



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년05월08일

(11) 등록번호 10-2804498

(24) 등록일자 2025년04월30일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/725 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01) *C07K 14/71* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/7051 (2013.01)
A61K 39/39558 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7018369
- (22) 출원일자(국제) 2015년12월03일
 심사청구일자 2020년12월03일
- (85) 번역문제출일자 2017년07월03일
- (65) 공개번호 10-2017-0087514
- (43) 공개일자 2017년07월28일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2015/063839
- (87) 국제공개번호 WO 2016/090190
 국제공개일자 2016년06월09일
- (30) 우선권주장
 62/087,224 2014년12월03일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
 JP2014507118 A*
 JP2017530694 A*
 Immunology Today 1994, 15(9), 432-436*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
 주노 셰러퓨티크스 인코퍼레이티드
 미국 워싱턴 98109 시애틀 스위트 1200 텍스터 애비뉴 노스 400
- (72) 발명자
 길버트, 마크, 제이.
 미국 워싱턴 98109 시애틀 스위트 300 웨스트레이크 애비뉴 노스 307
- (74) 대리인
 양영준, 이귀동

전체 청구항 수 : 총 60 항

심사관 : 이동욱

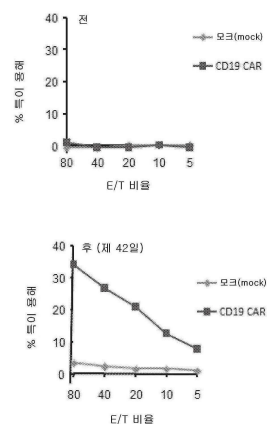
(54) 발명의 명칭 입양 세포 치료를 위한 방법 및 조성물

(57) 요약

본 발명에 따라 입양 세포 치료를 위한 세포의 다회 투여 방법, 및 선행 투여 받은 적이 있는 대상자에게 세포들을 투여하는 방법, 및 이들 방법에 사용되기 위한 조성물 및 제조 물질이 제공된다. 세포는 일반적으로 재조합 분자, 예컨대 재조합 수용체, 예컨대, 키메라 항원 수용체 (CARs) 및/또는 그 밖의 트랜스제닉 수용체를 발현한

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



다. 본 발명의 방법은 제1 또는 선행 수용체(들)을 발현하는 세포 및 제2 또는 후행 수용체를 발현하는 세포(들)을 투여하는 것을 포함하는 단계로서, 여기서 상기 제2 또는 후행 수용체(들)은 제1 수용체들과 구별되고, 일반적으로 제1 수용체를 발현하지 않는 것인 단계, 및/또는 제2 수용체를 발현하는 세포를 제1 투여를 받은 적이 있는 대상자에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 본 발명의 방법은 제1 또는 선행 수용체에 대한 대상자 내 면역 반응 관점에서 개선된 효능, 및/또는 제1 또는 선행 투여 후, 항원 손실, 하향조절 또는 변형 관점에서 다양한 장점을 제공할 수 있다.

(52) CPC특허분류

C07K 14/70521 (2013.01)

C07K 14/70578 (2013.01)

C07K 14/71 (2013.01)

C07K 16/2803 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2319/00 (2013.01)

C07K 2319/03 (2013.01)

C07K 2319/33 (2013.01)

C07K 2319/70 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

제1 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 세포로 이전에 치료받은 적이 있는 대상자의 B 세포 악성종양을 치료하기 위한, 제2 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 세포를 포함하는 조성물이며, 여기서

제1 CAR은 CD19에 특이적으로 결합하고;

제1 CAR과 구별되는 제2 CAR은 CD22에 특이적으로 결합하는 것인 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

제1 CAR은 B 세포 악성종양과 연관된 항원에 특이적으로 결합하고, 제2 CAR은 B 세포 악성종양과 연관된 상이한 항원과 특이적으로 결합하고,

제1 CAR은 CD19에 특이적으로 결합하고, 제2 CAR은 제1 CAR에 의해 결합된 항원과 구별되는 CD22에 결합하고; 및

제2 CAR은, 제1 CAR의 대응하는 영역과 아미노산 서열에 있어서 동일한 적어도 하나의 영역을 포함하는 것인 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

제1 CAR은 B 세포 악성종양과 연관된 항원에 특이적으로 결합하고;

제1 CAR과 구별되는 제2 CAR은 B 세포 악성종양과 연관된 상이한 항원과 특이적으로 결합하고;

제1 CAR은 CD19에 특이적으로 결합하고, 제2 CAR은 제1 CAR에 의해 결합된 항원과 구별되는 CD22에 결합하고;

조성물은 제1 CAR을 발현하는 세포의 투여 최소한 28일 후에 투여용인 것인 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

제1 CAR은 B 세포 악성종양과 연관된 항원에 특이적으로 결합하고;

제1 CAR과 구별되는 제2 CAR은 B 세포 악성종양과 연관된 상이한 항원과 특이적으로 결합하고;

제1 CAR은 CD19에 특이적으로 결합하고, 제2 CAR은 제1 CAR에 의해 결합된 항원과 구별되는 CD22에 결합하고;

B 세포 악성종양은 제1 CAR을 발현하는 세포의 투여 후 대상자에서 재발되었거나 지속되는 것인 조성물.

청구항 5

청구항 1, 2 및 4 중 어느 하나의 항에 있어서,

조성물은 제1 CAR을 발현하는 세포의 투여 최소한 28일 후에 투여용인 것인 조성물.

청구항 6

청구항 3에 있어서,

조성물은 제1 CAR을 발현하는 세포의 투여 최소한 35일, 최소한 42일, 최소한 49일, 및/또는 최소한 60일 후에 투여용인 것인 조성물.

청구항 7

청구항 1 내지 3 중 어느 하나의 항에 있어서,

B 세포 악성종양은 제1 CAR을 발현하는 세포의 투여 후 대상자에서 재발되었거나 지속되는 것인 조성물.

청구항 8

청구항 1, 3 및 4 중 어느 하나의 항에 있어서,

제2 CAR은 제1 CAR의 대응하는 영역과 아미노산 서열에 있어서 동일한 적어도 하나의 영역을 포함하는 것인 조성물.

청구항 9

청구항 1 내지 4 중 어느 하나의 항에 있어서,

대상자는 제1 CAR에 대해 특이적인 탐지가능한 체액성 및/또는 세포-매개형 면역 반응을 나타내는 것인 조성물.

청구항 10

청구항 1 내지 4 중 어느 하나의 항에 있어서,

상기 제1 CAR은 상기 제2 CAR에는 존재하지 않는 적어도 1개의 면역반응성 에피토프를 포함하는 것인 조성물.

청구항 11

청구항 10에 있어서,

상기 적어도 1개의 면역반응성 에피토프는 적어도 1개의 B 세포 에피토프를 포함하는 것인 조성물.

청구항 12

청구항 10에 있어서,

상기 적어도 1개의 면역반응성 에피토프는 적어도 1개의 T 세포 에피토프를 포함하는 것인 조성물.

청구항 13

청구항 1 내지 4 중 어느 하나의 항에 있어서,

상기 대상자는 사용 전 제2 CAR을 발현하는 세포의 투여량을 투여받은 적이 없는 것인 조성물.

청구항 14

청구항 1 내지 4 중 어느 하나의 항에 있어서,

제2 CAR은 scFv 항체 단편인 항원-결합 도메인을 함유하는 세포의 부분을 포함하는 것인 조성물.

청구항 15

청구항 1 내지 4 중 어느 하나의 항에 있어서,

제2 CAR은 CD3-제타(CD3ζ) 사슬의 제타 사슬의 세포질 시그널링 도메인을 포함하는 세포내 시그널링 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 16

청구항 14에 있어서,

항원-결합 도메인은 CD4, CD28, 또는 CD8로부터 유래된 막간 도메인과 연결되는 것인 조성물.

청구항 17

청구항 15에 있어서,

항원-결합 도메인은 CD4, CD28, 또는 CD8로부터 유래된 막간 도메인과 연결되는 것인 조성물.

청구항 18

청구항 16에 있어서,

막간 도메인은 CD8알파로부터 유래된 것인 조성물.

청구항 19

청구항 1 내지 4 중 어느 하나의 항에 있어서,

제2 CAR은,

T 세포 동시자극 분자의 세포내 도메인, 또는

T 세포 동시자극 분자로부터 유래된 세포내 도메인을 함유하고,

여기서 T 세포 동시자극 분자는 CD28 또는 4-1BB인 조성물.

청구항 20

청구항 1에 있어서,

서열에 있어서 동일한 적어도 하나의 영역은 세포내 동시자극 시그널링 도메인, 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM)-함유 도메인, 및 막간 도메인으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 21

청구항 1 내지 4 중 어느 하나의 항에 있어서,

제2 CAR을 발현하는 세포는 제1 CAR에 의해 특이적으로 결합된 상기 항원에 특이적으로 결합하는 수용체를 포함하지 않는 것인 조성물.

청구항 22

청구항 1 내지 4 중 어느 하나의 항에 있어서,

제2 CAR의 사용은 대상자에게 이것을 투여한지 30일 이내, 60일 이내 또는 90일 이내에는, 제2 CAR에 대한 탐지 가능한 체액성 또는 세포-매개형 면역 반응을 야기하지 않는 것인 조성물.

청구항 23

청구항 1 내지 4 중 어느 하나의 항에 있어서,

제2 CAR은 제1 CAR에 비해 아미노산 서열이 하나 이상 차이나는 것인 조성물.

청구항 24

청구항 23에 있어서,

상기 하나 이상의 차이는 제1 CAR을 발현하는 세포의 투여 후 대상자에서 그에 대해 검출가능한 면역 반응이 일어나는 제1 CAR의 영역과 비교시 적어도 하나의 아미노산 서열 차이를 포함하는 것인 조성물.

청구항 25

청구항 23에 있어서,

상기 하나 이상의 차이는 제1 CAR을 발현하는 세포의 투여 후 대상자에서 그에 대해 검출가능한 면역 반응이 일어나는 제1 CAR의 각 영역과 비교시 적어도 하나의 아미노산 서열 차이를 포함하는 것인 조성물.

청구항 26

청구항 24에 있어서,

상기 하나 이상의 차이는 제1 CAR을 발현하는 세포의 투여 후 대상자에서 그에 대해 검출가능한 면역 반응이 일어나는 제1 CAR의 각 영역과 비교시 적어도 하나의 아미노산 서열 차이를 포함하는 것인 조성물.

청구항 27

청구항 1 내지 4 중 어느 하나의 항에 있어서,

대상자는 제1 CAR에 대한 CAR-특이적 면역 반응이 그 대상자에서 탐지된 적이 있었던 대상자인 것인 조성물.

청구항 28

청구항 1 내지 4 중 어느 하나의 항에 있어서,

제1 CAR은 CD28 막간 도메인 또는 그의 기능성 부분 및 4-1BB 동시자극 시그널링 도메인 또는 그의 기능성 부분을 포함하고;

제2 CAR은 제1 CAR 내의 막간 도메인 및 동시자극 시그널링 도메인 중 하나 또는 두 가지 모두와 구별되는 막간 도메인 및 동시자극 시그널링 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 29

청구항 1 내지 4 중 어느 하나의 항에 있어서,

제1 CAR 및 제2 CAR 두 가지 모두는 CD28 막간 도메인 또는 그의 기능성 부분 및 4-1BB 동시자극 시그널링 도메인 또는 그의 기능성 부분을 포함하는 것인 조성물.

청구항 30

청구항 1 내지 4 중 어느 하나의 항에 있어서,

제2 CAR을 발현하는 세포를 포함하는 조성물은 대상자에서 B 세포 악성종양의 부담 경감에 충분한 양으로 상기 세포를 포함하는 것인 조성물.

청구항 31

청구항 1 내지 4 중 어느 하나의 항에 있어서,

제2 CAR을 발현하는 세포는 T 세포인 것인 조성물.

청구항 32

청구항 1 내지 4 중 어느 하나의 항에 있어서,

대상자는 제1 CAR에 의해 표적화된 항원의 하향조절 또는 변형 및/또는 항원 손실을 나타내는 것인 조성물.

청구항 33

청구항 1 내지 4 중 어느 하나의 항에 있어서,

제2 CAR을 발현하는 세포를 포함하는 조성물은 1×10^6 내지 1×10^8 개의 CAR-발현 T 세포, T 세포 또는 말초혈액단핵구 세포(PBMCs), 또는 2×10^6 내지 1×10^8 개의 CAR-발현 T 세포, T 세포 또는 말초혈액단핵구 세포(PBMCs)를 대상자에게 투여하기 위하여 제제화되는 것인 조성물.

청구항 34

청구항 1 내지 4 중 어느 하나의 항에 있어서,

제2 CAR을 발현하는 세포를 포함하는 조성물은 대상자의 체중 킬로그램당 1×10^6 개 초과인 CAR-발현 T 세포, T 세포 또는 PBMC, 또는 대상자의 체중 킬로그램당 3×10^6 내지 1×10^8 개의 그러한 세포들을 대상자에게 투여하기 위하여 제제화되는 것인 조성물.

청구항 35

청구항 1 내지 4 중 어느 하나의 항에 있어서,

적어도 1×10^2 개, 적어도 1×10^3 개, 적어도 1×10^4 개, 적어도 1×10^5 개, 적어도 1×10^6 개, 적어도 5×10^6 개, 적어도 1×10^7 개, 적어도 5×10^7 개 또는 적어도 1×10^8 개의 제2 CAR을 발현하는 세포, 및/또는 마이크로리터당 적어도 10개, 25개, 50개, 100개, 200개, 300개, 400개, 500개, 또는 1000개의 제2 CAR을 발현하는 세포가 대상자 또는 그의 유액, 조직 또는 구획, 또는 그의 질병 부위에서 검출가능하거나 존재하는 것인 조성물.

청구항 36

청구항 1 내지 4 중 어느 하나의 항에 있어서,

제2 CAR을 발현하는 세포의 수 또는 농도는, 조성물의 투여 후 적어도 20일, 적어도 40일, 또는 적어도 60일, 또는 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12개월, 또는 적어도 2 또는 3년 동안 대상자에서 검출가능한 것인 조성물.

청구항 37

청구항 1 내지 4 중 어느 하나의 항에 있어서,

치료는, 마이크로리터 당 적어도 10개의 CAR-발현 세포, 말초혈액단핵구 세포(PBMCs) 총 수의 적어도 50%, 적어도 1×10^5 개의 CAR-발현 세포, 또는 DNA 마이크로그램당 적어도 1,000개, 2,000개, 3,000개, 4,000개, 또는 5,000개 카피의 CAR-인코딩 DNA의, 인간 대상자의 혈액 내 최대 농도 또는 수의 CAR-발현 세포를 생성하고/거나;

제2 CAR을 발현하는 세포의 투여 개시후 제30일, 제60일 또는 제90일에, CAR-발현 세포가 대상자의 혈액 또는 혈청에서 탐지가능하고/거나;

제2 CAR을 발현하는 세포의 투여 개시후 제30일, 제60일 또는 제90일에, 대상자의 혈액은 적어도 20% CAR-발현 세포, 마이크로리터당 적어도 10개의 CAR-발현 세포 또는 적어도 1×10^4 개의 CAR-발현 세포를 포함하는 것인 조성물.

청구항 38

청구항 1 내지 4 중 어느 하나의 항에 있어서,

제1 CAR을 발현하는 세포는 T 세포인 것인 조성물.

청구항 39

청구항 31에 있어서,

T 세포는 대상자에 대해 자가(autologous)인 조성물.

청구항 40

대상자의 B 세포 악성종양을 치료하는 데 사용하기 위한, 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 조성물이며,

여기서 제1 항원 결합 도메인은 CD19에 결합하고, 제2 항원 결합 도메인은 CD22에 결합하고, 각 항원 결합 도메인은 T 세포에 의해 발현되는 키메라 항원 수용체(CAR)의 세포외 결합 도메인 내에 포함되고, CAR은 힌지 도메인, 막간 도메인, 4-1BB 동시자극 도메인 및 CD3-제타 세포내 시그널링 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 41

청구항 1 내지 4 및 40 중 어느 하나의 항에 있어서,

B 세포 악성종양은 백혈병인 조성물.

청구항 42

청구항 41에 있어서,
백혈병은 B 세포 급성 림프성 백혈병(ALL)인 조성물.

청구항 43

청구항 1 내지 4 및 40 중 어느 하나의 항에 있어서,
B 세포 악성종양은 림프종인 조성물.

청구항 44

청구항 1 내지 4 및 40 중 어느 하나의 항에 있어서,
조성물은 화학요법제와 조합하여 사용하기 위한 것인 조성물.

청구항 45

청구항 1 내지 4 및 40 중 어느 하나의 항에 있어서,
대상자는 인간인 조성물.

청구항 46

대상자의 B 세포 악성종양으로부터 발생하는 암을 치료하는 데 사용하기 위한, 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인 포함하는 조성물이며,

제1 항원 결합 도메인은 CD19에 결합하고, 제2 항원 결합 도메인은 CD22에 결합하고, 각각의 항원 결합 도메인은 T 세포에 의해 발현되는 키메라 항원 수용체(CAR)의 세포외 결합 도메인에 포함되고,

CAR은 힌지 도메인, 막간 도메인, 4-1BB 동시자극 도메인 및 CD3-제타 세포내 시그널링 도메인을 포함하고, 여기서 투여되는 총 세포 수는 (1) 체중 킬로그램당 2×10^5 내지 2×10^8 개의 세포 또는 (2) 2×10^6 내지 2×10^8 개의 총 CAR 발현 세포인, 조성물.

청구항 47

청구항 46에 있어서,

막간 도메인은 CD8알파, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, 또는 CD154로부터 유래되는 막간 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 48

청구항 46에 있어서,

막간 도메인은 CD8알파 또는 CD28로부터 유래되는 막간 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 49

청구항 46에 있어서,

힌지 영역은 면역글로불린, CD8, CD28, 또는 CD137의 힌지 영역 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 조성물.

청구항 50

청구항 49에 있어서,

힌지 영역은 IgG4의 힌지 영역을 포함하는 것인 조성물.

청구항 51

청구항 50에 있어서,

IgG4 힌지 도메인은 SEQ ID NO:1에 제시되는 것인 조성물.

청구항 52

청구항 49에 있어서,

힌지 영역은 CD8의 힌지 영역을 포함하는 것인 조성물.

청구항 53

청구항 46에 있어서,

B 세포 악성종양은 백혈병 또는 림프종인 조성물.

청구항 54

청구항 46에 있어서,

B 세포 악성종양은 비-호지킨 B-세포 림프종, 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL), 원발성 종격동 거대 B-세포 림프종(PMBCL), 외투세포 림프종(MCL), 여포성 림프종(FL), 만성 림프성 백혈병(CLL), 또는 작은 림프성 림프종(SLL)인 조성물.

청구항 55

청구항 46 내지 54 중 어느 하나의 항에 있어서,

대상자는 B 세포 악성종양에 대해 특이적으로 이전 치료법을 받았고, 상기 이전 치료법에 불응성(refractory)이거나 재발했거나 무반응(non-responsive)이었던 것인 조성물.

청구항 56

청구항 55에 있어서,

이전 치료법은 T 세포를 발현하는 CAR의 사전 투여를 포함하고, 여기서 이전 투여의 T 세포 내 CAR과 본 치료의 T 세포 내 CAR은 아미노산 서열에 있어서 동일한 적어도 하나의 영역을 갖는 것인 조성물.

청구항 57

청구항 56에 있어서,

서열에 있어서 동일한 적어도 하나의 영역은 막간 도메인, 4-1BB 동시자극 도메인, CD3-제타 세포내 시그널링 도메인, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 58

청구항 56에 있어서,

서열에 있어서 동일한 적어도 하나의 영역은,

- a) 막간 도메인 및 4-1BB 동시자극 도메인, 및
- b) 4-1BB 동시자극 도메인 및 CD3-제타 세포내 시그널링 도메인

으로부터 선택되는 2개의 인접한 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 59

대상자의 백혈병 또는 림프종을 치료하기 위한, 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인 포함하는 조성물이며,

여기서 제1 항원 결합 도메인은 CD19에 결합하고, 제2 항원 결합 도메인은 CD22에 결합하고, 각각의 항원 결합 도메인은 T 세포에 의해 발현되는 키메라 항원 수용체(CAR)의 세포외 결합 도메인에 포함되며,

제1 및 제2 CAR 양자 모두는 힌지 도메인, 막간 도메인, CD28 또는 4-1BB 동시자극 도메인 및 CD3-제타 세포내

시그널링 도메인을 포함하고;

투여되는 총 세포 수는 (1) 체중 킬로그램당 2×10^5 내지 2×10^8 개의 세포 또는 (2) 2×10^6 내지 2×10^8 개의 총 CAR 발현 세포인, 조성물.

청구항 60

청구항 59에 있어서,

백혈병 또는 림프종은 비-호지킨 B-세포 림프종, 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL), 원발성 종격동 거대 B-세포 림프종(PMBCL), 외투세포 림프종(MCL), 여포성 림프종(FL), 만성 림프성 백혈병(CLL), 또는 작은 림프성 림프종(SLL)인 조성물.

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 상호 참조

[0002] [0001] 이 출원은 "입양 세포 치료를 위한 방법 및 조성물"이라는 명칭의, 2014년 12월 3일자 미국 가특허출원 No. 62/087,224에 기초한 우선권 주장 출원으로, 상기 출원은 그 내용 전체가 본 발명에 참조 병합되었다.

[0003] 서열목록 참조 병합

[0004] [0002] 이 출원은 전자문서 형식의 서열목록(서열Listing)과 함께 출원된다. 서열목록의 명칭은 735042001240SeqList.txt이고, 크기는 65,266 바이트이며, 2015년 12월 3일에 생성되었다. 서열목록의 전자문서 형식의 정보는 그 내용 전체가 본 발명에 참조 통합된다.

[0005] 분야

[0006] [0003] 본 발명은 유전자 조작된(재조합) 수용체를 발현하는 세포를, 예컨대 복수회의 투여 단계를 통해 투여하거나 및/또는 선행 투여(prior administration)를 통해 이미 투여받은 대상자에게 투여하는 것과 같은 다회 투여(multiple dose)에 의한 입양 세포 치료법에 관한 것이다. 일반적으로, 어떤 상이한 투여 단계들과 관련되어 투여된 세포들은 상이한 수용체를 발현한다. 재조합 수용체에는 키메라 수용체, 예컨대, 키메라 항원 수용체(CARs), 및/또는 다른 트랜스제닉 수용체, 예컨대 트랜스제닉 T 세포 수용체(TCRs)가 포함될 수 있다. 본 발명 방법은 예컨대 질병-관련 항원을 표적화하는 수용체를 발현하는 투여된 세포에 대한 표적 대상자의 노출 증가에 따라, 개선된 효능을 갖는 등 다양한 장점을 제공한다. 1차 또는 선행 투여시 세포에 의해 발현된 것과는 다른 수용체를 발현하는 세포의 후속 투여가 효능을 증강시킬 수 있다. 예컨대, 이것은 특이적인 항-수용체 면역 반응을 일으킬 수 있는, 세포에 대한 노출 감소 위험을 최소화시키거나 및/또는 항원 손실 및/또는 1차 또는 선행 수용체에 의해 표적화된 항원 또는 에피토프의 하향조절 또는 변형의 경우 효과적인 표적화를 가능케할 수 있다.

배경 기술

[0007] 배경

[0008] [0004] 키메라 항원 수용체(CARs)와 같은 재조합 수용체를 발현하는 조작된 세포를 이용하는 입양 세포 치료법에는 다양한 방법이 이용가능하다. 예컨대 투여된 세포에 대한 대상자의 노출을 증가시키므로써, 예컨대 이러한 치료법의 효능을 개선하는 개선된 방법들이 요구되고 있다. 예컨대 투여된 세포의 확장(expansion) 및/또는 지속성을 향상시키고, 난치성 또는 재발된 대상자를 치료하는 능력을 제공하거나 및/또는 독성 또는 기타 원치 않는 결과가 얻어질 위험성을 감소시킬 수 있는 그러한 방법들이 요구되고 있다. 본 발명에 따라 이러한 요구사항을 충족하는 방법, 조성물 및 제조 물품이 제공된다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0009] 발명의 개요

[0010] [0005] 본 발명에 따라 예컨대 암 및 기타 질병, 병태 또는 장애 치료에 있어 입양 세포 치료와 같은, 대상자에게 세포를 투여하는 방법, 및 이러한 방법에 사용되기 위한 세포, 조성물 및 제조 물품이 제공된다. 세포는 일반적으로 하나 이상의 재조합 수용체, 예컨대 키메라 항원 수용체(CARs), 기타 항원 수용체, 및/또는 기타 키메라 수용체를 발현한다. 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법은 예컨대 투여된 세포의 확장 및/또는 지속성 개선에 의해, 투여된 세포에 대한 대상자 노출을 증가시키고, 난치성 또는 재발된 대상자 및/또는 표적화된 항원 또는 그의 에피토프의 손실, 하향조절 또는 변형을 나타내는 대상자를 치료하는 능력을 제공한다. 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법은 다른 세포 치료법에 비해 독성 또는 기타 원치 않는 결과가 일어날 위험성을 감소시켜준다.

[0011] [0006] 몇몇 구체예에서, 본 발명은 제1(또는 선행) 수용체, 예컨대 제1(또는 선행) CAR 또는 TCR을 발현하는 세포가 이전에 이미 투여된 바 있는 대상자에게 제2(또는 후행) 수용체, 예컨대 제2(또는 후행) 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 트랜스제닉 TCR을 발현하는 세포를, 대상자에게 투여함으로써 수행되는 치료방법을 제공한다.

여기서 제2 또는 후행 수용체는 일반적으로 제1 또는 선행 수용체와 다르다. 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법은 제2 또는 후행 수용체를 발현하는 세포를 투여하기에 앞서서 제1 또는 선행 수용체를 발현하는 세포를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 예컨대, 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법은 (a) 제1 또는 선행 수용체 (예컨대, 제1 또는 선행 CAR)를 발현하는 세포를 대상자에게 투여하고, 및 (b) 제1 또는 선행 수용체, 예컨대, CAR를 발현하는 세포를 대상자에게 투여하며; 및 (b) 제2 또는 후행 수용체, 예컨대, CAR을 발현하는 세포를 대상자에게 투여함으로써 수행된다.

- [0012] [0007] 몇몇 구체예에서, 제2 또는 후행 수용체, 예컨대, CAR을 발현하는 세포들은 제1 또는 선행 수용체, 예컨대, CAR을 발현하지 않는다. 몇몇 구체예에서, 제1(또는 선행) 및/또는 제2(또는 후행) 수용체는 CAR 또는 트랜스제닉 TCR과 같은 항원 수용체이다. 이러한 몇몇 구체예에서, 제1 또는 선행 수용체, 예컨대, CAR은 대상자에 있어서, 질병 또는 병태 또는 장애와 연관된 항원에 특이적으로 결합한다. 몇몇 구체예에서, 제1 또는 선행 수용체, 예컨대, CAR과 제2 또는 후행 수용체, 예컨대, CAR은 항원의 동일한 에피토프에 특이적으로 결합한다. 몇몇 구체예에서, 제1 또는 선행 수용체는 항원에 대한 결합을 놓고 제2 또는 후행 수용체와 결합하거나 또는 그 역이다. 몇몇 구체예에서, 제1 또는 선행 수용체 및 제2 또는 후행 수용체는 항원의 독특한 에피토프 또는 그의 일부에 특이적으로 결합한다.
- [0013] [0008] 몇몇 구체예에서, 제2 또는 후행 수용체는 대상자에서 질병 또는 병태 또는 장애와 연관된 상이한 항원에 특이적으로 결합한다. 예컨대, 몇몇 구체예에서, 제1 수용체에 의해 인식 또는 결합된 항원은 CD19이고, 제2 또는 후행 수용체에 의해 특이적으로 결합되거나 인식되는 항원은 CD22 또는 CD20처럼 CD19와는 구별되는, B-세포 특이적이거나 또는 B-세포와 관련된 항원 (또는 예컨대, B 세포 종양과 같은, B 세포 질병(들)과 연관되어 있거나 이에 특이적인 항원) 이다.
- [0014] [0009] 몇몇 구체예에서, 제2 또는 후행 수용체, 예컨대, CAR은 제1 또는 선행 수용체, 예컨대, CAR에 의해 특이적으로 결합된 항원에 특이적으로 결합하지 않는다. 몇몇 구체예에서, 제2 또는 후행 수용체를 발현하는 세포는 제1 또는 선행 수용체에 의해 특이적으로 결합된 항원에 특이적으로 결합하는 수용체를 포함하지 않는다.
- [0015] [0010] 몇몇 구체예에서, 제2 또는 후행 수용체를 발현하는 세포 투여시, 투여 전 및/또는 투여 직전에, 대상자는 제1 또는 선행 수용체에 특이적인, 검출가능한 체액성 및/또는 세포-매개형 면역 반응을 나타낸다. 몇몇 구체예에서, 대상자는 예컨대 (b)에서의 투여와 같이, 제2 또는 후행 수용체를 발현하는 세포 투여 약 30일 이내, 약 60일 이내 또는 약 90일 이내에, 제2 또는 후행 수용체, 예컨대, CAR에 대하여, 검출가능한 체액성 또는 세포-매개형 면역 반응을 나타내지 않는다.
- [0016] [0011] 몇몇 구체예에서는, 제2 또는 후행 수용체를 발현하는 세포의 투여시, 투여전 및/또는 투여 직전에, 질병 또는 병태가 대상자에 지속되거나; 및/또는 질병 또는 병태가 대상자에서 재발되어 있다.
- [0017] [0012] 몇몇 구체예에서, 제2 또는 후행 수용체를 발현하는 세포의 투여시, 투여전 및/또는 투여 직전에, 대상자는 제1 또는 선행 수용체에 의해 특이적으로 결합된 항원의 하향조절, 손실 또는 변형을 나타낸다.
- [0018] [0013] 몇몇 구체예에서, 제1 또는 선행 수용체를 발현하는 세포의 투여와 제2 또는 후행 수용체를 발현하는 세포의 투여 사이의 기간은 적어도 약 28일; 적어도 약 35일; 적어도 약 42일; 적어도 약 49일; 또는 적어도 약 60일이다. 몇몇 구체예에서, 이 기간은 적어도 약 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 또는 27일, 예컨대 적어도 14일 또는 적어도 21일이다.
- [0019] [0014] 몇몇 구체예에서, 제1 또는 선행 수용체, 예컨대, CAR은 제2 또는 후행 수용체, 예컨대, CAR에는 존재하지 않는 면역반응성 에피토프를 적어도 한 개 포함한다. 몇몇 구체예에서, 상기한 적어도 한 개의 면역반응성 에피토프는 체액성 면역 시스템에 의해 인식되는 적어도 한 개의 B 세포 에피토프 또는 에피토프를 포함하고; 및/또는 세포독성 및/또는 헬퍼 T 세포에 의해 인식되는 것과 같은, 세포-매개형 응답에 의해 인식되는 T 세포 에피토프 또는 에피토프를 적어도 한 개 포함한다.
- [0020] [0015] 몇몇 구체예에서, 대상자는 (a)에서의 투여 전에 제1 또는 선행 수용체를 발현하는 세포를 투여받은 적이 없고; 및/또는 (b)에서의 투여 전 또는 본 발명 개시 전에 제2 또는 선행 수용체를 발현하는 세포를 투여받은 적이 없는 대상자이다.
- [0021] [0016] 몇몇 구체예에서, 질병 또는 병태는 종양이다. 몇몇 구체예에서, 질병 또는 병태는 감염성 질병이거나 이것과 관련된 것이다. 몇몇 구체예에서, 질병 또는 병태는 자가면역 질병 또는 장애이거나 이것과 연관되어 있는 것이다.

- [0022] [0017] 제2 또는 후행 수용체, 예컨대, 제2 또는 후행 CAR은 일반적으로 제1 또는 선행 수용체, 예컨대, 제1 또는 선행 CAR과 비교시 아미노산 서열에서 하나 이상의 차이를 포함한다. 몇몇 구체예에서, 하나 이상의 차이는 단계 (a)에서의 투여 또는 제1 또는 선행 수용체, 예컨대, CAR을 발현하는 세포의 투여 후, 그에 대한 검출가능한 면역반응이 대상자에서 생성되는 제1 또는 선행 수용체, 예컨대, CAR의 영역과 비교시 적어도 하나의 아미노산 서열 차이를 포함한다. 몇몇 구체예에서, 이러한 하나 이상의 차이는 단계 (a)에서의 투여 또는 선행 통 후, 그에 대한 검출가능한 면역반응이 대상자에서 생성되는 제1 또는 선행 수용체의 각 영역과 비교시 적어도 하나의 아미노산 서열 차이를 포함한다. 몇몇 구체예에서, 이러한 면역 반응은 본 발명의 방법과 연계되어 탐지된다.
- [0023] [0018] 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법은 제2 또는 후행 수용체를 발현하는 세포의 투여 전 또는 단계 (b)에서의 투여 전에, 대상자에서 수용체-특이적, 예컨대, CAR-특이적인 면역 반응의 존재를 탐지하는 단계를 추가로 포함한다. 몇몇 구체예에서, 이러한 탐지는 대상자가 그에 대해 특이적인 면역 반응, 예컨대 특이적인 항체-또는 세포-매개형 면역 반응을 나타내는 제1 또는 선행 수용체, 예컨대, CAR의 적어도 하나의 영역을 동정하는 것을 포함한다.
- [0024] [0019] 몇몇 구체예에서, 제2 또는 후행 수용체, 예컨대, CAR은, 대상자에서의 면역 반응, 예컨대 대상자에서의 검출가능한 면역 반응이 그에 대하여 특이적인, 제1 또는 선행 수용체, 예컨대, CAR의 영역과 비교시 하나 이상의 아미노산 차이를 포함한다. 이러한 몇몇 구체예에서, 제1 또는 선행 수용체의 이러한 영역은 2개의 내인성 서열 또는 도메인 간의 정션(junction)이거나 정션을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 상기 영역은 scFv 부분, 링커 부분, 대상자로부터 유래하지 않는 아미노산 서열, 대상자와는 다른 종으로부터 유래된 서열, 및/또는 2개의 CAR 도메인 사이의 정션으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 CAR 부분에 포함된 영역이거나 이 영역을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 이 영역은 scFv 부분, 중쇄FR 서열, 중쇄 CDR 서열, 경쇄 FR 서열, 및/또는 경쇄 CDR 서열 내의 프레임워크 영역(FR)이거나 이 영역을 포함한다.
- [0025] [0020] 몇몇 구체예에서, 후행 또는 제2 수용체, 예컨대, CAR은 제1 또는 선행 수용체, 예컨대, CAR의 대응하는 영역과 아미노산 서열이 동일한 영역을 적어도 한 개 포함한다. 몇몇 구체예에서, 제1 또는 선행 수용체, 예컨대, CAR의 이러한 대응하는 영역은, 예컨대 제2 수용체를 발현하는 세포 투여전 또는 투여시, 대상자에 그에 대하여 탐지가능한 체액성 또는 세포-매개형 면역 반응을 나타내지 않는 영역이다. 몇몇 구체예에서, 이것은 내인성(endogenous) 서열이거나 이 서열을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 이것은 동시자극 도메인, ITAM-함유 도메인, 막간(transmembrane) 도메인, 형질도입 또는 발현 마커, 숙주 내인성 서열, 및/또는 숙주와 동일한 종으로부터 유래된 항체 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택된 CAR 부분 내의 영역이거나 이 영역을 포함한다.
- [0026] [0021] 몇몇 구체예에서, 이 방법은 다른 방법에 비해 세포에 대한 대상자의 노출을 증가 또는 향상시켜준다. 몇몇 구체예에서, CAR-발현 세포의 최대 개수, 제2 또는 후행 수용체를 발현하는 세포 투여 후 대상자에서 CAR-발현 세포가 탐지가능한 시간 및/또는 기간에 대한 CAR-발현 세포의 곡선하 면적 (AUC)은, 동일 시점에서 수행되거나 및/또는 아니면 후행 또는 제2 수용체를 발현하는 세포를 투여하는 제공된 방법, 예컨대, 단계 (b)에서의 투여와 동일한 조건에서 수행시, 제1 또는 선행 수용체를 발현하는 세포의 투여, 예컨대 단계 (a)에서의 투여, 및 제1 또는 선행 수용체를 발현하는 세포의 제2 투여 또는 후행 투여와 연관된 대안 투여 요법을 이용하는 방법으로 달성되는 것보다 더 크다.
- [0027] [0022] 몇몇 구체예에서, 이 방법은 대상자 혈액 내에 수용체-발현, 예컨대, CAR-발현 세포를 최대 농도 또는 최대 개수로, 즉, 상기 세포를 마이크로리터 당 적어도 또는 약 10개의 수용체-발현(예컨대, CAR-발현) 세포, 말초혈액단핵구 세포(PBMCs) 총 개수의 적어도 50%, 적어도 약 1×10^5 CAR-발현 세포, 또는 DNA 1 마이크로그램 당 적어도 1,000, 2,000, 3,000, 4,000, 또는 5,000 카피의 CAR-인코딩 DNA를 결과시킨다. 몇몇 구체예에서, 제2 또는 후행 수용체를 발현하는 세포 투여, 예컨대 단계 (b)의 투여 개시후 제30일, 제60일 또는 제90일에, 수용체-발현, 예컨대, CAR-발현 세포가 대상자의 혈액 또는 혈청에서 탐지가능하며; 및/또는 대상자의 혈액이 1 마이크로리터 당 적어도 20 % 수용체-발현 (예컨대, CAR-발현) 세포, 적어도 10 수용체-발현 (예컨대, CAR-발현) 세포를 함유하거나 또는 적어도 1×10^4 수용체-발현 (예컨대, CAR-발현) 세포를 함유한다.
- [0028] [0023] 몇몇 구체예에서, 전술한 구체예들은 어느 것이든 후속하는 다회 투여를 포함할 수 있다. 예컨대, 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법은 중복적인 양태로, 즉 추가의 후속적인 수용체를 각각 발현하는 세포들의 다회 투여를 포함하는 방식으로 수행된다(예컨대, 제1 또는 선행 수용체(들)과 각기 구별되는, 제3, 제4, 제5, 제6 및 그 이상의 수용체를 발현하는 세포들을 투여).

도면의 간단한 설명

- [0029] [0024] 도 1은 인간 대상자에서 항-CD19 CAR-발현 세포를 투여한 후 CAR-발현 세포에 특이적인 세포용해성 (cytolytic) 면역 반응 존재 여부를 탐지하는 예시적인 크롬 방출 분석법의 결과를 나타낸 도면이다. 이 결과는 CAR-발현 ("CD19-CAR") 및 비-CAR-발현 ("모크(Mock)") 존재 하에, CAR-발현 세포 주입 전 (좌측 패널) 및 주입 후 (우측 패널)로부터 유래된 말초혈액 단핵구 세포(PBMCs)를 함유하는 혼합-림프구 배양체에 대하여 나타난 것이다. "E/T"= 이펙터 대 표적 세포 비율.
- [0025] 도 2는 예시적인 인간 대상자에서 CAR의 특정 영역들을 나타내는 어떤 중복 펩타이드들에 대한 면역 반응을 확인하는 예시적인 ELISpot 분석 결과를 나타낸 도면이다. "pep" 표시가 붙은 숫자들은 CAR 서열 길이를 따라 나타나는 다양한 중복 펩타이드들로서, 대응하는 영역이 차트 위에 표시되어 있다.
- [0026] 도 3은 HLA-A2:01과의 결합에 대한 키메라 수용체의 예시적 영역의 펩타이드의 예상되는 결합 친화력에 대한 에피토프 친화력 맵을 나타낸 도면으로서,
- 아미노산 서열 CYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPF (SEQ ID NO: 6)을 갖는 예시적 정선 영역의 일련의 중복된 8mer 내지 14mer 펩타이드에 대한 것으로, 여기서 아미노산 잔기 1-15는 예시적인 CD28 막간 도메인에 대응하고, 잔기 16-30은 예시적인 4-1BB 동시자극 도메인에 대응한다. 이 도면은 또한 CD28 막간 도메인과 4-1BB 동시자극 도메인 사이에 삽입된 아스파라긴 잔기를 함유하는, 아미노산 서열 CYSLLVTVAFIIFWNNVKRGRKKLLYIFKQPF (SEQ ID NO: 13)을 갖는 변이체 정선 영역의 일련의 중복적인 8mer 내지 14mer 펩타이드의 예상된 결합 친화력도 나타낸다.
- [0027] 도 4A 및 도 4B는 각각 HLA 클래스 I 및 HLA 클래스 II 대립유전자에 대한 알고리즘-기반 T 세포 에피토프 예측을 나타낸 것으로, 세포모지단 내 개별적인 HLA 대립유전자 빈도에 따라 예상된 IC50이 50 nm 미만으로 칭량된 서열 길이에 따fms 각 위치를 포함하는 데이터 세트 내 서열의 총 개수를 나타낸다.
- [0028] 도 5는 일련의 변이체 펩타이드들의 HLA 클래스 I 및 HLA 클래스 II 대립유전자에 대한 알고리즘-기반 T 세포 에피토프 예측을 나타낸 도면이다. 실시예 2에 설명된 바에 따라 점수를 구하고 칭량하였다. 삼각형 및 점선은 클래스 I 칭량 점수를 나타낸다. 동그라미 및 실선은 클래스 II 칭량 점수를 나타낸다.
- [0029] 도 6은 SEQ ID NO: 5의 예시적인 CD28-4-1BB 서열의 아미노산 서열을 나타낸 도면이다. CD28 막간 도메인에 대응하는 아미노산에 실선 표시하고 화살표는 시점과 종점 위치를 나타낸다; 예시적인 4-1BB 동시자극 도메인의 아미노산은 쇄선으로 나타내었으며 화살표는 시점 및 종점 위치를 나타낸다; 예시적인 정선 영역의 아미노산은 쇄선 및 점선으로 나타내고 화살표는 시점과 종점 위치를 나타낸다. 정선 부위 바로 옆의 2개 플랭킹 아미노산에 박스 표시하였다. 몇몇 구체예에서 변형을 위해 표적화된 예시적인 아미노산, 예컨대 K28, R31, 및 L34를 굵은 문자로 표시하고 밑줄을 그었다. 4-1BB-매개형 TRAF-결합 및 시그널링에 관여할 수 있는 산성 잔기들의 영역에는 이중 밑줄을 그어 표시하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 상세한 설명
- [0031] I. 재조합 수용체를 발현하는 세포를 이용한 치료방법
- [0032] [0030] 본 발명에 따라 종양과 같은 다양한 질병 및 병태의 치료를 위한, 세포 요법에 사용하기 위한 방법, 조성물 및 제조 물품이 제공된다. 본 발명의 방법은 재조합 분자, 일반적으로는 질병 또는 병태와 연관된 분자를 인식 및/또는 특이적으로 결합하도록 설계되거나 및/또는 특정 치료 효과를 촉진하도록 설계된 재조합 수용체를 발현하는 유전자 조작 세포를 대상자에게 투여하는 것을 포함한다. 이러한 결합은 그러한 분자를 표적화하는 면역 반응과 같은 반응을 일으킬 수 있다. 재조합 수용체에는 키메라 수용체, 예컨대, 키메라 항원 수용체 (CARs), 및/또는 기타 트랜스제닉 수용체, 예컨대 트랜스제닉 T 세포 수용체 (TCRs)를 비롯한 트랜스제닉 항원 수용체가 포함될 수 있다.
- [0033] [0031] 구체적으로, 본 발명의 방법은 그러한 세포의 다회 투여 또는 그러한 세포가 선행 투여된 대상자에게 세포를 투여하는 것을 포함한다. 일반적으로, 제1 또는 선행 투여되는 (예컨대 제1 또는 선행 투여량으로) 세포들은 제2 또는 후행 투여(들) 또는 투여량(들)과 구별된다. 일반적으로, 이들 세포들은 적어도 부분적으로는 그들 특유의 재조합 분자, 예컨대 특유의 재조합 수용체에 의해 식별된다. 몇몇 구체예에서, 제2 또는 후행 투여되는 세포 또는 투여량은 제1 투여량 또는 투여되는 세포에 의해 발현되는 수용체는 발현하지 않는다. 몇몇 구체예에

서, 이러한 세포들은 제1 투여 또는 투여량과는 구별되는 수용체를 발현한다. 따라서, 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법은 제1 투여량이 투여된 대상자에게 제2 (및/또는 제3, 제4, 제5, 기타 등등) 투여량을 투여하는 것을 포함하거나 및/또는 대상자에게 제1 및 제2 (및/또는 제3, 제4, 제5, 기타 등등) 투여량을 투여하는 것을 포함하되, 여기서 제2 투여량으로 투여된 세포는 제1 투여량으로 투여된 세포에 의해 발현되는 수용체와는 다른 수용체를 발현하는 것이다. 이러한 방법은 반복 형식으로 수행될 수 있다.

[0032] 몇몇 측면에서, 제공된 구체예들은 대상자의, 재조합 수용체를 발현하는 투여된 세포들에 대한 노출 증가 (예컨대, 세포 개수 또는 경시적 기간 증가)가 입양 세포 치료의 효능 및 치료 결과를 향상시킬 수 있다는 관찰에 기초한 것이다. 복수회의 임상 시험에서, 여러가지 CD19-발현 암에 걸린 대상자들에게 서로 다른 여러가지 CD19-표적화 CAR-발현 T 세포들을 투여 후 수행된 이전의 분석 결과, CAR-발현 세포의 노출의 강도 및/또는 기간과 치료 결과 사이에 어떠한 상관관계가 있는 것으로 밝혀졌다.

[0033] 이러한 결과에는 심지어 위중하거나 유의한 종양 부하를 갖는 개체에서조차 환자의 생존 및 차도를 보이는 것이 포함된다. 그럼에도 불구하고, 노출은 투여된 세포에 의해 발현되는 재조합 수용체에 대한 숙주 면역 반응에 의해 세포들이 때 이르게 제거될 수 있음으로 인해 제한될 수 있다. 선천적이건 후천적이건 일단 이러한 숙주 면역 반응이 일어나면, 동일한 재조합 수용체를 발현하는 세포들의 후속 투여량을 투여함으로써 대상자를 재치료하는 것 또는 이에 대한 노출을 증가시키려는 시도는 효과적이거나 그럴듯한 접근 방법이 될 수 있다. 일단 이러한 면역 반응이 수용체에 대하여 발생하면, 동일한 수용체를 발현하는 세포들 또는 유사한 면역원성 에피토프를 갖는 세포들의 제2 투여 또는 후행 투여량 투여는, 세포들이 효과적인 또는 실질적인 정도로 확장 및/또는 지속할 기회를 가져보지도 못한채 이들 세포들을 급속히 제거하는 결과를 가져올 수 있다. 본 발명에 의해 이러한 과제를 해결하는 구체예들이 제공된다.

[0034] 몇몇 구체예에서, 제1 또는 선행 투여량에 의해 발현되는 제1 또는 선행 수용체와는 구별되는 제2 (및/또는 기타 후행) 수용체 (예컨대, CAR)를 발현하는 세포들의 제2 (및/또는 기타 후행) 투여량을 제공함으로써, 본 발명의 방법은 제1 또는 선행 수용체에 대한 숙주 면역 반응에 기인하는 노출 감소 문제를 해결해준다. 특히, 제2 또는 후행 투여량의 세포들은 제1 또는 선행 투여량의 세포들에 의해 발현되는 것과 동일한 수용체를 발현하지 않기 때문에, 제2 또는 후행 투여량의 세포에 존재하는 분자에 특이적인 면역 반응이 대상자에게서 일어날 위험성이 감소된다.

[0035] 몇몇 측면에서, 제공되는 구체예들은 면역요법, 예컨대 입양 세포 면역요법 관점에서 항원 손실, 돌연변이, 변형, 및/또는 하향조절의 관찰 결과에 기반한 것이다. 예컨대, CD19-음성 질병이 항-CD19 CAR-발현 T 세포들의 투여를 비롯하여, CD19-표적 요법이 시행된 어떤 환자들에서 관찰된 바 있다. 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법들은 항원 하향조절 또는 손실 또는 변형 측면에서 장점을 제공한다. 예컨대, 제1 또는 선행 수용체에 의해 표적화된 항원 또는 에피토프와는 상이한 항원에 특이적으로 결합하는 제2 또는 후행 수용체를 발현하는 세포를 투여 - 여기서 대상자는 이러한 에피토프 또는 항원의 손실 또는 변형을 경험하거나 나타냄 - 하면 질병 또는 병태를 지속적으로 치료할 수 있거나 및/또는 개선된 효능을 볼 수 있다. 몇몇 구체예에서 상이한 항원은 제1 항원이 특이적이거나 연관된 동일 질병 또는 병태와 연관되거나 그에 특이적인 또 다른 항원이다. 몇몇 구체예에서, 이것은 예컨대 치료적 개재 동안 또는 개재 후, 대상자에서 발현되는 스플라이스 변이체나 또는 돌연변이 버전과 같은 제1 항원의 변이체이다. 따라서, 본 발명에 따라 제공되는 방법들 및 조성물의 장점들에는 첫번째 치료적 접근을 덜 효과적으로 만드는, 항원 손실, 하향조절 또는 변형을 경험하는 대상자에서 지속적이고도 효과적인 치료법을 제공하는 능력이 포함된다.

[0036] 몇몇 구체예에서, 대상자는 예컨대 제2 또는 후행 투여시 또는 그 직전과 같이, 제1 또는 선행 투여 후 제1 또는 선행 수용체에 대한 면역 반응을 나타냄으로써 해서, 제1 수용체를 발현하는 세포의 추가 투여 또는 유사한 면역원성을 이용한 방법이 효과가 없을 수 있다. 몇몇 구체예에서, 대상자는 제2 수용체를 발현하는 세포의 투여 후, 제 2 수용체에 대한 면역 반응을 나타내지 않거나 또는 특정한 유형 또는 정도로 면역 반응을 나타내지 않거나, 또는 특정 기간 내, 예컨대 이들 세포 투여로부터 약 60일 이내에 그러한 반응을 나타내지 않는다. 이러한 유형의 면역 반응은 탐지가능한 면역 반응, 체액성 면역 반응, 및/또는 세포-매개형 면역 반응일 수 있다. 몇몇 구체예에서, 제1 또는 선행 투여 후 이러한 면역 반응의 존재 유무가 탐지되어, 제1 또는 선행 수용체와 대조되는 제2 또는 후행 수용체에 제시될 차이점을 설계하는데 정보를 줄 수 있다. 이러한 탐지는 대상자가 특이적인 면역 반응을 나타내는 제1 또는 다른 선행 수용체 (예컨대, CAR)의 적어도 일부 영역을 동정하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 동정된 영역은 제2 또는 그 밖의 후행 수용체, 예컨대 하나 이상의 영역에서 차이가 나는 제2 투여시 선택된 수용체에서 가변적일 수 있다.

- [0039] [0037] 특히, 제2 분자, 예컨대, 제2 수용체 (예컨대, 제2 CAR)는, 일반적으로 제1 수용체 (예컨대 제1 CAR)과는, 예컨대 아미노산 서열 및/또는 면역학적 에피토프(들) 측면에서 어느 정도 차이가 있다. 그러므로, 제1 또는 선행 수용체는, 세포가 투여된 대상자의 면역 시스템에 의해 인식될 수 있는, 적어도 하나의 B 세포 에피토프 및/또는 적어도 하나의 T 세포 에피토프와 같은, 일반적으로 제2 또는 후행 수용체에는 존재하지 않는 적어도 1개의 면역반응성 에피토프를 포함한다. 특정 구체예에서, 제2(또는 후행) 수용체, 예컨대, CAR은 제1 또는 선행 수용체와는 아미노산 서열이 하나 이상 차이가 난다.
- [0040] [0038] 이러한 차이들에는 예컨대 제1 또는 선행 수용체의 그러한 영역에 대응하는 제2 또는 후행 수용체의 영역에서의 차이와 같은, 제1 또는 선행 투여 후 대상자에서 그에 대한 탐지가능한 면역 반응이 나타나는 제1 또는 선행 수용체의 영역에 비해 적어도 하나의 차이가 포함된다. 차이(들)을 포함하는 영역에는 항원-결합 부분, 예컨대 scFv 부분이 포함될 수 있고, 여기에는 scFv 또는 가변 영역 부분 내의 프레임워크 영역(들) (FRs), 예컨대, VH, 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역 부분의 FR1, FR2, FR3, 링커 부분, 힌지 부분, 2개의 CAR 도메인 사이의 정션, 형질도입 또는 발현 마커, 및/또는 CAR 내 아미노산 서열로서 비-내인성인, 예컨대 숙주의 내인성 분자에 존재하는 서열과 동일하지 않은 아미노산 서열, 예컨대 키메라 수용체 또는 항체/항체 단편 내 2개의 내인성 서열들 간의 정션과 같이, 천연 세팅에서 단일 아미노산 서열에서 서로 자연적으로 관련되지 않은 2개의 도메인들 간의 정션 영역이 포함될 수 있다.
- [0041] [0039] 제1 또는 기타 선행 수용체와 비교할 때 제2 또는 기타 후행 수용체에 비록 하나 이상의 차이점이 존재하지만, 이들 수용체들은 예컨대 아미노산 서열이 동일한 영역과 같은 유사한 영역도 포함할 수 있다. 몇몇 구체예에서, 동일성 영역(들)은 제1 또는 선행 투여 후 대상자가 면역 반응을 나타내지 않거나 나타내지 않을 것 같은 영역들이다. 이러한 영역들은 동시자극 도메인, ITAM-함유 도메인, 막간 도메인, CDR, 및/또는 형질도입 또는 발현 마커 내의 영역들을 포함할 수 있다. scFv 및/또는 가변 영역이 수용체마다 다를 경우, 각각의 scFv 또는 가변 영역이 동일 중 (예컨대 마우스 또는 인간)으로부터 유래, 상이한 종으로부터 유래 및/또는 이들의 조합인 때문일 수 있다.
- [0042] [0040] 몇몇 구체예에서, 인지된 차이는 제2 투여량 또는 제2 투여의 경우에 비해 제1 투여량 또는 제1 투여의 세포 내 재조합 분자, 예컨대 수용체들 간의 차이, 또는 실질적이거나 기본적인 차이가 전부다. 몇몇 구체예에서, 수용체의 차이 및/또는 다른 인지된 차이 외에, 선행 및 후행 투여시 투여된 세포 및/또는 세포집단은 동일하거나, 또는 기본적으로 또는 실질적으로 동일하다. 몇몇 구체예에서, 하나 이상의 마커를 탐지가능한 표면 수준으로 발현하는 세포들의 비율은 후행 투여의 경우와 비교시 한 투여에서 동일 또는 유사하다. 몇몇 구체예에서, 상이한 투여량 또는 투여에서 세포집단 및/또는 하위 세포집단의 백분율은 동일하거나 실질적 또는 기본적으로 동일하다. 이들 상이한 투여량들은 T 세포, CD8+ 및/또는 CD4+ T 세포, 특정 계통 또는 활성화 상태 또는 경험에 따른 T 세포를 동일한 백분율로, 예컨대 이펙터, 나이브, 및/또는 기억 T 세포, 및/또는 이의 하위-집단, 예컨대 T_{CM}, T_{EM}, T_{SCM} 세포를 동일한 상대적 백분율로 함유하거나 및/또는 세포들은 동일한 대상자, 샘플, 조직 및/또는 유액 또는 구획(compartment),로부터 유래될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 예컨대 재조합 수용체를 인코딩하는 벡터를 이용한 형질도입에 의해, 제1 투여량의 세포를 유전자 조작하는데 이용된 동일한 세포 조성물의 다른 부분을 이용하여, 제2 투여용 세포를 조작한다. 몇몇 구체예에서, 조성물은 제2 투여 전에 예컨대 냉동보존법(cryopreservation)에 의해 보존된다.
- [0043] [0041] 몇몇 구체예에서, 투여량은 특정한 양 및/또는 특정한 시간 파라미터에 따라 투여된다. 몇몇 구체예에서, 제2 (또는 제3, 제4, 제5, 기타 등등) 수용체를 발현하는 세포의 제2 또는 기타 후행 투여량은 제1 또는 기타 선행 투여량 내의 수용체에 대한 면역 반응이 전개된 후, 전개될 기회가 주어진 후 및/또는 그러한 면역 반응이 탐지 또는 달리 확인된 연후에, 예컨대 제1 또는 기타 선행 투여로부터 약 또는 적어도 약 28일 또는 35일 후에 주어진다.
- [0044] [0042] 제1 또는 선행 투여 후 재발을 재치료하기 위해, 및/또는 표적 질병 또는 장애의 재발을 예방하기 위해, 및/또는 목적하는 항원과 연관된 질병 또는 병태를 표적화하는 재조합 수용체를 발현하는 세포에 대한 노출 감소를 해결 또는 방지하기 위해, 후행 투여를 이용할 수 있다. 예컨대, 몇몇 구체예에서 후행 투여량은 상기 세포의 지속성 또는 확장성의 감소 또는 대상자 또는 장기나 그의 체액 내 상기 세포의 총 개수 또는 상대적 개수의 감소가 탐지될 경우 또는 탐지된 후에 투여된다. 그러므로, 몇몇 구체예에서는 제1 투여량 또는 기타 선행 투여량과 제2 또는 기타 후행 투여량 사이의 시간에 이들 하나 이상의 파라미터들을 측정, 탐지 또는 평가하여, 후행 투여량을 투여할 시기 또는 투여 여부를 이러한 평가 결과에 기반하여 결정한다. 예컨대, 제2 투여량은 수용체-발현 세포의 개수 또는 농도가 목적하는 수준 미만이거나 또는 어떤 최대 백분율 또는 기타 측정 농도나

개수 미만으로 저하되는 시점에서 투여될 수 있다.

