



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0040476
(43) 공개일자 2022년03월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) A61K 35/15 (2014.01)
A61K 35/17 (2014.01) A61K 39/00 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01) C12N 9/64 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0636 (2013.01)
A61K 35/15 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7006292
(22) 출원일자(국제) 2022년07월30일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년02월24일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/044159
(87) 국제공개번호 WO 2021/021989
국제공개일자 2021년02월04일
(30) 우선권주장
62/881,467 2019년08월01일 미국(US)

(71) 출원인
메모리얼 슬로안 케터링 캔서 센터
미국, 뉴욕 10065, 뉴욕, 요크 애비뉴 1275
슬로안-케터링인스티튜트퍼캔서리서치
미국, 뉴욕10065, 뉴욕, 요크애버뉴1275
메모리얼 하스피탈 포 캔서 앤드 얼라이드 디지즈
스
미국 뉴욕주 10065 뉴욕 요크 애비뉴 1275
(72) 발명자
웨인버그 데이비드 에이.
미국 뉴욕주 10025 뉴욕 #6엔 센트럴 파크 웨스트
325
페라로 레일라
미국 메사추세츠주 02141 캠프리지 스프링 스트리트
130
(74) 대리인
특허법인태평양

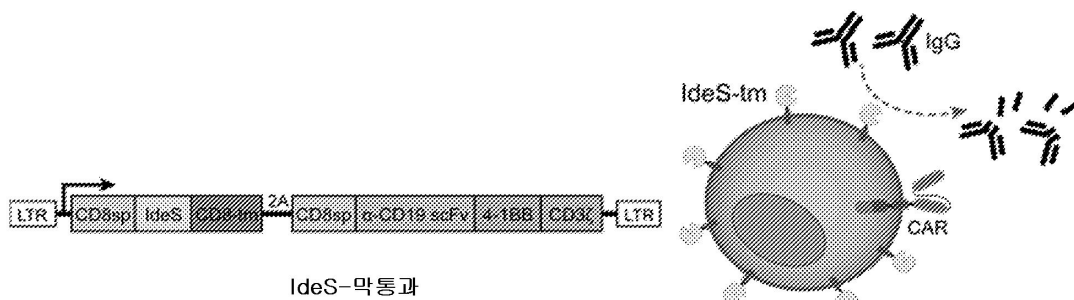
전체 청구항 수 : 총 76 항

(54) 발명의 명칭 개선된 면역치료법을 위한 세포 및 이의 용도

(57) 요약

본원에서 개시되는 주제는 개선된 면역치료법을 위한 세포 및 조성물 그리고 이러한 세포 및 조성물을 사용하는 방법을 제공한다. 이는 리간드-인식 수용체(예로, 항원-인식 수용체, 예로, 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 T-세포 수용체(TCR)) 및 IgG-분해 효소 또는 이의 단편을 포함하는 세포에 관한 것이다. IgG-분해 효소는 IgG를 신속하게 절단한다. IgG-분해 효소는 숙주 체액성 반응에 대한 생체분자 차폐로서 작용한다. 세포는 숙주 체액성 반응(예로, 항체-유래 숙주 체액성 반응)에 대해 증가된 내성을 가지며, 이는 세포에 대한 연장된 지속성을 허용하여 세포의 향상된 활성을 야기한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 35/17 (2013.01)
A61K 39/0008 (2013.01)
A61K 39/001112 (2018.08)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 16/2803 (2013.01)
C07K 16/2833 (2013.01)
C07K 16/2887 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 9/6472 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 리간드-인식 수용체, 및
- (b) IgG-분해 효소 또는 이의 단편을 포함하는 세포.

청구항 2

청구항 1에 있어서,
상기 IgG-분해 효소는 분비되는 세포.

청구항 3

청구항 1에 있어서,
상기 IgG-분해 효소는 막에 결합되는 세포.

청구항 4

청구항 3에 있어서,
(c) 상기 IgG-분해 효소에 부착된 막통과 도메인을 추가로 포함하는 세포.

청구항 5

청구항 4에 있어서,
상기 막통과 도메인은 상기 IgG-분해 효소의 C-말단에 부착되는 세포.

청구항 6

청구항 4 또는 청구항 5에 있어서,
상기 IgG-분해 효소에 부착된 막통과 도메인은 CD8 폴리펩타이드, 선택적으로 CD8의 막통과 폴리펩타이드를 포함하는 세포.

청구항 7

청구항 1 내지 청구항 6 중 어느 한 항에 있어서,
상기 IgG-분해 효소는 스트렙토코커스 피오게네스(*S. pyogenes*)의 IgG-분해 효소(IdeS), 스트렙토코커스 에쿠이 아종 주에피데미쿠스(*S. equi subsp. zooepidemicus*)의 IgG-분해 효소(IdeZ), 스트렙토코커스 에쿠이 아종 에쿠이(*S. equi subsp. equi.*)의 IgG-분해 효소(IdeE), 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*) 유래의 엔도글리코시다제(EndoS), 및 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*) 유래의 스트렙토코커스 시스테인 프로티나제(*SpeB*)로부터 선택되는 세포.

청구항 8

청구항 1 내지 청구항 7 중 어느 한 항에 있어서,
상기 리간드-인식 수용체는 외인성 또는 내인성인 세포.

청구항 9

청구항 1 내지 청구항 8 중 어느 한 항에 있어서,
상기 리간드-인식 수용체는 재조합적으로 발현되는 세포.

청구항 10

청구항 1 내지 청구항 9 중 어느 한 항에 있어서,
상기 리간드-인식 수용체는 백터로부터 발현되는 세포.

청구항 11

청구항 1 내지 청구항 10 중 어느 한 항에 있어서,
상기 IgG-분해 효소는 백터로부터 발현되는 세포.

청구항 12

청구항 1 내지 청구항 11 중 어느 한 항에 있어서,
상기 세포는 반응성 세포 또는 활성화 가능한 세포인 세포.

청구항 13

청구항 1 내지 청구항 12 중 어느 한 항에 있어서,
상기 세포는 면역반응성 세포인 세포.

청구항 14

청구항 1 내지 청구항 13 중 어느 한 항에 있어서,
상기 세포는 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, B 세포, 대식구, 단핵구, 수지상 세포, 줄기 세포, 및 정상 조직 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 세포.

청구항 15

청구항 1 내지 청구항 14 중 어느 한 항에 있어서,
상기 세포는 T 세포인 세포.

청구항 16

청구항 1 내지 청구항 15 중 어느 한 항에 있어서,
상기 리간드-인식 수용체는 항원에 결합하는 세포.

청구항 17

청구항 16에 있어서,
상기 항원은 종양 항원, 병원체 항원, 정상 세포 항원, HLA 항원, 및 동종항원으로부터 선택되는 세포.

청구항 18

청구항 16 또는 청구항 17에 있어서,
상기 항원은 종양 항원인 세포.

청구항 19

청구항 17 또는 청구항 18에 있어서,
상기 종양 항원은 CD19인 세포.

청구항 20

청구항 16 또는 청구항 17에 있어서,
상기 항원은 정상 세포 항원인 세포.

청구항 21

청구항 16 또는 청구항 17에 있어서,
상기 항원은 HLA 항원 또는 동종항원인 세포.

청구항 22

청구항 21에 있어서,
상기 동종항원은 부조직 적합성 동종항원인 세포.

청구항 23

청구항 1 내지 청구항 22 중 어느 한 항에 있어서,
상기 리간드-인식 수용체는 T 세포 수용체(TCR) 또는 키메라 항원 수용체(CAR)인 세포.

청구항 24

청구항 1 내지 청구항 23 중 어느 한 항에 있어서,
상기 리간드-인식 수용체는 CAR인 세포.

청구항 25

청구항 24에 있어서,
상기 CAR은 세포외 항원-결합 도메인, 막통과 도메인, 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포.

청구항 26

청구항 25에 있어서,
상기 CAR의 세포외 항원-결합 도메인은 단일쇄 가변 단편(scFv)을 포함하는 세포.

청구항 27

청구항 25 또는 청구항 26에 있어서,
상기 막통과 도메인은 CD8 폴리펩타이드를 포함하는 세포.

청구항 28

청구항 25 내지 청구항 27 중 어느 한 항에 있어서,
상기 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 CD3 ζ 폴리펩타이드를 포함하는 세포.

청구항 29

청구항 25 내지 청구항 28 중 어느 한 항에 있어서,
상기 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 적어도 하나의 공동-자극 신호전달 도메인을 추가로 포함하는 세포.

청구항 30

청구항 29에 있어서,
상기 적어도 하나의 공동-자극 도메인은 CD28 폴리펩타이드, 4-1BB 폴리펩타이드, 또는 이의 조합을 포함하는 세포.

청구항 31

청구항 29 또는 청구항 30에 있어서,
상기 적어도 하나의 공동-자극 도메인은 4-1BB 폴리펩타이드를 포함하는 세포.

청구항 32

청구항 1 내지 청구항 31 중 어느 한 항에 있어서,

상기 IgG-분해 효소는 (a) IgG를 절단함으로써, IgG 항체가 세포를 사멸시키는 것을 방지하고, 및/또는 (b) IgG를 절단함으로써, IgG의 잔여 단편이 세포에 대한 결합을 보유하도록 허용하고, 이는 상기 세포를 하나 이상의 세포독성 항체로부터 보호하며, 선택적으로 상기 하나 이상의 세포독성 항체는 상기 IgG와 동일한 에피토프 영역에 결합하여 상기 세포를 사멸시키는 세포.

청구항 33

청구항 1 내지 청구항 32 중 어느 한 항의 세포를 포함하는 조성물.

청구항 34

청구항 33에 있어서,

약학적으로 허용가능한 부형제를 추가로 포함하는 약학적 조성물인 조성물.

청구항 35

청구항 33 또는 청구항 34에 있어서,

신생물을 치료하기 위한 조성물.

청구항 36

(a) 리간드-인식 수용체를 인코딩하는 제1 폴리뉴클레오타이드; 및 (b) IgG-분해 효소 또는 이의 단편을 인코딩하는 제2 폴리뉴클레오타이드;를 세포 내로 도입하는 단계를 포함하는 세포를 생산하기 위한 방법으로서,

각각의 상기 제1 및 제2 핵산 서열은 선택적으로 프로모터 요소에 작동가능하게 연결되는 방법.

청구항 37

청구항 36에 있어서,

상기 제1 및 제2 폴리뉴클레오타이드 중 하나 또는 모두는 벡터 내에 포함되는 방법.

청구항 38

청구항 37에 있어서,

상기 벡터는 레트로바이러스 벡터, 또는 렌티바이러스 벡터이거나, mRNA 분자 내에 인코딩되는 방법.

청구항 39

(a) 리간드-인식 수용체를 인코딩하는 제1 폴리뉴클레오타이드 및 (b) IgG-분해 효소 또는 이의 단편을 인코딩하는 제2 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 핵산 조성물.

청구항 40

청구항 39에 있어서,

상기 제1 폴리뉴클레오타이드는 프로모터 요소에 작동가능하게 연결되는 핵산 조성물.

청구항 41

청구항 39 또는 청구항 40에 있어서,

상기 제2 폴리뉴클레오타이드는 프로모터 요소에 작동가능하게 연결되는 핵산 조성물.

청구항 42

청구항 39 내지 청구항 41 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 및 제2 폴리뉴클레오타이드 중 하나 또는 모두는 벡터 내에 포함되는 핵산 조성물.

청구항 43

청구항 42에 있어서,

상기 벡터는 레트로바이러스 벡터, 또는 렌티바이러스 벡터이거나, mRNA 분자 내에 인코딩되는 핵산 조성물.

청구항 44

청구항 39 내지 청구항 43 중 어느 한 항의 핵산 조성물을 포함하는 벡터.

청구항 45

청구항 1 내지 청구항 32 중 어느 한 항의 세포, 청구항 33 내지 청구항 35 중 어느 한 항의 조성물, 청구항 39 내지 청구항 43 중 어느 한 항의 핵산 조성물, 또는 청구항 44의 벡터를 포함하는 키트.

청구항 46

청구항 45에 있어서,

상기 키트는 신생물, 병원체 감염, 및/또는 자가면역 장애를 치료 및/또는 방지하기 위한 기록된 설명서를 추가로 포함하는 키트.

청구항 47

대상체에 유효량의 청구항 1 내지 청구항 32 중 어느 한 항의 세포, 청구항 33 내지 청구항 35 중 어느 한 항의 조성물, 청구항 39 내지 청구항 43 중 어느 한 항의 핵산 조성물, 또는 청구항 44의 벡터를 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서 종양 부담을 감소시키는 방법.

청구항 48

청구항 47에 있어서,

상기 방법은 대상체에서 종양 세포의 수를 감소시키고, 종양 크기를 감소시키고, 및/또는 종양을 박멸하는 방법.

청구항 49

대상체에 유효량의 청구항 1 내지 청구항 32 중 어느 한 항의 세포, 청구항 33 내지 청구항 35 중 어느 한 항의 조성물, 청구항 39 내지 청구항 43 중 어느 한 항의 핵산 조성물, 또는 청구항 44의 벡터를 투여하는 단계를 포함하는 신생물, 병원체 감염, 및/또는 자가면역 장애를 치료 및/또는 방지하는 방법.

청구항 50

대상체에 유효량의 청구항 1 내지 청구항 32 중 어느 한 항의 세포, 청구항 33 내지 청구항 35 중 어느 한 항의 조성물, 청구항 39 내지 청구항 43 중 어느 한 항의 핵산 조성물, 또는 청구항 44의 벡터를 투여하는 단계를 포함하는 신생물, 병원체 감염, 및/또는 자가면역 장애를 갖는 대상체의 생존을 연장하는 방법.

청구항 51

청구항 44 내지 청구항 47 중 어느 한 항에 있어서,

상기 종양 또는 신생물은 급성 골수 백혈병(AML), 림프모구 백혈병(ALL), 만성 림프구 백혈병(CLL), 만성 골수 백혈병(CML), 다발 골수종, 비-호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 유방암, 난소암, 중피종, 교모세포종, 결장직장암, 및 췌장암으로부터 선택되는 방법.

청구항 52

청구항 49 또는 청구항 50에 있어서,

상기 자가면역 질환은 류마티스 관절염, 중증 근무력증, 전신 루푸스, 그레이브스병, 하시모토 갑상샘염, 전신

경화증, 담관간경화, 셀리악병, 축삭 신경병증, 염증성 근육병증, 소뇌 변성, I형 당뇨병, 및 다발근육염으로부터 선택되는 방법.

청구항 53

유효량의 청구항 1 내지 청구항 32 중 어느 한 항의 세포, 청구항 33 내지 청구항 35 중 어느 한 항의 조성물, 청구항 39 내지 청구항 43 중 어느 한 항의 핵산 조성물, 또는 청구항 44의 벡터를 투여하는 단계를 포함하는 기관 이식을 수여받는 대상체에서 세포 및/또는 조직의 항체-매개 거부를 감소 및/또는 방지하는 방법.

청구항 54

청구항 53에 있어서,

상기 이식은 동종이형 이식(동종이식)인 방법.

청구항 55

청구항 53 또는 청구항 54에 있어서,

상기 대상체는 상기 기관 이식 이전에 상기 세포, 조성물, 또는 핵산 조성물을 수여받는 방법.

청구항 56

유효량의 청구항 1 내지 청구항 32 중 어느 한 항의 세포, 청구항 33 내지 청구항 35 중 어느 한 항의 조성물, 청구항 39 내지 청구항 43 중 어느 한 항의 핵산 조성물, 또는 청구항 44의 벡터를 투여하는 단계를 포함하는 세포 치료법을 수여받는 대상체에서 사용되는 세포 또는 조직의 항체-매개 거부를 감소 및/또는 방지하는 방법.

청구항 57

청구항 56에 있어서,

상기 세포 및/또는 조직은 상기 세포 치료법에 포함되는 방법.

청구항 58

청구항 56 또는 청구항 57에 있어서,

상기 세포 및/또는 조직은 자가 또는 동종이형인 방법.

청구항 59

청구항 1 내지 청구항 32 중 어느 한 항에 있어서,

치료법에 사용하기 위한 세포.

청구항 60

청구항 1 내지 청구항 32 중 어느 한 항에 있어서,

종양 부담을 감소시키는데 사용하기 위한 세포.

청구항 61

청구항 1 내지 청구항 32 중 어느 한 항에 있어서,

신생물, 병원체 감염, 및/또는 자가면역 장애의 치료 및/또는 방지에 사용하기 위한 세포.

청구항 62

청구항 1 내지 청구항 32 중 어느 한 항에 있어서,

신생물, 병원체 감염, 및/또는 자가면역 질환을 갖는 대상체의 생존 연장에 사용하기 위한 세포.

청구항 63

청구항 1 내지 청구항 32 중 어느 한 항에 있어서,

기관 이식을 수여받는 대상체에서 세포 및 조직의 항체-매개 거부의 감소 및/또는 방지에 사용하기 위한 세포.

청구항 64

청구항 1 내지 청구항 32 중 어느 한 항에 있어서,

세포 치료법을 수여받는 대상체에서 세포 및/또는 조직의 항체-매개 거부의 감소 및/또는 방지에 사용하기 위한 세포.

청구항 65

청구항 33 내지 청구항 35 중 어느 한 항에 있어서,

치료법에 사용하기 위한 조성물.

청구항 66

청구항 33 내지 청구항 35 중 어느 한 항에 있어서,

종양 부담을 감소시키는데 사용하기 위한 조성물.

청구항 67

청구항 33 내지 청구항 35 중 어느 한 항에 있어서,

신생물, 병원체 감염, 및/또는 자가면역 질환의 치료 및/또는 방지에 사용하기 위한 조성물.

청구항 68

청구항 33 내지 청구항 35 중 어느 한 항에 있어서,

신생물, 병원체 감염, 및/또는 자가면역 질환을 갖는 대상체의 생존 연장에 사용하기 위한 조성물.

청구항 69

청구항 33 내지 청구항 35 중 어느 한 항에 있어서,

기관 이식을 수여받는 대상체에서 세포 및 조직의 항체-매개 거부의 감소 및/또는 방지에 사용하기 위한 조성물.

청구항 70

청구항 33 내지 청구항 35 중 어느 한 항에 있어서,

세포 치료법을 수여받는 대상체에서 세포 및/또는 조직의 항체-매개 거부의 감소 및/또는 방지에 사용하기 위한 조성물.

청구항 71

청구항 39 내지 청구항 43 중 어느 한 항에 있어서,

치료법에 사용하기 위한 핵산 조성물.

청구항 72

청구항 39 내지 청구항 43 중 어느 한 항에 있어서,

종양 부담의 감소에 사용하기 위한 핵산 조성물.

청구항 73

청구항 39 내지 청구항 43 중 어느 한 항에 있어서,

신생물, 병원체 감염, 및/또는 자가면역 질환의 치료 및/또는 방지에 사용하기 위한 핵산 조성물.

청구항 74

청구항 39 내지 청구항 43 중 어느 한 항에 있어서,

신생물, 병원체 감염, 및/또는 자가면역 질환을 갖는 대상체의 생존 연장에 사용하기 위한 핵산 조성물.

청구항 75

청구항 39 내지 청구항 43 중 어느 한 항에 있어서,

기관 이식을 수여받는 대상체에서 세포 및 조직의 항체-매개 거부의 감소 및/또는 방지에 사용하기 위한 핵산 조성물.

청구항 76

청구항 39 내지 청구항 43 중 어느 한 항에 있어서,

세포 치료법을 수여받는 대상체에서 세포 및/또는 조직의 항체-매개 거부의 감소 및/또는 방지에 사용하기 위한 핵산 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호-참조

[0002] 본 출원은 2019년 8월 1일에 출원된 U.S. 특허 가출원 일련 번호 62/881,467에 대한 우선권을 주장하며, 그 내용의 전문이 참조로 포함된다.

[0003] 연구비 정보

[0004] 본 발명은 미국 국립 위생 연구소의 국립 암 연구소로부터의 연구비 번호 P30 CA008747 하에 정부 지원으로 수행되었다. 정부는 본 발명에서 소정 권리를 갖는다.

[0005] 서열 목록

[0006] 본 출원은 서열 목록을 포함하며, 이는 EFS-웹을 통해 ASCII 포맷으로 제출되었고 본원에 그 전문이 참조로 포함된다. 2020년 7월 28일에 생성된 ASCII 사본은 "072734_1109_ST25.txt"로 명명되며 52,647바이트 크기이다.

[0007] 1. 개요

[0008] 본원에서 개시되는 주제는 개선된 면역치료법을 위한 세포 및 조성물 그리고 이러한 세포 및 조성물을 사용하는 방법을 제공한다. 이는 리간드-인식 수용체(예로, 항원-인식 수용체, 예로, 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 T-세포 수용체(TCR)) 및 IgG-분해 효소 또는 이의 단편을 포함하는 세포에 관한 것이다. IgG-분해 효소는 IgG를 신속하게 절단한다. IgG-분해 효소는 숙주 체액성 반응에 대한 생체분자 차폐로서 작용한다. 세포는 숙주 체액성 반응(예로, 항체-유래 숙주 체액성 반응)에 대해 증가된 내성을 가지며, 이는 세포에 대한 연장된 지속성을 허용하여 세포의 향상된 활성을 야기한다.

배경 기술

[0009] 2. 본 발명의 배경

[0010] 합성 면역학 및 합성 생물학은 면역 세포를 활용하여 종양 세포를 사멸시키거나 다른 중요한 질환을 치료한다. 합성 면역학 및 생물학에서 빠르게 성장하는 영역은 차용 세포 전달, 줄기 세포 이식, 기관 이식, CRISPR 유전자 편집, 유전적 치료법, 및 CAR-T 세포 치료법의 사용에 있다. 변경되거나 조작된 세포가 대상체 내로 도입되는 임의의 상황에서, 숙주(대상체)는 세포 또는 조직에 대해, 이것이 외래이거나 숙주에서 보통 확인되지 않는 외래 유전자 및 단백질을 함유하므로, 면역 반응을 일으킬 수 있다. 상기 면역 인식의 결과는 치료 효과의 중화, 조직 또는 세포의 거부, 및/또는 치료 의도의 실패 등일 수 있다. 따라서, 숙주 체액성 반응에 대해 증가된 내성을 갖는 조작된 세포가 필요하다.

발명의 내용

3. 본 발명의 요약

본원에서 개시되는 주제는 (a) 리간드-인식 수용체, 및 (b) IgG-분해 효소 또는 이의 단편을 포함하는 세포를 제공한다. 소정 구현예에서, IgG-분해 효소는 분비된다. 소정 구현예에서, IgG-분해 효소는 막 결합된다. 소정 구현예에서, 세포는 (c) IgG-분해 효소에 부착된 막통과 도메인을 추가로 포함한다. 막통과 도메인은 IgG-분해 효소의 C-말단에 부착될 수 있다. 소정 구현예에서, IgG-분해 효소에 부착된 막통과 도메인은 CD8 폴리펩타이드를 포함한다.

소정 구현예에서, IgG-분해 효소는 스트렙토코커스 피오게네스(*S. pyogenes*)의 IgG-분해 효소(IdeS), 스트렙토코커스 에쿠이 아종 주에피데미쿠스(*S. equi subsp. zooepidemicus*)의 IgG-분해 효소(IdeZ), 스트렙토코커스 에쿠이 아종 에쿠이(*S. equi subsp. equi.*)의 IgG-분해 효소(IdeE), 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*)로부터의 엔도글리코시다제(EndoS), 및 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*)로부터의 스트렙토코커스 시스템인 프로티나제(*SpeB*)로부터 선택된다.

소정 구현예에서, 리간드-인식 수용체는 외인성 또는 내인성이다. 소정 구현예에서, 리간드-인식 수용체는 재조합적으로 발현된다. 소정 구현예에서, 리간드-인식 수용체는 백터로부터 발현된다. 소정 구현예에서, IgG-분해 효소는 백터로부터 발현된다.

소정 구현예에서, 세포는 반응성 세포이다. 소정 구현예에서, 세포는 반응성 세포, 예로, 면역반응성 세포이다. 소정 구현예에서, 세포는 활성화 가능한 세포이다. 소정 구현예에서, 세포는 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, B 세포, 대식구, 단핵구, 수지상 세포, 줄기 세포, 정상 조직 세포(예로, 신장, 간, 폐, 골수, 또는 체장 유래) 및 이의 조합으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 세포는 T 세포이다.

소정 구현예에서, 리간드-인식 수용체는 항원에 결합한다. 항원은 종양 항원, 병원체 항원, 정상 세포 항원, HLA 항원 또는 동종항원일 수 있다. 소정 구현예에서, 항원은 정상 세포 항원이다. 소정 구현예에서, 동종항원은 부조직 적합성 동종항원이다.

소정 구현예에서, 항원은 종양 항원이다. 소정 구현예에서, 종양 항원은 CD19이다.

소정 구현예에서, 리간드-인식 수용체는 T 세포 수용체(TCR) 또는 키메라 항원 수용체(CAR)이다. 소정 구현예에서, 리간드-인식 수용체는 CAR이다. 소정 구현예에서, CAR은 세포외 항원-결합 도메인, 막통과 도메인, 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 소정 구현예에서, CAR의 세포외 항원-결합 도메인은 단일쇄 가변 단편(scFv)을 포함한다. 소정 구현예에서, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 CD3ζ 폴리펩타이드를 포함한다. 소정 구현예에서, 막통과 도메인은 CD8 폴리펩타이드를 포함한다. 소정 구현예에서, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 적어도 하나의 공동-자극 신호전달 도메인을 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 공동-자극 도메인은 CD28 폴리펩타이드, 4-1BB 폴리펩타이드, 또는 이의 조합을 포함한다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 공동-자극 도메인은 4-1BB 폴리펩타이드를 포함한다. 소정 구현예에서, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 2개의 공동-자극 신호전달 도메인을 포함한다.

소정 구현예에서, IgG-분해 효소는 IgG를 절단함으로써, IgG 항체가 세포를 사멸시키는 것을 방지한다. 소정 구현예에서, IgG-분해 효소는 IgG를 절단함으로써, IgG의 잔여 단편이 세포에 대한 결합을 보유하도록 허용하며, 이는 세포를 하나 이상의 세포독성 항체로부터 보호한다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 세포독성 항체는 IgG와 동일한 부위에 결합하고 세포를 사멸시킨다. 이에 따라, 방법은 보호 차폐를 생성한다.

본원에서 개시되는 주제는 또한 본원에서 기재되는 세포를 포함하는 조성물을 제공한다. 소정 구현예에서, 조성물은 약학적으로 허용가능한 부형제를 추가로 포함하는 약학적 조성물이다. 소정 구현예에서, 조성물은 신생물을 치료하기 위한 것이다.

또한, 본원에서 개시되는 주제는 본원에서 개시되는 세포를 생산하는 방법을 제공한다. 소정 구현예에서, 방법은 세포 내로 (a) 리간드-인식 수용체를 인코딩하는 제1 폴리뉴클레오타이드; 및 (b) IgG-분해 효소 또는 이의 단편을 인코딩하는 제2 폴리뉴클레오타이드를 도입하는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, (a) 및/또는 (b)는 유전적으로 세포에 도입된다. 소정 구현예에서, 제1 폴리뉴클레오타이드는 선택적으로 프로모터 요소에 작동가능하게 연결된다. 소정 구현예에서, 제2 폴리뉴클레오타이드는 선택적으로 프로모터 요소에 작동가능하게 연결된다. 소정 구현예에서, 제1 및 제2 폴리뉴클레오타이드 중 하나 또는 둘 다가 백터에 포함된다. 소정 구현예에서, 제1 및 제2 폴리뉴클레오타이드는 2개의 상이한 백터에 포함된다. 소정 구현예에서, 백터는 레트로바이러스

백터이다. 소정 구현예에서, 백터는 렌티바이러스 백터이다. 소정 구현예에서, 백터는 mRNA 분자로 인코딩된다.

[0022] 본원에서 개시되는 주제는 핵산 조성물을 추가로 제공한다. 소정 구현예에서, 핵산 조성물은 (a) 리간드-인식 수용체를 인코딩하는 제1 폴리뉴클레오타이드 및 (b) IgG-분해 효소 또는 이의 단편을 인코딩하는 제2 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 소정 구현예에서, 제1 폴리뉴클레오타이드는 프로모터 요소에 작동가능하게 연결된다. 소정 구현예에서, 제2 폴리뉴클레오타이드는 프로모터 요소에 작동가능하게 연결된다. 소정 구현예에서, 제1 및 제2 폴리뉴클레오타이드 중 하나 또는 둘 다가 백터에 포함된다. 소정 구현예에서, 제1 및 제2 폴리뉴클레오타이드가 2개의 상이한 백터에 포함된다. 소정 구현예에서, 백터는 레트로바이러스 백터이다. 소정 구현예에서, 백터는 렌티바이러스 백터이다. 소정 구현예에서, 백터 mRNA 분자로 인코딩된다.

[0023] 또한 본원에서 기재되는 핵산 조성물을 포함하는 백터가 제공된다.

[0024] 본원에서 개시되는 주제는 본원에서 기재되는 세포, 본원에서 기재되는 조성물, 본원에서 기재되는 핵산 조성물, 또는 본원에서 기재되는 백터를 포함하는 키트를 추가로 제공한다. 소정 구현예에서, 키트는 신생물, 병원체 감염, 및/또는 자가면역 장애를 치료하고/하거나 방지하기 위한 기록된 설명서를 추가로 포함한다.

[0025] 본원에서 개시되는 주제는 또한 다양한 방법을 제공한다. 본원에서 개시되는 주제는 대상체에서 종양 부담을 감소시키는 방법을 제공한다. 소정 구현예에서, 방법은 대상체에 유효량의 본원에서 기재되는 세포, 본원에서 기재되는 조성물, 본원에서 기재되는 핵산 조성물, 또는 본원에서 기재되는 백터를 투여하는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 방법은 대상체에서 종양 세포의 수를 감소시키고, 종양 크기를 감소시키고, 및/또는 종양을 박멸한다.

[0026] 본원에서 개시되는 주제는 신생물, 병원체 감염, 및/또는 자가면역 장애를 치료하고/하거나 방지하는 방법을 제공한다. 소정 구현예에서, 방법은 대상체에 유효량의 본원에서 기재되는 세포, 본원에서 기재되는 조성물, 본원에서 기재되는 핵산 조성물, 또는 본원에서 기재되는 백터를 투여하는 단계를 포함한다.

[0027] 본원에서 개시되는 주제는 신생물, 병원체 감염, 및/또는 자가면역 장애를 갖는 대상체의 생존을 연장하는 방법을 제공한다. 소정 구현예에서, 방법은 대상체에 유효량의 본원에서 기재되는 세포, 본원에서 기재되는 조성물, 본원에서 기재되는 핵산 조성물, 또는 본원에서 기재되는 백터를 투여하는 단계를 포함한다.

[0028] 소정 구현예에서, 신생물은 급성 골수 백혈병(AML), 림프모구 백혈병(ALL), 만성 림프구 백혈병(CLL), 만성 골수 백혈병(CML), 다발 골수종, 비-호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 유방암, 난소암, 중피종, 교모세포종, 결장직장암, 및 췌장암으로부터 선택된다.

[0029] 본원에서 개시되는 주제는 기관 이식을 수여받는 대상체에서 세포 및/또는 조직의 항체-매개 거부를 감소시키고/거나 방지하는 방법을 제공한다. 소정 구현예에서, 이식은 동종이형 이식(동종이식)이다. 소정 구현예에서, 대상체는 기관 이식 전에 세포, 조성물, 또는 핵산 조성물을 수여받는다.

[0030] 본원에서 개시되는 주제는 세포 치료법을 수여받는 대상체에서 세포 및/또는 조직의 항체-매개 거부를 감소시키고/시키거나 방지하는 방법을 추가로 제공한다. 소정 구현예에서, 세포 및/또는 조직은 자가 또는 동종이형이다. 소정 구현예에서, 세포 및/또는 조직이 세포 치료법에서 사용된다.

[0031] 소정 구현예에서, 방법은 유효량의 본원에서 기재되는 세포, 본원에서 기재되는 조성물, 본원에서 기재되는 핵산 조성물, 또는 본원에서 기재되는 백터를 투여하는 단계를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0032] 4. 도면의 간단한 설명

도 1a 및 1b는 본원에서 개시되는 주제의 소정 구현예에 따른 백터 및 세포를 도시한다. 도 1a는 본원에서 개시되는 주제에 따른 백터 및 세포를 도시하며, 예로, IgG 분해 효소는 세포 상에 있다. 도 1b는 본원에서 개시되는 주제에 따른 백터 및 세포를 도시하며, 예로, IgG 분해 효소는 세포로부터 분비된다.

도 2는 포유류 세포에서의 IdeS 발현을 도시한다. HEK293t 세포를 IdeS의 막-결합(IdeS-tm) 및 분비된(IdeS-sec) 버전으로 일시적으로 전달감염시켰다. 세포 용해액 및 상청액 유체를 항-HA 항체를 사용하여 웨스턴 면역블롯에 의해 분석하고 IdeS 단백질을 각각 세포 또는 분비된 유체에서 검출하였다. 형질도입되지 않은 HEK293t 세포는 IdeS 단백질을 나타내지 않았다(각각의 겔에서 왼쪽 레인은 분자량 마커임).

도 3a-3c는 경시적인 세포-발현 IdeS 절단 활성을 도시한다. HEK 293t 세포를 IdeS-tm으로 일시적으로 전달감염

시켰다. 도 3a는 전달감염 48 hr 후를 나타내며, 여기서 IgG를 24-웰 플레이트의 웰에 첨가한 후, 상이한 시점에 제거하고 램리(Laemmli) 완충액을 사용하여 켄칭하였다. 샘플을 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. 도 3b는 쿠마시(Coomassie)로 염색된 겔을 나타낸다. 절단된 Ig는 5분 내에 나타났으며 경시적으로 증가하였다. 도 3c는 항-인간 Fc-특이적 항체로의 불꽃을 나타낸다. Fc 단편으로 절단된 Ig는 5분 내에 나타났으며 경시적으로 증가하였다.

도 4a 및 4b는 IdeS에 의한 절단을 도시한다. ELISA-기반 검정을 사용하여 IdeS에 의한 IgG의 절단 정도를 분석하였다. 도 4a는 재조합 IdeS를 사용하는 검정의 표준 곡선 검증을 나타낸다. 도 4b는 웨스턴 면역블롯에 의한 HEK293t 세포에서의 IdeS의 발현 확인 및 상이한 시점에 ELISA에 의해 평가된 절단 활성을 나타낸다.

도 5a-5b는 세포-분비 IdeS가 주변 세포 상에 결합된 항체를 절단할 수 있음을 도시한다. Raji 세포를 30분 동안 리툽시맙(Rituximab)과 인큐베이션하였다. 이어서 Raji 세포를 19BBz 작제물 단독, IdeS-tm 19BBz, 또는 IdeS-sec 19BBz를 발현하는 HEK293t와 하룻밤 동안 공동-배양하였다. 절단 정도를 표지된 항-Fc 이차 ab를 사용하여 평가하고, 유세포 측정을 통해 측정하였다. 도 5a는 Raji 세포의 항-Fc 형광 정도를 나타내는 히스토그램을 나타낸다. 도 5b는 각각의 히스토그램에 대한 평균 형광 세기(MFI)의 막대 그래프를 나타낸다.

도 6은 본원에서 개시되는 주제의 세포에 의한 종양 세포의 사멸을 도시한다. 형질도입되지 않은 T 세포, 19BBz CAR 및 막-결합 IdeS를 포함하는 T 세포, 19BBz CAR을 포함하고 IdeS를 분비하는 T 세포, 및 19BBz CAR T-세포를 18 hr 동안 초파리 루시페라제를 발현하는 Raji 세포와 인큐베이션하였다. 루시페린을 첨가하고 생체발광을 측정하여 Raji 세포의 세포 생활성을 평가하였다. IdeS 차폐된 CAR T 세포는 차폐되지 않은 CAR T 세포만큼 기능적으로 활성이었다.

