NB의 진행 및/또는 전이를 억제 또는 지연시키는 방법, 환자에서 종양 또는 암 세포, 예컨대 NB의 존재를 억제 또는 감소시키는 방법 및/또는 그를 필요로 하는 환자에서 CD171 발현 세포의 표적 집단을 억제 또는 감소시키는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 세포성 면역 반응을 제공하는 상기 대상체 또는 상기 환자에게 유전자 변형된 세포독성 T 림프구 세포 제제를 투여하는 것을 수반하며, 여기서 세포독성 T 림프구 세포 제제는 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 리간드는 림프구에 의한 인식 및 제거를 매개하는데 적합한 종양 특이적 항원 또는 표적 세포 집단 상에 발현된 임의의 다른 문자 (예를 들어 CD171)임); 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 폴리펩티드 스페이서는 맞춤화된 길이를 갖고, 여기서 스페이서는 참조 키메라 수용체와 비교 시 증진된 T 세포 증식, 증진된 생체내 세포 활성 및/또는 시토카인 생산 (예를 들어 생체내)을 제공함); 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 1개 이상의 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된 키메라 수용체를 갖는 CD8+ T 세포를 포함한다.

[0027] 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 질환 또는 장애와 연관된 리간드를 표적화할 수 있고/거나 그에 특이적인 세포외 항체 가변 도메인이다. 한 대안은 유전자 변형된 헬퍼 T 림프구 세포 제제를 포함하며, 여기서 헬퍼 T 림프구 세포 제제는 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 리간드는 림프구에 의한 인식 및 제거를 매개하는데 적합한 종양 특이적 항원 또는 종양 표적화 항원, 또는 표적 세포 집단 상에 발현된 임의의 다른 문자임); 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 폴리펩티드 스페이서는 맞춤화된 길이를 갖고, 여기서 스페이서는 참조 키메라 수용체와 비교 시 증진된 T 세포 증식, 증진된 생체내 세포 활성 및/또는 시토카인 생산을 제공함); 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 1개 이상의 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 키메라 수용체를 갖는 CD4+ 발현 T 세포를 포함한다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 건강한 세포보다 오히려 종양 세포 상에서 더 자주 발견되는 CD171의 에피토프를 표적화하고/거나 그에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함한다. 다른 대안에서, 스페이서 영역은 짧은 세포외 스페이서를 포함한다. 일부 대안에서, 신호전달 도메인은 단일 신호전달 도메인을 함유하고, 다른 신호전달 도메인을 제외한다.

[0028] 일부 대안에서, 유전자 변형된 CD8+ 및 유전자 변형된 CD4+ 발현 T 세포 집단은 공-투여된다. 일부 대안에서, T 세포는 자가 또는 동종 T 세포이다. 본원에 기재된 방법의 다양한 변형이 가능하다. 예를 들어, CD4+ 발현 T 세포 및 CD8+ 발현 T 세포에 의해 발현된 키메라 수용체는 동일하거나 상이할 수 있다.

[0029] 또 다른 대안은 세포성 면역 반응을 도출하고 항원-반응성 키메라 수용체를 발현하는 키메라 수용체 변형된 종양-특이적 또는 종양-표적화 CD8+ 발현 세포독성 T 림프구 세포 제제 (여기서 변형된 세포독성 T 림프구 세포 제제는 리간드 결합 도메인 (여기서 리간드는 종양 특이적 항원 또는 종양 표적화 항원 또는 림프구에 의한 인식 및 제거를 매개하는데 적합한 표적 세포 집단 상에 발현된 임의의 다른 문자임); 폴리펩티드 스페이서 (여기서 폴리펩티드 스페이서는 맞춤화된 길이를 갖고, 여기서 스페이서는 참조 키메라 수용체와 비교 시 증진된 T 세포 증식, 증진된 생체내 세포 활성 및/또는 시토카인 생산을 제공함); 막횡단 도메인; 및 1개 이상의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 수용체를 갖는 CD8+ 발현 T 세포를 포함함)를 수득함으로써; 및/또는 변형된 나이브 또는 기억 CD4+ 발현 T 헬퍼 세포 (여기서 변형된 헬퍼 T 림프구 세포 제제는 리간드 결합 도메인 (여기서 리간드는 종양 특이적 항원 또는 종양 표적화 항원 또는 림프구에 의한 인식 및 제거를 매개하는데 적합한 표적 세포 집단 상에 발현된 임의의 다른 문자임); 폴리펩티드 스페이서 (여기서 폴리펩티드 스페이서는 맞춤화된 길이를 갖고, 여기서 스페이서는 최적화됨); 막횡단 도메인; 및 1개 이상의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 수용체를 갖는 CD4+ 발현 세포를 포함함)를 수득함으로써 입양 면역요법 조성물을 제조하는 방법에 관한 것이다. 일부 대안에서, 스페이서는 참조 키메라 수용체와 비교 시 리간드에 반응하여 증가된 T 세포 증식 및/또는 시토카인 생산을 위해 최적화된다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 건강한 세포보다 오히려 종양 세포 상에서 더 자주 발견되는 CD171의 에피토프에 특이적으로 결합하고/거나 그를 표적화하는 항체 또는 항원 결합 단편을 포함한다. 다른 대안에서, 스페이서 영역은 15개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상), 예컨대 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 또는 2개 아미노산 또는 상기 언급된 길이 중 임의의 2개에 의해 규정된 범위 내의 길이일 수 있는 짧은 세포외 스페이서를 포함한다. 일부 대안에서, 신호전달 도메인은 단일 신호전달 도메인을 함유하고, 다른 신호전달 도메인을 제외한다.

[0030] 일부 대안은 또한 키메라 수용체를 코딩하는 핵산에 관한 것이다. 일부 대안에서, 상기 핵산은 a) 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 리간드 결합 도메인은 CD171에 결합하고/거나 그를 표적화함), b) 리간드 결합 도메인과 막횡단 도메인 사이에 삽입된 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 d) 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 면역 세포 집단에서의 키메라 수용체의 발현은 CD171-발현 종양을 갖는 대상체에게의 투여 시 CD171과의 직면 후 시간의 경과에 따른 면역 세포의 증가된 생존 및/또는 지속성 및/또는 치료 효능에서의 증가를 발생시키고, 상기 증가는 보다 긴 폴리펩티드 스페이서를 갖는 상기 참조 키메라 수용체의 발현에 상대적이다. 일부 대안에서, 시간의 경과에 따른 증가된 생존 및/또는 지속성은 상기 키메라 수용체를 발현하는 세포를 CD171을 발현하는 세포에 다중, 연속 라운드에 걸쳐 노출시키는 것을 포함하는, 시험관내 스트레스 시험 검정에서 측정된 바와 같은 항원-유도된 세포 사멸에서의 상대적 감소를 포함하고/거나, 시간의 경과에 따른 증가된 생존 및/또는 지속성은 CD171-발현 종양을 갖는 대상체에게의 투여 후 생체내 세포의 지속성에서의 증가를 포함하고/거나, 상기 보다 긴 폴리펩티드 스페이서는 길이가 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10배 더 크다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 항체 단편이다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 단일 쇄 가변 단편이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상)이다. 일부 대안에서, 스페이서는 200, 150, 100, 50 또는 20개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상) 길이 또는 상기 언급된 길이 중 임의의 2개에 의해 규정된 범위 내의 길이이다.

[0031] 일부 대안은 a) CD171에 특이적으로 결합하고/거나 그를 표적화하는 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, b) 키메라 수용체의 리간드 결합 도메인과 막횡단 도메인을 연결하는 100개 아미노산 미만 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상) 길이의 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 키메라 수용체의 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 키메라 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 키메라 수용체 핵산에 관한 것이다. 일부 대안에서, 스페이서는 X₁PPX₂P의 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 X₁ 및 X₂는 독립적으로 임의의 아미노산이다. 일부 대안에서, X₁ 및/또는 X₂는 시스테인이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 미만 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상) 길이이다. 일부 대안에서, 스페이서는 12, 13, 14 또는 15개 아미노산 길이 또는 상기 언급된 길이 중 임의의 2개에 의해 규정된 범위 내의 길이이다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 한지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 EPKSCDKTHTCPPCP (서열식별번호(SEQ ID NO): 17), ERKCCVECPPCP (서열식별번호: 18), ELKTPPLGDTHTCPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP)₃ (서열식별번호: 19), ESKYGPPCPSCP (서열식별번호: 20), ESKYGPPCPPCP

(서열식별번호: 21), YGPPCPPCP (서열식별번호: 51), KYGPPCPPCP (서열식별번호: 52) 또는 EVVKYGPCCPPCP (서열식별번호: 53)를 포함하거나, 그로 이루어지거나, 또는 그로 본질적으로 이루어진다. 일부 대안에서, 스페이서는 ESKYGPCCSCP (서열식별번호: 20), ESKYGPCCPPCP (서열식별번호: 21), YGPPCPPCP (서열식별번호: 51), KYGPPCPPCP (서열식별번호: 52) 또는 EVVKYGPCCPPCP (서열식별번호: 53)로 이루어지거나 또는 그로 본질적으로 이루어진다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 또 다른 공동자극 분자의 세포내 부분을 추가로 포함하지 않고/거나, 여기서 세포내 신호전달 도메인은 CD27, CD28, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3으로 이루어진 군으로부터 선택된 분자의 세포내 신호전달 부분을 포함하지 않고/거나, 여기서 세포내 신호전달 도메인은 CD28의 세포내 신호전달 부분을 포함하지 않는다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다.

[0032]

일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산이 제공되며, 여기서 키메라 수용체 핵산은 a) 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 리간드 결합 도메인은 CD171에 결합하고/거나 그를 표적화함), b) 소정 길이의 최적화된 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 d) 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 항체 단편이다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 단일 쇄 가변 단편이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상)이다. 일부 대안에서, 스페이서는 X_iPPX_jP의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 헌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다.

[0033]

일부 대안에서, 키메라 수용체 폴리펩티드가 제공되며, 여기서 키메라 수용체 폴리펩티드는 키메라 수용체 핵산에 의해 코딩된다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 a) 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 리간드 결합 도메인은 CD171에 결합하고/거나 그를 표적화함), b) 소정 길이의 최적화된 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 d) 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 항체 단편이다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 단일 쇄 가변 단편이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상)이다. 일부 대안에서, 스페이서는 X_iPPX_jP의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 헌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다.

[0034]

일부 대안에서, 단리된 키메라 수용체 핵산을 포함하는 발현 벡터가 제공된다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 a) 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 리간드 결합 도메인은 CD171에 결합하고/거나 그를 표적화함), b) 소정 길이의 최적화된 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 d) 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 항체 단편이다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 단일 쇄 가변 단편이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상)이다. 일부 대안에서, 스페이서는 X_iPPX_jP의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 헌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다.

[0035]

일부 대안에서, 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 일부 대안에서, 발현 벡터는 단리된 키메라 수용체

체 핵산을 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 a) 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 리간드 결합 도메인은 CD171에 결합하고/거나 그를 표적화함), b) 소정 길이의 최적화된 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 d) 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 항체 단편이다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 단일 쇄 가변 단편이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상)이다. 일부 대안에서, 스페이서는 X₁PPX₂P의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 힌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD8+ T 세포, 중심 기억 CD8+ T 세포, 이펙터 기억 CD8+ T 세포 및 벌크 CD8+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD8+ T 세포독성 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD8+ 세포독성 T 림프구 세포는 중심 기억 T 세포이며, 여기서 중심 기억 T 세포는 CD45RO+, CD62L+ 및 CD8+에 대해 양성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD4+ 헬퍼 림프구 세포는 나이브 CD4+ T 세포이며, 여기서 나이브 CD4+ T 세포는 CD45RA+, CD62L+ 및 CD4+에 대해 양성이고 CD45RO에 대해 음성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 전구체 T 세포이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 조혈 줄기 세포이다.

[0036] 일부 대안에서, 제약상 허용되는 부형제 중 숙주 세포를 포함하는 조성물이 제공된다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 발현 벡터를 포함한다. 일부 대안에서, 발현 벡터는 단리된 키메라 수용체 핵산을 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 a) 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 리간드 결합 도메인은 CD171에 결합하고/거나 그를 표적화함), b) 소정 길이의 최적화된 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 d) 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 항체 단편이다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 단일 쇄 가변 단편이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상)이다. 일부 대안에서, 스페이서는 X₁PPX₂P의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 힌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD8+ T 세포, 중심 기억 CD8+ T 세포, 이펙터 기억 CD8+ T 세포 및 벌크 CD8+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD8+ T 세포독성 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD8+ 세포독성 T 림프구 세포는 중심 기억 T 세포이며, 여기서 중심 기억 T 세포는 CD45RO+, CD62L+ 및 CD8+에 대해 양성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD4+ 헬퍼 림프구 세포는 나이브 CD4+ T 세포이며, 여기서 나이브 CD4+ T 세포는 CD45RA+, CD62L+ 및 CD4+에 대해 양성이고 CD45RO에 대해 음성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 전구체 T 세포이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 조혈 줄기 세포이다. 일부 대안에서, 조성물은 나이브 CD8+ T 세포, 중심 기억 CD8+ T 세포, 이펙터 기억 CD8+ T 세포 및 벌크 CD8+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD8+ T 세포독성 림프구 세포 또는 중심 기억 T 세포를 포함하고, 여기서 중심 기억 T 세포는 CD45RO+, CD62L+, 및 CD8+에 대해 양성이고, 또 다른 숙주 세포를 포함하며, 여기서 숙주 세포는 CD45RO+, CD62L+, 및 CD8+에 대해 양성인 중심 기억 T 세포, 또는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포, 또는 CD45RA+, CD62L+ 및 CD4+에 대해 양성이고 CD45RO에 대해 음성인 나이브 CD4+ T 세포이다.

[0037] 일부 대안에서, a) 키메라 수용체를 코딩하는 핵산의 라이브러리를 제공하는 단계이며, 여기서 각각의 복수개의

핵산은 길이가 상이한 키메라 수용체를 코딩하는 것인 단계, b) 각각의 복수개의 핵산을 별개의 단리된 T 림프구 집단에 도입시키고 각각의 T 림프구 집단을 시험관내에서 확장시키는 단계, c) 각각의 유전자 변형된 T 림프구 집단을 중양 보유 동물 모델에 투여하고, 유전자 변형된 T 림프구 집단이 항종양 효능을 갖는지 여부를 결정하는 단계, 및 d) 항종양 효능을 제공하는 키메라 수용체를 코딩하는 핵산을 선택하는 단계를 포함하는, 숙주 세포를 제조하는 방법이 제공된다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 밸현 벡터를 포함한다. 일부 대안에서, 밸현 벡터는 단리된 키메라 수용체 핵산을 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 a) 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 리간드 결합 도메인은 CD171에 결합하고/거나 그를 표적화함), b) 소정 길이의 최적화된 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 d) 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 항체 단편이다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 단일 쇄 가변 단편이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상)이다. 일부 대안에서, 스페이서는 X₁PPX₂P의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 헌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD8+ T 세포, 중심 기억 CD8+ T 세포, 이펙터 기억 CD8+ T 세포 및 벌크 CD8+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD8+ T 세포독성 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD8+ 세포독성 T 림프구 세포는 중심 기억 T 세포이며, 여기서 중심 기억 T 세포는 CD45R0+, CD62L+ 및 CD8+에 대해 양성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD4+ 헬퍼 림프구 세포는 나이브 CD4+ T 세포이며, 여기서 나이브 CD4+ T 세포는 CD45RA+, CD62L+ 및 CD4+에 대해 양성이고 CD45R0에 대해 음성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 전구체 T 세포이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 조혈 줄기 세포이다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 a) 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 리간드 결합 도메인은 CD171에 결합하고/거나 그를 표적화함), b) 소정 길이의 최적화된 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 d) 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 항체 단편이다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 단일 쇄 가변 단편이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상)이다. 일부 대안에서, 스페이서는 X₁PPX₂P의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 헌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 방법은 키메라 수용체를 코딩하는 선택된 핵산을 숙주 세포에 도입시키는 단계를 추가로 포함한다.

[0038]

일부 대안에서, 청구범위 중 어느 한 항의 숙주 세포를 제조하는 방법이 제공되며, 여기서 방법은 a) 핵산 또는 밸현 벡터를 CD45RA-, CD45R0+, 및 CD62L+ 표현형을 갖는 림프구 집단에 도입시키는 단계 및 b) 세포를 항-CD3 및/또는 항 CD28, 및 적어도 1종의 항상성 시토카인의 존재 하에 세포가 세포 주입물로서 사용하기에 충분히 확장될 때까지 배양하는 단계를 포함한다. 일부 대안에서, 밸현 벡터는 단리된 키메라 수용체 핵산을 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 a) 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 리간드 결합 도메인은 CD171에 결합하고/거나 그를 표적화함), b) 소정 길이의 최적화된 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 d) 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 항체 단편이다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 단일 쇄 가변 단편이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상)이다. 일부 대안에서, 스페이서는 X₁PPX₂P의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 헌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD8+ T

세포, 중심 기억 CD8+ T 세포, 이펙터 기억 CD8+ T 세포 및 벌크 CD8+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD8+ T 세포독성 랩프구 세포이다. 일부 대안에서, CD8+ 세포독성 T 랩프구 세포는 중심 기억 T 세포이며, 여기서 중심 기억 T 세포는 CD45RO+, CD62L+ 및 CD8+에 대해 양성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 랩프구 세포이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 랩프구 세포이다. 일부 대안에서, CD4+ 헬퍼 랩프구 세포는 나이브 CD4+ T 세포이며, 여기서 나이브 CD4+ T 세포는 CD45RA+, CD62L+ 및 CD4+에 대해 양성이고 CD45RO에 대해 음성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 전구체 T 세포이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 조혈 줄기 세포이다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 랩프구는 CD8+ 또는 CD4+이다.

[0039]

일부 대안에서, 청구범위의 숙주 세포 또는 조성물의 용도가 제공되며, 여기서 용도는 CD171을 발현하는 암 또는 고형 종양의 치료를 위한 것이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 발현 백터를 포함한다. 일부 대안에서, 발현 백터는 단리된 키메라 수용체 핵산을 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 a) 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 리간드 결합 도메인은 CD171에 결합하고/거나 그를 표적화함), b) 소정 길이의 최적화된 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 d) 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 항체 단편이다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 단일 쇄 가변 단편이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상)이다. 일부 대안에서, 스페이서는 X₁PPX₂P의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 헌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD8+ T 세포, 중심 기억 CD8+ T 세포, 이펙터 기억 CD8+ T 세포 및 벌크 CD8+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD8+ T 세포독성 랩프구 세포이다. 일부 대안에서, CD8+ 세포독성 T 랩프구 세포는 중심 기억 T 세포이며, 여기서 중심 기억 T 세포는 CD45RO+, CD62L+ 및 CD8+에 대해 양성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 랩프구 세포이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 랩프구 세포이다. 일부 대안에서, CD4+ 헬퍼 랩프구 세포는 나이브 CD4+ T 세포이며, 여기서 나이브 CD4+ T 세포는 CD45RA+, CD62L+ 및 CD4+에 대해 양성이고 CD45RO에 대해 음성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 전구체 T 세포이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 조혈 줄기 세포이다. 일부 대안에서, 제약상 허용되는 부형제 중 숙주 세포를 포함하는 조성물이 제공된다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 발현 백터를 포함한다. 일부 대안에서, 발현 백터는 단리된 키메라 수용체 핵산을 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 a) 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 리간드 결합 도메인은 CD171에 결합하고/거나 그를 표적화함), b) 소정 길이의 최적화된 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 d) 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 항체 단편이다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 단일 쇄 가변 단편이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상)이다. 일부 대안에서, 스페이서는 X₁PPX₂P의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 헌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD8+ T 세포, 중심 기억 CD8+ T 세포, 이펙터 기억 CD8+ T 세포 및 벌크 CD8+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD8+ T 세포독성 랩프구 세포이다. 일부 대안에서, CD8+ 세포독성 T 랩프구 세포는 중심 기억 T 세포이며, 여기서 중심 기억 T 세포는 CD45RO+, CD62L+ 및 CD8+에 대해 양성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 랩프구 세포이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 랩프구 세포이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 랩프구 세포이다.

CD4+ T 헬퍼 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD4+ 헬퍼 림프구 세포는 나이브 CD4+ T 세포이며, 여기서 나이브 CD4+ T 세포는 CD45RA+, CD62L+ 및 CD4+에 대해 양성이고 CD45RO에 대해 음성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 전구체 T 세포이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 조혈 줄기 세포이다. 일부 대안에서, 조성물은 나이브 CD8+ T 세포, 중심 기억 CD8+ T 세포, 이펙터 기억 CD8+ T 세포 및 벌크 CD8+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD8+ T 세포독성 림프구 세포 또는 중심 기억 T 세포를 포함하고, 여기서 중심 기억 T 세포는 CD45RO+, CD62L+, 및 CD8+에 대해 양성이고, 또 다른 숙주 세포를 포함하며, 여기서 숙주 세포는 CD45RO+, CD62L+, 및 CD8+에 대해 양성인 중심 기억 T 세포, 또는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포, 또는 CD45RA+, CD62L+ 및 CD4+에 대해 양성이고 CD45RO에 대해 음성인 나이브 CD4+ T 세포이다. 일부 대안에서, 암은 신경모세포종이다. 일부 대안에서, 고형 종양은 유방암, 뇌암, 결장암, 신암, 췌장암 및 난소암으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0040]

일부 대안에서, 조성물 또는 숙주 세포를 암 또는 종양을 갖는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 세포 면역요법을 수행하는 방법이 제공된다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 밸현 벡터를 포함한다. 일부 대안에서, 밸현 벡터는 단리된 키메라 수용체 핵산을 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 a) 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 리간드 결합 도메인은 CD171에 결합하고/거나 그를 표적화함), b) 소정 길이의 최적화된 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 d) 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 항체 단편이다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 단일 쇄 가변 단편이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상)이다. 일부 대안에서, 스페이서는 X₁PPX₂P의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 힌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD8+ T 세포, 중심 기억 CD8+ T 세포, 이펙터 기억 CD8+ T 세포 및 벌크 CD8+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD8+ T 세포독성 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD8+ 세포독성 T 림프구 세포는 중심 기억 T 세포이며, 여기서 중심 기억 T 세포는 CD45RO+, CD62L+ 및 CD8+에 대해 양성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD4+ 헬퍼 림프구 세포는 나이브 CD4+ T 세포이며, 여기서 나이브 CD4+ T 세포는 CD45RA+, CD62L+ 및 CD4+에 대해 양성이고 CD45RO에 대해 음성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 전구체 T 세포이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 조혈 줄기 세포이다. 일부 대안에서, 제약상 허용되는 부형제 중 숙주 세포를 포함하는 조성물이 제공된다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 밸현 벡터를 포함한다. 일부 대안에서, 밸현 벡터는 단리된 키메라 수용체 핵산을 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 a) 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 리간드 결합 도메인은 CD171에 결합하고/거나 그를 표적화함), b) 소정 길이의 최적화된 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 d) 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 항체 단편이다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 단일 쇄 가변 단편이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상)이다. 일부 대안에서, 스페이서는 X₁PPX₂P의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 힌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD8+ T 세포, 중심 기억 CD8+ T 세포, 이펙터 기억 CD8+ T 세포 및 벌크 CD8+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD8+ T 세포독성 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD8+ 세포독성 T 림프구 세포는 중심 기억 T 세포이며, 여기서 중심 기억 T 세포는 CD45RO+, CD62L+ 및 CD8+에 대해 양성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD4+ T

세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이팩터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD4+ 헬퍼 림프구 세포는 나이브 CD4+ T 세포이며, 여기서 나이브 CD4+ T 세포는 CD45RA+, CD62L+ 및 CD4+에 대해 양성이고 CD45RO에 대해 음성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 전구체 T 세포이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 조혈 줄기 세포이다. 일부 대안에서, 조성물은 나이브 CD8+ T 세포, 중심 기억 CD8+ T 세포, 이팩터 기억 CD8+ T 세포 및 벌크 CD8+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD8+ T 세포독성 림프구 세포 또는 중심 기억 T 세포를 포함하고, 여기서 중심 기억 T 세포는 CD45RO+, CD62L+, 및 CD8+에 대해 양성이고, 또 다른 숙주 세포를 포함하며, 여기서 숙주 세포는 CD45RO+, CD62L+, 및 CD8+에 대해 양성인 중심 기억 T 세포, 또는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이팩터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포, 또는 CD45RA+, CD62L+ 및 CD4+에 대해 양성이고 CD45RO에 대해 음성인 나이브 CD4+ T 세포이다. 일부 대안에서, 암은 신경모세포종이다. 일부 대안에서, 종양은 유방암, 뇌암, 결장암, 신암, 췌장암 및 난소암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 대안에서, 스페이서는 참조 키메라 수용체와 비교 시 리간드에 반응하여 증가된 T 세포 증식 및/또는 시토카인 생산을 위해 최적화된다.

[0041]

또 다른 대안은 키메라 수용체 핵산에 의해 코딩되는 키메라 수용체 폴리펩티드에 관한 것이다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 a) CD171에 특이적으로 결합하고/거나 그를 표적화하는 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, b) 키메라 수용체의 리간드 결합 도메인과 막횡단 도메인을 연결하는, 100개 아미노산 미만 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상) 길이의 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 키메라 수용체의 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 키메라 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 X_1PPX_2P 의 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 X_1 및 X_2 는 독립적으로 임의의 아미노산이다. 일부 대안에서, X_1 및/또는 X_2 는 시스테인이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 미만 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상) 길이이다. 일부 대안에서, 스페이서는 12, 13, 14 또는 15개 아미노산 길이 또는 상기 언급된 길이 중 임의의 2개에 의해 규정된 범위 내의 길이이다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 힌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 EPKSCDKTHTCPPCP (서열식별번호: 17), ERKCCVECPPCP (서열식별번호: 18), ELKTPLGDTHTCPSCP (EPKSCDTPPPCPRCP)₃ (서열식별번호: 19), ESKYGPPCPSCP (서열식별번호: 20), ESKYGPPCPPCP (서열식별번호: 21), YGPPCPPCP (서열식별번호: 51), KYGPPCPPCP (서열식별번호: 52) 또는 EVVKYGYPPCPPCP (서열식별번호: 53)를 포함하거나, 그로 이루어지거나, 또는 그로 본질적으로 이루어진다. 일부 대안에서, 스페이서는 ESKYGPPCPSCP (서열식별번호: 20), ESKYGPPCPPCP (서열식별번호: 21), YGPPCPPCP (서열식별번호: 51), KYGPPCPPCP (서열식별번호: 52) 또는 EVVKYGYPPCPPCP (서열식별번호: 53)로 이루어지거나 또는 그로 본질적으로 이루어진다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 또 다른 공동자극 분자의 세포내 부분을 추가로 포함하지 않고/거나, 여기서 세포내 신호전달 도메인은 CD27, CD28, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3으로 이루어진 군으로부터 선택된 분자의 세포내 신호전달 부분을 포함하지 않고/거나, 여기서 세포내 신호전달 도메인은 CD28의 세포내 신호전달 부분을 포함하지 않는다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 참조 키메라 수용체와 비교 시 리간드에 반응하여 증가된 T 세포 증식 및/또는 시토카인 생산을 제공한다.

[0042]

또 다른 대안은 키메라 수용체 핵산을 포함하는 발현 벡터에 관한 것이다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 a) CD171에 특이적으로 결합하고/거나 그를 표적화하는 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, b) 키메라 수용체의 리간드 결합 도메인과 막횡단 도메인을 연결하는, 100개 아미노산 미만 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상) 길이의 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 키메라 수용체의 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 키메라 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 X_1PPX_2P 의 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 X_1 및 X_2 는 독립적으로 임의의 아미노산이다. 일부 대안에서, X_1 및/또는 X_2 는 시스테인이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 미만 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상) 길이이다. 일부 대안에서, 스페이서는 12, 13, 14 또는 15개 아미노산 길이 또는 상기 언급된 길이 중 임의의 2개에 의해 규정된 범위 내의 길이이다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 힌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 EPKSCDKTHTCPPCP

(서열식별번호: 17), ERKCCVECPPCP (서열식별번호: 18), ELKTPLDTHTCPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP)₃ (서열식별번호: 19), ESKYGPPCPSCP (서열식별번호: 20), ESKYGPPCPSCP (서열식별번호: 21), YGPPCPPCP (서열식별번호: 51), KYGPPCPSCP (서열식별번호: 52) 또는 EVVKYGGPCPPCP (서열식별번호: 53)를 포함하거나, 그로 이루어지거나, 또는 그로 본질적으로 이루어진다. 일부 대안에서, 스페이서는 ESKYGPPCPSCP (서열식별번호: 20), ESKYGPPCPSCP (서열식별번호: 21), YGPPCPPCP (서열식별번호: 51), KYGPPCPSCP (서열식별번호: 52) 또는 EVVKYGGPCPPCP (서열식별번호: 53)로 이루어지거나 또는 그로 본질적으로 이루어진다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 또 다른 공동자극 분자의 세포내 부분을 추가로 포함하지 않고/거나, 여기서 세포내 신호전달 도메인은 CD27, CD28, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3으로 이루어진 군으로부터 선택된 분자의 세포내 신호전달 부분을 포함하지 않고/거나, 여기서 세포내 신호전달 도메인은 CD28의 세포내 신호전달 부분을 포함하지 않는다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 참조 키메라 수용체와 비교 시 리간드에 반응하여 증가된 T 세포 증식 및/또는 시토카인 생산을 제공한다.

[0043]

일부 대안에서, 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 일부 대안에서, 발현 벡터는 키메라 수용체 핵산을 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 a) CD171에 특이적으로 결합하고/거나 그를 표적화하는 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, b) 키메라 수용체의 리간드 결합 도메인과 막횡단 도메인을 연결하는, 100개 아미노산 미만 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상) 길이의 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 키메라 수용체의 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 키메라 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 X₁PPX₂P의 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 X₁ 및 X₂는 독립적으로 임의의 아미노산이다. 일부 대안에서, X₁ 및/또는 X₂는 시스테인이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 미만 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상) 길이이다. 일부 대안에서, 스페이서는 12, 13, 14 또는 15개 아미노산 길이 또는 상기 언급된 길이 중 임의의 2개에 의해 규정된 범위 내의 길이이다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 헌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 EPKSCDKTHTCPCP (서열식별번호: 17), ERKCCVECPPCP (서열식별번호: 18), ELKTPLDTHTCPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP)₃ (서열식별번호: 19), ESKYGPPCPSCP (서열식별번호: 20), ESKYGPPCPSCP (서열식별번호: 21), YGPPCPPCP (서열식별번호: 51), KYGPPCPSCP (서열식별번호: 52) 또는 EVVKYGGPCPPCP (서열식별번호: 53)를 포함하거나, 그로 이루어지거나, 또는 그로 본질적으로 이루어진다. 일부 대안에서, 스페이서는 ESKYGPPCPSCP (서열식별번호: 20), ESKYGPPCPSCP (서열식별번호: 21), YGPPCPPCP (서열식별번호: 51), KYGPPCPSCP (서열식별번호: 52) 또는 EVVKYGGPCPPCP (서열식별번호: 53)로 이루어지거나 또는 그로 본질적으로 이루어진다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 또 다른 공동자극 분자의 세포내 부분을 추가로 포함하지 않고/거나, 여기서 세포내 신호전달 도메인은 CD27, CD28, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3으로 이루어진 군으로부터 선택된 분자의 세포내 신호전달 부분을 포함하지 않고/거나, 여기서 세포내 신호전달 도메인은 CD28의 세포내 신호전달 부분을 포함하지 않는다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 CD8+ T 세포독성 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD8+ 세포독성 T 림프구 세포는 중심 기억 T 세포이며, 여기서 중심 기억 T 세포는 CD45RO, CD62L 및 CD8에 대해 양성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD4+ 헬퍼 림프구 세포는 나이브 CD4+ T 세포이며, 여기서 나이브 CD4+ T 세포는 CD45RA, CD62L 및/또는 CD4에 대해 양성이고/거나 CD45RO에 대해 음성이다. 일부 대안에서, 스페이서는 참조 키메라 수용체와 비교 시 리간드에 반응하여 증가된 T 세포 증식 및/또는 시토카인 생산을 제공한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 전구체 T 세포이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 조혈 줄기 세포이다.

[0044]

일부 대안에서, 숙주 세포를 포함하는 조성물이 제공된다. 일부 대안에서, 조성물은 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 전구체 T 세포이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 조혈 줄기 세포이다. 일부 대안에서, 발현 벡터는 키메라 수용체 핵산을 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산

은 a) CD171에 특이적으로 결합하고/거나 그를 표적화하는 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, b) 키메라 수용체의 리간드 결합 도메인과 막횡단 도메인을 연결하는, 100개 아미노산 미만 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상) 길이의 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 키메라 수용체의 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 키메라 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 X_1PPX_2P 의 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 X_1 및 X_2 는 독립적으로 임의의 아미노산이다. 일부 대안에서, X_1 및/또는 X_2 는 시스테인이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 미만 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상) 길이이다. 일부 대안에서, 스페이서는 12, 13, 14 또는 15개 아미노산 길이 또는 상기 언급된 길이 중 임의의 2개에 의해 규정된 범위 내의 길이이다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 헌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 EPKSCDKTHTCPCP (서열식별번호: 17), ERKCCVECPPCP (서열식별번호: 18), ELKTPLGDTHTCPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP)₃ (서열식별번호: 19), ESKYGPPCPSCP (서열식별번호: 20), ESKYGPPCPPCP (서열식별번호: 21), YGPPCPPCP (서열식별번호: 51), KYGPPCPPCP (서열식별번호: 52) 또는 EVVKYGPPCPPCP (서열식별번호: 53)를 포함하거나, 그로 이루어지거나, 또는 그로 본질적으로 이루어진다. 일부 대안에서, 스페이서는 ESKYGPPCPSCP (서열식별번호: 20), ESKYGPPCPPCP (서열식별번호: 21), YGPPCPPCP (서열식별번호: 51), KYGPPCPPCP (서열식별번호: 52) 또는 EVVKYGPPCPPCP (서열식별번호: 53)로 이루어지거나 또는 그로 본질적으로 이루어진다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 또 다른 공동자극 분자의 세포내 부분을 추가로 포함하지 않고/거나, 여기서 세포내 신호전달 도메인은 CD27, CD28, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3으로 이루어진 군으로부터 선택된 분자의 세포내 신호전달 부분을 포함하지 않고/거나, 여기서 세포내 신호전달 도메인은 CD28의 세포내 신호전달 부분을 포함하지 않는다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 CD8+ T 세포독성 림프구 세포이다. 조성물의 일부 대안에서, 상기 숙주 세포는 나이브 CD8+ T 세포, 중심 기억 CD8+ T 세포, 이펙터 기억 CD8+ T 세포 또는 벌크 CD8+ T 세포로 본질적으로 이루어지거나 또는 이에 대해 풍부화된 바 있는 CD8+ 세포의 집단을 포함한다. 일부 대안에서, CD8+ 세포의 상기 집단은 CD45R0, CD62L 및 CD8에 대해 양성인 CD8+ 중심 기억 T 세포로 본질적으로 이루어지거나 또는 이에 대해 풍부화된 바 있다. 일부 대안에서, 상기 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구로 본질적으로 이루어지거나 또는 이에 대해 풍부화된 바 있는 CD4+ 세포의 집단을 포함한다. 일부 대안에서, CD4+ 세포의 상기 집단은 CD45RA, CD62L 및 CD4에 대해 양성이고 CD45R0에 대해 음성인 나이브 CD4+ T 세포로 본질적으로 이루어지거나 또는 이에 대해 풍부화된 바 있다. 일부 대안에서, CD8+ 세포독성 T 림프구 세포는 중심 기억 T 세포이며, 여기서 중심 기억 T 세포는 CD45R0, CD62L 및 CD8에 대해 양성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD4+ 헬퍼 림프구 세포는 나이브 CD4+ T 세포이며, 여기서 나이브 CD4+ T 세포는 CD45RA, CD62L 및/또는 CD4에 대해 양성이고/거나 CD45R0에 대해 음성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 전구체 T 세포이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 조혈 줄기 세포이다.

[0045] 또 다른 대안에서, 숙주 세포를 포함하는 조성물 또는 제약상 허용되는 부형제 중 숙주 세포의 조성물이 제공된다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 발현 백터를 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 전구체 T 세포이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 조혈 줄기 세포이다. 일부 대안에서, 발현 백터는 키메라 수용체 핵산을 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 a) CD171에 특이적으로 결합하고/거나 그를 표적화하는 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, b) 키메라 수용체의 리간드 결합 도메인과 막횡단 도메인을 연결하는, 100개 아미노산 미만 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상) 길이의 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 키메라 수용체의 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 키메라 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 X_1PPX_2P 의 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 X_1 및 X_2 는 독립적으로 임의의 아미노산이다. 일부 대안에서, X_1 및/또는 X_2 는 시스테인이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 미만 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상) 길이이다. 일부 대안에서, 스페이서는 12, 13, 14 또는 15개 아미노산 길이 또는 상기 언급된 길이 중 임의의 2개에 의해 규정된 범위 내의 길이이다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 헌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 EPKSCDKTHTCPCP (서열식별번호: 17), ERKCCVECPPCP (서열식별번호: 18), ELKTPLGDTHTCPRCP

(EPKSCDTPPPCPRCP)₃ (서열식별번호: 19), ESKYGPSCPSCP (서열식별번호: 20), ESKYGPCCPPCP (서열식별번호: 21), YGPPCCPPCP (서열식별번호: 51), KYGPPCCPPCP (서열식별번호: 52) 또는 EVVKYGPCCPPCP (서열식별번호: 53)를 포함하거나, 그로 이루어지거나, 또는 그로 본질적으로 이루어진다. 일부 대안에서, 스페이서는 ESKYGPSCPSCP (서열식별번호: 20), ESKYGPCCPPCP (서열식별번호: 21), YGPPCCPPCP (서열식별번호: 51), KYGPPCCPPCP (서열식별번호: 52) 또는 EVVKYGPCCPPCP (서열식별번호: 53)로 이루어지거나 또는 그로 본질적으로 이루어진다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 또 다른 공동자극 분자의 세포내 부분을 추가로 포함하지 않고/거나, 여기서 세포내 신호전달 도메인은 CD27, CD28, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3으로 이루어진 군으로부터 선택된 분자의 세포내 신호전달 부분을 포함하지 않고/거나, 여기서 세포내 신호전달 도메인은 CD28의 세포내 신호전달 부분을 포함하지 않는다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 CD8+ T 세포독성 램프구 세포이다. 일부 대안에서, CD8+ 세포독성 T 램프구 세포는 중심 기억 T 세포이며, 여기서 중심 기억 T 세포는 CD45RO, CD62L 및/또는 CD8에 대해 양성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 램프구 세포이다. 일부 대안에서, CD4+ 헬퍼 램프구 세포는 나이브 CD4+ T 세포이며, 여기서 나이브 CD4+ T 세포는 CD45RA, CD62L 및/또는 CD4에 대해 양성이고/거나 CD45RO에 대해 음성이다. 일부 대안에서, 조성물은 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 포함한다. 일부 대안에서, 발현 벡터는 키메라 수용체 핵산을 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 a) CD171에 특이적으로 결합하고/거나 그를 표적화하는 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, b) 키메라 수용체의 리간드 결합 도메인과 막획단 도메인을 연결하는, 100개 아미노산 미만 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상) 길이의 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 키메라 수용체의 막획단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 키메라 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 X₁PPX₂P의 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 X₁ 및 X₂는 독립적으로 임의의 아미노산이다. 일부 대안에서, X₁ 및/또는 X₂는 시스테인이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 미만 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상) 길이이다. 일부 대안에서, 스페이서는 12, 13, 14 또는 15개 아미노산 길이 또는 상기 언급된 길이 중 임의의 2개에 의해 규정된 범위 내의 길이이다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 헌자 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 EPKSCDKTHTCPPCP (서열식별번호: 17), ERKCCVECPPCP (서열식별번호: 18), ELKTPLDTHCPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP)₃ (서열식별번호: 19), ESKYGPSCPSCP (서열식별번호: 20), ESKYGPCCPPCP (서열식별번호: 21), YGPPCCPPCP (서열식별번호: 51), KYGPPCCPPCP (서열식별번호: 52) 또는 EVVKYGPCCPPCP (서열식별번호: 53)로 이루어지거나 또는 그로 본질적으로 이루어진다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 또 다른 공동자극 분자의 세포내 부분을 추가로 포함하지 않고/거나, 여기서 세포내 신호전달 도메인은 CD27, CD28, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3으로 이루어진 군으로부터 선택된 분자의 세포내 신호전달 부분을 포함하지 않고/거나, 여기서 세포내 신호전달 도메인은 CD28의 세포내 신호전달 부분을 포함하지 않는다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 CD8+ T 세포독성 램프구 세포이다. 조성물의 일부 대안에서, 상기 숙주 세포는 나이브 CD8+ T 세포, 중심 기억 CD8+ T 세포, 이펙터 기억 CD8+ T 세포 또는 벌크 CD8+ T 세포로 본질적으로 이루어지거나 또는 이에 대해 풍부화된 바 있는 CD8+ 세포의 집단을 포함한다. 일부 대안에서, CD8+ 세포의 상기 집단은 CD45RO, CD62L 및/또는 CD8에 대해 양성인 CD8+ 중심 기억 T 세포로 본질적으로 이루어지거나 또는 이에 대해 풍부화된 바 있는 CD8+ 세포의 집단을 포함한다. 일부 대안에서, CD8+ 세포의 상기 집단은 CD45RA, CD62L 및/또는 CD4에 대해 양성이고/거나 CD45RO에 대해 음성인 나이브 CD4+ T 세포로 본질적으로 이루어지거나 또는 이에 대해 풍부화된 바 있는 CD4+ 세포의 집단을 포함한다. 일부 대안에서, CD4+ 세포의 상기 집단은 CD45RA, CD62L 및/또는 CD4에 대해 양성이고/거나 CD45RO에 대해 음성인 나이브 CD4+ T 세포로 본질적으로 이루어지거나 또는 이에 대해 풍부화된 바 있는 CD4+ 세포의 집단을 포함한다.

화된 바 있다. 일부 대안에서, CD8+ 세포독성 T 림프구 세포는 중심 기억 T 세포이며, 여기서 중심 기억 T 세포는 CD45RO, CD62L 및 CD8에 대해 양성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프 구 세포이다. 일부 대안에서, CD4+ 헬퍼 림프구 세포는 나이브 CD4+ T 세포이며, 여기서 나이브 CD4+ T 세포는 CD45RA, CD62L 및/또는 CD4에 대해 양성이고/거나 CD45RO에 대해 음성이다. 일부 대안에서, 조성물은 숙주 세포를 포함하며, 여기서 숙주 세포는 CD8+ T 세포독성 림프구 세포이거나 또는 CD8+ 세포독성 T 림프구 세포는 중심 기억 T 세포이고, 여기서 중심 기억 T 세포는 CD45RO, CD62L 및/또는 CD8에 대해 양성이고, 또 다른 숙주 세포를 포함하며, 여기서 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포이거나 또는 CD4+ 헬퍼 림프구 세포는 나이브 CD4+ T 세포이고, 여기서 나이브 CD4+ T 세포는 CD45RA, CD62L 및/또는 CD4에 대해 양성이고/거나 CD45RO에 대해 음성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 전구체 T 세포이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 조혈 줄기 세포이다.

[0046] 또 다른 대안에서, 숙주 세포를 제조하는 시험관내 방법이 제공된다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 발현 벡터를 포함한다. 일부 대안에서, 발현 벡터는 키메라 수용체 핵산을 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 a) CD171에 특이적으로 결합하고/거나 그를 표적화하는 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, b) 키메라 수용체의 리간드 결합 도메인과 막횡단 도메인을 연결하는, 100개 아미노산 미만 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상) 길이의 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 키메라 수용체의 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 키메라 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 X_1PPX_2P 의 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 X_1 및 X_2 는 독립적으로 임의의 아미노산이다. 일부 대안에서, X_1 및/또는 X_2 는 시스테인이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 미만 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상) 길이이다. 일부 대안에서, 스페이서는 12, 13, 14 또는 15개 아미노산 길이 또는 상기 언급된 길이 중 임의의 2개에 의해 규정된 범위 내의 길이이다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 힌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 EPKSCDKTHTCPPCP (서열식별번호: 17), ERKCCVECPPCP (서열식별번호: 18), ELKTPLGDTHTCPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP)₃ (서열식별번호: 19), ESKYGPPCPSCP (서열식별번호: 20), ESKYGPPCPSCP (서열식별번호: 21), YGPPCPSCP (서열식별번호: 51), KYGPPCPSCP (서열식별번호: 52) 또는 EVVKYGPPCPSCP (서열식별번호: 53)를 포함하거나, 그로 이루어지거나, 또는 그로 본질적으로 이루어진다. 일부 대안에서, 스페이서는 ESKYGPPCPSCP (서열식별번호: 20), ESKYGPPCPSCP (서열식별번호: 21), YGPPCPSCP (서열식별번호: 51), KYGPPCPSCP (서열식별번호: 52) 또는 EVVKYGPPCPSCP (서열식별번호: 53)로 이루어지거나 또는 그로 본질적으로 이루어진다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD27, CD28, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3으로 이루어진 군으로부터 선택된 분자의 세포내 신호전달 부분을 포함하지 않고/거나, 여기서 세포내 신호전달 도메인은 CD28의 세포내 신호 전달 부분을 포함하지 않는다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 CD8+ T 세포독성 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD8+ 세포독성 T 림프구 세포는 중심 기억 T 세포이며, 여기서 중심 기억 T 세포는 CD45RO, CD62L 및/또는 CD8에 대해 양성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD4+ 헬퍼 림프구 세포는 나이브 CD4+ T 세포이며, 여기서 나이브 CD4+ T 세포는 CD45RA, CD62L 및/또는 CD4에 대해 양성이고/거나 CD45RO에 대해 음성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 CD8+ T 세포독성 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD8+ 세포독성 T 림프구 세포는 중심 기억 T 세포이며, 여기서 중심 기억 T 세포는 CD45RO, CD62L 및/또는 CD8에 대해 양성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD4+ 헬퍼 림프구 세포는 나이브 CD4+ T 세포이며, 여기서 나이브 CD4+ T 세포는 CD45RA, CD62L 및/또는 CD4에 대해 양성이고/거나 CD45RO에 대해 음성이다. 일부 대안에서, 방법은 a) 각각 키메라 수용체를 코딩하는 복수개의 핵산을 포함하는 라이브러리를 제공하는 단계이며, 여기서 복수개의 핵산에 의해 코딩된 각각의 복수개의 키메라 수용체는 길이가 상이한 것인 단계, b) 각각의 복수개의 핵산을 별개의 림프구 집단에 도입시키고 각각의 T 림프구 집단을 시험관내에서 확장시켜 복수개의 유전자 변형된 T 림프구 집단을 생성하는 단계, c) 각각의 T 림프구 집단을 시험관내에서 확장시켜 복수개의 유전자 변형된 T 림프구 집단을 생성하는 단계,

각의 복수개의 유전자 변형된 T 림프구 집단을 종양 보유 동물 모델에 투여하고, 항종양 효능의 판독을 평가하는 단계 및 d) 시험관내 및/또는 동물 모델에서 항종양 효능을 나타내는 키메라 수용체를 코딩하는 핵산을 선택하는 단계를 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 a) CD171에 특이적으로 결합하고/거나 그를 표적화하는 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, b) 키메라 수용체의 리간드 결합 도메인과 막횡단 도메인을 연결하는, 100개 아미노산 미만 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상) 길이의 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 키메라 수용체의 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 키메라 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 X_1PPX_2P 의 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 X_1 및 X_2 는 독립적으로 임의의 아미노산이다. 일부 대안에서, X_1 및/또는 X_2 는 시스테인이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 미만 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상) 길이이다. 일부 대안에서, 스페이서는 12, 13, 14 또는 15개 아미노산 길이 또는 상기 언급된 길이 중 임의의 2개에 의해 규정된 범위 내의 길이이다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 헌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 EPKSCDKTHTCPCPCP (서열식별번호: 17), ERKCCVECPPCP (서열식별번호: 18), ELKTPLGDTHTCPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP)₃ (서열식별번호: 19), ESKYGPPCPSCP (서열식별번호: 20), ESKYGPPCPPCP (서열식별번호: 21), YGPPCPPCP (서열식별번호: 51), KYGPPCPPCP (서열식별번호: 52) 또는 EVVKYGPCCPPCP (서열식별번호: 53)를 포함하거나, 그로 이루어지거나, 또는 그로 본질적으로 이루어진다. 일부 대안에서, 스페이서는 ESKYGPPCPSCP (서열식별번호: 20), ESKYGPPCPPCP (서열식별번호: 21), YGPPCPPCP (서열식별번호: 51), KYGPPCPPCP (서열식별번호: 52) 또는 EVVKYGPCCPPCP (서열식별번호: 53)로 이루어지거나 또는 그로 본질적으로 이루어진다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 또 다른 공동자극 분자의 세포내 부분을 추가로 포함하지 않고/거나, 여기서 세포내 신호전달 도메인은 CD27, CD28, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3으로 이루어진 군으로부터 선택된 분자의 세포내 신호전달 부분을 포함하지 않고/거나, 여기서 세포내 신호전달 도메인은 CD28의 세포내 신호전달 부분을 포함하지 않는다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 복수개의 핵산은 발현 벡터를 코딩한다. 일부 대안에서, 발현 벡터는 키메라 수용체 핵산을 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 a) CD171에 특이적으로 결합하고/거나 그를 표적화하는 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, b) 키메라 수용체의 리간드 결합 도메인과 막횡단 도메인을 연결하는, 100개 아미노산 미만 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상) 길이의 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 키메라 수용체의 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 키메라 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 X_1PPX_2P 의 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 X_1 및 X_2 는 독립적으로 임의의 아미노산이다. 일부 대안에서, X_1 및/또는 X_2 는 시스테인이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 미만 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상) 길이이다. 일부 대안에서, 스페이서는 12, 13, 14 또는 15개 아미노산 길이 또는 상기 언급된 길이 중 임의의 2개에 의해 규정된 범위 내의 길이이다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 헌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 EPKSCDKTHTCPCPCP (서열식별번호: 17), ERKCCVECPPCP (서열식별번호: 18), ELKTPLGDTHTCPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP)₃ (서열식별번호: 19), ESKYGPPCPSCP (서열식별번호: 20), ESKYGPPCPPCP (서열식별번호: 21), YGPPCPPCP (서열식별번호: 51), KYGPPCPPCP (서열식별번호: 52) 또는 EVVKYGPCCPPCP (서열식별번호: 53)를 포함하거나, 그로 이루어지거나, 또는 그로 본질적으로 이루어진다. 일부 대안에서, 스페이서는 ESKYGPPCPSCP (서열식별번호: 20), ESKYGPPCPPCP (서열식별번호: 21), YGPPCPPCP (서열식별번호: 51), KYGPPCPPCP (서열식별번호: 52) 또는 EVVKYGPCCPPCP (서열식별번호: 53)로 이루어지거나 또는 그로 본질적으로 이루어진다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 또 다른 공동자극 분자의 세포내 부분을 추가로 포함하지 않고/거나, 여기서 세포내 신호전달 도메인은 CD27, CD28, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3으로 이루어진 군으로부터 선택된 분자의 세포내 신호전달 부분을 포함하지 않고/거나, 여기서 세포내 신호전달 도메인은 CD28의 세포내 신호전달 부분을 포함하지 않는다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 방법은 키메라 수용체를 코딩하는 선택된 핵산을 숙주 세포에 도입시키는 단계를 추가

로 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 전구체 T 세포이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 조혈 줄기 세포이다.

[0047] 일부 대안에서, 항원을 표적화하기 위한 키메라 수용체를 선택하는 시험관내 방법이 제공되며, 여기서 방법은 각각의 복수개의 세포 집단을 항원을 발현하는 공여자 세포와 함께 일련의 순차적 재귀적 라운드로 인큐베이션 하며, 여기서 복수개의 세포 집단은 다양한 길이의 복수개의 키메라 수용체를 코딩하는 핵산을 포함하며, 각각의 키메라 수용체는 항원에 특이적으로 결합하고/거나 그를 표적화하는 것인 단계, 및 각각의 복수개의 세포 집단의 확장, 활성화 및/또는 생존을 평가하는 단계, 및 상기 평가를 기반으로 하여 키메라 수용체를 선택하는 단계를 포함한다. 일부 대안에서, 일련의 순차적 라운드는 적어도 3 라운드의 인큐베이션을 포함하며, 여기서 세포 집단은 라운드 사이에 수거된다. 일부 대안에서, 평가는 순차적 라운드의 인큐베이션 후에 각각의 집단의 생존 또는 생존 세포의 수 또는 백분율을 검출하는 것에 의해 수행되고, 여기서 선택된 키메라 수용체는 생존 또는 세포 수 또는 백분율이 또 다른 복수개의 세포 집단에 비해 증가된 집단에 의해 발현된다. 일부 대안에서, 집단의 세포 및 항원을 발현하는 세포는 각 라운드의 시작 시에 1:1의 비로 인큐베이션된다. 일부 대안에서, 다양한 길이의 키메라 수용체는 상이한 길이의 스페이서를 포함하고/거나 (각각의 스페이서는 키메라 수용체의 항원 결합 도메인과 막횡단 도메인을 연결함); 다양한 길이의 키메라 수용체는 다양한 수의 세포내 공동자극 도메인 (각각 개별적으로 상이한 천연 공동자극 분자로부터의 세포내 도메인)을 갖는 키메라 수용체를 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 전구체 T 세포이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 조혈 줄기 세포이다.

[0048] 또 다른 대안에서, 숙주 세포를 제조하는 시험관내 방법이 제공되며, 여기서 방법은 상기 제시된 바와 같은 핵산 또는 상기 제시된 바와 같은 발현 벡터를 CD45RA, CD45RO+, 및/또는 CD62L+ 표현형을 갖는 림프구 집단에 도입시키는 단계 및 세포를 항-CD3 및/또는 항 CD28, 및 적어도 1종의 항상성 시토카인의 존재 하에 세포가 세포 주입물로서 사용하기에 충분히 확장될 때까지 배양하는 단계를 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 상기 제시된 바와 같은 발현 벡터를 포함한다. 일부 대안에서, 발현 벡터는 상기 제시된 바와 같은 키메라 수용체 핵산을 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 a) CD171에 특이적으로 결합하고/거나 그를 표적화하는 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, b) 키메라 수용체의 리간드 결합 도메인과 막횡단 도메인을 연결하는, 100개 아미노산 미만 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상) 길이의 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 키메라 수용체의 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 키메라 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 X₁PPX₂P의 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 X₁ 및 X₂는 독립적으로 임의의 아미노산이다. 일부 대안에서, X₁ 및/또는 X₂는 시스테인이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 미만 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상) 길이이다. 일부 대안에서, 스페이서는 12, 13, 14 또는 15개 아미노산 길이 또는 상기 언급된 길이 중 임의의 2개에 의해 규정된 범위 내의 길이이다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 헌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 EPKSCDKTHTCPPCP (서열식별번호: 17), ERKCCVECPPCP (서열식별번호: 18), ELKTPLDTHTCPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP)₃ (서열식별번호: 19), ESKYGPPCPSCP (서열식별번호: 20), ESKYGPPCPPCP (서열식별번호: 21), YGPPCPPCP (서열식별번호: 51), KYGPPCPPCP (서열식별번호: 52) 또는 EVVKYGYPPCPPCP (서열식별번호: 53)를 포함하거나, 그로 이루어지거나, 또는 그로 본질적으로 이루어진다. 일부 대안에서, 스페이서는 ESKYGPPCPSCP (서열식별번호: 20), ESKYGPPCPPCP (서열식별번호: 21), YGPPCPPCP (서열식별번호: 51), KYGPPCPPCP (서열식별번호: 52) 또는 EVVKYGYPPCPPCP (서열식별번호: 53)로 이루어지거나 또는 그로 본질적으로 이루어진다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 또 다른 공동자극 분자의 세포내 부분을 추가로 포함하지 않고/거나, 여기서 세포내 신호전달 도메인은 CD27, CD28, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3으로 이루어진 군으로부터 선택된 분자의 세포내 신호전달 부분을 포함하지 않고/거나, 여기서 세포내 신호전달 도메인은 CD28의 세포내 신호전달 부분을 포함하지 않는다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 CD8+ T 세포독성 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD8+ 세포독성 T 림프구 세포는 중심 기억 T 세포이며, 여기서 중심 기억 T 세포는 CD45RO, CD62L 및/또는 CD8에 대해 양성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이팩터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD4+ 헬퍼 림프구 세포는 나이브 CD4+ T 세포이며, 여기서 나이브 CD4+ T 세포는 CD45RA, CD62L 및/또는 CD4에 대해 양성이고/거나 CD45RO에 대해 음성이다. 일부 대안에서, 키메라

수용체 핵산은 a) CD171에 특이적으로 결합하고/거나 그를 표적화하는 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, b) 키메라 수용체의 리간드 결합 도메인과 막횡단 도메인을 연결하는, 100개 아미노산 미만 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상) 길이의 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 키메라 수용체의 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 키메라 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 X₁PPX₂P의 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 X₁ 및 X₂는 독립적으로 임의의 아미노산이다. 일부 대안에서, X₁ 및/또는 X₂는 시스테인이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 미만 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상) 길이이다. 일부 대안에서, 스페이서는 12, 13, 14 또는 15개 아미노산 길이 또는 상기 언급된 길이 중 임의의 2개에 의해 규정된 범위 내의 길이이다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 헌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 EPKSCDKTHTCPPCP (서열식별번호: 17), ERKCCVECPPCP (서열식별번호: 18), ELKTPLGDTHTCPYRCP (EPKSCDTPPPCPRCP)₃ (서열식별번호: 19), ESKYGPPCPSCP (서열식별번호: 20), ESKYGPPCPPCP (서열식별번호: 21), YGPPCPPCP (서열식별번호: 51), KYGPPCPPCP (서열식별번호: 52) 또는 EVVKYGYGPPCPPCP (서열식별번호: 53)를 포함하거나, 그로 이루어지거나, 또는 그로 본질적으로 이루어진다. 일부 대안에서, 스페이서는 ESKYGPPCPSCP (서열식별번호: 20), ESKYGPPCPPCP (서열식별번호: 21), YGPPCPPCP (서열식별번호: 51), KYGPPCPPCP (서열식별번호: 52) 또는 EVVKYGYGPPCPPCP (서열식별번호: 53)로 이루어지거나 또는 그로 본질적으로 이루어진다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 또 다른 공동자극 분자의 세포내 부분을 추가로 포함하지 않고/거나, 여기서 세포내 신호전달 도메인은 CD27, CD28, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3으로 이루어진 군으로부터 선택된 분자의 세포내 신호전달 부분을 포함하지 않고/거나, 여기서 세포내 신호전달 도메인은 CD28의 세포내 신호전달 부분을 포함하지 않는다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 림프구는 CD8+ 또는 CD4+이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 전구체 T 세포이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 조혈 줄기 세포이다.

일부 대안에서, CD171을 발현하는 암 또는 고형 종양의 치료 또는 억제에서의 숙주 세포 또는 조성물의 용도가 제공된다. 일부 대안에서, 암은 신경모세포종이다. 일부 대안에서, 고형 종양은 유방암, 뇌암, 결장암, 신암, 퀘장암 및 난소암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 본원에 제시된 바와 같이 발현 벡터를 포함한다. 일부 대안에서, 발현 벡터는 키메라 수용체 핵산을 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 a) CD171에 특이적으로 결합하고/거나 그를 표적화하는 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, b) 키메라 수용체의 리간드 결합 도메인과 막획단 도메인을 연결하는, 100개 아미노산 미만 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상) 길이의 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 키메라 수용체의 막획단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 키메라 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 X₁PPX₂P의 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 X₁ 및 X₂는 독립적으로 임의의 아미노산이다. 일부 대안에서, X₁ 및/또는 X₂는 시스테인이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 미만 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상) 길이이다. 일부 대안에서, 스페이서는 12, 13, 14 또는 15개 아미노산 길이 또는 상기 언급된 길이 중 임의의 2개에 의해 규정된 범위 내의 길이이다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 헌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 EPKSCDKTHTCPPCP (서열식별번호: 17), ERKCCVECPPCP (서열식별번호: 18), ELKTPLGDHTCPRCP (EPKSCDTPPPCCRCP)₃ (서열식별번호: 19), ESKYGPPCPSCP (서열식별번호: 20), ESKYGPPCPPCP (서열식별번호: 21), YGPPCPPCP (서열식별번호: 51), KYGPPCPPCP (서열식별번호: 52) 또는 EVVKYGYGPPCPPCP (서열식별번호: 53)를 포함하거나, 그로 이루어지거나, 또는 그로 본질적으로 이루어진다. 일부 대안에서, 스페이서는 ESKYGPPCPSCP (서열식별번호: 20), ESKYGPPCPPCP (서열식별번호: 21), YGPPCPPCP (서열식별번호: 51), KYGPPCPPCP (서열식별번호: 52) 또는 EVVKYGYGPPCPPCP (서열식별번호: 53)로 이루어지거나 또는 그로 본질적으로 이루어진다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 또 다른 공동자극 분자의 세포내 부분을 추가로 포함하지 않고/거나, 여기서 세포내 신호전달 도메인은 CD27, CD28, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3으로 이루어진 군으로부터 선택된 분자의 세포내 신호전달 부분을 포함하지 않고/거나, 여기서 세포내 신호전달 도메인은 CD28의 세포내 신호전달 도메인과 조합하여 포함된다.

전달 부분을 포함하지 않는다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 CD8+ T 세포독성 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD8+ 세포독성 T 림프구 세포는 중심 기억 T 세포이며, 여기서 중심 기억 T 세포는 CD45RO, CD62L 및/또는 CD8에 대해 양성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD4+ 헬퍼 림프구 세포는 나이브 CD4+ T 세포이며, 여기서 나이브 CD4+ T 세포는 CD45RA, CD62L 및/또는 CD4에 대해 양성이고/거나 CD45RO에 대해 음성이다. 일부 대안에서, 조성물은 숙주 세포를 포함한다. 일부 대안에서, 조성물은 본원에 제시된 바와 같은 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 포함한다. 일부 대안에서, 발현 벡터는 본원에 제시된 바와 같은 키메라 수용체 핵산을 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 a) CD171에 특이적으로 결합하고/거나 그를 표적화하는 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, b) 키메라 수용체의 리간드 결합 도메인과 막횡단 도메인을 연결하는, 100개 아미노산 미만 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상) 길이의 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 키메라 수용체의 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 키메라 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 X₁PPX₂P의 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 X₁ 및 X₂는 독립적으로 임의의 아미노산이다. 일부 대안에서, X₁ 및/또는 X₂는 시스테인이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 미만 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상) 길이이다. 일부 대안에서, 스페이서는 12, 13, 14 또는 15개 아미노산 길이 또는 상기 언급된 길이 중 임의의 2개에 의해 규정된 범위 내의 길이이다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 힌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 EPKSCDKTHTCPPCP (서열식별번호: 17), ERKCCVECPPCP (서열식별번호: 18), ELKTPPLGDTHTCPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP)₃ (서열식별번호: 19), ESKYGPPCPSCP (서열식별번호: 20), ESKYGPPCPPCP (서열식별번호: 21), YGPPCPPCP (서열식별번호: 51), KYGPPCPPCP (서열식별번호: 52) 또는 EVVKYGPCCPPCP (서열식별번호: 53)를 포함하거나, 그로 이루어지거나, 또는 그로 본질적으로 이루어진다. 일부 대안에서, 스페이서는 ESKYGPPCPSCP (서열식별번호: 20), ESKYGPPCPPCP (서열식별번호: 21), YGPPCPPCP (서열식별번호: 51), KYGPPCPPCP (서열식별번호: 52) 또는 EVVKYGPCCPPCP (서열식별번호: 53)로 이루어지거나 또는 그로 본질적으로 이루어진다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 또 다른 공동자극 분자의 세포내 부분을 추가로 포함하지 않고/거나, 여기서 세포내 신호전달 도메인은 CD27, CD28, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3으로 이루어진 군으로부터 선택된 분자의 세포내 신호전달 부분을 포함하지 않고/거나, 여기서 세포내 신호전달 도메인은 CD28의 세포내 신호전달 부분을 포함하지 않는다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 CD8+ T 세포독성 림프구 세포이다. 조성물의 일부 대안에서, 상기 숙주 세포는 나이브 CD8+ T 세포, 중심 기억 CD8+ T 세포, 이펙터 기억 CD8+ T 세포 또는 벌크 CD8+ T 세포로 본질적으로 이루어지거나 또는 이에 대해 풍부화된 바 있는 CD8+ 세포의 집단을 포함한다. 일부 대안에서, CD8+ 세포의 상기 집단은 CD45RO, CD62L 및 CD8에 대해 양성인 CD8+ 중심 기억 T 세포로 본질적으로 이루어지거나 또는 이에 대해 풍부화된 바 있다. 일부 대안에서, 상기 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구로 본질적으로 이루어지거나 또는 이에 대해 풍부화된 바 있는 CD4+ 세포의 집단을 포함한다. 일부 대안에서, CD4+ 세포의 상기 집단은 CD45RA, CD62L 및 CD4에 대해 양성이고 CD45RO에 대해 음성인 나이브 CD4+ T 세포로 본질적으로 이루어지거나 또는 이에 대해 풍부화된 바 있다. 일부 대안에서, CD8+ 세포독성 T 림프구 세포는 중심 기억 T 세포이며, 여기서 중심 기억 T 세포는 CD45RO, CD62L 및 CD8에 대해 양성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD4+ 헬퍼 림프구 세포는 나이브 CD4+ T 세포이며, 여기서 나이브 CD4+ T 세포는 CD45RA, CD62L 및/또는 CD4에 대해 양성이고/거나 CD45RO에 대해 음성이다. 일부 대안에서, 조성물은 제약상 허용되는 부형제를 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 전구체 T 세포이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 조혈 줄기 세포이다.

[0050] 일부 대안에서, 청구범위의 조성물 또는 숙주 세포를 암 또는 종양을 갖는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 세포 면역요법을 수행하는 방법이 제공된다. 일부 대안에서, 암은 신경모세포종이다. 일부 대안에서, 종양은 유방암, 뇌암, 결장암, 신암, 췌장암 및 난소암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 본원에 제시된 바와 같이 발현 벡터를 포함한다. 일부 대안에서, 발현 벡터는 본원에 제

시된 바와 같은 키메라 수용체 혼산을 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 혼산은 a) CD171에 특이적으로 결합하고/거나 그를 표적화하는 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, b) 키메라 수용체의 리간드 결합 도메인과 막횡단 도메인을 연결하는, 100개 아미노산 미만 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상) 길이의 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 키메라 수용체의 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 키메라 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 X_1PPX_2P 의 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 X_1 및 X_2 는 독립적으로 임의의 아미노산이다. 일부 대안에서, X_1 및/또는 X_2 는 시스테인이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 미만 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상) 길이이다. 일부 대안에서, 스페이서는 12, 13, 14 또는 15개 아미노산 길이 또는 상기 언급된 길이 중 임의의 2개에 의해 규정된 범위 내의 길이이다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 헌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 EPKSCDKTHTCPPCP (서열식별번호: 17), ERKCCVECPPCP (서열식별번호: 18), ELKTPLGDTHTCPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP)₃ (서열식별번호: 19), ESKYGPSCPSCP (서열식별번호: 20), ESKYGPCCPPCP (서열식별번호: 21), YGPPCCPPCP (서열식별번호: 51), KYGPPCCPPCP (서열식별번호: 52) 또는 EVVKYGPCCPPCP (서열식별번호: 53)를 포함하거나, 그로 이루어지거나, 또는 그로 본질적으로 이루어진다. 일부 대안에서, 스페이서는 ESKYGPCCPSCP (서열식별번호: 20), ESKYGPCCPPCP (서열식별번호: 21), YGPPCCPPCP (서열식별번호: 51), KYGPPCCPPCP (서열식별번호: 52) 또는 EVVKYGPCCPPCP (서열식별번호: 53)로 이루어지거나 또는 그로 본질적으로 이루어진다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 또 다른 공동자극 분자의 세포내 부분을 추가로 포함하지 않고/거나, 여기서 세포내 신호전달 도메인은 CD27, CD28, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3으로 이루어진 군으로부터 선택된 분자의 세포내 신호전달 부분을 포함하지 않고/거나, 여기서 세포내 신호전달 도메인은 CD28의 세포내 신호전달 부분을 포함하지 않는다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 혼산은 마커 서열을 코딩하는 혼산을 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 CD8+ T 세포독성 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD8+ 세포독성 T 림프구 세포는 중심 기억 T 세포이며, 여기서 중심 기억 T 세포는 CD45RO, CD62L 및/또는 CD8에 대해 양성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD4+ 헬퍼 림프구 세포는 나이브 CD4+ T 세포이며, 여기서 나이브 CD4+ T 세포는 CD45RA, CD62L 및/또는 CD4에 대해 양성이고/거나 CD45RO에 대해 음성이다. 일부 대안에서, 조성물은 숙주 세포를 포함한다. 일부 대안에서, 조성물은 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 포함한다. 일부 대안에서, 발현 벡터는 키메라 수용체 혼산을 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 혼산은 a) CD171에 특이적으로 결합하고/거나 그를 표적화하는 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, b) 키메라 수용체의 리간드 결합 도메인과 막횡단 도메인을 연결하는, 100개 아미노산 미만 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상) 길이의 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 키메라 수용체의 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 키메라 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 X_1PPX_2P 의 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 X_1 및 X_2 는 독립적으로 임의의 아미노산이다. 일부 대안에서, X_1 및/또는 X_2 는 시스테인이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 미만 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상) 길이이다. 일부 대안에서, 스페이서는 12, 13, 14 또는 15개 아미노산 길이 또는 상기 언급된 길이 중 임의의 2개에 의해 규정된 범위 내의 길이이다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 헌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 EPKSCDKTHTCPPCP (서열식별번호: 17), ERKCCVECPPCP (서열식별번호: 18), ELKTPLGDTHTCPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP)₃ (서열식별번호: 19), ESKYGPSCPSCP (서열식별번호: 20), ESKYGPCCPPCP (서열식별번호: 21), YGPPCCPPCP (서열식별번호: 51), KYGPPCCPPCP (서열식별번호: 52) 또는 EVVKYGPCCPPCP (서열식별번호: 53)를 포함하거나, 그로 이루어지거나, 또는 그로 본질적으로 이루어진다. 일부 대안에서, 스페이서는 ESKYGPCCPSCP (서열식별번호: 20), ESKYGPCCPPCP (서열식별번호: 21), YGPPCCPPCP (서열식별번호: 51), KYGPPCCPPCP (서열식별번호: 52) 또는 EVVKYGPCCPPCP (서열식별번호: 53)로 이루어지거나 또는 그로 본질적으로 이루어진다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 또 다른 공동자극 분자의 세포내 부분을 추가로 포함하지 않고/거나, 여기서 세포내 신호전달 도메인은

CD27, CD28, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3으로 이루어진 군으로부터 선택된 분자의 세포내 신호전달 부분을 포함하지 않고/거나, 여기서 세포내 신호전달 도메인은 CD28의 세포내 신호전달 부분을 포함하지 않는다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 CD8+ T 세포독성 림프구 세포이다. 조성물의 일부 대안에서, 상기 숙주세포는 나이브 CD8+ T 세포, 중심 기억 CD8+ T 세포, 이펙터 기억 CD8+ T 세포 또는 벌크 CD8+ T 세포로 본질적으로 이루어지거나 또는 이에 대해 풍부화된 바 있는 CD8+ 세포의 집단을 포함한다. 일부 대안에서, CD8+ 세포의 상기 집단은 CD45RO, CD62L 및/또는 CD8에 대해 양성인 CD8+ 중심 기억 T 세포로 본질적으로 이루어지거나 또는 이에 대해 풍부화된 바 있다. 일부 대안에서, 상기 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어지거나 또는 이에 대해 풍부화된 바 있는 CD4+ 세포의 집단을 포함한다. 일부 대안에서, CD4+ 세포의 상기 집단은 CD45RA, CD62L 및/또는 CD4에 대해 양성이고/거나 CD45RO에 대해 음성인 나이브 CD4+ T 세포로 본질적으로 이루어지거나 또는 이에 대해 풍부화된 바 있다. 일부 대안에서, CD8+ 세포독성 T 림프구 세포는 중심 기억 T 세포이며, 여기서 중심 기억 T 세포는 CD45RO, CD62L 및/또는 CD8에 대해 양성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD4+ 헬퍼 림프구 세포는 나이브 CD4+ T 세포이며, 여기서 나이브 CD4+ T 세포는 CD45RA, CD62L 및/또는 CD4에 대해 양성이고/거나 CD45RO에 대해 음성이다. 일부 대안에서, 조성물은 제약상 허용되는 부형제를 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 전구체 T 세포이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 조혈 줄기 세포이다.

도면의 간단한 설명

[0051]

도 1은 말초 혈액 단핵 세포로부터의 중심 기억 T 세포의 단리를 제시한다. A)는 CD4 및 CD8 마커에 대해 사전 소팅된 세포의 유동 세포측정법 프로파일을 제시한다. B)는 CD8의 존재에 대해 소팅한 후 세포의 유동 세포측정법 프로파일을 제시한다. C)는 CD45RA에 대해 양성인 세포에 대한 CD8 + 세포 집단의 고갈 후의 세포의 유동 세포측정법 프로파일을 제시한다. D)는 CD8에 대해 풍부화되고, CD45RA에 대해 고갈되고, CD45RO에 대해 풍부화되고, CD62L에 대해 풍부화된 세포 집단의 유동 세포측정법 프로파일을 제시한다.

도 2a는 짧은, 중간 또는 긴 스페이서를 갖는 CAR 구축물로 형질도입된 CD8 중심 기억 세포의 유동 세포측정법 프로파일을 제시한다. 항 CD171 CAR의 발현은 F(ab)에 결합하는 항체에 의해 검출된다. 각 패널에 대한 삽도 그래프는 각 세포 집단에서 각 구축물에 존재하는 CD8 및 말단절단된 EGFR를 발현하는 세포의 %를 제시한다. 패널 1은 모의 감염된 세포이고, F(ab) 또는 EGFRt의 어떠한 발현도 나타내지 않는다. 패널 2는 CD8, EGFRt 및 F(ab)의 발현에 의한 결정 시 짧은 구축물의 발현을 제시한다. 패널 3은 CD8, EGFRt 및 F(ab)의 발현에 의한 결정 시 중간형 구축물의 발현을 제시한다. 패널 4는 CD8, EGFRt 및 F(ab)의 발현에 의한 결정 시 긴 구축물의 발현을 제시한다. CD8 세포에서의 각각의 구축물의 발현은 짧은 (패널 2), 중간 (패널 3) 또는 긴 스페이서 (패널 4)가 구축물에 존재하는지의 여부에 상관없이 유사하다.

도 2b는 형질도입된 CD8 세포에서의 짧은, 중간 또는 긴 스페이서를 갖는 각 구축물의 동등한 발현을 제시하는, CD3 제타 쇄에 대해 지시된 항체를 사용한 웨스턴 블로트를 제시한다. 레인 2는 짧은 구축물의 발현을 제시한다. 레인 3은 중간형 구축물의 발현을 제시한다. 레인 4는 긴 구축물의 발현을 제시한다.

도 2c는 SK-N-BE 2 신경모세포종 세포주 (Be2) 또는 대조군 세포주 TML (EBV-형질전환된 TMLCL)에 대한 모의 감염된 CD8 세포 (●) 또는 짧은 스페이서 (■), 중간형 (▲) 또는 긴 스페이서 (▼)를 갖는 구축물로 형질도입된 CD8 세포의 세포용해 활성이 이전에 기재된 바와 같이 PBMC로부터 이루어졌다는 것을 제시한다 (Pelloquin F, Lamelin , Lenoir GM. In vitro cell dev biol 1986; 22(12):689-694). 패널 1은 대조군 세포주 TML 대비 임의의 CD8 세포의 세포용해 활성의 결여를 제시한다. 삽도 그래프는 대조군 TML 세포주가 CD171을 발현하지 않는다는 것을 제시한다. 패널 2는 긴 구축물 (▼)로 형질도입된 세포가 중간형 (▲) 또는 짧은 (■) 구축물로 형질도입된 세포보다 CD171 발현 신경모세포종 세포를 사멸시키는데 보다 효과적이라는 것을 제시한다. 삽도 그래프는 신경모세포종 세포주 Be2가 CD171을 발현한다는 것을 제시한다. 패널 3은 항원 CD3 (Okt3)을 표적화 할 수 있고/거나 그에 특이적일 뿐만 아니라 각각의 구축물로 형질도입된 CD8 세포와 함께 인큐베이션된 TML 대조군 세포가 구축물의 존재에도 불구하고 CD3을 표적화할 수 있고/거나 그에 특이적인 이펙터 세포에 의해 사멸되었다는 것을 제시한다.

도 2d는 Be2 신경모세포종 세포 또는 대조군 TML과 접촉 시 짧은 스페이서, 중간형 스페이서 또는 긴 스페이서를 갖는 구축물로 형질도입된 CD8 세포에 의한 시토카인 생산을 제시한다. 패널 1은 긴 스페이서 (L)를 갖는

CD8 형질도입된 세포가 Be2 신경모세포종 세포와 접촉될 때 중간형 (I) 및 짧은 스페이서 (S)로 형질도입된 CD8 세포보다 더 많은 IFN γ 를 생산하였음을 제시한다. 패널 2는 긴 스페이서 (L)를 갖는 CD8 형질도입된 세포가 Be2 신경모세포종 세포와 접촉될 때 중간형 (I) 및 짧은 스페이서 (S)로 형질도입된 CD8 세포보다 더 많은 IL-2를 생산하였음을 제시한다. 패널 3은 긴 스페이서 (L)를 갖는 CD8 형질도입된 세포가 Be2 신경모세포종 세포와 접촉될 때 중간형 (I) 및 짧은 스페이서 (S)로 형질도입된 CD8 세포보다 더 많은 TNF α 를 생산하였음을 제시한다.

도 2e는 NSG 마우스에서 두개내 신경모세포종 이종이식 종양 모델의 종양 세포 생존 및 증식을 제시한다. 좌측의 그래프는 짧은 구축물로 형질도입된 CD8 세포로 처리된 마우스에서 표지된 신경모세포종 세포가, 긴 구축물로 형질도입된 CD8 세포 (상단으로부터 두번째 라인) 또는 가형질도입된 T 세포로 처리된 대조군 마우스 (상단 라인)와 비교하여 표지의 매우 적은 발현 (하단 라인)을 제시하였다. 우측에 있는 그래프는 짧은, 중간형 또는 긴 스페이서 영역으로 형질도입된 CD8 세포로 처리된 이종이식편 신경모세포종 종양을 갖는 마우스의 생존을 제시한다. 짧은 스페이서 (상단 라인)를 갖는 구축물로 형질도입된 CD8 세포로 처리된 마우스는 중간형 (두번째 라인) 또는 긴 스페이서 (상단으로부터의 세번째 라인)보다 훨씬 더 오래 생존하였다.

도 2f는 긴 스페이서를 갖는 구축물로 형질도입된 CD8 세포로 처리된 마우스로부터의 종양이 종양 내에서 보다 많은 수의 CD3+ 세포를 나타내었음을 제시한다.

도 2g는 긴 스페이서를 갖는 구축물로 형질도입된 CD8 세포로 처리된 마우스로부터의 종양이 종양에서 더 많은 카스파제 3을 발현하였다는 것을 제시한다.

도 3a, 3b 및 3c는 24시간 동안 종양 세포에의 노출 후 (라운드 1)의 형질도입된 CAR T 세포의 활성화 상태 및 생존율을 제시하고, 이어서 T 세포는 라운드 1 세포 배양으로부터 수거되고 또 다른 24시간 동안 새로운 배양으로 전달되고 (라운드 2); 이어서 T 세포는 라운드 2 세포 배양으로부터 수거되고 또 다른 24시간 동안 새로운 배양으로 전달된다 (라운드 3). 전달 사이의 생존 T 세포의 양은 상이한 T 세포주 사이에 동일하게 유지되었다.

도 3a는 긴 스페이서 영역 (L)을 갖는 구축물로 형질도입된 CD8 세포가 전달의 각 라운드에서 짧은 스페이서 (S)를 갖는 구축물로 형질도입된 세포와 비교 시 활성화된 세포 표면 마커 CD25/CD69를 갖는 더 큰 %의 세포를 갖는다는 것을 제시한다.

도 3b는 긴 (▼) 또는 중간형 스페이서 영역 (▲)을 갖는 구축물로 형질도입된 CD8 세포가 짧은 스페이서 (■)를 갖는 구축물로 형질도입된 세포와 비교 시 더 큰 %의 사멸 세포 (상단 2 라인)를 가졌다는 것을 제시한다.

도 3c는 긴 또는 중간형 스페이서 영역을 갖는 구축물로 형질도입된 CD8 세포가 짧은 스페이서를 갖는 구축물로 형질도입된 그러한 세포와 비교하여 종양 세포에서 보다 큰 FasR 발현을 유발하였다는 것을 제시한다.

도 4a, 4b, 4c, 4d, 4e 및 4f는 짧은 스페이서 영역을 갖지만, 구축물이 CD3 제타 신호전달 도메인과 함께 CD28 및 4-1BB로부터의 공동자극 신호전달 영역을 포함하도록 CD28로부터의 추가의 세포내 신호전달 영역을 갖는 CAR 구축물로 형질도입된 CD8 중심 기억 T 세포를 제시한다.

도 4a는 CD28cyto/4-1BB 공동자극 도메인을 갖는 CAR 구축물 및 4-1BB 공동자극 도메인을 갖는 구축물로 형질도입된 CD8 중심 기억 세포의 유동 세포층정법 프로파일을 제시한다. 항-CD171 CAR의 발현은 F(ab)에 결합하는 형체에 의해 검출된다. 각 패널에 대한 삽도 그래프는 각 세포 집단에서 각 구축물에 존재하는 CD8 및 말단절단된 EGFR을 발현하는 세포의 %를 제시한다. 패널 1은 모의 감염된 세포이고, F(ab) 또는 EGFRt의 어떠한 발현도 나타내지 않는다. 패널 2는 CD8, EGFRt 및 F(ab)의 발현에 의한 결정 시 4-1BB 공동자극 도메인을 갖는 짧은 구축물의 발현을 제시한다. 패널 3은 CD8, EGFRt 및 F(ab)의 발현에 의한 결정 시 CD28cyto/4-1BB 공동자극 도메인을 갖는 짧은 구축물의 발현을 제시한다. CD8 세포에서의 각각의 구축물의 발현은 유사하다.

도 4b는 SK-N-BE 2 신경모세포종 세포주 (Be2)에 대한, 짧은 스페이서, 공동자극 도메인 4-1BB 및 신호전달 도메인 CD3 ζ 를 포함하는 구축물 및 짧은 스페이서, 공동자극 도메인 CD28 cyto, 공동자극 도메인 4-1BB 및 신호전달 도메인 CD3 ζ 를 포함하는 구축물로 형질도입된 CD8 세포의 세포용해 활성을 제시한다. 그래프는 공동자극 도메인 CD28cyto를 갖는 구축물로 형질도입된 세포 (상단 라인 ◆)가 CD28 cyto가 결여된 구축물로 형질도입된 세포 (상단으로부터 두번째 라인 ▼)보다 CD171 발현 신경모세포종 세포를 사멸시키는데 보다 효과적이라는 것을 제시한다.

도 4c는 Be2 신경모세포종 세포 또는 대조군 TML과 접촉 시 형질도입된 T 세포에 의한 시토카인 생산을 제시한

다. Be2 또는 TML 세포는, 짧은 스페이서, 공동자극 도메인 4-1BB, 및 신호전달 도메인 CD3 ζ를 포함하는 구축물 및 짧은 스페이서, 공동자극 도메인 CD28 cyto, 공동자극 도메인 4-1BB 및 신호전달 도메인 CD3 ζ를 포함하는 구축물로 형질도입된 CD8 세포와 접촉된다. 그래프는 CD28cyto 공동자극 도메인 (CD28cyto)을 갖는 구축물을 갖는 CD8 형질도입된 세포가 Be2 세포와의 접촉 시 CD28cyto 공동자극 도메인 (4-1BB)을 갖지 않는 구축물로 형질도입된 CD8 세포보다 더 IFN γ를 생산하였다는 것을 제시한다.

도 4d는 NSG 마우스에서 두개내 신경모세포종 이종이식 종양 모델의 종양 세포 생존 및 증식을 제시한다. 그래프는 짧은 스페이서, 공동자극 도메인 4-1BB 및 신호전달 도메인 CD3 ζ (4-1BB)를 포함하는 구축물 및 짧은 스페이서, 공동자극 도메인 CD28 cyto, 공동자극 도메인 4-1BB 및 신호전달 도메인 CD3 ζ (CD28 cyto)를 포함하는 구축물로 형질도입된 CD8 세포로 처리된 이종이식편 신경모세포종 종양을 갖는 마우스의 생존을 제시한다. CD28cyto 공동자극 도메인을 갖는 (CD28 cyto) 구축물로 형질도입된 세포로 처리된 마우스보다 CD28cyto 공동자극 도메인을 갖지 않는 (4-1BB) 구축물로 형질도입된 CD8 세포로 처리된 마우스가 보다 큰 백분율로 생존하였다.

도 4e는 24시간 동안 종양 세포에의 노출 후 (라운드 1)의 형질도입된 CAR T 세포의 활성화 상태 및 생존율을 제시하고, 이어서 T 세포는 라운드 1 세포 배양으로부터 수거되고 또 다른 24시간 동안 새로운 배양으로 전달되고 (라운드 2), 이어서 T 세포는 라운드 2 세포 배양으로부터 수거되고 또 다른 24시간 동안 새로운 배양으로 전달된다 (라운드 3). 그래프는 CD28 cyto 공동자극 도메인 (CD28 cyto)을 갖는 구축물로 형질도입된 CD8 세포가 CD28 cyto 공동자극 도메인 (4-1BB)을 갖지 않는 구축물로 형질도입된 세포와 비교 시 더 큰 %의 활성화된 세포 표면 마커 CD25/CD69를 갖는 세포를 갖는다는 것을 제시한다.

도 4f는 CD28cyto 공동자극 도메인을 갖는 구축물로 형질도입된 CD8 세포 (▲)가 CD28cyto 공동자극 도메인을 갖지 않는 구축물로 형질도입된 그러한 세포 (■)와 비교 시 더 큰 %의 사멸 세포를 가졌다는 것을 제시한다.

도 5는 Ce7scFv-IgG4한지-CH2-CH3 CD28tm/4-1BB-제타-T2A-EGFRt-epHIV7 (긴 구축물)에 대한 서열 (서열식별번호: 54)을 제시한다. 텔데는 구축물의 각 구성요소에 대한 코딩 서열의 시작 및 끝을 제시한다.

도 6은 Ce7scFv-IgG4한지-CH2-CH3-CD28tm/4-1BB-제타-T2A-EGFRt-epHIV7 (긴 구축물)에 대한 서열을 포함하는 플라스미드 지도를 제시한다.

도 7은 CE7scFv-IgG4한지-CH3-CD28tm/4-1BB-제타-T2A-EGFRt-epHIV7 (중간형)에 대한 서열 (서열식별번호: 55)을 제시한다. 텔데는 구축물의 각 구성요소에 대한 코딩 서열의 시작 및 끝을 제시한다.

도 8은 CE7scFv-IgG4한지-CH3-CD28tm/4-1BB-제타-T2A-EGFRt-epHIV7 (중간형)에 대한 서열을 포함하여 플라스미드 지도를 제시한다.

도 9는 CE7scFv-IgG4한지-CD28tm/4-1BB-제타-T2A-EGFRt-epHIV7 (짧은)에 대한 서열 (서열식별번호: 56)을 제시한다. 텔데는 구축물의 각 구성요소에 대한 코딩 서열의 시작 및 끝을 제시한다.

도 10은 CE7scFv-IgG4한지-CD28tm/4-1BB-제타-T2A-EGFRt-epHIV7 (짧은)에 대한 서열에 대한 플라스미드 지도를 제시한다.

도 11은 2개의 공동자극 도메인을 갖는 구축물 CE7scFv-IgG4한지-CD28tm/cyto-4-1BB-제타-T2A-EGFRt-epHIV7 (짧은)에 대한 서열 (서열식별번호: 57)을 제시한다. 텔데는 구축물의 각 구성요소에 대한 코딩 서열의 시작 및 끝을 제시한다.

도 12는 2개의 공동자극 도메인을 갖는 구축물 CE7scFv-IgG4한지-CD28tm/cyto-4-1BB-제타-T2A-EGFRt-epHIV7 (짧은)에 대한 서열을 포함하는 플라스미드 지도를 제시한다.