[0043] 재조합 수용체, 예컨대, CARs 또는 트랜스제닉 TCRs은 일반적으로 대상자 및/또는 그의 세포(들) 또는 조직(들) 내의 질병 또는 병태에 의해 발현되거나, 관련되거나 및/또는 그에 특이적인 하나 이상의 항원에 특이적으로 결합한다. 이러한 질병에는 종양, 암, 기타 증식성 질환, 자가면역 질환, 또는 장애, 및/또는 감염 물질 또는 질병이 포함될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 제1(또는 기타 선행) 및 제2(또는 기타 후행) 수용체들은 비록 상이하지만, 그와 같은 동일한 항원에 특이적으로 결합한다. 결합은 유사 또는 동일한 에피토프에 대한 것일 수 있다. 몇몇 구체예에서, 항원에 대한 하나의 수용체의 결합은 그 항원에 대한 다른 수용체의 결합과 경쟁한다. 몇몇 구체예에서 결합은 다른 수용체의 그것과 경쟁하지 않는, 전적으로 상이한 에피토프에 대한 것이거나 및/또는 완전히 다른 항원에 대한 것이다. 이와 관련해서, 몇몇 구체예의 방법들은, 대상자의 질병 또는 병태가 특정 에피토프 또는 항원을 표적화하는 치료에 내성이 생겨, 예컨대 그 질병 또는 병태 또는 그의 세포에 의한 표적 하향조절 또는 돌연변이가 야기되거나, 및/또는 항원 손실이 일어날 경우 그 대상자를 치료하는데 유용할 수 있다. 예컨대, 몇몇 구체예에서, 제1 수용체에 의해 인식 또는 결합되는 항원은 CD19이고 제2 또는 후행 수용체에 의해 특이적으로 결합 또는 인식되는 항원은 CD22 또는 CD20처럼 CD19와는 다른, B-세포 특이적 또는 B-세포 관련 항원 (또는 예컨대, B 세포 종양처럼 B 세포 질병(들)과 관련이 있거나 특이적인 항원)이다.

[0044] 그러므로, 유사한 그러나 구별되는 질병-관련 에피토프 또는 항원을 표적화하는 능력의 제공에 의해, 몇몇 구체예의 방법들은 대상자 내의 유전자 조작된 세포의 전반적인 지속성의 증가를 통한 것 뿐만 아니라, 심지어 본래의 표적의 하향조절 또는 돌연변이 맥락에서 세포 및/또는 치료 형태가 기능하도록 함으로써, 그 효능을 증강시킨다. 몇몇 구체예에서, 제2 수용체는 동일 질병의 동일한 항원과 상이한 항원에 결합하고 및/또는 세포는 각기 서로 다른 항원이나 에피토프에 결합하는 복수개의 수용체를 함유하되, 여기서 상기 항원이나 에피토프 중 하나 이상은 제1 수용체에 의해 인식되 것과 구별되거나 동일한 것일 수 있다. 몇몇 구체예에서, 제2 또는 후행 수용체는 제1 수용체에 의해 인식되는 항원의 변이체, 예컨대 상이한 스플라이스 변이체 또는 변형된 버전 에 결합한다.

[0045] 몇몇 구체예에서, 상이한 수용체들은 동일한 종에 기원하는 서열을 갖는 도메인(들) (예컨대 항원-결합 도메인, 예컨대, sFvs, 및/또는 또는 키메라 수용체의 기타 도메인, 예컨대, 기타 CAR 도메인)을 갖거나 및/또는 상이한 종에 기원하는 서열을 갖는 도메인(들)을 갖는다. 예컨대, 몇몇 구체예에서, 상이한 수용체들은 동일한 종으로부터 유래한 2개의 구별되는 결합 도메인들, 예컨대 2마리 마우스로부터 유래된 scFv 도메인들 또는 각각 FMC63 및 SJ25C1로부터 유래된 것들과 같은, 마우스로부터 유래된 프레임워크 영역 (FR) 서열을 갖는 2개의 scFv 도메인들을 함유한다. 또 다른 구체예에서, 상이한 수용체들은 서로 다른 종으로부터 유래된 동일 또는 상이한 항원들에 대한 2 개의 구별되는 결합 도메인을 함유하며, 예컨대 제1 수용체는 쥐의 서열로부터 유래된 FMC63 또는 SJ25C1과 같은 scFv 또는 기타 결합 도메인을 갖고, 또 다른 수용체는 전체적으로 또는 부분적으로 인간과 같은 다른 종으로부터 유래하는 도메인, 또는 동일한 항원, 예컨대 동일하거나 상이한 에피토프에 결합하거나 또는 상이한 항원에 결합하는 것과 같은 인간화 서열을 갖는다.

[0046] 몇몇 구체예에서, 수용체는 항원 수용체 이외의 수용체, 한 쌍의 결합 파트너 및/또는 그의 변이체 중 하나로서, 그의 또 다른 파트너는 예컨대 질병 또는 병태 또는 그의 세포 또는 조직 맥락에서 특이적으로 발현되거나 및/또는 그의 발현이 질병 또는 병태와 관련된 것이다. 몇몇 구체예에서, 이러한 수용체는 키메라 수용체이다. 몇몇 구체예에서, 이러한 키메라 수용체는 그러한 결합 파트너와 특이적으로 상호작용하고 예컨대 면역 자극 시그널 또는 시그널들을 증강시킬 수 있는 막간 및/또는 세포내 시그널링 도메인(들), 예컨대 어떤 키메라 항원 수용체에 존재하는 것과 같은 활성화 및/또는 동시자극 도메인을 함유하는 세포외 결합 부분을 함유한다.

[0047] 몇몇 구체예에서, 제공된 방법은 조작된 세포를 제1, 제2, 제3 및/또는 그 이상 부가적으로 후속 투여하는 것을 포함하는, 대상자 내 질병 또는 장애의 장기간 또는 지속적인 치료 또는 관리를 위한 것으로, 여기서 이러한 투여량 중 하나 이상은, 예컨대 동일 또는 상이한 에피토프(들)에서, 동일 또는 상이한 질병-특이적 또는 질병-관련 항원을 표적화하는 상이한 수용체와 같은, 다른 투여량(들)의 그것과는 구별되는 재조합 수용체를 발현하지만, 대상자 내 동일한 질병 또는 병태를 표적화하는 세포를 포함하는 것이다. 몇몇 구체예에서 장기간 또는 만성 치료 또는 관리는 반복적 프로세스로서, 면역원성 및/또는 세포의 노출, 존재, 지속성, 개수 및/또는 백분율의 저하에 대해 대상자를 모니터링하고, 제1 또는 선행 수용체 또는 세포와 관련하여 특정한 효능 손실 또는 그러한 위험성이 감지될 경우 감지될 때 다음의 후행 투여(예컨대 다음 후행 수용체)를 도입한다. 몇몇 구체예에서, 각각의 후행 투여는 선행 투여량 내 세포에 대한 감소된 노출, 지속성, 확장, 대상자에 특이적인 면역 반응, 표적 항원 하향조절 또는 변화 및/또는 재발, 내성 등 효능 감소 위험성 표시자가 하나 이상 탐지될

경우 개시된다.

[0050] 제2 키메라 수용체를 이용한 예시적인 투여 방법

[0048] 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법은 제1 키메라 수용체에 대해 면역 반응이 일어났거나 및/또는 면역원성이 될 확률이 있는 대상자에게 제2 키메라 수용체를 투여하는 것을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 제1 키메라 수용체는 면역원성인 제1 및 제2 도메인의 정선 영역을 함유한다. 몇몇 구체예에서, 면역원성 영역은 하나 이상의 펩타이드 에피토프들 (T 세포 에피토프라고도 칭함)을 포함한다. 몇몇 경우에서, 2개의 도메인들의 정선에 걸친 잠재적인 펩타이드 에피토프들을 함유하는 정선 영역은 면역원성일 수 있고 정선 영역을 함유하는 키메라 수용체를 대상자에게 투여시 면역 반응이 생성될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 정선 영역은 키메라 수용체의 제1 도메인과 제2 도메인을 연결하는 정선의 C-말단에 약 8 내지 24 아미노산 (예컨대 8 내지 15 아미노산 또는 8 내지 13 아미노산, 예컨대 약 또는 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 그 이상의 아미노산)의 인접 서열의 각기 중복적인 펩타이드 단편들을 직접 포함하거나 및/또는 약 8 내지 24 아미노산 (예컨대 8 내지 15 아미노산 또는 8 내지 13 아미노산, 예컨대 약 또는 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 그 이상의 아미노산)을 정선의 N-말단에 포함할 수 있으며, 상기 펩타이드 단편들은 각각 2개 도메인의 정선을 포함하거나 또는 그에 걸친 것이다. 따라서, 몇몇 경우, 정선 영역은 HLA 분자에 대해 결합 친화력을 나타내고 및/또는 면역 반응을 유도할 수 있는 잠재적인 펩타이드 에피토프들을 복수개 함유할 수 있다.

[0049] 몇몇 구체예에서, 키메라 수용체의 정선 영역과 같은 면역원성 영역이 동정될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 면역원성 영역은 MHC 분자에 대한 그의 결합능 또는 특정 조건 하에서 면역 반응을 이끌어내는 그의 능력에 의해 동정될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 키메라 수용체의 중복 펩타이드, 예컨대 중복되는 8mer 내지 20 mer 펩타이드들, 예컨대 9mers, 10mers, 11mers, 12mers, 13mers, 14mers 또는 15mers를 후술하는 것과 같은 알고리즘 또는 기타 컴퓨터 방법을 이용하여 MHC 결합에 대해 평가할 수 있다. 몇몇 구체예에서, 키메라 수용체가 면역원성인지를, 이것이 투여된 대상자, 예컨대 키메라 수용체(예를 들어 CAR)에 의해 유전자 조작된 세포가 투여된 대상자에서의 면역 반응을 평가함으로써 평가할 수 있다. 면역반응의 예시적인 평가방법을 이하에 설명하였다.

[0050] 몇몇 구체예에서, 적어도 하나의 펩타이드 에피토프는 세포 머시너리에 의해 프로세싱되는 펩타이드들을 비롯하여, 폴리펩타이드의 펩타이드 단편들과 몇몇 경우 복합체를 형성할 수 있는, 폴리모र्फ 펩타이드 결합 자리 또는 결합 그루브를 함유하는 분자들인, 클래스 I 또는 클래스 II 단백질과 같은 주요 조직적합성 복합체 (MHC) 분자에 결합할 수 있다. 몇몇 구체예에서, 펩타이드 에피토프는 인간 MHC 분자인 MHC 분자에 결합할 수 있다. 몇몇 구체예에서, MHC 분자는 인간 백혈구 항원 (HLA) 분자이다. 몇몇 구체예에서, 적어도 하나의 펩타이드 에피토프는 HLA 분자, 예컨대 HLA 클래스 I 분자 또는 n HLA 클래스 II 분자에 대한 결합 친화력 (예컨대 IC50)을 나타낸다. 몇몇 구체예에서, 레퍼런스 키메라 수용체의 정선 영역은 1000 nM 미만, 500 nM 미만 또는 50 nM 미만의 결합 친화력을 나타내는 펩타이드 에피토프를 함유한다.

[0051] 몇몇 구체예에서, 레퍼런스 키메라 수용체의 정선 영역의 적어도 하나 이상의 펩타이드 에피토프들은 MHC 클래스 II 에피토프이다. 몇몇 구체예에서, MHC 클래스 II 분자에 결합하는 펩타이드들은 길이가 8 내지 20 아미노산, 예컨대 10 내지 17 아미노산일 수 있다. 몇몇 구체예에서, MHC 클래스 II 분자에 결합할 수 있는 펩타이드는 20 아미노산을 초과하는 길이일 수 있다. 몇몇 구체예에서, 펩타이드는 MHC II 펩타이드-결합 그루브를 따라 연장된 배열을 취한다. 몇몇 구체예에서, MHC II 펩타이드-결합 그루브는 양 말단이 열려 있다. 몇몇 구체예에서, 펩타이드는 펩타이드-결합 그루브를 대는 보존 잔기들과의 주쇄 원자 접촉에 의해 적어도 부분적으로 그 자리를 유지한다. 몇몇 구체예에서, MHC 클래스 II 대립유전자는 인간 대상자와 같은 대상자 내에서 존재하는 것으로 알려진 여하한 것일 수 있다. 몇몇 구체예에서, MHC 대립유전자는 DR1, DR3, DR4, DR7, DR52, DQ1, DQ2, DQ4, DQ8 및 DP1일 수 있으나 이들로 한정되지 않는다. 몇몇 구체예에서, MHC 클래스 II 대립유전자는 표 1B에 제시된 여하한 세트일 수 있다. 몇몇 구체예에서, MHC 클래스 II 대립유전자는 HLA-DRB1*0101, HLA-DRB*0301, HLA-DRB*0701, HLA-DRB*0401 HLA-DQB1*0201이다.

[0052] 몇몇 구체예에서, 레퍼런스 키메라 수용체의 정선 영역의 적어도 1개의 펩타이드 에피토프는 MHC 클래스 I 에피토프이다. 몇몇 구체예에서, MHC 클래스 I 분자에 결합하는 펩타이드는 7 내지 15 아미노산 길이이다. 몇몇 구체예에서, MHC 클래스 I 분자에 결합하는 펩타이드는 8 내지 13 아미노산 길이일 수 있다. 몇몇 구체예에서, 펩타이드의 결합은 모든 MHC 클래스 I 분자들의 펩타이드-결합 그루브 내 불변부 및 펩타이드의 주쇄 내 원자들 사이의 접촉에 의해 그의 양 말단에서 안정화된다. 몇몇 구체예에서, 펩타이드의 아미노 및 카복시 말단에 결합하는 그루브의 양 말단에 불변부가 있다. 몇몇 구체예에서, 펩타이드 길이의 변화는 펩타이드 골격 내킹

크(kink)에 의해 수용될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 키크는 유연성을 부여할 수 있는, 프롤린 또는 글리신 잔기를 포함한다. 몇몇 구체예에서, MHC 클래스 I 대립유전자는 인간 대상자와 같은 대상자에서 존재하는 것으로 알려진 어느 것이든 무방하다. 몇몇 구체예에서, MHC 클래스 I 대립유전자는 HLA-A2, HLA-A1, HLA-A3, HLA-A24, HLA-A28, HLA-A31, HLA-A33, HLA-A34, HLA-B7, HLA-B45 또는 HLA-Cw8 대립유전자이다. 몇몇 구체예에서, MHC 클래스 I 대립유전자는 가장 흔한 MHC 클래스 I 대립유전자가 수록되어 있는 하기 표 1A에 제시된 여하한 것일 수 있다 (Solberg et al., (2008) *Hum Immunol.* 2008 Jul; 69(7):443-6). 몇몇 구체예에서, HLA 클래스 I 대립유전자는 HLA-A*02:01, HLA-A*03:01, HLA-A*11:01 또는 HLA-B*08:01이다.

[0056] [0053] 몇몇 구체예에서, MHC 클래스 I 대립유전자는 HLA-A2 대립유전자인데, 이것은 어떤 집단에서 그 집단의 약 50%에서 발현된다. 몇몇 구체예에서, the HLA-A2 대립유전자는 HLA-A*0201, *0202, *0203, *0206, 또는 *0207 유전자 산물일 수 있다. 몇몇 경우에서, 상이한 집단들 간의 서브타입 빈도는 다를 수 있다. 예컨대, 몇몇 구체예에서, HLA-A2 양성 코카시안 집단의 95% 이상은 HLA-A*0201인 반면, 중국인 집단에서는 그 빈도가 대략 23% HLA-A*0201, 45% HLA-A*0207, 8% HLA-A*0206 및 23% HLA-A*0203이다. 몇몇 구체예에서, MHC 분자는 HLA-A*0201이다.

[0057] [0054] 몇몇 구체예에서, 제2 키메라 수용체는 제1 키메라 수용체일 수 있는 레퍼런스 키메라 수용체의 정선 영역과 비교시 변형된 정선 영역을 함유하는 변이체 키메라 수용체이며, 여기서 레퍼런스 키메라 수용체의 제1 도메인과 제2 도메인을 연결하는 정선의 바로 C-말단의 8 내지 24 아미노산 위치 (예컨대 8 내지 15 아미노산 또는 8 내지 13 아미노산, 예컨대 약 또는 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 그 이상의 아미노산) 위치 및/또는 상기 정선의 바로 N-말단의 8 내지 24 아미노산 위치 (예컨대 8 내지 15 아미노산 또는 8 내지 13 아미노산, 예컨대 약 또는 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 그 이상의 아미노산)의 하나 이상의 아미노산은 삽입, 결실 또는 아미노산 치환 등에 의해 변형된다. 몇몇 구체예에서, 변이체 키메라 수용체는 레퍼런스 키메라 수용체 내 정선 영역에 비해 변형된 정선 영역에서 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20 아미노산 차이 또는 변형을 함유한다.

[0058] [0055] 몇몇 구체예에서, 변이체 키메라 수용체는 레퍼런스 키메라 수용체의 제1 도메인과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 도메인 및/또는 레퍼런스 키메라 수용체의 제2 도메인과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 도메인을 함유한다. 몇몇 구체예에서, 변이체 키메라 수용체는 레퍼런스 키메라 수용체의 제1 도메인과 서열이 동일한 도메인을 함유하고 레퍼런스 키메라 수용체의 제2 도메인과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 서열이 동일한 도메인을 함유한다. 몇몇 구체예에서, 변이체 키메라 수용체는 레퍼런스 키메라 수용체의 제1 도메인과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 도메인을 함유하고 레퍼런스 키메라 수용체의 제2 도메인과 서열이 동일한 도메인을 함유한다. 몇몇 구체예에서, 변이체 키메라 수용체 내에 존재하는 적어도 하나의 도메인 또는 두 가지 모두의 도메인은 변형된 정선 영역을 함유하는 부분에서 레퍼런스 키메라 수용체의 제1 도메인 및/또는 제2 도메인에 비해 변형된 것이다.

[0059] [0056] 몇몇 구체예에서, 변이체 키메라 수용체는 레퍼런스 키메라 수용체에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는다. 몇몇 구체예에서, 변이체 키메라 수용체는 레퍼런스 키메라 수용체와 비교시 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20 아미노산 차이 또는 변형(예컨대 아미노산 삽입, 결실 또는 치환)을 함유한다.

[0060] [0057] 몇몇 구체예에서, 레퍼런스 키메라 수용체 (예컨대 레퍼런스 CAR)의 제1 및/또는 제2 도메인은 천연의 내인성 인간 단백질의 도메인이거나 또는 천연 또는 내인성 단백질의 도메인과 100% 동일성을 갖는 도메인 또는 그의 기능성 일부분이다. 몇몇 구체예에서, 제1 도메인 및 제2 도메인은 인간 대상자에 있어서 생체내에서는 동일 분자 내에 존재하지 않는다. 몇몇 구체예에서, 제1 도메인 및 제2 도메인은 단일의 천연 또는 내인성 인간 단백질 또는 폴리펩타이드 내에 존재하지 않는다.

[0061] [0058] 몇몇 구체예에서, 제1 및/또는 제2 도메인은 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막간 도메인, 또는 세포내 시그널링 도메인 또는 그의 기능성 부분이거나 이를 포함한다. 몇몇 구체예에서, 세포내 시그널링 도메인은 동시자극 시그널링 도메인, 예컨대 CD28, 4-1BB, 또는 ICOS 동시자극 시그널링 도메인이거나 이를 포함한다. 몇몇 구체예에서, 세포내 시그널링 도메인은 예컨대 T 세포 수용체 (TCR) 성분이거나 이를 함유하는 도메인 및/또

는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 (ITAM)을 함유하는 도메인과 같은, 활성화 세포질 시그널링 도메인이거나 이를 포함한다. 몇몇 경우에서, 활성화 세포질 도메인은 CD3-제타 (CD3 ζ) 사슬의 제타 사슬의 세포질 시그널링 도메인 또는 그의 기능성 변이체 또는 시그널링 부분이거나 이를 포함한다.

[0062] [0059] 몇몇 구체예에서, 레퍼런스 키메라 수용체는 CAR이다. 몇몇 구체예에서, 키메라 수용체, CAR은, 그의 N-말단으로부터 C-말단으로: 세포외 리간드-결합 도메인, 막간 도메인 및 세포내 시그널링 도메인을 순서대로 포함한다. 몇몇 구체예에서, 세포내 시그널링 도메인은 활성화 시그널링 도메인 (예컨대 TCR 및/또는 ITAM을 함유하는 성분, 예컨대 CD3-제타 시그널링 도메인)을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 세포내 시그널링 도메인은 동시자극 시그널링 도메인 (예컨대 CD28, 4-1BB 또는 ICOS 시그널링 도메인)이거나 이를 포함한다. 몇몇 구체예에서, 세포내 시그널링 도메인은 동시자극 시그널링 도메인 또는 활성화 시그널링 도메인 중 하나만을 함유하거나 또는 두 가지 도메인 모두를 순서 상관없이 함유한다. 몇몇 구체예에서, 세포내 시그널링 도메인은 동시자극 시그널링 도메인 및 활성화 시그널링 도메인 두 가지 모두를 함유한다.

[0063] [0060] 몇몇 구체예에서, 변이체 키메라 수용체는 그의 N-말단부터 C-말단으로: 세포외 리간드-결합 도메인, 막간 도메인 및 세포내 시그널링 도메인을 상기 순서대로 포함하되, 임의로 동시자극 시그널링 도메인 (예컨대 CD28, 4-1BB 또는 ICOS) 및/또는 활성화 시그널링 도메인 (예컨대 TCR 및/또는 ITAM을 함유하는 성분, 예컨대 CD3-제타 시그널링 도메인)을 각기 단독으로 또는 순서와 무관하게, 세포내 시그널링 도메인의 일부로서 포함할 수 있고, 여기서 상기 변이체 키메라 수용체는 정선의 어느 쪽에서든 (N-말단 및/또는 C-말단) 8 내지 24 아미노산 (예컨대 8 내지 15 아미노산 또는 8 내지 13 아미노산, 예컨대 약 또는 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 그 이상의 아미노산)의 인접부 내의 하나 이상의 아미노산 잔기가 변형된 것일 수 있다.

[0064] [0061] 몇몇 구체예에서, 레퍼런스 키메라 수용체의 특징은 하기 서브섹션 III에 설명된 것일 수 있다. 몇몇 구체예에서, 변이체 키메라 수용체의 특징 역시 하기 서브섹션 III에 설명된 것일 수 있으나, 단 변이체 키메라 수용체는 설명된 바와 같이 변형된 정선 영역에서 하나 이상의 변형(예컨대 삽입, 결실 또는 치환)을 포함한다.

[0065] [0062] 몇몇 구체예에서, 변이체 키메라 수용체는 설명된 바와 같이 레퍼런스 키메라 수용체의 정선 영역에 하나 이상의 변형(예컨대 삽입, 결실 또는 치환)을 함유하되, 여기서 레퍼런스 키메라 수용체는 세포외 리간드 결합 도메인이거나 이를 포함하는 제1 도메인 및, 이것과 정선에서 인접 서열을 통해 연결된, 힌지 도메인 또는 그의 일부이거나 이를 포함하는 제2 도메인을 함유한다.

[0066] [0063] 몇몇 구체예에서, 변이체 키메라 수용체는 설명된 바와 같이 레퍼런스 키메라 수용체의 정선 영역 내에 하나 이상의 변형(예컨대 삽입, 결실 또는 치환)을 함유하는 변형된 정선 영역을 포함하며, 여기서 레퍼런스 키메라 수용체는 힌지 도메인 또는 그의 일부이거나 이를 포함하는 제1 도메인 및 이것과 정선에서 인접 서열을 통해 연결된, 막간 도메인 또는 그의 일부이거나 이를 포함하는 제2 도메인을 함유한다.

[0067] [0064] 몇몇 구체예에서, 변이체 키메라 수용체는 설명된 바와 같이 레퍼런스 키메라 수용체의 정선 영역 내에 하나 이상의 변형(예컨대 삽입, 결실 또는 치환)을 함유하는 변형된 정선 영역을 포함하며, 여기서 레퍼런스 키메라 수용체는 막간 도메인 또는 그의 일부이거나 이를 포함하는 제1 도메인 및 이것과 정선에서 인접 서열을 통해 연결된, 동시자극 시그널링 도메인 또는 그의 일부이거나 이를 포함하는 제2 도메인을 함유한다.

[0068] [0065] 몇몇 구체예에서, 변이체 키메라 수용체는 설명된 바와 같이 레퍼런스 키메라 수용체의 정선 영역 내에 하나 이상의 변형(예컨대 삽입, 결실 또는 치환)을 함유하는 변형된 정선 영역을 포함하며, 여기서 레퍼런스 키메라 수용체는 동시자극 시그널링 도메인 또는 그의 일부이거나 이를 포함하는 제1 도메인 및 이것과 정선에서 인접 서열을 통해 연결된, 활성화 세포질 시그널링 도메인 또는 그의 일부이거나 이를 포함하는 제2 도메인을 함유한다.

[0069] [0066] 몇몇 구체예에서, 레퍼런스 키메라 수용체의 제1 도메인은 막간 도메인 또는 그의 일부이거나 이를 포함한다. 몇몇 구체예에서, 막간 도메인은 T-세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 사슬, CD28, CD3 ϵ 셀론, CD45, CD4, CD5, CDS, CD9, CD 16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD 154로부터 및/또는 예컨대 그의 막간 특성과 같은 실질적인 구조 부분을 유지하는 것과 같은 그의 기능성 변이체를 함유하는 막간 영역으로부터 유래된 것을 포함한다 (즉, 적어도 상기한 것들의 막간 영역(들)을 포함함). 몇몇 구체예에서, 막간 도메인은 CD4, CD28, 또는 CD8, 예컨대, CD8알파, 또는 그의 기능성 변이체로부터 유래된 막간 도메인이다. 몇몇 구체예에서, 레퍼런스 키메라 수용체의 제2 도메인은 막간 도메인에 직접 링크 또는 연결된 동시자극 시그널링 도메인이거나 이를 포함한다. 몇몇 구체예에서, 동시자극 시그널링 도메인은 CD28, 4-1BB, OX40, DAP10, 및 ICOS의 시그널링 도메인이거나 이를 포함하는 것이다.

- [0070] [0067] 몇몇 구체예에서, 변이체 키메라 수용체는 설명된 바와 같이 레퍼런스 키메라 수용체의 정선 영역 내 하나 이상의 변형(예컨대 삽입, 결실 또는 치환)을 함유하는 변형된 정선 영역을 함유하며, 여기서 레퍼런스 키메라 수용체는 CD28 막간 도메인 또는 그의 일부이거나 이를 포함하는 제1 도메인 및, 이것과 정선에서 인접 서열을 통해 연결된, 4-1BB 동시자극 시그널링 도메인 또는 그의 일부인 제2 도메인을 함유한다. 몇몇 구체예에서, CD28 막간 도메인은 SEQ ID NO:2, 103 또는 104에 제시된 아미노산 서열이거나 이를 포함하며, 또는 SEQ ID NO:2, 103 또는 104에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 서열을 포함하는 그의 기능성 부분 또는 변이체이다. 몇몇 구체예에서 4-1BB 시그널링 도메인은 SEQ ID NO:3에 제시된 아미노산 서열이거나 이를 포함하거나 또는 SEQ ID NO:3에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 의 서열 동일성을 나타내는 서열을 포함하는, 그의 기능성 일부 또는 변이체이다. 몇몇 구체예에서, 제1 도메인 및 제2 도메인은 함께 SEQ ID NO:5에 제시된 아미노산 서열 또는 또는 SEQ ID NO:5에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 그의 기능성 일부 또는 변이체를 포함하거나 갖는다. 몇몇 구체예에서, 레퍼런스 키메라 수용체의 제1 도메인과 제2 도메인은 함께 SEQ ID NO:5에 제시된 아미노산 서열을 갖거나 포함한다.
- [0071] [0068] 몇몇 구체예에서, 변이체 키메라 수용체는 SEQ ID NO:137에 대해 100% 미만의 서열 동일성을 갖지만 SEQ ID NO:137에 대해 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 또는 96%를 초과하는 서열 동일성을 갖는 변형된 정선 영역을 포함하고, 변형을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 변이체 키메라 수용체는 SEQ ID NO:5에 대해 100% 미만의 서열 동일성을 갖지만 SEQ ID NO:5에 대해 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 또는 96%를 초과하는 서열 동일성을 갖는 변형된 정선 영역을 포함하고, 변형을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 변이체 키메라 수용체는 SEQ ID NOS: 138-157 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 변형된 정선 영역, SEQ ID NOS: 138-157 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 또는 96%의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 그의 기능성 변이체를 갖거나 포함하고, 이들 각각은 변형(들)을 포함한다.
- [0072] [0069] 몇몇 구체예에서, 변이체 키메라 수용체는 CD28 막간 도메인과 같은, 막간 도메인 내 소수성 아미노산 잔기 또는 소수성 부분에서 또는 그러한 잔기나 부분의 변형을 함유하지 않는다. 몇몇 구체예에서, 변이체 키메라 수용체는 CD28 막간 도메인과 같은, 막간 도메인 내 소수성 아미노산 잔기 또는 소수성 부분에서 또는 그러한 잔기나 부분에서 하나 이상의 변형을 함유한다. 몇몇 구체예에서, 하나 이상의 변형은 소수성 아미노산을 또 다른 소수성 아미노산 잔기로 치환하는 것이거나 이러한 치환을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 하나 이상의 변형은 막간 도메인 내 소수성 아미노산 잔기 또는 소수성 부분에서 또는 상기 잔기 또는 부분의 또 다른 소수성 아미노산 잔기에 의한 치환 이외의 변형이 아니거나 포함하지 않는다.
- [0073] [0070] 몇몇 경우에서, 막간 도메인은 막의 지질 이중층과 상호작용하는 하나 이상의 트립토판 잔기를 함유한다. 몇몇 경우에서, 하나 이상의 트립토판 잔기는 지질-물 계면 근방에 위치할 수 있다. 몇몇 경우에서, 하나 이상의 트립토판 잔기는 막 내 막간 도메인을 앵커링하거나 또는 앵커링하는 것을 돕는다. [예컨대 de Jesus 및 Allen, *Biochim Biophys Acta*. 2013 Feb;1828(2):864-76 참조]. 몇몇 구체예에서, 변이체 키메라 수용체는 CD28 막간 도메인과 같은 막간 도메인 내 1개 또는 2개 모두의 트립토판 잔기에서 변형을 함유하지 않는다. 몇몇 구체예에서, 키메라 수용체는 SEQ ID NO: 5의 넘버링과 관련하여 위치 2 및/또는 위치 26에 대응하는 아미노산 위치에서의 변형을 함유하지 않으며, 상기 위치 각각은 레퍼런스 키메라 수용체 내 트립토판에 대응한다.
- [0074] [0071] 몇몇 구체예에서, 레퍼런스 키메라 수용체의 막간 도메인에 대응하는 변이체 키메라 수용체 내의 도메인은 실질적으로 소수성 수치요법(hydropathy) 프로파일을 갖거나 및/또는 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2 또는 그보다 큰 값의 수치요법의 그랜드 평균(GRAVY) 값을 갖는다.
- [0075] [0072] 몇몇 구체예에서, 변이체 키메라 수용체는 4-1BB 시그널링에 관여 또는 필요한 아미노산 잔기와 같은, 동시자극 시그널링 도메인의 시그널링에 관여 또는 필요한 아미노산 잔기에서의 변형을 함유하지 않는다. 일반적으로, 동시자극 시그널링은 TRAF 분자들과의 상호반응을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 변이체 키메라 수용체는 TRAF 분자에 대한 결합을 위한 결합 모티프 또는 그의 일부와 상호반응하는 아미노산 잔기에서 또는 그의 변형을 함유하지 않는다. 몇몇 구체예에서, 변이체 키메라 수용체는 모티프 (P/S/A/T)X(Q/E)E를 포함하는 레퍼런스 키메라 수용체의 동시자극 시그널링 도메인 내의 아미노산 잔기에서의 또는 그의 변형을 함유하지 않는다. 몇몇 구체예에서, TRAF 분자는 TRAF 1, TRAF2 및/또는 TRAF3이다. 몇몇 구체예에서, 레퍼런스 키메라 수용체의 동시자극 시그널링 도메인에 대응하는 변이체 키메라 수용체 내의 도메인은 TRAF의 활성화 또는 세포 국소화를

유도하거나 및/또는 TRAF-매개된 시그널링을 유도할 수 있다. 몇몇 구체예에서, 변이체 키메라 수용체는 49-52에 대응하는 위치의 아미노산 TTQE 및/또는 잔기 60-63에 대응하는 위치의 아미노산 PEEE를 함유하며, 여기서 상기 넘버링은 SEQ ID NO:5에 제시된 넘버링에 따른 것이다.

- [0076] [0073] 몇몇 구체예에서, 변이체 키메라 수용체는 SEQ ID NO:5에 제시된 넘버링에 의할 때, 잔기 13 내지 42 또는 아미노산 잔기 15 내지 40 내의 위치에서 하나 이상의 아미노산 변형을 함유한다.
- [0077] [0074] 몇몇 구체예에서, 변형은 하나 이상의 아미노산 잔기의 삽입이거나 이를 포함한다. 몇몇 구체예에서, 하나 이상의 삽입은 도메인들 간의 정선에 인접한 아미노산 잔기들 간의 삽입이다. 몇몇 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 삽입은 SEQ ID NO:5에 제시된 넘버링에 의할 때 아미노산 잔기 27과 28 사이의 삽입이다. 몇몇 구체예에서, 하나 이상의 삽입은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15 아미노산 잔기의 삽입을 포함할 수 있다. 몇몇 구체예에서, 삽입은 1, 2, 3, 4, 또는 5 아미노산 잔기의 삽입이다. 몇몇 구체예에서, 삽입은 어떠한 아미노산 잔기의 삽입이든 무방하다. 몇몇 구체예에서, 삽입은 아스파라긴(N)의 삽입이다.
- [0078] [0075] 몇몇 구체예에서, 변형은 SEQ ID NO:5에 제시된 넘버링에 의할 때 잔기 28, 31 또는 34에 대응하는 잔기에서의 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 아미노산 치환은 다른 모든 아미노산에 의할 수 있다. 몇몇 구체예에서, 아미노산 치환은 류신(L), 아스파라긴(N), 글루타민(Q), 알라닌 (A), 세린(S) 또는 히스티딘(H) 아미노산 잔기에 의한 것이다. 몇몇 구체예에서, 아미노산 치환은 SEQ ID NO:5에 제시된 넘버링에 의할 때 K28A, K28H, K28L, K28Q, K28S, R31A, R31H, R31L, R31N, L34A 및 L34S 중 하나 이상이거나 이에 대응한다.
- [0079] [0076] 몇몇 구체예에서, 변이체 키메라 수용체는 레퍼런스 키메라 수용체의 정선 영역과 비교시 2개 이상, 예컨대 최대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 이상의 아미노산이 변형된 정선 영역을 함유한다. 몇몇 구체예에서, 아미노산 치환은 K28Q/R31A, K28Q/R31N, K28Q/R31S, K28Q/L34A, K28Q/L34S, R31N/L34A, R31N/L34S, K28Q/R31N/L34A, K28Q/R31N/L34S으로부터 선택된 아미노산 치환이거나 또는 이에 대응한다.
- [0080] [0077] 몇몇 구체예에서, 변이체 키메라 수용체는 SEQ ID NOS: 138-157 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NOS: 138-157 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 또는 96% 의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 그의 변이체를 갖는 변형된 정선 영역을 갖거나 포함하며, 이들 각각은 변형(들)을 포함한다.
- [0081] [0078] 몇몇 구체예에서, 변이체 키메라 수용체는 SEQ ID NOS: 114-134 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NOS: 114-134 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 또는 96% 의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 그의 변이체를 갖는 변형된 정선 영역을 갖거나 포함하며, 이들 각각은 변형(들)을 포함한다.
- [0082] [0079] 몇몇 구체예에서, 변이체 키메라 수용체는 변형된 정선 영역을 함유하며, 이러한 영역의 펩타이드 단편들은 인간 백혈구 항원 (HLA)에 대해 더 낮은 결합 친화력을 나타내거나 및/또는 상기 영역은 대상자에게 투여 후를 비롯해서 감소된 면역원성을 나타낸다.
- [0083] [0080] 몇몇 구체예에서, 변형된 정선 영역의 8-16 아미노산 서열 부분을 갖는 펩타이드 단편의, 인간 백혈구 항원 (HLA) 분자에 대한 결합 친화력은 레퍼런스 키메라 수용체의 정선 영역의 대응하는 서열 부분을 갖는 펩타이드 단편의 동일한 HLA 분자에 대한 결합 친화력보다 더 낮다. 몇몇 구체예에서, 레퍼런스 키메라 수용체의 정선 영역의 대응하는 부분의 펩타이드 단편은 1000 nM 미만, 500 nM 미만 또는 50 nM 미만의 결합 친화력을 갖는다.
- [0084] [0081] 몇몇 구체예에서, 인간 HLA 분자에 대한 변형된 정선 영역 내의 모든 8-15 아미노산 단편들 또는 모든 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15 아미노산 단편들의 평균 결합 친화력은 레퍼런스 키메라 수용체의 정선 영역 내의 모든 8-15 아미노산 단편들, 또는 모든 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15 아미노산 단편들의 평균적인 결합 친화력보다 더 낮다. 몇몇 구체예에서, 결합 친화력 또는 평균 결합 친화력은 2배 이상, 5배 이상, 10배 이상, 25배 이상, 50배 이상 또는 100배 이상 더 낮다.
- [0085] [0082] 몇몇 구체예에서, 인간 백혈구 항원 (HLA)에 대하여 1000 nM 미만의 한 결합 친화력을 갖는 변형된 정선 영역의 8-15 아미노산 서열 부분을 갖는 펩타이드 단편들의 수는 동일한 HLA에 대하여 동일한 결합 친화력을 갖는 레퍼런스 키메라 수용체의 정선 영역의 8-15 아미노산 서열 부분을 갖는 펩타이드 단편들의 수에 비해 감소된다. 몇몇 구체예에서, 인간 백혈구 항원 (HLA)에 대하여 500 nM 미만의 한 결합 친화력을 갖는 변형된 정선 영역의 8-15 아미노산 서열 부분을 갖는 펩타이드 단편들의 수는 동일한 HLA에 대하여 동일한 결합 친화력을 갖

는 레퍼런스 키메라 수용체의 정션 영역의 8-15 아미노산 서열 부분을 갖는 펩타이드 단편들의 수에 비해 감소된다. 인간 백혈구 항원 (HLA)에 대하여 50 nM 미만의 한 결합 친화력을 갖는 변형된 정션 영역의 8-15 아미노산 서열 부분을 갖는 펩타이드 단편들의 수는 동일한 HLA에 대하여 동일한 결합 친화력을 갖는 레퍼런스 키메라 수용체의 정션 영역의 8-15 아미노산 서열 부분을 갖는 펩타이드 단편들의 수에 비해 감소된다.

[0086] [0083] 몇몇 구체예에서, 결합 친화력은 실험적으로 또는 알고리즘에 의해 구할 수 있다. 몇몇 구체예에서, MHC에 대한 펩타이드 결합 친화력은 컴퓨터에 의해, 예컨대 정량적 결합 친화력 모델에 기초한 알고리즘을 이용하여 구할 수 있다(Lafuente 및 Reche (2009) *Current Pharmaceutical Design*, 15:3209-3220). 몇몇 구체예에서, 결합 친화력은 인비트로 분석법으로 구할 수 있다.

[0087] [0084] 몇몇 구체예에서, MHC에 대한 펩타이드의 결합 친화력을 구하는 것은 방사능 또는 형광 경쟁 결합분석법을 이용한다. [예컨대 Ettinger et al., *J. Immunol.* 160:2365 (1998) 참조]. 몇몇 구체예에서, 경쟁적 분석법은 여러가지 상이한 펩타이드들의 결합 친화력을 비교하는 것을 포함한다. 몇몇 MHC 결합 연구는 EBV 형질전환 세포주로부터의 세제 가용화된 클래스 I 분자를 이용한다 [예컨대 Sette, A., et al., *Mol Immunol*, 31(11):813-22 (1994) 참조]. 몇몇 구체예에서, 경쟁적 분석법은 천연 로딩된 MHC를 이용하며, 목적하는 MHC 분자는 세제 용해물 내 다른 MHC 분자로부터 정제되거나 또는 다른 MHC 분자와 혼합되어 사용가능하다. 몇몇 구체예에서, 문제의 MHC 분자에 대해 높은 친화력을 갖는 방사능표지된 펩타이드를 동정할 수 있다. 몇몇 구체예에서, 그 후 문제의 MHC 분자에 대한 부가적인 "테스트" 펩타이드의 친화력을 고친화력 방사능표지된 펩타이드와 경쟁하는 이들의 능력에 의해 구한다.

[0088] [0085] 몇몇 구체예에서, 펩타이드 친화력을 구하는 것은 재인식 분석법을 이용할 수 있는데, 이 분석법은 예컨대 적절한 MHC 대립유전자를 발현하는 세포로부터 단기간 동안 pH 2-3에서 인큐베이션시킴으로써 천연 결합 펩타이드를 "스트리핑"시킨 "T2" 세포를 이용한다. 몇몇 구체예에서, 동일한 MHC 대립유전자에 대한 추정 MHC-결합 펩타이드의 결합 친화력을 구하기 위해, 스트리핑된 MHC 모노머를 추정 MHC-결합 펩타이드, 베타2-마이크로글로불린 및 임체열-의존성 모노클로날 항체와 용액 내에서 결합시킬 수 있다. 몇몇 구체예에서, 예컨대, 표지된 모노클로날 항체 또는 형광-표지된 2차 항체로 직접 표지 후 테스트 결합 펩타이드 존재 또는 부재 하에 인큐베이션된 세포들 간에 탐지된 형광 강도 차이를 이용하여 테스트 펩타이드의 결합력을 구할 수 있다.

[0089] [0086] 몇몇 구체예에서, MHC (예컨대 HLA) 분자에 대한 결합 친화력은 결합 분석에서 레퍼런스 펩타이드의 결합의 50% 억제에 관찰된 때의 펩타이드의 농도인 IC50에 의해 나타내진다. 몇몇 경우에서, 이러한 분석은 IC50 값이 K_D 값과 근사한 조건 하에서 수행될 수 있다 (즉, 제한 HLA 단백질 및 표지된 펩타이드 농도). 몇몇 구체예에서, 결합은 레퍼런스 펩타이드에 상대적으로 표현할 수 있다.

[0090] [0087] 몇몇 구체예에서, 결합 친화력은 실리코법을 이용하여 예상가능하다. 알고리즘 또는 기타 컴퓨터 분석법을 이용하여 MHC 결합에 대한 결합 친화력을 예상하기 위한 실리코법이 기술 분야에 알려져 있다 [예컨대, Marsh, et al., *The HLA Factsbook* (Academic Press, 2000) 참조]. 몇몇 구체예에서, 관심대상 펩타이드가 주어진 MHC 분자에 결합할지를 예상하기 위해 알고리즘이 이용될 수 있다 [예컨대, Southwood, et al., *J. Immunol.* 160:3363 (1998); Honeyman, et al., *Nat. Biotechnol.* 16:966-969 (1998); Breisie, et al., *Bioinformatics* 14:121-131 (1998), as well as the "SYFPEITHI" algorithm (Hans-Georg Rammensee, et al., *Immunogenetics* (1999) 50: 213-219), Zhang et al., *PLoS ONE* 7(2): e30483. doi: 10.1371/journal.pone.0030483, the Immune Epitope and Analysis Resource (IEDB) (Peters B, et al. *PLoS Biology* 3: 379 (2005)), 및 the "BIMAS" algorithm (Parker, K. C., M. A. Bednarek, 및 J. E. Coligan. *J. Immunol.* 152:163 (1994) 참조].

[0091] [0088] 몇몇 구체예에서, IEDB로부터 입수가능한 것들을 비롯한 알고리즘 예상 도구들은 ANN (Nielsen et al. (2003) *Protein Sci.*, 12:1007-1017 및 Lundegaard et al. (2008) *NAR*, 36:W509-512), SMM (Peters 및 Sette (2005) *BMC Bioinformatics*, 6:132) 및 comblib (Sidney et al. (2008) *Immunome Res.* 4:2), 또는 컨센서스 도구(Consensus tool) (참조: Kim, et al. (2012) *Immune epitope database analysis resource*, *NAR*, 전술한 것들로부터의 예상을 조합)을 이용하는 하나 이상의 예측법을 이용한다.

[0092] [0089] 몇몇 구체예에서, 항원 프로세싱 예상은 원생동물 클레비지(PaProC)에 대한 알고리즘을 이용하여 달성가능하다. [Kuttler et al., *J. Mol. Biol.* 298 (2000), 417-429 및 Nussbaum et al., *Immunogenetics* 53 (2001), 87-94 참조].

[0093] [0090] 몇몇 구체예에서, 제2 키메라 수용체일 수 있는 변이체 키메라 수용체는 제1 키메라 수용체일 수 있는

레퍼런스 키메라 수용체와 비교시 탐지가능한 면역 반응 감소를 나타낸다. 몇몇 구체예에서, 면역 반응은 체액성 면역 반응이다. 몇몇 구체예에서, 면역 반응은 세포-매개형 면역 반응이다. 몇몇 구체예에서, 면역 반응은 1.5배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 50배, 100배 또는 그 이상으로 감소된다. 몇몇 구체예에서, 면역 반응은 인비트로에서 평가된다. 몇몇 구체예에서, 면역 반응은 키메라 수용체를 발현하는 세포 투여와 같이, 대상자에게 키메라 수용체를 투여한 후에 생체내 평가한다. 몇몇 구체예에서, 키메라 수용체에 대한 숙주 면역 반응은 후술하는 바와 같이 평가된다.

II. 입양 세포 치료법에서 세포의 투여.

[0091] 제공된 방법은 일반적으로 질병 또는 병태를 갖는, 예컨대 수용체와 같은 재조합 분자에 의해 특이적으로 인식 및/또는 치료되는 성분과 연관된 질병 또는 병태에 걸린 대상자에게, 예컨대 CARs, 다른 키메라 수용체, 또는 기타 항원 수용체, 예컨대 트랜스제닉 TCRs 등의 재조합 수용체와 같은 재조합 분자를 발현하는 세포를 다회 투여하는 것을 포함한다. 이러한 투여는 일반적으로 상기 질병 또는 병태의 하나 이상의 증상의 개선 및/또는 질병 또는 병태 또는 그의 증상의 치료 또는 예방을 일으킨다..

[0092] 본 발명에서 "대상자(subject)"라 함은 포유동물, 예컨대 인간 또는 기타 동물, 전형적으로는 인간이다. 몇몇 구체예에서, 대상자는 1 이상의 투여 또는 투여량 제공 전에, 질병 또는 병태를 표적화하는 치료제에 의해 치료된 바 있는 대상자이다. 몇몇 측면에서, 대상자는 다른 치료제로는 난치성이거나 그에 대해 반응이 없거나 또는 그렇게 되어가는 대상자이다. 몇몇 구체예에서, 대상자는 난치성 또는 비반응성으로 된 것은 아니지만, 예컨대 치료에 대해 난치성 또는 비반응성이 되는 것을 방지하기 위해, 제2 또는 후행 수용체를 발현하는 세포를 예방적으로 투여받는다.

[0093] 몇몇 구체예에서, 1 이상의 투여시 또는 투여 직전의 대상자는 지속적이거나 재발된 질병을 갖는다. 예컨대, 질병은 화학요법, 방사선 치료, 및/또는 조혈줄기세포 이식(HSCT), 예컨대, 대립유전자 HSCT를 비롯한 다른 치료적 개재에 의한 치료후 재발되었거나 또는 그러한 치료에 대해 난치성으로 된 것일 수 있다. 질병 또는 병태는 제1 투여 또는 투여량의 세포에 대해, 제2 투여 전 또는 투여 시점에서 난치성으로 되거나 재발될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 본 발명의 투여는 예컨대 입양 세포 치료법 이외의 다른 치료법 또는 입양 세포 치료법 예컨대 구별되는 수용체를 발현하는 세포를 먼저 투여하는 것과 같은 다른 치료법에 대해 대상자가 내성을 가지게 된 것에도 불구하고 대상자를 효과적으로 치료한다.

[0094] 몇몇 구체예에서, 대상자는 다른 치료제 또는 세포 투여에 대해 응답성이고 치료제를 이용한 치료 또는 투여는 질병 부담을 경감시킨다. 몇몇 측면에서, 대상자는 초기에 치료제 또는 투여에 응답하지만, 시간이 지나면서, 예컨대 세포 요법 수행 시점 또는 제2 투여량 또는 투여가 수행된 시점에서 질병 또는 병태의 재발을 나타낸다. 몇몇 구체예에서, 대상자는 재발된 대상자가 아니다. 이러한 몇몇 구체예에서, 대상자는 재발 위험이 있는 것으로, 예컨대 재발 위험이 매우 높은 것으로 결정함으로써, 예컨대 재발 가능성을 낮추고 재발을 방지하기 위해, 세포를 예방적으로 투여한다.

[0095] 몇몇 구체예에서, 대상자는 다른 치료제에 의해 선행 치료된 바 없는 대상자이다. 몇몇 구체예에서, 대상자는 제1 투여량의 투여 전에, CAR과 같은 수용체를 발현하는 세포 투여량을 투여받은 바 없거나 및/또는 동일한 분자 또는 항원을 표적화하는 여하한 재조합 수용체를 발현하거나 그러한 세포에 의해 발현된 CAR 또는 다른 수용체를 발현하는 세포의 투여량이 투여된 바 없는 대상자이다. 몇몇 구체예에서, 대상자는 제1 투여량 투여 전에 제1 투여량의 수용체를 발현하는 세포의 투여량이 투여된 바 없는 대상자이다. 또 다른 구체예에서, 제1 및/또는 제2 투여로 세포의 다회 투여량이 주어진다.

[0096] 질병, 병태 및 장애로 종양, 예컨대 고형 종양, 혈액 종양 및 흑색종을 들 수 있고, 여기에는 국소화 및 전이된 종양, 감염 질환 예컨대 바이러스 또는 기타 병원균, 예컨대 HIV, HCV, HBV, CMV, HPV, 및 기생충 감염 질환 및 자가면역 및 염증 질환이 포함된다. 몇몇 구체예에서, 질병 또는 병태는 종양, 암, 악성종양, 신생물 또는 기타 증식성 질환, 장애이다. 이러한 질병의 비제한적인 예로는 백혈병, 림프종, 예컨대 만성 림프성 백혈병(ALL), 비-호지킨 림프종, 급성 골수성 백혈병, 다발골수종, 난치성소포성 림프종, 비만세포 림프종, 무통성 B 세포 림프종, B 세포 악성종양, 결장암, 폐암, 간암, 유방암, 전립선암, 난소암, 피부암, 흑색종, 골암, 뇌암, 난소암, 상피암, 신장세포 암종, 췌장선암종, 호지킨 림프종, 자궁경부암종, 결장직장암, 교모세포종, 신경모세포종, 유잉 육종, 수모세포종, 골육종, 활막육종, 및/또는 중피종을 들 수 있다.

[0097] 몇몇 구체예에서, 질병 또는 병태는 종양이고 대상자는 고형 종양 또는 질병 관련의 많은 수 또는 대량 예를 들어, 종양 또는 암세포와 같은 제1 투여량의 투여 전에 큰 종양 부담을 가진다. 몇몇 측면에 있어서, 대

상체의 초기 종양 부담은 낮고 대상체는 거의 전이하지 않는다. 몇몇 구체예에서, 투여량의 크기 또는 시점은 대상체에서 초기 질병 부담에 따라 결정된다. 예를 들어, 어떤 측면에서 대상자는 제1 투여량에서 비교적 적은 개수의 세포를 투여받을 수 있지만, 질병 부담이 더 낮은 관점에서 투여량이 더 높을 수 있다.

[0102] [0098] 몇몇 구체예에서, 질병 또는 병태는 바이러스, 레트로 바이러스, 박테리아 및 원충 감염, 면역 결핍증, 거대세포바이러스 (CMV), 엡스타인-바 바이러스 (EBV), 아데노바이러스, BK 폴리오마바이러스와 같은 감염성 질병 또는 병태다. 몇몇 구체예에서, 질병 또는 병태는 관절염, 예를 들어, 류마티스성 관절염 (RA), I 형 당뇨병, 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 염증성 장질환, 건선, 경피증, 자가면역 갑상선 질환, 그레이브 병, 그론 병, 다발성 경화증, 천식 및/또는 이식과 관련된 질병 또는 병태와 같은 자가면역 또는 염증성 질병 또는 병태다.

[0103] [0099] 몇몇 구체예에서, 질병 또는 장애와 관련된 항원은 고아성 티로신 키나아제 수용체 ROR1, tEGFR, Her2, L1-CAM, CD19, CD20, CD22, 메소테린, CEA 및 B형 간염 표면 항원, 항-엽산 수용체, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-4, OEPHa2, ErbB2, 3, 또는 4, FBP, 태아 아세틸콜린 수용체, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-alpha, IL-13R-alpha2, kdr, 카파경쇄, 루이스 Y, L1-세포 접착 분자, MAGE-A1, 메소테린, MUC1, MUC16, PSCA, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, MART-1, gp100, 태아성 암항원, ROR1, TAG72, VEGF-R2, 발암배아성 항원 (CEA), 전립선 특이 항원, PSMA, Her2/neu, 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, 에프린B2, CD123, CS-1, c-Met, GD-2, 및 MAGE A3, CE7, 윌름즈 종양 1 (WT-1), 사이클린 A1 (CCNA 1)과 같은 사이클린 및/또는 비오틴 화 분자 및/또는 HIV, HCV, HBV 또는 다른 병원체에 의해 발현되는 분자로 이루어지는 군 중에서 선택된다.

[0104] [0100] 본 발명에서 사용된, "치료" (및 "치료" 또는 "치료하는"과 같은 문법적 변형)은 질병 또는 병태 또는 장애 또는 증상, 결과의 불리한 효과 또는 그것을 이루는 표현형의 완전한 또는 부분적인 개선 또는 감소를 의미한다. 치료의 바람직한 효과는 질병의 발생 또는 재발 방지, 증상의 완화, 질병의 직접 또는 간접적인 병리학 적 결과의 감소, 전이 방지, 질병 진행률 감소, 질병 상태의 개선 또는 완화, 및 예후의 차도 또는 개선 등을 포함하나 이에 한하지 않는다. 이 용어는 질병의 완전한 완치 또는 모든 증상이나 결과에 대한 증상이나 효과의 완전한 제거를 의미하지는 않는다.

[0105] [0101] 본 발명에 사용된 바와 같이, "질병의 진행 지연"은 질병 (암과 같은)의 진행을 연기, 방해, 늦춤, 지연, 안정화, 억제 및/또는 연기하는 것을 의미한다. 이 지연은 치료될 질병 및/또는 개인의 병력에 따라 다양한 시간길이 될 수 있다. 당해 기술 분야의 숙련된 기술자에게 명백한 바와 같이, 충분하거나 현저한 지연은 실제로 개체가 질병을 발병하지 않는다는 점에서, 예방을 포함할 수 있다. 예를 들어, 전이 발달과 같은 말기 암이 지연될 수 있다.

[0106] [0102] 본 발명에서 사용된 "예방"은 질병에 걸리기 쉽지만, 아직 질병으로 진단되지 않는 대상자에서 질병의 발생 또는 재발에 관한 예방을 제공하는 것을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 제공된 세포 및 조성물은 질병의 발달을 지연시키거나 질환의 진행을 늦추는데 사용된다.

[0107] [0103] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 기능 또는 활성을 "억제"시키는 것은 대상 조건 또는 매개 변수를 제외하고 다른 조건과 달리 또는 다른 조건과 비교하여 대안적으로 비교할 때 기능 또는 활성을 감소시키는 것이다. 예를 들어, 종양 성장을 억제하는 세포는 세포가 없는 경우 종양의 성장 속도와 비교하여 종양의 성장 속도를 감소시킨다.

[0108] [0104] 투여의 관점에 있어서, 약제제제, 세포 또는 조성물과 같은 약제의 "유효량"은 치료 또는 예방의 결과와 같은 바람직한 결과를 얻기 위해 필요한 투여량/양 및 필요한 시간 동안 유효량을 의미한다.

[0109] [0105] 약학적 제형 또는 세포와 같은 약제의 "치료적 유효량"은 질병, 증상 또는 장애의 치료 및/또는 치료의 약물동력학적 또는 약력학적 효과와 같은 목적하는 치료 결과를 달성하기 위해 필요한 투여량 및 필요한 기간 동안의 유효량을 의미한다. 치료적 유효량은 질병의 상태, 대상자의 나이, 성별 및 체중 및 투여된 세포 모집단과 같은 요인에 따라 달라질 수 있다. 몇몇 구체예에서, 제공되는 방법은 세포 및/또는 조성물을 효과적인 양으로 예를 들어, 치료 유효량으로 투여하는 것을 포함한다.

[0110] [0106] "예방적 유효량"은 원하는 예방적 결과를 얻기 위해 필요한 투여량 및 기간 동안의 효과적인 양을 의미한다. 일반적으로 그러나 반드시 필요한 것은 아니지만, 질병의 초기 단계에서 예방적 투여량이 사용되기 때문에, 예방적 유효량은 치료적 유효량보다 적을 것이다. 낮은 종양 부담과 관련하여, 몇몇 측면에 있어서의 예방적 유효량은 치료적 유효량보다 높을 것이다.