도 7은 본원에서 개시되는 주제의 세포가 보체-의존적 세포독성(CDC)에 대해 보호되었음을 도시한다. 형질도입되지 않은 T 세포, 19BBz CAR 및 막-결합 IdeS를 포함하는 T 세포, 19BBz CAR을 포함하고 IdeS를 분비하는 T 세포, 및 19BBz CAR T-세포를 상이한 농도의 토끼 항가슴샘세포 글로불린(ATG)으로 처리한 후 토끼 혈청을 첨가하고 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세포 생활성을 Cell Titer Glo를 통해 측정하였다. 19BBz CAR 및 막-결합 IdeS를 포함하는 T 세포 및 19BBz CAR을 포함하고 IdeS를 분비하는 T 세포는 IgG의 Fc 단편을 절단해내어 CDC를 회피하고 살아있는 채로 유지되었다.

도 8은 본원에서 개시되는 주제의 세포의 예시된 작용 기전을 도시한다. IgG 항체는 세포 표면 항원 및 수용체에 결합하여 CDC, ADCC 및 옵소닌화를 통해 세포사를 야기한다. 본원에서 개시되는 주제의 세포는 인지 영역 아래에서 IgG를 절단하여 Fc 단편을 방출하는 효소인 IdeS를 발현한다. 본원에서 개시되는 주제의 세포는 $F(ab')_2$ 단편에서 코팅된 채 유지되며, 이는 추가 항체가 결합하는 것을 방지한다.

도 9는 IdeS를 발현하는 CAR T 세포의 활성을 도시한다. IdeS를 발현하는 CAR T 세포는 IgG Fc를 절단하였고 $F(ab')_2$ 차폐를 유지하였다. CAR T 세포를 $1 \mu\text{g/mL}$ 의 항-가슴샘세포 글로불린(ATG)으로 처리하고 하룻밤 동안 인큐베이션하였다. 세포를 세척하고 항-Fc(상부) 또는 항-Fab(하부) 표지된 항체로 분석하였다. 형광 세기 중앙값을 오른쪽에 막대 그래프로 도시하였다.

도 10은 본원에서 개시되는 세포가 항체-의존적 세포성 세포독성(ADCC)에 대해 보호되었음을 도시한다. IdeS-tm 19BBz T-세포, IdeS-sec 19BBz T-세포, 및 IdeS가 없는 19BBz T-세포를 상이한 용량의 항-가슴샘세포 글로불린(ATG)으로, 이어서 인간 PBMC로 처리하였다. IdeS-tm 19BBz T-세포 및 IdeS-sec 19BBz T-세포는 둘 다 IdeS가 없는 19BBz T-세포에 비해 용해로부터 보호되었다.

도 11a-11c는 본원에서 개시되는 세포가 신장 이식 환자로부터의 혈청 IgG를 절단할 수 있고 CDC로부터 보호되었음을 도시한다. 도 11a는 거부를 유도하는 항-HLA 항체를 함유하는 신장 이식 환자(환자 2)로부터 유래된 혈청이 유세포 측정에 의해 A02+ 세포에 결합하는 것으로 나타났음을 도시한다. 도 11b는 환자 2로부터의 혈청이 유세포 측정에 의해 확인된 바와 같이, A02+ IdeS-tm 19BBz T-세포 및 IdeS-sec 19BBz T-세포에 의해 절단되었음을 도시한다. 도 11c는 A02+ IdeS-tm 19BBz T-세포 및 IdeS-sec 19BBz T-세포가 환자 2 혈청에 의해 매개되는 보체 사멸(CDC)로부터도 보호되었음을 도시한다.

도 12는 본원에서 개시되는 세포가 생체내 인간 폴리클로날 IgG를 절단하였음을 도시한다. 인간 T 세포를 IdeS CAR이 없는 19BBz(왼쪽부터 레인: #1-2) 또는 IdeS-tm 19BBz CAR(막통과 형태)(왼쪽부터 레인: #3-5) 및 IdeS-sec 19BBz(분비된 형태)(왼쪽부터 레인: #6-8)로 형질도입하였다. CAR T 세포를 NSG 마우스에 i.p. 주사하였고 24 hr 후 인간 폴리클로날 IgG를 또한 i.p.로 주사하였다. PBS를 사용하는 ip 세척을 수행하고, 자기 단백질 G

비드를 사용하여 샘플을 정제하고, 항-인간 Fc-특이적 HRP 이차 항체를 사용하여 웨스턴 블롯에 의해 분석하여 IgG의 절단을 평가하였다. 절단되지 않은 중쇄는 약 55 kDa(레인 #9)에서 관찰된 반면, 절단된 Fc 단편은 약 25 kDa(화살표)에 존재한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

5. 본 발명의 상세한 설명

본원에서 개시되는 주제를 기재되는 특정 구현예에 제한하려는 것이 아니라 예로서 주어지는, 하기 상세한 설명은 첨부되는 도면과 함께 이해될 수 있다.

본원에서 개시되는 주제는 리간드-인식 수용체(예로, TCR 또는 CAR) 및 IgG-분해 효소 또는 이의 단편을 포함하는 유전적으로 변형된 면역반응성 세포(예로, T 세포 또는 NK 세포)가 포함되는 세포, 및 이러한 세포를 포함하는 조성물을 제공한다. 본원에서 개시되는 주제는 또한 이러한 세포를 생산하는 방법, 및 이러한 세포 및 이를 포함하는 조성물을 사용하는 방법을 제공한다. 본원에서 개시되는 주제는 또한 대상체에서 종양 부담을 감소시키고, 신생물, 병원체 감염, 및/또는 자가면역 장애를 갖는 대상체의 생존을 연장하고, 신생물 또는 다른 질환/장애를 치료하고/하거나 방지하고, 자가면역 질환을 치료하고/하거나 방지하고, 및/또는 대상체에서 세포 및/또는 조직의 항체-매개 거부를 감소시키고/시키거나 방지하기 위한 이러한 세포 및 조성물의 용도를 제공하며, 예로, 대상체는 기관 이식 또는 세포 치료법을 수여받고 여기서 세포 및/또는 조직은 세포 치료법에서 사용된다.

본원에서 개시되는 주제는 적어도 부분적으로, IgG-분해 효소, 예로, IdeS가 IgG를 전달하고 절단함으로써, 세포의 숙주 체액성 반응에 대한 내성을 증가시킬 수 있고, 이는 세포의 연장된 지속성 및 보다 강력한 세포 활성화(예로, 항-종양 활성)를 야기한다는 발견에 기반한다. 세포의 연장된 지속성은 또한 이러한 세포가 포함되는 치료법, 예로, CAR-T 세포 치료법의 비용 효과를 개선할 수 있다.

본원에서 개시되는 주제의 비제한적 구현예가 본 명세서 및 실시예에 의해 기재된다.

제한으로서가 아니라 본원에서 개시되는 주제의 명확성을 위한 목적으로, 상세한 설명은 하기 하위섹션으로 구분된다:

5.1. 정의;

5.2. IgG-분해 효소;

5.3. 항원 리간드-인식 수용체

5.4. 세포;

5.5. 조성물 및 벡터;

5.6. 폴리펩타이드 및 유사체;

5.7. 투여;

5.8. 제형화;

5.9. 사용 방법; 및

5.10. 키트.

5.1. 정의

달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 갖는다. 하기 참고문헌은 본원에서 개시되는 주제에서 사용되는 여러 용어의 일반적 정의를 통상의 기술자에게 제공한다: [Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); 및 Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)].

본원에서 사용되는 용어 "약" 또는 "대략"은 통상의 기술자에 의해 결정되는 바와 같은 특정 값에 대한 허용가능한 오차 범위 내를 의미하며, 이는 부분적으로 값이 어떻게 측정되는지 또는 결정되는지, 즉 측정 시스템의 한계에 의존할 것이다. 예를 들어, "약"은 당분야의 관례에 따라 3 또는 3 초과의 표준 편차 내임을 의미할 수

있다. 대안적으로, "약"은 주어진 값의 최대 20%, 예로, 최대 10%, 최대 5%, 또는 최대 1% 범위를 의미할 수 있다. 대안적으로, 특히 생물학적 시스템 또는 공정에 관해, 이 용어는 크기 단위 내, 예로 값의 5-배 내 또는 2-배 내를 의미할 수 있다.

[0052] "면역반응성 세포"란 면역 반응에서 기능하는 세포 또는 이의 선조체, 또는 자손을 의미한다. 소정 구현예에서, 면역반응성 세포는 림프 계통의 세포 또는 골수 계통의 세포이다. 림프 계통의 세포의 비제한적 예에는 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 수지상 세포, B 세포, 및 이로부터 림프 세포가 분화될 수 있는, 줄기 세포(예로, 유도된 다능성 줄기 세포)가 포함된다. 골수 계통의 세포의 비제한적 예에는 단핵구, 대식구, 호중구, 호염기구, 호산구, 적혈구, 거핵구, 및 이로부터 골수 세포가 분화될 수 있는, 줄기 세포가 포함된다.

[0053] "면역반응성 세포를 활성화한다"란 면역 반응의 개시를 초래하는, 세포에서의 신호 전달의 유도 또는 단백질 발현의 변화를 의미한다. 예를 들어, CD3 사슬이 리간드 결합 및 면역수용체 티로신-기반 억제 모티프(ITAM)에 반응하여 클러스터링하는 경우, 신호 전달 캐스케이드가 생성된다. 소정 구현예에서, 내인성 TCR 또는 외인성 CAR 이 항원에 결합하는 경우, 결합된 수용체(예로 CD4 또는 CD8, $CD3\gamma/\delta/\epsilon/\zeta$ 등) 근처에서 여러 분자의 클러스터링이 포함되는 면역학적 시냅스의 형성이 일어난다. 상기 막 결합된 신호전달 분자의 클러스터링은 CD3 사슬 내에 함유된 ITAM 모티프가 인산화되는 것을 허용한다. 상기 인산화는 다시 T 세포 활성화 경로를 개시하여 궁극적으로 전사 인자, 예컨대 NF- κ B 및 AP-1을 활성화한다. 이들 전사 인자는 T 세포 매개된 면역 반응을 개시하기 위해 증식 및 마스터 조절인자 T 세포 단백질을 위해 IL-2 생산을 증가시키는 T 세포의 전반적 유전자 발현을 유도한다.

[0054] "면역반응성 세포를 자극한다"란 강력하고 지속된 면역 반응을 초래하는 신호를 의미한다. 다양한 구현예에서, 이는 면역 세포(예로, T-세포) 활성화 후에 일어나거나 비제한적으로 CD28, CD137(4-1BB), OX40, CD40 및 ICOS 가 포함되는 수용체를 통해 동시에 매개된다. 다중 자극 신호의 수신은 강력한 장기 T 세포 매개된 면역 반응을 일으키기 위해 중요할 수 있다. T 세포는 빠르게 억제되고 항원에 비반응성이 될 수 있다. 이들 공동-자극 신호의 효과는 다양할 수 있지만, 이들은 일반적으로 완전하고 지속된 박멸을 위해 항원에 강력하게 반응하는 장기 생존, 증식성, 및 항-아포토시스성 T 세포를 생성하기 위해 증가된 유전자 발현을 초래한다.

[0055] 본원에서 사용되는 용어 "항원-인식 수용체"는 항원에 대한 그 결합에 반응하여 면역 또는 면역반응성 세포(예로, T-세포)를 활성화할 수 있는 수용체를 나타낸다.

[0056] 항원-결합 단편에는 $F(ab')_2$, 및 Fab가 포함된다. $F(ab')_2$, 및 Fab 단편은 온전한 항체의 Fc 단편이 없다.

[0057] 소정 구현예에서, 항체는 디설피드 결합에 의해 상호-연결된 적어도 2개의 중쇄(H) 및 2개의 경쇄(L)를 포함하는 당단백질이다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(본원에서 V_H 로 약칭됨) 및 중쇄 불변 영역(C_H) 영역으로 이루어진다. 중쇄 불변 영역은 $CH1$, $CH2$ 및 $CH3$ 의 3개 도메인으로 이루어진다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(본원에서 V_L 로 약칭됨) 및 경쇄 불변 영역(C_L) 영역으로 이루어진다. 경쇄 불변 영역은 1개 도메인, C_L 로 이루어진다. V_H 및 V_L 영역은 프레임워크 영역(FR)으로 명명된 보다 보존된 영역과 함께 분산되는, 상보성 결정 영역(CDR)으로 명명된 초가변성 영역으로 추가 세분될 수 있다. 각각의 V_H 및 V_L 은 하기 순서: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4로 아미노-말단부터 카복시-말단으로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 이루어진다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 항체의 불변 영역은 면역계의 다양한 세포(예로, 효과기 세포) 및 전통적 보체계의 제1 성분($C1q$)이 포함되는, 숙주 조직 또는 인자에 대한 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다.

[0058] 본원에서 사용된 바와 같이, "CDR"은 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 고가변 영역인 항체의 상보성 결정 영역 아미노산 서열로 정의된다. 예로, 문헌[Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th U. S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)]을 참고한다. 일반적으로, 항체는 가변 영역에 3개의 중쇄 및 3개의 경쇄 CDR 또는 CDR 영역을 포함한다. CDR은 항원 또는 에피토프에 대한 항체의 결합을 위한 대부분의 접촉 잔기를 제공한다. 소정 구현예에서, CDR 영역은 Kabat 시스템을 사용하여 기술된다(Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242).

[0059] 본원에서 사용되는 용어 "단일쇄 가변 단편" 또는 "scFv"는 공유 연결되어 $V_H::V_L$ 이중이량체를 형성하는 면역글로불린의 중쇄(V_H) 및 경쇄(V_L) 가변 영역의 융합 단백질이다. V_H 및 V_L 은 직접 연결되거나 펩타이드-인코딩 링

커(예로, 10개, 15개, 20개, 25개 아미노산)에 의해 연결되며, 이는 V_H 의 N-말단을 V_L 의 C-말단과 연결하거나, V_H 의 C-말단을 V_L 의 N-말단과 연결한다. 링커는 보통 가요성을 위해 글리신, 뿐만 아니라 가용성을 위해 세린 또는 트레오닌이 풍부하다. 불변 영역의 제거 및 링커의 도입에도 불구하고, scFv 단백질은 원래 면역글로불린의 특이성을 보유한다. 단일쇄 Fv 폴리펩타이드 항체는 Huston 등(Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883, 1988)에 의해 기재된 바와 같이 V_H - 및 V_L -인코딩 서열이 포함되는 핵산으로부터 발현될 수 있다. 또한, U.S. 특허 번호 5,091,513, 5,132,405 및 4,956,778; 및 U.S. 특허 공개 번호 20050196754 및 20050196754를 참고한다. 억제 활성을 갖는 길항성 scFv가 기재되었다(예로, Zhao et al., Hybridoma (Larchmt) 2008 27(6):455-51; Peter et al., J Cachexia Sarcopenia Muscle 2012 August 12; Shieh et al., J Immunol 2009 183(4):2277-85; Giomarelli et al., Thromb Haemost 2007 97(6):955-63; Fife et al., J Clin Invest 2006 116(8):2252-61; Brocks et al., Immunotechnology 1997 3(3):173-84; Moosmayer et al., Ther Immunol 1995 2(10):31-40) 참고. 자극 활성을 갖는 작용성 scFv가 기재되었다(예로, Peter et al., J Bio Chem 2003 278(38):36740-7; Xie et al., Nat Biotech 1997 15(8):768-71; Ledbetter et al., Crit Rev Immunol 1997 17(5-6):427-55; Ho et al., Biochim Biophys Acta 2003 1638(3):257-66 참고).

[0060] 본원에서 사용되는 용어 "친화도"는 결합 강도의 척도를 의미한다. 친화도는 항체 조합 부위 및 항원 결정기 간 입체화학적 피팅의 근접도, 이들 간 접촉 면적의 크기, 및/또는 하전된 기 및 소수성 기의 분포에 의존할 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "친화도"에는 또한 "결합력"이 포함되며, 이는 가역적 복합체의 형성 후 항원-항체 결합의 강도를 나타낸다. 비제한적으로 다양한 항원-결합 실험, 예로, 기능적 검정(예로, 유세포 측정 검정)이 포함되는, 항원에 대한 항체의 친화도를 계산하는 방법은 당분야에 알려져 있다.

[0061] 본원에서 사용되는 용어 "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR"은 면역 또는 면역반응성 세포를 활성화하거나 자극할 수 있는 세포내 신호전달 도메인에 융합되는 세포외 항원-결합 도메인, 및 막통과 도메인을 포함하는 분자를 나타낸다. 소정 구현예에서, CAR의 세포외 항원-결합 도메인은 scFv를 포함한다. scFv는 항체의 가변 중쇄 및 경쇄 영역의 융합으로부터 유래될 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, scFv는 Fab로부터 유래될 수 있다(항체로부터 대신, 예로, Fab 라이브러리로부터 획득됨). 소정 구현예에서, scFv는 막통과 도메인에 이어 세포내 신호전달 도메인에 융합된다.

[0062] 본원에서 사용되는 용어 "핵산 분자"에는 관심 폴리펩타이드(예로, IL-36 폴리펩타이드) 또는 이의 단편을 인코딩하는 임의의 핵산 분자가 포함된다. 이러한 핵산 분자는 내인성 핵산 서열과 100% 상동성이거나 동일할 필요는 없지만, 실질적 동일성을 나타낼 수 있다. 내인성 서열과 "실질적 동일성" 또는 "실질적 상동성"을 갖는 폴리뉴클레오타이드는 전형적으로 이중-가닥 핵산 분자의 적어도 하나의 가닥과 혼성화할 수 있다. "혼성화한다"란 다양한 엄격성 조건 하에, 상보적인 제1 폴리뉴클레오타이드 서열(예로, 본원에서 기재되는 유전자), 또는 이의 일부 간에 이중-가닥 분자를 형성하는 페어를 의미한다(예로, Wahl, G. M. and S. L. Berger (1987) Methods Enzymol. 152:399; Kimmel, A. R. (1987) Methods Enzymol. 152:507 참고).

[0063] 예를 들어, 엄격한 염 농도는 보통 약 750 mM NaCl 및 75 mM 3나트륨 시트레이트 미만, 예로, 약 500 mM NaCl 및 50 mM 3나트륨 시트레이트 미만, 또는 약 250 mM NaCl 및 25 mM 3나트륨 시트레이트 미만일 것이다. 낮은 엄격성의 혼성화는 유기 용매, 예로, 포름아미드의 부재 하에 획득될 수 있는 반면, 높은 엄격성의 혼성화는 적어도 약 35% 포름아미드, 예로, 적어도 약 50% 포름아미드의 존재 하에 획득될 수 있다. 엄격한 온도 조건에는 보통 적어도 약 30°C, 적어도 약 37°C, 또는 적어도 약 42°C의 온도가 포함된다. 추가 파라미터의 변화, 예컨대 혼성화 시간, 세제, 예로, 나트륨 도데실 설페이트(SDS)의 농도, 및 담체 DNA의 포함 또는 제외는 통상의 기술자에게 잘 알려져 있다. 다양한 수준의 엄격성이 필요한 바에 따라 이들 다양한 조건을 조합함으로써 달성된다. 소정 구현예에서, 혼성화는 750 mM NaCl, 75 mM 3나트륨 시트레이트, 및 1% SDS 중 30°C에서 일어날 것이다. 소정 구현예에서, 혼성화는 500 mM NaCl, 50 mM 3나트륨 시트레이트, 1% SDS, 35% 포름아미드, 및 100 µg/ml 변성 연어 정자 DNA(ssDNA) 중 37°C에서 일어날 것이다. 소정 구현예에서, 혼성화는 250 mM NaCl, 25 mM 3나트륨 시트레이트, 1% SDS, 50% 포름아미드, 및 200 µg/ml ssDNA 중 42°C에서 일어날 것이다. 이들 조건에 대한 유용한 변동은 통상의 기술자에게 용이하게 자명할 것이다.

[0064] 대부분의 적용에 있어서, 혼성화에 뒤따르는 세척 단계도 엄격성이 다양할 것이다. 세척 엄격성 조건은 염 농도 및 온도에 의해 정의될 수 있다. 상기와 같이, 세척 엄격성은 염 농도를 감소시키거나 온도를 증가시켜 증가될 수 있다. 예를 들어, 세척 단계를 위한 엄격한 염 농도는 약 30 mM NaCl 및 3 mM 3나트륨 시트레이트 미만, 예로, 약 15 mM NaCl 및 1.5 mM 3나트륨 시트레이트 미만일 수 있다. 세척 단계를 위한 엄격한 온도 조건에는 보통 적어도 약 25°C, 적어도 약 42°C, 또는 적어도 약 68°C의 온도가 포함될 것이다. 소정 구현예에서, 세척 단

계는 30 mM NaCl, 3 mM 3나트륨 시트레이트, 및 0.1% SDS 중 25℃에서 일어날 것이다. 소정 구현예에서, 세척 단계는 15 mM NaCl, 1.5 mM 3나트륨 시트레이트, 및 0.1% SDS 중 42℃에서 일어날 것이다. 소정 구현예에서, 세척 단계는 15 mM NaCl, 1.5 mM 3나트륨 시트레이트, 및 0.1% SDS 중 68℃에서 일어날 것이다. 이들 조건에 대한 추가 변동은 통상의 기술자에게 용이하게 자명할 것이다. 혼성화 기법은 통상의 기술자에게 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 문헌[Benton and Davis (Science 196:180, 1977); Grunstein and Rogness (Proc. Natl. Acad. Sci., USA 72:3961, 1975); Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York, 2001); Berger and Kimmel (Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, New York); 및 Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York]에 기재되어 있다.

- [0065] "실질적으로 동일한" 또는 "실질적으로 상동성인"이란 참조 아미노산 서열(예를 들어, 본원에서 기재되는 임의의 아미노산 서열) 또는 참조 핵산 서열(예를 들어, 본원에서 기재되는 임의의 핵산 서열)과 적어도 약 50% 상동성이거나 동일함을 나타내는 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드를 의미한다. 소정 구현예에서, 이러한 서열은 비교를 위해 사용되는 아미노산 서열 또는 핵산 서열과 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 99%, 또는 적어도 약 100% 상동성이거나 동일하다.
- [0066] 서열 동일성은 서열 분석 소프트웨어(예를 들어, Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705의 서열 분석 소프트웨어 패키지, BLAST, BESTFIT, GAP, 또는 PILEUP/PRETTYBOX 프로그램)를 사용하여 측정될 수 있다. 이러한 소프트웨어는 다양한 치환, 결실, 및/또는 다른 변형에 상동성 정도를 할당하여 동일하거나 유사한 서열을 매칭한다. 보존적 치환에는 전형적으로 하기 그룹 내의 치환이 포함된다: 글리신, 알라닌; 발린, 이소류신, 류신; 아스파르트산, 글루탐산, 아스파라긴, 글루타민; 세린, 트레오닌; 라이신, 아르기닌; 및 페닐알라닌, 티로신. 동일성 정도의 결정에 대한 예시적 접근에서, BLAST 프로그램이 사용될 수 있고, e-3 내지 e-100의 확률 스코어는 밀접하게 관련된 서열을 시사한다.
- [0067] "유사체"란 참조 폴리펩타이드 또는 핵산 분자의 기능을 갖는 구조적으로 관련된 폴리펩타이드 또는 핵산 분자를 의미한다.
- [0068] 본원에서 사용되는 용어 "리간드"는 수용체에 결합하는 분자를 나타낸다. 소정 구현예에서, 리간드는 또 다른 세포 상의 수용체에 결합하여 세포-대-세포 인식 및/또는 상호작용을 허용한다.
- [0069] 본원에서 사용되는 용어 "구성적 발현" 또는 "구성적으로 발현되는"은 모든 생리적 조건 하의 발현 또는 발현됨을 나타낸다.
- [0070] "질환"이란 세포, 조직, 또는 기관의 정상 기능에 손상을 주거나 이를 방해하는 임의의 병태, 질환 또는 장애, 예로, 신생물, 및 세포의 병원체 감염을 의미한다.
- [0071] "유효량"이란 치료 효과를 갖기에 충분한 양을 의미한다. 소정 구현예에서, "유효량"은 신생물의 계속된 증식, 성장, 또는 전이(예로, 침습, 또는 이동)를 정지시키거나, 완화하거나, 억제하기에 충분한 양이다.
- [0072] "관용성 강제"란 이식된 기관 또는 조직을 표적으로 하는 자가-반응성 세포 또는 면역반응성 세포의 활성 방지를 의미한다.
- [0073] "내인성"이란 세포 또는 조직에서 정상적으로 발현되는 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드를 의미한다.
- [0074] "외인성"이란 세포에 내인성으로 존재하지 않는 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드를 의미한다. 따라서 용어 "외인성"은 세포에서 발현되는 임의의 재조합 핵산 분자 또는 폴리펩타이드, 예컨대 외래, 이종성, 및 과발현된 핵산 분자 및 폴리펩타이드를 포괄할 것이다. "외인성" 핵산이란 천연 야생형 세포에 존재하지 않는 핵산을 의미한다; 예를 들어, 외인성 핵산은 서열, 위치/자리, 또는 둘 다에 의해 내인성 대응물과 다를 수 있다. 명확성을 위해, 외인성 핵산은 그 천연 내인성 대응물 대비 동일하거나 상이한 서열을 가질 수 있다; 이는 세포 자체 또는 그 자손 내로 유전 조작에 의해 도입될 수 있고, 선택적으로 대안적 제어 서열, 예컨대 비-천연 프로모터 또는 분비 서열에 연결될 수 있다.
- [0075] "이종성 핵산 분자 또는 폴리펩타이드"란 세포 또는 세포로부터 수득되는 샘플에 정상적으로 존재하지 않는 핵산 분자(예로, cDNA, DNA 또는 RNA 분자) 또는 폴리펩타이드를 의미한다. 상기 핵산은 또 다른 유기체 유래일 수 있거나, 예를 들어, 세포 또는 샘플에서 정상적으로 발현되지 않는 mRNA 분자일 수 있다.

- [0076] "조절한다"란 긍정적으로 또는 부정적으로 변경함을 의미한다. 예시적인 조절에는 약 1%, 약 2%, 약 5%, 약 10%, 약 25%, 약 50%, 약 75%, 또는 약 100% 변화가 포함된다.
- [0077] "증가시킨다"란 적어도 약 5%만큼 긍정적으로 변경하는 것을 의미한다. 변경은 약 5%, 약 10%, 약 25%, 약 30%, 약 50%, 약 75%, 약 100% 이상만큼일 수 있다.
- [0078] "감소시킨다"란 적어도 약 5%만큼 부정적으로 변경하는 것을 의미한다. 변경은 약 5%, 약 10%, 약 25%, 약 30%, 약 50%, 약 75%, 또는 심지어 약 100%만큼일 수 있다.
- [0079] 용어 "단리된", "정제된", 또는 "생물학적으로 순수한"은 그 천연 상태에서 확인될 때 이에 정상적으로 수반되는 성분이 다양한 정도로 없는 물질을 나타낸다. "단리하다"는 원래 원천 또는 주변으로부터의 분리 정도를 표시한다. "정제한다"는 단리보다 높은 분리 정도를 표시한다. "정제된" 또는 "생물학적으로 순수한" 단백질에는 임의의 불순물이 단백질의 생물학적 특성에 실제로 영향을 미치거나 다른 유해 결과를 유도하지 않도록 다른 물질이 충분히 없다. 즉, 핵산 또는 펩타이드는 이것에 세포성 물질, 바이러스 물질, 또는 재조합 DNA 기법에 의해 생산된 경우 배양 배지, 또는 화학적으로 합성된 경우 화학적 잔여물 또는 다른 화합물이 실질적으로 없는 경우 정제된 것이다. 순도 및 동종성은 전형적으로 분석 화학 기법, 예를 들어, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 또는 고성능 액체 크로마토그래피를 사용하여 결정된다. 용어 "정제된"은 핵산 또는 단백질이 전기영동 겔에서 본질적으로 하나의 밴드를 생성함을 표시할 수 있다. 변형, 예를 들어, 인산화 또는 글리코실화를 거칠 수 있는 단백질에 있어서, 상이한 변형은 상이한 단리된 단백질을 생성할 수 있고, 이는 별도로 정제될 수 있다.
- [0080] "단리된 세포"란 세포에 자연적으로 수반되는 분자적 및/또는 세포성 성분으로부터 분리된 세포를 의미한다.
- [0081] 본원에서 사용되는 용어 "항원-결합 도메인"은 세포 상에 존재하는 특정 항원 결정기 또는 항원 결정기 세트에 특이적으로 결합할 수 있는 도메인을 나타낸다.
- [0082] "신생물"이란 세포 또는 조직의 병리적 증식 및 다른 조직 또는 기관으로의 그 후속 이동 또는 침습을 특징으로 하는 질환을 의미한다. 신생물 성장은 전형적으로 제어되지 않으며 진행성이고, 정상 세포의 증식을 유발하지 않을, 또는 그 종료를 유도할 조건 하에 일어난다. 신생물은 비제한적으로 다양한 세포 유형, 조직, 또는 방광, 뼈, 뇌, 유방, 연골, 아교세포, 식도, 나팔관, 담낭, 심장, 내장, 신장, 간, 폐, 림프절, 신경 조직, 난소, 췌장, 전립샘, 골격근, 피부, 척추, 비장, 위, 정소, 가슴샘, 갑상샘, 기관, 비뇨생식기도, 요관, 요도, 자궁, 및 질로 이루어진 군으로부터 선택되는 기관이 포함되는 기관, 또는 이의 조직 또는 세포 유형에 영향을 미칠 수 있다. 신생물에는 암, 예컨대 육종, 암종, 또는 형질세포종(형질 세포의 악성 종양)이 포함된다.
- [0083] "수용체"란 적어도 하나의 리간드에 선택적으로 결합하는 세포막 상에 존재하는, 폴리펩타이드 또는 이의 일부 또는 단편을 의미한다. 소정 구현예에서, 리간드는 항원이다. 항원은 종양 항원, 병원체 항원, 또는 정상 세포 항원. HLA 항원, 또는 동종항원(예로, 부조직 적합성 동종항원)일 수 있다.
- [0084] "인식하다"란 표적, 예로, 리간드(예로, 항원)에 선택적으로 결합함을 의미한다. 예를 들어, 종양을 인식하는 세포(예로, T 세포)는 종양 항원에 결합하는 수용체(예로, TCR 또는 CAR)를 발현할 수 있다.
- [0085] 본원에서 사용되는 용어 "리간드-인식 수용체"는 리간드를 인식할 수 있는 수용체를 나타낸다.
- [0086] "참조" 또는 "대조군"이란 비교 표준을 의미한다. 예를 들어, CAR 및 scFv를 발현하는 세포에 의한 scFv-항원 결합 수준은 CAR만을 발현하는 대응하는 세포에서의 scFv-항원 결합 수준과 비교될 수 있다.
- [0087] "분비된"이란 세포로부터, 예로, 소포체, 골지 기구를 통한 분비 경로를 통해, 및 세포 형질막과 일시적으로 융합하여 세포 외부로 폴리펩타이드를 방출하는 소포로서 방출되는 폴리펩타이드를 의미한다.
- [0088] "특이적으로 결합한다"란 생물학적 관심 분자(예로, 폴리펩타이드)를 인식하고 이에 결합하지만, 샘플, 예를 들어, 자연적으로 본원에서 개시되는 폴리펩타이드가 포함되는 생물학적 샘플 중 다른 분자를 실질적으로 인식하고 이에 결합하지 않는 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 의미한다.
- [0089] 본원에서 사용되는 용어 "종양 항원"은 정상 또는 비-IS 신생 세포 대비 종양 세포 상에서 고유하게 또는 차별적으로 발현되는 항원(예로, 폴리펩타이드)을 나타낸다. 소정 구현예에서, 종양 항원에는 항원-인식 수용체(예로, CD19, MUC-16)를 통해 면역 반응을 활성화하거나 유도할 수 있는, 또는 수용체-리간드 결합(예로, CD47, PD-L1/L2, B7.1/2)을 통해 면역 반응을 억제할 수 있는 종양에 의해 발현되는 임의의 폴리펩타이드가 포함된다.
- [0090] 용어 "포함한다", "포함하는", 등은 U.S. 특허법에서 이들에게 부여되는 광의의 의미를 가지려는 것이며 "포함

된다", "포함되는" 등을 의미할 수 있다.

[0091] 본원에서 사용되는 바와 같은 "치료"는 치료받는 개체 또는 세포의 질환 경과를 변경하려는 시도의 임상적 개입을 나타내며, 예방을 위해 또는 임상 병리의 경과 동안 수행될 수 있다. 치료의 치료 효과에는 비제한적으로 질환의 발생 또는 재발 방지, 증상의 경감, 질환의 임의의 직접적이거나 간접적인 병리적 결과의 축소, 전이의 방지, 질환 진행 속도의 감소, 질환 상태의 완화 또는 억제, 및 진정 또는 개선된 예후가 포함된다. 질환 또는 장애의 진행을 방지함으로써, 치료는 영향받거나 진단받은 대상체 또는 장애를 갖는 것으로 추정되는 대상체에서 장애로 인한 저하를 방지할 수 있지만, 또한 치료는 장애에 대한 위험이 있거나 장애를 갖는 것으로 추정되는 대상체에서의 장애 또는 장애 증상의 개시를 방지할 수 있다.

[0092] 본원에서 "개체" 또는 "대상체"는 척추동물, 예컨대 인간 또는 비-인간 동물, 예를 들어, 포유류이다. 포유류에는 비제한적으로 인간, 영장류, 농장 동물, 스포츠 동물, 설치류 및 애완동물이 포함된다. 비-인간 동물 대상체의 비제한적 예에는 설치류, 예컨대 마우스, 래트, 햄스터, 및 기니 피그; 토끼; 개; 고양이; 양; 돼지; 염소; 소; 말; 및 비-인간 영장류, 예컨대 유인원 및 원숭이가 포함된다. 본원에서 사용되는 용어 "면역손상된"은 면역결핍을 가진 대상체를 나타낸다. 대상체는 보통 건강한 면역계를 가진 개인에서는 질환을 유도하지 않지만, 불량하게 기능하거나 억제된 면역계를 가진 개인에게는 영향을 미칠 수 있는 유기체에 의해 유도되는 감염인 기회 감염에 매우 취약하다.

[0093] 본원에서 개시되는 주제의 다른 양태는 하기 개시에서 기재되며 본원에서 개시되는 주제의 범위 내이다.

[0094] 5.2. IgG-분해 효소

[0095] 본원에서 개시되는 세포는 IgG-분해 효소를 포함한다.

[0096] IgG-분해 효소는 IgG를 절단할 수 있다. IgG는 인간 면역계에서 중요한 보호 역할을 담당하지만, 또한 질환, 예컨대 류마티스 관절염, 중증 근무력증, 전신 루푸스 등의 발병기전과 연관되며, 여기서 IgG의 제거는 이들 자가면역 질환을 치료하기 위한 치료 방법으로서 사용되었다(Johansson *et al.*, *PLoS ONE* (2008);3:1-6; Berta *et al.*, *The International Journal of Artificial Organs* (1994);17:603-608, Stummvoll *et al.*, *Annals of the Rheumatic Disease* (2005); 64:1015-1021). 또한, 숙주 IgG는 동종이식에서 중요한 역할을 담당하며, 여기서 HLA 공여자 간 부적합성은 동종이식편의 항체-매개 거부를 야기한다(Loupy *et al.*, *New England Journal of Medicine* (2018);379:1150-1160).

[0097] IdeS는 동종이식 전에 탈감작을 위해 인간에서 평가되었다. 연구에서, 25명의 환자 중 24명이 모든 공여자-특이적 항체를 신속하게 제거한 IdeS로의 치료 후, HLA-부적합 이식을 수여받을 수 있었다(Jordan *et al.*, *New England Journal of Medicine* (2017);377:442-453; Lonze *et al.*, *Annals of Surgery* (2018);268:488-496).