도 13a-13h는 CAR 세포와 스페이서가 CD8+ 발현 CTL의 항종양 이펙터 아웃풋을 조율한다는 것을 제시한다. 도 13a는 CD171-특이적 및/또는 표적화 2G-CAR 세포와 도메인 스페이서 변이체의 개략도를 제시한다. 도 13b는 각각 항-류린 FAB 및 세특시맙에 의해 검출된 2G SS, MS 또는 LS 스페이서 변이체 및 EGFRt의 인간 CD8+ T_{E(CM)} 세포 표면 발현을 제시한다. 도 13c는 CD3- ζ 특이적 웨스턴 블로트에 의해 검출된 2G-CAR 발현 수준을 제시한다. 도 13d는 1:1의 E:T 비에서의 CD171+ Be2 신경모세포종 종양 세포와의 공동-배양 시 포스포-ERK의 2G-CAR 유도된 수준을 제시한다 (조건당 n≥3). 도 13e는 도 13d에서와 같이 종양 공동-배양 시 2G-CAR 활성화 유도된 CD137 표면 발현을 제시한다. 도 13f는 4-시간 크로뮴 방출 검정에 의해 결정된 스페이서 변이체 2G-CAR CTL의 항종양 용해 활성을 제시한다. 10:1의 E:T 비에서의 SS 2G-CAR CTL에 비례한 LS 및 MS 스페이서의 배수 특이적

용해. 도 13g는 혼합된 2G-CAR CTL 혼합 종양 (Be2) 배양물 (조건당 $n \geq 5$)에서 시토카인 분비의 자극을 제시한다. 배수 시토카인 생산 비교는 도 13h에서와 같이, SS 2G-CAR에 비례한다.

도 14a-14h는 시험관내 CAR 스페이서-의존성 CTL 기능적 효력 및 생체내 항종양 활성의 역 상관관계를 제시한다. 도 14a는 정위 이식 후 제+6일에 두개내 NSG 마우스 신경모세포종 이종이식편 요법 모델 및 ffLuc^+ Be2 종양의 생체광자 신호의 도식을 제시한다. 도 14b는 종양내로 주입된 2G-CAR $\text{CD8}^+ \text{T}_{\text{E}(\text{CM})}$ 스페이서 변이체 (군당 $n=6$ 마우스)에 대한 생체광자 Be2 종양 신호 반응을 제시한다. LS 2G-CAR 코호트는 종양 관련된 동물 고통으로 인해 제20일에 안락사되었다. 도 14c는 도 14b로부터의 처리된 코호트의 카플란 마이어 생존을 제시한다. 도 14d는 징후적 종양 진행의 시점에서 종양내 2G-CAR T 세포의 정량화를 제시한다. T 세포 밀도는 인간 CD3^+ 세포를 계수함으로써 결정하고, 40 hpf당 총수 (개별 종양 분석을 대표하는 데이터)로 보고하였다. 도 14e는 후속 IHC/IF 검사를 위한 Be2 i.c. 이종이식편을 보유하고 2G-CAR CTL로 처리된 NSG 마우스로부터의 종양 회수의 시간선을 제시한다. 도 14fa 및 14fb는 CD3, Ki67 및 활성화된 카스파제 3의 경우에 공동-국재화된 SS 2G-CAR CTL의 동시 염색에 대한 대표적인 종양 및 반대측 반구 IF 이미지를 제시한다. 도 14g는 종양내 이식 3일 후 지속성 2G-CAR 스페이서 변이체 CTL의 IF 정량화를 제시한다. N=도 14d에서와 같은 40 hpf당 전체 인간 CD3^+ 세포. 도 14h는 그랜자임 B (좌측 패널), Ki67 (중앙 패널) 및 활성화된 카스파제 3 (우측 패널)을 공동-발현하는 CD3^+ T 세포의 백분율을 제시한다 ($n=2$ 마리의 개별 생착 마우스의 분석으로부터의 평균 세포 수 /40hpf).

도 15a-15h는 시험관내 재귀적 항원 노출이 CAR 스페이서 치수를 기반으로 하는 차별적 FasL 매개 AICD를 발생시킨다는 것을 제시한다. 도 15a는 종양 세포로의 반복 자극 시 CAR T 세포 기능적 상태 및 생존율의 분석을 위한 시험관내 스트레스 시험 검정의 도식을 제시한다. 도 15b는 2G-CAR 전달의 연속 라운드 후에 잔여 생존 fLuc^+ Be2 종양 세포의 정량화를 제시한다 (%종양 생존율=3회 독립적 실험의 평균). 도 15c는 1:1의 이펙터:자극제 (E:S) 비에서 Be2 세포와 공동-배양의 연속 라운드 후의 CD25 및 CD69 표면 발현의 글로우 세포측정 정량화를 제시한다 (% $\text{CD25}^+ \text{CD69}^+$ 값=2회의 독립적 실험의 평균). 도 15d는 각 라운드 후에 구아바 비아카운트 검정에 의한 2G-CAR T 세포 생존율 결정을 제시한다. %사멸 T 세포 값은 도 15c에서와 같이 구한다. 도 15e는 Be2와의 8시간 공동-배양 전 및 후 FasL^+ 2G-CAR CTL의 빈도를 제시한다 (E:S 1:1; 각 데이터 포인트는 독립적 실험으로부터 유래된다). 도 15f는 SS 2G-CAR CTL과 관련하여 MS 및 LS 2G-CAR 스페이서 변이체의 공동-배양물을 베타-액틴에 대해 정규화 시 rt-qPCR에 의해 측정된 FasL mRNA 전사의 유도-배수를 제시한다 (5회의 독립적 실험의 평균). 도 15g는 Be2와의 16시간 공동-배양 후 활성화된 카스파제 3⁺ 2G-CAR CTL의 빈도를 제시한다 (E:S 1:1; 값=4회 독립적 실험의 평균). 도 15h는 3 라운드 후에 LS 2G-CAR CTL에서의 아폽토시스 유도에 대한 Fas 또는 FasL의 siRNA 녹다운의 효과를 제시한다. 3회 독립적 실험으로 수행된 구아바 비아카운트 검정에 의한 평균 생존율 결정 ("1+" 상태는 모의 전기천공된 T 세포이고, "scr" 상태는 스크램블링된 siRNA임).

도 16a-16f는 제3 세대 CD28:4-1BB:제타 세포질 도메인을 통해 증대된 공동-자극이 시험관내 증진된 이펙터 기능 아웃풋을 발생시킨다는 것을 제시한다. 도 16a는 2G- 대 3G-CAR 조성물의 개략도를 제시한다. 도 16b는 각각 항-뮤린 FAB 및 세특시맙에 의해 검출된 2G- 대 3G-CAR(SS) 및 EGFRt의 인간 $\text{CD8}^+ \text{T}_{\text{E}(\text{CM})}$ 세포 표면 발현을 제시한다. 도 16c는 $\text{CD3}-\zeta$ 특이적 웨스턴 블로트에 의해 검출된 2G- 및 3G-CAR(SS) 발현 수준을 제시한다. 도 16d는 종양 공동-배양 시 2G- 대 3G-CAR(SS) 활성화 유도된 CD137 표면 발현을 제시한다. 도 16e는 4시간 크로뮴 방출 검정에 의해 결정된 2G- 대 3G-CAR(SS) CTL의 항종양 용해 활성을 제시한다. 10:1의 E:T 비에서의 SS-2G CTL에 비례한 SS-3G의 배수 특이적 용해 (3회 독립적 실험의 평균). 도 16f는 2G- 대 3G-CAR(SS) CTL 종양 (Be2) 공동-배양물 (조건당 $n \geq 6$) 중 시토카인 분비의 자극을 제시한다. 배수 시토카인 생산 비교는 (E)에서와 같이 2G-CAR(SS)에 비례한다.

도 17a-17d는 3G-CAR(SS) CTL이 생체내에서 증진된 항종양 활성을 나타내지 않는다는 것을 제시한다. 도 17a는 2G- 대 3G-CAR(SS) CTL로 처리된 Be2 생착된 NSG 마우스의 카플란 마이어 생존 곡선을 제시한다 ($n=\text{군당 } 5-6$, 가형질도입된 CTL 대조군, 흑색). 도 17b는 도 17a에서와 같이 처리된 SK-N-DZ 그라프트된 마우스에 대한 카플란 마이어 생존 곡선을 제시한다. 도 17c는 입양 전달 3일 후의 2G- 대 3G-CAR(SS) T 세포 종양내 지속성을 제시한다. N= 2개의 독립적으로 유래된 종양 시편에서의 40hpf당 CD3^+ 세포의 수. 도 17d는 도 17c에 기재된 바와 같은 그랜자임 B (좌측 패널) 및 활성화된 카스파제 3 + (우측 패널) CD3^+ CTL의 IF 검출을 제시한다.

도 18a-18e는 시험관내 재귀적 항원 노출은 짧은 스페이서 세포의 도메인과 관련하여 CAR 세포질 신호전달을 기반으로 하여 차별적 FasL 매개 AICD를 발생시킨다는 것을 제시한다. 도 18a는 1:1의 E:S에서 Be2 세포와 공동-배양의 연속 라운드 후의 2G- 대 3G-CAR(SS) CTL에 의한 CD25 및 CD69 표면 발현의 유동 세포측정 정량화를 제시한다 (%CD25⁺CD69⁺ 값은 2회의 독립적 실험의 평균으로부터 유래된다). 도 18b는 종양 공동-배양의 각 라운드 후에 구아바 비아카운트 검정에 의한 2G- 대 3G-CAR(SS) T 세포 생존율 결정을 제시한다. % 사멸 T 세포 값은 이전에 기재된 바와 같이 구한다. 도 18c는 1:1의 E:S 비에서의 Be2 세포와 8시간 공동-배양 전 및 후의 FasL⁺ 2G- 대 3G-CAR(SS) CTL의 빈도를 제시한다 (2G-CAR 스페이서 변이체당 5개의 각각의 데이터 포인트는 독립적으로 수행된 실험으로부터 유래된다). 도 18d는 2G- 대 3G-CAR(SS) CTL의 공동-배양물을 베타-액틴에 대해 정규화 시 rt-qPCR에 의해 측정된 FasL mRNA 전사의 배수 유도를 제시한다 (5회의 독립적으로 수행된 실험으로부터의 평균 결과). 도 18e는 1:1의 E:S 비로의 Be2와의 16시간 공동-배양 후 시토졸 활성화된 카스파제 3⁺ 2G- 대 3G-CAR(SS) CTL의 빈도를 제시한다 (4회의 독립적 실험의 평균 값). + (도 18d) 및 도 18c에 기재된 바와 같은 활성화된 카스파제 3+ (도 18e) CD3+ CTL.

도 19a-19c는 스페이서 변이체 2G-CAR로의 렌티바이러스 형질도입 후 확장된 단리된 CD45RO⁺CD62L⁺ 인간 Tcm 사이의 표현형 유사성을 제시한다. 도 19a는 실험적 사용 전에 CD8 T CM 단리, 형질도입 및 확장의 시간선을 제시한다. 도 19b는 PBMC로부터의 CD8⁺ T_{CM} 세포 (CD45RO+ CD62L+)의 면역자기 단리 방법 및 순도를 제시한다. 도 19c는 실험적 사용 시점에 2G-CAR의 상이한 스페이서 변이체로 형질도입된 CD8+ T_{E(CM)}의 표현형을 제시한다.

도 20a-20d는 CD171⁺ SK-N-DZ 인간 신경모세포종 이종이식편에 대한 CD171-특이적 및/또는 표적화 2G-CAR 스페이서 변이체 CD8+ T_{E(CM)} CLT의 시험관내 및 생체내 항종양 활성을 제시한다. 도 20a는 SK-N-DZ에 대한 4시간 CRA에서의 2G-CAR 스페이서 변이체의 용해 효력을 제시한다. 도 20b는 스페이서 변이체 2G-CAR CTL에 의한 IFN γ 분비의 SK-N-DZ 자극을 제시한다. 도 20c는 종양내로 주입된 2G-CAR(SS, MS 또는 LS) CD8⁺ T_{E(CM)} (군당 n=5)에 대한 생체광자 SK-N-DZ 종양 신호 반응을 제시한다. 도 20d는 처리된 코호트의 카플란 마이어 생존을 제시한다.

도 21은 siRNA 녹다운 후 Fas 및 FasL의 발현을 제시한다. 패널 A는 scr siRNA로 처리된 LS 2G-CAR CTL과 관련하여 Fas의 siRNA 녹다운 후의 Fas⁺ LS 2G-CAR CTL의 빈도를 제시한다 (%Fas⁺ 값은 4회의 독립적 실험의 평균로부터 구함). 패널 B는 패널 A에 기재된 바와 같이 FasL의 siRNA 녹다운 후에 FasL⁺ LS 2G-CAR CTL의 빈도를 제시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0052] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 과학 용어는 본 발명이 속한 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다.
- [0053] 본원에 사용된 "활성화"는 검출가능한 세포 증식, 시토카인 생산 또는 세포 표면 마커 예컨대 CD69 및 CD25의 발현, 또는 검출가능한 이谶터 기능을 유도하기 위해 충분히 자극된 T 세포의 상태를 지칭한다.
- [0054] 본원에 사용된 "활성화 유도된 세포 사멸"은 활성화되었지만 2 세대를 초과하여 증식할 수 없는 T 세포의 상태를 지칭하고, 아폽토시스의 마커를 나타낸다.
- [0055] 본원에 사용된 "항원" 또는 "Ag"는 면역 반응을 유발하는 분자를 지칭한다. 이러한 면역 반응은 항체 생산 또는 특이적 면역학적-적격 세포의 활성화 또는 둘 다를 수반할 수 있다. 항원이 재조합적으로 생성, 합성, 생산될 수 있거나 또는 생물학적 샘플로부터 유래될 수 있는 것은 용이하게 명백하다. 이러한 생물학적 샘플은 조직 샘플, 종양 샘플, 세포 또는 생물학적 유체를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0056] 본원에 사용된 "항종양"은 종양 부피의 감소, 종양 세포의 수의 감소, 전이의 수의 감소, 기대 수명의 증가 또는 암성 상태와 연관된 다양한 생리학적 증상의 감소에 의해 명시될 수 있는 생물학적 효과를 지칭한다. "항종양 효과"는 또한 재발의 감소 또는 재발 전 시간의 증가에 의해 명시될 수 있다.
- [0057] 본원에 사용된 "키메라 수용체"는 질환 또는 장애와 연관된 분자에 결합하고, 스페이서 도메인을 통해 T 세포의 1개 이상의 세포내 신호전달 도메인 또는 다른 수용체, 예컨대 공동자극 도메인에 연결된, 항체 또는 다른 단백

질 서열의 리간드 결합 도메인을 포함하는 합성적으로 설계된 수용체를 지칭한다. 키메라 수용체는 또한 인공 T 세포 수용체, 키메라 T 세포 수용체, 키메라 면역수용체 또는 키메라 항원 수용체 (CAR)로서 지칭될 수 있다. 이를 CAR은 면역 수용체 세포 상에 임의적인 특이성을 그라프팅할 수 있는 조작된 수용체이다. 키메라 항원 수용체 또는 "CAR"은 일부 조사자에 의해 항체 또는 항체 단편, 스페이서, 신호전달 도메인 및 막횡단 영역을 포함하는 것으로 고려된다. 그러나, CAR의 상이한 구성요소 또는 도메인, 예컨대 에피토프 결합 영역 (예를 들어, 항체 단편, scFv 또는 그의 부분), 스페이서, 막횡단 도메인, 및/또는 신호전달 도메인을 변형시키는 것의 놀라운 효과로 인해, 본 개시내용의 일부 문맥에서 CAR의 구성요소가 독립적으로 기재된다. CAR의 상이한 요소의 변이는, 예를 들어, 특이적 에피토프에 대한 더 강한 결합 친화도로 이어질 수 있다.

[0058] 본원에 사용된 용어 "공동-자극 도메인"은 예를 들어 TCR/CD3 복합체의 CD3 제타 쇄에 의해 제공되는 1차 신호에 더하여 활성화, 증식, 분화, 시토카인 분비 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 T 세포 반응을 매개하는 신호를 T 세포에게 제공하는 신호전달 모이어티를 지칭한다. 공동-자극 도메인은 CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, ICOS, 램프구 기능-연관 항원-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 및/또는 CD83과 특이적으로 결합하고/거나 CD83을 표적화하는 리간드의 모두 또는 일부를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 대안에서, 공동-자극 도메인은 다른 세포내 매개자와 상호작용하여 활성화, 증식, 분화 및 시토카인 분비 등을 포함하는 세포 반응을 매개하는 세포내 신호전달 도메인이다.

[0059] 본원에 사용된 "을 코딩하는"은 다른 거대분자 예컨대 아미노산의 규정된 서열의 합성을 위한 주형으로서 작용하는, 폴리뉴클레오티드 내 뉴클레오티드의 특정한 서열, 예컨대 유전자, cDNA 또는 mRNA의 속성을 지칭한다. 따라서, 유전자는 그 유전자에 상응하는 mRNA의 전사 및 번역이 세포 또는 다른 생물학적 시스템에서 단백질을 생산하는 경우에 단백질을 코딩한다. "폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열"은 서로의 축중성 버전이고 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 모든 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0060] 본원에 사용된 "세포독성 T 램프구" (CTL)는 그의 표면 상에 CD8을 발현하는 T 램프구 (예를 들어, CD8⁺ 발현 T 세포, 또한 CD8+ T 세포 또는 CD8 T 세포로도 지칭됨, 이는 모두 상호교환가능하게 사용될 수 있음)를 지칭한다. 일부 대안에서 이러한 세포는 바람직하게는 항원-경험 "기억" T 세포 (T_M 세포)이다. 유사한 방식으로, CD4+ 발현 T 세포는 CD4+ T 세포 또는 CD4 T 세포로서 상호교환가능하게 지칭될 수 있다.

[0061] 본원에 사용된 "중심 기억" T 세포 (또는 " T_{CM} ")는 그의 표면 상에 CD62L 또는 CCR-7 및/또는 CD45RO를 발현하고, 나이브 세포와 비교 시 CD45RA를 발현하지 않거나 감소된 발현을 갖는 항원 경험 CTL을 지칭한다. 일부 대안에서, 중심 기억 세포는 나이브 세포와 비교 시 CD62L, CCR7, CD28, CD127, CD45RO 및/또는 CD95의 발현에 대해 양성이고/거나, CD54RA의 감소된 발현을 갖는다.

[0062] 본원에 사용된 "이펙터 기억" T 세포 (또는 " T_{EM} ")는 중심 기억 세포와 비교 시 그의 표면 상에 CD62L을 발현하지 않거나 감소된 발현을 갖고, 나이브 세포와 비교 시 CD45RA를 발현하지 않거나 감소된 발현을 갖는 항원 경험 T 세포를 지칭한다. 일부 대안에서, 이펙터 기억 세포는 나이브 세포 또는 중심 기억 세포와 비교 시 CD62L 및/또는 CCR7의 발현에 대해 음성이고, CD28 및/또는 CD45RA의 가변 발현을 갖는다.

[0063] 본원에 사용된 "나이브" T 세포는 중심 또는 이펙터 기억 세포와 비교하여 CD62L 및/또는 CD45RA는 발현하고 CD45RO는 발현하지 않는 비-항원 경험 T 램프구를 지칭한다. 일부 대안에서, 나이브 CD8+ T 램프구는 CD62L, CCR7, CD28, CD127 및/또는 CD45RA를 포함한 나이브 T 세포의 표현형 마커의 발현에 의해 특징화된다.

[0064] 본원에 사용된 "이펙터 T_E " T 세포는 중심 기억 또는 나이브 T 세포와 비교 시 CD62L, CCR7, CD28을 발현하지 않거나 감소된 발현을 갖고/거나 그랜자임 B 및/또는 퍼포린에 대해 양성인 항원 경험 세포독성 T 램프구 세포를 지칭한다.

[0065] 본원에 기재된 "T 세포 전구체"는 흥선으로 이동하고 T 세포 수용체를 발현하지 않는 T 세포 전구체가 될 수 있는 램프성 전구체 세포를 지칭한다. 모든 T 세포는 골수의 조혈 줄기 세포로부터 기원한다. 조혈 줄기 세포로부터의 조혈 전구세포 (램프성 전구 세포)는 흥선으로 이주하고, 세포 분열에 의해 확장되어 미성숙 흥선세포의 큰 집단을 생성한다. 가장 조기 흥선세포는 CD4도 CD8도 발현하지 않고, 따라서 이중-음성 (CD4-CD8-) 세포로 분류된다. 그것이 그의 발생을 통해 진행됨에 따라, 그는 이중-양성 흥선세포 (CD4+CD8+)가 되고, 최종적으로 단일-양성 (CD4+CD8- 또는 CD4-CD8+) 흥선세포로 성숙하며, 이어서 이는 흥선으로부터 말초 조직으로 방출된다.

[0066] 흥선세포의 약 98%는 양성 선택 또는 음성 선택을 실패함으로써 흥선에서의 발생 과정 동안 사멸되는 반면에,

다른 2%는 생존하고 흉선에 남겨져서 성숙한 면역적격 T 세포가 된다.

[0067] 전구체 T 세포의 이중 음성 (DN) 단계는 기능적 β -쇄를 생산하는 것에 초점을 맞추는 반면에, 이중 양성 (DP) 단계는 기능적 α -쇄를 생산하여 궁극적으로 기능적 $\alpha\beta$ T 세포 수용체를 생산하는 것에 초점을 맞춘다. 발생 중인 흉선세포가 4 DN 단계 (DN1, DN2, DN3 및 DN4)를 통해 진행함에 따라, T 세포는 불변 α -쇄를 발현하지만, β -쇄 로커스를 재배열한다. 재배열된 β -쇄가 불변 α -쇄와 성공적으로 쌍형성한 경우에, β -쇄의 재배열을 중지시키고 (및 대안적 대립유전자를 침묵시키고) 세포의 증식을 발생시키는 신호가 생성된다. 이를 신호가 세포 표면에서 이러한 프리-TCR을 필요로 하더라도, 이들은 프리-TCR에 대한 리간드 결합에 의존성이다. 이를 흉선세포는 이어서 CD4 및 CD8 둘 다를 발현할 것이고, α -쇄의 선택이 일어나는 이중 양성 (DP) 단계로 진행한다. 재배열된 β -쇄가 어떠한 신호전달로도 이어지지 않으면 (예를 들어 불변 α -쇄와 쌍형성하지 못하는 결과로서), 세포는 무시 (신호전달의 결여)에 의해 사멸할 수 있다.

[0068] 본원에 기재된 "조혈 줄기 세포" 또는 "HSC"는 골수 세포 예컨대, 예를 들어, 대식세포, 단핵구, 대식세포, 호중구, 호염기구, 호산구, 적혈구, 거핵구/혈소판, 수지상 세포 및 림프계 (예컨대, 예를 들어, T-세포, B-세포, NK-세포)로 발생할 수 있는 전구체 세포이다. HSC는 줄기 세포의 3개 클래스가 존재하는 이중 집단을 가지며, 이는 혈액 내 림프성 대 골수성 자손의 그들의 비 (L/M)에 의해 구별된다.

[0069] 본원에 기재된 "표적화", "표적"은 문자가 특이적인 리간드에 결합하는 능력을 지칭한다. "특이적" 또는 "특이성"은 결합 파트너에 대한 리간드 또는 대안적으로 리간드에 대한 결합 파트너의 특징을 지칭할 수 있고, 결합을 위한 상보적 형상, 전하 및 소수성 특이성을 포함할 수 있다. 결합에 대한 특이성은 입체특이성, 위치선택성 및 화학선택성을 포함할 수 있다.

[0070] 혼합물 중 세포 유형의 양을 기재하기 위해 본원에 사용된 "풍부화된" 및 "고갈된"은 세포의 혼합물에 대해 "풍부화된" 유형의 수의 증가 및 "고갈된" 세포의 수의 감소를 발생시키는 과정 또는 단계를 적용하는 것을 지칭한다. 따라서, 풍부화 과정에 적용된 원래의 세포 집단의 공급원에 따라, 혼합물 또는 조성물은 "풍부화된" 세포 60, 70, 80, 90, 95 또는 99 퍼센트 이상 (수 또는 카운트 단위) 및 "고갈된" 세포 40, 30, 20, 10, 5 또는 1 퍼센트 이하 (수 또는 카운트 단위)를 함유할 수 있다.

[0071] 본원에 사용된 "에피토프"는 항체, T 세포 및/또는 B 세포를 포함한 면역계에 의해 인식되는 항원 또는 분자의 부분을 지칭한다. 에피토프는 통상적으로 적어도 7개 아미노산을 갖고, 선형 또는 입체형태적일 수 있다.

[0072] "단리된"이 본원에 개시된 다양한 폴리펩티드를 기재하는데 사용될 때, 이는 그의 자연 환경의 구성요소로부터 확인 및 분리되고/거나 회수된 폴리펩티드 또는 핵산을 의미한다. 바람직하게는, 단리된 폴리펩티드 또는 핵산은 그것이 자연적으로 회합되는 모든 구성요소와의 회합을 함유하지 않는다. 그의 자연 환경의 오염 성분은 전형적으로 폴리펩티드 또는 핵산에 대한 진단 또는 치료 용도를 방해할 물질이고, 효소, 호르몬, 및 다른 단백질 성 또는 비-단백질성 용질을 포함할 수 있다.

[0073] 본원에 사용된 "세포내 신호전달 도메인"은 림프구의 활성화를 제공하는 분자 (여기서 키메라 수용체 분자)의 1개 이상의 도메인의 모두 또는 일부를 지칭한다. 이러한 분자의 세포내 도메인은 세포 매개자와 상호작용함으로써 신호를 매개하여 증식, 분화, 활성화 및 다른 이펙터 기능을 발생시킨다. 일부 대안에서, 이러한 분자는 CD28, CD3 또는 4-1BB의 모두 또는 일부, 또는 그의 조합을 포함한다. 세포내 신호전달 도메인은 공동자극 도메인을 포함한다.

[0074] 본원에 사용된 "리간드"는 또 다른 물질에 특이적으로 결합하여 복합체를 형성하고/거나 또 다른 물질을 표적화하는 물질을 지칭한다. 리간드의 예는 항원 상의 에피토프, 수용체에 결합하는 분자, 기질, 억제인자, 호르몬 및 활성화인자를 포함한다. 본원에 사용된 "리간드 결합 도메인"은 리간드에 결합하는 물질 또는 물질의 부분을 지칭한다. 리간드 결합 도메인의 예는 항체의 항원 결합 부분, 수용체의 세포외 도메인, 및 효소의 활성 부위를 포함한다.

[0075] 본원에 사용된 "작동가능하게 연결된"은 이종 핵산 서열의 발현을 발생시키는 조절 서열과 이종 핵산 서열 사이의 기능적 연결을 지칭한다. 예를 들어, 제1 핵산 서열이 제2 핵산 서열과 기능적 관계로 위치할 때 제1 핵산 서열은 제2 핵산 서열과 작동가능하게 연결된다. 예를 들어, 프로모터는 프로모터가 코딩 서열의 전사 또는 발현에 영향을 미치는 경우에 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, 작동가능하게 연결된 DNA 서열은 인접하고, 필요한 경우에 2개의 단백질 코딩 영역을 동일한 리딩 프레임 내에 연결한다.

[0076] 본원에 확인된 키메라 수용체 폴리펩티드 서열과 관련하여 "퍼센트 (%) 아미노산 서열 동일성"은 서열을 정렬하고 필요하다면 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하기 위해 캡을 도입한 후에 각각의 리간드 결합 도메인, 스페이

서, 막횡단 도메인 및/또는 림프구 활성화 도메인에 대한 참조 서열 내 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 내 아미노산 잔기의 백분율로서 정의되며, 임의의 보존적 치환은 서열 동일성의 부분으로서 간주하지 않는다. 퍼센트 아미노산 서열 동일성을 결정하기 위한 목적의 정렬은 예를 들어 공중 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 또는 메갈라인 (DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여, 관련 기술분야의 기술내의 다양한 방식으로 달성될 수 있다.

[0077] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 비교되는 서열의 전장에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여, 정렬을 측정하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 예를 들어, WU-BLAST-2 컴퓨터 프로그램 [Altschul et al., Methods in Enzymology, 266:460-480 (1996)]을 사용하여 생성된 % 아미노산 서열 동일성 값은 여러 검색 파라미터를 사용하며, 그의 대부분은 디폴트 값으로 설정된다. 디폴트 값 (즉, 조정 가능한 파라미터)으로 설정되지 않은 것은 하기 값으로 설정된다: 오버랩 스윕=1, 오버랩 분획=0.125, 단어 역치 (T)=11 및 스코어링 매트릭스=BLOSUM62. % 아미노산 서열 동일성 값은 (a) WU-BLAST-2에 의해 결정되는 바와 같이 표 2에 제공된 참조 키메라 수용체 서열의 각각의 또는 모든 폴리펩티드 아미노산 서열과 관심 비교 아미노산 서열 사이에 매칭되는 동일한 아미노산 잔기의 수를 (b) 관심 폴리펩티드의 아미노산 잔기의 총 수로 나누는 것에 의해 결정된다.

[0078] 본원에 사용된 "키메라 수용체 변이체 폴리뉴클레오티드" 또는 "키메라 수용체 변이체 핵산 서열"은 도 5, 7, 9 또는 11에 제시된 폴리뉴클레오티드 산 서열 또는 그의 특이적으로 유래된 단편, 예컨대 항원 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 스페이서 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및/또는 림프구 자극 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 핵산 서열 동일성을 갖는 하기에 정의된 바와 같은 폴리펩티드-코딩 핵산 분자를 지칭한다. 통상적으로, 폴리뉴클레오티드 또는 그의 단편의 키메라 수용체 변이체는 도 5, 7, 9, 또는 11에 제시된 바와 같은 핵산 서열 또는 그의 유도된 단편과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 핵산 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 81% 핵산 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 82% 핵산 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 83% 핵산 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 84% 핵산 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 85% 핵산 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 86% 핵산 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 87% 핵산 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 8% 핵산 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 89% 핵산 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 90% 핵산 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 91% 핵산 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 92% 핵산 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 93% 핵산 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 94% 핵산 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 95% 핵산 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 96% 핵산 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 97% 핵산 서열 동일성을 가질 것이다. 변이체는 천연 뉴클레오티드 서열을 포괄하지 않는다. 이와 관련하여, 유전자 코드의 축중성으로 인해, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 도 5, 7, 9, 또는 11의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 핵산 서열 동일성을 갖는 다수의 키메라 수용체 변이체 폴리뉴클레오티드를 즉시 인식할 것이다.

[0079] "실질적으로 정제된"은 다른 문자 유형을 본질적으로 함유하지 않는 문자 또는 다른 세포 유형을 본질적으로 함유하지 않는 세포를 지칭한다. 실질적으로 정제된 세포는 또한 그것이 그의 자연 발생 상태에서 정상적으로 회합되는 다른 세포 유형으로부터 분리된 세포를 지칭한다. 일부 경우에, 실질적으로 정제된 세포의 집단은 세포의 동종 집단을 지칭한다.

[0080] "실질적으로 발견되지 않는"이 정상 세포 상의 종양 항원 또는 다른 문자의 존재와 관련하여 사용되는 경우에, 이는 항원 또는 문자를 갖는 정상 세포 유형의 백분율 및/또는 세포 상의 항원의 밀도를 지칭한다. 일부 대안에서, 실질적으로 발견되지 않는은 항원 또는 문자가 종양 세포 또는 다른 이환 세포 상에서 발견되는 세포 또는 항원의 양과 비교 시 정상 세포 유형의 50% 미만 상에서 및/또는 50% 미만의 밀도로 발견된다는 것을 의미한다.

[0081] 본원에 사용된 "T 세포" 또는 "T 림프구"는 임의의 포유동물, 바람직하게는 원숭이, 개 및 인간을 포함한, 영장류 종으로부터의 것일 수 있다. 일부 대안에서 T 세포는 수용자 대상체와 동종이고 (동일한 종이지만 상이한 공여자로부터); 일부 대안에서 T 세포는 자가이고 (공여자와 수용자가 동일); 일부 대안에서 T 세포는 동계이다 (공여자와 수용자가 상이하지만, 일관성 쌍둥이임).

[0082] "특이적" 또는 "특이성"은 결합 파트너에 대한 리간드 또는 대안적으로 리간드에 대한 결합 파트너의 특징을 지

칭할 수 있고, 결합을 위한 상보적 형상, 전하 및 소수성 특이성을 포함할 수 있다. 결합에 대한 특이성은 입체특이성, 위치선택성 및 화학선택성을 포함할 수 있다.

[0083] 일부 대안에서, 스페이서는 스페이서가 리간드에 특이적이도록 기재된다. 리간드에 특이적인 스페이서는 스페이서가 참조 키메라 수용체와 비교 시 리간드에 반응하여 증가된 T 세포 증식 및/또는 시토카인 생산을 제공하도록 그의 특이적 또는 표적화된 리간드에 대해 리간드 결합 도메인의 증진된 결합 또는 표적화를 가능하게 할 수 있는 특이적 폴리펩티드 길이를 지정할 수 있다.

[0084] 본원에 기재된 "표적화"는 외래 표적의 고유한 부분, 예컨대 예를 들어, 단백질 에피토프의 인식을 지칭한다. 표적화는 또한, 항원으로서 지칭될 수 있는, 단백질의 특이적 영역에 대한 결합 또는 인식을 지칭할 수 있다. 유사한 항원 부위는 또한 표적화 항체에 의해 인식될 수 있고, 이는 항체가 상이한 단백질 상의 유사한 항원 부위와 반응하는 능력으로 이어질 수 있고, 따라서 교차-반응성 항체로 이어질 수 있다.

[0085] "세포 활성"은 특정한 세포 집단의 체액성 반응, 세포-기반 면역 반응, 세포 반응, 성숙 경로, 성장 경로 및/또는 반응성을 지칭할 수 있다. 일부 대안에서, 키메라 항원 수용체가 제공되며, 여기서 키메라 항원 수용체는 스페이서를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 증진 또는 개선된 T 세포 증식, 증진 및/또는 감소된 생체내 세포 활성, 및/또는 시토카인 생산을 제공한다.

[0086] 키메라 수용체 핵산, 및 이러한 핵산을 포함하는 벡터 및 숙주 세포가 본원에 제공된다. 키메라 수용체 핵산은 특이적 표적 분자를 표적화하도록 키메라 수용체를 맞춤화하기 위해 삭제 및 다른 구성요소로 대체될 수 있는 수많은 모듈화된 구성요소를 포함한다. 본 개시내용은 모듈 구성요소 중 1종이 스페이서 구성요소임을 제공한다. 놀랍게도, 스페이서 영역의 길이가 키메라 수용체를 발현하도록 변형된 T 세포의 생체내 효능에 영향을 미치고, 증진된 치료 활성을 위해 개별 표적 분자에 대해 맞춤화될 수 있다는 것이 발견된 바 있다.

[0087] 한 측면에서, 참조 키메라 수용체와 비교 시 리간드에 반응하여 증진 또는 개선된 종양 인식, 증가된 T 세포 증식 및/또는 시토카인 생산을 갖고/거나 참조 키메라 수용체와 비교 시 항원에 대한 수용체의 특이적 결합 또는 표적화 후 키메라 수용체를 보유하는 세포의 증가된 생존을 발생시키는 키메라 수용체를 설계하기 위한 방법 및 핵산 구축물이 제공된다.

[0088] 일부 대안에서, 참조 키메라 수용체는 수용체의 리간드 결합 도메인, 예를 들어 항체 단편과 수용체의 막횡단 및/또는 세포내 부분을 연결하는 스페이서, 예컨대 폴리펩티드 스페이서에서 1개 이상의 변형을 갖는 것 외에는 달리 대상 키메라 수용체와 동일한 키메라 수용체이다. 예를 들어, 일부 대안에서, 참조 키메라 수용체는 대상 키메라 수용체의 것과 비교하여 길이 또는 서열에서 상이한 스페이서, 예를 들어 아미노산 길이가 더 긴, 예컨대 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 배의 수인 스페이서를 갖는 것 이외에는 대상 수용체와 동일하다.

[0089] 일부 대안에서, 핵산의 라이브러리가 제공되며, 여기서 각각의 핵산은 서열 및/또는 길이에서 다른 것과 상이한 스페이서 영역을 코딩한다. 이어서 각각의 핵산은 리간드에 반응하여 증진 또는 개선된 종양 인식, 증가된 T 세포 증식 및/또는 시토카인 생산을 제공하는 스페이서가 선택될 수 있도록 생체내 (동물 모델 내) 및/또는 시험관내에서 시험될 수 있는 키메라 수용체 핵산 구축물을 형성하는데 사용될 수 있다.

[0090] 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 리간드는 종양 항원임), 맞춤화된 최적화된 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 참조 키메라 수용체와 비교 시 리간드에 반응하여 증가된 T 세포 증식 및/또는 시토카인 생산을 위해 최적화된다.

[0091] 키메라 수용체의 설계는 종양의 유형, 종양 상에 존재하는 표적 항원 또는 분자, 표적 분자에 대한 항체의 친화도, 항원 결합 도메인에 필요한 가교성 및/또는 세포내 신호전달 도메인에 따라 맞춤화될 수 있다. 일부 대안에서, 수용체로 변형된 T 세포가 면역결핍 마우스에서 종양 세포를 사멸시키고 입양 전달 후에 증식 및 지속되는 능력을 결정하기 위해 수많은 키메라 수용체 구축물이 시험관내 및 생체내 모델에서 시험된다.

[0092] 표적 분자가 대상체의 종양 세포 상에 존재하는지 여부에 따라, 키메라 수용체는 그러한 표적 분자에 특이적으로 결합하고/거나 그를 표적화하는 리간드 결합 도메인을 포함한다. 일부 대안에서, 대상체의 종양 세포는 세포 표면 종양 분자에 대해 특징화된다. 표적 분자는 특정한 대상체의 종양 세포 상의 그의 존재의 결정을 기반으로 하여 선택될 수 있다. 일부 대안에서, 표적 분자 또는 그의 에피토프가 선택되고, 이는 종양 세포 상에서 우세하게 발견되고 정상 조직 상에서는 임의의 실질적인 정도로 발견되지 않는 세포 표면 분자이다. 일부 대안에서, 항체는 표적화된 세포 표면 분자의 에피토프에 결합하도록 선택된다. 일부 대안에서, 표적 분자는 CD171이다. 일부 대안에서, 키메라 수용체는 CE7로 공지된 항체에 의해 인식되는 CD171 상의 에피토프 및/또는

CD171 또는 또 다른 항원의 에피토프에 특이적으로 결합하고/거나 그를 표적화하며, 여기서 에피토프는 CD171+ 세포의 표면 형질 막으로부터 동일하거나 유사한 거리에 있다. 일부 대안에서, 항원은 CD171의 것과 유사한 크기 또는 길이의 세포외 부분을 갖고, 따라서 유사한 키메라 수용체 구성은 적절하다.

[0093] 또한, 키메라 수용체의 스페이서 영역은 표적 세포 상의 리간드의 T 세포 인식을 증진 또는 개선시키도록 변경될 수 있다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 15개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상), 예컨대 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 또는 2개 아미노산 또는 상기 언급된 길이 중 임의의 2개에 의해 규정된 범위 내의 아미노산 수의 짧은 스페이서 도메인으로부터 선택된다. 일부 대안에서, 스페이서 도메인은 119개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상), 예컨대 119, 115, 110, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20 또는 15개 아미노산 또는 상기 언급된 길이 중 임의의 2개에 의해 규정된 범위 내의 아미노산의 수의 중간형 스페이서 도메인으로부터 선택된다. 일부 대안에서, 스페이서 도메인은 229개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상), 예컨대 229, 225, 220, 215, 210, 205, 200, 195, 190, 185, 180, 175, 170, 165, 160, 155, 150, 145, 140, 135, 130, 125, 또는 120개 아미노산 또는 상기 언급된 길이 중 임의의 2개에 의해 규정된 범위 내의 아미노산의 수의 긴 스페이서로부터 선택된다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 CH₂ 또는 CH₃ 또는 둘 다와 조합된 힌지 영역이다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 CH₂ 및 CH₃ 도메인을 포함한다. 대안에서 스페이서 영역은 전장 Fc 수용체를 포함하지 않고/거나, CH₂ 및/또는 CH₃ 도메인을 포함하지 않는다. 일부 이러한 대안에서, 스페이서는 항체 힌지 영역을 포함한다.

[0094] 1차 및 공동자극 세포내 신호전달 도메인의 다양한 조합은 키메라 수용체의 생체내 효능을 증진시키는데 사용될 수 있다. 일부 대안에서, 키메라 수용체의 상이한 구축물은 종양 사멸에 대한 효능을 결정하기 위해 생체내 동물 모델에서 실험될 수 있다. 일부 대안에서, 공동자극 세포내 신호전달 도메인은 CD28 및 그의 변형된 버전, 4-1BB 및 그의 변형된 버전 및/또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다른 공동자극 도메인, 예컨대 OX40이 혼입될 수 있다. 일부 대안에서, 수용체의 공동자극 세포내 신호전달 부분은 단지 단일 공동자극 분자, 예컨대 오직 4-1BB 또는 오직 CD28로부터 유래된 세포내 도메인을 포함하고, 추가로 또 다른 이러한 분자로부터의 이러한 도메인을 함유하지 않는다.

[0095] 일부 대안에서, 소트 정제된 CD8+ 중심 기억 T 세포로부터 제조된 키메라 수용체-변형된, 예를 들어 CD171 특이적 및/또는 표적화 키메라 수용체-변형된 세포, 예를 들어 세포독성 T 세포를 CD4+ 키메라 수용체-변형된 세포, 예를 들어 CD171 특이적 및/또는 표적화 키메라 수용체-변형된 T 세포의 존재 또는 부재 하에 투여된다. 일부 대안에서, 종양-특이적 또는 종양 표적화 CD4+ 발현 T 세포는 항종양 반응성을 발휘하고, 시험관내 및 생체내에서 종양-특이적 CD8+ 발현 T 세포에게 도움을 제공한다. 구체적 대안에서, 종양-특이적 또는 종양-표적화 CD4+ 발현 T 세포 또는 나이브 또는 중심 기억 하위세트로부터 선택된 CD4⁺ 발현 T 세포는 단독으로 또는 CD8⁺ T_{CM}과 조합되어 이용된다.

[0096] 일부 대안에서 키메라 항원 수용체 (CAR) 발현 T 세포를 사용하는 입양 면역요법은 암을 치료 또는 억제하기에 유용하다. 일부 대안에서, 항원 CD171 (L1CAM)의 에피토프에 대해 지시된 CAR이 제조된다. 이러한 CAR 구축물은 CD171 (L1CAM)을 발현하는 임의의 암을 치료 또는 억제하는데 유용하다. 일부 대안에서, CD171을 발현하는 1종의 암은 신경모세포종 (NB)이다. CD171은 고위험 NB의 100%에서 발현된다. CD171을 과다 발현하는 것으로 생각되는 다른 암은 흑색종, 자궁경부 암종, 난소암, 자궁 암종, 체장암, 결장 암종, 신암종 및 교모세포종을 포함한다.

[0097] 본 개시내용은 입양 면역요법에 사용하기 위해 림프구를 형질전환 또는 형질도입시키기에 유용한 키메라 수용체 핵산을 제공한다. 일부 대안에서, 핵산은 핵산의 요소의 용이한 치환을 제공하는 다수의 모듈 구성요소를 함유한다. 본 개시내용의 범주를 제한하기 위해 의도되는 것은 아니지만, 각각의 종양 항원에 대한 키메라 수용체는 포유동물 세포에서의 생체내 효능 및 효율적 발현을 제공하기 위해 바람직하게는 구성요소의 면에서 맞춤화되는 것으로 여겨진다. 예를 들어, 구체적 대안에서, CD171 L1CAM 에피토프에 결합하는 scFV를 포함하는 키메라 수용체의 효능을 위해, 예컨대 CE7로 여겨지는 항체를 인식하는 것과 동일 또는 유사한 것, 또는 CD171 상의 에피토프 또는 표면 형질 막으로부터 동일한 관련 거리의 다른 항원, 15개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상)인 스페이서가 사용된다. 일부 대안에서, 발현 벡터는 본원에 기재된 바와 같은 키메라 핵산을 포함한다. 키메라 수용체 핵산의 모두 또는 일부에 의해 코딩된 폴리펩티드가 또한 본원에 포함된다.

[0098] 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대

안에서, 리간드 결합 도메인은 CD171 또는 CD171의 종양 제한된 에피토프에 특이적으로 결합하고/거나 그를 표적화한다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 항체 또는 그의 단편이다. 항체 또는 그의 결합 단편을 코딩하는 핵산 서열은 용이하게 결정될 수 있다. 구체적 대안에서, 폴리뉴클레오티드는 CD171 (L1CAM)에 특이적으로 결합하고/거나 그를 표적화하는 단일 쇄 Fv를 코딩한다. 예시적인 항체는 CE7 항체이다. 항체 CE7 scFv에 대한 예시적인 핵산 서열은 도 5에 제공된다. 다른 항체의 서열은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있거나 또는 그에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0099] 종양 항원은 면역 반응을 도출하는 종양 세포에 의해 생산되는 단백질이다. 본 발명의 리간드 결합 도메인의 선택은 치료 또는 억제될 암의 유형에 따라 달라질 것이고, 종양 항원 또는 다른 종양 세포 표면 분자를 표적화할 수 있다. 대상체로부터의 종양 샘플은 특정 바이오마커 또는 세포 표면 마커의 존재에 대해 특징화될 수 있다. 예를 들어, 대상체로부터의 신경모세포종 세포는 CD171 (L1CAM)의 존재에 대해 특징화된다. 다른 암 또는 종양 세포는 또한 CD171 (L1CAM)의 존재에 대해 특징화될 수 있고, 본원에 기재된 조성물로 처리 또는 억제될 수 있다. 일부 대안에서 표적 분자는 종양 세포에서 발견되고 정상 조직에서는 실질적으로 발견되지 않거나, 그의 발현이 비-생체 정상 조직으로 제한되는 세포 표면 분자이다.

[0100] 일단 키메라 수용체로 표적화될 수 있는 종양 세포 표면 분자가 확인되면, 표적 분자의 에피토프가 선택되고 특징화된다. L1CAM은 뉴런의 세포 부착에 수반되는 세포 막 분자이다. L1CAM은 아미노산 1-19 신호 웨티드, 아미노산 35-125 Ig-유사 C2 유형 1, 아미노산 139-226 Ig-유사 C2 유형 2, 아미노산 240-328 Ig-유사 C2 유형 3, 아미노산 333-420 Ig-유사 C2 유형 4, 아미노산 425-507 Ig-유사 C2 유형 5, 아미노산 518-607 Ig-유사 C2 유형 6, 아미노산 615-712 피브로넥틴 유형 III 1, 아미노산 717-810 피브로넥틴 유형 III 2, 아미노산 814-916 피브로넥틴 유형 III 3, 아미노산 920-1015 피브로넥틴 유형 III 4, 및 아미노산 1016-1115 피브로넥틴 유형 III 5를 포함하여 여러 도메인을 갖는다. 에피토프는 임의의 이를 도메인에서 발견될 수 있다. 특징화된 1종의 에피토프는 CE7 에피토프로 공지되어 있다. CE7 에피토프는 정상 조직과 비교 시 종양 세포 상에서 더 자주 발견되는 에피토프이다. 일부 대안에서, 건강한 세포보다 종양 세포 상에서 더 자주 발견되는 CD171의 에피토프가 선택된다.

[0101] 종양 세포 표면 분자에 특이적으로 결합하고/거나 그를 표적화하는 항체는 모노클로날 항체를 수득하는 방법, 파지 디스플레이의 방법, 인간 또는 인간화 항체를 생성하는 방법, 또는 인간 항체를 생산하기 위해 조작된 트랜스제닉 동물 또는 식물을 사용하는 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 부분 또는 완전 합성 항체의 파지 디스플레이 라이브러리가 이용가능하고, 표적 분자에 결합할 수 있는 항체 또는 그의 단편에 대해 스크리닝될 수 있다. 인간 항체의 파지 디스플레이 라이브러리가 또한 이용가능하다. 일부 대안에서, 항체는 종양 세포 표면 분자에 특이적으로 결합하고/거나 그를 표적화하고, 비특이적 구성요소 예컨대 소 혈청 알부민 또는 다른 비관련 항원과 교차 반응하지 않는다. 일단 확인되면, 항체를 코딩하는 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열은 단리 및/또는 결정될 수 있다.

[0102] 항체 또는 항원 결합 단편은 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 합성 항체, 키메라 항체, 이중특이적 항체, 미니바디와 선형 항체의 모두 또는 일부를 포함한다. 항체 단편은 무손상 항체의 일부, 바람직하게는 무손상 항체의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함하고, 용이하게 제조될 수 있다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체; 단일-쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다. 다수의 항 CD171 항체는 공지되어 있고, 상업적으로 입수 가능하다.

[0103] 일부 대안에서, 특정한 종양 세포 표면 분자에 결합하는 다수의 상이한 항체는 단리되고 특징화될 수 있다. 일부 대안에서, 항체는 에피토프 특이성 및/또는 표적화된 분자의 표적화를 기반으로 하여 특징화된다. 또한, 일부 경우에서, 동일한 에피토프에 결합하는 항체는 그 에피토프에 대한 항체의 친화도를 기반으로 하여 선택될 수 있다. 일부 대안에서, 항체는 적어도 1 mM, 바람직하게는 <50 nM의 친화도를 갖는다. 일부 대안에서, 다른 항체와 비교 시 에피토프에 대해 더 높은 친화도를 갖는 항체가 선택된다. 예를 들어, 동일한 에피토프에 결합하는 참조 항체보다 적어도 2배, 적어도 5배, 적어도 10배, 적어도 20배, 적어도 30배, 적어도 40배, 또는 적어도 50배 더 큰 친화도를 갖는 항체가 선택된다.

[0104] 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 스페이서 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결된다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 또한, 용이한 절제 및 상이한 항원을 코딩하거나 또는 상이한 결합 특성을 갖는 리간드 결합 도메인을 코딩하는 또 다른 폴리뉴클레오티드에 의한 폴리뉴클레오티드의 대체를 제공하기 위해 코딩 서열의 5' 및/또는 3' 말단에 1개 이상의 제한 효소 부위를 가질 수 있다. 예를 들어, 제한 부위, NheI는 리더 서열의 상류를 코딩하고; 한지 영역

내에 위치한 3' RsrII는 키메라 수용체 벡터 내로의 임의의 바람직한 scFv의 서브클로닝을 허용한다. 일부 대안에서, 폴리뉴클레오티드는 포유동물 세포에서의 발현을 위해 코돈 최적화된다.

[0105] 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 신호 펩티드에 작동가능하게 연결된다. 일부 대안에서 신호 펩티드는 과립구 콜로니 자극 인자에 대한 신호 펩티드이다. 다른 신호 펩티드 예컨대 CD8 알파를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 이용될 수 있다.

[0106] 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 포유동물 세포에서 키메라 항원 수용체의 발현을 제공하는 프로모터가 선택된다. 구체적 대안에서 프로모터는 신장 성장 인자 프로모터 (EF-1)이다. 적합한 프로모터의 또 다른 예는 극초기 시토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터 서열이다. 그러나, 원숭이 바이러스 40 (SV 40) 초기 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스 (MMTV), 인간 면역 결핍 바이러스 (HIV) 긴 말단 반복부 (LTR) 프로모터, MuMoLV 프로모터, 조류 백혈병 바이러스 프로모터, 앱스 타인-바르 바이러스 극초기 프로모터, 라우스 육종 바이러스 프로모터, 뿐만 아니라 인간 유전자 프로모터, 예컨대 비제한적으로 액틴 프로모터, 미오신 프로모터, 헤모글로빈 프로모터 및 크레아틴 키나제 프로모터를 포함하나 이에 제한되지는 않는 다른 구성적 프로모터 서열이 또한 사용될 수 있다. 유도성 프로모터가 또한 고려된다. 유도성 프로모터의 예는 메탈로티오닌 프로모터, 글루코코르티코이드 프로모터, 프로게스테론 프로모터 및 테트라시클린 프로모터를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 구체적 대안은 CD171 상의 에피토프 Ce7에 특이적으로 결합하고/거나 그를 표적화하는 항체로부터의 scFv로서 도 5에 제시된다.

[0107] 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 스페이서 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 놀랍게도, 스페이서 영역의 길이가 키메라 수용체를 발현하도록 변형된 T 세포의 생체내 효능에 영향을 미치고, 최적 종양 또는 표적 세포 인식을 위해 개별 표적 분자에 대해 맞춤화될 수 있다는 것이 발견된 바 있다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 스페이서 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 라이브러리로부터 선택된 맞춤화가능한 스페이서 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서 길이는 에피토프의 위치, 에피토프에 대한 항체의 친화도 및/또는 키메라 수용체를 발현하는 T 세포가 항원 인식에 반응하여 시험관내 및/또는 생체내에서 증식하는 능력을 기반으로 하여 선택된다.

[0108] 전형적으로 스페이서 영역은 키메라 수용체의 리간드 결합 도메인과 막횡단 도메인 사이에서 발견된다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 리간드 결합 도메인의 가요성을 제공하고, 림프구에서의 높은 발현 수준을 허용한다. 229개 아미노산의 스페이서 도메인을 갖는 CD171특이적 및/또는 표적화 키메라 수용체는 15개 아미노산 미만 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상)으로 구성된 짧은 스페이서 영역을 갖는 CD171-특이적 및/또는 표적화 키메라 수용체보다 더 낮은 생체내 항종양 활성을 가졌다.

[0109] 일부 대안에서, 스페이서 영역은 적어도 10 내지 229개 아미노산, 10 내지 200개 아미노산, 10 내지 175개 아미노산, 10 내지 150개 아미노산, 10 내지 125개 아미노산, 10 내지 115개 아미노산, 10 내지 100개 아미노산, 10 내지 75개 아미노산, 10 내지 50개 아미노산, 10 내지 40개 아미노산, 10 내지 30개 아미노산, 10 내지 20개 아미노산 또는 10 내지 15개 아미노산 또는 상기 언급된 아미노산 길이 중 임의의 2개에 의해 규정된 범위 내의 길이를 갖는다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 15개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상), 119개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상) 또는 229개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상)를 갖는다.

[0110] 일부 대안에서, 스페이서 영역은 이뮤노글로불린 유사 분자의 힌지 영역으로부터 유래된다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 IgG1, 인간 IgG2, 인간 IgG3 또는 인간 IgG4로부터의 힌지 영역 또는 그의 변형된 변이체의 모두 또는 일부를 포함하고, 1개 이상의 아미노산 치환을 함유할 수 있다. 힌지 영역의 예시적인 서열은 표 6에 제공된다. 일부 대안에서, 힌지 영역의 일부는 가변 중쇄와 코어 사이에서 발견되는 상부 힌지 아미노산, 및 폴리프롤린 영역을 포함하는 코어 힌지 아미노산을 포함한다. 전형적으로, 상부 힌지 영역은 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아미노산을 갖는다. 일부 경우에서, 스페이서 영역은 X₁PPX₂P (서열식별번호: 1)의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 대안에서, X₁은 시스테인, 글리신 또는 아르기닌이고 X₂는 시스테인 또는 트레오닌이다.

[0111] 일부 대안에서, 힌지 영역 서열은 바람직하지 않은 구조적 상호작용 예컨대 이량체화를 회피하기 위해 1개 이상의 아미노산에서 변형될 수 있다. 구체적 대안에서, 스페이서 영역은, 예를 들어, 표 1 또는 표 6에 제시된 바와 같은 IgG4로부터 변형된 인간 힌지 영역의 일부를 포함한다. 변형된 IgG4 힌지 영역의 일부를 코딩하는 대표적인 폴리뉴클레오티드가 표 1에 제공된다. 일부 대안에서, 힌지 영역은 표 1 또는 표 6에서 확인되는 힌지

영역 아미노산 서열과 적어도 90%, 92%, 95%, 또는 100% 서열 동일성을 가질 수 있다. 구체적 대안에서, IgG4로부터의 인간 헌지 영역의 일부는 CPSP에서부터 CPPC까지의 코어 아미노산에서 아미노산 치환을 갖는다.

[0112] 일부 대안에서, 헌지 영역의 모두 또는 일부는 이뮤노글로불린의 불변 영역의 1개 이상의 도메인과 조합된다. 예를 들어, 헌지 영역의 일부는 CH2 또는 CH3 도메인 또는 그의 변이체의 모두 또는 일부와 조합될 수 있다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 CD8 알파, 전장 Fc 수용체, 및/또는 CD28 분자의 세포외 부분으로 이루어진 스페이서 영역으로부터의 47-48개 아미노산 헌지 영역 서열을 포함하지 않는다.

[0113] 일부 대안에서, 짧은 스페이서 영역은 15개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상)를 갖고 IgG4 헌지 영역 서열 또는 그의 변이체의 모두 또는 일부를 포함하고, 중간형 스페이서 영역은 119개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상)를 갖고 IgG4 헌지 영역 서열 및 CH3 영역 또는 그의 변이체의 모두 또는 일부를 포함하고, 긴 스페이서는 229개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상)를 갖고 IgG4 헌지 영역 서열, CH2 영역 및 CH3 영역 또는 그의 변이체의 모두 또는 일부를 포함한다.

[0114] 스페이서 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 아미노산 서열로부터 합성 또는 재조합 방법에 의해 용이하게 제조될 수 있다. 일부 대안에서, 스페이서 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 막황단 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된다. 일부 대안에서, 스페이서 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 또한, 용이한 절제 및 상이한 스페이서 영역을 코딩하는 또 다른 폴리뉴클레오티드에 의한 폴리뉴클레오티드의 대체를 제공하기 위해 코딩 서열의 5' 및/또는 3' 말단에 1개 이상의 제한 효소 부위를 가질 수 있다. 일부 대안에서, 스페이서 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 포유동물 세포, 바람직하게는 인간에서의 발현을 위해 코돈 최적화된다.

[0115] 일부 대안에서, 상이한 스페이서 영역을 각각 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 라이브러리가 제공된다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 또는 그의 일부로부터의 헌지 영역 서열, CH2 영역 또는 그의 변이체의 모두 또는 일부와 조합된 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4로부터의 헌지 영역 서열, CH3 영역 또는 그의 변이체의 모두 또는 일부와 조합된 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4로부터의 헌지 영역 서열, 및 CH2 영역 또는 그의 변이체 및 CH3 영역 또는 그의 변이체의 모두 또는 일부와 조합된 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4로부터의 헌지 영역 서열로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 대안에서, 짧은 스페이서 영역은 15개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상)를 갖는 변형된 IgG4 헌지 서열이고, 중간형 서열은 119개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상)를 갖는 CH3 서열을 갖는 IgG4 헌지 서열 (서열식별번호: 49); 또는 229개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상)를 갖는 CH2 및 CH3 영역을 갖는 IgG4 헌지 서열이다.

[0116] 일부 대안에서, 키메라 수용체에 대해 스페이서 영역을 선택하는 방법이 본원에 제공된다. 놀랍게도 일부 키메라 수용체 구축물은, 시험관내에서 T 세포를 활성화시키고 종양 세포의 사멸을 지시하는데 효과적이더라도, 생체내에서 효과적이지 않았다. 또한, 키메라 수용체 변형된 T 세포의 부작용 프로파일은 보다 많은 세포가 활성화 유도된 세포 사멸을 겪게 하거나 생체내 시토카인의 증가를 유발하도록 하는 정도일 수 있다. 일부 대안에서, 방법은 단지 스페이서 영역에서만 상이한 복수개의 키메라 수용체 혼합을 제공하는 단계; 각각의 키메라 수용체 혼합을 별개의 T 림프구 집단에 도입시키는 단계; 각각의 별개의 림프구 집단을 시험관내에서 확장시키는 단계, 및 각각의 림프구 집단을 종양 보유 동물에 도입시켜 T 세포에서 발현되었을 때 각각의 키메라 수용체의 항종양 효능을 결정하는 단계, 및 각각의 다른 키메라 수용체로 변형된 각각의 다른 별개의 림프구 집단과 비교하여 항종양 효능을 제공하는 키메라 수용체를 선택하는 단계를 포함한다.

[0117] 다양한 종양의 동물 모델이 공지되어 있다. 항종양 효능은 종양 부피의 감소를 확인함으로써, 동물 사멸, 생체내 유전자 변형된 T 세포의 지속성, 유전자 변형된 T 세포의 활성화 (예를 들어, CD25 및/CD69의 발현의 증가를 검출함으로써) 및/또는 생체내 유전자 변형된 T 세포의 증식을 결정함으로써 측정될 수 있다. 일부 대안에서, 이를 파라미터 중 하나 이상에 의해 결정된 바와 같이 생체내 최고 항종양 효능을 제공하는 키메라 수용체가 선택된다. 항종양 효능의 결여는 생체내 유전자 변형된 림프구의 지속성의 결여, 동물 사망, 카스파제 -3의 유도의 증가에 의해 측정되는 바와 같은 아폽토시스에서의 증가 및/또는 유전자 변형된 림프구의 증식에서의 감소에 의해 결정될 수 있다.

[0118] 일부 대안에서, 시험관내 및/또는 생체내에서 2 세대를 통해 증식하는 적어도 30%의 세포를 제공하는 키메라 수용체가 선택된다. 다른 대안에서 키메라 수용체는 이것이 적어도 세포의 50%가 72시간 내에 활성화 유도된 세포 사멸을 겪도록 하는 경우에 선택되지 않는다.

[0119] 일부 대안에서, 단지 스페이서 영역에서만 상이한 복수개의 키메라 수용체 혼합을 제공하는 단계는 리간드 결합

도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 리간드는 림프구에 의한 인식 및 제거를 막개하는데 적합한 종양 특이적 및/또는 종양 표적화 항원, 또는 표적 세포 집단 상에 발현된 임의의 다른 분자임); 제1 폴리펩티드 스페이서에 대한 코딩 서열의 5' 및 3' 말단에서 규정된 제한 부위를 갖는 제1 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 1개 이상의 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 키메라 수용체 구축물을 제공하는 단계를 포함한다.

[0120] 일부 대안에서, 방법은 각각이 상이한 스페이서 영역을 코딩하는 1종 이상의 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것을 추가로 포함한다. 예시적인 구축물은 도 5, 7 및 9에 제공된다. 일부 대안에서, 방법은 스페이서 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 상이한 스페이서 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 대체하여 상이한 스페이서 영역을 갖는 키메라 수용체 핵산을 형성하는 것을 추가로 포함한다. 방법은 각각 스페이서 영역에서 상이한, 임의의 수의 키메라 수용체 핵산을 형성하기 위해 반복될 수 있다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 단지 스페이서 영역에서 서로 상이하다.

[0121] 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 막횡단 도메인은 막에서의 키메라 수용체의 고정을 제공한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 내 도메인 중 1개와 자연적으로 회합된 막횡단 도메인이 사용된다. 일부 경우에서, 막횡단 도메인은 이러한 도메인이 동일하거나 상이한 표면 막 단백질의 막횡단 도메인에 결합하는 것을 회피하여 다른 수용체 복합체의 구성원과의 상호작용을 최소화하기 위해 선택되거나 또는 아미노산 치환에 의해 변형될 수 있다.

[0122] 막횡단 도메인은 천연 또는 합성 공급원으로부터 유래될 수 있다. 공급원이 천연인 경우에, 도메인은 임의의 막-결합된 또는 막횡단 단백질로부터 유래될 수 있다. 막횡단 영역은 적어도 T-세포 수용체, CD28, CD3, CD45, CD4, CD8, CD9, CD16, CD22; CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 및/또는 CD154의 알파, 베타 또는 제타 쇄의 막횡단 영역(들)을 포함한다. 구체적 대안에서, 막횡단 도메인은 표 1에 제시된 바와 같은 CD28 막횡단 도메인의 아미노산 서열을 포함한다. CD28 막횡단 도메인을 코딩하는 대표적인 폴리뉴클레오티드 서열은 표 1에 제시된다 (서열식별번호: 5).

[0123] 막횡단 도메인은 합성 또는 자연 발생 막횡단 도메인의 변이체일 수 있다. 일부 대안에서, 합성 또는 변이체 막횡단 도메인은 우세하게 소수성 잔기 예컨대 류신 및 밸린을 포함한다. 일부 대안에서, 막횡단 도메인은 표 1 또는 표 3에 제시된 바와 같은 막횡단 도메인과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 아미노산 서열 동일성을 가질 수 있다. 변이체 막횡단 도메인은 바람직하게는 카이트-둘리틀에 의해 계산 시 적어도 50의 소수성 점수를 갖는다.

[0124] 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 합성 또는 재조합 방법에 의해 용이하게 제조될 수 있다. 일부 대안에서, 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 세포내 신호전달 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된다. 일부 대안에서, 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 또한, 용이한 절제 및 상이한 막횡단 도메인을 코딩하는 또 다른 폴리뉴클레오티드에 의한 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 대체를 제공하기 위해 코딩 서열의 5' 및/또는 3' 말단에 1개 이상의 제한 효소 부위를 가질 수 있다. 일부 대안에서, 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 포유동물 세포에서의 발현을 위해 코돈 최적화된다.

[0125] 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 세포내 신호전달 도메인은 종양 세포 상에 발현된 리간드에의 결합 시 키메라 수용체를 발현하는 형질도입된 세포의 1종의 기능의 활성화를 제공한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 1개 이상의 공동자극 도메인을 함유한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 형질도입된 세포의 적어도 1종의 기능의 활성화를 제공하는 세포내 신호전달 도메인의 일부 및/또는 변이체이다.

[0126] 본 개시내용의 키메라 수용체에 사용하기 위한 세포내 신호전달 도메인의 예는 CD3 제타 쇄 및/또는 키메라 수용체 관여 후 협력하여 신호 전달을 개시하는 작용을 하는 보조-수용체의 세포질 서열, 뿐만 아니라 이를 서열의 임의의 유도체 또는 변이체 및 동일한 기능적 능력을 갖는 임의의 합성 서열을 포함한다. T 세포 활성화는 2종의 구분되는 부류의 세포질 신호전달 서열에 의해 매개되는 것으로 언급될 수 있다: 항원-의존성 1차 활성화를 개시하고 T 세포 수용체 유사 신호를 제공하는 것 (1차 세포질 신호전달 서열) 및 항원-비의존성 방식으로 작용하여 2차 또는 공동-자극 신호를 제공하는 것 (2차 세포질 신호전달 서열). 자극 방식으로 작용하는 1차 세포질 신호전달 서열은 수용체 티로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로 공지된 신호전달 모티프를 함유할 수 있다. 1차 세포질 신호전달 서열을 함유하는 ITAM의 예는 CD3 제타, FcR 감마, CD3 감마, CD3 텔타, CD3 앱실론, CD5, CD22, CD79a, CD79b 및/또는 CD66d로부터 유래된 것을 포함한다. 일부 대안에서, 1차 신호전달 세포

내 도메인은 표 1에 제공된 서열을 갖는 CD3제타에 대해 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 서열 동일성을 가질 수 있다. 일부 대안에서, CD3 제타의 변이체는 표 5에 제시된 바와 같은 적어도 1, 2, 3개 또는 모든 ITAM 영역을 보유한다.

[0127] 바람직한 대안에서, 키메라 수용체의 세포내 신호전달 도메인은 CD3-제타 신호전달 도메인을 단독으로 또는 임의의 다른 목적하는 세포질 도메인(들)과 조합하여 포함하도록 설계될 수 있다. 예를 들어, 키메라 수용체의 세포내 신호전달 도메인은 CD3-제타 쇄 및 공동자극 신호전달 영역을 포함할 수 있다.

[0128] 공동자극 신호전달 영역은 공동자극 분자의 세포내 도메인을 포함하는 키메라 수용체의 일부를 지칭한다. 공동자극 분자는 항원에 대한 림프구의 반응에 요구되는 항원 수용체 또는 그들의 리간드 이외의 세포 표면 분자이다. 이러한 분자의 예는 CD27, CD28, 4-1BB (CD 137), OX40, CD30, CD40, 림프구 기능-연관 항원-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 및/또는 CD83에 특이적으로 결합하고/거나 CD83을 표적화하는 리간드를 포함한다. 일부 대안에서, 공동자극 신호전달 도메인은 표 3에 제시된 바와 같은 CD28의 세포내 도메인에 대해 또는 표 4에 제공된 서열을 갖는 4-1BB에 대해 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 아미노산 서열 동일성을 가질 수 있다. 일부 대안에서, CD28 세포내 도메인의 변이체는 위치 186-187에서 아미노산 치환을 포함하며, 여기서 LL은 GG로 치환된다.

[0129] 키메라 수용체의 세포내 신호전달 서열은 무작위 또는 명시된 순서로 서로에 연결될 수 있다. 임의로, 바람직하게는 2 내지 10개 아미노산 길이의 짧은 올리고- 또는 폴리펩티드 링커는 연결을 형성할 수 있다. 하나의 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3-제타의 신호전달 도메인 또는 그의 변이체의 모두 또는 일부 및 CD28의 신호전달 도메인 또는 그의 변이체의 모두 또는 일부를 포함한다. 또 다른 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3-제타의 신호전달 도메인 또는 그의 변이체의 모두 또는 일부 및 4-1BB의 신호전달 도메인 또는 그의 변이체의 모두 또는 일부, 및 4-1BB의 신호전달 도메인 또는 그의 변이체의 모두 또는 일부를 포함한다. 또 다른 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3-제타의 신호전달 도메인 또는 그의 변이체의 모두 또는 일부 또는 일부를 포함한다. 구체적 대안에서, CD3제타의 변이체 및 4-1BB 세포내 신호전달 도메인의 일부를 포함하는 세포내 신호전달 도메인의 아미노산 서열은 표 1에 제공된다. 대표적인 핵산 서열은 표 1에 제공된다.

[0130] 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 CD3-제타 도메인의 일부에 연결된 4-1BB 세포내 도메인을 포함한다. 다른 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 단일 공동자극 도메인만을 포함하고, 이중 공동자극 도메인, 예컨대 4-1BB 공동자극 도메인과 조합된 CD28 cyto는 포함하지 않는다.

[0131] 일부 대안에서, CD3-제타 도메인의 일부에 연결된 4-1BB 세포내 도메인에 연결된 CD28 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 도 11에 제공된다. 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 아미노산 서열로부터 합성 또는 재조합 방법에 의해 용이하게 제조될 수 있다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 또한, 용이한 절제 및 상이한 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 또 다른 폴리뉴클레오티드에 의한 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 대체를 제공하기 위해 코딩 서열의 5' 및/또는 3' 말단에 1개 이상의 제한 효소 부위를 가질 수 있다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 포유동물 세포, 바람직하게는 인간에서의 발현을 위해 코돈 최적화된다.

[0132] 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 임의로 마커를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 추가로 포함한다. 마커 서열은 바람직하게는 형질도입된 세포의 선택 및/또는 형질도입된 세포의 확인을 허용할 수 있는 세포 표면 발현된 마커를 코딩한다. 일부 대안에서, 마커 서열은 링커 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결된다. 일부 대안에서, 링커 서열은 절단가능한 링커 서열이다.

[0133] 다수의 다양한 마커 서열이 사용될 수 있다. 전형적으로 마커 서열은 형질도입된 세포의 선택 및/또는 형질도입된 세포의 검출을 허용하는 기능적 특징을 갖는다. 일부 대안에서, 마커 서열은 인간 림프구의 형질도입과 상용성이다.

[0134] 양성 선택 마커는 숙주 세포에의 도입 시 유전자를 보유하는 세포의 양성 선택을 허용하는 우성 표현형을 발현하는 유전자일 수 있다. 이 유형의 유전자는 관련 기술분야에 공지되어 있고, 특히 히그로마이신 B에 대한 저항성을 부여하는 히그로마이신-B 포스포트랜스퍼라제 유전자 (hph), 항생제 G418에 대한 저항성을 코딩하는 Tn5로부터의 아미노 글리코시드 포스포트랜스퍼라제 유전자 (neo 또는 aph), 디히드로풀레이트 리덕타제 (DHFR) 유전자, 아데노신 데아미나제 유전자 (ADA) 및/또는 다중-약물 저항성 (MDR) 유전자를 포함한다.

- [0135] 일부 대안에서, 키메라 수용체 혼산은 마커를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 마커 서열은 세포 표면에서 발현된, 말단절단된 표피 성장 인자 수용체를 코딩한다. 말단절단된 표피 성장 인자 수용체에 대한 예시적인 폴리뉴클레오티드는 표 1에 제시된다. 일부 대안에서, 마커를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 링커 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된다. 구체적 대안에서, 링커 서열은 표 1에 제시된 바와 같은, 절단가능한 링커 서열 T2A이다. T2A 링커를 코딩하는 예시적인 폴리뉴클레오티드 서열은 표 1에 제공된다.
- [0136] 마커를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 아미노산 서열로부터 합성 또는 재조합 방법에 의해 용이하게 제조될 수 있다. 일부 대안에서 마커를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된다. 일부 대안에서, 마커를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 또한, 용이한 절제 및 상이한 마커를 코딩하는 또 다른 폴리뉴클레오티드에 의한 마커를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 대체를 제공하기 위해 코딩 서열의 5' 및/또는 3' 말단에 1개 이상의 제한 효소 부위를 가질 수 있다. 일부 대안에서, 마커를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 포유동물 세포에서의 발현을 위해 코돈 최적화된다.
- [0137] 본원에 기재된 조성물은 CD4+ 및/또는 CD8+ T 림프구를 제공한다. T 림프구는 공지된 기술에 따라 수집되고, 공지된 기술 예컨대 항체에 결합하는 친화도 예컨대 유동 세포측정법 및/또는 면역자기 선택에 의해 풍부화 또는 고갈될 수 있다. 풍부화 및/또는 고갈 단계 후에, 목적하는 T 림프구의 시험관내 확장은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 공지된 기술 (미국 특허 번호 6,040,177 (Riddell et al.)에 기재된 것을 포함하나 이에 제한되지는 않음) 또는 그의 변경에 따라서 실행될 수 있다. 일부 대안에서, T 세포는 환자로부터 수득된 자가 T 세포이다.
- [0138] 예를 들어, 목적하는 T 세포 집단 또는 하위집단은 시험관내 배양 배지에 초기 T 림프구 집단을 첨가하고, 이어서 배양 배지에 피더 세포, 예컨대 비-분열 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 첨가하고 (예를 들어, 생성된 세포의 집단이 확장되는 초기 집단 내 각각의 T 림프구에 대해 적어도 5, 10, 20 또는 40 또는 그 초과의 PBMC 피더 세포를 함유하도록); 배양물을 인큐베이션하는 것 (예를 들어 T 세포의 수를 확장시키기에 충분한 시간 동안)에 의해 확장될 수 있다. 비-분열 피더 세포는 감마-조사된 PBMC 피더 세포를 포함할 수 있다. 일부 대안에서, PBMC는 세포 분열을 방지하기 위해 3000 내지 3600 rad 범위의 감마선으로 조사된다. 배양 배지에의 T 세포 및 피더 세포의 첨가 순서는 원하는 경우에 역전될 수 있다. 배양물은 전형적으로 T 림프구의 성장에 적합한 온도 등의 조건 하에 인큐베이션될 수 있다. 인간 T 림프구의 성장을 위해, 예를 들어, 온도는 일반적으로 적어도 25°C, 바람직하게는 적어도 30°C, 보다 바람직하게는 37°C일 것이다.
- [0139] 확장된 T 림프구는 인간 종양 또는 병원체 상에 존재하는 항원에 특이적일 수 있는 CD8⁺ 세포독성 T 림프구 (CTL) 및 CD4⁺ 헬퍼 T 림프구를 포함한다. 임의로, 확장 방법은 피더 세포로서 비-분열 EBV-형질전환된 림프모 구성 세포 (LCL)를 첨가하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. LCL은 6000 내지 10,000 rad 범위의 감마선으로 조사될 수 있다. LCL 피더 세포는 임의의 적합한 양, 예컨대 적어도 10:1의 LCL 피더 세포 대 초기 T 림프구의 비로 제공될 수 있다. 임의로, 확장 방법은 항-CD3 및/또는 항 CD28 항체를 배양 배지에 첨가하는 단계 (예를 들어, 적어도 0.5 ng/ml의 농도로)를 추가로 포함할 수 있다. 임의로, 확장 방법은 IL-2 및/또는 IL-15를 배양 배지에 첨가하는 단계 (예를 들어, 여기서 IL-2의 농도는 적어도 10 단위/ml임)를 추가로 포함할 수 있다. T 림프구의 단리 후에 세포독성 및 헬퍼 T 림프구 둘 다는 확장 전 또는 후에 나이브, 기억 및 이팩터 T 세포 하위집단으로 소팅될 수 있다.
- [0140] CD8+ T 세포는 표준 방법을 사용하여 수득될 수 있다. 일부 대안에서, CD8+ T 세포는 각각의 유형의 CD8+ T 세포와 연관된 세포 표면 항원을 확인함으로써 나이브, 중심 기억 및 이팩터 기억 세포로 추가로 소팅된다. 일부 대안에서, 기억 T 세포는 CD8+ 말초 혈액 림프구의 CD62L+ 및 CD62L- 하위세트 둘 다에 존재한다. PBMC는 항-CD8 및 항-CD62L 항체로 염색한 후 CD62L-CD8+ 및/또는 CD62L+CD8+ 분획으로 소팅된다. 일부 대안에서, 중심 기억 T_{CM}의 표현형 마커의 발현은 CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 및/또는 CD127을 포함하고, 그랜자임 B 및/또는 CD45RA에 대해 음성이거나 낮다. 일부 대안에서, 중심 기억 T 세포는 CD45RO+, CD62L+ 또는 CD8+ T 세포이다. 일부 대안에서, 이팩터 T_E는 CD62L, CCR7, CD28 및/또는 CD127에 대해 음성이고, 그랜자임 B 및/또는 퍼포린에 대해 양성이다. 일부 대안에서, 나이브 CD8+ T 림프구는 CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD127 및/또는 CD45RA를 포함한 나이브 T 세포의 표현형 마커의 발현에 의해 특징화된다.
- [0141] 세포 또는 세포 집단이 특정한 세포 표면 마커에 대해 양성인지 여부는 표면 마커에 특이적인 항체 및 이소형 매칭 대조군 항체에 의한 염색을 사용하는 유동 세포측정법에 의해 결정될 수 있다. 마커에 대해 음성인 세포

집단은 이소형 대조군에 비해 특이적 항체에 의한 세포 집단의 유의한 염색의 부재를 지칭하고, 양성은 이소형 대조군에 비해 세포 집단의 균일한 염색을 지칭한다. 일부 대안에서, 마커 중 1종의 발현의 감소는 참조 세포 집단과 비교 시 평균 형광 강도에서의 1 log10의 손실 및/또는 적어도 세포의 20%, 세포의 25%, 세포의 30%, 세포의 35%, 세포의 40%, 세포의 45%, 세포의 50%, 세포의 55%, 세포의 60%, 세포의 65%, 세포의 70%, 세포의 75%, 세포의 80%, 세포의 85%, 세포의 90%, 세포의 95% 및 세포의 100% 및 20 내지 100% 사이의 임의의 %의 마커를 나타내는 세포의 백분율의 감소를 지칭한다. 일부 대안에서, 마커 중 1개에 대해 양성인 세포 집단은 참조 세포 집단과 비교 시 적어도 세포의 50%, 세포의 55%, 세포의 60%, 세포의 65%, 세포의 70%, 세포의 75%, 세포의 80%, 세포의 85%, 세포의 90%, 세포의 95% 또는 세포의 100% 또는 50 내지 100% 사이의 임의의 %가 마커를 나타내는 세포의 백분율을 지칭한다.

[0142] CD4+ T 헬퍼 세포는 세포 표면 항원을 갖는 세포 집단을 확인함으로써 나이브, 중심 기억 및 이펙터 세포로 소팅된다. CD4+ 림프구는 표준 방법에 의해 수득될 수 있다. 일부 대안에서, 나이브 CD4+ T 림프구는 CD45RO-, CD45RA+, CD62L+ 및/또는 CD4+ T 세포이다. 일부 대안에서, 중심 기억 CD4+ 세포는 CD62L+ 및/또는 CD45RO+이다. 일부 대안에서, 이펙터 CD4+ 세포는 CD62L- 및/또는 CD45RO-이다.

[0143] 일부 대안에서, 항원 특이적인 CD4+ 및 CD8+의 집단은 항원으로 나이브 또는 항원 특이적 T 림프구를 자극함으로써 수득될 수 있다. 예를 들어, 항원-특이적 T 세포주 또는 클론은 시토메갈로바이러스 항원에 대해, 감염된 대상체로부터 T 세포를 단리하고 동일한 항원으로 세포를 시험관내 자극함으로써 생성될 수 있다. 나이브 T 세포가 또한 사용될 수 있다. 종양 세포로부터의 임의의 수의 항원은 T 세포 반응을 도출하기 위한 표적으로 이용될 수 있다. 일부 대안에서, 입양 세포 면역요법 조성물은 고형 종양, 혈액 악성종양, 유방암 또는 흑색종을 포함하는 질환 또는 장애의 치료에 유용하다.

[0144] 일부 대안에서 본 개시내용에 따라 면역요법에 사용될 T 세포에 기능적 유전자를 도입시키는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 도입된 유전자 또는 유전자들은 전달된 T 세포의 생존율 및/또는 기능을 촉진함으로써 요법의 효능을 증진 또는 개선시킬 수 있거나; 또는 이는 생체내 생존 또는 이동의 선택 및/또는 평가를 허용하는 유전자 마커를 제공할 수 있거나; 또는 이는 예를 들어 문헌 [Lupton S. D. et al., Mol. and Cell Biol., 11:6 (1991); 및 Riddell et al., Human Gene Therapy 3:319-338 (1992)]에 기재된 바와 같이 세포가 생체내 음성 선택에 감수성하게 함으로써 면역요법의 안전성을 증진 또는 개선시키는 기능을 혼입시킬 수 있고; 또한 우성 양성 선택 마커를 음성 선택 마커와 융합하는 것으로부터 유래된 이중기능적 선택 융합 유전자의 사용을 기재한 PCT/US91/08442 및 PCT/US94/05601 (Lupton et al.)을 참조한다. 이는 공지된 기술 (예를 들어 미국 특허 번호 6,040,177 (Riddell et al.) 칼럼 14-17 참조) 또는 본 개시내용을 기반으로 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 그의 변경에 따라 실행될 수 있다.

[0145] 일부 대안에서, T 세포는 본원에 기재된 바와 같이 키메라 수용체로 변형된다. 일부 대안에서, T 세포는 치료될 대상체로부터 수득되고, 다른 대안에서, 림프구는 동종 인간 공여자, 바람직하게는 건강한 인간 공여자로부터 수득된다. 바람직하게는, 본원에 기재된 바와 같은 키메라 항원 수용체를 함유하는 T 세포는 흥선세포 (인간에서 자연적 발생)로부터 뿐만 아니라 조작된 전구체, 예컨대 iPS 세포로부터 유래된 것으로부터 유래된다.

[0146] 일부 대안에서, 키메라 수용체는 본원에 기재된 바와 같은 종양 세포 표면 분자, 폴리펩티드 스페이서 영역, 막 횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인에 특이적으로 결합하고/거나 그를 표적화하는 리간드 결합 도메인을 포함한다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 모노클로날 항체 (mAb)의 가변 중쇄 (VH) 및 가변 경쇄 (VL)로부터 유래된 단일-쇄 항체 단편 (scFv)이다. 공동자극 신호는 또한 CD3 ζ 쇄에 CD28 및/또는 4-1BB의 공동자극 도메인을 융합시킴으로써 키메라 수용체를 통해 제공될 수 있다. 키메라 수용체는 HLA와 독립적으로 세포 표면 분자에 특이적이고/거나 그를 표적화하여, HLA-제한 및 종양 세포 상에서의 낮은 수준의 HLA-발현을 포함하는 TCR-인식의 한계를 극복한다.

[0147] 일부 대안에서, 동일하거나 상이한 키메라 수용체는 CD4+ 및 CD8+ T 림프구의 각각의 집단에 도입될 수 있다. 일부 대안에서, 각각의 이를 집단 내의 키메라 수용체는 종양 또는 감염된 세포 상의 동일한 리간드에 특이적으로 결합하고/거나 그를 표적화하는 리간드 결합 도메인을 갖는다. 세포 신호전달 모듈은 상이할 수 있다. 일부 대안에서, CD8+ 세포독성 T 세포의 세포내 신호전달 도메인은 CD4+ 헬퍼 T 세포의 세포내 신호전달 도메인과 동일하다. 다른 대안에서, CD8+ 세포독성 T 세포의 세포내 신호전달 도메인은 CD4+ 헬퍼 T 세포의 세포내 신호전달 도메인과는 상이하다.

[0148] 일부 대안에서 각각의 CD4 또는 CD8 T 림프구는 본원에 기재된 바와 같이 형질도입 전에 나이브, 중심 기억, 이펙터 기억 또는 이펙터 세포로 소팅될 수 있다. 대안적 대안에서, 각각의 CD4 또는 CD8 T 림프구는 형질도입

후에 나이브, 중심 기억, 이펙터 기억 또는 이펙터 세포로 소팅될 수 있다.

[0149] 다양한 형질도입 기술이 개발된 바 있으며, 이는 유전자 전달을 위한 재조합 감염성 바이러스 입자를 이용한다. 이는 본 발명의 T 림프구의 형질도입에 대한 현재 바람직한 접근법을 나타낸다. 이러한 방식에 사용된 바이러스 벡터는 원숭이 바이러스 40, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스 (AAV), 렌티바이러스 벡터 및/또는 레트로바이러스로부터 유래된 바이러스 벡터를 포함한다. 따라서, 유전자 전달 및 발현 방법은 수없이 많지만, 본 질적으로 포유동물 세포에 유전 물질을 도입시키고 발현시키기 위해 기능한다. 재조합 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스 및/또는 레트로바이러스 벡터를 사용한 인산칼슘 형질감염, 원형질체 융합, 전기천공, 및/또는 감염을 포함하는 몇몇 상기 기술은 조혈 또는 림프성 세포를 형질도입시키는데 사용된 바 있다. 1차 T 림프구는 전기천공에 의해 및 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 감염에 의해 성공적으로 형질도입된 바 있다.

[0150] 레트로바이러스 및 렌티바이러스 벡터는 진핵 세포 내로의 유전자 전달을 위한 고도로 효율적인 방법을 제공한다. 더욱이, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 통합은 제어된 방식으로 일어나고, 세포당 하나 또는 소수의 카피의 새로운 유전자 정보의 안정한 통합을 발생시킨다.

[0151] 일부 대안에서 시험관내 음성 선택 표현형 세포의 선택을 가능하게 하는 양성 마커를 T 세포에 포함시키는 것이 유용할 수 있다. 양성 선택 마커는 숙주 세포에의 도입 시 유전자를 보유하는 세포의 양성 선택을 허용하는 우성 표현형을 발현하는 유전자일 수 있다. 이 유형의 유전자는 관련 기술분야에 공지되어 있고, 특히 히그로마이신 B에 대한 저항성을 부여하는 히그로마이신-B 포스포트랜스퍼라제 유전자 (hph), 항생제 G418에 대한 저항성을 코딩하는 Tn5로부터의 아미노 글리코시드 포스포트랜스퍼라제 유전자 (neo 또는 aph), 디히드로풀레이트 리덕타제 (DHFR) 유전자, 아데노신 데아미나제 유전자 (ADA) 및/또는 다중-약물 저항성 (MDR) 유전자를 포함한다.

[0152] 다양한 방법이 관련 기술분야에서 널리 공지된 바와 같이, T 림프구를 형질도입시키는데 사용될 수 있다. 일부 대안에서, 형질도입은 렌티바이러스 벡터를 사용하여 수행된다. 일부 대안에서, CD4+ 및 CD8+ T 세포 각각은 개별적으로 키메라 수용체를 코딩하는 발현 벡터로 변형되어 규정된 집단을 형성할 수 있다. 일부 대안에서, 이를 세포는 이어서 각각의 세포 집단에 고유한 세포 표면 항원에 대해 소팅함으로써 상기 기재된 바와 같이 나이브, 중심 기억 및 이펙터 세포의 하위집단으로 추가로 소팅된다. 또한, CD4+ 또는 CD8+ T 세포 집단은 그들의 시토카인 프로파일 또는 증식 활성에 의해 선택될 수 있다. 예를 들어, 항원에 의해 자극될 때 가형질도입된 세포 또는 형질도입된 CD8+ 세포와 비교 시 시토카인 예컨대 IL-2, IL-4, IL-10, TNF α 및/또는 IFN γ 의 증진된 생산을 갖는 CD4+ T 림프구가 선택될 수 있다. 다른 대안에서, IL-2 및/또는 TNF α 의 증진된 생산을 갖는 나이브 또는 중심 기억 CD4+ T 세포가 선택된다. 마찬가지로, 가형질도입된 CD8+ 세포와 비교 시 증진된 IFN γ 생산을 갖는 CD8+ 세포가 선택된다.

[0153] 일부 대안에서, 항원 또는 종양 표적에 반응하여 증식하는 CD4+ 및 CD8+ T 세포가 선택된다. 예를 들어, 가형질도입된 세포 또는 CD8+ 형질도입된 세포와 비교 시 항원 또는 종양 표적에 의해 자극될 때 격렬하게 증식하는 CD4+ T 세포가 선택된다. 일부 대안에서, 항원 보유 세포에 대해 세포독성인 CD4+ 및 CD8+ T 세포가 선택된다. 일부 대안에서, CD4+ T 세포는 CD8+ T 세포와 비교 시 약하게 세포독성이 것으로 예상된다.

[0154] 바람직한 대안에서, 특정한 유형의 암에 대해 확립된 동물 모델을 사용하여 생체내 종양 세포 사멸을 제공하는 형질도입된 림프구, 예컨대 CD8+ 중심 기억 세포가 선택된다. 이러한 동물 모델은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있고, 인간을 제외한다. 본원에 기재된 바와 같이, 림프구 내로 형질도입된 모든 키메라 수용체 구축물이 시험관내에서 활성화되고 종양 세포를 사멸시키는 능력에도 불구하고 생체내에서 종양 세포를 사멸시키는 능력을 부여하는 것은 아니다. 특히, 일부 표적 분자의 경우에 긴 스페이서 영역을 갖는 키메라 수용체 구축물을 갖는 T 세포는 짧은 스페이서 영역을 갖는 키메라 수용체를 갖는 T 세포와 비교 시 생체내에서 종양 세포를 사멸시키는데 덜 효과적이었다.