- [0111] [01071] 입양 세포 치료법에서 세포의 투여방법은 공지되어 있으며, 제공된 방법 및 조성물과 관련하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 입양 T 세포 요법은 예를 들어, Gruenberg 등의 미국 특허 출원 공개 제2003/0170238호; 로젠버그 (Rosenberg)의 미국 특허번호 제4,690,915호; 로젠버그 (2011) Nat Rev Clin Oncol. 8 (10) : 577-85] 에 개시되어 있다. 예를 들어, Themeli et al. (2013) Nat Biotechnol. 31 (10): 928-933; Tsukahara et al. (2013) Biochem Biophys Res Commun 438 (1): 84-9; Davila et al. (2013) PLoS ONE 8 (4): e61338를 참조하라.
- [0112] [0108] 몇몇 구체예에서, 세포 치료법 예를 들어, 입양 세포 치료법, 예를 들어 입양 T 세포 치료법은 자가 전달에 의해 수행되고, 세포는 세포를 분리시키고 또는 분리시키거나 그렇지 않으면 세포 치료법 또는 그러한 대상자로부터 유래된 시료로부터 수득할 수 있다. 따라서, 몇몇 측면에 있어서는, 세포는 치료를 필요로하는 대대상자 예를 들어, 환자로부터 유래하고, 세포는 분리되고 처리된 후에 동일한 대상자에게 투여된다.
- [0113] [0109] 몇몇 구체예에서, 세포 치료법 예를 들어, 입양 세포 치료법, 예를 들어 입양 T 세포 치료법은 동종이계의 전달에 의해 수행되며, 여기서 세포는 분리되고 및/또는 다른 한편으로는 예를 들어 제1 대상자 같이 궁극적으로 세포 치료를 받거나 받는 대상자로부터 준비되는 것이다. 몇몇 구체예에서, 세포는 동일한 종의 상이한 대상자 예를 들어, 제2 대상자에게 투여된다. 몇몇 구체예에서, 제1 및 제2 대상자는 유전적으로 동일 또는 유사하다. 몇몇 구체예에서, 제2 대상자는 제1 대상자와 동일한 HLA 클래스 또는 수퍼타입을 나타낸다.
- [0114] [0110] 세포는 임의 적절한 방법, 예를 들어 볼루스 주입과 같은 정맥 또는 피하 주입, 안내 주입, 안구주위 주입, 망막하 주입, 유리체내 주입, 경격막 주입, 공막하 주입, 맥락막내 주입, 전안방내 주입, 서브콘젝트발 주입, 결막하 주입, 안각간하 주입, 교후부 주입, 안구 주위 주입, 또는 엉덩이 성관계 전달과 같은 주입에 의한 정맥내 단일주입으로 투여될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 이들은 비경구, 폐내 및 비내 투여에 의해 투여되고, 국소 치료를 위해 필요하다면 병내 투여로 투여된다. 비경구 주입에는 근육 내, 정맥 내, 동맥 내, 복강 내, 흉곽내, 두개내, 또는 피하 투여가 포함된다. 몇몇 구체예에서, 주어진 투여량은 세포의 단일 투여에 의해 투여된다. 몇몇 구체예에서는 예컨대 3일 이하의 기간 동안, 세포를 연속 주입 투여함으로써, 세포를 다회 볼루스 투여한다.
- [0115] [0111] 질병의 예방 및 치료를 위해, 적절한 투여량은 세포가 예방적 또는 치료목적 목적, 이전 치료법, 대상자의 치료적 기록 및 세포에 대한 반응 및 주치의의 재량으로 투여되는지 여부에 따라 치료될 질병의 유형, 세포 또는 재조합 수용체의 유형, 질병의 중증도 및 결과에 의존한다. 조성물 및 세포는 몇몇 구체예에서 한번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 대상자에게 적절하게 투여된다.
- [0116] [0112] 몇몇 구체예에서, 세포는 세포독성 또는 치료제와 같은 항체 또는 가공된 세포 또는 수용체 또는 다른 제제와 같은 다른 치료적 중재와 임의의 순서로 동시에 또는 순차적으로 조합치료의 일부로서 투여된다. 따라서, 몇몇 구체예에서의 세포는 1 이상의 추가적인 치료제와 함께 또는 다른 치료적 중재와 관련하여 동시에 또는 임의의 순서로 순차적으로 공동-투여된다. 몇몇 측면에 있어서는, 세포는 1 이상의 추가 치료제의 효과를 증진시키는 세포집단과 시간이 충분히 가까운 다른 치료과 공동 투여되거나 또는 그 반대의 경우도 있다. 몇몇 구체예에서, 세포들은 1 이상의 추가적 치료제 전에 투여된다. 몇몇 구체예에서, 세포는 1 이상의 추가 치료제 후에 투여된다. 몇몇 구체예에서, 1 이상의 추가적 제제는 예를 들어 지속성을 향상시키는 IL-2와 같은 사이토카인 또는 다른 사이토카인을 포함한다.
- [0117] [0113] 몇몇 구체예에서, 이 방법은 투여량 투여 전에 예컨대 종양 부담을 줄이기 위해, 컨디셔닝 화학요법제와 같은 화학요법제를 투여하는 것을 포함한다.
- [0118] [0114] 일단 세포가 대상자 (예를 들어, 사람)에게 투여되면, 몇몇 관점에 있어서 가공된 세포 모집단의 생물학적 활성은 다수의 공지된 방법 중 임의의 방법에 의해 측정된다. 평가할 파라미터는 가공된 또는 자연의 T 세포 또는 다른 면역 세포의 항원에 대한 특이적 결합, 예를 들어, 생체 내 이미징 또는 예를 들어, 생체 외 ELISA 또는 유동 세포 측정법에 의한 특이적 결합을 포함한다. 특정 구체예에서, 가공된 세포가 표적 세포를 파괴시키는 능력은 예를 들어 Kochenderfer 등, J.Immunotherapy, 32 (7)에 기재된 세포 독성 검정과 같은 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법을 사용하여 측정 될 수 있다: 689-702 (2009) 및 Herman et al. J. Immunological Methods, 285 (1): 25-40 (2004). 특정 구체예에서, 세포의 생물학적 활성은 또한 CD 107a, IFN γ , IL-2 및 TNF와 같은 특정 사이토카인의 발현 및/또는 분비를 분석함으로써 측정될 수 있다. 몇몇 측면에 있어서, 생물학적 활성은 종양 부담 또는 부하의 감소와 같은 치료적 결과를 평가함으로써 측정된다. 몇몇 측면에 있어서, 독성 결과, 세포의 지속성 및/또는 팽창 및/또는 숙주 면역 반응의 존재 또는 부재가 평가된다.

- [0119] [0115] 특정 구체예에서, 가공된 세포는 그 치료 또는 예방 효능이 증가되도록 임의의 수의 방식으로 변형된다. 예를 들어, 집단에 의해 발현된 가공된 CAR 또는 TCR은 직접적으로 또는 링커를 통해 간접적으로 표적 모이어티에 접합될 수 있다. 화합물, 예를 들어, CAR 또는 TCR을 표적 모이어티에 접합시키는 실시방법은 당업계에 공지되어있다. 예를 들어, Wadwa 등, J. Drug Targeting 3 : 111 (1995) 및 미국 특허 제 5,087,616 호 참조.
- [0120] **III. 세포에 의해 발현되는 재조합 수용체**
- [0121] [0116] 세포는 일반적으로 재조합 수용체를 발현한다. 상이한 투여량의 세포에 의해 발현되는 수용체들은 일반적으로 적어도 부분적으로 서로 다르다. 수용체들은 키메라 항원 수용체(CAR)를 비롯한 기능성 비-TCR 항원과 같은 항원 수용체, 및 기타 항원-결합 수용체 예컨대 트랜스제닉 T 세포 수용체 (TCRs)를 포함할 수 있다. 수용체는 또한 다른 키메라 수용체, 예컨대 특정 리간드에 결합하고 CAR에 존재하는 것과 유사한 막간 및/또는 세포 내 시그널링 도메인을 갖는 수용체를 포함할 수도 있다.
- [0122] [0117] CARs를 비롯한 예시적인 항원 수용체 및 조작 방법 및 이러한 수용체를 세포 내로 도입하는 방법이 예컨대 국제특허출원 공개번호 WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061 U.S. 특허출원 공개번호 US2002131960, US2013287748, US20130149337, 미국특허 Nos.: 6,451,995, 7,446,190, 8,252,592, 8,339,645, 8,398,282, 7,446,179, 6,410,319, 7,070,995, 7,265,209, 7,354,762, 7,446,191, 8,324,353, 및 8,479,118, 및 유럽특허출원 번호 EP2537416, 및/또는 문헌 [Sadelain 외, Cancer Discov. 2013 April; 3(4): 388-398; Davila 외 (2013) *PLoS ONE* 8(4): e61338; Turtle 외, *Curr. Opin. Immunol.*, 2012 October; 24(5): 633-39; Wu 외, *Cancer*, 2012 March 18(2): 160-75]에 설명되어 있다. 몇몇 측면에서, 항원 수용체는 미국특허 No.: 7,446,190에 설명된 바와 같은 CAR, 및 국제특허출원 공개 No.: WO/2014055668 A1에 설명된 것들을 포함한다. CAR의 예로는 전술한 공개문헌들, 예를 들면 WO2014031687, US 8,339,645, US 7,446,179, US 2013/0149337, 미국특허 No.: 7,446,190, 미국특허 No.: 8,389,282, Kochenderfer et al., 2013, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10, 267-276 (2013); Wang et al. (2012) *J. Immunother.* 35(9): 689-701; 및 Brentjens et al., *Sci Transl Med.* 2013 5(177)에 설명된 것을 들 수 있다. 또한 국제특허공개 No.: WO2014031687, 미국특허 Nos.: 8,339,645, 7,446,179, 7,446,190, 및 8,389,282, 및 미국특허 출원 공개 No. US 2013/0149337도 참조. 키메라 수용체에는 키메라 항원 수용체 (CARs)가 포함된다. CARs와 같은 키메라 수용체는 일반적으로 세포의 항원 결합 도메인, 예컨대 항체의 일부, 일반적으로 예컨대 scFv 항체 단편과 같은, 항체의 중쇄 가변 영역(V_H) 및/또는 경쇄 가변 영역 (V_L)이 포함된다.
- [0123] [0118] 몇몇 구체예에서, 결합 도메인(들), 예컨대, 항체 예컨대, 항체 단편, 재조합 수용체의 일부는 예컨대, IgG4 힌지 영역과 같은 힌지 영역 등의 면역글로불린 불변 영역의 일부, 및/또는 CH1/CL 및/또는 Fc 영역을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 불변 영역 또는 부분은 인간 IgG, 예컨대 IgG4 또는 IgG1의 그것이다. 몇몇 측면에서, 불변 영역의 일부는 항원-인식 성분 예컨대, scFv와 막간 도메인 간의 스페이스 영역으로서 기능한다. 스페이스는 스페이스가 부재할 경우에 비해, 항원 결합 후 세포의 증가된 응답성을 제공하는 길이일 수 있다. 예시적인 스페이스, 예컨대, 힌지 영역은 특허출원 공개번호 WO2014031687에 설명된 것들을 포함한다. 몇 가지 예에서, 스페이스의 길이는 12 또는 약 12 아미노산 또는 12개 이하의 아미노산일 수 있다. 예시적인 스페이스는 적어도 약 10 내지 229 아미노산, 약 10 내지 200 아미노산, 약 10 내지 175 아미노산, 약 10 내지 150 아미노산, 약 10 내지 125 아미노산, 약 10 내지 100 아미노산, 약 10 내지 75 아미노산, 약 10 내지 50 아미노산, 약 10 내지 40 아미노산, 약 10 내지 30 아미노산, 약 10 내지 20 아미노산, 또는 약 10 내지 15 아미노산, 및 상기 나열된 범위들의 양 종점의 숫자들 사이의 여하한 정수의 아미노산 길이일 수 있다. 몇몇 구체예에서, 스페이스 영역은 약 12개 이하의 아미노산 또는, 약 119개 이하의 아미노산 또는 약 229개 이하의 아미노산을 갖는다. 예시적인 스페이스는 IgG4 힌지 단독, CH2 및 CH3 도메인에 링크된 IgG4 힌지, 또는 CH3 도메인에 링크된 IgG4 힌지를 포함한다. 예시적인 스페이스는 비제한적인 예로서 문헌 [Hudecek 외 (2013) *Clin. Cancer Res.*, 19:3153, 국제특허출원공개 번호 WO2014031687, 미국특허 No. 8,822,647 또는 published app. No. US2014/0271635]에 설명된 것들을 포함한다.
- [0124] [0119] 몇몇 구체예에서, 불변 영역 또는 부분은 인간 IgG, 예를 들면 IgG4 또는 IgG1의 것이다. 몇몇 구체예에서, 스페이스는 서열 ESKYGPCCPPCP (SEQ ID NO: 1에 제시됨)을 가지며 SEQ ID NO: 158에 제시된 서열에 의해 인코딩된다. 몇몇 구체예에서, 스페이스는 SEQ ID NO: 107에 제시된 서열을 갖는다. 몇몇 구체예에서, 스페이스는 SEQ ID NO: 108에 제시된 서열을 갖는다. 몇몇 구체예에서, 불변 영역 또는 부분은 IgD의 것이다. 몇몇 구체예에서, 스페이스는 SEQ ID NO:109에 제시된 서열을 갖는다. 몇몇 구체예에서, 스페이스는 SEQ ID NOS: 1, 107,

108 또는 109 중 어느 하나에 제시된 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 갖는다.

[0125] [0120] 이 항원 인식 도메인은 일반적으로 또 다른 세포 표면 수용체를 경유하여 CAR, 및/또는 시그널의 경우, 항원 수용체 복합체, 예를 들면 TCR 복합체를 통해 활성화를 모방하는 시그널링 성분과 같은 하나 이상의 세포 내 시그널링 성분에 링크된다. 몇몇 구체예에서 시그널은 면역자극적이거나 및/또는 동시자극적일 수 있다. 그러므로 몇몇 구체예에서, 항원-결합 성분 (예컨대, 항체)은 하나 이상의 막간 및 세포내 시그널링 도메인에 링크되어 있다. 몇몇 구체예에서, 막간 도메인은 세포외 도메인에 융합된다. 일 구체예에서, 보통, 예컨대, CAR과 같이 수용체 내 도메인들 중 하나와 연관되어 있는 막간 도메인이 이용된다. 몇몇 구체예에서는 수용체의 다른 멤버와의 상호반응을 최소화시키기 위해, 동일 또는 상이한 표면 막 단백질의 막간 도메인에 이러한 도메인이 결합하는 것을 회피하도록, 막간 도메인을 선택하거나 또는 아미노산 치환에 의해 변형시킨다.

[0126] [0121] 몇몇 구체예에서 막간 도메인은 천연 또는 합성 소스로부터 유도된다. 소스가 천연의 것일 경우, 도메인은 몇몇 측면에서 여하한 막-결합 또는 막간 단백질로부터 유래된다. 막간 영역은 T-세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 사슬, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD 16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD 154로부터 유래된 것을 포함하고 (즉 적어도 상기의 막간 영역(들)을 포함함) 및/또는 막간 영역은 예컨대 막간의 실질적인 구조 일부를 유지하거나 그의 특징을 유지하는, 그의 기능성 변이체를 함유한다. 몇몇 구체예에서, 막간 도메인은 합성적인 것이다. 몇몇 측면에서, 합성 막간 도메인은 예를 들면 류신 및 발린과 같은 소수성 잔기들을 주로 포함한다. 몇몇 측면에서, 페닐알라닌, 트립토판 및 발린의 삼량체가 합성 막간 도메인의 각 말단에서 발견된다. 몇몇 구체예에서, 연결은 링커, 스페이서, 및/또는 막간 도메인(들)에 의한다.

[0127] [0122] 세포내 시그널링 도메인에는 천연 항원 수용체를 통해 시그널을 모방 또는 근사하는 것들, 동시자극 수용체와 조합된 수용체를 통해 시그널을 모방 또는 근사하는 것들, 및/또는 동시자극 수용체 단독을 통해 시그널을 모방 또는 근사하는 것들이 포함된다. 몇몇 구체예에서, 짧은 올리고펩타이드 또는 폴리펩타이드 링커, 예를 들어, 길이가 2 내지 10 아미노산인 링커, 예를 들면 글라이신들 및 세린들, 예컨대, 글라이신-세린 더블렛을 함유하는 것이 존재하며 CAR의 막간 도메인과 세포질 시그널링 도메인 사이의 연결(linkage)을 형성한다.

[0128] [0123] The 수용체, 예컨대, CAR은 일반적으로 적어도 1개의 세포내 시그널링 성분 또는 성분들을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 수용체는 예컨대, CD3 제타 사슬과 같이, T-세포 활성화 및 세포독성을 매개하는 TCR CD3 사슬과 같은 TCR 복합체의 세포내 성분을 포함한다. 그러므로, 몇몇 측면에서, 항원-결합 부분은 하나 이상의 세포내 시그널링 모듈에 링크된다. 몇몇 구체예에서, 세포내 시그널링 모듈은 CD3 막간 도메인, CD3 세포내 시그널링 도메인, 및/또는 other CD 막간 도메인을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 수용체, 예컨대, CAR은, 하나 이상의 부가적인 분자 예를 들면 Fc 수용체 γ , CD8, CD4, CD25, 또는 CD16의 부분을 추가로 포함한다. 예를 들어, 몇몇 측면에서, CAR 또는 기타 키메라 수용체는 CD3-제타 (CD3- ζ) 또는 Fc 수용체 γ 와 CD8, CD4, CD25 또는 CD16 사이에 키메라 분자를 포함한다.

[0129] [0124] 몇몇 구체예에서, CAR 또는 그 밖의 키메라 수용체의 접합(ligation)시, 수용체의 세포질 도메인 또는 세포내 시그널링 도메인은 정상 이펙터 기능 또는 예컨대 CAR의 발현을 위해 조작된 T 세포와 같은 면역 세포 응답성 중 적어도 한 가지를 활성화시킨다. 예를 들어, 몇 가지 맥락에서, CAR은 시토카인 또는 다른 인자의 분비와 같은, T-헬퍼 활성 또는 세포독성 활성 등의 T 세포 기능을 유도한다. 몇몇 구체예에서, 예를 들어 만일 이것이 이펙터 기능 시그널을 형질도입할 경우 항원 수용체 성분 또는 동시자극 분자의 세포내 시그널링 도메인의 트렁케이티드 부분이 온전한 면역자극 사슬 대신 사용된다. 몇몇 구체예에서, 세포내 시그널링 도메인 또는 도메인들은 T 세포 수용체 (TCR)의 세포질 서열 및 몇몇 측면에서 자연적 관점에서 항원 수용체 결부 후 그러한 수용체와 협업하여 시그널 형질도입을 개시하도록 작용하는 공동-수용체의 서열을 포함한다.

[0130] [0125] 천연 TCR 관점에서, 완전한 활성화는 일반적으로 TCR을 통한 시그널링 뿐만 아니라, 동시자극 시그널 역시도 필요로 한다. 그러므로, 몇몇 구체예에서, 완전한 활성화를 촉진하기 위해, 2차 또는 공동-자극 시그널을 위한 성분 역시도 CAR에 포함된다. 다른 구체예에서, CAR은 동시자극 시그널을 위한 성분을 포함하지 않는다. 몇몇 측면에서, 부가적인 CAR이 동일한 세포에서 발현되어 2차 또는 동시자극 시그널을 발생시키기 위한 성분을 제공한다.

[0131] [0126] T 세포 활성화는 몇몇 측면에서 2가지 부류의 세포질 시그널링 서열에 의해 매개되는 것으로 설명된다: 즉 TCR을 통해 항원-의존성 1차 활성화를 개시하는 것들(1차 세포질 시그널링 서열), 및 항원-독립적 방식으로 작용하여 2차 또는 공동-자극 시그널을 제공하는 것들(2차 세포질 시그널링 서열)이 그것이다. 몇몇 측면에서,

CAR은 이러한 시그널링 성분들 중 한 가지 또는 양자 모두를 포함한다.

- [0132] [0127] 몇몇 측면에서, CAR은 천연 세팅에서 TCR 복합체의 일차 활성화를 촉진하는 시그널링 분자 또는 도메인 으로부터 유래하는 일차 세포질 시그널링 서열을 포함한다. 자극적 방식으로 작용하는 1차 세포질 시그널링 서열은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAMs(immunoreceptor tyrosine-기반 activation motifs)이라 알려져 있는 시그널링 모티프를 함유할 수도 있다. ITAM 함유 1차 세포질 시그널링 서열의 예로는 CD3 제타 사슬, FcR 감마, FcR 베타, CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CDS, CD22, CD79a, CD79b, 및 CD66d로부터 유래한 것들을 들 수 있다. 몇몇 구체예에서, CAR 내 세포질 시그널링 분자(들)은 세포질 시그널링 도메인, 그의 일부, 또는 CD3 제타로부터 유래한 서열을 함유한다.
- [0133] [0128] 몇몇 구체예에서, CAR은 시그널링 도메인 및/또는 동시자극 수용체, 예를 들면 CD28, 4-1BB, OX40, DAP10, 및 ICOS의 막간 부분, 를 포함한다. 몇몇 측면에서, 동일한 CAR은 활성화 및 동시자극 성분들 두 가지 모두를 포함한다.
- [0134] [0129] 몇몇 구체예에서, 활성화 도메인은 하나의 CAR에 포함된 반면 동시자극 성분은 동일한 세포에 존재하는, 다른 항원을 인식하는 다른 CAR에 의해 제공된다. 몇몇 구체예에서, CARs은 활성화 또는 자극 CARs, 동시자극 CARs을 포함하되, 두 가지 모두 동일 세포에서 발현되는 것들이다 (참조: W02014/055668). 몇몇 측면에서, 세포는 하나 이상의 자극 또는 활성화 CAR 및/또는 동시자극 CAR을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 세포는 추가로 억제 CARs (iCARs, 참조: Fedorov 외, *Sci. Transl. Medicine*, 5(215) (December, 2013), 예를 들면 질병 또는 병태와 관련되거나 및/또는 이에 특이적인 것이 아닌 항원을 인식하는 CAR을 포함함으로써 해서, 질병-표적화 CAR을 통해 전달된 활성화 시그널이, 억제 CAR과 그의 리간드와의 결합에 의해 감소 또는 억제되어 오프-표적 효과를 감소시키게 된다.
- [0135] [0130] 몇몇 구체예에서, 재조합 수용체, 예를 들면 CAR의 세포내 시그널링 성분은 CD3 제타 세포내 도메인 및 동시자극 시그널링 영역을 포함한다. 특정 구체예에서, 세포내 시그널링 도메인은 CD28 막간 및 CD3 (예컨대, CD3-제타) 세포내 도메인에 링크된 시그널링 도메인을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 세포내 시그널링 도메인은 CD3 제타 세포내 도메인에 링크된, 키메라 CD28 및 CD137 (4-1BB, TNFRSF9) 공동-자극 도메인을 포함한다.
- [0136] [0131] 몇몇 구체예에서, CAR은 하나 이상, 예컨대 2 이상의 동시자극 도메인 및 활성화 도메인, 예컨대, 1차 활성화 도메인을 세포질 부분에 포함한다. 예시적인 CARs은 CD3-제타, CD28, 및 4-1BB의 세포내 성분을 포함한다.
- [0137] [0132] 몇몇 구체예에서, CAR 또는 다른 항원 수용체는 수용체, 예를 들면 세포 표면 수용체의 트렁케이트된 버전, 예를 들면 트렁케이트된 EGFR (tEGFR)를 발현하기 위해 세포의 형질도입 또는 조작을 확인하는데 이용될 수 있는 마커, 예를 들면 세포 표면 마커를 추가로 포함한다. 몇몇 측면에서, 마커는 CD34, NGFR, 또는 표피 성장인자 수용체 (예컨대, tEGFR) 전부 또는 일부(예컨대, 트렁케이트된 형태)를 포함한다. 몇몇 구체예에서, 마커를 인코딩하는 핵산은 링커 서열, 예를 들면 절단가능한 링커 서열, 예컨대, T2A를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 작동적으로 연결된다. 예를 들어, 마커, 및 임의로 링커 서열은 공개특허출원 No. W02014031687에 개시된 것이면 어느 것이든 무방하다. 예를 들어, 마커는 링커 서열, 예를 들면 T2A 절단가능한 링커 서열에 임의로 링크된, 트렁케이트된 EGFR (tEGFR)일 수 있다. 트렁케이트된 EGFR (예컨대 tEGFR)에 대한 예시적인 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 111에 제시된 아미노산의 서열 또는 SEQ ID NO: 111에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 서열을 포함한다. 예시적인 T2A 링커 서열은 SEQ ID NO: 110에 제시된 아미노산의 서열 또는 SEQ ID NO: 110에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 서열을 포함한다.
- [0138] [0133] 몇몇 구체예에서, 마커는 T 세포 상에서 자연적으로 발견되는 것이 아닌, 또는 T 세포의 표면 또는 그의 일부에서 자연적으로 발견되는 것이 아닌 분자, 예컨대, 세포 표면 단백질이다.
- [0139] [0134] 몇몇 구체예에서, 분자는 비-자가 분자, 예컨대, 비-자가 단백질, 즉, 세포가 입양 전달될 숙주의 면역 시스템에 의해 "자가(self)"인 것으로 인식되지 않는 것들이다.
- [0140] [0135] 몇몇 구체예에서, 마커는 치료 기능을 하지 않고 및/또는 유전자 조작을 위한 마커, 예컨대 성공적으로 조작된 세포를 선택하기 위한 마커로서 사용되는 것 이외에 다른 효과는 나타내지 않는다. 다른 구체예에서, 마커는 치료 분자이거나 또는 몇몇 소망되는 효과, 예를 들면 동시자극 또는 면역 체크포인트 분자와 같이생체 내에서 마주치게될 세포에 대한 리간드일 수 있음으로 해서, 입양 전달 및 리간드와 조우시 세포의 반응을 향상

및/또는 감소시킬 수 있다.

- [0141] [0136] 몇몇 경우에서, CARs은 1세대, 2세대 및/또는 3세대 CARs로 칭해진다. 몇몇 측면에서, 1세대 CAR은 항원 결합시 CD3-사슬 유도된 시그널만을 제공하는 것이고; 몇몇 측면에서, 2세대 CARs은 시그널 및 동시자극 시그널을 제공하는 것, 예를 들면 동시자극 수용체 예를 들면 CD28 또는 CD137로부터의 세포내 시그널링 도메인을 포함하는 것이며; 3세대 CAR은 몇몇 측면에서 상이한 동시자극 수용체들의 복수개의 동시자극 도메인을 포함하는 것이다.
- [0142] [0137] 몇몇 구체예에서, 키메라 항원 수용체는 항원-결합 도메인, 예를 들면 scFv 또는 Fv와 같은, 항원-결합 항체 단편 또는 항체를 함유하는 세포외 부분을 포함한다. 몇몇 측면에서, 키메라 항원 수용체는 본 발명에 설명된 항체 또는 단편을 함유하는 세포외 부분 및 세포내 시그널링 도메인을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 항체 또는 단편은 scFv를 포함하고 세포내 도메인은 ITAM을 포함한다. 몇몇 측면에서, 세포내 시그널링 도메인은 CD3-제타 (CD3 ζ) 사슬의 제타 사슬의 시그널링 도메인을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 키메라 항원 수용체는 세포외 도메인과 세포내 시그널링 도메인을 연결하는 막간 도메인을 포함한다. 몇몇 측면에서, 막간 도메인은 CD28의 막간 부분을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 키메라 항원 수용체는 T 세포 동시자극 분자의 세포내 도메인을 함유한다. 세포외 도메인과 막간 도메인은 직접 또는 간접적으로 연결될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 세포외 도메인과 막간은 스페이서, 본 발명에 설명된 스페이서에 의해 연결된다. 몇몇 구체예에서, 수용체는 예를 들면 CD28 세포외 부분과 같이, 막간 도메인이 유래된 분자의 세포외 부분을 함유한다. 몇몇 구체예에서, 키메라 항원 수용체는 T 세포 동시자극 분자 또는 그의 기능성 변이체로부터 유래된 세포내 도메인을 막간 도메인과 세포내 시그널링 도메인 사이에 함유한다. 몇몇 측면에서, T 세포 동시자극 분자는 CD28 또는 41BB이다.
- [0143] [0138] 예를 들어, 몇몇 구체예에서, CAR은 항체, 예컨대, 항체 단편, CD28 또는 그의 기능성 변이체의 막간 부분이거나 상기 부분을 포함하는 막간 도메인, 및 CD28 또는 그의 기능성 변이체의 시그널링 부분 및 CD3 제타 또는 그의 기능성 변이체의 시그널링 부분을 포함하는 세포내 시그널링 도메인을 포함한다. 몇몇 구체예에서, CAR은 항체, 예컨대, 항체 단편, 4-1BB 또는 그의 기능성 변이체의 막간 부분이거나 상기 부분을 포함하는 막간 도메인, 및 4-1BB 또는 그의 기능성 변이체의 시그널링 부분 및 CD3 제타 또는 그의 기능성 변이체의 시그널링 부분을 포함하는 세포내 시그널링 도메인을 포함한다. 이러한 몇 가지 구체예에서, 수용체는 추가로 Ig 분자, 예를 들면 인간 Ig 분자의 일부를 함유하는 스페이서, 예를 들면 Ig 힌지, 예컨대 IgG4 힌지, 예를 들면 힌지-온리(only) 스페이서를 추가로 포함한다.
- [0144] [0139] 몇몇 구체예에서, 제조합 수용체, 예컨대, CAR의 막간 도메인은, 인간 CD28 (예컨대 수탁번호 P01747.1) 또는 그의 변이체의 막간 도메인, 예를 들면 SEQ ID NO: 2에 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 2에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 막간 도메인이거나 이 막간 도메인을 포함한다; 몇몇 구체예에서, 막간-도메인은 SEQ ID NO: 104에 제시된 아미노산 서열 또는 상기 서열에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0145] [0140] 몇몇 구체예에서, 키메라 항원 수용체는 T 세포 동시자극 분자의 세포내 도메인을 함유한다. 몇몇 측면에서, T 세포 동시자극 분자는 CD28 또는 41BB이다.
- [0146] [0141] 몇몇 구체예에서, 제조합 수용체, 예컨대 CAR의 세포내 시그널링 성분(들)은 인간 CD28의 세포내 동시자극 시그널링 도메인 또는 그의 기능성 변이체 또는 그의 일부, 예컨대 천연 CD28 단백질의 186-187 위치의 LL이 GG로 치환된 도메인을 함유한다. 예를 들어, 세포내 시그널링 도메인은 SEQ ID NO: 112 또는 113에 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 112 또는 113에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 몇몇 구체예에서, 세포내 도메인은 4-1BB의 세포내 동시자극 시그널링 도메인 (예컨대 (수탁번호 Q07011.1) 또는 그의 기능성 변이체 또는 일부의 세포내 동시자극 시그널링 도메인, 예를 들면 SEQ ID NO: 3에 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 3에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0147] [0142] 몇몇 구체예에서, 제조합 수용체, 예컨대 CAR의 세포내 시그널링 도메인은 인간 CD3 제타 자극 시그널링 도메인 또는 그의 기능성 변이체, 예를 들어 인간 CD3 ζ (수탁 No.: P20963.2)의 이소폼 3의 112 AA 세포질 도메인 또는 CD3 제타 시그널링 도메인을 포함한다 (미국특허 No.: 7,446,190 또는 미국특허 No. 8,911,993 참조). 예컨대, 몇몇 구체예에서, 세포내 시그널링 도메인은 SEQ ID NO: 4, 105 또는 159에 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 4, 105 또는 159에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,

96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다.

- [0148] [0143] 몇몇 측면에서, 스페이서는 IgG의 힌지 영역만을, 예를 들면 IgG4 또는 IgG1의 힌지 만을, 예를 들면 SEQ ID NO:1에 제시된 힌지 온리 스페이서를 함유한다. 또 다른 구체예에서, 스페이서는 Ig 힌지, 예컨대, 임의로 CH2 및/또는 CH3 도메인에 연결된 IgG4-유도된 힌지이거나 이를 함유한다. 몇몇 구체예에서, 스페이서는 Ig 힌지, 예를 들면 SEQ ID NO:108에 제시된 바와 같이 CH2 및 CH3 도메인에 링크된 IgG4 힌지이다. 몇몇 구체예에서, 스페이서는 Ig 힌지, 예컨대, SEQ ID NO:107에 제시된 바와 같이 CH3 도메인에만 연결된 IgG4 힌지이다. 몇몇 구체예에서, 스페이서는 글라이신-세린이 풍부한 서열 또는 예컨대 공지의 유연한 링커와 같은 기타 유연한 링커이거나 이들을 포함한다.
- [0149] [0144] 예를 들어, 몇몇 구체예에서, CAR은 항체 예를 들면 항체 단편, 예를 들면 본 발명에 따라 제공된 인간 항-CD19 항체, 예컨대, 본 발명에 설명된 scFvs를 비롯한 단일-사슬 항체, 스페이서, 예를 들면 면역글로불린 분자의 일부, 예를 들면 중쇄 분자의 힌지 영역 및/또는 하나 이상의 불변 영역을 함유하는 스페이서, 예를 들면 Ig-힌지 함유 스페이서, CD28-유도된 막간 도메인, CD28-유도된 세포내 시그널링 도메인, 및 CD3 제타 시그널링 도메인의 전부 또는 일부를 함유하는 막간 도메인을 포함한다. 몇몇 구체예에서, CAR은 항-CD19 항체 또는 단편, 예를 들면 본 발명에 설명된 scFvs를 포함한 여하한 인간 항-CD19 항체, 스페이서 예를 들면 여하한 Ig-힌지 함유 스페이서, CD28-유도된 막간 도메인, 4-1BB-유도된 세포내 시그널링 도메인, 및 CD3 제타-유도된 시그널링 도메인을 포함한다.
- [0150] [0144] 예컨대, 몇몇 구체예에서, CAR은 항체 예컨대 scFvs를 비롯한 항체 단편, 스페이서, 예를 들면 면역글로불린 분자의 일부를 함유하는 스페이서, 예컨대 힌지 영역 및/또는 중쇄 분자의 하나 이상의 불변 영역, 예컨대 Ig-힌지 함유 스페이서, CD28-유래 막간 도메인의 전부 또는 일부를 함유하는 막간 도메인, CD28-유래 세포내 시그널링 도메인, 및 CD3 제타 시그널링 도메인을 포함한다. 몇몇 구체예에서, CAR은 항체 또는 단편, 예컨대 scFv, 여하한 Ig-힌지 함유 스페이서와 같은 스페이서, CD28-유래된 막간 도메인, 4-1BB-유래된 세포내 시그널링 도메인, 및 CD3 제타-유래된 시그널링 도메인을 포함한다.
- [0151] [0145] 몇몇 구체예에서, 이러한 CAR 구조물을 인코딩하는 핵산 분자들은 예컨대, CAR을 인코딩하는 서열의 하류에 T2A 리보솜 스킵 요소를 인코딩하는 서열 및/또는 tEGFR 서열을 추가로 더 포함한다. 몇몇 구체예에서, 이 서열은 SEQ ID NO: 110에 제시된 T2A 리보솜 스킵 요소를 인코딩하는 서열, 또는 SEQ ID NO: 110에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 인코딩한다. 몇몇 구체예에서, 비-면역원성 선택 에피토프로서 트렁케이트형 EGFR (EGFRt)을 발현하도록 (예컨대 동일 구조물로부터 2개의 단백질을 발현하기 위해 T2A 리보솜 스위치에 의해 이격된 CAR 및 EGFRt를 인코딩하는 구조물의 도입에 의해) 항원 수용체 (예컨대 CAR)를 인코딩하는 T 세포들도 만들 수 있으며, 이어서 이를 이러한 세포를 탐지하기 위한 마커로서 사용할 수 있다 (예컨대 미국특허 No. 8,802,374 참조). 몇몇 구체예에서, 서열은 SEQ ID NO:111에 제시된 tEGFR 서열을 인코딩하거나, 또는 SEQ ID NO: 111에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 인코딩한다.
- [0152] [0146] "폴리펩타이드" 및 "단백질"이라는 용어는 아미노산 잔기의 폴리머를 가리키는 것으로 호환적으로 사용되며, 최소 길이로 한정되지 않는다. 제공된 항체 및 항체 사슬 및 기타 펩타이드, 예컨대, 링커 및 CD19-결합 펩타이드를 비롯한 폴리펩타이드들은 천연 및/또는 비-천연 아미노산 잔기를 비롯한 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 이 용어는 또한 폴리펩타이드의 발현후 변형, 예를 들어, 글리코실화, 시알릴화, 아세틸화, 인산화 등도 포함한다. 몇몇 측면에서, 단백질이 소망되는 활성을 유지하는 한, 폴리펩타이드는 본래의 또는 천연 서열과 관련한 변형을 함유할 수 있다. 이러한 변형은 위치-지향된 돌연변이를 통하는 것과 같이 의도적일 수 있으며 또는 예컨대 단백질을 생성하는 숙주의 돌연변이를 통한가 또는 PCR 증폭에 기인하는 에러와 같은 사고에 의할 수도 있다.
- [0153] [0147] 다양한 투여량으로 대상체에 투여된 세포에 의해 발현된 CAR과 같은 재조합 수용체는 일반적으로 인지하거나 질병 또는 병태 또는 치료된 그들의 세포에서 발현된, 관련된 및/또는 특이적인 분자에 결합한다. 분자 (예를 들어, 항원)에 특이적으로 결합하면, 수용체는 일반적으로 ITAM-형질도입 신호와 같은 면역자극 신호를 세포내로 전달하여, 질병 또는 병태를 표적으로 하는 면역 반응을 자극한다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 제1 투여량의 세포는 질병 또는 병태의 세포 또는 조직 또는 질병 또는 병태와 관련된 세포 또는 조직에 의해 발현된 항원에 특이적으로 결합하는 수용체, 예컨대 CAR을 발현한다.
- [0154] [0148] 몇몇 구체예에서, 후행 투여되는 세포는 질병 또는 병태의 세포 또는 조직 또는 질병 또는 병태와 연관

된 세포 또는 조직에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하는, 예컨대 CAR과 같은 수용체를 발현한다. 몇몇 측면에서, 제2 투여량의 세포에 의해 발현되는 수용체는 제1 투여량의 수용체와 동일한 항원에 결합하거나 또는 결합을 두고 경쟁한다. 또 다른 구체예에서, 제2 투여량의 세포에 의해 발현되는 수용체는 제1 투여량의 수용체에 의해 결합된 것과는 다른 항원에 특이적으로 결합한다.

[0155] [0149] 따라서, 몇몇 구체예에서, 제2 수용체 (예컨대, 제2 CAR)는 제1 수용체(예컨대 제1 CAR)과는 예컨대 아미노산 서열 및/또는 면역학적 에피토프(들) 측면에서 어느 정도 상이하다. 예컨대, 어떤 측면에서, 제1 투여량으로 투여된 세포에 의해 발현되는, CAR과 같은 수용체는 후행 투여량의 세포에 의해 발현되지 않는 면역반응성 에피토프를 적어도 1개 함유한다. 몇몇 구체예에서, 제2 투여량으로 투여된 세포에 의해 발현되는, CAR과 같은 수용체는 제1 투여량의 세포에 의해 발현되는 면역반응성 에피토프를 함유하지 않는다. 예시적인 면역반응성 에피토프들에는 B 세포 에피토프 및 T 세포 에피토프가 포함되고, 이들은 세포가 투여되는 대상자의 면역 시스템에 의해 인식될 수도 있다.

[0156] [0150] 그러므로, 몇몇 구체예에서, 후행 투여량의 CAR의 1 이상의 성분은 제1 투여량의 CAR과는 구별된다. 몇몇 구체예에서, 제2(또는 후행) 수용체, 예컨대, CAR은 제1 또는 선행 수용체에 비해 아미노산 서열이 1개 이상 차이가 난다. 예컨대, 몇몇 측면에서, 후행 투여량의 세포에 의해 발현된 CAR은 제1 투여량의 세포에 의해 발현된 CAR에 비해 상이한 scFv, 상이한 시그널링 도메인, 및/또는 상이한 정선을 함유한다. 몇몇 구체예에서, 제1 및/또는 제2 수용체 또는 숙주에 대해 비-내인성인, 예컨대 숙주에 본래 존재하는 분자에 존재하지 않는 기타 분자 내 서열. 이러한 비-내인성 서열의 예로는 CAR과 같은 키메라 분자 내 비-천연적으로 관련되거나 융합된 도메인의 정선에 걸친 서열을 들 수 있다. 몇몇 구체예에서, 후행 투여량의 세포에 의해 발현된 CAR은 제1 투여량의 그것으로부터의 것과는 구별되는 동시자극, 자극, 막간 및/또는 기타 도메인을 함유한다.

[0157] [0151] 이러한 차이점들에는 제1 또는 선행 투여 후 대상자에서 탐지가능한 면역 반응이 나타나는 제1 또는 선행 수용체의 영역에 비해 적어도 하나의 차이, 예컨대 제1 또는 선행 수용체 내 그러한 영역에 대응하는 제2 또는 후행 수용체 내 영역에서의 차이점이 포함된다. 차이점(들)을 포함하는 영역으로는 항원-결합 부분, 예컨대 scFv 부분, scFv 내 프레임워크 영역(들) 또는 가변 영역 부분, 예컨대 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역 부분, 링커 부분, 힌지 부분, 2개의 CAR 도메인 간의 정선, 및/또는 형질도입 또는 발현 마커를 들 수 있다.

[0158] [0152] 몇몇 구체예에서, 제1 또는 기타 선행 및 제2 또는 기타 후행 수용체는 유사한 영역, 예컨대 아미노산 서열 동일성 영역을 포함할 수 있다. 예컨대, 몇몇 구체예에서, 후행 투여량의 세포에 의해 발현되는 CAR은 제1 투여량의 세포에 의해 발현되는 CAR과 동일한 scFv, 동일한 시그널링 도메인, 및/또는 동일한 정선을 함유한다. 몇몇 구체예에서, 이것은 제1 투여량의 그것과 동일한 동시자극, 자극, 막간, 및/또는 기타 도메인을 추가로 함유한다.

[0159] [0153] 몇몇 측면에서, 동일성 영역(들)은 대상자가 제1 또는 선행 투여 후 면역반응을 나타내지 않거나 나타내지 않을 확률이 높은 영역들이다. 이러한 영역은 동시자극 도메인, ITAM-함유 도메인, 막간 도메인, CDR, 및/또는 형질도입 또는 발현 마커 내의 영역을 포함할 수 있다.

[0160] [0154] 몇몇 측면에서, 항원-결합 도메인, 예컨대 항체 또는 그의 항체 단편들 및/또는 도메인, 예컨대, 제2 수용체, 예컨대 제2 CAR의 경쇄 및/또는 중쇄 가변 영역은 제1 수용체, 예컨대 제1 CAR의 그것과는 상이한 종이거나 그로부터 유래한다. 이러한 도메인 또는 단편들의 예시적인 종들은 인간 및 비-인간 종, 예컨대 마우스를 포함한다. 예컨대, 몇몇 구체예에서, 제1 또는 선행 CAR의 scFv은 마우스 항체 또는 FMC63 또는 SJ25C1 scFv와 같은, 쥐-유래된 부분으로부터 유래하고, 제2 또는 후행 CAR의 scFv는 인간 항체 또는 항체 단편으로부터 유래하거나, 또는 그 역이다.

[0161] [0155] 몇몇 구체예에서, 제1 CAR의 항원-결합 도메인, 예컨대, 항체 부분 또는 단편, 예컨대, scFv 및 제2 CAR의 그것은 동일한 종으로부터 유래한다. 이러한 몇몇 구체예에서, 제1 및 제2 수용체의 도메인은 동일한 종으로부터 유래되나 서열상 1개 이상의 차이를 포함한다. 몇몇 측면에서, 제1 CAR의 scFv는 마우스 서열, 예컨대 FMC63으로부터 유래된 것이고, 제2 CAR의 scFv는 이와는 다른 마우스 서열, 예컨대 SJ25C1로부터 유래된 것으로 그 역도 성립한다.

[0162] [0156] 몇몇 측면에서, 제2 투여량의 수용체, 예컨대, CAR은 제1 투여량의 수용체, 예컨대 CAR과 동일한 항원 결합 도메인, 예컨대 항체 단편 또는 그의 일부, 예컨대 scFv를 함유한다. 몇몇 구체예에서, 이러한 후행 또는 제2 수용체는 제1 또는 선행 투여량의 CAR에 비해 하나 이상의 구별되는 정선 영역을 함유한다.

[0163] [0157] 이러한 몇몇 구체예에서, 제2 또는 후행 CAR을 발현하는 세포를 투여하면 제2 CAR이 제1 투여량의 세포

와 동일한 정션 또는 정션들을 함유하거나 및/또는 제1 투여량의 수용체에 존재하는 어떤 비-내인성 서열(들)을 함유한다.

[0164] [0158] 몇몇 측면에서, 제1 및 제2 수용체는 동일한 항원을 표적화시킨다. 몇몇 구체예에서, 제1 및 제2 수용체는 항원의 동일한 에피토프를 표적으로 한다. 예컨대, 몇몇 구체예에서, 제1 및 제2 수용체는 동일 또는 중복되는 에피토프를 표적으로 삼거나 및/또는 항원과의 결합을 두고 서로 경쟁하지만, 예컨대 마우스 및 인간과 같이 각기 다른 종으로부터 유래된다. 또 다른 구체예에서, 제1 및 제2 수용체는 동일 항원 상의 상이한 에피토프를 표적으로 한다.

[0165] [0159] 몇몇 구체예에서, 제2 분자, 예컨대, 수용체, 예컨대, CAR은 제1 분자에 함유된 1 이상의 면역원성 부분(들)을 포함하지 않는다: 몇몇 구체예에서, 제2 수용체는 제1 수용체 내의 여하한 면역원성 부분 (또는 명시된 분석법에 의해 면역원성인 것으로 여겨지는 부분)도 함유하지 않는다. 이러한 몇몇 구체예에서, 제2 수용체, 예컨대, CAR은 예컨대 특정 대상자 및/또는 특이적인 면역 반응이 탐지된 대상자, 예컨대 치료 중인 대상자에서 제1 수용체에 함유된 면역원성 부분(들)을 함유하지 않거나 및/또는 면역원성인 것으로 여겨지는 부분을 함유하지 않도록 특별히 선택 및/또는 설계된다. 몇몇 측면에서, 제1 수용체, 예컨대 CAR의 면역원성 부분(들)은 상이한 서열 또는 상이한 서열들에 의해 치환된 것이다.

[0166] [0160] 몇몇 구체예에서, 예컨대 대상자가 제1 수용체 또는 분자에 의해 표적화된 항원 또는 기타 결합 파트너를 표적화하는 치료에 대해 내성이 생기거나 및/또는 대상자 또는 질병 조직(예컨대 종양)에서 항원 또는 결합 파트너가 하향조절되거나 돌연변이된 경우, 제2 투여량의 수용체(예컨대 CAR)은 제1 투여량의 수용체에 의해 표적화된 것과 구별되는 항원을 표적화하도록 설계 또는 선택된다. 이러한 몇몇 측면에서, 제2 투여량(즉, 제2 분자 예컨대 제2 수용체를 발현하는 세포)의 투여는 세포, 동일한 수용체를 발현하는 세포, 및/또는 동일한 항원을 표적화하는 수용체를 발현하는 세포를 함유하는 후행 투여량을 투여하는 것보다, 예컨대 종양 부담과 같은, 대상자 내 질병 부담을 더 크게 감소시키는 효과를 낸다.

[0167] [0161] 이와 관련하여, 몇몇 구체예의 방법은 그 질병 또는 병태가 특정 에피토프 또는 항원 또는 기타 질병 표적을 표적화하는 치료에 내성을 갖게 된 질병 또는 병태에 걸린 대상자에서, 그 질병 또는 병태 또는 그의 세포에 의한 돌연변이 또는 하향-조절을 일으키는 등, 이러한 질병 또는 병태를 치료하는데 유용할 수 있다. 그러므로, 유사한 그러나 상이한 질병-관련 에피토프 또는 질병을 표적화하는 능력을 제공함으로써, 몇몇 구체예에서 이러한 방법들은 예컨대 대상자 내 이와 같이 조작된 세포들의 확장 또는 지속성의 증가를 통하여, 수용체 또는 기타 재조합 분자들을 발현하는 세포에 대한 대상자의 전체적인 노출 증가에 의해서 뿐만 아니라, 심지어 세포로 하여금 원래의 표적의 하향조절 또는 돌연변이 맥락에서도 기능하도록 허용함으로써, 그 효능이 개선된다.

[0168] IV. 투여된 세포에 대한 숙주 면역 반응

[0169] [0162] 몇몇 구체예에서, 입양 세포 치료법의 효능은 투여된 세포 및/또는 구조물에 대한 대상자 내 면역 반응의 발달에 의해 제한될 수 있다. 본 발명에서는 B 세포 악성종양에 걸린, 종종 면역억제된 어떤 대상자들에서조차, 입양 세포 치료법에서 투여된 세포에 의해 발현되는 수용체의 영역에 특이적인 면역 반응이 탐지될 수 있다는 것이 관찰되었다. 이에 더해, 몇몇 맥락에서, 세포 치료법에 의해 표적화되는 질병-특이적 또는 질병-관련 항원의 손실, 하향조절 및/또는 변형이 대상자에서 일어날 수 있고, 이는 그 항원 또는 에피토프를 표적화하는 치료법의 효능을 손상시킬 수 있다. 예컨대, 항-CD19 면역요법으로 치료받은 어떤 대상자에서 CD19-음성 질환이 관찰된 바 있다. 몇몇 구체예에서, 제공된 방법은 이러한 한 가지 이상의 맥락에서 효능을 증강시켜준다.

[0170] [0163] 제공된 방법의 몇몇 구체예에서, 하나 이상의 투여량 또는 투여, 예컨대 제2 수용체를 발현하는 세포의 후행 투여량(들) 또는 후행 투여가, 대상자에서 제1 재조합 수용체 및/또는 세포에 대한 후천적 또는 특이적 면역 반응이 존재, 탐지가가능하거나 또는 특정 수준 이상으로 탐지가가능한 때에 실시된다. 재조합 분자에 대하여 특이적 면역 반응이 존재하거나 특정 수준으로 나타난다는 것은 그 세포에 의해 발현된, 예컨대 CAR이나 트랜스제닉 TCR과 같은 수용체의 면역원 특성과 관계될 수 있거나, 및/또는 대상자가 그에 노출된 기간과 관계될 수 있다. 예컨대, 몇몇 구체예에서, 면역 반응, 예컨대, 수용체에 대한 특이적인 체액성 및/또는 세포-매개형 면역 반응이 제1 수용체를 발현하는 세포에 대하여 대상자가 최초로 노출된지 약 28일, 또는 약 35일, 또는 또는 약 42일 후에 탐지된다. 그러므로, 몇몇 구체예에서, 제1 재조합 수용체 또는 제1 또는 선행 투여량의 세포에 대한 면역 반응, 적응 또는 특이적 면역 반응, 탐지가가능한 면역 반응 및/또는 기억 반응이 대상자에서 일어난 후에, 제1 투여량의 세포에 의해 발현된 수용체를 발현하지 않는 수용체-발현 세포의 후행 투여량이 투여된다. 이와 관련하여, 후행 투여량의 세포가 대상자 내에서 확장 및/또는 지속될 수 있는 능력은, 후행 투여량의 세포가 제1 투여량의 경우와 동일한 수용체를 발현하는 다른 방법에 비해 더 향상된다. 몇몇 구체예에서, 제2 또는 후행

투여량은 적어도 약 28일, 35일, 또는 42일 후의 시점에서 투여된다. 몇몇 구체예에서, 이것은 적어도 약 14 또는 21일에 투여된다.

- [0171] [0164] 본 발명의 방법은 예컨대 제1 또는 제2 투여량 투여 후 그리고 후행 또는 그 다음의 후행 투여량 투여 전에, 그러한 면역 반응 또는 그의 표시자의 존재 여부 또는 수준을 탐지하는 것을 포함할 수 있다.
- [0172] [0165] 몇몇 구체예에서, 후행 투여량의 투여 시기 및/또는 투여를 할지 말지의 결정은 대상자가 그러한 면역 반응 또는 탐지가능한 그의 판독, 예컨대 제1 투여량의 세포에 의해 발현되는, CAR과 같은 재조합 수용체 또는 세포에 대해 특이적인 탐지가능한 특이적 또는 적응적 숙주 면역 반응을 나타내는지 여부에 따라, 및/또는 그러한 반응이 특정 수준 이상으로 검출되는지 여부에 달려있다. 몇몇 구체예에서, 이러한 반응이 탐지될 경우, 대상자에게 후행 투여량이 투여된다.
- [0173] [0166] 일반적으로, 후행 투여량은 대상자가 제1 투여량의 세포에 의해 발현되는 예컨대 CAR과 같은 수용체에 대하여 예컨대 체액성 또는 세포-매개성 면역 반응과 같은 특이적이거나 적응성 면역 반응을 나타내는 시점 또는 대상자가 그러한 반응 또는 표시자를 탐지가능한 수준 또는 허용가능한 수준 이상으로 나타내는 시점에서 투여된다. 몇몇 측면에서, 후행 투여량의 투여 시점에서, 대상자는 제1 투여량의 세포에 의해 발현되는 예컨대 CAR과 같은 수용체에 대하여 체액성 또는 세포-매개성 면역 반응을 나타낸다.
- [0174] [0167] 몇몇 구체예에서, 숙주 면역 반응은 체액성 면역 반응이거나 이를 포함한다. 체액성 면역 반응은 세포 또는 그에 의해 발현되는 수용체에 특이적인 항체가 대상자의 혈청, 그 밖의 체액 및/또는 장기나 조직에 존재하는 것에 의해 동정될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 특정 이소타입의 이러한 항체들, 예컨대 IgM 또는 IgG, 예컨대, IgG1, IgG2, IgG3, 및/또는 IgG4이 존재하며; 몇몇 구체예에서 이들은 IgE를 포함한다.
- [0175] [0168] 몇몇 구체예에서, 면역 반응은 세포-매개형 성분이거나 이를 포함한다. 세포-매개형 반응은 T 세포 수용체를 통한, 재조합 수용체 또는 세포의 1 이상의 에피토프를 특이적으로 인식하는 세포, 예컨대, T 세포, 예컨대, 헬퍼 또는 세포독성 T 세포의 존재에 의해 동정될 수 있다.
- [0176] [0169] 몇몇 구체예에서 면역 반응은 1차(primary) 면역 반응이다; 몇 가지 측면에서, 면역 반응은 기억 반응이다.
- [0177] [0170] 전술한 구체예들 중 몇몇에서, 탐지가능한 면역 반응은 특정 항원 및 세포에 대한 특이적인 면역 반응을 평가하기 위한 몇몇 공지 방법에 의해 탐지가능한 양을 참조로 한 것이다. 예컨대, 몇몇 구체예에서, 특정 종류의 면역 반응은 예컨대 CAR과 같은 재조합 수용체의 에피토프에 대한 결합과 같이, 세포에 존재하는 항원에 특이적으로 결합 및/또는 무력화하는 항체의 존재 여부를 알아내기 위해 대상자로부터의 혈청에 대해 ELISpot, ELISAs, 또는 세포-기반 항체 검출 방법, 예컨대 유세포분석법을 수행함으로써 탐지가능하다. 이러한 몇몇 분석법에서, 검출된 항체의 이소타입이 결정되고 이로부터 반응의 종류 및/또는 그 반응이 기억 반응인지 아닌지를 알 수 있다.
- [0178] [0171] 몇몇 구체예에서, 재조합 수용체 내 에피토프에 반응하여 세포독성을 유도하거나 이에 특이적으로 결합하는 CD8+ T 세포들의 검출을 위한, 세포독성 cytotoxic T-림프구(CTL) 분석법, 및/또는 자극자 세포로서 재조합 수용체를 발현하는, 예컨대 조사된 세포와 같은 세포를 이용하는 혼합 림프구 반응에 의해, 특이적인 면역 반응이 검출될 수 있다.
- [0179] [0172] 몇몇 측면에서, 검출가능한 면역 반응은 그러한 방법에 의해 대조군 샘플, 예컨대 재조합 수용체를 발현하지 않는 세포 또는 대조군 펩타이드로 코팅된 웰 또는 비-코팅 웰의 수준 및/또는 재조합 수용체를 발현하는 세포에 의한 치료 전 대상자로부터의 치료 전 혈청 또는 혈액 샘플에 기초하여 검출되는 수준보다 높거나 유의적으로 더 높은 수준으로 검출되는 반응이다.
- [0180] [0173] 몇몇 측면에서, 숙주 면역 반응의 유무 및/또는 그의 양, 정도 등은, 예컨대 제1 투여량 또는 후행 투여량(들)의 투여 후에, 탐지 또는 측정된다.
- [0181] [0174] 체액성 면역 반응은 결합 분석, 면역 분석 및 세포-기반 분석과 같이, 특정한 항원이나 세포에 특이적인 항체를 검출하기 위한 여러가지 공지 분석법에 의해 검출될 수 있다. 이들 분석법에는 항체의 특정한 기능, 예컨대 항원에 대한 결합시, 특정 이펙터 기능을 수행하는 이들의 능력과 같이, 항원의 특정 기능의 존재 여부를 평가하기 위한, 예컨대 무력화 항체 분석법이 포함될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 체액성 면역 반응 결과, 예컨대 항원-특이적 항체, 예컨대, 무력화 항체를 세포-기반 분석법을 이용함으로써, 예컨대 대상자로부터 수득한 치료 전 및 또는 치료후 세포와 함께 재조합 수용체를 발현하는 세포 (및 대조군 세포)를 같이 인큐베이션하고 예컨

대 유세포분석법 또는 효소적 분석법에 의해, 항원-특이적 결합 및/또는 다른 결과, 무력화 결과를 검출함으로써 세포-기반 분석법을 이용하여 무력화 항체를 탐지한다. 몇몇 구체예에서, ELISA, 및/또는 ELISpot 분석법을 이용하여 CAR과 같은 재조합 수용체 및 수용체 부분을 나타내는 개별 펩타이드를 이용하는 것과 같은 공지 기술을 이용하여 매핑된 에피토프에 특이적인 항체를 검출 및 정량한다. [예컨대, Berger et al. *Blood*. 2006 March; 107(6): 2294-2302, Berger et al. *J Virol*. 2001 January 75(2): 799-808, Riddell et al. *Nature Medicine*. 1996 February 2(2): 216-223, Berger et al. *Blood*. 2005 February 105(4): 1640-1647, Jensen et al. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 September; 16(9): 1245-1256 참조]. 몇몇 구체예에서 검출가능한 항체들의 이소타입을, 예컨대 인간 이소타입과 같은 특정 이소타입에 특이적인 검출 항체를 이용함으로써 평가한다.

[0182] [0175] 몇몇 공지 기술법을 이용하여 세포 및/또는 수용체에 대한 세포성 또는 세포-기반 면역 반응을 검출 및/또는 측정할 수 있다. 이러한 기술에는 재조합 수용체, 예컨대, CAR 및/또는 투여된 세포에서 에피토프에 응답하여 특이적으로 결합 및 세포독성을 유도하는 CD8+ T 세포들의 검출을 위한 세포독성 T-림프구(CTL) 분석법이 포함될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 이러한 분석법은 PBMC 또는, 혼합 림프구 반응인데, 이것은 리스폰더 세포로서 혈액이나 기타 장기 또는 조직으로부터 다른 숙주-유래 세포, 예컨대 자극자 세포와 같은 CAR을 발현하는 조사된 T 세포들을 이용하는 혼합 림프구 반응이다. 자극자 세포는 일반적으로 자가유래이고 대상자에게 투여된 동일한 세포일 수 있으며, 조사된 것일 수 있다. 대조군 샘플에서는 자극자 세포 대신 음성 대조군으로서, 관심 대상 트랜스유전자를 발현하지 않는 비-형질도입 세포 또는 세포들을 이용할 수 있다. 마찬가지로, 예비-치료 시점으로부터의 리스폰더 세포 샘플 또는 기타 대상자를 대조군 샘플에서 이용할 수 있다. 몇몇 측면에서, 이러한 분석법은, 투여된 세포에 존재하는 항원을 특이적으로 인식하여 세포독성 반응을 유도하는, 대상자 내에 존재하는 세포독성 T 세포들을 탐지하기 위한 크롬 방출 분석법을 이용하는 것처럼, 예컨대 항원-특이적 세포 용해와 같은 1 이상의 이펙터 기능을 수행하는 숙주 세포의 능력을 평가한다. 몇몇 구체예에서, 세포 투여 전 및 투여 후에, 대상자로부터 말초혈액 세포, 예컨대 PBMCs를 수득하고, 재조합 수용체를 발현하도록 변형된 자가 T 세포를 이용하는, 세포 용해 분석법과 같은 분석법에서 이들을 각각 이용하는데, 이들은 일반적으로 조사된다. 특이적 용해는 수용체-특이적 세포-매개형 면역 반응의 존재 여부를 가리킨다. 에피토프 매핑은 재조합 수용체의 일부를 나타내는 펩타이드 패널을 이용하여 수행될 수 있다 [예컨대, Berger et al. *Blood*. 2006 March; 107(6): 2294-2302, Berger et al. *J Virol*. 2001 January 75(2): 799-808, Riddell et al. *Nature Medicine*. 1996 February 2(2): 216-223, Berger et al. *Blood*. 2005 February 105(4): 1640-1647, Lamers, *Blood* 2011 117: 72-82 참조]. 항원-특이적 T 세포들을 계수하는데HLA 테트라머 결합 분석법을 이용할 수 있다. 몇몇 측면에서, 트랜스유전자-특이적 CD4+ T 세포를 검출하기 위해, 림프구증식 분석법(LPAs) 및/또는 분비된 사이토카인의 평가를 위한 분석법, 예컨대 ELISA 및/또는 세포내 염색법 및 유세포분석법에 의한 평가법이 이용된다.