[0098] 연구는 IgG-분해 효소가 긍정적 치료 결과를 가짐을 나타내었다. 예를 들어, IdeS는 특발성 혈소판감소증, 궤양성 대장염, 및 관절염의 동물 모델에서 긍정적인 치료 결과를 갖는 것으로 나타났다(Johansson *et al.*, *PLoS ONE* (2008);3:1-6; Yang *et al.*, *Nephrology Dialysis Transplantation* (2010);25:2479-2486; Nandakumar *et al.*, *Arthritis and Rheumatism* (2007);56:3253-3260. s

[0099] IgG-분해 효소는 IgG를 절단함으로써, IgG 항체가 세포를 사멸시키는 것을 방지할 수 있다. 부가적으로 또는 대안적으로, IgG-분해 효소는 IgG를 절단함으로써, IgG의 잔여 단편이 세포에 대한 결합을 보유하는 것을 허용할 수 있고, 이는 세포를 하나 이상의 세포독성 항체로부터 보호한다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 세포독성 항체는 IgG와 동일한 에피토프 영역에 결합하거나 IgG와 동일한 에피토프 영역으로의 결합에 대해 교차-경쟁함으로써, 세포를 사멸시킨다. 따라서, 이 방법은 보호 차폐를 생성한다.

[0100] IgG-분해 효소는 숙주 체액성 반응으로부터 리간드-인식 수용체(예로, CAR 또는 TCR)를 포함하는 세포를 보호하기 위해 사용될 수 있다. 숙주 체액성 반응의 비제한적 예에는 항체-유래 숙주 면역 반응(예로, 항-CAR 항체), 새로운 아미노산 서열에 대한 숙주 체액성 반응, 외래 서열에 대한 숙주 체액성 반응, 융합 지점 서열에 대한 숙주 체액성 반응, 동종항원(예로, 부조직 적합성 동종항원)에 대한 숙주 체액성 반응, HLA 항원에 대한 숙주 체액성 반응, 다른 대립유전자 항원에 대한 숙주 체액성 반응, 단백질 또는 탄수화물 발현 변화에 대한 숙주 체액성 반응, 단백질의 번역-후 변형에 대한 숙주 체액성 반응, 숙주 및 주입된 세포 간 차이에 의해 유도된 숙주 체액성 반응이 포함된다. 여기에는 기존 반응 또는 세포의 주입에 의해 자극된 반응이 포함될 수 있다. 숙주 체액성 반응으로부터의 보호는 세포의 사멸 또는 중화를 방지하며, 세포에 증가된 지속성, 개선된 활성(예로, 항-종양 활성, 증식, 사이토카인의 분비, 세포용해성 연루, 또는 세포 내로 특이적으로 조작된 다른 기능)을 제공한다. 세포의 증가된 지속성 및 기능은 또한 세포를 포함하는 임의의 치료법에 대한 비용 감소를 야기할 수 있다.

다. 예를 들어, CAR-T 세포 치료법은 매우 높은 비용과 연관되며, 예로, 1회 주입이 수 십만 달러를 상회한다 (Lin, *et al.*, *Journal of Clinical Oncology* (2018); 36:3192-3202). CAR-T 세포의 지속성 개선은 상기 유형의 치료의 비용 효과를 개선할 수 있다.

- [0101] IgG-분해 효소의 비제한적 예에는 스트렙토코커스 피오게네스(*S. pyogenes*)의 IgG-분해 효소(예로, IdeS), 스트렙토코커스 에쿠이 아종 주에피데미쿠스(*S. equi subsp. zooepidemicus*)의 IgG-분해 효소(IdeZ), 스트렙토코커스 에쿠이 아종 에쿠이(*S. equi subsp. equi.*)의 IgG-분해 효소(IdeE), 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*)로부터의 엔도글리코시다제(EndoS), 및 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*)로부터의 스트렙토코커스 시스템인 프로티나제(SpeB)가 포함된다.
- [0102] IdeE 및 IdeZ는 스트렙토코커스 에쿠이(*Streptococcus equi*)로부터 유래된다(Lannergard *et al.*, *FEMS Microbiology Letters* (2006);262:230-235). 각각의 IdeE 및 IdeZ는 IgG의 힌지 영역 아래에서 Fc 영역을 절단하며, 여기서 이 영역은 부위 LLGGP를 포함한다.
- [0103] EndoS는 IgG의 감마-사슬 상에서 글리칸 모이어티를 제거함으로써 IgG와 Fc 수용체의 상호작용을 방해하는 엔도글리코시다제이다(Collin *et al.*, *EMBO J.* (2001);20(12):3046-3055).
- [0104] 소정 구현예에서, IgG-분해 효소는 IgG 및 Fc 수용체 간 상호작용을 방해할 수 있다. 소정 구현예에서, IgG-분해 효소는 엔도펩티다제, 예로, IdeS, IdeZ, IdeE, 및 SpeB이다. 소정 구현예에서, IgG-분해 효소는 IgG 특이적 엔도펩티다제, 예로, IdeS, IdeZ, 및 IdeE이다. 소정 구현예에서, IgG-분해 효소는 엔도글리코시다제, 예로, EndoS이다.
- [0105] 소정 구현예에서, IgG-분해 효소는 IdeS이다. 박테리아는 인간 면역계를 회피하는 복잡한 전략, 예컨대 흡소닌화 및 식균작용을 배제하기 위한 단백질 분해 효소의 방출을 진화시켰다(Potempa *et al.*, *Biol Chem.* (2012);393:873-888). 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*)는 IgG-분해 효소를 절단하며, 이는 힌지 영역 아래에서 IgG를 절단하여 Fab 및 Fc 단편을 생성한다.
- [0106] IdeS는 면역글로불린 A, M, E 및 D를 절단하지 않고, 면역글로불린 G에 대해 높은 특이성을 갖는 시스템인 프로테아제이다(Von *et al.*, *EMBO Journal* (2002);21:1607-1615, 및 Johansson *et al.*, *PLoS ONE* (2008);3:1-6). IdeS는 자체가 잠재적으로 면역원성이지만, 효소는 또한 자체를 숙주 면역 반응으로부터 보호해야 하며, 이것이 그 자연적 목표이다. IdeS는 힌지 영역 아래에서 IgG를 절단함으로써 Fc 단편을 방출하고 F(ab')₂ 단편은 온전히 유지된다(von Pawel-Rammingen *et al.*, *EMBO J.* (2002);21(7):1607-15).
- [0107] 소정 구현예에서, IdeS는 아래에서 제공되는 바와 같이 GenBank No: AEJ35177.1을 갖는 아미노산 서열(서열번호 1), 또는 이의 단편과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 적어도 약 100% 상동성이거나 동일한 아미노산 서열(본원에서 상동성 및 동일성은 표준 소프트웨어, 예컨대 BLAST 또는 FASTA를 사용하여 결정될 수 있음)을 갖고/가거나 선택적으로 최대 1개 또는 최대 2개 또는 최대 3개의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 소정 구현예에서, IdeS는 적어도 약 20개, 또는 적어도 약 30개, 또는 적어도 약 40개, 또는 적어도 약 50개, 또는 적어도 약 60개, 또는 적어도 약 70개, 또는 적어도 약 100개, 또는 적어도 약 200개, 또는 적어도 약 300개, 및 최대 341개 아미노산 길이인, 서열번호 1의 연속 부분인 아미노산 서열을 포함하거나 갖는다. 대안적으로 또는 부가적으로, 비제한적인 다양한 구현예에서, IdeS는 서열번호 1의 아미노산 1 내지 341, 30 내지 341, 1 내지 50, 50 내지 100, 100 내지 150, 150 내지 200, 또는 200 내지 341의 아미노산 서열을 포함하거나 갖는다. 소정 구현예에서, IdeS는 서열번호 1의 아미노산 30 내지 341을 포함하거나 갖는다. 서열번호 1은 아래에 제공된다.
- [0108] 1 MRKRCYSTSA VVLAATLFA LSVDRGVIAD SFSANQEIRY SEVTPYHVTS VWTKGVTTPA
- [0109] 61 KFTQGEDVFH APYVANQGWY DITKTFNGKD DLLCGAATAG NMLHWWFDQN KEKIEAYLKK
- [0110] 121 HPDKQKIMFG DQELLDVRKV INTKGDQTN ELFNFRDKA FPGLSARRIG VMPDLVDMF
- [0111] 181 INGYLLNVYK TQTTDVNRTY QEKDRRGIF DAVFTRGDQS KLLTSRHFDF EKNLKEISDL
- [0112] 241 IKKELTEGKA LGLSHTYANV RINHVINLWG ADFDSNGNLK AIYVTDSDSN ASIGMKKYFV
- [0113] 301 GVNSAGKVAI SAKEIKEDNI GAQVLGLFTL STGQDSWNQT N [서열번호 1]
- [0114] 서열번호 1의 아미노산 30 내지 341을 인코딩하는 예시적인 핵산 서열을 서열번호 2에 나타내며, 이는 아래에

제공된다.

- [0115] GACTCTTTTAGTGCCAATCAAGAAATCCGATATAGCGAGGTGACTCCTTACCATGTAACCTTCTGTGTGGACCAAGGGAGTTACCCACCAGCCAAGTTCACG CAGGGTGAGGACGTATTTACGCACCGTACGTAGCTAACAGGGTTGGTACGACATCACTAAGACCTTCAATGGGAAAGACGATCTTTTGTGTGGTGCCGCA ACGCGGGCAACATGCTGCACTGGTGGTTTCGACCAAAACAAGGAGAAGATCGAAGCGTACTTGAAGAAACACCCAGACAAACAGAAAATCATGTTTGGAGAC CAGGAGCTCTGGATGTGAGAAAGTAACTCAACACTAAAGGTGACCAAAACAACAGTGAACCTTTTAACTATTTTCGGGACAAGGCGTTTCCAGGATTGAGT GCCAGAAGAATCGGCGTAATGCCTGACCTCGTGCTTGACATGTTTCATCAATGGATACTATCTCAATGTATATAAGACCCAAACCACAGATGTTAATCGAACT TATCAGGAGAAGGATAGAAGGGAGGAATATTTGATGCCGTTTTTACTCGAGGAGACCAGTCTAAGCTCTTGACCAGCAGGCACGACTTCAAAGAGAAGAAT CTAAAGAAATATCTGATCTCATAAAGAAGGAACGTACGGAAGGCAAAGCGCTGGGACTTTCCCATACGTATGCCAATGTAAGAATCAATCATGTCATAAAC CTTTGGGGTGCTGATTTTCGATTCTAATGGAATCTTAAGGCTATATATGTTACTGATTCCGACTCCAACGCGTCTATTGGCATGAAAAAATACTTCGTCGGG GTGAACCTCAGCAGAAAGGTGCGAATATCTGCTAAGGAAATTAAGGAAGACAACATAGGGGCGCAAGTGCTGGGTCTCTTACCCTTTCCACCGCCAAGAC TCCTGGAATCAAACAAAT [서열번호 2]
- [0116] 소정 구현예에서, IgG-분해 효소는 세포에 결합된다(또한 "막-결합 IgG-분해 효소"로 나타냄). 예로, 도 1a를 참고한다. 막-결합 IgG-분해 효소에 있어서, 효소는 막통과 도메인에 융합되거나 부착되며, 이는 세포로 효소를 결합시키거나 부착할 수 있다. 예로, 도 1a를 참고한다. 막통과 도메인은 IgG-분해 효소의 C-말단 또는 N-말단에 부착될 수 있다. 소정 구현예에서, 막통과 도메인은 IgG-분해 효소의 C-말단에 부착된다. 예로, 도 1a를 참고한다.
- [0117] 막통과 도메인은 분자 또는 단백질의 막통과 도메인 또는 이의 일부일 수 있다. 막통과 도메인은 CD8 폴리펩타이드(예로, CD8의 막통과 도메인 또는 이의 일부), CD28 폴리펩타이드(예로, CD28의 막통과 도메인 또는 이의 일부), CD3ζ 폴리펩타이드(예로, CD3ζ의 막통과 도메인 또는 이의 일부), CD4 폴리펩타이드(예로, CD4의 막통과 도메인 또는 이의 일부), 4-1BB 폴리펩타이드(예로, 4-1BB의 막통과 도메인 또는 이의 일부), OX40 폴리펩타이드(예로, OX40의 막통과 도메인 또는 이의 일부), ICOS 폴리펩타이드(예로, ICOS의 막통과 도메인 또는 이의 일부), 합성 펩타이드(면역 반응과 연관된 단백질에 기반하지 않음), 또는 이의 조합을 포함할 수 있다.
- [0118] 소정 구현예에서, IgG-분해 효소에 융합된 막통과 도메인은 CD8 폴리펩타이드이다. 소정 구현예에서, CD8 폴리펩타이드는 서열번호 3에 나타난 아미노산 서열 또는 서열번호 27의 아미노산 137 내지 207을 포함하거나 갖는다. 서열번호 3은 아래에 제공된다.
- [0119] PTTTPAPRPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCN [서열번호 3]
- [0120] 서열번호 3의 아미노산을 인코딩하는 예시적인 핵산 서열을 서열번호 4에 나타내며, 이는 아래에 제공된다.
- [0121] CCAACTACTACTCCCGCACCGAGACCGCCACTCTGCTCCACAGATTGCCTCCCAACCTCTTAGCTTGAGACCGGAAGCATGTCGGCCTGCGGCCGTGGC GCAGTACATACTCGCGCCTGGACTTTGCGTGCGACATATACATTGGGCACCCCTGGCCGGCACTTGCGGAGTTTGTCTGTCTCTCGTGATAACTCTC TATTGTAAC [서열번호 4]
- [0122] 소정 구현예에서, IgG-분해 효소는 세포로부터 분리된다(또한 "분리된 IgG-분해 효소"로 나타냄). 예로, 도 1b를 참고한다. 분리된 IgG-분해 효소에 있어서, 효소가 막통과 도메인에 융합되거나 부착되지 않음으로서, 효소는 세포로부터 세포외 환경 또는 세포 인근으로 분리되거나 방출된다. 예로, 도 1b를 참고한다.
- [0123] 소정 구현예에서, IgG-분해 효소는 신호 펩타이드(또한 "리더 서열"로 나타냄)에 연결되거나 융합된다. 본원에 서 사용된 바와 같이, "신호 서열" 또는 "리더 서열"은 그 수송을 지시하기 위해, 예로 세포막으로 IgG-분해 효소를 수송하기 위해, 또는 세포막으로 리간드-인식 수용체(예로, CAR)를 수송하기 위해 폴리펩타이드 또는 단백질 또는 이의 단편의 N-말단에 존재하는 펩타이드 서열(예로, 약 5개, 10개, 15개, 20개, 25개 또는 30개 아미노산)을 나타낸다.
- [0124] 예시적인 신호 서열에는 비제한적으로 CD4 신호 펩타이드, IgG 중쇄 신호 펩타이드, IL-2 신호 서열(예로, 서열번호 5에 나타난 아미노산 서열을 갖는 인간 IL-2 신호 펩타이드 또는 서열번호 6에 나타난 아미노산 서열을 갖는 마우스 IL-2 신호 펩타이드), 카파 신호 서열(예로, 서열번호 7에 나타난 아미노산 서열을 갖는 인간 카파 신호 서열 또는 서열번호 8에 나타난 아미노산 서열을 갖는 마우스 카파 신호 서열), CD8 신호 서열(예로, 서열번호 9에 나타난 아미노산 서열을 갖는 인간 CD8 신호 펩타이드 또는 서열번호 10에 나타난 아미노산 서열을 갖는 절단된 인간 CD8 신호 펩타이드), 알부민 신호 서열(예로, 서열번호 11에 나타난 아미노산 서열을 갖는 인간 알부민 신호 서열), 및 프로락틴 신호 서열(예로, 서열번호 12에 나타난 아미노산 서열을 갖는 인간 프로락틴 신호 서열)이 포함된다. 서열번호 5 내지 서열번호 12가 아래에 제공된다.

- [0125] MYRMQLLSICIALSLALVTNS [서열번호 5]
- [0126] MYSMQLASCVTLTLLVNS [서열번호 6]
- [0127] METPAQLLFLLLLWLPDTTG [서열번호 7]
- [0128] METDTLLLWVLLLVPGSTG [서열번호 8]
- [0129] MALPVTALLPLALLHAARP [서열번호 9]
- [0130] MALPVTALLPLALLHA [서열번호 10]
- [0131] MKWVTFISLLFSSAYS [서열번호 11]
- [0132] MDSKGSSQKGSRLLLLVSNNLLCQGVVS [서열번호 12]
- [0133] 소정 구현예에서, IgG-분해 효소는 CD8 신호 서열에 연결되거나 융합된다. 소정 구현예에서, CD8 신호 서열은 서열번호 10에 나타난 아미노산 서열을 포함하거나 갖는다.
- [0134] 서열번호 10의 아미노산 서열을 인코딩하는 예시적인 핵산 서열을 서열번호 13에 나타내며, 이는 아래에 제공된다.
- [0135] ATGGCCCTTCGGTGACGGCGCTTCTCTCCCTTGGCGCTTCTCTGCACGCT [서열번호 13]
- [0136] 소정 구현예에서, IgG-분해 효소는 벡터로부터 발현된다. IgG-분해 효소의 발현은 비제한적으로 번역블롯, PCR, ELISA, 질량 분광측정, 및 유세포 측정이 포함되는 임의의 적합한 방법에 의해 검출될 수 있다.
- [0137] **5.3. 리간드-인식 수용체**
- [0138] 본원에서 개시되는 세포는 리간드-인식 수용체의 제공을 포함한다. 리간드에 결합할 수 있는 임의의 수용체는 본 개시의 리간드-인식 수용체일 수 있다. 리간드-인식 수용체의 비제한적 예에는 관심 항원에 결합하는 항원-인식 수용체, 세포 부착 분자, 사이토카인 수용체(예로, 인터류킨 또는 사이토카인 수용체, 예컨대 Fas 리간드 또는 TGF β 수용체, Trail, TCR, IgG, CAR, NK 억제 수용체, 성장 인자 수용체, 예컨대 EGFR 또는 FGFR, 펩타이드 리간드 또는 부착 분자, 탄수화물 수용체, G 단백질 수용체 등), 및 Fc 수용체가 포함된다. 수용체는 1가 또는 다가일 수 있다. 리간드-인식 수용체는 내인성 또는 외인성일 수 있다. 리간드-인식 수용체는 재조합적으로 발현될 수 있다. 소정 구현예에서, 리간드-인식 수용체는 벡터로부터 발현된다.
- [0139] 소정 구현예에서, 리간드-인식 수용체는 관심 항원에 결합하는 항원-인식 수용체이다. 항원-인식 수용체의 비제한적 예에는 키메라 항원 수용체(CAR), T-세포 수용체(TCR), IgG, B 세포 수용체(BCR), IgM, IgD, 및 IgE가 포함된다.
- [0140] 소정 구현예에서, 리간드-인식 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR)이다. 소정 구현예에서, 리간드-인식 수용체는 T-세포 수용체(TCR)이다.
- [0141] 소정 구현예에서, 리간드-인식 수용체는 항원에 결합한다. 항원은 종양 항원, 병원체 항원, 정상 세포 항원(예로, 자가면역 질환 또는 기관 이식용), HLA 항원, 또는 동종항원(예로, 부조직 적합성 동종항원)일 수 있다.
- [0142] 5.3.1. 항원
- [0143] 소정 구현예에서, 리간드-인식 수용체는 항원에 결합하며, 이는 종양 항원이다. 임의의 종양 항원(항원성 펩타이드)이 본원에서 기재되는 종양-관련 구현예에서 사용될 수 있다. 항원의 원천에는 비제한적으로 암 단백질이 포함된다. 항원은 펩타이드로서 또는 온전한 단백질 또는 이의 일부로서 발현될 수 있다. 온전한 단백질 또는 이의 일부는 천연형태일 수 있거나 돌연변이화될 수 있다. 종양 항원의 비제한적 예에는 카본산 안하이드라제 IX(CAIX), 암배아 항원(CEA), CD2, CD8, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CLL1, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD74, CD133, CD138, CD123, CD44V6, 사이토메갈로바이러스(CMV) 감염된 세포의 항원(예로, 세포 표면 항원), HPV E6 또는 E7 펩타이드, EBV 펩타이드, MAGE 펩타이드, 상피 당단백질-2(EGP-2), 상피 당단백질-40(EGP-40), 상피 세포 부착 분자(EpCAM), 수용체 티로신-단백질 키나제 erb-B2,3,4(erb-B2,3,4), 플레이트-결합 단백질(FBP), 태아 아세틸콜린 수용체(AChR), 플레이트 수용체- α , 갱글리오시드 G2(GD2), 갱글리오시드 G3(GD3), 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER-2), 인간 텔로머라제 역전사효소(hTERT), 인터류킨-13 수용체 서브유닛 알파-2(IL-13R α 2), κ -경쇄, 키나제 삽입 도메인 수용체(KDR), 루이스 Y(LeY), L1 세포 부착 분자(L1CAM), 흑색종 항원 패밀리카, 1(MAGE-A1), 뮤신 16(MUC16), 뮤신 1(MUC1), 메조텔린

(MSLN), ERBB2, MAGEA3, p53, MART1, GP100, 프로티나제3(PR1), 티로시나제, 서바빈(Survivin), hTERT, EphA2, NKG2D 리간드, 암-정소 항원 NY-ESO-1, 종양태아 항원(h5T4), 전립샘 줄기 세포 항원(PSCA), 전립샘-특이적 막 항원(PSMA), ROR1, 종양-연관 당단백질 72(TAG-72), 혈관 내피 성장 인자 R2(VEGF-R2), 및 윌름 종양 단백질(WT-1), BCMA, NKCS1, EGF1R, EGFR-VIII, CD99, CD70, ADGRE2, CCR1, LILRB2, PRAME, 및 ERBB가 포함된다.

[0144] 소정 구현예에서, 리간드-인식 수용체는 CD19에 결합한다. 소정 구현예에서, 리간드-인식 수용체는 쥐와 CD19 폴리펩타이드에 결합한다. 소정 구현예에서, 쥐와 CD19 폴리펩타이드는 서열번호 14에 나타난 아미노산 서열을 포함한다.

[0145] RPQKSLLEVEEGNVLPCLPDSSPVSSSEKLAWYRGNQSTPFLLESPGSPGLHVGSLGILLVIVNVSDHMGGFYLCQKRPPFKDIWQPAWTVNVEDSGE MFRWNASDVRDLDCDLNRSSSGSHRSTSGSQLYVWAKDHPKVWGTGPVCAPRGSSSLNQLINQDLTVAPGSTLWLSGCVPPVPVAKGSI SWTHVHPRRPNVSLLSLSLGGHPVREMWWGSLLLLPQATALDEGTYCYLRGNLTIERHVKVIARSAVWLWLLRTGG [서열번호 14]

[0146] 소정 구현예에서, 리간드-인식 수용체는 인간 CD19 폴리펩타이드에 결합한다. 소정 구현예에서, 인간 CD19 폴리펩타이드는 서열번호 15에 나타난 아미노산 서열을 포함한다.

[0147] PEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKPLKLSLGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSSQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGEL FRWNVSDLGGLGCLKNRSSEGPSSPGKLMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPPCLPPRDSLNQSLSQDLTMAPGSTLWLSGCVPPDSVSRGPLSWTHVHPKPGK SLLSLELKDDRPARDMVWMETGLLLPRATAQDAGKYCHRGNTMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWK [서열번호 15]

[0148] 소정 구현예에서, 리간드-인식 수용체는 인간 또는 쥐와 CD19 단백질의 세포외 도메인에 결합한다.

[0149] 소정 구현예에서, 리간드-인식 수용체는, 예를 들어, 면역손상된 대상체에서, 병원체 감염 또는 다른 감염성 질환의 치료 및/또는 방지에서 사용하기 위해, 병원체 항원에 결합한다. 병원체의 비제한적 예에는 질환을 유도할 수 있는 바이러스, 박테리아, 진균, 기생충 및 원생동물이 포함된다.

[0150] 바이러스의 비제한적인 예에는 레트로비리대(*Retroviridae*)(예로 인간 면역결핍 바이러스, 예컨대 HIV-1(또한 HDTV-III, LAV 또는 HTLV-III/LAV, 또는 HIV-III으로 나타냄; 및 다른 단리물, 예컨대 HIV-LP; 피코나비리대(*Picornaviridae*)(예로 소아마비 바이러스, A형 간염 바이러스; 엔테로바이러스, 인간 콕사키 바이러스, 리노바이러스, 에코바이러스); 칼시비리대(*Calciviridae*)(예로 위장염을 유도하는 균주); 토가비리대(*Togaviridae*)(예로 말 뇌염 바이러스, 풍진 바이러스); 플라비리대(*Flaviridae*)(예로 뎅기 바이러스, 뇌염 바이러스, 황열 바이러스); 코로노비리대(*Coronaviridae*)(예로 코로나바이러스); 램도비리대(예로 소수포 구내염 바이러스, 광견병 바이러스); 필로비리대(*Filoviridae*)(예로 에볼라 바이러스); 파라믹소비리대(*Paramyxoviridae*)(예로 파라인플루엔자 바이러스, 볼거리 바이러스, 홍역 바이러스, 호흡기 융합 바이러스); 오르소믹소비리대(*Orthomyxoviridae*)(예로 인플루엔자 바이러스); 분가비리대(*Bungaviridae*)(예로 한탄 바이러스, 분가 바이러스, 플레보바이러스 및 나이아 바이러스); 아레나 비리대(*Arena viridae*)(출혈열 바이러스); 레오비리대(*Reoviridae*)(예로 레오바이러스, 오르비바이러스 및 로타바이러스); 버나비리대(*Birnaviridae*); 헤파드나비리대(*Hepadnaviridae*)(B형 간염 바이러스); 파보비리다(*Parvovirida*)(파보바이러스); 파포바비리대(*Papovaviridae*)(유두종 바이러스, 폴리오마 바이러스); 아데노비리대(*Adenoviridae*)(대부분의 아데노바이러스); 헤르페스비리대(*Herpesviridae*)(단순 헤르페스 바이러스(HSV) 1 및 2, 바리셀라 조스터 바이러스, 사이토메갈로바이러스(CMV), 헤르페스 바이러스; 폭스비리대(*Poxviridae*)(바리올라 바이러스, 백시니아 바이러스, 폭스 바이러스); 및 이리도비리대(*Iridoviridae*)(예로 아프리카 돼지열 바이러스); 및 미분류 바이러스(예로 델타 간염 체제(B형 간염 바이러스의 결합성 위성으로 여겨짐), 비-A, 비-B 간염 체제(클래스 1 = 내부 전파됨; 클래스 2 = 부모로부터 전파됨(즉 C형 간염); 노워크 및 관련된 바이러스, 및 아스트로바이러스)가 포함된다.

[0151] 박테리아의 비제한적 예에는 파스퇴렐라(*Pasteurella*), 스타필로코키(*Staphylococci*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*), 대장균(*Escherichia coli*), 슈도모나스 종(*Pseudomonas species*), 및 살모넬라 종(*Salmonella species*)이 포함된다. 감염성 박테리아의 구체예에는 비제한적으로 헬리코박터 필로리(*Helicobacter pyloris*), 보렐리아 부르그도르페리(*Borelia burgdorferi*), 레지오넬라 뉴모필리아(*Legionella pneumophila*), 미코박테리아 종(예로 미코박테리아 투베르쿨로시스(*M. tuberculosis*), 미코박테리아 아비움(*M. avium*), 미코박테리아 인트라셀룰라레(*M. intracellulare*), 미코박테리아 칸사이이(*M. kansasii*), 미코박테리아 고르도네(*M. gordonae*)), 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 나이세리아 고노로에에(*Neisseria gonorrhoeae*), 나이세리아 메닝지티디스(*Neisseria meningitidis*), 리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*), 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*)(그룹 A 스트렙토코커스), 스트렙토코커스 아갈락티에(*Streptococcus agalactiae*)(그룹 B 스트렙토코커스), 스트렙토코커스(비리단스

(viridans) 그룹), 스트렙토코커스 패칼리스(*Streptococcus faecalis*), 스트렙토코커스 보비스(*Streptococcus bovis*), 스트렙토코커스(혐기성 중), 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*), 병원성 캄필로박터(*Campylobacter*) 중, 엔테로코커스(*Enterococcus*) 중, 해모필러스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*), 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*), 코리네박테리움 디프테리아(*Corynebacterium diphtheriae*), 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 중, 에리시페로트릭스 루시오파티아(*Erysipelothrix rhusiopathiae*), 클로스트리듐 퍼프링거스(*Clostridium perfringens*), 클로스트리듐 테타니(*Clostridium tetani*), 엔테로박터 에어로게네스(*Enterobacter aerogenes*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 파스퇴렐라 멀토시다(*Pasturella multocida*), 박테로이데스(*Bacteroides*) 중, 푸소박테리움 뉴클레아툼(*Fusobacterium nucleatum*), 스트렙토바실러스 모닐리포르미스(*Streptobacillus moniliformis*), 트레포네마 팔리둠(*Treponema pallidum*), 트레포네마 퍼테누에(*Treponema pertenuis*), 렙토스피라(*Leptospira*), 리케차(*Rickettsia*), 및 액티노마이세스 이스라엘리(*Actinomyces israelii*)가 포함된다.

[0152] 소정 구현예에서, 병원체 항원은 사이토메갈로바이러스(CMV)에 존재하는 바이러스 항원, 엡스타인 바 바이러스(EBV)에 존재하는 바이러스 항원, 인간 면역결핍 바이러스(HIV)에 존재하는 바이러스 항원, 인간 파필로마바이러스(HPV)에 존재하는 바이러스 항원, 또는 인플루엔자 바이러스에 존재하는 바이러스 항원이다.

[0153] 소정 구현예에서, 리간드-인식 수용체는 동종항원, 예컨대 HLA 분자, 및 부조직 적합성 동종항원에 결합한다.

[0154] 5.3.2. T-세포 수용체(TCR)

[0155] 소정 구현예에서, 리간드-인식 수용체는 TCR이다. TCR은 불변 CD3 사슬 분자와의 복합체의 일부로서 발현되는 2개의 가변쇄로 이루어진 디설피드-결합 이중이량체성 단백질이다. TCR은 T 세포의 표면 상에서 확인되며, 주조직 적합 복합체(MHC) 분자에 결합된 펩타이드로서 항원 인식에 관여된다. 소정 구현예에서, TCR은 알파쇄 및 베타쇄(각각 TRA 및 TRB에 의해 인코딩됨)를 포함한다. 소정 구현예에서, TCR은 감마쇄 및 델타쇄(각각 TRG 및 TRD에 의해 인코딩됨)를 포함한다.

[0156] TCR의 각각의 사슬은 2개의 세포의 도메인: 가변(V) 영역 및 불변(C) 영역으로 이루어진다. 불변 영역은 세포막의 근위이며, 막통과 영역 및 짧은 세포질 꼬리가 뒤따른다. 가변 영역은 펩타이드/MHC 복합체에 결합한다. 두 쇄의 가변 도메인은 각각 3개의 상보성 결정 영역(CDR)을 갖는다.

[0157] 소정 구현예에서, TCR은 3개의 이량체성 신호전달 모듈 CD3 δ/ϵ , CD3 γ/ϵ 및 CD247 ζ/η 또는 ζ/η 과 함께 수용체 복합체를 형성할 수 있다. TCR 복합체가 그 항원 및 MHC(펩타이드/MHC)와 연루되는 경우, TCR 복합체를 발현하는 T 세포가 활성화된다.

[0158] 소정 구현예에서, 리간드-인식 수용체는 내인성 TCR이다. 소정 구현예에서, 리간드-인식 수용체는 외인성 TCR이다. 소정 구현예에서, 리간드-인식 수용체는 재조합 TCR이다. 소정 구현예에서, 리간드-인식 수용체는 비-자연 발생 TCR이다. 소정 구현예에서, 비-자연 발생 TCR은 적어도 하나의 아미노산 잔기에 의해 임의의 자연 발생 TCR과 상이하다. 소정 구현예에서, 비-자연 발생 TCR은 적어도 약 2개, 약 3개, 약 4개, 약 5개, 약 6개, 약 7개, 약 8개, 약 9개, 약 10개, 약 11개, 약 12개, 약 13개, 약 14개, 약 15개, 약 20개, 약 25개, 약 30개, 약 40개, 약 50개, 약 60개, 약 70개, 약 80개, 약 90개, 약 100개 이상의 아미노산 잔기에 의해 임의의 자연 발생 TCR과 상이하다. 소정 구현예에서, 비-자연 발생 TCR은 적어도 하나의 아미노산 잔기에 의해 자연 발생 TCR로부터 변형된다. 소정 구현예에서, 비-자연 발생 TCR은 적어도 약 2개, 약 3개, 약 4개, 약 5개, 약 6개, 약 7개, 약 8개, 약 9개, 약 10개, 약 11개, 약 12개, 약 13개, 약 14개, 약 15개, 약 20개, 약 25개, 약 30개, 약 40개, 약 50개, 약 60개, 약 70개, 약 80개, 약 90개, 약 100개 이상의 아미노산 잔기에 의해 자연 발생 TCR로부터 변형된다.

[0159] 5.3.3. 키메라 항원 수용체(CAR)

[0160] 소정 구현예에서, 리간드-인식 수용체는 CAR이다. CAR은 조작된 수용체이며, 이는 면역 효과기 세포 상에 관심 특이성을 이식하거나 부여한다. CAR은 T 세포 상에 모노클로날 항체의 특이성을 이식하기 위해 사용될 수 있다; 이의 코딩 서열의 전달은 레트로바이러스 벡터에 의해 촉진된다.

[0161] 3개 세대의 CAR이 존재한다. "제1 세대" CAR은 전형적으로 세포의 항원-결합 도메인(예로, scFv)으로 이루어지며, 이는 막통과 도메인에 융합되고, 세포질/세포내 신호전달 도메인에 융합된다. "제1 세대" CAR은 새로운 항원 인식을 제공하고 HLA-매개 항원 제시와 무관하게, 단일 융합 분자 내에서 이의 CD3 ζ 사슬 신호전달 도메인을 통해 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 둘 다의 활성화를 유도할 수 있다. "제2 세대" CAR은 다양한 공동- 자극

분자(예로, CD28, 4-1BB, ICOS, OX40)로부터의 세포내 신호전달 도메인을 CAR의 세포질 꼬리로 부가하여 T 세포에 추가 신호를 제공한다. "제2 세대" CAR은 공동-자극(예로, CD28 또는 4-1BB) 및 활성화(CD3 ζ)를 모두 제공하는 것들을 포함한다. "제3 세대" CAR은 다중 공동-자극(예로, CD28 및 4-1BB) 및 활성화(CD3 ζ)를 제공하는 것들을 포함한다. 소정 구현예에서, 항원-인식 수용체는 제1 세대 CAR이다. 소정 구현예에서, 항원-인식 수용체는 제2 세대 CAR이다.

[0162] 소정 비제한적 구현예에서, CAR의 세포외 항원-결합 도메인(예를 들어, scFv 또는 이의 유사체로 구현됨)은 약 5×10^{-7} M 이하의 해리 상수(K_d)로 항원에 결합한다. 소정 구현예에서, K_d 는 약 5×10^{-7} M 이하, 약 1×10^{-7} M 이하, 약 5×10^{-8} M 이하, 약 1×10^{-8} M 이하, 약 5×10^{-9} M 이하, 약 1×10^{-9} M 이하, 약 5×10^{-10} M 이하, 약 1×10^{-10} M 이하, 약 5×10^{-11} M 이하, 약 1×10^{-11} M 이하, 약 5×10^{-12} M 이하, 또는 약 1×10^{-12} M 이하이다.