[0155] 본 개시내용은 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 조합물이 조성물에서 이용될 것을 고려한다. 하나의 대안에서, 키메라 수용체 형질도입된 CD4+ 세포의 조합물은 동일한 리간드 특이성의 키메라 수용체 형질도입된 CD8+ 세포와 조합될 수 있거나, 또는 별개의 종양 리간드에 특이적이고/거나 그를 표적화하는 CD8+ T 세포와 조합될 수 있다. 다른 대안에서, 키메라 수용체 형질도입된 CD8+ 세포를, 종양 상에 발현된 상이한 리간드에 특이적이고/거나 그를 표적화할 수 있는 키메라 수용체 형질도입된 CD4+ 세포와 조합한다. 또 다른 대안에서, 키메라 수용체 변형된 CD4+ 및 CD8+ 세포는 조합된다. 일부 대안에서 CD8+ 및 CD4+ 세포는 상이한 비, 예를 들어 CD8+ 및 CD4+의 1:1 비, CD8+ 대 CD4+의 10:1 비, 또는 CD8+ 대 CD4+의 100:1 비로 조합될 수 있다. 일부 대안에서, 조합된 집단은 시험관내 및/또는 생체내 세포 증식에 대해 시험되고, 세포의 증식을 제공하는 세포의 비가 선택된다.

- [0156] 본원에 기재된 바와 같이, 본 개시내용은 CD4+ 및 CD8+ T 세포가 추가로 하위집단, 예컨대 나이브, 중심 기억 및 이펙터 기억 세포 집단으로 분리될 수 있음을 고려한다. 일부 대안에서, 본원에 기재된 나이브 CD4+ 세포는 CD45RO-, CD45RA+, CD62L+, CD4+ 양성 T 세포이다. 일부 대안에서, 중심 기억 CD4+ 세포는 CD62L 양성 및 CD45RO 양성이다. 일부 대안에서, 이펙터 CD4+ 세포는 CD62L 음성 및 CD45RO 양성이다. 각각의 이들 집단은 독립적으로 키메라 수용체로 변형될 수 있다.
- [0157] 형질도입 및/또는 키메라 수용체 보유 세포에 대한 선택 후에, 인간 대상체에의 적어도 1회의 주입을 제공하는데 충분한 수의 세포, 전형적으로 대략 10^4 개 세포/kg 내지 10^9 개 세포/kg가 수득될 때까지 세포 집단을 바람직하게는 시험관내 확장시킨다. 일부 대안에서, 형질도입된 세포는 항원 보유 세포, 항 CD3, 항 CD28, 및 IL-2, IL-7, IL-15 또는 IL-21 또는 그의 조합의 존재 하에 배양된다.
- [0158] CD4+ 및 CD8+ 세포의 각각의 하위집단은 서로 조합될 수 있다. 구체적 대안에서, 변형된 나이브 또는 중심 기억 CD4+ 세포는 변형된 중심 기억 CD8+ T 세포와 조합되어 항원 보유 세포, 예컨대 종양 세포에 대해 상승작용적 세포독성 효과를 제공한다.
- [0159] 본 개시내용은 본원에 기재된 바와 같은 유전자 변형된 T 림프구 세포 제제를 포함하는 입양 세포 면역요법 조성물을 제공한다.
- [0160] 일부 대안에서, T 림프구 세포 제제는 본원에 기재된 바와 같은 질환 또는 장애와 연관된 리간드에 특이적인 세포외 항체 가변 도메인, 맞춤화된 스페이서 영역, 막횡단 도메인, 및 T 세포 수용체 또는 다른 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 수용체를 갖는 CD4+ T 세포를 포함한다. 다른 대안에서, 입양 세포 면역요법 조성물은 세포성 면역 반응을 제공하는 키메라 수용체 변형된 종양-특이적 CD8+ 세포독성 T 림프구 세포 제제를 추가로 포함하며, 여기서 세포독성 T 림프구 세포 제제는 본원에 기재된 바와 같은 질환 또는 장애와 연관된 리간드에 특이적인 세포외 단일 쇄 항체, 맞춤화된 스페이서 영역, 막횡단 도메인, 및 T 세포 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 수용체를 갖는 CD8+ T 세포를 포함한다.
- [0161] 일부 대안에서, 입양 세포 면역요법 조성물은 세포성 면역 반응을 제공하는 키메라 수용체 변형된 종양-특이적 CD8+ 세포독성 T 림프구 세포 제제를 포함하며, 여기서 세포독성 T 림프구 세포 제제는 CD45RO- CD62L+ CD4+ T 세포로부터 유래된 항원-반응성 키메라 수용체 변형된 나이브 CD4+ T 헬퍼 세포, 및 제약상 허용되는 담체와 조합하여, 질환 또는 장애와 연관된 리간드를 표적화할 수 있고/거나 그에 특이적인 세포외 단일 쇄 항체, 맞춤화 가능한 스페이서 영역, 막횡단 도메인, 및 T 세포 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 수용체를 갖는 CD8+ T 세포를 포함한다.
- [0162] 다른 대안에서, 입양 세포 면역요법 조성물은 CD8+ 면역 반응을 증대시키는 항원-반응성 키메라 수용체 변형된 나이브 CD4+ T 헬퍼 세포와 조합하여, 환자로부터 유래된 세포성 면역 반응을 제공하는 항원 특이적 및/또는 표적화 CD8+ 세포독성 T 림프구 세포 제제를 포함하며, 여기서 헬퍼 T 림프구 세포 제제는 질환 또는 장애와 연관된 항원을 표적화할 수 있고/거나 그에 특이적인 세포외 항체 가변 도메인, 맞춤화된 스페이서 영역, 막횡단 도메인, 및 T 세포 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 수용체를 갖는 CD4+ T 세포를 포함한다.
- [0163] 추가 대안에서, 입양 세포 면역요법 조성물은 CD8+ 면역 반응을 증대시키는 항원-반응성 키메라 수용체 변형된 나이브 CD4+ T 헬퍼 세포를 포함하며, 여기서 헬퍼 T 림프구 세포 제제는 질환 또는 장애와 연관된 리간드를 표적화할 수 있고/거나 그에 특이적인 세포외 항체 가변 도메인, 맞춤화된 스페이서 영역, 막횡단 도메인, 및 T 세포 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 수용체를 갖는 CD4+ T 세포를 포함한다.
- [0164] 일부 대안에서, CD4+ T 헬퍼 림프구 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포 또는 별크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 대안에서, CD4+ 헬퍼 림프구 세포는 나이브 CD4+ T 세포이며, 여기서 나이브 CD4+ T 세포는 CD45RO-, CD45RA+, 및/또는 CD62L+ CD4+ T 세포를 포함한다. 일부 대안에서, CD8+ T 세포독성 림프구 세포는 나이브 CD8+ T 세포, 중심 기억 CD8+ T 세포, 이펙터 기억 CD8+ T 세포 또는 별크 CD8+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 대안에서, CD8+ 세포독성 T 림프구 세포는 중심 기억 T 세포이며, 여기서 중심 기억 T 세포는 CD45RO+, CD62L+ 및/또는 CD8+ T 세포를 포함한다. 또 다른 대안에서, CD8+ 세포독성 T 림프구 세포는 중심 기억 T 세포이고 CD4+ 헬퍼 T 림프구 세포는 나이브 또는 중심 기억 CD4+ T 세포이다.
- [0165] 본 개시내용은 입양 면역요법 조성물을 제조하는 방법, 및 질환 또는 장애를 갖는 대상체에서 세포 면역요법을 수행하기 위한 이들 조성물의 용도 또는 사용 방법을 제공한다. 키메라 수용체 변형된 T 세포의 종식 및 지속성은 질환 또는 장애의 동물 모델을 사용하여 세포를 투여하고 전달된 세포의 지속성 및/또는 종식 능력을 결정

하는 것에 의해 결정될 수 있다. 다른 대안에서, 증식 및 활성화는 항원 보유 세포를 사용하여 활성화의 다중 순환을 거침으로써 시험관내 시험될 수 있다.

[0166] 일부 대안에서, 조성물을 제조하는 방법은 변형된 나이브 CD4+ T 헬퍼 세포를 수득하는 단계를 포함하며, 여기서 변형된 헬퍼 T 림프구 세포 제제는 본원에 기재된 바와 같은 종양 세포 표면 분자를 표적화할 수 있고/거나 그에 특이적인 리간드 결합 도메인, 맞춤화된 스페이서 도메인, 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 수용체를 갖는 CD4+ T 세포를 포함한다.

[0167] 또 다른 대안에서, 방법은 변형된 CD8+ 세포독성 T 세포를 수득하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서 변형된 세포독성 T 림프구 세포 제제는 본원에 기재된 바와 같은 종양 세포 표면 분자를 표적화할 수 있고/거나 그에 특이적인 리간드 결합 도메인, 맞춤화된 스페이서 도메인, 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 수용체를 갖는 CD8+ 세포를 포함한다.

[0168] 또 다른 대안에서, 방법은 변형된 CD8+ 세포독성 T 세포를 수득하는 단계를 포함하며, 여기서 변형된 세포독성 T 림프구 세포 제제는 본원에 기재된 바와 같은 종양 세포 표면 분자를 표적화할 수 있고/거나 그에 특이적인 리간드 결합 도메인, 맞춤화된 스페이서 도메인, 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 수용체를 갖는 CD8+ T 세포를 포함하고, 방법은 변형된 CD8+ 세포독성 T 세포를 CD4+ 헬퍼 세포 림프구 세포 제제와 조합하는 것을 추가로 포함한다.

[0169] 키메라 수용체로 변형된 CD4+ 및 CD8+ 세포의 제조는 상기 뿐만 아니라 실시예에서 기재된 바 있다. 항원 특이적 또는 항원 표적화 T 림프구는 질환 또는 장애를 갖는 환자로부터 수득될 수 있거나, 또는 항원의 존재 하에 T 림프구의 시험관내 자극에 의해 제조될 수 있다. 항원 특이성 또는 표적화에 대해 선택되지 않은 CD4+ 및 CD8+ T 림프구의 하위집단이 또한 본원에 기재된 바와 같이 단리되고 제조 방법에서 조합될 수 있다. 일부 대안에서, 세포 집단의 조합은 세포 표면 마커의 균일성, 적어도 2 세대를 통해 균일한 세포 분화 상태를 갖도록 증식하는 능력에 대해 평가될 수 있다. 품질 관리는 표적 리간드를 발현하는 세포주를 키메라 수용체 변형된 T 세포와 공동-배양하여 관련 기술분야에 공지된 세포독성, 증식 또는 시토카인 생산 검정을 사용하여 키메라 수용체 변형된 T 세포가 세포주를 인식하는지 여부를 결정함으로써 수행될 수 있다. 세포 분화 상태 및 키메라 수용체 변형된 T 세포 표면 마커는 유동 세포측정법에 의해 결정될 수 있다. 일부 대안에서, 마커 및 CD8+ 세포의 세포 분화 상태는 CD3, CD8, CD62L, CD28, CD27, CD69, CD25, PD-1, CTLA-4, CD45RO 및/또는 CD45RA를 포함한다. 일부 대안에서, 마커 및 CD4+ 세포의 세포 분화 상태는 CD3, CD4, CD62L, CD28, CD27, CD69, CD25, PD-1, CTLA-4, CD45RO 및/또는 CD45RA를 포함한다.

[0170] 일부 대안에서, 키메라 수용체에 대해 스페이서 영역을 선택하는 방법이 본원에 제공된다. 놀랍게도 일부 키메라 수용체 구축물은, 시험관내에서 T 세포를 활성화시키는데 효과적이더라도, 생체내에서 효과적이지 않았다. 일부 대안에서, 방법은 단지 스페이서 영역에서만 상이한 복수개의 키메라 수용체 핵산을 제공하는 단계; 각각의 키메라 수용체 핵산을 별개의 T 림프구 집단에 도입시키는 단계; 각각의 별개의 림프구 집단을 시험관내에서 확장시키는 단계, 및 각각의 림프구 집단을 종양 보유 동물에 도입시켜 각각의 키메라 수용체 변형된 T 세포의 항종양 효능을 결정하는 단계, 및 각각의 다른 키메라 수용체 변형된 T 세포로 변형된 각각의 다른 별개의 림프구 집단과 비교하여 항종양 효능을 제공하는 키메라 수용체를 선택하는 단계를 포함한다.

[0171] 다양한 종양의 동물 모델이 공지되어 있다. 항종양 효능은 종양 부피의 감소를 확인함으로써, 동물 사멸, 생체내 유전자 변형된 T 세포의 지속성, 유전자 변형된 T 세포의 활성화 (예를 들어, CD25 및/CD69의 발현의 증가를 검출함으로써) 및/또는 생체내 유전자 변형된 T 세포의 증식을 결정함으로써 측정될 수 있다. 일부 대안에서, 이를 파라미터 중 하나 이상에 의해 결정된 바와 같이 생체내 최고 항종양 효능을 제공하는 키메라 수용체가 선택된다. 항종양 효능의 결여는 생체내 유전자 변형된 림프구의 지속성의 결여, 동물 사망, 카스파제 -3의 유도의 증가에 의해 측정되는 바와 같은 아폽토시스에서의 증가 및/또는 유전자 변형된 림프구의 증식에서의 감소에 의해 결정될 수 있다.

[0172] 일부 대안에서, 단지 스페이서 영역에서만 상이한 복수개의 키메라 수용체 핵산을 제공하는 단계는 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 리간드는 림프구에 의한 인식 및 제거를 매개하는데 적합한 종양 특이적 또는 종양 표적화 항원 (예를 들어 CD171)이거나, 또는 표적 세포 집단 상에 발현된 임의의 다른 분자임); 제1 폴리펩티드 스페이서에 대한 코딩 서열의 5' 및 3' 말단에서 규정된 제한 부위를 갖는 제1 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 키메라 수용체 구축물을 제공하는 단계를 포함한다.

[0173]

일부 대안에서, 본 개시내용은 그를 필요로 하는 환자에서 암을 치료 또는 억제하는 방법, 암의 진행 및/또는 전이를 억제 또는 지연시키는 방법, 종양 또는 암 세포의 존재를 억제 또는 감소시키는 방법, 및/또는 CD171 발현 세포의 표적 집단을 억제 또는 감소시키는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 세포성 면역 반응을 제공하는 상기 대상체 또는 상기 환자에게 유전자 변형된 세포독성 T 림프구 세포 제제를 투여하는 것을 수반하며, 여기서 세포독성 T 림프구 세포 제제는 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 리간드는 림프구에 의한 인식 및 제거를 매개하는데 적합한 종양 특이적 항원 또는 표적 세포 집단 상에 발현된 임의의 다른 분자 (예를 들어 CD171임); 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 폴리펩티드 스페이서는 맞춤화된 길이를 갖고, 여기서 스페이서는 참조 키메라 수용체와 비교 시 증진된 T 세포 증식, 증진된 생체내 세포 활성 및/또는 시토카인 생산 (예를 들어 생체내)을 제공함); 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 1개 이상의 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된 키메라 수용체를 갖는 CD8+ 발현 T 세포를 포함한다. 일부 대안에서, 대상체는 암을 억제 또는 치료하는 요법을 필요로 하는 대상체로서 확인 또는 선택된다. 이러한 선택 또는 확인은 임상 또는 진단 평가에 의해 이루어질 수 있다.

[0174]

본 개시내용은 또한 본원에 기재된 바와 같은 키메라 수용체를 발현하는 림프구의 조성물을 질환 또는 장애를 갖는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 세포 면역요법을 수행하는 방법을 제공한다. 다른 대안에서, 방법은 대상체에게 세포성 면역 반응을 제공하는 유전자 변형된 세포독성 T 림프구 세포 제제 (여기서 세포독성 T 림프구 세포 제제는 본원에 기재된 바와 같은 종양 세포 표면 분자를 표적화할 수 있고/거나 그에 특이적인 리간드 결합 도메인, 맞춤화된 스페이서 도메인, 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 수용체를 갖는 CD8 + T 세포를 포함함) 및 직접 종양 인식을 도출하고 세포성 면역 반응을 매개하는 유전자 변형된 세포독성 T 림프구 세포 제제 능력을 증대시키는 유전자 변형된 헬퍼 T 림프구 세포 제제 (여기서 헬퍼 T 림프구 세포 제제는 본원에 기재된 바와 같은 종양 세포 표면 분자를 표적화할 수 있고/거나 그에 특이적인 리간드 결합 도메인, 맞춤화된 스페이서 도메인, 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 수용체를 갖는 CD4+ T 세포를 포함함)를 투여하는 것을 포함한다. 일부 대안에서, 대상체는 암을 억제 또는 치료하는 요법을 필요로 하는 대상체로서 확인 또는 선택된다. 이러한 선택 또는 확인은 임상 또는 진단 평가에 의해 이루어질 수 있다.

[0175]

본 개시내용의 범주를 제한하지 않으면서, 투여 전 생체내에서 지속 및 증식할 수 있는 키메라 수용체 변형된 T 세포 집단을 선택함으로써 보다 낮은 용량의 T 세포를 사용하고 보다 균일한 치료 활성을 제공하는 능력을 발생시킬 수 있는 것으로 여겨진다. 일부 대안에서, T 세포의 용량은 적어도 10%, 20%, 또는 30% 또는 그 초과만큼 감소될 수 있다. T 세포의 용량에서의 감소는 위험 또는 종양 용해 증후군 및 시토카인 폭풍을 감소시키는데 유익할 수 있다.

[0176]

또 다른 대안에서, 질환 또는 장애를 갖는 대상체에서 세포 면역요법을 수행하는 방법은 상기 대상체에게 유전자 변형된 헬퍼 T 림프구 세포 제제를 투여하는 것을 포함하며, 여기서 변형된 헬퍼 T 림프구 세포 제제는 본원에 기재된 바와 같은 종양 세포 표면 분자를 표적화할 수 있고/거나 그에 특이적인 리간드 결합 도메인, 맞춤화된 스페이서 도메인, 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 수용체를 갖는 CD4+ T 세포를 포함한다. 일부 대안에서, 방법은 대상체에게 유전자 변형된 세포독성 T 림프구 세포 제제를 투여하는 것을 추가로 포함하며, 여기서 변형된 세포독성 T 림프구 세포 제제는 본원에 기재된 바와 같은 종양 세포 표면 분자를 표적화할 수 있고/거나 그에 특이적인 리간드 결합 도메인, 맞춤화된 스페이서 도메인, 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 수용체를 갖는 CD8+ 세포를 포함한다. 일부 대안에서, 대상체는 암을 억제 또는 치료하는 요법을 필요로 하는 대상체로서 확인 또는 선택된다. 이러한 선택 또는 확인은 임상 또는 진단 평가에 의해 이루어질 수 있다.

[0177]

또 다른 대안은 질환 또는 장애를 갖는 대상체의 생물학적 샘플을 질환 또는 장애와 연관된 표적 분자 (예를 들어 CD171)의 존재에 대해 분석하는 것 및 본원에 기재된 입양 면역요법 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 질환 또는 장애를 갖는 대상체에서 세포 면역요법을 수행하는 방법을 기재하며, 여기서 키메라 수용체는 표적 분자에 특이적으로 결합하고/거나 그를 표적화한다. 일부 대안에서, 대상체는 암을 억제 또는 치료하는 요법을 필요로 하는 대상체로서 확인 또는 선택된다. 이러한 선택 또는 확인은 임상 또는 진단 평가에 의해 이루어질 수 있다.

[0178]

일부 대안에서, CD4+ T 헬퍼 림프구 세포는 키메라 수용체의 도입 전에 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포 또는 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 구체적 대안에서, CD4+ 헬퍼 림프구 세포는 나이브 CD4+ T 세포이며, 여기서 나이브 CD4+ T 세포는 CD45RO-, CD45RA+, 및/또는 CD62L+ CD4+ T 세포를 포함한다. 또 다른 대안에서, CD8+ T 세포독성 림프구 세포는 키메라 수용체의 도입 전

에 나이브 CD8+ T 세포, 중심 기억 CD8+ T 세포, 이팩터 기억 CD8+ T 세포 또는 벌크 CD8+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 구체적 대안에서, CD8+ 세포독성 T 림프구 세포는 중심 기억 T 세포이며, 여기서 중심 기억 T 세포는 CD45RO+, CD62L+ 및/또는 CD8+ T 세포를 포함한다. 구체적 대안에서, CD8+ 세포독성 T 림프구 세포는 중심 기억 T 세포이고, CD4+ 헬퍼 T 림프구 세포는 나이브 CD4+ T 세포이다. 일부 대안에서, 대상체는 암을 억제 또는 치료하는 요법을 필요로 하는 대상체로서 확인 또는 선택된다. 이러한 선택 또는 확인은 임상 또는 진단 평가에 의해 이루어질 수 있다.

[0179] 일부 대안에서, CD8+ T 세포 및 CD4+ T 세포는 둘 다 종양-특이적 세포 표면 분자에 특이적으로 결합하고/거나 그를 표적화하는 항체 중쇄 도메인을 포함하는 키메라 수용체로 유전자 변형된다. 다른 대안에서, CD8 세포독성 T 세포의 세포내 신호전달 도메인은 CD4 헬퍼 T 세포의 세포내 신호전달 도메인과 동일하다. 또 다른 대안에서, CD8 세포독성 T 세포의 세포내 신호전달 도메인은 CD4 헬퍼 T 세포의 세포내 신호전달 도메인과는 상이하다.

[0180] 본원에 기재된 조성물을 제공받을 수 있는 대상체는 일반적으로 인간 및 다른 영장류 대상체, 예컨대 원숭이 및 수의학적 의약 목적을 위한 유인원이지만; 그러나, 기술은 또한 가축, 예컨대 말, 돼지, 양, 소 및 염소 뿐만 아니라 반려 동물, 예컨대 개 및 고양이에 대한 용도를 고려한다. 대상체는 남성 또는 여성일 수 있고, 유아, 소아, 청소년, 성인 및 노인 대상체를 포함한, 임의의 적합한 연령일 수 있다.

[0181] 방법은 예를 들어 CD171 보유 암 또는 종양 세포의 치료 또는 억제에 유용하다. 일부 대안에서, CD171 암 또는 종양 세포는 신경모세포종, 흑색종, 자궁경부 암종, 난소암, 자궁 암종, 혀암, 결장 암종, 신암종 및 교모세포종을 포함한다.

[0182] 상기 기재된 바와 같이 제조된 키메라 항원 T 세포는 본 발명의 개시내용을 기반으로 하여 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 공지된 기술 또는 그의 변경에 따라 입양 면역요법을 위한 방법 및 조성물에서 이용될 수 있다. 일부 대안에서, T 세포는 먼저 그의 배양 배지로부터 T 세포를 수거한 다음, 세척하고, 세포를 투여에 적합한 배지 및 용기 시스템 ("제약상 허용되는" 담체) 내에서 치료-유효량으로 농축시킴으로써 제제화된다. 적합한 주입 배지는 임의의 등장성 배지 제제, 전형적으로 생리 염수, 노르모졸 R (애보트) 또는 플라즈마-라이트 A (벡스터)일 수 있지만, 또한 물 중 5% 텍스트로스 또는 링거 라테이트가 이용될 수 있다. 주입 배지는 인간 혈청 알부민, 태아 소 혈청 또는 다른 인간 혈청 성분에 의해 보충될 수 있다.

[0183] 조성물 중 세포의 치료 유효량은 적어도 2개 세포 하위세트 (예를 들어, 1개 CD8+ 중심 기억 T 세포 하위세트 및 1개 CD4+ 헬퍼 T 세포 하위세트)이거나, 보다 전형적으로 10^2 개 세포 초과, 및 10^6 개 이하, 10^8 또는 10^9 개 세포 이하이고, 10^{10} 개 세포 초과일 수 있다. 세포의 수는 조성을 내에 포함될 세포의 유형에 따라 의도되는 궁극적 용도에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 특정한 항원을 표적화할 수 있고/거나 그에 특이적인 세포를 원하는 경우에, 집단은 이러한 세포를 70% 초과, 일반적으로 80%, 85% 및 90-95% 초과로 함유할 것이다. 본원에 제공된 용도를 위해, 세포는 일반적으로 리터 이하의 부피이고, 500 ml 이하, 심지어 250 ml 또는 100 ml 또는 그 미만일 수 있다. 따라서 목적 세포의 밀도는 전형적으로 10^4 개 세포/ml 초과이고, 일반적으로 10^7 개 세포/ml 초과, 일반적으로 10^8 개 세포/ml 이상이다. 누적해서 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} 또는 10^{11} 개 세포와 동일하거나 그를 초과하는 면역 세포의 임상적으로 적절한 수는 다중 주입으로 배분될 수 있다.

[0184] 일부 대안에서, 본 발명의 림프구는 개체에게 면역을 부여하는데 사용될 수 있다. "면역"은 병원체에 의한 감염에 대한, 또는 림프구 반응이 지시되는 종양에 대한 반응과 연관된 1종 이상의 신체 증상의 감소를 의미한다. 투여되는 세포의 양은 통상적으로 병원체에 대한 면역을 갖는 정상 개체에 존재하는 범위 내이다. 따라서, 세포는 통상적으로 주입에 의해 투여되며, 각각의 주입은 2개 세포로부터, 적어도 10^6 내지 3×10^{10} 개 세포까지의 범위, 바람직하게는 적어도 10^7 내지 10^9 개 세포의 범위이다. T 세포는 단일 주입에 의해, 또는 다중 주입에 의해 소정 시간 범위에 걸쳐 투여될 수 있다. 그러나, 상이한 개체가 반응성이 다양할 것으로 예상되기 때문에, 주입되는 세포의 유형 및 양, 뿐만 아니라 주입 횟수 및 다중 주입이 주어지는 시간 범위가 담당 의사에 의해 결정되고, 이는 상용 검사에 의해 결정될 수 있다. 충분한 수준의 T 림프구 (세포독성 T 림프구 및/또는 헬퍼 T 림프구 포함)의 생성은 본원에 예시된 바와 같은 본 발명의 신속한 확장 방법을 사용하여 용이하게 달성 가능하다. 예를 들어, 미국 특허 번호 6,040,177 (Riddell et al.)의 칼럼 17을 참조하며, 이는 그 전문이 참조로 명백히 포함된다.

[0185] 일부 대안에서, 본원에 기재된 바와 같은 조성물은 정맥내로, 복강내로, 종양내로, 골수 내로, 림프절 내로, 및

/또는 뇌척수액 내로 투여된다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 조작된 조성물은 종양 부위에 전달된다. 대안적으로, 본원에 기재된 바와 같은 조성물은 세포를 종양 또는 면역계 구획으로 표적화하고 폐와 같은 부위는 회피하는 화합물과 조합될 수 있다. 일부 대안에서, 본원에 기재된 바와 같은 조성물은 화학요법제 및/또는 면역억제제와 함께 투여된다. 일부 대안에서, 환자는 다른 면역 세포를 억제 또는 파괴하는 화학요법제로 먼저 처리된 다음, 본원에 기재된 조성물에 의해 처리된다. 일부 경우에서, 화학요법은 전적으로 회피될 수 있다.

[0186] 본 발명은 하기 제시된 추가의 대안에서 추가로 예시된다.

[0187] 대안

[0188] 하기 대안은 본 발명을 예시하는 것이지, 어떠한 방식, 형상 또는 형태로든 명백하게 또는 함축적으로 제한하고자 하는 것은 아니다. 그들이 사용될 수 있는 것들을 대표하더라도, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 다른 절차, 방법론 또는 기술이 대안적으로 사용될 수 있다.

[0189] 키메라 수용체 변형된 T 세포에 의한 CD171의 최적 인식을 위한 스페이서 도메인 길이의 맞춤화

[0190] 신경모세포종을 포함한 수많은 인간 악성종양 상에서 발현되는 CD171분자를 표적화할 수 있거나 또는 그에 특이적인 키메라 수용체를 구축하였다. CD171 키메라 수용체는 CD171 상의 에피토프 CE7에 특이적으로 결합하고/거나 그를 표적화하는 CD171 특이적 및/또는 표적화 scFV로부터 설계되었고, 상이한 길이의 세포외 스페이서 도메인을 함유한다. Ce7scFv-IgG4한지-CH2-CH3-CD28tm/4-1BB-제타-T2A-EGFRt-epHIV7 (긴 구축물)에 대한 서열 (서열식별번호: 54)은 도 5 및 도 6에 제시된다. CE7scFv-IgG4한지-CH3-CD28tm/4-1BB-제타-T2A-EGFRt-epHIV7 (중간형)에 대한 서열 (서열식별번호: 55)은 도 7 및 8에 제시된다. CE7scFv-IgG4한지-CD28tm/4-1BB-제타-T2A-EGFRt-epHIV7 (짧은)에 대한 서열 (서열식별번호: 56)은 도 9 및 10에 제시된다. 2개의 공동자극 도메인을 갖는 구축물 CE7scFv-IgG4한지-CD28tm/cyto-4-1BB-제타-T2A-EGFRt-epHIV7에 대한 서열 (서열식별번호: 57)은 도 11-12에 제시된다. 각각의 CD171 특이적 및/또는 표적화 키메라 수용체를 발현하는 T-세포가 시험관내에서 CD171 신경모세포종 종양을 인식하고, 면역결핍 마우스 내로 생착된 신경모세포종 종양 세포를 제거하는 능력을 분석하였다.

[0191] 인간 대상체

[0192] 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)는 연구 프로토콜의 사전 서면 동의 후에 건강한 공여자 및 환자로부터 입수하였다.

[0193] 세포주

[0194] SK-N-BE 2 신경모세포종 세포주 (Be2)는 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션으로부터 입수하였다. EBV-형질전환된 TMLCL은 이전에 기재된 바와 같이 PBMC로부터 제조되었다 (Pelloquin F, Lamelin, Lenoir GM. In vitro cell dev biol 1986; 22(12):689-694).

[0195] 면역표현형결정

[0196] PBMC 및 세포주를 하기 접합된 mAb: CD4, CD8, CD28, CD45RA 및 CD62L로 염색하고, 이소형 대조군 (BD 바이오사이언시스(BD Biosciences))을 매칭하였다. 중심 기억 T 세포는 면역자기 비드를 사용하여 CD8+ 세포를 단리시키고 CD45RA 세포의 CD8+ 세포 집단을 고갈시킴으로써 PBMC로부터 단리시켰다. CD45RA가 고갈된 CD8+ 세포는 도 1에 제시된 바와 같이 면역자기 비드를 사용하여 CD62L에 대해 풍부화시켰다. CD171키메라 수용체의 표면발현은 폴리클로날 염소 항-마우스-IgG 항체 (Fab-특이적) (잭슨 이뮤노리서치)를 사용하여 분석하였다. 유동분석은 FACS칸토(FACSCanto)® 상에서 실시하고, FACS아리아II(FACSAriaII)® (벡톤 디킨슨) 상에서 소트-정제하고, 데이터는 플로우조(FlowJo)® 소프트웨어 (트리스타(Treestar))를 사용하여 분석하였다.

[0197] 벡터 구축 및 키메라 수용체 코딩 렌티바이러스의 제조

[0198] CD171 특이적 및/또는 표적화 키메라 수용체는 CE7 mAb (CD171)의 VL 및 VH 쇄 결편을 사용하여 구축하였다. (CE7에 대한 가변 영역 서열은 도 5, 7, 9 및 11에 제공된다). 각각의 scFV는 '한지-CH2-CH3' (긴: 229 AA), '한지-CH3' (중간형: 119 AA) 또는 '한지' 단독 (짧은: 12 AA) 서열을 포함하는 IgG4-Fc (유니프롯 데이터베이스: P01861; 표 2)로부터 유래된 스페이서 도메인에 연결되었다 (표 6). 모든 스페이서는 천연 IgG4-Fc 단백질의 위치 108에 위치한 '한지' 도메인 내에 S → P 치환을 함유하였고; 인간 CD28 (유니프롯: P10747, 표 3)의 27 AA 막횡단 도메인, 및 (i) 인간 4-1BB (유니프롯: Q07011, 표 4)의 42 AA 세포질 도메인에 연결된 천연 CD28 단백질 (표 3)의 위치 186-187에 위치한 LL → GG 치환을 갖는 인간 CD28의 41 AA 세포질 도메인 또는 (ii) 인간 4-1BB 단독의 세포질 도메인을 포함하는 신호전달 모듈 (각각의 모듈은 인간 CD3ξ (유니프롯:

P20963, 표 5)의 이소형 3의 112 AA 세포질 도메인에 연결됨)에 연결되었다. 구축물은 키메라 수용체 하류의 T2A 리보솜 스킵 요소 (표 1) 및 tEGFR 서열 (표 1)을 코딩하였다. 각각의 트랜스진을 코딩하는 인간 코돈-최적화된 뉴클레오티드 서열을 합성하고 (라이프 테크놀로지스), epHIV7 렌티바이러스 벡터로 클로닝하였다.

[0199] CD171-키메라 수용체 또는 tEGFR-코딩 렌티바이러스를 패키징 벡터 pCHGP-2, pCMV-Rev2 및 pCMV-G, 및 칼포스 (Calphos)® 형질감염 시약 (클론테크)을 사용하여 293T 세포에서 생산하였다.

[0200] CD171-키메라 수용체를 발현하는 T-세포주의 생성

[0201] CD8⁺ CD45RA- CD62L⁺ 중심 기억 T-세포 (T_{CM})를 정상 공여자의 PBMC로부터 소팅하고 (도 1 참조), 항-CD3/CD28 비드 (라이프 테크놀로지스)로 활성화시키고, 제3일에 1 μg/mL 폴리브렌 (밀리포어)으로 보충된 렌티바이러스 상청액 (MOI = 3)에 의해, 800 g에서 45분 동안 32°C에서의 원심분리에 의해 활성화한 후에 형질도입시켰다. T-세포는 50 U/mL의 최종 농도로 재조합 인간 IL-2로 보충된 10% 인간 혈청, 2 mM L-글루타민을 함유하는 RPMI (CTL 배지) 중에서 확장시켰다. 각각의 T-세포주의 tEGFR+ 하위세트는 비오틴-접합된 항-EGFR mAb (임클론 시스템즈) 및 스트렙타비딘-비즈 (밀테니)를 사용하는 면역자기 선택에 의해 풍부화시켰다.

[0202] 세포독성, 및 시토카인 분비

[0203] 표적 세포, Be2 세포 또는 TML CL을, ⁵¹Cr (퍼킨엘머(PerkinElmer))로 표지하고, 세척하고, 다양한 이펙터 대 표적 (E:T) 비에서 이펙터 키메라 수용체 변형된 T-세포와 함께 1-2x10³ 개 세포/웰로 3중으로 인큐베이션하였다. 상청액을 4-시간 인큐베이션 후에 γ-계수를 위해 수거하고, 특이적 용해를 표준 식을 사용하여 계산하였다. 시토카인 분비의 분석을 위해, 5x10⁴ 개 T-세포를 표적 세포와 함께 30:1, 10:1, 3:1 또는 1:1의 E:T 비로 3중으로 플레이팅하고, 24-시간 인큐베이션 후에 제거한 상청액 중에서 ELISA 또는 멀티플렉스 시토카인 면역검정 (루미넥스)에 의해 IFN-γ, TNF-α 및 IL-2를 측정하였다.

[0204] NOD/SCID/γ c^{-/-} (NSG) 마우스에서의 실험

[0205] 6- 내지 8-주령 암컷 NOD.Cg-Prkdc^{scid} I12rg^{tm1Wj1}/SzJ (NSG) 마우스는 잭슨 래보러토리로부터 입수하거나 또는 사내 사육하였다. 마우스는 0.2x10⁶ 개의 신경모세포종 종양 세포로 두개내로 주입되었고, 7일 후에, 2 x10⁶ 개의 키메라 수용체-변형된 또는 대조군 T-세포의 두개내 주사를 제공받았다. 종양 성장의 생물발광 영상화를 위해, 마우스는 PBS 중 재현탁된 루시페린 기질 (캘리퍼 라이프 사이언시스)의 주사 (15 μg/g 체중)를 제공받았다. 마우스를 이소플루란으로 마취하고, 1초 내지 1분의 수득 시간에서 작은 또는 중간 비甬 방식으로의 루시페린의 주사 15분 후에 제노젠 IVIS 영상화 시스템 (캘리퍼)을 사용하여 영상화하여 불포화 영상을 수득하였다. 루시페라제 활성은 리빙 이미지 소프트웨어 (캘리퍼)를 사용하여 분석하고, 광자 플러스를 전신을 포괄한 관심 영역 내에서 분석하였다.

[0206] 통계적 분석

[0207] 통계적 분석은 프리즘 소프트웨어 (그래프패드(GraphPad)®)를 사용하여 수행하였다. 스튜던트 t-검정은 95%의 신뢰 구간을 갖는 양측 대응표본 검정으로서 수행하였고, p<0.05의 p-값을 갖는 결과를 유의한 것으로 간주하였다. 생존의 통계적 분석은 로그-순위 검정에 의해 실시하였고, p<0.05의 p-값을 갖는 결과를 유의한 것으로 간주하였다.

[0208] CD171 키메라 수용체의 더 긴 스페이서 도메인은 우월한 세포독성 및 생체내 시토카인 분비를 부여한다

[0209] CE7 scFV를 사용하는 CD171-특이적 및/또는 표적화 키메라 수용체의 설계가 공지되어 있다. (Park J et al. Molecular Therapy 2007, April 15(4):825-33). 이 키메라 수용체는 시험관내에서 CD171 종양의 특이적 인식 및/또는 표적화를 부여했지만, 스페이서 도메인을 조정하는 것은 종양 인식 및 T-세포 신호전달을 증진시킬 것이라고 가정되었다. 따라서, 스페이서 도메인이 '힌지-CH2-CH3' (229개 아미노산, 긴), '힌지-CH3' (119 AA, 중간형) 및 '힌지-단독' (12 AA, 짧은) 변이체로부터 선택된 키메라 수용체를 구축하였다. 각각의 새로운 수용체는 동일한 CE7 scFV, 및 4-1BB 및 CD3ζ 신호전달 모듈을 함유하였다. 트랜스진 카세트는 키메라 수용체-변형된 T-세포에 대한 형질도입, 선택 및 생체내 트랙킹 마커로서 작용하는 말단절단된 EGFR (tEGFR)을 포함하였다.

- [0210] 정제된 CD8⁺ T_{cm}은 상이한 길이 스페이서를 함유하는 CD171-키메라 수용체로, 및 tEGFR 대조군 백터로 형질도입시켰다. 각각의 키메라 수용체의 표면 발현은 F(ab)-특이적 항체로 염색함으로써 확인하였다 (도 2a). CD3 ζ에 특이적인 항체에 의해 형질도입된 세포의 웨스턴 블롯은 짧은, 중간 및 긴 구축물의 발현을 제시한다 (도 2b). F(ab) 및 EGFRt의 유사한 발현은 각각의 짧은, 중간 또는 긴 스페이서 도메인과 함께 발견되었다.
- [0211] 각각의 CD171키메라 수용체를 발현하도록 변형된 CD8+ T-세포의 시험관내 기능의 분석은 각각의 수용체가 자연적으로 CD171을 발현하는 Be2 세포의 특이적 용해를 부여하지만, 대조군 TML CL의 인식은 부여하지 않는다는 것을 증명하였다 (도 2c). 긴 CD171-키메라 수용체를 발현하는 T-세포는 최대 세포용해 활성을 가졌고, CD171종양 표적에 대해 종양 용해의 계층 (긴> 중간형> 짧은)이 명백하게 분명하였다 (도 2c).
- [0212] Be2 세포로의 자극에 반응한 시토카인 생산의 정량 분석은 각각의 CD171 키메라 수용체를 발현하는 T-세포에 의한 IFN-γ, TNF-α 및 IL-2의 생산을 제시하였다. 세포독성 검정에서 관찰된 바와 같이, 긴 스페이서 구축물을 갖는 T 세포는 종양 인식 후에 시토카인 분비를 매개하는데 있어서 우월하였다 (도 2d).
- [0213] CD171 특이적 및/또는 표적화 CAR은 생체내 활성을 위해 짧은 세포외 스페이서 도메인을 필요로 한다.
- [0214] 보다 긴 스페이서를 갖는 CD171 키메라 수용체로 변형된 T-세포의 우월한 시험관내 활성이 생체내에서의 증진 또는 개선된 항종양 활성으로 번역되는지 여부는 불확실하게 남아있다. 이들 의문을 다루기 위해, 면역결핍 NSG 마우스의 코호트에 신경모세포종 세포를 두개내 주사에 의해 접종하고, 7일 후 마우스를 짧은, 중간형 또는 긴 스페이서를 갖는 CD171 특이적 키메라 수용체 CD8+ T-세포의 단일 두개내 용량으로 처리하였다. 대조군 마우스를 tEGFR T-세포로 처리하거나 또는 비처리하였다. 비처리된 NSG/NB 마우스는 종양 접종 대략 4주 후에 안락사를 필요로 하는 신경모세포종이 발생하였다 (도 2e, 우측 패널).
- [0215] 종양 퇴행 및 증진 또는 개선된 생존은 짧은 스페이서를 갖는 CD171 키메라 수용체 T-세포로 처리된 모든 마우스에서 관찰되었다. 짧은 스페이서를 갖는 CD171 키메라 수용체 T-세포로 처리된 마우스는 긴 스페이서를 갖는 CD171 키메라 수용체 T-세포로 처리된 마우스와 비교하여 우수한 항종양 반응 및 생존을 가졌다 (도 2e, 우측 패널). 루시페린 기질로 로딩된 종양 세포로부터 총 플러스를 측정하는 것은 짧은 또는 중간형 스페이서를 갖는 구축물로 형질도입된 CD8 세포로 처리된 마우스가 비처리 마우스 또는 긴 스페이서를 갖는 구축물로 형질도입된 CD8 세포로 처리된 마우스보다 훨씬 낮은 플러스를 나타냈다는 것을 제시한다 (도 2e, 좌측 패널).
- [0216] 긴 스페이서 CD171 CAR 발현 CD8 T_{cm}으로 처리된 마우스로부터의 종양은 면역조직화학에 의하면 모의, 짧은 또는 중간 스페이서 CD171 CAR 발현 CD8 T_{cm}으로 처리된 마우스로부터의 것보다 더 높은 CD3+ 세포의 백분율을 제시하였다 (도 2f). Ki67의 어떠한 차이도 상이한 CD8 T_{cm}에서의 면역조직화학에 의해 검출할 수 없었지만, 높은 수준의 카스파제 3 및 그랜자임 B가 T 세포 주사의 3일 후에 짧은 또는 중간 스페이서를 발현하는 CD8 T_{cm}에서보다 긴 스페이서 CD171 CAR을 발현하는 CD8 T_{cm}에서 발견되었다 (도 2g).
- [0217] 긴 세포외 스페이서 도메인을 갖는 CD171 특이적 및/또는 표적화 CAR은 보다 많은 활성화 유도된 세포 사멸을 제시하였다.
- [0218] 긴 스페이서 도메인을 갖는 CD171 키메라 수용체를 발현하는 T 세포의 열등한 생체내 항종양 활성의 기저를 이루는 잠재적 메카니즘을 결정하기 위해, T 세포가 생체내에서 종양 세포에 의해 효율적으로 활성화되지 않을 가능성, 또는 반대로 그들이 생체내에서 활성화 유도된 T 세포 사멸을 겪을 가능성이 고려되었다.
- [0219] 짧은, 중간형 또는 긴 스페이서 구축물을 갖는 CD171CAR 구축물로 형질도입된 CD8 중심 기억 세포를 시험관내에서 24시간 동안 신경모세포종 세포에 노출시켰다 (라운드 1). CD8 중심 기억 세포를 배양물로부터 분리하고, 표현형적으로 특징화한 다음, 추가 24시간 동안 종양 세포와 함께 인큐베이션하였다 (라운드 2). CD8 세포를 배양물로부터 분리하고, 표현형적으로 특징화한 다음, 추가 24시간 동안 종양 세포와 함께 배양물에 위치시켰다 (라운드 3). 이어서, CD8 세포를 분리하고, 표현형적으로 특징화하였다.
- [0220] 각 라운드로부터의 세포는 유동 세포측정법을 사용하여 활성화 마커 CD25 및 CD69의 발현에 대해 특징화하였다. 각 라운드로부터의 세포 중 사멸 세포의 백분율은 구아바 비아카운트에 의해 결정하였다. NB 세포는 라운드 I 후에 FasR 발현에 대해 특징화되었다.
- [0221] 결과는 짧은 스페이서 CAR 세포가 긴 스페이서 CAR-발현 세포에 비해 연속 종양 세포 공동-배양 챌린지 후에 더 낮은 활성 및 더 나은 생존율을 나타내었다는 것을 제시한다 (라운드 III: CD25+CD69+ 42% (짧은) vs 66% (긴) (도 3a), % 사멸 세포 15% (짧은) vs 60% (긴) (도 3b)). 긴 스페이서 CAR-발현 세포는 짧은 스페이서 CAR 세

포보다 더 큰 정도로 NB 세포에서 FasR 발현을 유도하였다 (도 3c).

[0222] 접합적으로, 데이터는 긴 세포외 스페이서 도메인을 갖는 CD171 지시된 키메라 수용체가, 시험관내에서 동등하거나 우월한 기능을 매개함에도 불구하고, 생체내에서 높은 수준의 활성화 유도된 세포 사멸을 유도하고, 확립된 신경모세포종을 근절하는데 실패한다는 증거를 제공한다.

[0223] CD171은 많은 암종의 표면 상에서의 그의 발현으로 인해 암 면역요법을 위한 잠재적 표적으로서 관심을 끈 바 있다. CD171 키메라 수용체의 설계 및 기능은 세포외 스페이서 도메인의 변형을 통해 증진되거나 개선된 바 있다. 결과는 헌지 단독 짧은 스페이서 도메인을 갖는 CD171 지시된 CAR로 형질도입된 중심 기억 T 세포가 헌지-CH3 (중간형) 또는 헌지-CH2-CH3 (긴) 스페이서 도메인을 갖는 CD171 지시된 CAR로 형질도입된 T 세포와 비교 시 신경모세포종 종양 근절의 생체내 모델에서 훨씬 우수한 성능을 갖는다는 것을 제시한다.

[0224] 공동자극 도메인의 변형

[0225] 신경모세포종을 포함한 수많은 인간 악성종양 상에서 발현되는 CD171분자를 표적화할 수 있거나 또는 그에 특이적인 키메라 수용체를 구축하였다. CD171 키메라 수용체는 CD171 상의 표적 에피토프 CE7에 특이적으로 결합하고/거나 그를 표적화하고, 짧은 세포외 스페이서 도메인을 함유하는 CD171 특이적 및/또는 표적화 scFV로부터 설계되었다. 한 구축물은 CD3 제타 도메인에 연결된 공동자극 도메인 4-1BB를 함유하고 (4-1BB), 다른 구축물은 CD3 제타에 연결된 CD28cyto 및 4-1BB를 포함하는 이중 공동자극 도메인을 포함한다 (CD28cyto). 2개의 공동자극 도메인을 갖는 구축물 CE7scFv-IgG4헌지-CD28tm/cyto-4-1BB-제타-T2A-EGFRt-epHIV7에 대한 서열은 도 11-12에 제시된다. CE7scFv-IgG4헌지-CD28tm/4-1BB-제타-T2A-EGFRt-epHIV7 (짧은)에 대한 서열은 도 9-10에 제시된다. 각각의 CD171 특이적 키메라 수용체를 발현하는 T-세포가 시험관내에서 CD171 신경모세포종 종양을 인식하고, 면역결핍 마우스 내로 생착된 신경모세포종 종양 세포를 제거하는 능력을 분석하였다.

[0226] 인간 대상체

[0227] 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)는 연구 프로토콜의 사전 서면 동의 후에 건강한 공여자 및 환자로부터 입수하였다.

[0228] 세포주

[0229] SK-N-BE 2 신경모세포종 세포주 (Be2)는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션으로부터 입수하였다. EBV-형질전환된 TMLCL은 이전에 기재된 바와 같이 PBMC로부터 제조되었다 (Pelloquin F, Lamelin, Lenoir GM. In vitro cell dev biol 1986; 22(12):689-694).

[0230] 면역표현형 결정

[0231] PBMC 및 세포주를 하기 접합된 mAb: CD4, CD8, CD28, CD45RA 및 CD62L로 염색하고, 이소형 대조군 (BD 바이오 사이언시스)을 매칭하였다. 중심 기억 T 세포는 면역 자기 비드를 사용하여 CD8+ 세포를 단리시키고 CD45RA 세포의 CD8+ 세포 집단을 고갈시킴으로써 PBMC로부터 단리시켰다. CD45RA가 고갈된 CD8+ 세포는 도 1에 제시된 바와 같이 면역자기 비드를 사용하여 CD62L에 대해 풍부화시켰다. CD171키메라 수용체의 표면 발현은 폴리클로날 염소 항-마우스-IgG 항체 (Fab-특이적) (잭슨 이뮤노리서치)를 사용하여 분석하였다. 유동 분석은 FACS칸토® 상에서 실시하고, FACS아리아II® (베톤 디킨슨) 상에서 소트-정제하고, 데이터는 플로우조® 소프트웨어 (트리스타)를 사용하여 분석하였다.

[0232] 벡터 구축 및 키메라 수용체 코딩 렌티바이러스의 제조

[0233] CD171 특이적 및/또는 표적화 키메라 수용체는 CE7 mAb (CD171)의 VL 및 VH 쇄 절편을 사용하여 구축하였다. (CE7에 대한 가변 영역 서열이 도 5, 7, 9 및 11에 제공된다) 각각의 scFV는 '헌지-CH2-CH3' (긴: 229 AA), '헌지-CH3' (중간형: 119 AA) 또는 '헌지' 단독 (짧은: 12 AA) 서열을 포함하는 IgG4-Fc (유니프롯 데이터베이스: P01861; 표 2)로부터 유래된 스페이서 도메인에 연결되었다 (표 6). 모든 스페이서는 천연 IgG4-Fc 단백질의 위치 108에 위치한 '헌지' 도메인 내에 S → P 치환을 함유하였고; 인간 CD28 (유니프롯: P10747, 표 3)의 27 AA 막횡단 도메인, 및 (i) 인간 4-1BB (유니프롯: Q07011, 표 4)의 42 AA 세포질 도메인에 연결된 천연 CD28 단백질 (표 3)의 위치 186-187에 위치한 LL → GG 치환을 갖는 인간 CD28의 41 AA 세포질 도메인 또는 (ii) 인간 4-1BB 단독의 세포질 도메인을 포함하는 신호전달 모듈 (각각의 모듈은 인간 CD3ζ (유니프롯: P20963, 표 5)의 이소형 3의 112 AA 세포질 도메인에 연결됨)에 연결되었다. 한 구축물은 인간 4-1BB (유니프롯: Q07011, 서열식별번호: 15)의 42 AA 세포질 도메인을 포함하는 공동자극 신호전달 모듈을 함유하였고, 이는 인간 CD3ζ (유니프롯: P20963, 서열식별번호: 16)의 이소형 3의 112 AA 세포질 도메인에 연결되었다. 구축물은 키메라 수용체 하류의 T2A 리보솜 스킵 요소 (서열식별번호: 8) 및 tEGFR 서열 (서열식별번호: 9)을 코딩하

였다. 각각의 트랜스진을 코딩하는 인간 코돈-최적화된 뉴클레오티드 서열을 합성하고 (라이프 테크놀로지스), epHIV7 렌티바이러스 벡터 내로 클로닝하였다. CD171-키메라 수용체 또는 tEGFR-코딩 렌티바이러스를 패키징 벡터 pCHGP-2, pCMV-Rev2 및 pCMV-G, 및 칼포스® 형질감염 시약 (클론테크)을 사용하여 293T 세포 내에서 생산하였다.

[0234] CD171-키메라 수용체를 발현하는 T-세포주의 생성

[0235] CD8⁺ CD45RA- CD62L⁺ 중심 기억 T-세포 (T_{CM})를 정상 공여자의 PBMC로부터 소팅하고 (도 1 참조), 항-CD3/CD28 비드 (라이프 테크놀로지스)로 활성화시키고, 제3일에 1 μ g/mL 폴리브렌 (밀리포어)으로 보충된 렌티바이러스 상청액 (MOI = 3)에 의해, 800 g에서 45분 동안 32°C에서의 원심분리에 의해 활성화한 후에 형질도입시켰다. T-세포는 재조합 인간 IL-2에 의해 50 U/mL의 최종 농도로 및 IL-15에 의해 10ng/ μ l의 최종 농도로 보충된 10% 인간 혈청, 2 mM L-글루타민 (CTL 배지)을 갖는 RPMI 중에서 확장되었다. 각각의 T-세포주의 tEGFR+ 하위세트는 비오틴-접합된 항-EGFR mAb (임클론 시스템즈) 및 스트렙타비딘-비즈 (밀테니)를 사용하는 면역자기 선택에 의해 풍부화시켰다.

[0236] 세포독성, 및 시토카인 분비

[0237] 표적 세포, Be2 세포 또는 TML CL을, ⁵¹Cr (페킨엘마)로 표지하고, 세척하고, 다양한 이펙터 대 표적 (E:T) 비에서 이펙터 키메라 수용체 변형된 T-세포와 함께 1-2x10³개 세포/웰로 3중으로 인큐베이션하였다. 상청액을 4-시간 인큐베이션 후에 γ -계수를 위해 수거하고, 특이적 용해를 표준 식을 사용하여 계산하였다. 시토카인 분비의 분석을 위해, 5x10⁴개 T-세포를 표적 세포와 함께 30:1, 10:1, 3:1 또는 1:1의 E:T 비로 3중으로 플레이팅하고, 24-시간 인큐베이션 후에 제거한 상청액 중에서 ELISA 또는 멀티플렉스 시토카인 면역검정 (루미넥스)에 의해 IFN- γ , TNF- α 및 IL-2를 측정하였다.

[0238] NOD/SCID/ γ c^{-/-} (NSG) 마우스에서의 실험

[0239] 6- 내지 8-주령 암컷 NOD.Cg-Prkdc^{scid} I12rg^{t_{m1Wj1}}/SzJ (NSG) 마우스는 잭슨 래보러토리로부터 입수하거나 또는 사내 사육하였다. 마우스는 0.2x10⁶개 신경모세포종 종양 세포를 두개내로 주사받았고, 2 x10⁶개 키메라 수용체-변형된 또는 대조군 T-세포의 두개내 주사를 제공받았다. 종양 성장의 생물발광 영상화를 위해, 마우스는 PBS 중 재현탁된 루시페린 기질 (캘리퍼 라이프 사이언시스)의 주사 (15 μ g/g 체중)를 제공받았다. 마우스를 이소 플루란으로 마취하고, 1초 내지 1분의 수득 시간에서 작은 또는 중간 비닝 방식으로의 루시페린의 주사 15분 후에 제노젠 IVIS 영상화 시스템 (캘리퍼)을 사용하여 영상화하여 불포화 영상을 수득하였다. 루시페라제 활성을 리빙 이미지 소프트웨어 (캘리퍼)를 사용하여 분석하고, 광자 플러스를 전체를 포괄한 관심 영역 내에서 분석하였다.

[0240] 통계적 분석

[0241] 통계적 분석은 프리즘 소프트웨어 (그래프패드®)를 사용하여 수행하였다. 스튜던트 t-검정은 95%의 신뢰 구간을 갖는 양측 대응표본 검정으로서 수행하였고, p<0.05의 p-값을 갖는 결과를 유의한 것으로 간주하였다. 생존의 통계적 분석은 로그-순위 검정에 의해 실시하였고, p<0.05의 p-값을 갖는 결과를 유의한 것으로 간주하였다.

[0242] 짧은 스페이서 영역 및 2개의 공동자극 도메인을 갖는 CD171 키메라 수용체는 우월한 세포독성 및 생체내 시토카인 분비를 부여한다

[0243] 본 발명자들은 상이한 공동자극 도메인을 함유하는 CD171-키메라 수용체로 및 tEGFR 대조군 벡터로 정제된 CD8⁺ T_{CM} 을 형질도입시켰다. 각각의 키메라 수용체의 표면 발현은 F(ab)-특이적 항체로 염색함으로써 확인하였다 (도 4a). F(ab) 및 EGFRt의 유사한 발현은 단일 4-1BB 공동자극 도메인을 갖는 구축물 (패널 2) 및 CD28cyto/4-1BB 공동자극 도메인을 갖는 구축물 (패널 3) 각각에 의해 발견되었다. 각각의 CD171-키메라 수용체를 발현하도록 변형된 CD8+ T-세포의 시험판내 기능의 분석은 각각의 수용체가 자연적으로 CD171을 발현하는 Be2 세포의 특이적 용해를 부여하지만, 대조군 TML CL의 인식은 부여하지 않는다는 것을 증명하였다 (도 4b). CD28cyto/4-1BB 공동자극 도메인을 갖는 CD171-키메라 수용체를 발현하는 T-세포는 더 높은 세포용해 활성을 가지고 있었다. Be2 세포로의 자극에 반응한 시토카인 생산의 정량 분석은 각각의 CD171 키메라 수용체를 발현하는 T-세포에 의한 IFN- γ 의 생산을 제시하였다. 세포독성 검정에서 관찰된 바와 같이, CD28cyto/4-1BB 공동자극 도

메인을 갖는 구축물을 종양 인식 후에 시토카인 분비를 매개하는데 있어서 우월하였다 (도 4c).

[0244] CD28cyto/4-1BB 공동자극 도메인을 갖는 CD171 특이적 및/또는 표적화 CAR은 생체내에서 훨씬 효과적이었다

[0245] CD28cyto/4-1BB 공동자극 도메인을 갖는 CD171 키메라 수용체로 변형된 T-세포의 우월한 시험관내 활성이 생체내에서의 증진 또는 개선된 항종양 활성으로 번역되는지 여부는 불확실하게 남아있다. 이들 의문을 다루기 위해, 본 발명자들은 면역결핍 NSG 마우스의 코호트에 신경모세포종 세포를 두개내 주사에 의해 접종하고, 7일 후 마우스를 짧은, 중간형 또는 긴 스페이서를 갖는 CD171 특이적 및/또는 표적화 키메라 수용체 CD8⁺ T-세포의 단일 두개내 용량으로 처리하였다. 대조군 마우스를 tEGFR T-세포로 처리하거나 또는 비처리하였다. 비처리된 NSG/NB 마우스는 종양 접종 대략 4주 후에 안락사를 필요로 하는 신경모세포종이 발생하였다 (도 4d).

[0246] 본 발명자들은 단일 4-1BB 공동자극 도메인을 갖는 구축물을 갖는 CD171 키메라 수용체 T-세포로 처리된 모든 마우스에서 종양 퇴행 및 개선된 생존을 관찰하였다. 단일 4-1BB 공동자극 도메인을 갖는 구축물을 갖는 CD171 키메라 수용체 T-세포로 처리된 마우스는 CD28cyto/4-1BB 공동자극 도메인을 갖는 CD171 키메라 수용체 T-세포로 처리된 마우스와 비교하여 우월한 항종양 반응 및 생존을 가졌다 (도 4d).

[0247] 긴 세포외 스페이서 도메인을 갖는 CD171 특이적 및/또는 표적화 CAR은 보다 많은 활성화 유도된 세포 사멸을 제시하였다

[0248] 본 발명자들은 CD28cyto/4-1BB 공동자극 도메인을 갖는 CD171 키메라 수용체를 발현하는 T 세포의 열등한 생체내 항종양 활성의 기저를 이루는 잠재적 메카니즘을 결정하려고 노력하였다. 본 발명자들은 T 세포가 생체내에서 종양 세포에 의해 효율적으로 활성화되지 않았을 가능성 또는 반대로, 그들이 생체내에서 활성화 유도된 T 세포 사멸을 겪었을 가능성을 고려하였다.

[0249] CD28cyto/4-1BB 공동자극 도메인을 갖는 CD171CAR 구축물 또는 4-1BB 공동자극 도메인 구축물로 형질도입된 CD8 중심 기억 세포를 시험관내에서 24시간 동안 신경모세포종 세포에 노출시켰다 (라운드 1). CD8 중심 기억 세포를 배양물로부터 분리하고, 표현형적으로 특징화한 다음, 추가 24시간 동안 종양 세포와 함께 인큐베이션하였다 (라운드 2). CD8 세포를 배양물로부터 분리하고, 표현형적으로 특징화한 다음, 추가 24시간 동안 종양 세포와 함께 배양물에 위치시켰다 (라운드 3). 이어서, CD8 세포를 분리하고, 표현형적으로 특징화하였다. 각 라운드로부터의 세포는 유동 세포측정법을 사용하여 활성화 마커 CD25 및 CD69의 발현에 대해 특징화하였다. 각 라운드로부터의 세포 중 사멸 세포의 백분율은 구아바 비아카운트에 의해 결정하였다.

[0250] 결과는 4-1BB 공동자극 도메인 단독을 갖는 CAR 세포가 CD28/cyto/4-1BB 공동-자극 도메인을 갖는 CAR을 발현하는 세포에 비해 연속 종양 세포 공동-배양 챌린지 후에 더 낮은 활성화 및 더 나은 생존율을 나타내었다는 것을 제시한다 (라운드 III: CD25+CD69+ 40% (4-1BB) vs 60% (CD28cyto/4-1BB) (도 4e), % 사멸 세포 20% (4-1BB) vs 45% (CD28cyto/4-1BB) (도 4f)). 집합적으로, 데이터는 이중 CD28cyto/ 4-1BB 공동자극 도메인을 갖는 CD171 지시된 키메라 수용체가, 시험관내에서 동등하거나 우월한 이펙터 기능을 매개함에도 불구하고, 생체내에서 높은 수준의 활성화 유도된 세포 사멸을 유도하고, 확립된 신경모세포종을 근절하는데 감소된 능력을 갖는다는 증거를 제공한다.

[0251] CD171 키메라 수용체의 설계 및 기능은 공동자극 도메인의 변형을 통해 증진되거나 개선된 바 있다. 결과는 단일 4-1BB 공동자극 도메인을 갖는 CD171 지시된 CAR로 형질도입된 중심 기억 T 세포가 이중 CD28cyto/ 4-1BB 공동자극 도메인을 갖는 CD171 지시된 CAR로 형질도입된 T 세포보다 신경모세포종 종양 근절의 생체내 모델에서 훨씬 우수한 성능을 갖는다는 것을 제시한다.

[0252] 시험관내 및 생체내 CD171 표적화 CAR의 성능에 대한 세포외 스페이서 길이 및 세포질 신호전달 도메인의 기여.

[0253] CD171을 표적화하는 CAR의 성능에 대한 세포외 스페이서 길이 및 세포질 신호전달 도메인의 기여를 시험관내 및 생체내 평가하였다. 시험관내에서, 초점은 표준 검정을 사용하여 세포독성, 시토카인 분비, 활성화 상태 및 세포 사멸을 분석하는 것 및 종양 세포 노출의 다중 순차적 순환을 사용하여 새로운 CAR T-세포 스트레스 시험을 분석하는 것에 맞춰졌다. 상이한 공여자 T 세포를 사용하여 각 연구를 다수회 수행하였고, 최종 분석은 풀링된 데이터 또는 2회 이상의 샘플 반복에 의한 대표적인 실험을 포함하였다. 생체내 실험은 라이브 영상화, 생존 및 면역조직화학을 사용하여 항종양 활성을 분석하였다. 모든 마우스 실험은 군당 적어도 2마리의 마우스를 갖도록 설계하였다. 모든 이상치는 데이터 분석에 포함되었다.

[0254] CAR 구축 및 렌티바이러스 생산

[0255] CD171-특이적 및/또는 표적화 CAR은 CE7 (항-CD171) IgG2 모노클로날 항체의 (G4S)3 웨티드 연결된 VL 및 VH 절편을 사용하여 구축하였다. scFv를 코돈 최적화하고, 후속해서 인간 IgG4-Fc로부터 유래된 12 AA (짧은 스페이서 (SS)/"한지-단독"), 119 AA (중간 스페이서 (MS)/"한지-CH3") 또는 229 AA (긴 스페이서 (LS)/"한지-CH2-CH3")를 기반으로 하는 가변 스페이서 길이 도메인에 연결시켰다. 모든 스페이서는 IgG4-Fc 단백질의 위치 108에 위치한 "한지" 도메인 내에 S → P 치환을 함유하였고, 인간 CD28의 막횡단 도메인 및 (i) 4-1BB 단독 (2G CAR) 또는 (ii) CD28 (돌연변이체) 및 4-1BB (3G CAR)의 세포질 도메인을 포함하는 신호전달 모듈 (각각의 신호전달 모듈은 그의 카르복실 말단 상에서 인간 CD3- ζ 엔도도메인에 융합됨)에 연결되었다. 구축물에 사용된 CD28의 세포질 도메인의 일부는 천연 CD28 단백질의 위치 186 내지 187에 위치한 LL → GG 치환을 함유하였다. CAR 변이체를 코딩하는 cDNA 클론은 하류 T2A 리보솜 스kip 요소 및 말단절단된 EGF 수용체 (EGFRt)에 연결되고, epHIV7 렌티바이러스 벡터 내로 클로닝되고, CD171-CAR 렌티바이러스는 293T 세포에서 생산되었다.

[0256] 실시간 PCR

[0257] 총 RNA는 제조업체의 지침 (퀴아젠)에 따라 RNeasy 미니키트를 사용하여 T 세포로부터 추출하였다. cDNA는 퍼스트 스트랜드 키트 (라이프 테크놀로지스)를 사용하는 역전사에 의해 합성하였다. 특이적 유전자에 대한 RNA 정량화는 FasL (IDT) 및 CFX96 실시간 검출 시스템 (바이오라드)을 위한 실시간 프라이머를 사용하여 수행하였다. 액틴은 하우스 키핑 유전자로서 사용되었다. 데이터를 CFX 매니저 소프트웨어 버전 3.0을 사용하여 분석하였다.

[0258] 단백질 발현

[0259] 웨스턴 블롯 (WB) T-세포를 수거하고, PBS 중에서 2회 세척하고, 프로테아제 억제제 (밀리포어) 중에서 용해시켰다. 단백질을 SDS/PAGE를 사용한 다음, 항-CD247 (CD3- ζ , BD 바이오사이언시스)을 사용하는 웨스턴 블로팅에 의해 제조업체의 지침에 따라 분석하였다. 신호는 오디세이 적외선 이미저를 사용하여 검출하고, 밴드 강도는 오디세이 v2.0 소프트웨어 (LI-COR)를 사용하여 정량화하였다.

[0260] 유동 세포측정법

[0261] 면역표현형결정은 형광단-접합된 mAb: CD4, CD8, CD27, CD28, CD45RA, CD45RO, CD62L, CCR7 (바이오레전드)을 사용하여 수행하였다. L1CAM의 세포 표면 발현은 형광단-접합된 mAb (클론 014, 시노 바이올로지칼)를 사용하여 분석하였다. EGFRt 발현은 비오티닐화 세톡시맙 (브리스톨-마이어스-스큅) 및 형광단 접합된 스트렙타비딘 2차 시약을 사용하여 분석하였다. 활성화 및 AICD를 평가하기 위해, CD25, CD69, CD137, C178 (Fas 리간드) 및 CD95 (Fas, 모두 바이오레전드)에 대한 형광단 접합된 mAb를 사용하였다. 카스파제 3 활성은 제조업체의 프로토콜에 따라 카스프글로우(CaspGlow) (이바이오사이언스(eBioscience))를 사용하여 측정하였다. 유동 분석은 LSR포르테사 (BD 바이오사이언시스) 상에서 수행하였고, 데이터는 플로우조 소프트웨어 (트리스타)를 사용하여 분석하였다.

[0262] CD171 CAR을 발현하는 T 세포주의 생성

[0263] 혈관침윤 전혈의 샘플을, 시애틀 아동 연구소의 임상시험 심사 위원회에 의해 승인된 연구 프로토콜 (SCRI IRB #13795)을 따르는 사전 서면 동의 후에 건강한 공여자로부터 수득하였다. 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 피콜 (지이 헬스케어 라이프 사이언시스)를 사용하는 표준 프로토콜에 의해 단리하였고, CD8 $^+$ CD45RO $^+$ CD62L $^+$ 중심 기억 T 세포 (T_{CM})는 제조업체의 지시 (밀테니 바이오텍)에 따라 면역자기 마이크로비드를 사용하여 단리하였다.

첫째로, CD8 $^+$ CD45RO $^+$ 세포를 CD8 T 세포 단리 키트 및 CD45RA 비드를 사용한 음성 선택에 의해 수득하고, 이어서 세포를 CD62L에 대해 풍부화하고, 3:1의 비드 대 세포 비로 항-CD3/CD28 비드로 활성화시키고 (라이프 테크놀로지스, 씨모 피셔 사이언티픽), 제3일에 1 mg/ml 프로타민 술레이트 (APP 파마슈티칼스)로 보충된 렌티바이러스 상청액 (감염 다중도 [MOI] = 5)에 의해, 800 g에서 30분 동안 32°C에서의 원심분리에 의해 형질도입시켰다. T 세포는 최종 농도 50 U/ml 재조합 인간 인터류킨 (IL)-2 (키론 코포레이션) 및 10ng/μl IL-15 (밀테니 바이오텍)로 보충된 10% 열-불활성화 태아 소 혈청 (아틀라스, 콜로라도주 포트 콜린스), 2 mmol/L L-글루타민 (셀그로)를 함유하는 RPMI (셀그로) 중에서 확장되었다. 각각의 T-세포주의 EGFRt+ 하위세트는 비오틴-접합된 에르비黠스 (브리스톨-마이어스-스큅) 및 스트렙타비딘-마이크로비즈 (밀테니 바이오텍)를 사용하는 면역자기 선택에 의해 풍부화시켰다. CD171-CAR 및 모의 대조군 T 세포를 신속한 확장 프로토콜을 사용하여 확장시켰다 (생체내 검정에 사용된 T 세포를 S₁R₂D₁₄에서 동결시켰고, 주사일에 해동시켰다).

[0264]

세포주

[0265]

NB 세포주 Be2 및 SK-N-DZ는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (ATCC)으로부터 입수하였다. Be2 GFP-ffLuc_epHIV7 및 SK-N-DZ GFP-ffLuc_epHIV7을 반딧불이 루시페라제 (ffLuc) 유전자로의 렌티바이러스 형질도입에 의해 유도하고, GFP 상에서 소팅함으로써 정제하였다. 둘 다의 세포주는 CD19t 상에서 소팅하는 것에 의해 정제되는 IL-2 분비 신경모세포종 세포주를 생성하기 위해 CD19t-2A-IL2_pHIV7로 추가로 형질도입시켰다. 모든 NB 세포주는 10% 열-불활성화 태아 소 혈청 및 2mmol/L L-글루타민으로 보충된 DMEM (셀그로)에서 배양하였다. EBV-형질전환된 림프모구성 세포주 (TMLCL) 및 OKT3 mAb로부터 유래된 막 테더링 CD3 앱실론 특이적 scFvFc를 발현하는 TMLCL (TMLCL-OKT3)을 10% 열-불활성화 태아 소 혈청 및 2 mmol/L L-글루타민으로 보충된 RPMI 1640 중에서 배양하였다.

[0266]

CAR T 세포 수용체 신호전달

[0267]

1×10^6 개의 이펙터 및 표적 세포를 4 - 8분 동안 공동-배양한 후에, 세포를 가공하여 7-플렉스 T 세포 수용체 신호전달 키트 (밀리포어)에 따라 Erk/MAP 키나제 $\frac{1}{2}$ 활성을 측정하였다. 단백질 농도는 피어스 BCA 단백질 검정 키트 (씨모 사이언티픽)를 사용하여 측정하였다.

[0268]

시험관내 T 세포 검정

[0269]

크로뮴 방출 검정에 의해 측정된 세포독성. 표적 세포를 ^{51}Cr (퍼킨 엘머)로 표지하고, 세척하고, 다양한 이펙터 대 표적 (E:T) 비에서 T 세포 ($S_1R_2D_{12-14}$)와 함께 웰당 5×103 개의 세포로 3중으로 인큐베이션하였다. 상청액은 탑 카운트 NTX (퍼킨 엘머)를 사용하는 γ -계수를 위해 4시간 인큐베이션 후에 수거하고, 특이적 용해는 이전에 기재된 바와 같이 계산하였다.

[0270]

생체광자 루시페라제 검정에 의해 측정된 세포독성

[0271]

GFP-ffLuc_epHIV7을 함유하는 NB 세포주는 5:1 E:T 비로 이펙터 세포와 함께 공동-배양하였다. 이펙터 세포는 상기 기재된 바와 같이 종양 세포 직면의 제1, 제2 또는 제3 라운드에 있었다. T 세포 직면 후에 남겨진 생존 종양 세포의 양을 평가하기 위해, D-루시페린을 첨가하고, 5분 후에 IVIS 스펙트럼 영상화 시스템 (퍼킨 엘머)을 사용하여 NB 세포로부터의 생체광자 신호를 측정하였다.

[0272]

시토카인 방출

[0273]

총 5×10^5 개 T 세포 ($S_1R_2D_{12-14}$)를 자극제 세포와 함께 2:1의 E:T 비로 24시간 동안 플레이팅하였다. 상청액 중 IFN- γ , TNF-a 및 IL-2를 바이오-플렉스 시토카인 검정 및 바이오 플렉스-200 시스템 (바이오-라드 래보러토리즈)을 사용하여 측정하였다.

[0274]

스트레스 시험

[0275]

재귀적 항원 직면을 모방하기 위해, 1:1 E:T 비에서 부착 표적 세포 및 새롭게 해동된 비-부착 이펙터 세포의 공동-배양을 시작하였다. 24시간 (라운드 I) 및 48시간 (라운드 II) 후에, 구아바 비아카운트 검정 (밀리포어)을 사용하여 T 세포 생존율을 평가하였고, 비-부착 이펙터 세포를 1:1 E:T 비에서 부착 표적 세포의 새로운 세트로 이동시켰다. 라운드 I, II 및 III (72시간) 후에 T 세포를 수거하고, 추가의 분석 전에 사멸 세포 제거 키트 (밀테니)로 처리하였다.

[0276]

면역조직화학

[0277]

마우스 뇌를 사후 수거하고, 10% 중성 완충 포르말린 (씨모) 중에 24시간 동안 고정하고, 가공하고, 파라핀 포매하고, $5\text{ }\mu\text{m}$ 절편으로 절단하였다. 항원 검색은 디바 디클로커 RTU (바이오케어 메디칼(Biocare Medical))를 사용하여 수행하였다. 1차 항체를 섹션과 함께 4°C에서 밤새 인큐베이션하고, 다음과 같이 차단 완충제 중에 희석시켰다: 래트 모노클로날 항 인간 CD3 (클론 CD3-12, AbD 세로텍/바이오-라드) 1:100, 마우스 모노클로날 항 인간 Ki67 (클론 MIB-1, 다코) 1:200, 토끼 폴리클로날 항 인간 절단된 카스파제-3 (바이오 메디칼) 1:100, 토끼 폴리클로날 항 인간 그랜자임 B (코반스) 1:200. 2차 항체 (라이프 테크놀로지스)는 실온에서 2시간 동안 섹션과 함께 인큐베이션하고, 0.2% BSA를 함유하는 PBS 중에 1:500 희석하였다.

[0278]

슬라이드는 뉘앙스 멀티스펙트럼 영상화 시스템 (퍼킨 엘머)이 장착된 이클립스 Ci 업라이트 에피형광 현미경 (니콘) 상에서 40x 배율로 영상화하였다. 영상화 데이터는 인폼 분석 소프트웨어 (퍼킨 엘머)를 사용하여 분석

하였다.

[0279] NOD/SCID/γ c^{-/-} 마우스에서의 실험

[0280] NSG 마우스 종양 모델은 SCRI IACUC 승인 프로토콜 하에 수행되었다.

[0281] 두개내 NSG 마우스 인간 신경모세포종 이종이식편 모델

[0282] 성체 수컷 NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ [NOD scid 감마(NSG)] 마우스는 잭슨 래보리토리로부터 입수하거나 또는 사내 사육하였다. 마우스는 제0일에 2×10^5 개의 IL-2분비, ffLuc 발현 Be2 또는 SK-N-DZ 종양 세포로 브레그마에 대해 2mm 측면, 0.5mm 전방 및 경막으로부터 2.5mm 깊이로 두개내 (i.c.) 주사를 제공받았다. 마우스는 2×10^6 개 CAR-변형된 CD8⁺T_{E(CM)}의 후속 종양내 주사를 7일 (요법 반응 모델) 또는 14일 (스트레스 시험 모델) 이후에 제공받았다. 스트레스 시험 모델에서 마우스를 T 세포 주사 3일 후에 안락사시키고, IHC 분석을 위해 뇌를 수거하였다. 종양 성장의 생물발광 영상화를 위해, 마우스는 D-루시페린 (퍼킨 엘머; 4.29mg/마우스)의 복막내 (i.p.) 주사를 제공받았다. 마우스를 이소플루란으로 마취하고, D-루시페린 주사 15분 후에 IVIS 스펙트럼 영상화 시스템 (퍼킨 엘머)을 사용하여 영상화하였다. 루시페라제 활성은 리빙 이미지 소프트웨어 버전 4.3 (퍼킨 엘머)을 사용하여 분석하고, 광자 플러스는 관심 영역 내에서 분석하였다.

[0283] 통계적 분석

[0284] 통계적 분석은 프리즘 소프트웨어 (그래프패드(GraphPad))를 사용하여 수행하였다. 데이터는 도면 범례에서 제시된 바와 같이 ± SD 또는 SEM으로서 나타낸다. 스튜던트 t 검정은 95%의 신뢰 구간을 갖는 양측 대응표본 검정으로서 수행하였고, 0.05 미만의 P 값을 갖는 결과를 유의한 것으로 간주하였다. 생존의 통계적 분석은 로그-순위 검정에 의해 실시하였고, 0.05 미만의 P 값을 갖는 결과를 유의한 것으로 간주하였다.

[0285] CAR 촉발된 세포용해 및 시토카인 기능적 아웃풋의 크기는 CAR 세포외 스페이서 크기를 기반으로 하여 충분적으로 조정될 수 있다

[0286] CAR 발현 T 세포와 종양 세포 사이의 생물물리학적 시냅스는 종양 세포의 형질 막으로부터의 거리와 관련하여 종양 세포 표면 표적 분자 상의 에피토프 위치에 의해 영향을 받는다. 기능적 신호전달 시냅스를 수용하기 위한 CAR 세포외 스페이서 크기 조율은 생물활성 CAR을 조작하기 위한 주요 속성인 것으로 가정되었다. CD171-특이적 및/또는 표적화 CAR 세포외 스페이서 크기의 영향을 평가하기 위해, 하기와 같은 인간 IgG4의 모듈 도메인을 사용하여 일련의 스페이서를 어셈블리하였다: (긴 스페이서) (LS) IgG4 헌지-CH2-CH3, (중간 스페이서) (MS) IgG4 헌지-CH3 융합체, 및 (짧은 스페이서) (SS) IgG4 헌지. 각각의 스페이서 변이체를 CD28 막횡단 도메인에 이어 제2 세대 (2G) 4-1BB: 제타 엔도도메인에 융합시켰고, 이를 다시 T2A 리보솜 스크립터드를 사용하여 세포 표면 EGFRt 태그에 연결시켰다 (도 13a). 정제된 CD8⁺CD45RO⁺CD62L⁺ 중심 기억 전구체로부터 면역자기 선택에 의해 스페이서 변이체 2G-CAR/EGFRt⁺ 인간 CD8+ 중심 기억 유래 이谶터 T 세포주 (T_{E(CM)})의 세트가 생성되었다 (도 19a 및 b). 렌티바이러스적으로 형질도입된 T_{E(CM)}의 확장 후, 세포주를 추가로 세토시맙 면역자기 양성 선택에 의해 균질 수준의 EGFRt 발현에 대해 풍부화시켰다 (18). 항-뮤린 F(ab)- 및 EGFR-특이적 유동 세포측정 염색에 의해 각각의 CAR 스페이서 변이체의 유사한 표면 발현 수준 및 각각의 T 세포주의 CD3 ζ 에 대한 웨스턴 블롯에 의해 정량화된 단백질 발현을 확인하였다 (도 13b 및 c).

[0287] 결과에 따라 CD8⁺T_{E(CM)}의 2G-CAR 촉발된 시험관내 활성화의 크기가 스페이서 도메인 크기에 의해 영향을 받는지를 결정하여야 하였다. CD171+ 인간 신경모세포종 (NB) 종양 세포에 의한 활성화 후, CD171-특이적 및/또는 표적화 2G-CAR(LS) CD8+ T_{E(CM)}는 그의 CD171-CAR(SS) 대응물과 비교 시 3.1-배 더 높은 수준의 포스포-ERK ($p=0.003$) 및 5.7-배 더 높은 백분율의 활성화 마커 CD137을 발현하는 세포 ($p=0.015$)를 나타내었다 (도 13d 및 e). 2G-CAR(MS)는 LS 및 SS 2G-CAR과 비교 시 중간 정도 수준의 포스포-ERK 및 CD137 유도를 나타내었다. 다음에, 스페이서 크기가 또한 항종양 세포용해 활성의 크기를 LS>MS>SS 패턴으로 조정하는지 여부를 결정하였다. 4-시간 크로뮴 방출 검정을 사용할 때, CD171+ NB 표적 세포의 용해는 CD171 고 Be2 및 CD171 저 SK-N-DZ NB 세포주 둘 다에 대해 LS>MS>SS의 동일한 효력 구배에 따라 관찰되었다 (도 13f 및 도 20a). 또한, 시토카인 분비를 위한 활성화는 동일한 증분 아웃풋 계층을 따랐고, 2G-CAR(LS)는 2G-CAR(SS)와 비교 시 8.4-배 더 높은 양의 IFN-γ ($p=0.003$), 6.3-배 더 많은 IL-2 ($p<0.0001$) 및 6.1-배 더 높은 수준의 TNF-α ($p=0.005$; 도 13

g)를 생산하였고, 2G-CAR(MS)는 2개의 극값 사이에 속하였다. 이들 데이터는 CAR에 의해 생성된 생물물리학적 시냅스가 활성화 및 기능적 아웃풋의 충분 수준이 달성되도록 하는 스페이서 크기에 의해 조율될 수 있음을 증명한다. 기술분야에서 전형적으로 이용되는 표준 CAR 개발 기준을 기반으로 하여, 2G-CAR(LS) 스페이서 변이체는 임상 적용을 위한 추가의 개발을 위한 주요 후보일 것이다.

[0288] 시험관내 스페이서 조정된 CAR 재지시된 CTL 기능적 효력과 생체내 항종양 활성화의 역 상관관계

[0289] 시험관내 검정을 기반으로 한 CAR 신호전달의 관찰된 효력 대 생체내 치료 활성의 관계를 서술하기 위해, 뇌 반구에 정위 이식된 확립된 인간 NB 이종이식편을 갖는 NSG 마우스에서 입양 전달 실험을 수행하였다 (도 14a). 놀랍게도, 2G-CAR(LS)의 종양내 주사로 처리된 Be2 종양 생착 마우스는 종양 접종 대략 3주 후에 어떠한 치료 활성도 나타내지 않았고, 동물 안락사를 필요로 하였다 (도 14b 및 c). 비교 시, 생체팡자 종양 신호는 감소되었고, 생존은 2G-CAR(SS) CAR CD8+ T_{E(CM)}로 처리된 마우스에서 증진되었고, 2G-CAR(MS) 변이체로 처리된 마우스에서는 중간 정도까지 증진되었다 ($p=0.001$; 상이한 군의 중앙 생존기간: LS=20d, 모의=21d, MS=59.5d, SS=76d). SK-N-DZ 종양 생착된 마우스는 2G-CAR(SS) CD8+ T_{E(CM)}로 처리된 동물의 균일한 종양 클리어런스 및 100% 생존과 함께, 종양 반응의 SS>MS>>LS 계층을 나타내었다 (도 20c 및 d). 생착된 종양 내로 직접 주사된 2G-CAR(LS) 재지시된 CTL의 실패는, 그랜자임 B 및 Ki67을 발현한 전달된 T 세포의 동등한 종양내 밀도가 입양 전달 직후 (제3일)에 IHC에 의해 관찰되었기 때문에, 입양 전달에서 생존하는 것 및 계내 활성화되는 것의 실패로 인한 것이 아닐 수 있다 (도 14d-g). 통계적으로 유의하지 않더라도 ($p=0.34$), 활성화된 카스파제 3이 검출된 2G-CAR(LS) CD8+ T_{E(CM)}는 그들의 2G-CAR(SS) 대응물보다 12.1-배 더 빈번하였다. 이들 데이터는 세포외 스페이서 크기에 의해 좌우되는 CAR 재지시된 T 세포의 시험관내 항종양 효력과 그의 생체내 항종양 치료 활성 사이의 예상치못한 비부합성을 밝힌다.

[0290] 증대된 활성화 유도된 세포 사멸은 재귀적 항원 노출 시 긴 스페이서 포맷된 제2 세대 CAR의 과다활성 신호전달 아웃풋을 동반한다

[0291] 4-시간 내 CRA의 세포용해를 위한 시험관내 활성화는 CAR 매개 신호전달의 제한된 지속시간의 결과이지만, 생체내 종양 모델은 종양 근절을 달성하기 위해 재귀적 라운드의 활성화를 필요로 하는 것으로 가정되었다. 따라서, 시험관내에서 우월한 메트릭스를 좌우하는 특정한 CAR 포맷의 신호전달 성능은 생체내 신호전달 진폭의 결과를 밝히는데 실패할 수 있다. 시험관내 재귀적 연속 자극을 재생하기 위해, CAR T 세포-종양 세포 공동-배양 (스트레스 시험) 검정이 고안되었고, 이에 의하면 24시간마다 CAR T 세포가 수거되고, 1:1의 불변 생존 T 세포:종양 세포 비를 조정하는 종양 세포로 시팅된 배양 접시에 재귀적으로 전달된다 (도 15a). 반딧불이 루시페라제를 발현하도록 변형된 Be2는 각각의 3 라운드의 연속 전달 시 종양 세포 사멸을 공동으로 트래킹하기 위해 이용되었다. 2G-CAR 스페이서 변이체 균주의 재귀적 활성화는 라운드 III에 의해 항종양 활성의 등가의 손실을 발생시켰다 (도 15b). 추가적으로, 유동 세포 측정에 의한 각 라운드 후의 이펙터 세포를 발현하는 각각의 스페이서 변이체의 분석은, 2G-CAR(LS) CD8⁺T_{E(CM)}가 그의 2G-CAR(SS) 대응물과 비교하여 활성화 마커 CD25 및 CD69를 발현하는 세포의 보다 높은 빈도를 나타냈다는 것을 밝혀내었다 (라운드 I 79.4 vs 46.8%, $p=0.007$; 라운드 II 74.0 vs 47.6%; 라운드 III 65.7 vs 42.1%, $p=0.037$) (도 15c).

[0292] 보다 이른 시험관내 분석을 모방한 라운드 I에서의 활성화 마커의 상향조절의 LS>MS>SS 패턴과 대조적으로, 라운드 III에서 가장 실질적인 T 세포 생존율의 LS/MS>SS 손실이 관찰되었다 (라운드 III 퍼센트 사멸 세포 LS 58.7%, MS 62.6% vs SS 21.1%, LS vs SS $p=0.024$ 및 MS vs SS $p=0.007$) (도 15d). 재귀적 활성화와 함께 발생한 2G-CAR(LS) CTL에 의한 T 세포 생존율의 비대칭 손실이 증대된 AICD의 결과임을 증명하기 위해, FasL-Fas 매개 T 세포 동족살해에 초점을 맞추어 세포 사멸의 메카니즘을 평가하였다. 2G-CAR(LS) CD8⁺T_{E(CM)}가 짧은 또는 중간 스페이서 CAR T 세포보다 각각 4.8- 및 2.5-배 더 높은 FasL 표면 발현 및 5.5- 및 3.3-배 더 높은 FasL mRNA 존재비를 나타내었으므로, FasL의 종양-유도된 CAR 활성화 의존성 상향조절은 LS>MS>SS 계층을 따랐다는 것이 관찰되었다 (긴 vs 짧은: $p<0.0001$ 및 $p=0.002$; 긴 vs 중간: $p<0.0001$ 및 $p=0.016$) (도 15e 및 f). FasL 발현을 증가된 Fas 매개 아폽토시스와 연결시키기 위해, 카스파제 3 활성을 분석하였고, 그의 SS 대응물과 비교시 ($p<0.0001$) 2G-CAR(LS) CD8+ T_{E(CM)}에서 절단된 카스파제 3의 13.2-배 더 높은 수준이 관찰되었다 (도 15g). 마지막으로, 2G-CAR(LS) CD8+ T_{E(CM)}를 Fas 또는 FasL의 siRNA 녹다운에 적용시킨 다음, 종양에 노출시켰고, 라운드 III 후에 T 세포 생존율에서 1.4-배 (Fas) ($p=0.005$) 및 1.6-배 (FasL) ($p=0.0001$) 증가가 각각 관찰되었다 (도 15h). siRNA 녹다운이 Fas/FasL의 감소로 이어지는지 검증하기 위해, 2G-CAR(LS) CD8+ T_{E(CM)} 상에서의

그의 표면 발현을 평가하였고, 스크램블 siRNA로 처리된 2G-CAR(LS) CD8+T_{E(CM)}보다 Fas+ ($p<0.0001$)에서 91.3% 감소 및 FasL+ CTL ($p<0.0001$)에서 80.1% 감소가 관찰되었다 (도 21A 및 B). 전체적으로, 이들 데이터는 CAR 스페이서 크기를 조율하는 것이 차별적 크기의 항종양 기능적 아웃풋 뿐만 아니라 AICD에 대한 감수성의 통합된 증가를 발생시키는 하류 신호전달 사건을 조정할 수 있다고 증명한다. 최적 생체내 항종양 활성을 위한 이들 2 종의 과정 사이의 균형은 2G-CAR(LS) 및 2G-CAR(SS) 구조적 변이체의 이들 비교에 의해 예시되는 바와 같이 최고 수준의 CAR 신호전달 아웃풋을 달성하기 위한 스페이서 조율에 의해 항상 달성되는 것은 아닐 수 있다.