[0183] [0176] 몇몇 구체예에서, 예컨대 본 명세서에 설명된 분석법, 예컨대 에피토프 매핑을 이용함으로써, 대상자 내 수용체나 세포에 대한 특이적 면역반응의 존재 여부를 평가한다. 몇몇 측면에서, 제1 투여 후 대상자에서 그에 대한 면역 반응이 일어났거나 일어났을 확률이 있는, 제1 수용체 내 영역 및/또는 면역원성 에피토프를 결정하고 이러한 면역원성 에피토프 또는 영역을 함유하지 않고 및/또는 그러한 영역 내에서 아미노산 차이를 함유하는 제2 수용체를 선택한다.

[0184] [0177] 몇몇 구체예에서, 제1 또는 선행 투여 후 그러한 면역 반응의 존재 여부가 탐지되고, 제1 또는 선행 수용체에 비해 제2 또는 후행 수용체에서 어떠한 차이를 존재시킬 것인지 설계하도록 정보를 얻는다. 이러한 탐지는 대상자가 그에 대해 특이적인 면역 반응을 나타내는 제1 또는 그 밖의 선행 수용체(예컨대, CAR)의 적어도 하나의 영역을 동정하는 것을 포함할 수 있다.

[0185] [0178] 그러므로, 몇몇 구체예에서, 제2 투여량의 세포는 이들이 발현하는 수용체에 기반하여 선택된다. 몇몇 구체예에서, 제2 투여량은 제1 또는 선행 투여량의 투여 후 대상자가 면역 반응을 일으킨 특정한 면역반응성 에피토프를 함유하지 않거나 및/또는 그러한 면역반응성 에피토프 또는 면역원성인 것으로 결정된 그러한 여하한 에피토프를 함유하지 않는 수용체(예컨대, CAR)를 함유하지 않는다. 몇몇 측면에서, 면역원성인 것으로 결정된 1 이상의 영역에서 제1 투여량의 세포에 의해 발현되는 수용체와 상이한 수용체를 발현하는 세포의 제2 또는 후행 투여량을 대상자에게 투여할 수 있다. 따라서, 몇몇 구체예에서, 제2(또는 기타 후행) 투여량으로 투여될 수용체-발현 세포의 선택은 환자-특이적이다.

[0186] [0179] 몇몇 구체예에서, 제1 투여량의 세포에 의해 발현된 수용체와 상이한, 예컨대 CAR과 같은 수용체를 발현하는 세포를 함유하는 제2 투여량의 투여는 제1 투여량의 수용체에 대해 특이적인, 탐지가능한 체액성 또는 세포-매개형 면역 반응을 이끌어내지 않는다. 몇몇 측면에서, 제2 투여량은 제2 투여량의 세포에 의해 발현된 수

용체에 대해 탐지가능한 체액성 또는 세포-매개형 면역 반응을 이끌어내지 않는다.

[0187] [0180] 그러므로, 몇몇 구체예에서, 대상자는 제2 수용체를 발현하는 세포의 투여 후 제2 수용체에 대한 탐지가능한 면역 반응, 예컨대 체액성 또는 세포-매개형 면역 반응을 나타내지 않거나, 또는 특정 기간 이내에, 예컨대 그러한 세포 투여 후 약 60일 이내에 그러한 반응을 나타내지 않는다.

[0188] [0181] 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법은 제2 투여량의 세포에 의해 발현되는 수용체에 대한 항체의 유도를 방지하거나 또는 그러한 항체의 수준을 감소시킨다. 예컨대, 제1 투여량의 세포와 동일한 수용체를 발현하는 세포의 후행 투여량이 투여된 방법에 비해, 후행 투여량의 투여 후, ELISA에 의한 대상자 혈청에서 측정되는 바와 같이, 예컨대 항-CAR와 같은 항-수용체의 항체 역가가 감소된다. 그러므로, 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법은 그렇지 않으면 명확하였을 숙주 면역 반응을 예방 또는 감소시킴으로써, 투여된 세포에 대한 대상자의 노출 증가에 의해 효능을 향상시킨다.

[0189] V. 투여(Dosing)

[0190] [0182] 본 발명의 방법은 일반적으로 예컨대 경시적으로, 세포에 대한 대상자 노출을 증가시킴으로써, 입양 세포 치료법의 효능을 증가시키도록 설계된다. 본 발명의 방법은 먼저 제1 투여량을 투여한 다음 일반적으로 제2 및/또는 1 이상의 부가적인 후행 투여량을 투여하되, 이 때 어떤 상이한 투여량들 사이에 특정한 시간 간격(time frame)이 주어진다.

[0191] [0183] 입양 세포 치료의 관점에 있어서, 주어진 "투여량(dose)"의 투여는 단일 조성물로서의 주어진 양 또는 수의 세포의 투여 및/또는 단일의 연속된 투여, 예컨대 단일 주사 또는 연속 주입으로서의 투여를 포함하며, 또한, 3일 이하의 특정 시간 동안 다수의 개별 조성물 또는 주입에 제공되는 분할 투여량으로서의 주어진 양 또는 세포 수의 투여를 포함한다. 따라서, 몇몇 측면에 있어서, 투여량은 단일 시점에서 주어지거나 개시되는 특정 수의 세포의 단일 또는 연속 투여이다. 그러나 몇몇 측면에 있어서는, 투여량을 하루에 3 번 또는 이를 동안 또는 하루에 여러 번 주입하여 3 일을 넘지 않는 기간 동안 다중 주사 또는 주입으로 투여한다.

[0192] [0184] 따라서, 몇몇 측면에서, 세포들은 단일 의약 조성물로서 투여된다.

[0193] [0185] 몇몇 구체예에서, 세포들은 단일 투여량의 세포들을 집합적으로 함유하는 조성물의 형태로 복수회 투여된다.

[0194] [0186] "분할 투여량(split dose)"이라는 용어는 나뉘어진 투여량을 의미하며 이에 따라 예컨대 하루 이상의 기간 동안 1회를 초과하여 주입 투여된다. 이러한 투여 유형은 본 발명의 방법에 의해 포괄되며 단일 투여량인 것으로 간주된다. 분할 투여량은 3일 초과 기간 동안 주입된다.

[0195] [0187] 따라서, 몇몇 측면에 있어서의 제1 투여량 및/또는 연속 투여량은 분할 투여량으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 몇몇 구체예에 있어서, 투여량은 2일 또는 3일 이상 동안 대상자에게 투여될 수 있다. 분할 투여를 위한 예시적인 방법은 제1일에 투여량의 25 %를 투여하고 제2일째에 투여량의 나머지 75 %를 투여하는 것을 포함한다. 다른 구체예에 있어서, 제1 투여량의 33 %는 제1일에 투여될 수 있고 나머지 67 %는 제2일에 투여될 수 있다. 몇몇 측면에 있어서, 투여량의 10 %는 제1일에 투여되고, 투여량의 30 %는 제2일에 투여되고, 투여량의 60 %는 제3일에 투여된다. 몇몇 구체예에 있어서, 분할 투여량은 3일 이상 동안 확산되지 않는다.

[0196] [0188] 몇몇 구체예에서, 몇몇 측면에서 제1 투여 및 제2 투여 사이의 타이밍 관점에서 동일한 타이밍 가이드라인을 이용하여 다회 투여가 수행된다. 예컨대 제1 투여량 및 다회의 후행 투여량을 투여하되, 각각의 후행 투여량은 제1 또는 선행 투여량의 투여로부터 약 28일 이상 경과 시점에서 주어진다.

[0197] [0189] 본 발명에서 "제1 투여량(first dose)"은 주어진 투여량이 후행 또는 제2 투여량의 투여보다 선행하여 주어진다는 타이밍을 설명하기 위해 사용된다. 그렇다고, 이 용어가, 반드시 대상자가 그 전에 세포 치료 투여량을 전혀 받은 적이 없거나, 심지어 대상자가 동일 또는 상이한 재조합 수용체를 발현하거나 또는 동일 또는 상이한 항원을 표적화하는 동일한 세포 또는 세포들의 투여량을 받은 적이 없음을 암시하는 것은 아니다. 예컨대, 몇몇 구체예에서, 본 발명에서 사용된 제1 투여량은 대상자에 대한 세포의 제2 또는 그 이상의 주입을 나타낸다.

[0198] [0190] 본 발명에서, "제2 투여량(second dose)"은 주어진 투여량이 선행, 예컨대 제1 투여량의 투여보다 후행하여 주어진다는 타이밍을 설명하기 위해 사용된다. 그렇다고 이 용어가 반드시, 대상자가 그 전에 세포 치료 투여량을 한 번만 받았거나 대상자가 동일한 재조합 수용체를 발현하거나 동일한 항원을 표적화하는 세포 투여량들만을 받았음을 암시하는 것은 아니다. 몇몇 구체예에서, 제1 및 제2 투여량 사이에 다회 투여량이 투여되

고 및/또는 제1 투여량에 선행하여 또는 제2 투여량에 후행하여 다회 투여량이 투여되기도 한다. 제1 투여량의 세포(또는 제1 투여량의 수용체를 발현하는 세포)가 다회 투여된 후 제2 투여량의 세포 또는 수용체가 다회 투여될 수 있다. 제1 및 제2라는 용어는 단지 시간과의 관계상 서로 투여량이 다르다는 것을 설명하기 위해 사용된 것이다.

- [0199] [0191] 제1 투여량과 같은 선행 투여량(prior dose)과 관련하여, "후행 투여량(subsequent dose)"이라는 용어는 선행, 예컨대 제1 투여량 투여 후, 동일 대상자에게 어떤 투여량이 투여되었음을 의미한다. 몇몇 측면에서, 후행 투여량은 제2, 제3, 제4 및 기타 등등의 투여량이다. "후행(subsequent)"이라는 용어든, 특정한 수치값(예컨대 "제2")이든, 두 가지 모두 투여량을 설명할 경우, 개재 투여량의 부재를 암시하지 않는다.
- [0200] [0192] 몇몇 구체예에서, 제1 투여량과 동일한 수용체 예컨대 CAR을 발현하는 세포들을 1 이상의 연속 투여량으로 대상자에게 투여할 수 있다.
- [0201] [0193] 제1 투여량과 같은 선행 투여량과 관련하여, "연속 투여량(consecutive dose)"이라는 용어는 선행 투여, 예컨대 제1 투여 후 중간(intervening) 투여량을 투여함이 없이, 동일한 대상자에게 투여되는 투여량을 가리키는 것이다. 그럼에도 불구하고, 이 용어는 단일 분할 투여량 내에 포함되는 일련의 주입 또는 주사에 의한 제2, 제3 및/또는 기타의 주사 또는 주입은 포함하지 않는다. 따라서, 달리 명시되지 않는 한, 1, 2 또는 3일 기간 내에 제2주입은 본 발명에서 사용된 "연속" 투여량으로 간주되지 않는다. 마찬가지로, 분할 투여량 내에서 복수 투여량의 제2, 제3 및 기타 등은 "연속" 투여량의 의미에서 "중간" 투여량으로 간주되지 않는다. 따라서 달리 명시되지 않는 한, 제1 또는 선행 투여량의 개시 후, 3일 이상 일정 기간 투여된 투여량은 대상체가 제1 투여량에 따르는 세포의 제2 또는 후속 주사 또는 주입을 받았다 할지라도, 제1 또는 선행 투여량의 개시후 3일 이내에 제2 또는 후속 주사 또는 주입이 일어나는 한, "연속" 투여량으로 간주된다.
- [0202] [0194] 따라서, 달리 명시되지 않는 한, 3일까지 기간 동안의 동일한 세포의 다회 투여는 단일 투여량으로 간주되고, 초기 투여 3일 이내의 세포 투여는 후행 투여량으로 간주되지 않으며, 제2 투여량이 제1 투여량에 "연속"인지 여부를 결정하기 위한 목적의 중간 투여량으로 간주되지 않는다.
- [0203] [0195] 몇몇 구체예에서, 다회 연속 투여량이 주어진다. 다회 연속 투여량은 예컨대 제1 및 제1 연속 투여량 간의 타이밍에 대하여 설명된 것과 동일한 타이밍 가이드라인을 이용하여 투여될 수 있으며, 예컨대, 제1 및 다회 연속 투여량을 투여하되, 각각의 연속 투여량을 제1 투여 또는 직전의 선행 투여로부터 약 14일 이후 약 28일 미만, 예컨대 약 21일 후에 투여한다. 몇몇 구체예에서, 제1 투여량, 연속 투여량 각각은 제1 투여량으로 투여되는 것과 동일한 세포 및/또는 제1 투여량의 세포에 의해 발현되는 동일한 재조합 수용체를 포함한다. 이러한 몇몇 구체예에서, 이와 같은 연속 투여량(들)의 투여 후, 제2 투여량이 투여되며, 몇몇 경우 추가적인 연속 투여량(들)이 더 투여된다.
- [0204] [0196] 따라서, 몇몇 측면에서, 동일한 수용체를 발현하는 세포를 대상자에게 다회 투여할 수 있다. 몇몇 구체예에서, 제1 수용체를 발현하는 세포를 함유하는 다회 연속 투여량을, 상이한 수용체를 발현하는 세포의 후행 투여 전, 예컨대 제2 투여량을 투여하기 전에 투여할 수 있으며, 몇몇 구체예에서는 그에 이어 제2 투여량의 세포를 연속 투여할 수도 있다. 몇몇 측면에서, 제2 (또는 제3, 제4, 제5 및 기타 등등) 수용체를 발현하는 세포의 다회 연속 투여량을 대상자에게 투여할 수 있다.
- [0205] [0197] 몇몇 구체예에서, 예컨대, 다중 임상 시험 관점에서, 제1 임상시험의 조사 대상 수용체를 발현하는 세포의 제1 투여량을 대상자에게 투여하고 제2 임상시험의 조사 대상 수용체를 발현하는 세포의 제2(또는 기타 후행) 투여량을 투여할 수 있다.
- [0206] [0198] 몇몇 구체예에서, 제공된 방법은 대상자에 있어서 질병 또는 장애의 장기간 또는 연속적 치료 또는 관리를 위해 제공되는 것으로, 대상자의 동일한 질병 또는 병태를 표적화하는 서로 다른 재조합 수용체들을 각기 발현하는 조작된 세포들의 제1, 제2, 제3 및/또는 부가적인 다회 연속 투여를 포함한다. 이러한 장기간 치료 또는 관리는 대상자를 모니터링하여 특정한 효능 손실 표시자 또는 그러한 손실 위험이 감지되거나 감지될 경우, 다음의 후행 투여(예컨대 다음 후행 수용체)를 실시하는 것을 포함할 수 있다. 몇몇 구체예에서, 각각의 후행 투여는 선행 투여량 내 세포에 대한 노출, 확장, 지속성 감소, 대상자에서 그에 특이적인 면역 반응, 표적 항원 내 재발, 내성 및/또는 하향 조절 또는 변화되는 것과 같은, 효능 감소 위험을 알리는 지시자가 하나 이상 감지될 경우, 개시된다.
- [0207] [0199] 몇몇 구체예에서, 표적 질병 또는 장애의 재발의 재치료 및/또는 재발 방지, 및/또는 제1 투여 후 재조합 수용체를 발현하는 세포에 대한 노출 감소 방식을 위해, 예컨대 그러한 세포의 지속성 또는 확장 감소 또는

그러한 세포 개수의 감소가 감지될 경우, 후행 투여량이 투여된다. 따라서, 몇몇 구체예에서 제1 또는 기타 선행 투여 및 제2 또는 기타 후행 투여 사이의 시간 동안 하나 이상의 이러한 파라미터들이 측정, 탐지 또는 평가되며, 후행 투여를 투여하기 위한 타이밍 또는 투여 여부는 그러한 평가 결과에 기초하여 결정된다. 예컨대, 제2 투여량은 수용체-발현 세포의 개수 또는 농도가 목적하는 수준 미만이거나 또는 어떤 최대 백분율 또는 기타 측정 농도나 개수 미만으로 저하되는 시점에서 투여될 수 있다.

[0208] 투여량 또는 크기

[0209] [0200] 몇몇 구체예에서, 제1 또는 후행 투여량은 몇 개의 세포, 몇 개의 재조합 수용체(예컨대 CAR)-발현 세포, 몇 개의 T 세포, 또는 몇 개의 말초 혈액단핵구세포(PBMC)를 대상체의 체중 킬로그램당 그러한 세포를 약 10^5 내지 약 10^6 의 범위 각각에, 및/또는 그러한 세포의 수는 대상체의 체중 킬로그램당 그러한 세포의 약 10^5 또는 약 10^6 이하로 포함한다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 제1 또는 후행 투여량은 대상체의 체중 킬로그램당 약 1×10^5 이하, 약 2×10^5 , 약 5×10^5 또는 약 1×10^6 또는 그와 같은 세포를 포함한다. 일부 구체예에서, 제1 투여량은 대상체 체중 킬로그램 당 약 1×10^5 , 약 2×10^5 , 약 5×10^5 또는 약 1×10^6 또는 그러한 세포를 포함하거나, 상기 값들 중 임의의 2개 사이의 범위내에 있다. 특정 구체예에서, 세포의 수 및/또는 농도는 재조합 수용체 (예를 들어, CAR) 발현 세포의 수를 지칭한다. 다른 구체예에서, 세포의 수 및/또는 농도는 투여된 모든 세포, T 세포 또는 말초 혈액 단핵구 (PBMC)의 수 또는 농도를 지칭한다.

[0210] [0201] 몇몇 구체예에서, 예를 들어 대상체가 사람인 경우, 제1 또는 후행 투여량은 약 1×10^8 개 미만의 총 재조합 수용체(예를 들어, CAR) 발현 세포, T 세포 또는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMCs)를 포함하며, 예컨대 약 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 또는 1×10^8 또는 그 이하의 총 세포 수, 예를 들어 약 1×10^6 내지 1×10^8 그러한 세포들, 또는 상기 값들 중 임의의 2개 사이의 범위를 포함한다.

[0211] [0202] 몇몇 구체예에서, 제1 또는 후행 투여량은 대상의 m^2 당 총 재조합 수용체 (예를 들어, CAR) 발현 세포, T 세포 또는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMCs)를 약 1×10^8 개 이하로 함유하고, 예를 들어, 대상자 m^2 당 약 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 또는 1×10^8 과 같은 약 1×10^6 내지 1×10^8 범위의 그러한 대상체의 m^2 당 세포 수, 또는 상기 값 중 임의의 2개 사이의 범위의 값으로 함유한다.

[0212] [0203] 특정 구체예에서, 제1 또는 후행 투여량 내의 세포, 재조합 수용체(예컨대, CAR)-발현 세포, T 세포, 또는 말초혈액 단핵구 세포(PBMCs)의 개수는 대상자 체중 1 킬로그램 당 그러한 세포를 1×10^6 개 초과, 예컨대, 체중 1 킬로그램 당 그러한 세포 2×10^6 , 3×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 또는 1×10^{10} 개 및/또는, 대상자 $1 m^2$ 당 그러한 세포 1×10^8 , 또는 1×10^9 , 1×10^{10} 개 또는 전술한 값들 중 2개 사이의 범위이다.

[0213] [0204] 몇몇 구체예에서, 후행 투여량으로 투여된 세포의 수는 본 발명의 구체예 중 임의의 제1 투여량으로 투여된 세포의 수와 동일하거나 유사하며, 예를 들어, 대상체의 체중 킬로그램당 약 1×10^5 , 약 2×10^5 , 약 5×10^5 , 또는 약 1×10^6 또는 그와 같은 세포이다. 일부 구체예에서, 후행 투여량은 대상체의 체중 킬로그램 당 약 1×10^5 , 약 2×10^5 , 약 5×10^5 또는 약 1×10^6 또는 그와 같은 세포를 함유하며, 또는 상기 값들 중 임의의 2개 사이의 범위 내의 값의 세포를 함유한다. 몇몇 구체예에서, 이러한 값은 재조합 수용체-발현 세포의 개수를 가리키며; 다른 구체예에서, 이들은 투여된 총 세포 또는 PBMC 또는 T 세포 개수를 가리킨다. 일부 관점에 있어서, 후행 투여량은 제1 투여량보다 크다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 후행 투여량은 대상체의 체중 킬로그램 당 약 1×10^6 개 이상의 세포, 재조합 수용체 (예를 들어, CAR) 발현 세포, T 세포 및/또는 PBMC, 예를 들어, 대상체 체중 킬로그램 당 약 또는 적어도 약 3×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 또는 1×10^9 세포를 포함한다. 몇몇 구체예에서, 후행 투여량 또는 크기는 질병 부담 또는 이의 지표 및/또는 질병 또는 병태의 하나 이상의 증상을 감소시키기에 충분하다. 몇몇 구체예에서, 제2 (또는 기타 후행) 투여량은 예를 들어, 생존, 재발이 없는 생존 또는 무 사건 생존을 적어도 6개월 동안, 또는 적어도 1, 2, 3, 4 또는 5년 동안 유도하기 위해 대상체의 생존을 개선시키는데 유효한 크기이다. 일부 구체예에서, 후행 투여량으로 대상체의 체중 당 투여되는 세포, 재조합 수용체 (예를 들어, CAR) 발현 세포, T 세포 및/또는 PBMC 및/또는 그러한 세포의 수는 제1 투여

량으로 투여된 수에 비하여 적어도 2배 이상이고, 5배, 10배, 50배, 또는 100배 또는 그 이상일 수 있다. 몇몇 구체예에서, 질병 부담, 종양 크기, 종양 부피, 종양 질량 및/또는 종양 하중 또는 종양 덩어리는 후행 투여 후, 제1 투여량 또는 제2 (또는 기타 후행) 투여량의 투여 직전에 비하여 적어도 약 50, 60, 70, 80, 90 % 또는 그 이상 감소한다.

[0214] [0205] 다른 구체예에서, 후행 투여량으로 투여된 세포의 수는 제1 투여량으로 투여된 세포의 수보다 적다.

[0215] [0206] 몇몇 구체예에서, 다회 후행 투여량은 제1 투여량 후에 투여되고, 그러한 추가적인 투여 또는 투여량은 제2(또는 기타 후행) 투여량의 투여 후에 투여된다. 몇몇 측면에서, 대상자에게 부가적인 후행 투여량 또는 투여량들(즉, 제3, 제4, 제5 등등)으로 투여된 세포의 수는 제1 투여량, 제2 투여량 및/또는 기타 후행 투여량과 동일하거나 유사하다. 일부 구체예에서, 추가적인 투여 또는 투여량은 선행 투여량보다 크다.

[0216] [0207] 일부 관점에 있어서, 제1 및/또는 후행 투여량의 크기는 예를 들어, 화학요법, 종양의 부하, 대량, 크기 또는 정도, 연장 또는 전이의 종류 단계 및/또는 독성결과를 나타내는 대상체의 가능성 또는 방향의 정도와 같은 대상체의 종양 부담, 예를 들어 CRS, 대식 세포 활성화 증후군, 종양 용해 증후군, 신경독성 및/또는 투여되는 세포 및/또는 재조합 수용체에 대한 숙주 면역 반응과 같은 이전 치료에 의한 대상체의 반응과 같은 하나 이상의 표준에 기초하여 결정된다.

[0217] [0208] 몇몇 측면에서, 제1 및/또는 후행 투여량의 크기는 대상체에서 질병 또는 병태의 부담에 의해 결정된다. 예를 들어, 일부 측면에서, 제1 투여량으로 투여된 세포의 수는 제1 투여량 투여 직전에 대상체에 존재하는 종양 부하에 기초하여 결정된다. 일부 구체예에서, 제1 및/또는 후행 투여량의 크기는 질병 부담과 반비례 관계에 있다. 일부 관점에 있어서, 큰 질병 부담과 관련하여, 대상체 적은 수의 세포, 예를 들어 대상의 체중 킬로그램 당 약 1×10^6 세포 미만으로 투여된다. 다른 구체예에서, 보다 낮은 질병 부담과 관련하여, 대상체에게 대상체의 체중 킬로그램 당 약 1×10^6 보다 많은 세포, 예를 들어 약 2×10^6 , 2.5×10^6 또는 3×10^6 세포/kg 보다 많은 수의 세포가 투여된다.

[0218] [0209] 몇몇 측면에서, 후행 투여량으로 투여된 세포 개수는 제1 투여량이 투여된 후 대상자 내에 존재하는 종양 부담에 기초하여 구한다. 몇몇 구체예에서, 제1 투여량이 종양 부담을 감소시켰거나 또는 특정한 역치 양 또는 수준 (그 이상일 경우 독성 결과 위험이 증가됨) 미만으로 감소시켰을 경우, 후행 투여량은 예컨대 체중 킬로그램 당 예컨대 1×10^6 세포 초과 (예컨대, 총 세포, 수용체-발현 세포, T 세포, 또는 PBMCs)로 크고 및/또는 제1 투여량보다 크다. 또 다른 측면에서, 후행 투여량으로 투여된 세포 개수는 예컨대 약 1×10^6 으로, 예컨대 제1 투여량과 동일하거나 그 보다 적은 양이며, 여기서 제1 투여량은 종양 부담을 작은 정도로 감소시키거나 제1 투여량은 종양 부담을 탐지 가능할 정도로 감소시키지 않은 것이다.

[0219] [0210] 몇몇 구체예에서, 제1 투여량으로 투여된 세포 개수는 예컨대 세포를 대량의 단일 투여량으로 투여하거나, 면역 반응이 일어나기 전에 세포에 투여하는 것과 같은 다른 방법으로 투여된 세포 개수보다 낮다. 그러므로, 몇몇 구체예에서, 이 방법은 대량의 투여량으로 투여하는 것과 연관된 다른 방법에 비해 독성이 감소되거나 독성 결과가 감소된다.

[0220] [0211] 몇몇 구체예에서, 제1 투여량은 사이토카인 방출 증후군 (CRS), 중증 CRS (sCRS), 대식세포 활성화 증후군, 종양 용해 증후군, 3일 또는 그 이상 동안 적어도 약 38°C 또는 적어도 또는 약 20 mg/dL의 CRP의 혈장 수준, 신경 독성 및/또는 신경 독성을 갖는 질환과 같은 독성 또는 독성의 결과의 가능성을 일으키지 않거나 완화하는 양의 세포를 포함한다. 일부 관점에 있어서, 제1 투여량으로 투여된 세포의 수는 환자가 세포 투여 후 CRS, sCRS 및/또는 CRS-관련 결과와 같은 독성 또는 독성 결과를 나타낼 가능성에 기초하여 결정된다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 대상체에서의 독성 결과의 발전 가능성은 종양 부담에 기초하여 예상된다. 일부 구체예에서, 방법은 투여량의 투여 전에 독성 결과 및/또는 질병 부담을 검출 또는 평가하는 것을 포함한다.

[0221] [0212] 몇몇 구체예에서, 제2(또는 기타 후행) 투여량은 사이토카인-방출 증후군(CRS), 대식세포 활성화 증후군 또는 종양 용해 증후군이 일어날 임상적 위험성이 없거나 또는 지나갔거나 또는 제1 투여 후 가라앉은 시점, 예컨대 이러한 사례가 일반적으로 가라앉거나 및/또는 일어날 가능성이 낮은, 예컨대 특정 질병 또는 병태에 걸린 대상자의 예컨대, 60, 70, 80, 90, 또는 95 %에서 일어날 가능성이 낮은 시점에서 투여된다.

[0222] 투여 시기

[0223] [0213] 몇몇 측면에서, 제2 또는 후행 투여 시기는 제1 투여의 개시로부터 후행 투여의 개시까지 측정된다. 다

른 구체예에서, 후행 투여 시기는 예를 들어 본 발명에 개시된 분할 투여 관점에서, 투여량이 1일 이상, 예를 들어 2일 또는 3일 이상 투여되는 경우, 제1 투여 완료로부터, 또는 제1 투여의 중간날(median day)로부터 측정된다.

- [0224] [0214] 몇몇 구체예에서, 제1 투여량의 세포에 의해 발현되는 것과 구별되는 수용체, 예컨대 CAR를 발현하는 세포의 후행 투여량의 투여 여부는 대상자에서 제1 투여량의 세포 또는 그에 의해 발현된 재조합 수용체에 대한 면역 반응의 존재 여부 또는 면역 반응의 정도 또는 탐지가능한 면역 반응에 기초하여 결정된다. 몇몇 측면에서, 제1 투여량의 세포와 다른 수용체를 발현하는 세포를 함유하는 후행 투여량이 특정 수준, 단계 또는 정도에 도달하거나 이를 확립한 면역 반응 또는 탐지가능한 숙주 적응 면역 반응이 있는 대상자에게 투여된다.
- [0225] [0215] 몇몇 구체예에서, 제2(또는 기타 후행) 투여량은 제1 수용체(예컨대 CAR)를 발현하는 세포의 제2 투여가 숙주 면역 시스템에 의해 제거될 것으로 예상되거나 또는 일어났을 시점에 투여된다. 면역 반응이 일어날 가능성은 설명된 바와 같이, 제1 투여량 투여 후 대상자에서 수용체-특이적 면역 반응을 측정함으로써 결정가능하다.
- [0226] [0216] 예컨대, 몇몇 구체예에서, 제1 투여 후 대상자에서 면역 반응이 탐지되는지를 결정하기 위해 제1(또는 기타 선행) 투여 후 및 제2(또는 기타 후행) 투여 전에 대상자들을 테스트할 수 있다. 이러한 몇몇 구체예에서, 제1 투여량에 대한 면역 반응의 검출은 제2 투여량의 투여 필요성을 촉발할 수 있다.
- [0227] [0217] 몇몇 측면에서, 제1 투여 또는 선행 투여 후 예컨대 대상자에서 설명된 바와 같은 세포의 특정 개수 또는 농도가 목적하는 노출보다 낮거나 또는 감소되었는지를 알아보기 위해, 대상자로부터의 샘플을 설명된 바와 같이 테스트할 수 있다. 이러한 몇몇 측면에서, 세포에 대한 대상자의 노출 감소 여부의 검출은 제2 투여량의 투여 필요성을 촉발할 수 있다.
- [0228] [0218] 몇몇 구체예에서, 연속 투여량은 대상자의 질병 또는 병태가 제1 또는 선행 투여량에 대한 질병 부담 반응 감소에 따라 재발하지 않는 시점에 투여된다. 몇몇 구체예에 있어서, 질병 부담의 감소는 대상자 또는 유체 또는 기관 또는 그들의 조직의 질병 세포의 하중 또는 수, 종양의 부피 또는 전이의 정도 또는 범위와 같은 1 이상 요인의 감소로 표시된다. 이러한 요인은 초기 치료 또는 투여에 따른 반응의 요인의 감소 후에 요인이 그 후에 증가하면 재발하는 것으로 간주된다.
- [0229] [0219] 몇몇 구체예에서, 제2 투여량은 질병이 재발된 시점에서 투여된다. 몇몇 구체예에서, 재발은 하나 이상의 요인 또는 일반적으로 질병 부담에 있다. 몇몇 측면에서, 후행 투여량은 대상자, 질병 부담 또는 그들의 요인이 제1 또는 이전의 투여에 따라 측정되거나 도달하는 최저 시점과 비교하여 재발하는 시점, 그러나 여전히 제1 투여량 직전의 시간에 비하여 더 낮은 시점에 투여된다. 몇몇 구체예에 있어서, 대상자는 질병 부담 또는 이들을 나타내는 요인이 변화되지 않는 시점 예를 들어, 질병 부담이 증가하는 것을 방지하는 시점에 후행 투여량이 투여된다.
- [0230] [0220] 몇몇 구체예에서, 후행 투여량은 숙주 적응 면역 반응이 검출되거나, 성립되거나, 특정 수치, 정도 또는 단계에 도달하는 시점에 투여된다. 몇몇 측면에서, 후행 투여량은 대상자의 기억 면역 반응이 일어난 후에 투여된다.
- [0231] [0221] 몇몇 측면에서, 제1 투여량의 투여 및 후행 투여량의 투여 사이의 기간은 약 28 내지 약 35일, 약 29 내지 약 35일, 또는 약 35일 초과이다. 몇몇 구체예에서, 제2 투여량의 투여는 제1 투여량의 투여로부터 약 28일 초과가 더 지난 시점이다. 몇몇 측면에서, 제1 투여량과 후행 투여량 사이의 기간은 약 28일이다.
- [0232] [0222] 몇몇 구체예에서, 부가적인 투여량 또는 투여량들, 예컨대 후행 투여량은 제2 투여량의 투여 후에 투여된다. 몇몇 측면에서, 부가적인 투여량 또는 투여량들은 선행 투여량의 투여로부터 적어도 약 28일 후에 투여된다. 몇몇 구체예에서는 선행 투여 후 약 28일 미만 동안에는 어떠한 투여도 행해지지 않는다.
- [0233] [0223] 몇몇 측면에서, 본 발명의 방법은 예컨대 다른 방법이 제1 투여량의 세포에 대한 면역 반응이 검출된 후, 제1 투여량의 수용체를 발현하는 세포를 함유하는 제2 투여량을 투여할 수 있는 시간 범위를 넘어 연장된 시점에서 수용체-발현 세포의 투여를 허용한다는 점에서 유리하다.
- [0234] [0224] 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법은 예컨대 제1 수용체를 발현하는 세포의 제2 투여가 제1 수용체에 대한 면역 반응에 의해 소거되는 시점과 같은, 예컨대 제1 투여에 이어 독성 결과가 소거된 후 제2 투여를 수행함으로써, 다른 방법에 비해 독성 또는 독성 결과를 감소시킨다.
- [0235] [0225] 몇몇 측면에서, 본 발명의 방법은 재발이 일어난 때, 예컨대 대상자가 치료에 초기 반응하였으나, 재발이 일어난 때, 예컨대 제1 수용체에 대한 면역 반응에 의해 제1 수용체를 발현하는 세포의 제2 투여가 소거된

때 제2 투여량의 투여를 허용한다.

- [0236] [0226] 몇몇 구체예에서, 예컨대 제1 투여량의 세포에 의해 발현되는 수용체를 발현하는 1 이상의 연속 투여량이 대상자에게 투여될 경우, 그 연속 투여량들은 약 14, 약 15, 약 21, 약 27, 또는 약 28일 만큼 이격될 수 있다. 몇몇 측면에서, 연속 투여량은 선행 투여량 투여 후 21일 후에 투여된다. 몇몇 구체예에서, 연속 투여량은 선행 투여량 투여 후 14일 내지 28일 사이에 투여된다.
- [0237] [0227] 어떤 구체예에서, 본 발명의 방법은 몇몇 경우 제1 또는 선행 투여량 및 후행 투여량(들)의 투여를 포함하고, 또 다른 경우 이전에 제1 또는 선행 투여량을 투여받은 적이 있는 대상자에게 후행 투여량(들)을 투여하는 것을 포함하지만 제1 또는 후행 투여량 자체의 투여는 포함하지 않는다. 그러므로, 몇몇 경우 본 발명의 방법은 재조합 수용체를 발현하는, 예컨대, CAR을 발현하는 세포의 투여량이 이전에 투여된 바 있는 대상자에게 통합(consolidating) 후행 투여량을 투여하는 것과 같은, 통합 치료 투여를 포함한다.
- [0238] [0228] 몇몇 구체예에서, 제1 또는 선행 투여량 또는 제2 또는 후행 투여량의 투여 직전에 비해 질병 부담, 종양 크기, 종양 부피, 종양 질량, 및/또는 종양 부하 또는 종양 덩어리가 후행 투여량 후 적어도 약 50, 60, 70, 80, 90% 이상 감소된다.
- [0239] VI. 세포 노출 및 지속성
- [0240] [0229] 몇몇 구체예에 있어서, 제공된 방법은 투여된 세포에 대한 대상자의 노출을 증가시키고 (예를 들어, 증가된 세포 수 또는 시간 경과에 따른 지속 시간) 및/또는 입양 세포 치료의 효능 및 치료 결과를 개선한다. 몇몇 측면에서, 본 방법은 재조합 수용체, 예를 들어, CAR 발현 세포를 발현하는 세포에 대한 보다 큰 및/또는 더 긴 정도의 노출이 다른 방법과 비교하여 치료 결과를 개선한다는 점에서 유리하다. 이러한 결과에는 심각한 종양 부담이 있는 대상자에서도 환자 생존 및 완화가 포함될 수 있다.
- [0241] [0230] 몇몇 구체예에서, 제1 투여 후 및/또는 후행 투여 후 대상자에서 재조합 수용체를 발현하는 세포 (예를 들어, CAR 발현 세포)의 존재 및/또는 양이 검출된다. 몇몇 측면에서, 정량적 PCR (qPCR)은 대상자의 혈액 또는 혈청 또는 기관 또는 조직 (예를 들어, 질병 부위)에서 재조합 수용체를 발현하는 세포 (예를 들어, CAR 발현 세포)의 양을 평가하는데 사용된다. 몇몇 측면에서, 마이크로그램의 DNA 당 수용체, 예를 들어 CAR을 코딩하는 DNA 또는 플라스미드의 카피, 또는 시료의, 예를 들어 혈액 또는 혈청의 마이크로리터당 수용체 발현, 예를 들어 CAR 발현 세포 수, 또는 시료의 마이크로리터 당 말초 혈액 단핵 세포 (PBMCs) 또는 백혈구 또는 T 세포의 총 수로 지속성은 정량화된다.
- [0242] [0231] 몇몇 구체예에서, 세포는 제2(또는 기타 후행) 투여량의 투여 후 적어도 4, 14, 15, 27 또는 28일째에 개체에서 검출된다. 몇몇 측면에서, 세포는 제2(또는 기타 후행) 투여 후, 3, 6, 또는 12, 18, 또는 24, 또는 30 또는 36 개월, 또는 1, 2, 3, 4, 5 년, 또는 그 이상으로 투여될 수 있다.
- [0243] [0232] 몇몇 구체예에서, 후행 투여량 투여 후 본 방법에 의한 대상자에서의 수용체, 예를 들어, CAR 발현 세포의 지속성은 제1(또는 기타 선행) 투여량의 세포와 동일한 수용체 예컨대 CAR을 발현하는 세포의 후행 투여량의 투여 또는 단일 투여량의 투여와 관련된 대안 방법으로 달성가능한 경우에 비해 더 크다.
- [0244] [0233] 몇몇 구체예에서, 제2 투여량의 투여 후 대상자에 있어서 재조합 수용체, 예컨대 CAR을 발현하는 세포의 지속성 및/또는 확장 및/또는 존재는, 대안 투여법을 이용하는 방법, 예컨대 수용체-발현 세포의 단일 투여량의 투여와 연관된 방법 또는 제1 투여량의 세포에 의해 발현된 것과 동일한 수용체를 발현하는 세포의 제2 투여 또는 다회 투여와 연관된 방법과 같은 대안 방법을 통하여 달성되는 것보다 더 크다.
- [0245] [0234] 확장 및 / 또는 지속성을 나타내는 노출, 예를 들어, 세포의 수는 대상자에 노출된 세포의 최대 수, 검출가능한 세포의 지속시간 또는 특성 수 또는 백분율 이상의 세포, 시간 경과에 따른 세포 수 그래프 면적 및/또는 이들의 조합 및 이들의 지표로서 표현될 수 있다. 이러한 결과는 특정 시료, 예를 들어 혈액 또는 혈청에서 핵산 또는 DNA의 총 양에 대한 재조합 수용체를 코딩하는 핵산의 카피수를 검출하기 위한 qPCR 및/또는 일반적으로 수용체에 특이적인 항체를 이용하여 수용체를 발현하는 세포를 검출하기 위한 유동세포계수법 같은 공지된 방법을 사용하여 평가될 수 있다. 또한 세포 기반 평가는 결합할 수 있는 및/또는 중성화할 수 있는 및/또는 반응, 예를 들어 질병 또는 병태 또는 수용체에 의해 인식된 항원을 발현하는 세포에 대한 세포독성 반응을 유도할 수 있는 세포와 같은 기능성 세포의 수 또는 백분율을 검출하는데 사용될 수 있다.
- [0246] [0235] 몇몇 측면에서, 대상자의 세포에 대한 증가된 노출은 세포의 증가된 확장을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 수용체 (예를 들어, CAR) 발현 세포는 제1 투여량 투여 후 및/또는 후행 투여량 투여 후 대상자에서 확장한다.

몇몇 측면에서, 본 발명의 방법은 다른 방법들, 예컨대 제1 투여량과 동일한 수용체를 발현하는 세포를 단일 투여량으로 또는 후행 투여량 또는 투여량들로 투여하는 것과 연관된 다른 방법에 비해 세포들의 더 큰 확장을 결과시킨다.

[0247] [0236] 몇몇 측면에서, 방법은 예를 들어, 유동세포계수법에 의해 측정된 바와 같은 투여된 세포의 생체 내 높은 증식을 초래한다. 몇몇 측면에서, 세포의 높은 피크의 비율이 검출된다. 예를 들어, 몇몇 구체예에서, 제1 또는 후행 투여 후의 피크 또는 최대 수치에서, 혈액 또는 대상자의 질병-부위 또는 그들의 백혈구 분율에서, 예를 들어, PBMC 분율 또는 T 세포 분율에서, 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상 또는 약 90% 이상의 세포는 재조합 수용체, 예를 들어, CAR을 발현한다.

[0248] [0237] 몇몇 구체예에서, 본 방법은 대상자의 혈액 또는 혈장 또는 다른 체액 또는 기관 또는 조직에서, DNA의 마이크로그램당 수용체, 예를 들어 CAR을 코딩하는 핵산의 적어도 100, 500, 1000, 1500, 2000, 5000, 10,000 또는 15,000 카피 또는 적어도 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)의 총 개수, 단핵 세포의 총 개수, T 세포의 총 개수 또는 마이크로리터의 총 개수당 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 또는 0.9 수용체 발현, 예를 들어 CAR 발현 세포의 최대 농도를 초래한다. 몇몇 구체예에서, 수용체를 발현하는 세포는 대상자의 혈액내 적어도 10, 20, 30, 40, 50, 또는 60 % 의 총 PBMC 및/또는 제1 또는 후행 투여 후 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24, 36, 48, 또는 52 주째 또는 그러한 투여 후 1, 2, 3, 4, 또는 5년 또는 그 이상인 때의 수치로 검출된다.

[0249] [0238] 몇몇 측면에서, 방법은 예를 들어, 대상자의 혈청에서, DNA의 마이크로그램당 재조합 수용체, 예를 들어 CAR을 코딩하는 핵산 카피의 적어도 2배, 적어도 4배, 적어도 10배 또는 적어도 20배 증가를 초래한다.

[0250] [0239] 몇몇 구체예에서, 제1 투여 또는 제2 (또는 기타 후행) 투여량의 투여 후 적어도 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 또는 60일 또는 그 이상인 때에, 제1 투여 또는 후행 투여(들)의 투여 후 적어도 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 또는 24 주 또는 그 이상인 때에, 예를 들어 qPCR 또는 유동세포계수법에 기초한 검출 방법과 같은 특정 방법으로, 수용체를 발현하는 세포는 대상자의 혈액 또는 혈청에서 검출가능하다.

[0251] [0240] 몇몇 측면에서, 마이크로리터당 적어도 약 1×10^2 , 적어도 약 1×10^3 , 적어도 약 1×10^4 , 적어도 약 1×10^5 또는 적어도 약 1×10^6 또는 적어도 약 5×10^6 또는 적어도 약 1×10^7 또는 적어도 약 5×10^7 또는 적어도 약 1×10^8 재조합 수용체 발현, 예를 들어 CAR 발현 세포 및/또는 적어도 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 또는 500 또는 1000 수용체 발현 세포, 예를 들어, 마이크로리터당 적어도 10이 혈액, 예를 들어 말초 혈액 또는 그들의 질병 부위와 같은 대상자 또는 이들의 유체, 조직 또는 부분에서 검출가능하거나 존재한다. 몇몇 구체예에서, 대상자의 세포의 그러한 개수 또는 농도는 제1 투여량의 투여 후 또는 후행 투여량의 투여 후, 적어도 약 20일, 적어도 약 40일 또는 적어도 약 60일 또는 적어도 약 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12 개월 또는 적어도 약 2 또는 3년째에 검출가능하다. 이러한 세포 수는 유동세포계수법에 기초한 또는 정량적 PCR에 기초한 방법 및 공지된 방법을 사용하여 총 세포 개수의 외삽법으로 검출될 수 있다. 예를 들어, Brentjens et al., *Sci Transl Med.* 2013 5(177), Park et al, *Molecular Therapy* 15(4):825-833 (2007), Savoldo et al., *JCI* 121(5):1822-1826 (2011), Davila et al. (2013) *PLoS ONE* 8(4):e61338, Davila et al., *Oncoimmunology* 1(9):1577-1583 (2012), Lamers, *Blood* 2011 117:72-82, Jensen et al. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010 September; 16(9): 1245-1256, Brentjens et al., *Blood* 2011 118(18):4817-4828 참조.

[0252] [0241] 몇몇 측면에서, 예를 들어, 제1 또는 후행 투여 세포의 투여 후 약 1 주, 약 2 주, 약 3 주, 약 4 주, 약 5 주 또는 적어도 약 6 주 또는 적어도 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12 개월 또는 적어도 약 2 또는 3 년인때에, 면역조직화학, PCR 및/또는 유동세포계수법에 의해서 측정된 재조합 수용체를 코딩하는 핵산 카피, 예를 들어 벡터 카피 개수는, 예를 들어 말초 혈액 또는 골수 또는 다른 부분에서의 세포 100개당 적어도 0.01, 적어도 0.1, 적어도 1 또는 적어도 10 이다. 몇몇 구체예에서, 수용체 발현, 예를 들어 CAR 발현 세포의 제1 투여 또는 후행 투여량의 투여 약 1주, 약 2주, 약 3주 또는 약 4주인때 또는 그러한 투여 후의 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12 개월 또는 적어도 2년 또는 3년인때의 게놈 DNA의 마이크로그램당 수용체, 예를 들어 CAR을 발현하는 벡터의 카피 개수는 적어도 100, 적어도 1000, 적어도 5000 또는 적어도 10,000 또는 적어도 15,000 또는 적어도 20,000이다.

- [0253] [0242] 몇몇 측면에서, 대상자, 그들의 혈액 및/또는 그들의 질병부위에서, 세포에 의해 발현된 수용체, 예를 들어 CAR은, 제1 투여 또는 제2 투여 또는 후행 투여량의 투여 개시 후 적어도 약 3개월, 적어도 약 6개월, 적어도 약 12개월, 적어도 약 1년, 적어도 약 2년, 적어도 약 3년 또는 3년 이상인 때에 정량적 PCR (qPCR) 또는 유동세포계수법으로 검출 가능하다.
- [0254] [0243] 몇몇 구체예에서, 대상자의 체액, 조직 또는 기관, 예를 들어 혈액에서 제1 투여량의 투여 후 시간에 따른 수용체 (예를 들어, CAR) 발현 세포의 농도에 대한 곡선하 면적 (AUC)은 대상자가 동일한 수용체를 발현하는 세포를 단일 투여받거나 다회 투여된 대안적인 투여 요법으로 달성가능한 것 보다 더 크다.
- [0255] [0244] 몇몇 측면에서, 대상자의 체액, 조직 또는 기관, 예를 들어 혈액에서 후행 투여량의 투여 후 시간에 따른 수용체 (예를 들어, CAR) 발현 세포의 농도에 대한 곡선하 면적 (AUC)은 대상자가 동일한 수용체를 발현하는 세포를 단일 투여받거나 다회 투여된 대안적인 투여 요법으로 달성가능한 것 보다 더 크다.
- [0256] **VII. 질병 부담(Disease burden)**
- [0257] [0245] 투여량의 투여는 일반적으로 대상자에서 질병 또는 병태의 확장 또는 부담을 감소시키거나 예방한다. 예를 들어, 질병 또는 병태가 종양인 경우, 방법은 일반적으로 종양 크기, 덩어리, 전이를 감소시키고 및/또는 예후 또는 생존 또는 종양 부담과 관련된 다른 증상을 개선시킨다. 몇몇 구체예에서, 제2 또는 후행 투여량의 투여시기를 제1 또는 선행 투여량 후의 트랜스유전자-특이적 면역 반응의 발달 및/또는 재발과 관련하여 가능한다.
- [0258] [0246] 질병 부담은 대상자의 또는 종양의 장기 또는 조직 또는 예를 들어, 전이를 나타내는 다른 위치와 같은 대상의 장기, 조직 또는 체액의 질병의 세포의 총 수를 포함할 수 있다. 예를 들어, 종양 세포는 특정 혈액 악성 종양의 관점에 있어서 혈액 또는 골수에서 검출 및/또는 정량화될 수 있다. 질병 부담은, 몇몇 구체예에서, 종양의 질량, 전이의 수 또는 범위를 포함할 수 있다.
- [0259] [0247] 몇몇 구체예에서, 2 이상의 투여량의 투여에 의해 종양 부담이 감소된다. 몇몇 측면에서, 투여량들을 투여함으로써 질병 부담의 증가를 방지할 수 있고 이것은 질병 부담에서 아무런 변화가 없는 것에 의해 입증될 수 있다.
- [0260] [0248] 몇몇 측면에서, 질병 또는 병태는 제1 투여량의 투여 후에도 지속되거나 및/또는 제1 투여량의 투여는 대상자에서 질병 또는 병태를 제거하기에 충분하지 않다.
- [0261] [0249] 몇몇 측면에서, 제2 투여량의 투여는 제1 투여량의 투여 직전의 시기 또는 제2 투여량의 투여 직전의 시기의 질병 부담과 비교하여 질병 부담을 감소시킨다. 몇몇 측면에서, 예를 들어 재발과 관련하여, 제2 투여량의 투여는 제1 투여량의 투여후 질병 부담의 피크 수치와 비교하여 질병 부담의 감소에 영향을 미친다.
- [0262] [0250] 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법은 질병 또는 병태의 부담, 예컨대 종양 세포수, 종양 크기, 환자의 생존 기간 또는 무사건(event-free) 생존률을 다른 투여법을 이용한 방법, 예컨대 대상자에게 동일한 수용체, 예컨대 CAR을 발현하는 세포의 단일 투여량 또는 복수회 투여량을 대상자에게 투여하는 것과 같은 대안 투여법을 이용하여 관찰되는 감소에 비해 훨씬 큰 정도 및/또는 더 장기간 질병 부담을 감소시킨다. 몇몇 구체예에서, 질병 부담은 동일한 수용체, 예컨대 CAR을 발현하는 세포의 제2 투여량을 투여함으로써 야기되는 감소에 비해 제2 투여량 투여 후 보다 큰 정도 또는 기간 동안 감소된다.
- [0263] [0251] 몇몇 구체예에서, 대상자에서 질병 또는 병태의 부담이 검출, 평가 또는 측정된다. 질병 부담은 혈액 또는 혈청과 같은 개체 또는 개체의 기관, 조직 또는 체액에서 질병 또는 질병 관련 세포, 예를 들어 종양 세포의 총 수를 검출함으로써 일부 측면에서 검출될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 질병 부담, 예를 들어, 종양 부담은 고형 종양의 질량 및/또는 전이의 수 또는 범위를 측정함으로써 평가된다. 몇몇 측면에서, 대상의 생존, 특정 기간 내의 생존, 생존 범위, 무사건 또는 무증상 생존의 기간 또는 지속 기간 또는 무재발 생존 여부가 평가된다. 몇몇 구체예에서, 질병 또는 병태의 증상이 평가된다. 몇몇 구체예에서, 질병 또는 병태 부담의 측정이 특정된다.
- [0264] [0252] 몇몇 측면에서, 제1 투여량 투여 전, 제1 투여량 투여 후 그러나 제2 투여량 투여 전 및/또는 제2 또는 후행 투여량 투여 후에 질병 부담이 측정되거나 검출된다. 다중 후행 투여량과 관련하여, 몇몇 구체예에서의 질병 부담은 후행 투여의 전후에, 또는 후행 투여량들의 투여 사이의 기간 동안 측정될 수 있다.
- [0265] [0253] 몇몇 측면에서, 투여량들의 투여는 제2 투여량의 투여 직전 또는 전반적으로 제1 투여 직전과 비교하여 질병 부담, 예를 들어, 종양 부담의 추가 감소, 예를 들어, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 90 또는 100 %의 부

담 감소를 초래한다. 몇몇 구체예에서, 질병 부담, 종양 크기, 종양 부피, 종양 질량 및/또는 종양 하중 또는 대량은 제1 투여 또는 후행 투여량의 투여 직전과 비교하여 후행 투여 후에 적어도 약 50, 60, 70, 80, 90 % 또는 그 이상만큼 감소된다.

[0266] [0254] 몇몇 구체예에서, 방법에 의한 질병 부담의 완화는, 예를 들어 제1 또는 여하한 후행 투여량의 투여, 예를 들어, 개시 후 1 개월, 2 개월, 3 개월 또는 3 개월 이상으로 평가 된 경우, 형태학적 완전한 차도의 유도를 포함한다. 몇몇 측면에서, 최소 잔류 질환에 대한 분석, 예를 들어 다중파라미터 유동세포계수법에 의해 측정된 바와 같이, 음의 값이거나, 또는 최소 잔류 질병의 수치는 약 0.3 % 미만, 약 0.2 % 미만, 약 0.1 % 미만 또는 약 0.05 % 미만이다.

[0267] [0255] 몇몇 구체예에서, 다른 방법에 비해 본 방법에 의해 대상자의 무사건 생존율 또는 전체 생존율이 향상된다. 예를 들어, 몇몇 구체예에서, 제1 투여 후 6 개월 제에 본 방법으로 치료 한 대상자의 무사건 생존율 또는 확률은 약 40 % 초과, 약 50 % 초과, 약 60 % 초과, 약 70 % 초과, 약 80 % 초과, 약 90 % 초과 또는 약 95 % 초과이다. 몇몇 측면에서, 전체 생존율은 약 40 % 초과, 약 50 % 초과, 약 60 % 초과, 약 70 % 초과, 약 80 % 초과, 약 90 % 초과, 또는 약 95 % 초과이다. 몇몇 구체예에서, 본 방법으로 치료된 대상자는 무사건 생존, 무재발 생존 또는 적어도 6 개월, 또는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 년 생존을 나타낸다. 몇몇 구체예에서, 약 6 개월보다 크거나 약 6 개월, 또는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10년의 진행 시간과 같이 진행되는 시간이 개선된다.

[0268] [0256] 몇몇 구체예에서, 다른 방법에 비해 본 방법에 의한 처리 후, 재발의 가능성이 줄어든다. 예를 들어, 몇몇 구체예에서, 제1 투여 후 6 개월째의 재발 확률은 약 80 % 미만, 약 70 % 미만, 약 60 % 미만, 약 50 % 미만, 약 40 % 미만, 약 30 % 미만, 약 20 % 미만, 또는 약 10 % 미만이다.

[0269] VIII. 독성 및 독성 결과

[0270] [0257] 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법은 단일 투여량으로서의 세포 투여, 제1 투여량과 동일한 수용체를 발현하는 세포의 후행 투여량의 투여, 및/또는 본 발명의 방법에 의해 특정된 제1 투여와 후행 투여 사이의 시간보다 더 빠른 시점에서의 후행 투여량의 투여에 비해, 독성 또는 그의 결과 또는 증상을 감소 또는 방지해준다.

[0271] [0258] 키메라 항원 수용체를 발현하는 T 세포의 치료와 같은, 선택성 T 세포 치료의 투여는 사이토카인 방출 증후군 및 신경 독성과 같은 독성 효과 또는 결과를 유도할 수 있다. 일부 실시예에서, 그러한 효과 또는 결과는 관찰된 독성의 기초가 되는 순환하는 사이토카인의 높은 수준과 평행하다.

[0272] [0259] 몇몇 측면에서, 본 발명의 방법은 예컨대, 단일의 대량 투여량이 투여되는 다른 방법에서보다 제1 투여량을 더 적게 투여함으로써, 다른 방법에 비해 독성 또는 독성 결과를 감소시킬 수 있다. 예컨대 동일한 수용체를 발현하는 세포의 보다 적은 투여량을 복수회 투여함으로써 숙주 면역 반응에 의해 제거될 수 있다.

[0273] [0260] 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법은 제1 투여량 투여 후 28일 이상 경과된 후 후행 투여량을 투여함으로써, 만일 재투여시, 예컨대 제1 수용체에 대한 면역 반응이 일어나 제1 수용체를 발현하는 세포가 제거되도록 하여, 다른 방법에 비해 독성 또는 독성 결과가 감소될 수 있다. 그러므로, 몇몇 측면에서, 본 발명의 방법은 대상자가 CRS를 일으킬 위험이 있는 시점에서 복수회의 투여량을 투여하는 방법에 비해 독성을 감소시킨다.

[0274] [0261] 몇몇 측면에서, 독성 결과는 사이토 카인 방출 증후군 (CRS) 또는 중증 CRS (sCRS)이거나 이와 관련되거나 이를 나타낸다. CRS 예를 들어, sCSR는 일부의 경우 입양 T 세포 치료 및 다른 생물학적 체계의 대상자에의 투여 후에 발생할 수 있다. Davila et al., Sci Transl Med 6, 224ra25 (2014); Brentjens et al., Sci. Transl. Med. 5, 177ra38 (2013); Grupp et al., N. Engl. J. Med. 368, 1509-1518 (2013); 및 Kochenderfer et al., Blood 119, 2709-2720 (2012); Xu et al., Cancer Letters 343 (2014) 172-78 참조.