[0163] 세포외 항원-결합 도메인(예를 들어, scFv 또는 이의 유사체 내)의 결합은, 예를 들어, 효소-연관 면역흡착 검정(ELISA), 방사선면역검정(RIA), FACS 분석, 생체검정(예로, 성장 억제), 표면 플라즈몬 공명, 웨스턴 블롯 검정, 당분화에 알려진 다른 검정에 의해 확인될 수 있다. 각각의 이들 검정은 일반적으로 관심 복합체에 특이적인 표지된 시약(예로, 항체, 또는 scFv)을 채택하여 특정 관심 단백질-항체 복합체의 존재를 검출한다. 예를 들어, scFv는 방사활성으로 표지되고 방사선면역검정(RIA)에서 사용될 수 있다(예를 들어, 본원에서 참조로 포함되는 문헌[Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986] 참고). 방사활성 동위원소는 γ 카운터 또는 신틸레이션 카운터의 사용과 같은 수단에 의해 또는 자가방사선촬영에 의해 검출될 수 있다. 소정 구현예에서, CAR의 세포외 항원-결합 도메인은 형광 마커로 표지된다. 형광 마커의 비제한적 예에는 녹색 형광 단백질(GFP), 청색 형광 단백질(예로, EBFP, EBFP2, 아주라이트(Azurite), 및 mKalamal), 붉은색 형광 단백질(예로, ECFP, 세룰리안(Cerulean), 및 CyPet), 및 황색 형광 단백질(예로, YFP, 시트린(Citrine), 비너스(Venus), 및 YPet)이 포함된다.

[0164] 본원에서 개시되는 주제에 따르면, CAR은 세포외 항원-결합 도메인, 막통과 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있고, 여기서 세포외 항원-결합 도메인은 항원, 예로, 중양 항원 또는 병원체 항원에 특이적으로 결합한다.

[0165] 5.3.3.1. CAR의 세포외 항원-결합 도메인

[0166] 소정 구현예에서, CAR의 세포외 항원-결합 도메인은 scFv를 포함한다. 소정 구현예에서, scFv는 인간 scFv이다. 소정 구현예에서, scFv는 인간화 scFv이다. 소정 구현예에서, scFv는 찢과 scFv이다. 소정 구현예에서, CAR의 세포외 항원-결합 도메인은 Fab를 포함하며, 이는 선택적으로 가교된다. 소정 구현예에서, CAR의 세포외 항원-결합 도메인은 F(ab)₂를 포함한다. 소정 구현예에서, 임의의 상기 분자는 이중성 서열과의 융합 단백질에 포함되어 CAR의 세포외 항원-결합 도메인을 형성할 수 있다.

[0167] 소정 구현예에서, CAR의 세포외 항원-결합 도메인은 찢과 scFv를 포함한다. 소정 구현예에서, 본원에서 개시되는 CAR의 세포외 항원-결합 도메인은 CD19에 결합하는 scFv를 포함한다.

[0168] 소정 구현예에서, scFv는 서열번호 16에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H)을 포함한다. 소정 구현예에서, scFv는 서열번호 17에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함한다. 소정 구현예에서, scFv는 서열번호 16에 나타난 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열번호 17에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 V_L 을, 선택적으로 (iii) V_H 및 V_L 간 링커 서열, 예를 들어 링커 펩타이드와 함께 포함한다.

[0169] 본원에서 사용된 바와 같은 "링커"는 이들이 서로 연결되도록 2개 이상의 폴리펩타이드 또는 핵산을 공유 부착하는 작용기(예로, 화학물질 또는 폴리펩타이드)를 나타낸다. 본원에서 사용된 바와 같이, "펩타이드 링커"는 2개의 단백질을 함께 커플링하기 위해(예로, V_H 및 V_L 도메인을 커플링하기 위해) 사용되는 하나 이상의 아미노산을 나타낸다.

[0170] 소정 구현예에서, 링커는 서열번호 18에 나타난 아미노산 서열을 포함하며, 이는 아래에 제공된다.

[0171] GGGSGGGSGGGGS [서열번호 18]

- [0172] 소정 구현예에서, CAR의 세포외 항원-결합 도메인은 서열번호 16과 적어도 약 80%(예로, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%) 상동성이거나 동일한 아미노산 서열을 포함하는 V_H 를 포함한다. 예를 들어, CAR의 세포외 항원-결합 도메인은 서열번호 16과 약 80%, 약 81%, 약 82%, 약 83%, 약 84%, 약 85%, 약 86%, 약 87%, 약 88%, 약 89%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 또는 약 99% 상동성이거나 동일한 아미노산 서열을 포함하는 V_H 를 포함한다. 소정 구현예에서, CAR의 세포외 항원-결합 도메인은 서열번호 16에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 V_H 를 포함한다.
- [0173] 소정 구현예에서, CAR의 세포외 항원-결합 도메인은 서열번호 17과 적어도 약 80%(예로, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%) 상동성이거나 동일한 아미노산 서열을 포함하는 V_L 를 포함한다. 예를 들어, CAR의 세포외 항원-결합 도메인은 서열번호 17과 약 80%, 약 81%, 약 82%, 약 83%, 약 84%, 약 85%, 약 86%, 약 87%, 약 88%, 약 89%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 또는 약 99% 상동성이거나 동일한 아미노산 서열을 포함하는 V_L 를 포함한다. 소정 구현예에서, CAR의 세포외 항원-결합 도메인은 서열번호 17에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 V_L 를 포함한다. 소정 구현예에서, CAR의 세포외 항원-결합 도메인은 서열번호 16과 적어도 약 80%(예로, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%) 상동성이거나 동일한 아미노산 서열을 포함하는 V_H , 및 서열번호 17과 적어도 약 80%(예로, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%) 상동성이거나 동일한 아미노산 서열을 포함하는 V_L 를 포함한다. 소정 구현예에서, CAR의 세포외 항원-결합 도메인은 서열번호 16에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 V_H 및 서열번호 17에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 V_L 를 포함한다.
- [0174] 소정 구현예에서, CAR의 세포외 항원-결합 도메인은 서열번호 19에 나타난 아미노산 서열 또는 이의 보존적 변형을 포함하는 V_H CDR1, 서열번호 29에 나타난 아미노산 서열 또는 이의 보존적 변형을 포함하는 V_H CDR2, 및 서열번호 21에 나타난 아미노산 서열 또는 이의 보존적 변형을 포함하는 V_H CDR3을 포함한다. 소정 구현예에서, CAR의 세포외 항원-결합 도메인은 서열번호 19에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR1, 서열번호 20에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR2, 및 서열번호 21에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR3을 포함한다. 소정 구현예에서, CAR의 세포외 항원-결합 도메인은 서열번호 22에 나타난 아미노산 서열 또는 이의 보존적 변형을 포함하는 V_L CDR1, 서열번호 23에 나타난 아미노산 서열 또는 이의 보존적 변형을 포함하는 V_L CDR2, 및 서열번호 24에 나타난 아미노산 서열 또는 이의 보존적 변형을 포함하는 V_L CDR3을 포함한다. 소정 구현예에서, CAR의 세포외 항원-결합 도메인은 서열번호 22에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 V_L CDR1, 서열번호 23에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 V_L CDR2, 및 서열번호 24에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 V_L CDR3을 포함한다. 소정 구현예에서, CAR의 세포외 항원-결합 도메인은 서열번호 19에 나타난 아미노산 서열 또는 이의 보존적 변형을 포함하는 V_H CDR1, 서열번호 20에 나타난 아미노산 서열 또는 이의 보존적 변형을 포함하는 V_H CDR2, 서열번호 21에 나타난 아미노산 서열 또는 이의 보존적 변형을 포함하는 V_H CDR3, 서열번호 22에 나타난 아미노산 서열 또는 이의 보존적 변형을 포함하는 V_L CDR1, 서열번호 23에 나타난 아미노산 서열 또는 이의 보존적 변형을 포함하는 V_L CDR2, 및 서열번호 24에 나타난 아미노산 서열 또는 이의 보존적 변형을 포함하는 V_L CDR3을 포함한다. 소정 구현예에서, CAR의 세포외 항원-결합 도메인은 서열번호 19에 나타난 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 V_H CDR1, 서열번호 20에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR2, 서열번호 21에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR3, 서열번호 22에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 V_L CDR1, 서열번호 23에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 V_L CDR2, 및 서열번호 24에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 V_L CDR3을 포함한다.
- [0175] 소정 구현예에서, 세포외 항원-결합 도메인은 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 scFv를 포함하며 인간 CD19 폴리펩타이드(예로, 서열번호 15에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 인간 CD19 폴리펩타이드)에 특이적으로 결합한다. 소정 구현예에서, 서열번호 25에 나타난 아미노산 서열을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 서열번호 26에 나타낸다.
- [0176] 서열번호 16, 서열번호 17, 및 서열번호 19 내지 서열번호 26이 아래에 제공된다.
- [0177] EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNVKQRPQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTIS

SVVDFYFDYWGGTTVTSS [서열번호 16]

[0178] DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGT
KLEIKR [서열번호 17]

[0179] GYAFSSY [서열번호 19]

[0180] YPGDGD [서열번호 20]

[0181] KTISSVDFYFDY [서열번호 21]

[0182] KASQNVGTNVA [서열번호 22]

[0183] SATYRNS [서열번호 23]

[0184] QQYNRYPYT [서열번호 24]

[0185] EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNVVKRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTIS
SVVDFYFDYWGGTTVTSSGGGGSGGGSGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGS
GTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKR [서열번호 25]

[0186] GAGGTGAAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGCTTCTGGCTATGCATTAGTAGTACTGGATG
AACTGGGTGAAGCAGAGGCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTATCTGAGAGTGGTGATACTAACTACAATGGAAGTTCAAGGGTCAAGCC
ACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCAGCCTACATGCAGCTCAGCGGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAAAGACCATTAGT
TCGGTAGTAGATTCTACTTTGACTACTGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGA
TCTGACATTGAGCTCACCCAGTCTCCAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATGTA
GCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACCACTGATTTACTCGGCAACCTACCGGAACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCT
GGGACAGATTTACTCTCACCATCACTAACGTGCAGTCTAAAGACTTGGCAGACTATTTCTGTCAACAATATAACAGGTATCCGTACACGTCCGGAGGGGGG
ACCAAGCTGGAGATCAAACGG [서열번호 26]

[0187] 본원에서 사용되는 용어 "보존적 서열 변형"은 아미노산 서열을 포함하는 본원에서 개시되는 CAR(예로, CAR의 세포외 항원-결합 도메인)의 결합 특징에 유의미하게 영향을 미치거나 이를 변경하지 않는 아미노산 변형을 나타낸다. 보존적 변형에는 아미노산 치환, 부가 및 결실이 포함될 수 있다. 변형은 당분야에 알려진 표준 기법, 예컨대 부위-지정 돌연변이화 및 PCR-매개 돌연변이화에 의해 본원에서 개시되는 CAR의 인간 scFv 내에 도입될 수 있다. 아미노산은 이의 물리화학적 특성, 예컨대 전하 및 극성에 따라 그룹으로 분류될 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 아미노산 잔기가 동일한 그룹 내의 아미노산으로 대체되는 것이다. 예를 들어, 아미노산은 전하에 의해 분류될 수 있다: 양으로 하전된 아미노산에는 라이신, 아르기닌, 히스티딘이 포함되며, 음으로 하전된 아미노산에는 아스파르트산, 글루탐산이 포함되고, 중성 전하 아미노산에는 알라닌, 아스파라긴, 시스테인, 글루타민, 글리신, 이소류신, 류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신, 및 발린이 포함된다. 또한, 아미노산은 극성에 의해 분류될 수 있다: 극성 아미노산에는 아르기닌(염기성 극성), 아스파라긴, 아스파르트산(산성 극성), 글루탐산(산성 극성), 글루타민, 히스티딘(염기성 극성), 라이신(염기성 극성), 세린, 트레오닌, 및 티로신이 포함되며; 비극성 아미노산에는 알라닌, 시스테인, 글리신, 이소류신, 류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 트립토판, 및 발린이 포함된다. 따라서, CDR 영역 내의 하나 이상의 아미노산 잔기는 동일한 그룹으로부터의 다른 아미노산 잔기로 대체될 수 있고 변경된 항체는 본원에서 기재되는 기능적 검정을 사용하여 보유된 기능(즉, 상기 (c) 내지 (1)에 나타난 기능)에 대해 시험될 수 있다. 소정 구현예에서, 특정된 서열 또는 CDR 영역 내의 1개 이하, 2개 이하, 3개 이하, 4개 이하, 5개 이하의 잔기가 변경된다.

[0188] 특정 서열(예로, 서열번호 16 및 서열번호 17)과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%(예로, 약 81%, 약 82%, 약 83%, 약 84%, 약 85%, 약 86%, 약 87%, 약 88%, 약 89%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 또는 약 99%) 상동성 또는 동일성을 갖는 V_H 및/또는 V_L 아미노산 서열은 특정된 서열(들) 대비 치환(예로, 보존적 치환), 삽입, 또는 결실을 함유할 수 있지만, 표적 항원(예로, CD19)에 결합하는 능력을 보유할 수 있다. 소정 구현예에서, 총 1개 내지 10개의 아미노산이 특정 서열(예로, 서열번호 16 및 서열번호 17)에서 치환되고, 삽입되고 및/또는 결실된다. 소정 구현예에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 세포외 항원-결합 도메인의 CDR 외부 영역(예로, FR 내)에서 일어난다. 소정 구현예에서, CAR의 세포외 항원-결합 도메인은 그 서열(서열번호 16 및 서열번호 17)의 번역-후 변형이 포함되는, 서열번호 16 및 17로 이루어진 군으로부터 선택되는 V_H 및/또는 V_L 서열을 포함한다.

- [0189] 본원에서 사용된 바와 같이, 두 아미노산 서열 간 상동성%는 두 서열 간 동일성%와 동등하다. 두 서열 간 동일성%는 두 서열의 최적 정렬을 위해 도입될 필요가 있는 갭의 수, 및 각각의 갭의 길이를 고려하여, 서열에 의해 공유되는 동일한 위치수의 함수(즉, 상동성% = 동일한 위치의 #/총 위치의 # x 100)이다. 서열 비교 및 두 서열 간 동일성%의 결정은 수학적 알고리즘을 사용하여 달성될 수 있다.
- [0190] 두 아미노산 서열 간 상동성%는 PAM120 가중치 잔기 표, 갭 길이 페널티 12 및 갭 페널티 4를 사용하여, ALIGN 프로그램(버전 2.0) 내에 포함된 E. Meyers 및 W. Miller(Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988))의 알고리즘을 사용하여 결정될 수 있다. 또한, 두 아미노산 서열 간 상동성%는 Blossum 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스, 및 갭 가중치 16, 14, 12, 10, 8, 6, 또는 4 및 길이 가중치 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6을 사용하여 GCG 소프트웨어 패키지(www.gcg.com에서 이용가능함) 내 GAP 프로그램 내에 포함된 Needleman 및 Wunsch(J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)) 알고리즘을 사용하여 결정될 수 있다.
- [0191] 부가적으로 또는 대안적으로, 본원에서 개시되는 주제의 아미노산 서열은, 예를 들어, 관련된 서열을 확인하기 위해, 공개 데이터베이스에 대한 검색을 수행하기 위한 "쿼리 서열"로 추가 사용될 수 있다. 이러한 검색은 문헌[Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10]의 XBLAST 프로그램(버전 2.0)을 사용하여 수행될 수 있다. BLAST 단백질 검색은 본원에서 개시되는 특정된 서열(예로, scFv m903, m904, m905, m906, 및 m900의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열)과 상동성인 아미노산 서열을 수득하기 위해 XBLAST 프로그램, 스코어 = 50, 워드길이 = 3으로 수행될 수 있다. 비교 목적을 위한 갭을 포함하는(gapped) 정렬을 수득하기 위해, Gapped BLAST가 문헌[Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402]에 기재된 바와 같이 이용될 수 있다. BLAST 및 Gapped BLAST 프로그램을 이용하기 위해, 각 프로그램(예로, XBLAST 및 NBLAST)의 기본 파라미터가 사용될 수 있다.
- [0192] 5.3.3.2. CAR의 막통과 도메인
- [0193] 소정 비제한적 구현예에서, CAR의 막통과 도메인은 적어도 일부 막에 걸치는 소수성 알파 나선을 포함한다. 상이한 막통과 도메인은 상이한 수용체 안정성을 초래한다. 항원 인식 후, 수용체는 클러스터링하며 신호가 세포로 전파된다. CAR의 막통과 도메인은 CD8 폴리펩타이드(예로, CD8의 막통과 도메인 또는 이의 일부), CD28 폴리펩타이드(예로, CD28의 막통과 도메인 또는 이의 일부), CD3 ζ 폴리펩타이드, CD4 폴리펩타이드(예로, CD4의 막통과 도메인 또는 이의 일부), 4-1BB 폴리펩타이드(예로, 4-1BB의 막통과 도메인 또는 이의 일부), OX40 폴리펩타이드(예로, OX4의 막통과 도메인 또는 이의 일부, ICOS 폴리펩타이드(예로, ICOS의 막통과 도메인 또는 이의 일부), 합성 펩타이드(면역 반응과 연관된 단백질에 기반하지 않음), 또는 이의 조합을 포함할 수 있다.
- [0194] 소정 구현예에서, CAR의 막통과 도메인은 CD8 폴리펩타이드, 예로, 인간 CD8의 막통과 도메인 또는 이의 일부, 또는 쥐와 CD8의 막통과 도메인을 포함한다. 소정 구현예에서, CD8 폴리펩타이드는 아래에서 제공된 바와 같은 NCBI 참조 번호: NP_001139345.1을 갖는 서열(서열번호 27), 또는 이의 단편과 적어도 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 약 100% 상동성이거나 동일한 아미노산 서열(본원에서 상동성은 표준 소프트웨어, 예컨대 BLAST 또는 FASTA를 사용하여 결정될 수 있음)을 포함하거나 갖고, 및/또는 선택적으로 최대 1개 또는 최대 2개 또는 최대 3개의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 소정 구현예에서, CD8 폴리펩타이드는 서열번호 27의 연속 부분인 아미노산 서열을 포함하거나 갖고, 이는 적어도 20개, 또는 적어도 30개, 또는 적어도 40개, 또는 적어도 50개, 및 최대 235개 아미노산 길이이다. 대안적으로 또는 부가적으로, 비제한적인 다양한 구현예에서, CD8 폴리펩타이드는 서열번호 25의 아미노산 1 내지 235, 1 내지 50, 50 내지 100, 100 내지 150, 137 내지 207, 137 내지 209, 150 내지 200, 또는 200 내지 235의 아미노산 서열을 포함하거나 갖는다. 소정 구현예에서, CAR의 막통과 도메인은 서열번호 27의 아미노산 137 내지 207을 포함하거나 갖는 CD8 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0195] MALPVTALLLPLALLLHAARPSQFRVSPDLRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSGCSWLFQPRGAAASPTFLLYLSQNKPKAAEGLDTQRFSQKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYYFCSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVKSGDKPSLSARYV [서열번호 27]
- [0196] 서열번호 27의 아미노산 137 내지 207을 인코딩하는 예시적인 뉴클레오타이드 서열을 서열번호 28에 나타내며, 이는 아래에 제공된다.
- [0197] CCCACCACGACGCCAGCGCCGACCAACCCCGCGGCCACGATCGCGTCGAGCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGCGTGCCGCCAGCGCGGGGGCGCAGTGACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATACCCCTTTACTGCAAC [서열번호 28]

- [0198] 소정 구현예에서, CD8 폴리펩타이드는 아래에서 제공된 바와 같은 NCBI 참조 번호: AAA92533.1을 갖는 서열(서열번호 29) 또는 이의 단편과 적어도 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 약 100% 상동성이거나 동일한 아미노산 서열(본원에서 상동성은 표준 소프트웨어, 예컨대 BLAST 또는 FASTA를 사용하여 결정될 수 있음)을 포함하거나 갖고, 및/또는 선택적으로 최대 1개 또는 최대 2개 또는 최대 3개의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 소정 구현예에서, CD8 폴리펩타이드는 서열번호 27의 연속 부분인 아미노산 서열을 포함하거나 갖고, 이는 적어도 약 20개, 또는 적어도 약 30개, 또는 적어도 약 40개, 또는 적어도 약 50개, 또는 적어도 약 60개, 또는 적어도 약 70개, 또는 적어도 약 100개, 또는 적어도 약 200개, 및 최대 247개 아미노산 길이이다. 대안적으로 또는 부가적으로, 비제한적인 다양한 구현예에서, CD8 폴리펩타이드는 서열번호 29의 아미노산 1 내지 247, 1 내지 50, 50 내지 100, 100 내지 150, 150 내지 200, 151 내지 219, 또는 200 내지 247의 아미노산 서열을 포함하거나 갖는다. 소정 구현예에서, CAR의 막통과 도메인은 서열번호 29의 아미노산 151 내지 219를 포함하거나 갖는 CD8 폴리펩타이드를 포함한다. 서열번호 29를 아래에 제공한다.
- [0199] 1 MASPLTRFLS LNLLMGESI ILGSGEAKPQ APELRIFPKK MDAELGQKVD LVCEVLGSVS
- [0200] 61 QGCSWLFQNS SSKLPQPTFV VYMASSHNI TWDEKLNSSK LFSVRDTNN KYVLTNLKFS
- [0201] 121 KENEGYFCS VISNSVMYFS SVVPVLQKVN STTKPVLRT PSPVHTGTS QPQRPEDCRP
- [0202] 181 RGSVKGGLD FACDIYIAP LAGICVAPLL SLIITLICYP RSRKRVCCKP RPLVRQEGKP
- [0203] 241 RPSEKIV [서열번호 29]
- [0204] 소정 구현예에서, CAR의 막통과 도메인은 CD28 폴리펩타이드, 예로, 인간 CD28의 막통과 도메인 또는 이의 일부, 또는 컷과 CD28의 막통과 도메인을 포함한다. CD28 폴리펩타이드는 NCBI 참조 번호: NP_006130을 갖는 서열(서열번호 30), 또는 이의 단편과 적어도 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 100% 상동성이거나 동일한 아미노산 서열을 가질 수 있고/있거나 선택적으로 최대 1개 또는 최대 2개 또는 최대 3개의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 비제한적인 소정 구현예에서, CD28 폴리펩타이드는 서열번호 30의 연속 부분인 아미노산 서열을 포함하거나 갖고, 이는 적어도 20개, 또는 적어도 30개, 또는 적어도 40개, 또는 적어도 50개, 및 최대 220개 아미노산 길이이다. 대안적으로 또는 부가적으로, 비제한적인 다양한 구현예에서, CD28 폴리펩타이드는 서열번호 30의 아미노산 1 내지 220, 1 내지 50, 50 내지 100, 100 내지 150, 150 내지 200, 또는 200 내지 220의 아미노산 서열을 포함하거나 갖는다. 소정 구현예에서, CAR의 막통과 도메인은 서열번호 30의 아미노산 153 내지 179를 포함하거나 갖는 CD28 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0205] 서열번호 30을 아래에 제공한다:
- [0206] 1 MLRLLALNL FPSIQVTGNK ILVKQSPMLV AYDVAVLNSC KYSYNLFSRE FRASLHKGLD
- [0207] 61 SAVEVCVYV NYSQQLQVYS KTGFCNDGKL GNESTVFYLY NLYVNQTDIY FCKIEVMYPP
- [0208] 121 PYLDNEKSNG TIIHVKGKHL CPSPLFPGPS KPFWLVVVG GVLACYSLLV TVAFIIFWVR
- [0209] 181 SKRSRLHSD YMNMTPRRPG PTRKHYQPYA PPRDFAAYRS [서열번호 30]
- [0210] 소정 비제한적 구현예에서, CAR은 세포의 항원-결합 도메인을 막통과 도메인으로 연결하는 스페이스 영역을 추가로 포함한다. 스페이스 영역은 항원 결합 도메인이 항원 인식을 촉진하기 위해 상이한 방향으로 배향하는 것을 허용하기 충분히 가요성일 수 있다. 스페이스 영역은 IgG1로부터의 힌지 영역, 또는 면역글로불린의 CH₂CH₃ 영역 및 CD3의 일부, CD28 폴리펩타이드의 일부(예로, 서열번호 30의 일부), CD8 폴리펩타이드의 일부(예로, 서열번호 27 또는 29의 일부), 이와 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95% 상동성이거나 동일한 임의의 상기의 변이형, 또는 합성 스페이스 서열일 수 있다.
- [0211] 5.3.3.3. CAR의 세포내 신호전달 도메인
- [0212] 소정 비제한적 구현예에서, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 CD3 ζ 폴리펩타이드를 포함하며, 이는 세포(예로, 림프 계통의 세포, 예로, T 세포)를 활성화하거나 자극할 수 있다. CD3 ζ는 3개의 ITAM을 포함하며, 항원이 결합된 후 활성화 신호를 세포(예로, 림프 계통의 세포, 예로, T 세포)로 전파한다. CD3 ζ-사슬의 세포내 신호전달 도메인은 내인성 TCR로부터의 일차 신호 전파체이다. 소정 구현예에서, CD3 ζ 폴리펩타이드는 NCBI 참조 번호: NP_932170을 갖는 서열(서열번호 31), 또는 이의 단편과 적어도 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 약 100% 상동성인 아미노산 서열을 포함하거나 갖고, 및/또는 선택적으로 최대 1개 또는

최대 2개 또는 최대 3개의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 소정 비제한적 구현예에서, CD3 ζ 폴리펩타이드는 서열번호 31의 연속 부분인 아미노산 서열을 포함하거나 갖고, 이는 적어도 20개, 또는 적어도 30개, 또는 적어도 40개, 또는 적어도 50개, 및 최대 164개 아미노산 길이이다. 대안적으로 또는 부가적으로, 비제한적인 다양한 구현예에서, CD3 ζ 폴리펩타이드는 서열번호 31의 아미노산 1 내지 164, 1 내지 50, 50 내지 100, 100 내지 150, 또는 150 내지 164의 아미노산 서열을 포함하거나 갖는다. 소정 구현예에서, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 31의 아미노산 52 내지 164를 포함하거나 갖는 CD3 ζ 폴리펩타이드를 포함한다.

[0213] 서열번호 31을 아래에 제공한다:

[0214] 1 MKWKALFTAA ILQAQLPITE AQSFGLLDPK LCYLLDGILF IYGVILTALF LRVKFSRSAD

[0215] 61 APAYQQGQNG LYNELNLGR EYDVLDRR GRPEMGGKP QRRKNPQEG LYNELQKDKMA

[0216] 121 EAYSEIGMKG ERRRGKGDH LYQGLSTATK DTYDALHMQA LPPR [서열번호 31]

[0217] 소정 구현예에서, CD3 ζ 폴리펩타이드는 NCBI 참조 번호: NP_001106864.2를 갖는 서열(서열번호 32), 또는 이의 단편과 적어도 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 약 100% 상동성이거나 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 갖고, 및/또는 선택적으로 최대 1개 또는 최대 2개 또는 최대 3개의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 소정 비제한적 구현예에서, CD3 ζ 폴리펩타이드는 서열번호 32의 연속 부분인 아미노산 서열을 포함하거나 갖고, 이는 적어도 약 20개, 또는 적어도 약 30개, 또는 적어도 약 40개, 또는 적어도 약 50개, 또는 적어도 약 90개, 또는 적어도 약 100개, 및 최대 188개 아미노산 길이이다. 대안적으로 또는 부가적으로, 비제한적인 다양한 구현예에서, CD3 ζ 폴리펩타이드는 서열번호 32의 아미노산 1 내지 164, 1 내지 50, 50 내지 100, 52 내지 142, 100 내지 150, 또는 150 내지 188의 아미노산 서열을 포함하거나 갖는다. 소정 구현예에서, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 32의 아미노산 52 내지 142를 포함하거나 갖는 CD3 ζ 폴리펩타이드를 포함한다.

[0218] 서열번호 32를 아래에 제공한다:

[0219] 1 MKWKVSVLAC ILHVRFPAGE AQSFGLLDPK LCYLLDGILF IYGVIIITALY LRAKFSRSE

[0220] 61 TAANLQDPNQ LYNELNLGR EYDVLEKKR ARPEMGGKQ RRRNPQEGVY NALQKDKMAE

[0221] 121 AYSEIGTKGE RRRGKGDHGL YQDSHFQAVQ FGNNRREGE ELTRLGLRA RPKACRHKKP

[0222] 181 LSLPAAVS [서열번호 32]

[0223] 소정 구현예에서, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 33에 나타난 아미노산 서열을 포함하거나 갖는 CD3 ζ 폴리펩타이드를 포함하며, 이는 아래에 제공된다.

[0224] RVKFSRSADAPAYQQGQNGLYNELNLGRREYDVLDRRGRPEMGGKPRRKNPQEG L [서열번호 33]

[0225] 서열번호 33을 인코딩하는 예시적인 핵산 서열을 서열번호 34에 나타내며, 이는 아래에 제공된다.

[0226] AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCTG [서열번호 34]

[0227] 소정 비제한적 구현예에서, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 적어도 공동-자극 신호전달 영역을 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, 공동-자극 영역은 적어도 하나의 공동-자극 분자 또는 이의 일부(예로, 공동-자극 분자의 세포내 도메인 또는 이의 일부)를 포함한다. 공동-자극 신호전달 영역은 세포에 최적 림프구 활성화를 제공할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, "공동-자극 분자"는 관심 항원에 대한 면역반응성 세포의 효율적 반응을 위해 요구되는 항원-인식 수용체 또는 이의 리간드 이외의 세포 표면 분자를 나타낸다. 공동-자극 분자의 비제한적 예에는 CD28, 4-1BB, OX40, ICOS, DAP-10, CD27, CD40, CD2, 및 NKGD2가 포함된다. 공동-자극 분자는 공동-자극 리간드에 결합할 수 있고, 이는 그 수용체에 대한 결합 시 공동-자극 반응, 즉 항원-인식 수용체(예로, CAR)가 그 표적 항원에 결합하는 경우 제공되는 자극을 일으키는 세포내 반응을 생성하는 세포 표면 상에서 발현되는 단백질이다. 공동-자극 리간드에는 비제한적으로 4-1BB 리간드(4-1BBL), CD80, CD86, CD70, OX40L, 및 ICOSLG가 포함된다. 하나의 예로서, 4-1BBL은 활성화 신호와 조합되는 경우 CAR-T 세포의 효과기 세포 기능을 유도하는 공동-자극 신호를 제공하기 위해 4-1BB에 결합할 수 있다. 4-1BB, ICOS 또는 DAP-10을 포함하는 공동-자극 신호전달 영역을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 CAR은 U.S. 7,446,190에 개시되며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

- [0228] 소정 구현예에서, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 4-1BB 폴리펩타이드(예로, 4-1BB의 세포내 도메인 또는 이의 일부)를 포함하는 공동-자극 신호전달 영역을 포함한다. 4-1BB 폴리펩타이드는 NCBI 참조 번호: NP_001552를 갖는 서열(서열번호 35) 또는 이의 단편과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99%, 적어도 약 100% 상동성이거나 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 가질 수 있고, 및/또는 선택적으로 최대 1개 또는 최대 2개 또는 최대 3개의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 비제한적인 소정 구현예에서, 4-1BB 폴리펩타이드는 서열번호 35의 연속 부분인 아미노산 서열을 포함하거나 갖고, 이는 적어도 20개, 또는 적어도 30개, 또는 적어도 40개, 또는 적어도 50개, 및 최대 255개 아미노산 길이이다. 대안적으로 또는 부가적으로, 비제한적인 다양한 구현예에서, 4-1BB 폴리펩타이드는 서열번호 35의 아미노산 1 내지 220, 1 내지 50, 50 내지 100, 100 내지 150, 150 내지 200, 또는 200 내지 255의 아미노산 서열을 포함하거나 갖는다. 소정 구현예에서, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 4-1BB의 세포내 도메인 또는 이의 일부를 포함하는 공동-자극 신호전달 영역을 포함한다. 소정 구현예에서, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 인간 4-1BB의 세포내 도메인 또는 이의 일부를 포함하는 공동-자극 신호전달 영역을 포함한다. 소정 구현예에서, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 35의 아미노산 214 내지 255를 포함하거나 갖는 4-1BB 폴리펩타이드를 포함하는 공동-자극 신호전달 영역을 포함한다. 서열번호 35은 아래에 제공된다.
- [0229] 1 MGNSCYNIVA TLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR
- [0230] 61 TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC
- [0231] 121 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE
- [0232] 181 PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG
- [0233] 241 CSCRPFEEEE GGCEL [서열번호 35]
- [0234] 서열번호 35의 아미노산 214 내지 255를 인코딩하는 예시적인 핵산 서열을 서열번호 36에 나타내며, 이는 아래에 제공된다.
- [0235] AAACGGGGCAGAAAGAAGCTCCTGTATATATTCAAACAACCATTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTCCAGAA GAAGAAGAAGGAGGATGTGAACCTG [서열번호 36]
- [0236] 소정 구현예에서, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 CD28 폴리펩타이드(예로, CD28의 세포내 도메인 또는 이의 일부)를 포함하는 공동-자극 신호전달 영역을 포함한다. CD28 폴리펩타이드는 서열번호 29 또는 서열번호 30에 나타난 아미노산 서열, 또는 이의 단편과 적어도 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 100% 상동성이거나 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 가질 수 있고, 및/또는 선택적으로 최대 1개 또는 최대 2개 또는 최대 3개의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 비제한적인 소정 구현예에서, CD28 폴리펩타이드는 서열번호 30의 연속 부분인 아미노산 서열을 포함하거나 갖고, 이는 적어도 20개, 또는 적어도 30개, 또는 적어도 40개, 또는 적어도 50개, 및 최대 220개 아미노산 길이이다. 대안적으로 또는 부가적으로, 비제한적인 다양한 구현예에서, CD28 폴리펩타이드는 서열번호 29 또는 서열번호 30의 아미노산 1 내지 220, 1 내지 50, 50 내지 100, 100 내지 150, 150 내지 200, 180 내지 220, 또는 200 내지 220의 아미노산 서열을 포함하거나 갖는다. 소정 구현예에서, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 CD28의 세포내 도메인 또는 이의 일부를 포함하는 공동-자극 신호전달 영역을 포함한다. 소정 구현예에서, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 인간 CD28의 세포내 도메인 또는 이의 일부를 포함하는 공동-자극 신호전달 영역을 포함한다. 소정 구현예에서, 인간 CD28은 서열번호 30에 나타난 아미노산 서열과 적어도 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 100% 상동성이거나 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 소정 구현예에서, 인간 CD28은 서열번호 30에 나타난 아미노산 서열을 갖는다. 소정 구현예에서, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 30의 아미노산 180 내지 220을 포함하거나 갖는 CD28 폴리펩타이드를 포함하는 공동-자극 신호전달 영역을 포함한다.
- [0237] 소정 구현예에서, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 OX40 폴리펩타이드(예로, OX40의 세포내 도메인 또는 이의 일부)를 포함하는 공동-자극 신호전달 영역을 포함한다. OX40 폴리펩타이드는 NCBI 참조 번호: NP_003318.1을 갖는 서열(서열번호 37), 또는 이의 단편과 적어도 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 100% 상동성이거나 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 가질 수 있고, 및/또는 선택적으로 최대 1개 또는 최대 2개 또는 최대 3개의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 비제한적인 소정 구현예에서, OX40 폴리펩타이드는 서열번호 37의 연속 부분인 아미노산 서열을 포함하거나 갖고, 이는 적어도 20개, 또는 적어도 30개, 또는 적어도 40개, 또는 적어도 50개, 및 최대 277개 아미노산 길이이다. 대안적으로 또는 부가적으로, 비제한적인 다양한 구현예에서, OX40 폴리펩타이드는 서열번호 37의 아미노산 1 내지 220, 1 내지 50, 50 내지 100,

100 내지 150, 150 내지 200, 또는 200 내지 277을 포함하거나 갖는다. 소정 구현예에서, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 OX40의 세포내 도메인 또는 이의 일부를 포함하는 공동-자극 신호전달 영역을 포함한다. 소정 구현예에서, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 인간 OX40의 세포내 도메인 또는 이의 일부를 포함하는 공동-자극 신호전달 영역을 포함한다. 소정 구현예에서, 인간 OX40은 서열번호 37에 나타낸 아미노산 서열과 적어도 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 100% 상동성이거나 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 소정 구현예에서, 인간 OX40은 서열번호 37에 나타낸 아미노산 서열을 갖는다.