[0293] CAR 세포질 엔도도메인 조성물의 증진은 재귀적 종양 직면 시 짧은 스페이서 CD171-CAR을 AICD 경향 변이체로 복귀시킨다

[0294] 제3 세대 CAR은 CD3- ζ 활성화 모듈과 직렬로 2개의 공동-자극 엔도도메인 모듈을 함유하고, 그의 제2 세대 대응물보다 세포용해 및 시토카인 생산 수준의 크기를 증대시키는 것으로 보고되어 있다. CD171-특이적 및/또는 표적화 3G-CAR은 2G 4-1BB:제타 엔도도메인에 대한 CD28 엔도도메인의 부가를 통해 어셈블리되었다 (도 16a). 대등한 수준의 2G-CAR(SS) 및 3G-CAR(SS)을 발현하는 CD8⁺T_{E(CM)}가 정제된 T_{CM} 전구체로부터 면역자기 선택에 의해 유도되었다 (도 16b 및 c). 3G-CAR(SS) CD8⁺T_{E(CM)}는 종양 접촉 시 그의 제2 세대 대응물보다 8.4-배 더 높은 CD137 발현의 유도 ($p<0.0001$) (도 16d), Be2 표적에 대한 세포용해 활성에서의 1.3-배 증가 (이펙터 대 표적 비 1:10, $p=0.0001$) (도 16e) 및 5.1-배 많은 IL-2 및 2.5-배 많은 TNF- α 분비 ($p<0.0001$ 및 $p=0.003$) (도 16f)를 증명하였다.

[0295] 다음으로, 세포외 짧은 스페이서와 관련하여 3G 엔도도메인에 의해 매개되는 증대된 CAR을 통해 고조된 T 세포 활성화가 AICD의 악화 없이 생체내에서 항종양 활성을 선택적으로 증진시킬 수 있는지 여부를 평가하였다. 놀랍게도, Be2 (도 17a) 및 SK-N-DZ (도 17b)는, 통계적으로 유의한 정도까지는 아니었지만, 그의 2G-CAR(SS) 대응물보다 열등하였다. 이들 발견은 입양 전달 3일 후에 검출된 인간 CD3+ T 세포의 유사한 밀도를 기반으로 하여 종양 내에서의 CAR T 세포의 단기 지속성에서의 차이에서 기인할 수 없다 (도 17c). 2G-CAR(SS) 종양내 T 세포와 비교 시 그랜자임 B+ 3G-CAR(SS) T 세포의 보다 높은 빈도의 발견에도 불구하고, 활성화된 카스파제 3을 갖는 증대된 수의 제3 세대 T 세포가 다시 관찰되었고, 이는 제3 세대 CAR에서 CD28 및 4-1BB의 조합 효과를 통해 증대된 공동자극이 짧은 스페이서 세포외 도메인의 상황에도 불구하고 고조된 AICD를 발생시키는 과다자극일 수 있음을 시사한다 (도 17d). 이는 시험관내 스트레스 시험 검정을 사용하여 그들의 성능을 비교함으로써 확인하였다. 종양 자극의 각 라운드 후에, 3G-CAR(SS) T 세포 집단에서의 CD25+CD69+ T 세포의 보다 높은 빈도가 관찰되었고 (도 18a), 연속 라운드의 활성화를 통해 사멸 T 세포의 증가된 빈도가 동반되었다 (도 18b). 증대된 AICD는 다시 표면 염색 및 mRNA 함량에 의해 FasL 발현의 고조된 수준과 연관되고, 이는 차례로 활성화된 카스파제 3의 증가된 수준과 부합한다 (도 18c-e). 이들 데이터는 세포내 신호전달 도메인 조성을 기반으로 한 CAR 신호전달 아웃풋의 과다 조율이 FasL-매개 T 세포 AICD를 증진시킴으로써 조합 방식으로 조율된 짧은 스페이서 치수에 부정적인 영향을 미친다는 것을 증명한다.

[0296] CAR은 재지시된 항종양 T 세포 이펙터 기능을 촉발하는 멀티플렉스화 신호전달 아웃풋을 매개할 수 있다. 급성 림프모구성 백혈병을 갖는 환자에서 CD19에 대해 재지시된 CAR T 세포의 반박할 수 없는 치료 효력에도 불구하고, 합성 수용체의 이러한 부류의 생물물리학적 구조-기능 속성은 불완전하게 이해된 채로 남아있다. 효과적인 T 세포 항종양 활성을 위해 CAR을 조율하는 것은 고형 종양 적용에서 보다 엄격할 것이 당연하고, 생체내 항종양 기능에 대한 그의 조성물의 영향의 제한된 이해를 기반으로 한 CAR의 실험적 설계는 인간 임상 적용에서의 과정을 방해만 할 것이다. 여기에서, 세포질 신호전달 모듈 조성과 관련하여 세포외 스페이서 치수의 조합 효과(들)에 초점을 맞춘 인간 중심 기억 유래 CD8+ 이펙터 CTL의 CAR 구조-기능이 체계적으로 조사되었다. 시험관내 검정을 사용하여 CAR 신호전달 강도를 조사함으로써, CAR 구조적 변이체의 효력 계층을 확인하였다. 이들 분석은 고조된 AICD에 의해 감쇠된 생체내 효력을 초과하는 생체내 항종양 활성을 허용하는 CAR 신호전달 아웃풋의 범위를 밝혀내었다.

[0297] CAR 설계의 진화는 지금까지 주로 실험적 과정을 통해 진행되었고, 우세하게는 ITAM 함유 활성화 도메인, 예컨대 CD3 복합체의 제타 쇄에 직렬로 융합된 공동자극 수용체 세포질 도메인의 결합 모듈을 통해 신호전달 아웃풋을 증대하는 것에 초점을 맞춰왔다. 제1, 제2 또는 제3 세대 CAR을 발현하는 CTL의 기능의 비교는 전형적으로, 전장 IgG에서 상대적으로 짧은 CD8 α 헌지 또는 CD28의 막 근위부에 이르는 범위의 특정한 실험실에서 선호되는 "스톡" 세포외 스페이서 도메인과 관련하여 이루어져졌다. CAR 신호전달 및 기능적 활성에 대한 스페이서 치수의 영향이 많이 연구된 바 있다. 초분자 활성화 복합체 (SMAC)의 어셈블리를 허용하는 T 세포 형질 막과 표적

세포 형질 막 사이의 스크립트된 생물물리학적 갭을 규정하는 웨티드 로딩된 HLA 클래스 I 또는 II와의 TcR 접촉과는 달리, CAR은 표적 분자의 구조적 차원, 표적 분자 상의 scFv의 에피토프 위치 및 CAR의 스페이서 크기의 결과로서의 이러한 차원적 관계를 따르지 않는다. CAR을 통한 SMAC의 분자 어셈블리는 상대적으로 공지되어 있지 않으나, 지금까지의 분석은 그것이 TcR SMAC의 정돈된 아키텍처를 복제하지 않음을 시사한다. 제1 2개의 치수는 각각의 선택된 항원 및 항체 결합 도메인 선택에 고유한 반면에, CAR 스페이서는 조율가능한 크기이고, CAR T 세포와 표적 세포 사이의 직교 시냅스 거리를 정규화하는데 있어서 어느 정도까지 보상할 수 있다. T 세포와 표적 세포 사이의 면역학적 시냅스의 이러한 지형학은 또한, 짧은 스페이서 CAR에도 불구하고, 신호전달을 위해 시냅스 거리를 근위로 둘 수 없는 세포 표면 표적 분자 상의 막 원위 에피토프로 인해 CAR에 의해 기능적으로 가교될 수 없는 거리를 규정한다. 마찬가지로, 막 근위 CAR 표적 항원 에피토프에 대해 신호전달 아웃풋이 오직 긴 스페이서 CAR과 관련해서만 관찰된다고 기재된 바 있다.

[0298]

먼저 CE7 mAb로부터 유래된 CD171-특이적 및/또는 표적화 scFv 결합 도메인을 사용하여, 4-1BB:제타 제2 세대 CAR로부터의 신호전달 아웃풋에 대한 세포의 스페이서 크기의 영향을 평가하였다. 시험관내 검정을 기반으로 하여 스페이서 크기가 짧은 IgG4 헌지 스페이서로부터 중간형 헌지:CH3으로, 전장 IgG4 헌지:Fc 스페이서로 증가됨에 따라 신호전달 아웃풋에서 기능의 충분 획득이 관찰되었다. 예상외로, NSG 마우스에서의 확립된 정위 이식된 실질내 뇌 신경모세포종 이종이식편에 대한 생체내 시험 시, 종양내로 주사된 CAR CD8+ CTL의 항종양 효력은 스페이서 크기 (즉, SS>MS>LS) 및 시험관내 기능적 효력과 역의 상관관계가 있었다. 직접 종양내 경로의 T 세포 투여는 T 세포 이동 또는 생존에 영향을 미칠 수 있는 마우스 Fc⁺ 세포와의 상호작용에 대한 잠재적 스페이서 효과를 제거하기 위해 사용되었다. 이들 발견을 고려하면, 단일 제한된 지속시간의 종양 세포 칙면 시 CAR T 세포 기능 (즉, 종양 세포 세포용해, 시토카인 분비의 자극 및 증식)을 평가하는 통상적으로 사용되는 시험관내 검정은, 재귀적 종양 노출 시 생체내 고형 종양 내에서 발생할 것으로 예측되는 바와 같은 CAR T 세포의 후속 운명을 검출하는데 실패할 것으로 가정되었다. 이러한 가능성을 보다 잘 평가하기 위해 CAR T 세포가 생체광자 리포터 유전자 발현 종양 세포의 동등한 수에 재귀적으로 노출되는 시험관내 검정을 고안하였다. 그에 의해 종양 세포 사멸이 생체광자적으로 정량화될 수 있고, 회수된 CAR T 세포는 종양 공동-배양의 각 라운드 후에 활성화 상태, 생존율 및 카스파제 활성에 대해 조사될 수 있다. 시험관내에서의 3종의 재귀적 종양 칙면 시 2G-CAR(SS) T 세포와 비교하여 2G-CAR(LS) T 세포 사이에서 아폽토시스를 겪는 T 세포의 빈도의 불균등한 증가가 관찰되었다. 증대된 AICD는 FasL의 고조된 LS CAR 유도된 발현 및 SS CAR과 비례하여 활성화된 카스파제 3과 상관관계가 있었다. LS CAR T 세포 내 AICD는 종양 세포에 대한 노출 전에 FAS 또는 FasL의 siRNA 뉴다운에 의해 감소되었다. 이들 시험관내 발견은 SS CAR T 세포와 비교 시 종양 이종이식편 내에서의 LS CAR T 세포의 제한된 종양내 지속성과 상관관계가 있었다. 전체적으로 이들 데이터는 비-신호전달 세포의 스페이서가 고형 종양에서 신호전달 활성 뿐만 아니라 CAR T 세포의 지속성에 영향을 미치는 주요 조율가능한 CAR 설계 요소임을 증명한다.

[0299]

4-1BB제타 제2 세대 (2G) CAR과 관련하여 스페이서 치수 및 생체내 생존 사이의 관계를 고려하여, 제3 세대 (3G) CD28:4-1BB:제타 CAR 엔도도메인 포맷의 신호전달 아웃풋을 증대시키는 것과 관련하여 짧은 스페이서 치수가 일반적으로 최적일 것인지 여부를 결정하기 위한 노력이 수행되었다. 다중 다른 그룹에 의한 관찰과 일치하여, CD171-특이적 및/또는 표적화 3G-CAR(SS)은 시험관내 종양 자극 시 2G-CAR(SS)와 비교하여 고조된 수준의 세포용해 활성 및 시토카인 합성을 자극하였다. 그러나, 그의 짧은 스페이서와 관련하여 3G-CAR의 증대된 신호전달 아웃풋은 또한 FasL 발현을 증가시키고, 활성화된 카스파제 3의 증가된 수준에 의해 제시되는 바와 같이 아폽토시스를 악화시키고, 보다 높은 빈도의 세포 사멸을 야기하였다. 상응하게, 감쇠된 생체내 종양내 생존으로 인해 2G-CAR(SS)과 비교 시 손상된 생체내 3G-CAR(SS) T 세포의 항종양 효능이 관찰되었다. CD28이 초기 항원 활성화 시 T 세포를 동시자극하고, cFLIPshort에서의 NFAT 조절된 증가를 통해 AICD를 편향시킴으로써 T 세포 생존율을 증진시키는 한편, 공개된 연구는 또한 이전에 활성화된 T 세포의 재귀적 CD28 공동자극이 증대된 FasL 발현 및 결과적으로 증가된 AICD를 통해 그의 후속 생존을 감소시킬 수 있다는 것을 밝혀낸 바 있다. 따라서, 보고된 임상 시험 (2, 35)에서 항-CD19 4-1BB:제타 처리된 환자의 종종 장기간 지속성과 비교하여, 항-CD19 CD28: 제타 CAR T 세포에 의해 매개된 재귀적 CD28 신호전달이 처리된 ALL 환자에서 상대적으로 짧은 지속 시간에 대한 책임이 있는지 여부를 추측하는 것은 흥미롭다. 전체적으로, 이들 데이터는 CAR 재지시된 T 세포의 생체내 효력이, 부분적으로, 특정한 세포질 신호전달 도메인 조성물과 관련하여 크기 최적화된 세포의 스페이서 도메인의 허용되는 조합을 확인하는 것에 의존성이라는 것을 증명한다. 추가로, 재귀적 활성화 사건 시 1차 인간 CD8+ CTL에서 AICD를 유도하는 CAR 구축물의 경향을 평가하기 위한 시험관내 검정을 기재하였다. 이들 연구는 스페이서 치수 및 세포질 신호전달 모듈 선택의 조합 순효과를 기반으로 하여 CAR의 "과다조율"의 경고를 밝혀낸다.

[0300]

선험적으로 CAR이 종양 세포의 형질 막과 관련하여 표적 분자 에피토프 위치를 기반으로 어떻게 구축되어야 하는지 신뢰가능하게 지시할 수 있는 예측 구조 모델은 아직 존재하지 않는다. 더욱이, 시험관내 생물검정에서 통상적으로 사용되는 대용물은 고-수준 기능적 항종양 CAR T 세포 아웃풋 및 저-수준 AICD 사이의 최대 차등을 발생시키는 CAR 조성물의 결정적 선택과 동떨어진 지시를 할 수 있다. 본원의 작업은 시험관내 스트레스 시험 검정을 사용한 CAR 구조적 라이브러리 스크린 기술이 CAR 조작과의 통합을 위한 가치있는 추가의 파라미터일 수 있음을 입증한다. 유전자 전략은 과다활성 CAR 구축물이 AICD를 겪을 감수성, 예컨대 cFLIP 또는 Toso의 강제 과다 발현, 또는, FasL 또는 Fas를 녹다운시키는 siRNA의 벡터 지시된 합성을 제한할 수 있는 것으로 생각될 수 있다. 아폽토시스를 겪도록 T 세포 감수성을 조작하는 것은 상응하는 엄격한 안전성 특색, 예컨대 유도성 자살 구축물, 또는 임상 제어 하에서의 트랜스진 발현 제어 가변저항, 예컨대 소분자 조절된 전사 또는 번역 제어 시스템을 포함시키는 것을 필요로 할 것이다. CAR 과다조율의 추가의 2차 결과, 예컨대 과다활성 CAR PD-L1 내에서 소진된 T 세포 기능적 상태를 강요할 수 있는 억제 수용체, 예컨대 PD-1의 증대된 발현을 촉발시키는 것은 또한 조사를 필요로 한다. 데이터는 하기를 증명한다: 1.) 통상적으로 사용되는 기능적 검정을 사용한 CAR 구조-기능 시험관내 시험은 통상의 실시가 최고 기능적 활성을 나타내는 구축물에 초점을 맞추기 때문에 후보 구축물의 선택을 잘못 지시할 수 있고; 2.) CAR 제지시된 이펙터 CTL의 효력 조율은 이펙터 아웃풋의 크기에서 이득이 CAR을 통한 재귀적 촉발 시 AICD의 증진에 의해 부정되는 상한치를 갖는다. 이들 결과는 재발성/불응성 신경모세포종을 갖는 소아에서의 I상 연구를 위한 CD171-특이적 및/또는 표적화 짧은 스페이서 CAR의 선택을 가이드하였다.

[0301]

추가의 대안

[0302]

일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산이 제공된다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 a) 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 리간드 결합 도메인은 CD171에 결합하고/거나 그를 표적화함), b) 리간드를 표적화할 수 있고/거나 그에 특이적인 소정 길이의 최적화된 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 d) 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 항체 단편이다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 단일 쇄 가변 단편이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 이하이다. 일부 대안에서, 스페이서는 X₁PPX₂P의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 힌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 참조 키메라 수용체와 비교 시 리간드에 반응하여 증가된 T 세포 증식 및/또는 시토카인 생산을 위해 최적화된다.

[0303]

일부 대안에서, 키메라 수용체 폴리펩티드가 제공된다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 폴리펩티드는 키메라 수용체 핵산에 의해 코딩된다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 a) 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 리간드 결합 도메인은 CD171에 결합하고/거나 그를 표적화함), b) 리간드에 특이적인 소정 길이의 최적화된 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 d) 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 항체 단편이다. 일부 대안에서, 스페이서는 참조 키메라 수용체와 비교 시 리간드에 반응하여 증가된 T 세포 증식 및/또는 시토카인 생산을 위해 최적화된다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 단일 쇄 가변 단편이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상)이다. 일부 대안에서, 스페이서는 X₁PPX₂P의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 힌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다.

[0304]

일부 대안에서, 단리된 키메라 수용체 핵산을 포함하는 발현 벡터가 제공된다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 a) 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 리간드 결합 도메인은 CD171에 결합하고/거나 그를 표적화함), b) 리간드에 특이적인 소정 길이의 최적화된 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레

오티드, c) 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 d) 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 참조 키메라 수용체와 비교 시 리간드에 반응하여 증가된 T 세포 증식 및/또는 시토카인 생산을 위해 최적화된다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 항체 단편이다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 단일 쇄 가변 단편이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상)이다. 일부 대안에서, 스페이서는 X_1PPX_2P 의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 힌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다.

[0305] 일부 대안에서 숙주 세포가 제공된다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 발현 벡터를 포함한다. 일부 대안에서, 단리된 키메라 수용체 핵산을 포함하는 발현 벡터가 제공된다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 a) 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 리간드 결합 도메인은 CD171에 결합하고/거나 그를 표적화함), b) 리간드에 특이적인 소정 길이의 최적화된 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 d) 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 참조 키메라 수용체와 비교 시 리간드에 반응하여 증가된 T 세포 증식 및/또는 시토카인 생산을 위해 최적화된다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 항체 단편이다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 단일 쇄 가변 단편이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상)이다. 일부 대안에서, 스페이서는 X_1PPX_2P 의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 힌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD8+ T 세포, 중심 기억 CD8+ T 세포, 이펙터 기억 CD8+ T 세포 및 별크 CD8+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD8+ T 세포독성 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD8+ 세포독성 T 림프구 세포는 중심 기억 T 세포이며, 여기서 중심 기억 T 세포는 CD45RO+, CD62L+ 및/또는 CD8+에 대해 양성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포 및 별크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD4+ 헬퍼 림프구 세포는 나이브 CD4+ T 세포이며, 여기서 나이브 CD4+ T 세포는 CD45RA+, CD62L+ 및/또는 CD4+에 대해 양성이고/거나 CD45RO에 대해 음성이다.

[0306] 일부 대안에서, 조성물이 제공된다. 일부 대안에서, 조성물은 제약상 허용되는 부형제 중 숙주 세포를 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 발현 벡터를 포함한다. 일부 대안에서, 단리된 키메라 수용체 핵산을 포함하는 발현 벡터가 제공된다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 a) 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 리간드 결합 도메인은 CD171에 결합하고/거나 그를 표적화함), b) 리간드에 특이적인 소정 길이의 최적화된 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 d) 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 항체 단편이다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 단일 쇄 가변 단편이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상)이다. 일부 대안에서, 스페이서는 X_1PPX_2P 의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 힌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD8+ T 세포, 중심 기억 CD8+ T 세포, 이펙터 기억 CD8+ T 세포 및 별크 CD8+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD8+ T 세포독성 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD8+ 세포독성 T 림프구 세포는 중심 기억 T 세포이며, 여기서 중심 기억 T 세포는 CD45RO+, CD62L+ 및/또는 CD8+에 대해 양성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포 및 별크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD4+ 헬퍼 림프구 세포는 나이브 CD4+ T 세포이며, 여기서 나이브 CD4+ T 세포는 CD45RA+, CD62L+ 및/또는 CD4+에 대해 양성이고/거나 CD45RO에 대해 음성이다.

대해 음성이다. 일부 대안에서, 조성물은 숙주 세포를 포함하며, 여기서 숙주 세포는 나이브 CD8+ T 세포, 중심 기억 CD8+ T 세포, 이펙터 기억 CD8+ T 세포 및 벌크 CD8+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD8+ T 세포독성 림프구 세포이거나, 또는 여기서 CD8+ 세포독성 T 림프구 세포는 중심 기억 T 세포이고, 여기서 중심 기억 T 세포는 CD45RO+, CD62L+, 및/또는 CD8+에 대해 양성이고, 또 다른 숙주 세포를 포함하며, 여기서 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포이거나 또는 여기서 CD4+ 헬퍼 림프구 세포는 나이브 CD4+ T 세포이고, 여기서 나이브 CD4+ T 세포는 CD45RA+, CD62L+ 및/또는 CD4+에 대해 양성이고/거나 CD45RO에 대해 음성이다. 일부 대안에서, 스페이서는 참조 키메라 수용체와 비교 시 리간드에 반응하여 증가된 T 세포 증식 및/또는 시토카인 생산을 위해 최적화된다.

[0307] 일부 대안에서, 숙주 세포를 제조하는 시험관내 방법이 제공된다. 일부 대안에서, a) 키메라 수용체를 코딩하는 핵산의 라이브러리를 제공하는 단계이며, 여기서 각각의 복수개의 핵산은 길이가 상이한 키메라 수용체를 코딩하는 것인 단계, b) 각각의 복수개의 핵산을 별개의 단리된 T 림프구 집단에 도입시키고 각각의 T 림프구 집단을 시험관내에서 확장시키는 단계, c) 각각의 유전자 변형된 T 림프구 집단을 종양 보유 동물 모델에 투여하고, 유전자 변형된 T 림프구 집단이 항종양 효능을 갖는지 여부를 결정하는 단계, 및 d) 시험관내 및/또는 동물 모델에서 항종양 효능을 제공하는 키메라 수용체를 코딩하는 핵산을 선택하는 단계를 포함하는, 숙주 세포를 제조하는 시험관내 방법이 제공된다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 발현 백터를 포함한다. 일부 대안에서, 단리된 키메라 수용체 핵산을 포함하는 발현 백터가 제공된다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 a) 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 리간드 결합 도메인은 CD171에 결합하고/거나 그를 표적화함), b) 리간드에 특이적인 소정 길이의 최적화된 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 d) 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 참조 키메라 수용체와 비교 시 리간드에 반응하여 증가된 T 세포 증식 및/또는 시토카인 생산을 위해 최적화된다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 항체 단편이다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 단일 쇄 가변 단편이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상)이다. 일부 대안에서, 스페이서는 X₁PPX₂P의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 힌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD8+ T 세포, 중심 기억 CD8+ T 세포, 이펙터 기억 CD8+ T 세포 및 벌크 CD8+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD8+ T 세포독성 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD8+ 세포독성 T 림프구 세포는 중심 기억 T 세포이며, 여기서 중심 기억 T 세포는 CD45RO+, CD62L+ 및/또는 CD8+에 대해 양성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD4+ 헬퍼 림프구 세포는 나이브 CD4+ T 세포이며, 여기서 나이브 CD4+ T 세포는 CD45RA+, CD62L+ 및/또는 CD4+에 대해 양성이고 CD45RO에 대해 음성이다. 일부 대안에서, 키메라 수용체를 코딩하는 핵산은 발현 백터를 구성한다. 일부 대안에서, 발현 백터는 단리된 키메라 수용체 핵산을 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 a) 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 리간드 결합 도메인은 CD171에 결합하고/거나 그를 표적화함), b) 리간드에 특이적인 소정 길이의 최적화된 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 d) 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 참조 키메라 수용체와 비교 시 리간드에 반응하여 증가된 T 세포 증식 및/또는 시토카인 생산을 위해 최적화된다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 항체 단편이다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 단일 쇄 가변 단편이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상)이다. 일부 대안에서, 스페이서는 X₁PPX₂P의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 힌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 방법은 키메라 수용체를 코딩하는 선택된 핵산을 숙주 세포에 도입시키는 단계를 추가로 포함한다.

[0308]

일부 대안에서, 숙주 세포를 제조하는 시험관내 방법이 제공된다. 일부 대안에서, 방법은 a) 키메라 수용체 핵산 또는 발현 벡터를 CD45RA-, CD45RO+, 및/또는 CD62L+ 표현형을 갖는 램프구 집단에 도입시키는 단계 및 b) 세포를 항-CD3 및/또는 항 CD28, 및 적어도 1종의 항상성 시토카인의 존재 하에 세포가 세포 주입물로서 사용하기에 충분히 확장될 때까지 배양하는 단계를 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 발현 벡터를 포함한다. 일부 대안에서, 단리된 키메라 수용체 핵산을 포함하는 발현 벡터가 제공된다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 a) 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 리간드 결합 도메인은 CD171에 결합하고/거나 그를 표적화함), b) 리간드에 특이적인 소정 길이의 최적화된 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 d) 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 항체 단편이다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 단일 쇄 가변 단편이다. 일부 대안에서, 스페이서는 참조 키메라 수용체와 비교 시 리간드에 반응하여 증가된 T 세포 증식 및/또는 시토카인 생산을 위해 최적화된다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상)이다. 일부 대안에서, 스페이서는 X₁PPX₂P의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 헌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD8+ T 세포, 중심 기억 CD8+ T 세포, 이펙터 기억 CD8+ T 세포 및 벌크 CD8+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD8+ T 세포독성 램프구 세포이다. 일부 대안에서, CD8+ 세포독성 T 램프구 세포는 중심 기억 T 세포이며, 여기서 중심 기억 T 세포는 CD45RO+, CD62L+ 및/또는 CD8+에 대해 양성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 램프구 세포이다. 일부 대안에서, CD4+ 헬퍼 램프구 세포는 나이브 CD4+ T 세포이며, 여기서 나이브 CD4+ T 세포는 CD45RA+, CD62L+ 및/또는 CD4+에 양성이고/거나 CD45RO에 대해 음성이다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 a) 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 리간드 결합 도메인은 CD171에 결합하고/거나 그를 표적화함), b) 리간드에 특이적인 소정 길이의 최적화된 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 d) 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 항체 단편이다. 일부 대안에서, 스페이서는 참조 키메라 수용체와 비교 시 리간드에 반응하여 증가된 T 세포 증식 및/또는 시토카인 생산을 위해 최적화된다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 단일 쇄 가변 단편이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상)이다. 일부 대안에서, 스페이서는 X₁PPX₂P의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 헌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 발현 벡터는 단리된 키메라 수용체 핵산을 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 a) 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 리간드 결합 도메인은 CD171에 결합하고/거나 그를 표적화함), b) 리간드에 특이적인 소정 길이의 최적화된 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 d) 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 참조 키메라 수용체와 비교 시 리간드에 반응하여 증가된 T 세포 증식 및/또는 시토카인 생산을 위해 최적화된다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 항체 단편이다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 단일 쇄 가변 단편이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 이하이다. 일부 대안에서, 스페이서는 X₁PPX₂P의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 헌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 램프구는 CD8+ 또는 CD4+이다.

[0309]

일부 대안에서, CD171을 발현하는 암 또는 고형 종양의 치료에서의 숙주 세포 또는 조성물의 용도가 제공된다.

일부 대안에서, 조성물은 제약상 허용되는 부형제 중 숙주 세포를 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 발현 벡터를 포함한다. 일부 대안에서, 단리된 키메라 수용체 핵산을 포함하는 발현 벡터가 제공된다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 a) 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 리간드 결합 도메인은 CD171에 결합하고/거나 그를 표적화함), b) 리간드에 특이적인 소정 길이의 최적화된 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 d) 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 참조 키메라 수용체와 비교 시 리간드에 반응하여 증가된 T 세포 증식 및/또는 시토카인 생산을 위해 최적화된다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 항체 단편이다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 단일 쇄 가변 단편이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상)이다. 일부 대안에서, 스페이서는 X_1PPX_2P 의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 힌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD8+ T 세포, 중심 기억 CD8+ T 세포, 이펙터 기억 CD8+ T 세포 및 벌크 CD8+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD8+ T 세포독성 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD8+ 세포독성 T 림프구 세포는 중심 기억 T 세포이며, 여기서 중심 기억 T 세포는 CD45RO+, CD62L+ 및/또는 CD8+에 대해 양성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 세포독성 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD4+ 헬퍼 림프구 세포는 나이브 CD4+ T 세포이며, 여기서 나이브 CD4+ T 세포는 CD45RA+, CD62L+ 및/또는 CD4+에 대해 양성이고/거나 CD45RO에 대해 음성이다. 일부 대안에서, 조성물은 숙주 세포를 포함하며, 여기서 숙주 세포는 나이브 CD8+ T 세포, 중심 기억 CD8+ T 세포, 이펙터 기억 CD8+ T 세포 및 벌크 CD8+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD8+ T 세포독성 림프구 세포이거나, 또는 여기서 CD8+ 세포독성 T 림프구 세포는 중심 기억 T 세포이고, 여기서 중심 기억 T 세포는 CD45RO+, CD62L+, 및/또는 CD8+에 대해 양성이고, 또 다른 숙주 세포를 포함하며, 여기서 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포이거나 또는 여기서 CD4+ 헬퍼 림프구 세포는 나이브 CD4+ T 세포이고, 여기서 나이브 CD4+ T 세포는 CD45RA+, CD62L+ 및/또는 CD4+에 대해 양성이고/거나 CD45RO에 대해 음성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 발현 벡터를 포함한다. 일부 대안에서, 단리된 키메라 수용체 핵산을 포함하는 발현 벡터가 제공된다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 a) 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 리간드 결합 도메인은 CD171에 결합하고/거나 그를 표적화함), b) 리간드에 특이적인 소정 길이의 최적화된 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 d) 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 참조 키메라 수용체와 비교 시 리간드에 반응하여 증가된 T 세포 증식 및/또는 시토카인 생산을 위해 최적화된다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 항체 단편이다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 단일 쇄 가변 단편이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상)이다. 일부 대안에서, 스페이서는 X_1PPX_2P 의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 힌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD8+ T 세포, 중심 기억 CD8+ T 세포, 이펙터 기억 CD8+ T 세포 및 벌크 CD8+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD8+ T 세포독성 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD8+ 세포독성 T 림프구 세포는 중심 기억 T 세포이며, 여기서 중심 기억 T 세포는 CD45RO+, CD62L+ 및/또는 CD8+에 대해 양성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD4+ 헬퍼 림프구 세포는 나이브 CD4+ T 세포이며, 여기서 나이브 CD4+ T 세포는 CD45RA+, CD62L+ 및/또는 CD4+에 대해 양성이고/거나 CD45RO에 대해 음성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 발현 벡터를 포함한다. 일부 대안에서, 단리된 키메라 수용체 핵산을 포함하는 발현 벡터가 제공된다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 a) 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 리간드 결합 도메인은 CD171에 결합하고/거나 그를 표적화함), b) 리간드에 특이적인 소정 길이의 최적화된 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 d) 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서는 참조 키메라 수용체와 비교 시 리간드에 반응하여 증가된 T 세포 증식 및/또는 시토카인 생산을 위해 최적화된다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 항체 단편이다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 단일 쇄 가변 단편이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상)이다. 일부 대안에서, 스페이서는 X_1PPX_2P 의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 힌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD8+ T 세포, 중심 기억 CD8+ T 세포, 이펙터 기억 CD8+ T 세포 및 벌크 CD8+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD8+ T 세포독성 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD8+ 세포독성 T 림프구 세포는 중심 기억 T 세포이며, 여기서 중심 기억 T 세포는 CD45RO+, CD62L+ 및/또는 CD8+에 대해 양성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD4+ 헬퍼 림프구 세포는 나이브 CD4+ T 세포이며, 여기서 나이브 CD4+ T 세포는 CD45RA+, CD62L+ 및/또는 CD4+에 대해 양성이고/거나 CD45RO에 대해 음성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 암은 신경모세포종이다. 일부 대안에서, 고형 종양은 결장암, 신암, 췌장암 및 난소암으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0310] 일부 대안에서, 암 또는 종양을 갖는 대상체에서 세포 면역요법을 수행하는 방법이 제공된다. 일부 대안에서, 방법은 조성물 또는 숙주 세포를 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 발현 벡터

를 포함한다. 일부 대안에서, 단리된 키메라 수용체 핵산을 포함하는 발현 백터가 제공된다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 a) 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 리간드 결합 도메인은 CD171에 결합하고/거나 그를 표적화함), b) 리간드에 특이적인 소정 길이의 최적화된 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 d) 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 항체 단편이다. 일부 대안에서, 스페이서는 참조 키메라 수용체와 비교 시 리간드에 반응하여 증가된 T 세포 증식 및/또는 시토카인 생산을 위해 최적화된다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 단일 쇄 가변 단편이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상)이다. 일부 대안에서, 스페이서는 X₁PPX₂P의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 힌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD8+ T 세포, 중심 기억 CD8+ T 세포, 이펙터 기억 CD8+ T 세포 및 벌크 CD8+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD8+ T 세포독성 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD8+ 세포독성 T 림프구 세포는 중심 기억 T 세포이며, 여기서 중심 기억 T 세포는 CD45RO+, CD62L+ 및/또는 CD8+에 대해 양성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 세포독성 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD4+ 헬퍼 림프구 세포는 나이브 CD4+ T 세포이며, 여기서 나이브 CD4+ T 세포는 CD45RA+, CD62L+ 및/또는 CD4+에 대해 양성이고/거나 CD45RO에 대해 음성이다. 일부 대안에서, 조성물은 제약상 허용되는 부형제 중 숙주 세포를 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 발현 백터를 포함한다. 일부 대안에서, 단리된 키메라 수용체 핵산을 포함하는 발현 백터가 제공된다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 a) 리간드 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (여기서 리간드 결합 도메인은 CD171에 결합하고/거나 그를 표적화함), b) 리간드에 특이적인 소정 길이의 최적화된 폴리펩티드 스페이서를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, c) 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 d) 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 항체 단편이다. 일부 대안에서, 리간드 결합 도메인은 단일 쇄 가변 단편이다. 일부 대안에서, 스페이서는 15개 아미노산 이하 (그러나 1 또는 2개 아미노산 이상)이다. 일부 대안에서, 스페이서는 X₁PPX₂P의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 대안에서, 스페이서 영역은 인간 항체의 힌지 영역의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 모두 또는 일부를 CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C 및 B7-H3 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 도메인과 조합하여 포함한다. 일부 대안에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타의 일부 및 4-1BB의 일부를 포함한다. 일부 대안에서, 키메라 수용체 핵산은 마커 서열을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD8+ T 세포, 중심 기억 CD8+ T 세포, 이펙터 기억 CD8+ T 세포 및 벌크 CD8+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD8+ T 세포독성 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD8+ 세포독성 T 림프구 세포는 중심 기억 T 세포이며, 여기서 중심 기억 T 세포는 CD45RO+, CD62L+ 및/또는 CD8+에 대해 양성이다. 일부 대안에서, 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포이다. 일부 대안에서, CD4+ 헬퍼 림프구 세포는 나이브 CD4+ T 세포이며, 여기서 나이브 CD4+ T 세포는 CD45RA+, CD62L+ 및/또는 CD4+에 대해 양성이고/거나 CD45RO에 대해 음성이다. 일부 대안에서, 조성물은 숙주 세포를 포함하며, 여기서 숙주 세포는 나이브 CD8+ T 세포, 중심 기억 CD8+ T 세포, 이펙터 기억 CD8+ T 세포 및 벌크 CD8+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD8+ T 세포독성 림프구 세포이거나, 또는 여기서 CD8+ 세포독성 T 림프구 세포는 중심 기억 T 세포이고, 여기서 중심 기억 T 세포는 CD45RO+, CD62L+, 및/또는 CD8+에 대해 양성이고, 또 다른 숙주 세포를 포함하며, 여기서 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포이거나 또는 여기서 CD4+ 헬퍼 림프구 세포는 나이브 CD4+ T 세포이고, 여기서 나이브 CD4+ T 세포는 CD45RA+, CD62L+ 및/또는 CD4+에 대해 양성이고/거나 CD45RO에 대해 음성이다. 일부 대안에서, 암은 신경모세포종이다. 일부 대안에서, 종양은 결장암, 신암, 췌장암 및 난소암으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0311]

<표 1> 예시적인 서열

IgG4현지

DNA: GAGAGCAAGTACCGA

AA: E S K Y G

CD28tm

DNA: CCGCCCTGCCCTTGCCCT:ATGTTCTGGTGCTGGTGGTCGGAGGC

AA: P P C P P C P M F W V L V V V G G

DNA: GTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCTGGTCACCGTGGCCTTCATCATCTTTGG

AA: V L A C Y S L L V T V A F I I F W

41BB

DNA: GTG:AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTATG

AA: V K R G R K K L L Y I F K Q P F M

DNA: AGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCA

AA: R P V Q T T Q E E D G C S C R F P

CD3제타

DNA: GAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAAGTCGGGTGAAG:TTCAGCAGAACGCGCC

AA: E E E E G G C E L R V K F S R S A

DNA: GACGCCCTGCCTACCAGCAGGCCAGAATCAGCTGTACAACGAGCTGAAC

AA: D A P A Y Q Q G Q N Q L Y N E L N

DNA: CTGGCAGAACGGAGAGTACGACGTCTGGATAAGCGGAGAGGCCGGAC

AA: L G R R E E Y D V L D K R R G R D

DNA: CCTGAGATGGCGGGCAAGCCTCGGCGGAAGAACCCCCAGGAAGGCCTGTAT

AA: P E M G G K P R R K N P Q E G L Y

DNA: AACGAACGTGAGAACAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATG

AA: N E L Q K D K M A E A Y S E I G M

[0312]

DNA: AAGGGCGAGCGGAGGCAGGGCAAGGGCCACGACGGCTGTATCAGGGCTG
AA: K G E R R R G K G H D G L Y Q G L

DNA: TCCACCGCCACCAAGGATAACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCC
AA: S T A T K D T Y D A L H M Q A L P

T2A

DNA: CCAAGG:CTCGAGGGCGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGT
AA: P R L E G G G E G R G S L L T C G
EGFRt

DNA: GACGTGGAGGAGAATCCCAGGCCCTAGG:**ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTT**
AA: D V E E N P G P R M L L L V T S L

DNA: CTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCCTCCTGATCCCACGCAAAGTG
AA: L L C E L P H P A F L L I P R K V

DNA: TGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTAAAGACTCACTCTCCATAAATGCT
AA: C N G I G I G E F K D S L S I N A

DNA: ACGAATATTAAACACTTCAAAAACTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCAC
AA: T N I K H F K N C T S I S G D L H

DNA: ATCCTGCCGGTGGCATTTAGGGGTGACTCCTTCACACATACTCCTCCTCTG
AA: I L P V A F R G D S F T H T P P L

DNA: GATCCACAGGAACTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTT
AA: D P Q E L D I L K T V K E I T G F

DNA: TTGCTGATTCAAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCCTTGAG
AA: L L I Q A W P E N R T D L H A F E

DNA: AACCTAGAAATCATACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTCTCTT
AA: N L E I I R G R T K Q H G Q F S L

DNA: GCAGTCGTCAACATAACATCCTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAG
AA: A V V S L N I T S L G L R S L K E

DNA: ATAAGTGTGGAGATGTGATAATTTCAGGAAACAAAAATTGTGCTATGCA
AA: I S D G D V I I S G N K N L C Y A

DNA: AATACAATAACTGGAAAAAAACTGTTGGACCTCCGGTCAGAAACCAAA
AA: N T I N W K K L F G T S G Q K T K

DNA: ATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCTGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGC
AA: I I S N R G E N S C K A T G Q V C

DNA: CATGCCTTGTGCTCCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCGGAGCCAGGGACTGC
AA: H A L C S P E G C W G P E P R D C

DNA: **GTCTCTGCCGGAATGTCAGCCGAGGCAGGGAAATGCGTGGACAAGTGCAAC**

AA: V S C R N V S R G R E C V D K C N

DNA: **CTTCCTGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTGTGGAGAACTCTGAGTGCATACAG**

AA: L L E G E P R E F V E N S E C I Q

DNA: **TGCCACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGG**

AA: C H P E C L P Q A M N I T C T G R

DNA: **GGACCAGACAACGTATCCAGTGTGCCACTACATTGACGGCCCCACTGC**

AA: G P D N C I Q C A H Y I D G P H C

DNA: **GTCAAGACCTGCCGGCAGGAGTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGG**

AA: V K T C P A G V M G E N N T L V W

DNA: **AAGTACGCAGACGCCGGCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAAACTGCACC**

AA: K Y A D A G H V C H L C H P N C T

DNA: **TACGGATGCACTGGGCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCAACGAATGGGCTTAAG**

AA: Y G C T G P G L E G C P T N G P K

DNA: **ATCCCGTCCATGCCACTGGATGGTGGGGGCCCTCCTCTGCTGCTGGTG**

AA: I P S I A T G M V G A L L L L V

DNA: **GTGGCCCTGGGATCGGCCTTTCATGTGA** (SEQ ID NO:10)

AA: V A L G I G L F M * (SEQ ID NO:11)

[0314]

<표 2>

[0316] 예시적인 서열 유니프롯 P0861 IgG4-Fc (서열식별번호: 13)

10	20	30	40	50	60
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS					
70	80	90	100	110	120
GLYSLSSVVT VPSSLGKTK YTCDVNDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPSCP APEFLGGPSV					
130	140	150	160	170	180
FLFPPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVQSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY					
190	200	210	220	230	240
RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK					
250	260	270	280	290	300
NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG					

[0317]

310	320
NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK	

1-98 CH1

99-110 헌지

111-220 CH2

221-327 CH3

위치 108 S→P

[0318]

[0319]

<표 3>

[0320]

예시적인 서열/유니프롯 P10747 CD28(서열식별번호: 14)

10	20	30	40	50	60
MLRLLLALNL FPSIQVTGNK ILVKQSPMLV AYDNAVNLSC KYSYNLFSRE FRASLHKGLD					
70	80	90	100	110	120
SAVEVCVVYG NYSQQLQVYS KTGFNCDGKL GNESVTFYLQ NLYVNQTDIY FCKIEVMYPP					
130	140	150	160	170	180
PYLDNEKSNG TIIHVKGKHL CPSPLFPGPS KPFWVLVVVG GVLACYSLLV TVAFIIFWVR					
190	200	210	220		
SKRSRLLHSD YMNMTPRRPG PTRKYQPYA PPRDFAAYRS					

1-18 신호 웨터드

19-152 세포외 도메인

153-179 막횡단 도메인

180-220 세포내 도메인

위치 186-187 LL→GG

[0321]

[0322]

<표 4>

[0323] 예시적인 서열/유니프롯 Q07011 4-1BB(서열식별번호: 15)

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQTCSPCPP NSFSSAGGQR					
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC					
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE					
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
PGHSPQTISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG					
<u>250</u>					
CSCRFPEEEE GGCEL					

1-23 신호 펩티드

24-186 세포외 도메인

187-213 막획단 도메인

214-255 세포내 도메인

[0324]

[0325] <표 5>

[0326]

예시적인 서열/유니프롯 P20963 인간 CD3 ζ 이소형 3 (서열식별번호: 16)

10	20	30	40	50	60
MKWKALFTAA ILQAOQLPITE AQSFGLLDPK LCYLLDGILF IYGVILTA LF LRVKF SRSAD					
70	80	90	100	110	120
APAYQQGQHQ LYNELNLGRR EYDVLDKRR GRDPEMGGKP QRRKNPQEGL YNEIQLQDKMA					
130	140	150	160		
EAYSEIGMKG ERRRGKGHDG LYQGLSTATK DTYDALHMQA LPPR					

1-21 신호 웹티드

22-30 세포외

31-51 막횡단

52-164 세포내 도메인

61-89 ITAM1

100-128 ITAM2

131-159 ITAM3

[0327]

[0328]

<표 6> 예시적인 한지 영역 서열

인간 IgG1 EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:17)

인간 IgG2 ERKCCVECPPCP (SEQ ID NO:18)

인간 IgG3 ELKTPGDTHTCP RCP (EPKSCDT PPPCPRCP)₃ (SEQ ID NO:19)

인간 IgG4 ESKYGPPCPSCP (SEQ ID NO:20)

변형된 인간 IgG4 ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:21)

변형된 인간 IgG4 YGPPCPPCP (SEQ ID NO:51)

변형된 인간 IgG4 KYGPPCPPCP (SEQ ID NO:52)

변형된 인간 IgG4 EVVKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:53)

[0329]

[0330]

<豆 7>

중간 스페이서 IgG4 헌지-CH3 (SEQ ID NO: 37)

IgG4 스페이서

TA CCGGACCGCCCTGCCCTTGCCT

CH₃

GGCCAGCCTCGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCTCCCTCCCAGGAAGAGATG
ACCAAGAACCAAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCCAGCGAC
ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCAC
CCCTCCCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTCCTGTACAGCCGGCTGACCGTG
GACAAGAGCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTAGCTGCAGCGTGATGCACGAG
GCCCTGCACAACCAACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAG

긴 스페이서 IgG4 헌지-CH2-CH3 (SEQ ID NO: 58)

IgG4 스페이서

TA CGGACCGCCCTGCCCTTGCCT

CH₂

GCCCCCGAGTTCTGGCGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCAAGCCCAAGG
ACACCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGACGTGA
GCCAGGAAGATCCCGAGGTCCAGTCATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAAGTGC
ACAACGCCAAGACCAAGCCCCAGAGAGGAACAGITCAACAGCACCTACCGGGTG
GTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTAACGGCAAAGAATACAAG
TGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCAGCAGCATCGAAAAGACCATCAGCAAG
GCCAAG

CH₃

GGCCAGCCTCGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCTCCCTCCCAGGAAGAGATG
ACCAAGAACCAAGGTGTCCTGACCTGCCTGGTAAGGGCTTCTACCCCCAGCGAC
ATCGCCGTGGAGTGGAGAGCAACGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCAC
CCCTCCCGTGTGGACAGCGACGGCAGCTTCTCCTGTACAGCCGGCTGACCGTG
GACAAGAGCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTAGCTGCAGCGTGATGCACGAG
GCCCTGCACAACCAACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAG

[0331]

[0332]

<표 8>

짧은 스페이서 (SEQ ID NO: 21)

한지 스페이서

ESKYGPPCPPCP

중간 스페이서 (SEQ ID NO: 59)

한지 스페이서

ESKYGPPCPPCP

CH3

GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT**C**LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV
LDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS**C**SVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

긴 스페이서 (SEQ ID NO: 60)

한지 스페이서

ESKYGPPCPPCP

CH2

APEFLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVT**C**VVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK**C**KVSNKGLPSSIEKTISKAK

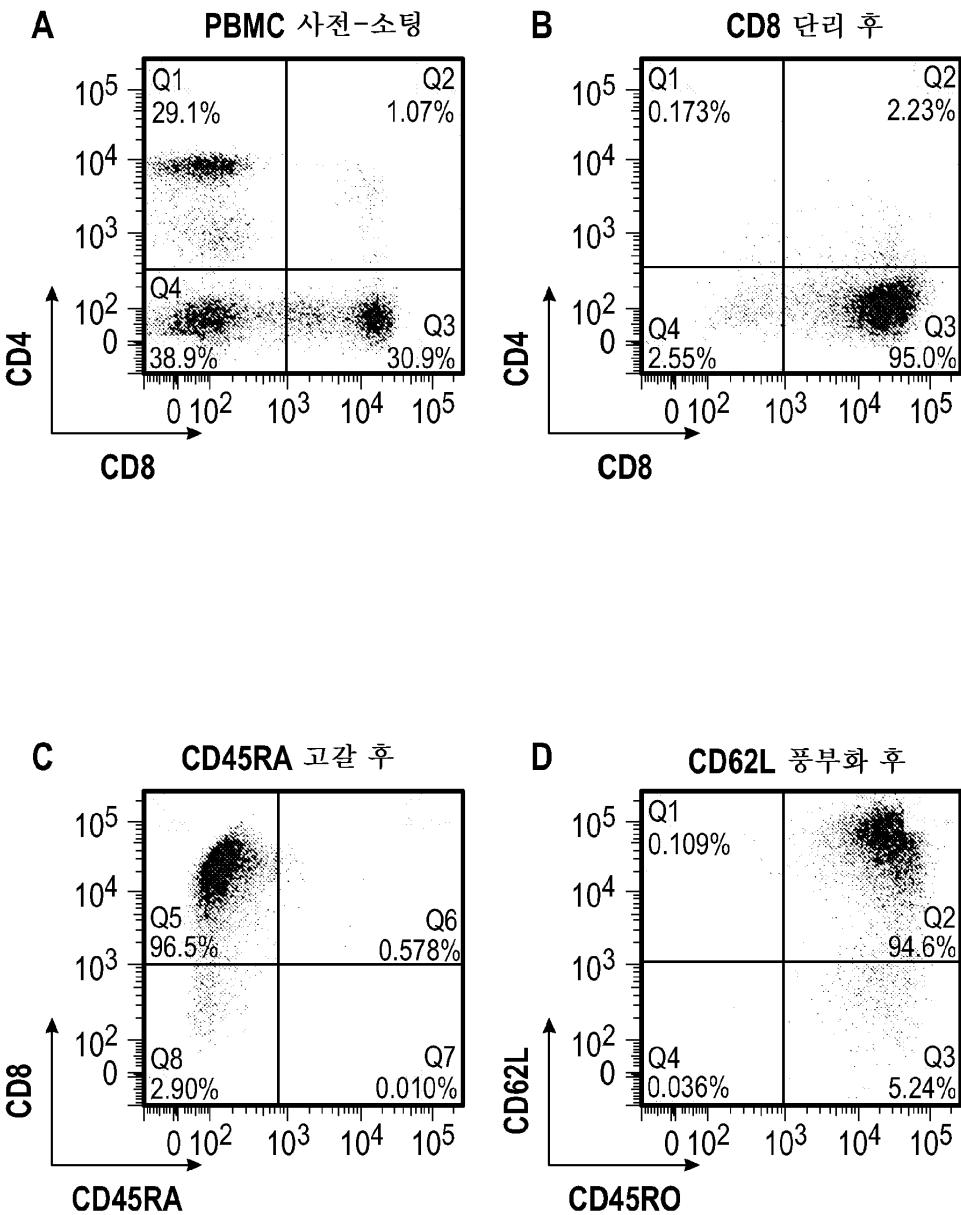
CH3

GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT**C**LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV
LDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS**C**SVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

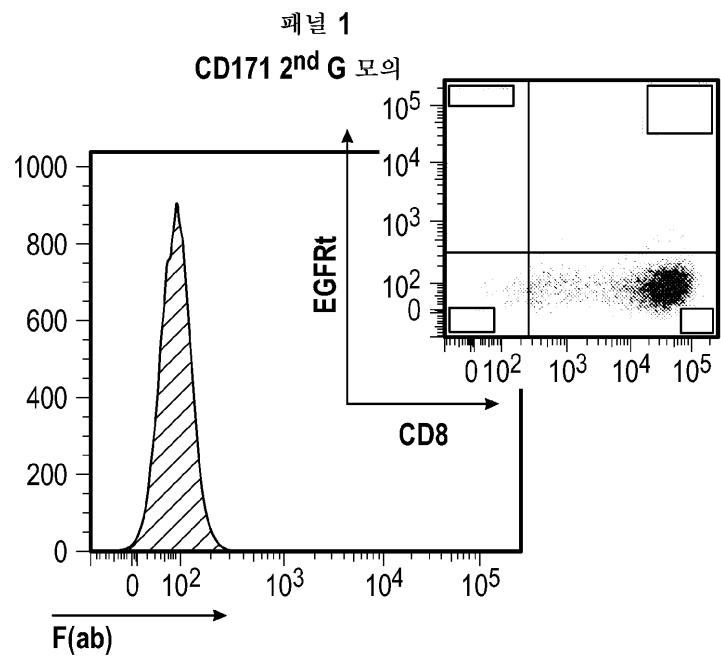
[0333]

도면

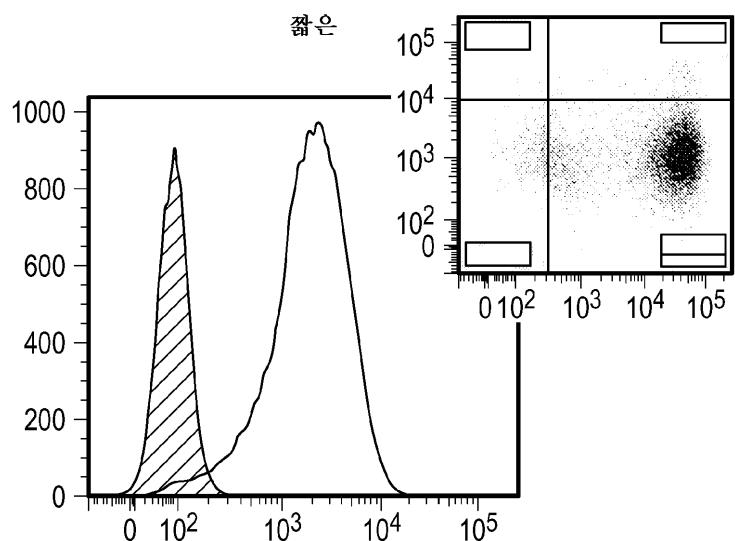
도면1



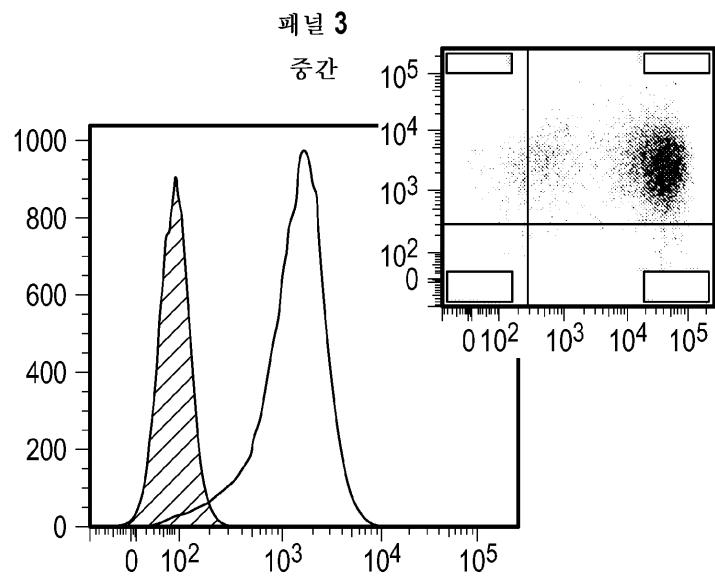
도면2aa



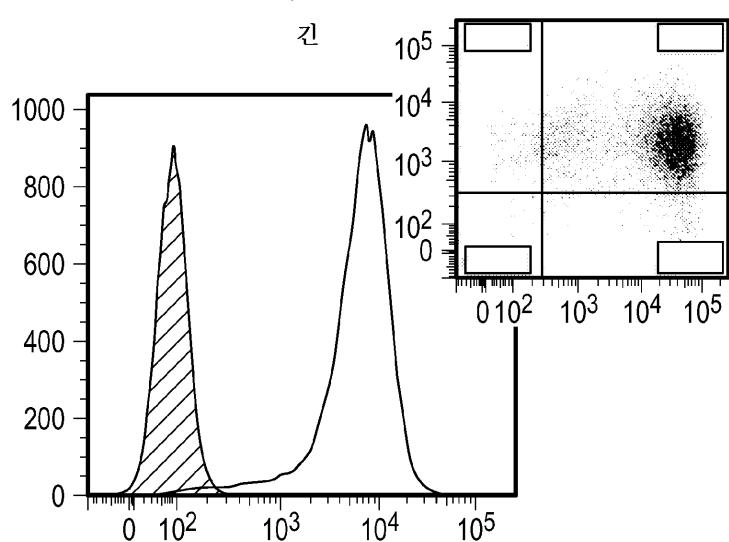
폐널 2



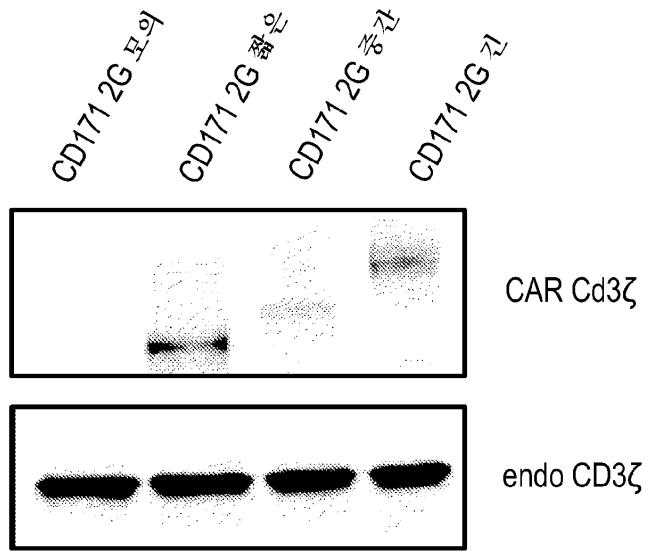
도면2ab



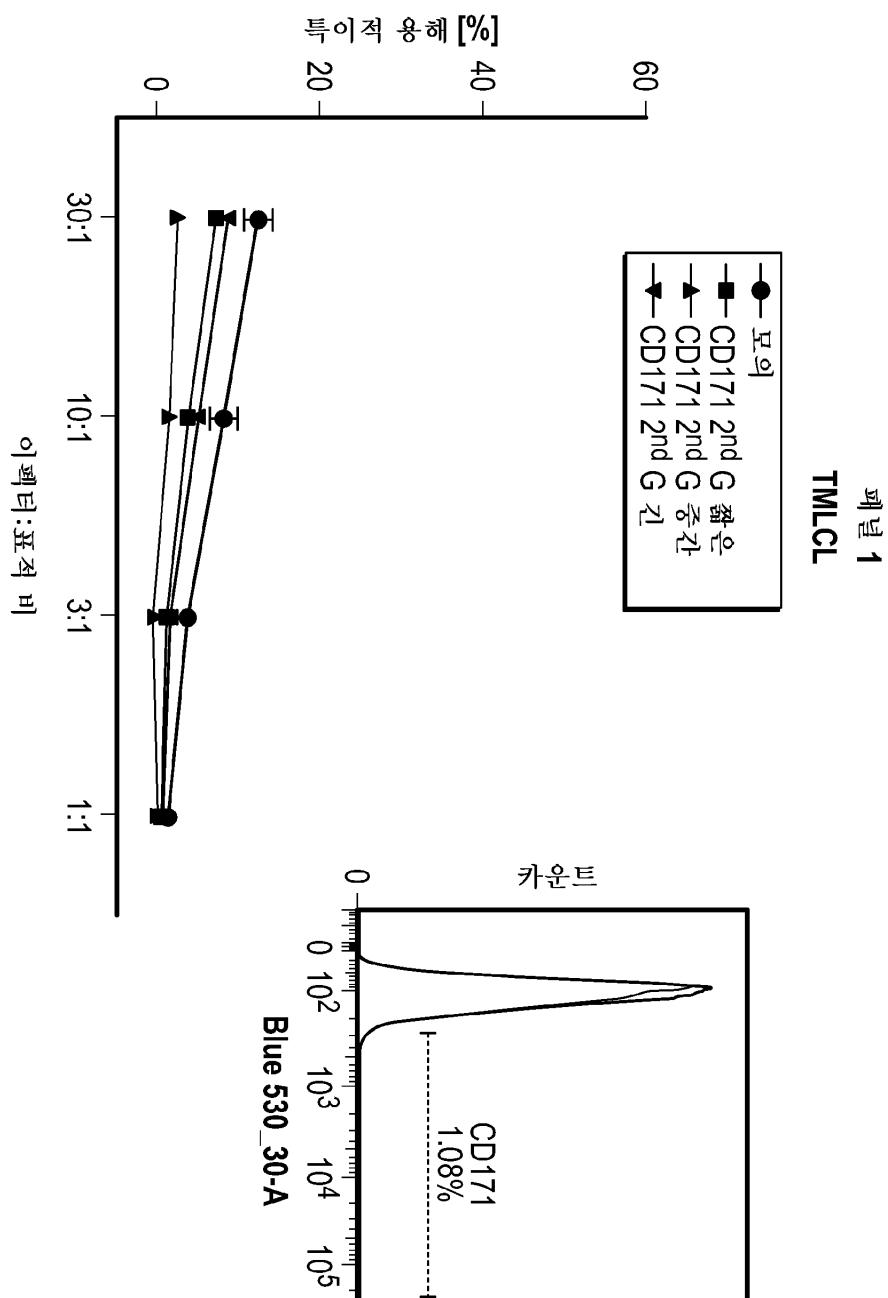
폐널 4



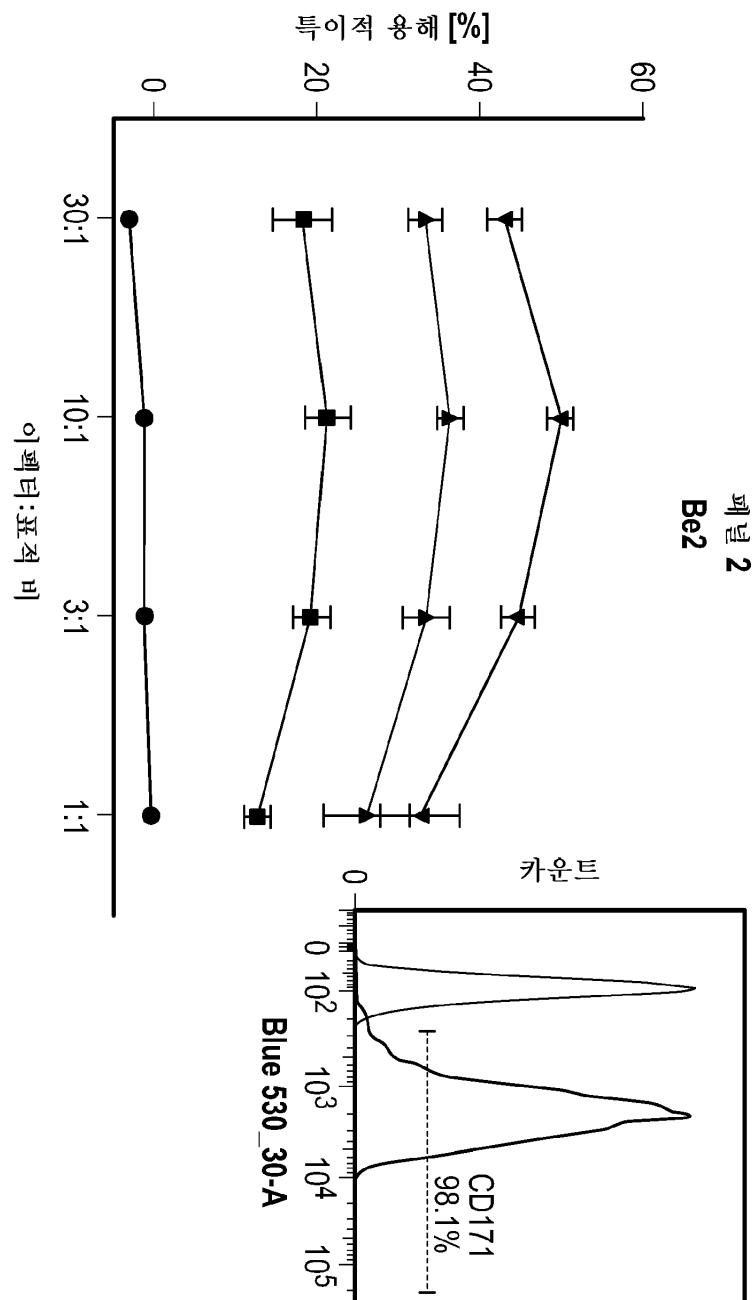
도면2b



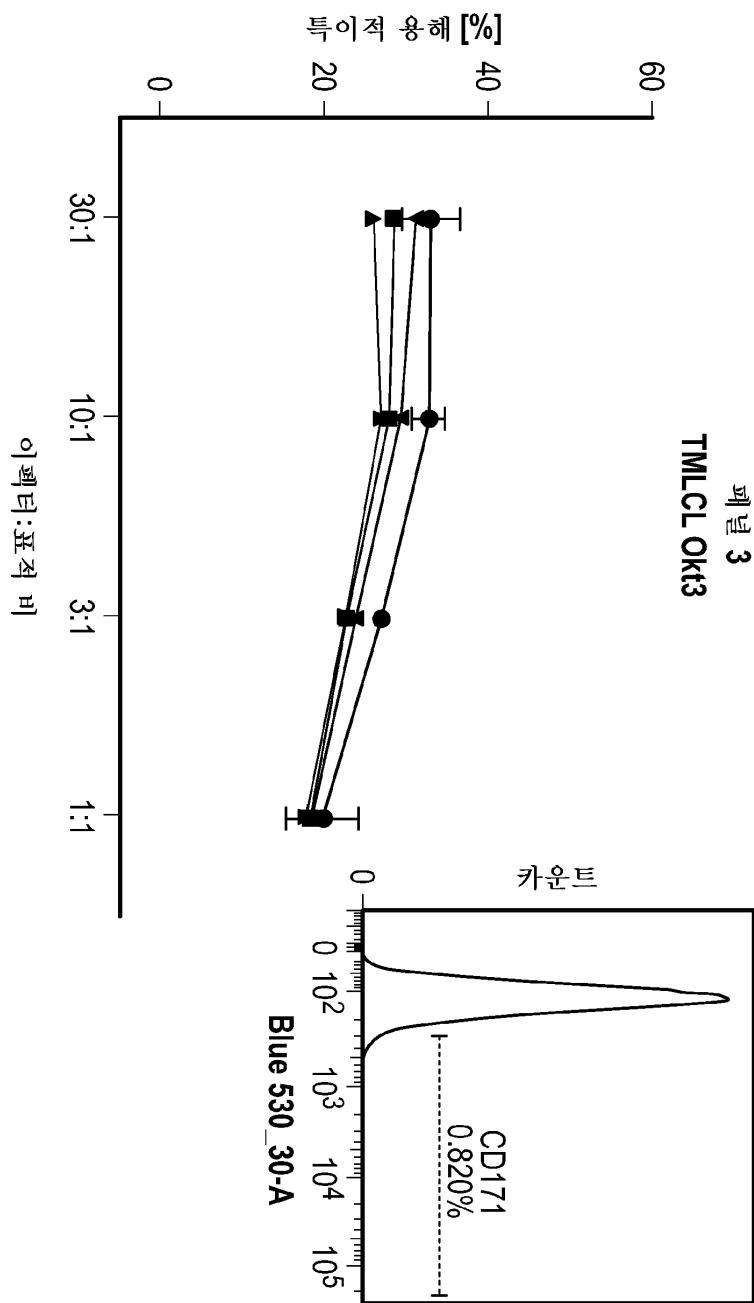
도면2ca



도면2cb

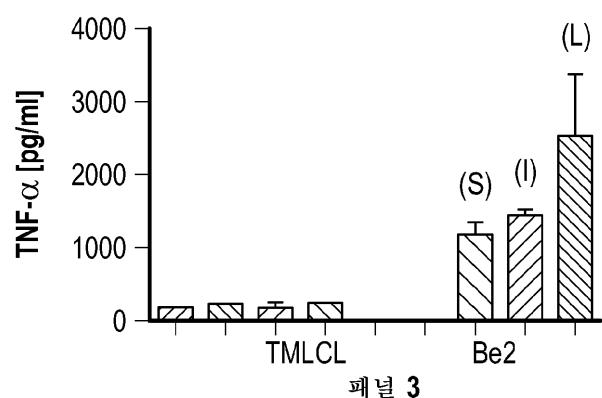
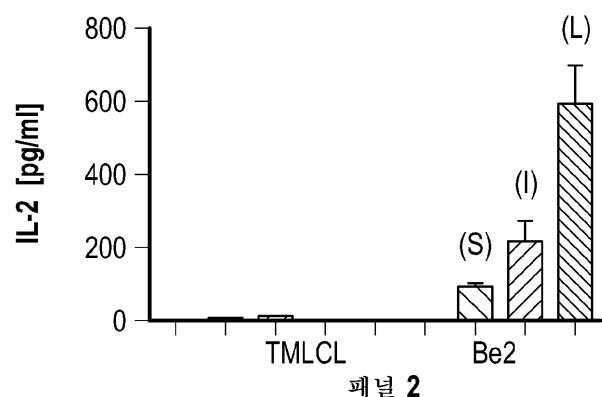
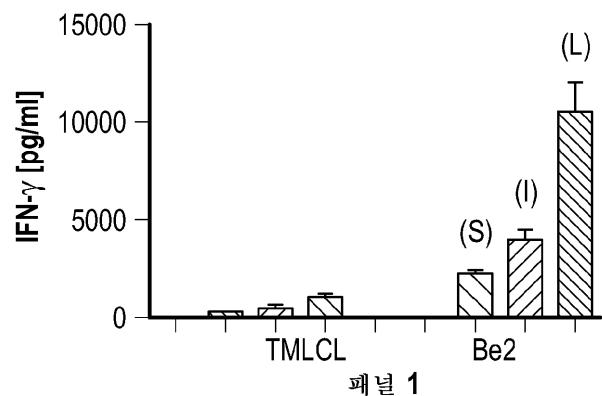


도면2cc

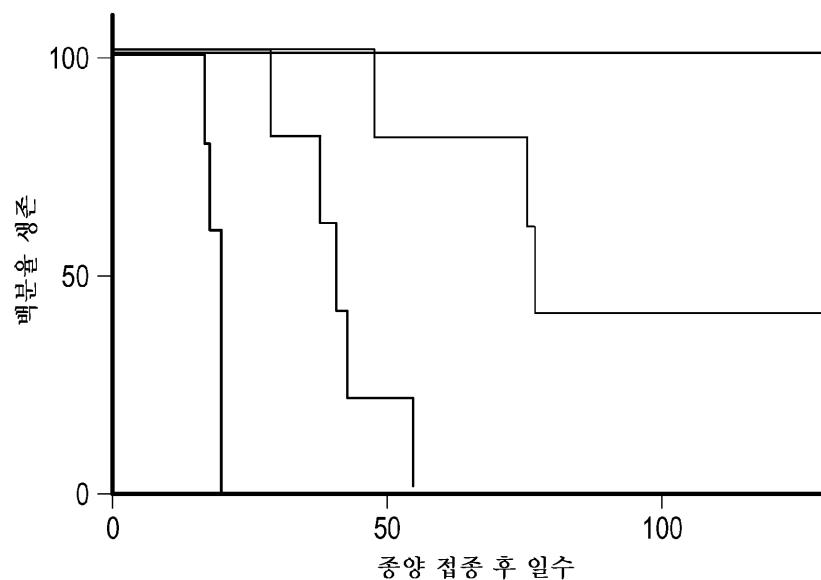
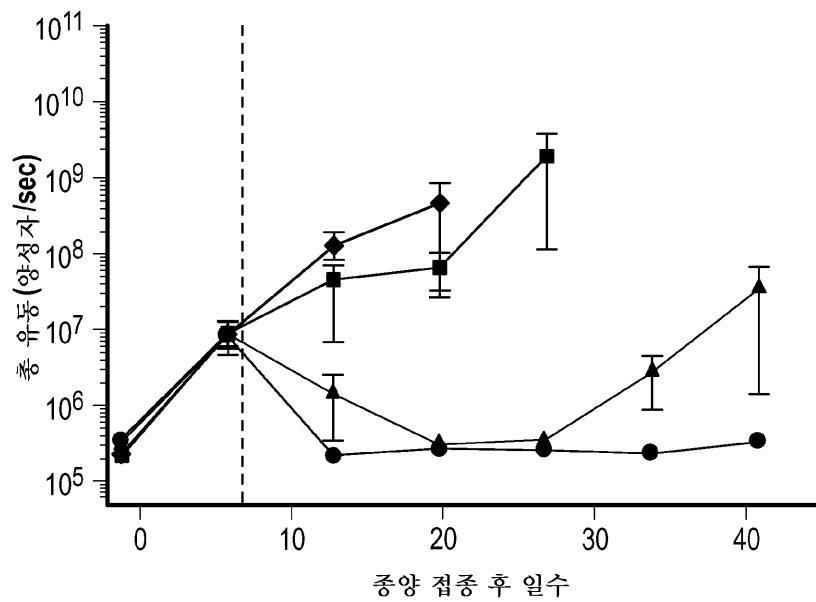


이펙터:표적 비

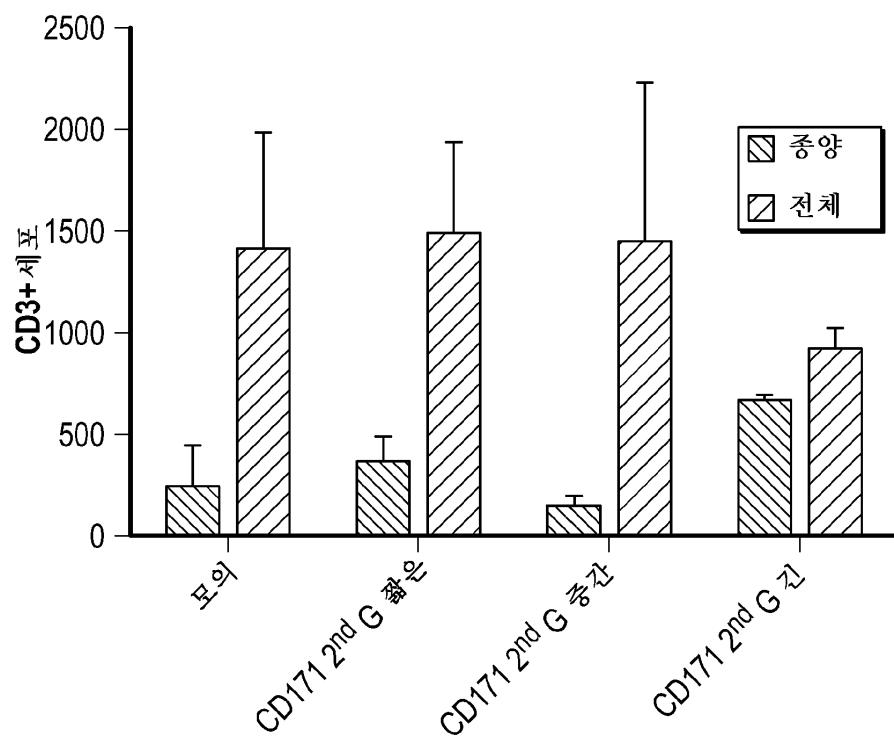
도면2d



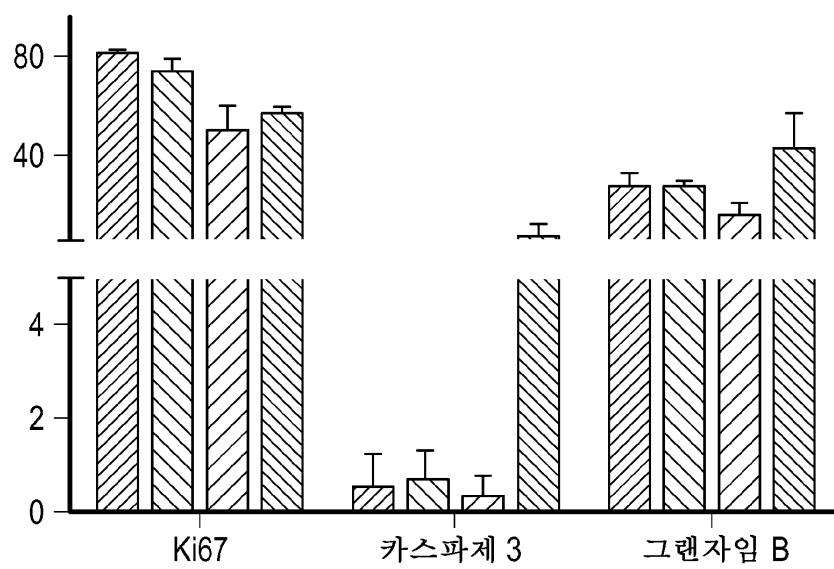
도면 2e



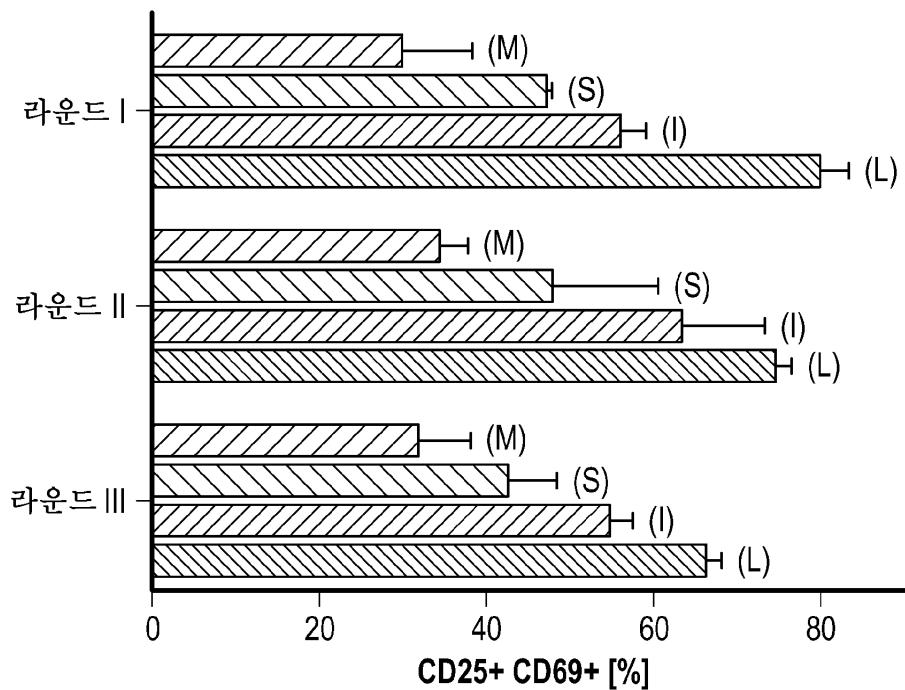
도면2f



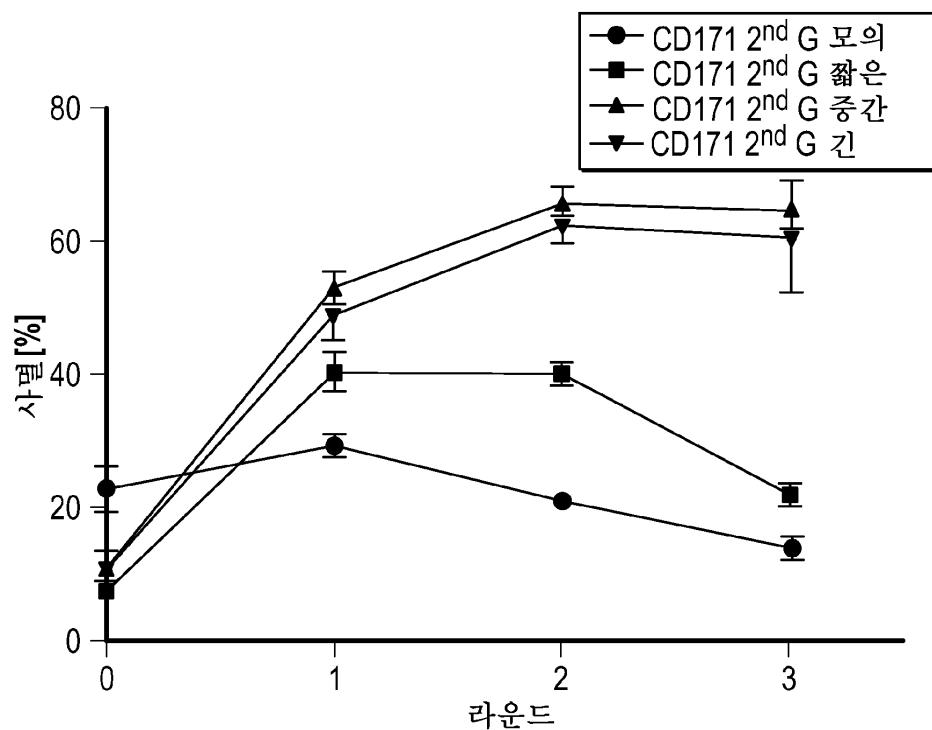
도면2g



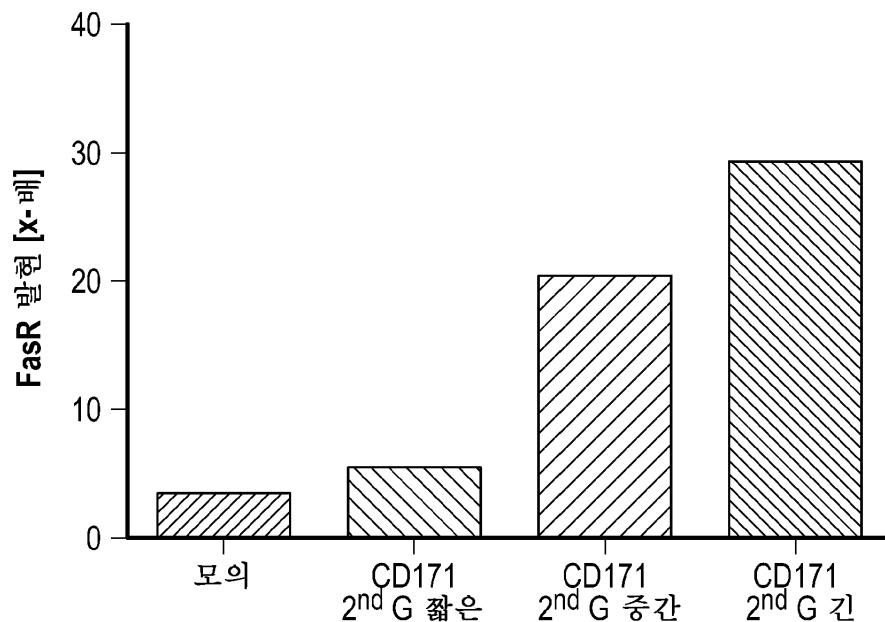
도면3a



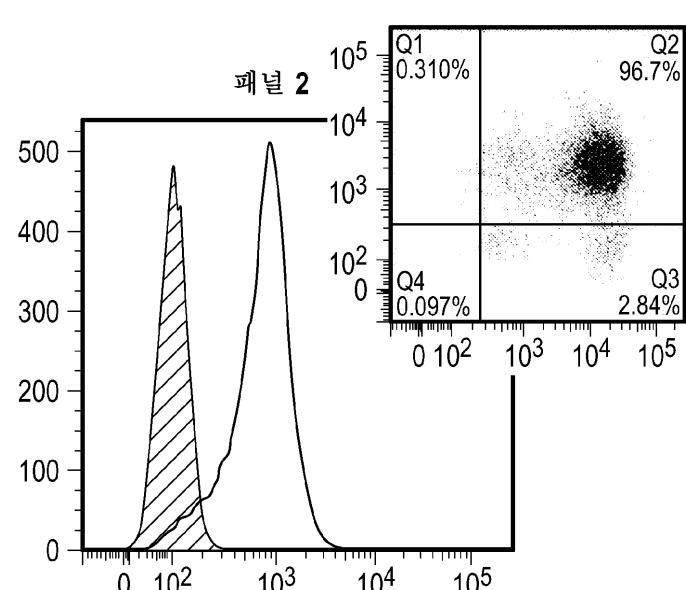
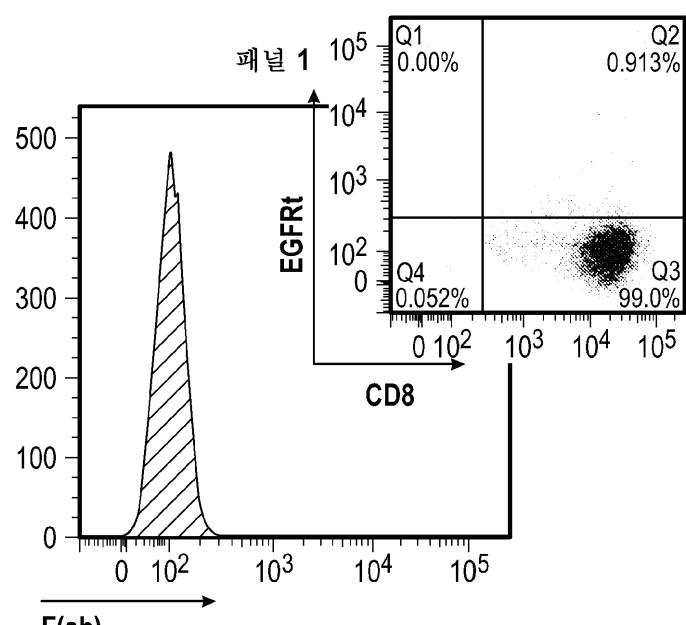
도면3b