[0275] [0262] CRS는 항 IL-6 치료, 예를 들어, 항 IL-6 항체, 예를 들어, 토실리주맙 또는 항생제와 같은 항-염증 요법을 사용하여 치료할 수 있다. 몇몇 구체예에서, 대상자는 제1 투여 후에 이러한 요법으로 치료되고, 후행 투여량은 CRS-관련 증상이 완화되거나 그러한 치료 후 허용 가능한 수준 미만으로 줄어들거나 또는 감소되는 경우에만 투여된다.

[0276] [0263] CRS의 결과, 징후 및 증상은 공지되어 있으며 본 발명에 개시된 것들을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 특정 투여량 요법 또는 투여가 소정의 CRS-관련 결과, 징후 또는 증상에 영향을 미치지 않거나 영향을 미치는 경우, 특정 결과, 징후 및 증상 및/또는 그들의 양 또는 정도가 특정될 수 있다.

- [0277] [0264] 다양한 결과를 측정 또는 탐지하는 방법이 명시될 수 있다.
- [0278] [0265] 몇몇 측면에서, 제1 투여량의 투여에 앞서, 제1 투여량의 투여 후에, 그리고 후행 투여량의 투여 전 또는 후행 투여량의 투여 후, 대상자에서 CRS-관련 결과를 평가한다. 몇몇 구체예에서, 독성 결과의 수준, 예컨대 CRS-관련 결과, 예컨대, CRS의 표시자의 혈청 수준을 ELISA에 의해 측정한다.
- [0279] [0266] 몇몇 측면에서, 독성 결과는 신경독성이거나 이와 연관된다. 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법은 다른 방법에 비해 신경독성과 연관된 증상을 감소시킨다. 예컨대, 본 발명의 방법으로 치료된 대상자들은 사지 약화 또는 무감각, 기억, 시력, 및/또는 지능 손상, 제어할 수 없는 강박 및/또는 강박 행동, 망상, 두통, 운동 제어 손상을 비롯한 인지 및 행동 문제, 인지력 저하 및 자율신경계 장애 및 성기능 장애와 같은 신경독성 증상이, 다른 방법으로 치료받은 대상자에 비해 감소된다.
- [0280] [0267] 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법은 뉴런 파괴와 같은 신경계 및/또는 뇌에 대한 손상을 비롯한 신경독성과 연관된 결과를 감소시킨다. 몇몇 측면에서, 본 발명의 방법은 베타 아밀로이드(A β), 글루타메이트 및 산소 래디칼과 같은 신경독성과 관련된 인자들의 수준을 감소시킨다.
- [0281] [0268] 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법에 따라 투여량들이 투여된 대상자들은 제1 투여량과 동일한 수용체, 예컨대 CAR을 발현하는 세포의 단일 투여량의 투여, 후행 투여량의 투여, 및/또는 본 발명의 방법에 의해 구체화된 제1 투여 및 후행 투여 사이의 기간보다 조기에 후행 투여량을 투여하는 방법에 비해 신경독성과 연관된 감소된 증상, 결과 또는 인자를 갖는다.
- [0282] **IX. 세포**
- [0283] [0269] 세포는 일반적으로 진핵 세포, 예를 들면 포유동물 세포이고, 전형적으로 인간 세포, 예컨대 인간 대상자로부터 유래된 것과 예컨대 재조합 수용체를 발현하기 위해 조작된 것과 같은 유전자 조작된 세포를 들 수 있다. 몇몇 구체예에서, 세포는 혈액, 골수, 림프 또는 림프 기관으로부터 유래되며, 면역계의 세포, 예를 들면 선천 또는 후천 면역 세포, 예컨대, 골수 또는 림프 세포이고, 여기에는 림프구, 일반적으로 T 세포 및/또는 NK 세포가 포함된다. 그 밖의 예시적인 세포에는 줄기세포, 예를 들면 다능성(multipotent) 및 전능성(pluripotent) 세포, 유도된 다능성(iPSCs)가 포함된다. The 세포는 일반적으로 일차 세포, 예를 들면 대상자로부터 직접 분리되거나 및/또는 대상자로부터 분리되어 동결된 세포이다. 몇몇 구체예에서, 세포는 T 세포 또는 기타 세포 유형의 하나 이상의 서브세트, 예를 들면 전체 T 세포 집단, CD4+ 세포, CD8+ 세포, 및 예를 들면 기능, 활성 상태, 성숙도, 분화 잠재능, 팽창, 재순환, 국소화 및/또는 지속능, 항원-특이성, 항원 수용체의 종류, 특정 장기 또는 분획 내의 존재여부, 마커 또는 시토킨 분비 프로파일, 및/또는 분화도에 의해 정의되는 바와 같은 그의 서브집단을 포함한다. 치료될 대상자와 관련하여, 세포는 동종이계(allogeneic) 및/또는 자가(autologous)일 수 있다. 방법에는 기성의 상용(off-the-shelf) 방법이 포함된다. 몇몇 측면에서, 예를 들면 기성의 상용 기술에서, 세포는 전능성 및/또는 다능성, 예를 들면 줄기 세포, 예를 들면 유도된 전능성 줄기 세포(iPSCs)이다. 몇몇 구체예에서, 이 방법은 본 발명에 설명된 바와 같이 대상자로부터 세포를 분리, 이를 준비, 가공, 배양 및/또는 조작하고, 동결보존 전 또는 후에 이를 동일 대상자에게 재도입하는 것을 포함한다.
- [0284] [0270] T 세포 및/또는 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포의 서브타입 및 서브집단에는 나이브 T (T_N) 세포, 이펙터 T 세포 (T_{EFF}), 기억 T 세포 및 이의 서브타입들, 예를 들면 줄기세포 기억 T (T_{SCM}), 중심 기억 T (T_{CM}), 이펙터 기억 T (T_{EM}), 또는 말단 분화된 이펙터 기억 T 세포, 종양-주입 림프구 (TIL), 미성숙 T 세포, 성숙 세포, 헬퍼 T 세포, 세포독성 T 세포, 점막-관련 불변 T (MAIT) 세포, 자연발생 및 적응 조절 T (Treg) 세포, 헬퍼 T 세포, 예를 들면 TH1 세포, TH2 세포, TH3 세포, TH17 세포, TH9 세포, TH22 세포, 소포성 헬퍼 T 세포, 알파/베타 T 세포, 및 델타/감마 T 세포를 들 수 있다.
- [0285] [0271] 몇몇 구체예에서, 세포는 자연 살해(NK) 세포이다. 몇몇 구체예에서, 세포는 단핵구 또는 과립구, 예컨대, 골수 세포, 대식세포, 호중구, 수지상 세포, 비만 세포, 호산구, 및/또는 호염기구이다.
- [0286] [0272] 몇몇 구체예에서, 세포는 유전자 조작을 통해 도입된 하나 이상의 핵산을 포함하며, 그에 따라 이러한 핵산의 재조합 또는 유전자 조작 산물을 발현한다. 몇몇 구체예에서, 핵산은 세포 또는 그 세포로부터 수득된 샘플 내에 보통은 존재하지 않는 이종의 것, 예를 들면 다른 생명체 또는 세포로부터 수득된 것이거나, 예를 들어 조작하고자 하는 세포 및/또는 그러한 세포가 유래된 생명체에서 보통 발견되지 않는 것일 수 있다. 몇몇 구체예에서, 핵산은 자연발생적인 것이 아니다. 예를 들면 핵산은 복수개의 상이한 세포 유형으로부터의 다양한 도메인들을 인코딩하는 핵산의 키메라 조합을 포함하는 것을 비롯하여, 자연에서 발견되지 않는 핵산이다.

- [0287] 유전자 조작을 위한 벡터 및 방법
- [0288] [0273] 또한, 본 발명에 따라, 재조합 수용체를 발현하는 유전자 조작된 세포를 생산하기 위한 방법, 핵산, 조성물, 및 키트가 제공된다. 유전자 조작은 일반적으로 재조합 또는 조작된 성분을 인코딩하는 핵산을 예를 들면 레트로바이러스 형질도입(transduction), 형질감염(transfection) 또는 형질전환(transformation)에 의해 세포 내로 도입하는 것과 연관된다.
- [0289] [0274] 몇몇 구체예에서, 유전자 전달은 예를 들면 먼저 세포를 시토카인 또는 활성화 마커의 발현에 의해 측정되는 바와 같은 증식, 생존 및/또는 활성화와 같은 반응을 유도하는 자극원과 조합한 다음 활성화된 세포를 형질도입하고 임상 응용에 충분한 숫자가 될 때까지 배양하여 증식시킴으로써 달성된다.
- [0290] [0275] 몇몇 측면에서, 자극 인자(예를 들면 림포카인 또는 시토카인)의 과발현은 대상자에게 독성적일 수 있다. 그러므로, 몇 가지 측면에서, 조작된 세포는 예컨대 입양 면역요법에서 투여될 경우, 세포를 생체내 음성 선택에 민감하게 만드는 유전자 세그먼트를 포함한다. 예를 들어 몇몇 측면에서, 세포는 이들이 투여될 대상자의 생체내 조건의 변화에 따라 제거될 수 있도록 조작된다. 음성 선택가능한 표현형은 투여된 물질, 예를 들어 어떤 화합물에 민감성을 부여하는 유전자의 삽입 결과일 수 있다. 음성 선택성 유전자에는 간시클로비어 민감성을 부여하는 I형 단순포진 바이러스 티미딘 키나아제 (HSV-I TK) 유전자 (Wigler 외, Cell 11:223, 1977); 세포성 하이포잔틴 포스포리보실트랜스퍼라제 (HPRT) 유전자, 세포성 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라제 (APRT) 유전자, 세균성 시토신 데아미나제, (Mullen 외, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:33 (1992))가 포함된다.
- [0291] [0276] 몇몇 측면에서, 세포는 추가로 시토카인 또는 기타 인자들의 발현을 촉진하도록 조작된다. 유전자 조작된 성분들, 예컨대 항원 수용체, 예컨대 CAR의 도입을 위한 다양한 방법이 잘 알려져 있으며, 본 발명의 방법 및 조성물에 이용될 수 있다. 예시적인 방법에는 수용체를 인코딩하는 핵산을 바이러스, 예컨대 레트로바이러스 또는 렌티바이러스를 경유하여 전달하는 것들, 형질도입, 트랜스포존 및 전기영동 등의 방법이 있다.
- [0292] [0277] 몇몇 구체예에서, 재조합 핵산은 예컨대 시미안 바이러스 40 (SV40), 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스(AAV)로부터 유래된 벡터와 같은 재조합 감염성 바이러스 입자들을 이용하여 세포 내로 도입된다. 몇몇 구체예에서, 재조합 핵산은 재조합 렌티바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터, 예를 들면 감마-레트로바이러스 벡터를 이용하여 T 세포 내로 전달된다 (참조: 예컨대, Koste 외 (2014) Gene Therapy 2014 Apr 3. doi: 10.1038/gt.2014.25; Carlens 외 (2000) Exp Hematol 28(10): 1137-46; Alonso-Camino 외 (2013) Mol Ther Nucl Acids 2, e93; Park 외, Trends Biotechnol. 2011 November 29(11): 550-557).
- [0293] [0278] 몇몇 구체예에서, 레트로바이러스 벡터는 긴 말단 반복 서열 (LTR), 예컨대, 멀로니 쥐 백혈병 바이러스 (MoMLV)로부터 유래된 레트로바이러스 벡터, 골수증식 육종 바이러스(MPSV), 쥐의 배아 줄기세포 바이러스 (MESV), 쥐의 줄기세포 바이러스(MSCV), 골수 포커스 형성 바이러스(SFFV), 또는 아데노-관련 바이러스(AAV)를 갖는다. 대부분의 레트로바이러스 벡터는 쥐의 레트로바이러스로부터 유래된 것이다. 몇몇 구체예에서, 레트로바이러스는 조류 또는 포유동물 세포 소스로부터 유래된 것들을 포함한다. 레트로바이러스는 일반적으로 양생(amphotropic)인데, 이는 이들이 인간을 비롯하여 몇몇 종의 숙주 세포를 감염시킬 수 있음을 의미한다. 일 구체예에서, 발현될 유전자는 레트로바이러스 gag, pol 및/또는 env 서열을 대체한다. 몇몇 예시적인 레트로바이러스 시스템이 설명된 바 있다(예컨대, 미국특허 Nos. 5,219,740; 6,207,453; 5,219,740; Miller 및 Rosman (1989) BioTechniques 7:980-990; Miller, A. D. (1990) Human Gene Therapy 1:5-14; Scarpa 외 (1991) Virology 180:849-852; Burns 외 (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8033-8037; 및 Boris-Lawrie 및 Temin (1993) Cur. Opin. Genet. Develop. 3:102-109 참조).
- [0294] [0279] 렌티바이러스 형질도입 방법이 알려져 있다. 예시적인 방법은 예컨대 문헌 [Wang 외 (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701; Cooper 외 (2003) Blood. 101:1637-1644; Verhoeven 외 (2009) Methods Mol Biol. 506: 97-114; 및 Cavalieri 외 (2003) Blood. 102(2): 497-505]에 설명되어 있다.
- [0295] [0280] 몇몇 구체예에서, 재조합 핵산은 전기영동을 통해 T 세포에 전달된다 (참조: 예컨대, Chicaybam 외, (2013) PLoS ONE 8(3): e60298 및 Van Tedeloo 외 (2000) Gene Therapy 7(16): 1431-1437). 몇몇 구체예에서, 재조합 핵산은 전좌(transposition)을 통해 T 세포에 전달된다 (참조: 예컨대, Manuri 외 (2010) Hum Gene Ther 21(4): 427-437; Sharma 외 (2013) Molec Ther Nucl Acids 2, e74; 및 Huang 외 (2009) Methods Mol Biol 506: 115-126). 면역 세포에서 유전자 물질을 도입 및 발현하는 그 밖의 방법으로는 인산칼슘 형질도입(예컨대, 문헌 Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y.에 설명됨), 원형질 융합, 양이온성 리포솜-매개된 형질감염; 텅스텐 입자-보조된 마이크로입자 폭발법 (Johnston, Nature, 346:

776-777 (1990)); 및 인산 스트론튬 DNA 공침법 (Brash 외, *Mol. Cell Biol.*, 7: 2031-2034 (1987))을 들 수 있다.

- [0296] [0281] 재조합 산물을 인코딩하는 핵산의 전달을 위한 그 밖의 접근법 및 벡터는 예컨대 국제특허출원 공개 No.: W02014055668, 및 미국특허 No. 7,446,190에 설명되어 있다.
- [0297] [0282] 부가적인 핵산, 예컨대 도입을 위한 유전자들은 예를 들면 전달된 세포의 생존능 및/또는 기능을 촉진함으로써 치료 효능을 개선시키기 위한 것들; 예컨대 생체내 생존 또는 국소화를 평가하기 위해, 세포의 선택 및/또는 평가를 위한 유전자 마커를 제공하기 위한 유전자; 예컨대 생체내 음성 선택에 세포를 민감하게 만듦으로써 안전성을 향상시키기 위한 유전자들이다, 예컨대 문헌 [Lupton S. D. 외, *Mol. 및 Cell Biol.*, 11:6 (1991); 및 Riddell 외, *Human Gene Therapy* 3:319-338 (1992) 참조; 또한 음성 선택가능한 마커와 우점 양성 선택성 마커를 융합시킴으로써 유래된 이기능성 선택가능한 융합 유전자의 사용을 설명하는 PCT/US91/08442 및 PCT/US94/05601 by Lupton 외, 참조]. 예컨대 문헌 [Riddell 외, 미국특허 No. 6,040,177, 컬럼 14-17] 참조.
- [0298] 조작을 위한 세포 준비
- [0299] [0283] 몇몇 구체예에서, 조작된 세포의 준비는 하나 이상의 배양 및/또는 준비 단계를 포함한다. 예컨대 트랜스제닉 수용체를 인코딩하는 핵산의 도입을 위한 세포는 샘플, 예컨대 생물학적 샘플, 예컨대 대상자로부터 수득 또는 유래된 샘플로부터 분리될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 세포가 분리되는 대상자는 세포 요법을 필요로 하는 질병 또는 병태에 걸린 대상자 또는 세포 요법이 투여될 대상자이다. 몇몇 구체예에서 대상자는 특정한 치료적 개재, 예를 들면 세포가 분리, 가공 및/또는 조작될 입양 세포 치료법을 필요로 하는 인간이다.
- [0300] [0284] 따라서, 몇몇 구체예에서 세포는 일차 세포, 예컨대 일차 인간 세포이다. 샘플에는 대상자로부터 직접 채취된 조직, 유액(fluid), 및 기타 세포 뿐만 아니라 분리, 원심분리, 유전자 조작 (예컨대 바이러스 벡터를 이용한 형질도입), 세척, 및/또는 인큐베이션과 같은 한 가지 이상의 프로세싱 단계의 결과 얻어지는 샘플이 포함된다. 생물학적 샘플은 프로세싱되는 샘플 또는 생물학적 공급원으로부터 직접 얻어지는 샘플일 수 있다. 생물학적 샘플의 비제한적인 예로는 체액, 예컨대 혈액, 혈장, 혈청, 뇌척수액, 활액, 뇨 및 땀, 조직 및 장기 샘플 및 이들로부터 유래된 프로세싱된 샘플을 들 수 있다.
- [0301] [0285] 몇몇 측면에서, 세포가 유래 또는 분리되는 샘플은 혈액 또는 혈액-유래된 샘플이거나 또는 성분채집술 또는 백혈구성분채집술 생성물로부터 유래된 것이다. 예시적인 샘플로는 전혈, 말초혈액단핵 세포(PBMCs), 백혈구, 골수, 흉선, 조직 생검, 종양, 백혈병, 림프종, 림프절, 장연관 림프조직, 점막연관 림프조직, 비장, 기타 림프조직, 간, 폐, 위, 소장, 결장, 신장, 췌장, 유방, 뼈, 전립선, 자궁경부, 고환, 난소, 편도, 또는 기타 장기, 및/또는 이들로부터 유래된 세포를 들 수 있다. 예컨대, 입양세포 치료와 같은 세포 치료 맥락에서 샘플에는 예컨대 자가 공급원 및 동종이계 공급원으로부터의 샘플이 포함된다.
- [0302] [0286] 몇몇 측면에서, 제2 투여량은 제1 투여량의 세포와 동일한 성분채집술 산물로부터 유래된다. 몇몇 구체예에서, 다회 투여, 예컨대, 제1, 제2, 제3 및 기타 등등의 투여로부터의 세포는 동일한 성분채집술 산물로부터 유래된다.
- [0303] [0287] 또 다른 구체예에서, 제2(또는 기타 후행) 투여량의 세포는 제1(또는 기타 선행) 투여량의 세포가 유래된 것과는 구별되는 성분채집술 산물로부터 유래된다.
- [0304] [0288] 몇몇 구체예에서, 세포는 세포주, 예컨대, T 세포주로부터 유래된다. 몇몇 구체예에서 세포는 이종발생(xenogeneic) 공급원, 예컨대 마우스, 래트, 비인간 영장류 및 돼지로부터 수득된다.
- [0305] [0289] 몇몇 구체예에서, 세포 또는 세포 집단들의 단리는 하나 이상의 제조 및/또는 비-친화력 기반 세포 단리 단계를 포함한다. 몇 가지 예에서, 세포들은 예컨대 원치 않는 성분들을 제거하고, 원하는 성분들을 농축시키거나, 특정 시약에 민감한 세포들을 용해 또는 제거하기 위한 1종 이상의 시약의 존재 하에, 세척, 원심분리, 및/또는 인큐베이션된다. 몇 가지 예에서, 세포들은 밀도, 흡착 특성, 크기, 민감성 및/또는 특정 성분에 대한 내성과 같은 하나 이상의 성질에 기반하여 분리된다.
- [0306] [0290] 몇 가지 예에서, 대상자의 순환 혈액으로부터 예컨대 성분채집술 또는 백혈구성분채집술에 의해 세포를 수득한다. 몇몇 측면에서 샘플은 림프구, 예컨대 T 세포, 단핵구, 과립구, B 그 밖에 유핵 백혈구 세포, 적혈구 세포, 및/또는 혈소판을 포함하며 몇몇 측면에서 적혈구 세포 및 혈소판 이외의 세포들을 함유한다.
- [0307] [0291] 몇몇 구체예에서, 대상자로부터 수집된 혈액 세포들을 세척하여 예컨대 혈장 분획을 제거하고 후속 프로세싱 단계를 위하여 세포를 적절한 완충액 또는 배지에 넣는다. 몇몇 구체예에서, 세포들을 인산완충염수(PBS)

로 세척한다. 몇몇 구체예에서, 세척용액은 칼슘 및/또는 마그네슘 및/또는 다수의 또는 모든 2가 양이온을 결여한다. 몇몇 측면에서, 세척 단계는 제조사 지침에 따라 반자동화식 "병류(flow-through)" 원심분리 (예컨대, Cobe 2991 세포 프로세서, Baxter)에 의해 달성된다. 몇몇 측면에서, 세척 단계는 제조사 지침에 따라 탄젠트 유동 여과(tangential flow filtration: TFF)에 의해 달성된다. 몇몇 구체예에서, 세포는 예컨대 $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ 가 없는 PBS와 같은 다양한 생체적합성 완충액에 재현탁된다. 특정 구체예에서, 혈액세포 샘플 성분들을 제거하고 세포들을 배양 배지에 직접 현탁시킨다.

[0308] [0292] 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법은 적혈구 세포의 용해 및 Percoll 또는 Ficoll 구배를 통한 원심분리에 의해 말초혈액으로부터 백혈구 세포를 준비하는 것과 같은, 밀도-기반 세포 분리방법을 포함한다.

[0309] [0293] 몇몇 구체예에서, 분리 방법은 세포 내 하나 이상의 특이 분자, 예컨대 표면 마커, 예컨대 표면 단백질, 세포내 마커 또는 핵산의 발현 또는 존재여부에 기초하여 상이한 세포 유형을 분리하는 것을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 이러한 마커에 기반한 공지의 분리 방법들이 이용될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 분리는 친화력- 또는 면역친화력-기반 분리이다. 예컨대, 몇몇 측면에서 단리는 세포 발현 또는 전형적으로 세포 표면 마커와 같은 하나 이상의 마커의 발현 수준에 기초하여 세포 및 세포 집단을 분리하는 것을 포함하며, 예컨대 이러한 마커에 특이적으로 결합하는 항체 또는 결합 파트너와 함께 인큐베이션한 다음, 일반적으로 세척 단계 및, 항체 또는 결합 파트너와 결합된 세포를 항체 또는 결합 파트너와 결합하지 않은 세포들로부터 분리함으로써 달성된다.

[0310] [0294] 이러한 분리 단계는 시약과 결합한 세포가 추가 사용을 위해 유지되는 양성 선택 및/또는 항체 또는 결합 파트너에 결합되지 않은 세포들이 유지되는 음성 선택에 기초할 수 있다. 몇 가지 예에서, 두 가지 분획 모두 추가 사용을 위해 유지된다. 몇몇 측면에서, 음성 선택은 소망되는 집단 이외의 세포에 의해 발현되는 마커에 기초하여 분리가 최선으로 수행되는 것인, 이중 집단 내의 세포 유형을 특이적으로 동정할 수 있는 항체가 없을 경우 특히 유용할 수 있다.

[0311] [0295] 분리에 의해 특정 마커를 발현하는 세포 특정 세포 집단 또는 세포가 반드시 100% 농축되거나 제거되는 것은 아니다. 예컨대, 마커를 발현하는 것과 같은 특정 유형의 세포에 대한 농축 또는 양성 선택은 그러한 세포의 갯수 또는 백분율을 증가시키는 것을 가리키는 것이지 그 마커를 발현하지 않는 세포의 완전한 부재를 반드시 결과시키는 것은 아니다. 마찬가지로, 예컨대 마커를 발현하는 것처럼 어떤 특정한 유형의 세포의 음성 선택, 제거 또는 고갈은 이러한 세포의 갯수 또는 백분율을 감소시키는 것을 가리키는 것일 뿐 이러한 모든 세포의 완전한 제거를 반드시 결과시키는 것은 아니다.

[0312] [0296] 몇 가지 예에서, 분리 단계를 복수 라운드로 수행하는데, 이 경우 어떤 한 단계로부터 양성 또는 음성 선택된 분획을 후속적인 양성 또는 음성 선택과 같은 또 다른 분리 단계로 처리한다. 몇 가지 예에서, 음성 선택에 표적화된 마커에 대해 각각 특이적인 복수개의 항체 또는 결합 파트너와 세포를 함께 인큐베이션시킴으로써, 단일 분리 단계에 의해 복수개의 마커를 동시에 발현하는 세포를 고갈시킬 수 있다. 마찬가지로, 다양한 세포 종류에서 발현되는 복수개의 항체 또는 결합 파트너와 세포를 함께 인큐베이션시킴으로써 복수개의 세포 종류들을 동시에 양성 선택할 수 있다.

[0313] [0297] 예컨대, 몇몇 측면에서, 예컨대, $\text{CD}28^+$, $\text{CD}62\text{L}^+$, $\text{CCR}7^+$, $\text{CD}27^+$, $\text{CD}127^+$, $\text{CD}4^+$, $\text{CD}8^+$, $\text{CD}45\text{RA}^+$, 및/또는 $\text{CD}45\text{RO}^+$ T 세포와 같은, 하나 이상의 표면 마커를 높은 수준으로 발현하거나 이에 대해 양성인 세포와 같은 T 세포의 특별한 하위집단이 양성 또는 음성 선택 기술에 의해 분리된다.

[0314] [0298] 예컨대, $\text{CD}3^+$, $\text{CD}28^+$ T 세포는 $\text{CD}3/\text{CD}28$ 컨주게이트된 자기 비드 (예컨대, DYNABEADS® M-450 $\text{CD}3/\text{CD}28$ T Cell Expander)를 이용하여 양성 선택될 수 있다.

[0315] [0299] 몇몇 구체예에서, 단리는 양성 선택에 의한 특정 세포 집단에 대한 농축 또는 음성 선택에 의한 특정 세포 집단의 고갈에 의해 수행된다. 몇몇 구체예에서, 양성 또는 음성 선택은 각각 양성 또는 음성 선택된 세포 상에서 비교적 고수준 (마커^{하이})으로 또는 발현되는 (마커⁺) 하나 이상의 표면 마커에 특이적으로 결합하는 1종 이상의 항체 또는 기타 결합제와 세포를 함께 인큐베이션함으로써 달성된다.

[0316] [0300] 몇몇 구체예에서, T 세포는 비-T 세포, 예를 들면 B 세포, 단핵구, 또는 기타 백혈구 세포, 예를 들면 $\text{CD}14$ 상에서 발현되는 마커의 음성 선택에 의해 PBMC 샘플로부터 분리된다. 몇몇 측면에서, $\text{CD}4^+$ 또는 $\text{CD}8^+$ 선택 단계를 이용하여 $\text{CD}4^+$ 헬퍼 및 $\text{CD}8^+$ 세포독성 T 세포를 분리한다. 이러한 $\text{CD}4^+$ 및 $\text{CD}8^+$ 집단은 하나 이상의 나이

브, 기억 및/또는 이펙터 T 세포 서브집단 상에서 상대적으로 더 높은 정도로 발현되거나 발현된 마커에 대해 양성 또는 음성 선택에 의해 서브집단으로 추가 소팅될 수 있다.

[0317] [0301] 몇몇 구체예에서, $CD8^+$ 세포를 나이브 중심 기억, 이펙터 기억, 및/또는 중심 기억 줄기 세포에 대해, 예컨대 이들 각각의 하위집단과 연계된 표면 항원에 기초한 양성 또는 음성 선택에 의해, 추가로 농축 또는 고갈시킨다. 몇몇 구체예에서, 효능 증가를 위해, 예컨대 투여 후 장기간 생존, 증식 및/또는 이식을 위해 중심 기억 T (T_{CM}) 세포에 대한 농축이 수행되는데, 이는 몇몇 측면에서 이러한 하위집단들에서 특히 원기왕성하다. 참조 [Terakura et al. (2012) *Blood*.1:72-82; Wang et al. (2012) *J Immunother*. 35(9):689-701]. 몇몇 구체예에서, T_{CM} -농축된 $CD8^+$ T 세포와 $CD4^+$ T 세포의 조합에 의해 효능이 추가로 향상된다.

[0318] [0302] 몇몇 구체예에서, 기억 T 세포는 $CD8^+$ 말초 혈액 림프구의 $CD62L^+$ 및 $CD62L^-$ 서브세트 양쪽 모두에 존재한다. PBMC는 예컨대 항- $CD8$ 및 항- $CD62L$ 항체를 이용함으로써, $CD62L-CD8^+$ 및/또는 $CD62L^+CD8^+$ 분획을 농축 또는 고갈시킬 수 있다.

[0319] [0303] 몇몇 구체예에서, 중심 기억 T (T_{CM}) 세포의 농축은 $CD45RO$, $CD62L$, $CCR7$, $CD28$, $CD3$, $CD27$ 및/또는 $CD127$ 의 양성 또는 높은 표면 발현에 기초한다; 몇몇 측면에서, 이것은 $CD45RA$ 및/또는 그랜자임(granzyme) B를 발현 또는 고도로 발현하는 세포에 대한 음성 선택에 기반한다. 몇몇 측면에서, T_{CM} 세포가 농축된 $CD8^+$ 집단의 단리는 $CD4$, $CD14$, $CD45RA$ 를 발현하는 세포의 고갈 및 $CD62L$ 를 발현하는 세포의 양성 선택 또는 농축에 의해 수행된다. 일 측면에서, 중심 기억 T (T_{CM}) 세포에 대한 농축은 $CD14$ 및 $CD45RA$ 의 발현에 기초한 음성 선택 및 $CD62L$ 에 기초한 양성 선택 처리되는 $CD4$ 발현에 기초하여 선택된 세포들의 음성 분획으로부터 출발하여 수행된다. 몇몇 측면에서 이러한 선택은 동시에 수행되며 또 다른 측면에서는 순서와 상관없이 순차적으로 수행된다. 몇몇 측면에서, $CD8^+$ 세포 집단 또는 하위집단을 준비하는데 사용된 것과 동일한 $CD4$ 발현-기반 선택 단계를, $CD4^+$ 세포 집단 또는 하위집단을 생성하는데도 이용함으로써, $CD4$ -기반 분리로부터의 양성 및 음성 분획 양방 모두를 유지하여 후속 단계에서 이용할 수 있으며, 한 가지 이상의 추가적인 양성 또는 음성 선택 단계를 임의로 더 실시할 수 있다.

[0320] [0304] 특정 예에서, PBMCs 샘플 또는 기타 백혈구 세포 샘플을 $CD4^+$ 세포 선택 처리하여, 음성 분획과 양성 분획 양자 모두를 유지시킨다. 이어서 음성 분획을 $CD14$ 및 $CD45RA$ 또는 $CD19$ 의 발현에 기반하여 음성 선택하고, 중심 기억 T 세포, 예컨대 $CD62L$ 또는 $CCR7$ 에 특징적인 마커에 기초하여 양성 선택하되, 이 때 양성 선택과 음성 선택을 순서와 관계없이 수행한다.

[0321] [0305] 세포 표면 항원을 가는 세포 집단을 동정함으로써 $CD4^+$ T 헬퍼 세포를 나이브, 중심 기억 및 이펙터 세포로 소팅한다. $CD4^+$ 림프구는 표준 방법에 의해 수득가능하다. 몇몇 구체예에서, 나이브 $CD4^+$ T 림프구는 $CD45RO^-$, $CD45RA^+$, $CD62L^+$, $CD4^+$ T 세포이다. 몇몇 구체예에서, 중심 기억 $CD4^+$ 세포는 $CD62L^+$ 및 $CD45RO^+$ 이다. 몇몇 구체예에서, 이펙터 $CD4^+$ 세포는 $CD62L^-$ 및 $CD45RO^-$ 이다.

[0322] [0306] 일례에서, 음성 선택에 의해 $CD4^+$ 세포를 농축하기 위해, 모노클로날 항체 콕테일은 일반적으로 $CD14$, $CD20$, $CD11b$, $CD16$, $HLA-DR$, 및 $CD8$ 에 대한 항체를 포함한다. 몇몇 구체예에서, 항체 또는 결합 파트너는 고상 지지체 또는 매트릭스, 예를 들면 자성 비드 또는 상자성 비드와 결합되어 양성 및/또는 음성 선택으로 세포를 분리시킬 수 있다. 예컨대, 몇몇 구체예에서, 세포 및 세포 집단은 면역자성(또는 친화자성) 분리 기술에 의해 분리 또는 단리된다 (문헌 *Methods in Molecular Medicine*, vol. 58: *Metastasis Research Protocols*, Vol. 2: *Cell Behavior In Vitro and In Vivo*, p 17-25 Edited by: S. A. Brooks 및 U. Schumacher " Humana Press Inc., Totowa, NJ에서 검토됨).

[0323] [0307] 몇몇 측면에서, 분리하고자 하는 세포의 샘플 또는 조성물은 자성 반응성 입자 또는 마이크로입자, 예컨대 상자성 비드 (예컨대 Dynalbeads 또는 MACS 비드)와 같이 자화가능하거나 또는 자성적으로 반응성인 소형 물질과 함께 인큐베이션된다. 자성적으로 반응성인 물질, 예컨대, 입자는 일반적으로 분리하고자 하는, 예컨대 양성 또는 음성 선택이 요구되는 세포 또는 세포 집단 상에 존재하는 예컨대 표면 마커와 같은 분자에 특이적으로

결합하는 항체와 같은 결합 파트너에 일반적으로 직접 또는 간접적으로 결합된다.

- [0324] [0308] 몇몇 구체예에서, 자성 입자 또는 비드는 항체 또는 기타 결합 파트너와 같은 특이적인 결합 멤버에 결합된 자성적으로 반응성인 물질을 포함한다. 이 분야에는 자성 분리방법에 사용되는 자성적으로 반응성인 많은 물질들이 알려져 있다. 적절한 자성 입자에는 Molday의 미국특허 No. 4,452,773, 및 유럽 특허 명세서 EP 452342 B에 설명된 것들이 포함되며, 이들 문헌은 본 발명에 참조 통합되었다. 그 밖의 예로는 예컨대 Owen의 미국특허 No. 4,795,698, 및 Liberti 등의 미국특허 No. 5,200,084에 설명된 콜로이드 크기의 입자를 들 수 있다.
- [0325] [0309] 인큐베이션은 일반적으로 항체 또는 결합 파트너 또는 분자, 이러한 항체 또는 결합 파트너에 특이적으로 결합하고 자성 입자 또는 비드에 결합된 예컨대 2차 항체 또는 기타 시약이 샘플 내 세포 상에 존재할 경우 세포 표면 분자에 특이적으로 결합하는 그러한 조건 하에서 수행된다.
- [0326] [0310] 몇몇 측면에서, 샘플은 자기장에 놓이며, 자성적으로 반응성인 세포 또는 그에 결합된 자화가능한 입자들이 자석에 이끌려 비표지 세포로부터 분리된다. 양성 선택의 경우, 자석에 유인되는 세포들이 유지된다; 음성 선택의 경우, 유인되지 않는 세포(비표지 세포)가 유지된다. 몇몇 측면에서, 동일한 선택 단계 동안 양성 및 음성 선택의 조합을 수행하여, 양성 및 음성 분획을 유지하여 추가 분리 단계로 처리하거나 또는 추가 프로세싱한다.
- [0327] [0311] 특정 구체예에서, 자성적으로 반응성인 입자들은 일차 항체 또는 기타 결합 파트너, 이차 항체, 렉틴, 효소, 또는 스트랩트아비딘에서 코팅된다. 특정 구체예에서, 자성 입자들은 하나 이상의 마커에 특이적인 일차 항체의 코팅을 통해 세포에 결합된다. 특정 구체예에서는 비드가 아닌 세포가 일차 항체 또는 결합 파트너로 표지된 다음, 세포-유형 특이적인 이차 항체- 또는 기타 결합 파트너(예컨대, 스트랩트아비딘)-코팅된 자성 입자가 첨가된다. 특정 구체예에서, 스트랩트아비딘-코팅된 자성 입자들은 바이오티닐화된 일차 또는 이차 항체와 연계적으로 사용된다.
- [0328] [0312] 몇몇 구체예에서, 자성적으로 반응성인 입자들은 후속적으로 인큐베이션, 배양 및/또는 조작될 세포에 부착된 채로 방치된다; 몇몇 측면에서, 이들 입자들은 환자에 대한 투여를 위해 세포에 부착된 채로 방치된다. 몇몇 구체예에서, 자화가능한 또는 자성적으로 반응성인 입자들이 세포로부터 제거된다. 세포로부터 자화가능한 입자를 제거하는 방법은 공지이며 여기에는 예컨대 경쟁적 비-표지 항체의 사용, 자화가능한 입자 또는 절단가능한 링커에 건조제이션된 항체의 사용, 등이 포함된다. 몇몇 구체예에서, 자화가능한 입자들은 생분해성이다.
- [0329] [0313] 몇몇 구체예에서, 친화력-기반 선택은 자기-활성화 세포 소팅(MACS) (Miltenyi Biotech, Auburn, CA)을 경유한다. 자기 활성화 세포 소팅(MACS) 시스템은 그에 결합된 자화된 입자들을 갖는 세포의 고순도 선택이 가능하다. 특정 구체예에서, MACS는 비표적 중 또는 표적 중이 외부 자기장 인가 후에 순차적으로 용리되는 방식으로 작동한다. 즉, 자화된 입자에 부착된 세포들은 그 자리에 유지되는 반면 부착되지 않은 종들은 용리된다. 이어서, 이 1차 용리 단계가 종결된 후, 자기장에 포획된 종들 및 용리되지 않은 종들이 용리 및 회수가 가능한 몇몇 방식으로 방출된다. 특정 구체예에서, 비-표적 세포가 표지되어 이질적인 세포 집단으로부터 고갈된다.
- [0330] [0314] 특정 구체예에서, 단리 또는 분리는 당해 방법의 단리, 세포 준비, 분리, 가공, 인큐베이션, 배양 및/또는 제형화 단계를 하나 이상 수행하는 시스템, 디바이스 또는 장치를 이용하여 수행된다. 몇몇 측면에서, 시스템은 예컨대 실수, 사용자 핸들링 및/또는 오염으로 최소화하기 위해 밀폐 또는 멸균 환경에서 이들 단계들을 각각 수행하는데 이용된다. 일례에서, 시스템은 국제특허출원, 공개번호 WO2009/072003, 또는 US 20110003380 A1에 설명된 바와 같은 시스템이다.
- [0331] [0315] 몇몇 구체예에서, 시스템 또는 장치는 통합형 또는 자납식 시스템, 및/또는 자동화 또는 프로그램 방식으로, 단리, 가공, 조작 및 제형화 단계들 중 하나 이상, 예컨대 모두를 수행한다. 몇몇 측면에서, 시스템 또는 장치는 사용자로 하요금 결과를 프로그램, 제어, 평가하거나 및/또는 가공, 단리, 조작 및 제형화 단계들의 다양한 측면을 조정할 수 있도록 해주는, 시스템 또는 장치와 교통하는 컴퓨터 프로그램 및/또는 컴퓨터를 포함한다.
- [0332] [0316] 예컨대 밀폐 및 멸균 시스템에서 임상-규모 수준으로 세포를 자동화 분리하기 위해, 몇몇 측면에서, 분리 및/또는 기타 단계들은 CliniMACS 시스템을 이용하여 수행된다. 부품으로는 일체형 마이크로컴퓨터, 자성 분리 유닛, 연동 펌프, 다양한 핀치 밸브를 들 수 있다. 몇몇 측면에서 일체형 컴퓨터는 장비의 모든 부품들을 제어하여 시스템으로 하여금 표준화된 시퀀스로 공정을 반복 수행하게 할 수 있다. 몇몇 측면에서 자성 분리 유닛은 이동가능한 영구자석 및 선택 컬럼용 홀더를 포함한다. 연동 펌프는 튜빙 세트를 통해 유속을 조절하고 핀치

밸브와 함께 시스템을 통한 완충액의 흐름과 세포의 지속적인 현탁을 통제한다.

- [0333] [0317] 몇몇 구체예에서, 자동화 분리, 예컨대 몇몇 측면에서 CliniMACS 시스템을 이용한 분리는 멸균된 비발열성 용액에 공급되는 항체-커플링된 자화가능한 입자를 이용한다. 몇몇 구체예에서, 세포를 자성 입자로 표시한 후 세포들을 세척하여 과량의 입자를 제거한다. 이어서 세포 제조 백을 튜빙 세트에 연결한 다음 이것을 완충액을 함유하는 백과 세포 수집 백에 연결한다. 튜빙 세트는 예비-컬럼 및 분리 컬럼을 비롯하여, 미리-조립된 멸균 튜빙으로 구성되며, 1회 사용만을 염두에 둔 것이다. 분리 프로그램 개시 후, 시스템은 세포 샘플을 분리 컬럼에 자동적으로 적용한다. 표시된 세포들은 컬럼 내에 유지되는 한편, 비표지 세포들은 일련의 세척 단계로부터 제거된다. 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법에 사용되기 위한 세포 집단은 표시되지 않으며 컬럼에 유지되지 않는다. 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법에 사용되기 위한 세포 집단은 표시되며 컬럼 내에 유지된다. 몇몇 구체예에서, 본 발명에 설명된 방법에 사용되기 위한 세포 집단은 자기장 제거 후 컬럼으로부터 용리되어, 세포 수집 백에 수집된다.
- [0334] [0318] 특정 구체예에서, 분리 및/또는 기타 단계들은 CliniMACS Prodigy 시스템 (Miltenyi Biotec)을 이용하여 수행된다. CliniMACS Prodigy 시스템에는 몇몇 측면에서 자동화 세척 및 원심분리에 의한 세포의 분획화를 가능케 해주는 세포 가공 유닛이 구비되어 있다. CliniMACS Prodigy 시스템은 또한 소스 세포 산물의 현거시적인 층을 알아차림으로써 최적 분획화 종말점을 탐지하는 온보드 카메라 및 이미지 인식 소프트웨어를 포함할 수도 있다. 예를 들어, 말초 혈액을 적혈구, 백혈구 및 혈장 층 내로 자동 분리한다. CliniMACS Prodigy 시스템은 또한 예컨대 세포 분화 및 성장, 항원 로딩 및 장기간 세포 배양 등의 세포 배양 프로토콜을 달성하는 일체형 세포 배양 챔버를 포함할 수도 있다. 인풋 포트는 배지의 멸균 제거 및 재보충을 가능케하며 일체형 현미경을 이용하여 세포를 모니터링할 수 있다. 예컨대, Klebanoff et al.(2012) *J Immunother.* 35(9): 651-660, Terakura et al. (2012) *Blood*.1:72-82, 및 Wang et al. (2012) *J Immunother.* 35(9):689-701 참조.
- [0335] [0319] 몇몇 구체예에서, 복수개의 세포 표면 마커에 대해 염색된 세포를 유동 스트림에서 처리하는, 유세포분석법을 통해 본 발명에서 설명된 세포 집단을 수집 및 농축 (또는 고갈)시킨다. 몇몇 구체예에서, 예비 스케일 (FACS)-소팅을 경유하여 본 발명에 설명된 세포 집단을 수집 및 농축한다. 특정 구체예에서는 FACS-기반 검출 시스템과 조합된 마이크로전기기계 시스템(MEMS)를 이용함으로써 본 발명에 설명된 세포 집단을 수집 및 농축시킨다 (참조: 예컨대, WO 2010/033140, Cho 외 (2010) *Lab Chip* 10, 1567-1573; 및 Godin (2008) *J Biophoton.* 1(5):355-376). 양자 모두에 있어서, 세포를 복수개의 마커로 표시할 수 있으므로, 잘-정의된 T 세포 서브세트를 고순도로 분리해낼 수 있다.
- [0336] [0320] 몇몇 구체예에서는, 양성 및/또는 음성 선택을 위한 분리를 용이화하기 위해 항체 또는 결합 파트너를 하나 이상의 검출 가능한 마커로 표시한다. 예컨대, 분리는 형광 표시된 항체에 대한 결합에 기초할 수 있다. 몇 가지 예에서, 1개 이상의 세포 표면 마커에 특이적인 항체 또는 기타 결합 파트너의 결합에 기초한 세포 분리를 유체 스트림에서, 예컨대, 예비 규모(FACS) 및/또는 미세전자기계 시스템(MEMS) 칩을 비롯한, 형광-활성화 세포 소팅(FACS)에 의해, 유세포 검출 시스템과 조합하여 수행한다. 이러한 방법에 의해 복수 마커에 기초하여 양성 및 음성 선택을 동시에 수행할 수 있다.
- [0337] [0321] 몇몇 구체예에서, 준비 방법은 세포를 단리, 인큐베이션 및/또는 조작하기 전 또는 후에 세포를 동결, 예컨대 동결보존하는 단계를 포함한다. 몇몇 구체예에서, 동결 및 후속되는 해동 단계는 세포 집단에서 과립구 및 어느 정도의 단핵구를 제거한다. 몇몇 구체예에서, 세포는 예컨대 혈장 및 혈소판 제거를 위한 세척 단계 후에 동결 용액 중에서 현탁된다. 몇몇 측면에서, 다양한 공지의 동결 용액 및 변수들이 이용될 수 있다. 그 한 가지 예는 20% DMSO 및 8% 인간 혈청 알부민 (HSA)을 함유하는 PBS, 또는 기타 적절한 세포 동결 매질을 이용하는 것이다. 이어서 이를 매질과 1:1로 희석하여 DMSO 및 HSA의 최종 농도를 각각 10% 및 4%로 한다. 이어서 일반적으로 세포를 분 당 1℃의 비율로 -80℃까지 동결시키고 증기상 액체질소 보관 탱크에서 보존한다.
- [0338] [0322] 몇몇 구체예에서, 제공된 방법은 배양, 인큐베이션, 배양 및/또는 유전자 조작 단계를 포함한다. 예를 들어, 몇몇 구체예에서, 고갈된 세포 집단 및 배양-개시 조성물을 인큐베이션 및/또는 조작하기 위한 방법이 제공된다.
- [0339] [0323] 그러므로, 몇몇 구체예에서, 세포 집단은 배양-개시 조성물에서 인큐베이션된다. 인큐베이션 및/또는 조작은 배양 용기, 예를 들면, 세포를 배양 또는 재배하기 위한 유닛, 챔버, 웰, 컬럼, 튜브, 튜빙 세트, 밸브, 바이알, 배양 접시 또는 백에서 수행될 수 있다.
- [0340] [0324] 몇몇 구체예에서, 세포는 유전자 조작 전에 또는 그와 관련하여 인큐베이션 및/또는 배양된다. 인큐베이션

선 단계는 배양(culture), 배양(cultivation), 자극, 활성화, 및/또는 증식을 포함할 수 있다. 몇몇 구체예에서, 조성물 또는 세포를 자극 조건 또는 자극 물질 존재 하에 인큐베이션한다. 이러한 조건은 항원 노출 방법, 및/또는 예를 들면 재조합 항원 수용체 도입과 같은 유전자 조작을 위한 세포 프라임을 위해, 집단에서 세포의 증식, 팽창, 활성화 및/또는 생존을 유도하도록 설계된 것들을 포함한다.

[0341] [0325] 조건은 특정 배지, 온도, 산소 함량, 이산화탄소 함량, 시간, 물질, 예컨대 영양물질, 아미노산, 항생제, 이온, 및/또는 자극 인자, 예를 들면 시토카인, 케모카인, 항원, 결합 파트너, 융합 단백질, 재조합 가용성 수용체, 및 세포 활성화를 위해 설계된 기타 물질 중 1가지 이상을 포함할 수 있다.

[0342] [0326] 몇몇 구체예에서, 자극 조건 또는 물질은 하나 이상의 물질, 예컨대, TCR 복합체의 세포내 시그널링 도메인을 활성화시킬 수 있는 리간드를 포함한다. 몇몇 측면에서, 물질은 T 세포 내에서 TCR/CD3 세포내 시그널링을 촉발 또는 개시한다. 이러한 물질로는 항체, 예를 들면 TCR 성분 및/또는 동시자극 수용체에 특이적인 것들, 예컨대, 항-CD3, 항-CD28, 예를 들어, 비드와 같은 고상 지지체에 결합된 것, 및/또는 하나 이상의 시토카인을 들 수 있다. 임의로, 증식 방법은 또한 배양 배지에 항-CD3 및/또는 항-CD28 항체를 첨가하는 단계 (적어도 약 0.5 ng/ml의 농도로)를 추가로 포함할 수 있다. 몇몇 구체예에서, 자극 물질은 IL-2 및/또는 IL-15을, 예를 들어, IL-2를 적어도 약 10 유닛/mL의 농도로 포함한다.

[0343] [0327] 몇몇 측면에서, 인큐베이션은 Riddell 등의 미국특허 No. 6,040,177, Klebanoff et al.(2012) *J Immunother.* 35(9): 651-660, Terakura et al. (2012) *Blood*.1:72-82, 및/또는 Wang et al. (2012) *J Immunother.* 35(9):689-701에 설명된 기술에 따라 수행된다.

[0344] [0328] 몇몇 구체예에서, T 세포는 예컨대 비-분열성 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)와 같은 배양-개시 조성물 피더 세포를 첨가함으로써 (예컨대 결과적인 세포 집단이 증식시키고자 하는 초기 집단 중의 각각의 T 림프구에 대해 PBMC 피더 세포를 적어도 5, 10, 20, 또는 40배 또는 그 이상 함유하도록); 배양체를 인큐베이션 (예컨대 몇몇 T 세포들이 증식하는데 충분한 기간 동안) 함으로써 증식된다. 몇몇 측면에서, 비분열 피더 세포들은 감마선이 조사된 PBMC 피더 세포를 포함할 수 있다. 몇몇 구체예에서, 세포 분열을 방지하기 위해 약 3000 내지 3600 rads 범위로 PBMC에 감마선을 조사한다. 몇몇 측면에서, T 세포 집단을 첨가하기에 앞서서, 배양 배지에 피더 세포를 첨가한다.

[0345] [0329] 몇몇 구체예에서, 자극 조건은 인간 T 림프구의 성장에 적합한 온도예컨대, 적어도 약 25°C, 일반적으로 적어도 약 30도, 및 일반적으로 약 37°C를 포함한다. 필요에 따라, 인큐베이션은 피더 세포로서 비분열 EBV-형질 전환된 림프모구 세포(LCL)을 첨가하는 것을 더 포함할 수 있다. LCL에 약 6000 내지 10,000 rads 범위의 감마선을 조사할 수 있다. 몇몇 측면에서 LCL 피더 세포가 적절한 양, 예컨대 적어도 약 10:1의 초기 T 림프구에 대한 LCL 피더 세포 비율로서 제공된다.

[0346] [0330] 구체예에서, 나이브 또는 항원 특이적인 T 림프구를 항원으로 자극함으로써 항원 특이적인 T 세포, 예컨대 항원 특이적인 CD4⁺ 및 CD8⁺ 수득할 수 있다. 예컨대, 감염된 대상자로부터 T 세포를 분리하고 시험관 내에서 상기 세포를 동일한 항원으로 자극시킴으로써, 시토크로마이리드 항원에 대한 항원-특이적인 T 세포주 또는 클론을 생성할 수 있다.

[0347] X.조성물 및 제형(formulations)

[0348] [0331] 또한 본 발명에 따라 의약 조성물을 비롯한 세포를 포함하는 조성물, 및 제형, 예컨대 주어진 투여량 또는 그의 분획으로 세포 수를 포함하는 단위 투여 제형 조성물이 제공된다. 의약 조성물 및 제형은 임의로 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 일반적으로 포함한다. 몇몇 구체예에서, 조성물은 적어도 1종의 부가적인 치료제를 포함한다.

[0349] [0332] "의약 제형(pharmaceutical formulation)"이라는 용어는 그러한 형태에서, 그에 함유된 활성 성분의 생물학적 활성이 유효하게끔 허용해주는 제제로서, 상기 제형이 투여될 대상자에게 허용가능하게 독성인 부가적인 성분들을 전혀 함유하지 않는 제제를 가리킨다.

[0350] [0333] "약학적으로 허용가능한 담체"라 함은 의약 조성물 내에서 활성 성분이 아니면서 대상자에게 비독성인 성분을 가리킨다. 약학적으로 허용가능한 담체의 비제한적인 예로는 완충제, 부형제, 안정화제 또는 보존제를 들 수 있다.

[0351] [0334] 몇몇 측면에서, 담체의 선택은 부분적으로 특정한 세포, 및/또는 투여 방법에 따라 결정된다. 따라서, 적절한 제형이 다양하게 존재한다. 예를 들어, 의약 조성물은 보존제를 함유할 수 있다. 적절한 보존제로는 예

컨대 메틸파라벤, 프로필파라벤, 소듐 벤조에이트, 및 염화 벤잘코늄을 들 수 있다. 몇몇 측면에서, 2종 이상의 보존제의 혼합물이 사용된다. 보존제 또는 그의 혼합물은 일반적으로 총 조성물 중 약 0.0001% 내지 약 2 중량%의 양으로 존재한다. 담체는 예컨대 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 설명되어 있다. 약학적으로 허용가능한 담체는 일반적으로 사용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이며: 완충제 예컨대 포스페이트, 시트레이트 및 기타 유기산; 아스코르브산 및 메티오닌을 비롯한 항산화제; 보존제(예를 들면 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드); 핵사메토늄 클로라이드; 벤잘코늄 클로라이드; 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤 예를 들면 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥사놀; 3-펜타놀; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 잔기 미만) 폴리펩타이드; 단백질, 예를 들면 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 폴리머 예를 들면 폴리비닐피롤리돈; 아미노산 예를 들면 글라이신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 라이신; 당류, 이당류 및 기타 탄수화물 예컨대 글루코스, 만노스 또는 덱스트린; 킬레이트화제 예를 들면 EDTA; 당 예를 들면 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 카운터-이온 예를 들면 소듐; 금속 복합체(예컨대 Zn-단백질 복합체); 및/또는 비-이온성 계면활성제 예를 들면 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)를 포함할 수 있으며 이들로 한정되지 않는다.

[0352] [0335] 완충제는 몇몇 측면에서 조성물에 포함된다. 적절한 완충제의 예로는 시트르산, 소듐 시트레이트, 인산, 포타슘 포스페이트, 및 그 밖에 다양한 및 염을 들 수 있다. 몇몇 측면에서, 2종 이상의 완충제의 혼합물이 사용된다. 완충제 또는 그의 혼합물은 총 조성물에 대해 일반적으로 약 0.001% 내지 약 4 중량%의 양으로 존재한다. 투약가능한 의약 조성물의 제조 방법은 공지이다. 예시적인 방법은 예를 들면 문헌 [Remington: The Science 및 Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005)]에 보다 자세히 설명되어 있다.

[0353] [0336] 제형은 수용액을 포함할 수 있다. 제형 또는 조성물은 또한 세포, 또는 세포에 상보적인 활성을 갖는 것들로 치료되는 특정 증상, 질병 또는 병태에 유용한 2종 이상의 활성 성분을 함유할 수 있으며, 여기서 각각의 활성은 서로 악영향을 미치지 않는 것이다. 이러한 활성 성분들은 목적하는 용도에 효과적인 양으로 조합하여 적절히 존재한다. 그러므로, 몇몇 구체예에서, 의약 조성물은 그 밖의 약학적 활성 물질 또는 약물, 예를 들면 화학치료제, 예컨대 아스파라기나제, 부술판, 카르보플라틴, 시스플라틴, 다우노루비신, 독소루비신, 플루오로우라실, 겐시타빈, 히드록시우레아, 토트렉세이트, 파클리탁셀, 리톡시맵, 빈블라스틴 및/또는 빈크리스틴 등을 추가로 포함한다.

[0354] [0337] 몇몇 구체예에서 의약 조성물은 질병 또는 병태를 치료 또는 예방하는데 효과적인 양, 예컨대 치료적 유효량 또는 예방적 유효량으로 세포를 포함한다. 몇몇 구체예에서 치료적 또는 예방적 효능은 치료된 대상자를 주기적으로 평가함으로써 모니터링한다. 소망되는 투여량은 조성물의 단일 볼러스(bolus) 투여, 조성물의 복수 회 볼러스 투여 또는 조성물의 연속 주입 투여에 의해 전달될 수 있다.

[0355] [0338] 세포 및 조성물은 표준 투여 기술, 제형 및/또는 디바이스를 이용하여 투여될 수 있다. 세포의 투여는 동종 또는 이종일 수 있다. 예컨대, 한 대상자로부터 면역응답 세포 또는 전구세포(progenitors)를 수득하여 이를 동일 또는 상이한, 호환가능한 대상자에게 투여할 수 있다. 말초혈액에서 유래하는 면역응답 세포 또는 그의 자손(예컨대 생체내, 생체외 또는 인비트로 유래됨)은 카테터 투여, 전신 주사, 국소 주사, 정맥 주사 또는 비경구 투여를 비롯한 국소화된 주사를 통해 투여될 수 있다. 치료 조성물(예컨대 유전자 변형된 면역응답 세포를 함유하는 의약 조성물)을 투여하는 경우, 일반적으로 주사가 가능한 단위 투여 제형(용액, 현탁액, 에멀전)으로서 제제화된다.

[0356] [0339] 몇몇 구체예에서 제형은 경구, 정맥내, 복강내, 피하, 폐, 경피, 근육내, 비강내, 협강내(buccal), 설하 또는 좌제 투여 경로로 투여된다. 몇몇 구체예에서, 세포 집단은 비경구 투여된다. 본 발명에서 "비경구"라는 용어는 정맥내, 근육내, 피하, 직장, 질내 및 복강내 투여를 포함한다. 몇몇 구체예에서, 세포는 정맥내, 복강내 또는 피하 주사에 의한 말초 전신 전달을 이용하여 대상자에게 투여된다.

[0357] [0340] 몇몇 구체예에서, 조성물은 멸균 액상 제제, 예컨대 등장성 수용액, 현탁액, 에멀전, 분산액 또는 점성 조성물로서 제공되며, 이들은 몇몇 측면에서 선택된 pH로 완충될 수 있다. 액상 제제는 보통 겔, 기타 점성 조성물 및 고체 조성물에 비해 제조하기가 더 쉽다. 이에 더해, 액상 조성물은 특히 주사에 의해, 투여하기가 다소 더 간편하다. 다른 한편으로, 점성 조성물은 특정 조직과의 보다 장기간 접촉을 제공하기 위해 적절한 점도 범위를 갖도록 제제화될 수 있다. 액상 및 점성 조성물은 예컨대 물, 염수, 인산염 완충 염수, 폴리올(예컨대 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액상 폴리에틸렌 글리콜) 및 이들의 적절한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매

질일 수 있는 담체를 포함할 수 있다.