[0238] 서열번호 37을 아래에 제공한다:

[0239] 1 MCVGARRLGR GPCAAALLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCRSRQ

[0240] 61 NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGERKQLCT ATQDTCRCR AGTQPLDSYK

[0241] 121 PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ

[0242] 181 GPPARPITVQ PTEAWPTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLP LAILLALYLL

[0243] 241 RRDQRLPPDA HKPPGGGSFR TPIQEEQADA HSTLAKI [서열번호 37]

[0244] 소정 구현예에서, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 ICOS 폴리펩타이드(예로, ICOS의 세포내 도메인 또는 이의 일부를 포함하는 공동-자극 신호전달 영역을 포함한다. ICOS 폴리펩타이드는 NCBI 참조 번호: NP_036224.1(서열번호 38)을 갖는 서열, 또는 이의 단편과 적어도 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 100% 상동성이거나 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 가질 수 있고, 및/또는 선택적으로 최대 1개 또는 최대 2개 또는 최대 3개의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 비제한적인 소정 구현예에서, ICOS 폴리펩타이드는 서열번호 38의 연속 부분인 아미노산 서열을 포함하거나 갖고, 이는 적어도 20개, 또는 적어도 30개, 또는 적어도 40개, 또는 적어도 50개, 및 최대 199개 아미노산 길이이다. 대안적으로 또는 부가적으로, 비제한적인 다양한 구현예에서, ICOS 폴리펩타이드는 서열번호 38의 아미노산 1 내지 220, 1 내지 50, 50 내지 100, 100 내지 150, 또는 150 내지 199의 아미노산 서열을 포함하거나 갖는다. 소정 구현예에서, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 ICOS의 세포내 도메인을 포함하는 공동-자극 신호전달 영역을 포함한다. 소정 구현예에서, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 인간 ICOS의 세포내 도메인을 포함하는 공동-자극 신호전달 영역을 포함한다. 소정 구현예에서, 인간 ICOS는 서열번호 38에 나타낸 아미노산 서열과 적어도 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 100% 상동성이거나 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 소정 구현예에서, 인간 ICOS는 서열번호 38에 나타낸 아미노산 서열을 갖는다.

[0245] 서열번호 38을 아래에 제공한다:

[0246] 1 MKSGLWYFFL FCLRIKVLTG EINGSANYEM FIFHNGGVQI LCKYPDIVQQ FKMQLKGGQ

[0247] 61 ILCDLTKTKG SGNVTSIKSL KFCHSQLSNN SVSFFLYNLD HSHANYFCN LSIFDPPPFK

[0248] 121 VTLTGGLHI YESQLCCQLK FWLPIGCAAF VVVCILGCIL ICWLTKKKYS SSVHDPNGEY

[0249] 181 MFMRAVNTAK KSRLTDVTL [서열번호 38]

[0250] 소정 구현예에서, CAR은 2개의 공동-자극 신호전달 도메인을 포함하며, 여기서 제1 공동-자극 도메인은 4-1BB의 세포내 도메인 또는 이의 일부를 포함하고, 제2 공동-자극 도메인은 CD28의 세포내 도메인 또는 이의 일부를 포함한다.

[0251] 소정 구현예에서, 본원에서 개시되는 CAR은 인간 세포에서 핵산 서열을 발현하기 위해, 유도성 프로모터를 추가로 포함한다. CAR 유전자를 발현하는 데 사용하기 위한 프로모터는 구성적 프로모터, 예컨대 유비퀴틴 C(UbiC) 프로모터일 수 있다.

[0252] 5.3.3.4. 예시적 CAR

[0253] 소정 구현예에서, 본원에서 개시되는 세포는 CD19에 결합하는 세포외 항원-결합 도메인, CD8 폴리펩타이드를 포함하는 막통과 도메인(예로, 인간 CD8의 막통과 도메인 또는 이의 일부), 및 CD3ζ 폴리펩타이드를 포함하는 세포내 신호전달 도메인 및 4-1BB 폴리펩타이드를 포함하는 공동-자극 신호전달 영역(예로, 인간 4-1BB의 세포내 도메인 또는 이의 일부)을 포함하는 CAR을 포함한다.

[0254] 소정 구현예에서, CAR은 "19BBz"로 명명된다. 소정 구현예에서, CAR(예로, 19BBz)은 서열번호 19에 나타낸 아미

노산 서열을 포함하는 V_H CDR1, 서열번호 20에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR2, 서열번호 21에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR3, 서열번호 22에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 V_L CDR1, 서열번호 23에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 V_L CDR2, 서열번호 24에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 V_L CDR3을 포함하는 세포외 항원-결합 도메인; 서열번호 3 또는 서열번호 27의 아미노산 137 내지 207에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 CD8 폴리펩타이드를 포함하는 막통과 도메인; 서열번호 33에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 CD3 ζ 폴리펩타이드를 포함하는 세포내 신호전달 도메인, 및 서열번호 35의 아미노산 214 내지 255를 포함하는 4-1BB 폴리펩타이드를 포함하는 공동-자극 신호전달 영역을 포함한다.

[0255] 소정 구현예에서, CAR(예로, 19BBz)은 서열번호 39에 나타난 아미노산 서열과 적어도 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 약 100% 상동성이거나 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 이는 아래에 제공된다.

[0256] EVKLQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNVKQRPQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTIS SVVDFYFDYWGGQTTVTVSSGGGSGGGGSGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGS GTDFTLTITNVQSKDLADYFCQYNRYPYTSGGGTKLEIKRAAAPTTTPAPRPPTPTPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCG VLLLSLVITLYCNKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR [서열번호 39]

[0257] 서열번호 39의 아미노산 서열을 인코딩하는 예시적인 핵산 서열을 서열번호 40에 나타내며, 이는 아래에 제공된다.

[0258] GAGGTGAAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGTCTCAGTGAAGATTCTCTGCAAGGCTTCTGGCTATGCATTAGTACTGATGATG AACTGGGTGAAGCAGAGGCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTATCTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTCAAGCC AACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCGGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAAAGACCATTAGT TCGGTAGTAGATTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAAGGGACACGGTACCGTCTCCTCAGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGA TCTGACATTGAGCTCACCCAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATGTA GCCTGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCTAAACCCTGATTTACTCGGCAACCTACCGGAACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCT GGGACAGATTTACTCTCACCATCACTAACGTGCAGTCTAAAGACTTGGCAGACTATTTCTGTCAACAATATAACAGGTATCCGTACAGTCCGGAGGGGGG ACCAAGCTGGAGATCAACGGGCGGCCGACCCACACGACGCGCCGCGACCACCAACCCCGGCGCCACGATCGCGTCGAGCCCTGTCCCTGCGC CCAGAGGCGTGCCGCGCAGCGCGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTGGCCGGGACTTGTGGG GTCCTTCTCTGTCTAGTGTATCACCTTTACTGCAACAAACGGGCGAGAAAGAGCTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACT ACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAGGAGATGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTAC CAGCAGGGCCAGAACAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGAGCTGGCCGGGACCTGAGATGGGGGA AAGCCGAGAAGAAGAACCTCAGGAAGGCTGTACAATGAAGTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCG AGGGGCAAGGGGACGATGGCCTTACCAGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCTCGC [서열번호 40]

[0259] 소정 구현예에서, CAR(예로, 19BBz)은 CD8 신호 펩타이드를 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, CD8 신호 펩타이드는 서열번호 10에 나타난 아미노산 서열을 포함하거나 갖는다. 서열번호 10의 아미노산 서열을 인코딩하는 예시적인 핵산 서열을 서열번호 41에 나타내며, 이는 아래에 제공된다.

[0260] ATGGCTCTCCAGTGACTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCTGCATGCA [서열번호 41]

[0261] CD8 신호 펩타이드를 포함하는 19BBz에 대한 아미노산 서열을 서열번호 42에 나타내며, 이는 아래에 제공된다.

[0262] MALPVTALLLPLALLLHAEVKLQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNVKQRPQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLS GLTSEDSAVYFCARKTISVVDYFDYWGGQTTVTVSSGGGSGGGGSGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIY SATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFLTITNVQSKDLADYFCQYNRYPYTSGGGTKLEIKRAAAPTTTPAPRPPTPTPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG LDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR [서열번호 42]

[0263] 서열번호 42의 아미노산 서열을 인코딩하는 예시적인 핵산 서열을 서열번호 43에 나타내며, 이는 아래에 제공된다.

[0264] ATGGCTCTCCAGTGACTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCTGCATGCAGAGGTGAAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCTGGGTCC TCAGTGAAGATTCTCTGCAAGGCTTCTGGCTATGCATTAGTACTGAGTGAAGTGGGTGAAGCAGAGGCTGGACAGGCTTCTGAGTGGATTGGACAG

ATTTATCCTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTCAAGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGC
GGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTCTGTGCAAGAAAGACCATTAGTTTCGGTAGTAGATTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTC
ACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGACATTGAGCTCACCCAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTA
GGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACCACTGATTAC
TCGGCAACCTACCGGAACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACTAACGTGCAGTCTAAAGACTTG
GCAGACTATTCTGTCAACAATATAACAGGTATCCGTACACGTCGCGAGGGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGGGCGGCGCCACCCACCACGACGCCAGCG
CCGCGACCACCAACCCCGCGGCCACGATCGCGTCGCGAGCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTCCGCGCCAGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGG
CTGGACTTCGCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTGGCGGGGACTTGTGGGGTCTTCTCTCTGCTACTGGTTATCACCCTTTACTGCAACAAACGGGGC
AGAAAGAAGCTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCAGAAGAAGAAGAA
GGAGGATGTGAAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGA
GAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCTGTACAATGAAGTGCAG
AAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAAGTGGGATGAAAGCGAGCGCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACC
AAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCTCTGC [서열번호 43]

[0265] **5.4. 세포**

[0266] 본원에서 개시되는 주제는 (a) 리간드-인식 수용체(예로, 섹션 5.3에 개시되는 리간드-인식 수용체), 및 (b) IgG-분해 효소(예로, 섹션 5.2에 개시되는 IgG-분해 효소)를 포함하는 세포를 제공한다. 소정 구현예에서, 리간드-인식 수용체는 세포를 활성화할 수 있다. 세포는 세포가 리간드-인식 수용체 및 IgG-분해 효소를 공동-발현하도록 리간드-인식 수용체 및 IgG-분해 효소로 형질도입될 수 있다. 소정 구현예에서, IgG-분해 효소는 세포 표면에 부착된다. 소정 구현예에서, IgG-분해 효소는 세포 표면에 부착되지 않으며, 세포로 전달되거나 이로부터 방출된다.

[0267] 소정 구현예에서, 세포는 절단가능한(예로, 자가-절단가능한) 링커(예로, 2A 펩타이드, 예로, P2A 펩타이드, T2A 펩타이드, E2A 펩타이드, 및 F2A 펩타이드)를 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, 세포는 P2A 펩타이드를 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, P2A 펩타이드는 리간드-인식 수용체 및 IgG-분해 효소 사이에 배치된다. 소정 구현예에서, P2A 펩타이드는 서열번호 44에 나타난 아미노산 서열을 포함하거나 가지며, 이는 아래에 제공된다:

[0268] ATNFSLLKQAGDVEENPGP [서열번호 44]

[0269] 서열번호 44에 나타난 아미노산 서열을 인코딩하는 예시적 뉴클레오타이드 서열을 서열번호 45에 나타내며, 이는 아래에 제공된다.

[0270] GCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCT [서열번호 45]

[0271] 소정 구현예에서, 세포는 반응성 세포이다. 소정 구현예에서, 세포는 반응성 세포, 예로, 면역반응성 세포이다. 소정 구현예에서, 세포는 활성화 가능한 세포이다. 소정 구현예에서, 세포는 림프 계통의 세포이다. 소정 구현예에서, 세포는 골수 계통의 세포이다. 소정 구현예에서, 세포는 정상 조직 유래, 예로, 신장, 간, 폐, 골수, 또는 체장 유래 세포이다.

[0272] 림프 계통의 세포는 항체 생산, 세포성 면역계의 조절, 혈중 외래 체제의 검출, 숙주에 외래인 세포의 검출 등을 제공할 수 있다. 림프 계통의 세포의 비제한적 예에는 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, B 세포, 수지상 세포, 및 이로부터 림프 세포가 분화될 수 있는 줄기 세포가 포함된다. 줄기 세포는 다능성 줄기 세포(예로, 배아 줄기 세포, 및 유도된 다능성 줄기 세포)일 수 있다.

[0273] 소정 구현예에서, 세포는 T 세포이다. T 세포는 가슴샘에서 성숙하고 주로 세포-매개 면역성에 관여되는 림프구일 수 있다. T 세포는 차용 면역계에 관여된다. 본원에서 개시되는 주제의 T 세포는 비제한적으로 헬퍼 T 세포, 세포독성 T 세포, 기억 T 세포(중추 기억 T 세포, 줄기-세포-유사 기억 T 세포(또는 줄기-유사 기억 T 세포), 및 2가지 유형의 효과기 기억 T 세포: 예로 T_{EM} 세포 및 T_{EMRA} 세포, 조절 T 세포(억제인자 T 세포로도 알려져 있음), 종양-침윤 림프구(TIL), 자연 살해 T 세포(NK T 세포), 점막 연관 불변 T 세포, 및 $\gamma \delta$ T 세포가 포함되는 임의의 유형의 T 세포일 수 있다. 세포독성 T 세포(CTL 또는 킬러 T 세포)는 감염된 체세포 또는 종양 세포의 사멸을 유도할 수 있는 T 림프구의 하위세트이다. 환자의 고유한 T 세포는 항원-인식 수용체, 예로, CAR 또는 TCR의 도입을 통해 특정 항원을 표적화하도록 유전적으로 변형될 수 있다. T 세포는 CD4⁺ T 세포 또는 CD8⁺ T 세포일 수 있다. 소정 구현예에서, T 세포는 CD4⁺ T 세포이다. 소정 구현예에서, T 세포는 CD8⁺ T 세포이다.

- [0274] 소정 구현예에서, 세포는 NK 세포이다. 자연 살해(NK) 세포는 세포-매개 면역성의 일부이며 선천성 면역 반응 동안 작용하는 림프구일 수 있다. NK 세포는 표적 세포 상에서 이의 세포독성 효과를 수행하기 위해 사전 활성화화를 필요로 하지 않는다.
- [0275] 본원에서 개시되는 주제의 인간 림프구 유형에는 비제한적으로 말초 공여자 림프구, 예로 문헌[Sadelain, M., et al. 2003 *Nat Rev Cancer* 3:35-45 (CAR을 발현하도록 유전적으로 변형된 말초 공여자 림프구를 개시함), Morgan, R.A., et al. 2006 *Science* 314:126-129 (α 및 β 이중이량체를 포함하는 전장 종양 항원-인식 T 세포 수용체 복합체를 발현하도록 유전적으로 변형된 말초 공여자 림프구를 개시함), Panelli, M.C., et al. 2000 *J Immunol* 164:495-504; Panelli, M.C., et al. 2000 *J Immunol* 164:4382-4392 (종양 생검에서 종양 침윤 림프구(TIL)로부터 유래되는 림프구 배양을 개시함), 및 Dupont, J., et al. 2005 *Cancer Res* 65:5417-5427; Papanicolaou, G.A., et al. 2003 *Blood* 102:2498-2505 (인공 항원-제시 세포(AAPC) 또는 펄스화된 수지상 세포를 채택하는 선택적으로 시험관내-증식된 항원-특이적 말초혈 백혈구를 개시함)]에 개시된 것들이 포함된다.
- [0276] 세포(예로, T 세포)는 자가, 비-자가(예로, 동종이형)이거나, 조작된 선조체 또는 줄기 세포로부터 시험관내 유도될 수 있다. 소정 구현예에서, 세포는 동종이형 세포이다.
- [0277] 소정 구현예에서, 세포는 골수 계통의 세포이다. 골수 계통의 세포의 비제한적 예에는 단핵구, 대식구, 호중구, 호염기구, 호산구, 적혈구, 거핵구, 및 이로부터 골수 세포가 분화될 수 있는 줄기 세포가 포함된다.
- [0278] 소정 구현예에서, 본원에서 개시되는 세포는 치료법에서 사용된다. 소정 구현예에서, 본원에서 개시되는 세포는 세포 치료법에서 사용된다. 소정 구현예에서, 본원에서 개시되는 세포는 유전자 치료법에서 사용된다. 소정 구현예에서, 본원에서 개시되는 세포는 CRISPR 유전자 치료법에서 사용된다. 세포 조작 분야는, 특히 CRISPR-Cas9 기술의 사용이 세계적으로 확산됨에 따라 증가 중이며, 다중 외래 단백질의 세포내 도입으로, 세포의 면역원성이 중요한 고려사항이 된다. 면역원성 세포는 환자로부터 빠르게 제거되어, 이의 효과를 감소시킬 것이다 (Porter et al., *Science Translational Medicine* (2015);7; Maude et al., *N Engl J Med.* (2014);371:1507-1517; Louis et al., *Blood* (2011);118:6050-6056). 유전자 치료법에는 바이러스 유전자 또는 다른 외래 헬퍼 유전자가 종종 수반되는 세포 내로 외래 유전자를 삽입하는 단계가 관여된다. 바이러스 단백질, 예컨대 혈우병 치료 및 다른 유전 장애에서 사용되는 AAV 바이러스로부터의 단백질은 수 개월 또는 수 년 동안 환자에서 지속되고 면역 반응의 표적으로 작용할 수 있다.
- [0279] 본원에서 개시되는 세포는 외래 세포의 면역원성을 경감시킬 수 있다.
- [0280] 소정 구현예에서, 본원에서 개시되는 세포는 면역치료법에서 사용된다. 소정 구현예에서, 본원에서 개시되는 세포는 차용 세포 전달(ACT)에서 사용된다. 빠르게 출현 중인 맞춤형 유형의 면역치료법은 차용 세포 전달(ACT)이며, 여기서 환자의 면역 세포는 이의 암을 치료하기 위한 도구로 사용된다(Kalos et al., *Immunity* (2013);39:49-60). T-세포는 종양 세포를 인식하도록 유전적으로 조작되고, 시험관내 증식된 후, 환자 내로 다시 전달될 수 있다. 키메라 항원 수용체(CAR) T-세포, T-세포 수용체(TCR)-조작 T-세포, 및 종양 침윤 림프구(TIL)가 포함되는 몇몇 유형의 ACT가 존재한다(Rosenberg et al., *Nature Reviews Cancer* (2008);8:299-308). ACT에서, T-세포는 종양 세포를 인식하도록 유전적으로 조작되고, 시험관내 증식된 후, 환자 내로 다시 전달된다.
- [0281] CAR T-세포 치료법은 2017년에 2개의 FDA 승인된 치료법과 함께 임상 환경에서 진보를 이뤄냈다(Zheng et al., *Drug Discovery Today* (2018);23:1175-1182). 당분야에서 계속된 시도는 종양의 통행 및 인식을 개선하고, 이의 증식 및 지속성을 증가시키고, 이의 활성 대비 본 발명자들의 제어를 향상시키기 위해 CAR T-세포 치료법의 현재 한계를 다루고 있다(Lim et al., *Cell* (2017);168:724-740). 표적을 벗어난 효과가 감소되고 독성이 줄었을 뿐만 아니라 전반적 유효성이 개선된 개선된, ACT에 대한 필요성이 존재한다. 환자에서의 체액성 반응이 이를 수여받는 환자에서 CAR T-세포에 대해 관찰되었다. 이러한 항체는 CAR 작제물 단백질에 대해서 뿐만 아니라 형질도입을 위해 사용되는 레트로바이러스 벡터로부터의 프로바이러스 단백질에 대해서 유도되었다(Kershaw et al., *Clinical Cancer Research* (2006);12:6106-6115; Lamers et al., *Blood* (2011);117:72-82; Jensen et al., *Biology of Blood and Marrow Transplantation* (2010);16:1245-1256.7-9). 박테리아 단백질이 CRISPR 기술의 사용을 통한 CAR T-세포 조작을 위해 사용됨에 따라, 그리고 중요하게는 동종이형 CAR T-세포의 사용이 보다 널리 확산됨에 따라 면역원성은 더욱 큰 문제가 될 수 있다(Jung et al., *Molecules and Cells* (2018);41:717-723; Graham et al., *Cells* (2018);7:155).
- [0282] 본원에서 개시되는 세포는 CAR T-세포의 항원성 맥락에서 ACT 유효성을 개선하고/하거나 독성을 감소시킬 수 있

다.

- [0283] 본원에서 개시되는 세포는 체액성 반응에 대해 증가된 내성을 가지며, 이는 CAR T-세포의 연장된 말초 지속성을 허용함으로써 보다 강력한 활성화(예로, 항-종양 활성화)를 야기한다. 세포의 연장된 지속성은 또한 세포 치료법(예로, 보통 매우 높은 비용과 연관되는, ACT)의 비용 효과를 개선할 수 있다.
- [0284] CAR-T 세포에 대한 항체 결합은 항체-의존적 세포-매개 세포독성(ADCC) 또는 보체-의존적 세포독성(CDC)에 의한 CAR T-세포의 용해를 야기함으로써 감소된 치료 효과를 산출할 수 있다. 항-개별특이형 항체는 CAR T-세포 기능을 중화하는 것으로 나타났다(Lamers et al., Blood (2011);117:72-82). CAR T-세포의 제한된 말초 지속성은 또한 세포성 반응에 기인하였으며, 여기서 CAR T-세포는 내인성 T 세포에 의해 표적화된다(Lamers et al., Blood (2011);117:72-82; Jensen et al., Biology of Blood and Marrow Transplantation (2010);16:1245-1256). 카본산 안하이드라제 IX(CAIX)-표적화 CAR T-세포 모델에서 관찰되는 항-CAR 면역성에 관여되는 에피토프가 확인되었으며, 여기에는 CAR의 상보성-결정 영역 및 프레임워크 영역으로부터 유래되는 펩타이드 서열, 및 또한 SFG 레트로바이러스 벡터로부터 유래되는 프로바이러스 서열이 포함되었다(Lamers et al., Blood (2011);117:72-82). 상기 문제를 다루기 위해 취해진 하나의 접근은 이들을 비-면역원성으로 만들기 위한 인간화 CAR이다(Gonzales et al., Tumor Biology (2005);26:31-43). 그러나, 이는 바이러스 벡터-특이적 면역 반응도 동종이형 세포도 다루지 않을 것이다. 본원에서 개시되는 세포는 외래 세포성 치료법, 예컨대 CAR T-세포 치료법에 대한 체액성 반응을 극복할 수 있고, 항-세포 항체에 의한 세포성 활성화의 중화를 방지할 수 있다.
- [0285] 문헌에 항-CAR 항체의 형성에 대한 선례가 존재하지만, 이들 치료법의 성공에 대해서는 상당한 장애가 존재한다(Kershaw et al., Clinical Cancer Research (2006);12:6106-6115; Lamers et al., Blood (2011);117:72-82; Jensen et al., Biology of Blood and Marrow Transplantation (2010);16:1245-1256; Jung et al., Molecules and Cells (2018);41:717-723; Graham et al., Cells (2018);7:155).
- [0286] 본원에서는 숙주 체액성 반응(예로, 잠재적 항체)에 대한 생체분자 차폐로서 작용하는, IgG-분해 효소(예로, IdeS)를 포함하는 세포를 개시한다. 세포에서 IgG-분해 효소의 발현은 하기: a) 중화 항-CAR 항체로부터의 보호, b) 세포(예로, 조작된 CAR T-세포)의 연장된 지속성, 및 c) 연장된 치료 활성 윈도우를 산출함으로써, 전반적으로 더 높은 유효성을 산출한다. CAR-T 세포 분야에서의 다른 접근은, 예를 들어 HLA I 및 TCR을 결실시킴으로써, CAR T-세포에 대한 세포성 면역 반응에 집중한다(Zhao et al., Journal of Hematology and Oncology (2018);11:1-9). 그러나, 본 발명자의 지식에 따르면, 본 발명은 직접 항체-유래 숙주 면역 반응을 다루는 것을 목표로 하는 첫 번째 작업이다.
- [0287] **5.5. 조성물 및 벡터**
- [0288] 본원에서 개시되는 주제는 본원에서 개시되는 IgG-분해 효소(예로, 섹션 5.2에서 개시됨) 및 본원에서 개시되는 리간드-인식 수용체(예로, 섹션 5.3에서 개시됨)를 포함하는 조성물을 제공한다. 또한 이러한 조성물을 포함하는 세포가 제공된다.
- [0289] 소정 구현예에서, IgG-분해 효소는 제1 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 소정 구현예에서, 리간드-인식 수용체는 제2 프로모터에 작동가능하게 연결된다.
- [0290] 소정 구현예에서, 조성물은 절단가능한(예로, 자가-절단가능한) 링커(예로, 2A 펩타이드, 예로, P2A 펩타이드, T2A 펩타이드, E2A 펩타이드, 및 F2A 펩타이드)를 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, 조성물은 P2A 펩타이드를 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, P2A 펩타이드는 리간드-인식 수용체 및 IgG-분해 효소 사이에 배치된다. 소정 구현예에서, P2A 펩타이드는 서열번호 43에 나타난 아미노산 서열을 포함하거나 갖는다.
- [0291] 또한, 본원에서 개시되는 주제는 본원에서 개시되는 IgG-분해 효소(예로, 섹션 5.2에서 개시됨)를 인코딩하는 제1 폴리뉴클레오타이드 및 본원에서 개시되는 리간드-인식 수용체(예로, 섹션 5.3에서 개시됨)를 인코딩하는 제2 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 핵산 조성물을 제공한다. 또한, 이러한 핵산 조성물을 포함하는 세포가 제공된다.
- [0292] 소정 구현예에서, 핵산 조성물은 IgG-분해 효소에 작동가능하게 연결된 제1 프로모터를 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, 핵산 조성물은 리간드-인식 수용체에 작동가능하게 연결된 제2 프로모터를 추가로 포함한다.
- [0293] 소정 구현예에서, 제1 및 제2 프로모터 중 하나 또는 둘 다는 내인성 또는 외인성이다. 소정 구현예에서, 외인성 프로모터는 연장 인자(EF)-1 프로모터, CMV 프로모터, SV40 프로모터, PGK 프로모터, 및 메탈로티오나인 프로모터로부터 선택된다.

- [0294] 소정 구현예에서, 핵산 조성물은 절단가능한(예로, 자가-절단가능한) 링커(예로, 2A 펩타이드, 예로, P2A 펩타이드, T2A 펩타이드, E2A 펩타이드, 및 F2A 펩타이드)를 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, 핵산 조성물은 P2A 펩타이드를 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, P2A 펩타이드는 리간드-인식 수용체 및 IgG-분해 효소 사이에 배치된다. 소정 구현예에서, P2A 펩타이드는 서열번호 45에 나타난 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 갖는다. 조성물 및 핵산 조성물은 당분야에 알려진 방법에 의해 또는 본원에서 기재된 바와 같이 대상체에 투여되고/되거나 전달될 수 있다.
- [0295] 세포(예로, 면역반응성 세포, 예로, T 세포 또는 NK 세포)의 유전적 변형은 재조합 DNA 작제물로 실질적으로 동종성 세포 조성물을 형질도입하여 달성될 수 있다. 소정 구현예에서, 레트로바이러스 벡터(감마-레트로바이러스 또는 렌티바이러스)는 세포 내로의 핵산 조성물의 도입을 위해 채택된다. 예를 들어, IgG-분해 효소를 인코딩하는 제1 폴리뉴클레오타이드 및 리간드-인식 수용체를 인코딩하는 제2 폴리뉴클레오타이드는 레트로바이러스 벡터 내로 클로닝될 수 있고 그 내인성 프로모터로부터, 레트로바이러스 장형 말단 반복으로부터, 또는 관심 표적 세포 유형에 특이적인 프로모터로부터 발현이 유도될 수 있다. 비-바이러스 벡터가 또한 사용될 수 있다.
- [0296] 리간드-인식 수용체(예로, CAR 또는 TCR)를 포함하는 세포의 최초 유전적 변형을 위해, 레트로바이러스 벡터가 일반적으로 형질도입을 위해 채택되지만, 임의의 다른 적합한 바이러스 벡터 또는 비-바이러스 전달 시스템이 사용될 수 있다. 리간드-인식 수용체 및 IgG-분해 효소는 단일, 다중시스트론 발현 카세트로, 단일 벡터의 다중 발현 카세트로, 또는 다중 벡터로 작제될 수 있다. 폴리시스트론 발현 카세트를 생성하는 요소의 예에는 비제한적으로 다양한 바이러스 및 비-바이러스 내부 리보솜 진입 부위(IRES, 예로, FGF-1 IRES, FGF-2 IRES, VEGF IRES, IGF-II IRES, NF- κ B IRES, RUNX1 IRES, p53 IRES, A형 간염 IRES, C형 간염 IRES, 페스티바이러스 IRES, 아프토바이러스 IRES, 피코나바이러스 IRES, 폴리오바이러스 IRES 및 뇌심근염 바이러스 IRES) 및 절단가능한 링커(예로, 2A 펩타이드, 예로, P2A, T2A, E2A 및 F2A 펩타이드)가 포함된다. 레트로바이러스 벡터 및 적절한 패키징 라인의 조합도 적합하며, 여기서 캡시드 단백질은 인간 세포를 감염시키기 위해 기능적일 것이다. 비제한적으로 PA12(Miller, *et al.* (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:431-437); PA317(Miller, *et al.* (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:2895-2902); 및 CRIP(Danos, *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6460-6464)이 포함되는, 다양한 양생 바이러스-생산 세포주가 알려져 있다. 비-양생 입자, 예로 VSVG, RD114 또는 GALV 외피로 위 유형화된 입자 및 당분야에 알려진 임의의 다른 것들이 또한 적합하다.
- [0297] 가능한 형질도입 방법에는 또한, 예로 문헌[Bregni, *et al.* (1992) *Blood* 80:1418-1422]의 방법에 의한, 세포와 생산체 세포의 직접 공동-배양, 또는 예로, 문헌[Xu, *et al.* (1994) *Exp. Hemat.* 22:223-230; 및 Hughes, *et al.* (1992) *J. Clin. Invest.* 89:1817]의 방법에 의한, 바이러스 상청액 단독 또는 적절한 성장 인자 및 다중양이온을 포함하거나 포함하지 않는 농축된 벡터 스톱과의 배양이 포함된다.
- [0298] 다른 형질도입 바이러스 벡터가 세포를 변형하기 위해 사용될 수 있다. 소정 구현예에서, 선택된 벡터는 높은 감염 효율 및 안정한 통합과 발현을 나타낸다(예로, Cayouette *et al.*, *Human Gene Therapy* 8:423-430, 1997; Kido *et al.*, *Current Eye Research* 15:833-844, 1996; Bloomer *et al.*, *Journal of Virology* 71:6641-6649, 1997; Naldini *et al.*, *Science* 272:263-267, 1996; 및 Miyoshi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:10319, 1997 참고). 사용될 수 있는 다른 바이러스 벡터에는, 예를 들어, 아데노바이러스, 렌티바이러스, 및 아데나-연관 바이러스 벡터, 백시니아 바이러스, 소 유두종 바이러스, 또는 헤르페스 바이러스, 에컨대 엡스타인-바 바이러스가 포함된다(또한, 예를 들어, 문헌[Miller, *Human Gene Therapy* 15-14, 1990; Friedman, *Science* 244:1275-1281, 1989; Eglitis *et al.*, *BioTechniques* 6:608-614, 1988; Tolstoshev *et al.*, *Current Opinion in Biotechnology* 1:55-61, 1990; Sharp, *The Lancet* 337:1277-1278, 1991; Cornetta *et al.*, *Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 36:311-322, 1987; Anderson, *Science* 226:401-409, 1984; Moen, *Blood Cells* 17:407-416, 1991; Miller *et al.*, *Biotechnology* 7:980-990, 1989; LeGal La Salle *et al.*, *Science* 259:988-990, 1993; 및 Johnson, *Chest* 107:77S-83S, 1995]의 벡터 참고). 레트로바이러스 벡터는 특히 잘 개발되어 있으며 임상 상황에서 사용되었다(Rosenberg *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 323:370, 1990; Anderson *et al.*, U.S. 특허 번호 5,399,346).
- [0299] 비-바이러스 접근이 또한 세포의 유전적 변형을 위해 채택될 수 있다. 예를 들어, 핵산 분자는 리포펙션(Feigner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:7413, 1987; Ono *et al.*, *Neuroscience Letters* 17:259, 1990; Brigham *et al.*, *Am. J. Med. Sci.* 298:278, 1989; Staubinger *et al.*, *Methods in Enzymology* 101:512, 1983), 비시알로오소스뮤코이드-폴리스티렌 콘주게이션(Wu *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* 263:14621, 1988; Wu *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* 264:16985, 1989)의 존재 하에, 또는 수술 조건 하의 마이크로-주사에 의해(Wolff *et al.*, *Science* 247:1465, 1990) 핵산을 투여함으로써 세포 내로 도입

될 수 있다. 유전자 전달을 위한 다른 비-바이러스 수단에는 칼슘 포스페이트, DEAE 텍스트란, 전기천공, 및 원형질체 융합을 사용하는 시험관내 전달감염이 포함된다. 리포솜은 또한 세포 내로의 DNA 전달을 위해 잠재적으로 유익할 수 있다. 대상체의 이환 조직 내로의 정상 유전자의 이식이 또한 세포(또는 그 후손)이 표적화된 조직 내로 주사되거나 전신 주사된 후, 정상 핵산을 생체의 배양 가능한 세포 유형(예로, 자가 또는 이종성 일차 세포 또는 이의 자손) 내로 전달함으로써 달성될 수 있다. 제조합 수용체는 또한 전위효소 또는 표적화된 뉴클레아제(예로 아연 핑거 뉴클레아제, 메가뉴클레아제, 또는 TALE 뉴클레아제, CRISPR)를 사용하여 유도되거나 수득될 수 있다. RNA 전기천공에 의해 일시적 발현이 수득될 수 있다.

[0300] 임의의 표적화된 게놈 편집 방법이 또한 세포 또는 대상체에 본원에서 개시되는 IgG-분해 효소 및/또는 리간드-인식 수용체를 전달하기 위해 사용될 수 있다. 소정 구현예에서, CRISPR 시스템이 본원에서 개시되는 IgG-분해 효소 및/또는 리간드-인식 수용체를 전달하기 위해 사용된다. 소정 구현예에서, 아연-핑거 뉴클레아제가 본원에서 개시되는 IgG-분해 효소 및/또는 리간드-인식 수용체를 전달하기 위해 사용된다. 소정 구현예에서, TALEN 시스템이 본원에서 개시되는 IgG-분해 효소 및/또는 리간드-인식 수용체를 전달하기 위해 사용된다.

[0301] 클러스터링된 정규-산재 단형 앞뒤상동 반복(CRISPR) 시스템은 원핵 세포에서 발견된 게놈 편집 도구이다. 게놈 편집을 위해 이용되는 경우, 시스템에는 Cas9(그 가이드로 crRNA를 이용하여 DNA를 변형할 수 있는 단백질), CRISPR RNA(crRNA, Cas9와 활성 복합체를 형성하는 tracrRNA(일반적으로 헤어핀 루프 형태)에 결합하는 영역을 따라 숙주 DNA의 정확한 섹션으로 이를 가이드하기 위해 Cas9에 의해 사용되는 RNA를 함유함), 트랜스-활성화 crRNA(tracrRNA, crRNA에 결합하고 Cas9와 활성 복합체를 형성함), 및 DNA 보수 주형의 선택적 섹션(특정 DNA 서열의 삽입을 허용하는 세포성 보수 공정을 가이드하는 DNA)이 포함된다. CRISPR/Cas9는 종종 표적 세포를 전달감염시키기 위해 플라스미드를 채택한다. crRNA는 이것이 세포에서 표적 DNA를 확인하고 이에 직접 결합하기 위해 Cas9가 사용하는 서열이므로 각각의 적용을 위해 설계될 필요가 있다. CAR 발현 카세트를 운반하는 보수 주형도 이것이 절단쪽 상의 서열과 중첩하고 삽입 서열을 코딩해야 하므로, 각각의 적용에 대해 설계되어야 한다. 다중 crRNA 및 tracrRNA가 함께 패키징되어 단일-가이드 RNA(sgRNA)를 형성할 수 있다. 상기 sgRNA는 세포 내로 전달감염되기 위해 Cas9 유전자와 함께 연결되어 플라스미드로 제조될 수 있다.