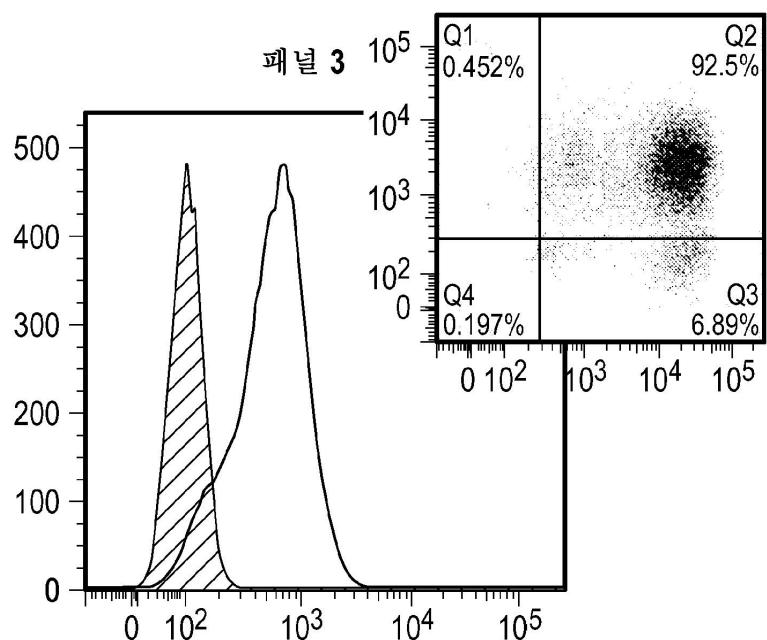
도면3c



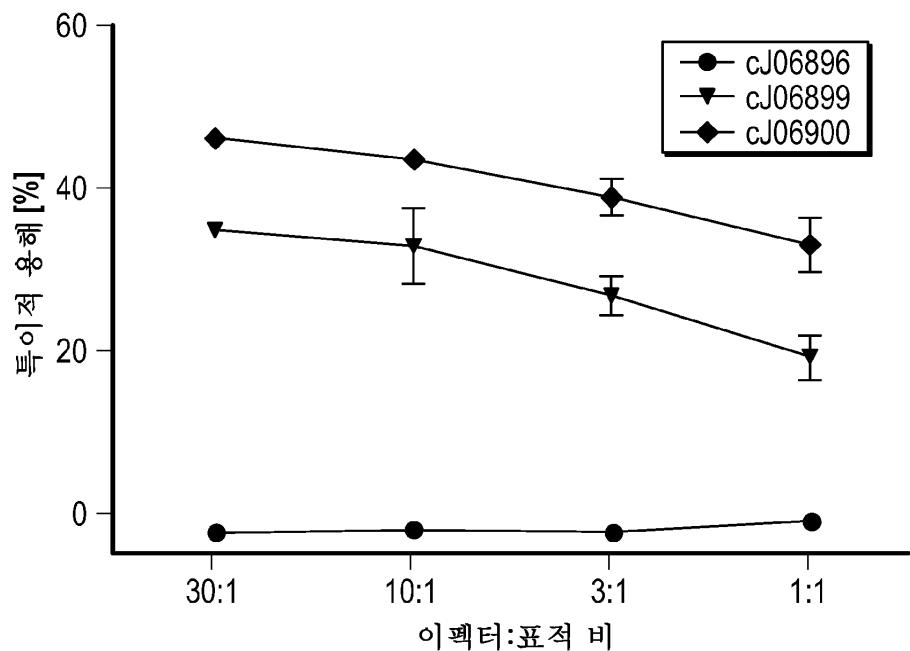
도면4aa



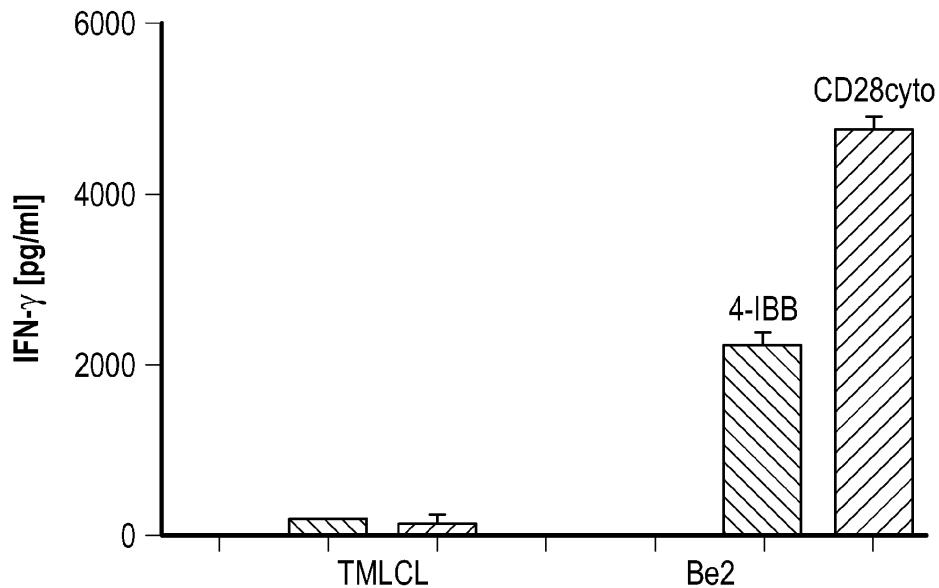
도면4ab



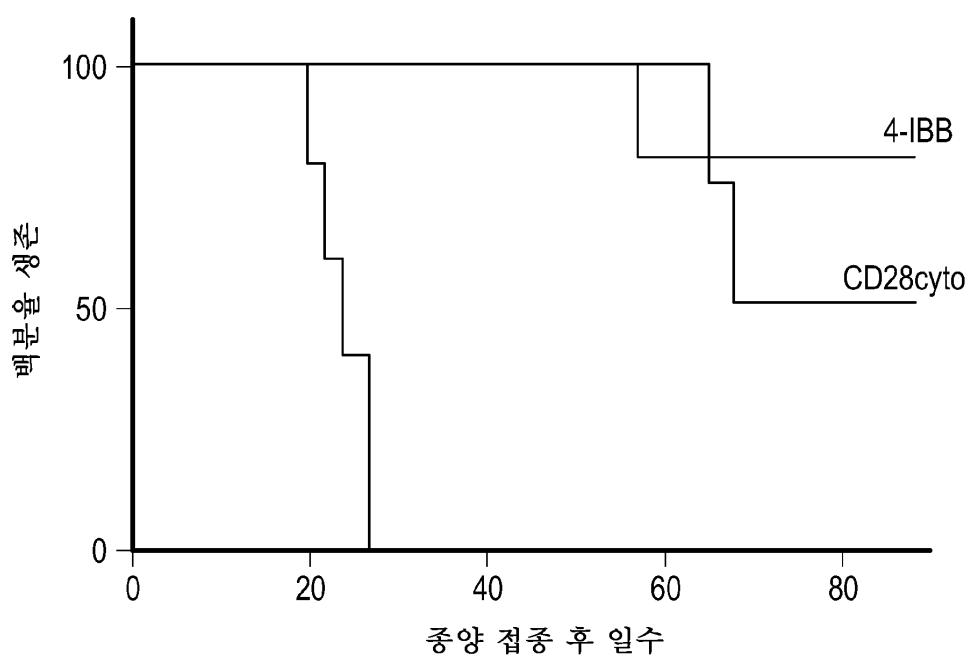
도면4b



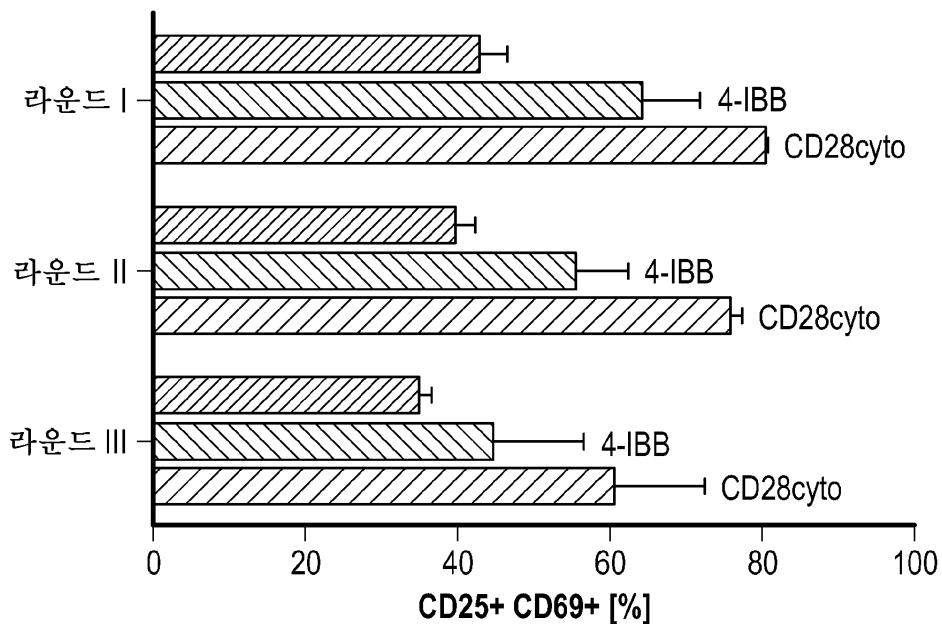
도면4c



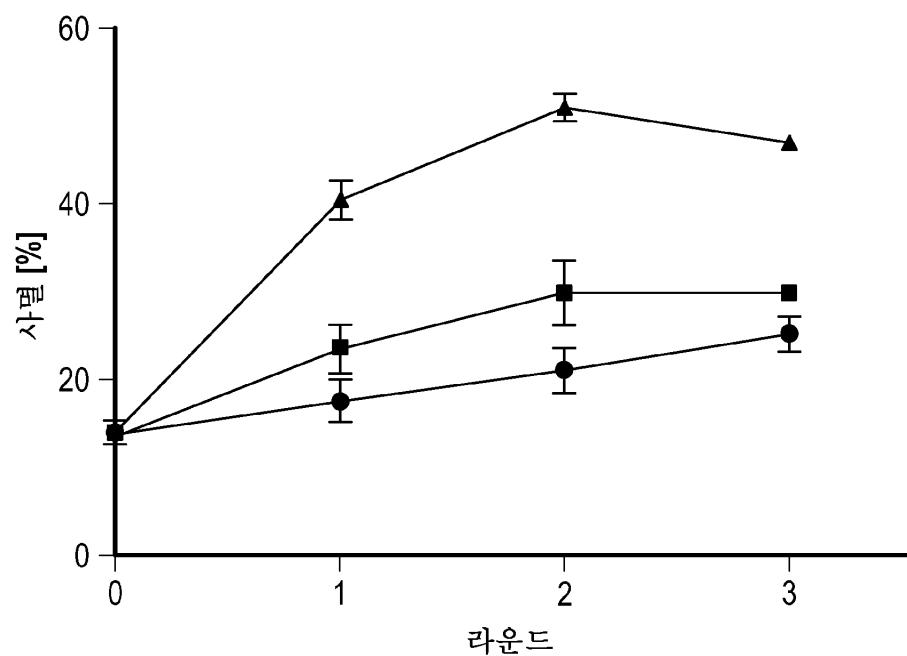
도면4d



도면4e



도면4f



도면5a

도면5b

도면5c

도면5d

- 93 -

IgG4 CH3

CD28tm

3501 TGAATGCACGA GCCCCTCAC AACCACACA CCGAGAGAG CCTGAGCCTG TCCCTGGCA AGATGTCG GGTGCTGGT GTGGTGGGG GGGTGCTGCC
ACTACGIGCT CGGGAGGT TTGGTAIGT GGGTCITCTC GGACIGGGAC AGGGACCGT TCTAACAGAC CCACGACAC CACACCCGC CCCACGACCG

3601 CGCTAGCAGC CTGCTGGTGA CAGTGGCCTT CTCAGCTT TGGGAAAC GGGGAGAA GAACCTCTG TATATATCA AACACATT TATGAGACCA
GACGATCTCG GACGACACT GTCACCGGAA GTAGTAGAAA ACCACCTTG CCCGCTTT CTTGAGGAC ATATATAAGT TTGTTGGTA AATACTCTGGT

4-1BB

3701 GIVACAACAA CTCAAGAGGA AGATGGCTGT AGCTGGCGAT TTCCAGAGA AGAACAGGA GGAGTGAAC TGCGGGTAA GTTCAGCAGA AGGGCCGAGG
CATGTTGAT GAGTCICCT TCTACCGACA TCGACGGCTA AGGTCTCT TCTCTTCTT CCTACACTG ACGCCCACTT CAAGTCGCT TCAGGGCTTC
3801 COCTGCTA CGACGGGG CAGAATAGC TGAATACGA GCTGACCTG GGCAAAAGG AAGGTACGA CGTCTGGAT ASGGGAGG GCGGGGAGC
GGGACGGAT GGTCGUCCG GICTWAGTCG ACATGTTGCT CGACUUGAC CCGTCCTCCC TTCTCATGCT GCAGGACCA TTGGCTCTC CGGCCCTGG
3901 TAGATGGC GCAAGCTC GGGGGAGGA CCCAGGAA GGCCCTGATA ACGATGCA GAAAGCAAG ATGGCGAGG CTCAGCGCA GATCGGAG
ATCTACCG CGTUGGG CGCCCTCTT GGGGTCTT CGGACATAT TGCTTGACT TTCTCTGTC TACGGCTC GGATGTGCTT CTAGCGTAC
제타
4001 AAGGGCGAGC GGAGGGGGGG CAAGGCOAC GACGGCTGT ATCAGGCCCT GTCCCGCCCG ACCAGGATA CCTTGAGCC CTCGACATG CAGGCGCTTC
TTCCCGCTCG CCTCCGCC GTCGGGTG CTGGGACA TAGCCGGAA CAGTGGCCG TGGTCTAT GGATGCTGCG GACGGTGTAC GTCCGGGAGG
제타
~~~~~  
4101 CGCAAGCT CGAGGGGG GAGAAGCT TCTAACATGC GTGTGCGTG AGGAAATCC CGGCCCTAGG ATGGCTCTC TTGGTGACAG  
GGGGTTCGGA GTCCTCCCG CTCCTCCGT CTCCCTCAGA AGATGTCG CCACGGCACC TCCCTCTAGG GCCGGATTC TAGGAAGGG ACCACTGTC  
제타  
4201 CCTCTCTGCT TGTGAGTAC CACACCGC ATTCCCTCTG ATCCACCGA AAGTGTAA CGGATAGGT ATGGTGAAT TTAAAGACTC ACTCTCCATA  
GGAGACGAG ACACCTAGT GTGGGCTG TAAGGAGAC TAGGGCGT TTACACATT GCCTATCCA TAACACTA ATTCTGAG TGAGGAT  
EGFRt  
4301 ATGCTACGA ATATTAACA CTCAAAAC TGCACTCA TAGGGGCA TCTCACATC CTGGGGTG CATTAGGG TGACTCTC ACACATAC  
TTACGATGCT TATAATTTG GAAGTTTG ACGTGGAGT AGTCACGCT AGAGGTGAG GACGCCACC GAAATCCCC ACTGAGGAAG TGATGATGAG  
EGFRt  
4401 CTCCCTGGAA TCCAGGAA CTGGATATC TGAAACCGT AAAGGAAAC ACGGTTT TGCAGATTC GGTGTTGGCT GAAACAGGA CGGACCTCC

도면5e

GAGGAGACCT AGGTGTCCCT GACCTATAAG ACTTTGGCA TTTCCCTTAG TGTCCAAA ACGACTAAGT CCGAACCGGA CTTCGTGCT GCCTGGAGG  
 4501 TTGCTTCTAG~AACCTAGAA TCAATCAGG~GAGG~CACAGGGTC AGTTCCTCT~TGCATCGTC~AGCTGACA~TAACATCCT~GGAAATTAGG  
 ACGGAAACTC TGGATCTT AGTATGCC GTCCTGGTC GTGACCCAG TCAAAGAGA ACGCAGAG TCGGACTGT ATTGTAGGA CCTTAAGGG  
 EGRT  
 4601 ~~~~TCCCTCAGG~AGATAAGG~TGGAGATG~ATAATTCT~GAACAAA~TTTGCGTAT~GCAATACAA~TAACGTGAA AACAGTGT~GGAACTCG  
 AGGGAGTCC TCTATTCACT ACCTCTACAC TATTAAGTC CTTGTTTT AACACATA CGTTATGTT ATTGACCTT TTTGACAA CCTGGAGG  
 EGRT  
 4701 ~~~~GTCAGAAC~CMAATATA~AGCAACAGG~GIGAACACAG~CTGCAAGGCC~ACAGCCAGG~TCTSCATGC~CTTCGCTC~CCGAGGG~GCCTGGGCC  
 CACTTCTTG GTTTAATI TCGTGTCT CACTTGTGTC GACGTCGG TGCCGGTC AGAGGTAG GACACGAGG GGGCTCCGA CGACCCGGG  
 EGRT  
 4801 ~~~~GAGGCCAGG~GACTGCTCT~CTTGCGGAA~TGTCAACCGA~GGCAGGAA~GCTGAGCAA~GTGGACCT~CTGAGGGTG~AGCAAGGA~GTGTTGGAG  
 CCTGGGGTCC CTGACGAGA GAACGGCCT ACAGTGGCT CGTCCCTA CGCACCTT CACGTGAA GACCTCCAC TCGGTCCT CAACACCTC  
 EGRT  
 4901 ~~~~AATCTGAGT~GCATACAGT~CCACCGAG~TGCCTGCCT~AGGCATGAA~CATGCCCTG~ACAGGAGGG~GACGAGCA~CTGATTCAG~TGTGCCACT  
 TIGAGACTCA CTTATGTCAC GGTGGGCTC ACGGACCG AG TOCGCTT GTAGTGGACG TGTCTGGCC CTGGCTGTT GACATAGTC ACACGGGGA  
 EGRT  
 5001 ~~~~AATCTGAGG~CCCCCATG~GTCAGGCC~GCCGGGAGG~AGTCATGG~GAATGAGG~GAANCA~CCCTGGCT~GAATGAGG~GACGCCGCC~ATGTTGCA  
 TGTAACTGCC GGGGTGACG CAGTCTGGA CGGGCTGCC TCAGTACCT CTITGTTGT GGGACAGAC CTIATGGCT CTGGGCCGG TAGCACCGT  
 EGRT  
 5101 ~~~~CTGTGCAAT~CCAACCGA~CCTACCGA~CAGTGGCA~GGTCTGAG~GGTGGCTAC GTGACCCGGT CCAGACTC CGACGGTG CTIACCGGA TTCTAGGCA GGTAAGGGCT  
 GGACACGGTA GTTGTGAGT EGRT  
 5201 ~~~~GGGGCCCTC~TCTTGGCT~GGTGGGGCC~CTGGGATCG~GCCTCTCAT~GTGACGGCC GCTTAGACC CGGGCTGCAG GAATTCGATA TCAAGCTTAT  
 CCCGGGGAG AGACCGAGA CCCACCGG GACCCTAG CGTGGGGAGTA CACTGGCG CGAACATGG GCCGAGCT CITRAGCTAT AGTCGAATA  
 WRE  
 5301 ~~~~CGTAACTCAA~CCCTGGAAT~ACAAATCT~TGAAGGTT~ACTGGGATC~TAACTATGT~TGCCTCTT~ACGGATG~GATACGCTC~TTAAATGCT  
 GCTATTAGT GTGACCTAA TGTAAAC ACTTCTAC TGACCTAA AGTACATACA ACGGAAAA TGCAATACAC CTATGGAGG AAATTACGGA  
 WRE  
 5401 ~~~~TTGTTATGAT~CTATTGCTC~CGTATGGCT~TCTATTCT~CCTCTTGT~TAATCTGG~TTGGTGTCT~TTATGGAGA GTGTTGGCC GTGTTGGC  
 AACATAGTAC GATAACGAG GGCATACCGA AAGTAAAGA GGAGGACAT ATTAGGAC AACGACAGAG AAATCTCTT CAACACCCGG CAACAGTCGG  
 WRE  
 5501 ~~~~AACGGGGT~GGTGTGACT~GTTGTTGT~AGCAACCC~CAGTGG~GGCATGCA~CCAGCTGCA~GTCCTTCC~GGACTTGT~CTTCCCGCT  
 TGGACCCCA CCACAGGGA CACAACGGC TCGGTGGGG GTGACCAAC CGTGACGGT GTGAGCAGT CGGGAAGG CCTGAAAGC GAAGGGGA  
 WRE

## 도면5f

5601 CCCTATGCC ACGGGGAC TCATGCCGC CTGCTTGCA CGTGTGCA CAGGGCTCG GCTGTTGGC ACTGACAATT CGCTGGTT GTCCGGAAA  
 GGGATAACGG TGCCGCCTG AGTAGGGCG GACGGACCG GCGAACCGT GTCACCGC TGACTGTA GGACACCAA CAGCCCTTT  
 5701 ATCATCGCTCT TTCTCTGGCT GCTCGCTCT GTGGCCACCT GGTATCTGG CGAGACGCC WPE WPE  
 ACTAGGAGGA AAGGAACCGA CGAGGGACA CAACGGGA CCTAGAGC GCCTGGAG AACAGATTC AGGAAACCG GGAGTTAGT CGCTGGAG  
 5801 CGTCCGGGG CGTGGGGCG GCTGGGGCG GCTGGGGCG CGAGACGCC TCTCTGGCG TCTCTGGC CGCTCACTCA GGGGACCTTC  
 GAAGGGGCC GACGACGGC CGAGACGCC GAGAGGGCA AGAGGGAA GCGGGAGCT GCTAGGCTA GAGGAACC CGGGAGGG CGTAGCTAT  
 5901 CGGTGACTA GCGGACTCT TAGGCAAT GACTACAG GCGCTGGTAG del U3  
 GGCAGGTGAT CGGCATGGAA ATTCTGGTA CTGAGTTC CGTGACATC TAGAATGGT GAAAATT CTITCCCC CTGACCTTCC CGATTAAGTG  
 ~~~~~ R ~~~~~  
 6001 TCCCAAGAA GACAAGATCT GCTTGTGCT TGTGCTGGT GACCGAGTC TAGGCTGG ~~~~KCCCTCTGG CTAACTAGGG ~~~~KCCCTCTGG
 AGGGTTCTT CTGTTCTAGA CGAAAAACGG ACATGACCA GAGAGCAA TCTGGCTAG ACTCGGACCC TGGAGAGCC GATTGATCC TGGGAGC
 6101 ~~~~~U5~~~~~ ATAAAGCTT GCTTGTGCT TGTGCTGGT GACCGAGTC TAGGCTGG ~~~~KCCCTCTGG CTAACTAGGG ~~~~KCCCTCTGG
 ATATCGAGT TATTCGAC GGAACCTACG AAGTCATCA CACCGGCA GACACACAG TAGGACATT GATCTCAGG GATCTCAGG AAATCGTCA
 ~~~~~U5~~~~~  
 6201 GTGGAAATC TGTAGGAGA TTGATATCA AGCTATCGA TACGGTGAC CTGGGGGG GCCCCGTC COATTCGCC CTATAGTG TGTATTACA  
 CACCTTTAG AGATCGCTC AGCTATCG TGAATAGCT ATGGAGCT GAGCTCCC CCGGGCATG GTTAAGGG GATACATCC ACCATATGT  
 6301 ATTCATGTC CGTGGTCA AACCTCTG ACTGGAA CCTGGGTT ACCACATTC ATGGCTTC AGCACATCC CCTTGCCG GCTGGGAA  
 TAAGTGAACCG GCAGCAAT GTGGAGCAC TGACCTTT GGACCGCCTA TGGTGTGAT TAGGGACG TGTGTAGGG GAAACGGT CGACCCATT  
 6401 TAGCGAGAG GCGCGACCG ATCGCCTC CAAACAGTG CGAGCTGA ATGGAGTG GAAATGTA GGGTAAAT TTGTAAAT TTGTAAAT TTGTAAAT  
 ATCGCTCTC CGGGCTGG TAGGGGAAG GTTGTCAAC GCGTGGACT TACCGCTAC CTTAACATT CCCAATTAA AACAAATT AAGGCAATT  
 6501 ATTTTGTTA ATACGCTA TTTTACCA AATAGGCGA AATGGCAA ATCCCTATA ATCAAAAGA ATAGACGG ATAGGTGA GTGTGTCTCC  
 TAATAACAT TTAGTGTAGT AAAATGG TTACCGGT TTACCGGT TGGGAATAT TTAGTGTCTC TACCGCTC TATCCACT CACAAAGG  
 6601 AGTGGGAC AAGAGTCAC AATGGACAG TATTAAGAA CGGGACATC AACCTAACG CGGAACAC CGTATAG GGGATGCC GATAGGGA ACCATACCC  
 TCAAACCTG TTCTCAGGT ATAATTCCT CGACCTAGG TTGGAGCTT CGCTTGTG GGGTACTC CGGTACCC GTGATGCACT TTGTAGTGG  
 6701 TAATCGAGT AAACCCCG CTCCACGGCA TTUTGTGATT TACGCTTGG ATTCCTCG GGGCTTAAT CTGGAACCTC CCTTTCGGC CGCTTGACCC  
 ATAGTGTCA AAACCCCG CGGGGCTAG GGCGCTGG AGTGTAGGG TACGCTGG CGTAACCC AGACGGCC GCTTAATG  
 6801 CGAGAAAGGA AGGGAGAA CGGAAGGGAG CGGGGCTAG CGGAACAC CGTATAG GGGATGCC GATAGGGA ACCATACCC  
 GCTCTTCTT CGCTTCTC GCGGGGATC CGGGGAGTC CGGGGCTAG TTGGAGCTT CGCTTCTC GGGGATCC GGGGATCC GGGGATCC  
 6901 CGCGCTACAG GGGGGCTAG GTGGACTT CGGGGAA CCTCTATTG TTATTTTC TAATACATT CAAATGTA TCCGCTATG  
 CGCGGAGTC CGCGGAGTC CACCGGAA AGCCCTTA CACCGGCTT GGGGAAAC ATTAAGG ATTAATGTA GTTATACAT AGGCGAGTAC  
 7001 AGACAATAC CCTGAAATCT GCTTGTGCT TGTGCTGGT GAGGAGTAT GAGGAGTAA CAGGAGTAA CAGGAGTAA CAGGAGTAA  
 TGTGTATG GGACTATTA CGAAGTATT ATTACTTT CCTCTCTATA CTCATAAGT GTCAGGAC AGGGGATA AGGGAAAAA CGCGGAA  
 Amp

도면5g

7101 ~GCCTCCGT~TTTGTCA~CCAGAACG~TGTGAAGT~AAGATGT~GAAGTCAG~TGGTGCGC~AGGGTTC~ATGAACTG~ATTCACAG  
 CGGAAGGACA~AAAAGAGTG~GGTCTTGG~ACCATTCA~TTCTAGCA~CTCTAGCA~ACCCAGTC~TCACCAATG~TAGCTTGAC~TAGGTGTC  
 7201 ~GGGTAAGATC~CTTGAGGT~TTCGCCCGA~AGAAGTTT~CCAATGATG~GCACTTAA~AGTCTGCA~TGTGGCGGG~TATTATCCC~AATATAGGC~AATACTGCGG  
 GCCATTCTAG~GAACTCTCA~AAGGGGGT~TCTGCAAA~GGTACTACT~CTGAAATT~TCAAGCAT~ACACGGCC~AATAGAGCC~  
 7301 ~GGGCAAGAGC~AACTCGGT~COGCATACAC~TATTCAGA~ATGACTGGT~TGAGACTCA~CCAGTCACAG~AAAGCATCT~TGGGATGGC~AATGACAGTA~  
 CCCGTTCTCG~TGAGCCAG~GGCGTATGT~ATAAGAGCT~TACTGACCA~ACTCATGAT~GGTCAGTGC~TTTCGAGA~ATGCTTACCG~TACTGTCA~  
 7401 ~GAGAAATTATG~CAGTGCTGCC~ATAACCATGA~GTGAAACAC~TGCGCCAC~TACTCTGA~CAAGATCGG~AGAACCGAG~GGCTAACCG~  
 CTCCTTATAC~GTCACGACGG~TATGGTACT~CACTATGTG~ACCGGGTGT~AATGAAGCT~GTTCTAGCC~TCTGGCTC~CTGATGSC~GAAAAACGT~  
 7501 ~CAACAGGGG~GATCAGTMA~CTCGCCTGA~TGTGGGAA~CCGGAGCTGA~ATGAGCCAT~ACGAAACGAC~GACCGATGCC~TGAGCMA~  
 GTGTGACCC~CTAGTACAT~GAGCGAACAT~AGCAACCTT~GGCCTGACT~TACTTGGTA~TGGTTGCTG~CTGCACTGT~GTTGCTACGG~ACATCGTAC~  
 7601 ~GCAACAACT~TGGCAAAT~ATTAACTGG~GAACTACTA~CTCTAGTC~CGGGCACAA~TTATAGACT~GGTGGAGC~GATAAAGT~GGAGGACCAC~  
 CGTGTGTCGA~ACGCGTTGTA~TAATGACCG~CTTGATGAT~GAGATGAG~GGCGGTGTT~AATATCTGA~CCACCTCG~CCATTCIA~CGFCCTGGTAC~  
 7701 ~TCTGGCTC~GGCCCTTCG~GCTGGTGT~TTATGCTGA~TAATCTGGA~GCGGTGAGC~GTGGCTCTG~GGTATCAT~GAGCACTGG~GGCGAGATGG~  
 AAGACCGCG~CGGGAGGC~CGACCGACCA~AATAACGACT~ATTAGACCT~CGGCCACTCG~CACCGAGC~GCCATAGIA~CTCTGTCAC~CGGGCTAAC~  
 7801 ~TAAGCCCTCC~CGTATGTTAG~TTATCACAC~GACGGGGAGT~CAGGAACTA~TGGTGAAGC~AAAAGACAG~ATGCTGAG~TGGTGCCTC~ACTGATAG~  
 Amp~ ATTCGGGAGG~GCATAGCAT~AATAGTGTG~CTGCCCTCA~GTCCCTGTAT~ACCTACTGC~TTTCTGTC~TACCGACT~ATCCACGGAG~TGACTTAATC~  
 Amp~  
 7901 ~CATGGGIAAC~TGTCAAGACCA~AGTIPRACTCA~TATATACATT~AGATGATT~AAACTCAT~TTTAATTA~AAAGGATCA~GGGAGAGC~CTTTTGTATA~  
 GAAACATG~ACAGTGTGT~TCAATGAGT~ATATGAA~TCTACTAA~TTTGAGTA~AAATTAAT~TTCTAGAT~CACTCTAG~GAAACTAT~  
 COE1 ori  
 8001 ~AATCTATGAC~CAAATCCTT~TAACCTGAGT~TTCTGTC~CTGAGCTCA~GACCGCTAG~AAAGATCAA~AGGATCTCT~TGTGATCC~TTTCTGCGG~  
 TAGAGTACIG~GTITAGGGA~ATTCACICA~AAGCAAGGI~GACTCGI~CTGGGCAT~TTTCTAGT~TCTTGAAGA~ACTCTAGGA~AAAAGAGCG~  
 COE1 ori  
 8101 ~GTTAAATGTC~TGCTTGCA~CAAAACACC~ACCGTACCA~GGGGTGGTT~GTGTCGCGA~TCAAGGCA~CCAACTCTT~TTCCGAAGT~ATCTGGCTC~  
 GCATAGACG~ACGAACGTT~GTTTTGTG~TGGCAAGGT~CGCACCAA~CAAACGGCT~ATGTTCTGAT~GGTGTGAGAA~AAGGCTCCA~TIGACCGAG~  
 COE1 ori  
 8201 ~GGCAGAGCGC~AGATHCAA~TACTGTCTT~CTAGGTAG~CGTAGTGTAG~CCACCCCTC~AAGAACTCT~TACCAACGCC~TICATACCTC~GTCTGTAA~  
 TCGTCTCGC~TCTATGGTT~ATGACAAAGAA~GATCACATCG~GCACCATCC~GGTGGGAG~TCTCTGAGAC~ATGTTGGGG~AUGTATGGAG~CGAGACGATT~

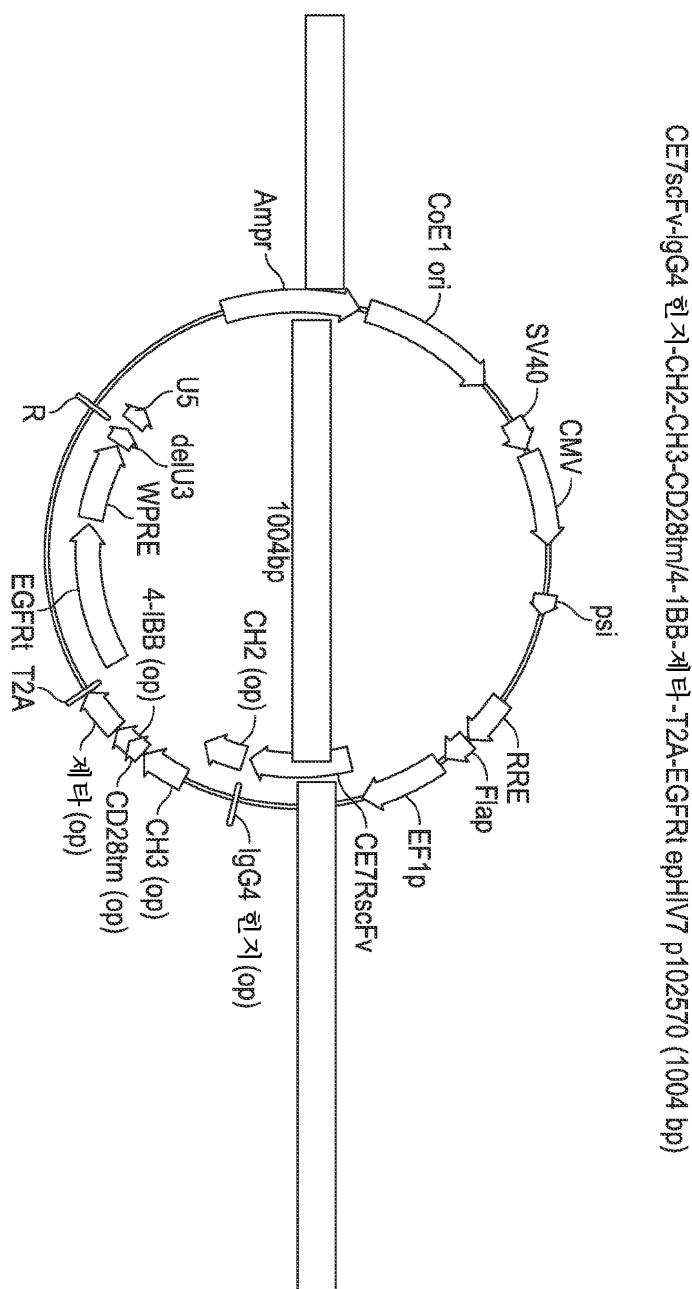
## 도면5h

8301 ~TCCTGTTTACCA AGTGGGTGCT~GCCAGTGCGG ATAANGCTGG TCTTACCGGG TGGACTAA GCGGATAAG GCGCAGGGT CGGGCTGAAC  
 AGGACATGG TCACCGACGA CGGTACCCG TATTGACAG AGATGGCC AACCTGAGTT CTGCTATAA TGGCTATTC CGCGTCCCA GCGCGACTTG  
 8401 ~GGGGGTTTCG~TGCACAGC~CCAGTTGA GCGAACGAC~TACGGGAAC~TGAGTACCT~AGGGGAG~CTATGAGAA~GGCCACGGT~TCCGGAGGG  
 CCCCCAACG ACGTGHTGCG GGTGAACTT CGCTTGCTGG ATGIGGCTG ACTCATGA TGCGCACIC GATACTT CCGGGCGA MGGCHTOCC  
 8501 ~AGAAGGGG~ACAGGATC~GTAAGCGG~AGGTOGGAA~CAGAGGG~CAGAGGG~CTTCAGGG~GAGGCTG~GATCTTAT~AGCTGTCG  
 TCTTTCGCC TGTCATAGG CCATTCGCC TCCCAGCCTT GTCTCTCCG GTCTCCCTC GAGGTCCC CTTGCCAC CATAGAATA TAGGACAGC  
 8601 ~GTTTGGCA~CTCTTACTT~GAGCTGAT~TTTGTGAT~CTCTCAGG~GGGGAGGC~TATGAA~GGCAGAAC~GGGCCTT~TACGGTCT  
 OCE1 ori  
 OCE1 ori OCE1 ori OCE1 ori OCE1 ori OCE1 ori OCE1 ori OCE1 ori OCE1 ori OCE1 ori OCE1 ori OCE1 ori  
 8701 ~GGCCTTITGC~GGAGCTGAA~CTCGAGCTA~AAACACTAC~GASCAGTCC~CCGCCTGG~ATACCTTT~GGGCTCTG~GGCGAAA~ATGCCAGGA  
 CGGAAAACG ACCGAAAC GAGTACAA GAAGGACG AATAGGGAC TAAGACCT ATGGATAA TGGGAAC TACTCGACT ATGGCAGCG  
 COE1 ori  
 8801 ~GGCAGCGGA~CGACCGAGC~CAGCAGTC~GTAGGGAGG~AAGGGGAGA~GCCCAATA~CECAACCGC~CTCTCCCG~GGTTEGCCG~ATTCATAAT  
 CGTCTCGCTT GCTGGCTCGC GTGGCTCAST CACTCGCTC TTGCTCTT CGGGTAT GCTTGGG GAGGGGGC CGCACCGG TAAGRATA  
 8901 CGAGCGGCA CGACAGGTT CCCAGCTGA AAGGGGAG TGACCGAAC GGATTAATG TGTATGACT CACTCATAG SCACCCAGG CTTATACT  
 OTCGACGCT GTGTGCAA GGGCTGACT TTGCGCGTC ACTUGGGTIG CGTATATAC ACTCAUTGA GIGGATIAC OGTGGGTC GAATGIGAA  
 9001 TATGCTCCG SCTGPAAT TGTGTTGAAT TGTGAGGA TAACATTAC ACAGGAA CAGTATAC CAGTATCGA AAATACCT  
 ATACGAGGC CGAGGATACA ACACACCTA ACATOGCC ATTGTTAAG TGTGCTCTT GTCGATACTG GTACTATGC GTTCCAGCT TTAATGGGA  
 SV40  
 9101 CACTAAGGG ACAAAAGCT GGAGTCCC CGGGGGCG GCTCGAGG~CGAGTCCG~TGCACCGA~KCTAGTCC~GCCCTAAC~TCCGCATC  
 GIGATTCCTC TTGTTTGC CTCGGGGTG GGGCACCGC CGAGCTCA GCUTAGGC AGGTGCTG TGGTACAGG GGGGGATG AGGGGGTAG  
 9201 ~CGCCCTAA~CTCCGGCCAG~TTCGCCCCAT~TCGCGCCCS~ATGCTGACT~AATTTTT~ATTTATGGAG~AGGGCGGC~GCCCTGGCC~TCTGAGGTT  
 GCGGGGGATT GAGGGGGT AAGGGGGT AAGGGGGG TACCGACTGA TAAAGAA TAATACCT TCCGGCTCG CGGAGCCG AGACTGATA  
 SV40 CMV  
 9301 ~TCAGAGTA~GTGAGGGC~TTTGTGGAG~GCCAGGGT~TTCGAAMAG~CTCGACGGT~ATCGATGGC~TCTATGCTAA~CATTAACG~ATGTTGACAT  
 AGGTCTCAT CACTCTCCG AAAAACCTC CGATCCGA AACCTTTC GAACTGCCA TAGCTAACG AGTACAGTT GTATGGCG TACAATGTA  
 9401 ~TGTATATG~CTAGTTAT~ATAGTATCA~ATTGGGGT~CATTTATCA~TACCGCAT~ATGGAGTTC~GGGTACATA~ACTTACGTA~ATGGCGCG  
 ACTAATRACT GATCATATA TATGTTAGI TAATGCCCA GTRATCAGT ATGGGTATA TACCTCAGG CGGAGTGT TGAATGCCAT TTACCGGGCG  
 CMV  
 9501 ~CTGGCTGACC~GCCAACGAC~CCCCGCCAT~TGACGTCAAT~AATGAGCT~GTCCCATAG~TAAGCCAT~AGGGACTTTC~CATGACGTC~ATGGGTGGA

## 도면5i

|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 9601  | GGCCGACTGG CGCGTGTGTC GGGGGGGTA ACTGCACTA TAACTGATA CAAGGTTTC ATTGCCGTTA TCCCTGAAG GTAACTGCAG TTACCGACCT<br>CATATAATGCC ATTGTGACGGG TGAAACCGTCA TGHAGTTCAC ATAGTATAGC GTCATGGG GGGATACTG CAGTTACTGC CATTACCOGG GGGGACGGTA<br>CMV                                                                                            |
| 9701  | ~ATG~GCC~CGGT~ ATCA~GAC~CTT~ ATGG~GAC~TT~ CCT~ACT~TG~GG~ AGT~AC~AT~CA~TCA~ CGT~AT~TAG~TC~ ATCG~CP~AT~A~ CCAT~GT~GAT~<br>ATACGGGTC A TCACTGGAA TACCGAA GAATGAAACG TCAATGAGT GCATAATAG TAGCGATAAT GGTAACACTA GGCAAAACG GTCATGAGT<br>CMV                                                                                       |
| 9801  | ~ATG~GG~CG~GG~ ~ATG~GG~GT~T~ ~G~G~T~C~A~GG~ ~G~G~T~C~A~A~G~ IC~T~C~C~A~C~C~ ~AT~G~A~C~C~A~ ~AT~G~G~G~T~T~ ~G~T~T~G~G~C~A~C~ ~C~A~A~T~C~A~C~ ~G~G~G~A~C~T~C~<br>TACCCGACC TATGCCAAA CTGAGTCGC CTAAGGTT AGAGGGGG TAACTGAGT TACCCCAA CAAACGTG GTTATGTT CGCTGAAGG<br>CMV                                                        |
| 9901  | ~A~A~A~T~G~G~T~ ~A~C~A~C~T~C~G~ CCC~C~A~T~G~A~C~ SC~A~A~M~G~G~C~ G~G~T~A~G~G~C~G~T~ ~T~A~C~G~G~A~T~C~ ~G~G~A~G~G~G~G~A~ G~C~C~C~T~A~G~A~T~ CCT~G~C~A~T~A~G~ ~A~G~C~A~G~G~T~G~C~T~<br>TTTACAGCA TTGTGAGGC GGGGTAACGT CGTTAACCG OCATCCGCAC ATGCCATAG CCTCACCGCT CGGGAGTCATA GGACGTTAT TCGTUGACGA<br>AAACGGACA TGACCCAGAG ACAC |
| 10001 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |

도면6



도면7a

1 GTTAGACCACT ACTSAGCCT GGGAGCTC TGGTAACCA GGSACCAC TGCATAAGCC TCAATAAGC TTGCTTGAG TGCTTCAGT AGTGTGIGCC  
 101 CAATCGGTC TAGACTCGGA CCCTGAGAG ACCGATTGAT CCCCTGGTG AGCAATCCG AGTATTCG AACGAACTC AGAGAGTC TACACACGG  
 GCAGACACA CACTGAGACC ATGGACTCT AGGGACTG GAAATCAG TACACCTT TAGATCGI CACCGGGGC TTGCCCCGTA ACTTGGCTT

201 AGGGAAACCA GAGGAGCTCT CTGGAGCGAG GACCTGGCTT GCCTGAACCC GCGGGCAG AGCGAAGGG CGGGGACTGG TTGAGTGGCC AAAAATTTG  
 TOCCTTGGI CTCTCGAGA GAGCTGGCCT CTGGCCGAA CGACTTCGG CGTGGCGTC TCGCTCCC GCCCTGAC ACTCATGGG TTTAAAC

301 ~CTAGGGGAG~ GCTAGGAG~ GAGAATGG~ TGCAGAGG~ TCACTATIA GCGGGGAGA ATTGATGA TGGAAAAA TTGGTTAG GCGAGGGGA  
 psi  
 401 AGAGAAAT ATAAATCAA ACATATAGA TGGCAAGCA GGGAGCTACA AGCATATATT CGCCCTCTT TAATCTACT ACCCTTTT AAGCCATTG CGTCGCCCT  
 TCTTTTTA TATTAATT TGATATCT ACCTGTCI CCTCTGACT CTGTTAGGT CATTAGGC AGCACATT ATATACGT ACCAACCTC TTGTTGTC ATCAAGGAT  
 501 AAATCTGGG ACAGCTACAA CCATCCCTC AGAGGGATC AGAGACATT AGTCAATT ATATACGT ACCAACCTC TTGTTGTC ATCAAGGAT  
 TTATACCC TGTCAATGT GGTAGGAG AGTCAATT TCTCTCTAG TCTAGTAATA TATATGCA TTGTTGGAG ATAACACAGC TAGTTCTA

601 AGAGAAATA GACACAGG AGCTTAGA CAGATAGAG GAGAGCAGA ACAGAGTA GAAAGAGA CAGAACAG CAGCTGAC AGGACAGC  
 TCCTGATTC CGGGTTTC TTGGRATCT CTCTGTT TTGTTGTT CTGTTGTC GTCGACGTC TTCTGTCICG  
 701 ATACAGCTA CCAAATAA CCTTATAGC CAGACATCC AGGGCAAT CGACATCG GGCATATC CAGACATT ATATGCTGG GAAACTAC  
 TTAGTCAGT CGGTAAAT GGATATACG GTCTGTTAG TCCCGTTA CCTGTTAGC CATTTCATC CGTATAGT CACTTAA TTATGTTAC  
 801 TAGAAGAGAA GGCTTCAGC CCAAGAGTA TACCATGTT TTAGCATTA TCAAGAGG CCAACCCACA AGATTAAC ACCATGCA AACAGTGG  
 ATCTCTCTT CGGAAGTCG GGCTCTACT ATGGTACAA AAGCTGTAAT AGCTCTC GGTGGGGT ITCATAATG TTGTACATT TTGTCACCC

901 GGGACATCAA GCAGCCATC AAATGTTAA AGACACATC AATGAGGAAG CTCAGGAA AGAGAAGGT GGTGAGA GAAAGAGG CAGTGGGAA  
 CCCTGAGTT CGTCGGTAG TTACATTI TCCTGGTAG TTACTCTC GAGCTCTT TCTCTCTCA CCAGCTCT CTTTCTC GTCACCTA

1001 ~GGAGGTG~ TTCTTGGGT TCTGGGAGC AGTAGGAAAGC ACTATGGGG CACGCTCAT GACCTGAGC GACAGCCA GCAATTATT GCTGTGTTA  
 TOCTCGAAC AAGGACCA AGAACCTCG TCGTCTCG TGATACCGC GTCGAGTA CTCGACTGTC CAGTCGGT CTTGTTATAA GAGACATAT

1101 ~GGGAGGAG~ AGAACATT~ GCTGGGGCT ATGGGGC AACGACCT GTGCAACTC AGGCTGGG GATCAGCA GTCAGGCA AGAACCTGG  
 CACGTCGTCG TCTGTTAA CGACTCGCA TAATCCGG TTGTTGAG CACGTTGAG TGTGAGACCC CGTAGTCGT CGAGTCGT TCTTGGACC

RRE  
 flap

~~~~~

1201 ~GTTGGAAG~ ATACCTAAG GTCAGACAGC TCCGGGGAT TTGGGGTC TCTGGAAAG TCTTGGAC CACTGGCTG CCTGGCTT ACAATGCA
 GACACCTTC TATGGATTCT CTAGTGTGCG AGAACCTCA AACCCAAAG AGACCTTGT AGTAAGCTG GTGAGGACG GAACTCTAGA TTGTTACCGT