- [0358] [0341] 예컨대 적절한 담체, 희석제 또는 부형제, 예컨대 멸균수, 생리식염수, 글루코스, 텍스트로스 등과 혼합된 용매에 세포를 혼입시킴으로써 주사가능한 멸균 용액을 제조할 수 있다. 투여 경로 및 소망되는 제제에 따라 조성물은 보조 물질, 예컨대 습윤제, 분산제 또는 유화제(예컨대 메틸셀룰로스), pH 완충제, 겔화제 또는 점도증강 첨가제, 방부제, 풍미제, 및/또는 색소를 함유할 수 있다. 몇몇 측면에서 적절한 제제를 제조하기 위해, 표준 텍스트를 참조할 수 있다.
- [0359] [0342] 항미생물 보존제, 항산화제, 킬레이팅제 및 완충제를 비롯하여, 조성물의 안정성과 멸균성을 향상시키는 다양한 첨가제가 첨가될 수 있다. 다양한 항균제 및 항진균제, 예컨대 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 및 소르브산에 의하여 미생물의 작용을 방지할 수 있다. 예컨대 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같은 흡수지연제를 이용함으로써 주사가능한 의약 형태를 장기간 흡수시킬 수 있다.
- [0360] [0343] 생체내 투여에 사용되기 위한 제형은 일반적으로 멸균된다. 예컨대 멸균 여과막을 통한 여과에 의해, 쉽게 멸균을 달성할 수 있다.
- [0361] **XI. 제조 물품(Articles of Manufacture)**
- [0362] [0344] 입양 세포 치료를 위해 제공된 방법에 따라 대상체에게 세포를 투여하고, 세포 및 조성물의 저장 및 투여를 위한 키트 및 장치와 같은 제조 물품도 또한 제공된다.
- [0363] [0345] 제조 물품은 하나 이상의 용기, 전형적으로는 복수의 용기, 포장 재료 및 용기 또는 용기들 및/또는 포장에 또는 이들과 결합된 라벨 또는 포장 삽입물을 포함하며, 일반적으로 대상체에 세포를 투여하기 위한 지시를 포함한다.
- [0364] [0346] 용기는 일반적으로 투여될 세포, 예를 들어 그들의 하나 이상의 단위 투여량을 함유한다. 제조 물품은 전형적으로 세포의 단일 단위 투여량을 각각 함유하는 다수의 용기를 포함한다. 단위 투여량은 제1 투여으로 대상체에게 투여될 세포의 양 또는 수 또는 제1 또는 후행 투여량(들)로 투여될 세포의 수 (또는 그 이상) 일 수 있다. 투여 방법과 관련하여 대상체에게 투여될 세포의 최저 투여량 또는 가능한 최소 투여량일 수 있다. 일부 구체예에서, 단위 투여량은 본 발명의 방법에 따라 특정 질환 또는 증상을 갖는 임의의 대상체 또는 임의의 대상체에게 단일 투여량으로 투여될 세포의 최소 수 또는 세포의 수이다. 예를 들어, 일부 관점에서의 단위 투여량은 상대적으로 낮은 체중 및/또는 상대적으로 높은 질병 부담의 환자에게 투여될 수 있는 최소 세포 수를 포함할 수 있어, 하나의 경우 및 경우에 따라 하나 이상의 단위 투여량은 제1 투여량을 받은 대상체에게 투여되고, 1 또는 하나 이상의 단위 투여량은 하나 이상의 후행 투여량 (예를 들어, 제공된 방법에 따른)을 받은 대상체에게 투여된다.
- [0365] [0347] 몇몇 구체예에서, 하나 이상의 단위 투여량은 동일한 수용체, 예컨대 CAR를 발현하는 세포를 함유한다. 몇몇 측면에서, 하나 이상의 단위 투여량은 하나 이상의 다른 단위 투여량이 발현하는 것과는 다른 수용체, 예컨대 CAR를 발현한다.
- [0366] [0348] 몇몇 구체예에서, 용기 각각은 개별적으로, 동일하거나 실질적으로 동일한 수의 세포를 함유하는 제1, 제2, 또는 제3 또는 기타 등등의 수용체를 발현하는 단위 투여량의 세포를 포함한다. 따라서, 일부 구체예에서, 용기 각각은 동일하거나 대략 또는 실질적으로 동일한 수의 세포 또는 재조합 수용체 발현 세포의 수를 포함한다. 일부 구체예에서, 단위 투여량은 치료된 및/또는 세포가 유래된 대상체의 kg 당 조작된 세포, 총 세포, T 세포 또는 PBMC의 약 1×10^8 미만, 약 5×10^7 미만, 약 1×10^6 미만 또는 약 5×10^5 미만을 포함한다. 일부 구체예에서, 각각의 단위 투여량은 약 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 또는 1×10^8 의 조작된 세포, 전체 세포, T 세포 또는 PBMC를 함유한다.
- [0367] [0349] 적합한 용기는 예를 들어, 병, 바이알, 주사기 및 주입 백과 같은 유연한 백을 포함한다. 특정 구체예에서, 용기는 백(bag)이다 (예를 들어, 유연한 플라스틱 또는 PVC 백 및/또는 IV 용액 백과 같은 대상체에 세포의 주입에 적합한 것과 같은 유연한 백). 일부 구체예에서의 백은 멸균될 수 있고 및/또는 살균 될 수 있어서 세포 및 조성물의 무균 용액 및 전달을 제공한다. 일부 구체예에서, 용기, 예를 들어, 백은 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 또는 1000 ml 용량, 예를 들어 약 10 내지 약 100 또는 약 10 내지 약 500 mL 용량 일 수 있다. 일부 구체예에서, 용기 (예를 들어, 백)은 물질 및/또는 물질로부터 만들어지고, 이 물질은 안정하고 및/또는 저온과 같은 하나 이상의 다양한 온도에서 세포의 안정한 저장 및/또는 유지를 제공하고, 예를 들어 온도는 약 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$, $135\text{ }^{\circ}\text{C}$ 또는 그 이하 및/또는 동결 보존에 적합한 온도 및/

또는 세포를 해동하기에 적합한 온도 및 약 37 °C 또는 그와 같은 체온과 같은 다른 온도일 수 있고, 예를 들어, 치료 직전의 대상체의 위치 또는 치료 위치 (예를 들어, 병상)에서 해동을 가능하게 하는 온도이다.

- [0368] [0350] 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 재료로부터 형성될 수 있다. 일부 구체예에서, 용기는 하나 이상의 포트, 예를 들어 먼균 접근 포트를 가지고, 예를 들어 하나 이상의 튜브에 튜빙 또는 캐놀러를 연결하기 위한 포트, 예를 들어 정맥내 또는 다른 주입 및/또는 세포 배양 및/또는 저장 백 또는 다른 용기와 같은 다른 용기에서 및 용기로부터 전달하는 목적으로 연결을 위한 포트를 갖는다. 예시적인 용기는 주입 백, 정맥내 용액 백, 주사 바늘로 관통할 수 있는 마개를 포함하는 바이알을 포함한다.
- [0369] [0351] 제조 물품은 사용을 위한 하나 이상의 식별 정보 및/또는 지시의 하나 이상의 조각의 패키지 삽입물 또는 라벨을 추가로 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 정보 또는 지시는 내용물이 특정 증상 또는 질병을 치료하는 것에 사용될 수 있거나 사용되어야 함 및/또는 그에 대한 지침을 제공하는 것을 나타낸다. 라벨 또는 포장 삽입물은 제조 물품의 내용물이 질병 또는 병태를 치료하기 위해 사용되어야 함을 나타낼 수 있다. 일부 구체예에서, 라벨 또는 포장 삽입물을, 예를 들어 제공된 방법의 임의의 구체예에 따른 세포의 제1 및 후행 투여량의 투여를 포함하는 방법을 통해, 예를 들어 세포가 유래된 대상체를 치료하기 위한 지침을 제공한다. 일부 구체예에서, 지침은 제1 투여에서 1 단위 투여량, 예를 들어 제조 물품내의 단일 개별 용기의 내용물, 특정 시점에서의 또는 특정 시간의 창에서의 하나 이상의 후행 투여에 따른 및/또는 대상체내의 하나 이상의 인자 또는 결과의 존재 또는 부재 또는 양 또는 정도의 검출후의 투여를 명시한다.
- [0370] [0352] 몇몇 구체예에서, 지침은 제1 투여 및 후행 투여를 수행함으로써 대상체에게 복수의 단위 투여량을 투여하는 것을 명시한다. 몇몇 구체예에서, 제1 투여는 예컨대 CAR과 같은 제1 수용체를 발현하는 세포를 함유하는 상기 단위 투여량 중 하나를 대상체에게 전달하는 것을 포함하고, 후행 투여는 제1 투여와 동일한 수용체, 예컨대 CAR을 발현하는 세포를 함유하는 상기 단위 투여량 중 하나 이상을 대상자에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0371] [0353] 몇몇 측면에서, 제1 투여는 예컨대 CAR과 같은 제1 수용체를 발현하는 세포를 함유하는 상기 단위 투여량 중 하나를 대상체에게 전달하는 것을 포함하고, 후행 투여는 제1 투여와 동일한 수용체, 예컨대 CAR을 발현하는 세포를 함유하는 상기 단위 투여량 중 하나 이상을 대상자에게 투여하는 것을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 환자가 제1 투여와 동일한 수용체를 발현하는 세포를 함유하는 제2 투여를 받을지, 또는 제1 투여의 세포에 의해 발현되는 것과 구별되는 수용체, 예컨대 CAR을 발현하는 세포를 함유하는 제2 투여를 받을지는, 본 발명에 설명된 방법의 파라미터들에 의해 결정할 수 있다. 예컨대, 몇가지 관점에서, 예컨대 환자가 제1 수용체에 대해 면역 반응을 일으킨 경우, 제1 수용체와는 구별되는 수용체를 발현하는 세포를 함유하는 단위 투여량을 투여할 수 있다.
- [0372] [0354] 몇몇 구체예에서, 지침은 제2 (또는 기타 후행) 투여가 제1 투여로부터, 예컨대 제1 투여 개시로부터 또는 선행 투여로부터 적어도 약 28일 또는 적어도 약 35일 되는 시점에서 수행될 것을 명시한다. 몇몇 구체예에서, 지침은 제1 (또는 선행) 투여량의 세포에 의해 발현되는, 예컨대 CAR과 같은 수용체에 특이적인 탐지가능한 입양 숙주 면역 반응을 대상자가 나타내는 것으로 결정된 후에 후행 투여를 수행할 것을 명시한다.
- [0373] [0355] 일부 구체예에서, 표지 또는 포장 삽입물 또는 포장은 세포가 유래된 및/또는 투여될 대상의 특정 동일성을 나타내기 위한 식별자를 포함한다. 자가 전달의 경우, 세포가 유도되는 대상체의 동일성은 세포가 투여될 대상체의 동일성과 동일합니다. 따라서, 식별 정보는 세포들이 세포가 원래 유래된 특정 환자에게 투여되어야 함을 명시할 수 있다. 이러한 정보는 포장 재료 및/또는 라벨에 바코드 또는 다른 코딩된 식별자의 형태로 존재할 수 있거나, 또는 대상체의 이름 및/또는 다른 식별 특징을 나타낼 수 있다.
- [0374] [0356] 일부 구체예에서의 제조 물품은 하나 이상의, 전형적으로는 복수의, 세포를 포함하는 조성물 (예를 들어, 세포가 형성하는 개별 단위 투여량)을 함유하는 용기를 포함할 수 있고, 세포독성 또는 다른 치료 제제 (예를 들어, 세포에 동시 또는 임의의 순서로 순차적으로 조합하여 투여되는 것)와 같은 추가의 제제를 포함하는 그 안에 함유된 조성물을 가지는 하나 이상의 추가적인 용기를 더 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 제조 물품은 약학적으로 허용되는 완충제를 포함하는 다른 또는 동일한 용기를 추가로 포함할 수 있다. 그것은 다른 완충액, 희석제, 필터, 튜빙, 바늘 및/또는 주사기와 같은 다른 재료를 더 포함할 수 있다.
- [0375] [0357] 용어 "포장 삽입물"은 치료 제품의 상업용 포장에 통상적으로 포함된 지시를 나타내는데 사용되고, 이는 조짐, 사용법, 투여량, 투여, 병용 요법, 사용금지사유 및/또는 그러한 치료 제품의 용도로의 사용에 관한 경고에 관한 정보를 포함한다.
- [0376] [0358] 달리 정의되지 않는 한, 여기에 사용된 모든 기술, 표기 및 다른 기술적 및 과학적 용어 또는 용어들은

청구된 주제가 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는 것으로 의도된다. 몇몇 경우에, 일반적으로 이해되는 의미를 갖는 용어는 명확성 및/또는 용이한 참조를 위해 본 발명에서 정의되며, 본 발명의 정의를 포함하는 것은 당해 기술 분야에서 일반적으로 이해되는 것 이상의 실질적인 차이를 나타내는 것으로 해석되어서는 아니 된다.

[0377] [0359] 본 발명에서 사용되는, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 문맥이 달리 명시하지 않는 한 복수 대상을 포함한다. 예를 들어, "a" 또는 "an"은 "적어도 하나" 또는 "하나 이상"을 의미한다. 본 발명에 기재된 관점 및 변형은 관점 및 변형을 "포함하는" 및/또는 "본질적으로 이루어진다"를 포함하는 것으로 이해된다.

[0378] [0360] 본 개시 내용 전반에 걸쳐, 청구된 주제의 다양한 관점이 범위 형식으로 제시된다. 범위 형식에서의 설명은 편의상 및 간략화를 위한 것이며 청구된 주제의 범위에 대한 융통성 없는 제한으로 해석되어서는 아니됨을 이해해야 한다. 따라서, 범위의 설명은 가능한 모든 하위 범위 및 그 범위 내의 개별적인 수치를 구체적으로 개시한 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어, 값의 범위가 제공되는 경우, 그 범위의 상한과 하한 사이의 각각의 개재된 값 및 언급된 범위 내의 다른 명시된 또는 개재된 값은 청구된 주제 내에 포함되는 것으로 이해된다. 이들 작은 범위의 상한 및 하한은 독립적으로 작은 범위에 포함될 수 있으며, 기술된 범위 내에서 특별히 배제된 한계를 조건으로 청구 범위 내에 포함될 수 도있다. 언급된 범위가 하나의 한도 또는 한도 모두를 포함하는 경우, 포함된 한도 각각 또는 모두를 제외한 범위가 청구 대상에 또한 포함된다. 이는 범위의 폭에 관계없이 적용된다.

[0379] [0361] 본 명세서에서 사용된 용어 "약"은 이 기술 분야의 당업자에게 용이하게 공지된 각각의 값에 대한 통상적인 오차 범위를 나타낸다. 본 명세서에서 "약"의 값 또는 파라미터에 대한 언급은 그 값 또는 파라미터 그 자체로 지시하는 구체예를 포함한다 (그리고 설명한다). 예를 들어, "약 X"에 관한 설명은 "X"에 대한 설명을 포함한다.

[0380] [0362] 본 발명에 사용된 바와 같이, 조성물은 세포를 비롯한 2종 이상의 제품, 물질 또는 화합물의 임의의 혼합물을 지칭한다. 이는 용액, 현탁액, 액체, 분말, 페이스트, 수성, 비수성 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다.

[0381] [0363] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 세포 또는 세포 집단이 특정 마커에 대해 "양성"이라는 기재는 특정 마커, 전형적으로 표면 마커의 세포상 또는 세포내에서의 검출 가능한 존재를 나타낸다. 표면 마커를 언급할 때, 이 용어는 유동세포계수법, 예를 들어 마커에 특이적으로 결합하는 항체를 염색함으로써 및 상기 항체를 검출함으로써 검출되는 표면 발현의 부재를 의미하고, 여기서 염색은 유동세포계수법으로 동일한 조건하 및/또는 마커에 대해 음서으로 알려진 세포에 대한 수치와 비교하여 실질적으로 더 높은 수치에서 아이소타입매치 대조군으로 동일한 절차를 수행하여 검출된 염색보다 실질적으로 위의 수치로 검출되지 않는다.

[0382] [0364] 본 발명에 사용된 바와 같이, 세포 또는 세포 집단이 특정 마커에 대해 "음성"이라는 설명은 특정 마커, 전형적으로 표면 마커의 세포상 또는 세포내에서 실질적으로 검출 가능한 존재의 부재를 의미한다. 표면 마커를 언급할 때, 이 용어는 유동세포계수법, 예를 들어 마커에 특이적으로 결합하는 항체를 염색함으로써 및 상기 항체를 검출함으로써 검출되는 표면 발현의 부재를 의미하고, 여기서 염색은 유동세포계수법으로 동일한 조건하 및/또는 마커에 대해 음서으로 알려진 세포에 대한 수치와 비교하여 실질적으로 유사한 수치에서 아이소타입매치 대조군으로 동일한 절차를 수행하여 검출된 염색보다 실질적으로 위의 수치로 검출되지 않는다.

[0383] [0365] 본 발명에 사용된 용어 "벡터"는 그것이 연결된 다른 핵산을 증식시킬 수 있는 핵산 분자를 말한다. 상기 용어는 도입된 숙주 세포의 계놈에 혼입된 벡터뿐만 아니라 자기 복제 핵산 구조로서의 벡터를 포함한다. 특정 벡터는 작동 가능하게 연결된 핵산의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "발현 벡터"로 불린다.

[0384] [0366] 본 출원에 언급된 특허 문헌, 과학 기사 및 데이터베이스를 포함하는 모든 간행물은 각각의 개별 간행물이 개별적으로 참고 문헌으로 인용된 것과 동일한 정도로 모든 목적을 위해 그 전체가 참조로 포함된다. 본 발명에 기재된 정의가 본 발명에 참고로 인용된 특허, 출원, 공개된 출원 및 기타 공보에 기재된 정의와 상반되거나 그렇지 않으면 상반되는 경우, 본 발명에 기재된 정의는 본 발명에 참고로 인용된 정의에 우선한다.

[0385] [0367] 본 발명에서 사용된 섹션 표제는 단지 조직적인 목적을 위한 것이며 설명된 주제를 제한하는 것으로 해석되어서는 아니 된다.

[0386] XII. 예시적인 구체예들

- [0387] [0368] 본 발명에 따라 특히 다음 구체예들이 제공된다:
- [0388] 1. (a) 대상자의 질병 또는 병태와 연관된 항원에 특이적으로 결합하는 제1 키메라 항원 수용체(CAR)을 발현하는 세포를 대상자에게 투여하는 단계; 및
- [0389] (b) 상기 제1 CAR과 구별되는 제2 CAR를 발현하되, 제1 CAR은 발현하지 않는 세포를 상기 대상자에게 투여하는 단계
- [0390] 를 포함하는 치료방법.
- [0391] 2. 구체예 1에 있어서, 제2 CAR을 발현하는 세포의 투여시 또는 투여 직전에:
- [0392] 대상자가 제1 CAR에 특이적인, 탐지가능한 체액성 및/또는 세포-매개형 면역 반응을 나타내고;
- [0393] 질병 또는 병태가 대상자에서 지속되며; 및/또는
- [0394] 질병 또는 병태가 대상자에서 재발되는 것인 방법.
- [0395] 3. 구체예 1 또는 구체예 2에 있어서:
- [0396] 제1 CAR을 발현하는 세포의 투여와 제2 CAR을 발현하는 세포의 투여 사이의 기간은 적어도 약 28일, 적어도 약 35일, 적어도 약 42일, 적어도 약 49일, 및/또는 적어도 약 60일인 것인 방법.
- [0397] 4. 구체예 1-3 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 CAR은 상기 제2 CAR에는 존재하지 않는 면역반응성 에피토프를 적어도 1개 포함하는 것인 방법.
- [0398] 5. 구체예 4에 있어서:
- [0399] 상기 적어도 1개의 면역반응성 에피토프는 적어도 1개의 B 세포 에피토프를 포함하고; 및/또는
- [0400] 상기 적어도 1개의 면역반응성 에피토프는 적어도 1개의 T 세포 에피토프를 포함하는 것인 방법.
- [0401] 6. 구체예 1-5 중 어느 하나에 있어서:
- [0402] 상기 대상자는 단계 (a)에서의 투여에 앞서 제1 CAR을 발현하는 세포의 투여량을 투여받은 적이 없고; 및/또는
- [0403] 상기 대상자는 단계 (b)에서의 투여에 앞서 제2 CAR을 발현하는 세포의 투여량을 투여받은 적이 없는 것인 방법.
- [0404] 7. 구체예 1-6 중 어느 하나에 있어서, 제2 CAR은 제1 CAR과 동일한 항원에 대해 특이적으로 결합하는 것인 방법.
- [0405] 8. 구체예 1-7 중 어느 하나에 있어서, 질병 또는 병태는 종양인 것인 방법.
- [0406] 9. 구체예 1-8 중 어느 하나에 있어서, 질병 또는 병태는 B 세포 악성종양인 것인 방법.
- [0407] 10. 구체예 9에 있어서, 제1 CAR 및 제2 CAR은 상기 항원의 동일한 에피토프에 특이적으로 결합하는 것인 방법.
- [0408] 11. 구체예 7-10 중 어느 하나에 있어서, 제1 CAR은 상기 항원에 대한 결합을 두고 제2 CAR과 경쟁하는 것인 방법.
- [0409] 12. 구체예 7-9 및 11 중 어느 하나에 있어서, 제1 CAR 및 제2 CAR은 상기 항원의 상이한 에피토프들과 특이적으로 결합하는 것인 방법.
- [0410] 13. 구체예 1-12 중 어느 하나에 있어서:
- [0411] 제2 CAR은 제1 CAR에 의해 결합된 항원에 비해 상기 질병 또는 병태와 연관된 또 다른 항원과 특이적으로 결합하거나; 또는
- [0412] 제2 CAR은 제1 CAR에 의해 특이적으로 결합된 항원과 특이적으로 결합하지 않는 것인 방법.
- [0413] 14. 구체예 9-13 중 어느 하나에 있어서, 제1 CAR은 CD19, CD22 또는 CD20으로부터 선택된 B 세포 악성종양과 연관된 항원과 특이적으로 결합하고 제2 CAR은 제1 CAR에 의해 결합된 항원과는 구별되는, CD19, CD22 또는 CD20로부터의 또 다른 항원과 결합하는 것인 방법.
- [0414] 15. 구체예 14에 있어서, 제1 CAR은 CD19에 특이적으로 결합하고 제2 CAR은 CD22에 특이적으로 결합하는 것인

방법.

- [0415] 16. 구체예 1-6 중 어느 하나에 있어서, 제2 CAR을 발현하는 세포는 제1 CAR에 의해 특이적으로 결합된 상기 항원에 특이적으로 결합하는 수용체를 포함하지 않는 것인 방법.
- [0416] 17. 구체예 1-16 중 어느 하나에 있어서, 대상자는 제2 CAR을 발현하는 세포 투여로부터 약 30일 이내, 약 60일 이내 또는 약 90일 이내에, 제2 CAR에 대한 탐지가능한 체액성 또는 세포-매개형 면역 반응을 나타내지 않는 것인 방법.
- [0417] 18. 구체예 1-17 중 어느 하나에 있어서, 제2 CAR은 제1 CAR에 비해 아미노산 서열이 하나 이상 차이나는 것인 방법.
- [0418] 19. 구체예 18에 있어서,
- [0419] 하나 이상의 차이는 제1 CAR을 발현하는 세포의 투여 후 대상자에서 그에 대해 검출가능한 면역 반응이 일어난 제1 CAR의 영역에 비해 적어도 하나의 아미노산 서열 차이를 포함하고; 및/또는
- [0420] 하나 이상의 차이는 제1 CAR을 발현하는 세포의 투여 후 대상자에서 그에 대해 검출가능한 면역 반응이 일어난 제1 CAR의 각 영역에 비해 적어도 하나의 아미노산 서열 차이를 포함하는 것인 방법.
- [0421] 20. 구체예 1-19 중 어느 하나에 있어서, 제2 CAR을 발현하는 세포의 투여 전에, 대상자에서 CAR-특이적 면역 반응의 존재 여부를 검출하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.
- [0422] 21. 구체예 20에 있어서, 검출은 그에 대해 대상자가 특이적인 면역 반응을 나타내는 제1 CAR의 적어도 하나의 영역을 동정하는 것을 포함하는 것인 방법.
- [0423] 22. 구체예 21에 있어서, 제2 CAR은 그에 대한 면역 반응이 특이적인 제1 CAR의 상기 영역에 비해 하나 이상의 아미노산 서열 차이를 함유하는 것인 방법.
- [0424] 23. 구체예 19-22 중 어느 하나에 있어서, 제1 CAR의 영역은 scFv 부분, 링커 부분, 대상자에게 내인성이 아닌 아미노산 서열, 대상자와 상이한 종으로부터 유래된 서열, 및/또는 2개의 CAR 도메인들 사이의 정선으로 이루어진 군으로부터 선택된 영역을 하나 이상의 CAR 부분들 중에 포함하고; 및/또는 여기서 제1 CAR에 대한 영역은 2개의 도메인들 사이의 정선의 각 측면 상의 아미노산들을 포함하는 정선 영역인 것인 방법.
- [0425] 24. 구체예 23에 있어서:
- [0426] 영역은 scFv 부분 내에 프레임워크 영역 (FR)을 포함하고,
- [0427] 영역은 중쇄 FR 서열을 포함하며,
- [0428] 영역은 중쇄 CDR 서열을 포함하고,
- [0429] 영역은 경쇄 FR 서열을 포함하거나, 및/또는
- [0430] 영역은 경쇄 CDR 서열을 포함하는 것인 방법.
- [0431] 25. 구체예 24에 있어서, 영역은 정선 영역을 포함하고, 정선 영역은 제1 CAR의 제1 도메인과 제2 도메인을 연결하는 정선의 C-말단에 바로 인접한 최대 15개의 아미노산 및/또는 정선의 N-말단에 바로 인접한 최대 15개의 아미노산, 및 임의로 정선을 추가로 포함하는 것인 방법.
- [0432] 26. 구체예 25에 있어서:
- [0433] 제1 도메인 및/또는 제2 도메인은 천연 또는 내인성 인간 단백질의 도메인 또는 천연 또는 내인성 인간 단백질의 도메인 또는 그의 기능성 부분과 100% 동일성을 갖는 도메인을 포함하고, 여기서 상기 천연 또는 내인성 인간 단백질은 임의로 치료될 대상자에 의해 발현되며; 및/또는
- [0434] 제1 도메인 및/또는 제2 도메인은 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막간 도메인, 또는 세포내 시그널링 도메인을 포함하고, 상기 세포내 시그널링 도메인은 임의로 동시자극 시그널링 도메인 또는 활성화 세포질 시그널링 도메인인 것인 방법.
- [0435] 27. 구체예 26에 있어서, 제1 도메인 및 제2 도메인은 인간 대상자에서 생체내 동일 분자에 존재하지 않거나 또는 단일의 천연 또는 내인성 인간 단백질 또는 폴리펩타이드에 존재하지 않는 것인 방법.
- [0436] 28. 구체예 26 또는 구체예 27에 있어서, 제1 도메인 및 제2 도메인은 각각 세포외 리간드 결합 도메인 및 힌지

도메인, 힌지 도메인 및 막간 도메인, 막간 도메인 및 세포내 동시자극 시그널링 도메인, 및 세포내 동시자극 시그널링 도메인 및 활성화 세포질 시그널링 도메인이거나 이를 포함하고, 이들은 이러한 도메인의 기능성 부분을 포함할 수 있는 것인 방법.

- [0437] 29. 구체에 26-28 중 어느 하나에 있어서, 제1 도메인은 막간 도메인 또는 그의 기능성 부분이거나 이를 포함하고 제2 도메인은 동시자극 시그널링 도메인 또는 그의 기능성 부분이거나 이를 포함하는 것인 방법.
- [0438] 30. 구체에 29에 있어서, 막간 도메인은 CD28 막간 도메인 또는 그의 기능성 부분이고 동시자극 시그널링 도메인은 4-1BB 시그널링 도메인 또는 그의 기능성 부분인 것인 방법.
- [0439] 31. 구체에 26-30 중 어느 하나에 있어서, 제2 CAR은:
- [0440] 제1 도메인에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 도메인 및/또는 제2 도메인에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 도메인;
- [0441] 제1 도메인과 서열이 동일한 도메인 및 제2 도메인에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 도메인; 또는
- [0442] 제1 도메인에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 도메인 및 제2 도메인과 서열이 동일한 도메인을 포함하고,
- [0443] 여기서 제2 CAR 내에 존재하는 도메인들 중 하나 또는 두개 모두는 변형된 정선 영역을 포함하는 부분에서 제1 CAR의 제1 도메인 및 제2 도메인 중 하나 또는 두개 모두에 비해 적어도 하나 이상의 아미노산 서열 차이를 포함하는 것인 방법.
- [0444] 32. 구체에 29-31 중 어느 하나에 있어서:
- [0445] 제1 CAR은 함께 SEQ ID NO:5에 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO:5과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 CD28 막간 도메인 및 4-1BB 동시자극 도메인을 포함하고; 및 정선 영역을 포함하며; 및
- [0446] 제2 CAR은 제1 CAR에 비해 변형된 서열을 포함하고, 상기 변형은 SEQ ID NO:5에 제시된 넘버링에 의할 때, 잔기 13 내지 42의 서열 또는 잔기 15 내지 40의 서열을 포함하는 부분에 적어도 하나의 아미노산 서열 차이를 포함하는 것인 방법.
- [0447] 33. 구체에 18-32 중 어느 하나에 있어서, 제2 CAR은 제1 CAR에 비해 20개 이하의 아미노산 서열 차이를 포함하거나 또는 제2 CAR은 제1 CAR에 대해 적어도 95% 아미노산 서열 동일성을 포함하는 것인 방법.
- [0448] 34. 구체에 18-33 중 어느 하나에 있어서, 적어도 하나 이상의 서열 차이를 함유하는 제2 CAR의 영역은:
- [0449] 인간 백혈구 항원 (HLA) 분자에 대한 결합 친화력인 IC₅₀이 1000 nM 미만인 제1 CAR의 대응하는 영역과 비교시 보다 적은 8-15 아미노산을 함유하거나; 또는
- [0450] 레퍼런스 키메라 수용체의 정선 영역의 대응하는 부분의 서열을 갖는 펩타이드 단편의 동일한 HLA 분자에 대한 결합 친화력보다 더 낮은, 인간 백혈구 항원 (HLA) 분자에 대한 결합 친화력을 갖거나; 또는
- [0451] 영역 내 적어도 하나의 펩타이드 단편의 결합 친화력, 또는 제1 CAR의 대응하는 영역에 비해, 영역 내 8-15 아미노산 부분의 서열을 갖는 모든 펩타이드 단편들의 감소된 평균 결합 친화력을 갖는 것인 방법.
- [0452] 35. 구체에 18-34 중 어느 하나에 있어서, 제1 CAR을 대상자에게 투여한 후 제1 CAR 내의 영역에 대하여 대상자에서 일어난 면역 반응에 비해, 적어도 하나의 아미노산 서열 차이를 포함하는 제2 CAR의 대응하는 영역에 대해 제2 CAR을 발현하는 세포 투여 후 대상자에서 감소된 탐지가능한 면역 반응이 생성되는 것인 방법.
- [0453] 36. 구체에 1-17 중 어느 하나에 있어서:
- [0454] 제1 CAR은 CD28 막간 도메인 또는 그의 기능성 부분 및 4-1BB 동시자극 시그널링 도메인 또는 그의 기능성 부분을 포함하고; 및
- [0455] 제2 CAR은 제1 CAR 내의 막간 도메인 및 동시자극 시그널링 도메인 중 하나 또는 두 가지 모두와 다른 막간 도메인 및 동시자극 시그널링 도메인을 포함하는 것인 방법.
- [0456] 37. 구체에 1-36 중 어느 하나에 있어서, 제2 CAR은 제1 CAR의 대응하는 영역과 아미노산 서열이 동일한 적어도 하나의 영역을 포함하는 것인 방법.
- [0457] 38. 구체에 37에 있어서, 제1 CAR의 대응하는 영역은 제2 CAR을 발현하는 세포 투여시 대상자가 그에 대해 검출 가능한 체액성 또는 세포-매개형 면역 반응을 나타내지 않는 영역인 것인 방법.

- [0458] 39. 구체에 37 또는 구체에 38에 있어서, 제1 CAR의 대응하는 영역은 동시자극 도메인, ITAM-함유 도메인, 막간 도메인, 형질도입 또는 발현 마커, 숙주에 내인성인 서열 및/또는 숙주와 동일한 종으로부터 유래된 항체 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택된 CAR 부분 내의 영역을 포함하는 것인 방법.
- [0459] 40. 구체에 1-39 중 어느 하나에 있어서, CAR-발현 세포의 최대 개수, 시간 경과에 따른 CAR-발현 세포에 대한 곡선하 면적(AUC), 및/또는 제2 CAR을 발현하는 세포 투여 후 대상자에서 탐지가능한 CAR-발현 세포의 유지 기간은 제 CAR을 발현하는 세포의 투여 및 그에 이어 제1 CAR을 발현하는 세포의 제2 투여를 포함하는 대안적인 방법으로서, 상기 제2 투여가 제2 CAR을 발현하는 세포의 투여와 동시에 수행되는 것인 대안적인 방법을 통해 달성되는 것들보다 더 큰 것인 방법.
- [0460] 41. 구체에 1-40 중 어느 하나에 있어서:
- [0461] 상기 방법은 마이크로리터 당 적어도 약 10 CAR-발현 세포, 말초혈액 단핵구세포(PBMCs)의 총 개수의 적어도 50%, 적어도 약 1×10^5 CAR-발현 세포, 또는 DNA 마이크로그램 당 적어도 적어도 1,000, 또는 적어도 2,000, 또는 적어도 3,000, 또는 적어도 4,000, 또는 적어도 5,000 카피의 CAR-인코딩 DNA인, 대상자 혈액 내 CAR-발현 세포의 최대 농도 또는 개수를 초래하거나; 및/또는
- [0462] 제2 CAR을 발현하는 세포 투여 개시 후 제30일, 제60일 또는 제90일에, CAR-발현 세포가 대상자의 혈액 또는 혈청에서 탐지가능하거나; 및/또는
- [0463] 제2 CAR을 발현하는 세포 투여 개시 후 제30일, 제60일 또는 제90일에, 대상자의 혈액은 마이크로리터 당 적어도 20 % CAR-발현 세포, 적어도 10 CAR-발현 세포 또는 적어도 1×10^4 CAR-발현 세포를 함유하는 것인 방법.
- [0464] 42. 구체에 1-41 중 어느 하나에 있어서, 제1 CAR을 발현하는 세포의 투여량 및/또는 제2 CAR을 발현하는 세포의 투여량은 독립적으로 각각 대상자 내 질병 또는 병태의 부담을 감소시키는데 충분한 양으로 세포를 포함하는 것인 방법.
- [0465] 43. 구체에 1-42 중 어느 하나에 있어서, 제1 CAR을 발현하는 세포의 투여 및/또는 제2 CAR을 발현하는 세포의 투여는 대상자 내 질병 또는 병태의 부담을 감소시킴으로써, 질병 또는 병태를 치료하는 것인 방법.
- [0466] 44. 구체에 1-43 중 어느 하나에 있어서, 세포는 T 세포인 것인 방법.
- [0467] 45. 구체에 1-44 중 어느 하나에 있어서, T 세포는 대상자에게 자가(autologous)인 것인 방법.
- [0468] 46. 대상자에게 세포를 투여하는 것을 포함하는 치료방법으로서,
- [0469] 상기 세포는 제1 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하지 않되 제2 CAR을 발현하고, 여기서:
- [0470] 상기 대상자는 이전에 제1 CAR을 발현하는 세포를 투여받은 적이 있고;
- [0471] 상기 제1 CAR은 대상자 내 질병 또는 병태와 연관된 항원에 특이적으로 결합하며; 및
- [0472] 상기 제2 CAR은 제1 CAR에 특이적으로 결합된 항원 또는 대상자 내 질병 또는 병태와 관련된 상이한 항원과 특이적으로 결합하는 것인 방법.
- [0473] 47. 구체에 46에 있어서, 제2 CAR을 발현하는 세포 투여 전에, 제1 CAR을 발현하는 세포를 대상자에게 투여하는 방법.
- [0474] 48. 구체에 46-47 중 어느 하나에 있어서, 제2 CAR을 발현하는 세포의 투여시 또는 투여 직전에:
- [0475] 대상자는 제1 CAR에 특이적인 탐지가능한 체액성 및/또는 세포-매개형 면역 반응을 나타내고;
- [0476] 질병 또는 병태가 대상자에서 지속되거나; 및/또는
- [0477] 질병 또는 병태가 대상자에서 재발된 것인 방법.
- [0478] 49. 구체에 46-48 중 어느 하나에 있어서:
- [0479] 제1 CAR을 발현하는 세포의 투여와 제2 CAR을 발현하는 세포의 투여 사이의 기간은 적어도 약 28일, 적어도 약 35일, 적어도 약 42일, 적어도 약 49일, 및/또는 적어도 약 60일인 것인 방법.
- [0480] 50. 구체에 46-49 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 CAR은 상기 제2 CAR에 존재하지 않는 적어도 하나의 면역반

응성 에피토프를 포함하는 것인 방법.

- [0481] 51. 구체예 50에 있어서:
- [0482] 상기 적어도 하나의 면역반응성 에피토프는 적어도 하나의 B 세포 에피토프를 포함하고; 및/또는
- [0483] 상기 적어도 하나의 면역반응성 에피토프는 적어도 하나의 T 세포 에피토프를 포함하는 것인 방법.
- [0484] 52. 구체예 46-51 중 어느 하나에 있어서, 상기 대상자는 상기 투여 전에 제2 CAR을 발현하는 세포의 투여량을 투여받은 적이 없는 것인 방법.
- [0485] 53. 구체예 46-52 중 어느 하나에 있어서, 제2 CAR은 제1 CAR과 동일한 항원에 특이적으로 결합하는 것인 방법.
- [0486] 54. 구체예 46-53 중 어느 하나에 있어서, 질병 또는 병태는 종양인 것인 방법.
- [0487] 55. 구체예 46-54 중 어느 하나에 있어서, 질병 또는 병태는 B 세포 악성종양인 것인 방법.
- [0488] 56. 구체예 53에 있어서, 제1 CAR 및 제2 CAR은 상기 항원의 동일한 에피토프에 특이적으로 결합하는 것인 방법.
- [0489] 57. 구체예 53-56 중 어느 하나에 있어서, 제1 CAR은 상기 항원에 대한 결합을 두고 제2 CAR과 경쟁하는 것인 방법.
- [0490] 58. 구체예 53-55 및 57 중 어느 하나에 있어서, 제1 CAR 및 제2 CAR은 상기 항원의 구별되는 에피토프들에 특이적으로 결합하는 것인 방법.
- [0491] 59. 구체예 46-58 중 어느 하나에 있어서:
- [0492] 제2 CAR은 제1 CAR에 의해 결합된 항원에 비해 상기 질병 또는 병태와 연관된 또 다른 항원에 특이적으로 결합하거나; 또는
- [0493] 제2 CAR은 제1 CAR에 의해 결합된 항원에 특이적으로 결합하지 않는 것인 방법.
- [0494] 60. 구체예 55-59 중 어느 하나에 있어서, 제1 CAR은 CD19, CD22 또는 CD20로부터 선택된 B 세포 악성종양과 연관된 항원에 특이적으로 결합하고 제2 CAR은 제1 CAR에 의해 결합된 항원과는 구별되는, CD19, CD22 또는 CD20로부터의 또 다른 항원에 결합하는 것인 방법.
- [0495] 61. 구체예 60에 있어서, 제1 CAR은 CD19에 특이적으로 결합하고 제2 CAR은 CD22에 특이적으로 결합하는 것인 방법.
- [0496] 62. 구체예 46-52 중 어느 하나에 있어서, 제2 CAR을 발현하는 세포는 제1 CAR에 의해 특이적으로 결합된 상기 항원에 특이적으로 결합하는 수용체를 포함하지 않는 것인 방법.
- [0497] 63. 구체예 46-62 중 어느 하나에 있어서, 대상자는 제2 CAR을 발현하는 세포의 투여로부터 약 30일 이내, 약 60일 이내 또는 약 90일 이내에 제2 CAR에 대한 검출가능한 체액성 또는 세포-매개형 면역 반응을 나타내지 않는 것인 방법.
- [0498] 64. 구체예 46-63 중 어느 하나에 있어서, 제2 CAR은 제1 CAR에 비해 하나 이상의 아미노산 서열 차이를 포함하는 것인 방법.
- [0499] 65. 구체예 64에 있어서,
- [0500] 하나 이상의 차이는 제1 CAR을 발현하는 세포의 투여 후 대상자에서 그에 대해 검출가능한 면역 반응이 일어난 제1 CAR의 영역에 비해 적어도 하나의 아미노산 서열 차이를 포함하고; 및/또는
- [0501] 하나 이상의 차이는 제1 CAR을 발현하는 세포의 투여 후 대상자에서 그에 대해 검출가능한 면역 반응이 일어난 제1 CAR의 각 영역에 비해 적어도 하나의 아미노산 서열 차이를 포함하는 것인 방법.
- [0502] 66. 구체예 46-65 중 어느 하나에 있어서, 제2 CAR을 발현하는 세포의 투여 전에, 대상자에서 CAR-특이적 면역 반응의 존재 여부를 검출하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.
- [0503] 67. 구체예 66에 있어서, 검출은 그에 대해 대상자가 특이적인 면역 반응을 나타내는 제1 CAR의 적어도 하나의 영역을 동정하는 것을 포함하는 것인 방법.
- [0504] 68. 구체예 67에 있어서, 제2 CAR은 그에 대한 면역 반응이 특이적인 제1 CAR의 상기 영역에 비해 하나 이상의

아미노산 서열 차이를 함유하는 것인 방법.

- [0505] 69. 구체예 65-68 중 어느 하나에 있어서, 제1 CAR의 영역은 scFv 부분, 링커 부분, 대상자에게 내인성이 아닌 아미노산 서열, 대상자와 상이한 종으로부터 유래된 서열, 및/또는 2개의 CAR 도메인들 사이의 정선으로 이루어진 군으로부터 선택된 영역을 하나 이상의 CAR 부분들 중에 포함하고; 및/또는 여기서 제1 CAR에 대한 영역은 2개의 도메인들 사이의 정선의 각 측면 상의 아미노산들을 포함하는 정선 영역인 것인 방법.
- [0506] 70. 구체예 69에 있어서:
- [0507] 영역은 scFv 부분 내에 프레임워크 영역 (FR)을 포함하고,
- [0508] 영역은 중쇄 FR 서열을 포함하며,
- [0509] 영역은 중쇄 CDR 서열을 포함하고,
- [0510] 영역은 경쇄 FR 서열을 포함하거나, 및/또는
- [0511] 영역은 경쇄 CDR 서열을 포함하는 것인 방법.
- [0512] 71. 구체예 69에 있어서, 영역은 정선 영역을 포함하고, 정선 영역은 제1 CAR의 제1 도메인과 제2 도메인을 연결하는 정선의 C-말단에 바로 인접한 최대 15개의 아미노산 및/또는 정선의 N-말단에 바로 인접한 최대 15개의 아미노산, 및 임의로 정선을 추가로 포함하는 것인 방법.
- [0513] 72. 구체예 71에 있어서:
- [0514] 제1 도메인 및/또는 제2 도메인은 천연 또는 내인성 인간 단백질의 도메인 또는 천연 또는 내인성 인간 단백질의 도메인 또는 그의 기능성 부분과 100% 동일성을 갖는 도메인을 포함하고, 여기서 상기 천연 또는 내인성 인간 단백질은 임의로 치료될 대상자에 의해 발현되며; 및/또는
- [0515] 제1 도메인 및/또는 제2 도메인은 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막간 도메인, 또는 세포내 시그널링 도메인을 포함하고, 상기 세포내 시그널링 도메인은 임의로 동시자극 시그널링 도메인 또는 활성화 세포질 시그널링 도메인인 것인 방법.
- [0516] 73. 구체예 72에 있어서, 제1 도메인 및 제2 도메인은 인간 대상자에서 생체내 동일 분자에 존재하지 않거나 또는 단일의 천연 또는 내인성 인간 단백질 또는 폴리펩타이드에 존재하지 않는 것인 방법.
- [0517] 74. 구체예 72 또는 구체예 73에 있어서, 제1 도메인 및 제2 도메인은 각각 세포외 리간드 결합 도메인 및 힌지 도메인, 힌지 도메인 및 막간 도메인, 막간 도메인 및 세포내 동시자극 시그널링 도메인, 및 세포내 동시자극 시그널링 도메인 및 활성화 세포질 시그널링 도메인이거나 이를 포함하고, 이들은 이러한 도메인의 기능성 부분을 포함할 수 있는 것인 방법.
- [0518] 75. 구체예 72-74 중 어느 하나에 있어서, 제1 도메인은 막간 도메인 또는 그의 기능성 부분이거나 이를 포함하고 제2 도메인은 동시자극 시그널링 도메인 또는 그의 기능성 부분이거나 이를 포함하는 것인 방법.
- [0519] 76. 구체예 75에 있어서, 막간 도메인은 CD28 막간 도메인 또는 그의 기능성 부분이고 동시자극 시그널링 도메인은 4-1BB 시그널링 도메인 또는 그의 기능성 부분인 것인 방법.
- [0520] 77. 구체예 72-76 중 어느 하나에 있어서, 제2 CAR은:
- [0521] 제1 도메인에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 도메인 및/또는 제2 도메인에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 도메인;
- [0522] 제1 도메인과 서열이 동일한 도메인 및 제2 도메인에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 도메인; 또는
- [0523] 제1 도메인에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 도메인 및 제2 도메인과 서열이 동일한 도메인을 포함하고,
- [0524] 여기서 제2 CAR 내에 존재하는 도메인들 중 하나 또는 두개 모두는 변형된 정선 영역을 포함하는 부분에서 제1 CAR의 제1 도메인 및 제2 도메인 중 하나 또는 두개 모두에 비해 적어도 하나 이상의 아미노산 서열 차이를 포함하는 것인 방법.
- [0525] 78. 구체예 75-77 중 어느 하나에 있어서:
- [0526] 제1 CAR은 함께 SEQ ID NO:5에 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO:5과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을

포함하는 CD28 막간 도메인 및 4-1BB 동시자극 도메인을 포함하고; 및 정션 영역을 포함하며; 및

- [0527] 제2 CAR은 제1 CAR에 비해 변형된 서열을 포함하고, 상기 변형은 SEQ ID NO:5에 제시된 넘버링에 의할 때, 잔기 13 내지 42의 서열 또는 잔기 15 내지 40의 서열을 포함하는 부분에 적어도 하나의 아미노산 서열 차이를 포함하는 것인 방법.
- [0528] 79. 구체예 64-78 중 어느 하나에 있어서, 제2 CAR은 제1 CAR에 비해 20개 이하의 아미노산 서열 차이를 포함하거나 또는 제2 CAR은 제1 CAR에 대해 적어도 95% 아미노산 서열 동일성을 포함하는 것인 방법.
- [0529] 80. 구체예 64-79 중 어느 하나에 있어서, 적어도 하나 이상의 서열 차이를 함유하는 제2 CAR의 영역은:
- [0530] 인간 백혈구 항원 (HLA) 분자에 대한 결합 친화력인 IC50이 1000 nM 미만인 제1 CAR의 대응하는 영역과 비교시 보다 적은 8-15 아미노산을 함유하거나; 또는
- [0531] 레퍼런스 키메라 수용체의 정션 영역의 대응하는 부분의 서열을 갖는 펩타이드 단편의 동일한 HLA 분자에 대한 결합 친화력보다 더 낮은, 인간 백혈구 항원 (HLA) 분자에 대한 결합 친화력을 갖거나; 또는
- [0532] 영역 내 적어도 하나의 펩타이드 단편의 결합 친화력, 또는 제1 CAR의 대응하는 영역에 비해, 영역 내 8-15 아미노산 부분의 서열을 갖는 모든 펩타이드 단편들의 감소된 평균 결합 친화력을 갖는 것인 방법.
- [0533] 81. 구체예 64-80 중 어느 하나에 있어서, 제1 CAR을 대상자에게 투여한 후 제1 CAR 내의 영역에 대하여 대상자에서 일어난 면역 반응에 비해, 적어도 하나의 아미노산 서열 차이를 포함하는 제2 CAR의 대응하는 영역에 대해 제2 CAR을 발현하는 세포 투여 후 대상자에서 감소된 탐지가능한 면역 반응이 생성되는 것인 방법.
- [0534] 82. 구체예 46-63 중 어느 하나에 있어서:
- [0535] 제1 CAR은 CD28 막간 도메인 또는 그의 기능성 부분 및 4-1BB 동시자극 시그널링 도메인 또는 그의 기능성 부분을 포함하고; 및
- [0536] 제2 CAR은 제1 CAR 내의 막간 도메인 및 동시자극 시그널링 도메인 중 하나 또는 두 가지 모두와 다른 막간 도메인 및 동시자극 시그널링 도메인을 포함하는 것인 방법.
- [0537] 83. 구체예 46-82 중 어느 하나에 있어서, 제2 CAR은 제1 CAR의 대응하는 영역과 아미노산 서열이 동일한 적어도 하나의 영역을 포함하는 것인 방법.
- [0538] 84. 구체예 83에 있어서, 제1 CAR의 대응하는 영역은 제2 CAR을 발현하는 세포 투여시 대상자가 그에 대해 검출 가능한 체액성 또는 세포-매개형 면역 반응을 나타내지 않는 영역인 것인 방법.
- [0539] 85. 구체예 83 또는 구체예 84에 있어서, 제1 CAR의 대응하는 영역은 동시자극 도메인, ITAM-함유 도메인, 막간 도메인, 형질도입 또는 발현 마커, 숙주에 내인성인 서열 및/또는 숙주와 동일한 종으로부터 유래된 항체 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택된 CAR 부분 내의 영역을 포함하는 것인 방법.
- [0540] 86. 구체예 46-85 중 어느 하나에 있어서, CAR-발현 세포의 최대 개수, 시간 경과에 따른 CAR-발현 세포에 대한 곡선하 면적(AUC), 및/또는 제2 CAR을 발현하는 세포 투여 후 대상자에서 탐지가능한 CAR-발현 세포의 유지 기간은 제1 CAR을 발현하는 세포의 투여 및 그에 이어 제1 CAR을 발현하는 세포의 제2 투여를 포함하는 대안적인 방법으로서, 상기 제2 투여가 제2 CAR을 발현하는 세포의 투여와 동시에 수행되는 것인 대안적인 방법을 통해 달성되는 것들보다 더 큰 것인 방법.
- [0541] 87. 구체예 46-86 중 어느 하나에 있어서:
- [0542] 상기 방법은 마이크로리터 당 적어도 약 10 CAR-발현 세포, 말초혈액 단핵구세포(PBMCs)의 총 개수의 적어도 50%, 적어도 약 1×10^5 CAR-발현 세포, 또는 DNA 마이크로그램 당 적어도 적어도 1,000, 또는 적어도 2,000, 또는 적어도 3,000, 또는 적어도 4,000, 또는 적어도 5,000 카피의 CAR-인코딩 DNA인, 대상자 혈액 내 CAR-발현 세포의 최대 농도 또는 개수를 초래하거나; 및/또는
- [0543] 제2 CAR을 발현하는 세포 투여 개시 후 제30일, 제60일 또는 제90일에, CAR-발현 세포가 대상자의 혈액 또는 혈청에서 탐지가능하거나; 및/또는
- [0544] 제2 CAR을 발현하는 세포 투여 개시 후 제30일, 제60일 또는 제90일에, 대상자의 혈액은 마이크로리터 당 적어도 20 % CAR-발현 세포, 적어도 10 CAR-발현 세포 또는 적어도 1×10^4 CAR-발현 세포를 함유하는 것인 방법.

- [0545] 88. 구체예 46-87 중 어느 하나에 있어서, 제1 CAR을 발현하는 세포의 투여량 및/또는 제2 CAR을 발현하는 세포의 투여량은 독립적으로 각각 대상자 내 질병 또는 병태의 부담을 감소시키는데 충분한 양으로 세포를 포함하는 것인 방법.
- [0546] 89. 구체예 46-88 중 어느 하나에 있어서, 제1 CAR을 발현하는 세포의 투여 및/또는 제2 CAR을 발현하는 세포의 투여는 대상자 내 질병 또는 병태의 부담을 감소시킴으로써, 질병 또는 병태를 치료하는 것인 방법.
- [0547] 90. 구체예 46-89 중 어느 하나에 있어서, 세포는 T 세포인 것인 방법.
- [0548] 91. 구체예 46-90 중 어느 하나에 있어서, T 세포는 대상자에게 자가(autoologous)인 것인 방법.
- [0549] 92. 제1 키메라 항원 수용체(CAR)을 발현하는 세포로 이전에 치료받은 적이 있는 대상자의 질병 또는 병태 치료용 의약을 제조하는데 있어서의, 제2 키메라 수용체(CAR)을 발현하는 세포를 포함하는 조성물의 용도로서
- [0550] 제1 CAR은 대상자 내 질병 또는 병태와 연관된 항원에 특이적으로 결합하고; 및
- [0551] 제2 CAR은 제1 CAR에 특이적으로 결합된 항원 또는 질병 또는 병태와 관련된 상이한 항원과 특이적으로 결합하는 것인 용도.
- [0552] 93. 제1 키메라 항원 수용체(CAR)을 발현하는 세포로 이전에 치료받은 적이 있는 대상자의 질병 또는 병태를 치료하기 위한, 제2 키메라 수용체(CAR)을 발현하는 세포를 포함하는 조성물로서:
- [0553] 제1 CAR은 대상자 내 질병 또는 병태와 연관된 항원에 특이적으로 결합하고; 및
- [0554] 제2 CAR은 제1 CAR에 특이적으로 결합된 항원 또는 질병 또는 병태와 관련된 상이한 항원과 특이적으로 결합하는 것인 조성물.
- [0555] 94. 구체예 92의 용도 또는 구체예 93의 조성물로서, 상기 용도는 대상자에 있어서:
- [0556] 제1 CAR에 대해 특이적인 탐지가능한 체액성 및/또는 세포-매개형 면역 반응을 나타내고;
- [0557] 질병 또는 병태는 제1 CAR을 발현하는 세포 투여 후 대상자에서 지속되며; 및/또는
- [0558] 질병 또는 병태는 제1 CAR을 발현하는 세포 투여 후 대상자에서 재발된 것인 구체예 92의 용도 또는 구체예 93의 조성물.
- [0559] 95. 구체예 92-94 중 어느 하나에 있어서, 조성물은 제1 CAR을 발현하는 세포의 투여 후 적어도 약 28일, 적어도 약 35일, 적어도 약 42일, 적어도 약 49일, 및/또는 적어도 약 60일 동안 사용하기 위한 것인 용도 또는 조성물.
- [0560] 96. 구체예 92-95 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 CAR은 상기 제2 CAR에는 존재하지 않는 면역반응성 에피토프를 적어도 1개 포함하는 것인 용도 또는 조성물.
- [0561] 97. 구체예 96에 있어서:
- [0562] 상기 적어도 1개의 면역반응성 에피토프는 적어도 1개의 B 세포 에피토프를 포함하고; 및/또는
- [0563] 상기 적어도 1개의 면역반응성 에피토프는 적어도 1개의 T 세포 에피토프를 포함하는 것인 용도 또는 조성물.
- [0564] 98. 구체예 92-97 중 어느 하나에 있어서, 상기 대상자는 사용 전 제2 CAR을 발현하는 세포의 투여량을 투여받은 적이 없는 것인 용도 또는 조성물.
- [0565] 99. 구체예 92-98 중 어느 하나에 있어서, 제2 CAR은 제1 CAR과 동일한 항원에 대해 특이적으로 결합하는 것인 용도 또는 조성물.
- [0566] 100. 구체예 92-99 중 어느 하나에 있어서, 질병 또는 병태는 종양인 것인 용도 또는 조성물.
- [0567] 101. 구체예 92-100 중 어느 하나에 있어서, 질병 또는 병태는 B 세포 악성종양인 것인 용도 또는 조성물.
- [0568] 102. 구체예 56-101 중 어느 하나에 있어서, 제1 CAR 및 제2 CAR은 상기 항원의 동일한 에피토프에 특이적으로 결합하는 것인 용도 또는 조성물.
- [0569] 103. 구체예 99-102 중 어느 하나에 있어서, 제1 CAR은 상기 항원에 대한 결합을 두고 제2 CAR과 경쟁하는 것인 용도 또는 조성물.