[0302] 아연-핑거 뉴클레아제(ZFN)는 인공 제한 효소이며, 이는 아연 핑거 DNA-결합 도메인을 DNA-절단 도메인과 조합함으로써 생성된다. 아연 핑거 도메인은 아연-핑거 뉴클레아제가 게놈 내의 요망되는 서열을 표적화하는 것을 허용하는 특정 DNA 서열을 표적화하도록 조작될 수 있다. 개별 ZFN의 DNA-결합 도메인은 전형적으로 복수의 개별 아연 핑거 반복부를 함유하며 각각 복수의 염기쌍을 인식할 수 있다. 새로운 아연-핑거 도메인을 생성하는 가장 일반적인 방법은 알려진 특이성을 갖는 더 작은 아연-핑거 "모듈"을 조합하는 것이다. ZFN에서 가장 일반적인 절단 도메인은 유형 II 제한 엔도뉴클레아제 FokI로부터의 비-특이적 절단 도메인이다. 내인성 상동 재조합(HR) 기구 및 CAR 발현 카세트를 운반하는 상동성 DNA 주형을 사용하여, ZFN은 CAR 발현 카세트를 게놈 내로 삽입하기 위해 사용될 수 있다. 표적화된 서열이 ZFN에 의해 절단되는 경우, HR 기구는 손상된 염색체 및 상동성 DNA 주형 간 상동성에 대해 검색한 후, 염색체의 2개의 절단된 말단 사이 주형 서열을 복사하고, 이에 의해 상동성 DNA 주형이 게놈 내로 통합된다.

[0303] 전사 활성화제-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN)는 특정 DNA 서열을 절단하도록 조작될 수 있는 제한 효소이다. TALEN 시스템은 ZFN과 거의 동일한 원리로 작동한다. 이들은 전사 활성화제-유사 효과기 DNA-결합 도메인을 DNA 절단 도메인과 조합함으로써 생성된다. 전사 활성화제-유사 효과기(TALE)는 특정 뉴클레오타이드에 대해 강력한 인식을 갖는 2개의 가변 위치를 갖는 33개~34개 아미노산 반복 모티프로 이루어진다. 이들 TALE의 어레이를 조합함으로써, TALE DNA-결합 도메인은 요망되는 DNA 서열에 결합하도록 조작됨으로써, 뉴클레아제가 게놈 내 특정 자리를 절단하도록 가이드할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드 치료법 방법에서 사용하기 위한 cDNA 발현은 임의의 적합한 프로모터(예로, 인간 사이토메갈로바이러스(CMV), 시미안 바이러스 40(SV40), 또는 메탈로티오나인 프로모터)로부터 유도되고, 임의의 적절한 포유류 조절 요소 또는 인트론(예로 연장 인자 1a 인핸서/프로모터/인트론 구조)에 의해 조절될 수 있다. 예를 들어, 요망되는 경우, 특정 세포 유형에서 유전자 발현을 우선적으로 유도하는 것으로 알려진 인핸서가 핵산의 발현을 유도하기 위해 사용될 수 있다. 사용되는 인핸서에는 비제한적으로 조직- 또는 세포-특이적 인핸서로 특징지워지는 것들이 포함될 수 있다. 대안적으로, 게놈 클론이 치료 작제물로 사용되는 경우, 조절은 인지체 조절 서열에 의해 또는 요망되는 경우, 상술된 임의의 프로모터 또는 조절 요소가 포함되는 이종성 원천으로부터 유래되는 조절 서열에 의해 매개될 수 있다.

[0304] 생성 세포는 미변형 세포에 대한 것들과 유사한 조건 하에 성장시킬 수 있고, 이에 의해 변형된 세포는 다양한 목적을 위해 증식되고 사용될 수 있다.

- [0305] 게놈 편집 제제/시스템을 전달하는 방법은 필요에 따라 변할 수 있다. 소정 구현예에서, 선택된 게놈 편집 방법의 성분은 하나 이상의 플라스미드에서 핵산 조성물(예로, DNA 작제물)로 전달된다. 소정 구현예에서, 성분은 바이러스 벡터를 통해 전달된다. 일반적인 전달 방법에는 비제한적으로 전기천공, 마이크로주사, 유전자 총, 임펠렉션(impalefection), 정수압, 연속 주입, 초음파분쇄, 자기감염, 아데노-연관 바이러스, 바이러스 벡터의 외피 단백질 위유형화, 복제-적격 벡터 시스템 및 트랜스-작용 요소, 단순 헤르페스 바이러스, 화학적 비히클(예로, 올리고뉴클레오타이드, 리포플렉스, 폴리머솜, 폴리플렉스, 덴드리머, 무기 나노입자, 및 세포-침투 펩타이드)이 포함된다.
- [0306] 본원에서 개시되는 조성물 또는 핵산 조성물은 게놈 내 임의의 위치에 배치될 수 있다. 소정 구현예에서, 조성물 또는 핵산 조성물은 T 세포의 게놈 내 부위에 배치된다.
- [0307] **5.6. 폴리펩타이드 및 유사체**
- [0308] 요망되는 목적을 위한, 예로, 세포에서 발현되는 경우 이의 항-신생물 및/또는 항-종양 활성의 향상을 위한 방식으로 변형되는 본원에서 개시되는 폴리펩타이드(예로, CD19, 4-1BB, CD28, CD3 ξ , 및 IgG-분해 효소 또는 이의 단편)가 또한 본원에서 개시되는 주제에 포함된다. 본원에서 개시되는 주제는 서열 내 변경, 및 변형된 아미노산 서열 및 핵산 서열을 생성함으로써 아미노산 서열 또는 핵산 서열을 최적화하는 방법을 제공한다. 이러한 변경에는 소정 돌연변이, 결실, 삽입, 또는 번역-후 변경이 포함될 수 있다. 본원에서 개시되는 주제에는 본원에서 개시되는 임의의 자연-발생 폴리펩타이드의 유사체가 추가로 포함된다. 유사체는 아미노산 서열 차이에 의해, 번역-후 변형에 의해, 또는 둘 다에 의해 본원에서 개시되는 자연-발생 폴리펩타이드와 상이할 수 있다. 유사체는 본원에서 개시되는 주제의 자연-발생 아미노산 서열의 전부 또는 일부와 적어도 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 이상의 상동성을 나타낼 수 있다. 서열 비교 길이는 적어도 5개, 10개, 15개 또는 20개 아미노산 잔기, 예로, 적어도 25개, 50개, 또는 75개 아미노산 잔기, 또는 100개 초과인 아미노산 잔기이다. 또한, 동일성 정도를 결정하는 예시적 접근에서, BLAST 프로그램이 사용될 수 있고, 확률 스코어 e^{-3} 내지 e^{-100} 은 밀접하게 관련된 서열을 시사한다. 변형에는 폴리펩타이드의 생체내 및 시험관내 화학적 유도체화, 예로, 아세틸화, 카복실화, 인산화, 또는 글리코실화가 포함된다; 이러한 변형은 폴리펩타이드 합성 또는 가공 동안 또는 단리된 변형 효소로의 처리 후에 일어날 수 있다. 유사체는 또한 일차 서열에서의 변경에 의해 자연-발생 폴리펩타이드와 상이할 수 있다. 이들에는 자연적인 및 유도된 것들(예를 들어, 조사 또는 에탄메틸설페이트로의 노출에 의해 무작위 돌연변이화로부터 또는 문헌[Sambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed.), CSH Press, 1989, 또는 Ausubel et al., 상기]에 기재된 바와 같은 부위-특이적 돌연변이화에 의해 생성됨) 모두의, 유전적 변이체가 포함된다. 또한 L-아미노산 이외의 잔기, 예로, D-아미노산 또는 비-자연 발생 또는 합성 아미노산, 예로, β 또는 γ 아미노산을 함유하는 고리화된 펩타이드, 분자, 및 유사체가 포함된다.
- [0309] 전장 폴리펩타이드에 부가하여, 본원에서 개시되는 주제는 또한 본원에서 개시되는 임의의 하나의 폴리펩타이드의 단편을 제공한다. 본원에서 사용되는 용어 "단편"은 적어도 5개, 10개, 13개, 또는 15개 아미노산을 의미한다. 소정 구현예에서, 단편은 적어도 20개의 연속 아미노산, 적어도 30개의 연속 아미노산, 또는 적어도 50개의 연속 아미노산을 포함한다. 소정 구현예에서, 단편은 적어도 60개 내지 80개, 100개, 200개, 300개 이상의 연속 아미노산을 포함한다. 단편은 통상의 기술자에게 알려진 방법에 의해 생성될 수 있거나 정상적인 단백질 가공으로부터 생성될 수 있다(예로, 생물학적 활성을 위해 요구되지 않는 신생 폴리펩타이드로부터의 아미노산 제거 또는 대안적 mRNA 스플라이싱 또는 대안적 단백질 가공 사건에 의한 아미노산의 제거).
- [0310] 비-단백질 유사체는 본원에서 개시되는 단백질(예로, IgG-분해 효소)의 기능적 활성을 모사하도록 설계된 화학적 구조를 갖는다. 이러한 유사체는 원래 폴리펩타이드의 생리적 활성을 초과할 수 있다. 유사체 설계 방법은 당분야에 잘 알려져 있고, 유사체의 합성은 생성 유사체가 세포에서 발현되는 경우 원래 폴리펩타이드의 항-신생물 활성을 증가시키도록 화학적 구조를 변형함으로써 이러한 방법에 따라 수행될 수 있다. 이들 화학적 변형에는 비제한적으로 대안적 R 기의 치환 및 참조 폴리펩타이드의 특정 탄소 원자에서의 포화도 변화가 포함된다. 소정 구현예에서, 단백질 유사체는 생체내 분해에 대해 상대적으로 내성이 있어서, 투여 시 보다 연장된 치료 효과를 초래한다. 기능적 활성을 측정하기 위한 검정에는 비제한적으로 아래의 실시예에 기재된 것들이 포함된다.
- [0311] **5.7. 투여**
- [0312] 본원에서 개시되는 세포를 포함하는 조성물은 항원에 대한 면역 반응을 유도하고/하거나 향상시키고 및/또는 신

생물, 병원체 감염, 또는 감염성 질환을 치료하고/하거나 방지하기 위해 대상체에 전신으로 또는 직접 제공될 수 있다. 소정 구현예에서, 본원에서 개시되는 세포, 조성물, 또는 핵산 조성물은 관심 기관(예로, 신생물에 의해 영향받은 기관) 내로 직접 주사된다. 대안적으로, 본원에서 개시되는 세포, 조성물, 또는 핵산 조성물은, 예를 들어, 순환계(예로, 중앙 혈관계) 내로의 투여에 의해, 관심 기관으로 간접적으로 제공된다. 증식 및 분화 제제는 시험관내 또는 생체내 세포(예로, T 세포(예로, CTL 세포) 또는 NK 세포의 생산을 증가시키기 위해 세포, 조성물, 또는 핵산 조성물의 투여 전에, 동안 또는 후에 제공될 수 있다.

[0313] 본원에서 개시되는 세포, 조성물, 또는 핵산 조성물은 비제한적으로 정맥내, 피하, 결절내, 종양내, 경막내, 흉강내, 복강내, 및 피부가 포함되는 임의의 적합한 경로로 투여될 수 있다. 소정 구현예에서, 본원에서 개시되는 세포, 조성물, 또는 핵산 조성물은 대상체에 복강내 투여된다. 보통, 적어도 약 1×10^5 개 세포가 투여되어, 궁극적으로 약 1×10^{10} 개 이상에 도달할 것이다. 본원에서 개시되는 세포는 순수하지 않은 또는 정제된 세포 집단에 포함될 수 있다. 통상의 기술자는 다양한 잘 알려진 방법, 예컨대 형광 활성화 세포 정렬(FACS)을 사용하여 집단 내에서 본원에서 개시되는 세포의 백분율을 용이하게 결정할 수 있다. 본원에서 개시되는 세포를 포함하는 집단에서 적합한 순도 범위는 약 50% 내지 약 55%, 약 5% 내지 약 60%, 및 약 65% 내지 약 70%이다. 소정 구현예에서, 순도는 약 70% 내지 약 75%, 약 75% 내지 약 80%, 또는 약 80% 내지 약 85%이다. 소정 구현예에서, 순도는 약 85% 내지 약 90%, 약 90% 내지 약 95%, 및 약 95% 내지 약 100%이다. 투여량은 통상의 기술자에 의해 용이하게 조정될 수 있다(예로, 순도 감소는 투여량 증가를 필요로 할 수 있음). 세포는 주사, 카테터 등에 의해 도입될 수 있다. 세포는 다양한 계통의 10^9 개 또는 최대 10^{11} 개 세포가 포함되는 기관 또는 조직에 포함될 수 있다.

[0314] 본원에서 개시되는 조성물은 본원에서 개시되는 세포 또는 이의 선조체 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물일 수 있다. 투여는 자가 또는 이종성일 수 있다. 예를 들어, 세포, 또는 선조체는 하나의 대상체로부터 획득되고, 동일한 대상체 또는 상이한, 적합성 대상체에 투여될 수 있다. 말초혈 유래된 세포 또는 이의 자손(예로, 생체내, 생체외 또는 시험관내 유래됨)은 카테터 투여, 전신 주사, 편재된 주사, 정맥내 주사, 또는 비경구 투여가 포함되는 편재된 주사를 통해 투여될 수 있다. 본원에서 개시되는 주제의 치료 조성물(예로, 본원에서 개시되는 면역반응성 세포를 포함하는 약학적 조성물)을 투여하는 경우, 이는 단위 투여량 주사형(용액, 현탁액, 에멀전)으로 제형화될 수 있다.

[0315] 5.8. 제형물

[0316] 본원에서 개시되는 세포를 포함하는 조성물은 멸균 액체 조제물, 예로, 등장성 수용액, 현탁액, 에멀전, 분산액, 또는 점성 조성물로서 편리하게 제공될 수 있으며, 이는 선택된 pH로 완충될 수 있다. 액체 조제물은 보통 겔, 다른 점성 조성물, 및 고체 조성물보다 제조하기 더 용이하다. 부가적으로, 액체 조성물은 특히 주사에 의해, 다소 투여하기 더 편리하다. 반면, 점성 조성물은 특정 조직과 더 긴 접촉 기간을 제공하기 위해 적절한 점도 범위 내에서 제형화될 수 있다. 액체 또는 점성 조성물은 담체를 포함할 수 있으며, 이는, 예를 들어, 물, 식염수, 인산염 완충 식염수, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다.

[0317] 몇군 주사용 용액은 요망되는 바에 따라, 다양한 양의 다른 성분과 함께 요구되는 양의 적절한 용매 중 유전적으로 변형된 면역반응성 세포를 포함시켜 제조될 수 있다. 이러한 조성물은 적합한 담체, 희석제, 또는 부형제, 예컨대 멸균수, 생리 식염수, 글루코스, 텍스트로스 등과의 혼합물일 수 있다. 조성물은 또한 동결건조될 수 있다. 조성물은 요망되는 투여 및 제조 경로에 따라, 보조 성분, 예컨대 수화제, 분산제, 또는 유화제(예로, 메틸셀룰로스), pH 완충제, 겔화제 또는 점도 향상 첨가제, 보존제, 풍미제, 착색제 등을 함유할 수 있다. 표준 텍스트, 예컨대 본원에 참조로 포함되는 문헌["REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE", 17th edition, 1985]을 과도한 실험 없이, 적합한 조제물을 제조하기 위해 찾아볼 수 있다.

[0318] 항균 보존제, 항산화제, 킬레이트화제, 및 완충제가 포함되는, 조성물의 안정성 및 멸균성을 향상시키는 다양한 첨가제가 첨가될 수 있다. 미생물의 작용 방지는 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산 등에 의해 확보될 수 있다. 주사용 약학 형태의 연장된 흡수는 흡수를 지연하는 제제, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 사용으로 일으킬 수 있다. 그러나, 본원에서 개시되는 주제에 따르면, 사용되는 임의의 비히클, 희석제, 또는 첨가제는 유전적으로 변형된 면역반응성 세포 또는 이의 선조체와 적합성을 가져야 한다.

[0319] 조성물은 등장성일 수 있다, 즉, 이들은 혈액 및 누액과 동일한 삼투압을 가질 수 있다. 조성물의 요망되는 등

장성은 나트륨 클로라이드, 또는 다른 약학적으로 허용가능한 제제, 예컨대 텍스트로스, 봉산, 나트륨 타르트레이트, 프로필렌 글리콜 또는 다른 무기 또는 유기 용질을 사용하여 달성될 수 있다. 나트륨 클로라이드는 특히 나트륨 이온을 함유하는 완충액을 위한 것일 수 있다.

[0320] 조성물의 점도는, 요망되는 경우, 약학적으로 허용가능한 증점제를 사용하여 선택된 수준에서 유지될 수 있다. 예를 들어, 메틸셀룰로스는 용이하게 그리고 경제적으로 이용가능하며 함께 작업하기 용이하다. 다른 적합한 증점제에는, 예를 들어, 잔탄 검, 카복시메틸 셀룰로스, 하이드록시프로필 셀룰로스, 카보머 등이 포함된다. 증점제의 농도는 선택되는 제제에 의존할 수 있다. 중요한 점은 선택된 점도를 달성할 양을 사용하는 것이다. 명백하게, 적합한 담체 및 다른 첨가제의 선택은 정확한 투여 경로 및 특정 투여형, 예로, 액체 투여형의 성질(예로, 조성물이 용액, 현탁액, 겔 또는 또 다른 액체 형태, 예컨대 경시 방출 형태 또는 액체-충전 형태로 제형화될 것인지 여부)에 의존할 것이다.

[0321] 투여될 세포의 양은 치료받는 대상체에 있어서 변할 것이다. 소정 구현예에서, 약 10^4 개 내지 약 10^{10} 개, 약 10^5 개 내지 약 10^9 개, 또는 약 10^6 개 내지 약 10^8 개의 본원에서 개시되는 면역반응성 세포가 대상체(예로, 인간 대상체)에 투여된다. 소정 구현예에서, 약 10^4 개 내지 약 10^7 개, 또는 약 10^5 개 내지 약 10^7 개의 본원에서 개시되는 면역반응성 세포가 대상체(예로, 인간 대상체)에 투여된다. 보다 효과적인 세포는 더 적은 수로 투여될 수 있다. 소정 구현예에서, 적어도 약 1×10^8 개, 약 2×10^8 개, 약 3×10^8 개, 약 4×10^8 개, 또는 약 5×10^8 개의 본원에서 개시되는 면역반응성 세포가 대상체(예로, 인간 대상체)에 투여된다. 유효 용량으로 간주될 양의 정확한 결정은 이의 체격, 연령, 성별, 체중, 및 특정 대상체의 상태가 포함되는, 각각의 대상체에 대한 개별 요인에 기반할 수 있다. 투여량은 본 개시 및 당분야의 지식으로부터 통상의 기술자에 의해 용이하게 확인될 수 있다.

[0322] 통상의 기술자는 방법에서 투여될 조성물 중 세포 및 선택적 첨가제, 비히클, 및/또는 담체의 양을 용이하게 결정할 수 있다. 전형적으로, 임의의 첨가제(활성 세포(들) 및/또는 제제(들)에 부가하여)는 인간염 완충 식염수 중 0.001 내지 50%(중량) 용액의 양으로 존재하며, 활성 성분은 마이크로그램 내지 밀리그램 수준, 예컨대 약 0.0001 내지 약 5 wt%, 약 0.0001 내지 약 1 wt%, 약 0.0001 내지 약 0.05 wt% 또는 약 0.001 내지 약 20 wt%, 약 0.01 내지 약 10 wt%, 또는 약 0.05 내지 약 5 wt%로 존재한다. 동물 또는 인간에 투여될 임의의 조성물에 있어서, 하기가 결정될 수 있다: 적합한 동물 모델, 예로, 설치류, 예컨대 마우스에서 치사 용량(LD) 결정 및 LD50에 의한, 독성; 조성물(들)의 투여량, 여기서의 성분 농도 및 적합한 반응을 유발할, 조성물(들)의 투여 시점, 이러한 결정은 통상의 기술자의 지식, 본 개시 및 본원에서 인용되는 문헌으로부터 과도한 실험을 필요로 하지 않는다. 그리고, 순차적 투여를 위한 시간은 과도한 실험 없이 확인될 수 있다.

[0323] 5.9. 사용 방법

[0324] 본원에서 개시되는 주제는, 예로, 치료 또는 치료법을 위해, 대상체 내로 본원에서 개시되는 세포, 본원에서 개시되는 조성물, 또는 본원에서 개시되는 핵산 조성물을 투여하는 방법을 제공한다. 치료 또는 치료법의 비제한적 예에는 면역치료법(예로, 차용 세포 전달), 세포 치료법(또는 세포성 치료법), 줄기 세포 이식, 기관 이식, 유전적 치료법(예로, CRISPR 유전자 편집 치료법), 바이러스 주입(예로, AAV), 핵산, 유리 핵산 또는 보다 안정해진 유사체를 함유하는 나노입자, mRNA 또는 안정화된 mRNA, 또는 대상체 조작된 세포를 함유하는 기관 또는 조직이 포함된다. 본원에서 개시되는 세포, 조성물, 및 핵산 조성물은 치료법, 치료, 또는 약제에서 사용될 수 있다. 소정 구현예에서, 숙주 체액성 반응에 대한 증가된 내성, 세포의 연장된 지속성, 및/또는 외래 세포의 경감된 면역원성이 치료법 또는 치료를 위해 요망된다.

[0325] 본원에서 개시되는 주제는 대상체에서 신생물을 치료하고/하거나 방지하는 방법을 제공한다. 본원에서 개시되는 세포, 조성물, 및 핵산 조성물은 대상체에서 신생물을 치료하고/하거나 방지하기 위해 사용될 수 있다. 본원에서 개시되는 세포, 조성물, 및 핵산 조성물은 신생물을 겪는 대상체의 생존을 연장하기 위해 사용될 수 있다.

[0326] 본원에서 개시되는 주제는 대상체, 예컨대 면역손상된 인간 대상체에서 병원체 감염 또는 다른 감염성 질환을 치료하고/하거나 방지하는 방법을 제공한다. 본원에서 개시되는 세포, 조성물, 및 핵산 조성물은 또한 대상체, 예컨대 면역손상된 인간 대상체에서 병원체 감염 또는 다른 감염성 질환을 치료하고/하거나 방지하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 방법은 기존 병태의 억제된 재발의 방지, 요망되는 효과를 달성하기 위해 유효한 양으로 본원에서 개시되는 세포, 본원에서 개시되는 조성물(예로, 약학적 조성물), 또는 본원에서 개시되는 핵산 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0327] 본원에서 개시되는 주제는 대상체에서 자가면역 질환을 치료하고/하거나 방지하는 방법을 제공한다. 본원에서

개시되는 세포, 조성물, 및 핵산 조성물은 또한 대상체에서 자가면역 질환을 치료하고/하거나 방지하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 방법은 자가면역 질환을 갖는 대상체에 유효한 양으로 본원에서 개시되는 세포, 본원에서 개시되는 조성물(예로, 약학적 조성물), 또는 본원에서 개시되는 핵산 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0328] 본원에서 개시되는 주제는 대상체에서 세포 및/또는 조직의 항체-매개 거부를 감소시키고/시키거나 방지하는 방법을 제공하며, 여기서 대상체는 기관 이식을 수여받는다. 본원에서 개시되는 세포, 조성물, 및 핵산 조성물은 또한 대상체에서 세포 및/또는 조직의 항체-매개 거부를 감소시키고/시키거나 방지하기 위해 사용될 수 있고, 여기서 대상체는 기관 이식을 수여받는다. 이러한 방법은 기관 이식을 수여받는 대상체에 유효한 양으로 본원에서 개시되는 세포, 본원에서 개시되는 조성물(예로, 약학적 조성물), 또는 본원에서 개시되는 핵산 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0329] 본원에서 개시되는 주제는 대상체에서 자가 또는 동종이형 세포 및/또는 조직의 항체-매개 거부를 감소시키고/시키거나 방지하는 방법을 제공하며, 여기서 대상체는 세포 치료법을 수여받는다. 본원에서 개시되는 세포, 조성물, 및 핵산 조성물은 또한 세포 및/또는 조직의 항체-매개 거부를 감소시키고/시키거나 방지하기 위해 사용될 수 있고, 여기서 대상체는 세포 치료법을 수여받는다. 이러한 방법은 세포 치료법을 수여받는 대상체에 유효한 양으로 본원에서 개시되는 세포, 본원에서 개시되는 조성물(예로, 약학적 조성물), 또는 본원에서 개시되는 핵산 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0330] 치료를 위해, 투여되는 양은 요망되는 효과를 생성하는 데 효과적인 양이다. 유효량은 1개의 또는 일련의 투여로 제공될 수 있다. 유효량은 볼루스로 또는 연속 관류에 의해 제공될 수 있다.

[0331] "유효량"(또는 "치료 유효량")은 치료 시 유익하거나 요망되는 임상 결과를 일으키기 충분한 양이다. 유효량은 하나 이상의 용량으로 대상체에 투여될 수 있다. 치료 측면에서, 유효량은 질환을 억제하거나, 완화하거나, 안정화하거나, 역전시키거나, 그 진행을 늦추거나, 달리 질환의 병리적 결과를 감소시키기 충분한 양이다. 유효량은 일반적으로 사례 별 기준으로 의사에 의해 결정되며 통상의 기술자의 기술 수준 내이다. 유효량을 달성하기 위해 적절한 투여량을 결정하는 경우 몇몇 요인이 전형적으로 고려된다. 이들 요인에는 대상체의 연령, 성별 및 체중, 치료받는 병태, 병태의 중증도 및 투여되는 세포의 형태와 유효 농도가 포함된다.

[0332] 항원-특이적 T 세포를 사용하는 차용 면역치료법에 있어서, 약 10^6 개~ 10^{10} 개 범위(예로, 약 10^9 개)의 세포 용량이 전형적으로 주입된다. 본원에서 개시되는 세포의 숙주 내로의 투여 및 후속 분화 시, 특정 항원에 대해 특이적으로 유도되는 T 세포가 유도된다.

[0333] 신생물

[0334] 본원에서 개시되는 주제는 대상체에서 신생물을 치료하고/하거나 방지하는 방법을 제공한다. 방법은 신생물을 갖는 대상체에 유효량의 본원에서 개시되는 세포, 본원에서 개시되는 조성물, 또는 본원에서 개시되는 핵산 조성물을 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0335] 신생물의 비제한적 예에는 혈액암(예로 백혈병, 림프종, 및 골수종), 난소암, 유방암, 방광암, 뇌암, 결장암, 내장암, 간암, 폐암, 췌장암, 전립샘암, 피부암, 위암, 교모세포종, 인후암, 흑색종, 신경모세포종, 췌암종, 교종, 연조직 육종, 및 다양한 암종(전립샘암 및 소세포폐암 포함)이 포함된다. 적합한 암종에는 비제한적으로 성상세포종, 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 회소돌기아교세포종, 뇌실막종, 수모세포종, 원시 신경 외배엽 종양(PNET), 연골육종, 뼈형성 육종, 췌장관 샘암종, 소세포 및 대세포 폐 샘암종, 척삭종, 혈관육종, 내피육종, 편평상피세포 암종, 기관지폐포 암종, 상피 샘암종, 및 이의 간 전이, 림프혈관육종, 림프혈관내피육종, 간암종, 쓸개관암종, 윤활막종, 증피종, 어뢰 종양, 횡문근육종, 결장암종, 기저 세포 암종, 땀샘 암종, 유두모양 암종, 땀샘 암종, 유두모양 샘암종, 낭샘암종, 수질 암종, 기관지원성 암종, 신세포 암종, 담관 암종, 융모막암종, 고환종, 배아 암종, 율름 종양, 정소 종양, 수모세포종, 머리인두종, 뇌실막종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경집종, 회소돌기아교세포종, 수막종, 신경모세포종, 망막모세포종, 백혈병, 다발 골수종, 발덴스트롬 거대글로불린혈증, 및 중쇄 질환, 유방 종양, 예컨대 도관 및 소엽 샘암종, 자궁 경부의 편평상피 및 샘암종, 자궁 및 난소 상피 암종, 전립샘 샘암종, 방광의 전이 편평상피세포 암종, B 및 T 세포 림프종(결절성 및 확산성) 형질세포종, 급성 및 만성 백혈병, 악성 흑색종, 연조직 육종 및 평활근육종이 포함되는, 종양학 분야에 알려진 임의의 것들이 추가로 포함된다. 소정 구현예에서, 신생물은 혈액암(예로 백혈병, 림프종, 및 골수종), 난소암, 전립샘암, 유방암, 방광암, 뇌암, 결장암, 내장암, 간암, 폐암, 췌장암, 전립샘암, 피부암, 위암, 교모세포종, 및 인후암으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 본원에서 개시되는 세포, 조성물, 핵산 조성물은 혈액암(예로, 백혈병, 림프종, 및 골수종) 또는 난소암을 치료하고/하거나 방지하기 위해 사용될 수 있고, 이는 통상적인 치료

개입에 적합하지 않다. 소정 구현예에서, 본원에서 개시되는 세포, 조성물, 핵산 조성물은 고형 종양을 치료하고/하거나 방지하기 위해 사용될 수 있다. 소정 구현예에서, 본원에서 개시되는 세포, 조성물, 핵산 조성물은 급성 골수 백혈병(AML), 림프모구 백혈병(ALL), 만성 림프구 백혈병(CLL), 만성 골수 백혈병(CML), 다발 골수종, 비-호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 유방암, 난소암, 중피종, 교모세포종, 결장직장암, 및 췌장암으로부터 선택되는 신생물을 치료하고/하거나 방지하기 위해 사용될 수 있다.

[0336] 자가면역 질환

[0337] 본원에서 개시되는 주제는 대상체에서 자가면역 질환을 치료하고/하거나 방지하는 방법을 제공한다. 방법은 자가면역 질환을 갖는 대상체에 유효량의 본원에서 개시되는 세포, 본원에서 개시되는 조성물, 또는 본원에서 개시되는 핵산 조성물을 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 자가면역 질환의 비제한적 예에는 류마티스 관절염, 중증 근무력증, 전신 루푸스, 그레이브스병, 하시모토 갑상샘염, 전신 경화증, 췌관 간경화, 셀리악병, 축삭 신경병증, 염증성 근육병증, 소뇌 변성, 1형 당뇨병, 및 다발근육염이 포함된다.

[0338] USA에서 자가면역 장애를 갖는 환자는 2천만 명을 초과한다. 이들, 예컨대 루푸스 및 중증 근무력증 중 다수에는 환자 자신의 조직 성분, DNA 및 세포에 대한 항체에 의한 공격이 관여된다. <https://www.google.com/search?client=firefox-b-l-d&q=incidence+toutimmune+disease>. 이들 질환에 대해 효과적이거나 근치적인 접근은 거의 존재하지 않는다. IgG는 인간 면역계에서 중요한 보호 역할을 담당하지만, 질환, 예컨대 류마티스 관절염, 중증 근무력증, 전신 루푸스 등의 발병기전에 또한 연관되며, 여기서 IgG의 제거가 이들 자가면역 질환을 치료하기 위한 치료 방법으로 사용되었다(Johansson et al., PLoS ONE (2008);3:1-6; Berta et al., The International Journal of Artificial Organs (1994);17:603-608; Stummvoll et al., Annals of the Rheumatic Diseases (2005);64:1015-1021). 본원에서 개시되는 세포에 포함되는 IgG-분해 효소는 숙주 세포를 공격하는 기능적 IgG를 고갈시킴으로써, 자가면역 질환을 치료할 수 있다.

[0339] 항체-매개 거부

[0340] 본원에서 개시되는 주제는 대상체에서 세포 및/또는 조직의 항체-매개 거부를 감소시키고/시키거나 방지하는 방법을 제공한다. 소정 구현예에서, 대상체는 기관 이식을 수여받는다. 소정 구현예에서, 이식은 동종이형 이식(동종이식)이다. 소정 구현예에서, 대상체는 기관 이식 전에 본원에서 개시되는 세포, 조성물, 또는 핵산 조성물을 수여받는다. 소정 구현예에서, 대상체는 세포 치료법을 수여받으며, 예로, 세포 및/또는 조직(예로, 자가 또는 동종이형 세포 및/또는 조직)이 세포 치료법에서 사용된다.

[0341] 방법은 대상체에 유효량의 본원에서 개시되는 세포, 본원에서 개시되는 조성물, 또는 본원에서 개시되는 핵산 조성물을 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0342] 고형 기관 이식, 예컨대 신장, 간, 폐, 심장 및 다른 기관은 USA에서 매년 36,000명을 초과하는 환자에서 사용되며 100,000명 초과가 이식을 대기 중이다. <https://www.organdonor.gov/statistics-stories/statistics.html>. 이들 기관은 가능한 최대한 환자에게 매칭될 뿐만 아니라 심각하고 때때로 치명적인 결과를 갖는 환자의 면역억제가 빈번하고 일생 동안 지속된다. USA에서 그 비용은 천 억 달러이다. 숙주 IgG는 동종이식에서 중요한 역할을 담당하며, 여기서 HLA 공여자 간 비적합성이 동종이식편의 항체-매개 거부를 야기한다(Loupy et al., New England Journal of Medicine (2018);379:1150-1160). IdeS가 동종이식 전 탈감작을 위해 인간에서 평가되었다. 연구에서, 25명의 환자 중 24명이 모든 공여자-특이적 항체를 신속히 제거한 IdeS로의 처리 후, HLA-부적합 이식을 수여받을 수 있었다(Jordan et al., New England Journal of Medicine (2017);377:442-453; Lonze et al., Annals of Surgery (2018);268:488-496). 본원에서 개시되는 세포에 포함되는 IgG-분해 효소는 공여자 기관 세포를 공격하는 기능적 IgG(예로, 숙주 IgG)를 고갈시킴으로써, 기관 이식과 연관된 항체-매개 거부를 감소시키고/시키거나 방지할 수 있다.

[0343] 대상체는 진행된 형태의 질환을 가질 수 있고, 이 경우 치료 목적에는 질환 진행의 경감 또는 역전, 및/또는 부작용의 완화가 포함될 수 있다. 대상체는 병태 이력을 가질 수 있고, 이에 대해 이들은 이미 치료받았으며, 이 경우 치료 목적에는 전형적으로 재발 위험의 감소 또는 지연이 포함될 것이다.

[0344] 치료법을 위해 적합한 인간 대상체는 전형적으로 임상 기준에 의해 구별될 수 있는 2개의 치료군을 포함한다. "진행된 질환" 또는 "높은 종양 부담"을 갖는 대상체는 임상적으로 측정가능한 종양을 보유하는 자들이다. 임상적으로 측정가능한 종양은 종양 물질에 기반하여(예로, 촉진, CAT 스캔, 초음파영상, 유방촬영영상 또는 X-선에 의해; 이들 자신에 대한 양성적 생화학적 또는 조직병리학적 마커는 상기 집단을 확인하기 위해 불충분함) 검출될 수 있는 것이다. 약학적 조성물은 이의 병태를 억제하는 것을 목적으로, 항-종양 반응을 유발하기 위해 이들

대상체에 투여된다. 이상적으로, 종양 물질의 감소가 결과적으로 일어나지만, 임의의 임상적 개선이 이익을 구성한다. 임상적 개선에는 종양의 위험 또는 진행 속도 감소 또는 병리적 결과의 감소가 포함된다.