RRE
 flap

~~~~~

## 도면7b

1301 GATTCATCC ACAAATTAA AGAAAAGGG GGGATGGGG GCTACAGTGC AGGGAAAGA ATAGTACGA TAATGCAAC AGACATACAA ACTAANGAT  
 CATAAGTAGG TGTAAAT TCCTTTTCC CCCAACCC CCAGTCAG TCCCTTCT flag  
 1401 TACAAAGA~AATGAA~ATCAAA~ATCAAA~TTGGGTTTA TTAGGGAC~AGAGAGC~CAGTGGG ATCAATICA TGAAGAATCT GCTAGGGT  
 ATGTTTTGT TTAAGTTT TAAGTTAA AAGCCAAT AATGTCCTG TCTCTCTAG GCAACCCC TAGTAACTG ACTTCTAGA CGATCCAA  
 1501 AGCGGTITG CGCTGCTCS CGAGGATG~CGATGCC~GATGCC~GATGCC~AGGGAA~GGCACATG~GGCACG~GGAGAGTT~GGGGGGGG  
 TCGGAAAC GCGAGAAGC GCTCTAGAC GCTAGGGAG CCACGGAG TCACCCGTT CGGTGAGC GGGTGAG GGCCTCTCAA CCCCTTCC  
 1601 GTCGGAAAT~GACGGGTG~CTAGGAAG~TGGGGGGG~TAACTGGA~AATGATG~GTCATG~TGGCCITT~TCCGAGGT~GGGGAGAC  
 CAGCCGTTAA CTGGCCACG GATCTTCC ACGGCCCC ATTIGACCTT TICACATAG CACATACG AGGGAAA AGGGCTCCA CCCCTCTG  
 1701 GGTATATAG TGAGTATG~GCGTGAAG~TCTTITG~CAGGGTT~GCGCCAG~CAGCTAA~GTCGAGG~GTCGCACT~GTCCTTACG  
 GCATAATAC ACGICATAG CGGACTTC AGAAAAGC GTGCGCAA CGGGCIT GTSTGACTT CGAGCTCC CGAGCAGA GAGGAAGTGC  
 1801 CGCCCGCCGC CCTACTGAG~GCCGCATC~ACGGGGTG~AGTGGTGC~TGCCTTC~CGCTGTGT~GCTCCGAA~CAGCTCGC~GTCCTGTTA  
 GGGGGGGCG GGAIGGACTC CGGGGTAGG TCGGCCAC TCAGCGAG ACGGGAGG CGGACACCA CGGAGGACTT GACCGAGGG CGAGATCCAT  
 1901 AGTTAAAGC TCAGGGAG~ACGGGCCCT~TGTGGGGC~TCCTTGGAG~CTAACCTAGA CTCAGCGGC~TCCTCAGCT~TGCCTACC~CIGCTGCTC  
 TCAATTTG AGTCAGTC AGGGGGCTT TGGGGAGA ACAGGGGG AGGAAACTC GGATGATCT GAGTGGGA AGGATGGGA AACGATGG  
 2001 KACTCTAGT~CTTGTGTC~TTTGTGTC~TGCCTGTT~CAGTCCTAG~CTGAGCTG~CGCTTAA~GTCGCTGC ACCATGTC~TGTGGTGA  
 TGAGATGCA GAACAAAGC AAAGACAG ACGGCAAT GTCTAGTC GACCTGGC CGCGATGCC ATCCGGGG TGTACGAGC AGGACACTG  
 CER scFv  
 2101 CGGGCTGCTG~CTGTGGAG~TGCCCCC~CGGTTCTG~CTGACCC~AGGGACT~GAGGAGCT~GGGGAGG~TGTGAGGC~AGGCGCAGC  
 GTGGAGAC GACAGCTG ACGGGTGG GCGGAAGAC GATCTGGG TCCACGCA CGTGGCGA CGGGCTCG ACCACTCG TCCGGGTG  
 CER scFv  
 2201 GTGAAGCTGT~CTGCAAGGC~CAGGGCTAC~ACCTCAAG~GCTACTGAT~GCTCTGGG~AGGAGAGC~CGGGCAGGG~CGGGAGAGA  
 CACTTGACA GGACGTCCG GTGGCGGAG TGGAGTGGC CGATGACCA CGGACCCAC TGGCTCTG GCGGGGCC GACCTTAC  
 CER scFv  
 2301 TCAACCCAG CAACGGCGG ACCRACTACA AGGAGGTT CAAGAGCAG GCGACCCGA CGGGGCAAGGAGAC ACCGGCTCA TGCAGCTG  
 AGTGGGGTC GTGCGGCC TGGTGTGATI TGCCTGCAA GTCTGTC CGGTGGACT GGCACGTT CTGTCGAG TGGGGAGI AGTCGACAG  
 CER scFv  
 2401 CGGGCAGGAC AGGAGGACA CGGGCGTGA CTCTGCGC AGGACTACT AGGACACAG CTACACTC GACTACTGG CGCAGGAC CACACTGACC  
 CGGGGACTGG TCGCTCCGTI CGGGCACAT GAAGCGGG TCCTGATGA TGGGGTC GATGTTGAG CTGATGACCC CGGCCCCGTG GTGTGACTGG  
 CER scFv

### 도면7c

도면7d

3401 AGCTGCCGAT TTCCAGAGA AGAAGAGAGA CGATGTGAC TCGGGGAGA GTTCAGCAGA AGCCGAGC CCCCTGCCTA CCAGCAGGC CAGAATCAGC  
TCGACGGCTA AAGCTCTCTC TCTTCCTT CCTACACTG ACGCCACTT CAAGTGCTC TCGGGCTGC GGGACGGAT GGTCGCCCC GTCGTAGTC  
3501 TGAACTGG~ GCCTGAAGC~ GGCAGAGG~ AGAGTACGA CGTCCTGG~ AAGCAGAG~ TGAAATGG~ GGCAGGCTC~ GGGAGAAGA  
ACGTGTGCT CGACTGGAC CGCTCTCC TCTCATCT GCAGGACCTA TTGCCCCTC CGGCCCTGG ACTTACCG CGTCGGAG CGCCTCTT  
3601 CCCCGAGGA~ GGCTGTTA AGAACGCA GAAGACAG ATGGCGGG CCTACCGGA GATCCGAT AGGGAGG GAGGGGGG CAAGGGCAC  
GGGGGCTT CCGCACATAT TCTTGACCT CTTCCTCTC TACGGCTC GGATGCGCT CTAGCGTAC TTCCGCTCG CCTCCGCCG GTCGCCGGTG  
3701 GAGGGCCCTT ATGAGGGCTT GTCACCCAC ACCAGGATA CCTACCGGC ~CAGGCTGC~ CCCNAGGT CGGGCGGC GAGAGGCA  
CTGGCGGACA TAGCTCCGGA T2A EGRT  
3801 GAGGAGGCTT TCTAACAGC~ GTGACGGG~ AGGAGATC~ CGGGCTTAGG ATGCTCTC TGGTACAG CCTCTGCTC TGAGTGTAC CACCCAGC  
CTCTCTGCA ATATGAGC CGACTGAC TCCTCTAGS GCGGATTC TAGGAGG ACCAGTTC GAGACAG ACATCAAG GTGGGGTG  
EGRT  
3901 ATTCCTCTG~ ATCCACCA AGTGTGTA CGGAAATGGT ATGGTAA TAAACACT ACTCTCTA ATTCCTAGA ATATAACA CTUCAAAC  
TAAGGAGGAC TAGGTGGT TICACACAT GCCTATCCA TAACCCTA ATTCCTGAG TGAGGTTAT TATATTGT GAAGTTTG  
EGRT  
4001 TGAACTCA~ TGAGGGGA~ TCTCACAC~ CTCGCGGG~ CATTAGGG TGAACCTC~ ACAGTACTC~ ACAGTACTC~ CTCGCTGG~ TCCAGGAA CGGATATIC  
ACGTGGAGT AGTCACCCCT AGAGGTTAG GACGGCACCT GAAATCCC ACTGAGGAG TGTCATGAG GAGGAGACT AGTGTCTT GACCTATAAG  
EGRT  
4101 TGAACCT~ TAAAGAAC~ ACAGGTTT TCTGATICA GCCTGGCT GAAAGGA CGACCTCA TGCCTTGAG AACCTAGAA TCTAACGGG  
ACTTCTGCA TTTCTTGTAG TGCACAAA ACCACTAGT CGAACCGGA CTTCTCTC GCCGGAGGT ACAGAACTC TTGGATCTT AGATGCGC  
EGRT  
4201 CAGGACCA~ CAACATGGC~ AGTTTCCTC~ TECAGTGTG~ AGCTGACA TACACCTT GGATTAAGC~ TCCCTAAG~ AGATAAGTA~ TGAAGATG  
GTCCTGGTC GTGTACAG TCAAGAGA ACCTCAGG TGGACTGT ATTGTAGAA CCTATGCG AGGGATTC TCTATTACT ACCTCTAC  
EGRT  
4301 ATTAATTCAG GAAACAAA TTGTGCTT GAAATGAA TAACCGAA AACCTGTT GGACCTCG GTGAAAC CAATTAAG AGAGAGAG  
TATTAAGTC CTGTGTTT AACACGATA CTTTAACTT ATTGACCT TTGTGCAA CCTGAGG CACTCTTG GTTTAATAT TCGTGTCTC  
EGRT  
4401 GTGAAAG~ CTGCAAGGC~ ACAGGCCAGG TCGCTATGC CTTGCTTC CGCGGGCT GCTGGGCC~ GGACCCGG CCTUGGGTC CTGGCCGA  
CACTTGTGIC GACGTCCGG IGCCGGTC AGACGGTACG GACAGGAGG GGCCTCCGA CGACCCGGG CCTUGGGTC CTGGCCGA  
EGRT

도면7e

4501 TGTCAAGCGA~GCCAGGAAT~GGTGGACAA~GTCACCTT~CTGGAGGAG~AGCAAGGA~GTTGGAG~RACCTGAGT~GATAACAG~GCACCAAGAG  
 ACAGTGCTT CGCCTCTTA CGCACCTT CACGTTGAA GACCTCCAC TCGTCCCT CAAACCTC TTAGACTCA CGTATTCAC GGTCGTC  
 4601 TGCCTGCTC AGGCATGAA CATGCCCTGC ACAGGACGG GACGAGACA CTTATCCAG TGCCCACT ACATGAGGG CCCCATGC GTCAGACCT  
 ACGGAGGG AGCGGAGG TCGGTAAT GTAGGGACG TGTCTGCC CTTGCTGTT GACATAGGIC ACAGGGIGA TGAACGCC GGGGIGACG CAGTCTGGA  
 4701 CGCCGGAGG AGCTATGGA GAAAGACA CCCATGGTCA GACATGCA GAGCCGGG ATGTTGCA CGTGTGCA GAAACGCA CCTACGGATG  
 CGGGCGTCC TCACTACCTT CTITCTGTG GGGACAGAC CTTCATGCTT CTGGGGGG TACACGGT GACACGCTA GTTGTACGT GATGCTAC  
 EGFR -  
 4801 CACTGGCCA GGTCTGAGG GCTGGCACAC GAATGGCTT AAGTCCTG CCAAGGCC TGGAGGCG ACCTACAC CCCGGGGG AGAACAGCA CCTACGGATG  
 EGFR -  
 4901 CGGGGATG GCCTCTCAT GTGAGGGCC GCTCTAGACC CGGCTGAG GAATTGATA TCAAGCTT CTTATCAA CCTCTGGATT AGTTGAATA TGTTCAC  
 GACCCCTAGC CGGAGAGTA CACTGGCCC CGAGATCTGG GCGGAGCTC TTAAACCTT AGCTGAACTT AGTTGAATA TGTTCAC  
 WPRE -  
 5001 TGAAGATG ACTGGGATC TTAACTATG TGCCTCTT ACCTATG GATAGCTC TTIAATGCT TTTATGCT TTTATGCT TATGGTCTC CGTATGGCT  
 ACTTCTAAC TGACATAG ATTGATACA AGGAGAAA TGCATACAC CTAGGAG AACAGACAT ATTAGGACCC AACAGACAG AACATACAC GATACGAG GGCAACCGA  
 WPRE -  
 5101 TTCAATTCTT CTCCCTGTA TAACTCTTG TTGGCTCTC TTATGAGA TTGGGGCC TTGTCAGG AACCTGGCT GTGGTGCCT GCTTTCCTC  
 AGATAAAAGA GGAGGACAT ATTAGGACCC AACAGACAG AACATACAC CAACACGGG AACAGTCG TGCACCCA AACACGTA AACAAAGAC  
 WPRE -  
 5201 CGGCAGCCC CACTGGTG GGCATGCC CCACCTGCA GCTCTTCC GGGACCTTG CTTCCTCT CCTATGCC AGGGGAAAT TATGCC  
 TCGTCTGG GTGACCAAC CGTACAGGT GTGGACAGT CGGAAAG CCTGAAAC GAAAGGGGA GGGATAACGG TCCGCTTG AGTAGGGCG  
 WPRE -  
 5301 CGCCCTGCC CGCTGGGAA CAGGGCTCG GCTGGGGCC ACTCAAAATT CCTGGTGTG TCACTGCTT TCTCTGGT GCTCGCTGT  
 GACGGACCG GCGACACTT GICCCGAGC CGAACACCC TGACTGTTAA GGCACACAA CGCCCTT AGTAGGAG AACAAACGA GAGGGACA  
 WPRE -  
 5401 GTGGCAACTT GGATCTGCG CGGGAGGCTC TTCTGCTAGG TCCCTTCGGC CCTCATCA GGGACCTC TTTCCTGGG GCTCTGGG  
 CAACGCTGGA CCTAGAGACG GCCCTGCAAG AAGAGATGC AGGGAGCC CGAGTGGT CGCTGGAG GAGGGGCC GAGACAGGC CGAGGGCG  
 WPRE -  
 5501 CTCTTCTGGC TCTTCCTT CGCCCTGAGA CGAGTGGAT CTCTCTTGG GCGGCTGCC CGATGAA CGCTGACTA GCGGAGCTT TAAGGAA  
 GAGAGGGCG AGAAGGGAA GCGGGACTC GTCAGCTA GAGGAACC CGGGGGGG GCTGACAT GAGGACGAT CGCATGAA ATTCGTTA  
 del U3 ~~~~~ R ~~~~~

## 도면7f

도면7g

CACTATGTG ACGCCGGTT AATGAAGACT GTTGCTGCC TCTGGCTTC CTCGATTGGC GAAACCGT GTGT<sup>a</sup>ACCC CTAATACATT GAGGGAACT  
 7201 TGGTGGAA~CGGAGGTA~ATGAAACCAT ACCAANGAC GAGCGACA~CCACCATGC~TGTGCAATG GCACAACT~ATTACTGCC  
 AGCAACCTT GCCTCGACT TACTUGGTG TGGTTTGCTG CTGGCTCTGT GTGTCACCG ACATGTTAC CGTGTGTCACG TAATGACCG  
 Amp  
 7301 GGACTCTA~CTTCACTC~CGGCAACAA~TTAACTACCT~GGATGGGG~GGATNAGT~GCAGAACAC~TTGGCGCT~GCCTTCCG~GGGGCCTGGT  
 CTGATGAAAT GAGATCGAG GGGCGTTT AATTATGTA CCTACTCCG CCTATTCAA CGCTCTGGT AACACGGAG CGACCGACCA  
 7401 TTATGCTGA~TAATCUGA~GCGGTAAGC~GGGGTTCG~GGTACATT~GCAGGACTGG~GGCGAGATGG~TAACGCC~CGTGTGAG~TTAACTAC  
 AATAACGACT ATTAGACCT CGGCCACTG CACCGAGC GCCATGTA CGCTGTAC CCgtCTIACC ATTGGGAGG GCATAGCAIC AATAGATGIG  
 Amp  
 7501 GAGGGGGT~CAGCACCA~TGGATGACG~AAATAGAC~ATGGCTGA~TAGGGCTC~ACTGTTAG~CAGTGTAA TGTCAGACCA AGTTTACTCA  
 CGCCCTCTCA GTCGTGAT ACCTACTTC TTATGTC TAGGGCTCT ATCCACGGG TGACATTAC GTACCATG AGCTGTGTT TCAATGAGT  
 Col ori  
 7601 TATATACCT AGATGATT AAACCTAT TTAAATTA~AAAGGCTA~GGTGTGAG~TTTGTGAT~AAAGGCTA~AGGATTCCT~TTTGTGAGT  
 ATATATGAA TCTAACPA TTTGAGTA AAATTAAT TTTCATGAT CCACTCTAG GAAACTAT TAGACTACTG GTTITAGGA ATTCGACTCA  
 7701 TTTCGTGTTCA~CTGAGCGGTA~GACCCGTTG~AAAGGCTA~AGGATTCCT~TGAGGCTT~TTTGTGAG~CTTGTGATC~TTTGTGAG~  
 AACCCAAGT GACTGGAGT CTGGGCACT TTTCAGTT TCTAGGAA ACTTCAGGA ACTTCAGGA AACAGACGC AGGACGTT GTTTTTCG  
 Col ori  
 7801 ACGCTTCA GGGGTGTTT GTTGGCGGA TCAGGCTA CCACCTTT TTCCSAGGT ACTGGCTC AGCGAGGC AGATACAAA TACTGTCTT  
 TGGGATGTT CGCCACCAA CAACGGCCT AGTCCTGAT GGTGAGAA AGGTGTTCA TTGACCGAAG TCTCTCGG TCTAGGTT ATGACAGAA  
 Col ori  
 7901 CTAGTGTG~CTAGTGTG~CCACCACTC~AAGAATCTG~TGGCGGC~TACATACCT~GCTTGCTAA~TCCGTATTAC~AGTGGCTCT~GGCAATGGGG  
 GANACACATCG GATCAATTCG GGTGGAGAG TTCTGAGAC ATCGGGCGG ATGTTAGG CGAAGCAGT AGACATGG TCAACGAGCA CGGTOACCGC  
 Col ori  
 8001 ATTAATGCTG~TTTACGGG~TTGGATGCTA~GACGATGTT~ACCGTGTAG~GGCGCGGT~GGGGTGTAC~GGGGGTCTG~TGGCAACG~CCGGCTGG  
 TATTCAGGAC AGAATGGCCC AACCTGAGT CTGCTACAA TGCCATAGA CGCGGCCA GCGGACTTG CCCCAAGC ACGGTGTGCG GGTGAACT  
 Col ori  
 8101 GGGAACGCC~TACACCAAC~TGAGATACCT~ACAGGCGG~CTAGGAA~GGGGCAGCT~TCCGAGGG~AGAAGGGG~ACAGGATCC~GGTAAAGCGCC  
 CGCTGCTGG ATGTCGCTG ACTCTATGGA TGTGCACTC GATACTTT CGGGTGGGA AGGCTTCC TCTTCGCC TGTCCATAGG CCATTCGCC  
 Col ori  
 8201 AAGGTGCGAA~CAGGAGGCG~CAGGAGGAG~CTTCCGGG~GAAAGGCTG~GTTGTTTAT~AGGTCGTCG~GGTGTGCA~CTTGTGACT~GAGGTCGAT  
 TCCACCTT GTCCTCTG GTCGTCCTC GAGGACCC CTGGGAG CAAAGATA TCAAGACASC CCAAGCGT GAGACGAGA CTCGAGCTA  
 Col ori

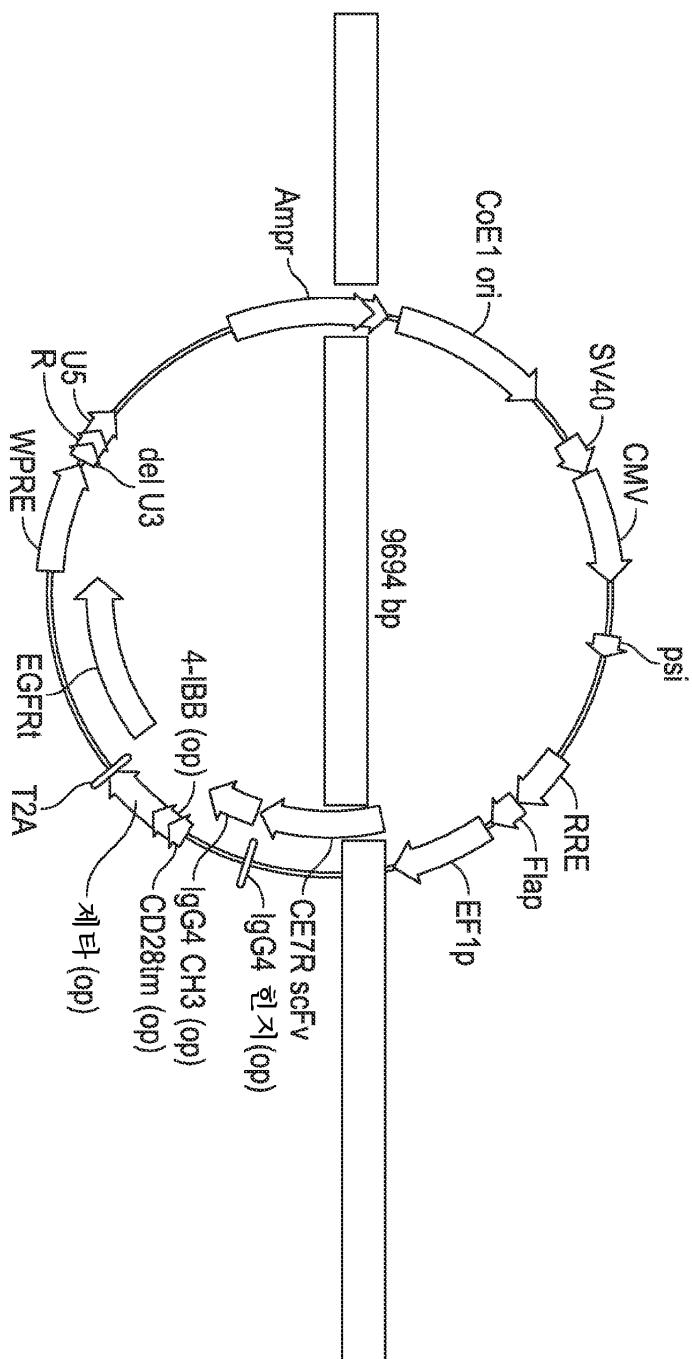
## 도면7b

8301 TTTTGATG CTTCAGGG GGGGGAGCC TAGGAAAA CCCAGAAC CGGCCCTT TAGGTCTT GGCCTTTC TGCCCTTTC CTCACATTT  
 AAACACTAC GAGGAGTCCC CCCCTCTCG ATTCCTT GGGCTCTTG CGCCGAAA ATGCCAGGA CGGAAACG ACCGAAAC GAGGATCAA  
  
 8401 CTTTCTGGG TTATCCCCC ATTGTGGA TAGGGTATT ACGCCCTTG AGTAGGTTA TAGGCTGG CGGGGGAA CGACCGGG CAGGAGTC  
 GAAAGGACGC AATAGGGGAC TAAGACACTT ATGGCAAA TGCGGAAC TCACTCACT ATGGCAGGG GCGTGGCTT GCTGCTCGC GTCCTCAGT  
     Coel ori  
  
 8501 GTGAGGGGG TGGGGAGG GCGCCATA CGAACCCG CTCGCCG GGGTGGCC ATTCAATT GCACCTGCA CGACAGGTT CGGACTGGA  
 CACTGCTCC TTCCCTTT CGGGTTAT GCGTTGGG GAGGGGGC CGAACCGC TAAGTATA CGTCAACCT GTGTCGAA GGCTTGACT  
 8601 AGGGGGCAG TGAGGCAAC GCAATTAGT TAGTTACT CACTATAG GACCCAGG CTTCACCT TATGCTTCG GCTCTATGT GTGTTGAT  
 TCGCCGTC ACTGGCTG CGTAATTC ACTCAATGA GAGGATAC CGTGGGTC GAATGGA ATAGGAGG CGAGGATACA AACACCTA  
 8701 TGTAGGGGA TACAAATTC ACACAGGAA CACTATAC CAGATAGG CCAAGCTGA ATTAAACCT CACTAAAGGG AACAAAGCT GAGGTCAC  
 ACACGCTT ATTTTAAG TGTTCTT GIGATAGT GACTATGCA GTTCTGACTT TTAATGGA GTGATTCG TTGTTTCA CTCGGAGG  
  
 8801 CGCGGTGGCG GCTTCGAGGT CGAGATCCG TCAACACCA ACCATATTCG CGCCCTTAC TCCGCCCCAT CGCCGCTAA CTCCGCCCAT  
 GGGCACCGC CGGAGCTCA GCTCTAGGCC AGCTGGTGT TGTATAGG SV40 GGGGATG AGGGGTAG GGCGGGATT GAGGGGTC AGGGGTA  
  
 8901 TCTCGCCCT ATGGCTGAT ATTCTTTT ATTATGGAG AGGCAGGGC CGCCCTGGCC TCTGAGCTAT TCCAGAGTA GTGAGGGC TTGTTGGAG  
 AGAGGGGG TACCGACTGA TAAAGAAA TAATACCGC TCCGGCTCG EGGAGCCGG AGACTGATA AGGCTCAT CACTCTCG AAAAACCTC  
     SV40 CMV  
  
 9001 GCGTAGGCTT TGGAAAAG CTGCGACGGT ATGGATGGC TGATGTCGA CATTACGCC ATGGTACAT TGATATGA CTAGTATTA ATAGTATCA  
 CGGATCCGAA AACGTTTC GAGCTGCGA TGTCTAACG AGTACAGT GTATGCGG TACACTGA ACTAAACT GATCAATAT TATATTAGT  
     OMV  
  
 9101 ATTACGGGT CATTAGTC TAGCCATAT ATGGAGTT CGGTACATA ACTTAGGTA ATGGCCGC CTGGGTGACC GCCAACGAC CCCGCCAT  
 TAATGCCCA GTAACTAAGT ATCGGGATA TACTCAAGG CCAATATAT TGAATGCACT TACCGGGG GACGACTGG CGGGTGCTG GGGGGGTA  
     CMV  
  
 9201 TGCCTCAAT ATAGCTT GTGCCATAG TAGGGCAT AGGGCAT CATTGGCTC ATGGTGGA GTATTTAGG TAACTGCC ACTTGCGAT  
 ACTGCGTTA TTAAGCTAC CAAGGTTAC ATGGCTTA TCCGTAGA GTACCGAC TCAACACT CATAATGCC ATTGCGGG TGACCGCA  
  
 9301 ACATAGTG TACATATGC CAAGTAGGC CCATATTAC GCAATAGG GAAATAGT CAGTATGCA CATTACGG GGGACGTA ATACGGCA TGATATGGAA TACCTGAA  
     OMV  
  
 9401 CTGATGTC AGTAGTC CCAATAGT ATGGCTAT CCGGGTGTG GGGTTGG AGTAGTCAGT ATGGGGTT GAGTACGG  
 CGATGACCC TCACTGAGT CGATAATG TACGATAT GTACGATAT OMV CGCCAAAC GTCAGTAGT TACCGCACC TATCCCAA CTGAGTGCC  
  
 9501 GATTCAGG TCTGACCC ATGGAGT GTGGAGT GTTGGAC GAAATAC GGGATTC GAAATTCG TAAATTCG TAAATTCG  
 CTAAGGTC AGAGGTGG TAACTGCAST TACCTCAA CAACCGTG GTTGTAGTG CCTGAAGG TTTACAGCA TTGTCAGGC GGGTAACG  
     CMV

도면 7i

9601 GCGAAATGGCC GGTAGGCGTG TACGGGAATG GGAATGGCA GCCCAGAT CGCGATAA AGCAGCTGCT TTTGGCGT ACCTGGCTC TCAG CGTTAACCG CCATCCGCAC ATGCCCTTAAG CCTCACCGCT CGGAGCTCA GGACGTATA TCGTGACGA AAACGGACA TGACCCAG AGAC

도면8



## 도면9a

1 GTTAGACCA GTCAGACCT GGGACCTC TGGCTAACTA GGGACCCAC TGTTAACCC TCAAATAAGC TGCCTTGAG TCTTCAGT AGTGTGCCC  
 CAATCGGTC TAGACTGGA CCCTCGAG ACCATTGAT CCCCTGGGAG ACCATTGGG AGTATTTCG AGTATTTCG AAGGAAGTCA TCACACACGG  
 101 CGTCCTGT GTGATCTG TACIAGAGA TCCCTAGAC CCTTTAGIC AGIGGGAA ATCTCTAGA GIEGGCCCG AACAGGACT TGAAGGGAA  
 GCAGACACA CACTGAGACC ATTGATCTT AGGGAGCTG GMAAATCGA TCACACCTT TAGATGT CACCGGGGC TTGTCCTGA ACTTGCCT  
 201 AGGGAAACCA GAGGACCTCT CTCGAGCGAG GACCTGGCTT GCTGAGGCC GCTGAGGCC CGACTCGC CGGGCGTC TGGCTCCCC GCGCGCAC  
 TCCCTGGGT CTCCCGAGA GAGCTGGC CIGAGCGGA CGACTCGC TGGCTCCCC GCGCGCAC ACTCATGGG TTGTCCTGA  
 psi  
 301 AGTAGGGAG GCTAGAGGA GAGAGATGGC TGGAGAGG GCTAGTAA GCGGGGACA ATTAGATGA TGGAAAATTA TTGGTTAG GCGAGGGGA  
 TGATCCTCT CGATCTCCC ACCTCTCC AGCTATATT CGCCCTCTT TAACTCTG ACCTTCTTC AGGCTATTC CGGTCCCT  
 401 AGAAATAAT ATAATTTAA ACATATAGIA IGGGAGCA GGGAGCTA AGCATCGA GTTACCTG GCGTGTAGA AGATCGAA GCGTGTAGAC  
 TCTTCTTTA TATTAATT TGTTATCAT ACCGTTGT CCTCGATC TGTAGGT CAATAGGC CGGACATCT TTGAGCTT CGACATCT  
 501 AAATATGGG ACAGTACAA CCATCCCTC AGACAGACTT AGAGACACTT AGATATTAAT ATATACGT AGCAACCTC TTGTTGTC ATCAAGGAT  
 TTATGACCC TGCGGAGT GTTGGAGA TCTGGCTAG TCTAGTAA TATATGCA TGGTGGAG ATAACACAG TAGTTCTA  
 601 AGAGATAAA GACACAGAA AGCTTGTAGA CAAGATAGA GAGACAGAA ACAGAGAA CAGCAACAG CAGTGACAC AGGACAGC  
 TCCTCAATT CIGSCTTC AGTCAATCT CTCTCTGT TGTTCATT CTTTGTG GIGTGTGIC GIGGACTGIG TTGTTGTC  
 701 ATCAGCTCA GCCAATTA CCCTATAGC CAGACATCC AGGGCAAT GCAATCAG CCATATCAC CTGACTT ATATGATGG GAAAGTAG  
 TTAGTCAGT CGGTAAAT GGATATCAC GTCTTGAGG TCCCGTTA CCATGAGC CGTATAGC GATCTGAA TTACGTAAC CATTTCATC  
 801 TAGAAGAGAA CCAGAGTAA TACCGATTT TTGACGATTA AGTAGGGG CGCAAGCTAA AGATTAAC ACCATGCTAA ACACATGGG  
 ATCTCTCTT CGCAAAGTGC GGTCTCACT ATGGTACAA AAGTGTAA AGTCTCTC GGTGGGGT TCTGTGAGT TTGTTGACCC  
 RE  
 901 GGGACATCA GCAGGATTC AATGTTAA AGACACAT AATGAGGAAG CTIAGGCA AGAGAGAGT GGGAGAGA GAAAGAGAG CAGTGGGAT  
 CCCTGTAGTT CGTCGGTAG TTACATTT TCCTGGTAG TAACTCTC GAGCTCGT TCTTCTCA CCACGTCTC TTCTTCTC GTCACCTA  
 RE  
 1001 AGGAGCTTG TCCCTGGGT TCTGGGGC AGGGAGG ACTTGGGGC CAGGTCAAT GAGGTGAGG TGTAGGGCA GACATATT GCTGGTATA  
 TOCTCGAAC AGGACACCA AGAACCTCG TCGCTCTCG TGAATCCCG CAGGTCAAT GAGGTGAGG TGTAGGGCA GACATATT GCTGGTATA  
 RE  
 1101 GGGAGGAG AGAGATTT GCTGGGGCT ATGGGGC AGCAGACTT GTGCAACT AGAGCTGG GGTCAAGCA GTCCTGGCA AGAATCTGG  
 GGGAGGAG AGAGATTT GCTGGGGCT ATGGGGC AGCAGACTT GTGCAACT AGAGCTGG GGTCAAGCA GTCCTGGCA AGAATCTGG  
 GGGAGGAG AGAGATTT GCTGGGGCT ATGGGGC AGCAGACTT GTGCAACT AGAGCTGG GGTCAAGCA GTCCTGGCA AGAATCTGG  
 GGGAGGAG AGAGATTT GCTGGGGCT ATGGGGC AGCAGACTT GTGCAACT AGAGCTGG GGTCAAGCA GTCCTGGCA AGAATCTGG  
 flap  
 1201 CGTGGAAAG ATACCTAAG GATCACAGC TCTGGGGCT TGGGGAT TGGGAAAC TCTTGCAC CACTGGCTG CCTGGACTT ACAAAGGCA  
 GACACCTTC TATGGATTC CTAGTGTGAGGACCCCA AACCCACCG AGACCTTTC AGAAAGTG GTGAGCAC GGAACCTAGA TGTTCACCGT  
 RE  
 1301 GGGAGGAG AGAGATTT GCTGGGGCT ATGGGGC AGCAGACTT GTGCAACT AGAGCTGG GGTCAAGCA GTCCTGGCA AGAATCTGG  
 GATAGTAGG TGTTAAATT TTCTTCTC CCTAACCC CCACTGTCAG TCCCTCTC TATCAGCTT ATTATGGT TTGTTGAGT TTGTTCTA  
 flap

## 도면9b

flap

1401 TACAAANACA ATTACAAA ATCCAAATT TCGGGTTA TACAGGGAC AGCAGAGTC CAGTTGGG ATCAAATCA TGAAGAATCT GCTTAGGTT  
AATTTTGT ITAIGHTT TAAGTTAA AAGCCAAT AATGTCCTG TCGTCTAG GIAAACCC TAGTTAAGT ACTCTTAA CGATCCAA

1501 AGCGTTTG CGCTGCTCG CGAGGTCG CGATGCCCGT CCGAGCTCC GGTGCCGTC AGTGGCAGA GGGACATG CCGAGAGT GGGGGAGG  
TCCGCAAAAC GGCAGGAAGC GCTCTAGAC GCTAGCGAG CCACGGCAG TCACCGCT CCGCTGAGC GGCTCTAGC GCGCTCTCAA CCCCTCTCC  
EFLP

1601 GCGGGAAATT GAACCGGTG CTAGAGAGG TGGCGGGG TAATGGGA AAGGATGTC GTGACTGGC TCGCCCTT TCGGAGGT GGGGGAGG  
TAGCCGTAA CTGGCACG GATCCTCC ACCGGCCC ATTTGACCT TTACATAG CACAGACCG AGGGAAA AGGGCTCCA CCCCTCTTG  
EFLP

1701 GGTATATAAG TGCAGAGTC GCGGTAAAG TCTTTTCG CAGGGTT GCGGAGA CAGCTGAAGCTGAGG GCGCATCT CTCCTTAAG  
GCATATATTC ACGTCTAGC CGGACTTGC AAGAAAGC GTGCCCAA CGGGCTTT GTGCGACTT CGAGCTCC CAGCTAGA GAGGAGTC  
EFLP

1801 GCGCCGGCG CCTACTTAGG GCGGCAATC AGCGGGTT AGTGGGTC TCGGGCTC CGCTGGGTG GCTTGAAGT CTCGGTGGC CGCTAGTA  
CGGGGGCGG GGATGGACTC CGCGCTAG TGCGCCAC TCAGCGAG AGGGGAGG GCGACACCA CGGAGACTT GAGCAGGG  
EFLP

1901 AGTTTAAAGC TCAGGTCGAG ACCGGGCGTT TGTCCGGCG TCCCTGGAG CCTRACTASA CTGGCCGGC TCGCACCGT TCGCTGACC  
TCAAATTGCG AGTCAGCTC TGGCGGGAA ACAGGGCG AGGAACCTC GGATGATC GAGTGGCCG AGAGTGCA AGGACTCG  
EFLP

2001 KACTCTAGT CTGTTGTCG TTTCGTTG TCGGGTTA CAGTCAGG CTGTCAGG CGCTTACGG CGCTTACGG TACGCCGCC ACCATGCTC TGTGGTGC  
TTCAGATGCA GAAACAAG AAAGCAAG ACGGCCAT GTCAGGTC GACATGGCC GCGATGCC ATCGGGGG TGGTACGAGC AGGACACTG  
CETR SCFV

2101 CGCCCTCTG CTGTCGGAGC TCGGGTCC CGCTTACCG CGCTTCTG CTGTCAGG AGGTCAGT GCACTACCTT GGGGGAGG TGGTGGAGC  
GTCGACGAC GACGCTCG AGGGGGGG GCGGAAGAC GACTGGGG TCCACGTCA CGTCGCGA CCCGGCTCG ACCACTCG TCGGGGTG  
CETR SCFV

2201 CGCAASGCTGT CTCGCAAGC CAGCGCTAC ACCTCACCG GCTACTGGAT GCAGGGTG AGAGAGAG CGCCCAAG CGTGAAGG ATGGGGAGA  
CACTTGACA GGAGTTCG GTCGGGATG TGAAGTGGC CGATGACCA CGTACCCAC TTCTCTCG GCGGGTGC GACCTAAC  
CETR SCFV

2301 TCAACCCAG CAACGGCGG ACCAATICA AGGAGGGT CAAGGGCAG GCGCCGTA CGGGAGCA GAGAGCAGT ACGGCTTA TGGAGCTC  
AGTGGGGTC GTTCGGGC TGGTGTAGT TGCCTGCAA GTTCGCTC CGGGGACT GGGACTT CTGTCGIGG TGGGAAAT AGTCGACAG  
CETR SCFV

2401 CGGGCTACCC AGGAGAGAC GCGGGTGTG CTCGGCC AGGGCTACT AGGGACAG CGAGACTC GACTACTGG GCGGGGAC CGACTGAGC  
GCGGACTGG TCGCCTGT CGGGCACAT GAAGACGGG TCCCTGATGA TGGGGTGC GAGTTGAAG CTGATGACCC CGTCCCGTG GGTGACIGG

## 도면9c

|         |                                                                                                                                                                                                                                              |           |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2501    | GIGGAGCAGGG CCGAGGGGG CTGTGGGGC GGAGGATCT GGGAGGGGG CAGGCGACAT CAGATGCC AGAGCGAG CAGCTCAGC GAGGGCTGG CACTCGGACC                                                                                                                              | CE/R scFv |
| 2601    | GGGAAAGGGT GACCATACC TTGAAGCCA AGGAGACAT CAACACGG CTGGCTGGT ATCAGGGAG CCCCAGAAC AGCCAGGC TCTGTACAG CGCTGGCCA CTGGTACGG ACATTCGGT TTCTCTGTA GTGTTGGC GACGGACCA TAGTCGCTG GGGCGTGT TGGGGTGG ACAGACTGTC                                         | CETR scFv |
| 2701    | GGGGCACCA AACCTGTTGA CGGGGTCG CAGGGTTT AGGGGGGGG GTCCCCCAA GGAATGACC CTGACCATCA GAAACGCA GGGGAGAC GCGGGTGG TTGACACT GGGGACGG CCTGATGGG GACTGGTAGT GTTGGAGCT CGAGGGCGTT CCTGATGGG GACTGGTAGT GTTGGAGCT CGGGCTCTG                              | CETR scFv |
| 2801    | TCGGCCCT ACTACTCCA GCAGTACTGG TCACCTCCT TCACCTTGG CAGGGTACCC GAGCTGAA TCAAAATC TAATGAGGA CGGGCCNGCC AGGGGACGG TTGAGACCC ATCACAGACC CACGACCC ACCAGCTCC GACGACCC AGCATGGG AGTGGGGGA AGTGGAGCC GTCGCGGG CTCGACCTT AGTTCCTAG ATTCAAGCT GGGGGACGG | CD28 tm   |
| 1964 허지 | ~~~~~                                                                                                                                                                                                                                        | ~~~~~     |
| 2901    | GGCTCTGGCC TTAGTCTGG GTGCTGGGG TTGTCGAGG CTGTCGEC TCCTACAGC TTCTGGTAC CGTGGCTC ATCACCTTT GGGTGAAGG GGGGACGG ATCACAGACC CACGACCC ACCAGCTCC GACGACCC AGCATGGG AGTGGGGGA AGTGGAGCC GTCGCGGG CTCGACCTT AGTTCCTAG ATTCAAGCT GGGGGACGG             | 4-1BB     |
| 3001    | GGGCAAGA AACCTCTGT ATATATCAA ACCACCTT ATGAGACCG TACAACATAC TCAAGGAA GATGGTGA TCTGGGATT AGTTCCTAG ATTCAAGCT GGGGGACGG                                                                                                                         | 4-1BB     |
| 3101    | GGAGGAGGG GATGTTGACT GGGGGTAAAG TTCAAGGAA GGGCGACGG CCCTGGCTAC CAGCAGGGCC AGATAAGCT GTACACGAG CAGAACCTGG CTCACCTGA CGCCACCTC AACGGCTT CGGGTCTGG CGGACGGAG GTCACCTGC TCTACGGG TCTAGTGA CATGTCCT GACTGGACC                                     | 4-1BB     |
| 3201    | GGAGGAGGG AGATGGTACG GTCCTGATA AGGGGAGG COGGGACCT GAGATGGGG GCAAGCTCG GGGGAGAC CCCAGAG GCGCTGATAA CGCTCTCTC TCTACGGG CAGGACCTT TGCCTCTCC GGCCTCTGA CTCTACCGC CGTCGGAG CGCTCTCTG GGGGACCTT                                                    | 제4        |
| 3301    | GGAACTCCG AAGACAAA TGCCGAGG CTACAGGAG ATGGGATGA AGGGCAGG GAGGGAGG AAGGGCAGC AGGGCCTGA TCAAGGCTGG GTTGTGAGC TTCTGTTCT ACGGCTCCG TATGTCGCTC TAGCCGFACT TCCGGCTGC CTCGGCCCG TCUCCGTTGC TCCGGACAT AGTCCGGAC                                      | 제4        |
| 3401    | TCCACCCCA CCAAGGATAC CTACAGGCC TGGCAATGC AGGCCCCG CCGAAGGTC GAGGGCG GAGAGGAG AGGAAGCTT CTAACATGCG                                                                                                                                            | T2A       |

도면9d

AGTGGGGGT GGTCCATG GATGTCGG GACGTGACG TCGGGACGG GGGTCCAG CTCGCCGC CTCTCCGC TCTCAGA GATGAGC  
 T2A ~~~~~  
 3501 GGACGGGA~GGAGATCC~GGCCCTAGA TGCTCTCT GTGACAGC CTCCTCT GTGAGTAC ACCACCCA TTCTCTGA TCCACCCNA  
 CACTGCACCT CCTCTTAGGG CGGGATCT ACAGAAGGA CCACGTCG GAAGAGGA CACTAANG TGHHHGTGTT AGGGAGACT AGGGGGTT  
 3601 ATGTGAACT~GGATAGGT~TGGCAATT~TAACTCA~CTCTCTAA~ATGTAGGA~TATTAAGC TTCAAACCT~GGACCTCT~GTGGGT  
 TCACACATG CCTTATCCAT AACCCTAA ATTCTGAGT GAGGGTATT TAGGATCT ATAATTGIG ARCTTITGA CGGGAGCTA CTACCGCTA  
 EGFR EGFR  
 3701 GTCCAGATCC TGCGGGGC ATTMAGGGT GACCTCTCA CACTACTC TCTCTGGT CGCTTGAT GTCATGAG ACCATAGA CTITGGCAT TCTCTTGT  
 GAGGTETAGG ACGCCACCG TAATCCTA CTGAGGACT GTCATGAG AGGACCA GTCTCCCTG ACCATAGA CTITGGCAT TCTCTTGT  
 3801 CGGGTTTT GTGATTCAG~GCTGGCTG~GCTGGCTG~AAAGAGC~GGACCTCA~GGCTTGAGA~KCTAGAAT~GAGGGC~AGGACAGC~KCTAGTC  
 GTCCCAAAA CGACTAAGT CGAACGGAC TTTCCTG CTGGAGTA CGAACACTT TGGACCTA GTGGCCG TCTGGTGT TGTACCTA  
 EGFR EGFR  
 3901 GGTTCCTT~GGAGTCGA~GCCATACAT~KACATCTTG~GGATTCGT~CCCTCAGA~GATAAGT~GGAGTCGA~TATTCGG~KACATCAT  
 CARAGAGAA CGTCAGCTT CGGACTGTA TTGAGAAC CCTATGCA GGGATCTCT CRATCACT CCTCTACT ATTAAGTC TTGTTTT  
 EGFR EGFR  
 4001 TGTGCTATG~CAATCAAT~AACGGAA~AACCTTG~GGACTTCGG~TCAAAACC~AAATATA~GGACAGGG~TAAACGG~TCAAGGCC  
 AACGGATAC GTTAACTA TTGACCTT TTGACAAAC CGGGGGC AGCTTITGG TTAACTATT CGTGTCTC ACTTITGTG AGTCCGGI  
 EGFR EGFR  
 4101 CGGGCAGT CTGCCCTGCC TTGTCCTCC CGGAGGGCTG CTGGGGCCG GACCCAGG ACTGGCTCT TTCCGGAT GTGAGGGAG CGAGGGATG  
 GTCGGTCCA GACGGTACGG AACACGGGG GCCTCCGAC GACCCGGC CTGGGTCC TAAAGGGAG AACGGCTTA CAGICGGCTC CGTCCCCTAC  
 EGFR EGFR  
 4201 CGTGGAAAG TCAACTTC TGGGGTGA GCAAGGGAG TTGGAGA ACTTGAGC CATACGCC CACTAGGT GCGCCCTCA GCGGAGAC  
 GACCHGTC ACCTGGAG ACCTCCTCCT CGGTCCTC AACACTCT TGACTCAC GATGTCAG GGGGTCTCA CGGAGGGT CGGTACTG  
 EGFR EGFR  
 4301 ATGACCTGCA~GGAGGGG~ACGAGCA~TGTACGGT~GTGGCACT~CTTGACGG~CCCTACGG~TGTAGCTG~GGGGAG~GTCATGGAG  
 TAGTGCACGT GTCTCCCTC TGGTGTG ACATGGTC CACGGTGT GACTGCG GGGTGAGC AGTCTGAC GCGCGCTCT CAGTACCTC  
 EGFR EGFR  
 4401 AAACAAAC~CTGGTGTG~AATGAGCAG~ACGGGGCA~TGTGCGAC~CTGGCCAT~CAACTGGC~CTGGAGT~ACTGGGAG~GCTTGAGG  
 TTGTTGTG GGACAGACG TCACTGCTC TGCGGGCT ACACAGCTG GACAGGTG GTTGTACG GATGCTACG TACCCGGTC CAGACTTC  
 EGFR EGFR  
 4501 TGTGCAACG~KATGGCTA~AGTCCCTG~CATGGCTC~GGGTGGT~GGGGCTCT~CTGGTGTG~GTTGGAGG~CTCTCTAG  
 GACAGGTGCA TTACCCGGT TCTAGGGAG GTACGGGTA CCCTACACC CCCGGAGA GACGACGAC CACCAACGG ACCCTAGCC GAGAGACT

도면9e

EGERT  
 4601 TGAGGCCCG CTCAGACCC GGGCTCAGG AATCGATAT CAAGCTTAC~ GATAAACAC~ CTCGGTTAA CAAATTGT~ GAAGATGA~ CTGGTATCT~  
 ACTGGGGC GAGATCTGGG CCTGAGCTC TTAGCTATA GTTCTAGT~ CTATTAGT~ GAGACCAAT GTTAAACA~ CTTTAACI GACCATAGA  
 4701 TAATGAGT~ GTCTCTTTA CGCTATGG~ ATACGTGCT~ TAATGCTT~ GTTATGATC~ TATTGTTCC~ CGTATGCTT~ TCATTTCTC~ CTCTTGAT~  
 ATTGATCAA CGGAAAT GGCATACACC TATGGACGA~ AATAGGA~ ACATAGTAG~ ATACGAGG~ GCATACGAA~ AGTAAAGAG~ GAGAACATA  
 4801 AAATCCGGT~ TGCTGTCT~ TTATGGGG~ TTGTGGCCG~ TTGTCGGG~ AGTGGGG~ GTGTCGACTG~ TGTTCTGA~ CGCAKCCCC~ ACTGGTGGG~  
 TTAGGACCA~ ACGACAGAGA~ AATACCTCTC~ AACACGGGC~ AACAGCTGT~ TGCACCGAC~ CACACGGAC~ ACAAAAGACT~ GGGTGGGG~ TGACCAACCC  
 4901 GCATGGCAC~ CACTGTAG~ CTCTTTCG~ GACTTTCG~ TTCCCTCT~ CCATATGCA~ CGCGCAACT~ CATGGCGCC~ TGCCATGCC~ GCTGCTGGAC  
 CGTAACTGGT~ GIGGACGTC~ GAGGAAGGC~ CTGAAAGCG~ AAAGGGAG~ GGATACGGT~ GCGGCTTGA~ GTAGCGCGG~ AGGAAAGCC~ AACGGGGC  
 5001 AGGGGCTGG~ CTGTTGGCA~ CTGACATT~ CTGGGGTG~ TCGGSAAT~ CATGGCCTT~ TCTTGGCT~ CTGGCTTG~ TGGCACCTG~ GATTCGGC  
 TCCCGAGCC~ GAAACCGT~ GACTGTAAG~ GCACACAA~ AGCCCCTTA~ GTACCGAA~ AGGAACGAC~ GAGGGCAC~ AACGGGGC~ CTAAGACGG  
 5101 GGAGGCTT~ TCTGCTGT~ CCTCTGGG~ CTCAATCG~ CGGACCTG~ CGGACCTG~ TICCGGGG~ CTGCTGGG~ CTCTGGGG~ TCTTGGCT~ CTTCGGCTC  
 CCTCTGGGG~ AGACGATCA~ GGGAAAGCG~ GAGTAGGT~ GCCTGAAGG~ AAGGGGCC~ GACGAGGCC~ GAGACCCGG~ AGAACGCC~ GAAGCGAG  
 5201 GCGCTCAG~ GAGTGGATC~ TCTTGGG~ CGCGCTTCC~ CGATCGAAC~ CTCGACTAG~ CGTAACTT~ AGACCAAT~ ACTTAAAGG~ CGCTTGA  
 CGGAGCTG~ CTCAGCTAG~ AGGAAACCC~ GCGGGAGGG~ CTGAGGTAG~ GCAGCTGATC~ GGCATGGAA~ TCTGTTAC~ TGATCTTC~ GTGACATCT  
 R del 1 U3  
 5301 TCTTASCC~ TTTTAAG~ AAAGGGGG~ ACTGGAGGG~ CTAACTACT~ CCCAAGAG~ ACAGCTG~ CTTITGGCT~ GIACTGGTC~ TCTCTGGTA  
 AGATCGGT~ AAAATTC~ TTTCCTCC~ TEACCTCCC~ GATTAGTA~ GGTTCTC~ TGTCTAGAC~ GAAACGGA~ CATGACCCAG~ AGAACCAAT  
 R US  
 5401 GACCAAGTCT~ GAGGCCGG~ GCTCTGGC~ TAATGGGA~ ACCCAAGCT~ TAAGCTCAA~ TAAGCTTC~ CTGACTGCT~ TCAAGTAGT~ TGTCGCGTC  
 CTGGCTAGA~ CTUGGACCT~ CGAGACCC~ ATTGATCCT~ TGGTACGAA~ ATTGGAGTT~ ATTCTGAACT~ GAACTACGA~ AGTTCATAC~ ACACGGGCG  
 5501 TGTGCTGA~ CTCTGGTAC~ TAGAGTCC~ TAGACCTT~ TTAGCTGT~ TGGAAATCT~ CTAGCAAT~ TOGATCAA~ GGTATGAT~ ACCGTGAC  
 ACAACACACT~ GAGGACCTG~ ATCTCTGGG~ AGTCCTGAA~ AATCAGTCAC~ ACCTTCTAGA~ GATGCGTTA~ AGCTATAGT~ CGAACTAGCA~ TGGCACCTGG  
 TCGGGGGG~ GCGGGTAC~ CATGGGGC~ TATAGTGCA~ CTGATGCA~ ATTCTGAACT~ GCAATATG~ AATGCGGG~ CAGCAATG~ TACGCTGTA~ CCTGGGTTA  
 AGCTGGGG~ CGGGCATG~ GTTAAGGGC~ AATACACTCA~ GCAATATG~ AATGCGGG~ CAGCAATG~ TACGCTGTA~ CCTGGGTTA~ CGGGCAATG~ TGGCGTCTC  
 5601 CCTCACTTAA~ TCGCTCTGA~ GCACATCCC~ CTTCGGTAC~ CTGGCTTAC~ ATTGAGGAGG~ CGGGCACTGA~ TGGCGTCTC~ CCTGGGTTA~  
 CCTCACTTAA~ TCGCTCTGA~ GCACATCCC~ CTTCGGTAC~ CTGGCTTAC~ ATTGAGGAGG~ CGGGCACTGA~ TGGCGTCTC~ CCTGGGTTA~ CGGGCAATG~ TGGCGTCTC  
 5701 CCTCACTTAA~ TCGCTCTGA~ GCACATCCC~ CTTCGGTAC~ CTGGCTTAC~ ATTGAGGAGG~ CGGGCACTGA~ TGGCGTCTC~ CCTGGGTTA~ CGGGCAATG~ TGGCGTCTC  
 GGGTGTGATT~ AGGGAACT~ CGTGTAGGGG~ GAAGGGCTC~ GACGGGCTG~ AGGGGAGG~ GTTGTCAACG~ CGTGGACTT~  
 R

## 도면9f

도면9g

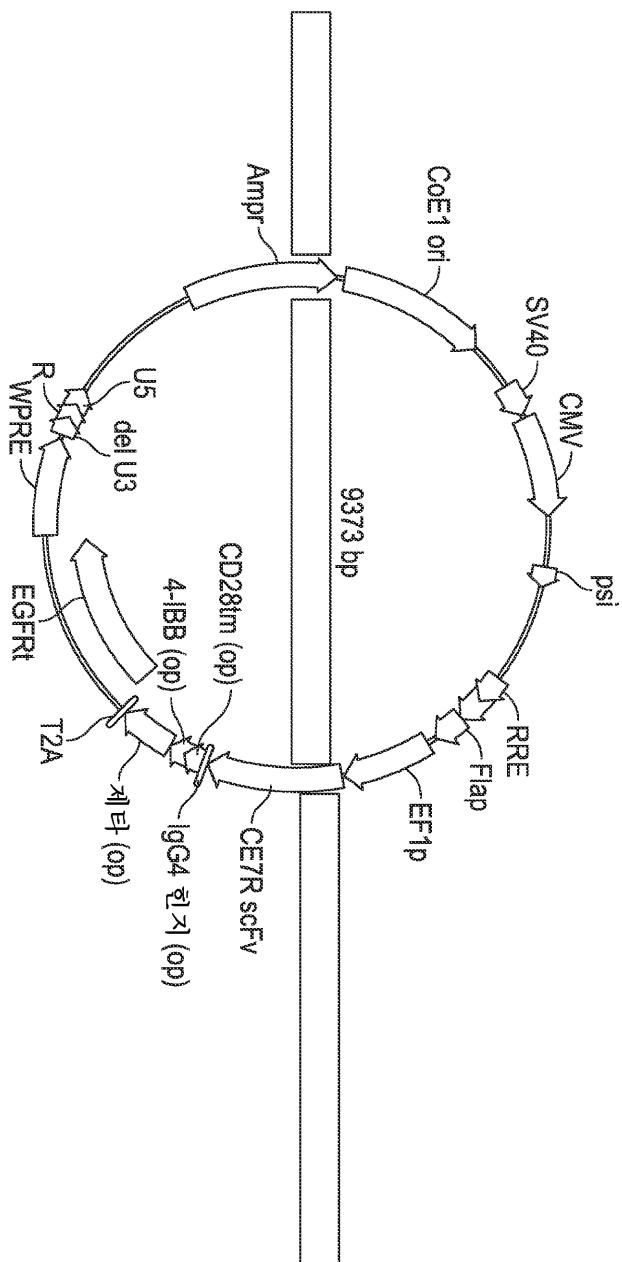
Amp<sup>r</sup>

7201 GGATGAGCAGA~AATACAGA~TCGGTGAAGAT~AGGTTGCCA~CTGATTAA~ATGGTAAC TGCAGACCA GTTACATCA ATATACTTA GATGATTA  
 CCTACTTGCT TTATCTGCT AGCGACTCTA TCCACGGAGT GACTTAATCG TACCATGA CACTCTGGT CAAATGATA TATATGAAAT CTAACTAAAT  
 7301 AACTCTAATT TTAAATTAA~AAGGTGCTAG~GGTGAAGAAGC~TTTGTGAA~TCGATGAC~AAATCCCT~AACGTTGTT~TTGGTTTAC~TGAGGTTGAG  
 TTGAGAGTAA AATTAATT TTCTTAGATC CACTCTAGG AAACATTAGT AGATACGG TTTAGGAA TGCACCAA AGCAAGGTG ACTCGAGTC  
 7401 ACCCTGAGA~AAGTCAA~GGATCTCTT~GAGTCTTT~TTTCGCCC~GAGTCTGT~GTTGCAAC~AAAGACCGG CATAGACGA CAACTGTT TTTTGTG  
 TGGGACATCT TTCTAGTT CCTAGAAGAA AAAGACCGG CTCAGGAA AAAGACCGG CTCAGGAA AAAGACCGG CTCAGGAA AAAGACCGG  
 7501 TTGGCGGT~CAAGCTAC~CAACTTT~TCCGAGGT~AACGCTTA~TCGAGGAA~GAGGAGCA~GATACCAAT~AGTGTCTC~TGTGAGCC~GAGTGTGG  
 AACCGGCTTA GTTCGAGT GTTGAGAAA AGGTCTCAT TGACCGAAT CGTCGCGT CHATGTTTA TGACAAAGG ATCACACGG CATCACATCG  
 7601 GACCACTCA~AGATCTGT~AGGCGGCT~AGTACCTGG~CTGGTAA~CCGTTACA~GGGGTGG~GGAGTGGGA~TAACTGCT~CTACGGGT  
 GTGGTGAAGT TCTTGAGACA TCGTUGCGGA TGAATGGASC GAGACATGT CACGACGAC GTCACCGCT ATTCAGACAA GAATGGCCA  
 7701 TGGACCTGAG~AGGAGTGT~CCGGATAAAG~CGCGGCGTC~GGGTTAACG~GGGGTGTGT~GAAACAGCC~CAGCTTGAG~CGAACGACCT~ACACCGACT  
 AACTGAGTTC TGCATCAT GCCTTATTC CGCGTGCAG CCCGACTTC CCCCAAGGA CGTGTGGG GTGAAACCTC GTGCTGGA TGIGGCTGA  
 7801 GAGATACCA~CAGCGAGC~TATGAGAAG~CGGACGCT~CCGAGGAA~GAGGGAA~CGGTTACG~GAAAGCCCA~GGTGGAC~AGGAGGCG  
 CCTCTATGGAT GTCGACTCG ATACCTTC GCGGTCGGA GGGTTCCCT CTTCGCT GTCCATAGGC CATTCGGT CCACGCTTG TCTCTCGG  
 7901 AGGAGGGAGC~TTCCGAGG~AAAGGCTTG~TATCTTAA~GTCGTTGG~GTCGTTGG~GGTGGCAC~CTGTCAGT~AGGTCGTT~TTGGTGTGG~TGTGAGGG  
 TCTCTCTCG AAGGCCCC TTGGGACCC ATAGAATAAT CAGGACAGC CAAGGGTG GAGCTGAC TCCAGCTAA AACACTACG AGCACTCCC  
 8001 GCGGAGGCT~ATGGAAAC~GCGCAGC~CGGCTT~AGCTCTG~GCTTGT~GAGCTTGC~TCACATTC~TTCTCTGT~TATCTCTGA  
 CGCCCTCGGA TACCTTTC CGGTGTTG GCAGGAAAA TGCAAGAC CGGAAGAC CGGAAGAC AGTGACAG AAAGGCGA ATAGGGACT  
 8101 TTCTGTGGAT~AACCTTAA~GCGCTTCA~GTCGCTGT~AACCTCTGG~GAGGCGAC~GAGGAGGC~AGGAGTC~TGGGGGA~AGGAGGAG  
 AGAGACTA TTGGAAAT GCGGAACT CACTGACTA TGGGAGGG CGTGGCTG CGGGTCTG TCCCTCTC ACTCGCTCT TGCCTCTC  
 8201 CGCCCAATAC GCAAGCCGC TCTCCCGCG CGTGGCGGA TCAATATG CACGGGAGT AGGGGAGT GAGGGAGT GAGGGAGT  
 GCGGTATAC CGTGGCGCG AGAGGCGGC GCAACCGGT AAGTATAC CGCAGGCTG CTTCGAAG GGTCGACCT TGCCTCTCA CTGGGTG  
 8301 CAATTTATGT GAGTAACTG CACCGAGC TTTCACAT ATCTCTGG CTGGTGTGG GTGGTGTGG GTGAGGGAT TCAACTTCA  
 GTTAATACA CTCACTCGA TGAGTATCC GTGGGGTCCG RAATGTGAA TAGGAGGC GAGCTAGAA CACCTTA GACTGCTA TGTGAAI  
 SV40

도면9h

GTCGCTTTCG TCGATACTGG TACTAATGGC GTTCGAGCT TAATGGGAG TGATTTCGAC CTCCAGGTGG CGCCACCGCC GGAGCTCCAG  
 Sv40  
 8501 ~GAGATCCGGT~ CGACCAAGC~ CCATAGTCG~ GGCCTTAAT~ CCGCCCAATC~ CCCCTAAC~ TCGCCCAAGT~ TGAGGCAATT~ GTCCGCCCA~ TGGCTGACTA  
 CTCCTAGCCA GCCTGCTGTT GGTATCAGGG CGGGATGCA GGGGGTAGG AGGGGTCA AGGGGTAA GAGGGGGT ACCGACTGAT  
 Sv40  
 8601 ~TTTTTTTA~ TTAAAGGAG~ GGGGAGGG~ GGTGGGCT~ CGAGGAAAT~ CGAGAATG~ TGGGAGCT~ TTGTTGAGG~ CGTGGGTT~ TGCAAGG  
 TAATAAAAT AATACGTC CCGCTCCG CGAGCCGA GACTGATAA GGTCTCATC ACTCTCGA AAAACCC GGTCCGAA ACGTTTTCG  
 CMV  
 8701 TCGACGGT~ TGATGGCT~ CAGTCAC~ ATTAACGGCA~ TGTTGAC~ TGTTAAT~ TAGTAA~ TTACGGGT~ ATAGTCAT  
 AAGGCGCAT AGCTAACCGA GTACAGGTG TAAAGGCGT ACTACGTA CAAATACG ATCAATATT ATCAATAGT AATGCCAG TAATCAAGTA  
 CMV  
 8801 ~AGCCCATATA~ TGGGTTCCG~ CGTACATA~ CTIACGGTA~ ATGGCCGCC~ TGGCTGCCG~ CCCAACACC~ CCCGCCATT~ GACGTATA~ ATGAGGATG  
 TCGGTATAT ACCTCAAGGC GCANAGTATT GAATGGCATT TACCGGGGG ACCGACTGGC GGGTGCTG GGGGGTAA CTGCACTT TACTGATAC  
 CMV  
 8901 ~TCCGATAGT~ AACGCAATA~ GGGACTTC~ ATGGACGTA~ ATGGGGAG~ TATTTAGGT~ AACGACCA~ CTGGGAGTA~ CTCAGGTT~ ATCAATGCG  
 AGGGTATCA TTGGGTAT CCTGAAAGG TAATGGCACT TACCTCACCT ATAAAGCA TTGACGGT GACCGTCAT GTAGTCACA TAGTATACG  
 CMV  
 9001 ~AGTAGGCC~ CCTATGAC~ TCAATGGC~ TATGGC~ GGTGGGAA~ ATGGCAATA~ CGACCTTA~ TGGGACITC~ CTACTGGCA~ GTACACTAC  
 TCAATGGGG GGATAACTGC AGTACTGCC ATTACGGG CGAACCTTA TACGGCAT STACTGGAT ACCCTGAAAG GATGACCGT CATGAGATG  
 CMV  
 9101 ~GATATAGCA~ TCGTATAC~ CAAGGTGAG~ CGGTTTGG~ AGACATCA~ TGGGGGGA~ TGGGGTGT~ ACTACGGG~ ATTCAGT~ CTCAAGG  
 CATAATCAGT AGCGATAATG GTACCACTAC GCAAACGG TGTGTCAT ACCGCACCT ATGCCAAC TGAGTCGCC TAAGGTCA GAGGGGGGT  
 CMV  
 9201 ~TGGAGTCAA~ TGGGAGTGT~ TTGGCAC~ AAATCAAG~ GGACTTCGA~ AAATGGGTA~ ACAACTCGC~ CCCATGGAG~ CAATGGCG~ GTAGGGGTGT  
 ACTGAGTT ACCCTAAC AACACCGGG ITTAGTGTG CTGAAAGT TTACAGCAT TGTGAGGG GGGTAATGC GTTACCCG CATCCGCA  
 CMV  
 9301 ~AGGGATTCG~ GAGAGCGAG~ CCCTAGAGTC~ CGACATAAA~ GGTGCTGT~ TTGCGCTGA~ CGGGGTCT~ CTG  
 TCCTTAAGC CTACCGCTC GGGACTCTAG GACCTATT CGTCGACGAA AACGGACAT GACCAGAGA GAC

## 도면 10



## 도면 11a

1 GTTAGGACCG ATCTGAGCT GGAGGCTC TGGCTACTA GGAACCCAC TGCTTAAGC TCAAATAAGC TTGCTTGTAG TGCTCACT AGTGTGTCC  
 CAATCTGC TAGACTGGA CCTCTGAGAG ACCGATGAT CCTTGTGGTG AGAAATTCG ATGTTATTCG AACGGACT ACAGAATCA TCAACACGG  
 101 CGCTGTGT GTGACTCTGG TAATAGAGA TCCCTAGAC CCTTGTAGC AGTGTGAA ATCTCAGCA GTGGCCGAA AACAGACT TGAAAGCAA  
 GCAGAACCA CACTGAGACC ATGATCTCT AGGGACTCT CGACTTGCG CCGTGGGTG CGTGGCGTC TOCGCCTCC GCGGGGAC  
 201 AGGGAAACCA GAGGAGCT CTGGACCG GACTGGCTT GCTGAAAGC GCACGGAG AGGGAGGG GGGGACTGG TGAGTACGCC AAATTTG  
 TCCCTTGTG CTCTCGAGA GAGCTGCTC CTGAGCGAA CGACTTGCG CGTGGCGTC TOCGCCTCC GCGGGGAC  
 301 AGTAAAGCAG GCTTAAAGG GAGAGTGG TGGGAGCG TCAAGTTAA GCGGGGAGA ATTAGCTGA TGGGAAAAA TTGCGTAG GCGAGGGGA  
 TGATGCGCT CGATCTCT CTCTGACCC AGCTGCTGC AGTCATATT CGCCCTCT TAATCAGCT ACCCTTTT AAGCCATTG CGGTCGCC  
 401 AGAGAAAT ATAATCAA ACATATGA TGGGAGCA GGGAGTTAGA AGGATCGA GTAAATTCG GCCTGTAGA AACATAGA GGCCTGTAGC  
 TCTTTTA TATTATT TGATATCAT ACCGTTGT CCTCTGTG CTGTAGGT CAATAGGAC CGGACATCT TGTGTTT CGGACATCTG  
 501 AACATCGGG AGACGACAA CCATCCCTC AGAACAGATC AGAACAGTAT AGATCTTAA ATAATAGCT AGCACCTC TATTCGTC ATCAAGGAT  
 TTATGAC TGTGAGTT GTGAGGGAG TGTGCTCTAG TCTAGATA TATAGGAT TGTGAGGAG ATAACAGAC TGTGAGGAG ATAAACAGC  
 601 AGAGAAACCA GACCAAGG AGCTTAAAGA CAAGATGAA GAGAGCAA AACAGATGA AACAGAGCA CAGGAGCA CAGGACAG  
 TCTCTTGT CTGGTGTCC TPGAACTCT GTTCATCTC CTCTGTG TTGTTCATT CTTTTGTG GTCTGTGTC GTGAGCTG TGCTGTGCG  
 701 AACAGGCTCA CCCAAATTA CCTATAGT CAGACATCC AGGGCAAT GTTACATCG GCAATATAC CTAGACATT AATSCATGG GAAACTAG  
 TTAGTCAGT CGGTTPAT GGATATAC GCTCTGTAG TOCCCTTA CCATGATGC CGGTATGTG GATCTGAA TTAGTACCATTC  
 801 TAGAGGAA GGCTTCAG CCAAGATGA TACCAAGTT TCAGAGGA CACCCACCA AGATTAAC ACCAATCAA ACACAGCTGG  
 ATCTCCTT CGGAACTCG GTCCTCACT ATGGTACAA AAGTGTAA ATGTCCTTC GGTGGGTG TCTAATTTG TTGTCGATT TGTCACCC  
 901 GGGACATCA GCAGCCATCC AACGTAA AGAACATC ATAGGAGG CTGAGGAGA AGAGAAGT GTGAGGAGA GAAAGAGAG CAGGGGAA  
 CCCTGTAGTT CGTGTGTAAG TTACATT TCTCTGTAG TTACTCTC GACGCGTT TCTCTCTCA CCACCTCT CTTTTCTC GTCAACCTTA  
 1001 AGGAGTTG TTCTGGGT TTCTGGAGG AGGAGGAG AGGAGGAG AGCTGGGAG ACTGGGAG CAGGTGAT GAGGTAGC GTACAGGCA GACATATT  
 TCCTGAAAC AGGAACTCA AGAACCTCG TGTCTCTG TGATCCGC GTCCAGTA CTGCACTC CATGCGTT CTCTTAAAGA CAGACATAT  
 RHE  
 1101 GTGCAAGAG AGAACATT GTGAGGCG AGCAGATC GTGCACTC AGTGTGGG GCAAGAGA GCTGGAGCA AGAACCTCG  
 CAGCTGTC TCTGTAA CGACTCCGA TAATCCGG TGTCTAGA CAACGTGAG TGCTGAGCC CGTAGTGTG CGAGGCGT TCTTGTG  
 RE  
 1201 GTGAGGAG ATACCTAAAG GATCAAGC TGTGGGGAT TTGGGTGTC TGTGGAAAC TCAATTCAC CACTGGTG CCTGGATC ACACATGGA  
 GACACCTTC TATGGATTC CTAGTGTG AGGACCCCTA AACCCAAAG AGACCTTG AGTAACGT GTGACACAC GGAACCTAGA TGTATACCGT  
 Flag

### 도면 11b

1301 GATGATACG ACAAUTTAA AGAGAAGGAG CCGTAAACCC CCGATGTCAG TCCCCTTCTT TATCACTGT ATTTCGTT TCISGATGT TGATTTCTTA  
 CATACTGG TTTTAAATT TTCTTCTC CCGGATGGGG GGATAGIC AGGGAAAAGA ATAGAGACA TATAGAAC AGAAVACAA ACAAAGAAT  
 1401 TACAAACAA ATTAACTAA ATTCAAAATT TCGGGTTA TTACGGGC ACCAGAGATC CAGTGTGGG ATCAATGCA TGAAGAAC AGAAVACAA ACAAAGAAT  
 ATGTTTGT TTATGTT TAGTTAA LAGCCAAAT ATGTCCTG TCGTCTCTAG GTCAACCC TAGTACGT ACTCTTGA CGATCCCC  
 EFLP  
 1501 AGGCCTTTC CGCTGCCCTG CGAGCTCTG CGATCCTCC GGTGCGCTC ACTGGCGA GCGCATCG CCCAGACTCC CGGAGAGTT GGGGGAGGG  
 TCCGAACTA CTGGCCACG GATCTCTTC ACGGCCCCC ATTGACCT TTCACTACG CACATGAGG AGGGAAAG AGGTCTCA CCCCCTCC  
 EFLP  
 1701 CGTATATAG TCGAGAGTC GCGTAAAG TCTCTTCTG CAACGGTT GCGCGAAG~ GACAGTGA~ GCTTGAGGG GCTGCACTC GTCCTACG  
 GCTATATTC AGCTCATCG CGGCACTTC AGAGAAAG GTGCCCCAA CGGGCTCTT GTGTCGACTT CGAGCTCC CGAGCTAGA GACAGTGC  
 EFLP  
 1801 CGCCCGCGCG CCTAACCTGAG GCGGCATCC AGCGCGTGT AGTGGCTTCTC CGCCGTTGGT GCGCTCTGAA CTGGCTCCG~ CGTGTAGGA  
 GCGGGCGCG GGATGGACTC CGGGTAGG TCGGCCAAC TCAGGCAAG ACGGGGAGG GCGGACACCA CGGAGACTT GACCGAGGC CGAACATCAT  
 EFLP  
 1901 AGTTTAAGC TCAAGTGAG ACCGGGCTT TGTGCGGCC TCCCTTCTGAA~ CTCGCGGCC TCTTCAGCTT TTGCTGACCGT CTCGTTGCTC  
 TCAATTTCG AGTCCACCTC TGCCCCGAA ACAGGGCGG AGGGACCTC GGATGACTT GAGTGGCCG AGAGGTGCA AACGCTGG GACCAAGAG  
 EFLP  
 2001 AACCTCTAAGT CTITGTGCTG TTTCGTTCTC TCGCGCTTA CAGAATCAG~ CTCGACCG~ CGCCATGCC TAGGCCGCC ACCATCTGCTC TCGCTGTC  
 TTGAGTCA GAAACAAAG AACAGAAC AGAGGCAAT GTCGGGTC GACACTGGC GGGAGGG ATTCGGGG TGGTACAC AGGACACTS  
 CTR SCFV  
 2101 CGASCCTGCT CTGGCGGAGC TCCCACCC GCCTCTCTG CTGATCCCC AGGTCAGCT GCAAGGCTT GGCGCGAGC TGGTGAAGC AGGGCCAGC  
 GHOAGACAG GACACGCTG AGGGGTGG GCGGAAGAC GACTGGGG TCCAGTGA CGTCGTCGA CGGGGCTCG ACCACTTCG TCCCGGTGCG  
 CTR SCFV  
 2201 GTGAGGTT CTGCAAGG CAGGGTAC GCTTACGG AGCTTACGG GCTACTGGT GCACTGGG AGCGAGAC CGGGCAGG CCTGGATGG ATCGGGAGA  
 CACTTGACA GGACGTTGCG GTGCGCGATG TGGAGTGGC CGATACCTA CGTGGCCAC TTGCTCTG GGGGGTGC GGAATCTAC TAGCGCTCT  
 CTR SCFV  
 2301 TCAACCCAG CAACGGCGG ACCAACTAC AGCAGGGTT CAAGGGAG~ GCGTCTGAA CGCAGCTGA CGTGGAGA~ GAGGAGACC ACCGCTCA TGGAGCTG  
 AGTGGGGCT GTTGGGGCC TGGTACGT TCTCTCAA GTTCGTCG GCGAGCTT CTGGGGGG TGGGGAGT AGCAGACAG  
 CTR SCFV  
 2401 CGCCGCTGACG AGCGAGACA CGCCCGCTGA CTTCCTGCGCC AGGGCTACT ACGGACAGC CTACACTC GACTACTGG GCCGAGGCAC CACCTGAC  
 CGCGACTGG TCGCTCTGT CGGGCACAT GAAGACGGG TCCCTGAGA TGCCTGGTC GATGTGAG CTGATGACCC CGGTCCTGG GTGACTGG

## 도면 11c

도면11d

제1부

3501 ~CGAGGGCCT~GTAACAGGC~CIGGCCACCG~CCACCAAGA~TACCTAGAC~GCCCTACA~TGCAGGCC~GCCCAAGG~CTCGAGGG~GCGAGAGG  
 TGCTCCCCGA CATAGCCCC GACAGGTCG GGTGGTCT ATGGATCTG CGGAGGTGT ACGTCCCCG GACCTCCC CGCTCTCCC  
 T2A  
 3601 ~CAGGAACT~CTTGTACAT~GGCGTGAATT~GGGGAAAT~CCGGCCTA~GGATGGTCT~CCTGGGACA~AGCCTCTGC~TCGAGTT~ACCACACCA  
 GTCTCTCTCA GAAGATGTA CGCCACTGCA CCTCTCTIA GGGCGGAT CCTACAGA GGACACTGT TCGAGAGC AGACACTCA TGGTGTT  
 EGFR  
 3701 ~GATTCCTCC~TGACCCAGC~CAAGTGT~AAGGAATAG~GTTGAGTGA~ATTAAAGAC~TCACCTCCA~TAATGCTAC~GAAATCAA~CACTCAA  
 GTAGGAGG ACTAGGGTC GFTCACACA TGGCTHATIC CATACTACT TAATPTCTG AGTGAGGT ATTACATG CTATAAATT GTGAGGTT  
 EGFR  
 3801 ~ACTSGACCT~CATAGTGG~GATTCGAGA~TCTGGGGT~GGCATTTAG~GTTGATCT~TCAGACAT~TCCCTCTG~GATCCACAGG~AACGGATAT  
 TGACGTGGAG GTACTCACCG CTAGAGGTT AGGACGCC CGTAGTCC CCACTAGGA AGTGTGAT AGGAGGAGC CTAGGTGTC TGACCTATA  
 EGFR  
 3901 ~CTGAAAC~GTAAGGAA~TACAGGTT~TTCGTTGT~GAGGTGTC~CTGAAACAG~GAGGAGCT~CATGGCTT~AGAACTAA~ATACATACGC  
 AGACITTTGG CATTCTTT AGTTCCTCA AACGACAA GTGGACCC GACTTTGTC CTGGCTGGAG GTACGGAAAC TTCTGGATCT TATATGCC  
 EGFR  
 4001 ~GGCGGACCA~AGCACATGG~TCGTGTTCT~CTGGAGTC~TCAAGCTGA~CATAAATCC~TGGGATTC~GCTCTCTCA~GGAGTAATG~GATGAGATG  
 CGCTCTGGT TCGTGTACG AGCCTAACGA GAGCTGCC AGTGGGACTT GTCCTCTAC EGFR  
 4101 ~TGGATATTIC~AGGAACAA~AATTTGCT~ATGCAATAC~ATAAATGG~AAAAGCT~TGGGACTCT~GGTGGAA~ACCAATA~TAAGACAG  
 ACTATTAAG TCCTTGTCT TAAACACCA TAGTTTATG TTATGACCC TTTTGACA ACCCTGGAG CGCAGCTT TGTTTAAT ATTCGTGTC  
 EGFR  
 4201 ~AGGGAAAC~AGCCTGCAAG~CCGAGGCC~GGTGTGCA~GCTGTGCT~CCTGGCTC~GGTGGAA~ACCAATA~TAAGACAG  
 TCCACTTGT TCGAGTCTC GGTCGGGT CGAGCTGA CGGACAGGA GGGGGTCC GACGACCC CGCTGGGT CCTGACGCC GAGACGGCC  
 EGFR  
 4301 ~ATGTCACCC~GAGCAGGA~ATCGTGCAC~TCTGGGG~TGACCAAGG~GAGTGTG~AGAATCTGA~GTGATACAG~TCCACCCAG  
 TTACAGTCGG CTGGTCTCT TAGCCTCTG TTACAGTGG AGAACCTCC ACTCGGTCC CTCACAGCC TCTGTGACT CGAGTGTG  
 EGFR  
 4401 ~AGTGCCTGCC~TCAGGCCATG~AGATCACT~GGACAGGG~GGGACCCAG~AACTGATCC~AGTGCTCC~CTACATGAC~GGCCCAACT~GGGCAAGAC  
 TCAGGACGG AGTCGGTAC TGGTGTGGA CGTGCTCC CGCTGGCTG TTGACATAGG TCACTGGGT GATGAACTG CGGGGGTGA CGCAGTCTG  
 EGFR  
 4501 ~CTGGCGGCA~GGAGCTACCG~GAGAAACA~CACCTGTC~TGGAGTACG~CAGACCCGG~CCATGTGTC~CACCTGTCC~ATCCAACTG~CACCTACGA  
 GACGGGCCGT CCTCACTTACG CTCTTGTG TGGGACAG ACCTTGTC GCTGGGGCC GTGACACAG GTGACACGG TAGTTGAC GTGAGGCT  
 EGFR

## 도면11e

4601 TGACTTGGC~ CGGTCTGCA AGGCGTCGA AGGAAGGGC CTAAGTCGC  
 ACGTACCCG GTCCAGACI TCCGACAGT TGCTACCCG GATCTAGG CAGGAGCGG TGACCTTAC ACCCGGGGA GAGAACGAC  
 4701 CCTCTGGGAT CGCCCTCTC ATGTGACCC CGCTCTAGA CCCGGCTCC AGGAATCGA TATGAACTT ATCGATAATC AACCTCTGCA TTACAANT  
 GGACACCCTA GCGGAGAGA TACACTGCC GGCAGACI CT GGGCGACG TCCTAAGCT ATAGTGAA TAGTATTAG TTSAGACCT AATGTTAA  
 4801 TGGAAACAT TAECTGGTAT TCTTAATCT GTGGCTCT TACGTATG TGGATAGCT GCTTAATGC CTTCATAC TGGATATGCT TCCGATAGG  
 AACTTCTCA ACTGACCAT AAGATGATA CAACGAGGA AATGCCATAC ACCTATGCC CGAAATTAGG GAAACATAGT ACGATAACG AGGGATACCC  
 4901 CGTCATTTT~ CGCTCTCTG~ TTAATCT~ GTTGATGCT~ TCTTCTG~ GAGTGTGG~ CGGTGTCG~ GCAAGGGC~ GTGGTGTGA~ CTCGTTGCG  
 GAAAGTAAA GAGGAGAAC ATATTTAGGA CCAACGACAG AGAAATACCT CTCACACCG GGCACAGTC CGTTCACCG CACACACGT GACACAACG  
 5001 TGACGCACCC~ CCCACTGT~ GGGCATGTC~ CACCACTGT~ CAGCTCTT~ CGGGACTTT~ CGCTTTCCT~ CTCTCTATG~ CACGGGCGA~ ACICATGCC  
 ACTGGGTGGS GGGTACCA CCCCCTACG GTGGTGTCA GTCAACGAGAA GGCCTGAA GCGAAGGGG GAGGATAC GTGCCCCCT TTAGTAGCGG  
 5101 GCGTGCCTG~ CGCGCTGCT~ GACAGGGCT CGGCCTTGG GCACGACAA TCCCTGGT~ TGGGGGA~ AACATGTC~ CTTCCTTG~ CTGCTCGCT  
 CGACGGAC GGGCGACG CTCGCCCCGA GCGACACCC CGTGTACCTT AAGGACAC AACGCCCT TTAGTAGCG GAAGGAACC GAGGAGCGA  
 5201 GGTGTCGAC~ CTGGATCTG CGGGGGGGT CCTTCCTCA CGTCCTTGG~ GGCCTAATC GAGGGACCT~ TCCTCCCG~ GGCCTCTGC~ CGCTCTGG  
 CACAACTGGT GACCTAAGAC GGCCTCTCA GGAAGGAGT GCAGGAAGC CGGGATG TAG GTGGCTGGA AGGAGGGC CCGACGAGC GCGAGAGC  
 5301 GCTCTCTCG~ CGCTCTGGC~ TTGCCCCCA~ GAGAGCTGG ATCTCCCTT~ GGGGCTCT~ CCCGATCGA~ TACGTGCGAC TAGCGTACCT TTAGACCA  
 CGAGAGGC CGAGAAGGGT CTCCTCACG TAGAGGAA CCCGGGGAG GGGCTAGCT ATGGAGCTG ATGGAGCTG AAATCTGT  
 del U3 ~~~~~  
 5401 ATGACTTACA AGGCAGCTGT AGATCTAG CACTTTAA AGAAAGGG GGGAAATC ACICCAAG AGACAGAT CGCTTCTA GACGAAAC  
 TACTGAATGT TCGTGCACA TCTAGATCG GTGAATAAT TTCTTCTCC CCCTACCTT CCCGATTAAG TGGGGTTC TCTCTCTA GACGAAAC  
 R ~~~~~ 05  
 5501 CGTGTACTGG~ GCTCTCTGG~ TTGACAGGA TCTGAGCTG GGAGCTCT~ GGCTTAATCT~ GCTTAAGCT CAAATAAGCT TGCTTGACT  
 GGACATGACCGAGAGACCA AATCTGCTCT AGACIGGAC CCTCGAGAGA CGGATGACI CCTTGGTGA CGAAATCGGA GTTATTGGA ACCGACACCA  
 05  
 5601 GCTCTCAAGA~ GGGTGTGCC~ GTCGTTGTTG~ TGACTCTGG~ AACCTAGAT~ CCTCTAGAC~ CGTCTAGAC~ GTGGGAA~ TCTCTAGAC~ AACGATGAA  
 CGAGTCTAT CACACAGGG CAGACACAC ACTGAGACCA TTGATCTA GGAGTCTGG GAAATCAGT CACACCTT AGAGATCGTC TTAGCTATA

## 도면 11f

## 도면 11g

Amp<sup>r</sup>

7201 GGTATATTGCT~GATAAATG~GAGCCGCTGA~GGGTGGCTCT~CGGGENATCA~TGGCGACT~GGGCCAGAT~GGTAAGCCCT~CGGTATCT~AGTTATCAG  
 CAATAACGA CTTTACAGC CTGGCCACT CGCACCTAGA GGCCTATAGT AACGUGTGAA CCCGGCTCTA CCANTCGGA GGGCATAGCA TCAATAGAT

7301 AGGACGGGA~GCGAGGAC~TATGGTGA~CGAATAGAC~AGATGGCTGA~GATGGTGC~TCATGATTA AGGATGGTA ACIGTCASC CGATTTACT  
 TGCAGGCCCT CAGTCGGT ATACCTACCT GCITACCTG TCTAGGACT CTATCACAG AGTCACAT ICSTACAT TAGAGCTG GTCTAACATGA

7401 CATATATCTC ITAGATGAT TAAAACTC ATTPTTATT TAAGGATC~TAGGGAGA~TCCATTGTA TATTCCTA~ACCAAACTC~CTAACCGGA  
 GATATATGA AACTAATC AATTGAG TAAATTA ATTCTCTAG ATCCACTCT AGGAAACT ATTAGAGTC TGGTTTACG GAATGCACT  
 COEL Ori

7501 GTTTCGTC~CACTGAGC~GAGCCCGT~AGAAGATC~KAGGTCTT~CTGGAGTC~TTCCTCTG~CGGTAACT~GCGCTGGA~AGCAAA  
 GAAAGCAG GTCACCTCA GTCGGGCA TCTTCTCTAG TTCTCTAG AAACATAGA GACCTAG AAACAGAC GCGCTTACA GCGACACT TTCTTCTT  
 COEL Ori

7601 CGACCGCTAC~CAGGGGGT~TGTGCG~GATCAGGC~TACACTCT~TTTCGAG~GTAAGCT~TCACTAGG~GAGATACCA~AAATCCTG  
 GGTGGCGATG GTUCCACCA AACAACGGC CTAGTCCTG ATGGCTGA AAAGCCTC CATGACCGA AGTCCTGCTG CTCTATGG TTATGACAG

7701 TTCTAGCTA~GCGTACAT~CGCGTAAAT CGCGTCTGCA ACTCTCTG ACATGGCC GGATCTATGG AGCGAGCA TGGACAT GTCCTTCTT  
 AACGATCACAT CGCGTAAAT CGCGTCTGCA ACTCTCTG ACATGGCC GGATCTATGG AGCGAGCA TGGACAT GTCCTTCTT  
 COEL Ori

7801 CGATAAGCG~TGCTTACG~GGTGGCTC~AAGACCTAG~TACCGATA~AGGCCAGG~GTCCGGCTGA~ACGGGGGT~CGTCACCA~GCCAGCTG  
 GGTGGCTGAC ACAGAATGGC CCACCTGAG TCTGCTAC ATACCTAT TCCGGCTGC CAGCGACT TGCCCCCA GACGCTGTC  
 COEL Ori

7901 GGGGAAGGA~CCTACACCGA~ACTGAGATC~CTACAGCTG~ACTTCTGAG~AACCCACG~CTTCGGAG~GGGAAGGC~GCGAGGT~CGGTAAGG  
 CTGGCTGCT GTATGTCGCT TGACTCTAT GATGTGCGAC TGATACCT TTGGGGTGC GAAGGCTC CCTCTTCG CGTCTCA TA GGCATTCGC

8001 GAGGGCTGG~AACAGGGAG~CGCACAGGG~ACCTTCTAGG~GGGAAGGC~TGGTACCTT~ATACCTCTG~CGGTTTCG~CACCTCTAC~TTCAGCTG  
 CGTCTGAGCC TTGCTCTC GGTGCTCC TGGAGCTC CGCTGG ACCATAGAA TATAGGACA GCGAAGGC GTGGAGCTG AACTCGGAC  
 COEL Ori

8101 ATTTTGTGA~TCTTCGCA~GGGGGGGGAG~CCTATGAA~AACGCCAGCA~ACGCCGCTT~TTCAGGTT~CTGCTCTT~GCGGCTT~TGCCTACCTG  
 TAATACACT AGGAGCTC CCCGCCCTC GGATACCTT TTGGCTGT TGCGGGAA AATGCCAG GACGGAAA GACGGAAA AGGAGTGA  
 COEL Ori

8201 TTCTTCTC~GGTATGCC~TGTTCGCT~GATTCGCT~GATTCGCT~TACGCC~TACGCC~TACGCC~TACGCC~TACGCC~TACGCC  
 AGGAAGGAC GCAATAGGG ACTAAGACAC CTATGGCT ATGGGAA ACTCTCTGA CTATGGCAG CGCGTCGGC TTCTGGCTC GCGTCGCTCA  
 COEL Ori

8301 CACTGAGGA~GAAAGCGGA~GAGCGCCA TACGCAAC GCCTCTCCC GCGCTGGC CGATCTATTA ATGAGCTGG CAGCACAGT TTCTGGCTG  
 GTCAGCTGCT CTTCGGCTT ATGGCTTG CGGAGGGG CGCGAACCG GCTAGTAAT TAGTCGACC GTCGCTGCA AAGGCTGAC

8401 GAAAGCAGC AGTGGGCA ACCGAAUTAA TGAGCTGTAG CTCACTACATT AGGCCTCCA GGCCTTACAC TTCTGCTGCTG CGCTGCTG  
 CTTCGGGG TCACTCGGT TCGTTAATT ACACCTAC GAGTGAGTA TCCGGGGT CGGAATGTG AATACGAAG CGCGGACATA CAACACCT

## 도면11h

8501 ATTTGTGAGCG GATAACATT TCACACAGGA AACACCTAT ACCATGATA CGCCAAAGTC GAAATTACC CTTACTAAG GAAACAAG CTGGAGCTCC  
 TAACACTTCGC CTATGTTAA AGTGCTCTCT TTGICGATAC TGGTACTAAT GCGCTCGAG CTTAATGG GAGGATTC CCTTGTTTC GACCTGGAG  
 SV40

8601 ACCCGCGCTGG CGGCCUTGAG GTGCGATTC GGTGACCCAG CAACCATAGT~ CCCGCCCA~ ACCTGCCA~ TCCGCCCT~ ATTCGCC~ ATTCGCC~  
 TGGCGGCACC GCGGAGCTC CAGCTCTAGG CCASOTGTC GTTGATCA GGCGGGGT TEAGGGGGT AGGGGGGA TTGAGGGGG TCAAGGGGG

8701 ~ATTCGCC~ CCATGGCTA CTAAATTIT~ TTATATGC AGAGCCGAG GCCGCTGG CCCTGAGT~ ATTCAGAG TTGTGAGGAG GCGTTTIGG  
 TAAGAGCGG GGTACCGACT GATTAATAA AATAATAG TCTCGGGTC CGGGAGGC GGAGACTGA TAGGTCCTC ATCACCTTC CGAAAACC  
 SV40

8801 ~AGGCC~AGGC~ TTTCGAAA AGCTTGAGC GTAGGATG~ GCCTAGTC~ AAGATAGG~ CCATGAGC~ ATGATATT~ GACTAGTAT~ TAATGAT~  
 TUCGGGATCCG AAACGTT TCGAAGCTGC CATACTAAC CGACTACAG TGTATGGC GTIACACTG TACTAATA CTGATCATA AATACATTA  
 CMV

8901 ~CAATTAGGG~ GTCAATTAGT~ CATACCCCAT~ ATAGGAGT~ CCCTGGTACA~ TAATTAAGG~ TAATGGCC~ GCGGGTGA~ CGGCCAACG~ ACCCGGGCC  
 GTTAATGCC CAGTAACTAA GTATGGGIA TATACCTAA GGCGCAATG ATTAAATGCC ATTACCGG CGAACCGACT GGGGGTIGC TGGGGGGGG  
 CMV

9001 ~ATGGAGTC~ ATAATGAGCT~ ATGTTCCCAT~ ATGTTACCA~ ATAGGGACT~ TCAATGGGT~ TATCCGAA AGTAACTGC AGTAACTCC CGACTGGCA  
 TAATGCGAGI TATATTGCA TACAGGGIA TCAATGGGT TATCCGAA AGTAACTGC AGTAACTCC CGACTGGCA  
 OMV

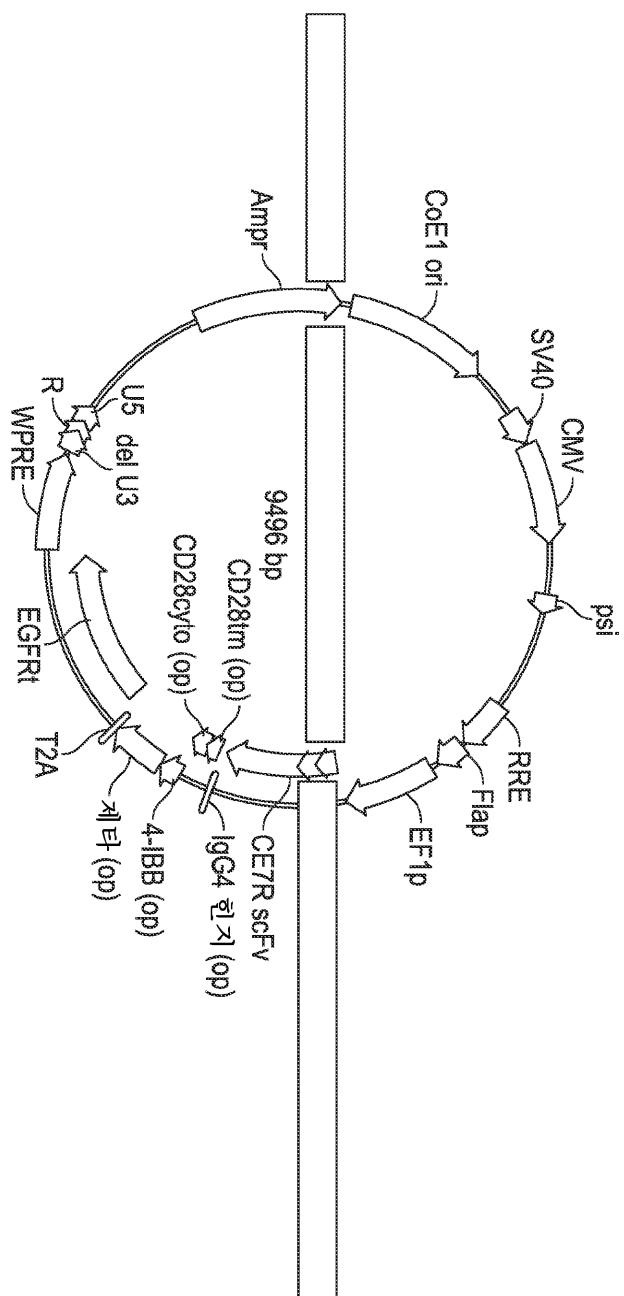
9101 ~GAGACATCAAG~ TGATCAAT~ GCGCAAGTACG~ CCCTCTATG~ AGCAGATGA~ CGGTAAATGG~ CGGGCTGGC~ ATTAATGCC~ GAGATGAC~ TTATGGACT~  
 CATGAGTIC ACTAGTATA CGGTATAC TGGTACTI GCAATTAC GGGGACCC TATACGGG TATACGGG CTTGATCTG AGTACCTGA  
 CMV

9201 ~TCCCTACTG~ GCAGTCATC~ TACGATTAAG~ TCAATGGTAT~ TACGATGGT~ ATGGGTTT~ GGGAGTAT~ CTTGGGGT~ GGAATGGG~ TTGACTCAG  
 AGGAGTACAC CGTCATGAG ATGCATATIC AGTACGGATA ATGGGACAC TACCCCAA CGCTCAIGTA GTIACCCCA CCTATGCCA AACTGAGTC  
 CMV

9301 ~GGGATTC~ AGCTCTCAC~ CCATGAGCT~ CAATGGAGT~ TGTGTTGGC~ ACCAAATCA~ AGGGACTT~ CCAAAATG~ GAAACATC~ GCGCCATG  
 CCTAAAGGT TCAGGGTGC GGTAACTGCA GTIACCCCA AACAAACCG TGGTTTGTG TGCCCTGAA GTTITACAG CTTGTTGAG GGGGGTAC  
 CMV

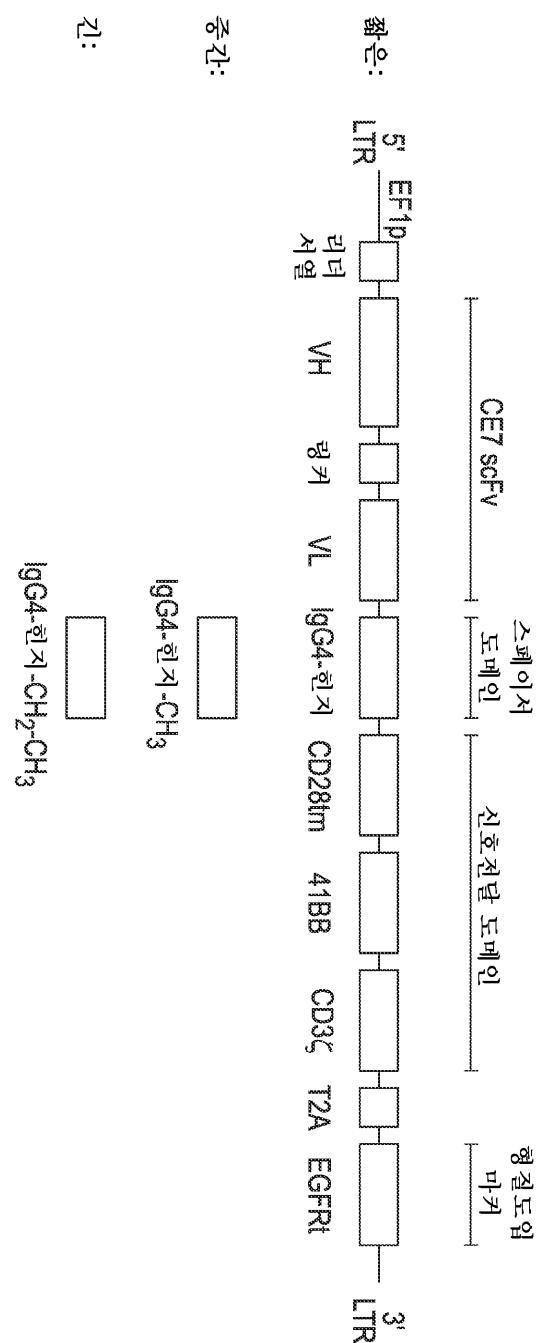
9401 ~GGGATTC~ GGATGGAG~ TGGAGTGC GACCCTAG ACCTGATA TACAGCTG CTTTTGCCT GTAATGGTC TCTCTG  
 TCGTTTACG CGCCATCCGC ACATCCCTA AGCCCTACCG CTGGGAGTC TAGGAGCTAT ATTCGTCGAC GAAAAACGGA CATGACCCG AGAGAC

도면12



CE7scFv-IgG4 헌자-CD28tm/cyto-4-1BB-제티-T2A-EGFRte (9496 bp)

## 도면 13a



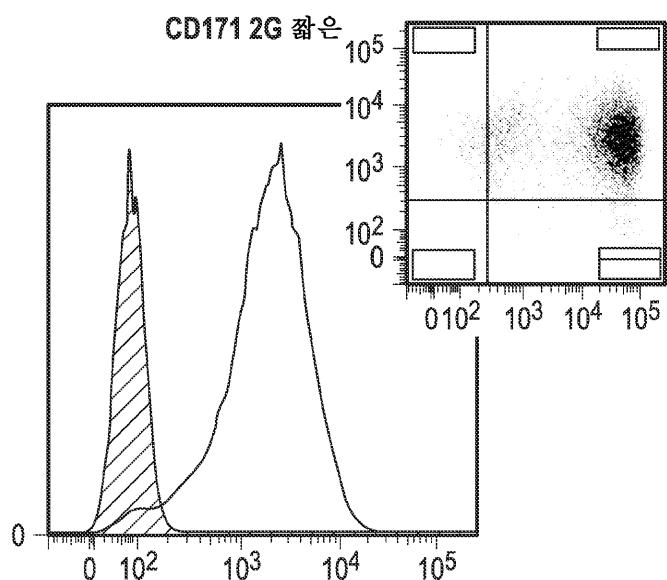
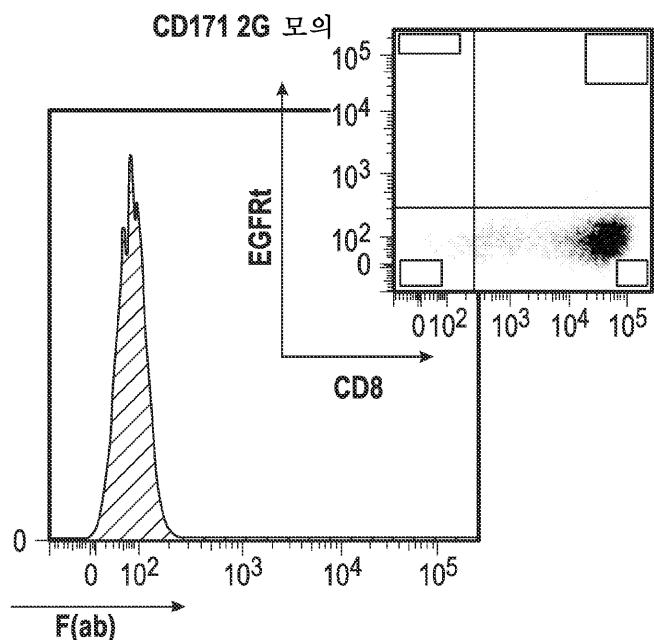
중간:

IgG4-흰자

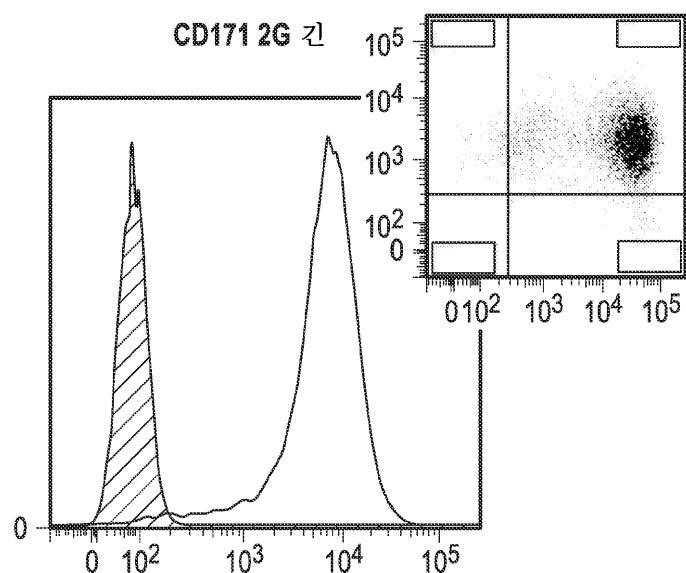
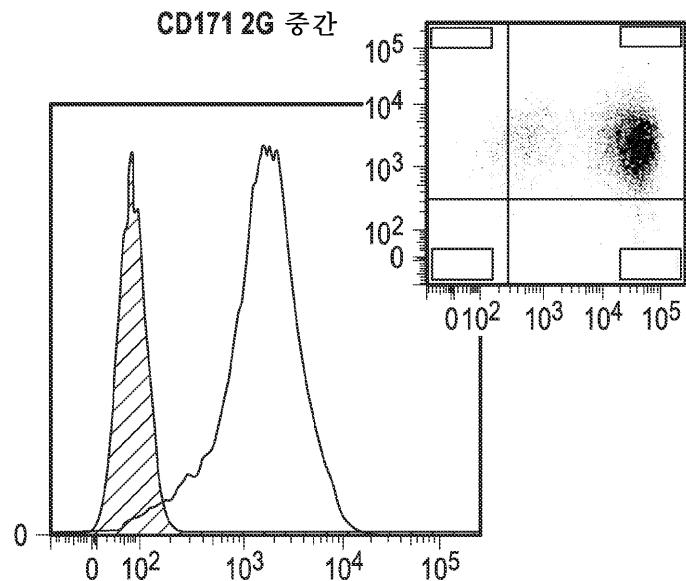
긴:

IgG4-흰자-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>

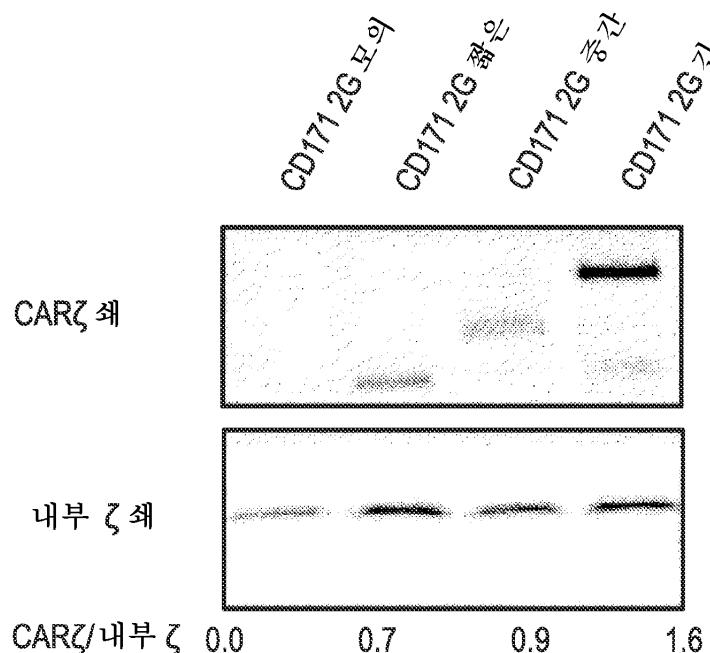
## 도면 13ba



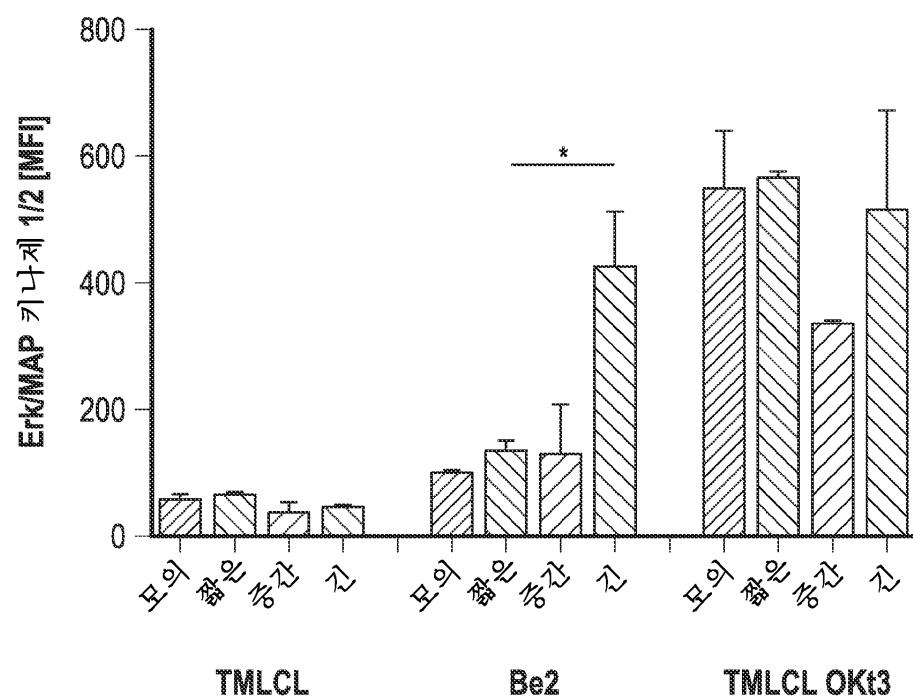
도면 13bb



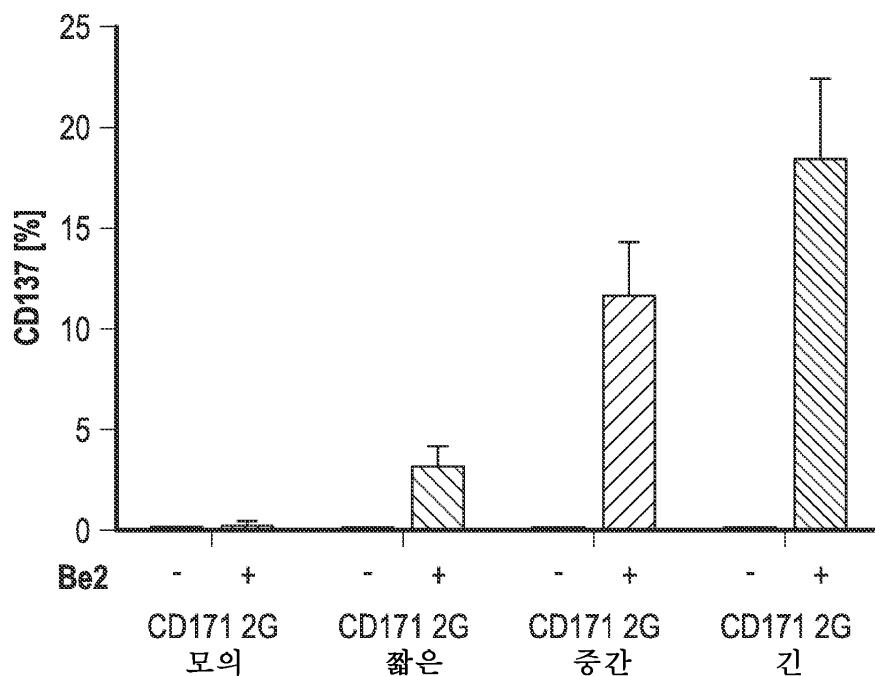
도면 13c



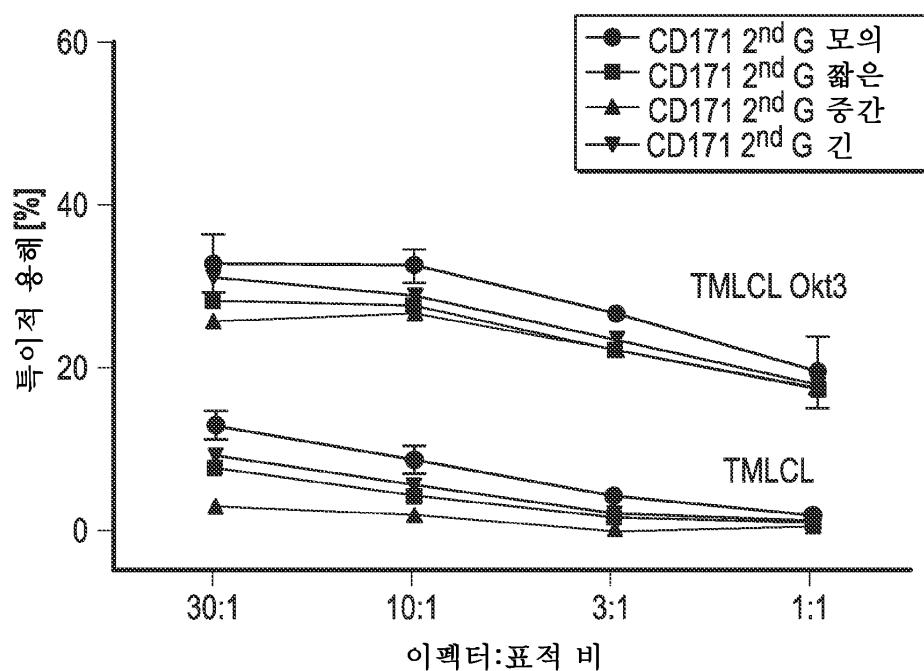
도면 13d



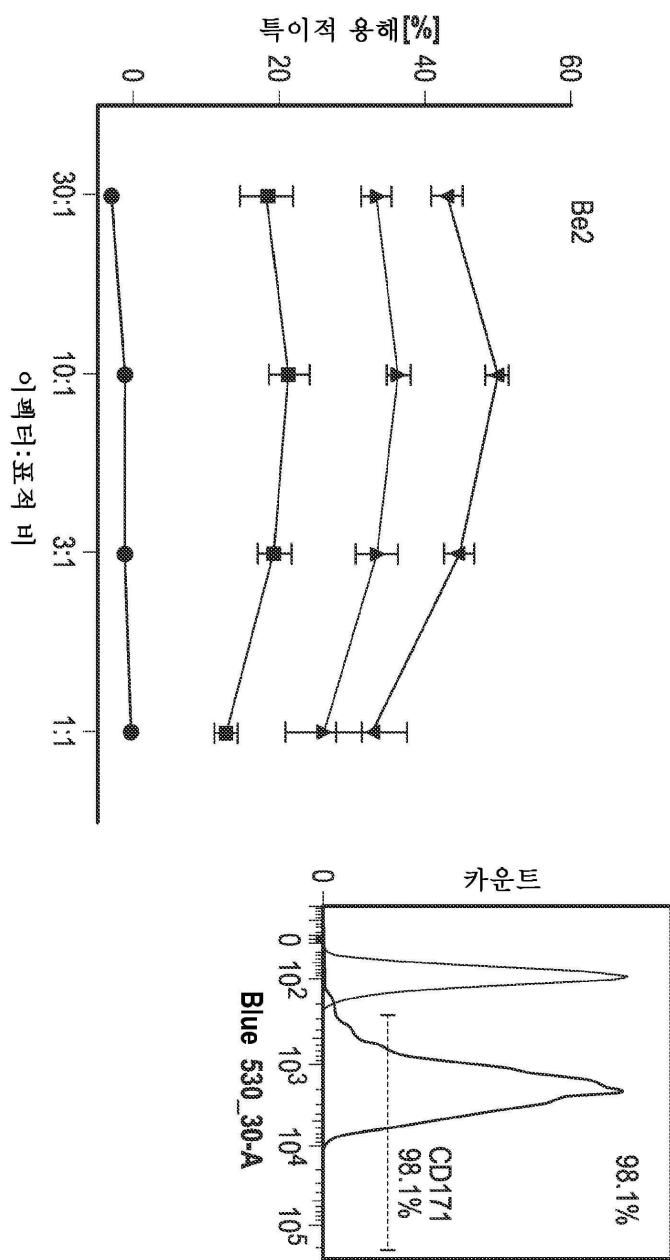
도면 13e



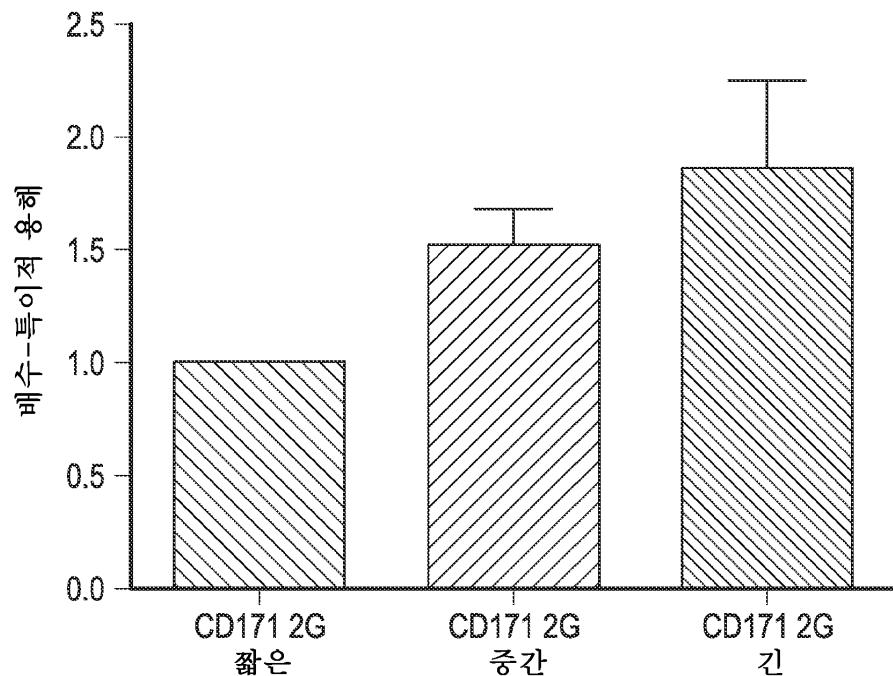
도면 13fa



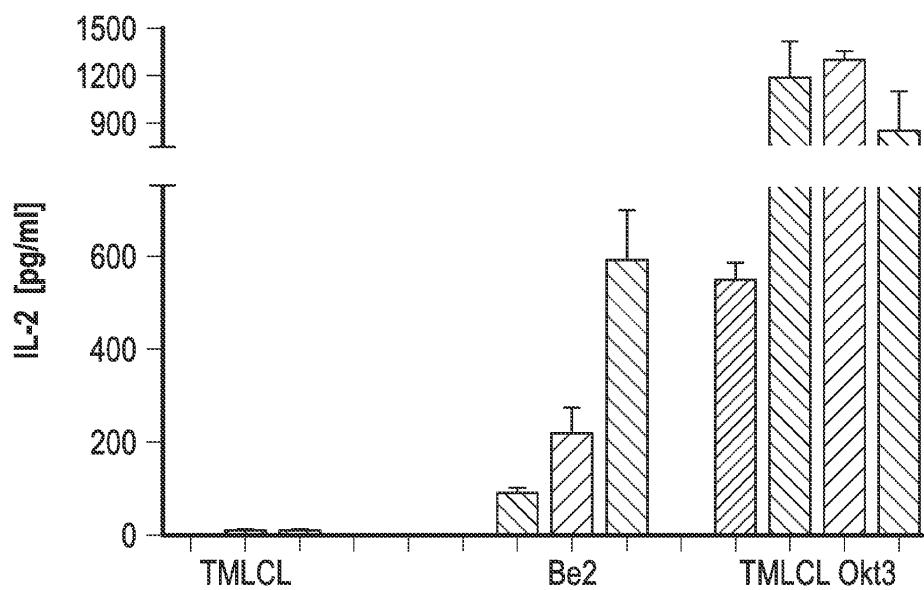
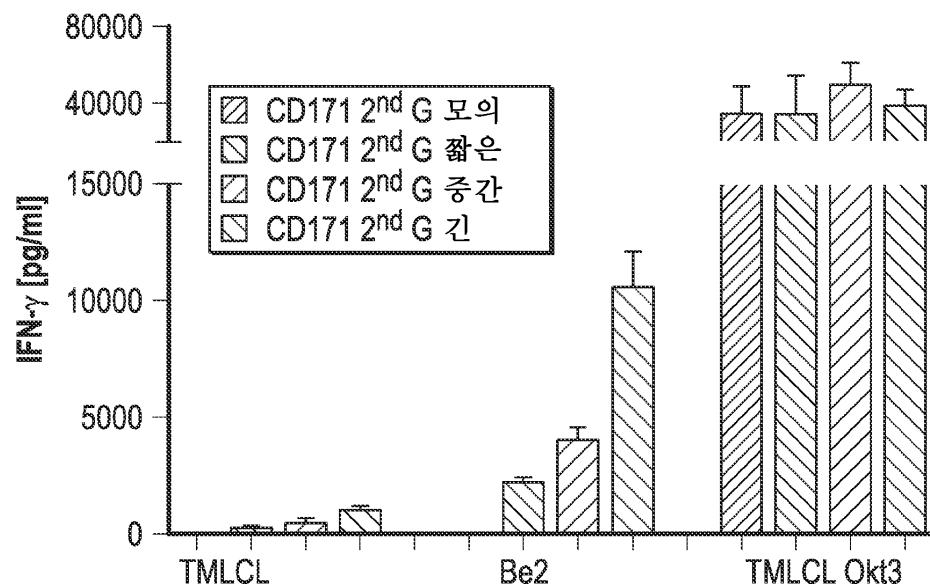
도면 13fb



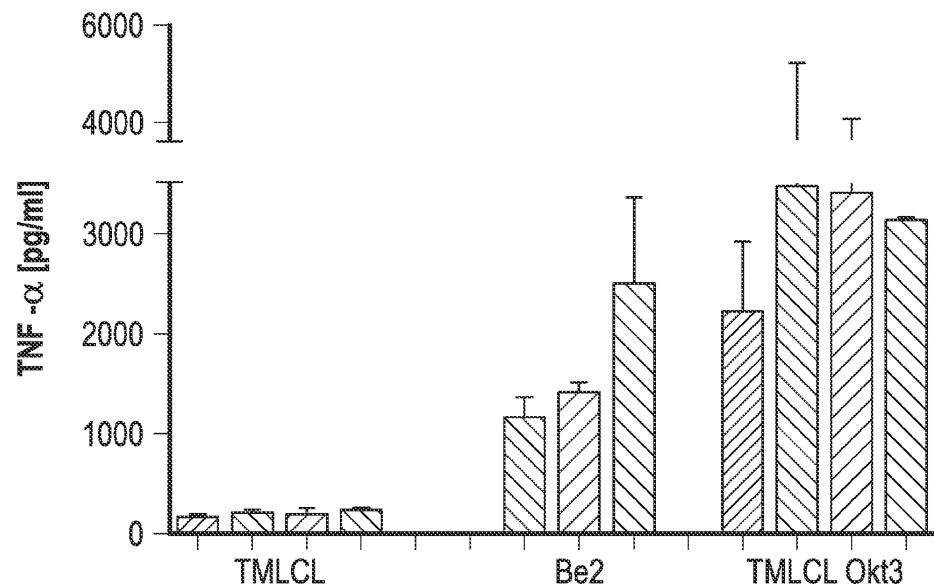
## 도면 13fc



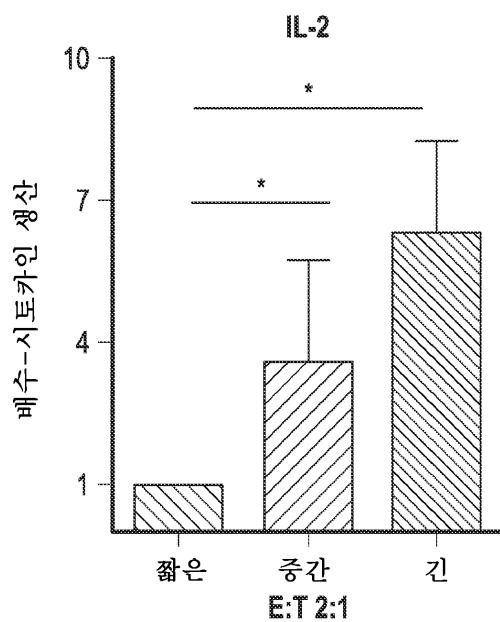
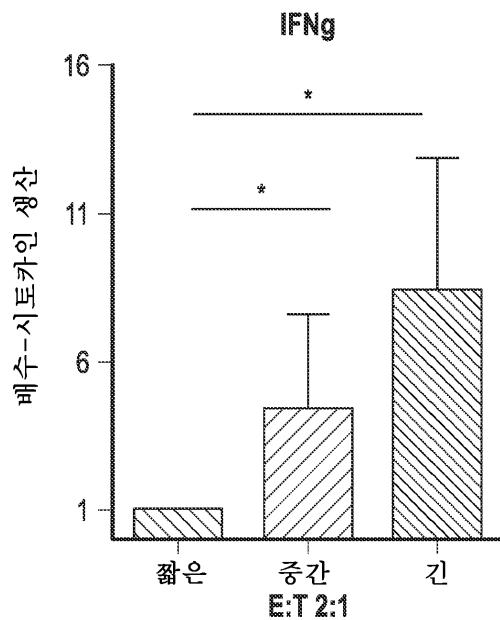
## 도면 13ga



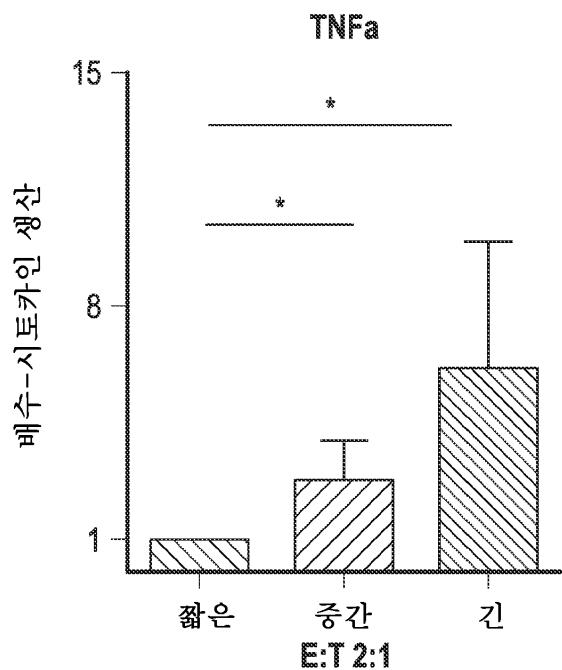
도면 13gb



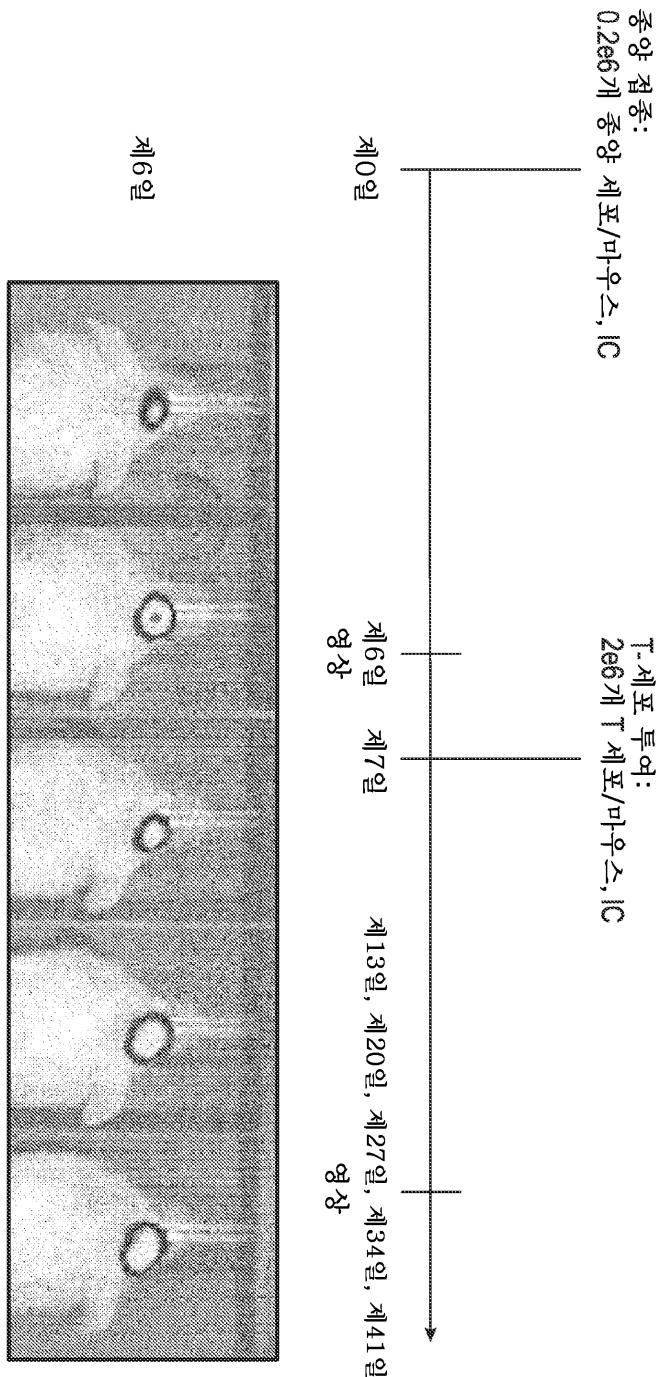
## 도면 13ha



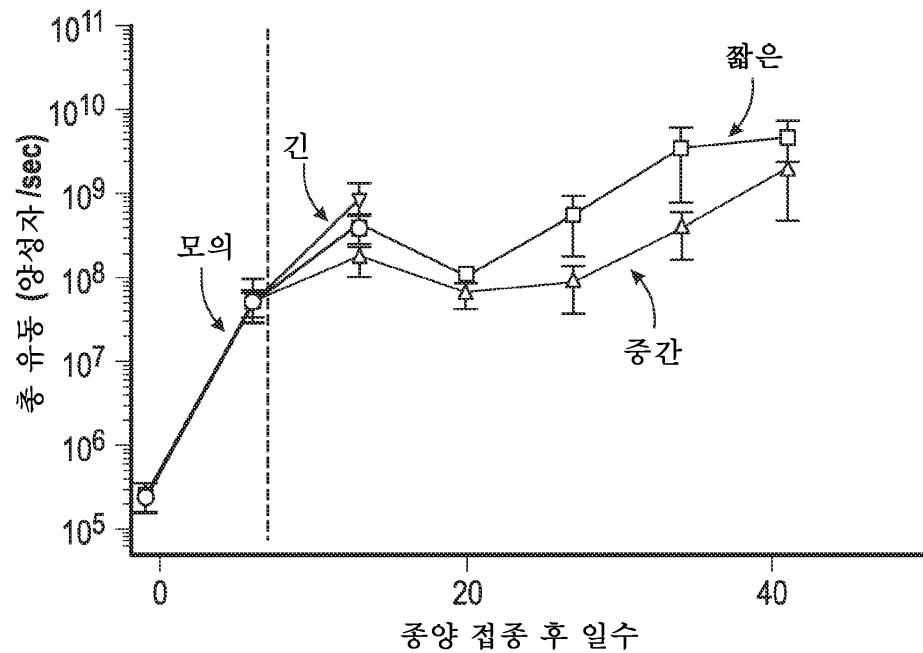
## 도면 13hb



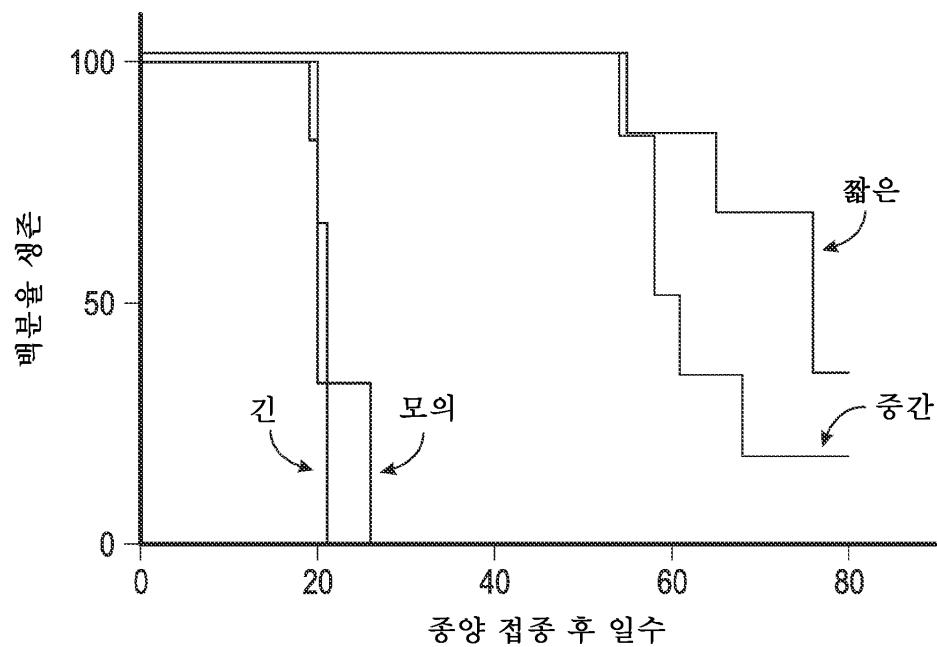
도면 14a



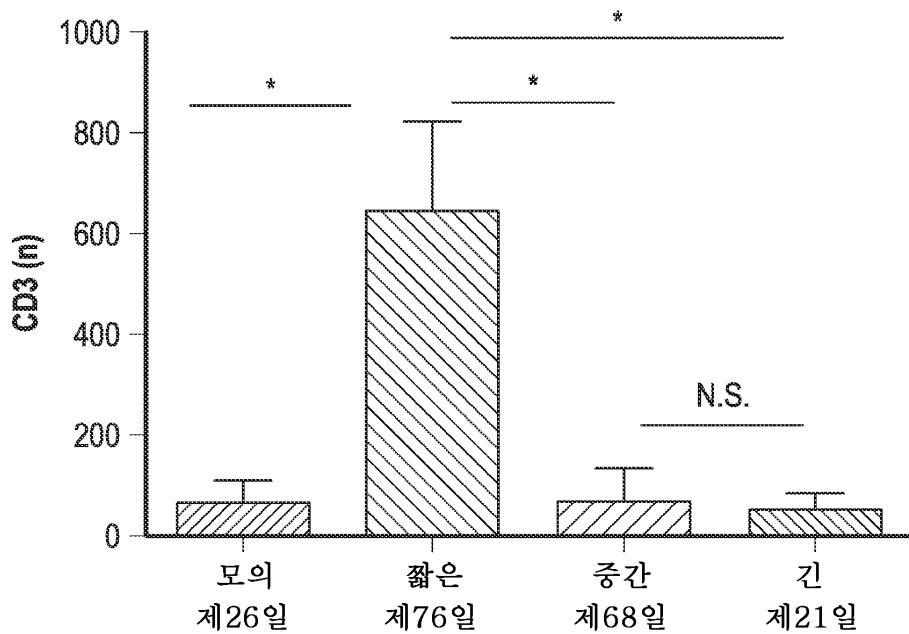
도면 14b



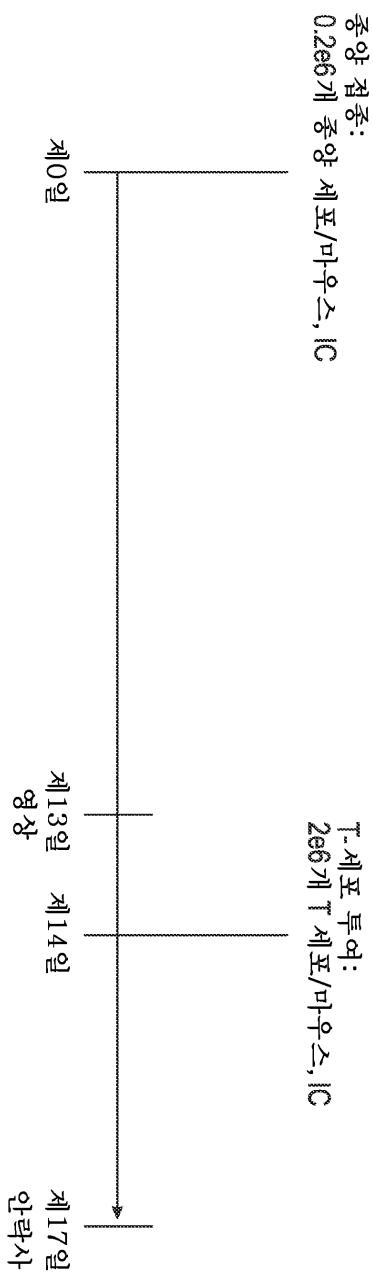
도면 14c



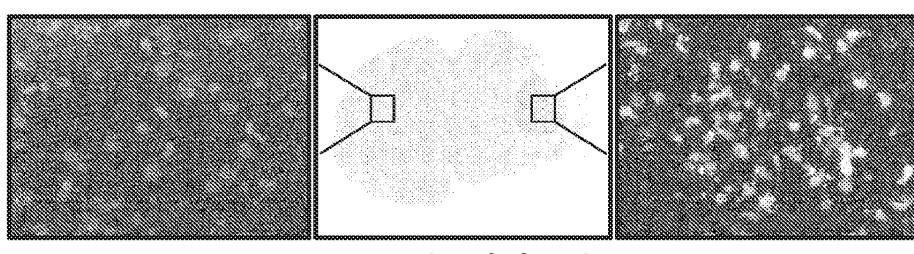
도면 14d



도면 14e

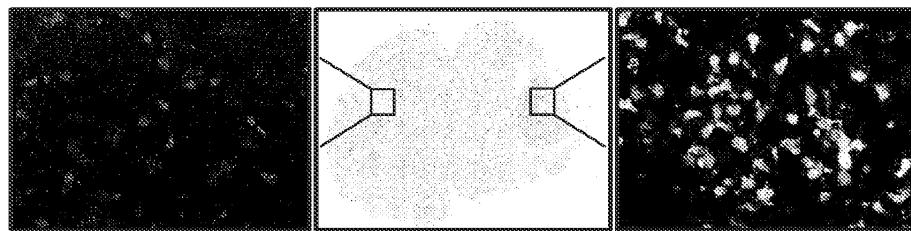


도면 14fa



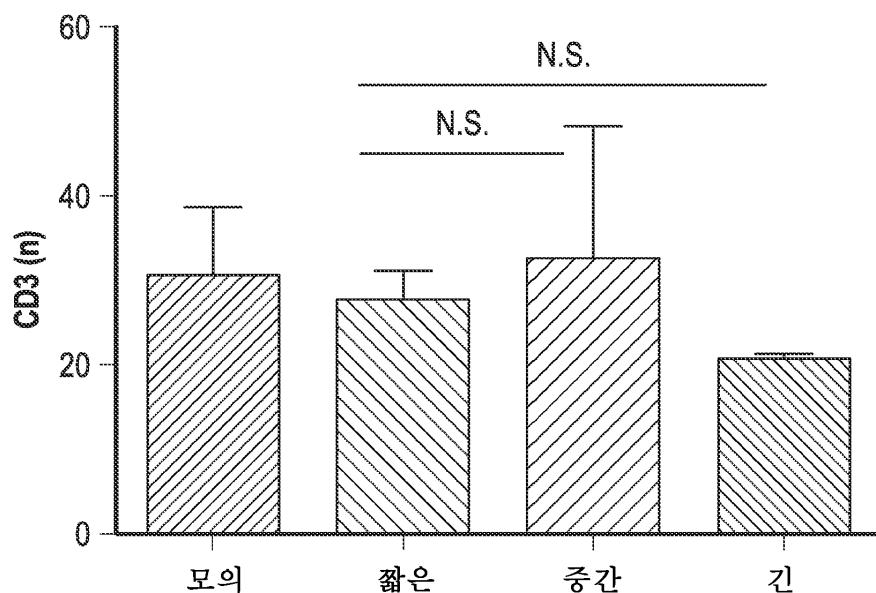
CD3, Ki67, 카스파제 3, 퀘스트

## 도면 14fb

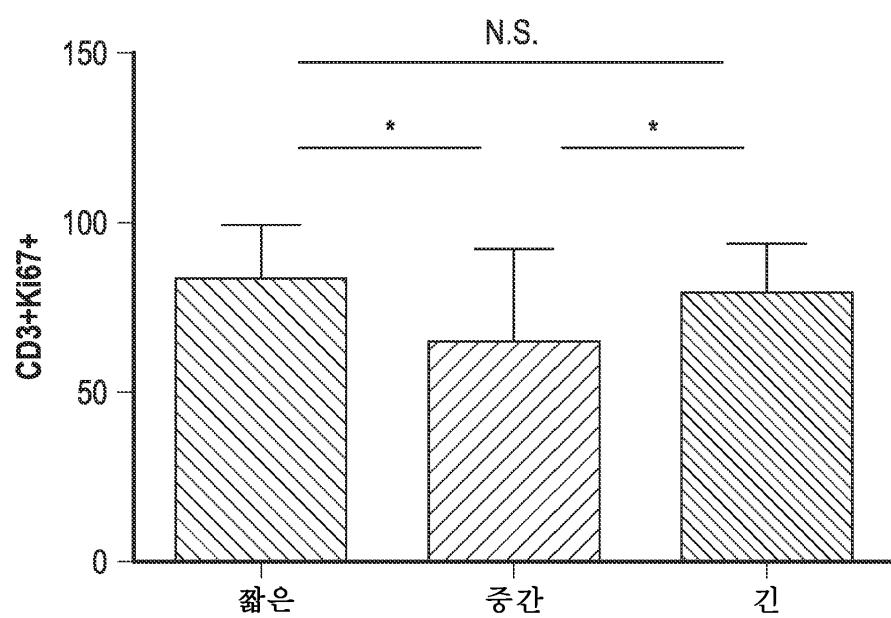
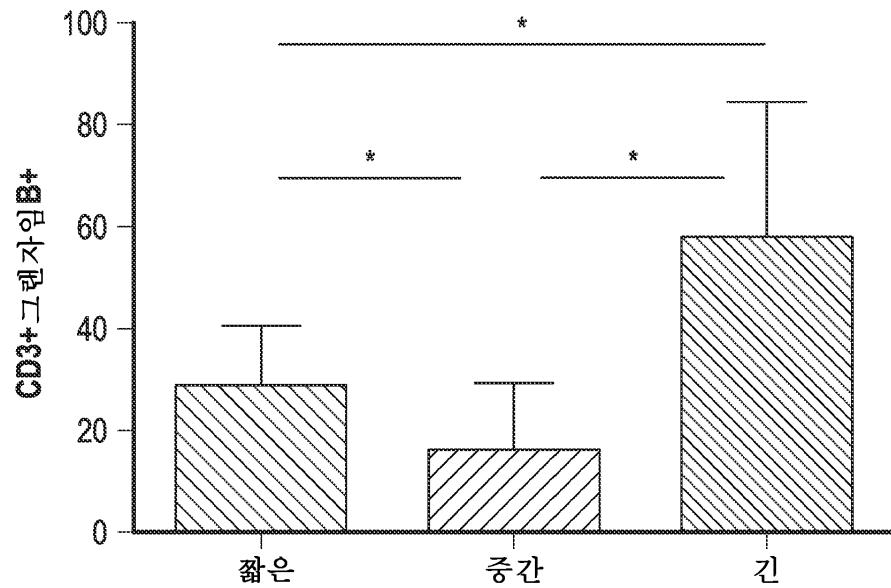


Cd3, Ki67, 카스파제 3, 퀘스트

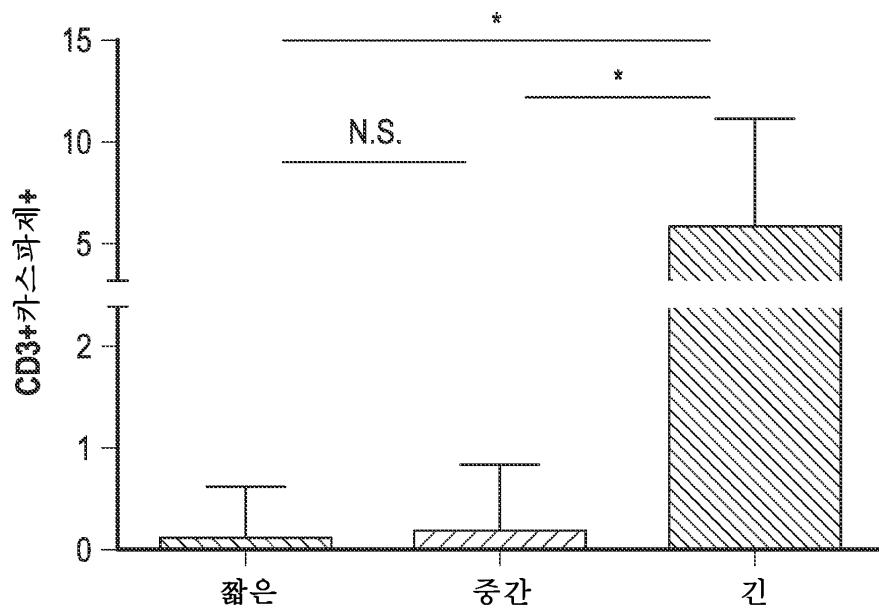
## 도면 14g



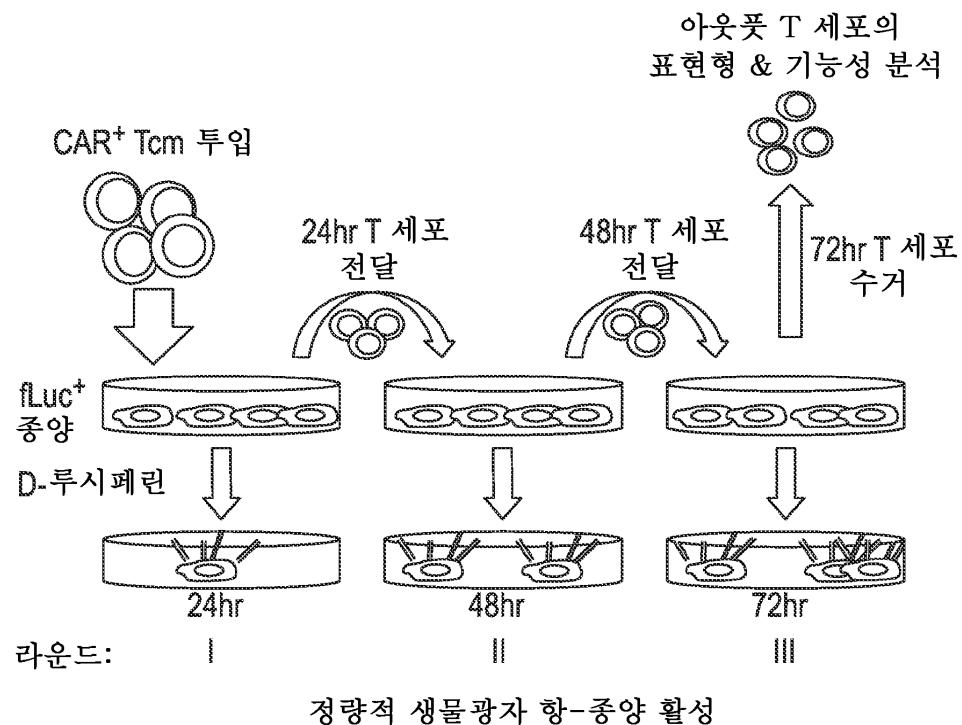
## 도면 14ha



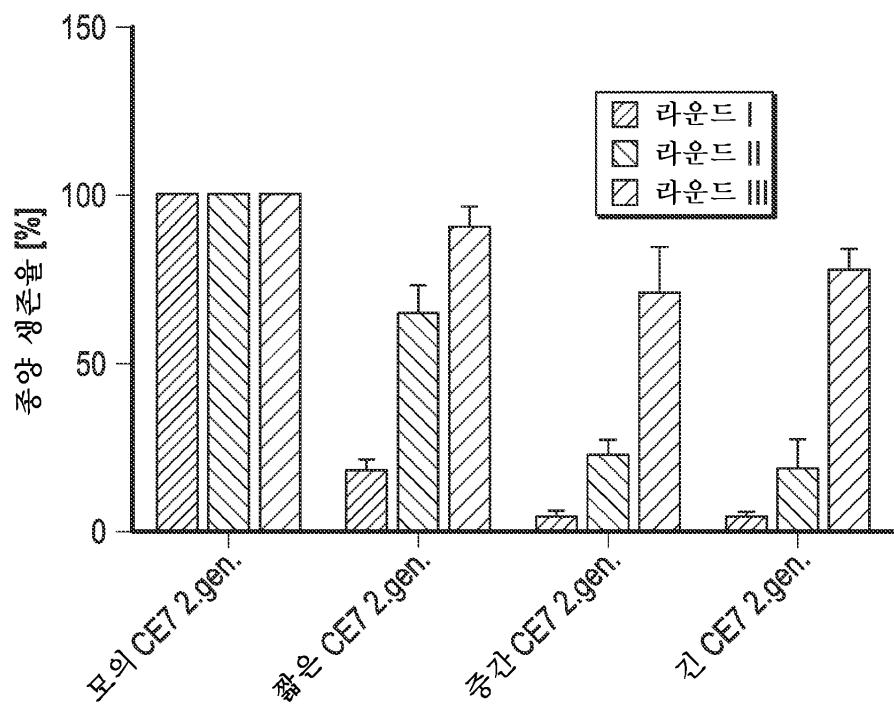
도면 14hb



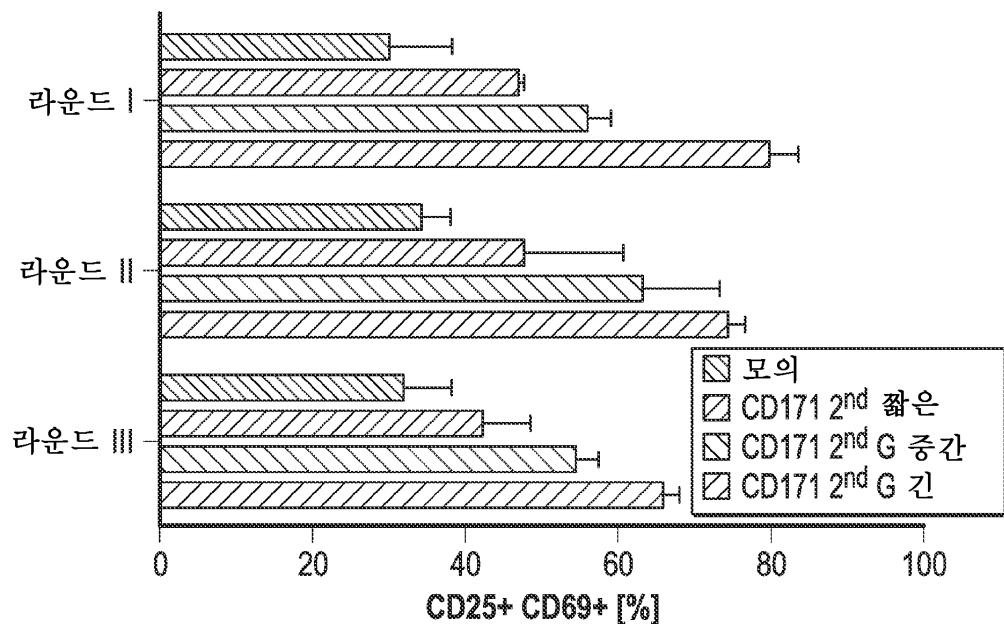
도면 15a



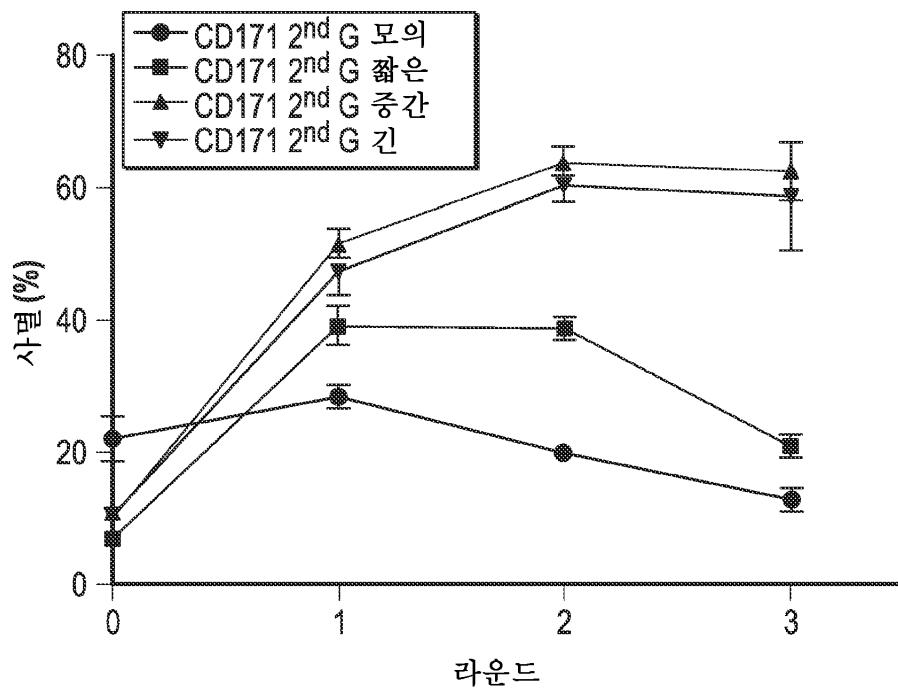
도면 15b



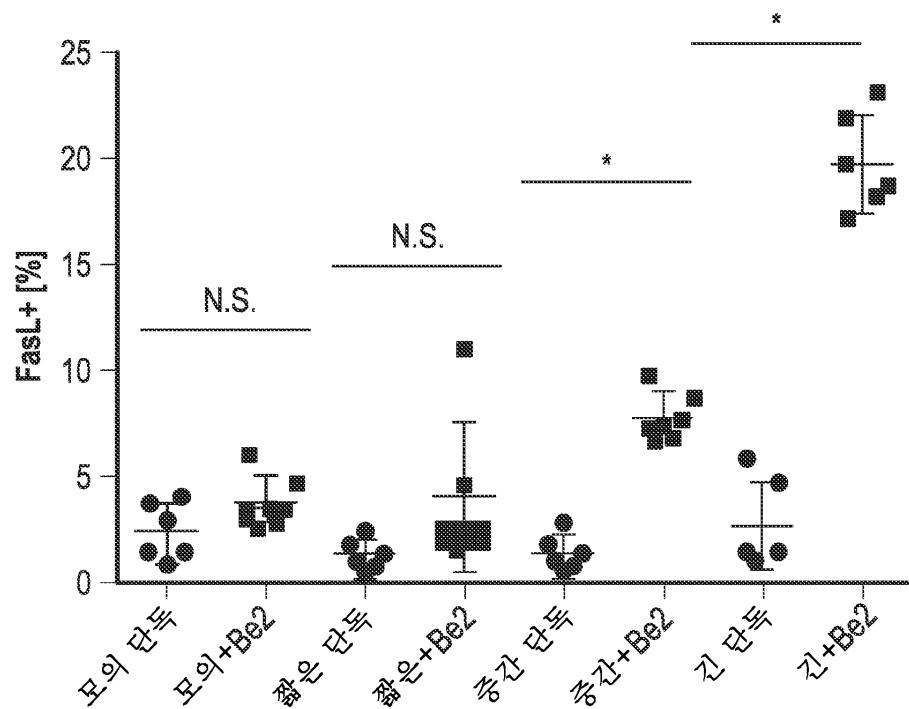
도면 15c



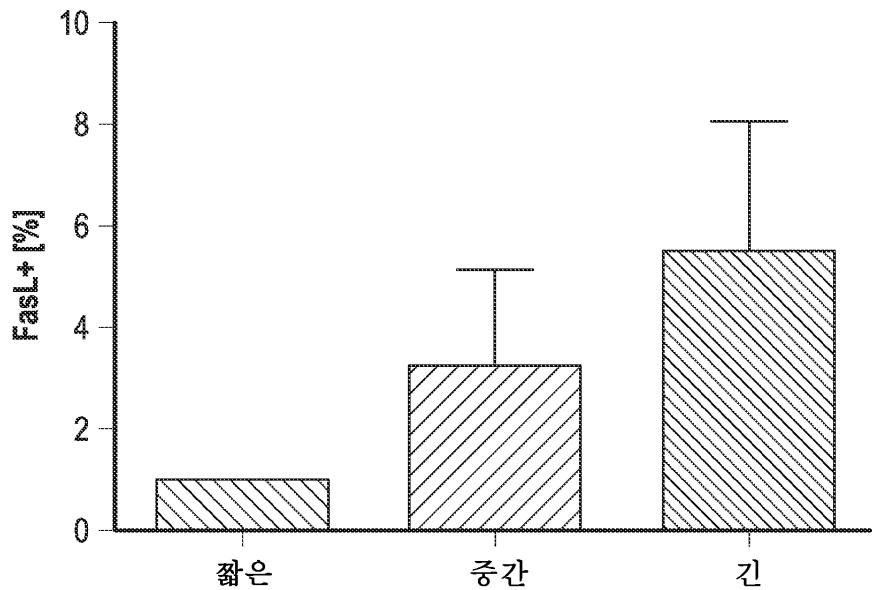
도면 15d



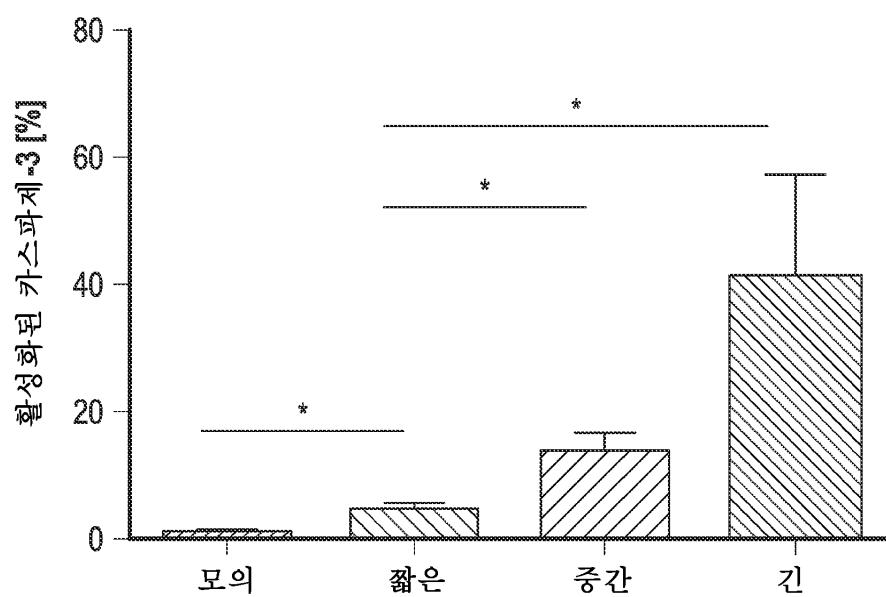
도면 15e



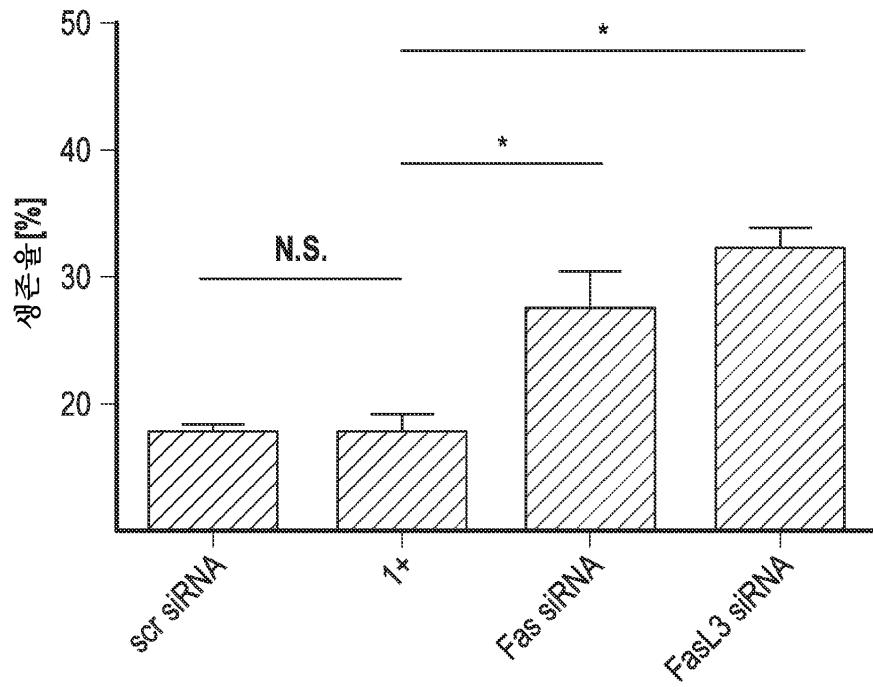
도면 15f



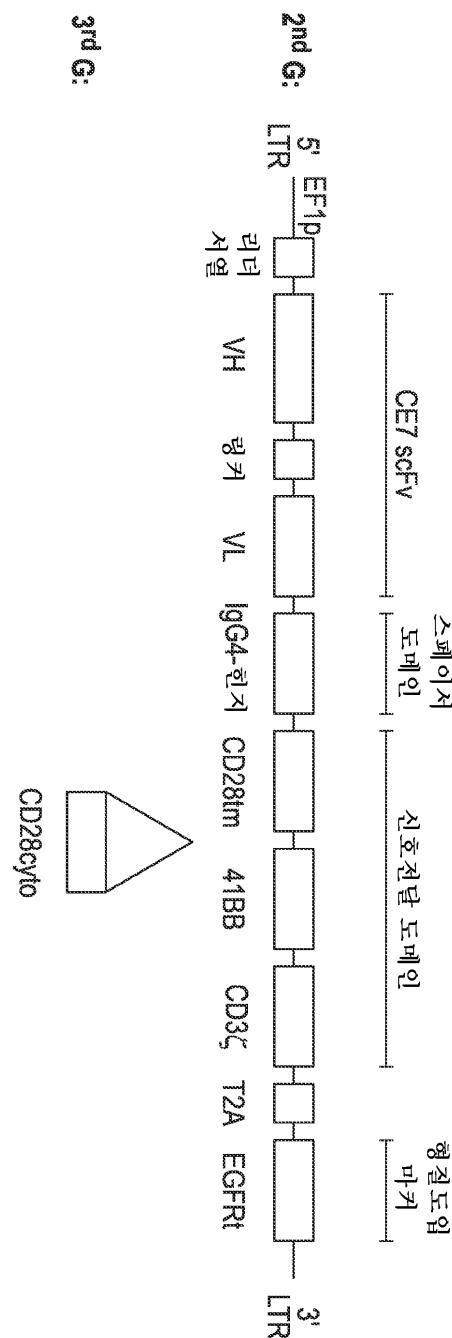
도면 15g



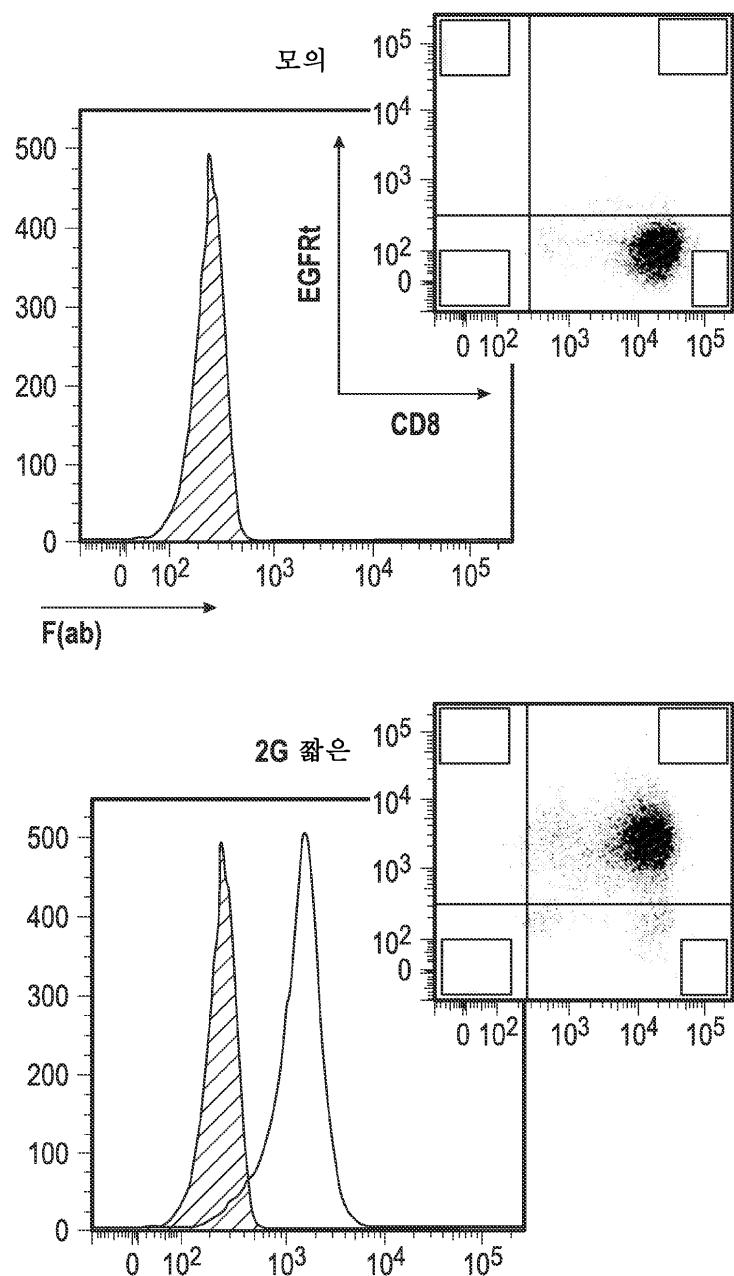
## 도면 15h



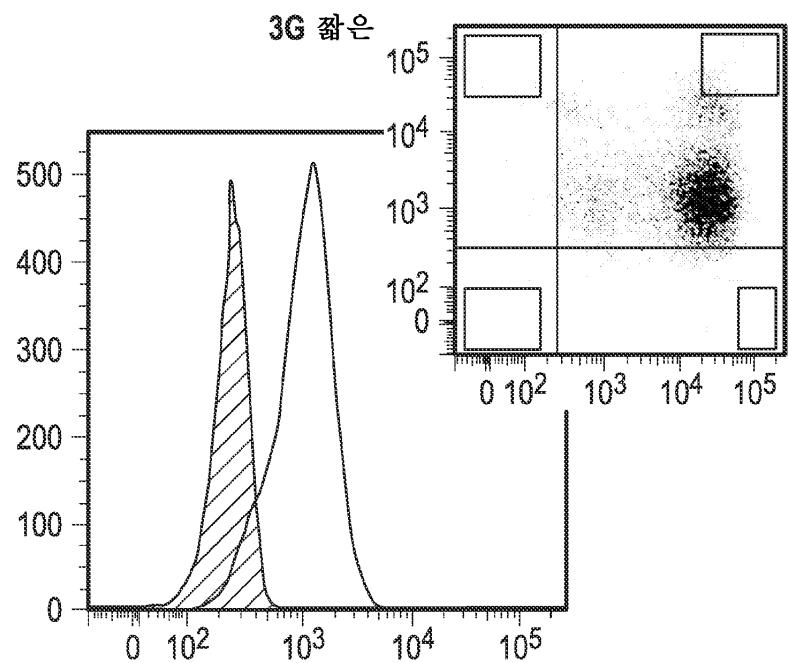
도면 16a



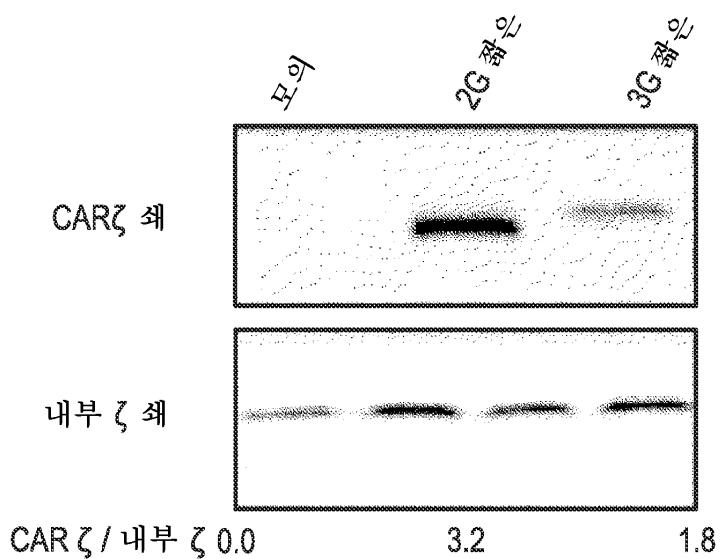
도면 16ba



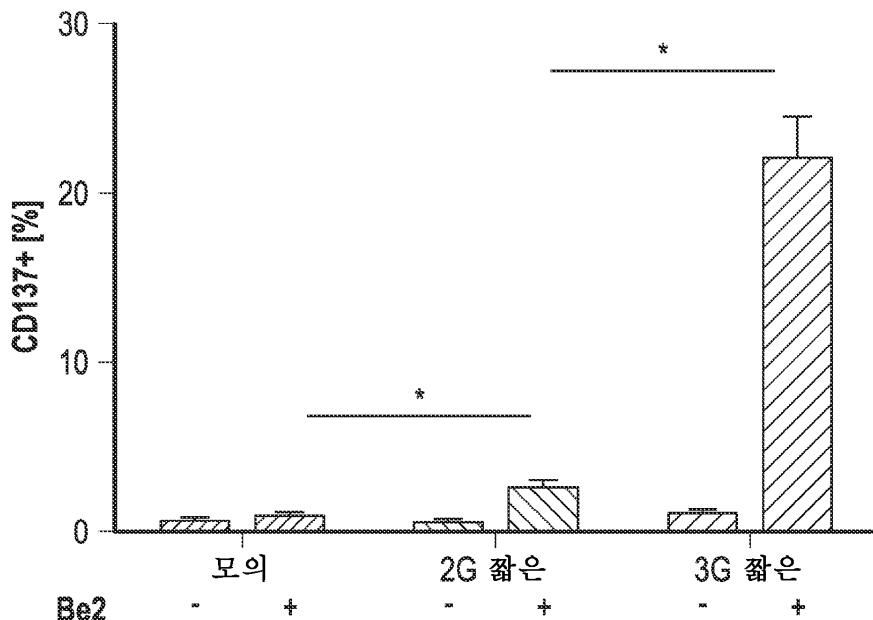
도면 16bb



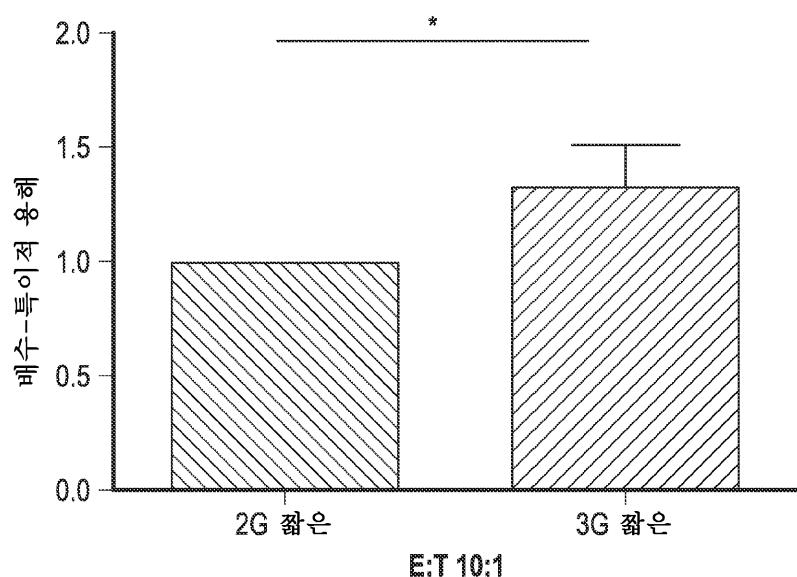
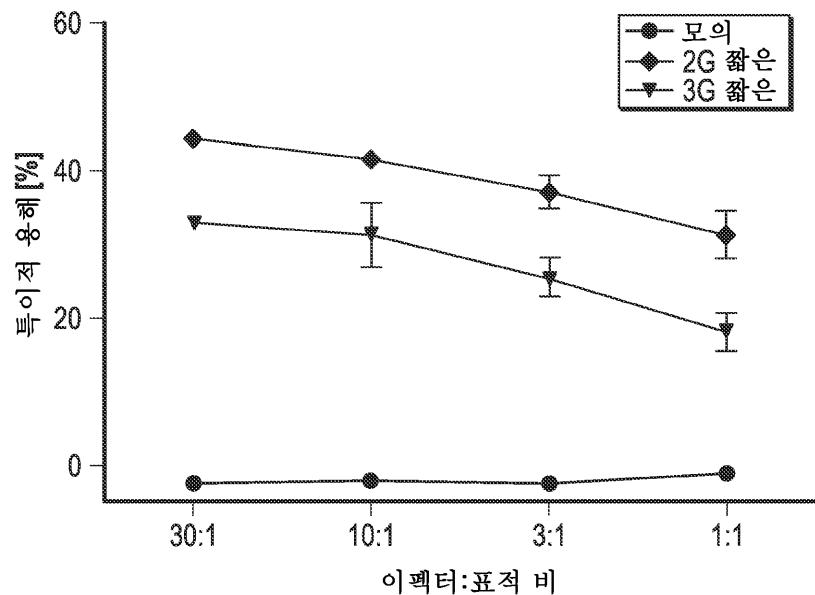
도면 16c



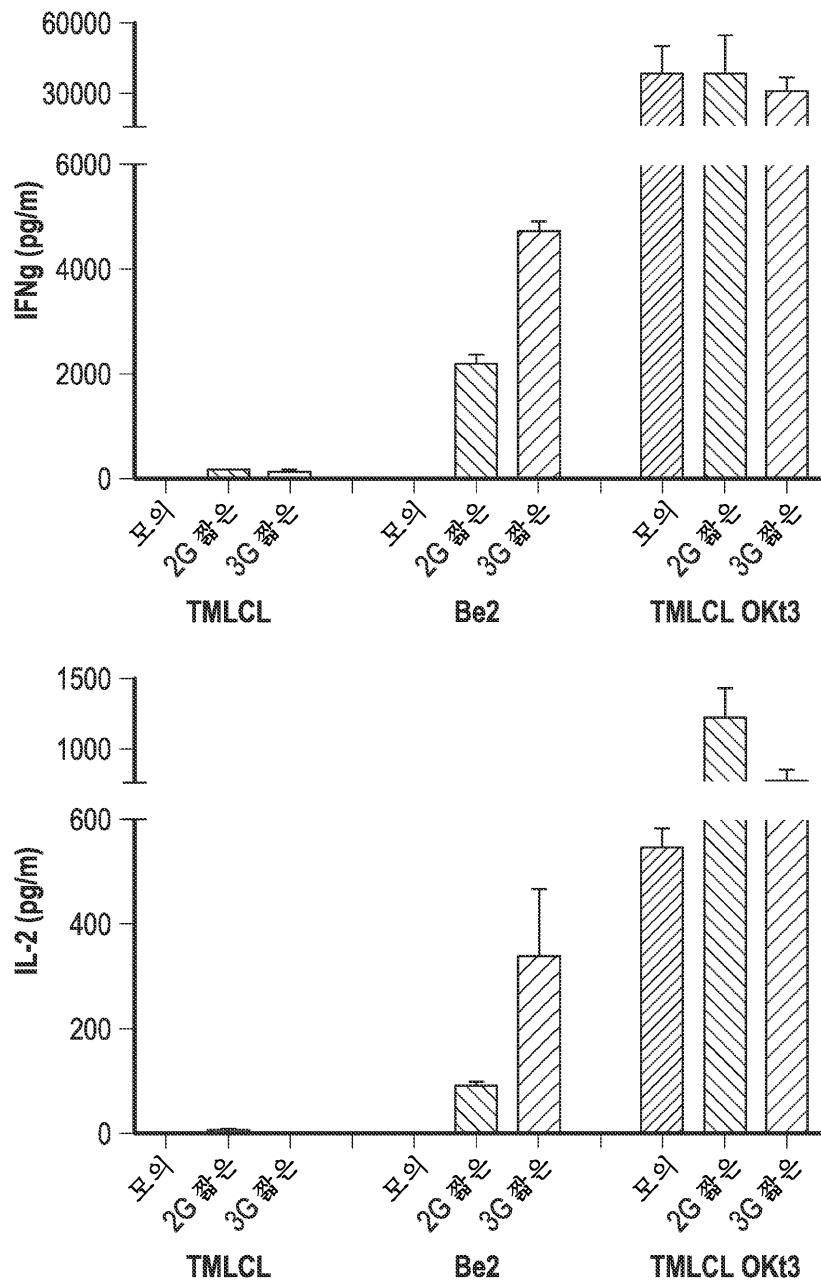
도면 16d



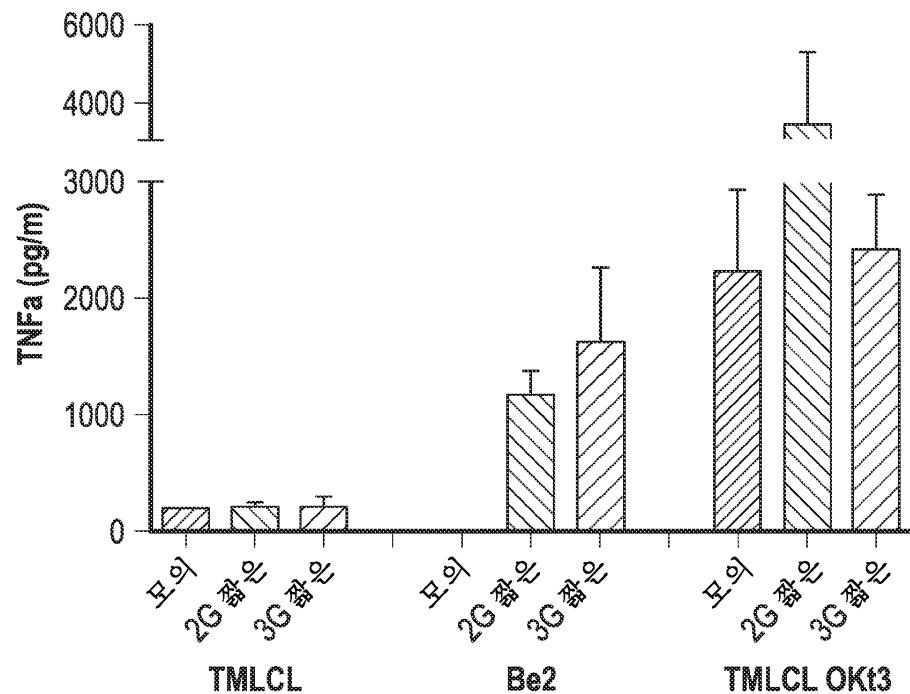
도면 16e



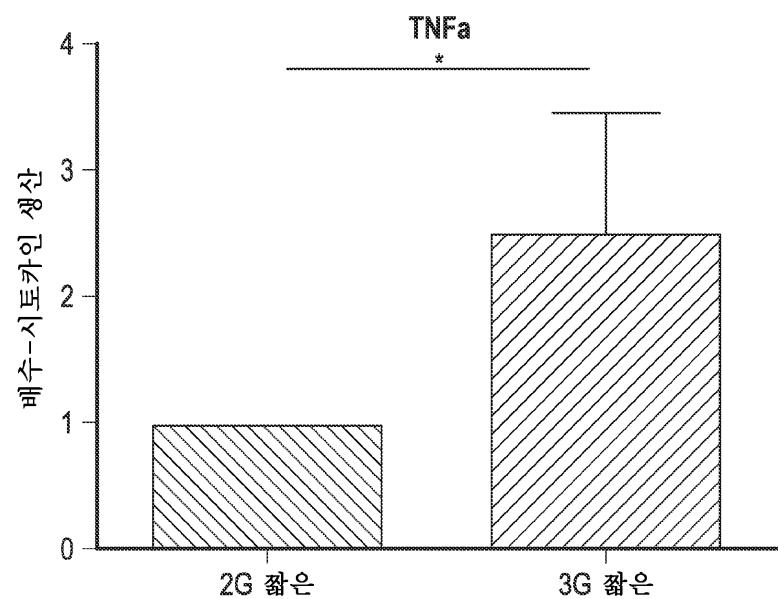
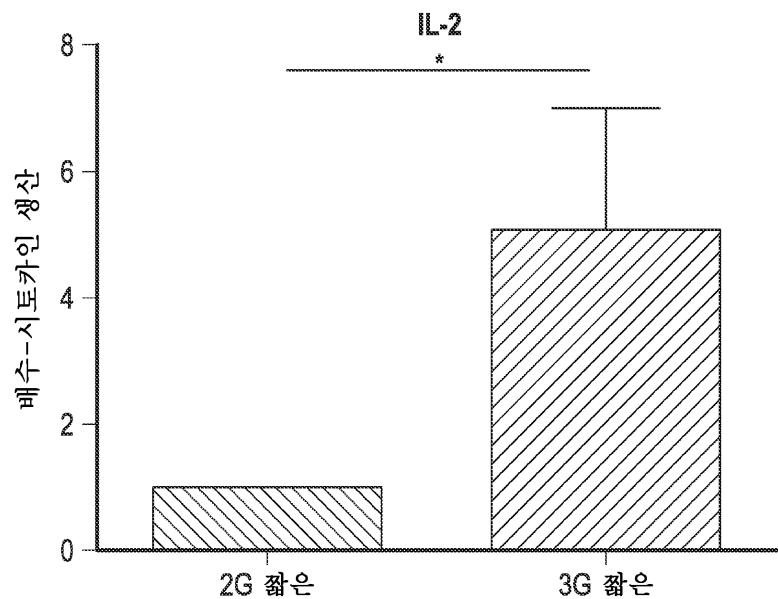
## 도면 16fa



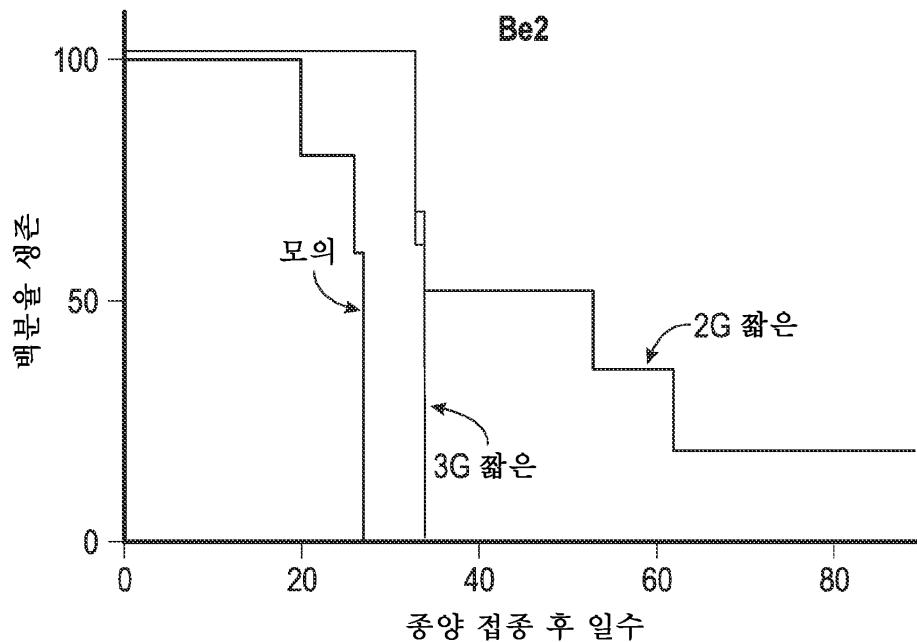
## 도면 16fb



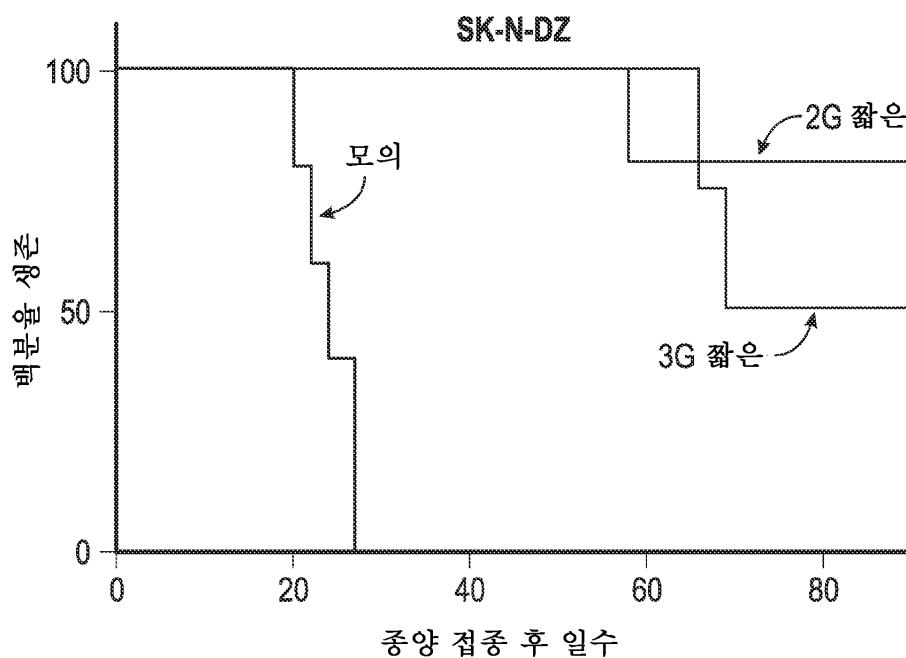
## 도면 16fc



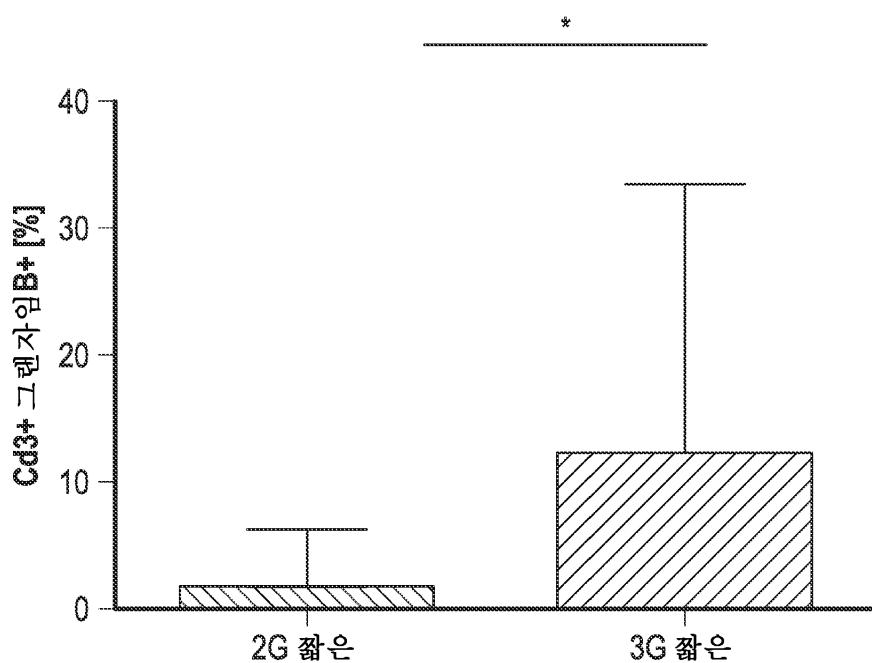
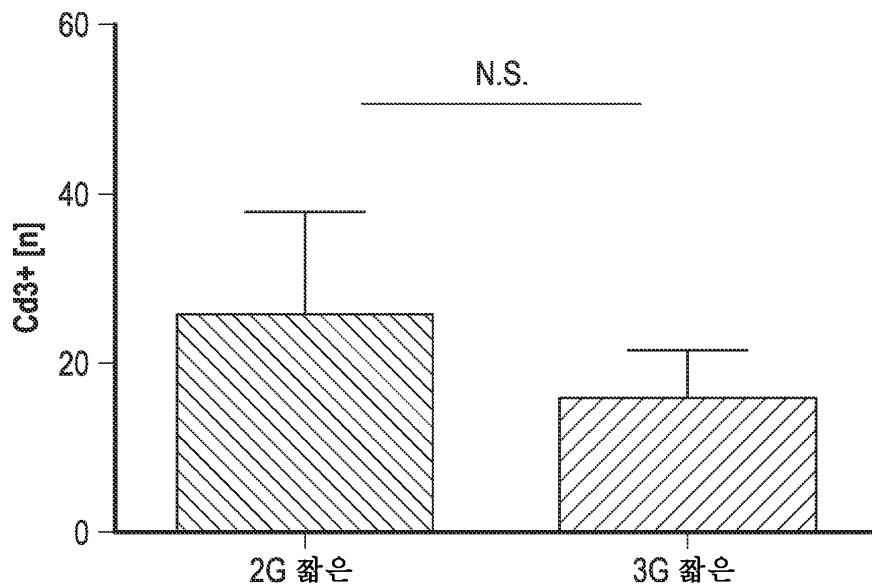
도면17a



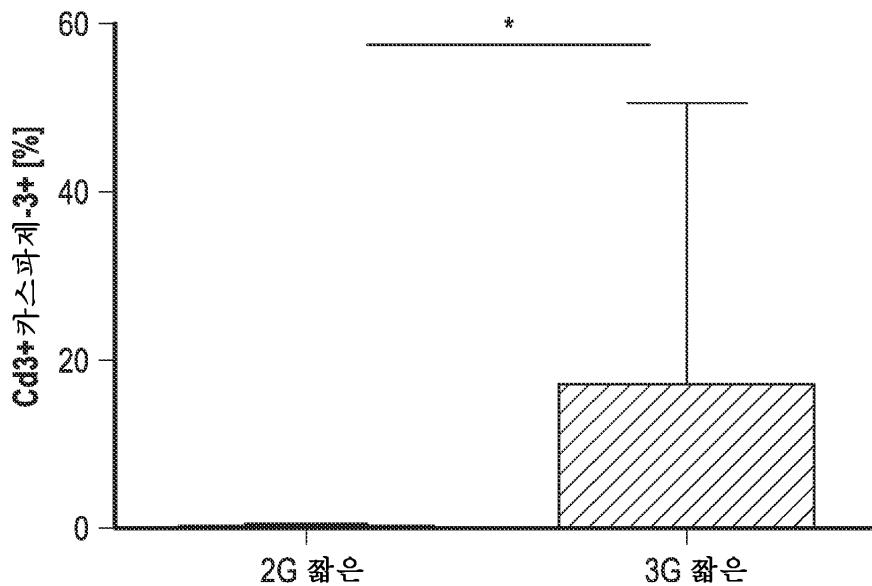
도면17b



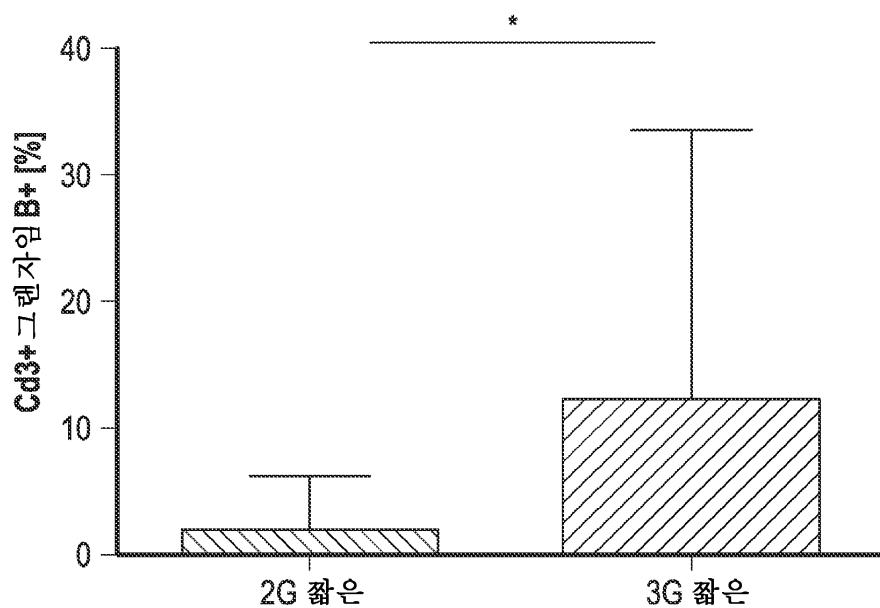
도면 17ca



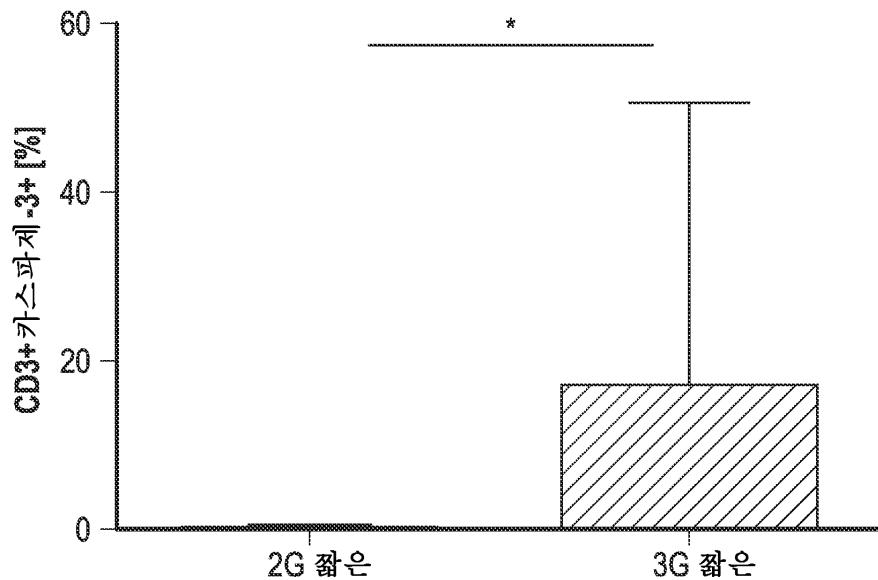
도면 17cb



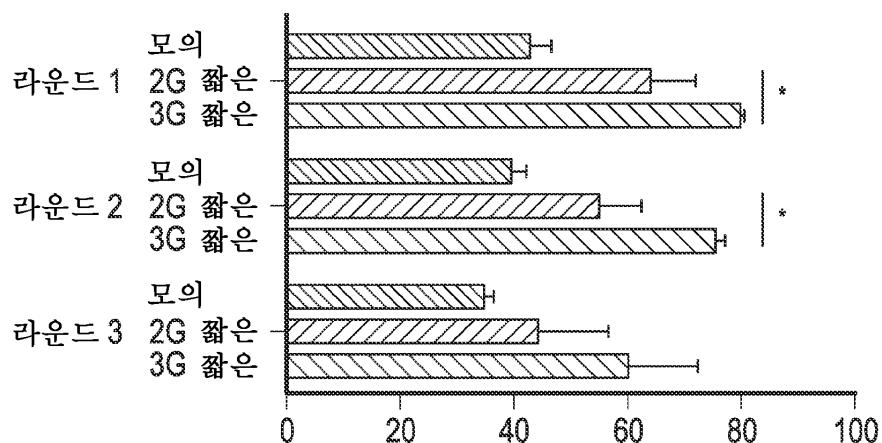
도면 17da



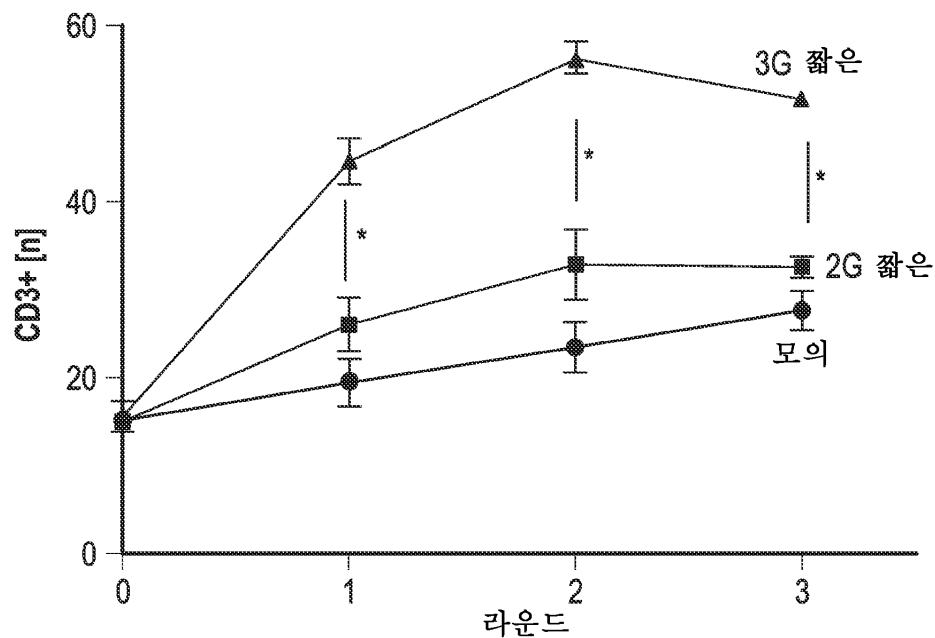
도면 17db



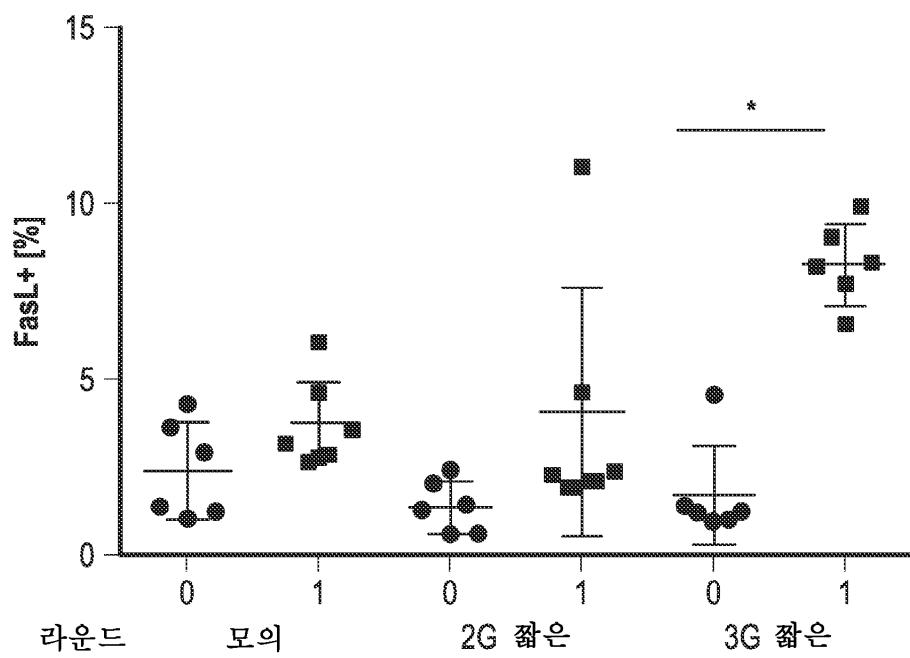
도면 18a



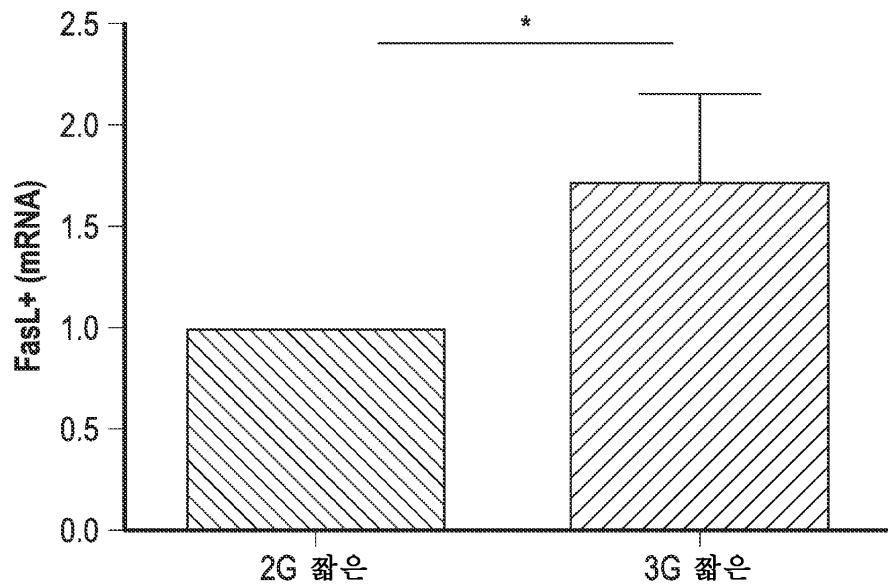
도면18b



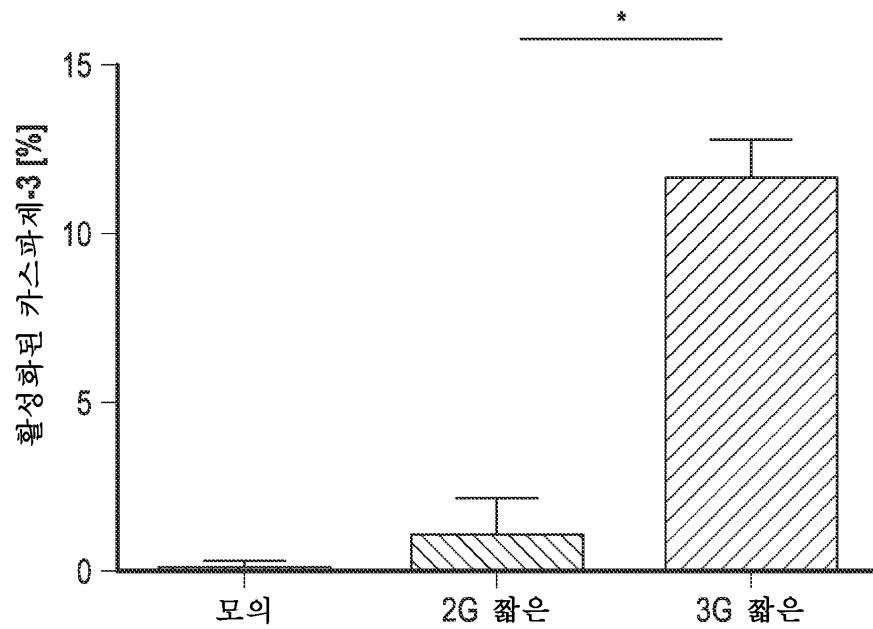
도면18c



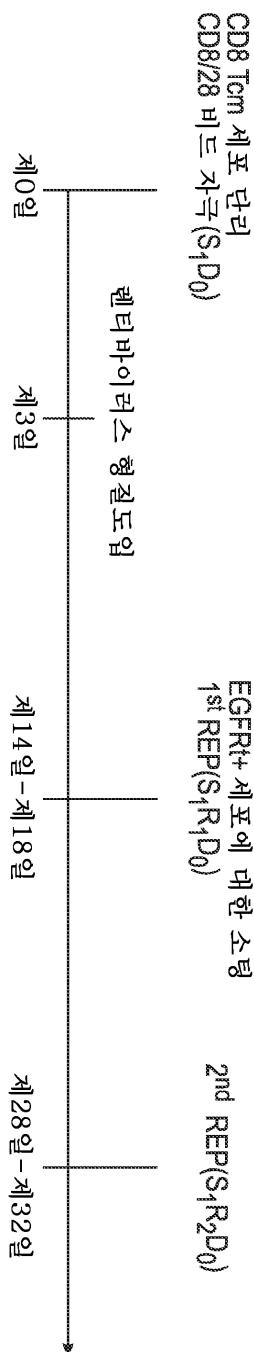
도면 18d



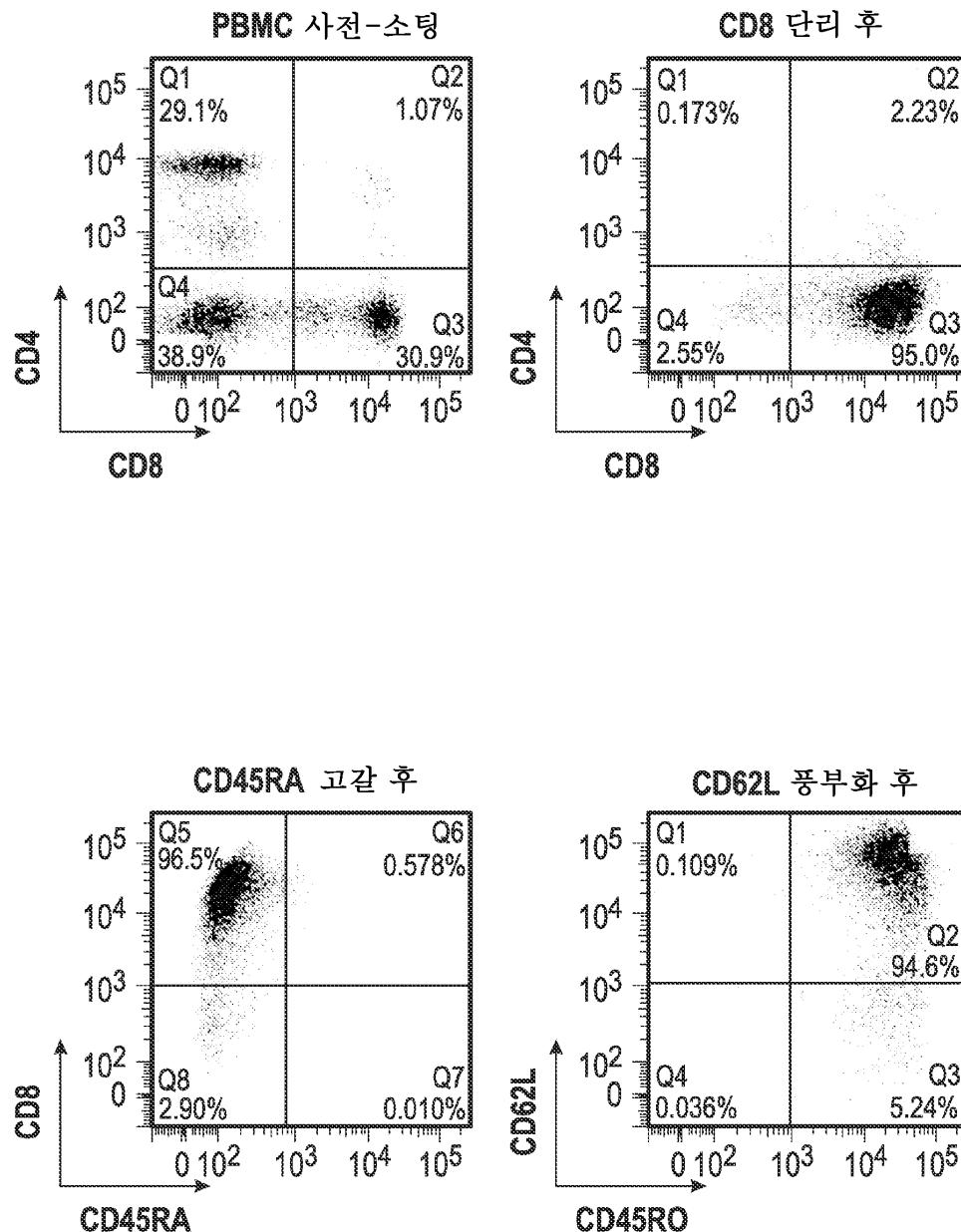
도면 18e



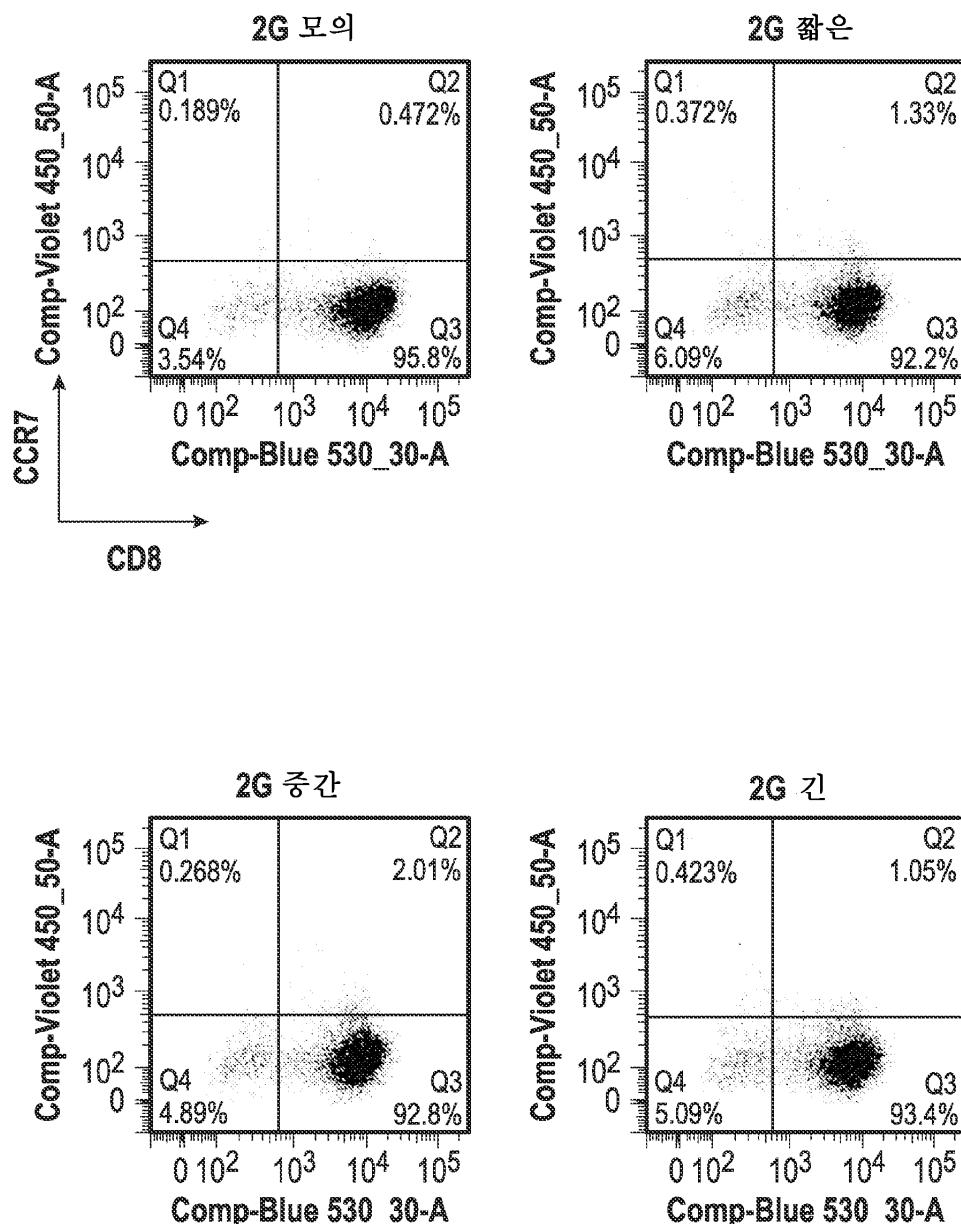
도면 19a



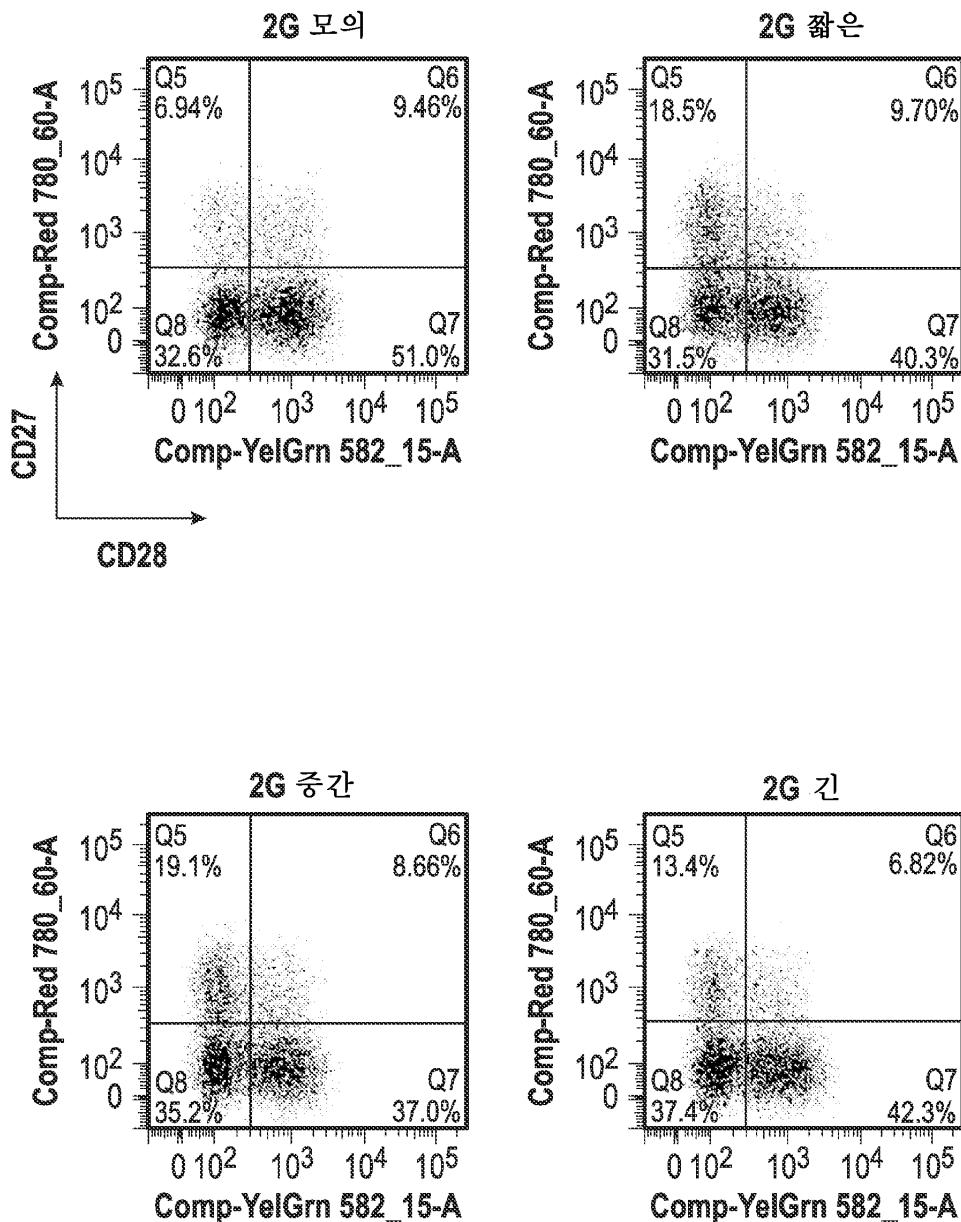
## 도면19b



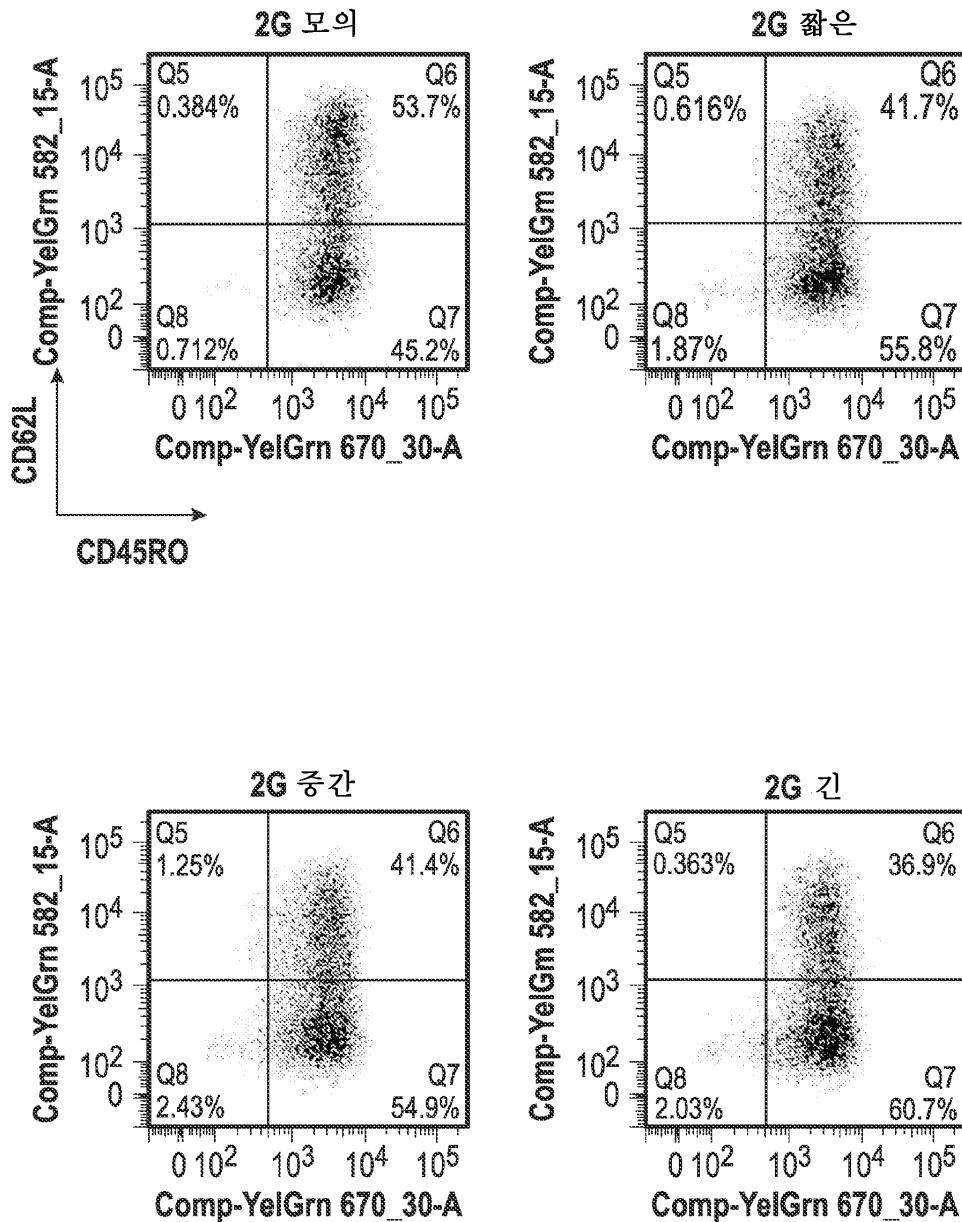
도면19ca



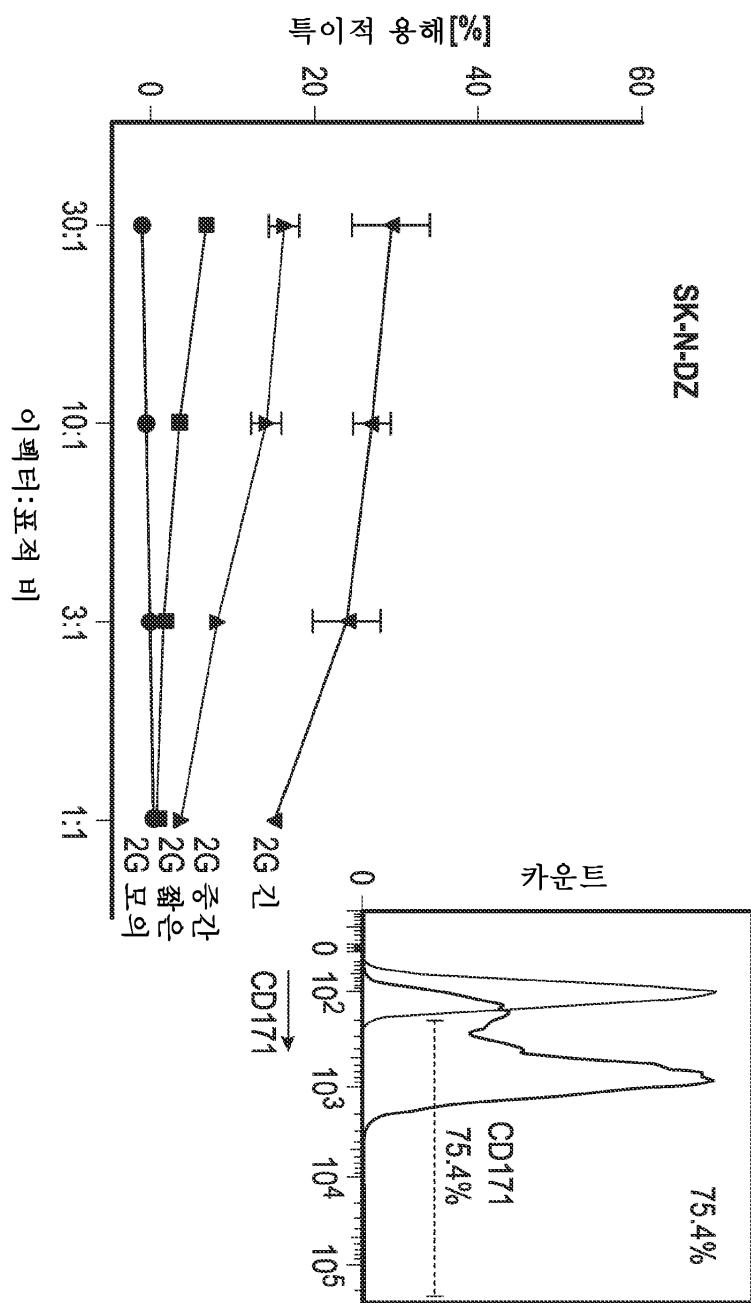
도면19cb



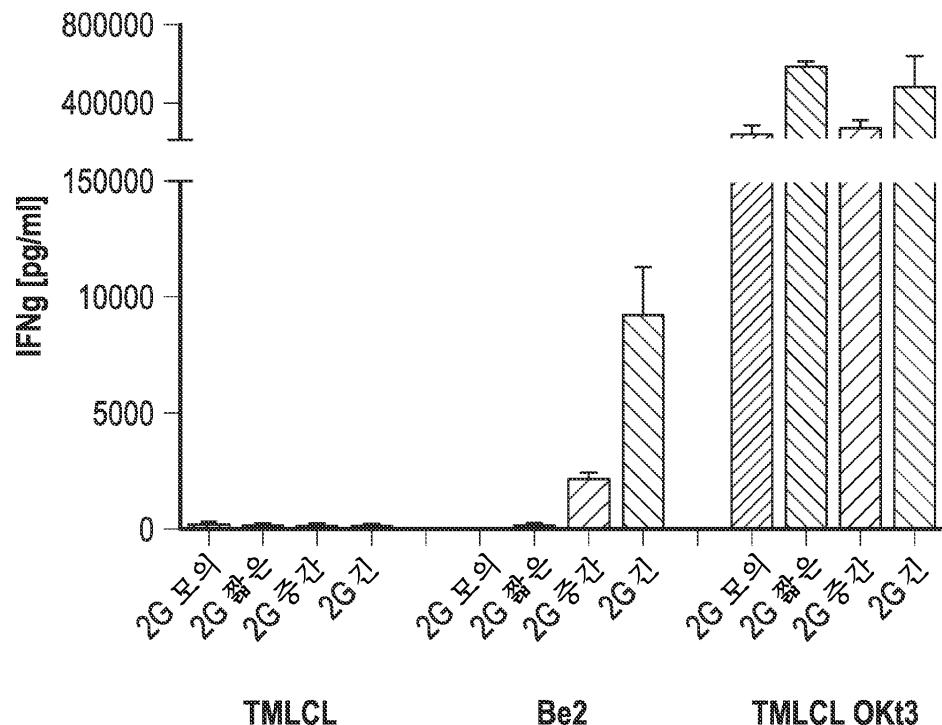
도면 19cc



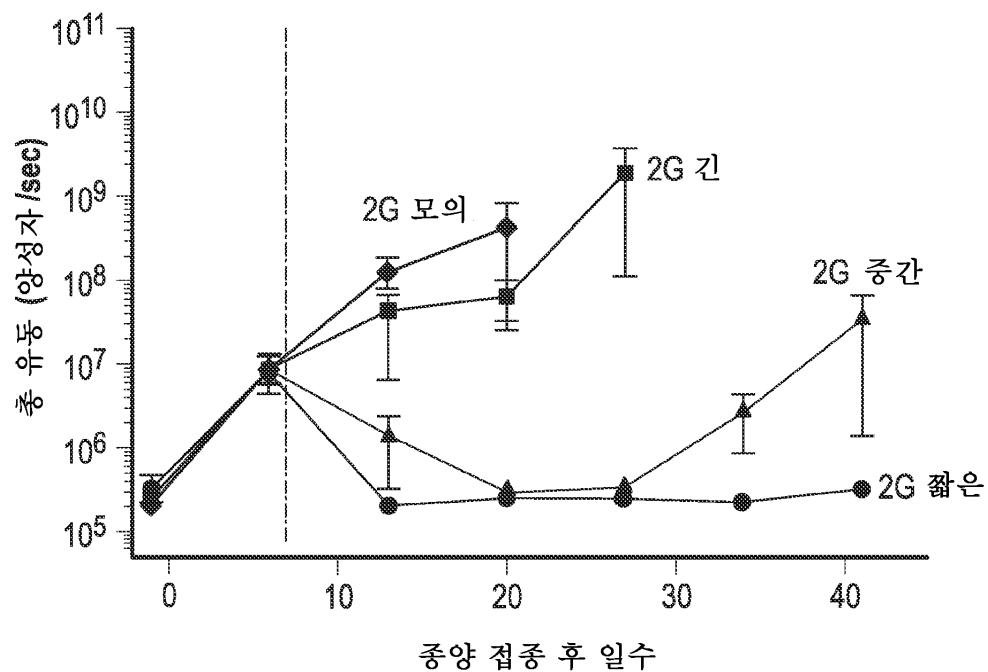
도면20a



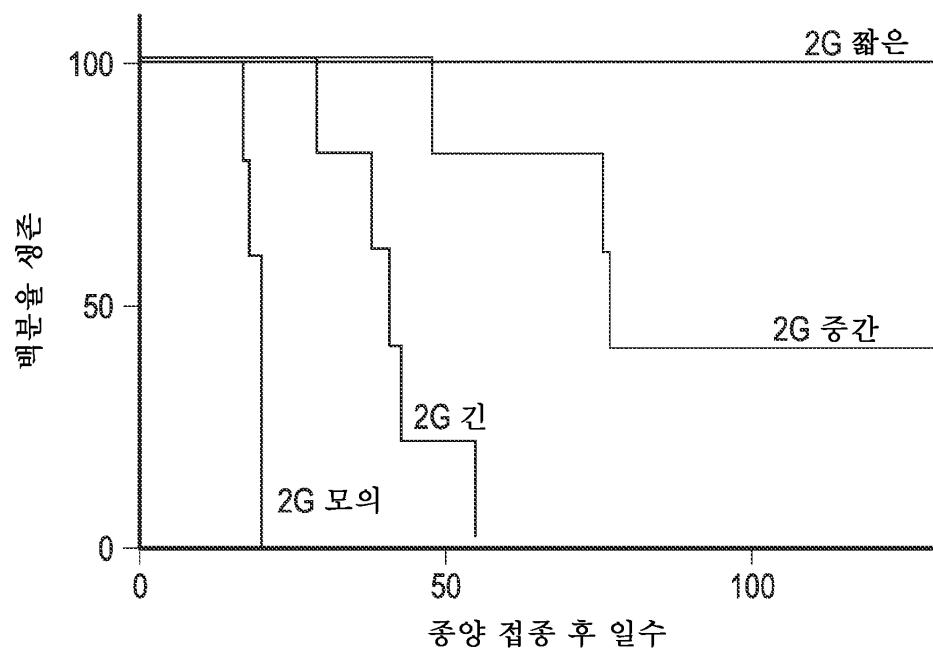
도면20b



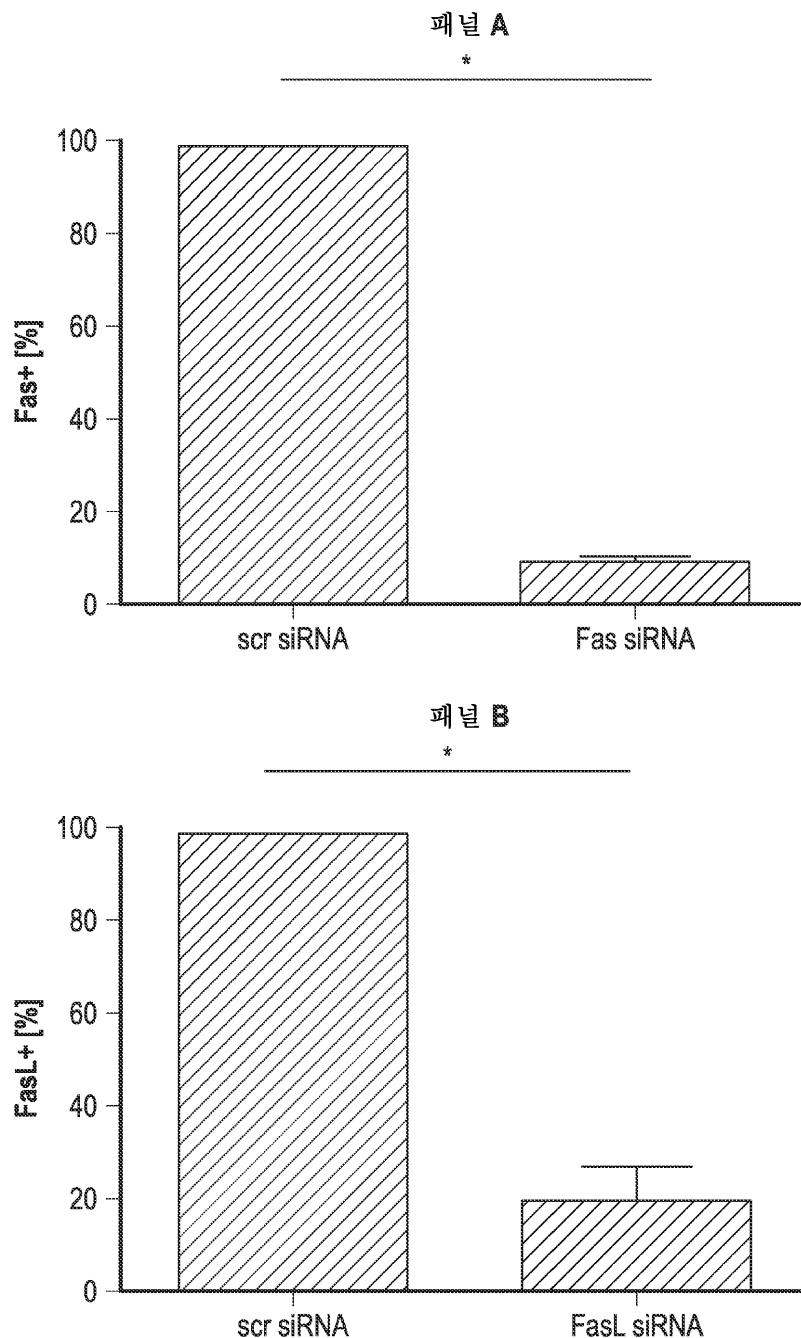
도면20c



도면20d



## 도면21



## 서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Seattle Children's Hospital

d/b/a Seattle Children's Research Institute

Jensen, Michael C.

&lt;120&gt; METHOD AND COMPOSITIONS FOR CELLULAR

IMMUNOTHERAPY

<140> 10-2016-7031067

<141> 2016-11-07

<150> 62/090,845

<151> 2014-12-11

<150> 62/089,730

<151> 2014-12-09

<150> 62/088,363

<151> 2014-12-05

<150> 62/058,973

<151> 2014-10-02

<150> 61/986,479

<151> 2014-04-30

<150> 61/977,751

<151> 2014-04-10

<160> 60

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Spacer Region

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = cysteine, glycine, or arginine

<220>

<221> VARIANT

<222> 4

<223> Xaa = cysteine or threonine

<400> 1

Xaa Pro Pro Xaa Pro

1 5

<210> 2

<400> 2

000  
<210> 3  
<400> 3  
000  
<210> 4  
<400> 4  
000  
<210> 5  
<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD28 transmembrane domain polynucleotide

<400> 5

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Met Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly

|   |   |    |    |
|---|---|----|----|
| 1 | 5 | 10 | 15 |
|---|---|----|----|

Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile

|    |    |    |
|----|----|----|
| 20 | 25 | 30 |
|----|----|----|

Phe Trp

<210> 6

<400> 6

000

<210> 7

<400> 7

000

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

>

<223> T2A ribosomal skip element

<400> 8

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> tEGFR

<400> 9

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5

<210> 10

<211> 1152

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> T2A domain

<400> 10

ccaaggctcg agggcggcgg agagggcaga ggaagtcttc taacatgcgg tgacgtggag 60

gagaatcccg gcccttagat gcttctcctg gtgacaagcc ttctgctctg tgagttacca 120

caccaggcat tcctcctgat cccacgc当地 gtgtgtaaacg gaataggtat tggtgaattt 180

aaagactcac tctccataaa tgctacgaat attaacact tcaaaaactg cacctccatc 240

agtggcgate tccacatctt gccgggtggca tttaggggtg actccttcac acatactct 300

cctctggatc cacaggaact ggatattctg aaaaccgtaa aggaatcac agggttttg 360

ctgattcagg ctggcctga aaacaggacg gacccatg ccttgagaa cctagaaatc 420

atacgcggca ggaccaagca acatggtcag tttctctg cagtcgtcag cctgaacata 480

acatccttgg gattacgctc cctcaaggag ataagtgtatg gagatgtgat aatttcagga 540

aacaaaatt tgtgttatgc aaatacaata aactggaaaa aactgtttgg gaccccggt 600

cagaaaacca aaattataag caacagaggt gaaaacagct gcaaggccac aggccaggc 660

tgccatgcct tgtgtcccc cgagggctgc tggggccgg agcccaggaa ctgcgtct 720

tgccggaatg tcagccgagg cagggaaatgc gtggacaagt gcaaccttct ggagggtgag 780

ccaagggagt ttgtggagaa ctctgagtgc atacagtgcc acccagagtg cctgcctcag 840

gccccatgaaca tcacctgcac aggacgggca ccagacaact gtatccagtg tgcccactac 900

attgacggcc cccactgcgt caagacctgc ccggcaggag tcatgggaga aaacaacacc 960  
 ctggcttggaa agtacgcaga cgccggccat gtgtccacc tgtccatcc aaactgcacc 1020  
 tacggatgca ctggccagg tcttgaaggc tgtccaacga atggcctaa gatcccgtcc 1080

atcgccactg ggatggtggg ggccctcctc ttgctgtgg tggtggccct gggatccgc 1140  
 ctcttcatgt ga 1152

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 383

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; T2A domain

&lt;400&gt; 11

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

1 5 10 15

Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg Met Leu Leu Leu Val Thr

20 25 30

Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro Ala Phe Leu Leu Ile Pro

35 40 45

Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu

50 55 60

Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr

100 105 110

Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn

115 120 125

Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg

130 135 140

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

|     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|
| 145 | 150 | 155 | 160 |
|-----|-----|-----|-----|

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

|     |     |     |  |
|-----|-----|-----|--|
| 165 | 170 | 175 |  |
|-----|-----|-----|--|

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

|     |     |     |  |
|-----|-----|-----|--|
| 180 | 185 | 190 |  |
|-----|-----|-----|--|

Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn

|     |     |     |  |
|-----|-----|-----|--|
| 195 | 200 | 205 |  |
|-----|-----|-----|--|

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

|     |     |     |  |
|-----|-----|-----|--|
| 210 | 215 | 220 |  |
|-----|-----|-----|--|

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

|     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|
| 225 | 230 | 235 | 240 |
|-----|-----|-----|-----|

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

|     |     |     |  |
|-----|-----|-----|--|
| 245 | 250 | 255 |  |
|-----|-----|-----|--|

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

|     |     |     |  |
|-----|-----|-----|--|
| 260 | 265 | 270 |  |
|-----|-----|-----|--|

Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly

|     |     |     |  |
|-----|-----|-----|--|
| 275 | 280 | 285 |  |
|-----|-----|-----|--|

Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro

|     |     |     |  |
|-----|-----|-----|--|
| 290 | 295 | 300 |  |
|-----|-----|-----|--|

His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr

|     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|
| 305 | 310 | 315 | 320 |
|-----|-----|-----|-----|

Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His

|     |     |     |  |
|-----|-----|-----|--|
| 325 | 330 | 335 |  |
|-----|-----|-----|--|

Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro

|     |     |     |  |
|-----|-----|-----|--|
| 340 | 345 | 350 |  |
|-----|-----|-----|--|

Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala

|     |     |     |  |
|-----|-----|-----|--|
| 355 | 360 | 365 |  |
|-----|-----|-----|--|

Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met

|     |     |     |  |
|-----|-----|-----|--|
| 370 | 375 | 380 |  |
|-----|-----|-----|--|

<210> 12

<400> 12

000

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 326

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Exemplary IgG4-Fc

&lt;400&gt; 13

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val Glu Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu

100 105 110

Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

130 135 140

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn

165 170 175

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp

180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro

195 200 205

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu

210 215 220

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