- [0570] 104. 구체예 99-101 및 103 중 어느 하나에 있어서, 제1 CAR 및 제2 CAR은 상기 항원의 상이한 에피토프들과 특이적으로 결합하는 것인 용도 또는 조성물.
- [0571] 105. 구체예 92-9 중 어느 하나에 있어서:
- [0572] 제2 CAR은 제1 CAR에 의해 결합된 항원에 비해 상기 질병 또는 병태와 연관된 또 다른 항원과 특이적으로 결합하거나; 또는
- [0573] 제2 CAR은 제1 CAR에 의해 특이적으로 결합된 항원과 특이적으로 결합하지 않는 것인 용도 또는 조성물.
- [0574] 106. 구체예 101-105 중 어느 하나에 있어서, 제1 CAR은 CD19, CD22 또는 CD20으로부터 선택된 B 세포 악성종양과 연관된 항원과 특이적으로 결합하고 제2 CAR은 제1 CAR에 의해 결합된 항원과는 구별되는, CD19, CD22 또는 CD20로부터의 또 다른 항원과 결합하는 것인 용도 또는 조성물.
- [0575] 107. 구체예 106에 있어서, 제1 CAR은 CD19에 특이적으로 결합하고 제2 CAR은 CD22에 특이적으로 결합하는 것인 용도 또는 조성물.
- [0576] 108. 구체예 92-98 중 어느 하나에 있어서, 제2 CAR을 발현하는 세포는 제1 CAR에 의해 특이적으로 결합된 상기 항원에 특이적으로 결합하는 수용체를 포함하지 않는 것인 용도 또는 조성물.
- [0577] 109. 구체예 92-108 중 어느 하나에 있어서, 제2 CAR의 사용은 대상자에게 이것을 투여한지 약 30일 이내, 약 60일 이내 또는 약 90일 이내에, 제2 CAR에 대한 탐지가능한 체액성 또는 세포-매개형 면역 반응을 나타내지 않는 것인 용도 또는 조성물.
- [0578] 110. 구체예 92-109 중 어느 하나에 있어서, 제2 CAR은 제1 CAR에 비해 아미노산 서열이 하나 이상 차이나는 것인 용도 또는 조성물.
- [0579] 111. 구체예 110에 있어서,
- [0580] 하나 이상의 차이는 제1 CAR을 발현하는 세포의 투여 후 대상자에서 그에 대해 검출가능한 면역 반응이 일어난 제1 CAR의 영역에 비해 적어도 하나의 아미노산 서열 차이를 포함하고; 및/또는
- [0581] 하나 이상의 차이는 제1 CAR을 발현하는 세포의 투여 후 대상자에서 그에 대해 검출가능한 면역 반응이 일어난 제1 CAR의 각 영역에 비해 적어도 하나의 아미노산 서열 차이를 포함하는 것인 용도 또는 조성물.
- [0582] 112. 구체예 92-11 중 어느 하나에 있어서, 대상자는 제1 CAR에 대한 CAR-특이적 면역 반응이 그 대상자에서 탐지되었던 적이 있는 대상자인 것인 용도 또는 조성물.
- [0583] 113. 구체예 112에 있어서, 검출은 그에 대해 대상자가 특이적인 면역 반응을 나타내는 제1 CAR의 적어도 하나의 영역을 동정하는 것을 포함하는 것인 용도 또는 조성물.
- [0584] 114. 구체예 113에 있어서, 제2 CAR은 그에 대한 면역 반응이 특이적인 제1 CAR의 상기 영역에 비해 하나 이상의 아미노산 서열 차이를 함유하는 것인 용도 또는 조성물.
- [0585] 115. 구체예 111-114 중 어느 하나에 있어서, 제1 CAR의 영역은 scFv 부분, 링커 부분, 대상자에게 내인성이 아닌 아미노산 서열, 대상자와 상이한 종으로부터 유래된 서열, 및/또는 2개의 CAR 도메인들 사이의 정선으로 이루어진 군으로부터 선택된 영역을 하나 이상의 CAR 부분들 중에 포함하고; 및/또는 여기서 제1 CAR에 대한 영역은 2개의 도메인들 사이의 정선의 각 측면 상의 아미노산들을 포함하는 정선 영역인 것인 용도 또는 조성물.
- [0586] 116. 구체예 115에 있어서:
- [0587] 영역은 scFv 부분 내에 프레임워크 영역 (FR)을 포함하고,
- [0588] 영역은 중쇄 FR 서열을 포함하며,
- [0589] 영역은 중쇄 CDR 서열을 포함하고,
- [0590] 영역은 경쇄 FR 서열을 포함하거나, 및/또는
- [0591] 영역은 경쇄 CDR 서열을 포함하는 것인 용도 또는 조성물.
- [0592] 117. 구체예 115에 있어서, 영역은 정선 영역을 포함하고, 정선 영역은 제1 CAR의 제1 도메인과 제2 도메인을 연결하는 정선의 C-말단에 바로 인접한 최대 15개의 아미노산 및/또는 정선의 N-말단에 바로 인접한 최대 15개

의 아미노산, 및 임의로 정선을 추가로 포함하는 것인 용도 또는 조성물.

- [0593] 118. 구체예 117에 있어서:
- [0594] 제1 도메인 및/또는 제2 도메인은 천연 또는 내인성 인간 단백질의 도메인 또는 천연 또는 내인성 인간 단백질의 도메인 또는 그의 기능성 부분과 100% 동일성을 갖는 도메인을 포함하고, 여기서 상기 천연 또는 내인성 인간 단백질은 임의로 치료될 대상자에 의해 발현되며; 및/또는
- [0595] 제1 도메인 및/또는 제2 도메인은 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막간 도메인, 또는 세포내 시그널링 도메인을 포함하고, 상기 세포내 시그널링 도메인은 임의로 동시자극 시그널링 도메인 또는 활성화 세포질 시그널링 도메인인 것인 용도 또는 조성물.
- [0596] 119. 구체예 117 또는 구체예 118에 있어서, 제1 도메인 및 제2 도메인은 인간 대상자에서 생체내 동일 분자에 존재하지 않거나 또는 단일의 천연 또는 내인성 인간 단백질 또는 폴리펩타이드에 존재하지 않는 것인 용도 또는 조성물.
- [0597] 120. 구체예 117-119 중 어느 하나에 있어서, 제1 도메인 및 제2 도메인은 각각 세포외 리간드 결합 도메인 및 힌지 도메인, 힌지 도메인 및 막간 도메인, 막간 도메인 및 세포내 동시자극 시그널링 도메인, 및 세포내 동시자극 시그널링 도메인 및 활성화 세포질 시그널링 도메인이거나 이를 포함하고, 이들은 이러한 도메인의 기능성 부분을 포함할 수 있는 것인 용도 또는 조성물.
- [0598] 121. 구체예 117-120 중 어느 하나에 있어서, 제1 도메인은 막간 도메인 또는 그의 기능성 부분이거나 이를 포함하고 제2 도메인은 동시자극 시그널링 도메인 또는 그의 기능성 부분이거나 이를 포함하는 것인 용도 또는 조성물.
- [0599] 122. 구체예 121에 있어서, 막간 도메인은 CD28 막간 도메인 또는 그의 기능성 부분이고 동시자극 시그널링 도메인은 4-1BB 시그널링 도메인 또는 그의 기능성 부분인 것인 용도 또는 조성물.
- [0600] 123. 구체예 117-122 중 어느 하나에 있어서, 제2 CAR은:
- [0601] 제1 도메인에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 도메인 및/또는 제2 도메인에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 도메인;
- [0602] 제1 도메인과 서열이 동일한 도메인 및 제2 도메인에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 도메인; 또는
- [0603] 제1 도메인에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 도메인 및 제2 도메인과 서열이 동일한 도메인을 포함하고,
- [0604] 여기서 제2 CAR 내에 존재하는 도메인들 중 하나 또는 두개 모두는 변형된 정선 영역을 포함하는 부분에서 제1 CAR의 제1 도메인 및 제2 도메인 중 하나 또는 두개 모두에 비해 적어도 하나 이상의 아미노산 서열 차이를 포함하는 것인 용도 또는 조성물.
- [0605] 124. 구체예 121-132 중 어느 하나에 있어서:
- [0606] 제1 CAR은 함께 SEQ ID NO:5에 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO:5과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 CD28 막간 도메인 및 4-1BB 동시자극 도메인을 포함하고; 및 정선 영역을 포함하며; 및
- [0607] 제2 CAR은 제1 CAR에 비해 변형된 서열을 포함하고, 상기 변형은 SEQ ID NO:5에 제시된 넘버링에 의할 때, 잔기 13 내지 42의 서열 또는 잔기 15 내지 40의 서열을 포함하는 부분에 적어도 하나의 아미노산 서열 차이를 포함하는 것인 용도 또는 조성물.
- [0608] 125. 구체예 110-124 중 어느 하나에 있어서, 제2 CAR은 제1 CAR에 비해 20개 이하의 아미노산 서열 차이를 포함하거나 또는 제2 CAR은 제1 CAR에 대해 적어도 95% 아미노산 서열 동일성을 포함하는 것인 용도 또는 조성물.
- [0609] 126. 구체예 110-125 중 어느 하나에 있어서, 적어도 하나 이상의 서열 차이를 함유하는 제2 CAR의 영역은:
- [0610] 인간 백혈구 항원 (HLA) 분자에 대한 결합 친화력인 IC₅₀이 1000 nM 미만인 제1 CAR의 대응하는 영역과 비교시 보다 적은 8-15 아미노산을 함유하거나; 또는
- [0611] 레퍼런스 키메라 수용체의 정선 영역의 대응하는 부분의 서열을 갖는 펩타이드 단편의 동일한 HLA 분자에 대한 결합 친화력보다 더 낮은, 인간 백혈구 항원 (HLA) 분자에 대한 결합 친화력을 갖거나; 또는
- [0612] 영역 내 적어도 하나의 펩타이드 단편의 결합 친화력, 또는 제1 CAR의 대응하는 영역에 비해, 영역 내 8-15 아

미노산 부분의 서열을 갖는 모든 펩타이드 단편들의 감소된 평균 결합 친화력을 갖는 것인 방법.

- [0613] 127. 구체예 110-126 중 어느 하나에 있어서, 제2 CAR의 사용은
- [0614] 제1 CAR을 대상자에게 투여한 후 제1 CAR 내의 영역에 대하여 대상자에서 일어난 면역 반응에 비해, 적어도 하나의 아미노산 서열 차이를 포함하는 제2 CAR의 대응하는 영역에 대해 대상자에서 생성된 탐지가능한 면역 반응의 감소를 일으키는 것인 용도 또는 조성물.
- [0615] 128. 구체예 92-113 중 어느 하나에 있어서:
- [0616] 제1 CAR은 CD28 막간 도메인 또는 그의 기능성 부분 및 4-1BB 동시자극 시그널링 도메인 또는 그의 기능성 부분을 포함하고; 및
- [0617] 제2 CAR은 제1 CAR 내의 막간 도메인 및 동시자극 시그널링 도메인 중 하나 또는 두 가지 모두와 다른 막간 도메인 및 동시자극 시그널링 도메인을 포함하는 것인 용도 또는 조성물.
- [0618] 129. 구체예 92-128 중 어느 하나에 있어서, 제2 CAR은 제1 CAR의 대응하는 영역과 아미노산 서열이 동일한 적어도 하나의 영역을 포함하는 것인 용도 또는 조성물.
- [0619] 130. 구체예 129에 있어서, 제1 CAR의 대응하는 영역은 제2 CAR을 발현하는 세포 투여시 대상자가 그에 대해 검출가능한 체액성 또는 세포-매개형 면역 반응을 나타내지 않는 영역인 것인 용도 또는 조성물.
- [0620] 131. 구체예 129 또는 구체예 130에 있어서, 제1 CAR의 대응하는 영역은 동시자극 도메인, ITAM-함유 도메인, 막간 도메인, 형질도입 또는 발현 마커, 숙주에 내인성인 서열 및/또는 숙주와 동일한 종으로부터 유래된 항체 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택된 CAR 부분 내의 영역을 포함하는 것인 용도 또는 조성물.
- [0621] **XIII. 실시예**
- [0622] [0369] 다음의 실시예들은 오직 설명 목적을 위해 제공되며 본 발명의 범위가 이 실시예 범위로 한정되는 것은 아니다.
- [0623] **실시예 1: 트랜스유전자 산물-특이적인 숙주 면역 반응의 분석**
- [0624] [0370] 치료전 및 치료후 말초혈액 단핵구세포(PBMC) 샘플을, CD19-특이적 CAR을 발현하는 자가 T 세포들에 의해 치료된 B 세포 악성종양이 있는 4명의 대상자들로부터 수득하였다. CAR은 쥐의 항체로부터 유래된 항-CD19 scFv, 힌지 도메인, CD28 막간 도메인, 4-1BB 세포내 시그널링 도메인, CD3-제타 세포내 시그널링 도메인, T2A 도메인, 및 트렁케이티드 EGFR (EGFRt) 부분을 포함하였다.
- [0625] [0371] 대상자로부터 수득한 주입전 및 주입후(제42일) PBMCs를 기본적으로 문헌[Berger et al. *Blood*. 2006 March; 107(6): 2294-2302, Berger et al. *J Virol*. 2001 January 75(2): 799-808, Riddell et al. *Nature Medicine*. 1996 February 2(2): 216-223, Berger et al. *Blood*. 2005 February 105(4): 1640-1647]에 설명된 바와 같이 특이적인 항-CAR 면역 반응의 존재 또는 부재를 검출하기 위해 평가하였다. 간단히 설명하면 PBMCs (응답자:responders)를 투여된 세포에 의해 발현된 CAR로 형질도입된 자가 감마-조사된 세포에 의해 인비트로 자극하였다 (자극자, 응답자-대자극자 비율 1:1 또는 2:1). 이어서 다양한 이펙터-대-표적 (E/T) 비율로, 자가 ⁵¹Cr-표지된 CAR-형질도입된 ("CD19 CAR") 및 형질도입되지 않은("Mock") T 세포들(표적)에 대한 세포독성을 크롬 방출 분석으로 배양체에 대해 평가하였다. 동시-인큐베이션 후, 크롬 방출을 정량하고 각 샘플 내 획득가능한 최대 용해 백분율을 구하였다.
- [0626] [0372] 한 명의 예시적인 환자로부터 유래된 샘플에 대한 결과를 도 1에 나타내었다. 도 1은 주입전 및 제42일의 주입후 PBMC의 세포용해 활성을 나타낸 도면이다. 평가된 4명의 대상자 중 2명에서는, 어떠한 주입전 PBMC-유래된 배양체에서도 CAR-형질도입된 표적 세포에 대하여 특이적인 세포용해 활성이 검출되지 않은 반면, 주입후 PBMC 샘플로부터 유래된 배양체에서는 CAR-특이적 용해활성이 검출되었다. 이러한 결과는 CAR-특이적 면역 반응이 CAR-발현 T 세포의 단일 주입 후 발달할 수 있음을 가리킨다.
- [0627] [0373] 특이적인 면역 반응에 의해 인식된 CAR의 영역(들)을 평가하기 위해 에피토프 매핑을 수행하였다. 주입전 및 주입후 PBMC 샘플들을 복수개의 15-mer 펩타이드의 개별 풀 존재하에, 투여된 세포에 의해 발현된 CAR의 대략 500 아미노산 서열 전장 길이의 중복 부분(11 아미노산 중복)을 나타내는 서열로 자극하였다. CD8 및 CD4 표면 발현 및 세포내 사이토카인 발현을 검출하기 위해 세포들을 항체로 염색하였다. 스물 세개(23) 풀을 평가하였는데, 이들은 각기 열개(10)의 펩타이드 및 집합적으로 125개의 개별적인 중복 펩타이드를 포함하며, 이 각

각의 펩타이드는 적어도 2개의 풀에서 나타났다.

- [0628] [0374] 이 디자인에 의해 개별 펩타이드에 특이적인 반응들을 평가하기 위한 분석 그리드가 생성될 수 있었고, 이에 따라 이 분석법에서 히트(hits)로서 검출된 두개 이상의 풀에 존재하는 펩타이드가 잠재적인 면역원성 펩타이드인 것으로 추정되었다. CAR-특이적 면역 반응이 검출된 바 있는 2명의 환자들의 경우, 각각 6개 및 3개 펩타이드 히트가 동정되었다.
- [0629] [0375] 이들 개별 히트 각각에 대하여 특이적인 면역 반응의 존재 여부를 평가하기 위해 항-사이토카인 포획 항체를 이용하여 개별적인 ELISpot 분석법을 수행하였다 (Berger et al. (2006); Berger et al. (2001); Riddell et al. (1996); 및 Berger et al. (2005), 상기문헌 참조). 한 명의 환자에 대한 예시적인 분석 결과를 도 2에 나타내었다. CAR의 scFv의 V_H 부분 내의 서열을 갖는 펩타이드에 대한 특이적인 면역 반응이 평가된 두 명의 환자 모두에서 검출되었다(한 명의 환자에서는 FR1, CDR1, 및 FR2 영역 내의 영역, 또 다른 환자의 경우 FR3 내의 영역). 첫 번째 환자의 경우, 특이적인 면역 반응은 2개의 중복 15-mer 펩타이드들에 대해서도 탐지되었는데, 이들 각각은 CAR의 막간 도메인과 동시자극 도메인 사이의 정선을 함유한다(도 2에서 "융합 부위"로 표시됨). 이들 2개의 중복 15-mer 펩타이드들은 각각 아미노산 서열 AFIIFWVKRGRKKLL (SEQ ID NO: 8) 및 FWVKRGRKKLLYIFK (SEQ ID NO: 9)을 갖는다. 유사한 방법을 이용하여 쥐의 scFv, CD28 막간 및 동시자극 도메인 및 CD3 제타 도메인을 갖는 다른 CAR을 투여한 후의 또 다른 연구에서, 항-CD19 scFv의 V_H 부분을 함유하는 풀의 한 대상자에서, 그리고 정선 부분을 함유하는 풀의 또 다른 대상자에서도 면역 반응이 검출되었다.
- [0630] [0376] 이들 환자에서 이 분석법으로는 다른 영역의 펩타이드에 대해서는 특이적인 면역 반응이 검출되지 않았다. 예컨대, 이 분석법에서, scFv의 프레임워크 영역 또는 다른 CDR 내의 서열을 갖는 펩타이드, 동시자극 도메인이나 막간 도메인의 영역내이지만 이들 두 도메인 사이의 정선에 걸쳐있지는 않은 펩타이드, 또는 CAR의 EGFRt 또는 CD3- ζ 영역 내의 펩타이드에 대하여는 특이적인 반응이 검출되지 않았다. 내인성 서열에 대해서는 특이적인 면역 반응이 검출되지 않았다.
- [0631] **실시예 2: HLA 클래스 I 및 HLA 클래스 II에 대한 결합을 위한 CAR의 정선 영역들로부터 유래된 펩타이드의 인실리코 (*In Silico*) 분석**
- [0632] [0377] MHC-결합 친화력 및 예시적인 CAR 서열의 일부 내의 일련의 중복 펩타이드 서열 각각에 대한 잠재적 면역원성과 관련된 기타 특징들을 예상하기 위한 인실리코 분석을 위해, Immune Epitope Database 및 분석 리소스(IEDB)로부터 입수가 가능한 T 세포 에피토프 예상 도구(tools)를 이용하였다. 이 부분은 면역글로불린 유래된 힌지 도메인을 갖는 스페이서, 인간 CD28 막간 도메인, 인간 4-1BB 동시자극 도메인, 및 인간 CD3 제타 시그널링 도메인을 포함하였다. 평가된 부분에서, 힌지 도메인은 인간 IgG4 힌지 도메인이었고, CD28 막간 도메인은 SEQ ID NO:2에 제시된 서열을 포함하였고 4-1BB 동시자극 도메인은 SEQ ID NO:3에 제시된 서열을 함유하였다. 이 부분은 따라서 인간 서열들로부터 유래된 서로 다른 도메인들 간의 3개의 정선(상기 정선들은 인간 대상자에게 투여시 CAR에 대한 잠재적 면역원성 부위를 나타내었을 수 있다); 스페이서 영역과 막간 도메인 사이의 정선, 막간 도메인과 동시자극 도메인 간의 정선, 및 동시자극 도메인 및 세포내 시그널링 도메인 간의 정선. (도 3A 및 3B 참조).
- [0633] [0378] T 세포에 보다 잘 제시되도록 하는 특별한 성질을 가질 수 있는 서열 부분들을 동정하기 위해, 27개의 개별적인 HLA 클래스 I 대립유전자 및 56개의 개별적인 HLA 클래스 II 대립유전자에 대한 결합 친화력을, 각각 8-14 아미노산 길이 및 15 아미노산 길이 (9-mer 결합 코어를 함유함)를 따라 중복된 펩타이드에 대하여 예상하였다. 이들 대립유전자, 전 세계 집단의 99% 이상 및 미국 집단에서의 이들의 대략적 빈도를 참조로 존재하는 집합적으로 나타내지는 HLA 대립유전자를 표 1A 및 1B에 나타내었다.

표 1A: HLA 클래스 I		
클래스 I	대립유전자	집단 중 빈도
1	HLA-A*01:01	12.94
2	HLA-A*02:01	42.88
3	HLA-A*02:03	0.19
4	HLA-A*02:06	1.55
5	HLA-A*03:01	13.50
6	HLA-A*11:01	11.60
7	HLA-A*23:01	8.30
8	HLA-A*24:02	22.56
9	HLA-A*26:01	5.36
10	HLA-A*30:01	6.29
11	HLA-A*30:02	5.21
12	HLA-A*31:01	6.87
13	HLA-A*32:01	3.71
14	HLA-A*33:01	2.62
15	HLA-A*68:01	6.36
16	HLA-A*68:02	4.79
17	HLA-B*07:02	12.96
18	HLA-B*08:01	9.23
19	HLA-B*15:01	6.54
20	HLA-B*35:01	13.03
21	HLA-B*40:01	9.79
22	HLA-B*44:02	7.22
23	HLA-B*44:03	8.96
24	HLA-B*51:01	8.51
25	HLA-B*53:01	7.26
26	HLA-B*57:01	3.49
27	HLA-B*58:01	4.82

[0634]

표 1B: HLA 클래스 II					
클래스 II	대립유전자	집단 중 빈도	클래스 II	대립유전자	집단 중 빈도
1	HLA-DRB1*01:01	13.62	29	HLA-DQA1*01:02/DQB1*05:02	21.13
2	HLA-DRB1*15:01	22.86	30	HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:02	30.74
3	HLA-DRB1*03:01	21.82	31	HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02	31.56
4	HLA-DRB1*04:01	15.54	32	HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:04	19.00
5	HLA-DRB1*11:01	10.92	33	HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01	80.58
6	HLA-DRB1*13:01	9.86	34	HLA-DQA1*02:01/DQB1*02:02	27.99
7	HLA-DRB1*07:01	19.84	35	HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:01	49.92
8	HLA-DRB1*01:01	4.06	36	HLA-DQA1*02:01/DQB1*03:03	23.32
9	HLA-DRB1*01:02	1.85	37	HLA-DQA1*03:03/DQB1*03:03	20.22
10	HLA-DRB1*04:02	6.28	38	HLA-DPA1*01:03/DPB1*01:01	99.83
11	HLA-DRB1*04:05	1.22	39	HLA-DPA1*01:03/DPB1*02:01	99.83
12	HLA-DRB1*04:07	2.78	40	HLA-DPA1*01:03/DPB1*03:01	99.82
13	HLA-DRB1*04:08	1.26	41	HLA-DPA1*01:03/DPB1*04:01	99.88
14	HLA-DRB1*08:04	0.86	42	HLA-DPA1*01:03/DPB1*04:02	99.86
15	HLA-DRB1*09:01	5.33	43	HLA-DPA1*01:03/DPB1*05:01	99.81
16	HLA-DRB1*10:01	2.78	44	HLA-DPA1*02:01/DPB1*01:01	23.54
17	HLA-DRB1*11:02	0.94	45	HLA-DPA1*02:01/DPB1*02:01	24.11
18	HLA-DRB1*11:03	0.74	46	HLA-DPA1*02:01/DPB1*03:01	17.63
19	HLA-DRB1*11:04	4.76	47	HLA-DPA1*02:01/DPB1*04:01	46.73
20	HLA-DRB1*15:02	0.78	48	HLA-DPA1*02:01/DPB1*04:02	38.04
21	HLA-DRB1*15:03	1.22	49	HLA-DPA1*02:01/DPB1*05:01	13.24
22	HLA-DRB1*16:01	4.06	50	HLA-DPA1*02:01/DPB1*06:01	8.59
23	HLA-DRB1*16:02	0.84	51	HLA-DPA1*02:01/DPB1*09:01	7.26
24	HLA-DRB3*02:02	0.00	52	HLA-DPA1*02:01/DPB1*11:01	9.98
25	HLA-DRB3*03:01	0.00	53	HLA-DPA1*02:01/DPB1*13:01	11.55
26	HLA-DRB5*01:01	0.00	54	HLA-DPA1*02:01/DPB1*14:01	7.98
27	HLA-DQA1*01:01/DQB1*05:01	30.57	55	HLA-DPA1*02:01/DPB1*15:01	7.73
28	HLA-DQA1*05:01/DQB1*02:01	76.17	56	HLA-DPA1*02:01/DPB1*17:01	10.40

[0635]

[0636]

[0379] IEDB로부터 입수가 가능한 알고리즘-기반 T 세포 에피토프 예상 틀을 이용하여 ANN (Nielsen et al. (2003) Protein Sci., 12:1007-1017 및 Lundegaard et al. (2008) NAR, 36:W509-512) and, in some cases, 하나 이상의 additional prediction using SMM (Peters 및 Sette (2005) BMC Bioinformatics, 6:132) 및 comblib (Sidney et al. (2008) Immunome Res. 4:2, 또는 Consensus 틀 (참조: Kim, et al. (2012) Immune epitope database analysis resource, NAR (전술한 것들로부터의 예측을 조합)을 이용하여 데이터셋 내 각각의 8-14 아미노산 펩타이드에 대해 HLA 클래스 I 분자에 대한 결합에 대한 IC50값을 예상하였다. 데이터셋 내의 각각의 15개 아미노산 펩타이드에 있어서 HLA 클래스 II에 대한 결합의 IC50값의 예측을 NetMHCIIpan 방법 (Karosiene et al. (2013) Immunogenetics 65(10):711; Nielsen et al. (2008) PLoS Comput Biol.4(7)e1000107)에 따라 수행하였다. CAR 아미노산 서열 부분 내의 각각의 개별적인 위치에 대해, 예상된 IC50이 50 nm 미만인 클래스 I 또는 클래스 II 대립유전자에 결합될 것으로 예상되고 그 위치를 포함한 데이터 세트내 서열의 총 갯수를 구하였다. 도 4A (HLA 클래스 I) 및 4B (HLA 클래스 II)는 각각 클래스 I 및 클래스 II 대립유전자에 대한 결과를 도시하는데, 집단 내 개별적인 HLA 대립유전자의 빈도에 따라 청량된, 구해진 총 갯수에 기초한 서열 길이의 위치 커버리지를 보여준다. 평가된 전 영역에 걸친 곡선하 면적 (AUC)은 HLA 클래스 I 결합의 경우 약 1321이었고 HLA 클래스 II 결합의 경우 2943이었다. 막간-동시자극 도메인 영역에 대한 AUC는 HLA 클래스 I 결합의 경우 약 931이었고 HLA 클래스 II 결합에서는 2212이었다.

[0637]

[0380] 도 4A 및 4B에 나타난 바와 같이, 이 방법에 의해 서열의 어떤 부분들은 MHC 복합체에서 더 잘 결합할 것 같은 단편들을 함유하는 것으로 예상되었고 그에 따라 T 세포에 의한 잠재적인 인식을 위한 에피토프로서 제

시되었다. HLA 대립유전자 단독에 대한 결합 친화력이 반드시 면역원성을 예상하는 것은 아니다. 이 예시적인 CAR에서 개별적인 도메인(예컨대, 막간, 동시자극)이 인간-유래된 경우, 인간 대상자에게 투여시, 면역원성 반응은 이들 개별 영역 단독 중 어느 하나의 에피토프에 대해 일어날 확률은 높지 않았다 (보통 서로 연관되지 않은 복수개 영역에 걸쳐있거나 및/또는 이러한 영역들 간의 정선을 포함하는 에피토프와 반대됨). 예컨대, MHC 분자 관점에서 그에 잘 결합하고 제시될 것으로 예상된 펩타이드의 경우에서조차, 만일 그 펩타이드가 전적으로 내인성 단백질로부터 유래한 경우, "자가(self)"로서 인식될 수 있고 그에 따라 생산적인 면역 반응을 유도하지 못할 수 있다. 예컨대, 완전히 단일 막간 또는 세포질 도메인 내에 있는 어떤 영역들은 실시예 1에 설명된 결과에서, HLA-결합 친화력 예상에서 높은 점수를 얻은 반면, 유사한 CAR 서열의 이들 도메인 중 어느 하나에만 있는 펩타이드 서열에 대하여는 아무런 면역 반응이 검출되지 않았다. 따라서, 예상된 HLA-결합 친화력과 관련하여 다양한 "핫 스팟(hot spots)"이 관찰되었으며, 더 높이 예상된 IC50 값을 가질 뿐 아니라, 두 개의 서로 다른 단백질로부터 유래된 상이한 도메인들 간의 정선에 걸쳐 있는 잠재적인 에피토프들 역시도 포함하는 이들 영역에 후속 평가 및 변경이 집중되었다.

[0638] [0381] 구체적으로, 예시적인 CAR의 CD28 막간 도메인과 4-1BB 시그널링 도메인의 정선에 걸친 하나 이상의 잠재적인 펩타이드 에피토프들을 포함하는 정선 영역을 추가로 평가하였다. 예시적인 인간 CD28 막간 도메인 (SEQ ID NO:2) 및 예시적인 인간 4-1BB 동시자극 도메인 (SEQ ID NO:3)을 포함하는 SEQ ID NO:5에 제시된 서열과 관련하여, 평가된 정선 영역은 다음과 같이, CD28 막간 및 4-1BB 동시자극 도메인에 걸친 정선의 어느 한 쪽에 13개의 아미노산:

[0639] FVWLVVVGGVLACY**SLLVTVAFIIFWVKRGRKLLYIFKQ**PFMRPVQTTQEEDGCSC RFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO:5)을 포함하였고, 여기서 26개의 아미노산 정선 영역을 굵은 문자로, 정선의 C' 및 N'의 2개 아미노산에 밑줄을 그었다. 평가된 26 아미노산 정선 영역을 SEQ ID NO:137에 나타내었고, 이는 SEQ ID NO:5에 제시된 아미노산 서열의 아미노산 잔기 15 내지 40에 대응한다.

[0640] [0382] 높은 IC50 값을 갖고 클래스 I 및 클래스 II 대립유전자에 결합할 것으로 예상되고, 그에 따라 이 영역을 함유하는 CAR에 대한 면역원성을 유도하는 잠재력을 감소시킬 것으로 예상된 펩타이드 단편들을 결과시키는 SEQ ID NO: 137에 제시된 26-아미노산 정선 영역 내의 하나 이상의 아미노산 변형을 동정하기 위해 인실리코 모델링을 수행하였다. 구체적으로, SEQ ID NO:137를 참조로 넘버링할 때 위치 14, 17 및 20에 대응하는 아미노산 잔기 위치에서 하나 이상의 돌연변이 (SEQ ID NO:5를 참조로 넘버링할 때 위치 28, 31 및 34에 대응하는 아미노산 위치에서의 하나 이상의 돌연변이에 대응함)를 함유하는 정선 영역의 변이체 펩타이드 단편들에 대해 예상하였다. 이 예시적인 연구에서, 인실리코 돌연변이 및 모든 고친화력 에피토프의 결합 예측 후 이들 잔기들을 추가 분석을 위해 선택하였는데, 여기서는 그 에피토프에 걸친 가능한 모든 단일 아미노산 치환들을 예상된 IC50 값에 대한 이들의 영향에 대하여 조사하였다. 보다 큰 IC50 예상값 (결합은 감소)을 결과시킨 잔기들을 동정하였으며, 상기 잔기들은 치환에 민감한 것으로 동정되었다.

[0641] [0383] 예시적인 CAR 서열 내의 돌연변이되지 않은 정선 영역에 비해, 평가된 위치(들)에서 하나 이상의 아미노산 치환을 각기 함유하는, 일련의 상이한 변이체 정선 영역들을 평가하였다. 동정된 위치에서의 아미노산 치환들의 예시적인 서브셋을 선택하였는데 이들은 동시자극 시그널링 도메인의 막간 영역의 구조나 기능에 대해 덜 파괴적일 수 있다. 또한, 에피토프들이 중복되기 때문에 한번에 두 개 이상의 에피토프에 영향을 미칠 수 있는 치환을 선택하였다. 구체적으로, 개별 변이체 정선 영역들은 다음 변형(아미노산 치환): K28A, K28H, K28L, K28Q, K28S, R32A, R31H, R31L, R31N, L34A, L34S, K28Q/R31A, K28Q/R31N, K28Q/R31S, K28Q/L34A, K28Q/L34S, R31N/L34A, R31N/L34S, K28Q/R31N/L34A, K28Q/R31N/L34S를 함유하였으며, 여기서 넘버링은 SEQ ID NO:5의 넘버링에 따른 것이다.

[0642] [0384] 비-변이체 및 변이체 정선 영역의 경우, IEDB로부터 입수가 가능한 T 세포 에피토프예상을 이용하여, 청량된 면역원성 점수를 클래스 I 및 클래스 II 대립유전자에 대하여 획득하였다. 대응하는 (변이체 또는 비-변이체) 26-아미노산 정선 영역 내, 일련의 8-mer 내지 14-mer 중복 펩타이드 (개별적으로, 27 HLA 클래스 I 대립유전자 각각에 대하여) 및 일련의 15-mer 중복 펩타이드들 (개별적으로, 56 HLA 클래스 II 대립유전자 각각에 대하여) 각각에 대하여 예상된 IC50 값을 이용하여 점수를 구하고, 개별적인 HLA 클래스 I 및 클래스 II 대립유전자의 집단에서의 상대적인 빈도에 기초하여 청량하였다. 상대 점수가 높을수록 예상 결합도가 더 높음을 가리킨다.

[0643] [0385] 결과를 도 5에 나타내었다. 이들 결과는 CAR 정선 영역 내 아미노산을 변형시킴으로써, CAR 정선 영역 내의 전체적인 HLA 클래스 I 면역원성 점수를 감소시킬 수 있는 능력을 입증한다. 이들 결과는 또한 HLA 클래스

II 결합에 대한 예상된 면역원성 점수의 실질적인 증가를 일으키지 않아, 예상된 HLA 클래스 I 결합 친화력(및 그에 따라 감소된 예상된 면역원성 점수)을 감소시키는 능력도 확인해준다. 그러므로, 일반적으로, 이들 결과는 CAR의 CD28 막간 도메인과 4-1BB 동시자극 도메인 사이에 걸친 정선 영역 내에서 아미노산 변형(들)을 일으킬 수 있다는 것과 이러한 변형이 인간 HLA 결합에 대한 예상된 친화력의 전체적인 감소를 일으킨다는 것을 보여주며, 이는 인간 대상자에게 이 영역을 갖지만, 이 영역에서 변형 또는 변형들의 조합을 함유하는 수용체와 동일한 키메라 수용체를 투여시, 면역원성에 대한 잠재력이 감소된다는 것과 일치하는 것이다.

[0644] **실시예 3: HLA 클래스 I와의 결합에 대한 CAR의 정선 영역들로부터 유래된 펩타이드들의 인실리코 분석 및 인비트로 결합 비교**

[0386] CD28 및 4-1BB 정선에 걸친 26 아미노산 정선 영역의 일부에서의 예시적인 중복 9 아미노산 펩타이드 서열에 대해 어떤 HLA 클래스 I 대립유전자 (A*02:01, A*03:01, A*11:01, 및 B*08:01)에 대한 실질적인 결합 친화력을 평가하였다. 구체적으로, 평가는 CD28 막간 도메인 및 4-1BB 동시자극 도메인들 사이에 걸친 정선 부분(밀접한 2개의 아미노산을 연결하는 결합)을 함유하는, 서열 VAFIIFWYKRGKKLL (SEQ ID NO: 7에 제시됨)로부터 유래된, 일련의 중복 9-mer 펩타이드들에 대하여 수행되었다. 이에 더해, 이 부분의 여러가지 상이한 변이체들 각각의 일련의 중복 9-mer 펩타이드들 역시도 평가하였으며, 여기서 각각의 변이체는 실시예 2에 설명된 바와 같이 이 영역에 돌연변이 또는 돌연변이들을 함유한다.

[0387] 다양한 9-mer 중복 펩타이드들을 합성하고 이들의 순도를 MALDI-TOF 질량 스펙트럼에 의해 분석하였다. 이어서 이들 합성 펩타이드들을 재조합 MHC 분자와 함께 인큐베이션하여, 결합 특성을 평가하였다. 결합 특성은 각각의 펩타이드가 3원 MHC-펩타이드 복합체(ProImmune, Oxford, United Kingdom)를 안정화시킬 수 있는 정도를 측정하는, 고성능 결합 분석도구인 REVEAL Epitope Discovery System을 이용하여 수행하였다. 각각의 펩타이드를 HLA 클래스 I 대립유전자들 각각에 대한 안정성에 대하여 개별적으로 테스트하고 양성 대조군(해당 대립유전자에 대한 공지의 T 세포 에피토프)에 대해 관찰된 정도에 대해 정규화시켰다. 결과를 점수로서 보고하였고, 이 점수에서는 결합을 100%로 설정된 양성 대조군 펩타이드에 대해 정규화하였다. 이 분석에서, 점수가 50을 넘으면 일반적으로 양호 또는 높은 결합 친화력을 나타내는 것으로 간주하였다.

[0388] 실시예 2에 설명된 바와 같은 인실리코 예측법을 이용하여, 동일 펩타이드:MHC 복합체의 결합에 대하여 수득된 예상된 결합(IC50)값과 상기 결과를 비교하였다. 예상된 최대 IC50 값이 약 50,000이었기 때문에, IC50 값을 log 변환시키고, LOG(50000)로부터 빼고 LOG(50000)로 나누어 정규화된 인실리코 점수 $((\log(50000) - \log IC50) / \log(50000))$ 를 얻었다. 이 분석법에서, 인실리코 결합 예측 점수가 2.0을 넘으면 양호하거나 높은 예측된 결합 친화력을 나타내는 것으로 간주하였다.

[0389] 결과를 표 2A (HLA-A*02:01 및 HLA-A*03:01) 및 표 2B (HLA-A*11:01 및 HLA-B*08:01)에 나타내었다. 일반적으로, 인실리코 결합 예측은 실제로 인비트로 결합 결과를 예측하는 것이었다. 몇몇 경우에서, 상대적으로 더 높은 결합이 인실리코에서 예상되었지만 인비트로 분석에서는 관찰되지 않았다.

[0390] 이들 결과들은 인비트로 분석법에서 측정된 바와 같은 친화력을 일반적으로 예측하는 예측된 결합 친화력과도 일치하였다. 뿐만 아니라, 이들 결과는 정선 영역 내에서의 변형에 의해 HLA에 대한 결합 친화력이 성공적으로 감소되었음을 입증하였고, 동일 잔기를 함유하는 또 다른 중복 에피토프들에 대한 결합 친화력이나 점수를 증가(또는 한편으로 감소시키면서)시킴이 없이, 잠재적인 중복 에피토프들 중 어느 하나의 예측된 또는 실제 결합 친화력 또는 점수를 저하시키는 방식으로 서열을 변형시키는 것이 가능함을 보여준다. 몇몇 구체예에서, 이러한 돌연변이 또는 변형들은 특히 유리할 수 있다. 이들 결과의 비제한적인 예로서, SEQ ID NO:5에 제시된 넘버링에 따를 때, 변형 K29L, R31H, L34S 및/또는 L34A는 다른 HLA 대립유전자에 대하여 더 높은 결합 친화력을 야기하거나 및/또는 또 다른 펩타이드에 대하여 더 높은 결합 친화력을 야기함이 없이, 평가된 영역 내 적어도 하나의 HLA 대립유전자에 대하여 및/또는 적어도 하나의 펩타이드에 대하여 감소된 예상 또는 실제 결합 친화력을 일반적으로 결과시켰다.

표 2A: 변이체 펩타이드의 인실리코 및 인비트로 MHC 결합									
중복 레퍼런스 펩타이드	펩타이드 서열	돌연변이	A*02:01			A*03:01			SEQ ID NO.
			IEDB IC50	인실리코 점수	인비트로 점수	IEDB IC50	인실 리코	인비트 로	
1	VAFIIFWVK	없음	19617	0.41	0.70	262	2.28	1.50	16
2	AFIIFWVKR	없음	25314	0.30	0.50	17846	0.45	5.70	17
3	FIIFWVKRG	없음	7967	0.80	10.10	23693	0.32	1.40	18
4	IIFWVKRGR	없음	24769	0.31	1.70	406	2.09	24.30	19
5	IFWVKRGRK	없음	30463	0.22	4.50	3482	1.16	20.50	20
6	FWVKRGRKK	없음	28878	0.24	3.50	17327	0.46	2.20	21
7	WVKRGRKKL	없음	27956	0.25	1.40	22961	0.34	13.10	22
1	VAFIIFWVS	K29S	12273	0.61	70.60	22660	0.34	0.70	23
2	AFIIFWVSR	K29S	23924	0.32	4.50	18157	0.44	0.30	24
3	FIIFWVSRG	K29S	3382	1.17	0.20	21751	0.36	0.10	25
4	IIFWVSRGR	K29S	21442	0.37	2.60	155	2.51	25.30	26
5	IFWVSRGRK	K29S	30615	0.21	1.30	1880	1.42	39.20	27
6	FWVSRGRKK	K29S	28679	0.24	1.50	17832	0.45	2.90	28
7	WVSRGRKKL	K29S	23551	0.33	2.30	22394	0.35	2.10	29
1	VAFIIFWVL	K29L	1336	1.57	0.20	20145	0.39	0.00	30
2	AFIIFWVLR	K29L	22444	0.35	5.70	15583	0.51	0.30	31
3	FIIFWVLRG	K29L	2037	1.39	7.20	20853	0.38	0.10	32
4	IIFWVLRGR	K29L	17613	0.45	8.40	238	2.32	2.80	33
5	IFWVLRGRK	K29L	30293	0.22	2.90	3675	1.13	19.50	34
6	FWVLRGRKK	K29L	28857	0.24	3.30	16996	0.47	0.40	35
7	WVLRGRKKL	K29L	19522	0.41	2.40	23063	0.34	0.70	36
1	VAFIIFWVH	K29H	23252	0.33	3.10	10359	0.68	0.30	37
2	AFIIFWVHR	K29H	22819	0.34	0.30	18506	0.43	0.30	38
3	FIIFWVHRG	K29H	1691	1.47	37.30	22930	0.34	0.00	39
4	IIFWVHRGR	K29H	23573	0.33	4.70	326	2.19	30.10	40
5	IFWVHRGRK	K29H	29930	0.22	7.10	1062	1.67	37.80	41
6	FWVHRGRKK	K29H	28189	0.25	1.60	17052	0.47	3.60	42
7	WVHRGRKKL	K29H	25035	0.30	1.60	22278	0.35	3.40	43
1	VAFIIFWVA	K29A	2733	1.26	28.50	21010	0.38	0.00	44

[0650]

2	AFIIFWVAR	K29A	23072	0.34	2.20	17755	0.45	0.50	45
3	FIFWVARG	K29A	1902	1.42		22486	0.35		102
4	IIFWVARGR	K29A	22077	0.36	9.60	206	2.39	18.60	46
5	IFWVARGRK	K29A	30251	0.22	1.00	3893	1.11	53.70	47
6	FWVARGRKK	K29A	28353	0.25	13.50	16210	0.49	5.00	48
7	WVARGRKKL	K29A	22630	0.34	8.80	22548	0.35	1.30	49
1	VAFIIFWVQ	K29Q	17921	0.45	5.30	22927	0.34	0.20	50
2	AFIIFWVQR	K29Q	24165	0.32	0.40	19279	0.41	0.20	51
3	FIFWVQRG	K29Q	4152	1.08	16.80	23136	0.33	0.40	52
4	IIFWVQRGR	K29Q	21783	0.36	5.80	231	2.34	18.00	53
5	IFWVQRGRK	K29Q	30704	0.21	6.10	3177	1.20	36.70	54
6	FWVQRGRKK	K29Q	29501	0.23	5.20	18619	0.43	6.40	55
7	WVQRGRKKL	K29Q	24480	0.31	8.10	23630	0.33	4.90	56
4	IIFWVKRGS	R32S	18902	0.42	13.60	19450	0.41	16.20	57
5	IFWVKRGSK	R32S	29391	0.23	2.40	3348	1.17	10.40	58
6	FWVKRGSKK	R32S	28317	0.25	1.90	14227	0.55	5.90	59
7	WVKRGSKKL	R32S	23485	0.33	3.00	22637	0.34	1.90	60
4	IIFWVKRGL	R32L	2692	1.27	82.20	16661	0.48	15.90	61
5	IFWVKRGLK	R32L	29250	0.23	2.40	1973	1.40	26.90	62
6	FWVKRGLKK	R32L	27554	0.26	9.40	14434	0.54	2.70	63
7	WVKRGLKKL	R32L	20709	0.38	24.50	22985	0.34	10.00	64
4	IIFWVKRGH	R32H	27453	0.26	5.30	1665	1.48	26.60	65
5	IFWVKRGHK	R32H	29806	0.22	2.20	3806	1.12	9.00	66
6	FWVKRGHKK	R32H	27689	0.26	2.60	16743	0.48	4.10	67
7	WVKRGHKKL	R32H	25923	0.29	3.90	22313	0.35	1.40	68
4	IIFWVKRGA	R32A	6107	0.91	85.90	16069	0.49	42.90	69
5	IFWVKRGAK	R32A	29354	0.23	13.80	3470	1.16	22.00	70
6	FWVKRGAKK	R32A	28151	0.25	4.30	17066	0.47	4.70	71
7	WVKRGAKKL	R32A	24746	0.31	4.70	22982	0.34	4.10	72
4	IIFWVKRGN	R32N	25979	0.28	9.30	18552	0.43	4.30	73
5	IFWVKRGNK	R32N	29978	0.22	3.50	2669	1.27	8.00	74
6	FWVKRGNKK	R32N	28430	0.25	8.70	17713	0.45	3.60	75
7	WVKRGNKKL	R32N	24790	0.30	2.40	22813	0.34	0.90	76
4	IIFWVQRGS	K29Q/R32S	14326	0.54	22.40	17741	0.45	4.50	77

[0651]

5	IFWVQRGSK	K29Q/R3 2S	29540	0.23	33.50	3052	1.21	20.30	78
6	FWVQRGSKK	K29Q/R3 2S	28907	0.24	0.80	15992	0.50	1.90	79
7	WVQRGSKKL	K29Q/R3 2S	18121	0.44	4.40	23279	0.33	1.20	80
4	IIFWVQRGA	K29Q/R3 2A	2658	1.27	95.30	13467	0.57	2.70	81
5	IFWVQRGAK	K29Q/R3 2A	29482	0.23	11.70	3205	1.19	17.00	82
6	FWVQRGAKK	K29Q/R3 2A	28792	0.24	2.20	18649	0.43	2.70	83
7	WVQRGAKKL	K29Q/R3 2A	20217	0.39	3.00	23651	0.33	2.00	84
4	IIFWVQRGN	K29Q/R3 2N	23103	0.34	13.00	16590	0.48	3.60	85
5	IFWVQRGNK	K29Q/R3 2N	30164	0.22	16.10	2438	1.31	23.20	86
6	FWVQRGNKK	K29Q/R3 2N	29113	0.23	3.10	19165	0.42	1.30	87
7	WVQRGNKKL	K29Q/R3 2N	19790	0.40	4.30	23457	0.33	1.50	88
7	WVKRGRKKS	L35S	30812	0.21	3.90	25365	0.29	0.90	89
7	WVKRGRKKA	L35A	28556	0.24	4.50	24086	0.32	0.90	90
7	WVQRGNKKS	K29Q/L3 5S	26883	0.27	1.20	25680	0.29	0.70	91
7	WVQRGNKKA	K29Q/L3 5A	21998	0.36	1.90	24564	0.31	1.20	92
1	VAFIIFWVR	K29R	20045	0.40	1.20	5746	0.94	0.70	100
2	AFIIFWVRR	K29R	25059	0.30	1.40	17924	1.00		101

[0652]

표 2B: 변이체 펩타이드의 인실리코 및 인비트로 MHC 결합									
중복 레퍼런스 펩타이드	펩타이드 서열	돌연변이	A*11:01			B*08:01			SEQ ID NO.
			IEDB IC50	인실 리코 점수	인비 트로 점수	IEDB IC50	인실 리코 점수	인비 트로 점수	
1	VAFIIFWVK	wt	19	3.42	109.20	15806	0.50	0.30	16
2	AFIIFWVKR	wt	3271	1.18	25.90	23244	0.33	1.90	17
3	FIIFWVKRG	wt	22946	0.34	0.40	18081	0.44	0.10	18
4	IIFWVKRGR	wt	706	1.85	54.50	23025	0.34	0.00	19
5	IFWVKRGRK	wt	9701	0.71	29.30	23513	0.33	0.40	20
6	FWVKRGRKK	wt	22175	0.35	6.50	21764	0.36	0.00	21
7	WVKRGRKKL	wt	24020	0.32	4.80	225	2.35	28.50	22
1	VAFIIFWVS	K29S	12403	0.61	25.10	13796	0.56	0.10	23
2	AFIIFWVSR	K29S	2175	1.36	54.00	21862	0.36	0.30	24
3	FIIFWVSRG	K29S	20651	0.38	5.10	17854	0.45	0.40	25
4	IIFWVSRGR	K29S	162	2.49	68.90	23445	0.33	0.00	26
5	IFWVSRGRK	K29S	5778	0.94	39.20	23448	0.33	0.00	27
6	FWVSRGRKK	K29S	21126	0.37	6.30	23067	0.34	0.00	28
7	WVSRGRKKL	K29S	23684	0.32	4.40	3208	1.19	6.20	29
1	VAFIIFWVL	K29L	14191	0.55	0.20	1196	1.62	0.00	30
2	AFIIFWVLR	K29L	850	1.77	17.20	23012	0.34	0.20	31
3	FIIFWVLRG	K29L	19162	0.42	2.40	17427	0.46	0.20	32
4	IIFWVLRGR	K29L	185	2.43	35.20	23298	0.33	0.40	33
5	IFWVLRGRK	K29L	6386	0.89	29.30	23324	0.33	0.00	34
6	FWVLRGRKK	K29L	21862	0.36	5.00	23437	0.33	0.00	35
7	WVLRGRKKL	K29L	23725	0.32	3.20	1342	1.57	4.00	36
1	VAFIIFWVH	K29H	1209	1.62	12.30	16202	0.49	0.00	37
2	AFIIFWVHR	K29H	4939	1.01	34.90	22682	0.34	0.30	38
3	FIIFWVHRG	K29H	19850	0.40	0.90	17464	0.46	0.20	39
4	IIFWVHRGR	K29H	196	2.41	77.50	22662	0.34	0.20	40
5	IFWVHRGRK	K29H	7133	0.85	36.60	22030	0.36	0.10	41
6	FWVHRGRKK	K29H	22214	0.35	5.60	23778	0.32	0.00	42
7	WVHRGRKKL	K29H	23844	0.32	5.60	814	1.79	19.20	43
1	VAFIIFWVA	K29A	12499	0.60	2.80	5131	0.99	0.00	44

[0653]

2	AFIIFWVAR	K29A	2784	1.25	51.80	21850	0.36	0.20	45
3	FIFWVARG	K29A	20922	0.38		18463	0.43		102
4	IIFWVARGR	K29A	239	2.32	70.60	23580	0.33	0.30	46
5	IFWVARGRK	K29A	8772	0.76	34.90	23612	0.33	0.00	47
6	FWVARGRKK	K29A	20762	0.38	8.90	23035	0.34	0.00	48
7	WVARGRKKL	K29A	23920	0.32	13.80	2821	1.25	32.40	49
1	VAFIIFWVQ	K29Q	15477	0.51	3.90	14875	0.53	0.20	50
2	AFIIFWVQR	K29Q	2174	1.36	15.00	23016	0.34	0.00	51
3	FIFWVQRG	K29Q	22161	0.35	1.50	17653	0.45	0.60	52
4	IIFWVQRGR	K29Q	361	2.14	72.80	23548	0.33	0.10	53
5	IFWVQRGRK	K29Q	9561	0.72	128.50	23670	0.32	0.00	54
6	FWVQRGRKK	K29Q	22394	0.35	5.70	22604	0.34	1.90	55
7	WVQRGRKKL	K29Q	23688	0.32	12.80	2512	1.30	45.10	56
4	IIFWVKRGS	R32S	18923	0.42	100.00	22325	0.35	0.40	57
5	IFWVKRGSK	R32S	7476	0.83	47.90	21691	0.36	1.20	58
6	FWVKRGSKK	R32S	19910	0.40	5.60	20823	0.38	0.10	59
7	WVKRGSKKL	R32S	24090	0.32	11.80	585	1.93	56.10	60
4	IIFWVKRGL	R32L	20182	0.39	32.40	17368	0.46	1.70	61
5	IFWVKRGLK	R32L	4201	1.08	61.10	23537	0.33	58.30	62
6	FWVKRGLKK	R32L	17309	0.46	25.30	20839	0.38	6.30	63
7	WVKRGLKKL	R32L	24095	0.32	22.10	765	1.82	65.70	64
4	IIFWVKRGH	R32H	7117	0.85	19.50	23227	0.33	0.10	65
5	IFWVKRGHK	R32H	10783	0.67	30.90	23461	0.33	3.20	66
6	FWVKRGHKK	R32H	17635	0.45	27.60	20754	0.38	0.40	67
7	WVKRGHKKL	R32H	23924	0.32	2.80	269	2.27	47.60	68
4	IIFWVKRGA	R32A	19134	0.42	22.60	19585	0.41	0.90	69
5	IFWVKRGAK	R32A	8311	0.78	69.70	21592	0.36	2.20	70
6	FWVKRGAKK	R32A	20234	0.39	13.20	21762	0.36	0.30	71
7	WVKRGAKKL	R32A	23857	0.32	4.60	1366	1.56	34.10	72
4	IIFWVKRGN	R32N	19351	0.41	42.10	22864	0.34	0.90	73
5	IFWVKRGNK	R32N	6780	0.87	45.90	24238	0.31	0.10	74
6	FWVKRGNKK	R32N	20732	0.38	7.30	21565	0.37	0.10	75
7	WVKRGNKKL	R32N	24036	0.32	4.10	1181	1.63	65.90	76
4	IIFWVQRGS	K29Q/R32S	18031	0.44	16.90	22961	0.34	0.10	77
5	IFWVQRGSK	K29Q/R32S	7300	0.84	103.30	22846	0.34	0.00	78

6	FWVQRGSKK	K29Q/R32S	20419	0.39	6.80	21853	0.36	0.00	79
7	WVQRGSKKL	K29Q/R32S	23740	0.32	5.90	5230	0.98	6.80	80
4	IIFWVQRGA	K29Q/R32A	18055	0.44	56.50	20759	0.38	0.20	81
5	IFWVQRGAK	K29Q/R32A	8237	0.78	61.30	22801	0.34	0.20	82
6	FWVQRGAKK	K29Q/R32A	20696	0.38	18.30	22612	0.34	0.00	83
7	WVQRGAKKL	K29Q/R32A	23552	0.33	3.80	8314	0.78	11.40	84
4	IIFWVQRGN	K29Q/R32N	18437	0.43	29.00	23425	0.33	0.00	85
5	IFWVQRGNK	K29Q/R32N	6566	0.88	67.50	24059	0.32	0.10	86
6	FWVQRGNKK	K29Q/R32N	21228	0.37	5.90	22436	0.35	0.00	87
7	WVQRGNKKL	K29Q/R32N	23751	0.32	10.70	7869	0.80	32.00	88
7	WVKRGRKKS	L35S	23906	0.32	6.70	10345	0.68	4.30	89
7	WVKRGRKKA	L35A	23864	0.32	3.10	1225	1.61	3.10	90
7	WVQRGNKKS	K29Q/L35S	23612	0.33	5.00	21235	0.37	0.00	91
7	WVQRGNKKA	K29Q/L35A	23576	0.33	0.80	14247	0.55	0.70	92
1	VAFIIFWVR	K29R	108	2.67	34.60	16290	0.49	0.10	100
2	AFIIFWVRR	K29R	3387	1.17	1.50	22717	0.34	0.30	101

실시예 4 : HLA-A2:01에 부착하기 위한 CAR 정선 영역으로부터 유도된 펩타이드의 분석

[0391] 면역원성 반응을 유도할 수 있는 CAR 유도 펩타이드를 식별하기 위해, CAR 의 CD28 막간 도메인 및 4-1BB 공동자극 도메인 사이의 정선을 함유하는 비변이체 (레퍼런스) 서열 내의 일련의 중첩 펩타이드는 *인실리코* 에서 평가되었다. 결합에 대한 친화력을 예측하기 위해 *인실리코* 분석을 사용하여 일반적인 인간 MHC 클래스 I 분자 (HLA-A2:01)의 펩타이드 그루브에 대한 결합 친화력을 예측하는 알고리즘이 사용되었다. 도 3에 도시된 바와 같이, CAR의 평가 부분은 서열 CYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPF (서열번호 6에 기재 됨)를 가지고, 이 서열

은 밑줄로 표시된 도메인의 정선에 걸쳐있는 잔기를 가지는 CD28 막간 도메인 (서열번호 2에 기재 됨) 및 4-1BB 공동자극 도메인 (서열번호 3에 기재 됨)의 일부를 함유한다. 예측된 HLA-A2:01 결합 친화성은 일련의 서열번호 6에 기재된 서열의 8-14 아미노산의 140 중첩 펩타이드에 대해 *인실리코* 평가하였다. 펩타이드 35개는 막간 도메인 부분의 서열만 함유하였고, 펩타이드 35개는 공동자극 도메인 부분만 함유하였고, 또 펩타이드 70개는 도메인 사이 정선을 연결하는 아미노산 잔기를 함유하는 정선 또는 융합 부위 서열을 가졌다. 이 평가를 위해, 0 nM 내지 50 nM의 해리 상수를 가지는 HLA-A2:01과 결합하는 것으로 예상되는 펩타이드 단편들은 높은 친화력으로 결합할 것으로 예측되었다. 51 nM 내지 1000 nM의 해리 상수를 가지는 결합을 할 것으로 예측되는 펩타이드 단편들은 낮은 친화력으로 결합할 것으로 예측되었다. 1000 nM 내지 5000 nM로 예상되는 친화력을 가지는 결합을 할 것으로 예측되는 펩타이드 단편들은 희귀 친화성으로 결합할 것으로 예측되었다. 이 결과는 도 3에 도시하였다.

[0658] [0392] 도 3에 보이는 바와 같이, 각각 도메인 사이의 정선에 걸친 중첩 영역을 가지는 서열을 함유하는 이 영역의 레퍼런스 서열로부터 유래된 펩타이드 2개는 HLA-A2:01에 낮은 결합 친화성을 나타내는 것으로 예측되었다. 특히 서열 FIIFWVKRGRKKLL (서열번호 10)을 가지는 14-mer 펩타이드는 294 nM 해리 상수로 결합할 것으로 예측되었고, 서열 FIIFWVKRGRKKL (서열번호 11)을 가지는 13-mer 펩타이드는 618 nM 해리 상수로 결합할 것으로 예측되었다. 이들 펩타이드 각각은 서열번호 1에 기재되고 실시예 1에서 확인된 15-mer 펩타이드의 일부를 포함하였다. 이 서열내에서 더 짧은 8-mer 내지 12-mer 펩타이드들은 HLA-A2:01에 결합을 나타낼 것으로 예측되지 않았다. 아미노산 서열 IIFWVKRGRKKLL (서열번호 12)를 함유하는 또 다른 13-mer 펩타이드는 약 3000 nM의 예측된 해리 상수를 가지는 희귀한 결합 친화력을 가지는 것으로 예측되었다. HLA-A2:01에 대한 결합 친화력을 나타내기 위해 이 분석에 의해 도메인 두 개 사이 정선에 연결된 나머지 단편들이 없는 것으로 예측되었다 (모두 5000 nM 보다 훨씬 큰 예측된 해리 상수를 가지고, 대부분의 경우 14,000 nM 또는 20,000 nM 또는 더 그 이상일 것임). HLA-A2:01에 결합할 것으로 예측되는 각각의 펩타이드에서, 두 개의 정선에 걸친 잔기 (VK) 그 자체는 앵커(anchor) 잔기로 예측되지 않았고; 오히려 그러한 펩타이드는 이들 잔기를 비인접 위치에 함유하였다.