[0345] 적합한 대상체의 제2 그룹은 "보조 그룹"으로 당분야에 알려져 있다. 이들은 신생물 이력을 가졌으나, 또 다른 치료법 방식에 반응성이었던 개체이다. 사전 치료법에는 수술적 절제, 방사선치료법, 및 전통적 화학치료법이 포함되었으나, 이에 제한되지 않는다. 결과적으로, 이들 개체는 임상적으로 측정가능한 종양을 갖지 않는다. 그러나, 이들은 원래 종양 부위 근처에서 또는 전이에 의해, 질환 진행의 위험이 있는 것을 추정된다. 이들 그룹은 고위험 및 저위험 개체로 추가 세분될 수 있다. 세분화는 최초 치료 전에 또는 후에 관찰된 특성에 기반하여 수행된다. 이들 특성은 임상 분야에 알려져 있으며, 각각의 상이한 신생물에 대해 적합하게 정의된다. 고위험 하위군에 전형적인 특성은 종양이 주변 조직을 침습했거나, 림프절 관여를 나타내는 것들이다.

[0346] 또 다른 그룹은 신생물에 대한 유전적 소인을 갖지만 아직 신생물의 임상적 징후를 증명하지 않았다. 예를 들어, 유방암과 연관된 유전적 돌연변이에 대해 양성으로 시험되었지만 여전히 가임기 연령인 여성은 방지적 수술을 수행하기 적합한 때까지 신생물의 발생을 방지하기 위해 예방적 치료에서 하나 이상의 본원에서 기재되는 세포를 수여받고자 희망할 수 있다.

[0347] 리간드-인식 수용체(예로, 종양 항원에 결합하는 항원-인식 수용체) 및 세포의 활성화(예로, 항-종양 활성화)를 향상시키는 IgG-분해 효소의 발현 결과, 차용 전달된 세포에는 종양 부위에서 강화되고 선택적인 세포용해 활성이 부여된다. 또한, 종양으로의 이의 편재 또는 바이러스 감염 및 이의 증식에 이어, 세포(예로, T 세포)는 종양 또는 바이러스 감염 부위에서 생리적 항-종양 또는 항바이러스 반응에 관여되는 광범위한 면역 세포(종양 침윤 림프구, NK-, NKT-세포, 수지상 세포, 및 대식구)에 대해 고도 유도성인 환경으로 변한다.

[0348] 부가적으로, 본원에서 개시되는 주제는 대상체, 예로, 면역손상된 대상체에서 병원체 감염(예로, 바이러스 감염, 박테리아 감염, 진균 감염, 기생충 감염, 또는 원생동물 감염)을 치료하고/하거나 방지하는 방법을 제공한다. 방법은 병원체 감염을 갖는 대상체에 유효량의 본원에서 개시되는 세포, 본원에서 개시되는 조성물, 또는 본원에서 개시되는 핵산 조성물을 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 치료에 적합한 예시적 바이러스 감염에는 비제한적으로 사이토메갈로바이러스(CMV), 엡스타인 바 바이러스(EBV), 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 및 인플루엔자 바이러스 감염이 포함된다.

[0349] 면역학적 합병증("악성 T-세포 암화"로 알려짐), 예로, 이식편-대-숙주병(GvHD)의 위험을 회피하거나 최소화하기 위해, 또는 건강한 조직이 종양 세포와 동일한 표적 항원을 발현하여 GvHD와 유사한 결과를 야기하는 경우 본원에서 개시되는 세포(예로, T 세포)에 추가 변형이 도입될 수 있다. 상기 문제에 대한 잠재적 해결책은 자살 유전자의 본원에서 개시되는 면역반응성 세포 내로의 조작이다. 적합한 자살 유전자에는 비제한적으로 단순 헤르페스 바이러스 티미딘 키나제(hsv-tk), 유도성 카스파제 9 자살 유전자(iCasp-9), 및 절단된 인간 표피 성장 인자 수용체(EGFRt) 폴리펩타이드가 포함된다. 소정 구현예에서, 자살 유전자는 EGFRt 폴리펩타이드이다. EGFRt 폴리펩타이드는 항-EGFR 모노클로날 항체(예로, 세툽시맵)를 투여하여 T 세포 제거를 가능하게 할 수 있다. EGFRt는 본원에서 개시되는 CAR의 항원-인식 수용체 상류에 공유 연결될 수 있다. 자살 유전자는 본원에서 개시되는 CAR을 인코딩하는 핵산을 포함하는 벡터 내에 포함될 수 있다. 이러한 방식으로, 자살 유전자를 활성화하도록 설계된 전구약물(예로, 전구약물, 예로, 악성 T-세포 암화(예로, GVHD) 동안 iCasp-9를 활성화할 수 있는 AP1903은 자살 유전자-활성화 CAR-발현 T 세포에서 아포토시스를 유발한다. 자살 유전자의 본원에서 개시되는 CAR 내로의 포함은 매우 짧은 시기 내에 대부분의 CAR T 세포를 제거하는 능력과 함께 추가된 수준의 안전성을 제공한다. 자살유전자가 포함되는 본원에서 개시되는 세포(예로, T 세포)는 CAR T 세포 주입 후 주어진 시점에 선제적으로 제거되거나, 최초의 독성 징후 시 박멸될 수 있다.

[0350] 5.10. 키트

[0351] 본원에서 개시되는 주제는 대상체에서 신생물, 또는 병원체 감염, 또는 자가면역 질환을 치료하고/하거나 방지하기 위한 키트, 및 대상체에서 항체-매개 거부를 감소시키고/시키거나 방지하기 위한 키트를 제공하며, 여기서 대상체는 기관 이식을 수여받는다. 소정 구현예에서, 키트는 유효량의 본원에서 개시되는 세포, 본원에서 개시되는 조성물, 또는 본원에서 개시되는 핵산 조성물을 포함한다. 소정 구현예에서, 키트는 멸균 용기를 포함한다; 이러한 용기는 상자, 앰플, 병, 바이알, 튜브, 백, 파우치, 블리스터-팩, 또는 당분야에 알려진 다른 적합한 용기일 수 있다. 이러한 용기는 플라스틱, 유리, 라미네이트지, 금속 호일, 또는 약제를 보호하기 위해 적합한 다른 물질로 제조될 수 있다. 소정 비제한적 구현예에서, 키트에는 관심 항원에 대해 유도된 항원-인식 수용체(예로, CAR 또는 TCR)를 인코딩하는 단리된 핵산 분자 및 발현가능한(그리고 분비 가능한) 형태로 IL-36 폴리펩타이드를 인코딩하는 단리된 핵산 분자가 포함되며, 이는 선택적으로 동일하거나 상이한 벡터에 포함될

수 있다.

[0352] 요망되는 경우, 세포, 조성물, 또는 핵산 조성물은 신생물, 병원체 감염, 또는 자가면역 질환이 발생한 또는 발생할 위험이 있는 대상체 또는 기관 이식을 수여받는 대상체에 세포, 조성물, 또는 핵산 조성물을 투여하기 위한 설명서와 함께 제공된다. 설명서에는 일반적으로 신생물 또는 병원체 감염, 또는 자가면역 질환의 치료 및/또는 방지를 위한 세포, 조성물 또는 핵산 조성물의 용도에 관한 정보가 포함된다. 소정 구현예에서, 설명서에는 하기 중 적어도 하나: 치료제의 설명; 신생물, 병원체 감염, 또는 면역 장애 또는 이의 증상의 치료 또는 방지를 위한 투여량 일정 및 투여; 주의사항; 경고; 적응증; 역-적응증; 과-투여량 정보; 유해 반응; 동물 약리학; 임상 연구; 및/또는 참고문헌이 포함된다. 설명서는 용기 상에 직접 인쇄되거나(존재하는 경우), 표지로서 용기에 적용되거나, 별도 종이, 팜플렛, 카드, 또는 폴더로서 용기 내에 또는 이와 함께 공급될 수 있다.

[0353] 6. 실시예

[0354] 본 개시의 실시는, 달리 나타내지 않는 한, 분자 생물학(재조합 기법 포함), 미생물학, 세포 생물학, 생화학 및 면역학의 통상적 기법을 채택하며, 이는 통상의 기술자의 기술범위 내에 확실히 속한다. 이러한 기법은 문헌, 예컨대 ["Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition (Sambrook, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984); "Animal Cell Culture" (Freshney, 1987); "Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1996); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller and Calos, 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis, 1994); "Current Protocols in Immunology" (Coligan, 1991)]에 자세히 설명되어 있다. 이들 기법은 본원에서 개시되는 폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩타이드의 제조에 적용 가능하며, 이와 같이, 본원에서 개시되는 주제의 제조 및 실시에서 고려될 수 있다. 특정 구현예에 대해 특히 유용한 기법은 후술되는 섹션에서 논의될 것이다.

[0355] 하기 실시예는 본원에서 개시되는 세포 및 조성물을 어떻게 제조하고 사용하는지에 대한 전체 개시 및 설명을 통상의 기술자에게 제공하기 위해 나타내며, 본 발명자들이 무엇을 자신의 발명으로 간주하는지에 대한 범위를 제한하려는 것이 아니다.

[0356] 실시예 1 - 생성 및 시험관내 활성

[0357] 요약

[0358] 2가지 형태의 IdeS를 발현하는 CAR T-세포, 즉, 막-결합 형태(IdeS가 표면 막-결합 형태로 발현됨) 및 분비된 형태(IdeS가 세포로부터 분비됨)를 생성하였다. 아래에 나타난 바와 같이, 두 형태 모두에서, IdeS는 시험관내에서 IgG를 성공적으로 절단하였다.

[0359] 결과

[0360] 작제물 및 안정한 세포주의 제조

[0361] B-세포 종양의 항원인 CD19를 표적화하는 CAR T-세포 치료법이 최근 FDA에 의해 승인되었다(Zheng et al., Drug Discovery Today (2018);23:1175-1182). CD19는 이것이 B-세포에 특이적이고 정상적으로는 다른 세포 또는 조직 상에서 발현되지 않으므로, 이상적인 항원이 된다. 4-1BB/CD3ζ 신호전달 도메인을 갖는 CD19 CAR은 시험관내 및 생체내 환자에서 잘 특징규명되었다(Brentjens et al., Sci Transl Med. (2013);5:177ra38; Pegram et al., Blood (2012);119:4133-4141; Kalos et al., Science Translational Medicine (2011);3:1-11).

[0362] 도 1에 나타난 바와 같이, 막-결합 형태의 작제물("IdeS-tm"으로 나타냄; 도 1a 참고) 및 분비된 형태의 작제물("IdeS-sec"으로 나타냄; 도 1b 참고)을 생성하였다. T 세포를 조작하여 4-1BB 폴리펩타이드 및 CD3ζ 폴리펩타이드를 포함하는 세포내 신호전달 도메인), 및 CD8 폴리펩타이드를 포함하는 막통과 도메인을 포함하는 CD19-표적화 CAR을 발현하였다. CAR은 "19BBz"로 명명된다.

[0363] 작제물의 설계는 SFG 감마 레트로바이러스 벡터를 사용하는 이전에 보고된 방법에 기반하였다(Rivière et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (1995);92:6733-7). CD8 신호 펩타이드 서열을 사용하여 IdeS를 세포막으로 수송하였다(도 1a 및 1b 참고). 효소의 막-결합 버전을 생성하기 위해, CD8의 막통과 도메인을 효소의 C-말단 상에 포함시켰다. 이어서 CAR 작제물을 자가-절단 펩타이드 2A 뒤에 부가하였다. 도 1a 및 1b에 나타난 바와 같이, CAR 작제물에는 CD8 신호 펩타이드 서열, 항원-특이적 scFv(이 경우 항-CD19), CD8 막통과 도메인, 및 4-1BB/CD3ζ 세포내 신호전달 도메인이 포함된다. CAR 발현 T-

세포를 생산하는 방법은 문헌[Brentjens et al., Sci Transl Med. (2013);5:177ra38; Parente-Pereira et al., Journal of Biological Methods (2014);1:7]]에서 이전에 기재되었다. 작제물을 사용하여 H29 레트로바이러스 패키징 세포주를 전달감염시켰다. H29 세포로부터 유래된 바이러스를 사용해서 안정한 PG13 레트로바이러스 패키징 세포주를 제조하였다. PG13 세포는 긴팔 원숭이 백혈병 바이러스(GALV) 입자를 제조하였고, 이를 사용하여 임의의 세포주, 또는 일차 세포를 형질도입하였다(Parente-Pereira et al., Journal of Biological Methods (2014);1:7). 말초혈 단핵 세포(PBMC)를 형질도입하여 CAR T-세포를 생성하였다. 또한, Galv9 생산체 세포주를 사용하여 바이러스를 제조하였다.

[0364] **발현 및 시험관내 활성**

[0365] IdeS의 안정한 발현을 안정한 모델 T 세포주, 예컨대 Jurkat 세포에서 면역블롯을 사용하여 시험하였다. C-말단 HA-태그가 IdeS 작제물에 포함되었으므로, 세포주의 세포 용해액 및 상청액을 항-HA 항체를 사용하여 시험하였다. 도 2에 나타난 바와 같이, IdeS의 발현을 HEK293t 세포의 일시적 전달감염을 통해 포유류 세포에 성공적으로 적응시켰다. CAR T-세포의 기능을 IdeS 활성 및 또한 CAR 활성화에 관해 평가하였다.

[0366] IgG의 절단 정도를 평가하여 IdeS의 효소 활성을 시험하였다. SDS-PAGE 검정뿐만 아니라 ELISA-기반 검정을 사용하였다. 도 3a~3c는 SDS-PAGE 검정 결과를 나타낸다. SDS-PAGE 검정을 위해, HEK 293t 세포를 IdeS-tm으로 일시적으로 전달감염시켰다. 전달감염 48시간 후, IgG를 24-웰 플레이트의 웰에 첨가한 후, 상이한 시점에 제거하고 램피 완충액을 사용하여 케칭하였다. 도 3a를 참고한다. 인간 폴리클로날 IgG의 절단을 경시적으로 추적하고 SDS-PAGE 검정을 사용하여 검출하고, 이를 쿠마시 및 면역블롯 둘 다에 의해 가시화하였다(도 3b 및 3c). 도 3b 및 3c에 나타난 바와 같이, HEK293t 세포로부터 발현된 IdeS는 시험관내에서 활성이었다.

[0367] 도 4a 및 4b는 ELISA-기반 검정의 결과를 나타낸다. 적응된 ELISA-기반 검정(Järnnum et al., Molecular Cancer Therapeutics (2017);16:1887-1897)을 사용하여 IdeS에 의한 IgG 절단을 검출하였다. 제조한 IdeS를 사용하여, 절단 ELISA를 검증하였다(도 4a 참고). HEK293t 세포를 IdeS의 분비된 버전("IdeS-sec")으로 전달감염시켰다. 항-HA를 사용하여 면역블롯에 의해 상청액 유체를 시험하여 효소의 발현을 검증하였다(도 4b 참고). 절단 ELISA를 적용하여, IdeS-sec이 상이한 시점에 인간 폴리클로날 IgG를 효율적으로 절단함을 확인하였다(도 4b 참고).

[0368] IdeS가 세포 표면 상에 결합된 항체를 성공적으로 절단할 수 있는지 여부를 평가하기 위해, 공동-배양 실험을 설계하였다. 공동-배양 실험에서, IdeS-발현 세포를 CD20을 발현하는 Raji 세포 및 Raji 세포에 결합하는, 항체 리독시매팩과 인큐베이션하였다. 그러나, IdeS는 항체를 절단하여 Fc 단편을 방출하였다. 도 5에 나타난 바와 같이, IdeS를 분비하는 HEK293t 세포는 Raji 세포 상에 결합된 리독시매팩의 Fc 단편을 성공적으로 절단하였다.

[0369] 문헌[Dao et al. Science Translational Medicine (2013);5:1-11]]에 이전에 개시된 바와 같은 루시퍼라제-발현 표적 세포에 대한 활성을 시험함으로써 CAR T-세포에 의한 특이적 용해를 시험하였다. CD19⁺ Raji 세포주를 중앙 모델로 사용하였고, Raji 세포의 특이적 용해를 측정하였다. Raji 세포를 초파리 루시퍼라제를 발현하도록 변형하였고, 이는 루시퍼라제-기반 사멸 검정을 허용한다. 도 6에 나타난 바와 같이, IdeS-tm 19BBz 세포 및 IdeS-sec 19BBz 세포는 둘 다 IdeS를 포함하지 않는 19BB 세포와 동일한 정도로 시험관내에서 Raji 세포를 사멸시켰다. 따라서, CAR T-세포에 대한 IdeS의 첨가는 CAR T-세포의 사멸 활성을 손상시키지 않는다.

[0370] 또한, IdeS-발현 세포가 보체-의존적 세포독성(CDC)으로부터 보호될 수 있는지 여부를 연구하였다. 형질도입되지 않은 T 세포, IdeS-tm 19BBz T-세포, IdeS-sec 19BBz T-세포, 및 IdeS가 없는 19BBz T-세포를 상이한 농도의 토끼 항가슴샘세포 글로불린(ATG)으로 처리한 후, 토끼 혈청을 첨가하고, 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세포 생존성을 Cell Titer Glo를 통해 측정하였다. 도 7에 나타난 바와 같이, IdeS-tm 19BBz T-세포 및 IdeS-sec 19BBz T-세포는 둘 다 IgG의 Fc 단편을 절단해내어 CDC를 회피하였다.

[0371] 또한, IdeS-발현 세포가 항체-의존적 세포성 세포독성(ADCC)으로부터 보호될 수 있는지 여부를 연구하였다. IdeS-tm 19BBz T-세포, IdeS-sec 19BBz T-세포, 및 IdeS가 없는 19BBz T-세포를 상이한 용량의 항-가슴샘세포 글로불린(ATG)으로, 이어서 인간 PBMC로 처리하였다. 세포독성을 ⁵¹Cr 방출 검정을 사용하여 결정하였다. 도 10에 나타난 바와 같이, IdeS-tm 19BBz T-세포 및 IdeS-sec 19BBz T-세포는 둘 다 IdeS가 없는 19BBz T-세포에 비해 용해로부터 보호되었다.

[0372] 부가적으로, 본 발명자들은 IdeS-발현 세포가 신장 이식 환자로부터의 혈청 IgG를 절단하고 보체-의존적 세포독성(CDC)으로부터 보호될 수 있는지 여부를 연구하였다. 도 11a에 나타난 바와 같이, 거부를 유도하는 항-HLA 항체 함유 신장 이식 환자(환자 2)로부터 유래된 혈청은 유세포 측정에 의해 A02+ 세포에 결합하는 것으로 나타났

다. 도 11b에 나타난 바와 같이, 환자 2로부터의 혈청은 유세포 측정에 의해 확인된 바와 같이, A02+ IdeS-tm 19BBz T-세포 및 IdeS-sec 19BBz T-세포에 의해 절단되었다. 도 11c에 나타난 바와 같이, A02+ IdeS-tm 19BBz T-세포 및 IdeS-sec 19BBz T-세포는 또한 환자 2 혈청에 의해 매개되는 보체 사멸(CDC)로부터 보호되었다(오른 쪽).

[0373] 작용 기전

[0374] 이어서 본 발명자들은 IdeS-발현 세포가 어떻게 스스로를 잠재적 항체에 대해 차폐하는지 연구하였다. 도 8은 하나의 제안된 작용 기전을 나타낸다. 도 8에 나타난 바와 같이, IgG 항체는 세포 표면 항원 및 수용체에 결합 하여 CDC, ADCC 및 옹소닌화를 통해 세포사를 야기한다. IdeS는 힌지 영역 아래에서 IgG를 절단하여, Fc 단편을 방출한다. IdeS-발현 세포는 F(ab')₂ 단편에서 코팅된 채 유지되며, 이는 추가 항체가 결합하는 것을 방지한다.

[0375] 효소의 절단 기전이 분비되는 것인지 막 결합되는 것인지 여부를 이해하는 것이 중요하다. 막-결합 형태는 보다 편재된 활성을 허용하지만, 도 5에 나타난 데이터는 분비된 형태가 트랜스 시스템에서 항체를 절단하는 데 보다 효율적임을 제시한다. IdeS-발현 세포의 시스 또는 트랜스 절단 기전을 또한 평가한다. 상기 목적을 위해, 토끼 항-마우스 항체를 사용하며, 이 항체는 scFv의 찢과 부분을 표적화한다. IdeS의 막-결합 또는 분비된 버전이 더 유리한지 여부를 평가한다.

[0376] 상기 효소 기전의 중요한 양태는 이것이 힌지 영역 아래에서 IgG를 절단하므로, F(ab')₂ 단편이 온전하게 유지 되고, 이에 따라 세포 표면 상에 결합된 채 유지될 수 있다는 것이다. 증가하는 농도의 IdeS로, Fc 단편이 세포 표면으로부터 제거된 반면 F(ab')₂ 단편이 표면에 결합된 채 유지됨이 재조합 IdeS를 사용하여 관찰되었다. 도 9에 나타난 바와 같이, IdeS를 발현하는 CAR T 세포는 IgG Fc를 절단하였고 F(ab')₂ 차폐를 유지하였다. IgG(ATG)가 IdeS 발현 세포에 첨가된 후(막통과 형태건 분비된 형태건), IgG는 Fab가 형성되고 Fc가 사라짐에 따라 세포에 결합된 채 유지되었다. Fc의 부재는 기능을 제거한 반면 결합된 Fab는 새로운 세포독성 IgG가 결합 하는 것을 방지하였고, 이에 따라 차폐로서 기능하였다. IdeS를 함유하지 않은 세포로는, 이것이 일어나지 않았다.

[0377] 이는 잔여 F(ab')₂ 단편이 세포 주변 차폐를 생성하여, 이를 잠재적인 항후 체액성 반응으로부터 숨김을 제시한 다. 상기 가설을 상술된 안정한 세포주에서 막-결합 및 세포-분비 IdeS를 사용하여 시험한다. 항-Fab 특이적 항 체 또는 항-Fc 특이적 항체를 사용하여, IgG의 어느 부분이 여전히 세포에 결합되어 있는지 여부를 검출한다. 상기 공정의 동력학을 또한 조사하여 절단 후 얼마나 오래 F(ab')₂ 단편이 결합된 채 유지되는지, 그리고 이들 이 온전한 IgG와 경쟁하는지를 이해한다.

[0378] 결론

[0379] 본 실시예에 나타난 본 발명의 데이터는 IdeS-발현 CAR-T 세포가 포유류 세포에서 성공적으로 발현되었음을 실 증하며, 효율적인 시험관내 절단 활성을 나타내었다. 또한, IdeS의 CAR T-세포로의 포함은 CAR의 시험관내 사멸 활성을 손상시키지 않는다. 또한, IdeS-발현 CAR-T 세포는 보체-의존적 세포독성(CDC)에 대해 보호되었다.

[0380] 실시예 2 - 생체내 활성

[0381] 요약

[0382] 본 실시예에서, 실시예 1의 IdeS-발현 CAR T-세포의 생체내 활성을 연구한다. 이들 세포의 IgG 절단 활성 및 세 포 사멸 활성을 생체내 마우스 모델에서 연구한다. 이들 세포를 이들이 항체에 의해 표적화되는 시스템에서 시 험하여 CAR T-세포에 대한 체액성 면역원성 모델을 재현하였다. 상기 모델로, 세포의 지속성뿐만 아니라 정규 CAR T-세포 대비 종양 세포의 사멸 효율을 시험한다. 이들 실험의 설계에서 하나의 중요한 고려사항은 IdeS가 마우스 IgG를 절단하지 않는다는 것이다; 따라서, 첨가된 이중유전자 항체(예컨대, IdeS가 작용할 수 있는 토끼 또는 인간뿐만 아니라 잠재적으로 이식된 면역 효과기 세포)에 적합성인 고도 면역결핍 마우스 모델인 NSG 마우스 를 사용한다.

[0383] 생체내 세포 지속성

[0384] IdeS-발현 CAR T-세포의 생체내 지속성을 IdeS가 없는 CAR T-세포와 비교하고 시험한다. NSG 마우스에 IdeS-발 현 CAR T-세포 또는 IdeS가 없는 CAR T-세포를 복강내(IP) 주사한다. 이어서 마우스에 CAR T-세포를 표적화하는 인간 항체, 예컨대 항-CD3, 항-MHC 클래스 I 항체, 또는 CAR을 표적화하는 항체를 IP로 주사한다. IdeS가 토끼

IgG의 모든 이소형뿐만 아니라 인간 IgG를 완전 절단하므로, 토끼 또는 인간 유래 항체를 사용한다(Johansson et al., PLoS ONE (2008);3:1-6; Yang et al., Nephrology Dialysis Transplantation (2010);25:2479-2486; Wang et al., Experimental Neurology (2017);291:134-140). IdeS-발현 세포는 흔히 아래에서 항체를 절단하고 이에 따라 Fc 단편을 방출할 것으로 예상된다. 마우스로부터 수확된 복수 및 말초혈을 이전에 나타낸 바와 같이 (Rafiq et al., Nature Biotechnology (2018);36:847-858), 면역블롯 또는 ELISA에 의해 상이한 시점에 분석하여 IgG의 절단을 평가한다(도 3 및 4에 나타낸 바와 같음). 복수를 수집하고, IdeS 작제물 상에 존재하는, 항-CD19 CAR 및 항-HA 태그로의 유세포 측정에 의해 분석하여 CAR T-세포의 존재를 결정한다. Fab 단편이 세포 표면에 결합된 채(기능적 IgG의 추가 결합에 대한 차폐로서) 유지되는지 여부를 연구하기 위해, 항-Fab 특이적 항체를 사용하여 유세포 측정에 의해 잔여 결합을 분석한다. 이용가능한 잔여 CAR T-세포 표면 표적(즉, CD3 또는 MHC I)의 존재를 또한 평가한다. 유사한 실험을 세포 및 항체의 정맥내(IV) 주입으로 수행한다.

[0385] **생체내 유효성**

[0386] CD19⁺ Raji 세포주를 종양 모델로 사용하고, Raji 세포의 특이적 용해를 측정한다. Raji 세포를 변형하여 초과리 루시페라제를 발현하고, 이는 루시페라제-기반 사멸 검정뿐만 아니라 종양의 생체내 생체발광 조영을 허용한다(Koneru et al., Oncoimmunology (2015);4:e994446). NSG 마우스에 Raji 세포에 이어 IdeS-발현 CAR-T 세포 또는 IdeS가 없는 CAR T-세포, 및 CAR을 표적화하기 위해 Raji 세포에 결합하지 않는 CAR T-세포 표적화 항체(예로, 항-CD3 또는 항-마우스 항체) 주사를 IP 주입한다. 생체발광 조영을 사용하여 종양 성장 및 질환 진행을 평가한다. CAR T-세포의 지속성을 또한 유세포 측정을 사용하여 또는 대안적 발광 탐침을 운반하는 CAR T 세포의 조영에 의해 상기 시스템에서 평가한다. 가우시아(Gaussian) 루시페라제를 발현하도록 조작된 CAR T-세포를 초과리 루시페라제와 교차 사용할 수 있다(Santos et al., Nature Medicine (2009);15:338-344). 발광 탐침을 운반하는 CAR T 세포는 경시적으로 CAR T-세포 지속성을 추적하고 모니터링하면서 또한 종양을 추적하는 것을 허용한다. 유사한 실험을 세포 및 항체의 IV 주입으로 수행한다.

[0387] 실시예 3

[0388] 인간 T 세포를 IdeS CAR이 없는 19BBz(왼쪽으로부터 레인: #1~2) 또는 IdeS-tm 19BBz CAR(막통과 형태)(왼쪽으로부터 레인: #3~5) 및 IdeS-sec 19BBz CAR(분비된 형태(왼쪽으로부터 레인: #6~8)로 형질도입하였다. 2×10^6 CAR T 세포를 NSG 마우스에 i.p. 주사하고 24시간 후 인간 폴리클로날 IgG를 또한 i.p. 주사하였다. PBS를 사용하여 i.p. 세척을 수행하고, 자기 단백질 G 비드를 사용하여 샘플을 정제하고, 항-인간 Fc-특이적 HRP 이차 항체를 사용하여 웨스턴 블롯에 의해 분석하여 IgG의 절단을 평가하였다. 도 12에 나타낸 바와 같이, 절단되지 않은 중쇄는 55 kDa 근처에서 관찰된 반면(레인 #9), 절단된 Fc 단편은 25 kDa 근처에 존재하였다(화살표).

[0389] **본원에서 개시되는 주제의 구현예**

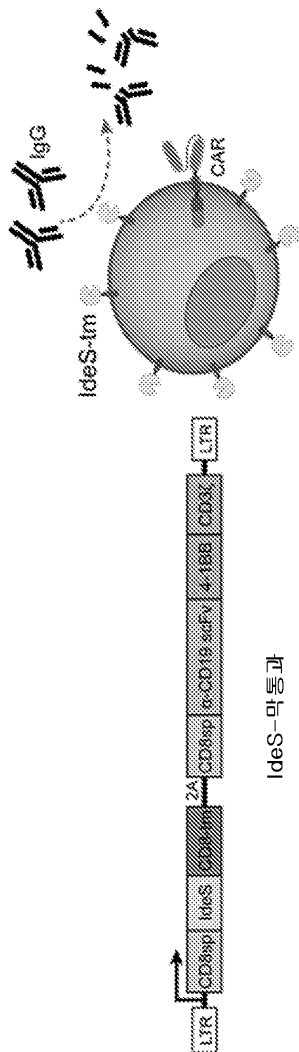
[0390] 상기 기재로부터, 변동 및 변형이 본원에서 개시되는 주제에 대해 다양한 용법 및 조건에 이를 차용하기 위해 수행될 수 있음이 자명할 것이다. 이러한 구현예도 하기 청구범위의 범위 내에 있다.

[0391] 본원에서의 변수의 임의 정의에서 요소 목록의 열거에는 임의의 단일 요소 또는 기재된 요소의 조합(또는 하위-조합)으로서의 그 변수의 정의가 포함된다. 본원에서 구현예의 열거에는 임의의 단일 구현예 또는 임의의 다른 구현예 또는 이의 일부와의 조합으로서의 해당 구현예가 포함된다.

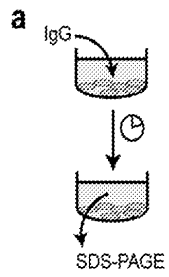
[0392] 본 명세서에서 언급되는 모든 특허 및 공보는 각각의 독립적 특허 및 공보가 구체적이고 개별적으로 참조로 포함됨을 나타내는 것과 동일한 정도로 본원에 참조로 포함된다.