225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr

260 265 270

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

275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys

290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu

305 310 315 320

Ser Leu Ser Leu Gly Lys

325

<210> 14

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Modified IgG4 hinge region

<400> 14

Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Leu Phe Pro Ser Ile Gln Val Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser Arg

35 40 45

Glu Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu Val

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 50                                                              | 55  | 60  |
| Cys Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser Lys |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  |
| Thr Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr Phe |     |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |
| Tyr Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys Lys |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn     |     |     |
|                                                                 |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn |     |     |
|                                                                 |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser                     |     |     |
| 210                                                             | 215 |     |
| <210> 15                                                        |     |     |
| <211> 255                                                       |     |     |
| <212> PRT                                                       |     |     |
| <213> Artificial Sequence                                       |     |     |
| <220>                                                           |     |     |
| <223> Cytoplasmic domain of human 4-1BB                         |     |     |
| <400> 15                                                        |     |     |
| Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Val Leu     |     |     |
| 1                                                               | 5   | 10  |
|                                                                 |     |     |
|                                                                 |     |     |

Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro

20 25 30

Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys

35 40 45

Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile

50 55 60

Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser

65 70 75 80

Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly

85 90 95

Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu

100 105 110

Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln

115 120 125

Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys

130 135 140

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

145 150 155 160

Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala

165 170 175

Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu

180 185 190

Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Leu Thr Leu

195 200 205

Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe

210 215 220

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly

225 230 235 240

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

245 250 255

<210> 16

<211> 164

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Cytoplasmic domain of isoform 3 of human CD3 zeta

&lt;400&gt; 16

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu

1 5 10 15

Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys

20 25 30

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

35 40 45

Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Pro Pro Arg

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Human IgG1 hinge region

<400> 17

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

|   |   |    |    |
|---|---|----|----|
| 1 | 5 | 10 | 15 |
|---|---|----|----|

<210> 18

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Human IgG2 hinge region

<400> 18

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro

|   |   |    |  |
|---|---|----|--|
| 1 | 5 | 10 |  |
|---|---|----|--|

<210> 19

<211> 61

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Human IgG3 hinge region

<400> 19

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro

|   |   |    |    |
|---|---|----|----|
| 1 | 5 | 10 | 15 |
|---|---|----|----|

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu

|    |    |    |  |
|----|----|----|--|
| 20 | 25 | 30 |  |
|----|----|----|--|

Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro

|    |    |    |  |
|----|----|----|--|
| 35 | 40 | 45 |  |
|----|----|----|--|

Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro

|    |    |    |  |
|----|----|----|--|
| 50 | 55 | 60 |  |
|----|----|----|--|

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Human IgG4 hinge region

<400> 20

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro

1 5 10

<210> 21

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Modified Human IgG4 hinge region

<400> 21

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 22

<400> 22

000

<210> 23

<400> 23

000

<210> 24

<400> 24

000

<210> 25

<400> 25

000

<210> 26

<400> 26

000

<210> 27

<400> 27

000

<210> 28

<400> 28

000

<210> 29

<400> 29

000

<210> 30

<400> 30

000

<210> 31

<400> 31

000

<210> 32

<400> 32

000

<210> 33

<400> 33

000

<210> 34

<400> 34

000

<210> 35

<400> 35

000

<210> 36

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Medium spacer IgG4 hinge-CH3

<400> 36

tacggaccgc cctcccccc ttgccctggc cagcctcgcg agccccaggt gtacaccctg 60

cctccctccc aggaagagat gaccaagaac caggtgtccc tgacctgcct ggtgaaggcc 120

ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaacg gccagcctga gaacaactac 180

aagaccaccc ctcccggtgct ggacagcgcac ggcagcttct tcctgtacag ccggctgacc 240

gtggacaaga gccggtgca ggaaggcaac gtcttagct gcagcgtgat gcacgaggcc 300

ctgcacaacc actacaccca gaagagcctg agcctgtccc tgggcaag 348  
<210> 37  
<400> 37  
000  
<210> 38  
<400> 38  
000  
<210> 39  
<400> 39  
000  
<210> 40  
<400> 40  
000  
<210> 41  
<400> 41  
000  
<210> 42  
<400> 42  
000  
<210> 43  
<400> 43  
000  
<210> 44  
<400> 44  
000  
<210> 45  
<400> 45  
000  
<210> 46  
<400> 46  
000  
<210> 47  
<400> 47  
000  
<210> 48  
<400> 48

000

<210> 49

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IgG4 hinge

<400> 49

Glu Ser Lys Tyr Gly

1 5

<210> 50

<400> 50

000

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Modified Human IgG4 hinge region

<400> 51

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Modified Human IgG4 hinge region

<400> 52

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 53

<211> 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Modified Human IgG4 hinge region

&lt;400&gt; 53

Glu Val Val Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

&lt;210&gt; 54

&lt;211&gt; 10024

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Ce7scFv-IgG4hinge-CH2-CH3-CD28tm/4-1BB-zeta-T2A-EG

FRt-epHIV7

&lt;400&gt; 54

gttagaccag atctgagcct gggagctctc tggctaacta ggaaacccac tgcttaagcc 60

tcaataaaagc ttgccttgag tgcttcaagt agtgtgtgcc cgtctgtgt gtgactctgg 120  
 taactagaga tccctcagac ccttttagtc agtgtggaaa atctctagca gtggcgcccg 180  
 aacagggact tggaaagcgaa agggaaacca gaggagctct ctgcacgcag gactcggctt 240  
 gctgaaggcgc gcacggcaag aggcgagggg cgccgactgg tgagtacgcc aaaaattttg 300  
 actagcggag gctagaagga gagagatggg tgcgagagcg tcagtattaa gcgggggaga 360  
 attagatcga tggaaaaaaa ttcggttaag gccaggggaa aagaaaaaat ataaattaaa 420  
 acatatagtt tggcaagca gggagctaga acgattcgca gttaatctg gcctgttaga 480  
 aacatcagaa ggctgttagac aaatactggg acagctacaa ccatcccttc agacaggatc 540

agaagaacctt agatcattat ataatacagt agcaaccctc tattgtgtgc atcaaaggat 600  
 agagataaaa gacaccaagg aagctttaga caagatagag gaagagcaaa acaaaagtaa 660  
 gaaaaaaagca cagcaaggcag cagctgacac aggacacagc aatcaggtca gccaaaatta 720  
 ccctatagtg cagaacatcc agggcataat ggtacatcag gccatatcac ctagaacttt 780  
 aaatgcattt gtaaaatgtt tagaagagaa ggctttcagc ccagaagtga taccatgtt 840  
 ttcagcattt tcagaaggag ccaccccaca agatttaaac accatgctaa acacagtggg 900  
 gggacatcaa gcagccatgc aaatgttaaa agagaccatc aatgaggaag ctgcaggca 960  
 agagaagagt ggtgcagaga gaaaaaaagag cagtggaaat aggagctttg ttccttgggt 1020

tcttgggagc agcaggaagc actatggcg cagcgtcaat gacgctgacg gtacaggcca 1080  
 gacaattatt gtctggata gtgcagcagc agaacaattt gctgagggct attgaggcgc 1140  
 aacagcatct gttcaactc acagtctgg gcatcaagca gctccaggca agaatcctgg 1200  
 ctgtggaaag atacctaaag gatcaacagc tcctggat tgggttgc tctgaaaac 1260  
 tcattgcac cactgctgtc cttggatct acaaatggca gtattcatcc acaatttaa 1320  
 aagaaaaggg gggattgggg ggtacagtgc agggaaaga atagtagaca taatagcaac 1380  
 agacatacaa actaaagaat tacaaaaaca aattacaaa attcaaaatt ttcgggtaa 1440  
 ttacaggac agcagagatc cagtttgggg atcaattgca tgaagaatct gcttagggtt 1500

aggcgitttgcgcgtttcg cgaggatctcg cgatcgctcc ggtgccgtc agtggcaga 1560  
 ggcacatcg cccacagtcc ccgagaagtt ggggggagggt gtcggcaatt gaaccgggtc 1620  
 ctagagaagg tgccggggg taaactggga aagtggatgtc gtgtactggc tccgccttt 1680  
 tccccgggtt gggggagaac cgtatataag tgcagtagtc gcccgtaaacg ttcttttcg 1740  
 caacgggtt gccggccagaa cacagctgaa gcttcgaggg gctcgcatct ctccttcacg 1800  
 cggccggccgc cctaccttag gcccgcattcc acggcggttg agtcgcgttc tgccgcctcc 1860  
 cgcctgttgtt gcctcctgaa ctgcgtccgc cgtcttagta agttaaagc tcaggtcgag 1920  
 accgggcctt tgtccggcgc tcccttggag cctacctaga ctccggcgc tctccacgct 1980

ttgcctgacc ctgcttgctc aactctacgt ctttggatcg tttctgttc tgccgcgtta 2040  
 cagatccaag ctgtgaccgg cgccctacggc tagccggcc accatgtgc tgctgggtac 2100  
 cagccctgtcg ctgtgcgagc tgccccaccc cgccttctg ctgatcccc aggtgcagct 2160  
 gcagcagccgtt ggccggcggc tggtgaagcc agggcccgacg gtgaagctgt cctgcaaggc 2220  
 cagcggtac accttcacccg gctactggat gcactgggtg aagcagagac ccggccacgg 2280  
 cctgaaatgg atcggcgaga tcaaccccg caacggccgg accaactaca acgagcggtt 2340  
 caagagcaag gccaccctga ccgtggacaa gagcagcacc accgccttca tgcagctgtc 2400  
 cggcctgacc agcgaggaca gcccgtgtt cttctgcgtcc agggactact acggcaccag 2460

ctacaacttc gactactggg gccagggcac cacactgacc gtgagcagcg gcccgggggg 2520  
 ctctggccgc ggaggatctg ggggggggg cagcgtacatc cagatgaccc agagcagcag 2580  
 cagcttcagc gtgagcgtgg gcgaccgggtt gaccatcacc tgtaaggcca acgaggacat 2640  
 caacaaccgg ctggcctgtt atcagcagac ccccgcaac agccccaggc tgctgtatcag 2700  
 cggccaccacc aacctggta cggcggtcc cagccgtttt agggccagcg gctccggcaa 2760  
 ggactacacc ctgaccatca caagcctgca ggccgaggac ttgcacccctt actactgcca 2820  
 gcagttactgg tccacccct tcacccctt cagcggcacc gagctggaaa tcaaagagag 2880

caagtacgga ccgcctgcc ccccttgecc tgccccgag ttctggcg gaccagcg 2940

gttcctgttc cccccaagg ccaaggacac cctgatgatc agccggaccc cgaggtgac 3000  
 ctgcgtggtg gtggacgtga gccaggaaga tcccggagtc cagttcaatt ggtacgtgga 3060  
 cggcgtggaa gtgcacaacg ccaagacca gcccagagag gaacagttca acagcaccta 3120  
 ccgggtggtg tctgtgtca ccgtgctca ccaggactgg ctgaacggca aagaatacaa 3180  
 gtgcaagggtg tccaacaagg gcctgcccag cagcatgaa aagaccatca gcaaggccaa 3240  
 gggccagcct cgcgagcccc aggtgtacac cctgcctcc tccaggaag agatgaccaa 3300  
 gaaccaggtg tccctgacct gcctggtaa gggcttctac cccagcgaca tcgccgtgga 3360  
 gtgggagagc aacggccagc ctgagaacaa ctacaagacc acccctcccg tgctggacag 3420

cgacggcagc ttcttcgtt acagccgct gaccgtggac aagagccggt ggcaggaagg 3480  
 caacgtctt agctgcagcg tcatgcacga ggcctgcac aaccactaca cccagaagag 3540  
 cctgagcctg tccctggca agatgttctg ggtgctggtg gtgtggcg gggctggc 3600  
 ctgctacagc ctgctggta cagtggcctt catcatctt tgggtgaaac gggcagaaa 3660  
 gaaactctg tatataattca aacaaccatt tatgagacca gtacaaacta ctcaagagga 3720  
 agatggctgt agctgccat ttccagaaga agaagaagga ggatgtgaac tgccggtaa 3780  
 gttcagcaga agccggacg cccctgccta ccagcaggc cagaatcage tgtacaacga 3840  
 gctgaacctg ggcagaaggg aagagtacga cgtcctggat aagcggagag gcccggaccc 3900

tgagatggc ggcaagcctc ggccgaagaa cccccagggaa ggcctgtata acgaactgca 3960  
 gaaagacaag atggccgagg cctacagcgat gatcgcatg aagggcgagc ggaggcgaaa 4020  
 caagggccac gacggcctgt atcaggcct gtccaccgccc accaaggata cctacgacgc 4080  
 cctgcacatg cagggcctgc ccccaaggct cgagggcgcc ggagagggca gaggaagtct 4140  
 tctaactgc ggtgacgtgg aggagaatcc cggccctagg atgcttctcc tggtgacaag 4200  
 ccttcgtc tggatgttac cacaccacg attcctcctg atccacgca aagtgtgaa 4260  
 cggaataggt attggtaat ttaagactc actctccata aatgctacga atattaaaca 4320  
 cttcaaaaac tgacacccca tcagtggcgat tctccacatc ctggcggtgg catttaggg 4380

tgactccttc acacatactc ctcccttgaa tccacaggaa ctggatattc tgaaaaccgt 4440  
 aaaggaaatc acagggttt tgctgatca ggcttggcct gaaaacagga cggacctcca 4500  
 tgcctttagt aaccttagaa tcatacgcgg caggaccaag caacatggtc agtttctct 4560  
 tgcagtcgtc agcctgaaca taacatcctt gggattacgc tccctcaagg agataagtga 4620  
 tggagatgtg ataatttcag gaaacaaaaa ttgtgtctat gcaaatacaa taaactggaa 4680  
 aaaactgttt gggacctccg gtcagaaaac caaaattata agcaacagag gtgaaaacag 4740

ctgcaaggcc acaggccagg tctgccatgc cttgtctcc cccgaggcgt gctggggccc 4800  
ggagccccagg gactgcgtct cttgccggaa tgtcagccga ggcagggaaat gcgtggacaa 4860

gtgcaacctt ctggagggtg agccaaggga gtttgaggag aactctgagt gcatacagt 4920  
ccacccagag tgccctgcctc aggccatgaa catcacctgc acaggacggg gaccagacaa 4980  
ctgtatccag tggccact acattgacgg ccccccactgc gtcaagacct gcccggcagg 5040  
agtcatggga gaaaacaaca ccctggtctg gaagtacgca gacgcccggcc atgtgtgcc 5100  
cctgtgccat ccaaactgca cctacggatg cactggccca ggtcttgaag gctgtccaa 5160  
gaatggcct aagatcccgt ccatgcccac tggatggtg gggccctcc tcttgcgtct 5220  
ggtgtggcc ctgggatcg gcctcttcgt gtgagccggc gctctagacc cgggcgtcag 5280  
gaattcgata tcaagcttat cgataatcaa cctctggatt aaaaaatttgc taaaagatttgc 5340

actggtattt ttaactatgt tgctcctttt acgctatgtg gatacgtgc tttaatgcct 5400  
ttgtatcatg ctattgcttc ccgtatggct ttcattttct cctcctgtta taaatccgg 5460  
ttgctgtctc ttatgagga gttgtggccc gttgtcaggc aacgtggcgt ggtgtgcact 5520  
gtgtttgtcgt acgcaacccc cactggttgg ggcattgcca ccacctgtca gtcctttcc 5580  
gggactttcg cttcccccct ccctattgcc acggcggaaac tcatgcccgc ctgccttgcc 5640  
cgctgctgga caggggctcg gctgtggcc actgacaatt ccgtgggtt gtcggggaaa 5700  
tcatcgctt ttccttgct gtcgcctgt gttgccacct ggattctgca cgggacgtcc 5760  
ttctgctacg tccctcgcc cctcaatcca gcgacccitc cttcccgccg cctgctgccc 5820

gctctgccc ctctccgca tcttcgcctt cgccctcaga cgagtccggat ctcccttgg 5880  
gccgcctccc cgcacatcgata ccgtcgacta gccgtacccct taagaccaat gacttacaag 5940  
gcagctgttag atcttagcca ctttttaaaa gaaaaggggg gactggaagg gctaattcac 6000  
tcccaaagaa gacaagatct gcttttgcc tgtactgggt ctctctgggtt agaccagatc 6060  
tgagccctgg agctctctgg ctaacttaggg aacccactgc ttaagcctca ataaagcttgc 6120  
ccttgagtgc ttcaagtagt gtgtgcccgt ctgtgtgtg actctggtaa cttagatcc 6180  
ctcagacccct ttiagtcagt gtggaaaatc tctagcagaa ttcgatatca agcttatacg 6240  
taccgtcgac ctgcaggggg ggcccggtac ccaattcgcc ctatagtgatcg tgcgtattaca 6300

attcaactggc cgtcgttta caacgtcgatg actggggaaa ccctggcgat acccaactta 6360  
atcgccctgc agcacatccc ctttcgcctt gctggcgtaa tagcgaagag gcccgcaccg 6420  
atcgcccttc ccaacagttg cgcagccctga atggcgatg gaaattgtaa gcgttaatat 6480  
tttggtaaaa ttgcgttta atttttgtta aatcagctca ttttttaacc aataggccga 6540  
aatcgccaaa atcccttata aatcaaaaga atagaccgag atagggttga gtgtgttcc 6600

agtttggAAC aagagtccAC tattaaAGAA cgtggactCC aacgtcaaAG ggcgaaaAC 6660  
 cgtctatcAG ggcgatggCC cactacGTGA accatcacCC taatcaagTT ttttgggTC 6720  
 gaggtgccGT aaagcactAA atcggaACCC taaagggAGC ccccgattTA gagcttgacG 6780

gggaaagccG gcgaacgtGG cgagaaAGGA aggaaagAAA gcgaaaggAG cggcgctAG 6840  
 ggcgctggCA agtgtagcGG tcacgctcG cgtaaccACC acaccGCCG cgctaatGC 6900  
 gccgctacAG ggcgcgtcAG gtggcactTT tcggggAAat gtgcgcggAA cccctattG 6960  
 ttatTTTC taaatacATT caaatatGTa tccgctcatG agacaataAC cctgataaAT 7020  
 gcttcataAA tattgaaaaA ggaagagtAT gagtattCAA cattccGTG tcgccttAT 7080  
 tcccttttG cggcatttG gccttcTGT ttttgtcAC ccagaaACG tggtgaaAGt 7140  
 aaaagatGCT gaagatcAGT tgggtgcACG agtgggttAC atcgaactGG atctcaacAG 7200  
 cggttaagatC cttagagatTT tcggccccGA agaacgttt ccaatgatGA gcactttAA 7260

agttctgCTA tgtggcgcGG tattatcccG tattgacGCC gggcaagAGC aactcggtCG 7320  
 ccgcataCAC tattctcAGA atgacttGGT tgagtactCA ccagtcaCAG aaaagcatCT 7380  
 tacggatGGC atgacagtaA gagaattatG cagtgtGCC ataaccatGA gtgataaacAC 7440  
 tgcggccaAC ttacttctGA caacgatCGG aggaccGAAG gagctaaccG ctTTTtGCA 7500  
 caacatgggg gatcatgtAA ctgccttGA tcgttggAA ccggagctGA atgaagccAT 7560  
 accaaacGAC gagcgtGACA ccacgatGCC tgtagcaatG gcaacaacGT tgcgcAAact 7620  
 attaactGGC gaactactTA ctctagCTTC ccggcaacAA ttaatagact ggatggaggC 7680  
 ggataaaAGt gcaggaccAC ttctgcgtcG ggcccttCG gctggctggt ttattgtGA 7740

taaatctgGA gcccgtgAGC gtgggtctCG cggtatCATT gcagcactGG ggccagatGG 7800  
 taagccctCC cgtatcgtag ttatctacAC gacggggAGt caggcaACTA tggatgaACG 7860  
 aaatagacAG atcgctgAGA taggtgcCTC actgattaAG cattggtaAC tgtcagacCA 7920  
 agtttactCA tatatactTT agattgATT aaaacttCAT tttaatttA aaaggatCTA 7980  
 ggtgaagatC ctTTTtGATA atctcatGAC caaaatCCt taacgtgAGt ttctgtCCA 8040  
 ctgagcgtCA gaccccgtag AAAAGatCAA aggatTTtC tgagatCCTT ttTTCTCG 8100  
 ctgtaatctGC tgcttgcaAA caaaaaaaaACC accgctacCA gcggtggTTT gtttgcggA 8160  
 tcaagagCTA ccaactCTT ttccgaaggT aactggctC AGCAGAGCgC agataccAA 8220

tactgttctt ctatgttagC cgtatgttagG ccaccacTtC aagaactCTG tagcacGCC 8280  
 tacatacctC gctctgctAA tcctgttacc agtggctgCT gccagtgccG ataagtctG 8340  
 tcttaccggG ttggactCAA gacgatagtt accggataAG ggcgcAGcGGt cgggctGAAC 8400  
 ggggggttcG tgacacAGC ccagcttgGA gcgAACGACC tacaccGAAC tgagatacCT 8460

acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgt tcccgaaagg agaaaggcgg acaggtatcc 8520  
 ggtaagcggc agggctggaa caggagagcg cacgaggagg ctccaggaa gaaacgcctg 8580  
 gtatcttat agtccgtcg gtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtatg 8640  
 ctcgtcaggg gggggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gccccttt tacggitcct 8700

ggcctttgc tggcctttg ctcacatgtt cttcctgct ttatccccgtt attctgtgga 8760  
 taaccgtatt accgccttg agtgagctga taccgctcg cgcagccgaa cgaccgagcg 8820  
 cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaga ggcggcaata cgcaaacccgc ctctccccgc 8880  
 gcgttggccg attcataat gcagctggca cgacagggtt cccgactgga aagcggcag 8940  
 tgagcgaac gcaattaatg tgagtttagt cactcattag gcaccccagg ctttacactt 9000  
 tatgcttcg gtcgtatgt tgtgtggaat tgtgagcgga taacaattt acacaggaaa 9060  
 cagctatgac catgattacg ccaagctgaa aattaaacct cactaaaggg aacaaaagct 9120  
 ggagctccac cgcggtggcg gcctcgaggt cgagatccgg tcgaccagca accatagtc 9180

cgccttaac tccgcccata ccgccttaa ctccgeccag ttccgcccatt tctccgcccc 9240  
 atggctgact aatttttttt atttatgcag aggccgagggc cgctcggcc tctgagctat 9300  
 tccagaagta gtgaggaggc tttttggag gcctaggctt ttgcaaaaag ctgcacgg 9360  
 atcgattggc tcatgtccaa cattaccgccc atgttgacat tgattattga ctgttatta 9420  
 atagtaatca attacgggtt cattagttca tagcccatat atggagttcc gcgttacata 9480  
 acttacggta aatggccgcg ctggctgacc gcccacgac cccgcctt tgacgtcaat 9540  
 aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggacttcc cattgacgtc aatgggtgga 9600  
 gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagt tatcatatgc caagtacgcc 9660

ccctattgac gtcaatgacg gttaatggcc cgccctggcat tatgcccagt acatgaccc 9720  
 atggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgcttata ccatgggtat 9780  
 gcggtttgg cagtacatca atggcgtgg atagcggtt gactcacggg gatttccaag 9840  
 tctccacccc attgacgtca atggagttt gttttggcac caaaatcaac gggacttcc 9900  
 aaaaatgtcgt aacaactccg ccccaattgac gcaaattggc ggtaggcgtg tacgaaattc 9960  
 ggagtgccga gccctcagat cctgcatata agcagctgct tttgcctgt actgggtctc 10020  
 tctg 10024

&lt;210&gt; 55

&lt;211&gt; 9694

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Ce7scFv-IgG4 hinge-CH3-CD28tm/4-1BB-zeta-T2A-EGFRt-  
epHIV7 (intermediate)

&lt;400&gt; 55

gttagaccag atctgagcct gggagcttc tggctaacta ggaaacccac tgcttaagcc 60  
tcaataaagg ttgcctttag tgcttcaagt agtgtgtgcc cgtctgtgt gtgactctgg 120  
taactagaga tccctcagac ctttttagtc agtgtggaaa atctctagca gtggcgcccg 180  
aacagggact tggaaagcgaa aggaaacca gaggagctct ctgcacgcag gactcggctt 240  
gctgaagcgc gcacggcaag aggcgagggg cgccgactgg tgagtacgcc aaaaatttg 300

actagcggag gctagaagga gagagatggg tgcgagagcg tcagtattaa gcgggggaga 360  
attagatcga tggaaaaaaa ttgcgttaag gccaggggaa aagaaaaaat ataaattaaa 420  
acatatagta tggcaagca gggagctaga acgattcgc gtaatcctg gcctgttaga 480  
aacatcagaa ggctgttagac aaatactggg acagctacaa ccattccctc agacaggatc 540  
agaagaacctt agatcattat ataatacagt agcaaccctc tattgtgtgc atcaaaggat 600  
agagataaaa gacaccaagg aagctttaga caagatagag gaagagcaaa acaaaagtaa 660  
gaaaaaagca cagcaagcag cagctgacac aggacacagc aatcaggtca gccaaaattta 720  
ccctatagtg cagaacatcc agggcaaat ggtacatcag gccatatcac ctagaacttt 780

aaatgcattgg gtaaaagttag tagaagagaa ggcttcagc ccagaagtga taccatgtt 840  
ttcagcatta tcagaaggag ccacccaca agatttaaac accatgctaa acacagtggg 900  
gggacatcaa gcagccatgc aaatgtttaa agagaccatc aatgaggaag ctgcaggcaa 960  
agagaagagt ggtgcagaga gaaaaaagag cagtggaaat aggagctttg ttccctgggt 1020  
tcttgggagc agcaggaagc actatggcg cagcgtcaat gacgctgacg gtacaggcca 1080  
gacaattatt gtctggata gtgcagcagc agaacaattt gctgaggcgt attgaggcgc 1140  
aacagcatct gttcaactc acagtctgg gcatcaagca gctccaggca agaatcctgg 1200  
ctgtggaaag atacctaaag gatcaacagc tcctgggat ttgggttgc tctggaaac 1260

tcatttgcac cactgctgtg cttggatct acaaattggca gtattcatcc acaatttaa 1320  
aagaaaaaggg gggattgggg ggtacagtgc agggaaaga atagtagaca taatagcaac 1380  
agacatacaa actaaagaat tacaaaaaca aattacaaaa attcaaaattt ttcgggtta 1440  
ttacaggac agcagagatc cagtttgggg atcaattgca tgaagaatct gcttagggtt 1500  
aggcgtttg cgctgcttcg cgaggatctg cgatcgctcc ggtgccgctc agtggcaga 1560  
gcccacatcg cccacagtcc ccgagaagtt ggggggaggg gtcggcaatt gaaccggcgc 1620  
ctagagaagg tggcgcgggg taaactggga aagtgtgtc gtgtactggc tccgccttt 1680

tcccgagggtt ggggagaac cgtatataag tgcagtagtc gccgtgaacg ttcttttcg 1740

caacgggtt gccgccagaa cacagctgaa gcttcgaggg gctcgcatct ctccttcacg 1800  
 cgccccccgc cctaccttag gcccgcattcc acgcccgttg agtcgcgttc tgccgcctcc 1860  
 cgcctgttgtt gcctcctgaa ctgcgtccgc cgtctaggta agtttaaagc tcaggtcgag 1920  
 accgggcctt tgccggcgc tcccttgag cctacctaga ctcagccgac tctccacgct 1980  
 ttgcctgacc ctgcttgctc aactctacgt ctttggatc tttctgttc tgccgcgtt 2040  
 cagatccaag ctgtgaccgg cgcctacggc tagcgcggcc accatgtgc tgctgggtac 2100  
 cagcctgctg ctgtgcgagc tgccccaccc cgccttctg ctgatcccc aggtgcagct 2160  
 gcagcagcctt ggccgcgagc tggtaagcc aggcgcagc gtgaagctgt cctgcaaggc 2220

cagcggtac accttacccg gctactggat gcactgggtg aagcagagac ccggccacgg 2280  
 cctggaatgg atcgccgaga tcaaccccg caacggccgg accaactaca acgagcggtt 2340  
 caagagcaag gccaccctga ccgtggacaa gagcagcacc accgccttca tgccagctgtc 2400  
 cggcctgacc agcgaggaca ggcgcgtgtt cttctgcgac agggactact acggcaccag 2460  
 ctacaacttc gactactggg gccaggcac cacactgacc gtgagcagcg gcggaggggg 2520  
 ctctggccgc ggaggatctg ggggaggggg cagcgacatc cagatgaccc agagcagcag 2580  
 cagcttcagc gtgagcctgg ggcgcgggtt gaccatcacc tgtaaggcca acgaggacat 2640  
 caacaaccgg ctggccttgtt atcagcagac ccccgcaac agccccaggc tgctgtatcag 2700

cgccgccacc aacctggta cggcggtgcc cagccgtttt agcggcagcg gctccggcaa 2760  
 ggactacacc ctgaccatca caagcctgca ggccgaggac ttgcacccctt actactgcac 2820  
 gcagtagctgg tccacccctt tccatcggtt cagcgccacc gagctggaaa tcaaagaatc 2880  
 taagtacgga cggccctgccc ccccttgcctt tggccagcctt agagaacccc aggtgtacac 2940  
 cctgcctccc agccaggaag agatgaccaaa gaaccaggatc tccctgaccc gcctggtaa 3000  
 aggcttctac cccagcgata tcggcggtt atgggagac aacggccagc ccgagaacaa 3060  
 ctacaagacc acccccccgtt tgctggacag cgacggcagc ttcttcctgtt actccggctt 3120  
 gaccgtggac aagagccggt ggcaggaagg caacgtcttcc agctgcagcg tgatgcacga 3180

ggccctgcac aaccactaca cccagaagtc cctgagccctg agcctggca agatgttctg 3240  
 ggtgtgggtt gtggcgag ggcgtgtggc ctgtacagc ctgtgggtca ccgtggccctt 3300  
 catcatctttt tgggtgaaac gggcagaaa gaaactccgtt tatatattca aacaaccatt 3360  
 tatgagacca gtacaaacta ctcaagagga agatggctgtt agctgcccgtt ttccagaaga 3420  
 agaagaagga ggtatgtgaac tgcgggtgaa gttcagcaga agcgccgacg cccctgccta 3480  
 ccagcaggc cagaatcagc tgtacaacga gctgaacctg ggcagaaggg aagagtacga 3540

cgtcctggat aagcggagag gccgggaccc tgagatggc ggcaaggctc ggcggaagaa 3600  
 cccccagaa ggcctgtata acgaactgca gaaagacaag atggccgagg cctacagcga 3660

gatcgcatg aagggcgagc ggaggcgggg caagggccac gacggcctgt atcagggcct 3720  
 gtccaccgcc accaaggata cctacgacgc cctgcacatg caggccctgc ccccaaggct 3780  
 cgagggcggc ggagagggca gaggaagtct tctaacadgc ggtgacgtgg aggagaatcc 3840  
 cggccctagg atgcttctcc tggtgacaag cttctgcctc tgtgagttac cacacccagc 3900  
 attcctcctg atcccacgca aagtgtgtaa cggaataggt attggtaat ttaaagactc 3960  
 actctccata aatgctacga atattaaaca cttcaaaaac tgcacctcca tcagtggcga 4020  
 tctccacatc ctgcccgtgg cattttaggg tgactccttc acacatactc ctccctgga 4080  
 tccacagaa ctggatattc taaaaaccgt aaaggaaatc acagggttt tgctgattca 4140

ggcttgccct gaaaacagga cggacctcca tgcctttag aacctagaaa tcatacgccg 4200  
 caggaccaag caacatggtc agtttctct tgcagtcgtc agcctgaaca taacatcctt 4260  
 gggattacgc tccctcaagg agataagtga tggagatgtg ataatttcag gaaacaaaaaa 4320  
 tttgtgttat gcaaatacaa taaactggaa aaaactgtt gggacctccg gtcagaaaaac 4380  
 caaaattata agcaacagag gtgaaaacag ctgcaaggcc acaggccagg tctgcatgc 4440  
 ctttgttcc cccgagggct gctggggccc ggagccagg gactgcgtct cttggccgaa 4500  
 tgtcagccga ggcaggaaat gcgtggacaa gtgcaacctt ctggagggtg agccaaggaa 4560  
 gtttgtggag aactctgagt gcatacagtg ccacccagag tgcctgcctc aggccatgaa 4620

catcacatgc acaggacggg gaccagacaa ctgtatccag tggccact acattgacgg 4680  
 ccccaactgc gtcaagacct gcccggcagg agtcatggaa gaaaacaaca ccctggctcg 4740  
 gaagtacgca gacgcccccc atgtgtgcca cctgtgcccatt ccaaactgca cctacggatg 4800  
 cactggccca ggtcttgaag gctgtccaaac gaatggccct aagatcccgt ccatgcccac 4860  
 tggatggtg gggccctcc tcttgctgt ggtggggcc ctgggatcg gcctcttcat 4920  
 gtgagccgccc gctctagacc cgggctgcag gaattcgata tcaagcttgcgataatcaa 4980  
 cctctggatt acaaaatttg taaaagattt actggatattc ttaactatgt tgctccttt 5040  
 acgtatgtg gatacgctgc ttaatgcct ttgtatcatg ctattgcttc ccgtatggct 5100

ttcattttct ctccttgta taaatccgg ttgctgtctc tttatgagga gttgtggccc 5160  
 gttgtcaggc aacgtggcgt ggtgtgcact gtgttgcgt acgcaacccc cactgggtgg 5220  
 ggcattgcca ccacctgtca gtccttcc gggactttcg cttcccccct ccctattgcc 5280  
 acggcggAAC tcatacgccgc ctgccttgcc cgctgcgtgg cagggcgtcg gctgtggc 5340  
 actgacaatt ccgtgggttt gtcggggaaa tcatcgctt ttcctggct gctcgctgt 5400

gttgcacccggattctcgccggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatcca 5460  
gcggacccctccttcccgccgcctgtgcggcgtctgcggccttccgcgtttcgccctt 5520  
gcgcctcaaga cgagtccggatctcccttgg gcccctcccgcatcgataccgtcgacta 5580

gccgtaccc taagaccat gacttacaag gcagctgtag atcttagcca ctttttaaaa 5640  
gaaaaggggg gactggaagg gctaattcac tcccaaagaa gacaagatct gcttttgcc 5700  
tgtactgggt ctctctgggt agaccagatc tgagcctggg agctctctgg ctaactaggg 5760  
aacccactgc ttaagcctca ataaagcttgc ctttgagtgc ttcaagtagt gtgtgccgt 5820  
ctgttgtgtg actctggtaa ctagagatcc ctcagaccct tttagtcagt gtggaaaatc 5880  
tctagcagaa ttcgatatac agcttatcga taccgtcgac ctcgaggggg ggcccggtac 5940  
ccaattcgcc ctatagttagt tcgttattaca attcaatggc cgtcgttta caacgtcggt 6000  
actggggaaaa ccctggcggtt acccaactta atcgccctgc agcacatccc ccttcgcca 6060

gctggcgtaa tagcgaagag gcccgccaccg atcgcccccc ccaacagttt cgccgccttg 6120  
atggcgaatg gaaattgttaa gcgttaatat tttgttaaaa ttgcgttaa attttgtta 6180  
aatcagctca ttttttaacc aataggccga aatcgccaaa atcccttata aatcaaaaga 6240  
atagaccgag atagggttga gtgttgttcc agtttggAAC aagagtccac tattaaagaa 6300  
cgtggactcc aacgtcaaag ggcggaaaaac cgtctatcag ggccatggcc cactacgtga 6360  
accatcaccc taatcaagg tttgggggtc gaggtgccgt aaagcactaa atcggaaccc 6420  
taaaggggagc ccccgattta gagcttgacg gggaaagccg gcgaaacgtgg cgagaaaggg 6480  
agggaagaaaa gcgaaaggag cggcgcttag gggcgtggca agtgttagccg tcacgctgcg 6540

cgttaaccacc acacccggccg cgcttaatgc gccgctacag ggcgcgtcag gtggcacttt 6600  
tcgggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatTTTC taaatacatt caaatatgtA 6660  
tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattaaaaaa ggaagagtat 6720  
gagtattcaa catttccgtg tgcccttat tcccttttt gcggcatttt gccttcctgt 6780  
ttttgctcac ccagaaacgc ttgtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg 6840  
agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggttaagatc cttgagagtt ttcgccccga 6900  
agaacgtttt ccaatgtatc gcactttaa agttctgtta tgtggcgccg tattatcccg 6960  
tattgacgcc gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga atgacttttgtt 7020

tgtagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg 7080  
cagtgctgcc ataaccatga gtgataaacac tgccggccaac ttacttctga caacgatcg 7140  
aggaccgaag gagctaaccg ctttttgc acaatgggg gatcatgtaa ctgcgccttg 7200  
tcgttggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgcac gagcgtgaca ccacgatgc 7260

tgttagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attaactggc gaactactta ctctagttc 7320  
 ccggcaaca ttaatagact ggatggaggc ggataaaagt gcaggaccac ttctgcgtc 7380  
 ggcccttcg gctggctggt ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctg 7440  
 cggtatcatt gcagcactgg ggccagaatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctcac 7500

gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc 7560  
 actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt 7620  
 aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc cttttgata atctcatgac 7680  
 caaaatccct taacgtgagt tttcggtcca ctgagcgtca gacccctgaaa 7740  
 aggatcttct tgagatcctt ttttctggtcg cgtaatctgc tgcttgaaa caaaaaacc 7800  
 accgctacca gcggtggttt gtttgcggta tcaagagcta ccaactctt ttccgaaggt 7860  
 aactggcttc ageggagcgc agataccaaa tactgttctt ctatgttagc cgtatgtttagg 7920  
 ccaccacttc aagaactctg tagcaccggcc tacataccctc gctctgctaa tcctgttacc 7980

agtggctgct gccagtggcg ataagtcgt tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt 8040  
 accggataag ggcggcgtt cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttgaa 8100  
 gcgaacgacc tacaccgaac tgagataacct acagcgtgag ctatgagaaaa ggcacacgct 8160  
 tcccgaaaggc agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg 8220  
 cacgagggag ctcccgaggaa gaaacgcctg gtatctttat agtccctgtcg gtttcgcca 8280  
 cctctgactt gagcgtcgat ttttgtatg ctgcgtcaggg gggcggagcc tatgaaaaaa 8340  
 cgccagcaac gcccctttt tacgggttctt ggcctttgc tggccttttgc ctcacatgtt 8400  
 ctttcctgctt ttatccccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 8460

taccgctcgc cgccggcga cggaccggc cagcggatca gtgagcggagg aagcggaaga 8520  
 gcggccaaata cggccaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcatataat gcagctggca 8580  
 cgacagggtt cccgactgga aagcggcggc tgagcgcac gcaattaaatg tgatgttagct 8640  
 cactcattag gcaccccgagg ctttacactt tatgttccg gtcgtatgt tttgtggaaat 8700  
 tgtgagcggta taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg ccaagctcga 8760  
 aattaaacctt cactaaaggaa aacaaaagct ggagctccac cgcgggtggcg gcctcgaggt 8820  
 cgagatccgg tcgaccagca accatagtcc cggccctaac tccgcccatac cggccctaa 8880  
 ctccgcccag ttccgcccattt tctccggcccc atggctgact aatttttttt atttatgcag 8940

aggccgaggc cgcctcgcc tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc tttttggag 9000  
 gccttaggctt ttgcaaaaag cttcgacggt atcgattggc tcatgtccaa cattaccgcc 9060  
 atgttgacat tgattattga ctagtttata atagtaatca attacgggtt cattagttca 9120

tagccatat atggagttcc gcgttacata acttacgta aatggcccgc ctggctgacc 9180  
 gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat gttccatag taacgccaat 9240  
 agggacttcc cattgacgtc aatgggtgga gtattacgg taaactgccc acttggcagt 9300  
 acatcaagt tatcatatgc caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc 9360  
 cgcctggcat tatgcccagt acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta 9420

cgtattagtc atcgctatta ccatggtgat gcgggtttgg cagtagatca atggcgtgg 9480  
 atagcgttt gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atggagttt 9540  
 gtttggcac caaaatcaac gggacttcc aaaatgtcgt aacaactccg cccattgac 9600  
 gcaaatggc ggtaggcgtg tacggaattc ggagtggcga gccctcagat cctgcatata 9660  
 agcagctgct tttgcctgt actgggtctc tctg 9694

&lt;210&gt; 56

&lt;211&gt; 9373

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Ce7scFv-IgG4hinge-CD28tm/4-1BB-zeta-T2A-EGFRt-epHI

V7

&lt;400&gt; 56

gttagaccag atctgaccct gggagctctc tggctaacta gggAACCCAC tgcttaagcc 60  
 tcaataaagc ttgcctttag tgcttcaagt agtgtgtgcc cgtctgtgt gtgactctgg 120  
 taactagaga tccctcagac ccttttagtc agtgtggaaa atctctagca gtggcgcgg 180  
 aacagggact tgaaaagcgaa agggaaacca gaggagctct ctgcacgcag gactcggctt 240  
 gctgaaggcgc gcacggcaag aggcgagggg cgccgactgg tgagtacgcc aaaaatttg 300  
 actagcggag gctagaagga gagagatggg tgcgagagcg tcagtattaa gcgggggaga 360  
 attagatcga tggaaaaaaa ttcggttaag gccaggggaa aagaaaaat ataaattaaa 420

acatatacgta tggcaagca gggagctaga acgattcgca gttaatcctg gcctgttaga 480  
 aacatcagaa ggctgttagac aaatactggg acagctacaa ccatcccttc agacaggatc 540  
 agaagaacctt agatcattat ataatacagt agcaaccctc tattgtgtgc atcaaaggat 600  
 agagataaaa gacaccaagg aagctttaga caagatagag gaagagcaaa acaaaaagtaa 660  
 gaaaaaagca cagcaaggcag cagctgacac aggacacagc aatcaggta gccaaaattta 720  
 ccctatagtg cagaacatcc aggggcaat ggtacatcag gccatatcac ctagaacttt 780  
 aatgcgtgg gtaaaagttag tagaagagaa ggcttcagc ccagaagtga taccatgtt 840

ttcagcatta tcagaaggag ccacccaca agattnaac accatgtaa acacagtgg 900

gggacatcaa gcagccatgc aaatgtaaa agagaccatc aatgaggaag ctgcaggaa 960  
 agagaagagt ggtgcagaga gaaaaaagag cagtggaat aggagcttg ttccttgggt 1020  
 tcttgggagc agcaggaagc actatggcg cagcgtcaat gacgctgacg gtacaggcca 1080  
 gacaattatt gtctggata gtgcagcgc agaacaattt gctgagggtt attgaggcgc 1140  
 aacagcatct gttcaactc acagtctgg gcatcaagca gctccaggca agaatcctgg 1200  
 ctgtggaaag atacctaaag gatcaacgc tcctggat ttggggtgc tctggaaac 1260  
 tcatttgcac cactgctgt cttggatct acaaattgca gtattcatcc acaattttaa 1320  
 aagaaaaggg gggattgggg ggtacagtgc agggaaaga atagtagaca taatagcaac 1380

agacatacaa actaaagaat tacaaaaca aattacaaa attcaaaatt ttcgggta 1440  
 ttacagggac agcagagatc cagttgggg atcaattgca tgaagaatct gcttagggtt 1500  
 aggcgtttg cgctgcttcg cgaggatctg cgatcgctcc ggtgcccgtc agtggcaga 1560  
 ggcacatcg cccacagtcc ccgagaagtt gggggaggg gtccggcaatt gaaccggcgc 1620  
 cttagagaagg tggcgccggg taaactggga aagtgtatgtc gtgtactggc tccgccttt 1680  
 tccccgggtt gggggagaac cgtatataag tgcaatgtatc gccgtgaacg ttctttcg 1740  
 caacgggtt gccggccagaa cacagctgaa gcttcgaggg gctcgatct ctccttcacg 1800  
 cgccggccgc cttaccttag gcccgcattc acgcccgtt agtcgcgtt tgccgcctcc 1860

cgcctgttgtt gcctcctgaa ctgcgtccgc cgtcttagta agttaaagc tcaggtcgag 1920  
 accgggcctt tgtccggcgc tcccttggag cctacctaga ctgcgtccgc tctccacgt 1980  
 ttgcctgacc ctgcttgctc aactctacgt ctttggatcg tttctgttc tgccgcgtt 2040  
 cagatccaag ctgtgaccgg cgccctacggc taggcggcc accatgtgc tgctgggtac 2100  
 cagcctgctg ctgtgcgagc tgccccaccc cgcccttctg ctgatcccc aggtgcagct 2160  
 gcagcagccct ggccggcggc tggtaagcc aggcggcagc gtgaagctgt cctgcaaggc 2220  
 cagcggctac accttcaccc gctactggat gcactgggt aagcagagac cggccacgg 2280  
 cctgaaatgg atcggcgaga tcaacccag caacggccgg accaactaca acgagcggtt 2340

caagagcaag gcccacccgtga cctgtggacaa gagcagcacc accgccttca tgcaatgttc 2400  
 cggcctgacc agcgaggaca ggcggcgtta cttctgcgcc agggactact acggcaccag 2460  
 ctacaacttc gactactggg gccaggccac cacactgacc gtgagcagcg gcccgggggg 2520  
 ctctggccgc ggaggatctg ggggggggg cagcgtacatc cagatgaccc agagcagcag 2580  
 cagcttcagc gtgagcctgg ggcggccggt gaccatcacc tgtaaggcca acgaggacat 2640  
 caacaacccgg ctggccttgtt atcagcagac cccggcaac agccccaggc tgctgatcag 2700

cgggccacc aacctggta cggcgtgcc cagccggtt agccgcagcg gctccggcaa 2760  
 ggactacacc ctgaccatca caagcctgca ggccgaggac ttgcacacct actactgcca 2820

gcagttactgg tccacccct tcacccctgg cagccgcacc gagctggaaa tcaaagaatc 2880  
 taagtacgga ccgcctgccc cccctgccc tatgttctgg gtgttgtgg tggtcggagg 2940  
 cgtgtggcc tgctacagcc tgctggcac cgtggccttc atcatcttt gggtaaacg 3000  
 gggcagaaag aaactcctgt atatattcaa acaaccattt atgagaccag tacaaactac 3060  
 tcaagaggaa gatggctgta gtcggcgatt tccagaagaa gaagaaggag gatgtgaact 3120  
 gcgggtgaag tttagcagaa gcggcgacgc ccctgcctac cagcaggccc agaatcagct 3180  
 gtacaacgag ctgaaacctgg gcagaaggaa agatcagac gtccgtgata agcggagagg 3240  
 cgggaccct gagatggcgc gcaaggctcg gcggagaac cccaggaag gcctgtataa 3300

cgaactgcag aaagacaaga tggccgaggc ctacagcgat atcggcatga agggcgagcg 3360  
 gaggcggggc aaggcccacg acggcctgta tcagggctg tccaccgcca ccaaggatac 3420  
 ctacgacgcc ctgcacatgc aggccctgcc cccaggctc gagggcggcg gagagggcag 3480  
 aggaagtctt ctaacatgcg gtgacgtgaa ggagaatccc ggccttagga tgcttctct 3540  
 ggtgacaagc cttctgctt gtgagttacc acacccagca ttctcctga tcccacgcaa 3600  
 agtgtgtaac ggaataggta ttggtaatt taaagactca ctctccataa atgctacgaa 3660  
 tattaaacac ttcaaaaact gcacccat cagtgccat ctccacatcc tgccgtggc 3720  
 atttaggggt gactccttca cacatactcc tcctctggat ccacaggaac tggatattct 3780

aaaaaccgta aaggaaatca cagggtttt gctgattcag gcttggctg aaaacaggac 3840  
 ggacctccat gccttgaga acctagaaat catacgccgc aggaccaagc aacatggta 3900  
 gtttctctt gcagtcgtca gcctgaacat aacatcctg ggattacgct ccctcaagga 3960  
 gataagtgtatggatgtgaa taatttcagg aaacaaaaat ttgtgtatg caaatacaat 4020  
 aaactggaaa aaactgttt ggaccccgcc tcagaaaaacc aaaattataa gcaacagagg 4080  
 tgaaaacagc tgcaaggcca cagggcaggctgcatgatcc ttgtgtatg ccggggctg 4140  
 ctggggcccg gagcccgagg actgcgtctc ttgcggat gtcagccgag gcaggaaatg 4200  
 cgtggacaag tgcaacccatc tggagggtga gccaaggag tttgtggaga actctgtatg 4260

catacagtgc cacccagagt gcctgcctca ggccatgaac atcacctgca caggacgggg 4320  
 accagacaac tgtatccagt gtgcccacta cattgacggc cccactgctc tcaagacctg 4380  
 cccggcagga gtcatgggag aaaacaacac cctggctgg aagtacgag acggccggcca 4440  
 tgtgtgcac ctgtgccatc caaactgcac ctacggatgc actggccag gtcttgaagg 4500  
 ctgtccaaacg aatggcccta agatcccgtc catgccact gggatggtg gggccctct 4560

cttgctgctg gtggggcccc tgggatcg cctttcatg tgagcggccg ctctagaccc 4620  
 gggctgcagg aattcgatat caagcttatac gataatcaac ctctggatta caaaatttgt 4680  
 gaaagattga ctgttattct taactatgtt gtcctttta cgctatgtgg atacgctgct 4740

ttaatgcctt tgtatcatgc tattgcttc cgtatggctt tcattttctc ctccttgtat 4800  
 aaatcctgggt tgcgtctct ttatgaggag ttgtggcccg ttgtcaggca acgtggcgtg 4860  
 gtgtgcactg tggggctga cgcaaccccc actgggtgg gcattgccac cacctgttag 4920  
 ctcccttcgg ggacttcgc ttccccctc cctattgcca cggcggaaact catgccccc 4980  
 tgccttgcgc gctgctggac aggggctcg ctgttggca ctgacaattc cgtgggttg 5040  
 tcggggaaat catcgctt cccttggctg ctgcctgtt ttgcacccctg gattctggc 5100  
 gggacgtct tctgtacgt cccttcggcc ctcaatccag cggaccccttcc ttcccgccg 5160  
 ctgtgcggg ctctggggcc tttccggctt ctgccttc gccctcagac gagtcggatc 5220

tcccttggg ccgcctcccc gcatcgatac cgtcgactag ccgtacccctt aagaccaatg 5280  
 acttacaagg cagctgtaga tcttagccac tttttaaaag aaaagggggg actggaagg 5340  
 ctaattcaact cccaaagaag acaagatctg cttttgcct gtactgggtc tctctggta 5400  
 gaccagatct gagectggga gctctctggc taactaggaa acccactgct taaggctcaa 5460  
 taaagcttgc cttagtgct tcaagttagt tggtccgtc tggtgtgtga ctctggtaac 5520  
 tagagatccc tcagaccctt ttagtcgtg tgaaaatct ctgcagaat tcgatataa 5580  
 gcttatcgat accgtcgacc tcgagggggg gcccgttacc caattcgccc tatagtggat 5640  
 cgttaccaa ttcaactggcc gtcgtttac aacgtcgta ctggaaaac cctggcgta 5700

cccaacttaa tcgccttgca gcacatcccc ctttgcctcag ctggcgtaat agcgaagagg 5760  
 cccgcaccga tcgccttcc caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg aaattgtaa 5820  
 cgttaatatt ttgttaaaat tcgcgttaaa tttttgttaa atcagctcat ttttaacca 5880  
 ataggccgaa atcggcaaaa tcccttataa atcaaaagaa tagaccgaga tagggttgag 5940  
 tttgttcca gtttggaaaca agagtcact attaaagaac gtggactcca acgtcaaaagg 6000  
 gcgaaaaacc gtctatcagg gcatggccc actacgtgaa ccatcaccct aatcaagttt 6060  
 tttgggtcg aggtggcgta aagcactaaa tcggaaacctt aaaggagcc cccgatttag 6120  
 agcttgacgg gggaaagccgg cgaacgtggc gagaaaggaa gggaaaggaa cgaaaggagc 6180

gggcgcctagg gcgcgtggca gtgttagcggt cacgtcgcc gtaaccacca caccggccgc 6240  
 gcttaatgcg ccgcgtacagg gcgcgtcagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaaac 6300  
 cccttattgt ttatccatc aaatacattc aaatatgtat ccgcctcatga gacaataacc 6360  
 ctgataaatg ctcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt 6420

cgcccttatt cccttttg cggcatttg ctttcgtt tttgctcacc cagaaacgct 6480  
 ggtgaaagta aaagatgctg aagatcgtt gggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga 6540  
 tctcaacagc ggttaagatcc ttgagagtt tcgccccaa gaacgtttc caatgatgag 6600  
 cacttitaaa gtctgctat gtggcgccgt attatccgt attgacgccc ggcaagagca 6660

actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttgggtt gagtaactcac cagtcacaga 6720  
 aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgccaa taaccatgag 6780  
 tgataaacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc 6840  
 tttttgcac aacatggggg atcatgtAAC tcgccttgcgt cggtggaaac cggagctgaa 6900  
 tgaagccata ccaaaccgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacgtt 6960  
 gcgc当地acta ttaactggcg aactacttac tctagttcc cggcaacaat taatagactg 7020  
 gatggaggcg gataaagtgtt caggaccact tctgctcg gccctccgg ctggctgggtt 7080  
 tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattt cagcactggg 7140

gccagatggta aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat 7200  
 ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtaact 7260  
 gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt ttaatttaa 7320  
 aaggatctag gtgaagatcc ttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt 7380  
 ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatcctt 7440  
 ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaac aaaaaaaccac ccgttaccag cgggggtttg 7500  
 tttgccggat caagagctac caactttt tccgaaggta actggctca gcagagcgca 7560  
 gataccaaat actgttcttc tagttagcc gtagtttaggc caccactca agaactctgt 7620

agcacccctt acatacctcg ctctgctaat cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga 7680  
 taagtctgtt ctaccgggt tggactcaag acgatagttt ccggataagg cgcagcggtc 7740  
 gggctgaacg ggggggtcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacctt acaccgaact 7800  
 gagataccca cagcgtgagc tatgagaaag cggccacgctt cccgaaggaa gaaaggcgga 7860  
 caggtatccg gtaagcggca gggtcggaaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg 7920  
 aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcggccac ctctgacttg agcgtcgatt 7980  
 tttgtatgc tcgtcagggg ggcggagccct atggaaaaac gccagcaacg cggcctttt 8040  
 acggttccctg gcctttgtt ggcctttgc tcacatgttc ttccctgcgt tatcccctga 8100

ttctgtggat aaccgttata ccgccttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac 8160  
 gaccgagcgcc acggagtcag tgagcggagga agcggaaagag cggccaaatac gcaaaaccgc 8220  
 tctcccccgcc cgttggccga ttcatatg cagctggcac gacaggtttc ccgactggaa 8280

agcgggcagt gagcgcaacg caattaatgt gagttagtc actcattagg caccccagc 8340  
 tttacactt atgctccgg ctcgtatgtt gtgtggatt gtgagccgt aacaattca 8400  
 cacaggaaac agctatgacc atgattacgc caagctgaa attaaccctc actaaaggga 8460  
 acaaaaagctg gagctccacc gcggtggcgg cctcgaggc gagatccggt cgaccagcaa 8520  
 ccatagtccc gcccttaact ccgccccatcc cgcccttaac tccgcccagt tccgcccatt 8580

ctccgccccca tggctgacta attttttta tttatgcaga ggccgaggcc gcctcgccct 8640  
 ctgagctatt ccagaagtag tgaggaggct ttttgaggc cctaggctt tgaaaaagc 8700  
 ttcgacggta tcgattggct catgtccaac attaccgcca tggacatt gattattgac 8760  
 tagttataa tagtaatcaa ttacgggtc attagttcat agccatata tggagttccg 8820  
 cgttacataa cttaggttaa atggccgccc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt 8880  
 gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgcaata gggactttcc attgacgtca 8940  
 atgggtggag tatttacggt aaactgccc cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc 9000  
 aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta 9060

catgaccta tggacttgc ctacttgca gtacatctac gtattagtca tcgctattac 9120  
 catggtgatg cggtttggc agtacatcaa tggcgtgga tagcggttg actcacgggg 9180  
 atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tggagtttgc tttggcacc aaaatcaacg 9240  
 ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatggcgc gtaggcgtgt 9300  
 acgaaattcg gagtggcag ccctcagatc ctgcatataa gcagctgctt tttgcctgta 9360  
 ctgggtctct ctg 9373

&lt;210&gt; 57

&lt;211&gt; 9496

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&gt; Ce7scFv-IgG4hinge-CD28tm/cyto-4-1BB-zeta-T2A-EGFRt

-epHIV7 (short two costimulatory domains)

&lt;400&gt; 57

gttagaccag atctgaccct gggagctctc tggctaaacta ggaaacccac tgcttaagcc 60  
 tcaataaagc ttgccttgag tgcttcaagt agtgtgtgcc cgtctgttgt gtgactctgg 120  
 taactagaga tccctcagac ccttttagtc agtgtggaaa atctctagca gtggcgcgg 180  
 aacagggact tggaaagcgaa agggaaacca gaggagctct ctcgacgcag gactcggctt 240  
 gctgaaggcgc gcacggcaag aggcgagggg cggcgactgg tgagtacgcc aaaaatttg 300

actagcggag gctagaagga gagagatggg tgcgagagcg tcagtattaa gcggggaga 360

attagatcga tggaaaaaaa ttcggttaag gccaggggaa aagaaaaat ataaattaa 420  
 acatatagta tggcaagca gggagctaga acgattcgca gttaatcctg gcctgttaga 480  
 aacatcagaa ggctgttagac aaatactggg acagctacaa ccatccctc agacaggatc 540  
 agaagaacctt agatcattat ataatacagt agcaaccctc tattgtgtgc atcaaaggat 600  
 agagataaaa gacaccaagg aagctttaga caagatagag gaagagcaaa acaaaagtaa 660  
 gaaaaaagca cagcaagcag cagctgacac aggacacagc aatcaggatca gccaaaatta 720  
 ccctatagtg cagaacatcc agggcaaat ggtacatcag gccatatcac cttagaactt 780  
 aaatgcattgg taaaagtag tagaagagaa ggcttcagc ccagaagtga taccatgtt 840

ttcagcatta tcagaaggag ccaccccaca agattnaac accatgtaa acacagtggg 900  
 gggacatcaa gcagccatgc aaatgttaaa agagaccatc aatgaggaag ctgcaggca 960  
 agagaagagt ggtcagaga gaaaaaagag cagtggaat aggagcttg ttccctgggt 1020  
 tcttgggagc agcaggaagc actatggcg cagcgtcaat gacgctgacg gtacaggcca 1080  
 gacaattatt gtctggata gtgcagcagc agaacaattt gctgagggtt attgaggcgc 1140  
 aacagcatct gttgcaactc acagtctggg gcatcaagca gctccaggca agaatctgg 1200  
 ctgtggaaag atacctaaag gatcaacagc tcctgggat ttggggttgc tctggaaac 1260  
 tcattgcac cactgctgtg cttggatct acaaatggca gtattcatcc acaatttaa 1320

aagaaaaggg gggattgggg ggtacagtgc agggaaaga atagtagaca taatagcaac 1380  
 agacatacaa actaaagaat tacaaaaaca aattacaaa attcaaaattt ttcgggtta 1440  
 ttacaggac agcagagatc cagtttgggg atcaattgca tgaagaatct gcttagggtt 1500  
 aggcttttgc cgctgcttcg cgaggatctg cgatcgctcc ggtgccgtc agtggcaga 1560  
 ggcacatcg cccacagtcc ccgagaagtt gggggaggg gtcggcaattt gaaccggcgc 1620  
 ctagagaagg tggcgccccggg taaactggga aagtgtatgc gtgtactggc tccgccttt 1680  
 tcccgagggtt gggggagaac cgtatataag tgcaatgttc ggcgtgaacg ttcttttcg 1740  
 caacgggtt gccgcacaa cacagctgaa gcttcgggg gctcgcacatct ctccttcacg 1800

cggccggcgc cttacactgag gcccgcacatcc acgcccgttg agtcgcgttc tgccgcctcc 1860  
 cgcctgttgtt gcctcctgaa ctgcgtccgc cgtcttaggtt agtttaagc tcaggtcgag 1920  
 accggccctt tgcggcgc tcccttggag cttacactgaa ctcagccggc tctccacgt 1980  
 ttgcctgacc ctgtttgttc aactctacgt ctttgggttgc ttttctgttc tgccgcgtta 2040  
 cagatccaag ctgtgaccgg cgcctacggc tagcggccgc accatgtgc tgctgggtac 2100  
 cagcctgctg ctgtgcgagc tgccccaccc cgccttctg ctgatcccc aggtgcagct 2160

gcagcagccct ggcgccgagc tggtaagcc aggcccgac gtgaagctgt cctgcaaggc 2220  
cagcggtac acttcacccg gctactggat gcactgggtg aagcagagac ccggccacgg 2280

cctggaatgg atcggcgaga tcaacccag caacggccgg accaactaca acgagcggtt 2340  
caagagcaag gccaccctga ccgtggacaa gagcagcacc accgccttca tgagctgtc 2400  
cggcctgacc agcgaggaca gcccgtgt a cttctgcgc agggactact acggcaccag 2460  
ctacaacttc gactactggg gccagggcac cacactgacc gtgagcagcg gcggaggggg 2520  
ctctggcggc ggaggatctg ggggaggggg cagcgcacatc cagatgaccc agagcagcag 2580  
cagcttcagc gtgagcctgg gcgaccgggt gaccatcacc tgtaaggcca acgaggacat 2640  
caacaaccgg ctggcttgtt atcagcagac ccccgcaac agccccaggc tgctgatcag 2700  
cggcgccacc aacctggta ccggcgtgcc cagccggtt agcggcagcg gctccggcaa 2760

ggactacacc ctgaccatca caagcctgca ggccgaggac ttgcacactt actactgcca 2820  
gcagtagtgg tccacccct tcacccctgg cagcggcacc gagctggaaa tcaaagaatc 2880  
taagtacgga ccgcctgccc ccccttgcct tatgttctgg gtgctgggt tggtcggagg 2940  
cgtgctggcc tgctacagcc tgctggcac cgtggcttc atcatcttt ggtcccgag 3000  
caagcggagc agaggcggcc acagcgacta catgaacatg acccctagac ggcctggccc 3060  
caccagaaag cactaccagc cctacgcccc tccccggac tttgccct acagaagcaa 3120  
acggggcaga aagaaactcc tgtatatatt caaacaacca tttatgagac cagtacaaac 3180  
tactcaagag gaagatggct gtagctggcc atttccagaa gaagaagaag gaggatgtga 3240

actgcgggtg aagttagca gaagcgccga cgccctgcc taccagcagg gccagaatca 3300  
gctgtacaac gagctgaacc tggcgagaag ggaagagttac gacgtccctgg ataagcggag 3360  
aggccggac cctgagatgg gcccggcaagcc tcggcgaaag aaccccgagg aaggcctgt 3420  
taacgaactg cagaaagaca agatggccga ggcctacagc gagatggca tgaagggcga 3480  
gcggaggcgg gccaaggggcc acgacggct gtatcaggc ctgtccaccg ccaccaagga 3540  
tacctacgac gcccgtcaca tgcaggccct gcccccaagg ctggggcgc gggaggg 3600  
cagaggaagt ctctaacat gcccgtacgt ggaggagaat cccggcccta ggatgttct 3660  
cctggtgaca agccttctgc tctgtgagtt accacacca gcattcctcc tggatcccacg 3720

caaagtgtt aacgaaatag gtattggta atttaagac tcaacttcca taaatgtac 3780  
gaatattaaa cactcaaaa actgcaccc catcagtggc gatctccaca tcctggcggt 3840  
ggcattttagg ggtgactct tcacacatac tcctccctg gatccacagg aactggat 3900  
tctgaaaacc gtaaaggaaa tcacagggtt tttgctgatt caggcttgc ctgaaaacag 3960  
gacggaccc catgccttg agaacctaga aatcatacgc ggcaggacca agcaacatgg 4020

tcagtttct ctgcagtcg tcagcctgaa cataacatcc ttgggattac gtcctcaa 4080  
 ggagataagt gatggagatg tgataattc aggaacaaa aatttggtct atgcaaatac 4140  
 aataaaactgg aaaaaactgt ttggacacc cggtcagaaa accaaaatta taagcaacag 4200

aggtaaaaac agtcgaagg ccacaggcca ggtctgccat gccttgct ccccgaggg 4260  
 ctgcgtggcc cggagccca gggactgcgt ctctgccc aatgtcagcc gaggcaggga 4320  
 atgcgtggac aagtcaacc ttctggaggg tgagccaagg gagtttgtgg agaactctga 4380  
 gtgcatacag tgccacccag agtgcctgcc tcagccatg aacatcacct gcacaggacg 4440  
 gggaccagac aactgtatcc agtgcgtccca ctacattgac ggccccact gcgtcaagac 4500  
 ctgcccggca ggagtcatgg gagaaccaa caccciggtc tggaaagtacg cagacgcgg 4560  
 ccatgtgtgc cacctgtgcc atccaaactg cacctacgga tgcactggc caggtcttga 4620  
 aggctgtcca acggatggc ctaagatccc gtccatcgcc actggatgg tggggccct 4680

cctttgctg ctgggtgtgg ccctgggat cggccttgc atgtgagcgg ccgcctaga 4740  
 cccggctgc aggaattcga tatcaagtt atcgataatc aacctctgga ttacaaaatt 4800  
 tgtgaaagat tgactggat tcttaactat gttgctcctt ttacgctatg tggatacgt 4860  
 gcttaatgc ctttgtatca tgctattgtc tcccgatgg ctttcatttt ctcccttgc 4920  
 tataaatcct gttgtgtc tcttatgag gagttgtggc ccgttgcag gcaacgtggc 4980  
 gtgggtgtca ctgtgttgc tgacgcaacc cccactggg tgggcattgc caccacgt 5040  
 cagctccccc cgggacttt cgcttcccc ctccctattg ccacggcga actcatcgcc 5100  
 gcctgcctt cccgctgctg gacagggtt gcaactgacaa ttccgtgtg 5160

ttgtcgggaa aatcatcgtc ctttccttgg ctgctgcct gtgtgccac ctggattctg 5220  
 cgcgggacgt cttctgcta cgtcccttcg gccctcaatc cagcgaccc tcctccgc 5280  
 ggcctgctgc cggctctgctg gccttccg cgtttcgcc ttgcctca gacgagtcgg 5340  
 atctccctt gggccgcctc cccgcatcga taccgtcgac tagccgtacc tttaagacca 5400  
 atgacttaca aggtagtgt agatcttagc cacttttaa aagaaaaggg gggactggaa 5460  
 gggctaattc actccaaag aagacaagat ctgttttg cctgtactgg gtctcttgg 5520  
 ttagaccaga tctgagcctg ggagctctct ggcttaacttag ggaaccact gcttaagcct 5580  
 caataaaagct tgccctgagt gcttcaagta gtgtgtccc gtctgtgtg tgactctggt 5640

aactagagat ccctcagacc cttttagtca gtgtggaaaa tctctagcag aattcgat 5700  
 caagcttatac gataccgtcg acctcgaggg gggcccggt acccaattcg ccctatagt 5760  
 agtcgttata caattcactg gccgtcggtt tacaacgtcg tgactggaa aaccctggcg 5820  
 ttacccaaact taatgcctt gcagcacatc ccccttcgc cagctggcgt aatagcgaag 5880

aggcccac cgatgccct tcccaacagt tgccgagcct gaatggcgaa tgaaaattgt 5940  
 aagcgtaat atttgttaa aattcgctt aaattttgt taaatcagct catttttaa 6000  
 ccaataggcc gaaatcgca aaatcccta taaatcaaaa gaatagaccg agatagggtt 6060  
 gagtgtagtt ccagtttgc acaagagtc actattaaag aacgtggact ccaacgtcaa 6120

agggcgaaaa accgtctatc agggcgatgg cccactacgt gaaccatcac cctaatacg 6180  
 tttttgggg tcgaggtgcc gtaaagcact aaatcggaac cctaaaggga gcccccgatt 6240  
 tagagcttga cggggaaagc cggcgaacgt ggcgagaaag gaagggaaga aagcgaaagg 6300  
 agcgggcgtt agggcgctgg caagtgtac ggtcacgctg cgcgtaaacca ccacacccgc 6360  
 cgcgttaat gcgcgcgtac agggcgctc aggtggact tticgggaa atgtgcgcgg 6420  
 aaccctatt tgtttatttt tctaaataca ttcaaataatg tatccgctca tgagacaata 6480  
 accctgataa atgettcaat aatattgaaa aaggaaaggt atgagttttc aacatttcg 6540  
 tgtcgccctt attcccttt ttgcggcatt ttgccttc gttttgctc acccagaaac 6600

gctggtaaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgact 6660  
 ggatctcaac agcgtaaga tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgtat 6720  
 gagcactttt aaagttctgc tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccggcaaga 6780  
 gcaactcggt cgccgcatac actattctca gaatgacttg gttgagttt caccagtac 6840  
 agaaaagcat ctacggatg gcatgacagt aagagaatta tgcagtgcgt ccataaccat 6900  
 gagtgataac actgcggcca acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagcta 6960  
 cgctttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgccctt gatcggtggg aaccggagct 7020  
 gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga caccacgatg cctgttagcaa tggcaacaac 7080

gttgcgcaaa ctatatact gcgaaactact tactctagct tcccgcaac aattataga 7140  
 ctggatggag cgccgataaag ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg 7200  
 gtttattgtct gataaatctg gagccgtga gcgtgggtct cgcgtatca ttgcagtcact 7260  
 gggccagat gtaagccct cccgtatctg agttatctac acgacgggaa gtcaggcaac 7320  
 tatggatgaa cggaaatagac agatcgctga gatagggtcc tcactgatta agcattggta 7380  
 actgtcagac caagtttact catatatact ttagattgtat ttaaaacttc attttaatt 7440  
 taaaaggatc taggtgaaga tccttttgc taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga 7500  
 gtttcgttc cactgagcgt cagacccgt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc 7560

ttttttctg cgcgtatct gtcgttgca aacaaaaaaaaa ccacgcgtac cagcggttgt 7620  
 ttgtttgcgt gatcaagagc taccaactct tttccgaag gtaactggct tcagcagagc 7680  
 gcagatacca aatactgttc ttctagtgta gccgtagttt ggccaccact tcaagaactc 7740

tgtacccatgg cctacataacc tcgctctgt aatcctgtta ccagtggctg ctgccagg 7800  
 cgataagtgc tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg 7860  
 gtcgggctga acggggggtt cgtgcacaca gcccagcttg gagcgaacga cctacaccga 7920  
 actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgcacg ctccccaa ggagaaaggc 7980  
 ggacaggtat ccggtaagcg gcagggtcg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg 8040

gggaaacgcc tggtatctt atagtcctgt cgggttcgc cacctctgac ttgagcgtcg 8100  
 attttgta tgctcgtag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt 8160  
 tttacggttc ctggccttt gctggcctt tgctcacatg ttcttcctg cgttatcccc 8220  
 tgattctgtg gataaccgta ttaccgcct tgagtgagct gataccgcic gccgcagccg 8280  
 aacgaccgag cgacgcgact cagtgagcga ggaagcggaa gagcgcctaa tacgcaaacc 8340  
 gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta atgcagctgg cacgacaggt ttccgcactg 8400  
 gaaagcgggc agtgagcgc aacgcaattaa tgtgagtttgc ctcactcatt aggccaccca 8460  
 ggctttacac ttatgcttc cggctcgat gttgtgtgaa attgtgagcg gataacaatt 8520

tcacacagga aacagctatg accatgatta cgccaagctc gaaattaacc ctcactaaag 8580  
 ggaacaaaag ctggagctcc accgcgggtgg cggcctcgag gtgcgatcc ggtgcaccag 8640  
 caaccatagt cccgcctta actccgcctt tcccgcctt aactccgcctt agttccgcctt 8700  
 attctccccc ccatggctga ctaattttt ttatattgc agaggccgag gcccctcg 8760  
 cctctgagct attccagaag tagtgaggag gctttttgg aggcctaggc ttttgc 8820  
 agcttcgacg gtatcgattt gctcatgtcc aacattaccg ccatgttgac attgattttt 8880  
 gactagttt taatgtaat caattacgg gtcatttttgc catagcccat atatggagtt 8940  
 ccgcgttaca taatttacgg taaatggccc gcctggctga ccgcaccaacg acccccgcccc 9000

attgacgtca ataatgacgt atgttcccat agtaacgcca atagggactt tccattgacg 9060  
 tcaatgggtg ggtatatttac ggttaactgc ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat 9120  
 gccaagtcacg ccccttatttgc acgtcaatga cggtaatgg cccgcctggc attatgc 9180  
 gtacatgacc ttatggact ttcctacttg gcagtgatc tacgtttagt tcatcgat 9240  
 taccatggtg atgcggttt ggcagtgatc caatggcggt ggatagcggt ttgactcag 9300  
 gggatttcca agtctccacc ccattgacgt caatggcggt ttgtttggc accaaaatca 9360  
 acgggacttt ccaaatgtc gtaacaactc cggccatgg acgcaatgg gcggtaggcg 9420  
 tgtacggaat tcggagtggc gagccctcgat atccctgcata taagcagctg cttttgct 9480

|                  |      |
|------------------|------|
| gtactggtc tctctg | 9496 |
| <210> 58         |      |

&lt;211&gt; 679

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Long Spacer IgG4 hinge-CH2-CH3

&lt;400&gt; 58