[0659] [0393] 막간 도메인으로부터만 유래된 서열을 함유하는 펩타이드 약 15개는 HLA-A2:01에 대해 5000 nM 보다 작은 해리 상수를 가지는 것으로 예측되었다. 동시 자극 도메인으로부터만 유래된 서열을 함유하는 펩타이드 2개는 HLA-A2:01에 대해 5000 nM 보다 작은 해리 상수를 가지는 것으로 예측되었다. 평가된 서열의 공동 자극 도메인 및 막간 도메인은 내인성 인간 서로부터 유래되고, 일반적으로 인간 대상체에 대한 면역원성이 낮다. 예컨대, 실시예 1에 설명된 연구에서, CAR의 이들 도메인 중 어느 하나의 펩타이드 서열에만 특이적인 면역 반응이 검출되지 않았다. 따라서, 정선 영역에 걸친 서열을 함유하는 펩타이드의 변이체가 평가 되었다.

[0660] [0394] HLA-A2:01에 대해 감소된 면역원성 및/또는 HLA 대립유전자를 가지는 인간 대상체에 감소된 면역원성을 가지는 것으로 예측되는 전이체 펩타이드를 생성하기 위해, 서열번호 6에 나타난 서열과 비교하여 정선 영역에서 변이체를 함유하는 변이체 서열은 인실리코에서 생성되었다. 정선에 걸친 "VK" 잔기 (비앵커 위치에서)를 함유하는 펩타이드는 HLA-A2:01에 높은 결합 친화력을 나타내는 것으로 예측되는 것으로 주어지고, 2개의 아스파라긴 잔기는 CD28 막간 및 4-1BB 동시자극 도메인사이의 정선에 삽입되었다. 상기 변이체는 서열 CYSLLVTVAFIIFWVNKRGRKKLLYIFKQPF (서열번호 13에 나타나있고, 아스파라긴 잔기의 삽입에 의해 생성된 정선에 인접한 서열이 밑줄로 표시됨)을 함유하였다. 서열번호 13의 예시적인 변이체 서열은 동일한 예측 방법으로 평가하였다. 이러한 변이체 서열에 대한 예측된 결합 친화력을 평가하기 위해, 서열번호 13에 나타난 서열의 8-14 아미노산의 일련의 154개 중첩 단편들은 상기 설명된 *인실리코* 분석으로 평가하였고, 35개 펩타이드는 막간 부분에만 서열을 가지고, 펩타이드 35개는 공동자극 도메인 영역에만 서열을 가지고, 펩타이드 84개는 삽입된 아스파라긴 잔기 중 하나 또는 둘 모두를 함유하는 도메인을 연결하는 아미노산을 함유하는 정선 영역 서열을 함유한다.

[0661] [0395] 상기 결과들은 도 3에 나타나 있다. 전체에서 볼 수 있듯이, 정선을 함유하는 변이체 영역에서 중첩되는 펩타이드의 HLA-A2:01 결합 친화력은 비변이체 서열과 비교하여 집합적으로 실질적으로 감소했다. 특히 면역 원성이 있을 것으로 이전에 예측된 정선 영역의 부분에서 펩타이드의 HLA-A2:01에 대한 결합의 예측되는 해리 상수는 실질적으로 감소하였다. 예컨대, 서열번호 10 및 11 기재된 바와 같이 확인된 펩타이드와 비교하여 변이된 인접 잔기를 포함하는 펩타이드 변이체 IIFWVNKRGRKKL (서열번호 14) 및 IIFWVNKRGRKK (서열번호 15)는 HLA-A2:01에 대한 예측 가능한 결합 친화력을 나타내지 않는 것으로 예측되었다. 2개의 14-mer 펩타이드, FIIFWVNKRGRKK (서열번호 11) 및 IFWVNKRGRKKLL (서열번호 12)는 1000 nM 내지 5000 nM 내의 희소 결합 친화력을 나타내는 이 HLA에 대한 결합의 해리 상수를 나타낼 것으로 예측되었다. 개질된 정선 영역 서열을 함유하

는 모든 다른 펩타이드는 5000 nM 보다 큰 해리 상수를 나타낼 것으로 예측되었고, 대부분의 경우 14,000 nM 또는 20,000 nM 또는 그 이상이고, 따라서 이 평가에 따라 HLA-A2:01에 대한 결합 친화성을 나타내지 않을 것으로 예측되었다. 또한, 정션 영역 서열의 개질은 공동자극 또는 막간 도메인 영역 내에서 HLA-A2:01에 대해 더 높은 친화력을 가질 것으로 예측되는 새로운 펩타이드를 전혀 생성하지 않았다.

[0662] 실시예 5: 항 CD19 CAR로 이전에 치료된 대상체에 항 CD22 CAR 발현 세포의 투여

[0663] [0396] 재발성/난치성 CD22+ B 세포 림프성 백혈병 (ALL)을 가진 6 명의 대상체에 항 CD22 키메라 항원 수용체 (CAR)을 발현하는 자가 T세포를 투여하였다. CAR에는 인간 항 CD22 sc Fv 항체, CD8 알파 막간 도메인, 4-1BB 세포내 시그널링 도메인 및 CD3 제타 세포내 시그널링 도메인을 포함하였다.

[0664] [0397] 모든 대상체는 이전에 적어도 하나의 이전의 동종 조혈 모세포 이식을 겪었고, 다양한 CD 19-유도 CAR T 세포 치료법 중 하나를 사용한 치료를 받았다. 대상체 5명은 CD19가 검출되지 않는 ALL이 재발되었고 ("CD 19 음성"), 반면에 대상체 1명은 이전의 CD19 CAR 치료에 반응하지 않은 사람이었다.

[0665] [0398] 표 3에 치료된 환자의 특성을 요약하였다.

표 3: 환자 특징						
ID	연령/성별	선행 HCT	선행 항-CD19 CAR	CD19 neg 재발	CD22 부위 밀도	Pre-HCT 질병 부담 (% 흡입물 중 % 백혈구)
1	22/M	Y	Y	Y	2084	>95%
2	20/F	Y (2)	Y	Y	13452	5%
3	22/M	Y	Y	Y	846	>90%
4	22/M	Y	Y	N	2589	95%
5	7/F	Y	Y	Y	2839	32%
6	17/F	Y	Y	Y	2185	1%

[0666] HCT: 조혈세포 이식.

[0667] [0399] 세포 투여 전에, 환자는 말초 혈액 단핵구 (PBMC)를 채취하기 위해 자가 혈액 백혈구를 채취하였다. T 세포는 CD3 발현에 대한 면역 친화성에 기초한 농축에 의해 채취된 PBMC로부터 분리되었고, 항 CD3/CD8 비드의 존재 하에 배양 후, 항 CD22 CAR을 코딩하는 렌티바이러스 벡터로 형질 도입하였다. 세포는 7-10일 동안 배양하였다. 대상체는 4, 3 일 및 2 일째에 플루다라빈 25 mg/m² 및 2일째에 사이클로포스파미드 900 mg/m² (0일째에 세포주입)로 유도화학요법을 받았다. 환자 각각은 정맥 내 주입에 의해 3 x 10⁵ 형질도입 된 T 세포/수혜자 체중 (kg)으로 투여한 초기 CAR T 세포를 투여 받았다. 두 번째 대상체는 3 단계 설사가 발생하였고, 명의 피험자를 치료하기 위해 첫 번째 용량 수준에서 용량 확장을 유도하는 용량 제한 독성 (DLT)에 대한 기준을 충족시킨다. 이 복용량에서 이후의 DLT는 보이지 않았다. 두 명의 대상체에서 사이토카인 방출 증후군 (CRS) 등급1이 나타났다, 한 명의 대상체에서 CRS 등급 2가 나타났고, 두 명의 대상체에서는 CRS가 존재하지 않았다.

[0668] [0400] 말초 혈액, 골수 또는 뇌척수액 중의 CAR-T 세포의 수는 세포를 CD22-Fc와 함께 배양시킴으로써 치료 후 측정 시점에서 결정되었다. 팽창이 관찰된 환자의 경우, 약 7일경부터 시작하는 CAR-T 세포 팽창의 증거가 말초 혈액, 골수 및 뇌 척수액에서 관찰되었다. 최대 또는 피크 CAR-T 세포 팽창은 일반적으로 주입 후 약 12일 및 약 15일 사이에 관찰되었다. 표 7은 치료된 대상체에 대한 각 시료의 총 T 세포의 백분율로서 이 평가 기간에 관찰된 항 CD22 CAR T 세포의 최대 또는 피크 백분율을 나타낸다. 임상 반응은 주입 후 28일째 (+/- 4일)에 평가되었다.

[0669] [0401] 표 4에 나타난 바와 같이, 결과는 일반적으로 CAR-T 세포 팽창의 정도와 상관되는 반응과 일치하였다. CAR-T 세포 생장이 없거나 낮은 CAR-T 세포 팽창을 나타냈던 3명의 대상체에 대해 질병 진행의 증거가 보였다. 대상체 2명은 안정한 질병을 가졌고, 1명은 MRD가 없는 완전한 차도가 관찰되었다. 유동 세포 계측 CAR 지속성은 이 대상체에서 주입 후 47일째에 검출되었고, 차도는 주입 후 3개월 동안 유지되었다. 강기 결과는 이전의 항 CD19 CAR 치료를 겪은 (예컨대, 에피토프/항원 소실로 인해 반응하지 않게 된) 대상체에서 안전하고, 실행할 수 있고 치료적으로 활성인 항 CD22 CAR T 세포 치료법을 입증한다.

표 4: 치료 응답					
ID	최대 CAR 확장 (flow)			CRS	최고 응답
	PB	골수	CSF		
1	0	0	n/a	없음	PD
2	52.3%	19.5%	0%	Gr 1	MRD neg CR
3	73%	36%	32%	Gr 1	SD
4	6%	1%	0%	Gr 2	SD
5	0%	1.3%	0%	없음	PD
6	1.8%	2%	0%	없음	PD

PB: 말초 혈액; CSF: 뇌척수액; CRS: 사이토카인 방출 증후군; PD: 진행성 질병; MRD: 최소 잔여 질병; CR: 완전한 완화; SD: 안정한 질병.

[0670]

[0671]

[0402] 이 발명은 여기서 개시된 구체적인 예에 의해 그 범위가 한정되지 않고, 이들은 본 발명의 개별적인 측면의 단일의 예시로서 의도되고, 기능적으로 등가인 것은 모두 본 발명의 범위 에 있다. 여기서 기술된 것에 더하여, 본 발명의 모델 및 방법에 대한 다양한 변형은 진술한 설명 및 교시로부터 당업자에게 명백할 것이고, 유사하게 본 발명의 범위 내에 속한다. 이러한 변형 또는 다른 구체적인 예는 본 발명의 진정한 범위 및 사상을 벗어나지 않고 실시될 수 있다.

표 5:서열

SEQ ID NO	서열	각주
1	ESKYGPCCPPCP	IgG4 힌지
2	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 막간 도메인
3	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEGGCEL	4-1BB 공동자극 도메인 (아미노산 214-255 of Q07011.1) 호모 사파엔
4	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPFR	CD3-제타 세포내 시그널링 도메인
5	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>KRGRKKLL</u> YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEGGCEL	CD28-4-1BB
6	CYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPF	웹타이드
7	VAFIIFWVKRGRKKLL	웹타이드
8	AFIIFWVKRGRKKLL	웹타이드
9	FWVKRGRKKLLYIFK	웹타이드
10	FIIFWVKRGRKKLL	웹타이드
11	FIIFWVKRGRKKL	웹타이드
12	IIFWVKRGRKKLL	웹타이드
13	CYSLLVTVAFIIFWV <u>NN</u> KRGRKKLLYIFKQPF	변이체 정션 영역
14	IIFWVNNKRGRKKL	변이체 웹타이드
15	IIFWVNNKRGRKK	변이체 웹타이드
16	VAFIIFWVK	합성 웹타이드
17	AFIIFWVKR	합성 웹타이드
18	FIIFWVKRG	합성 웹타이드
19	IIFWVKRGR	합성 웹타이드
20	IFWVKRGRK	합성 웹타이드
21	FWVKRGRKK	합성 웹타이드
22	WVKRGRKKL	합성 웹타이드
23	VAFIIFWVS	합성 웹타이드

[0672]

		K28S
24	AFIIFWVSR	합성 펩타이드 K28S
25	FIIIFWVSRG	합성 펩타이드 K28S
26	IIFWVSRGR	합성 펩타이드 K28S
27	IFWVSRGRK	합성 펩타이드 K28S
28	FWVSRGRKK	합성 펩타이드 K28S
29	WVSRGRKKL	합성 펩타이드 K28S
30	VAFIIFWVL	합성 펩타이드 K28L
31	AFIIFWVLR	합성 펩타이드 K28L
32	FIIIFWVLRG	합성 펩타이드 K28L
33	IIFWVLRGR	합성 펩타이드 K28L
34	IFWVLRGRK	합성 펩타이드 K28L
35	FWVLRGRKK	합성 펩타이드 K28L
36	WVLRGRKKL	합성 펩타이드 K28L
37	VAFIIFWVH	합성 펩타이드 K28H
38	AFIIFWVHR	합성 펩타이드 K28H
39	FIIIFWVHRG	합성 펩타이드 K28H
40	IIFWVHRGR	합성 펩타이드 K28H

[0673]

41	IFWVHRGRK	합성 펩타이드 K28H
42	FWVHRGRKK	합성 펩타이드 K28H
43	WVHRGRKKL	합성 펩타이드 K28H
44	VAFIIFWVA	합성 펩타이드 K28A
45	AFIIFWVAR	합성 펩타이드 K28A
46	IIFWVARGR	합성 펩타이드 K28A
47	IFWVARGRK	합성 펩타이드 K28A
48	FWVARGRKK	합성 펩타이드 K28A
49	WVARGRKKL	합성 펩타이드 K28A
50	VAFIIFWVQ	합성 펩타이드 K28Q
51	AFIIFWVQR	합성 펩타이드 K28Q
52	FIIIFWVQRG	합성 펩타이드 K28Q
53	IIFWVQRGR	합성 펩타이드 K28Q
54	IFWVQRGRK	합성 펩타이드 K28Q
55	FWVQRGRKK	합성 펩타이드 K28Q
56	WVQRGRKKL	합성 펩타이드 K28Q
57	IIFWVKRGS	합성 펩타이드 R31S
58	IFWVKRGSK	합성 펩타이드 R31S

[0674]

59	FWVKRGSKK	합성 펩타이드 R31S
60	WVKRGSKKL	합성 펩타이드 R31S
61	IIFWVKRGL	합성 펩타이드 R31L
62	IFWVKRGLK	합성 펩타이드 R31L
63	FWVKRGLKK	합성 펩타이드 R31L
64	WVKRGLKKL	합성 펩타이드 R31L
65	IIFWVKRGH	합성 펩타이드 R31H
66	IFWVKRGHK	합성 펩타이드 R31H
67	FWVKRGHKK	합성 펩타이드 R31H
68	WVKRGHKKL	합성 펩타이드 R31H
69	IIFWVKRGA	합성 펩타이드 R31A
70	IFWVKRGAK	합성 펩타이드 R31A
71	FWVKRGAKK	합성 펩타이드 R31A
72	WVKRGAKKL	합성 펩타이드 R31A
73	IIFWVKRGN	합성 펩타이드 R31N
74	IFWVKRGNK	합성 펩타이드 R31N
75	FWVKRGNKK	합성 펩타이드 R31N
76	WVKRGNKKL	합성 펩타이드 R31N

[0675]

77	IIFWVQRGS	합성 펩타이드 K28Q/R31S
78	IIFWVQRGSK	합성 펩타이드 K28Q/R31S
79	FWVQRGSKK	합성 펩타이드 K28Q/R31S
80	WVQRGSKKL	합성 펩타이드 K28Q/R31S
81	IIFWVQRGA	합성 펩타이드 K28Q/R31A
82	IIFWVQRGAK	합성 펩타이드 K28Q/R31A
83	FWVQRGAKK	합성 펩타이드 K28Q/R31A
84	WVQRGAKKL	합성 펩타이드 K28Q/R31A
85	IIFWVQRGN	합성 펩타이드 K28Q/R31N
86	IIFWVQRGNK	합성 펩타이드 K28Q/R31N
87	FWVQRGNKK	합성 펩타이드 K28Q/R31N
88	WVQRGNKKL	합성 펩타이드 K28Q/R31N
89	WVKRGRKKS	합성 펩타이드 L34S
90	WVKRGRKKA	합성 펩타이드 L34A
91	WVQRGNKKS	합성 펩타이드 K28Q/L34S
92	WVQRGNKKA	합성 펩타이드 K28Q/L34A
93	MGNSCYNIVATLLLVNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCP PNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAG CSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVL VNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTS	4-1BB 공동자극 도메인 (수탁 No. Q07011.1) 호모 사피엔

[0676]

	TALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF PEEEEGGCEL	
94	MGNSCYNIVATLLLVNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCP PNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAG CSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRFPWTNCSLDGKSVL VNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTS TALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF PEEEEGGCEL	CD28 막간 도메인 (수탁 No. P10747) 호모 사피엔
95	MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTAL FLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGG KPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQALPPR	CD3 제타 사슬 (수탁 No. P20963) 호모 사피엔
96	FIIFWVNNKRGRKK	합성 펩타이드
97	IFWVNNKRGRKKLL	합성 펩타이드
98	FIIFWVNNKRGRKK	합성 펩타이드
99	IFWVNNKRGRKKLL	합성 펩타이드
100	VAFIIFWVR	합성 펩타이드 K28R
101	AFIIFWVRR	합성 펩타이드 K28R
102	FIIFWVARG	합성 펩타이드 K28A
103	MFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 막간 도메인 (아미노산 153-179 of 수탁 No. P10747) 호모 사피엔
104	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLEFGPSKPFWVLVVGGV LACYSLLVTVAFIIFWV	CD28, 막간 포함 (아미노산 114-179 of 수탁 No. P10747) 호모 사피엔
105	RVKFSRSAEPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 제타 호모 사피엔
106	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCCCT	스페이서 (IgG4힌지) (nt)

[0677]

		호모 사피엔
107	ESKYGPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	힌지-CH3 스페이서 호모 사피엔
108	ESKYGPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDNLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKAQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDK SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	힌지-CH2-CH3 스페이서 호모 사피엔
109	RWPESPKAQASSVPTAQQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEKKKEKE KEEQEERETKTPECPHSTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSD LKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSHSLTLPRSLWNAGT SVTCTLNHPSPLPQRLMALREPAQAQPVKLSNLLASSDPPEAASWLLC EVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPQPGSTTFWAWSVLRVP APPSPQPATYTCVVSHEDSRLLNASRSLEVSIVTDH	IgD-힌지-Fc 호모 사피엔
110	LEGGEGRGSLTTCGDVEENPGPR	T2A 인공
111	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSL SINATNIKHFK NCTSIGDLHLIPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQA WPENRITDLHAFENLEIIRGRTKQHQQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISD GDVIIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSKATGQVCH ALCSPEGCGWPEPRDCVSCRNVSRGECVDCNLLGEPREFVENSECI QCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCFAGVMGENNT LVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGTGPGLEGCPNGPKIPSIATGMVGAL LLLLVVALGIGLFM	IEGFR 인공
112	RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGFTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 세포질 도메인 (아미노산 180-220 of P10747) 호모 사피엔
113	RSKRSRGHSDYMNMTPRRPGFTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 세포질 도메인 변이체 (LL to GG) 호모 사피엔
114	FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIIFWVARGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPPEEEGGCEL	CD28-4-1BB K28A 변이체
115	FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIIFWVHARGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT	CD28-4-1BB K28H

[0678]

	QEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL	변이체
116	FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>L</u> RG <u>R</u> KKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL	CD28-4-1BB K28L 변이체
117	FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>Q</u> RG <u>R</u> KKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL	CD28-4-1BB K28Q 변이체
118	FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>S</u> RG <u>R</u> KKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL	CD28-4-1BB K28S 변이체
119	FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>K</u> RG <u>A</u> KKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL	CD28-4-1BB R31A 변이체
120	FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>K</u> RG <u>H</u> KKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL	CD28-4-1BB R31H 변이체
121	FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>K</u> RG <u>L</u> KKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL	CD28-4-1BB R31L 변이체
122	FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>K</u> RG <u>N</u> KKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL	CD28-4-1BB R31N 변이체
123	FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>K</u> RG <u>R</u> KK <u>A</u> LYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL	CD28-4-1BB L34A 변이체
124	FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>K</u> RG <u>R</u> KK <u>S</u> LYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL	CD28-4-1BB L34S 변이체
125	FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>Q</u> RG <u>A</u> KKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL	CD28-4-1BB K28Q/R31A 변이체
126	FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>Q</u> RG <u>N</u> KKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL	CD28-4-1BB K28Q/R31N 변이체
127	FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>Q</u> RG <u>S</u> KKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL	CD28-4-1BB K28Q/R31S 변이체
128	FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>Q</u> RG <u>R</u> KK <u>A</u> LYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL	CD28-4-1BB K28Q/L34A 변이체
129	FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>Q</u> RG <u>R</u> KK <u>S</u> LYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL	CD28-4-1BB K28Q/L34S 변이체
130	FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>K</u> RG <u>N</u> KK <u>A</u> LYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL	CD28-4-1BB R31N/L34A 변이체
131	FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>K</u> RG <u>N</u> KK <u>S</u> LYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL	CD28-4-1BB R31N/L34S 변이체
132	FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>Q</u> RG <u>N</u> KK <u>A</u> LYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL	CD28-4-1BB K28Q/R31N/L34A 변이체

[0679]

133	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>Q</u> RGNKKSLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	CD28-4-1BB K28Q/R31N/L34S 변이체
134	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVNN <u>K</u> RGRKKLLYIFKQPFMRPVQ TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	삽입이 있는 변이체 정선 영역을 갖는 CD28-4-1BB
135	MFVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT TQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	CD28-4-1BB
136	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLVVVGGV LACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF PEEEEGGCEL	CD28-4-1BB
137	SLLVTVAFIIFWV <u>K</u> RGRKKLLYIFKQ	CD28-4-1BB 정선 영역
138	SLLVTVAFIIFWV <u>A</u> RGRKKLLYIFKQ	CD28-4-1BB 정선 영역 K14A 변이체
139	SLLVTVAFIIFWV <u>H</u> RGRKKLLYIFKQ	CD28-4-1BB 정선 영역 K14H 변이체
140	SLLVTVAFIIFWV <u>L</u> RGRKKLLYIFKQ	CD28-4-1BB 정선 영역 K14L 변이체
141	SLLVTVAFIIFWV <u>Q</u> RGRKKLLYIFKQ	CD28-4-1BB 정선 영역 K14Q 변이체
142	SLLVTVAFIIFWV <u>S</u> RGRKKLLYIFKQ	CD28-4-1BB 정선 영역 K14S 변이체
143	SLLVTVAFIIFWV <u>K</u> RGAKKLLYIFKQ	CD28-4-1BB 정선 영역 R17A 변이체
144	SLLVTVAFIIFWV <u>K</u> RGHKKLLYIFKQ	CD28-4-1BB 정선 영역 R17H 변이체
145	SLLVTVAFIIFWV <u>K</u> RGLKKLLYIFKQ	CD28-4-1BB 정선 영역 R17L 변이체
146	SLLVTVAFIIFWV <u>K</u> RGNKKLLYIFKQ	CD28-4-1BB 정선 영역 R17N 변이체
147	SLLVTVAFIIFWV <u>K</u> RGRKKALYIFKQ	CD28-4-1BB 정선 영역 L20A 변이체
148	SLLVTVAFIIFWV <u>K</u> RGRKKSLYIFKQ	CD28-4-1BB 정선 영역 L20S 변이체
149	SLLVTVAFIIFWV <u>Q</u> RGAKKLLYIFKQ	CD28-4-1BB 정선

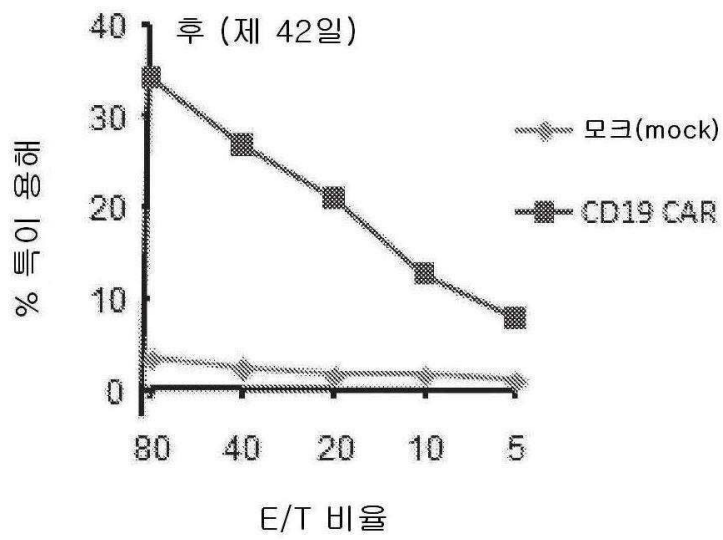
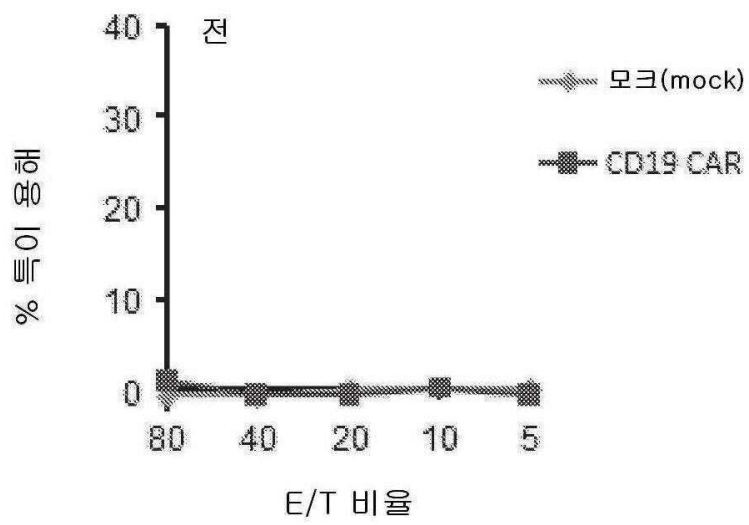
[0680]

		영역 K14Q/R17A 변이체
150	SLLVTVAFIIFWV <u>Q</u> RGNKKLLYIFKQ	CD28-4-1BB 정션 영역 K14Q/R17N 변이체
151	SLLVTVAFIIFWV <u>Q</u> RGSKKLLYIFKQ	CD28-4-1BB 정션 영역 K14Q/R17S 변이체
152	SLLVTVAFIIFWV <u>Q</u> RGRKKALYIFKQ	CD28-4-1BB 정션 영역 K14Q/L20A 변이체
153	SLLVTVAFIIFWV <u>Q</u> RGRKKSLYIFKQ	CD28-4-1BB 정션 영역 K14Q/L20S 변이체
154	SLLVTVAFIIFWV <u>K</u> RGNKKALYIFKQ	CD28-4-1BB 정션 영역 R17N/L20A 변이체
155	SLLVTVAFIIFWV <u>K</u> RGNKKSLYIFKQ	CD28-4-1BB 정션 영역 R17N/L20S 변이체
156	SLLVTVAFIIFWV <u>Q</u> RGNKKALYIFKQ	CD28-4-1BB 정션 영역 K14Q/R17N/L20A 변이체
157	SLLVTVAFIIFWV <u>Q</u> RGNKKSLYIFKQ	CD28-4-1BB 정션 영역 K14Q/R17N/L20S 변이체
158	G A A T C T A A G T A C G G A C C G C C C T G C C C C C C T T G C C C T	스페이서 (IgG4힌지) (뉴클레오타이드) 호모 사피엔
159	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATK DTYDALHMQALPPR	CD3 제타

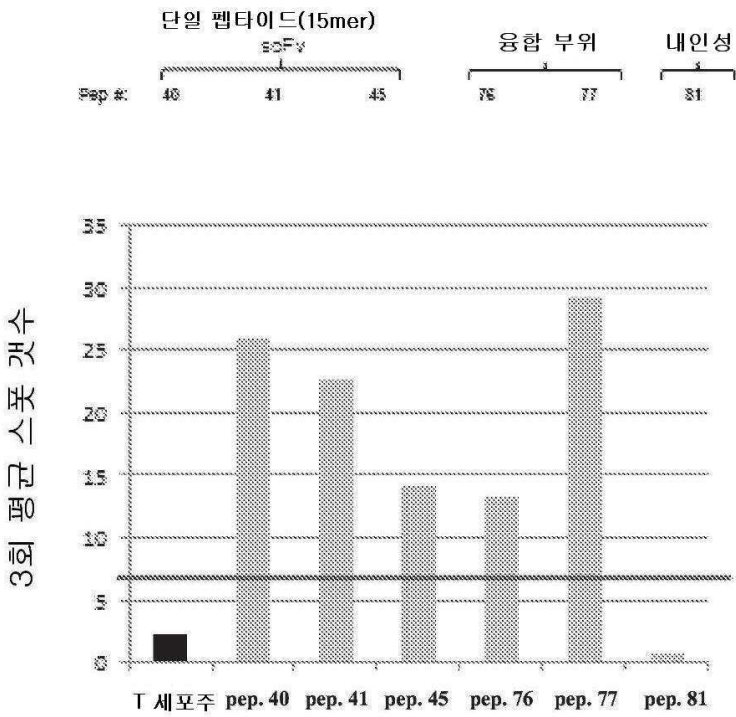
[0681]

도면

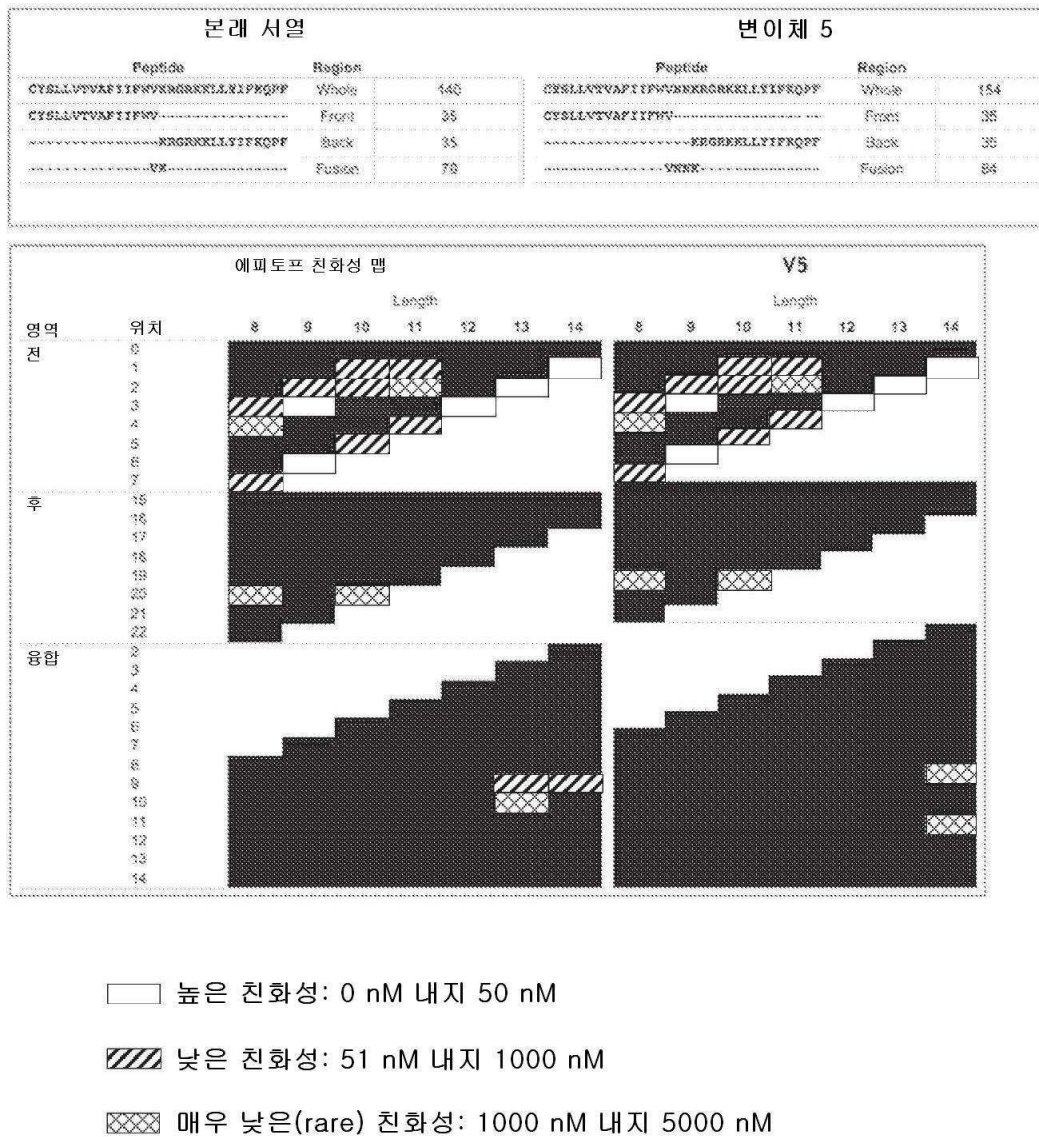
도면1



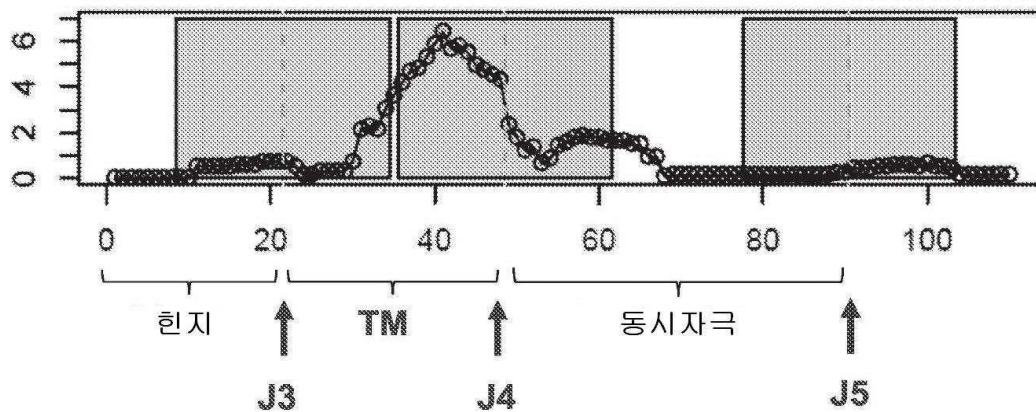
도면2



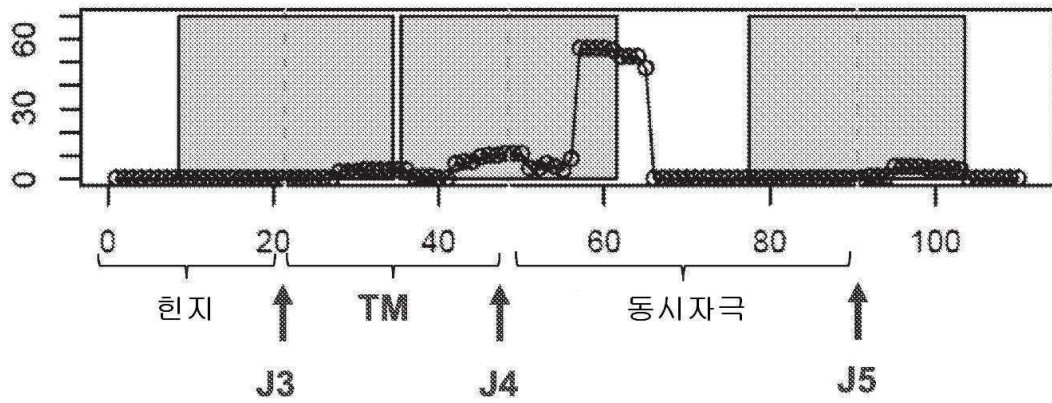
도면3



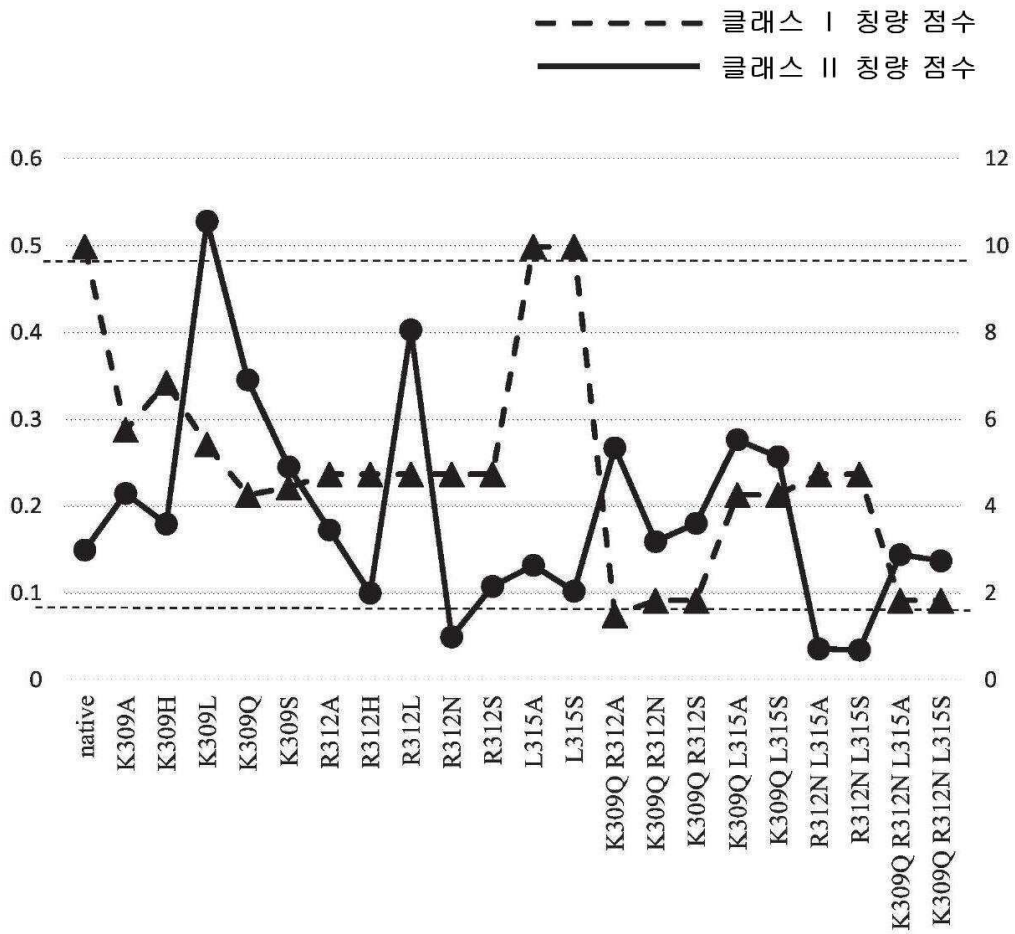
도면4a



도면4b



도면5



도면6



SEQ ID NO: 5

서열 목록

- SEQUENCE LISTING
- <110> Juno Therapeutics, Inc.
- <120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR ADOPTIVE CELL THERAPY
- <130> 735042001240
- <140> Not Yet Assigned
- <141> Concurrently Herewith
- <150> US 62/087,224
- <151> 2014-12-03
- <160> 159
- <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
- <210> 1
- <211> 12
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> Synthetic
- <220>
- <223> IgG4 hinge

<400> 1

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

1 5 10

<210> 2

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> CD28 transmembrane domain

<400> 2

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

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val

20 25

<210> 3

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> 4-1BB costimulatory domain

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

35 40

<210> 4

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> CD3-zeta intracellular signaling domain

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 5

<211> 69

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> CD28-4-1BB

<400> 5

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

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly Arg Lys

20 25 30

Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr
 35 40 45

Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu
 50 55 60

Gly Gly Cys Glu Leu

65

<210> 6

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 6

Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys
 1 5 10 15

Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe
 20 25 30

<210> 7

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 7

Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu
 1 5 10 15

<210>

> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 8

Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu

1 5 10 15

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 9

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

1 5 10 15

<210> 10

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 10

Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu

1 5 10

<210> 11

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 11

Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu

1 5 10

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 12

Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu

1 5 10

<210> 13

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> Variant junction region

<400> 13

Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Asn

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 14

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> Variant peptide

<400> 14

Ile Ile Phe Trp Val Asn Asn Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu

1 5 10

<210> 15

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> Variant peptide

<400> 15

Ile Ile Phe Trp Val Asn Asn Lys Arg Gly Arg Lys Lys

1 5 10

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 16

Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys

1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 17

Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 18

Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly

1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 19

Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly Arg

1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 20

Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly Arg Lys

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 21

Phe Trp Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 22

Trp Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28S

<400> 23

Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Ser

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28S

<400> 24

Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Ser Arg

1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28S

<400> 25

Phe Ile Ile Phe Trp Val Ser Arg Gly

1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28S

<400> 26

Ile Ile Phe Trp Val Ser Arg Gly Arg

1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28S

<400> 27

Ile Phe Trp Val Ser Arg Gly Arg Lys

1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28S

<400> 28

Phe Trp Val Ser Arg Gly Arg Lys Lys

1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28S

<400> 29

Trp Val Ser Arg Gly Arg Lys Lys Leu

1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28L

<400> 30

Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Leu

1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28L

<400> 31

Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Leu Arg

1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28L

<400> 32

Phe Ile Ile Phe Trp Val Leu Arg Gly

1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28L

<400> 33

Ile Ile Phe Trp Val Leu Arg Gly Arg

1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28L

<400> 34

Ile Phe Trp Val Leu Arg Gly Arg Lys

1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28L

<400> 35

Phe Trp Val Leu Arg Gly Arg Lys Lys

1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28L

<400> 36

Trp Val Leu Arg Gly Arg Lys Lys Leu

1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28H

<400> 37

Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val His

1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28H

<400> 38

Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val His Arg

1 5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28H

<400> 39

Phe Ile Ile Phe Trp Val His Arg Gly

1 5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28H

<400> 40

Ile Ile Phe Trp Val His Arg Gly Arg

1 5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28H

<400> 41

Ile Phe Trp Val His Arg Gly Arg Lys

1 5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28H

<400> 42

Phe Trp Val His Arg Gly Arg Lys Lys

1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28H

<400> 43

Trp Val His Arg Gly Arg Lys Lys Leu

1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28A

<400> 44

Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Ala

1 5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28A

<400> 45

Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Ala Arg

1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28A

<400> 46

Ile Ile Phe Trp Val Ala Arg Gly Arg

1 5

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28A

<400> 47

Ile Phe Trp Val Ala Arg Gly Arg Lys

1 5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28A

<400> 48

Phe Trp Val Ala Arg Gly Arg Lys Lys

1 5

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28A

<400> 49

Trp Val Ala Arg Gly Arg Lys Lys Leu

1 5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28Q

<400> 50

Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Gln

1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28Q

<400> 51

Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Gln Arg

1 5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28Q

<400> 52

Phe Ile Ile Phe Trp Val Gln Arg Gly

1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28Q

<400> 53

Ile Ile Phe Trp Val Gln Arg Gly Arg

1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28Q

<400> 54

Ile Phe Trp Val Gln Arg Gly Arg Lys

1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28Q

<400> 55

Phe Trp Val Gln Arg Gly Arg Lys Lys

1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28Q

<400> 56

Trp Val Gln Arg Gly Arg Lys Lys Leu

1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide R31S

<400> 57

Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly Ser

1 5

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide R31S

<400> 58

Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly Ser Lys

1 5

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<

223> Synthetic peptide R31S

<400> 59

Phe Trp Val Lys Arg Gly Ser Lys Lys

1 5

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide R31S

<400> 60

Trp Val Lys Arg Gly Ser Lys Lys Leu

1 5

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide R31L

<400> 61

Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly Leu

1 5

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide R31L

<400> 62

Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly Leu Lys

1 5

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide R31L

<400> 63

Phe Trp Val Lys Arg Gly Leu Lys Lys

1 5

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide R31L

<400> 64

Trp Val Lys Arg Gly Leu Lys Lys Leu

1 5

<210> 65

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide R31H

<400> 65

Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly His

1 5

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide R31H

<400> 66

Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly His Lys

1 5

<210> 67

<211> 9

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide R31H

<400> 67

Phe Trp Val Lys Arg Gly His Lys Lys

1 5

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide R31H

<400> 68

Trp Val Lys Arg Gly His Lys Lys Leu

1 5

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide R31A

<400> 69

Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly Ala

1 5

<210> 70

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide R31A

<400> 70

Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly Ala Lys

1 5

<210> 71

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide R31A

<400> 71

Phe Trp Val Lys Arg Gly Ala Lys Lys

1 5

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide R31A

<400> 72

Trp Val Lys Arg Gly Ala Lys Lys Leu

1 5

<210> 73

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide R31N

<400> 73

Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly Asn

1 5

<210> 74

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide R31N

<400> 74

Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly Asn Lys

1 5

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide R31N

<400> 75

Phe Trp Val Lys Arg Gly Asn Lys Lys

1 5

<210> 76

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide R31N

<400> 76

Trp Val Lys Arg Gly Asn Lys Lys Leu

1 5

<210> 77

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28Q/R31S

<400> 77

Ile Ile Phe Trp Val Gln Arg Gly Ser

1 5

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28Q/R31S

<400> 78

Ile Phe Trp Val Gln Arg Gly Ser Lys

1 5

<210> 79

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28Q/R31S

<400> 79

Phe Trp Val Gln Arg Gly Ser Lys Lys

1 5

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28Q/R31S

<400> 80

Trp Val Gln Arg Gly Ser Lys Lys Leu

1 5

<210> 81

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28Q/R31A

<400> 81

Ile Ile Phe Trp Val Gln Arg Gly Ala

1 5

<210> 82

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28Q/R31A

<400> 82

Ile Phe Trp Val Gln Arg Gly Ala Lys

1 5

<210> 83

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28Q/R31A

<400> 83

Phe Trp Val Gln Arg Gly Ala Lys Lys

1 5

<210> 84

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28Q/R31A

<400> 84

Trp Val Gln Arg Gly Ala Lys Lys Leu

1 5

<

210> 85

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28Q/R31N

<400> 85

Ile Ile Phe Trp Val Gln Arg Gly Asn

1 5

<210> 86

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28Q/R31N

<400> 86

Ile Phe Trp Val Gln Arg Gly Asn Lys

1 5

<210> 87

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28Q/R31N

<400> 87

Phe Trp Val Gln Arg Gly Asn Lys Lys

1 5

<210> 88

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28Q/R31N

<400> 88

Trp Val Gln Arg Gly Asn Lys Lys Leu

1 5

<210> 89

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide L34S

<400> 89

Trp Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Ser

1 5

<210>

90

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide L34A

<400> 90

Trp Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Ala

1 5

<210> 91

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28Q/L34S

<400> 91

Trp Val Gln Arg Gly Asn Lys Lys Ser

1 5

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28Q/L34A

<400> 92

Trp Val Gln Arg Gly Asn Lys Lys Ala

1 5

<210> 93

<211> 255

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> 4-1BB

<400> 93

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> 94

<211> 255

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD28

<400> 94

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> 95
 <211> 164
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <223> CD3 zeta chain
 <400> 95
 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> 96

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 96

Phe Ile Ile Phe Trp Val Asn Asn Lys Arg Gly Arg Lys Lys

1

5

10

<210> 97

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 97

Ile Phe Trp Val Asn Asn Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu

1

5

10

<210> 98

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 98

Phe Ile Ile Phe Trp Val Asn Asn Lys Arg Gly Arg Lys Lys

1 5 10

<210> 99

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 99

Ile Phe Trp Val Asn Asn Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu

1 5 10

<210> 100

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28R

<400> 100

Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg

1 5

<210> 101

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28R

<400> 101

Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Arg

1 5

<210> 102

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide K28A

<400> 102

Phe Ile Ile Phe Trp Val Ala Arg Gly

1 5

<210> 103

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD28 transmembrane domain

<400> 103

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

1 5 10 15

Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val

20 25

<210> 104

<211> 66

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD28

<400> 104

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn

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

65

<210> 105

<211> 112

<212

> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD3 zeta

<400> 105

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Glu Pro Pro Ala Tyr Gln Gln Gly			
1	5	10	15
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr			
	20	25	30
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys			
	35	40	45
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys			
	50	55	60
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg			
65	70	75	80
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala			
	85	90	95
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			

100 105 110

<210> 106

<211> 36

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> spacer (IgG4hinge)

<400> 106

gaatctaagt acggaccgcc ctgccccct tgcct 36

<210> 107

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Hinge-CH3 spacer

<400> 107

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

115

<210> 108

<211> 229

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Hinge-CH2-CH3 spacer

<400> 108

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220
 Leu Ser Leu Gly Lys
 225
 <210
 > 109
 <211> 282
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> IgD-hinge-Fc
 <400> 109
 Arg Trp Pro Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro Thr Ala
 1 5 10 15
 Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala
 20 25 30
 Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys
 35 40 45
 Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro

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

 115 120 125
 Ser Gln Ser Gln His Ser Arg Leu Thr Leu Pro Arg Ser Leu Trp Asn
 130 135 140
 Ala Gly Thr Ser Val Thr Cys Thr Leu Asn His Pro Ser Leu Pro Pro
 145 150 155 160

Gln Arg Leu Met Ala Leu Arg Glu Pro Ala Ala Gln Ala Pro Val Lys

165 170 175

Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser Asp Pro Pro Glu Ala Ala Ser

180 185 190

Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe Ser Pro Pro Asn Ile Leu Leu

195 200 205

Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu Val Asn Thr Ser Gly Phe Ala Pro

210 215 220

Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro Gly Ser Thr Thr Phe Trp Ala Trp Ser

225 230 235 240

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

245 250 255

Cys Val Val Ser His Glu Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn Ala Ser Arg

260 265 270

Ser Leu Glu Val Ser Tyr Val Thr Asp His

275 280

<210> 110

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> T2A

<400> 110

Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp

1 5 10 15

Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg

20

<210> 111

<211> 357

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> tEGFR

<400> 111

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly

20 25 30

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

35 40 45

Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala

50 55 60

Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu

65 70 75 80

Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile

85 90 95

Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu

100 105 110

Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala

115 120 125

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

130 135 140

Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr

145 150 155 160

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

165 170 175

Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly

180 185 190

Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu
195 200 205
Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys
210 215 220
Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu
225 230 235 240
Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met
245 250 255
Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala
260 265 270
His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val
275 280 285
Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His
290 295 300
Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro
305 310 315 320
Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala
325 330 335
Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly
340 345 350
Ile Gly Leu Phe Met
355

<210

> 112

<211> 41

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD28 cytoplasmic domain

<400> 112

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
1 5 10 15
Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro

20 25 30
 Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 35 40
 <210> 113
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>

 <223> CD28 cytoplasmic domain
 <400> 113
 Arg Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
 1 5 10 15
 Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
 20 25 30
 Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 35 40
 <210> 114
 <211> 69
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic K28A

 <400> 114
 Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu

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

65

<210

> 115

<211> 69

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic K28H

<400> 115

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

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val His Arg Gly Arg Lys

20 25 30

Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Gly Cys Glu Leu

65

<210> 116

<211> 69

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic K28L

<400> 116

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

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Leu Arg Gly Arg Lys

20 25 30

Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr

35 40 45
 Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu
 50 55 60

Gly Gly Cys Glu Leu

65

<210> 117

<211> 69

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic K28Q

<400> 117

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Gln Arg Gly Arg Lys
 20 25 30

Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr
 35 40 45

Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu
 50 55 60

Gly Gly Cys Glu Leu

65

<210> 118

<211> 69

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic K28S

<400> 118

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Ser Arg Gly Arg Lys
20 25 30

Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr
35 40 45

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

50 55 60

Gly Gly Cys Glu Leu

65

<210> 119

<211> 69

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic R31A

<400> 119

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly Ala Lys
20 25 30

Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Gly Cys Glu Leu

65

<210> 120

<211> 69

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic R31H

<400> 120

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

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly His Lys

20 25 30

Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Gly Cys Glu Leu

65

<210> 121

<211> 69

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic R31L

<400> 121

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

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly Leu Lys

20 25 30

Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Gly Cys Glu Leu

65

<210>

> 122

<211> 69

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic R31N

<400> 122

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

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly Asn Lys

20 25 30

Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Gly Cys Glu Leu

65

<210> 123

<211> 69

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic L34A

<400> 123

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

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly Arg Lys

20 25 30

Lys Ala Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Gly Cys Glu Leu

65

<210> 124

<211> 69

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic L34S

<400> 124

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly Arg Lys
20 25 30

Lys Ser Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr
35 40 45

Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu
50 55 60

Gly Gly Cys Glu Leu

65

<210> 125

<211> 69

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic K28Q/R31A

<400> 125

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Gln Arg Gly Ala Lys
20 25 30

Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr
35 40 45

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

50 55 60

Gly Gly Cys Glu Leu

65

<210> 126

<211> 69

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic K28Q/R31N

<400> 126

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

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Gln Arg Gly Asn Lys

20 25 30

Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Gly Cys Glu Leu

65

<210> 127

<211> 69

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic K28Q/R31S

<400> 127

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

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Gln Arg Gly Ser Lys

20 25 30

Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Gly Cys Glu Leu

65

<210> 128

<211> 69

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic K28Q/L34A

<400> 128

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

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Gln Arg Gly Arg Lys

20 25 30

Lys Ala Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Gly Cys Glu Leu

65

<210>

> 129

<211> 69

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic K28Q/L34S

<400> 129

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

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Gln Arg Gly Arg Lys

20 25 30

Lys Ser Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Gly Cys Glu Leu

65

<210> 130

<211> 69

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic R31N/L34A

<400> 130

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

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly Asn Lys

20 25 30

Lys Ala Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Gly Cys Glu Leu

65

<210> 131

<211> 69

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic R31N/L34S

<400> 131

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

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly Asn Lys

20 25 30

Lys Ser Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Gly Cys Glu Leu

65

<210> 132

<211> 69

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic K28Q/R31N/L34A

<400> 132

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

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Gln Arg Gly Asn Lys

20 25 30

Lys Ala Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Gly Cys Glu Leu

65

<210> 133

<211> 69

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic K28Q/R31N/L34S

<400> 133

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

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Gln Arg Gly Asn Lys

20 25 30

Lys Ser Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Gly Cys Glu Leu

65

<210> 134

<211> 71

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> NN Insertion

<400> 134

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

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Asn Asn Lys Arg Gly

20 25 30

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

35

40

45

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

50

55

60

Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

65

70

<210> 135

<211> 70

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 135

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

1

5

10

15

Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly Arg

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

Glu Gly Gly Cys Glu Leu

65

70

<210> 136

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 136

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn

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

100 105

<210> 137

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> junction region

<400> 137

Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly

1 5 10 15

Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln

20 25

<210> 138

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> junction region K14A

<400> 138

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

1 5 10 15

Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln

20 25

<210> 139

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> junction region K14H

<400> 139

Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val His Arg Gly

1 5 10 15

Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln

20 25

<210> 140

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> junction region K14L

<400> 140

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

1 5 10 15

Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln

20 25

<210> 141

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> junction region K14Q

<400> 141

Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Gln Arg Gly

1 5 10 15

Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln

20 25

<210> 142

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> junction region K14S

<400> 142

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

1 5 10 15

Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln

20 25

<210> 143

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> junction region R17A

<400> 143

Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly

1 5 10 15

Ala Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln

20 25

<210> 144

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> junction region R17H

<400> 144

Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly

1 5 10 15

His Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln

20 25

<210> 145

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> junction region R17L

<

<400> 145

Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly

1 5 10 15

Leu Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln

20 25

<210> 146

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> junction region R17N

<400> 146

Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly

1 5 10 15

Asn Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln

20 25

<210> 147

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> junction region L20A

<400> 147

Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly

1 5 10 15

Arg Lys Lys Ala Leu Tyr Ile Phe Lys Gln

20 25

<210> 148

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> junction region L20S

<400> 148

Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly

1 5 10 15

Arg Lys Lys Ser Leu Tyr Ile Phe Lys Gln

20 25

<210> 149

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> junction region K14Q/R17A

<400> 149

Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Gln Arg Gly

1 5 10 15

Ala Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln

20 25

<210> 150

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> junction region K14Q/R17N

<400> 150

Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Gln Arg Gly

1 5 10 15

Asn Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln

20 25

<210> 151

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> junction region K14Q/R17S

<400> 151

Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Gln Arg Gly

1 5 10 15

Ser Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln

20 25

<210> 152

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> junction region K14Q/L20A

<400> 152

Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Gln Arg Gly

1 5 10 15

Arg Lys Lys Ala Leu Tyr Ile Phe Lys Gln

20 25

<210> 153

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> junction region K14Q/L20S

<400> 153

Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Gln Arg Gly

1 5 10 15

Arg Lys Lys Ser Leu Tyr Ile Phe Lys Gln

20 25

<210> 154

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> junction region R17N/L20A

<400> 154

Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly

1 5 10 15

Asn Lys Lys Ala Leu Tyr Ile Phe Lys Gln

20 25

<210> 155

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> junction region R17N/L20S

<400> 155

Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly

1 5 10 15

Asn Lys Lys Ser Leu Tyr Ile Phe Lys Gln

20 25

<210> 156

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> junction region K14Q/R17N/L20A

<400> 156

Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Gln Arg Gly

1 5 10 15

Asn Lys Lys Ala Leu Tyr Ile Phe Lys Gln

20 25

<210> 157

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> junction region K14Q/R17N/L20S

<400> 157

Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Gln Arg Gly

1 5 10 15

Asn Lys Lys Ser Leu Tyr Ile Phe Lys Gln

20 25

<210> 158

<211> 36

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> spacer (IgG4hinge)

<400> 158

gaatctaagt acggaccgcc ctgccccct tgcct 36

<210> 159

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> CD3 Zeta

<400> 159

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

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