도면

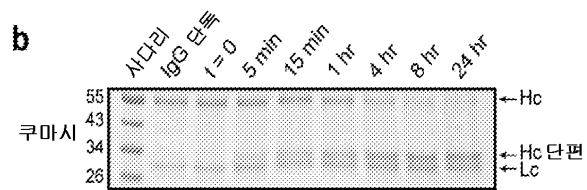
도면1a



도면3a



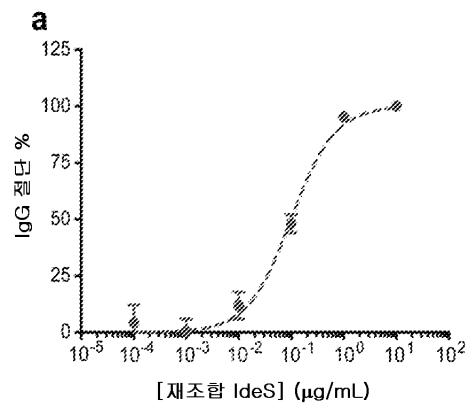
도면3b



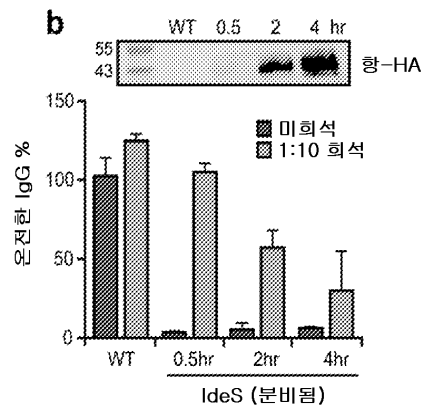
도면3c



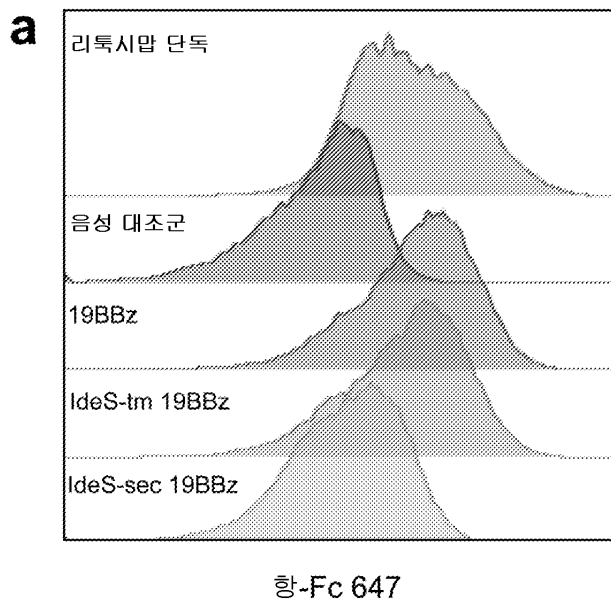
도면4a



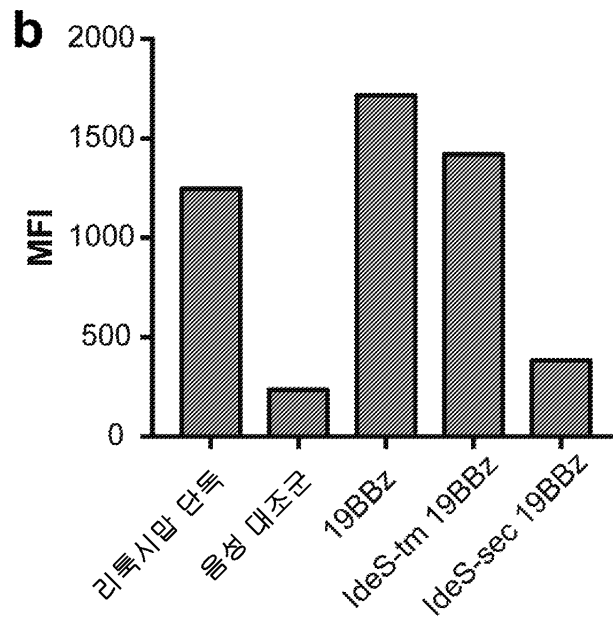
도면4b



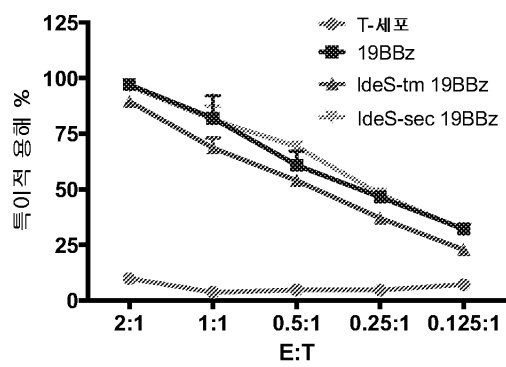
도면5a



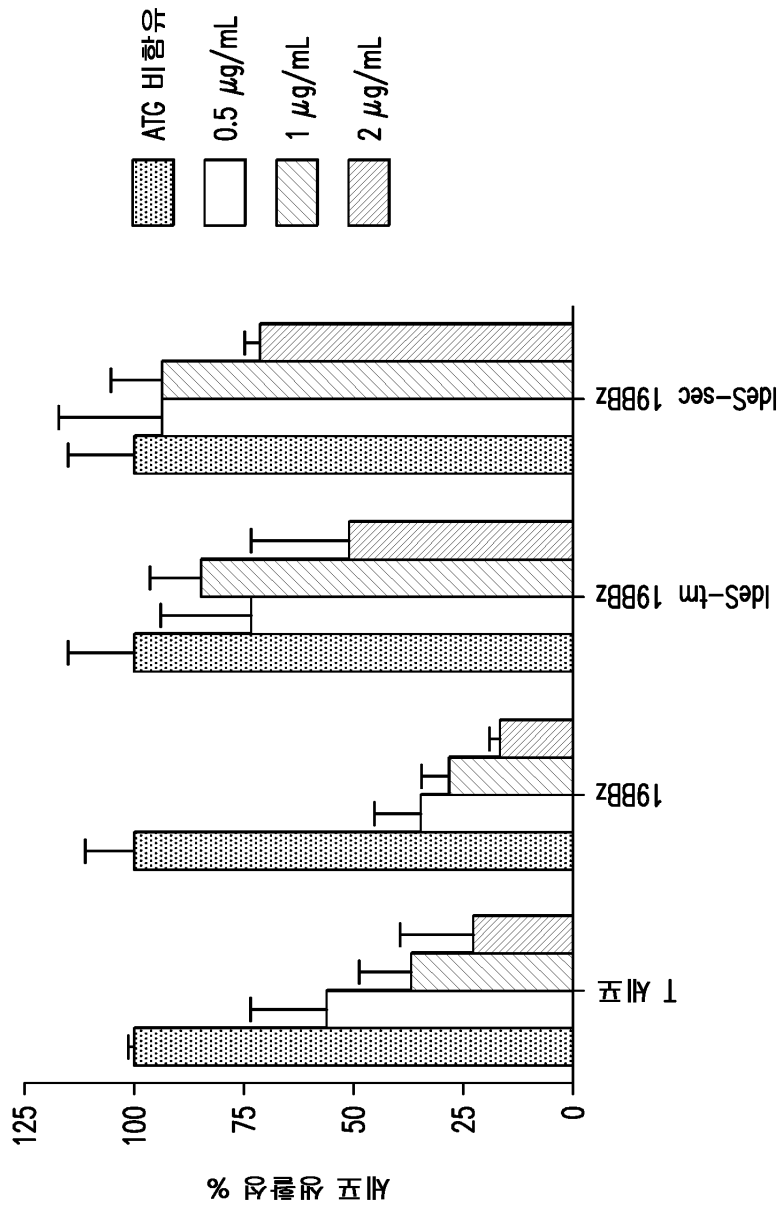
도면5b



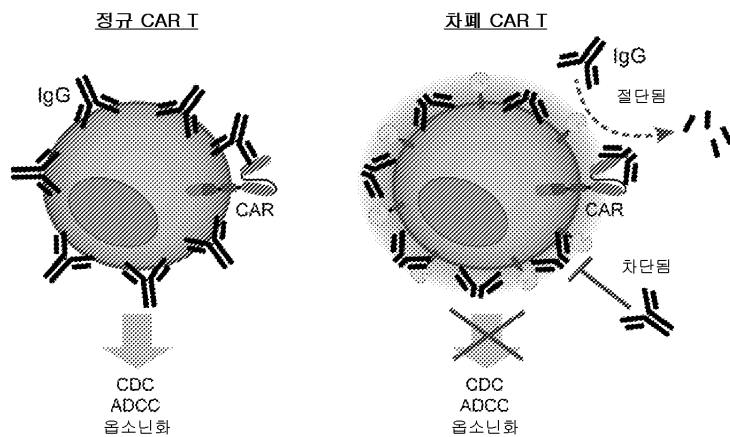
도면6



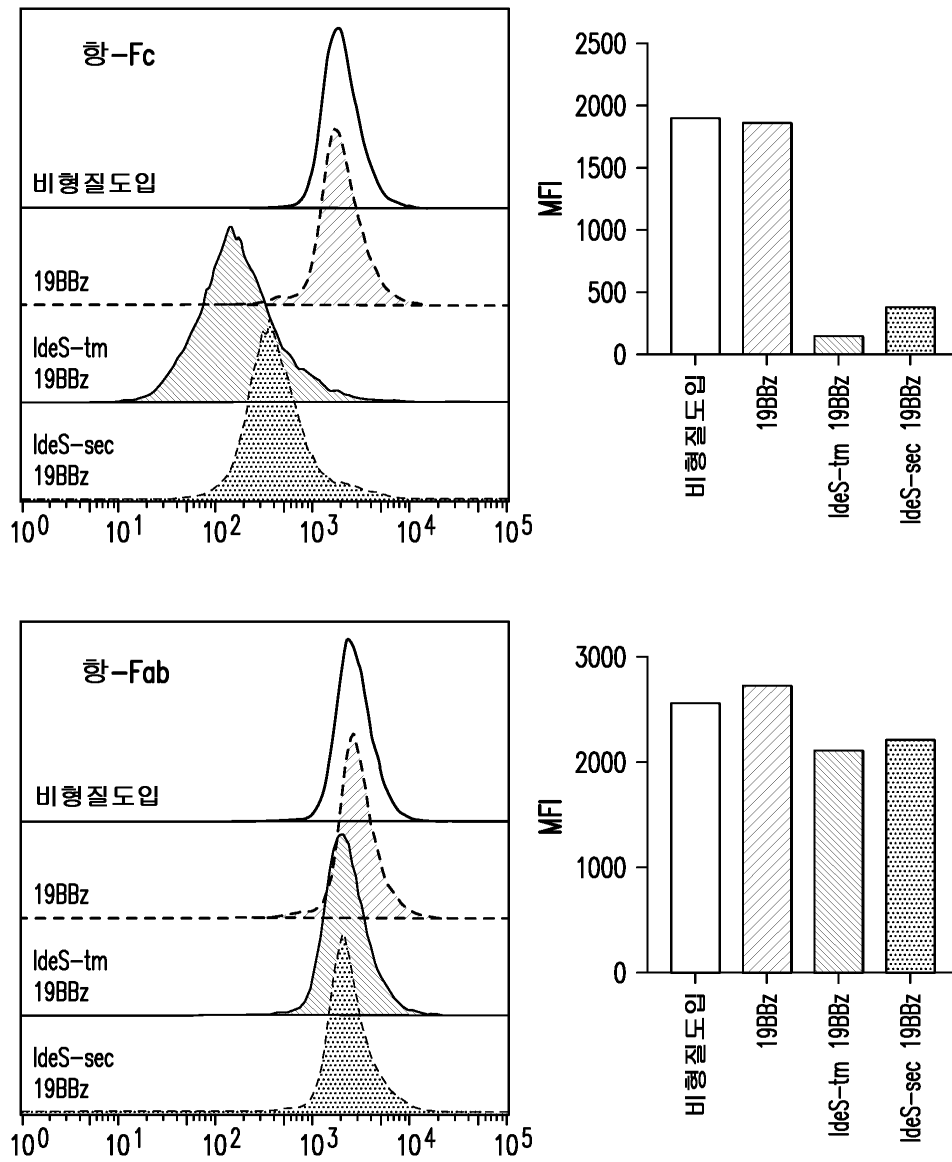
도면7



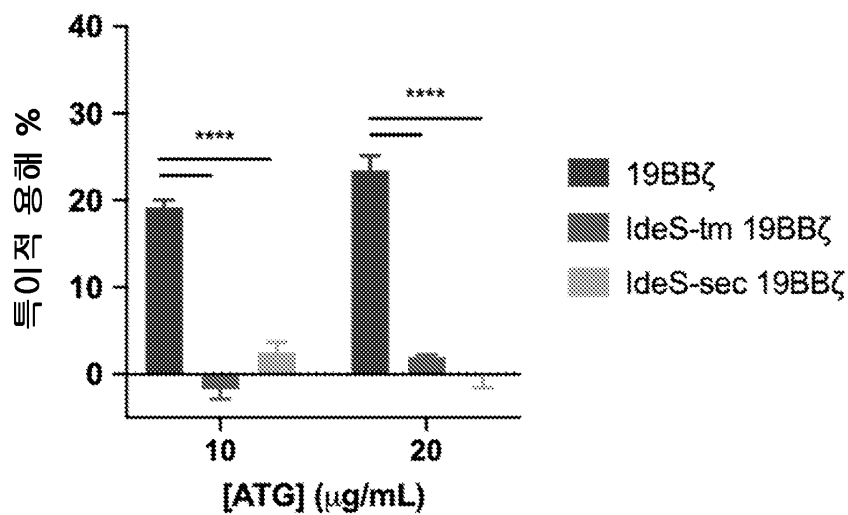
도면8



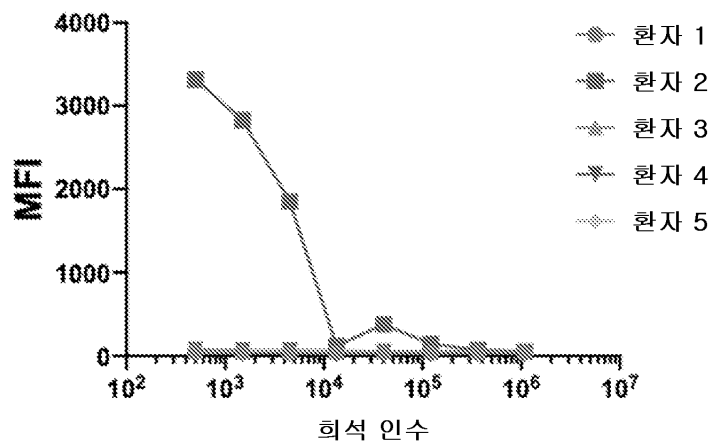
도면9



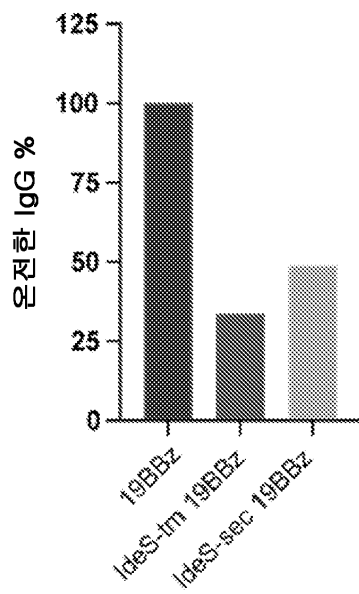
도면10



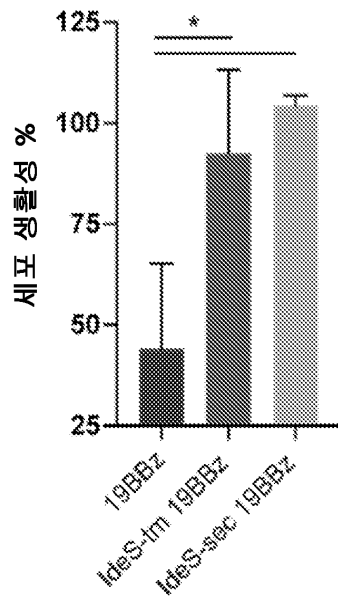
도면11a



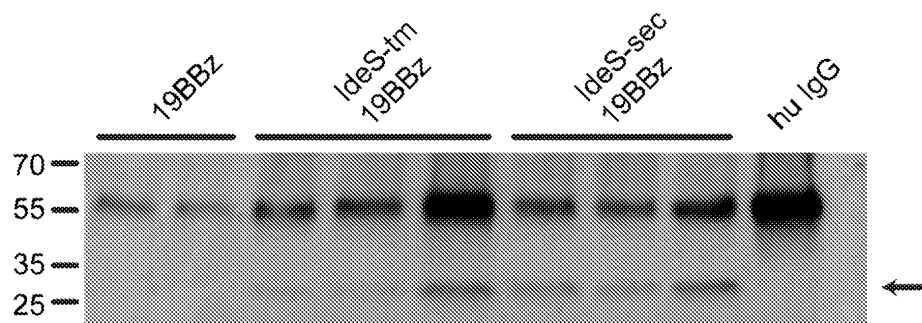
도면11b



도면11c



도면12



서열목록

- <110> MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER
Sloan-Kettering Institute For Cancer Research
Memorial Hospital For Cancer And Allied Diseases
- <120> CELLS FOR IMPROVED IMMUNOTHERAPY AND USES THEREOF
- <130> 2022-FPA-1263
- <150> US 62/881,467
- <151> 2019-08-01
- <160> 45
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 341
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IdeS amino acid sequence

<400> 1

Met Arg Lys Arg Cys Tyr Ser Thr Ser Ala Val Val Leu Ala Ala Val

1 5 10 15
Thr Leu Phe Ala Leu Ser Val Asp Arg Gly Val Ile Ala Asp Ser Phe

20 25 30
Ser Ala Asn Gln Glu Ile Arg Tyr Ser Glu Val Thr Pro Tyr His Val

35 40 45
Thr Ser Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Pro Ala Lys Phe Thr Gln

50 55 60
Gly Glu Asp Val Phe His Ala Pro Tyr Val Ala Asn Gln Gly Trp Tyr

65 70 75 80

Asp Ile Thr Lys Thr Phe Asn Gly Lys Asp Asp Leu Leu Cys Gly Ala
85 90 95

Ala Thr Ala Gly Asn Met Leu His Trp Trp Phe Asp Gln Asn Lys Glu
100 105 110

Lys Ile Glu Ala Tyr Leu Lys Lys His Pro Asp Lys Gln Lys Ile Met
115 120 125

Phe Gly Asp Gln Glu Leu Leu Asp Val Arg Lys Val Ile Asn Thr Lys
130 135 140

Gly Asp Gln Thr Asn Ser Glu Leu Phe Asn Tyr Phe Arg Asp Lys Ala

145 150 155 160
Phe Pro Gly Leu Ser Ala Arg Arg Ile Gly Val Met Pro Asp Leu Val

165 170 175
Leu Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Tyr Leu Asn Val Tyr Lys Thr Gln

180 185 190
Thr Thr Asp Val Asn Arg Thr Tyr Gln Glu Lys Asp Arg Arg Gly Gly

195 200 205
Ile Phe Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asp Gln Ser Lys Leu Leu Thr

210 215 220

Ser Arg His Asp Phe Lys Glu Lys Asn Leu Lys Glu Ile Ser Asp Leu

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

 290 295 300
 Ala Gly Lys Val Ala Ile Ser Ala Lys Glu Ile Lys Glu Asp Asn Ile
 305 310 315 320
 Gly Ala Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly Gln Asp Ser
 325 330 335
 Trp Asn Gln Thr Asn
 340

<210> 2

<211> 936

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: exemplary nucleic acid sequence encoding amino acids
 30 to 341 of SEQ ID NO: 1

<400> 2

gactctttta gtgccaatca agaaatccga tatagcgagg tgactcctta ccatgtaact	60
tctgtgtgga ccaagggagt taccacacca gccaaagtca cgcagggtga ggacgtat	120
cacgcaccgt acgtagctaa ccagggttgg tacgacatca ctaagacctt caatgggaaa	180
gacgatcttt tgtgtgggtgc cgcaacggcg ggcaacatgc tgcactggtg gttcgaccaa	240
aacaaggaga agatcgaagc gtacttgaag aaacaccag acaaacagaa aatcatgttt	300
ggagaccagg agctcctgga tgtgagaaaag gtaatcaaca ctaaagggtga ccaaacaac	360
agtgaacttt ttaactat	420
ggcgtaatgc ctgacctcgt gcttgacatg ttcacatg gatactatct caatgtatat	480
aagaccctaaa ccacagatgt taatcgaact tatcaggaga aggatagaag gggaggaata	540
tttgatgccg tttttactcg aggagaccag tctaagctct tgaccagcag gcacgacttc	600

aaagagaaga atcttaaaga aatatctgat ctcataaaga aggaactgac ggaaggcaaa 660
gcgctgggac tttcccatat gtatgccaat gtaagaatca atcatgtcat aaacctttgg 720
ggtgctgatt tcgattctaa tggaaatctt aaggctatat atgttactga ttccgactcc 780
aacgcgtcta ttggcatgaa aaaatacttc gtcgggggtga actcagcagg aaaggtcgca 840

atatctgcta aggaaattaa ggaagacaac ataggggcgc aagtgtctggg tctcttcacc 900
ctttccaccg gccaaagactc ctggaatcaa acaaat 936

<210> 3

<211> 71

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CD8 polypeptide

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn

65 70

<210> 4

<211> 213

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: exemplary nucleic acid sequence encoding the amino
acid of SEQ ID NO: 3

<400> 4

ccaactacta ctccgcacc gagaccgcc actcctgctc ccacgattgc ctcccaacct 60

cttagcttga gaccggaagc atgtcggcct gcggccggtg gcgcagtaca tactcgcggc 120

ctggactttg cgtgcgacat atacatttgg gcacccttgg ccggcacttg cggagtittg 180

ctgctgtctc tcgtgataac tctctattgt aac

213

<210> 5

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(20)

<223> human IL-2 signal peptide

<400> 5

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu

1 5 10 15

Val Thr Asn Ser

20

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(20)

<223> mouse IL-2 signal peptide

<400> 6

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

1 5 10 15

Leu Val Asn Ser

20

<210> 7

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(20)

<223> human kappa signal sequence

<400> 7

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly

20

<210> 8

<211> 20

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(20)

<223> mouse kappa signal sequence

<400> 8

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly

20

<210

> 9

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(21)

<223> human CD8 signal peptide

<400> 9

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro

20

<210> 10

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(18)

<223> truncated human CD8 signal peptide

<400> 10

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

1 5 10 15

His Ala

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(16)

<223> human albumin signal sequence

<400> 11

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Ser Ser Ala Tyr Ser

1 5 10 15

<210> 12

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(30)

<223> human prolactin signal sequence

<400> 12

Met Asp Ser Lys Gly Ser Ser Gln Lys Gly Ser Arg Leu Leu Leu Leu

1 5 10 15

Leu Val Val Ser Asn Leu Leu Leu Cys Gln Gly Val Val Ser

20 25 30

<210> 13

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CD8 signal sequence nucleic acid sequence encoding the

amino acid sequence of SEQ ID NO: 10

<400> 13

atggcccttc cggtagacggc gcttctctc cctttggcgc ttcttctgca cget

54

<210> 14

<211> 269

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(269)

<223> murine CD19 polypeptide

<400> 14

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

1 5 10 15

Val Leu Pro Cys Leu Pro Asp Ser Ser Pro Val Ser Ser Glu Lys Leu

20 25 30

Ala Trp Tyr Arg Gly Asn Gln Ser Thr Pro Phe Leu Glu Leu Ser Pro

35 40 45

Gly Ser Pro Gly Leu Gly Leu His Val Gly Ser Leu Gly Ile Leu Leu

50 55 60

Val Ile Val Asn Val Ser Asp His Met Gly Gly Phe Tyr Leu Cys Gln

65 70 75 80

Lys Arg Pro Pro Phe Lys Asp Ile Trp Gln Pro Ala Trp Thr Val Asn

85 90 95

Val Glu Asp Ser Gly Glu Met Phe Arg Trp Asn Ala Ser Asp Val Arg

100 105 110

Asp Leu Asp Cys Asp Leu Arg Asn Arg Ser Ser Gly Ser His Arg Ser

115 120 125

Thr Ser Gly Ser Gln Leu Tyr Val Trp Ala Lys Asp His Pro Lys Val

130 135 140

Trp Gly Thr Lys Pro Val Cys Ala Pro Arg Gly Ser Ser Leu Asn Gln

145 150 155 160

Ser Leu Ile Asn Gln Asp Leu Thr Val Ala Pro Gly Ser Thr Leu Trp

165 170 175
Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Val Pro Val Ala Lys Gly Ser Ile Ser
180 185 190

Trp Thr His Val His Pro Arg Arg Pro Asn Val Ser Leu Leu Ser Leu
195 200 205

Ser Leu Gly Gly Glu His Pro Val Arg Glu Met Trp Val Trp Gly Ser
210 215 220

Leu Leu Leu Leu Pro Gln Ala Thr Ala Leu Asp Glu Gly Thr Tyr Tyr
225 230 235 240

Cys Leu Arg Gly Asn Leu Thr Ile Glu Arg His Val Lys Val Ile Ala
245 250 255

Arg Ser Ala Val Trp Leu Trp Leu Leu Arg Thr Gly Gly

260 265

<210> 15

<211> 272

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(272)

<223> human CD19 polypeptide

<400> 15

Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp Asn Ala Val

1 5 10 15

Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln Gln Leu Thr

20 25 30

Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu Ser Leu Gly

35 40 45

Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile Trp Leu Phe

50 55 60

Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu Cys Gln Pro

65 70 75 80

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

85 90 95
 Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp Leu Gly Gly
 100 105 110

Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro Ser Ser Pro
 115 120 125

Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala Lys Asp Arg
 130 135 140

Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro Arg Asp Ser
 145 150 155 160

Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro Gly Ser Thr
 165 170 175

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

180 185 190
 Leu Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser Leu Leu Ser

195 200 205
 Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp Val Met Glu

210 215 220
 Thr Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala Gly Lys Tyr

225 230 235 240
 Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu Glu Ile Thr

245 250 255

Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly Gly Trp Lys
 260 265 270

<210> 16

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: VH extracellular antigen-binding domain of CAR

<400> 16

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

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

20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Gln Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 17
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: VL extracellular antigen-binding domain of CAR
 <400> 17
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Thr Tyr Arg Asn Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser
 65 70 75 80
 Lys Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr
 85 90 95

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

100 105

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: linker

<400> 18

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

1 5 10 15

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: VH CDR1

<400> 19

Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr

1 5

<210> 20

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: VH CDR2

<400> 20

Tyr Pro Gly Asp Gly Asp

1 5

<210> 21

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: VH CDR3

<400> 21

Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10
 <210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: VL CDR1
 <400> 22
 Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala

1 5 10
 <210> 23
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: VL CDR2
 <400> 23
 Ser Ala Thr Tyr Arg Asn Ser

1 5
 <210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: VL CDR3
 <400> 24
 Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr

1 5
 <210> 25
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: scFv

<400> 25
 Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Gln Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser
 130 135 140
 Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys
 145 150 155 160
 Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 165 170 175
 Pro Gly Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Ser Ala Thr Tyr Arg Asn
 180 185 190
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 195 200 205
 Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser Lys Asp Leu Ala Asp Tyr Phe
 210 215 220
 Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys
 225 230 235 240
 Leu Glu Ile Lys Arg
 245
 <210> 26
 <211> 735

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: nucleotide sequence encoding the amino acid sequence
of SEQ ID NO: 25

<400> 26

gaggtgaagc tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctgggtcctc agtgaagatt 60
tcctgcaagg ctcttggtta tgcattcagt agctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120

cctggacagg gtcttgagtg gattggacag atttattcctg gagatgggtga tactaactac 180
aatggaaagt tcaaggggtca agccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240
atgcagctca gcggcctaac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagaaagacc 300
attagtctgg tagtagattt ctactttgac tactggggcc aagggaccac ggtcacctgc 360
tcctcaggtg gaggtggatc aggtggaggt ggatctggtg gaggtggatc tgacattgag 420
ctcaccagct ctccaaaatt catgtccaca tcagtaggag acagggtcag cgtcacctgc 480
aaggccagtc agaattgtggg tactaatgta gcctgggtatc aacagaaacc aggacaatct 540

cctaaaccac tgattttactc ggcaacctac cggaacagtg gaggccctga tcgcttcaca 600
ggcagtggtt ctgggacaga ttctactctc accatcacta acgtgcagtc taaagacttg 660
gcagactatt tctgtcaaca atataacagg tatccgtaca cgtccggagg ggggaccaag 720
ctggagatca aacgg 735

<210> 27

<211> 235

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CD8 polypeptide

<400> 27

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

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

Ala Ser Pro Thr Phe Leu Leu Tyr Leu Ser Gln Asn Lys Pro Lys Ala
65 70 75 80

Ala Glu Gly Leu Asp Thr Gln Arg Phe Ser Gly Lys Arg Leu Gly Asp
85 90 95

Thr Phe Val Leu Thr Leu Ser Asp Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr
100 105 110

Tyr Phe Cys Ser Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe
115 120 125

Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg
130 135 140

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

145 150 155 160

Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly
165 170 175

Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr
180 185 190

Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His
195 200 205

Arg Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Lys Ser
210 215 220

Gly Asp Lys Pro Ser Leu Ser Ala Arg Tyr Val

225 230 235

<210> 28

<211> 213

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: exemplary nucleotide sequence encoding amino acids 137
to 207 of SEQ ID NO: 27

<400> 28

cccaccacga cgccagcgcc ggcaccacca accccggcgc ccacgatcgc gtcgcagccc 60

ctgtccctgc gccagagggc gtgccggcca gcggcggggg gcgcagtgca cagagggggg 120

ctggacttcg cctgtgatat ctacatctgg gcgcccctgg ccgggacttg tggggtcctt 180

ctcctgtcac tggttatcac cctttactgc aac 213

<210> 29

<211> 247

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(247)

<223> CD8 polypeptide

<400> 29

Met Ala Ser Pro Leu Thr Arg Phe Leu Ser Leu Asn Leu Leu Leu Met

1 5 10 15

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

20 25 30

Glu Leu Arg Ile Phe Pro Lys Lys Met Asp Ala Glu Leu Gly Gln Lys

35 40 45

Val Asp Leu Val Cys Glu Val Leu Gly Ser Val Ser Gln Gly Cys Ser

50 55 60

Trp Leu Phe Gln Asn Ser Ser Ser Lys Leu Pro Gln Pro Thr Phe Val

65 70 75 80

Val Tyr Met Ala Ser Ser His Asn Lys Ile Thr Trp Asp Glu Lys Leu

85 90 95

Asn Ser Ser Lys Leu Phe Ser Ala Val Arg Asp Thr Asn Asn Lys Tyr

100 105 110

Val Leu Thr Leu Asn Lys Phe Ser Lys Glu Asn Glu Gly Tyr Tyr Phe

115 120 125

Cys Ser Val Ile Ser Asn Ser Val Met Tyr Phe Ser Ser Val Val Pro

130 135 140

Val Leu Gln Lys Val Asn Ser Thr Thr Thr Lys Pro Val Leu Arg Thr

145 150 155 160

Pro Ser Pro Val His Pro Thr Gly Thr Ser Gln Pro Gln Arg Pro Glu

165 170 175

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

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

245

<210> 30

<211> 220

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(220)

<223> CD28 polypeptide

<400> 30

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Val Cys Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Tyr Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys

100 105 110

Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser
115 120 125

Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro
130 135 140

Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly
145 150 155 160

Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile
165 170 175

Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met
180 185 190

Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro

195 200 205
Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
210 215 220

<210> 31

<211> 164

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(164)

<223> CD3-zeta polypeptide

<400> 31

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 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

<210> 32

<211> 188

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(188)

<223> CD3-zeta polypeptide

<400> 32

Met Lys Trp Lys Val Ser Val Leu Ala Cys Ile Leu His Val Arg Phe
1 5 10 15

Pro Gly Ala 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 Ile Thr Ala
35 40 45

Leu Tyr Leu Arg Ala Lys Phe Ser Arg Ser Ala Glu Thr Ala Ala Asn
50 55 60

Leu Gln Asp Pro Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
65 70 75 80

Glu Glu Tyr Asp Val Leu Glu Lys Lys Arg Ala Arg Asp Pro Glu Met
85 90 95

Gly Gly Lys Gln Arg Arg Arg Asn Pro Gln Glu Gly Val Tyr Asn Ala
100 105 110
Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Thr Lys
115 120 125
Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Asp Ser
130 135 140
His Phe Gln Ala Val Gln Phe Gly Asn Arg Arg Glu Arg Glu Gly Ser
145 150 155 160
Glu Leu Thr Arg Thr Leu Gly Leu Arg Ala Arg Pro Lys Ala Cys Arg
165 170 175
His Lys Lys Pro Leu Ser Leu Pro Ala Ala Val Ser
180 185

<210> 33

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CD3-zeta polypeptide

<400> 33

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

50

55

<210> 34

<211> 174

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: exemplary nucleic acid sequence

<400> 34

agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc 60
tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttggacaa gagacgtggc 120
cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctg 174

<210> 35

<211> 255

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(255)

<223> 4-1BB polypeptide

<400> 35

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

1 5 10 15

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 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 Glu Gly Gly Cys Glu Leu
245 250 255

<210> 36
<211> 126
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic: exemplary nucleic acid sequence encoding amino acids

214 to 255 of SEQ ID NO: 35
<400> 36
aaacggggca gaaagaagct cctgtatata ttcaacaac catttatgag accagtacaa 60
actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt 120
gaactg 126
<210> 37
<211> 277
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(277)
<223> human OX40 has the amino acid sequence
<400> 37

Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
1 5 10 15
Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val

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

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

 145 150 155 160
 Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro
 165 170 175
 Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr
 180 185 190
 Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu
 195 200 205
 Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val
 210 215 220

 Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu
 225 230 235 240
 Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly
 245 250 255
 Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser
 260 265 270
 Thr Leu Ala Lys Ile

275

<210> 38

<211> 199

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(199)

<223> human ICOS

<400> 38

Met Lys Ser Gly Leu Trp Tyr Phe Phe Leu Phe Cys Leu Arg Ile Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile Leu Cys Lys Tyr Pro Asp Ile Val

35 40 45

Gln Gln Phe Lys Met Gln Leu Leu Lys Gly Gly Gln Ile Leu Cys Asp

50 55 60

Leu Thr Lys Thr Lys Gly Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Ser Leu

65 70 75 80

Lys Phe Cys His Ser Gln Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu

85 90 95

Tyr Asn Leu Asp His Ser His Ala Asn Tyr Tyr Phe Cys Asn Leu Ser

100 105 110

Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Lys Val Thr Leu Thr Gly Gly Tyr Leu

115 120 125

His Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Phe Trp Leu Pro

130 135 140

Ile Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys Ile Leu

145 150 155 160

Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro

165 170 175

Asn Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser

180 185 190
 Arg Leu Thr Asp Val Thr Leu
 195
 <210> 39
 <211>
 473
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: 19BBz
 <400> 39
 Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Gln Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser
 130 135 140
 Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys
 145 150 155 160
 Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 165 170 175
 Pro Gly Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Ser Ala Thr Tyr Arg Asn

180 185 190
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

195 200 205
Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser Lys Asp Leu Ala Asp Tyr Phe

210 215 220
Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys

225 230 235 240
Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg

245 250 255
Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg

260 265 270

Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly
275 280 285

Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr
290 295 300

Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn Lys
305 310 315 320

Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg
325 330 335

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

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

355 360 365
Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu

370 375 380
Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg

385 390 395 400
Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln

405 410 415

Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
420 425 430

Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp

435

440

445

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

450

455

460

Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

465

470

<210> 40

<211> 1419

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<

220><223> Synthetic: exemplary nucleic acid sequence encoding the amino acid sequence of SEQ ID NO: 39

<400> 40

gaggtgaagc tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctgggtcctc agtgaagatt 60
tcctgcaagg ctcttgcta tgcattcagt agctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120
cctggacagg gtcttgagtg gattggacag atttatcctg gagatggtga tactaactac 180
aatggaaagt tcaagggtca agccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240
atgcagctca gcggcctaac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagaaagacc 300

attagtctgg tagtagattt ctactttgac tactggggcc aagggaccac ggtcacctgc 360
tcctcaggtg gaggtggatc aggtggaggt ggatctggtg gaggtggatc tgacattgag 420
ctcaccagtc ctccaaaatt catgtccaca tcagtaggag acagggtcag cgtcacctgc 480
aaggccagtc agaattgtggg tactaatgta gcctgggtatc aacagaaaacc aggacaatct 540
cctaaaccac tgatttactc ggcaacctac cggaacagtg gaggccctga tcgcttcaca 600
ggcagtggtg ctgggacaga tttcactctc accatcacta acgtgcagtc taaagacttg 660
gcagactatt tctgtcaaca atataacagg tatccgtaca cgtccggagg ggggaccaag 720

ctggagatca aacgggcggc cgcacccacc acgacgccag cgccgcgacc accaaccctg 780
gcgcccacga tcgcgtcgca gccctgtcc ctgcgcccag aggcgtgccg gccagcggcg 840
gggggcgcag tgcacacgag ggggctggac ttgcctgtg atatctacat ctgggcgccc 900
ctggccggga ctgtgggggt ccttctcttg tcaactggtt tcacccttta ctgcaacaaa 960
cggggcgagaa agaagctcct gtatatattc aaacaacat ttatgagacc agtacaact 1020
actcaagagg aagatggctg tagctgccga tttccagaag aagaagaagg aggatgtgaa 1080

ctgagagtga agttcagcag gagcgcagac gccccgcgt accagcaggg ccagaaccag 1140

ctctataacg agctcaatct aggacgaaga gaggagtacg atgttttgga caagagacgt 1200

ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg agaaggaaga accctcagga aggcctgtac 1260

aatgaactgc agaaagataa gatggcggag gcctacagtg agattgggat gaaaggcgag 1320

cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt taccagggtc tcagtacagc caccaaggac 1380

acctacgacg cccttcacat gcaggccctg cccctcgc 1419

<210> 41

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: exemplary nucleic acid sequence encoding the amino

acid sequence of SEQ ID NO: 10

<400> 41

atggctctcc cagtgaactgc cctactgctt ccctagcgc ttctcctgca tgca 54

<210> 42

<211> 491

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 19BBz comprising the CD8 signal peptide

<400> 42

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu

50 55 60

Trp Ile Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110
Phe Cys Ala Arg Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp

115 120 125
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly

130 135 140
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr

145 150 155 160
Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val

165 170 175
Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln

180 185 190
Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Ser Ala Thr Tyr

195 200 205
Arg Asn Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr

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

225 230 235 240
Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr Ser Gly Gly Gly

245 250 255
Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Pro Thr Thr Thr Pro Ala

260 265 270
Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser

275 280 285
Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr

290 295 300
Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala

305 310 315 320

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

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

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

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

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

485 490

<210> 43

<211> 1473

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: exemplary nucleic acid sequence encoding the amino acid sequence of SEQ ID NO: 42

<400> 43

atggctctcc cagtgactgc cctactgctt ccctagcgc ttctcctgca tgcagaggtg 60

aagctgcagc agtctggggc tgagctgggt aggcctgggt cctcagtga gatttcctgc 120

aaggcttctg gctatgcatt cagtagctac tggatgaact gggatgaagca gaggcctgga 180

cagggtcttg agtggattgg acagatttat cctggagatg gtgatactaa ctacaatgga 240

aagttcaagg gtcaagccac actgactgca gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag 300

ctcagcggcc taacatctga ggactctgcg gtctatttct gtgcaagaaa gaccattagt 360

tcggtagtag atttctactt tgactactgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 420
ggtaggagtg gatcaggtag aggtggatct ggtggagtg gatctgacat tgagtcacc 480

cagtctccaa aattcatgtc cacatcagta ggagacaggg tcagcgtcac ctgcaaggcc 540
agtcagaatg tgggtactaa ttagcctgg tatcaacaga aaccaggaca atctcctaaa 600
ccactgattt actcggcaac ctaccggaac agtggagtcc ctgacgctt cacaggcagt 660
ggatctggga cagatttcac tctcaccatc actaacgtgc agtctaaaga cttggcagac 720
tatttctgtc aacaataaa caggtatccg tacacgtccg gaggggggac caagctggag 780
atcaaaggcg cgccgcacc caccacgacg ccagcgccgc gaccaccaac cccggcgccc 840
acgatcgct cgcagccct gtccctgcgc ccagaggcgt gccggccagc ggcggggggc 900

gcagtgcaca cgagggggct ggacttcgcc tgtgatctt acatctgggc gccctggcc 960
gggacttgtg gggctcttct cctgtcactg gttatcacc tttactgcaa caaacggggc 1020
agaaagaagc tctgtatat attcaaaca ccatctatga gaccagtaca aactactcaa 1080
gaggaagatg gctgtagctg ccgatttcca gaagaagaag aaggaggatg tgaactgaga 1140
gtgaagtcca gcaggagcgc agacgcccc gcgtaccagc agggccagaa ccagctctat 1200
aacgagctca atctaggacg aagagaggag tacgatgttt tggacaagag acgtggccgg 1260
gaccctgaga tggggggaaa gccgagaagg aagaaccctc aggaaggcct gtacaatgaa 1320

ctgcagaaag ataagatggc ggaggcctac agtgagattg ggatgaaagg cgagcgccgg 1380
aggggcaagg ggcacgatgg cctttaccag ggtctcagta cagccaccaa ggacacctac 1440
gacgcccctc acatgcaggc cctgccccct cgc 1473

<210> 44

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: P2A peptide

<400> 44

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

1 5 10 15

Pro Gly Pro

<210> 45

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: exemplary nucleotide sequence encoding the amino acid
sequence set forth in SEQ ID NO: 44

<400> 45

gctactaact tcagcctgct gaagcaggct ggagacgtgg aggagaaccc tggacct 57