```
tacggaccgt ccctgcccc cttgccctgc ccccgagttc ctggggggac ccagcgtgtt 60
cctgtttcccc cccaaggccca aggacacccct gatgatcagc cggacccccc aggtgacctg 120
cgtggtggtg gacgtgagcc aggaagatcc cgaggtccag ttcaatttgt acgtggacgg 180
cgtgaaagtg cacaacgccta agaccaagcc cagagaggaa cagttcaaca gcacctaccc 240
ggtgtgtct gtgctgaccg tgctgcacca ggactggctg aacggcaaag aatacaagtg 300
```

```
caagggtgtcc aacaaggggcc tgcccagcag catcgaaaag accatcagca aggccaagg 360
ccagcctcgc gagccccagg tgtacacccct gcctccctcc caggaagaga tgaccaagaa 420
ccaggtgtcc ctgacctgccc tggtaaggg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg 480
ggagagcaac gcccagcctg agaacaacta caagaccacc cctccgtgc tggacagcga 540
cgccagcttc ttccctgtaca gccggctgac cgtggacaag agccggtgcc aggaaggcaa 600
cgtcttagc tgcagcgtga tgcacgaggc cctgcacaaac cactacaccc agaagagcc 660
gagcctgtcc ctgggcaag 679
```

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Medium spacer

&lt;400&gt; 59

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Gly Gln Pro Arg

1 5 10 15

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys

20 25 30

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

35 40 45

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 50                                                              | 55  | 60  |
| Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  |
| Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser |     | 80  |
| 85                                                              | 90  | 95  |
| Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys                                     |     |     |
| 115                                                             |     |     |

<210> 60  
<211> 229  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Long spacer  
<400> 60

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

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

|     |     |     |
|-----|-----|-----|
| 115 | 120 | 125 |
|-----|-----|-----|

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
130 135 140  
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
145 150 155 160  
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
165 170 175  
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu  
  
180 185 190  
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
195 200 205  
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
210 215 220  
Leu Ser Leu Gly Lys  
225